(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-522086
(P2024-522086A)
(43)公表日　令和6年6月11日(2024.6.11)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	ＺＺＮＡ	
Ｃ１２Ｎ	*9/22 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/22		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全411頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-572062(P2023-572062)
(86)(22)出願日　令和4年6月1日(2022.6.1)
(85)翻訳文提出日　令和6年1月19日(2024.1.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/031849
(87)国際公開番号　WO2022/256462
(87)国際公開日　令和4年12月8日(2022.12.8)
(31)優先権主張番号　63/196,127
(32)優先日　令和3年6月2日(2021.6.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/233,653
(32)優先日　令和3年8月16日(2021.8.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/261,436
最終頁に続く

(71)出願人　522185863
メタゲノミ，インク．
アメリカ合衆国　９４６０８　カリフォルニア州　エメリービル　パーク・アベニュー　１５４５
(74)代理人　110003797
弁理士法人清原国際特許事務所
(72)発明者　トーマス，ブライアン
アメリカ合衆国　９４６０８　カリフォルニア州　エメリービル　パーク・アベニュー　１５４５
(72)発明者　ブラウン，クリストファー
アメリカ合衆国　９４６０８　カリフォルニア州　エメリービル　パーク・アベニュー　１５４５
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　クラスＩＩ、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ系

(57)【要約】
遺伝子編集に有用な方法、組成物、及び未培養微生物に由来する系が本明細書に記載される。
【選択図】図４Ｂ

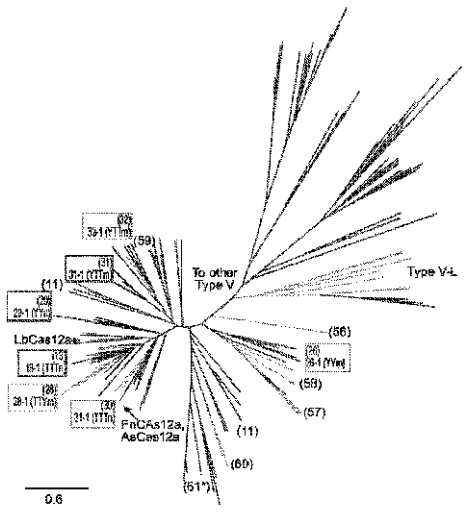


FIG. 4B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞におけるＣＤ３８遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＣＤ３８遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４４６６～４５０３及び５６８６のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４４２８～４４６５及び５６８５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項２】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４４６６、４４６７、４４６８、４４７９、４４８４、４４９０、４４９２、４４９３、４４９５、４４９８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４４２８、４４２９、４４３０、４４３６、４４４１、４４４６、４４５２、４４５４、４４５５、４４６０、又は４４６１のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項１～

６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
細胞におけるＴＩＧＩＴ遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＴＩＧＩＴ遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４５２１～４５３７のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４５０４～４５２０のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項１０】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項９～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項９～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４５２１、４５２７、４５２８、４５３５、又は４５３６のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項９～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４５０４、４５１０、４５１１、４５１８、

又は４５１９のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項９～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項９～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
細胞におけるＡＡＶＳ１遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼとⅠ、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＡＡＶＳ１遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４５６９～４５９９のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４５３８～４５６８のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項１８】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼⅠが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１７～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１７～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４５７４、４５７７、４５７８、４５７９、４５８２、４５８４、４５８５、４５８６、４５８７、４５８９、４５９０、４５９１、４５９２、４５９３、４５９５、４５９６、又は４５９８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項１７～２１のいずれか一項に記載

の方法。
【請求項２３】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４５４３、４５４６、４５４７、４５４８、４５５１、４５５３、４５５４、４５５５、４５５６、４５５８、４５５９、４５６０、４５６１、４５６２、４５６５、又は４５６７のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項１７～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、肝細胞、又はそれらの前駆体である、請求項１７～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
細胞におけるＢ２Ｍ遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記Ｂ２Ｍ遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４６７６～４７５１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４６００～４６７５及び５６８５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項２６】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７及び６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項２５～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項２５～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４６７６、４６７８－４６８７、４６９０、４６９２、４６９８－４７０７、４７２０－４７２３、４７２５－４７２６、４７３２－４７３３、４７３６－４７３７、４７４１、又は４７５０～４７５１のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項２５～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３１】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４６００、４６０２－４６１１、４６１４、４６１６、４６２２－４６３１、４６４４－４６４７、４６４９－４６５０、４６５６－４６５７、４６６０－４６６１、４６６５、又は４６７４～４６７５のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項２５～３０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３２】

前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３３】

細胞におけるＣＤ２遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（ａ）クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼとＣＤ２遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４８３７～４９２１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４７５２～４８３６のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項３４】

前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼがＣ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、Ｃ２ｃ３、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ８ａ、Ｃ８ｂ、Ｃ９、Ｃ１０、Ｃ１２、Ｃ１３ａ、Ｃ１３ｂ、Ｃ１４ａ、Ｃ１４ｂ、Ｃ１５、Ｃ１６、Ｃ１７、Ｃ１８、Ｃ１９、Ｃ２０、Ｃ２１、Ｃ２２、Ｃ２３、Ｃ２４、Ｃ２５、Ｃ２６、Ｃ２７、Ｃ２８、Ｃ２９、Ｃ３０、Ｃ３１、Ｃ３２、Ｃ３３、Ｃ３４、Ｃ３５、Ｃ３６、Ｃ３７、Ｃ３８、Ｃ３９、Ｃ４０、Ｃ４１、Ｃ４２、Ｃ４３、Ｃ４４、Ｃ４５、Ｃ４６、Ｃ４７、Ｃ４８、Ｃ４９、Ｃ５０、Ｃ５１、Ｃ５２、Ｃ５３、Ｃ５４、Ｃ５５、Ｃ５６、Ｃ５７、Ｃ５８、Ｃ５９、Ｃ６０、Ｃ６１、Ｃ６２、Ｃ６３、Ｃ６４、Ｃ６５、Ｃ６６、Ｃ６７、Ｃ６８、Ｃ６９、Ｃ７０、Ｃ７１、Ｃ７２、Ｃ７３、Ｃ７４、Ｃ７５、Ｃ７６、Ｃ７７、Ｃ７８、Ｃ７９、Ｃ８０、Ｃ８１、Ｃ８２、Ｃ８３、Ｃ８４、Ｃ８５、Ｃ８６、Ｃ８７、Ｃ８８、Ｃ８９、Ｃ９０、Ｃ９１、Ｃ９２、Ｃ９３、Ｃ９４、Ｃ９５、Ｃ９６、Ｃ９７、Ｃ９８、Ｃ９９、Ｃ１００、Ｃ１０１、Ｃ１０２、Ｃ１０３、Ｃ１０４、Ｃ１０５、Ｃ１０６、Ｃ１０７、Ｃ１０８、Ｃ１０９、Ｃ１１０、Ｃ１１１、Ｃ１１２、Ｃ１１３、Ｃ１１４、Ｃ１１５、Ｃ１１６、Ｃ１１７、Ｃ１１８、Ｃ１１９、Ｃ１２０、Ｃ１２１、Ｃ１２２、Ｃ１２３、Ｃ１２４、Ｃ１２５、Ｃ１２６、Ｃ１２７、Ｃ１２８、Ｃ１２９、Ｃ１３０、Ｃ１３１、Ｃ１３２、Ｃ１３３、Ｃ１３４、Ｃ１３５、Ｃ１３６、Ｃ１３７、Ｃ１３８、Ｃ１３９、Ｃ１４０、Ｃ１４１、Ｃ１４２、Ｃ１４３、Ｃ１４４、Ｃ１４５、Ｃ１４６、Ｃ１４７、Ｃ１４８、Ｃ１４９、Ｃ１５０、Ｃ１５１、Ｃ１５２、Ｃ１５３、Ｃ１５４、Ｃ１５５、Ｃ１５６、Ｃ１５７、Ｃ１５８、Ｃ１５９、Ｃ１６０、Ｃ１６１、Ｃ１６２、Ｃ１６３、Ｃ１６４、Ｃ１６５、Ｃ１６６、Ｃ１６７、Ｃ１６８、Ｃ１６９、Ｃ１７０、Ｃ１７１、Ｃ１７２、Ｃ１７３、Ｃ１７４、Ｃ１７５、Ｃ１７６、Ｃ１７７、Ｃ１７８、Ｃ１７９、Ｃ１８０、Ｃ１８１、Ｃ１８２、Ｃ１８３、Ｃ１８４、Ｃ１８５、Ｃ１８６、Ｃ１８７、Ｃ１８８、Ｃ１８９、Ｃ１９０、Ｃ１９１、Ｃ１９２、Ｃ１９３、Ｃ１９４、Ｃ１９５、Ｃ１９６、Ｃ１９７、Ｃ１９８、Ｃ１９９、Ｃ２００、Ｃ２０１、Ｃ２０２、Ｃ２０３、Ｃ２０４、Ｃ２０５、Ｃ２０６、Ｃ２０７、Ｃ２０８、Ｃ２０９、Ｃ２１０、Ｃ２１１、Ｃ２１２、Ｃ２１３、Ｃ２１４、Ｃ２１５、Ｃ２１６、Ｃ２１７、Ｃ２１８、Ｃ２１９、Ｃ２２０、Ｃ２２１、Ｃ２２２、Ｃ２２３、Ｃ２２４、Ｃ２２５、Ｃ２２６、Ｃ２２７、Ｃ２２８、Ｃ２２９、Ｃ２３０、Ｃ２３１、Ｃ２３２、Ｃ２３３、Ｃ２３４、Ｃ２３５、Ｃ２３６、Ｃ２３７、Ｃ２３８、Ｃ２３９、Ｃ２４０、Ｃ２４１、Ｃ２４２、Ｃ２４３、Ｃ２４４、Ｃ２４５、Ｃ２４６、Ｃ２４７、Ｃ２４８、Ｃ２４９、Ｃ２５０、Ｃ２５１、Ｃ２５２、Ｃ２５３、Ｃ２５４、Ｃ２５５、Ｃ２５６、Ｃ２５７、Ｃ２５８、Ｃ２５９、Ｃ２６０、Ｃ２６１、Ｃ２６２、Ｃ２６３、Ｃ２６４、Ｃ２６５、Ｃ２６６、Ｃ２６７、Ｃ２６８、Ｃ２６９、Ｃ２７０、Ｃ２７１、Ｃ２７２、Ｃ２７３、Ｃ２７４、Ｃ２７５、Ｃ２７６、Ｃ２７７、Ｃ２７８、Ｃ２７９、Ｃ２８０、Ｃ２８１、Ｃ２８２、Ｃ２８３、Ｃ２８４、Ｃ２８５、Ｃ２８６、Ｃ２８７、Ｃ２８８、Ｃ２８９、Ｃ２９０、Ｃ２９１、Ｃ２９２、Ｃ２９３、Ｃ２９４、Ｃ２９５、Ｃ２９６、Ｃ２９７、Ｃ２９８、Ｃ２９９、Ｃ３００、Ｃ３０１、Ｃ３０２、Ｃ３０３、Ｃ３０４、Ｃ３０５、Ｃ３０６、Ｃ３０７、Ｃ３０８、Ｃ３０９、Ｃ３１０、Ｃ３１１、Ｃ３１２、Ｃ３１３、Ｃ３１４、Ｃ３１５、Ｃ３１６、Ｃ３１７、Ｃ３１８、Ｃ３１９、Ｃ３２０、Ｃ３２１、Ｃ３２２、Ｃ３２３、Ｃ３２４、Ｃ３２５、Ｃ３２６、Ｃ３２７、Ｃ３２８、Ｃ３２９、Ｃ３３０、Ｃ３３１、Ｃ３３２、Ｃ３３３、Ｃ３３４、Ｃ３３５、Ｃ３３６、Ｃ３３７、Ｃ３３８、Ｃ３３９、Ｃ３４０、Ｃ３４１、Ｃ３４２、Ｃ３４３、Ｃ３４４、Ｃ３４５、Ｃ３４６、Ｃ３４７、Ｃ３４８、Ｃ３４９、Ｃ３５０、Ｃ３５１、Ｃ３５２、Ｃ３５３、Ｃ３５４、Ｃ３５５、Ｃ３５６、Ｃ３５７、Ｃ３５８、Ｃ３５９、Ｃ３６０、Ｃ３６１、Ｃ３６２、Ｃ３６３、Ｃ３６４、Ｃ３６５、Ｃ３６６、Ｃ３６７、Ｃ３６８、Ｃ３６９、Ｃ３７０、Ｃ３７１、Ｃ３７２、Ｃ３７３、Ｃ３７４、Ｃ３７５、Ｃ３７６、Ｃ３７７、Ｃ３７８、Ｃ３７９、Ｃ３８０、Ｃ３８１、Ｃ３８２、Ｃ３８３、Ｃ３８４、Ｃ３８５、Ｃ３８６、Ｃ３８７、Ｃ３８８、Ｃ３８９、Ｃ３９０、Ｃ３９１、Ｃ３９２、Ｃ３９３、Ｃ３９４、Ｃ３９５、Ｃ３９６、Ｃ３９７、Ｃ３９８、Ｃ３９９、Ｃ４００、Ｃ４０１、Ｃ４０２、Ｃ４０３、Ｃ４０４、Ｃ４０５、Ｃ４０６、Ｃ４０７、Ｃ４０８、Ｃ４０９、Ｃ４１０、Ｃ４１１、Ｃ４１２、Ｃ４１３、Ｃ４１４、Ｃ４１５、Ｃ４１６、Ｃ４１７、Ｃ４１８、Ｃ４１９、Ｃ４２０、Ｃ４２１、Ｃ４２２、Ｃ４２３、Ｃ４２４、Ｃ４２５、Ｃ４２６、Ｃ４２７、Ｃ４２８、Ｃ４２９、Ｃ４３０、Ｃ４３１、Ｃ４３２、Ｃ４３３、Ｃ４３４、Ｃ４３５、Ｃ４３６、Ｃ４３７、Ｃ４３８、Ｃ４３９、Ｃ４４０、Ｃ４４１、Ｃ４４２、Ｃ４４３、Ｃ４４４、Ｃ４４５、Ｃ４４６、Ｃ４４７、Ｃ４４８、Ｃ４４９、Ｃ４５０、Ｃ４５１、Ｃ４５２、Ｃ４５３、Ｃ４５４、Ｃ４５５、Ｃ４５６、Ｃ４５７、Ｃ４５８、Ｃ４５９、Ｃ４６０、Ｃ４６１、Ｃ４６２、Ｃ４６３、Ｃ４６４、Ｃ４６５、Ｃ４６６、Ｃ４６７、Ｃ４６８、Ｃ４６９、Ｃ４７０、Ｃ４７１、Ｃ４７２、Ｃ４７３、Ｃ４７４、Ｃ４７５、Ｃ４７６、Ｃ４７７、Ｃ４７８、Ｃ４７９、Ｃ４８０、Ｃ４８１、Ｃ４８２、Ｃ４８３、Ｃ４８４、Ｃ４８５、Ｃ４８６、Ｃ４８７、Ｃ４８８、Ｃ４８９、Ｃ４９０、Ｃ４９１、Ｃ４９２、Ｃ４９３、Ｃ４９４、Ｃ４９５、Ｃ４９６、Ｃ４９７、Ｃ４９８、Ｃ４９９、Ｃ５００、Ｃ５０１、Ｃ５０２、Ｃ５０３、Ｃ５０４、Ｃ５０５、Ｃ５０６、Ｃ５０７、Ｃ５０８、Ｃ５０９、Ｃ５１０、Ｃ５１１、Ｃ５１２、Ｃ５１３、Ｃ５１４、Ｃ５１５、Ｃ５１６、Ｃ５１７、Ｃ５１８、Ｃ５１９、Ｃ５２０、Ｃ５２１、Ｃ５２２、Ｃ５２３、Ｃ５２４、Ｃ５２５、Ｃ５２６、Ｃ５２７、Ｃ５２８、Ｃ５２９、Ｃ５３０、Ｃ５３１、Ｃ５３２、Ｃ５３３、Ｃ５３４、Ｃ５３５、Ｃ５３６、Ｃ５３７、Ｃ５３８、Ｃ５３９、Ｃ５４０、Ｃ５４１、Ｃ５４２、Ｃ５４３、Ｃ５４４、Ｃ５４５、Ｃ５４６、Ｃ５４７、Ｃ５４８、Ｃ５４９、Ｃ５５０、Ｃ５５１、Ｃ５５２、Ｃ５５３、Ｃ５５４、Ｃ５５５、Ｃ５５６、Ｃ５５７、Ｃ５５８、Ｃ５５９、Ｃ５６０、Ｃ５６１、Ｃ５６２、Ｃ５６３、Ｃ５６４、Ｃ５６５、Ｃ５６６、Ｃ５６７、Ｃ５６８、Ｃ５６９、Ｃ５７０、Ｃ５７１、Ｃ５７２、Ｃ５７３、Ｃ５７４、Ｃ５７５、Ｃ５７６、Ｃ５７７、Ｃ５７８、Ｃ５７９、Ｃ５８０、Ｃ５８１、Ｃ５８２、Ｃ５８３、Ｃ５８４、Ｃ５８５、Ｃ５８６、Ｃ５８７、Ｃ５８８、Ｃ５８９、Ｃ５９０、Ｃ５９１、Ｃ５９２、Ｃ５９３、Ｃ５９４、Ｃ５９５、Ｃ５９６、Ｃ５９７、Ｃ５９８、Ｃ５９９、Ｃ６００、Ｃ６０１、Ｃ６０２、Ｃ６０３、Ｃ６０４、Ｃ６０５、Ｃ６０６、Ｃ６０７、Ｃ６０８、Ｃ６０９、Ｃ６１０、Ｃ６１１、Ｃ６１２、Ｃ６１３、Ｃ６１４、Ｃ６１５、Ｃ６１６、Ｃ６１７、Ｃ６１８、Ｃ６１９、Ｃ６２０、Ｃ６２１、Ｃ６２２、Ｃ６２３、Ｃ６２４、Ｃ６２５、Ｃ６２６、Ｃ６２７、Ｃ６２８、Ｃ６２９、Ｃ６３０、Ｃ６３１、Ｃ６３２、Ｃ６３３、Ｃ６３４、Ｃ６３５、Ｃ６３６、Ｃ６３７、Ｃ６３８、Ｃ６３９、Ｃ６４０、Ｃ６４１、Ｃ６４２、Ｃ６４３、Ｃ６４４、Ｃ６４５、Ｃ６４６、Ｃ６４７、Ｃ６４８、Ｃ６４９、Ｃ６５０、Ｃ６５１、Ｃ６５２、Ｃ６５３、Ｃ６５４、Ｃ６５５、Ｃ６５６、Ｃ６５７、Ｃ６５８、Ｃ６５９、Ｃ６６０、Ｃ６６１、Ｃ６６２、Ｃ６６３、Ｃ６６４、Ｃ６６５、Ｃ６６６、Ｃ６６７、Ｃ６６８、Ｃ６６９、Ｃ６７０、Ｃ６７１、Ｃ６７２、Ｃ６７３、Ｃ６７４、Ｃ６７５、Ｃ６７６、Ｃ６７７、Ｃ６７８、Ｃ６７９、Ｃ６８０、Ｃ６８１、Ｃ６８２、Ｃ６８３、Ｃ６８４、Ｃ６８５、Ｃ６８６、Ｃ６８７、Ｃ６８８、Ｃ６８９、Ｃ６９０、Ｃ６９１、Ｃ６９２、Ｃ６９３、Ｃ６９４、Ｃ６９５、Ｃ６９６、Ｃ６９７、Ｃ６９８、Ｃ６９９、Ｃ７００、Ｃ７０１、Ｃ７０２、Ｃ７０３、Ｃ７０４、Ｃ７０５、Ｃ７０６、Ｃ７０７、Ｃ７０８、Ｃ７０９、Ｃ７１０、Ｃ７１１、Ｃ７１２、Ｃ７１３、Ｃ７１４、Ｃ７１５、Ｃ７１６、Ｃ７１７、Ｃ７１８、Ｃ７１９、Ｃ７２０、Ｃ７２１、Ｃ７２２、Ｃ７２３、Ｃ７２４、Ｃ７２５、Ｃ７２６、Ｃ７２７、Ｃ７２８、Ｃ７２９、Ｃ７３０、Ｃ７３１、Ｃ７３２、Ｃ７３３、Ｃ７３４、Ｃ７３５、Ｃ７３６、Ｃ７３７、Ｃ７３８、Ｃ７３９、Ｃ７４０、Ｃ７４１、Ｃ７４２、Ｃ７４３、Ｃ７４４、Ｃ７４５、Ｃ７４６、Ｃ７４７、Ｃ７４８、Ｃ７４９、Ｃ７５０、Ｃ７５１、Ｃ７５２、Ｃ７５３、Ｃ７５４、Ｃ７５５、Ｃ７５６、Ｃ７５７、Ｃ７５８、Ｃ７５９、Ｃ７６０、Ｃ７６１、Ｃ７６２、Ｃ７６３、Ｃ７６４、Ｃ７６５、Ｃ７６６、Ｃ７６７、Ｃ７６８、Ｃ７６９、Ｃ７７０、Ｃ７７１、Ｃ７７２、Ｃ７７３、Ｃ７７４、Ｃ７７５、Ｃ７７６、Ｃ７７７、Ｃ７７８、Ｃ７７９、Ｃ７８０、Ｃ７８１、Ｃ７８２、Ｃ７８３、Ｃ７８４、Ｃ７８５、Ｃ７８６、Ｃ７８７、Ｃ７８８、Ｃ７８９、Ｃ７９０、Ｃ７９１、Ｃ７９２、Ｃ７９３、Ｃ７９４、Ｃ７９５、Ｃ７９６、Ｃ７９７、Ｃ７９８、Ｃ７９９、Ｃ８００、Ｃ８０１、Ｃ８０２、Ｃ８０３、Ｃ８０４、Ｃ８０５、Ｃ８０６、Ｃ８０７、Ｃ８０８、Ｃ８０９、Ｃ８１０、Ｃ８１１、Ｃ８１２、Ｃ８１３、Ｃ８１４、Ｃ８１５、Ｃ８１６、Ｃ８１７、Ｃ８１８、Ｃ８１９、Ｃ８２０、Ｃ８２１、Ｃ８２２、Ｃ８２３、Ｃ８２４、Ｃ８２５、Ｃ８２６、Ｃ８２７、Ｃ８２８、Ｃ８２９、Ｃ８３０、Ｃ８３１、Ｃ８３２、Ｃ８３３、Ｃ８３４、Ｃ８３５、Ｃ８３６、Ｃ８３７、Ｃ８３８、Ｃ８３９、Ｃ８４０、Ｃ８４１、Ｃ８４２、Ｃ８４３、Ｃ８４４、Ｃ８４５、Ｃ８４６、Ｃ８４７、Ｃ８４８、Ｃ８４９、Ｃ８５０、Ｃ８５１、Ｃ８５２、Ｃ８５３、Ｃ８５４、Ｃ８５５、Ｃ８５６、Ｃ８５７、Ｃ８５８、Ｃ８５９、Ｃ８６０、Ｃ８６１、Ｃ８６２、Ｃ８６３、Ｃ８６４、Ｃ８６５、Ｃ８６６、Ｃ８６７、Ｃ８６８、Ｃ８６９、Ｃ８７０、Ｃ８７１、Ｃ８７２、Ｃ８７３、Ｃ８７４、Ｃ８７５、Ｃ８７６、Ｃ８７７、Ｃ８７８、Ｃ８７９、Ｃ８８０、Ｃ８８１、Ｃ８８２、Ｃ８８３、Ｃ８８４、Ｃ８８５、Ｃ８８６、Ｃ８８７、Ｃ８８８、Ｃ８８９、Ｃ８９０、Ｃ８９１、Ｃ８９２、Ｃ８９３、Ｃ８９４、Ｃ８９５、Ｃ８９６、Ｃ８９７、Ｃ８９８、Ｃ８９９、Ｃ９００、Ｃ９０１、Ｃ９０２、Ｃ９０３、Ｃ９０４、Ｃ９０５、Ｃ９０６、Ｃ９０７、Ｃ９０８、Ｃ９０９、Ｃ９１０、Ｃ９１１、Ｃ９１２、Ｃ９１３、Ｃ９１４、Ｃ９１５、Ｃ９１６、Ｃ９１７、Ｃ９１８、Ｃ９１９、Ｃ９２０、Ｃ９２１、Ｃ９２２、Ｃ９２３、Ｃ９２４、Ｃ９２５、Ｃ９２６、Ｃ９２７、Ｃ９２８、Ｃ９２９、Ｃ９３０、Ｃ９３１、Ｃ９３２、Ｃ９３３、Ｃ９３４、Ｃ９３５、Ｃ９３６、Ｃ９３７、Ｃ９３８、Ｃ９３９、Ｃ９４０、Ｃ９４１、Ｃ９４２、Ｃ９４３、Ｃ９４４、Ｃ９４５、Ｃ９４６、Ｃ９４７、Ｃ９４８、Ｃ９４９、Ｃ９５０、Ｃ９５１、Ｃ９５２、Ｃ９５３、Ｃ９５４、Ｃ９５５、Ｃ９５６、Ｃ９５７、Ｃ９５８、Ｃ９５９、Ｃ９６０、Ｃ９６１、Ｃ９６２、Ｃ９６３、Ｃ９６４、Ｃ９６５、Ｃ９６６、Ｃ９６７、Ｃ９６８、Ｃ９６９、Ｃ９７０、Ｃ９７１、Ｃ９７２、Ｃ９７３、Ｃ９７４、Ｃ９７５、Ｃ９７６、Ｃ９７７、Ｃ９７８、Ｃ９７９、Ｃ９８０、Ｃ９８１、Ｃ９８２、Ｃ９８３、Ｃ９８４、Ｃ９８５、Ｃ９８６、Ｃ９８７、Ｃ９８８、Ｃ９８９、Ｃ９９０、Ｃ９９１、Ｃ９９２、Ｃ９９３、Ｃ９９４、Ｃ９９５、Ｃ９９６、Ｃ９９７、Ｃ９９８、Ｃ９９９、Ｃ１０００、Ｃ１００１、Ｃ１００２、Ｃ１００３、Ｃ１００４、Ｃ１００５、Ｃ１００６、Ｃ１００７、Ｃ１００８、Ｃ１００９、Ｃ１０１０、Ｃ１０１１、Ｃ１０１２、Ｃ１０１３、Ｃ１０１４、Ｃ１０１５、Ｃ１０１６、Ｃ１０１７、Ｃ１０１８、Ｃ１０１９、Ｃ１０２０、Ｃ１０２１、Ｃ１０２２、Ｃ１０２３、Ｃ１０２４、Ｃ１０２５、Ｃ１０２６、Ｃ１０２７、Ｃ１０２８、Ｃ１０２９、Ｃ１０３０、Ｃ１０３１、Ｃ１０３２、Ｃ１０３３、Ｃ１０３４、Ｃ１０３５、Ｃ１０３６、Ｃ１０３７、Ｃ１０３８、Ｃ１０３９、Ｃ１０４０、Ｃ１０４１、Ｃ１０４２、Ｃ１０４３、Ｃ１０４４、Ｃ１０４５、Ｃ１０４６、Ｃ１０４７、Ｃ１０４８、Ｃ１０４９、Ｃ１０５０、Ｃ１０５１、Ｃ１０５２、Ｃ１０５３、Ｃ１０５４、Ｃ１０５５、Ｃ１０５６、Ｃ１０５７、Ｃ１０５８、Ｃ１０５９、Ｃ１０６０、Ｃ１０６１、Ｃ１０６２、Ｃ１０６３、Ｃ１０６４、Ｃ１０６５、Ｃ１０６６、Ｃ１０６７、Ｃ１０６８、Ｃ１０６９、Ｃ１０７０、Ｃ１０７１、Ｃ１０７２、Ｃ１０７３、Ｃ１０７４、Ｃ１０７５、Ｃ１０７６、Ｃ１０７７、Ｃ１０７８、Ｃ１０７９、Ｃ１０８０、Ｃ１０８１、Ｃ１０８２、Ｃ１０８３、Ｃ１０８４、Ｃ１０８５、Ｃ１０８６、Ｃ１０８７、Ｃ１０８８、Ｃ１０８９、Ｃ１０９０、Ｃ１０９１、Ｃ１０９２、Ｃ１０９３、Ｃ１０９４、Ｃ１０９５、Ｃ１０９６、Ｃ１０９７、Ｃ１０９８、Ｃ１０９９、Ｃ１１００、Ｃ１１０１、Ｃ１１０２、Ｃ１１０３、Ｃ１１０４、Ｃ１１０５、Ｃ１１０６、Ｃ１１０７、Ｃ１１０８、Ｃ１１０９、Ｃ１１１０、Ｃ１１１１、Ｃ１１１２、Ｃ１１１３、Ｃ１１１４、Ｃ１１１５、Ｃ１１１６、Ｃ１１１７、Ｃ１１１８、Ｃ１１１９、Ｃ１１２０、Ｃ１１２１、Ｃ１１２２、Ｃ１１２３、Ｃ１１２４、Ｃ１１２５、Ｃ１１２６、Ｃ１１２７、Ｃ１１２８、Ｃ１１２９、Ｃ１１３０、Ｃ１１３１、Ｃ１１３２、Ｃ１１３３、Ｃ１１３４、Ｃ１１３５、Ｃ１１３６、Ｃ１１３７、Ｃ１１３８、Ｃ１１３９、Ｃ１１４０、Ｃ１１４１、Ｃ１１４２、Ｃ１１４３、Ｃ１１４４、Ｃ１１４５、Ｃ１１４６、Ｃ１１４７、Ｃ１１４８、Ｃ１１４９、Ｃ１１５０、Ｃ１１５１、Ｃ１１５２、Ｃ１１５３、Ｃ１１５４、Ｃ１１５５、Ｃ１１５６、Ｃ１１５７、Ｃ１１５８、Ｃ１１５９、Ｃ１１６０、Ｃ１１６１、Ｃ１１６２、Ｃ１１６３、Ｃ１１６４、Ｃ１１６５、Ｃ１１６６、Ｃ１１６７、Ｃ１１６８、Ｃ１１６９、Ｃ１１７０、Ｃ１１７１、Ｃ１１７２、Ｃ１１７３、Ｃ１１７４、Ｃ１１７５、Ｃ１１７６、Ｃ１１７７、Ｃ１１７８、Ｃ１１７９、Ｃ１１８０、Ｃ１１８１、Ｃ１１８２、Ｃ１１８３、Ｃ１１８４、Ｃ１１８５、Ｃ１１８６、Ｃ１１８７、Ｃ１１８８、Ｃ１１８９、Ｃ１１９０、Ｃ１１９１、Ｃ１１９２、Ｃ１１９３、Ｃ１１９４、Ｃ１１９５、Ｃ１１９６、Ｃ１１９７、Ｃ１１９８、Ｃ１１９９、Ｃ１２００、Ｃ１２０１、Ｃ１２０２、Ｃ１２０３、Ｃ１２０４、Ｃ１２０５、Ｃ１２０６、Ｃ１２０７、Ｃ１２０８、Ｃ１２０９、Ｃ１２１０、Ｃ１２１１、Ｃ１２１２、Ｃ１２１３、Ｃ１２１４、Ｃ１２１５、Ｃ１２１６、Ｃ１２１７、Ｃ１２１８、Ｃ１２１９、Ｃ１２２０、Ｃ１２２１、Ｃ１２２２、Ｃ１２２３、Ｃ１２２４、Ｃ１２２５、Ｃ１２２６、Ｃ１２２７、Ｃ１２２８、Ｃ１２２９、Ｃ１２３０、Ｃ１２３１、Ｃ１２３２、Ｃ１２３３、Ｃ１２３４、Ｃ１２３５、Ｃ１２３６、Ｃ１２３７、Ｃ１２３８、Ｃ１２３９、Ｃ１２４０、Ｃ１２４１、Ｃ１２４２、Ｃ１２４３、Ｃ１２４４、Ｃ１２４５、Ｃ１２４６、Ｃ１２４７、Ｃ１２４８、Ｃ１２４９、Ｃ１２５０、Ｃ１２５１、Ｃ１２５２、Ｃ１２５３、Ｃ１２５４、Ｃ１２５５、Ｃ１２５６、Ｃ１２５７、Ｃ１２５８、Ｃ１２５９、Ｃ１２６０、Ｃ１２６１、Ｃ１２６２、Ｃ１２６３、Ｃ１２６４、Ｃ１２６５、Ｃ１２６６、Ｃ１２６７、Ｃ１２６８、Ｃ１２６９、Ｃ１２７０、Ｃ１２７１、Ｃ１２７２、Ｃ１２７３、Ｃ１２７４、Ｃ１２７５、Ｃ１２７６、Ｃ１２７７、Ｃ１２７８、Ｃ１２７９、Ｃ１２８０、Ｃ１２８１、Ｃ１２８２、Ｃ１２８３、Ｃ１２８４、Ｃ１２８５、Ｃ１２８６、Ｃ１２８７、Ｃ１２８８、Ｃ１２８９、Ｃ１２９０、Ｃ１２９１、Ｃ１２９２、Ｃ１２９３、Ｃ１２９４、Ｃ１２９５、Ｃ１２９６、Ｃ１２９７、Ｃ１２９８、Ｃ１２９９、Ｃ１３００、Ｃ１３０１、Ｃ１３０２、Ｃ１３０３、Ｃ１３０４、Ｃ１３０５、Ｃ１３０６、Ｃ１３０７、Ｃ１３０８、Ｃ１３０９、Ｃ１３１０、Ｃ１３１１、Ｃ１３１２、Ｃ１３１３、Ｃ１３１４、Ｃ１３１５、Ｃ１３１６、Ｃ１３１７、Ｃ１３１８、Ｃ１３１９、Ｃ１３２０、Ｃ１３２１、Ｃ１３２２、Ｃ１３２３、Ｃ１３２４、Ｃ１３２５、Ｃ１３２６、Ｃ１３２７、Ｃ１３２８、Ｃ１３２９、Ｃ１３３０、Ｃ１３３１、Ｃ１３３２、Ｃ１３３３、Ｃ１３３４、Ｃ１３３５、Ｃ１３３６、Ｃ１３３７、Ｃ１３３８、Ｃ１３３９、Ｃ１３４０、Ｃ１３４１、Ｃ１３４２、Ｃ１３４３、Ｃ１３４４、Ｃ１３４５、Ｃ１３４６、Ｃ１３４７、Ｃ１３４８、Ｃ１３４９、Ｃ１３５０、Ｃ１３５１、Ｃ１３５２、Ｃ１３５３、Ｃ１３５４、Ｃ１３５５、Ｃ１３５６、Ｃ１３５７、Ｃ１３５８、Ｃ１３５９、Ｃ１３６０、Ｃ１３６１、Ｃ１３６２、Ｃ１３６３、Ｃ１３６４、Ｃ１３６５、Ｃ１３６６、Ｃ１３６７、Ｃ１３６８、Ｃ１３６９、Ｃ１３７０、Ｃ１３７１、Ｃ１３７２、Ｃ１３７３、Ｃ１３７４、Ｃ１３７５、Ｃ１３７６、Ｃ１３７７、Ｃ１３７８、Ｃ１３７９、Ｃ１３８０、Ｃ１３８１、Ｃ１３８２、Ｃ１３８３、Ｃ１３８４、Ｃ１３８５、Ｃ１３８６、Ｃ１３８７、Ｃ１３８８、Ｃ１３８９、Ｃ１３９０、Ｃ１３９１、Ｃ１３９２、Ｃ１３９３、Ｃ１３９４、Ｃ１３９５、Ｃ１３９６、Ｃ１３９７、Ｃ１３９８、Ｃ１３９９、Ｃ１４００、Ｃ１４０１、Ｃ１４０２、Ｃ１４０３、Ｃ１４０４、Ｃ１４０５、Ｃ１４０６、Ｃ１４０７、Ｃ１４０８、Ｃ１４０９、Ｃ１４１０、Ｃ１４１１、Ｃ１４１２、Ｃ１４１３、Ｃ１４１４、Ｃ１４１５、Ｃ１４１６、Ｃ１４１７、Ｃ１４１８、Ｃ１４１９、Ｃ１４２０、Ｃ１４２１、Ｃ１４２２、Ｃ１４２３、Ｃ１４２４、Ｃ１４２５、Ｃ１４２６、Ｃ１４２７、Ｃ１４２８、Ｃ１４２９、Ｃ１４３０、Ｃ１４３１、Ｃ１４３２、Ｃ１４３３、Ｃ１４３４、Ｃ１４３５、Ｃ１４３６、Ｃ１４３７、Ｃ１４３８、Ｃ１４３９、Ｃ１４４０、Ｃ１４４１、Ｃ１４４２、Ｃ１４４３、Ｃ１４４４、Ｃ１４４５、Ｃ１４４６、Ｃ１４４７、Ｃ１４４８、Ｃ１４４９、Ｃ１４５０、Ｃ１４５１、Ｃ１４５２、Ｃ１４５３、Ｃ１４５４、Ｃ１４５５、Ｃ１４５６、Ｃ１４５７、Ｃ１４５８、Ｃ１４５９、Ｃ１４６０、Ｃ１４６１、Ｃ１４６２、Ｃ１４６３、Ｃ１４６４、Ｃ１４６５、Ｃ１４６６、Ｃ１４６７、Ｃ１４６８、Ｃ１４６９、Ｃ１４７０、Ｃ１４７１、Ｃ１４７２、Ｃ１４７３、Ｃ１４７４、Ｃ１４７５、Ｃ１４７６、Ｃ１４７７、Ｃ１４７８、Ｃ１４７９、Ｃ１４８０、Ｃ１４８１、Ｃ１４８２、Ｃ１４８３、Ｃ１４８４、Ｃ１４８５、Ｃ１４８６、Ｃ１４８７、Ｃ１４８８、Ｃ１４８９、Ｃ１４９０、Ｃ１４９１、Ｃ１４９２、Ｃ１４９３、Ｃ１４９４、Ｃ１４９５、Ｃ１４９６、Ｃ１４９７、Ｃ１４９８、Ｃ１４９９、Ｃ１５００、Ｃ１５０１、Ｃ１５０２、Ｃ１５０３、Ｃ１５０４、Ｃ１５０５、Ｃ１５０６、Ｃ１５０７、Ｃ１５０８、Ｃ１５０９、Ｃ１５１０、Ｃ１５１１、Ｃ１５１２、Ｃ１５１３、Ｃ１５１４、Ｃ１５１５、Ｃ１５１６、Ｃ１５１７、Ｃ１５１８、Ｃ１５１９、Ｃ１５２０、Ｃ１５２１、Ｃ１５２２、Ｃ１５２３、Ｃ１５２４、Ｃ１５２５、Ｃ１５２６、Ｃ１５２７、Ｃ１５２８、Ｃ１５２９、Ｃ１５３０、Ｃ１５３１、Ｃ１５３２、Ｃ１５３３、Ｃ１５３４、Ｃ１５３５、Ｃ１５３６、Ｃ１５３７、Ｃ１５３８、Ｃ１５３９、Ｃ１５４０、Ｃ１５４１、Ｃ１５４２、Ｃ１５４３、Ｃ１５４４、Ｃ１５４５、Ｃ１５４６、Ｃ１５４７、Ｃ１５４８、Ｃ１５４９、Ｃ１５５０、Ｃ１５５１、Ｃ１５５２、Ｃ１５５３、Ｃ１５５４、Ｃ１５５５、Ｃ１５５６、Ｃ１５５７、Ｃ１５５８、Ｃ１５５９、Ｃ１５６０、Ｃ１５６１、Ｃ１５６２、Ｃ１５６３、Ｃ１５６４、Ｃ１５６５、Ｃ１５６６、Ｃ１５６７、Ｃ１５６８、Ｃ１５６９、Ｃ１５７０、Ｃ１５７１、Ｃ１５７２、Ｃ１５７３、Ｃ１５７４、Ｃ１５７５、Ｃ１５７６、Ｃ１５７７、Ｃ１５７８、Ｃ１５７９、Ｃ１５８０、Ｃ１５８１、Ｃ１５８２、Ｃ１５８３、Ｃ１５８４、Ｃ１５８５、Ｃ１５８６、Ｃ１５

求項３３～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４８３７、４８４４、４８４５、４８４８、４８５７～４８５８、４８８３、４８８７、４８９２～４８９３、４９０４～４９０９、４９１４、４９１６、又は４９１８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項３３～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４８３７、４８４４、４８４５、４８４８、４８５７～４８５８、４８８３、４８８７、４８９２～４８９３、４９０４～４９０９、４９１４、４９１６、又は４９１８のうちのいずれか１つを標的とする、表１４ＥからのガイドｒＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項３３～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
細胞におけるＣＤ５遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＣＤ５遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４９４６～４９６９のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４９２２～４９４５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項４２】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び６０３３～６０３

６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項４１～４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４５】

前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４９４６～４９４７、４９４９、４９５１、４９５７～４９６０、４９６３、４９６７、又は４９６９のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項４１～４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４７】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４４９４６～４９４７、４９４９、４９５１、４９５７～４９６０、４９６３、４９６７、又は４９６９のうちのいずれか１つを標的とする、表１４Ｆからのガイドの配列のうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項４１～４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４８】

前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４９】

細胞におけるマウスＴＲＡＣ遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（ａ）クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＶ、と、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記マウスＴＲＡＣ遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５１２６～５１９５、５６８２、又は５６８４のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５０５６～５１２５、５６８１、又は５６８３のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項５０】

前記クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＶが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項４９に記載の方法。

【請求項５１】

前記クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＶが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項５０に記載の方法。

【請求項５２】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１～３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項４９～５１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５３】

前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５１２６～５１３０、５１３３～５１４３、５１４７～５１５０、５１７２～５１７３、５１８４～５１８９、又は５１９２～５１９４のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項４９～５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５５】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５１２６～５１３０、５１３３～５１４３、５１４７～５１５０、５１７２～５１７３、５１８４～５１８９、又は５１９２～５１９４のうちのいずれか１つを標的とする、表１４ＧからのガイドＲＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項４９～５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５６】

前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項４９～５５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５７】

細胞におけるマウスＴＲＢＣ１又はＴＲＢＣ２遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記マウスＴＲＢＣ１又はＴＲＢＣ２遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５２１１～５２２５又は５２４７～５２６７のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５１９６～５２１０又は５２２６～５２４６のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項５８】

前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいず

れか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１～３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項５７～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項５７～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５２１１、５２１３～５２１５、５２１７、５２２１、５２２３、５２４７、５２４９～５２５０、５２５２～５２５３、５２５８～５２５９、又は５２６４のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項５７～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５２１１、５２１３～５２１５、５２１７、５２２１、５２２３、５２４７、５２４９～５２５０、５２５２～５２５３、５２５８～５２５９、又は５２６４のうちのいずれか１つを標的とする、表１４ＨからのガイドＲＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項５７～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項５７～６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
細胞におけるヒトＴＲＢＣ１又はＴＲＢＣ２遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ヒトＴＲＢＣ１又はＴＲＢＣ２遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５６６１～５６７９のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５６４２～５６６０のうちのいずれか１つと

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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項６６】

前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項６５に記載の方法。

【請求項６７】

前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項６６に記載の方法。

【請求項６８】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項６５～６７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６９】

前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項６５～６８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７０】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５６６１～５６６３、５６７２～５６７５、又は５６７８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項６５～６９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７１】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５６６１～５６６３、５６７２～５６７５、又は５６７８のうちのいずれか１つを標的とする、表１４Ｉからのガイドのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項６５～６９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７２】

前記細胞が、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項６５～７１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７３】

細胞におけるＨＰＲＴ遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＨＰＲＴ遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５５６２～５６４１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオ

チド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５４８２～５５６１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項７４】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項７３～７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項７３～７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５５６２～５５６４又は５５６８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項７３～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５５６２～５５６４又は５５６８のうちのいずれか１つを標的とする、表１４ＪからのガイドｒＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項７３～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項７３～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８１】
細胞におけるＡＰＯ－Ａ１遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＡＰＯ－Ａ１遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５８６１～５８７４のうちのいずれか１つと少なくとも約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

％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５８４７～５８６０のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項８２】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項８１～８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項８１～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５８６１～５８６６又は５８６８～５８６９のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項８１～８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５８６１～５８６６又は５８６８～５８６９のうちのいずれか１つを標的とする、表４３Ａからのガイドのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項８１～８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項８１～８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８９】
細胞におけるＡＮＧＰＴＬ３遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＡＮＧＰＴＬ３遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５９５３～６０３０のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５８７５～５９５２のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項９０】

前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項８９に記載の方法。

【請求項９１】

前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項９０に記載の方法。

【請求項９２】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項８９～９１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９３】

前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項８９～９２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９４】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５９５５－５９６３、５９６８－５９７５、５９７９－５９８７、５９８９－５９９３、５９９７、５９９９、６００３－６０１０、６０１４－６０１６、６０２４－６０２５、又は６０２７～６０３０のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、請求項８９～９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５９５５－５９６３、５９６８－５９７５、５９７９－５９８７、５９８９－５９９３、５９９７、５９９９、６００３－６０１０、６０１４－６０１６、６０２４－６０２５、又は６０２７～６０３０のうちのいずれか１つを標的とする、表４３ＢからのガイドＲＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項８９～９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９６】

前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項８９～９５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９７】

細胞におけるヒトＲｏｓａ２６遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ヒトＲｏｓａ２６遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５０１３～５０５５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４９７０～５０１２のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項９８】

前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項９７に記載の方法。

【請求項９９】

前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項９８に記載の方法。

【請求項１００】

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項９７～９９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０１】

前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項９７～１００のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０２】

前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項９７～１０１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０３】

細胞におけるＦＡＳ遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（ａ）クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＶ型と、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＦＡＳ遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、

前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５３６７～５４６５のうちのいずれか１つと少なくとも約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

％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５２６８～５３６６のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項１０４】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０５】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１０３～１０５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０７】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１０３～１０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０８】
前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項１０３～１０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０９】
細胞におけるＰＤ－１遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ＰＤ－１遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５４７４～５４８１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号５４６６～５４７３のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項１１０】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１０９に記載の方法。
【請求項１１１】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１０９～１１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１３】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１０９～１１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１４】
前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項１０９～１１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１５】
操作されたヌクレアーゼ系であって、
（ａ）配列番号２１５のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含み、
前記系が、Ｃａｓ９酵素を含む同等の系と比較して、ヒト対象に投与されたときに低減された免疫原性を有する、方法。
【請求項１１６】
前記Ｃａｓ９酵素が、ＳｐＣａｓ９酵素である、請求項１１５に記載の系。
【請求項１１７】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１１５又は１１６に記載の系。
【請求項１１８】
前記免疫原性が、抗体免疫原性である、請求項１１５～１１７のいずれか一項に記載の系。
【請求項１１９】
細胞におけるマウスＨＡＯ－１遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記マウスＨＡＯ－１遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、

前記操作されたガイドＲＮＡが、表２５に記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２５からのガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－１＿３７、ｍＨ２９－１５＿３７、ｍＨ２９－２９＿３７のヌクレオチドを含むか、
又は前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４１８４～４２２５のうちのいずれか１つを含む、方法。
【請求項１２０】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１２０に記載の方法。
【請求項１２２】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２３】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１１９～１２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２４】
前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項１１９～１２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２５】
前記操作されたガイドＲＮＡが、表２５に記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２５からのガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－１５＿３７又はｍＨ２９－２９＿３７のヌクレオチドを含む、請求項１１９～１２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２６】
前記方法が、前記ＨＡＯ－１遺伝子座からのグリコール酸オキシダーゼの発現を破壊することを更に含む、請求項１１９～１２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２７】
細胞におけるヒトＴＲＡＣ遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記ヒトＴＲＡＣ遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、表２８Ｂに記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２８ＢからのＭＧ２９－１－ＴＲＡＣ－ｓｇＲＮＡ－３５のヌクレオチドを含む、方法。
【請求項１２８】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１２７に記載の方法。

【請求項１２９】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１２７～１２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３１】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１２７～１３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３２】
前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項１２７～１３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３３】
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、前記細胞に、
（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ前記アルブミン遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、
前記操作されたガイドＲＮＡが、表２９に記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２９からのｍＡｌｂ２９８－３７、ｍＡｌｂ２９１２－３７、ｍＡｌｂ２９１８－３７、又はｍＡｌｂ２９８－３４のヌクレオチドを含むか、又は
前記操作されたガイドＲＮＡが、表４６に記載されるヌクレオチド修飾を含む、ｍＡｌｂ２９－８－４４、ｍＡｌｂ２９－８－５０、ｍＡｌｂ２９－８－５０ｂ、ｍＡｌｂ２９－８－５１ｂ、ｍＡｌｂ２９－８－５２ｂ、ｍＡｌｂ２９－８－５３ｂ、又はｍＡｌｂ２９－８－５４ｂのヌクレオチドを含む、方法。
【請求項１３４】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３５】
前記クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１３４に記載の方法。
【請求項１３６】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３

６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１３３～１３５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３７】

前記ガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１３３～１３６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３８】

前記細胞が、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である、請求項１３３～１３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３９】

前記操作されたガイドＲＮＡが、表２９に記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２９からのｍＡｌｂ２９８－３７、ｍＡｌｂ２９１２－３７、ｍＡｌｂ２９１８－３７、又はｍＡｌｂ２９８－３４のヌクレオチドを含む、請求項１３３～１３８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４０】

操作されたガイドＲＮＡであって、

ａ）標的ＤＮＡ分子中の標的配列と相補的であるヌクレオチド配列を含む標的化セグメントと、

ｂ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼに結合するように構成されているタンパク質結合セグメントと、を含み、

前記ガイドＲＮＡが、表３４の配列番号５６９５～５７０１のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド修飾パターンを含む、操作されたガイドＲＮＡ。

【請求項１４１】

前記ガイドＲＮＡが、ｍＡｌｂ２９－８－４４、ｍＡｌｂ２９－８－５０、ｍＡｌｂ２９－８－３７、又はｍＡｌｂ２９－１２－４４を含む、請求項１４０に記載の操作されたガイドＲＮＡ。

【請求項１４２】

前記ガイドＲＮＡが、ｈＨ２９－４＿５０、ｈＨ２９－２１＿５０、ｈＨ２９－２３＿５０、ｈＨ２９－４１＿５０、ｈＨ２９－４＿５０ｂ、ｈＨ２９－２１＿５０ｂ、ｈＨ２９－２３＿５０ｂ、又はｈＨ２９－４１＿５０ｂ、ｍＨ２９－１－５０、ｍＨ２９－１５－５０、ｍＨ２９－２９－５０、ｍＨ２９－１－５０ｂ、ｍＨ２９－１５－５０ｂ、又はｍＨ２９－２９－５０ｂを含む、請求項１４０に記載の操作されたガイドＲＮＡ。

【請求項１４３】

前記ＤＮＡ標的化セグメントが、ＨＡＯ－１遺伝子又はアルブミン遺伝子にハイブリダイズするように構成されている、請求項１４０に記載の操作されたガイドＲＮＡ。

【請求項１４４】

前記クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼがＣ、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１４０～１４２のいずれか一項に記載の操作されたガイドＲＮＡ。

【請求項１４５】

前記クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼがＣ、配列番号２１５と少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１４０～１４４のいずれか一項に記載の操作されたガイドＲＮＡ。

【請求項１４６】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

（ａ）配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ若しくはそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼ、又は前記エノヌクレアーゼをコー

ドするヌクレオチド配列と、
（ｂ）ＣＲＩＳＰＲアレイをコードするポリヌクレオチド配列であって、前記ＣＲＩＳＰＲアレイが、前記エンドヌクレアーゼによって操作されたガイドＲＮＡに処理されるように構成されており、前記操作されたガイドＲＮＡが、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、前記操作されたガイドＲＮＡが、標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、ポリヌクレオチド配列と、を含み、
前記スペーサー配列が、アルブミン遺伝子にハイブリダイズするように構成されている、操作されたヌクレアーゼ系。
【請求項１４７】
前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号５７１２と少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１４６に記載の系。
【請求項１４８】
前記エンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１４６又は１４７に記載の系。
【請求項１４９】
前記エンドヌクレアーゼが、配列番号２１５と少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項１４８に記載の系。
【請求項１５０】
操作されたヌクレアーゼ系であって、
（ａ）配列番号４７０又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。
【請求項１５１】
前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号６０３１と少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１５０に記載の操作されたヌクレアーゼ系。
【請求項１５２】
前記エンドヌクレアーゼが、配列番号６０３２を含む５’ＰＡＭ配列に対して選択的であるように構成されている、請求項１５１又は１５２に記載の操作されたヌクレアーゼ系。
【請求項１５３】
操作されたヌクレアーゼ系であって、
（ａ）配列番号２８２４、２８４１、若しくは２８９６のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、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％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、前記操作されたガイドＲＮＡが、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、前記操作されたガイドＲＮＡが、標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作さ

れたガイドＲＮＡと、を含み、
　前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号６０３３、６０３４、又は６０３５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列を含む、操作されたヌクレアーゼ系。
【請求項１５４】
　前記エンドヌクレアーゼが、配列番号２８２４と少なくとも８０％の配列同一性を有し、前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号６０３３と少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項１５３に記載の操作されたヌクレアーゼ系。
【請求項１５５】
　前記エンドヌクレアーゼが、配列番号２８４１と少なくとも８０％の配列同一性を有し、前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号６０３４と少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項１５３に記載の操作されたヌクレアーゼ系。
【請求項１５６】
　前記エンドヌクレアーゼが、配列番号２８９６と少なくとも８０％の配列同一性を有し、前記操作されたガイドＲＮＡが、配列番号６０３５と少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項１５３に記載の操作されたヌクレアーゼ系。
【請求項１５７】
　前記エンドヌクレアーゼが、配列番号６０３７～６０３９のうちのいずれか１つを含む５’ＰＡＭ配列に対して選択的であるよう構成されている、請求項１５３～１５６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１５８】
　脂質ナノ粒子であって、
　（ａ）本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのうちのいずれかと、
　（ｂ）本明細書に記載される操作されたガイドＲＮＡのうちのいずれかと、
　（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。
【請求項１５９】
　前記カチオン性脂質が、Ｃ１２－２００を含むか、前記ステロールが、コレステロールを含むか、前記中性脂質が、ＤＯＰＥを含むか、又は前記ＰＥＧ修飾脂質が、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００を含む、請求項１５８に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１６０】
　前記カチオン性脂質が、図１０９に示される前記カチオン性脂質のうちのいずれかを含む、請求項１５８に記載の脂質ナノ粒子。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
　本出願は、２０２１年６月２日に出願された米国仮特許出願第６３／１９６，１２７号、２０２１年８月１６日に出願された第６３／２３３，６５３号、２０２１年９月２１日に出願された第６３／２６１，４３６号、２０２１年１０月６日に出願された第６３／２６２，１６９号、２０２１年１１月１６日に出願された第６３／２８０，０２６号、２０２２年１月１４日に出願された第６３／２９９，６６４号、２０２２年２月１０日に出願された第６３／３０８，７６６号、２０２２年３月２３日に出願された第６３／３２３，０１４号、及び２０２２年４月１４日に出願された第６３／３３１，０７６号の利益を主張するものであり、それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本出願は、ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２１／２１２５９号に関し、その全体が参照により本

明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
Ｃａｓ酵素は、それらの関連するクラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ガイドリボ核酸（ＲＮＡ）とともに、原核生物の免疫系の広範（細菌の約４５％、古細菌の約８４％）な成分であるようであり、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のに役立つ。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。
【０００３】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。２０２１年３月５日に作成された当該ＡＳＣＩＩコピーは、５５９２１－７２８＿６０１＿ＳＬ．ｔｘｔと名付けられ、２３，８８６，６４５バイトのサイズである。
【発明の概要】
【０００４】
いくつかの態様では、本開示は、（ａ）エンドヌクレアーゼが、未培養微生物に由来し、エンドヌクレアーゼが、Ｃａｓ１２ａエンドヌクレアーゼである、ＲｕｖＣドメインを含む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スペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡ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、Ｃａｓ１２ａエンドヌクレアーゼは、配列ＧＷｘｘｘＫを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、ＵＣＵＡＣ［N_{3-5}］ＧＵＡＧＡＵ（N_4）を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、ＣＣＵＧＣ［N_4］ＧＣＡＧＧ（N_{3-4}）を含む。いくつかの態様では、本開示は、（ａ）配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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スペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡ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、ＲｕｖＣＩ、ＩＩ、又はＩＩＩドメインを含む。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１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントのＲｕｖＣＩ、ＩＩ、又はＩＩＩドメインと少なくとも約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。いくつかの実施形態では、ＲｕｖＣＩドメインは、Ｄ触媒残基を含む。いくつかの実施形態では、ＲｕｖＣＩＩドメインは、Ｅ触媒残基を含む。いくつかの実施形態では、ＲｕｖＣＩＩＩドメインは、Ｄ触媒残基を含む。いくつかの実施形態では、当該ＲｕｖＣドメインは、ヌクレアーゼ活性を有さない。いくつかの実施形態では、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントのＷＥＤＩＩドメインと少なくとも約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ＷＥＤ　ＩＩドメインを更に含む。いくつかの態様では、本開示は、（ａ）エンドヌクレアーゼが、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである、配列番号３８６２～３９１３のうちのいずれか１つを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に結合するように構成されている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スペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡ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、ジンクフィンガー様ドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５ＭＧ１１、ＭＧ１３、ＭＧ１９、ＭＧ２０、ＭＧ２６、ＭＧ２８、ＭＧ２９、ＭＧ３０、ＭＧ３１、ＭＧ３２、ＭＧ３７、９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの態様では、本開示は、（ａ）、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む操作されたガイドＲＮＡと、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡに結合するように構成されているクラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、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、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つを含むプロトスペ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。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、真核生物、真菌、植物、哺乳類、又はヒトゲノムポリヌクレオチド配列と相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、３０～２５０個のヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼのＮ末端又はＣ末端の近位に１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）を含む。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、配列番号３９３８～３９５３からなる群から選択される配列と少なくとも８０％同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの配列が配列番号２１５に最適に整列するとき、以下の変異：Ｓ１６８Ｒ、Ｅ１７２Ｒ、Ｎ５７７Ｒ、又はＹ１７０Ｒのうちの少なくとも１つを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの配列が配列番号２１５と最適に整列するとき、変異Ｓ１６８Ｒ及びＥ１７２Ｒを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの配列が配列番号２１５と最適に整列するとき、変異Ｎ５７７Ｒ又はＹ１７０Ｒを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの配列が配列番号２１５と最適に整列するとき、変異Ｓ１６８Ｒを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、Ｅ１７２、Ｎ５７７、又はＹ１７０の変異を含まない。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、５’から３’に、標的デオキシリボ核酸配列に対して５’の、少なくとも２０個のヌクレオチドの配列を含む第１の相同アーム、少なくとも１０個のヌクレオチドの合成ＤＮＡ配列、及び標的配列に対して３’の、少なくとも２０個のヌクレオチドの配列を含む第２の相同アームを含む、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ修復鋳型を更に含む。いくつかの実施形態では、第１又

は第２の相同アームは、少なくとも４０、８０、１２０、１５０、２００、３００、５００、又は１，０００個のヌクレオチドの配列を含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２の相同アームは、原核生物、細菌、真菌、又は真核生物のゲノム配列に対して相同である。いくつかの実施形態では、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ修復鋳型は、導入遺伝子ドナーを含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、１つ又は２つの一本鎖ＤＮＡセグメントに隣接した二本鎖ＤＮＡセグメントを含むＤＮＡ修復鋳型を更に含む。いくつかの実施形態では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、二本鎖ＤＮＡセグメントの５’末端にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、二本鎖ＤＮＡセグメントの３’末端にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、４～１０ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの実施形態では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、スペーサー配列内の配列と相補的であるヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖ＤＮＡ配列は、バーコード、オープンリーディングフレーム、エンハンサー、プロモーター、タンパク質コード配列、ｍｉＲＮＡコード配列、ＲＮＡコード配列、又は導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖ＤＮＡ配列は、ヌクレアーゼ切断部位に隣接している。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼ切断部位は、スペーサー及びＰＡＭ配列を含む。いくつかの実施形態では、系は、Mg^{2+}の供給源を更に含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、少なくとも８個、少なくとも１０個、又は少なくとも１２個の塩基対リボヌクレオチドを含むヘアピンを含む。いくつかの実施形態では、ヘアピンは、１０個の塩基対リボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、（ａ）エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％、８０％、又は９０％同一の配列を含み、（ｂ）ガイドＲＮＡ構造は、配列番号３６０８～３６０９、３８５３、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％、又は９０％同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号３８６３～３９１３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、エンドヌクレアーゼは、配列番号３８７１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、配列同一性は、ＢＬＡＳＴＰ、ＣＬＵＳＴＡＬＷ、ＭＵＳＣＬＥ、ＭＡＦＦＴアルゴリズム、又はＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ相同性検索アルゴリズムパラメーターを用いたＣＬＵＳＴＡＬＷアルゴリズムによって決定される。いくつかの実施形態では、配列同一性は、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、条件付き組成スコアマトリックス調整を使用した、ＢＬＡＳＴＰ相同性検索アルゴリズムによって決定される。

【０００５】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）標的ＤＮＡ分子中の標的配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメントと、（ｂ）ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖を形成するヌクレオチドの２つの相補的なストレッチを含むタンパク質結合セグメントと、を含む操作されたガイドＲＮＡを提供し、ヌクレオチドの２つの相補的なストレッチは、介在するヌクレオチドと互いに共有結合しており、操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと複合体を形成すること、及び複合体を標的ＤＮＡ分子の標的配列に標的化することができる。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ標的化セグメントは、ヌクレオチドの２つの相補的なストレッチの両方の３’に位置付けられる。いくつかの実施形態では、タンパク質結合セグメントは、配列番号３６０８～３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも７０％、少なくとも８０％、又は少なくとも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、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖は、少なくとも５個、少なくとも８個、少なくとも１０個、又は少なくとも１２個のリボヌクレオチドを含む。

【０００６】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドをコードするデオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを提供する。

【０００７】

いくつかの態様では、本開示は、生物における発現に最適化された操作された核酸配列を含む核酸を提供し、核酸は、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼをコードし、エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来し、生物は、未培養生物ではない。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つと少なくとも７０％又は少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼのＮ末端又はＣ末端の近位に１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、配列番号３９３８～３９５３から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、配列番号３９３９を含む。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、エンドヌクレアーゼのＮ末端の近位にある。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、配列番号３９３８を含む。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、エンドヌクレアーゼのＣ末端の近位にある。いくつかの実施形態では、生物は、原核生物、細菌、真核生物、真菌、植物、哺乳類、齧歯類、又はヒトである。

【０００８】

いくつかの態様では、本開示は、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼ、又はＣａｓ１２ａエンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む操作されたベクターを提供し、エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。

【０００９】

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を含む操作されたベクターを提供する。

【００１０】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるデオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを含む操作されたベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミド、ミニサークル、ＣＥＬｉＤ、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）由来ビリオン、レンチウイルス、又はアデノウイルスである。

【００１１】

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を含む細胞を提供する。

【００１２】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される宿主細胞のうちのいずれかを培養することを含む、エンドヌクレアーゼを製造する方法を提供する。

【００１３】

いくつかの態様では、本開示は、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを結合、切断、マーキング、又は修飾する方法を提供し、方法は、（ａ）二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを、エンドヌクレアーゼ及び二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドに結合するように構成されている操作されたガイドＲＮＡと複合体化したクラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと接触させることと、（ｂ）二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドが、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を含むことと、（ｃ）ＰＡＭが、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つを含む配列を含むことと、を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、操作されたガイドＲＮＡの配列と相補的である配列を含む第１の鎖と、ＰＡＭを含む第２の鎖とを含む。いくつかの実施形態では、ＰＡＭは、操作されたガイドＲＮＡの配列と相補的である配列の５’末端に直接隣接する。いくつかの実施形態では、ＰＡＭは、配列番号３８７１を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。いくつかの実施形態では、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、真核生物、植物、真菌、哺乳類、齧歯類、又はヒト二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載される操作されたヌクレアー

ゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することを含み、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドリボ核酸構造と複合体を形成するように構成されており、複合体は、複合体の標的核酸遺伝子座への結合時に複合体が標的核酸遺伝子座を修飾するように構成されている。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座を修飾することは、標的核酸遺伝子座を結合、ニッキング、切断、又はマーキングすることを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、ゲノムＤＮＡ、ウイルス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、標的核酸遺伝子座は、インビトロである。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座は、細胞内にある。いくつかの実施形態では、細胞は、原核細胞、細菌細胞、真核細胞、真菌細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、齧歯類細胞、霊長類細胞、ヒト細胞、又は初代細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、初代細胞である。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。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することは、本明細書に記載される核酸又は本明細書に記載されるベクターを送達することを含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することは、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸を送達することを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームが作動可能に連結されているプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することは、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含むキャッピングされたｍＲＮＡを送達することを含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することは、翻訳されたポリペプチドを送達することを含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することは、リボ核酸（ＲＮＡ）ｐｏｌ ＩＩＩプロモーターに作動可能に連結された操作されたガイドＲＮＡをコードするデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を送達することを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、標的遺伝子座で、又は標的遺伝子座の近位で、一本鎖切断又は二本鎖切断を誘導する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、標的遺伝子座内又は標的遺伝子座の３’に互い違いの一本鎖切断を誘導する。

【００１４】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＴＲＡＣ遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）ＲＮＡガイドエンドヌクレアーゼと、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡとを接触させることを含み、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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４３１６～４３６９のいずれか１つの少なくとも１８個の連続するヌクレオチドと少なくとも８５％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、ＲＮＡガイドエンドヌクレアーゼは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ型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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、ＲｕｖＣＩサブドメイン、ＲｕｖＣＩＩサブドメイン、及びＲｕｖＣＩＩＩサブドメインを含むＲｕｖＣドメインを含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも１９個と少なくとも８０％の配列同一

性を有する配列を更に含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％、８０％、又は９０％同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ構造は、配列番号３６０８～３６０９、３８５３、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも１９個と少なくとも８０％、又は少なくとも９０％同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、方法は、配列番号４４２４又は４４２５のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する配列によって、３’末端又は５’末端に隣接するカーゴ配列を含むドナー核酸を細胞に接触させるか、又は細胞に導入することを更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。いくつかの実施形態では、細胞は、Ｔ細胞若しくはその前駆体、又は造血幹細胞（ＨＳＣ）である。いくつかの実施形態では、カーゴ配列は、Ｔ細胞受容体ポリペプチド、ＣＡＲ－Ｔポリペプチド、又はその断片若しくは誘導体をコードする配列を含む。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４３７０～４４２３のうちのいずれか１つと少なくとも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５Ａに列挙される対応する化学修飾を含む、表５ＡからのｓｇＲＮＡ１～５４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、配列番号４３３４、４３５０、又は４３２４のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の配列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、配列番号４３８８、４４０４、又は４３７８のうちのいずれか１つと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、表５ＡからのｓｇＲＮＡ９、３５、又は１９のヌクレオチド配列を含む。

【００１５】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）ＲＮＡガイドエンドヌクレアーゼと、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡとを含む操作されたヌクレアーゼ系を提供し、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、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スペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、以下の修飾：（ｉ）操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の４塩基以内、又は操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の４塩基内の少なくとも１つのヌクレオチドの２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基修飾、（ｉｉ）操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の５塩基のうちの少なくとも２つの間のチオホスフェート（ＰＳ）結合、又は操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の５塩基のうちの少なくとも２つの間のチオリン酸結合、（ｉｉｉ）操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム内のチオホスフェート結合、（ｉｖ）操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム内の２’－Ｏメチル又は２’塩基修飾、（ｖ）操作されたガイドＲＮＡのスペーサー領域の少なくとも７塩基の２’－フルオロ塩基修飾、及び（ｖｉ）操作されたガイドＲＮＡのループ領域内のチオホスフェート結合のうちの少なくとも１つを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の５塩基又は操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の５塩基内の少なくとも１つのヌクレオチドの２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基修飾を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの５’末端又は操作されたガイドＲＮＡの３’末端に、２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基修飾を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の５塩基のうちの少なくとも２つの間のチオホスフェート（ＰＳ）結合、又は操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の５塩基のうちの少なくとも２つの間のチオホスフェート結合を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム内にチオホスフェート結合を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム内に２’－Ｏメチル塩基修飾を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡのスペーサー領域の少なくとも７塩基の２’－フルオロ塩基修飾を含む

。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡのループ領域内にチオホスフェート結合を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの５’末端に少なくとも３個の２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基、操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の３塩基の間に２個のチオホスフェート結合、操作されたガイドＲＮＡの４’末端に少なくとも４個の２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基、及び操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の３塩基の間に３個のチオホスフェート結合を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの５’末端に少なくとも２つの２’－Ｏ－メチル塩基及び少なくとも２つのチオホスフェート結合、並びに操作されたガイドＲＮＡの３’末端に少なくとも１つの２’－Ｏ－メチル塩基及び少なくとも１つのチオホスフェート結合を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム領域の両方に少なくとも１つの２’－Ｏ－メチル塩基を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡのシード領域を除くスペーサー領域に少なくとも１個～少なくとも１４個の２’－フルオロ塩基を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、操作されたガイドＲＮＡの５’ステム領域に少なくとも１つの２’－Ｏ－メチル塩基、及びガイドＲＮＡのシード領域を除くスペーサー領域に少なくとも１個～少なくとも１４個の２’－フルオロ塩基を含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、ＶＥＧＦ－Ａ遺伝子を標的とするスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号３９８５と少なくとも８０％の同一性を有するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、表７に列挙される化学修飾を含む、表７からのガイドＲＮＡ１～７のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドエンドヌクレアーゼは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼであ る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＩサブドメイン、ＲｕｖＣＩＩサブドメイン、及びＲｕｖＣＩＩＩサブドメインを含むＲｕｖＣドメインを含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＩは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号３６０８～３６０９、３８５３、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む。

【００１６】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する異種エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含む宿主細胞を提供する。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１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞又は哺乳類細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞であり、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞は、λＤＥ３リソゲンであるか、又はＥ．ｃｏｌｉ細胞は、ＢＬ２１（ＤＥ３）株である。いくつかの実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞は、ｏｍｐＴ　ｌｏｎ遺伝子型を有する。いく

つかの実施形態では、オープンリーディングフレームは、Ｔ７プロモーター配列、Ｔ７－ｌａｃプロモーター配列、ｌａｃプロモーター配列、ｔａｃプロモーター配列、ｔｒｃプロモーター配列、ＰａｒａＢＡＤプロモーター配列、ＰｒｈａＢＡＤプロモーター配列、Ｔ５プロモーター配列、ｃｓｐＡプロモーター配列、ａｒａP_{BAD}プロモーター、ファージラムダからの強い左向きプロモーター（ｐＬプロモーター）、又はそれらの任意の組み合わせに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、オープンリーディングフレームは、エンドヌクレアーゼをコードする配列にインフレームで連結された親和性タグをコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、親和性タグは、固定化金属親和性クロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）タグである。いくつかの実施形態では、ＩＭＡＣタグは、ポリヒスチジンタグである。いくつかの実施形態では、親和性タグは、ｍｙｃタグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）タグ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグ、ストレプトアビジンタグ、ＦＬＡＧタグ、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、親和性タグは、プロテアーゼ切断部位をコードするリンカー配列を介して、エンドヌクレアーゼをコードする配列にインフレームで連結される。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位、ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ（登録商標）プロテアーゼ切断部位、トロンビン切断部位、第Ｘａ因子切断部位、エンテロキナーゼ切断部位、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、オープンリーディングフレームは、宿主細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、オープンリーディングフレームは、ベクター上に提供される。いくつかの実施形態では、オープンリーディングフレームは、宿主細胞のゲノムに組み込まれる。

【００１７】

いくつかの態様では、本開示は、適合する液体培地中で本明細書に記載される宿主細胞のうちのいずれかを含む培養物を提供する。

【００１８】

いくつかの態様では、本開示は、適合する成長培地中で本明細書に記載される宿主細胞のうちのいずれかを培養することを含む、エンドヌクレアーゼを製造する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、エンドヌクレアーゼの発現を誘導することを更に含む。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼの発現の誘導は、追加の化学剤の添加若しくは栄養素の量の増加によるものであるか、又は温度上昇若しくは低下によるものである。いくつかの実施形態では、追加の化学剤又は栄養素の量の増加は、イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）又は追加の量のラクトースを含む。いくつかの実施形態では、方法は、培養後に宿主細胞を単離することと、宿主細胞を溶解してタンパク質抽出物を産生することとを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、エンドヌクレアーゼを単離することを更に含む。いくつかの実施形態では、単離することは、タンパク質抽出物をＩＭＡＣ、イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、又は陽イオン交換クロマトグラフィーに供することを含む。いくつかの実施形態では、オープンリーディングフレームは、エンドヌクレアーゼをコードする配列にインフレームで連結された親和性タグをコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、親和性タグは、プロテアーゼ切断部位をコードするリンカー配列を介して、エンドヌクレアーゼをコードする配列にインフレームで連結される。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位、ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ（登録商標）プロテアーゼ切断部位、トロンビン切断部位、第Ｘａ因子切断部位、エンテロキナーゼ切断部位、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、方法は、プロテアーゼ切断部位に対応するプロテアーゼをエンドヌクレアーゼと接触させることによって親和性タグを切断することを更に含む。いくつかの実施形態では、親和性タグは、ＩＭＡＣ親和性タグである。いくつかの実施形態では、方法は、サブトラクティブＩＭＡＣ親和性クロマトグラフィーを行って、エンドヌクレアーゼを含む組成物から親和性タグを除去することを更に含む。

【００１９】
一部の態様では、本開示は、（ａ）エンドヌクレアーゼが、ｓＭｂＣａｓ１２ａと比較して増加された切断活性を有する、３－又は４－ヌクレオチドＰＡＭ配列に結合するように構成されているクラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、（ｂ）クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓ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、かつ標的核酸配列を含む標的核酸にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡとを含む系を提供する。いくつかの実施形態では、切断活性は、エンドヌクレアーゼを適合するガイドＲＮＡとともに標的核酸を含む細胞に導入し、細胞内の標的核酸配列の切断を検出することによってインビトロで測定される。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、２１５～２２５又はそのバリアントと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、標的核酸は、標的核酸配列の近位にＹＹＮ　ＰＡＭ配列を更に含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、ｓＭｂＣａｓ１２ａと比較して少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、若しくは２００％、又はそれ以上増加した活性を有する。

【００２０】
いくつかの態様では、本開示は、（ａ）クラス２、Ｖ－Ａ’型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡとを含む系を提供し、操作されたガイドＲＮＡは、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼの天然エフェクター反復配列の約１９個～約２５個又は約１９個～約３１個の連続するヌクレオチドと少なくとも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、天然エフェクター反復配列は、配列番号３５６０～３５７２のうちのいずれか１つである。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ－Ａ’型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１２６と少なくとも７５％の同一性を有する。

【００２１】
いくつかの態様では、本開示は、（ａ）クラス２、Ｖ－Ｌ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡとを含む系を提供し、操作されたガイドＲＮＡは、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼの天然エフェクター反復配列の約１９個～約２５個又は約１９個～約３１個の連続するヌクレオチドと少なくとも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、Ｖ－Ｌ型エンドヌクレアーゼは、配列番号７９３～１１６３のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の配列同一性を有する。

【００２２】
いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＶＥＧＦ－Ａ遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、ＶＥＧＦ－Ａ遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号３９８５と少なくとも８０％の同一性を有する標的化配列を含むか、又は操作されたガイドＲＮＡは、表７からのガイドＲＮＡ１～７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、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５

－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号３６０８～３６０９、３８５３、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む。

【００２３】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）配列番号２１５～２２５のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の同一性を有するクラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡとを含む組成物を接触させることを含み、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、遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、細胞内のｓｐＣａｓ９と少なくとも同等の切断活性を有する。いくつかの実施形態では、切断活性は、エンドヌクレアーゼを適合するガイドＲＮＡとともに標的核酸を含む細胞に導入し、細胞内の標的核酸配列の切断を検出することによってインビトロで測定される。いくつかの実施形態では、組成物は、２０ｐｍｏｌｅ以下のクラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、１ｐｍｏｌ以下のクラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む。

【００２４】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＣＤ３８遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、ＣＤ３８遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４４６６～４５０３及び５６８６のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４４２８～４４６５及び５６８５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４４６６、４４６７、４４６８、４４７９、４４８４、４４９０、４４９２、４４９３、４４９５、４４９８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４４２８、４４２９、４４３０、４４３６、４４４１、４４４６、４４５２、４４５４、４４５５、４４６０、又は４４６１のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する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、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００２５】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＴＩＧＩＴ遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、ＴＩＧＩＴ遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４５２１～４５３７のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４５０４～４５２０のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４５２１、４５２７、４５２８、４５３５、又は４５３６のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４５０４、４５１０、４５１１、４５１８、又は４５１９のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する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、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００２６】

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を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４５６９～４５９９のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４５３８～４５６８のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４５７４、４５７７、４５７８、４５７９、４５８２、４５８４、４５８５、４５８６、４５８７、４５８９、４５９０、４５９１、４５９２、４５９３、４５９５、４５９６、又は４５９８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４５４３、４５４６、４５４７、４５４８、４５５１、４５５３、４５５４、４５５５、４５５６、４５５８、４５５９、４５６０、４５６１、４５６２、４５６５、又は４５６７のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する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、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、肝細胞、又はそれらの前駆体である。

【００２７】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＢ２Ｍ遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４６７６～４７５１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４６００～４６７５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７及び６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４６７６、４６７８～４６８７、４６９０、４６９２、４６９８～４７０７、４７２０～４７２３、４７２５～４７２６、４７３２～４７３３、４７３６～４７３７、４７４１、又は４７５０～４７５１のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４６００、４６０２－４６１１、４６１４、４６１６、４６２２－４６３１、４６４４－４６４７、４６４９－４６５０、４６５６－４６５７、４６６０－４６６１、４６６５、又は４６７４～４６７５のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する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、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００２８】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＣＤ２遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＶと、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡとを導入することを含み、操作されたガイドＲＮＡは、エンドヌクレアーゼＶ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、ＣＤ２遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４８３７～４９２１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４７５２～４８３６のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列

を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４８３７、４８４４、４８４５、４８４８、４８５７～４８５８、４８８３、４８８７、４８９２～４８９３、４９０４～４９０９、４９１４、４９１６、又は４９１８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４８３７、４８４４、４８４５、４８４８、４８５７～４８５８、４８８３、４８８７、４８９２～４８９３、４９０４～４９０９、４９１４、４９１６、又は４９１８のうちのいずれか１つを標的とする、表１４Ｅからのガイドの配列のうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００２９】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＣＤ５遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、ＣＤ５遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４９４６～４９６９のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４９２２～４９４５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３

６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４９４６～４９４７、４９４９、４９５１、４９５７～４９６０、４９６３、４９６７、又は４９６９のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４９４６～４９４７、４９４９、４９５１、４９５７～４９６０、４９６３、４９６７、又は４９６９のうちのいずれか１つを標的とする、表１４ＦからのガイドＲＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００３０】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるマウスＴＲＡＣ遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、マウス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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５１２６～５１９５、５６８２、又は５６８４のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５０５６～５１２５、５６８１、又は５６８３のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１～３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５１２６～５１３０、５１３３～５１４３、５１４７～５１５０、５１７２～５１７３、５１８４～５１８９、又は５１９２～５１９４のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５１２６～５１３０、５１３３～５１４３、５１４７～５１５０、５１７２～５１７３、５１８４～５１８９、又は５１９２～５１９４のうちのいずれか１つを標的とする、表１４Ｇからのガイドの配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００３１】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるマウスＴＲＢＣ１又はＴＲＢＣ２遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、マウスＴＲＢＣ１又は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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５２１１～５２２５又は５２４７～５２６７のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５１９６～５２１０又は５２２６～５２４６のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１，３５３９，３５５１－３５５９，３６０８－３６０９，３６１２，３６３６－３６３７，３６４０－３６４１，３６４４－３６４５，３６４８－３６４９，３６５２－３６５３，３６５６－３６５７，３６６０－３６６１，３６６４－３６６７，３６７１－３６７２，３６７７－３６７８，３６９５－３６９６，３７２９－３７３０，３７３４－３７３５、３８５１～３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５２１１、５２１３～５２１５、５２１７、５２２１、５２２３、５２４７、５２４９～５２５０、５２５２～５２５３、５２５８～５２５９、又は５２６４のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５２１１、５２１３～５２１５、５２１７、５２２１、５２２３、５２４７、５２４９～５２５０、５２５２～５２５３、５２５

８～５２５９、又は５２６４のうちのいずれか１つを標的とする、表１４Ｈからのガイド
ＲＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態
では、細胞は、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。
【００３２】
いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるヒトＴＲＢＣ１又はＴＲＢＣ２遺伝子座
を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、操作されたガイドＲＮ
Ａ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、ヒトＴＲＢＣ１又はＴＲＢＣ２遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構
成されているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５６６１～５
６７９のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２
０～２２個の連続するヌクレオチドを有する配列にハイブリダイズするように構成されて
いるか、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５６４２～５６６０のうちのいずれか
１つと少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９
１％、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９
５％、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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラ
ス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又
はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１
、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はその
バリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１，３５３９，３５５１
－３５５９，３６０８－３６０９，３６１２，３６３６－３６３７，３６４０－３６４１
，３６４４－３６４５，３６４８－３６４９，３６５２－３６５３，３６５６－３６５７
，３６６０－３６６１，３６６４－３６６７，３６７１－３６７２，３６７８，３６９５
－３６９６，３７２９－３７３０，３７３４－３７３５，３８５１－３８５７、又は６０
３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレ
オチドと少なくとも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、
操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５６６１～５６６３、５６７２～５６７５、又は５
６７８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２
個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５６６１～５６６３、５６
７２～５６７５、又は５６７８のうちのいずれか１つを標的とする、表１４Ｉからのガイ
ドＲＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する。いくつかの実施形
態では、細胞は、真核細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。
【００３３】
いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＨＰＲＴ遺伝子座を破壊する方法を提供
し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、ＨＰＲＴ遺
伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、操作さ
れたガイドＲＮＡは、配列番号５５６２～５６４１のうちのいずれか１つと少なくとも約

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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５４８２～５５６１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼはＣａｓ１２ｉ、Ｃａｓ１２ｊ、Ｃａｓ１２ｋ、Ｃａｓ１２ｌ、Ｃａｓ１２ｍ、Ｃａｓ１２ｎ、Ｃａｓ１２ｏ、Ｃａｓ１２ｐ、Ｃａｓ１２ｑ、Ｃａｓ１２ｒ、Ｃａｓ１２ｓ、Ｃａｓ１２ｔ、Ｃａｓ１２ｕ、Ｃａｓ１２ｖ、Ｃａｓ１２ｗ、Ｃａｓ１２ｘ、Ｃａｓ１２ｙ、Ｃａｓ１２ｚ、Ｃａｓ１２ａａ、Ｃａｓ１２ａｂ、Ｃａｓ１２ａｃ、Ｃａｓ１２ａｄ、Ｃａｓ１２ａｅ、Ｃａｓ１２ａｆ、Ｃａｓ１２ａｇ、Ｃａｓ１２ａｈ、Ｃａｓ１２ａｉ、Ｃａｓ１２ａｊ、Ｃａｓ１２ａｋ、Ｃａｓ１２ａｌ、Ｃａｓ１２ａｍ、Ｃａｓ１２ａｎ、Ｃａｓ１２ａｏ、Ｃａｓ１２ａｐ、Ｃａｓ１２ａｑ、Ｃａｓ１２ａｒ、Ｃａｓ１２ａｓ、Ｃａｓ１２ａｔ、Ｃａｓ１２ａｕ、Ｃａｓ１２ａｖ、Ｃａｓ１２ａｗ、Ｃａｓ１２ａｘ、Ｃａｓ１２ａｙ、Ｃａｓ１２ａｚ、Ｃａｓ１２ｂａ、Ｃａｓ１２ｂｂ、Ｃａｓ１２ｂｃ、Ｃａｓ１２ｂｄ、Ｃａｓ１２ｂｅ、Ｃａｓ１２ｂｆ、Ｃａｓ１２ｂｇ、Ｃａｓ１２ｂｈ、Ｃａｓ１２ｂｉ、Ｃａｓ１２ｂｊ、Ｃａｓ１２ｂｋ、Ｃａｓ１２ｂｌ、Ｃａｓ１２ｂｍ、Ｃａｓ１２ｂｎ、Ｃａｓ１２ｂｏ、Ｃａｓ１２ｂｐ、Ｃａｓ１２ｂｑ、Ｃａｓ１２ｂｒ、Ｃａｓ１２ｂｓ、Ｃａｓ１２ｂｔ、Ｃａｓ１２ｂｕ、Ｃａｓ１２ｂｖ、Ｃａｓ１２ｂｗ、Ｃａｓ１２ｂｘ、Ｃａｓ１２ｂｙ、Ｃａｓ１２ｂｚ、Ｃａｓ１２ｃａ、Ｃａｓ１２ｃｂ、Ｃａｓ１２ｃｃ、Ｃａｓ１２ｃｄ、Ｃａｓ１２ｃｅ、Ｃａｓ１２ｃｆ、Ｃａｓ１２ｃｇ、Ｃａｓ１２ｃｈ、Ｃａｓ１２ｃｉ、Ｃａｓ１２ｃｊ、Ｃａｓ１２ｃｋ、Ｃａｓ１２ｃｌ、Ｃａｓ１２ｃｍ、Ｃａｓ１２ｃｎ、Ｃａｓ１２ｃｏ、Ｃａｓ１２ｃｐ、Ｃａｓ１２ｃｑ、Ｃａｓ１２ｃｒ、Ｃａｓ１２ｃｓ、Ｃａｓ１２ｃｔ、Ｃａｓ１２ｃｕ、Ｃａｓ１２ｃｖ、Ｃａｓ１２ｃｗ、Ｃａｓ１２ｃｘ、Ｃａｓ１２ｃｙ、Ｃａｓ１２ｃｚ、Ｃａｓ１２ｄａ、Ｃａｓ１２ｄｂ、Ｃａｓ１２ｄｃ、Ｃａｓ１２ｄｄ、Ｃａｓ１２ｄｅ、Ｃａｓ１２ｄｆ、Ｃａｓ１２ｄｇ、Ｃａｓ１２ｄｈ、Ｃａｓ１２ｄｉ、Ｃａｓ１２ｄｊ、Ｃａｓ１２ｄｋ、Ｃａｓ１２ｄｌ、Ｃａｓ１２ｄｍ、Ｃａｓ１２ｄｎ、Ｃａｓ１２ｄｏ、Ｃａｓ１２ｄｐ、Ｃａｓ１２ｄｑ、Ｃａｓ１２ｄｒ、Ｃａｓ１２ｄｓ、Ｃａｓ１２ｄｔ、Ｃａｓ１２ｄｕ、Ｃａｓ１２ｄｖ、Ｃａｓ１２ｄｗ、Ｃａｓ１２ｄｘ、Ｃａｓ１２ｄｙ、Ｃａｓ１２ｄｚ、Ｃａｓ１２ｅａ、Ｃａｓ１２ｅｂ、Ｃａｓ１２ｅｃ、Ｃａｓ１２ｅｄ、Ｃａｓ１２ｅｅ、Ｃａｓ１２ｅｆ、Ｃａｓ１２ｅｇ、Ｃａｓ１２ｅｈ、Ｃａｓ１２ｅｉ、Ｃａｓ１２ｅｊ、Ｃａｓ１２ｅｋ、Ｃａｓ１２ｅｌ、Ｃａｓ１２ｅｍ、Ｃａｓ１２ｅｎ、Ｃａｓ１２ｅｏ、Ｃａｓ１２ｅｐ、Ｃａｓ１２ｅｑ、Ｃａｓ１２ｅｒ、Ｃａｓ１２ｅｓ、Ｃａｓ１２ｅｔ、Ｃａｓ１２ｅｕ、Ｃａｓ１２ｅｖ、Ｃａｓ１２ｅｗ、Ｃａｓ１２ｅｘ、Ｃａｓ１２ｅｙ、Ｃａｓ１２ｅｚ、Ｃａｓ１２ｆａ、Ｃａｓ１２ｆｂ、Ｃａｓ１２ｆｃ、Ｃａｓ１２ｆｄ、Ｃａｓ１２ｆｅ、Ｃａｓ１２ｆｆ、Ｃａｓ１２ｆｇ、Ｃａｓ１２ｆｈ、Ｃａｓ１２ｆｉ、Ｃａｓ１２ｆｊ、Ｃａｓ１２ｆｋ、Ｃａｓ１２ｆｌ、Ｃａｓ１２ｆｍ、Ｃａｓ１２ｆｎ、Ｃａｓ１２ｆｏ、Ｃａｓ１２ｆｐ、Ｃａｓ１２ｆｑ、Ｃａｓ１２ｆｒ、Ｃａｓ１２ｆｓ、Ｃａｓ１２ｆｔ、Ｃａｓ１２ｆｕ、Ｃａｓ１２ｆｖ、Ｃａｓ１２ｆｗ、Ｃａｓ１２ｆｘ、Ｃａｓ１２ｆｙ、Ｃａｓ１２ｆｚ、Ｃａｓ１２ｇａ、Ｃａｓ１２ｇｂ、Ｃａｓ１２ｇｃ、Ｃａｓ１２ｇｄ、Ｃａｓ１２ｇｅ、Ｃａｓ１２ｇｆ、Ｃａｓ１２ｇｇ、Ｃａｓ１２ｇｈ、Ｃａｓ１２ｇｉ、Ｃａｓ１２ｇｊ、Ｃａｓ１２ｇｋ、Ｃａｓ１２ｇｌ、Ｃａｓ１２ｇｍ、Ｃａｓ１２ｇｎ、Ｃａｓ１２ｇｏ、Ｃａｓ１２ｇｐ、Ｃａｓ１２ｇｑ、Ｃａｓ１２ｇｒ、Ｃａｓ１２ｇｓ、Ｃａｓ１２ｇｔ、Ｃａｓ１２ｇｕ、Ｃａｓ１２ｇｖ、Ｃａｓ１２ｇｗ、Ｃａｓ１２ｇｘ、Ｃａｓ１２ｇｙ、Ｃａｓ１２ｇｚ、Ｃａｓ１２ｈａ、Ｃａｓ１２ｈｂ、Ｃａｓ１２ｈｃ、Ｃａｓ１２ｈｄ、Ｃａｓ１２ｈｅ、Ｃａｓ１２ｈｆ、Ｃａｓ１２ｈｇ、Ｃａｓ１２ｈｈ、Ｃａｓ１２ｈｉ、Ｃａｓ１２ｈｊ、Ｃａｓ１２ｈｋ、Ｃａｓ１２ｈｌ、Ｃａｓ１２ｈｍ、Ｃａｓ１２ｈｎ、Ｃａｓ１２ｈｏ、Ｃａｓ１２ｈｐ、Ｃａｓ１２ｈｑ、Ｃａｓ１２ｈｒ、Ｃａｓ１２ｈｓ、Ｃａｓ１２ｈｔ、Ｃａｓ１２ｈｕ、Ｃａｓ１２ｈｖ、Ｃａｓ１２ｈｗ、Ｃａｓ１２ｈｘ、Ｃａｓ１２ｈｙ、Ｃａｓ１２ｈｚ、Ｃａｓ１２ｉａ、Ｃａｓ１２ｉｂ、Ｃａｓ１２ｉｃ、Ｃａｓ１２ｉｄ、Ｃａｓ１２ｉｅ、Ｃａｓ１２ｉｆ、Ｃａｓ１２ｉｇ、Ｃａｓ１２ｉｈ、Ｃａｓ１２ｉｉ、Ｃａｓ１２ｉｊ、Ｃａｓ１２ｉｋ、Ｃａｓ１２ｉｌ、Ｃａｓ１２ｉｍ、Ｃａｓ１２ｉｎ、Ｃａｓ１２ｉｏ、Ｃａｓ１２ｉｐ、Ｃａｓ１２ｉｑ、Ｃａｓ１２ｉｒ、Ｃａｓ１２ｉｓ、Ｃａｓ１２ｉｔ、Ｃａｓ１２ｉｕ、Ｃａｓ１２ｉｖ、Ｃａｓ１２ｉｗ、Ｃａｓ１２ｉｘ、Ｃａｓ１２ｉｙ、Ｃａｓ１２ｉｚ、Ｃａｓ１２ｊａ、Ｃａｓ１２ｊｂ、Ｃａｓ１２ｊｃ、Ｃａｓ１２ｊｄ、Ｃａｓ１２ｊｅ、Ｃａｓ１２ｊｆ、Ｃａｓ１２ｊｇ、Ｃａｓ１２ｊｈ、Ｃａｓ１２ｊｉ、Ｃａｓ１２ｊｊ、Ｃａｓ１２ｊｋ、Ｃａｓ１２ｊｌ、Ｃａｓ１２ｊｍ、Ｃａｓ１２ｊｎ、Ｃａｓ１２ｊｏ、Ｃａｓ１２ｊｐ、Ｃａｓ１２ｊｑ、Ｃａｓ１２ｊｒ、Ｃａｓ１２ｊｓ、Ｃａｓ１２ｊｔ、Ｃａｓ１２ｊｕ、Ｃａｓ１２ｊｖ、Ｃａｓ１２ｊｗ、Ｃａｓ１２ｊｘ、Ｃａｓ１２ｊｙ、Ｃａｓ１２ｊｚ、Ｃａｓ１２ｋａ、Ｃａｓ１２ｋｂ、Ｃａｓ１２ｋｃ、Ｃａｓ１２ｋｄ、Ｃａｓ１２ｋｅ、Ｃａｓ１２ｋｆ、Ｃａｓ１２ｋｇ、Ｃａｓ１２ｋｈ、Ｃａｓ１２ｋｉ、Ｃａｓ１２ｋｊ、Ｃａｓ１２ｋｋ、Ｃａｓ１２ｋｌ、Ｃａｓ１２ｋｍ、Ｃａｓ１２ｋｎ、Ｃａｓ１２ｋｏ、Ｃａｓ１２ｋｐ、Ｃａｓ１２ｋｑ、Ｃａｓ１２ｋｒ、Ｃａｓ１２ｋｓ、Ｃａｓ１２ｋｔ、Ｃａｓ１２ｋｕ、Ｃａｓ１２ｋｖ、Ｃａｓ１２ｋｗ、Ｃａｓ１２ｋｘ、Ｃａｓ１２ｋｙ、Ｃａｓ１２ｋｚ、Ｃａｓ１２ｌａ、Ｃａｓ１２ｌｂ、Ｃａｓ１２ｌｃ、Ｃａｓ１２ｌｄ、Ｃａｓ１２ｌｅ、Ｃａｓ１２ｌｆ、Ｃａｓ１２ｌｇ、Ｃａｓ１２ｌｈ、Ｃａｓ１２ｌｉ、Ｃａｓ１２ｌｊ、Ｃａｓ１２ｌｋ、Ｃａｓ１２ｌｌ、Ｃａｓ１２ｌｍ、Ｃａｓ１２ｌｎ、Ｃａｓ１２ｌｏ、Ｃａｓ１２ｌｐ、Ｃａｓ１２ｌｑ、Ｃａｓ１２ｌｒ、Ｃａｓ１２ｌｓ、Ｃａｓ１２ｌｔ、Ｃａｓ１２ｌｕ、Ｃａｓ１２ｌｖ、Ｃａｓ１２ｌｗ、Ｃａｓ１２ｌｘ、Ｃａｓ１２ｌｙ、Ｃａｓ１２ｌｚ、Ｃａｓ１２ｍａ、Ｃａｓ１２ｍｂ、Ｃａｓ１２ｍｃ、Ｃａｓ１２ｍｄ、Ｃａｓ１２ｍｅ、Ｃａｓ１２ｍｆ、Ｃａｓ１２ｍｇ、Ｃａｓ１２ｍｈ、Ｃａｓ１２ｍｉ、Ｃａｓ１２ｍｊ、Ｃａｓ１２ｍｋ、Ｃａｓ１２ｍｌ、Ｃａｓ１２ｍｍ、Ｃａｓ１２ｍｎ、Ｃａｓ１２ｍｏ、Ｃａｓ１２ｍｐ、Ｃａｓ１２ｍｑ、Ｃａｓ１２ｍｒ、Ｃａｓ１２ｍｓ、Ｃａｓ１２ｍｔ、Ｃａｓ１２ｍｕ、Ｃａｓ１２ｍｖ、Ｃａｓ１２ｍｗ、Ｃａｓ１２ｍｘ、Ｃａｓ１２ｍｙ、Ｃａｓ１２ｍｚ、Ｃａｓ１２ｎａ、Ｃａｓ１２ｎｂ、Ｃａｓ１２ｎｃ、Ｃａｓ１２ｎｄ、Ｃａｓ１２ｎｅ、Ｃａｓ１２ｎｆ、Ｃａｓ１２ｎｇ、Ｃａｓ１２ｎｈ、Ｃａｓ１２ｎｉ、Ｃａｓ１２ｎｊ、Ｃａｓ１２ｎｋ、Ｃａｓ１２ｎｌ、Ｃａｓ１２ｎｍ、Ｃａｓ１２ｎｎ、Ｃａｓ１２ｎｏ、Ｃａｓ１２ｎｐ、Ｃａｓ１２ｎｑ、Ｃａｓ１２ｎｒ、Ｃａｓ１２ｎｓ、Ｃａｓ１２ｎｔ、Ｃａｓ１２ｎｕ、Ｃａｓ１２ｎｖ、Ｃａｓ１２ｎｗ、Ｃａｓ１２ｎｘ、Ｃａｓ１２ｎｙ、Ｃａｓ１２ｎｚ、Ｃａｓ１２ｏａ、Ｃａｓ１２ｏｂ、Ｃａｓ１２ｏｃ、Ｃａｓ１２ｏｄ、Ｃａｓ１２ｏｅ、Ｃａｓ１２ｏｆ、Ｃａｓ１２ｏｇ、Ｃａｓ１２ｏｈ、Ｃａｓ１２ｏｉ、Ｃａｓ１２ｏｊ、Ｃａｓ１２ｏｋ、Ｃａｓ１２ｏｌ、Ｃａｓ１２ｏｍ、Ｃａｓ１２ｏｎ、Ｃａｓ１２ｏｏ、Ｃａｓ１２ｏｐ、Ｃａｓ１２ｏｑ、Ｃａｓ１２ｏｒ、Ｃａｓ１２ｏｓ、Ｃａｓ１２ｏｔ、Ｃａｓ１２ｏｕ、Ｃａｓ１２ｏｖ、Ｃａｓ１２ｏｗ、Ｃａｓ１２ｏｘ、Ｃａｓ１２ｏｙ、Ｃａｓ１２ｏｚ、Ｃａｓ１２ｐａ、Ｃａｓ１２ｐｂ、Ｃａｓ１２ｐｃ、Ｃａｓ１２ｐｄ、Ｃａｓ１２ｐｅ、Ｃａｓ１２ｐｆ、Ｃａｓ１２ｐｇ、Ｃａｓ１２ｐｈ、Ｃａｓ１２ｐｉ、Ｃａｓ１２ｐｊ、Ｃａｓ１２ｐｋ、Ｃａｓ１２ｐｌ、Ｃａｓ１２ｐｍ、Ｃａｓ１２ｐｎ、Ｃａｓ１２ｐｏ、Ｃａｓ１２ｐｐ、Ｃａｓ１２ｐｑ、Ｃａｓ１２ｐｒ、Ｃａｓ１２ｐｓ、Ｃａｓ１２ｐｔ、Ｃａｓ１２ｐｕ、Ｃａｓ１２ｐｖ、Ｃａｓ１２ｐｗ、Ｃａｓ１２ｐｘ、Ｃａｓ１２ｐｙ、Ｃａｓ１２ｐｚ、Ｃａｓ１２ｑａ、Ｃａｓ１２ｑｂ、Ｃａｓ１２ｑｃ、Ｃａｓ１２ｑｄ、Ｃａｓ１２ｑｅ、Ｃａｓ１２ｑｆ、Ｃａｓ１２ｑｇ、Ｃａｓ１２ｑｈ、Ｃａｓ１２ｑｉ、Ｃａｓ１２ｑｊ、Ｃａｓ１２ｑｋ、Ｃａｓ１２ｑｌ、Ｃａｓ１２ｑｍ、Ｃａｓ１２ｑｎ、Ｃａｓ１２ｑｏ、Ｃａｓ１２ｑｐ、Ｃａｓ１２ｑｑ、Ｃａｓ１２ｑｒ、Ｃａｓ１２ｑｓ、Ｃａｓ１２ｑｔ、Ｃａｓ１２ｑｕ、Ｃａｓ１２ｑｖ、Ｃａｓ１２ｑｗ、Ｃａｓ１２ｑｘ、Ｃａｓ１２ｑｙ、Ｃａｓ１２ｑｚ、Ｃａｓ１２ｒａ、Ｃａｓ１２ｒｂ、Ｃａｓ１２ｒｃ、Ｃａｓ１２ｒｄ、Ｃａｓ１２ｒｅ、Ｃａｓ１２ｒｆ、Ｃａｓ１２ｒｇ、Ｃａｓ１２ｒｈ、Ｃａｓ１２ｒｉ、Ｃａｓ１２ｒｊ、Ｃａｓ１２ｒｋ、Ｃａｓ１２ｒｌ、Ｃａｓ１２ｒｍ、Ｃａｓ１２ｒｎ、Ｃａｓ１２ｒｏ、Ｃａｓ１２ｒｐ、Ｃａｓ１２ｒｑ、Ｃａｓ１２ｒｒ、Ｃａｓ１２ｒｓ、Ｃａｓ１２ｒｔ、Ｃａｓ１２ｒｕ、Ｃａｓ１２ｒｖ、Ｃａｓ１２ｒｗ、Ｃａｓ１２ｒｘ、Ｃａｓ１２ｒｙ、Ｃａｓ１２ｒｚ、Ｃａｓ１２ｓａ、Ｃａｓ１２ｓｂ、Ｃａｓ１２ｓｃ、Ｃａｓ１２ｓｄ、Ｃａｓ１２ｓｅ、Ｃａｓ１２ｓｆ、Ｃａｓ１２ｓｇ、Ｃａｓ１２ｓｈ、Ｃａｓ１２ｓｉ、Ｃａｓ１２ｓｊ、Ｃａｓ１２ｓｋ、Ｃａｓ１２ｓｌ、Ｃａｓ１２ｓｍ、Ｃａｓ１２ｓｎ、Ｃａｓ１２ｓｏ、Ｃａｓ１２ｓｐ、Ｃａｓ１２ｓｑ、Ｃａｓ１２ｓｒ、Ｃａｓ１２ｓｓ、Ｃａｓ１２ｓｔ、Ｃａｓ１２ｓｕ、Ｃａｓ１２ｓｖ、Ｃａｓ１２ｓｗ、Ｃａｓ１２ｓｘ、Ｃａｓ１２ｓｙ、Ｃａｓ１２ｓｚ、Ｃａｓ１２ｔａ、Ｃａｓ１２ｔｂ、Ｃａｓ１２ｔｃ、Ｃａｓ１２ｔｄ、Ｃａｓ１２ｔｅ、Ｃａｓ１２ｔｆ、Ｃａｓ１２ｔｇ、Ｃａｓ１２ｔｈ、Ｃａｓ１２ｔｉ、Ｃａｓ１２ｔｊ、Ｃａｓ１２ｔｋ、Ｃａｓ１２ｔｌ、Ｃａｓ１２ｔｍ、Ｃａｓ１２ｔｎ、Ｃａｓ１２ｔｏ、Ｃａｓ１２ｔｐ、Ｃａｓ１２ｔｑ、Ｃａｓ１２ｔｒ、Ｃａｓ１２ｔｓ、Ｃａｓ１２ｔｔ、Ｃａｓ１２ｔｕ、Ｃａｓ１２ｔｖ、Ｃａｓ１２ｔｗ、Ｃａｓ１２ｔｘ、Ｃａｓ１２ｔｙ、Ｃａｓ１２ｔｚ、Ｃａｓ１２ｕａ、Ｃａｓ１２ｕｂ、Ｃａｓ１２ｕｃ、Ｃａｓ１２ｕｄ、Ｃａｓ１２ｕｅ、Ｃａｓ１２ｕｆ、Ｃａｓ１２ｕｇ、Ｃａｓ１２ｕｈ、Ｃａｓ１２ｕｉ、Ｃａｓ１２ｕｊ、Ｃａｓ１２ｕｋ、Ｃａｓ１２ｕｌ、Ｃａｓ１２ｕｍ、Ｃａｓ１２ｕｎ、Ｃａｓ１２ｕｏ、Ｃａｓ１２ｕｐ、Ｃａｓ１２ｕｑ、Ｃａｓ１２ｕｒ、Ｃａｓ１２ｕｓ、Ｃａｓ１２ｕｔ、Ｃａｓ１２ｕｕ、Ｃａｓ１２ｕｖ、Ｃａｓ１２ｕｗ、Ｃａｓ１２ｕｘ、Ｃａｓ１２ｕｙ、Ｃａｓ１２ｕｚ、Ｃａｓ１２ｖａ、Ｃａｓ１２ｖｂ、Ｃａｓ１２ｖｃ、Ｃａｓ１２ｖｄ、Ｃａｓ１２ｖｅ、Ｃａｓ１２ｖｆ、Ｃａｓ１２ｖｇ、Ｃａｓ１２ｖｈ、Ｃａｓ１２ｖｉ、Ｃａｓ１２ｖｊ、Ｃａｓ１２ｖｋ、Ｃａｓ１２ｖｌ、Ｃａｓ１２ｖｍ、Ｃａｓ１２ｖｎ、Ｃａｓ１２ｖｏ、Ｃａｓ１２ｖｐ、Ｃａｓ１２ｖｑ、Ｃａｓ１２ｖｒ、Ｃａｓ１２ｖｓ、Ｃａｓ１２ｖｔ、Ｃａｓ１２ｖｕ、Ｃａｓ１２ｖｖ、Ｃａｓ１２ｖｗ、Ｃａｓ１２ｖｘ、Ｃａｓ１２ｖｙ、Ｃａｓ１２ｖｚ、Ｃａｓ１２ｗａ、Ｃａｓ１２ｗｂ、Ｃａｓ１２ｗｃ、Ｃａｓ１２ｗｄ、Ｃａｓ１２ｗｅ、Ｃａｓ１２ｗｆ、Ｃａｓ１２ｗｇ、Ｃａｓ１２ｗｈ、Ｃａｓ１２ｗｉ、Ｃａｓ１２ｗｊ、Ｃａｓ１２ｗｋ、Ｃａｓ１２ｗｌ、Ｃａｓ１２ｗｍ、Ｃａｓ１２ｗｎ、Ｃａｓ１２ｗｏ、Ｃａｓ１２ｗｐ、Ｃａｓ１２ｗｑ、Ｃａｓ１２ｗｒ、Ｃａｓ１２ｗｓ、Ｃａｓ１２ｗｔ、Ｃａｓ１２ｗｕ、Ｃａｓ１２ｗｖ、Ｃａｓ１２ｗｗ、Ｃａｓ１２ｗｘ、Ｃａｓ１２ｗｙ、Ｃａｓ１２ｗｚ、Ｃａｓ１２ｘａ、Ｃａｓ１２ｘｂ、Ｃａｓ１２ｘｃ、Ｃａｓ１２ｘｄ、Ｃａｓ１２ｘｅ、Ｃａｓ１２ｘｆ、Ｃａｓ１２ｘｇ、Ｃａｓ１２ｘｈ、Ｃａｓ１２ｘｉ、Ｃａｓ１２ｘｊ、Ｃａｓ１２ｘｋ、Ｃａｓ１２ｘｌ、Ｃａｓ１２ｘｍ、Ｃａｓ１２ｘｎ、Ｃａｓ１２ｘｏ、Ｃａｓ１２ｘｐ、Ｃａｓ１２ｘｑ、Ｃａｓ１２ｘｒ、Ｃａｓ１２ｘｓ、Ｃａｓ１２ｘｔ、Ｃａｓ１２ｘｕ、Ｃａｓ１２ｘｖ、Ｃａｓ１２ｘｗ、Ｃａｓ１２ｘｘ、Ｃａｓ１２ｘｙ、Ｃａｓ１２ｘｚ、Ｃａｓ１２ｙａ、Ｃａｓ１２ｙｂ、Ｃａｓ１２ｙｃ、Ｃａｓ１２ｙｄ、Ｃａｓ１２ｙｅ、Ｃａｓ１２ｙｆ、Ｃａｓ１２ｙｇ、Ｃａｓ１２ｙｈ、Ｃａｓ１２ｙｉ、Ｃａｓ１２ｙｊ、Ｃａｓ１２ｙｋ、Ｃａｓ１２ｙｌ、Ｃａｓ１２ｙｍ、Ｃａｓ１２ｙｎ、Ｃａｓ１２ｙｏ、Ｃａｓ１２ｙｐ、Ｃａｓ１２ｙｑ、Ｃａｓ１２ｙｒ、Ｃａｓ１２ｙｓ、Ｃａｓ１２ｙｔ、Ｃａｓ１２ｙｕ、Ｃａｓ１２ｙｖ、Ｃａｓ１２ｙｗ、Ｃａｓ１２ｙｘ、Ｃａｓ１２ｙｙ、Ｃａｓ１２ｙｚ、Ｃａｓ１２ｚａ、Ｃａｓ１２ｚｂ、Ｃａｓ１２ｚｃ、Ｃａｓ１２ｚｄ、Ｃａｓ１２ｚｅ、Ｃａｓ１２ｚｆ、Ｃａｓ１２ｚｇ、Ｃａｓ１２ｚｈ、Ｃａｓ１２ｚｉ、Ｃａｓ１２ｚｊ、Ｃａｓ１２ｚｋ、Ｃａｓ１２ｚｌ、Ｃａｓ１２ｚｍ、Ｃａｓ１２ｚｎ、Ｃａｓ１２ｚｏ、Ｃａｓ１２ｚｐ、Ｃａｓ１２ｚｑ、Ｃａｓ１２ｚｒ、Ｃａｓ１２ｚｓ、Ｃａｓ１２ｚｔ、Ｃａｓ１２ｚｕ、Ｃａｓ１２ｚｖ、Ｃａｓ１２ｚｗ、Ｃａｓ１２ｚｘ、Ｃａｓ１２ｚｙ、Ｃａｓ１２ｚｚ、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ１、Ｃａｓ１３ｂ２、Ｃａｓ１３ｃ、Ｃａｓ１３ｄ、Ｃａｓ１４ａ１、Ｃａｓ１４ａ２、Ｃａｓ１４ｂ１、Ｃａｓ１４ｂ２、Ｃａｓ１４ｃ１、Ｃａｓ１４ｃ２、Ｃａｓ１４ｄ１、Ｃａｓ１４ｄ２、Ｃａｓ１４ｅ１、Ｃａｓ１４ｅ２、Ｃａｓ１４ｅ３、Ｃａｓ１４ｅ４、Ｃａｓ１４ｅ５、Ｃａｓ１４ｅ６、Ｃａｓ１４ｆ１、Ｃａｓ１４ｆ２、Ｃａｓ１４ｇ１、Ｃａｓ１４ｇ２、Ｃａｓ１４ｈ１、Ｃａｓ１４ｈ２、Ｃａｓ１４ｉ１、Ｃａｓ１４ｉ２、Ｃａｓ１４ｊ１、Ｃａｓ１４ｊ２、Ｃａｓ１４ｋ１、Ｃａｓ１４ｋ２、Ｃａｓ１４ｌ１、Ｃａｓ１４ｌ２、Ｃａｓ１４ｍ１、Ｃａｓ１４ｍ２、Ｃａｓ１４ｎ１、Ｃａｓ１４ｎ２、Ｃａｓ１４ｏ１、Ｃａｓ１４ｏ２、Ｃａｓ１４ｐ１、Ｃａｓ１４ｐ２、Ｃａｓ１４ｑ１、Ｃａｓ１４ｑ２、Ｃａｓ１４ｒ１、Ｃａｓ１４ｒ２、Ｃａｓ１４ｓ１、Ｃａｓ１４ｓ２、Ｃａｓ１４ｔ１、Ｃａｓ１４ｔ２、Ｃａｓ１４ｕ１、Ｃａｓ１４ｕ２、Ｃａｓ１４ｖ１、Ｃａｓ１４ｖ２、Ｃａｓ１４ｗ１、Ｃａｓ１４ｗ２、Ｃａｓ１４ｘ１、Ｃａｓ１４ｘ２、Ｃａｓ１４ｙ１、Ｃａｓ１４ｙ２、Ｃａｓ１４ｚ１、Ｃａｓ１４ｚ２、Ｃａｓ１５ａ１、Ｃａｓ１５ａ２、Ｃａｓ１５ｂ１、Ｃａｓ１５ｂ２、Ｃａｓ１５ｃ１、Ｃａｓ１５ｃ２、Ｃａｓ１５ｄ１、Ｃａｓ１５ｄ２、Ｃａｓ１５ｅ１、Ｃａｓ１５ｅ２、Ｃａｓ１５ｆ１、Ｃａｓ１５ｆ２、Ｃａｓ１５ｇ１、Ｃａｓ１５ｇ２、Ｃａｓ１５ｈ１、Ｃａｓ１５ｈ２、Ｃａｓ１５ｉ１、Ｃａｓ１５ｉ２、Ｃａｓ１５ｊ１、Ｃａｓ１５ｊ２、Ｃａｓ１５ｋ１、Ｃａｓ１５ｋ２、Ｃａｓ１５ｌ１、Ｃａｓ１５ｌ２、Ｃａｓ１５ｍ１、Ｃａｓ１５ｍ２、Ｃａｓ１５ｎ１、Ｃａｓ１５ｎ２、Ｃａｓ１５ｏ１、Ｃａｓ１５ｏ２、Ｃａｓ１５ｐ１、Ｃａｓ１５ｐ２、Ｃａｓ１５ｑ１、Ｃａｓ１５ｑ２、Ｃａｓ１５ｒ１、Ｃａｓ１５ｒ２、Ｃａｓ１５ｓ１、Ｃａｓ１５ｓ２、Ｃａｓ１５ｔ１、Ｃａｓ１５ｔ２、Ｃａｓ１５ｕ１、Ｃａｓ１５ｕ２、Ｃａｓ１５ｖ１、Ｃａｓ１５ｖ２、Ｃａｓ１５ｗ１、Ｃａｓ１５ｗ２、Ｃａｓ１５ｘ１、Ｃａｓ１５ｘ２、Ｃａｓ１５ｙ１、Ｃａｓ１５ｙ２、Ｃａｓ１５ｚ１、Ｃａｓ１５ｚ２、Ｃａｓ１６ａ１、Ｃａｓ１６ａ２、Ｃａｓ１６ｂ１、Ｃａｓ１６ｂ２、Ｃａｓ１６ｃ１、Ｃａｓ１６ｃ２、Ｃａｓ１６ｄ１、Ｃａｓ１６ｄ２、Ｃａｓ１６ｅ１、Ｃａｓ１６ｅ２、Ｃａｓ１６ｆ１、Ｃａｓ１６ｆ２、Ｃａｓ１６ｇ１、Ｃａｓ１６ｇ２、Ｃａｓ１６ｈ１、Ｃａｓ１６ｈ２、Ｃａｓ１６ｉ１、Ｃａｓ１６ｉ２、Ｃａｓ１６ｊ１、Ｃａｓ１６ｊ２、Ｃａｓ１６ｋ１、Ｃａｓ１６ｋ２、Ｃａｓ１６ｌ１、Ｃａｓ１６ｌ２、Ｃａｓ１６ｍ１、Ｃａｓ１６ｍ２、Ｃａｓ１６ｎ１、Ｃａｓ１６ｎ２、Ｃａｓ１６ｏ１、Ｃａｓ１６ｏ２、Ｃａｓ１６ｐ１、Ｃａｓ１６ｐ２、Ｃａｓ１６ｑ１、Ｃａｓ１６ｑ２、Ｃａｓ１６ｒ１、Ｃａｓ１６ｒ２、Ｃａｓ１６ｓ１、Ｃａｓ１６ｓ２、Ｃａｓ１６ｔ１、Ｃａｓ１６ｔ２、Ｃａｓ１６ｕ１、Ｃａｓ１６ｕ２、Ｃａｓ１６ｖ１、Ｃａｓ１６ｖ２、Ｃａｓ１６ｗ１、Ｃａｓ１６ｗ２、Ｃａｓ１６ｘ１、Ｃａｓ１６ｘ２、Ｃａｓ１６ｙ１、Ｃａｓ１６ｙ２、Ｃａｓ１６ｚ１、Ｃａｓ１６ｚ２、Ｃａｓ１７ａ１、Ｃａｓ１７ａ２、Ｃａｓ１７ｂ１、Ｃａｓ１７ｂ２、Ｃａｓ１７ｃ１、Ｃａｓ１７ｃ２、Ｃａｓ１７ｄ１、Ｃａｓ１７ｄ２、Ｃａｓ１７ｅ１、Ｃａｓ１７ｅ２、Ｃａｓ１７ｆ１、Ｃａｓ１７ｆ２、Ｃａｓ１７ｇ１、Ｃａｓ１７ｇ２、Ｃａｓ１７ｈ１、Ｃａｓ１７ｈ２、Ｃａｓ１７ｉ１、Ｃａｓ１７ｉ２、Ｃａｓ１７ｊ１、Ｃａｓ１７ｊ２、Ｃａｓ１７ｋ１、Ｃａｓ１７ｋ２、Ｃａｓ１７ｌ１、Ｃａｓ１７ｌ２、Ｃａｓ１７ｍ１、Ｃａｓ１７ｍ２、Ｃａｓ１７ｎ１、Ｃａｓ１７ｎ２、Ｃａｓ１７ｏ１、Ｃａｓ１７ｏ２、Ｃａｓ１７ｐ１、Ｃａｓ１７ｐ２、Ｃａｓ１７ｑ１、Ｃａｓ１７ｑ２、Ｃａｓ１７ｒ１、Ｃａｓ１７ｒ２、Ｃａｓ１７ｓ１、Ｃａｓ１７ｓ２、Ｃａｓ１７ｔ１、Ｃａｓ１７ｔ２、Ｃａｓ１７ｕ１、Ｃａｓ１７ｕ２、Ｃａｓ１７ｖ１、Ｃａｓ１７ｖ２、Ｃａｓ１７ｗ１、Ｃａｓ１７ｗ２、Ｃａｓ１７ｘ１、Ｃａｓ１７ｘ２、Ｃａｓ１７ｙ１、Ｃａｓ１７ｙ２、Ｃａｓ１７ｚ１、Ｃａｓ１７ｚ２、Ｃａｓ１８ａ１、Ｃａｓ１８ａ２、Ｃａｓ１８ｂ１、Ｃａｓ１８ｂ２、Ｃａｓ１８ｃ１、Ｃａｓ１８ｃ２、Ｃａｓ１８ｄ１、Ｃａｓ１８ｄ２、Ｃａｓ１８ｅ１、Ｃａｓ１８ｅ２、Ｃａｓ１８ｆ１、Ｃａｓ１８ｆ２、Ｃａｓ１８ｇ１、Ｃａｓ１８ｇ２、Ｃａｓ１８ｈ１、Ｃａｓ１８ｈ２、Ｃａｓ１８ｉ１、Ｃａ

％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５８６１～５８６６又は５８６８～５８６９のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５８６１～５８６６又は５８６８～５８６９のうちのいずれか１つを標的とする、表４３Ａからのガイドの配列のうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００３５】

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を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５９５３～６０３０のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５８７５～５９５２のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５９５５～５９６３、５９６８～５９７５、５９７９～５９８７、５９８９～５９９３、５９９７、５９９９、６００３～６０１０、６０１４～６０１６、６０２４～６０２５、又は６０２７～６０３０のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５９５５～５９６３、５９６８～５９７５、５９７９～５９８７、５９８９～５９９３、５９９７、５９９９、６００３～６０１０、６０１４～６０１６、６０２４～６０２５、又は６０２７～６０３０のうちのいずれか１つを標的とする、表４３ＢからのガイドＲＮＡのうちのいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００３６】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるヒトＲｏｓａ２６遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＶと、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡとを導入することを含み、操作されたガイドＲＮＡは、エンドヌクレアーゼＶ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、ヒトＲｏｓａ２６遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５０１３～５０５５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４９７０～５０１２のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼＶは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、細胞は、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００３７】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＦＡＳ遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、ＦＡＳ遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５３６７～５４６５のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５２６８～５３６６のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、細胞は、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００３８】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるＰＤ－１遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、ＰＤ－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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５４７４～５４８１のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも２０～２２個の連続するヌクレオチド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か、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号５４６６～５４７３のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配

列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、細胞は、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００３９】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）配列番号２１５のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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スペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を提供し、系は、Ｃａｓ９酵素を含む同等の系と比較して、ヒト対象に投与されたときに低減された免疫原性を有する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９酵素は、ＳｐＣａｓ９酵素である。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、免疫原性は、抗体免疫原性である。

【００４０】

本開示の態様は、細胞におけるマウスＨＡＯ－１遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、マウス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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、表２５に記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２５からのガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－１＿３７、ｍＨ２９－１５＿３７、ｍＨ２９－２９＿３７のヌクレオチドを含むか、又は操作されたガイドＲＮＡは、配列番号４１８４～４２２５のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、細胞は、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、表２５に記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２５からのガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－１５＿３７又はｍＨ２９－２９＿３７のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＨＡＯ－１遺伝子座からのグリコール酸オキシダーゼの発現を破壊することを更に含む。

【００４１】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるヒトＴＲＡＣ遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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、ヒト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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、表２８Ｂに記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２８ＢからのＭＧ２９－１－ＴＲＡＣ－ｓｇＲＮＡ－３５のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、細胞は、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。

【００４２】

本開示の態様は、細胞におけるアルブミン遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（ａ）クラス２、Ｖ型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み、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ているスペーサー配列を含み、操作されたガイドＲＮＡは、表２９に記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２９からのｍＡｌｂ２９８－３７、ｍＡｌｂ２９１２－３７、ｍＡｌｂ２９１８－３７、若しくはｍＡｌｂ２９８－３４のヌクレオチドを含むか、又は操作されたガイドヌクレオチドＲＮＡは、表４６に記載されるヌクレオチド修飾を含むｍＡｌｂ２９－８－４４、ｍＡｌｂ２９－８－５０、ｍＡｌｂ２９－８－５０ｂ、ｍＡｌｂ２９－８－５１ｂ、ｍＡｌｂ２９－８－５２ｂ、ｍＡｌｂ２９－８－５３ｂ若しくはｍＡｌｂ２９－８－５４ｂのヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちの

いずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、又は６０３３～６０３６のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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ＲＮＡは、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも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、細胞は、真核細胞、肝細胞、Ｔ細胞、造血幹細胞、又はそれらの前駆体である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドＲＮＡは、表２９に記載されるヌクレオチド修飾を含む、表２９からのｍＡｌｂ２９８－３７、ｍＡｌｂ２９１２－３７、ｍＡｌｂ２９１８－３７、又はｍＡｌｂ２９８－３４のヌクレオチドを含む。

【００４３】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）標的ＤＮＡ分子中の標的配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメントと、（ｂ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼに結合するように構成されているタンパク質結合セグメントとを含む操作されたガイドＲＮＡを提供し、ガイドＲＮＡは、表３４の配列番号５６９５～５７０１のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド修飾パターンを含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、ｍＡｌｂ２９－８－４４、ｍＡｌｂ２９－８－５０、ｍＡｌｂ２９－８－３７、又はｍＡｌｂ２９－１２－４４を含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、ｈＨ２９－４＿５０、ｈＨ２９－２１＿５０、ｈＨ２９－２３＿５０、ｈＨ２９－４１＿５０、ｈＨ２９－４＿５０ｂ、ｈＨ２９－２１＿５０ｂ、ｈＨ２９－２３＿５０ｂ、又はｈＨ２９－４１＿５０ｂ、ｍＨ２９－１－５０、ｍＨ２９－１５－５０、ｍＨ２９－２９－５０、ｍＨ２９－１－５０ｂ、ｍＨ２９－１５－５０ｂ、又はｍＨ２９－２９－５０ｂを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ標的化セグメントは、ＨＡＯ－１遺伝子又はアルブミン遺伝子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、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号２１５と少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む。

【００４４】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、（ｂ）ＣＲＩＳＰＲアレイをコードするポリヌクレオチド配列とを含む操作されたヌクレアーゼ系を提供し、ＣＲＩＳＰＲアレイは、エンドヌクレアーゼによって操作されたガイドＲＮＡに処理されるように構成されており、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、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スペーサー配列を含み、スペーサー配列は、アルブミン遺伝子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、ポリヌクレオチド配列は、配列番号５７１２と少なくとも約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、エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２２のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも

７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む。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２１５と少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む。

【００４５】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）配列番号４７０又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する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スペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡ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、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号６０３１と少なくとも約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、エンドヌクレアーゼは、配列番号６０３２を含む５’ＰＡＭ配列に対する選択的であるように構成されている。

【００４６】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）配列番号２８２４、２８４１、又は２８９６のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、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％の配列同一性を有する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スペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む操作されたヌクレアーゼ系を提供し、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号６０３３、６０３４、又は６０３５のうちのいずれか１つと少なくとも約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、エンドヌクレアーゼは、配列番号２８２４と少なくとも８０％の配列同一性を有し、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号６０３３と少なくとも８０％の配列同一性を有する。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２８４１と少なくとも８０％の配列同一性を有し、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号６０３４と少なくとも８０％の配列同一性を有する。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２８９６と少なくとも８０％の配列同一性を有し、操作されたガイドＲＮＡは、配列番号６０３５と少なくとも８０％の配列同一性を有する。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６０３７～６０３９のうちのいずれか１つを含む５’ＰＡＭ配列に対する選択的であるように構成されている。

【００４７】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）本明細書に記載のエンドヌクレアーゼのうちのいずれか、（ｂ）本明細書に記載の操作されたガイドＲＮＡのうちのいずれか、（ｃ）カチオン性脂質、（ｄ）ステロール、（ｅ）中性脂質、及び（ｆ）ＰＥＧ修飾脂質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１０９に示されるカチオン性脂質のうちのいずれかを含む。

【００４８】

本開示の更なる態様及び利点は、以下の詳細な説明から、当業者に容易に明らかになり、ここで、本開示の例示的な実施形態のみが示され、記載される。理解されるように、本開示は、他の異なる実施形態をすることができ、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改変することができる。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、制限としてみなされるべきではない。

【００４９】

参照による組み込み

本明細書において言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許、又は特許出願が、参照により組み込まれるべきことが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【００５０】

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲に特記して記載される。本発明の特徴及び利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することによって得られるだろう。

【００５１】

【図１】本開示の前に以前に文書化された異なるクラス及びタイプのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ遺伝子座の例示的な組織を示す。

【図２】本明細書に記載されるＭＧヌクレアーゼの環境分布を示す。タンパク質長は、ＭＧ２９タンパク質ファミリーの代表について示されている。円の影は、各タンパク質が特定された環境又は環境タイプを示す（濃い灰色の円は高温環境源を示し、淡い灰色の円は非高温環境源を示す）。Ｎ／Ａは、試料が収集された環境のタイプが不明であることを示す。

【図３】本明細書に記載される試料タイプから検出されたＭＧヌクレアーゼに存在する予測された触媒残基の数を示す（例えば図）。タンパク質長は、ＭＧ２９タンパク質ファミリーの代表について示されている。各タンパク質について予測された触媒残基の数を、図の凡例（３．０残基）に示す。第１、第２、及び第３の触媒残基は、それぞれ、ＲｕｖＣＩドメイン、ＲｕｖＣＩＩドメイン、及びＲｕｖＣＩＩＩドメインに位置する。

【図４Ａ】ＣＲＩＳＰＲ　Ｖ－Ａ型エフェクターの多様性を示す。図４Ａは、新規のＶ－Ａ型エフェクターをコードするコンティグの分類学的分類のファミリー毎の分布を示す。ＭＧファミリーは、括弧内に示される。活性ヌクレアーゼのＰＡＭ要件は、ファミリーに関連付けられた箱で概説されている。非Ｖ－Ａ型参照配列を使用して、遺伝子系統樹に根を付けた（＊ＭＧ６１ファミリーは、代替的なステム－ループ配列を有するｃｒＲＮＡを必要とする）。

【図４Ｂ】ＣＲＩＳＰＲ　Ｖ－Ａ型エフェクターの多様性を示す。図４Ｂは、１１９個の新規及び８９個の参照Ｖ型エフェクター配列のアラインメントから推定される遺伝子系統樹を示す。ＭＧファミリーは、括弧内に示される。活性ヌクレアーゼのＰＡＭ要件は、ファミリーに関連付けられた箱で概説されている。非Ｖ－Ａ型参照配列を使用して、遺伝子系統樹に根を付けた（＊ＭＧ６１ファミリーは、代替的なステム－ループ配列を有するｃｒＲＮＡを必要とする）。

【図５Ａ】本明細書に記載されるヌクレアーゼに関する様々な特徴的な情報を提供する。図５Ａは、エフェクタータンパク質の長さのファミリー毎の分布及び試料のタイプを示す。

【図５Ｂ】本明細書に記載されるヌクレアーゼに関する様々な特徴的な情報を提供する。図５Ｂは、ＲｕｖＣ触媒残基の存在を示す。

【図５Ｃ】本明細書に記載されるヌクレアーゼに関する様々な特徴的な情報を提供する。図５Ｃは、様々な反復モチーフを有するＣＲＩＳＰＲアレイの数を示す。

【図５Ｄ】本明細書に記載されるヌクレアーゼに関する様々な特徴的な情報を提供する。図５Ｄは、反復モチーフのファミリー毎の分布を示す。

【図６Ａ】Ｖ－Ａ型配列における触媒及びＰＡＭ相互作用領域の複数の配列アラインメントを示す。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｃａｓ１２ａ（ＦｎＣａｓ１２）は、参照配列である。他の参照配列は、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．（ＡｓＣａｓ１２ａ）、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ　ｂｏｖｏｃｕｌｉ（ＭｂＣａｓ１２ａ）、及び

Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６（ＬｂＣａｓ１２ａ）である。図６Ａは、ＲｕｖＣ－Ｉ（左）、ＲｕｖＣ－ＩＩ（中央）、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩ（右）の領域におけるＤＥＤ触媒残基の周りの保存のブロックを示す。ＦｎＣａｓ１２ａ配列の下の灰色の箱は、ドメインを特定する。

【図６Ｂ】Ｖ－Ａ型配列における触媒及びＰＡＭ相互作用領域の複数の配列アラインメントを示す。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｃａｓ１２ａ（ＦｎＣａｓ１２）は、参照配列である。他の参照配列は、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．（ＡｓＣａｓ１２ａ）、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（ＭｂＣａｓ１２ａ）、及びＬａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６（ＬｂＣａｓ１２ａ）である。図６Ｂは、ＰＡＭ認識及び相互作用に関与する残基を含むＷＥＤ－ＩＩ及びＰＡＭ相互作用領域を示す。ＦｎＣａｓ１２ａ配列の下の灰色の箱は、ドメインを特定する。アラインメント内の暗い箱は、配列同一性の増加を示す。ＦｎＣａｓ１２ａ配列上の黒色の箱は、参照配列の触媒残基（及び位置）を示す。灰色の箱は、アラインメントの上部の参照配列のドメインを示す（ＦｎＣａｓ１２ａ）。黒色の箱は、参照配列の触媒残基（及び位置）を示す。

【図７Ａ】Ｖ－Ａ型及び関連するＶ－Ａ’エフェクターを示す。図７Ａは、転写の方向を示す矢印によって示されるＶ－Ａ型（ＭＧ２６－１）及びＶ－Ａ’型（ＭＧ２６－２）を示す。ＣＲＩＳＰＲアレイは、灰色のバーで示されている。コンティグ内の各タンパク質の予測されたドメインは、箱で示されている。

【図７Ｂ】Ｖ－Ａ型及び関連するＶ－Ａ’エフェクターを示す。図７Ｂは、Ｖ－Ａ’型ＭＧ２６－２及びＡｓＣａｓ１２ａ参照配列の配列アラインメントを示す。上：ＲｕｖＣ－Ｉドメイン。中央：ＲｕｖＣ－Ｉ及びＲｕｖＣ－ＩＩ触媒残基を含む領域。下：ＲｕｖＣ－ＩＩＩ触媒残基を含む領域。触媒残基は四角で示されている。

【図８】ＡａｃＣ２Ｃ１との三重複合体におけるｓｇＲＮＡ及び標的ＤＮＡの構造の概略図を示す（Ｙａｎｇ，Ｈｕｉ，Ｐｕ Ｇａｏ，Ｋａｎａｇａｌａｇｈａｔｔａ Ｒ．Ｒａｊａｓｈａｎｋａｒ，ａｎｄ Ｄｉｎｓｈａｗ Ｊ．Ｐａｔｅｌ．２０１６．“ＰＡＭ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｔａｒｇｅｔ ＤＮＡ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｌｅａｖａｇｅ ｂｙ Ｃ２ｃ１ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ．”Ｃｅｌｌ １６７（７）：１８１４－２８．ｅ１２を参照されたく、当該文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【図９】ｓｇＲＮＡのＲ－ＡＲドメインにおける変異又は切断が、直鎖プラスミドＤＮＡのＡａｃＣ２ｃ１媒介性切断に及ぼす影響を示す；ＷＴ、野生型ｓｇＲＮＡ。ｓｇＲＮＡ内の変異体ヌクレオチド（レーン１～５）は、左側のパネルで強調表示されている。Δ１５：ｓｇＲＮＡ Ｒ－ＡＲ１領域から１５ｎｔ欠失。Δ１２：１２ｎｔは、ｓｇＲＮＡ Ｊ２／４ Ｒ－ＡＲ １領域から除去されている（Ｌｉｕ，Ｌｉａｎｇ，Ｐｅｎｇ Ｃｈｅｎ，Ｍｉｎ Ｗａｎｇ，Ｘｕｅｙａｎ Ｌｉ，Ｊｉｕｙｕ Ｗａｎｇ，Ｍａｏｌｕ Ｙｉｎ，ａｎｄ Ｙａｎｌｉ Ｗａｎｇ．２０１７．“Ｃ２ｃ１－ｓｇＲＮＡ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ｒｅｖｅａｌｓ ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ ＤＮＡ Ｃｌｅａｖａｇｅ Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ．”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ ６５（２）：３１０－２２を参照されたく、当該文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【図１０Ａ】ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）構造がＶ－Ａ型系の間で保存されていることを示す。図１０Ａは、ＬｂＣｐｆ１系における参照ｃｒＲＮＡ配列の構造倍率を示す。

【図１０Ｂ】ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）構造がＶ－Ａ型系の間で保存されていることを示す。図１０Ｂは、新規のＶ－Ａ型系に関連するＣＲＩＳＰＲ反復の複数の配列アラインメントを示す。ＬｂＣｐｆ１処理部位は黒色のバーで示されている。

【図１０Ｃ】ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）構造がＶ－Ａ型系の間で保存されていることを示す。図１０Ｃは、代替的なステム－ループモチーフＣＣＵＧＣ［Ｎ$_{3-4}$］ＧＣＡＧＧを有するＭＧ６１－２推定ｃｒＲＮＡの構造倍率を示す。

【図１０Ｄ】ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）構造がＶ－Ａ型系の間で保存されてい

ることを示す。図１０Ｄは、代替的な反復モチーフ配列とのＣＲＩＳＰＲ反復の複数の配列アラインメントを示す。処理部位及びループが示されている。
【図１１】本明細書で利用されるガイドＲＮＡの予測された構造を示す（配列番号３６０８）。
【図１２－１】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６３６、３６３７、３６４１、３６４０）。
【図１２－２】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６３６、３６３７、３６４１、３６４０）。
【図１３－１】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６４４、３６４５、３６４９、３６４８）。
【図１３－２】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６４４、３６４５、３６４９、３６４８）。
【図１４－１】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６５２、３６５３、３６５７、３６５６）。
【図１４－２】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６５２、３６５３、３６５７、３６５６）。
【図１５－１】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６６０、３６６１、３６６５、３６６４）。
【図１５－２】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６６０、３６６１、３６６５、３６６４）。
【図１６－１】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６６６、３６６７、３６７２、３６７１）。
【図１６－２】本明細書に記載されるＭＧ酵素の対応するｓｇＲＮＡの予測された構造を示す（時計回りで、配列番号３６６６、３６６７、３６７２、３６７１）。
【図１７Ａ】様々なＭＧファミリーヌクレアーゼ及びそれらの対応するｔｒａｃｒＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを含むＴＸＴＬ抽出物の存在下でのＰＡＭベクターライブラリー切断の結果を示すアガロースゲルを示す（実施例１２に記載される）。図１７Ａは、レーン１：はしごを示す。バンドは、上から下に、７６６、５００、３５０、３００、３５０、２００、１５０、１００、７５、５０である；レーン２：２８－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー１（配列番号１４１＋３８６０）；レーン３：２９－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー１（配列番号２１５＋３８６０）；レーン４：３０－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー１（配列番号２２６＋３８６０）；レーン５：３１－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー１（配列番号２２９＋３８６０）；レーン６：３２－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー１（配列番号２６１＋３８６０）；レーン７：はしご。
【図１７Ｂ】様々なＭＧファミリーヌクレアーゼ及びそれらの対応するｔｒａｃｒＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを含むＴＸＴＬ抽出物の存在下でのＰＡＭベクターライブラリー切断の結果を示すアガロースゲルを示す（実施例１２に記載される）。図１７Ｂは、レーン１：はしご；レーン２：ＬｂａＣａｓ１２ａ＋ＬｂａＣａｓ１２ａ　ｃｒＲＮＡスペーサー２；レーン３：ＬｂａＣａｓ１２ａ＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー２；レーン４：Ａｐｏ　１３－１；レーン５：２８－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー２（配列番号１４１＋３８６１）；レーン６：２９－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー２（配列番号２１５＋３８６１）；レーン７：３０－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー２（配列番号２２６＋３８６１）；レーン８：３１－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー２（配列番号２２９＋３８６１）；レーン９：３２－１＋ＭＧｃｒＲＮＡスペーサー２（配列番号２６１＋３８６１）
【図１８Ａ－１】本明細書に記載されるＶ－Ａ型エフェクターが活性ヌクレアーゼであることを示すデータを提供する。図１８Ａ－１は、本明細書に記載される３つのヌクレアーゼについて決定されたＰＡＭ配列のｓｅｑＬｏｇｏ表現を示す。
【図１８Ａ－２】本明細書に記載されるＶ－Ａ型エフェクターが活性ヌクレアーゼであることを示すデータを提供する。図１８Ａ－２は、本明細書に記載される３つのヌクレアーゼについて決定されたＰＡＭ配列のｓｅｑＬｏｇｏ表現を示す。

