

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-510622
(P2025-510622A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全268頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-554788(P2024-554788)		(71)出願人	522185863	
(86)(22)出願日	令和5年3月14日(2023.3.14)			メタゲノミ, インク.	
(85)翻訳文提出日	令和6年9月30日(2024.9.30)			アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/064351			ニア州 エメリービル パーク・アベニュー	
(87)国際公開番号	WO2023/178115			ー 1 5 4 5	
(87)国際公開日	令和5年9月21日(2023.9.21)		(74)代理人	110003797	
(31)優先権主張番号	63/319,725			弁理士法人清原国際特許事務所	
(32)優先日	令和4年3月14日(2022.3.14)		(72)発明者	トーマス, ブライアン, シー.	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル	
(31)優先権主張番号	63/335,542			ニア州 エメリービル パーク・アベニュー	
(32)優先日	令和4年4月27日(2022.4.27)		(72)発明者	ブルックス, アラン	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル	
(31)優先権主張番号	63/392,814			ニア州 エメリービル パーク・アベニュー	
		最終頁に続く		ー 1 5 4 5	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 操作されたヌクレアーゼ及びキメラヌクレアーゼ

(57)【要約】

キメラヌクレアーゼ及びキメラヌクレアーゼ系を含む、操作されたヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ系が、本明細書に開示される。本明細書に開示される操作されたヌクレアーゼ及びキメラヌクレアーゼは、核酸ガイドヌクレアーゼを含む。加えて、操作されたヌクレアーゼを生成する方法及びそれを使用する方法が、本明細書に開示される。

【選択図】 図 3 B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

操作されたエンドヌクレアーゼであって、

a) 配列番号 696 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む N 末端部分と、

b) 配列番号 697 ~ 721 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む、操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 2】

前記 N 末端部分及び前記 C 末端部分が、互いに直接融合している、請求項 1 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 3】

前記 N 末端部分及び前記 C 末端部分が、リンカーによって結合されている、請求項 1 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 4】

前記リンカーが、グリシン及び／又はセリンリッチリンカー、大きなタンパク質ドメイン、長いヘリックス構造、又は短いヘリックス構造である、請求項 3 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 5】

前記リンカーが、(GGGGS) n であり、 n が、1 ~ 20 の整数である、請求項 3 ~ 4 のいずれか一項に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 6】

前記リンカーが、GGGGS (配列番号 2864) である、請求項 3 ~ 4 のいずれか一項に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 7】

前記 N 末端部分が、配列番号 696 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 8】

前記 N 末端部分が、配列番号 696 に対して 100% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 9】

前記 C 末端部分が、配列番号 697 ~ 721 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 10】

前記 C 末端部分が、配列番号 697 ~ 721 のうちのいずれか 1 つに対して 100% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 11】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 60 ~ 66、117、865 ~ 919、及び 2855 ~ 2863 のうちのいずれか 1 つを含む PAM に結合するように構成されている、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 12】

配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 13】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 12 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 14】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちの

10

20

30

40

50

いずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 12 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 15】

配列番号 10 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 16】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 10 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 15 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 17】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 10 に対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 15 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 18】

配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 19】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 18 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 20】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 18 に記載の操作されたエンドヌクレアーゼ。

【請求項 21】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成し、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成された操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 22】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 21 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 23】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 21 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 24】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、単一ガイド核酸である、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 25】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、デュアルガイド核酸である、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 26】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、RNA である、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 27】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、前記操作されたガイドポリヌクレオチドに非共有結合している、請求項 21 ~ 26 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

前記エンドヌクレアーゼが、前記操作されたガイドポリヌクレオチドに共有結合している、請求項 21～26 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 29】

前記エンドヌクレアーゼが、前記操作されたガイドポリヌクレオチドに融合している、請求項 21～26 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 30】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、配列番号 28～45、605～610、646～695、863、及び 1789～1826 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 21～29 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

10

【請求項 31】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、配列番号 28～45、605～610、646～695、863、及び 1789～1826 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 21～29 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 32】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 60～66、865～919、及び 2863 のうちのいずれか 1 つを含む PAM に結合するように構成されている、請求項 21～31 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 33】

20

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 109～110 及び 2842～2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成し、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成された操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 34】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 109～110 及び 2842～2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 33 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

30

【請求項 35】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 109～110 及び 2842～2854 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 33 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 36】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、単一ガイド核酸である、請求項 33～35 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 37】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、デュアルガイド核酸である、請求項 33～35 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

40

【請求項 38】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、RNA である、請求項 33～35 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 39】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、前記操作されたガイドポリヌクレオチドに非共有結合している、請求項 33～38 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 40】

前記エンドヌクレアーゼが、前記操作されたガイドポリヌクレオチドに共有結合している、請求項 33～38 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 41】

50

前記エンドヌクレアーゼが、前記操作されたガイドポリヌクレオチドに融合している、請求項 33～38 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 42】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、配列番号 111～113 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 33～41 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 43】

前記操作されたガイドポリヌクレオチドが、配列番号 111～113 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 33～41 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 44】

前記操作されたエンドヌクレアーゼが、配列番号 117 及び 2855～2862 のうちのいずれか 1 つを含む PAM に結合するように構成されている、請求項 33～43 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 45】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつアルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 46】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRAC 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 47】

前記標的核酸配列が、配列番号 139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び 2618～2653 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 46 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 48】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ B2M 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 159～184 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 49】

前記標的核酸配列が、配列番号 185～210 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 48 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 50】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

- a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、
- b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRBC1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 211～251 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

10

【請求項 51】

前記標的核酸配列が、配列番号 252～292 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 50 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 52】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

- a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、
- b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRBC2 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 293～337 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

20

【請求項 53】

前記標的核酸配列が、配列番号 338～382 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 52 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

30

【請求項 54】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

- a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、
- b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGP TL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

40

【請求項 55】

前記標的核酸配列が、配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 54 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 56】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

- a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも

50

80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつPCK9遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項57】

前記標的核酸配列が、配列番号588～602及び1377～1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項56に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

10

【請求項58】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつVCP遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号723～738及び755～762のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

20

【請求項59】

前記標的核酸配列が、配列番号739～754及び763～770のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項58に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項60】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAAVS1遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

30

【請求項61】

前記標的核酸配列が、配列番号950～971及び1050～1087のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項60に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項62】

40

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつGPR146遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号1588～1656のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項63】

50

前記標的核酸配列が、配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 6 2 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 6 4】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ A P O A 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 6 5】

前記標的核酸配列が、配列番号 1 7 4 5 ~ 1 7 6 3、1 7 7 5 ~ 1 7 8 5、1 9 6 2 ~ 2 0 5 7、及び 2 0 8 9 ~ 2 1 1 9 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 6 4 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 6 6】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ H A O 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項 6 7】

標的核酸配列を修飾するための方法であって、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のエンドヌクレアーゼ又は請求項 3 3 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記標的核酸配列を接触させることを含む、方法。

【請求項 6 8】

前記標的核酸配列を修飾することが、前記標的核酸配列を結合、ニッキング、又は切断することを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記標的核酸配列が、ゲノム D N A、ウイルス D N A、ウイルス R N A、又は細菌 D N A を含む、請求項 6 7 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記修飾が、インビトロである、請求項 6 7 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記修飾が、インビボである、請求項 6 7 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記修飾が、エクスビボである、請求項 6 7 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 3】

g R N A が、配列番号 2 5 1 ~ 2 6 0、2 7 1 ~ 2 7 4、及び 2 7 9 ~ 2 9 0 のうちのいずれか 1 つを有する配列によってコードされる、請求項 6 7 ~ 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記標的核酸配列が、配列番号 2 6 1 ~ 2 7 0、2 7 5 ~ 2 7 8、及び 2 9 1 ~ 3 0 2

10

20

30

40

50

のうちのいずれか1つを有する配列を含む、請求項67～72のいずれか一項に記載の方法。

【請求項75】

哺乳動物細胞における標的核酸配列を修飾する方法であって、請求項1～32のいずれか一項に記載のエンドヌクレアーゼ又は請求項33～66のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記哺乳動物細胞を接触させることを含む、方法。

【請求項76】

前記修飾を含む細胞を選択することを更に含む、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

アルブミン遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

10

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記アルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記アルブミン遺伝子を接触させることを含む、方法。

【請求項78】

20

T R A C 遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 T R A C 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記 T R A C 遺伝子を接触させることを含む、方法。

30

【請求項79】

前記標的核酸配列が、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

B 2 M 遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

40

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 B 2 M 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記 B 2 M 遺伝子を接触させることを含む、方法。

【請求項81】

前記標的核酸配列が、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

50

T R B C 1 遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 T R B C 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 211～251 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記 T R B C 1 遺伝子を接触させることを含む、方法。

10

【請求項 83】

前記標的核酸配列が、配列番号 252～292 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

T R B C 2 遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 T R B C 2 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 293～337 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記 T R B C 2 遺伝子を接触させることを含む、方法。

20

【請求項 85】

前記標的核酸配列が、配列番号 338～382 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 86】

A N G P T L 3 遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 A N G P T L 3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記 A N G P T L 3 遺伝子を接触させることを含む、方法。

30

【請求項 87】

前記標的核酸配列が、配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 86 に記載の方法。

40

【請求項 88】

P C S K 9 遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 P C S K 9 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1

50

つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記PCSK9遺伝子を接触させることを含む、方法。

【請求項89】

前記標的核酸配列が、配列番号588～602及び1377～1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

VC P遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、 10

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記VC P遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号723～738及び755～762のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記VC P遺伝子を接触させることを含む、方法。

【請求項91】

前記標的核酸配列が、配列番号739～754及び763～770のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項90に記載の方法。 20

【請求項92】

AAVS1遺伝子座を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記AAVS1遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記AAVS1遺伝子座を接触させることを含む、方法。 30

【請求項93】

前記標的核酸配列が、配列番号950～971及び1050～1087のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項92に記載の方法。

【請求項94】

GPR146遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、 40

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記GPR146遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号1588～1656のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記GPR146遺伝子を接触させることを含む、方法。

【請求項95】

前記標的核酸配列が、配列番号1657～1725のうちのいずれか1つに対して少な 50

くとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 96】

APOA1 遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 APOA1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び 2058～2088 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記 APOA1 遺伝子を接触させることを含む、方法。

10

【請求項 97】

前記標的核酸配列が、配列番号 1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び 2089～2119 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

TRAC 遺伝子を修飾する方法であって、操作されたヌクレアーゼ系であって、

a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、

b) 前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ HAO1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドであって、配列番号 611～633、1789～1826、及び 1827～1865 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を使用して、前記 TRAC 遺伝子を接触させることを含む、方法。

20

【請求項 99】

請求項 1～32 のいずれか一項に記載のエンドヌクレアーゼ、又は請求項 33～66 のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系を含む、細胞。

30

【請求項 100】

前記細胞が、真核細胞である、請求項 99 に記載の細胞。

【請求項 101】

前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 99 に記載の細胞。

【請求項 102】

前記細胞が、不死化細胞である、請求項 99 に記載の細胞。

【請求項 103】

前記細胞が、昆虫細胞である、請求項 99 に記載の細胞。

【請求項 104】

前記細胞が、酵母細胞である、請求項 99 に記載の細胞。

40

【請求項 105】

前記細胞が、植物細胞である、請求項 99 に記載の細胞。

【請求項 106】

前記細胞が、真菌細胞である、請求項 99 に記載の細胞。

【請求項 107】

前記細胞が、原核細胞である、請求項 99 に記載の細胞。

【請求項 108】

前記細胞が、A549、HEK-293、HEK-293T、BHK、CHO、HeLa、MRC5、Sf9、Cos-1、Cos-7、Vero、BSC 1、BSC 40、BMT 10、WI38、HeLa、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、

50

Hep G2、Huh7、K562、初代細胞、又はその誘導体である、請求項99に記載の細胞。

【請求項109】

前記細胞が、操作された細胞である、請求項99に記載の細胞。

【請求項110】

前記細胞が、安定した細胞である、請求項99に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

【0002】

本出願は、2022年3月14日に出願された米国仮特許出願第63/319,725号、2022年4月27日に出願された米国仮特許出願第63/335,542号、2022年7月27日に出願された米国仮特許出願第63/392,814号、及び2023年1月30日に出願された米国仮特許出願第63/482,294号の利益及び優先権を主張するものであり、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

Cas酵素は、関連するクラスター化され規則的に間隔があいた短い回文配列反復（CRISPR）ガイドリボ核酸（RNA）とともに、原核生物の免疫系の広範な（細菌の約45%、古細菌の約84%）成分であると見られ、CRISPR-RNAガイド核酸切断による感染性ウイルス及びプラスミドなどの非自己核酸からこうした微生物を保護する働きをする。CRISPR RNAエレメントをコードするデオキシリボ核酸（DNA）エレメントは、構造及び長さが比較的保存され得るが、それらのCRISPR関連（Cas）タンパク質は、高度に多様であり、非常に様々な核酸相互作用ドメインを含有する。CRISPR DNAエレメントは、早くも1987年に観察されているが、CRISPR/Cas複合体のプログラム可能なエンドヌクレアーゼ切断能力は、比較的最近でしか認識されておらず、多様なDNA操作及び遺伝子編集用途における組換えCRISPR/Cas系の使用につながっている。

【0004】

配列表

本出願は、XML形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2023年3月14日に作成された当該XMLコピーは、MTG-010WO__SL.xmlと名付けられ、4,575,581バイトのサイズである。

【発明の概要】

【0005】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるVCP遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、（a）クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼと、（b）操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、VCP遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号739～754若しくは763～770に対して少なくとも80%の同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号723～738若しくは755～762のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される操作されたヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55%の同一性を有する融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722又は配列番号863

の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性の配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号743～745、749～752、754、若しくは769のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列に対して相補的であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表22Bに列挙される化学修飾を含む、表22BからのガイドRNAのうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。

10

【0006】

いくつかの場合では、本開示は、(a) 配列番号696又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼのRuvCドメイン、RECドメイン、RuvC-IIドメイン、HNHドメイン、又はRuvC-IIドメインの少なくとも一部を含むN末端配列と、(b) MG3-1、MG3-2、MG3-3、MG3-4、MG3-5、MG3-6、MG3-7、MG3-8、MG3-18、MG3-22、MG3-24、MG3-30、MG3-42、MG3-78、MG3-89、MG3-90、MG3-91、MG3-92、MG3-93、MG3-94、MG3-95、MG3-96、MG3-101、MG3-103、MG3-104、MG150-1、MG150-2、MG150-3、MG150-4、MG150-5、MG150-6、MG150-7、MG150-8、MG150-9、MG150-10、MG15-1、MG15-54、MG15-66、MG15-94、MG15-115、MG15-135、MG15-146、MG15-164、MG15-166、MG15-171、MG15-172、MG15-174、MG15-177、MG15-184、MG15-187、MG15-191、MG15-193、MG15-195、MG15-217、MG15-218、若しくはMG15-219、又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼのWED又はPIDドメインを含むC末端配列と、を含む融合エンドヌクレアーゼを提供し、N末端配列及びC末端配列は、天然では、同じリーディングフレームにおいて一緒に生じない。いくつかの実施形態では、N末端配列及びC末端配列は、異なる生物に由来する。いくつかの実施形態では、融合エンドヌクレアーゼは、配列番号771～862のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一

20

30

40

50

性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、融合エンドヌクレアーゼは、nnRG G n TではないPAMに対して選択的であるように構成されている。いくつかの実施形態では、融合エンドヌクレアーゼは、配列番号865～919のうちのいずれか1つを含むPAMに対して選択的であるように構成されている。いくつかの実施形態では、融合エンドヌクレアーゼが、MG3-8に対して少なくとも55%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼからのWEDドメインと、MG3-1、MG3-2、MG3-3、MG3-4、MG3-5、MG3-6、MG3-7、MG3-8、MG3-18、MG3-22、MG3-24、MG3-30、MG3-42、MG3-78、MG3-89、MG3-90、MG3-91、MG3-92、MG3-93、MG3-94、MG3-95、MG3-96、MG3-101、MG3-103、MG3-104、MG150-1、MG150-2、MG150-3、MG150-4、MG150-5、MG150-6、MG150-7、MG150-8、MG150-9、MG150-10、MG15-1、MG15-54、MG15-66、MG15-94、MG15-115、MG15-135、MG15-146、MG15-164、MG15-166、MG15-171、MG15-172、MG15-174、MG15-177、MG15-184、MG15-187、MG15-191、MG15-193、MG15-195、MG15-217、MG15-218、若しくはMG15-219のうちの少なくとも1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも55%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼからのPIDドメインと、を含む。

10

20

30

40

50

【0007】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号771～862のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する操作されたアミノ酸配列を含むエンドヌクレアーゼを提供する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号809～823、827、829～830、832、834、又は838～839のうちのいずれか1つに対して少なくとも55%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する操作されたアミノ酸配列を含む。

【0008】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されたガイドリボ核酸を含む、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成された操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む操作されたヌクレアーゼ系を提供し、ガイドリボ核酸配列は、エンドヌクレアーゼに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸は、エンドヌクレアーゼに結合するように構成されたtracrリボ核酸配列を更に含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、培養されていない微生物に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼ、Cas14エンドヌクレアーゼ、Cas12aエンドヌクレアーゼ、Cas12bエンドヌクレアーゼ、Cas12cエンドヌクレアーゼ、Cas12dエンドヌクレアーゼ、Cas12eエンドヌクレアーゼ、Cas13aエンドヌクレアーゼ、Cas13bエンドヌクレアーゼ、Cas13cエンドヌクレアーゼ、又はCas13dエンドヌクレアーゼではない。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、SpyCas9エンドヌクレアーゼに対して86%未満の同一性を有する。いくつかの実施形態では、エ

ンドヌクレアーゼは、配列番号 771～862 のうちのいずれか 1 つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも 55 %、少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸配列は、配列番号 722 又は配列番号 863 の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。

10

20

30

40

50

【0009】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における TRAC 遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a) クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼと、(b) 操作されたガイド RNA と、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイド RNA は、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイド RNA は、TRAC 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 925～927、992～1011、1184～1279、若しくは 1321～1361 に対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイド RNA は、配列番号 922～924、972～991、1088～1183、若しくは 1280～1320 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼを含むか、又は配列番号 771 に対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 722 又は配列番号 863 の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0010】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における AAVS1 遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a) クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼと、(b) 操作

されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、AAVS1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号950～971若しくは1050～1087に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号928～949若しくは1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼを含むか、又は配列番号771に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722又は配列番号863の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

10

20

30

【0011】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるPCSK9遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a)クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼと、(b)操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、PCSK9遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号1377～1391に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも9

40

50

1 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、又は少なくとも99 %の配列同一性を有する融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722又は配列番号863の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80 %、少なくとも81 %、少なくとも82 %、少なくとも83 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、又は少なくとも99 %の配列同一性を有する配列を含む。

【0012】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるANGPTL3遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a) クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼと、(b) 操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、ANGPTL3遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号1490～1587に対して少なくとも80 %、少なくとも81 %、少なくとも82 %、少なくとも83 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、若しくは少なくとも99 %の配列同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号1392～1489のうちのいずれか1つに対して少なくとも80 %、少なくとも81 %、少なくとも82 %、少なくとも83 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、若しくは少なくとも99 %の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55 %、少なくとも80 %、少なくとも81 %、少なくとも82 %、少なくとも83 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、又は少なくとも99 %の配列同一性を有する融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722又は配列番号863の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80 %、少なくとも81 %、少なくとも82 %、少なくとも83 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、又は少なくとも99 %の配列同一性を有する配列を含む。

【0013】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるGPR146遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a) クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼと、(b) 操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、GPR146遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号1657～1725に対して少なくとも

10

20

30

40

50

80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号1588～1656のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722又は配列番号863の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

10

20

【0014】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるAPOA1遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a) クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼと、(b) 操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、APOA1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号1745～1763若しくは1775～1785に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号1726～1744若しくは1764～1774のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性の配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722又は配列番号863の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

30

40

【0015】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのい

50

ずれかと、(b) 本明細書に記載される操作されたガイドRNAのいずれかと、(c) カチオン性脂質と、(d) ステロールと、(e) 中性脂質と、(f) PEG修飾脂質と、を含む脂質ナノ粒子を提供する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、C12-200を含み、ステロールは、コレステロールを含み、中性脂質は、DOPEを含み、又はPEG修飾脂質は、DMG-PEG2000を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、図45に示されるカチオン性脂質のいずれかを含む。

【0016】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 配列番号696又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼのRuvCドメイン、RECドメイン、又はHNHドメインの少なくとも一部を含むN末端配列と、(b) 配列番号697~721のうちのいずれか1つ又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼのWED、TOPO、又はCTDドメインを含むC末端配列と、を含む融合エンドヌクレアーゼを提供し、N末端配列及びC末端配列は、天然では、同じリーディングフレームにおいて一緒に生じない。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプV Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、N末端配列及びC末端配列は、異なる生物に由来する。いくつかの実施形態では、N末端配列は、RuvC-I、BH、又はRuvC-IIドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、C末端配列は、PAM相互作用ドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、融合エンドヌクレアーゼは、配列番号1~27又は108のうちのいずれか1つに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、融合エンドヌクレアーゼは、nnRGGnTではないPAMに結合するように構成されている。

【0017】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号1~27又は108のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する操作されたアミノ酸配列を含むエンドヌクレアーゼを提供する。

【0018】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号109~110のうちのいずれか1つ、又は

そのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する操作されたアミノ酸配列を含むエンドヌクレアーゼを提供する。

【0019】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼ、融合エンドヌクレアーゼ、又はCas酵素のいずれかをコードする配列を含む核酸を提供する。いくつかの態様では、配列は、宿主細胞における発現のためコドン最適化される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、原核細胞、真核細胞、哺乳動物、又はヒトである。

10

【0020】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸配列のいずれかを含有するベクターを提供する。

【0021】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるベクター、系、又は核酸のいずれかを含有する宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、原核細胞、真核細胞、哺乳動物、又はヒトである。

【0022】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 本明細書に記載されるヌクレアーゼ、Cas酵素、又は融合エンドヌクレアーゼのいずれかと、(b) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されたガイドリボ核酸を含む、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成された操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む操作されたヌクレアーゼ系を提供し、ガイドリボ核酸配列は、エンドヌクレアーゼに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸は、エンドヌクレアーゼに結合するように構成されたtracrRリボ核酸配列を更に含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、培養されていない微生物に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼ、Cas14エンドヌクレアーゼ、Cas12aエンドヌクレアーゼ、Cas12bエンドヌクレアーゼ、Cas12cエンドヌクレアーゼ、Cas12dエンドヌクレアーゼ、Cas12eエンドヌクレアーゼ、Cas13aエンドヌクレアーゼ、Cas13bエンドヌクレアーゼ、Cas13cエンドヌクレアーゼ、又はCas13dエンドヌクレアーゼではない。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、SpyCas9エンドヌクレアーゼに対して86%未満の同一性を有する。いくつかの実施形態では、系は、Mg²⁺の供給源を更に含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号8~12、26~27、若しくは108のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸配列は、配列番号33、34、44、45、78、84、又は87のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。

20

30

40

50

【0023】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 配列番号1~27、108、若しくは109~110のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションのRuvC又はHNHDメインに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するクラス2、タイプII Cas酵素RuvC又はHNHDメインと、(b) 配列番号1~27、108、若しくは109~110のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションのPAM相互作用(PI)ドメインに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するクラス2、タイプII Cas酵素PAM相互作用(PI)ドメインと、を含む操作されたヌクレアーゼを提供する。いくつかの実施形態では、(a)及び(b)は、天然では一緒に生じない。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas酵素は、培養されていない微生物に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、SpyCas9エンドヌクレアーゼに対して86%未満の同一性を有する。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼは、配列番号1~27のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

10

20

30

【0024】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されており、かつエンドヌクレアーゼに結合するように構成されたガイドリボ核酸配列を含む、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成された操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸は、エンドヌクレアーゼに結合するように構成されたtracrRリボ核酸配列を更に含む。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸配列は、配列番号28~32若しくは33~44のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションの非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、系は、標的核酸部位に隣接するヌクレアーゼと適合性があるPAM配列を更に含む。いくつかの実施形態では、PAM配列は、標的デオキシリボ核酸配列の3'に位置する。いくつかの実施形態では、PAM配列は、標的デオキシリボ核酸配列の5'に位置する。

40

【0025】

いくつかの態様では、本開示は、アルブミン遺伝子を標的化する方法であって、本明細

50

書に記載される系のいずれかを細胞に導入することを含む、方法を提供し、ガイドリボ核酸配列は、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子 (LNP) と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNP を含む脂質ナノ粒子 (LNP) と接触させることを含む。

10

【0026】

いくつかの態様では、本開示は、HAO1 遺伝子又は遺伝子座を標的化する方法であって、本明細書に記載される系のいずれかを細胞に導入することを含む、方法を提供し、ガイドリボ核酸配列は、配列番号 611～633 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸配列は、配列番号 615、618、620、624、又は 626 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸は、配列番号 605～610 又は 1789～1865 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸は、配列番号 1812～1824、1835、1849、1858、若しくは 1861 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の同一性を有する配列、又は配列番号 1812～1824、1835、1849、1858、若しくは 1861 のうちのいずれか 1 つの標的化配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入する

20

30

40

50

ことは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体（RNP）と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNPを含む脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞におけるHAO-1遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、（a）本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、（b）操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、HAO-1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号611～633に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号618、620、624、若しくは626のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列、又は配列番号618、620、624、若しくは626のうちのいずれか1つの標的化配列に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表9A～9E、表12

10

20

30

40

50

、表 18、表 20、又は表 23 からのガイド RNA のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 9 A ~ 9 E に列挙される化学修飾を含む、表 9 A ~ 9 E からのガイド RNA のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 12 に列挙される化学修飾を含む、表 12 からのガイド RNA のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 18 に列挙される化学修飾を含む、表 18 からのガイド RNA のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 20 に列挙される化学修飾を含む、表 20 からのガイド RNA のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 23 に列挙される化学修飾を含む、表 23 からのガイド RNA のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子 (LNP) と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNP を含む脂質ナノ粒子 (LNP) と接触させることを含む。

10

【0028】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における TRAC 遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a) 本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b) 操作されたガイド RNA と、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイド RNA は、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイド RNA は、TRAC 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 139 ~ 158 に対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイド RNA は、配列番号 119 ~ 138 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号 10 又はそのバリエーションに対して少なくとも 55 % の同一性を有する融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 722 の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97

20

30

40

50

%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号121、132、136、130、134、135、若しくは137のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列、又は配列番号121、132、136、130、134、135、若しくは137のうちのいずれか1つの標的化配列に対して少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表9AからのガイドRNAのうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体(RNP)と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNPを含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。

10

【0029】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞におけるB2M遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a)本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b)操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、B2M遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号185~210に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号159~184のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する配列を

20

30

40

50

含む融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号159、165、168、174、若しくは184のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列、又は配列番号159、165、168、174、若しくは184のうちのいずれか1つの標的化配列に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表9BからのガイドRNAのうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体(RNP)と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNPを含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。

10

20

【0030】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるTRBC1遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a)本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b)操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、TRBC1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号252~292に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号211~251のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含

30

40

50

む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する配列を含む融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号211、212、215、241、若しくは242のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又は配列番号211、212、215、241、若しくは242のうちのいずれか1つの標的化配列に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表9CからのガイドRNAのうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体(RNP)と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNPを含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。

10

20

30

40

50

【0031】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるTRBC2遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a)本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b)操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、TRBC2遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号338~382に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号293~337のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくと

も 99% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼは、配列番号 10 又はそのバリエーションに対して少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 722 の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 296、306、若しくは 332 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% の同一性を有する配列を含むか、又は配列番号 296、306、若しくは 332 のうちのいずれか 1 つの標的化配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 9C からのガイド RNA のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子 (LNP) と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNP を含む脂質ナノ粒子 (LNP) と接触させることを含む。

10

20

30

40

50

【0032】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における ANGPTL3 遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a) 本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b) 操作されたガイド RNA と、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイド RNA は、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイド RNA は、ANGPTL3 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 478~572 に対して少なくとも 80% の同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイド RNA は、配列番号 383~477 のうちの

いずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号419、425、431、439、447、453、461、467、471、若しくは473のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列、又は配列番号419、425、431、439、447、453、461、467、471、若しくは473のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表9DからのガイドRNAのうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体(RNP)と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNPを含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。

10

20

30

40

50

【0033】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるPCSK9遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a)本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b)操

作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、PCSK9遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号588～602に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する標的化配列にハイブリダイズするように構成されているか、若しくはそれを含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号573～587のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合エンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する配列を含む融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドは、配列番号574、578、581、又は585のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表9EからのガイドRNAのうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触させることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体(RNP)と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNPを含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。

10

20

30

40

50

【0034】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞におけるアルブミン遺伝子座を破壊する方法であって、細胞に、(a) 本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのいずれかと、(b) 操作されたガイドRNAと、を導入することを含む、方法を提供し、操作されたガイドRNAは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、操作されたガイドRNAは、アルブミン遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成された標的化配列を含み、操作されたガイドRNAは、配列番号67～86若しくは646～695のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、又は操作されたガイドRNAは、配列番号67～86若しくは646～695のうちのいずれか1つの標的化配列に対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される融合又は操作されたエンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載されるタイプII Cas エンドヌクレアーゼのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号10又はそのバリエーションに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する融合エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号722の非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号67、68、70、71、72、76、79、80、647、648、649、653、654、655、656、673、680、681、又は682のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する配列に相補的であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表6からのガイドRNAのうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸若しくはベクターと接触さ

10

20

30

40

50

せることを更に含むか、又は細胞を、ベクター若しくは核酸を含む脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入することは、細胞を、融合タンパク質若しくはガイドポリヌクレオチドを含むリボヌクレオタンパク質複合体（RNP）と接触させることを更に含むか、又は細胞を、RNPを含む脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含む。

【0035】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号1～27、108、又は109～110のうちのいずれか1つに対して少なくとも55%の配列同一性を有する操作されたアミノ酸配列を含むエンドヌクレアーゼを提供する。

【0036】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼと、標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されたガイドリボ核酸配列、及びエンドヌクレアーゼに結合するように構成されたtracrリボ核酸配列を含む、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成された操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、培養されていない微生物に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼ、Cas14エンドヌクレアーゼ、Cas12aエンドヌクレアーゼ、Cas12bエンドヌクレアーゼ、Cas12cエンドヌクレアーゼ、Cas12dエンドヌクレアーゼ、Cas12eエンドヌクレアーゼ、Cas13aエンドヌクレアーゼ、Cas13bエンドヌクレアーゼ、Cas13cエンドヌクレアーゼ、又はCas13dエンドヌクレアーゼではない。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、SpyCas9エンドヌクレアーゼに対して86%未満の同一性を有する。いくつかの実施形態では、系は、 Mg^{2+} の供給源を更に含む。

【0037】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 配列番号1～27、108、又は109～110のうちのいずれか1つのRuvC及びHNHドメインに対して少なくとも55%の配列同一性を有するクラス2、タイプII Cas酵素RuvC及びHNHドメインと、(b) 配列番号1～27、108、又は109～110のうちのいずれか1つのPAM相互作用（PI）ドメインに対して少なくとも55%の配列同一性を有するクラス2、タイプII Cas酵素PAM相互作用（PI）ドメインと、を含む操作されたヌクレアーゼを提供する。いくつかの実施形態では、(a) 及び (b) は、天然では一緒に生じない。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas酵素は、培養されていない微生物に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、SpyCas9エンドヌクレアーゼに対して86%未満の同一性を有する。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼは、配列番号1～27のうちのいずれか1つに対して少なくとも55%の配列同一性を有する配列を含む。

【0038】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される態様又は実施形態のいずれかによるエンドヌクレアーゼと、標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されたガイドリボ核酸配列、及びエンドヌクレアーゼに結合するように構成されたtracrリボ核酸配列を含む、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成された操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸配列は、配列番号28～32若しくは33～44のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションの非縮重ヌクレオチドに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、系は、標的核酸部位に隣接するヌクレアーゼと適合性があるPAM配列を更に含む。いくつかの実施形態では、PAM配列は、標的デオキシリボ核酸配列の3'に位置する。

【0039】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される態様又は実施形態によるクラス2、タイプII酵素と適合性がある操作された単一分子異種ガイドポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

を提供し、異種ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 605～610 又は 1789～1865 のうちのいずれか 1 つに記載の化学修飾を含む。

【0040】

いくつかの態様では、本開示は、アルブミン遺伝子を標的化する方法であって、本明細書に記載される態様又は実施形態のうちのいずれか 1 つによる系を細胞に導入することを含む、方法を提供し、ガイドリボ核酸配列は、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つを含む配列にハイブリダイズするように構成されている。

【0041】

いくつかの態様では、本開示は、HAO1 遺伝子を標的化する方法であって、本明細書に記載される態様又は実施形態のうちのいずれか 1 つによる系を細胞に導入することを含む、方法を提供し、ガイドリボ核酸配列は、配列番号 611～633 のうちのいずれか 1 つにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸配列は、配列番号 615、618、620、624、又は 626 のうちのいずれか 1 つにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸は、配列番号 605～610 又は 1789～1865 のうちのいずれか 1 つによる配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸は、配列番号 1812～1824、1835、1849、1858、又は 1861 のうちのいずれか 1 つによる配列を含む。

【0042】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼを含む細胞を提供する。いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるいずれかの核酸分子を含む細胞を提供する。いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるいずれかの操作されたヌクレアーゼ系を含む細胞を提供する。

【0043】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 696 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む N 末端部分と、b) 配列番号 697～721 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む操作されたエンドヌクレアーゼが、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、N 末端部分及び C 末端部分は、互いに直接融合している。いくつかの実施形態では、N 末端部分及び C 末端部分は、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシン及び／又はセリンリッチリンカー、大きなタンパク質ドメイン、長いヘリックス構造、又は短いヘリックス構造である。いくつかの実施形態では、リンカーは、(GGGS)_n であり、n は、1～20 の整数である。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGGGS (配列番号 2864) である。いくつかの実施形態では、N 末端部分は、配列番号 696 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、N 末端部分は、配列番号 696 に対して 100% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、C 末端部分は、配列番号 697～721 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、C 末端部分は、配列番号 697～721 のうちのいずれか 1 つに対して 100% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 60～66、117、865～919、及び 2855～2863 のうちのいずれか 1 つを含む PAM に結合するように構成されている。

【0044】

ある特定の実施形態では、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼが、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して 100% の配列同一性を有する配列を含む。

【0045】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、配列番号 10 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼが、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 10 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 10 に対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0046】

ある特定の実施形態では、配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼが、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0047】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成された操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 1 ~ 27 及び 771 ~ 862 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、単一ガイド核酸である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、デュアルガイド核酸である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、RNA である。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、操作されたガイドポリヌクレオチドに非共有結合している。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドポリヌクレオチドに共有結合している。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドポリヌクレオチドに融合している。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 28 ~ 45、605 ~ 610、646 ~ 695、863、及び 1789 ~ 1826 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 28 ~ 45、605 ~ 610、646 ~ 695、863、及び 1789 ~ 1826 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、融合エンドヌクレアーゼは、配列番号 60 ~ 66、865 ~ 919、及び 2863 のうちのいずれか 1 つを含む PAM に結合するように構成されている。

【0048】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成された操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 109 ~ 110 及び 2842 ~ 2854 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、単一ガイド核酸である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、デュアルガイド核酸である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、RNA である

。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、操作されたガイドポリヌクレオチドに非共有結合している。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドポリヌクレオチドに共有結合している。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドポリヌクレオチドに融合している。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 111～113 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 111～113 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 117 及び 2855～2862 のうちのいずれか 1 つを含む PAM に結合するように構成されている。

10

【0049】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつアルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0050】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRAC 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び 2618～2653 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0051】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ B2M 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 159～184 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 185～210 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

40

【0052】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRBC1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌク

50

レオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 211～251 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 252～292 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0053】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ T R B C 2 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 293～337 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 338～382 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0054】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ A N G P T L 3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0055】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ P C S K 9 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 588～602 及び 1377～1391 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0056】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ V C P 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 723～738 及び 755～762 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

40

50

【0057】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAAVS1遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号950～971及び1050～1087のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0058】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつGPR146遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号1588～1656のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号1657～1725のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0059】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAPOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0060】

ある特定の実施形態では、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHAO1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

40

【0061】

ある特定の実施形態では、標的核酸配列を修飾するための方法であって、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼ又は本明細書に記載される操作されたヌクレアーゼ系を使用して、標的核酸配列に接触することを含む方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、標的核酸配列を修飾することは、標的核酸配列を結合、ニックング、又は切断することを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、ゲノムDNA、ウイルス

50

DNA、ウイルスRNA、又は細菌DNAを含む。いくつかの実施形態では、修飾は、インビトロである。いくつかの実施形態では、修飾は、インビボである。いくつかの実施形態では、修飾は、エクスビボである。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号251～260、271～274、及び279～290のうちのいずれか1つを有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号261～270、275～278、及び291～302のうちのいずれか1つを有する配列を含む。

【0062】

ある特定の実施形態では、哺乳動物細胞における標的核酸配列を修飾する方法であって、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼ又は本明細書に記載される操作されたヌクレアーゼ系を使用して、哺乳動物細胞に接触することを含む方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、方法は、修飾を含む細胞を選択することを更に含む。

10

【0063】

ある特定の実施形態では、アルブミン遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつアルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、アルブミン遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0064】

ある特定の実施形態では、TRAC遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、TRAC遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0065】

ある特定の実施形態では、B2M遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、B2M遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

40

【0066】

ある特定の実施形態では、TRBC1遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号1

50

～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、TRBC1遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号211～251のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号252～292のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0067】

ある特定の実施形態では、TRBC2遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC2遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、TRBC2遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号293～337のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号338～382のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0068】

ある特定の実施形態では、ANGPTL3遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつANGPTL3遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、ANGPTL3遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号383～477、1392～1489、2120～2215、及び2312～2350のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0069】

ある特定の実施形態では、PCSK9遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつPCSK9遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、PCSK9遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号588～602及び1377～1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

40

【0070】

ある特定の実施形態では、VCP遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号1～2

50

7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ V C P 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、V C P 遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 7 3 9 ~ 7 5 4 及び 7 6 3 ~ 7 7 0 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0071】

ある特定の実施形態では、A A V S 1 遺伝子座を修飾する方法であって、a) 配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ A A V S 1 遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、A A V S 1 遺伝子座に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 9 2 8 ~ 9 4 9 及び 1 0 1 2 ~ 1 0 4 9 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 9 5 0 ~ 9 7 1 及び 1 0 5 0 ~ 1 0 8 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0072】

ある特定の実施形態では、G P R 1 4 6 遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ G P R 1 4 6 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、G P R 1 4 6 遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0073】

ある特定の実施形態では、A P O A 1 遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ A P O A 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、A P O A 1 遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 1 7 4 5 ~ 1 7 6 3、1 7 7 5 ~ 1 7 8 5、1 9 6 2 ~ 2 0 5 7、及び 2 0 8 9 ~ 2 1 1 9 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。

40

【0074】

ある特定の実施形態では、T R A C 遺伝子を修飾する方法であって、a) 配列番号 1 ~

50

27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたエンドヌクレアーゼと、b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHAO1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を使用して、TRAC遺伝子に接触することを含む方法が、本明細書に記載され、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0075】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼ又は本明細書に記載される操作されたヌクレアーゼ系を含む細胞が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、不死化細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、昆虫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、酵母細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、植物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、真菌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、原核細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、A549、HEK-293、HEK-293T、BHK、CHO、HeLa、MRC5、Sf9、Cos-1、Cos-7、Vero、BSC 1、BSC 40、BMT 10、WI38、HeLa、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、He

10

20

【0076】

本開示の追加の態様及び利点は、本開示の例示的な実施形態のみが示され、説明される、以下の詳細な説明から、当業者に容易に明らかになるであろう。理解されるように、本開示は、他の異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細は、全て本開示から逸脱することなく、様々な明白な点において修正が可能である。したがって、図面及び説明は、本質的に例示とみなされるべきであり、限定的なものとしてみなされるべきではない。

【図面の簡単な説明】

30

【0077】

本発明の新規の特徴は、特に添付の特許請求の範囲に記載される。本開示の特徴及び利点のより良好な理解は、本開示の原理が利用される例証的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面（また、本明細書では「図（Figure）」及び「図（FIG.）」）を参照することによって得られるであろう。

【図1A】本明細書に記載される様々なエフェクターの天然のPAM特異性を示す。図1Aは、本明細書に記載される様々なエフェクターの系統樹を示す。

【図1B】本明細書に記載される様々なエフェクターの天然のPAM特異性を示す。図1Bは、天然のRNAガイドCRISPR関連エンドヌクレアーゼのPAM特異性の表である。

40

【図2】RNAガイドCRISPR関連ヌクレアーゼ間のドメイン交換の概念を示す。

【図3A】最適なブレイクポイントの決定をガイドするための複数の配列のアライメントを示す。図3Aは、本明細書に記載されるいくつかのタンパク質にアライメントしたSaCas9及びSpCas9を示し、これらの配列の末端の保存された残基（アラニン残基）を、交換したセクションの提案したC末端として識別する。

【図3B】最適なブレイクポイントの決定をガイドするための複数の配列のアライメントを示す。図3Bは、RuvC-IIドメイン、WEDドメイン、TOPODドメイン、及びCTDドメインの交換したスパンのSaCas9タンパク質のC末端ドメインを示す。PAM相互作用ドメインは、TOPODドメイン及びCTDドメインから構成されている。活性部位残基（RuvCドメインのD10、E477、及びH701、並びにNHNDメ

50

インのD556、D557、及びN580)は、交換したC末端ドメインに含まれない。

【図4】密接に関連するヌクレアーゼ及び遠く関連するヌクレアーゼ由来の様々なC末端ドメインとMG3-6を組換える際の、インビトロPAM濃縮アッセイを用いたキメラのスクリーニングを示す。N末端親ドメイン由来のsgRNAを、RNAガイドヌクレアーゼ活性に使用した。

【図5A】本明細書に記載される機能的キメラのPAM配列(図5A)及びPAM配列の配列ロゴ表示(図5B)を示す。RuvC-IIII、WED、TOPO及びCTDの予測C末端ドメインのブレイクポイント交換を考慮すると、密接に関連するヌクレアーゼと再度組換える場合、キメラは機能的であった。操作したキメラは、天然タンパク質が同じ実験で機能していない場合であっても、天然タンパク質のPAM相互作用ドメイン由来のPAM特異性を保存する傾向にあった。

10

【図5B】本明細書に記載される機能的キメラのPAM配列(図5A)及びPAM配列の配列ロゴ表示(図5B)を示す。RuvC-IIII、WED、TOPO及びCTDの予測C末端ドメインのブレイクポイント交換を考慮すると、密接に関連するヌクレアーゼと再度組換える場合、キメラは機能的であった。操作したキメラは、天然タンパク質が同じ実験で機能していない場合であっても、天然タンパク質のPAM相互作用ドメイン由来のPAM特異性を保存する傾向にあった。

【図6】密接に関連するヌクレアーゼ及び遠く関連するヌクレアーゼ由来の様々なc末端ドメインとMG3-6を組換えているキメラを用いたインビトロPAM濃縮アッセイを用いたキメラのスクリーニングを示す。C末端親ドメイン由来のsgRNAを、RNAガイドヌクレアーゼ活性に使用した。括弧内の数字は、sgRNA種を示す。C末端親ドメイン由来のsgRNAの使用は、活性を救出しなかった。

20

【図7】MG3-6及びMG15-1の予測した構造を示す。MG3-6のWEDドメイン及びPIDドメインを、MG15-1対応物のドメインと交換して、キメラ1(C1)を生成した。代替的には、MG3-6のPIDドメインをMG15-1の対応物と交換して、キメラ2(C2)を生成した。

【図8A】PAM特異性についてのインビトロPAM濃縮アッセイ及びサンガー配列決定の結果を示す。C1: MG3-6+MG15-1(WP)及びC2: MG3-6+MG15-1(P)。操作したキメラは、天然タンパク質のPAM相互作用ドメイン由来のPAM特異性を保存する傾向にある。PAM濃縮アッセイを3回行った。(図8A)は、配列を活性酵素の存在下で切断したことを示すアッセイのアガロースゲル表示を示し、(図8B)は、アッセイによって決定したPAM配列の配列ロゴ表示を示す。

30

【図8B】PAM特異性についてのインビトロPAM濃縮アッセイ及びサンガー配列決定の結果を示す。C1: MG3-6+MG15-1(WP)及びC2: MG3-6+MG15-1(P)。操作したキメラは、天然タンパク質のPAM相互作用ドメイン由来のPAM特異性を保存する傾向にある。PAM濃縮アッセイを3回行った。(図8A)は、配列を活性酵素の存在下で切断したことを示すアッセイのアガロースゲル表示を示し、(図8B)は、アッセイによって決定したPAM配列の配列ロゴ表示を示す。

【図9A】哺乳動物細胞における本明細書に記載されるキメラの活性を示す。キメラに対するmRNAの交配を、20個の異なるsgRNA(例えば、配列番号67~86を参照)とHepa1-6細胞に共トランスフェクトした。編集を、サンガー配列決定及びCRISPR編集(ICE)の推論によって評価した。図9Aは、試験したガイドの編集効率を示す。2つの生物学的複製物を示す。

40

【図9B】哺乳動物細胞における本明細書に記載されるキメラの活性を示す。キメラに対するmRNAの交配を、20個の異なるsgRNA(例えば、配列番号67~86を参照)とHepa1-6細胞に共トランスフェクトした。編集を、サンガー配列決定及びCRISPR編集(ICE)の推論によって評価した。図9Bは、代表的なガイドによって生じたインデルプロファイルを示す。

【図10】Hepa1-6細胞におけるガイドスクリーニングの結果を示し、ガイドを、リポフェクタミンメッセンジャーマックスを使用してmRNA及びgRNAとして送達し

50

た。

【図 1 1 A】MG 3-6 / 3-4 ガイドの構造部分を示す。

【図 1 1 B】MG 3-6 ガイドの構造部分を示す。

【図 1 2】リポフェクタミンメッセンジャーマックスを使用して mRNA 及び gRNA として送達したときの、Hepa 1-6 細胞における化学的に修飾した MG 3-6 / 3-4 ガイドの活性を示す。

【図 1 3】37℃で9時間にわたる化学修飾した MG 3-6 / 3-4 ガイドの安定性を示す。

【図 1 4】37℃で21時間にわたる化学修飾した MG 3-6 / 3-4 ガイドの安定性を示す。

【図 1 5 A】タイプ V-A キメラのインビトロスクリーニングを示す。図 1 5 A は、各切断反応についての増幅した切断産物のアガロースゲルを示す。同じファミリーからのドメイン交換（括弧内の数字は sgRNA 種を示す）である MG 29-1 + MG 29-5 キメラで、陽性濃縮を観察する。

【図 1 5 B】タイプ V-A キメラのインビトロスクリーニングを示す。図 1 5 B は、親酵素及びそれから誘導したキメラについての PAM の配列ロゴ表示を示す。

【図 1 6】HEK 293 T 細胞における TRAC の DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 1 7】HEK 293 T 細胞における B2M の DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 1 8】T 細胞における TRAC の DNA 及び表現型レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 1 9】T 細胞における B2M の DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 2 0】T 細胞における TRBC 1 及び TRBC 2 の表現型レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 2 1】Hep 3 B 細胞における ANGPTL 3 の DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 2 2】Hep 3 B 細胞における PCSK 9 の DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 2 3】次世代配列決定によって分析した野生型マウスにおける、MG 3-6 / 3-4 による HAO-1 遺伝子座でのゲノム編集を示す。

【図 2 4】MG 3-6 / 3-4 mRNA 及び HAO-1 遺伝子を標的化するガイド RNA で処置したマウスの肝臓におけるグリコール酸オキシダーゼタンパク質レベルを示す。

【図 2 5】MG 3-6 / 3-4 mRNA 及び 4 つの異なる化学修飾を有する HAO-1 を標的化するガイド RNA 7 (G7) で処置した野生型マウスにおける HAO-1 遺伝子座でのゲノム編集を示す。

【図 2 6】実施例 19 に記載されるような、MG 3-6 / 3-4 mRNA 及び 4 つの異なる化学修飾を有する sgRNA 7 (G7) を封入している LNP を用いた処置の 11 日後のマウスの肝臓におけるグリコール酸オキシダーゼ (GO) / HAO-1 タンパク質レベルでのウェスタンブロット分析を示す。個々のマウスを番号によって示す。

【図 2 7】実施例 20 にあるような標的 HAO-1 に対する脂質トランスフェクションを使用して、mRNA 及び gRNA として送達した場合の、Hep 3 B 細胞における化学修飾されたガイドの活性を示す。

【図 2 8】実施例 21 に記載されるような標的 HAO-1 に対する脂質トランスフェクションを使用して、mRNA 及び gRNA として送達した場合の、初代ヒト肝細胞における化学修飾されたガイドの活性を示す。

【図 2 9】実施例 22 で評価したような、2 つの MG 3-6 キメラ酵素についての哺乳動物細胞編集の実証及び PAM 配列の決定を示す。

【図 3 0】実施例 23 にあるような LNP におけるインビボ送達後のマウスの肝臓における編集活性に関する MG 3-6 / 3-4 ガイド化学物質の評価を示す。

10

20

30

40

50

【図 3 1】実施例 2 4 にあるような K 5 6 2 細胞における V C P についての D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 3 2】K 5 6 2 細胞における D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。ガイドを、T R A C 及び A A V S 1 を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 3 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 3 と交換しているキメラである。

【図 3 3】K 5 6 2 細胞における D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。ガイドを、T R A C 及び A A V S 1 を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 7 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 7 と交換しているキメラである。

【図 3 4】K 5 6 2 細胞における D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。ガイドを、T R A C を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 8 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 8 と交換しているキメラである。

【図 3 5】K 5 6 2 細胞における D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。ガイドを、T R A C を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 8 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 8 と交換しているキメラである。

【図 3 6】ヒト H e p 3 B 細胞における D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。ガイドを、P C S K 9 を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 4 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 4 と交換しているキメラである。

【図 3 7】ヒト H e p 3 B 細胞における D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。ガイドを、A N G P T L 3 を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 4 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 4 と交換しているキメラである。

【図 3 8】D N A レベルヒト H e p 3 B 細胞での遺伝子編集結果を示す。ガイドを、A P O A 1 を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 8 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 8 と交換しているキメラである。

【図 3 9】マウス H e p a 1 - 6 細胞における D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。ガイドを、G P R 1 4 6 を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 7 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 7 R W P と交換しているキメラである。

【図 4 0】マウス H e p a 1 - 6 細胞における D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。ガイドを、A P O A 1 を標的化するように設計した。M G 3 - 6 __ 3 - 4 R W P は、M G 3 - 6 の部分的 R u v C - I I I、W E D、及び P I D を M G 3 - 4 と交換しているキメラである。

【図 4 1】M G 3 - 6 キメラの設計戦略を示す。図 4 1 のパネル (a) (左上) は、M G 3 - 6 の予測ドメイン境界、並びに M G 3 及び M G 1 5 0 メンバーとの組換えのブレイクポイントを示す。図 4 1 のパネル (b) (左下) は、M G 3 - 6 の予測 3 - D 構造及びタンパク質組換えのブレイクポイントを示す。構造は、N o v a f o l d によって予測される。図 4 1 のパネル (c) (右) は、M G 3 及び M G 1 5 0 メンバーの多重配列アライメント (M S A) を示す。ブレイクポイントは、矢印で示される。

【図 4 2 A】M G 3 - 6 キメラのスクリーニング及び P A M 特異性の特性評価を示す。図 4 2 A (左) は、酵素活性を評価する D N A アガロースゲル電気泳動分析を示す。

【図 4 2 B】M G 3 - 6 キメラのスクリーニング及び P A M 特異性の特性評価を示す。図 4 2 B (右) は、機能的キメラについての系統樹及び配列ロゴを示す。

【図 4 3 - 1】M G 3 - 6 __ 3 - 8 キメラの設計戦略を示す。図 4 3 のパネル (a) (左上) は、M G 3 - 6 __ 3 - 8 の予測ドメイン境界、並びに M G 3 及び M G 1 5 0 メンバーとの組換えのブレイクポイントを示す。図 4 3 のパネル (b) (左下) は、M G 3 - 6 の予測 3 - D 構造及びタンパク質組換えのブレイクポイントを示す。構造は、N o v a f o l d によって予測される。

10

20

30

40

50

【図 4 3 - 2】MG 3 - 6 __ 3 - 8 キメラの設計戦略を示す。図 4 3 のパネル (c) (中央) は、MG 3 及び MG 1 5 0 メンバーの多重配列アライメント (MSA) を示す。図 4 3 のパネル (d) (右) は、MG 1 5 メンバーの多重配列アライメント (MSA) を示す。ブレイクポイントは、矢印で示される。

【図 4 4 A】MG 3 - 6 __ 3 - 8 キメラのスクリーニング及び PAM 特異性の特性評価を示す。図 4 4 A (上) は、酵素活性を評価する DNA アガロースゲル電気泳動分析を示す。

【図 4 4 B - 1】MG 3 - 6 __ 3 - 8 キメラのスクリーニング及び PAM 特異性の特性評価を示す。図 4 4 B (下) は、機能的キメラについての PAM 配列の配列ロゴコンセンサス表示を示す。

【図 4 4 B - 2】MG 3 - 6 __ 3 - 8 キメラのスクリーニング及び PAM 特異性の特性評価を示す。図 4 4 B (下) は、機能的キメラについての PAM 配列の配列ロゴコンセンサス表示を示す。