【図１８Ｂ】本明細書に記載されるＶ－Ａ型エフェクターが活性ヌクレアーゼであることを示すデータを提供する。図１８Ｂは、活性ヌクレアーゼについてのインデル編集の頻度から推定されるプラスミドトランスフェクション活性アッセイの箱ひげ図を示す。箱ひげ図の境界は、第１及び第３四分位値を示す。平均は「ｘ」で示され、中央値は各箱内の正中線で表される。
【図１８Ｃ】本明細書に記載されるＶ－Ａ型エフェクターが活性ヌクレアーゼであることを示すデータを提供する。図１８Ｃは、ＭＧ２９－１及びＡｓＣａｓ１２ａの４つの標的部位でのプラスミドトランスフェクション編集頻度を示す。ＡｓＣａｓ１２ａを用いた１つの比較実験を行った。図１８Ｃ及び図１８Ｄが示すバープロットは、１つの標準偏差エラーバーを有する平均編集頻度を示す。
【図１８Ｄ】本明細書に記載されるＶ－Ａ型エフェクターが活性ヌクレアーゼであることを示すデータを提供する。図１８Ｄは、ＴＴＮ又はＣＣＮ　ＰＡＭのいずれかを有する１４の標的遺伝子座におけるヌクレアーゼＭＧ２９－１のプラスミド及びＲＮＰ編集活性を示す。図１８Ｃ及び図１８Ｄが示すバープロットは、１つの標準偏差エラーバーを有する平均編集頻度を示す。
【図１８Ｅ】本明細書に記載されるＶ－Ａ型エフェクターが活性ヌクレアーゼであることを示すデータを提供する。図１８Ｅは、ＲＮＰトランスフェクションアッセイからのヌクレアーゼＭＧ２９－１の編集プロファイルを示す。ＡｓＣａｓ１２ａを用いた１つの比較実験を行った。ＭＧ２９－１の編集頻度及びプロファイル実験を２つ組で行った。
【図１９】ヒトゲノム中の様々な位置を標的とする様々な異なる標的化配列を含む対応するｓｇＲＮＡとともに、実施例１２に記載されるＭＧ２９－１構築物を用いたＨＥＫ細胞のトランスフェクションによって生成された細胞インデル形成を示す。
【図２０】本明細書に記載される（実施例１３に記載される）ＮＧＳを介して誘導される特定のＭＧファミリー酵素のＰＡＭ配列のｓｅｑＬｏｇｏ表現を示す。
【図２１】配列番号本明細書に記載されるＮＧＳを介して誘導される特定のＭＧファミリー酵素のＰＡＭ配列のｓｅｑＬｏｇｏ表現を示す（上から下に、３８６５、３８６７、３８７２）。
【図２２】本明細書に記載されるＮＧＳを介して誘導されるＰＡＭ配列のｓｅｑＬｏｇｏ表現を示す（上から下に、配列番号３８７８、３８７９、３８８０、３８８１）。
【図２３】本明細書に記載されるＮＧＳを介して誘導されるＰＡＭ配列のｓｅｑＬｏｇｏ表現を示す（上から下に、配列番号３８８３、３８８４、３８８５）。
【図２４】本明細書に記載されるＮＧＳを介して誘導されるＰＡＭ配列のｓｅｑＬｏｇｏ表現を示す（配列番号３８８２）。
【図２５】ヒトゲノム中の様々な位置を標的とする様々な異なる標的化配列を含む対応するｓｇＲＮＡとともに、実施例１４に記載されるＭＧ３１－１構築物を用いたＨＥＫ細胞のトランスフェクションによって生成された細胞インデル形成を示す。
【図２６Ａ】Ｖ－Ａ型ヌクレアーゼの生化学的特徴付けを示す。図２６Ａは、ユニバーサルｃｒＲＮＡに結合されたときの本明細書に記載されるヌクレアーゼ及びＣｐｆ１（陽性対照）の活性を示す、それらの末端にライゲーションされたアダプターを有する切断産物のＰＣＲを示す。予期された切断産物バンドは矢印で標識されている。
【図２６Ｂ】Ｖ－Ａ型ヌクレアーゼの生化学的特徴付けを示す。図２６Ｂは、天然ｃｒＲＮＡに結合されたときの本明細書に記載されるヌクレアーゼの活性を示す、それらの末端にライゲーションされたアダプターを有する切断産物のＰＣＲを示す。切断産物バンドは矢印で示されている。
【図２６Ｃ】Ｖ－Ａ型ヌクレアーゼの生化学的特徴付けを示す。図２６Ｃは、ＮＧＳ切断部位の分析が、２２位の標的鎖上の切断を示し、時には２１又は２３ｎｔ後の切断頻度が低いことを示すことを示す。
【図２７Ａ】（図２７Ａ）Ｖ－Ｌ型ヌクレアーゼの例示的な遺伝子座構成を示す、本明細書に記載されるＶ－Ｌ型ヌクレアーゼの複数の配列アラインメント、及び（図２７Ｂ）複数の配列アラインメントを示す。推定ＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインを含む領域は、淡い灰色

の長方形として示されている。推定ＲｕｖＣ触媒残基は、各配列の上に小さな暗い灰色の長方形として示されている。推定一本鎖ＲＮＡ結合配列は、小さな白色の長方形であり、切断可能な推定リン酸結合部位は、配列上の黒色の長方形で示され、標的配列における切断可能なリン酸塩付近の塩基スタッキングを破壊すると予測される残基は、配列の上の小さな灰色みの長方形で示されている。

【図２７Ｂ】（図２７Ａ）Ｖ－Ｌ型ヌクレアーゼの例示的な遺伝子座構成を示す、本明細書に記載されるＶ－Ｌ型ヌクレアーゼの複数の配列アラインメント、及び（図２７Ｂ）複数の配列アラインメントを示す。推定ＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインを含む領域は、淡い灰色の長方形として示されている。推定ＲｕｖＣ触媒残基は、各配列の上に小さな暗い灰色の長方形として示されている。推定一本鎖ＲＮＡ結合配列は、小さな白色の長方形であり、切断可能な推定リン酸結合部位は、配列上の黒色の長方形で示され、標的配列における切断可能なリン酸塩付近の塩基スタッキングを破壊すると予測される残基は、配列の上の小さな灰色みの長方形で示されている。

【図２８】エフェクター反復構造、及びＶ型ファミリーにおける酵素の位置を示す系統樹に沿った例示的な遺伝子座構成としてＭＧ６０と標識されたＶ－Ｌ型候補を示す。

【図２９】より小さなＶ型エフェクターの例を示し、そのうちの１つはＭＧ７０として標識され得る。

【図３０－１】本明細書に記載されるＭＧ７０の特徴的な情報を示す。Ｖ型ファミリーにおけるこれらの酵素の位置を示す系統樹に沿った例示的な遺伝子座構成が図示されている。

【図３０－２】本明細書に記載されるＭＧ７０の特徴的な情報を示す。Ｖ型ファミリーにおけるこれらの酵素の位置を示す系統樹に沿った例示的な遺伝子座構成が図示されている。

【図３１－１】本明細書に記載される小さなＶ型エフェクターＭＧ８１の別の例を示す。Ｖ型ファミリーにおけるこれらの酵素の位置を示す系統樹に沿った例示的な遺伝子座構成が図示されている。

【図３１－２】本明細書に記載される小さなＶ型エフェクターＭＧ８１の別の例を示す。Ｖ型ファミリーにおけるこれらの酵素の位置を示す系統樹に沿った例示的な遺伝子座構成が図示されている。

【図３２】本明細書で特定されるＶ型エフェクターファミリー（例えば、ＭＧ２０、ＭＧ６０、ＭＧ７０、その他）の活性の個々の酵素が、様々な異なる酵素長（例えば、４００～１２００ＡＡ）にわたって維持されることを示す。明るい点（真）は活性酵素を示すが、一方で暗い点（未知）は未試験の酵素を示す。

【図３３】本明細書に記載されるＭＧヌクレアーゼの配列保存を示す。黒色のバーは、推定ＲｕｖＣ触媒残基を示す。

【図３４】推定ＲｕｖＣ触媒残基（濃い灰色の長方形）、切断可能なリン酸結合残基（黒色の長方形）、及び切断可能なリン酸塩に隣接した塩基スタッキングを破壊すると予測される残基（淡い灰色の長方形）を含む、本明細書に記載されるＭＧヌクレアーゼの領域の図３３の複数の配列アラインメントの拡大バージョンを示す。

【図３５】推定ＲｕｖＣ触媒残基（濃い灰色の長方形）、切断可能なリン酸結合残基（黒色の長方形）、及び切断可能なリン酸塩に隣接した塩基スタッキングを破壊すると予測される残基（淡い灰色の長方形）を含む、本明細書に記載されるＭＧヌクレアーゼの領域の図３３の複数の配列アラインメントの拡大バージョンを示す。

【図３６】推定ＲｕｖＣ－ＩＩＩドメイン及び触媒残基を含む、本明細書に記載されるＭＧヌクレアーゼの領域を示す。

【図３７】推定一本鎖ＲＮＡ結合残基（配列の上の白色の長方形）を含む、ＭＧヌクレアーゼの領域を示す。

【図３８】いくつかのＭＧ　Ｖ型ファミリーからの代表の複数のタンパク質配列アラインメントを示す。ヌクレアーゼ活性に関与すると予測されるＲｕｖＣドメインの一部を含む保存領域が示されている。予測された触媒残基が強調表示されている。

【図３９】ＭＧ２９－１遺伝子編集のためのＴＲＡＣ遺伝子座のスクリーニングを示す。棒グラフは、初代ヒトＴ細胞中のＴＲＡＣ遺伝子座を標的とする５４個の別個のガイドＲＮＡを用いたＭＧ２９－１のトランスフェクションから生じるインデル生成を示す。図に示される対応するガイドＲＮＡは、配列番号４３１６～４４２３で特定される。

【図４０】ＴＲＡＣにおけるＭＧ２９－１編集の最適化を示す。棒グラフは、図３９（９、１９、２５、及び３５）からの４個の最良の２２ｎｔガイドＲＮＡを用いたＭＧ２９－１のトランスフェクション（示される濃度で）から生じるインデル生成を示す。凡例：ＭＧ２９－１　９は、ＭＧ２９－１エフェクター（配列番号２１５）及びガイド９（配列番号４３７８）であり、ＭＧ２９－１　１９は、ＭＧ２９－１エフェクター（配列番号２１５）及びガイド１９（配列番号４３８８）であり、ＭＧ２９－１　２５は、ＭＧ２９－１エフェクター（配列番号２１５）及びガイド２５（配列番号４３９４）であり、ＭＧ２９－１　３５は、ＭＧ２９－１エフェクター（配列番号２１５）及びガイド３５（配列番号４４０４）である。

【図４１】ＴＲＡＣにおけるＭＧ２９－１編集の用量及びガイド長さの最適化を示す。線グラフは、ＭＧ２９－１及びガイドＲＮＡ＃１９（配列番号４３８８）又はガイドＲＮＡ＃３５（配列番号４４０４）のいずれかのトランスフェクションから生じるインデル生成を示す。ヌクレアーゼ／ガイドＲＮＡの３つの異なる用量を使用した。各用量について、６つの異なるガイド長、配列番号４３８８及び４４０４の連続する１つのヌクレオチド３’切断を試験した。図３９及び図４０で使用されるガイドは、この場合、２２ｎｔ長のスペーサー含有ガイドである。

【図４２】実施例２２の実験でのＴＲＡＣにおけるインデル生成とＴ細胞受容体発現の喪失との相関関係を示す。

【図４３】ＭＧ２９－１切断によって刺激されたＴＲＡＣにおける標的化導入遺伝子統合を示す。ＡＡＶ感染によって導入遺伝子ドナーのみを受けている細胞は、ＴＣＲ発現を保持し、ＣＡＲ発現を欠く。ＭＧ２９－１　ＲＮＰでトランスフェクトされ、１００，０００ｖｇ（ベクターゲノム）のＣＡＲ導入遺伝子ドナーに感染された細胞は、ＴＣＲ発現を失い、ＣＡＲ発現を得る。ＣＡＲ－Ｔ含有ドナー配列（ＡＡＶ）を含むＡＡＶのみ、ＭＧ２９－１酵素及びｓｇＲＮＡ　１９（配列番号４３８８）を含むＣＡＲ－Ｔ含有ドナー配列を含むＡＡＶ（２２ヌクレオチドスペーサーを含む「ＡＡＶ＋ＭＧ２９－１－１９－２２」）、又はＭＧ２９－１酵素及びｓｇＲＮＡ　３５（配列番号４４０４）を含むＣＡＲ－Ｔ含有ドナー配列を含むＡＡＶ（２２ヌクレオチドスペーサーを含む「ＡＡＶ＋ＭＧ２９－１－３５－２２」）でトランスフェクトされた細胞についてのＣＡＲ抗原結合対ＴＣＲ発現のＦＡＣＳプロットが示されている。

【図４４】造血幹細胞におけるＴＲＡＣでのＭＧ２９－１遺伝子編集を示す。棒グラフは、モックトランスフェクト細胞と比較した、ＭＧ２９－１－９－２２（「ＭＧ２９－１９」；ＭＧ２９－１＋ガイドＲＮＡ＃１９）及びＭＧ２９－１－３５－２２（「ＭＧ２９－１　３５」；ＭＧ２９－１＋ガイドＲＮＡ＃３５）を用いたトランスフェクション後のＴＲＡＣにおけるインデル生成の程度を示す。

【図４５】細胞における遺伝子編集結果の分析に基づく、ＭＧ２９－１　ＰＡＭの精緻化を示す。ガイドＲＮＡを、５’－ＮＴＴＮ－３’ＰＡＭ配列を使用して設計し、次いで、観察された遺伝子編集活性に従って分類した。下線付き塩基（５’－近位Ｎ）の同一性が、各ビンについて示されている。１０％を超える活性を有する全てのガイドは、ゲノムＤＮＡのこの位置にＴを有し、ＭＧ２９－１　ＰＡＭが５’－ＴＴＴＮ－３’として最良に説明され得ることを示す。この位置でのＴの過剰表現の統計的有意性が、各ビンについて示されている。

【図４６－１】ＭＧ２９－１スペーサー配列のベース組成物に対する遺伝子編集活性の分析を示す。棒グラフは、ＧＣ含量（％）とインデル頻度との間の関係を示す実験データを示す（「高」は、＞５０％のインデル（Ｎ＝４）を意味し、「中」は、１０～５０％のインデル（Ｎ＝１５）を意味し、「＞１％」は、１～５％のインデル（Ｎ＝１２）を意味し、「＜１％」は、１％未満のインデル（Ｎ＝８２）を意味する）。

【図４６－２】ＭＧ２９－１スペーサー配列のベース組成物に対する遺伝子編集活性の分析を示す。棒グラフは、ＧＣ含量（％）とインデル頻度との間の関係を示す実験データを示す（「高」は、＞５０％のインデル（Ｎ＝４）を意味し、「中」は、１０～５０％のインデル（Ｎ＝１５）を意味し、「＞１％」は、１～５％のインデル（Ｎ＝１２）を意味し、「＜１％」は、１％未満のインデル（Ｎ＝８２）を意味する）。
【図４７】ＭＧ２９－１ガイドＲＮＡ化学修飾を示す。棒グラフは、修飾されていないガイドＲＮＡ（試料＃１）と比較したＶＥＧＦ－Ａ編集活性に対する表７からの修飾の結果を示す。
【図４８－１】様々な化学的に修飾されたＭＧ２９－１　ＲＮＡの用量滴定を示す。棒グラフは、修飾パターン１、４、５、７、及び８を使用したガイドを有するＲＮＰのトランスフェクション後のインデル生成を示す。ＲＮＰ用量は、１２６ｐｍｏｌのＭＧ２９－１及び１６０ｐｍｏｌのガイドＲＮＡであるか、又は示されるとおりであった。全用量（Ａ）、１／４（Ｂ）、１／８（Ｃ）、１／１６（Ｄ）、及び１／３２（Ｅ）。
【図４８－２】様々な化学的に修飾されたＭＧ２９－１　ＲＮＡの用量滴定を示す。棒グラフは、修飾パターン１、４、５、７、及び８を使用したガイドを有するＲＮＰのトランスフェクション後のインデル生成を示す。ＲＮＰ用量は、１２６ｐｍｏｌのＭＧ２９－１及び１６０ｐｍｏｌのガイドＲＮＡであるか、又は示されるとおりであった。全用量（Ａ）、１／４（Ｂ）、１／８（Ｃ）、１／１６（Ｄ）、及び１／３２（Ｅ）。
【図４９】ｐＭＧ４５０（ｌａｃ誘導性ｔａｃプロモーターＥ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１発現ベクター中のＭＧ２９－１ヌクレアーゼタンパク質）のプラスミドマップを示す。
【図５０】マウスアルブミンイントロン１を標的とするガイドを有するｓｐＣａｓ９と比較した、スペーサーｍＡＬｂ２９－１－８（配列番号３９９９）を有するＭＧ２９－１のインデルプロファイルを示す。
【図５１－１】実施例２９のように次世代シーケンシング（およそ１５，０００の総読み取りを分析）によって決定されたマウスアルブミンイントロン１を標的とするガイドを有するＭＧ２９－１の代表的なインデルプロファイルである。
【図５１－２】実施例２９のように次世代シーケンシング（およそ１５，０００の総読み取りを分析）によって決定されたマウスアルブミンイントロン１を標的とするガイドを有するＭＧ２９－１の代表的なインデルプロファイルである。
【図５２】実施例２９にようにＲＮＰでヌクレオフェクションしたマウス肝臓細胞株Ｈｅｐａ１－６におけるｓｐＣａｓ９と比較した、ＭＧ２９－１の編集効率を示す。
【図５３Ａ】野生型ＭＧ２９－１と比較した、単一及び二重アミノ酸置換を有するＭＧ２９－１バリアントの哺乳類細胞における編集効率を示す。図５３Ａは、ＭＧ２９－１　ＷＴ又は変異型をコード化しているプラスミドでトランスフェクトされたＨｅｐａ１－６細胞における編集効率を示す。
【図５３Ｂ】野生型ＭＧ２９－１と比較した、単一及び二重アミノ酸置換を有するＭＧ２９－１バリアントの哺乳類細胞における編集効率を示す。図５３Ｂは、様々な濃度のＷＴ又はＳ１６８ＲをコードするｍＲＮＡでトランスフェクトされたＨｅｐａ１－６細胞における編集効率を示す。
【図５３Ｃ】野生型ＭＧ２９－１と比較した、単一及び二重アミノ酸置換を有するＭＧ２９－１バリアントの哺乳類細胞における編集効率を示す。図５３Ｃは、単一又は二重アミノ酸置換を有するＭＧ２９－１のｍＲＮＡコード化バージョンでトランスフェクトされたＨｅｐａ　１－６細胞における編集効率を示す。
【図５３Ｄ】野生型ＭＧ２９－１と比較した、単一及び二重アミノ酸置換を有するＭＧ２９－１バリアントの哺乳類細胞における編集効率を示す。図５３Ｄは、ＭＧ２９－１　ＷＴ対Ｓ１６８ＲでトランスフェクトされたＨｅｐａ１－６細胞及びＨＥＫ２９３Ｔ細胞における、１３個のガイドと組み合わせた編集効率を示す。１２個のガイドは、表７のガイドに対応する。ガイド「３５（ＴＲＡＣ）」は、ヒト遺伝子座ＴＲＡＣを標的とするガイドである。
【図５４】ＭＧ２９－１ガイドｍＡｌｂ２９－１－８の予測される二次構造を示す。

【図５５】哺乳類細胞の全細胞抽出物におけるｓｇＲＮＡの安定性に対するＭＧ２９－１ｓｇＲＮＡ配列の化学修飾の影響を示す。
【図５６Ａ】ＭＧ２９－１タンパク質、ガイドＲＮＡ、及び適切な鋳型を用いて行われたインビトロ反応において標的鎖上の切断部位を特定するための配列決定の使用を示す。図５６Ａは、次世代シーケンシングによって決定されるヌクレオチドにおけるＰＡＭからの切断位置の距離を示す。
【図５６Ｂ】ＭＧ２９－１タンパク質、ガイドＲＮＡ、及び適切な鋳型を用いて行われたインビトロ反応において標的鎖上の切断部位を特定するための配列決定の使用を示す。図５６Ｂは、標的鎖上のＭＧ２９－１切断部位を画定するためのサンガーシーケンシングの使用を示す。
【図５６Ｃ】ＭＧ２９－１タンパク質、ガイドＲＮＡ、及び適切な鋳型を用いて行われたインビトロ反応において標的鎖上の切断部位を特定するための配列決定の使用を示す。図５６Ｃは、非標的鎖上のＭＧ２９－１切断部位を画定するためのサンガーシーケンシングの使用を示す。ランオフサンガーシーケンシングは、両方の鎖の切断を評価するために、ＭＧ２９－１、ガイド、及び適切な鋳型を含むインビトロ反応で行った。標的鎖上の切断部位は、２３位であり、これは、図５６ＡのＮＧＳデータと一貫しており、これは２１～２３塩基での切断を示す。配列末端での「Ａ」ピークは、ポリメラーゼランオフのためであり、予想される。非標的鎖上の切断部位は、予想される終結塩基が「Ｔ」である逆読み取り値で見ることができる。マークされた場所（線）は、ＰＡＭから１７位、次いで末端Ｔからの切断を示す。しかしながら、ＰＡＭから１８位、１９位、及び２０位に混合Ｔシグナルがあり、１７位、１８位、及び１９位のこの鎖の可変切断を示唆する。
【図５７】ＣＤ３８のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。ＣＤ３８及びＴＲＡＣのＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ（Ｓｐｙ）Ｃａｓ９ガイドは右に示されている。
【図５８】ＣＤ３８の表現型レベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図５９】ＴＩＧＩＴのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６０】ＡＡＶＳ１のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６１】Ｂ２ＭのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６２】ＣＤ２のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６３】ＣＤ５のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６４Ａ】マウスＴＲＡＣのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６４Ｂ】マウスＴＲＡＣの遺伝子編集のフローサイトメトリーの結果を示す。
【図６５】インデルの割合に対するＴＲＡＣノックアウトのパーセンテージを示す。
【図６６Ａ】マウスＴＲＢＣ１のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６６Ｂ】マウスＴＲＢＣ２のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６６Ｃ】ヒトＴＲＢＣ１／２の遺伝子編集のフローサイトメトリーの結果を示す。
【図６７】ＨＰＲＴのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図６８】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、Ｈｅｐａ１－６細胞における化学的に修飾されたガイドの活性を示す。
【図６９】末端修飾又は未修飾ガイドに対する、修飾４４で修飾されたガイドの安定性を示す。
【図７０Ａ】ＩＩ型及びＶ型系のガイド安定性の比較を示す。図７０Ａは、未修飾ガイドの安定性データを示す。
【図７０Ｂ】ＩＩ型及びＶ型系のガイド安定性の比較を示す。図７０Ｂは、５’及び３’末端修飾を有するガイドの安定性データを示す。
【図７１】ＭＧ２９－１（Ｖ型）及びＭＧ３－６／３－４（ＩＩ型）ガイドＲＮＡの予測された二次構造を示す。骨格（ｔｒａｃｒ）部分が示されている。
【図７２】Ｈｅｐａ１－６細胞からの細胞溶解物における、ｍＡｌｂ２９８－３７と比較したガイドｍＡｌｂ２９８－３４の安定性を示す。
【図７３】インビボ送達後のマウス肝臓におけるＭＧ２９－１の編集効率を示す。

【図７４】Ｔ細胞におけるｍＲＮＡエレクトロポレーションについてのＮＧＳによる遺伝子編集結果の分析を示す。
【図７５】化学的に修飾されたガイドについてのＮＧＳによる遺伝子編集結果の分析を示す。
【図７６】ＭＧ２９－１に対する抗体を検出するために１：５０の血清希釈で行われたスクリーニングからのＥＬＩＳＡ結果を示す（ｎ＝５０）。この抗原に対する広範なワクチン接種のため破傷風トキソイドを陽性対照として使用した。破線上の血清試料は、抗体陽性とみなされ、この線は、陰性対照（ヒトアルブミン）の平均吸光度に平均から２つの標準偏差を加えたものを表す。＊対応のないスチューデントｔ検定により測定した場合、Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１；ｎｓ、有意ではない。
【図７７】ＮＧＳによって測定されたマウス肝臓におけるＨＡＯ－１編集効率を示す。各点は、個々のマウスを表す。
【図７８Ａ】ウェスタンブロットによって評価されたマウス肝臓におけるグリコール酸オキシダーゼ（ＧＯ）タンパク質レベルに対するＨＡＯ－１編集の効果を示す。各試料に対して１０μｇの総タンパク質を充填した。
【図７８Ｂ】ウェスタンブロットによって評価されたマウス肝臓におけるグリコール酸オキシダーゼ（ＧＯ）タンパク質レベルに対するＨＡＯ－１編集の効果を示す。各試料に対して１０μｇの総タンパク質を充填した。
【図７９】ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドｍＨ２９－１＿３７又はｍＨ２９－５＿３７のいずれかを封入する脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）で処置された２匹の個々のマウスと比較した、未処置マウスにおけるグリコール酸オキシダーゼ（ＧＯ）タンパク質レベルのウェスタンブロット分析を示す。各マウスからの３つの異なる量の総肝臓タンパク質（４０μｇ、２０μｇ、及び１０μｇ）をゲル上に装填し、次いで、マウスグリコール酸オキシダーゼタンパク質の検出のために処理した。
【図８０】マウス肝臓におけるＨＡＯ－１遺伝子を標的とするＭＧ２９－１及びｓｇＲＮＡのインデルプロファイルの例を示す。試料をマウス＃１７（ｍＨ２９－２９＿３７及びＭＧ２９－１　ＷＴ　ｍＲＮＡを封入する脂質ナノ粒子で処理した）から採取した。
【図８１】ヒト末梢血Ｂ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８２】造血幹細胞におけるＴＲＡＣのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図８３】人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）におけるＴＲＡＣのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図８４】次世代シーケンシング（ＮＧＳ）によって定量化された、ＭＧ２９－１を用いたインビボゲノム編集の結果を示す。
【図８５】次世代シーケンシング（ＮＧＳ）によって測定された、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及びガイド２９８－３７によって生成された例示的なインデルプロファイルを示す。
【図８６】２つの遺伝子座を標的とするＭＧ２９－１ガイドのスペーサー長の最適化を示す。
【図８７】ＭＧ２９－１及びＭＧ３－６／３－４に対するｓｇＲＮＡのインビトロ安定性を示す。
【図８８】ＭＧ２９－１及びＭＧ３－６／３－４についてのガイドＲＮＡの骨格部分の予測される二次構造を示す。
【図８９】マウスアルブミンを標的とするスペーサーを有するＭＧ３－６／３－４ガイドの予測される二次構造を示す。
【図９０】ＭＧ３－６／３－４からのステム－ループ１が５’末端に付加されたＭＧ２９－１ガイドの予測される二次構造を示す。
【図９１】ｍＲＮＡトランスフェクション又はＲＮＰヌクレオフェクションによる、Ｈｅｐａ１－６細胞における化学物質４４又は５０を有するマウスアルブミンガイド８を用いたＭＧ２９－１の編集効率を示す。
【図９２】ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び４つの異なるガイドＲＮＡのうちの１つを封入す

るＬＮＰを用いた投与後のマウスの肝臓における編集を示す。
【図９３】ＲＮＡ分子ｍＡｌｂ２９－ｇ８－３７－アレイの予測される二次構造を示す。
【図９４】以下のうちの１つを封入するＬＮＰの静脈注射後５日でのマウスの全肝臓における編集効率を示すプロットを示す：（１）３つの異なる用量でのＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドｍＡｌｂ２９－８－５０（ｍＡ２９－８－５０）、（２）３つの異なる用量でのｓｐＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びガイドｍＡｌｂＲ２、又は（３）ＰＢＳ緩衝液（対照）。各円は単一のマウスを表し、バーは平均及び標準偏差を示す。
【図９５】ヒトＨＡＯ－１を標的とするＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び６ｓｇＲＮＡでトランスフェクトされたＨｅｐ３Ｂ細胞における編集活性を示す。
【図９６】リボ核タンパク質複合体でトランスフェクトされたＨｕＨ７細胞及びＨｅｐ３Ｂ細胞におけるヒトＨＡＯ－１を標的とする４　ＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡの編集活性を示す。
【図９７】初代ヒト肝細胞中のヒトＨＡＯ－１遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡを用いたＭＧ２９－１の編集活性を示す。
【図９８Ａ】初代ヒト肝細胞におけるＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡ　ｈＨ２９－４－３７及びｈＨ２９－２１－３７の代表的なインデルプロファイルを示す。
【図９８Ｂ】初代ヒト肝細胞におけるＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡ　ｈＨ２９－２３－３７及びｈＨ２９－４１－３７の代表的なインデルプロファイルを示す。
【図９９】マウス肝臓におけるマウスＨＡＯ－１を標的とする２２個のヌクレオチド又は２０個のヌクレオチドスペーサーを有するＭＧ２９－１ガイドＲＮＡの活性を示す。
【図１００】マウス肝臓における編集効率に対するｍＲＮＡ／ガイドＲＮＡ比及び別個又は共製剤の影響を示す。
【図１０１】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ＭＧ２９－１ガイド化学物質の評価を示す。
【図１０２】Ｈｅｐａ１－６細胞におけるＡＰＯ－Ａ１のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図１０３】Ｈｅｐａ１－６細胞におけるＡＮＧＰＴＬ３のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果を示す。
【図１０４Ａ】ＭＧ５５－４３のインビトロ特徴付けを示す。図１０４Ａは、ＭＧ５５－４３ヌクレアーゼの近傍のゲノム領域を示す。遺伝子はオレンジ色の矢印で表される。候補ヌクレアーゼをコードする遺伝子は、「推定トランスポターゼＤＮＡ結合ドメイン」を含む。ＣＲＩＳＰＲアレイは、反復及びスペーサーで表される。予測されるｔｒａｃｒＲＮＡは、アレイとヌクレアーゼとの間の矢印として示され、「予測されるトリミングされたＴｒａｃｒＲＮＡ－ＣＭ２」と標識されている。
【図１０４Ｂ】ＭＧ５５－４３のインビトロ特徴付けを示す。図１０４Ｂは、活性単一ガイドＲＮＡ設計（テトラループによって接続されたｔｒａｃｒＲＮＡ及び反復配列）を示す。窒素化塩基の色は、その塩基の塩基対合の確率に対応し、赤は高い確率であり、青は低い確率である。
【図１０４Ｃ】ＭＧ５５－４３のインビトロ特徴付けを示す。図１０４Ｃは、プラスミド標的ＤＮＡライブラリーのｓｇＲＮＡ及び２つの異なるスペーサー（Ｕ６７及びＵ４０）を用いたインビトロ切断を示すアガロースゲルを示す。ＭＧ５５－４３ヌクレアーゼに関連しないレーンは示されていない。
【図１０４Ｄ】ＭＧ５５－４３のインビトロ特徴付けを示す。図１０４Ｄは、ＭＧ５５－４３　ＰＡＭ配列を示す配列ロゴを示す。
【図１０４Ｅ】ＭＧ５５－４３のインビトロ特徴付けを示す。図１０４Ｅは、ＭＧ５５－４３で試験されたスペーサー配列の切断部位位置を示すヒストグラムを示す。
【図１０５Ａ】ＭＧ９１ヌクレアーゼをコードするゲノム領域の例を示す。遺伝子は、そのように標識された候補ヌクレアーゼをコードする遺伝子とともに矢印によって表される。ＣＲＩＳＰＲアレイは、反復及びスペーサーで表される。活性ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的にコードする遺伝子間領域は、ＩＧ番号又は遺伝子間領域番号で標識されたバーとして

強調表示される。
【図１０５Ｂ】ＭＧ９１ヌクレアーゼをコードするゲノム領域の例を示す。遺伝子は、そのように標識された候補ヌクレアーゼをコードする遺伝子とともに矢印によって表される。ＣＲＩＳＰＲアレイは、反復及びスペーサーで表される。活性ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的にコードする遺伝子間領域は、ＩＧ番号又は遺伝子間領域番号で標識されたバーとして強調表示される。
【図１０５Ｃ】ＭＧ９１ヌクレアーゼをコードするゲノム領域の例を示す。遺伝子は、そのように標識された候補ヌクレアーゼをコードする遺伝子とともに矢印によって表される。ＣＲＩＳＰＲアレイは、反復及びスペーサーで表される。活性ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的にコードする遺伝子間領域は、ＩＧ番号又は遺伝子間領域番号で標識されたバーとして強調表示される。
【図１０６Ａ】ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的に含む遺伝子間領域ヌクレオチド配列の複数の配列アラインメントを示す。上の緑色のバーは、遺伝子間領域の配列間の高度な類似性を示す。図１０６Ａは、ＭＧ９１－１５ヌクレアーゼ及びその類縁体の近傍の遺伝子間領域２を示す。
【図１０６Ｂ】ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的に含む遺伝子間領域ヌクレオチド配列の複数の配列アラインメントを示す。上の緑色のバーは、遺伝子間領域の配列間の高度な類似性を示す。図１０６Ｂは、ＭＧ９１－３２ヌクレアーゼ及びその類縁体の近傍の遺伝子間領域２を示す。
【図１０６Ｃ】ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的に含む遺伝子間領域ヌクレオチド配列の複数の配列アラインメントを示す。上の緑色のバーは、遺伝子間領域の配列間の高度な類似性を示す。図１０６Ｃは、ＭＧ９１－８７ヌクレアーゼ及びその類縁体の近傍の遺伝子間領域２を示す。
【図１０７Ａ】単一ガイドＲＮＡ設計及びインビトロ切断アッセイの結果を示す。単一ガイドＲＮＡ設計（ｔｒａｃｒＲＮＡ及び反復配列）については、塩基の色は、その塩基の塩基対合の確率に対応し、赤は高い確率であり、青は低い確率である。図１０７Ａは、ＭＧ９１－１５　ｓｇＲＮＡ１を示す。
【図１０７Ｂ】単一ガイドＲＮＡ設計及びインビトロ切断アッセイの結果を示す。単一ガイドＲＮＡ設計（ｔｒａｃｒＲＮＡ及び反復配列）については、塩基の色は、その塩基の塩基対合の確率に対応し、赤は高い確率であり、青は低い確率である。図１０７Ｂは、ＭＧ９１－３２　ｓｇＲＮＡ１を示す。
【図１０７Ｃ】単一ガイドＲＮＡ設計及びインビトロ切断アッセイの結果を示す。単一ガイドＲＮＡ設計（ｔｒａｃｒＲＮＡ及び反復配列）については、塩基の色は、その塩基の塩基対合の確率に対応し、赤は高い確率であり、青は低い確率である。図１０７Ｃは、ＭＧ９１－８７　ｓｇＲＮＡ１を示す。
【図１０７Ｄ】単一ガイドＲＮＡ設計及びインビトロ切断アッセイの結果を示す。単一ガイドＲＮＡ設計（ｔｒａｃｒＲＮＡ及び反復配列）については、塩基の色は、その塩基の塩基対合の確率に対応し、赤は高い確率であり、青は低い確率である。図１０７Ｄは、異なるｓｇＲＮＡ設計（ｓｇＲＮＡ１及びｓｇＲＮＡ２）及び２つの異なるスペーサー（Ｕ６７及びＵ４０）を有するプラスミド標的ＤＮＡライブラリーのインビトロ切断を示すアガロースゲルを示す。これらのヌクレアーゼに関連しないレーンは示されていない。
【図１０８Ａ】予測されるＰＡＭ配列の配列ロゴ及び切断部位の位置を示すヒストグラムを示す。図１０８Ａ、１０８Ｂ、及び１０８Ｃはそれぞれ、ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、及びＭＧ９１－８７のＰＡＭ配列を示す配列ロゴを示す。
【図１０８Ｂ】予測されるＰＡＭ配列の配列ロゴ及び切断部位の位置を示すヒストグラムを示す。図１０８Ａ、１０８Ｂ、及び１０８Ｃはそれぞれ、ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、及びＭＧ９１－８７のＰＡＭ配列を示す配列ロゴを示す。
【図１０８Ｃ】予測されるＰＡＭ配列の配列ロゴ及び切断部位の位置を示すヒストグラムを示す。図１０８Ａ、１０８Ｂ、及び１０８Ｃはそれぞれ、ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、及びＭＧ９１－８７のＰＡＭ配列を示す配列ロゴを示す。

【図１０８Ｄ】予測されるＰＡＭ配列の配列ロゴ及び切断部位の位置を示すヒストグラムを示す。図１０８Ｄ、１０８Ｅ、及び１０８Ｆはそれぞれ、ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、ＭＧ９１－８７で試験されたスペーサー配列の切断部位位置を示すヒストグラムを示す。
【図１０８Ｅ】予測されるＰＡＭ配列の配列ロゴ及び切断部位の位置を示すヒストグラムを示す。図１０８Ｄ、１０８Ｅ、及び１０８Ｆはそれぞれ、ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、ＭＧ９１－８７で試験されたスペーサー配列の切断部位位置を示すヒストグラムを示す。
【図１０８Ｆ】予測されるＰＡＭ配列の配列ロゴ及び切断部位の位置を示すヒストグラムを示す。図１０８Ｄ、１０８Ｅ、及び１０８Ｆはそれぞれ、ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、ＭＧ９１－８７で試験されたスペーサー配列の切断部位位置を示すヒストグラムを示す。
【図１０９】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。
【００５２】
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例示的なポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列を提供する。以下は、その中の配列の例示的な説明である。
【００５３】
ＭＧ１１
配列番号１～３７は、ＭＧ１１ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００５４】
配列番号３４７１は、ＭＧ１１ヌクレアーゼと機能するように設計されたｃｒＲＮＡ５’直接反復を示す。
【００５５】
配列番号３４７２～３５３８は、ＭＧ１１ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００５６】
配列番号３８～１１８は、ＭＧ１３ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００５７】
配列番号３５４０～３５５０は、ＭＧ１３ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００５８】
ＭＧ１９
配列番号１１９～１２４は、ＭＧ１９ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００５９】
配列番号３５５１～３５５８は、ＭＧ１９ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【００６０】
配列番号３８６３～３８６６は、ＭＧ１９ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【００６１】
ＭＧ２０
配列番号１２５は、ＭＧ２０ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００６２】
配列番号３５５９は、ＭＧ２０ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【００６３】
配列番号３８６７は、ＭＧ２０ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【００６４】

ＭＧ２６
配列番号１２６～１４０は、ＭＧ２６ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００６５】
配列番号３５６０～３５７２は、ＭＧ２６ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００６６】
ＭＧ２８
配列番号１４１～２１４は、ＭＧ２８ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００６７】
配列番号３５７３～３６０７は、ＭＧ２８ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００６８】
配列番号３６０８～３６０９は、ＭＧ２８ヌクレアーゼと機能するように設計されたｃｒＲＮＡ　５’直接反復を示す。
【００６９】
配列番号３８６８～３８６９は、ＭＧ２８ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【００７０】
ＭＧ２９
配列番号２１５～２２５は、ＭＧ２９ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００７１】
配列番号５６８０は、５’ＵＴＲ、ＮＬＳ、ＣＤＳ、ＮＬＳ、３’ＵＴＲ、及びｐｏｌｙＡテールを含むＭＧ２９－１ヌクレアーゼのヌクレオチド配列を示す。
【００７２】
配列番号３６１０～３６１１は、ＭＧ２９ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００７３】
配列番号３６１２は、ＭＧ２９ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【００７４】
配列番号３８７０～３８７２は、ＭＧ２９ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【００７５】
配列番号５６８７は、ｍＲＮＡの生成に使用されるＭＧ２９－１コード配列を示す。
【００７６】
配列番号５８３０及び５８４６は、ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡをコードするＤＮＡ配列を示す。
【００７７】
ＭＧ３０
配列番号２２６～２２８は、ＭＧ３０ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００７８】
配列番号３６１３～３６１５は、ＭＧ３０ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００７９】
配列番号３８７３は、ＭＧ３０ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【００８０】
ＭＧ３１
配列番号２２９～２６０は、ＭＧ３１ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００８１】
配列番号３６１６～３６３２は、ＭＧ３１ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００８２】

配列番号３８７４～３８７６は、ＭＧ３１ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【００８３】
ＭＧ３２
配列番号２６１は、ＭＧ３２ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００８４】
配列番号３６３３～３６３４は、ＭＧ３２ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００８５】
配列番号３８７６は、ＭＧ３２ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【００８６】
ＭＧ３７
配列番号２６２～４２６は、ＭＧ３７ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００８７】
配列番号３６３５は、ＭＧ３７ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【００８８】
配列番号３６３６～３６３７、３６４０～３６４１、３６４４～３６４５、３６４８～３６４９、３６５２～３６５３、３６５６～３６５７、及び３６６０～３６６１は、ＭＧ３７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。
【００８９】
配列番号３６３８、３６４２、３６４６、３６５０、３６５４、３６５８、及び３６６２は、上記のＭＧ３７ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するＭＧ３７　ｔｒａｃｒＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【００９０】
配列番号３６３９、３６４３、３６４７、３６５１、３６５５、及び３６５９は、３’標的化配列又はスペーサー配列に対して５’に配置されたときにｃｒＲＮＡとして機能する天然ＭＧ３７遺伝子座に由来する５’直接反復配列を示す。
【００９１】
ＭＧ５３
配列番号４２７～４２８は、ＭＧ５３ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００９２】
配列番号３６６３は、３’標的化配列又はスペーサー配列に対して５’に配置されたときにｃｒＲＮＡとして機能する天然ＭＧ５３遺伝子座に由来する５’直接反復配列を示す。
【００９３】
配列番号３６６４～３６６７は、ＭＧ５３ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【００９４】
配列番号３６６８～３６６９は、上記のＭＧ５３ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するＭＧ５３　ｔｒａｃｒＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【００９５】
ＭＧ５４
配列番号４２９～４３０は、ＭＧ５４ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【００９６】
配列番号３６７０は、３’標的化配列又はスペーサー配列に対して５’に配置されたときにｃｒＲＮＡとして機能する天然ＭＧ５４遺伝子座に由来する５’直接反復配列を示す。
【００９７】
配列番号３６７１～３６７２は、ＭＧ５４ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【００９８】
配列番号３６７３～３６７６は、上記のＭＧ５４ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するＭＧ５４　ｔｒａｃｒＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。

【００９９】
ＭＧ５５
配列番号４３１～６８８は、ＭＧ５５ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１００】
配列番号６０３１は、ＭＧ５５ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１０１】
配列番号６０３２は、ＭＧ５５ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【０１０２】
ＭＧ５６
配列番号６８９～６９０は、ＭＧ５６ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１０３】
配列番号３６７８は、ＭＧ５６ヌクレアーゼと機能するように設計されたｃｒＲＮＡ５’直接反復を示す。
【０１０４】
配列番号３６７９～３６８０は、ＭＧ５６ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【０１０５】
ＭＧ５７
配列番号６９１～７２１は、ＭＧ５７ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１０６】
配列番号３６８１～３６９４は、ＭＧ５７ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【０１０７】
配列番号３６９５～３６９６は、ＭＧ５７ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１０８】
配列番号３８７９～３８８０は、ＭＧ５７ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【０１０９】
ＭＧ５８
配列番号７２２～７７９は、ＭＧ５８ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１１０】
配列番号３６９７～３７１１は、ＭＧ５８ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【０１１１】
ＭＧ５９
配列番号７８０～７９２は、ＭＧ５９ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１１２】
配列番号３７１２～３７２８は、ＭＧ５９ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【０１１３】
配列番号３７２９～３７３０は、ＭＧ５９ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１１４】
配列番号３８８１～３８８２は、ＭＧ５９ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【０１１５】
ＭＧ６０
配列番号７９３～１１６３は、ＭＧ６０ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１１６】
配列番号３７３１～３７３３は、ＭＧ６０ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを

示す。
【０１１７】
ＭＧ６１
配列番号１１６４～１４６９は、ＭＧ６１ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１１８】
配列番号３７３４～３７３５は、ＭＧ６１ヌクレアーゼと機能するように設計されたｃｒＲＮＡ　５’直接反復を示す。
【０１１９】
配列番号３７３６～３８４７は、ＭＧ６１ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【０１２０】
ＭＧ６２
配列番号１４７０～１４７２は、ＭＧ６２ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１２１】
配列番号３８４８～３８５０は、ＭＧ６２ヌクレアーゼのエフェクター反復モチーフを示す。
【０１２２】
ＭＧ７０
配列番号１４７３～１５１４は、ＭＧ７０ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１２３】
ＭＧ７５
配列番号１５１５～１７１０は、ＭＧ７５ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１２４】
ＭＧ７７
配列番号１７１１～１７１２は、ＭＧ７７ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１２５】
配列番号３８５１～３８５２は、ＭＧ７７ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１２６】
配列番号３８８３～３８８４は、ＭＧ７７ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【０１２７】
ＭＧ７８
配列番号１７１３～１７１７は、ＭＧ７８ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１２８】
配列番号３８５３は、ＭＧ７８ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１２９】
配列番号３８８５は、ＭＧ７８ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【０１３０】
ＭＧ７９
配列番号１７１８～１７２２は、ＭＧ７９ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１３１】
配列番号３８５４～３８５７は、ＭＧ７９ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１３２】
配列番号３８８６～３８８９は、ＭＧ７９ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【０１３３】
ＭＧ８０
配列番号１７２３は、ＭＧ８０ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１３４】

ＭＧ８１
配列番号１７２４～２６５４は、ＭＧ８１ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１３５】
ＭＧ８２
配列番号２６５５～２６５７は、ＭＧ８２ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１３６】
ＭＧ８３
配列番号２６５８～２６５９は、ＭＧ８３ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１３７】
ＭＧ８４
配列番号２６６０～２６７７は、ＭＧ８４ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１３８】
ＭＧ８５
配列番号２６７８～２６８０は、ＭＧ８５ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１３９】
ＭＧ９０
配列番号２６８１～２８０９は、ＭＧ９０ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１４０】
ＭＧ９１
配列番号２８１０～３４７０は、ＭＧ９１ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。
【０１４１】
配列番号６０３３～６０３６は、ＭＧ９１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１４２】
配列番号６０３７～６０３９は、ＭＧ９１ヌクレアーゼと適合するＰＡＭ配列を示す。
【０１４３】
配列番号６０４０～６０４９は、ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的にコードするＭＧ９１遺伝子間領域を示す。
【０１４４】
配列番号６０５０～６０５９は、ＭＧ９１　ＣＲＩＳＰＲ反復を示す。
スペーサーセグメント
【０１４５】
配列番号３８５８～３８６１は、スペーサーセグメントのヌクレオチド配列を示す。
【０１４６】
ＮＬＳ
配列番号３９３８～３９５３は、本開示によるヌクレアーゼに付加され得る核局在化配列（ＮＬＳ）の例の配列を示す。
【０１４７】
ＣＤ３８標的化
配列番号４４２８～４４６５及び５６８５は、ＣＤ３８を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１４８】
配列番号４４６６～４５０３及び５６８６は、ＣＤ３８標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１４９】
ＴＩＧＩＴ標的化
配列番号４５０４～４５２０は、ＴＩＧＩＴを標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１５０】
配列番号４５２１～４５３７は、ＴＩＧＩＴ標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１５１】

ＡＡＶＳ１標的化
配列番号４５３８～４５６８は、ＡＡＶＳ１を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１５２】
配列番号４５６９～４５９９は、ＡＡＶＳ１標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１５３】
Ｂ２Ｍ標的化
配列番号４６００～４６７５は、Ｂ２Ｍを標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１５４】
配列番号４６７６～４７５１は、Ｂ２Ｍ標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１５５】
ＣＤ２標的化
配列番号４７５２～４８３６は、ＣＤ２を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１５６】
配列番号４８３７～４９２１は、ＣＤ２標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１５７】
ＣＤ５標的化
配列番号４９２２～４９４５は、ＣＤ５を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１５８】
配列番号４９４６～４９６９は、ＣＤ５標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１５９】
ｈＲｏｓａ２６標的化
配列番号４９７０～５０１２は、ｈＲｏｓａ２６を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１６０】
配列番号５０１３～５０５５は、ｈＲｏｓａ２６標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１６１】
ＴＲＡＣ標的化
配列番号５０５６～５１２５、５６８１、及び５６８３は、ＴＲＡＣを標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１６２】
配列番号５１２６～５１９５、５６８２、及び５６８４は、ＴＲＡＣ標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１６３】
ＴＲＢＣ１標的化
配列番号５１９６～５２１０は、ＴＲＢＣ１を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１６４】
配列番号５２１１～５２２５は、ＴＲＢＣ１標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１６５】
ＴＲＢＣ２標的化
配列番号５２２６～５２４６は、ＴＲＢＣ２を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１６６】
配列番号５２４７～５２６７は、ＴＲＢＣ２標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１６７】

ＴＲＢＣ１／２標的化
配列番号５６４２～５６６０は、ＴＲＢＣを標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１６８】
配列番号５６６１～５６７９は、ＴＲＢＣ標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１６９】
ＦＡＳ標的化
配列番号５２６８～５３６６は、ＦＡＳを標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１７０】
配列番号５３６７～５４６５は、ＦＡＳ標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１７１】
ＰＤ－１標的化
配列番号５４６６～５４７３は、ＰＤ－１を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１７２】
配列番号５４７４～５４８１は、ＰＤ－１標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１７３】
ＨＰＲＴ標的化
配列番号５４８２～５５６１は、ＨＰＲＴを標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１７４】
配列番号５５６２～５６４１は、ＨＰＲＴ標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１７５】
ＨＡＯ－１標的化
配列番号５７８８～５８２９及び５８３１～５８３４は、ヒトＨＡＯ－１を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１７６】
配列番号５８３６～５８４５は、マウスＨＡＯ－１を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１７７】
ＡＰＯ－Ａ１標的化
配列番号５８４７～５８６０は、マウスＡＰＯ－Ａ１を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１７８】
配列番号５８６１～５８７４は、ＡＰＯ－Ａ１標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【０１７９】
ＡＮＧＰＴＬ３標的化
配列番号５８７５～５９５２は、マウスＡＮＧＰＴＬ３を標的とするために、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼと機能するよう操作されたｓｇＲＮＡのヌクレオチド配列を示す。
【０１８０】
配列番号５９５３～６０３０は、ＡＮＧＰＴＬ３標的部位のＤＮＡ配列を示す。
【発明を実施するための形態】
【０１８１】
本発明の様々な実施形態は本明細書に示され、記載されるが、このような実施形態が、例示の目的でのみ提供されることは、当業者には明らかであろう。多数の変形、変更、及び置換は、本発明から逸脱することなく、当業者にとって生じ得る。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替が用いられ得ることは、理解されるべきである。
【０１８２】

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：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））（参照により本明細書に完全に組み込まれる）を参照のこと。

【０１８３】

本明細書で使用される場合、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、用語「含むこと」、「含む」、「有すること」、「有する」、「有する」、又はそのバリアントが、詳細な説明及び／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、用語「含むこと」と類似した様式で包含的であることが意図される。

【０１８４】

用語「約」又は「およそ」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、すなわち、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又は２つ以上の標準偏差内を意味し得る。あるいは、「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。

【０１８５】

本明細書で使用される場合、「細胞」は概して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、及び／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、真核生物の細胞、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、トウモロコシ、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、開花している植物、針葉樹、ジムノスパーム、シダ、ヒカゲノカズラ、ツノゴケ、コケ植物、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、クニダリアン、エキノデルム、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、哺乳類）由来の細胞、哺乳類（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。いくつかの場合では、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ことがある）。

【０１８６】

本明細書で使用される場合、用語「ヌクレオチド」は、概して、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、［αＳ］ｄＡＴＰ、７－デアザ－ｄＧＴＰ及び７－デアザ－ｄＡＴＰ、並びにそれらを含有する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（ｄｄＮＴＰ）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、ｄｄＡＴＰ、ｄｄＣＴＰ、ｄｄＧＴＰ、ｄｄＩＴＰ、及びｄｄＴＴＰが挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、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、非標識又は検出可能に標識されてもよい。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、テキサスレット、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．から入手可能なフルオロ結合デオキシヌクレオチド、フルオロ結合Ｃｙ３－ｄＣＴＰ、フルオロ結合Ｃｙ５－ｄＣＴＰ、フルオロ結合フルオロＸ－ｄＣＴＰ、フルオロ結合Ｃｙ３－ｄＵＴＰ、及びフルオロ結合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を挙げることができる。ヌクレオチドはまた、化学修飾によって標識又は印付けられてもよい。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）が挙げられる。

【０１８７】

用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸」は、概して、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はその類似体のいずれかを、一本鎖、二本鎖、又は多本鎖の形態で、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指すよう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、遺伝子又はその断片であってもよい。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。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、シュードウリジン、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、遺伝子又は遺伝子断片のコード又は非コード領域、結合解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。

【０１８８】

用語「トランスフェクション」又は「トランスフェクトされた」は、概して、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（参照により本明細書に完全に組み込まれる）を参照のこと。

【０１８９】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書において互換的に使用され、概して、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。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、全長タンパク質、及び二次及び／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、概して、修飾アミノ酸及びアミノ酸類似体を含むが、これ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。用語「アミノ酸」は、Ｄ－アミノ酸とＬ－アミノ酸の両方を含む。

【０１９０】
本明細書で使用される場合、「非天然」は、概して、天然の核酸又はタンパク質に存在しない核酸又はポリペプチド配列を指すことができる。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、及び／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及び／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）を示し得、かつ／又はコードし得る。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及び／又はポリペプチド配列（若しくはそのバリアント）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及び／又はポリペプチド配列を生成してもよい。
【０１９１】
本明細書で使用される場合、用語「プロモーター」は、概して、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のヌクレオチド又はヌクレオチドの領域に隣接するか、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」とも呼ばれる「基礎プロモーター」は、概して、作動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塩基性要素を含有するプロモーターを指してもよい。真核生物の基礎プロモーターは、ＴＡＴＡ－ボックス及び／又はＣＡＡＴボックスを含み得る。
【０１９２】
本明細書で使用される場合、用語「発現」は、概して、核酸配列若しくはポリヌクレオチドがＤＮＡ鋳型から（例えば、ｍＲＮＡ若しくは他のＲＮＡ転写物に）転写されるプロセス、及び／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、真核生物の細胞におけるｍＲＮＡのスプライシングを含む。
【０１９３】
本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」、「作動可能な連結」、「作動可能に連結された」、又はその文法的な均等物は、概して、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並列化を指し、ここで、エレメントは、それらが予期される様式で作動することを可能にする関係にある。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、制御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。
【０１９４】
本明細書で使用される場合、「ベクター」は、概して、ポリヌクレオチドを含むか、又はポリヌクレオチドと会合し、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会合を指す。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター、リポソーム、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、制御エレメントを含む。
【０１９５】
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、又は発現のために作動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概して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、発現のために作動可能に連結されている制御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。
【０１９６】

ＤＮＡ又はタンパク質配列の「機能的断片」は、概して、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した生物学的活性（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、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。

【０１９７】

本明細書で使用される場合、「操作された」対象は、概して、対象がヒトの介入によって修飾されたことを示す。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改変す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更す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つの操作された構成要素を含む。

【０１９８】

本明細書で使用される場合、「合成」及び「人工」は一般に、天然に存在するヒトタンパク質と低い配列同一性（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）を有するタンパク質又はそのドメインを指すために互換的に使用され得る。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。

【０１９９】

本明細書で使用される場合、用語「Ｃａｓ１２ａ」は概して、クラス２、タイプＶ－ＡＣａｓエンドヌクレアーゼであり、（ａ）ＣＲＩＳＰＲアレイからの転写後にヌクレアーゼ自体によって処理される比較的小さいガイドＲＮＡ（約４２～４４ヌクレオチド）を使用し、かつ（ｂ）互い違いの切断部位を残すようにＤＮＡを切断する、Ｃａｓエンドヌクレアーゼのファミリーを指す。この酵素ファミリーの更なる特徴は、例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ Ｂ，Ｈｅｉｄｅｎｒｅｉｃｈ Ｍ，Ｍｏｈａｎｒａｊｕ Ｐ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０１７；３５：３１－３４、及びＺｅｔｓｃｈｅ Ｂ，Ｇｏｏｔｅｎｂｅｒｇ ＪＳ，Ａｂｕｄａｙｙｅｈ ＯＯ，ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ ２０１５；１６３：７５９－７７１に見出されることができ、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２００】

本明細書において使用される場合、「ガイド核酸」は、概して、別の核酸にハイブリダイズし得る核酸を指すことができる。ガイド核酸は、ＲＮＡであってもよい。ガイド核酸は、ＤＮＡであってもよい。ガイド核酸は、部位特異的に核酸の配列に結合するようにプログラムされてもよい。標的化されるべき核酸、又は標的核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。ガイド核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。標的核酸の一部は、ガイド核酸の一部に対して相補的であってもよい。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、用語「ガイド核酸」は、単一ガイド核酸と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」又は「核酸標的化配列」又は「スペーサー配列」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。

【０２０１】

２つ以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈における用語「配列同一性」又は「同一性パーセント」は、概して、配列比較アルゴリズムを使用して測定された場合、局所比較ウ

ィンドウ又はグローバル比較ウィンドウにわたって最大対応のために比較及び整列されたとき、同一であるか、又は特定のパーセンテージの、同一であるアミノ酸残基又はヌクレオチドを有する、２つ（例えば、ペアワイズアラインメントで）又はそれ以上（例えば、複数の配列アラインメントにおける）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）、１０００００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Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ相同性検索アルゴリズムパラメーターを用いたＣＬＵＳＴＡＬＷ；デフォルトパラメーターを用いたＭＵＳＣＬＥ；２のリツリー及び１０００の最大反復のパラメーターを用いた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ＨＭＭＥＲ　ｈｍｍａｌｉｇｎが挙げられる。

【０２０２】

２つ以上の核酸配列又はポリペプチド配列の文脈で、用語「最適に整列された」は、概して、例えば、最も高い又は「最適化された」同一性パーセントのスコアを生成するアライメントによって決定される、アミノ酸残基又はヌクレオチドの最大対応に整列された２つ（例えば、ペアワイズアラインメントで）又はそれ以上（例えば、複数の配列アラインメントで）の配列を指す。

【０２０３】

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うちのいずれかのバリアントが、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、又は代わりに、異なる種由来の相同なタンパク質のアライン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変化させることなく、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アントは、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼタンパク質配列（例えば、本明細書に記載されるＭＧ１１、ＭＧ１３、ＭＧ２６、ＭＧ２８、ＭＧ２９、ＭＧ３０、ＭＧ３１、ＭＧ３２、ＭＧ３７、ＭＧ５３、ＭＧ５４、ＭＧ５５、ＭＧ５６、ＭＧ５７、ＭＧ５８、ＭＧ５９、ＭＧ６０、ＭＧ６１、ＭＧ６２、ＭＧ７０、ＭＧ８２、ＭＧ８３、ＭＧ８４、若しくはＭＧ８５ファミリーエンドヌクレアーゼ、又は本明細書に記載される任意のファミリーヌクレアーゼ）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％の配列同一性を有するバリアントを含んでもよい。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アントは、機能的バリアントである。こうした機能的バリアントは、エンドヌクレアーゼの１つ以上の重要な活性部位残基又はガイドＲＮＡ結合残基の活性が破壊されないように、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タンパク質のうちのいずれかの機能的バリアントは、図１７、１８、１０、２０、若しくは２５でコールアウトされた保存された残基若しくは機能的残基又は表１Ｂに記載される残基のうちの少なくとも１

つを欠く。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質のうちのいずれかの機能的バリアントは、図１７、１８、１０、２０、若しくは２５でコールアウトされた保存された残基若しくは機能的残基又は表１Ｂに記載される残基の全てを欠く。

【０２０４】

また、本開示には、酵素の活性を減少させる又は排除するための１つ以上の触媒残基の置換を有する、本明細書に記載される酵素のうちのいずれかのバリアント（例えば、活性低下バリアント）も含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質としての活性低下バリアントは、表１Ｂに特定される少なくとも１つ、少なくとも２つ、又は３つ全ての触媒残基の破壊的置換を含む。

【０２０５】

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つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む：

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）。

【０２０６】

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、及び使いやすさを改善する可能性を付与する可能性がある。微生物におけるクラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）系の予測される保有率及び微生物種の純多様性と比較して、比較的少数の機能的に特徴付けられたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素が、文献に存在する。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。多数の微生物種を含有する天然の環境ニッチからのメタゲノミクスシークエンシングは、特徴付けられた新しい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ミクス解析からのＣａｓＸ／ＣａｓＹ ＣＲＩＳＰＲ系の２０１６年の発見によって示される。

【０２０７】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、微生物における適応免疫系として機能すると記載されている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（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復）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（３０～４０ｂｐ）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、概して、（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必要とする（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（図を参照されたい）。
【０２０８】
クラスＩ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、大型の複数サブユニットエフェクター複合体を有し、Ｉ、ＩＩＩ、及びＩＶ型を含む。クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、概して、単一ポリペプチド複数ドメインヌクレアーゼエフェクターを有し、ＩＩ、Ｖ、及びＶＩ型を含む。
【０２０９】
ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、構成要素の点で最も単純なものとみなされる。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系では、ＣＲＩＳＰＲアレイを成熟ｃｒＲＮＡにプロセシングすることは、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、アレイリピート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）であり、ｔｒａｃｒＲＮＡは、その対応するエフェクターヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）及びリピート配列の両方と相互作用して、前駆ｄｓＲＮＡ構造を形成し、ｔｒａｃｒＲＮＡとｃｒＲＮＡの両方を負荷した成熟エフェクター酵素を生成するために、内因性ＲＮＡｓｅ　ＩＩＩによって切断される。Ｃａｓ　ＩＩヌクレアーゼは、ＤＮＡヌクレアーゼとして特定される。２型エフェクターは、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。
【０２１０】
Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、ＲｕｖＣ様ドメインを含む、ＩＩ型エフェクターの構造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。ＩＩ型と同様に、ほとんどの（全てではない）Ｖ型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ＩＩ型系とは異なり、Ｖ型系は、エフェクターヌクレアーゼ自体を使用してプレｃｒＲＮＡを切断することができる。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と同様に、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、ＤＮＡヌクレアーゼとしてまた特定されている。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系とは異なり、一部のＶ型酵素（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。
【０２１１】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、近年、その標的性及び使いやすさから、遺伝子編集技術として浮上している。最も一般的に使用される系は、クラス２、ＩＩ型ＳｐＣａｓ９及びクラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓ１２ａである。具体的に、Ｖ－Ａ型系は、細胞におけるその報告された特異性が、他のヌクレアーゼよりも高く、オフターゲット効果がより少ないか又は全くないため、より広く使用されるようになってきている。Ｖ－Ａ系はまた、ガイドＲＮＡが小さく、（ＳｐＣａｓ９についてのおよそ１００ｎｔと比較して４２～４４ヌクレオチド）、ＣＲＩＳＰＲアレイからの転写後にヌクレアーゼ自体によって処理され、複数の遺伝子編集を伴う多重化アプリケーションを簡素化するという点で有利である。更に、Ｖ－Ａ系は、互い違いの切断部位を有し、これは、マイクロホモロジー依存的標的組み込み（ＭＩＴＩ）などの指向型修復経路を容易にし得る。
【０２１２】
最も一般的に使用されるＶ－Ａ型酵素は、選択された標的部位の隣に５’プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を必要とする：Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＮＤ２００６　ＬｂＣａｓ１２ａ及びＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ種ＡｓＣａｓ１２ａに対して５’－ＴＴＴＶ－３’；及びＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　ＦｎＣａｓ１２ａに対して５’－ＴＴＶ－３’。オルソログの最近の調査は、例えばＹＴＶ、ＹＹＮ、又はＴＴＮなどの哺乳動物細胞培養においても活性である、制限のより少ないＰＡＭ配列

を有するタンパク質を明らかにした。しかしながら、これらの酵素は、Ｖ－Ａの生物多様性及び標的性を完全に包含するものではなく、全ての可能な活性及びＰＡＭ配列要件を表すものではない可能性がある。ここで、Ｖ－Ａ型ヌクレアーゼについて、多数のメタゲノムから数千のゲノム断片を引き出した。特定されたＶ－Ａ酵素の多様性は拡大されている可能性があり、新規の系は、高度に標的化可能で、コンパクト、かつ正確な遺伝子編集剤へと開発されている可能性がある。

【０２１３】

ＭＧ酵素

Ｖ－Ａ型ＣＲＩＳＰＲ系は、様々なゲノム編集用途での使用のために急速に採用されている。これらのプログラム可能なヌクレアーゼは、適応微生物免疫系の一部であり、その自然多様性は、ほとんど研究されていない。Ｖ－Ａ型ＣＲＩＳＰＲ酵素の新規ファミリーを、様々な複雑な環境から収集されたメタゲノムの大規模な分析を通して特定し、これらの系の代表を遺伝子編集プラットフォームに開発した。ヌクレアーゼは、系統学的に多様であり（図４Ａ）、特定のモチーフを有する単一ガイドＲＮＡを認識する。これらの系の大部分は、未培養生物由来であり、その一部は、同じＣＲＩＳＰＲオペロン内の分岐Ｖ型エフェクターをコードする。生化学分析により、予想外のＰＡＭ多様性が明らかになり（図４Ｂを参照のこと）、これらの系が様々なゲノム工学用途を促進することを示す。ヒト細胞株におけるガイド配列及び活性の単純化は、遺伝子及び細胞療法における有用性を示唆する。

【０２１４】

いくつかの態様では、本開示は、新規のＶ－Ｌ型候補を提供する（図２７Ａ及びＢ）。Ｖ－Ｌ型は、新規のサブタイプであってもよく、一部のサブファミリーが特定されている場合がある。これらのヌクレアーゼは、約１０００～１１００アミノ酸長である。Ｖ－Ｌ型は、Ｖ－Ａ型エフェクターと同じＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に見出され得る。ＲｕｖＣ触媒残基は、Ｖ－Ｌ型候補に対して特定されている場合があり、これらのＶ－Ｌ型候補は、ｔｒａｃｒＲＮＡを必要としない場合がある。Ｖ－Ｌ型の一例は、本明細書に記載されるＭＧ６０ヌクレアーゼである（図２８及び図３２を参照のこと）。

【０２１５】

いくつかの態様では、本開示は、より小さなＶ型エフェクターを提供する（図３０を参照のこと）。こうしたエフェクターは、小さな推定エフェクターであり得る。これらのエフェクターは、送達を単純化し得、治療用途を広げ得る。

【０２１６】

いくつかの態様では、本開示は、新規のＶ型エフェクターを提供する。こうしたエフェクターは、本明細書に記載されるＭＧ７０であり得る（図２９）。ＭＧ７０は、約３７３アミノ酸長の超低分子酵素であり得る。ＭＧ７０は、Ｎ末端に単一のトランスポターゼドメインを有してもよく、予測されるｔｒａｃｒＲＮＡを有してもよい（図３０及び図３２を参照のこと）。

【０２１７】

いくつかの態様では、本開示は、より小さなＶ型エフェクターを提供する（図３１を参照のこと）。こうしたエフェクターは、本明細書に記載されるＭＧ８１であり得る。ＭＧ８１は、約５００～７００アミノ酸長であってもよく、ＲｕｖＣ及びＨＴＨ　ＤＮＡ結合ドメインを含んでもよい。

【０２１８】

一態様では、本開示は、メタゲノミクスシーケンシングを介して発見された操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの場合では、メタゲノミクスシーケンシングは、試料上で実施される。いくつかの場合では、試料は、様々な環境から収集され得る。こうした環境は、ヒトマイクロバイオーム、動物マイクロバイオーム、高温環境、低温環境であり得る。こうした環境は、堆積物を含み得る。本明細書に記載される操作されたヌクレアーゼ系のこうした環境のタイプの例は、図に見出され得る。

【０２１９】

一態様では、本開示は、（ａ）エンドヌクレアーゼを含む操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。エンドヌクレアーゼは、ＲｕｖＣドメインを含み得る。いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系は、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡを含む。いくつかの場合では、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いる。いくつかの場合では、操作されたガイドＲＮＡは、スペーサー配列を含む。いくつかの場合では、スペーサー配列は、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。

【０２２０】

一態様では、本開示は、（ａ）エンドヌクレアーゼ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、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つと少なくとも７０％の配列同一性を有する。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つと少なくとも約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。

【０２２１】

いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の同一性を有するバリアントを含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つと実質的に同一であり得る。

【０２２２】

いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系は、操作されたガイドＲＮＡを含む。いくつかの場合では、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いる。いくつかの場合では、操作されたガイドＲＮＡは、スペーサー配列を含む。いくつかの場合では、スペーサー配列は、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。

【０２２３】

一態様では、本開示は、（ａ）エンドヌクレアーゼを含む操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、プロトスペ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。いくつかの場合では、ＰＡＭ配列は、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つに対して実質的に同一である。いくつかの場合では、ＰＡＭ配列は、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つである。ある場合には、エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系は、（ｂ）操作されたガイドＲＮＡを含む。いくつかの場合では、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いる。いくつかの場合では、操作されたガイドＲＮＡは、スペーサー配列を含む。いくつかの場合では、スペーサー配列は、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。

【０２２４】

いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１又はＣｍｓ１エンドヌクレアーゼではない。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、ジンクフィンガー様ドメインを更に含む。

【０２２５】

いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、最初の１９ヌクレオチド又は、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、若しくは３８５１～３８５７の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、最初の１９ヌクレオチド又は、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、若しくは３８５１～３８５７の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の同一性を有する配列を含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、最初の１９ヌクレオチド又は、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、若しくは３８５１～３８５７の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の同一性を有するバリアントを含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、最初の１９ヌクレオチド又は、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、若しくは３８５１～３８５７の非縮重ヌクレオチドと実質的に同一である配列を含む。

【０２２６】

いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、最初の１９ヌクレオチド又は、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７

２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、若しくは３８５１～３８５７の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の同一性を有する配列を含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドＲＮＡに結合するように構成されている。いくつかの場合では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、操作されたガイドＲＮＡに結合するように構成されている。いくつかの場合では、クラス２、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、操作されたガイドＲＮＡに結合するように構成されている。いくつかの場合では、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、操作されたガイドＲＮＡに結合するように構成されている。いくつかの場合では、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、操作されたガイドＲＮＡに結合するように構成されている。

【０２２７】

いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つを含むプロトスペ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。

【０２２８】

いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、真核生物、真菌、植物、哺乳類、又はヒトゲノムポリヌクレオチド配列と相補的である配列を含む。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と相補的である配列を含む。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と相補的である配列を含む。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と相補的である配列を含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、哺乳類ゲノムポリヌクレオチド配列と相補的である配列を含む。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と相補的である配列を含む。

【０２２９】

いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、３０～２５０ヌクレオチド長である。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、４２～４４ヌクレオチド長である。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、４２ヌクレオチド長である。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、４３ヌクレオチド長である。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、４４ヌクレオチド長である。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、８５～２４５ヌクレオチド長である。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、９０超のヌクレオチド長である。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、２４５未満のヌクレオチド長である。

【０２３０】

いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）を有するバリアントを含み得る。ＮＬＳは、エンドヌクレアーゼのＮ末端又はＣ末端の近位にあってもよい。ＮＬＳは、配列番号３９３８～３９５３のうちのいずれか１つ、又は配列番号３９３８～３９５３のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の同一性を有するバリアントに対してＮ末端又はＣ末端に付加され得る。いくつかの場合では、ＮＬＳは、配列番号３９３８～３９５３のうちのいずれか１つと実質的に同一である配列を含み得る。

【０２３１】

【表１】

表１：本開示に従ってＣａｓエフェクターとともに使用され得る例示的なＮＬＳ配列。

供給源	NLSアミノ酸配列	配列番号
SV40	PKKKRKV	3938
ヌクレオプラスミン二分子NLS	KRPAATKKAGQAKKKK	3939
c-myc NLS	PAAKRVKLD	3940
c-myc NLS	RQRRNELKRSP	3941
hRNPA1 M9 NLS	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY	3942
インポーチン-アルファIBBドメイン	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV	3943
筋腫Tタンパク質	VSRKRPRP	3944
筋腫Tタンパク質	PPKKARED	3945
p53	PQPKKKPL	3946
マウスc-abl IV	SALIKKKKKMAP	3947
インフルエンザウイルスNS1	DRLRR	3948
インフルエンザウイルスNS1	PKQKKRK	3949
肝炎ウイルスデルタ抗原	RKLKKKIKKL	3950
マウスMx1タンパク質	REKKKFLKRR	3951
ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ	KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK	3952
ステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイド	RKCLQAGMNLEARKTKK	3953

【０２３２】

いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系は、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ修復鋳型を更に含む。いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系は、一本鎖ＤＮＡ修復鋳型を更に含む。いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系は、二本鎖ＤＮＡ修復鋳型を更に含む。いくつかの場合では、一本鎖又は二本鎖のＤＮＡ修復鋳型は、５’から３’に、当該標的デオキシリボ核酸配列に対して５’の、少なくとも２０個のヌクレオチドの配列を含む第１の相同アーム、少なくとも１０個のヌクレオチドの合成ＤＮＡ配列、及び当該標的配列に対して３’の、少なくとも２０個のヌクレオチドの配列を含む第２の相同アームを含み得る。

【０２３３】

いくつかの場合では、第１の相同アームは、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも１１０、少なくとも１２０、少なくとも１３０、少なくとも１４０、少なくとも１５０、少なくとも１７５、少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも７５０、又は少なくとも１０００個のヌクレオチドの配列を含む。いくつかの場合では、第２の相同アームは、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも１１０、少なくとも１２０、少なくとも１３０、少なくとも１４０、少なくとも１５０、少なくとも１７５、少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも７５０、又は少なくとも１０００個のヌクレオチドの配列を含む。

【０２３４】

いくつかの場合では、第１及び第２の相同アームは、原核生物のゲノム配列に対して相同である。いくつかの場合では、第１及び第２の相同アームは、細菌のゲノム配列に対して相同である。いくつかの場合では、第１及び第２の相同アームは、真菌のゲノム配列に対して相同である。いくつかの場合では、第１及び第２の相同アームは、真核生物のゲノム配列に対して相同である。

【０２３５】

いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系は、ＤＮＡ修復鋳型を更に含む。ＤＮＡ修復鋳型は、二本鎖ＤＮＡセグメントを含んでもよい。二本鎖ＤＮＡセグメントには、１つの一本鎖ＤＮＡセグメントが隣接していてもよい。二本鎖ＤＮＡセグメントには、２つの一本鎖ＤＮＡセグメントが隣接していてもよい。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、二本鎖ＤＮＡセグメントの５’末端にコンジュゲートされる。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、二本鎖ＤＮＡセグメントの３’末端にコンジュゲートされる。

【０２３６】

いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、１～１５ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、４～１０ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、４ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、５ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、６ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、７ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、８ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、９ヌクレオチド塩基の長さを有する。いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、１０ヌクレオチド塩基の長さを有する。

【０２３７】

いくつかの場合では、一本鎖ＤＮＡセグメントは、スペーサー配列内の配列と相補的であるヌクレオチド配列を有する。いくつかの場合では、二本鎖ＤＮＡ配列は、バーコード、オープンリーディングフレーム、エンハンサー、プロモーター、タンパク質コード配列、ｍｉＲＮＡコード配列、ＲＮＡコード配列、又は導入遺伝子を含む。

【０２３８】

いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系は、Mg^{2+}の供給源を更に含む。

【０２３９】

いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、少なくとも８個の塩基対リボヌクレオチドを含むヘアピンを含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、少なくとも９個の塩基対リボヌクレオチドを含むヘアピンを含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１０個の塩基対リボヌクレオチドを含むヘアピンを含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１１個の塩基対リボヌクレオチドを含むヘアピンを含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１２個の塩基対リボヌクレオチドを含むヘアピンを含む。

【０２４０】

いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアント１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１、又はそのバリアントのバリアントと少なくとも７０％同一である配列を含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントのバリアントと少なくとも７５％同一である配列を含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントのバリアントと少なくとも８０％同一である配列を含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１

つ又はそのバリアントのバリアントと少なくとも８５％同一である配列を含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントのバリアントと少なくとも９０％同一である配列を含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントのバリアントと少なくとも９５％同一である配列を含む。

【０２４１】

いくつかの場合では、ガイドＲＮＡ構造は、最初の１９ヌクレオチド又は配列番号３６０８の非縮重ヌクレオチドと少なくとも７０％同一の配列を含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡ構造は、最初の１９ヌクレオチド又は配列番号３６０８の非縮重ヌクレオチドと少なくとも７５％同一の配列を含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡ構造は、最初の１９ヌクレオチド又は配列番号３６０８の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％同一の配列を含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡ構造は、最初の１９ヌクレオチド又は配列番号３６０８の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８５％同一の配列を含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡ構造は、最初の１９ヌクレオチド又は配列番号３６０８の非縮重ヌクレオチドと少なくとも９０％同一の配列を含む。いくつかの場合では、ガイドＲＮＡ構造は、最初の１９ヌクレオチド又は配列番号３６０８の非縮重ヌクレオチドと少なくとも９５％同一の配列を含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号３８６３～３９１３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。

【０２４２】

いくつかの場合では、配列は、ＢＬＡＳＴＰ、ＣＬＵＳＴＡＬＷ、ＭＵＳＣＬＥ、若しくはＭＡＦＦＴアルゴリズム、又はＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ相同性検索アルゴリズムパラメーターを用いたＣＬＵＳＴＡＬＷアルゴリズムによって決定され得る。配列同一性は、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、条件付き組成スコアマトリックス調整を使用した、当該ＢＬＡＳＴＰ相同性検索アルゴリズムによって決定され得る。

【０２４３】

一態様では、本開示は、（ａ）ＤＮＡ標的化セグメントを含む操作されたガイドＲＮＡを提供する。いくつかの場合では、ＤＮＡ標的化セグメントは、標的配列と相補的であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの場合では、標的配列は、標的ＤＮＡ分子中にある。いくつかの場合では、操作されたガイドＲＮＡは、（ｂ）タンパク質結合セグメントを含む。いくつかの場合では、タンパク質結合セグメントは、２つの相補的なヌクレオチドのストレッチを含む。いくつかの場合では、２つの相補的なヌクレオチドのストレッチは、ハイブリダイズして、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖を形成する。いくつかの場合では、２つの相補的なヌクレオチドのストレッチは、介在するヌクレオチドと互いに共有結合している。いくつかの場合では、操作されたガイドリボ核酸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ことができる。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つと少なくとも約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。いくつかの場合では、複合体は、標的ＤＮＡ分子の標的配列を標的とする。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡ標的化セグメントは、２つの相補的なヌクレオチドのストレッチの両方の３’に位置付けられる。いくつかの場合では、タンパク質結合セグメ

ントは、最初の１９ヌクレオチド又は、配列番号３６０８の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約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％の同一性を有する配列を含む。

【０２４５】

いくつかの場合では、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖は、少なくとも８個のリボヌクレオチドを含む。いくつかの場合では、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖は、少なくとも９個のリボヌクレオチドを含む。いくつかの場合では、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖は、少なくとも１０個のリボヌクレオチドを含む。いくつかの場合では、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖は、少なくとも１１個のリボヌクレオチドを含む。いくつかの場合では、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖は、少なくとも１２個のリボヌクレオチドを含む。

【０２４６】

いくつかの場合では、デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドをコードする。

【０２４７】

一態様では、本開示は、操作された核酸配列を含む核酸を提供する。いくつかの場合では、操作された核酸配列は、生物における発現のために最適化される。いくつかの場合では、核酸は、エンドヌクレアーゼをコードする。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２エンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。いくつかの場合では、生物は、未培養生物ではない。

【０２４８】

いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するバリアントを含む。

【０２４９】

いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）を有するバリアントを含み得る。ＮＬＳは、エンドヌクレアーゼのＮ末端又はＣ末端の近位にあってもよい。ＮＬＳは、配列番号３９３８～３９５３のうちのいずれか１つ、又は配列番号３９３８～３９５３のうちのいずれか１つと少なくとも約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％の配列同一性を有するバリアントに対してＮ末端又はＣ末端に付加され得る。

【０２５０】
いくつかの場合では、生物は、原核生物である。いくつかの場合では、生物は、細菌である。いくつかの場合では、生物は、真核生物である。いくつかの場合では、生物は、真菌である。いくつかの場合では、生物は、植物である。いくつかの場合では、生物は、哺乳類である。いくつかの場合では、生物は、齧歯類である。いくつかの場合では、生物は、ヒトである。
【０２５１】
一態様では、本開示は、操作されたベクターを提供する。いくつかの場合では、操作されたベクターは、エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む。ある場合には、エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。
【０２５２】
いくつかの場合では、操作されたベクターは、本明細書に記載される核酸を含む。いくつかの場合では、本明細書に記載される核酸は、本明細書に記載されるデオキシリボ核酸ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミド、ミニサークル、ＣＥＬｉＤ、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）由来ビリオン、又はレンチウイルスである。
【０２５３】
一態様では、本開示は、本明細書に記載されるベクターを含む細胞を提供する。
【０２５４】
一態様では、本開示は、エンドヌクレアーゼを製造する方法を提供する。いくつかの場合では、方法は、細胞を培養することを含む。
【０２５５】
一態様では、本開示は、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを結合、切断、マーキング、又は修飾する方法を提供する。方法は、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドをエンドヌクレアーゼと接触させることを含み得る。ある場合には、エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドＲＮＡと複合体化される。いくつかの場合では、操作されたガイドＲＮＡ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。いくつかの場合では、操作されたガイドＲＮＡは、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドに結合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ＲＮＡは、エンドヌクレアーゼに、及び二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドに結合するように構成されている。いくつかの場合では、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を含む。いくつかの場合では、ＰＡＭ配列は、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つを含む配列である。
【０２５６】
いくつかの場合では、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、操作されたガイドＲＮＡの配列と相補的である配列を含む第１の鎖と、ＰＡＭを含む第２の鎖とを含む。いくつかの場合では、ＰＡＭは、操作されたガイドＲＮＡの配列と相補的である配列の５’末端に直接隣接する。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼ又はＣｍｓ１エンドヌクレアーゼではない。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。いくつかの場合では、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、真核生物、植物、真菌、哺乳類、齧歯類、又はヒト二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドである。いくつかの場合では、ＰＡＭは、配列番号３８６３～３９

１３のうちのいずれか１つを含む。
【０２５７】
一態様では、本開示は、標的核酸遺伝子座を修飾する方法を提供する。方法は、本明細書に記載される操作されたヌクレアーゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することを含み得る。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドリボ核酸構造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、複合体は、複合体の標的核酸遺伝子座への結合時に、複合体が標的核酸遺伝子座を修飾するように構成されている。
【０２５８】
いくつかの場合では、標的核酸遺伝子座を修飾することは、当該標的核酸遺伝子座を結合、ニッキング、切断、又はマーキングすることを含む。いくつかの場合では、標的核酸遺伝子座は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）を含む。いくつかの場合では、標的核酸は、ゲノムＤＮＡ、ウイルスＤＮＡ、ウイルスＲＮＡ、又は細菌ＤＮＡを含む。いくつかの場合では、標的核酸遺伝子座は、インビトロである。いくつかの場合では、標的核酸遺伝子座は、細胞内にある。いくつかの場合では、細胞は、原核細胞、細菌細胞、真核細胞、真菌細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、齧歯類細胞、霊長類細胞、初代細胞、又はヒト細胞である。
【０２５９】
いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系の標的核酸遺伝子座への送達は、本明細書に記載される核酸又は本明細書に記載されるベクターを送達することを含む。いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系の標的核酸遺伝子座への送達は、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸を送達することを含む。いくつかの場合では、核酸は、プロモーターを含む。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームは、プロモーターに作動可能に連結されている。
【０２６０】
いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系の標的核酸遺伝子座への送達は、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含むキャッピングされたｍＲＮＡを送達することを含む。いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系の標的核酸遺伝子座への送達は、翻訳されたポリペプチドを送達することを含む。いくつかの場合では、操作されたヌクレアーゼ系の標的核酸遺伝子座への送達は、リボ核酸（ＲＮＡ）ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターに作動可能に連結された操作されたガイドＲＮＡをコードするデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を送達することを含む。
【０２６１】
いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、標的遺伝子座で、又は標的遺伝子座の近位で、一本鎖切断又は二本鎖切断を誘導する。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼは、当該標的遺伝子座内又は当該標的遺伝子座の３’に互い違いの一本鎖切断を誘導する。
【０２６２】
いくつかの場合では、エフェクター反復モチーフを使用して、ＭＧヌクレアーゼのガイド設計を通知する。例えば、Ｖ－Ａ型系における処理されたｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ反復の最後の２０～２２ヌクレオチドを含む。この配列は、可能性のある標的のライブラリー上で切断のために、ｃｒＲＮＡ（スペーサーとともに）に合成され、合成ヌクレアーゼとともにインビトロで試験され得る。この方法を使用して、ＰＡＭが決定され得る。いくつかの場合では、Ｖ－Ａ型酵素は、「ユニバーサル」ｇＲＮＡを使用し得る。いくつかの場合では、Ｖ型酵素は、固有のｇＲＮＡを利用し得る。
【０２６３】
脂質ナノ粒子
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することができ、参照により全ての目的のために本明細書に組み込まれるＷＯ２０１２／１３５８０５（Ａ２）に記載されるように概して製剤

化することができる。こうしたナノ粒子は、概して、（ａ）カチオン性脂質（例えば、図１０９に記載される脂質のうちのいずれか）、（ｂ）中性脂質（例えば、ＤＳＰＣ又はＤＯＰＥ）、（ｃ）ステロール（例えば、コレステロール又はコレステロール類似体）、及び（ｄ）ＰＥＧ修飾脂質（例えば、ＰＥＧ－ＤＭＧ）を含み得る。

【０２６４】

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おり、それらの両方は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。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つ又はそれ以上のいずれかの構成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には、これらに限定されないが、９８Ｎ１２－５（又は図１０９に記載される他の構造のうちのいずれか）が挙げられ、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）を含み得る。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。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＵＳ１０７０９７７９（Ｂ２）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１０９に示されるカチオン性脂質のうちのいずれかからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ナノ粒子は、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。

【０２６６】

本開示の系は、例えば、核酸分子に結合する（例えば、配列特異的結合）、核酸編集（例えば、遺伝子編集）などの様々な用途に使用され得る。このような系は、例えば、対象において疾患を引き起こす可能性のある遺伝的に受け継がれた変異に対処する（例えば、除去又は置換する）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）、特定のヌクレオチド配列（例えば、細菌内の抗生物質耐性をコードする配列）を標的と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化するか、若しくは宿主細胞に感染できないようにするため、価値ある低分子、高分子、若しくは二次代謝産物を生じるように生物を操作するための遺伝子を加えるか、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、バイオセンサーとして外来低分子及びヌクレオチドによる細胞の摂動を検出するため使用され得る。

【実施例】

【０２６７】

実施例１－新しいタンパク質のメタゲノミクス分析の方法

メタゲノミクス試料を、沈殿物、土壌、及び動物から収集した。デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を、Ｚｙｍｏｂｉｏｍｉｃｓ ＤＮＡミニプレップキットを用いて抽出し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ（登録商標）２５００で配列決定した。試料を、所有者の同意を得て収集した。クラスＩＩ、Ｖ型ＣａｓエフェクタータンパクＣａｓタンパク質配列に基づいて生成された隠れマルコフモデルを使用してメタゲノミクス配列データを検索し、新しいＣａｓエフェクターを特定した（図を参照されたく、これは、高温試料などの試料タイプから特定された１つのファミリーＭＧ２９で検出されたタンパク質の分布を示す）。検索によって特定された新規のエフェクタータンパク質を、特定されたタンパク質に整列させて、潜在的な活性部位を特定した（例えば、図を参照されたく、これは、様々な試料から特定された全てのＭＧ２９ファミリーエフェクターが、ＲｕｖＣＩ、ＲｕｖＣＩＩ、及びＲｕｖＣＩＩＩ触媒ドメインから３つの触媒残基を有し、活性であると予測されることを示す）。このメタゲノミクスワークフローは、本明細書に記載される：３４７１，３５３９，３５５１－３５５ＭＧ１１，ＭＧ１３，ＭＧ１９，ＭＧ２０，ＭＧ２６，ＭＧ２８，ＭＧ２９，ＭＧ３０，ＭＧ３１，ＭＧ３２，ＭＧ３７，９，３６０８－３６０９，３６１２，３６３６－３６３７，３６４０－３６４１，３６４４－３６４５，３６４８－３６４９，３６５２－３６５３，３６５６－３６５７，３６６０－３６６１，３６６４－３６６７，３６７１－３６７２，３６７８，３６９５－３６９６，３７２９－３７３０，３７３４－３７３５，３８５１－３８５７及びＭＧ９１ファミリーの説明をもたらした。推定スペーサー配列は、エフェクタータンパク質をコードするゲノム遺伝子座に隣接するそれらの位置によって特定された。

【０２６８】

実施例２－新しいタンパク質のメタゲノミクス分析の方法

１３個の動物マイクロバイオーム、高温バイオフィルム、及び沈殿物試料を収集し、収集後に氷上又はＺｙｍｏ ＤＮＡ／ＲＮＡ Ｓｈｉｅｌｄに保存した。Ｑｉａｇｅｎ ＤＮｅａｓｙ ＰｏｗｅｒＳｏｉｌ Ｋｉｔ又はＺｙｍｏＢＩＯＭＩＣＳ ＤＮＡ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔのいずれかを使用して、試料からＤＮＡを抽出した。ＤＮＡシーケンシングライブラリーを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ ４０００又はＶｉｎｃｅｎｔ Ｊ．Ｃｏａｔｅｓ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（ＵＣ Ｂｅｒｋｅｌｅｙ）のＮｏｖａｓｅｑマシンで、４００～８００ｂｐの標的挿入サイズを有する対になった１５０ｂｐ読み取り（試料当たり１０ＧＢのシーケンシングを標的とした）を用いて、構築及び配列決定した。公的に入手可能なメタゲノミクスシーケンシングデータをＮＣＢＩ ＳＲＡからダウンロードした。配列決定の読み取りは、ＢＢＭａｐ（Ｂｕｓｈｎｅｌｌ Ｂ．，ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔ／ｐｒｏｊｅｃｔｓ／ｂｂｍａｐ／）を使用してトリミングされ、Ｍｅｇａｈｉｔ １１と組み立てられた。オープンリーディングフレーム及びタンパク質配列をＰｒｏｄｉｇａｌで予測した。特定されたＶ－Ａ型ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼのＨＭＭプロファイルを構築し、ＨＭＭＥＲ３（ｈｍｍｅｒ．ｏｒｇ）を使用して全ての予測されたタンパク質に対して検索して、潜在的なエフェクターを特定した。組み立てたコンティグ上のＣＲＩＳＰＲアレイを、Ｍｉｎｃｅｄ（ｈｔｔｐｓ：／／ｇｉｔｈｕｂ．ｃｏｍ／ｃｔＳｋｅｎｎｅｒｔｏｎ／ｍｉｎｃｅｄ）で予測した。分類法は、Ｋａｉｊｕを有するタンパク質に割り当てられ、コンティグ分類法は、全てのコードされたタンパク質のコンセンサスを見つけることによって決定された。

【０２６９】
予測及び参照（例えば、ＬｂＣａｓ１２ａ、ＡｓＣａｓ１２ａ、ＦｎＣａｓ１２ａ）Ｖ型エフェクタータンパク質をＭＡＦＦＴと整列させ、ＦａｓＴｒｅｅ２を使用して系統樹を推定した。新規のファミリーは、この研究から回収された配列から構成されるクレードを特定することによって描写された。ファミリー内から、候補を、それらが可能な限り系統発生的な多様性をサンプリングする方法で、実験室分析のための構成要素を含む（すなわち、それらはＣＲＩＳＰＲアレイを用いた十分に組み立てられ、注釈付けされたコンティグで見出された）場合に、選択した。多様なファミリー（すなわち、より広範なタンパク質配列を共有する代表を有するファミリー）からの小さなエフェクターを優先付けた。選択された代表的な配列及び参照配列を、ＭＵＳＣＬＥ及びＣｌｕｓｔａｌ Ｗを使用して整列させて、触媒残基及びＰＡＭ相互作用残基を特定した。ＣＲＩＳＰＲアレイ反復を、Ｖ－Ａ型系、ＴＣＴＡＣ－Ｎ－ＧＴＡＧＡ（１～８個のＮ残基を含む）に関連するモチーフについて検索した。この分析から、代表的なＣＲＩＳＰＲアレイがこれらのモチーフ配列のうちの１つを含んでいた場合、ファミリーはＶ－Ａと推定上分類された。このデータセットを使用して、Ｖ－Ａファミリーに関連するＨＭＭプロファイルを特定し、次いで、それを追加のファミリーを分類するために使用した（図３３～図３７）。慣習は、それらをコードする生物に基づいて新規のＣａｓ１２ヌクレアーゼを命名することであるが、本明細書に記載されるヌクレアーゼに対してそうすることは可能ではない。したがって、慣例に最良に遵守するために、本明細書に記載される系は、組み立てられたメタゲノミクス断片に由来することを示すために、接頭辞ＭＧを用いて命名される。

【０２７０】
１４０，８６７Ｍｂｐの組み立てられたメタゲノミクスシーケンシングデータを、多様な環境（土壌、熱親和性、沈殿物、ヒト及び非ヒトマイクロバイオーム）からマイニングした。合計で１１９個のゲノム断片が、ＣＲＩＳＰＲアレイの横のＶ－Ａ型ヌクレアーゼに遠位に関連するＣＲＩＳＰＲエフェクターをコードした（図４Ｂ）。Ｖ－Ａ型エフェクターは、互いに、及び参照配列（例えば、ＬｂＣａｓ１２ａ、ＡｓＣａｓ１２ａ、ＦｎＣａｓ１２ａ）と、３０％未満の平均ペアワイズアミノ酸同一性を共有する１４個の新規のファミリーに分類された。一部のエフェクターは、ＲｕｖＣ及びアルファ－ヘリカル認識ドメイン、並びにＲｕｖＣＩ／ＣＩＩ／ＣＩＩＩドメインからの保存されたＤＥＤヌクレアーゼ触媒残基を含み（複数の配列アラインメントで特定され、例えば、以下の表１Ａを参照のこと）、これらのエフェクターが活性ヌクレアーゼであったことを示唆する（図５～図７）。新規のＶ－Ａ型ヌクレアーゼは、＜８００～１，４００アミノ酸長のサイズの範囲であり（図５Ａを参照のこと）、それらの分類は、多様なアレイの門にわたり（図４Ａ）、水平移動の可能性を示唆する。

【０２７１】
Ｖ－Ａ型ＣＲＩＳＰＲ系を担持する一部のゲノム断片はまた、Ｖ－Ａ型プライムと称される第２のエフェクターをコードした（Ｖ－Ａ’、図７Ａ）。例えば、Ｖ－Ａ型ＭＧ２６－２と１６．６％のアミノ酸同一性を共有するＶ－Ａ’型ＭＧ２６－１は、同じＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓオペロンでコードされ、同じｃｒＲＮＡをＭＧ２６－１と共有し得る（図７Ｂ）。ヌクレアーゼドメインは予測されなかったが、ＭＧ２６－２は、複数の配列アラインメントから特定された３つのＲｕｖＣ触媒残基を含んでいた（図７Ｂ）。

【０２７２】

【表２】

表１Ａ：アライメントによって特定された、本明細書に記載される酵素の触媒残基

MGID	RuvC-I (D)	RuvC-II (E)	RuvC-III (D)
MG84-16	238	337	413
MG84-15	238	337	413
MG84-3	230	329	405
MG84-2	230	329	405
MG84-1	230	329	405
MG84-13	233	332	408
MG84-14	233	332	408
MG84-12	233	332	408
MG84-11	233	332	408
MG84-10	233	332	408
MG84-9	233	332	408
MG84-8	233	332	408
MG84-7	233	332	408
MG84-4	233	332	408
MG84-5	233	332	408
MG84-6	233	332	408
MG81-18	296	399	497
MG81-17	296	399	497
MG81-9	297	400	498
MG81-6	297	400	498
MG81-11	297	400	498
MG81-7	297	400	498
MG81-8	297	400	498
MG81-13	297	400	498
MG81-5	300	403	501
MG81-12	300	403	501
MG81-1	300	403	502
MG81-4	310	413	501
MG81-3	310	413	511
MG81-15	388	491	589
MG81-10	310	413	511
MG81-2	306	409	507
MG90-2	388	548	661
MG91-1	444	560	653
MG91-2	245	358	453
MG91-3	297	404	499
MG37-1	763	1167	1335
MG37-2	169	538	689
MG37-3	745	1202	1350
MG37-4	811	1230	1377
MG37-5	775	1173	1319
MG37-6	698	1058	1229
MG37-7	752	1135	1273
MG53-1	--	775	920
MG54-1	--	612	722

【０２７３】

実施例３－（一般プロトコル）ＰＡＭ配列の特定／確認

ＣＲＩＳＰＲエフェクターによってインビトロで切断され得るＰＡＭ配列は、エフェクターをｃｒＲＮＡと、ｃｒＲＮＡのスペーサーと相補的である配列の５’末端に隣接して位置する８個の無作為化ヌクレオチドを有するプラスミドライブラリーとともにインキュベートすることによって特定される。プラスミドは、８個の無作為化ヌクレオチドが機能性ＰＡＭ配列を形成した場合、プラスミドが切断されるように構成されている。次いで、切断されたプラスミドの末端にアダプターをライゲーションし、次いで、アダプターを含むＤＮＡ断片を配列決定することによって、機能的ＰＡＭ配列を特定した。推定エンドヌ

クレアーゼは、Ｅ．ｃｏｌｉ溶解物ベースの発現系（ｍｙＴＸＴＬ、Ａｒｂｏｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で発現された。推定ヌクレアーゼをコードするＥ ｃｏｌｉコドン最適化ヌクレオチド配列を、Ｔ７プロモーターの制御下でＰＣＲ断片からインビトロで転写し、翻訳した。Ｔ７プロモーターとそれに続く反復スペーサー反復配列から構成される最小ＣＲＩＳＰＲアレイを有する第２のＰＣＲ断片を、同じ反応で転写した。エンドヌクレアーゼ配列及び反復スペーサー反復配列の発現に成功し、続いてＣＲＩＳＰＲアレイ処理により、活性なインビトロＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ複合体を得た。

【０２７４】

８Ｎ（変性）塩基（推定ＰＡＭ配列）が先行する最小アレイ中のそれと一致するスペーサー配列を含む標的プラスミドのライブラリーを、ＴＸＴＬ反応の生産物とともにインキュベートした。１～３時間後、反応を停止し、ＤＮＡクリーンアップキット、例えば、Ｚｙｍｏ ＤＣＣ、ＡＭＰｕｒｅ ＸＰビーズ、ＱｉａＱｕｉｃｋなどを介してＤＮＡを回収した。アダプター配列を、エンドヌクレアーゼによって切断された活性なＰＡＭ配列を有するＤＮＡ断片に平滑末端ライゲーションしたが、切断されなかったＤＮＡは、ライゲーションにはアクセスできなかった。次いで、活性ＰＡＭ配列を含むＤＮＡセグメントを、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を用いてＰＣＲにより増幅した。ＰＣＲ増幅産物をゲル上で分解して、切断事象に対応するアンプリコンを特定した。切断反応の増幅したセグメントも、ＮＧＳライブラリーの調製のための鋳型として、又はサンガーシーケンシングのための基質として使用した。開始８Ｎライブラリーのサブセットであるこの得られたライブラリーを配列決定することにより、ＣＲＩＳＰＲ複合体と適合するＰＡＭ活性を有する配列を明らかにした。処理されたＲＮＡ構築物を用いたＰＡＭ試験については、インビトロ転写ＲＮＡをプラスミドライブラリーとともに加え、最小ＣＲＩＳＰＲアレイ鋳型を省略したことを除いて、同じ手順を繰り返した。これらのアッセイでは、以下の配列を標的として使用した：ＣＧＴＧＡＧＣＣＡＣＣＡＣＧＴＣＧＣＡＡＧＣＣＴ（配列番号３８６０）；ＧＴＣＧＡＧＧＣＴＴＧＣＧＡＣＧＴＧＧＴＧＧＣＴ（配列番号３８６１）；
ＧＴＣＧＡＧＧＣＴＴＧＣＧＡＣＧＴＧＧＴＧＧＣＴ（配列番号３８５８）；及び
ＴＧＧＡＧＡＴＡＴＣＴＴＧＡＡＣＣＴＴＧＣＡＴＣ（配列番号３８５９）。

【０２７５】

実施例４－本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのＰＡＭ配列特定／確認

ＰＡＭ要件は、Ｅ．ｃｏｌｉ溶解物ベースの発現系（ｍｙＴＸＴＬ、Ａｒｂｏｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を介して、修飾を用いて決定された。簡潔には、Ｅ．ｃｏｌｉコドン最適化エフェクタータンパク質配列を、２９℃で１６時間、Ｔ７プロモーターの制御下で発現させた。次いで、この粗タンパク質ストックを、総反応体積の２０％の濃度で、インビトロ消化反応で使用した。反応物を、８Ｎ混合塩基が先行する定常標的配列、及びＮＥＢ緩衝液２．１（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ；ＮＥＢ緩衝液２．１は、候補を市販のタンパク質と比較するために選択された）中の標的配列と相補的である配列に連結されたエフェクターと同じＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に由来する５０ｎＭのインビトロ転写ｃｒＲＮＡを含む５ｎＭのプラスミドライブラリーとともに、３７℃で３時間インキュベートした。ＰＡＭ発見アッセイでは、タンパク質濃度は正規化されなかった（ＰＣＲ増幅シグナルは、低発現又は活性に対して高い感受性を提供する）。ＴＸＴＬ反応からの切断産物を、ＡＭＰｕｒｅ ＳＰＲＩビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いたクリーンアップを介して回収した。ＤＮＡは、クレノウ断片及びｄＮＴＰ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）の添加を介して平滑化した。平滑末端生成物を、１００倍過剰な二本鎖アダプター配列とライゲーションし、ＮＧＳライブラリーの調製のための鋳型として使用し、そこからＰＡＭ要件を配列分析から決定した。

【０２７６】

生のＮＧＳ読み取りを、Ｐｈｒｅｄ品質スコア＞２０によってフィルタリングした。ＰＡＭに隣接する骨格から特定されたＤＮＡ配列を表す２８ｂｐを基準として使用して、ＰＡＭ近位領域を見つけ、隣接する８ｂｐを推定ＰＡＭとして特定した。ＰＡＭとライゲー

ションアダプターとの間の距離も、各読み取りに対して測定された。参照配列又はアダプター配列と正確に一致しなかった読み取りは除外された。ＰＡＭ配列を、最も頻度の高い切断部位±２ｂｐを有するＰＡＭが分析に含まれるように、切断部位頻度によってフィルタリングした。この補正は、粗Ｅ．ｃｏｌｉ溶解物の使用に起因してランダム位置で起こり得る低レベルのバックグラウンド切断を除去した。このフィルタリング段階は、候補タンパク質のシグナル対ノイズ比に応じて、読み取りの２％～４０％を除去することができ、活性の低いタンパク質は、より多くのバックグラウンドシグナルを有する。参照ＭＧ２９－１については、この段階で読み取りの２％をフィルタリングした。ＰＡＭのフィルタリングされたリストを使用して、Ｌｏｇｏｍａｋｅｒを使用して配列ロゴを生成した。ＰＡＭのこれらの配列ロゴの描写を図２０～２４に表す。

【０２７７】

実施例５－ｔｒａｃｒＲＮＡ予測及びガイド設計

ｓｇＲＮＡ及び標的ＤＮＡに結合されたＡａｃＣ２ｃ１（Ｃａｓ１２ｂ）の三重複合体の結晶構造は、Ｒ－ＡＲ二重鎖１及びＲ－ＡＲ二重鎖２と示される、結合ｓｇＲＮＡ中の２つの別個の反復抗反復（Ｒ－ＡＲ）モチーフを明らかにする（本明細書の図８及び図９、並びにＹａｎｇ，Ｈｕｉ，Ｐｕ Ｇａｏ，Ｋａｎａｇａｌａｇｈａｔｔａ Ｒ．Ｒａｊａｓｈａｎｋａｒ，ａｎｄ Ｄｉｎｓｈａｗ Ｊ．Ｐａｔｅｌ．２０１６．“ＰＡＭ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｔａｒｇｅｔ ＤＮＡ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｌｅａｖａｇｅ ｂｙ Ｃ２ｃ１ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ．”Ｃｅｌｌ １６７（７）：１８１４－２８．ｅ１２及びＬｉｕ，Ｌｉａｎｇ，Ｐｅｎｇ Ｃｈｅｎ，Ｍｉｎ Ｗａｎｇ，Ｘｕｅｙａｎ Ｌｉ，Ｊｉｕｙｕ Ｗａｎｇ，Ｍａｏｌｕ Ｙｉｎ，ａｎｄ Ｙａｎｌｉ Ｗａｎｇ．２０１７．“Ｃ２ｃ１－ｓｇＲＮＡ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ｒｅｖｅａｌｓ ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ ＤＮＡ Ｃｌｅａｖａｇｅ Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ．”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ ６５（２）：３１０－２２を参照されたく、それら各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。本明細書に開示されるＣＲＩＳＰＲエフェクターに対する推定ｔｒａｃｒＲＮＡ配列は、天然ＣＲＩＳＰＲアレイの周囲のゲノムコンテキストにおける抗反復配列を検索することによって特定され、Ｒ－ＡＲ二重鎖２抗反復配列は、Ｒ－ＡＲ二重鎖１抗反復配列の上流（よりもｔｒａｃｒＲＮＡの５’末端に近い）の約２０～９０ヌクレオチドで発生する。ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の特定後、各酵素について２つのガイド配列を設計した。第１のものは、Ｒ－ＡＲ二重鎖１及び２の両方を含み（例えば、配列番号３６３６、３６４０、３６４４、３６４８、３６５２、３６５６、３６６０、３６７１、及び３６７２を参照のこと）、第２のものは、この領域が切断に必須ではない場合があるため、Ｒ－ＡＲ二重鎖１領域が欠失した短いガイド配列であった（例えば、配列番号３６３７、３６４１、３６４５、３６４９、３６５３、３６５７、及び３６６１を参照のこと）。

【０２７８】

実施例６－予測されたＲＮＡフォールディングのプロトコル

３７℃でのＲＮＡ配列の予測されたＲＮＡフォールディングを、Ａｎｄｒｏｎｅｓｃｕ２００７（これは参照により本明細書に完全に組み込まれる）の方法を使用して計算した。

【０２７９】

実施例７－ＲＮＡガイドの特定

Ｖ－Ａ型エフェクター及びＣＲＩＳＰＲアレイをコードしたコンティグについては、反復の二次構造フォールディングは、新規のＶ－Ａ型系が単一のガイドｃｒＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ、図１０Ａ～Ｄ）を必要とすることを示した。ｔｒａｃｒＲＮＡ配列は特定されなかった。ｓｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ反復の３’末端から約１９～２２ｎｔを含んでいた。インビトロ活性について試験されたＶ－Ａ型候補のうちの６つからのＣＲＩＳＰＲ反復の多重配列アラインメントは、反復の３’末端に高度に保存されたモチーフを示し、これはｓｇＲＮＡのステム－ループ構造を形成した（図１０Ｃ）。モチーフであるＵＣＵＡＣ［Ｎ３－５］ＧＵＡＧＡＵは、３～５個のヌクレオチド（ループ）によって分離された短い

回文反復（ステム）を含んでいた。

【０２８０】

ｓｇＲＮＡモチーフの保存を使用して、分類されたＶ－Ａ型ヌクレアーゼとの類似性を示さない場合がある新規のエフェクターを明らかにした。モチーフを、６９，１１７個のＣＲＩＳＰＲアレイからの反復で検索した。最も一般的なモチーフは、４ヌクレオチドループを含んでいたが、３及び５ヌクレオチドループはあまり一般的ではなかった（図１２、図１３、図１４、図１５、及び図１６）。反復モチーフを含むＣＲＩＳＰＲアレイを囲むゲノムコンテキストの検査により、様々な長さの多数のエフェクターが明らかになった。例えば、ファミリーＭＧ５７のエフェクターは、特定されたＶ－Ａ型ヌクレアーゼ（平均約１４００ａａ）の中で最も大きく、４ｂｐループで反復をコードした。ＨＭＭ分析から特定された別のファミリーは、異なる反復モチーフ、ＣＣＵＧＣ［Ｎ$_{3-4}$］ＧＣＡＧＧを含んでいた（図５Ｃ、５Ｄを参照のこと）。配列は異なるが、構造は、非常に類似したステムループ構造に折り畳まれると予測された。

【０２８１】

実施例８－ＭＧ　ＣＲＩＳＰＲ複合体のインビトロ切断効率

エンドヌクレアーゼは、タンパク質分解酵素欠損Ｅ．ｃｏｌｉＢ株における誘導性Ｔ７プロモーターからのＨｉｓタグ付き融合タンパク質として発現される。Ｈｉｓタグ付きタンパク質を発現している細胞を超音波処理によって溶解し、Ｈｉｓタグ付きタンパク質を、ＡＫＴＡ　Ａｖａｎｔ　ＦＰＬＣ（ＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅ）上のＨｉｓＴｒａｐ　ＦＦカラム（ＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅ）上のＮｉ－ＮＴＡ親和性クロマトグラフィーによって精製する。溶離液をアクリルアミドゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上のＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分解し、ＩｎｓｔａｎｔＢｌｕｅ　Ｕｌｔｒａｆａｓｔ　ｃｏｏｍａｓｓｉｅ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で染色する。純度を、ＩｍａｇｅＬａｂソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いたタンパク質バンドの濃度測定法を使用して決定する。精製されたエンドヌクレアーゼを、５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、３００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＴＣＥＰ、５％のグリセロール、ｐＨ７．５から構成される保存緩衝液に透析し、－８０℃で保存する。ペーサー配列及びＰＡＭ配列を含む標的ＤＮＡ（例えば、実施例３又は実施例４のいずれかで決定される）は、ＤＮＡ合成によって構築される。ＰＡＭが縮重塩基を有する場合の試験のため、単一の代表的なＰＡＭを選択する。標的ＤＮＡは、ＰＡＭ及び一端から７００ｂｐに位置するスペーサーを用いたＰＣＲ増幅を介してプラスミドに由来する２２００ｂｐの直鎖ＤＮＡからなる。切断の成功は、７００及び１５００ｂｐの断片をもたらす。標的ＤＮＡ、インビトロ転写単一ＲＮＡ、及び精製した組換えタンパク質を、過剰なタンパク質及びＲＮＡを含む切断緩衝液（１０ｍＭのトリス、１００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$）中で組み合わせ、５分～３時間、通常は１時間インキュベートする。反応を、ＲＮＡｓｅ　Ａの添加及び６０分のインキュベーションを介して停止させる。次いで、反応物を１．２％ＴＡＥアガロースゲル上で分解し、切断した標的ＤＮＡの画分をＩｍａｇｅＬａｂソフトウェアで定量化する。

【０２８２】

実施例９－Ｅ．ｃｏｌｉにおけるＭＧ　ＣＲＩＳＰＲ複合体のゲノム切断活性の試験

Ｅ．ｃｏｌｉは、二本鎖ＤＮＡ切断を効率的に修復する能力を欠く。したがって、ゲノムＤＮＡの切断は、致命的な事象であり得る。この現象を利用して、エンドヌクレアーゼ活性を、スペーサー／標的を有する標的株においてエンドヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡ（例えば、実施例６で決定される）を組換え発現させることによって、Ｅ．ｃｏｌｉで試験し、それらのゲノムＤＮＡに組み込まれたそのゲノムＤＮＡ（例えば、実施例４で決定される）に組み込まれたＰＡＭ配列を、エンドヌクレアーゼをコードするＤＮＡで形質転換する。次いで、形質転換体を、化学能力を有するようにし、標的配列に特異的（「オンターゲット」）、又は標的に非特異的（「非標的」）かのいずれかの５０ｎｇのガイドＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ）で形質転換する。ヒートショック後、形質転換を、ＳＯＣ中、３７℃で２時間回収した。次いで、ヌクレアーゼ効率を、誘導培地上で成長させた５倍希釈系列によって決定する。コロニーを、３つ組で希釈系列から定量化する。オフターゲ

ットガイドＲＮＡで形質転換されたコロニー数と比較して、オンターゲットガイドＲＮＡで形質転換されたコロニー数の低減は、エンドヌクレアーゼによる特異的ゲノム切断を示す。

【０２８３】

実施例１０－一般的手順：哺乳類細胞におけるＭＧ　ＣＲＩＳＰＲ複合体のゲノム切断活性の試験

哺乳類発現ベクターの２つのタイプを使用して、哺乳類細胞における標的化及び切断活性が検出される。第１に、ＭＧ　Ｃａｓエフェクターは、Ｃ末端ＳＶ４０　ＮＬＳ及びＧＦＰタグに連結されたウイルス２Ａコンセンサス切断可能ペプチド配列（タンパク質の発現を監視するための２Ａ－ＧＦＰタグ）に融合される。第２に、ＭＧ　Ｃａｓエフェクターは、２つのＳＶ４０　ＮＬＳ配列に融合され、一方はＮ末端に、他方はＣ末端に融合される。ＮＬＳ配列は、本明細書に記載されるＮＬＳ配列のうちのいずれかを含む（例えば、配列番号３９３８～３９５３）。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を、哺乳類細胞における発現のためにコドン最適化する。

【０２８４】

哺乳類標的ＤＮＡと相補的である配列に融合されたｃｒＲＮＡ配列を有する単一ガイドＲＮＡを、第２の哺乳類発現ベクターにクローニングする。２つのプラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトする。共トランスフェクションの７２時間後、ＤＮＡを、形質転換したＨＥＫ２９３Ｔ細胞から抽出し、ＮＧＳライブラリーの調製に使用する。ＮＨＥＪのパーセントを標的部位におけるインデルを定量化することによって測定して、哺乳類細胞における酵素の標的化効率を示す。各タンパク質の活性を試験するために、少なくとも１０個の異なる標的部位を選択する。

【０２８５】

実施例１１－哺乳類細胞におけるＭＧ　ＣＲＩＳＰＲ複合体のゲノム切断活性の試験

哺乳類細胞における標的化及び切断活性を示すために、ＭＧ　Ｃａｓエフェクタータンパク質配列を、隣接するＮ末端及びＣ末端ＳＶ４０　ＮＬＳ配列、Ｃ末端Ｈｉｓタグ、及び２Ａ－ＧＦＰ（例えば、ＧＦＰに連結されたウイルス２Ａコンセンサス切断可能ペプチド配列）タグを有する哺乳類発現ベクターに、Ｈｉｓタグの後のＣ末端でクローニングした（骨格１）。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞における発現のためにコドン最適化されたか、又は哺乳類細胞における発現のためにコドン最適化された、天然配列である。

【０２８６】

目的の遺伝子標的を有する単一ガイドＲＮＡ配列（ｓｇＲＮＡ）も、哺乳類発現ベクターにクローニングした。２つのプラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトする。発現プラスミドとｓｇＲＮＡ標的化プラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクションしてから７２時間後、ＤＮＡを抽出し、ＮＧＳライブラリーの調製に使用した。ＮＨＥＪのパーセントを標的部位の配列決定におけるインデルを介して測定して、哺乳類細胞における酵素の標的化効率を示した。７～１２個の異なる標的部位を各タンパク質の活性を試験するために選択した。５％インデルの任意の閾値を使用して、活性候補を特定した。ヒト細胞におけるゲノム編集効率を、切断オフセット＝－４及びウィンドウ＝１０のパラメーターを使用して、ＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏを用いたＮＧＳ読み取りから評価した。ＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏ出力からの全ての切断後事象を、±１ｂｐのインデル／変異、並びに≧２ｂｐの欠失、挿入、及び変異について合計した。全ての結果を、予想されるアンプリコンに整列させた総配列に対して正規化した（図１８Ａ～Ｅ）

【０２８７】

実施例１２－ＭＧ２９ファミリーの特性付け

ＰＡＭ特異性、ｔｒａｃｒＲＮＡ／ｓｇＲＮＡ検証

ＭＧ２９ファミリーエンドヌクレアーゼ系の標的化エンドヌクレアーゼ活性を、実施例３及び実施例８に記載されるｍｙＴＸＴＬ系を使用して確認した。このアッセイでは、切断された標的プラスミドのＰＣＲ増幅により、図１７Ａ及びＢに示されるように、ゲル中

のおよそ１７０ｂｐで遊走する産物が得られる。ＭＧ２９－１については、配列番号３６０９に対応するｃｒＲＮＡを用いて増幅産物が観察された（図１７Ａ、レーン７）。ＰＣＲ産物の配列決定により、以下の表２に示されるように、これらの酵素の活性ＰＡＭ配列が明らかになった。

【０２８８】

【表３】

表２：様々な標的部位におけるＭＧ２９－１の活性

標的 ID	標的配列	PAM を含む 5'配列	遺伝子座	NHEJ% (平均±標準偏差)
標的 1	TGTCAGAAGCAAATGTAAGCAATA (配列番号 3914)	AACACAGTTG (配列番号 3890)	HBB	2.185±0.007
標的 2	CTGAAAGGTTATTGTTGTGTTTGT (配列番号 3915)	TACAGTTTTG (配列番号 3891)	フィブリノーゲン	10.5±8.74
標的 3	CTAGTGAACACAGTTGTGTCAGAA (配列番号 3916)	TTTGAGGTTG (配列番号 3892)	HBB	2.14±2.83
標的 4	TGAAGTCTTACAAGGTTATCTTAT (配列番号 3917)	TTTGTATTTG (配列番号 3893)	アルブミン	13.757±5.46
標的 5	CACTTTCCTTAGTGCGCAAAAGAA (配列番号 3918)	AGTTACTTTG (配列番号 3894)	アルブミン	17.937±8.27
標的 6	GTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGG (配列番号 3919)	GATGAAGTTG (配列番号 3895)	HBB	12.545±1.73
標的 7	GGAGGTCAGAAATAGGGGGTCCAG (配列番号 3920)	TAGCTGTTTG (配列番号 3896)	VEGFA	23.56±7.04
標的 8	GAAAGGGGGTGGGGGGAGTTTGCT (配列番号 3921)	ATGGGCTTTG (配列番号 3897)	VEGFA	30.147±10.17
標的 9	GTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT (配列番号 3922)	GGGCAGGTTG (配列番号 3898)	HBB	10.935±1.56
標的 10	TGTGAGGGAGCACCGTTCTCTAGA (配列番号 3923)	TACATAGTTG (配列番号 3899)	アポリポタンパク質	30.43±1.57
標的 11	GGTAGTTTTCTGTGGTCCTATTAT (配列番号 3924)	TACGCATTTG (配列番号 3900)	アポリポタンパク質	18.173±6.28
標的 12	CCAGGAAAGTTGATGTGGTCTGCG (配列番号 3925)	CCGCAAGTTG (配列番号 3901)	アポリポタンパク質	7.47±10.52

【０２８９】

哺乳類細胞における標的化エンドヌクレアーゼ活性

ＭＧ２９－１標的遺伝子座は、ＰＡＭ　ＹＹｎ（配列番号３８７１）を用いてゲノム内の位置を試験するために選択された。選択された標的部位に対応するスペーサーを、実施例９に記載される哺乳類ベクター系骨格１のｓｇＲＮＡ足場にクローニングした。部位を以下の表３に列挙する。様々な標的部位におけるＭＧ２９－１の活性を表２及び図１９に示す。

【０２９０】

【表４】

表３：本明細書に記載される酵素の５’ＰＡＭ配列及びｃｒＲＮＡ

酵素	酵素 配列番号	5'PAM	PAM 配列番号	crRNA 配列番号
MG29-1	215	KTTG	3870	3608

【０２９１】
実施例１３－ＮＧＳを介した高複製ＰＡＭ決定
Ｖ型エンドヌクレアーゼ（例えば、ＭＧ２８、ＭＧ２９、ＭＧ３０、ＭＧ３１エンドヌクレアーゼ）を、実施例３及び実施例８に記載されるように、ｍｙＴＸＴＬキットにおけるＥ ｃｏｌｉ溶解物ベースの発現を使用して切断活性について試験した。ｃｒＲＮＡと、８つの変性（Ｎ）塩基（５’ＰＡＭライブラリー）が先行するｃｒＲＮＡと一致するスペーサー配列決定を含むプラスミドライブラリーとのインキュベーション時に、機能性ＰＡＭを有するプラスミドライブラリーのサブセットを切断した。この切断部位へのライゲーション及びＰＣＲ増幅は、１７０ｂｐで、ゲルで観察されたバンドによって示される活性の証拠を提供した（図１７Ｂ）。ゲル１（上部パネル、Ａ）レーンは以下のとおりである：１（はしご；最も暗いバンドは２００ｂｐに対応する）；２：陽性対照（以前に検証されたライブラリー）；３（ｎ／ａ）；４（ｎ／ａ）；５（ＭＧ２８－１）；６（ＭＧ２９－１）；７（ＭＧ３０－１）；８（ＭＧ３１－１）；９（ＭＧ３２－１）；及び１０（はしご）。ゲル２（下部パネル、Ｂ）レーンは以下のとおりである：１（はしご；最も暗いバンドは２００ｂｐに対応する）；２（ＬｂＣｐｆ１陽性対照）；３（ＬｂＣｐｆ１陽性対照）；４（陰性対照）；５（ｎ／ａ）；６（ｎ／ａ）；７（ＭＧ２８－１）；８（ＭＧ２９－１）；９（ＭＧ３０－１）；１０（ＭＧ３１－１）；１１（ＭＧ３２－１）。
【０２９２】
ＰＣＲ産物をＮＧＳシーケンシングに更に供し、ＰＡＭをｓｅｑＬｏｇｏ（例えば、Ｈｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１５ Ｆｅｂ；１２（２）：１１５－２１を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる）表現に照合した（図２０）。ｓｅｑＬｏｇｏ表現は、０～７位として標識されたスペーサーの上流（５’）にある８ｂｐを示す。図２０に示されるように、ＰＡＭはピリミジンリッチ（Ｃ及びＴ）であり、ほとんどの配列要件はスペーサーの２～４ｂｐ上流である（ＳｅｑＬｏｇｏの４～６位）。
【０２９３】
ＭＧ候補のＰＡＭを以下の表４に示す。
【０２９４】
【表５】

表４：本明細書に記載される酵素の５’ＰＡＭ配列及びｃｒＲＮＡ

酵素	酵素 配列番号	5’PAM	PAM 配列番号	crRNA配列番号
MG28-1	141	TTTn	3868	3609
MG29-1	215	YYn	3871	3609
MG31-1	229	YTTn	3875	3609
MG32-1	261	TTTn	3877	3609

【０２９５】
いくつかの場合では、スペーサーにすぐ隣接する位置は、例えば、「ｎ」の代わりに、「ｍ」又は「ｖ」に対して、より弱い特異性を有し得る。
【０２９６】
実施例１４－ＭＧ３１ヌクレアーゼを有する哺乳類細胞における標的化エンドヌクレアーゼ活性
哺乳類細胞における標的化エンドヌクレアーゼ活性
ＭＧ３１－１標的遺伝子座は、ＰＡＭ ＴＴＴＲ（配列番号３８７５）を用いてゲノム内の位置を試験するために選択された。選択された標的部位に対応するスペーサーを、実施例１１に記載される哺乳類ベクター系骨格１のｓｇＲＮＡ足場にクローニングした。部位を以下の表５に列挙する。様々な標的部位におけるＭＧ３１－１の活性を、表５及び図

２５に示す。

【０２９７】

【表６】

表５：様々な標的部位におけるＭＧ３１－１の活性

標的 ID	標的配列	PAM	遺伝子座	NHEJ% (平均±標準偏差)
標的 1	GTTATTAATTTCTTGCTACTTGTC (配列番号 3926)	GTTTTCTTTA (配列番号 3902)	フィブリノーゲン	1.005±0.516
標的 2	CTGAAAGGTTATTGTTGTGTTTGT (配列番号 3927)	TACAGTTTTG (配列番号 3903)	フィブリノーゲン	2.417±1.47
標的 3	GTGTTAGTACAGTTTTGCTGAAAG (配列番号 3928)	AGAACTTTTA (配列番号 3904)	フィブリノーゲン	2.925±0.516
標的 4	TGAAGTCTTACAAGGTTATCTTAT (配列番号 3929)	TTTGTATTTG (配列番号 3905)	アルブミン	7.053±2.72
標的 5	CACTTTCCTTAGTGCGCAAAAGAA (配列番号 3930)	AGTTACTTTG (配列番号 3906)	アルブミン	0.927±0.50
標的 6	CCTAGGATGTTTGAATTTTATTAA (配列番号 3931)	TTTTTTTTTA (配列番号 3907)	アルブミン	1.125±0.43
標的 7	GGAGGTCAGAAATAGGGGGTCCAG (配列番号 3932)	TAGCTGTTTG (配列番号 3908)	VEGFA	17.39±8.67
標的 8	GAAAGGGGGTGGGGGGAGTTTGCT (配列番号 3933)	ATGGGCTTTG (配列番号 3909)	VEGFA	4.01±1.29
標的 9	GCCAGAGCCGGGGTGTGCAGACGG (配列番号 3934)	TCCCTCTTTA (配列番号 3910)	VEGFA	6.72±1.92
標的 10	CTTGGACCTTGTTTTGCTTACTGT (配列番号 3935)	ACAAATTTTA (配列番号 3911)	アポリポタンパク質	-0.32±0.75
標的 11	GGTAGTTTTCTGTGGTCCTATTAT (配列番号 3936)	TACGCATTTG (配列番号 3912)	アポリポタンパク質	2.593±1.33
標的 12	ATCATAAGAAGTTAGCTTGACGCA (配列番号 3937)	GAAAAATTTA (配列番号 3913)	アポリポタンパク質	3.095

【０２９８】

実施例３－インビトロ活性

本実施例に記載されるように、更なる生化学的分析のために、バイオインフォマティクス分析及び予備スクリーニングからの有望な候補を選択した。保存された３’ｓｇＲＮＡ構造を使用して、３’２０ｎｔのＣＲＩＳＰＲ反復及び２４ｎｔのスペーサーを含む、「ユニバーサル」ｓｇＲＮＡを設計した（図１０Ａ～Ｄ）。試験された７つの候補のうち、６つは、８Ｎ　ＰＡＭライブラリーに対してインビトロで活性を示した（図２６Ａ）。残りの不活性候補（３０－１）は、その予測される内因性トリミングＣＲＩＳＰＲ反復（配列番号３６０８、図２６Ｂを参照のこと）で試験されたが、ＮＧＳライブラリーアッセイには含まれなかったときに活性を示した。（図２６Ｃ）

【０２９９】

特定されたＰＡＭの大部分は、２～３塩基のチミンリッチ配列である（図１８Ａ）。しかしながら、２つの酵素、ＭＧ２６－１（ＰＡＭ　ＹＹｎ）及びＭＧ２９－１（ＰＡＭ　ＹＹｎ）は、ピリミジン塩基、チミン、又はシトシンのいずれかに対してＰＡＭ特異性を有し、より広範な配列標的化を可能にした。推定ＰＡＭ相互作用残基の分析は、活性Ｖ－Ａ型ヌクレアーゼが、保存されたリジン及びＧＷｘｘｘＫモチーフを含むことを示し、これはＦｎＣａｓ１２ａ中の異なるＰＡＭとの認識及び相互作用において重要であることが示された。

【０３００】
本ＰＡＭ検出アッセイは、ＰＡＭ濃縮前に平滑末端断片を作製するためにライゲーションを必要とするため、これは、これらの酵素が、報告されたＶ－Ａ型ヌクレアーゼと同様に、互い違いの二本鎖ＤＮＡ切断を作り出したことを示唆した。標的鎖上の切断部位は、インデル検出に使用されるＮＧＳ読み取りの分析によって特定することができ（図１８Ｂ）、第２２のＰＡＭ遠位塩基の後に切断を示した。
【０３０１】
ＭＧ２９－１によるインビトロ切断を、切断産物を配列決定することによって更に調査した。標的鎖上の切断位置は、ほとんどの配列においてＰＡＭから２２ヌクレオチド離れており、２１又は２３ヌクレオチドだけより少ない頻度であった（図５６Ａ～Ｃ）。非標的鎖上の切断位置は、ＰＡＭから１７～１９ヌクレオチドであった。組み合わせて、これらの結果は、３～５ｂｐのオーバーハングを示す。
【０３０２】
実施例４－ゲノム編集
ＰＡＭの確認後、本明細書に記載される新規のタンパク質を、遺伝子標的化活性についてＨＥＫ２９３Ｔ細胞で試験した。全ての候補は、１０個の試験された標的遺伝子座のうちの少なくとも１つに対して、５％を超えるＮＨＥＪ（バックグラウンド補正）の活性を示した。ＭＧ２９－１は、ＮＨＥＪ修飾結果において最も高い全体的活性を示し（図１８Ｂ）、最も高い数の標的に対して活性であった。したがって、このヌクレアーゼは、ＨＥＫ２９３細胞における精製されたリボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）試験のために選択された。ＭＧ２９－１ホロ酵素のＲＮＰトランスフェクションは、９つの標的のうち４つでプラスミドベースのトランスフェクションよりも高いＲＮＰによる編集レベルを示し、いくつかの場合では８０％の編集効率を示した（図１８Ｃ）。ＭＧ２９－１の編集プロファイルの分析は、このヌクレアーゼが、それらの標的部位で他のタイプの編集よりも２ｂｐ超更に頻繁に欠失を生じることを示す（図１８Ｄ）。いくつかの標的（５及び８）では、ＭＧ２９－１のインデル頻度はＡｓＣｐｆ１の２倍であった（図１８Ｅ）。
【０３０３】
実施例１７－議論
Ｖ－Ａ型ＣＲＩＳＰＲは、様々な複雑な環境から収集され、かつファミリーに配置されたメタゲノムから特定された。これらの新規のＶ－Ａ型ヌクレアーゼは、ファミリー内及びファミリー間で多様な配列及び系統発生源、並びに多様なＰＡＭ部位を有する切断された標的を有していた。他のＶ－Ａ型ヌクレアーゼ（例えば、ＬｂＣａｓ１２ａ、ＡｓＣａｓ１２ａ、及びＦｎＣａｓ１２ａ）と同様に、本明細書に記載されるエフェクターは、単一のガイドＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を利用して、ＤＮＡの互い違いの二本鎖切断を標的とし、ガイド設計及び合成を簡略化し、多重化編集を容易にする。ｃｒＲＮＡのステム－ループ構造を形成したＣＲＩＳＰＲ反復モチーフの分析は、本明細書に記載されるＶ－Ａ型エフェクターが、より短いループ又はより長いループよりも頻繁に４ｎｔループガイドを有することを示唆した。ＬｂＣｐｆ１のｓｇＲＮＡモチーフは、あまり一般的ではない５ｎｔを有するが、４ｎｔループは、既に特定された１６個のＣｐｆ１オルソログでも観察された。異常なステム－ループＣＲＩＳＰＲ反復モチーフ配列、ＣＣＵＧＣ［Ｎ$_{3-4}$］ＧＣＡＧＧを、Ｖ－Ａ型エフェクターのＭＧ６１ファミリーについて特定した。Ｖ－Ａ型における可変ループ長を有するｓｇＲＮＡの高度の保存は、本明細書に記載されるタンパク質について示されるように、柔軟なレベルの活性をもたらし得る。まとめると、これらのエフェクターは、以前に研究された酵素に近接した相同体ではなく、Ｖ－Ａ型様ｓｇＲＮＡヌクレアーゼの多様性を大幅に拡大する。
【０３０４】
本明細書に記載される追加のＶ型エフェクターは、本明細書ではＣａｓ１２ａヌクレアーゼの隣にコードされ得るＶ－Ａ型プライムエフェクター（Ｖ－Ａ’）と称されるＶ－Ａ型様ヌクレアーゼの重複から進化している場合がある。Ｖ－Ａ型及びこれらのＶ－Ａ’型系の両方は、ＣＲＩＳＰＲ　ｓｇＲＮＡを共有し得るが、Ｖ－Ａ’型系はＣａｓ１２ａか

ら分岐している（図４）。これらのプライムエフェクターに関連するＣＲＩＳＰＲ反復はまた、ＵＣＵＡＣ［Ｎ$_{3-5}$］ＧＵＡＧＡＵモチーフを有する単一ガイドｃｒＲＮＡに折り畳まれる。１つの報告は、Ｖ－Ａ型ヌクレアーゼの横にコードされたＶ型ｃｍｓ１エフェクターを特定し、それは植物細胞における切断活性のために単一ガイドｃｒＲＮＡを必要とした。異なるＣＲＩＳＰＲアレイが各エフェクターについて報告されたが、本明細書に記載されるＶ－Ａ’型系は、Ｖ－Ａ型及びＶ－Ａ’型の両方が、ＤＮＡ標的化及び切断のために同じｃｒＲＮＡを必要とし得ることを示唆した。Ｒｏｉｚｍａｎ細菌ゲノムに記載されるように（例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｆｒｏｎｔ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１９ Ｍａｙ ３；１０：９２８を参照のこと）、Ｖ－Ａ型及びＶ－Ａ’型エフェクターの両方は、配列相同性及び系統学的解析に基づいて遠縁に当たる。したがって、プライムエフェクターは、Ｖ－Ａ型分類内に属さず、別個のＶ型サブ分類に値する。

【０３０５】

活性Ｖ－Ａ型ヌクレアーゼについて決定されたＰＡＭは概して、チミンリッチであり、他のＶ－Ａ型ヌクレアーゼについて記載されたＰＡＭと同様であった。対照的に、ＭＧ２９－１は、より短いＹＹＮ ＰＡＭ配列を必要とし、これは、ＬｂＣｐｆ１の４ヌクレオチドＴＴＴＶ ＰＡＭと比較して、標的の柔軟性を増加させる。更に、ＭＧ２９－１を含むＲＮＰは、３ヌクレオチドＰＡＭを有するｓＭｂＣａｓ１２ａと比較して、ＨＥＫ２９３細胞においてより高い活性を有していた。

【０３０６】

インビトロ編集活性について新規のヌクレアーゼを試験したとき、ＭＧ２９－１は、クラスの他の報告された酵素と同等又はより良好な活性を呈した。Ｃａｓ１２ａオルソログを使用した哺乳類細胞におけるプラスミドトランスフェクション編集効率の報告は、ＴリッチＰＡＭを有するガイドについて２１％～２６％のインデル頻度を示し、ＣＣＮ ＰＡＭを有する１８個のガイドのうちの１つは、Ｍｂ３Ｃａｓ１２ａにおいて約１０％の活性を示した（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ１１＿００２０５ Ｃａｓ１２ａ、例えば、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０２０ １３３：ｊｃｓ２４０７０５を参照のこと）。特に、プラスミドトランスフェクションにおけるＭＧ２９－１活性は、ＴＴＮ及びＣＣＮ ＰＡＭを有する標的について、Ｍｂ３Ｃａｓ１２ａについて報告された活性よりも大きいように思われる（例えば、図１８Ａ～Ｅを参照のこと）。プラスミドトランスフェクションの標的部位は、全ての実験で同じＴＴＧ ＰＡＭを有するため、編集効率の差は、異なる標的遺伝子でのゲノムアクセシビリティの差に起因し得る。ＲＮＰとしてのＭＧ２９－１編集は、プラスミドを介するよりもはるかに効率的であり、７個の標的遺伝子座のうち２個においてＡｓＣａｓ１２ａよりも効率的である。したがって、ＭＧ２９－１は、非常に活性で効率的な遺伝子編集ヌクレアーゼであり得る。これらの所見は、特定された単一ガイドＶ－Ａ型ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼの多様性を増加させ、未培養微生物由来の新規の酵素のゲノム編集の可能性を示す。７個の新規のヌクレアーゼは、多様なＰＡＭ要件を有するインビトロ活性を示し、ＲＮＰデータは、ヒト細胞株における治療的に関連する標的について８０％を超える編集効率を示した。これらの新規のヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素のツールキットを拡張し、多様なゲノム工学用途を可能にする。

【０３０７】

実施例１８－ＭＧ２９－１は、Ｔ細胞におけるＴＲＡＣ遺伝子座の編集を誘導した

Ｔ細胞受容体アルファ鎖定常領域（ＴＲＡＣＡ）の３つのエクソンを、ＭＧ２９－１の初期予測５’－ＴＴＮ－３’ＰＡＭ特異性に一致する配列についてスキャンし、専有のＡｌｔ－Ｒ修飾を有する一本鎖ガイドＲＮＡをＩＤＴから注文した。全てのガイドスペーサー配列は、２２ｎｔの長さであった。ガイド（８０ｐｍｏｌ）を、精製されたＭＧ２９－１タンパク質（６３ｐｍｏｌ）と混合し、室温で１５分間インキュベートした。Ｔ細胞を、（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓヒト Ｔ細胞単離キット＃１７９５１）を使用したネガティブ選択によってＰＢＭＣから精製し、ＣＤ２／３／２８ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｔ細胞活性化／増殖キット＃１３０－０９１－４４１）によって活性化した

。４日間の細胞増殖後、プログラムＥＯ－１１５及びＰ３緩衝液を使用して、各ＭＧ２９－１／ガイドＲＮＡ混合物を、Ｌｏｎｚａ　４－Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒを用いて２００，０００個のＴ細胞にエレクトロポレーションした。トランスフェクションから７２時間後に細胞を採取し、ゲノムＤＮＡを単離し、ＴＲＡＣＡ遺伝子座を標的とするプライマーを使用するハイスループットＤＮＡシーケンシングを使用して分析のためにＰＣＲ増幅した。ＮＨＥＪベースの遺伝子編集に特徴的な挿入及び欠失の作製を、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを使用して定量化した（図３９を参照のこと）。

【０３０８】

【表７－１】

表５Ａ：実施例１８で使用されるガイド配列

エンティティ名	配列	配列番号
MG29-1 ガイド 1 標的配列	ACCGATTTTGATTCTCAAACAA	4316
MG29-1 ガイド 2 標的配列	TGATTCTCAAACAAATGTGTCA	4317
MG29-1 ガイド 3 標的配列	GATTCTCAAACAAATGTGTCAC	4318
MG29-1 ガイド 4 標的配列	ATTCTCAAACAAATGTGTCACA	4319
MG29-1 ガイド 5 標的配列	TCAAACAAATGTGTCACAAAGT	4320
MG29-1 ガイド 6 標的配列	TGATGTGTATATCACAGACAAA	4321
MG29-1 ガイド 7 標的配列	AAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT	4322
MG29-1 ガイド 8 標的配列	GCATGTGCAAACGCCTTCAACA	4323
MG29-1 ガイド 9 標的配列	CATGTGCAAACGCCTTCAACAA	4324
MG29-1 ガイド 10 標的配列	AACAACAGCATTATTCCAGAAG	4325
MG29-1 ガイド 11 標的配列	TTCCAGAAGACACCTTCTTCCC	4326
MG29-1 ガイド 12 標的配列	CAGAAGACACCTTCTTCCCCAG	4327
MG29-1 ガイド 13 標的配列	TGGAATAATGCTGTTGTTGAAG	4328
MG29-1 ガイド 14 標的配列	TTGAAGGCGTTTGCACATGCAA	4329
MG29-1 ガイド 15 標的配列	AAGGCGTTTGCACATGCAAAGT	4330
MG29-1 ガイド 16 標的配列	GCACATGCAAAGTCAGATTTGT	4331
MG29-1 ガイド 17 標的配列	CACATGCAAAGTCAGATTTGTT	4332
MG29-1 ガイド 18 標的配列	GTTGCTCCAGGCCACAGCACTG	4333
MG29-1 ガイド 19 標的配列	TTGCTCCAGGCCACAGCACTGT	4334
MG29-1 ガイド 20 標的配列	CTCCAGGCCACAGCACTGTTGC	4335
MG29-1 ガイド 21 標的配列	CTCTTGAAGTCCATAGACCTCA	4336
MG29-1 ガイド 22 標的配列	AAGTCCATAGACCTCATGTCTA	4337
MG29-1 ガイド 23 標的配列	TGTCTGTGATATACACATCAGA	4338

【０３０９】

【表７－２】

エンティティ名	配列	配列番号
MG29-1 ガイド 24 標的配列	GTCTGTGATATACACATCAGAA	4339
MG29-1 ガイド 25 標的配列	TCTGTGATATACACATCAGAAT	4340
MG29-1 ガイド 26 標的配列	CTTTGTGACACATTTGTTTGAG	4341
MG29-1 ガイド 27 標的配列	GTGACACATTTGTTTGAGAATC	4342
MG29-1 ガイド 28 標的配列	TGACACATTTGTTTGAGAATCA	4343
MG29-1 ガイド 29 標的配列	GTTTGAGAATCAAAATCGGTGA	4344
MG29-1 ガイド 30 標的配列	TTTGAGAATCAAAATCGGTGAA	4345
MG29-1 ガイド 31 標的配列	GAGAATCAAAATCGGTGAATAG	4346
MG29-1 ガイド 32 標的配列	AGAATCAAAATCGGTGAATAGG	4347
MG29-1 ガイド 33 標的配列	TCACTGGATTTAGAGTCTCTCA	4348
MG29-1 ガイド 34 標的配列	AGAGTCTCTCAGCTGGTACACG	4349
MG29-1 ガイド 35 標的配列	GAGTCTCTCAGCTGGTACACGG	4350
MG29-1 ガイド 36 標的配列	CTGTGATGTCAAGCTGGTCGAG	4351
MG29-1 ガイド 37 標的配列	CAAAGCTTTTCTCGACCAGCTT	4352
MG29-1 ガイド 38 標的配列	AAAGCTTTTCTCGACCAGCTTG	4353
MG29-1 ガイド 39 標的配列	TCTCGACCAGCTTGACATCACA	4354
MG29-1 ガイド 40 標的配列	CTCGACCAGCTTGACATCACAG	4355
MG29-1 ガイド 41 標的配列	TCGACCAGCTTGACATCACAGG	4356
MG29-1 ガイド 42 標的配列	CAAAACCTGTCAGTGATTGGGT	4357
MG29-1 ガイド 43 標的配列	AAAACCTGTCAGTGATTGGGTT	4358
MG29-1 ガイド 44 標的配列	GGTTCCGAATCCTCCTCCTGAA	4359
MG29-1 ガイド 45 標的配列	CGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG	4360

【０３１０】

【表７－３】

エンティティ名	配列	配列番号
MG29-1 ガイド 46 標的配列	AATCTGCTCATGACGCTGCGGC	4361
MG29-1 ガイド 47 標的配列	ATCTGCTCATGACGCTGCGGCT	4362
MG29-1 ガイド 48 標的配列	AACCCGGCCACTTTCAGGAGGA	4363
MG29-1 ガイド 49 標的配列	CAGGAGGAGGATTCGGAACCCA	4364
MG29-1 ガイド 50 標的配列	AGGAGGAGGATTCGGAACCCAA	4365
MG29-1 ガイド 51 標的配列	GGAACCCAATCACTGACAGGTT	4366
MG29-1 ガイド 52 標的配列	TGAAAGTTTAGGTTCGTATCTG	4367
MG29-1 ガイド 53 標的配列	GAAAGTTTAGGTTCGTATCTGT	4368
MG29-1 ガイド 54 標的配列	AAAGTTTAGGTTCGTATCTGTA	4369
合成された MG29-1 ガイド 1 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrCrGrArUrUrUrUrGrArUrUrCrUrCrArArArCrArA/AltR2/	4370
合成された MG29-1 ガイド 2 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArUrUrCrUrCrArArArCrArArArUrGrUrGrUrCrA/AltR2/	4371
合成された MG29-1 ガイド 3 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArUrUrCrUrCrArArArCrArArArUrGrUrGrUrCrArC/AltR2/	4372
合成された MG29-1 ガイド 4 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrCrUrCrArArArCrArArArUrGrUrGrUrCrArCrA/AltR2/	4373
合成された MG29-1 ガイド 5 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArArArCrArArArUrGrUrGrUrCrArCrArArArGrU/AltR2/	4374
合成された MG29-1 ガイド 6 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArUrGrUrGrUrArUrArUrCrArCrArGrArCrArArA/AltR2/	4375
合成された MG29-1 ガイド 7 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrArGrCrArArCrArGrUrGrCrUrGrUrGrGrCrCrU/AltR2/	4376
合成された MG29-1 ガイド 8 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArUrGrUrGrCrArArArCrGrCrCrUrUrCrArArCrA/AltR2/	4377
合成された MG29-1 ガイド 9 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrGrUrGrCrArArArCrGrCrCrUrUrCrArArCrArA/AltR2/	4378
合成された MG29-1 ガイド 10 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArCrArArCrArGrCrArArUrUrArUrUrCrCrArGrArArG/AltR2/	4379

【０３１１】

【表７－４】

エンティティ名	配列	配列番号
合成された MG29-1 ガイド 11 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrCrArGrArArGrArCrArCrCrUrUrCrUrUrCrCrC/AltR2/	4380
合成された MG29-1 ガイド 12 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArArGrArCrArCrCrUrUrCrUrUrCrCrCrArG/AltR2/	4381
合成された MG29-1 ガイド 13 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrArArUrArArUrGrCrUrGrUrUrGrUrUrGrArArG/AltR2/	4382
合成された MG29-1 ガイド 14 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrArArGrGrCrGrUrUrUrGrCrArCrArUrGrCrArA/AltR2/	4383
合成された MG29-1 ガイド 15 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrGrCrGrUrUrUrGrCrArCrArUrGrCrArArArGrU/AltR2/	4384
合成された MG29-1 ガイド 16 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArCrArUrGrCrArArArGrUrCrArGrArUrUrUrGrU/AltR2/	4385
合成された MG29-1 ガイド 17 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArCrArUrGrCrArArArGrUrCrArGrArUrUrUrGrU/AltR2/	4386
合成された MG29-1 ガイド 18 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrGrCrUrCrCrArGrGrCrCrArCrArGrCrArCrUrG/AltR2/	4387
合成された MG29-1 ガイド 19 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrCrUrCrCrArGrGrCrCrArCrArGrCrArCrUrGrU/AltR2/	4388
合成された MG29-1 ガイド 20 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrCrArGrGrCrCrArCrArGrCrArCrUrGrUrUrGrC/AltR2/	4389
合成された MG29-1 ガイド 21 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrUrUrGrArArGrUrArCrCrUrCrA/AltR2/	4390
合成された MG29-1 ガイド 22 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrUrCrCrArUrArGrArCrCrUrCrArUrGrUrCrUrA/AltR2/	4391
合成された MG29-1 ガイド 23 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrCrUrGrUrGrArUrArUrArCrArCrArUrCrArGrA/AltR2/	4392
合成された MG29-1 ガイド 24 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrCrUrGrUrGrArUrArUrArCrArCrArUrCrArGrArA/AltR2/	4393
合成された MG29-1 ガイド 25 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrUrGrArUrArUrArCrArCrArUrCrArGrArArU/AltR2/	4394
合成された MG29-1 ガイド 26 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrGrUrGrArCrArCrArUrUrUrGrUrUrUrGrArG/AltR2/	4395
合成された MG29-1 ガイド 27 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrArCrArCrArUrUrUrGrUrUrUrGrArGrArArUrC/AltR2/	4396

【０３１２】

【表７－５】

エンティティ名	配列	配列番号
合成された MG29-1 ガイド 28 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArCrArCrArUrUrUrGrUrUrUrGrArGrArArUrCrA/AltR2/	4397
合成された MG29-1 ガイド 29 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrUrGrArGrArArArUrCrArArArArUrCrGrGrUrGrA/AltR2/	4398
合成された MG29-1 ガイド 30 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrArGrArArArUrCrArArArArUrCrGrGrUrGrArA/AltR2/	4399
合成された MG29-1 ガイド 31 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrArArArUrCrArArArArUrCrGrGrUrGrArArUrArG/AltR2/	4400
合成された MG29-1 ガイド 32 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArArArArUrCrGrGrUrGrArArUrArArG/AltR2/	4401
合成された MG29-1 ガイド 33 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArCrUrGrGrArUrUrUrArGrArGrUrCrUrCrUrCrA/AltR2/	4402
合成された MG29-1 ガイド 34 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArGrUrCrUrCrUrCrArGrCrUrGrGrUrArCrArCrG/AltR2/	4403
合成された MG29-1 ガイド 35 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrUrCrArGrCrUrGrGrUrArCrArCrGrG/AltR2/	4404
合成された MG29-1 ガイド 36 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrGrArUrGrUrCrArArGrCrUrGrGrUrArCrGrArG/AltR2/	4405
合成された MG29-1 ガイド 37 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArArGrCrUrUrUrUrCrUrCrGrArCrCrArGrCrUrU/AltR2/	4406
合成された MG29-1 ガイド 38 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArGrCrUrUrUrUrCrUrCrGrArCrCrArGrCrUrU/AltR2/	4407
合成された MG29-1 ガイド 39 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrCrGrArCrCrArGrCrUrUrGrArCrCrArCrA/AltR2/	4408
合成された MG29-1 ガイド 40 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrGrArCrCrArGrCrUrUrGrArCrCrArCrG/AltR2/	4409
合成された MG29-1 ガイド 41 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrGrArCrCrArGrCrUrUrGrArCrCrArCrG/AltR2/	4410
合成された MG29-1 ガイド 42 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArArArCrCrUrGrUrCrArGrUrGrArUrUrGrGrGrU/AltR2/	4411
合成された MG29-1 ガイド 43 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArArCrCrUrGrUrCrArGrUrGrArUrUrGrGrGrUrU/AltR2/	4412

【０３１３】

【表７－６】

エンティティ名	配列	配列番号
合成された MG29-1 ガイド 44 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrUrCrCrGrArArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrGrArA/AltR2/	4413
合成された MG29-1 ガイド 45 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrArArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrGrArArArGrUrGrG/AltR2/	4414
合成された MG29-1 ガイド 46 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrCrUrGrCrUrCrArUrGrArCrGrCrUrGrCrGrGrC/AltR2/	4415
合成された MG29-1 ガイド 47 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrUrGrCrUrCrArUrGrArCrGrCrUrGrCrGrGrCrU/AltR2/	4416
合成された MG29-1 ガイド 48 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArCrCrCrGrGrCrCrArCrUrUrUrCrArGrGrArGrGrA/AltR2/	4417
合成された MG29-1 ガイド 49 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrGrArGrArGrGrArUrUrCrGrGrArArCrCrCrA/AltR2/	4418
合成された MG29-1 ガイド 50 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrGrArGrArGrGrArUrUrCrGrGrArArCrCrCrArA/AltR2/	4419
合成された MG29-1 ガイド 51 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArArCrCrCrArArUrCrArCrUrGrArCrArGrGrUrU/AltR2/	4420
合成された MG29-1 ガイド 52 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArArArGrUrUrArArGrGrUrUrArUrCrUrG/AltR2/	4421
合成された MG29-1 ガイド 53 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArArGrUrUrUrArGrGrUrUrCrGrUrArUrCrUrGrU/AltR2/	4422
合成された MG29-1 ガイド 54 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArGrUrUrUrArGrGrUrUrCrGrUrArUrCrUrGrUrA/AltR2/	4423

【０３１４】

実施例１９－ＭＧ２９－１のリードガイドの再試験

ＭＧ２９－１のリードガイドを再試験する実験を行った。Ｔ細胞受容体アルファ鎖定常領域の３つのエクソンを、Ａｌｔ－Ｒ修飾を使用してＩＤＴから注文した５’－ＴＴＮ－３’及び一本鎖ガイドＲＮＡに一致する配列についてスキャンした。全てのガイドスペーサー配列は、２２ｎｔの長さである。ガイドを、精製されたＭＧ２９－１タンパク質（８０ｐｍｏｌのｇＲＮＡ＋６３ｐｍｏｌのＭＧ２９－１、又は１２６ｐｍｏｌのＭＧ２９－１を含む１６０ｐｍｏｌのｇＲＮＡ）と混合し、室温で１５分間インキュベートした。Ｔ細胞を、（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓヒトｔ細胞単離キット＃１７９５１）を使用したネガティブ選択によってＰＢＭＣから精製し、ＣＤ２／３／２８ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｔ細胞活性化／増殖キット＃１３０－０９１－４４１）によって活性化した。４日間の細胞増殖後、プログラムＥＯ－１１５及びＰ３緩衝液を使用して、各ＭＧ２９－１／ガイドＲＮＡ混合物を、Ｌｏｎｚａ　４－Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒを用いて２００，０００個のＴ細胞にエレクトロポレーションした。トランスフェクションの７２時間後に、ゲノムＤＮＡを採取し、ハイスループットＤＮＡシーケンシングを使

用して分析のためにＰＣＲ増幅した。ＮＨＥＪベースの遺伝子編集に特徴的な挿入及び欠失の作製を、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを使用して定量化した（図４０を参照のこと）。

【０３１５】

実施例２０－ＭＧ２９－１のガイドスペーサーの長さの試験

最適なガイドスペーサーの長さを決定するために実験を行った。Ｔ細胞受容体アルファ鎖定常領域の３つのエクソンを、Ａｌｔ－Ｒ修飾を使用してＩＤＴから注文した５’－ＴＴＮ－３’及び一本鎖ガイドＲＮＡに一致する配列についてスキャンした。ガイドを、精製されたＭＧ２９－１タンパク質（８０ｐｍｏｌのｇＲＮＡ＋６０ｐｍｏｌのエフェクター、１６０ｐｍｏｌのｇＲＮＡ＋１２０ｐｍｏｌのエフェクター、又は３２０ｐｍｏｌのｇＲＮＡ＋２４０ｐｍｏｌのエフェクター）と混合し、室温で１５分間インキュベートした。Ｔ細胞を、（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓヒト Ｔ細胞単離キット＃１７９５１）を使用したネガティブ選択によってＰＢＭＣから精製し、ＣＤ２／３／２８ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｔ細胞活性化／増殖キット＃１３０－０９１－４４１）によって活性化した。４日間の細胞増殖後、プログラムＥＯ－１１５及びＰ３緩衝液を使用して、各ＭＧ２９－１／ガイドＲＮＡ混合物を、Ｌｏｎｚａ　４－Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒを用いて２００，０００個のＴ細胞にエレクトロポレーションした。トランスフェクションの７２時間後に、ゲノムＤＮＡを採取し、ハイスループットＤＮＡシーケンシングを使用して分析のためにＰＣＲ増幅した。ＮＨＥＪベースの遺伝子編集に特徴的な挿入及び欠失の作製を、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを使用して定量化した。結果を図４１に示し、それは、２０～２４ｎｔのガイドスペーサーの長さが良好に機能し、１９ｎｔでのドロップオフを有することを示す。

【０３１６】

実施例２１－ＴＣＲ発現に対するＭＧ２９－１インデル生成の決定

図４１の細胞を、ＡＰＣ標識抗ヒトＴＣＲα／β　Ａｂ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　＃３０６７１８、クローンＩＰ２６）及びＡｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用したフローサイトメトリーによってＴＣＲ発現について分析した。インデルデータは、図４１から取られる。

【０３１７】

実施例２２－ＭＧ２９－１との標的化ＣＡＲ統合

Ｔ細胞受容体アルファ鎖定常領域の３つのエクソンを、ＩＤＴの専有のＡｌｔ－Ｒ修飾を使用してＩＤＴから注文した５’－ＴＴＮ－３’及び一本鎖ガイドＲＮＡに一致する配列についてスキャンした。ガイド（８０ｐｍｏｌ）を、精製されたＭＧ２９－１タンパク質（６３ｐｍｏｌ）と混合し、室温で１５分間インキュベートした。Ｔ細胞を、（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓヒト Ｔ細胞単離キット＃１７９５１）を使用したネガティブ選択によってＰＢＭＣから精製し、ＣＤ２／３／２８ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｔ細胞活性化／増殖キット＃１３０－０９１－４４１）によって活性化した。４日間の細胞増殖後、各ＭＧ２９－１／ガイドＲＮＡ混合物を、プログラムＥＯ－１１５及びＰ３緩衝液を使用して、Ｌｏｎｚａ　４－Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒを用いて２００，０００個のＴ細胞にエレクトロポレーションした。ＴＲＡＣ遺伝子を標的とする５’及び３’相同アーム（５’アーム配列番号４４２４が約５００ｎｔの長さであり、３’アーム配列番号４４２５が約５００ｎｔの長さである）に隣接したカスタマイズされたキメラ抗原受容体のコード配列を含む血清型６アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ－６）の１００，０００個のベクターゲノムを、トランスフェクションの直後に細胞に添加した。複製物を、ＴＲＡＣインデルに対するＴＣＲ発現について分析し（図４２）、ＴＲＡＣ遺伝子のインデルが、ＴＣＲの発現の損失と相関したことを示す。細胞はまた、実施例２１のように、ＴＣＲ発現について（図４２）、及びＣＡＲへの標的抗原の結合について（図４３、そこでプロットが単一の生細胞上でゲーティングされる）、フローサイトメトリーによって同時に分析された。図４３のフロー分析の結果は、ガイドＲＮＡのみがＴＣＲ発現の排除に効果的であったが（「ＲＮＰのみ」）、ガイドＲＮＡとＡＡＶの添加は、ＣＡＲ抗原に結合する新し

い細胞集団をもたらしたことを示す（プロットの左上「ＡＡＶ＋ＭＧ２９－１－１９－２２」及び「ＡＡＶ＋ＭＧ２９－１－３５－２２」）。ｓｇＲＮＡ　３５（配列番号４４０４）は、ｓｇＲＮＡ　１９（配列番号４３８８）よりもＣＡＲの統合の誘導においてやや効果的であった。差異について考えられる１つの説明は、ガイド１９の予測されたヌクレアーゼ切断部位が、右相同アームの末端から約１６０ｂｐ離れていることである。

【０３１８】

【表８】

表５Ｂ：実施例２２で使用されるガイドＲＮＡ

エンティティ名	配列	配列番号
MG29-1 TRAC ガイド 19 標的結合配列	TTGCTCCAGGCCACAGCACTGT	4334
合成された MG29-1TRAC ガイド 19 完全 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrCrUrCrCrArGrGrCrCrArCrArGrCrArCrUrGrU/AltR2/	4388
MG29-1 TRAC ガイド 35 標的結合配列	GAGTCTCTCAGCTGGTACACGG	4350
合成された MG29-1TRAC ガイド 35 完全 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrUrCrArGrCrUrGrGrUrArCrArCrGrG/AltR2/	4404
/AltR1/及び/AltR2/は、IDT の専有の Alt-R 5'及び 3'修飾を指し、m;2'-O-メチル塩基(例えば、2'-O-メチル修飾を有する A 塩基は、mA と記載される)、i2F;内部 2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する内部 C は、/i2FC/と記載される)、52F;配列の 5'末端の 2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する 5'C は、/52FC/と記載される)、32F;配列の 3'末端の 2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する 3'A 塩基は、/32FA/と記載される)、r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間		

【０３１９】

実施例５－ＨＳＣにおけるＭＧ２９－１　ＴＲＡＣ編集

造血幹細胞をＡｌｌｃｅｌｌｓから購入し、供給業者の指示に従って解凍し、ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳで洗浄し、Ｓｔｅｍｓｐａｎ　ＩＩ培地＋ＣＣ１１０サイトカイン中に再懸濁した。１００万個の細胞を、４ｍＬの培地中の６ウェルディッシュ中で７２時間培養した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰを作製し、トランスフェクトし、ＥＯ－１００ヌクレオフェクションプログラムの使用を除いて、実施例１８のように遺伝子編集を分析した。結果を図６１に示し、これは、以下の表５Ｂの＃１９（配列番号４３８８）及び＃３５（配列番号４４０４）ｓｇＲＮＡを使用した造血幹細胞におけるＴＲＡＣでの遺伝子編集を示す。結果はまた、＃３５　ｓｇＲＮＡがＴＲＡＣ遺伝子座の標的化に非常に効果的であることを示す。

【０３２０】

【表９】

表５Ｃ：実施例２３で使用されるガイドＲＮＡ

エンティティ名	配列	配列番号
MG29-1 TRAC ガイド 19 標的結合配列	TTGCTCCAGGCCACAGCACTGT	4334
合成された MG29-1TRAC ガイド 19 完全 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrCrUrCrCrArGrGrCrCrArCrArGrCrArCrUrGrU/AltR2/	4388
MG29-1 TRAC ガイド 35 標的結合配列	GAGTCTCTCAGCTGGTACACGG	4350
合成された MG29-1TRAC ガイド 35 完全 sgRNA	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrUrCrArGrCrUrGrGrUrArCrArCrGrG/AltR2/	4404
/AltR1/及び/AltR2/は、IDT の専有の Alt-R 5’及び 3’修飾を指し、m;2’-O-メチル塩基(例えば、2’-O-メチル修飾を有する A 塩基は、mA と記載される)、i2F;内部 2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する内部 C は、/i2FC/と記載される)、52F;配列の 5’末端の 2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する 5’C は、/52FC/と記載される)、32F;配列の 3’末端の 2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する 3’A 塩基は、/32FA/と記載される)、r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間		

【０３２１】

実施例６－ＭＧ２９－１に関連するＰＡＭ特異性の更なる分析

ＭＧ２９－１のＰＡＭ特異性をより正確に決定するために、更なる分析を行った。ガイドＲＮＡを、５’－ＮＴＴＮ－３’ＰＡＭ配列を使用して設計し、次いで、観察された遺伝子編集活性に従って分類した（図４５、そこで、下線付き塩基－５’－近位Ｎの同一性を各ビンについて示す）。１０％を超える活性を有する全てのガイドは、ゲノムＤＮＡのこの位置にＴを有し、ＭＧ２９－１　ＰＡＭが５’－ＴＴＴＮ－３’としてより十分に説明され得ることを示す。この位置でのＴの過剰表現の統計的有意性が、各ビンについて示されている。図４５では、様々なビン（高、中、低、＞１％、＜１％）は、以下を示す。

- **高：＞５０％インデル（Ｎ＝４）**
- **中：１０～５０％インデル（Ｎ＝１５）**
- **低：５～１０％インデル（Ｎ＝５）**
- **＞１％：１～５％インデル（Ｎ＝１２）**
- **＜１％（Ｎ＝８２）**

【０３２２】

【表１０】

表２－実施例２４のヌクレオチド特異性分析のｐ値

	chi^2 ｐ値
高/中	0.000005
低	0.035110
>1%	0.005416
<1%	0.126751

【０３２３】

実施例７－ＭＧ２９－１インデル誘導能力対スペーサーベース組成物の決定

ＭＧ２９－１スペーサー配列のベース組成物に対する遺伝子編集活性の更なる分析を実施した。相関は中程度であった（Ｒ＾２＝０．２３）が、ＧＣ含有量が高いほど活性が良好になる傾向があった（図４６を参照されたく、そこで、培養細胞で誘導されたインデルとスペーサー配列のＧＣ含有量との間の相関はドットプロットとして表される）。

【０３２４】

実施例２６－ＭＧ２９－１ガイド化学修飾

ＭＧ２９－１を使用してＶＥＧＦ－Ａ遺伝子座の標的化するための化学修飾を最適化するための実験を、実施例１８の手順を使用するが、ＶＥＧＦ－Ａを標的化する示されたガイドＲＮＡを用いて行った（以下の表７を参照のこと）。実験は、１２６ｐｍｏｌのＭＧ２９－１及び１６０ｐｍｏｌのガイドＲＮＡを使用した。結果を図４７に表す。ガイド＃４、５、６、７、及び８は、未修飾ガイド＃１に対して改善された活性を示し、これらの配列における対応する修飾が、未修飾ＲＮＡ配列に対してこれらのガイドＲＮＡの活性を改善したことを示す。

【０３２５】

【表１１】

表７－ＭＧ２９－１ガイド修飾

MG29-1 試験 番号	以下の凡例による、太字の標的化配列を有する MG29-1 ガイド及び修飾	配列番号
1	**UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGAAAGGGGGTGGGGGGAGTTTGCT**	3985
2	**mU*mA*mA*UUUCUACUCUUGUAGAUGAAAGGGGGTGGGGGGAGTTT*mG*mC*mT**	3986
3	**mU*mA*AUUUCUACUCUUGUAGAUGAAAGGGGGTGGGGGGAGTTT*mG*mC*mT**	3987
4	**mU*AAUUUCUACUCUUGUAGAUGAAAGGGGGTGGGGGGAGTTT*mG*mC*mT**	3988
5	**mU*AAUUUCUACUCUUGUAGAUGAAAGGGGGTGGGGGGAGTTTGC*mT**	3989
6	**mC*UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGAAAGGGGGTGGGGGGAGTTT*mG*mC*mT**	3990
7	**mC*U*AAUUUCUACUCUUGUAGAUGAAAGGGGGTGGGGGGAGTTTG*C*mT**	3991
8	**/AltR1/UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGAAAGGGGGTGGGGGGAGTTTGCT/AltR2/**	3992
凡例:/AltR1/及び/AltR2/は、IDT の専有の Alt-R 5’及び 3’修飾を指し、m;2’-O-メチル塩基(例えば、2’-O-メチル修飾を有する塩基は、mA と記載される)、i2F;内部 2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する内部 C は、/i2FC/と記載される)、52F;配列の 5’末端の 2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する 5’C は、/52FC/と記載される)、32F;配列の 3’末端の 2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する 3’A 塩基は、/32FA/と記載される)、r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの１つが硫黄で置き換えられている塩基間		

【０３２６】

実施例２７－実施例２６からの修飾ＭＧ２９－１ガイドの滴定

更なる実験を行って、実施例２６で使用される修飾ガイドの活性の用量依存性を決定し、可能性のある用量依存性毒性効果を特定した。実験は、実施例２６のように行ったが、開始用量（Ａ、１２６ｐｍｏｌのＭＧ２９－１、及び１６０ｐｍｏｌのガイドＲＮＡ）の１／４（Ｂ）、１／８（Ｃ）、１／１６（Ｄ）、及び１／３２（Ｅ）を用いた。結果を４８）に表す。

【０３２７】

実施例２８－本明細書に記載されるヌクレアーゼの大規模合成

プロジェクト概要

ＭｅｔａｇｅｎｏｍｉのＶ－Ａ型ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、ＭＧ２９－１の産生は、１０Ｌの初期培養体積までスケールアップされる。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、発現スクリーニング、スケールアップ発現、下流発達、製剤研究、及び精製されたタンパク質≧９０％の送達が行われる。

【０３２８】

発現及び精製スクリーニング

発現：

図４９に図示されるｐＭＧ４５０ベクターからのＭＧ２９－１の発現は、以下の条件：宿主株、発現培地、誘導剤、誘導時間、及び温度を変化させるスクリーニングで試験され

る。
【０３２９】
スクリーニング後、Ｅ．ｃｏｌｉを適切な発現プラスミドで形質転換し、培養物を好適な密度振盪フラスコに増殖させ、培養物を、発現スクリーニング中に特定された最適な発現条件に従って材料及び方法を使用して誘導する。細胞ペーストを採取し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって発現を検証する。これらの実験については、細胞培養体積は２０Ｌに制限される。最大１グラムのタンパク質を、以下の方法を使用して精製し、貯蔵緩衝液に製剤化し、Ａ２８０による収率及び濃度、並びにＳＤＳ－ＰＡＧＥによる純度を評価する。
【０３３０】
精製：
Ｅ．ｃｏｌｉ細胞ペーストから抽出された総可溶性タンパク質を、全ての条件についてＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析する。固定化金属親和性クロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）プルダウン、続いてＳＤＳ－ＰＡＧＥを、上位３つの発現条件で行い、収率及び純度を推定し、最適な発現条件を特定する。溶解のためにスケールアップ方法が開発される。重要なパラメーターは、ＩＭＡＣ及びサブトラクティブＩＭＡＣ（タバコエッチングウイルスプロテアーゼ（ＴＥＶ）切断を含む）による精製のために特定される。カラム画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して試験する。溶出プールを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び２８０ｎｍでの光度吸光度（Ａ２８０）を使用して試験する。タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）による緩衝液交換及び濃縮のための方法が開発される。
【０３３１】
純度が９０％より低い場合、≧９０％の純度を達成するために追加のクロマトグラフィー段階が開発される。１つのクロマトグラフィーモードを試験する（例えば、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー）。最大８個の固有の条件（例えば、それぞれ２～３個の緩衝系を有する２～６個の樹脂）を試験する。カラム画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して試験する。溶出プールを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＡ２８０を使用して試験する。１つの条件を選択し、３条件負荷研究を行う。カラム画分及び溶出プールは、上述のように分析される。緩衝液交換のための方法が開発され、ＴＦＦによって濃縮され得る。
【０３３２】
製剤研究
精製されたタンパク質を使用して、製剤研究を行い、精製されたタンパク質の最適な貯蔵条件を決定する。研究は、濃度、貯蔵緩衝液、貯蔵温度、最大凍結／解凍サイクル、貯蔵時間、又は他の条件を探索し得る。
【０３３３】
実施例２９－培養マウス肝臓細胞中のイントロン領域を編集する本明細書に記載されるヌクレアーゼの能力の実証
発現された遺伝子のイントロン領域は、疾患を治療又は治癒するためのそのタンパク質を発現する目的で、目的の治療用タンパク質のコード配列を組み込むための魅力的なゲノム標的である。タンパク質コード配列の統合は、外因的に供給されたドナー鋳型の存在下で配列特異的ヌクレアーゼを使用して、イントロン内に二本鎖切断を作製することによって達成され得る。ドナー鋳型は、相同組換え修復（ＨＤＲ）及び非相同末端結合（ＮＨＥＪ）と呼ばれる２つの主要な細胞修復経路のうちの１つを介して二本鎖切断に組み込まれてもよく、ドナー鋳型の標的化された統合をもたらす。ＮＨＥＪ経路は、非分裂細胞において優勢であり、一方でＨＤＲ経路は、主に分裂細胞において活性である。肝臓は、インビボ送達系の利用可能性、並びに肝臓が高い効率でタンパク質を発現及び分泌する能力に起因して、タンパク質コード配列の標的化された統合のための特に魅力的な組織である。
【０３３４】
イントロン領域で二本鎖切断を作り出すＭＧ２９－１の可能性を評価するために、血清アルブミンのイントロン１を標的遺伝子座として選択した。マウスアルブミンイントロン１を標的とした２２ｎｔのスペーサー長を有する単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅ核酸分析ソフトウェア（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｅ

ｉｏｕｓ．ｃｏｍ／ｐｒｉｍｅ／）のガイド発見アルゴリズムを使用して同定した。スペーサーの５’に位置するＫＴＴＧ（配列番号３８７０）のＰＡＭを使用して、マウスアルブミンイントロン１内で合計１１２個の潜在的なｓｇＲＮＡを特定した。イントロン／エクソン境界にわたるガイドは除外された。Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅを使用して、これら１１２個のガイドのスペーサー配列をマウスゲノムに対して検索し、ゲノム内の追加の部位へのアラインメントに基づいて特異性スコアをソフトウェアによって割り当てた。同じ塩基の４つ以上の連続塩基を有するスペーサー配列は、特異性についての懸念により除外された。最も高い特異性スコアを有する合計１２個のスペーサーを試験のために選択した。ｓｇＲＮＡを作製するために、「ＴＡＡＴＴＴＣＴＡＣＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴ」の骨格配列をスペーサー配列の３’末端に付加した。ｓｇＲＮＡは、ｃｐｆ１ガイド（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能なＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２化学物質）に対するｓｇＲＮＡの性能を改善するために特定された化学修飾塩基を組み込んで化学的に合成された。これらのガイドのスペーサー配列を以下の表８に列挙する。

【０３３５】

【表１２】

表８－ＭＧ２９－１／ｓｇＲＮＡ　ＲＮＰでヌクレオフェクションされた、又はメッセンジャーマックスを使用してＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡでトランスフェクトされた、Ｈｅｐａ１－６細胞におけるマウスアルブミンイントロン１を標的とするＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡの活性

sgRNA名	スペーサー(DNA配列、PAMなし)	配列番号	PAM	配列番号	特異性スコア	Hepa1-6細胞における活性(インデル%)	
						RNPヌクレオフェクション	mRNA/sgRNA脂質トランスフェクション
mAlb29-1-1	GTATAGCATGGTCGAGCAGGCA	3993	TTTA	4012	98.5	86.5	43
mAlb29-1-2	CCGATCGTTACAGGAAAATCTG	3994	GTTC	4013	98.4	0	0
mAlb29-1-3	AATTTATTACGGTCTCATAGGG	3995	GTTG	4014	98.2	0	0
mAlb29-1-4	TTACGGTCTCATAGGGCCTGCC	3996	TTTA	4015	97.6	43.5	44
mAlb29-1-5	CCTGTAACGATCGGGAACTGGC	3997	TTTT	4016	97.2	3	0
mAlb29-1-7	AGTATAGCATGGTCGAGCAGGC	3998	TTTT	4017	96.8	11	15
mAlb29-1-8	CTGTAACGATCGGGAACTGGCA	3999	TTTC	4018	95.9	77	45
mAlb29-1-9	GATACAGTTGAATTTATTACGG	4000	GTTG	4019	95.3	0	0
mAlb29-1-10	TAGTATAGCATGGTCGAGCAGG	4001	TTTT	4020	95.2	18	35
mAlb29-1-11	CATCTGAGAACCCTTAGGTGGT	4002	TTTG	4021	95.0	7	2
mAlb29-1-12	AGTGTAGCAGAGAGGAACCATT	4003	TTTG	4022	93.8	NT	47
mAlb29-1-13	CTAGTAATGGAAGCCTGGTATT	4004	TTTT	4023	92.4	8	24
mAlb29-1-14	GGTATCTTTGATGACAATAATG	4005	TTTT	4024	91.8	0	13
mAlb29-1-15	TCTAGTAATGGAAGCCTGGTAT	4006	TTTT	4025	91.8	0	0
mAlb29-1-16	TAGTAATGGAAGCCTGGTATTT	4007	TTTC	4026	89.8	90.5	51
mAlb29-1-17	GTATCTTTGATGACAATAATGG	4008	TTTG	4027	87.8	10	NT
mAlb29-1-18	AAGATTGATGAAGACAACTAAC	4009	TTTA	4028	87.4	76	NT
mAlb29-1-19	CTCTCTGCTACACTCAAAGTTA	4010	GTTC	4029	85.7	0	0
mAlb29-1-20	AAACCCGTTAAGTGTTTATATC	4011	TTTA	4030	87.3	0	4

【０３３６】

形質転換されたマウス肝臓細胞株であるＨｅｐａ１－６細胞を、標準条件下（５％ＣＯ２インキュベーター中に１０％ＦＢＳを有するＤＭＥＭ培地）で培養し、ＰＢＳ緩衝液中でｓｇＲＮＡ及び精製されたＭＧ２９－１タンパク質を混合することによって形成されたリボ核タンパク質でヌクレオフェクションした。完全ＳＦヌクレオフェクション試薬（Ｌｏｎｚａ）中の懸濁液中のＨｅｐａ１－６細胞（１×１０^{5}）を、５０ｐｍｏｌのＭＧ２９－１タンパク質及び１００ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡを混合することによって形成されたＲＮＰを有する４Ｄヌクレオフェクションデバイス（Ｌｏｎｚａ）を使用してヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクション後、細胞をＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ中の２４ウェル

プレートに播種し、５％ＣＯ２インキュベーター中で４８～７２時間インキュベートした。次いで、カラムベースの精製キット（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ ｍｉｎｉ ｋｉｔ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してゲノムＤＮＡを細胞から抽出し、２６０ｎｍでの吸光度によって定量化した。アルブミンイントロン１領域を、プライマーｍＡｌｂ９０Ｆ（ＣＴＣＣＴＣＴＴＣＧＴＣＴＣＣＧＧＣ）（配列番号４０３１）及びｍＡｌｂ１０７３Ｒ（ＣＴＧＣＣＡＣＡＴＴＧＣＴＣＡＧＣＡＣ）（配列番号４０３２）の各０．５マイクロモル並びに１×Ｐｆｕｓｉｏｎ Ｆｌａｓｈ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘを含む反応物中の５０ｎｇのゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅した。

【０３３７】

マウスアルブミンのイントロン１全体にわたる得られた９８４ｂｐのＰＣＲ産物を、カラムベースの精製キット（ＤＮＡ Ｃｌｅａｎ ａｎｄ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ、Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製し、各ｓｇＲＮＡの予測される標的部位の１５０～３５０ｂｐ内に位置するプライマーを使用して配列決定した。非トランスフェクトＨｅｐａ１－６細胞からのプライマーｍＡｌｂ９０Ｆ（配列番号４０３１）及びｍＡｌｂ１０７３Ｒ（配列番号４０３２）を使用して生成されたＰＣＲ産物を、対照として並行して配列決定した。サンガーシーケンシングクロマトグラムを、インデルの頻度並びにインデルプロファイルを決定するＣＲＩＳＰＲ編集の推論（Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ Ｅｄｉｔｓ）（ＩＣＥ）を使用して分析した（Ｈｓｉａｕ ｅｔ．ａｌ，Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ Ｅｄｉｔｓ ｆｒｏｍ Ｓａｎｇｅｒ Ｔｒａｃｅ Ｄａｔａ．ＢｉｏＡｒｘｉｖ．２０１８ ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｒｘｉｖ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｅａｒｌｙ／２０１８／０１／２０／２５１０８２）。

【０３３８】

ヌクレアーゼが生細胞内のＤＮＡに二本鎖切断（ＤＳＢ）を作り出す場合、ＤＳＢは細胞ＤＮＡ修復機構によって修復される。培養物中の形質転換哺乳類細胞などの細胞を積極的に分裂させ、修復鋳型が不在である場合、この修復はＮＨＥＪ経路によって生じる。ＮＨＥＪ経路は、二本鎖切断の部位に塩基の挿入又は欠失を導入するエラーが発生しやすいプロセスである（Ｌｉｅｂｅｒ，Ｍ．Ｒ，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０１０；７９：１８１－２１１）。したがって、これらの挿入及び欠失は、発生し、かつその後修復された二本鎖切断の特徴であり、ヌクレアーゼの編集又は切断効率の読み出しとして広く使用されている。挿入及び欠失のプロファイルは、二本鎖切断を作り出したヌクレアーゼの特性だけでなく、切断部位での配列状況にも依存する。インビトロアッセイに基づいて、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼは、ＰＡＭの３’に位置する互い違いの切断を作り出す。互い違い切断は、多くの場合、末端結合前の一本鎖末端のトリミングにより、より大きな欠失をもたらす。表８は、Ｈｅｐａ１－６細胞で試験されたマウスアルブミンイントロン１を標的とする１９個のｓｇＲＮＡの各々によって生成された総インデル頻度を列挙する。１８個のｓｇＲＮＡのうち１１個は、標的部位で検出可能なインデルをもたらし、５個のｓｇＲＮＡは、５０％超のインデル頻度をもたらし、４個のｓｇＲＮＡは、７５％超のインデル周波数をもたらした。これらのデータは、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが、７５％を超える効率で、ｓｇＲＮＡの予測される標的部位で培養されたマウス肝臓細胞のゲノムを編集することができることを示す。

【０３３９】

ｓｇＲＮＡの同じセットの編集効率を、市販の脂質ベースのトランスフェクション試薬（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、ｓｇＲＮＡとＭＧ２９－１ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡの共トランスフェクションによって評価した。ＭＧ２９－１をコードするｍＲＮＡは、ＭＧ２９－１のコード配列がクローニングされたプラスミドからのＴ７ポリメラーゼを使用したインビトロ転写によって生成された。ＭＧ２９－１コード配列は、ヒトコドン使用頻度表を使用してコドン最適化され、Ｎ末端でＳＶ４０から、及びＣ末端でヌクレオプラスミンから誘導された核局在化シグナルに隣接した。更に、翻訳を改善するために、ＵＴＲをコード配列の

３’末端に含めた。インビボでのｍＲＮＡ安定性を改善するために、３’ＵＴＲ、続いておよそ９０～１１０ヌクレオチドのポリＡ管を、コード配列の３’末端に含めた（例えば、野生型ＭＧ２９－１については配列番号４４２６、及びＳ１６８Ｒバリアントについては配列番号３３２７を参照のこと）。インビトロ転写反応は、Ｃｌｅａｎ　Ｃａｐ（登録商標）キャッピング試薬（Ｔｒｉｌｉｎｋ　ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含み、得られたＲＮＡをＭＥＧＡＣｌｅａｒ（商標）Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｃｌｅａｎ－Ｕｐキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して精製し、ＴａｐｅＳｔａｔｉｏｎ（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して純度を評価し、＞９０％の全長ＲＮＡから構成されることが見出された。表１に見られるように、Ｈｅｐａ１－６細胞のｍＲＮＡ／ｓｇＲＮＡ脂質トランスフェクション後の編集効率は、ＲＮＰのヌクレオフェクションで見られるものと同様であるが同一ではなく、しかしながら、ｍＲＮＡの形態で送達された場合、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが培養された肝臓細胞で活性であることを確認する。

【０３４０】

図５０は、ガイド（配列番号３９９９）としてｍＡＬｂ２９－１－８を使用するＩＣＥ分析によって決定される、ＭＧ２９－１のインデルプロファイルの代表的な例であり、４塩基の欠失が、最も頻度の高い事象（全配列の２５％）であり、１、５、６、又は７塩基の欠失が各々、配列の約１０～１５％を占めることを示す。最大１３塩基のより長い欠失も検出されたが、挿入は検出不可能であった。対照的に、マウスアルブミンイントロン１を標的とするガイドを有するｓｐＣａｓ９は、主に１塩基の挿入又は欠失を生成した。

【０３４１】

図５１は、マウスアルブミンイントロン１領域のＰＣＲ産物の次世代シーケンシング（ＮＧＳ）によって決定される、ＭＧ２９－１及びｓｇＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９－１－８のインデルプロファイルの代表的な例である。合計でおよそ１５，０００の配列読み取りを得た。ＮＧＳによる４塩基の欠失は、最も頻度の高いインデル（合計の約２０％）であり、１、５、６、及び７塩基の欠失は各々、インデルの約１０％を占めている。最大１９ｂｐのより大きな欠失も検出された。ＮＧＳ分析によって観察されたプロファイルは、ＩＣＥによって測定されたプロファイルと厳密に一致する。これらの結果は、ＭＧ２９－１が、インビトロで観察された互い違いの切断と一貫する標的部位でより大きな欠失を生成することを示す。

【０３４２】

実施例８－培養されたヒト肝臓細胞（ＨｅｐＧ２）中のイントロン領域を標的とする本明細書に記載されるヌクレアーゼの能力の実証

ヒト細胞のイントロン領域で二本鎖切断を作り出すＭＧ２９－１の可能性を評価するために、ヒト血清アルブミンのイントロン１を標的遺伝子座として選択した。ヒトアルブミンイントロン１を標的とした２２ｎｔのスペーサー長を有する単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅ核酸分析ソフトウェア（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｅｉｏｕｓ．ｃｏｍ／ｐｒｉｍｅ／）のガイド発見アルゴリズムを使用して同定した。スペーサーの５’に位置するＫＴＴＧ（配列番号３８７０）のＰＡＭを使用して、ヒトアルブミンイントロン１内で合計９０個の潜在的なｓｇＲＮＡを特定した。イントロン／エクソン境界にわたるガイドは除外された。Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅを使用して、これらガイドのスペーサー配列をマウスゲノムに対して検索し、ゲノム内の追加の部位へのアラインメントに基づいて特異性スコアをソフトウェアによって割り当てた。同じ塩基の４つ以上の連続塩基を有するスペーサー配列は、特異性についての懸念により除外された。最も高い特異性スコアを有する合計２３個のスペーサーを試験のために選択した。ｓｇＲＮＡを作製するために、「ＴＡＡＴＴＴＣＴＡＣＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴ」の骨格配列をスペーサー配列の３’末端に付加した。ｓｇＲＮＡは、ｃｐｆ１ガイド（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能なＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２化学物質）に対するｓｇＲＮＡの性能を改善するために特定された化学修飾塩基を組み込んで化学的に合成された。これらのガイドのスペーサー配列を以下の表９に列挙する。

【０３４３】
【表１３】
表９－ヒトアルブミンイントロン１を標的とするＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡのスペーサー配列、及びＭＧ２９－１／ｓｇＲＮＡ　ＲＮＰでヌクレオフェクションされたＨｅｐＧ２細胞における活性

sgRNA名	スペーサー(DNA配列、PAMなし)	配列番号	PAM	配列番号	特異性スコア	HepG2細胞における活性(インデル%)
hAlb_g63	GTAAACTCTGCATCTTTAAAGA	4033	TTTA	4056	91.25%	0
hAlb_g59	TTTCAAAATATTGGGCTCTGAT	4034	TTTG	4057	90.64%	0
hAlb_g58	AGTAAACTCTGCATCTTTAAAG	4035	TTTT	4058	90.46%	0
hAlb_g56	AAGATGCAGAGTTTACTAAAAC	4036	TTTA	4059	90.23%	0
hAlb_g72	AAAATATTGGGCTCTGATTCCT	4037	TTTC	4060	93.26%	0
hAlb_g70	AAATAAAGCATAGTGCAATGGA	4038	TTTT	4061	92.31%	63
hAlb_g74	AATAAAGCATAGTGCAATGGAT	4039	TTTA	4062	95.41%	93
hAlb_g83	TGAGATCAACAGCACAGGTTTT	4040	TTTA	4063	98.39%	93
hAlb_g85	TGTAGGAATCAGAGCCCAATAT	4041	TTTC	4064	99.20%	55
hAlb_g89	CTGTAGGAATCAGAGCCCAATA	4042	TTTT	4065	100.00%	43
hAlb_g88	TCTGTAGGAATCAGAGCCCAAT	4043	TTTT	4066	100.00%	45
hAlb_g77	GTGACTGTAATTTTCTTTTGCG	4044	TTTA	4067	96.77%	0
hAlb_g69	CTTTTGCGCACTAAGGAAAGTG	4045	TTTT	4068	92.18%	3
hAlb_g66	TGAAGTCTTACAAGGTTATCTT	4046	TTTG	4069	91.80%	19
hAlb_g75	AGTGTCTATCAACAGCAACCAA	4047	TTTT	4070	95.96%	13
hAlb_g79	CTTAGTGCGCAAAAGAAAATTA	4048	TTTC	4071	97.45%	60
hAlb_g82	TAGCCTTATATTCAAACTTAGA	4049	TTTA	4072	98.32%	0
hAlb_g80	GGATAGTTATGAATTCAATCTT	4050	TTTG	4073	97.46%	23
hAlb_g84	CACTTTCCTTAGTGCGCAAAAG	4051	TTTG	4074	98.85%	96
hAlb_g81	GTATTTGTGAAGTCTTACAAGG	4052	TTTT	4075	98.07%	17
hAlb_g90	GTGTCTATCAACAGCAACCAAG	4053	TTTA	4076	100.00%	91
hAlb_g87	CGCACTAAGGAAAGTGCAAAGT	4054	TTTG	4077	100.00%	97
hAlb_g86	GCGCACTAAGGAAAGTGCAAAG	4055	TTTT	4078	100.00%	42

【０３４４】
形質転換されたヒト肝臓細胞株であるＨｅｐＧ２細胞を、標準条件下（５％ＣＯ２インキュベーター中に１０％ＦＢＳを有するＭＥＭ培地）で培養し、ＰＢＳ緩衝液中でｓｇＲＮＡ及び精製されたＭＧ２９－１タンパク質を混合することによって形成されたリボ核タンパク質でヌクレオフェクションした。完全ＳＦヌクレオフェクション試薬（Ｌｏｎｚａ）中の懸濁液中の合計１　ｅ５のＨｅｐＧ２細胞を、８０ｐｍｏｌのＭＧ２９－１タンパク質及び１６０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡを混合することによって形成されたＲＮＰを有する４Ｄヌクレオフェクションデバイス（Ｌｏｎｚａ）を使用してヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクション後、細胞をＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ中の２４ウェルプレートに播種し、５％CO_2インキュベーター中で４８～７２時間インキュベートした。次いで、カラムベースの精製キット（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ　ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　ｍｉｎｉ　ｋｉ

ｔ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してゲノムＤＮＡを細胞から抽出し、２６０ｎｍでの吸光度によって定量化した。アルブミンイントロン１領域を、プライマーｈＡｌｂ　１１Ｆ（ＴＣＴＴＣＴＧＴＣＡＡＣＣＣＣＡＣＡＣＧＣＣ）（配列番号４０７９）及びｈＡｌｂ８３４Ｒ（ＣＴＴＧＴＣＴＧＧＧＣＡＡＧＧＧＡＡＧＡ）（配列番号４０８０）の各０．５マイクロモル並びに１×Ｐｆｕｓｉｏｎ　Ｆｌａｓｈ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘを含む反応物中の５０ｎｇのゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅した。マウスアルブミンのイントロン１全体にわたる得られた８２６ｂｐのＰＣＲ産物を、カラムベースの精製キット（ＤＮＡ　Ｃｌｅａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製し、ｓｇＲＮＡの予測される標的部位の１５０～３５０ｂｐ内に位置するプライマーを使用して配列決定した。

【０３４５】

非トランスフェクトＨｅｐＧ２細胞からプライマーｈＡｌｂ　１１Ｆ（ＴＣＴＴＣＴＧＴＣＡＡＣＣＣＣＡＣＡＣＧＣＣ）（配列番号４０７９）及びｈＡｌｂ８３４Ｒ（ＣＴＴＧＴＣＴＧＧＧＣＡＡＧＧＧＡＡＧＡ）（配列番号４０８０）を使用して生成されたＰＣＲ産物を、対照として並行して配列決定した。サンガーシーケンシングクロマトグラムを、インデルの頻度及びインデルプロファイルを決定するＣＲＩＳＰＲ編集の推論（ＩＣＥ）を使用して分析した。ヌクレアーゼが生細胞内のＤＮＡに二本鎖切断（ＤＳＢ）を作り出す場合、ＤＳＢは細胞ＤＮＡ修復機構によって修復される。培養物中の形質転換哺乳類細胞などの細胞を積極的に分裂させ、修復鋳型が不在である場合、この修復はＮＨＥＪ経路によって生じる。ＮＨＥＪ経路は、二本鎖切断の部位に塩基の挿入又は欠失を導入するエラーが発生しやすいプロセスである（Ｌｉｅｂｅｒ，Ｍ．Ｒ，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０１０；７９：１８１－２１１）。

【０３４６】

したがって、これらの挿入及び欠失は、発生し、かつその後修復された二本鎖切断の特徴であり、ヌクレアーゼの編集又は切断効率の読み出しとして広く使用されている。挿入及び欠失のプロファイルは、二本鎖切断を作り出したヌクレアーゼの特性だけでなく、切断部位での配列状況にも依存する。インビトロアッセイに基づいて、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼは、ＰＡＭから２２ヌクレオチドで標的鎖を切断し（ＰＡＭから２１ヌクレオチドで少ない頻度で）、ＰＡＭから１８ヌクレオチドで非標的鎖を切断し、したがって、ＰＡＭの３’に位置する４ヌクレオチドの互い違いの末端を作り出す。互い違い切断は、多くの場合、末端結合前の一本鎖末端のトリミングにより、より大きな欠失をもたらす。

【０３４７】

表９は、ＨｅｐＧ２細胞で試験されたヒトアルブミンイントロン１を標的とする２３個のｓｇＲＮＡの各々によって生成された総インデル頻度を列挙する。２３個のｓｇＲＮＡのうち１６個が、標的部位で検出可能なインデルをもたらし、８個のｓｇＲＮＡが、５０％超のインデルをもたらし、５個のｓｇＲＮＡが、９０％超のインデル頻度をもたらした。これらのデータは、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが、９０％を超える効率で、ｓｇＲＮＡの予測される標的部位で培養されたヒト肝臓細胞株のゲノムを編集することができることを示す。

【０３４８】

実施例９－培養されたマウス肝臓細胞のエクソン領域を編集する本明細書に記載されるヌクレアーゼの能力の実証

配列特異的ヌクレアーゼを使用して、遺伝子のコード配列を破壊し、それによって目的のタンパク質の機能的ノックアウトを作製することができる。これは、特定のタンパク質のノックダウンが特定の疾患において有益な効果を有する場合に、治療的使用のためのものになり得る。遺伝子のコード配列を破壊する１つの方法は、配列特異的ヌクレアーゼを使用して、遺伝子のエクソン領域内で二本鎖切断を作ることである。これらの二本鎖切断は、エラーが発生しやすい修復経路を介して修復され、フレームシフト変異又はタンパク質の機能を妨害するアミノ酸配列の変化のいずれかをもたらし得る挿入又は欠失を生成する。

【０３４９】
肝臓細胞に発現される遺伝子のエクソン領域で二本鎖切断を作り出すＭＧ２９－１の可能性を評価するために、グリコール酸オキシダーゼ（ｈａｏ－１）をコードする遺伝子を標的遺伝子座として選択した。マウスｈａｏ－１のエクソン１～４を標的とした２２ｎｔのスペーサー長を有する単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅ核酸分析ソフトウェア（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｅｉｏｕｓ．ｃｏｍ／ｐｒｉｍｅ／）のガイド発見アルゴリズムを使用して同定した。ｈａｏ－１遺伝子の最初の４つのエクソンは、ｈａｏ－１コード配列のおよそＮ末端５０％を含む。遺伝子のコード配列のＮ末端に向かって作製されたインデルは、タンパク質の活性を妨害するフレームシフト又はミスセンス変異を作製する可能性がより高いため、最初の４つのエクソンを選択した。スペーサーの５’に位置するＫＴＴＧ（配列番号３８７０）のＰＡＭを使用して、マウスｈａｏ－１エクソン１～４内で合計４５個の潜在的なｓｇＲＮＡを特定した。イントロン／エクソンの境界にわたるガイドは、こうしたガイドがスプライシングに干渉するインデルを作製し得るため、含まれた。Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅを使用して、これら４５個のガイドのスペーサー配列をマウスゲノムに対して検索し、マウスゲノム内の追加の部位へのアラインメントに基づいて特異性スコアをソフトウェアによって割り当てた。同じ塩基の４つ以上の連続塩基を有するスペーサー配列は、特異性についての懸念により除外された。最も高い特異性スコアを有する合計４５個のスペーサーを試験のために選択した。

【０３５０】
ｓｇＲＮＡを作製するために、「ＴＡＡＴＴＴＣＴＡＣＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴ」の骨格配列をスペーサー配列の３’末端に付加した。ｓｇＲＮＡは、ｃｐｆ１ガイド（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能なＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２化学物質）に対するｓｇＲＮＡの性能を改善するために特定された化学修飾塩基を組み込んで化学的に合成された。これらのガイドのスペーサー配列を以下の表３に列挙する。

【０３５１】

【表１４】

表３－マウスｈａｏ－１エクソン１～４を標的とするＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡのスペーサー配列、及びＭＧ２９－１／ｓｇＲＮＡ　ＲＮＰでヌクレオフェクションされたＨｅｐａ１－６細胞における活性

sgRNA名	スペーサー(DNA配列、PAMなし)	配列番号	PAM	配列番号	特異性スコア	Hepa1-6細胞における活性(インデル%)
mH29-1	CCCCAGACCTGTAATAGTCATA	4081	TTTG	4126	100.00%	92.2
mH29-2	AGGACAGAGAGTCAGCATGCCA	4082	TTTT	4127	100.00%	0
mH29-3	GGAGACAACAGTGGACTTGCTG	4083	TTTT	4128	100.00%	0
mH29-4	CCCTACCCTGCCACAATGTTGC	4084	GTTG	4129	100.00%	0
mH29-5	CTTACCTAGAAAATGCTTGGAT	4085	GTTT	4130	100.00%	0
mH29-6	ACAGATCGATATCAGCAACGTT	4086	GTTG	4131	100.00%	0
mH29-7	CGAAGCATCCGTGGATAGAGCT	4087	GTTG	4132	100.00%	0
mH29-8	TTGGGCTACCTCCTCAATAGAA	4088	GTTC	4133	100.00%	0
mH29-9	AAGCTGCCACCACAACTCAGGT	4089	GTTC	4134	100.00%	0
mH29-10	TGGTGGCAGCTTGAACCTGTTC	4090	GTTG	4135	100.00%	0
mH29-11	CGCACGTCATCAATGCGGTTGC	4091	GTTC	4136	100.00%	0
mH29-12	CCCAGGTAAGGGGTGTCCACAG	4092	GTTG	4137	100.00%	0
mH29-13	CATCCAGCGAAGTGCCTCTGGG	4093	GTTG	4138	100.00%	0
mH29-14	AAATTCCAGATGGAAGCTCTAT	4094	TTTT	4139	99.04%	0
mH29-15	TGACTGTGGACACCCCTTACCT	4095	TTTG	4140	99.04%	97.5
mH29-16	ATTACAGCCTGTCAGACCATGG	4096	TTTC	4141	99.30%	91
mH29-17	GAGACAACAGTGGACTTGCTGA	4097	TTTG	4142	98.37%	27.5
mH29-18	CAACAATAGGCAGTGATGTCAA	4098	TTTA	4143	99.22%	85
mH29-19	CCTCGACTGGTCTGCATCAGTG	4099	GTTG	4144	97.69%	0
mH29-20	ATAATCACTGATGCAGACCAGT	4100	GTTC	4145	98.07%	0
mH29-21	TCAGCTAACGTCTCCTGATCAT	4101	GTTA	4146	99.33%	0
mH29-22	CTGATATCGATCTGTCAACTTC	4102	GTTG	4147	99.22%	0
mH29-23	TAAAGGGCATTTTGAGAGGTTT	4103	GTTG	4148	99.22%	0
mH29-24	AATAGCAAAGTTTCTTACCTAG	4104	TTTA	4149	95.75%	0
mH29-25	GGACAGAGAGTCAGCATGCCAA	4105	TTTA	4150	95.73%	47
mH29-26	TCCATTTCATTACAGCCTGTCA	4106	TTTC	4151	94.08%	79
mH29-27	AGTCTGTGAGATCATACTGACC	4107	TTTG	4152	96.85%	65
mH29-28	TAGATGTACAGTTGCATCCAGC	4108	TTTG	4153	98.20%	29
mH29-29	CCTTAGGAGAAAATGCCAAATC	4109	TTTC	4154	96.18%	94.5
mH29-30	CTCCTAAGGGAAATTTTGGAGA	4110	TTTT	4155	98.06%	0
mH29-31	GCTGATAACATCCAAGCATTTT	4111	GTTA	4156	93.30%	0
mH29-32	AAATAGCAAAGTTTCTTACCTA	4112	GTTT	4157	97.31%	0
mH29-33	TAGGACAGAGAGTCAGCATGCC	4113	GTTT	4158	95.84%	0
mH29-34	GGGCTACTGCCATGCAGTGCAT	4114	GTTG	4159	97.53%	0
mH29-35	TCTCCAAAATTTCCCTTAGGAG	4115	GTTG	4160	96.94%	0
mH29-36	AATTCCAGATGGAAGCTCTATC	4116	TTTA	4161	96.74%	0
mH29-37	TCCTAAGGGAAATTTTGGAGAC	4117	TTTC	4162	97.59%	53.5
mH29-38	TTACCTAGAAAATGCTTGGATG	4118	TTTC	4163	94.99%	21.8
mH29-39	CAAGGCCATATTTGTGACTGTG	4119	GTTA	4164	93.57%	0
mH29-40	CTCCATTTCATTACAGCCTGTC	4120	TTTT	4165	93.71%	0
mH29-41	GCATTTTCTCCTAAGGGAAATT	4121	TTTG	4166	92.30%	59
mH29-42	TTACCTCGCACAGTGGCCAGCT	4122	TTTC	4167	77.16%	32
mH29-43	TCTCTCTTTTCTTACCTCGCAC	4123	TTTG	4168	87.70%	0
mH29-44	CTTACCTCGCACAGTGGCCAGC	4124	TTTT	4169	95.19%	0
mH29-45	AAACCAATGATTTGGCATTTTC	4125	TTTG	4170	91.09%	0

【０３５２】

形質転換されたマウス肝臓細胞株であるＨｅｐａ１－６細胞を、標準条件下（５％CO_2インキュベーター中に１０％ＦＢＳを有するＤＭＥＭ培地）で培養し、ＰＢＳ緩衝液中でｓｇＲＮＡ及び精製されたＭＧ２９－１タンパク質を混合することによって形成されたリボ核タンパク質でヌクレオフェクションした。完全ＳＦヌクレオフェクション試薬（Ｌｏｎｚａ）中の懸濁液中の合計１　e^5のＨｅｐａ１－６細胞を、５０ｐｍｏｌのＭＧ２９－１タンパク質及び１００ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡを混合することによって形成されたＲＮＰを有する４Ｄヌクレオフェクションデバイス（Ｌｏｎｚａ）を使用してヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクション後、細胞をＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ中の２４ウェル

プレートに播種し、５％ＣＯ２インキュベーター中で４８～７２時間インキュベートした。次いで、カラムベースの精製キット（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ ｍｉｎｉ ｋｉｔ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してゲノムＤＮＡを細胞から抽出し、２６０ｎｍでの吸光度によって定量化した。マウスｈａｏ－１遺伝子１のエクソン１～４を、各エクソンに特異的なプライマーの０．５マイクロモル対を含む反応において、４０ｎｇのゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅した。エクソン１に使用したＰＣＲプライマーは、ＰＣＲ＿ｍＨＥ１＿Ｆ＿＋２３３（ＧＴＧＡＣＣＡＡＣＣＣＴＡＣＣＧＴＴＴ）（配列番号４１７１）、ＰＣＲ＿ｍＨＥ１＿Ｒ＿－５５３（ＧＣＡＡＧＣＡＣＣＴＡＣＴＧＴＣＴＣＧＴ）（配列番号４１７２）であった。エクソン２に使用したＰＣＲプライマーは、ＨＡＯ１＿Ｅ２＿Ｆ５７２１（ＣＡＡＣＧＡＡＧＧＴＴＣＣＣＴＣＣＡＧＧ）（配列番号４１７３）、ＨＡＯ１＿Ｅ２＿Ｒ６２７１（ＧＧＡＡＧＧＧＴＧＴＴＣＧＡＧＡＡＧＧＡ）（配列番号４１７４）であった。エクソン３に使用したＰＣＲプライマーは、ＨＡＯ１＿Ｅ３＿Ｆ２３１９８（ＴＧＣＣＣＴＡＧＡＣＡＡＧＣＴＧＡＣＡＣ）（配列番号４１７５）、ＨＡＯ１＿Ｅ３＿Ｒ２３８７９（ＣＡＧＡＴＴＣＴＧＧＡＡＧＴＧＧＣＣＣＡ）（配列番号４１７６）であった。エクソン４に使用したＰＣＲプライマーは、ＨＡＯ１＿Ｅ４＿Ｆ３１０８７（ＣＣＴＧＴＡＧＧＴＧＧＣＴＧＡＧＴＡＣＧ）（配列番号４１７７）、ＨＡＯ１＿Ｅ４＿Ｒ３１６５０（ＡＧＧＴＴＴＧＧＴＴＣＣＣＣＴＣＡＣＣＴ）（配列番号４１７８）であった。

【０３５３】

プライマー及びゲノムＤＮＡに加えて、ＰＣＲ反応は、１×Ｐｆｕｓｉｏｎ Ｆｌａｓｈ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を含んでいた。得られたＰＣＲ産物は、アガロースゲル上で分析したときに単一のバンドを含み、ＰＣＲ反応が特異的であったことを示し、カラムベースの精製キット（ＤＮＡ Ｃｌｅａｎ ａｎｄ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ、Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製した。配列決定のために、各切断部位から少なくとも１００ｎｔの配列と相補的であるプライマーを使用した。エクソン１を配列決定するためのプライマーは、Ｓｅｑ＿ｍＨＥ１＿Ｆ＿＋１３９（ＧＴＣＴＡＧＧＣＡＴＡＣＡＡＴＧＴＴＴＧＣＴＣＡ）（配列番号４１７９）であった。エクソン２を配列決定するためのプライマーは、５９３８Ｆ Ｓｅｑ＿ＨＡＯ１＿Ｅ２（ＣＴＡＴＧＣＡＡＧＧＡＡＡＡＧＡＴＴＴＧＧＣＣ）（配列番号４１８０）であった。エクソン３を配列決定するためのプライマーは、ＨＡＯ１＿Ｅ３＿Ｆ２３４７６（ＴＣＴＴＣＣＣＣＣＴＴＧＡＡＴＧＡＡＡＣＡＣＴ）（配列番号４１８１）及び逆ＰＣＲプライマー、ＨＡＯ１＿Ｅ３＿Ｒ２３８７９（ＣＡＧＡＴＴＣＴＧＧＡＡＧＴＧＧＣＣＣＡ）（配列番号４１８２）であった。エクソン４を配列決定するためのプライマーは、逆ＰＣＲプライマー、ＨＡＯ１＿Ｅ４＿Ｒ３１６５０（ＡＧＧＴＴＴＧＧＴＴＣＣＣＣＴＣＡＣＣＴ）（配列番号４１８３）であった。

【０３５４】

ＰＣＲ産物の配列決定は、それらがｈａｏ－１エクソンの予想される配列を含んでいたことを示した。異なるＲＮＰヌクレオフェクトされたＨｅｐａ－１６細胞又は未処理対照に由来するＰＣＲ産物を、各ｓｇＲＮＡの予測される標的部位の１００～３５０ｂｐ以内に位置するプライマーを使用して配列決定した。サンガーシーケンシングクロマトグラムを、インデルの頻度並びにインデルプロファイルを決定するＣＲＩＳＰＲ編集の推論（ＩＣＥ）を使用して分析した（Ｈｓｉａｕ ｅｔ．ａｌ，Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ Ｅｄｉｔｓ ｆｒｏｍ Ｓａｎｇｅｒ Ｔｒａｃｅ Ｄａｔａ．ＢｉｏＡｒｘｉｖ．２０１８ ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｒｘｉｖ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｅａｒｌｙ／２０１８／０１／２０／２５１０８２）。ヌクレアーゼが生細胞内のＤＮＡに二本鎖切断（ＤＳＢ）を作り出す場合、ＤＳＢは細胞ＤＮＡ修復機構によって修復される。培養物中の形質転換哺乳類細胞などの細胞を積極的に分裂させ、修復鋳型が不在である場合、この修復はＮＨＥＪ経路によって生じる。ＮＨＥＪ経路は、二本鎖切断の部位に塩基の挿入又は欠失を導入するエラーが発生しやすいプロセスである（Ｌｉｅｂｅｒ，Ｍ．Ｒ，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０１０；７９：１８１－２１１）。したが

って、これらの挿入及び欠失は、発生し、かつその後修復された二本鎖切断の特徴であり、ヌクレアーゼの編集又は切断効率の読み出しとして当該技術分野で広く使用されている。表３に表されるように、１４個のガイドは、それらの予測される標的部位で検出可能な編集を示した。４個のガイドは、９０％超の編集活性を呈した。活性ガイドの１４個全てが、ＴＴＴＮのＰＡＭ配列を有し、このＰＡＭがインビボでより効率的であることを示した。しかしながら、ＴＴＴＮ　ＰＡＭを利用する全てのガイドが活性であったわけではない。これらのデータは、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが、培養された肝臓細胞のエクソン領域においてＲＮＡガイド配列特異的二本鎖切断を高い効率で生成することができることを示す。

【０３５５】

実施例１０－Ｈａｏ－１遺伝子の破壊のための更なるｓｇＲＮＡの設計

更なるｓｇＲＮＡを、ｈａｏ－１遺伝子のエクソン部分を標的とするように設計した。これらは、最初の４つのエクソンを標的とするように設計されるが、これは、これらがコード配列のおよそ５０％を含み、遺伝子のコード配列のＮ末端に向かって作製されたインデルが、タンパク質の活性を妨害するフレームシフト又はミスセンス変異を作製する可能性がより高いためである。哺乳類細胞においてより活性であることが実施例９に示されたＫＴＴＧのより制限的なＰＡＭ（配列番号３８７０）を使用して、ヒトｈａｏ－１エクソン１～４内で合計４２個の潜在的なｓｇＲＮＡを特定した（表４）。

【０３５６】

【表１５】

表４－ヒトｈａｏ－１遺伝子のエクソン１～４で特定されたMG２９－１のスペーサー配列

sgRNA名	スペーサー(DNA配列、PAMなし)	配列番号	PAM	配列番号	特異性スコア
hH29-1	GCATGTTGTTCATAATCATTGA	4184	TTTA	4226	96.25%
hH29-2	GAAGTACTGATTTAGCATGTTG	4185	TTTG	4227	98.37%
hH29-3	TATCAATGATTATGAACAACAT	4186	TTTG	4228	87.44%
hH29-4	CCCCAGACCTGTAATAGTCATA	4187	TTTG	4229	99.04%
hH29-5	TTCATCATTTGCCCCAGACCTG	4188	TTTC	4230	95.59%
hH29-6	TTACCTGGAAAATGCTGCAATA	4189	TTTC	4231	80.36%
hH29-7	CTTACCTGGAAAATGCTGCAAT	4190	TTTT	4232	79.67%
hH29-8	GCTGATAATATTGCAGCATTTT	4191	TTTG	4233	92.20%
hH29-9	AAAAATAAATTTTCTTACCTGG	4192	TTTA	4234	58.56%
hH29-10	AAAAAATAAATTTTCTTACCTG	4193	TTTT	4235	44.93%
hH29-11	ATTTTATTTTTTAATTCTAGAT	4194	TTTT	4236	10.22%
hH29-12	TTTTATTTTTTAATTCTAGATG	4195	TTTA	4237	10.64%
hH29-13	ATTTTTTAATTCTAGATGGAAG	4196	TTTT	4238	70.62%
hH29-14	TTTTTTAATTCTAGATGGAAGC	4197	TTTA	4239	44.69%
hH29-15	TTAATTCTAGATGGAAGCTGTA	4198	TTTT	4240	99.13%
hH29-16	TAATTCTAGATGGAAGCTGTAT	4199	TTTT	4241	97.06%
hH29-17	AATTCTAGATGGAAGCTGTATC	4200	TTTT	4242	96.74%
hH29-18	ATTCTAGATGGAAGCTGTATCC	4201	TTTA	4243	98.94%
hH29-19	AGCAACATTCCGGAGCATCCTT	4202	TTTC	4244	97.81%
hH29-20	AGGACAGAGGGTCAGCATGCCA	4203	TTTT	4245	97.75%
hH29-21	GGACAGAGGGTCAGCATGCCAA	4204	TTTA	4246	100.00%
hH29-22	TTTCTCAGCCTGTCAGTCCCTG	4205	TTTC	4247	88.19%
hH29-23	TCAGCCTGTCAGTCCCTGGGAA	4206	TTTC	4248	100.00%
hH29-24	TGACAGTGGACACACCTTACCT	4207	TTTG	4249	100.00%
hH29-25	AATCTGTTACGCACATCATCCA	4208	TTTG	4250	100.00%
hH29-26	ATGCATTTCTTATTTTAGGATG	4209	TTTT	4251	80.79%
hH29-27	TGCATTTCTTATTTTAGGATGA	4210	TTTA	4252	76.81%
hH29-28	TTATTTTAGGATGAAAAATTTT	4211	TTTC	4253	52.38%
hH29-29	AGGATGAAAAATTTTGAAACCA	4212	TTTT	4254	90.56%
hH29-30	GGATGAAAAATTTTGAAACCAG	4213	TTTA	4255	89.17%
hH29-31	CTCAGGAGAAAATGATAAAGTA	4214	TTTC	4256	90.51%
hH29-32	CCTCAGGAGAAAATGATAAAGT	4215	TTTT	4257	88.16%
hH29-33	GAAACCAGTACTTTATCATTTT	4216	TTTT	4258	86.74%
hH29-34	AAACCAGTACTTTATCATTTTC	4217	TTTG	4259	91.02%
hH29-35	TCATTTTCTCCTGAGGAAAATT	4218	TTTA	4260	83.29%
hH29-36	CTCCTGAGGAAAATTTTGGAGA	4219	TTTT	4261	91.88%
hH29-37	TCCTGAGGAAAATTTTGGAGAC	4220	TTTC	4262	96.24%
hH29-38	GCCACATATGCAGCAAGTCCAC	4221	TTTA	4263	100.00%
hH29-39	GGAGACGACAGTGGACTTGCTG	4222	TTTT	4264	90.43%
hH29-40	GAGACGACAGTGGACTTGCTGC	4223	TTTG	4265	99.01%
hH29-41	ATATCTTCCCAGCTGATAGATG	4224	TTTG	4266	99.18%
hH29-42	CAACAATTGGCAATGATGTCAG	4225	TTTG	4267	95.26%

【０３５７】

イントロン／エクソンの境界にわたるガイドは、こうしたガイドがスプライシングに干渉するインデルを作製し得るため、含まれた。Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅを使用して、これら４２個のガイドのスペーサー配列をヒトゲノムに対して検索し、ヒトゲノムへのアラインメントに基づいて特異性スコアをソフトウェアによって割り当てた。より高い特異性スコアは、スペーサーが設計された部位以外のヒトゲノム中の１つ以上の配列を認識するガイドのより低い確率を示す。特異性スコアは、１０％～１００％の範囲であり、２５個のガイドは９０％超の特異性スコアを有し、３３個のガイドは８０％超の特異性スコアを有する。この分析は、高い特異性スコアを有するヒト遺伝子のエクソン領域を標的と

するガイドを容易に特定することができ、いくつかの高度に活性なガイドが特定されることが期待されることを示す。

【０３５８】

実施例１１－マウス肝臓細胞における、本明細書に記載されるヌクレアーゼの編集能力とｓｐＣａｓ９の編集能力の比較

細菌種Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ（ｓｐＣａｓ９）由来のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、ゲノム編集に広く使用されており、特定された最も活性なＲＮＡガイドヌクレアーゼである。ｓｐＣａｓ９と比較したＭＧ２９－１の相対的効力を、マウス肝臓細胞株Ｈｅｐａ１－６における異なる用量のＲＮＰのヌクレオフェクションによって評価した。マウスアルブミンのイントロン１を標的とするｓｇＲＮＡを両方のヌクレアーゼに使用した。ＭＧ２９－１については、実施例２９で特定されたｓｇＲＮＡ ｍＡｌｂ２９－１－８を選択した。ガイドｍＡｌｂ２９－１－８（実施例２９を参照のこと）を、ＭＧ２９－１と同様のｓｇＲＮＡ構造を有するＶ型ヌクレアーゼｃｐｆ１のガイドの効力を改善するように設計されたＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）と呼ばれる化学的修飾を組み込んで化学的に合成した。ｓｐＣａｓ９については、マウスアルブミンイントロン１を効率的に編集したｓｇＲＮＡを、インシリコスクリーニングから選択された３つのガイドを試験することによって特定した。これらの研究で使用されたｓｐＣａｓ９タンパク質は、商業的供給業者（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ＡｌｔＲ－ｓＰＣａｓ９）から入手した。

【０３５９】

ｓｇＲＮＡ ｍＡｌｂＲ１（スペーサー配列ＴＴＡＧＴＡＴＡＧＣＡＴＧＧＴＣＧＡＧＣ）を化学合成し、細胞における効力を改善するガイドの両末端の３塩基上の２’Ｏメチル塩基及びホスホロチオエート（ＰＳ）結合からなる化学修飾を組み込んだ。ｍＡｌｂＲ１ ｓｇＲＮＡは、２０ｐｍｏｌのｓｐＣａｓ９タンパク質／５０ｐｍｏｌのガイドから構成されるＲＮＰが、Ｈｅｐａ１－６細胞にヌクレオフェクションされたとき、９０％の頻度でインデルを生成し、これは非常に活性なガイドであることを示す。２０ｐｍｏｌｅ～１ｐｍｏｌｅの範囲のヌクレアーゼタンパク質、及び１：２．５のタンパク質対ｓｇＲＮＡの定常比で形成されたＲＮＰを、Ｈｅｐａ１－６細胞にヌクレオフェクションした。マウスアルブミンイントロン１の標的部位のインデルを、ＰＣＲ増幅ゲノムＤＮＡのサンガーシーケンシング及びＩＣＥ分析を使用して定量化した。図５２に示される結果は、ＭＧ２９－１が、編集が飽和していないときに、より低いＲＮＰ用量でｓｐＣａｓ９よりも高い割合のインデルを生成したことを示す。これらのデータは、ＭＧ２９－１が、肝臓由来哺乳類細胞において、少なくともｓｐＣａｓ９と同じ活性であり、潜在的により活性であることを示す。

【０３６０】

実施例３４－本明細書に記載されるヌクレアーゼの配列バリアントの操作、及びマウス肝臓細胞における評価

ＭＧ２９－１の編集効率を改善するために、１つ又は２つのアミノ酸を置換する変異のセットをＭＧ２９－１コード領域に導入した。アミノ酸置換のセットを、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．Ｃａｓ１２ａ（ＡｓＣａｓ１２ａ）へのアラインメントによって決定した。構造ガイド操作（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ，ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１９，３７ ２７６－２８２）は、ＰＡＭ結合を変更又は改善する目的で、ＡｓＣａｓ１２ａ中の異なるアミノ酸を置換した。ＡｓＣａｓ１２ａにおける４つのアミノ酸置換：Ｓ１７０Ｒ、Ｅ１７４Ｒ、Ｎ５７７Ｒ、及びＫ５８３Ｒは、標準及び非標準ＰＡＭでより高い編集効率を示した。これらの置換に一致する部位は、ＭＧ２９－１において複数のアラインメントにより特定され、ＭＧ２９－１において以下に対応した：Ｓ１６８Ｒ、Ｅ１７２Ｒ、Ｎ５７７Ｒ、及びＫ５８３Ｒ。

【０３６１】

単一アミノ酸置換を試験するために、２プラスミド送達系を使用した。単一アミノ酸置

換を有するＭＧ２９－１をコードする発現プラスミドを、標準的な分子クローニング技術を使用して構築した。１つのプラスミドはＣＭＶプロモーター下でＭＧ２９－１をコードし、第２のプラスミドは、ｍＡｌｂ２９－１－８　ｓｇＲＮＡを含んでおり（表８を参照のこと）、これはＨｅｐａ　１－６細胞において高い編集効率を有する。ガイドの転写は、ヒトＵ６プロモーターによって駆動された。２プラスミド系を使用した単一アミノ酸置換、及び二重アミノ酸置換の試験からの初期結果の確認を、ＭＧ２９－１をコードするインビトロ転写（ＩＶＴ）ｍＲＮＡ（ＩＶＴ　ｍＲＮＡがどのように作製されたかの詳細については実施例１１を参照のこと）及びＣｐｆ１についてＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによって最適化されているＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２化学修飾を組み込んだ化学的に合成されたガイド（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓで合成された）を使用して行った。２プラスミド系の送達のために、ＭＧ２９－１をコードする１００ｎｇのプラスミド及びガイドをコードする４００ｎｇのプラスミドを、リポフェクタミン３０００と混合し、Ｈｅｐａ１－６細胞に添加し、ゲノムＤＮＡ単離の前に３日間インキュベートした。

【０３６２】

ＩＶＴ　ｍＲＮＡ及び合成ガイドの送達のために、３００ｎｇのｍＲＮＡ及び１２０ｎｇの合成ガイドを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ　Ｍａｘと混合し、細胞に添加し、ゲノムＤＮＡ単離の前に２日間インキュベートした。ＩＶＴ　ｍＲＮＡを使用してスクリーニングされた合成ガイドは、表８に詳述されるガイドに対応するが、簡略化のために、図５３のガイドの名称は短縮されるため、ガイド「ｍＡｌｂ２９－１－１」はｇ１－１として表され、「ｍＡｌｂ２９－１－８」はｇ１－８として表されるといったものである。ヒトＴ細胞受容体遺伝子座（ＴＲＡＣ）を標的とする１つのガイドも試験した（図５３Ｄ上の３５ＴＲＡＣ）。ガイド３５　ＴＲＡＣスペーサーは、ＴＴＴＧＰＡＭを有するＧＡＧＴＣＴＣＴＣＡＧＣＴＧＧＴＡＣＡＣＧＧ（配列番号４２６８）である。ガイド３５　ＴＲＡＣを、前に述べられるのと同じ修飾で注文した。マウスアルブミンイントロン１のＭＧ２９－１編集について、前の実施例に記載されるようにゲノムＤＮＡ及びＰＣＲ増幅を行った。ガイド３５　ＴＲＡＣについては、ヒトＴＲＡＣ遺伝子座を、プライマーＦ：ＴＧＣＴＴＴＧＣＴＧＧＧＣＣＴＴＴＴＴＣ（配列番号４２６９）、プライマーＲ：ＡＣＡＧＴＣＴＧＡＧＣＡＡＡＧＧＣＡＧＧ（配列番号４２７０）で増幅した。得られた９５７ｂｐのＰＣＲ産物を、前述のように精製した。編集を、プライマーＡＴＣＡＣＧＡＧＣＡＧＣＴＧＧＴＴＴＣＴ（配列番号４２７１）を使用したサンガーシーケンシングによって評価した。

【０３６３】

マウスアルブミンイントロン１及びヒトＴＲＡＣ遺伝子座の編集効率を、ＰＣＲ産物のサンガーシーケンシング、続いてＣＲＩＳＰＲ編集の推論（ＩＣＥ）を使用して定量化した。最大４つの生物学的複製を表すデータを、図５３Ａ～Ｄにプロットした。単一アミノ酸置換Ｓ１６８Ｒは、２プラスミド系においてガイドｍＡｌｂ２９－１－８を使用したとき、改善された編集効率を示した（図５３Ａ）。変異Ｅ１７２Ｒは、ガイドｍＡｌｂ２９－１－８で大きな改善を提供しなかったが、変異Ｋ５８３Ｒは、ｍＡｌｂ２９－１－８ガイドで編集を完全に防止した。ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び合成ガイドｍＡｌｂ２９－１－８を用いたトランスフェクションにより、プラスミドトランスフェクションの結果が確認された（図５３Ｂ）。単一アミノ酸置換Ｓ１６８Ｒは、ガイドｍＡｌｂ２９－１－８で試験された異なる濃度のｍＲＮＡにわたってより高い編集効率を与えた（図５３Ｂ）。Ｓ１６８ＲのＥ１７２Ｒ（図５３Ａに見られるように、活性のみを損なわなかった置換）、又はＮ５７７Ｒ（ＭＧ２９－１プラスミドトランスフェクションで試験されなかったが、ｃｐｆ１のより高い編集効率を与えた置換）及びＹ１７０Ｒ（予測されたＭＧ２９－１タンパク質構造に基づいて編集効率し得ると仮定された）との二重アミノ酸置換を試験し、単一のＳ１６８Ｒ変異体と比較した。

【０３６４】

二重変異のいずれも、試験した条件下で改善された編集効率を与えなかった（図５３Ｃ

）。ＭＧ２９－１及びＭＧ２９－１　ＷＴのＳ１６８Ｒバリアントの編集効率を、マウスアルブミンイントロン１を標的とする１２個のガイド及びヒトＴ細胞受容体遺伝子座（ＴＲＡＣ）を標的とする１個のガイドと並行して比較した。ＭＧ２９－１のＳ１６８Ｒバリアントは、１３個のガイド全てで改善された編集効率を呈し、いくつかのガイドは、他のガイドよりも多くの利益をもたらした（図４ｄ）。重要なことに、Ｓ１６８Ｒは、試験したガイドのいずれについても哺乳類編集効率を損なわなかった。これらの結果は、ＭＧ２９－１のＳ１６８Ｒ（アミノ酸１６８位のセリンがアルギニンに変化した）バリアントが、編集活性を改善し、治療的使用のための高度に活性なガイドを特定するのに有利であることを示す。

【０３６５】

実施例３５－哺乳類細胞におけるガイド安定性を改善し、編集効率を改善する、本明細書に記載されるヌクレアーゼのｓｇＲＮＡの化学修飾の特定

ＲＮＡ分子は、ヌクレアーゼによる切断に対する感受性のために、生物学的系では本質的に不安定である。ＲＮＡの天然化学構造の修飾は、治療用薬剤開発の状況においてＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）に使用される安定性ＲＮＡ分子を改善するために広く使用されている（Ｃｏｒｅｙ，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００７ Ｄｅｃ ３；１１７（１２）：３６１５－３６２２，Ｊ．Ｂ．Ｂｒａｍｓｅｎ，Ｊ．Ｋｊｅｍｓ Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，３（２０１２），ｐ．１５４）。ＲＮＡの核酸塩基又はホスホジエステル骨格への化学修飾の導入は、インビボでの短いＲＮＡ分子の安定性、及びしたがって効力を改善する上で極めて重要である。ヌクレアーゼに対する安定性及び相補的ＤＮＡ又はＲＮＡに対する親和性に関して、異なる特性を有する広範な化学修飾が開発されている。

【０３６６】

同様の化学修飾が、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ９ヌクレアーゼのガイドＲＮＡに適用されている（Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５ Ｓｅｐ；３３（９）：９８５－９８９、Ｒｙａｎ ｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２０１８ Ｊａｎ ２５；４６（２）：７９２－８０３．，Ｍｉｒ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ｖｏｌｕｍｅ ９，Ａｒｔｉｃｌｅ ｎｕｍｂｅｒ：２６４１（２０１８），Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ ｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２０１９ ４７，５４６－５５８，Ｙｉｎ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｖｏｌｕｍｅ ３５，ｐａｇｅｓ １１７９－１１８７（２０１７）、こ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）。

【０３６７】

ＭＧ２９－１ヌクレアーゼは、ｃｐｆ１などの特定されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ酵素と限定的なアミノ酸配列類似性を有する新規のヌクレアーゼである。ＭＧ２９－１について特定されたガイドＲＮＡの構造（骨格）成分の配列は、改善された安定性を可能にするＭＧ２９－１ガイドに対するｃｐｆ１化学修飾の配列と類似しているが、保持活性は特定されなかった。ＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡの一連の化学修飾を、哺乳類細胞におけるｓｇＲＮＡ活性に対するそれらの影響、及び哺乳類細胞タンパク質抽出物の存在下での安定性を評価するために設計した。

【０３６８】

本発明者らは、ガイドが、ＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２と呼ばれるＩＤＴによって開発された、ｃｐｆ１に対するガイドＲＮＡの活性を改善するように設計され、かつ市販されている専有の化学修飾のセットを含んでいたとき（ＩＤＴ）、マウス肝臓細胞株Ｈｅｐａ１－６において高度に活性であったｓｇＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９－１－８を選択した。本発明者らは、核酸塩基の２つの化学修飾、２’ヒドロキシル基がメチル基で置き換えられる２’－Ｏ－メチル、及び２’ヒドロキシル基がフッ素で置き換えられる２’－フオロを試験するように選択した。２’－Ｏ－メチル修飾及び２’－フルオロ修飾の両方は、ヌクレアーゼに対する耐性を改善する。２’－Ｏ－メチル修飾は、ＲＮＡの天然に存在する転写後修飾であり、ＲＮＡ：ＲＮＡ二本鎖の結合親和性を改善するが、ＲＮＡ：ＤＮＡ安定性にほとんど

影響を与えない。２’－フルオロ修飾塩基は、低減された免疫刺激効果を有し、両方のＲＮＡの結合親和性を増加させる：ＲＮＡ及びＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッド（例えば、Ｐａｌｌａｎ ｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２０１１ Ａｐｒ；３９（８）：３４８２－９５、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ ｖｏｌｕｍｅ ９，Ａｒｔｉｃｌｅ ｎｕｍｂｅｒ：６０７８（２０１９）、Ｋａｗａｓａｋｉ，Ａ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ ３６，８３１－８４１（１９９３）を参照のこと）。

【０３６９】

塩基間のホスホジエステル結合の代わりにホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含めることも評価した。ＰＳ結合は、ヌクレアーゼに対する耐性を改善する（Ｍｏｎｉａ ｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｖｏｌｕｍｅ ２７１，ＩＳＳＵＥ ２４，Ｐ１４５３３－１４５４０，Ｊｕｎｅ １４，１９９６）．

【０３７０】

マウスアルブミンイントロン１（ｍＡｌｂ－１－８）を標的とするスペーサーを有するＭＧ２９－１ ｓｇＲＮＡの予測される二次構造を図５４に示す。ガイドの骨格部分のステムループは、他のＣＲＩＳＰＲ－ｃａｓ系の配列構造に基づいて、ＭＧ２９－１タンパク質との相互作用に重要であると推定された。二次構造に基づいて、一連の化学修飾を、ガイドの異なる構造及び機能的領域で設計した。ガイドの構造及び機能的領域が、活性の著しい損失なしに異なる化学修飾を許容し得ることを知らせる、より少ない化学修飾を有するガイドの初期試験を可能にするモジュール式アプローチが取られた。構造及び機能的領域を以下のように定義した。ガイドの３’末端及び５’末端は、エクソヌクレアーゼの標的であり、ｓｐＣａｓ９のガイドの安定性を改善するために使用されているアプローチである、２’－Ｏ－メチル及びＰＳ結合を含む様々な化学修飾によって保護され得る（Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５ Ｓｅｐ；３３（９）：９８５－９８９）。

【０３７１】

ガイドの骨格領域にステム及びループの両方の半分を含む配列を、修飾のために選択した。スペーサーを、シード領域（ＰＡＭに最も近い最初の６個のヌクレオチド）とスペーサーの残りの１６個のヌクレオチド（非シード領域と称される）とに分割した。合計４３個のガイドを設計し、３９個を合成した。４３個のガイド全てが、同じヌクレオチド配列を含むが、異なる化学修飾を有する。ガイドのうちの３９個の編集活性を、ＲＮＰのヌクレオフェクションによって、又はＭＧ２９－１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、又は両方の方法によって、Ｈｅｐａ１－６細胞で評価した。これら２つのトランスフェクションの方法は、細胞への送達の差異に起因して、観察されたガイドの活性に影響を与え得る。

【０３７２】

ＲＮＰのヌクレオフェクションを使用する場合、ガイド及びＭＧ２９－１タンパク質は、管内で予め複合体化され、次いで、ＲＮＰの存在下で細胞の懸濁液に電流が印加されるヌクレオフェクションを使用して細胞に送達される。電流は、細胞膜（及びおそらく核膜にも）の細孔を一時的に開き、ＲＮＰ上の電荷によって駆動されるＲＮＰの細胞侵入を可能にする。ＲＮＰが、電流によって作製される細孔を介して若しくはＲＮＰのタンパク質構成要素内で操作された核局在化シグナルを介して、又はこれら２つの組み合わせを介して、核に侵入するかどうかは不明である。

【０３７３】

メッセンジャーＭＡＸなどの脂質トランスフェクション試薬を用いるｍＲＮＡ及びガイドの共トランスフェクションが使用される場合、２つのＲＮＡの混合物は、正に荷電した脂質と複合体を形成し、複合体は、エンドサイトーシスを介して細胞に侵入し、最終的に細胞質に到達する。細胞質では、ｍＲＮＡはタンパク質に翻訳される。ＭＧ２９－１などのＲＮＡガイドヌクレアーゼの場合、得られたＭＧ２９－１タンパク質は、ＭＧ２９－１

タンパク質に操作された核局在化シグナルによって媒介されるプロセスにおいて核に侵入する前に、細胞質内のガイドＲＮＡと複合体を形成すると推定される。

【０３７４】

十分な量のＭＧ２９－１タンパク質へのｍＲＮＡの翻訳、続いてガイドＲＮＡへのＭＧ２９－１タンパク質の結合には限られた時間を要するため、ガイドＲＮＡは、予め形成されたＲＮＰがヌクレオフェクションによって送達される場合よりも長い間、細胞質における増加された安定性を必要とし得る。したがって、脂質ベースのｍＲＮＡ／ｓｇＲＮＡの共トランスフェクションは、ＲＮＰヌクレオフェクションの場合よりも安定したガイドを必要とする場合があり、これは、ＲＮＰとして活性であるが、カチオン性脂質試薬を使用してｍＲＮＡと共トランスフェクトされたときに不活性である一部のガイド化学物質をもたらし得る。

【０３７５】

ガイドｍＡｌｂ２９８－１～ｍＡｌｂ２９８－５は、２’－Ｏ－メチル及び２’フルオロ塩基＋ＰＳ結合の混合物を使用して、配列の５’及び３’末端に限定された化学修飾を含む。化学修飾を伴わないｓｇＲＮＡと比較して、これらのガイドは、ＲＮＰを介して送達された場合、７～１１倍更に活性であり、ガイドに対する末端修飾がガイド活性を改善し、エクソヌクレアーゼに対する耐性が改善されたことを示す。ｓｇＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９８－１～ｍＡｌｂ２９８－５は、市販の化学修飾（ＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２）を含むガイドの編集活性の６４～１１４％を呈した。最大数の化学修飾を含むガイド４は、末端修飾ガイドの活性が最も低かったが、未修飾ガイドよりも依然として７倍更に活性であった。ガイドｍＡＬＢ２９８－３０は、５’末端に３個の２’－Ｏメチル塩基及び２個のＰＳ結合、並びに５’末端に４個の２’－Ｏメチル塩基及び３個のＰＳ結合を含み、また未修飾ガイドよりも約１０倍高い活性を呈し、ｍＡｌｂ２９８－１と比較してＲＮＡ共トランスフェクションの場合に類似していたか、又はわずかに改善された。これらのデータは、ＭＧ２９－１ガイドの両末端のＰＳ結合と組み合わせた２’Ｏ－メチルが、未修飾ガイドと比較してガイド活性を著しく増強したことを示す。

【０３７６】

２’－フルオロ塩基及びＰＳ結合の組み合わせも、ガイドの３’末端で許容された。ガイドｍＡＬｂ２９８－２８は、５’末端に３個の２’－フルオロ塩基及び２個のＰＳ結合、並びに３’末端に４個の２’－フルオロ塩基及び３個のＰＳ結合を含む。この末端修飾ガイドは、両末端に２’－Ｏメチル及びＰＳ修飾を有するガイドと類似した良好な編集活性を保持し、ガイド安定性を改善し、かつ編集活性を保持するために、２’－Ｏメチルの代わりに２’－フルオロを使用することができることを示す。

【０３７７】

ｓｇＲＮＡ　ｍＡＬｂ２９８－６、ｍＡＬｂ２９８－７、及びｍＡＬｂ２９８－８は、ステムの異なる領域におけるｍＡｌｂ２９８－１＋ＰＳ結合に存在する５’及び３’末端の両方に、同じ最小の化学修飾を含む。３’ステム（ｍＡＬｂ２９８－６）及び５’ステム（ｍＡＬｂ２９８－７）のＰＳ結合は、ＲＮＰヌクレオフェクションアッセイのｍＡｌｂ２９８－１と比較して約３０％活性を低減さし、これらの修飾が許容され得ることを示す。脂質ベースのトランスフェクションにより、活性のより大きな低減が観察された。

【０３７８】

３’及び５’のステム（ｍＡＬｂ２９８－８）の両方にＰＳ結合を導入すると、ＲＮＰヌクレオフェクションアッセイではｍＡｌｂ２９８－１と比較して約８０％、及び脂質トランスフェクションアッセイでは９５％超、活性が低減され、２つのＰＳ結合修飾の組み合わせがガイドの機能を著しく損なったことを示す。

【０３７９】

ｓｇＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９８－９は、ｍＡｌｂ２９８－１に存在する５’及び３’末端の両方に同じ最小の化学修飾と、ループ内のＰＳ結合とを含み、ｍＡｌｂ２９８－１と類似した活性を呈し、ループ内のＰＳ結合は忍容性が良好であったことを示す。

【０３８０】

ｓｇＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９８－１０、ｍＡｌｂ２９８－１１、及びｍＡｌｂ２９８－１２は、ｍＡｌｂ２９８－１に存在する５’及び３’末端の両方に同じ最小の化学修飾と、ステムの異なる領域に２’－Ｏメチル塩基とを含む。３’ステム（ｍＡｌｂ２９８－１１）若しくは５’ステム（ｍＡｌｂ２９８－１２）のいずれか、又はステム（ｍＡｌｂ２９８－１０）の両方の半分に２’－Ｏメチル塩基を含むことは、一般的に忍容性が良好であり、ガイドｍＡｌｂ２９８－１２（５’ステム修飾）が最も活性であるｍＡｌｂ２９８－１と比較して活性のわずかな低減があった。

【０３８１】

ガイドｍＡｌｂ２９８－１４は、ｍＡｌｂ２９８－１に存在する５’及び３’末端の両方に同じ最小の化学修飾と、ステムの両方の半分に２’－Ｏ－メチル塩基及びＰＳ結合の組み合わせとを含み、ＲＮＰヌクレオフェクション又は脂質ベースのＲＮＡ共トランスフェクションによる編集活性を有さなかった。これは、両方のステムにＰＳ結合のみを含んでいたｍＡｌｂ２９８－８が、低いレベルの活性を保持していたことを確認し、結果を拡張し、ステムの両方の半分の広範な化学修飾がガイドを不活性にすることを示す。

【０３８２】

ｓｇＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９８－１３は、ｍＡｌｂ２９８－１に存在する５’及び３’末端の両方に同じ最小の化学修飾と、スペーサーのシード領域を除いて、骨格及びスペーサーの残りの部分全体にわたって他の塩基ごとに間隔を置いたＰＳ結合とを含む。これらの修飾は、バックグラウンドレベルに近い編集活性の劇的な損失をもたらした。このガイドの純度は、ほとんどのガイドについて＞７５％と比較して約５０％であったが、これだけでは編集活性の完全な損失を説明しない場合がある。したがって、ガイド全体にわたってＰＳ結合を本質的にランダムな様式で分配することは、編集活性を保持しながらガイド安定性を改善する効果的なアプローチではない。

【０３８３】

ガイドｍＡＬｂ２９８－１５及びｍＡＬｂ２９８－１６は、ｍＡｌｂ２９８－１に存在する５’及び３’末端の両方に同じ最小の化学修飾と、骨格に広範なＰＳ結合とを含む。両方のガイドは、ＲＮＰヌクレオフェクションによってｍＡｌｂ２９８－１の活性の約３５％を保持したが、それらは脂質ベースのＲＮＡ共トランスフェクションによってｍＡｌｂ２９８－１の活性の３％を保持し、骨格の広範なＰＳ修飾が編集活性を著しく低減したことを示す。骨格中のＰＳ結合を、ｍＡｌｂ２９８－１７及びｍＡｌｂ２９８－１８のようなスペーサー領域中のＰＳ結合と組み合わせることにより、ＰＳ結合のランダムな包含が、ＭＧ２９－１による編集を指示するガイドの能力を遮断する観察と一致する活性の更なる損失がもたらされた。

【０３８４】

ガイドｍＡｌｂ２９８－１９は、ｍＡＬｂ２９８－１と同じ化学修飾をスペーサーに含むが、骨格領域では、５’末端は、追加の４つの２’Ｏ－メチル塩基及び追加の１４個のＰＳ結合を有する。ｍＡｌｂ２９８－１９の活性は、ＲＮＰヌクレオフェクションによるｍＡｌｂ２９８－１の活性の約４０％であったが、ＲＮＡ共トランスフェクションによると２２％であり、ガイドの骨格領域における広範な化学修飾は忍容性が良好ではないことを再び示す。

【０３８５】

ガイドｍＡｌｂ２９８－２０、ｍＡｌｂ２９８－２１、ｍＡｌｂ２９８－２２、及びｍＡｌｂ２９８－２３は、ｍＡｌｂ２９８－１と同じ５’末端修飾である、５’末端に単一の２’－Ｏメチル及び２個のＰＳ結合からなる骨格領域に同一の化学修飾を有する。ガイドｍＡｌｂ２９８－２０、ｍＡｌｂ２９８－２１、ｍＡｌｂ２９８－２２、及びｍＡｌｂ２９８－２３のスペーサー領域は、２’－Ｏ－メチル及び２’－フルオロ塩基並びにＰＳ結合の組み合わせを含む。これらの４つのガイドのうち最も活性であるものは、ｍＡｌｂ２９８－２であり、そこで２’－フルオロ修飾は、ＰＡＭ（シード領域）に最も近い７つの塩基、並びに２’－Ｏ－メチル及び２つのＰＳ結合で修飾された３’末端の末端塩基を除いて、スペーサーの全ての塩基で行われた。これは、シード領域を除いてスペーサーの大部分

に２’－フルオロ修飾を含むことは、活性を著しく低減せず、したがってガイド安定性を増強するための良好な戦略を表すことを示す。

【０３８６】

ガイドｍＡｌｂ２９８－２４、ｍＡｌｂ２９８－２５、ｍＡｌｂ２９８－２６、及びｍＡｌｂ２９８－８は、骨格において同一の化学修飾を有する。ステム上の両方の半分にＰＳ結合を有するｍＡｌｂ２９８－８は、編集活性を著しく低減し、ガイドｍＡｌｂ２９８－１の２４％及び２％は、これらのＰＳ結合が活性を損なったことを示す。興味深いことに、ｍＡＬｂ２９８－２４及びｍＡＬｂ２９８－２５も低い編集活性を有していたが、ｍＡＬｂ２９８－２６の活性は、ｍＡｌｂ２９８－８と比較して改善され、スペーサー（シード領域を除く）中の塩基のうちの１４個に２’－フルオロ塩基を含むｍＡＬｂ２９８－２６における追加の修飾が、ステム中のＰＳ結合によって引き起こされる低減された編集活性を少なくとも部分的に救済したことを示す。これは、編集活性時のスペーサーにおける２’－フルオロ塩基の有益な影響の追加の証拠を提供する。

【０３８７】

ガイドｍＡｌｂ２９８－２７及びｍＡｌｂ２９８－２９は、骨格領域及びスペーサー領域全体にわたって広範な塩基及びＰＳ修飾を含み、再び活性を有さず、ガイドの全ての化学修飾が編集活性を保持するわけではないことを示す。

【０３８８】

ガイドｍＡＬｂ２９８－１～ｍＡＬｂ２９８－３０の分析から得られた構造活性関係に基づいて、７個のガイドの追加セットを設計し、ＲＮＰヌクレオフェクション及びＨｅｐａ１－６細胞の脂質ベースのＲＮＡ共トランスフェクションによって試験した。これらのガイドは、ガイドｍＡＬｂ２９８－１～ｍＡＬｂ２９８－３０において良好な編集活性を保持することが観察された化学修飾を組み合わせた。ガイドｍＡＬｂ２９８－３１～ｍＡＬｂ２９８－３７全てが、５’末端に少なくとも１つの２’－Ｏメチル及び２つのＰＳ結合、並びに５’末端に１つの２’－Ｏメチル及び１つのＰＳ結合からなる末端修飾を含む。末端修飾に加えて、ｍＡｌｂ２９８－３１のように、ステムの両方の半分の２’－Ｏメチル塩基を、スペーサー（シード領域を除く）の１４個の塩基の２’フルオロ塩基と組み合わせることにより、末端修飾単独と比較してわずかに改善されたか、又は類似しており、かつ未修飾ガイドと比較して１０倍改善された編集活性がもたらされた。ｍＡＬｂ２９８－３２のように、５’ステムのみの２’－Ｏメチル塩基を、スペーサー（シード領域を除く）の１４個の塩基の２’フルオロ塩基と組み合わせることにより、試験された最も活性なものの１つであったガイドが得られた。

【０３８９】

同様に、ｍＡＬｂ２９８－３３のように、ループのみのＰＳ結合をスペーサー（シード領域を除く）の１４個の塩基の２’フルオロ塩基と組み合わせることにより、未修飾ガイドよりも最大１５倍高い強力な活性がもたらされた。ガイドｍＡｌｂ２９８－３７は、より広範な３’末端修飾を、５’ステムの２’－Ｏメチル塩基、ループ内のＰＳ結合、及びスペーサー（シード領域を除く）内の１４個の２’フルオロ塩基及び３個のＰＳ結合と組み合わせ、依然としてＡｌｔＲ１／Ｒ２修飾の編集活性と類似した編集活性を保持し、未修飾ガイドと比較して著しく改善した。したがって、ｍＡＬｂ２９８－３７は、哺乳類細胞において強力な編集活性を保持する大幅に修飾されたＭＧ２９－１ガイドを表す。ガイドｍＡＬｂ２９８－３８は、ＲＮＰとして送達されたときに強力な編集活性を呈したが、脂質ベースのＲＮＡ共トランスフェクションによって細胞に送達されたとき、完全に不活性であったことから、ガイドがヌクレアーゼに対する予想外の感受性を有し得ることが示唆される。スペーサー内に１１個更に少ない２’－フルオロ塩基及び１個更に少ないＰＳ結合を有することを除いて、ガイドｍＡｌｂ２９８－３７と同一であるガイドｍＡＬｂ２９８－３９は、ＲＮＰ及びｍＲＮＡの両方のトランスフェクション方法を考慮すると、最も高い編集活性を有したが、インビボでの性能の点で有害であり得る他のガイド設計の一部よりも少ない化学修飾を有する。

【０３９０】

化学修飾の追加の組み合わせを、より広範な化学修飾を有する一方で良好な編集活性も保持し得る、ｍＡｌｂ２９８－４０～ｍＡＬｂ２９８－４３に作製するように設計した。例えば、いくつかのＤＮＡ塩基も組み込んだｍＡｌｂ２９８－４１では、塩基のうちの６つは非修飾リボヌクレオチドである。同様に、ｍＡｌｂ２９８－４２は、スペーサー全体にわたって２’－フルオロ基を含み、５個の非修飾リボヌクレオチドを有する。これら及び他のガイド化学修飾の試験が、１つ以上の最適化された設計につながることが想定される。それにもかかわらず、ガイドｍＡＬｂ２９８－１～ｍＡＬｂ２９８－３９のセット内、及び特にガイドｍＡＬｂ２９８－３１～ｍＡＬｂ２９８－３９のセットの中で、末端修飾のみを有する未修飾ガイド又はガイドの編集活性と同様であるか、又はそれよりも優れた編集活性を保持する広範な化学修飾を有するガイドを特定した。

【０３９１】

化学修飾を有さないガイド（天然ＲＮＡ）と比較して、化学的に修飾されたガイドの安定性を試験するために、細胞粗抽出物を使用した安定性アッセイを使用した。ガイドＲＮＡは、インビトロ又はインビボで哺乳類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べきであるため、哺乳類細胞由来の粗細胞抽出物を選択した。Ｈｅｐａ１－６細胞を、コンフルエント細胞の１５ｃｍのディッシュ当たり３ｍｌの冷ＰＢＳ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回収した。細胞を、１０分間、２００ｇでペレット化し、将来的な使用のため－８０℃で凍結した。安定性アッセイのため、細胞を４体積の冷ＰＢＳ中に再懸濁した（例えば、１００ｍｇのペレットについて、細胞を４００μｌの冷ＰＢＳ中に再懸濁した）。Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を、０．２％（ｖ／ｖ）の終濃度で加え、細胞を１０秒間ボルテックスし、１０分間氷上に置き、１０秒間再びボルテックスした。Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００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。

【０３９２】

安定性反応を氷上でセットアップし、１００ｆｍｏｌｅの各ガイド（１μｌの１００ｎＭストック）とともに２０μｌの細胞粗抽出物を含んだ。入力、１５分間、３０分間、６０分間、２４０分間、及び５４０分間（分単位の時間は、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つの反応をセットアップした。試料を１５分間～最大５４０分間、３７℃でインキュベートし、一方、入力対照を氷上に５分間置いた。各インキュベーション期間の後、反応を、フェノールとグアニジンチオシアネート（Ｔｒｉ試薬、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）の混合物３００μｌを加えることによって停止させ、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ＲＮＡの回収を促進した。Ｔｒｉ試薬を加えた後、試料を１５秒間ボルテックスし、－２０℃で保存した。ＲＮＡを、Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ　ＲＮＡ　ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して試料から抽出し、１００μｌのヌクレアーゼを含まない水において溶出した。修飾したガイドの検出を、Ｔａｑｍａｎ　ｍｉＲＮＡアッセイテクノロジー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用したＴａｑｍａｎ　ＲＴ－ｑＰＣＲを使用して行い、プライマー及びプローブを、ｍＡｌｂ２９８　ｓｇＲＮＡ中の配列を特異的に検出するよう設計した、これは、ガイドの全てについて同じである。データを、入力試料に対する残りのｓｇＲＮＡの割合の関数としてプロットした。化学修飾を有さないガイドは、細胞抽出物（図５５）とともにインキュベートしたときに最も急速に排除され、ガイドの９０％超が３０分以内に分解された。ＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２（図５５のＡｌｔＲ）化学修飾を有するガイドは、未修飾ガイドよりも細胞抽出物の存在下でわずかにより安定しており、ガイドの約８０％が３０分で分解された。両方の末端に化学修飾、並びに両方のステムに２’－Ｏ－メチル塩基、及びシード領域を除いてスペーサーの全ての位置に２’－フルオロ塩基を含むガイドｍＡＬｂ２９８－３１は、未修飾ガイド又はＡｌｔＲガイドのいずれかよりも著しく安定していた。

【０３９３】

ガイドｍＡｌｂ２９８－３４は、ガイドｍＡＬｂ２９８－３１と比較して改善された安

定性を呈した。ガイドｍＡＬｂ２９８－３４は、スペーサー内の化学修飾においてｍＡＬｂ２９８－３１をガイドするのとは異なる。ｍＡＬｂ２９８－３４は、ｍＡＬｂ２９８－３１よりもスペーサー内に９個少ない２’－フルオロ塩基を有するが、ｍＡＬｂ２９８－３１における２個のＰＳ結合と比較して、スペーサー内に４個のＰＳ結合を含む。２’－フルオロ塩基はＲＮＡの安定性を改善するため、これは、スペーサー中の追加のＰＳ結合が、ｍＡＬｂ２９８－３１と比較して、ｍＡＬｂ２９８－３４の安定性の改善の原因であったことを示唆している。

【０３９４】

ガイドｍＡＬｂ２９８－３７は、試験した全てのガイドのうち最も安定であり、ｍＡＬｂ２９８－３４よりも著しく安定であり、ガイドの８０％は、ｍＡＬｂ２９８－３４の３０％と比較して、２４０分後（４時間）に残っていた。ｍＡＬｂ２９８－３７の化学修飾は、スペーサー領域及び骨格領域の両方でガイドｍＡＬｂ２９８－３４とは異なる。ｍＡＬｂ２９８－３７は、５’末端に追加の２つの２’－Ｏ－メチル基及び２つの追加のＰＳ結合を有する。更に、ｍＡＬｂ２９８－３７のループ領域は、ＰＳ結合を含み、ｍＡＬｂ２９８－３４のステムの後半に存在する２’－Ｏ－メチル基を含まない。更に、ｍＡＬｂ２９８－３７のスペーサーは、更に９個の２’－フルオロ塩基を含むが、異なる位置ではあるが、ｍＡＬｂ２９８－３４と同じ数のＰＳ結合を含む。

【０３９５】

全体的に、これらのデータは、スペーサーの５’末端及び骨格領域のループにおける追加のＰＳ結合が、ガイドＲＮＡの安定性を著しく改善することを示唆する。試験したガイドの中でも細胞抽出物において最大の安定性を呈したガイドｍＡＬｂ２９８－３７はまた、ＡｌｔＲ１／Ａｌｔｒ２修飾と比較して類似した又は改善された、かつ５’末端及び３’末端のみの化学修飾と比較して改善された、Ｈｅｐａ１－６細胞における強力な編集活性を呈した。

【０３９６】

【表１６－１】

表５－哺乳類細胞における編集活性に対するＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡ配列の化学修飾の影響

sgRNA 名	sgRNA 配列	配列番号	編集活性 (AltR1/AltR2 対照に対する%)	
			RNP	mRNA
mAlb298-1_AltR1/R2	/AltR1/rCrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrGrCrA/AltR2/	N/4272	100	100
mAlb298-0	rCrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrGrCrA	4272	13.5	NT
mAlb298-1	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4273	114.7	76.2
mAlb298-2	mC*rU*rU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrG*rG*rC*mA	4274	111.7	70.2
mAlb298-3	mC*mU*rU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrG*rG*mC*mA	4275	100.2	63.7
mAlb298-4	mC*mU*mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrG*mG*mC*mA	4276	72.5	69.6
mAlb298-5	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrG*/i2FG//i2FC/*/32FA/	4277	76.9	87.5
mAlb298-6	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrG*rU*rA*rG*rArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4278	89.4	40.4
mAlb298-7	mC*rU*rUrArArUrU*rU*rC*rU*rArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4279	83.2	24.5
mAlb298-8 #	mC*rU*rUrArArUrU*rU*rC*rU*rArCrUrGrUrUrG*rU*rA*rG*rArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4280	28.4	2.6

【０３９７】

【表１６－２】

sgRNA名	sgRNA配列	配列番号	編集活性(AltR1/AltR2対照に対する%)	
			RNP	mRNA
mAlb298-9	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4281	110.9	87.5
mAlb298-10	mC*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrUrGrUrUrGmUmAmGmArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4282	87.5	61.6
mAlb298-11	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGmUmAmGmArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4283	94.5	63.5
mAlb298-12	mC*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4284	121.8	84.0
mAlb298-13 #	mC*rU*rU*rArA*rUrU*rUrC*rUrA*rCrU*rGrU*rUrG*rUrA*rGrA*rUrCrUrGrUrArA*rCrG*rArU*rCrG*rGrG*rArA*rCrU*rGrG*mC*mA	4285	1.0	0.0
mAlb298-14	mC*rU*rUrArArUrU*mU*mC*mU*mArCrUrGrUrUrG*mU*mA*mG*mArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4286	0.0	0.0
mAlb298-15 #	mC*rU*rU*rArArU*rU*rU*rC*rU*rA*rC*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rA*rG*rA*rUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4287	39.3	2.4
mAlb298-16	mC*rU*rU*rArArU*rU*rU*rC*rUrArCrU*rG*rU*rU*rG*rU*rA*rG*rA*rUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4288	41.6	3.7
mAlb298-17 #	mC*rU*rU*rArArU*rU*rU*rC*rUrArCrU*rG*rU*rU*rG*rU*rA*rG*rA*rUrCrUrGrUrArA*rCrG*rArU*rCrG*rGrG*rArA*rCrU*rGrG*mC*mA	4289	0.0	1.2
mAlb298-18	mC*rU*rU*rA*rA*rU*rU*rU*rC*rU*rA*rC*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rA*rG*rA*rUrCrUrGrUrArA*rCrG*rArU*rCrG*rGrG*rArA*rCrU*rGrG*mC*mA	4290	5.2	1.2

【０３９８】

【表１６－３】

sgRNA名	sgRNA配列	配列番号	編集活性(AltR1/AltR2対照に対する%)	
			RNP	mRNA
mAlb298-19	mG*mU*mA*mG*mC*rU*rU*rArA*rUrU*rUrC*rUrA*rCrU*rGrU*rUrG*rUrA*rGrA*rUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrUrGrG*rC*mA	4291	50.1	17.4
mAlb298-20	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArC*/i2FU//i2FG/*/i2FG//i2FC/*/32FA/	4292	33.6	86.3
mAlb298-21	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArC/i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC//i2FU//i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4293	119.0	80.6
mAlb298-22	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrA*rA/i2FC/*/i2FU//i2FG/*/i2FG//i2FC/*mA	4294	25.1	98.8
mAlb298-23	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrA/i2FA//i2FC//i2FU//i2FG//i2FG/*mC*mA	4295	22.6	61.9
mAlb298-24	mC*rU*rUrArArUrU*rU*rC*rU*rArCrUrGrUrUrG*rU*rA*rG*rArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArC*/i2FU//i2FG/*/i2FG//i2FC/*/32FA/	4296	7.4	12.2
mAlb298-25	mC*rU*rUrArArUrU*rU*rC*rU*rArCrUrGrUrUrG*rU*rA*rG*rArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrG/i2FG//i2FA/*/i2FA//i2FC/*/i2FU//i2FG/*rGrC*mA	4297	0.0	0.0
mAlb298-26	mC*rU*rUrArArUrU*rU*rC*rU*rArCrUrGrUrUrG*rU*rA*rG*rArUrCrUrGrUrArArC/i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC//i2FU//i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4298	55.5	29.8

【０３９９】

【表１６－４】

sgRNA名	sgRNA配列	配列番号	編集活性(AltR1/AltR2対照に対する%)	
			RNP	mRNA
mAlb298-27	/52FC/*/i2FU/*/i2FU/*rUrUrArArU/i2FU//i2FU/rC*rU/i2FA/*/i2FC/rU/i2FG/*/i2FU//i2FU/rG/i2FU//i2FA//i2FG//i2FA/rU/i2FC/rUrG*rUrA/i2FA/rC/i2FG/*/i2FA/*/i2FU/*/i2FC/*/i2FG/rG*rGrA*rA/i2FC/*rU*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*/32FA	4299	NT	0
mAlb298-28	/52FC/*/i2FU/*/i2F/rUrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrU*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*/52FA/	4300	NT	84.8
mAlb298-29	mC*mU*mU*rUrUrArArUmUmUrC*rUmA*mCrUmG*mUmUrGmUmAmGmArUmCrUrG*rUrAmArCmG*mA*mU*mC*mGrG*rGrA*rAmC*rU*mGmG*mC*mA	4301	0.0	0.0
mAlb298-30	mC*mU*mUrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrU*mGmG*mC*mA	4302	101.1	105.4
mAlb298-31	mC*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrUrGrUrUrGmUmAmGmArUrCrUrGrUrArArC/i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC//i2FU//i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4303	140.5	74.4
mAlb298-32	mC*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArC/i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC//i2FU//i2FG//i2FG*/i2FC/*mA	4304	170.3	93.1
mAlb298-33	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArC/i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC//i2FU//i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4305	202.7	64.4
mAlb298-34	mC*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrUrGrUrUrGmUmAmGmArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrA*rA/i2FC/*/i2FU//i2FG/*/i2FG//i2FC/*mA	4306	83.8	107.0

【０４００】

【表１６－５】

sgRNA名	sgRNA配列	配列番号	編集活性(AltR1/AltR2対照に対する%)	
			RNP	mRNA
mAlb298-35	mC*rU*rUrArArUrUrUrCrUrArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrA*rA/i2FC/*/i2FU//i2FG/*/i2FG//i2FC/*mA	4307	24.3	67.9
mAlb298-36	mC*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrA*rA/i2FC/*/i2FU//i2FG/*/i2FG//i2FC/*mA	4308	43.2	116.2
mAlb298-37	mC*mU*mU*U*rUrArArUrUmUmCmUmArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArC/i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC/*/i2FU/*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4309	164.9	84.5
mAlb298-38	mC*mU*mU*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrU*rG*rU*rU*rGmUmAmGmArUrCrUrGrUrArArC/i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC/*/i2FU/*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4310	140.5	0.0
mAlb298-39	mC*mU*mU*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrArArCrU*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4311	135.1	114.0
mAlb298-40	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU/i2FC//i2FU//i2FG//i2FU//i2FA//i2FA//i2FC//i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC/*/i2FU/*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4312	NT	NT
mAlb298-41	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*dGdTdAdGdAdT/i2FC//i2FU//i2FG//i2FU//i2FA//i2FA//i2FC//i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC/*/i2FU/*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4313	NT	NT
mAlb298-42	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*/i2FG//i2FU//i2FA//i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FU//i2FG//i2FU//i2FA//i2FA//i2FC//i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC/*/i2FU/*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4314	NT	NT
mAlb298-43	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmAmCU*G*U*U*GUAGAU/i2FC//i2FU//i2FG//i2FU//i2FA//i2FA//i2FC//i2FG//i2FA//i2FU//i2FC//i2FG//i2FG//i2FG//i2FA//i2FA//i2FC/*/i2FU/*/i2FG//i2FG/*/i2FC/*mA	4315	NT	NT

＃：これらのガイドは、５４～６４％の範囲の純度を有する分析ＨＰＬＣに基づいて、７５％未満の純度を有した。他の全てのガイドは純度７５％を超えた

ＮＴ：未試験

化学修飾の命名法：「／」は、２’－フッ素修飾を有する塩基を分離するために使用される、ｍ；２’－Ｏ－メチル塩基（例えば、２’－Ｏ－メチル修飾を有するＡ塩基は、ｍＡと記載される）、ｉ２Ｆ；内部２’－フッ素塩基（例えば、２’－フッ素修飾を有する内部Ｃは、／ｉ２ＦＣ／と記載される）、５２Ｆ；配列の５’末端の２’－フッ素塩基（例えば、２’－フッ素修飾を有する５’Ｃは、／５２ＦＣ／と記載される）、３２Ｆ；配列の３’末端の２’－フッ素塩基（例えば、２’－フッ素修飾を有する３’Ａ塩基は、／３２ＦＡ／と記載される）、ｒ；糖リボースを含む天然ＲＮＡ結合（例えば、Ａ塩基のリボース又はＲＮＡ形態は、ｒＡと記載される）、ｄ；デオキシリボース糖（ＤＮＡ）結合（例えば、Ａ塩基のデオキシリボース形態は、ｄＡと記載される）、＊；ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの１つが硫黄で置き換えられている塩基間；Ａｌｔ Ｒ１及びＡｌｔＲ２は、ＩＤＴ技術の専有の５’及び３’ＡｌｔＲ修飾を指す

【０４０１】

実施例１２－本明細書に記載されるヌクレアーゼを使用したマウスにおける治療用遺伝子編集

本明細書に記載される遺伝子編集プラットフォームは、インビボで修復改変をもたらす可能性がある。肝臓組織は、インビボ遺伝子編集のために本明細書に記載される遺伝子編集組成物及び系を使用して、例えば、有害な遺伝子の発現をノックダウンするように機能するか、又は欠陥遺伝子を置き換えるために使用される、インデルの導入によって、有利に標的化され得る組織の例である。例えば、いくつかの遺伝性疾患は、主に肝臓で発現されるタンパク質の欠陥から生じ、肝臓へのインビボ送達は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ

）ベクターの臨床試験において安全かつ有効であることが証明されている。脂質ナノ粒子は、ＲＮＡｉ戦略のために核酸及び承認された薬剤を送達することも示されている。肝臓組織には、全身循環へのタンパク質の効率的な分泌のための適切な細胞機構も含まれる。

【０４０２】

表１３又は表１４の状態を有する対象を、遺伝子編集療法のために選択する。例えば、血友病Ａを有するヒト又はマウスモデル対象は、遺伝子編集プラットフォームを使用した遺伝子置換療法を用いた治療のために特定される。

【０４０３】

【表１７】

表６－治療用遺伝子置換における対象選択のいくつかの適応症

血友病 A	第 VIII 因子		男性 5,000 人に 1 人
血友病 A	第 VIII 因子	分泌	男性 5,000 人に 1 人
血友病 B	第 IX 因子	分泌	20,000 人に 1 人
遺伝性血管性浮腫	C1 阻害剤タンパク質	分泌	25,000 人に 1 人
アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症	アルギニノコハク酸リアーゼ	細胞内	70,000 人に 1 人
ムコ多糖症 IV 型 (MPS IV)、	アリールスルファターゼ B	細胞内	200,000 人に 1 人
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型	ATP 結合カセットファミリーB	細胞内	50,000 人に 1 人
古典的ガラクトース血症	ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ	細胞内	50,000 人に 1 人

【０４０４】

【表１８】

表７－治療用遺伝子ノックダウンにおける対象選択のいくつかの適応症

適応症	標的遺伝子	有病率
原発性高シュウ酸尿症Ｉ型	グリオキシル酸オキシダーゼ(HAO1)	推定 100,000 人に１人、米国及び欧州で最大 5,000 人の患者
家族性 ATTR アミロイドーシス	トランスサイレチン	米国で 100,000 人に１人、日本、スウェーデンではより頻度が高い
急性肝性ポルフィリン症	アミノレブリン酸シンターゼ(ALAS1)	50,000 人に１人
スタチンによる十分な LDL 低下を伴わない心血管疾患	PCSK9	高(CVD に起因して米国では３人に１人死亡)
稀な脂質異常症	アンジオポエチン様 3	多様、約 500,000 人に１人
ホモ接合性家族性高コレステロール血症	ApoB100	100 万人に１人
遺伝性血管性浮腫	カリクレイン	25,000 人に１人

【０４０５】

本明細書に記載されるＭＧヌクレアーゼをコードするｓｇＲＮＡ及びｍＲＮＡを封入する脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と、治療用遺伝子をコードするドナー鋳型核酸を含むＡＡＶ（例えば、ＡＡＶ血清型８）とを含む遺伝子編集プラットフォームは、対象に肝臓に静脈内導入される。ＬＮＰは、ＬＮＰの表面官能化を介して肝細胞を標的とする。

【０４０６】

例えば、血友病Ａを有する対象は、本明細書に記載されるＭＧ２９－１ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰを含む遺伝子置換プラットフォームで治療される（配列番号２１４）。ＬＮＰはまた、肝臓で高度に発現されるアルブミンＩに特異的なｓｇＲＮＡを含む（例えば、アルブミンは、肝臓で約５ｇ／ｄＬで発現され得るが、第ＶＩＩＩ因子は、肝臓で約１０μｇ／ｄＬで、又はアルブミンよりも１００万倍少なく発現される）。ＬＮＰに加えて、置換第ＶＩＩＩ因子ヌクレオチド配列をコードする置換鋳型ＤＮＡをコードするプラスミドを含むＡＡＶ８（ＡＡＶ血清型８）ウイルス粒子も対象に送達される。細胞内に入ると、ｍＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、及び鋳型ＤＮＡは、一過性に発現される。ＭＧ２９－１ヌクレアーゼは、ｓｇＲＮＡを使用して宿主肝細胞ＤＮＡの標的遺伝子座を標的とし、次いで、宿主ＤＮＡを切断する。ＡＡＶ８中の宿主肝細胞に送達されたプラスミドから転写されたドナー鋳型ＤＮＡは、細胞内にスプライシングされ、アルブミンＩ遺伝子の標的部位で宿主ＤＮＡに安定的に統合され、挿入された第ＶＩＩＩ因子ＤＮＡは、アルブミンプロモーター下で発現される。

【０４０７】

遺伝子編集プラットフォームは、遺伝子ノックダウン療法のために選択された対象でも使用される。例えば、家族性ＡＴＴＲアミロイドーシスを呈する対象は、本明細書に記載されるＭＧ２９－１ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰ（配列番号２１４）、及びトランスサイレチン遺伝子の標的部位に特異的なｓｇＲＮＡで治療される。ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及びｓｇＲＮＡは、対象の肝細胞に送達され、肝細胞で発現される。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、トランスサイレチン遺伝子の終止コドンを標的

とし、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼの活性は、内因性終止コドンを除去し、遺伝子の発現を効果的にノックダウンする。いくつかの実施形態では、遺伝子ノックダウンプラットフォームは、終止コドンを含むポリヌクレオチドをコードするプラスミドを含むＡＡＶ８を含む。ＡＡＶ８がヌクレアーゼ及びｓｇＲＮＡを発現する同じ細胞に送達されると、外因性終止コドンは、トランチレチン遺伝子にスプライシングされ、編集されたＤＮＡから産生されたＲＮＡから翻訳されたタンパク質の早期切断の結果として遺伝子の発現のノックダウンをもたらす。

【０４０８】

実施例１３－ＣＤ３８のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代ＮＫ細胞を、製造業者の推奨に従ってＮＫ　Ｃｌｏｕｄｚ系（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して増殖させた。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（２１２ｐｍｏｌのタンパク質／３２０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号４４２８～４４６５）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＮＫ細胞（５００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（配列番号４４６６～４５０３）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図５７）。

【０４０９】

【表１９－１】

表１４Ａ：実施例３７のガイドＲＮＡの配列及びそれによって標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4428	MG29-1-CD38-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrGrArGrArCrCrGrUrCrCrUrGrGrCrGrCrGrArUrG/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4429	MG29-1-CD38-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrGrUrArCrUrUrGrArCrGrCrArUrCrGrCrGrCrC/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4430	MG29-1-CD38-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrCrGrGrArCrArCrCrGrGrGrCrUrGrArArCrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4431	MG29-1-CD38-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrGrGrUrGrCrArUrUrUrArUrUrUrCrArArArArC/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4432	MG29-1-CD38-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrArArArArCrArUrCrCrUrUrGrCrArArCrArU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4433	MG29-1-CD38-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArCrArUrCrCrUrUrGrCrArArCrArUrUrArCrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4434	MG29-1-CD38-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArArArUrGrCrArCrCrCrUrUrGrArArArG/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4435	MG29-1-CD38-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArUrArArArUrGrCrArCrCrCrUrUrGrArArArGrC/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4436	MG29-1-CD38-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArGrUrCrUrArCrArUrGrUrCrUrGrArGrArUrArA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4437	MG29-1-CD38-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrCrArGrArArUrArArArArGrArUrCrUrGrGrCrC/AltR2/

【０４１０】

【表１９－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4438	MG29-1-CD38-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrCrUrGrCrUrCrCrArArArGrArArGrArArUrCrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4439	MG29-1-CD38-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrGrCrUrCrCrArArArGrArArGrArArUrCrUrA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4440	MG29-1-CD38-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrArUrUrCrUrGrGrArArArArCrGrGrUrUrUrCrC/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4441	MG29-1-CD38-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrGrCrArGrGrGrUrArArGrUrArCrCrArArGrUrArG/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4442	MG29-1-CD38-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArGrArArUrArCrUrGrArArArCrArGrGrGrUrUrG/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4443	MG29-1-CD38-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArArUrArCrUrGrArArArCrArGrGrGrUrUrGrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4444	MG29-1-CD38-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArGrUrCrUrGrGrGrCrArArGrArUrUrGrArUrA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4445	MG29-1-CD38-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrArArArArGrArCrArUrArGrUrUrUrGrUrA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4446	MG29-1-CD38-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArArGrCrUrGrCrCrUrGrUrGrArUrGrUrGrUrGrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4447	MG29-1-CD38-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrArArArArArCrArGrGrUrArCrArCrArUrUrUrUrArU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4448	MG29-1-CD38-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrCrArArArGrArUrUrUrUrArCrUrGrCrGrGrGrGrA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4449	MG29-1-CD38-sgRNA-F3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrCrArArArGrArUrUrUrUrArCrUrGrCrGrGrGrArU/AltR2/

【０４１１】

【表１９－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4450	MG29-1-CD38-sgRNA-G3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArArArGrArUrUrUrUrArCrUrGrCrGrGrGrArUrC/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4451	MG29-1-CD38-sgRNA-H3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrGrCrGrGrGrArUrCrCrArUrUrGrArGrCrArUrC/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4452	MG29-1-CD38-sgRNA-A4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrCrGrGrGrArUrCrCrArUrUrGrArGrCrArUrCrA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4453	MG29-1-CD38-sgRNA-B4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrGrArGrUrGrUrGrGrArArGrUrCrCrArUrArArUrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4454	MG29-1-CD38-sgRNA-C4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArGrUrGrUrGrGrArArGrUrCrCrArUrArArUrUrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4455	MG29-1-CD38-sgRNA-D4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArCrCrArGrArGrArArGrGrUrUrCrArGrArCrArC/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4456	MG29-1-CD38-sgRNA-E4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrCrArArGrArArUrArUrCrUrArCrArGrGrUrA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4457	MG29-1-CD38-sgRNA-F4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrCrArArGrArArUrArUrCrUrArCrArGrGrUrArA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4458	MG29-1-CD38-sgRNA-G4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrUrArUrArArUrCrGrArUrUrCrCrArGrCrUrCrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4459	MG29-1-CD38-sgRNA-H4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrArUrArArUrCrGrArUrUrCrCrArGrCrUrCrUrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4460	MG29-1-CD38-sgRNA-A5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrGrUrGrGrArUrCrCrUrGrGrCrArUrArArGrU/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4461	MG29-1-CD38-sgRNA-B5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrUrGrGrArUrCrCrUrGrGrCrArUrArArGrUrC/AltR2/

【０４１２】

【表１９－４】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4462	MG29-1-CD38-sgRNA-C5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrArGrUrGrUrGrUrGrArArArArArUrCrCrUrGrA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4463	MG29-1-CD38-sgRNA-D5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArCrArCrArCrUrGrArArGrArArArCrUrUrGrUrC/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4464	MG29-1-CD38-sgRNA-E5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArCrArCrArCrUrGrArArGrArArArCrUrUrGrUrCrA/AltR2/
CD38を標的とするMG29-1 sgRNA	4465	MG29-1-CD38-sgRNA-F5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrArCrArCrUrGrArArGrArArArCrUrUrGrUrCrArG/AltR2/
CD38標的部位のDNA配列	4466	MG29-1-CD38-標的部位-A1	CCGAGACCGTCCTGGCGCGATG
CD38標的部位のDNA配列	4467	MG29-1-CD38-標的部位-B1	AGTGTACTTGACGCATCGCGCC
CD38標的部位のDNA配列	4468	MG29-1-CD38-標的部位-C1	TCCCCGGACACCGGGCTGAACT
CD38標的部位のDNA配列	4469	MG29-1-CD38-標的部位-D1	AAGGGTGCATTTATTTCAAAAC
CD38標的部位のDNA配列	4470	MG29-1-CD38-標的部位-E1	TTTCAAAACATCCTTGCAACAT
CD38標的部位のDNA配列	4471	MG29-1-CD38-標的部位-F1	AAAACATCCTTGCAACATTACT
CD38標的部位のDNA配列	4472	MG29-1-CD38-標的部位-G1	GAAATAAATGCACCCTTGAAAG
CD38標的部位のDNA配列	4473	MG29-1-CD38-標的部位-H1	AAATAAATGCACCCTTGAAAGC
CD38標的部位のDNA配列	4474	MG29-1-CD38-標的部位-A2	GCAGTCTACATGTCTGAGATAA
CD38標的部位のDNA配列	4475	MG29-1-CD38-標的部位-B2	GAGCAGAATAAAAGATCTGGCC

【０４１３】

【表１９－５】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD38標的部位のDNA配列	4476	MG29-1-CD38-標的部位-C2	ATTCTGCTCCAAAGAAGAATCT
CD38標的部位のDNA配列	4477	MG29-1-CD38-標的部位-D2	TTCTGCTCCAAAGAAGAATCTA
CD38標的部位のDNA配列	4478	MG29-1-CD38-標的部位-E2	AGTATTCTGGAAAACGGTTTCC
CD38標的部位のDNA配列	4479	MG29-1-CD38-標的部位-F2	CCGCAGGGTAAGTACCAAGTAG
CD38標的部位のDNA配列	4480	MG29-1-CD38-標的部位-G2	CCAGAATACTGAAACAGGGTTG
CD38標的部位のDNA配列	4481	MG29-1-CD38-標的部位-H2	CAGAATACTGAAACAGGGTTGT
CD38標的部位のDNA配列	4482	MG29-1-CD38-標的部位-A3	TCCAGTCTGGGCAAGATTGATA
CD38標的部位のDNA配列	4483	MG29-1-CD38-標的部位-B3	TTTCTAAAAGACATAGTTTGTA
CD38標的部位のDNA配列	4484	MG29-1-CD38-標的部位-C3	CAGAAGCTGCCTGTGATGTGGT
CD38標的部位のDNA配列	4485	MG29-1-CD38-標的部位-D3	ACAAAAACAGGTACACATTTAT
CD38標的部位のDNA配列	4486	MG29-1-CD38-標的部位-E3	TGTCAAAGATTTTACTGCGGGA
CD38標的部位のDNA配列	4487	MG29-1-CD38-標的部位-F3	GTCAAAGATTTTACTGCGGGAT
CD38標的部位のDNA配列	4488	MG29-1-CD38-標的部位-G3	TCAAAGATTTTACTGCGGGATC
CD38標的部位のDNA配列	4489	MG29-1-CD38-標的部位-H3	ACTGCGGGATCCATTGAGCATC
CD38標的部位のDNA配列	4490	MG29-1-CD38-標的部位-A4	CTGCGGGATCCATTGAGCATCA

【０４１４】

【表１９－６】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD38 標的部位の DNA 配列	4491	MG29-1-CD38-標的部位-B4	GGGAGTGTGGAAGTCCATAATT
CD38 標的部位の DNA 配列	4492	MG29-1-CD38-標的部位-C4	GGAGTGTGGAAGTCCATAATTT
CD38 標的部位の DNA 配列	4493	MG29-1-CD38-標的部位-D4	CAACCAGAGAAGGTTCAGACAC
CD38 標的部位の DNA 配列	4494	MG29-1-CD38-標的部位-E4	CCTGCAAGAATATCTACAGGTA
CD38 標的部位の DNA 配列	4495	MG29-1-CD38-標的部位-F4	CTGCAAGAATATCTACAGGTAA
CD38 標的部位の DNA 配列	4496	MG29-1-CD38-標的部位-G4	GCTTATAATCGATTCCAGCTCT
CD38 標的部位の DNA 配列	4497	MG29-1-CD38-標的部位-H4	CTTATAATCGATTCCAGCTCTT
CD38 標的部位の DNA 配列	4498	MG29-1-CD38-標的部位-A5	ATGGTGGGATCCTGGCATAAGT
CD38 標的部位の DNA 配列	4499	MG29-1-CD38-標的部位-B5	TGGTGGGATCCTGGCATAAGTC
CD38 標的部位の DNA 配列	4500	MG29-1-CD38-標的部位-C5	TTCAGTGTGTGAAAAATCCTGA
CD38 標的部位の DNA 配列	4501	MG29-1-CD38-標的部位-D5	TCACACACTGAAGAAACTTGTC
CD38 標的部位の DNA 配列	4502	MG29-1-CD38-標的部位-E5	CACACACTGAAGAAACTTGTCA
CD38 標的部位の DNA 配列	4503	MG29-1-CD38-標的部位-F5	ACACACTGAAGAAACTTGTCAG
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5'及び 3'AltR 修飾を指す			

【０４１５】

実施例３８－ＣＤ３８の表現型レベルでの遺伝子編集結果

編集された細胞を、以下のようにＣＤ３８発現についてアッセイした：初代ＮＫ細胞（５００，０００）をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄し、製造業者の仕様に従ってＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ａｑｕａ Ｄｅａｄ Ｃｅｌｌ Ｓｔａｉｎ Ｋｉｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）で染色した。次いで、細胞を洗浄し、ＦＣ Ｂｌｏｃｋ－Ｈｕｍａｎ ＴｒｕＳｔａｉｎ ＦｃＸ（商標）（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）とともに氷上で２０分間インキュベートした。次に、製造業者の推奨に従って、細胞を抗ＣＤ５６ ＰＥ及び抗３８ ＰｅｒＣＰ ｅＦｌｕｏｒ ７１０抗体（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈ

ｅｒ）で染色し、検体当たり２５，０００個の総事象を収集することによりフローサイトメトリーによって分析した（図５８）。

【０４１６】

実施例３９－ＴＩＧＩＴのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＭＢＣから精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１０６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号４５０４～４５２０）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＴ細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（配列番号４５２１～４５３７）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図５９）。

【０４１７】

【表２０－１】

表１４Ｂ：実施例３９のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4504	MG29-1-TIGIT-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrGrCrCrUrUrArCrCrUrGrArGrGrCrGrArGrGrGrG/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4505	MG29-1-TIGIT-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrUrGrUrGrCrCrUrGrUrCrArUrCrArUrUrCrCrU/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4506	MG29-1-TIGIT-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrCrArGrArArArUrGrUrUrCrCrCrGrUrUrG/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4507	MG29-1-TIGIT-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrArGrArGrArArArGrGrUrGrGrCrUrCrUrArUrC/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4508	MG29-1-TIGIT-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArUrGrCrUrGrArCrUrUrGrGrGrGrGrCrArC/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4509	MG29-1-TIGIT-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrGrArCrCrUrCrCrArGrGrArArGrArUrUrCrUrC/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4510	MG29-1-TIGIT-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrCrCrUrCrCrCrUrCrUrArGrUrGrUrGrCrUrGrArGrC/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4511	MG29-1-TIGIT-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrCrCrCrUrCrUrArGrUrGrUrGrCrUrGrArGrCrA/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4512	MG29-1-TIGIT-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrUrCrArArCrGrCrGrArCrCrArCrCrArCrGrArU/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4513	MG29-1-TIGIT-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrUrUrUrGrUrUrUrGrUrUrUrUrArGrArArArGrA/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4514	MG29-1-TIGIT-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrUrUrUrUrUrArGrArArGrArArArGrCrCrCrU/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4515	MG29-1-TIGIT-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrArGrArArGrArArArGrCrCrCrUrCrArGrA/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4516	MG29-1-TIGIT-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrArArGrArArArGrCrCrUrCrArGrArArUrCrC/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4517	MG29-1-TIGIT-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArArGrArArArGrCrCrUrCrArGrArArUrCrCrA/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4518	MG29-1-TIGIT-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArGrArArGrArArArGrCrCrUrCrArGrArArUrCrCrArU/AltR2/

【０４１８】

【表２０－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4519	MG29-1-TIGIT-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrGrArGrGrUrCrArCrCrUrUrCrCrArCrArGrA/AltR2/
TIGITを標的とするMG29-1 sgRNA	4520	MG29-1-TIGIT-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrCrUrGrArGrGrUrCrArCrCrUrUrCrCrArCrArG/AltR2/
TIGIT標的部位のDNA配列	4521	MG29-1-TIGIT-標的部位-A1	AGGCCTTACCTGAGGCGAGGGG
TIGIT標的部位のDNA配列	4522	MG29-1-TIGIT-標的部位-B1	TATTGTGCCTGTCATCATTCCT
TIGIT標的部位のDNA配列	4523	MG29-1-TIGIT-標的部位-C1	TCTGCAGAAATGTTCCCCGTTG
TIGIT標的部位のDNA配列	4524	MG29-1-TIGIT-標的部位-D1	TGCAGAGAAAGGTGGCTCTATC
TIGIT標的部位のDNA配列	4525	MG29-1-TIGIT-標的部位-E1	TAATGCTGACTTGGGGTGGCAC
TIGIT標的部位のDNA配列	4526	MG29-1-TIGIT-標的部位-F1	TAGGACCTCCAGGAAGATTCTC
TIGIT標的部位のDNA配列	4527	MG29-1-TIGIT-標的部位-G1	GTCCTCCCTCTAGTGGCTGAGC
TIGIT標的部位のDNA配列	4528	MG29-1-TIGIT-標的部位-H1	TCCTCCCTCTAGTGGCTGAGCA
TIGIT標的部位のDNA配列	4529	MG29-1-TIGIT-標的部位-A2	TAGTCAACGCGACCACCACGAT
TIGIT標的部位のDNA配列	4530	MG29-1-TIGIT-標的部位-B2	TAGTTTGTTTGTTTTTAGAAGA
TIGIT標的部位のDNA配列	4531	MG29-1-TIGIT-標的部位-C2	TTTGTTTTTAGAAGAAAGCCCT
TIGIT標的部位のDNA配列	4532	MG29-1-TIGIT-標的部位-D2	TTTTTAGAAGAAAGCCCTCAGA
TIGIT標的部位のDNA配列	4533	MG29-1-TIGIT-標的部位-E2	TAGAAGAAAGCCCTCAGAATCC
TIGIT標的部位のDNA配列	4534	MG29-1-TIGIT-標的部位-F2	AGAAGAAAGCCCTCAGAATCCA
TIGIT標的部位のDNA配列	4535	MG29-1-TIGIT-標的部位-G2	GAAGAAAGCCCTCAGAATCCAT
TIGIT標的部位のDNA配列	4536	MG29-1-TIGIT-標的部位-H2	CTCCTGAGGTCACCTTCCACAG
TIGIT標的部位のDNA配列	4537	MG29-1-TIGIT-標的部位-A3	TCCTGAGGTCACCTTCCACAGA
r;糖リボースを含む天然RNA結合(例えば、A塩基のリボース又はRNA形態は、rAと記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A塩基のデオキシリボース形態は、dAと記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの1つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1及びAltR2は、IDT技術の専有の5'及び3'AltR修飾を指す			

【０４１９】

実施例１４－ＡＡＶＳ１のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＭＢＣから精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１０６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号４５３８～４５６８）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＴ細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（配列番号４５６９～４５９９）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図６０）。

【０４２０】

【表２１－１】

表１４Ｃ：実施例４０のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4538	MG29-1-AAVS1-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrUrUrUrCrCrArArArCrUrGrCrUrUrCrUrCrCrU/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4539	MG29-1-AAVS1-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrCrCrArArArCrUrGrCrUrUrCrUrCrCrUrC/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4540	MG29-1-AAVS1-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArArArCrUrGrCrUrUrCrUrCrUrUrGrG/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4541	MG29-1-AAVS1-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArArArCrUrGrCrUrUrCrUrCrUrCrUrUrGrGrG/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4542	MG29-1-AAVS1-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArArCrUrGrCrUrUrCrUrCrUrCrUrUrGrGrGrA/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4543	MG29-1-AAVS1-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrCrArCrCrArArUrCrCrUrGrUrCrCrCrUrArG/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4544	MG29-1-AAVS1-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrCrArCrCrArArUrCrCrUrGrUrCrCrCrUrArGrU/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4545	MG29-1-AAVS1-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrGrUrUrGrUrCrCrArGrArArArArArCrGrGrUrGrA/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4546	MG29-1-AAVS1-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrCrUrCrCrUrUrCrUrGrGrGrCrCrUrGrUrG/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4547	MG29-1-AAVS1-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrCrUrCrCrUrUrCrUrGrGrGrCrCrUrGrUrGrC/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4548	MG29-1-AAVS1-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArGrGrArUrGrGrCrCrUrUrCrUrCrCrGrArCrGrG/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4549	MG29-1-AAVS1-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrGrArCrArArCrCrCrCrArArArGrUrArCrCrC/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4550	MG29-1-AAVS1-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrGrArCrArArCrCrCrArArArGrUrArCrCrCrC/AltR2/