【図 4 5】本明細書に記載される脂質ナノ粒子で使用され得る例示的なカチオン性脂質の構造を示す。

【図 4 6】実施例 2 8 に記載されるような LNP におけるインビボ送達後のマウスの肝臓における HAO - 1 遺伝子編集及び mRNA ノックダウン活性に関する MG 3 - 6 / 3 - 4 ガイド化学物質の評価を示す。

【図 4 7】Hep a 1 - 6 細胞における m A p o a 1 についての DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 4 8】Hep a 1 - 6 細胞における m A n g p t l 3 についての DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 4 9】Hep a 1 - 6 細胞における m T r a c についての DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 5 0】次世代配列決定によって分析した野生型マウスにおける、MG 3 - 6 / 3 - 8 による A P O A 1 及び A N G P T L 3 遺伝子座でのゲノム編集を示す。

【図 5 1 A】本明細書に記載される様々な MG 2 9 エフェクターの系統樹を示す。

【図 5 1 B】A l p h a f o l d 2 を使用して予測した MG 2 9 - 1 エフェクターの三次元構造を示す。R-ループを形成する核酸は、C p f 1 (P D B I D : 5 X H 7) との構造的アライメントを介してモデル化される。R E C、R u v C、及び N U C ドメインは、それぞれ灰色、シアン色、及びピンク色で色付けされる。PAM 相互作用ドメイン、すなわち、W E D - I I、W E D - I I I、及び P I D ドメインは、それぞれ黄色及びオレンジ色で色付けされる。

【図 5 2 A】タイプ V - A ヌクレアーゼの系統学的分析を示す。系統樹を、M A F F T グローバル (g - i n s - i) 多重配列アライメントからの R A x M L で推論した。祖先 W e d I I、P I、及び W e d I I I ドメインを、3 つの祖先ノード (黒丸で強調表示されたノード : M G 2 9 - 2 2 9、M G 2 9 - 2 3 0、及び M G 2 9 - 2 3 1) に対して生成した。

【図 5 2 B】MG 2 9 - 1 の予測した構造に対する、MG 2 9 - 2 8 由来の祖先ドメインの 3 D 構造予測を示す。これらのドメインの高い類似性は、構造間の重複 (上)、並びに配列アライメントにおける主要な残基の保存 (下) によって観察される。PAM 結合に参与する重要な残基は、アライメントの上の暗いボックスによって、並びに 3 D アライメントにおけるスティックカートゥーン可視化によって示される。

【図 5 3 A】キメラ形成のための最適なブレイクポイントを決定するための MG 2 9 - 1 相同体の多重配列アライメントを示す。図 5 3 A は、本明細書に記載されるいくつかのタンパク質にアライメントされた MG 2 9 - 1 及び F n C a s 1 2 a を示す。W E D - I I、P I D、及び W E D - I I I ドメインは、交換されているドメインを強調表示するために注釈付けされる。破線は、これらの酵素ドメインを交換するための切断部位を示す。全体的に、交換された領域は、W E D - I I、P I D、及び W E D - I I I ドメインに及ぶ。

10

20

30

40

50

【図 5 3 B】キメラ形成のための最適なブレイクポイントを決定するための M G 2 9 - 1 相同体の多重配列アライメントを示す。図 5 3 B： M G 2 9 - 1 タンパク質及びその相同体の C 末端は、R E C ドメイン及び W E D - I I ドメインの縁部のブレイクポイントからなる。全体的に、交換された領域は、W E D - I I、P I D、及び W E D - I I I ドメインに及ぶ。

【図 5 3 C】キメラ形成のための最適なブレイクポイントを決定するための M G 2 9 - 1 相同体の多重配列アライメントを示す。図 5 3 C： M G 2 9 - 1 タンパク質及びその相同体の N 末端は、W E D - I I I 及び R u v C ドメインの縁部のブレイクポイントからなる。全体的に、交換された領域は、W E D - I I、P I D、及び W E D - I I I ドメインに及ぶ。

10

【図 5 4】タイプ V - A キメラのインビトロスクリーニングを示す。アガロースゲルは、各切断反応についての増幅した切断産物を示す。M G 2 9 - 1 並びにその相同体のいくつか、すなわち、M G 2 9 - 1 3、M G 2 9 - 1 4、M G 2 9 - 1 6、M G 2 9 - 2 0、及び M G 2 9 - 1 8 を有するキメラについて、陽性濃縮が観察された。

【図 5 5】タイプ V - A 祖先配列及び M G 2 9 - 1 を有するそれらの対応するキメラのインビトロスクリーニングを示す。アガロースゲルは、各切断反応についての増幅した切断産物を示す。陽性濃縮は、祖先的に再構築された M G 2 9 - 2 3 0 及び M G 2 9 - 2 3 1 についてのみ観察された。しかしながら、全ての対応するキメラは、活性であることがわかった。

20

【図 5 6 - 1】M G 2 9 - 1 及びそのキメラに由来するキメラに関連する P A M を示す。

【図 5 6 - 2】M G 2 9 - 1 及びそのキメラに由来するキメラに関連する P A M を示す。

【0 0 7 8】

配列表の簡単な説明

本明細書とともに提出された配列表は、本開示による方法、組成物、及び系で使用するためのポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の例を提供する。以下は、その中の配列の説明例である。

【0 0 7 9】

M G 3 - 6 キメラ

配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 は、M G 3 - 6 キメラヌクレアーゼの完全長ペプチド配列を示す。

30

【0 0 8 0】

配列番号 1 0 8 は、5' U T R、N L S、C D S、N L S、3' U T R、及びポリ A テールを含む M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼのヌクレオチド配列を示す。

【0 0 8 1】

配列番号 7 2 2 は、M G 3 - 6 / 3 - 4 ガイド s g R N A 足場のヌクレオチド配列を示す。

【0 0 8 2】

配列番号 2 8 ~ 4 5、6 0 5 ~ 6 1 0、6 4 6 ~ 6 9 5、8 6 3、及び 1 7 8 9、1 8 2 6 は、M G 3 - 6 キメラヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

40

【0 0 8 3】

配列番号 6 0 3 は、M G 3 - 6 / 3 - 4 の D N A コード配列を示す。

【0 0 8 4】

配列番号 6 0 4 は、M G 3 - 6 / 3 - 4 カセットコード配列のタンパク質配列を示す。

【0 0 8 5】

M G 2 9 - 1 キメラ

配列番号 1 0 9 ~ 1 1 0 及び 2 8 4 2 ~ 2 8 5 4 は、M G 2 9 - 1 キメラヌクレアーゼの完全長ペプチド配列を示す。

【0 0 8 6】

配列番号 1 1 1 ~ 1 1 3 は、M G 2 9 - 1 キメラヌクレアーゼで機能するように操作さ

50

れた s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 8 7 】

M G キメラ

配列番号 6 9 6 は、M G 3 - 6 の N 末端ペプチド配列 (1 ~ 7 4 2) を示す。

【 0 0 8 8 】

配列番号 6 9 7 ~ 7 2 1 は、C 末端ペプチド配列を示す。

【 0 0 8 9 】

アルブミン標的化

配列番号 6 7 ~ 8 6 は、アルブミンを標的化するために、M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 9 0 】

T R A C 標的化

配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8 は、T R A C を標的化するために、M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 9 1 】

配列番号 1 3 9 ~ 1 5 8 は、T R A C 標的部位の D N A 配列を示す。

【 0 0 9 2 】

配列番号 9 2 2 ~ 9 2 4 は、T R A C を標的化するために、M G 3 - 6 / 3 - 3 ヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 9 3 】

配列番号 9 2 5 ~ 9 2 7 は、T R A C 標的部位の D N A 配列を示す。

【 0 0 9 4 】

配列番号 9 7 2 ~ 9 9 1 は、T R A C を標的化するために、M G 3 - 6 / 3 - 7 ヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 9 5 】

配列番号 9 9 2 ~ 1 0 1 1 は、T R A C 標的部位の D N A 配列を示す。

【 0 0 9 6 】

配列番号 1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 は、T R A C を標的化するために、M G 3 - 6 / 3 - 8 ヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 9 7 】

配列番号 1 1 8 4 ~ 1 2 7 9、1 3 2 1 ~ 1 3 6 1、2 4 8 6 ~ 2 5 8 1、及び 2 6 1 8 ~ 2 6 5 3 は、T R A C 標的部位の D N A 配列を示す。

【 0 0 9 8 】

B 2 M 標的化

配列番号 1 5 9 ~ 1 8 4 は、B 2 M を標的化するために、M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 9 9 】

配列番号 1 8 5 ~ 2 1 0 は、B 2 M 標的部位の D N A 配列を示す。

【 0 1 0 0 】

T R B C 1 標的化

配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 は、T R B C 1 を標的化するために、M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 0 1 】

配列番号 2 5 2 ~ 2 9 2 は、T R B C 1 標的部位の D N A 配列を示す。

【 0 1 0 2 】

T R B C 2 標的化

配列番号 2 9 3 ~ 3 3 7 は、T R B C 2 を標的化するために、M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼで機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 0 3 】

10

20

30

40

50

配列番号 338～382 は、TRBC2 標的部位の DNA 配列を示す。

【0104】

ANGPTL3 標的化

配列番号 383～477 及び 1392～1489 は、ANGPTL3 を標的化するために、MG3-6 / 3-4 ヌクレアーゼで機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0105】

配列番号 478～572 及び 1490～1587 は、ANGPTL3 標的部位の DNA 配列を示す。

【0106】

配列番号 2120～2215 及び 2312～2350 は、ANGPTL3 を標的化するために、MG3-6 / 3-8 ヌクレアーゼで機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0107】

配列番号 2216～2311 及び 2351～2389 は、ANGPTL3 標的部位の DNA 配列を示す。

【0108】

PCSK9 標的化

配列番号 573～587 及び 1362～1376 は、PCSK9 を標的化するために、MG3-6 / 3-4 ヌクレアーゼで機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0109】

配列番号 588～602 及び 1377～1391 は、PCSK9 標的部位の DNA 配列を示す。

【0110】

VCP R155 標的化

配列番号 723～738 は、VCP R155 を標的化するために、MG3-6 / 3-8 ヌクレアーゼで機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0111】

配列番号 739～754 は、VCP R155 標的部位の DNA 配列を示す。

【0112】

配列番号 755～762 は、VCP R155 を標的化するために、MG3-6 / 3-4 ヌクレアーゼで機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0113】

配列番号 763～770 は、VCP R155 標的部位の DNA 配列を示す。

【0114】

AAVS1 標的化

配列番号 928～949 は、AAVS1 を標的化するために、MG3-6 / 3-3 ヌクレアーゼと機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0115】

配列番号 950～971 は、AAVS1 標的部位の DNA 配列を示す。

【0116】

配列番号 1012～1049 は、AAVS1 を標的化するために、MG3-6 / 3-7 ヌクレアーゼと機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0117】

配列番号 1050～1087 は、AAVS1 標的部位の DNA 配列を示す。

【0118】

GPR146 標的化

配列番号 1588～1656 は、M. musculus GPR146 を標的化するために、MG3-6 / 3-7 ヌクレアーゼで機能するように操作された sgRNA のヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列を示す。

【0119】

配列番号1657～1725は、*M. musculus* GPR146 標的部位のDNA配列を示す。

【0120】

APOA1 標的化

配列番号1726～1744は、*M. musculus* APOA1を標的化するために、MG3-6/3-4ヌクレアーゼで機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0121】

配列番号1745～1763は、*M. musculus* APOA1 標的部位のDNA配列を示す。

【0122】

配列番号1764～1774は、*H. sapiens* APOA1を標的化するために、MG3-6/3-4ヌクレアーゼで機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0123】

配列番号1775～1785は、*H. sapiens* APOA1 標的部位のDNA配列を示す。

【0124】

配列番号1866～1961及び2058～2088は、マウスAPOA1を標的化するために、MG3-6/3-8ヌクレアーゼで機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0125】

配列番号1962～2057及び2089～2119は、マウスAPOA1 標的部位のDNA配列を示す。

【0126】

HAO1 標的化

配列番号611～633及び1789～1826は、*M. musculus* HAO1を標的化するために、MG3-6/3-4ヌクレアーゼで機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0127】

配列番号1827～1865は、ヒトHAO1を標的化するために、MG3-6/3-4ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0128】

他の配列

配列番号87～102、118、634～645、及び1786～1787は、プライマー配列を示す

【0129】

配列番号103～107、920～921、及び1788は、プラスミド配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0130】

本開示の様々な実施形態が本明細書に示され、記載されているが、そのような実施形態がほんの一例として提供されることは、当業者には明らかであろう。多数の変形、変更、及び置換が、本開示から逸脱することなく、当業者に想起され得る。本明細書に記載される本開示の実施形態に対する様々な代替が用いられ得ることが、理解されるべきである。

【0131】

本明細書に開示されるいくつかの方法の実践は、別段の示唆がない限り、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス、及び組換えDNAの技術を用いる。例えば、Sambrook and Green, Molecular Cloning

10

20

30

40

50

ning: A Laboratory Manual, 4th Edition (2012); the series Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds.); the series Methods In Enzymology (Academic Press, Inc.), PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th Edition (R. I. Freshney, ed. (2010)) を参照されたい。

10

【0132】

本明細書において使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が別途明確に示さない限り、複数形も含むことが意図される。更に、「含むこと」、「含む」、「有すること」、「有する」、「有する」という用語、又はそのバリエーションが、詳細な説明又は特許請求の範囲のいずれかで使用される限りにおいて、かかる用語は、「含むこと」という用語と類似した様式で包含的であることが意図される。

【0133】

「約」又は「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値についての許容可能な誤差範囲内を意味し、これは、値がどのように測定又は決定されるか、例えば、測定系の限界に部分的に依存する。例えば、「約」は、当該技術分野の慣行によると、1つ又は2つ以上の標準偏差内を意味し得る。代替的には、「約」は、所与の値の最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、又は最大1%の範囲を意味し得る。

20

【0134】

本明細書で使用される場合、「細胞」とは、生物学的細胞を指す。細胞は、生きている生物の基本的な構造、機能、又は生物学的単位であり得る。細胞は、1つ以上の細胞を有する任意の生物を起源とし得る。いくつかの非限定的な例としては、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、古細菌細胞、単一細胞の真核生物の細胞、原虫細胞、植物由来の細胞（例えば、植物作物、果実、野菜、穀物、大豆、コーン、トウモロコシ、小麦、種子、トマト、米、キャッサバ、サトウキビ、カボチャ、乾草、ジャガイモ、綿、大麻、タバコ、顕花植物、針葉樹、裸子植物、シダ、ヒカゲノカズラ、ツノゴケ、ゼニゴケ、コケ由来の細胞）、藻類の細胞（例えば、*Botryococcus braunii*、*Chlamydomonas reinhardtii*、*Nannochloropsis gaditana*、*Chlorella pyrenoidosa*、*Sargassum patens* C. Agardh など）、海藻（例えば、ケルプ）、真菌細胞（例えば、酵母細胞、キノコ由来の細胞）、動物細胞、脊椎動物（例えば、フルーツフライ、刺胞動物、棘皮動物、線虫など）由来の細胞、脊椎動物（例えば、魚、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、哺乳動物（例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、齧歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、ヒトなど）由来の細胞などが挙げられる。場合によっては、細胞は、天然の生物に由来するものではない（例えば、細胞は、合成的に作製されてもよく、時には人工細胞と呼ばれる）。

30

40

【0135】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、塩基-糖-リン酸の組み合わせを指す。ヌクレオチドは、合成ヌクレオチドを含んでもよい。ヌクレオチドは、合成ヌクレオチド類似体を含んでもよい。ヌクレオチドは、核酸配列（例えば、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA））の単量体単位であってもよい。ヌクレオチドという用語は、リボヌクレオシド三リン酸アデノシン三リン酸（ATP）、ウリジン三リン酸（UTP）、シトシン三リン酸（CTP）、グアノシン三リン酸（GTP）及びデオキシリボヌクレオシド三リン酸、例えば、dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP、又はその誘導体を含み得る。かかる誘導体としては、例えば、[α S

50

〕 d A T P、7-デアザ-d G T P及び7-デアザ-d A T P、並びにそれらを含む核酸分子にヌクレアーゼ耐性を付与するヌクレオチド誘導体を挙げることができる。本明細書で使用される場合、ヌクレオチドという用語は、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (d d N T P) 及びその誘導体を指す場合がある。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の例としては、d d A T P、d d C T P、d d G T P、d d I T P、及び d d T T P が挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、非標識であり得るか、又は光学的に検出可能な部分 (例えば、フルオロフォア) を含む部分を使用するなど、検出可能に標識され得る。標識はまた、量子ドットを用いて行われてもよい。検出可能な標識としては、例えば、放射性同位元素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識を挙げることができる。ヌクレオチドの蛍光標識は、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン (FAM)、2'-7'-ジメトキシ-4'-5-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン (JOE)、ローダミン、6-カルボキシローダミン (R6G)、N, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン (TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン (ROX)、4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ) 安息香酸 (DABCYL)、カスケードブルー、オレゴングリーン、テキサスレッド、シアニン及び5-(2'-アミノエチル) アミノナフタレン-1-スルホン酸 (EDANS) を含むが、これらに限定されない。蛍光標識されたヌクレオチドの具体的な例としては、Perkin Elmer、Foster City, Calif から入手可能な [R6G] dUTP、[TAMRA] dUTP、[R110] dCTP、[R6G] dCTP、[TAMRA] dCTP、[JOE] ddATP、[R6G] ddATP、[FAM] ddCTP、[R110] ddCTP、[TAMRA] ddGTP、[ROX] ddTTP、[dR6G] ddATP、[dR110] ddCTP、[dTAMRA] ddGTP、及び [dROX] ddTTP; Amersham、Arlington Heights, IL. から入手可能な FluoroLink DeoxyNucleotides、FluoroLink Cy3-dCTP、FluoroLink Cy5-dCTP、FluoroLink Fluor X-dCTP、FluoroLink Cy3-dUTP、及び FluoroLink Cy5-dUTP; Boehringer Mannheim、Indianapolis, Ind. から入手可能なフルオレセイン-15-dATP、フルオレセイン-12-dUTP、テトラメチル-ローダミン-6-dUTP、IR770-9-dATP、フルオレセイン-12-ddUTP、フルオレセイン-12-UTP、及びフルオレセイン-15-2'-dATP; 並びに Molecular Probes、Eugene, Oreg から入手可能な染色体標識ヌクレオチド、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、カスケードブルー-7-UTP、カスケードブルー-7-dUTP、フルオレセイン-12-UTP、フルオレセイン-12-dUTP、オレゴングリーン488-5-dUTP、ローダミングリーン-5-UTP、ローダミングリーン-5-dUTP、テトラメチルローダミン-6-UTP、テトラメチルローダミン-6-dUTP、テキサスレッド-5-UTP、テキサスレッド-5-dUTP、及びテキサスレッド-12-dUTP が挙げられ得る。ヌクレオチドはまた、化学修飾によって標識又はマーキングされてもよい。化学修飾された単一ヌクレオチドは、ビオチン-dNTP であり得る。ビオチン化 dNTP のいくつかの非限定的な例としては、ビオチン-dATP (例えば、ビオ-N6-ddATP、ビオチン-14-dATP)、ビオチン-dCTP (例えば、ビオチン-11-dCTP、ビオチン-14-dCTP)、及びビオチン-dUTP (例えば、ビオチン-11-dUTP、ビオチン-16-dUTP、ビオチン-20-dUTP) が挙げられ得る。

【0136】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸」という用語は、一本鎖、二本鎖、又は多本鎖の形態で、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチドのいずれか、又はその類似体である、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指すよう

10

20

30

40

50

に互換的に使用される。ポリヌクレオチドは、細胞にとって外因性又は内因性であってもよい。ポリヌクレオチドは、無細胞環境に存在してもよい。ポリヌクレオチドは、遺伝子又はそのフラグメントであってもよい。ポリヌクレオチドは、DNAであってもよい。ポリヌクレオチドは、RNAであってもよい。Tを指すときのポリヌクレオチドでは、Tは、RNA中のU（ウラシル）及びDNA中のT（チミン）を意味する。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してもよく、任意の機能を発揮してもよい。ポリヌクレオチドは、1つ以上の類似体（例えば、改変された骨格、糖、又は核酸塩基）を含んでもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリの前又は後に付与されてもよい。類似体のいくつかの非限定的な例としては、5-ブロモウラシル、ペプチド核酸、異種核酸、モルホリノ、ロックド核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コーディセピン、7-デアザ-GTP、フルオロフォア（例えば、糖に結合したローダミン又はフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン結合ヌクレオチド、蛍光塩基アナログ、CpGアイランド、メチル-7-グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チオウリジン、シュドウリジン、ジヒドロウリジン、クエオシン、及びワイオシンが挙げられる。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子又は遺伝子フラグメントのコード又は非コード領域、結合分析から定義した遺伝子座（遺伝子座）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、リボソームRNA（rRNA）、短い干渉RNA（siRNA）、短いヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、細胞を含まないDNA（cfDNA）及び細胞を含まないRNA（cfRNA）を含む細胞を含まないポリヌクレオチド、核酸プローブ、並びにプライマーが挙げられる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。

10

20

30

40

50

【0137】

「トランスフェクション」又は「トランスフェクトされた」という用語は、非ウイルス又はウイルスベースの方法による細胞内への核酸の導入を指す。核酸分子は、完全なタンパク質又はその機能的部分をコードする遺伝子配列であってもよい。例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.1-18.88を参照されたい。

【0138】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、ペプチド結合によって結合された少なくとも2つのアミノ酸残基のポリマーを指すように、本明細書では互換的に使用される。この用語は、ポリマーの特定の長さを意味しておらず、ペプチドが組換え技術、化学若しくは酵素合成を使用して産生されるか、又は天然に存在するかを暗示又は区別することを意図するものではない。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー並びに少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むアミノ酸ポリマーに適用する。いくつかの場合では、ポリマーは、非アミノ酸によって中断されてもよい。用語は、完全長タンパク質、及び二次又は三次構造を有するか又は有さないタンパク質（例えば、ドメイン）を含む、任意の長さのアミノ酸鎖を含む。用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質形成、アセチル化、リン酸化、酸化、及び標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作によって修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」及び「複数のアミノ酸」という用語は、修飾アミノ酸及びアミノ酸類似体を含むがこれらに限定されない、天然及び非天然アミノ酸を指す。修飾アミノ酸は、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸を含んでもよく、これは、アミノ酸上に天然に存在しない基又は化学的部分を含むように化学的に修飾されている。アミノ酸類似体は、アミノ酸誘導体を指す場合がある。「アミノ酸」という用語は、D-アミノ酸及びL-アミノ酸の両方を含む。

【0139】

本明細書で使用される場合、「非天然」とは、天然核酸又はタンパク質で見出されない

核酸又はポリペプチド配列を指し得る。非天然は、親和性タグを指してもよい。非天然は、融合物を指してもよい。非天然は、変異、挿入、又は欠失を含む、天然に存在する核酸又はポリペプチド配列を指してもよい。非天然配列は、非天然配列が融合される核酸配列又はポリペプチド配列によっても呈され得る活性（例えば、酵素活性、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性など）を呈していてもよく、又はコードしてもよい。非天然核酸又はポリペプチド配列を、遺伝子操作によって天然に生じる核酸又はポリペプチド配列（若しくはそのバリエーション）に連結して、キメラ核酸又はポリペプチドをコードするキメラ核酸又はポリペプチド配列を生成してもよい。

【0140】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子）の転写又は発現を制御し、RNA転写が開始されるヌクレオチド又はヌクレオチドの領域に隣接又は重複して位置し得る、調節DNA領域を指す。プロモーターは、しばしば転写因子と呼ばれるタンパク質因子に結合する特定のDNA配列を含有してもよく、これは、RNAポリメラーゼのDNAへの結合を促進し、これにより、遺伝子転写をもたらす。「コアプロモーター」とも称される「基礎プロモーター」は、動作可能に連結されたポリヌクレオチドの転写発現を促進するための全ての基本的に必要なエレメントを含むプロモーターを指し得る。真核生物の基礎プロモーターは、必ずしもではないが典型的には、TATAボックス及び／又はCAATボックスを含む。

【0141】

本明細書で使用される場合、「発現」という用語は、核酸配列若しくはポリヌクレオチドがDNAテンプレートから（例えば、mRNA若しくは他のRNA転写物に）転写されるプロセス、又は転写mRNAが続いてペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物及びコードされたポリペプチドは、「遺伝子産物」と総称され得る。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。

【0142】

本明細書で使用される場合、「動作可能に連結された（operably linked）」、「動作可能な連結（operable linkage）」、「動作可能に連結された（operatively linked）」、又はそれらの文法的同等物は、遺伝子エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化配列などの配置を指し、第1の遺伝子エレメントの動作（例えば、移動又は活性化）は、第2の遺伝子エレメントに何らかの影響を及ぼす。第2の遺伝子エレメントに対する影響は、第1の遺伝子エレメントの動作と同じタイプのものであり得るが、そうである必要はない。例えば、第1のエレメントの移動が第2のエレメントの活性化を引き起こす場合、2つの遺伝子エレメントは、動作可能に連結されている。例えば、プロモーター配列及び／又はエンハンサー配列を含み得る、調節エレメントは、調節エレメントが、コード配列の転写を開始するのを助ける場合、コード領域に作動可能に連結される。この機能的関係が維持される限り、調節エレメントとコード領域との間に介在する残基があってもよい。

【0143】

本明細書で使用される場合、「ベクター」とは、ポリヌクレオチドを含むか、又はポリヌクレオチドに関連し、ポリヌクレオチドの細胞への送達を媒介するために使用され得る、高分子又は高分子の関連を指す。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター、リボソーム、及び他の遺伝子送達ビヒクルが挙げられる。ベクターは、概して、標的中の遺伝子の発現を促進するために遺伝子に作動可能に連結された、遺伝子エレメント、例えば、調節エレメントを含む。

【0144】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」及び「核酸カセット」は、ともに発現されるか、又は発現のために動作可能に連結される、核酸配列又はエレメントの組み合わせを指すために互換的に使用される。いくつかの場合では、発現カセットは、発現のために

10

20

30

40

50

動作可能に連結されている調節エレメントと遺伝子又は複数の遺伝子との組み合わせを指す。

【0145】

DNA又はタンパク質配列の「機能的断片」とは、完全長DNA又はタンパク質配列の生物学的活性と実質的に類似する生物学的活性（機能的又は構造的のいずれか）を保持する断片を指す。DNA配列の生物学的活性は、完全長配列に起因する様式で発現に影響を与える能力であってもよい。

【0146】

「操作された」、「合成」、及び「人工」という用語は、ヒトの介入によって修飾された物体を指すために本明細書で互換的に使用される。例えば、本用語は、天然に存在しないポリヌクレオチド又はポリペプチドを指し得る。操作されたペプチドは、天然に存在するヒトタンパク質に対して低い配列同一性（例えば、50%未満の配列同一性、25%未満の配列同一性、10%未満の配列同一性、5%未満の配列同一性、1%未満の配列同一性）を有し得るが、それを必要としない。例えば、VPRドメイン及びVP64ドメインは、合成トランス活性化ドメインである。例えば、VPRドメイン及びVP64ドメインは、合成トランス活性化ドメインである。非限定的な実施例によれば、核酸は、その配列を、天然では生じない配列に変化させることによって修飾されてもよく、核酸は、ライゲーションされた産物が、オリジナルの核酸に存在しない機能を有するように、天然では関連しない核酸にライゲーションすることによって修飾されてもよく、操作された核酸は、天然では存在しない配列を用いてインビトロで合成されてもよく、タンパク質は、天然では存在しない配列にそのアミノ酸配列を変化させることによって修飾されてもよく、操作されたタンパク質は、新しい機能又は特性を獲得してもよい。「操作された」系は、少なくとも1つの操作された成分を含む。

【0147】

「tracrRNA」又は「tracr配列」という用語は、CRISPR RNAをトランス活性化することを意味する。tracrRNAは、CRISPR (cr) RNAと相互作用して、タイプII及びサブタイプV-B CRISPR-Cas系のガイド (g) RNAを形成する。tracrRNAが操作される場合、それは、野生型の例示的なtracrRNA配列（例えば、S. pyogenes、S. aureusに由来するtracrRNA）に対して約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%の配列同一性及び／又は配列類似性を有し得る。tracrRNAは、欠失、挿入、若しくは置換、バリエント、変異、又はキメラなどのヌクレオチド変化を含み得る、tracrRNAの修飾形態を指し得る。tracrRNAは、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにわたって、野生型の例示的なtracrRNA（例えば、S. pyogenes、S. aureusなど由来のtracrRNA）配列に対して少なくとも約60%同一であり得る核酸を指してもよい。例えば、tracrRNA配列は、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにわたって、野生型の例示的なtracrRNA（例えば、S. pyogenes、S. aureusなど由来のtracrRNA）配列に対して少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、又は100%同一であり得る。II型tracrRNA配列は、隣接するCRISPRアレイ中の反復配列の一部に対して相補性を有する領域を特定することによって、ゲノム配列上で予測することができる。

【0148】

本明細書で使用される場合、「ガイド核酸」又は「ガイドポリヌクレオチド」とは、標的核酸にハイブリダイズし、それによって、関連するヌクレアーゼを標的核酸に指向し得る、核酸を指す。ガイド核酸は、RNA（ガイドRNA又はgRNA）であり得る。ガイド核酸は、DNAであり得る。ガイド核酸は、RNA及びDNAの混合物であり得る。ガ

イド核酸は、*crRNA*若しくは*tracrRNA*、又は両方の組み合わせを含み得る。ガイド核酸は、操作され得る。ガイド核酸は、標的核酸に特異的に結合するようにプログラムされ得る。標的核酸の一部分は、ガイド核酸の一部分に対して相補的であり得る。ガイド核酸に相補的であり、ガイド核酸とハイブリダイズする二本鎖標的ポリヌクレオチドの鎖を、相補鎖と呼ぶことができる。相補鎖に相補的であり、それゆえ、ガイド核酸に相補的ではない二本鎖標的ポリヌクレオチドの鎖は、非相補鎖と呼ばれてもよい。ガイド核酸は、ポリヌクレオチド鎖を含んでもよく、また「単一ガイド核酸」と呼ばれ得る。ガイド核酸は、2つのポリヌクレオチド鎖を含んでもよく、また「ダブルガイド核酸」と呼ばれ得る。そうでない場合、「ガイド核酸」という用語は、単一ガイド核酸及びダブルガイド核酸の両方を指す、包括的であってもよい。ガイド核酸は、「核酸標的化セグメント」若しくは「核酸標的化配列」又は「スパーサー」と称され得るセグメントを含み得る。核酸標的化セグメントは、「タンパク質結合セグメント」又は「タンパク質結合配列」又は「Casタンパク質結合セグメント」と称され得るサブセグメントを含んでもよい。

10

【0149】

本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」及び「ゲノム編集」という用語は、互換的に使用され得る。遺伝子編集又はゲノム編集は、遺伝子又はゲノムの核酸配列を変化させることを意味する。ゲノム編集には、例えば、挿入、欠失、及び変異が含まれ得る。

【0150】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列との関連での「配列同一性」又は「同一性率」という用語は、配列比較アルゴリズムを使用して測定されると、局所的又は大域的比較ウィンドウにわたって最大対応のために比較及びアライメントされたときに同一であるか、又は同一であるアミノ酸残基若しくはヌクレオチドの特定の割合を有する、(例えば、ペアワイズアライメントでは)2つ又は(例えば、多重配列アライメントでは)それ以上の配列を指す。ポリペプチド配列に好適な配列比較アルゴリズムとしては、例えば、3のワード長(W)、10の期待値(E)のパラメーター、及び11の存在、1の延長でギャップコストを設定しているBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用し、かつ30残基よりも長いポリペプチド配列についての条件付き組成スコアマトリックス調整を使用したBLASTP;2のワード長(W)、1000000の期待値(E)のパラメーター、及びオープンギャップに対して9及び30残基よりも短い配列についての拡張ギャップに対して1でのPAM30スコアリング設定ギャップコストを使用したBLASTP(https://blast.ncbi.nlm.nih.govで入手可能なBLASTにおいてBLASTPについてのデフォルトのパラメーターが存在する);2の一致、-1のミスマッチ、及び-1のギャップのパラメーターを用いたSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムを用いたCLUSTALW;デフォルトパラメーターを用いたMUSCLE;2のパラメーターリツリー及び1000の最大反復を用いたMAFFT;デフォルトパラメーターを用いたNovafold;デフォルトパラメーターを用いたHMMERhmmalignが挙げられる。

20

30

【0151】

本明細書で使用される場合、「RuvC__IIIドメイン」という用語は、RuvCエンドヌクレアーゼドメインの第3の不連続セグメントを指す(RuvCヌクレアーゼドメインは、3つの不連続セグメント、RuvC__I、RuvC__II、及びRuvC__IIIから構成される)。RuvCドメイン又はそのセグメントは、概して、文書化されているドメイン配列へのアライメント、注釈付きドメインを有するタンパク質への構造的アライメント、又は文書化されているドメイン配列(例えば、RuvC__IIIのPfamHMMPF18541)に基づいて構築された隠れマルコフモデル(HMM)との比較によって特定され得る。

40

【0152】

本明細書で使用される場合、「ウェッジ」(WED)ドメインという用語は、主にsgRNA及びPAM二重の反復:抗反復二重と相互作用するドメイン(例えば、Casタンパク質に存在する)を指す。WEDドメインは、概して、文書化されたドメイン配列への

50

アライメント、注釈付きドメインを有するタンパク質への構造的アライメント、又は文書化されたドメイン配列に基づいて構築された隠れマルコフモデル（HMM）との比較によって特定され得る。

【0153】

本明細書で使用される場合、「PAM相互作用ドメイン」又は「PIDドメイン」という用語は、Casタンパク質によって標的化される領域内のシード配列の外部のプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）と相互作用するドメインを指す。PAM相互作用ドメインの例としては、Casタンパク質に存在するトポイソメラーゼ相同性（TOPO）ドメイン及びC末端ドメイン（CTD）が挙げられるが、これらに限定されない。PAM相互作用ドメイン又はそのセグメントは、概して、文書化されたドメイン配列へのアライメント、注釈付きドメインを有するタンパク質への構造的アライメント、又は文書化されたドメイン配列に基づいて構築された隠れマルコフモデル（HMM）との比較によって特定され得る。

10

【0154】

本明細書で使用される場合、「RECドメイン」という用語は、ガイドRNAを接触させると考えられるアルファらせンドメインである2つのセグメント（REC1又はREC2）のうちの少なくとも1つを含むドメイン（例えば、Casタンパク質に存在する）を指す。RECドメイン又はそのセグメントは、概して、文書化されたドメイン配列へのアライメント、注釈付きドメインを有するタンパク質への構造的アライメント、又は文書化されたドメイン配列（例えば、ドメインREC1のPfam PF19501）に基づいて構築された隠れマルコフモデル（HMM）との比較によって特定され得る。

20

【0155】

本明細書で使用される場合、「BHDドメイン」という用語は、タイプII Cas酵素のNUC葉とREC葉との間の架橋ヘリックスであるドメイン（例えば、Casタンパク質に存在する）を指す。BHDドメイン又はそのセグメントは、概して、文書化されたドメイン配列へのアライメント、注釈付きドメインを有するタンパク質への構造的アライメント、又は文書化されたドメイン配列（例えば、ドメインBHのPfam PF16593）に基づいて構築された隠れマルコフモデル（HMM）との比較によって特定され得る。

【0156】

本明細書で使用される場合、「HNHDドメイン」という用語は、特徴的なヒスチジン残基及びアスパラギン残基を有するエンドヌクレアーゼドメインを指す。HNHDドメインは、概して、文書化されているドメイン配列へのアライメント、注釈付きドメインを有するタンパク質への構造的アライメント、又は文書化されているドメイン配列（例えば、ドメインHNHDのPfam HMM PF01844）に基づいて構築された隠れマルコフモデル（HMM）との比較によって特定され得る。

30

【0157】

1つ以上の保存的アミノ酸置換を有する本明細書に記載される酵素のいずれかのバリエーションが、本開示に含まれる。こうした保存的置換は、ポリペプチドの三次元構造又は機能を破壊することなく、ポリペプチドのアミノ酸配列においてなされ得る。保存的置換は、アミノ酸を、互いに同様の疎水性、極性、及びR鎖長で置換することによって達成することができる。加えて、又は代替的には、異なる種由来の相同なタンパク質のアライメントされた配列を比較することによって、保存的置換は、コードされたタンパク質の基本的な機能を改変することなく、種間で変異したアミノ酸残基（例えば、非保存残基を見つけることによって特定され得る。このような保存的置換されたバリエーションは、本明細書に記載される系のうちのいずれか1つに対して少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少な

40

50

くとも約 98%、又は少なくとも約 99%の同一性を有するバリエーションを含んでもよい。いくつかの実施形態では、このような保存的に置換されたバリエーションは、機能的バリエーションである。こうした機能的バリエーションは、エンドヌクレアーゼの重要な活性部位残基の活性が破壊されないような置換を有する配列を包含することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される系のいずれかの機能的バリエーションは、本明細書に記載される保存された残基又は機能的残基のうちの少なくとも 1つの置換を欠く。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される系のいずれかの機能的バリエーションは、本明細書に記載される保存された残基又は機能的残基の全ての置換を欠く。

【0158】

機能的に類似したアミノ酸をもたらす保存的置換表は、様々な参考文献から入手可能である（例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd Edition (December 1993) を参照のこと）。以下の 8つの群は各々、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)、
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、スレオニン (T)、及び
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)。

【0159】

概要

固有の機能性及び構造を有する新しい Cas 酵素の発見は、デオキシリボ核酸 (DNA) 編集技術を更に破壊し、速度、特異性、機能性、及び使い易さを改善する可能性を付与し得る。微生物におけるクラスター化され規則的に間隔があいた短い回文配列反復 (CRISPR) 系の予測される保有率及び微生物種の完全な多様性と比較して、文献には機能的に特徴付けられた CRISPR/Cas 酵素が比較的少ない。これは、一部、実験室条件下では、膨大な数の微生物種が容易には培養されないためである。多数の微生物種を表す天然の環境ニッチからのメタゲノム配列決定は、文書化された新しい CRISPR/Cas 系の数を劇的に増加させ、新しいオリゴヌクレオチド編集機能の発見を早める可能性を付与する可能性がある。このようなアプローチの実りのある最近の例は、天然微生物群集のメタゲノム分析からの Cas X/Cas Y CRISPR 系の 2016 年の発見によって示される。

【0160】

CRISPR/Cas 系は、微生物における適応免疫系として機能すると説明されている RNA 指向ヌクレアーゼ複合体である。それらの自然な状況では、CRISPR/Cas 系は、CRISPR (クラスター化され規則的に間隔があいた短い回文配列反復) オペロン又は遺伝子座において生じ、これは概して、2つの部分：(i) RNA ベースの標的化エレメントをコードする、同等に短いスペーサー配列によって分けられた短い反復配列 (30~40 bp) のアレイ；及び (ii) アクセサリータンパク質/酵素と並んだ RNA ベースの標的化エレメントによって指示されるヌクレアーゼポリペプチドをコードする Cas をコードする ORF を含む。特定の標的核酸配列の効率的なヌクレアーゼ標的化は、(i) 標的 (標的シード) の最初の 6~8 個の核酸と crRNA ガイドとの間の相補的なハイブリダイゼーション、及び (ii) 標的シードの画定された近傍内のプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列の存在の両方を伴い得る (PAM は、通常、宿主ゲノム内に一般的に表されない配列である)。系の正確な機能及び構成に応じて、CRISPR-Cas 系は、共有された機能的特徴及び進化的類似性に基づき、2つのクラス、5つのタイプ、及び 16 のサブタイプに一般的に構成されている。

【0161】

クラス1 CRISPR-Cas系は、大型の多重サブユニットエフェクター複合体を有し、タイプI、タイプII、及びタイプIVを含む。

【0162】

タイプI CRISPR-Cas系は、構成要素の面で中程度の複雑さとみなされる。タイプI CRISPR-Cas系では、RNA標的化エレメントのアレイは、リピートエレメントで処理される長い前駆crRNA（プレcrRNA）として転写されて、ヌクレアーゼ複合体を核酸標的に配向させる短い成熟crRNAが、その後、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）と呼ばれる好適な短いコンセンサス配列に引き続いて放出される。この処理は、カスケードと呼ばれる大きなエンドヌクレアーゼ複合体のエンドリボヌクレアーゼサブユニット（Cas6）を介して生じ、これは、crRNA指向ヌクレアーゼ複合体のヌクレアーゼ（Cas3）タンパク質成分も含む。Cas Iヌクレアーゼは、主にDNAヌクレアーゼとして機能する。

10

【0163】

タイプII CRISPR系は、Csm又はCmrタンパク質サブユニットを含む反復関連ミステリアスタンパク質（RAMP）とともに、Cas10として知られる中心ヌクレアーゼの存在によって特徴付けられ得る。タイプIの系と同様、成熟crRNAは、Cas6様酵素を使用してプレcrRNAから処理される。タイプI及びII系とは異なり、タイプIII系は、DNA-RNA二本鎖（RNAポリメラーゼのテンプレートとして使用されるDNA鎖など）を標的化し、切断すると思われる。

20

【0164】

タイプIV CRISPR-Cas系は、高度に還元された大きなサブユニットヌクレアーゼ（csf1）、Cas5（csf3）及びCas7（csf2）群のRAMPタンパク質の2つの遺伝子、並びにいくつかの場合では、予測される小さいサブユニットの遺伝子を含む、エフェクター複合体を保有し、そのような系は、一般的に内因性プラスミド上で見出される。

【0165】

クラス2 CRISPR-Cas系は、概して、単一ポリペプチドマルチドメインヌクレアーゼエフェクターを有し、タイプII、タイプV、及びタイプVIを含む。

【0166】

タイプII CRISPR-Cas系は、構成要素の点で最も単純なものとみなされる。タイプII CRISPR-Cas系では、CRISPRアレイを成熟crRNAに処理することは、特別なエンドヌクレアーゼサブユニットの存在を必要としないが、むしろ、アレイ反復配列に相補的な領域を有する小さなトランスコードcrRNA（tracrRNA）を必要とし、tracrRNAは、その対応するエフェクターヌクレアーゼ（例えば、Cas9）及び反復配列の両方と相互作用して、前駆dsRNA構造を形成し、これは、内因性RNAse IIIで切断されて、tracrRNA及びcrRNAの両方を装填した成熟エフェクター酵素を生成する。Cas IIヌクレアーゼは、DNAヌクレアーゼとして文書化される。タイプ2エフェクターは、概して、RuvC様ヌクレアーゼドメインのフォールドに挿入された無関係なHNHヌクレアーゼドメインを有するRNAse Hフォールドに適合するRuvC様エンドヌクレアーゼドメインを含む構造を呈する。RuvC様ドメインは、標的（例えば、crRNA相補的）DNA鎖の切断に関与し、一方、HNHドメインは、置換DNA鎖の切断に関与する。

30

40

【0167】

タイプV CRISPR-Cas系は、RuvC様ドメインを含む、タイプIIエフェクターと類似したヌクレアーゼエフェクター（例えば、Cas12）構造によって特徴付けられる。タイプIIと同様に、大部分の（ただし全てではない）タイプV CRISPR系は、tracrRNAを使用して、プレcrRNAを成熟crRNAに処理するが、プレcrRNAを複数のcrRNAに切断するためのRNAse IIIを必要とするタイプII系とは異なり、タイプV系は、エフェクターヌクレアーゼ自体を使用してプレc

50

rRNAを切断することができる。タイプII CRISPR-Cas系と同様に、タイプV CRISPR-Cas系の場合もやはり、DNAヌクレアーゼとして文書化される。タイプII CRISPR-Cas系とは異なり、一部のタイプV酵素（例えば、Cas12a）は、二本鎖標的配列の第1のcrRNA指向切断によって活性化される、強固な一本鎖非特異的デオキシリボヌクレアーゼ活性を有するようである。

【0168】

タイプVI CRISPR-Cas系は、RNAガイドRNAエンドヌクレアーゼを有する。RuvC様ドメインの代わりに、タイプVI系（例えば、Cas13）の単一ポリペプチドエフェクターは、2つのHEPNリボヌクレアーゼドメインを含む。タイプII及びV系の両方とは異なり、タイプVI系もまた、いくつかの実施形態では、プレcrRNAをcrRNAに処理するためtracrRNAを必要としないと思われる。しかしながら、タイプV系と同様に、一部のタイプVI系（例えば、C2C2）は、標的RNAの第1のcrRNA指向切断によって活性化される、強固な一本鎖非特異的ヌクレアーゼ（リボヌクレアーゼ）活性を有するようである。

【0169】

そのより単純な構造により、クラス2 CRISPR-Casは、設計ヌクレアーゼ／ゲノム編集用途として操作及び開発のために最も広く採用されてきた。

【0170】

インビトロ使用のためのそのような系の初期適応のうちの1つは、(i) S. pyogenes SF370から単離される、組換え発現された精製完全長Cas9（例えば、クラス2、タイプII Cas酵素）、(ii) 切断されることが所望される標的DNA配列に相補的な約20ntの5'配列、続いて、3' tracr結合配列を担持する、精製された成熟約42ntのcrRNA（T7プロモーター配列を担持する合成DNAテンプレートからインビトロで転写されている全crRNA）、(iii) T7プロモーター配列を担持する合成DNAテンプレートからインビトロで転写される精製されたtracrRNA、及び(iv) Mg²⁺を伴った。以降の改良された、操作された系は、それ自体で標的にCas9を誘導することが可能な単一の融合合成ガイドRNA（sgRNA）を形成するために、リンカー（例えば、GAA）によって(iii)の5'末端に結合された(ii)のcrRNAを伴った。

【0171】

そのような操作された系は、(i) C末端核局在化配列（例えば、SV40 NLS）及び好適なポリアデニル化シグナル（例えば、TK pAシグナル）を有する好適な哺乳動物プロモーター下でコドン最適化Cas9（例えば、クラス2、タイプII Cas酵素）をコードするORF、及び(ii) 好適なポリメラーゼIIIプロモーター（例えば、U6プロモーター）下でsgRNA（Gで始まる5'配列、続いて、3' tracr結合配列に結合された20ntの相補的標的化核酸配列、リンカー、及びtracrRNA配列を有する）をコードするORFをコードする、DNAベクターを提供することによって、哺乳動物細胞での使用のために適合され得る。

操作されたエンドヌクレアーゼ

【0172】

ある特定の実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼが、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、2つ以上のエンドヌクレアーゼのキメラである。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、2つ以上のエンドヌクレアーゼの融合である。

【0173】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、核酸ガイドヌクレアーゼなどのヌクレアーゼの1つ以上の断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される生物、属、種、又は他の系統群のオーソログ由来のヌクレアーゼの1つ以上の断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、異なる種のヌクレアーゼオーソログ由来の1

10

20

30

40

50

つ以上の断片又はドメインを含む。

【0174】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、少なくとも2つの異なるヌクレアーゼ由来の1つ以上の断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくはそれ以上の異なるヌクレアーゼ由来の1つ以上の断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、異なる種由来の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくはそれ以上のヌクレアーゼ由来の1つ以上の断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、各々が異なるヌクレアーゼ由来の2つの断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、各々が異なるヌクレアーゼ由来の3つの断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、各々が異なるヌクレアーゼ由来の4つの断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、各々が異なるヌクレアーゼ由来の5つの断片又はドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、3つの断片又はドメインを含み、少なくとも1つの断片又はドメインは、異なるヌクレアーゼ由来である。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、4つの断片又はドメインを含み、少なくとも1つの断片又はドメインは、異なるヌクレアーゼ由来である。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、5つの断片又はドメインを含み、少なくとも1つの断片又はドメインは、異なるヌクレアーゼ由来である。

【0175】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、インビトロ、インビボ、又はエクスピボ用途のための原核細胞又は真核細胞において機能的である。

【0176】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、培養されていない微生物に由来する。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼ、Cas14エンドヌクレアーゼ、Cas12aエンドヌクレアーゼ、Cas12bエンドヌクレアーゼ、Cas12cエンドヌクレアーゼ、Cas12dエンドヌクレアーゼ、Cas12eエンドヌクレアーゼ、Cas13aエンドヌクレアーゼ、Cas13bエンドヌクレアーゼ、Cas13cエンドヌクレアーゼ、又はCas13dエンドヌクレアーゼではない。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、SpyCas9エンドヌクレアーゼに対して86%未満の同一性を有する。

【0177】

いくつかの実施形態では、異なるヌクレアーゼ又は種由来の断片又はドメイン間の結合は、非構造化領域のストレッチで生じる。ポリヌクレオチド中の非構造化領域は、例えば、アルファヘリックス又はベータ鎖などの予測二次構造エレメントを有しない領域を含む。非構造化領域は、例えば、配列又は構造アライメントによって予測されるように、タンパク質構造内に曝露される領域、ループ領域、又は様々なタンパク質オーソログ内に保存されていない領域を含み得る。

【0178】

ある特定の実施形態では、配列番号696に対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含むN末端部分と、配列番号697~721のうちのいずれか1つに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくと

も 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99%の配列同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む操作されたエンドヌクレアーゼ（例えば、キメラエンドヌクレアーゼ又は融合エンドヌクレアーゼ）が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 70%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 70%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 75%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 75%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 80%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 80%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 85%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 85%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 90%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 90%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 95%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 95%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 96%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 96%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 97%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 97%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 98%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 98%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して少なくとも約 99%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して少なくとも約 99%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 696 に対して 100%の同一性を有する配列を含む N 末端部分と、配列番号 697～721のうちのいずれか 1つに対して 100%の同一性を有する配列を含む C 末端部分と、を含む。

10

20

30

40

【0179】

ある特定の実施形態では、Cas エンドヌクレアーゼの RuvC、REC、又は HNH ドメインを含み、かつ配列番号 696 に対して少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99%の配列同一性を有する配列を含む N 末端部分と、Cas エンドヌクレアーゼの WED、TOPO、又は CTD ドメインを含み、かつ配列番号 697～721のうちの

50

のいずれか1つに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含むC末端部分と、を含む操作されたエンドヌクレアーゼ（例えば、キメラエンドヌクレアーゼ又は融合エンドヌクレアーゼ）が、本明細書に記載される。

【0180】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのN末端部分は、RuvCドメイン、RECドメイン、HNHドメイン、BHドメイン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのC末端部分は、WEDドメイン、TOPOドメイン、CTDドメイン、PAM相互作用ドメイン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのN末端部分は、RuvC、REC、及びHNHドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのN末端部分は、RuvC及びHNHドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのN末端部分は、RuvC、REC、HNH、RuvC-I、BH、及びRuvC-IIIドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのC末端部分は、WED、TOPO、及びCTDドメインを含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのC末端部分は、PAM相互作用ドメインを含む。

【0181】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのN末端部分及び操作されたエンドヌクレアーゼのC末端部分は、天然では、同じリーディングフレームにおいて一緒に生じない。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのN末端部分及び操作されたエンドヌクレアーゼのC末端部分は、異なる生物に由来する。

【0182】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのN末端部分及び操作されたエンドヌクレアーゼのC末端部分は、直接融合している。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼのN末端部分及び操作されたエンドヌクレアーゼのC末端部分は、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシン及び／又はセリンリッチリンカー、大きなタンパク質ドメイン、長いヘリックス構造、又は短いヘリックス構造である。いくつかの実施形態では、リンカーは、(G4S)_nであり、nは、1~20の整数である。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGGGS（配列番号2864）である。いくつかの実施形態では、リンカーは、(GS)_n、(G2S)_n、(G3S)_n、(G4S)_n、及び(G)_nからなる群から選択される配列を含み、nは、1~20の整数である。いくつかの実施形態では、1つ以上のリンカーは、(GGSGGD)_n又は(GGSGGE)_nからなる群から選択される配列を含み、nは、1~6の整数である。いくつかの実施形態では、1つ以上のリンカーは、(GGGSGGG)_n、(GGGSGSGGGGS)_n、及び(GGGGGPGGGGP)_nからなる群から選択される配列を含み、nは、1~3の整数である。いくつかの実施形態では、1つ以上のリンカーは、(GX)_n、(GGX)_n、(GGGX)_n、(GGGGX)_n、及び(GzX)_nからなる群から選択される配列を含み、zは1~20であり、nは、少なくとも8である。いくつかの実施形態では、Xは、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、又はプロリンである。

【0183】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ（例えば、キメラエンドヌクレアーゼ又は融合エンドヌクレアーゼ）は、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも8

2%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む。

10

20

30

40

50

【0184】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたエンドヌクレアーゼは、天然PAM特異性を有する（図1Bを参照）。いくつかの実施形態では、本開示は、タンパク質操作によるPAM特異性の実現を提供する。いくつかの実施形態では、PAM特異性の実現は、RNAガイドCRISPR関連ヌクレアーゼのドメイン交換によって達成される（図2を参照）。いくつかの実施形態では、ドメイン交換及び組換えのプロセスには、最適なブレイクポイントがある。いくつかの実施形態では、最適なブレイクポイントは、本明細書に記載される複数の配列のアライメントによってガイドされる（図3Aを参照）。

【0185】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、nnRGGnTではないPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、表1AのPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、nnRGGnT、nnnmmtY、nnnCccY、nnraww、nnRnYAY、nnncctC、nnRGGTY、nnRGGTY、nnncctC、nnRnYAY、nnnMWTY、nnrRTwy、nnRRTWY、nyrnwYY、nnrCyY、nnncMMc、nnrnYCC、nnncMMc、nnrRnCm、nnnYCMw、nnnmCmC、nnrnynnn、nnnmCm、nnRnYCYr、nnRAYAC、nnnmCm、nnnRMYT、nnTYCm、nnTMCy、nnrMTCr、nnnmCCY、nnrmww、nnrRkyY、nnRnYhy、nnnmwTY、nnnmyY、nnRnYhY、nnnmhTY、nnRMAC、nnrRtwy、nnrwwYY、nnrmyY、nnrwYCC、nnRgnCr、nnMhYy、nnyCCMww、nnnMCMcw、nnRwYhWw、nnRrYC