【０４２１】

【表２１－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4551	MG29-1-AAVS1-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrArCrArArCrCrCrCrArArArGrUrArCrCrCrCrG/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4552	MG29-1-AAVS1-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrCrArCrCrUrCrUrCrCrArUrCrCrUrCrUrUrGrCrU/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4553	MG29-1-AAVS1-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrCrCrUrGrGrArCrArCrCrCrCrGrUrUrCrUrC/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4554	MG29-1-AAVS1-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrGrArCrArCrCrCrCrGrUrUrCrUrCrCrUrGrU/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4555	MG29-1-AAVS1-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrUrGrGrGrCrArGrCrUrCrCrCrCrUrArCrCrCrC/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4556	MG29-1-AAVS1-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrArGrCrUrCrCrCrCrCrCrCrCrUrUrA/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4557	MG29-1-AAVS1-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrCrCrUrCrCrArGrGrGrArUrCrCrUrGrUrGrUrC/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4558	MG29-1-AAVS1-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrUrGrUrCrCrCrCrUrCrCrArCrCrCrCrArCrArG/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4559	MG29-1-AAVS1-sgRNA-F3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrUrCrCrCrUrCrCrArCrCrCrCrArCrArGrU/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4560	MG29-1-AAVS1-sgRNA-G3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrGrArCrArUrCrUrCrUrCrCrCrUrUrGrC/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4561	MG29-1-AAVS1-sgRNA-H3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrArCrGrArUrGrGrArGrCrCrArGrArGrArGrGrA/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4562	MG29-1-AAVS1-sgRNA-A4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrGrArUrCrCrUrGrGrUrGrCrArGrCrUrU/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4563	MG29-1-AAVS1-sgRNA-B4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArArArArCrArGrArArUrArArGrU/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4564	MG29-1-AAVS1-sgRNA-C4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrCrUrUrCrArCrCrUrUrUrCrUrArGrUrCrCrCrC/AltR2/

【０４２２】

【表２１－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4565	MG29-1-AAVS1-sgRNA-D4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrUrCrCrCrArArUrUrUrArUrArUrUrGrUrUrC/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4566	MG29-1-AAVS1-sgRNA-E4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrGrUrUrCrCrUrCrCrGrUrGrCrGrUrCrArGrU/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4567	MG29-1-AAVS1-sgRNA-F4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrCrUrGrUrGrArGrArUrArArGrGrCrCrArGrUrArG/AltR2/
AAVS1を標的とするMG29-1 sgRNA	4568	MG29-1-AAVS1-sgRNA-G4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrUrGrArGrArUrArArGrGrCrCrArGrUrArGrC/AltR2/
AAVS1標的部位のDNA配列	4569	MG29-1-AAVS1-標的部位-A1	GTTTTTCCAAACTGCTTCTCCT
AAVS1標的部位のDNA配列	4570	MG29-1-AAVS1-標的部位-B1	TTTTTCCAAACTGCTTCTCCTC
AAVS1標的部位のDNA配列	4571	MG29-1-AAVS1-標的部位-C1	TCCAAACTGCTTCTCCTCTTGG
AAVS1標的部位のDNA配列	4572	MG29-1-AAVS1-標的部位-D1	CCAAACTGCTTCTCCTCTTGGG
AAVS1標的部位のDNA配列	4573	MG29-1-AAVS1-標的部位-E1	CAAACTGCTTCTCCTCTTGGGA
AAVS1標的部位のDNA配列	4574	MG29-1-AAVS1-標的部位-F1	CTGTCACCAATCCTGTCCCTAG
AAVS1標的部位のDNA配列	4575	MG29-1-AAVS1-標的部位-G1	TGTCACCAATCCTGTCCCTAGT
AAVS1標的部位のDNA配列	4576	MG29-1-AAVS1-標的部位-H1	GGGTTGTCCAGAAAAACGGTGA
AAVS1標的部位のDNA配列	4577	MG29-1-AAVS1-標的部位-A2	CCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTG
AAVS1標的部位のDNA配列	4578	MG29-1-AAVS1-標的部位-B2	CTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGC
AAVS1標的部位のDNA配列	4579	MG29-1-AAVS1-標的部位-C2	TTAGGATGGCCTTCTCCGACGG
AAVS1標的部位のDNA配列	4580	MG29-1-AAVS1-標的部位-D2	TCTGGACAACCCCAAAGTACCC

【０４２３】

【表２１－４】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4581	MG29-1-AAVS1-標的部位-E2	CTGGACAACCCCAAAGTACCCC
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4582	MG29-1-AAVS1-標的部位-F2	TGGACAACCCCAAAGTACCCCG
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4583	MG29-1-AAVS1-標的部位-G2	GCCACCTCTCCATCCTCTTGCT
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4584	MG29-1-AAVS1-標的部位-H2	TTTGCCTGGACACCCCGTTCTC
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4585	MG29-1-AAVS1-標的部位-A3	CCTGGACACCCCGTTCTCCTGT
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4586	MG29-1-AAVS1-標的部位-B3	ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCC
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4587	MG29-1-AAVS1-標的部位-C3	GGCAGCTCCCCTACCCCCCTTA
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4588	MG29-1-AAVS1-標的部位-D3	CTGCCTCCAGGGATCCTGTGTC
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4589	MG29-1-AAVS1-標的部位-E3	ATCTGTCCCCTCCACCCCACAG
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4590	MG29-1-AAVS1-標的部位-F3	TCTGTCCCCTCCACCCCACAGT
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4591	MG29-1-AAVS1-標的部位-G3	CTGGAGCCATCTCTCTCCTTGC
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4592	MG29-1-AAVS1-標的部位-H3	CTTACGATGGAGCCAGAGAGGA
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4593	MG29-1-AAVS1-標的部位-A4	ACTGATCCTGGTGCTGCAGCTT
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4594	MG29-1-AAVS1-標的部位-B4	GAAAAACAAAATCAGAATAAGT
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4595	MG29-1-AAVS1-標的部位-C4	GCTCTTCACCTTTCTAGTCCCC
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4596	MG29-1-AAVS1-標的部位-D4	TAGTCCCCAATTTATATTGTTC
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4597	MG29-1-AAVS1-標的部位-E4	TATTGTTCCTCCGTGCGTCAGT
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4598	MG29-1-AAVS1-標的部位-F4	ACCTGTGAGATAAGGCCAGTAG
AAVS1 標的部位の DNA 配列	4599	MG29-1-AAVS1-標的部位-G4	CCTGTGAGATAAGGCCAGTAGC
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5'及び 3'AltR 修飾を指す			

【０４２４】

実施例１５－Ｂ２ＭのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＭＢＣから精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１０６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号４６００～４６７５）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＴ細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（配列番号４６７６～４７５１）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図６１）。

【０４２５】

【表２２－１】

表１４Ｄ：実施例４１のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4600	MG29-1-B2M-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArArUrUrGrGrCrCrUrGrGrArGrGrCrUrArUrCrCrArGrCrGrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4601	MG29-1-B2M-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArArUrCrCrCrGrArUrArUrUrCrCrUrCrArGrGrUrArCrUrCrUrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4602	MG29-1-B2M-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArArUrCrCrGrArUrArArUrUrCrCrUrCrArGrGrUrArCrUrCrCrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4603	MG29-1-B2M-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArArUrCrUrCrArCrGrUrCrArUrCrCrArGrCrArGrArArGrArArU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4604	MG29-1-B2M-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArArUrCrUrGrArArUrUrGrUrGrUrCrUrGrGrGrGrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4605	MG29-1-B2M-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArArUrArUrCrCrArUrCrCrGrArArCrArUrUrGrArArGrUrUrGrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4606	MG29-1-B2M-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrArArGrGrArCrUrGrGrUrCrUrUrUrCrUrArUrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4607	MG29-1-B2M-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrCrUrCrUrUrGrUrArCrUrArCrArCrUrGrArArArU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4608	MG29-1-B2M-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArCrArGrCrCrCrArArGrArUrArArGrUrUrArArArGrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4609	MG29-1-B2M-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArGrUrGrGrGrGrGrUrGrArArUrUrCrArGrUrGrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4610	MG29-1-B2M-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrUrGrGrGrGrGrUrGrArArUrUrCrArGrUrGrUrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4611	MG29-1-B2M-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrGrGrGrGrGrUrGrArArUrUrCrArGrUrGrUrArG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4612	MG29-1-B2M-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArArUrUrCrUrCrCrArUrUrCrUrUrCrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4613	MG29-1-B2M-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArUrUrCrUrCrCrArUrUrCrUrUrCrArG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4614	MG29-1-B2M-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrUrCrUrCrUrCrUrCrCrArUrUrCrUrUrCrArGrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4615	MG29-1-B2M-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrUrCrCrArUrUrCrUrCrUrGrCrUrGrGrArArUrG/AltR2/

【０４２６】

【表２２－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4616	MG29-1-B2M-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrUrCrUrCrUrGrCrUrGrGrArUrGrArCrGrUrGrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4617	MG29-1-B2M-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrCrCrArCrUrGrUrCrUrUrUrUrUrCrArUrArGrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4618	MG29-1-B2M-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrCrArCrUrGrUrCrUrUrUrUrUrCrArUrArGrArU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4619	MG29-1-B2M-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArCrUrGrUrCrUrUrUrUrUrCrArUrArGrArUrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4620	MG29-1-B2M-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArUrArGrArUrCrGrArGrArCrArUrGrUrArArGrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4621	MG29-1-B2M-sgRNA-F3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrArGrArUrCrGrArGrArCrArUrGrUrArArGrCrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4622	MG29-1-B2M-sgRNA-G3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrCrCrUrGrGrArGrGrCrUrArUrCrCrArGrCrGrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4623	MG29-1-B2M-sgRNA-H3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrGrGrGrGrArGrCrArGrGrGrGrArGrArCrCrUrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4624	MG29-1-B2M-sgRNA-A4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrCrUrArCrGrGrCrGrArCrGrGrGrArGrGrGrUrCrG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4625	MG29-1-B2M-sgRNA-B4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrGrCrGrUrCrGrArUrArArGrCrGrUrCrArGrArGrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4626	MG29-1-B2M-sgRNA-C4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrCrCrGrCrUrCrUrUrUrCrGrCrGrGrGrGrCrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4627	MG29-1-B2M-sgRNA-D4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrGrGrGrCrCrUrCrUrGrGrCrUrCrCrCrCrCrArG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4628	MG29-1-B2M-sgRNA-E4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArArCrGrCrGrUrGrGrArGrGrGrGrCrGrCrUrUrG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4629	MG29-1-B2M-sgRNA-F4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrCrCrArCrGrGrUrGrUrGrGrCrCrCrCrArCrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4630	MG29-1-B2M-sgRNA-G4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArCrGrArGrCrCrUrArCrCrCrGrUrCrCrCrCrCrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4631	MG29-1-B2M-sgRNA-H4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrCrGrArCrCrCrUrCrCrCrGrUrCrGrCrCrGrUrA/AltR2/

【０４２７】

【表２２－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4632	MG29-1-B2M-sgRNA-A5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrGrGrGrArGrCrGrCrArUrGrCrCrUrUrUrUrGrGrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4633	MG29-1-B2M-sgRNA-B5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrGrGrArGrCrGrCrArUrGrCrCrUrUrUrUrGrGrCrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4634	MG29-1-B2M-sgRNA-C5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrUrGrUrArArUrUrCrGrUrGrCrArUrUrUrUrUrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4635	MG29-1-B2M-sgRNA-D5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrGrUrArArUrUrCrGrUrGrCrArUrUrUrUrUrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4636	MG29-1-B2M-sgRNA-E5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrArArGrArArArArArCrGrCrCrUrGrCrCrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4637	MG29-1-B2M-sgRNA-F5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrArArGrArArArArArCrGrCrCrUrGrCrCrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4638	MG29-1-B2M-sgRNA-G5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrArArGrArArArArArCrGrCrCrUrGrCrCrUrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4639	MG29-1-B2M-sgRNA-H5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArArGrArArArArArCrGrCrCrUrGrCrCrUrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4640	MG29-1-B2M-sgRNA-A6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArGrArArArArArCrGrCrCrUrGrCrCrUrUrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4641	MG29-1-B2M-sgRNA-B6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrArArArArArCrGrCrCrUrGrCrCrUrUrCrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4642	MG29-1-B2M-sgRNA-C6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArArArArArCrGrCrCrUrGrCrCrUrUrCrGrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4643	MG29-1-B2M-sgRNA-D6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrUrArCrArGrArGrGrCrUrUrCrCrUrCrUrUrUrG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4644	MG29-1-B2M-sgRNA-E6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArCrArGrArGrGrCrUrUrCrCrUrCrUrUrUrG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4645	MG29-1-B2M-sgRNA-F6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrCrUrUrUrGrCrCrUrGrGrUrUrGrUrUrUrCrCrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4646	MG29-1-B2M-sgRNA-G6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrGrUrUrUrUrCrCrArArGrArUrGrUrArC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4647	MG29-1-B2M-sgRNA-H6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArGrArUrGrUrArCrUrGrUrGrCrCrUrCrUrUrArC/AltR2/

【０４２８】

【表２２－４】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4648	MG29-1-B2M-sgRNA-A7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArArArCrCrGrArArArGrUrArArGrArGrGrCrArC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4649	MG29-1-B2M-sgRNA-B7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArArCrCrGrArArArGrUrArArGrArGrGrCrArCrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4650	MG29-1-B2M-sgRNA-C7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrUrGrGrArGrArArUrCrUrCrArCrGrCrArGrArA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4651	MG29-1-B2M-sgRNA-D7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrArArArArArArArArArUrGrCrArCrGrArArU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4652	MG29-1-B2M-sgRNA-E7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrArArArArArArArArArUrGrCrArCrGrArArArU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4653	MG29-1-B2M-sgRNA-F7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArArArArArArArArArUrGrCrArCrGrArArUrUrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4654	MG29-1-B2M-sgRNA-G7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrUrCrArArArArUrGrGrArGrGrUrGrGrCrUrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4655	MG29-1-B2M-sgRNA-H7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrCrArGrArGrUrGrGrArArArUrGrGrArArUrUrGrG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4656	MG29-1-B2M-sgRNA-A8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrUrArCrCrUrGrArGrGrArArUrArUrCrGrGrGrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4657	MG29-1-B2M-sgRNA-B8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrUrGrGrGrGrCrUrArArCrUrUrGrGrUrGrUrCrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4658	MG29-1-B2M-sgRNA-C8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrUrUrGrGrUrCrArUrCrGrArUrUrUrUrCrUrCrCrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4659	MG29-1-B2M-sgRNA-D8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrCrArUrCrGrArUrUrUrCrUrCrCrCrArArUrUrCrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4660	MG29-1-B2M-sgRNA-E8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrCrArArUrUrCrArUrUrCrCrArCrUrCrUrG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4661	MG29-1-B2M-sgRNA-F8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArCrUrCrUrGrGrCrCrArArArUrGrArGrCrUrUrCrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4662	MG29-1-B2M-sgRNA-G8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArGrArArUrArArArArCrCrGrUrGrArCrUrUrGrGrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4663	MG29-1-B2M-sgRNA-H8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrArArUrArArArCrCrGrUrGrArCrUrUrGrGrUrA/AltR2/

【０４２９】

【表２２－５】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4664	MG29-1-B2M-sgRNA-A9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrCrArUrArArUrUrCrCrUrCrUrArUrArCrArUrG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4665	MG29-1-B2M-sgRNA-B9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrUrUrUrUrUrUrCrUrArGrCrArGrArUrUrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4666	MG29-1-B2M-sgRNA-C9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrUrUrUrUrUrUrCrUrArGrCrArGrArUrUrUrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4667	MG29-1-B2M-sgRNA-D9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrUrUrUrUrUrCrUrArGrCrArGrArUrUrUrCrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4668	MG29-1-B2M-sgRNA-E9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrUrUrCrUrArGrCrArGrArUrUrUrCrUrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4669	MG29-1-B2M-sgRNA-F9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrCrUrArGrCrArGrArUrUrUrCrUrArGrCrArG/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4670	MG29-1-B2M-sgRNA-G9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrUrArGrCrArGrArUrUrUrCrUrArGrCrArGrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4671	MG29-1-B2M-sgRNA-H9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrArGrCrArGrArUrUrUrCrUrArGrCrArGrUrA/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4672	MG29-1-B2M-sgRNA-A10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrArGrCrArGrArUrUrUrCrUrArGrCrArGrUrArU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4673	MG29-1-B2M-sgRNA-B10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrArGrCrArGrArUrUrUrCrUrArGrCrArGrUrArUrC/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4674	MG29-1-B2M-sgRNA-C10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrCrArGrArUrUrUrCrUrArGrCrArGrUrArUrCrU/AltR2/
B2M を標的とする MG29-1 sgRNA	4675	MG29-1-B2M-sgRNA-D10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrCrArGrUrArUrCrUrUrCrUrGrUrCrArCrUrGrG/AltR2/
B2M 標的部位の DNA 配列	4676	MG29-1-B2M-標的部位-A1	TGGCCTGGAGGCTATCCAGCGT
B2M 標的部位の DNA 配列	4677	MG29-1-B2M-標的部位-B1	CCCGATATTCCTCAGGTACTCC
B2M 標的部位の DNA 配列	4678	MG29-1-B2M-標的部位-C1	CCGATATTCCTCAGGTACTCCA
B2M 標的部位の DNA 配列	4679	MG29-1-B2M-標的部位-D1	CTCACGTCATCCAGCAGAGAAT
B2M 標的部位の DNA 配列	4680	MG29-1-B2M-標的部位-E1	CTGAATTGCTATGTGTCTGGGT
B2M 標的部位の DNA 配列	4681	MG29-1-B2M-標的部位-F1	ATCCATCCGACATTGAAGTTGA

【０４３０】

【表２２－６】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
B2M 標的部位の DNA 配列	4682	MG29-1-B2M-標的部位-G1	AGCAAGGACTGGTCTTTCTATC
B2M 標的部位の DNA 配列	4683	MG29-1-B2M-標的部位-H1	TATCTCTTGTACTACACTGAAT
B2M 標的部位の DNA 配列	4684	MG29-1-B2M-標的部位-A2	TCACAGCCCAAGATAGTTAAGT
B2M 標的部位の DNA 配列	4685	MG29-1-B2M-標的部位-B2	TCAGTGGGGGTGAATTCAGTGT
B2M 標的部位の DNA 配列	4686	MG29-1-B2M-標的部位-C2	CAGTGGGGGTGAATTCAGTGTA
B2M 標的部位の DNA 配列	4687	MG29-1-B2M-標的部位-D2	AGTGGGGGTGAATTCAGTGTAG
B2M 標的部位の DNA 配列	4688	MG29-1-B2M-標的部位-E2	TCAATTCTCTCTCCATTCTTCA
B2M 標的部位の DNA 配列	4689	MG29-1-B2M-標的部位-F2	CAATTCTCTCTCCATTCTTCAG
B2M 標的部位の DNA 配列	4690	MG29-1-B2M-標的部位-G2	AATTCTCTCTCCATTCTTCAGT
B2M 標的部位の DNA 配列	4691	MG29-1-B2M-標的部位-H2	ACTTTCCATTCTCTGCTGGATG
B2M 標的部位の DNA 配列	4692	MG29-1-B2M-標的部位-A3	CATTCTCTGCTGGATGACGTGA
B2M 標的部位の DNA 配列	4693	MG29-1-B2M-標的部位-B3	TCTCCACTGTCTTTTTCATAGA
B2M 標的部位の DNA 配列	4694	MG29-1-B2M-標的部位-C3	CTCCACTGTCTTTTTCATAGAT
B2M 標的部位の DNA 配列	4695	MG29-1-B2M-標的部位-D3	TCCACTGTCTTTTTCATAGATC
B2M 標的部位の DNA 配列	4696	MG29-1-B2M-標的部位-E3	TCATAGATCGAGACATGTAAGC
B2M 標的部位の DNA 配列	4697	MG29-1-B2M-標的部位-F3	CATAGATCGAGACATGTAAGCA
B2M 標的部位の DNA 配列	4698	MG29-1-B2M-標的部位-G3	TGGCCTGGAGGCTATCCAGCGT
B2M 標的部位の DNA 配列	4699	MG29-1-B2M-標的部位-H3	GGCGGGGAGCAGGGGAGACCTT
B2M 標的部位の DNA 配列	4700	MG29-1-B2M-標的部位-A4	GCCTACGGCGACGGGAGGGTCG
B2M 標的部位の DNA 配列	4701	MG29-1-B2M-標的部位-B4	GGGCGTCGATAAGCGTCAGAGC
B2M 標的部位の DNA 配列	4702	MG29-1-B2M-標的部位-C4	TCTTCCGCTCTTTCGCGGGGCC
B2M 標的部位の DNA 配列	4703	MG29-1-B2M-標的部位-D4	GCGGGGCCTCTGGCTCCCCCAG
B2M 標的部位の DNA 配列	4704	MG29-1-B2M-標的部位-E4	TGAACGCGTGGAGGGGCGCTTG

【０４３１】

【表２２－７】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
B2M 標的部位の DNA 配列	4705	MG29-1-B2M-標的部位-F4	CTCCCCACGGTGTGGCCCCACA
B2M 標的部位の DNA 配列	4706	MG29-1-B2M-標的部位-G4	GGACGAGCCTACCCGTCCCCCA
B2M 標的部位の DNA 配列	4707	MG29-1-B2M-標的部位-H4	TCCCGACCCTCCCGTCGCCGTA
B2M 標的部位の DNA 配列	4708	MG29-1-B2M-標的部位-A5	GCGGGAGCGCATGCCTTTTGGC
B2M 標的部位の DNA 配列	4709	MG29-1-B2M-標的部位-B5	CGGGAGCGCATGCCTTTTGGCT
B2M 標的部位の DNA 配列	4710	MG29-1-B2M-標的部位-C5	GGCTGTAATTCGTGCATTTTTT
B2M 標的部位の DNA 配列	4711	MG29-1-B2M-標的部位-D5	GCTGTAATTCGTGCATTTTTTT
B2M 標的部位の DNA 配列	4712	MG29-1-B2M-標的部位-E5	TTTTTAAGAAAAACGCCTGCCT
B2M 標的部位の DNA 配列	4713	MG29-1-B2M-標的部位-F5	TTTTAAGAAAAACGCCTGCCTT
B2M 標的部位の DNA 配列	4714	MG29-1-B2M-標的部位-G5	TTTAAGAAAAACGCCTGCCTTC
B2M 標的部位の DNA 配列	4715	MG29-1-B2M-標的部位-H5	TTAAGAAAAACGCCTGCCTTCT
B2M 標的部位の DNA 配列	4716	MG29-1-B2M-標的部位-A6	TAAGAAAAACGCCTGCCTTCTG
B2M 標的部位の DNA 配列	4717	MG29-1-B2M-標的部位-B6	AAGAAAAACGCCTGCCTTCTGC
B2M 標的部位の DNA 配列	4718	MG29-1-B2M-標的部位-C6	AGAAAAACGCCTGCCTTCTGCG
B2M 標的部位の DNA 配列	4719	MG29-1-B2M-標的部位-D6	CGTACAGAGGGCTTCCTCTTTG
B2M 標的部位の DNA 配列	4720	MG29-1-B2M-標的部位-E6	GTACAGAGGGCTTCCTCTTTGG
B2M 標的部位の DNA 配列	4721	MG29-1-B2M-標的部位-F6	GCTCTTTGCCTGGTTGTTTCCA
B2M 標的部位の DNA 配列	4722	MG29-1-B2M-標的部位-G6	CCTGGTTGTTTCCAAGATGTAC
B2M 標的部位の DNA 配列	4723	MG29-1-B2M-標的部位-H6	CAAGATGTACTGTGCCTCTTAC
B2M 標的部位の DNA 配列	4724	MG29-1-B2M-標的部位-A7	CAAAACCGAAAGTAAGAGGCAC
B2M 標的部位の DNA 配列	4725	MG29-1-B2M-標的部位-B7	AAAACCGAAAGTAAGAGGCACA
B2M 標的部位の DNA 配列	4726	MG29-1-B2M-標的部位-C7	CTCTGGAGAATCTCACGCAGAA
B2M 標的部位の DNA 配列	4727	MG29-1-B2M-標的部位-D7	TCTTAAAAAAAAATGCACGAAT

【０４３２】

【表２２－８】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
B2M 標的部位の DNA 配列	4728	MG29-1-B2M-標的部位-E7	CTTAAAAAAAAATGCACGAATT
B2M 標的部位の DNA 配列	4729	MG29-1-B2M-標的部位-F7	TTAAAAAAAAATGCACGAATTA
B2M 標的部位の DNA 配列	4730	MG29-1-B2M-標的部位-G7	TTCTTCAAAATGGAGGTGGCTT
B2M 標的部位の DNA 配列	4731	MG29-1-B2M-標的部位-H7	GCCAGAGTGGAAATGGAATTGG
B2M 標的部位の DNA 配列	4732	MG29-1-B2M-標的部位-A8	GAGTACCTGAGGAATATCGGGA
B2M 標的部位の DNA 配列	4733	MG29-1-B2M-標的部位-B8	ACTTGGGGCTAACTTGGTGTCA
B2M 標的部位の DNA 配列	4734	MG29-1-B2M-標的部位-C8	CATTTGGTCATCGATTTCTCCC
B2M 標的部位の DNA 配列	4735	MG29-1-B2M-標的部位-D8	GTCATCGATTTCTCCCAATTCC
B2M 標的部位の DNA 配列	4736	MG29-1-B2M-標的部位-E8	TCCCAATTCCATTTCCACTCTG
B2M 標的部位の DNA 配列	4737	MG29-1-B2M-標的部位-F8	CACTCTGGCCAAATGAGCTTCC
B2M 標的部位の DNA 配列	4738	MG29-1-B2M-標的部位-G8	GAAGAATAAACCGTGACTTGGT
B2M 標的部位の DNA 配列	4739	MG29-1-B2M-標的部位-H8	AAGAATAAACCGTGACTTGGTA
B2M 標的部位の DNA 配列	4740	MG29-1-B2M-標的部位-A9	CCTCATAATTCCTCTATACATG
B2M 標的部位の DNA 配列	4741	MG29-1-B2M-標的部位-B9	TTGTTTTTTTTCTAGCAGATTT
B2M 標的部位の DNA 配列	4742	MG29-1-B2M-標的部位-C9	TGTTTTTTTTCTAGCAGATTTC
B2M 標的部位の DNA 配列	4743	MG29-1-B2M-標的部位-D9	GTTTTTTTTCTAGCAGATTTCT
B2M 標的部位の DNA 配列	4744	MG29-1-B2M-標的部位-E9	TTTTTTTTCTAGCAGATTTCTA
B2M 標的部位の DNA 配列	4745	MG29-1-B2M-標的部位-F9	TTTTCTAGCAGATTTCTAGCAG
B2M 標的部位の DNA 配列	4746	MG29-1-B2M-標的部位-G9	TTTCTAGCAGATTTCTAGCAGT
B2M 標的部位の DNA 配列	4747	MG29-1-B2M-標的部位-H9	TTCTAGCAGATTTCTAGCAGTA
B2M 標的部位の DNA 配列	4748	MG29-1-B2M-標的部位-A10	TCTAGCAGATTTCTAGCAGTAT
B2M 標的部位の DNA 配列	4749	MG29-1-B2M-標的部位-B10	CTAGCAGATTTCTAGCAGTATC
B2M 標的部位の DNA 配列	4750	MG29-1-B2M-標的部位-C10	TAGCAGATTTCTAGCAGTATCT
B2M 標的部位の DNA 配列	4751	MG29-1-B2M-標的部位-D10	TAGCAGTATCTTCTGTCACTGG
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5'及び 3'AltR 修飾を指す			

【０４３３】

実施例１６－ＣＤ２のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＭＢＣから精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号４７５２～４８３６）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＴ細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（配列番号４８３７～４９２１）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図６２）。

【０４３４】

【表２３－１】

表１４Ｅ：実施例４２のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4752	MG29-1-CD2-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrGrUrArArArUrUrUrGrUrArGrCrCrArGrCrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4753	MG29-1-CD2-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrCrCrArGrCrUrUrCrUrUrCrUrGrArUrUrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4754	MG29-1-CD2-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrCrUrUrArUrGrCrUrUrArCrCrUrUrUrGrGrArA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4755	MG29-1-CD2-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArGrArArArCrArUrUrGrArArArArUrCrArGrArA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4756	MG29-1-CD2-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrUrUrUrArUrArGrGrUrGrCrArGrUrCrUrCrC/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4757	MG29-1-CD2-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrUrArUrArGrGrUrGrCrArGrUrCrUrCrCrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4758	MG29-1-CD2-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrArGrGrUrGrCrArGrUrCrUrCrCrArArArGrArG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4759	MG29-1-CD2-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrArGrGrUrGrCrArGrUrCrUrCrCrArArArGrArGrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4760	MG29-1-CD2-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrGrUrGrCrArGrUrCrUrCrCrArArArGrArGrArU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4761	MG29-1-CD2-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArArUrGrArGrUrGrArUrGrArUrArUrUrGrArCrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4762	MG29-1-CD2-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArUrGrArGrUrGrArUrGrArUrArUrUrGrArCrGrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4763	MG29-1-CD2-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrGrArArArArGrArUrArCrArUrArUrArArGrC/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4764	MG29-1-CD2-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArUrGrGrArArCrUrCrUrGrArArArArUrUrArA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4765	MG29-1-CD2-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArArCrArCrArUrUrUrUrUrCrCrUrUrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4766	MG29-1-CD2-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArArCrArCrArUrUrUrUrUrCrCrUrUrUrG/AltR2/

【０４３５】

【表２３－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4767	MG29-1-CD2-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArArCrArCrArUrUrUrUrUrUrCrCrUrUrUrUrGrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4768	MG29-1-CD2-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArCrArCrArUrUrUrUrUrUrCrCrUrUrUrUrGrUrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4769	MG29-1-CD2-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrCrUrUrUrUrGrUrArUrCrArUrArUrArUrUrGrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4770	MG29-1-CD2-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrUrUrUrGrUrArUrCrArUrArUrArUrUrGrArU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4771	MG29-1-CD2-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrUrUrGrUrArUrCrArUrArUrArUrUrGrArUrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4772	MG29-1-CD2-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrUrGrUrArUrCrArUrArUrArUrUrGrArUrArC/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4773	MG29-1-CD2-sgRNA-F3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArUrCrArUrArUrArUrUrGrArUrArCrCrUrUrGrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4774	MG29-1-CD2-sgRNA-G3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrCrArUrArUrArUrUrGrArUrArCrCrUrUrGrUrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4775	MG29-1-CD2-sgRNA-H3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArGrUrUrCrCrArUrUrUrUrUrArArArUrArGrC/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4776	MG29-1-CD2-sgRNA-A4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArGrUrUrCrCrArUrUrUrUrUrArArArUrArGrCrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4777	MG29-1-CD2-sgRNA-B4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArArUrArGrCrUrUrArUrArUrGrUrArUrCrUrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4778	MG29-1-CD2-sgRNA-C4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArUrArGrCrUrUrArUrArUrGrUrArUrCrUrUrU/AltR2/

【０４３６】

【表２３－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4779	MG29-1-CD2-sgRNA-D4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrArGrCrUrUrArUrArUrGrUrArUrCrUrUrUrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4780	MG29-1-CD2-sgRNA-E4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrUrGrArArArGrUrCrUrCrUrUrUrCrUrCrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4781	MG29-1-CD2-sgRNA-F4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrArArArGrUrCrUrCrUrUrUrCrUrCrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4782	MG29-1-CD2-sgRNA-G4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrGrArArArGrUrCrUrCrUrUrUrCrUrCrUrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4783	MG29-1-CD2-sgRNA-H4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrUrCrUrGrArArUrUrGrUrGrCrArArUrCrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4784	MG29-1-CD2-sgRNA-A5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrArArUrUrGrUrGrCrArArUrCrUrUrUrUrUrCrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4785	MG29-1-CD2-sgRNA-B5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArArUrUrGrUrGrCrArArUrCrUrUrUrUrUrCrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4786	MG29-1-CD2-sgRNA-C5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrGrUrCrUrGrArArGrUrUrUrUrUrCrCrCrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4787	MG29-1-CD2-sgRNA-D5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrGrUrCrUrGrArArGrUrUrUrUrUrCrCrCrArU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4788	MG29-1-CD2-sgRNA-E5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrCrUrGrArArGrUrUrUrUrUrCrCrCrArUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4789	MG29-1-CD2-sgRNA-F5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrCrCrArUrUrUrUrArUrArUrCrGrUrCrArArUrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4790	MG29-1-CD2-sgRNA-G5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrCrArUrUrUrUrArUrArUrCrGrUrCrArArUrArU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4791	MG29-1-CD2-sgRNA-H5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrArUrUrUrUrArUrArUrCrGrUrCrArArUrArUrC/AltR2/

【０４３７】

【表２３－４】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4792	MG29-1-CD2-sgRNA-A6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArUrUrUrArUrArUrCrGrUrCrArArUrArUrCrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4793	MG29-1-CD2-sgRNA-B6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrArUrCrGrUrCrArArUrArUrCrArArUrCrArCrUrCrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4794	MG29-1-CD2-sgRNA-C6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrCrGrUrCrArArUrArUrCrArArUrCrArCrUrCrArU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4795	MG29-1-CD2-sgRNA-D6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArArCrUrArGrGrArArUrGrUrCrCrArArGrUrUrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4796	MG29-1-CD2-sgRNA-E6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArGrGrCrArUrUrCrGrUrArArUrCrUrCrUrUrUrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4797	MG29-1-CD2-sgRNA-F6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrCrUrUrUrUrArGrArGrArArGrGrUrCrUrC/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4798	MG29-1-CD2-sgRNA-G6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrArGrArGrArGrGrGrUrCrUrCrArArArArC/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4799	MG29-1-CD2-sgRNA-H6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrArGrArGrGrGrUrCrUrCrArArArArArCrCrArArA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4800	MG29-1-CD2-sgRNA-A7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArGrArGrGrGrUrCrUrCrArArArArArCrCrArArArG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4801	MG29-1-CD2-sgRNA-B7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrArGrGrGrUrCrUrCrArArArArArCrCrArArArGrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4802	MG29-1-CD2-sgRNA-C7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArGrArGrGrGrUrCrArUrCrArCrArCrArCrArArG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4803	MG29-1-CD2-sgRNA-D7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrCrCrUrGrCrUrGrUrGrCrArCrUrUrGrArArUrU/AltR2/

【０４３８】

【表２３－５】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4804	MG29-1-CD2-sgRNA-E7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArCrUrCrArGrGrCrUrGrGrUrGrGrUrCrCrArCrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4805	MG29-1-CD2-sgRNA-F7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArCrUrCrArGrGrCrUrGrGrUrGrGrUrCrCrArCrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4806	MG29-1-CD2-sgRNA-G7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArUrGrUrUrUrCrCrCrArUrCrUrUrGrArUrArCrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4807	MG29-1-CD2-sgRNA-H7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArUrGrUrUrUrCrCrCrArUrCrUrUrGrArUrArCrArG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4808	MG29-1-CD2-sgRNA-A8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArUrCrUrUrGrArUrArCrArGrGrUrUrUrArArUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4809	MG29-1-CD2-sgRNA-B8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrCrGrGrGrGrUrCrArGrUrUrCrCrArUrUrCrArU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4810	MG29-1-CD2-sgRNA-C8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArGrGrArArArArGrGrUrCrUrGrGrArCrArUrCrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4811	MG29-1-CD2-sgRNA-D8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArGrArArArGrGrUrCrUrGrGrArCrArUrCrUrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4812	MG29-1-CD2-sgRNA-E8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrCrArCrUrGrCrUrCrGrUrUrUrCrUrArUrArU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4813	MG29-1-CD2-sgRNA-F8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrArUrArUrCrArCrCrArArArArGrGrArArArArArA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4814	MG29-1-CD2-sgRNA-G8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrArUrCrArCrCrArArArArGrGrArArArArArC/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4815	MG29-1-CD2-sgRNA-H8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrGrArCrUrCrCrUrCrUrGrUrUrUrUrUrUrCrCrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4816	MG29-1-CD2-sgRNA-A9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrCrUrUrUrUrGrGrUrGrArUrArUrArGrArArArA/AltR2/

【０４３９】

【表２３－６】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4817	MG29-1-CD2-sgRNA-B9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrUrUrUrGrGrUrGrArUrArUrArGrArArArArC/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4818	MG29-1-CD2-sgRNA-C9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrUrUrGrGrUrGrArUrArUrArGrArArArArCrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4819	MG29-1-CD2-sgRNA-D9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrUrGrGrUrGrArUrArUrArGrArArArArCrGrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4820	MG29-1-CD2-sgRNA-E9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrArUrArUrArGrArArArArCrGrArGrCrArGrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4821	MG29-1-CD2-sgRNA-F9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrArUrArUrArGrArArArArCrGrArGrCrArGrUrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4822	MG29-1-CD2-sgRNA-G9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrCrArArArArGrGrArArGrArArGrUrGrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4823	MG29-1-CD2-sgRNA-H9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrGrCrArGrArUrGrArGrGrArGrCrUrGrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4824	MG29-1-CD2-sgRNA-A10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrUrGrCrArGrArUrGrArGrGrArGrCrUrGrGrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4825	MG29-1-CD2-sgRNA-B10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrCrUrUrUrUrUrArArUrUrArGrArGrGrArArG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4826	MG29-1-CD2-sgRNA-C10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArArUrUrArGrArGrGrArGrGrGrArCrArArU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4827	MG29-1-CD2-sgRNA-D10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArUrUrArGrArGrGrGrArGrGrGrArCrArArUrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4828	MG29-1-CD2-sgRNA-E10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrUrArGrArGrGrArGrGrGrArCrArArUrGrA/AltR2/

【０４４０】

【表２３－７】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4829	MG29-1-CD2-sgRNA-F10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrArGrArGrGrArArGrGrGrGrArCrArArUrGrArG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4830	MG29-1-CD2-sgRNA-G10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrCrUrGrCrCrCrCrArUrGrGrGrGrArGrGrUrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4831	MG29-1-CD2-sgRNA-H10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrUrGrCrCrCrCrArUrGrGrGrGrArGrGrUrUrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4832	MG29-1-CD2-sgRNA-A11	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrUrGrArArCrUrCrGrArGrGrUrCrUrGrGrGrGrA/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4833	MG29-1-CD2-sgRNA-B11	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrGrArArCrUrCrGrArGrGrUrCrUrGrGrGrGrArG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4834	MG29-1-CD2-sgRNA-C11	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrUrGrGrUrGrArArCrUrUrGrUrGrGrCrCrCrG/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4835	MG29-1-CD2-sgRNA-D11	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrGrGrCrUrUrCrCrGrGrCrCrCrCrUrUrUrCrU/AltR2/
CD2を標的とするMG29-1 sgRNA	4836	MG29-1-CD2-sgRNA-E11	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrArGrUrArGrCrUrArCrUrCrUrGrUrGrGrCrCrU/AltR2/
CD2標的部位のDNA配列	4837	MG29-1-CD2-標的部位-A1	CATGTAAATTTGTAGCCAGCTT
CD2標的部位のDNA配列	4838	MG29-1-CD2-標的部位-B1	TAGCCAGCTTCCTTCTGATTTT
CD2標的部位のDNA配列	4839	MG29-1-CD2-標的部位-C1	ACTCTTATGCTTACCTTTGGAA
CD2標的部位のDNA配列	4840	MG29-1-CD2-標的部位-D1	GAAGAAACATTGAAAATCAGAA
CD2標的部位のDNA配列	4841	MG29-1-CD2-標的部位-E1	GCTTTTTATAGGTGCAGTCTCC

【０４４１】

【表２３－８】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2 標的部位の DNA 配列	4842	MG29-1-CD2-標的部位-F1	CTTTTTATAGGTGCAGTCTCCA
CD2 標的部位の DNA 配列	4843	MG29-1-CD2-標的部位-G1	TATAGGTGCAGTCTCCAAAGAG
CD2 標的部位の DNA 配列	4844	MG29-1-CD2-標的部位-H1	ATAGGTGCAGTCTCCAAAGAGA
CD2 標的部位の DNA 配列	4845	MG29-1-CD2-標的部位-A2	TAGGTGCAGTCTCCAAAGAGAT
CD2 標的部位の DNA 配列	4846	MG29-1-CD2-標的部位-B2	CAAATGAGTGATGATATTGACG
CD2 標的部位の DNA 配列	4847	MG29-1-CD2-標的部位-C2	AAATGAGTGATGATATTGACGA
CD2 標的部位の DNA 配列	4848	MG29-1-CD2-標的部位-D2	AAGGAAAAAGATACATATAAGC
CD2 標的部位の DNA 配列	4849	MG29-1-CD2-標的部位-E2	AAAATGGAACTCTGAAAATTAA
CD2 標的部位の DNA 配列	4850	MG29-1-CD2-標的部位-F2	TTCCAACACATTTTTTCCTTTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4851	MG29-1-CD2-標的部位-G2	TCCAACACATTTTTTCCTTTTG
CD2 標的部位の DNA 配列	4852	MG29-1-CD2-標的部位-H2	CCAACACATTTTTTCCTTTTGT
CD2 標的部位の DNA 配列	4853	MG29-1-CD2-標的部位-A3	CAACACATTTTTTCCTTTTGTA
CD2 標的部位の DNA 配列	4854	MG29-1-CD2-標的部位-B3	TTCCTTTTGTATCATATATTGA
CD2 標的部位の DNA 配列	4855	MG29-1-CD2-標的部位-C3	TCCTTTTGTATCATATATTGAT
CD2 標的部位の DNA 配列	4856	MG29-1-CD2-標的部位-D3	CCTTTTGTATCATATATTGATA

【０４４２】

【表２３－９】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2 標的部位の DNA 配列	4857	MG29-1-CD2-標的部位-E3	CTTTTGTATCATATATTGATAC
CD2 標的部位の DNA 配列	4858	MG29-1-CD2-標的部位-F3	GTATCATATATTGATACCTTGT
CD2 標的部位の DNA 配列	4859	MG29-1-CD2-標的部位-G3	TATCATATATTGATACCTTGTA
CD2 標的部位の DNA 配列	4860	MG29-1-CD2-標的部位-H3	CAGAGTTCCATTTTTAAATAGC
CD2 標的部位の DNA 配列	4861	MG29-1-CD2-標的部位-A4	AGAGTTCCATTTTTAAATAGCT
CD2 標的部位の DNA 配列	4862	MG29-1-CD2-標的部位-B4	TAAATAGCTTATATGTATCTTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4863	MG29-1-CD2-標的部位-C4	AAATAGCTTATATGTATCTTTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4864	MG29-1-CD2-標的部位-D4	AATAGCTTATATGTATCTTTTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4865	MG29-1-CD2-標的部位-E4	TCCTTGAAAGTCTCTTTCTCTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4866	MG29-1-CD2-標的部位-F4	CCTTGAAAGTCTCTTTCTCTTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4867	MG29-1-CD2-標的部位-G4	CTTGAAAGTCTCTTTCTCTTTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4868	MG29-1-CD2-標的部位-H4	TCTTTTCTGAATTGTGCAATCT
CD2 標的部位の DNA 配列	4869	MG29-1-CD2-標的部位-A5	CTGAATTGTGCAATCTTTTTCT
CD2 標的部位の DNA 配列	4870	MG29-1-CD2-標的部位-B5	TGAATTGTGCAATCTTTTTCTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4871	MG29-1-CD2-標的部位-C5	TCTTGTCTGAAGTTTTTTCCCA

【０４４３】

【表２３－１０】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2 標的部位の DNA 配列	4872	MG29-1-CD2-標的部位-D5	CTTGTCTGAAGTTTTTTCCCAT
CD2 標的部位の DNA 配列	4873	MG29-1-CD2-標的部位-E5	TTGTCTGAAGTTTTTTCCCATT
CD2 標的部位の DNA 配列	4874	MG29-1-CD2-標的部位-F5	TTCCCATTTTATATCGTCAATA
CD2 標的部位の DNA 配列	4875	MG29-1-CD2-標的部位-G5	TCCCATTTTATATCGTCAATAT
CD2 標的部位の DNA 配列	4876	MG29-1-CD2-標的部位-H5	CCCATTTTATATCGTCAATATC
CD2 標的部位の DNA 配列	4877	MG29-1-CD2-標的部位-A6	CCATTTTATATCGTCAATATCA
CD2 標的部位の DNA 配列	4878	MG29-1-CD2-標的部位-B6	ATATCGTCAATATCATCACTCA
CD2 標的部位の DNA 配列	4879	MG29-1-CD2-標的部位-C6	TATCGTCAATATCATCACTCAT
CD2 標的部位の DNA 配列	4880	MG29-1-CD2-標的部位-D6	AAAACTAGGAATGTCCAAGTTG
CD2 標的部位の DNA 配列	4881	MG29-1-CD2-標的部位-E6	CAAGGCATTCGTAATCTCTTTG
CD2 標的部位の DNA 配列	4882	MG29-1-CD2-標的部位-F6	CTTTCTTTTTAGAGAGGGTCTC
CD2 標的部位の DNA 配列	4883	MG29-1-CD2-標的部位-G6	TTTTTAGAGAGGGTCTCAAAAC
CD2 標的部位の DNA 配列	4884	MG29-1-CD2-標的部位-H6	TAGAGAGGGTCTCAAAACCAAA
CD2 標的部位の DNA 配列	4885	MG29-1-CD2-標的部位-A7	AGAGAGGGTCTCAAAACCAAAG
CD2 標的部位の DNA 配列	4886	MG29-1-CD2-標的部位-B7	GAGAGGGTCTCAAAACCAAAGA

【０４４４】

【表２３－１１】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2標的部位のDNA配列	4887	MG29-1-CD2-標的部位-C7	TCAGAGGGTCATCACACACAAG
CD2標的部位のDNA配列	4888	MG29-1-CD2-標的部位-D7	TTCCCTGCTGTGCACTTGAATT
CD2標的部位のDNA配列	4889	MG29-1-CD2-標的部位-E7	GCACTCAGGCTGGTGGTCCACT
CD2標的部位のDNA配列	4890	MG29-1-CD2-標的部位-F7	CACTCAGGCTGGTGGTCCACTT
CD2標的部位のDNA配列	4891	MG29-1-CD2-標的部位-G7	AGATGTTTCCCATCTTGATACA
CD2標的部位のDNA配列	4892	MG29-1-CD2-標的部位-H7	GATGTTTCCCATCTTGATACAG
CD2標的部位のDNA配列	4893	MG29-1-CD2-標的部位-A8	CCATCTTGATACAGGTTTAATT
CD2標的部位のDNA配列	4894	MG29-1-CD2-標的部位-B8	ATTCGGGGTCAGTTCCATTCAT
CD2標的部位のDNA配列	4895	MG29-1-CD2-標的部位-C8	CCATCTTGATACAGGTTTAATT
CD2標的部位のDNA配列	4896	MG29-1-CD2-標的部位-D8	CAGAGAAAGGTCTGGACATCTA
CD2標的部位のDNA配列	4897	MG29-1-CD2-標的部位-E8	TGGCACTGCTCGTTTTCTATAT
CD2標的部位のDNA配列	4898	MG29-1-CD2-標的部位-F8	CTATATCACCAAAAGGAAAAAA
CD2標的部位のDNA配列	4899	MG29-1-CD2-標的部位-G8	TATATCACCAAAAGGAAAAAAC
CD2標的部位のDNA配列	4900	MG29-1-CD2-標的部位-H8	TCCGACTCCTCTGTTTTTTCCT
CD2標的部位のDNA配列	4901	MG29-1-CD2-標的部位-A9	TTCCTTTTGGTGATATAGAAAA
CD2標的部位のDNA配列	4902	MG29-1-CD2-標的部位-B9	TCCTTTTGGTGATATAGAAAAC

【０４４５】

【表２３－１２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD2 標的部位の DNA 配列	4903	MG29-1-CD2-標的部位-C9	CCTTTTGGTGATATAGAAAACG
CD2 標的部位の DNA 配列	4904	MG29-1-CD2-標的部位-D9	CTTTTGGTGATATAGAAAACGA
CD2 標的部位の DNA 配列	4905	MG29-1-CD2-標的部位-E9	GGTGATATAGAAAACGAGCAGT
CD2 標的部位の DNA 配列	4906	MG29-1-CD2-標的部位-F9	GTGATATAGAAAACGAGCAGTG
CD2 標的部位の DNA 配列	4907	MG29-1-CD2-標的部位-G9	TCTGCAAAAGGAAGAGAAGTGG
CD2 標的部位の DNA 配列	4908	MG29-1-CD2-標的部位-H9	GTTGTTGCAGATGAGGAGCTGG
CD2 標的部位の DNA 配列	4909	MG29-1-CD2-標的部位-A10	TTGTTGCAGATGAGGAGCTGGA
CD2 標的部位の DNA 配列	4910	MG29-1-CD2-標的部位-B10	TATCTTTTTTAATTAGAGGAAG
CD2 標的部位の DNA 配列	4911	MG29-1-CD2-標的部位-C10	TTAATTAGAGGAAGGGGACAAT
CD2 標的部位の DNA 配列	4912	MG29-1-CD2-標的部位-D10	TAATTAGAGGAAGGGGACAATG
CD2 標的部位の DNA 配列	4913	MG29-1-CD2-標的部位-E10	AATTAGAGGAAGGGGACAATGA
CD2 標的部位の DNA 配列	4914	MG29-1-CD2-標的部位-F10	ATTAGAGGAAGGGGACAATGAG
CD2 標的部位の DNA 配列	4915	MG29-1-CD2-標的部位-G10	CTGCTGCCCCATGGGGAGGTTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4916	MG29-1-CD2-標的部位-H10	TGCTGCCCCATGGGGAGGTTTT
CD2 標的部位の DNA 配列	4917	MG29-1-CD2-標的部位-A11	GGCTGAACTCGAGGTCTGGGGA
CD2 標的部位の DNA 配列	4918	MG29-1-CD2-標的部位-B11	GCTGAACTCGAGGTCTGGGGAG
CD2 標的部位の DNA 配列	4919	MG29-1-CD2-標的部位-C11	TGCTGGTGAACTTGTGTGCCCG
CD2 標的部位の DNA 配列	4920	MG29-1-CD2-標的部位-D11	GTGGGGCTTCCGGCCCCTTTCT
CD2 標的部位の DNA 配列	4921	MG29-1-CD2-標的部位-E11	TTCAGTAGCTACTCTGTGGGCT
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5'及び 3'AltR 修飾を指す			

【０４４６】

実施例１７－ＣＤ５のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＭＢＣから精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号４９２２～４９４５）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＴ細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（配列番号４９４６～４９６９）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図６３）。

【０４４７】

【表２４－１】

表１４Ｆ：実施例４３のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4922	MG29-1-CD5-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrArGrUrCrGrCrUrUrCrCrUrGrCrCrUrCrGrGrA/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4923	MG29-1-CD5-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArUrGrUrGrGrCrUrCrUrUrCrCrUrUrArCrCrU/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4924	MG29-1-CD5-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArCrCrCrCrCrArGrArUrUrUrCrCrArGrGrCrArA/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4925	MG29-1-CD5-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrGrCrArArGrGrCrUrCrArCrCrCrGrUrUrCrCrA/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4926	MG29-1-CD5-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrCrCrArGrArGrCrUrGrGrGrCrCrGrGrArGrC/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4927	MG29-1-CD5-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrUrGrUrGrGrCrUrGrCrArGrUrUrGrGrArGrArA/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4928	MG29-1-CD5-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArCrGrCrUrUrGrArCrUrGrGrGrUrCrCrUrCrCrC/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4929	MG29-1-CD5-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrGrCrUrUrGrArCrUrGrGrGrGrUrCrCrUrCrCrCrA/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4930	MG29-1-CD5-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrGrGrGrCrUrUrGrArUrUrUrUrCrCrUrGrArArG/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4931	MG29-1-CD5-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrGrGrCrUrUrGrArUrUrUrUrCrCrUrGrArArGrC/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4932	MG29-1-CD5-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrArArGrCrArArUrGrCrUrCrCrArGrGrGrArG/AltR2/

【０４４８】

【表２４－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4933	MG29-1-CD5-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrArArGrCrArArUrGrCrUrCrCrArGrGrGrArGrG/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4934	MG29-1-CD5-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArUrUrGrCrUrUrCrCrCrCrUrCrUrCrArGrGrUrU/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4935	MG29-1-CD5-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrCrCrCrArArGrGrUrGrCrArGrArGrCrCrCrGrUrC/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4936	MG29-1-CD5-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArGrArGrArArArUrUrCrCrUrArCrUrGrCrArArG/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4937	MG29-1-CD5-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrCrCrCrArArArGrUrUrCrGrUrGrGrCrArCrUrG/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4938	MG29-1-CD5-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrArCrUrArGrCrUrUrCrUrUrGrUrArGrGrGrCrArA/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4939	MG29-1-CD5-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrCrUrCrUrUrUrGrCrCrCrArGrUrCrCrGrCrCrA/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4940	MG29-1-CD5-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrUrCrArUrUrUrCrCrCrGrUrUrGrGrGrCrCrCrArArU/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4941	MG29-1-CD5-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrCrArUrUrUrCrCrCrGrUrUrGrGrGrCrCrArArUrC/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4942	MG29-1-CD5-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrCrGrCrArArCrCrArCrArCrGrGrCrArArCrCrG/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4943	MG29-1-CD5-sgRNA-F3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrCrCrCrArGrCrUrCrUrGrGrArArGrGrGrGrC/AltR2/
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4944	MG29-1-CD5-sgRNA-G3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrArGrCrUrCrUrGrGrArArGrGrGrGrCrUrCrUrG/AltR2/

【０４４９】

【表２４－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD5を標的とするMG29-1 sgRNA	4945	MG29-1-CD5-sgRNA-H3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrCrCrUrCrUrGrArGrCrCrCrCrArUrGrCrArGrA/AltR2/
CD5標的部位のDNA配列	4946	MG29-1-CD5-標的部位-A1	TGCAGTCGCTTCCTGCCTCGGA
CD5標的部位のDNA配列	4947	MG29-1-CD5-標的部位-B1	TCCATGTGGCTCTTCCTTACCT
CD5標的部位のDNA配列	4948	MG29-1-CD5-標的部位-C1	TGACCCCCAGATTTCCAGGCAA
CD5標的部位のDNA配列	4949	MG29-1-CD5-標的部位-D1	CAGGCAAGGCTCACCCGTTCCA
CD5標的部位のDNA配列	4950	MG29-1-CD5-標的部位-E1	CAGCCAGAGCTGGGGCCGGAGC
CD5標的部位のDNA配列	4951	MG29-1-CD5-標的部位-F1	TGCTGTGGCTGCAGTTGGAGAA
CD5標的部位のDNA配列	4952	MG29-1-CD5-標的部位-G1	GACGCTTGACTGGGGTCCTCCC
CD5標的部位のDNA配列	4953	MG29-1-CD5-標的部位-H1	ACGCTTGACTGGGGTCCTCCCA
CD5標的部位のDNA配列	4954	MG29-1-CD5-標的部位-A2	CTGGGGCTTGATTTTCCTGAAG
CD5標的部位のDNA配列	4955	MG29-1-CD5-標的部位-B2	TGGGGCTTGATTTTCCTGAAGC
CD5標的部位のDNA配列	4956	MG29-1-CD5-標的部位-C2	CCTGAAGCAATGCTCCAGGGAG
CD5標的部位のDNA配列	4957	MG29-1-CD5-標的部位-D2	CTGAAGCAATGCTCCAGGGAGG
CD5標的部位のDNA配列	4958	MG29-1-CD5-標的部位-E2	CCATTGCTTCCCCTCTCAGGTT

【０４５０】

【表２４－４】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
CD5標的部位のDNA配列	4959	MG29-1-CD5-標的部位-F2	CAGCCCAAGGTGCAGAGCCGTC
CD5標的部位のDNA配列	4960	MG29-1-CD5-標的部位-G2	GGAGAGAAATTCCTACTGCAAG
CD5標的部位のDNA配列	4961	MG29-1-CD5-標的部位-H2	TCTCCCAAAGTTCGTGGCACTG
CD5標的部位のDNA配列	4962	MG29-1-CD5-標的部位-A3	TTCACTAGCTTCTTGTAGGCAA
CD5標的部位のDNA配列	4963	MG29-1-CD5-標的部位-B3	TTGTCTCTTGCCCAGTCCGCCA
CD5標的部位のDNA配列	4964	MG29-1-CD5-標的部位-C3	GGTTCATTCCCGTTGGGCCAAT
CD5標的部位のDNA配列	4965	MG29-1-CD5-標的部位-D3	GTTCATTCCCGTTGGGCCAATC
CD5標的部位のDNA配列	4966	MG29-1-CD5-標的部位-E3	CATCGCAACCACACGGCAACCG
CD5標的部位のDNA配列	4967	MG29-1-CD5-標的部位-F3	TTTCCCCAGCTCTGGAAGGGGC
CD5標的部位のDNA配列	4968	MG29-1-CD5-標的部位-G3	CCCAGCTCTGGAAGGGGCTCTG
CD5標的部位のDNA配列	4969	MG29-1-CD5-標的部位-H3	CAGCCTCTGAGCCCCATGCAGA
r;糖リボースを含む天然RNA結合(例えば、A塩基のリボース又はRNA形態は、rAと記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A塩基のデオキシリボース形態は、dAと記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの1つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1及びAltR2は、IDT技術の専有の5'及び3'AltR修飾を指す			

【０４５１】

実施例１８－マウスＴＲＡＣのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代Ｔ細胞を、Ｃ５７ＢＬ／６マウス脾臓から精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号５０５６～５１２５）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーター及び１００ｐｍｏｌトランスフェクションエンハンサー（ＩＤＴ）を使用してＴ細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（配列番号５１２６～５１９５）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図６４Ａ）。

【０４５２】

【表２５－１】

表１４Ｇ：実施例４４のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5056	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrCrCrArArArUrCrArArUrGrUrGrCrCrGrArA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5057	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrArUrArUrCrUrUrGrGrCrArGrGrUrGrArArGrC/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5058	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrUrCrCrArGrCrArCrArGrUrUrUrUrGrUrCrArG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5059	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrCrArGrUrGrArUrGrArArCrGrUrUrCrCrArGrArU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5060	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArGrUrGrArUrGrArArCrGrUrUrCrCrArGrArUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5061	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrGrCrArCrArUrUrGrArUrUrUrGrGrGrArGrUrCrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5062	MG29-1-mTRAC-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrArCrArUrUrGrArUrUrUrGrGrGrArGrUrCrArA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5063	MG29-1-mTRAC-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArGrUrCrArArArGrUrCrGrGrUrGrArArCrArGrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5064	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArCrUrGrGrUrArCrArCrArGrCrArGrGrUrUrCrUrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5065	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrGrGrUrArCrArCrArGrCrArGrGrUrUrCrUrGrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5066	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrCrCrUrUrUrUrArGrArCrGrUrUrCrCrCrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5067	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrUrUrUrUrArGrArCrGrUrUrCrCrCrUrGrUrGrA/AltR2/

【０４５３】

【表２５－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5068	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrUrUrArGrArCrGrUrUrCrCrCrUrGrUrGrArU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5069	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArCrGrUrUrCrCrCrUrGrUrGrArUrGrCrCrArCrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5070	MG29-1-mTRAC-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArCrGrUrUrCrCrCrUrGrUrGrArUrGrCrCrArCrGrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5071	MG29-1-mTRAC-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArGrCrUrUrUrUrCrUrCrArGrUrCrArArCrGrUrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5072	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrArGrUrCrArArCrGrUrGrGrCrArUrCrArCrArG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5073	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArGrUrCrArArCrGrUrGrGrCrArUrCrArCrArG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5074	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrArGrArUrArUrGrArArCrCrUrArArArCrUrUrUrC/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5075	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArUrArUrGrArArCrCrUrArArArCrUrUrUrCrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5076	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArArCrCrUrGrUrCrArGrUrUrArUrGrGrGrGrArCrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5077	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrCrUrGrCrUrCrArUrGrArCrGrCrUrGrArGrGrCrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5078	MG29-1-mTRAC-sgRNA-G3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrCrCrUrUrCrUrUrArCrCrUrCrArArCrUrGrGrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5079	MG29-1-mTRAC-sgRNA-H3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrArGrGrArGrGrArArUrUrCrGrGrArGrUrCrCrCrA/AltR2/

【０４５４】

【表２５－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5080	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArGrGrArArGrGrUrUrGrCrUrGrGrArGrArGrCrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5081	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5082	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5083	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5084	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5085	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5086	MG29-1-mTRAC-sgRNA-G4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5087	MG29-1-mTRAC-sgRNA-H4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5088	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5089	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5090	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrUrUrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5091	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrUrUrUrArA/AltR2/

【０４５５】

【表２５－４】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5092	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrUrUrUrArArG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5093	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrUrUrUrArArGrC/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5094	MG29-1-mTRAC-sgRNA-G5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrUrUrUrArArGrCrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5095	MG29-1-mTRAC-sgRNA-H5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrUrUrUrArArArGrCrArU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5096	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrGrGrUrUrUrArUrUrUrUrUrUrUrArArGrCrArUrC/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5097	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrUrArArGrCrArUrCrCrArUrGrArArGrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5098	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrArArGrCrArUrCrCrArUrGrArArGrArArArUrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5099	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArArGrCrArUrCrCrArUrGrArArGrArArArUrGrC/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5100	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArGrCrArUrCrCrArUrGrArArGrArArArUrGrCrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5101	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrCrArUrCrCrArUrGrArArGrArArArUrGrCrArU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5102	MG29-1-mTRAC-sgRNA-G6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrArUrCrCrArUrGrArArGrArArArUrGrCrArUrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5103	MG29-1-mTRAC-sgRNA-H6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrArArGrGrUrGrUrArGrArArArUrUrArUrCrUrC/AltR2/

【０４５６】

【表２５－５】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5104	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrUrUrUrUrCrUrGrArArUrCrArCrCrUrUrUrArA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5105	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrUrUrUrCrUrGrArArUrCrArCrCrUrUrUrArArU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5106	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrArArUrCrArCrCrUrUrUrArArUrGrArUrGrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5107	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrArArUrCrArCrCrUrUrUrArArUrGrArUrGrUrC/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5108	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArArUrCrArCrCrUrUrUrArArUrGrArUrGrUrCrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5109	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrArUrGrUrCrArUrGrGrArCrArGrCrArGrArArU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5110	MG29-1-mTRAC-sgRNA-G7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArCrArCrUrUrGrArUrGrArArArGrArGrUrArArU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5111	MG29-1-mTRAC-sgRNA-H7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrArUrGrGrArUrGrCrUrUrArArArArArArArArA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5112	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrArCrArArCrArUrUrCrUrCrCrArArGrArGrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5113	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrArCrArArCrArUrUrCrUrCrCrArArGrArGrArU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5114	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArCrArArCrArUrUrCrUrCrCrArArGrArGrArUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5115	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArCrArArCrArUrUrCrUrCrCrArArGrArGrArUrUrU/AltR2/

【０４５７】

【表２５－６】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5116	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrArArCrArUrUrCrUrCrCrArArGrArGrArUrUrUrU/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5117	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArCrArUrUrCrUrCrCrArArGrArGrArUrUrUrUrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5118	MG29-1-mTRAC-sgRNA-G8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrArGrGrGrGrArGrUrCrUrGrCrCrArUrGrGrGrGrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5119	MG29-1-mTRAC-sgRNA-H8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrGrGrGrArGrUrCrUrGrCrCrArUrGrGrGrGrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5120	MG29-1-mTRAC-sgRNA-A9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrGrArArUrGrGrUrCrArGrCrArGrUrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5121	MG29-1-mTRAC-sgRNA-B9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrGrArArUrGrGrUrCrArGrCrArGrUrGrA/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5122	MG29-1-mTRAC-sgRNA-C9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrArArUrGrGrUrCrArGrCrArGrCrArGrUrGrArG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5123	MG29-1-mTRAC-sgRNA-D9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArArUrGrGrUrCrArGrCrArGrCrArGrUrGrArGrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5124	MG29-1-mTRAC-sgRNA-E9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrUrUrGrArArGrArArGrGrArArGrCrGrGrArGrGrG/AltR2/
マウスTRACを標的とするMG29-1 sgRNA	5125	MG29-1-mTRAC-sgRNA-F9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrUrGrArArGrArArGrGrArArGrCrGrGrArGrGrG/AltR2/
TRAC標的部位のDNA配列	5126	MG29-1-mTRAC-標的部位-A1	ACTCCCAAATCAATGTGCCGAA
TRAC標的部位のDNA配列	5127	MG29-1-mTRAC-標的部位-B1	AAGATATCTTGGCAGGTGAAGC
TRAC標的部位のDNA配列	5128	MG29-1-mTRAC-標的部位-C1	ATGTCCAGCACAGTTTTGTCAG

【０４５８】

【表２５－７】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
TRAC標的部位のDNA配列	5129	MG29-1-mTRAC-標的部位-D1	GTCAGTGATGAACGTTCCAGAT
TRAC標的部位のDNA配列	5130	MG29-1-mTRAC-標的部位-E1	TCAGTGATGAACGTTCCAGATT
TRAC標的部位のDNA配列	5131	MG29-1-mTRAC-標的部位-F1	CGGCACATTGATTTGGGAGTCA
TRAC標的部位のDNA配列	5132	MG29-1-mTRAC-標的部位-G1	GGCACATTGATTTGGGAGTCAA
TRAC標的部位のDNA配列	5133	MG29-1-mTRAC-標的部位-H1	GGAGTCAAAGTCGGTGAACAGG
TRAC標的部位のDNA配列	5134	MG29-1-mTRAC-標的部位-A2	AACTGGTACACAGCAGGTTCTG
TRAC標的部位のDNA配列	5135	MG29-1-mTRAC-標的部位-B2	ACTGGTACACAGCAGGTTCTGG
TRAC標的部位のDNA配列	5136	MG29-1-mTRAC-標的部位-C2	TTTTCCCTTTTAGACGTTCCCT
TRAC標的部位のDNA配列	5137	MG29-1-mTRAC-標的部位-D2	CCCTTTTAGACGTTCCCTGTGA
TRAC標的部位のDNA配列	5138	MG29-1-mTRAC-標的部位-E2	CCTTTTAGACGTTCCCTGTGAT
TRAC標的部位のDNA配列	5139	MG29-1-mTRAC-標的部位-F2	AGACGTTCCCTGTGATGCCACG
TRAC標的部位のDNA配列	5140	MG29-1-mTRAC-標的部位-G2	GACGTTCCCTGTGATGCCACGT
TRAC標的部位のDNA配列	5141	MG29-1-mTRAC-標的部位-H2	AAAGCTTTTCTCAGTCAACGTG
TRAC標的部位のDNA配列	5142	MG29-1-mTRAC-標的部位-A3	CTCAGTCAACGTGGCATCACAG
TRAC標的部位のDNA配列	5143	MG29-1-mTRAC-標的部位-B3	TCAGTCAACGTGGCATCACAGG

【０４５９】

【表２５－８】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
TRAC標的部位のDNA配列	5144	MG29-1-mTRAC-標的部位-C3	ACAGATATGAACCTAAACTTTC
TRAC標的部位のDNA配列	5145	MG29-1-mTRAC-標的部位-D3	CAGATATGAACCTAAACTTTCA
TRAC標的部位のDNA配列	5146	MG29-1-mTRAC-標的部位-E3	AAAACCTGTCAGTTATGGGACT
TRAC標的部位のDNA配列	5147	MG29-1-mTRAC-標的部位-F3	ACCTGCTCATGACGCTGAGGCT
TRAC標的部位のDNA配列	5148	MG29-1-mTRAC-標的部位-G3	ATGCCTTCTTACCTCAACTGGA
TRAC標的部位のDNA配列	5149	MG29-1-mTRAC-標的部位-H3	AGCAGGAGGATTCGGAGTCCCA
TRAC標的部位のDNA配列	5150	MG29-1-mTRAC-標的部位-A4	TGAGGAAGGTTGCTGGAGAGCT
TRAC標的部位のDNA配列	5151	MG29-1-mTRAC-標的部位-B4	TTGTTTTTTTTTTTTTTGCGGG
TRAC標的部位のDNA配列	5152	MG29-1-mTRAC-標的部位-C4	TGTTTTTTTTTTTTTTGCGGGT
TRAC標的部位のDNA配列	5153	MG29-1-mTRAC-標的部位-D4	GTTTTTTTTTTTTTTGCGGGTT
TRAC標的部位のDNA配列	5154	MG29-1-mTRAC-標的部位-E4	TTTTTTTTTTTTTTGCGGGTTT
TRAC標的部位のDNA配列	5155	MG29-1-mTRAC-標的部位-F4	TTTTTTTTTTGCGGGTTTATTT
TRAC標的部位のDNA配列	5156	MG29-1-mTRAC-標的部位-G4	TTTTTTTTTGCGGGTTTATTTT
TRAC標的部位のDNA配列	5157	MG29-1-mTRAC-標的部位-H4	TTTTTTTTGCGGGTTTATTTTT
TRAC標的部位のDNA配列	5158	MG29-1-mTRAC-標的部位-A5	TTTTTTTGCGGGTTTATTTTTT

【０４６０】

【表２５－９】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
TRAC標的部位のDNA配列	5159	MG29-1-mTRAC-標的部位-B5	TTTTTTGCGGGTTTATTTTTTT
TRAC標的部位のDNA配列	5160	MG29-1-mTRAC-標的部位-C5	TTTTTGCGGGTTTATTTTTTTA
TRAC標的部位のDNA配列	5161	MG29-1-mTRAC-標的部位-D5	TTTTGCGGGTTTATTTTTTTAA
TRAC標的部位のDNA配列	5162	MG29-1-mTRAC-標的部位-E5	TTTGCGGGTTTATTTTTTTAAG
TRAC標的部位のDNA配列	5163	MG29-1-mTRAC-標的部位-F5	TTGCGGGTTTATTTTTTTAAGC
TRAC標的部位のDNA配列	5164	MG29-1-mTRAC-標的部位-G5	TGCGGGTTTATTTTTTTAAGCA
TRAC標的部位のDNA配列	5165	MG29-1-mTRAC-標的部位-H5	GCGGGTTTATTTTTTTAAGCAT
TRAC標的部位のDNA配列	5166	MG29-1-mTRAC-標的部位-A6	CGGGTTTATTTTTTTAAGCATC
TRAC標的部位のDNA配列	5167	MG29-1-mTRAC-標的部位-B6	TTTTTTTAAGCATCCATGAAGA
TRAC標的部位のDNA配列	5168	MG29-1-mTRAC-標的部位-C6	TTTAAGCATCCATGAAGAAATG
TRAC標的部位のDNA配列	5169	MG29-1-mTRAC-標的部位-D6	TTAAGCATCCATGAAGAAATGC
TRAC標的部位のDNA配列	5170	MG29-1-mTRAC-標的部位-E6	TAAGCATCCATGAAGAAATGCA
TRAC標的部位のDNA配列	5171	MG29-1-mTRAC-標的部位-F6	AAGCATCCATGAAGAAATGCAT
TRAC標的部位のDNA配列	5172	MG29-1-mTRAC-標的部位-G6	AGCATCCATGAAGAAATGCATA
TRAC標的部位のDNA配列	5173	MG29-1-mTRAC-標的部位-H6	ATCAAGGTGTAGAAATTATCTC

【０４６１】

【表２５－１０】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
TRAC 標的部位の DNA 配列	5174	MG29-1-mTRAC-標的部位-A7	GGTTTTTCTGAATCACCTTTAA
TRAC 標的部位の DNA 配列	5175	MG29-1-mTRAC-標的部位-B7	GTTTTTCTGAATCACCTTTAAT
TRAC 標的部位の DNA 配列	5176	MG29-1-mTRAC-標的部位-C7	TCTGAATCACCTTTAATGATGT
TRAC 標的部位の DNA 配列	5177	MG29-1-mTRAC-標的部位-D7	CTGAATCACCTTTAATGATGTC
TRAC 標的部位の DNA 配列	5178	MG29-1-mTRAC-標的部位-E7	TGAATCACCTTTAATGATGTCA
TRAC 標的部位の DNA 配列	5179	MG29-1-mTRAC-標的部位-F7	ATGATGTCATGGACAGCAGAAT
TRAC 標的部位の DNA 配列	5180	MG29-1-mTRAC-標的部位-G7	TACACCTTGATGAAAGAGTAAT
TRAC 標的部位の DNA 配列	5181	MG29-1-mTRAC-標的部位-H7	TTCATGGATGCTTAAAAAAATA
TRAC 標的部位の DNA 配列	5182	MG29-1-mTRAC-標的部位-A8	TTTTACAACATTCTCCAAGAGA
TRAC 標的部位の DNA 配列	5183	MG29-1-mTRAC-標的部位-B8	TTTACAACATTCTCCAAGAGAT
TRAC 標的部位の DNA 配列	5184	MG29-1-mTRAC-標的部位-C8	TTACAACATTCTCCAAGAGATT
TRAC 標的部位の DNA 配列	5185	MG29-1-mTRAC-標的部位-D8	TACAACATTCTCCAAGAGATTT
TRAC 標的部位の DNA 配列	5186	MG29-1-mTRAC-標的部位-E8	ACAACATTCTCCAAGAGATTTT
TRAC 標的部位の DNA 配列	5187	MG29-1-mTRAC-標的部位-F8	CAACATTCTCCAAGAGATTTTA
TRAC 標的部位の DNA 配列	5188	MG29-1-mTRAC-標的部位-G8	ACAGGGGAGTCTGCCATGGGGG
TRAC 標的部位の DNA 配列	5189	MG29-1-mTRAC-標的部位-H8	CAGGGGAGTCTGCCATGGGGGA
TRAC 標的部位の DNA 配列	5190	MG29-1-mTRAC-標的部位-A9	TTGTGAATGGTCAGCAGCAGTG
TRAC 標的部位の DNA 配列	5191	MG29-1-mTRAC-標的部位-B9	TGTGAATGGTCAGCAGCAGTGA
TRAC 標的部位の DNA 配列	5192	MG29-1-mTRAC-標的部位-C9	GTGAATGGTCAGCAGCAGTGAG
TRAC 標的部位の DNA 配列	5193	MG29-1-mTRAC-標的部位-D9	TGAATGGTCAGCAGCAGTGAGG
TRAC 標的部位の DNA 配列	5194	MG29-1-mTRAC-標的部位-E9	GGCTTGAAGAAGGAGCGGAGGG
TRAC 標的部位の DNA 配列	5195	MG29-1-mTRAC-標的部位-F9	GCTTGAAGAAGGAGCGGAGGGG
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5'及び 3'AltR 修飾を指す			

【０４６２】

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個のマウスＴ細胞を抗マウスＣＤ３抗体（クローン１７Ａ２、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ １１－００３２－８２）で、４℃で３０分間染色し、Ａｔｔｕｎｅ　Ｎｘｔフローサイトメーターで分析した。マウスＴＲＡＣ遺伝子の３’末端のガイドは、高レベルのインデルを有するが、ＴＲＡＣのノックアウトを産生することができない。驚くべきことに、また予想外にも、表現型は、遺伝子の末端付近の遺伝子型と相関せず、これは、切断された対立遺伝子の機能の保持、及び早期に切断されたアウトオブフレームｍＲＮＡを除去するナンセンス媒介減衰経路の失敗に起因する可能性が高い（図６５）。

【０４６３】
実施例１９－マウスＴＲＢＣ１及びＴＲＢＣ２のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果
初代Ｔ細胞を、Ｃ５７ＢＬ／６マウス脾臓から精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１０４ｐｍｏｌのタンパク質／１２０ｐｍｏｌのガイド）（ＴＲＢＣ１：配列番号５１９６～５２１０；ＴＲＢＣ２：配列番号５２２６～５２４６）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーター及び１００ｐｍｏｌトランスフェクションエンハンサー（ＩＤＴ）を使用してＴ細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（ＴＲＢＣ１：配列番号５２１１～５２２５；ＴＲＢＣ２：配列番号５２４７～５２６７）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図６６Ａ及び６６Ｂ）。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個のマウスＴ細胞を抗マウスＣＤ３抗体（クローン１７Ａ２、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１１－００３２－８２）で、４℃で３０分間染色し、Ａｔｔｕｎｅ　Ｎｘｔフローサイトメーターで分析した。
【０４６４】

【表２６－１】

表１４Ｈ：実施例４５のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5196	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrCrCrArGrArGrGrArUrCrUrGrArGrArArArU/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5197	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArGrGrArUrCrUrGrArGrArArArUrGrUrGrArC/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5198	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrCrArUrCrArArArArGrCrArGrArGrArUrUrGrC/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5199	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArGrGrArGrGrArCrArArGrUrGrGrCrCrArGrArG/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5200	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrArGrCrCrCrUrCrUrGrGrCrCrArCrUrUrGrU/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5201	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrUrGrUrUrUrGrCrArArUrCrUrCrUrGrGrCrUrUrUrU/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5202	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrUrUrUrGrCrArArUrCrUrCrUrGrGrCrUrUrUrU/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5203	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrCrArArUrCrUrCrUrGrGrCrUrUrUrUrGrArUrG/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5204	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArUrCrUrCrUrGrCrUrUrUrUrGrArUrGrGrCrUrC/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5205	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArUrGrGrCrUrCrArArArCrArArGrGrArGrArArCrCrU/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5206	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrGrCrUrCrArArArCrArArGrGrArGrArArCrCrU/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5207	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrCrUrUrCrUrUrUrCrArGrArCrUrGrUrGrGrGrA/AltR2/

【０４６５】

【表２６－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5208	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrCrArArCrArGrCrArUrCrCrUrArUrCrArArC/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5209	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrCrArArCrArGrCrArUrCrCrUrArUrCrArArCrA/AltR2/
マウス TRBC1を標的とするMG29-1 sgRNA	5210	MG29-1-mTRBC1-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrArGrCrArGrGrArUrCrUrCrArUrArGrArGrGrA/AltR2/
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5211	MG29-1-mTRBC1-標的部位-A1	CTTTCCAGAGGATCTGAGAAAT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5212	MG29-1-mTRBC1-標的部位-B1	CAGAGGATCTGAGAAATGTGAC
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5213	MG29-1-mTRBC1-標的部位-C1	AGCCATCAAAAGCAGAGATTGC
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5214	MG29-1-mTRBC1-標的部位-D1	AGAGGAGGACAAGTGGCCAGAG
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5215	MG29-1-mTRBC1-標的部位-E1	GGTGAGCCCTCTGGCCACTTGT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5216	MG29-1-mTRBC1-標的部位-F1	GTTTGTTTGCAATCTCTGCTTT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5217	MG29-1-mTRBC1-標的部位-G1	TTTGTTTGCAATCTCTGCTTTT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5218	MG29-1-mTRBC1-標的部位-H1	TTTGCAATCTCTGCTTTTGATG
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5219	MG29-1-mTRBC1-標的部位-A2	CAATCTCTGCTTTTGATGGCTC
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5220	MG29-1-mTRBC1-標的部位-B2	GATGGCTCAAACAAGGAGACCT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5221	MG29-1-mTRBC1-標的部位-C2	ATGGCTCAAACAAGGAGACCTT
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5222	MG29-1-mTRBC1-標的部位-D2	TCTCTTCTTTCAGACTGTGGGA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5223	MG29-1-mTRBC1-標的部位-E2	CTGTCAACAGCATCCTATCAAC

【０４６６】

【表２６－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5224	MG29-1-mTRBC1-標的部位-F2	TGTCAACAGCATCCTATCAACA
TRBC1 標的部位の DNA 配列	5225	MG29-1-mTRBC1-標的部位-G2	CCTAGCAGGATCTCATAGAGGA
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5226	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrCrCrArGrArGrGrArUrCrUrGrArGrArArArU/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5227	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArGrGrArUrCrUrGrArGrArArArUrGrUrGrArC/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5228	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrCrArUrCrArArArArGrCrArGrArGrArUrUrGrC/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5229	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArGrGrArGrGrArCrArArGrUrGrCrCrArGrArG/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5230	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrArUrGrArGrCrUrCrCrGrCrArCrUrUrArCrCrU/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5231	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrArGrCrCrCrUrCrUrGrGrCrCrArCrUrUrGrU/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5232	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrGrArUrUrGrUrGrCrCrArGrArArGrGrUrArGrC/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5233	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrUrUrGrCrArArUrCrUrCrUrGrCrUrUrUrU/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5234	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrGrCrArArUrCrUrCrUrGrCrUrUrUrU/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5235	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrCrArArUrCrUrCrUrGrCrUrUrUrArUrG/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5236	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArUrCrUrCrUrGrCrUrUrUrUrGrArUrGrGrCrUrC/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5237	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArUrGrGrCrUrCrArArArCrArArGrGrArGrArCrC/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5238	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrGrCrUrCrArArArCrArArGrGrArGrArCrCrU/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5239	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrCrCrUrCrUrCrCrUrUrUrUrCrUrUrUrCrArGrArC/AltR2/
マウス TRBC2 を標的とする MG29-1 sgRNA	5240	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrCrUrCrCrUrUrUrUrCrUrUrUrUrCrArGrArCrU/AltR2/

【０４６７】

【表２６－４】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
マウスTRBC2を標的とするMG29-1 sgRNA	5241	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrArGrArCrUrGrUrGrGrArArUrCrArCrUrUrCrArUrC/AltR2/
マウスTRBC2を標的とするMG29-1 sgRNA	5242	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArCrUrGrUrGrGrArArUrCrArCrUrUrCrArGrGrU/AltR2/
マウスTRBC2を標的とするMG29-1 sgRNA	5243	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrCrArArCrArUrCrCrUrArUrCrArUrC/AltR2/
マウスTRBC2を標的とするMG29-1 sgRNA	5244	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArUrCrCrUrArCrCrArUrUrCrUrUrArCrCrArU//AltR2/
マウスTRBC2を標的とするMG29-1 sgRNA	5245	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArGrGrUrCrArArGrArArArArArArArArArUrUrCrC/AltR2/
マウスTRBC2を標的とするMG29-1 sgRNA	5246	MG29-1-mTRBC2-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrCrArGrGrArArUrUrUrUrUrUrUrCrUrUrGrA/AltR2/
TRBC2標的部位のDNA配列	5247	MG29-1-mTRBC2-標的部位-A1	CTTTCCAGAGGATCTGAGAAAT
TRBC2標的部位のDNA配列	5248	MG29-1-mTRBC2-標的部位-B1	CAGAGGATCTGAGAAATGTGAC
TRBC2標的部位のDNA配列	5249	MG29-1-mTRBC2-標的部位-C1	AGCCATCAAAAGCAGAGATTGC
TRBC2標的部位のDNA配列	5250	MG29-1-mTRBC2-標的部位-D1	AGAGGAGGACAAGTGGCCAGAG
TRBC2標的部位のDNA配列	5251	MG29-1-mTRBC2-標的部位-E1	CTCATGAGCTCCGCACTTACCT
TRBC2標的部位のDNA配列	5252	MG29-1-mTRBC2-標的部位-F1	GGTGAGCCCTCTGGCCACTTGT
TRBC2標的部位のDNA配列	5253	MG29-1-mTRBC2-標的部位-G1	GAGGATTGTGCCAGAAGGTAGC
TRBC2標的部位のDNA配列	5254	MG29-1-mTRBC2-標的部位-H1	GTTTGTTTGCAATCTCTGCTTT
TRBC2標的部位のDNA配列	5255	MG29-1-mTRBC2-標的部位-A2	TTTGTTTGCAATCTCTGCTTTT
TRBC2標的部位のDNA配列	5256	MG29-1-mTRBC2-標的部位-B2	TTTGCAATCTCTGCTTTTGATG
TRBC2標的部位のDNA配列	5257	MG29-1-mTRBC2-標的部位-C2	CAATCTCTGCTTTTGATGGCTC
TRBC2標的部位のDNA配列	5258	MG29-1-mTRBC2-標的部位-D2	GATGGCTCAAACAAGGAGACCT
TRBC2標的部位のDNA配列	5259	MG29-1-mTRBC2-標的部位-E2	ATGGCTCAAACAAGGAGACCTT
TRBC2標的部位のDNA配列	5260	MG29-1-mTRBC2-標的部位-F2	CTCCCTCTCCTTTCTTTCAGAC
TRBC2標的部位のDNA配列	5261	MG29-1-mTRBC2-標的部位-G2	TCCCTCTCCTTTCTTTCAGACT
TRBC2標的部位のDNA配列	5262	MG29-1-mTRBC2-標的部位-H2	TTTCAGACTGTGGAATCACTTC
TRBC2標的部位のDNA配列	5263	MG29-1-mTRBC2-標的部位-A3	AGACTGTGGAATCACTTCAGGT
TRBC2標的部位のDNA配列	5264	MG29-1-mTRBC2-標的部位-B3	CTGTCAACAGCATCCTATCATC
TRBC2標的部位のDNA配列	5265	MG29-1-mTRBC2-標的部位-C3	TCCATCCTACCATTCTTACCAT
TRBC2標的部位のDNA配列	5266	MG29-1-mTRBC2-標的部位-D3	TCAGGTCAAGAAAAAAAATTCC
TRBC2標的部位のDNA配列	5267	MG29-1-mTRBC2-標的部位-E3	TCTCAGGAATTTTTTTTCTTGA
r;糖リボースを含む天然RNA結合(例えば、A塩基のリボース又はRNA形態は、rAと記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A塩基のデオキシリボース形態は、dAと記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの1つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1及びAltR2は、IDT技術の専有の5'及び3'AltR修飾を指す			

【０４６８】

実施例２０－ヒトＴＲＢＣ１／２のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＭＢＣから精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１０６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号５６４２～５６６０）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用して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℃で３０分間染色し、Ａｔｔｕｎｅ　Ｎｘｔフローサイトメーターで分析した（図６６Ｃ）。

【０４６９】
【表２７－１】

表１４Ｉ：実施例４６のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	SEQUENCE
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5642	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrCrArUrCrArGrArArGrCrArGrArGrArUrC/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5643	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrUrGrGrGrArGrArUrCrUrCrUrGrCrUrU/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5644	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrUrGrGrGrArGrArUrCrUrCrUrGrCrU/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5645	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrCrCrUrArUrCrCrUrGrGrUrCrCrArCrUrC/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5646	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrArGrArCrUrGrUrGrGrCrUrUrUrArCrC/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5647	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArCrUrGrUrGrGrCrUrUrUrArCrCrUrCrGrG/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5648	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrCrUrGrCrArGrGrUrCrArArGrArGrArA/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5649	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrGrArCrCrUrGrCrArGrArArGrArGrArA/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5650	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrGrUrCrCrUrCrUrGrGrArArArGrGrGrArArG/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5651	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrGrUrCrCrUrCrUrGrGrArArArGrGrGrArA/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5652	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArGrGrUrCrCrUrCrUrGrGrArArArGrGrGrA/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5653	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrCrArUrCrArGrArArGrCrArGrArGrArUrC/AltR2/

【０４７０】

【表２７－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	SEQUENCE
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5654	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrUrGrGrGrArGrArUrCrUrCrUrGrCrUrU/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5655	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrUrGrGrGrArGrArUrCrUrCrUrGrCrU/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5656	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrCrCrUrArUrCrCrUrGrGrGrUrCrCrArCrUrC/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5657	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrCrArGrArCrUrGrUrGrGrCrUrUrCrArC/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5658	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrArGrArCrUrGrUrGrGrCrUrUrCrArCrC/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5659	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArCrUrGrUrGrGrCrUrUrCrArCrCrUrCrG/AltR2/
ヒトTRBC1/2を標的とするMG29-1 sgRNA	5660	MG29-1-TRBC1/2-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrGrArCrCrUrGrUrGrGrArArGrArGrArG/AltR2/
TRBC1/2標的部位のDNA配列	5661	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-A1	AGCCATCAGAAGCAGAGATC
TRBC1/2標的部位のDNA配列	5662	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-B1	GGTGTGGGAGATCTCTGCTT
TRBC1/2標的部位のDNA配列	5663	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-C1	GGGTGTGGGAGATCTCTGCT
TRBC1/2標的部位のDNA配列	5664	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-D1	GCCCTATCCTGGGTCCACTC
TRBC1/2標的部位のDNA配列	5665	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-E1	TTTCAGACTGTGGCTTTACC
TRBC1/2標的部位のDNA配列	5666	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-F1	AGACTGTGGCTTTACCTCGG
TRBC1/2標的部位のDNA配列	5667	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-G1	TCTTCTGCAGGTCAAGAGAA
TRBC1/2標的部位のDNA配列	5668	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-H1	TCTTGACCTGCAGAAGAGAA

【０４７１】

【表２７－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	SEQUENCE
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5669	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-A2	AGGTCCTCTGGAAAGGGAAG
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5670	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-B2	CAGGTCCTCTGGAAAGGGAA
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5671	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-C2	TCAGGTCCTCTGGAAAGGGA
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5672	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-D2	AGCCATCAGAAGCAGAGATC
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5673	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-E2	GGTGTGGGAGATCTCTGCTT
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5674	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-F2	GGGTGTGGGAGATCTCTGCT
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5675	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-G2	GCCCTATCCTGGGTCCACTC
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5676	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-H2	CTTTCAGACTGTGGCTTCAC
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5677	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-A3	TTTCAGACTGTGGCTTCACC
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5678	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-B3	AGACTGTGGCTTCACCTCCG
TRBC1/2 標的部位の DNA 配列	5679	MG29-1-TRBC1/2-標的部位-C3	TCTTGACCTGTGGAAGAGAG
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5'及び 3'AltR 修飾を指す			

【０４７２】

実施例２１－ＨＰＲＴのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＭＢＣから精製した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）（配列番号５４８２～５５６１）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＴ細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを生成し、最適化し、各ガイドＲＮＡ（配列番号５５６２～５６４１）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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎス

クリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図６７）。

【０４７３】

【表２８－１】

表１４Ｊ：実施例４７のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5482	MG29-1-HPRT-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrCrCrCrUrGrGrCrUrUrArCrCrUrUrUrArGrGrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5483	MG29-1-HPRT-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArCrArCrArArGrCrCrCrArCrCrArUrUrArArArA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5484	MG29-1-HPRT-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrGrGrUrGrGrGrCrUrUrGrUrGrUrUrCrUrArArA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5485	MG29-1-HPRT-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrGrUrGrGrCrUrUrGrUrGrUrUrCrUrArArArG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5486	MG29-1-HPRT-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrUrArArCrArArArGrArUrGrGrGrUrUrUrGrUrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5487	MG29-1-HPRT-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrGrCrArCrCrCrArArArUrUrArArUrArArCrGrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5488	MG29-1-HPRT-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrCrGrUrUrArArUrUrArArArUrUrUrGrGrGrUrGrCrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5489	MG29-1-HPRT-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrGrArGrUrGrUrArGrUrCrUrGrUrUrArGrCrCrArC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5490	MG29-1-HPRT-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArGrGrUrGrArGrUrArUrGrArUrGrUrGrUrCrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5491	MG29-1-HPRT-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrGrUrGrUrGrCrArGrGrArUrCrArArUrGrArCrArGrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5492	MG29-1-HPRT-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArGrGrUrGrUrGrCrArGrGrArUrCrArArUrGrArCrArG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5493	MG29-1-HPRT-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrCrArUrUrGrArUrCrCrUrGrCrArCrCrUrArC/AltR2/

【０４７４】

【表２８－２】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5494	MG29-1-HPRT-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrCrArCrArGrUrArArUrUrCrUrCrArCrCrArArA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5495	MG29-1-HPRT-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrArGrArArUrUrArCrUrGrUrGrCrUrGrArArA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5496	MG29-1-HPRT-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrGrArArUrArGrCrArUrGrGrCrArGrArGrGrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5497	MG29-1-HPRT-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArGrGrGrGrCrCrCrArArArArUrCrCrUrCrUrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5498	MG29-1-HPRT-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArArGrGrGrGrCrCrCrArArArArUrCrCrUrCrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5499	MG29-1-HPRT-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrGrCrCrCrCrCrUrUrGrCrArArArArUrUrArArGrArA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5500	MG29-1-HPRT-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrCrCrCrCrUrUrGrCrArArArArUrUrArArGrArA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5501	MG29-1-HPRT-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrArCrArGrArCrArCrArArArGrArArGrArUrGrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5502	MG29-1-HPRT-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArUrUrArArGrUrCrGrGrCrCrUrCrArCrCrUrCrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5503	MG29-1-HPRT-sgRNA-F3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrUrArArGrUrCrGrGrCrCrUrCrArCrCrUrCrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5504	MG29-1-HPRT-sgRNA-G3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrArArGrUrCrGrGrCrCrUrCrArCrCrUrCrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5505	MG29-1-HPRT-sgRNA-H3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrArArGrUrCrGrGrCrCrUrCrArCrCrUrCrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5506	MG29-1-HPRT-sgRNA-A4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrGrUrArGrGrGrUrCrArGrGrUrArArUrGrUrU/AltR2/

【０４７５】

【表２８－３】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5507	MG29-1-HPRT-sgRNA-B4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrUrArGrGrGrGrUrCrArGrGrUrArArUrGrUrUrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5508	MG29-1-HPRT-sgRNA-C4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrArGrGrGrGrUrCrArGrGrUrArArUrGrUrUrCrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5509	MG29-1-HPRT-sgRNA-D4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArArArArUrCrArCrGrGrUrArUrCrUrGrUrCrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5510	MG29-1-HPRT-sgRNA-E4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrCrArGrArGrUrArArGrCrCrUrUrCrUrArGrUrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5511	MG29-1-HPRT-sgRNA-F4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArCrArGrGrUrArCrUrArUrGrArGrArGrUrArUrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5512	MG29-1-HPRT-sgRNA-G4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArArUrGrUrCrArArCrCrUrArCrUrGrUrGrGrCrArU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5513	MG29-1-HPRT-sgRNA-H4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrGrUrCrArArCrCrUrArCrUrGrUrGrGrCrArUrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5514	MG29-1-HPRT-sgRNA-A5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrGrUrUrCrUrUrCrCrUrGrGrUrArUrArUrGrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5515	MG29-1-HPRT-sgRNA-B5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrGrUrArUrArUrGrCrUrGrUrGrGrArArUrUrGrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5516	MG29-1-HPRT-sgRNA-C5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrArUrGrUrCrCrUrArCrCrUrGrUrGrGrCrArArC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5517	MG29-1-HPRT-sgRNA-D5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrUrUrGrCrCrArCrArGrGrUrArGrGrArCrArUrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5518	MG29-1-HPRT-sgRNA-E5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrUrGrCrCrArCrArGrGrUrArGrGrArCrArUrGrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5519	MG29-1-HPRT-sgRNA-F5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrArCrUrGrUrArArArArUrGrGrUrArArCrCrGrU/AltR2/

【０４７６】

【表２８－４】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5520	MG29-1-HPRT-sgRNA-G5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArUrArCrUrGrUrArArArUrGrGrGrUrArArCrCrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5521	MG29-1-HPRT-sgRNA-H5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrArArGrCrUrCrCrArUrCrUrCrUrArArGrGrCrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5522	MG29-1-HPRT-sgRNA-A6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrArUrArCrCrUrUrUrUrUrCrUrGrGrArGrCrArUrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5523	MG29-1-HPRT-sgRNA-B6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrGrArGrCrArUrUrCrCrUrGrArGrUrUrCrArGrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5524	MG29-1-HPRT-sgRNA-C6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrArGrCrArUrUrCrCrUrGrArGrUrUrCrArGrGrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5525	MG29-1-HPRT-sgRNA-D6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrUrGrUrGrArUrUrGrGrCrUrUrGrUrUrArUrGrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5526	MG29-1-HPRT-sgRNA-E6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrGrUrGrArUrUrGrGrCrUrUrGrUrUrArUrGrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5527	MG29-1-HPRT-sgRNA-F6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrGrArUrUrGrGrCrUrUrGrUrUrArUrGrUrUrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5528	MG29-1-HPRT-sgRNA-G6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrGrArArGrArUrGrGrCrArUrCrArUrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5529	MG29-1-HPRT-sgRNA-H6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArUrGrUrUrArArArArGrGrCrArGrUrCrUrCrArA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5530	MG29-1-HPRT-sgRNA-A7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrGrArGrArCrUrGrCrCrUrUrUrArArArCrArUrCrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5531	MG29-1-HPRT-sgRNA-B7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrArGrArCrUrGrCrCrUrUrUrArArCrArUrCrUrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5532	MG29-1-HPRT-sgRNA-C7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArCrCrCrArArArUrGrCrUrGrCrCrUrGrUrUrGrA/AltR2/

【０４７７】

【表２８－５】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5533	MG29-1-HPRT-sgRNA-D7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrArArCrCrCrArArArUrGrCrUrGrCrCrUrGrUrUrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5534	MG29-1-HPRT-sgRNA-E7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArArCrArGrGrCrArGrCrArUrUrUrGrGrGrUrUrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5535	MG29-1-HPRT-sgRNA-F7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArCrArGrGrCrArGrCrArUrUrUrGrGrGrUrUrArU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5536	MG29-1-HPRT-sgRNA-G7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArCrArGrGrCrArGrCrArUrUrUrGrGrGrUrUrArUrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5537	MG29-1-HPRT-sgRNA-H7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArCrArArArGrCrUrGrGrArGrUrGrGrUrUrArU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5538	MG29-1-HPRT-sgRNA-A8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrArGrArGrUrUrGrArCrUrArUrArCrCrArCrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5539	MG29-1-HPRT-sgRNA-B8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArGrArGrUrUrGrArCrUrArUrArCrCrArCrCrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5540	MG29-1-HPRT-sgRNA-C8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArArCrArArArGrCrUrGrGrArGrUrGrGrUrArA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5541	MG29-1-HPRT-sgRNA-D8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrArArCrArArArGrCrUrGrGrArGrUrGrGrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5542	MG29-1-HPRT-sgRNA-E8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrGrGrArArCrArArArArGrCrUrGrGrArGrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5543	MG29-1-HPRT-sgRNA-F8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrGrUrArArArCrArArCrUrArGrUrGrUrGrCrCrA/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5544	MG29-1-HPRT-sgRNA-G8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrArCrArCrUrArGrUrUrUrGrUrUrUrArCrCrCrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5545	MG29-1-HPRT-sgRNA-H8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArCrArCrUrArGrUrUrGrUrUrUrArCrCrCrUrA/AltR2/

【０４７８】

【表２８－６】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5546	MG29-1-HPRT-sgRNA-A9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrUrArArArGrUrUrCrCrUrCrUrUrUrGrUrArArG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5547	MG29-1-HPRT-sgRNA-B9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrGrArUrUrGrUrArUrUrUrUrCrCrArArGrGrUrUrUrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5548	MG29-1-HPRT-sgRNA-C9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArGrGrUrUrUrCrUrArGrArCrUrGrArGrArGrCrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5549	MG29-1-HPRT-sgRNA-D9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrArCrUrGrArGrArGrCrCrCrUrUrUrUrCrArUrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5550	MG29-1-HPRT-sgRNA-E9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrCrUrUrUrGrCrUrCrArUrUrGrArCrArCrUrCrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5551	MG29-1-HPRT-sgRNA-F9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrUrUrUrGrCrUrCrArUrUrGrArCrArCrUrCrUrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5552	MG29-1-HPRT-sgRNA-G9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrArUrUrGrArCrArCrUrCrUrGrUrArCrCrCrArU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5553	MG29-1-HPRT-sgRNA-H9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrArCrArCrCrCrArArGrGrArArArGrArCrUrArUrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5554	MG29-1-HPRT-sgRNA-A10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArCrArCrArCrCrArArGrGrArArArGrArCrUrArU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5555	MG29-1-HPRT-sgRNA-B10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrCrUrCrCrArUrUrUrCrArUrArGrUrCrUrUrUrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5556	MG29-1-HPRT-sgRNA-C10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrArGrUrCrUrUrUrCrCrUrUrGrGrGrUrGrUrGrUrU/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5557	MG29-1-HPRT-sgRNA-D10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrGrGrGrUrGrUrGrUrArArArArGrUrGrArCrC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5558	MG29-1-HPRT-sgRNA-E10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrCrGrUrGrCrUrGrArGrUrGrUrArCrCrArUrGrG/AltR2/

【０４７９】

【表２８－７】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5559	MG29-1-HPRT-sgRNA-F10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrUrCrArUrCrCrGrUrGrCrUrGrArGrUrGrUrArC/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5560	MG29-1-HPRT-sgRNA-G10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArArCrGrUrCrArGrUrCrUrUrCrUrCrUrUrUrUrG/AltR2/
HPRTを標的とするMG29-1 sgRNA	5561	MG29-1-HPRT-sgRNA-H10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrArGrArGrCrArCrArUrUrUrGrCrCrArGrUrA/AltR2/
HPRT標的部位のDNA配列	5562	MG29-1-HPRT-標的部位-A1	TCTCCCTGGCTTACCTTTAGGA
HPRT標的部位のDNA配列	5563	MG29-1-HPRT-標的部位-B1	GAACACAAGCCCACCATTAAAA
HPRT標的部位のDNA配列	5564	MG29-1-HPRT-標的部位-C1	AATGGTGGGCTTGTGTTCTAAA
HPRT標的部位のDNA配列	5565	MG29-1-HPRT-標的部位-D1	ATGGTGGGCTTGTGTTCTAAAG
HPRT標的部位のDNA配列	5566	MG29-1-HPRT-標的部位-E1	CCCTAACAAAGATGGGTTTGTT
HPRT標的部位のDNA配列	5567	MG29-1-HPRT-標的部位-F1	AAGGCACCCAAATTAATAACGC
HPRT標的部位のDNA配列	5568	MG29-1-HPRT-標的部位-G1	TAGCGTTATTAATTTGGGTGCC
HPRT標的部位のDNA配列	5569	MG29-1-HPRT-標的部位-H1	TCGAGTGTAGTCTGTTAGCCAC
HPRT標的部位のDNA配列	5570	MG29-1-HPRT-標的部位-A2	TTAGGGAGTTATGATGTTGTCC
HPRT標的部位のDNA配列	5571	MG29-1-HPRT-標的部位-B2	TAGGTGCAGGATCAATGACAGC
HPRT標的部位のDNA配列	5572	MG29-1-HPRT-標的部位-C2	GTAGGTGCAGGATCAATGACAG
HPRT標的部位のDNA配列	5573	MG29-1-HPRT-標的部位-D2	CTGTCATTGATCCTGCACCTAC
HPRT標的部位のDNA配列	5574	MG29-1-HPRT-標的部位-E2	CAGCACAGTAATTCTCACCAAA

【０４８０】

【表２８－８】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRT標的部位のDNA配列	5575	MG29-1-HPRT-標的部位-F2	GGTGAGAATTACTGTGCTGAAA
HPRT標的部位のDNA配列	5576	MG29-1-HPRT-標的部位-G2	TCCTGAATAGCATGGCAGAGGA
HPRT標的部位のDNA配列	5577	MG29-1-HPRT-標的部位-H2	CAAGGGGGCCCAAAATCCTCTG
HPRT標的部位のDNA配列	5578	MG29-1-HPRT-標的部位-A3	GCAAGGGGGCCCAAAATCCTCT
HPRT標的部位のDNA配列	5579	MG29-1-HPRT-標的部位-B3	GGGCCCCCTTGCAAAATTAAGA
HPRT標的部位のDNA配列	5580	MG29-1-HPRT-標的部位-C3	GGCCCCCTTGCAAAATTAAGAA
HPRT標的部位のDNA配列	5581	MG29-1-HPRT-標的部位-D3	ACTACAGACACAAAGAAGATGC
HPRT標的部位のDNA配列	5582	MG29-1-HPRT-標的部位-E3	TTATTAAGTCGGCCTCACCTCC
HPRT標的部位のDNA配列	5583	MG29-1-HPRT-標的部位-F3	TATTAAGTCGGCCTCACCTCCT
HPRT標的部位のDNA配列	5584	MG29-1-HPRT-標的部位-G3	ATTAAGTCGGCCTCACCTCCTC
HPRT標的部位のDNA配列	5585	MG29-1-HPRT-標的部位-H3	TTAAGTCGGCCTCACCTCCTCA
HPRT標的部位のDNA配列	5586	MG29-1-HPRT-標的部位-A4	TATGTAGGGGTCAGGTAATGTT
HPRT標的部位のDNA配列	5587	MG29-1-HPRT-標的部位-B4	ATGTAGGGGTCAGGTAATGTTC
HPRT標的部位のDNA配列	5588	MG29-1-HPRT-標的部位-C4	TGTAGGGGTCAGGTAATGTTCT
HPRT標的部位のDNA配列	5589	MG29-1-HPRT-標的部位-D4	GAAAAAATCACGGTATCTGTCG
HPRT標的部位のDNA配列	5590	MG29-1-HPRT-標的部位-E4	AATCAGAGTAAGCCTTCTAGTG

【０４８１】

【表２８－９】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRT標的部位のDNA配列	5591	MG29-1-HPRT-標的部位-F4	GGACAGGTACTATGAGAGTATA
HPRT標的部位のDNA配列	5592	MG29-1-HPRT-標的部位-G4	AAATGTCAACCTACTGTGGCAT
HPRT標的部位のDNA配列	5593	MG29-1-HPRT-標的部位-H4	AATGTCAACCTACTGTGGCATA
HPRT標的部位のDNA配列	5594	MG29-1-HPRT-標的部位-A5	GTTGTTCTTTCCTGGTATATGC
HPRT標的部位のDNA配列	5595	MG29-1-HPRT-標的部位-B5	CTGGTATATGCTGTGGAATTGA
HPRT標的部位のDNA配列	5596	MG29-1-HPRT-標的部位-C5	AGCATGTCCTACCTGTGGCAAC
HPRT標的部位のDNA配列	5597	MG29-1-HPRT-標的部位-D5	GTGTTGCCACAGGTAGGACATG
HPRT標的部位のDNA配列	5598	MG29-1-HPRT-標的部位-E5	TGTTGCCACAGGTAGGACATGC
HPRT標的部位のDNA配列	5599	MG29-1-HPRT-標的部位-F5	CATACTGTAAATGGGTAACCGT
HPRT標的部位のDNA配列	5600	MG29-1-HPRT-標的部位-G5	CCATACTGTAAATGGGTAACCG
HPRT標的部位のDNA配列	5601	MG29-1-HPRT-標的部位-H5	ATAAAGCTCCATCTCTAAGGCA
HPRT標的部位のDNA配列	5602	MG29-1-HPRT-標的部位-A6	GTGATACCTTTTCTGGAGCATT
HPRT標的部位のDNA配列	5603	MG29-1-HPRT-標的部位-B6	CTGGAGCATTCCTGAGTTCAGG
HPRT標的部位のDNA配列	5604	MG29-1-HPRT-標的部位-C6	TGGAGCATTCCTGAGTTCAGGT
HPRT標的部位のDNA配列	5605	MG29-1-HPRT-標的部位-D6	TGCTGTGATTGGCTTGTTATGT
HPRT標的部位のDNA配列	5606	MG29-1-HPRT-標的部位-E6	GCTGTGATTGGCTTGTTATGTT

【０４８２】

【表２８－１０】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRT標的部位のDNA配列	5607	MG29-1-HPRT-標的部位-F6	CTGTGATTGGCTTGTTATGTTC
HPRT標的部位のDNA配列	5608	MG29-1-HPRT-標的部位-G6	TTGGAAGAGTCATGAGGGACAT
HPRT標的部位のDNA配列	5609	MG29-1-HPRT-標的部位-H6	CAGATGTTAAAGGCAGTCTCAA
HPRT標的部位のDNA配列	5610	MG29-1-HPRT-標的部位-A7	CTTGAGACTGCCTTTAACATCT
HPRT標的部位のDNA配列	5611	MG29-1-HPRT-標的部位-B7	TTGAGACTGCCTTTAACATCTG
HPRT標的部位のDNA配列	5612	MG29-1-HPRT-標的部位-C7	TAACCCAAATGCTGCCTGTTGA
HPRT標的部位のDNA配列	5613	MG29-1-HPRT-標的部位-D7	ATAACCCAAATGCTGCCTGTTG
HPRT標的部位のDNA配列	5614	MG29-1-HPRT-標的部位-E7	TCAACAGGCAGCATTTGGGTTA
HPRT標的部位のDNA配列	5615	MG29-1-HPRT-標的部位-F7	CAACAGGCAGCATTTGGGTTAT
HPRT標的部位のDNA配列	5616	MG29-1-HPRT-標的部位-G7	AACAGGCAGCATTTGGGTTATA
HPRT標的部位のDNA配列	5617	MG29-1-HPRT-標的部位-H7	GAACAAAAGCTGGAGGTGGTAT
HPRT標的部位のDNA配列	5618	MG29-1-HPRT-標的部位-A8	GGTAGAGTTGACTTATACCACC
HPRT標的部位のDNA配列	5619	MG29-1-HPRT-標的部位-B8	GTAGAGTTGACTTATACCACCT
HPRT標的部位のDNA配列	5620	MG29-1-HPRT-標的部位-C8	GGAACAAAAGCTGGAGGTGGTA
HPRT標的部位のDNA配列	5621	MG29-1-HPRT-標的部位-D8	TGGAACAAAAGCTGGAGGTGGT
HPRT標的部位のDNA配列	5622	MG29-1-HPRT-標的部位-E8	TTTTTGGAACAAAAGCTGGAGG

【０４８３】

【表２８－１１】

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
HPRT標的部位のDNA配列	5623	MG29-1-HPRT-標的部位-F8	GGGTAAAACAACTAGTGTGCCA
HPRT標的部位のDNA配列	5624	MG29-1-HPRT-標的部位-G8	GGCACACTAGTTGTTTTACCCT
HPRT標的部位のDNA配列	5625	MG29-1-HPRT-標的部位-H8	GCACACTAGTTGTTTTACCCTA
HPRT標的部位のDNA配列	5626	MG29-1-HPRT-標的部位-A9	CCCTAAAGTTCCTCTTTGTAAG
HPRT標的部位のDNA配列	5627	MG29-1-HPRT-標的部位-B9	GGGATTGTATTTCCAAGGTTTC
HPRT標的部位のDNA配列	5628	MG29-1-HPRT-標的部位-C9	CAAGGTTTCTAGACTGAGAGCC
HPRT標的部位のDNA配列	5629	MG29-1-HPRT-標的部位-D9	TAGACTGAGAGCCCTTTTCATC
HPRT標的部位のDNA配列	5630	MG29-1-HPRT-標的部位-E9	CATCTTTGCTCATTGACACTCT
HPRT標的部位のDNA配列	5631	MG29-1-HPRT-標的部位-F9	ATCTTTGCTCATTGACACTCTG
HPRT標的部位のDNA配列	5632	MG29-1-HPRT-標的部位-G9	CTCATTGACACTCTGTACCCAT
HPRT標的部位のDNA配列	5633	MG29-1-HPRT-標的部位-H9	ACACACCCAAGGAAAGACTATG
HPRT標的部位のDNA配列	5634	MG29-1-HPRT-標的部位-A10	AACACACCCAAGGAAAGACTAT
HPRT標的部位のDNA配列	5635	MG29-1-HPRT-標的部位-B10	GCTCTCCATTTCATAGTCTTTC
HPRT標的部位のDNA配列	5636	MG29-1-HPRT-標的部位-C10	ATAGTCTTTCCTTGGGTGTGTT
HPRT標的部位のDNA配列	5637	MG29-1-HPRT-標的部位-D10	CTTGGGTGTGTTAAAAGTGACC
HPRT標的部位のDNA配列	5638	MG29-1-HPRT-標的部位-E10	ATCCGTGCTGAGTGTACCATGG
HPRT標的部位のDNA配列	5639	MG29-1-HPRT-標的部位-F10	ATTTCATCCGTGCTGAGTGTAC
HPRT標的部位のDNA配列	5640	MG29-1-HPRT-標的部位-G10	GAAACGTCAGTCTTCTCTTTTG
HPRT標的部位のDNA配列	5641	MG29-1-HPRT-標的部位-H10	TAGAGAGGCACATTTGCCAGTA
r;糖リボースを含む天然RNA結合(例えば、A塩基のリボース又はRNA形態は、rAと記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A塩基のデオキシリボース形態は、dAと記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの1つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1及びAltR2は、IDT技術の専有の5'及び3'AltR修飾を指す			

【０４８４】

実施例２２－追加のＭＧ２９－１ガイド化学最適化

同じ塩基配列を有するが、異なる化学修飾を有する５つの単一ガイドの編集活性を、ＭＧ２９－１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、結果を表１５及び図６８に示す。同じ塩基配列及びＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２と呼ばれる市販の化学修飾を有するガイドを、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とする。ガイドｍＡｌｂ２９８－４４は、対照ＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２ガイドの編集活性の６７．５％を呈したが、他の４つのガイドは測定可能な編集をもたら

さなかった。メッセンジャーＭＡＸなどの脂質トランスフェクション試薬を用いるｍＲＮＡ及びガイドの共トランスフェクションが使用される場合、２つのＲＮＡの混合物は、正に荷電した脂質と複合体を形成し、複合体は、エンドサイトーシスを介して細胞に侵入し、最終的に、ｍＲＮＡがタンパク質に翻訳される細胞質に到達する。ＭＧ２９－１などのＲＮＡガイドヌクレアーゼの場合、得られたＭＧ２９－１タンパク質は、ＭＧ２９－１タンパク質に操作された核局在化シグナルによって媒介されるプロセスにおいて核に侵入する前に、細胞質内のガイドＲＮＡと複合体を形成すると推定される。十分な量のＭＧ２９－１タンパク質へのｍＲＮＡの翻訳、続いてガイドＲＮＡへのＭＧ２９－１タンパク質の結合には限られた時間を要するため、ガイドＲＮＡは、予め形成されたＲＮＰがヌクレオフェクションによって送達される場合よりも長い間、細胞質における増加された安定性を必要とし得る。したがって、脂質ベースのｍＲＮＡ／ｓｇＲＮＡの共トランスフェクションは、ＲＮＰヌクレオフェクションの場合よりも安定したガイドを必要とする場合があり、これは、ＲＮＰとして活性であるが、カチオン性脂質試薬を使用してｍＲＮＡと共トランスフェクトされたときに不活性である一部のガイド化学物質をもたらし得る。

【０４８５】

【表２９】

表１５：ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡでトランスフェクトされたＨｅｐａ１－６細胞における化学的に修飾されたＭＧ２９－１ガイドの活性

sgRNA 名	配列番号	sgRNA 配列及び化学修飾	編集活性(AltR1/AltR2対照に対する%)
mAlb298-40	5745	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUi2FCi2FUi2FGi2FUi2FAi2FAi2FCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FAi2FAi2FC*i2FU*i2FGi2FG*i2FC*mA	0
mAlb298-41	5746	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*dGdTdAdGdAdTi2FCi2FUi2FGi2FUi2FAi2FAi2FCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FAi2FAi2FC*i2FU*i2FGi2FG*i2FC*mA	0
mAlb298-42	5747	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*i2FGi2FUi2FAi2FGi2FAi2FUi2FCi2FUi2FGi2FUi2FAi2FAi2FCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FAi2FAi2FC*i2FU*i2FGi2FG*i2FC*mA	0
mAlb298-43	5748	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmAmCU*G*U*U*GUAGAUi2FCi2FUi2FGi2FUi2FAi2FAi2FCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FAi2FAi2FC*i2FU*i2FGi2FG*i2FC*mA	0
mAlb298-44	5749	mC*mU*mU*U*rU*rArArUrUmUmCmUmArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FA*i2FAi2FC*i2FU*i2FG*i2FG*i2FC*mA	67.5

化学修飾の命名法:「/」は、2’-フッ素修飾を有する塩基を分離するために使用される、m;2’-O-メチル塩基(例えば、2’-O-メチル修飾を有するA塩基は、mAと記載される)、i2F;内部2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する内部Cは、/i2FC/と記載される)、52F;配列の5’末端の2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する5’Cは、/52FC/と記載される)、32F;配列の3’末端の2’-フッ素塩基(例えば、2’-フッ素修飾を有する3’A塩基は、/32FA/と記載される)、r;糖リボースを含む天然RNA結合(例えば、A塩基のリボース又はRNA形態は、rAと記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A塩基のデオキシリボース形態は、dAと記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの1つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1及びAltR2は、IDT技術の専有の5’及び3’AltR修飾を指す

【０４８６】

化学修飾を有さないガイド（天然ＲＮＡ）と比較して、これらの化学的に修飾され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ＲＮＡは、インビトロ又はインビボで哺乳類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、哺乳類細胞由来の粗細胞抽出物を選択した。Ｈｅｐａ１－６細胞を、コンフルエント細胞の１５ｃｍのディッシュ当たり３ｍｌの冷ＰＢＳ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回収した。細胞を、１０分間、２００ｇでペレット化し、将来的な使用のため－８０℃で凍結した。安定性アッセイのため、細胞を４体積の冷ＰＢＳ中に再懸濁した（すなわち、１００ｍｇのペ

レットについて、細胞を４００μｌの冷ＰＢＳ中に再懸濁した）。Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を、０．２％（ｖ／ｖ）の終濃度で加え、細胞を１０秒間ボルテックスし、１０分間氷上に置き、１０秒間再びボルテックスした。Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００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、２ｐｍｏｌｅの各ガイド（１ｕｌの２ｕＭストック）とともに２０μｌの細胞粗抽出物を含んだ。入力、０．５時間、１時間、４時間、９時間、及び２１時間（時間単位の時間は、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つの反応をセットアップした。試料を０．５時間～最大２１時間、３７℃でインキュベートし、一方、入力対照を氷上に５分間置いた。各インキュベーション期間の後、反応を、フェノールとグアニジンチオシアネート（Ｔｒｉ試薬、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）の混合物３００ｕｌを加えることによって停止させ、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ＲＮＡの回収を促進した。Ｔｒｉ試薬を加えた後、試料を１５秒間ボルテックスし、－２０℃で保存した。ＲＮＡを、Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ　ＲＮＡ　ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して試料から抽出し、１００ｕｌのヌクレアーゼを含まない水において溶出した。修飾したガイドの検出を、Ｔａｑｍａｎ　ｍｉＲＮＡアッセイテクノロジー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用したＴａｑｍａｎ　ＲＴ－ｑＰＣＲを使用して行い、プライマー及びプローブを、ｍＡｌｂ２９８　ｓｇＲＮＡ中の配列を特異的に検出するよう設計した、これは、ガイドの全てについて同じである。データを、入力試料に対する残りのｓｇＲＮＡの割合の関数としてプロットした（表１６及び図６９）。

【０４８７】

【表３０】

表１６：化学的に修飾されたＭＧ２９－１ガイドの安定性

	残りのガイドの割合		
時間(時間)	未修飾のmAlb298	mAlb298-AltR	mAlb298-44
0.5	31.8640157	46.1691	89.5025
1	19.6826994	18.8809	68.7771
4	3.80753207	7.99366	55.0953
9	1.67464604	2.14928	50
21	1.17190546	0.4044	44.1351

【０４８８】

ガイドｍＡｌｂ２８９－４４は、修飾されていないガイド及びＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２修飾を有するガイドの両方と比較して、細胞溶解物において著しく改善された安定性を呈した。したがって、ｍＡｌｂ２８９－４４ガイドに存在する化学修飾は、インビボでの編集を最適化するのに有用であり得る。ｍＡｌｂ２８９－４４ガイド上に存在する化学修飾を表１５に詳述する。ｍＡｌｂ２８９－４４ガイド化学物質は、３つの追加のホスホロチオエート結合の存在によって、ｍＡｌｂ２８９－３７と呼ばれる別の非常に安定したガイド化学物質とは異なる。

【０４８９】

実施例２３－５’末端にステム－ループを付加することによるＭＧ２９－１のガイドＲＮＡの安定性の改善

ＭＧ２９－１についてのガイドＲＮＡのインビトロでの細胞溶解物における安定性と、ＭＧ３－６／３－４と呼ばれるＩＩ型ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼについてのガイドＲＮＡの安定性との比較は、ＭＧ２９－１ガイドが本質的にあまり安定性でないことを示す（表１７及び図７０Ａ～Ｂ）。

【０４９０】

【表３１】

表１７：ＩＩ型ガイド対Ｖ型ガイドの安定性

	残りのガイドの割合			
	未修飾		5'末端修飾及び3'末端修飾のみ	
時間(時間)	II型	V型	II型	V型
0.5	68.30201	31.86402	61.98539	46.16912
1	51.05061	19.6827	59.66679	18.88091
4	9.672281	3.807532	51.05061	7.99366
9	1.757904	1.674646	40.47211	2.149284
21	0.034051	1.171905	1.447794	0.4044

【０４９１】

図７０Ａに示されるように、化学修飾を有さないガイドＲＮＡを比較する場合、Ｖ型ガイド（ＭＧ２９－１ガイド）は、ＩＩ型ガイド（ＭＧ３－６／３－４ガイド）よりも急速に分解された。図７０Ｂに示されるように、ＲＮＡの両末端の化学修飾を有するガイドＲＮＡを比較する場合、Ｖ型ガイド（ＭＧ２９－１ガイド）とＩＩ型ガイド（ＭＧ３－６／３－４ガイド）との間の安定性の差が更により顕著であった。末端修飾Ｖ型ガイドは、１０時間でほぼ完全に分解されたが、ＩＩ型ガイドの４０％は、同じ時点で残っていた。ＭＧ２９－１（Ｖ型）ガイドの骨格（ＣＲＩＳＰＲ反復及びｔｒａｃｒ）及びＭＧ３－６／３－４（ＩＩ型）ガイドの骨格の二次構造を、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅのフォールディングアルゴリズムを使用して予測し、図７１に示す。ＭＧ２９－１ガイドの骨格は２４ヌクレオチド長であるが、一方でＭＧ３－６／３－４の骨格は８８ヌクレオチド長である。ＭＧ２９－１ガイドの骨格（ＣＲＩＳＰＲ反復）は、５個のヌクレオチド及び－１．２２ｋｃａｌ／ｍｏｌの自由エネルギーからなるステムを有する単一のステムループを形成すると予測されるが、一方で、ＭＧ３－６／３－４の骨格（ＣＲＩＳＰＲ反復及びｔｒａｃｒ）は、－１４．８ｋｃａｌ／ｍｏｌの自由エネルギーを有する３つのステムループを形成すると予測される。ＭＧ３－６／３－４ガイドＲＮＡの３つのステムループは、１０個のヌクレオチドステムを有するステム１（ＴＲＡＣＲの５’末端に）、５個のヌクレオチドステムを有するステム２（中間に）、及び１１個のヌクレオチドステムを有するステム３（骨格の３’末端に）からなる。ＭＧ３－６／３－４ガイドＲＮＡにおけるより大きなサイズでより広範なステム構造は、ＭＧ２９－１ガイドと比較して、このガイドのより大きな安定性に寄与し得る。ＭＧ２９－１ガイドの５’末端にステム－ループ形成ＲＮＡ配列を付加することにより、その安定性が改善され、それによってインビボでの編集の効率が潜在的に改善され得る。一実施形態では、ＭＧ３－６／３－４ガイドのステム１は、配列（ＧＵＵＧＡＧＡＡＵＣＧＡＡＡＧＡＵＵＣＵ<u>Ｕ</u>ＡＡ<u>Ｕ</u>）を含み、下線付き塩基は、非標準Ｇ－Ｕ塩基対を形成すると予測される。ステムの安定性を改善するために、下線付き塩基をＵからＣに変更し、これらを予測されるステムのＧ－Ｃ塩基対に変換した（ＧＵＵＧＡＧＡＡＵＣＧＡＡＡＧＡＵＵＣＵ<u>Ｃ</u>ＡＡ<u>Ｃ</u>）。一実施形態では、このステム－ループ形成配列は、化学物質＃３７を有するＭＧ２９－１ガイドＲＮＡの５’末端に付加される。更に、ヌクレアーゼ攻撃からガイドの５’末端を保護するために、＃３７の化学物質の最も５’末端の４個のヌクレオチド上の化学修飾（２’Ｏ－メチル結合及びホスホロチオエート結合からなる）を、ガイドの新しい５’末端で複製した。これにより、ｍＡｌｂ

２９－８－５０と呼ばれるガイドＲＮＡ配列が生じた（表１８）。代替的なガイド設計では、ｍＡｌｂ２９８－３７の元の５’末端の化学的に修飾された塩基を、ｍＡｌｂ２９－８－４９のようにステム－ループ配列の付加後に、ガイドの新しい５’末端に移動させた。潜在的により安定したＭＧ２９－１ガイドの別の設計では、ステム－ループ１及びステム－ループ２を包含するＭＧ３－６／３－４骨格からのＲＮＡ配列を、ＭＧ２９－１ガイドの５’末端に付加して、含まれる化学的に修飾された塩基が異なるｍＡｌｂ２９－８－４８及びｍＡｌｂ２９－８－４７を作製した。別のバージョンでは、ガイドｍＡｌｂ２９－８－４８は、ループ１（ｍＡＬｂ２９－８－４７）又はループ１及びループ２（（ｍＡＬｂ２９－８－４６）にホスホロチオエート及び２’Ｏ－メチル塩基を含めることによって更に化学的に修飾される。これらのガイドの活性は、ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ脂質試薬又は他の方法論を使用してｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡ混合物のトランスフェクションによって哺乳類細胞において試験され得る。これらのガイドの安定性は、上に記載されるものと同じ哺乳類細胞溶解物アッセイ系で試験することができる。編集活性を保持し、安定性の改善を呈するガイドは、マウスにおけるインビボ試験のための候補である。

【０４９２】

【表３２】

表１８：ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡでトランスフェクトされたＨｅｐａ１－６細胞における化学的に修飾したＭＧ２９－１ガイドの活性

sgRNA 名	配列番号	sgRNA 配列及び化学修飾
mAlb298-37	5750	mC*mU*mU*U*rUrArArUrUmUmCmUmArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FAi2FAi2FC*i2FU*i2FGi2FG*i2FC*mA
mAlb29-8-50	5751	mG*mU*mU*GrArGrArArUrC*mG*mA*mA*mArGrArUrUrCrUrCrArArC*mC*mU*mU*U*UrArArUrUmUmCmUmArCrU*G*U*U*GrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCfGfAfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fGfG*fC*mA
mAlb29-8-49	5752	mG*mU*mU*GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrCrArArC*mC*mU*mU*U*UrArArUrUmUmCmUmArCrU*G*U*U*GrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCfGfAfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fGfG*fC*mA
mAlb29-8-48	5753	mG*mU*mU*GAGAAUCGAAAGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCmC*mU*mU*U*rUrArArUrUmUmCmUmArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FAi2FAi2FC*i2FU*i2FGi2FG*i2FC*mA
mAlb29-8-47	5754	mG*mU*mU*GAGAAUCGAAAGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCCUUUrUrArArUrUmUmCmUmArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FAi2FAi2FC*i2FU*i2FGi2FG*i2FC*mA
mAlb29-8-46	5755	mG*mU*mU*GAGAAUCmG*mA*mA*mAGAUUCUUAAUAAGGCAUCmC*mU*mU*mC*mCGAUGCmC*mU*mU*U*rUrArArUrUmUmCmUmArCrU*rG*rU*rU*rGrUrArGrArUrCrUrGrUrArArCi2FGi2FAi2FUi2FCi2FGi2FGi2FGi2FAi2FAi2FC*i2FU*i2FGi2FG*i2FC*mA
化学修飾の命名法:「/」は、2'-フッ素修飾を有する塩基を分離するために使用される、m;2'-O-メチル塩基(例えば、2'-O-メチル修飾を有するA塩基は、mAと記載される)、i2F;内部2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する内部Cは、/i2FC/と記載される)、52F;配列の5'末端の2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する5'Cは、/52FC/と記載される)、32F;配列の3'末端の2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する3'A塩基は、/32FA/と記載される)、r;糖リボースを含む天然RNA結合(例えば、A塩基のリボース又はRNA形態は、rAと記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A塩基のデオキシリボース形態は、dAと記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの1つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1及びAltR2は、IDT技術の専有の5'及び3'AltR修飾を指す		

【０４９３】

実施例２４－ＭＧ２９－１ヌクレアーゼを用いたインビボゲノム編集

ＭＧ２９－１　Ｖ型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、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び４個のガイドＲＮＡのうちの１個をコードするｍＲＮＡを送達した。試験した４個のガイドＲＮＡは、ｍＡｌｂ２９８－３７、ｍＡｌｂ２９１２－３７、ｍＡｌｂ２９１８－３７、及びｍＡｌｂ２９８－３４であり、それらの配列を表１９に示す。ガイドｍＡｌｂ２９８－３７及びｍＡｌｂ２９８－３４は、同じヌクレオチド配列を有するが、異なる化学修飾を有し、ガイドｍＡｌｂ２９８－３７、ｍＡｌｂ２９１２－３７、及びｍＡｌｂ２９１８－

３７は、異なるスペーサー配列を有するが、同じ化学修飾を有する。

【０４９４】

【表３３】

表１９：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

ガイド名	配列番号	配列
mAlb298-37	5756	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCUGUAACfGfAfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fGfG*fC*mA
mAlb2912-37	5757	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUAGUGUAGfCfAfGfAfGfAfGfGfAfA*fC*fCfA*fU*mU
mAlb2918-37	5758	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUAAGAUUGfAfUfGfAfAfGfAfCfAfA*fC*fUfA*fA*mC
mAlb298-34	5759	mC*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrUrGrUrUrGmUmAmGmArUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrA*rAfC*fUfG*fGfC*mA

化学修飾の命名法:「/」は、2'-フッ素修飾を有する塩基を分離するために使用される、m;2'-O-メチル塩基(例えば、2'-O-メチル修飾を有するA塩基は、mAと記載される)、i2F;内部2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する内部Cは、/i2FC/と記載される)、52F;配列の5'末端の2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する5'Cは、/52FC/と記載される)、32F;配列の3'末端の2'-フッ素塩基(例えば、2'-フッ素修飾を有する3'A塩基は、/32FA/と記載される)、r;糖リボースを含む天然RNA結合(例えば、A塩基のリボース又はRNA形態は、rAと記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A塩基のデオキシリボース形態は、dAと記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの1つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1及びAltR2は、IDT技術の専有の5'及び3'AltR修飾を指す

【０４９５】

Ｈｅｐａ１－６細胞溶解物におけるインビトロ安定性アッセイでは、ｍＡｌｂ２９８－３７ガイドは、ｍＡｌｂ２９８－３４ガイドよりも安定しており（図７２）、ｍＡｌｂ２９８－３７ガイド上の化学修飾が、ガイドＲＮＡを分解から保護するのにより効果的であったことを示す。

【０４９６】

ＭＧ２９－１をコードするｍＲＮＡを、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、並びにＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ又はＴｒｉｌｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入したヌクレオチド及び酵素を使用する標準条件をして、直線化プラスミド鋳型のインビトロ転写によって生成した。ＭＧ２９－１コード配列の配列を、配列番号５６８０に示す。ＭＧ２９－１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個のアミノ酸のリンカー（ＧＧＧＳ）、開始メチオニンコドンを除去したＭＧ２９－１ヌクレアーゼのタンパク質コード配列、３個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、市販のアルゴリズムを使用して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ｐｏｌｙＡテールを、インビトロ転写に使用するプラスミド中にコードさせ、ｍＲＮＡを、Ｔｒｉｌｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入したＣｌｅａｎＣＡＰ（商標）試薬を使用して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。

【０４９７】

ＭＧ２９－１ ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを送達するために使用される脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤は、Ｋａｕｆｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．（例えば、Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．２０１５，１５，１１，７３００－７３０６を参照されたく、参照により本明細書に組み込まれる）を含む文献に記載されるＬＮＰ製剤に基づく。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）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（Ｉｇｎｉｔｅ ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｅｒ、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ）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、終了体積が達成されるまで、Ａｍｉｃｏｎスピン濃縮器（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮した。ＬＮＰ製剤中のＲＮＡの濃度を、Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）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。例示的なＬＮＰは、６５ｎｍ～１２０ｎｍの範囲の直径を有し、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の総ＲＮＡ用量で静脈内注射した。投与後３日目にマウスを　殺し、肝臓を収集し、ＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で供給された消化緩衝液中のビードビーター（Ｏｍｎｉ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を使用してホモジナイズした。ＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、得られたホモジネートからゲノムＤＮＡを精製し、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。次いで、肝臓ゲノムＤＮＡを、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を使用してＰＣＲ増幅した。使用したＰＣＲプライマーを表２０に示す。５０ｎｇのゲノムＤＮＡ及び６４℃のアニーリング温度で、ＰｆｕｓｉｏｎフラッシュハイフィデリティＰＣＲマスターミックス（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してＰＣＲを行った。

【０４９８】

【表３４】

表２０：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プライマー及び配列決定プライマーの配列

プライマー名	配列番号	配列
mAlb90F	5760	CTCCTCTTCGTCTCCGGC
mAlb1073	5761	CTGCCACATTGCTCAGCAC
mALb460F	5762	GCCTGCTCGACCATGCTATA

【０４９９】

得られたＰＣＲ産物は、アガロースゲル電気泳動による単一のバンドであり、ＤＮＡ Ｃｌｅａｎ＆Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ－５キット（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製され、次いで、異なるガイドの標的部位から１００～３００塩基に位置するプライマーｍＡｌｂ４６０Ｆを用いたサンガーシーケンシングに供された。サンガーシーケンシングクロマトグラムを、Ｂｒｉｎｋｍａｎ ｅｔ ａｌ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１４ Ｄｅｃ １６；４２（２２）：ｅ１６８）によって記載されるよ

うに、Ｔｒａｃｋｉｎｇ　ｏｆ　Ｉｎｄｅｌｓ　ｂｙ　ＤＥｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ（ＴＩＤＥ）によって各ガイドの予測される標的部位で挿入及び欠失（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。

【０５００】

ＴＩＤＥ分析の結果を図７３及び表２１に示す。群Ａのマウスは、ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９８－３７を封入しているＬＮＰを受けた。群Ｂのマウスは、ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９１２－３７を封入しているＬＮＰを受けた。群Ｃのマウスは、ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９１８－３７を封入しているＬＮＰを受けた。群Ｄのマウスは、ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９８－３４を封入しているＬＮＰを受けた。全てのマウスは、ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡを封入しているＬＮＰも受けた。ガイドｍＡｌｂ２９８－３７を受けた群Ａの平均インデル頻度は２１％であった。ガイドｍＡｌｂ２９１２－３７を受けた群Ｂの平均インデル頻度は２０％であった。ガイドｍＡｌｂ２９１８－３７を受けた群Ｃの平均インデル頻度は１５％であった。ガイドｍＡｌｂ２９８－３４を受けた群Ｄの平均インデル頻度は０％であった。このデータは、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが、化学修飾塩基（化学物質＃３７）からなるガイドＲＮＡと一緒に、マウスの肝臓においてインビボで活性であったことを示す。ガイドｍＡｌｂ２９８－３７と同じヌクレオチド配列を有するが、異なる化学修飾を有するガイドｍＡｌｂ２９８－３４は活性ではなかった。ガイドｍＡｌｂ２９８－３４は、ガイドｍＡｌｂ２９８－３７よりも細胞溶化物においてより低い安定性を呈し、これはインビボ活性と相関する。

【０５０１】

【表３５】

表２１：ヌクレアーゼｍＲＮＡ及びＬＮＰにパッケージングされたガイドＲＮＡのＩＶ注射の３日後のマウス肝臓の標的部位での遺伝子編集

群	動物	編集効率(%)	R 二乗
A	1281	20	0.98
	1282	19	0.98
	1283	25	0.98
	1284	24	0.98
	1285	17	0.99
B	1286	24	0.97
	1287	12	0.98
	1288	16	0.98
	1289	22	0.97
	1290	27	0.97
C	1291	12	0.99
	1292	19	0.99
	1293	未分析	
	1294	13	0.99
	1295	17	0.99
D	1296	0	1
	1297	0	1
	1298	0	1
	1299	0	1
	1300	0	1

【０５０２】

実施例２５－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ＭＧ２９－１ガイドスクリーニング

Ｈｅｐａ１－６細胞にヌクレオフェクションされたガイドＲＮＡに複合体化されたＭＧ２９－１タンパク質を使用して行われたマウスＨＡＯ－１遺伝子のエクソン１～４のガイドスクリーニングから、ガイドＲＮＡと混合されたＭＧ２９－１をコードするｍＲＮＡのトランスフェクションによる更なる評価のために、５個の高度に活性なガイドを選択した。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／Ｓｔｒｅ

ｐ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。更に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、２５μＬのＯｐｔｉＭＥＭ培地と１．２５μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ　Ｍａｘ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）をマスターミックス溶液中で混合し、ボルテックスし、室温で少なくとも５分間置いた。別個のチューブにおいて、３００ｎｇのＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び１２０ｎｇのｓｇＲＮＡを、２５μＬのＯｐｔｉＭＥＭ培地と一緒に混合し、軽くボルテックスした。適切な量のＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ溶液を各ＲＮＡ溶液に添加し、チューブをフリックして混合し、低速で軽くスピンダウンした。完全な編集試薬溶液を、室温で１０分間インキュベートし、次いで、Ｈｅｐａ１－６細胞に直接加えた。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し、ゲノムＤＮＡを、ＭａｇＭＡＸ（商標）ＤＮＡマルチサンプルウルトラ２．０キットを用いたＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒ　Ｆｌｅｘを介して、自動磁気ビーズ精製により精製した。ガイドの活性を、表２２に要約し、一方で使用したプライマーを表２３に要約する。

【０５０３】

【表３６】

表２２：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ＭＧ２９－１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%)
mH29-1	TTTG	5763	CCCCAGACCTGTAATAGTCATA	26.0
mH29-15	TTTG	5764	TGACTGTGGACACCCCTTACCT	32.7
mH29-16	TTTC	5765	ATTACAGCCTGTCAGACCATGG	15.0
mH29-26	TTTC	5766	TCCATTTCATTACAGCCTGTCA	10.0
mH29-29	TTTC	5767	CCTTAGGAGAAAATGCCAAATC	36.7

【０５０４】

【表３７】

表２３：最初の４つのエクソンの各々でＰＣＲに使用し、サンガーシーケンシングに使用し、マウス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	配列番号	プライマー配列
マウスHAO1エクソン1	フォワードPCR	PCR_mHE1_F_+233	5768	GTGACCAACCCTACCCGTTT
	リバースPCR	PCR_mHE1_R_-553	5769	GCAAGCACCTACTGTCTCGT
	配列決定	Seq_mHE1_F_+139	5770	GTCTAGGCATACAATGTTTGCTCA
マウスHAO1エクソン2	フォワードPCR	HAO1_E2_F5721	5771	CAACGAAGGTTCCCTCCAGG
	リバースPCR	HAO1_E2_R6271	5772	GGAAGGGTGTTCGAGAAGGA
	配列決定	5938F Seq_HAO1_E2	5773	CTATGCAAGGAAAAGATTTGGCC
マウスHAO1エクソン3	フォワードPCR	HAO1_E3_F23198	5774	TGCCCTAGACAAGCTGACAC
	リバースPCR	HAO1_E3_R23879	5775	CAGATTCTGGAAGTGGCCCA
	配列決定	HAO1_E3_F23198	5774	フォワードPCRプライマーと同じ
マウスHAO1エクソン4	フォワードPCR	PCR_mHE4_F_+300	5776	GGCTGGCTGAAAATAGCATCC
	リバースPCR	HAO1_E4_R31650	5777	AGGTTTGGTTCCCCTCACCT
	配列決定	PCR_mHE4_R_-149	5778	TCTGCCATGAAGGCATATGGAC

【０５０５】

実施例５２－Ｔ細胞におけるｍＲＮＡエレクトロポレーションの効率

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＭＢＣから精製した。ｍＲＮＡのヌクレオフェクションを以下のように行った：２００，０００個の細胞を、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーター（ＤＳ－１２０）を使用して、５００ｎｇのｍＲＮＡ及び示される量のガイドＲＮＡで共トランスフェクトした。細胞を採取し、初めのトランスフェクションの３日後にゲノムＤＮＡを調製した。「＋ｇＲＮＡ」と標識された条件について、最初のトランスフェクションの１５時間後、細胞を、示される量の追加のガイドでヌクレオフェクションした。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適した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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図７４）。

【０５０６】

実施例５３－化学的に修飾されたガイドを用いた編集

初代Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従って、負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用してＰＢＭＣから精製した。ｍＲＮＡのヌクレオフェクションを以下のように行った：２００，０００個の細胞を、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーター（ＤＳ－１２０）を使用して、５００ｎｇのｍＲＮＡ及び示される量のガイドで共トランスフェクトした。細胞を採取し、初めのトランスフェクションの３日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＲＮＰのヌ

クレオフェクションは、１２０ｐｍｏｌのタンパク質及び１６０ｐｍｏｌのガイドＲＮＡを組み合わせることによって行った。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを作製し、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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図７５）。

【０５０７】

実施例５４－既存の抗体応答を評価するＥＬＩＳＡアッセイ

ＭＧ２９－１は、Ｅｘｐｉ２９３（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｋｉｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してヒトＨＥＫ２９３細胞中で発現され、精製された。簡潔には、２９３個の細胞を、強力なウイルスプロモーターによって駆動されるヌクレアーゼをコードするプラスミドでリポフェクションした。細胞を撹拌しながら懸濁培養物中で増殖させ、トランスフェクションの２日後に採取した。ヌクレアーゼタンパク質を６－Ｈｉｓ親和性タグに融合し、金属親和性クロマトグラフィーによって５０～６０％の純度に精製した。並行溶解物をモックトランスフェクト細胞から作製し、同一の金属親和性クロマトグラフィープロセスに供した。Ｃａｓ９はＩＤＴから購入し、＞９５％純粋である。

【０５０８】

ＭａｘｉＳｏｒｐ（登録商標）ＥＬＩＳＡプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、１×リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で希釈した０．５μｇのヌクレアーゼ又は対照タンパク質でコーティングし、室温で一晩インキュベートした。次いで、プレートを洗浄し、１％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）／１×ＰＢＳ溶液（１％ＢＳＡ－ＰＢＳ）とともに室温で１時間インキュベートした。別の洗浄操作の後、ウェルを、無作為に選択されたヒトドナーから採取した５０個を超える別個の血清試料（１％ＢＳＡ－ＰＢＳ中１：５０希釈）とともに室温で１時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ中で１：５０，０００に希釈されたペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト（Ｆｃγ断片特異的）二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）とともに室温で１時間インキュベートした。アッセイは、製造業者の仕様に従って、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）液体基質系キット（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用して開発された。抗体力価は、４５０ｎｍで測定された吸光度値として報告する（図７６）。この抗原に対する広範なワクチン接種のため破傷風トキソイドを陽性対照として使用し、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。データは、ＳｐＣａｓ９及び破傷風トキソイド（陽性対照）とは対照的に、ＭＧ２９－１がアルブミン及び２９３Ｔ細胞抽出物に対して類似の抗体応答を有したことを示し、ドナーがＭＧ２９－１の抗原性エピトープへの既存の曝露を有していなかったことを示す。これは、この酵素が、既存の抗体応答によるインビボでの不活性化の影響を受けにくいため、インビボ編集により有効であり得ることを示唆している。

【０５０９】

実施例５５－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を介して送達されたＭＧ２９－１を用いたマウスＨＡＯ－１のインビボ編集

ヒト遺伝性疾患原発性高シュウ酸尿症Ｉ型（ＰＨ１）は、肝臓におけるグリコール酸代謝を破壊し、かつシュウ酸の過剰産生をもたらすアラニン－グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子（ＡＧＸＴ）の変異によって引き起こされる。シュウ酸は、腎臓によって身体から除去され、かつ尿中に排泄される不溶性代謝物である。シュウ酸産生レベルの上昇は、腎臓及び他の器官におけるシュウ酸の蓄積をもたらし、腎不全並びに他の器官への損傷をもたらす。ＰＨ１に利用可能な治癒的治療は、欠陥のある腎臓機能を置き換えるために腎臓移植としばしば組み合わされる肝臓移植である。ＨＡＯ－１遺伝子は、グリコール酸代謝経路のＡＧＸＴの上流にある酵素グリコール酸オキシダーゼ（ＧＯ）をコードする。ＧＯタンパク質の量の低減は、シュウ酸の産生を低減し、したがって、ＰＨ１のマウスモデルで（Ｍａｒｔｉｎ－Ｈｉｇｕｅｒａｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｖｏｌ．２４　ｎｏ．４，７１９－７２５（２０１６）ｄｏｉ：１０．

１０３８／ｍｔ．２０１５．２２４を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、及びＨＡＯ－１を標的とするＲＮＡｉ薬剤を用いた臨床試験において（Ｆｒｉｓｈｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．ＣＪＡＳＮ Ｊｕｌｙ ２０２１，１６（７）１０２５－１０３６ ｄｏｉ：１０．２２１５／ＣＪＮ．１４７３０９２０を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）示されるように、ＰＨ１の治療のための効果的なアプローチである

【０５１０】

ＨＡＯ－１遺伝子をノックダウンするゲノム編集アプローチは、ＰＨ１患者のための治癒療法のための魅力的なアプローチである。ＰＨ１に対するゲノム編集療法の１つのアプローチは、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）ＤＮＡ修復経路によって修復される肝細胞内のＨＡＯ－１遺伝子のコード領域内に二本鎖切断を作り出すことである。肝細胞は、ＨＡＯ－１遺伝子を発現する肝臓の細胞型であり、ＮＨＥＪ経路は、これらの細胞における主要なＤＮＡ修復経路である。ＮＨＥＪ修復経路は、エラーが発生しやすく、二本鎖切断の部位に挿入又は欠失を導入し、フレームシフト（挿入又は欠失が３ヌクレオチドの倍数でない場合）、又はアミノ酸の欠失若しくは挿入をもたらし得る。フレームシフトの導入は、ナンセンス媒介性ｍＲＮＡ減衰の誘導につながり得、これはｍＲＮＡのレベルを低減し、タンパク質ノックダウンに更に寄与する。

【０５１１】

二本鎖切断は、ＲＮＡガイドＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼによって配列特異的様式で生成され得る。ＭＧ２９－１は、３８～４２ヌクレオチドの短いガイドＲＮＡを利用するＶ型ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼである。ＭＧ２９－１は、主に培養された哺乳類細胞で試験されたときに切断部位で欠失を生成し、それは遺伝子をノックダウンする目的で魅力的となる。インビボ治療に有用であるために、ＭＧ２９－１活性は、臨床的に適切な送達系を使用して送達された場合、生きた哺乳動物において理想的に維持される。脂質ナノ粒子は、齧歯類及び霊長類における静脈内投与後にｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡを肝細胞に効率的に送達するため、肝臓における肝細胞のインビボゲノム編集のための魅力的な送達系を代表する。したがって、ＰＨ１の可能な療法としてＨＡＯ－１遺伝子をノックダウンすることにおいて使用するためのゲノム編集系としてのＭＧ２９－１を評価した。

【０５１２】

ＭＧ２９－１ヌクレアーゼをコードするメッセンジャーＲＮＡは、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼ、並びにｒＵＴＰ及びＣｌｅａｎＣＡＰ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）の代わりにリボヌクレオチドｒＡＴＰ、ｒＣＴＰ、及びｒＧＴＰとＮ１－メチルシュードウリジンとの混合物を使用する直線化プラスミド鋳型のインビトロ転写によって生成された。プラスミドはまた、コード配列の３’末端におよそ１００ｎｔのポリＡテールをコードした。野生型ＭＧ２９－１タンパク質をコードするｍＲＮＡに加えて、Ｓ１６８Ｒの単一アミノ酸変化を有するＭＧ２９－１タンパク質をコードする第２のｍＲＮＡを合成した。ｍＲＮＡを市販のスピンカラム上で精製し、濃度を２６０ｎＭでの吸光度によって決定し、純度をＴａｐｅ Ｓｔａｔｉｏｎ（Ａｇｉｌｅｎｔ）によって決定した。

【０５１３】

ガイドＲＮＡは、マウス肝臓細胞株Ｈｅｐａ１－６におけるマウスＨＡＯ－１遺伝子のエクソン１～４にわたる複数のガイドの編集効率評価に基づいて選択された。３個のガイドを、集合的に化学修飾＃３７と称される特定の位置での塩基の化学修飾の組み合わせを組み込んで化学的に合成し、これらのガイドＲＮＡを以下の表２５に示す。

【０５１４】

【表３８】

表２５：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名	配列番号	配列
mH29-1_37	5779	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCCCAGAfCfCfUfGfUfAfAfUfAfG*fU*fCfA*fU*mA
mH29-15_37	5780	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUGACUGUfGfGfAfCfAfCfCfCfCfU*fU*fAfC*fC*mU
mH29-29_37	5781	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fAfA*fU*mC

修飾塩基及び結合のコード：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

【０５１５】

ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡは、Ｋａｕｆｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ（Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔ．２０１５，１５，１１，７３００－７３０６，ＰＭＩＤ：２６４６９１８８，ＤＯＩ：１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．５ｂ０２４９７、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）によって本質的に記載されるプロセスを使用して、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に別々にパッケージングされた。脂質は、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓから、又はＣｏｒｄｅｎ　Ｐｈａｒｍａから購入し、エタノール中に溶解した。ｍＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを水中で調製し、次いで、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。４つの脂質成分を特定の比率で、エタノール中で組み合わせて、脂質ワーキングストックを作製した。例示的な脂質混合物は、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のモル比で含んでいた。脂質ワーキングストック及びＲＮＡワーキングストックを、１２ｍＬ／分の流量、及び１体積の脂質ワーキングストック対３体積のＲＮＡワーキングストックの比率で、マイクロ流体混合装置（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ）中で組み合わせた。製剤中のＣ１２－２００対ＲＮＡの質量比は、１０対１であった。製剤化されたＬＮＰを１×ＰＢＳで１：１に希釈し、次いで、１×ＰＢＳ中でそれぞれ１時間透析し、続いて、Ａｍｉｃｏｎスピンコンセントレータ中で濃縮した。得られたＬＮＰを１×ＰＢＳ緩衝液中で製剤化し、０．２ｕＭフィルターを通してフィルター滅菌し、４℃で保存した。ＬＮＰ内及びＬＮＰ外のＲＮＡの濃度を、Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して測定した。ＬＮＰの平均直径及び多分散性を、ＮａｎｏＢｒｏｏｋ　９０Ｐｌｕｓ（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ））を使用した動的光散乱によって、得られた濃縮ＬＮＰで測定した。

【０５１６】

ガイドＲＮＡ及びＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ又はＭＧ２９－１＿Ｓ１６８Ｒ　ｍＲＮＡを封入するＬＮＰを、１：１のＲＮＡ質量比で混合し、次いで、マウス当たり０．１ｍｌの総体積で、１ｋｇ当たり１ｍｇのＲＮＡの用量で尾静脈を介して野生型Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内注射した。投与後１０日目にマウスを　　殺し、肝臓の３つの葉（左外側、右外側、内側）を収集し、急速凍結し、－８０℃で保存した。肝臓の左外側葉全体を、ビーズミル中で組織重量１００ｍｇ当たり０．４ｍＬの緩衝液を使用して、ゲノム消化緩衝液（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）中でホモジナイズした。ゲノムＤＮＡを、Ｐｕｒｅｌｉｎｋ

Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用してホモジネートのアリコートから精製した。各特異的ガイドＲＮＡ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サイクルからなるＰＣＲ反応において、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）に使用されるバーコード化プライマーと相補的であるアダプターを有する遺伝子特異的プライマーを使用してＰＣＲ増幅した。この第１のＰＣＲ反応の産物を、合計１０サイクルを使用して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、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑ機器上でＮＧＳに供し、結果をカスタムスクリプトを使用して処理して、ＨＡＯ－１遺伝子の標的部位に挿入又は欠失（インデル）を含む配列決定読み取りの割合を生成した。ＰＢＳ緩衝液を注射したマウスの肝臓からのゲノムＤＮＡを対照として使用した。平均配列決定読み取り数は１４２，０００読み取り（範囲５４，０００～２０５，０００）であった。ＮＧＳデータはまた、フレームシフトを生成するインデルの割合の予測、及びインデルプロファイルの決定を可能にした（図８０）。

【０５１７】

ビーズミル中のＰＢＳ中でホモジナイズすることによって、同じマウスからの肝臓の右外側葉全体から総タンパク質を抽出し、続いて、－８０℃及び室温で３ラウンドの凍結融解を行った。溶解物を遠心分離して組織破片を除去し、上清を収集した。上清中の総タンパク質の濃度を、ＢＣＡアッセイを使用して決定した。等量の総タンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で分画し、ニトロセルロース膜に移し、次いで、抗グリコール酸オキシダーゼ抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ ＡＦ６１９７、ヒツジ抗ＨＡＯ１）でプローブした。検出は、ＨＲＰコンジュゲート二次抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ ＨＡＦ０１６、ロバ抗ヒツジＩｇＧ）を利用し、続いて、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｄｕｒａ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ基質（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号３４０７６）での検出、及びＢｉｏ－Ｒａｄ ＣｈｅｍｉＤｏｃ ＭＰイメージャーでの可視化を利用した。

【０５１８】

試験したガイドの編集活性を以下の表２６に要約する。

【０５１９】

【表３９】

表２６：マウスにおいてインビボで試験されたガイドＲＮＡの編集活性

ガイドRNA名	標的化されたHAO-1のエクソン	mRNAトランスフェクションによるHepa1-6細胞における編集活性(インデル%)	RNPヌクレオフェクションによるHepa1-6細胞における編集活性(インデル%)
mH29-1_37	エクソン1	17%	92.6%
mH29-15_37	エクソン3	34%	96.8%
mH29-29_37	エクソン4	35%	93.8%

【０５２０】

リボ核タンパク質複合体のヌクレオフェクションにより、これらのガイドＲＮＡは全て、Ｈｅｐａ１－６細胞において９０％以上の編集活性を有した。ＭＧ２９－１ ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡがリポフェクション（ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ試薬、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して共トランスフェクトされたときのＨｅｐａ１－６細胞における編集レベルは、より低いトランスフェクション効率に起因してより低く、ガイドｍＨ２９－１５及びｍＨ２９－２９は、このトランスフェクション方法によって試験されたときに

ｍＨ２９－１よりも著しく強力であった。

【０５２１】

ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを封入するＬＮＰの特徴を以下の表２７に要約する。

【０５２２】

【表４０】

表２７：脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の特徴

LNP	ペイロード	LNP 直径	LNP PDI	RNA の 回収%(収率)	封入された RNA の%
L012-A	mH29-1_37	74	0.15	71	92.7
L012-B	mH29-15_37	85	0.08	87	93.5
L012-C	mH29-29_37	83	0.121	78	92.1
L012-M	MG29-1 mRNA	98	0.13	97	92.9
L012-S	MG29-1_S168R mRNA	76	0.10	84	92.8

【０５２３】

３つのガイドＲＮＡを封入するＬＮＰは、７４ｎｍ～８５ｎｍの直径を有し、多分散性（ＰＤＩ）は０．０８～０．１５であった。ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びＭＧ２９－１＿Ｓ１６８Ｒ　ｍＲＮＡを封入するＬＮＰは、それぞれ９８ｎｍ及び７６ｎｍの直径を有し、ＰＤＩ値は、低い多分散性を示す０．１５未満であった。得られたＬＮＰ中で回収された入力ＲＮＡの割合は、７１％～９７％の範囲であり、ＬＮＰ内に封入された総ＲＮＡの割合は、全てのＬＮＰについて９２％以上であった。これらのデータは、ガイドＲＮＡ及びＭＧ２９－１　ｍＲＮＡの両方が、ＬＮＰに効率的に封入され得ること、及び得られたＬＮＰが、小さなサイズ（１００ｎＭ未満）であり、低い多分散性であったことを示す。

【０５２４】

ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの各々を封入するＬＮＰの静脈内注射の１０日後のＨＡＯ－１遺伝子の標的部位における編集レベルを、図７７に示す。予想通り、ＰＢＳ緩衝液を注射したマウスは編集を有さなかった。ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－１＿３７を封入するＬＮＰを注射したマウスは、１％～５２％の範囲の可変レベルの編集を呈した。ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－１５＿３７を封入するＬＮＰを注射したマウスは、平均５０．４％（範囲４５％～５４％）で一貫したレベルの編集を呈した。ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－２９＿３７を封入するＬＮＰを注射したマウスは、平均５７．７％（範囲５４％～６３％）で一貫したレベルの編集を呈した。ＭＧ２９－１＿Ｓ１６８Ｒ　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－１５＿３７を封入したＬＮＰを注射したマウスは、平均５０．８％（範囲３８％～６１％）で一貫したレベルの編集を呈した。これらの結果は、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡが、最適化された化学物質を有するガイドＲＮＡと一緒に、ＬＮＰ中で送達されたときにマウスの肝臓の標的遺伝子座を編集することができることを示す。試験された異なるスペーサー配列を有する３つのガイドＲＮＡのうち、２つは一貫して高レベルの編集を呈し、一方で１つはより可変的な編集を呈した。このタイプのＬＮＰは、それらのペイロードを肝細胞にほぼ排他的に送達し、かつ肝細胞はラット肝臓中の細胞総数の６０～６５％（Ｂａｌｅ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　ｖｏｌｕｍｅ　６，Ａｒｔｉｃｌｅ　ｎｕｍｂｅｒ：２５３２９（２０１６）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ２５３２９、参照によりその全体が本明細書に組み込

まれる）、及びマウス肝臓中の総細胞の５２％（Ｂａｒｒａｔｔａ　ｅｔ　ａｌ，Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ｖｏｌｕｍｅ　１３１，ｐａｇｅｓ７１３－７２６（２００９）ｄｏｉ：１０．１００７／ｓ００４１８－００９－０５７７－１、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を占めるため、ＨＡＯ－１遺伝子の各コピーで全ての肝細胞が編集された場合に達成可能な編集の最大レベルは、６０％～６５％であると予測される。したがって、肝臓から精製された総ゲノムＤＮＡで測定された５０％の編集は、肝細胞のおよそ７５～８０％の編集を表す。培養された細胞における編集効率を改善することができるＭＧ２９－１におけるＳ１６８Ｒアミノ酸変化の含有は、試験した１つのガイドＲＮＡを用いたこの研究では編集効率を改善しなかった。ＭＧ２９－１のＳ１６８Ｒアミノ酸バリアントを用いた編集効率の改善は、低編集を呈したガイドＲＮＡで以前に観察され、これは、高レベルの編集のために既に選択されたガイドＲＮＡで、ここで改善が観察されなかった理由を説明し得る。インデルプロファイル（図８０）は、全体が欠失からなっていた。欠失の大部分は、１～１１ヌクレオチドであり、少数のより大きな欠失を有した。ガイドｍＨ２９－１５及びｍＨ２９－２９で処置されたマウスの間で予測されるフレームシフト生成の頻度は、平均７５％で、総インデルの７０～８０％の範囲であった。したがって、平均して、観察されたインデルの７５％が、ＨＡＯ－１コード配列にフレームシフトを作製し、それが編集部位の下流のアミノ酸配列の破壊、及び終止コドンを作製する高い可能性をもたらすと予測される。

【０５２５】

同じマウスからの肝臓の他の主要な葉を、ＨＡＯ－１遺伝子の産物であるタンパク質グリコール酸オキシダーゼ（ＧＯ）のレベルについて分析して、ＨＡＯ－１遺伝子に導入されたインデルが肝臓のＧＯタンパク質レベルの低減をもたらしたかどうかを決定した。ＧＯタンパク質に対する抗体を使用したウェスタンブロット分析は、予想されるサイズのバンドを検出した（表２８及び図７８Ａ～Ｂ）。

【０５２６】

【表４１】

表２８：マウスにおけるグリコール酸オキシダーゼの編集

マウス	処置	編集%
1	PBS	0
2		0
3	mH29-1_37 MG29-1 mRNA	23
4		1
5		52
6		ND
8	mH29-15_37 MG29-1 mRNA	54
9		54
10		49
11		45
12		51
13	mH29-29_37 MG29-1 mRNA	56
14		63
15		58
16		58
17		54
18	mH29-15_37 MG29-1_S168R mRNA	61
19		39
20		51
21		52
22		ND

【０５２７】

ＰＢＳ緩衝液を受けたマウスと比較して、ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び様々なガイドＲＮＡを封入するＬＮＰを受けたマウスは、ＧＯタンパク質の低減されたレベルを呈した。概して、ＧＯタンパク質の低減の大きさは、ＮＧＳによって同じマウスで測定されるＨＡＯ－１遺伝子における編集効率と相関した。ＧＯタンパク質の低減を示したマウスのうちの２匹からの肝臓タンパク質を、３つの異なる量の総タンパク質をゲル上に充填し、ウェスタンブロットを繰り返すことによって更に試験した。図７９に示されるように、ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡ　ｍＨ２９－１＿３７又はｍＨ２９－１５＿３７のいずれかを封入するＬＮＰで処置した２匹のマウスにおけるＧＯタンパク質の低減が、異なる充填の総タンパク質で明確に観察された。これらのデータは、ＨＡＯ－１遺伝子の編集が、マウスの肝臓におけるＧＯタンパク質のレベルの低減をもたらしたことを示す。

【０５２８】

実施例５６－ヒト末梢血Ｂ細胞におけるＴＲＡＣのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

ヒト末梢血Ｂ細胞を、ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入し、ヌクレオフェクションの前にＩｍｍｕｎｏＣｕｌｔ（商標）Ｂ細胞増殖キットを使用して２日間増殖させた。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＢ細胞（２００，０００）に行った。細胞を採取し、トランスフェクションの３日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳ分析のために、ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを使用して、ＴＲＡＣ　３５ガイドＲＮＡ（配列番号５６８１）の標的配列を増幅した。アンプリコンをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図８１）。

【０５２９】

【表４２】

表２８Ｂ：実施例５６のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

ガイド標的	配列番号	ガイド名	配列
TRAC を標的とする MG29-1 sgRNA	5681	MG29-1-TRAC-sgRNA-35	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrUrCrArGrCrUrGrGrUrArCrArCrG*mG
TRAC 標的部位の DNA 配列	5682	MG29-1-TRAC-標的部位-35	GAGTCTCTCAGCTGGTACACGG
TRAC を標的とする MG29-1 sgRNA	5683	MG29-1-TRAC-sgRNA-35-AltR	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrUrCrArGrCrUrGrGrUrArCrArCrGrG/AltR2/
TRAC 標的部位の DNA 配列	5684	MG29-1-TRAC-標的部位-35-AltR	GAGTCTCTCAGCTGGTACACGG
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5'及び 3'AltR 修飾を指す			

【０５３０】

実施例５７－造血幹細胞（ＨＳＣ）におけるＴＲＡＣのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

固定化された末梢血ＣＤ３４＋細胞を、ＡｌｌＣｅｌｌｓから取得し、ヌクレオフェクションの前に、ＳｔｅｍＳｐａｍ（商標）ＣＣ１１０サイトカインカクテルを補充したＳ

ＴＥＭＣＥＬＬ　ＳｔｅｍＳｐａｎ（商標）ＳＦＥＭ　ＩＩ培地中で４８時間培養した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＨＳＣ（２００，０００）に行った。細胞を採取し、トランスフェクションの３日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを使用して、ＭＧ２９－１　ＴＲＡＣ　３５　ｇＲＮＡ（配列番号５６８１）の個々の標的配列を増幅した。ＮＧＳアンプリコンをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図８２）。

【０５３１】

実施例５８－人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）におけるＴＲＡＣのＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

ＡＴＣＣ－ＢＸＳ０１１６ヒト［非ヒスパニック系白人女性］人工多能性幹（ＩＰＳ）細胞を、ヌクレオフェクションの前に、１０μＭのＲＯＣＫ阻害剤Ｙ－２７６３２を含むｍＴＥＳＲ　Ｐｌｕｓ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中のＣｏｒｎｉｎｇ　Ｍａｔｒｉｇｅｌでコーティングされたプラスチックウェア上で２４時間培養した。ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してｉＰＳＣ（２００，０００）に行った。トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡ抽出のためにＡｃｃｕｔａｓｅを用いて細胞を採取した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを使用して、ＴＲＡＣ　３５　ｇＲＮＡ（配列番号５６８１）の個々の標的配列を増幅した。アンプリコンをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図８３）。

【０５３２】

実施例５９－次世代シーケンシング（ＮＧＳ）によって定量化された、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼを用いたインビボゲノム編集

ＭＧ２９－１　Ｖ型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、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ及び４個のガイドＲＮＡのうちの１個を脂質ナノ粒子で送達した。試験した４個のガイドＲＮＡは、ｍＡｌｂ２９８－３７、ｍＡｌｂ２９１２－３７、ｍＡｌｂ２９１８－３７、及びｍＡｌｂ２９８－３４であり、それらの配列を以下の表２９に示す。ガイドｍＡｌｂ２９８－３７及びｍＡｌｂ２９８－３４は、同じヌクレオチド配列を有するが、異なる化学修飾を有し、ガイドｍＡｌｂ２９８－３７、ｍＡｌｂ２９１２－３７、及びｍＡｌｂ２９１８－３７は、異なるスペーサー配列を有するが、同じ化学修飾を有する。

【０５３３】

【表４３】

表２９：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

ガイド名	配列番号	配列
mAlb298-37	5756	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU CUGUAACfGfAfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fGfG*fC*mA
mAlb2912-37	5757	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU AGUGUAGfCfAfGfAfGfAfGfGfAfA*fC*fCfA*fU*mU
mAlb2918-37	5758	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU AAGAUUGfAfUfGfAfAfGfAfCfAfA*fC*fUfA*fA*mC
mAlb298-34	5759	mC*rU*rUrArArUrUmUmCmUmArCrUrGrUrUrGmUmAmGmA rUrCrUrGrUrArArCrGrArUrCrGrGrGrA*rAfC*fUfG*fGfC*mA

Ｍ：２’－Ｏメチル修飾塩基；ｆ：２’－フッ素修飾塩基；＊：ホスホロチオエート骨格

【０５３４】

Ｈｅｐａ１－６細胞溶解物におけるインビトロ安定性アッセイでは、ｍＡｌｂ２９８－３７ガイドは、ｍＡｌｂ２９８－３４ガイドよりも安定しており、ｍＡｌｂ２９８－３７ガイド上の化学修飾が、ガイドＲＮＡを分解から保護するのにより効果的であったことを示す。

【０５３５】

ＭＧ２９－１をコードするｍＲＮＡ（配列番号５６８７）を、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ又はＴｒｉｌｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入したヌクレオチド及び酵素を使用して、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼ使用する直線化プラスミド鋳型のインビトロ転写によって生成した。ＭＧ２９－１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個のアミノ酸のリンカー（ＧＧＧＳ）、開始メチオニンコドンを除去したＭＧ２９－１ヌクレアーゼのタンパク質コード配列、３個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、市販のアルゴリズムを使用して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ｐｏｌｙＡテールを、インビトロ転写に使用するプラスミド中にコードさせ、ｍＲＮＡを、Ｔｒｉｌｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入したＣｌｅａｎＣＡＰ（商標）試薬を使用して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。

【０５３６】

ＭＧ２９－１ ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを送達するために使用される脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤を生成するために、４つの脂質成分をエタノール中に溶解し、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（Ｉｇｎｉｔｅ ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｅｒ、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ）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、所定の体積が達成されるまで、Ａｍｉｃｏｎスピン濃縮器（Ｍｉｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮した。ＬＮＰ製剤中のＲＮＡの濃度を、Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）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。例示的なＬＮＰは、６５ｎｍ～１２０ｎｍの範囲の直径を有し、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の総ＲＮＡ用量で静脈内注射した。投与後３日目にマウスを　　殺し、肝臓を収集し、ＰｕｒｅＬｉｎｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で供給された消化緩衝液中のビードビーター（Ｏｍｎｉ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を使用してホモジナイズした。ＰｕｒｅＬｉｎｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、得られたホモジネートからゲノムＤＮＡを精製し、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。

【０５３７】

次いで、肝臓ゲノムＤＮＡを、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３０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、かつＭｉＳｅｑ配列決定品質を改善するために、第２のＰＣＲで使用するＰＣＲプライマーと相補的である保存された領域、続いて５Ｎを含み、マウスゲノム中の標的領域と相補的である配列で終わる。ＰＣＲを、Ｑ５（登録商標）Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　２×Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、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、ＭｉＳｅｑ装置上の次世代シーケンシングのための固有の二重イルミナバーコード（ＩＤＴ）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、そこからインデルパーセンテージ及びインデルプロファイルを、独自のＰｙｔｈｏｎスクリプトを使用して計算した。

【０５３８】

【表４４】

表３０：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シーケンシングプライマーの配列

プライマー名	目的	配列番号	配列
mAlb298_NGS_F	アルブミンイントロン１の標的部位を増幅する	5782	GCTCTTCCGATCTNNNNNCTTGAGTTTGAATGCACAGATA
mAlb298_NGS_R	アルブミンイントロン１の標的部位を増幅する	5783	GCTCTTCCGATCTNNNNNTGGAAACAGGGAGAGAAAAACC
mAlb2912_NGS_F	アルブミンイントロン１の標的部位を増幅する	5784	GCTCTTCCGATCTNNNNNTACAAACATGACAGAAACACTAA
mAlb2912_NGS_R	アルブミンイントロン１の標的部位を増幅する	5785	GCTCTTCCGATCTNNNNNGATTGATGAAGACAACTAACTGT
mAlb2918_NGS_F	アルブミンイントロン１の標的部位を増幅する	5786	GCTCTTCCGATCTNNNNNCTTTGAGTGTAGCAGAGAGG
mAlb2918_NGS_R	アルブミンイントロン１の標的部位を増幅する	5787	GCTCTTCCGATCTNNNNNCATTATACCGATGGGCGATC

【０５３９】

ＮＧＳ分析の結果を図８４及び表３１に示す。群Ａのマウスは、ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９８－３７を封入しているＬＮＰを受けた。群Ｂのマウスは、ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９１２－３７を封入しているＬＮＰを受けた。群Ｃのマウスは、ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９１８－３７を封入しているＬＮＰを受けた。群Ｄのマウスは、ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９８－３４を封入しているＬＮＰを受けた。群Ａ～Ｄの全てのマウスはまた、注射前に１：１のＲＮＡ質量比でＬＮＰを含むガイドＲＮＡと混合したＭＧ２９－１　ｍＲＮＡを封入するＬＮＰを受けた。２匹のマウスに対照としてＰＢＳを注射した（群Ｅ）。

【０５４０】

【表４５】

表３１：ヌクレアーゼｍＲＮＡ及びＬＮＰにパッケージングされたガイドＲＮＡのＩＶ注射の３日後のマウス肝臓の標的部位での遺伝子編集

群	動物	NGSによる編集効率(%)	群当たりの平均	群当たりの標準偏差
A	1281	50.65	53.9	2.8
	1282	53.80		
	1283	53.50		
	1284	58.43		
	1285	53.14		
B	1286	53.19	52.3	4.5
	1287	44.49		
	1288	53.73		
	1289	55.90		
	1290	54.27		
C	1291	22.46	26.5	4.9
	1292	31.98		
	1293	31.59		
	1294	21.74		
	1295	24.88		
D	1296	12.94	12.7	1.1
	1297	14.35		
	1298	11.98		
	1299	12.78		
	1300	11.52		
E	1209	5.6		
	1209	0.45		

【０５４１】

ガイドｍＡｌｂ２９８－３７を受けた群Ａの平均インデル頻度は５３．９％であった。ガイドｍＡｌｂ２９１２－３７を受けた群Ｂの平均インデル頻度は５２．３％であった。ガイドｍＡｌｂ２９１８－３７を受けた群Ｃの平均インデル頻度は２６．５％であった。ガイドｍＡｌｂ２９８－３４を受けた群Ｄの平均インデル頻度は１２．７％であった。これらのデータは、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが、化学修飾塩基（化学物質＃３７又は化学物質＃３４）からなるガイドＲＮＡと一緒に、マウスの肝臓においてインビボで活性であったことを示す。ガイドｍＡｌｂ２９８－３７として編集の約５０％をもたらしたガイドｍＡｌｂ２９８－３４は、ｍＡｌｂ２９８－３７と同じヌクレオチド配列を有するが、異

なる化学修飾を有し、化学修飾＃３７が化学修飾＃３４よりもインビボで著しくより多くの編集活性を可能にすることを示す。化学物質＃３４と比較して、化学物質＃３７で観察された改善されたインビボ編集は、化学物質＃３７の優れたインビトロ安定性と一貫している。

【０５４２】

ＮＧＳによって測定されるＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及びガイド２９８－３７によって生成された例示的なインデルプロファイルを、図８５に示す。同じＬＮＰで処置された他の４匹のマウスからのインデルプロファイルは、本質的に同一であった。インデルの大部分は欠失であり、検出可能な挿入は非常に少なかった。このインデルプロファイルは、ｓｐＣａｓ９で見られるプロファイルとは異なっており、これは、＋１及び－１のインデルを生成する傾向を有する挿入及び欠失の混合物を一般的に生成する。ＭＧ２９－１によるインビボ切断から生じる欠失は、－１～－３０の範囲であり、欠失の大部分は－１～－１０ヌクレオチドである。

【０５４３】

実施例５９－ＭＧ２９－１単一ガイドＲＮＡに対するスペーサー長さの最適化

試験されたガイドは、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによって提供された「ＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２」と呼ばれる化学修飾を有する、ヒトアルブミンイントロン１の異なる領域を標的とする５個の異なるスペーサー（スペーサー７４、８３、８４、７８、及び８７）を含んでいた。スペーサー長は、ガイドＲＮＡの３’末端からヌクレオチドを除去することによって、２２ヌクレオチド（ｎｔ）から１７ｎｔで滴定された。これらのガイドの各々（スペーサー配列当たり６個）を、ヒト肝臓細胞株Ｈｅｐ３Ｂにおける編集効率について評価した。Ｈｅｐ３Ｂ細胞（１×１０^{5}細胞／試料）を、１２０ｐｍｏｌのＭＧ２９－１タンパク質及び１６０ｐｍｏｌのガイドＲＮＡを混合することによって作製された事前形成されたリボ核タンパク質複合体とともに、Ａｍａｘａヌクレオフェクション装置及びプログラムＥＨ－１００を使用してエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、細胞を２４ウェルプレートに播種し、３日間培養し、その後、市販のキット（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してゲノムＤＮＡを細胞から精製した。ゲノムＤＮＡを、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）によって、標的部位（ヒトアルブミンイントロン１）での編集について分析した。ＮＧＳデータを、カスタムＰｙｔｈｏｎスクリプト（ＩｎｄｅｌＣａｌｃｕｌａｔｏｒ ｖ１．３．１）によって分析した。図８６に示されるように、スペーサー長を２２ヌクレオチド～２０ヌクレオチドで滴定したとき、５つのガイド全てについて編集活性は変化しなかった。スペーサーを１９個のヌクレオチドに短縮すると、５個のガイド全ての編集活性が低減され、５個のガイドのうちの３個の活性のより顕著な７５％の低減があった。スペーサー長の１８又は１７ヌクレオチドへの低減は、１７ヌクレオチドスペーサーが５個のガイド全てに対して不活性となるように、編集活性を更に低減した。異なるゲノム遺伝子座であるヒトＨＡＯ－１遺伝子を標的とする４個の異なるガイドＲＮＡについて、同様のデータが得られた（図８６）。ＨＡＯ－１ガイドの場合、ガイドの長さが２０ｎｔから２２ｎｔに低減されたとき、編集活性は７５～９５％減少した。これらのデータは、異なるゲノム遺伝子座を標的とする異なるガイドスペーサー配列の範囲にわたって、最大の編集活性を保持した最小のＭＧ２９－１スペーサー長が２０ｎｔであったことを示す。より長いスペーサー配列は、オフターゲット編集のリスクを増加させ得るため、完全な活性を保持する最も短いスペーサーの特定が有益である。

【０５４４】

ガイドＲＮＡ（「ガイド２９」）は、ヒトＨＡＯ－１遺伝子座を標的とするＭＧ２９－１の２２ｎｔスペーサーを有するガイドのスクリーニングにおいて、高度に活性なガイドとして特定された。このガイドのスペーサー長は、スペーサーから最も３’の２ｎｔを除去して、化学修飾が異なるｍＨ２９－２９．１＿３７（配列番号５７１０）及びｍＨ２９－２９．２＿３７（配列番号５７１１）として指定されたガイドを作製することによって２０ｎｔに低減される。

【０５４５】
これらのガイドは、スペーサーが短縮された５’末端上の修飾を調整する必要があったことを除いて、２２ｎｔスペーサーに基づいた化学物質＃３７と同じ化学修飾を含む。ｍＨ２９－２９．１＿３７では、フルオロ塩基の数は２だけ低減されたが、５’での４つのＰＳ結合及び１つの２’－Ｏ－メチル塩基は、元の＃３７化学物質と同じままであった。ｍＨ２９－２９．２＿３７では、フルオロ塩基の数は２だけ低減され、最後の塩基上の２’－Ｏ－メチルが保持されたが、５’末端でのＰＳ結合の数は４から５に増加した。これらのガイドの相対効力は、培養物中の細胞及びマウスで試験される。
【０５４６】
実施例６０－安定性を改善するための、５’末端に２４個のヌクレオチドのステム－ループ構造を有するＭＧ２９－１のガイドＲＮＡの設計（化学物質＃５０）
ＭＧ２９－１及びＭＧ３－６／３－４ガイドのインビトロ安定性アッセイは、ＭＧ２９－１ガイドがあまり安定でない場合があることを示した（図８７）。このアッセイでは、ガイドＲＮＡを、ＲＮＡを分解することができるヌクレアーゼを含む哺乳類細胞（Ｈｅｐａ１－６）からの粗抽出物中でインキュベートした。５’末端及び３’末端に化学修飾を有するＭＧ２９－１ガイド（Ａｌｔ－Ｒ）を約２００分で分解したが、５’末端及び３’末端の化学修飾を有するＭＧ３－６／３－４ガイドの約５０％（Ｍｏｄ１）は、５００分後にインタクトなままであった（図８７）。
【０５４７】
ＭＧ２９－１及びＭＧ３－６／３－４ガイドＲＮＡの構造（図８８）は、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｔｕｒｎｅｒ　２００４アルゴリズム：ｈｔｔｐｓ：／／ｒｎａ．ｕｒｍｃ．ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ．ｅｄｕ／ＮＮＤＢ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ）を使用して予測され、著しく異なることが注目された。ＭＧ２９－１ガイドは、ＭＧ３－６／３－４のガイドＲＮＡの長さの約３分の１である。更に、ＭＧ２９－１ガイドは、５個のヌクレオチドの長さの１個のステムを含む最小の二次構造を含む。対照的に、ＭＧ３－６／３－４のガイドＲＮＡは、１０、６、及び１０個のヌクレオチドのステム長を有する３個のステムループを含む（図８８）。図８６のデータを生成するために使用されたマウスアルブミンを標的とするスペーサーを含む高度に活性なＭＧ３－６／３－４ガイドはまた、骨格単独に対して予測される１０ｎｔステムループと同一である１０個のヌクレオチドのステム（図８９のステムループ１）を含むと予測された。
【０５４８】
ＭＧ２９－１ガイドの最小の二次構造は、インビトロ安定性アッセイによって模倣される細胞環境において、安定性を低下させたと仮定した。ＭＧ３－６／３－４ガイドＲＮＡの著しくより大きなインビトロ安定性を考慮すると、修飾されたＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡ骨格を設計し、そこでＭＧ３－６／３－４の最大のステムループ（ステムループ１）をＭＧ２９－１ガイドの５’末端に付加した。この修飾されたＭＧ２９－１ガイドの予測される構造を図８９に示す。標準的なＭＧ２９－１ガイドＲＮＡの安定性及び活性を著しく改善することが以前に示されている化学物質＃３７と指定された化学修飾は、化学物質＃５０の設計に組み込まれ、具体的には、化学物質＃３７の骨格及びスペーサーに存在する同じホスホロチオエート、２’－Ｏ－メチル、及び２’－フルオロ修飾が、化学物質＃５０に含まれた。この新しい設計を更に安定化するために、５’末端の３個のヌクレオチドをホスホロチオエート結合及び２’－Ｏ－メチル塩基で修飾した。更に、ホスホロチオエート結合及び２’－Ｏ－メチル塩基は、付加されたステムループのループに含まれた（図９０のステムループ１）。
【０５４９】
化学物質＃５０の追加のバリアントを、以下の表３２に示されるように設計した。任意のスペーサー配列の化学物質＃４４、＃５０、＃５１、＃５２、＃５３、及び＃５４の設計は、配列番号５６９５～５７０１に示されており、そこでＮはスペーサー中の任意のリボヌクレオチド塩基である。
【０５５０】

【表４６】

表３２：化学物質＃５０及び追加のバリアントの概要

ガイド名	配列番号	スペーサー長さ (nt)	余分なステムループ	スペーサー/ステム2上の化学物質	追加の変更
mAlb29-8-50	5689	22	はい	#37	
mAlb29-8-50b	5690	20	はい	#37	
mAlb29-8-51b	5691	20	はい	スペーサーに2'-フルオロなし	
mAlb29-8-52b	5692	20	はい	スペーサーに低減された2'-フルオロ	
mAlb29-8-53b	5693	20	はい	#37	ステムループ1の各塩基上のPS及びメチル
mAlb29-8-54b	5694	20	はい	スペーサーに2'-フルオロなし	ステムループ1の各塩基上のPS及びメチル

【０５５１】

実施例６１－５’末端に２４ヌクレオチドステム－ループ構造を含むＭＧ２９－１ガイド化学物質＃５０を用いたインビトロ編集

マウス肝臓細胞株Ｈｅｐａ１－６（１×１０^{5}細胞／試料）を、事前形成されたリボ核タンパク質複合体（１６０ｐｍｏｌのガイドＲＮＡと混合された１２０ｐｍｏｌのＭＧ２９－１タンパク質）、又は５００ｎｇのＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び２１０ｐｍｏｌのガイドＲＮＡのいずれかとともに、Ａｍａｘａヌクレオフェクション装置及びプログラム：ＥＨ－１００を使用してエレクトロポレーションした。試験したガイドは、ｍＡｌｂ２９－８－４４（スペーサー８、化学物質４４）及びｍＡｌｂ２９－８－５０（スペーサー８、化学物質５０）であった。化学物質４４は、ＭＧ２９－１骨格に加えて２２ｎｔスペーサーと、活性及び安定性のために最適化された塩基又は骨格のいずれかの化学修飾の特定セットとを含む。化学修飾を有するｍＡＬｂ２９－８－４４の配列を配列番号５６８８に示す。ｍＡｌｂ２９－８－５０の配列を配列番号５６８９に示す。これらのガイドの両方は、２２個のヌクレオチドスペーサーを含む。エレクトロポレーション後、細胞を２４ウェルプレートに播種し、３日間培養し、その後、市販のキット（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してゲノムＤＮＡを細胞から精製した。ゲノムＤＮＡを、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）によって、標的部位（アルブミンイントロン１）での編集について分析した。ＮＧＳデータを、カスタムＰｙｔｈｏｎスクリプト（ＩｎｄｅｌＣａｌｃｕｌａｔｏｒ　ｖ１．３．１）によって分析した。図９１に示されるように、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼがｍＲＮＡトランスフェクションによって送達されたとき、化学物質５０は、編集効率を４６％から９４％に改善した。ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが、ガイドに予め複合体化されたタンパク質として送達されたとき、両方の化学物質は、９４％の編集を呈した。ヌクレアーゼがｍＲＮＡとして送達されるとき、ガイドは、ｍＲＮＡがタンパク質に翻訳されるまで細胞内で生存するのに十分に安定であることが理想的であり、その後、ヌクレアーゼはガイドと複合体を形成し、核に伝達し得る。したがって、ガイド安定性は、ヌクレアーゼがｍＲＮＡとして送達されるときにより重要である可能性が高い。対照的に、ガイドは、化学物質４４及び５０の両方が、ＲＮＰエレクトロポレーションによって９４％の編集をもたらしたという観察と一致して、細胞へのエレクトロポレーションの前に、ＲＮＰとしてヌクレアーゼと複合体化されたときに安定化され得る（図９１）。

これらのデータは、追加のステムループを含むＭＧ２９－１ガイドＲＮＡ上の化学物質５０が、培養物中の細胞における改善された編集を媒介することを示唆する。

【０５５２】

実施例６２－ＭＧ２９－１ガイド化学物質５０を有するマウスの肝臓におけるインビボ遺伝子編集

マウスの肝臓における遺伝子編集に対する異なるガイド化学物質の影響を評価するために、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用してＭＧ２９－１ ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを送達した。ＭＧ２９－１ヌクレアーゼをコードするメッセンジャーＲＮＡは、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼ、並びにｒＵＴＰ及びＣｌｅａｎＣＡＰ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）の代わりにリボヌクレオチドｒＡＴＰ、ｒＣＴＰ、及びｒＧＴＰとＮ１－メチルシュードウリジンとの混合物を使用する直線化プラスミド鋳型のインビトロ転写によって生成された。プラスミドはまた、コード配列の３’末端におよそ１００ｎｔのポリＡテールをコードした。ｍＲＮＡを市販のスピンカラム上で精製し、濃度を２６０ｎＭでの吸光度によって決定し、純度をＴａｐｅ Ｓｔａｔｉｏｎ（Ａｇｉｌｅｎｔ）によって決定した。同じスペーサー配列を含むが、異なる化学物質／骨格を有する３つの異なるガイドＲＮＡを、単一のマウス研究で評価した：ｍＡｌｂ２９－８－４４（配列番号５６８８）、ｍＡｌｂ２９－８－５０（配列番号５６８９）、及びｍＡｌｂ２９－８－３７（配列番号５７０２）。化学物質４４を有する異なるスペーサー（スペーサー１２）を含むガイドｍＡｌｂ２９－１２－４４（配列番号５７０３）も試験した。ＭＧ２９－１ ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡは、Ｋａｕｆｍａｎｎ ｅｔ ａｌ（ＰＭＩＤ：２６４６９１８８、ＤＯＩ：１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．５ｂ０２４９７、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）によって本質的に記載されるプロセスを使用して、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に別々にパッケージングされた。脂質は、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓから、又はＣｏｒｄｅｎ Ｐｈａｒｍａから購入し、エタノール中に溶解した。ｍＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを水中で調製し、次いで、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。４つの脂質成分を特定の比率で、エタノール中で組み合わせて、脂質ワーキングストックを作製した。例示的な脂質混合物は、コレステロール、ＤＯＰＥ、Ｃ１２－２００、及びＤＭＧ－ＰＥＧ－２０００を、４７．５：１６：３５：１．５のモル比で含んでいた。脂質ワーキングストック及びＲＮＡワーキングストックを、１２ｍＬ／分の流量、及び１体積の脂質ワーキングストック対３体積のＲＮＡワーキングストックの比率で、マイクロ流体混合装置（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ）中で組み合わせた。製剤中のＣ１２－２００対ＲＮＡの質量比は、１０対１であった。製剤化されたＬＮＰを１×ＰＢＳで１：１に希釈し、次いで、１×ＰＢＳ中でそれぞれ１時間透析し、続いて、Ａｍｉｃｏｎスピンコンセントレータ中で濃縮した。得られたＬＮＰを１×ＰＢＳ緩衝液中で製剤化し、０．２ｕＭフィルターを通してフィルター滅菌し、４℃で保存した。ＬＮＰの内側及び外側のＲＮＡの濃度を、Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して測定した。ＬＮＰの平均直径及び多分散性を、ＮａｎｏＢｒｏｏｋ ９０Ｐｌｕｓ（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ））を使用した動的光散乱によって、得られた濃縮ＬＮＰで測定した。代表的なＬＮＰは、ＰＤＩ＜０．１５及び９０％を超えるＲＮＡ封入比で、８０～１００ナノメートルのサイズの範囲であった。ガイドＲＮＡ及びＭＧ２９－１ ｍＲＮＡを封入するＬＮＰを、１：１のＲＮＡ質量比で混合し、次いで、マウス当たり０．１ｍｌの総体積で、１ｋｇ当たり０．５ｍｇのＲＮＡの用量で尾静脈を介して野生型Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内注射した（ＬＮＰ当たりＮ＝５匹のマウス）。投与後４日目にマウスを 殺し、肝臓の３つの葉（左外側、右外側、内側）を収集し、急速凍結し、－８０℃で保存した。肝臓の左外側葉全体を、ビーズミル中で組織重量１００ｍｇ当たり０．４ｍＬの緩衝液を使用して、ゲノム消化緩衝液（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）中でホモジナイズした。ゲノムＤＮＡを、Ｐｕｒｅｌｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用してホモジネートのアリコートから精製した。アルブ

ミンイントロン１領域を、プライマーｍＡｌｂ９０Ｆ（ＣＴＣＣＴＣＴＴＣＧＴＣＴＣＣＧＧＣ）及びｍＡｌｂ１０７３Ｒ（ＣＴＧＣＣＡＣＡＴＴＧＣＴＣＡＧＣＡＣ）の各０．５マイクロモル並びに１×Ｐｆｕｓｉｏｎ Ｆｌａｓｈ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘを含む反応物中の５０ｎｇのゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅した。マウスアルブミンのイントロン１全体にわたる得られた９８４ｂｐのＰＣＲ産物を、カラムベースの精製キット（ＤＮＡ Ｃｌｅａｎ ａｎｄ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ、Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製し、各ガイドＲＮＡの予測される標的部位の１５０～３５０ｂｐ内に位置するプライマーを使用して配列決定した。ＰＢＳ緩衝液を注射したマウスからプライマーｍＡｌｂ９０Ｆ及びｍＡｌｂ１０７３Ｒを使用して生成されたＰＣＲ産物を、対照として並行して配列決定した。サンガーシーケンシングクロマトグラムを、インデルの頻度並びにインデルプロファイルを決定するＣＲＩＳＰＲ編集の推論（ＩＣＥ）を使用して分析した（Ｈｓｉａｕ ｅｔ．ａｌ，Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ Ｅｄｉｔｓ ｆｒｏｍ Ｓａｎｇｅｒ Ｔｒａｃｅ Ｄａｔａ．ＢｉｏＡｒｘｉｖ．２０１８ ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｒｘｉｖ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｅａｒｌｙ／２０１８／０１／２０／２５１０８２）。

【０５５３】

理論によって拘束されることを望むものではないが、ヌクレアーゼが生細胞内のＤＮＡに二本鎖切断（ＤＳＢ）を作り出す場合、ＤＳＢは細胞ＤＮＡ修復機構によって修復されることが理解される。培養物中の形質転換哺乳類細胞などの細胞を積極的に分裂させ、修復鋳型が不在である場合、この修復はＮＨＥＪ経路によって生じることが理解される。理論によって拘束されることを望むものではないが、ＮＨＥＪ経路は、二本鎖切断の部位に塩基の挿入又は欠失を導入するエラーが発生しやすいプロセスであることが理解される（Ｌｉｅｂｅｒ，Ｍ．Ｒ，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０１０；７９：１８１－２１１）。これらの挿入及び欠失は、発生し、かつその後修復された二本鎖切断の特徴であることが理解され、したがって、ヌクレアーゼの編集又は切断効率の読み出しとして広く使用されている。

【０５５４】

マウスの肝臓における編集効率を、図９２に示す。同じスペーサー配列（ガイド８）であるが異なる化学物質又は骨格を有するガイドと比較して、化学物質＃４４（配列番号５６８８）を有するガイドは、最も活性が低かった（平均１．６％の編集）が、一方で、化学物質＃３７（配列番号５７０２）を有するガイドは、より活性であった（平均４％の編集）。化学物質＃４４は、スペーサー領域に２つの追加のＰＳ結合を付加することによって化学物質＃３７とは異なる（化学物質＃４４はスペーサー領域に６つのＰＳ結合を有するが、一方で、化学物質＃３７はスペーサー領域に４つのＰＳ結合を有する）。化学物質＃５０を有するガイド（配列番号５６８９）は、化学物質＃３７を有するガイドよりもおよそ５倍高く、かつ化学物質＃４４を有するガイドよりも１０倍高い、２２％の平均編集で著しくより活性であった。同じゲノムＤＮＡを次世代シーケンシング（ＮＧＳ）による編集について分析した場合、ガイドスペーサー８による編集のレベルは、化学物質４４、３７、及び５０についてそれぞれ７％、７％、及び４２％であると決定された。化学物質４４を有するガイドスペーサー１２については、編集レベルは、ＩＣＥ及びＮＧＳによって測定した場合、それぞれ４％及び９％であり、化学物質４４が化学物質３７と類似の活性を有することを確認した。これらのデータは、正常なＭＧ２９－１ガイド骨格の５’末端に付加されたＭＧ３－６／３－４ガイドからのステムループを含む化学物質＃５０が、ＬＮＰにおける全身送達後のマウスの肝臓における著しく改善された編集を呈することを示す。したがって、ガイド化学物質５０は、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼの改善されたインビボ効力を提供する。

【０５５５】

実施例６３－ＭＧ２９－１ガイド化学物質５０の更なる改善

ＭＧ２９－１ガイド化学物質＃５０の更なる改善が企図される。１つの潜在的に改善されたバージョンでは、標準的なＭＧ２９－１ガイド骨格の５’末端に付加されたステム－

ループ１中の全てのヌクレオチドは、化学物質５３（配列番号５７００）及び５４（配列番号５７０１）のように、塩基上の２’－Ｏ－メチル及びホスホロチオエート結合の両方を用いて化学的に修飾される。１つの潜在的に改善されたバージョンでは、スペーサー中の２’－フルオロ塩基の全ては、化学物質５１（配列番号５６９８）及び５４（配列番号５７０１）のように、標準ヌクレオチドに変化する。別の潜在的に改善されたバージョンでは、スペーサー中の２’－フルオロ塩基の数は、化学物質５２（配列番号５６９９）のように２倍低減される。２’－フルオロ塩基の数の低減は、ガイド特異性に影響を与え得る。

【０５５６】

実施例６４－天然ガイドアレイを含むＭＧ２９－１単一ガイドＲＮＡの設計

ＭＧ２９－１単一ガイドＲＮＡの安定性、及びしたがって効力を改善する代替的なアプローチは、ＭＧ２９－１の天然様ＣＲＩＳＰＲアレイを設計し、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが自身のＣＲＩＳＰＲアレイを切断して成熟ガイドを生成する文書化されたプロセスを模倣することである。アレイは、ｍＡｌｂ２９－ｇ８－３７－アレイ（配列番号５７１２）として指定され、ＭＧ２９－１の天然ＣＲＩＳＰＲアレイに埋め込まれたマウスアルブミン（スペーサー８）を標的とする２２ｎｔスペーサーの２つのコピーを含む。

【０５５７】

設計されたアレイは１２６ｎｔの長さであり、それは、反復、続いてスペーサー、続いて反復、続いてスペーサーを含む。ｍＡｌｂ２９－ｇ８－３７－アレイの予測される二次構造を、図９３に示し、５’末端は青色で丸が付けられ、３’末端は赤色で丸が付けられている。このＲＮＡは、発現されたＭＧ２９－１ヌクレアーゼによって哺乳類細胞内で切断されて、２つの機能性ｓｇＲＮＡを生成するように設計される。安定性を促進するために、化学修飾をｍＡｌｂ２９－ｇ８－３７－アレイに含めた。スペーサー及びＭＧ２９－１骨格部分の修飾は、化学物質＃３７で使用されるが、追加の修飾及びいくつかの変化を有するものに基づく。

【０５５８】

実施例６５－化学物質＃３７を有するヒトアルブミンイントロン１を標的とする２０ｎｔスペーサーを有するＭＧ２９－１ヌクレアーゼのガイド

ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び２２ｎｔスペーサーを有する単一ガイドＲＮＡを使用したヒトアルブミンイントロン１に対するガイドスクリーニングは、ヒトＨｅｐ３Ｂ細胞において高い編集活性を有する５つのガイドを特定した。これらのガイドは、スペーサー番号８７、７８、７４、８３、及び８４として指定された。２０ｎｔのスペーサーを有するこれらの単一ガイドＲＮＡのバージョンを、化学物質＃３７の化学修飾を組み込んで設計し、これらを、ｈＡ２９－８７－３７Ｂ（配列番号５７１３）、ｈＡ２９－７８－３７Ｂ（配列番号５７１４）、ｈＡ２９－７４－３７Ｂ（配列番号５７１５）、ｈＡ２９－８３－３７Ｂ（配列番号５７１６）、及びｈＡ２９－８４－３７Ｂ（配列番号５７１７）として指定した。

【０５５９】

実施例６６－化学物質＃３７を有するヒトＨＡＯ１を標的とする２０ｎｔスペーサーを有するＭＧ２９－１ヌクレアーゼのガイド

ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び２２ｎｔスペーサーを有する単一ガイドＲＮＡを使用したヒトＨＡＯ－１（グリコール酸オキシダーゼをコードする）に対するガイドスクリーニングは、ヒトＨｅｐ３Ｂ細胞において高い編集活性を有する４つのガイドを特定した。これらのガイドは、スペーサー番号４、２１、２３、及び４１として指定された。２０ｎｔのスペーサーを有するこれらの単一ガイドＲＮＡのバージョンを、化学物質＃３７の化学修飾を組み込んで設計し、これらを、ｈＨ２９－４＿３７ｂ（配列番号５７１８）、ｈＨ２９－２１＿３７ｂ（配列番号５７１９）、ｈＨ２９－２３＿３７ｂ（配列番号５７２０）、及びｈＨ２９－４１＿３７ｂ（配列番号５７２１）として指定した。

【０５６０】

実施例６７－化学物質＃５０を有するヒトＨＡＯ１を標的とする２２ｎｔスペーサーを有

するＭＧ２９－１ヌクレアーゼのガイド
　ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び２２ｎｔスペーサーを有する単一ガイドＲＮＡを使用したヒトＨＡＯ－１（グリコール酸オキシダーゼをコードする）に対するガイドスクリーニングは、ヒトＨｅｐ３Ｂ細胞において高い編集活性を有する４つのガイドを特定した。これらのガイドは、スペーサー番号４、２１、２３、及び４１として指定された。２２ｎｔのスペーサーを有するこれらの単一ガイドＲＮＡのバージョンを、化学物質＃５０の化学修飾を組み込んで設計し、これらを、ｈＨ２９－４＿５０（配列番号５７２２）、ｈＨ２９－２１＿５０（配列番号５７２３）、ｈＨ２９－２３＿５０（配列番号５７２４）、及びｈＨ２９－４１＿５０（配列番号５７２５）として指定した。
【０５６１】
実施例６８－化学物質＃５０を有するヒトＨＡＯ１を標的とする２０ｎｔスペーサーを有するＭＧ２９－１のガイド
　ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び２２ｎｔスペーサーを有する単一ガイドＲＮＡを使用したヒトＨＡＯ－１（グリコール酸オキシダーゼをコードする）に対するガイドスクリーニングは、ヒトＨｅｐ３Ｂ細胞において高い編集活性を有する４つのガイドを特定した。これらのガイドは、スペーサー番号４、２１、２３、及び４１として指定された。２０ｎｔのスペーサーを有するこれらの単一ガイドＲＮＡのバージョンを、化学物質＃５０の化学修飾を組み込んで設計し、これらを、ｈＨ２９－４＿５０ｂ（配列番号５７２６）、ｈＨ２９－２１＿５０ｂ（配列番号５７２７）、ｈＨ２９－２３＿５０ｂ（配列番号５７２８）、及びｈＨ２９－４１＿５０ｂ（配列番号５７２９）として指定した。
【０５６２】
実施例６９－化学物質＃５０を有するマウスＨＡＯ１を標的とする２２ｎｔスペーサーを有するＭＧ２９－１のガイド
　ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び２２ｎｔスペーサーを有する単一ガイドＲＮＡを使用したマウスＨＡＯ－１（グリコール酸オキシダーゼをコードする）に対するガイドスクリーニングは、マウスＨｅｐａ１－６細胞において高い編集活性を有する３つのガイドを特定した。これらのガイドは、スペーサー番号１、１５、及び２９として指定された。２２ｎｔのスペーサーを有するこれらの単一ガイドＲＮＡのバージョンを、化学物質＃５０の化学修飾を組み込んで設計し、これらを、ｍＨ２９－１－５０（配列番号５７３０）、ｍＨ２９－１５－５０（配列番号５７３１）、及びｍＨ２９－２９－５０（配列番号５７０４）として指定した。
【０５６３】
実施例７０－化学物質＃５０を有するマウスＨＡＯ１を標的とする２０ｎｔスペーサーを有するＭＧ２９－１のガイド
　ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び２２ｎｔスペーサーを有する単一ガイドＲＮＡを使用したマウスＨＡＯ－１（グリコール酸オキシダーゼをコードする）に対するガイドスクリーニングは、マウスＨｅｐａ１－６細胞において高い編集活性を有する４つのガイドを特定した。これらのガイドは、スペーサー番号１、１５、及び２９として指定された。２０ｎｔのスペーサーを有するこれらの単一ガイドＲＮＡのバージョンを、化学物質＃５０の化学修飾を組み込んで設計し、これらを、ｍＨ２９－１－５０ｂ（配列番号５７３２）、ｍＨ２９－１５－５０ｂ（配列番号５７３３）、及びｍＨ２９－２９－５０ｂ（配列番号５７０５）として指定した。
【０５６４】
実施例７１－ＭＧ２９－１とｓｐＣａｓ９のインビボ編集効率の比較
　ＭＧ２９－１ヌクレアーゼのインビボ編集効率をｓｐＣａｓ９のインビボ編集効率と比較するために、用量応答を野生型Ｃ５７Ｂｌ６マウスにおいて行った。アルブミンイントロン１を、ｓｐＣａｓ９及びＭＧ２９－１の両方のゲノム標的遺伝子座として選択した。Ｃｈｏｐ－Ｃｈｏｐアルゴリズム（例えば、Ｌａｂｕｎ　ｅｔ　ａｌ　ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｚ３６５を参照されたく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を使用したマウスイントロン１におけるｓｐＣａｓ９ガイド標的部位のインシリ

コ検索により、合計３９個の潜在的なガイドが特定され、それらはそれらの効率スコア及びオフターゲット予測に従って順位付けされた。更に、エクソン１又はエクソン２の５０ｂｐ内に位置するガイド標的部位は除外された。この順位付けからの上位３つのガイドは、ｍＡｌｂＲ１（配列番号５７３４）、ｍＡｌｂＲ２（配列番号５７３５）、及びｍＡｌｂＲ３（配列番号５７３６）と指定され、メチル化塩基（命名法ｍＡ、ｍＣ、ｍＧ、及びｍＵによって表される）及びホスホロチオエート骨格結合（命名法Ａ＊、Ｃ＊、Ｇ＊、及びＵ＊によって表される）を含む５’末端及び３’末端の両方で化学修飾を用いて化学的に合成した。これらの３つのガイドの編集効率を、ガイドＲＮＡと商業的に供給されたｓｐＣａｓ９タンパク質（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入）を１：２．５のモル比（タンパク質対ガイドＲＮＡ）で混合することによって形成されたリボ核タンパク質複合体のヌクレオフェクションによってマウス肝臓細胞株Ｈｅｐａ１－６において評価した。２０モルのｓｐＣａｓ９タンパク質を、５０モルのガイドＲＮＡと混合し、その後、プログラム設定ＥＨ１００を用いるＡｍａｘａエレクトロポレーション装置を使用して２×１０^{5}のＨｅｐａ１－６細胞にヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクションされた細胞を各々、新鮮な増殖培地中の４８ウェルプレートのウェルに移し、５％CO_2／３７℃の加湿されたインキュベーター中で４８時間培養した。Ｐｕｒｅｌｉｎｋキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して細胞からゲノムＤＮＡを精製し、プライマーｍＡｌｂ９０Ｆ及びｍＡｌｂ１０７３Ｒ（配列番号５７３７及び５７３８）並びに高ハイフィデリティＰＣＲ酵素ミックスを使用した標的遺伝子座のＰＣＲ増幅によって、アルブミンイントロン１の標的部位での編集について分析した。ＰＣＲ産物を、プライマーｍＡｌｂ２８２Ｆ又はｍＡｌｂ４６０Ｆを使用してサンガーシーケンシングに供した。サンガーシーケンシングクロマトグラムを、Ｂｒｉｎｋｍａｎ　ｅｔ　ａｌ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０１４　Ｄｅｃ　１６；４２（２２），ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｕ９３６、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）によって記載されるように、Ｔｒａｃｋｉｎｇ　ｏｆ　Ｉｎｄｅｌｓ　ｂｙ　ＤＥｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ（ＴＩＤＥ）によって各ガイドの予測される標的部位で挿入及び欠失（「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。ＴＩＤＥ分析の結果を表３３に示す。３つのガイド全てが、９０％を超えるインデル頻度を生成し、３つのガイド全てが高度に活性であることを示す。

【０５６５】

【表４７】

表３３：マウスアルブミンイントロン１を標的とするｓｐＣａｓ９及びＲＮＰとしてのｓｐＣａｓ９タンパク質のガイドＲＮＡでヌクレオフェクションされたＨｅｐａ１－６細胞におけるインデル頻度

試料 ID	ガイド	インデル%	R2
1	mAlbR1	92	0.95
2	mAlbR2	91	0.91
3	mAlbR3	96	0.96

【０５６６】
ガイドｍＡＬｂＲ２を、前述したように広範な化学修飾を用いて合成した（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．４００５、及びＷＯ２０１９／０７９５２７（Ａ１）、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）。化学修飾は、５’末端の３塩基及び３’末端の３塩基の修飾を含み、２’－Ｏ－メチル塩基及び５’末端の３塩基と３’末端の３塩基との間のホスホロチオエート結合を有する。更に、内部塩基のうちの３３個が、２’－Ｏ－メチルで修飾される（配列番号５７４１）。ｓｐＣａｓ９のガイドＲＮＡのこれらの化学修飾は、脂質ナノ粒子中のｓｐＣａｓ９及びガイドＲＮＡに対するｍＲＮＡの送達後に、マウス肝臓におけるインビボでの効率的な編集を可能にすることが報告された（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１９／０７９５２７（Ａ１）を参照されたい）。

【０５６７】
ＭＧ２９－１ヌクレアーゼをマウスアルブミンイントロン１に標的とし、切断及びインデル形成を促進するガイドのためのガイドスクリーニングを行った。ヌクレアーゼがｍＲＮＡとして送達されたときにＨｅｐａ１－６細胞において最も高い編集活性を有する２つのガイドは、ｍＡＬｂ２９－８及びｍＡｌｂ２９－１２であった。マウスにおけるインビボでのｓｐＣａｓ９ガイドｍＡｌｂＲ２との比較のために、ガイドｍＡＬｂ２９－８を選択した。ＭＧ２９－１のガイドＲＮＡに対する化学修飾及び構造修飾は、２’Ｏ－メチル及び２’－フルオロ修飾塩基、ホスホロチオエート結合、並びにガイドの安定性及び編集活性に対する追加のステムループを含む、異なる化学修飾の影響を評価することによって最適化した。

【０５６８】
ガイド化学最適化に関する実験は、ガイド化学物質＃５０が、試験されたものの中で最も活性なガイド化学物質であったことを示した。ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ、及びマウスアルブミンイントロン１を標的とするが２つの異なるガイド化学物質（＃３７及び＃５０）を有する同じガイドＲＮＡ配列を封入するＬＮＰを使用してマウスにインビボで送達されたとき、化学物質＃５０は、０．５ｍｇ／ｋｇの用量で化学物質＃３７よりも約４倍強力であった。したがって、ＭＧ２９－１ガイド化学物質＃５０を、その同族ガイドｍＡＬｂＲ２を用いたｓｐＣａｓ９と比較してインビボで試験するために選択した（配列番号５７４１）。

【０５６９】
ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ又はｓｐＣａｓ９ヌクレアーゼをコードするメッセンジャーＲＮＡは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、並びにリボヌクレオチドｒＡＴＰ、ｒＣＴＰ、及びｒＧＴＰ、Ｎ１－メチルシュードウリジン、及びＣｌｅａｎＣＡＰキャッピング試薬（Ｔｒｉｌｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）との混合物を使用する直線化プラスミド鋳型のインビトロ転写によって生成された。ＳＶ４０由来核局在化配列（ＰＫＫＫＲＫＶＧＧＧＧＳ）、続いて、短いリンカーを、ｓｐＣａｓ９及びＭＧ２９－１の両方のコード配列のＮ末端に含めた。短いリンカー（ＳＧＧＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ）が先行するヌクレオプラスミンからの核局在化シグナルを、ｓｐＣａｓ９及びＭＧ２９－１の両方のコード配列のＣ末端に付加した。したがって、ＭＧ２９－１及びｓｐＣａｓ９の両方に対して同じ核局在化シグナルを使用した。プラスミドはまた、ｓｐＣａｓ９及びＭＧ２９－１コード配列の両方の３’末端におよそ１００ｎｔのポリＡテールをコードし、これはｍＲＮＡ中にポリＡテールを生成する。ｓｐＣａｓ９及びＭＧ２９－１の両方のコード配列を、同じアルゴリズムを使用してコドン最適化した（例えば、Ｒａａｂ　ｅｔａｌ，ＤＯＩ　１０．１００７／ｓ１１６９３－０１０－９０６２－３を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。ｓｐＣａｓ９　ｍＲＮＡをコードするＤＮＡ配列は、配列番号５７４２にあり、ｓｐＣａｓ９　ｍＲＮＡによってコードされるアミノ酸配列は、配列番号５７４３にある。ｍＲＮＡを市販のスピンカラム上で精製し、濃度を２６０ｎＭでの吸光度によって決定し、純度をＴａｐｅ　Ｓｔａｔｉｏｎ（Ａｇｉｌｅｎｔ）によって決定し、純度は、ｓｐＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びＭＧ２９－１　ｍＲＮ

Ａの両方について同等であると見出された。マウスへのインビボ送達については、ｓｐＣａｓ９　ｍＲＮＡ／ｍＡｌｂＲ２ガイド又はＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ／ｍＡｌｂ２９－８－５０ガイドを、Ｋａｕｆｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（ＰＭＩＤ：２６４６９１８８、ＤＯＩ：１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．５ｂ０２４９７、これは参照により本明細書に組み込まれる）によって本質的に記載されるように、プロセスを使用して脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内にパッケージングした。ガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを、ｓｐＣａｓ９及びＭＧ２９－１の両方について別々にパッケージングした。脂質（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓから、又はＣｏｒｄｅｎ　Ｐｈａｒｍａから購入）をエタノール中に溶解した。ｍＲＮＡ又はガイドＲＮＡを水中で調製し、次いで、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。４つの脂質成分を特定の比率で、エタノール中で組み合わせて、脂質ワーキングストックを作製した。例示的な脂質混合物は、コレステロール、中性脂質、例えば、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）、カチオン性脂質、例えば、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ＰＥＧ結合脂質、例えば、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ－２０００）を４７．５：１６：３５：１．５のモル比で含んでいた。脂質ワーキングストック及びＲＮＡワーキングストックを、１２ｍＬ／分の流量、及び１体積の脂質ワーキングストック対３体積のＲＮＡワーキングストックの比率で、マイクロ流体混合装置（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ）中で組み合わせた。製剤中のＣ１２－２００対ＲＮＡの質量比は、１０対１であった。製剤化されたＬＮＰを１×ＰＢＳで１：１に希釈し、次いで、１×ＰＢＳ中でそれぞれ１時間透析し、続いて、Ａｍｉｃｏｎスピンコンセントレータ中で濃縮した。得られたＬＮＰを１×ＰＢＳ緩衝液中で製剤化し、０．２μＭフィルターを通してフィルター滅菌し、４℃で保存した。ＬＮＰの内側及び外側のＲＮＡの濃度を、Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ試薬（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して測定した。ＬＮＰの平均直径及び多分散性を、ＮａｎｏＢｒｏｏｋ　９０Ｐｌｕｓ（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ））を使用した動的光散乱によって、得られた濃縮ＬＮＰで測定した。代表的なＬＮＰは、ＰＤＩ＜０．１５及び９０％を超えるＲＮＡ封入比で、８０～１００ナノメートルのサイズの範囲であった。平均直径、多分散性、及びＲＮＡ封入効率を以下の表３４に示す。

【０５７０】

【表４８】

表３４：ＬＮＰ特徴の概要

LNP	RNA	平均直径 (nm)	多分散性	RNA の 封入パーセント
LNP-A	MG29-1 mRNA	57	0.082	94.9
LNP-B	mAlb29-8-50 ガイド (配列番号 5744)	47	0.082	93.7
LNP-C	Cas9 mRNA	60	0.114	94.5
LNP-D	mAlbR2 ガイド (配列番号 5741)	50	0.059	94.5

【０５７１】

ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂ２９－８－５０及びＭＧ２９－１　ｍＲＮＡを封入するＬＮＰを、１：１のＲＮＡ質量比で混合した。ガイドＲＮＡ　ｍＡｌｂＲ１及びｓｐＣａｓ９　ｍＲＮＡを封入するＬＮＰを、１：１のＲＮＡ質量比で混合した。両方のＬＮＰ混合物を、尾静脈を介して野生型Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、マウス当たり０．１ｍＬの総体積で１ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、又は０．２５ｍｇ／ｋｇのＲＮＡの総ＲＮＡ用量を静脈内注射した（ＬＮＰ用量当たりＮ＝５匹のマウス）。投与後５日目にマウスを　殺し、肝臓全体をフラッシュ凍結し、－８０℃で保存した。肝臓の左外側葉全体を、ビーズミル中で組織重量１００ｍｇ当たり０．４ｍＬの緩衝液を使用して、ゲノム消化緩衝液（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）中でホモジナイズした。ゲノムＤＮＡを、Ｐｕｒｅｌｉｎｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用してホモジネートのアリコートから精製した。アルブミンイントロン１領域を、プライマーｍＡｌｂ９０Ｆ（配列番号５７３７、ＣＴＣＣＴＣＴＴＣＧＴＣＴＣＣＧＧＣ）及びｍＡｌｂ１０７３Ｒ（配列番号５７３８、ＣＴＧＣＣＡＣＡＴＴＧＣＴＣＡＧＣＡＣ）並びに１×ＰｆｕｓｉｏｎフラッシュハイフィデリティＰＣＲマスターミックスの各々０．５マイクロモルを含む反応物中の５０ｎｇのゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅した。マウスアルブミンのイントロン１全体にわたる得られた９８４ｂｐのＰＣＲ産物を、カラムベースの精製キット（ＤＮＡ　Ｃｌｅａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製した。ＰＣＲ産物を、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）により配列決定し、標的配列におけるインデルの作製を分析し、それをＣａｓ酵素による二本鎖切断の作製及びＮＨＥＪ経路の関与の指標として使用した。この検出方法は、ヌクレアーゼが生細胞内のＤＮＡに二本鎖切断（ＤＳＢ）を作り出すとき、ＤＳＢは、修復鋳型の不在下で、ＮＨＥＪ経路によって生じる細胞ＤＮＡ修復機構によって修復されると考えられるという概念に基づく。ＮＨＥＪ経路は、二本鎖切断の部位に塩基の挿入又は欠失を導入するエラーが発生しやすいプロセスであることが知られているため（Ｌｉｅｂｅｒ，Ｍ．Ｒ，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０１０；７９：１８１－２１１）、これらの挿入及び欠失（インデル）は、発生し、かつその後修復された二本鎖切断の特徴として使用され、したがってヌクレアーゼの編集又は切断効率の読み出しとして使用される。

【０５７２】

配列決定読み取りを、野生型標的配列（この場合、アルブミンイントロン１）に各配列読み取りを整列させ、かつヌクレアーゼの予測されるオンターゲット切断部位のいずれかの側に１０塩基対にわたるウィンドウ内のインデルサイズに関係なく、少なくとも１つのインデルを含む読み取りの数を計算するカスタムＰｙｔｈｏｎスクリプト（ＩｎｄｅｌＣａｌｃｕｌａｔｏｒ　ｖ１．３．１）で分析した。各群の５匹のマウスの各々における編集効率（インデル頻度）、並びに群の平均及び標準偏差を、図９４に要約する。ＰＢＳ緩衝液を注射した対照マウスでは、編集は検出されなかった。ｓｐＣａｓ９　ｍＲＮＡ／ｍＡｌｂＲ２　ＬＮＰ及びＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ／ｍＡｌｂ２９－８－５０　ＬＮＰの両方が、用量依存的な編集をもたらした。３つの用量全てで、編集効率は、ｓｐＣａｓ９　ｍＲＮＡ／ｍＡｌｂＲ２　ＬＮＰよりもＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ／ｍＡｌｂ２９－８－５０　ＬＮＰで高かった。３つの用量での平均編集効率を表３５に要約する。１ｍｇ／ｋｇ（０．５ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ及び０．５ｍｇ／ｋｇのガイドＲＮＡ）の用量では、ＭＧ２９－１はｓｐＣａｓ９よりもわずかに強力であり、約１５％更に多いインデルをもたらした。０．５ｍｇ／ｋｇ（０．２５ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ及び０．２５ｍｇ／ｋｇのガイドＲＮＡ）の用量で、ＭＧ２９－１は、約５０％更に多いインデルをもたらした。０．２５ｍｇ／ｋｇ（０．１２５ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ及び０．１２５ｍｇ／ｋｇのガイドＲＮＡ）の用量で、ＭＧ２９－１は、１００％更に多いインデルをもたらした。これらのデータは、送達に同じＬＮＰを使用し、同一のプロセスを使用して産生されたｍＲＮＡを使用して、適切に最適化されたガイドＲＮＡと組み合わせたＭＧ２９－１ヌクレアーゼが、ｓｐＣａｓ９ヌクレアーゼ及び適切に修飾されたガイドＲＮＡよりも強力であることを示す。ＭＧ２９－１の優れたインビボ編集効率は、試験した最低用量で特に明らかであり、ＭＧ２９－１は、同じ用量でｓｐＣａｓ９よりも２倍更に強力であった。これらの結果は、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び化学物質＃５０によって例示される適切に修飾されたガイドＲＮＡが、ＬＮＰ送達を使用したインビボ遺伝子編集に利点を有し得ることを示唆している。

【０５７３】

【表４９】

表３５：３つの用量のMG２９－１　mRNA及びガイドmＡｌｂ２９－８－５０（mA２９－８－５０）若しくはｓｐＣａｓ９　mRNA及びガイドmＡｌｂＲ２のいずれかを封入するＬＮＰ、又はＰＢＳ緩衝液（対照）の静脈内注射の５日後のマウスの肝臓全体における平均編集効率。

mRNA	ガイドRNA	用量(mg/kg)	平均編集(%)	標準偏差
MG29-1	mAlb29-8-50	1	72.3	2.3
MG29-1	mAlb29-8-50	0.5	62.7	1.4
MG29-1	mAlb29-8-50	0.25	33.2	5.4
spCas9	mAlbR2	1	60.0	2.3
spCas9	mAlbR2	0.5	40.3	6.3
spCas9	mAlbR2	0.25	15.6	2.3
PBS 対照		-	0.18	0.1

【０５７４】

実施例７２－Ｈｅｐ３Ｂ細胞におけるｍＲＮＡベースのトランスフェクションによるヒトＨＡＯ－１のエクソン領域を標的とするＭＧ２９－１の活性単一ガイドＲＮＡの特定

配列特異的ヌクレアーゼを使用して、目的の遺伝子のコード配列を破壊し、それによってその遺伝子によりコードされたタンパク質の機能的ノックアウトを作製することができる。これは、タンパク質のノックダウンが特定のヒト疾患において有益な効果を有する場合に、治療的使用のためのものになり得る。遺伝子のコード配列を破壊する１つの方法は、配列特異的ヌクレアーゼを使用して、遺伝子のエクソン領域内で二本鎖切断を作ることである。二本鎖切断は、エラーが発生しやすい修復経路、主に非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を介して修復され、フレームシフト変異又はタンパク質の機能を妨害するアミノ酸配列の変化のいずれかをもたらし得る挿入又は欠失を生成する。

【０５７５】

ヒトグリコール酸オキシダーゼ（ＧＯ）をコードする遺伝子のエクソン領域で二本鎖切断を効率的に作り出すＭＧ２９－１のガイドＲＮＡを特定するために、ヒトヒドロキシ酸オキシダーゼ（ＨＡＯ－１）遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ　ＲｅｆＳｅｑアクセッション番号ＮＧ＿０４６７３３）のエクソン１～４を標的としたスペーサー長２２ｎｔの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ　Ｐｒｉｍｅ核酸分析ソフトウェア（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｅｉｏｕｓ．ｃｏｍ／ｐｒｉｍｅ／）のガイド発見アルゴリズムを使用して特定した。

【０５７６】

ヒトＨＡＯ－１遺伝子の最初の４つのエクソンは、ＨＡＯ－１コード配列のおよそＮ末端５０％を含むアミノ酸をコードする。遺伝子のコード配列のＮ末端に向かって作製されたインデルは、タンパク質の活性を妨害するフレームシフト又はミスセンス変異を作製する可能性がより高いため、最初の４つのエクソンを選択した。ＴＴＴＮのＭＧ２９－１に対するより制限的なＰＡＭを使用して、ヒトＨＡＯ－１エクソン１～４内で合計４２個の潜在的なｓｇＲＮＡを特定した。イントロン／エクソンの境界にわたるガイドは、こうしたガイドがスプライシングに干渉するインデルを作製し得るため、含まれた。完全なｓｇＲＮＡを作製するために、骨格配列（ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵ）をスペーサー配列の３’末端に付加した。ｓｇＲＮＡは、Ｖ型ヌクレアーゼｃｐｆ１（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから市販されている、「ＡｌｔＲ１／ＡｌｔＲ２」化学物質）に対するｓｇＲＮＡの性能を改善するために文書化された化学修飾塩基を組み込んで化学的に合成された。これらのガイドのスペーサー配列を以下の表３６に示す。

【０５７７】

【表５０－１】

表３６：ヒトＨｅｐ３Ｂ細胞における試験のためのヒトＨＡＯ－１を標的とする４２個の単一ガイドＲＮＡの配列

ガイド名	配列番号	エクソン	PAM	スペーサー配列(DNA として)	sgRNA 配列
hH29-1	4184	1	TTTA	GCATGTTGTTCATAATCATTGA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGCAUGUUGUUCAUAAUCAUUGA
hH29-2	4185	1	TTTG	GAAGTACTGATTTAGCATGTTG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGAAGUACUGAUUUAGCAUGUUG
hH29-3	4186	1	TTTG	TATCAATGATTATGAACAACAT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUAUCAAUGAUUAUGAACAACAU
hH29-4	4187	1	TTTG	CCCCAGACCTGTAATAGTCATA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCCCCAGACCUGUAAUAGUCAUA
hH29-5	4188	1	TTTC	TTCATCATTTGCCCCAGACCTG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUCAUCAUUUGCCCCAGACCUG
hH29-6	4189	1	TTTC	TTACCTGGAAAATGCTGCAATA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUACCUGGAAAAUGCUGCAAUA
hH29-7	4190	1	TTTT	CTTACCTGGAAAATGCTGCAAT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCUUACCUGGAAAAUGCUGCAAU
hH29-8	4191	1	TTTG	GCTGATAATATTGCAGCATTTT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGCUGAUAAUAUUGCAGCAUUUU
hH29-9	4192	1	TTTA	AAAAATAAATTTTCTTACCTGG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAAAAUAAAUUUUCUUACCUGG
hH29-10	4193	1	TTTT	AAAAAATAAATTTTCTTACCTG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAAAAAUAAAUUUUCUUACCUG
hH29-11	4194	2	TTTT	ATTTTATTTTTTAATTCTAGAT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUUUUAUUUUUUAAUUCUAGAU
hH29-12	4195	2	TTTA	TTTTATTTTTTAATTCTAGATG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUUUAUUUUUUAAUUCUAGAUG
hH29-13	4196	2	TTTT	ATTTTTTAATTCTAGATGGAAG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUUUUUUAAUUCUAGAUGGAAG

【０５７８】

【表５０－２】

ガイド名	配列番号	エクソン	PAM	スペーサー配列(DNA として)	sgRNA 配列
hH29-14	4197	2	TTTA	TTTTTTAATTCTAGATGGAAGC	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUUUUUAAUUCUAGAUGGAAGC
hH29-15	4198	2	TTTT	TTAATTCTAGATGGAAGCTGTA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUAAUUCUAGAUGGAAGCUGUA
hH29-16	4199	2	TTTT	TAATTCTAGATGGAAGCTGTAT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUAAUUCUAGAUGGAAGCUGUAU
hH29-17	4200	2	TTTT	AATTCTAGATGGAAGCTGTATC	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAUUCUAGAUGGAAGCUGUAUC
hH29-18	4201	2	TTTA	ATTCTAGATGGAAGCTGTATCC	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUUCUAGAUGGAAGCUGUAUCC
hH29-19	4202	2	TTTC	AGCAACATTCCGGAGCATCCTT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAGCAACAUUCCGGAGCAUCCUU
hH29-20	4203	2	TTTT	AGGACAGAGGGTCAGCATGCCA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAGGACAGAGGGUCAGCAUGCCA
hH29-21	4204	2	TTTA	GGACAGAGGGTCAGCATGCCAA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGGACAGAGGGUCAGCAUGCCAA
hH29-22	4205	3	TTTC	TTTCTCAGCCTGTCAGTCCCTG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUUCUCAGCCUGUCAGUCCCUG
hH29-23	4206	3	TTTC	TCAGCCTGTCAGTCCCTGGGAA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUCAGCCUGUCAGUCCCUGGGAA
hH29-24	4207	3	TTTG	TGACAGTGGACACACCTTACCT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUGACAGUGGACACACCUUACCU
hH29-25	4208	3	TTTG	AATCTGTTACGCACATCATCCA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAUCUGUUACGCACAUCAUCCA
hH29-26	4209	4	TTTT	ATGCATTTCTTATTTTAGGATG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUGCAUUUCUUAUUUUAGGAUG
hH29-27	4210	4	TTTA	TGCATTTCTTATTTTAGGATGA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUGCAUUUCUUAUUUUAGGAUGA

【０５７９】

【表５０－３】

ガイド名	配列番号	エクソン	PAM	スペーサー配列(DNA として)	sgRNA 配列
hH29-28	4211	4	TTTC	TTATTTTAGGATGAAAAATTTT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUAUUUUAGGAUGAAAAAUUUU
hH29-29	4212	4	TTTT	AGGATGAAAAATTTTGAAACCA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAGGAUGAAAAAUUUUGAAACCA
hH29-30	4213	4	TTTA	GGATGAAAAATTTTGAAACCAG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGGAUGAAAAAUUUUGAAACCAG
hH29-31	4214	4	TTTC	CTCAGGAGAAAATGATAAAGTA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCUCAGGAGAAAAUGAUAAAGUA
hH29-32	4215	4	TTTT	CCTCAGGAGAAAATGATAAAGT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCCUCAGGAGAAAAUGAUAAAGU
hH29-33	4216	4	TTTT	GAAACCAGTACTTTATCATTTT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGAAACCAGUACUUUAUCAUUUU
hH29-34	4217	4	TTTG	AAACCAGTACTTTATCATTTTC	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAACCAGUACUUUAUCAUUUUC
hH29-35	4218	4	TTTA	TCATTTTCTCCTGAGGAAAATT	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUCAUUUUCUCCUGAGGAAAAUU
hH29-36	4219	4	TTTT	CTCCTGAGGAAAATTTTGGAGA	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCUCCUGAGGAAAAUUUUGGAGA
hH29-37	4220	4	TTTC	TCCTGAGGAAAATTTTGGAGAC	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUCCUGAGGAAAAUUUUGGAGAC
hH29-38	4221	4	TTTA	GCCACATATGCAGCAAGTCCAC	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGCCACAUAUGCAGCAAGUCCAC
hH29-39	4222	4	TTTT	GGAGACGACAGTGGACTTGCTG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGGAGACGACAGUGGACUUGCUG
hH29-40	4223	4	TTTG	GAGACGACAGTGGACTTGCTGC	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGAGACGACAGUGGACUUGCUGC
hH29-41	4224	4	TTTG	ATATCTTCCCAGCTGATAGATG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUAUCUUCCCAGCUGAUAGAUG
hH29-42	4225	4	TTTG	CAACAATTGGCAATGATGTCAG	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCAACAAUUGGCAAUGAUGUCAG

【０５８０】

形質転換ヒト肝臓細胞株（肝細胞がん由来）であるＨｅｐ３Ｂ細胞（ＡＴＣＣカタログ番号ＨＢ－８０６４）を、５％CO_2インキュベーター中の増殖培地（１０％ＦＢＳを含むＥＭＥＭ培地）中で、標準条件下で培養し、ＭＧ２９－１をコードするｍＲＮＡと単一ガイドＲＮＡの各々との混合物でトランスフェクトした。ＭＧ２９－１をコードするｍＲＮＡは、ＭＧ２９－１のコード配列がクローニングされたプラスミドのＴ７ポリメラーゼインビトロ転写によって生成された。ＭＧ２９－１コード配列は、ヒトコドン使用頻度表を使用してコドン最適化され、（Ｎ末端で）ＳＶ４０から、及び（Ｃ末端で）ヌクレオプラスミンから誘導された核局在化シグナルに隣接した。更に、翻訳を改善するために、５

’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）をコード配列の５’末端に含めた。インビボでのｍＲＮＡ安定性を改善するために、３’ＵＴＲ、続いておよそ９０～１１０ヌクレオチドのポリＡ管を、コード配列の３’末端のｍＲＮＡ（プラスミドにおいてコードされる）に含めた。ｐｏｌｙＡテールを有さないＭＧ２９－１　ｍＲＮＡをコードするＤＮＡ配列を、配列番号５８３０に示す。インビトロ転写反応は、Ｃｌｅａｎ　Ｃａｐ（登録商標）キャッピング試薬（Ｔｒｉｌｉｎｋ　ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含み、得られたＲＮＡをＭＥＧＡＣｌｅａｒ（商標）Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｃｌｅａｎ－Ｕｐキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して精製し、ＴａｐｅＳｔａｔｉｏｎ（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して純度を評価し、＞９０％の全長ＲＮＡから構成されることが見出された。

【０５８１】

ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸなどの脂質トランスフェクション試薬を用いるｍＲＮＡ及びガイドの共トランスフェクションが使用される場合、２つのＲＮＡ分子の混合物は、正に荷電した脂質と複合体を形成し、複合体は、エンドサイトーシスを介して細胞に侵入し、最終的にＲＮＡのいくつかは細胞質に到達する。細胞質では、ｍＲＮＡはタンパク質に翻訳される。ＭＧ２９－１などのＲＮＡガイドヌクレアーゼの場合、得られたＭＧ２９－１タンパク質は、ＭＧ２９－１タンパク質に操作された核局在化シグナルによって媒介されるプロセスにおいて核に侵入する前に、細胞質内のｓｇＲＮＡと複合体を形成すると推定される。このプロセスは、インビボで、脂質ナノ粒子でｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを送達するプロセスと同様であり、コード配列内にインデルを導入することによってＨＡＯ－１遺伝子が機能的に不活化される治療用途に想定される使用の方法である。したがって、編集活性のための４２個の単一ガイドＲＮＡを、ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡの共トランスフェクションを使用してスクリーニングし、この方法は、計画された治療用途のより良好な代表である可能性が高く、したがって、４２個のｓｇＲＮＡのうちのどれが治療用途において最も活性であるかをより正確に予測する可能性が高いためである。

【０５８２】

増殖培地（ＥＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ）中に２４ウェルプレートのウェル当たり合計２×10^5個のＨｅｐ３Ｂ細胞を播種し、５％CO_2／３７℃の加湿されたインキュベーター中で一晩インキュベートした。翌日、リポフェクタミンＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）をＯＰＴＩＭＥＭ培地（トランスフェクション当たり１．２５μＬのＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ　ｐｌｕｓ＋２５μＬのＯＰＴＩＭＥＭ）中に希釈した。３００ｎｇのＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ（０．２２ｐｍｏｌ）及び１２０ｎｇ（８．４ｐｍｏｌ）のｓｇＲＮＡを、２５μＬのＯＰＴＩＭＥＭ培地中で合わせ、次いで、チューブを穏やかにフリッキングすることによって２６μＬの希釈されたＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸと混合した。室温で５～１０分間インキュベートした後、ＲＮＡ／ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ混合物を、Ｈｅｐ３Ｂ細胞の各ウェルに添加し、穏やかに渦を巻かせることによって混合した。細胞を一晩（１６時間）インキュベートし、その後、培地を新鮮な増殖培地と交換した。ＲＮＡ／ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ混合物の添加の４８時間後に、細胞を、トリプシン化又はオンプレート溶解によって収集し、Ｐｕｒｅｌｉｎｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）又はＭａｇＭａｘ　ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）及びＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒロボット系（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）のいずれかを使用してゲノムＤＮＡを精製した。精製されたゲノムＤＮＡを、２６０ｎｍでの吸光度によって定量化した。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（表３７）及びＰｈｕｓｉｏｎ　Ｆｌａｓｈ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）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。ＰＣＲ産物を、ＤＮＡ　Ｃｌｅａｎ＆Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ　５キット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製及び濃縮し、４０ｎｇのＰＣＲ産物を、各ｓｇＲＮＡの予測される標的部位の１００ｂｐ～３５０ｂｐ内に位置するプライマーを使用してサンガーシーケンシング（ＥＬＩＭ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓで）に供した（表３７）。未処理のＨｅｐ３Ｂ細胞に由来するＰＣＲ産物を対照として含

めた。ＰＣＲ産物の配列は、ＨＡＯ－１エクソンの予想される配列と一致した。

【０５８３】

【表５１】

表３７：最初の４つのエクソンのＰＣＲ増幅及びサンガーシーケンシングに使用される、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
ヒトHAO1エクソン1	フォワードPCR	PCR_hHe1_F_+490	TTTCATGGATGCCCCGTTCA
	リバースPCR	PCR_hHe1_R_-412	ACGAAAAGCCAGCAGGAAGA
	配列決定	Seq_hHe1_R_-121	AGCCCCAAGAACTTTTCCCT
ヒトHAO1エクソン2	フォワードPCR	PCR_hHe2_F_+391	TGCATCAGTGGTTGTCAGGG
	リバースPCR	PCR_hHe2_R_-387	CCTAGCTGTGACTTTGGGCA
	配列決定	Seq_hHe2_R_-152	TGGAAAGAAGAGGAGCAGGAC
ヒトHAO1エクソン3	フォワードPCR	PCR_hHe3_F_+238	AGGCTGGATGTTCAGGTTCTT
	リバースPCR	PCR_hHe3_R_-212	TCCCAAAGCCAAAGCCCTTA
	配列決定	Seq_hHe3_F_+186	AGCAGAAATAACTCCAGTAGCCA
ヒトHAO1エクソン4	フォワードPCR	PCR_hHe4_F_+324	GCTGGCTGAAAATCGTGTCAA
	リバースPCR	PCR_hHe4_R_-348	TCCTTGGGGCTTCTCTTTGG
	配列決定	Seq_hHe4_F_+174	ACTGATTAAGACCACTAGAGTATCACA

【０５８４】

サンガーシーケンシングクロマトグラムを、Ｂｒｉｎｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．（例えば、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１４ Ｄｅｃ １６；４２（２２）：ｅ１６８．Ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ ２０１４ Ｏｃｔ ９．ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｕ９３６を参照されたく、参照により本明細書に組み込まれる）によって記載されるように、Ｔｒａｃｋｉｎｇ ｏｆ Ｉｎｄｅｌｓ ｂｙ ＤＥｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ（ＴＩＤＥ）と呼ばれるアルゴリズムによって各ｓｇＲＮＡの予測される標的部位で挿入及び欠失（インデル）について分析した。表３８に表されるように、１４個のガイドは、それらの予測される標的部位で検出可能な編集を示した。１０個のガイドは、１０％以上の編集活性を呈した。これらのデータは、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼが、培養された肝臓細胞株におけるヒトＨＡＯ－１遺伝子のエクソン領域においてＲＮＡガイド配列特異的二本鎖切断を生成することができることを示す。

【０５８５】

【表５２】

表３８：Ｈｅｐ３Ｂ細胞におけるヒトＨＡＯ－１遺伝子のエクソン１～４を標的とする４２個のｓｇＲＮＡの編集活性。

ガイド名	PAM	平均インデル(割合)*	SD*
hH29-1	TTTA	8.5	4.95
hH29-2	TTTG	15.25	5.56
hH29-3	TTTG	6	5.66
hH29-4	TTTG	39.5	10.47
hH29-5	TTTC	0	0
hH29-6	TTTC	8	8.49
hH29-7	TTTT	0	0
hH29-8	TTTG	2.5	3.54
hH29-9	TTTA	0	0
hH29-10	TTTT	0	0
hH29-11	TTTT	0	0
hH29-12	TTTA	0	0
hH29-13	TTTT	0	0
hH29-14	TTTA	0	0
hH29-15	TTTT	0	0
hH29-16	TTTT	0	0
hH29-17	TTTT	0	0
hH29-18	TTTA	3.5	4.95
hH29-19	TTTC	18.75	12.74
hH29-20	TTTT	6.5	4.95
hH29-21	TTTA	68	8.04
hH29-22	TTTC	6	1.41
hH29-23	TTTC	17.5	2.89
hH29-24	TTTG	10	4.24
hH29-25	TTTG	0	0
hH29-26	TTTT	0	0
hH29-27	TTTA	0	0
hH29-28	TTTC	0	0
hH29-29	TTTT	0	0
hH29-30	TTTA	0	0
hH29-31	TTTC	0	0
hH29-32	TTTT	0	0
hH29-33	TTTT	0	0
hH29-34	TTTG	0	0
hH29-35	TTTA	0	0
hH29-36	TTTT	0	0
hH29-37	TTTC	0	0
hH29-38	TTTA	0	0
hH29-39	TTTT	0	0
hH29-40	TTTG	0	0
hH29-41	TTTG	34	13.04
hH29-42	TTTG	0	0

＊データは、２つの独立したトランスフェクションの平均である

【０５８６】

この初期スクリーニングから最も高い編集活性を有する６つのｓｇＲＮＡ（ｈＨ２９－２、ｈＨ２９－４，ｈＨ２９－１９、ｈＨ２９－２１、ｈＨ２９－２３、及びｈＨ２９－４１）を、Ｈｅｐ３Ｂ細胞における同じＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ／ｓｇＲＮＡ　ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘトランスフェクション法を使用して再試験した。２つの独立したトランスフェクションを行い、インデル頻度を、上に記載される同じサンガーシーケンシング方法を使用して決定し、続いてＴＩＤＥを使用して分析した。平均インデル頻度（図９５）は、２０％～７５％の範囲であった。編集効率の順位の順番は、ｈＨ２９－２１＞ｈＨ２９－４１＞ｈＨ２９－４＞ｈＨ２９－１９＞ｈＨ２９－２３＝ｈＨ２９－２であった。フ

レームシフト（アウトオブフレーム編集）を生成するインデルの頻度の評価も、サンガークロマトグラムに基づいて行い、これらの結果を図９５にプロットする。アウトオブフレーム編集対総インデルの比率は、異なるｓｇＲＮＡで異なっていたが、アウトオブフレーム編集頻度の順位の順番は、総インデルと同じであった。

【０５８７】

Ｈｅｐ３Ｂ細胞において最も高い編集活性を有する４つのｓｇＲＮＡ（ｈＨ２９－２１、ｈＨ２９－４、ｈＨ２９－４１、及びｈＨ２９－２３）も、Ｈｅｐ３Ｂ細胞及び別のヒト肝臓由来細胞株ＨｕＨ７の両方へのリボ核タンパク質粒子（ＲＮＰ）のヌクレオフェクションによる編集活性について評価した。リボ核タンパク質複合体は、ＰＢＳ緩衝液中で１６０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ及び１２６ｐｍｏｌの精製されたＭＧ２９－１タンパク質を混合することによって形成された。完全ＳＦヌクレオフェクション試薬（Ｌｏｎｚａ）中の懸濁液中の合計２×１０^{5}個のＨｅｐ３Ｂ細胞又はＨｕＨ７細胞を、４Ｄヌクレオフェクション装置（Ｌｏｎｚａ）を使用して、予め形成されたヌクレアーゼ／ｓｇＲＮＡ複合体でヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクション後、細胞を増殖培地＋１０％ＦＢＳ中の２４ウェルプレートに播種し、５％$ＣＯ_{２}$インキュベーター中で４８時間～７２時間インキュベートした。次いで、カラムベースの精製キット（Ｐｕｒｅｌｉｎｋ ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ ｍｉｎｉ ｋｉｔ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してゲノムＤＮＡを細胞から抽出し、２６０ｎｍでの吸光度によって定量化した。単一ガイドによって標的化されたＨＡＯ－１遺伝子配列を、関連するエクソン特異的プライマー（表３７）及びＰｈｕｓｉｏｎ Ｆｌａｓｈ Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）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。ＰＣＲ産物を、ＤＮＡ Ｃｌｅａｎ＆Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ ５（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製及び濃縮し、４０ｎｇのＰＣＲ産物を、各ｓｇＲＮＡの予測される標的部位の１００～３５０ｂｐ内に位置する関連するプライマー（表３７）を使用してサンガーシーケンシング（ＥＬＩＭ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓで）に供した。トランスフェクトされていない細胞に由来するＰＣＲ産物を対照として含めた。ＰＣＲ産物の配列は、ＨＡＯ－１エクソンの予想される配列と一致した。サンガーシーケンシングクロマトグラムを、Ｂｒｉｎｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１４ Ｄｅｃ １６；４２（２２）：ｅ１６８．Ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ ２０１４ Ｏｃｔ ９．ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｕ９３６）によって記載されるように、Ｔｒａｃｋｉｎｇ ｏｆ Ｉｎｄｅｌｓ ｂｙ ＤＥｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ（ＴＩＤＥ）によって各ガイドの予測される標的部位で挿入及び欠失（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。結果（図９６）は、ＲＮＰヌクレオフェクションのより効率的なトランスフェクション方法を使用して、これらの上位４つのガイドの編集頻度が２５％～９５％の範囲であったことを示す。これら４つのガイドの編集活性の順位の順番は、ｈＨ２９－２１＞ｈＨ２９－４＞ｈＨ２９－４１＞ｈＨ２９－２３であり、これは、Ｈｅｐ３Ｂ細胞におけるＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸによるｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡのトランスフェクションによって測定される編集活性の順位の順番と類似していたが、同一ではなかった（図９５）。

【０５８８】

実施例７３－初代ヒト肝細胞におけるヒトＨＡＯ－１のエクソン１～４を標的とする最も活性なＭＧ２９－１ガイドの編集活性

初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）は、Ｋｅｇｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｄｏｉ：１０．３７９１／５３０６９）などの文書化された方法を使用して、死亡したヒトの肝臓から単離される肝細胞である。ＰＨＨは、インビボでのその天然状態のヒト肝細胞の最も近い細胞ベースのモデルであり、したがって、インビボでのヒトにおける遺伝子編集系の性能を予測するために使用され得るインビトロ細胞系を表す。ＰＨＨは最小限の操作を受け、細胞分裂を経ず、約７日間の培養物中の限られた寿命を有する。ＰＨＨは、商業的供給業者（Ｌｏｎｚ

ａ、Ｇｉｂｃｏ）から入手し、供給業者が提供するプロトコルに従って培養した。ヒトＨＡＯ－１を標的とする４つの最も活性なＭＧ２９－１ガイドの編集活性を評価するために、スペーサー４、２１、２３、及び４１を有するｓｇＲＮＡを、ｓｇＲＮＡの安定性及び活性を改善する骨格及び核酸塩基への化学修飾＃３７の組み込みにより化学的に合成した。ＨＡＯ－１化学修飾＃３７を有する４つのｓｇＲＮＡは、ｈＨ２９－４－３７（配列番号５８３１）、ｈＨ２９－２１－３７（配列番号５８３２）、ｈＨ２９－２３－３７（配列番号５８３３）、及びｈＨ２９－４１－３７（配列番号５８３４）として指定される。１０２８ｎｇのＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び２２２ｎｇの各単一ガイドＲＮＡ（１：２０のモル比のｍＲＮＡ：ガイドＲＮＡ）を、以下のように初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）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、ＰＨＨ細胞を解凍し、１．０ｍｌのＨＢＭ^{TM}－５％ＦＢＳ－ＨＣＭ（商標）ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓ培地中で、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。トランスフェクションの日、６０．４μＬのＯｐｔｉＭＥＭ培地と２．１μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ　Ｍａｘ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）をマスターミックス溶液中で混合し、ボルテックスし、室温で少なくとも１０分間置いた。別個のチューブにおいて、１０２８ｎｇのＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び２２２ｎｇのｓｇＲＮＡを混合し、ＯｐｔｉＭＥＭ培地で６２．５μＬの体積にし、軽くピペッティングした。適切な量のＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ溶液を各ＲＮＡ溶液に添加し、チューブをフリックして混合し、低速で軽くスピンダウンした。完全な編集試薬溶液を、室温で少なくとも１０分間インキュベートし、次いで、ＰＨＨ細胞に直接加えた。トランスフェクション後、培地を回収まで毎日置き換えた。トランスフェクションの３日後、培養培地をＰＨＨ細胞の各ウェルから吸引し、ＭａｇＭＡＸ（商標）細胞及び組織ＤＮＡ抽出バッファー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）で置き換えた。細胞をこすり取り、９６ウェルプレートに移し、ゲノムＤＮＡを、ＭａｇＭＡＸ（商標）ＤＮＡマルチサンプルウルトラ２．０キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いたＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒ　Ｆｌｅｘを介して、自動磁気ビーズ精製によって精製した。

【０５８９】

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ポリメラーゼ及びエクソン特異的プライマー（表３７）であるが、合計２９サイクルの次世代シーケンシング（ＮＧＳ）に使用されるバーコード化プライマーと相補的であるアダプターの付加を用いてＰＣＲ増幅した。この第１のＰＣＲ反応の産物を、合計１０サイクルを使用して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、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ機器上でＮＧＳに供し、結果をカスタムスクリプトを使用して処理して、ＨＡＯ－１遺伝子の標的部位に挿入又は欠失（インデル）を含む配列決定読み取りの割合を生成した。ＰＨＨの２つの独立したトランスフェクションを行い、各実験において、ｓｇＲＮＡの各々を、ＮＧＳによってインデルについて別々にアッセイした２つ組のウェルで試験した。次いで、２つのウェルにおけるインデル頻度の平均を計算した。次いで、２つの独立した実験からのインデル頻度の平均を決定し（表３９）、エラーバーが標準偏差を表すグラフ形式でも示した（図９７）。

【０５９０】

【表５３】

表３９：ヒトＨＡＯ－１を標的とする４　ＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡのＰＨＨにおける編集活性

sgRNA	Exon	平均総インデル%*	標準偏差
hH29-4-37	1	58.3	5.6
hH29-21-37	2	59.1	10.5
hH29-23-37	3	31.5	10.5
hH29-41-37	4	49.2	9.9

＊データは、それぞれ２つ組のウェルで行われた、２つの独立したトランスフェクション実験の平均である。

【０５９１】

結果は、４つのガイド全てが、２０％～５８％の範囲の平均インデル頻度で、ＰＨＨにおいてＨＡＯ－１遺伝子を編集したことを示す（図９７）。ガイドｈＨ２９－４－３７及びｍＨ２９－２１－３７は、ＰＨＨにおいて最も高い編集活性を呈した。ガイドｈＨ２９－４１－３７は、ガイドｈＨ２９－４－３７及びｍＨ２９－２１－３７よりもわずかに活性が低かったが、差は有意ではなかった。ガイドｈＨ２９－２３－３７は、ＰＨＨにおける４つのガイドの中で最も活性が低かった。ガイドｈＨ２９－２３－３７はまた、Ｈｅｐ３Ｂ及びＨｕＨ７細胞において、これら４つのガイドの中で最も活性が低かった（表３７、図９５、図９６）。ＰＨＨ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、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び適切なｓｇＲＮＡが、ヒトＨＡＯ－１遺伝子のコード配列における挿入及び欠失の生成に有用性を有し、これは、ＧＯタンパク質の発現及び／又は活性の破壊につながるナンセンス変異、ミスセンス変異、及び欠失変異の混合物を生成することが予想されることを示す。

【０５９２】

ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び４つのｓｇＲＮＡでトランスフェクトしたＰＨＨにおけるＨＡＯ－１遺伝子の同じＮＧＳ配列データ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。標的部位で挿入又は欠失した塩基の数が３塩基又は３塩基の倍数ではない配列読み取りは、ＨＡＯ－１タンパク質コード配列のリーディングフレームをシフトさせる。フレームシフトは、インデルの下流のｍＲＮＡにコードされるアミノ酸配列を変化させ、多くの場合、ある時点でインフレーム停止コドンを導入する（これは各対立遺伝子について予測することができる）。ＮＧＳデータ（各試料に対して数千の読み取りを含む）を、フレームシフトを作成したインデルがある総配列決定読み取りの割合を計算するＰｙｔｈｏｎスクリプトを使用して分析し、これをアウトオブフレーム（ＯＯＦ）インデルの割合として指定した。ＯＯＦインデル割合、総インデル割合とともに図９７にプロットする。ＯＯＦインデルパーセンテージは、２０％～４０％の範囲であり、これは、総インデル割合の７０％～８０％を表し、インデルの大部分がフレームシフトを作製すると予測されることを示す。インフレームインデルは、ｍＲＮＡから１つ以上のコドンを欠失させ、したがって、ＨＡＯ－１によってコードされるグリコール酸オキシダーゼタンパク質から１つ以上のアミノ酸を除去する。図９８Ａ及び９８Ｂは、編集されたＰＨＨ由来の４つのＭＧｆ２９－１　ｓｇＲＮＡの各々についての代表的なインデルプロファイルを示す。３、６、９、１２、１５、１８、及び２１塩基のインフレーム欠失は、異なる相対頻度で明らかである。インフレーム欠失の頻度及びＧＯタンパク質配列に対するそれらの影響の分析を使用して、ＧＯタンパク質機能の最大の低減をもたらすｓｇＲＮＡの選択を通知することができる。

【０５９３】

実施例７４－マウスＨＡＯ－１のエクソン領域を標的とする２２及び２０個のヌクレオチドスペーサーを有するＭＧ２９－１の単一ガイドＲＮＡのインビボ編集活性

ＭＧ２９－１　Ｖ型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、ＭＧ２９－１ヌクレアーゼ及び４個のガイドＲＮＡのうちの１個をコードするｍＲＮＡを送達した。ＬＮＰで送達されたとき、マウスの肝臓のマウスＨＡＯ－１遺伝子を編集する２２ヌクレオチド（ｎｔ）スペーサーを含むｓｇＲＮＡを有するＭＧ２９－１の能力が、実施例５５に示された。培養された哺乳類細胞における実験は、ＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡ中のスペーサー領域の長さを２２ｎｔから２０ｎｔに低減させることは、編集活性を変化させなかったことを示した。スペーサーを２２ｎｔから２０ｎｔに低減させることは、オフターゲット活性を最小化する点、及びｓｇＲＮＡ製造の点で有利であり得る。２０ｎｔの低減されたスペーサー長を有するＭＧ２９－１　ｓｇＲＮＡが、インビボで効力を保持したことを検証するために、４つのガイドＲＮＡ（ｍＨ２９－２９－３７、ｍＨ２９－２９－４４、ｍＨ２９－２９ｓ－３７、及びｍＨ２９－２９ｓ－４４）を設計し、マウスで試験した。これらのガイドの配列を以下の表４０に示す。

【０５９４】

【表５４】

表４０：マウス研究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
mH29-29-37	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU **CCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fAfA*fU*mC**
mH29-29-44	mC*mU*mU*U*U*AAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU **CCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfG*fCfC*fA*fA*fA*fU*mC**
mH29-29s-37	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU **CCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfG*fCfC*fA*fA*mA**
mH29-29s-44	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU **CCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfG*fC*fC*fA*fA*mA**

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。普通字体は骨格配列。太字はスペーサー配列。

【０５９５】

ガイドｍＨ２９－２９－３７及びｍＨ２９－２９－４４は、同じｎｔ配列（スペーサー２９）を有するが、異なる化学修飾（化学物質３７及び４４）を有し、一方で、ガイドｍＨ２９－２９ｓ－３７及びｍＨ２９－２９ｓ－４４は、３’末端で２ｎｔだけ短縮されたスペーサー配列を有するが、それ以外は、ｎｔ配列においてそれぞれｍＨ２９－２９－３７及びｍＨ２９－２９－４４と同一である。２０ｎｔのスペーサーを有するガイドのスペーサー領域における２’－フルオロ、２’－Ｏ－メチル、及びホスホロチオエート修飾の位置は、２２ｎｔのスペーサーを有する対応するガイドの位置に対してシフトされる。ｓｇＲＮＡにおける化学修飾は、インビボ効力に重要なｓｇＲＮＡ安定性に影響を与えるため、これらの変化がインビボ編集に及ぼす影響を評価することが重要であった。

【０５９６】

ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡの調製

　ＭＧ２９－１をコードするｍＲＮＡ（配列番号５８４６）を、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、並びにＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ又はＴｒｉｌｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入したヌクレオチド及び酵素を使用する標準条件をして、直線化プラスミド鋳型のインビトロ転写によって生成した。ＭＧ２９－１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個のアミノ酸のリンカー（ＧＧＧＳ）、開始メチオニンコドンを除去したＭＧ２９－１ヌクレアーゼのタンパク質コード配列、３個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、市販のアルゴリズムを使用して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ｐｏｌｙＡテールを、インビトロ転写に使用するプラスミド中にコードさせ、ｍＲＮＡを、Ｔｒｉｌｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入したＣｌｅａｎＣＡＰ（商標）試薬を使用して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。

【０５９７】

脂質ナノ粒子の調製

　ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを送達するために使用される脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤は、Ｋａｕｆｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔ．２０１５，１５，１１，７３００－７３０６　ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．５ｂ０２４９７０）を含む文献に記載されるＬＮＰ製剤に基づく。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（Ｉｇｎｉｔｅ　ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｅｒ、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ）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、所望の体積が達成されるまで、Ａｍｉｃｏｎスピン濃縮器（Ｍｉｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮した。ＬＮＰ製剤中のＲＮＡの濃度を、Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）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、７０ｎｍ～８４ｎｍの範囲の直径、及び０．０９８～０．１５０のＰＤＩを有した。

【０５９８】

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０．８４ｍｇ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２，０００Ｇで１０分間遠心分離し、血漿を１．５ｍＬのクライオチューブに移し、－８０℃で保存した。

【０５９９】

次世代シーケンシング（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、ＰｕｒｅＬｉｎｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に供給された消化緩衝液中のＢｅａｄ　Ｒｕｐｔｏｒ（Ｏｍｎｉ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を使用してホモジナイズした。ゲノムＤＮＡを、ＭａｇＭＡＸ（商標）ＤＮＡマルチサンプルウルトラ２．０キット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して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り定量化した。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サイクルの次世代シーケンシング（ＮＧＳ）に使用されるバーコード化プライマーと相補的であるアダプターを有する遺伝子特異的プライマー（表４１）でＰＣＲ増幅した。

【０６００】

【表５５】

表４１：ＨＡＯ１ガイド標的部位を増幅するため及びＮＧＳに使用される及びプライマー

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
mH29-29 (スペーサー29)	mHAO1-NGS-P3	GCTCTTCCGATCTNNNNNGTGATGT CAATCGTCTGAGC	GCTCTTCCGATCT NNNNNTGTAGGTG GCTGAGTACGTT

【０６０１】

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、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑ機器上でＮＧＳに供し、結果をカスタムＰｙｔｈｏｎスクリプトを使用して処理して、ＨＡＯ－１遺伝子の標的部位に挿入又は欠失（インデル）を含む配列決定読み取りの割合を生成した。

【０６０２】

ＮＧＳ分析は、ＭＧ２９－１ ｍＲＮＡを封入するＬＮＰを投与された群の編集、及び４つのｓｇＲＮＡの各々が、総肝臓ゲノムＤＮＡの４２％～４８％の範囲であったことを示した（図９９）。群間でわずかな差異しかなく、２０ｎｔスペーサーを有するｓｇＲＮＡが、２２ｎｔスペーサーと同じくらい効率的に標的遺伝子座を編集したこと、及び化学物質３７及び４４を有するガイドＲＮＡが同様に良好に編集したことを示した。

【０６０３】

ＲＴ－ｄｄＰＣＲによるＲＮＡ調製及び分析

肝臓の内側葉をＲＮＡｌａｔｅｒ又はＲＮＡｐｒｏｔｅｃｔ（Ｑｉａｇｅｎ）中に保存し、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む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／ｓで１０～１５秒間に従って、Ｂｅａｄ Ｒｕｐｔｏｒ Ｅｌｉｔｅ（ＯＭＮＩ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）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、ＲＮｅａｓｙ Ｐｒｏｔｅｃｔ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、更に４５分間のオンカラムＤＮａｓｅ Ｉ消化処理（Ｑｉａｇｅｎ）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、単離されたＲＮＡ試料は、ｅｚＤＮａｓｅ（商標）酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して追加のＤＮａｓｅ処理を受け、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ（商標）ＩＶ Ｖｉｌｏ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して逆転写を受けた。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。

【０６０４】

ＨＡＯ－１ ｍＲＮＡレベルは、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。ＨＡＯ－１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。アッセイの鋳型材料は、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）（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）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１００ｎｇのｃＤＮＡ産物であった。ＰＣＲ混合物を、ＡｕｔｏＤＧ ｄｄＰＣＲ系（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を介して数千個の油の液滴に解析し、Ｃ１０００ Ｔｏｕｃｈ（商標）ディープウェルサーマルサイクラー（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔ

ｏｒｉｅｓ）で実行し、ＱＸ２００　Ｄｒｏｐｌｅｔ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して分析した。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。ＱｕａｎｔａＳｏｆｔソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して、各試料について、ＨＡＯ１及びＧＡＰＤＨの１μＬ当たりのコピーを計算した。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。ｍＨ２９－２９処置群のＨＡＯ１　ｍＲＮＡのＧＡＰＤＨ正規化レベルは、対照群の５２％～７０％の範囲であり（図９９）、インデル％によって定義される編集効率と相関し、ガイドＲＮＡ活性に対するスペーサー長さ又は化学物質の影響がほとんど又は全くないことを示した。

【０６０５】

【表５６】

表４２：増幅ＨＡＯ１及びＧＡＰＤＨ　ｄｄＰＣＲアッセイで使用される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	GGGGAGAAAGGTGTTCAAGATGT	CTCACCAATGTCTTGTCGATGA
GAPDH	FAM	CATGACCA+CAGT+C+CATGCCATC	GCACCACCAACTGCTTAG	CCATCCACAGTCTTCTGGG

化学修飾に関する表記法：＋＝ロックド核酸（ＬＮＡ）塩基修飾

【０６０６】

実施例７５－マウスにおけるインビボでの編集効率に関する異なるｍＲＮＡ：ｓｇＲＮＡ比及びＬＮＰ製剤手順の調査

　このインビボマウス研究では、ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ　ｍＨ２９－２９－５０ｂをＬＮＰに別々に製剤化し、次いで、投与前にｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡの異なる質量比で混合した。同じｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡも、同じＬＮＰ中で１：１の質量比で共製剤化し、次いで、４℃に保持されかつ４８時間以内に投与されるか（新鮮なＬＮＰ）、又は凍結されかつ－８０℃で保存され、次いで、解凍され、２時間以内に投与されるか（凍結ＬＮＰ）のいずれかであった。ｍＨ２９－２９－５０ｂ　ｓｇＲＮＡの配列を表４３に示す。このガイドは、２０ｎｔのスペーサー配列及び化学物質５０と指定された化学修飾を有する。

【０６０７】

【表５７】

表４３：マウス研究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
mH29-29-50	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU**CCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fAfA*fU*mC**
mH29-29-50b	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU**CCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fA*mA**
mH29-29-51b	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU**CCUUAGGAGAAAAUGCC*A*mA*mA**
mH29-29-52b	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU**CCUUAGGAfGAfAAfAUfG*C*fCA*fA*mA**
mH29-29-53b	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU**CCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fA*mA**
mH29-29-54b	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAU**CCUUAGGAGAAAAUGCC*A*mA*mA**

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。普通字体は骨格配列。太字はスペーサー配列。

【０６０８】

脂質ナノ粒子の調製

ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを送達するために使用されるＬＮＰ製剤を、以下の違いを有する実施例７４と同じ手順によって調製した。

１．別個に製剤化されたＬＮＰの異なる比について、ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡ　ＬＮＰを、１：２、１：１．５、１：１、１：０．７５、及び１：０．５のｍＲＮＡ：ガイドＲＮＡ質量比で混合した。

２．共製剤化されたＬＮＰについては、ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを、製剤化前に１：１の質量比で混合し、４℃（「新鮮」）又は－８０℃（「凍結」）のいずれかで一晩保存した。

【０６０９】

マウス投与及び採取

別個のＬＮＰ中で製剤化されたｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡを、上記のように異なる質量比で混合し、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０．３５ｍｇのＲＮＡの総ＲＮＡ用量で静脈内注射した。共製

剤化されたＬＮＰを同じ用量で同様に注射した。投与の７日後、マウスを　　殺し、実施例７４と同じ手順によって、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。終末血液を、実施例７４の手順に従って、心臓穿刺を介した放血によって収集した。

【０６１０】

ＮＧＳによるゲノムＤＮＡ調製及び編集分析

ゲノムＤＮＡを、実施例７４のようにＮＧＳによって調製し、分析した。

【０６１１】

ＲＴ－ｄｄＰＣＲによるＲＮＡ調製及び分析

ＲＮＡを、実施例７４のようにＲＴ－ｄｄＰＣＲによって調製し、分析した。

【０６１２】

結果は、別個に製剤化されたＬＮＰ中のｍＲＮＡ対ガイドの比が、編集効率に大きく影響しないことを示した（図１００）。中間の３つの比（１：１．５、１：１、及び１：０．７５）では極端（１：２、及び１：０．５）よりもやや高い編集効率があったが、差異は実験の変動の範囲内であった。共製剤化されたＬＮＰは、別個の製剤よりも高い編集をもたらし、新鮮及び凍結ＬＮＰは、同様に良好に行われた。編集効率と同様に、異なるＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ：ガイド比で別個に製剤化されたＬＮＰで処置されたマウスの肝臓中に存在するＨＡＯ－１　ｍＲＮＡの量に差異はほとんどなかった（図１００）。共製剤化されたＬＮＰで処置されたマウスにおけるＨＡＯ－１　ｍＲＮＡレベルは、別個に製剤化されたＬＮＰを受けた群と同様に、５０％を超えて低減した。結論として、これらの結果は、ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及び化学物質５０を有するｓｇＲＮＡが、編集効力の低減なしでＬＮＰに共製剤化され得ること、及び１：２～１：０．５のｍＲＮＡ対ｓｇＲＮＡ比の範囲が使用され得ることを示す。

【０６１３】

実施例７６－インビボでの編集効率に対する異なるガイド化学物質の影響の調査

脂質ナノ粒子の調製

ＭＧ２９－１　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを送達するために使用されるＬＮＰ製剤を、実施例７４と同じ手順によって調製した。ガイドＲＮＡ配列及び化学物質を表４０に列挙する。

【０６１４】

マウス投与及び採取

ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡを、ＬＮＰに別個に製剤化し、次いで、実施例７４にように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０．２５ｍｇ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、実施例７４と同じ手順によって、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。終末血液を、実施例７４の手順に従って、心臓穿刺を介した放血によって収集した。

【０６１５】

ＮＧＳによるゲノムＤＮＡ調製及び編集分析

ゲノムＤＮＡを、実施例７４のようにＮＧＳによって調製し、分析した。

【０６１６】

ＲＴ－ｄｄＰＣＲによるＲＮＡ調製及び分析

ＲＮＡを、実施例７４のようにＲＴ－ｄｄＰＣＲによって調製し、分析した。

【０６１７】

ガイド名（例えば、ｍＨ２９－２９－５０ｂ）に「ｂ」で指定された全てのガイドは、２０ｎｔスペーサーを含む。ガイドｍＨ２９－２９－３７及びｍＨ２９－２９－５０は、２２ｎｔのスペーサーを含む。化学物質５１、５２、５３、及び５４を有するガイドは、化学物質５０を有するガイドと同じヌクレオチド配列を含むが、ガイドの特定の領域で化学修飾に差異を有する。化学物質５１は、スペーサー内の２’－フルオロ修飾の除去を除

いて、化学物質５０と同一である。化学物質５２は、スペーサー内の２’－フルオロ修飾の半分の除去を除いて、化学物質５０と同一である。化学物質５３は、追加の２１個のホスホロチオエート結合及び２１個の２’－Ｏメチル修飾を除いて、化学物質５０と同一である。化学物質５３は、５’ステムループにおける追加の２１個のホスホロチオエート結合及び２１個の２’－Ｏメチル修飾を除いて、化学物質５０と同一である。化学物質５４は、５’ステムループにおける追加の２１個のホスホロチオエート結合及び２１個の２’－Ｏメチル修飾、並びにスペーサーにおける２’－フルオロ修飾の除去を除いて、化学物質５０と同一である。

【０６１８】

結果は、化学物質５０（５０ｂ）及び化学物質５２（５２ｂ）を有するガイドＲＮＡが最も高い編集効率を有したことを示す（図１０１）。ＨＡＯ－１遺伝子におけるインデルの導入は、リーディングフレームのシフト及び結果として生じる未成熟停止コドンに起因して、ナンセンス媒介性ｍＲＮＡ減衰を介してＨＡＯ－１　ｍＲＮＡのレベルを低減することが予想される。化学物質５０（ｍＨ２９－２９－５０ｂ）を有する２２ｎｔガイドを用いた処理により、このメカニズムと一致して、ＨＡＯ－１　ｍＲＮＡの最低レベル（最大の低減）がもたらされた（図１０１）。化学物質５１（５１ｂ）は、化学物質５０（５０ｂ）よりも２倍低い効力であり、スペーサーにおける２’－フルオロ修飾が効力に著しく寄与したことを示す。化学物質５２（５２ｂ）は、化学物質５０（５０ｂ）と比較して、類似した又はわずかに改善された編集能力を有し、このガイドスペーサー配列の状況において、効力を著しく低減することなく、スペーサーにおける２－フルオロ修飾の半分を除去することが可能であったことを示す。化学物質５３（５３ｂ）は、化学物質５０（５０ｂ）と比較して約２倍低い編集能力を有し、５’ステム－ループにおける２’－Ｏ－メチル結合及びＰＳ結合の付加が、効力に負の影響を及ぼしたことを示し、これは、これらの追加の修飾がガイド安定性を改善すると予想されることを考慮すると、驚くべきことである。化学物質５４（５４ｂ）は、化学物質５０（５０ｂ）と比較して約４倍低い効力、及び化学物質５３（５３ｂ）と比較して約２倍低い編集効力を有し、５’ステムループにおける追加の２’Ｏ－メチル塩基及びＰＳ塩基、並びにスペーサーにおける２’－フルオロ塩基の除去が両方とも、ガイド効力に相加的な負の影響を及ぼしたことが確認された。

【０６１９】

実施例７７－Ｈｅｐａ１－６細胞におけるＡＰＯ－Ａ１のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＨｅｐａ１－６細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを作製し、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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図１０２）。

【０６２０】

【表５８－１】

表４３Ａ：実施例７７のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5847	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrArArUrGrUrGrUrArUrGrUrGrGrArUrGrCrGrG/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5848	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrUrGrGrGrCrCrArArCrA/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5849	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrArCrUrUrCrArGrCrUrGrUrUrGrGrCrCrCrArA/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5850	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrCrGrCrArUrCrCrArCrArUrArCrArCrArUrUrArG/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5851	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrCrArUrUrGrGrGrArCrUrGrGrGrUrUrCrArU/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5852	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrGrArCrCrGrCrArUrGrCrGrCrArCrArCrArCrGrU/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5853	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrGrCrCrArArGrUrGrUrCrUrUrCrArGrGrUrGrGrG/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5854	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrCrCrUrGrGrUrGrGrUrArCrUrCrGrUrUrC/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5855	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrCrCrUrGrGrUrGrGrUrArCrUrCrGrUrUrCrA/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5856	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrUrUrCrUrUrCrUrGrGrArArUrUrCrGrUrCrCrA/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5857	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrGrGrArArUrUrCrGrUrCrCrArGrGrUrArGrG/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5858	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrUrCrCrUrCrUrArGrGrUrCrCrUrUrGrUrUrCrA/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5859	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrUrCrCrArGrGrUrUrArUrCrCrCrArGrArArG/AltR2/
マウス APO-A1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5860	MG29-1-マウス APO-A1-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArGrGrUrUrArUrCrCrCrArGrArArGrUrCrCrC/AltR2/
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5861	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-A1	GCTAATGTGTATGTGGATGCGG
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5862	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-B1	AATCCTCCTCCTTGGGCCAACA

【０６２１】

【表５８－２】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5863	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-C1	CTTACTTCAGCTGTTGGCCCAA
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5864	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-D1	ACCGCATCCACATACACATTAG
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5865	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-E1	TCCCATTGGGACTGGGGTTCAT
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5866	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-F1	GCGACCGCATGCGCACACACGT
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5867	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-G1	TCGCCAAGTGTCTTCAGGTGGG
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5868	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-H1	GGCCCTGGTGTGGTACTCGTTC
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5869	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-A2	GCCCTGGTGTGGTACTCGTTCA
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5870	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-B2	CATTTCTTCTGGAATTCGTCCA
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5871	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-C2	TTCTGGAATTCGTCCAGGTAGG
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5872	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-D2	ACTTCCTCTAGGTCCTTGTTCA
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5873	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-E2	TTTCTCCAGGTTATCCCAGAAG
APO-A1 標的部位の DNA 配列	5874	MG29-1-マウス APO-A1-標的部位-F2	TCCAGGTTATCCCAGAAGTCCC
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5’及び 3’AltR 修飾を指す			

【０６２２】

実施例７８－Ｈｅｐａ１－６細胞におけるＡＮＧＰＴＬ３のＤＮＡレベルでの遺伝子編集結果

ＭＧ２９－１　ＲＮＰ（１２６ｐｍｏｌのタンパク質／１６０ｐｍｏｌのガイド）のヌクレオフェクションを、Ｌｏｎｚａ　４Ｄエレクトロポレーターを使用してＨｅｐａ１－６細胞（２００，０００）に行った。細胞を回収し、トランスフェクションの５日後にゲノムＤＮＡを調製した。ＮＧＳベースのＤＮＡシーケンシングでの使用に適したＰＣＲプライマーを作製し、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Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑマシン上で配列決定し、専有のＰｙｔ

ｈｏｎスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図１０３）。

【０６２３】

【表５９－１】

表４３Ｂ：実施例７８のガイドＲＮＡの配列及び標的化された配列

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5875	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrUrGrUrUrCrCrUrUrUrArGrUrArArUrUrGrCrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5876	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrGrUrUrCrCrUrUrUrArGrUrArArUrUrGrCrArU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5877	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrUrCrCrUrUrUrArGrUrArArUrUrGrCrArUrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5878	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArArUrUrGrCrArUrCrCrArGrArGrUrGrGrArUrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5879	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrArUrUrUrGrArUrUrCrUrGrCrArCrCrUrUrCrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5880	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrCrUrGrCrArCrCrUrUrCrArGrArGrCrCrArArA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5881	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrArUrGrUrUrGrGrArArUrGrArUrGrUrCrArArArArU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5882	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H1	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrGrArArUrGrGrCrCrUrCrCrUrGrCrArGrCrUrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5883	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrGrArArUrGrGrCrCrUrCrCrUrGrCrArGrCrUrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5884	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrCrCrArUrArArGrArCrUrArArGrGrGrArCrArArA/AltR2/

【０６２４】

【表５９－２】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5885	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArUrArArGrArCrUrArArGrGrGrArCrArArArU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5886	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArArGrCrUrCrArArCrArUrArUrUrUrGrArUrCrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5887	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrArGrUrCrUrUrUrUrUrArUrGrArCrCrUrArUrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5888	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrGrArCrCrUrArUrCrArCrUrUrCrGrArArCrCrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5889	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrArCrCrUrArUrCrArCrUrUrCrGrArArCrCrArA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5890	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H2	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArCrCrUrArUrCrArCrUrUrCrGrArArCrCrArArU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5891	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrGrArGrCrArGrCrUrArArCrCrArArCrUrUrArA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5892	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArCrUrUrArCrUrUrUrGrArGrUrGrUrArUrGrUrUrArC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5893	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrGrArUrGrUrArArCrUrUrCrUrGrGrGrUrGrCrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5894	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrUrCrArGrUrUrCrUrArCrUrGrArCrArUrGrUrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5895	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArCrUrUrGrUrArGrUrGrUrArArGrArUrGrUrArGrArUrGrU/AltR2/

【０６２５】

【表５９－３】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5896	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArCrUrUrGrUrArGrUrGrUrArGrArUrGrUrArGrUrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5897	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrUrGrUrArGrUrGrUrArGrArUrGrUrArGrUrUrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5898	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H3	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrCrUrUrCrUrUrUrGrArUrUrUrCrArUrUrGrGrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5899	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrUrUrCrUrUrUrGrArUrUrUrCrArUrUrGrGrUrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5900	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrUrCrArUrUrGrGrUrUrCrGrArArGrUrGrArUrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5901	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrGrGrUrUrCrGrArArGrUrGrArUrCrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5902	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrCrUrUrArGrUrCrUrUrArUrGrGrArCrArArArA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5903	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrCrCrArUrGrArCrCrCrArGrCrUrGrCrArGrGrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5904	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArCrArUrCrArUrCrCrArArCrArUrArGrCrArArArU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5905	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrArUrCrArUrCrCrArArCrArUrArGrCrArArArUrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5906	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H4	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrUrCrUrGrArArGrGrUrGrCrArGrArArUrCrArA/AltR2/

【０６２６】

【表５９－４】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5907	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrCrUrGrArArGrGrUrGrCrArGrArArUrCrArArA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5908	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArGrArArCrArGrCrArArGrArCrArArCrArGrCrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5909	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrArArCrArGrCrArArGrArCrArArCrArGrCrArU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5910	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrArUrUrUrCrUrUrUrUrArUrCrUrGrCrArUrGrUrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5911	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrUrUrCrUrUrUrUrArUrCrUrGrCrArUrGrUrGrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5912	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrArUrCrUrGrCrArUrGrUrGrCrUrGrUrUrGrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5913	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrUrGrCrArUrGrUrGrCrUrGrUrUrGrArCrUrUrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5914	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H5	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrCrArUrGrUrGrCrUrGrUrUrGrArCrUrUrArA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5915	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArCrUrGrUrUrCrUrUrCrCrArCrArCrUrCrUrGrGrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5916	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrUrCrUrUrUrUrArUrCrArGrCrUrCrArGrArArA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5917	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrArGrCrUrCrArGrArArArGrArCrUrGrGrUrArU/AltR2/

【０６２７】

【表５９－５】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5918	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArGrCrUrCrArGrArArArGrArCrUrGrGrUrArUrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5919	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrArArArUrCrArArGrArCrCrArCrCrArArGrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5920	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrUrUrCrGrUrUrCrArGrUrUrGrArArGrArGrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5921	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrUrUrCrGrUrUrCrArGrUrUrGrArArGrArGrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5922	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H6	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrCrArGrUrUrGrArArGrArGrGrGrGrArGrUrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5923	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArGrArArArGrArGrArArUrUrUrUrCrUrGrArGrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5924	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrArGrGrGrUrUrCrUrUrGrArArUrArCrCrArGrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5925	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArGrGrGrUrUrCrUrUrGrArArUrArCrCrArGrUrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5926	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArCrArGrArGrArGrCrGrArArCrArUrArCrArArGrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5927	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrGrUrCrUrArCrUrGrUrGrArUrArCrCrCrArArUrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5928	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrGrGrGrUrUrUrArCrCrUrGrArUrUrGrGrGrUrA/AltR2/

【０６２８】

【表５９－６】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5929	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrArUrUrGrGrGrUrArUrCrArCrArGrUrArGrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5930	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H7	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrGrUrUrUrArArUrArGrUrGrUrArCrArCrGrCrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5931	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrArGrUrGrUrArCrArCrGrCrCrArCrUrUrGrUrArU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5932	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArUrCrGrArGrCrCrUrCrCrCrArArArGrCrCrCrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5933	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrUrArGrUrUrUrCrCrCrArUrGrUrUrUrCrGrUrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5934	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArGrUrUrUrCrCrCrArUrGrUrUrUrCrGrUrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5935	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrArUrGrUrUrUrCrGrUrUrGrArArGrUrCrCrUrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5936	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArUrGrUrUrUrCrGrUrUrGrArArGrUrCrCrUrGrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5937	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrGrArArGrUrCrUrGrUrGrArGrCrCrArUrCrU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5938	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H8	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrGrUrGrUrUrGrArArUrUrArArUrGrUrCrCrArUrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5939	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrUrCrUrArArCrUrUrUrUrUrUrCrUrUrUrArGrG/AltR2/

【０６２９】

【表５９－７】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5940	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrCrUrArArCrUrUrUrUrUrUrCrUrUrUrArGrGrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5941	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrUrUrArGrGrArGrArArUrUrUrUrGrGrUrUrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5942	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrUrArGrGrArGrArArUrUrUrUrGrGrUrUrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5943	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrUrArGrGrArGrArArUrUrUrUrGrGrUrUrGrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5944	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrArGrGrArGrArArUrUrUrUrGrGrUrUrGrGrC/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5945	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-G9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArGrArArUrUrUrUrGrGrUrUrGrGrCrCrUrArG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5946	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-H9	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrUrGrGrCrCrUrArGrArGrArArGrArUrCrUrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5947	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-A10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrGrGrCrCrUrArGrArGrArArGrArUrCrUrArU/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5948	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-B10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrGrArCrUrCrGrArGrCrUrArCrArArGrArCrUrGrG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5949	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-C10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrArCrUrCrGrArGrCrUrArCrArArGrArCrUrGrGrA/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5950	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-D10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrCrUrGrGrCrArGrUrCrArCrGrArArArCrCrArA/AltR2/

【０６３０】

【表５９－８】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5951	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-E10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrArCrUrGrCrCrCrArGrGrUrGrArArArGrGrArG/AltR2/
マウスANGPTL3を標的とするMG29-1 sgRNA	5952	MG29-1-マウスANGPTL3-sgRNA-F10	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrUrCrUrUrGrUrArGrCrUrCrGrArGrUrCrGrUrA/AltR2/
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5953	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-A1	TGTTGTTCCTTTAGTAATTGCA
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5954	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-B1	GTTGTTCCTTTAGTAATTGCAT
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5955	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-C1	TTGTTCCTTTAGTAATTGCATC
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5956	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-D1	GTAATTGCATCCAGAGTGGATC
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5957	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-E1	ATCATTTGATTCTGCACCTTCA
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5958	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-F1	ATTCTGCACCTTCAGAGCCAAA
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5959	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-G1	CTATGTTGGATGATGTCAAAAT
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5960	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-H1	AGCGAATGGCCTCCTGCAGCTG
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5961	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-A2	GCGAATGGCCTCCTGCAGCTGG
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5962	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-B2	GTCCATAAGACTAAGGGACAAA
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5963	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-C2	TCCATAAGACTAAGGGACAAAT
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5964	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-D2	AGAAGCTCAACATATTTGATCA
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5965	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-E2	ATCAGTCTTTTTATGACCTATC
ANGPTL3標的部位のDNA配列	5966	MG29-1-マウスANGPTL3-標的部位-F2	TATGACCTATCACTTCGAACCA

【０６３１】

【表５９－９】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5967	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-G2	ATGACCTATCACTTCGAACCAA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5968	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-H2	TGACCTATCACTTCGAACCAAT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5969	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-A3	GAGGAGCAGCTAACCAACTTAA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5970	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-B3	TACTTACTTTGAGTGATGTTAC
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5971	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-C3	AGTGATGTTACTTCTGGGTGCT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5972	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-D3	AGTTCAGTTCTACTGACATGTT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5973	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-E3	TAACTTGTAGTGTAGATGTAGT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5974	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-F3	AACTTGTAGTGTAGATGTAGTT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5975	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-G3	ACTTGTAGTGTAGATGTAGTTC
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5976	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-H3	CCTCTTCTTTGATTTCATTGGT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5977	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-A4	CTCTTCTTTGATTTCATTGGTT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5978	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-B4	ATTTCATTGGTTCGAAGTGATA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5979	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-C4	ATTGGTTCGAAGTGATAGGTCA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5980	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-D4	TCCCTTAGTCTTATGGACAAAA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5981	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-E4	AGTCCATGACCCAGCTGCAGGA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5982	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-F4	GACATCATCCAACATAGCAAAT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5983	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-G4	ACATCATCCAACATAGCAAATC

【０６３２】

【表５９－１０】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5984	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-H4	GGCTCTGAAGGTGCAGAATCAA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5985	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-A5	GCTCTGAAGGTGCAGAATCAAA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5986	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-B5	GTAGAACAGCAAGACAACAGCA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5987	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-C5	TAGAACAGCAAGACAACAGCAT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5988	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-D5	CTATTTCTTTTATCTGCATGTG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5989	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-E5	TATTTCTTTTATCTGCATGTGC
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5990	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-F5	TTTTATCTGCATGTGCTGTTGA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5991	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-G5	ATCTGCATGTGCTGTTGACTTA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5992	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-H5	TCTGCATGTGCTGTTGACTTAA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5993	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-A6	TACTGTTCTTCCACACTCTGGA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5994	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-B6	TATTCTTTTATCAGCTCAGAAA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5995	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-C6	ATCAGCTCAGAAAGACTGGTAT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5996	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-D6	TCAGCTCAGAAAGACTGGTATT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5997	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-E6	TTCTAAATCAAGAGCACCAAGA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5998	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-F6	CTGTTTCGTTCAGTTGAAGAGG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	5999	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-G6	TGTTTCGTTCAGTTGAAGAGGG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6000	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-H6	GTTCAGTTGAAGAGGGGGAGTA