Yr、nnrwyhh、ntrMcm、nnrwyhh、nnRRTWY、ntTYCM、nnTCCC、nnrnyhh、nnnCCCYR、nnRnYAYn、nnRRnnYn、及びnnRRnnYnのうちのいずれか1つの配列を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、PAM配列を認識することによってPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、PAM配列を認識し、かつそれに結合する。

【0186】

【表1-1】

表1 A. PAM配列

カテゴリー	説明	タイプ	生物	配列
MG3-6	MG3-6 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRGnT
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-2 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnmtY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-3 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnCCCy
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-3 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnCCCYR
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-4 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnraww
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-7 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRnYAY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-7 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRnYAYn
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-7 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnctC
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-8 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRGGTY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-8 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRRnnYn
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-18 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRGGTY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-22 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnctC
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-24 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRnYAY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-38 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnMWTY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-42 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrRTwy
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-78 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRRTWY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-89 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nyrnwYY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-90 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrCyY
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-91 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnncMMc
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-91 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrnYCC
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-93 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnncMMc

【0187】

【表 1 - 2】

カテゴリー	説明	タイプ	生物	配列
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-94 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrRnCm
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-94 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnYCMw
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-95 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnmCmC
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-96 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrnynnn
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-101 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnmCm
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-103 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRnYCYr
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-104 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRAYAC
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-150-1 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnmCm
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-150-6 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnRMYT
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-150-7 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnTYCm
MG3-6 キメラ PAM	MG3-6_3-150-8 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnTMCy
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-2 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrMTCr
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-3 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnmCCY
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-4 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrmww
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-6 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrRkyY
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-7 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRnYhy
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-18 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnmwTY
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-22 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnmyY
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-24 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRnYhY
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-38 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnmhTY

【 0 1 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

カテゴリー	説明	タイプ	生物	配列
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-42 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRMAC
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-78 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrRtwy
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-89 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrwwYY
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-90 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrmyY
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-91 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrwYCC
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-92 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRGnCr
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-93 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnMhYy
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-94 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnYCCMww
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-95 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnnMCMCw
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-96 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRwYhWw
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-103 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRrYCYr
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-104 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrwyhh
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-150-1 PAM	ヌクレオチド	人工配列	ntrMCm
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-150-2 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrwyhh
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-150-3 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnRRTWY
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-150-7 PAM	ヌクレオチド	人工配列	ntTYCM

【 0 1 8 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

カテゴリー	説明	タイプ	生物	配列
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-150-8 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnTCCC
MG3-6_3-8 キメラ PAM	MG3-6_3-8_3-150-9 PAM	ヌクレオチド	人工配列	nnrnyhh
MG29-1 キメラ PAM 配列	MG29-1_29-13 PAM	核酸	人工配列	TTTn
MG29-1 キメラ PAM 配列	MG29-1_29-14 PAM	核酸	人工配列	TTYn
MG29-1 キメラ PAM 配列	MG29-1_29-16 PAM	核酸	人工配列	TTTn
MG29-1 キメラ PAM 配列	MG29-1_29-18 PAM	核酸	人工配列	nYTn
MG29-1 キメラ PAM 配列	MG29-1_29-20 PAM	核酸	人工配列	TTYn
MG29-1 キメラ PAM 配列	MG29-1_29-229 PAM	核酸	人工配列	nTTn
MG29-1 キメラ PAM 配列	MG29-1_29-230 PAM	核酸	人工配列	nYYn
MG29-1 キメラ PAM 配列	MG29-1_29-231 PAM	核酸	人工配列	nYYn
MG3-6 キメラ PAM 配列	MG3-6_3-8 PAM	核酸	人工配列	nnRRnnYn

【0190】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ（例えば、キメラエンドヌクレアーゼ又は融合エンドヌクレアーゼ）は、配列番号 109～110 及び 2842～2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 109～110 及び 2842～2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 109～110 及び 2842～2854 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号 109～110 及び 2842～28

54のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む。

10

20

30

40

50

【0191】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、nnRG GnTではないPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、表1AのPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、TTTTn、TYYn、TTTn、nYTn、TTYn、nTTn、nYYn、及びnYYnのうちのいずれか1つを含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、PAM配列を認識することによってPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、PAM配列を認識し、かつそれに結合する。

【0192】

ガイドポリヌクレオチド

ある特定の実施形態では、(a)本明細書に開示される操作されたヌクレアーゼと、(b)ガイドポリヌクレオチド、例えば、ガイドリボ核酸(gRNA)、単一gRNA、又はデュアルガイドRNAと、を含むエンドヌクレアーゼ系が、本明細書に開示される。Tを指すときのポリヌクレオチドでは、Tは、RNA中のU(ウラシル)及びDNA中のT(チミン)を意味する。

【0193】

いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、操作されたエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されている。いくつかの場合では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、スパーサー配列を含む。いくつかの場合では、スパーサー配列は、標的核酸配列にハイブリダイズするように構成されている。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、プロトスパーサー隣接モチーフ(PAM)配列に結合するように構成されている。

【0194】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチド(例えば、gRNA)は、細胞中の遺伝子又は遺伝子座を標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、哺乳動物細胞中の遺伝子又は遺伝子座を標的化する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、齧歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、又はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子又は標的遺伝子座は、アルブミン、TRAC、B2M、TRBC1、TRBC2、ANGPTL3、PCSK9、VCP R

155、AAVS1、GPR146、APOA1、又はHAO1である。

【0195】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、アルブミンである。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つ、又は配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有する少なくとも約46～80個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列によってコードされる。

【0196】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、アルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに相補的な配列、又は配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する

配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列に相補的な配列化ハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

【0197】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、TRAC である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちいずれか 1 つに対して少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 % の同一性を有する少なくとも約 46～80 個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、

20

30

40

50

9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列によってコードされる。

10

【0198】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、T R A C 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 5 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 0 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 9 ~ 1 3 8、9 2 2 ~ 9 2 4、9 7 2 ~ 9 9 1、1 0 8 8 ~ 1 1 8 3、1 2 8 0 ~ 1 3 2 0、2 3 9 0 ~ 2 4 8 5、及び 2 5 8 2 ~ 2 6 1 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 %

20

30

40

50

の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0199】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、TRAC遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0200】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、B 2 Mである。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つ、又は配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有する少なくとも約46～80個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列によってコードされる。

10

20

30

【0201】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、B 2 M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに相補的な配列、又は配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184

40

50

のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0202】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、B2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0203】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、TRBC1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号211～251のうちのいずれか1つ、又は配列番号211～251のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号211～251のうちのいずれか1つに対して少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有する少なくとも約46～80個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号211～25

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

20

30

50

ドポリヌクレオチドは、配列番号 338～382 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 338～382 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 338～382 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 338～382 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 338～382 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

【0209】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、ANGPTL3 である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 % の同一性を有する少なくとも約 46～80 個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつか

20

30

40

50

の実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列によってコードされる。

【0210】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、ANGPTL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0211】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、ANGPTL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 478～572、1

490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号478～572、1490～1587、2216～2311、及び2351～2389のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

20

【0212】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、PCSK9である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つ、又は配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有する少なくとも約46～80個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列によってコードされ

30

40

50

る。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列によってコードされる。

10

【0213】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、PCSK9 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

20

30

40

【0214】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、PCSK9 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 588～602 及び 1377～1391 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 588～602 及び 1377～1391 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若し

50

くは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588~602及び1377~1391のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

20

【0215】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、VCP（例えば、VCP R155）である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つ、又は配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有する少なくとも約46~80個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列によ

30

40

50

ってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列によってコードされる。
【0 2 1 6】

10

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、V C P 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 5 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 0 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 3 ~ 7 3 8 及び 7 5 5 ~ 7 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

20

30

40

【0 2 1 7】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、V C P 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 3 9 ~ 7 5 4 及び 7 6 3 ~ 7 7 0 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 7 3 9 ~ 7 5 4 及び 7 6 3 ~ 7 7 0 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 7 3 9 ~ 7 5 4 及び 7 6 3 ~ 7 7 0 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有する配列をハイブリダイズ

50

するか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

20

【0218】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、AAVS1 である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、又は少なくとも約 99 % の同一性を有する少なくとも約 46～80 個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか

30

40

50

1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列によってコードされる。

【0219】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、AAVS1遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに相補的な配列、又は配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号928～949及び1012～1049のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0220】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、AAVS1遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号950～971及び1050～1087のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号950～971及び1050～1087のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号950～971及び1050～1087のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号950～971及び1050～1087のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれ

を標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

20

【0221】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、GPR146 である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、又は少なくとも約 99 % の同一性を有する少なくとも約 46～80 個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して

30

40

50

【 0 2 2 2 】

30

【 0 2 2 3 】

50

番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【 0 2 2 4 】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、A P O A 1 である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、又は少なくとも約 9 9 % の同一性を有する少なくとも約 4 6 ~ 8 0 個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 5 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 0 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列によ

10

20

30

40

50

てコードされる。

【0225】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、APOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに相補的な配列、又は配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0226】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、APOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのい

れか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び2089～2119のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

20

【0227】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、HAO1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つ、又は配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有する少なくとも約46～80個の連続するヌクレオチドを含む配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは

30

40

50

、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列によってコードされる。

10

20

30

40

50

【0228】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、H A O 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 5 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 0 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0229】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドRNA）は、プロトSpacer配列（標的配列）に結合するSpacer配列、crRNA、及び任意選択的なtracrRNAを含むがこれらに限定されない、様々な構造エレメントを含む。いくつかの実施形態では、ゲノム編集系は、CRISPRガイドRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、Spacer配列を含むcrRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、加えて、tracrRNA又は修飾tracrRNAを含む。

【0230】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される系は、1つ以上のガイドRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、センス配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、アンチセンス配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、標的配列の領域に相補的又は実質的に相補的な領域以外のヌクレオチド配列を含む。例えば、crRNAは、ガイドRNAの一部であるか、若しくはガイドRNAの一部とみなされるか、又はガイドRNA、例えば、crRNA:tracrRNAキメラに含まれる。

【0231】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、合成ヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、天然ホスホジエステルから修飾された1つ以上のヌクレオシド間リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAのヌクレオシド間リンカー、又はその連続するヌクレオチド配列の全てが修飾される。例えば、いくつかの実施形態では、ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合などの硫黄（S）を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、約10%、25%、50%、75%、又は90%を超える修飾ヌクレオシド間リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は10個を超える修飾ヌクレオシド間リンカー（例えば、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合）を含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、リボース糖又は核酸塩基への修飾を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、修飾糖部分を含む1つ以上のヌクレオシドを含み、修飾糖部分は、デオキシリボース核酸（DNA）及びRNAで見出されるリボース糖部分と比較すると、糖部分の修飾である。いくつかの実施形態では、修飾は、リボース環構造内にある。例示的な修飾としては、ヘキソース環（HNA）、リボース環上のC2炭素とC4炭素との間にビラジカル架橋を有する二環式環（例えば、ロックド核酸（LNA））、又はC2炭素とC3炭素との間の結合を典型的に欠く非結合リボース環（例えば、UNA）による置き換えが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖修飾ヌクレオシドは、ビシクロヘキソース核酸又は三環式核酸を含む。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドは、糖部分が、非糖部分、例えば、ペプチド核酸（PNA）又はモルホリノ核酸で置き換えられる、ヌクレオシドを含む。

【0233】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、1つ以上の修飾糖を含む。いくつかの実施形態では、糖修飾は、リボース環上の置換基を、水素以外の基、又はDNA及びRNAヌクレオシドで天然に見出される2'-OH基に改変することによって行われる修飾を含む。いくつかの実施形態では、置換基は、2'、3'、4'、5'位、又はそれらの組み合わせで導入される。いくつかの実施形態では、修飾糖部分を有するヌクレオシドは、2'修飾ヌクレオシド、例えば、2'置換ヌクレオシドを含む。2'糖修飾ヌクレオシドは、いくつかの実施形態では、2'位にH若しくは-OH以外の置換基を有するヌクレオシド（2'置換ヌクレオシド）であるか、又は2'結合ビラジカルを含み、かつ2'置換ヌクレオシド及びLNA（2'-4'ビラジカル架橋）ヌクレオシドを含む。2'置換修飾ヌクレオシドの例としては、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ

10

20

30

40

50

ーRNA、2'-O-メトキシエチル-RNA (MOE)、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-RNA、及び2'-F-ANAヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リボース基中の修飾は、リボース基の2'位に修飾を含む。いくつかの実施形態では、リボース基の2'位での修飾は、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、及び2'-O-(2-メトキシエチル)からなる群から選択される。

【0234】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、1つ以上の修飾糖を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、修飾糖のみを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、約10%、25%、50%、75%、又は90%を超える修飾糖を含む。いくつかの実施形態では、修飾糖は、二環式糖である。いくつかの実施形態では、修飾糖は、2'-O-メチルを含む。いくつかの実施形態では、修飾糖は、2'-フルオロを含む。いくつかの実施形態では、修飾糖は、2'-O-メトキシエチル基を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又は10個を超える修飾糖（例えば、2'-O-メチル又は2'-フルオロを含む）を含む。

10

【0235】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、ヌクレオシド間リンカー修飾及びヌクレオシド修飾の両方を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、約10%、25%、50%、75%、又は90%を超える修飾ヌクレオシド間リンカー、及び約10%、25%、50%、75%、又は90%を超える修飾糖を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又は10個を超える修飾ヌクレオシド間リンカー（例えば、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合）、及び1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又は10個を超える修飾糖（例えば、2'-O-メチル又は2'-フルオロを含む）を含む。

20

【0236】

いくつかの場合では、ガイドRNAは、真核生物、真菌、植物、哺乳動物、又はヒトゲノムポリヌクレオチド配列に相補的な配列を含む。いくつかの場合では、ガイドRNAは、真核生物ゲノムポリヌクレオチド配列に相補的な配列を含む。いくつかの場合では、ガイドRNAは、真菌ゲノムポリヌクレオチド配列に相補的な配列を含む。いくつかの場合では、ガイドRNAは、植物ゲノムポリヌクレオチド配列に相補的な配列を含む。いくつかの場合では、ガイドRNAは、哺乳動物ゲノムポリヌクレオチド配列に相補的な配列を含む。いくつかの場合では、ガイドRNAは、ヒトゲノムポリヌクレオチド配列に相補的な配列を含む。

30

【0237】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、30~250個のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、90個超のヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、245個未満のヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240個、又は240個超のヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、約30~約40個、約30~約50個、約30~約60個、約30~約70個、約30~約80個、約30~約90個、約30~約100個、約30~約120個、約30~約140個、約30~約160個、約30~約180個、約30~約200個、約30~約220個、約30~約240個、約50~約60個、約50~約70個、約50~約80個、約50~約90個、約50~約100個、約50~約120個、約50~約140個、約50~約160個、約50~約180個、約50~約200個、約50~約220個、約50~約240個、約100~約120個、約100~約140個、約100~約160個、約100~約180個、約100~約200個、約100~約220個、約100~約240個、約160~約180個、約160~約200個、約160~約220個、又は約160~約240個のヌクレオチドの長さである。

40

50

【0238】

MGエンドヌクレアーゼ系

ある特定の実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成された操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系が、本明細書に記載される。

【0239】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。

【0240】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109

～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号109～110及び2842～2854のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む操作されたエンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。

10

20

30

40

50

【0241】

いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、単一ガイド核酸である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、デュアルガイド核酸である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、RNAである。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼは、操作されたガイドポリヌクレオチドに非共有結合している。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドポリヌクレオチドに共有結合している。

【0242】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつアルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつアルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつアルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイ

50

オチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつアルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

【0243】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRAC 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRAC 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRAC 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRAC 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRAC 遺伝子内又は内因性

20

30

40

50

遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子内

10

20

30

40

50

又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに相補的な配列、又は配列番号119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び2582～2617のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。

10

【0244】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び2618～2653のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0245】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を

30

40

50

含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつB2M遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイ

10

20

30

40

50

ドポリヌクレオチドは、配列番号 159～184 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 159～184 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0246】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 185～210 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 185～210 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 185～210 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0247】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRBC1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 211～251 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRBC1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 211～251 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRBC1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 211～251 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRBC1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 211～251 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRBC1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 211～251 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TR

20

30

40

50

B C 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ T R B C 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ T R B C 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ T R B C 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ T R B C 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ T R B C 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 2 1 1 ~ 2 5 1 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【 0 2 4 8 】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 2 5 2 ~ 2 9 2 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 2 5 2 ~ 2 9 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 2 5 2 ~ 2 9 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 2 4 9 】

50

のいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC2遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号293~337のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC2遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号293~337のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC2遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号293~337のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC2遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号293~337のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号293~337のうちのいずれか1つに相補的な配列、又は配列番号293~337のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

20

30

【0250】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号338~382のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号338~382のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号338~382のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0251】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつANGPTL3遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号383~477、1392~1489、2120~2215、及び2312~2350のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1~27及び771~862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつANGPTL3遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハ

40

50

イブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対

10

20

30

40

50

して少なくとも約 97% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98% の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99% の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して 100% の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して 100% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。

10

20

30

【0252】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む。

【0253】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70% の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ PCSK9 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75% の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ PCSK9 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的

40

50

50

、かつPCSK9遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつPCSK9遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつPCSK9遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに相補的な配列、又は配列番号573～587及び1362～1376のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

20

30

40

50

【0254】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号588～602及び1377～1391のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号588～602及び1377～1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号588～602及び1377～1391のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0255】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつVCP遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号723～738及び755～762のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつVCP遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号723～738及び755～762のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつVCP遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的

50

標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 723～738 及び 755～762 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ VCP 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 723～738 及び 755～762 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 723～738 及び 755～762 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 723～738 及び 755～762 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

【0256】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 739～754 及び 763～770 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0257】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ AAVS1 遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ AAVS1 遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ AAVS1 遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ AAVS1 遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオ

30

40

50

50

たスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 928～949 及び 1012～1049 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0258】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号 950～971 及び 1050～1087 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0259】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ GPR146 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 70 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ GPR146 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ GPR146 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ GPR146 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1588～1656 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 85 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 90 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ GPR146 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは

10

20

30

40

50

、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 0 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ G P R 1 4 6 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ G P R 1 4 6 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 6 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ G P R 1 4 6 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 7 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ G P R 1 4 6 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 8 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ G P R 1 4 6 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1 ~ 2 7 及び 7 7 1 ~ 8 6 2 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ G P R 1 4 6 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【 0 2 6 0 】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つ

10

20

30

40

50

に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号1657～1725のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0261】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAPOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約70%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAPOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAPOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAPOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約85%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAPOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び2058～2088のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAPOA1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番

10

20

30

40

50

号 1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び 2058～2088 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ APOA1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び 2058～2088 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 96 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ APOA1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び 2058～2088 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 97 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ APOA1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び 2058～2088 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 98 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ APOA1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び 2058～2088 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号 1～27 及び 771～862 のうちのいずれか 1 つに対して 100 % の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ APOA1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び 2058～2088 のうちのいずれか 1 つに相補的な配列、又は配列番号 1726～1744、1764～1774、1866～1961、及び 2058～2088 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。

【0262】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1745～1763、1775～1785、1962～2057、及び 2089～2119 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 1745～1763、1775～1785、1962～20

10

20

30

40

50

５７、及び２０８９～２１１９のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、９５％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、配列番号１７４５～１７６３、１７７５～１７８５、１９６２～２０５７、及び２０８９～２１１９のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列を含む。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号１～２７及び７７１～８６２のうちのいずれか１つに対して少なくとも約７０％の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつＨＡＯ１遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号６１１～６３３、１７８９～１８２６、及び１８２７～１８６５のうちのいずれか１つに対して少なくとも約７０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号１～２７及び７７１～８６２のうちのいずれか１つに対して少なくとも約７５％の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつＨＡＯ１遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号６１１～６３３、１７８９～１８２６、及び１８２７～１８６５のうちのいずれか１つに対して少なくとも約７５％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号１～２７及び７７１～８６２のうちのいずれか１つに対して少なくとも約８０％の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつＨＡＯ１遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号６１１～６３３、１７８９～１８２６、及び１８２７～１８６５のうちのいずれか１つに対して少なくとも約８０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号１～２７及び７７１～８６２のうちのいずれか１つに対して少なくとも約８５％の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつＨＡＯ１遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号６１１～６３３、１７８９～１８２６、及び１８２７～１８６５のうちのいずれか１つに対して少なくとも約８５％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号１～２７及び７７１～８６２のうちのいずれか１つに対して少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつＨＡＯ１遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号６１１～６３３、１７８９～１８２６、及び１８２７～

10

20

30

40

50

1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHAO1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約96%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHAO1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約97%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHAO1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHAO1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、配列番号1～27及び771～862のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む、エンドヌクレアーゼと、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHAO1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに相補的な配列、又は配列番号611～633、1789～1826、及び1827～1865のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。

【0264】

細胞

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される操作されたエンドヌクレアーゼ系を含む細胞が、本明細書に記載される。

【0265】

いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞（例えば、植物細胞、動物細胞、原生生物細胞、若しくは真菌細胞）、哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞

10

20

30

40

50

、ベビーハムスター腎臓（BHK）、ヒト胎児腎臓（HEK）、マウス骨髄腫（NSO）、若しくはヒト網膜細胞）、不死化細胞（例えば、HeLa細胞、COS胞、HEK-293T細胞、MDCK細胞、3T3細胞、PC12胞、Huh7細胞、HepG2細胞、K562細胞、N2a細胞、若しくはSY5Y細胞）、昆虫細胞（例えば、Spodoptera frugiperda細胞、Trichoplusia ni細胞、Drosophila melanogaster細胞、S2細胞、若しくはHeliothis virescens細胞）、酵母細胞（例えば、Saccharomyces cerevisiae細胞、Cryptococcus細胞、若しくはCandida細胞）、植物細胞（例えば、実質細胞、厚角細胞、若しくは厚壁細胞）、真菌細胞（例えば、Saccharomyces cerevisiae細胞、Cryptococcus細胞、若しくはCandida細胞）、又は原核細胞（例えば、E. coli細胞、streptococcus細菌細胞、streptomyces土壌細菌細胞、若しくは古細菌細胞）である。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、不死化細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、昆虫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、酵母細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、植物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、真菌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、原核細胞である。

10

【0266】

いくつかの実施形態では、細胞は、A549、HEK-293、HEK-293T、BHK、CHO、HeLa、MRC5、Sf9、Cos-1、Cos-7、Vero、BSC1、BSC40、BMT10、WI38、HeLa、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2、Huh7、K562、初代細胞、又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、初代細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、初代細胞は、造血幹細胞（HSC）である。

20

【0267】

送達及びベクター

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ（例えば、融合エンドヌクレアーゼ又はキメラヌクレアーゼ）と、ガイドポリヌクレオチド、操作されたエンドヌクレアーゼ、又はガイドポリヌクレオチドと、を含む操作されたヌクレアーゼ系をコードする核酸配列が、本明細書に開示される。

30

【0268】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ系をコードする核酸は、DNA、例えば、直鎖状DNA、プラスミドDNA、又はミニサークルDNAである。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系をコードする核酸は、RNA、例えば、mRNAである。

【0269】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ系をコードする核酸は、核酸ベースのベクターによって送達される。いくつかの実施形態では、核酸ベースのベクターは、プラスミド（例えば、細胞の内側で自律的に複製することができる環状DNA分子）、コスミド（例えば、pWE若しくはsCosベクター）、人工染色体、ヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、P1由来人工染色体（PAC）、ファージミド、ファージ誘導体、バクミド、又はウイルスである。いくつかの実施形態では、核酸ベースのベクターは、pSF-CMV-NEO-NH2-PPT-3XFLAG、pSF-CMV-NEO-COOH-3XFLAG、pSF-CMV-PURO-NH2-GST-TEV、pSF-OBX20-COOH-TEV-FLAG(R)-6His、pCEP4 pDEST27、pSF-CMV-Ub-KrYFP、pSF-CMV-FMDV-daGFP、pEF1a-mCherry-N1ベクター、pEF1a-tdTomatoベクター、pSF-CMV-FMDV-Hygro、pSF-CMV-PGK-Puro、pMCP-tag(m)、pSF-CMV-PURO-NH2-CMYC、pSF-OBX20-BetaGal、pSF-OBX20-Flu

40

50

c、pSF-OXB20、pSF-Tac、pRI 101-AN DNA、pCamb i a2301、pTYB21、pKLAC2、pAc5.1/V5-His A、及びp DEST8からなるリストから選択される。

【0270】

いくつかの実施形態では、核酸ベースのベクターは、プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ミニプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、及びその誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CMV、CBA、EF1a、CAG、PGK、TRE、U6、UAS、T7、Sp6、lac、araBad、trp、Ptac、p5、p19、p40、シナプシン、CaMKII、GRK1、及びその誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、U6プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CAGプロモーターである。

10

【0271】

いくつかの実施形態では、核酸ベースのベクターは、ウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、アルファウイルス、パルボウイルス、アデノウイルス、AAV、バキュロウイルス、デングウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アネロウイルス、ボカウイルス、ワクシニアウイルス、又はレトロウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、アルファウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、パルボウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、アデノウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAVである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、バキュロウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、デングウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、レンチウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、ヘルペスウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、ポックスウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、アネロウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、ボカウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、ワクシニアウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、又はレトロウイルスである。

20

【0272】

いくつかの実施形態では、AAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh20、AAV-rh39、AAV-rh74、AAV-rhM4-1、AAV-hu37、AAV-Anc80、AAV-Anc80L65、AAV-7m8、AAV-PHP-B、AAV-PHP-EB、AAV-2.5、AAV-2tYF、AAV-3B、AAV-LK03、AAV-HSC1、AAV-HSC2、AAV-HSC3、AAV-HSC4、AAV-HSC5、AAV-HSC6、AAV-HSC7、AAV-HSC8、AAV-HSC9、AAV-HSC10、AAV-HSC11、AAV-HSC12、AAV-HSC13、AAV-HSC14、AAV-HSC15、AAV-TT、AAV-DJ/8、AAV-Myo、AAV-NP40、AAV-NP59、AAV-NP22、AAV-NP66、AAV-HSC16、又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ヘルペスウイルスは、HSVタイプ1、HSV-2、VZV、EBV、CMV、HHV-6、HHV-7、又はHHV-8である。

30

40

【0273】

いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAV1又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAV2又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAV3又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAV4又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAV5又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAV6又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAV7又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、AAV8又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、

50

形態では、ウイルスは、HHV-8又はその誘導体である。

【0275】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ又は操作されたエンドヌクレアーゼ系をコードする核酸は、非核酸ベースの送達系（例えば、非ウイルス送達系）によって送達される。いくつかの実施形態では、非ウイルス送達系は、リポソームである。いくつかの実施形態では、核酸は、脂質に関連する。脂質に関連する核酸は、いくつかの実施形態では、リポソームの水性内部に封入されるか、リポソームの脂質二重層内に散在するか、リポソーム及び核酸の両方に関連する結合分子を介してリポソームに付着されるか、リポソームに閉じ込められるか、リポソームと複合体化されるか、脂質を含有する溶液中に分散されるか、脂質と混合されるか、脂質と組み合わせられるか、脂質中に懸濁液として含まれるか、ミセルと含まれるか、若しくはミセルと複合体化されるか、又は別様に脂質に関連する。いくつかの実施形態では、核酸は、脂質ナノ粒子（LNPs）に含まれる。

10

【0276】

いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ又は操作されたエンドヌクレアーゼ系は、安定的又は一過性のいずれかで、任意の好適な方法で細胞内に導入される。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ又は操作されたエンドヌクレアーゼ系は、細胞にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、細胞は、操作されたエンドヌクレアーゼ又は操作されたエンドヌクレアーゼ系をコードする核酸構築物で形質導入又はトランスフェクトされる。例えば、細胞は、操作されたエンドヌクレアーゼ若しくは操作されたエンドヌクレアーゼ系をコードする核酸で形質導入されるか（例えば、操作されたエンドヌクレアーゼ若しくは操作されたエンドヌクレアーゼ系をコードするウイルスで）、又はトランスフェクトされるか（例えば、操作されたエンドヌクレアーゼ若しくは操作されたエンドヌクレアーゼ系をコードするプラスミドで）、又は操作されたエンドヌクレアーゼ若しくは操作されたエンドヌクレアーゼ系を翻訳される。いくつかの実施形態では、形質導入は、安定した形質導入又は一過性の形質導入である。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ若しくは操作されたエンドヌクレアーゼ系を発現するか、又は操作されたエンドヌクレアーゼ若しくは操作されたエンドヌクレアーゼ系を含有する細胞は、例えば、操作されたエンドヌクレアーゼ若しくは操作されたエンドヌクレアーゼ系がCRISPRヌクレアーゼを含む場合、1つ以上のgRNA分子で形質導入又はトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、操作されたエンドヌクレアーゼ又は操作されたエンドヌクレアーゼ系を発現するプラスミドは、エレクトロポレーション、一過性（例えば、リポフェクション）及び安定したゲノム統合（例えば、piggyback）、並びにウイルス形質導入（例えば、レンチウイルス若しくはAAV）、又は当業者に既知の他の方法を通して、細胞に導入される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集系は、1つ以上のポリペプチドとして細胞に導入される。いくつかの実施形態では、送達は、RNP複合体の使用を通して達成される。ポリペプチド及び／又はRNPの細胞への送達方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、エレクトロポレーションによるか、又は細胞圧搾による。

20

30

【0277】

核酸の送達の例示的な方法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション、エレクトロポレーション、安定したゲノム統合（例えば、piggyback）、マイクロインジェクション、バイオリステック、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン又は脂質核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ビリオン、及びDNAの薬剤強化取り込みが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、及び同第4,897,355号に記載され、リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Transfectam（商標）、Lipofectin（商標）、及びSF Cell Line 4D-Nucleofector X Kit（商標）（Lonza））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適であるカチオン性脂質及び中性脂質には、WO91/17424

40

50

及びWO91/16024の脂質が含まれる。いくつかの実施形態では、送達は、細胞（例えば、インビトロ若しくはエクスピボ投与）又は標的組織（例えば、インビボ投与）に対するものである。いくつかの実施形態では、核酸は、宿主細胞を特異的に標的化するリポソーム又はナノ粒子に含まれる。

【0278】

細胞への核酸の送達のための追加の方法が、当業者に既知である。例えば、US2003/0087817を参照されたい。

【0279】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載されるベクター又は核酸を含む細胞を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は、遺伝子編集系又はその一部を発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、エクスピボでゲノム編集される。いくつかの実施形態では、細胞は、インビボでゲノム編集される。

【0280】

脂質ナノ粒子

ある特定の実施形態では、細胞への操作されたエンドヌクレアーゼ系の送達のための本開示の操作されたエンドヌクレアーゼ系を含む脂質ナノ粒子が、本明細書に開示される。

【0281】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、操作されたエンドヌクレアーゼ系を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、操作されたエンドヌクレアーゼ又は操作されたエンドヌクレアーゼをコードする核酸と、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、操作されたエンドヌクレアーゼ系の1つ以上の成分を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、操作されたエンドヌクレアーゼ又は操作されたエンドヌクレアーゼをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、操作されたガイドポリヌクレオチドを含む。

【0282】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、操作されたエンドヌクレアーゼ系に繋がれている。

【0283】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、操作されたエンドヌクレアーゼ系又はその成分を細胞に送達するために使用される。いくつかの実施形態では、細胞は、特定の細胞型である。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞（例えば、植物細胞、動物細胞、原生生物細胞、若しくは真菌細胞）、哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）、ヒト胎児腎臓（HEK）、マウス骨髄腫（NS0）、若しくはヒト網膜細胞）、不死化細胞（例えば、HeLa細胞、COS細胞、HEK-293T細胞、MDCK細胞、3T3細胞、PC12細胞、Huh7細胞、HepG2細胞、K562細胞、N2a細胞、若しくはSY5Y細胞）、昆虫細胞（例えば、Spodoptera frugiperda細胞、Trichoplusia ni細胞、Drosophila melanogaster細胞、S2細胞、若しくはHeliothis virescens細胞）、酵母細胞（例えば、Saccharomyces cerevisiae細胞、Cryptococcus細胞、若しくはCandida細胞）、植物細胞（例えば、実質細胞、厚角細胞、若しくは厚壁細胞）、真菌細胞（例えば、Saccharomyces cerevisiae細胞、Cryptococcus細胞、若しくはCandida細胞）、又は原核細胞（例えば、E. coli細胞、streptococcus細菌細胞、streptomyces土壌細菌細胞、若しくは古細菌細胞）である。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、不死化細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、昆虫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、酵母細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、植物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、真菌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、原核細胞

10

20

30

40

50

である。いくつかの実施形態では、細胞は、A549、HEK-293、HEK-293T、BHK、CHO、HeLa、MRC5、Sf9、Cos-1、Cos-7、Vero、BSC 1、BSC 40、BMT 10、WI38、HeLa、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2、Huh7、K562、初代細胞、又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、初代細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、初代細胞は、造血幹細胞（HSC）である。

【0284】

本明細書に記載される脂質ナノ粒子は、4成分脂質ナノ粒子であり得る。こうしたナノ粒子は、RNA又は他の核酸（例えば、合成RNA、mRNA、又はインビトロで合成されたmRNA）の送達のために構成され得、WO2012/135805（A2）に記載されるように概して製剤化され得る。こうしたナノ粒子は、概して、（a）カチオン性脂質（例えば、図45に記載される脂質のいずれか）、（b）中性脂質（例えば、DSPC若しくはDOPE）、（c）ステロール（例えば、コレステロール若しくはコレステロール類似体）、又は（d）PEG修飾脂質（例えば、PEG-DMG）を含み得る。

【0285】

本明細書で「C12-200」と称されるカチオン性脂質は、Love et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869及びLiu and Huang, Molecular Therapy. 2010 669-670によって開示されている。カチオン性脂質製剤は、ポリヌクレオチド、一次構築物、又はRNA（例えば、mRNA）に加えて、3又は4つ以上のいずれかの成分を含む粒子を含み得る。一例として、ある特定のカチオン性脂質を含む製剤としては、98N12-5（又は図45に記載される他の構造のいずれか）が挙げられるがこれらに限定されず、42%のリピドイド、48%のコレステロール、及び10%のPEG（C14以上のアルキル鎖長）を含有し得る。別の例として、ある特定のリピドイドを有する製剤としては、これらに限定されないが、C12-200が挙げられ、50%のカチオン性脂質、10%のジステロイルホスファチジルコリン、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-DMGを含み得る。

【0286】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、US10709779に記載されるように製剤化される。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、PEG修飾脂質、ステロール、及び非カチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、図45に示されるカチオン性脂質からなる群から選択されるか、又はそれらのうちのいずれかを含んでいる。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ナノ粒子は、約20～60%のカチオン性脂質：約5～25%の非カチオン性脂質：約25～55%のステロール、及び約0.5～15%のPEG修飾脂質のモル比を有する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ナノ粒子は、約50%のカチオン性脂質、約1.5%のPEG修飾脂質、約38.5%のコレステロール、及び約10%の非カチオン性脂質のモル比を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ナノ粒子は、約55%のカチオン性脂質、約2.5%のPEG修飾脂質、約32.5%のコレステロール、及び約10%の非カチオン性脂質のモル比を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、イオン性カチオン性脂質であり、非カチオン性脂質は、中性脂質であり、ステロールは、コレステロールである。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ナノ粒子は、50：38.5：10：1.5のカチオン性脂質：コレステロール：PEG2000-DMG：DSPC又はDMG：DOPEのモル比を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される脂質ナノ粒子は、コレステロール、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、1,1'-（（2-（4-（2-（（2-（ビス（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）））））ピペラジン-1-イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン-2-オール）（C12-200）、及びDMG-PEG-2000を47.5：16：35：1.5のモル比で含むことができる。

10

20

30

40

50

【0287】

使用方法

本開示の遺伝子編集系は、例えば、核酸編集（例えば、遺伝子編集）又は核酸分子への結合（例えば、配列特異的結合）などの様々な用途に使用され得る。そのような系は、例えば、対象において疾患を引き起こし得る遺伝的に受け継がれた変異を修正する（例えば、除去するか、若しくは置き換える）ため、細胞におけるその機能を確認するために遺伝子を不活性化するため、疾患を引き起こす遺伝子エレメントを検出する診断ツールとして（例えば、逆転写されたウイルスRNA若しくは疾患を引き起こす変異をコードする増幅されたDNA配列の切断を介して）、特異的なヌクレオチド配列（例えば、細菌内の抗生物質耐性をコードする配列）を標的化し、検出するためのプローブと組み合わせた不活性化した酵素として、ウイルスゲノムを標的化することによってウイルスを不活性にするか、若しくは宿主細胞に感染することができないようにするため、価値ある小分子、高分子、若しくは二次代謝産物を産生するように生物を操作するための遺伝子を付加するか、若しくは代謝経路を修正するため、進化的選択のための遺伝子駆動エレメントを確立するため、並びに／又はバイオセンサーとして外来小分子及びヌクレオチドによる細胞摂動を検出するために、使用され得る。

10

【0288】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたエンドヌクレアーゼ（例えば、キメラヌクレアーゼ又は融合エンドヌクレアーゼ）を使用した遺伝子編集のための方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼは、クラス2、タイプIIエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、タイプIIエンドヌクレアーゼは、配列番号10に対して少なくとも55%（例えば、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%）の同一性を有する配列を有する。

20

【0289】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される操作されたヌクレアーゼ系を細胞に提供することを含む、標的核酸を修飾するための方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、エンドヌクレアーゼと、操作されたガイドポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、二本鎖である。いくつかの実施形態では、標的核酸は、二本鎖DNAである。いくつかの実施形態では、標的核酸は、一本鎖である。

30

【0290】

いくつかの実施形態では、方法は、細胞のゲノムに修飾を導入するために使用される。いくつかの実施形態では、修飾は、挿入、欠失、又は変異である。いくつかの実施形態では、方法は、細胞のゲノムに部位特異的挿入、欠失、及び／又は変異（例えば、挿入及び変異）を導入するために使用される。いくつかの実施形態では、方法は、細胞のゲノムへの部位特異的挿入を促進するために、核酸テンプレートと組み合わせて使用される。

【0291】

いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞ゲノム又は細胞に含まれるベクターは、修飾される。いくつかの実施形態では、細胞ゲノムは、エキスピボで修飾される。いくつかの実施形態では、細胞ゲノムは、インピボで修飾される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、アルブミン遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内のアルブミン遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号67～86のうちのいずれか1つ、又は配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号67～86のうちのいずれか1つを含む配列、又は配列番号67～86のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する

40

50

配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつアルブミン遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 67～86 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0292】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、TRAC 遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内の TRAC 遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つを含む配列、又は配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ TRAC 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 119～138、922～924、972～991、1088～1183、1280～1320、2390～2485、及び 2582～2617 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNA は、配列番号 139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び 2618～2653 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 139～158、925～927、992～1011、1184～1279、1321～1361、2486～2581、及び 2618～2653 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。

【0293】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、B2M 遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内の B2M 遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号 159～184 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 159～184 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 159～184 のうちのいずれか 1 つを含む配列、又は配列番号 159～184 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 %、95 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ B2M 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成さ

れたスパーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号159～184のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号185～210のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号185～210のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0294】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、TRBC1遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内のTRBC1遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号211～251のうちのいずれか1つ、又は配列番号211～251のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号211～251のうちのいずれか1つを含む配列、又は配列番号211～251のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC1遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号211～251のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号252～292のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号252～292のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0295】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、TRBC2遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内のTRBC2遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号293～337のうちのいずれか1つ、又は配列番号293～337のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号293～337のうちのいずれか1つを含む配列、又は配列番号293～337のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC2遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号293～337のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号338～382のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号338～382のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0296】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、ANGPTL3遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内のANGPTL3遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作

されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つを含む配列、又は配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ ANGPTL3 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 383～477、1392～1489、2120～2215、及び 2312～2350 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNA は、配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 478～572、1490～1587、2216～2311、及び 2351～2389 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。

10

20

30

40

50

【0297】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、PCSK9 遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内の PCSK9 遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つを含む配列、又は配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ PCSK9 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 573～587 及び 1362～1376 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNA は、配列番号 588～602 及び 1377～1391 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 588～602 及び 1377～1391 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0298】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、VCP 遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内の VCP 遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号 723～738 及び 755～762 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 723～738 及び 755～762 のうちのい

れか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つを含む配列、又は配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつVCP遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号723~738及び755~762のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号739~754及び763~770のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号739~754及び763~770のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

10

20

30

40

50

【0299】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、AAVS1遺伝子座を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内のAAVS1遺伝子座を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号928~949及び1012~1049のうちのいずれか1つ、又は配列番号928~949及び1012~1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号928~949及び1012~1049のうちのいずれか1つを含む配列、又は配列番号928~949及び1012~1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAAVS1遺伝子座内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号928~949及び1012~1049のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号950~971及び1050~1087のうちのいずれか1つによる配列、又は配列番号950~971及び1050~1087のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【0300】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、GPR146遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内のGPR146遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号1588~1656のうちのいずれか1つ、又は配列番号1588~1656のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号1588~1656のうちのいずれか1つを含む配列、又は配列番号1588~1656のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列に相補的な配列にハイブリダイズするか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ

G P R 1 4 6 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 8 8 ~ 1 6 5 6 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、g R N A は、配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 1 6 5 7 ~ 1 7 2 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするか、又はそれを標的化する。

【 0 3 0 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、A P O A 1 遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内の A P O A 1 遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つを含む配列、又は配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ A P O A 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含み、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 1 7 2 6 ~ 1 7 4 4、1 7 6 4 ~ 1 7 7 4、1 8 6 6 ~ 1 9 6 1、及び 2 0 5 8 ~ 2 0 8 8 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、g R N A は、配列番号 1 7 4 5 ~ 1 7 6 3、1 7 7 5 ~ 1 7 8 5、1 9 6 2 ~ 2 0 5 7、及び 2 0 8 9 ~ 2 1 1 9 のうちのいずれか 1 つによる配列、又は配列番号 1 7 4 5 ~ 1 7 6 3、1 7 7 5 ~ 1 7 8 5、1 9 6 2 ~ 2 0 5 7、及び 2 0 8 9 ~ 2 1 1 9 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列をハイブリダイズか、又はそれを標的化する。

【 0 3 0 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、H A O 1 遺伝子を修飾するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞内の H A O 1 遺伝子を標的化するためのものである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸）は、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つ、又は配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 6 1 1 ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つを含む配列、又はいくつかの実施形態では、本開示は、細胞における ~ 6 3 3、1 7 8 9 ~ 1 8 2 6、及び 1 8 2 7 ~ 1 8 6 5 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、若しくは 9 9 % の配列同一性を有する配列に相補的な配列をハイブリダイズか、又は配列を標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、操作されたガイドポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ H A O 1 遺伝子内又は内因性遺伝子のイントロン内の標的核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含み、操作

10

20

30

40

50

されたガイドポリヌクレオチドは、配列番号 611～633、1789～1826、及び 1827～1865 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0303】

キット

いくつかの実施形態では、本開示は、例えば、標的 DNA 配列を修飾することが可能なキメラヌクレアーゼ又は遺伝子編集系の成分をコードするヌクレオチド配列を含む、本明細書に記載されるキメラヌクレアーゼ又は遺伝子編集系の様々な成分をコードする 1 つ以上の核酸構築物を含む、キットを提供する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、遺伝子編集系成分の発現を駆動する異種プロモーターを含む。

10

【0304】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるキメラヌクレアーゼ又は遺伝子編集系のいずれかは、治療、診断、又は研究用途におけるその使用を促進するために、医薬、診断、又は研究キットに組み込まれる。キットは、本明細書に開示されるベクターのいずれかを収容する 1 つ以上の容器、及び使用説明書を含み得る。

【0305】

キットは、研究者による本明細書に記載される方法の使用を促進するように設計され得、多くの形態をとることができる。キットの組成物の各々は、適用可能である場合、液体形態で（例えば、溶液で）、又は固体形態（例えば、乾燥粉末）で提供され得る。ある特定の場合では、組成物のうちのいくつかは、例えば、キットとともに提供される場合とそうではない場合がある、好適な溶媒又は他の種（例えば、水又は細胞培地）の添加によって、（例えば、活性形態に）構成可能又は別様に処理可能であり得る。本明細書で使用される場合、「説明書」は、指示及び／又は販売促進の構成要素を定義し、典型的には、本開示の包装上にある、又はそれに関連する書面による説明書を伴うことができる。説明書はまた、ユーザが、説明書がキットに関連するものであることを明確に認識するような任意の様式で提供される任意の口頭又は電子の説明書、例えば、視聴覚（例えば、ビデオテープ、DVD など）、インターネット、及び／又はウェブベースの通信などを含むことができる。書面による説明書は、いくつかの実施形態では、医薬品又は生物学的製品の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって規定された形態であり、その説明書はまた、動物投与のための製造、使用、又は販売の機関による承認も反映し得る。

20

30

【実施例】

【0306】

以下の実施例は、本開示の様々な実施形態を例証する目的のために挙げられ、いかなる様式でも本開示を限定するように意図されていない。本実施例は、本明細書に記載される方法とともに、現在、好ましい実施形態を代表し、例示的であり、本開示の範囲に対する制限として意図されていない。特許請求の範囲によって定義される本開示の趣旨内に包含される、その中の変更及び他の使用が、当業者に想起されるであろう。

【0307】

実施例 1－プラスミド

キメラ配列を、E. coli 発現に対してコドン最適化し、合成し、pET21 ベクターにクローニングした。pET21-MG3-6+MG15-1 (WP) 及び pET21-MG3-6+MG15-1 (P) を構築するために、プライマー P441～P446 を使用して、pMGX3-6 及び pMGX15-1 から遺伝子断片を増幅した。得られた PCR 産物を、精製し、pAL3 (ClaI 及び XhoI により消化した) にアセンブリした。クローニングしたキメラ遺伝子の DNA 配列を、サンガー配列決定によって確認した。

40

【0308】

実施例 2－バイオインフォマティクス分析

本明細書で利用する CRISPR タイプ IIEndヌクレアーゼは、推定上の HNH 及び RuvC 触媒残基の存在に基づくヌクレアーゼ活性を有すると予測した。加えて、構造

50

予測は、PAMとの相互作用のガイド、標的、及び認識に關与する残基を示唆した。重要な残基の位置に基づき、タイプII CRISPRエンドヌクレアーゼの予測ドメイン構築物は、とりわけ、3つのRuvCドメイン、HNHエンドヌクレアーゼドメイン、認識ドメイン及びPAM相互作用ドメインを含んでいた。CRISPRアレイの隣の完全長タイプIIエンドヌクレアーゼをコードするゲノム配列について、tracrRNA配列を予測し、これらを、ヌクレアーゼが単一ガイドRNAとして使用するよう操作した。

【0309】

選択したRNAガイドCRISPRタイプIIエンドヌクレアーゼ配列の多重配列アライメントを実施した（図3Aを参照）。MG3-6及びMG15-1のタンパク質構造を、予測及び表示した。キメラ組成物の詳細を表1Bに示す。ガイドRNA最適化とともに予測した構造モデル情報によって導いて（図7を参照）、密接に關連するタイプII CRISPRエンドヌクレアーゼ、並びに遠く關連するタイプII CRISPRエンドヌクレアーゼからのドメインを連結することによって、非標準PAMを認識するタンパク質バリエーションを操作した。

【0310】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1 B-キメラ組成物

キメラ	N 末端	C 末端	配列例(配列番号)
MG3-6+MG1-4	MG3-6 (1-742)	MG1-4 (750-1025)	1
MG3-6+MG1-5	MG3-6 (1-742)	MG1-5 (789-1077)	2
MG3-6+MG1-6	MG3-6 (1-742)	MG1-6 (773-1059)	3
MG3-6+MG1-7	MG3-6 (1-742)	MG1-7 (775-1061)	4
MG3-6+MG2-4	MG3-6 (1-742)	MG2-4 (876-1201)	5
MG3-6+MG2-7	MG3-6 (1-742)	MG2-7 (817-1080)	6
MG3-6+MG3-1	MG3-6 (1-742)	MG3-1 (684-1050)	7
MG3-6+MG3-2	MG3-6 (1-742)	MG3-2 (755-1134)	8
MG3-6+MG3-3	MG3-6 (1-742)	MG3-3 (750-1132)	9
MG3-6+MG3-4	MG3-6 (1-742)	MG3-4 (743-1134)	10
MG3-6+MG3-7	MG3-6 (1-742)	MG3-7 (751-1131)	11
MG3-6+MG3-8	MG3-6 (1-742)	MG3-8 (741-1132)	12
MG3-6+MG4-2	MG3-6 (1-742)	MG4-2 (747-1043)	13
MG3-6+MG4-5	MG3-6 (1-742)	MG4-5 (747-1055)	14
MG3-6+MG6-3	MG3-6 (1-742)	MG6-3 (709-1027)	15
MG3-6+MG14-1	MG3-6 (1-742)	MG14-1 (756-1003)	16
MG3-6+MG15-1	MG3-6 (1-742)	MG15-1 (729-1082)	17
MG3-6+MG16-1	MG3-6 (1-742)	MG16-1 (787-1154)	18
MG3-6+MG16-2	MG3-6 (1-742)	MG16-2 (796-1227)	19
MG3-6+MG18-1	MG3-6 (1-742)	MG18-1 (997-1348)	20
MG3-6+MG21-1	MG3-6 (1-742)	MG21-1 (740-1098)	21
MG3-6+MG22-1	MG3-6 (1-742)	MG22-1 (1092-1521)	22
MG3-6+MG23-1	MG3-6 (1-742)	MG23-1 (1008-1377)	23
MG3-6+SaCas9	MG3-6 (1-742)	SaCas9 (706-1053)	24
MG3-6+SpCas9	MG3-6 (1-742)	SpCas9 (988-1368)	25
MG29-1+MG29-5 (WP)	MG29-1 (1-560)	MG29-5 (556-856)	109
MG3-6+MG15-1(WP)	MG3-6 (1-840)	MG15-1 (818-1082)	26
MG3-6+MG15-1(P)	MG3-6 (1-922)	MG15-1 (931-1082)	27
MG29-1+MG57-1 (WP)	MG29-1 (1-560)	MG57-1 (633-945)	110

10

20

30

40

【0311】

実施例 3-インビトロ PAM 濃縮アッセイ

本明細書で利用したヌクレアーゼの PAM 配列を、E. coli 可溶化物ベースの発現系又は再構成したインビトロ翻訳のいずれかでの発現を介して決定した。E. coli コドン最適化タンパク質配列を転写し、T7 プロモーターの制御下で PCR 断片から翻訳した。この混合物を、タンパク質特異的 sgRNA 及び PAM プラスミドライブラリー (PAM ライブラリー U67 / U40) を用いて、反応緩衝液 (10 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂) に希釈した。プラスミドのライブラリーは、単一ガイドでそれに続く 8 N の混合塩基と合致するスペーサー配列を含有し、

50

そのサブセットは、正しいPAMを有すると推定した。1～3時間後、反応を停止し、DNAクリーンアップキットを介してDNAを回収した。DNAを平滑末端ライゲーション反応に供し、インタクトな環状プラスミドを変えないで、アダプター配列を切断したライブラリープラスミドに加えた。PCRを、ライブラリー並びにアダプター配列に特異的なプライマー（LA065及びLA125）を用いて行い、ゲル上で分解して、活性タンパク質複合体を識別した（図4及び図6を参照）。得られたPCR産物を、8のサイクルパラメーターを用いたハイスループット配列決定プライマーを使用して、PCRによって更に増幅した。NGS分析に供した試料を定量化し、一緒にプールした。NGSライブラリーを精製及び定量化した。開始8Nライブラリーのサブセットであったこのライブラリーを配列決定することによって、正しいPAMを含有する配列を明らかにした（図5A及び図5Bを参照）。

10

【0312】

実施例4－インビボ標的化のための単一ガイド設計

本明細書で使用される単一ガイド（sgRNA）構造は、5'－22ntプロトスペーサー－リピーター－tracr－3'の構造を含んだ。マウスアルブミンイントロン1を標的化する20個の単一ガイドを設計した。いくつかの場合では、ガイドは、化学的に合成され、ガイドの化学修飾を含んだ。

【0313】

実施例5－mRNAのインビトロ転写

キメラ（例えば、MG3－6＋MG3－4（配列番号10））をコードするコード配列（CDS）を、マウスに対してコドン最適化し、化学的に合成した。CDSをmRNA産生ベクターpMG010にクローニングした。pMG010の構築物は、以下のエレメントの配列を含んでいた： T7プロモーター－5'UTR－開始コドン－核局在化シグナル1－CDS－核局在化シグナル2－停止コドン－3'UTR－107ヌクレオチドポリAテール（配列番号108）。MG3－6＋MG3－4 CDSを含有するプラスミドpMG010を、200mlの細菌培養物から精製した。ベクターを、ポリAテールの下流のプラスミドを直線化するために、SapIで一晩消化した。直線化ベクターを、フェノール／クロロホルムDNA抽出を使用して精製した。インビトロ転写を、50℃で1時間、T7 RNAポリメラーゼを使用して行った。インビトロで転写したmRNAを、37℃において10分間DNaseで処置し、mRNAを精製した。mRNAを260nmでの吸光度によって定量化し、そのサイズ及び純度を自動電気泳動によって評価し、期待サイズであることを示した。

20

30

【0314】

実施例6－Hepa1－6細胞のトランスフェクション及びアルブミン標的化

300ngのmRNA及び350ngの配列番号67～86の各単一ガイドRNA（sgRNA）を、以下のようにHepa1－6細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクションの1日前に、Hepa1－6細胞を、24時間後に70%のコフルエントを達成する密度で24ウェルに播種した。翌日、MG3－6＋MG3－4キメラmRNA及び単一ガイドをHepa1－6細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、培地を吸引し、ゲノムDNAを精製した（図9A及び図9Bを参照）。結果は、最も性能の高いsgRNAが、g87（配列番号72）及びg34（配列番号70）と指定したものであり、gRNA g45（配列番号67）、g44（配列番号71）、g59（配列番号76）、g78（配列番号68）、g84（配列番号79）、及びg33（配列番号80）についてもかなりの編集が起きたことを示す。

40

【0315】

実施例7－ゲノム編集した試料のサンガー配列決定

単一ガイドRNA（例えば、アルブミン遺伝子）によって標的化したゲノムの領域に隣接するプライマーを設計した。プライマー57F（配列番号97）及び1072R（配列番号98）を使用したPCR増幅を行い、1016bpのPCR産物を得た。PCR産物を精製し、濃縮し、100ngのPCR産物を、8ピコモルの個々の配列決定プライマー

50

(132F、282F、446R、及び460F、配列番号99～102)を使用したサンガー配列決定に供した。サンガー配列決定の結果を分析し、データをプロットした(図9Bを参照)。

【0316】

実施例8-mRNAトランスフェクションを使用したマウスHAO-1遺伝子のMG3-6/3-4ヌクレアーゼガイドスクリーニング

マウスHAO-1遺伝子のエクソン1～4(グリコール酸オキシダーゼをコードする)を標的化するMG3-6/3-4ヌクレアーゼのガイドRNAを、PAM配列3'NNAAA(A/T)N5'を検索することによってインシリコで同定した。マウスゲノム内で最も少ない予測オフターゲット部位を有する合計23個のガイドを、単一ガイドRNAとして化学的に合成した。300ngのmRNA及び120ngの単一ガイドRNAを、以下のようにHepa1-6細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの1日前に、Pen/Strepを含まないDMEM、10%FBS、1×NEAA培地中で10日未満培養したHepa1-6細胞を、TC処理した24ウェルプレートに播種した。細胞を計数し、60,000個の生細胞と同等の体積を各ウェルに加えた。追加の予め平衡化した培地を各ウェルに加えて、総体積を500μLにした。トランスフェクションの日に、300ngのMG3-6-MG-3-4コードmRNA(配列番号108)及び120ngのsgRNA(配列番号34の足場配列)と一緒に混合し、Hepa1-6細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、培地をHepa1-6細胞の各ウェルから吸引除去し、自動磁気ビーズ精製によってゲノムDNAを精製した。ガイドの活性を、表2及び3に要約し、使用したプライマーを表4に要約する。

【0317】

【表3】

表2: mRNAトランスフェクションにより送達したマウスHAO1におけるMG3-6/3-4ガイドの平均活性

ガイド名	PAM	配列番号	スペーサー配列	編集活性 (平均インデル%)
mH364-1	GCAAATG	611	GTATGACTATTACAGGTCTGGG	0
mH364-2	GAAAATG	612	AAATAGCAAAGTTTCTTACCTA	0
mH364-3	AGAAAAT	613	TAAATAGCAAAGTTTCTTACCT	0
mH364-6	CTAAAAC	614	ATTGGCATGCTGACTCTCTGTC	0
mH364-7	AGAAAAG	615	GAGCTGGCCACTGTGCGAGGTA	45.7
mH364-9	ACAAATA	616	CAGGTAAGGGGTGTCCACAGTC	0
mH364-10	TGAAAAA	617	ATTCTATGTATCTATTCTAGGA	0
mH364-11	GAAAAAC	618	TTCTATGTATCTATTCTAGGAT	31
mH364-15	CCAAATC	619	AAATTTCCCTTAGGAGAAAATG	0
mH364-16	GAAAATG	620	GTCTCCAAAATTTCCCTTAGGA	10.7
mH364-17	AGAAAAT	621	TGTCTCCAAAATTTCCCTTAGG	0
mH364-18	GGAAATT	622	TGATTTGGCATTTTCTCCTAAG	0
mH364-19	CAAAATT	623	TCAGCAAGTCCACTGTTGTCTC	0
mH364-20	CCAAAAT	624	TTCAGCAAGTCCACTGTTGTCT	25.9
mH364-22	CAAAATG	625	AGTAGAGAAATGACAAACCTCT	0
mH364-23	TCAAAAT	626	AAGTAGAGAAATGACAAACCTC	20.7

【 0 3 1 8 】

【 表 4 】

表 3 : mRNA トランスフェクションにより送達したマウス HAO 1 での、より寛容な PAM 設計を用いた MG 3 - 6 / 3 - 4 ガイドの試験の結果

ガイド名	PAM	配列番号	スペーサー配列	編集活性 (インデル%)	R ²
mH364-4	AGAAACT	627	ACATCCAAGCATTTTCTAGGTA	0	1
mH364-5	TAAAACA	628	TTGGCATGCTGACTCTCTGTCC	0	1
mH364-8	ACAAAGA	629	CGCTGGATGCAACTGTACATCT	0	0.99
mH364-12	AAAAACT	630	TCTATGTATCTATTCTAGGATG	0	0.99
mH364-13	TGAAACC	631	TCTATTCTAGGATGAAAAACTT	0	0.99
mH364-14	TCAAAGT	632	AGAAAATGCCAAATCATTGGTT	0	0.99
mH364-21	GTAAAGG	633	ATTGACATCACTGCCTATTGTT	0	1

【 0 3 1 9 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4： 最初の 4 つのエクソンの各々で P C R に使用され、サンガー配列決定に使用される、マウス H A O 1 遺伝子用に設計したプライマー。

標的エクソン	使用	プライマー名	配列番号	プライマー配列
マウス H A O 1 エクソン 1	フォワード PCR	PCR_mHE1_F_+233	634	GTGACCAACCCTACCCGTTT
	リバーズ PCR	PCR_mHE1_R_-553	635	GCAAGCACCTACTGTCTCGT
	配列決定	Seq_mHE1_F_+139	636	GTCTAGGCATACAATGTTTGCTCA
マウス H A O 1 エクソン 2	フォワード PCR	HAO1_E2_F5721	637	CAACGAAGGTTCCCTCCAGG
	リバーズ PCR	HAO1_E2_R6271	638	GGAAGGGTGTTCGAGAAGGA
	配列決定	5938F Seq_HAO1_E2	639	CTATGCAAGGAAAAGATTTGGCC
マウス H A O 1 エクソン 3	フォワード PCR	HAO1_E3_F23198	640	TGCCCTAGACAAGCTGACAC
	リバーズ PCR	HAO1_E3_R23879	641	CAGATTCTGGAAGTGGCCCA
	配列決定	HAO1_E3_F23198	642	フォワード PCR プライマーと同じ
マウス H A O 1 エクソン 4	フォワード PCR	PCR_mHE4_F_+300	643	GGCTGGCTGAAAATAGCATCC
	リバーズ PCR	HAO1_E4_R31650	644	AGGTTTGGTTCCTCACCT
	配列決定	PCR_mHE4_R_-149	645	TCTGCCATGAAGGCATATGGAC

【 0 3 2 0 】

実施例 9 - M G 3 - 6 / 3 - 4 及び M G 3 - 6 タイプ I I ヌクレアーゼについてのガイド化学最適化

40 個の異なる化学的に修飾したガイド (m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 0 ~ m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 4 4 と命名) を設計し、これらのガイドのうちの 39 個の活性を試験した。1 つのガイドである m H 3 6 3 4 - 3 4 - 3 2 は、R N A 合成に失敗し、したがって、これを試験しなかった。様々な化学修飾を挿入するためにモデルとして選択したガイドスレーサー配列は、マウス肝細胞株である H e p a 1 - 6 細胞におけるガイドスクリーニングにおいて最も活性なガイドであることが証明されたため、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 (アルブミンイントロン 1 を標的化する) であった (表 5 及び図 10 を参照)。

【 0 3 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5 : H e p a 1 - 6 細胞における化学的に修飾したガイドの活性

ガイド	編集活性 (インデル%)
mAlb3634-13	BLOD
mAlb3634-16	BLOD
mAlb3634-19	BLOD
mAlb3634-20	BLOD
mAlb3634-24	BLOD
mAlb3634-30	BLOD
mAlb3634-45	19.5
mAlb3634-44	16.5
mAlb3634-53	BLOD
mAlb3634-59	22
mAlb3634-64	BLOD
mAlb3634-72	BLOD
mAlb3634-73	BLOD
mAlb3634-74	BLOD
mAlb3634-78	9
mAlb3634-81	2
mAlb3634-84	15
mAlb3634-87	49
mAlb3634-34	62
mAlb3634-33	20.5

B L O D = 検出限界未満

【 0 3 2 2 】

MG3-6 / 3-4 の sgRNA は、5' 末端に位置するスペーサー、続いて CRISPR リピート及びトランス活性化 CRISPR RNA (tracr) を含む。CRISPR リピート及び tracr は、MG3-6 ヌクレアーゼのものと同一である (図 11A、図 11B)。CRISPR リピート及び tracr は、3つのステムループを含む構造化 RNA を形成する (図 11A)。リボースの 2' ヒドロキシルをメチル基で置き換えるか、又はホスホジエステル骨格をホスホロチオエート (PS) で置き換えることによって、ステムループの異なる領域を修飾した。更に、ガイドの 5' のスペーサーを、2'-O-メチル又は 2'-フッ素塩基及び PS 結合の混合物で修飾した。設計した化学修飾の異なる

る組み合わせを、mAlb3634-34-0～mAlb3634-34-44と呼び、それぞれの配列を表6に示す。

【0323】

全く同じ塩基配列を有するが、異なる化学修飾を有する39個の単一ガイドの編集活性を、MG3-6/3-4をコードするmRNA及びガイドの共トランスフェクションによってHepa1-6細胞で評価し、編集活性をガイド対照（AltR）の編集活性と比較して示す。結果を表6及び図12に示す。

【0324】

【表7-1】

表6： 化学的に修飾したMG3-6/3-4ガイドの配列、及びMG3-6/3-4 mRNAと共トランスフェクトしたときのHepa1-6細胞におけるそれらの活性

ガイド	配列番号	配列	活性%
mAlb3634-34-0	646	rCrUrUrArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrUrUrU	71.8
mAlb3634-34-1	647	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	124.5
mAlb3634-34-2	648	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArU*mU*mG*mU*mU*mU*mU	121.7
mAlb3634-34-3	649	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	120.5
mAlb3634-34-4	650	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	63.3
mAlb3634-34-5	651	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUmCmUmUmAmArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	0.8
mAlb3634-34-6	652	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*mGmAmUmUmCmUmUmAmArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-7	653	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmCmAmUmCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	113.0

【0325】

【表 7 - 2】

ガイド	配列番号	配列	活性 %
mAlb3634-34-8	654	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	115.6
mAlb3634-34-9	655	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCmGmAmAmArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrCrArUrCmCmUmUmCmCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCmAmAmUmArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	105.0
mAlb3634-34-10	656	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	101.6
mAlb3634-34-11	657	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrC*mA*mC*mC*mG*mU*mC*mC*mG*mU*mU*mU*mC*mC*mA*mA*mU*mArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	57.0
mAlb3634-34-12	658	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrC*mA*mC*mC*mG*mU*mC*mC*mG*mU*mU*mU*mU*mC*mC*mA*mA*mU*mA*mG*mG*mA*mG*mC*mG*mG*mG*mC*mG*mG*mU*mA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-13	659	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUmCmUmUmAmArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-14	670	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrC*mA*mC*mC*mG*mU*mC*mC*mG*mU*mU*mU*mU*mC*mC*mA*mA*mU*mA*mG*mG*mA*mG*mC*mG*mG*mG*mC*mG*mG*mU*mA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-15	671	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCmUmCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCmAmAmUmAmGmGmAmGmCmGmGmCmGmGmUmAmUmGmU*mU*mU*mU	34.5

【 0 3 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

ガイド	配列番号	配列	活性 %
mAlb3634-34-19	672	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUr rUrGrArGrArArUrC*mG*mA*mA*mArGrArUrUrCrUrUrArA*mU *mA*mArGrGrCrArUrC*mC*mU*mU*mC*mCrGrArUrGrCrU*m G*mA*mC*mU*mU*mC*mU*mCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrC rC*mA*mA*mU*mArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*m U*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-17	673	mC*mU*mU*i2FAi2FGi2FGi2FUi2FCi2FAi2FGi2FUi2FGi2FAi2F Ai2FGi2FAi2FGi2FArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArG rArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGr CrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUr ArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	147.7
mAlb3634-34-22	674	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrU rUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAr GrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUc mAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*m GmGmAmGmCmGmGmGmCmGmGmU*mA*mU*mG*mU*mU* mU*mU	44.2
mAlb3634-34-23	675	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrU rUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAm GmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUr CrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU* rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmCmGmGmU*mA*mU*mG* mU*mU*mU*mU	60.0
mAlb3634-34-24	676	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrU rUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAm GmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUr CrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU* rA*mGmGmAmGmCmGmGmCmGmGmU*mA*mU*mG*mU* mU*mU*mU	77.4
mAlb3634-34-25	677	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrU rUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAm GmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrA*rC*rU *rU*rC*rU*rC*mAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCr A*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmCmGmGmU*mA*mU *mG*mU*mU*mU*mU	50.5
mAlb3634-34-26	678	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArG rUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGr GrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrA rCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrG rGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	61.9
mAlb3634-34-27	679	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArG rUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrAr ArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUc AmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*rGr GrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	67.4

【 0 3 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

ガイド	配列番号	配列	活性 %
mAlb3634-34-29	680	mC*i2FU*i2FU*i2FA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	114.4
mAlb3634-34-30	681	mC*i2FU*i2FU*i2FA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	113.9
mAlb3634-34-31	682	mC*i2FU*i2FU*i2FA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmA mCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	100.0
mAlb3634-34-32	683	mC*mU*mU*i2FA*i2FGi2FGi2FU i2FCi2FAi2FGi2FU i2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*mGmAmUmUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmA mCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmGmCmGmUmA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	NT
mAlb3634-34-33	684	mC*mU*mU*i2FA*i2FGi2FGi2FU i2FCi2FAi2FGi2FU i2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*mGmAmUmUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-34	685	mC*mU*mU*mA*i2FGi2FGi2FU i2FCi2FAi2FGi2FU i2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU	68.9
mAlb3634-34-35	686	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCmG*mA*mA*mA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCmC*mU*mU*mC*mC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCmA*mA*mU*mA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	65.0
mAlb3634-34-36	687	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0

10

20

30

40

【 0 3 2 8 】

【表 7 - 5】

ガイド	配列番号	配列	活性 %
mAlb3634-34-37	688	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-38	689	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmCmGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-39	690	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArGrUrUrGrArGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrG*rA*rC*rU*rU*rC*rU*rC*rArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	3.7
mAlb3634-34-40	691	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArGrUrUrGrArGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*mGmAmUmUrCrUrUrArArUmAmAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*mGmAmUmGmCrU*rG*rA*mCmUmUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-41	692	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArGrUrUrGrArGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	47.1
mAlb3634-34-42	693	mC*mU*mU*mA*i2FGi2FGi2FUi2FCi2FAi2FGi2FUi2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGi2FAi2FAi2FGi2FArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	66.7
mAlb3634-34-43	694	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrAmGmGmAmGmCmGmGmGmCmGmGmUmA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	73.8
mAlb3634-34-44	695	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmCmCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	84.9

(r=天然のリボース塩基、m=2' -O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合)

10

20

30

40

【0329】

同じ塩基配列及び代替の化学修飾（（AltR1 / AltR2）を有するガイドを、対照として使用した。これらのガイドにおけるスペーサー配列は、マウスゲノムのアルブミンイントロン1の22のヌクレオチド領域を標的化する。ガイドmAlb3634-34-0（化学修飾なし）は、AltR1 / AltR2ガイドに対して72%の活性を示した。ガイドmAlb3634-34-1は、AltR1 / AltR2ガイドと比較して124%の活性を示し、これは、編集のためのガイドの安定性の重要性である、mAlb3634-34-1が、mAlb3634-34-0より安定であることを示している（図13及び図14を参照）。重要なことに、mAlb3634-34-17は、AltR1 /

50

A l t R 2 と比較して 1 4 7 % の活性を保持していた。スパーサーにおける 2' - O - フッ素の取り込みは、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 3 5 の安定性を大幅に増大させ、ガイドは、6 5 % の活性を保持していた。m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 3 5 は、M G 3 - 6 / 3 - 4 ガイドの 3 つのステムループのループに 2' - O - メチル及び P S 結合を含有する。重要なことに、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 4 2 は、活性の 6 6 % を保持し、このガイドは、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 1 7 と同じ数のフッ素をスパーサー中に含有するが、g R N A に存在する全てのループに P S 結合も含有する。m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 2 7 は、6 7 % の活性を保持し、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 2 9 は、1 1 4 % の活性を保持した。修飾のうち、これらのガイドは、それぞれ、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 2 7 及び m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 2 9 について、第 1 のステムループのループにおける P S 結合及び第 1 のステムループの第 1 の鎖における 2' - O - メチル基を含む。これら 2 つの修飾を組み合わせる（第 1 のステムループの第 1 の鎖における 2' - O - メチル及び第 1 のステムループのループにおける P S 結合）とき、ガイドは、それらの活性を失い（m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 3 3、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 3 6、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 - 3 8）、これは、g R N A / タンパク質の相互作用の複雑さを示し、単純な外挿の結果は、予測することが困難であることを示している。

10

【0330】

化学修飾を有さないガイド（天然 R N A）と比較して、これらの化学的に修飾したガイドの安定性を試験するために、粗細胞抽出物を使用した安定性アッセイを使用した。ガイド R N A は、インビトロ又はインビボで哺乳動物細胞に送達したとき曝露するヌクレアーゼの混合物を含むため、哺乳動物細胞由来の粗細胞抽出物を選択した。H e p a 1 - 6 細胞を、コンフルエント細胞の 1 5 c m のディッシュ当たり 3 m L の冷 P B S を加え、細胞スクレーパーを使用してディッシュの表面から細胞を放出することによって収集した。細胞を、1 0 分間、2 0 0 g でペレット化し、将来的な使用のために - 8 0 ° C で凍結した。安定性アッセイのため、細胞を 4 体積の冷 P B S 中に再懸濁した（例えば、1 0 0 m g のペレットについて、細胞を 4 0 0 μ L の冷 P B S 中に再懸濁した）。T r i t o n X - 1 0 0 を、0 . 2 % (v / v) の濃度で加え、細胞を 1 0 秒間ボルテックスし、1 0 分間氷上に置き、1 0 秒間再びボルテックスした。T r i t o n X - 1 0 0 は、細胞膜を破壊するが、使用した濃度ではタンパク質を不活化又は変性しない、マイルドな非イオン性界面活性剤である。安定性反応を氷上でセットアップし、2 ピコモルの各ガイド（1 μ L の 2 μ M ストック）とともに 2 0 μ l の細胞粗抽出物を含んだ。投入、0 . 5 時間、1 時間、4 時間、9 時間、及び場合により 2 1 時間（時間は、各試料をインキュベートする時間の長さを指している）を含むガイド当たり、6 種の反応をセットアップした。試料を 0 . 5 時間～最長 2 1 時間、3 7 ° C でインキュベートし、一方、投入対照を氷上に 5 分間置いた。各インキュベーション期間の後、反応を、3 0 0 μ L のフェノール及びグアニジンチオシアネートの混合物（T r i 試薬）を加えることによって停止させ、これにより全てのタンパク質を直ちに変性させ、リボヌクレアーゼを効率的に阻害し、その後の R N A の回収を促進する。T r i 試薬を加えた後、試料を 1 5 秒間ボルテックスし、- 2 0 ° C で保存した。R N A を試料から抽出し、1 0 0 μ L のヌクレアーゼを含まない水中で溶出した。修飾したガイドの検出を行い、プライマー及びプローブを、m A l b 3 6 3 4 - 3 4 s g R N A 中の配列を特異的に検出するよう設計し、これは、ガイドの全てについて同じである。データを、投入試料に対する残りの s g R N A の割合の関数としてプロットした（表 7 及び 8 ; 図 1 3 及び図 1 4 を参照）。

20

30

40

【0331】

50

【表 8】

表 7 : 37℃で9時間にわたる化学修飾したMG 3-6 / 3-4 ガイドの安定性

	残りのガイドの割合(%)			
時間(時間)	mAlb3634-34-0	mAlb3634-34-1	mAlb3634-34-17	mAlb3634-34-29
0.5	48.6	71.6	84.9	91.3
1	45.5	111.3	69.2	79.8
4	8.3	84.3	46.6	58.2
9	1.2	41.3	36.6	16.5
時間(時間)	mAlb3634-34-30	mAlb3634-34-35	mAlb3634-34-36	mAlb3634-34-42
0.5	86.7	ND	91.7	91.7
1	90.1	146.4	57.8	72.1
4	53.5	128.3	61.9	72.1
9	21.9	100	62.6	47.3

【0332】

【表 9】

表 8 : 37℃で21時間にわたる化学修飾したMG 3-6 / 3-4 ガイドの安定性

	残りのガイドの割合			
時間(時間)	mAlb3634-34-0	mAlb3634-34-1	mAlb3634-34-35	mAlb3634-34-42
0.5	68.3	61.9	104.6	80.9
1	51.0	59.6	84.0	73.2
4	9.6	51.0	52.6	70.7
9	1.7	40.4	51.2	45.3
21	0.03	1.4	24.8	15.6

【0333】

安定性アッセイは、ガイドの5'末端及び3'末端に3つの2'-O-メチル及び3つのPS結合を導入することで、安定性が有意に改善されたことを示した(図13及び図14を参照)。mAlb3634-17及びmAlb3634-42のように、5'及び3'修飾に追加の2'-フルオールを加えても、図13に示すように、早期時点(最長9時間)では明らかな利点を示さず、安定性アッセイを21時間にわたって行ったとき、安定性のわずかな改善が明白であった(図14を参照)。ステムループの全てのループに2'-O-メ

チル及びPS結合を含むこと (mAlb3634-35) は、図13に示す通り、5' 及び3' 末端に化学修飾を有するガイド (mAlb3634-1) と比較して、安定性が明白により大きく増大した。しかしながら、これらの結果を繰り返したとき、かつより長い時点で、この増大は、より早い時点では明白ではなくなり、図14に示す通り、最長21時間までのより遅い時間点で明白になった。個別のステムループの第1の鎖に2'-O-メチルを含むことは、mAlb3634-0 及び mAlb3634-29 及び mAlb3634-30 を比較することによって示すように、最長9時間の安定性の利点をもたらさなかった。全てのステムループの第1の鎖における2'-O-メチル及び全てのステムループのループにおけるPS結合の組み合わせを有するmAlb3634-36は、末端を修飾したガイド (mAlb3634-0) と比較したとき、9時間の明白な増大した安定性を示した。しかしながら、このガイドは、Hepa1-6細胞においてmRNAトランスフェクションを介して試験したとき、活性ではなかった。一般に、追加の修飾 (例えば、2'-O-メチル、2'-O-フルオール又はPS結合) を、末端を修飾したガイドに加えることは、最長9時間の早期時点での安定性に大きな利点をもたらさず (図13)、安定性のわずかな増加は、より長い時点で明らかになった (図14)。このgRNAの大きなサイズ (110 nt) 及び高度に構造化された性質は、より短い又はあまり構造化されていないガイドRNAよりも本質的に安定的になり得、これにより、安定性に対する化学修飾の利点が限定される。ガイドの5' 及び3' 末端を修飾すると、ヌクレアーゼに対する良好なレベルの保護を提供するように思われる。しかしながら、ガイドに追加の修飾を加えることは、これらのタイプの修飾が免疫原性を低減する可能性があるため、インビボでより多くの利点をもたらし得る。

10

20

【0334】

実施例10-タイプV-Aヌクレアーゼのタンパク質組換え

タイプIIヌクレアーゼより迅速なPAM交換の能力を拡大するために、タンパク質組換えのため、3つのタイプのV-Aヌクレアーゼを選択した。ブレイクポイントを、予測した構造情報に基づき選択した (表1B)。タイプII酵素組換えと同様に、タイプVキメラを、タンパク質が密接に関連するファミリーから組換えたとき、活性を示した。インビトロPAM濃縮及びNGS分析により、キメラのPAMがC末端親から遺伝するという一貫した結果が明らかになった。ブレイクポイント最適化を利用することによって遠く関連するファミリーからのタンパク質組換えの可能性のある構造破壊を回避することが可能であり得る (図15A~図15B)。

30

【0335】

実施例11-HEK293T細胞におけるTRACのDNAレベルでの遺伝子編集結果の分析

以下の表9A及び配列番号119~158に記載するsgRNAを含むMG3-6/4RNP (104 pmolのタンパク質/300 pmolのガイド) のヌクレオフェクションを、エレクトロポレーションによってHEK293T細胞 (200,000細胞/ウェル) に行った。トランスフェクションの3日後、細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。NGSベースのDNA配列決定での使用に適したPCRプライマーを生成し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分析して、遺伝子編集を決定した (図16)。結果は、sgRNAであるC1、F2、及びB3が、インデルの誘導に最も効果的であり、sgRNAであるD2、H2、A3、及びC3についてもかなりの編集が起きたことを示す。

40

【0336】

【表 10-1】

表 9 A : 実施例 11 で使用した gRNA 及び標的化配列

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	119	MG3- 6/3-4 TRAC A1	mG*mC*mC*rGrUrGrUrArCrCrArGrCrUrGrArGrArGrArCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	120	MG3- 6/3-4 TRAC B1	mA*mU*mU*rCrArCrCrGrArUrUrUrGrArUrUrCrUrCrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	121	MG3- 6/3-4 TRAC C1	mG*mA*mU*rUrCrUrGrArUrGrUrGrUrArUrArUrCrArCrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	122	MG3- 6/3-4 TRAC D1	mA*mA*mC*rArGrUrGrCrUrGrUrGrGrCrCrUrGrGrArGrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	123	MG3- 6/3-4 TRAC E1	mG*mG*mC*rUrGrGrGrGrArArGrArArGrGrUrGrUrCrUrUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	124	MG3- 6/3-4 TRAC F1	mG*mU*mU*rUrUrGrUrCrUrGrUrGrArUrArUrArCrArCrArU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	125	MG3- 6/3-4 TRAC G1	mU*mU*mA*rCrUrUrGrUrGrArCrArCrArUrUrGrUrUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	126	MG3- 6/3-4 TRAC H1	mU*mU*mG*rUrGrArCrArCrArUrUrGrUrUrUrGrArGrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【0337】

【表 10 - 2】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	127	MG3- 6/3-4 TRAC A2	mU*mG*mU*rGrArCrArCrArUrUrUrGrUrUrUrGrArGrArArUr rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	128	MG3- 6/3-4 TRAC B2	mA*mU*mU*rUrGrUrUrUrGrArGrArArUrCrArArArArUrCrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	129	MG3- 6/3-4 TRAC C2	mU*mU*mC*rCrUrGrUrGrArUrGrUrCrArArGrCrUrGrGrUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	130	MG3- 6/3-4 TRAC D2	mU*mC*mC*rUrGrUrGrArUrGrUrCrArArGrCrUrGrGrUrCrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	131	MG3- 6/3-4 TRAC E2	mG*mU*mC*rArArGrCrUrGrGrUrCrGrArGrArArArGrCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	132	MG3- 6/3-4 TRAC F2	mA*mG*mC*rUrUrGrArCrArUrCrArCrArGrGrArArCrUrUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	133	MG3- 6/3-4 TRAC G2	mG*mA*mC*rArUrCrArCrArGrGrArArCrUrUrUrCrUrArArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	134	MG3- 6/3-4 TRAC H2	mU*mU*mA*rCrArGrArUrArCrGrArArCrCrUrArArArCrUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【0338】

【表 10 - 3】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	135	MG3- 6/3-4 TRAC A3	mA*mA*mA*rArCrCrUrGrUrCrArGrUrGrArUrUrGrGrGrUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	136	MG3- 6/3-4 TRAC B3	mG*mA*mU*rUrGrGrGrUrUrCrCrGrArArUrCrCrUrCrCrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	137	MG3- 6/3-4 TRAC C3	mG*mG*mA*rArCrCrCrArArUrCrArCrUrGrArCrArGrGrUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	138	MG3- 6/3-4 TRAC D3	mU*mU*mG*rArArArGrUrUrUrArGrGrUrUrCrGrUrArUrCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC 標的部 位の DNA 配 列	139	MG3- 6/3-4 TRAC A1	GCCGTGTACCAGCTGAGAGACT
TRAC 標的部 位の DNA 配 列	140	MG3- 6/3-4 TRAC B1	ATTCACCGATTTTGATTCTCAA
TRAC 標的部 位の DNA 配 列	141	MG3- 6/3-4 TRAC C1	GATTCTGATGTGTATATCACAG
TRAC 標的部 位の DNA 配 列	142	MG3- 6/3-4 TRAC D1	AACAGTGCTGTGGCCTGGAGCA

【0339】

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRAC 標的部位の DNA 配列	143	MG3- 6/3-4 TRAC E1	GGCTGGGGAAGAAGGTGTCTTC
TRAC 標的部位の DNA 配列	144	MG3- 6/3-4 TRAC F1	GTTTTGTCTGTGATATACACAT
TRAC 標的部位の DNA 配列	145	MG3- 6/3-4 TRAC G1	TTACTTTGTGACACATTTGTTT
TRAC 標的部位の DNA 配列	146	MG3- 6/3-4 TRAC H1	TTGTGACACATTTGTTTGAGAA
TRAC 標的部位の DNA 配列	147	MG3- 6/3-4 TRAC A2	TGTGACACATTTGTTTGAGAAT
TRAC 標的部位の DNA 配列	148	MG3- 6/3-4 TRAC B2	ATTTGTTTGAGAATCAAAATCG
TRAC 標的部位の DNA 配列	149	MG3- 6/3-4 TRAC C2	TTCCTGTGATGTCAAGCTGGTC
TRAC 標的部位の DNA 配列	150	MG3- 6/3-4 TRAC D2	TCCTGTGATGTCAAGCTGGTCG
TRAC 標的部位の DNA 配列	151	MG3- 6/3-4 TRAC E2	GTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCT

【0340】

10

20

30

40

50

【表 10-5】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRAC 標的部位の DNA 配列	152	MG3- 6/3-4 TRAC F2	AGCTTGACATCACAGGAACTTT
TRAC 標的部位の DNA 配列	153	MG3- 6/3-4 TRAC G2	GACATCACAGGAACTTTCTAAA
TRAC 標的部位の DNA 配列	154	MG3- 6/3-4 TRAC H2	TTACAGATACGAACCTAAACTT
TRAC 標的部位の DNA 配列	155	MG3- 6/3-4 TRAC A3	AAAACCTGTCAGTGATTGGGTT
TRAC 標的部位の DNA 配列	156	MG3- 6/3-4 TRAC B3	GATTGGGTTCCGAATCCTCCTC
TRAC 標的部位の DNA 配列	157	MG3- 6/3-4 TRAC C3	GGAACCCAATCACTGACAGGTT
TRAC 標的部位の DNA 配列	158	MG3- 6/3-4 TRAC D3	TTGAAAGTTTAGGTTTCGTATCT
(r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合)			

【0341】

実施例 12 - HEK293T 細胞における B2M の DNA レベルでの遺伝子編集結果の分析

以下の表 9B 及び配列番号 159 ~ 210 に記載する sgRNA を含む MG3-6/4 RNP (104 pmol のタンパク質 / 300 pmol のガイド) のヌクレオフェクションを、エレクトロポレーションを使用して HEK293T 細胞 (200,000 細胞) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA 配列決定での使用に適した PCR プライマーを生成し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分

析して、遺伝子編集を決定した（図 17）。結果は、sgRNAであるA1、G1、B2、H2、及びB4が、編集を誘導するのに最も効果的であり、sgRNAであるC1、D1、A2、H1、E2、F2、G2、A3、C3、及びD3についてもかなりの編集が検出されたことを示す。

【0342】

【表 11-1】

表 9 B：実施例 12 で使用した gRNA 及び標的化配列

カテゴリー	配列番号	名称	配列
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	159	MG3-6/3-4 B2M A1	mU*mC*mA*rCrGrCrUrGrGrArUrArGrCrCrUrCrCrArGrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	160	MG3-6/3-4 B2M B1	mG*mG*mU*rUrUrArCrUrCrArCrGrUrCrArUrCrCrArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	161	MG3-6/3-4 B2M C1	mA*mC*mU*rCrArCrGrUrCrArUrCrCrArGrCrArGrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	162	MG3-6/3-4 B2M D1	mU*mC*mA*rUrCrCrArGrCrArGrArArUrGrGrArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	163	MG3-6/3-4 B2M E1	mA*mG*mA*rGrArArUrGrGrArArArGrUrCrArArArUrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	164	MG3-6/3-4 B2M F1	mC*mG*mA*rCrArUrUrGrArArGrUrUrGrArCrUrUrArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	165	MG3-6/3-4 B2M G1	mU*mU*mG*rArCrUrUrArCrUrGrArArGrArArUrGrGrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【0343】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	166	MG3-6/3-4 B2M H1	mU*mU*mA*rCrUrGrArArGrArArUrGrGrArGrArGrArArArGrArArUrGrArArGrArArUrCrGrArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	167	MG3-6/3-4 B2M A2	mU*mA*mC*rUrGrArArGrArArUrGrGrArGrArGrArGrArArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	168	MG3-6/3-4 B2M B2	mA*mC*mU*rGrArArGrArArUrGrGrArGrArGrArGrArArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	169	MG3-6/3-4 B2M C2	mU*mC*mU*rUrUrCrUrArUrCrUrCrUrUrGrUrArCrUrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	170	MG3-6/3-4 B2M D2	mU*mA*mC*rUrArCrArCrUrGrArArUrUrCrArCrCrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	171	MG3-6/3-4 B2M E2	mA*mC*mU*rArCrArCrUrGrArArUrUrCrArCrCrCrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	172	MG3-6/3-4 B2M F2	mC*mU*mA*rCrArCrUrGrArArUrUrCrArCrCrCrCrArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	173	MG3-6/3-4 B2M G2	mA*mU*mA*rCrUrCrArUrCrUrUrUrUrCrArGrUrGrGrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 4 4 】

50

【表 1 1 - 3】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	174	MG3-6/3-4 B2M H2	mG*mA*mA*rUrUrCrArGrUrGrUrArGrUrArCrArArGrArGrAr rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	175	MG3-6/3-4 B2M A3	mG*mA*mG*rArUrArGrArArArGrArCrArGrUrCrCrUrUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	176	MG3-6/3-4 B2M B3	mC*mA*mG*rUrCrCrUrUrGrCrUrGrArArArGrArCrArArGrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	177	MG3-6/3-4 B2M C3	mA*mG*mU*rCrArArCrUrUrCrArArUrGrUrCrGrGrArUrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	178	MG3-6/3-4 B2M D3	mA*mA*mA*rCrCrCrArGrArCrArCrArUrArGrCrArArUrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	179	MG3-6/3-4 B2M E3	mA*mA*mC*rCrCrArGrArCrArCrArUrArGrCrArArUrUrCrAr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	180	MG3-6/3-4 B2M F3	mC*mU*mG*rCrUrGrGrArUrGrArCrGrUrGrArGrUrArArArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	181	MG3-6/3-4 B2M G3	mA*mC*mC*rUrGrArArUrCrUrUrUrGrGrArGrUrArCrCrUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 4 5 】

【表 1 1 - 4】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	182	MG3-6/3-4 B2M H3	mU*mG*mC*rUrGrCrUrUrArCrArUrGrUrCrUrCrGrArUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	183	MG3-6/3-4 B2M A4	mG*mC*mU*rGrCrUrUrArCrArUrGrUrCrUrCrGrArUrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	184	MG3-6/3-4 B2M B4	mC*mU*mG*rCrUrUrArCrArUrGrUrCrUrCrGrArUrCrUrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
B2M 標的部位の DNA 配列	185	MG3-6/3-4 B2M A1	TCACGCTGGATAGCCTCCAGGC
B2M 標的部位の DNA 配列	186	MG3-6/3-4 B2M B1	GGTTTACTCACGTCATCCAGCA
B2M 標的部位の DNA 配列	187	MG3-6/3-4 B2M C1	ACTCACGTCATCCAGCAGAGAA
B2M 標的部位の DNA 配列	188	MG3-6/3-4 B2M D1	TCATCCAGCAGAGAATGGAAAG
B2M 標的部位の DNA 配列	189	MG3-6/3-4 B2M E1	AGAGAATGGAAAGTCAAATTTC
B2M 標的部位の DNA 配列	190	MG3-6/3-4 B2M F1	CGACATTGAAGTTGACTTACTG

【 0 3 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 5】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
DNA sequence of B2M target site	191	MG3-6/3-4 B2M G1	TTGACTTACTGAAGAATGGAGA
DNA sequence of B2M target site	192	MG3-6/3-4 B2M H1	TTACTGAAGAATGGAGAGAGAA
DNA sequence of B2M target site	193	MG3-6/3-4 B2M A2	TACTGAAGAATGGAGAGAGAAT
DNA sequence of B2M target site	194	MG3-6/3-4 B2M B2	ACTGAAGAATGGAGAGAGAATT
DNA sequence of B2M target site	195	MG3-6/3-4 B2M C2	TCTTTCTATCTCTTGACTACA
DNA sequence of B2M target site	196	MG3-6/3-4 B2M D2	TACTACACTGAATTCACCCCCA
DNA sequence of B2M target site	197	MG3-6/3-4 B2M E2	ACTACACTGAATTCACCCCCAC
DNA sequence of B2M target site	198	MG3-6/3-4 B2M F2	CTACACTGAATTCACCCCCACT

【 0 3 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 6】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
DNA sequence of B2M target site	199	MG3-6/3-4 B2M G2	ATACTCATCTTTTTCAGTGGGG
DNA sequence of B2M target site	200	MG3-6/3-4 B2M H2	GAATTCAGTG TAGTACAAGAGA
DNA sequence of B2M target site	201	MG3-6/3-4 B2M A3	GAGATAGAAAGACCAGTCCTTG
DNA sequence of B2M target site	202	MG3-6/3-4 B2M B3	CAGTCCTTGCTGAAAGACAAGT
DNA sequence of B2M target site	203	MG3-6/3-4 B2M C3	AGTCAACTTCAATGTCGGATGG
DNA sequence of B2M target site	204	MG3-6/3-4 B2M D3	AAACCCAGACACATAGCAATTC
DNA sequence of B2M target site	205	MG3-6/3-4 B2M E3	AACCCAGACACATAGCAATTCA
DNA sequence of B2M target site	206	MG3-6/3-4 B2M F3	CTGCTGGATGACGTGAGTAAAC

【 0 3 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 7】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
DNA sequence of B2M target site	207	MG3-6/3-4 B2M G3	ACCTGAATCTTTGGAGTACCTG
DNA sequence of B2M target site	208	MG3-6/3-4 B2M H3	TGCTGCTTACATGTCTCGATCT
DNA sequence of B2M target site	209	MG3-6/3-4 B2M A4	GCTGCTTACATGTCTCGATCTA
DNA sequence of B2M target site	210	MG3-6/3-4 B2M B4	CTGCTTACATGTCTCGATCTAT
(r=天然のリボース塩基、m=2' -O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合)			

10

20

30

【0 3 4 9】

実施例 1 3 - T 細胞における T R A C の D N A 及び表現型レベルでの遺伝子編集結果の分析

初代 T 細胞を、負の選択を使用して P M B C から精製した。以下の表 9 A 及び配列番号 1 1 9 ~ 1 5 8 に記載する選択した s g R N A を含む M G 3 - 6 / 4 R N P (1 0 4 p m o l のタンパク質 / 1 2 0 p m o l のガイド) のヌクレオフェクションを、エレクトロポレーションを使用して T 細胞 (2 0 0 , 0 0 0) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム D N A を調製した。N G S ベースの D N A 配列決定での使用に適した P C R プライマーを生成し、最適化し、各ガイド R N A の個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分析して、遺伝子編集を決定した。フローサイトメトリーによる分析のため、ヌクレオフェクションの 3 日後、1 0 0 , 0 0 0 個の T 細胞を抗 C D 3 抗体で 4 ° C において 3 0 分間染色し、フローサイトメトリーによって分析した (図 1 8) 。結果は、s g R N A である C 1 、D 2 、F 2 、H 2 、A 3 、B 3 、C 3 、及び D 3 が、s g R N A である C 1 及び B 3 によって行われたほとんどの編集で、かなりの編集を示したことを示した。

40

【0 3 5 0】

実施例 1 4 - T 細胞における B 2 M の D N A レベルでの遺伝子編集結果の分析

初代 T 細胞を、負の選択を使用して P M B C から精製した。以下の表 9 B 及び配列番号 1 5 9 ~ 2 1 0 に記載する選択した s g R N A を含む M G 3 - 6 / 4 R N P (1 0 4 p m o l のタンパク質 / 1 2 0 p m o l のガイド) のヌクレオフェクションを、エレクトロ

50

ポレーションを使用してT細胞（200,000）に行った。トランスフェクションの3日後に細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。NGSベースのDNA配列決定での使用に適したPCRプライマーを生成し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分析して、遺伝子編集を決定した（図19）。

【0351】

実施例15－T細胞におけるTRBC1及びTRBC2の表現型レベルでの遺伝子編集結果の分析

初代T細胞を、負の選択を使用してPBMCから精製した。以下の表9C及び配列番号211～382に記載するsgRNAを含むMG3-6/4 RNP（104 pmolのタンパク質／120 pmolのガイド）のヌクレオフェクションを、エレクトロポレーションを使用してT細胞（200,000）に行った。フローサイトメトリーによる分析のため、ヌクレオフェクションの3日後、100,000個のT細胞を抗CD3抗体で4℃において30分間染色し、フローサイトメトリーによって分析した（図20）。結果は、TRBC1の最も性能の高いsgRNAが、A1、B1、E1、G4、H4、及びB5であったことを示す（図20）。同様に、TRBC2の最も性能の高いsgRNAは、D1、H1、及びA5であった。

【0352】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1】

表 9 C : 実施例 1 5 で使用した g R N A 及び標的化配列

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	211	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A1	mC*mA*mG*rArArGrCrArGrArGrArUrCrUrCrCrArCrArCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	212	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B1	mC*mC*mA*rCrGrUrGrGrArGrCrUrGrArGrCrUrGrGrUrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	213	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C1	mA*mG*mU*rCrCrArGrUrUrCrUrArCrGrGrGrCrUrCrUrCrGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	214	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D1	mG*mA*mU*rUrArGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrArCrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	215	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E1	mA*mU*mU*rArGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	216	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F1	mU*mU*mA*rGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	217	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G1	mU*mG*mA*rGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArGrGrGrArArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	218	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H1	mC*mA*mG*rGrUrArGrCrArGrArCrArArGrArCrUrArGrArU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 5 3 】

【表 1 2 - 2】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	219	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A2	mA*mG*mG*rUrArGrCrArGrArCrArArGrArCrUrArGrArUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	220	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B2	mA*mG*mC*rArGrArCrArArGrArCrUrArGrArUrCrCrArArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	221	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C2	mG*mG*mA*rArCrCrArGrCrGrCrArCrArCrCrArUrGrArArGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	222	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D2	mG*mU*mG*rGrCrUrGrArCrArUrCrUrGrCrArUrGrGrCrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	223	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E2	mG*mG*mC*rCrUrGrGrGrArGrUrCrUrGrUrGrCrCrArArCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	224	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F2	mC*mU*mG*rArCrUrUrUrArCrUrUrUrArArUrUrGrCrCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	225	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G2	mU*mG*mA*rCrUrUrUrArCrUrUrUrUrArArUrUrGrCrCrUrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	226	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H2	mG*mA*mC*rUrUrUrArCrUrUrUrUrArArUrUrGrCrCrUrArU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 5 4 】

【表 1 2 - 3】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	227	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A3	mG*mG*mG*rArArGrGrArGrArArGrCrUrGrGrArGrUrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	228	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B3	mG*mG*mA*rArGrGrArGrArArGrCrUrGrGrArGrUrCrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	229	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C3	mA*mA*mC*rUrCrCrUrGrGrCrUrCrUrUrArArUrArArCrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	230	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D3	mA*mA*mC*rUrUrUrCrUrCrUrUrCrUrGrCrArGrGrUrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	231	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E3	mA*mC*mU*rCrCrArCrUrUrCrCrArGrGrGrCrUrGrCrCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	232	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F3	mC*mU*mC*rCrArCrUrUrCrCrArGrGrGrCrUrGrCrCrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	233	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G3	mU*mC*mC*rUrUrUrCrUrCrUrUrGrArCrCrUrGrCrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	234	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H3	mA*mG*mC*rCrArGrGrArGrUrUrGrUrGrArGrGrArUrUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 5 5 】

【表 1 2 - 4】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	235	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A4	mA*mG*mU*rArGrUrArGrGrCrCrArUrUrGrArCrArCr rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	236	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B4	mU*mG*mC*rArArGrUrUrArUrCrUrUrCrUrGrArGrGrCrArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	237	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C4	mA*mG*mU*rUrArUrCrUrUrCrUrGrArGrGrCrArCrCrUrGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	238	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D4	mG*mU*mU*rArUrCrUrUrCrUrGrArGrGrCrArCrCrUrGrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	239	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E4	mU*mC*mA*rArGrArArCrCrArUrGrArGrArGrArGrGrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	240	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F4	mC*mA*mA*rGrArArCrCrArUrGrArGrArGrArGrGrArGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	241	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G4	mU*mU*mA*rCrCrCrGrArGrGrUrArArArGrCrCrArCrArGrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	242	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H4	mC*mC*mG*rArGrGrUrArArArGrCrCrArCrArGrUrCrUrGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 5 6 】

【表 1 2 - 5】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	243	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A5	mC*mA*mG*rUrCrUrGrArArArGrArArArGrCrArGrGrArGrArGrUrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	244	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B5	mA*mG*mU*rCrUrGrArArArGrArArArGrCrArGrGrArGrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	245	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C5	mG*mU*mC*rUrGrArArArGrArArArGrCrArGrGrArGrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	246	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D5	mG*mA*mA*rArGrArArArGrCrArGrGrArGrArGrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	247	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E5	mG*mA*mG*rArCrCrUrUrArUrUrUrUrCrArUrArGrGrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	248	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F5	mG*mA*mU*rGrArGrArGrUrUrArCrArCrArGrGrCrCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	249	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G5	mA*mG*mC*rUrGrCrUrUrGrGrCrUrCrUrGrUrUrGrGrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	250	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H5	mU*mG*mU*rUrGrGrGrCrUrGrArGrArArUrCrUrGrGrGrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 5 7 】

【表 1 2 - 6】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	251	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A6	mG*mG*mA*rArCrArCrUrUrGrUrUrCrArGrGrUrCrCrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 標的部 位の DNA 配 列	252	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A1	CAGAAGCAGAGATCTCCCACAC
TRBC1 標的部 位の DNA 配 列	253	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B1	CCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG
TRBC1 標的部 位の DNA 配 列	254	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C1	AGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG
TRBC1 標的部 位の DNA 配 列	255	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D1	GATTAGGTGAGACCAGCTACCA
TRBC1 標的部 位の DNA 配 列	256	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E1	ATTAGGTGAGACCAGCTACCAG
TRBC1 標的部 位の DNA 配 列	257	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F1	TTAGGTGAGACCAGCTACCAGG
TRBC1 標的部 位の DNA 配 列	258	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G1	TGAGACCAGCTACCAGGGAAAA
TRBC1 標的部 位の DNA 配 列	259	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H1	CAGGTAGCAGACAAGACTAGAT

【0 3 5 8】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 7】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 標的部位の DNA 配列	260	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A2	AGGTAGCAGACAAGACTAGATC
TRBC1 標的部位の DNA 配列	261	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B2	AGCAGACAAGACTAGATCCAAA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	262	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C2	GGAACCAGCGCACACCATGAAG
TRBC1 標的部位の DNA 配列	263	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D2	GTGGCTGACATCTGCATGGCAG
TRBC1 標的部位の DNA 配列	264	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E2	GGCCTGGGAGTCTGTGCCAACT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	265	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F2	CTGACTTTACTTTTAATTGCCT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	266	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G2	TGACTTTACTTTTAATTGCCTA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	267	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H2	GACTTTACTTTTAATTGCCTAT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	268	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A3	GGGAAGGAGAAGCTGGAGTCAC

【 0 3 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 8】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 標的部位の DNA 配列	269	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B3	GGAAGGAGAAGCTGGAGTCACC
TRBC1 標的部位の DNA 配列	270	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C3	AACTCCTGGCTCTTAATAACCC
TRBC1 標的部位の DNA 配列	271	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D3	AACTTTCTCTTCTGCAGGTCAA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	272	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E3	ACTCCACTTCCAGGGCTGCCTT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	273	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F3	CTCCACTTCCAGGGCTGCCTTC
TRBC1 標的部位の DNA 配列	274	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G3	TCCTTTCTCTTGACCTGCAGAA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	275	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H3	AGCCAGGAGTTGTGAGGATTGA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	276	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A4	AGTAGTAGGGCCCATTGACCAC
TRBC1 標的部位の DNA 配列	277	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B4	TGCAAGTTATCTTCTGAGGCAC

【 0 3 6 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 9】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 標的部位の DNA 配列	278	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C4	AGTTATCTTCTGAGGCACCTGA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	279	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D4	GTTATCTTCTGAGGCACCTGAA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	280	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E4	TCAAGAACCATGAGAGAGGGAG
TRBC1 標的部位の DNA 配列	281	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F4	CAAGAACCATGAGAGAGGGAGA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	282	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G4	TTACCCGAGGTAAAGCCACAGT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	283	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H4	CCGAGGTAAAGCCACAGTCTGA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	284	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A5	CAGTCTGAAAGAAAGCAGGGAG
TRBC1 標的部位の DNA 配列	285	MG3- 6/3-4 TRBC 1 B5	AGTCTGAAAGAAAGCAGGGAGA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	286	MG3- 6/3-4 TRBC 1 C5	GTCTGAAAGAAAGCAGGGAGAG

【 0 3 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1 0】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC1 標的部位の DNA 配列	287	MG3- 6/3-4 TRBC 1 D5	GAAAGAAAGCAGGGAGAGGAAA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	288	MG3- 6/3-4 TRBC 1 E5	GAGACCTTATTTTCATAGGCAA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	289	MG3- 6/3-4 TRBC 1 F5	GATGAGAGTTACACAGGCCACA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	290	MG3- 6/3-4 TRBC 1 G5	AGCTGCTTGGCTCTGTTGGGCT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	291	MG3- 6/3-4 TRBC 1 H5	TGTTGGGCTGAGAATCTGGGAG
TRBC1 標的部位の DNA 配列	292	MG3- 6/3-4 TRBC 1 A6	GGAACACCTTGTTTCAGGTCCTC
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	293	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A1	mA*mC*mC*rUrCrUrUrCrCrCrUrUrUrCrCrArGrArGrGrArCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	294	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B1	mC*mC*mU*rCrUrUrCrCrCrUrUrUrCrCrArGrArGrGrArCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【 0 3 6 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1 1】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	295	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C1	mC*mU*mC*rUrUrCrCrUrUrUrCrCrArGrArGrArCrCrUr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	296	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D1	mC*mA*mG*rArArGrCrArGrArGrArUrCrUrCrCrArCrArCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	297	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E1	mC*mC*mA*rCrGrUrGrGrArGrCrUrGrArGrCrUrGrGrUrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	298	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F1	mA*mG*mU*rCrCrArGrUrUrCrUrArCrGrGrGrCrUrCrUrCrGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	299	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G1	mG*mA*mU*rUrArGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrArCrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	300	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H1	mA*mU*mU*rArGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	301	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A2	mU*mU*mA*rGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	302	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B2	mU*mG*mA*rGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArGrGrGrArArArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【 0 3 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1 2】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	303	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C2	mU*mA*mG*rCrGrArCrArGrArCrUrArGrArUrCrCrArGr rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	304	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D2	mC*mC*mC*rCrCrArCrCrArArGrArArGrCrArUrArGrArGrGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	305	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E2	mU*mC*mU*rGrCrUrCrUrCrGrArArCrCrArGrGrGrCrArUrGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	306	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F2	mG*mG*mA*rArCrArUrCrArCrArCrArUrGrGrGrCrArUrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	307	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G2	mC*mC*mU*rArArUrArUrArUrCrCrUrArUrCrArCrCrUrCrAr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	308	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H2	mA*mC*mC*rArUrArArUrGrArArGrCrCrArGrArCrUrGrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	309	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A3	mC*mC*mA*rUrArArUrGrArArGrCrCrArGrArCrUrGrGrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	310	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B3	mC*mA*mU*rArArUrGrArArGrCrCrArGrArCrUrGrGrGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【 0 3 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1 3】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	311	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C3	mG*mC*mC*rArGrArCrUrGrGrGrGrArGrArArArUrGrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	312	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D3	mG*mG*mA*rGrArArArUrGrCrArGrGrGrArArUrArUrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	313	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E3	mG*mG*mA*rGrArCrArArCrCrArGrCrGrArGrCrCrUrArCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	314	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F3	mU*mA*mC*rUrCrCrUrGrCrUrGrUrGrCrCrArUrArGrCrCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	315	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G3	mC*mU*mG*rUrGrCrCrArUrArGrCrCrCrCrUrGrArArArCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	316	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H3	mU*mG*mU*rGrCrCrArUrArGrCrCrCrCrUrGrArArArCrCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	317	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A4	mG*mU*mG*rCrCrArUrArGrCrCrCrCrUrGrArArArCrCrCrUr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	318	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B4	mU*mG*mU*rUrCrUrCrUrCrUrUrCrCrArCrArGrGrUrCrArAr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 6 5 】