【０６３３】

【表５９－１１】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6001	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-A7	GAAGAAAGAGAATTTTCTGAGG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6002	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-B7	CTGAGGGTTCTTGAATACCAGT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6003	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-C7	TGAGGGTTCTTGAATACCAGTC
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6004	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-D7	TAACAGAGGCGAACATACAAGT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6005	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-E7	ATGTCTACTGTGATACCCAATC
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6006	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-F7	CATGGGTTTACCTGATTGGGTA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6007	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-G7	CCTGATTGGGTATCACAGTAGA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6008	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-H7	TTGGTTTAATAGTGTACACGCC
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6009	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-A8	ATAGTGTACACGCCACTTGTAT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6010	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-B8	CCATCGAGCCTCCCAAAGCCCT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6011	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-C8	CGTAGTTTTCCCATGTTTCGTT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6012	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-D8	GTAGTTTTCCCATGTTTCGTTG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6013	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-E8	CCCATGTTTCGTTGAAGTCCTG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6014	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-F8	CCATGTTTCGTTGAAGTCCTGT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6015	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-G8	GTTGAAGTCCTGTGAGCCATCT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6016	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-H8	CGGTGTTGAATTAATGTCCATG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6017	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-A9	CCCTCTAACTTTTTTCTTTAGG

【０６３４】

【表５９－１２】

タイプ	配列番号	ガイド名	配列
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6018	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-B9	CCTCTAACTTTTTTCTTTAGGA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6019	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-C9	TTCTTTAGGAGAATTTTGGTTG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6020	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-D9	TCTTTAGGAGAATTTTGGTTGG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6021	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-E9	CTTTAGGAGAATTTTGGTTGGG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6022	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-F9	TTTAGGAGAATTTTGGTTGGGC
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6023	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-G9	GGAGAATTTTGGTTGGGCCTAG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6024	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-H9	GGTTGGGCCTAGAGAAGATCTA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6025	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-A10	GTTGGGCCTAGAGAAGATCTAT
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6026	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-B10	ACGACTCGAGCTACAAGACTGG
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6027	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-C10	CGACTCGAGCTACAAGACTGGA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6028	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-D10	ACCTGGGCAGTCACGAAACCAA
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6029	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-E10	GTGACTGCCCAGGTGAAAGGAG T
ANGPTL3 標的部位の DNA 配列	6030	MG29-1-マウス ANGPTL3-標的部位-F10	CAGTCTTGTAGCTCGAGTCGTA
r;糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は、rA と記載される)、d;デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は、dA と記載される)、*;ホスホジエステル結合中の酸素分子のうちの 1 つが硫黄で置き換えられている塩基間;AltR1 及び AltR2 は、IDT 技術の専有の 5’及び 3’AltR 修飾を指す			

【０６３５】

実施例７９－コンパクトＭＧ５５－４３ヌクレアーゼ系
推定ｔｒａｃｒＲＮＡを特定するためのインビトロ特徴付け

ｔｒａｃｒＲＮＡ配列を特定するために、ヌクレアーゼ（ＭＧ５５－４３、タンパク質配列番号４７０）、遺伝子間配列、及び最小アレイを、ｍｙＴＸＴＬ（登録商標）Ｓｉｇｍａ ７０ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ Ｋｉｔ（Ａｒｂｏｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して転写－翻訳反応混合物中で発現させた。最終反応混合物は、５ｎＭのヌクレアーゼＤＮＡ鋳型、１２ｎＭの遺伝子間ＤＮＡ鋳型、１５ｎＭの最小アレイＤＮＡ鋳型、０．１ｎＭのｐＴＸＴＬ－Ｐ７０ａ－Ｔ７ｒｎａｐ、及び１倍のｍｙＴＸＴＬ（登録商標）Ｓ

ｉｇｍａ　７０　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘを含んでいた。反応物を２９℃で１６時間インキュベートし、次いで、４℃で保存した。

【０６３６】

リボ核タンパク質複合体を、インビトロ切断反応を介して試験した。プラスミドＤＮＡライブラリー切断反応は、可能な全ての８Ｎ　ＰＡＭ、ＴＸＴＬ発現の５倍希釈、１０ｎＭのトリス－ＨＣｌ、１０ｎＭの$MgCl_2$、及び１００ｍＭのＮａＣｌを表す５ｎＭの標的プラスミドＤＮＡライブラリーを、３７℃で２時間混合することによって実施した。反応を停止し、ＨｉｇｈＰｒｅｐ（商標）ＰＣＲクリーンアップビーズ（ＭＡＧＢＩＯ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｉｎｃ．）できれいにし、トリスＥＤＴＡ　ｐＨ８．０緩衝液中で溶出した。３ｎＭの切断産物末端を、３．３３μＭのｄＮＴＰ、１×Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ緩衝液、及び０．１６７Ｕ／μＬのクレノウ断片（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）で、２５℃で１５分間平滑化した。１．５ｎＭの切断産物を、１５０ｎＭのアダプター、１×Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）、及び２０Ｕ／μＬのＴ４　ＤＮＡリガーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）を用いて室温で２０分間ライゲーションした。ライゲーションされた産物を、ＮＧＳプライマーを用いたＰＣＲによって増幅し、ＮＧＳによって配列決定して、ＰＡＭを得た。

【０６３７】

ｔｒａｃｒＲＮＡ及びｃｒＲＮＡの配列を得るために、Ｑｕｉｃｋ－ＲＮＡ（商標）Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）に従ってＴＸＴＬ溶解物からＲＮＡを抽出し、３０～５０μＬの水中で溶出する。転写物の総濃度を、Ｎａｎｏｄｒｏｐ、Ｔａｐａｓｅｓｔａｔｉｏｎ、及びＱｕｂｉｔ上で測定した。ＲＮＡライブラリーをＲＮＡシーケンシングに供した。

【０６３８】

新規のｔｒａｃｒＲＮＡ配列のインシリコ検索

潜在的なｔｒａｃｒＲＮＡを含む追加の非コード領域を特定するために、活性ｔｒａｃｒＲＮＡの配列を、同じヌクレアーゼファミリーのヌクレアーゼを含む他のコンティグにマッピングした。新たに特定された配列を使用して、共分散モデルを生成し、追加のｔｒａｃｒＲＮＡを予測した。共分散モデルは、活性及び予測されるｔｒａｃｒＲＮＡ配列の多重配列アライメント（ＭＳＡ）から構築された。ＭＳＡの二次構造を、ＲＮＡａｌｉｆｏｌｄ（Ｖｉｅｎｎａ　Ｐａｃｋａｇｅ）で取得し、共分散モデルをＩｎｆｅｒｎａｌパッケージ（ｈｔｔｐ：／／ｅｄｄｙｌａｂ．ｏｒｇ／ｉｎｆｅｒｎａｌ／）で構築した。候補ヌクレアーゼを含むコンティグを、Ｉｎｆｅｒｎａｌコマンド「ｃｍｓｅａｒｃｈ」を用いて共分散モデルを使用して検索した。

【０６３９】

ｓｇＲＮＡ設計

共分散モデルから得られた予測されるｔｒａｃｒＲＮＡ及び関連するＣＲＩＳＰＲ反復配列を、以下のように修飾して、ｓｇＲＮＡを生成した（図１０４Ａ、配列番号６０３１）：予測されるｔｒａｃｒＲＮＡ配列の３’末端及び反復配列の５’末端をトリミングし、次いで、ＧＡＡＡテトラループと結合させた（図１０４Ｂ）。

【０６４０】

インビトロ切断反応は、ＭＧ５５－４３活性を確認し、ＰＡＭ決定を可能にした

上に記載される標的プラスミドＤＮＡライブラリー切断反応（推定ｔｒａｃｒＲＮＡを特定するためのインビトロ特徴付け）を、ガイドを使用して実施した。反応の産物を、ＮＧＳプライマーを用いたＰＣＲによって増幅し、ＮＧＳによって配列決定して、ＰＡＭを得た。ＰＡＭライブラリーを首尾よく切断した活性タンパク質は、アガロースゲル電気泳動において約１８８又は２０５ｂｐのバンドを生じた（図１０４Ｃ）。

【０６４１】

【表６０】

表４４：試験されたガイドのスペーサー配列

コード	配列
U67 スペーサー	GTCGAGGCTTGCGACGTGGT
U40 スペーサー	TGGAGATATCTTGAACCTTG

【０６４２】

ＰＡＭの配列ロゴを、Ｓｅｑｌｏｇｏメーカーを使用して作製し、切断部位の選好を示すヒストグラムを、各ヌクレオチド位置での読み取りマッピングの計数から作製した。ＭＧ５５－４３によって認識されるＰＡＭは、５’－ｙＴｎ配列（図１０４Ｄ、配列番号６０３２）であり、好ましい切断位置は、ヌクレオチド２３である（図１０４Ｅ）。

【０６４３】

実施例８０－コンパクトＶ型ヌクレアーゼのＭＧ９１ファミリー

遺伝子間領域にコードされるｔｒａｃｒＲＮＡ配列の新たな予測

別個のクレード由来のコンパクトＶ型ヌクレアーゼタンパク質を、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系をコードするゲノム領域のインシリコ特徴付けのために標的化した。ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的にコードする遺伝子間領域を特定するために、個々のタンパク質クレード（確認された触媒残基を有する）を、コンパクト型ヌクレアーゼ遺伝子及びＣＲＩＳＰＲアレイをコードするコンティグの目視検査のために選択した。２つの遺伝子間、又は遺伝子とＣＲＩＳＰＲアレイとの間のコード配列予測を欠くゲノム領域を、遺伝子間領域として手作業で注釈付けした（図１０５）。ヌクレアーゼ遺伝子及びＣＲＩＳＰＲアレイの上流及び下流、すなわち、ヌクレアーゼ及び対応するＣＲＩＳＰＲアレイに対して同じ位置の遺伝子間領域を、相同ヌクレアーゼをコードするコンティグにわたって一貫して標識を割り当てた。一致する遺伝子間領域のヌクレオチド配列を整列させ、配列にわたって保存されたモチーフについて検査した（図１０６）。同様に、クレード内の非一致遺伝子間領域からのヌクレオチド配列を整列させ、検査した。比較すると、それらの中で最も高い保存度を有する遺伝子間領域は、ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする可能性があるとして特定された。

【０６４４】

候補ヌクレアーゼ（配列番号６０４０～６０４９）に対応するｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的にコードする遺伝子間領域を、本明細書に記載される方法によって特定し、インビトロ特徴付けの対象である。活性ヌクレアーゼＭＧ９１－１５（配列番号２８２４）、ＭＧ９１－３２（配列番号２８４１）、及びＭＧ９１－８７（配列番号２８９６）の結果を本明細書に提示する。

【０６４５】

遺伝子間領域二次構造予測は、ｔｒａｃｒＲＮＡ予測に情報を与える

ｔｒａｃｒＲＮＡを潜在的にコードする遺伝子間領域を、異なるエネルギーモデル（Ｔｕｒｎｅｒ　２００４又はＡｎｄｒｏｎｅｓｃｕ　２００７）及びパラメーター（例えば、２０℃、３７℃、ダングリングエンド）を使用して、対応する反復配列でフォールディングした。潜在的な二次ＲＮＡ構造の安定性を、塩基対確率に基づいて目視検査した。ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、及びＭＧ９１－８７の最適な遺伝子間領域／反復倍率を取得し、単一ガイドＲＮＡの設計に情報を与えるために使用した。

【０６４６】

ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、及びＭＧ９１－８７　ｓｇＲＮＡ設計

対応する反復配列を有するｔｒａｃｒＲＮＡを含む可能性がある遺伝子間領域の間の有望な倍率を以下のように修飾した：ｔｒａｃｒＲＮＡ配列を３’末端で、及び時には５’末

端でトリミングし、反復配列を５’末端でトリミングした。両方のＲＮＡ配列をＧＡＡＡテトラループを介して結合し、上に記載されるように二次構造予測のためにフォールディングした。ヌクレアーゼＭＧ９１－１５　ｓｇＲＮＡ１（配列番号６０３３）、ＭＧ９１－３２　ｓｇＲＮＡ１（配列番号６０３４）、及びＭＧ９１－８７　ｓｇＲＮＡ１（配列番号６０３５）に対応する活性ｓｇＲＮＡ１の二次構造を図１０７に示す。

【０６４７】

ＭＧ９１－１５、ＭＧ９１－３２、及びＭＧ９１－８７ヌクレアーゼのインビトロ活性及びＰＡＭ配列決定

５ｎＭのヌクレアーゼ増幅ＤＮＡ鋳型及び２５ｎＭのｓｇＲＮＡ増幅ＤＮＡ鋳型を、ＰＵＲＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）を用いて３７℃で３時間発現させた。プラスミドライブラリーＤＮＡ切断反応は、可能な全ての８Ｎ　ＰＡＭ、ＰＵＲＥｘｐｒｅｓｓ発現の５倍希釈、１０ｎＭのトリス－ＨＣｌ、１０ｎＭのＭｇＣｌ２、及び１００ｍＭのＮａＣｌを表す５ｎＭの標的ライブラリーを、３７℃で２時間混合することによって実施した。反応を停止し、ＨｉｇｈＰｒｅｐ（商標）ＰＣＲクリーンアップビーズ（ＭＡＧＢＩＯ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｉｎｃ．）できれいにし、トリスＥＤＴＡ　ｐＨ８．０緩衝液中で溶出した。３ｎＭの切断産物末端を、３．３３μＭのｄＮＴＰ、１×Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ緩衝液、及び０．１６７Ｕ／μＬのクレノウ断片（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）で、２５℃で１５分間平滑化した。１．５ｎＭの切断産物を、１５０ｎＭのアダプター、１×Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）、及び２０Ｕ／μＬのＴ４　ＤＮＡリガーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）を用いて室温で２０分間ライゲーションした。ライゲーションされた産物を、ＮＧＳプライマーを用いたＰＣＲによって増幅し、ＮＧＳによって配列決定して、ＰＡＭを得た。

【０６４８】

ＰＡＭライブラリーを首尾よく切断した活性タンパク質は、アガロースゲルにおいて約１８８又は２０５ｂｐのバンドを生じた（図１０７Ｄ）。

【０６４９】

配列ロゴを、Ｓｅｑｌｏｇｏメーカーを使用して作製し、ヒストグラムを、各ヌクレオチド位置での読み取りの計数から作製した。ＭＧ９１－１５によって認識されるＰＡＭは、５’－ＴｔＴＹｎ配列であり（図１０８Ａ、配列番号６０３７）、ＭＧ９１－３２によっては５’－ＧｎＹＹｎ配列であり（図１０８Ｂ、配列番号６０３８）、ＭＧ－８７によっては５’－ｗＣＣＣ配列である（図１０８Ｃ、配列番号６０３９）。好ましい切断位置は、ＭＧ９１－１５についてはヌクレオチド２１及び２２（図１０８Ｄ）、ＭＧ９１－３２についてはヌクレオチド１７（図１０８Ｅ）、及びＭＧ９１－８７についてはヌクレオチド２０（図１０８Ｆ）であった。

【０６５０】

共分散モデルを、活性ｔｒａｃｒＲＮＡ配列から上に記載されるように構築し（新規のｔｒａｃｒＲＮＡ配列のインシリコ検索、コンパクトＭＧ５５－４３型Ｃａｓヌクレアーゼ系）、ＭＧ９１ファミリーのヌクレアーゼに関連する他の遺伝子間領域からのｔｒａｃｒＲＮＡの予測を精密化するために使用した。

【０６５１】

コンパクトＶ型ＭＧ９１ヌクレアーゼ及び選択された遺伝子間領域のインビトロ活性（予想的）

ヌクレアーゼ、遺伝子間配列、及び最小アレイは、前述のようにｍｙＴＸＴＬ（登録商標）Ｓｉｇｍａ　７０　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ　Ｋｉｔ（Ａｒｂｏｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して転写－翻訳反応混合物中で発現される。リボ核タンパク質複合体を、ＴＸＴＬ発現を使用してプラスミド標的ＤＮＡライブラリーのインビトロ切断反応で試験する。産物を、ＮＧＳプライマーを用いたＰＣＲによって増幅し、ＮＧＳによって配列決定して、ＰＡＭ配列を得た。

【０６５２】
ＰＡＭライブラリーを首尾よく切断する活性タンパク質は、アガロースゲル電気泳動において約１８８又は２０５ｂｐのバンドをもたらすと予想される。配列ロゴを、Ｓｅｑｌｏｇｏメーカーを使用して作製し、ヒストグラムを、各ヌクレオチド位置での読み取りの計数から生成した。
【０６５３】
活性ｔｒａｃｒＲＮＡ及びｃｒＲＮＡの配列を得るために、Ｑｕｉｃｋ－ＲＮＡ（商標）Ｍｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）に従ってＴＸＴＬ溶解物からＲＮＡを抽出する。転写物の総濃度は、Ｎａｎｏｄｒｏｐ、Ｔａｐｅｓｔａｔｉｏｎ、及びＱｕｂｉｔ上で測定し、次世代シーケンシングに供する。
【０６５４】
活性ｔｒａｃｒＲＮＡ及びｃｒＲＮＡの配列を使用してｓｇＲＮＡを設計し、その後、対応するＭＧ９１ヌクレアーゼを用いてＰＵＲＥｘｐｒｅｓｓで試験して、ＰＡＭ配列及び切断部位を確認する。
【０６５５】
Ｅ．ｃｏｌｉ発現（コンパクトＶ型ヌクレアーゼ）（予想的）
エフェクター、ゲノムコンティグからの遺伝間配列、天然反復、及びＴ７プロモーターを有するユニバーサルスペーサー配列をコードするプラスミドを、ＢＬ２１ ＤＥ３又はＴ７ Ｅｘｐｒｅｓｓ ｌｙｓＹ／Ｉｑに形質転換し、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを補充した６０ｍＬのテリフィックブロス（ｔｅｒｒｉｆｉｃ ｂｒｏｔｈ）培地中で、３７℃で培養する。０．４ｍＭのＩＰＴＧで発現を誘導した後、培養物は０．５のＯＤ６００ｎｍに達し、細胞を１６℃で一晩インキュベートする。２５ｍＬの細胞を遠心分離によりペレット化し、１．５ｍＬの溶解緩衝液（２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、５００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＴＣＥＰ、５％グリセロール、Ｐｉｅｒｃｅ Ｐｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標））を含む１０ｍＭの$MgCl_2$、ｐＨ７．５）中に再懸濁する。次いで、細胞を超音波処理によって溶解する。上清及び細胞破片は、遠心分離によって分離する。
【０６５６】
精製されたタンパク質を用いたインビトロ切断効率（コンパクトＶ型ヌクレアーゼ）（予想的）
タンパク質は、Ｔ７誘導性プロモーター下でＥ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損Ｂ株で発現され、細胞は超音波処理を使用して溶解し、目的のＨｉｓタグ付きタンパク質を、ＡＫＴＡ Ａｖａｎｔ ＦＰＬＣ（ＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅ）上のＨｉｓＴｒａｐ ＦＦ（ＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅ）Ｎｉ－ＮＴＡ親和性クロマトグラフィーを使用して精製する。純度は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＩｎｓｔａｎｔＢｌｕｅ Ｕｌｔｒａｆａｓｔ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）クマシー染色アクリルアミドゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上で分解されたタンパク質バンドのＩｍａｇｅＬａｂソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）における密度測定を使用して決定される。タンパク質を、５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、３００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＴＣＥＰ、５％グリセロール、ｐＨ７．５から構成される保存緩衝液中で脱塩し、－８０℃で保存する。
【０６５７】
スペーサー配列を含み、ＰＡＭがＮＧＳを介して決定される標的ＤＮＡを構築する。ＰＡＭに縮重塩基がある場合、単一の代表的なＰＡＭを試験のために選択する。標的ＤＮＡは、ＰＣＲ増幅を介したプラスミドに由来する２２００ｂｐの直鎖ＤＮＡである。ＰＡＭ及びスペーサーは、一方の端から７００ｂｐに位置する。切断の成功は、７００及び１５００ｂｐの断片をもたらす。
【０６５８】
標的ＤＮＡ、インビトロ転写単一ＲＮＡ、及び精製した組換えタンパク質を、過剰なタンパク質及びＲＮＡを含む切断緩衝液（１０ｍＭのトリス、１００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭの$MgCl_2$）中で組み合わせ、５’～３時間、通常は１時間インキュベートする。

反応を、ＲＮＡｓｅ　Ａの添加を介して停止し、６０℃でインキュベートする。反応物を１．２％ＴＡＥアガロースゲル上で分解し、切断した標的ＤＮＡの画分をＩｍａｇｅＬａｂソフトウェアで定量化する。

【０６５９】

Ｅ．ｃｏｌｉにおける活性（コンパクトＶ型ヌクレアーゼ）（予想的）

細菌細胞におけるヌクレアーゼ活性の試験のために、目的の酵素に特異的な対応するＰＡＭ配列を有するスペーサー標的を含むゲノム配列を用いて株を構築する。次いで、操作された株を、目的のヌクレアーゼで形質転換し、その後、形質転換体を化学的コンピテントにし、標的配列に特異的であるか（オンターゲット）、又は標的に非特異的であるか（オフターゲット）のいずれかの５０ｎｇの単一ガイドで形質転換する。ヒートショック後、形質転換を、ＳＯＣ中、３７℃で２時間回収し、ヌクレアーゼ効率を、誘導培地上で成長させた5倍希釈液によって決定する。コロニーを、３つ組で希釈系列から定量化する。ヌクレアーゼ、及びしたがってゲノム編集能力は、宿主細胞染色体を標的とするガイド及びヌクレアーゼの存在下での生細胞の低減を定量化することによって評価される。

【０６６０】

哺乳類細胞における活性（コンパクトＶ型ヌクレアーゼ）（予想的）

哺乳類細胞における標的化及び切断活性を示すために、タンパク質配列を、２つの哺乳類発現ベクターにクローニングし、１つは、Ｃ末端のＳＶ４０　ＮＬＳ及び２Ａ－ＧＦＰタグを有し、１つは、ＧＦＰタグを有さず、２つのＮＬＳ配列を有する（１つはＮ末端上にあり、１つはＣ末端上にある）。使用され得る代替的なＮＬＳ配列を表４５に列挙する。

【０６６１】

【表６１】

表４５：代替的な核局在化配列（ＮＬＳ）

供給源	NLS アミノ酸配列
SV40	PKKKRKV
ヌクレオプラスミン二分子 NLS	KRPAATKKAGQAKKKK
c-myc NLS	PAAKRVKLD
c-myc NLS	RQRRNELKRSP
hRNPA1 M9 NLS	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY
インポーチン-アルファ IBB ドメイン	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV
筋腫 T タンパク質	VSRKRPRP
筋腫 T タンパク質	PPKKARED
p53	PQPKKKPL
マウス c-abl IV	SALIKKKKKMAP
インフルエンザウイルス NS1	DRLRR
インフルエンザウイルス NS1	PKQKKRK
肝炎ウイルスデルタ抗原	RKLKKKIKKL
マウス Mx1 タンパク質	REKKKFLKRR
ヒトポリ(ADP-リボース) ポリメラーゼ	KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK
ステロイドホルモン受容体(ヒト) グルココルチコイド	RKCLQAGMNLEARKTKK

【０６６２】

タンパク質のＤＮＡ配列は、天然配列、Ｅ．ｃｏｌｉコドン最適化配列、又は哺乳類コ

ドン最適化配列であり得る。目的の遺伝子標的を有する単一ガイドＲＮＡ配列も、哺乳類発現ベクターにクローニングする。２つのプラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトする。発現プラスミドとｓｇＲＮＡ標的化プラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクションしてから７２時間後、ＤＮＡを抽出し、ＮＧＳライブラリーの調製に使用する。ＮＨＥＪの割合を標的部位の配列決定におけるインデルを介して測定して、哺乳類細胞における酵素の標的化効率を示す。タンパク質の活性を試験するために、少なくとも１０個の異なる標的部位を選択する。

【０６６３】

【表６２－１】

表４６－配列表に含まれない、本明細書で言及される追加のタンパク質及び核酸配列のリスト

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
	4426	MG29-1 WT mRNA			TAATACGACTCACTATAA GGAAAAGCCAGCTCCAG CAGGCGCTGCTCACTCCT CCCCATCCTCTCCCTCTG TCCCTCTGTCCCTCTGAC CCTGCACTGTCCCAGCAC CATGGCCCCCAAGAAGA AGCGGAAAGTTGGCGGC GGAGGCAGCTTCAACAA CTTCATCAAGAAATACA GCCTGCAGAAGACCCTG CGGTTCGAACTGAAGCC CGTGGGCGAGACAGCGG ACTACATCGAAGACTTCA AGAGCGAATACCTGAAG GACACGGTGCTGAAGGA CGAACAGCGGGCAAAAG ACTACCAGGAGATCAAA ACACTGATCGACGACTA CCACCGGGAGTACATCG AAGAATGCCTGAGGGAA CCCGTGGACAAAAAGAC CGGCGAGATCCTGGACTT CACACAGGACCTGGAAG ACGCATTCAGCTACTACC AGAAACTGAAAGAAAAC CCCACCGAGAACCGAGT GGGGTGGGAGAAAGAGC AGGAGAGCCTGAGAAAG AAGCTGGTGACCAGCTTC GTGGGGAACGACGGCCT GTTCAAGAAAGAGTTCA TCACCCGCGACCTGCCCG AATGGCTGCAGAAAAAG GGGCTGTGGGGCGAATA CAAGGACACCGTGGAGA ACTTCAAAAAATTCACCA CCTACTTCAGCGGCTTCC ACGAGAACAGGAAGAAT ATGTACACAGCCGAAGC CCAGAGCACAGCCATCG CCAACAGGCTGATGAAC GACAACCTGCCCAAGTTC TTCAACAACTACCTGGCA TACCAGACCATCAAGGA GAAACACCCCGACCTGG TGTTCCGACTGGACGACG CCCTGCTGCAGGCCGCCG GCGTGGAGCACCTGGAC GAGGCATTCCAGCCCAG ATACTTCAGCAGACTGTT CGCACAGAGCGGAATCA

【０６６４】

【表６２－２】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					CGGCCTTCAACGAGCTG ATCGGAGGAAGGACCAC GGAAAACGGCGAAAAGA TCCAGGGCCTGAACGAG CAGATCAACCTGTACAG ACAGCAGAACCCCGAGA AGGCCAAGGGCTTCCCA AGATTCATGCCCCTGTTC AAGCAAATCCTGAGCGA CAGGGAGACCCACAGCT TCCTGCCCGACGCATTCG AAAACGACAAAGAGCTG CTGCAGGCCCTGAGGGA CTACGTGGACGCCGCCA CCAGCGAAGAAGGAATG ATCAGCCAACTGAACAA GGCCATGAACCAGTTCGT GACCGCCGACCTGAAAA GGGTGTACATCAAAAGC GCCGCCCTGACCAGCCTG AGCCAGGAACTGTTCCA CTTCTTCGGCGTGATCAG CGACGCCATCGCGTGGT ACGCCGAGAAGAGACTG AGCCCCAAGAAAGCCCA GGAGAGCTTCCTGAAAC AGGAAGTGTACGCCATC GAAGAACTGAACCAGGC CGTGGTGGGCTACATCG ACCAGCTGGAAGACCAG AGCGAGCTGCAGCAGCT GCTGGTGGACCTGCCAG ACCCCCAGAAACCAGTG AGCAGCTTCATCCTGACC CACTGGCAAAAAAGCCA GGAGCCGCTGCAGGCCG TGATCGCGAAGGTGGAA CCCCTGTTCGAACTGGAG GAGCTGAGCAAAAACAA ACGGGCCCCGAAACACG ACAAGGACCAGGGAGGG GAAGGCTTCCAGCAGGT GGACGCAATCAAGAACA TGCTGGACGCATTCATGG AGGTGAGCCACGCCATC AAGCCCCTGTACCTGGTG AAGGGCCGGAAAGCAAT CGACATGCCGGACGTGG ACACAGGATTCTACGCC GACTTCGCGGAGGCATA CAGCGCCTACGAGCAAG TGACGGTGAGCCTGTAC AACAAGACCCGAAACCA CCTGAGCAAGAAACCCT TCAGCAAAGACAAAATC AAAATCAACTTCGACGC CCCAACACTGCTGAACG

【０６６５】

【表６２－３】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GCTGGGACCTGAACAAG GAAAGCGACAACAAAAG CATCATCCTGAGAAAAG ACGGAAACTTCTACCTGG CCATCATGCACCCCAAAC ACACAAAGGTGTTCGAC TGCTACAGCGCCAGCGA GGCGGCCGGGAAATGCT ACGAGAAAATGAACTAC AAACTGCTGAGCGGCGC CAACAAGATGCTGCCCA AAGTGTTCTTCAGCAAGA AGGGAATCGAAACCTTC AGCCCACCCCAGGAAAT CCTGGACCTGTACAAGA ACAACGAACACAAGAAG GGAGCCACCTTCAAGCT GGAGAGCTGCCACAAGC TGATCGACTTCTTCAAGC GGAACATCCCCAAGTAC AAGGTGCACCCAACCGA CAACTTCGGATGGGACG TCTTCGGATTCCACTTCA GCCCAACCAGCAGCTAC GGCGACCTGAGCGGCTT CTACCGAGAGGTGGAAG CCCAGGGGTACAAACTG TGGTTCAGCGACGTGAG CGAGGCATACATCAACA AGTGCGTGGAAGAGGGC AAACTGTTCCTGTTCCAG ATCTACAACAAGGACTTC AGCCCCAACAGCACCGG GAAGCCAAACCTGCACA CACTGTACTGGAAAGGA CTGTTCGAACCCGAGAA CCTGAAGGACGTGGTGC TGAAACTGAACGGCGAG GCCGAGATCTTCTACAGG AAACACAGCATCAAGCA CGAGGACAAGACGATCC ACCGGGCCAAGGACCCA ATCGCCAACAAAAACGC AGACAACCCCAAGAAGC AGAGCGTGTTCGACTAC GACATCATCAAGGACAA GCGCTACACCCAGGACA AATTCTTCTTCCACGTGC CCATCAGCCTGAACTTCA AGAGCCAGGGAGTGGTG CGGTTCAACGACAAGAT CAACGGCCTGCTGGCCG CACAGGACGACGTGCAC GTGATCGGGATCGACCG AGGGGAACGCCACCTGC TGTACTACACCGTGGTGA ACGGCAAGGGCGAGGTG

【０６６６】

【表６２－４】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GTGGAACAGGGCAGCCT
					GAACCAGGTGGCCACAG
					ACCAGGGGTACGTGGTG
					GACTACCAACAGAAACT
					GCACGCCAAAGAGAAGG
					AGAGAGACCAGGCCAGG
					AAGAACTGGAGCACCAT
					CGAAAACATCAAGGAGC
					TGAAGGCCGGGTACCTG
					AGCCAGGTGGTGCACAA
					ACTGGCCCAGCTGATCGT
					GAAACACAACGCCATCG
					TGTGCCTGGAGGACCTG
					AACTTCGGATTCAAGAG
					GGGACGGTTCAAAGTGG
					AGAAGCAGGTGTACCAG
					AAGTTCGAGAAAGCCCT
					GATCGACAAGCTGAACT
					ACCTGGTGTTCAAGGAA
					CGGGGGGCCACCCAGGC
					AGGCGGATACCTGAACG
					CCTACCAGCTGGCCGCAC
					CATTCGAGAGCTTCGAA
					AAACTGGGCAAGCAGAC
					CGGCATCCTGTACTACGT
					GCGGAGCGACTACACCA
					GCAAGATCGACCCCGCC
					ACAGGCTTCGTGGACTTC
					CTGAAGCCCAAATACGA
					AAGCATGGCAAAGAGCA
					AAGTGTTCTTCGAGAGCT
					TCGAAAGAATCCAGTGG
					AACCAGGCCAAAGGCTA
					CTTCGAGTTCGAATTCGA
					CTACAAGAAAATGTGCC
					CCAGCAGGAAGTTCGGC
					GACTACCGCACCCGGTG
					GGTGGTGTGCACATTCGG
					CGACACACGGTACCAGA
					ACAGGCGCAACAAAAGC
					AGCGGCCAATGGGAGAC
					CGAGACAATCGACGTGA
					CCGCCCAGCTGAAGGCC
					CTGTTCGCGGCCTACGGC
					ATCACCTACAACCAGGA
					GGACAACATCAAGGACG
					CCATCGCAGCCGTGAAG
					TACACAAAATTCTACAA
					ACAGCTGTACTGGCTGCT
					GAGACTGACGCTGAGCC
					TGCGGCACAGCGTGACC
					GGGACCGACGAGGACTT
					CATCCTGAGCCCCGTGGC
					CGACGAGAACGGCGTGT
					TCTTCGACAGCAGGAAG
					GCCACGGACAAACAGCC
					CAAGGACGCAGACGCGA

【０６６７】

【表６２－５】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					ACGGCGCCTACCACATC GCCCTGAAGGGACTGTG GAACCTGCAGCAGATCA GGCAGCACGACTGGAAC GTGGAAAAACCAAAAAA GCTGAACCTGGCCATGA AAAACGAAGAGTGGTTC GGCTTCGCACAGAAGAA GAAATTCAGGGCCTCTG GCGGAAAAAGACCTGCC GCCACAAAGAAAGCCGG ACAGGCCAAGAAAAAGA AGTGACCACACCCCCATT CCCCCACTCCAGATAGA ACTTCAGTTATATCTCAC GTGTCTGGAGTTGGATCC AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAA
	4427	MG29-1 S168R mRNA			TAATACGACTCACTATAA GGAAAAGCCAGCTCCAG CAGGCGCTGCTCACTCCT CCCCATCCTCTCCCTCTG TCCCTCTGTCCCTCTGAC CCTGCACTGTCCCAGCAC CATGGCCCCCAAGAAGA AGCGGAAAGTTGGCGGC GGAGGCAGCTTCAACAA CTTCATCAAGAAATACA GCCTGCAGAAGACCCTG CGGTTCGAACTGAAGCC CGTGGGCGAGACAGCGG ACTACATCGAAGACTTCA AGAGCGAATACCTGAAG GACACGGTGCTGAAGGA CGAACAGCGGGCAAAAG ACTACCAGGAGATCAAA ACACTGATCGACGACTA CCACCGGGAGTACATCG AAGAATGCCTGAGGGAA CCCGTGGACAAAAAGAC CGGCGAGATCCTGGACTT CACACAGGACCTGGAAG ACGCATTCAGCTACTACC AGAAACTGAAAGAAAAC CCCACCGAGAACCGAGT GGGGTGGGAGAAAGAGC AGGAGAGCCTGAGAAAG AAGCTGGTGACCAGCTTC GTGGGGAACGACGGCCT GTTCAAGAAAGAGTTCA TCACCCGCGACCTGCCCG AATGGCTGCAGAAAAAG

【０６６８】

【表６２－６】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GGGCTGTGGGGCGAATA CAAGGACACCGTGGAGA ACTTCAAAAAATTCACCA CCTACTTCAGGGGCTTCC ACGAGAACAGGAAGAAT ATGTACACAGCCGAAGC CCAGAGCACAGCCATCG CCAACAGGCTGATGAAC GACAACCTGCCCAAGTTC TTCAACAACTACCTGGCA TACCAGACCATCAAGGA GAAACACCCCGACCTGG TGTTCCGACTGGACGACG CCCTGCTGCAGGCCGCCG GCGTGGAGCACCTGGAC GAGGCATTCCAGCCCAG ATACTTCAGCAGACTGTT CGCACAGAGCGGAATCA CGGCCTTCAACGAGCTG ATCGGAGGAAGGACCAC GGAAAACGGCGAAAAGA TCCAGGGCCTGAACGAG CAGATCAACCTGTACAG ACAGCAGAACCCCGAGA AGGCCAAGGGCTTCCCA AGATTCATGCCCCTGTTC AAGCAAATCCTGAGCGA CAGGGAGACCCACAGCT TCCTGCCCGACGCATTCG AAAACGACAAAGAGCTG CTGCAGGCCCTGAGGGA CTACGTGGACGCCGCCA CCAGCGAAGAAGGAATG ATCAGCCAACTGAACAA GGCCATGAACCAGTTCGT GACCGCCGACCTGAAAA GGGTGTACATCAAAAGC GCCGCCCTGACCAGCCTG AGCCAGGAACTGTTCCA CTTCTTCGGCGTGATCAG CGACGCCATCGCGTGGT ACGCCGAGAAGAGACTG AGCCCCAAGAAAGCCCA GGAGAGCTTCCTGAAAC AGGAAGTGTACGCCATC GAAGAACTGAACCAGGC CGTGGTGGGCTACATCG ACCAGCTGGAAGACCAG AGCGAGCTGCAGCAGCT GCTGGTGGACCTGCCAG ACCCCCAGAAACCAGTG AGCAGCTTCATCCTGACC CACTGGCAAAAAAGCCA GGAGCCGCTGCAGGCCG TGATCGCGAAGGTGGAA CCCCTGTTCGAACTGGAG GAGCTGAGCAAAAACAA

【０６６９】

【表６２－７】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					ACGGGCCCCGAAACACG ACAAGGACCAGGGAGGG GAAGGCTTCCAGCAGGT GGACGCAATCAAGAACA TGCTGGACGCATTCATGG AGGTGAGCCACGCCATC AAGCCCCTGTACCTGGTG AAGGGCCGGAAAGCAAT CGACATGCCGGACGTGG ACACAGGATTCTACGCC GACTTCGCGGAGGCATA CAGCGCCTACGAGCAAG TGACGGTGAGCCTGTAC AACAAGACCCGAAACCA CCTGAGCAAGAAACCCT TCAGCAAAGACAAAATC AAAATCAACTTCGACGC CCCAACACTGCTGAACG GCTGGGACCTGAACAAG GAAAGCGACAACAAAAG CATCATCCTGAGAAAAG ACGGAAACTTCTACCTGG CCATCATGCACCCCAAAC ACACAAAGGTGTTCGAC TGCTACAGCGCCAGCGA GGCGGCCGGGAAATGCT ACGAGAAAATGAACTAC AAACTGCTGAGCGGCGC CAACAAGATGCTGCCCA AAGTGTTCTTCAGCAAGA AGGGAATCGAAACCTTC AGCCCACCCCAGGAAAT CCTGGACCTGTACAAGA ACAACGAACACAAGAAG GGAGCCACCTTCAAGCT GGAGAGCTGCCACAAGC TGATCGACTTCTTCAAGC GGAACATCCCCAAGTAC AAGGTGCACCCAACCGA CAACTTCGGATGGGACG TCTTCGGATTCCACTTCA GCCCAACCAGCAGCTAC GGCGACCTGAGCGGCTT CTACCGAGAGGTGGAAG CCCAGGGGTACAAACTG TGGTTCAGCGACGTGAG CGAGGCATACATCAACA AGTGCGTGGAAGAGGGC AAACTGTTCCTGTTCCAG ATCTACAACAAGGACTTC AGCCCCAACAGCACCGG GAAGCCAAACCTGCACA CACTGTACTGGAAAGGA CTGTTCGAACCCGAGAA CCTGAAGGACGTGGTGC TGAAACTGAACGGCGAG GCCGAGATCTTCTACAGG

【０６７０】

【表６２－８】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					AAACACAGCATCAAGCA CGAGGACAAGACGATCC ACCGGGCCAAGGACCCA ATCGCCAACAAAAACGC AGACAACCCCAAGAAGC AGAGCGTGTTCGACTAC GACATCATCAAGGACAA GCGCTACACCCAGGACA AATTCTTCTTCCACGTGC CCATCAGCCTGAACTTCA AGAGCCAGGGAGTGGTG CGGTTCAACGACAAGAT CAACGGCCTGCTGGCCG CACAGGACGACGTGCAC GTGATCGGGATCGACCG AGGGGAACGCCACCTGC TGTACTACACCGTGGTGA ACGGCAAGGGCGAGGTG GTGGAACAGGGCAGCCT GAACCAGGTGGCCACAG ACCAGGGGTACGTGGTG GACTACCAACAGAAACT GCACGCCAAAGAGAAGG AGAGAGACCAGGCCAGG AAGAACTGGAGCACCAT CGAAAACATCAAGGAGC TGAAGGCCGGGTACCTG AGCCAGGTGGTGCACAA ACTGGCCCAGCTGATCGT GAAACACAACGCCATCG TGTGCCTGGAGGACCTG AACTTCGGATTCAAGAG GGGACGGTTCAAAGTGG AGAAGCAGGTGTACCAG AAGTTCGAGAAAGCCCT GATCGACAAGCTGAACT ACCTGGTGTTCAAGGAA CGGGGGGCCACCCAGGC AGGCGGATACCTGAACG CCTACCAGCTGGCCGCAC CATTCGAGAGCTTCGAA AAACTGGGCAAGCAGAC CGGCATCCTGTACTACGT GCGGAGCGACTACACCA GCAAGATCGACCCCGCC ACAGGCTTCGTGGACTTC CTGAAGCCCAAATACGA AAGCATGGCAAAGAGCA AAGTGTTCTTCGAGAGCT TCGAAAGAATCCAGTGG AACCAGGCCAAAGGCTA CTTCGAGTTCGAATTCGA CTACAAGAAAATGTGCC CCAGCAGGAAGTTCGGC GACTACCGCACCCGGTG GGTGGTGTGCACATTCGG CGACACACGGTACCAGA

【０６７１】

【表６２－９】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					ACAGGCGCAACAAAAGC AGCGGCCAATGGGAGAC CGAGACAATCGACGTGA CCGCCCAGCTGAAGGCC CTGTTCGCGGCCTACGGC ATCACCTACAACCAGGA GGACAACATCAAGGACG CCATCGCAGCCGTGAAG TACACAAAATTCTACAA ACAGCTGTACTGGCTGCT GAGACTGACGCTGAGCC TGCGGCACAGCGTGACC GGGACCGACGAGGACTT CATCCTGAGCCCCGTGGC CGACGAGAACGGCGTGT TCTTCGACAGCAGGAAG GCCACGGACAAACAGCC CAAGGACGCAGACGCGA ACGGCGCCTACCACATC GCCCTGAAGGGACTGTG GAACCTGCAGCAGATCA GGCAGCACGACTGGAAC GTGGAAAAACCAAAAAA GCTGAACCTGGCCATGA AAAACGAAGAGTGGTTC GGCTTCGCACAGAAGAA GAAATTCAGGGCCTCTG GCGGAAAAAGACCTGCC GCCACAAAGAAAGCCGG ACAGGCCAAGAAAAAGA AGTGACCACACCCCCATT CCCCCACTCCAGATAGA ACTTCAGTTATATCTCAC GTGTCTGGAGTTGGATCC AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAA
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	4970	MG29-1-hRosa26-sgRNA-A1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrGrUrCrArCrUrGrUrCrCrUrArGrCrUrCrUrCrCrA/AltR2/
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	4971	MG29-1-hRosa26-sgRNA-B1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrArGrGrCrCrGrGrGrCrGrCrGrUrGrGrC/AltR2/
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	4972	MG29-1-hRosa26-sgRNA-C1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrGrCrCrGrGrGrCrGrGrUrGrGrCrUrCrArC/AltR2/
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	4973	MG29-1-hRosa26-sgRNA-D1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrGrCrCrGrGrGrCrGrCrGrUrGrGrCrUrCrArCrA/AltR2/

【０６７２】

【表６２－１０】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4974	MG29-1-hRosa26-sgRNA-E1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrCrGrGrGrCrGrCrGrGrUrGrGrCrUrCrArCrArC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4975	MG29-1-hRosa26-sgRNA-F1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArGrGrCrCrGrArGrGrCrArGrGrCrArGrArUrCrA/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4976	MG29-1-hRosa26-sgRNA-G1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrGrUrCrArGrGrArGrGrUrUrCrArArGrArCrCrArGrC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4977	MG29-1-hRosa26-sgRNA-H1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrUrGrArCrUrGrArGrArUrCrGrUrGrCrCrArU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4978	MG29-1-hRosa26-sgRNA-A2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrGrGrUrUrGrGrGrGrUrGrUrGrGrUrGrGrC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4979	MG29-1-hRosa26-sgRNA-B2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrGrUrUrGrGrGrUrGrGrUrGrCrUrCrArC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4980	MG29-1-hRosa26-sgRNA-C2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrUrUrGrGrGrUrGrGrUrGrCrUrCrArCrA/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4981	MG29-1-hRosa26-sgRNA-D2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrUrGrGrGrUrGrGrUrGrCrUrCrArCrArC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4982	MG29-1-hRosa26-sgRNA-E2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrGrGrUrGrGrUrGrGrCrUrCrArCrArCrC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4983	MG29-1-hRosa26-sgRNA-F2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArGrGrArGrGrArUrGrArGrGrCrArGrArArGrGrArUrCrA/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4984	MG29-1-hRosa26-sgRNA-G2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArGrGrCrCrArArGrGrCrGrGrGrCrGrGrArUrCrA/AltR2/

【０６７３】

【表６２－１１】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4985	MG29-1-hRosa26-sgRNA-H2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrGrCrCrArUrUrCrUrCrCrUrGrCrCrUrCrArGrCrCrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4986	MG29-1-hRosa26-sgRNA-A3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrGrUrUrUrUrArGrUrArGrArGrArArGrGrG/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4987	MG29-1-hRosa26-sgRNA-B3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrGrUrUrUrUrArGrUrArGrArGrArArGrGrG/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4988	MG29-1-hRosa26-sgRNA-C3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrUrUrUrUrArGrUrArGrArGrArArGrGrGrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4989	MG29-1-hRosa26-sgRNA-D3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrUrUrUrUrArGrUrArGrArGrArArGrGrGrUrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4990	MG29-1-hRosa26-sgRNA-E3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrUrArGrArArArGrGrGrUrUrUrCrArCrCrG/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4991	MG29-1-hRosa26-sgRNA-F3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrArGrArArArGrGrGrGrUrUrUrCrArCrCrGrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4992	MG29-1-hRosa26-sgRNA-G3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArGrArGrArArGrGrGrGrUrUrUrCrArCrCrGrUrG/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4993	MG29-1-hRosa26-sgRNA-H3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrCrGrUrGrUrUrArGrCrCrArGrGrArUrGrGrUrCrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4994	MG29-1-hRosa26-sgRNA-A4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArCrUrCrCrUrUrGrGrCrUrCrArArGrUrGrArUrC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4995	MG29-1-hRosa26-sgRNA-B4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArCrUrCrCrUrUrGrGrCrUrCrArArGrUrGrArUrCrC/AltR2/

【０６７４】

【表６２－１２】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4996	MG29-1-hRosa26-sgRNA-C4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrUrCrUrUrGrArGrUrCrArGrArGrUrC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4997	MG29-1-hRosa26-sgRNA-D4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrCrUrUrGrArGrUrCrArGrArGrUrCrUrUrGrC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4998	MG29-1-hRosa26-sgRNA-E4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrUrUrGrArGrUrCrArGrArGrUrCrUrUrGrCrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	4999	MG29-1-hRosa26-sgRNA-F4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrUrGrArGrUrCrArGrArGrUrCrUrUrGrCrUrC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	5000	MG29-1-hRosa26-sgRNA-G4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrGrArGrUrCrArGrArGrUrCrUrUrGrCrUrCrC/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	5001	MG29-1-hRosa26-sgRNA-H4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrGrArGrUrCrArGrArGrUrCrUrUrGrCrUrCrCrG/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	5002	MG29-1-hRosa26-sgRNA-A5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrArGrUrCrArGrArGrUrCrUrUrGrCrUrCrCrGrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	5003	MG29-1-hRosa26-sgRNA-B5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrArUrUrUrUrUrArGrUrArGrArGrArUrGrGrGrG/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	5004	MG29-1-hRosa26-sgRNA-C5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArUrUrUrUrUrArGrUrArGrArGrArUrGrGrGrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	5005	MG29-1-hRosa26-sgRNA-D5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrUrUrUrUrArGrUrArGrArGrArUrGrGrGrUrU/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	5006	MG29-1-hRosa26-sgRNA-E5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrUrArGrArGrArUrGrGrGrGrUrUrCrArCrCrA/AltR2/
hRosa26を標的とするMG29-1 sgRNA	5007	MG29-1-hRosa26-sgRNA-F5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrArGrArGrArUrGrGrGrGrUrUrCrArCrCrArC/AltR2/

【０６７５】

【表６２－１３】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	5008	MG29-1-hRosa26-sgRNA-G5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArGrArGrArUrGrGrGrGrUrUrUrCrArCrCrArCrG/AltR2/
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	5009	MG29-1-hRosa26-sgRNA-H5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrCrArCrGrUrUrGrGrUrCrArGrGrCrUrGrGrUrCrU/AltR2/
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	5010	MG29-1-hRosa26-sgRNA-A6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrCrUrUrCrCrUrGrUrGrArCrUrUrCrCrUrGrGrArG/AltR2/
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	5011	MG29-1-hRosa26-sgRNA-B6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrCrCrUrGrUrGrArCrUrUrCrCrUrGrGrArGrA/AltR2/
hRosa26 を標的とする MG29-1 sgRNA	5012	MG29-1-hRosa26-sgRNA-C6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrGrGrArArGrGrUrUrCrUrCrUrGrUrCrUrGrCrC/AltR2/
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5013	MG29-1-hRosa26-標的部位-A1	ヌクレオチド	N.A.	AGGTCACTGTCCTAGCTCTCCA
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5014	MG29-1-hRosa26-標的部位-B1	ヌクレオチド	N.A.	TTTTTAGGCCGGGCGCGGTGGC
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5015	MG29-1-hRosa26-標的部位-C1	ヌクレオチド	N.A.	TAGGCCGGGCGCGGTGGCTCAC
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5016	MG29-1-hRosa26-標的部位-D1	ヌクレオチド	N.A.	AGGCCGGGCGCGGTGGCTCACA
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5017	MG29-1-hRosa26-標的部位-E1	ヌクレオチド	N.A.	GGCCGGGCGCGGTGGCTCACAC
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5018	MG29-1-hRosa26-標的部位-F1	ヌクレオチド	N.A.	GGAGGCCGAGGCAGGCAGATCA
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5019	MG29-1-hRosa26-標的部位-G1	ヌクレオチド	N.A.	AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGC
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5020	MG29-1-hRosa26-標的部位-H1	ヌクレオチド	N.A.	CAGTGAGCTGAGATCGTGCCAT
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5021	MG29-1-hRosa26-標的部位-A2	ヌクレオチド	N.A.	TTTTTTGGTTGGGTGTGGTGGC

【０６７６】

【表６２－１４】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5022	MG29-1-hRosa26-標的部位-B2	ヌクレオチド	N.A.	TTGGTTGGGTGTGGTGGCTCAC
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5023	MG29-1-hRosa26-標的部位-C2	ヌクレオチド	N.A.	TGGTTGGGTGTGGTGGCTCACA
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5024	MG29-1-hRosa26-標的部位-D2	ヌクレオチド	N.A.	GGTTGGGTGTGGTGGCTCACAC
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5025	MG29-1-hRosa26-標的部位-E2	ヌクレオチド	N.A.	GTTGGGTGTGGTGGCTCACACC
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5026	MG29-1-hRosa26-標的部位-F2	ヌクレオチド	N.A.	GAAGGATGAGGCAGAAGGATCA
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5027	MG29-1-hRosa26-標的部位-G2	ヌクレオチド	N.A.	GGAGGCCAAGGCGGGCGGATCA
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5028	MG29-1-hRosa26-標的部位-H2	ヌクレオチド	N.A.	CGCCATTCTCCTGCCTCAGCCT
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5029	MG29-1-hRosa26-標的部位-A3	ヌクレオチド	N.A.	TTGTGTTTTTAGTAGAGAAGGG
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5030	MG29-1-hRosa26-標的部位-B3	ヌクレオチド	N.A.	TGTGTTTTTAGTAGAGAAGGGG
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5031	MG29-1-hRosa26-標的部位-C3	ヌクレオチド	N.A.	GTGTTTTTAGTAGAGAAGGGGT
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5032	MG29-1-hRosa26-標的部位-D3	ヌクレオチド	N.A.	TGTTTTTAGTAGAGAAGGGGTT
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5033	MG29-1-hRosa26-標的部位-E3	ヌクレオチド	N.A.	TAGTAGAGAAGGGGTTTCACCG
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5034	MG29-1-hRosa26-標的部位-F3	ヌクレオチド	N.A.	AGTAGAGAAGGGGTTTCACCGT
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5035	MG29-1-hRosa26-標的部位-G3	ヌクレオチド	N.A.	GTAGAGAAGGGGTTTCACCGTG
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5036	MG29-1-hRosa26-標的部位-H3	ヌクレオチド	N.A.	ACCGTGTTAGCCAGGATGGTCT
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5037	MG29-1-hRosa26-標的部位-A4	ヌクレオチド	N.A.	GAACTCCTTGGCTCAAGTGATC

【０６７７】

【表６２－１５】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
hRosa26標的部位のDNA配列	5038	MG29-1-hRosa26-標的部位-B4	ヌクレオチド	N.A.	AACTCCTTGGCTCAAGTGATCC
hRosa26標的部位のDNA配列	5039	MG29-1-hRosa26-標的部位-C4	ヌクレオチド	N.A.	TTTTTTTTCTTGAGTCAGAGTC
hRosa26標的部位のDNA配列	5040	MG29-1-hRosa26-標的部位-D4	ヌクレオチド	N.A.	TTTTCTTGAGTCAGAGTCTTGC
hRosa26標的部位のDNA配列	5041	MG29-1-hRosa26-標的部位-E4	ヌクレオチド	N.A.	TTTCTTGAGTCAGAGTCTTGCT
hRosa26標的部位のDNA配列	5042	MG29-1-hRosa26-標的部位-F4	ヌクレオチド	N.A.	TTCTTGAGTCAGAGTCTTGCTC
hRosa26標的部位のDNA配列	5043	MG29-1-hRosa26-標的部位-G4	ヌクレオチド	N.A.	TCTTGAGTCAGAGTCTTGCTCC
hRosa26標的部位のDNA配列	5044	MG29-1-hRosa26-標的部位-H4	ヌクレオチド	N.A.	CTTGAGTCAGAGTCTTGCTCCG
hRosa26標的部位のDNA配列	5045	MG29-1-hRosa26-標的部位-A5	ヌクレオチド	N.A.	TTGAGTCAGAGTCTTGCTCCGT
hRosa26標的部位のDNA配列	5046	MG29-1-hRosa26-標的部位-B5	ヌクレオチド	N.A.	TGTATTTTTAGTAGAGATGGGG
hRosa26標的部位のDNA配列	5047	MG29-1-hRosa26-標的部位-C5	ヌクレオチド	N.A.	GTATTTTTAGTAGAGATGGGGT
hRosa26標的部位のDNA配列	5048	MG29-1-hRosa26-標的部位-D5	ヌクレオチド	N.A.	TATTTTTAGTAGAGATGGGGTT
hRosa26標的部位のDNA配列	5049	MG29-1-hRosa26-標的部位-E5	ヌクレオチド	N.A.	TAGTAGAGATGGGGTTTCACCA
hRosa26標的部位のDNA配列	5050	MG29-1-hRosa26-標的部位-F5	ヌクレオチド	N.A.	AGTAGAGATGGGGTTTCACCAC
hRosa26標的部位のDNA配列	5051	MG29-1-hRosa26-標的部位-G5	ヌクレオチド	N.A.	GTAGAGATGGGGTTTCACCACG
hRosa26標的部位のDNA配列	5052	MG29-1-hRosa26-標的部位-H5	ヌクレオチド	N.A.	ACCACGTTGGTCAGGCTGGTCT
hRosa26標的部位のDNA配列	5053	MG29-1-hRosa26-標的部位-A6	ヌクレオチド	N.A.	ACCTTCCTGTGACTTCCTGGAG
hRosa26標的部位のDNA配列	5054	MG29-1-hRosa26-標的部位-B6	ヌクレオチド	N.A.	CCTTCCTGTGACTTCCTGGAGA

【０６７８】

【表６２－１６】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
hRosa26 標的部位の DNA 配列	5055	MG29-1-hRosa26-標的部位-C6	ヌクレオチド	N.A.	TGGGGAAGGTTCTCTGTCTGCC
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5268	MG29-1-FAS-sgRNA-A1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrGrUrArArArCrArArCrCrGrArArCrUrGrArUrGrA/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5269	MG29-1-FAS-sgRNA-B1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrArGrCrArArArGrArCrUrCrUrUrGrCrUrArC/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5270	MG29-1-FAS-sgRNA-C1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArArCrGrUrGrGrCrArUrCrArArCrArUrCrArC/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5271	MG29-1-FAS-sgRNA-D1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArCrCrArGrCrUrCrCrCrArUrGrUrGrArUrGrUrU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5272	MG29-1-FAS-sgRNA-E1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrGrUrCrUrArUrUrArGrArUrGrCrUrCrArGrArGrU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5273	MG29-1-FAS-sgRNA-F1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrUrCrUrArUrUrArGrArUrGrCrUrCrArGrArGrU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5274	MG29-1-FAS-sgRNA-G1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrCrUrArUrUrArGrArUrGrCrUrCrArGrArGrUrG/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5275	MG29-1-FAS-sgRNA-H1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArUrCrUrGrUrCrArCrUrGrCrArCrUrUrArCrCrA/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5276	MG29-1-FAS-sgRNA-A2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrCrUrGrUrCrArCrUrGrCrArCrUrUrArCrCrArC/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5277	MG29-1-FAS-sgRNA-B2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrArGrArCrUrGrUrUrArGrUrGrCrCrArUrGrArG/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5278	MG29-1-FAS-sgRNA-C2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrUrUrArCrArGrGrUrUrCrUrUrArCrGrUrCrUrG/AltR2/

【０６７９】

【表６２－１７】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5279	MG29-1-FAS-sgRNA-D2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrArCrArGrGrUrUrCrUrUrArCrGrUrCrUrGrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5280	MG29-1-FAS-sgRNA-E2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrArGrGrUrUrCrUrUrArCrGrUrCrUrGrUrGrCrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5281	MG29-1-FAS-sgRNA-F2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrGrUrUrCrUrUrArCrGrUrCrUrGrUrGrCrUrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5282	MG29-1-FAS-sgRNA-G2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrGrUrArArCrArUrArCrCrUrGrGrArGrGrArCrArG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5283	MG29-1-FAS-sgRNA-H2	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrArArCrArUrArCrCrUrGrGrArGrGrArCrArG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5284	MG29-1-FAS-sgRNA-A3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrArCrGrArUrArArUrCrUrArGrCrArArCrArGrArC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5285	MG29-1-FAS-sgRNA-B3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArCrGrArUrArArUrCrUrArGrCrArArCrArGrArC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5286	MG29-1-FAS-sgRNA-C3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrCrUrUrGrGrGrCrArGrGrUrGrArArArGrGrArA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5287	MG29-1-FAS-sgRNA-D3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrUrGrGrGrCrArGrGrUrGrArArArGrGrArArA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5288	MG29-1-FAS-sgRNA-E3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrGrGrCrArGrGrUrGrArArArGrGrArArArG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5289	MG29-1-FAS-sgRNA-F3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrGrGrGrCrArGrGrUrGrArArArGrGrArArArGrC/AltR2/

【０６８０】

【表６２－１８】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5290	MG29-1-FAS-sgRNA-G3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrCrCrArArArUrGrCrArGrArArGrArUrGrUrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5291	MG29-1-FAS-sgRNA-H3	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrCrCrArArArUrGrCrArGrArArGrArUrGrUrArG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5292	MG29-1-FAS-sgRNA-A4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrCrArArArUrGrCrArGrArArGrArUrGrUrArGrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5293	MG29-1-FAS-sgRNA-B4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrArCrUrCrUrUrArCrCrArUrGrUrCrCrUrUrCrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5294	MG29-1-FAS-sgRNA-C4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArCrUrCrUrUrArCrCrArUrGrUrCrCrUrUrCrArU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5295	MG29-1-FAS-sgRNA-D4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArGrArArArArUrGrGrGrCrUrUrUrGrUrCrUrG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5296	MG29-1-FAS-sgRNA-E4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrUrArCrUrCrCrUrUrCrCrUrUrCrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5297	MG29-1-FAS-sgRNA-F4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArArArCrUrGrArUrUrUrUrCrUrArGrGrCrUrUrArG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5298	MG29-1-FAS-sgRNA-G4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrArGrGrCrUrUrArGrArArGrUrGrGrArArArUrArA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5299	MG29-1-FAS-sgRNA-H4	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrGrCrUrUrArGrArArGrUrGrGrArArArUrArArA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5300	MG29-1-FAS-sgRNA-A5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrUrArArCrUrCrUrArCrUrGrUrArUrGrUrGrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5301	MG29-1-FAS-sgRNA-B5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrArArCrUrCrUrArCrUrGrUrArUrGrUrGrArA/AltR2/

【０６８１】

【表６２－１９】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5302	MG29-1-FAS-sgRNA-C5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrArArCrUrCrUrArCrUrGrUrArUrGrUrGrArArC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5303	MG29-1-FAS-sgRNA-D5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrArArCrUrCrUrArCrUrGrUrArUrGrUrGrArArCrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5304	MG29-1-FAS-sgRNA-E5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArArCrUrCrUrArCrUrGrUrArUrGrUrGrArArCrArC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5305	MG29-1-FAS-sgRNA-F5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrUrUrUrArCrArUrCrUrGrCrArCrUrUrGrGrUrArUrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5306	MG29-1-FAS-sgRNA-G5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrCrUrGrCrArCrUrUrGrGrUrArUrUrCrUrUrCrUrGrGrG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5307	MG29-1-FAS-sgRNA-H5	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrGrUrArUrUrUrUrUrUrUrUrCrUrArGrArU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5308	MG29-1-FAS-sgRNA-A6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrUrCrUrArGrArUrGrUrGrArArCrArUrGrGrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5309	MG29-1-FAS-sgRNA-B6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrUrCrUrArGrArUrGrUrGrArArCrArUrGrGrArA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5310	MG29-1-FAS-sgRNA-C6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrUrArGrArUrGrUrGrArArCrArUrGrGrArArU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5311	MG29-1-FAS-sgRNA-D6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrArGrArUrGrUrGrArArCrArUrGrGrArArUrC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5312	MG29-1-FAS-sgRNA-E6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrArGrArUrGrUrGrArArCrArUrGrGrArArUrCrA/AltR2/

【０６８２】

【表６２－２０】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5313	MG29-1-FAS-sgRNA-F6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrArGrArUrGrUrGrArArCrArUrGrGrArArUrCrArU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5314	MG29-1-FAS-sgRNA-G6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrArUrGrUrGrArArCrArUrGrGrArArUrCrArUrC/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5315	MG29-1-FAS-sgRNA-H6	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArCrUrUrGrGrUrGrUrUrGrCrUrGrGrUrGrArGrUrG/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5316	MG29-1-FAS-sgRNA-A7	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrUrCrUrUrCrUrUrUrUrGrCrCrArArUrUrCrCrA/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5317	MG29-1-FAS-sgRNA-B7	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrCrArArUrUrCrCrArCrUrArArUrUrGrUrUrUrGrG/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5318	MG29-1-FAS-sgRNA-C7	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArArUrUrCrCrArCrUrArArUrUrGrUrUrUrGrGrG/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5319	MG29-1-FAS-sgRNA-D7	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArCrArArArGrCrArArGrArArCrUrUrArCrCrCrCrA/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5320	MG29-1-FAS-sgRNA-E7	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrGrUrUrCrUrUrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArA/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5321	MG29-1-FAS-sgRNA-F7	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrUrUrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArArGrGrA/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5322	MG29-1-FAS-sgRNA-G7	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrGrArArGrArGrArArArGrGrArArGrUrArCrArG/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5323	MG29-1-FAS-sgRNA-H7	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrArCrCrUrArCrArGrGrArUrUrUrArArArGrUrU/AltR2/

【０６８３】

【表６２－２１】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5324	MG29-1-FAS-sgRNA-A8	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArGrUrUrGrGrArGrArArUrUrCrArUrGrArGrArArCrC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5325	MG29-1-FAS-sgRNA-B8	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrCrUrGrUrGrCrUrUrUrCrUrGrCrArUrGrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5326	MG29-1-FAS-sgRNA-C8	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrCrUrGrUrGrCrUrUrUrCrUrGrCrArUrGrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5327	MG29-1-FAS-sgRNA-D8	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrGrCrUrUrUrCrUrGrCrArUrGrUrUrUrCrUrG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5328	MG29-1-FAS-sgRNA-E8	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrArUrGrUrUrUrCrUrGrUrArCrUrUrCrCrUrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5329	MG29-1-FAS-sgRNA-F8	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArCrUrUrCrCrUrUrUrCrUrUrCrArCrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5330	MG29-1-FAS-sgRNA-G8	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrCrUrUrUrCrUrArGrGrArArArCrArGrUrGrGrC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5331	MG29-1-FAS-sgRNA-H8	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrUrUrUrCrUrArGrGrArArArCrArGrUrGrGrCrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5332	MG29-1-FAS-sgRNA-A9	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrUrUrCrUrArGrGrArArArCrArGrUrGrGrCrArA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5333	MG29-1-FAS-sgRNA-B9	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrUrCrUrArGrGrArArArCrArGrUrGrGrCrArArU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5334	MG29-1-FAS-sgRNA-C9	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArGrGrArArArCrArGrUrGrGrCrArArUrArArArUrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5335	MG29-1-FAS-sgRNA-D9	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArCrUrArUrUrUrUrCrUrArUrUrUrUrUrCrArGrA/AltR2/

【０６８４】

【表６２－２２】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5336	MG29-1-FAS-sgRNA-E9	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrArUrUrUrUrUrCrArGrArUrGrUrUrGrArCrUrUrG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5337	MG29-1-FAS-sgRNA-F9	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArUrUrUrUrUrCrArGrArUrGrUrUrGrArCrUrUrGrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5338	MG29-1-FAS-sgRNA-G9	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArGrArUrGrUrUrGrArCrUrUrGrArGrUrArArArU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5339	MG29-1-FAS-sgRNA-H9	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArUrGrUrUrGrArCrUrUrGrArGrUrArArArUrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5340	MG29-1-FAS-sgRNA-A10	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArUrGrUrUrGrArCrUrUrGrArGrUrArArArUrArU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5341	MG29-1-FAS-sgRNA-B10	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrCrGrArArArGrArArUrGrGrUrGrUrCrArArUrGrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5342	MG29-1-FAS-sgRNA-C10	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrArCrUrCrUrUrGrCrArGrArGrArArArUrUrCrArG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5343	MG29-1-FAS-sgRNA-D10	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrUrUrUrUrUrCrArCrUrCrUrArGrArCrCrArArG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5344	MG29-1-FAS-sgRNA-E10	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrArCrUrCrUrArGrArCrCrArArGrCrUrUrUrGrGrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5345	MG29-1-FAS-sgRNA-F10	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArCrUrCrUrArGrArCrCrArArGrCrUrUrUrGrGrArU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5346	MG29-1-FAS-sgRNA-G10	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrCrUrArGrArCrCrArArGrCrUrUrUrGrGrArUrU/AltR2/

【０６８５】

【表６２－２３】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5347	MG29-1-FAS-sgRNA-H10	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArUrUrUrCrArUrUrUrCrUrGrArArGrUrUrUrGrArA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5348	MG29-1-FAS-sgRNA-A11	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrUrUrCrUrGrArArGrUrUrUrGrArArUrUrUrUrCrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5349	MG29-1-FAS-sgRNA-B11	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArArGrUrUrUrGrArArUrUrUrCrUrGrArGrUrC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5350	MG29-1-FAS-sgRNA-C11	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArArUrUrUrCrUrGrArGrUrCrArCrUrArGrUrArArU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5351	MG29-1-FAS-sgRNA-D11	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrGrArGrUrCrArCrUrArGrUrArArUrGrUrCrCrUrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5352	MG29-1-FAS-sgRNA-E11	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArGrUrCrArCrUrArGrUrArArUrGrUrCrCrUrUrG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5353	MG29-1-FAS-sgRNA-F11	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrCrUrGrCrArArGrArGrUrArCrArArArGrArUrUrG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5354	MG29-1-FAS-sgRNA-G11	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrCrArArGrArGrUrArCrArArArGrArUrUrG/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5355	MG29-1-FAS-sgRNA-H11	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrGrArGrArUrCrUrUrUrArArUrCrArArUrGrUrGrU/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5356	MG29-1-FAS-sgRNA-A12	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArGrArUrCrUrUrUrArArUrCrArArUrGrUrGrUrC/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5357	MG29-1-FAS-sgRNA-B12	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrArUrCrUrUrUrArArUrCrArArUrGrUrGrUrCrA/AltR2/
FASを標的とするMG29-1 sgRNA	5358	MG29-1-FAS-sgRNA-C12	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrArUrCrUrUrUrArArUrCrArArUrGrUrGrUrCrArU/AltR2/

【０６８６】

【表６２－２４】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5359	MG29-1-FAS-sgRNA-D12	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrArArUrGrUrGrUrCrArUrArCrGrCrUrUrCrUrU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5360	MG29-1-FAS-sgRNA-E12	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrUrUrCrCrArUrGrArArGrUrUrGrArUrGrCrCrArArU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5361	MG29-1-FAS-sgRNA-F12	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrGrArArGrUrUrGrArUrGrCrCrArArUrUrArCrG/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5362	MG29-1-FAS-sgRNA-G12	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrUrUrCrUrGrCrUrGrUrGrUrCrUrUrGrGrArCrArU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5363	MG29-1-FAS-sgRNA-H12	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrGrCrUrUrCrArUrUrGrArCrArCrCrArUrUrCrUrUrU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5364	MG29-1-FAS-sgRNA-A13	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrUrUrCrArUrUrGrArCrArCrCrArUrUrCrUrUrUrC/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5365	MG29-1-FAS-sgRNA-B13	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArCrArArArGrCrCrUrUrUrArArCrUrUrGrArCrU/AltR2/
FAS を標的とする MG29-1 sgRNA	5366	MG29-1-FAS-sgRNA-C13	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrUrGrArCrUrUrArGrUrGrUrCrArUrGrArCrCrUrC/AltR2/
FAS 標的部位の DNA 配列	5367	MG29-1-FAS-標的部位-A1	ヌクレオチド	N.A.	AGGTAAACAACCGAACTGATGA
FAS 標的部位の DNA 配列	5368	MG29-1-FAS-標的部位-B1	ヌクレオチド	N.A.	CCTGAGCAAAGACTCTTGCTAC
FAS 標的部位の DNA 配列	5369	MG29-1-FAS-標的部位-C1	ヌクレオチド	N.A.	CAGAACGTGGCATCAACATCAC
FAS 標的部位の DNA 配列	5370	MG29-1-FAS-標的部位-D1	ヌクレオチド	N.A.	TCACCAGCTCCCATGTGATGTT

【０６８７】

【表６２－２５】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FAS標的部位のDNA配列	5371	MG29-1-FAS-標的部位-E1	ヌクレオチド	N.A.	TGTGTCTATTAGATGCTCAGAG
FAS標的部位のDNA配列	5372	MG29-1-FAS-標的部位-F1	ヌクレオチド	N.A.	GTGTCTATTAGATGCTCAGAGT
FAS標的部位のDNA配列	5373	MG29-1-FAS-標的部位-G1	ヌクレオチド	N.A.	TGTCTATTAGATGCTCAGAGTG
FAS標的部位のDNA配列	5374	MG29-1-FAS-標的部位-H1	ヌクレオチド	N.A.	GCATCTGTCACTGCACTTACCA
FAS標的部位のDNA配列	5375	MG29-1-FAS-標的部位-A2	ヌクレオチド	N.A.	CATCTGTCACTGCACTTACCAC
FAS標的部位のDNA配列	5376	MG29-1-FAS-標的部位-B2	ヌクレオチド	N.A.	AGTAGACTGTTAGTGCCATGAG
FAS標的部位のDNA配列	5377	MG29-1-FAS-標的部位-C2	ヌクレオチド	N.A.	ATTTTACAGGTTCTTACGTCTG
FAS標的部位のDNA配列	5378	MG29-1-FAS-標的部位-D2	ヌクレオチド	N.A.	TTTTACAGGTTCTTACGTCTGT
FAS標的部位のDNA配列	5379	MG29-1-FAS-標的部位-E2	ヌクレオチド	N.A.	ACAGGTTCTTACGTCTGTTGCT
FAS標的部位のDNA配列	5380	MG29-1-FAS-標的部位-F2	ヌクレオチド	N.A.	CAGGTTCTTACGTCTGTTGCTA
FAS標的部位のDNA配列	5381	MG29-1-FAS-標的部位-G2	ヌクレオチド	N.A.	GTGTAACATACCTGGAGGACAG
FAS標的部位のDNA配列	5382	MG29-1-FAS-標的部位-H2	ヌクレオチド	N.A.	TGTAACATACCTGGAGGACAGG
FAS標的部位のDNA配列	5383	MG29-1-FAS-標的部位-A3	ヌクレオチド	N.A.	GGACGATAATCTAGCAACAGAC
FAS標的部位のDNA配列	5384	MG29-1-FAS-標的部位-B3	ヌクレオチド	N.A.	GACGATAATCTAGCAACAGACG
FAS標的部位のDNA配列	5385	MG29-1-FAS-標的部位-C3	ヌクレオチド	N.A.	TTCCTTGGGCAGGTGAAAGGAA
FAS標的部位のDNA配列	5386	MG29-1-FAS-標的部位-D3	ヌクレオチド	N.A.	TCCTTGGGCAGGTGAAAGGAAA
FAS標的部位のDNA配列	5387	MG29-1-FAS-標的部位-E3	ヌクレオチド	N.A.	CCTTGGGCAGGTGAAAGGAAAG

【０６８８】

【表６２－２６】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FAS 標的部位の DNA 配列	5388	MG29-1-FAS-標的部位-F3	ヌクレオチド	N.A.	CTTGGGCAGGTGAAAGGAAAGC
FAS 標的部位の DNA 配列	5389	MG29-1-FAS-標的部位-G3	ヌクレオチド	N.A.	TCTTCCAAATGCAGAAGATGTA
FAS 標的部位の DNA 配列	5390	MG29-1-FAS-標的部位-H3	ヌクレオチド	N.A.	CTTCCAAATGCAGAAGATGTAG
FAS 標的部位の DNA 配列	5391	MG29-1-FAS-標的部位-A4	ヌクレオチド	N.A.	TTCCAAATGCAGAAGATGTAGA
FAS 標的部位の DNA 配列	5392	MG29-1-FAS-標的部位-B4	ヌクレオチド	N.A.	AAGACTCTTACCATGTCCTTCA
FAS 標的部位の DNA 配列	5393	MG29-1-FAS-標的部位-C4	ヌクレオチド	N.A.	AGACTCTTACCATGTCCTTCAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5394	MG29-1-FAS-標的部位-D4	ヌクレオチド	N.A.	GAAGAAAAATGGGCTTTGTCTG
FAS 標的部位の DNA 配列	5395	MG29-1-FAS-標的部位-E4	ヌクレオチド	N.A.	TCTGTGTACTCCTTCCCTTCTT
FAS 標的部位の DNA 配列	5396	MG29-1-FAS-標的部位-F4	ヌクレオチド	N.A.	CAAACTGATTTTCTAGGCTTAG
FAS 標的部位の DNA 配列	5397	MG29-1-FAS-標的部位-G4	ヌクレオチド	N.A.	CTAGGCTTAGAAGTGGAAATAA
FAS 標的部位の DNA 配列	5398	MG29-1-FAS-標的部位-H4	ヌクレオチド	N.A.	TAGGCTTAGAAGTGGAAATAAA
FAS 標的部位の DNA 配列	5399	MG29-1-FAS-標的部位-A5	ヌクレオチド	N.A.	TTTGTAACTCTACTGTATGTGA
FAS 標的部位の DNA 配列	5400	MG29-1-FAS-標的部位-B5	ヌクレオチド	N.A.	TTGTAACTCTACTGTATGTGAA
FAS 標的部位の DNA 配列	5401	MG29-1-FAS-標的部位-C5	ヌクレオチド	N.A.	TGTAACTCTACTGTATGTGAAC
FAS 標的部位の DNA 配列	5402	MG29-1-FAS-標的部位-D5	ヌクレオチド	N.A.	GTAACTCTACTGTATGTGAACA
FAS 標的部位の DNA 配列	5403	MG29-1-FAS-標的部位-E5	ヌクレオチド	N.A.	TAACTCTACTGTATGTGAACAC

【０６８９】

【表６２－２７】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FAS 標的部位の DNA 配列	5404	MG29-1-FAS-標的部位-F5	ヌクレオチド	N.A.	GTTTACATCTGCACTTGGTATT
FAS 標的部位の DNA 配列	5405	MG29-1-FAS-標的部位-G5	ヌクレオチド	N.A.	CATCTGCACTTGGTATTCTGGG
FAS 標的部位の DNA 配列	5406	MG29-1-FAS-標的部位-H5	ヌクレオチド	N.A.	TCCTGTATTTTTTTTTCTAGAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5407	MG29-1-FAS-標的部位-A6	ヌクレオチド	N.A.	TTTTTCTAGATGTGAACATGGA
FAS 標的部位の DNA 配列	5408	MG29-1-FAS-標的部位-B6	ヌクレオチド	N.A.	TTTTCTAGATGTGAACATGGAA
FAS 標的部位の DNA 配列	5409	MG29-1-FAS-標的部位-C6	ヌクレオチド	N.A.	TTTCTAGATGTGAACATGGAAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5410	MG29-1-FAS-標的部位-D6	ヌクレオチド	N.A.	TTCTAGATGTGAACATGGAATC
FAS 標的部位の DNA 配列	5411	MG29-1-FAS-標的部位-E6	ヌクレオチド	N.A.	TCTAGATGTGAACATGGAATCA
FAS 標的部位の DNA 配列	5412	MG29-1-FAS-標的部位-F6	ヌクレオチド	N.A.	CTAGATGTGAACATGGAATCAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5413	MG29-1-FAS-標的部位-G6	ヌクレオチド	N.A.	TAGATGTGAACATGGAATCATC
FAS 標的部位の DNA 配列	5414	MG29-1-FAS-標的部位-H6	ヌクレオチド	N.A.	CACTTGGTGTTGCTGGTGAGTG
FAS 標的部位の DNA 配列	5415	MG29-1-FAS-標的部位-A7	ヌクレオチド	N.A.	TCTTCTTCTTTTGCCAATTCCA
FAS 標的部位の DNA 配列	5416	MG29-1-FAS-標的部位-B7	ヌクレオチド	N.A.	GCCAATTCCACTAATTGTTTGG
FAS 標的部位の DNA 配列	5417	MG29-1-FAS-標的部位-C7	ヌクレオチド	N.A.	CCAATTCCACTAATTGTTTGGG
FAS 標的部位の DNA 配列	5418	MG29-1-FAS-標的部位-D7	ヌクレオチド	N.A.	AACAAAGCAAGAACTTACCCCA
FAS 標的部位の DNA 配列	5419	MG29-1-FAS-標的部位-E7	ヌクレオチド	N.A.	TTTGTTCTTTCAGTGAAGAGAA
FAS 標的部位の DNA 配列	5420	MG29-1-FAS-標的部位-F7	ヌクレオチド	N.A.	TTCTTTCAGTGAAGAGAAAGGA

【０６９０】

【表６２－２８】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FAS標的部位のDNA配列	5421	MG29-1-FAS-標的部位-G7	ヌクレオチド	N.A.	AGTGAAGAGAAAGGAAGTACAG
FAS標的部位のDNA配列	5422	MG29-1-FAS-標的部位-H7	ヌクレオチド	N.A.	AATACCTACAGGATTTAAAGTT
FAS標的部位のDNA配列	5423	MG29-1-FAS-標的部位-A8	ヌクレオチド	N.A.	AAGTTGGAGATTCATGAGAACC
FAS標的部位のDNA配列	5424	MG29-1-FAS-標的部位-B8	ヌクレオチド	N.A.	CCTTTCTGTGCTTTCTGCATGT
FAS標的部位のDNA配列	5425	MG29-1-FAS-標的部位-C8	ヌクレオチド	N.A.	CTTTCTGTGCTTTCTGCATGTT
FAS標的部位のDNA配列	5426	MG29-1-FAS-標的部位-D8	ヌクレオチド	N.A.	TGTGCTTTCTGCATGTTTTCTG
FAS標的部位のDNA配列	5427	MG29-1-FAS-標的部位-E8	ヌクレオチド	N.A.	TGCATGTTTTCTGTACTTCCTT
FAS標的部位のDNA配列	5428	MG29-1-FAS-標的部位-F8	ヌクレオチド	N.A.	CTGTACTTCCTTTCTCTTCACT
FAS標的部位のDNA配列	5429	MG29-1-FAS-標的部位-G8	ヌクレオチド	N.A.	TTGCTTTCTAGGAAACAGTGGC
FAS標的部位のDNA配列	5430	MG29-1-FAS-標的部位-H8	ヌクレオチド	N.A.	TGCTTTCTAGGAAACAGTGGCA
FAS標的部位のDNA配列	5431	MG29-1-FAS-標的部位-A9	ヌクレオチド	N.A.	GCTTTCTAGGAAACAGTGGCAA
FAS標的部位のDNA配列	5432	MG29-1-FAS-標的部位-B9	ヌクレオチド	N.A.	CTTTCTAGGAAACAGTGGCAAT
FAS標的部位のDNA配列	5433	MG29-1-FAS-標的部位-C9	ヌクレオチド	N.A.	TAGGAAACAGTGGCAATAAATT
FAS標的部位のDNA配列	5434	MG29-1-FAS-標的部位-D9	ヌクレオチド	N.A.	AGACTATTTTCTATTTTTCAGA
FAS標的部位のDNA配列	5435	MG29-1-FAS-標的部位-E9	ヌクレオチド	N.A.	CTATTTTTCAGATGTTGACTTG
FAS標的部位のDNA配列	5436	MG29-1-FAS-標的部位-F9	ヌクレオチド	N.A.	TATTTTTCAGATGTTGACTTGA
FAS標的部位のDNA配列	5437	MG29-1-FAS-標的部位-G9	ヌクレオチド	N.A.	TCAGATGTTGACTTGAGTAAAT

【０６９１】

【表６２－２９】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FAS 標的部位の DNA 配列	5438	MG29-1-FAS-標的部位-H9	ヌクレオチド	N.A.	CAGATGTTGACTTGAGTAAATA
FAS 標的部位の DNA 配列	5439	MG29-1-FAS-標的部位-A10	ヌクレオチド	N.A.	AGATGTTGACTTGAGTAAATAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5440	MG29-1-FAS-標的部位-B10	ヌクレオチド	N.A.	TTCGAAAGAATGGTGTCAATGA
FAS 標的部位の DNA 配列	5441	MG29-1-FAS-標的部位-C10	ヌクレオチド	N.A.	TACTCTTGCAGAGAAAATTCAG
FAS 標的部位の DNA 配列	5442	MG29-1-FAS-標的部位-D10	ヌクレオチド	N.A.	TTGTTTTTCACTCTAGACCAAG
FAS 標的部位の DNA 配列	5443	MG29-1-FAS-標的部位-E10	ヌクレオチド	N.A.	TCACTCTAGACCAAGCTTTGGA
FAS 標的部位の DNA 配列	5444	MG29-1-FAS-標的部位-F10	ヌクレオチド	N.A.	CACTCTAGACCAAGCTTTGGAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5445	MG29-1-FAS-標的部位-G10	ヌクレオチド	N.A.	ACTCTAGACCAAGCTTTGGATT
FAS 標的部位の DNA 配列	5446	MG29-1-FAS-標的部位-H10	ヌクレオチド	N.A.	GATTTCATTTCTGAAGTTTGAA
FAS 標的部位の DNA 配列	5447	MG29-1-FAS-標的部位-A11	ヌクレオチド	N.A.	ATTTCTGAAGTTTGAATTTTCT
FAS 標的部位の DNA 配列	5448	MG29-1-FAS-標的部位-B11	ヌクレオチド	N.A.	TGAAGTTTGAATTTTCTGAGTC
FAS 標的部位の DNA 配列	5449	MG29-1-FAS-標的部位-C11	ヌクレオチド	N.A.	AATTTTCTGAGTCACTAGTAAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5450	MG29-1-FAS-標的部位-D11	ヌクレオチド	N.A.	CTGAGTCACTAGTAATGTCCTT
FAS 標的部位の DNA 配列	5451	MG29-1-FAS-標的部位-E11	ヌクレオチド	N.A.	TGAGTCACTAGTAATGTCCTTG
FAS 標的部位の DNA 配列	5452	MG29-1-FAS-標的部位-F11	ヌクレオチド	N.A.	CTCTGCAAGAGTACAAAGATTG
FAS 標的部位の DNA 配列	5453	MG29-1-FAS-標的部位-G11	ヌクレオチド	N.A.	TCTGCAAGAGTACAAAGATTGG

【０６９２】

【表６２－３０】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
FAS 標的部位の DNA 配列	5454	MG29-1-FAS-標的部位-H11	ヌクレオチド	N.A.	TTGAGATCTTTAATCAATGTGT
FAS 標的部位の DNA 配列	5455	MG29-1-FAS-標的部位-A12	ヌクレオチド	N.A.	TGAGATCTTTAATCAATGTGTC
FAS 標的部位の DNA 配列	5456	MG29-1-FAS-標的部位-B12	ヌクレオチド	N.A.	GAGATCTTTAATCAATGTGTCA
FAS 標的部位の DNA 配列	5457	MG29-1-FAS-標的部位-C12	ヌクレオチド	N.A.	AGATCTTTAATCAATGTGTCAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5458	MG29-1-FAS-標的部位-D12	ヌクレオチド	N.A.	ATCAATGTGTCATACGCTTCTT
FAS 標的部位の DNA 配列	5459	MG29-1-FAS-標的部位-E12	ヌクレオチド	N.A.	TTTCCATGAAGTTGATGCCAAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5460	MG29-1-FAS-標的部位-F12	ヌクレオチド	N.A.	CATGAAGTTGATGCCAATTACG
FAS 標的部位の DNA 配列	5461	MG29-1-FAS-標的部位-G12	ヌクレオチド	N.A.	TGTTCTGCTGTGTCTTGGACAT
FAS 標的部位の DNA 配列	5462	MG29-1-FAS-標的部位-H12	ヌクレオチド	N.A.	GGCTTCATTGACACCATTCTTT
FAS 標的部位の DNA 配列	5463	MG29-1-FAS-標的部位-A13	ヌクレオチド	N.A.	GCTTCATTGACACCATTCTTTC
FAS 標的部位の DNA 配列	5464	MG29-1-FAS-標的部位-B13	ヌクレオチド	N.A.	GAACAAAGCCTTTAACTTGACT
FAS 標的部位の DNA 配列	5465	MG29-1-FAS-標的部位-C13	ヌクレオチド	N.A.	ACTTGACTTAGTGTCATGACTC
PD-1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5466	MG29-1-PD-1-sgRNA-A1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrUrArGrCrGrGrArArUrGrGrGrCrArCrCrUrCrArUrC/AltR2/
PD-1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5467	MG29-1-PD-1-sgRNA-B1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrUrGrGrCrGrArArGrArArGrArArGrArCrCrCrGrG/AltR2/
PD-1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5468	MG29-1-PD-1-sgRNA-C1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrUrCrArArArGrArArGrGrArGrArCrCrCrCrU/AltR2/
PD-1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5469	MG29-1-PD-1-sgRNA-D1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrCrArGrGrArCrArArUrArGrGrArGrCrCrA/AltR2/

【０６９３】

【表６２－３１】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
PD-1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5470	MG29-1-PD-1-sgRNA-E1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArArCrUrGrGrCrCrGrGrCrUrGrGrCrCrUrGrGrGrU/AltR2/
PD-1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5471	MG29-1-PD-1-sgRNA-F1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrCrCrUrUrCrCrArGrArGrArGrArArGrGrGrCrA/AltR2/
PD-1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5472	MG29-1-PD-1-sgRNA-G1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrUrGrCrGrCrCrUrUrGrGrGrGrCrCrArGrGrG/AltR2/
PD-1 を標的とする MG29-1 sgRNA	5473	MG29-1-PD-1-sgRNA-H1	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrCrArCrGrArArGrCrUrCrUrCrCrGrArUrGrUrGrUrU/AltR2/
PD-1 標的部位の DNA 配列	5474	MG29-1-PD-1-標的部位-A1	ヌクレオチド	N.A.	ATCTGCGCCTTGGGGGCCAGGG
PD-1 標的部位の DNA 配列	5475	MG29-1-PD-1-標的部位-B1	ヌクレオチド	N.A.	GCACGAAGCTCTCCGATGTGTT
PD-1 標的部位の DNA 配列	5476	MG29-1-PD-1-標的部位-C1	ヌクレオチド	N.A.	GAACTGGCCGGCTGGCCTGGGT
PD-1 標的部位の DNA 配列	5477	MG29-1-PD-1-標的部位-D1	ヌクレオチド	N.A.	TGCCCTTCCAGAGAGAAGGGCA
PD-1 標的部位の DNA 配列	5478	MG29-1-PD-1-標的部位-E1	ヌクレオチド	N.A.	TCTGCAGGGACAATAGGAGCCA
PD-1 標的部位の DNA 配列	5479	MG29-1-PD-1-標的部位-F1	ヌクレオチド	N.A.	TCCTCAAAGAAGGAGGACCCCT
PD-1 標的部位の DNA 配列	5480	MG29-1-PD-1-標的部位-G1	ヌクレオチド	N.A.	CAGTGGCGAGAGAAGACCCCGG
PD-1 標的部位の DNA 配列	5481	MG29-1-PD-1-標的部位-H1	ヌクレオチド	N.A.	CTAGCGGAATGGGCACCTCATC
5'UTR、NLS、CDS、NLS、3'UTR、ポリ A テールを含む MG29-1	5680	MG29-1 mRNA	ヌクレオチド	N.A.	GAAAAGCCAGCTCCAGCAGGCGCTGCTCACTCCTCCCCATCCTCTCCCTCTGTCCCTCTGTCCCTCTGACCCTGCACTGTCCCAGCACCATGGCCCCTAAGAAGAAGAGAAAAGTCGGCGGAGGCGGCAGCTTCAACAACTTCATCAAGAAGTACAGCCTGCAGAAAACCCTGC

【０６９４】

【表６２－３２】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GCTTCGAGCTGAAGCCTG TGGGCGAGACAGCCGAC TACATCGAGGACTTCAA GAGCGAGTACCTGAAGG ACACCGTGCTGAAGGAC GAGCAGAGAGCCAAGGA CTACCAAGAGATCAAGA CCCTGATCGACGATTACC ACCGCGAGTACATCGAA GAGTGCCTGAGAGAACC CGTGGACAAGAAAACCG GCGAGATCCTGGACTTCA CCCAGGACCTGGAAGAT GCCTTCAGCTACTACCAG AAGCTGAAAGAGAACCC CACCGAGAACAGAGTCG GCTGGGAGAAAGAGCAA GAGAGCCTGAGGAAGAA GCTGGTCACCTCCTTCGT GGGCAACGACGGCCTGT TCAAGAAAGAGTTCATC ACCAGGGACCTGCCTGA GTGGCTGCAGAAGAAAG GACTCTGGGGCGAGTAC AAGGACACAGTGGAAAA CTTCAAGAAGTTCACCAC CTACTTCAGCGGCTTCCA CGAGAACCGGAAGAACA TGTACACCGCCGAGGCTC AGAGCACCGCTATCGCC AACAGACTGATGAACGA CAACCTGCCTAAGTTCTT TAACAACTACCTGGCCTA CCAGACCATCAAAGAGA AGCACCCCGACCTGGTGT TCAGACTGGATGATGCTC TGCTGCAGGCCGCTGGC GTGGAACATCTGGATGA GGCTTTCCAGCCTAGATA CTTCAGCAGACTGTTCGC CCAGAGCGGCATCACCG CTTTCAACGAGCTGATCG GCGGCAGAACCACAGAG AACGGCGAGAAGATCCA GGGCCTGAACGAGCAGA TCAACCTGTACAGACAG CAGAACCCCGAGAAGGC CAAGGGCTTCCCCAGATT CATGCCTCTGTTCAAGCA GATCCTGAGCGACAGAG AGACACACAGCTTTCTGC CCGACGCCTTCGAGAAC GACAAAGAGCTGCTCCA

【０６９５】

【表６２－３３】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GGCTCTGAGAGACTACG TGGACGCCGCCACATCTG AGGAAGGCATGATCAGC CAGCTGAACAAGGCCAT GAACCAGTTCGTGACCG CCGACCTGAAGAGAGTG TACATCAAGAGCGCCGC TCTGACCAGCCTGAGCCA AGAGCTGTTCCACTTCTT CGGCGTGATCAGCGACG CTATCGCTTGGTACGCCG AGAAGAGACTGAGCCCC AAGAAGGCCCAAGAGTC TTTCCTGAAGCAAGAGGT GTACGCCATCGAGGAAC TGAACCAGGCTGTCGTG GGCTACATCGACCAGCT GGAAGATCAGAGCGAGC TGCAGCAACTGCTGGTG GACCTGCCAGATCCTCAG AAACCCGTGTCCAGCTTC ATCCTGACACACTGGCA GAAGTCTCAAGAGCCCC TGCAGGCAGTGATCGCC AAGGTGGAACCTCTGTTC GAACTGGAAGAACTGAG CAAGAACAAGAGGGCCC CAAAGCACGACAAGGAC CAAGGCGGCGAGGGATT TCAGCAGGTCGACGCCA TCAAGAACATGCTGGAC GCCTTCATGGAAGTGTCC CACGCTATCAAGCCCCTG TACCTGGTCAAGGGAAG AAAGGCCATCGACATGC CCGACGTGGACACCGGC TTCTACGCTGATTTCGCC GAGGCCTACAGCGCCTA CGAGCAAGTGACAGTGT CCCTGTACAACAAGACC AGAAACCACCTGTCCAA GAAGCCCTTCAGCAAGG ACAAGATCAAGATCAAC TTCGACGCCCCTACACTG CTGAACGGCTGGGACCT GAACAAAGAGAGCGACA ACAAGTCCATCATCCTGC GGAAGGACGGCAACTTC TACCTGGCAATCATGCAC CCCAAGCACACCAAGGT GTTCGACTGCTACTCTGC CTCTGAGGCTGCCGGCA AGTGCTACGAGAAGATG AACTACAAGCTGCTGAG CGGCGCCAACAAGATGC TGCCTAAGGTGTTCTTTA GCAAGAAGGGCATCGAG

【０６９６】

【表６２－３４】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					ACATTCAGCCCTCCACAA GAAATCCTGGACCTGTAC AAGAACAACGAGCATAA GAAGGGCGCCACCTTCA AGCTGGAATCCTGCCAC AAGCTGATCGATTTCTTC AAGCGGAACATCCCCAA GTACAAGGTGCACCCTA CCGACAACTTTGGCTGGG ACGTGTTCGGCTTTCACT TCAGCCCTACCAGCAGCT ACGGCGACCTGTCTGGCT TCTACAGAGAGGTGGAA GCCCAGGGATACAAGCT GTGGTTCAGCGACGTGTC CGAGGCTTACATCAACA AATGCGTGGAAGAGGGC AAGCTGTTCCTGTTCCAA ATCTACAACAAGGACTTC TCCCCTAACTCCACCGGC AAGCCCAACCTGCACAC CCTGTATTGGAAGGGCCT GTTCGAGCCCGAGAACC TGAAAGACGTGGTGCTG AAGCTGAATGGCGAGGC CGAGATCTTCTACCGGAA GCACAGCATCAAGCACG AGGACAAGACCATCCAC AGAGCTAAGGACCCTAT CGCTAACAAGAACGCTG ACAACCCCAAGAAACAG AGCGTGTTCGATTACGAC ATCATCAAGGATAAGCG GTATACCCAGGACAAGT TCTTCTTCCACGTGCCAA TCAGCCTGAACTTCAAAA GCCAGGGCGTCGTGCGG TTCAACGATAAGATCAA CGGCCTGCTGGCCGCTCA GGACGATGTGCATGTGA TCGGCATCGACAGAGGC GAGAGACATCTGCTGTA CTACACCGTGGTCAACG GCAAGGGCGAAGTGGTG GAACAGGGCAGCCTGAA TCAGGTGGCCACAGATC AGGGCTACGTGGTGGAT TACCAGCAGAAGCTGCA CGCCAAAGAGAAAGAAC GCGACCAGGCCAGAAAG AACTGGTCCACCATCGA GAACATCAAAGAACTGA AGGCCGGCTACCTGAGC CAGGTGGTGCATAAGCT GGCTCAGCTGATCGTGA AGCACAACGCCATCGTG TGCCTCGAGGACCTGAAT

【０６９７】

【表６２－３５】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					TTCGGCTTCAAGAGGGG CAGATTCAAGGTCGAGA AACAGGTGTACCAGAAG TTCGAGAAGGCTCTGATC GACAAGCTGAACTACCT CGTGTTCAAAGAGAGAG GCGCCACACAGGCTGGC GGATACCTGAATGCTTAC CAGCTGGCCGCACCTTTC GAGAGCTTTGAGAAGCT GGGCAAGCAGACCGGCA TCCTGTACTACGTGCGGA GCGACTACACCAGCAAG ATCGACCCTGCTACCGGC TTCGTGGACTTTCTGAAG CCTAAGTACGAGAGCAT GGCCAAGAGCAAAGTGT TCTTCGAGTCCTTCGAGC GCATCCAGTGGAACCAG GCCAAAGGCTACTTCGA GTTCGAGTTTGACTACAA GAAGATGTGCCCCAGCA GAAAGTTCGGCGACTAC AGAACCAGATGGGTCGT GTGCACCTTCGGCGACAC CCGCTACCAGAACAGAA GAAACAAGAGCAGCGGC CAGTGGGAGACAGAGAC AATCGATGTGACAGCCC AGCTGAAAGCCCTGTTCG CCGCTTACGGCATCACAT ACAATCAAGAGGATAAC ATCAAGGACGCCATTGC CGCCGTGAAGTACACCA AGTTCTACAAGCAGCTGT ACTGGCTGCTGAGACTG ACCCTGAGCCTGAGACA CAGCGTGACAGGCACCG ACGAGGATTTCATCCTGT CTCCAGTGGCCGACGAG AATGGCGTGTTCTTTGAC TCTAGGAAGGCCACCGA CAAGCAGCCTAAGGACG CTGATGCTAACGGCGCCT ACCATATCGCCCTGAAA GGCCTGTGGAATCTCCAG CAGATCAGACAGCACGA CTGGAACGTGGAAAAGC CCAAAAAGCTGAACCTC GCCATGAAGAACGAAGA GTGGTTCGGCTTCGCTCA GAAGAAGAAGTTTAGAG CCAGCGGCGGCAAGAGG CCTGCCGCTACAAAAAA AGCCGGCCAGGCCAAGA AAAAGAAGTGACCACAC CCCCATTCCCCCACTCCA

【０６９８】

【表６２－３６】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GATAGAACTTCAGTTATA TCTCACGTGTCTGGAGTT GGATCCCTTGAAGACTA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAA
TRAC を標的とする MG29-1 sgRNA	5681	MG29-1-TRAC-sgRNA-35	ヌクレオチド	N.A.	mU*rArArUrUrUrCrUrArCr UrGrUrUrGrUrArGrArUrGr ArGrUrCrUrCrUrCrArGrCrU rGrGrUrArCrArCrG*mG
TRAC 標的部位の DNA 配列	5682	MG29-1-TRAC-標的部位-35	ヌクレオチド	N.A.	GAGTCTCTCAGCTGGTAC ACGG
TRAC を標的とする MG29-1 sgRNA	5683	MG29-1-TRAC-sgRNA-35-AltR	ヌクレオチド	N.A.	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUr ArCrUrGrUrUrGrUrArGrArU rGrArGrUrCrUrCrUrCrArGr CrUrGrGrUrArCrArCrGrG/A ltR2/
TRAC 標的部位の DNA 配列	5684	MG29-1-TRAC-標的部位-35-AltR	ヌクレオチド	N.A.	GAGTCTCTCAGCTGGTAC ACGG
CD38 を標的とする MG29-1 sgRNA	5685	MG29-1-CD38-sgRNA	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*rU*rUrArArUr UmUmCmUmArCrU*rG*rU *rU*rGrUrArGrArUrCrCrGr ArGrArC/i2FC//i2FG//i2FU//i 2FC//i2FC//i2FU//i2FG//i2FG //i2FC//i2FG/*/i2FC/*/i2FG//i 2FA/*/i2FU/*mG
CD38 標的部位の DNA 配列	5686	MG29-1-CD38-標的部位	ヌクレオチド	N.A.	CCGAGACCGTCCTGGCG CGATG
mRNA の生成に使用される MG29-1 コード配列	5687	MG29-1-mRNA コード配列	ヌクレオチド	N.A.	ATGGCCCCTAAGAAGAA GAGAAAAGTCGGCGGAG GCGGCAGCTTCAACAAC TTCATCAAGAAGTACAG CCTGCAGAAAACCCTGC GCTTCGAGCTGAAGCCTG TGGGCGAGACAGCCGAC TACATCGAGGACTTCAA GAGCGAGTACCTGAAGG ACACCGTGCTGAAGGAC GAGCAGAGAGCCAAGGA CTACCAAGAGATCAAGA CCCTGATCGACGATTACC ACCGCGAGTACATCGAA GAGTGCCTGAGAGAACC CGTGGACAAGAAAACCG GCGAGATCCTGGACTTCA CCCAGGACCTGGAAGAT GCCTTCAGCTACTACCAG AAGCTGAAAGAGAACCC CACCGAGAACAGAGTCG

【０６９９】

【表６２－３７】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GCTGGGAGAAAGAGCAA GAGAGCCTGAGGAAGAA GCTGGTCACCTCCTTCGT GGGCAACGACGGCCTGT TCAAGAAAGAGTTCATC ACCAGGGACCTGCCTGA GTGGCTGCAGAAGAAAG GACTCTGGGGCGAGTAC AAGGACACAGTGGAAAA CTTCAAGAAGTTCACCAC CTACTTCAGCGGCTTCCA CGAGAACCGGAAGAACA TGTACACCGCCGAGGCTC AGAGCACCGCTATCGCC AACAGACTGATGAACGA CAACCTGCCTAAGTTCTT TAACAACTACCTGGCCTA CCAGACCATCAAAGAGA AGCACCCCGACCTGGTGT TCAGACTGGATGATGCTC TGCTGCAGGCCGCTGGC GTGGAACATCTGGATGA GGCTTTCCAGCCTAGATA CTTCAGCAGACTGTTCGC CCAGAGCGGCATCACCG CTTTCAACGAGCTGATCG GCGGCAGAACCACAGAG AACGGCGAGAAGATCCA GGGCCTGAACGAGCAGA TCAACCTGTACAGACAG CAGAACCCCGAGAAGGC CAAGGGCTTCCCCAGATT CATGCCTCTGTTCAAGCA GATCCTGAGCGACAGAG AGACACACAGCTTTCTGC CCGACGCCTTCGAGAAC GACAAAGAGCTGCTCCA GGCTCTGAGAGACTACG TGGACGCCGCCACATCTG AGGAAGGCATGATCAGC CAGCTGAACAAGGCCAT GAACCAGTTCGTGACCG CCGACCTGAAGAGAGTG TACATCAAGAGCGCCGC TCTGACCAGCCTGAGCCA AGAGCTGTTCCACTTCTT CGGCGTGATCAGCGACG CTATCGCTTGGTACGCCG AGAAGAGACTGAGCCCC AAGAAGGCCCAAGAGTC TTTCCTGAAGCAAGAGGT GTACGCCATCGAGGAAC TGAACCAGGCTGTCGTG GGCTACATCGACCAGCT GGAAGATCAGAGCGAGC TGCAGCAACTGCTGGTG GACCTGCCAGATCCTCAG

【０７００】

【表６２－３８】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					AAACCCGTGTCCAGCTTC ATCCTGACACACTGGCA GAAGTCTCAAGAGCCCC TGCAGGCAGTGATCGCC AAGGTGGAACCTCTGTTC GAACTGGAAGAACTGAG CAAGAACAAGAGGGCCC CAAAGCACGACAAGGAC CAAGGCGGCGAGGGATT TCAGCAGGTCGACGCCA TCAAGAACATGCTGGAC GCCTTCATGGAAGTGTCC CACGCTATCAAGCCCCTG TACCTGGTCAAGGGAAG AAAGGCCATCGACATGC CCGACGTGGACACCGGC TTCTACGCTGATTTCGCC GAGGCCTACAGCGCCTA CGAGCAAGTGACAGTGT CCCTGTACAACAAGACC AGAAACCACCTGTCCAA GAAGCCCTTCAGCAAGG ACAAGATCAAGATCAAC TTCGACGCCCCTACACTG CTGAACGGCTGGGACCT GAACAAAGAGAGCGACA ACAAGTCCATCATCCTGC GGAAGGACGGCAACTTC TACCTGGCAATCATGCAC CCCAAGCACACCAAGGT GTTCGACTGCTACTCTGC CTCTGAGGCTGCCGGCA AGTGCTACGAGAAGATG AACTACAAGCTGCTGAG CGGCGCCAACAAGATGC TGCCTAAGGTGTTCTTTA GCAAGAAGGGCATCGAG ACATTCAGCCCTCCACAA GAAATCCTGGACCTGTAC AAGAACAACGAGCATAA GAAGGGCGCCACCTTCA AGCTGGAATCCTGCCAC AAGCTGATCGATTTCTTC AAGCGGAACATCCCCAA GTACAAGGTGCACCCTA CCGACAACTTTGGCTGGG ACGTGTTCGGCTTTCACT TCAGCCCTACCAGCAGCT ACGGCGACCTGTCTGGCT TCTACAGAGAGGTGGAA GCCCAGGGATACAAGCT GTGGTTCAGCGACGTGTC CGAGGCTTACATCAACA AATGCGTGGAAGAGGGC AAGCTGTTCCTGTTCCAA ATCTACAACAAGGACTTC TCCCCTAACTCCACCGGC

【０７０１】

【表６２－３９】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					AAGCCCAACCTGCACAC CCTGTATTGGAAGGGCCT GTTCGAGCCCGAGAACC TGAAAGACGTGGTGCTG AAGCTGAATGGCGAGGC CGAGATCTTCTACCGGAA GCACAGCATCAAGCACG AGGACAAGACCATCCAC AGAGCTAAGGACCCTAT CGCTAACAAGAACGCTG ACAACCCCAAGAAACAG AGCGTGTTCGATTACGAC ATCATCAAGGATAAGCG GTATACCCAGGACAAGT TCTTCTTCCACGTGCCAA TCAGCCTGAACTTCAAAA GCCAGGGCGTCGTGCGG TTCAACGATAAGATCAA CGGCCTGCTGGCCGCTCA GGACGATGTGCATGTGA TCGGCATCGACAGAGGC GAGAGACATCTGCTGTA CTACACCGTGGTCAACG GCAAGGGCGAAGTGGTG GAACAGGGCAGCCTGAA TCAGGTGGCCACAGATC AGGGCTACGTGGTGGAT TACCAGCAGAAGCTGCA CGCCAAAGAGAAAGAAC GCGACCAGGCCAGAAAG AACTGGTCCACCATCGA GAACATCAAAGAACTGA AGGCCGGCTACCTGAGC CAGGTGGTGCATAAGCT GGCTCAGCTGATCGTGA AGCACAACGCCATCGTG TGCCTCGAGGACCTGAAT TTCGGCTTCAAGAGGGG CAGATTCAAGGTCGAGA AACAGGTGTACCAGAAG TTCGAGAAGGCTCTGATC GACAAGCTGAACTACCT CGTGTTCAAAGAGAGAG GCGCCACACAGGCTGGC GGATACCTGAATGCTTAC CAGCTGGCCGCACCTTTC GAGAGCTTTGAGAAGCT GGGCAAGCAGACCGGCA TCCTGTACTACGTGCGGA GCGACTACACCAGCAAG ATCGACCCTGCTACCGGC TTCGTGGACTTTCTGAAG CCTAAGTACGAGAGCAT GGCCAAGAGCAAAGTGT TCTTCGAGTCCTTCGAGC GCATCCAGTGGAACCAG GCCAAAGGCTACTTCGA

【０７０２】

【表６２－４０】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GTTCGAGTTTGACTACAA GAAGATGTGCCCCAGCA GAAAGTTCGGCGACTAC AGAACCAGATGGGTCGT GTGCACCTTCGGCGACAC CCGCTACCAGAACAGAA GAAACAAGAGCAGCGGC CAGTGGGAGACAGAGAC AATCGATGTGACAGCCC AGCTGAAAGCCCTGTTCG CCGCTTACGGCATCACAT ACAATCAAGAGGATAAC ATCAAGGACGCCATTGC CGCCGTGAAGTACACCA AGTTCTACAAGCAGCTGT ACTGGCTGCTGAGACTG ACCCTGAGCCTGAGACA CAGCGTGACAGGCACCG ACGAGGATTTCATCCTGT CTCCAGTGGCCGACGAG AATGGCGTGTTCTTTGAC TCTAGGAAGGCCACCGA CAAGCAGCCTAAGGACG CTGATGCTAACGGCGCCT ACCATATCGCCCTGAAA GGCCTGTGGAATCTCCAG CAGATCAGACAGCACGA CTGGAACGTGGAAAAGC CCAAAAAGCTGAACCTC GCCATGAAGAACGAAGA GTGGTTCGGCTTCGCTCA GAAGAAGAAGTTTAGAG CCAGCGGCGGCAAGAGG CCTGCCGCTACAAAAAA AGCCGGCCAGGCCAAGA AAAAGAAGTGA
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5688	mAlb29-8-44	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*U*AAUUm UmCmUmACU*G*U*U*GU AGAUCUGUAACfGfAfUfC fGfGfGfA*fAfC*fU*fG*fG*f C*mA
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5689	mAlb29-8-50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*m G*mA*mA*mAGAUUCUC AAC*mC*mU*mU*U*UAA UUmUmCmUmACU*G*U* U*GUAGAUCUGUAACfGf AfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fG fG*fC*mA
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5690	mAlb29-8-50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*m G*mA*mA*mAGAUUCUC AAC*mC*mU*mU*U*UAA UUmUmCmUmACU*G*U* U*GUAGAUCUGUAACfGf AfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fG *mG
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5691	mAlb29-8-51b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*m G*mA*mA*mAGAUUCUC AAC*mC*mU*mU*U*UAA UUmUmCmUmACU*G*U* U*GUAGAUCUGUAACGA UCGGGAAC*U*mG*mG

【０７０３】

【表６２－４１】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5692	mAlb29-8-52b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCUGUAACGfAUfCGfGGfA*A*fCU*fG*mG
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5693	mAlb29-8-53b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCUGUAACfGfAfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fG*mG
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5694	mAlb29-8-54b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCUGUAACGAUCGGGAAC*U*mG*mG
ガイド修飾化学物質	5695	化学物質44(22ntスペーサー)	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*U*AAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUNNNNNNfNfNfNfNfNfNfNfN*fNfN*fN*fN*fN*mN
ガイド修飾化学物質	5696	化学物質50(22ntスペーサー)	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUNNNNNNNfNfNfNfNfNfNfNfN*fN*fNfN*fN*mN
ガイド修飾化学物質	5697	化学物質50(20ntスペーサー)	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUNNNNNNNfNfNfNfNfNfNfNfN*fN*fN*mN
ガイド修飾化学物質	5698	化学物質51(20ntスペーサー)	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUNNNNNNNNNNNNNNNN*N*mN*mN
ガイド修飾化学物質	5699	化学物質52(20ntスペーサー)	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUNNNNNNNNfNNfNNfNNfN*N*fNN*fN*mN

【０７０４】

【表６２－４２】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
ガイド修飾化学物質	5700	化学物質 53(20nt スペーサー)	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUNNNNNNNfNfNfNfNfNfNfNfNfNfN*fN*fN*mN
ガイド修飾化学物質	5701	化学物質 54(20nt スペーサー)	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUNNNNNNNNNNNNNNNNNN*N*mN*mN
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5702	mAlb29-8-37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCUGUAACfGfAfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fGfG*fC*mA
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5703	mAlb29-12-44	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*U*AAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUAGUGUAGfCfAfGfAfGfAfGfG*fAfA*fC*fC*fA*fU*mU
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5704	mH29-29-50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fA*fA*fU*mC
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5705	mH29-29-50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fA*mA
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5706	mH29-29-51b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGAGAAAAUGCC*A*mA*mA
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5707	mH29-29-52b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGAfGAfAAfAUfG*C*fCA*fA*mA
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5708	mH29-29-53b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fA*mA

【０７０５】

【表６２－４３】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5709	mH29-29-54b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGAGAAAAUGCC*A*mA*mA
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5710	mH29-29.1_37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfG*fCfC*fA*fA*mA
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5711	mH29-29.2_37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfG*fC*fC*fA*fA*mA
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 CRISPRアレイ	5712	mAlb29-g8-37-アレイ	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mC*UAAGACCUmU*mA*mC*U*U*AAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCUGUAACfGfAfUfCfGfGfGfA*fAfC*fU*fG*fG*fC*mAUCUUCAGUCUAAGACCUmU*mA*mC*U*U*AAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCUGUAACfGfAfUfCfGfGfGfA*fAfC*fU*fG*fG*fC*mAUCU*mU*mC*mA
ヒトアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5713	hA29-87-37B	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCGCACUAfAfGfGfAfAfAfGfU*fGfC*fA*fA*mA
ヒトアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5714	hA29-78-37B	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUUUUGCGfCfAfCfUfAfAfGfG*fAfA*fA*fG*mU
ヒトアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5715	hA29-74-37B	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUAAUAAAGfCfAfUfAfGfUfGfC*fAfA*fU*fG*mG
ヒトアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5716	hA29-83-37B	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUGAGAUCfAfAfCfAfGfCfAfC*fAfG*fG*fU*mU

【０７０６】

【表６２－４４】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
ヒトアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5717	hA29-84-37B	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCACUUUCfCfUfUfAfGfUfGfC*fGfC*fA*fA*mA
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5718	hH29-4_37b	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCCCAGAfCfCfUfGfUfAfAfU*fAfG*fU*fC*mA
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5719	hH29-21_37b	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUGGACAGAfGfGfGfUfCfAfGfC*fAfU*fG*fC*mC
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5720	hH29-23_37b	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUCAGCCUfGfUfCfAfGfUfCfC*fCfU*fG*fG*mG
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5721	hH29-41_37b	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUAUCUUfCfCfCfAfGfCfUfG*fAfU*fA*fG*mA
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5722	hH29-4_50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCCCAGAfCfCfUfGfUfAfAfUfAfG*fU*fCfA*fU*mA
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5723	hH29-21_50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUGGACAGAfGfGfGfUfCfAfGfCfAfU*fG*fCfC*fA*mA
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5724	hH29-23_50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUCAGCCUfGfUfCfAfGfUfCfCfCfU*fG*fGfG*fA*mA
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5725	hH29-41_50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUAUAUCUUfCfCfCfAfGfCfUfGfAfU*fA*fGfA*fU*mG
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5726	hH29-4_50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCCCAGAfCfCfUfGfUfAfAfU*fAfG*fU*fC*mA

【０７０７】

【表６２－４５】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5727	hH29-21_50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUGGACAGAfGfGfGfUfCfAfGfC*fAfU*fG*fC*mC
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5728	hH29-23_50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUCAGCCUfGfUfCfAfGfUfCfC*fCfU*fG*fG*mG
ヒトHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5729	hH29-41_50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUAUAUCUUfCfCfCfAfGfCfUfG*fAfU*fA*fG*mA
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5730	mH29-1-50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCCCAGAfCfCfUfGfUfAfAfUfAfG*fU*fCfA*fU*mA
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5731	mH29-15-50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUGACUGUfGfGfAfCfAfCfCfCfCfU*fU*fAfC*fC*mU
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5732	mH29-1-50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCCCAGAfCfCfUfGfUfAfAfUfAfG*fU*fC*mA
マウスHAO1を標的とするMG29-1 sgRNA	5733	mH29-15-50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUGACUGUfGfGfAfCfAfCfCfCfCfU*fU*fA*mC
マウスアルブミンを標的とするSpCas9 sgRNA	5734	mAlbR1ガイドRNA	ヌクレオチド	N.A.	mU*mU*mA*GUAUAGCAUGGUCGAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U

【０７０８】

【表６２－４６】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
マウスアルブミンを標的とするSpCas9 sgRNA	5735	mAlbR2ガイドRNA	ヌクレオチド	N.A.	mU*mU*mC*CUGUAACG AUCGGGAACGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U
マウスアルブミンを標的とするSpCas9 sgRNA	5736	mAlbR3ガイドRNA	ヌクレオチド	N.A.	mU*mG*mC*CAGUUCCCG AUCGUUACGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCm U*mU*mU*U
PCRプライマー	5737	mAlb90F PCRプライマー	ヌクレオチド	N.A.	CTCCTCTTCGTCTCCGGC
PCRプライマー	5738	mAlb1073R PCRプライマー	ヌクレオチド	N.A.	CTGCCACATTGCTCAGCA C
PCRプライマー	5739	mAlb282F PCRプライマー	ヌクレオチド	N.A.	TTGCATCTGAGAACCCTT AGG
PCRプライマー	5740	mAlb460F PCRプライマー	ヌクレオチド	N.A.	GCCTGCTCGACCATGCTA TA
マウスアルブミンを標的とするSpCas9 sgRNA	5741	広範な化学修飾を有するmAlbR2ガイドRNA	ヌクレオチド	N.A.	mU*mU*mC*CUGUAACG AUCGGGAACGUUUUAGA mGmCmUmAGAAAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCmA mAmCmUmUGAAAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*U
SpCas9 DNA配列	5742	spCas9インビトロ転写のための鋳型DNA	ヌクレオチド	N.A.	GCGGCCGCTAATACGAC TCACTATAAGAAAAGCC AGCTCCAGCAGGCGCTG CTCACTCCTCCCCATCCT CTCCCTCTGTCCCTCTGT CCCTCTGACCCTGCACTG TCCCAGCACCATGGCCCC CAAGAAGAAGCGGAAAG TTGGCGGCGGAGGCAGC GACAAGAAGTACTCTAT CGGCCTGGACATCGGCA CCAACTCTGTTGGATGGG CCGTGATCACCGACGAG TACAAGGTGCCCAGCAA GAAATTCAAGGTGCTGG GCAACACCGACCGGCAC AGCATCAAGAAGAATCT GATCGGCGCCCTGCTGTT CGACTCTGGCGAAACAG CCGAAGCCACCAGACTG AAGAGAACCGCCAGACG GCGGTACACCAGAAGAA AGAACCGGATCTGCTAC

【０７０９】

【表６２－４７】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					CTGCAAGAGATCTTCAGC AACGAGATGGCCAAGGT GGACGACAGCTTCTTCCA CAGACTGGAAGAGTCCT TCCTGGTGGAAGAGGAC AAGAAGCACGAGCGGCA CCCCATCTTCGGCAACAT CGTGGATGAGGTGGCCT ACCACGAGAAGTACCCC ACCATCTACCACCTGAGA AAGAAACTGGTGGACAG CACCGACAAGGCCGACC TGAGACTGATCTATCTGG CCCTGGCTCACATGATCA AGTTCCGGGGCCACTTCC TGATCGAGGGCGACCTG AATCCTGACAACAGCGA CGTGGACAAGCTGTTCAT CCAGCTGGTGCAGACCT ACAACCAGCTGTTCGAG GAAAACCCCATCAACGC CAGCGGAGTGGATGCCA AGGCCATCCTGTCTGCCA GACTGAGCAAGAGCAGA CGGCTGGAAAACCTGAT CGCTCAGCTGCCCGGCG AGAAGAAGAATGGCCTG TTCGGCAACCTGATTGCC CTGAGCCTGGGCCTGAC ACCTAACTTCAAGAGCA ACTTCGACCTGGCCGAG GACGCCAAACTGCAGCT GTCCAAGGACACCTACG ACGACGACCTGGACAAT CTGCTGGCCCAGATCGGC GATCAGTACGCCGACTTG TTTCTGGCCGCCAAGAAC CTGTCCGACGCCATCCTG CTGAGCGACATCCTGAG AGTGAACACCGAGATCA CAAAGGCCCCTCTGAGC GCCTCTATGATCAAGAG ATACGACGAGCACCACC AGGATCTGACCCTGCTGA AGGCCCTCGTTAGACAG CAGCTGCCTGAGAAGTA CAAAGAGATTTTCTTCGA CCAGAGCAAGAACGGCT ACGCCGGCTACATTGATG GCGGAGCCAGCCAAGAG GAATTCTACAAGTTCATC AAGCCCATCCTCGAGAA GATGGACGGCACCGAGG AACTGCTGGTCAAGCTG AACAGAGAGGACCTGCT GCGGAAGCAGCGGACCT TCGACAATGGCTCTATCC

【０７１０】

【表６２－４８】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					CTCACCAGATCCACCTGG GAGAGCTGCACGCCATT CTGCGGAGACAAGAGGA CTTTTACCCATTCCTGAA GGACAACCGGGAAAAGA TTGAGAAGATCCTGACCT TCAGGATCCCCTACTACG TGGGACCACTGGCCAGA GGCAATAGCAGATTCGC CTGGATGACCAGAAAGA GCGAGGAAACCATCACA CCCTGGAACTTCGAGGA AGTGGTGGACAAGGGCG CCAGCGCTCAGTCCTTCA TCGAGCGGATGACCAAC TTCGATAAGAACCTGCCT AACGAGAAGGTGCTGCC CAAGCACAGCCTGCTGT ACGAGTACTTCACCGTGT ACAACGAGCTGACCAAA GTGAAATACGTGACCGA GGGAATGAGAAAGCCCG CCTTTCTGAGCGGCGAGC AGAAAAAGGCCATTGTG GATCTGCTGTTCAAGACC AACCGGAAAGTGACCGT GAAGCAGCTGAAAGAGG ACTACTTCAAGAAAATC GAGTGCTTCGACAGCGT GGAAATCAGCGGCGTGG AAGATCGGTTCAATGCC AGCCTGGGCACATACCA CGACCTGCTGAAAATTAT CAAGGACAAGGACTTCC TGGACAACGAAGAGAAC GAGGACATCCTGGAAGA TATCGTGCTGACCCTGAC ACTGTTTGAGGACAGAG AGATGATCGAGGAACGG CTGAAAACATACGCCCA CCTGTTCGACGACAAAGT GATGAAGCAACTGAAGC GGCGGAGATACACCGGC TGGGGCAGACTGTCTCG GAAGCTGATCAACGGCA TCCGGGATAAGCAGTCC GGCAAGACCATCCTGGA CTTTCTGAAGTCCGACGG CTTCGCCAACAGAAACTT CATGCAGCTGATCCACG ACGACAGCCTGACCTTTA AAGAGGATATCCAGAAA GCCCAGGTGTCCGGCCA GGGCGATTCTCTGCATGA GCACATTGCCAACCTGGC CGGCTCTCCCGCCATTAA GAAGGGCATTCTGCAGA

【０７１１】

【表６２－４９】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					CAGTGAAGGTGGTGGAC GAGCTGGTCAAAGTCAT GGGCAGACACAAGCCCG AGAACATCGTGATCGAA ATGGCCAGAGAGAACCA GACCACACAGAAGGGCC AGAAGAACAGCCGCGAG AGAATGAAGCGGATCGA AGAGGGCATCAAAGAGC TGGGCAGCCAGATCCTG AAAGAACACCCCGTGGA AAACACCCAGCTGCAGA ACGAGAAGCTGTACCTG TACTACCTCCAGAACGGC CGGGATATGTACGTGGA CCAAGAGCTGGACATCA ACCGGCTGTCCGACTACG ATGTGGACCATATCGTGC CCCAGTCTTTTCTGAAGG ACGACTCCATCGACAAC AAGGTCCTGACCAGATC CGACAAGAATCGGGGCA AGAGCGACAACGTGCCC TCCGAAGAGGTGGTCAA GAAGATGAAGAACTACT GGCGACAGCTGCTGAAC GCCAAGCTGATTACCCA GCGGAAGTTCGATAACC TGACCAAGGCCGAGAGA GGCGGCCTGTCTGAACTG GATAAGGCCGGCTTCATC AAGAGACAGCTGGTGGA AACCCGGCAGATCACCA AACACGTGGCACAGATT CTGGACTCCCGGATGAA CACTAAGTACGACGAGA ATGACAAGCTGATCCGG GAAGTGAAAGTGATCAC CCTGAAGTCCAAGCTGGT GTCCGATTTCCGGAAGG ATTTCCAGTTCTACAAAG TGCGCGAGATCAACAAC TACCATCACGCCCACGAC GCCTACCTGAATGCCGTT GTTGGAACAGCCCTGATC AAGAAGTATCCCAAGCT GGAAAGCGAGTTCGTGT ACGGCGACTACAAGGTG TACGACGTGCGGAAGAT GATCGCCAAGAGCGAGC AAGAGATTGGCAAGGCT ACCGCCAAGTACTTTTTC TACAGCAACATCATGAA CTTTTTCAAGACCGAGAT TACCCTGGCCAACGGCG AGATCAGAAAGCGGCCT CTGATCGAGACAAACGG

【０７１２】

【表６２－５０】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					CGAAACCGGCGAGATTG TGTGGGATAAGGGCAGA GACTTTGCCACAGTGCGG AAAGTGCTGAGCATGCC CCAAGTGAATATCGTGA AGAAAACCGAGGTGCAG ACAGGCGGCTTCAGCAA AGAGTCCATTCTGCCCAA GAGAAACAGCGATAAGC TGATCGCCCGGAAGAAG GACTGGGACCCTAAGAA GTACGGCGGCTTCGATA GCCCTACCGTGGCCTATT CTGTGCTGGTGGTGGCCA AAGTGGAAAAGGGCAAG TCCAAGAAACTCAAGAG CGTGAAAGAGCTGCTGG GGATCACCATCATGGAA AGAAGCAGCTTCGAGAA GAATCCTATCGATTTCCT CGAGGCCAAGGGCTACA AAGAAGTGAAAAAGGAC CTGATCATCAAGCTCCCC AAGTACTCCCTGTTCGAG CTGGAAAATGGCCGGAA GCGGATGCTGGCTTCTGC TGGCGAACTGCAGAAGG GAAACGAACTGGCCCTG CCTAGCAAATATGTGAA CTTCCTGTACCTGGCCAG CCACTATGAGAAGCTGA AGGGCAGCCCCGAGGAC AATGAGCAAAAGCAGCT GTTTGTGGAACAGCACA AGCACTACCTGGACGAG ATCATCGAGCAGATCAG CGAGTTCTCCAAGAGAG TGATCCTGGCCGACGCTA ATCTGGACAAAGTGCTGT CCGCCTACAACAAGCAC CGGGACAAGCCTATCAG AGAGCAGGCCGAGAATA TCATCCACCTGTTTACCC TGACCAATCTGGGAGCC CCTGCCGCCTTCAAGTAC TTCGACACCACCATCGAC CGGAAGCGCTACACCAG CACCAAAGAGGTGCTGG ACGCCACACTGATCCACC AGTCTATCACCGGCCTGT ACGAGACACGGATCGAC CTGTCTCAGCTCGGAGGC GATTCTGGCGGAAAAAG ACCTGCCGCCACAAAGA AAGCCGGACAGGCCAAG AAAAAGAAGTGACCACA CCCCCATTCCCCCACTCC

【０７１３】

【表６２－５１】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					AGATAAAGCTTCAGTTAT ATCTCACGTGTCTGGAGT TAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAG AAGAGCCCTGCAGG
SpCas9 タンパク質配列	5743	核局在化シグナルを含む mRNA にコードされる spCas9 のアミノ酸配列	タンパク質	N.A.	MAPKKKRKVGGGGSDKK YSIGLDIGTNSVGWAVITD EYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAE ATRLKRTARRRYTRRKNR ICYLQEIFSNEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHER HPIFGNIVDEVAYHEKYPT IYHLRKKLVDSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIE GDLNPDNSDVDKLFIQLV QTYNQLFEENPINASGVD AKAILSARLSKSRRLENLI AQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAK LQLSKDTYDDDLDNLLAQ IGDQYADLFLAAKNLSDAI LLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKAL VRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFI KPILEKMDGTEELLVKLN REDLLRKQRTFDNGSIPHQ IHLGELHAILRRQEDFYPF LKDNREKIEKILTFRIPYYV GPLARGNSRFAWMTRKSE ETITPWNFEEVVDKGASA QSFIERMTNFDKNLPNEK VLPKHSLLYEYFTVYNEL TKVKYVTEGMRKPAFLSG EQKKAIVDLLFKTNRKVT VKQLKEDYFKKIECFDSV EISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDIL EDIVLTLTLFEDREMIEER LKTYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGI RDKQSGKTILDFLKSDGFA NRNFMQLIHDDSLTFKEDI QKAQVSGQGDSLHEHIAN LAGSPAIKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSQILKEH PVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDN KVLTRSDKNRGKSDNVPS

【０７１４】

【表６２－５２】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					EEVVKKMKNYWRQLLNA KLITQRKFDNLTKAERGG LSELDKAGFIKRQLVETRQ ITKHVAQILDSRMNTKYD ENDKLIREVKVITLKSKLV SDFRKDFQFYKVREINNY HHAHDAYLNAVVGTALIK KYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIAKSEQEIGKATAK YFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIV WDKGRDFATVRKVLSMP QVNIVKKTEVQTGGFSKE SILPKRNSDKLIARKKDW DPKKYGGFDSPTVAYSVL VVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPK YSLFELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFL YLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQI SEFSKRVILADANLDKVLS AYNKHRDKPIREQAENIIH LFTLTNLGAPAAFKYFDTT IDRKRYTSTKEVLDATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGD SGGKRPAATKKAGQAKK KK
マウスアルブミンを標的とするMG29-1 sgRNA	5744	mAlb29-8-50 ガイドRNA	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUC AAC*mC*mU*mU*U*UAA UUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCUGUAACfGfAfUfCfGfGfGfAfAfC*fU*fGfG*fC*mA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5788	hH29-1	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGCAUGUUGUUCAUAAUCAUUGA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5789	hH29-2	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGAAGUACUGAUUUAGCAUGUUG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5790	hH29-3	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUAUCAAUGAUUAUGAACAACAU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5791	hH29-4	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCCCCAGACCUGUAAUAGUCAUA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5792	hH29-5	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUCAUCAUUUGCCCCAGACCUG

【０７１５】

【表６２－５３】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5793	hH29-6	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUACCUGGAAAAUGCUGCAAUA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5794	hH29-7	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCUUACCUGGAAAAUGCUGCAAU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5795	hH29-8	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGCUGAUAAUAUUGCAGCAUUUU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5796	hH29-9	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAAAAUAAAUUUUCUUACCUGG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5797	hH29-10	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAAAAAUAAAUUUUCUUACCUG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5798	hH29-11	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUUUUAUUUUUUAAUUCUAGAU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5799	hH29-12	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUUUAUUUUUUAAUUCUAGAUG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5800	hH29-13	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUUUUUUAAUUCUAGAUGGAAG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5801	hH29-14	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUUUUUAAUUCUAGAUGGAAGC
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5802	hH29-15	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUAAUUCUAGAUGGAAGCUGUA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5803	hH29-16	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUAAUUCUAGAUGGAAGCUGUAU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5804	hH29-17	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAUUCUAGAUGGAAGCUGUAUC
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5805	hH29-18	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUUCUAGAUGGAAGCUGUAUCC

【０７１６】

【表６２－５４】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5806	hH29-19	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAGCAACAUUCCGGAGCAUCCUU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5807	hH29-20	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAGGACAGAGGGUCAGCAUGCCA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5808	hH29-21	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGGACAGAGGGUCAGCAUGCCAA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5809	hH29-22	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUUCUCAGCCUGUCAGUCCCUG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5810	hH29-23	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUCAGCCUGUCAGUCCCUGGGAA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5811	hH29-24	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUGACAGUGGACACACCUUACCU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5812	hH29-25	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAUCUGUUACGCACAUCAUCCA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5813	hH29-26	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUGCAUUUCUUAUUUUAGGAUG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5814	hH29-27	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUGCAUUUCUUAUUUUAGGAUGA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5815	hH29-28	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUUAUUUUAGGAUGAAAAAUUUU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5816	hH29-29	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAGGAUGAAAAAUUUUGAAACCA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5817	hH29-30	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGGAUGAAAAAUUUUGAAACCAG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5818	hH29-31	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCUCAGGAGAAAAUGAUAAAGUA

【０７１７】

【表６２－５５】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5819	hH29-32	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCCUCAGGAGAAAAUGAUAAAGU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5820	hH29-33	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGAAACCAGUACUUUAUCAUUUU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5821	hH29-34	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAAACCAGUACUUUAUCAUUUUC
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5822	hH29-35	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUCAUUUUCUCCUGAGGAAAAUU
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5823	hH29-36	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCUCCUGAGGAAAAUUUUGGAGA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5824	hH29-37	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUUCCUGAGGAAAAUUUUGGAGAC
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5825	hH29-38	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGCCACAUAUGCAGCAAGUCCAC
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5826	hH29-39	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGGAGACGACAGUGGACUUGCUG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5827	hH29-40	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUGAGACGACAGUGGACUUGCUGC
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5828	hH29-41	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUAUAUCUUCCCAGCUGAUAGAUG
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5829	hH29-42	ヌクレオチド	N.A.	UAAUUUCUACUGUUGUAGAUCAACAAUUGGCAAUGAUGUCAG
MG29-1メッセンジャーRNAをコードするDNA配列	5830	MG29-1メッセンジャーRNAをコードするDNA配列	ヌクレオチド	N.A.	AAAAGCCAGCTCCAGCAGGCGCTGCTCACTCCTCCCCATCCTCTCCCTCTGTCCCTCTGTCCCTCTGACCCTGCACTGTCCCAGCACCATGGCCCCTAAGAAGAAG

【０７１８】

【表６２－５６】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					AGAAAAGTCGGCGGAGG CGGCAGCTTCAACAACTT CATCAAGAAGTACAGCC TGCAGAAAACCCTGCGC TTCGAGCTGAAGCCTGTG GGCGAGACAGCCGACTA CATCGAGGACTTCAAGA GCGAGTACCTGAAGGAC ACCGTGCTGAAGGACGA GCAGAGAGCCAAGGACT ACCAAGAGATCAAGACC CTGATCGACGATTACCAC CGCGAGTACATCGAAGA GTGCCTGAGAGAACCCG TGGACAAGAAAACCGGC GAGATCCTGGACTTCACC CAGGACCTGGAAGATGC CTTCAGCTACTACCAGAA GCTGAAAGAGAACCCCA CCGAGAACAGAGTCGGC TGGGAGAAAGAGCAAGA GAGCCTGAGGAAGAAGC TGGTCACCTCCTTCGTGG GCAACGACGGCCTGTTC AAGAAAGAGTTCATCAC CAGGGACCTGCCTGAGT GGCTGCAGAAGAAAGGA CTCTGGGGCGAGTACAA GGACACAGTGGAAAACT TCAAGAAGTTCACCACCT ACTTCAGCGGCTTCCACG AGAACCGGAAGAACATG TACACCGCCGAGGCTCA GAGCACCGCTATCGCCA ACAGACTGATGAACGAC AACCTGCCTAAGTTCTTT AACAACTACCTGGCCTAC CAGACCATCAAAGAGAA GCACCCCGACCTGGTGTT CAGACTGGATGATGCTCT GCTGCAGGCCGCTGGCG TGGAACATCTGGATGAG GCTTTCCAGCCTAGATAC TTCAGCAGACTGTTCGCC CAGAGCGGCATCACCGC TTTCAACGAGCTGATCGG CGGCAGAACCACAGAGA ACGGCGAGAAGATCCAG GGCCTGAACGAGCAGAT CAACCTGTACAGACAGC AGAACCCCGAGAAGGCC AAGGGCTTCCCCAGATTC ATGCCTCTGTTCAAGCAG ATCCTGAGCGACAGAGA GACACACAGCTTTCTGCC CGACGCCTTCGAGAACG ACAAAGAGCTGCTCCAG

【０７１９】

【表６２－５７】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GCTCTGAGAGACTACGT GGACGCCGCCACATCTG AGGAAGGCATGATCAGC CAGCTGAACAAGGCCAT GAACCAGTTCGTGACCG CCGACCTGAAGAGAGTG TACATCAAGAGCGCCGC TCTGACCAGCCTGAGCCA AGAGCTGTTCCACTTCTT CGGCGTGATCAGCGACG CTATCGCTTGGTACGCCG AGAAGAGACTGAGCCCC AAGAAGGCCCAAGAGTC TTTCCTGAAGCAAGAGGT GTACGCCATCGAGGAAC TGAACCAGGCTGTCGTG GGCTACATCGACCAGCT GGAAGATCAGAGCGAGC TGCAGCAACTGCTGGTG GACCTGCCAGATCCTCAG AAACCCGTGTCCAGCTTC ATCCTGACACACTGGCA GAAGTCTCAAGAGCCCC TGCAGGCAGTGATCGCC AAGGTGGAACCTCTGTTC GAACTGGAAGAACTGAG CAAGAACAAGAGGGCCC CAAAGCACGACAAGGAC CAAGGCGGCGAGGGATT TCAGCAGGTCGACGCCA TCAAGAACATGCTGGAC GCCTTCATGGAAGTGTCC CACGCTATCAAGCCCCTG TACCTGGTCAAGGGAAG AAAGGCCATCGACATGC CCGACGTGGACACCGGC TTCTACGCTGATTTCGCC GAGGCCTACAGCGCCTA CGAGCAAGTGACAGTGT CCCTGTACAACAAGACC AGAAACCACCTGTCCAA GAAGCCCTTCAGCAAGG ACAAGATCAAGATCAAC TTCGACGCCCCTACACTG CTGAACGGCTGGGACCT GAACAAAGAGAGCGACA ACAAGTCCATCATCCTGC GGAAGGACGGCAACTTC TACCTGGCAATCATGCAC CCCAAGCACACCAAGGT GTTCGACTGCTACTCTGC CTCTGAGGCTGCCGGCA AGTGCTACGAGAAGATG AACTACAAGCTGCTGAG CGGCGCCAACAAGATGC TGCCTAAGGTGTTCTTTA GCAAGAAGGGCATCGAG

【０７２０】

【表６２－５８】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					ACATTCAGCCCTCCACAA
					GAAATCCTGGACCTGTAC
					AAGAACAACGAGCATAA
					GAAGGGCGCCACCTTCA
					AGCTGGAATCCTGCCAC
					AAGCTGATCGATTTCTTC
					AAGCGGAACATCCCCAA
					GTACAAGGTGCACCCTA
					CCGACAACTTTGGCTGGG
					ACGTGTTCGGCTTTCACT
					TCAGCCCTACCAGCAGCT
					ACGGCGACCTGTCTGGCT
					TCTACAGAGAGGTGGAA
					GCCCAGGGATACAAGCT
					GTGGTTCAGCGACGTGTC
					CGAGGCTTACATCAACA
					AATGCGTGGAAGAGGGC
					AAGCTGTTCCTGTTCCAA
					ATCTACAACAAGGACTTC
					TCCCCTAACTCCACCGGC
					AAGCCCAACCTGCACAC
					CCTGTATTGGAAGGGCCT
					GTTCGAGCCCGAGAACC
					TGAAAGACGTGGTGCTG
					AAGCTGAATGGCGAGGC
					CGAGATCTTCTACCGGAA
					GCACAGCATCAAGCACG
					AGGACAAGACCATCCAC
					AGAGCTAAGGACCCTAT
					CGCTAACAAGAACGCTG
					ACAACCCCAAGAAACAG
					AGCGTGTTCGATTACGAC
					ATCATCAAGGATAAGCG
					GTATACCCAGGACAAGT
					TCTTCTTCCACGTGCCAA
					TCAGCCTGAACTTCAAAA
					GCCAGGGCGTCGTGCGG
					TTCAACGATAAGATCAA
					CGGCCTGCTGGCCGCTCA
					GGACGATGTGCATGTGA
					TCGGCATCGACAGAGGC
					GAGAGACATCTGCTGTA
					CTACACCGTGGTCAACG
					GCAAGGGCGAAGTGGTG
					GAACAGGGCAGCCTGAA
					TCAGGTGGCCACAGATC
					AGGGCTACGTGGTGGAT
					TACCAGCAGAAGCTGCA
					CGCCAAAGAGAAAGAAC
					GCGACCAGGCCAGAAAG
					AACTGGTCCACCATCGA
					GAACATCAAAGAACTGA
					AGGCCGGCTACCTGAGC
					CAGGTGGTGCATAAGCT
					GGCTCAGCTGATCGTGA
					AGCACAACGCCATCGTG
					TGCCTCGAGGACCTGAAT