50

【表 1 2 - 1 4】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	319	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C4	mG*mA*mA*rArGrGrArUrUrCrCrArGrArGrGrCrUrArGrCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	320	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D4	mG*mG*mA*rUrGrGrUrUrUrUrGrGrArGrCrUrArGrCrCrUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	321	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E4	mC*mC*mC*rUrGrGrUrUrCrGrArGrArGrCrArGrArGrArCrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	322	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F4	mA*mG*mC*rArGrArGrArCrGrGrCrGrArArArGrArUrArGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	323	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G4	mG*mC*mA*rGrArGrArCrGrGrCrGrArArArGrArUrArGrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	324	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H4	mC*mA*mG*rArGrArCrGrGrCrGrArArArGrArUrArGrArGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	325	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A5	mU*mU*mA*rCrCrGrGrArGrGrUrGrArArGrCrCrArCrArGrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	326	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B5	mC*mG*mG*rArGrGrUrGrArArGrCrCrArCrArGrUrCrUrGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 6 6 】

【表 1 2 - 1 5】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	327	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C5	mG*mG*mA*rGrGrUrGrArArGrCrCrArCrArGrUrCrUrGrArAr rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	328	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D5	mA*mC*mA*rGrUrCrUrGrArArArGrArArArArCrArGrGrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	329	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E5	mC*mA*mG*rUrCrUrGrArArArGrArArArArCrArGrGrGrGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	330	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F5	mA*mG*mU*rCrUrGrArArArGrArArArArCrArGrGrGrGrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	331	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G5	mG*mU*mC*rUrGrArArArGrArArArArCrArGrGrGrGrArArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	332	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H5	mA*mC*mA*rGrGrGrGrArArGrArArArArArUrGrGrArUrGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	333	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A6	mG*mC*mG*rArArGrUrGrGrUrCrArCrUrArUrGrArUrCrUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	334	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B6	mU*mU*mA*rGrGrArArArCrCrArGrGrArCrCrCrCrArGrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 3 6 7 】

【表 1 2 - 1 6】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	335	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C6	mU*mA*mU*rGrGrCrUrGrGrUrCrCrUrCrArGrGrGrArGrArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	336	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D6	mC*mU*mA*rArGrGrUrGrUrCrArGrGrArUrCrUrGrArArGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	337	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E6	mG*mG*mA*rArCrArCrGrUrUrUrUrUrCrArGrGrUrCrCrUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	338	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A1	ACCTCTTCCCTTTCCAGAGGAC
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	339	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B1	CCTCTTCCCTTTCCAGAGGACC
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	340	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C1	CTCTTCCCTTTCCAGAGGACCT
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	341	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D1	CAGAAGCAGAGATCTCCACAC
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	342	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E1	CCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG

【 0 3 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1 7】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 標的部位の DNA 配列	343	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F1	AGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	344	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G1	GATTAGGTGAGACCAGCTACCA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	345	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H1	ATTAGGTGAGACCAGCTACCAG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	346	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A2	TTAGGTGAGACCAGCTACCAGG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	347	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B2	TGAGACCAGCTACCAGGGAAAA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	348	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C2	TAGCGGACAAGACTAGATCCAG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	349	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D2	CCCCCACCAGAAGCATAGAGG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	350	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E2	TCTGCTCTCGAACCAGGGCATG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	351	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F2	GGAACATCACACATGGGCATAA

【 0 3 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1 8】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 標的部位の DNA 配列	352	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G2	CCTAATATATCCTATCACCTCA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	353	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H2	ACCATAATGAAGCCAGACTGGG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	354	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A3	CCATAATGAAGCCAGACTGGGG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	355	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B3	CATAATGAAGCCAGACTGGGGA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	356	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C3	GCCAGACTGGGGAGAAAATGCA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	357	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D3	GGAGAAAATGCAGGGAATATCA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	358	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E3	GGAGACAACCAGCGAGCCCTAC
TRBC2 標的部位の DNA 配列	359	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F3	TACTCCTGCTGTGCCATAGCCC
TRBC2 標的部位の DNA 配列	360	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G3	CTGTGCCATAGCCCCTGAAACC

【 0 3 7 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1 9】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 標的部位の DNA 配列	361	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H3	TGTGCCATAGCCCCTGAAACCC
TRBC2 標的部位の DNA 配列	362	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A4	GTGCCATAGCCCCTGAAACCCT
TRBC2 標的部位の DNA 配列	363	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B4	TGTTCTCTCTTCCACAGGTCAA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	364	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C4	GAAAGGATTCCAGAGGCTAGCT
TRBC2 標的部位の DNA 配列	365	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D4	GGATGGTTTTGGAGCTAGCCTC
TRBC2 標的部位の DNA 配列	366	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E4	CCCTGGTTCGAGAGCAGAGACG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	367	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F4	AGCAGAGACGGCGAAAGATAGA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	368	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G4	GCAGAGACGGCGAAAGATAGAG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	369	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H4	CAGAGACGGCGAAAGATAGAGA

【 0 3 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2 0】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 標的部位の DNA 配列	370	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A5	TTACCGGAGGTGAAGCCACAGT
TRBC2 標的部位の DNA 配列	371	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B5	CGGAGGTGAAGCCACAGTCTGA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	372	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C5	GGAGGTGAAGCCACAGTCTGAA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	373	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D5	ACAGTCTGAAAGAAAACAGGGG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	374	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E5	CAGTCTGAAAGAAAACAGGGGA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	375	MG3- 6/3-4 TRBC 2 F5	AGTCTGAAAGAAAACAGGGGAA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	376	MG3- 6/3-4 TRBC 2 G5	GTCTGAAAGAAAACAGGGGAAG
TRBC2 標的部位の DNA 配列	377	MG3- 6/3-4 TRBC 2 H5	ACAGGGGAAGAAAAATGGATGA
TRBC2 標的部位の DNA 配列	378	MG3- 6/3-4 TRBC 2 A6	GCGAAGTGGTCACTATGATCTT

【 0 3 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2 1】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	379	MG3- 6/3-4 TRBC 2 B6	TTAGGAAACCAGGACCCCAGAA
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	380	MG3- 6/3-4 TRBC 2 C6	TATGGCTGGTCCTCAGGGAGAC
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	381	MG3- 6/3-4 TRBC 2 D6	CTAAGGTGTCAGGATCTGAAGG
TRBC2 標的部 位の DNA 配 列	382	MG3- 6/3-4 TRBC 2 E6	GGAACACGTTTTTCAGGTCCTC
(r=天然のリボース塩基、m=2' -O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合)			

【0 3 7 3】

実施例 1 6 - H e p 3 B 細胞における A N G P T L 3 の D N A レベルでの遺伝子編集結果の分析

以下の表 9 D 及び配列番号 3 8 3 ~ 5 7 2 に記載する s g R N A を含む M G 3 - 6 / 4 R N P (1 0 4 p m o l のタンパク質 / 1 2 0 p m o l のガイド) のヌクレオフェクションを、エレクトロポレーションを使用して H e p 3 B 細胞 (1 0 0 , 0 0 0) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム D N A を調製した。N G S ベースの D N A 配列決定での使用に適した P C R プライマーを生成し、最適化し、各ガイド R N A の個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分析して、遺伝子編集を決定した (図 2 1) 。結果は、s g R N A である E 5 、C 6 、A 7 、A 8 、A 9 、G 9 、G 1 0 、E 1 1 、A 1 2 、及び C 1 2 が、このアッセイにおいて最も性能の高い s g R N A であることを示す。

【0 3 7 4】

10

20

30

40

50

【表 13-1】

表 9 D : 実施例 16 で使用した gRNA 及び標的化配列

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化す る MG3- 6/3-4 sgRNA	383	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A1	mU*mU*mG*rUrUrCrCrUrCrUrArGrUrUrArUrUrCrCrUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化す る MG3- 6/3-4 sgRNA	384	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B1	mA*mU*mU*rUrGrArUrUrCrUrCrUrArUrCrUrCrArGrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化す る MG3- 6/3-4 sgRNA	385	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C1	mU*mU*mU*rGrArUrUrCrUrCrUrArUrCrUrCrArGrArGrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化す る MG3- 6/3-4 sgRNA	386	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D1	mA*mA*mG*rArUrUrGrCrUrArUrGrUrUrArGrArCrGrArU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化す る MG3- 6/3-4 sgRNA	387	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E1	mA*mG*mA*rUrUrUrGrCrUrArUrGrUrUrArGrArCrGrArUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化す る MG3- 6/3-4 sgRNA	388	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F1	mG*mA*mU*rUrUrGrCrUrArUrGrUrUrArGrArCrGrArUrGrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【0375】

50

【表 13 - 2】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	389	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G1	mA*mC*mU*rUrUrGrUrCrCrArUrArArGrArCrGrArArGrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	390	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H1	mA*mG*mG*rGrCrCrArArArUrUrArArUrGrArCrArUrArUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	391	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A2	mG*mG*mG*rCrCrArArArUrUrArArUrGrArCrArUrArUrUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	392	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B2	mU*mA*mU*rGrArUrCrUrArUrCrGrCrUrGrCrArArArCrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	393	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C2	mA*mU*mG*rArUrCrUrArUrCrGrCrUrGrCrArArArCrCrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	394	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D2	mC*mA*mA*rArCrCrArGrUrGrArArArUrCrArArArGrArArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	395	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E2	mA*mA*mA*rCrCrArGrUrGrArArArUrCrArArArGrArArGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【0376】

50

【表 13 - 3】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	396	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F2	mA*mC*mA*rArGrUrCrArArArArUrGrArArGrArGrUrAr rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	397	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G2	mG*mA*mA*rUrArUrGrUrCrArCrUrUrGrArArCrUrCrArArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	398	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H2	mU*mC*mA*rCrUrUrGrArArCrUrCrArArCrUrCrArArArCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	399	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A3	mU*mC*mA*rArArArCrUrUrGrArArArGrCrCrUrCrCrUrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	400	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B3	mC*mA*mA*rArArCrUrUrGrArArArGrCrCrUrCrCrUrArGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	401	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C3	mA*mA*mA*rArCrUrUrGrArArArGrCrCrUrCrCrUrArGrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	402	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D3	mA*mA*mA*rCrUrUrGrArArArGrCrCrUrCrCrUrArGrArArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【0377】

10

20

30

40

50

【表 13 - 4】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	403	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E3	mA*mA*mC*rUrUrGrArArArGrCrCrUrCrUrArGrArArGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	404	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F3	mG*mU*mU*rCrUrGrGrArGrUrUrUrCrArGrGrUrUrGrArUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	405	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G3	mC*mA*mC*rUrGrGrUrUrUrGrCrArGrCrGrArUrArGrArUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	406	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H3	mA*mC*mU*rGrGrUrUrUrGrCrArGrCrGrArUrArGrArUrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	407	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A4	mC*mG*mA*rUrArGrArUrCrArUrArArArArGrArCrUrGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	408	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B4	mC*mC*mC*rArArCrUrGrArArGrGrArGrGrCrCrArUrUrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	409	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C4	mC*mC*mA*rArCrUrGrArArGrGrArGrGrCrCrArUrUrGrGrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【0378】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 5】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	410	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D4	mC*mU*mU*rGrArUrUrUrGrGrCrUrCrUrGrGrArGrArUrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	411	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E4	mU*mU*mU*rUrGrGrCrUrCrUrGrGrArGrArUrArGrArGrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	412	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F4	mU*mC*mU*rGrGrArGrArUrArGrArGrArUrCrArArArUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	413	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G4	mG*mA*mA*rUrUrGrUrCrUrUrGrArUrCrArArUrUrCrUrGrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	414	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H4	mA*mA*mU*rUrGrUrCrUrUrGrArUrCrArArUrUrCrUrGrGrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	415	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A5	mG*mG*mA*rGrGrArArArUrArArCrUrArGrArGrGrArArCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	416	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B5	mG*mA*mG*rGrArArArUrArArCrUrArGrArGrGrArArCrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【 0 3 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 13 - 6】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	417	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C5	mA*mC*mU*rCrUrArUrArUrCrCrArGrArCrUrUrUrGrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	418	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D5	mC*mU*mC*rUrCrUrArUrArUrCrCrArGrArCrUrUrUrGrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	419	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E5	mU*mC*mU*rCrUrArUrArUrCrCrArGrArCrUrUrUrGrUrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	420	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F5	mA*mA*mC*rArArUrUrArArArCrCrArArCrArGrCrArUrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	421	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G5	mA*mU*mU*rArArArCrCrArArCrArGrCrArUrArGrUrCrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	422	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H5	mA*mA*mC*rCrArArCrArGrCrArUrArGrUrCrArArArUrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	423	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A6	mA*mC*mC*rArArCrArGrCrArUrArGrUrCrArArArUrArArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【0380】

10

20

30

40

50

【表 13 - 7】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	424	MG3-6/3-4 ANGP TL3 B6	mG*mA*mU*rGrCrUrArUrArUrCrUrUrGrUrUrUrUrCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	425	MG3-6/3-4 ANGP TL3 C6	mA*mG*mG*rArCrUrArGrUrArUrUrCrArArGrArArCrCrAr rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	426	MG3-6/3-4 ANGP TL3 D6	mG*mG*mA*rCrUrArGrUrArUrUrCrArArGrArArCrCrArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	427	MG3-6/3-4 ANGP TL3 E6	mA*mA*mG*rArArCrUrArCrUrCrCrUrUrUrCrUrUrCrArGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	428	MG3-6/3-4 ANGP TL3 F6	mA*mC*mU*rArCrUrCrCrUrUrUrCrUrUrCrArGrUrUrGrAr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	429	MG3-6/3-4 ANGP TL3 G6	mC*mU*mA*rCrUrCrCrUrUrUrCrUrUrCrArGrUrUrGrArAr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	430	MG3-6/3-4 ANGP TL3 H6	mC*mC*mU*rUrUrCrUrUrCrArGrUrUrGrArArUrGrArArUr rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【 0 3 8 1 】

10

20

30

40

50

【表 13 - 8】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	431	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A7	mG*mG*mU*rGrCrUrCrUrGrGrCrUrUrGrGrArArGrArUrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	432	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B7	mG*mU*mG*rCrUrCrUrUrGrGrCrUrUrGrGrArArGrArUrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	433	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C7	mA*mU*mA*rGrArGrArArUrUrUrCrUrGrGrUrGrGrUrUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	434	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D7	mG*mA*mA*rUrArCrUrArGrUrCrCrUrUrCrUrGrArGrCrUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	435	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E7	mU*mU*mA*rUrUrGrArUrUrCrUrArGrGrCrArUrUrCrCrUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	436	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F7	mG*mU*mC*rUrArCrUrGrUrGrArUrGrUrUrArUrArUrCrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	437	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G7	mC*mU*mG*rArUrArUrArArCrArUrCrArCrArGrUrArGrArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【0382】

10

20

30

40

50

【表 13 - 9】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	438	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H7	mU*mG*mA*rUrArUrArArCrArUrCrArCrArGrUrArGrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	439	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A8	mG*mA*mU*rArUrArArCrArUrCrArCrArGrUrArGrArCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	440	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B8	mC*mA*mC*rUrUrGrUrArUrGrUrUrCrArCrCrUrCrUrGrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	441	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C8	mU*mA*mU*rArArArUrGrGrUrGrGrUrArCrArUrUrCrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	442	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D8	mU*mG*mG*rUrArCrArUrUrCrArGrCrArGrGrArArUrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	443	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E8	mG*mU*mC*rCrArUrGrGrArCrArUrUrArArUrUrCrArArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	444	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F8	mU*mU*mC*rArArCrArUrCrGrArArUrArGrArUrGrGrArUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【 0 3 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 13 - 10】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	445	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G8	mA*mU*mA*rGrArUrGrGrArUrCrArCrArArArCrUrUrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	446	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H8	mU*mU*mC*rArArUrGrArArArCrGrUrGrGrGrArGrArArCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	447	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A9	mA*mG*mU*rCrCrCrUrUrArCrCrArUrCrArArGrCrCrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	448	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B9	mU*mU*mU*rGrUrGrArUrCrCrArUrCrUrArUrUrCrGrArUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	449	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C9	mU*mG*mA*rArUrUrArArUrGrUrCrCrArUrGrGrArCrUrArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	450	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D9	mU*mU*mU*rArCrGrArArUrUrGrArGrUrUrGrGrArArGrArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	451	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E9	mG*mG*mC*rArArUrGrUrCrCrCrArArUrGrCrArArUrCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【0384】

10

20

30

40

50

【表 13 - 11】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	452	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F9	mG*mC*mA*rArUrGrUrCrCrCrArArUrGrCrArArUrCrCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	453	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G9	mG*mU*mU*rUrUrCrUrArCrUrUrGrGrGrArUrCrArCrArArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	454	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H9	mC*mC*mU*rUrUrGrCrUrUrUrGrUrGrArUrCrCrCrArArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	455	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A10	mC*mU*mU*rUrUrGrCrUrUrUrGrUrGrArUrCrCrCrArArGrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	456	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B10	mU*mU*mG*rUrGrArUrCrCrCrArArGrUrArGrArArArArCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	457	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C10	mA*mG*mU*rUrGrGrUrUrUrCrGrUrGrArUrUrUrCrCrCrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	458	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D10	mG*mU*mU*rGrGrUrUrUrCrGrUrGrArUrUrUrCrCrCrArArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【0385】

10

20

30

40

50

【表 13 - 12】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	459	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E10	mG*mU*mU*rUrCrGrUrGrArUrUrCrCrArArGrUrArArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	460	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F10	mU*mU*mC*rCrArGrUrCrUrUrCrCrArArCrUrCrArArUrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	461	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G10	mA*mG*mU*rArUrArUrCrUrUrCrUrCrUrArGrGrCrCrArA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	462	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H10	mG*mU*mA*rUrArUrCrUrUrCrUrCrUrArGrGrCrCrArArCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	463	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A11	mU*mC*mU*rArGrGrCrCrArArCrCrArArArUrUrCrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	464	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B11	mC*mU*mA*rGrGrCrCrArArCrCrArArArUrUrCrUrCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	465	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C11	mG*mC*mC*rCrArArCrCrArArArUrUrCrUrCrUrGrArAr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【0386】

10

20

30

40

50

【表 13 - 13】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	466	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D11	mU*mG*mG*rUrGrGrUrGrGrCrArUrGrArUrGrArGrUrGrUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	467	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E11	mG*mG*mU*rGrGrUrGrGrCrArUrGrArUrGrArGrUrGrUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	468	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F11	mU*mG*mA*rUrGrArGrUrGrUrGrGrArGrArArArCrArArC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	469	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G11	mU*mG*mU*rGrGrArGrArArArArCrArArCrCrUrArArArUrG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	470	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H11	mG*mG*mU*rArArArUrArUrArArCrArArArCrCrArArGrArG rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	471	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A12	mG*mA*mA*rGrArGrGrArUrUrArUrCrUrUrGrGrArArGrUrC rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標 的化する MG3- 6/3-4 sgRNA	472	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B12	mA*mA*mG*rArGrGrArUrUrArUrCrUrUrGrGrArArGrUrCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【0387】

50

【表 13 - 14】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	473	MG3-6/3-4 ANGP TL3 C12	mU*mC*mA*rArArArUrGrGrArArGrGrUrUrArUrArCrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	474	MG3-6/3-4 ANGP TL3 D12	mC*mA*mA*rArArUrGrGrArArGrGrUrUrArUrArCrUrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	475	MG3-6/3-4 ANGP TL3 E12	mA*mU*mG*rUrUrGrArUrCrCrArUrCrCrArArCrArGrArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	476	MG3-6/3-4 ANGP TL3 F12	mC*mA*mU*rCrCrArArCrArGrArUrUrCrArGrArArArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 を標的化する MG3-6/3-4 sgRNA	477	MG3-6/3-4 ANGP TL3 G12	mG*mC*mC*rUrCrArGrUrUrCrArUrUrCrArArArGrCrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPT L3 標的部位の DNA 配列	478	MG3-6/3-4 ANGP TL3 A1	TTGTTCTCTAGTTATTCCTC
ANGPT L3 標的部位の DNA 配列	479	MG3-6/3-4 ANGP TL3 B1	ATTTGATTCTCTATCTCCAGAG

【0388】

10

20

30

40

50

【表 13 - 15】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	480	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C1	TTTGATTCTCTATCTCCAGAGC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	481	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D1	AAGATTTGCTATGTTAGACGAT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	482	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E1	AGATTTGCTATGTTAGACGATG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	483	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F1	GATTTGCTATGTTAGACGATGT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	484	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G1	ACTTTGTCCATAAGACGAAGGG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	485	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H1	AGGGCCAAATTAATGACATATT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	486	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A2	GGGCCAAATTAATGACATATTT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	487	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B2	TATGATCTATCGCTGCAAACCA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	488	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C2	ATGATCTATCGCTGCAAACCAG

【0389】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1 6】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	489	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D2	CAAACCAGTGAAATCAAAGAAG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	490	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E2	AAACCAGTGAAATCAAAGAAGA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	491	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F2	ACAAGTCAAAAATGAAGAGGTA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	492	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G2	GAATATGTCACCTGAACTCAAC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	493	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H2	TCACTTGAACTCAACTCAAAAC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	494	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A3	TCAAACTTGAAAGCCTCCTAG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	495	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B3	CAAACTTGAAAGCCTCCTAGA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	496	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C3	AAACTTGAAAGCCTCCTAGAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	497	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D3	AAACTTGAAAGCCTCCTAGAAG

【 0 3 9 0 】

10

20

30

40

50

【表 13 - 17】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	498	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E3	AACTTGAAAGCCTCCTAGAAGA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	499	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F3	GTTCTGGAGTTTCAGGTTGATT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	500	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G3	CACTGGTTTGCAGCGATAGATC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	501	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H3	ACTGGTTTGCAGCGATAGATCA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	502	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A4	CGATAGATCATAAAAAGACTGA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	503	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B4	CCCAACTGAAGGAGGCCATTGG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	504	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C4	CCAACTGAAGGAGGCCATTGGC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	505	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D4	CTTGATTTTGGCTCTGGAGATA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	506	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E4	TTTTGGCTCTGGAGATAGAGAA

【 0 3 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 13 - 18】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	507	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F4	TCTGGAGATAGAGAATCAAATG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	508	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G4	GAATTGTCTTGATCAATTCTGG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	509	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H4	AATTGTCTTGATCAATTCTGGA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	510	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A5	GGAGGAAATAACTAGAGGAACA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	511	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B5	GAGGAAATAACTAGAGGAACAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	512	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C5	ACTCTCTATATCCAGACTTTTG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	513	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D5	CTCTCTATATCCAGACTTTTGT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	514	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E5	TCTCTATATCCAGACTTTTGTA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	515	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F5	AACAATTAAACCAACAGCATAG

【 0 3 9 2 】

10

20

30

40

50

【表 13 - 19】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	516	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G5	ATTAAACCAACAGCATAGTCAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	517	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H5	AACCAACAGCATAGTCAAATAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	518	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A6	ACCAACAGCATAGTCAAATAAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	519	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B6	GATGCTATTATCTTGTCTTTCT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	520	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C6	AGGACTAGTATTCAAGAACCCA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	521	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D6	GGACTAGTATTCAAGAACCCAC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	522	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E6	AAGAACTACTCCCTTTCTTCAG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	523	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F6	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	524	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G6	CTACTCCCTTTCTTCAGTTGAA

【0393】

10

20

30

40

50

【表 13 - 20】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	525	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H6	CCTTTCTTCAGTTGAATGAAAT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	526	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A7	GGTGCTCTTGGCTTGGGAAGATA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	527	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B7	GTGCTCTTGGCTTGGGAAGATAG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	528	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C7	ATAGAGAAATTTCTGTGGGTTC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	529	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D7	GAATACTAGTCCTTCTGAGCTG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	530	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E7	TTATTGATTCTAGGCATTCCTG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	531	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F7	GTCTACTGTGATGTTATATCAG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	532	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G7	CTGATATAACATCACAGTAGAC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	533	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H7	TGATATAACATCACAGTAGACA

【0394】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2 1】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	534	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A8	GATATAACATCACAGTAGACAT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	535	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B8	CACTTGTATGTTCACCTCTGTT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	536	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C8	TATAAATGGTGGTACATTACAGC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	537	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D8	TGGTACATTACAGCAGGAATGCC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	538	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E8	GTCCATGGACATTAATTCAACA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	539	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F8	TTCAACATCGAATAGATGGATC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	540	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G8	ATAGATGGATCACAAAATTCA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	541	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H8	TTCAATGAAACGTGGGAGAACT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	542	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A9	AGTCCCCCTTACCATCAAGCCTC

【 0 3 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2 2】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	543	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B9	TTTGTGATCCATCTATTCGATG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	544	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C9	TGAATTAATGTCCATGGACTAC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	545	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D9	TTTACGAATTGAGTTGGAAGAC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	546	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E9	GGCAATGTCCCCAATGCAATCC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	547	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F9	GCAATGTCCCCAATGCAATCCC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	548	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G9	GTTTTCTACTTGGGATCACAAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	549	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H9	CCTTTTGCTTTGTGATCCCAAG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	550	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A10	CTTTTGCTTTGTGATCCCAAGT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	551	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B10	TTGTGATCCCAAGTAGAAAACA

【 0 3 9 6 】

10

20

30

40

50

【表 13 - 23】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	552	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C10	AGTTGGTTTCGTGATTTCCTCAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	553	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D10	GTTGGTTTCGTGATTTCCTCAAG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	554	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E10	GTTTCGTGATTTCCTCAAGTAAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	555	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F10	TTCCAGTCTTCCAACCTCAATTC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	556	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G10	AGTATATCTTCTCTAGGCCCAA
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	557	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H10	GTATATCTTCTCTAGGCCCAAC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	558	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A11	TCTAGGCCCAACCAAAATTCTC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	559	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B11	CTAGGCCCAACCAAAATTCTCC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	560	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C11	GCCCAACCAAAATTCTCCTGAA

【0397】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2 4】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	561	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D11	TGGTGGTGGCATGATGAGTGTG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	562	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E11	GGTGGTGGCATGATGAGTGTGG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	563	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F11	TGATGAGTGTGGAGAAAACAAC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	564	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G11	TGTGGAGAAAACAACCTAAATG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	565	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 H11	GGTAAATATAACAAACCAAGAG
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	566	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 A12	GAAGAGGATTATCTTGGAAGTC
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	567	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 B12	AAGAGGATTATCTTGGAAGTCT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	568	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 C12	TCAAAATGGAAGGTTATACTCT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	569	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 D12	CAAAATGGAAGGTTATACTCTA

【 0 3 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 13-25】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	570	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 E12	ATGTTGATCCATCCAACAGATT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	571	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 F12	CATCCAACAGATTCAGAAAGCT
ANGPT L3 標的 部位の DNA 配 列	572	MG3- 6/3-4 ANGP TL3 G12	GCCTCAGTTCATTCAAAGCTTT
(r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合)			

【0399】

実施例 17 - Hep3B 細胞における PCSK9 の DNA レベルでの遺伝子編集結果の分析

以下の表 9 E 及び配列番号 573 ~ 602 に記載する sgRNA を含む MG3-6 / 4 RNP (104 pmol のタンパク質 / 120 pmol のガイド) のヌクレオフェクションを、エレクトロポレーションを使用して Hep3B 細胞 (100,000) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA 配列決定での使用に適した PCR プライマーを生成し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分析して、遺伝子編集を決定した (図 22)。結果は、最も高い編集性能を、sgRNA である B1、F1、A2、及び E2 で達成し、相当な編集を D2、C2、B2、H1、及び F2 でも生じたことを示す。

【0400】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表 9 E : 実施例 1 7 で使用した g R N A 及び標的化配列

カテゴリー	配列番号	名称	配列
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	573	MG3- 6/3-4 PCSK 9 A1	mA*mC*mC*rCrCrUrCrCrArCrGrGrUrArCrCrGrGrCrGrGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	574	MG3- 6/3-4 PCSK 9 B1	mA*mC*mC*rArGrCrArUrArCrArGrArGrUrGrArCrCrArCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	575	MG3- 6/3-4 PCSK 9 C1	mC*mC*mA*rGrCrArUrArCrArGrArGrUrGrArCrCrArCrCrGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	576	MG3- 6/3-4 PCSK 9 D1	mC*mA*mG*rGrGrUrCrArUrGrGrUrCrArCrCrGrArCrUrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	577	MG3- 6/3-4 PCSK 9 E1	mC*mC*mU*rCrCrCrArGrGrCrCrUrGrGrArGrUrUrUrArUrUr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	578	MG3- 6/3-4 PCSK 9 F1	mC*mU*mC*rCrCrArGrGrCrCrUrGrGrArGrUrUrUrArUrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	579	MG3- 6/3-4 PCSK 9 G1	mC*mA*mG*rGrCrUrGrGrArCrCrArGrCrUrGrGrCrUrUrUrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	580	MG3- 6/3-4 PCSK 9 H1	mG*mG*mU*rGrGrCrCrCrArArCrUrGrUrGrArUrGrArCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

【 0 4 0 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	581	MG3- 6/3-4 PCSK 9 A2	mG*mC*mC*rCrCrGrCrCrGrCrUrUrCrCrArCrUrCrCrUrGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	582	MG3- 6/3-4 PCSK 9 B2	mA*mG*mU*rGrUrGrCrUrGrArCrCrArUrArCrArGrUrCrCrU rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	583	MG3- 6/3-4 PCSK 9 C2	mC*mC*mU*rGrCrArArArArCrArGrCrUrGrCrCrArArCrCrUr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	584	MG3- 6/3-4 PCSK 9 D2	mC*mU*mG*rCrArArArArCrArGrCrUrGrCrCrArArCrCrUrGr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	585	MG3- 6/3-4 PCSK 9 E2	mA*mA*mU*rGrGrCrGrUrArGrArCrArCrCrUrCrArCrCrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	586	MG3- 6/3-4 PCSK 9 F2	mU*mC*mC*rUrGrCrUrGrCrCrArUrGrCrCrCrArGrGrUrCr GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 を標的 化する MG3- 6/3-4 sgRNA	587	MG3- 6/3-4 PCSK 9 G2	mU*mG*mG*rArArUrGrCrArArArGrUrCrArArGrGrArGrCrA rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 標的部 位の DNA 配 列	588	MG3- 6/3-4 PCSK 9 A1	ACCCCTCCACGGTACCGGGCGG

【 0 4 0 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
PCSK9 標的部位の DNA 配列	589	MG3- 6/3-4 PCSK 9 B1	ACCAGCATACAGAGTGACCACC
PCSK9 標的部位の DNA 配列	590	MG3- 6/3-4 PCSK 9 C1	CCAGCATACAGAGTGACCACCG
PCSK9 標的部位の DNA 配列	591	MG3- 6/3-4 PCSK 9 D1	CAGGGTCATGGTCACCGACTTC
PCSK9 標的部位の DNA 配列	592	MG3- 6/3-4 PCSK 9 E1	CCTCCCAGGCCTGGAGTTTATT
PCSK9 標的部位の DNA 配列	593	MG3- 6/3-4 PCSK 9 F1	CTCCCAGGCCTGGAGTTTATTC
PCSK9 標的部位の DNA 配列	594	MG3- 6/3-4 PCSK 9 G1	CAGGCTGGACCAGCTGGCTTTT
PCSK9 標的部位の DNA 配列	595	MG3- 6/3-4 PCSK 9 H1	GGTGGCCCCAACTGTGATGACC
PCSK9 標的部位の DNA 配列	596	MG3- 6/3-4 PCSK 9 A2	GCCCCGCCGCTTCCCACTCCTG
PCSK9 標的部位の DNA 配列	597	MG3- 6/3-4 PCSK 9 B2	AGTGTGCTGACCATACAGTCCT

【 0 4 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

カテゴリー	配列番号	名称	配列
PCSK9 標的部 位の DNA 配 列	598	MG3- 6/3-4 PCSK 9 C2	CCTGCAAAACAGCTGCCAACCT
PCSK9 標的部 位の DNA 配 列	599	MG3- 6/3-4 PCSK 9 D2	CTGCAAAACAGCTGCCAACCTG
PCSK9 標的部 位の DNA 配 列	600	MG3- 6/3-4 PCSK 9 E2	AATGGCGTAGACACCCTCACCC
PCSK9 標的部 位の DNA 配 列	601	MG3- 6/3-4 PCSK 9 F2	TCCTGCTGCCATGCCCCAGGTC
PCSK9 標的部 位の DNA 配 列	602	MG3- 6/3-4 PCSK 9 G2	TGGAATGCAAAGTCAAGGAGCA
(r=天然のリボース塩基、m=2' -O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合)			

10

20

30

【0 4 0 4】

実施例 1 8 - 脂質ナノ粒子の全身投与によって送達したキメラヌクレアーゼ MG 3 - 6 / 3 - 4 によるマウスの肝臓におけるインビボ遺伝子編集

生きている動物においてインビボでゲノムを編集する MG 3 - 6 / 3 - 4 キメラタイプ II ヌクレアーゼの能力を評価するために、脂質ナノ粒子を使用して、マウス HAO-1 遺伝子のコード配列の異なる部分を標的化する MG 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼ（例えば、配列番号 6 0 3 の RNA バージョン）をコードする mRNA 及び単一ガイド RNA（sgRNA）（例えば、表 1 0 に記載する）を送達した。HAO-1 遺伝子は、グリコール酸代謝に関与する酵素であり、主に肝臓の肝細胞で発現される、グリコール酸オキシダーゼをコードする。HAO-1 コード配列を標的化する sgRNA のスクリーニングを、マウス肝細胞株 Hepa 1 - 6 で行い、活性ガイドを特定した。MG 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼをコードする mRNA をトランスフェクトしたとき、Hepa 1 - 6 細胞において 4 6 % 及び 2 6 % の編集を示した sgRNA である mH 3 6 4 - 7 及び mH 3 6 4 - 2 0 を、マウスにおける試験のため選択した。mH 3 6 4 - 7 は、エクソン 2 を標的化し、mH 3 6 4 - 2 0 は、エクソン 4 を標的化する。

40

【0 4 0 5】

天然 RNA 構造の多数の化学修飾を、これらの sgRNA に組み入れた。これらの化学

50

修飾を、編集活性に悪影響を与えることなく、哺乳動物細胞由来の抽出物においてインキュベートしたとき、インビトロでの s g R N A の安定性を改善するそれらの能力に基づいて選択した。マウスにおける初期試験のため、化学 1 及び化学 3 5 を組み込んだ s g R N A m H 3 6 4 - 7 及び m H 3 6 4 - 2 0 を試験のため選択し、m H 3 6 4 - 7 - 1、m H 3 6 4 - 2 0 - 1、m H 3 6 4 - 7 - 3 5、m H 3 6 4 - 2 0 - 3 5 と指定した。化学修飾を含むこれらのガイドの配列を以下の表 1 0 に示す。

【 0 4 0 6 】

【表 1 5】

表 1 0 : マウスにおけるインビボで試験したガイド R N A の配列及び化学修飾

ガイド名	配列	配列番号
mH364-7-1	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGA GAAUCGAAAGAUUCUUAUAAGGCAUCCUCCG AUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGG AGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1795
mH364-20-1	mU*mU*mC*AGCAAGUCCACUGUUGUCUGUUGA GAAUCGAAAGAUUCUUAUAAGGCAUCCUCCG AUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGG AGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1808
mH364-7-35	mG*mA*mG*mC*UGGCCACUGUGCGAGGUAGUUG AGAAUCmG*mA*mA*mA*GAUUCUUAUAAGGC AUCmC*mU*mU*mC*mC*GAUGCUGACUUCUCAC CGUCCGUUUUCCmA*mA*mU*mA*GGAGCGGGCG GUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1816
mH364-20-35	mU*mU*mC*mA*GCAAGUCCACUGUUGUCUGUUG AGAAUCmG*mA*mA*mA*GAUUCUUAUAAGGC AUCmC*mU*mU*mC*mC*GAUGCUGACUUCUCAC CGUCCGUUUUCCmA*mA*mU*mA*GGAGCGGGCG GUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1826

m : 2' - O メチル修飾塩基、* : ホスホロチオエート骨格

【 0 4 0 7 】

M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼをコードする m R N A を、T 7 R N A ポリメラーゼ、ヌクレオチド、及び酵素を使用して、直線化プラスミドテンプレートのインビトロ転写によって生成した。

【 0 4 0 8 】

R N A に転写した D N A 配列（配列番号 6 0 3）は、5' から 3' の順序で以下のエレメント：T 7 R N A ポリメラーゼプロモーター、5' 非翻訳領域（5' U T R）、核局在化シグナル、短いリンカー、M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼのコード配列、短いリンカー、核局在化シグナル、並びに 3' 非翻訳領域及びおよそ 1 0 0 個のヌクレオチドのポリ A テール（配列番号 2 8 6 5）（配列番号 6 0 3 には含まれない）を含んだ。

【 0 4 0 9 】

この M G 3 - 6 / 3 - 4 カセットにコードした合成 m R N A 中にコードしたタンパク質配列は、5' から 3' に以下のエレメント：S V 4 0 由来の核局在化シグナル、5つのアミノ酸のリンカー（G G G G S（配列番号 2 8 6 4））、開始メチオニンコドンを除いた M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼのタンパク質コード配列、3つのアミノ酸のリンカー（S G G）、及びヌクレオプラスミン由来の核局在化シグナルを含む。このカセットのタン

パク質コード領域のDNA配列を、ヒトにおけるコドン使用を反映するように修飾した。およそ100個のヌクレオチドのポリAテール（配列番号2865）を、インビトロ転写に使用するプラスミドにコードし、mRNAを共転写的にキャッピングした。mRNA中のウリジンを、N1-メチルシュドウリジンで置換した。

【0410】

MG3-6 / 3-4 mRNA及びガイドRNAを送達するために使用した脂質ナノ粒子（LNP）製剤は、4つの脂質成分を含んだ。4つの脂質成分をエタノールに溶解し、適切なモル比で混合して、脂質ワーキングミックスを作製した。mRNA及びガイドRNAを、製剤化前に1：1の質量比で混合するか、又は別個のLNPで製剤化し、それらを後に2つのRNAの1：1の質量比でマウスに同時注射した。いずれの場合でも、RNAを100mMの酢酸ナトリウム（pH4.0）中に希釈して、RNAワーキングストックを作製した。脂質ワーキングストック及びRNAワーキングストックを、マイクロ流体装置中で、それぞれ、1：3の流量比、及び12mL／分の流量で混合した。LNPを、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して2～16時間透析し、次いで、所望の低減された体積が達成されるまで濃縮した。LNP製剤中のRNAの濃度を、Ribogreen試薬を使用して測定した。LNPの直径及び多分散性（PDI）を、動的光散乱によって決定した。代表的なLNPは、65nm～120nmの範囲にある直径を有し、PDIは0.05～0.20であった。LNPを、8～12週齢のC57BL6野生型マウスに、尾静脈（マウス当たり0.1mL）を介して、体重1kg当たり1mgのRNA総RNA用量で静脈内注射した。投与後11日目に、各群中の5匹のマウスのうちの3匹を殺し、肝臓を収集し、消化緩衝液中のビードビーターを使用してホモジナイズした。ゲノムDNAを、得られたホモジネートから精製し、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。緩衝液のみを注射したマウスから精製したゲノムDNAを対照として使用した。投与後28日目に、各群中の残り2匹のマウスを殺し、肝臓を収集し、消化緩衝液中のビードビーターを使用してホモジナイズした。ゲノムDNAを、得られたホモジネートから精製し、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。緩衝液のみを注射したマウスから精製したゲノムDNAを対照として使用した。

【0411】

次いで、肝臓ゲノムDNAを、2つのガイドによって標的化される領域に隣接するプライマーの第1のセットを使用してPCR増幅した。使用したPCRプライマーを以下の表11に示す。

【0412】

【表16】

表11： マウスにおけるインビボゲノム編集を分析するために使用したPCRプライマー及び次世代配列決定プライマーの配列

プライマーセット名	目的	左プライマー配列	右プライマー配列
mHAOI-NGS-P4	ガイド mH364-7 についての HAOI エクソン 2 の標的部位を増幅する	GTAAAGAAAAACAAGGAA TGTAAT(配列番号 2866)	ATCTGTCAACTTCTGTTT TAGGAC(配列番号 2868)
mHAOI-NGS-P5	ガイド mH364-20 についての HAOI エクソン 4 の標的部位を増幅する	GCAAAGTAGAGAAATGAC AAACC(配列番号 2867)	ACCAAGTCAGATATAAAA CTGTCT(配列番号 2869)

【0413】

これらのプライマーの5'末端は、配列多様性を与え、配列決定品質を改善するために、第2のPCRで使用したPCRプライマーに相補的な保存された領域、続いて5Nを含み、マウスゲノム中の標的領域に相補的な配列で終わる。PCRを、100ngのゲノムDNA及び60℃のアニーリング温度を使用して、合計30サイクルにわたって行った。続いて、次世代配列決定のための固有のデュアルバーコードを追加するように設計したプライマーを使用したPCRの10サイクルの第2ラウンドを行った。各試料を、150bpの対形成した最終読み取り値を使用して、10,000リードを超える深さまで配列決定した。読み取り値を合わせて、単一の250bpの配列を生成し、そこからインデル割合及びインデルプロファイルを計算した。

10

【0414】

投与の11日後のマウス由来のインデルのNGS分析の結果を、個々のマウスについて表12に示し、図23に要約する。

【0415】

20

30

40

50

【表 17】

表 12： 次世代配列決定によって分析した LNP 投与の 11 日後の野生型マウスの肝臓全体における MG3-6/3-4 による HAO-1 遺伝子座でのゲノム編集。

動物番号	ガイド RNA	NGS 読み取り値の合計	インデル%	インデル OOF%	平均インデル	平均総 OOF%
1	PBS 対照	210962	0.09	100	0.2	0.2
2	PBS 対照	259982	0.29	99.87		
3	PBS 対照	211193	0.08	100		
6	364mHA-G7-1	164396	54.06	87.02	53.0	46.0
7	364mHA-G7-1	163409	51.93	85.9		
8	364mHA-G7-1	183054	52.94	87.6		
11	364mHA-G7-35	38835	22.71	91.57	23.6	21.1
12	364mHA-G7-35	269963	26.83	89.59		
13	364mHA-G7-35	190007	21.32	87.11		
16	364mHA-G20-1	227766	8.53	88.62	8.9	7.5
17	364mHA-G20-1	202915	5.01	90.36		
18	364mHA-G20-1	236757	13.06	80.52		
21	364mHA-G20-35	177059	2.78	80.98	2.5	2.0
22	364mHA-G20-35	163515	2.29	67.62		
23	364mHA-G20-35	136634	2.31	89.32		

個々のマウスについてのデータを示す。ガイド RNA LNP を受けたマウスは全て、MG3-6/3-4 mRNA を封入している LNP も受けた。インデル OOF の % は、HAO1 コード配列がフレーム外である配列をもたらした全てのインデルの割合である。平均総 OOF % は、HAO1 コード配列がフレーム外である全対立遺伝子の平均割合である。NGS 配列決定の読み取りの総数を与える。

【0416】

群 2 のマウスは、ガイド RNA mH364-7-1 を封入している LNP を受けた。群 3 のマウスは、ガイド RNA mH364-7-35 を封入している LNP を受けた。群 4 のマウスは、ガイド RNA mH364-20-1 を封入している LNP を受けた。群 5 のマウスは、ガイド RNA mH364-20-35 を封入している LNP を受けた。群 2～5 の全てのマウスはまた、注射前に 1：1 の RNA 質量比で LNP を含有するガイド RNA と混合した MG3-6/3-4 mRNA を封入している LNP を受けた。PBS 緩衝液を注射したマウスの肝臓では、インデルを検出しなかった（表 12 を参照）。ガイド 364mHA-G7-1 及び MG3-6/3-4 を封入している LNP を注射したマウ

スは、平均頻度 53.0% で、HAO-1 の標的部位でインデルを示した。ガイド 364mHA-G7-35 及び MG3-6/3-4 を封入している LNP を注射したマウスは、平均頻度 23.6% で、HAO-1 の標的部位でインデルを示した。ガイド 364mHA-G20-1 及び MG3-6/3-4 を封入している LNP を注射したマウスは、平均頻度 8.9% で、HAO-1 の標的部位でインデルを示した。ガイド 364mHA-G20-35 及び MG3-6/3-4 を封入している LNP を注射したマウスは、平均頻度 2.5% で、HAO-1 の標的部位でインデルを示した。これらのデータは、同じ化学修飾を有するガイドを比較するとき、スパーサー 7 (364mHA-G7-1 及び 364mHA-G7-35) を有するガイドが、スパーサー 20 を有するガイド (364mHA-G20-1 及び 364mHA-G20-35) よりもインビボで有意に強力であることを示す。これは、mRNA ベースのトランスフェクションによって、Hepa1-6 細胞においてこれら 2 つのガイド配列で観察した高レベルの編集と一致する (mH364-7 は、Hepa1-6 細胞において 46% のインデルを示し、mH364-20 は、26% のインデルを示した)。ガイド化学 #1 は、ガイド 7 (化学 #1 で 2.2 倍高い編集) 及びガイド 20 (化学 #1 で 3.5 倍高い編集) の両方について化学 #35 よりも高いレベルの編集をもたらした。これらのデータは、MG3-6/3-4 ヌクレアーゼが、sgRNA によって特定される標的部位で、マウスにおいてインビボで編集できることを示す。更に、化学 #1 と指定した化学修飾のセットを有する sgRNA は、LNP を使用して送達されたとき、肝臓全体中のゲノム DNA の 53% で編集を促進することができた。これらの研究で使用した LNP は、低密度リボタンパク質受容体への結合のリガンドである LNP へのアポリタンパク質 E (apoE) の結合を介して取り込まれる。

10

20

【0417】

肝臓は、多数の異なる細胞タイプから構成されている。マウスの肝臓では、肝細胞は、全細胞の約 52% を構成し (肝細胞の 35% は 2 つの核を含有する)、クッパー細胞 (18%)、伊東細胞 (8%)、及び内皮細胞 (22%) が残りの細胞を構成する。外挿によって、理論に拘束されることを望むものではないが、マウス肝臓における総核の約 60% $\left[\left(52 + (0.35 \times 52) \right) / \left(48 + (52 + (0.35 \times 52)) \right) \right]$ が肝細胞に由来すると予測される。LDL 受容体は、主に肝臓における肝細胞上で発現されるため、本明細書に記載のマウス研究で使用した LNP は、主に肝細胞によって取り込まれることが予想される。肝細胞核は、マウスの肝臓全体の全核の約 60% を占めるため、全ての肝細胞核が編集された場合、肝臓全体で測定したインデルのレベルは、約 60% であると予測すると予測することができる。MG3-6/3-4 の LNP 送達で 53% のインデル率を達成することができたという所見は、肝細胞核の大部分が編集されたことを示唆している。

30

【0418】

HAO1 遺伝子は、グリコール酸代謝に関与する細胞内酵素であるタンパク質グリコール酸オキシダーゼ (GO) をコードする。HAO1 遺伝子で観察した遺伝子編集が肝臓における GO タンパク質の発現の低減をもたらしたかを判断するために、肝臓の別個の葉からの総タンパク質を、同じ研究のマウスから抽出した。GO タンパク質を、マウス GO タンパク質に対する市販の抗体を用いたウェスタンブロットアッセイを使用して検出した。ピンキュリンのレベルは、HAO1 遺伝子の遺伝子編集によって影響を受けないと予測するため、タンパク質ピンキュリンをウェスタンブロットのローディング対照として使用した。図 24 に示すように、GO タンパク質のレベルは、MG3-6/3-4 mRNA 及び HAO1 を標的化する sgRNA を封入している LNP で処置したマウスの肝臓で有意に低減された。画像分析ソフトウェアを使用したウェスタンブロットの定量化及びピンキュリンレベルへの GO の正規化は、GO レベルが、それぞれ、sgRNA mH364-7-1、mH364-7-35、mH364-20-1、及び mH364-20-35 で処置したマウスにおいて平均 75%、58%、4%、及び 24% 低減されたことを示した。GO タンパク質の低減の程度は、マウスのこれらの群におけるインデル頻度と相関する (表 12 を参照)。これらのデータは、適切に設計した sgRNA と組み合わせた MG3

40

50

－ 6 / 3－ 4ヌクレアーゼを使用して、生きている哺乳動物においてインビボで対象の遺伝子においてインデルを作製し、その遺伝子によってコードされるタンパク質の産生を低減する（ノックダウンする）ことができることを示す。特定の遺伝子の発現の低減は、特定の疾患において治療上有益であり得る。GOタンパク質をコードするHAO1遺伝子の場合、肝臓におけるGOタンパク質のレベルの低減は、遺伝性疾患である原発性高シュウ酸尿症Ⅰ型を有する患者において有益であると予想される。したがって、MG3－6 / 3－4ヌクレアーゼは、HAO1遺伝子を標的化する適切な化学修飾を含有する適切なsgRNAとともに、原発性高シュウ酸尿症Ⅰ型の治療のための潜在的なアプローチである。

【 0 4 1 9 】

実施例 19－4つの異なる化学修飾を有する同じガイドRNA配列を使用したマウスにおけるMG3－6 / 3－4遺伝子編集効率の比較

インビボでの編集効率に対するsgRNAへの化学修飾の影響を、同じガイドRNA配列に導入した4つの異なるガイド化学を試験することによって更に調べた。マウスHAO1遺伝子を標的化するガイドRNA7を、化学修飾#1、#35、#42、又は#45で合成した。これらのガイドの配列を以下の表13に示す。

【 0 4 2 0 】

【表 1 8】

表 1 3 : マウスHAO1を標的化するMG3－6 / 3－4 sgRNAガイド7の配列

ガイド名	配列	配列番号
mH364-7-1	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAA UCGAAAGAUUCUAAUAAGGCAUCCUCCGAUGCU GACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGC GGUAUGU*mU*mU*mU	1821
mH364-7-35	mG*mA*mG*mC*UGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAG AAUCmG*mA*mA*mA*GAUUCUAAUAAGGCAUCmC *mU*mU*mC*mC*GAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUU UUCCmA*mA*mU*mA*GGAGCGGGCGGUA*mU*mG* mU*mU*mU*mU	1822
mH364-7-42	mG*mA*mG*mC*fufGfGfCfCfAfCfufGfufGfCfGfAfGfGf UAGUUGAGAAUCG*A*A*A*GAUUCUAAUAAGGCA UCC*U*U*C*C*GAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUU UCCA*A*U*A*GGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU* mU*mU	1823
mH364-7-45	mG*mA*mG*mC*fufGfGfCfCfAfCfufGfufGfCfGfAfGfGf UAGUUGAGAAUCmG*mA*mA*mA*GAUUCUAAUA GGCAUCmC*mU*mU*mC*mC*GAUGCUGACUUCUCA CCGUCCGUUUUCCmA*mA*mU*mA*GGAGCGGGCGG UA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1824
m: 2' -O メチル修飾塩基、*:ホスホロチオエート骨格		

【 0 4 2 1 】

MG3－6 / 3－4ヌクレアーゼをコードするmRNAを、T7 RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド、及び酵素を使用して、直線化プラスミドテンプレートのインビトロ転写によって生成した。RNAに転写したDNA配列は、5'から3'の順序で以下のエレメント：T7 RNAポリメラーゼプロモーター、5'非翻訳領域（5'UTR）、核局在化シグナル、短いリンカー、MG3－6 / 3－4ヌクレアーゼのコード配列、短いリンカー、

核局在化シグナル、並びに3'非翻訳領域（配列番号603）及びおよそ100個のヌクレオチドのポリAテール（配列番号2865）（配列番号603には含まれない）を含んだ。

【0422】

このMG3-6/3-4カセットにコードした合成mRNA中にコードしたタンパク質配列は、5'から3'に以下のエレメント：SV40由来の核局在化シグナル、5つのアミノ酸のリンカー（GGGGS（配列番号2864））、開始メチオニンコドンを除いたMG3-6/3-4ヌクレアーゼのタンパク質コード配列、3つのアミノ酸のリンカー（SGG）、及びヌクレオプラスミン由来の核局在化シグナルを含む。このカセットのタンパク質コード領域のDNA配列を、ヒトにおけるコドン使用を反映するように修飾した。およそ100個のヌクレオチドのポリAテール（配列番号2865）を、インビトロ転写に使用するプラスミドにコードし、mRNAを共転写的にキャッピングした。mRNA中のウリジンを、N1-メチルシュードウリジンで置換した。MG3-6/3-4 mRNA及びガイドRNAを送達するために使用した脂質ナノ粒子（LNP）製剤は、上記のLNP製剤に基づいている。4つの脂質成分をエタノールに溶解し、適切なモル比で混合して、脂質ワーキングミックスを作製した。mRNA及びガイドRNAを、製剤化前に1:1の質量比で混合するか、又は別個のLNPで製剤化し、それらを後に2つのRNAの1:1の質量比でマウスに同時注射した。いずれの場合でも、RNAを100mMの酢酸ナトリウム（pH4.0）中に希釈して、RNAワーキングストックを作製した。脂質ワーキングストック及びRNAワーキングストックを、マイクロ流体装置中で、それぞれ、1:3の流量比、及び12mL/分の流量で混合した。LNPを、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して2~16時間透析し、次いで、低減された体積が達成されるまで濃縮した。LNP製剤中のRNAの濃度を、Ribogreen試薬を使用して測定した。LNPの直径及び多分散性（PDI）を、動的光散乱によって決定した。代表的なLNPは、65nm~120nmの範囲にある直径を有し、PDIは0.05~0.20であった。LNPを、8~12週齢のC57BL/6野生型マウスに、尾静脈（マウス当たり0.1mL）を介して、体重1kg当たり1mgのRNA総RNA用量で静脈内注射した。投与後10日目に、各群中の5匹のマウスのうち3匹を殺し、肝臓を収集し、消化緩衝液中のビードビーターを使用してホモジナイズした。ゲノムDNAを、得られたホモジネートから精製し、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。緩衝液のみを注射したマウスから精製したゲノムDNAを対照として使用した。投与後28日目に、各群中の残り2匹のマウスを殺し、肝臓を収集し、消化緩衝液中のビードビーターを使用してホモジナイズした。ゲノムDNAを、得られたホモジネートから精製し、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。緩衝液のみを注射したマウスから精製したゲノムDNAを対照として使用した。