【０７２１】

【表６２－５９】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					TTCGGCTTCAAGAGGGG CAGATTCAAGGTCGAGA AACAGGTGTACCAGAAG TTCGAGAAGGCTCTGATC GACAAGCTGAACTACCT CGTGTTCAAAGAGAGAG GCGCCACACAGGCTGGC GGATACCTGAATGCTTAC CAGCTGGCCGCACCTTTC GAGAGCTTTGAGAAGCT GGGCAAGCAGACCGGCA TCCTGTACTACGTGCGGA GCGACTACACCAGCAAG ATCGACCCTGCTACCGGC TTCGTGGACTTTCTGAAG CCTAAGTACGAGAGCAT GGCCAAGAGCAAAGTGT TCTTCGAGTCCTTCGAGC GCATCCAGTGGAACCAG GCCAAAGGCTACTTCGA GTTCGAGTTTGACTACAA GAAGATGTGCCCCAGCA GAAAGTTCGGCGACTAC AGAACCAGATGGGTCGT GTGCACCTTCGGCGACAC CCGCTACCAGAACAGAA GAAACAAGAGCAGCGGC CAGTGGGAGACAGAGAC AATCGATGTGACAGCCC AGCTGAAAGCCCTGTTCG CCGCTTACGGCATCACAT ACAATCAAGAGGATAAC ATCAAGGACGCCATTGC CGCCGTGAAGTACACCA AGTTCTACAAGCAGCTGT ACTGGCTGCTGAGACTG ACCCTGAGCCTGAGACA CAGCGTGACAGGCACCG ACGAGGATTTCATCCTGT CTCCAGTGGCCGACGAG AATGGCGTGTTCTTTGAC TCTAGGAAGGCCACCGA CAAGCAGCCTAAGGACG CTGATGCTAACGGCGCCT ACCATATCGCCCTGAAA GGCCTGTGGAATCTCCAG CAGATCAGACAGCACGA CTGGAACGTGGAAAAGC CCAAAAAGCTGAACCTC GCCATGAAGAACGAAGA GTGGTTCGGCTTCGCTCA GAAGAAGAAGTTTAGAG CCAGCGGCGGCAAGAGG CCTGCCGCTACAAAAAA AGCCGGCCAGGCCAAGA AAAAGAAGTGACCACAC CCCCATTCCCCCACTCCA GATAGAACTTCAGTTATA TCTCACGTGTCTGGAGTT

【０７２２】

【表６２－６０】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5831	hH29-4_37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCCCAGAfCfCfUfGfUfAfAfUfAfG*fU*fCfA*fU*mA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5832	hH29-21-37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUGGACAGAfGfGfGfUfCfAfGfCfAfU*fG*fCfC*fA*mA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5833	hH29-23-37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUUCAGCCUfGfUfCfAfGfUfCfCfCfU*fG*fGfG*fA*mA
ヒトHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5834	hH29-41-37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUAUAUCUUfCfCfCfAfGfCfUfGfAfU*fA*fGfA*fU*mG
ガイド修飾化学物質	5835	化学物質37(22ntスペーサー)	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUNNNNNNNfNfNfNfNfNfNfNfNfN*fN*fNfN*fN*mN
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5836	mH29-29-37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fAfA*fU*mC
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5837	mH29-29-44	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*U*AAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfG*fCfC*fA*fA*fA*fU*mC
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5838	mH29-29s-37	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfG*fCfC*fA*fA*mA
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5839	mH29-29s-44	ヌクレオチド	N.A.	mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfG*fC*fC*fA*fA*mA
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5840	mH29-29-50	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fAfA*fU*mC
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5841	mH29-29-50b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fA*mA

【０７２３】

【表６２－６１】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5842	mH29-29-51b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGAGAAAAUGCC*A*mA*mA
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5843	mH29-29-52b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*GAGAAUC*mG*mA*mA*mAGAUUCUCAAC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGAfGAfAAfAUfG*C*fCA*fA*mA
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5844	mH29-29-53b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGfAfGfAfAfAfAfUfGfCfC*fA*fA*mA
マウスHAO-1を標的とするMG29-1 sgRNA	5845	mH29-29-54b	ヌクレオチド	N.A.	mG*mU*mU*mG*mA*mG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mA*mC*mC*mU*mU*U*UAAUUmUmCmUmACU*G*U*U*GUAGAUCCUUAGGAGAAAAUGCC*A*mA*mA
MG29-1メッセンジャーRNAをコードするDNA配列	5846	MG29-1メッセンジャーRNAをコードするDNA配列	ヌクレオチド	N.A.	AAAAGCCAGCTCCAGCAGGCGCTGCTCACTCCTCCCCATCCTCTCCCTCTGTCCCTCTGTCCCTCTGACCCTGCACTGTCCCAGCACCATGGCCCCTAAGAAGAAGAGAAAAGTCGGCGGAGGCGGCAGCTTCAACAACTTCATCAAGAAGTACAGCCTGCAGAAAACCCTGCGCTTCGAGCTGAAGCCTGTGGGCGAGACAGCCGACTACATCGAGGACTTCAAGAGCGAGTACCTGAAGGACACCGTGCTGAAGGACGAGCAGAGAGCCAAGGACTACCAAGAGATCAAGACCCTGATCGACGATTACCACCGCGAGTACATCGAAGAGTGCCTGAGAGAACCCGTGGACAAGAAAACCGGCGAGATCCTGGACTTCACCCAGGACCTGGAAGATGC

【０７２４】

【表６２－６２】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					CTTCAGCTACTACCAGAA GCTGAAAGAGAACCCCA CCGAGAACAGAGTCGGC TGGGAGAAAGAGCAAGA GAGCCTGAGGAAGAAGC TGGTCACCTCCTTCGTGG GCAACGACGGCCTGTTC AAGAAAGAGTTCATCAC CAGGGACCTGCCTGAGT GGCTGCAGAAGAAAGGA CTCTGGGGCGAGTACAA GGACACAGTGGAAAACT TCAAGAAGTTCACCACCT ACTTCAGCGGCTTCCACG AGAACCGGAAGAACATG TACACCGCCGAGGCTCA GAGCACCGCTATCGCCA ACAGACTGATGAACGAC AACCTGCCTAAGTTCTTT AACAACTACCTGGCCTAC CAGACCATCAAAGAGAA GCACCCCGACCTGGTGTT CAGACTGGATGATGCTCT GCTGCAGGCCGCTGGCG TGGAACATCTGGATGAG GCTTTCCAGCCTAGATAC TTCAGCAGACTGTTCGCC CAGAGCGGCATCACCGC TTTCAACGAGCTGATCGG CGGCAGAACCACAGAGA ACGGCGAGAAGATCCAG GGCCTGAACGAGCAGAT CAACCTGTACAGACAGC AGAACCCCGAGAAGGCC AAGGGCTTCCCCAGATTC ATGCCTCTGTTCAAGCAG ATCCTGAGCGACAGAGA GACACACAGCTTTCTGCC CGACGCCTTCGAGAACG ACAAAGAGCTGCTCCAG GCTCTGAGAGACTACGT GGACGCCGCCACATCTG AGGAAGGCATGATCAGC CAGCTGAACAAGGCCAT GAACCAGTTCGTGACCG CCGACCTGAAGAGAGTG TACATCAAGAGCGCCGC TCTGACCAGCCTGAGCCA AGAGCTGTTCCACTTCTT CGGCGTGATCAGCGACG CTATCGCTTGGTACGCCG AGAAGAGACTGAGCCCC AAGAAGGCCCAAGAGTC TTTCCTGAAGCAAGAGGT GTACGCCATCGAGGAAC TGAACCAGGCTGTCGTG GGCTACATCGACCAGCT

【０７２５】

【表６２－６３】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					GGAAGATCAGAGCGAGC
					TGCAGCAACTGCTGGTG
					GACCTGCCAGATCCTCAG
					AAACCCGTGTCCAGCTTC
					ATCCTGACACACTGGCA
					GAAGTCTCAAGAGCCCC
					TGCAGGCAGTGATCGCC
					AAGGTGGAACCTCTGTTC
					GAACTGGAAGAACTGAG
					CAAGAACAAGAGGGCCC
					CAAAGCACGACAAGGAC
					CAAGGCGGCGAGGGATT
					TCAGCAGGTCGACGCCA
					TCAAGAACATGCTGGAC
					GCCTTCATGGAAGTGTCC
					CACGCTATCAAGCCCCTG
					TACCTGGTCAAGGGAAG
					AAAGGCCATCGACATGC
					CCGACGTGGACACCGGC
					TTCTACGCTGATTTCGCC
					GAGGCCTACAGCGCCTA
					CGAGCAAGTGACAGTGT
					CCCTGTACAACAAGACC
					AGAAACCACCTGTCCAA
					GAAGCCCTTCAGCAAGG
					ACAAGATCAAGATCAAC
					TTCGACGCCCCTACACTG
					CTGAACGGCTGGGACCT
					GAACAAAGAGAGCGACA
					ACAAGTCCATCATCCTGC
					GGAAGGACGGCAACTTC
					TACCTGGCAATCATGCAC
					CCCAAGCACACCAAGGT
					GTTCGACTGCTACTCTGC
					CTCTGAGGCTGCCGGCA
					AGTGCTACGAGAAGATG
					AACTACAAGCTGCTGAG
					CGGCGCCAACAAGATGC
					TGCCTAAGGTGTTCTTTA
					GCAAGAAGGGCATCGAG
					ACATTCAGCCCTCCACAA
					GAAATCCTGGACCTGTAC
					AAGAACAACGAGCATAA
					GAAGGGCGCCACCTTCA
					AGCTGGAATCCTGCCAC
					AAGCTGATCGATTTCTTC
					AAGCGGAACATCCCCAA
					GTACAAGGTGCACCCTA
					CCGACAACTTTGGCTGGG
					ACGTGTTCGGCTTTCACT
					TCAGCCCTACCAGCAGCT
					ACGGCGACCTGTCTGGCT
					TCTACAGAGAGGTGGAA
					GCCCAGGGATACAAGCT
					GTGGTTCAGCGACGTGTC
					CGAGGCTTACATCAACA
					AATGCGTGGAAGAGGGC

【０７２６】

【表６２－６４】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					AAGCTGTTCCTGTTCCAA ATCTACAACAAGGACTTC TCCCCTAACTCCACCGGC AAGCCCAACCTGCACAC CCTGTATTGGAAGGGCCT GTTCGAGCCCGAGAACC TGAAAGACGTGGTGCTG AAGCTGAATGGCGAGGC CGAGATCTTCTACCGGAA GCACAGCATCAAGCACG AGGACAAGACCATCCAC AGAGCTAAGGACCCTAT CGCTAACAAGAACGCTG ACAACCCCAAGAAACAG AGCGTGTTCGATTACGAC ATCATCAAGGATAAGCG GTATACCCAGGACAAGT TCTTCTTCCACGTGCCAA TCAGCCTGAACTTCAAAA GCCAGGGCGTCGTGCGG TTCAACGATAAGATCAA CGGCCTGCTGGCCGCTCA GGACGATGTGCATGTGA TCGGCATCGACAGAGGC GAGAGACATCTGCTGTA CTACACCGTGGTCAACG GCAAGGGCGAAGTGGTG GAACAGGGCAGCCTGAA TCAGGTGGCCACAGATC AGGGCTACGTGGTGGAT TACCAGCAGAAGCTGCA CGCCAAAGAGAAAGAAC GCGACCAGGCCAGAAAG AACTGGTCCACCATCGA GAACATCAAAGAACTGA AGGCCGGCTACCTGAGC CAGGTGGTGCATAAGCT GGCTCAGCTGATCGTGA AGCACAACGCCATCGTG TGCCTCGAGGACCTGAAT TTCGGCTTCAAGAGGGG CAGATTCAAGGTCGAGA AACAGGTGTACCAGAAG TTCGAGAAGGCTCTGATC GACAAGCTGAACTACCT CGTGTTCAAAGAGAGAG GCGCCACACAGGCTGGC GGATACCTGAATGCTTAC CAGCTGGCCGCACCTTTC GAGAGCTTTGAGAAGCT GGGCAAGCAGACCGGCA TCCTGTACTACGTGCGGA GCGACTACACCAGCAAG ATCGACCCTGCTACCGGC TTCGTGGACTTTCTGAAG CCTAAGTACGAGAGCAT GGCCAAGAGCAAAGTGT

【０７２７】

【表６２－６５】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
					TCTTCGAGTCCTTCGAGC GCATCCAGTGGAACCAG GCCAAAGGCTACTTCGA GTTCGAGTTTGACTACAA GAAGATGTGCCCCAGCA GAAAGTTCGGCGACTAC AGAACCAGATGGGTCGT GTGCACCTTCGGCGACAC CCGCTACCAGAACAGAA GAAACAAGAGCAGCGGC CAGTGGGAGACAGAGAC AATCGATGTGACAGCCC AGCTGAAAGCCCTGTTCG CCGCTTACGGCATCACAT ACAATCAAGAGGATAAC ATCAAGGACGCCATTGC CGCCGTGAAGTACACCA AGTTCTACAAGCAGCTGT ACTGGCTGCTGAGACTG ACCCTGAGCCTGAGACA CAGCGTGACAGGCACCG ACGAGGATTTCATCCTGT CTCCAGTGGCCGACGAG AATGGCGTGTTCTTTGAC TCTAGGAAGGCCACCGA CAAGCAGCCTAAGGACG CTGATGCTAACGGCGCCT ACCATATCGCCCTGAAA GGCCTGTGGAATCTCCAG CAGATCAGACAGCACGA CTGGAACGTGGAAAAGC CCAAAAAGCTGAACCTC GCCATGAAGAACGAAGA GTGGTTCGGCTTCGCTCA GAAGAAGAAGTTTAGAG CCAGCGGCGGCAAGAGG CCTGCCGCTACAAAAAA AGCCGGCCAGGCCAAGA AAAAGAAGTGACCACAC CCCCATTCCCCCACTCCA GATAGAACTTCAGTTATA TCTCACGTGTCTGGAGTT
MG55活性エフェクターsgRNA	6031	MG55 sgRNA	ヌクレオチド	不明	AAATATTTCATTAAGTAC CGAATTTAAAAAATAGG ATTGCAGAAAGTGCAAT TAGGCTGGTTGTGCAGCC TTAATCTGAGGGATTAAT CCACTCGGAAAGTACCTT TATTGAAAAATGAAAGG TATTCACAAC
MG55活性エフェクターPAM(5') 	6032	MG55 PAM(5')	ヌクレオチド	不明	YTn
MG91活性エフェクターsgRNA	6033	MG91-15 sgRNA1	ヌクレオチド	不明	UAGAGAAAAUUAUAUAU UAGGUUUUGUUAAGCCU AACAAUCGUUAAGUGUU CUUUGGAAUAUUGAUUG UAAAUCUAUUUUGGGAA AUGAAAAGGCAAAAAUU ACAGUUAUCAAUUAAUU GAGAAGAGUAUAGAGUC AGUUUUAUAGUACCAAA AUAUACCUUAAUUCUUU AAGAAAUUAAAUUUAAG GUAAUAACAAG

【０７２８】

【表６２－６６】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
MG91活性エフェクターsgRNA	6034	MG91-32 sgRNA1	ヌクレオチド	不明	UGCACAUCGGGUAUGUG UGGGGUCGAGUAAGGCC GACGUUGUCCGCUACAA CUUAGCCGUCGGGCGGU UGGGCAACCGAUCGGAA GCGGAACCUGGAAUAAG GCCAGGCAGCGGCACUG CCGUCAAGCGGGAAUGA AGUCCAGUAGUACGUAA CCAGUAACUUACAAAGA AAUUUGUAAGGUACUUA CAGG
MG91活性エフェクターsgRNA	6035	MG91-87 sgRNA1	ヌクレオチド	不明	GAAUUGAUGCUUCGUGC AUCUAAAAAAUAUACUGG GAAUUGUAUUCCCGAAG UGAGCGUUAAUUGGCAC AGUGGUGUCAUUGCUCA UCAAAAGAAGAAUUGGA AAAACAGCGAACUUCAU CUCGUUUCUUCACCUUU GGUGCAAGCAAAGGUAA UGAAGUGAAGGCUUUUU AGUACAAUCUCAUACCC CUAACUGUGUGAUACUA UGCCCUCGAAAGAGGGG UAAAUACAGG
MG91活性エフェクターsgRNA	6036	MG91-87 sgRNA2	ヌクレオチド	不明	UGGGAAUUGUAUUCCCG AAGUGAGCGUUAAUUGG CACAGUGGUGUCAUUGC UCAUCAAAAGAAGAAUU GGAAAAACAGCGAACUU CAUCUCGUUUCUUCACC UUUGGUGCAAGCAAAGG UAAUGAAGUGAAGGCUU UUUAGUACAAUCUCAUA CCCCUAACUGUGUGAUA CUAUGCCCUCGAAAGAG GGGUAAAUACAGG
MG91活性エフェクターPAM(5')	6037	MG91-15 PAM(5')	ヌクレオチド	不明	TtTYn
MG91活性エフェクターPAM(5')	6038	MG91-32 PAM(5')	ヌクレオチド	不明	GnYYn
MG91活性エフェクターPAM(5')	6039	MG91-87 PAM(5')	ヌクレオチド	不明	wCCC

【０７２９】

【表６２－６７】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
tracrRNAを潜在的にコードするMG91遺伝子間領域	6040	MG91-2 IG2	ヌクレオチド	不明	AAATAACATACAGAGGT TTTGTTAAGCCTCACAAT CTTAATAAATAAGTGTTC TTTGAAAATATTTAGTTG ATTGTAAATCTATTTTGG GAAATAAAAAAACAAAA ATTACAGTTATTAGTTAA CTAAGAAGAGTATAGAG TTAGTTTTAAAGTACCAA AATATACCCTAAATTATT GTTTTTCAAAACTTTATA GAATATAT
tracrRNAを潜在的にコードするMG91遺伝子間領域	6041	MG91-10 IG1	ヌクレオチド	不明	TATGGCGTGTAATCACCT GGGAATGAAATAAAAAG GCCATGATTTGCATACTC GGAGACCTGCTCTATACT CCCATTCCCGAAGGAACT GACTGTTATTTTTGCATT CTACCATTCTGCATAATC GTTTGTCGCACCAGCCGC CCACTGGCATTAGCTTAA CGTACGCAAGGCCTGAC AACACCTTTATGTCGCAA ATATACGAATTATTATTG AAAGTGCGTACAGAATT CAGAATGAAAGTGCTAT ACTTTAACAGTATTTATC CAAAACGTTTAATATCTT ACACATCAATTCATGTTT GTAAATCACATTTCATTT ATTAATCAGACCTGTTTA ACGTAGTAACAAGAACG AAATTACTGACTTTCAAT CTGCCTTCTATATGATAG CAGAAAAATTCTCTAGA GAATTTCTTCCTGTATAA CTAAGTAGCAAATGCTAT ATCACTTAGTAAGGACA AAATTCTCTAGAGAATTT CTTTACTACTCTACAGCT AAGAAATGAGGAACAAC AGACTGGGTTTTACTTTA TAACCGATAGAGATGGA ACGGGTGAGTGTCGGAA GATGTTTAAATCAAGATT ATCGAGAAATAATTGGC ATTCTCAGGAGTATTTAC TAAATTTGCACGAAAAT ACGAAAAGCATT
tracrRNAを潜在的にコードするMG91遺伝子間領域	6042	MG91-52 IG1	ヌクレオチド	不明	GATATAAAGAGGCATTG TCAGGCCTCGCGGACGTT AAGCTAATGCCGGTGGG CGGCTGGTCCGACGAATT GGTGAGTGGAAGAGGAA TGCGAAAATGACAGTCA CCCTCGTAAGAGGGCTG AGTTATAGAGTATATCCG CGAGTACGCAAGCCGTG ACTACATACTGGCATTGA GCCAGTTAGACATTATGA

【０７３０】

【表６２－６８】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
tracrRNA を潜在的にコードする MG91 遺伝子間領域	6043	MG91-61 IG2	ヌクレオチド	不明	TAATTAAGGTTGTGATCT TTATGATTGAGATTGCAA CCTTTTTTTAAAAAAATA TGCAACAAAACGCCCCA AAACGCATCATTTAGGG GTGTTAGGGTCTTGAATT TGTTAAATCAAGACTTTT ATTTTGAATATTTTGGCT CCACAAGGGAATTTTCGC AATTTTGCACTGCACACC AGCAATGGCGTGTGGGG GCTTGTAGGCCCGACGC ATCCTCGCTTTAAAACTC AGCCATCGGGCGGTTAT GGGGAGCTGAACGGAAA CGGAAATGGGAATAAGA CAATGCAGCGCAAGCAG AGCGTGGATGAAGTCTC AGAGTACGCGACCATTG ACTTGCAAAAAGTGATCT TTGACCAACTGAAGGGT GTAATACACACCGCTGTA AGGCAAATACAGGCTGC AGACTGGCCATCCCAGA ATACAATAA
tracrRNA を潜在的にコードする MG91 遺伝子間領域	6044	MG91-69 IG2	ヌクレオチド	不明	TAAAAAAAGATATTAGG TTTTGTTAAGCCTAACAA TCGTTAAGTGTTCTTTGG AATATTGATTGTAAATCT ATTTTGGGAAATAAAAA AGCAAAAATTACAGTTA TCAGTTTACTGAGAAGA GTATAGAGTTAGTTTTAA AGTACCAAAATATACCCT AAATTATTGTTTTTCAAA ACTTTATAGAATATAT
tracrRNA を潜在的にコードする MG91 遺伝子間領域	6045	MG91-94 IG1	ヌクレオチド	不明	CCGTAGTGCATAATCACC TGAGAATGAATGAAAAA GGCCATGATATGCATACT TGGGGACTTGCTCTATAC TCCCATTCCCGAAGGAAT TGACTGTTATTTTTGCAT TCCACCATTCTGCAAATC GTTTGTCGCACCAGCCGC CCACTGGCATTAAGCTTA ACGTGCGCAAGGCCTGA CAACACCTTTATGGGTGC AAAGATACTAAAAGTTTT CAAAAGAAGATAGGGAA AAGAGAAAAAACTTCAA ATCCATTTTGGCGTTGCA GCGTTGCAGTGTTGCAGT TCCAAAATAGATTCTGCG ATAGTCAAAAAATAACT CTATATTTAATAAATATA GAAGTATT

【０７３１】

【表６２－６９】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
tracrRNAを潜在的にコードするMG91遺伝子間領域	6046	MG91-101 IG2	ヌクレオチド	不明	TTCAGGAATTCAAAGATC ACCTTTTTTGCAAGTTAC TGGTCACGTACTACTGGA CTTCATTCCTGCTTGACG GCAGTGCCGCTGCATGG CCTTATTCCAGGTTCCGC TTCCGATTGGCTGCCCAA CCGCCCGACGGCTAAGTT GTAGCGGACAGCGTTGG CCCTACAAGACCCCACA CATTCCCGATGTGCATTG CAAAGTTCGGGAATGAT ATCGAGAAAGGCAAAAT CTGGCAAAACTTTGTCTT GATTTAACACATTTATGA TTTTTCCGGCGAAAAAAT GGTCGCGAAAAATGTCA TCCAGGATATATGAAGA CTCCAGCGGAAAAAGGT TTAACGCCGTTGTAAACT TAGTTTTCTTTGGAGTAA ACAGGGTAACCTCTTGTG GAAATTCGGACAGGATG AGTGTTGATTGCTTTATC CGGATGTTATTTTGCTAT AGTATTT
tracrRNAを潜在的にコードするMG91遺伝子間領域	6047	MG91-107 IG2	ヌクレオチド	不明	GTATAAACACTATTGGAC TGTGACAAATAAAGTTA GGATAGGATGTTCTTACT TTAAATAGTATTTGCTAT CGTTCAAAAAGGCAAGA TAGCCATTTTTACATGAT AACATTCTGCTTTATTTC ATCACATCTTTGTTTTAG CAATGGCAATTGTTTGCC ATTAACGCTAAGATTGG ATTACAAATCCATATTTC T
tracrRNAを潜在的にコードするMG91遺伝子間領域	6048	MG91-155 IG1	ヌクレオチド	不明	CCTATGGTTGGTAATCAC CTAGGAATGAATAAAAA GACTATGATAAGCATACT CGGGGACTTGCTCTATAC TCCCGTTCTCGAAGGAAC TGACTGTTATTTTTGCAT TCCACCATTCTGCAAATC GTTTGTCGGACCAGCCGC CCACTGGCATTAGCTTGA CGTCCGCAAGGCCTAAC AACGCCTTTCTTTTGCAA ATATACGGATTTATATTT CTTTCACAAAATTAATGA GGAACTTTTTCATATTCC TTTTGTCCATCTGTTACT GCCACATGATTTTTCGTA GGAAAGACCTTGGAGGC GGATGGATTGAAA

【０７３２】

【表６２－７０】

触媒	配列番号	説明	タイプ	生物	配列
tracrRNAを潜在的にコードするMG91遺伝子間領域	6049	MG91-201 IG2	ヌクレオチド	不明	ATATATTCTATAAAGTTTTGAAAAACAATAATTTAGGGTATATTTTGGTACTTTAAAACTAACTCTATACTCTTCTTAGTTAACTAATAACTGTAATTTTTGTTTTTTTATTTCCCAAAATAGATTTACAATCAACTAAATATTTCAAAGAACACTTAATTATTAAGATTGTGAGGCTTAACAAAACCTCTGTATGTTATTTTTT
MG91 CRISPR反復	6050	MG91-2反復	ヌクレオチド	不明	GGTAGATATACCTATTAAAGTTAGGGTACTAACAAG
MG91 CRISPR反復	6051	MG91-10反復	ヌクレオチド	不明	GGTGTTAATCACCCGGAAATGTAGGCTATTGACAGG
MG91 CRISPR反復	6052	MG91-52反復	ヌクレオチド	不明	GGTGTAAGACACCTGGAAATGTAAGGCATTGACAGG
MG91 CRISPR反復	6053	MG91-61反復	ヌクレオチド	不明	CCTGTATTTGGCTTACAAATTAGGATGATTAACACC
MG91 CRISPR反復	6054	MG91-69反復	ヌクレオチド	不明	GGTGTATATACCTAATAAAGTTAGGGTACTAACAAG
MG91 CRISPR反復	6055	MG91-94反復	ヌクレオチド	不明	GGTGTTAATCACCCGAAAATGTAGGTCATTGACAGGA
MG91 CRISPR反復	6056	MG91-101反復	ヌクレオチド	不明	GGGTGTTACACACCCGAATTTGCAAGGTACTTACAGG
MG91 CRISPR反復	6057	MG91-107反復	ヌクレオチド	不明	CCTGTATGTGACTTTGAAATATAGGGTAGTTACAAG
MG91 CRISPR反復	6058	MG91-155反復	ヌクレオチド	不明	GGTGTTAATCACCCAGAAATGTAGACTATTAACAGG
MG91 CRISPR反復	6059	MG91-201反復	ヌクレオチド	不明	GCTGTATATGCCTAATAAAGTTAGGGTACTAACAAGAA

ｍＮ：２’－メチル修飾塩基Ｎ；ｆＮ：２’－フルオロ修飾塩基Ｎ；＊：ホスホロチオエート結合；Ｎ：標準リボヌクレオチド塩基

【０７３３】

本発明の好ましい実施形態は本明細書に示され、記載されるが、このような実施形態が、例示の目的でのみ提供されることは、当業者には明らかであろう。本発明は、本明細書内で提供される特定の実施例によって限定されることは意図されていない。本発明は前述の説明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説明は、限定された意味で解釈されることを意図していない。多数の変形、変更、及び置換は、ここで、本発明から逸脱することなく、当業者にとって生じるであろう。更に、本発明の全ての態様は、様々な条件及び変数に依存する、本明細書に記載される特定の描写、構成又は相対的割合に限定されないことが理解されよう。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する

様々な代替が、本発明の実施に用いられ得ることは、理解されるべきである。したがって、本発明は、こうした任意の代替、修正、変形、又は均等物も包含することが企図される。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲、及びそれによって包含されるこれらの請求の範囲及びそれらの均等物内のその方法及び構造を定義することが意図される。

【０７３４】

実施形態

以下の実施形態は、いかなる方法でも限定することを意図するものではない。

１．操作されたヌクレアーゼ系であって、

（ａ）未培養微生物に由来し、かつＣａｓ１２ａエンドヌクレアーゼである、ＲｕｖＣドメインを含むエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

２．操作されたヌクレアーゼ系であって、

（ａ）配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

３．操作されたヌクレアーゼ系であって、

（ａ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである、配列番号３８６２～３９１３のうちのいずれか１つを含むプロトスペ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エンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

４．当該エンドヌクレアーゼが、ジンクフィンガー様ドメインを更に含む、実施形態１～３のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

５．当該ガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５ＭＧ１１、ＭＧ１３、ＭＧ１９、ＭＧ２０、ＭＧ２６、ＭＧ２８、ＭＧ２９、ＭＧ３０、ＭＧ３１、ＭＧ３２、ＭＧ３７、９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、３８５１－３８５７、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、実施形態１～４のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

６．操作されたヌクレアーゼ系であって、

（ａ）配列番号３４７１，３５３９，３５５１－３５５９，３６０８－３６０９，３６１２，３６３６－３６３７，３６４０－３６４１，３６４４－３６４５，３６４８－３６４９，３６５２－３６５３，３６５６－３６５７，３６６０－３６６１，３６６４－３６６７，３６７１－３６７２，３６７７－３６７８，３６９５－３６９６，３７２９－３７３０，３７３４－３７３５、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む操作されたガイドＲＮＡと、

（ｂ）当該操作されたガイドＲＮＡに結合するように構成されているクラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

７．当該エンドヌクレアーゼが、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つを含むプロトスペ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、実施形態１～６のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

８．当該ガイドＲＮＡが、真核生物、真菌、植物、哺乳類、又はヒトゲノムポリヌクレオチド配列と相補的である配列を含む、実施形態１～７のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

９．当該ガイドＲＮＡが、３０～２５０ヌクレオチド長である、実施形態１～８のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１０．当該エンドヌクレアーゼが、当該エンドヌクレアーゼのＮ末端又はＣ末端の近位に１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）を含む、実施形態１～９のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１１．当該ＮＬＳが、配列番号３９３８～３９５３からなる群から選択される配列と少なくとも８０％同一である配列を含む、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１２．当該エンドヌクレアーゼが、当該エンドヌクレアーゼの配列が配列番号２１５に最適に整列するとき、以下の変異：Ｓ１６８Ｒ、Ｅ１７２Ｒ、Ｎ５７７Ｒ、又はＹ１７０Ｒのうちの少なくとも１つを含む、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１３．当該エンドヌクレアーゼが、当該エンドヌクレアーゼの配列が配列番号２１５と最適に整列するとき、変異Ｓ１６８Ｒ及びＥ１７２Ｒを含む、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１４．当該エンドヌクレアーゼが、当該エンドヌクレアーゼの配列が配列番号２１５と最適に整列するとき、変異Ｎ５７７Ｒ及びＹ１７０Ｒを含む、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１５．当該エンドヌクレアーゼが、当該エンドヌクレアーゼの配列が配列番号２１５と最適に整列するとき、変異Ｓ１６８Ｒを含む、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１６．当該エンドヌクレアーゼが、Ｅ１７２、Ｎ５７７、又はＹ１７０の変異を含まない、実施形態１５に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１７．５’から３’に、当該標的デオキシリボ核酸配列に対して５’の、少なくとも２０個のヌクレオチドの配列を含む第１の相同アーム、少なくとも１０個のヌクレオチドの合成ＤＮＡ配列、及び当該標的配列に対して３’の、少なくとも２０個のヌクレオチドの配列を含む第２の相同アームを含む、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ修復鋳型を更に含む、実施形態１～１６のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１８．当該第１又は第２の相同アームが、少なくとも４０、８０、１２０、１５０、２００、３００、５００、又は１，０００個のヌクレオチドの配列を含む、実施形態１７に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

１９．当該第１及び第２の相同アームが、原核生物、細菌、真菌、又は真核生物のゲノム配列に対して相同である、実施形態１２～１８のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

２０．当該一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ修復鋳型が、導入遺伝子ドナーを含む、実施形態１２～１９に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

２１．１つ又は２つの一本鎖ＤＮＡセグメントに隣接した二本鎖ＤＮＡセグメントを含むＤＮＡ修復鋳型を更に含む、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

２２．一本鎖ＤＮＡセグメントが、二本鎖ＤＮＡセグメントの５’末端にコンジュゲートされる、実施形態２１に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

２３．当該一本鎖ＤＮＡセグメントが、二本鎖ＤＮＡセグメントの３’末端にコンジュゲートされる、実施形態２１に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

２４．当該一本鎖ＤＮＡセグメントが、４～１０ヌクレオチド塩基の長さを有する、実施形態２１～２３のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。

２５．当該一本鎖ＤＮＡセグメントが、当該スペーサー配列内の配列と相補的であるヌクレオチド配列を有する、実施形態２１～２４のいずれか１つに記載の操作されたヌクレ

アーゼ系。
２６．当該二本鎖ＤＮＡ配列が、バーコード、オープンリーディングフレーム、エンハンサー、プロモーター、タンパク質コード配列、ｍｉＲＮＡコード配列、ＲＮＡコード配列、又は導入遺伝子を含む、実施形態２１～２５のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。
２７．当該二本鎖ＤＮＡ配列が、ヌクレアーゼ切断部位に隣接している、実施形態２１～２５のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。
２８．当該ヌクレアーゼ切断部位が、スペーサー及びＰＡＭ配列を含む、実施形態２７に記載の操作されたヌクレアーゼ系。
２９．当該系が、Mg^{2+}の供給源を更に含む、実施形態１～２８のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。
３０．当該ガイドＲＮＡが、少なくとも８個、少なくとも１０個、又は少なくとも１２個の塩基対リボヌクレオチドを含むヘアピンを含む、実施形態１～２９のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。
３１．当該ヘアピンが、１０塩基対リボヌクレオチドを含む、実施形態３０に記載の操作されたヌクレアーゼ系。
３２．ａ）当該エンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％、８０％、又は９０％同一である配列を含み、
ｂ）当該ガイドＲＮＡ構造が、配列番号３６０８～３６０９、３８５３、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％、又は９０％同一である配列を含む、実施形態１～３１のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。
３３．当該エンドヌクレアーゼが、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つを含むＰＡＭ配列に結合するように構成されている、実施形態１～３２のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。
３４．当該エンドヌクレアーゼが、配列番号３８７１を含むＰＡＭ配列に結合するように構成されている、実施形態１～３２のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。
３５．当該配列同一性が、ＢＬＡＳＴＰ、ＣＬＵＳＴＡＬＷ、ＭＵＳＣＬＥ、ＭＡＦＦＴアルゴリズム、又はＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ相同性検索アルゴリズムパラメーターを用いたＣＬＵＳＴＡＬＷアルゴリズムによって決定される、実施形態５～３４のいずれか１つに記載の操作されたヌクレアーゼ系。
３６．当該配列同一性が、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、条件付き組成スコアマトリックス調整を使用した、ＢＬＡＳＴＰ相同性検索アルゴリズムによって決定される、実施形態３５に記載の操作されたヌクレアーゼ系。
３７．操作されたガイドＲＮＡであって、
（ａ）標的ＤＮＡ分子中の標的配列と相補的であるヌクレオチド配列を含む標的化セグメントと、
（ｂ）二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖を形成するようハイブリダイズするヌクレオチドの２つの相補的なストレッチを含む、タンパク質結合セグメントと、を含み、
ヌクレオチドの当該２つの相補的なストレッチが、介在するヌクレオチドと互いに共有結合しており、
当該操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと複合体を形成し、当該複合体を当該標的ＤＮＡ分子の当該標的配列に標的化することができる、操作されたガイドＲＮＡ。
３８．当該ＤＮＡ標的化セグメントが、ヌクレオチドの当該２つの相補的なストレッチ

の両方の３’に位置付けられる、実施形態３７に記載の操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチド。

３９．当該タンパク質結合セグメントが、配列番号３６０８～３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも７０％、少なくとも８０％、又は少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む、実施形態３７～３８に記載の操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチド。

４０．当該二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）二重鎖が、少なくとも５個、少なくとも８個、少なくとも１０個、又は少なくとも１２個のリボヌクレオチドを含む、実施形態３７～３９のいずれか１つに記載の操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチド。

４１．実施形態１～４０のいずれか１つに記載の操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドをコードする、デオキシリボ核酸ポリヌクレオチド。

４２．生物における発現に最適化された操作された核酸配列を含む核酸であって、当該核酸が、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼをコードし、当該エンドヌクレアーゼが、未培養微生物に由来し、生物が、当該未培養生物ではない、核酸。

４３．当該エンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のいずれか１つと少なくとも７０％又は少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含む、実施形態４２に記載の核酸。

４４．当該エンドヌクレアーゼが、当該エンドヌクレアーゼのＮ末端又はＣ末端の近位に１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）をコードする配列を含む、実施形態４２又は４３に記載の核酸。

４５．当該ＮＬＳが、配列番号３９３８～３９５３から選択される配列を含む、実施形態４４に記載の核酸。

４６．当該ＮＬＳが、配列番号３９３９を含む、実施形態４４又は４５に記載の核酸。

４７．当該ＮＬＳが、当該エンドヌクレアーゼの当該Ｎ末端の近位にある、実施形態４６に記載の核酸。

４８．当該ＮＬＳが、配列番号３９３８を含む、実施形態４４又は４５に記載の核酸。

４９．当該ＮＬＳが、当該エンドヌクレアーゼの当該Ｃ末端の近位にある、実施形態４８に記載の核酸。

５０．当該生物が、原核生物、細菌、真核生物、真菌、植物、哺乳類、齧歯類、又はヒトである、実施形態４２～４９のいずれか１つに記載の核酸。

５１．クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む操作されたベクターであって、当該エンドヌクレアーゼが、未培養微生物に由来する、操作されたベクター。

５２．実施形態４２～４６のいずれか１つに記載の核酸を含む、操作されたベクター。

５３．実施形態４１に記載のデオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを含む、操作されたベクター。

５４．当該ベクターが、プラスミド、ミニサークル、ＣＥＬｉＤ、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）由来ビリオン、レンチウイルス、又はアデノウイルスである、実施形態５１～５３のいずれかに記載の操作されたベクター。

５５．実施形態５１～５４のいずれか１つに記載のベクターを含む、細胞。

５６．エンドヌクレアーゼを製造する方法であって、実施形態５５に記載の当該細胞を培養することを含む、方法。

５７．二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを結合、切断、マーキング、又は修飾する方法であって、

（ａ）当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを、当該エンドヌクレアーゼ及び当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドに結合するよう構成されている操作されたガイドＲＮＡと複合体化したクラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと接触させることを含み、

当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドが、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を含み、

当該ＰＡＭ配列が、配列番号３８６３～３９１３のうちのいずれか１つを含む配列を

含む、方法。
５８．当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドが、当該操作されたガイドＲＮＡの配列と相補的である配列を含む第１の鎖と、当該ＰＡＭを含む第２の鎖とを含む、実施形態５７に記載の方法。
５９．当該ＰＡＭが、当該操作されたガイドＲＮＡの当該配列と相補的である当該配列の５’末端に直接隣接する、実施形態５８に記載の方法。
６０．当該ＰＡＭが、配列番号３８７１を含む、実施形態５７～５９のいずれか１つに記載の方法。
６１．当該クラス２、Ｖ型ＣａｓエンドヌクレアーゼがＣａｓ１２ｉ、Ｃａｓ１２ｊ、Ｃａｓ１２ｋ、Ｃａｓ１２ｌ、Ｃａｓ１２ｍ、Ｃａｓ１２ｎ、Ｃａｓ１２ｏ、Ｃａｓ１２ｐ、Ｃａｓ１２ｑ、Ｃａｓ１２ｒ、Ｃａｓ１２ｓ、Ｃａｓ１２ｔ、Ｃａｓ１２ｕ、Ｃａｓ１２ｖ、Ｃａｓ１２ｗ、Ｃａｓ１２ｘ、Ｃａｓ１２ｙ、Ｃａｓ１２ｚ、Ｃａｓ１２ａａ、Ｃａｓ１２ａｂ、Ｃａｓ１２ａｃ、Ｃａｓ１２ａｄ、Ｃａｓ１２ａｅ、Ｃａｓ１２ａｆ、Ｃａｓ１２ａｇ、Ｃａｓ１２ａｈ、Ｃａｓ１２ａｉ、Ｃａｓ１２ａｊ、Ｃａｓ１２ａｋ、Ｃａｓ１２ａｌ、Ｃａｓ１２ａｍ、Ｃａｓ１２ａｎ、Ｃａｓ１２ａｏ、Ｃａｓ１２ａｐ、Ｃａｓ１２ａｑ、Ｃａｓ１２ａｒ、Ｃａｓ１２ａｓ、Ｃａｓ１２ａｔ、Ｃａｓ１２ａｕ、Ｃａｓ１２ａｖ、Ｃａｓ１２ａｗ、Ｃａｓ１２ａｘ、Ｃａｓ１２ａｙ、Ｃａｓ１２ａｚ、Ｃａｓ１２ｂａ、Ｃａｓ１２ｂｂ、Ｃａｓ１２ｂｃ、Ｃａｓ１２ｂｄ、Ｃａｓ１２ｂｅ、Ｃａｓ１２ｂｆ、Ｃａｓ１２ｂｇ、Ｃａｓ１２ｂｈ、Ｃａｓ１２ｂｉ、Ｃａｓ１２ｂｊ、Ｃａｓ１２ｂｋ、Ｃａｓ１２ｂｌ、Ｃａｓ１２ｂｍ、Ｃａｓ１２ｂｎ、Ｃａｓ１２ｂｏ、Ｃａｓ１２ｂｐ、Ｃａｓ１２ｂｑ、Ｃａｓ１２ｂｒ、Ｃａｓ１２ｂｓ、Ｃａｓ１２ｂｔ、Ｃａｓ１２ｂｕ、Ｃａｓ１２ｂｖ、Ｃａｓ１２ｂｗ、Ｃａｓ１２ｂｘ、Ｃａｓ１２ｂｙ、Ｃａｓ１２ｂｚ、Ｃａｓ１２ｃａ、Ｃａｓ１２ｃｂ、Ｃａｓ１２ｃｃ、Ｃａｓ１２ｃｄ、Ｃａｓ１２ｃｅ、Ｃａｓ１２ｃｆ、Ｃａｓ１２ｃｇ、Ｃａｓ１２ｃｈ、Ｃａｓ１２ｃｉ、Ｃａｓ１２ｃｊ、Ｃａｓ１２ｃｋ、Ｃａｓ１２ｃｌ、Ｃａｓ１２ｃｍ、Ｃａｓ１２ｃｎ、Ｃａｓ１２ｃｏ、Ｃａｓ１２ｃｐ、Ｃａｓ１２ｃｑ、Ｃａｓ１２ｃｒ、Ｃａｓ１２ｃｓ、Ｃａｓ１２ｃｔ、Ｃａｓ１２ｃｕ、Ｃａｓ１２ｃｖ、Ｃａｓ１２ｃｗ、Ｃａｓ１２ｃｘ、Ｃａｓ１２ｃｙ、Ｃａｓ１２ｃｚ、Ｃａｓ１２ｄａ、Ｃａｓ１２ｄｂ、Ｃａｓ１２ｄｃ、Ｃａｓ１２ｄｄ、Ｃａｓ１２ｄｅ、Ｃａｓ１２ｄｆ、Ｃａｓ１２ｄｇ、Ｃａｓ１２ｄｈ、Ｃａｓ１２ｄｉ、Ｃａｓ１２ｄｊ、Ｃａｓ１２ｄｋ、Ｃａｓ１２ｄｌ、Ｃａｓ１２ｄｍ、Ｃａｓ１２ｄｎ、Ｃａｓ１２ｄｏ、Ｃａｓ１２ｄｐ、Ｃａｓ１２ｄｑ、Ｃａｓ１２ｄｒ、Ｃａｓ１２ｄｓ、Ｃａｓ１２ｄｔ、Ｃａｓ１２ｄｕ、Ｃａｓ１２ｄｖ、Ｃａｓ１２ｄｗ、Ｃａｓ１２ｄｘ、Ｃａｓ１２ｄｙ、Ｃａｓ１２ｄｚ、Ｃａｓ１２ｅａ、Ｃａｓ１２ｅｂ、Ｃａｓ１２ｅｃ、Ｃａｓ１２ｅｄ、Ｃａｓ１２ｅｅ、Ｃａｓ１２ｅｆ、Ｃａｓ１２ｅｇ、Ｃａｓ１２ｅｈ、Ｃａｓ１２ｅｉ、Ｃａｓ１２ｅｊ、Ｃａｓ１２ｅｋ、Ｃａｓ１２ｅｌ、Ｃａｓ１２ｅｍ、Ｃａｓ１２ｅｎ、Ｃａｓ１２ｅｏ、Ｃａｓ１２ｅｐ、Ｃａｓ１２ｅｑ、Ｃａｓ１２ｅｒ、Ｃａｓ１２ｅｓ、Ｃａｓ１２ｅｔ、Ｃａｓ１２ｅｕ、Ｃａｓ１２ｅｖ、Ｃａｓ１２ｅｗ、Ｃａｓ１２ｅｘ、Ｃａｓ１２ｅｙ、Ｃａｓ１２ｅｚ、Ｃａｓ１２ｆａ、Ｃａｓ１２ｆｂ、Ｃａｓ１２ｆｃ、Ｃａｓ１２ｆｄ、Ｃａｓ１２ｆｅ、Ｃａｓ１２ｆｆ、Ｃａｓ１２ｆｇ、Ｃａｓ１２ｆｈ、Ｃａｓ１２ｆｉ、Ｃａｓ１２ｆｊ、Ｃａｓ１２ｆｋ、Ｃａｓ１２ｆｌ、Ｃａｓ１２ｆｍ、Ｃａｓ１２ｆｎ、Ｃａｓ１２ｆｏ、Ｃａｓ１２ｆｐ、Ｃａｓ１２ｆｑ、Ｃａｓ１２ｆｒ、Ｃａｓ１２ｆｓ、Ｃａｓ１２ｆｔ、Ｃａｓ１２ｆｕ、Ｃａｓ１２ｆｖ、Ｃａｓ１２ｆｗ、Ｃａｓ１２ｆｘ、Ｃａｓ１２ｆｙ、Ｃａｓ１２ｆｚ、Ｃａｓ１２ｇａ、Ｃａｓ１２ｇｂ、Ｃａｓ１２ｇｃ、Ｃａｓ１２ｇｄ、Ｃａｓ１２ｇｅ、Ｃａｓ１２ｇｆ、Ｃａｓ１２ｇｇ、Ｃａｓ１２ｇｈ、Ｃａｓ１２ｇｉ、Ｃａｓ１２ｇｊ、Ｃａｓ１２ｇｋ、Ｃａｓ１２ｇｌ、Ｃａｓ１２ｇｍ、Ｃａｓ１２ｇｎ、Ｃａｓ１２ｇｏ、Ｃａｓ１２ｇｐ、Ｃａｓ１２ｇｑ、Ｃａｓ１２ｇｒ、Ｃａｓ１２ｇｓ、Ｃａｓ１２ｇｔ、Ｃａｓ１２ｇｕ、Ｃａｓ１２ｇｖ、Ｃａｓ１２ｇｗ、Ｃａｓ１２ｇｘ、Ｃａｓ１２ｇｙ、Ｃａｓ１２ｇｚ、Ｃａｓ１２ｈａ、Ｃａｓ１２ｈｂ、Ｃａｓ１２ｈｃ、Ｃａｓ１２ｈｄ、Ｃａｓ１２ｈｅ、Ｃａｓ１２ｈｆ、Ｃａｓ１２ｈｇ、Ｃａｓ１２ｈｈ、Ｃａｓ１２ｈｉ、Ｃａｓ１２ｈｊ、Ｃａｓ１２ｈｋ、Ｃａｓ１２ｈｌ、Ｃａｓ１２ｈｍ、Ｃａｓ１２ｈｎ、Ｃａｓ１２ｈｏ、Ｃａｓ１２ｈｐ、Ｃａｓ１２ｈｑ、Ｃａｓ１２ｈｒ、Ｃａｓ１２ｈｓ、Ｃａｓ１２ｈｔ、Ｃａｓ１２ｈｕ、Ｃａｓ１２ｈｖ、Ｃａｓ１２ｈｗ、Ｃａｓ１２ｈｘ、Ｃａｓ１２ｈｙ、Ｃａｓ１２ｈｚ、Ｃａｓ１２ｉａ、Ｃａｓ１２ｉｂ、Ｃａｓ１２ｉｃ、Ｃａｓ１２ｉｄ、Ｃａｓ１２ｉｅ、Ｃａｓ１２ｉｆ、Ｃａｓ１２ｉｇ、Ｃａｓ１２ｉｈ、Ｃａｓ１２ｉｉ、Ｃａｓ１２ｉｊ、Ｃａｓ１２ｉｋ、Ｃａｓ１２ｉｌ、Ｃａｓ１２ｉｍ、Ｃａｓ１２ｉｎ、Ｃａｓ１２ｉｏ、Ｃａｓ１２ｉｐ、Ｃａｓ１２ｉｑ、Ｃａｓ１２ｉｒ、Ｃａｓ１２ｉｓ、Ｃａｓ１２ｉｔ、Ｃａｓ１２ｉｕ、Ｃａｓ１２ｉｖ、Ｃａｓ１２ｉｗ、Ｃａｓ１２ｉｘ、Ｃａｓ１２ｉｙ、Ｃａｓ１２ｉｚ、Ｃａｓ１２ｊａ、Ｃａｓ１２ｊｂ、Ｃａｓ１２ｊｃ、Ｃａｓ１２ｊｄ、Ｃａｓ１２ｊｅ、Ｃａｓ１２ｊｆ、Ｃａｓ１２ｊｇ、Ｃａｓ１２ｊｈ、Ｃａｓ１２ｊｉ、Ｃａｓ１２ｊｊ、Ｃａｓ１２ｊｋ、Ｃａｓ１２ｊｌ、Ｃａｓ１２ｊｍ、Ｃａｓ１２ｊｎ、Ｃａｓ１２ｊｏ、Ｃａｓ１２ｊｐ、Ｃａｓ１２ｊｑ、Ｃａｓ１２ｊｒ、Ｃａｓ１２ｊｓ、Ｃａｓ１２ｊｔ、Ｃａｓ１２ｊｕ、Ｃａｓ１２ｊｖ、Ｃａｓ１２ｊｗ、Ｃａｓ１２ｊｘ、Ｃａｓ１２ｊｙ、Ｃａｓ１２ｊｚ、Ｃａｓ１２ｋａ、Ｃａｓ１２ｋｂ、Ｃａｓ１２ｋｃ、Ｃａｓ１２ｋｄ、Ｃａｓ１２ｋｅ、Ｃａｓ１２ｋｆ、Ｃａｓ１２ｋｇ、Ｃａｓ１２ｋｈ、Ｃａｓ１２ｋｉ、Ｃａｓ１２ｋｊ、Ｃａｓ１２ｋｋ、Ｃａｓ１２ｋｌ、Ｃａｓ１２ｋｍ、Ｃａｓ１２ｋｎ、Ｃａｓ１２ｋｏ、Ｃａｓ１２ｋｐ、Ｃａｓ１２ｋｑ、Ｃａｓ１２ｋｒ、Ｃａｓ１２ｋｓ、Ｃａｓ１２ｋｔ、Ｃａｓ１２ｋｕ、Ｃａｓ１２ｋｖ、Ｃａｓ１２ｋｗ、Ｃａｓ１２ｋｘ、Ｃａｓ１２ｋｙ、Ｃａｓ１２ｋｚ、Ｃａｓ１２ｌａ、Ｃａｓ１２ｌｂ、Ｃａｓ１２ｌｃ、Ｃａｓ１２ｌｄ、Ｃａｓ１２ｌｅ、Ｃａｓ１２ｌｆ、Ｃａｓ１２ｌｇ、Ｃａｓ１２ｌｈ、Ｃａｓ１２ｌｉ、Ｃａｓ１２ｌｊ、Ｃａｓ１２ｌｋ、Ｃａｓ１２ｌｌ、Ｃａｓ１２ｌｍ、Ｃａｓ１２ｌｎ、Ｃａｓ１２ｌｏ、Ｃａｓ１２ｌｐ、Ｃａｓ１２ｌｑ、Ｃａｓ１２ｌｒ、Ｃａｓ１２ｌｓ、Ｃａｓ１２ｌｔ、Ｃａｓ１２ｌｕ、Ｃａｓ１２ｌｖ、Ｃａｓ１２ｌｗ、Ｃａｓ１２ｌｘ、Ｃａｓ１２ｌｙ、Ｃａｓ１２ｌｚ、Ｃａｓ１２ｍａ、Ｃａｓ１２ｍｂ、Ｃａｓ１２ｍｃ、Ｃａｓ１２ｍｄ、Ｃａｓ１２ｍｅ、Ｃａｓ１２ｍｆ、Ｃａｓ１２ｍｇ、Ｃａｓ１２ｍｈ、Ｃａｓ１２ｍｉ、Ｃａｓ１２ｍｊ、Ｃａｓ１２ｍｋ、Ｃａｓ１２ｍｌ、Ｃａｓ１２ｍｍ、Ｃａｓ１２ｍｎ、Ｃａｓ１２ｍｏ、Ｃａｓ１２ｍｐ、Ｃａｓ１２ｍｑ、Ｃａｓ１２ｍｒ、Ｃａｓ１２ｍｓ、Ｃａｓ１２ｍｔ、Ｃａｓ１２ｍｕ、Ｃａｓ１２ｍｖ、Ｃａｓ１２ｍｗ、Ｃａｓ１２ｍｘ、Ｃａｓ１２ｍｙ、Ｃａｓ１２ｍｚ、Ｃａｓ１２ｎａ、Ｃａｓ１２ｎｂ、Ｃａｓ１２ｎｃ、Ｃａｓ１２ｎｄ、Ｃａｓ１２ｎｅ、Ｃａｓ１２ｎｆ、Ｃａｓ１２ｎｇ、Ｃａｓ１２ｎｈ、Ｃａｓ１２ｎｉ、Ｃａｓ１２ｎｊ、Ｃａｓ１２ｎｋ、Ｃａｓ１２ｎｌ、Ｃａｓ１２ｎｍ、Ｃａｓ１２ｎｎ、Ｃａｓ１２ｎｏ、Ｃａｓ１２ｎｐ、Ｃａｓ１２ｎｑ、Ｃａｓ１２ｎｒ、Ｃａｓ１２ｎｓ、Ｃａｓ１２ｎｔ、Ｃａｓ１２ｎｕ、Ｃａｓ１２ｎｖ、Ｃａｓ１２ｎｗ、Ｃａｓ１２ｎｘ、Ｃａｓ１２ｎｙ、Ｃａｓ１２ｎｚ、Ｃａｓ１２ｏａ、Ｃａｓ１２ｏｂ、Ｃａｓ１２ｏｃ、Ｃａｓ１２ｏｄ、Ｃａｓ１２ｏｅ、Ｃａｓ１２ｏｆ、Ｃａｓ１２ｏｇ、Ｃａｓ１２ｏｈ、Ｃａｓ１２ｏｉ、Ｃａｓ１２ｏｊ、Ｃａｓ１２ｏｋ、Ｃａｓ１２ｏｌ、Ｃａｓ１２ｏｍ、Ｃａｓ１２ｏｎ、Ｃａｓ１２ｏｏ、Ｃａｓ１２ｏｐ、Ｃａｓ１２ｏｑ、Ｃａｓ１２ｏｒ、Ｃａｓ１２ｏｓ、Ｃａｓ１２ｏｔ、Ｃａｓ１２ｏｕ、Ｃａｓ１２ｏｖ、Ｃａｓ１２ｏｗ、Ｃａｓ１２ｏｘ、Ｃａｓ１２ｏｙ、Ｃａｓ１２ｏｚ、Ｃａｓ１２ｐａ、Ｃａｓ１２ｐｂ、Ｃａｓ１２ｐｃ、Ｃａｓ１２ｐｄ、Ｃａｓ１２ｐｅ、Ｃａｓ１２ｐｆ、Ｃａｓ１２ｐｇ、Ｃａｓ１２ｐｈ、Ｃａｓ１２ｐｉ、Ｃａｓ１２ｐｊ、Ｃａｓ１２ｐｋ、Ｃａｓ１２ｐｌ、Ｃａｓ１２ｐｍ、Ｃａｓ１２ｐｎ、Ｃａｓ１２ｐｏ、Ｃａｓ１２ｐｐ、Ｃａｓ１２ｐｑ、Ｃａｓ１２ｐｒ、Ｃａｓ１２ｐｓ、Ｃａｓ１２ｐｔ、Ｃａｓ１２ｐｕ、Ｃａｓ１２ｐｖ、Ｃａｓ１２ｐｗ、Ｃａｓ１２ｐｘ、Ｃａｓ１２ｐｙ、Ｃａｓ１２ｐｚ、Ｃａｓ１２ｑａ、Ｃａｓ１２ｑｂ、Ｃａｓ１２ｑｃ、Ｃａｓ１２ｑｄ、Ｃａｓ１２ｑｅ、Ｃａｓ１２ｑｆ、Ｃａｓ１２ｑｇ、Ｃａｓ１２ｑｈ、Ｃａｓ１２ｑｉ、Ｃａｓ１２ｑｊ、Ｃａｓ１２ｑｋ、Ｃａｓ１２ｑｌ、Ｃａｓ１２ｑｍ、Ｃａｓ１２ｑｎ、Ｃａｓ１２ｑｏ、Ｃａｓ１２ｑｐ、Ｃａｓ１２ｑｑ、Ｃａｓ１２ｑｒ、Ｃａｓ１２ｑｓ、Ｃａｓ１２ｑｔ、Ｃａｓ１２ｑｕ、Ｃａｓ１２ｑｖ、Ｃａｓ１２ｑｗ、Ｃａｓ１２ｑｘ、Ｃａｓ１２ｑｙ、Ｃａｓ１２ｑｚ、Ｃａｓ１２ｒａ、Ｃａｓ１２ｒｂ、Ｃａｓ１２ｒｃ、Ｃａｓ１２ｒｄ、Ｃａｓ１２ｒｅ、Ｃａｓ１２ｒｆ、Ｃａｓ１２ｒｇ、Ｃａｓ１２ｒｈ、Ｃａｓ１２ｒｉ、Ｃａｓ１２ｒｊ、Ｃａｓ１２ｒｋ、Ｃａｓ１２ｒｌ、Ｃａｓ１２ｒｍ、Ｃａｓ１２ｒｎ、Ｃａｓ１２ｒｏ、Ｃａｓ１２ｒｐ、Ｃａｓ１２ｒｑ、Ｃａｓ１２ｒｒ、Ｃａｓ１２ｒｓ、Ｃａｓ１２ｒｔ、Ｃａｓ１２ｒｕ、Ｃａｓ１２ｒｖ、Ｃａｓ１２ｒｗ、Ｃａｓ１２ｒｘ、Ｃａｓ１２ｒｙ、Ｃａｓ１２ｒｚ、Ｃａｓ１２ｓａ、Ｃａｓ１２ｓｂ、Ｃａｓ１２ｓｃ、Ｃａｓ１２ｓｄ、Ｃａｓ１２ｓｅ、Ｃａｓ１２ｓｆ、Ｃａｓ１２ｓｇ、Ｃａｓ１２ｓｈ、Ｃａｓ１２ｓｉ、Ｃａｓ１２ｓｊ、Ｃａｓ１２ｓｋ、Ｃａｓ１２ｓｌ、Ｃａｓ１２ｓｍ、Ｃａｓ１２ｓｎ、Ｃａｓ１２ｓｏ、Ｃａｓ１２ｓｐ、Ｃａｓ１２ｓｑ、Ｃａｓ１２ｓｒ、Ｃａｓ１２ｓｓ、Ｃａｓ１２ｓｔ、Ｃａｓ１２ｓｕ、Ｃａｓ１２ｓｖ、Ｃａｓ１２ｓｗ、Ｃａｓ１２ｓｘ、Ｃａｓ１２ｓｙ、Ｃａｓ１２ｓｚ、Ｃａｓ１２ｔａ、Ｃａｓ１２ｔｂ、Ｃａｓ１２ｔｃ、Ｃａｓ１２ｔｄ、Ｃａｓ１２ｔｅ、Ｃａｓ１２ｔｆ、Ｃａｓ１２ｔｇ、Ｃａｓ１２ｔｈ、Ｃａｓ１２ｔｉ、Ｃａｓ１２ｔｊ、Ｃａｓ１２ｔｋ、Ｃａｓ１２ｔｌ、Ｃａｓ１２ｔｍ、Ｃａｓ１２ｔｎ、Ｃａｓ１２ｔｏ、Ｃａｓ１２ｔｐ、Ｃａｓ１２ｔｑ、Ｃａｓ１２ｔｒ、Ｃａｓ１２ｔｓ、Ｃａｓ１２ｔｔ、Ｃａｓ１２ｔｕ、Ｃａｓ１２ｔｖ、Ｃａｓ１２ｔｗ、Ｃａｓ１２ｔｘ、Ｃａｓ１２ｔｙ、Ｃａｓ１２ｔｚ、Ｃａｓ１２ｕａ、Ｃａｓ１２ｕｂ、Ｃａｓ１２ｕｃ、Ｃａｓ１２ｕｄ、Ｃａｓ１２ｕｅ、Ｃａｓ１２ｕｆ、Ｃａｓ１２ｕｇ、Ｃａｓ１２ｕｈ、Ｃａｓ１２ｕｉ、Ｃａｓ１２ｕｊ、Ｃａｓ１２ｕｋ、Ｃａｓ１２ｕｌ、Ｃａｓ１２ｕｍ、Ｃａｓ１２ｕｎ、Ｃａｓ１２ｕｏ、Ｃａｓ１２ｕｐ、Ｃａｓ１２ｕｑ、Ｃａｓ１２ｕｒ、Ｃａｓ１２ｕｓ、Ｃａｓ１２ｕｔ、Ｃａｓ１２ｕｕ、Ｃａｓ１２ｕｖ、Ｃａｓ１２ｕｗ、Ｃａｓ１２ｕｘ、Ｃａｓ１２ｕｙ、Ｃａｓ１２ｕｚ、Ｃａｓ１２ｖａ、Ｃａｓ１２ｖｂ、Ｃａｓ１２ｖｃ、Ｃａｓ１２ｖｄ、Ｃａｓ１２ｖｅ、Ｃａｓ１２ｖｆ、Ｃａｓ１２ｖｇ、Ｃａｓ１２ｖｈ、Ｃａｓ１２ｖｉ、Ｃａｓ１２ｖｊ、Ｃａｓ１２ｖｋ、Ｃａｓ１２ｖｌ、Ｃａｓ１２ｖｍ、Ｃａｓ１２ｖｎ、Ｃａｓ１２ｖｏ、Ｃａｓ１２ｖｐ、Ｃａｓ１２ｖｑ、Ｃａｓ１２ｖｒ、Ｃａｓ１２ｖｓ、Ｃａｓ１２ｖｔ、Ｃａｓ１２ｖｕ、Ｃａｓ１２ｖｖ、Ｃａｓ１２ｖｗ、Ｃａｓ１２ｖｘ、Ｃａｓ１２ｖｙ、Ｃａｓ１２ｖｚ、Ｃａｓ１２ｗａ、Ｃａｓ１２ｗｂ、Ｃａｓ１２ｗｃ、Ｃａｓ１２ｗｄ、Ｃａｓ１２ｗｅ、Ｃａｓ１２ｗｆ、Ｃａｓ１２ｗｇ、Ｃａｓ１２ｗｈ、Ｃａｓ１２ｗｉ、Ｃａｓ１２ｗｊ、Ｃａｓ１２ｗｋ、Ｃａｓ１２ｗｌ、Ｃａｓ１２ｗｍ、Ｃａｓ１２ｗｎ、Ｃａｓ１２ｗｏ、Ｃａｓ１２ｗｐ、Ｃａｓ１２ｗｑ、Ｃａｓ１２ｗｒ、Ｃａｓ１２ｗｓ、Ｃａｓ１２ｗｔ、Ｃａｓ１２ｗｕ、Ｃａｓ１２ｗｖ、Ｃａｓ１２ｗｗ、Ｃａｓ１２ｗｘ、Ｃａｓ１２ｗｙ、Ｃａｓ１２ｗｚ、Ｃａｓ１２ｘａ、Ｃａｓ１２ｘｂ、Ｃａｓ１２ｘｃ、Ｃａｓ１２ｘｄ、Ｃａｓ１２ｘｅ、Ｃａｓ１２ｘｆ、Ｃａｓ１２ｘｇ、Ｃａｓ１２ｘｈ、Ｃａｓ１２ｘｉ、Ｃａｓ１２ｘｊ、Ｃａｓ１２ｘｋ、Ｃａｓ１２ｘｌ、Ｃａｓ１２ｘｍ、Ｃａｓ１２ｘｎ、Ｃａｓ１２ｘｏ、Ｃａｓ１２ｘｐ、Ｃａｓ１２ｘｑ、Ｃａｓ１２ｘｒ、Ｃａｓ１２ｘｓ、Ｃａｓ１２ｘｔ、Ｃａｓ１２ｘｕ、Ｃａｓ１２ｘｖ、Ｃａｓ１２ｘｗ、Ｃａｓ１２ｘｘ、Ｃａｓ１２ｘｙ、Ｃａｓ１２ｘｚ、Ｃａｓ１２ｙａ、Ｃａｓ１２ｙｂ、Ｃａｓ１２ｙｃ、Ｃａｓ１２ｙｄ、Ｃａｓ１２ｙｅ、Ｃａｓ１２ｙｆ、Ｃａｓ１２ｙｇ、Ｃａｓ１２ｙｈ、Ｃａｓ１２ｙｉ、Ｃａｓ１２ｙｊ、Ｃａｓ１２ｙｋ、Ｃａｓ１２ｙｌ、Ｃａｓ１２ｙｍ、Ｃａｓ１２ｙｎ、Ｃａｓ１２ｙｏ、Ｃａｓ１２ｙｐ、Ｃａｓ１２ｙｑ、Ｃａｓ１２ｙｒ、Ｃａｓ１２ｙｓ、Ｃａｓ１２ｙｔ、Ｃａｓ１２ｙｕ、Ｃａｓ１２ｙｖ、Ｃａｓ１２ｙｗ、Ｃａｓ１２ｙｘ、Ｃａｓ１２ｙｙ、Ｃａｓ１２ｙｚ、Ｃａｓ１２ｚａ、Ｃａｓ１２ｚｂ、Ｃａｓ１２ｚｃ、Ｃａｓ１２ｚｄ、Ｃａｓ１２ｚｅ、Ｃａｓ１２ｚｆ、Ｃａｓ１２ｚｇ、Ｃａｓ１２ｚｈ、Ｃａｓ１２ｚｉ、Ｃａｓ１２ｚｊ、Ｃａｓ１２ｚｋ、Ｃａｓ１２ｚｌ、Ｃａｓ１２ｚｍ、Ｃａｓ１２ｚｎ、Ｃａｓ１２ｚｏ、Ｃａｓ１２ｚｐ、Ｃａｓ１２ｚｑ、Ｃａｓ１２ｚｒ、Ｃａｓ１２ｚｓ、Ｃａｓ１２ｚｔ、Ｃａｓ１２ｚｕ、Ｃａｓ１２ｚｖ、Ｃａｓ１２ｚｗ、Ｃａｓ１２ｚｘ、Ｃａｓ１２ｚｙ、Ｃａｓ１２ｚｚ、Ｃａｓ１２ａａａ、Ｃａｓ１２ａａｂ、Ｃａｓ１２ａａｃ、Ｃａｓ１２ａａｄ、Ｃａｓ１２ａａｅ、Ｃａｓ１２ａａｆ、Ｃａｓ１２ａａｇ、Ｃａｓ１２ａａｈ、Ｃａｓ１２ａａｉ、Ｃａｓ１２ａａｊ、Ｃａｓ１２ａａｋ、Ｃａｓ１２ａａｌ、Ｃａｓ１２ａａｍ、Ｃａｓ１２ａａｎ、Ｃａｓ１２ａａｏ、Ｃａｓ１２ａａｐ、Ｃａｓ１２ａａｑ、Ｃａｓ１２ａａｒ、Ｃａｓ１２ａａｓ、Ｃａｓ１２ａａｔ、Ｃａｓ１２ａａｕ、Ｃａｓ１２ａａｖ、Ｃａｓ１２ａａｗ、Ｃａｓ１２ａａｘ、Ｃａｓ１２ａａｙ、Ｃａｓ１２ａａｚ、Ｃａｓ１２ａｂａ、Ｃａｓ１２ａｂｂ、Ｃａｓ１２ａｂｃ、Ｃａｓ１２ａｂｄ、Ｃａｓ１２ａｂｅ、Ｃａｓ１２ａｂｆ、Ｃａｓ１２ａｂｇ、Ｃａｓ１２ａｂｈ、Ｃａｓ１２ａｂｉ、Ｃａｓ１２ａｂｊ、Ｃａｓ１２ａｂｋ、Ｃａｓ１２ａｂｌ、Ｃａｓ１２ａｂｍ、Ｃａｓ１２ａｂｎ、Ｃａｓ１２ａｂｏ、Ｃａｓ１２ａｂｐ、Ｃａｓ１２ａｂｑ、Ｃａｓ１２ａｂｒ、Ｃａｓ１２ａｂｓ、Ｃａｓ１２ａｂｔ、Ｃａｓ１２ａｂｕ、Ｃａｓ１２ａｂｖ、Ｃａｓ１２ａｂｗ、Ｃａｓ１２ａｂｘ、Ｃａｓ１２ａｂｙ、Ｃａｓ１２ａｂｚ、Ｃａｓ１２ａｃａ、Ｃａｓ１２ａｃｂ、Ｃａｓ１２ａｃｃ、Ｃａｓ１２ａｃｄ、Ｃａｓ１２ａｃｅ、Ｃａｓ１２ａｃｆ、Ｃａｓ１２ａｃｇ、Ｃａｓ１２ａｃｈ、Ｃａｓ１２ａｃｉ、Ｃａｓ１２ａｃｊ、Ｃａｓ１２ａｃｋ、Ｃａｓ１２ａｃｌ、Ｃａｓ１２ａｃｍ、Ｃａｓ１２ａｃｎ、Ｃａｓ１２ａｃｏ、Ｃａｓ１２ａｃｐ、Ｃａｓ１２ａｃｑ、Ｃａｓ１２ａｃｒ、Ｃａｓ１２ａｃｓ、Ｃａｓ１２ａｃｔ、Ｃａｓ１２ａｃｕ、Ｃａｓ１２ａｃｖ、Ｃａｓ１２ａｃｗ、Ｃａｓ１２ａｃｘ、Ｃａｓ１２ａｃｙ、Ｃａｓ１２ａｃｚ、Ｃａｓ１２ａｄａ、Ｃａｓ１２ａｄｂ、Ｃａｓ１２ａｄｃ、Ｃａｓ１２ａｄｄ、Ｃａｓ１２ａｄｅ、Ｃａｓ１２ａｄｆ、Ｃａｓ１２ａｄｇ、Ｃａｓ１２ａｄｈ、Ｃａｓ１２ａｄｉ、Ｃａｓ１２ａｄｊ、Ｃａｓ１２ａｄｋ、Ｃａｓ１２ａｄｌ、Ｃａｓ１２ａｄｍ、Ｃａｓ１２ａｄｎ、Ｃａｓ１２ａｄｏ、Ｃａｓ１２ａｄｐ、Ｃａｓ１２ａｄｑ、Ｃａｓ１２ａｄｒ、Ｃａｓ１２ａｄｓ、Ｃａｓ１２ａｄｔ、Ｃａｓ１２ａｄｕ、Ｃａｓ１２ａｄｖ、Ｃａｓ１２ａｄｗ、Ｃａｓ１２ａｄｘ、Ｃａｓ１２ａｄｙ、Ｃａｓ１２ａｄｚ、Ｃａｓ１２ａｅａ、Ｃａｓ１２ａｅｂ、Ｃａｓ１２ａｅｃ、Ｃａｓ１２ａｅｄ、Ｃａｓ１２ａｅｅ、Ｃａｓ１２ａｅｆ、Ｃａｓ１２ａｅｇ、Ｃａｓ１２ａｅｈ、Ｃａｓ１２ａｅｉ、Ｃａｓ１２ａｅｊ、Ｃａｓ１２ａｅｋ、Ｃａｓ１２ａｅｌ、Ｃａｓ１２ａｅｍ、Ｃａｓ１２ａｅｎ、Ｃａｓ１２ａｅｏ、Ｃａｓ１２ａｅｐ、Ｃａｓ１２ａｅｑ、Ｃａｓ１２ａｅｒ、Ｃａｓ１２ａｅｓ、Ｃａｓ１２ａｅｔ、Ｃａｓ１２ａｅｕ、Ｃａｓ１２ａｅｖ、Ｃａｓ１２ａｅｗ、Ｃａｓ１２ａｅｘ、Ｃａｓ１２ａｅｙ、Ｃａｓ１２ａｅｚ、Ｃａｓ１２ａｆａ、Ｃａｓ１２ａｆｂ、Ｃａｓ１２ａｆｃ、Ｃａｓ１２ａｆｄ、Ｃａｓ１２ａｆｅ、Ｃａｓ１２ａｆｆ、Ｃａｓ１２ａｆｇ、Ｃａｓ１２ａｆｈ、Ｃａｓ１２ａｆｉ、Ｃａｓ１２ａｆｊ、Ｃａｓ１２ａｆｋ、Ｃａｓ１２ａｆｌ、Ｃａｓ１２ａｆｍ、Ｃａｓ１２ａｆｎ、Ｃａｓ１２ａｆｏ、Ｃａｓ１２ａｆｐ、Ｃａｓ１２ａｆｑ、Ｃａｓ１２ａｆｒ、Ｃａｓ１２ａｆｓ、Ｃａｓ１２ａｆｔ、Ｃａｓ１２ａｆｕ、Ｃａｓ１２ａｆｖ、Ｃａｓ１２ａｆｗ、Ｃａｓ１２ａｆｘ、Ｃａｓ１２ａｆｙ、Ｃａｓ１２ａｆｚ、Ｃａｓ１２ａｇａ、Ｃａｓ１２ａｇｂ、Ｃａｓ１２ａｇｃ、Ｃａｓ１２ａｇｄ、Ｃａｓ１２ａｇｅ、Ｃａｓ１２ａｇｆ、Ｃａｓ１２ａｇｇ、Ｃａｓ１２ａｇｈ、Ｃａｓ１２ａｇｉ、Ｃａｓ１２ａｇｊ、Ｃａｓ１２ａｇｋ、Ｃａｓ１２ａｇｌ、Ｃａｓ１２ａｇｍ、Ｃａｓ１２ａｇｎ、Ｃａｓ１２ａｇｏ、Ｃａｓ１２ａｇｐ、Ｃａｓ１２ａｇｑ、Ｃａｓ１２ａｇｒ、Ｃａｓ１２ａｇｓ、Ｃａｓ１２ａｇｔ、Ｃａｓ１２ａｇｕ、Ｃａｓ１２ａｇｖ、Ｃａｓ１２ａｇｗ、Ｃａｓ１２ａｇｘ、Ｃａｓ１２ａｇｙ、Ｃａｓ１２ａｇｚ、Ｃａｓ１２ａｈａ、Ｃａｓ１２ａｈｂ、Ｃａｓ１２ａｈｃ、Ｃａｓ１２ａｈｄ、Ｃａｓ１２ａｈｅ、Ｃａｓ１２ａｈｆ、Ｃａｓ１２ａｈｇ、Ｃａｓ１２ａｈｈ、Ｃａｓ１２ａｈｉ、Ｃａｓ１２ａｈｊ、Ｃａｓ１２ａｈｋ、Ｃａｓ１２ａｈｌ、Ｃａｓ１２ａｈｍ、Ｃａｓ１２ａｈｎ、Ｃａｓ１２ａｈｏ、Ｃａｓ１２ａｈｐ、Ｃａｓ１２ａｈｑ、Ｃａｓ１２ａｈｒ、Ｃａｓ１２ａｈｓ、Ｃａｓ１２ａｈｔ、Ｃａｓ１２ａｈｕ、Ｃａｓ１２ａｈｖ、Ｃａｓ１２ａｈｗ、Ｃａｓ１２ａｈｘ、Ｃａｓ１２ａｈｙ、Ｃａｓ１２ａｈｚ、Ｃａｓ１２ａｉａ、Ｃａｓ１２ａｉｂ、Ｃａｓ１２ａｉｃ、Ｃａｓ１２ａｉｄ、Ｃａｓ１２ａｉｅ、Ｃａｓ１２ａｉｆ、Ｃａｓ１２ａｉｇ、Ｃａｓ１２ａｉｈ、Ｃａｓ１２ａｉｉ、Ｃａｓ１２ａｉｊ、Ｃａｓ１２ａｉｋ、Ｃａｓ１２ａｉｌ、Ｃａｓ１２ａｉｍ、Ｃａｓ１２ａｉｎ、Ｃａｓ１

核酸（ＲＮＡ）ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターに作動可能に連結された当該操作されたガイドＲＮＡをコードするデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を送達することを含む、実施形態６３～７６のいずれか１つに記載の方法。

７９．当該エンドヌクレアーゼが、当該標的遺伝子座で、又は当該標的遺伝子座の近位で、一本鎖切断又は二本鎖切断を誘導する、実施形態６３～７８のいずれか１つに記載の方法。

８０．当該エンドヌクレアーゼが、当該標的遺伝子座内又は標的遺伝子座の３’に互い違いの一本鎖切断を誘導する、実施形態７９に記載の方法。

８１．細胞内のＴＲＡＣ遺伝子座を編集する方法であって、当該細胞に、

（ａ）ＲＮＡガイドエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ当該ＴＲＡＣ遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を接触させることを含み、

当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４３１６～４３６９のうちのいずれか１つの少なくとも１８個の連続ヌクレオチドと少なくとも８５％の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

８２．当該ＲＮＡガイドヌクレアーゼが、Ｃａｓエンドヌクレアーゼである、実施形態８１に記載の方法。

８３．当該Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである、実施形態８２に記載の方法。

８４．当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、ＲｕｖＣＩサブドメイン、ＲｕｖＣＩＩサブドメイン、及びＲｕｖＣＩＩＩサブドメインを含むＲｕｖＣドメインを含む、実施形態８３に記載の方法。

８５．当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態８３又は８４に記載の方法。

８６．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも１９個と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を更に含む、実施形態８１～８５のいずれか１つに記載の方法。

８７．当該エンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％、８０％、又は９０％同一である配列を含む、実施形態８１～８５のいずれか１つに記載の方法。

８８．当該ガイドＲＮＡ構造が、配列番号３６０８～３６０９、３８５３、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも１９個と少なくとも８０％、又は少なくとも９０％同一である配列を含む、実施形態８７に記載の方法。

８９．当該方法が、配列番号４４２４又は４４２５のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する配列によって、３’末端又は５’末端に隣接するカーゴ配列を含むドナー核酸を当該細胞に接触させるか、又は当該細胞に導入することを更に含む、実施形態８１～８８のいずれか１つに記載の方法。

９０．当該細胞が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である、実施形態８１～８９のいずれか１つに記載の方法。

９１．当該細胞が、Ｔ細胞若しくはその前駆体、又は造血幹細胞（ＨＳＣ）である、実施形態８１～８９のいずれか１つに記載の方法。

９２．当該カーゴ配列が、Ｔ細胞受容体ポリペプチド、ＣＡＲ－Ｔポリペプチド、又はその断片若しくは誘導体をコードする配列を含む、実施形態８９～９１のいずれか１つに記載の方法。

９３．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４３７０～４４２３のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む、実施形態８１～９２のいずれか１つに記載の方法。

９４．当該操作されたガイドＲＮＡが、表５Ａに列挙される対応する化学修飾を含む、表５ＡからのｓｇＲＮＡ１～５４のヌクレオチド配列を含む、実施形態９３に記載の方法。

９５．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４３３４、４３５０、又は４３２４のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、実施形態８１～９３のいずれか１つに記載の方法。

９６．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号４３８８、４４０４、又は４３７８のうちのいずれか１つと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、実施形態８１～９３のいずれか１つに記載の方法。

９７．当該操作されたガイドＲＮＡが、表５Ａのガイド９、３５、又は１９のヌクレオチド配列を含む、実施形態９６に記載の方法。

９８．操作されたヌクレアーゼ系であって、

（ａ）ＲＮＡガイドエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含み、

当該操作されたガイドＲＮＡが、以下の修飾：

（ｉ）当該操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の４塩基又は当該操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の４塩基内の少なくとも１つのヌクレオチドの２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基修飾、

（ｉｉ）当該操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の５塩基のうちの少なくとも２つの間のチオホスフェート（ＰＳ）結合、又は当該操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の５塩基のうちの少なくとも２つの間のチオホスフェート結合、

（ｉｉｉ）当該操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム内のチオホスフェート結合、

（ｉｖ）当該操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム内の２’－Ｏメチル又は２’塩基修飾、

（ｖ）当該操作されたガイドＲＮＡのスペーサー領域の少なくとも７塩基の２’－フルオロ塩基修飾、及び

（ｖｉ）当該操作されたガイドＲＮＡのループ領域内のチオホスフェート結合、のうちの少なくとも１つを含む、操作されたヌクレアーゼ系。

９９．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の５塩基又は当該操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の５塩基内の少なくとも１つのヌクレオチドの２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基修飾を含む、実施形態９８に記載の系。

１００．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの５’末端又は当該操作されたガイドＲＮＡの３’末端に２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基修飾を含む、実施形態９８に記載の系。

１０１．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの５’末端の最初の５塩基のうちの少なくとも２つの間のチオホスフェート（ＰＳ）結合、又は当該操作されたガイドＲＮＡの３’末端の最後の５塩基のうちの少なくとも２つの間のチオホスフェート結合を含む、実施形態９８～１００のいずれか１つに記載の系。

１０２．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム内にチオホスフェート結合を含む、実施形態９８～１０１のいずれか１つに

記載の系。
１０３．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの３’ステム又は５’ステム内に２’－Ｏメチル塩基修飾を含む、実施形態９８～１０２のいずれか１つに記載の系。
１０４．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡのスペーサー領域の少なくとも７塩基の２’－フルオロ塩基修飾を含む、実施形態９８～１０３のいずれか１つに記載の系。
１０５．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡのループ領域内にチオホスフェート結合を含む、実施形態９８～１０４のいずれか１つに記載の系。
１０６．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの当該５’末端に少なくとも３個の２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基、当該操作されたガイドＲＮＡの当該５’末端の最初の３塩基の間に２個のチオホスフェート結合、当該操作されたガイドＲＮＡの当該４’末端に少なくとも４個の２’－Ｏメチル又は２’－フルオロ塩基、及び当該操作されたガイドＲＮＡの当該３’末端の最後の３塩基の間に３個のチオホスフェート結合を含む、実施形態９８～１０５のいずれか１つに記載の系。
１０７．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの５’末端に少なくとも２つの２’－Ｏ－メチル塩基及び少なくとも２つのチオホスフェート結合、並びに当該操作されたガイドＲＮＡの３’末端に少なくとも１つの２’－Ｏ－メチル塩基及び少なくとも１つのチオホスフェート結合を含む、実施形態９８に記載の系。
１０８．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの当該３’ステム又は当該５’ステム領域の両方に少なくとも１つの２’－Ｏ－メチル塩基を含む、実施形態１０７に記載の系。
１０９．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡのシード領域を除くスペーサー領域内に少なくとも１個～少なくとも１４個の２’－フルオロ塩基を含む、実施形態１０７又は１０８に記載の系。
１１０．当該操作されたガイドＲＮＡが、当該操作されたガイドＲＮＡの当該５’ステム領域に少なくとも１つの２’－Ｏ－メチル塩基、及び当該ガイドＲＮＡのシード領域を除く当該スペーサー領域に少なくとも１個～少なくとも１４個の２’－フルオロ塩基を含む、実施形態１０７に記載の系。
１１１．当該ガイドＲＮＡが、ＶＥＧＦ－Ａ遺伝子を標的とするスペーサー配列を含む、実施形態９８～１１０のいずれか１つに記載の系。
１１２．当該ガイドＲＮＡが、配列番号３９８５と少なくとも８０％の同一性を有するスペーサー配列を含む、実施形態１１１に記載の系。
１１３．当該ガイドＲＮＡが、表７に列挙される化学修飾を含む、表７からのガイドＲＮＡ１～７のヌクレオチドを含む、実施形態１１１に記載の系。
１１４．当該ＲＮＡガイドヌクレアーゼが、Ｃａｓエンドヌクレアーゼである、実施形態９８～１１３のいずれか１つに記載の方法。
１１５．当該Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼである、実施形態１１４に記載の方法。
１１６．当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、ＲｕｖＣＩサブドメイン、ＲｕｖＣＩＩサブドメイン、及びＲｕｖＣＩＩＩサブドメインを含むＲｕｖＣドメインを含む、実施形態１１５に記載の方法。
１１７．当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態１１５～１１６のいずれか１つに記載の方法。
１１８．当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態１１５～１１６のいずれか１つに記載の方法。
１１９．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３

５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、実施形態１１４～１１８のいずれか１つに記載の方法。

１２０．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３６０８～３６０９、３８５３、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、実施形態１１１～１１８のいずれか１つに記載の方法。

１２１．配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する異種エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含む、宿主細胞。

１２２．当該エンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する、実施形態１２１に記載の宿主細胞。

１２３．当該宿主細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である、実施形態１２１～１２２のいずれか１つに記載の宿主細胞。

１２４．当該Ｅ．ｃｏｌｉ細胞が、λＤＥ３リソゲンであるか、又はＥ．ｃｏｌｉ細胞が、ＢＬ２１（ＤＥ３）株である、実施形態１２３に記載の宿主細胞。

１２５．当該Ｅ．ｃｏｌｉ細胞が、ｏｍｐＴ　ｌｏｎ細胞を有する、実施形態１０９～１１０のいずれか１つに記載の宿主細胞。

１２６．当該オープンリーディングフレームが、Ｔ７プロモーター配列、Ｔ７－ｌａｃプロモーター配列、ｌａｃプロモーター配列、ｔａｃプロモーター配列、ｔｒｃプロモーター配列、ＰａｒＢＡＤプロモーター配列、ＰｒｈａＢＡＤプロモーター配列、Ｔ５プロモーター配列、ｃｓｐＡプロモーター配列、ａｒａP_{BAD}プロモーター、ファージラムダからの強い左向きプロモーター（ｐＬプロモーター）、又はそれらの任意の組み合わせに作動可能に連結される、実施形態１２１～１２５のいずれか１つに記載の宿主細胞。

１２７．当該オープンリーディングフレームが、当該エンドヌクレアーゼをコードする配列にインフレームで連結された親和性タグをコードする配列を含む、実施形態１２１～１２６のいずれか１つに記載の宿主細胞。

１２８．当該親和性タグが、固定化金属親和性クロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）タグである、実施形態１２７に記載の方法。

１２９．当該ＩＭＡＣタグが、ポリヒスチジンタグである、実施形態１２８に記載の方法。

１３０．当該親和性タグが、ｍｙｃタグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）タグ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグ、ストレプトアビジンタグ、ＦＬＡＧタグ、又はそれらの任意の組み合わせである、実施形態１２７に記載の方法。

１３１．当該親和性タグが、プロテアーゼ切断部位をコードするリンカー配列を介して、当該エンドヌクレアーゼをコードする当該配列にインフレームで連結される、実施形態１２７～１３０のいずれか１つに記載の宿主細胞。

１３２．当該プロテアーゼ切断部位が、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位、ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ（登録商標）プロテアーゼ切断部位、トロンビン切断部位、第Ｘａ因子切断部位、エンテロキナーゼ切断部位、又はそれらの任意の組み合わせである、実施形態１３１に記載の宿主細胞。

１３３．当該オープンリーディングフレームが、当該宿主細胞における発現のためにコドン最適化される、実施形態１２１～１３２のいずれか１つに記載の宿主細胞。

１３４．当該オープンリーディングフレームが、ベクター上に提供される、実施形態１２１～１３３のいずれか１つに記載の宿主細胞。

１３５．当該オープンリーディングフレームが、当該宿主細胞のゲノムに組み込まれる

、実施形態１２１～１３３のいずれか１つに記載の宿主細胞。
１３６．適合する液体培地中に、実施形態１２１～１３５のいずれか１つに記載の宿主細胞を含む、培養物。
１３７．エンドヌクレアーゼを産生する方法であって、適合する成長培地中で実施形態１２１～１３５のいずれか１つに記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。
１３８．追加の化学剤又は増加された量の栄養素を添加することによって、当該エンドヌクレアーゼの発現を誘導することを更に含む、実施形態１３７に記載の方法。
１３９．追加の化学剤又は栄養素の量の増加が、イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）又は追加の量のラクトースを含む、実施形態１３８に記載の方法。
１４０．当該培養後に当該宿主細胞を単離することと、当該宿主細胞を溶解してタンパク質抽出物を産生することとを更に含む、実施形態１３７～１３９のいずれか１つに記載の方法。
１４１．当該タンパク質抽出物をＩＭＡＣ、又はイオン親和性クロマトグラフィーに供することを更に含む、実施形態１４０に記載の方法。
１４２．当該オープンリーディングフレームが、当該エンドヌクレアーゼをコードする配列にインフレームで連結されたＩＭＡＣ親和性タグをコードする配列を含む、実施形態１４１に記載の方法。
１４３．当該ＩＭＡＣ親和性タグが、プロテアーゼ切断部位をコードするリンカー配列を介して、当該エンドヌクレアーゼをコードする当該配列にインフレームで連結される、実施形態１４２に記載の方法。
１４４．当該プロテアーゼ切断部位が、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位、ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ（登録商標）プロテアーゼ切断部位、トロンビン切断部位、第Ｘａ因子切断部位、エンテロキナーゼ切断部位、又はそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態１４３に記載の方法。
１４５．当該プロテアーゼ切断部位に対応するプロテアーゼを当該エンドヌクレアーゼと接触させることによって、当該ＩＭＡＣ親和性タグを切断することを更に含む、実施形態１４３～１４４のいずれか１つに記載の方法。
１４６．サブトラクティブＩＭＡＣ親和性クロマトグラフィーを行って、当該エンドヌクレアーゼを含む組成物から当該親和性タグを除去することを更に含む、実施形態１４５に記載の方法。
１４７．系であって、
（ａ）３－又は４－ヌクレオチドＰＡＭ配列に結合するように構成されているクラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼであって、当該エンドヌクレアーゼが、ｓＭｂＣａｓ１２ａと比較して増加された切断活性を有する、クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、
（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、当該クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む、系。
１４８．当該切断活性が、当該エンドヌクレアーゼを適合するガイドＲＮＡとともに当該標的核酸を含む細胞に導入し、当該細胞内の当該標的核酸配列の切断を検出することによってインビトロで測定される、実施形態１４７に記載の系。
１４９．当該クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、２１５～２２５のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有する配列を含む、実施形態１４７～１４８のいずれか１つに記載の系。
１５０．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３６０９の非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む、実施形態１４９に記載の系。
１５１．当該標的核酸が、当該標的核酸配列の近位にＹＹＮ　ＰＡＭ配列を更に含む、実施形態１４９～１５０のいずれか１つに記載の系。
１５２．当該クラス２、Ｖ－Ａ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、ｓＭｂＣａｓ１２ａと

比較して少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、若しくは２００％、又はそれ以上増加した活性を有する、実施形態１４７～１５１のいずれか１つに記載の系。

１５３．系であって、

（ａ）クラス２、Ｖ－Ａ’型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼの天然エフェクター反復配列の約１９個～約２５個又は約１９個～約３１個の連続するヌクレオチドと少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む、系。

１５４．当該天然エフェクター反復配列が、配列番号３５６０～３５７２のうちのいずれか１つである、実施形態１５３に記載の系。

１５５．当該クラス２、Ｖ－Ａ’型Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、配列番号１２６と少なくとも７５％の同一性を有する、実施形態１５３～１５４のいずれか１つに記載の系。

１５６．細胞におけるＶＥＧＦ－Ａ遺伝子座を破壊する方法であって、当該細胞に、

（ｂ）クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ当該ＶＥＧＦ－Ａ遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を導入することを含み、

当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３９８５と少なくとも８０％の同一性を有する標的化配列を含むか、又は

当該操作されたガイドＲＮＡが、表７のガイドＲＮＡ１～７のうちのいずれか１つのヌクレオチド配列を含む、方法。

１５７．当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１～３４７０のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態１５６に記載の系。

１５８．当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、配列番号１４１、２１５、２２９、２６１、若しくは１７１１～１７２１のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態１５６～１５７のいずれか１つに記載の系。

１５９．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３４７１、３５３９、３５５１－３５５９、３６０８－３６０９、３６１２、３６３６－３６３７、３６４０－３６４１、３６４４－３６４５、３６４８－３６４９、３６５２－３６５３、３６５６－３６５７、３６６０－３６６１、３６６４－３６６７、３６７１－３６７２、３６７７－３６７８、３６９５－３６９６、３７２９－３７３０、３７３４－３７３５、及び３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、実施形態１５６～１５８のいずれか１つに記載の系。

１６０．当該操作されたガイドＲＮＡが、配列番号３６０８～３６０９、３８５３、又は３８５１～３８５７のうちのいずれか１つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、実施形態１５６～１５８のいずれか１つに記載の系。

１６１．細胞中の遺伝子座を破壊する方法であって、当該細胞に、

（ａ）配列番号２１５～２２５のうちのいずれか１つ又はそのバリアントと少なくとも７５％の同一性を有するクラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼと、

（ｂ）操作されたガイドＲＮＡであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するよう構成されており、かつ当該遺伝子座の領域にハイブリダイズするよう構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドＲＮＡと、を含む組成物を接触させることを含み、

当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼが、当該細胞中のｓｐＣａｓ９と少なくとも同等の切断活性を有する、方法。

１６２．当該切断活性が、当該エンドヌクレアーゼを適合するガイドＲＮＡとともに当

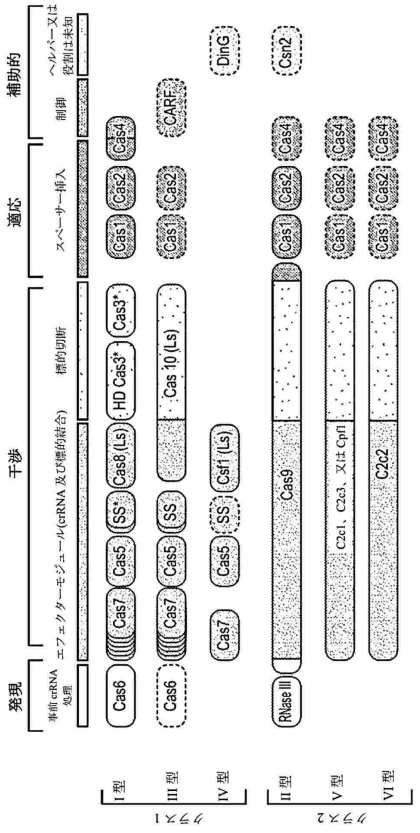
該標的核酸を含む細胞に導入し、当該細胞内の当該標的核酸配列の切断を検出することによってインビトロで測定される、実施形態１６１に記載の方法。

１６３．当該組成物が、２０ｐｍｏｌｅ以下の当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼをを含む、実施形態１６１～１６２のいずれか１つに記載の方法。

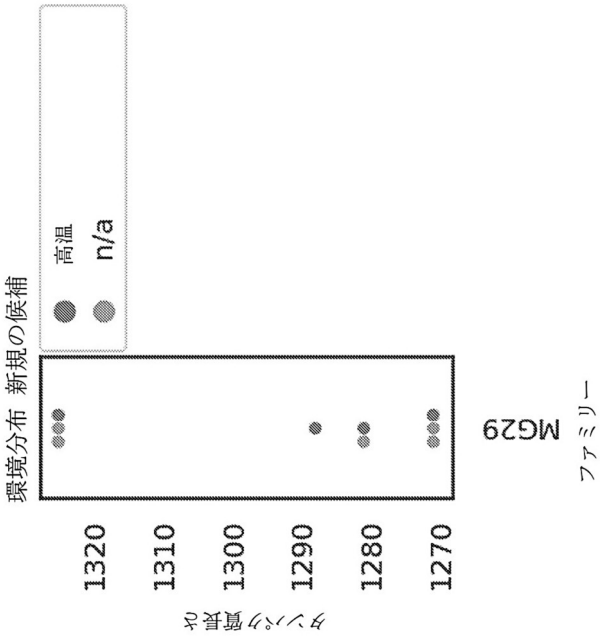
１６４．当該組成物が、１ｐｍｏｌｅ以下の当該クラス２、Ｖ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼをを含む、実施形態１６３に記載の方法。