【0423】

次いで、肝臓ゲノムDNAを、2つのガイドによって標的化される領域に隣接するプライマーの第1のセットを使用してPCR増幅した。使用したPCRプライマーを表11に示す。これらのプライマーの5'末端は、配列多様性を与え、配列決定品質を改善するために、第2のPCRで使用したPCRプライマーに相補的な保存された領域、続いて5Nを含み、マウスゲノム中の標的領域に相補的な配列で終わる。PCRを、100ngのゲノムDNA及び60℃のアニーリング温度で、合計30サイクルにわたって行った。続いて、次世代配列決定のための固有のデュアルバーコードを追加するように設計したプライマーを使用したPCRの10サイクルの第2ラウンドを行った。各試料を、150bpの対形成した最終読み取り値を使用して、10,000リードを超える深さまで配列決定した。読み取り値を合わせて、単一の250bpの配列を生成し、そこからインデル割合及びインデルプロファイルを計算した。

【0424】

編集結果を図25に要約し、表14に集計する。

【0425】

10

20

30

40

50

【表 19-1】

表 14 : MG3-6/3-4 mRNA並びに化学修飾42 (mH364-7-42)、45 (mH364-7-45)、1 (mH364-7-1)、及び35 (mH364-7-35)を含むHAO-1遺伝子を標的化するガイドRNA7を封入しているLNPで処置した個々のマウスの肝臓全体におけるHAO1遺伝子のゲノム編集頻度

日	mH364ガイド7化学物質	マウス	インデル%	平均群インデル	Stdev
10	PBS 対照	1	0.01	0.0	0.0
10	PBS 対照	2	0.01		
10	PBS 対照	3	0.01		
28	PBS 対照	4	0.02		
28	PBS 対照	5	0.02		
10	42	6	33.54	32.4	2.5
10	42	7	28.48		
10	42	8	31.3		
28	42	9	34.43		
28	42	10	34.19		
10	45	11	29.22	32.1	5.8
10	45	12	37.04		
10	45	13	37.24		
28	45	14	33.57		
28	45	15	23.63		

【0426】

10

20

30

40

50

【表 19-2】

日	mH364 ガイド 7 化学物質	マウス	インデル%	平均群インデル	Stdev
10	1	16	42.04	46.1	3.1
10	1	17	45.38		
10	1	18	50.8		
28	1	19	46.31		
28	1	20	45.98		
10	35	21	24.95	26.6	2.3
10	35	22	29.93		
10	35	23	24.75		
28	35	24	28.14		
28	35	25	25.22		

【0427】

PBS 緩衝液を注射した対照マウスは、ガイド 7 の標的部位に測定可能なインデルを含有しなかった。ガイド mH364-7-1、mH364-7-35、mH364-7-42、及び mH364-7-45 を含有する LNP を受け取ったマウスにおける平均インデル頻度は、それぞれ、46.1%、26.6%、32.4%、及び 32.1% であり、ガイド RNA 化学 #1 が最も強力であり、続いて #42 及び #45 であり、化学 #35 が最も強力ではないことを示している。これらのデータは、ガイド RNA の 5' 末端及び 3' 末端の塩基及び骨格に対する化学修飾が、試験した化学の中で最も高いインビボ効力をもたらしたことを示唆している。内部塩基の追加の修飾は、インビボでの効力を改善しなかった。これらの所見は、sgRNA の両端及び内部配列での塩基又は骨格の修飾が、最適なインビボ編集に必要であった場合、spCas9 sgRNA の公表データと対照的であり、sgRNA の 5' 末端及び 3' 末端のみの修飾が、同様の LNP における送達を使用して肝臓における低レベルの編集（20% のインデル）を可能にした。

【0428】

全 RNA を、表 14 に記載した同じマウス由来の肝臓の別個の葉から精製し、デジタル液滴 PCR (dd-PCR) によって HAO-1 mRNA のレベルを測定するために使用した。PBS を注射したマウスを対照として使用し、編集したマウスの肝臓における H

A O - 1 mRNA レベルをこれらの対照と比較した。d d - P C R アッセイを、分子生物学技術を使用して設計し、最適化した。d d P C R は、複合体混合物中の特定の核酸の絶対的なコピー数を決定するための非常に正確な方法である。総肝臓 R N A を、逆転写により c D N A にまず変換し、次いで G A P D H を内部対照として使用して d d - P C R アッセイにおいて定量して、試料間で正規化した。表 1 5 A に示す通り、M G 3 - 6 / 3 - 4 mRNA 及びマウス H A O 1 遺伝子を標的化する s g R N A を封入している L N P で処置した個々のマウスにおける H A O 1 mRNA のレベルは減少し、減少の程度は、インデル頻度と相関した。

【 0 4 2 9 】

【表 2 0 - 1】

表 1 5 A : M G 3 - 6 / 3 - 4 mRNA 並びに化学修飾 4 2 (m H 3 6 4 - 7 - 4 2) 、 4 5 (m H 3 6 4 - 7 - 4 5) 、 1 (m H 3 6 4 - 7 - 1) 、 及び 3 5 (m H 3 6 4 - 7 - 3 5) を含む H A O - 1 遺伝子を標的化するガイド RNA 7 を封入している L N P で処置した個々のマウスの肝臓全体における H A O 1 mRNA レベル

採取日	mH364 ガイド 7 化学物質	マウス	HAO mRNA の減 少%	HAO mRNA の平 均群減少%	Stdev
10	42	6	47.4	35.5	8.8
10	42	7	42.4		
10	42	8	29.0		
28	42	9	29.6		
28	42	10	28.9		
10	45	11	20.3	38.0	10.2
10	45	12	38.6		
10	45	13	41.8		
28	45	14	45.9		
28	45	15	43.2		
10	1	16	57.0	60.0	3.9
10	1	17	54.7		
10	1	18	62.5		
28	1	19	63.1		
28	1	20	62.6		
10	35	21	18.3	23.4	20.8

【 0 4 3 0 】

【 表 2 0 - 2 】

採取日	mH364 ガイド 7 化学物質	マウス	HAO mRNA の減 少%	HAO mRNA の平 均群減少%	Stdev
10	35	22	-2.5		
10	35	23	14.8		
28	35	24	52.6		
28	35	25	33.8		

表 1 0にあるものと同じマウスを分析した

【 0 4 3 1 】

HAO 1 mRNAの最大の低減は、sgRNA mH364-7-1で処置したマウスの群に見られ、一方、sgRNA mH364-7-35で処置したマウスでは、HAO-1 mRNAの最小の低減を観察した。HAO 1 mRNAの低減は、ナンセンス媒介性崩壊と呼ばれる機序を介して、フレームシフト変異を遺伝子のコード配列に導入するときに生じ得る。MG3-6/3-4を有するHAO-1遺伝子で編集したマウスの肝臓における低減されたHAO-1 mRNAの観察は、表 1 5 A～1 5 Bに示すように、高いフレームシフト率をもたらすインデルの存在と一致する。

【 0 4 3 2 】

【 表 2 1 】

表 1 5 B : MG3-6/3-4 mRNA及びHAO-1遺伝子を標的化するsgRNA 番号7 (G7) を封入しているLNPで処置したマウスの肝臓におけるフレームシフトをもたらす編集の頻度の分析

処置	平均インデル	インデルの Stdev	平均総 OOF%	Stdev 総 OFF%
PBS 対照	0.0	0.0	0.0	0.0
mH364-7-42	31.1	2.1	28.6	1.7
mH364-7-45	34.5	3.7	31.2	3.2
mH364-7-1	46.1	3.6	41.9	3.4
mH364-7-35	26.5	2.4	24.3	2.5

フレーム外割合 (OOF%) を、NGSデータを分析することによって計算した

【 0 4 3 3 】

表 1 5 Bでは、HAO 1コード配列のフレームシフトをもたらすインデルの平均頻度を、NGSデータから決定した。この分析は、インデルの大部分が、試験したsgRNAの4つ全てのフレームシフトをもたらしたことを示す。

【0434】

HAO1遺伝子は、グリコール酸代謝に関与する細胞内酵素であるタンパク質グリコール酸オキシダーゼ（GO）をコードする。HAO1遺伝子で観察した遺伝子編集が肝臓におけるGOタンパク質の発現の低減をもたらしたかを判断するために、肝臓の別個の葉から総タンパク質を、図25及び表14～15Bに記載した同じ研究のマウスから抽出した。GOタンパク質を、マウスGOタンパク質に対する市販の抗体を用いたウェスタンブロットアッセイを使用して検出した。等量のタンパク質をウェスタンブロットにロードした。図26に示すように、GOタンパク質のレベルは、MG3-6/3-4 mRNA及びHAO1を標的化するsgRNAを封入しているLNPで処置したマウスの肝臓で低減された。ガイドmH364-7-42（マウス7、8）、mH364-7-45（マウス12、13）、及びmH364-7-1（マウス17、18）は、GOタンパク質の明らかな低減をもたらした。試験した4つのガイドの中で最も低いレベルのインデルを有したガイドmH364-7-35（マウス22、23）は、GOタンパク質レベルを顕著に低減しなかった。これらのデータは、適切に設計したsgRNAと組み合わせたMG3-6/3-4ヌクレアーゼを使用して、生きている哺乳動物においてインビボで対象の遺伝子においてインデルを作製し、その遺伝子によってコードされるタンパク質の産生を低減する（ノックダウンする）ことができることを示す。特定の遺伝子の発現の低減は、特定の疾患において治療上有益であり得る。GOタンパク質をコードするHAO1遺伝子の場合、肝臓におけるGOタンパク質のレベルの低減は、遺伝性疾患である原発性高シュウ酸尿症I型を有する患者において有益であると予想される。したがって、MG3-6/3-4ヌクレアーゼは、HAO1遺伝子を標的化する適切な化学修飾を含有する適切なsgRNAとともに、原発性高シュウ酸尿症I型の治療のための潜在的なアプローチである。

10

20

【0435】

実施例20-Hep3B細胞のmRNAトランスフェクションを使用したヒトHAO-1遺伝子のMG3-6/3-4ヌクレアーゼガイドスクリーニング

ヒトHAO-1遺伝子（グリコール酸オキシダーゼをコードする）のエクソン1～4を標的化するMG3-6/3-4ヌクレアーゼのガイドRNAを、PAM配列5' NNA A A（A/T）N 3'を検索することによってインシリコで特定した。ヒトゲノムにおいて最も少ない予測されたオフターゲット部位を有する合計20個のガイドを、標的化配列をMG3-6/3-4のガイド足場（例えば、配列番号722又は配列番号863）に挿入することによって、AltR1/AltR2と指定した末端修飾を有する単一ガイドRNAとして化学的に合成した。

30

【0436】

Hep3Bトランスフェクションプロトコル

【0437】

300 ngのmRNA及び120 ngの単一ガイドRNAを、以下のようにヒト肝臓がん細胞株Hep3Bにトランスフェクトした。

【0438】

トランスフェクションの1日前に、Pen/Stepを含まないEMEM-10% FBS-2 mMグルタミン-1% NEAA培地中で10日未満培養したHep3B細胞を、TC処理した24ウェルプレートに播種した。細胞を計数し、60,000個の生細胞を含有する体積を各ウェルに加えた。追加の予め平衡化した培地を各ウェルに加えて、総体積を500 µLにした。

40

【0439】

トランスフェクションの日に、300 ngのMG3-6/3-4 mRNA及び120 ngのsgRNAをHep3B細胞にトランスフェクトした。

【0440】

トランスフェクションの2日後、培地をHep3B細胞の各ウェルから吸引除去し、自動磁気ビーズ精製によってゲノムDNAを精製した。

【0441】

50

PCR増幅及びサンガー配列決定による編集分析

【0442】

単一ガイドによって標的化されたHAO-1遺伝子配列を、エクソン特異的プライマー（以下の表16）を使用して、精製されたゲノムDNAからのPCRによって増幅した。

【0443】

【表22】

表16：最初の4つのエクソンのPCR増幅及びサンガー配列決定に使用した、ヒトHAO1遺伝子用に設計したプライマー

標的エクソン	使用	プライマー名	プライマー配列	配列番号
ヒトHAO1エクソン1	フォワードPCR	PCR_hHe1_F_+490	TTTCATGGATGCCCCGTTCA	2870
	リバーズPCR	PCR_hHe1_R_-412	ACGAAAAGCCAGCAGGAAGA	2871
	配列決定	Seq_hHe1_R_-121	AGCCCCAAGAACTTTTCCCT	2872
ヒトHAO1エクソン2	フォワードPCR	PCR_hHe2_F_+391	TGCATCAGTGGTTGTCAGGG	2873
	リバーズPCR	PCR_hHe2_R_-387	CCTAGCTGTGACTTTGGGCA	2874
	配列決定	Seq_hHe2_R_-152	TGGAAAGAAGAGGAGCAGGAC	2875
ヒトHAO1エクソン3	フォワードPCR	PCR_hHe3_F_+238	AGGCTGGATGTTTCAGGTTCTT	2876
	リバーズPCR	PCR_hHe3_R_-212	TCCCAAAGCCAAAGCCCTTA	2877
	配列決定	Seq_hHe3_F_+186	AGCAGAAATAACTCCAGTAGCCA	2878
ヒトHAO1エクソン4	フォワードPCR	PCR_hHe4_F_+324	GCTGGCTGAAAATCGTGTCAA	2879
	リバーズPCR	PCR_hHe4_R_-348	TCCTTGGGGCTTCTCTTTGG	2880
	配列決定	Seq_hHe4_F_+174	ACTGATTAAGACCACTAGAGTAT CACA	2881

【0444】

PCR産物を精製及び濃縮し、40ngのPCR産物をサンガー配列決定に供した。サンガー配列決定クロマトグラムを、各ガイドの予測した標的部位における挿入及び欠失（インデル）について分析した。標的部位におけるインデルの存在は、DNAにおける二本鎖切断の生成の結果であり、それは次いで、挿入及び欠失を導入するエラーが発生しやすい細胞修復機構によって修復される。このスクリーニングから、ガイドhH364-9、

２３、３２、及び３５を、ＰＨＨ細胞における編集についてアッセイされる最も活性なガイドとして特定した（図２７及び以下の表１７）。

【０４４５】

【表２３】

表１７：ＭＧ３－６／３－４ガイドに基づいて、ｍＲＮＡトランスフェクションによって送達されるヒトＨＡＯ１遺伝子を標的化するＭＧ３－６／３－４ガイドの編集活性

ガイド名	PAM	配列番号	スペーサー配列(標的化配列)	Hep3Bにおける編集活性(平均インデル%)	PHHにおける編集活性(平均インデル%)
hH364-1	ACAAATT	2882	CATGTTGTTTCATAATCATTGAT	6.0	
hH364-2	CTAAATC	2883	ATCAATGATTATGAACAACATG	0.0	
hH364-4	GCAAAATG	2884	ATATGACTATTACAGGTCTGGG	11.0	
hH364-9	AGAAAAT	2885	ATATTGCAGCATTTTCCAGGTA	27.5	25.7
hH364-12	CTAAAAC	2886	ATTGGCATGCTGACCCTCTGTC	0.0	
hH364-14	ACAAATA	2887	CAGGTAAGGTGTGTCCACTGTC	0.0	
hH364-16	TAAAATA	2888	CTGGTTTCAAAAATTTTTCATCC	0.0	
hH364-17	CTAAAAT	2889	ACTGGTTTCAAAAATTTTTCATC	0.0	
hH364-18	TGAAAAA	2890	TTATGCATTCTTATTTTAGGA	0.0	
hH364-19	GAAAAAT	2891	TATGCATTCTTATTTTAGGAT	2.5	
hH364-20	AAAAATT	2892	ATGCATTCTTATTTTAGGATG	7.0	
hH364-22	CAAAATT	2893	GAAAAATGATAAAGTACTGGTTT	0.0	
hH364-23	TCAAAAT	2894	AGAAAAATGATAAAGTACTGGTT	36.5	26.3
hH364-27	GGAAAAAT	2895	GTACTTTATCATTTTCTCCTGA	0.0	
hH364-28	GAAAAAT	2896	TACTTTATCATTTTCTCCTGAG	0.0	
hH364-29	CAAAATT	2897	GCAGCAAGTCCACTGTCGTCTC	0.0	
hH364-30	CCAAAAAT	2898	TGCAGCAAGTCCACTGTCGTCT	10.5	
hH364-32	TCAAAATG	2899	CCATCTATCAGCTGGGAAGATA	60.0	25.0
hH364-34	CAAAATG	2900	GTAGAGAAATAAACGAACCTCT	0.0	
hH364-35	TCAAAAT	2901	AGTAGAGAAATAAACGAACCTC	20.0	26.3

【０４４６】

実施例２１－初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）のｍＲＮＡトランスフェクションを使用したヒトＨＡＯ－１遺伝子のＭＧ３－６／３－４ヌクレアーゼガイドスクリーニング

Ｈｅｐ３Ｂ細胞において最も高い編集活性を有する４つのＭＧ３－６／３－４単一ガイドＲＮＡ（ガイド９、２３、３２、及び３５）を、末端修飾（以下の表１８）で化学的に合成し、ＨＰＬＣによって精製し、初代ヒト肝細胞にトランスフェクトした。

【0447】

【表24】

表18：初代ヒト肝細胞でアッセイした化学修飾MG3-6/3-4ガイドの配列（m=2'-Oメチル修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合）

ガイド	配列	配列番号
hH364-9	mA*mU*mA*UUGCAGCAUUUCCAGGUAGUUGAGAAUCGAAAG AUUCUUAUAAGGCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCC GUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1862
hH364-23	mA*mG*mA*AAAUGAUAAAGUACUGGUUGUUGAGAAUCGAAAG AUUCUUAUAAGGCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCC GUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1863
hH364-32	mC*mC*mA*UCUAUCAGCUGGGAAGAUAGUUGAGAAUCGAAAG AUUCUUAUAAGGCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCC GUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1864
hH364-35	mA*mG*mU*AGAGAAAUAACGAACCUCGUUGAGAAUCGAAAG AUUCUUAUAAGGCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCC GUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1865
化学修飾に関する表記法:m=2' O-メチルリボヌクレオチド(例えば、mC=2' ヒドロキシルの代わりに2' -Oメチルを有するシトシンリボヌクレオチド);f=2' フッ素リボヌクレオチド(例えば、fC=2' ヒドロキシルの代わりに2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド);*=ホスホロチオエート結合。他の全ての塩基は、天然リボヌクレオチドである。		

【0448】

初代ヒト肝細胞トランスフェクションプロトコル

適切な標的化配列（1：20モル比のmRNA：ガイドRNA）を有する779.76 ngのMG3-6/3-4 mRNA及び470.24 ngのMG3-6/3-4単一ガイドRNAを、以下のように初代ヒト肝細胞（PHH）の細胞にトランスフェクトした。

【0449】

トランスフェクションの1日前に、PHH細胞を解凍し、ウェル当たり1,000,000個の生細胞でコラーゲン処理した12ウェルプレートに播種した。

【0450】

トランスフェクションの日に、779.76 ngのMG3-6/3-4 mRNA及び470.24 ngのsgRNAを混合し、PHH細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後、培地を採取まで毎日置き換えた。

【0451】

トランスフェクションの3日後、トランスフェクトした細胞のゲノムDNAを、自動磁気ビーズ精製によって精製した。

【0452】

PCR増幅及び次世代配列決定（NGS）による編集分析

各特異的sgRNAによって標的化されたHAO-1遺伝子の領域を、Q5ハイフィデリティDNAポリメラーゼ、及び合計29サイクルの次世代配列決定（NGS）に使用されるバーコード化プライマーに相補的なアダプターを有する遺伝子特異的プライマー（以下の表19）でPCR増幅した。

【0453】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 1 9 : 各ヒト H A O 1 ガイド標的部位を増幅するため及び N G S に使用されるプライマー

ガイド	プライマー セット 名	Miseq アダプターを有する フォワード	配列番号	Miseq アダプターを有する リバース	配列番号
hH364-9	hHAO1- NGS-P8	GCTCTTCCGATCTNNN NNCCCAAGAACTTTT CCCTCTC	2902	GCTCTTCCGATCTNNN NNCCCCCGGCTAATTT GTATCA	2906
hH364-23	hHAO1- NGS-P9	GCTCTTCCGATCTNNN NNGATGTCAGTCTTCT CAGCCA	2903	GCTCTTCCGATCTNNN NNGAGCAGTGAACAG CCAATTG	2907
hH364-32	hHAO1- NGS-P4	GCTCTTCCGATCTNNN NNTATGAACGTATCC ACAAAGGAT	2904	GCTCTTCCGATCTNNN NNTCTCTGAGGAAAA TTTTGGAG	2908
hH364-35	hHAO1- NGS-P10	GCTCTTCCGATCTNNN NNGAGTTGGAATGTC TCTCTCAA	2905	GCTCTTCCGATCTNNN NNTGGAGACGACAGT GGACTTG	2909

【 0 4 5 4】

この第 1 の P C R 反応の産物を、合計 1 0 サイクルを使用して N G S のバーコード化プライマーを使用して P C R 増幅した。得られた産物を N G S に供し、結果を分析して、H A O - 1 遺伝子の標的化部位に挿入又は欠失（インデル）を含有する配列決定読み取りの割合を生成した。結果は、4 つのガイド全てが、同様の活性で P H H における H A O - 1 遺伝子を編集したことを示す（図 2 8 及び表 1 7）。P H H は、インビボで肝細胞を編集するための代用である。これらのデータは、M G 3 - 6 / 3 - 4 ヌクレアーゼ及び適切な単一ガイド R N A が、H A O - 1 遺伝子のコード配列における挿入及び欠失（インデル）の生成に有用であることを示す。N G S 配列決定から得られたインデルプロファイルを使用して、フレームシフトをもたらすインデルの割合を決定した（すなわち、挿入又は欠失の塩基数が 3 又は 3 の倍数ではない）。ガイド 9、2 3、3 2、及び 3 5 について、編集された P H H においてフレーム外であったインデルの割合は、それぞれ 8 7 . 1 %、8 9 . 8 %、7 7 . 8 %、及び 8 2 . 0 % であった。

【 0 4 5 5】

実施例 2 2 - 2 つの M G 3 - 6 キメラ酵素についての哺乳動物細胞編集の実証及び P A M 配列の決定

レンチウイルスライブラリーを作製し、無作為化された 7 つの塩基対領域には、活性ガイド R N A の標的部位の配列が隣接した。2 9 3 個の細胞の集団を作製し、各細胞を、ライブラリーからの、平均して 5 つのレンチウイルス粒子によって形質導入した。適切なガイド R N A 及びキメラ酵素をコードする合致する m R N A（M G 3 - 7 及び M G 3 - 8 の P A M 相互作用ドメインを使用して、M G 3 - 6 の類似ドメインを置き換えた）を、2 9 3 個の細胞集団（2, 0 0 0, 0 0 0 個の細胞、2 5 0 0 n g の m R N A、及び 1 2 0 0 p m o l のガイド R N A）にエレクトロポレーションした。標的部位でのインデル形成を監視し、コンセンサス P A M 配列をコンパイルし、図 2 9 に示す。

【 0 4 5 6】

実施例 2 3 - 異なる化学修飾を有する M G 3 - 6 / 3 - 4 単一ガイド R N A のインビボ編集活性

M G 3 - 6 / 3 - 4 タイプ I I ヌクレアーゼが生きている動物においてインビボでゲノムを編集する能力を評価するために、脂質ナノ粒子を使用して、M G 3 - 6 / - 3 4 ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び同じヌクレオチド配列を有するが異なる R N A 化学物質を有する 6 つのガイド R N A のうちの 1 つを送達した。これらのガイドの配列を表 2 0 に示す。

【 0 4 5 7 】

【 表 2 6 】

表 2 0 : マウスにおけるインビボで試験したガイドRNAの配列及び化学修飾

ガイドRNA	配列	配列番号
mH364-7-1	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCGAAA GAUUCUUAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCG UCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1812
mH364-7-2	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCGAAA GAUUCUUAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCG UCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU *mU	1813
mH364-7-9	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCmGmA mAmAGAUUCUUAUAAGGCAUCmCmUmUmCmCGAUGCUGAC UUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmAGGAGCGGGCGGUAU GU*mU*mU*mU	1814
mH364-7-10	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCG*A* A*A*GAUUCUUAUAAGGCAUCC*U*U*C*C*GAUGCUGACUU CUCACCGUCCGUUUUCCA*A*U*A*GGAGCGGGCGGUAUGU*m U*mU*mU	1815
mH364-7-46	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCmGmA mAmAGAUUCUUAUAAGGCAUCmCmUmUmCmCGAUGCUGAC UUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmAGGAGCGGGCGGUA* mU*mG*mU*mU*mU*mU	1819
mH364-7-47	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCG*A* A*A*GAUUCUUAUAAGGCAUCC*U*U*C*C*GAUGCUGACUU CUCACCGUCCGUUUUCCA*A*U*A*GGAGCGGGCGGUA*mU*m G*mU*mU*mU*mU	1820

化学修飾に関する表記法：m = 2' オーメチルリボヌクレオチド（例えば、mC = 2' ヒドロキシルの代わりに2' -Oメチルを有するシトシンリボヌクレオチド）；f = 2' フッ素リボヌクレオチド（例えば、fC = 2' ヒドロキシルの代わりに2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド）；* = ホスホロチオエート結合。他の全ての塩基は、天然リボヌクレオチドである。

【 0 4 5 8 】

これらのガイドにおけるスパーサー配列は、マウスHАО-1遺伝子を標的化する。ガイドmH364-7-1は、末端修飾を有する。ガイドmH364-7-2は、3'末端に追加のメチル及びホスホロチオエート修飾を有する。ガイドmH364-7-9は、3つ全てのループに末端修飾及びメチル基を有する。ガイドmH364-7-10は、3つ全てのループに末端修飾及びホスホロチオエート結合を有する。ガイドmH364-7-46は、3つのループ全てにmH364-7-2と同じ5'及び3'末端修飾並びにメチル基を有する。ガイドmH364-7-47は、mH364-7-2と同じ5'及び3'末端修飾、並びにmH364-7-10にあるものと同じ3つ全てのループにおけるホスホロチオエート結合を有する。sgRNAにおける化学修飾は、インビボ効力に重要であるsgRNA安定性に影響を与えるため、インビボ編集に対するこれらの変化の影響を評価することが重要であった。

【 0 4 5 9 】

MG3-6 / 3-4 mRNAの調製

MG3-6 / 3-4をコードするmRNAを、T7 RNAポリメラーゼを使用した直線化プラスミドテンプレートのインビトロ転写によって生成した。MG3-6 / 3-4カ

セットのタンパク質コード配列は、5'から3'に以下のエレメント：SV40由来の核局在化シグナル、5つのアミノ酸のリンカー（GGGGS（配列番号2864））、開始メチオニンコドンを除いたMG3-6/3-4ヌクレアーゼのタンパク質コード配列、3つのアミノ酸のリンカー（SGG）、及びヌクレオプラスミン由来の核局在化シグナルを含む。このカセットのDNA配列は、ヒトに対してコドン最適化した。およそ100個のヌクレオチドのポリAテール（配列番号2865）を、インビトロ転写に使用するプラスミドにコードし、mRNAを共転写的にキャッピングした。mRNA中のウリジンを、N1-メチルシュドウリジンで置換した。

【0460】

脂質ナノ粒子の調製

MG3-6/3-4 mRNA及びガイドRNAを送達するために使用した脂質ナノ粒子（LNP）製剤は、上記のLNP製剤に基づいている。4つの脂質成分をエタノールに溶解し、適切なモル比で混合して、脂質ワーキングストックを作製した。RNAを100 mMの酢酸ナトリウム（pH4.0）中に希釈して、RNAワーキングストックを作製した。脂質ワーキングストック及びRNAワーキングストックを、マイクロ流体装置中で、それぞれ、1：3の流量比、及び12 mL/分の流量で混合した。LNPを、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して2～16時間透析し、次いで濃縮した。LNP製剤中のRNAの濃度を、Ribogreen試薬を使用して測定した。LNPの直径及び多分散性（PDI）を、動的光散乱によって決定した。代表的なLNPは、70 nm～84 nmの範囲の直径、及び0.098～0.150のPDIを有した。

【0461】

マウス投与及び採取

mRNA及びsgRNAのLNPを、1：1の質量比で混合し、7週齢のC57BL6野生型マウスに、尾静脈（マウス当たり0.1 mL）を介して、体重1 kg当たり0.5 mgのRNAの総RNA用量で静脈内注射した。投与の7日後、マウスを殺し、それぞれDNA、RNA、及びタンパク質の調製のために肝臓の左外側葉、内側葉、及び右外側葉を収集した。血液を、心臓穿刺を介した失血によって収集し、BDマイクロテイナー（ヘパリンコーティングされた）上に収集した。遠心分離前に、試料を湿った氷上に30分以内の間維持した。試料を2,000 Gで10分間遠心分離し、血漿を1.5 mLのクライオチューブに移し、-80℃で保存した。

【0462】

次世代配列決定（NGS）によるゲノムDNA調製及び編集分析

肝臓の左外側葉（100 mg）を、消化緩衝液中のビードラプターを使用してホモジナイズした。ゲノムDNAを、得られたホモジネートから精製し、260 nmでの吸光度を測定することによって定量化した。PBS緩衝液のみを注射したマウスから精製したゲノムDNAを対照として使用した。各特異的sgRNAによって標的化されたHAO-1遺伝子の領域を、Q5ハイフィデリティDNAポリメラーゼ、及び合計29サイクルの次世代配列決定（NGS）に使用されるバーコード化プライマーに相補的なアダプターを有する遺伝子特異的プライマー（表21）でPCR増幅した。この第1のPCR反応の産物を、合計10サイクルでNGSのバーコード化プライマーを使用してPCR増幅した。得られた産物をNGSに供し、結果を分析して、HAO-1遺伝子の標的化部位に挿入又は欠失（インデル）を含有する配列決定読み取りの割合を生成した。

【0463】

【表27】

表21：HAO1ガイド標的部位を増幅するため及びNGSに使用されるプライマー

ガイド	プライマーセット名	Miseq アダプターを有するフォワード	Miseq アダプターを有するリバース
mH364-7(スパーサー7)	mHAO1-NGS-P4	GCTCTTCCGATCTNNNNNGTA AAGAAAAACAAGGAATGTAA T(配列番号 2910)	GCTCTTCCGATCTNNNNNA TCTGTCAACTTCTGTTTTA GGAC(配列番号 2911)

10

20

30

40

50

【0464】

RT-ddPCRによるRNA調製及び分析

肝臓の内側葉を保存緩衝液中に保存して、ホモジナイズの前にRNAの完全性を維持した。最大10mgの組織を、1.4mmのセラミックビーズを含有する2mLのチューブに移し、軟組織ホモジナイズプロトコル：5.00m/秒で10～15秒間に従って、ビードラプターを使用してホモジナイズした。次いで、ホモジナイズした組織を処理し、追加の45分間のオンカラムDNase I消化処置で処置した。RNA産物を、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。次いで、単離したRNA試料は、追加のDNase処置及び逆転写を受けた。次いで、cDNA産物を、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。

【0465】

HAO1 mRNAレベルを、ハウスキーピング遺伝子GAPDHと多重化されたカスタムddPCRプローブベースのアッセイを使用して定量化した。HAO1をHEXプローブで標識し、一方で、GAPDHをFAMプローブで標識した。両方のプローブは、約115bpのアンプリコンを作製するそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーに隣接した。アッセイのテンプレート材料は、ヌクレアーゼを含まない水で20μLの最終体積に上昇された10μLのddPCR Supermix for Probes (dUTPなし)とともに、遺伝子アッセイ当たり900nMの各プライマー及び250nMのプローブと混合した上記のプロセスからの25ngのcDNA産物であった。ddPCRを行い、分析した。結果は、負の液滴（蛍光なし）、単一の正の液滴（HEX又はFAM正の蛍光）、及び二重正の液滴（HEX及びFAM蛍光の両方）の4つのセクションに分割された。1μLのHAO1及びGAPDH当たりのコピーを、各試料について計算した。HAO1対GAPDHの比率を、mH29-29で処置したマウス対緩衝液単独で処置したマウスについて比較した。

【0466】

【表28】

表22A：増幅HAO1及びGAPDH ddPCRアッセイで使用したプライマー及びプローブ

標的遺伝子	プローブ蛍光	プローブ配列	フォワードプライマー配列	リバースプライマー配列
HAO1	HEX	AGTG+GGTG+C+CA+GAAT+GTGAA(配列番号 2912)	GGGGAGAAAGGTG TTCAAGATGT(配列番号 2914)	CTCACCAATGTCT TGTCGATGA(配列番号 2916)
GAPDH	FAM	CATGACCA+CAGT+C+CATGCCATC(配列番号 2913)	GCACCACCAACTG CTTAG(配列番号 2915)	CCATCCACAGTCT TCTGGG(配列番号 2917)

化学修飾に関する表記法：+=ロックド核酸（LNA）塩基修飾。

【0467】

結果及び結論

マウス肝臓ゲノムDNAのNGS分析は、MG3-6/3-4 mRNAを封入しているLNPを投与された群のHAO-1遺伝子のsgRNAの標的部位における編集、及び6つのsgRNAの各々が、総肝臓ゲノムDNAの25%～33%の範囲であったことを示した（図30）。群の大部分の間にわずかな差異があり、化学物質1、2、9、10、及び46を有するガイドRNAが同様の効率で編集したこと、並びに化学物質47の有効性がいくらか低い可能性があることを示した。

【0468】

mH364-7 sgRNA及びMG3-6/3-4 mRNAを封入しているLNPで処置した群からのマウスの肝臓におけるHAO1 mRNAのGAPDH正規化レベルは、対照群の67%～79%の範囲であった（図30）。インデルをコード配列に導入す

るH A O-1 遺伝子の編集は、ナンセンス媒介mRNA崩壊の結果として発現されたH A O-1 mRNAの量の低減をもたらし得る。H A O-1 mRNAの低減の大きさは、ゲノム編集効率と相関した。まとめると、ゲノム編集及びH A O-1 mRNAノックダウンデータは、異なるsgRNA化学物質1、2、9、10、46、及び47が、インビボ効力にわずかな効果を有したことを示す。

【0469】

実施例24-K562細胞におけるVCPのDNAレベルでの遺伝子編集結果の分析

MG3-6/3-8又はMG3-6/3-4 mRNA及びガイド(500ngのmRNA、150pmolのガイド)のいずれかのヌクレオフェクションを、エレクトロポレーションを使用してK562細胞(200,000)に行った。ガイドは、R155を標的化する単一のミスマッチを有する。トランスフェクションの3日後に細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。NGSベースのDNA配列決定での使用に適したPCRプライマーを生成し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分析して、遺伝子編集を決定した(図31)。

【0470】

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 1】

表 2 2 B : 実施例 2 4 に記載する V C P を編集するためのガイド配列

配列番号	ガイド RNA	配列
723	MG3-6/3-8-ヒト VCP A1	mG*mC*mA*rCrGrCrArUrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
724	MG3-6/3-8-ヒト VCP B1	mG*mC*mA*rCrGrCrArUrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
725	MG3-6/3-8-ヒト VCP C1	mA*mC*mG*rCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
726	MG3-6/3-8-ヒト VCP D1	mA*mC*mG*rCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
727	MG3-6/3-8-ヒト VCP E1	mC*mG*mG*rArCrArArGrArArArArArUrGrUrCrUrCrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
728	MG3-6/3-8-ヒト VCP F1	mU*mG*mG*rArCrArArGrArArArArArUrGrUrCrUrCrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
729	MG3-6/3-8-ヒト VCP G1	mG*mG*mA*rGrArCrArUrUrUrUrCrUrUrGrUrCrCrGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
730	MG3-6/3-8-ヒト VCP H1	mG*mG*mA*rGrArCrArUrUrUrUrCrUrUrGrUrCrCrArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
731	MG3-6/3-8-ヒト VCP A2	mA*mG*mA*rCrArUrUrUrUrCrUrUrGrUrCrCrGrUrGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 4 7 1】

50

【表 29-2】

配列番号	ガイドRNA	配列
732	MG3-6/3-8-ヒトVCPB2	mA*mG*mA*rCrArUrUrUrUrCrUrUrGrUrCrCrArUrGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
733	MG3-6/3-8-ヒトVCP C2	mU*mG*mU*rCrCrGrUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
734	MG3-6/3-8-ヒトVCP D2	mU*mG*mU*rCrCrArUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
735	MG3-6/3-8-ヒトVCP E2	mG*mU*mC*rCrGrUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
736	MG3-6/3-8-ヒトVCP F2	mG*mU*mC*rCrArUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
737	MG3-6/3-8-ヒトVCP G2	mU*mC*mC*rGrUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
738	MG3-6/3-8-ヒトVCP H2	mU*mC*mC*rArUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
739	MG3-6/3-8-ヒトVCP A1	GCACGCATCCCACCGACAA
740	MG3-6/3-8-ヒトVCP B1	GCACGCATCCCACCATGGACAA

10

20

30

40

【0472】

50

【表 2 9 - 3】

配 列 番 号	ガイ ド RNA	配列
741	MG3- 6/3-8- ヒト VCP C1	ACGCATCCCACCACGGACAAGA
742	MG3- 6/3-8- ヒト VCP D1	ACGCATCCCACCATGGACAAGA
743	MG3- 6/3-8- ヒト VCP E1	CGGACAAGAAAAATGTCTCCTG
744	MG3- 6/3-8- ヒト VCP F1	TGGACAAGAAAAATGTCTCCTG
745	MG3- 6/3-8- ヒト VCP G1	GGAGACATTTTTCTTGTCCGTG
746	MG3- 6/3-8- ヒト VCP H1	GGAGACATTTTTCTTGTCCATG
747	MG3- 6/3-8- ヒト VCP A2	AGACATTTTTCTTGTCCGTGGT
748	MG3- 6/3-8- ヒト VCP B2	AGACATTTTTCTTGTCCATGGT
749	MG3- 6/3-8- ヒト VCP C2	TGTCCGTGGTGGGATGCGTGCT

【 0 4 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 4】

配 列 番 号	ガイ ド RNA	配列
750	MG3- 6/3-8- ヒト VCP D2	TGTCCATGGTGGGATGCGTGCT
751	MG3- 6/3-8- ヒト VCP E2	GTCCGTGGTGGGATGCGTGCTG
752	MG3- 6/3-8- ヒト VCP F2	GTCCATGGTGGGATGCGTGCTG
753	MG3- 6/3-8- ヒト VCP G2	TCCGTGGTGGGATGCGTGCTGT
754	MG3- 6/3-8- ヒト VCP H2	TCCATGGTGGGATGCGTGCTGT
755	MG3- 6/3-4- ヒト VCP A3	mC*mA*mG*rCrArCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrGrUrUrGrArGr ArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrC rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArAr UrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
756	MG3- 6/3-4- ヒト VCP B3	mC*mA*mG*rCrArCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrGrUrUrGrArG rArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCr CrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArAr UrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
757	MG3- 6/3-4- ヒト VCP C3	mA*mG*mC*rArCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArGrUrUrGrArG rArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCr CrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArAr UrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
758	MG3- 6/3-4- ヒト VCP D3	mA*mG*mC*rArCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArGrUrUrGrArG rArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCr CrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArAr UrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【 0 4 7 4 】

50

【表 2 9 - 5】

配列番号	ガイドRNA	配列
759	MG3-6/3-4-ヒトVCP E3	mG*mC*mA*rCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
760	MG3-6/3-4-ヒトVCP F3	mG*mC*mA*rCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
761	MG3-6/3-4-ヒトVCP G3	mC*mA*mC*rGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
762	MG3-6/3-4-ヒトVCP H3	mC*mA*mC*rGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
763	MG3-6/3-4-ヒトVCP A3	CAGCACGCATCCCACCGGAC
764	MG3-6/3-4-ヒトVCP B3	CAGCACGCATCCCACCATGGAC
765	MG3-6/3-4-ヒトVCP C3	AGCACGCATCCCACCGGACA
766	MG3-6/3-4-ヒトVCP D3	AGCACGCATCCCACCATGGACA
767	MG3-6/3-4-ヒトVCP E3	GCACGCATCCCACCGGACAA

10

20

30

40

【 0 4 7 5 】

50

【表 29-6】

配列番号	ガイドRNA	配列
768	MG3-6/3-4-ヒトVCP F3	GCACGCATCCCACCATGGACAA
769	MG3-6/3-4-ヒトVCP G3	CACGCATCCCACCAACGGACAAG
770	MG3-6/3-4-ヒトVCP H3	CACGCATCCCACCATGGACAAG
化学修飾に関する表記法:m=2' O-メチルリボヌクレオチド(例えば、mC=2' ヒドロキシルの代わりに 2' -Oメチルを有するシトシンリボヌクレオチド);f=2' フッ素リボヌクレオチド(例えば、fC=2' ヒドロキシルの代わりに 2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド);*=ホスホロチオエート結合。他の全ての塩基は、天然リボヌクレオチドである。		

【0476】

実施例 25-mRNA のインビトロ転写

キメラ mRNA の配列を、ヒト発現に対してコドン最適化し、次いで合成し、高コピーアンピシリンプラスミドにクローニングした。T7プロモーター、UTR、キメラORF、及びNLS配列をコードする合成された構築物を、HindII及びBamHIで骨格から消化し、pUC19プラスミド骨格（配列番号1788）にライゲーションした。完全なキメラmRNAプラスミドは、ORI、アンピシリン耐性カセット、合成された構築物、及びコードされたポリAテールを含む。キメラmRNAを、直線化キメラmRNAプラスミドを使用してインビトロ転写（IVT）を介して合成した。このプラスミドを直線化し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1、v/v）で精製し、エタノール中に沈殿させ、500 ng/μLの調整された濃度でヌクレアーゼを含まない水に再懸濁した。キメラmRNAを生成するためのIVT反応を、50℃で1時間行った。1時間後、IVT反応を停止し、プラスミドDNAを250 U/mLのDNase Iを加えて消化し、37℃で10分間インキュベートした。キメラmRNAを精製し、転写物濃度をUVによって決定し、キャピラリーゲル電気泳動によって更に分析した。

【0477】

実施例 26-タイプIIEンドヌクレアーゼのタンパク質組換え

MG3-6は、高活性かつ特異的な二本鎖DNA（dsDNA）切断酵素である。PAM（プロトスペーサー隣接モチーフ、DNA認識に必要なDNA配列の短いストレッチ）に対するより一般的な選好又は異なる選好に適応するための酵素の操作は、DNA中の追加の配列を標的化するための酵素の有用性を更に高めるであろう。MG3-6キメラのセットを、部分的Ruvc（例えば、Rとして示されるRuvc-III）、WED（Wとして示される）、及びPAM相互作用ドメイン（PIとして示される）のドメインを含むドメインを交換することによって生成した。簡略化のために、これらのキメラ系を個別に

、MG3-6、続いて__MG番号及びRWPと指定した。ゲノム中のPAMの適合性を拡張するために、MG3-6のWED及びPIDメイン（PAM相互作用ドメイン）を、MG3及びMG150（MG3様ファミリー）タンパク質由来のドメインと交換した。ブレークポイントを、RuvC-IIIDメインとWEDドメインとの間の非構造化ループで選択した（図41のパネル（a）及び（b）を参照）。構造組換えのための特定のアミノ酸位置を決定するために、MG3及びMG150の相同配列を分析し、WED及びPIDメインを、MG3-6の残基838に対応するヒスチジンの直後に交換した（図41のパネル（c）を参照）（配列番号774～807として提供されるキメラ配列）。

【0478】

キメラタンパク質の活性を、以下の手順に従って、活性酵素がdsDNAを消化し、その後の処理によりDNA断片を産物として得られた、自動インビトロPAM濃縮によって特性評価した。キメラ配列を、E. coli 発現に対してコドン最適化し、合成し、pAL3ベクター（配列番号920）にクローニングした。PAM配列を、E. coli 可溶化物ベースの発現系又はインビトロを介して再構成した翻訳のいずれかでの発現を介して決定した。E. coli コドン最適化タンパク質配列を転写し、T7プロモーターの制御下でPCR断片から翻訳した。この混合物を、タンパク質特異的sgRNA及びPAMプラスミドライブラリー（PAMライブラリーU67/U40）を用いて、反応緩衝液（10mM Tris pH7.5、100mM NaCl、10mM MgCl₂）に希釈した。具体的には、MG3-6 sgRNAを、MG3及びMG150メンバーと組換えるMG3-6キメラ（配列番号863）に使用した。ガイドを合成した。プラスミドのライブラリーは、単一ガイドでそれに続く8Nの混合塩基と合致するスパーサー配列を含有し、そのサブセットは、好ましいPAM（配列番号921）を有するであろう。1～3時間後、反応を停止し、DNAを回収した。タイプIIキメラ消化からの切断されたDNA産物を、平滑末端ライゲーション反応に供し、これは、インタクトな環状プラスミドを変化しないままにしながら、アダプター配列を切断したライブラリープラスミドに加えた。PCRを、ライブラリー及びアダプター配列に特異的なプライマー（LA065及びLA125）（配列番号1786～1787）を用いて行い、産物をゲル上で分解して、活性タンパク質複合体を特定した。得られたPCR産物を、ハイスループット配列決定プライマーを使用して、PCRによって更に増幅した。NGS分析に供した試料を定量化し、一緒にプールした。NGSライブラリーを精製及び定量化した。開始8Nライブラリーのサブセットであったこのライブラリーを配列決定することにより、正しいPAMを含有する配列を明らかにする。

【0479】

アガロースゲルの結果は、MG3及びMG150と組換えた33個のMG3-6のうちの20個が活性であり、このブレークポイントでは60%のヒットであったことを示唆した（図42Aを参照）。MG150と組換えるMG3-6の成功率が低いことは、構造破壊に起因する可能性がある。MG3-6__3-2WP、MG3-6__3-42WP、MG3-6__3-91WP、MG3-6__3-94WP、MG3-6__3-101WPのバンドは、アガロースゲル上では観察されなかったが、高感度NGS分析を用いて配列ロゴを得た。密接に関連するPIDは、同様のPAMを共有し得ることが観察された。例えば、MG3-6__150-1WP、MG3-6__150-7WP、及びMG3-6__150-8WPは、8Nライブラリーの第4及び第5の位置でCCの配列選好を示した。このタンパク質工学アプローチでは、MG3-6 PAM（nnRGRYYn）を、様々なPAM配列に拡張した（図42Bを参照）。

【0480】

MG3-6の部分的RuvC-IIID、WED、及びPIのMG3-8とのドメイン交換は、そのPAMをnnRGRYYnからnnRRnnYnに改変し、ゲノム中の標的化密度を増加させることができたMG3-6__3-8をもたらしした。その活性を損なうことなくMG3-6__3-8RWPのPAMを改変するために、N末端MG3-6並びにMG3-8からの部分的RuvC-IIID及びWEDドメインを、組換えのためのヌクレアー

ゼシャーシとして維持した。組換えに使用したPIDドメインは、MG3、MG15、及びMG150メンバーから供給された（図43のパネル（a）及び（b）を参照）。MG3及びMG150メンバーを組換えるMG3-6__3-8のブレークポイントを、WED及びPIDのうちのフロップループで選択した（図43のパネル（c）を参照）（配列番号808～841）。同様に、MG15メンバーを組換えるMG3-6__3-8の組換えのために同じ領域を選択した（配列番号842～862）。試験した33個のキメラのうち、22個が、アガロースゲル上に別個のバンドを示し、これらのヌクレアーゼの切断活性を示唆している。以前は、MG3-6__3-2WP、MG3-6__42WP、及びMG3-6__3-91WPは、提案されたアガロースゲルの結果として高い活性を示さなかった。しかしながら、新しいブレークポイントを考慮すると、それらが、MG3-6__3-8のシャーシを使用してより活性になり得ることが観察された（図44A）。その後のNGS分析は、より広範なゲノム標的化のための多様なPAMのパネルを明らかにした（図44B）。

10

【0481】

実施例27-哺乳動物細胞におけるキメラのスクリーニング

mRNA及びガイド（500ngのmRNA、150pmolのガイド）のヌクレオフェクションを、エレクトロポレーションを使用して、K562細胞（ガイド当たり200,000細胞）、Hep3B細胞（ガイド当たり100,000細胞）、又はHepa1-6細胞（ガイド当たり100,000細胞）で行った。スクリーニングに使用したガイドを化学的に合成した。トランスフェクションの3日後に細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。NGSベースのDNA配列決定での使用に適したPCRプライマーを生成し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分析して、遺伝子編集を決定した。

20

【0482】

MG3-6__3-3RWP、MG3-6__3-7RWP、及びMG3-6__3-8RWPの遺伝子編集活性を、K562細胞で検査し、RWPは、部分的Ruvc-III、WED、及びPIDを表す（配列番号771～773）。MG3-6__3-3RWP、MG3-6__3-7RWP、及びMG3-6__3-8RWPのPAMは、それぞれ、nnnC CCYR、nnRnYAYn、及びnnRRnnYnである。MG3-6__3-3RWPの25個のガイドのスクリーニングは、TRAC遺伝子座上のガイドA1、並びにAAVS1遺伝子座上のガイドA2、E2、A3、及びF3が、50%超のインデルを示したことを明らかにした（図32）（配列番号922～924及び928～949）。同じ2つの遺伝子座を、MG3-6__3-7RWPの58個のガイドをスクリーニングするためにも使用し、結果は、TRACのガイドC3及びAAVS1のガイドB8が、50%超のインデルを示したことを示した（図33）（配列番号972～991及び1012～1049）。237個のガイドを、TRAC遺伝子座上のMG3-6__3-8RWPについてスクリーニングし、結果は、45個のガイドが、50%超の編集を示したことを示した。顕著に、複数の部位が、ガイドスクリーニングの過程で90%超の編集を示した（図34及び35）（配列番号1088～1183及び1280～1320）。

30

【0483】

TRAC及びAAVS1部位に加えて、ガイドを、Hep3B細胞においてPCSK9及びANGPTL3を標的化するためのMG3-6__3-4RWP、Hep3B細胞においてAPOA1を標的化するためのMG3-6__3-8RWP、及びHepa1-6細胞においてGPR146及びAPOA1を標的化するためのMG3-6__3-7RWPについても設計した。MG3-6__3-4RWPのスクリーニング結果は、PCSK9上の4つのガイドが、50%超のインデル率を達成し、ANGPTL3上の3つのガイドが、100%に近いインデル率を達成したことを示した（図36及び37）（配列番号1362～1376及び1392～1489）。APOA1上のMG3-6__3-8RWPに対して標的化した部位のうち、4つのガイドが、50%超のインデル形成を示した（図38）（配列番号1764～1774）。GPR146及びAPOA1上のMG3-6__3-7

40

50

RWPのスクリーニングは、50%のインデル率を超える1つ及び7つのガイドを示した（図39及び40）（配列番号1588～1656及び1726～1744）。

【0484】

実施例28－異なる化学修飾を有するMG3-6／3-4単一ガイドRNAのインビボ編集活性

MG3-6／3-4タイプIIヌクレアーゼが生きている動物においてインビボでゲノムを編集する能力を評価するために、脂質ナノ粒子を使用して、MG3-6／3-4ヌクレアーゼをコードするmRNA、及び同じヌクレオチド配列を有するが異なるRNA化学物質を有する5つのガイドRNAのうちの1つを送達した。これらのガイドの配列を表23に示す。

【0485】

【表30】

表23：マウスにおけるインビボで試験したガイドRNAの配列及び化学修飾

ガイドRNA	配列番号	配列(スパーサー-骨格)
mH364-7-46	1819	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUA- GUUGAGAAUCmGmAmAmAGAUUCUUAUAAGGCAUCmCmUmU mCmCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmAGGA GCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU
mH364-7-48	1821	mG*mA*mG*fCfUfGfGfCfCfAfCfUfGfUfGfCfGAGGUA- GUUGAGAAUCGAAAGAUUCUUAUAAGGCAUCCUCCGAUGCU GACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUA*mU*m G*mU*mU*mU*mU
mH364-7-50	1822	mG*mA*mG*fCfUfGfGfCfCfAfCfUfGfUfGfCfGAGGUA- GUUGAGAAUCmGmAmAmAGAUUCUUAUAAGGCAUCmCmUmU mCmCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmAGGA GCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU
mH364-7-52	1823	mG*mA*mG*CfUGfGfCfAfCfUfGfGfGCGAGGUA- GUUGAGAAUCmGmAmAmAGAUUCUUAUAAGGCAUCmCmUmU mCmCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmAGGA GCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU
mH364-7-53	1824	mG*mA*mG*fCUfGGfCCfAfCfUfGfUfGfCfGAGGUA- GUUGAGAAUCmGmAmAmAGAUUCUUAUAAGGCAUCmCmUmU mCmCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmAGGA GCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU

化学修飾に関する表記法：m=2' O-メチルリボヌクレオチド（例えば、mC=2' ヒドロキシルの代わりに2' -Oメチルを有するシトシンリボヌクレオチド）；f=2' フッ素リボヌクレオチド（例えば、fC=2' ヒドロキシルの代わりに2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド）；*=ホスホロチオエート結合。他の全ての塩基は、天然リボヌクレオチドである。

【0486】

これらのガイドにおけるスパーサー配列は、マウスHAO-1遺伝子を標的化する。全てのガイドRNAは、5'末端にホスホロチオエート結合を有する3つの2'メチル基、及び3'末端にホスホロチオエート結合を有する6つの2'メチル基からなる同じ末端修飾を有する。以前のマウス研究で最も高い編集活性を有したガイドmH364-7-46は、ガイド骨格配列の3つ全てのループに追加の2'メチル修飾を有する。ガイドmH364-7-48は、スパーサー配列に2'フッ素修飾を有するが、骨格ループにメチル修飾は有しない。ガイドmH364-7-50は、化学物質46及び48のスパーサー2'フッ素及び骨格ループ2'メチル修飾を組み合わせる。ガイドmH364-7-52は、化学物質50よりも少ない2'フッ素をスパーサーに有するが、化学物質50と同じ骨格メチル修飾を有する。ガイドmH364-7-53は、化学物質52とは異なる2'フッ素をスパーサー残基上に有し、化学物質50及び52と同じ骨格メチル修飾を有する。sgRNAにおける化学修飾は、インビボ効力に重要であるsgRNA安定性に影響を与えるた

め、インビボ編集に対するこれらの異なる修飾の影響を評価することが重要であった。

【0487】

MG3-6/3-4 mRNAの調製

MG3-6/3-4をコードするmRNAを、T7 RNAポリメラーゼを使用した直線化プラスミドテンプレートのインビトロ転写によって生成した。MG3-6/3-4カセットのタンパク質コード配列は、5'から3'に以下のエレメント：SV40由来の核局在化シグナル、5つのアミノ酸のリンカー（GGGS（配列番号2918））、開始メチオニンコドン除去したMG3-6/3-4ヌクレアーゼのタンパク質コード配列、3つのアミノ酸のリンカー（SGG）、及びヌクレオプラスミン由来の核局在化シグナルを含む。このカセットのDNA配列は、ヒト発現に対してコドン最適化した。およそ100個のヌクレオチドのポリAテール（配列番号2865）を、インビトロ転写に使用するプラスミドにコードし、mRNAを共転写的にキャッピングした。mRNA中のウリジンを、N1-メチルシュードウリジンで置き換えた。

10

【0488】

脂質ナノ粒子の調製

MG3-6/3-4 mRNA及びガイドRNAを送達するために使用した脂質ナノ粒子（LNP）製剤は、上記のLNP製剤に基づいている。4つの脂質成分をエタノールに溶解し、適切なモル比で混合して、脂質ワーキングミックスを作製した。RNAを100 mMの酢酸ナトリウム（pH 4.0）中に希釈して、RNAワーキングストックを作製した。脂質ワーキングストック及びRNAワーキングストックを、マイクロ流体装置中で、それぞれ、1:3の流量比、及び12 mL/分の流量で混合した。LNPを、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して2~16時間透析し、次いで濃縮した。LNP製剤中のRNAの濃度を、Ribogreen試薬を使用して測定した。LNPの直径及び多分散性（PDI）を、動的光散乱によって決定した。典型的なLNPは、70 nm~84 nmの範囲の直径、及び0.098~0.150のPDIを有した。

20

【0489】

マウス投与及び採取

mRNA及びsgRNAのLNPを、1:1の質量比で混合し、7週齢のC57BL6野生型マウスに、尾静脈（マウス当たり0.1 mL）を介して、体重1 kg当たり0.5 mgのRNAの総RNA用量で静脈内注射した。投与の14日後、マウスを殺し、それぞれDNA、RNA、及びタンパク質の調製のために肝臓の左外側葉、内側葉、及び右外側葉を収集した。血液を、心臓穿刺を介した失血によって収集し、BDマイクロテイナー（ヘパリンコーティングされた）上に収集した。遠心分離前に、試料を湿った氷上に30分以内の間維持した。試料を2,000 Gで10分間遠心分離し、血漿を1.5 mLのクライオチューブに移し、-80°Cで保存した。

30

【0490】

次世代配列決定（NGS）によるゲノムDNA調製及び編集分析

肝臓の左外側葉（100 mg）を、消化緩衝液中でホモジナイズした。ゲノムDNAを、得られたホモジネートから精製し、260 nmでの吸光度を測定することによって定量化した。PBS緩衝液のみを注射したマウスから精製したゲノムDNAを対照として使用した。各特異的sgRNAによって標的化されたHAO-1遺伝子の領域を、Q5ハイフィデリティDNAポリメラーゼ、及び合計29サイクルの次世代配列決定（NGS）に使用されるバーコード化プライマーに相補的なアダプターを有する遺伝子特異的プライマー（表24）でPCR増幅した。この第1のPCR反応の産物を、合計10サイクルでNGSのバーコード化プライマーを使用してPCR増幅した。得られた産物をNGSに供し、結果を分析して、HAO-1遺伝子の標的化部位に挿入又は欠失（インデル）を含有する配列決定読み取りの割合を生成した。

40

【0491】

マウス肝臓ゲノムDNAのNGS分析は、MG3-6/3-4 mRNAを封入しているLNPを投与された群のHAO-1遺伝子のsgRNAの標的部位における編集、及び

50

5つのsgRNAの各々が、総肝臓ゲノムDNAの26%～47%の範囲であったことを示した(図46)。化学物質46は、最も低い効率で編集した。化学物質48、50、及び52を有するガイドは、化学物質46を有するガイドと同様の又はやや高いレベルの編集を示した。化学物質53を有するガイドは、47%で最も高い編集効率を有し、これは、化学物質46を有する同じヌクレオチド配列を有するガイドで達成された編集のほぼ2倍であった。

【0492】

【表31】

表24: HAO1ガイド標的部位を増幅するため及びNGSに使用したプライマー

ガイドスペーサー	プライマーセット名	Miseqアダプターを有するフォワード	Miseqアダプターを有するリバース
mH364-7(スペーサー7)	mHAO1-NGS-P4	GCTCTTCCGATCTNNNNNGTAA AGAAAAACAAGGAATGTAAT(配列番号 2910)	GCTCTTCCGATCTNNNNNATC TGTCAACTTCTGTTTTAGGAC (配列番号 2911)

10

【0493】

RT-ddPCRによるRNA調製及び分析

肝臓の内側葉を保存緩衝液中に保存して、ホモジナイズの前にRNAの完全性を維持した。最大10mgの組織を、1.4mmのセラミックビーズを含有する2mLのチューブに移し、ホモジナイズした。次いで、ホモジナイズした組織を、追加の45分間のオンカラムDNase I消化処置で処理した。RNA産物を、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。次いで、単離したRNA試料は、追加のDNase処置及び逆転写を受けた。次いで、cDNA産物を、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。

20

【0494】

HAO1 mRNAレベルを、ハウスキーピング遺伝子GAPDHと多重化されたカスタムddPCRプローブベースのアッセイを使用して定量化した。HAO1をHEXプローブで標識し、一方で、GAPDHをFAMプローブで標識した。両方のプローブは、約115bpのアンプリコンを作製するそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーに隣接した。アッセイのためのテンプレート材料は、遺伝子アッセイ当たり900nMの各プライマー及び250nMのプローブと混合した上記のプロセスからの25ngのcDNA産物であり、ddPCRに供し、分析した。結果は、負の液滴(蛍光なし)、単一の正の液滴(HEX又はFAM正の蛍光)、及び二重正の液滴(HEX及びFAM蛍光の両方)の4つのセクションに分割された。1µLのHAO1及びGAPDH当たりのコピーを、各試料について計算した。HAO1対GAPDHの比率を、mH29-29で処置したマウスと、緩衝液のみで処置したマウスとを比較した。

30

【0495】

mH364-7 sgRNA及びMG3-6/3-4 mRNAを封入しているLNPで処置した群からのマウスの肝臓におけるHAO1 mRNAのノックダウンは、未処置対照群よりも36%～58%低かった(図46)。フレーム外(OOF)インデルをコード配列に導入するHAO-1遺伝子の編集は、ナンセンス媒介mRNA崩壊の結果としてのHAO-1 mRNAの量の低減をもたらし得る。5つの異なる化学修飾を有するガイドによるHAO-1 mRNAの低減の大きさは、ゲノム編集効率の大きさと相関し、ガイド化学物質53は、それが最も高いインデル%を有することと一致して、最も大きいノックダウンを有する。まとめると、ゲノム編集及びHAO-1 mRNAノックダウンデータは、ガイド化学物質53が、インビボで改善された効力を有することを示す。

40

【0496】

50

【表 3 2】

表 2 5 : 増幅 HAO 1 及び GAPDH ddPCR アッセイで使用したプライマー及びプローブ

標的遺伝子	プローブ蛍光	プローブ配列	フォワードプライマー配列	リバースプライマー配列
HAO1	HEX	AGTG+GGTG+C+CA+GAAT+GTGAA(配列番号 2912)	GGGGAGAAAGGTGTTC AAGATGT(配列番号 2914)	CTCACCAATGTCTTG TCGATGA(配列番号 2916)
GAPDH	FAM	CATGACCA+CAGT+C+CATGCCATC(配列番号 2913)	GCACCACCAACTGCTT AG(配列番号 2915)	CCATCCACAGTCTTC TGGG(配列番号 2917)

化学修飾に関する表記法：+=ロックド核酸（LNA）塩基修飾。

【0 4 9 7】

実施例 2 9 - 2 つの異なる細胞型における複数の遺伝子標的にわたる MG 3 - 6 キメラ（MG 3 - 6 / 3 - 8）の哺乳動物細胞スクリーニング

MG 3 - 6 酵素の C 末端をその密接に関連する相同体、特に WED 及び PAM 相互作用ドメインと交換することによって作製したキメラタンパク質は、相同体タイプ II 酵素からの PAM に対応する新しい PAM 配列を認識することが以前に実証された。MG 3 - 6 / 3 - 8（配列番号 1 2）は、MG 3 - 6 を MG 3 - 8 の WED 及び PID ドメインと組み合わせることによって作製したキメラであり、ヒト細胞株における複数の標的部位をうまく編集することができる。これらの結果は、2 つの新しい細胞株における 4 つの追加の遺伝子座で MG 3 - 6 / 3 - 8 キメラを使用することによって、本明細書では拡張される。

【0 4 9 8】

mRNA 産生

MG 3 - 6 / 3 - 8 キメラ（配列番号 1 2）mRNA の配列を、ヒト発現に対してコドン最適化し、次いで合成し、高コピーアンピシリンプラスミドにクローニングした。T 7 プロモーター、UTR、キメラ ORF、及び NLS 配列をコードする合成された構築物を、Hind II 及び Bam HI で骨格から消化し、pUC 1 9 プラスミド骨格にライゲーションした。完全キメラ mRNA プラスミドは、複製起源、アンピシリン耐性カセット、合成された構築物、及びコードされたポリ A テールからなる。mRNA を、直線化キメラ mRNA プラスミドを使用してインビトロ転写（IVT）を介して合成した。このプラスミドを直線化し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（2 5 : 2 4 : 1、v / v）で精製し、EtOH 中に沈殿させ、5 0 0 ng / μL の調整された濃度でヌクレアーゼを含まない水に再懸濁した。mRNA を生成するための IVT 反応を、5 0 °C で 1 時間行った。1 時間後、IVT を停止し、プラスミド DNA を 2 5 0 U / mL の DNase I を加えて消化し、3 7 °C で 1 0 分間インキュベートした。mRNA の精製を行い、転写物濃度を UV によって決定し、キャピラリーゲル電気泳動によって更に分析した。

【0 4 9 9】

細胞培養、トランスフェクション、次世代配列決定、及びスクリーニングのための編集分析

【0 5 0 0】

mRNA 及びガイド（5 0 0 ng の mRNA、1 5 0 pmol のガイド）のヌクレオフェクションを、エレクトロポレーターを使用して、Hepa 1 - 6 細胞（ガイド当たり 1 0 0 , 0 0 0 細胞）及び Hep 3 B 細胞（ガイド当たり 1 0 0 , 0 0 0 細胞）で行った。スクリーニングに使用したガイドを化学的に合成した。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA 配列決定での使用に適した PCR プライマーを生成し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを配列決定し、分析して、遺伝子編集を測定した。

【0501】

結果

操作されたMG3-6/3-8キメラ（配列番号12）の遺伝子編集活性を試験するために、MG3-6/3-8（PAM配列：nnRRnnYn（配列番号2863）を有するマウスゲノム中のAPOA1（配列番号1866～1961及び2058～2088）、ANPTL3（配列番号2120～2215及び2312～2350）、並びにTRAC（配列番号2390～2485及び2582～2617）遺伝子を標的化する394個のガイドを設計及び購入した。これらのガイドを、ヌクレオフェクションを介してHepa1-6（マウス不死化マウス肝細胞の細胞株）又はHep3B（ヒト肝臓細胞株）中のインビトロ合成したmRNAと共トランスフェクトし、ヌクレオフェクションの3日後にインデル形成についてアッセイした。全体として、平均インデル形成は、APOA1で40.7%（127個のガイドにわたって）、ANGPTL3で27.4%（135個のガイドにわたって）、及びTRAC部位で25.1%（132個のガイドにわたって）であった。179個のガイドは、80%超のインデル形成を示した。結論として、MG3-6/3-8キメラは、マウス及びヒトの両方の細胞株において、4つの独立した遺伝子座にわたって強固な遺伝子編集を示す（図47～図49）。

10

【0502】

実施例30－脂質ナノ粒子の全身投与によって送達したキメラヌクレアーゼMG3-6/3-8によるマウスの肝臓におけるインビボ遺伝子編集

インビボでゲノムを編集するMG3-6/3-8キメラタイプIIヌクレアーゼの能力を評価するために、脂質ナノ粒子を使用して、マウスAPOA1及びANGPTL3遺伝子のエクソン領域を標的化するMG3-6/3-8ヌクレアーゼをコードするmRNA及び単一ガイドRNA（sgRNA）を送達した（表26）。

20

【0503】

30

40

50

【表 3 3】

表 2 6 : マウス研究で使用した s g R N A 及び標的化スパーサー配列

標的部 位名	スパーサーDNA 配列	sgRNA 配列
Apoa1 A4	TCTCCTGGAAAACCTG GGGACACT(配列番 号 1986)	mU*mC*mU*rCrCrUrGrGrArArArArCrUrGrGrGrArCrArCrUrGrUrUr GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUr CrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrU rUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*m U*mU(配列番号 1890)
Apoa1 A5	CTGGGATAACCTG GAGAAAGAA(配列 番号 1994)	mC*mU*mG*rGrGrArUrArArCrCrUrGrGrArGrArArArGrArArGrUrUr GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUr CrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrU rUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*m U*mU(配列番号 1898)
Apoa1 C5	TTGGGTGAGACAG GAGATGAAC(配列 番号 1996)	mU*mU*mG*rGrGrUrGrArGrArCrArGrGrArGrArUrGrArArCrGrUrUr GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUr CrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrU rUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*m U*mU(配列番号 1900)
Apoa1 F4	AGGAACGGCTGGG CCCATTGAC(配列番 号 1991)	mA*mG*mG*rArArCrGrGrCrUrGrGrGrCrCrCrArUrUrGrArCrGrUrUr GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUr CrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrU rUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*m U*mU(配列番号 1895)
Apoa1 G4	GGAACGGCTGGGC CCATTGACT(配列番 号 1992)	mG*mG*mA*rArArCrGrGrCrUrGrGrGrCrCrCrArUrUrGrArCrUrGrUrUr GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUr CrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrU rUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*m U*mU(配列番号 1896)
Angptl3 C12	ACTATTAAACCAA GAAACTCCC(配列 番号 1993)	mA*mC*mU*rArUrUrArArArCrCrArArGrArArArCrUrCrCrCrGrUrUr GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUr CrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrU rUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*m U*mU(配列番号 2210)
(r=天然のリボース塩基、m=2' -O メチル修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合)		

【0504】

マウス肝細胞における A P O A 1 及び A N G P T L 3 コード配列を標的化する s g R N A のスクリーニング（実施例 2 9）を使用して、高度に活性なガイドを特定し、これらをインビボマウス研究に使用した（図 4 7～図 4 9）。具体的には、s g R N A M G 3 - 6 / 3 - 8 m A p o a 1 P 1 - A 4（配列番号 1 8 9 0）、M G 3 - 6 / 3 - 8 m A p o a 1 P 1 - A 5（配列番号 1 8 9 8）、M G 3 - 6 / 3 - 8 m A p o a 1 P 1 - C 5（配列番号 1 9 0 0）、M G 3 - 6 / 3 - 8 m A p o a 1 P 1 - F 4（配列番号 1 8 9 5）、及び M G 3 - 6 / 3 - 8 m A n g p t l 3 P 1 - C 1 2（配列番号 2 2 1 0）は、M G 3 - 6 / 3 - 8 ヌクレアーゼをコードする m R N A でトランスフェクトされたと

きに、Hepa1-6において95%超の編集を示し、マウスにおける試験のために選択された。加えて、比較的少ない編集（53%）を示したMG3-6/3-8 mApoa1P1-G4（配列番号1896）も、中程度の活性を有する部位についての情報を与えるためのマウス研究のために選択した。更に、天然RNA構造の多数の化学修飾を、これらのsgRNAに組み入れた。これらの化学修飾を、編集活性に悪影響を与えることなく、哺乳動物細胞由来の抽出物においてインキュベートしたとき、インビトロでのsgRNAの安定性を改善するそれらの能力に基づいて選択した。

【0505】

MG3-6/3-8 mRNAの調製

MG3-6/3-8ヌクレアーゼをコードするmRNAを、直線化プラスミドテンプレート¹⁰のインビトロ転写によって生成した。RNAに転写したDNA配列は、5'から3'の順序で以下のエレメント：T7 RNAポリメラーゼプロモーター、5'非翻訳領域（5' UTR）、核局在化シグナル、短いリンカー、MG3-6/3-8ヌクレアーゼのコード配列、短いリンカー、核局在化シグナル、3'非翻訳領域、及びおよそ100個のヌクレオチドのポリAテール（配列番号2865）を含んだ。

【0506】

このMG3-6/3-8カセットにコードした合成mRNA中にコードしたタンパク質配列は、5'から3'に以下のエレメント：SV40由来の核局在化シグナル、5つのアミノ酸のリンカー（GGGGS（配列番号2864））、開始メチオニンコドンを除いたMG3-6/3-8ヌクレアーゼのタンパク質コード配列、3つのアミノ酸のリンカー（SGG）²⁰、及びヌクレオプラスミン由来の核局在化シグナルを含む。このカセットのタンパク質コード領域のDNA配列を、市販のアルゴリズムを使用してヒトにおけるコドン使用を反映するように修飾した。およそ100個のヌクレオチドのポリAテール（配列番号2865）を、インビトロ転写に使用するプラスミドにコードし、mRNAを共転写的にキャッピングした。mRNA中のウリジンを、N1-メチルシュドウリジンで置換した。

【0507】

脂質ナノ粒子の調製

MG3-6/3-8 mRNA及びガイドRNAを送達するために使用した脂質ナノ粒子（LNP）³⁰製剤は、上記のLNP製剤に基づいている。4つの脂質成分をエタノールに溶解し、適切なモル比で混合して、脂質ワーキングミックスを作製した。mRNA及びガイドRNAを、1:1の質量比で製剤化する前に混合した。RNAを100mMの酢酸ナトリウム（pH4.0）中に希釈して、RNAワーキングストックを作製した。脂質ワーキングストック及びRNAワーキングストックを、マイクロ流体装置中で混合した。LNPをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して2~16時間透析し、次いで濃縮した。LNP製剤中のRNAの濃度を、Ribogreen試薬を使用して測定した。LNPの直径及び多分散性（PDI）を、動的光散乱によって決定した。代表的なLNP直径は、65nm~120nmの範囲であり、PDIは0.05~0.20であった。

【0508】

マウス投与及び採取

mRNA及びsgRNAのLNPを、1:1の質量比で混合し、7週齢のC57BL6野生型マウスに、尾静脈（マウス当たり0.1mL）を介して、体重1kg当たり1mgのRNAの総RNA用量で静脈内注射した。投与の7日後に、各群の4匹全てのマウスを殺した。肝左葉を収集し、急速冷凍した。

【0509】

次世代配列決定（NGS）によるゲノムDNA調製及び編集分析

肝臓の左外側葉（100mg）を、消化緩衝液中でホモジナイズした。ゲノムDNAを、得られたホモジネートから精製し、260nmでの吸光度を測定することによって定量化した。PBS緩衝液のみを注射したマウスから精製したゲノムDNAを対照として使用した。各特異的sgRNAによって標的化されたAPOA1及びANGPTL3遺伝子の⁵⁰

領域を、Q5ハイフィデリティDNAポリメラーゼ、及び合計29サイクルの次世代配列決定(NGS)に使用されるバーコード化プライマーに相補的なアダプターを有する遺伝子特異的プライマーでPCR増幅した。この第1のPCR反応の産物を、合計10サイクルでNGSのバーコード化プライマーを使用してPCR増幅した。得られた産物をNGSに供し、APOA1及びANGPTL3遺伝子の標的化部位に挿入又は欠失(インデル)を含有する配列決定読み取りの割合について分析した。

【0510】

結果

遺伝子編集の結果を表27に要約する。

【0511】

【表34】

表27: MG3-6/3-8 mRNA並びにAPOA-1及びANGPTL3遺伝子を標的化するsgRNAを封入しているLNPで処置したマウスの肝臓におけるフレームシフト(挿入/欠失)をもたらす編集の頻度の分析

処置	ガイド	平均インデル	インデルのStdev	平均総OOF%	Stdev 総OOF%
PBS 対照	Apoa1 A4	0.03	0.02	0.03	0.02
	Apoa1 A5	0.01	0.01	0.01	0.01
	Apoa1 C5	0.01	0.01	0.01	0.01
	Apoa1 F4	0.04	0.01	0.04	0.01
	Apoa1 G4	0.04	0.01	0.03	0.01
	Angptl3 C12	0.02	0.01	0.02	0.01
MG3-6_3-8	Apoa1 A4	79.30	6.23	75.40	5.87
	Apoa1 A5	65.23	3.96	55.51	3.49
	Apoa1 C5	77.82	1.88	73.90	1.55
	Apoa1 F4	43.07	13.67	30.37	11.77
	Apoa1 G4	34.76	9.83	38.97	8.64
	Angptl3 C12	42.80	3.34	37.18	3.12

【0512】

マウス肝臓ゲノムDNAのNGS分析は、MG3-6/3-8 mRNAを封入しているLNPを投与された群のAPOA1及びANGPTL3遺伝子のsgRNAの標的部位における編集、並びに6つのsgRNAの各々が、総肝臓ゲノムDNAの35%~80%の範囲であったことを示した(図50)。処置群の大部分の間にはわずかな差異があり、強固かつ再現可能な編集結果を示している。全体として、MG3-6/3-8キメラヌクレアーゼを使用して下流タンパク質産物を調節するために遺伝子をノックダウンするためのAPOA1及びANGPTL3部位でのゲノム編集は、標的化遺伝子編集を通してその治療能力を示す。

【0513】

実施例 3 1 – タイプ V – A キメラヌクレアーゼのインビトロ切断活性**バイオインフォマティクス分析**

タイプ V – A 酵素 MG 2 9 – 1 の 1 4 個の新しいタンパク質バリエーションを、多様な相同体からのドメイン、並びに祖先配列再構成 (A S R) を通して得られた新規の人工的に設計されたヌクレアーゼ配列からのドメインを連結することによって操作した (図 5 1 A、図 5 1 B 及び 5 2)。これらの新規のタイプ V – A キメラは、MG 2 9 – 1 酵素の P A M 標的化能力をその標準 P A M 配列を超えて拡張する。以前に操作されたタイプ V – A キメラ MG 2 9 – 1 / 2 9 – 5 (配列番号 1 0 9) 及び MG 2 9 – 1 / 5 7 – 1 (配列番号 1 1 0) と同様に、キメラ配列を、新規の MG 2 9 – 1 相同体である MG 2 9 – 1 3 ~ MG 2 9 – 2 1 (配列番号 2 8 4 2 ~ 2 8 4 9)、並びにより離れたタイプ V – A ヌクレアーゼ、すなわち、MG 1 1 – 1 8 及び MG 7 9 – 1 (配列番号 2 8 5 0 ~ 2 8 5 1) を用いて設計した。

10

【 0 5 1 4 】

加えて、タイプ V – A ヌクレアーゼの更なる多様性を生成するために、祖先配列再構成 (A S R) アルゴリズムを使用した。A S R は、既存のタンパク質配列及びそれらの間で推論される関係を使用して、祖先の、現在は消滅しているタンパク質の配列を再構築する計算技術である。この技術を使用して、MG 2 9 – 1 キメラ形成に使用するためのタイプ V – A ファミリーの新規配列を計算的に再構成した。この分析のために、3 3 0 個のタイプ V – A タンパク質配列をアライメントし、系統樹を構築した (図 5 2 A)。この樹を、4 つのタイプ V – L 配列を外群として使用してルーティングした。配列を再構成し、各再構成ノードに対して挿入及び欠失を手動で特定した。最終的に、3 つのタイプ V – A 祖先配列 (MG 2 9 – 2 2 9 ~ MG 2 9 – 2 3 1) を高い信頼性で再構成し、MG 2 9 – 1 を用いたキメラ形成のために選択した (配列番号 2 8 5 2 ~ 2 8 5 4) (表 2 8 及び図 5 2 A、図 5 2 B)。

20

【 0 5 1 5 】**【表 3 5】**

表 2 8 : W e d – I I、P I、及び W e d – I I I ドメインについての計算的に導出したタイプ V – A 祖先対 MG 2 9 – 1 の比較。

祖先親 (WED II+PID+WED-III)	平均支持	MG29-1 同一性%	交換されたドメイン長 (アミノ酸)
MG29-229	0.94	65	295
MG29-230	0.97	65	295
MG29-231	0.96	64	294

30

平均支持値は、再構成された配列の平均確率を 0 ~ 1 のスケールで示す。0. 7 超の支持値は、再構成された配列における高い信頼性を示す。

【 0 5 1 6 】

MG 2 9 – 1 の予測構造、及び F n C a s 1 2 a の基質結合 R ループ構造 (C p f 1 と呼ばれる) とのアライメントに基づいて、P A M 配列の認識及び結合に参与する可能性が高い、MG 2 9 – 1 の W E D – I I、P I D、及び W E D – I I I ドメインの境界、その相同体、並びに祖先配列を特定した (図 5 1 B 及び 5 2 B)。

40

【 0 5 1 7 】

MG 2 9 – 1 及び参照 C p f 1 とともに、選択した野生型及び A S R 生成タイプ V – A エンドヌクレアーゼの多重配列アライメントを構築した (図 5 3 A)。このアライメントに基づいて、これらの新規の MG 酵素の様々な機能ドメインを定義し、その後キメラ形成のための適切な R E C – W E D – I I 及び W E D – I I I – R u v C ブレークポイントを決定するために使用した (図 5 3 B ~ 図 5 3 C)。キメラ組成物の詳細を表 2 9 に示す

50

。【0518】

【表36】

表29： シャーシとしてMG29-1を使用するためのキメラアーキテクチャ

キメラタイプ	キメラ名	WED-I REC	WED-II+PI+WED-III	RuvC+Nuc
全ての天然配列の組み合わせ	MG29-1 29-13	MG29-1(1, 560)	MG29-13 (558, 859)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-14	MG29-1(1, 560)	MG29-14 (544, 845)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-15	MG29-1(1, 560)	MG29-15 (344, 645)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-16	MG29-1(1, 560)	MG29-16 (524, 825)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-17	MG29-1(1, 560)	MG29-17 (565, 866)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-18	MG29-1(1, 560)	MG29-18 (537, 830)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-20	MG29-1(1, 560)	MG29-20 (556, 857)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-21	MG29-1(1, 560)	MG29-21 (514, 815)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 11-18	MG29-1(1, 560)	MG11-18 (527, 872)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 79-1	MG29-1(1, 560)	MG79-1 (564, 865)	MG29-1(862, 1280)
天然配列及びASR生成配列の組み合わせ	MG29-1 29-229	MG29-1(1, 560)	MG29-1 29-229 (561, 855)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-230	MG29-1(1, 560)	MG29-1 29-230 (561, 855)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1 29-231	MG29-1(1, 560)	MG29-1 29-231 (561, 854)	MG29-1(862, 1280)

10

【0519】

結果

本明細書で利用したヌクレアーゼのPAM配列を、E.coli可溶化物ベースの発現系又はインビトロで再構成した翻訳のいずれかでの発現を介して決定した。MG29-1骨格、並びにMG29ファミリー相同体及び祖先配列からのPID及びWEDドメインを使用したキメラヌクレアーゼを用いたPAM濃縮アッセイは、MG29-1標的化ガイドRNAで試験したときに、9つのタイプV-Aキメラが活性であったことを示した（図54～図55）。必要なPAMモチーフを図56-1及び図56-2に示し、表30に要約する。

20

【0520】

【表37】

表30：MG29-1に由来する活性キメラに関連するPAM。

30

キメラ名	PAM配列
MG29-1 29-13	TTTn
MG29-1 29-14	TYYn
MG29-1 29-15	非活性
MG29-1 29-16	TTTn
MG29-1 29-17	非活性
MG29-1 29-18	nYTn
MG29-1 29-20	TTYn
MG29-1 29-21	非活性
MG29-1 11-18	非活性
MG29-1 79-1	非活性
MG29-1 29-229	nTTn
MG29-1 29-230	nYYn
MG29-1 29-231	nYYn

40

【0521】

参考文献

50

Kauffman, K. J. et al. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett* 15, 7300–7306 (2015).

Harms, M. & Thornton J. W. Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction. *Current Opinion in Structural Biology*, 20:360–366 (2010).

Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772–780. doi:10.1093/molbev/mst010

Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9), 1312–1313 (2014).

Yang, Z. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1586–1591 (2007).

【0522】

本開示の好ましい実施形態が本明細書に示され、記載されているが、そのような実施形態がほんの一例として提供されることは、当業者には明らかであろう。本開示が本明細書内で提供される具体的な実施例によって限定されることは意図されていない。本開示は前述の明細書を参照して記載されているが、本明細書の実施形態の記載及び例証は、限定的な意味で解釈されるように意図されていない。多数の変形、変更、及び置換が、ここで、本開示から逸脱することなく、当業者に想起されるであろう。更に、本開示の全ての態様は、様々な条件及び変数に依存する、本明細書に記載される具体的な描写、構成、又は相対的割合に限定されないことを理解されたい。本明細書に記載される本開示の実施形態に対する様々な代替が、本開示を実践する際に用いられ得ることが、理解されるべきである。したがって、本開示は、任意のそのような代替、修正、変形、又は均等物も網羅するものであることが企図される。以下の特許請求の範囲は、本開示の範囲、並びにこれらの請求項及びそれらの均等物の範囲内の方法及び構造がそれによって網羅されることを定義することが意図される。

10

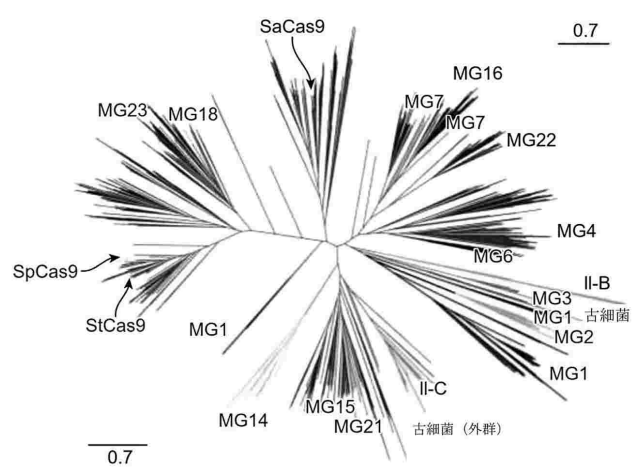
20

30

40

50

【図面】
【図 1 A】



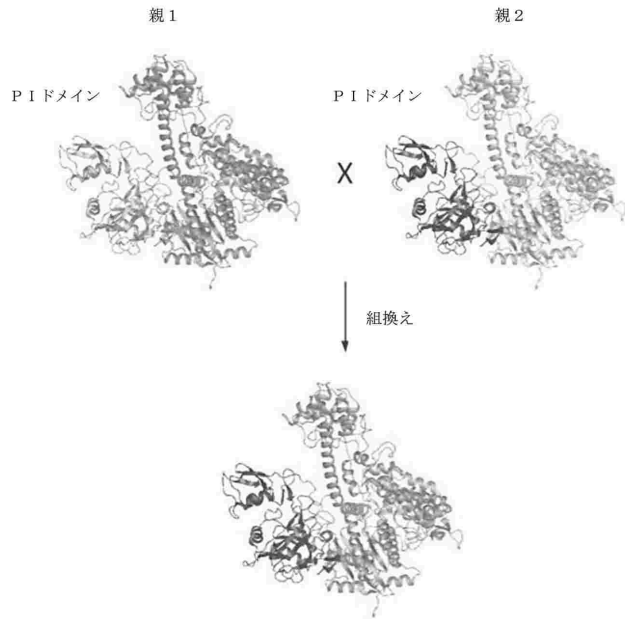
【図 1 B】

遺伝子	PAM
MG1-4	nRRR
MG1-5	nnnnYY
MG1-6	nnRRAY
MG1-7	nRRRAAG
MG2-4	nAGG
MG2-7	nnnRTA
MG3-1	該当なし
MG3-2	該当なし
MG3-3	nnnCCCYR
MG3-4	nnAAAABn
MG3-6	nnRGGnT
MG3-7	nnRnYAY
MG3-8	nnRGGTy
MG4-2	YRnMCC
MG4-5	nRCCV
MG6-3	nRRTA
MG7-1	nRRnCG
MG14-1	nRnnGRKA
MG15-1	CNNNCNAA
MG16-1	nRRnMC
MG18-1	nRWART
SpCas9	nGG
SaCas9	nGGRRT

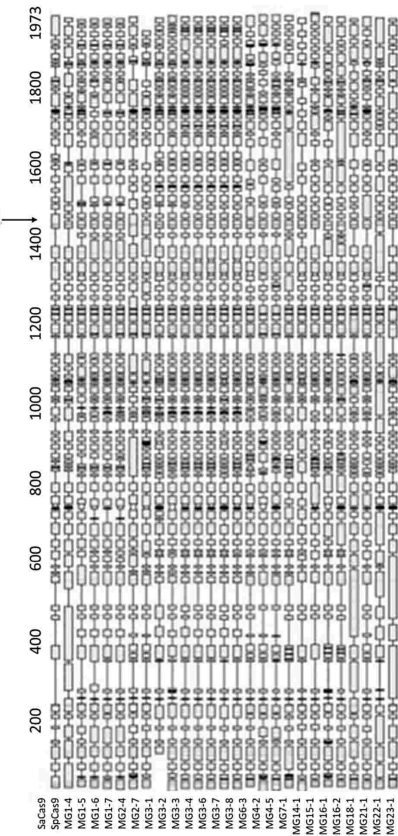
10

20

【図 2】



【図 3 A】

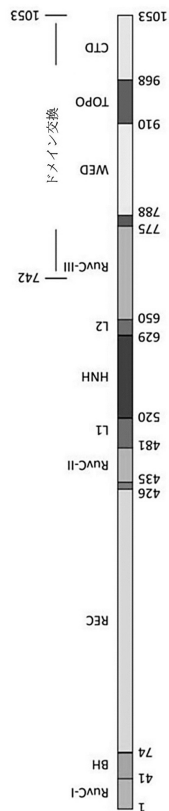


30

40

50

【図 3 B】



【図 4】



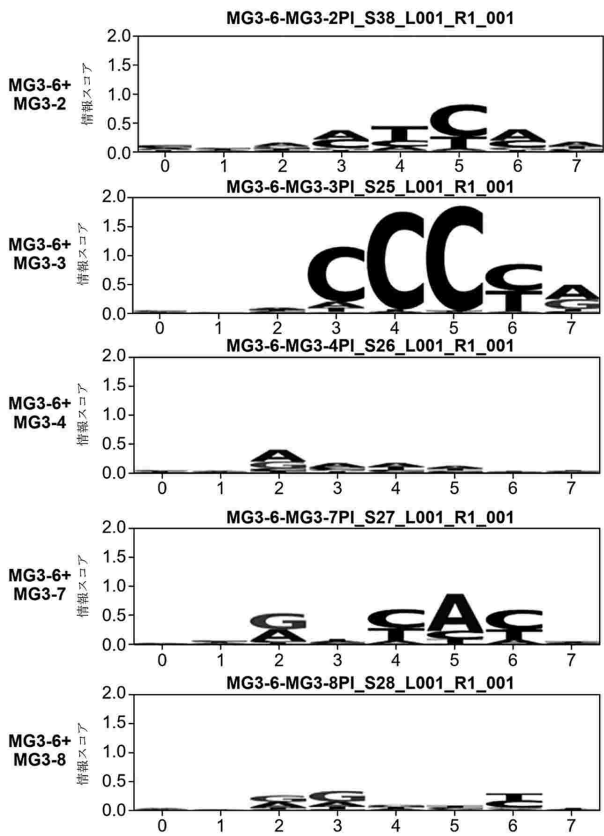
10

20

【図 5 A】

親	キメラ
MG3-3 (nnnCCCYR)	MG3-6+MG3-2 (nnRMYMW)
MG3-4 (nnAAAAAnn)	MG3-6+MG3-3 (nnnCCCYR)
MG3-6 (nnRGnT)	MG3-6+MG3-4 (nnAAAAAnn)
MG3-7 (nnRnYAY)	MG3-6+MG3-7 (nnRnYAY)
MG3-8 (nnRGGTY)	MG3-6+MG3-8 (nnRGGTY)

【図 5 B】

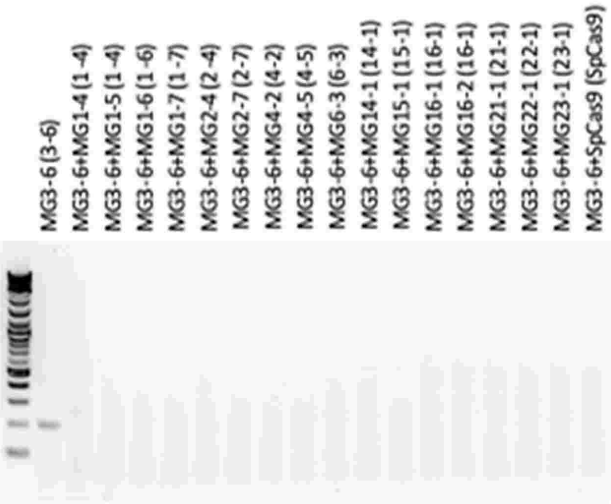


30

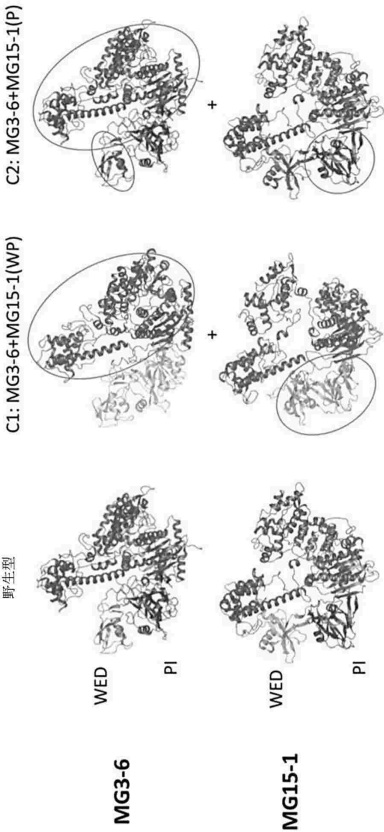
40

50

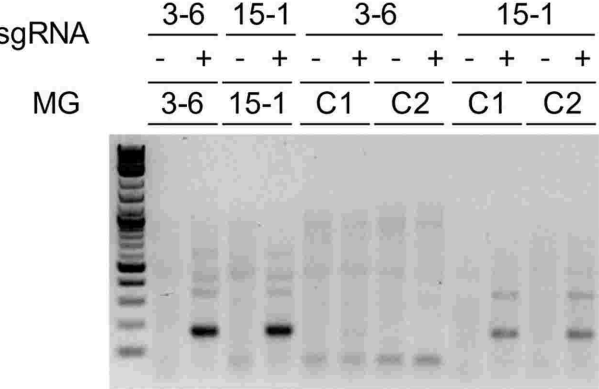
【図 6】



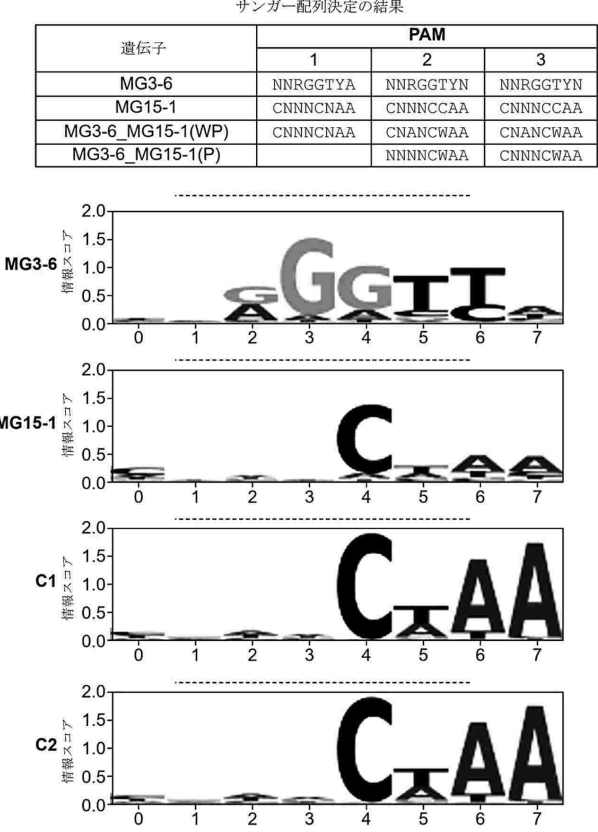
【図 7】



【図 8 A】



【図 8 B】



10

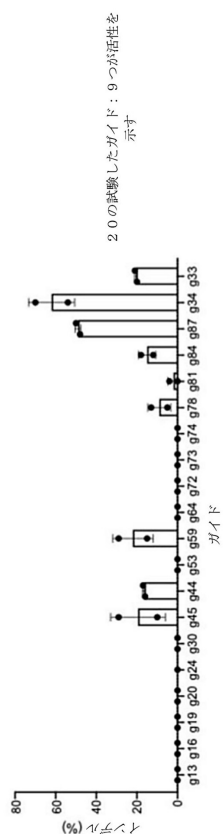
20

30

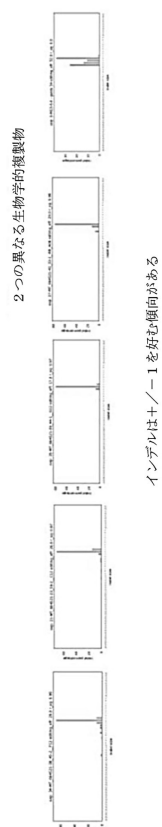
40

50

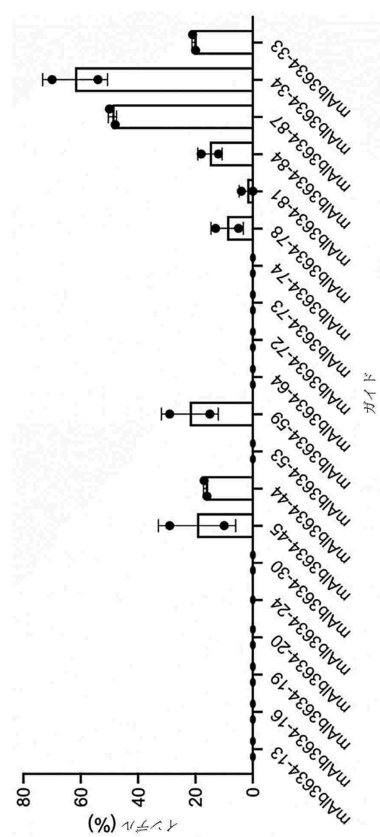
【図 9 A】



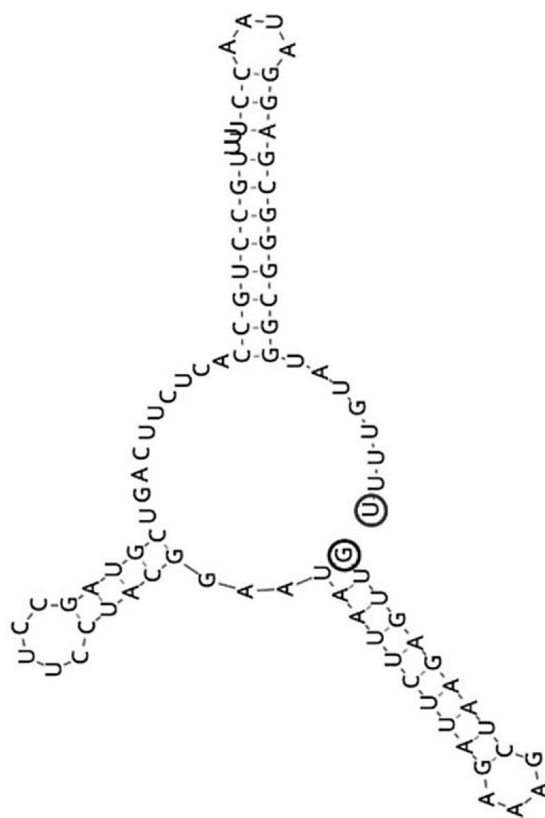
【図 9 B】



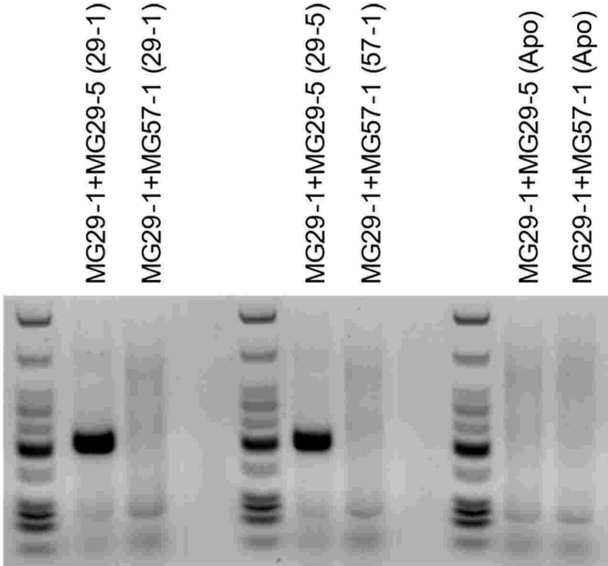
【図 10】



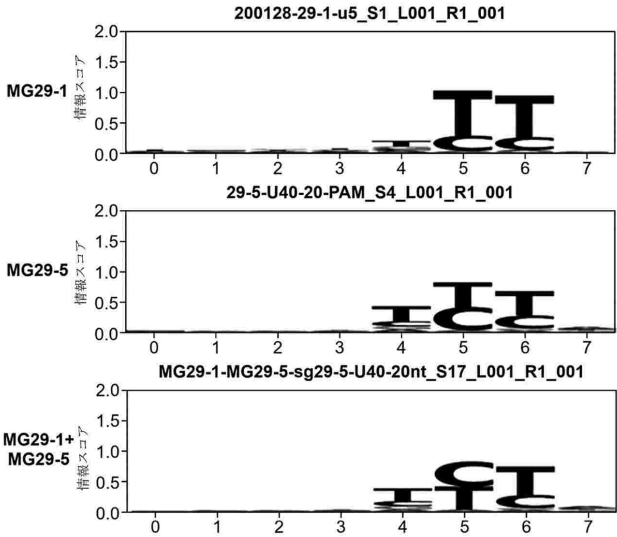
【図 1 1 A】



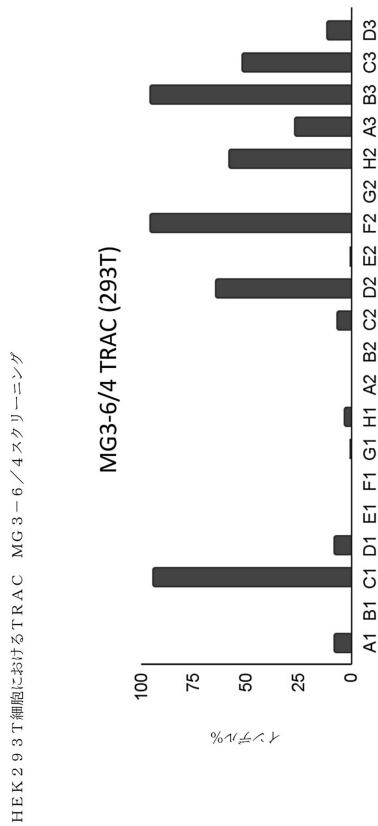
【図 15 A】



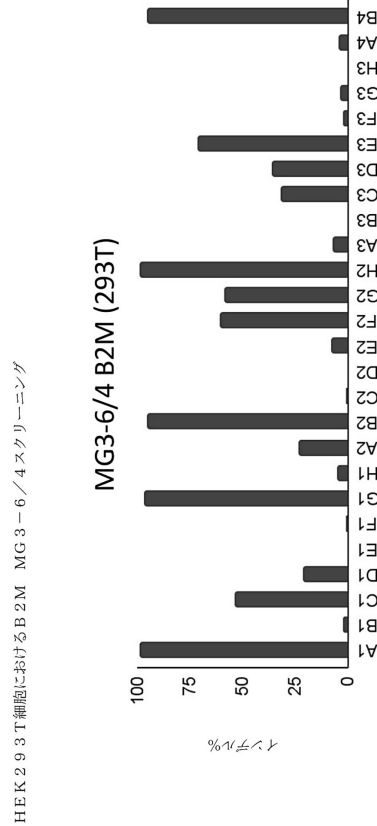
【図 15 B】



【図 16】



【図 17】



10

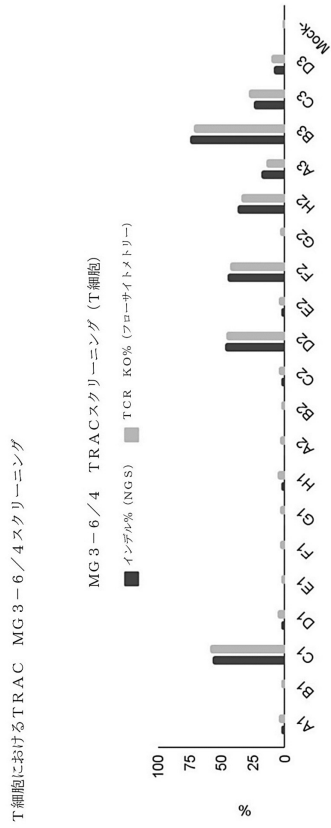
20

30

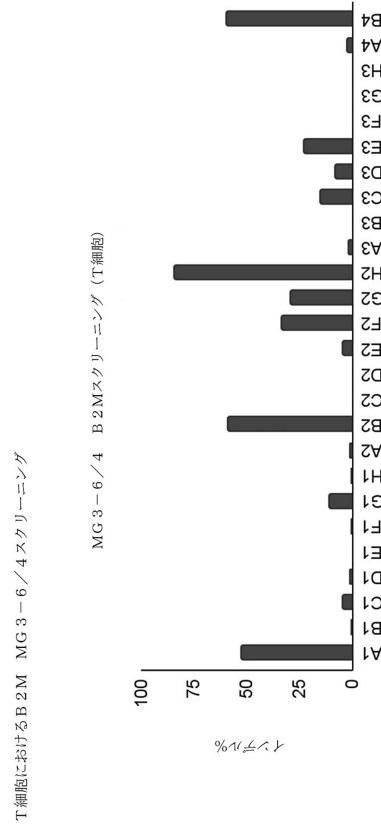
40

50

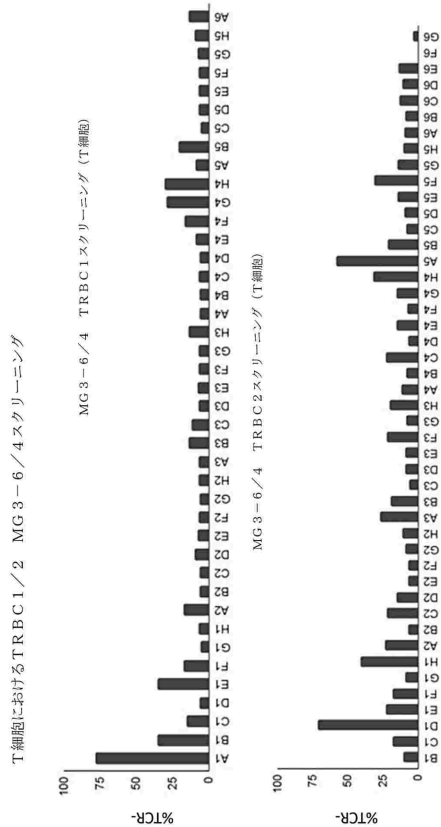
【図 18】



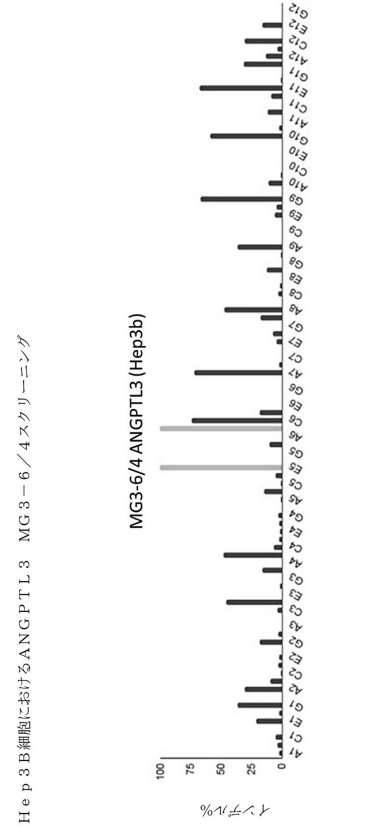
【図 19】



【図 20】



【図 21】



10

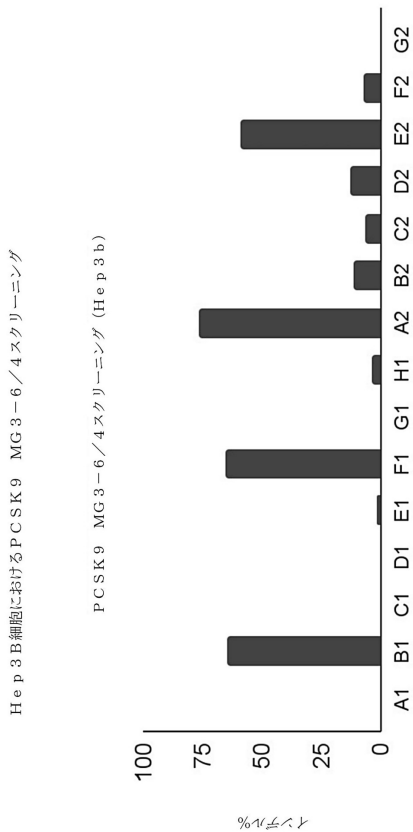
20

30

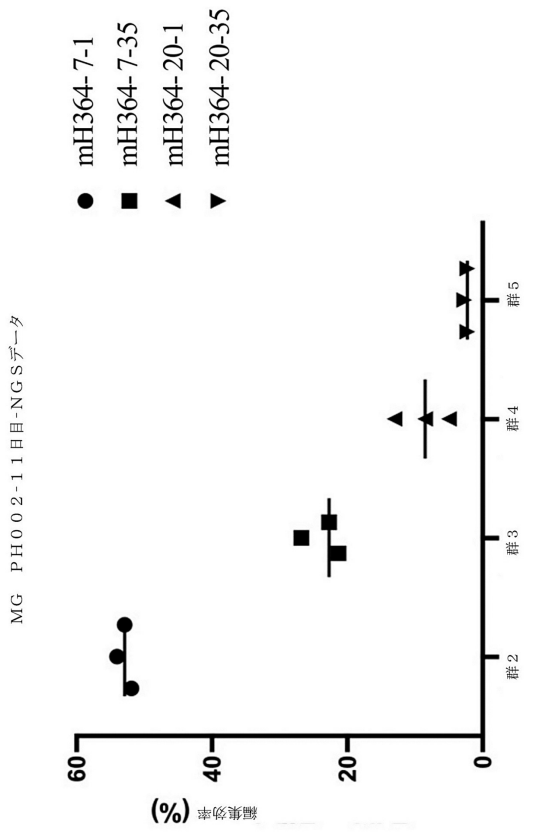
40

50

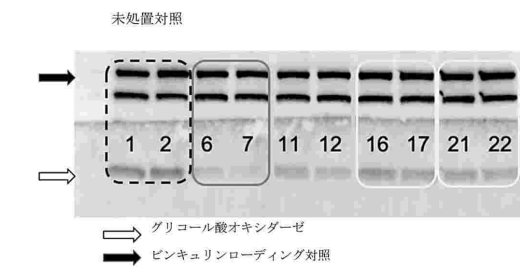
【図 2 2】



【図 2 3】



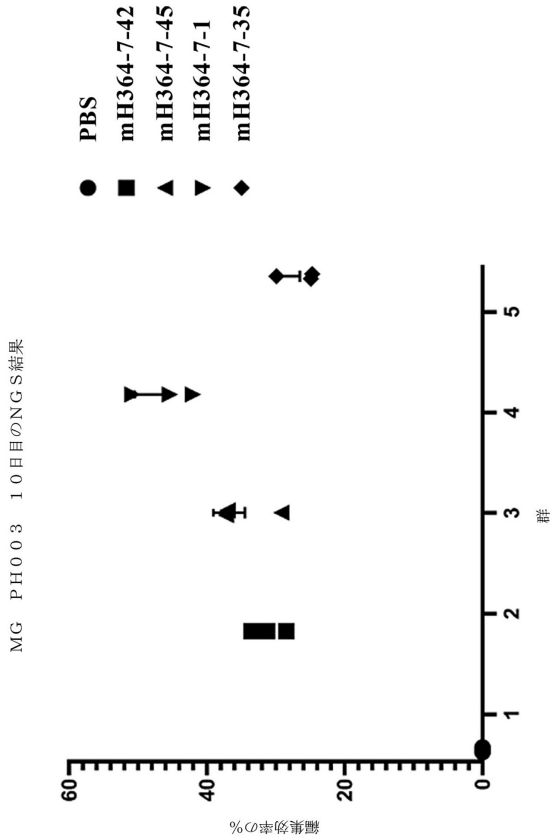
【図 2 4】



ウェスタンブロットの定量化				
ガイドRNA	化学	マウス	GOタンパク質%ノックダウン#	平均GOタンパク質%ノックダウン
mH364-7-1	1	6	65	75
		7	86	
mH364-7-35	35	11	56	58
		12	60	
mH364-20-1	1	16	4	4
		17	4	
mH364-20-35	35	21	21	24
		22	26	

未処置対照の%としてビンキュリンに正規化したGOタンパク質レベル数

【図 2 5】



10

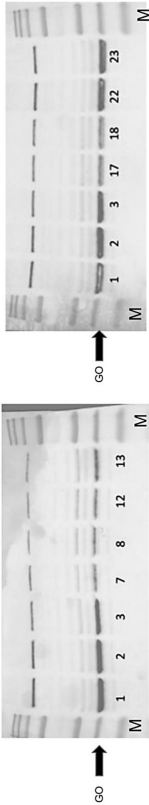
20

30

40

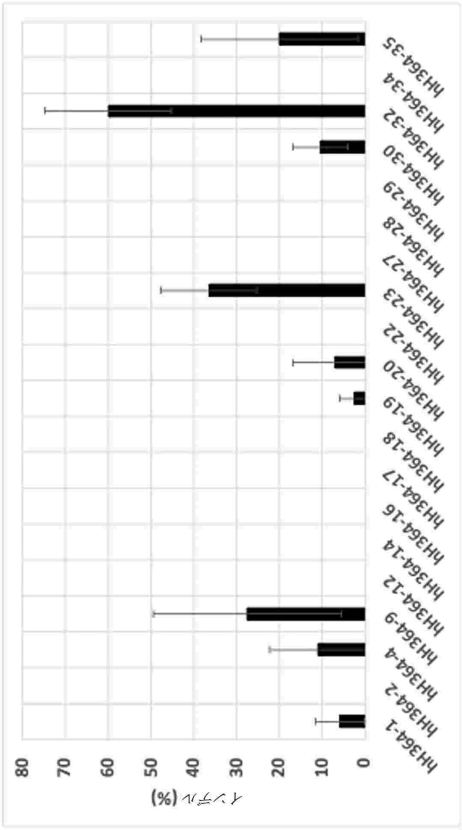
50

【図 2 6】



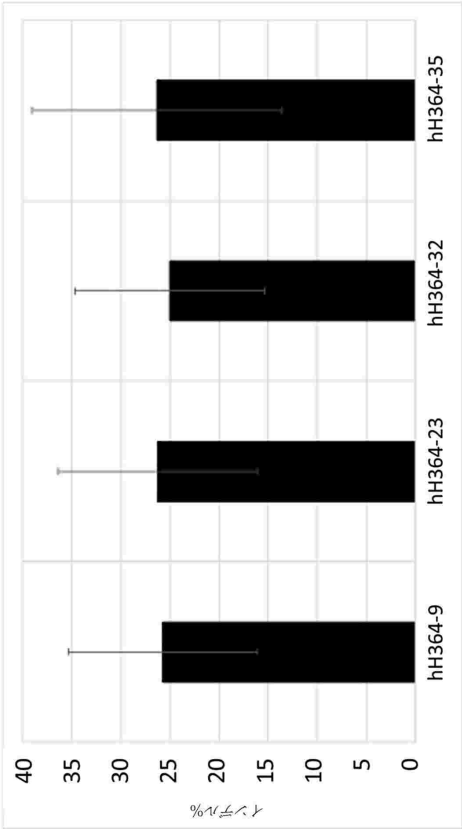
【図 2 7】

Hep3B細胞におけるMG3-6/3-4ヒトHAO-1ガイドのスクリーニング



【図 2 8】

初代ヒト肝細胞における選択されたMG3-6/3-4ヒトHAO-1ガイドの活性

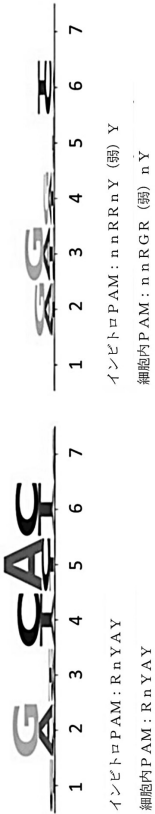


【図 2 9】

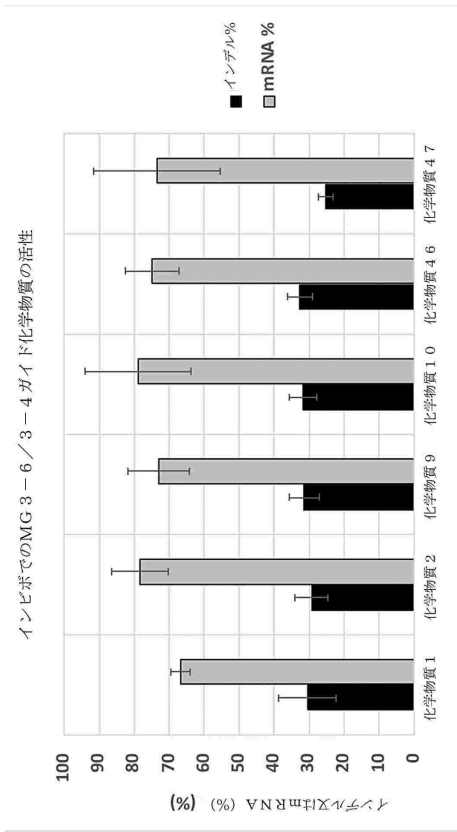
MG3-6キメラに対する細胞内PAM

MG3-6/7

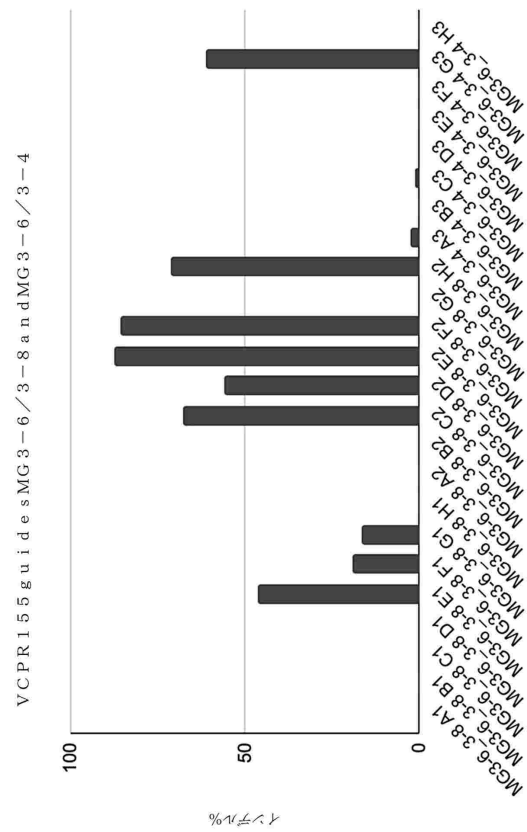
MG3-6/8



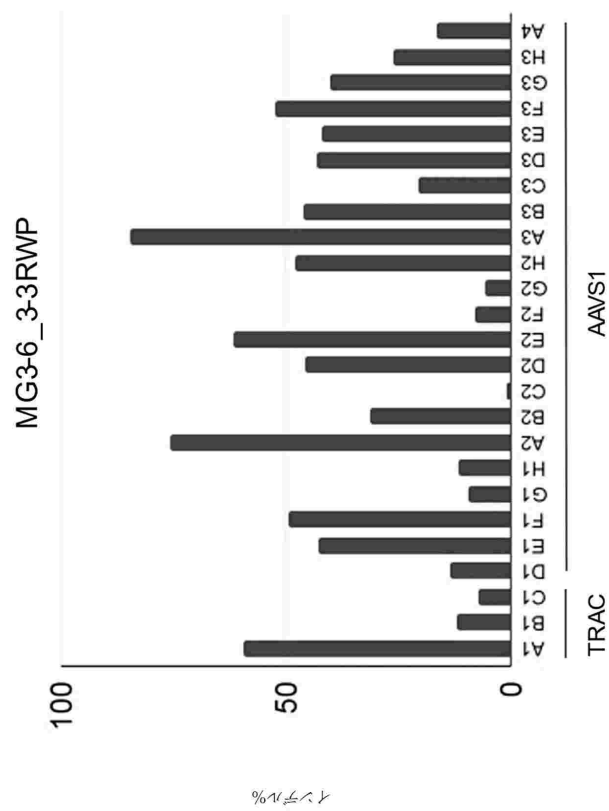
【図 3 0】



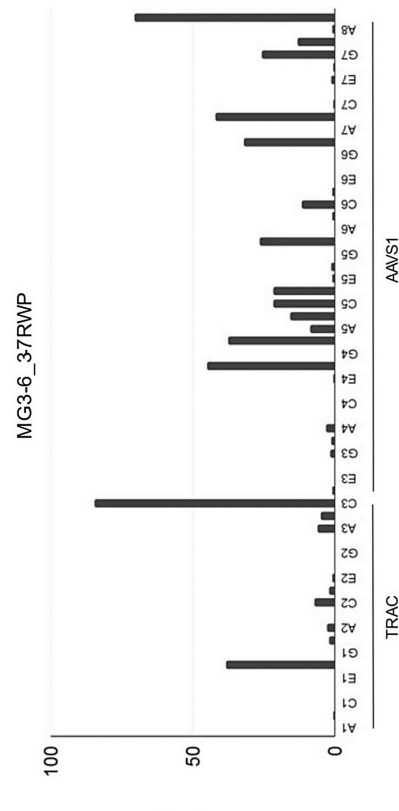
【図 3 1】



【図 3 2】



【図 3 3】



10

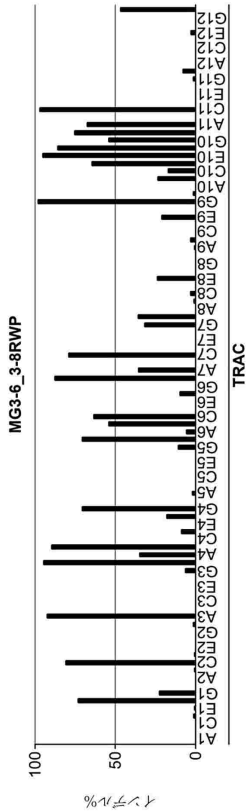
20

30

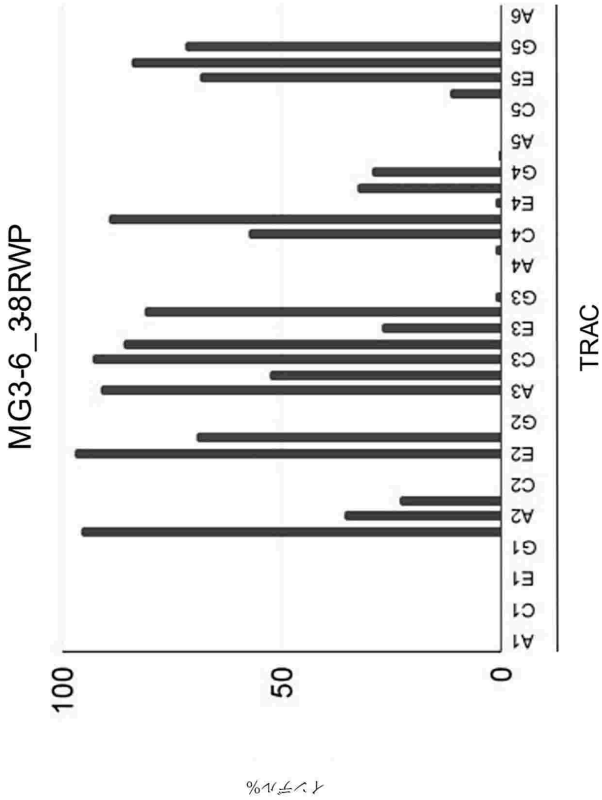
40

50

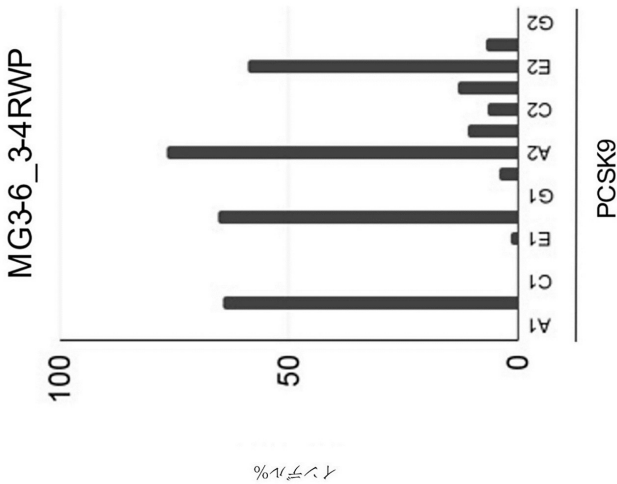
【 図 3 4 】



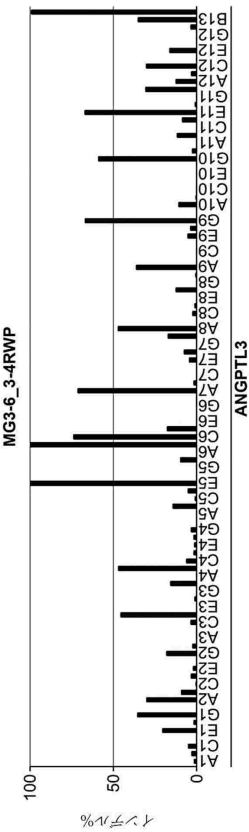
【 図 3 5 】



【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



10

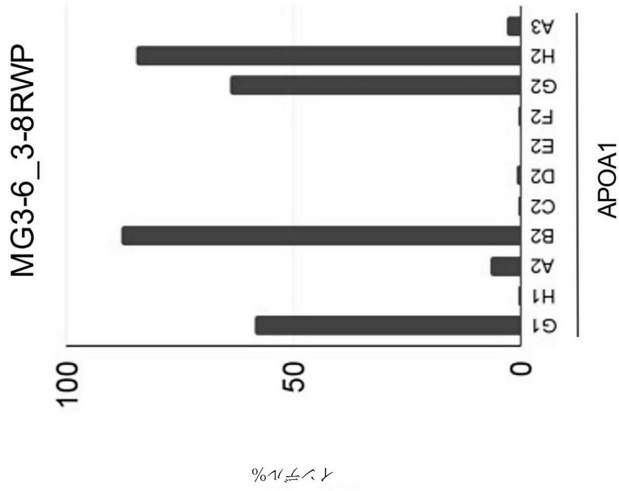
20

30

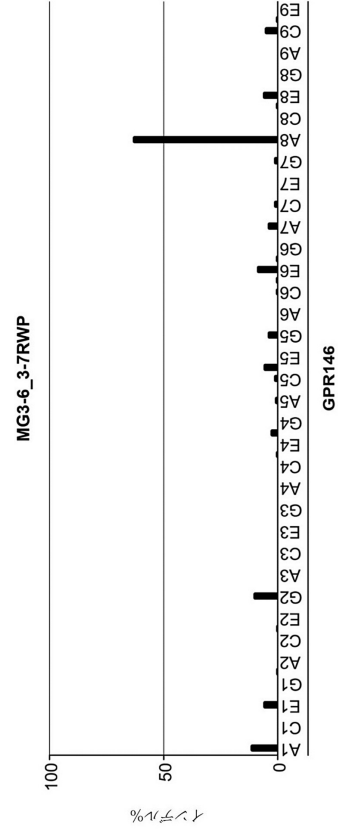
40

50

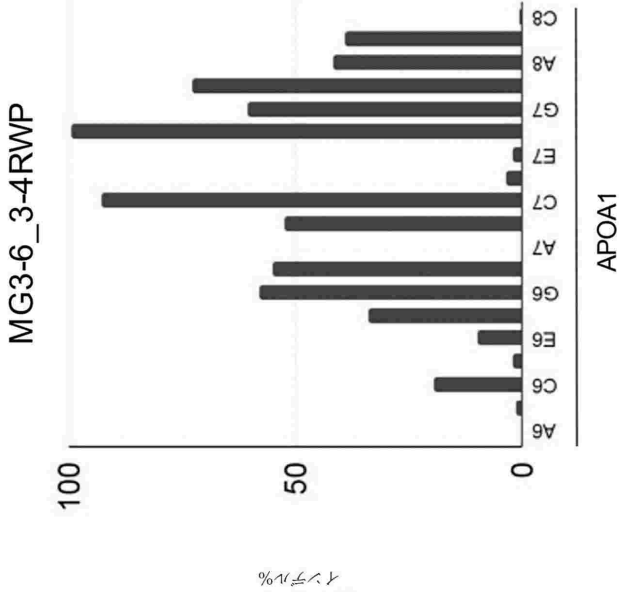
【図 38】



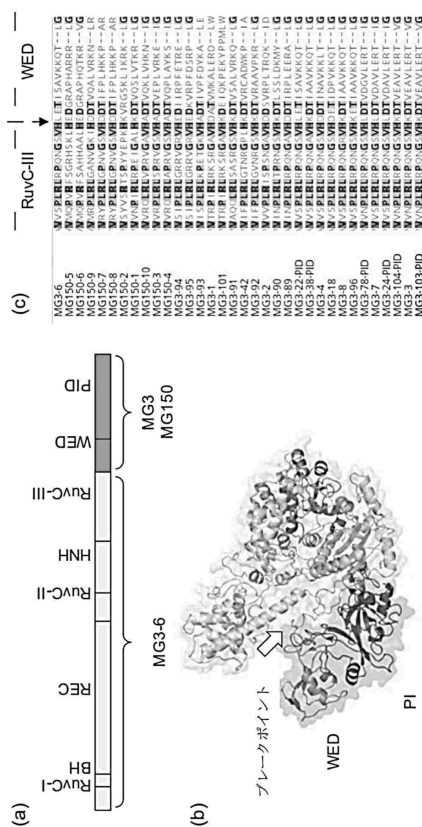
【図 39】



【図 40】



【図 41】



10

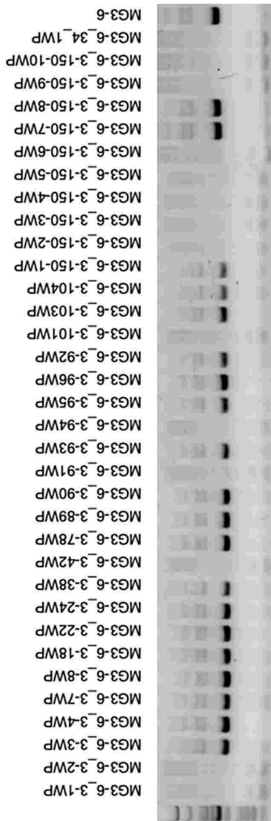
20

30

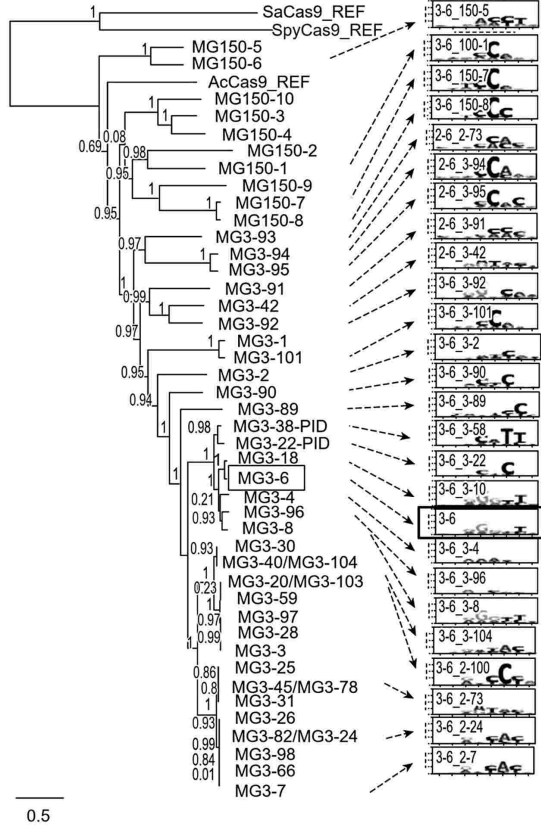
40

50

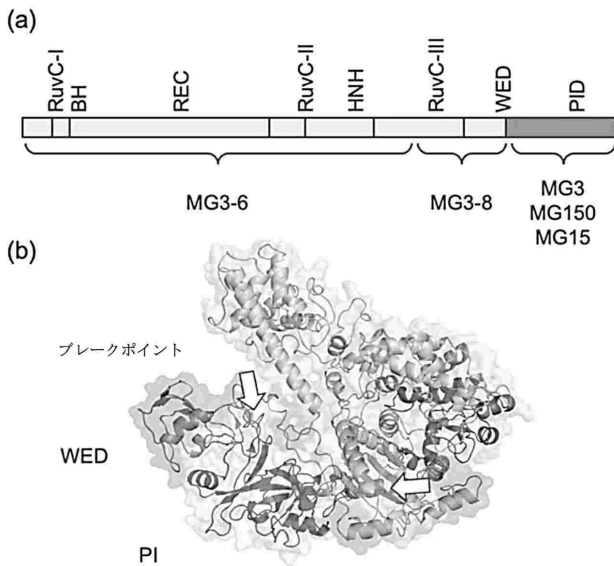
【図 4 2 A】



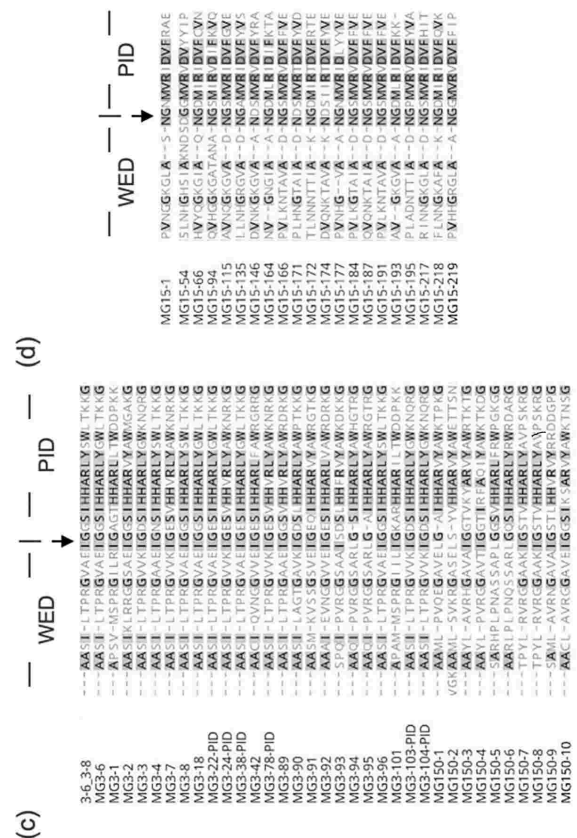
【図 4 2 B】



【図 4 3 - 1】



【図 4 3 - 2】



10

20

30

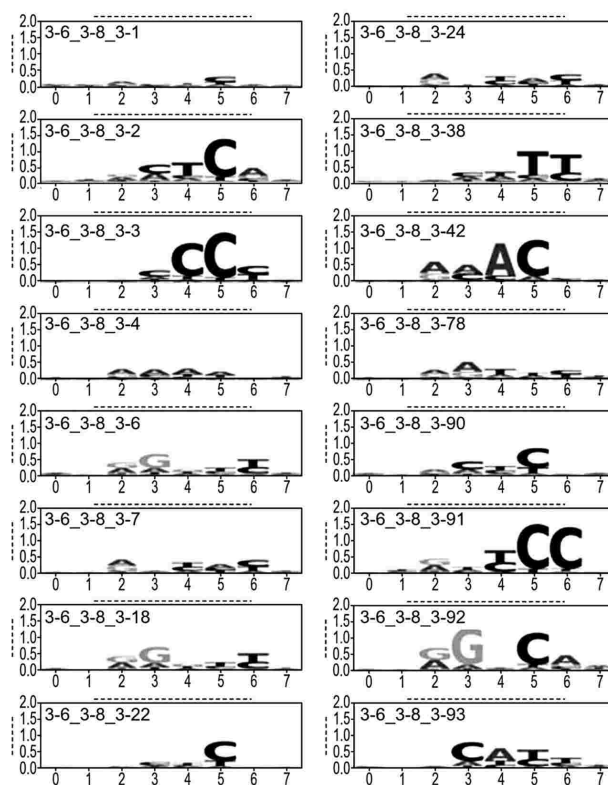
40

50

【図 4 4 A】



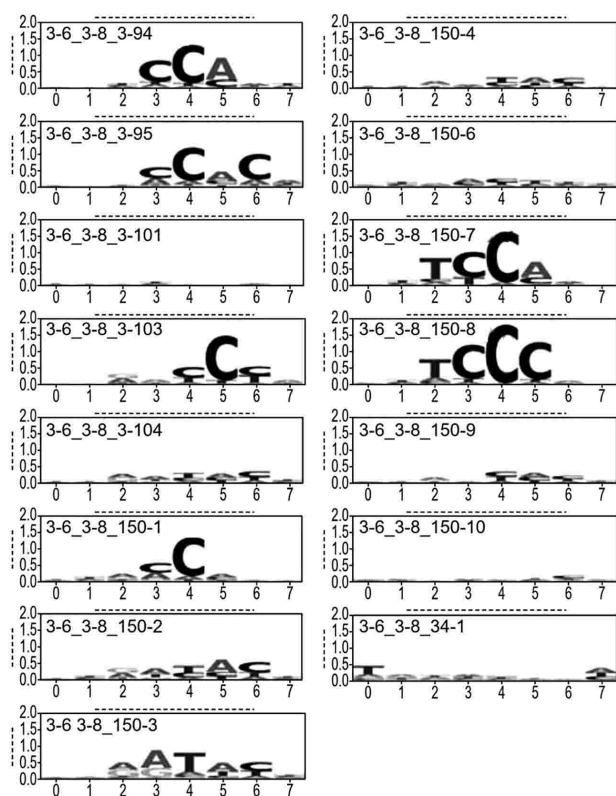
【図 4 4 B - 1】



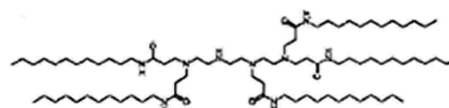
10

20

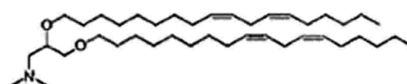
【圖 4 4 B - 2】



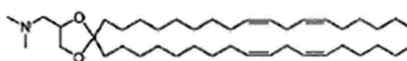
【図 4 5】



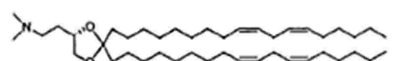
DLin DMA



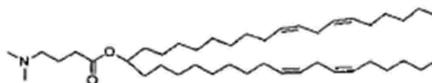
DLin-K-DMA (2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキサラン)



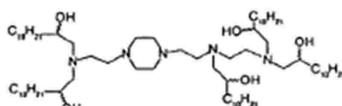
DLin-KC2-DMA



DLin-MC3-DMA



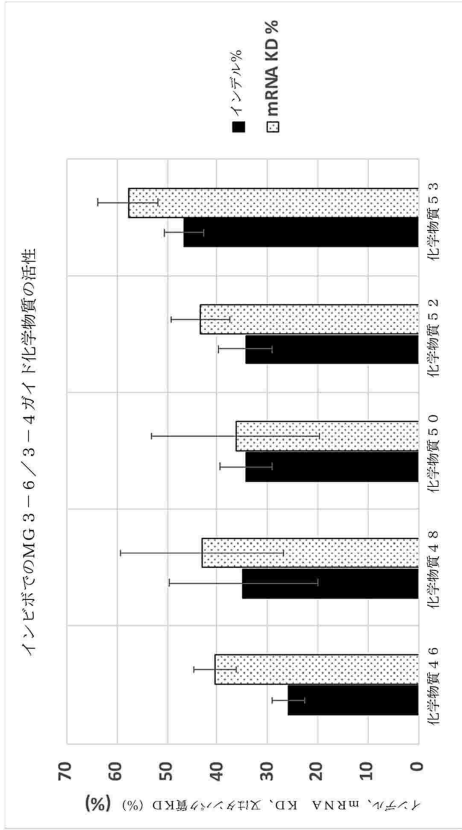
C12-200



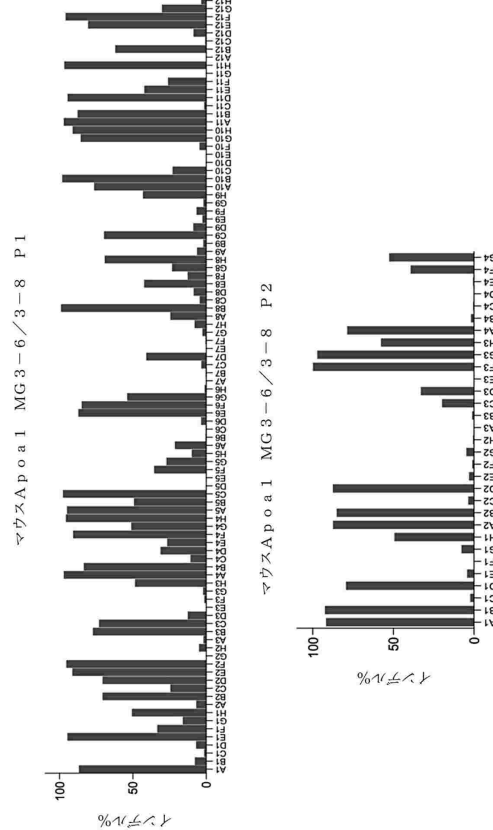
30

40

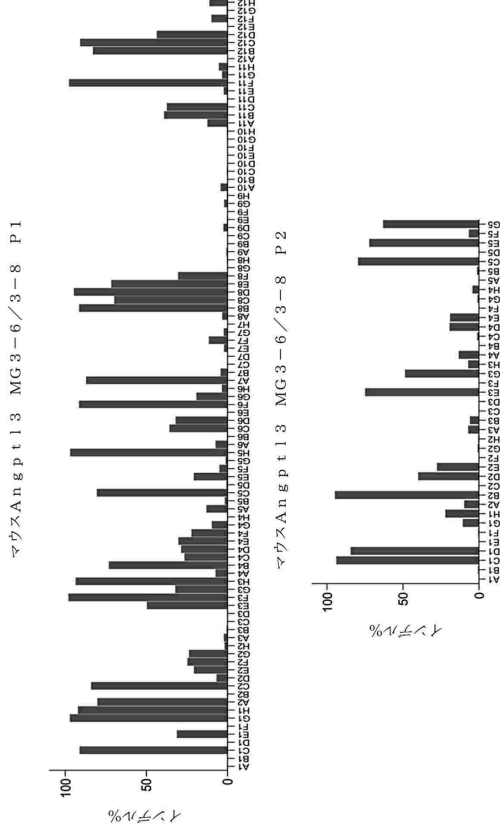
【図 4 6】



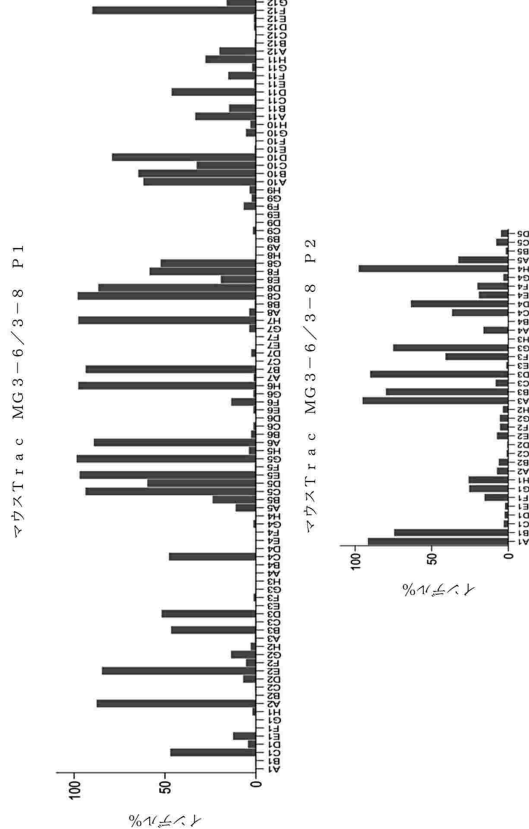
【図 4 7】



【図 4 8】



【図 4 9】



10

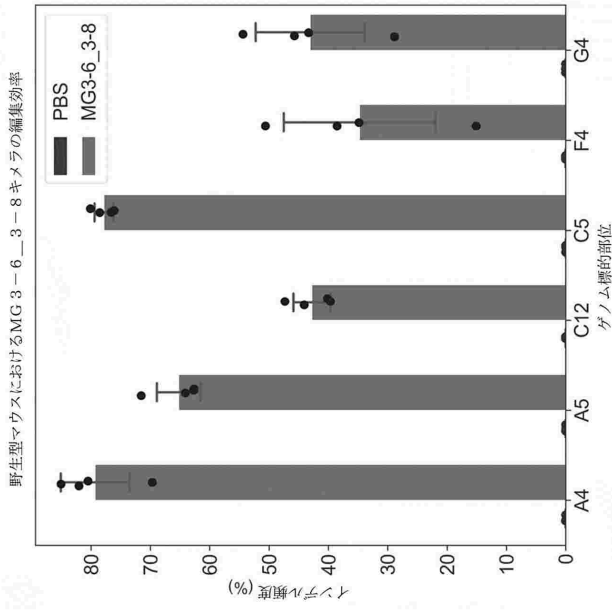
20

30

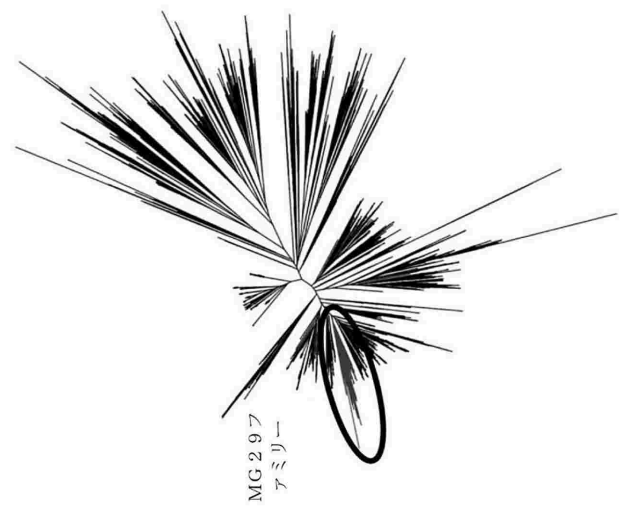
40

50

【図 5 0】

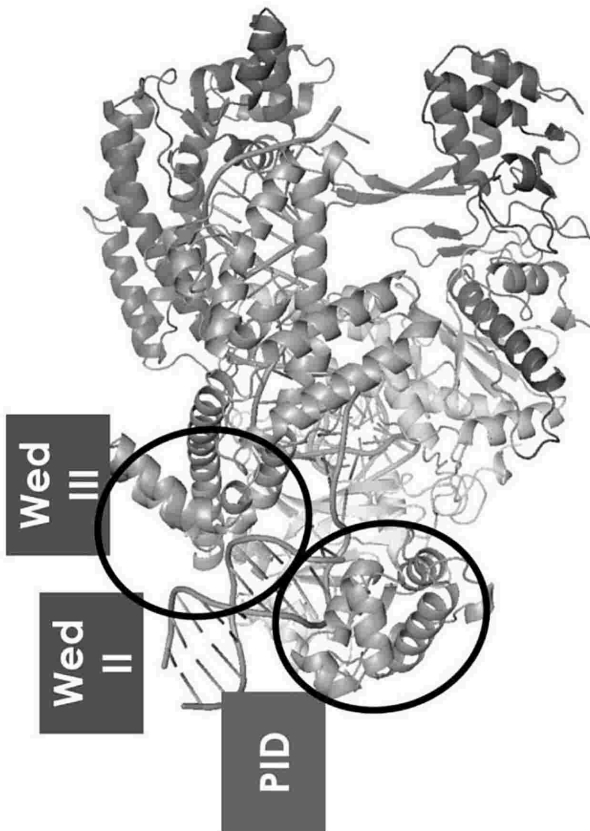


【図 5 1 A】

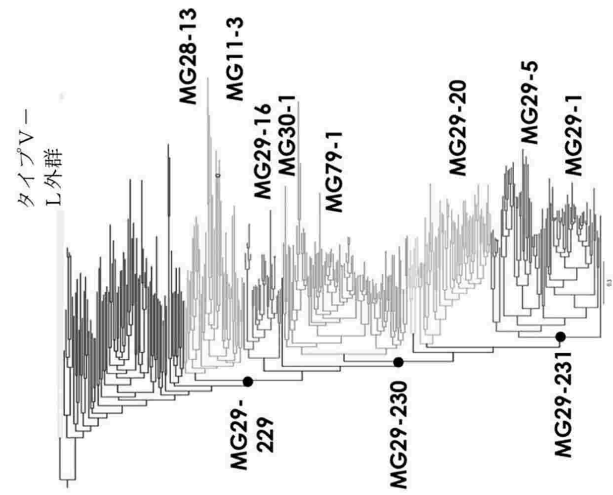


10

【図 5 1 B】



【図 5 2 A】



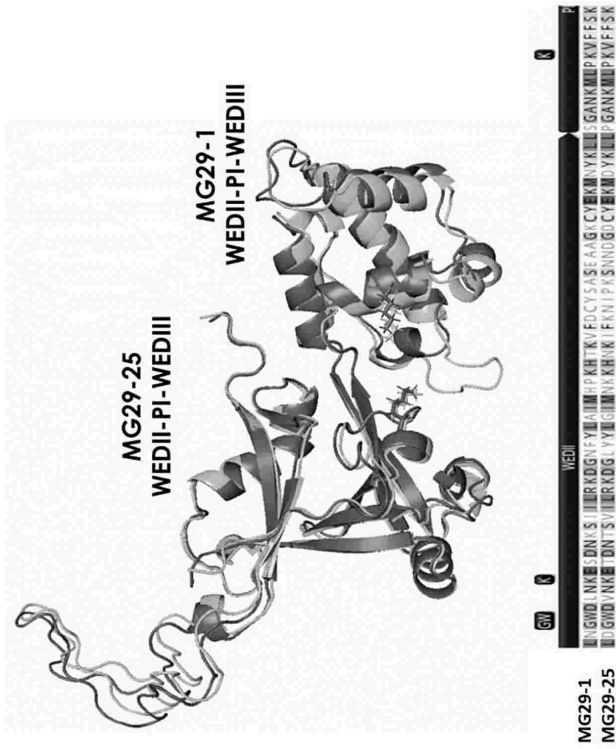
20

30

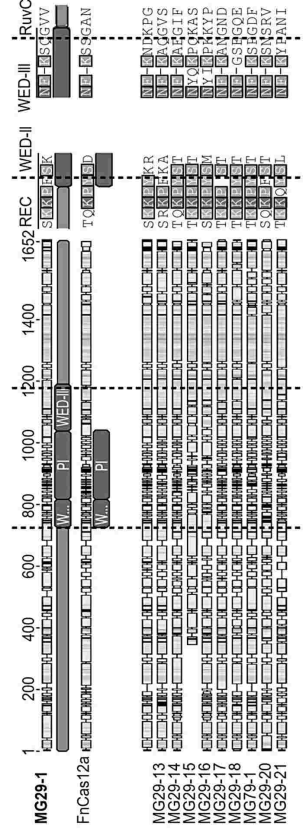
40

50

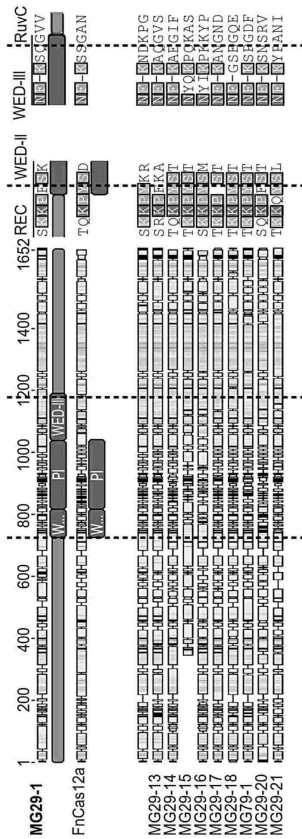
【図 5 2 B】



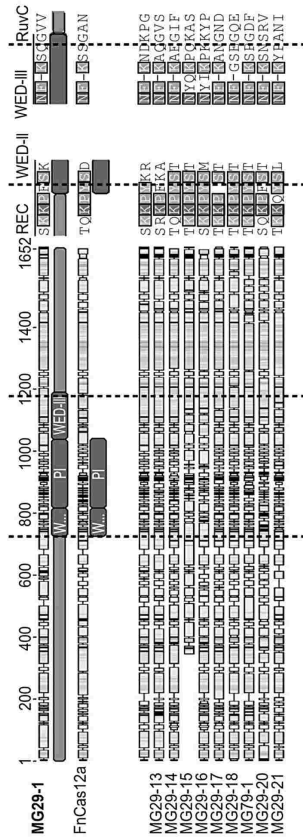
【図 5 3 A】



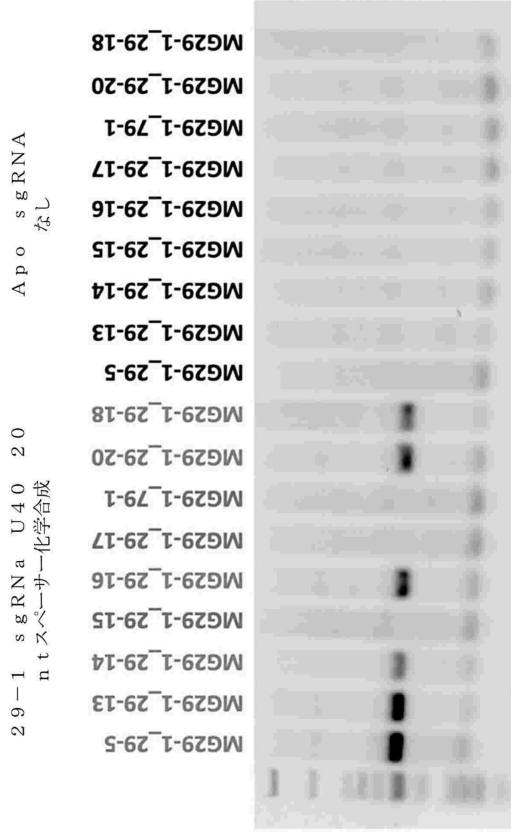
【圖 5 3 B】



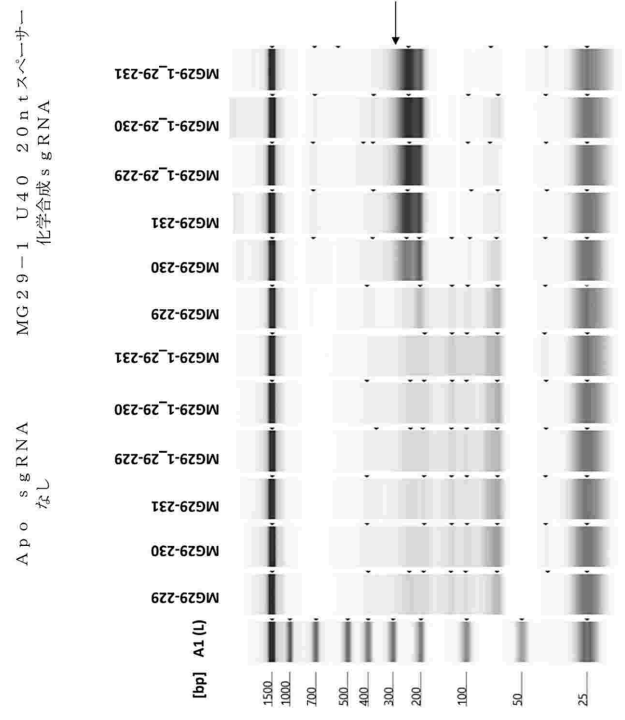
【図 5 3 C】



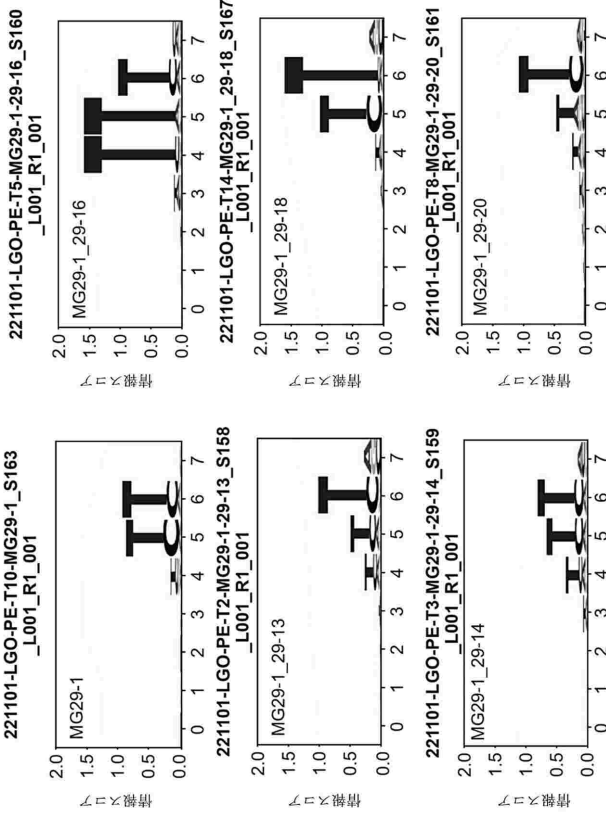
【図 5 4】



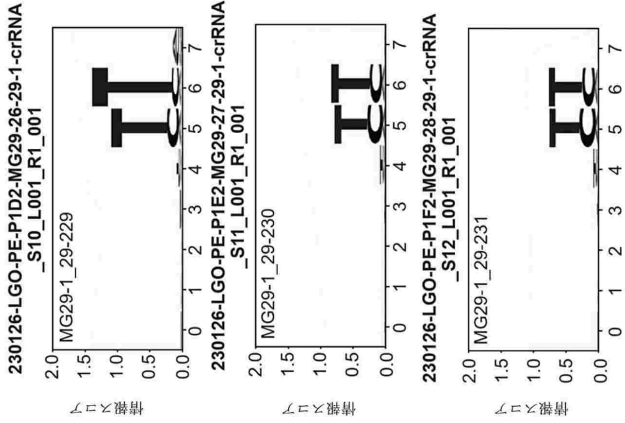
【図 5 5】



【図 5 6 - 1】



【図 5 6 - 2】



10

20

30

40

50

【配列表】
2025510622000001.xml

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 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
(32)優先日	令和4年7月27日(2022.7.27)	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	
(31)優先権主張番号	63/482,294	
(32)優先日	令和5年1月30日(2023.1.30)	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	
(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,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,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW	

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

(72)発明者	ブラウン, クリストファー	
	アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー	1 5 4 5
(72)発明者	バターフィールド, クリスティーナ, ノエル	
	アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー	1 5 4 5
(72)発明者	ゴルツマン, ダニエラ, エス., エー.	
	アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー	1 5 4 5
(72)発明者	リン, ジュニーリアン	
	アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー	1 5 4 5
(72)発明者	ノセダル, イザベル	
	アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー	1 5 4 5
(72)発明者	テモチューディアス, モライマ, エム.	
	アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー	1 5 4 5
F ターム (参考)	4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y	
	AB01 AC14 CA23 CA31 CA60	