【図面】

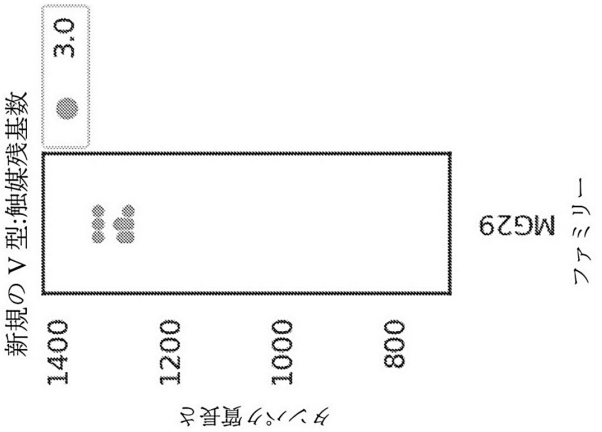
【図１】



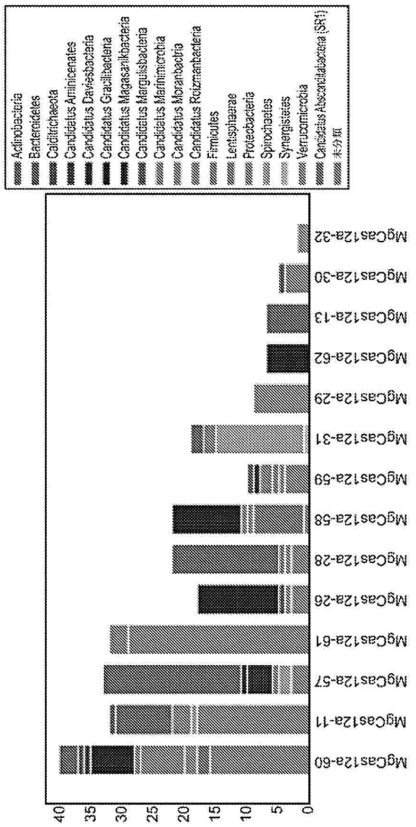
【図２】



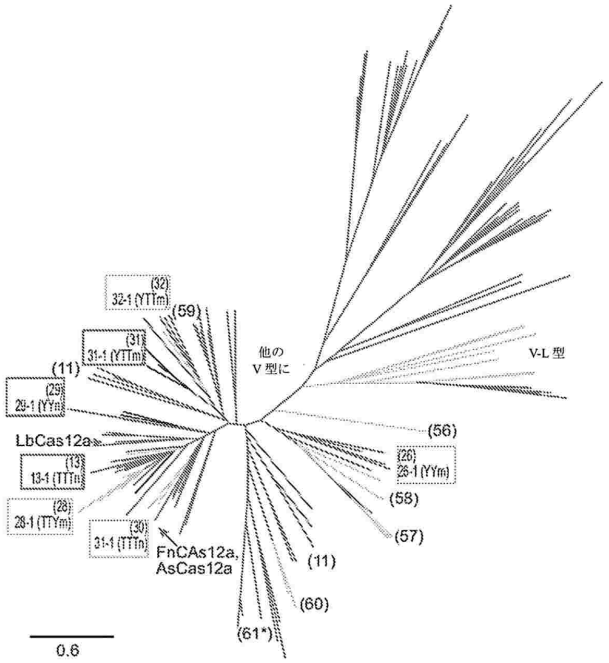
【図３】



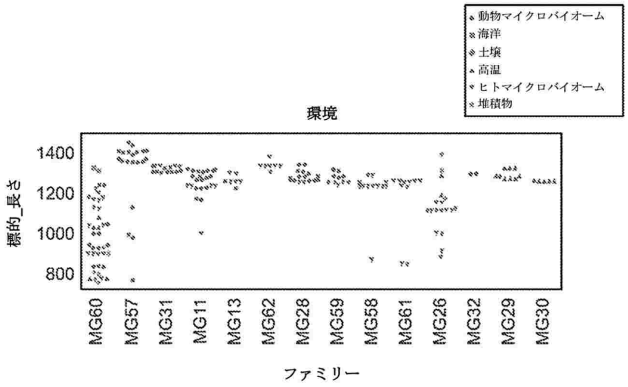
【図４Ａ】



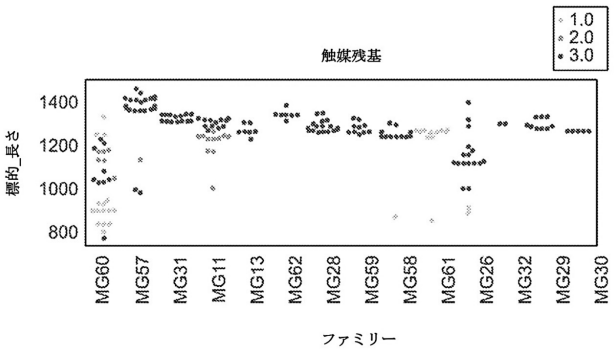
【図４Ｂ】



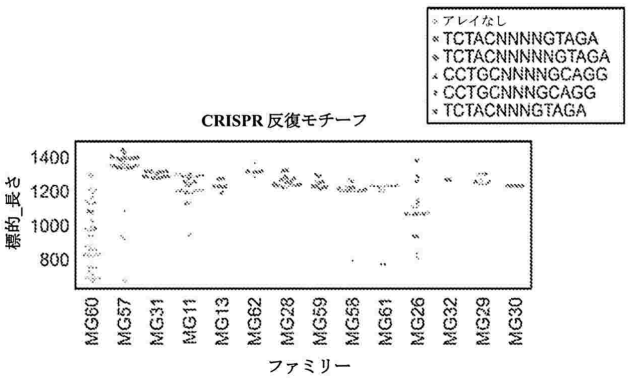
【図５Ａ】



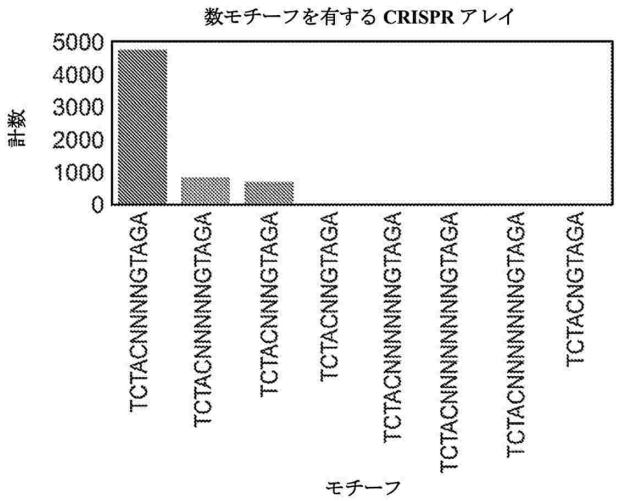
【図５Ｂ】



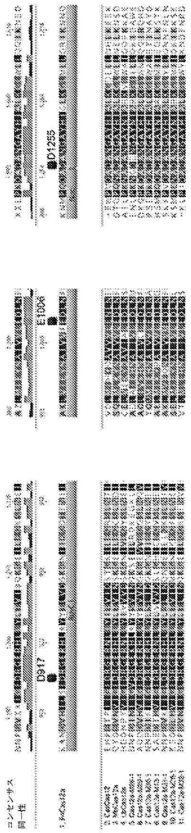
【図５Ｃ】



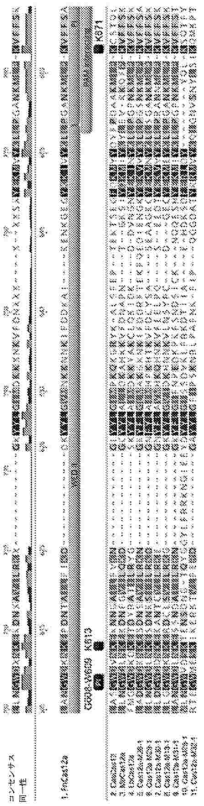
【図５Ｄ】



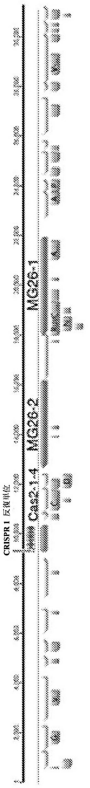
【図６Ａ】



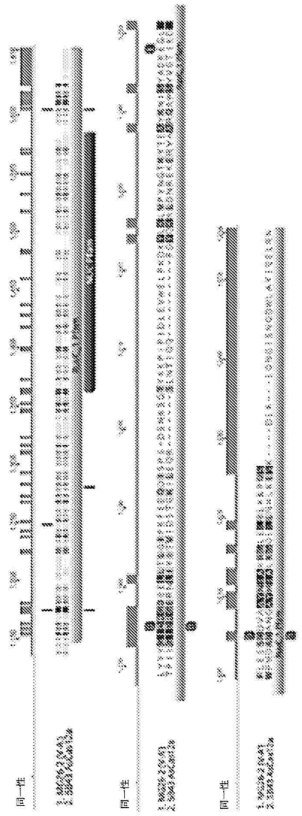
【図６Ｂ】



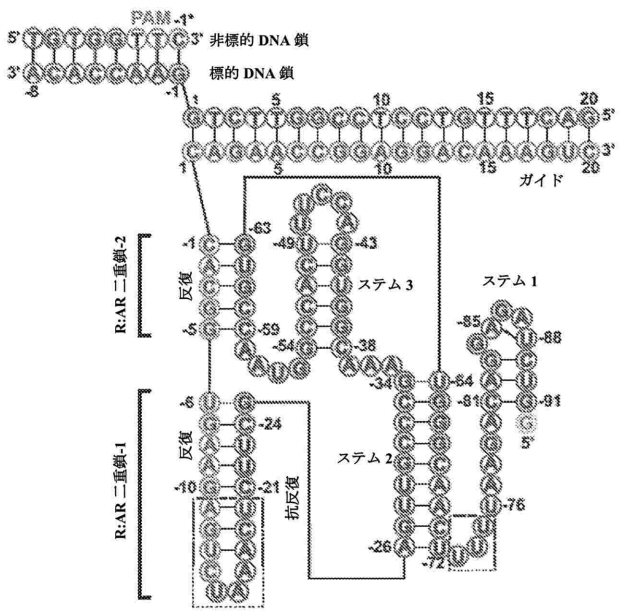
【図７Ａ】



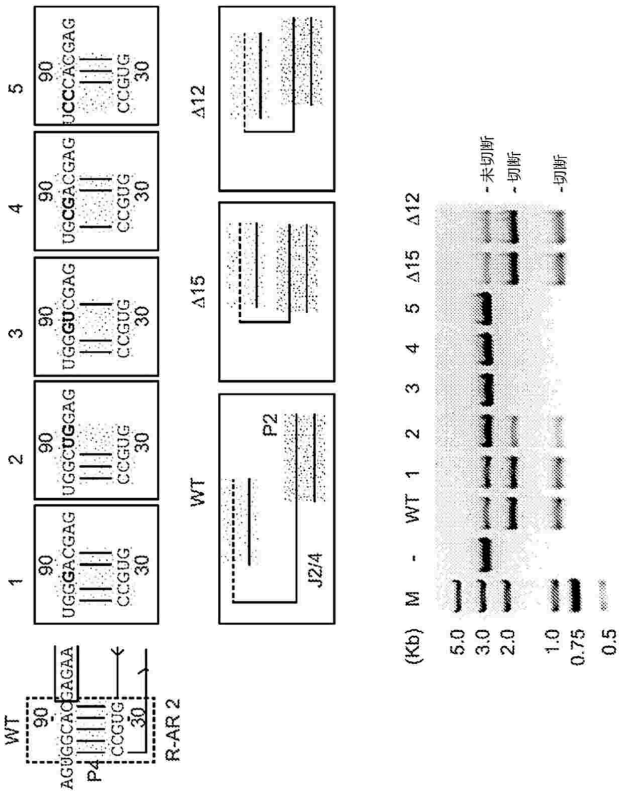
【図７Ｂ】



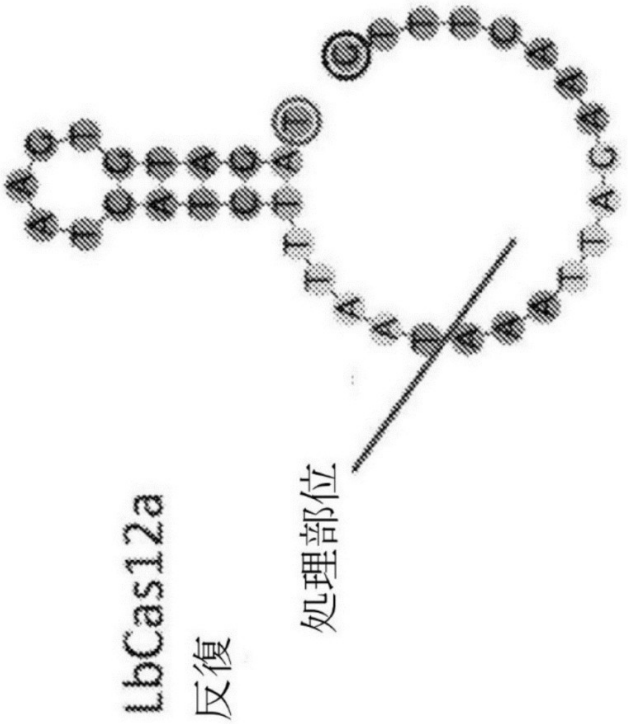
【図８】



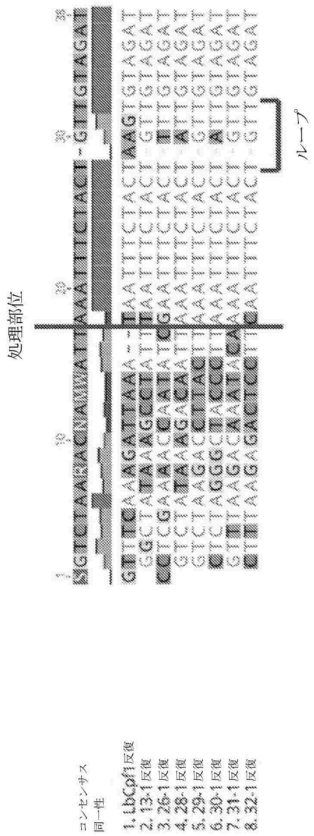
【図９】



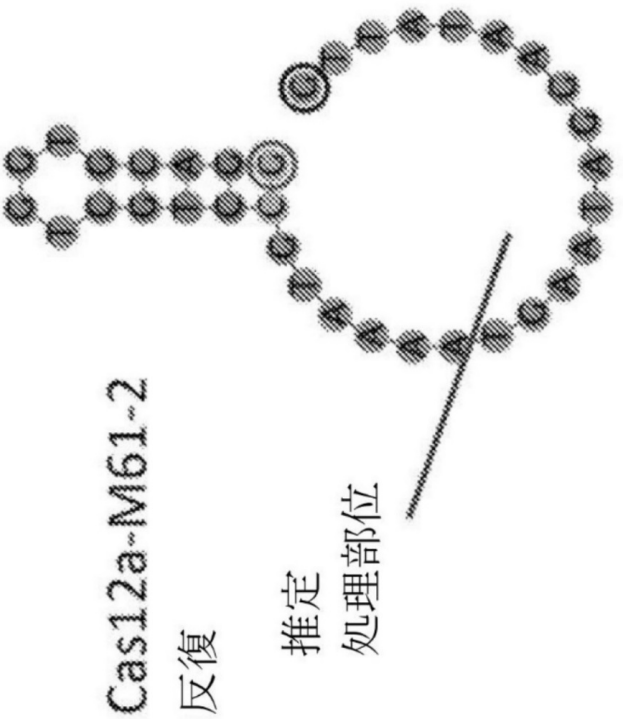
【図１０Ａ】



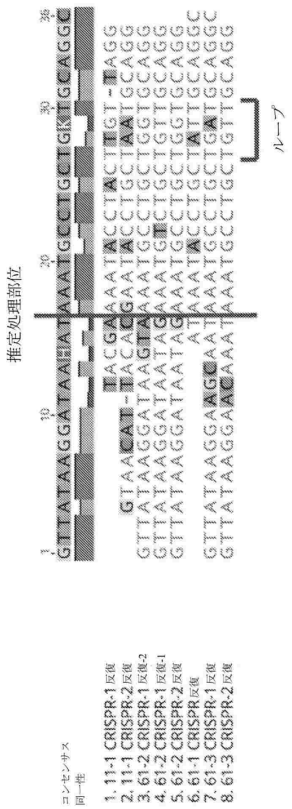
【図１０Ｂ】



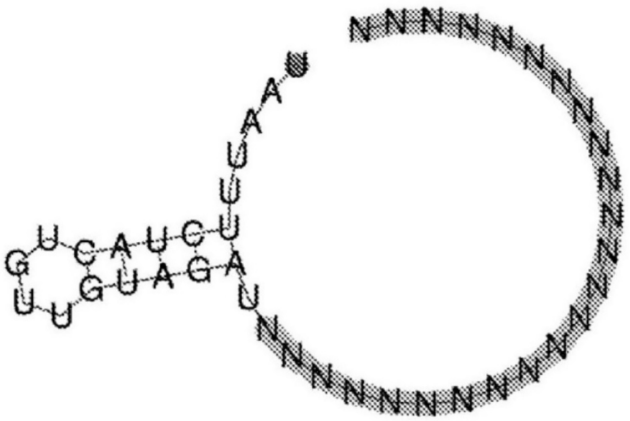
【図１０Ｃ】



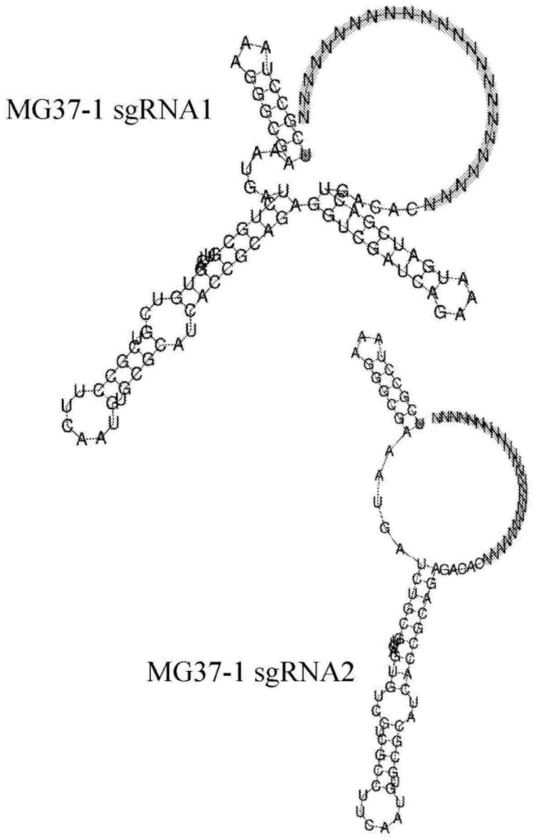
【図１０Ｄ】



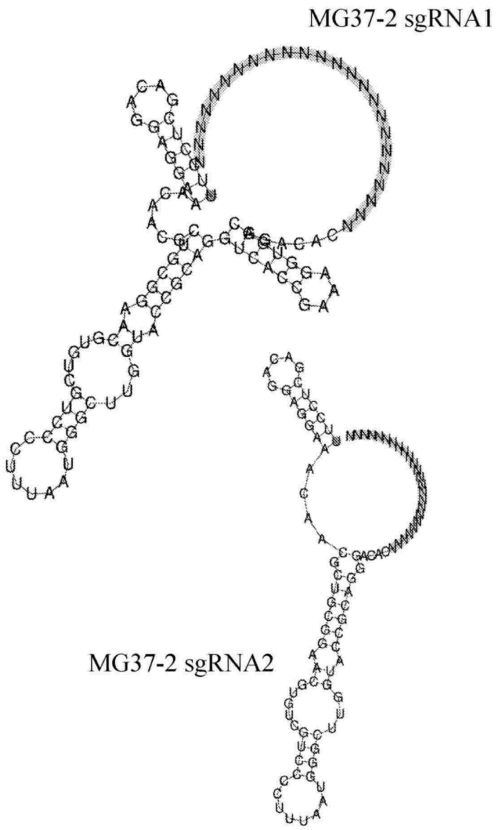
【図１１】



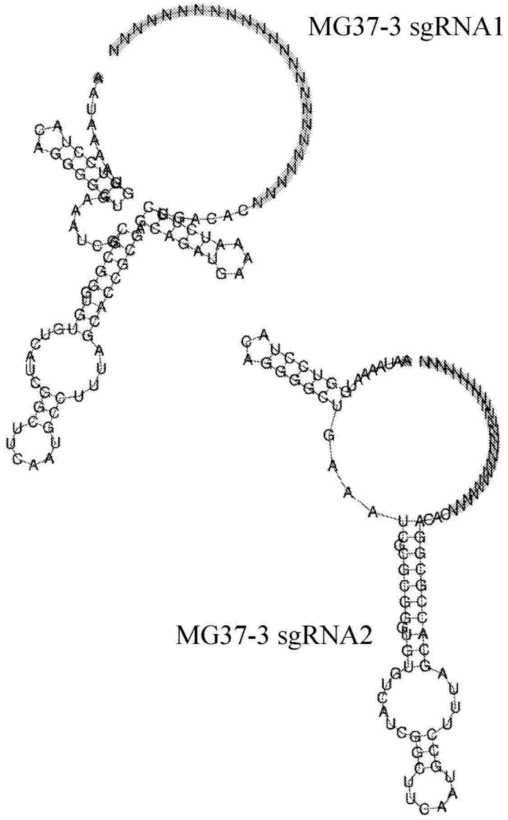
【図１２－１】



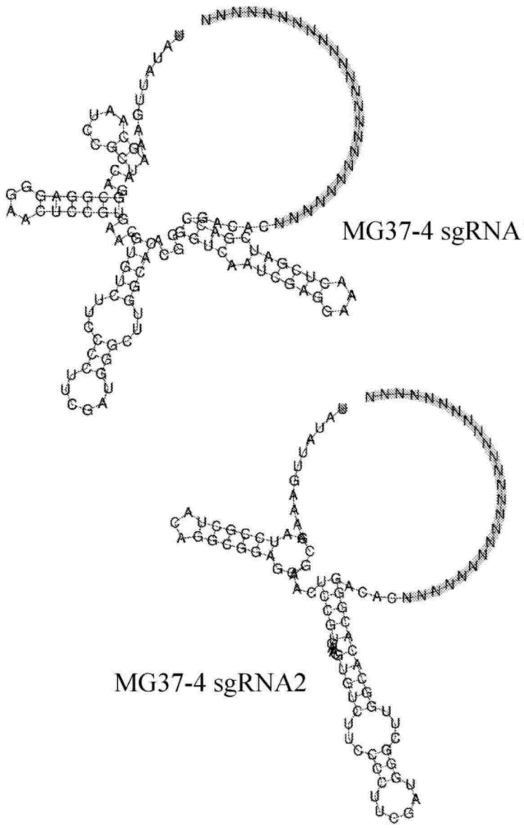
【図１２－２】



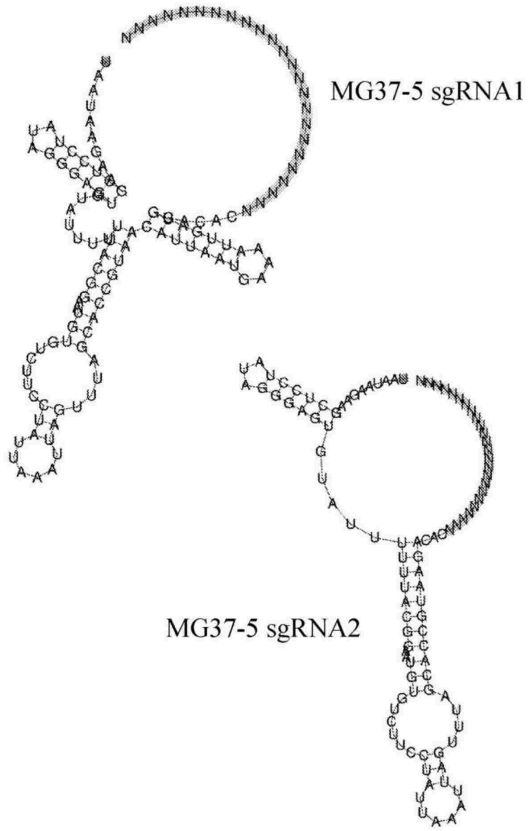
【図１３－１】



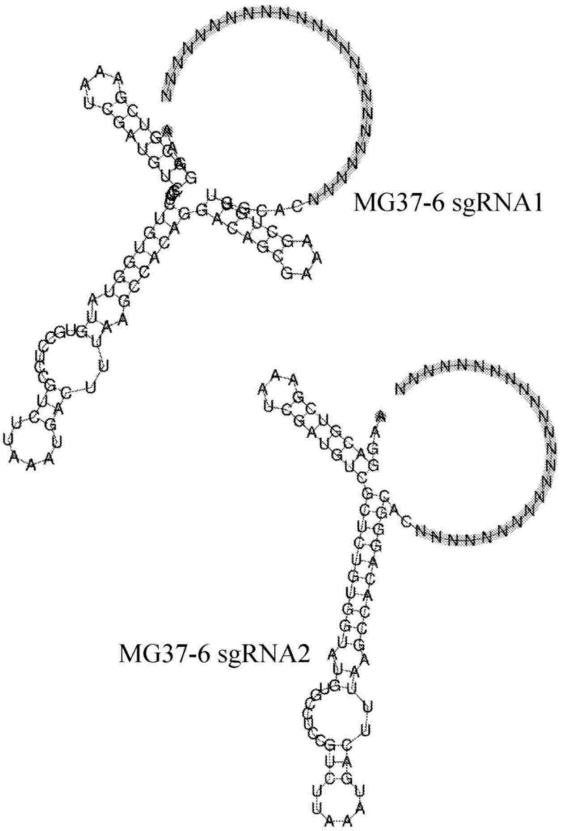
【図１３－２】



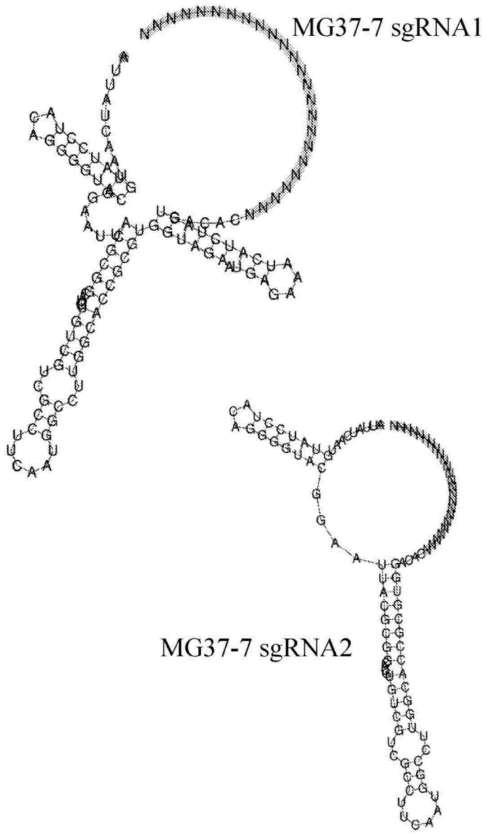
【図１４－１】



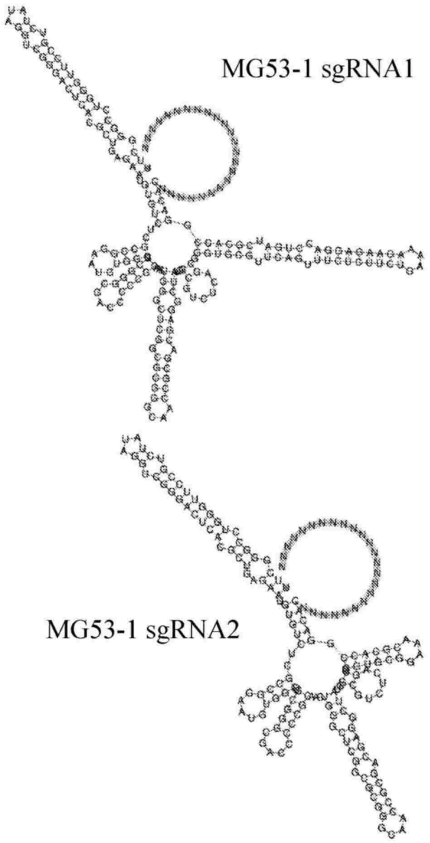
【図１４－２】



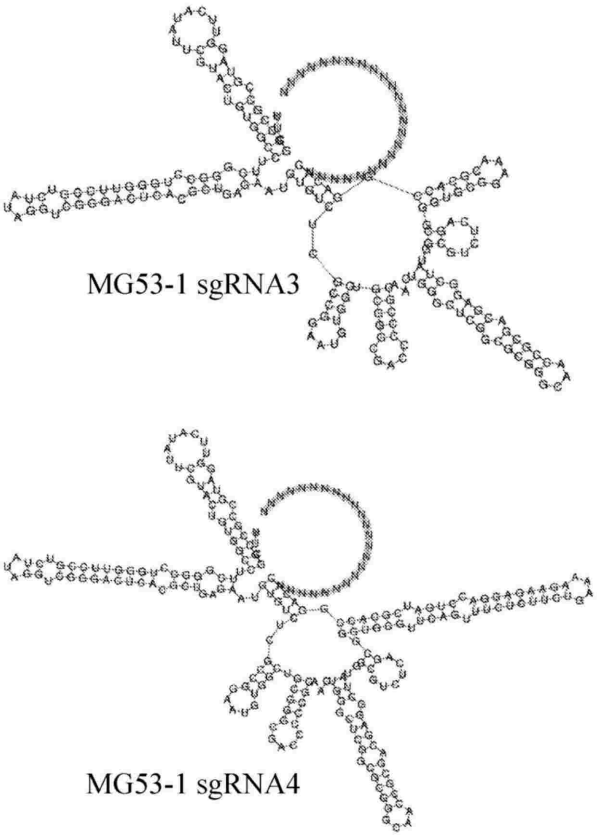
【図１５－１】



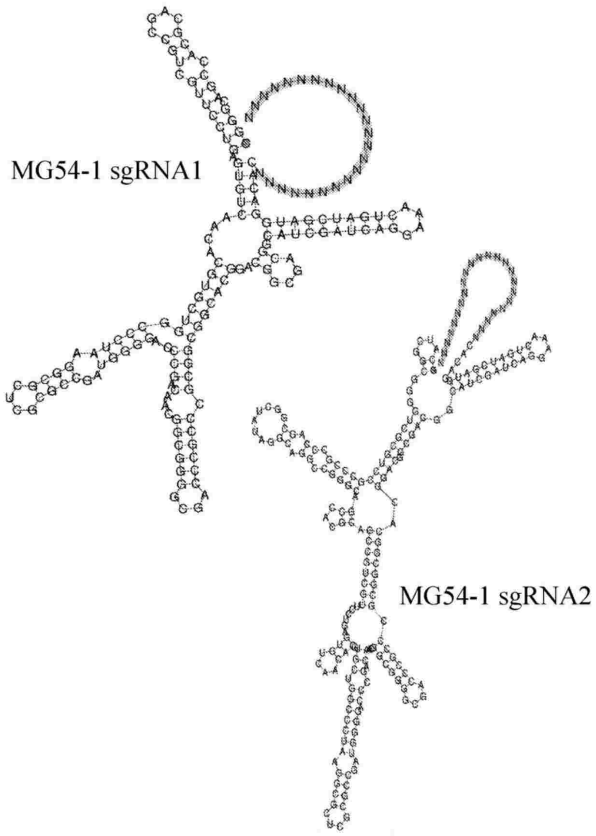
【図１５－２】



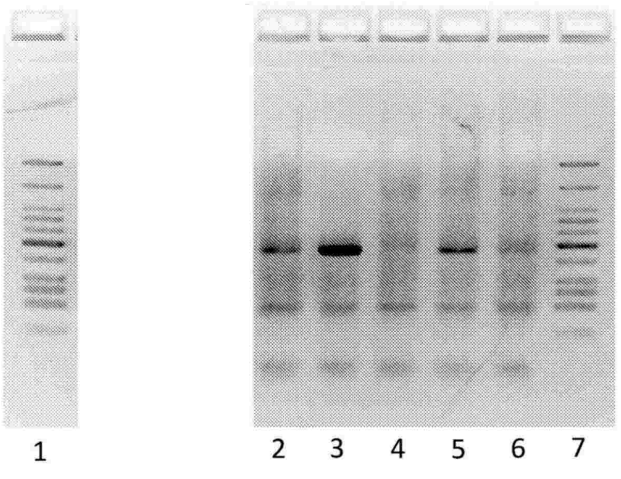
【図１６－１】



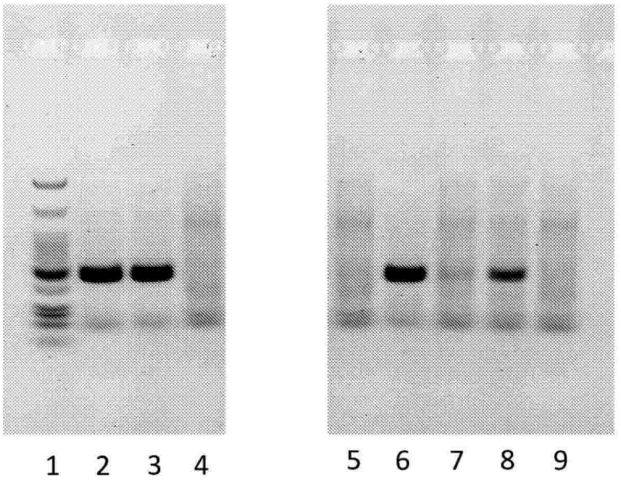
【図１６－２】



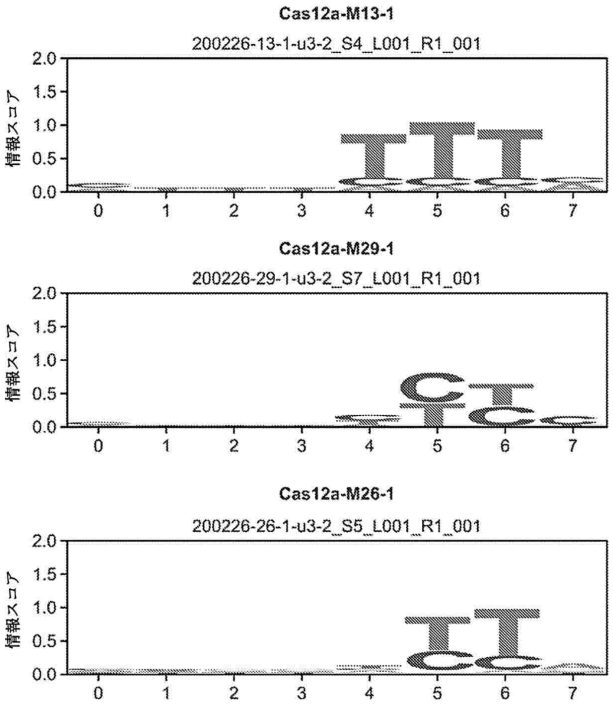
【図１７Ａ】



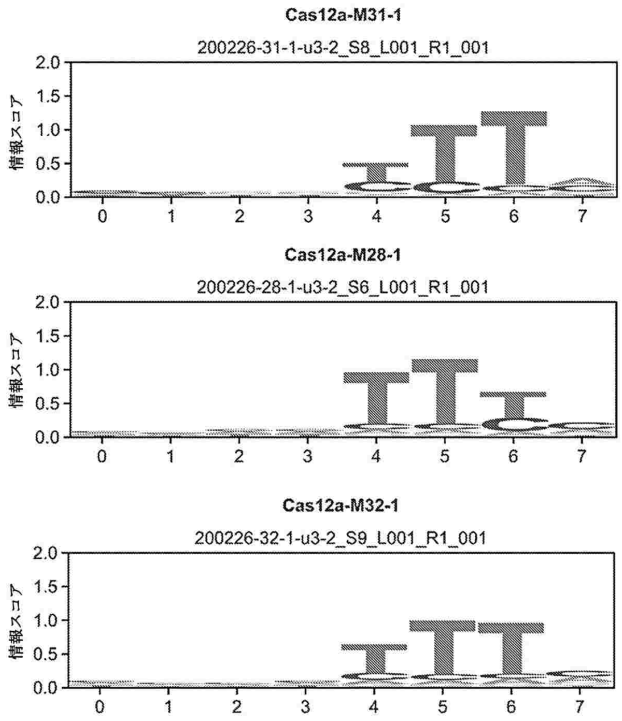
【図１７Ｂ】



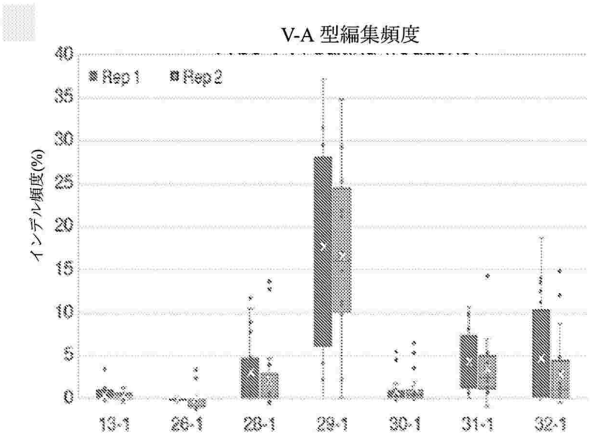
【図１８Ａ－１】



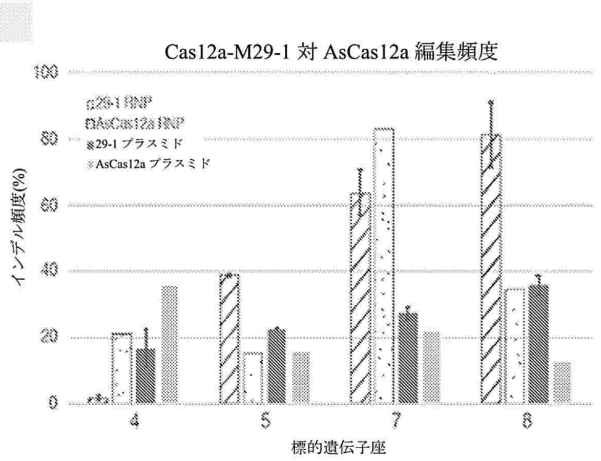
【図１８Ａ－２】



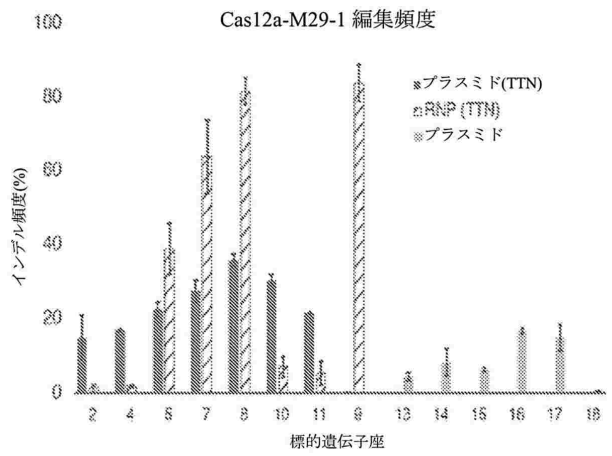
【図１８Ｂ】



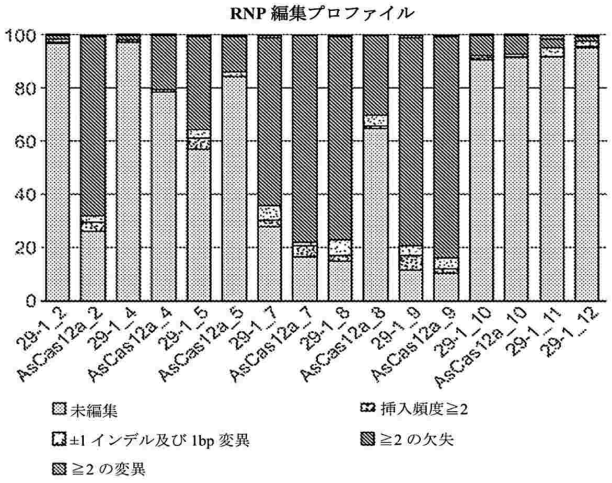
【図１８Ｃ】



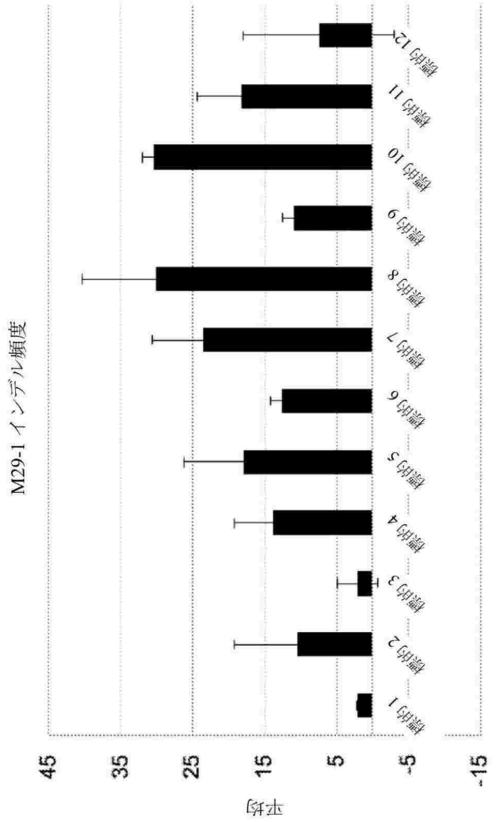
【図１８Ｄ】



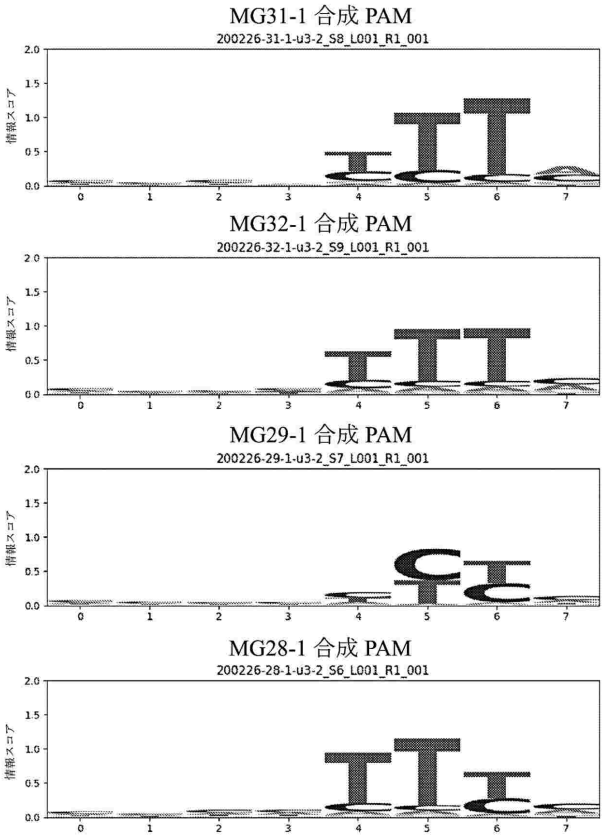
【図１８Ｅ】



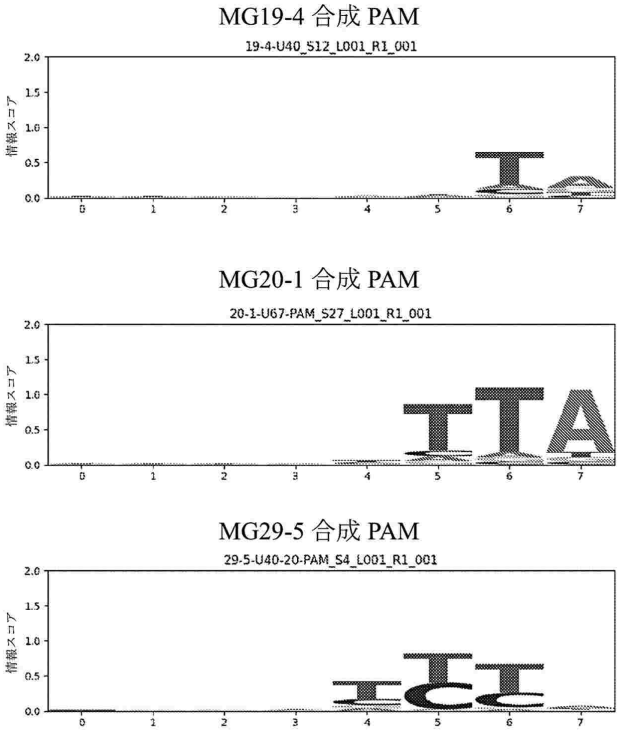
【図１９】



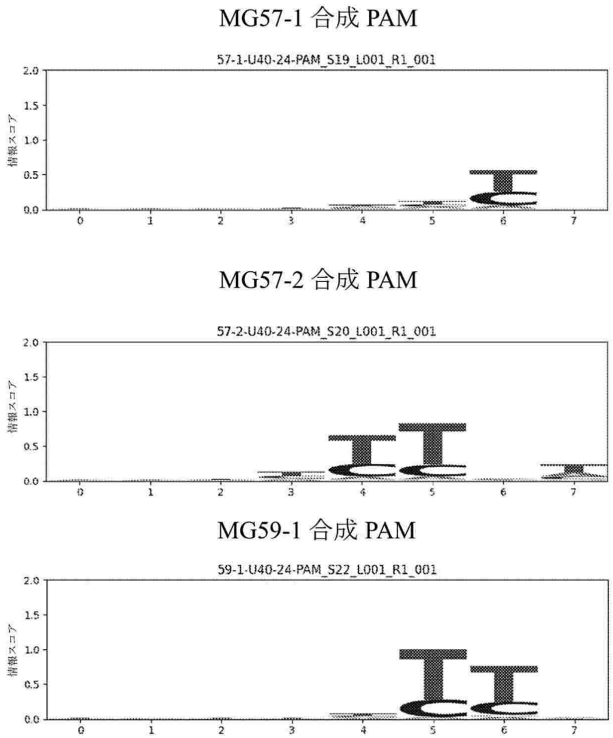
【図２０】



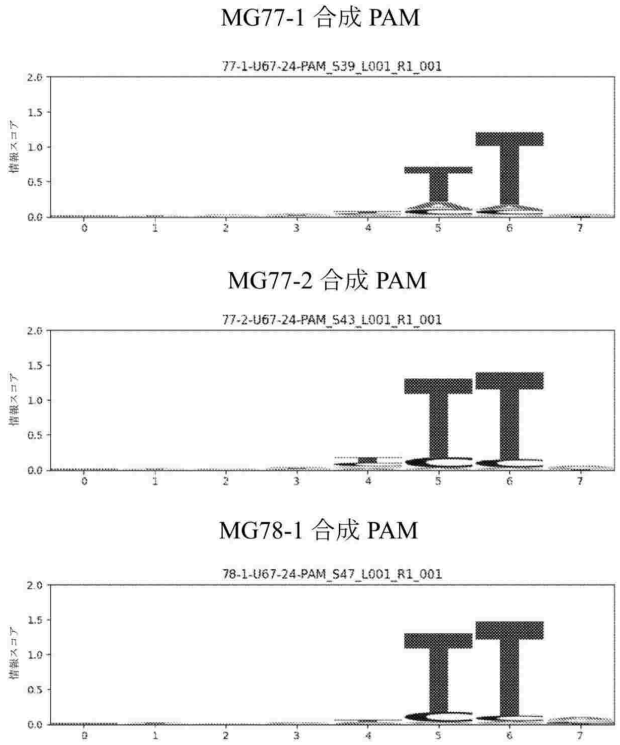
【図２１】



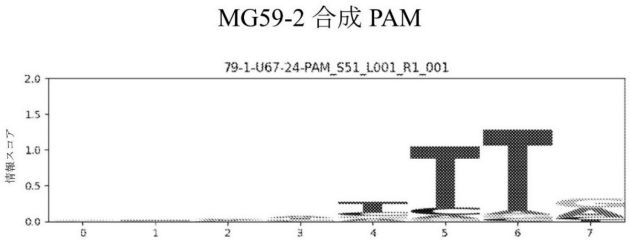
【図２２】



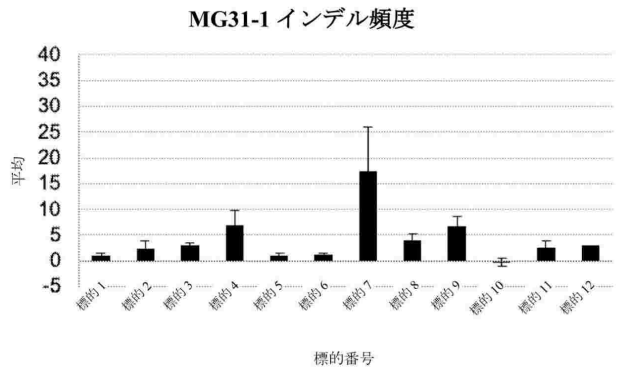
【図２３】



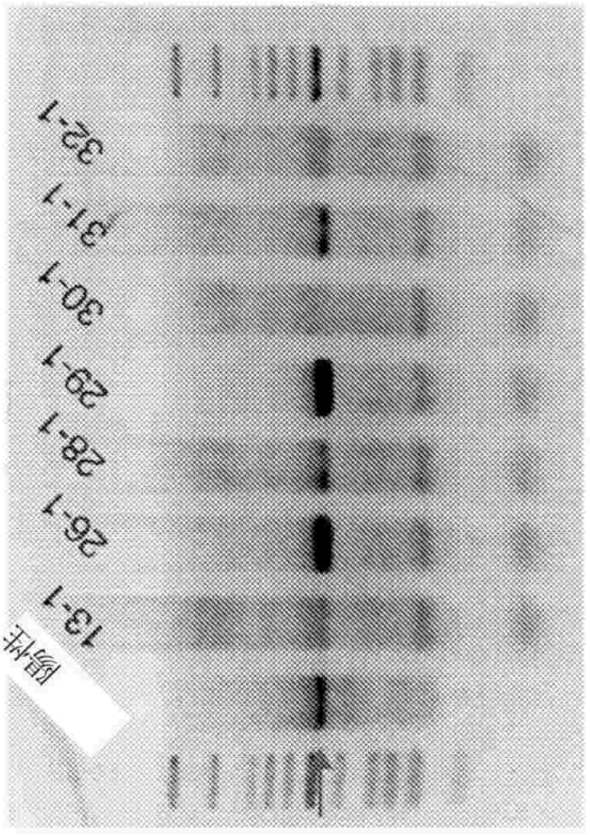
【図２４】



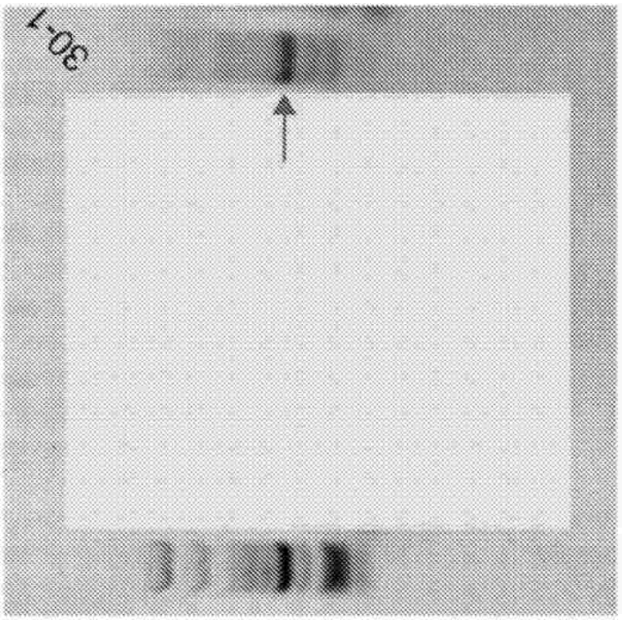
【図２５】



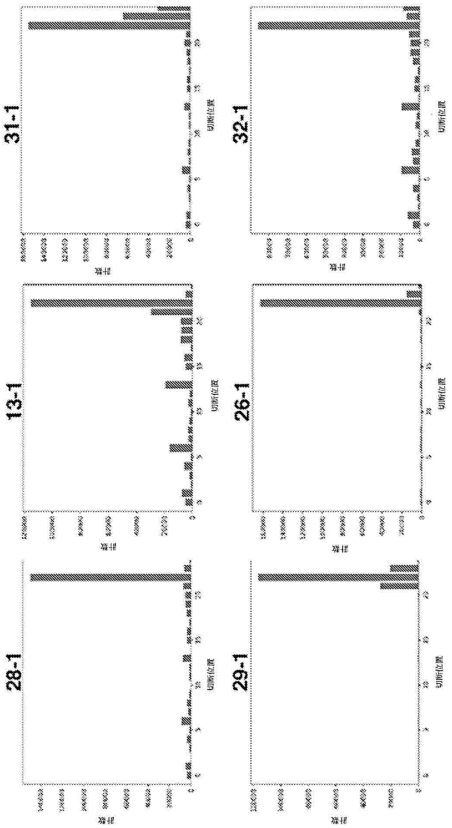
【図２６Ａ】



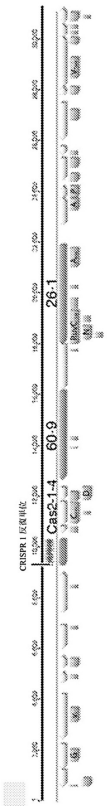
【図２６Ｂ】



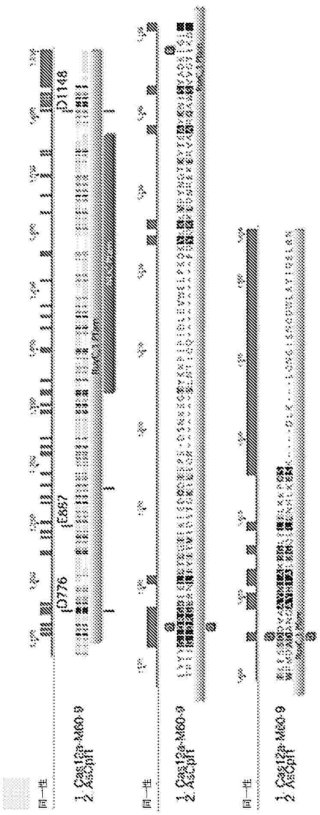
【図２６Ｃ】



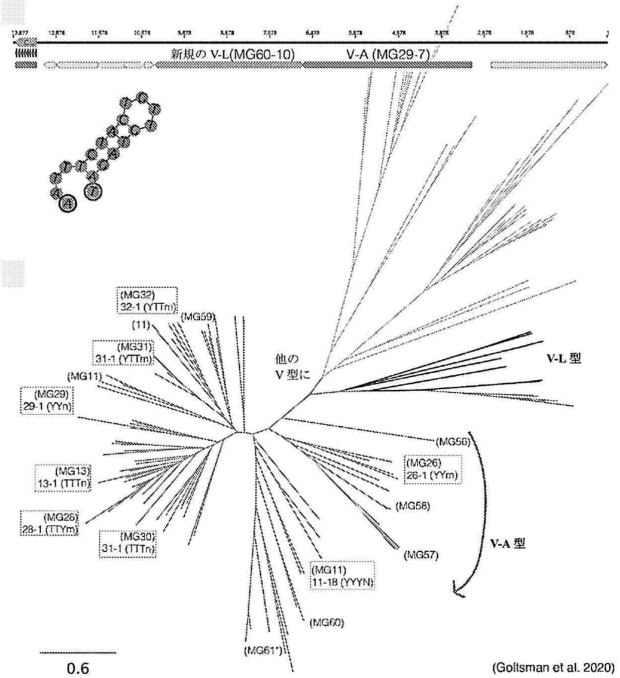
【図２７Ａ】



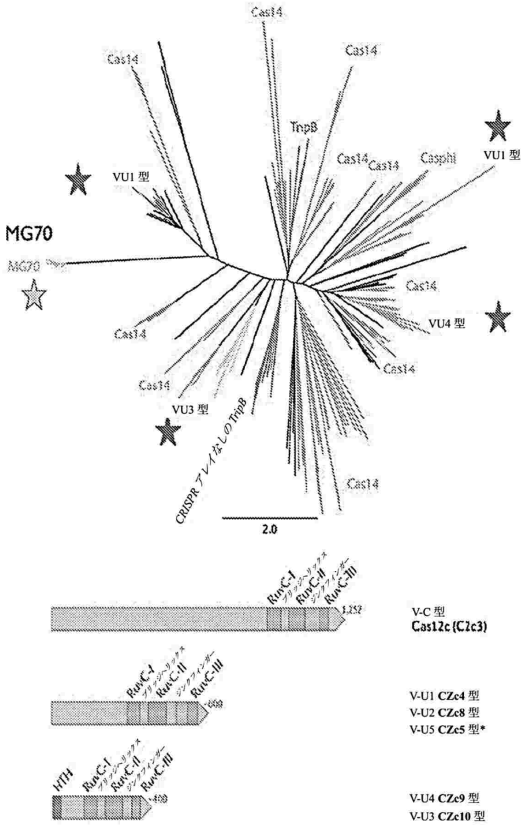
【図２７Ｂ】



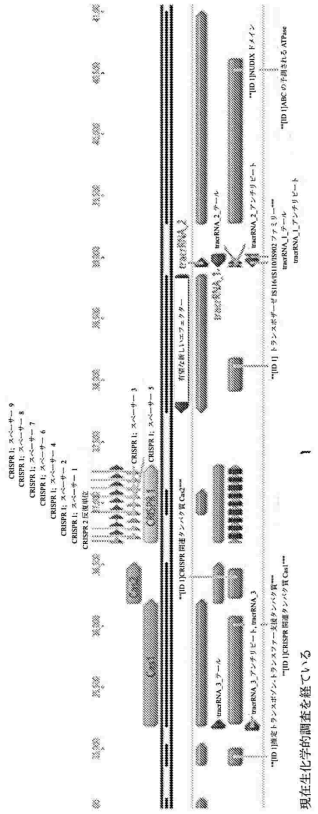
【図２８】



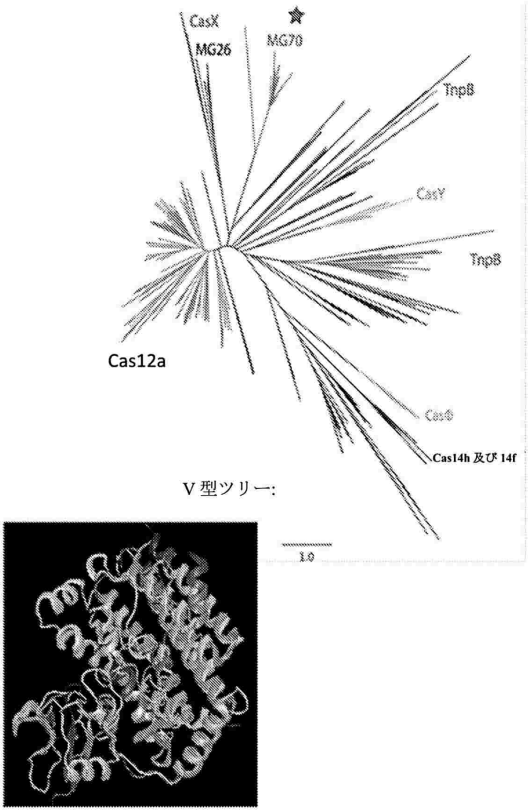
【図２９】



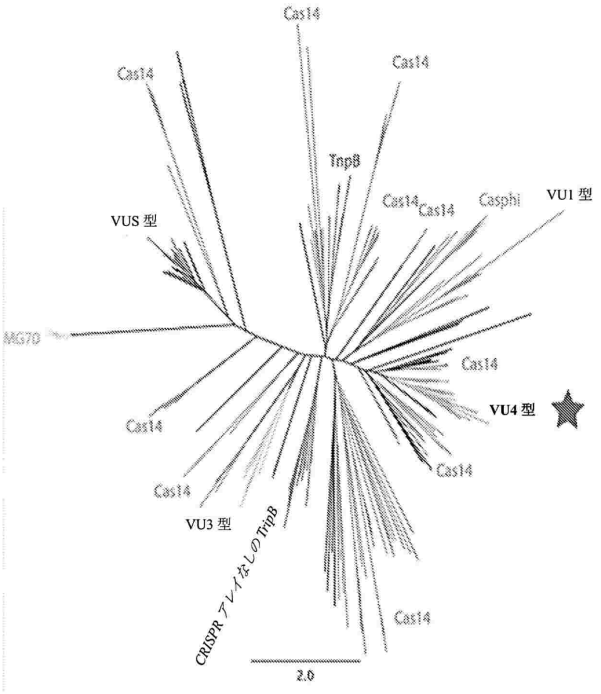
【図３０－１】



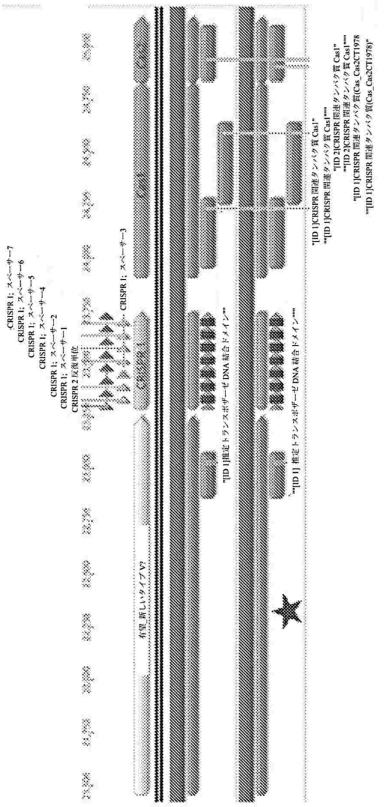
【図３０－２】



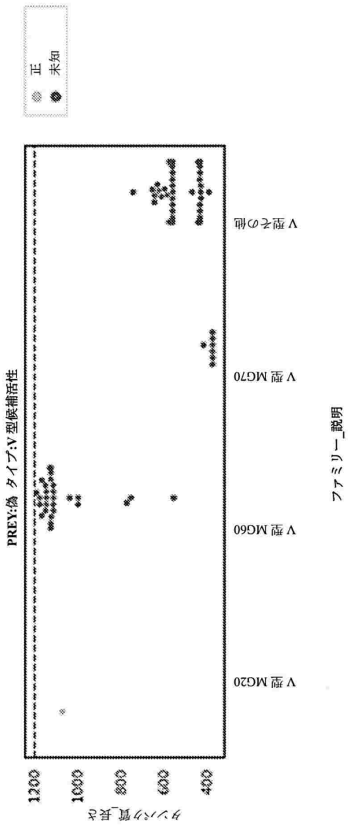
【図３１－１】



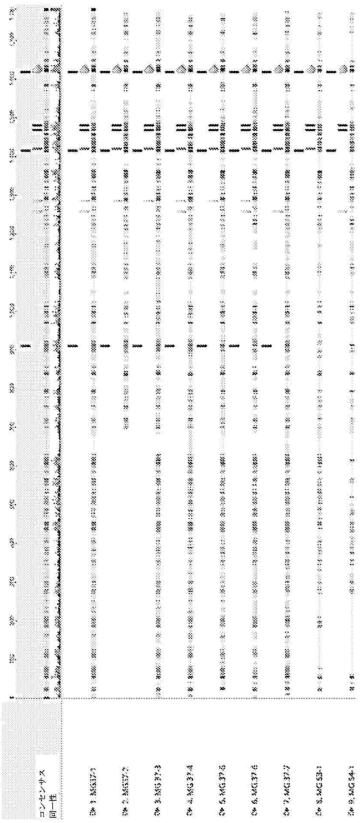
【図３１－２】



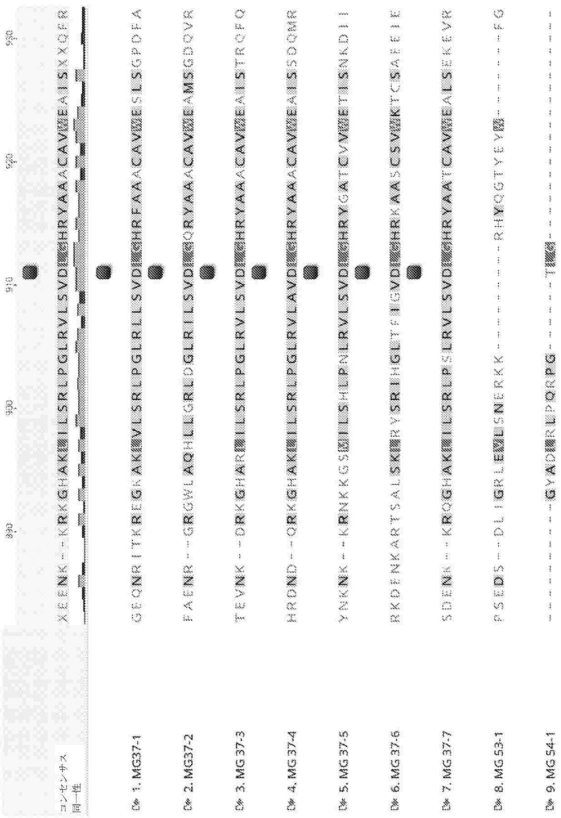
【図３２】



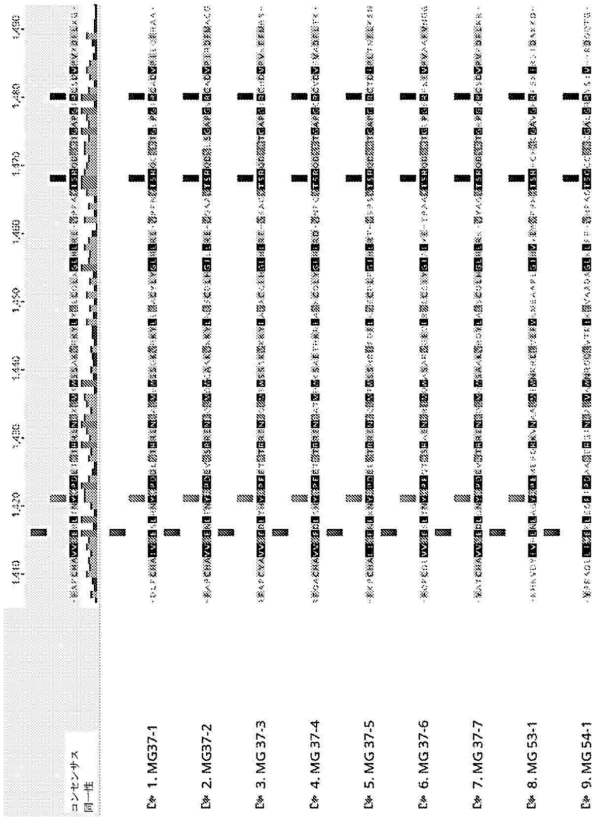
【図３３】



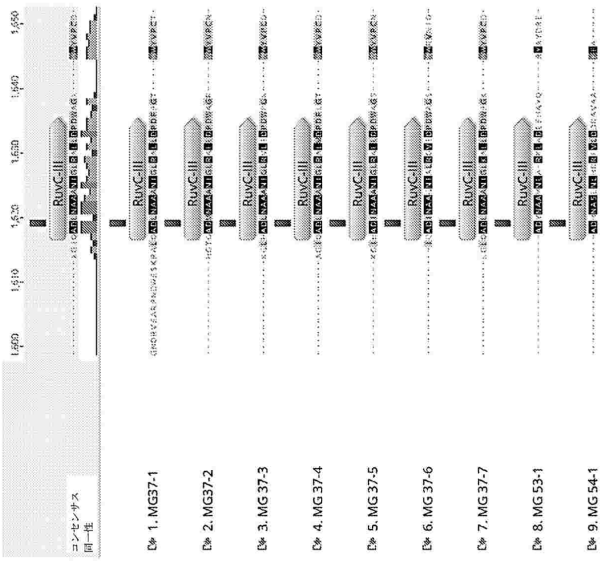
【図３４】



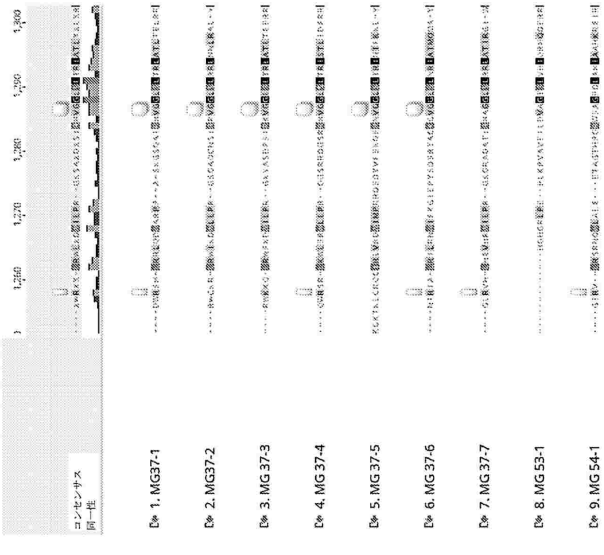
【図３５】



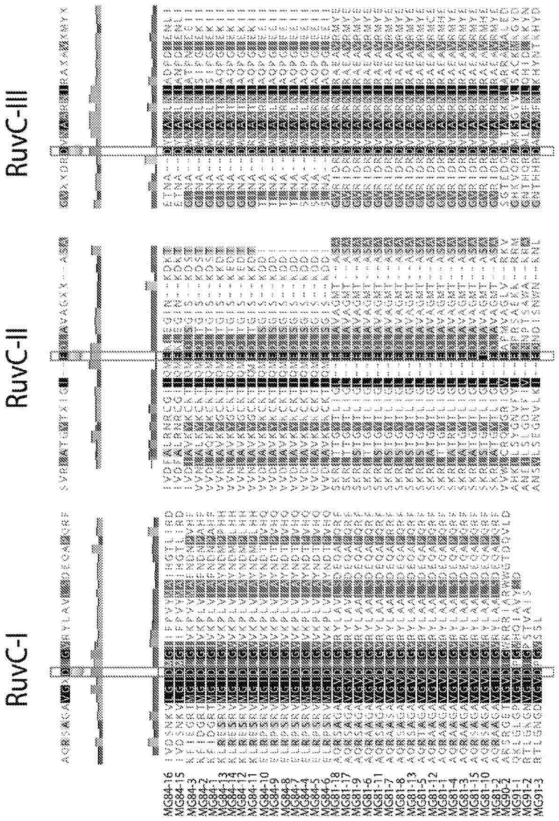
【図３６】



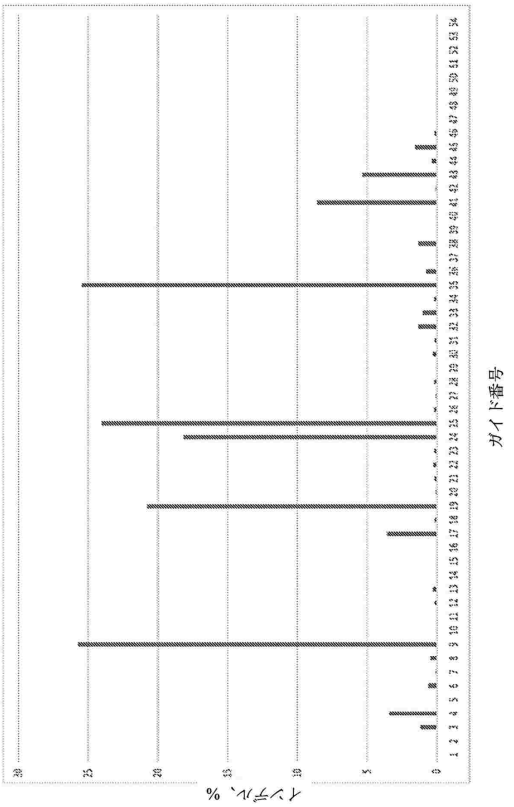
【図３７】



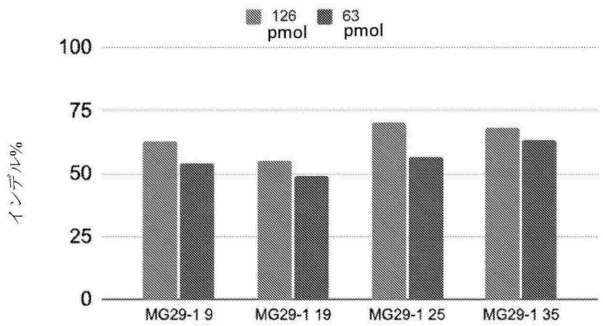
【図３８】



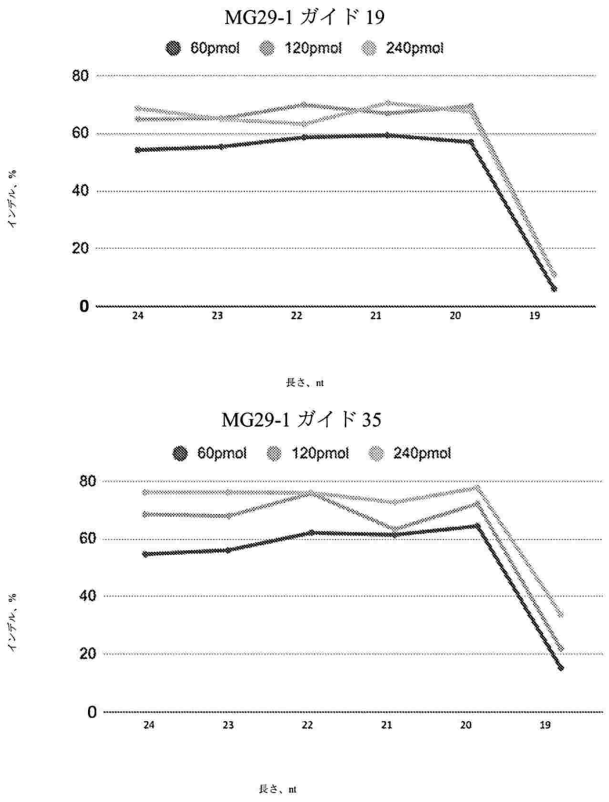
【図３９】



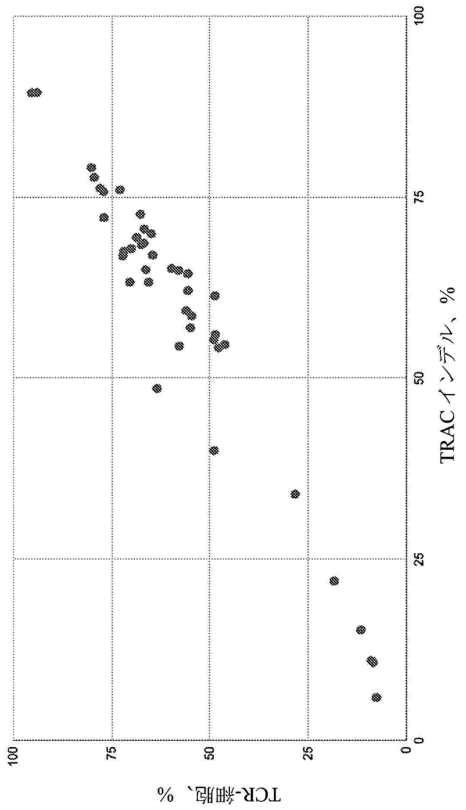
【図４０】



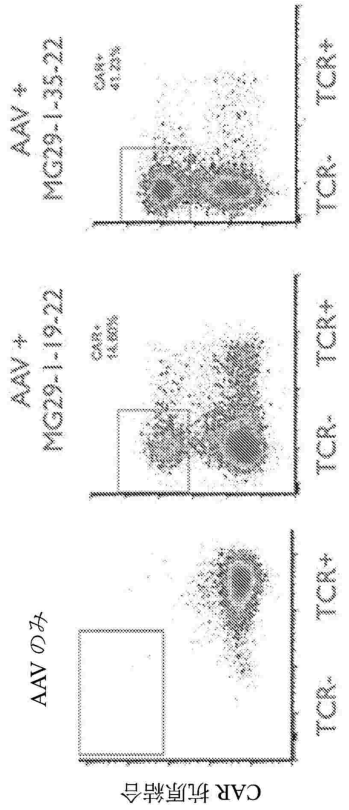
【図４１】



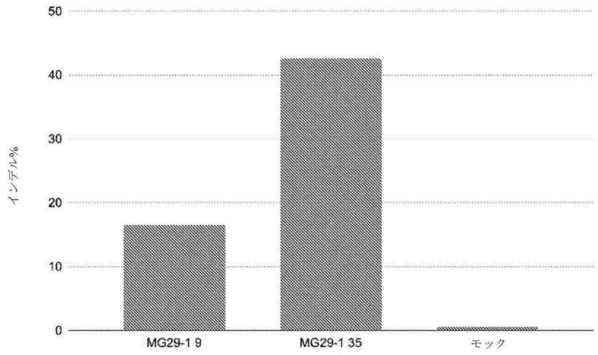
【図４２】



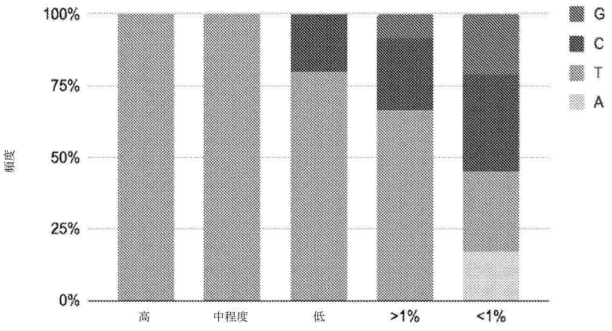
【図４３】



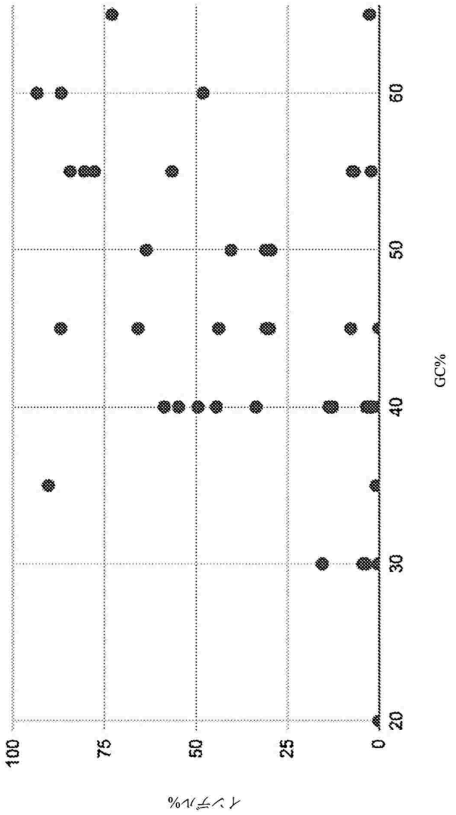
【図４４】



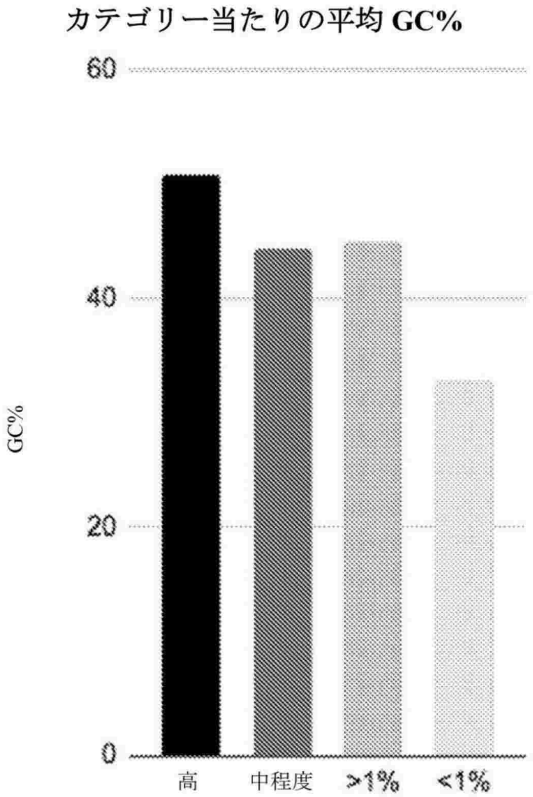
【図４５】



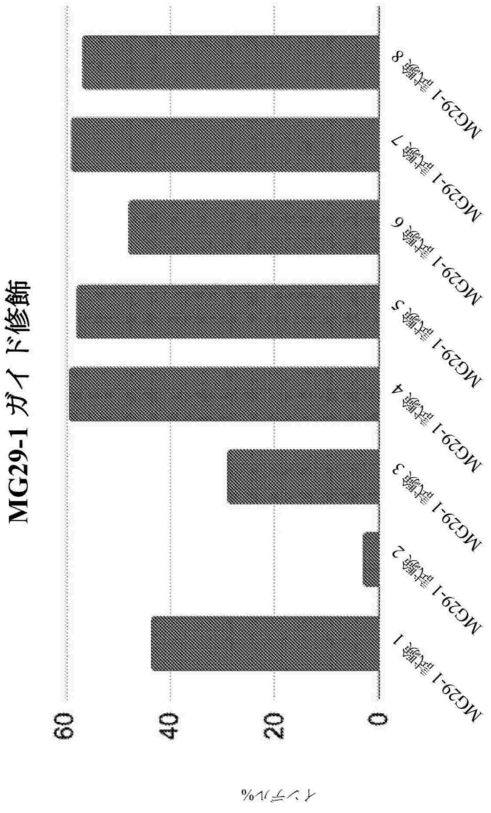
【図４６－１】



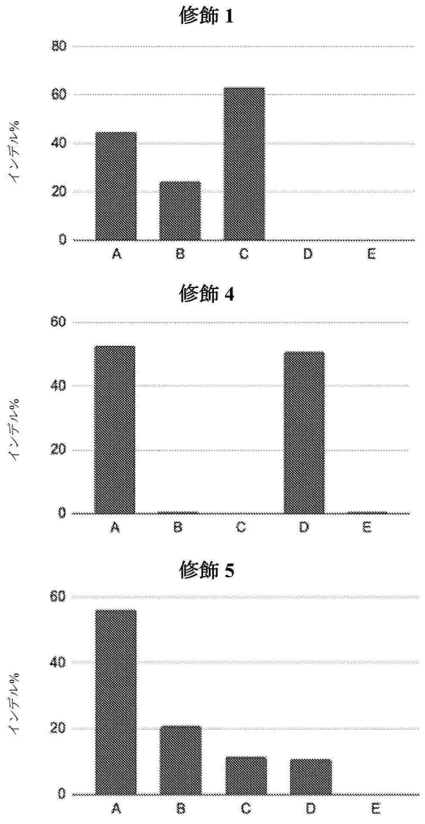
【図４６－２】



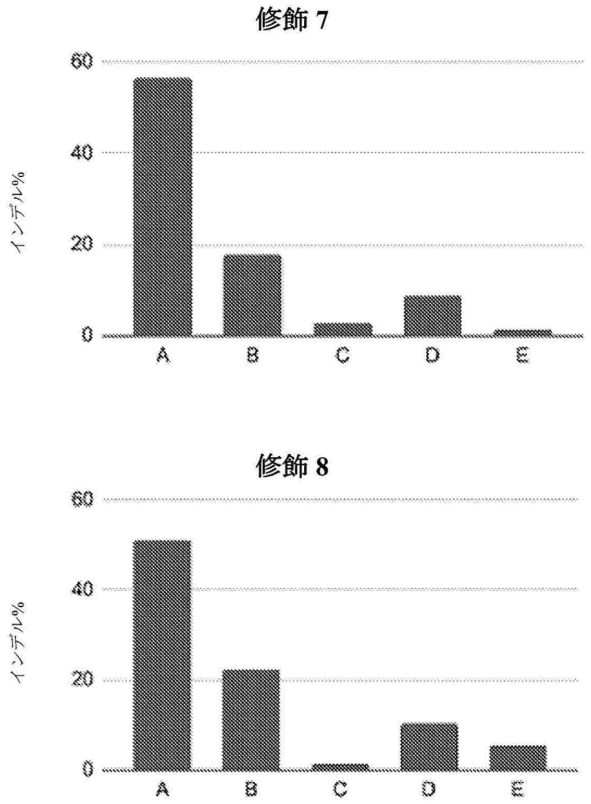
【図４７】



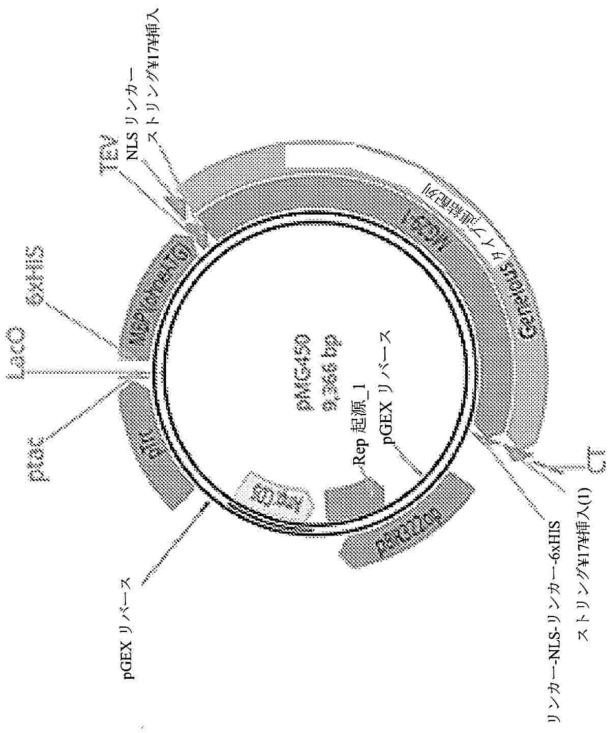
【図４８－１】



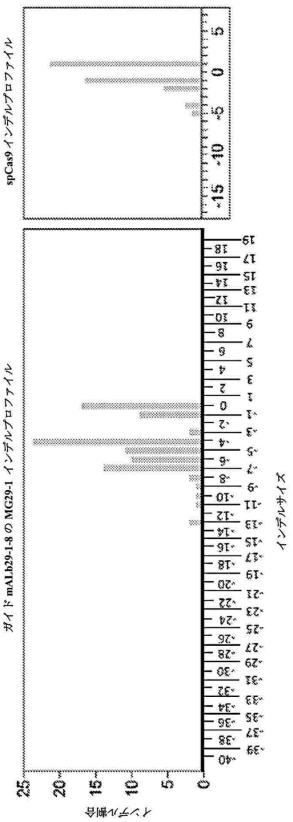
【図４８－２】



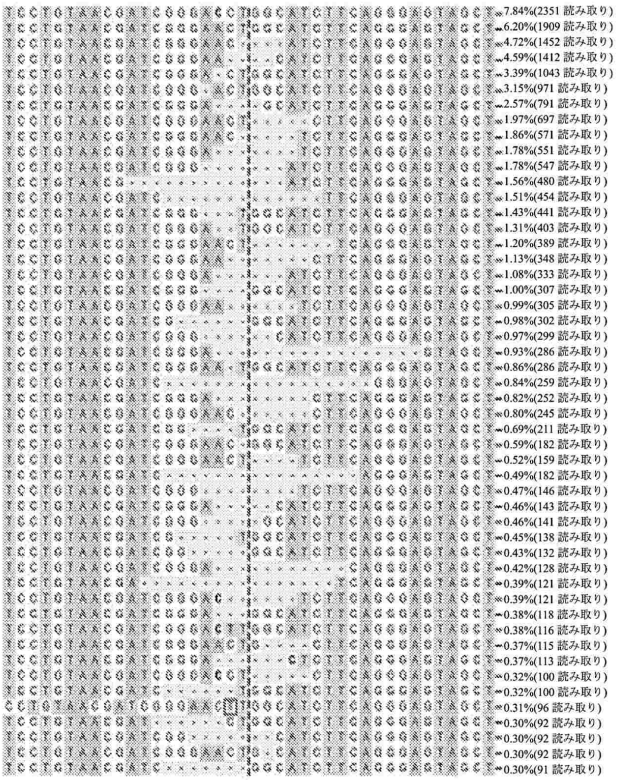
【図４９】



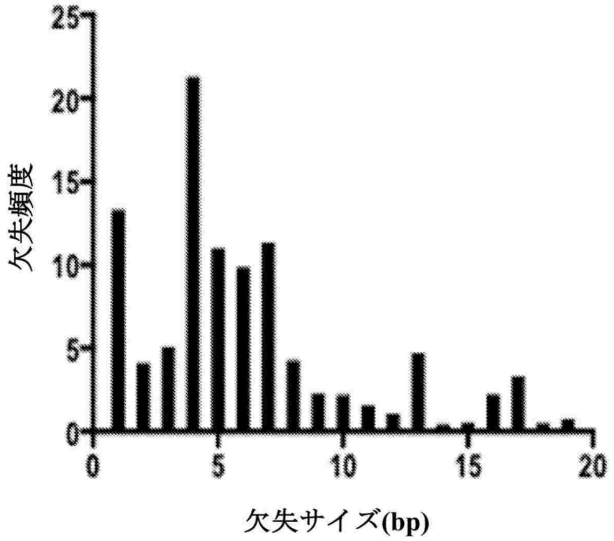
【図５０】



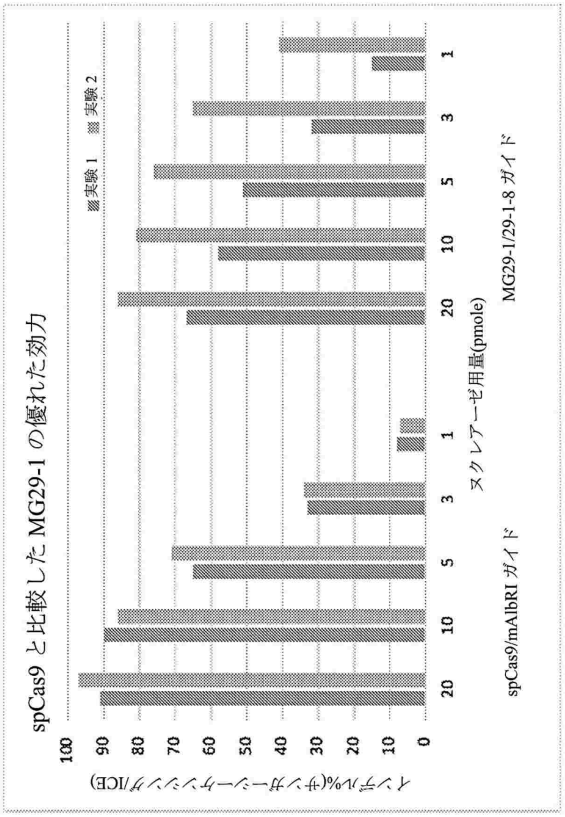
【図５１－１】



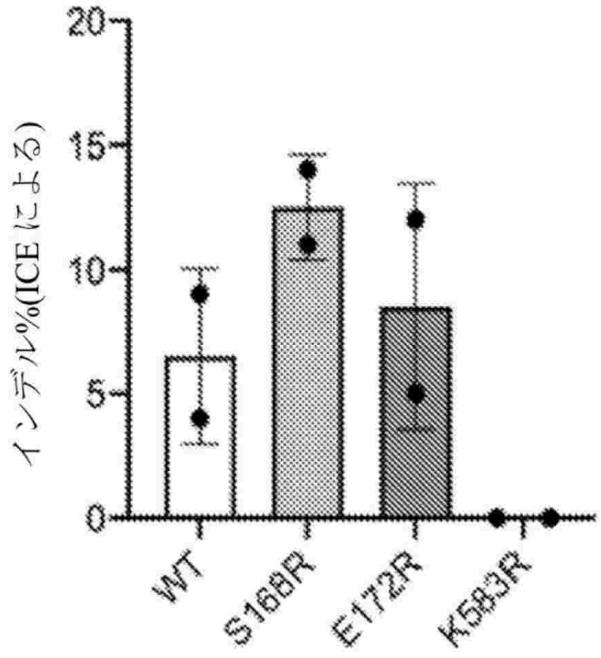
【図５１－２】



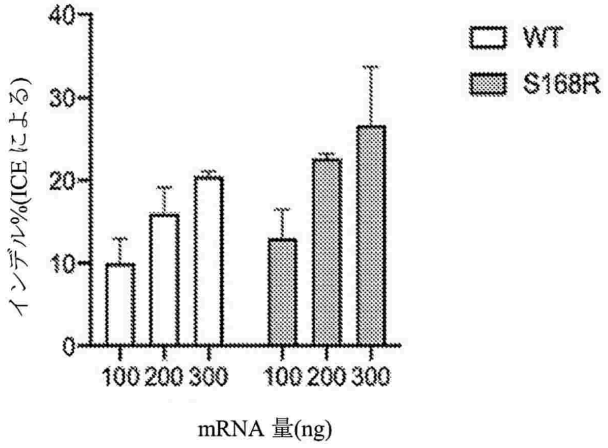
【図５２】



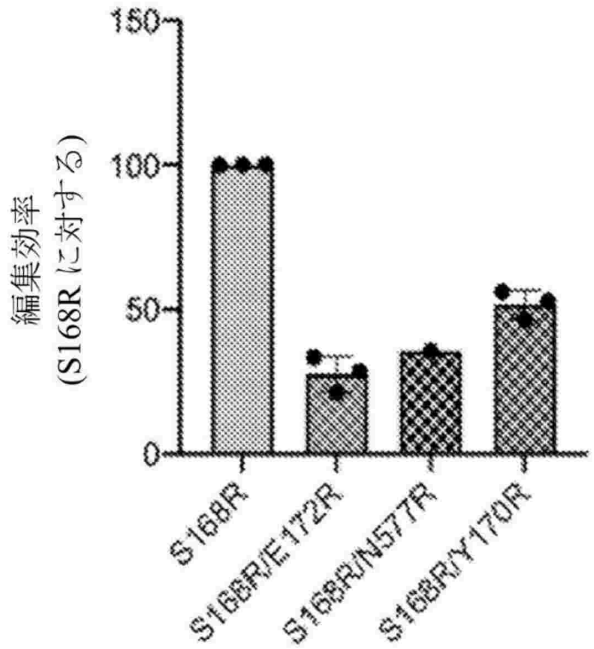
【図５３Ａ】



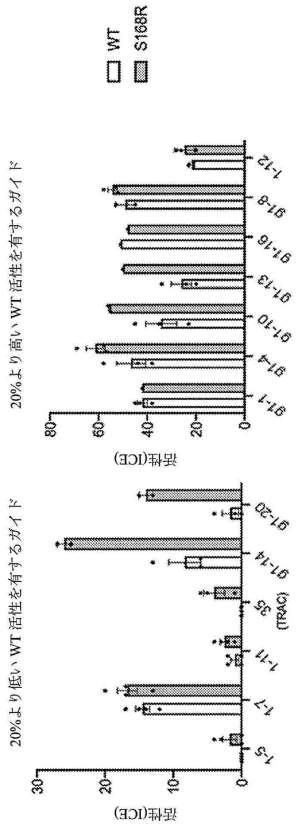
【図５３Ｂ】



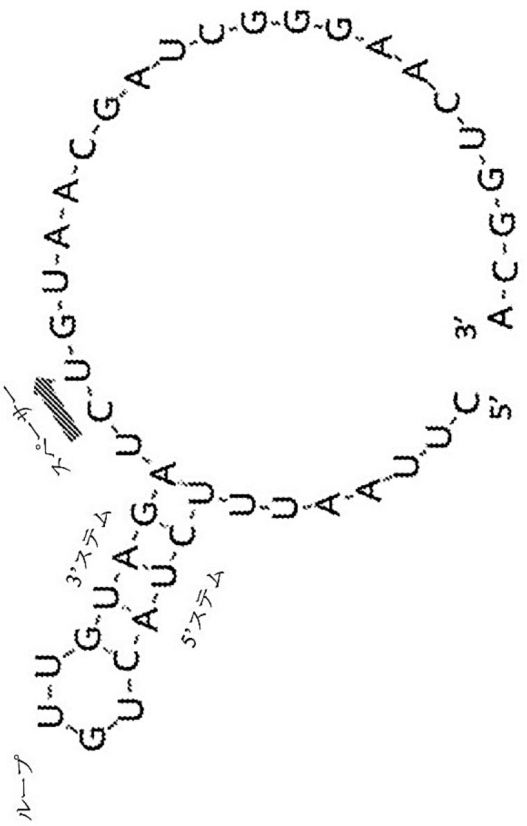
【図５３Ｃ】



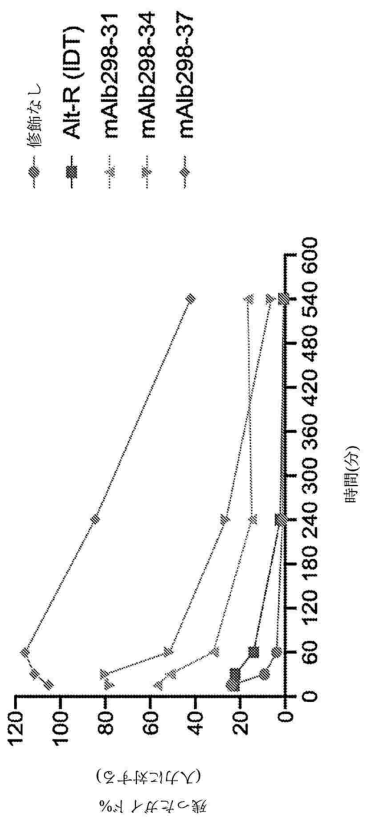
【図５３Ｄ】



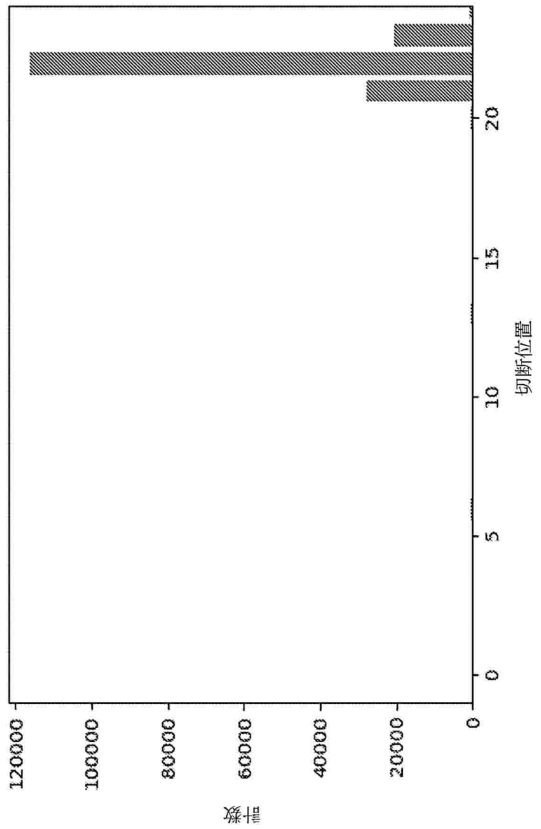
【図５４】



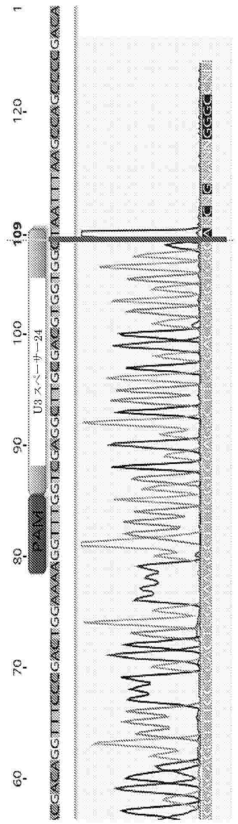
【図５５】



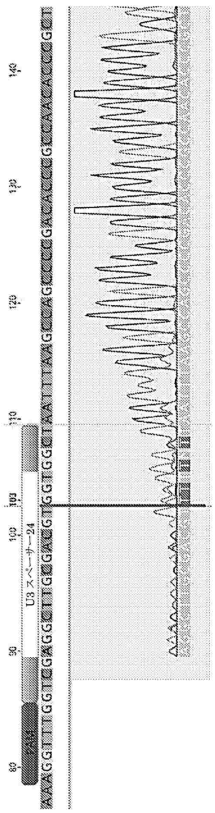
【図５６Ａ】



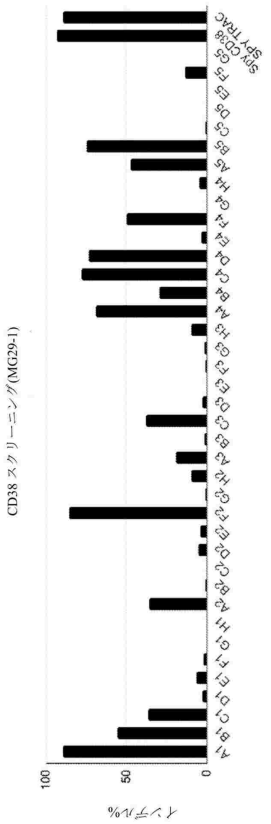
【図５６Ｂ】



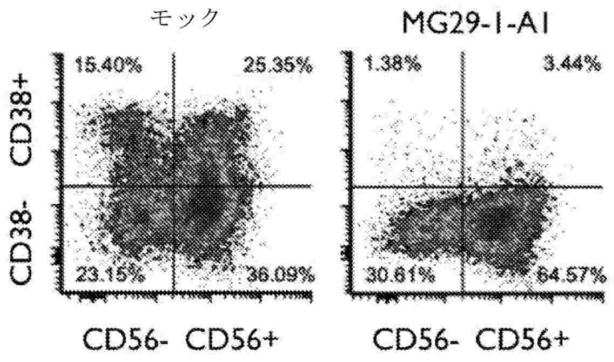
【図５６Ｃ】



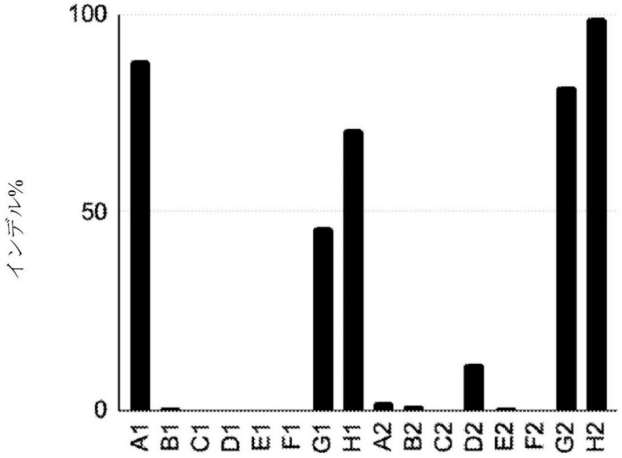
【図５７】



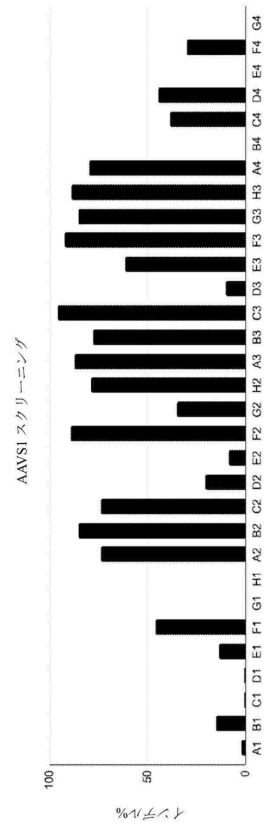
【図５８】



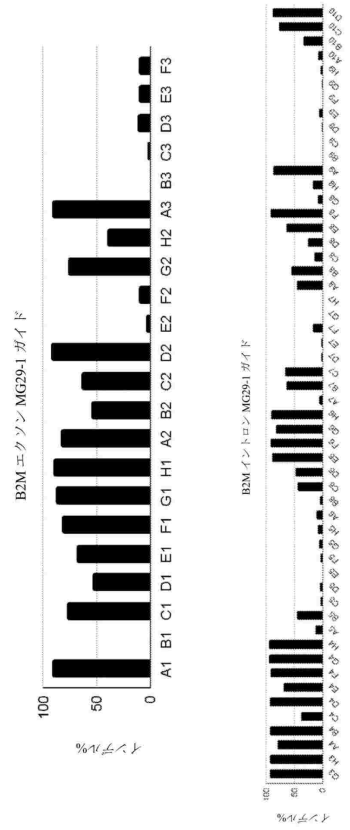
【図５９】



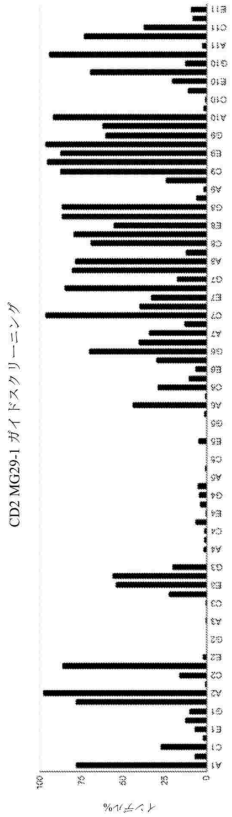
【図６０】



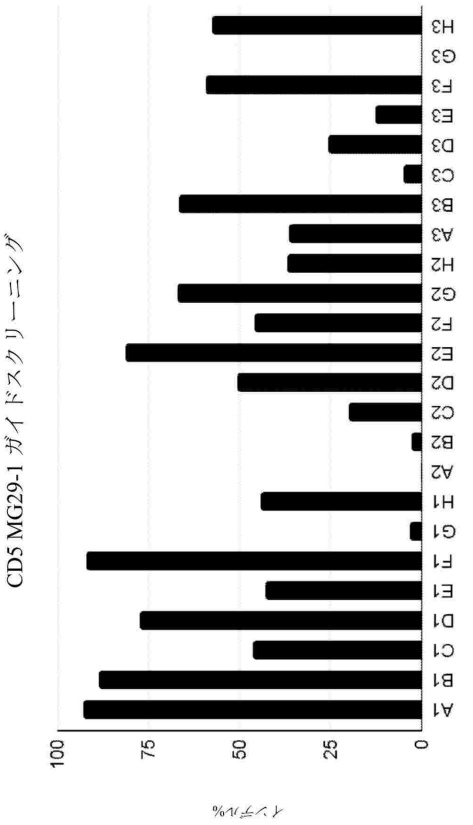
【図６１】



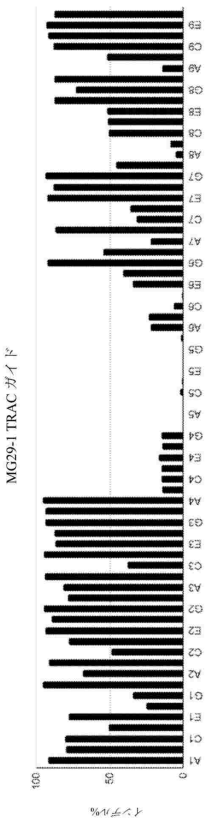
【図６２】



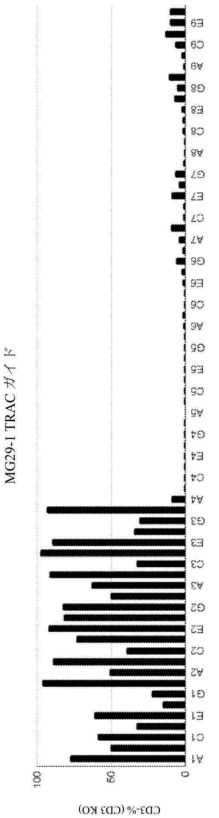
【図６３】



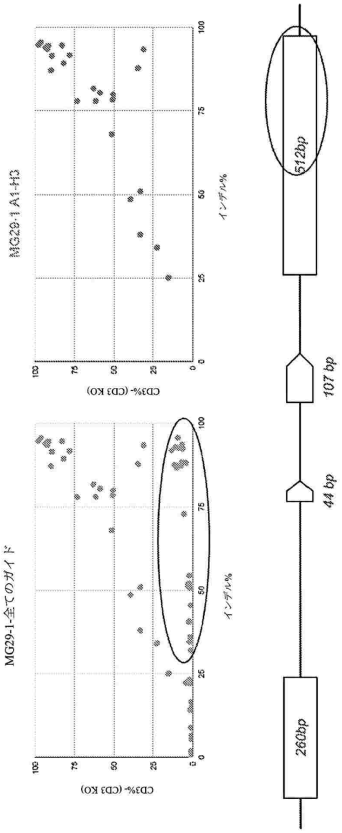
【図６４Ａ】



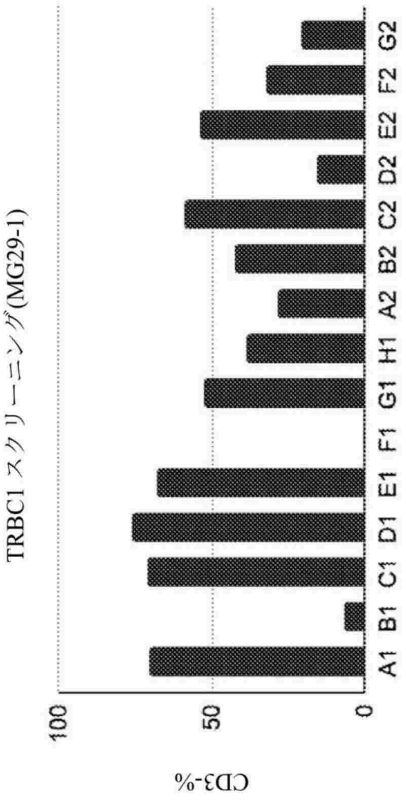
【図６４Ｂ】



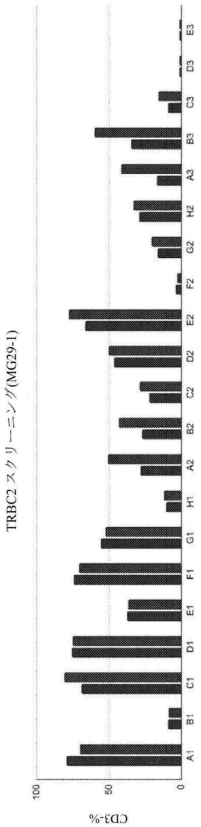
【図６５】



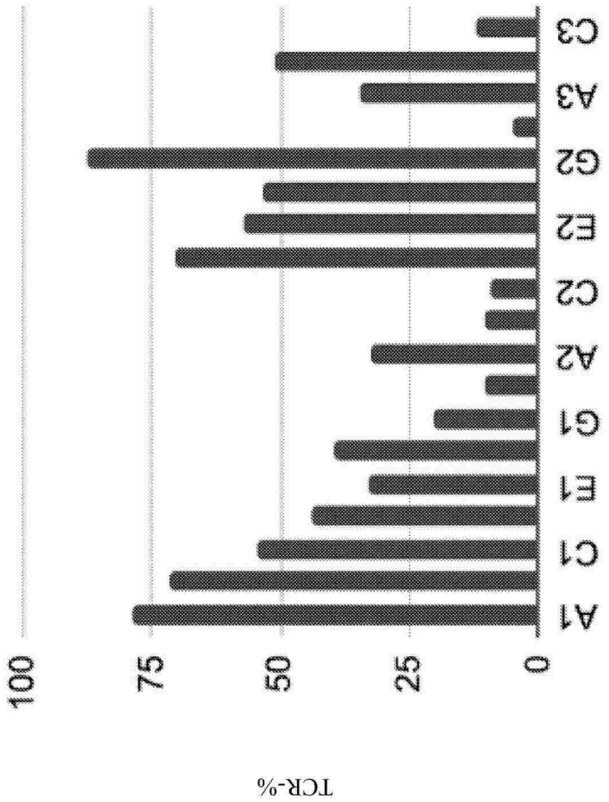
【図６６Ａ】



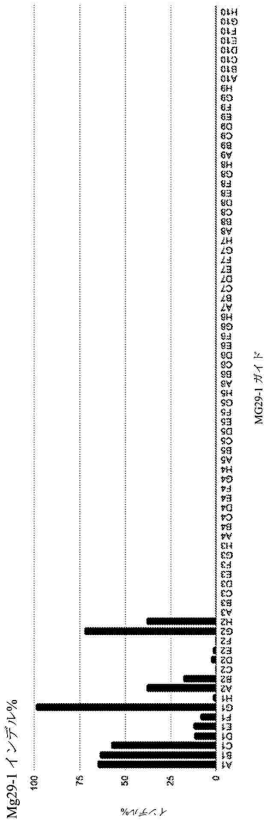
【図６６Ｂ】



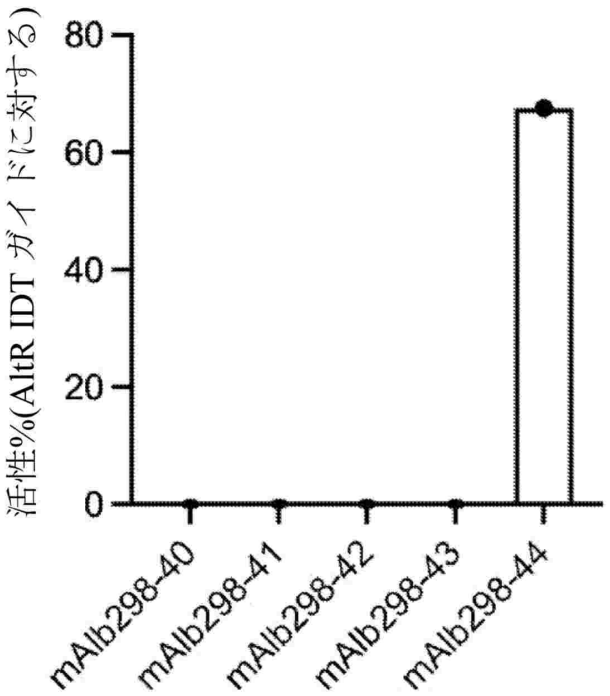
【図６６Ｃ】



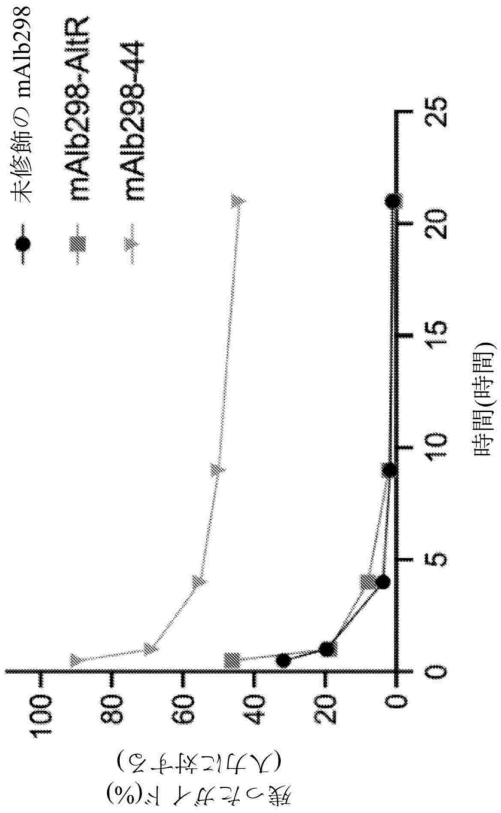
【図６７】



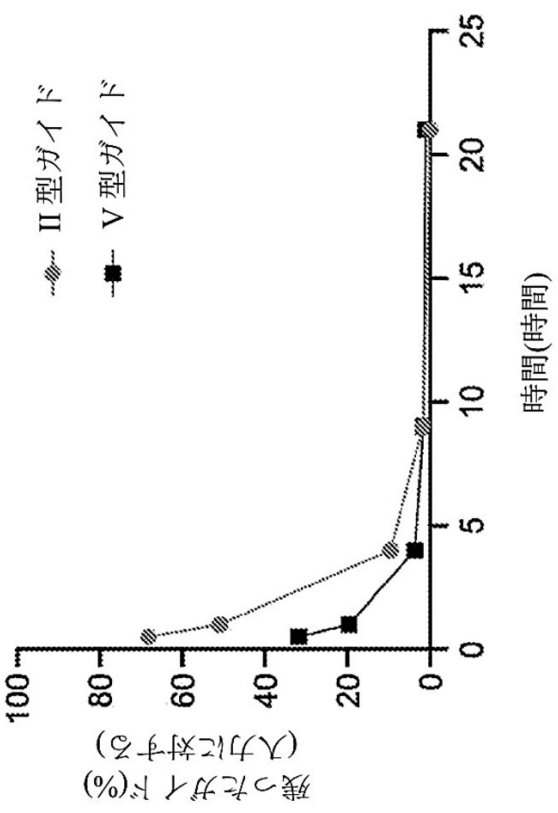
【図６８】



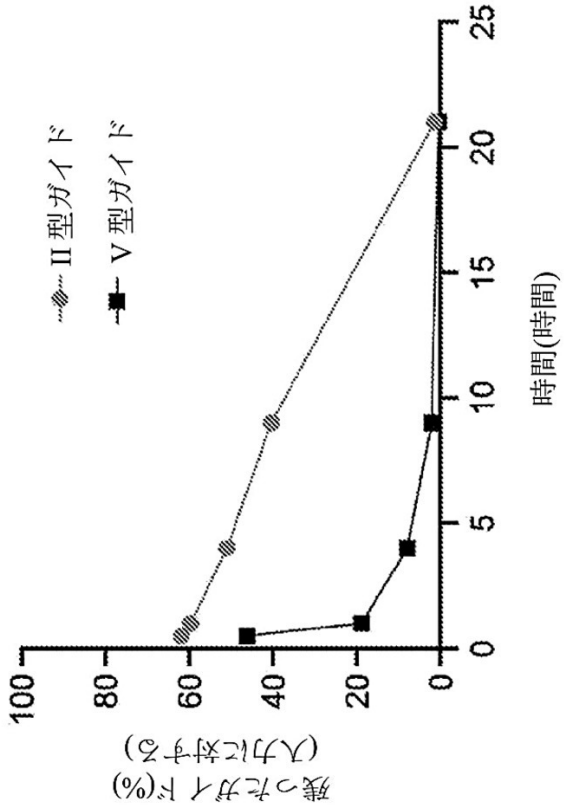
【図６９】



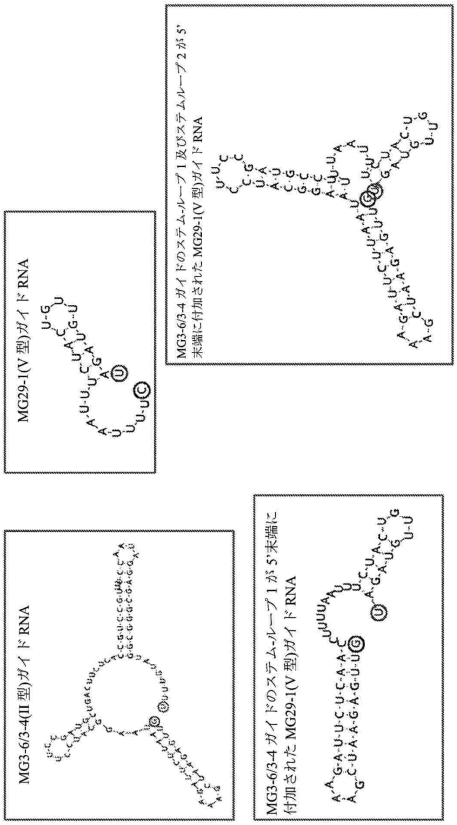
【図７０Ａ】



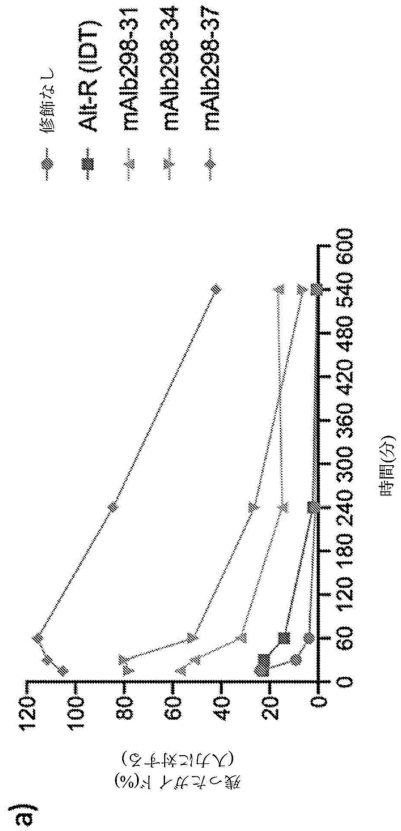
【図７０Ｂ】



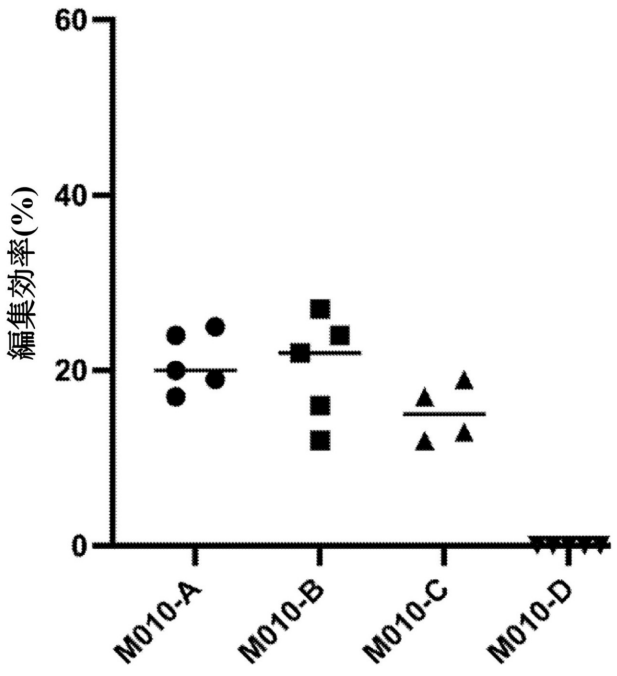
【図７１】



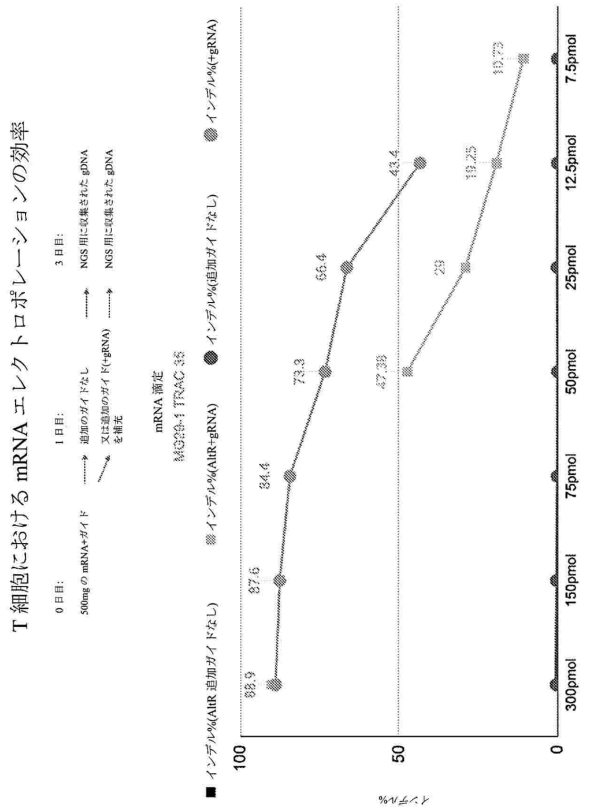
【図７２】



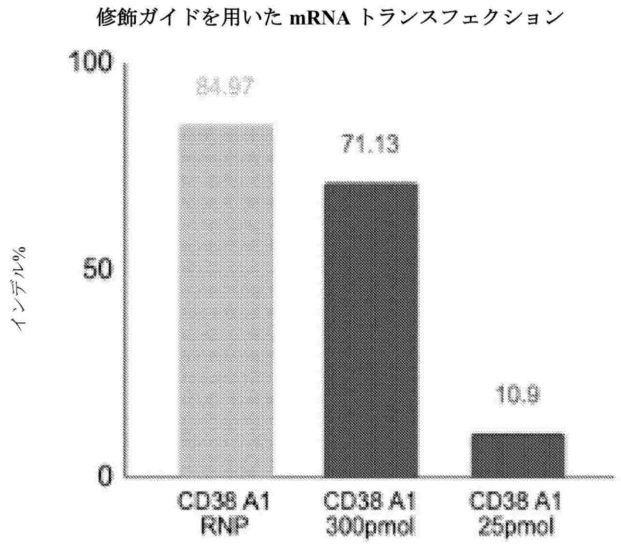
【図７３】



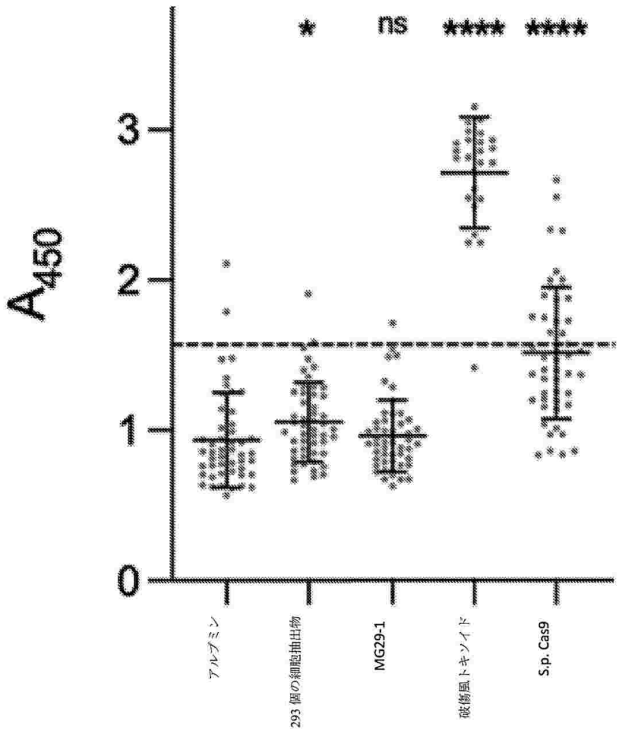
【図７４】



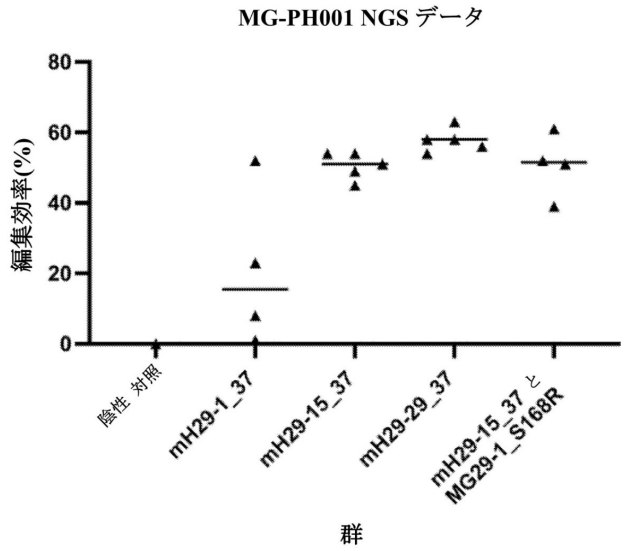
【図７５】



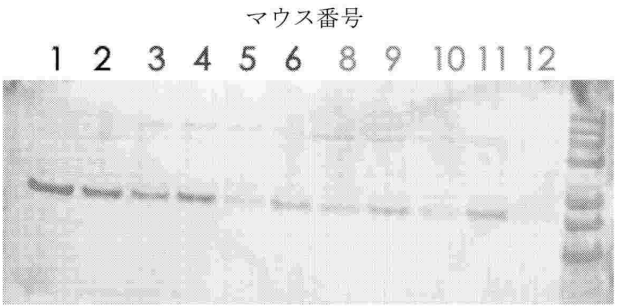
【図７６】



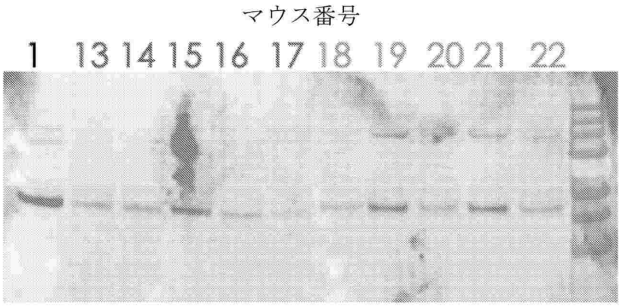
【図７７】



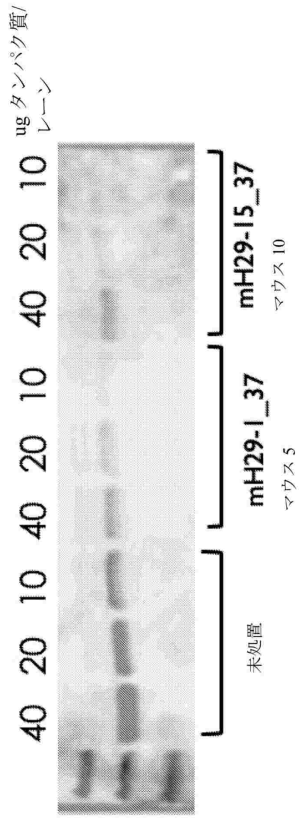
【図７８Ａ】



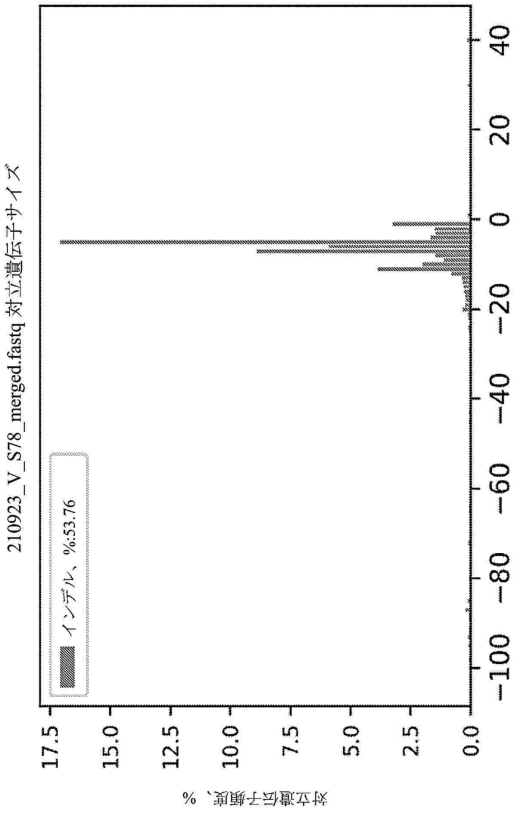
【図７８Ｂ】



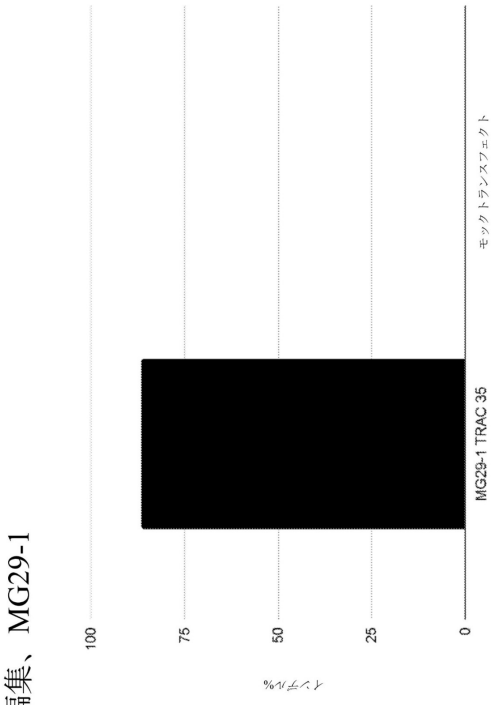
【図７９】



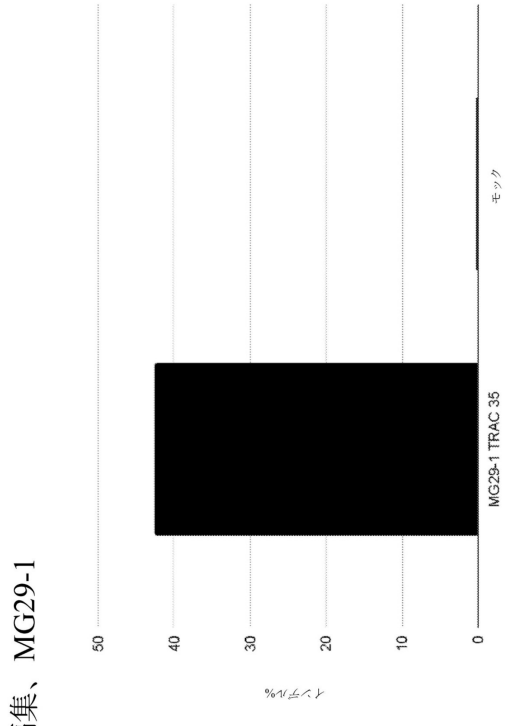
【図８０】



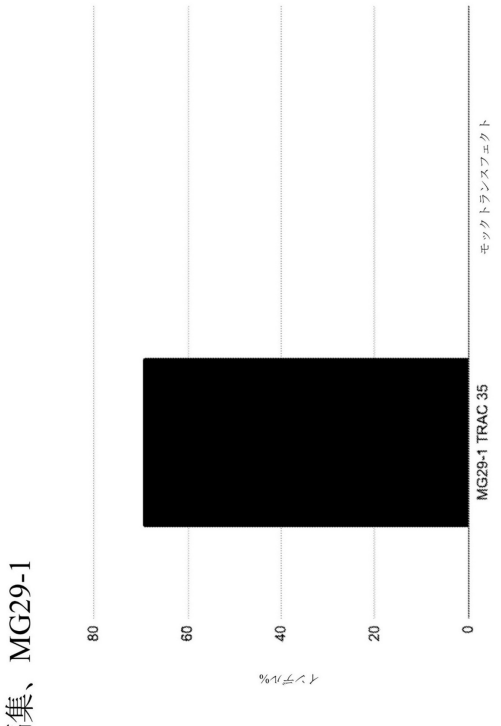
【図８１】



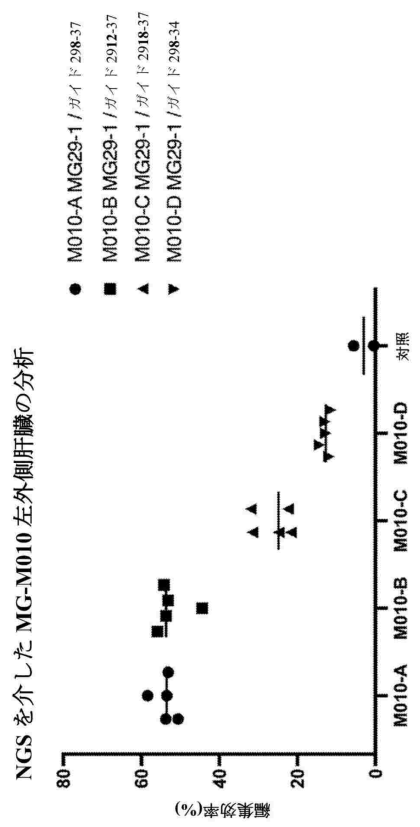
【図８２】



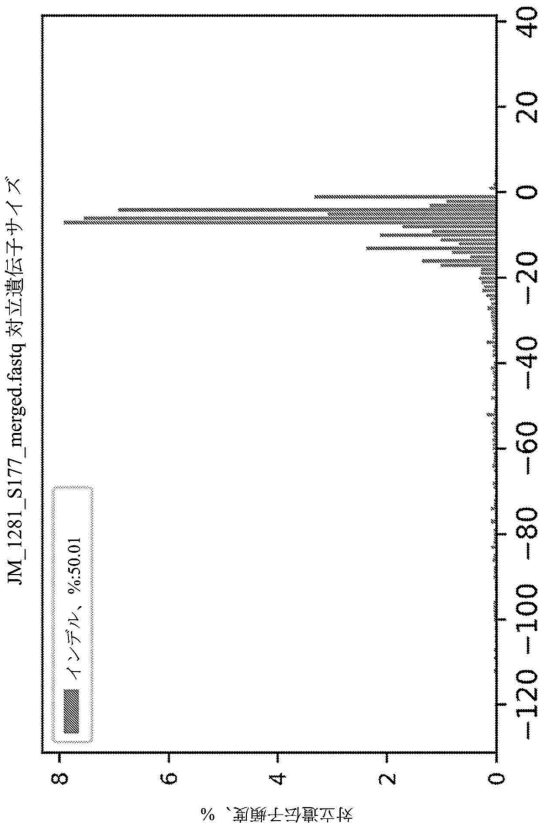
【図８３】



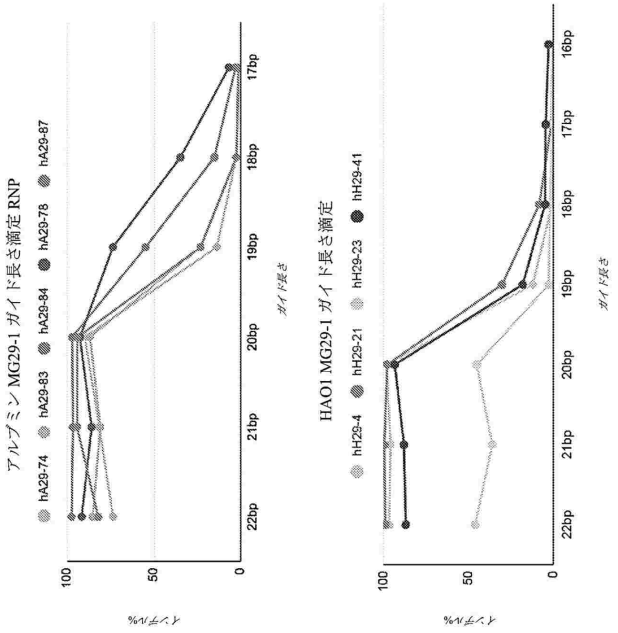
【図８４】



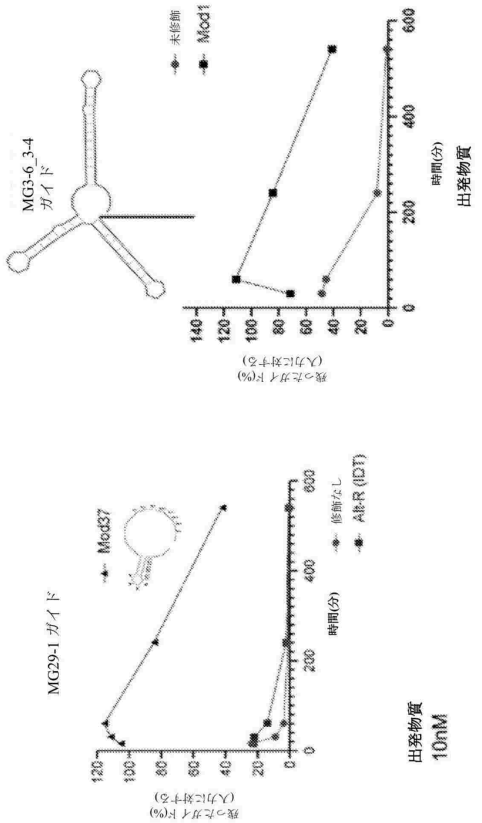
【図８５】



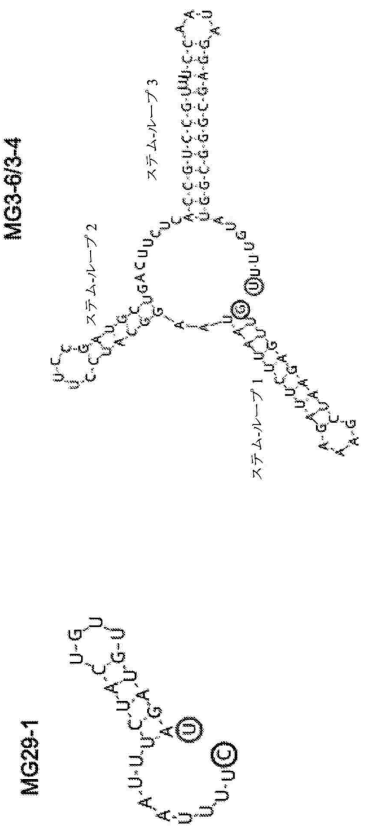
【図８６】



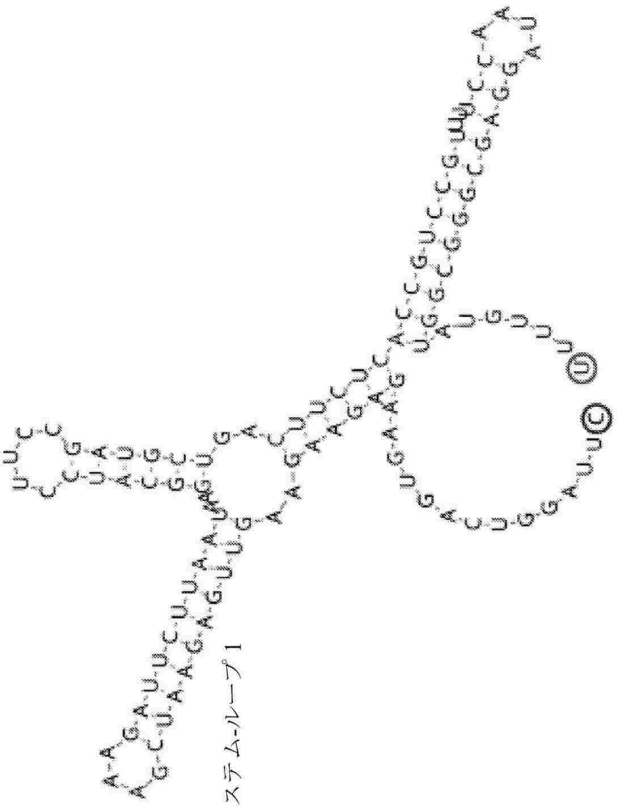
【図８７】



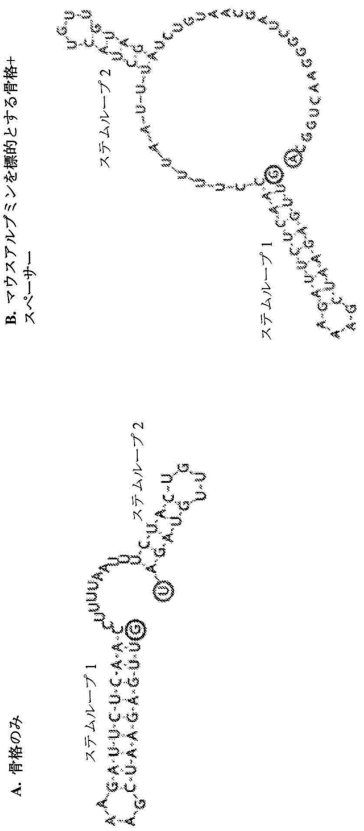
【図８８】



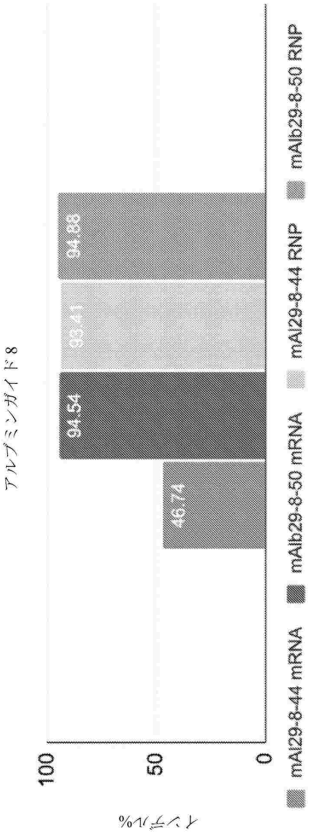
【図８９】



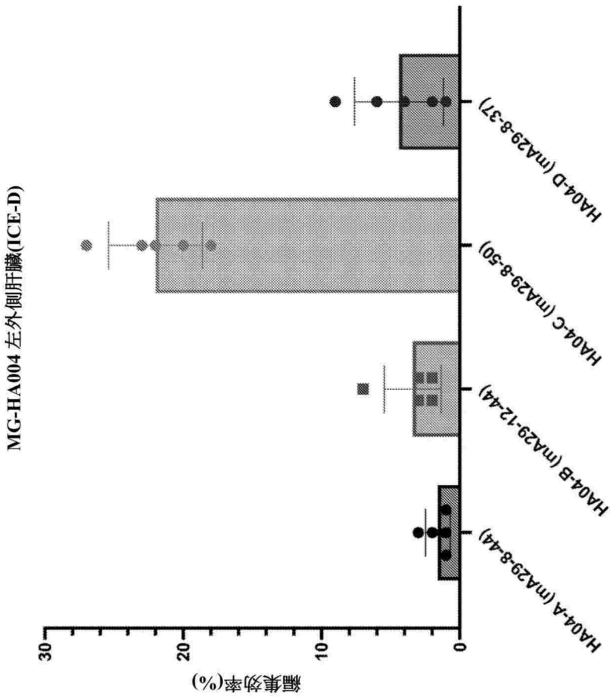
【図９０】



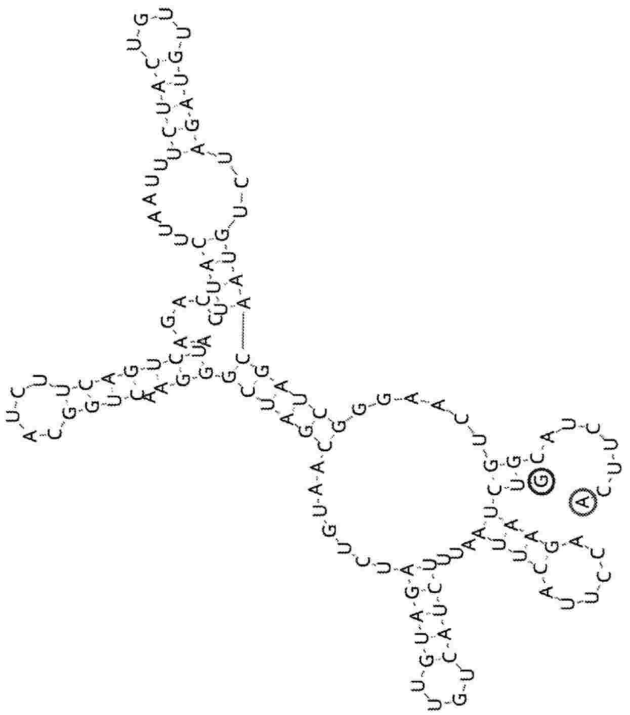
【図９１】



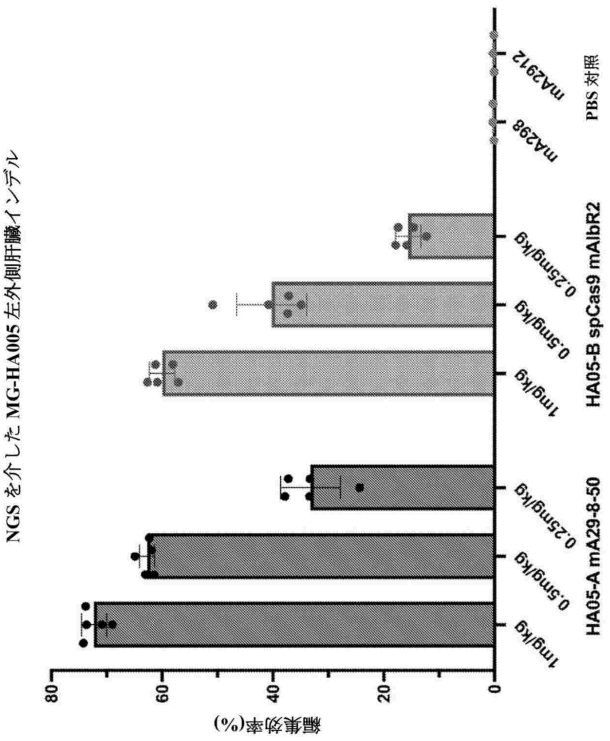
【図９２】



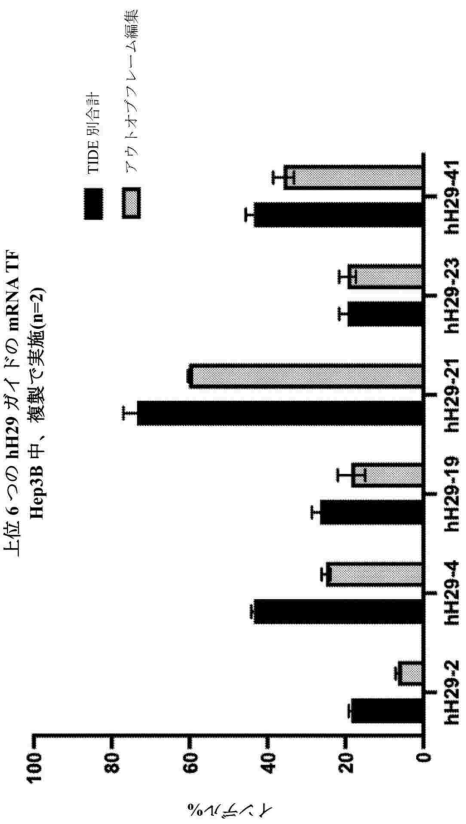
【図９３】



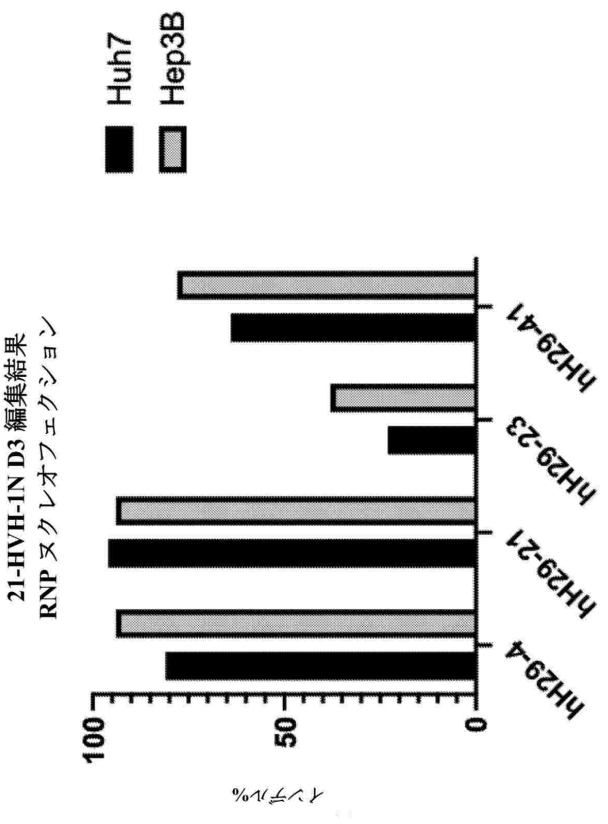
【図９４】



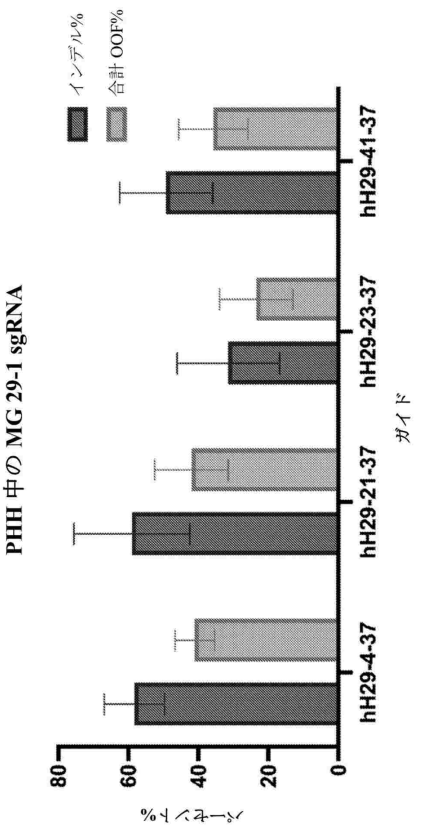
【図９５】



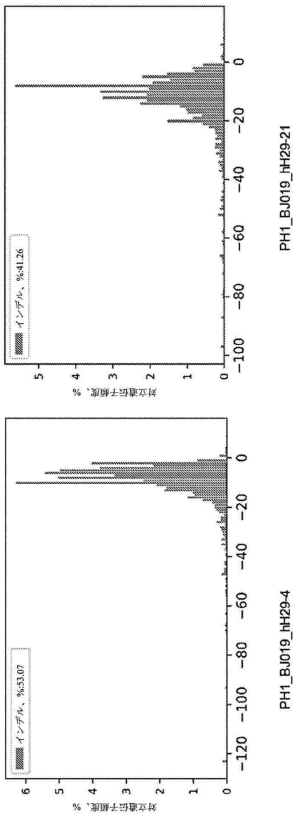
【図９６】



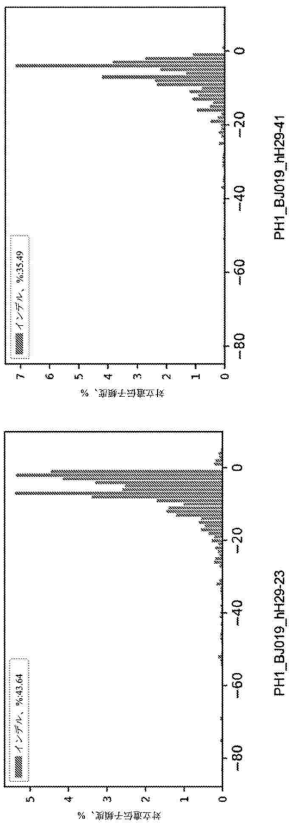
【図９７】



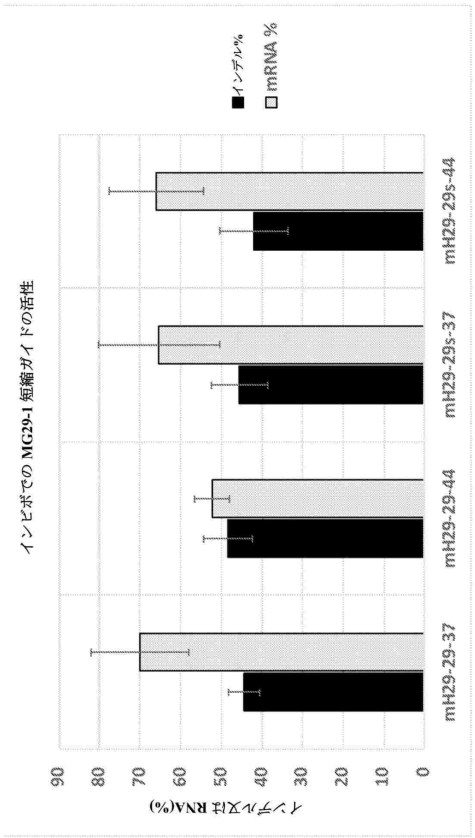
【図９８Ａ】



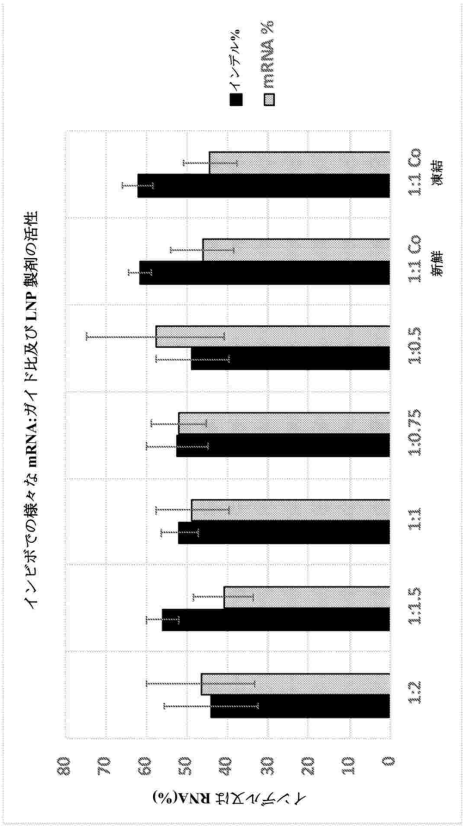
【図９８Ｂ】



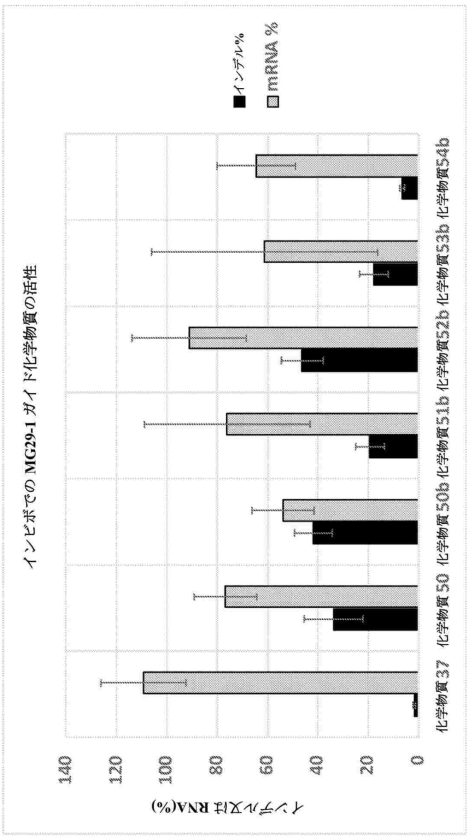
【図９９】



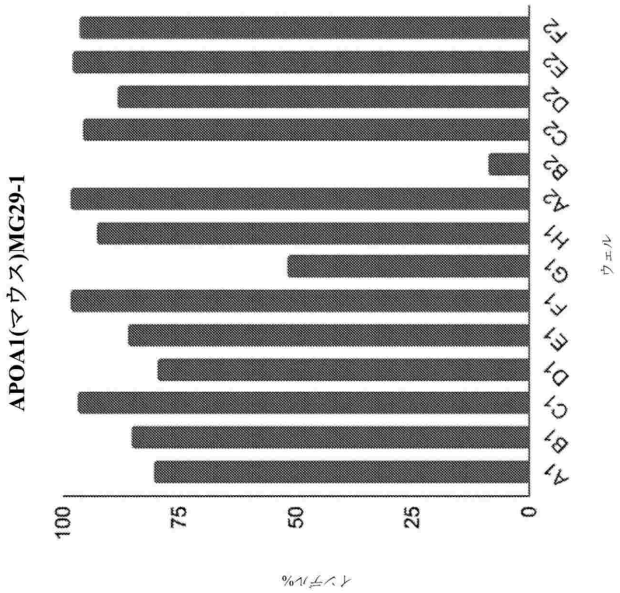
【図１００】



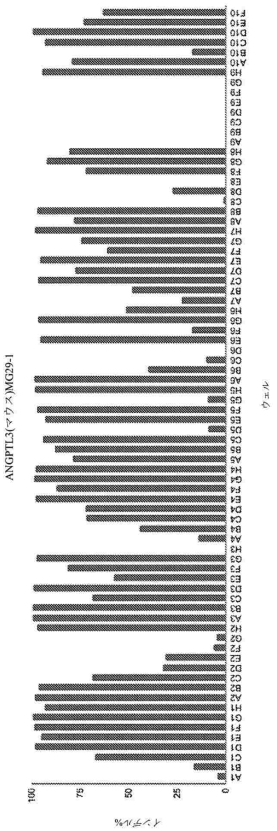
【図１０１】



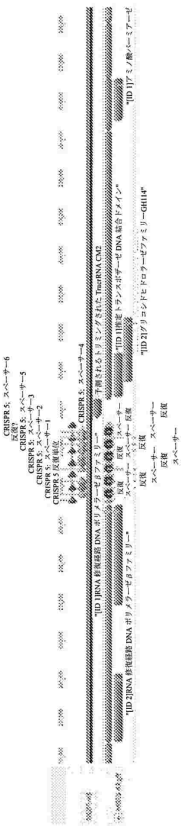
【図１０２】



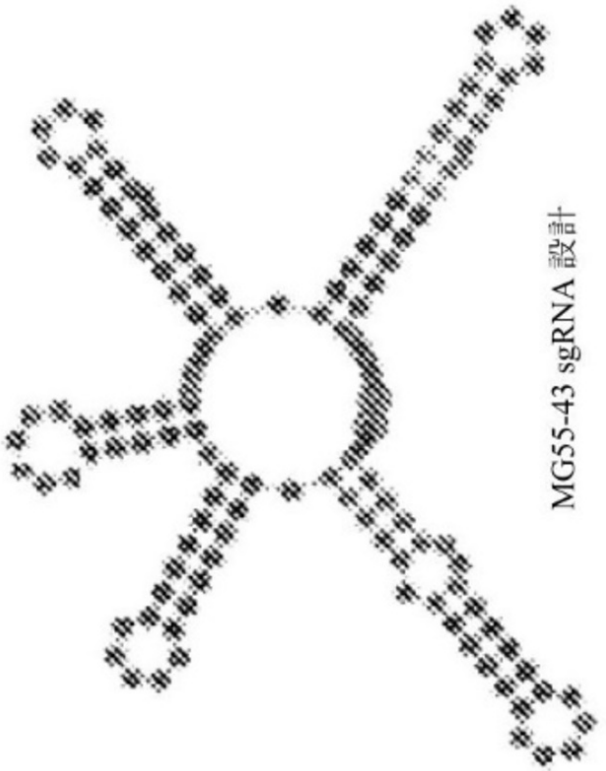
【図１０３】



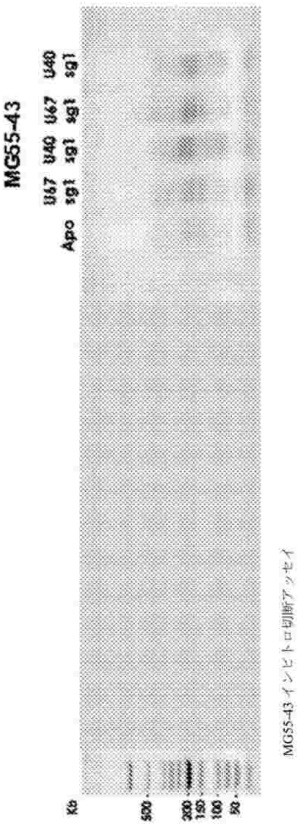
【図１０４Ａ】



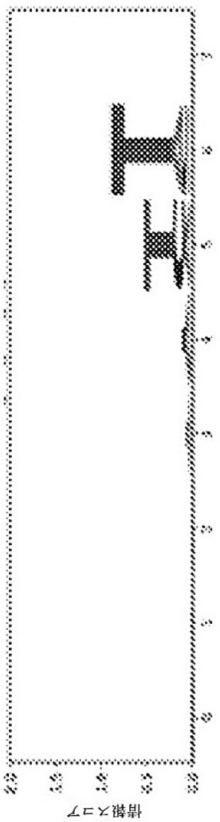
【図１０４Ｂ】



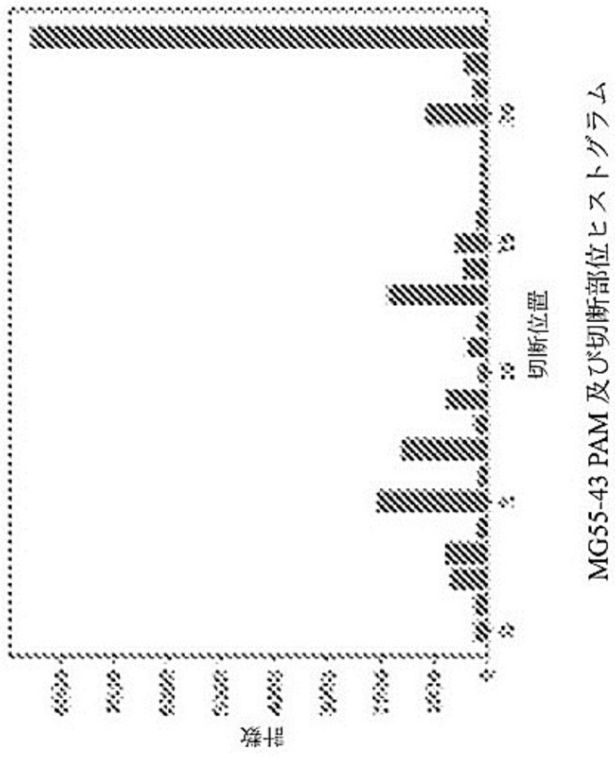
【図１０４Ｃ】



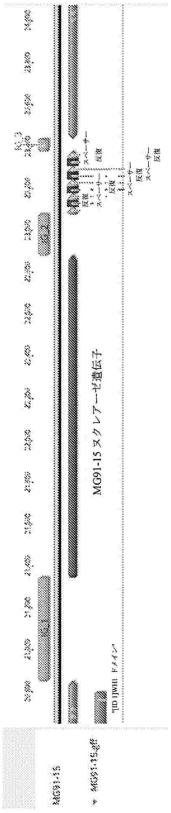
【図１０４Ｄ】



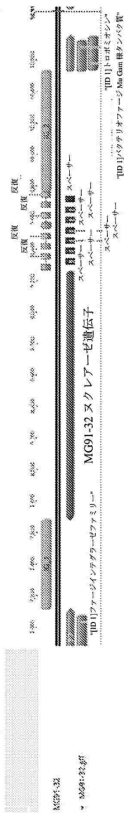
【図１０４Ｅ】



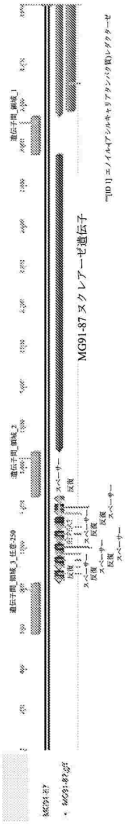
【図１０５Ａ】



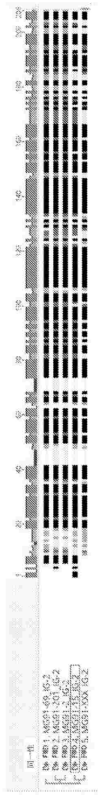
【図１０５Ｂ】



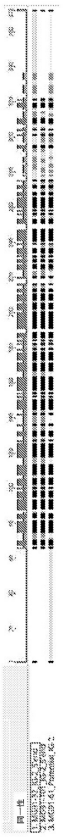
【図１０５Ｃ】



【図１０６Ａ】



【図１０６Ｂ】



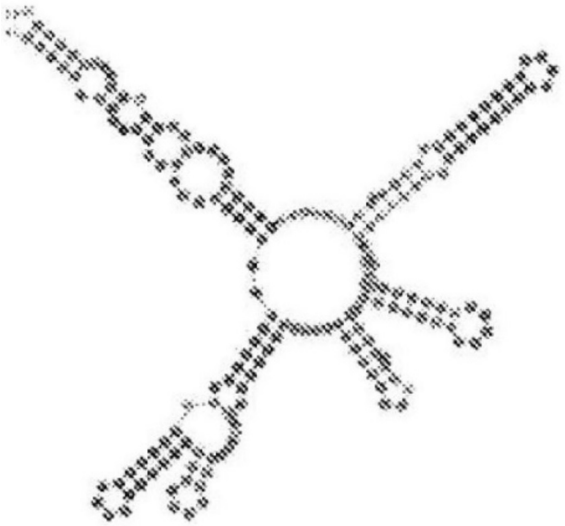
【図１０６Ｃ】



【図１０７Ａ】



【図１０７Ｂ】



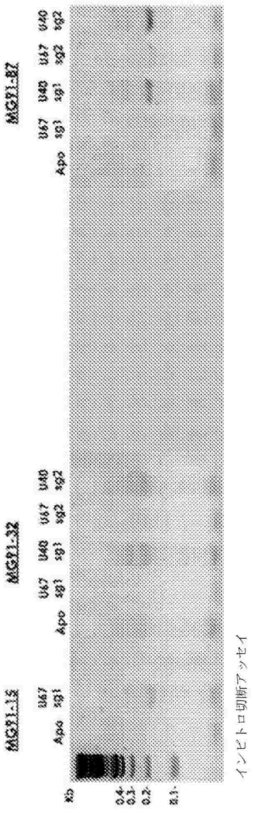
スペーサーを含まない、MG91-32 sgRNA

【図１０７Ｃ】



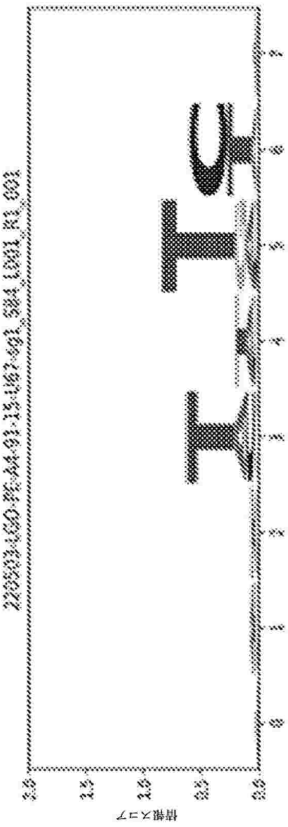
スペーサーを含まない、MG91-87 sgRNA

【図１０７Ｄ】



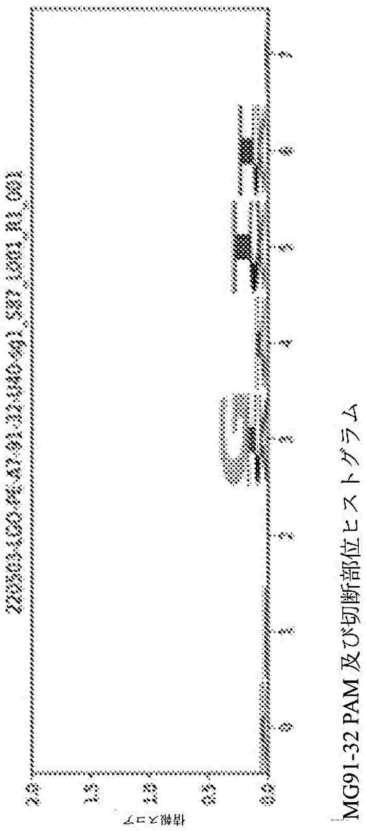
インビトロ切断アッセイ

【図１０８Ａ】

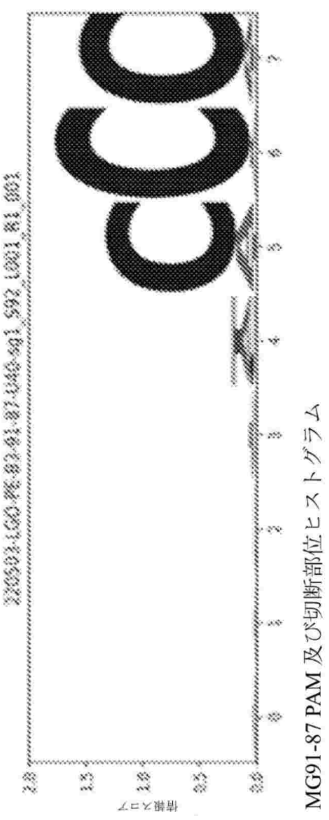


MG91-15 PAM 及び切断部位ヒストグラム

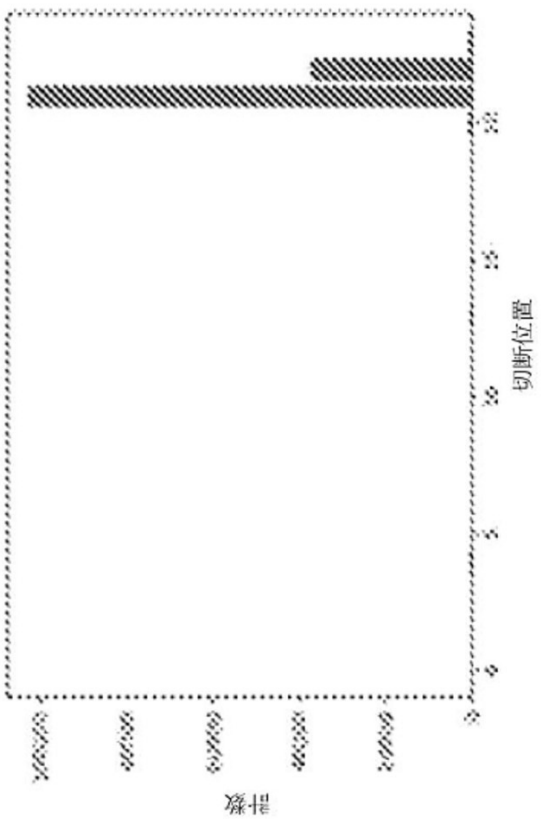
【図１０８Ｂ】



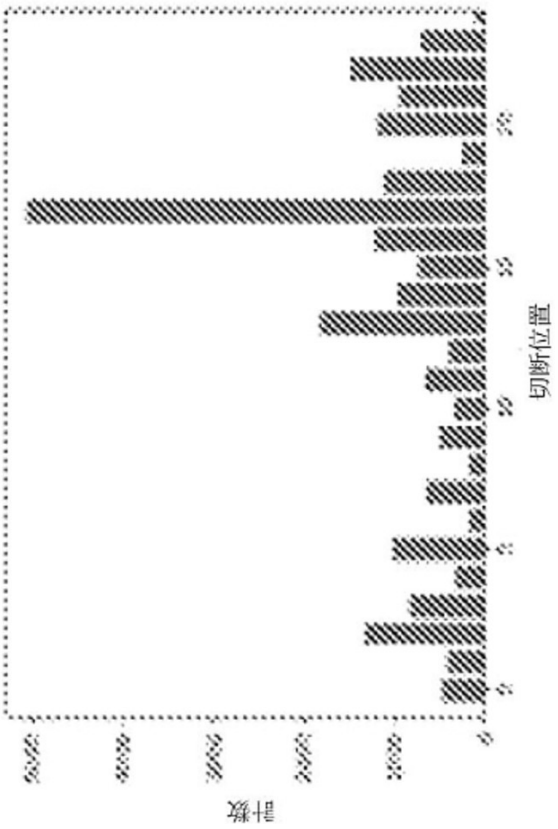
【図１０８Ｃ】



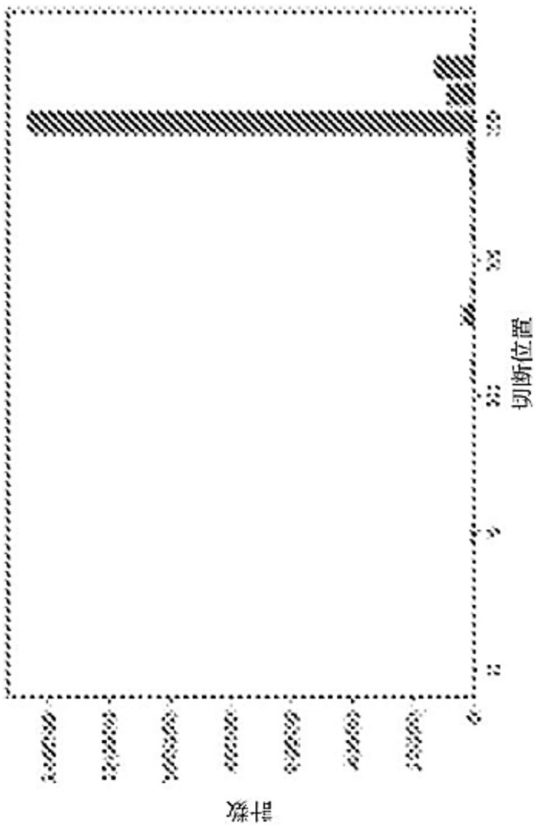
【図１０８Ｄ】



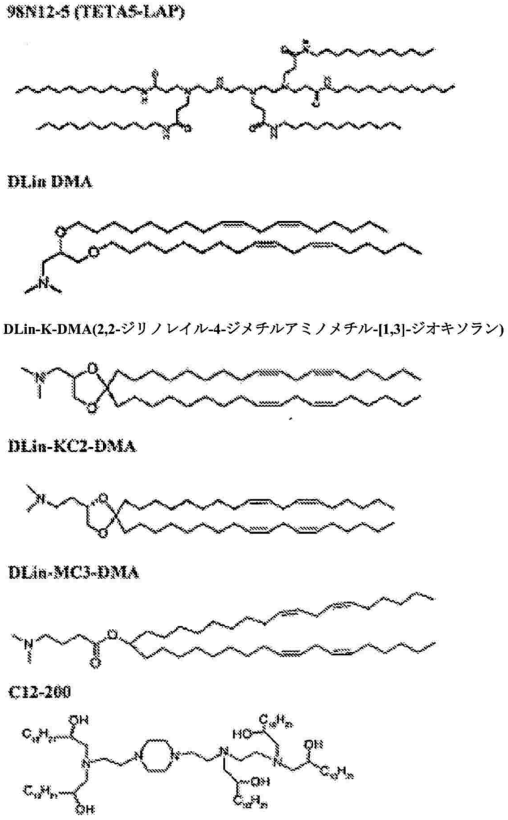
【図１０８Ｅ】



【図１０８Ｆ】



【図１０９】



【配列表】

2024522086000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/031849

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/10 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/90 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PATENW, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Google Scholar/Patents: CD38, CRISPR, Type 2 Class V Endonucleases, Cpf1, Cas12a and like terms

GenomeQuest: Sequence search of SEQ ID NOs: 1-3471, 3539, 3551-3559, 3608-3609, 3612, 3636-3637, 3640-3641, 3544-3645, 3648-3649, 3652-3653, 3656-3657, 3660-3661, 3664-3667, 3671-3672, 3678, 3695-3696, 3759-3730, 3734-3750, 3821-3857, 4428-4503, 5685-5868

Espacenet, Google Scholar/Patents: Applicant/Inventors search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 September 2022	05 September 2022
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	**Authorised officer** Stephanie Sun AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2235

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/US2022/031849
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALIAGA GOLTSMAN, D. S. ET AL., 'Novel Type V-A CRISPR Effectors Are Active Nucleases with Expanded Targeting Capabilities,' 2020, The CRISPR Journal, Vol. 3, Issue 6, pages 454-461. https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0043 Abstract, Results: Novel effectors, Results: Genome Editing, Table S2, Figure 2A-2D, Final paragraph of Discussion	1-8
X	STELLA, S. ET AL., 'Class 2 CRISPR–Cas RNA-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing,' 2017, Nature Structural and Molecular Biology, Vol. 24, No. 11, pages 882-892. https://doi.org/10.1038/nsmb.3486 Abstract, Figures 1-2	1, 6, 8
A	WO 2019191495 A1 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 03 October 2019 Example 2, Table 3	1-8
A	BU, X. ET AL., 'CD38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells,' 2018, Carcinogenesis, Vol. 39, Iss: 2, pages 242-251. https://doi.org/10.1093/carcin/bgx137 Figure 4A	1-8
A	NAEIMI KARAROUDI, M. ET AL., 'CD38 deletion of human primary NK cells eliminates daratumumab-induced fratricide and boosts their effector activity,' 2020, Blood, Vol. 136, No: 21, pages 2416-2427. https://doi.org/10.1182/blood.2020006200 Materials and Methods: Generation of CRISPR-modified cells	1-8
A	CN 110904239 A (JIANGSU BOJIA BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 24 March 2020 SEQ ID NO: 0006, 0016 and Examples 3-4	1-8
A	WO 2020030984 A2 (G+ FLAS LIFE SCIENCES ET AL.) 13 February 2020 SEQ ID NO: 51, Table 7	1-8
A	WO 2021067788 A1 (ARTISAN DEVELOPMENT LABS, INC. ET AL.) 08 April 2021 SEQ ID NO: 109, Example 1 and 3	1-8
A	CN 110684823 A (HAINAN UNIVERSITY) 14 January 2020 SEQ ID NO: 1, Claims 1 and 4	1-8
A	ZHANG, Y. et al., 'CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice,' 2017, Science Advances, Vol. 3, pages 1-10. doi: 10.1126/sciadv.1602814. Figure 4	
P,X	WO 2021178933 A2 (METAGENOMI IP TECHNOLOGIES, LLC ET AL.) 10 September 2021 SEQ ID NOs: 1-3470, Abstract, Claim 93, SEQ ID NOs: 4411, 4409, 4412, paragraphs [00155]-[00161]	1-8
E	WO 2022056489 A1 (VOR BIOPHARMA, INC.) 17 March 2022 Table 5, SEQ ID NO: 86, 95, 101, paragraph [00104], Claims	1, 6, 8

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/031849

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

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

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

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Sequences searched include SEQ ID NOs: 1-3471, 3539, 3551-3559, 3608-3609, 3612, 3636-3637, 3640-3641, 3544-3645, 3648-3649, 3652-3653, 3656-3657, 3660-3661, 3664-3667, 3671-3672, 3678, 3695-3696, 3759-3730, 3734-3750, 3821-3857, 4428-4503, 5685-5686.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/031849

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including

2. ☒ Claims Nos.: 140-145 **158-160**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See Supplemental Box

3. ☐ Claims Nos:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2022/031849

Supplemental Box

Continuation of **Box II**
Claim 140 is unclear. Claim 140 refers to a 'nucleotide modification pattern depicted in any one of SEQ ID NOs: 5695-5701 in Table 34.' There are no nucleotide modification patterns in Table 34. Furthermore, SEQ ID NOs: 5695-5701 as listed in the sequence listing, appear to include any unspecified modification and any base at positions 25-46. However, SEQ ID NOs: 5695-5701 are also listed in Table 46, but with a different nucleotide modification pattern. I cannot make a meaningful determination of which modification pattern is intended. I have therefore excluded examination of Claim 140 and corresponding dependent claims 141-145.

Claims 158-160 do not comply with Rule 6.2(a) because they rely on references to the description.

Continuation of: **Box III**
This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single inventive concept.

The international application is directed to methods of disrupting target loci in cells, by introducing to a cell, a class 2, type V Cas endonuclease and an engineered guide RNA wherein said guide RNA is configured to form a complex with said endonuclease, and a spacer sequence which hybridises to the region of said target loci. The international exemplification also identifies multiple different class 2, type V Cas endonucleases.

This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct inventions:

- Inventions 1-15 relate to methods of disrupting a target locus in a cell using a class 2, type V Cas endonuclease and a guide RNA which is configured to hybridise to a sequence having at least 20-22nt consecutive nucleotides having at least about 80% identity with specific sequences derived from the target locus, or wherein guide RNA has at least 80% sequence identity to a specific guide RNA sequence. I consider that each target gene is a separate invention. Specifically,
    - Invention 1: Claims 1-8 relates to target gene CD38
    - Invention 2: Claims 9-16 relates to target gene TIGIT.
    - Invention 3: Claims 17-24 relates to target gene AAVS1.
    - Invention 4: Claims 25-32 relates to target gene B2M.
    - Invention 5: Claims 33-40 relates to target gene CD2.
    - Invention 6: Claims 41-48 relates to target gene CD5.
    - Invention 7: Claims 49-56 relates to target gene TRAC.
    - Invention 8: Claims 57-72 (in part) relates to target gene TRBC1.
    - Invention 9: Claims 65-72 (in part) relates to target gene TRBC2.
    - Invention 10: Claims 73-80 relates to target gene HPRT.
    - Invention 11: Claims 81-88 relates to target gene APO-A1.
    - Invention 12: Claims 89-96 relates to target gene ANGPTL3.
    - Invention 13: Claims 97-102 relates to target gene Rosa26.
    - Invention 14: Claims 103-108 relates to target gene FAS.
    - Invention 15: Claims 109-114 relates to target gene PD-1.
- Invention 16: Claims 115-118, 127-139, 147 and 149 (in full) and Claims 125, 146, 148 (in part) relate to an engineered nuclease systems and their corresponding guide RNAs, guide RNAs with specific chemistries which modify editing

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2022/031849

Supplemental Box

efficiency, methods using said nuclease system for gene editing, and modifications which are specific to the MG29-1 nuclease (SEQ ID NO: 215).

- Invention 17: Claims 119-124, 126 (in full) and Claim 125 (in part) relate to a method of disrupting a HAO-1 locus by introducing to a cell a class 2, type V endonuclease, specific guide RNAs or a guide RNA that is complementary to SEQ ID NOs: 4184-4225.

- Invention 18: Claims 146 and 148 (in part) relates to an engineered nuclease system comprising an endonuclease having at least 75% identity to any one of SEQ ID NOs: 1-3470, or a variant thereof, or a subset of said SEQ ID NOs, with a CRISPR array which is configured to be processed by the nuclease using a engineered guide RNA with a spacer sequence hybridising to an albumin gene.

    - I note that Invention 18 may comprise multiple inventions even within this group as SEQ ID NOs: 1-3470 comprise multiple different metagenomic fragment families. For example, in Claim 148, SEQ ID NOs: 14 corresponds to MG28, SEQ ID NOs: 251 corresponds to MG32 and SEQ ID NOs: 1711-1712 corresponds to MG77. It is possible that some of these metagenomic fragment families may have significant identity or structural similarity to other identified nuclease families in this group, however, further clarification to such an interrelationship is required. This is because these metagenomic fragments do not appear to share effector proteins with significant amino acid identity (see paragraph [00376]), have different PAM sequences (paragraph [00619], [00612] and Table 4) and the families delineated by identifying clades from a phylogenetic tree (see paragraph [00375]).

- Invention 19: Claims 150-152 (in full) and Claims 146 and 148 (in part) relate to engineered nuclease systems comprising an endonuclease having at least 75% identity to MG55-43 (SEQ ID NO: 470) or a variant thereof.

- Invention 20: Claims 153-157 (in full) and Claims 146 and 148 (in part) relates to engineered nuclease systems comprising MG91 nucleases, including MG91-15 (SEQ ID NO: 2824), MG91-32 (SEQ ID NO: 2941) and MG91-87 (SEQ ID NO: 2896) and corresponding guide RNA sequences.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.

In the above groups of claims, the only feature common to all of the claimed inventions is a Class 2, Type V endonuclease and corresponding guide RNA for gene editing. However, this feature is disclosed in multiple documents in the art. I have cited the following literature as a representative example.

D10: ZHANG, Y. et al., 'CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice,' 2017, Science Advances, Vol. 3, pages 1-10. doi: 10.1126/sciadv.1602814.

This document discloses a method of editing a gene, X-linked dystrophin gene (DMD), using Cpf1, a class 2, type V Cas endonucleases and a engineered guide RNA configured to hybridise to the target gene in iPSC cells (see Figure 4).This feature therefore cannot be a special technical feature and thus the claims lack unity *a posteriori*.

The International Searching Authority has carried out search and examination on *only* Invention 1, that is, **Claims 1-8.**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/US2022/031849

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
WO 2019191495 A1	03 October 2019	WO 2019191495 A1	03 Oct 2019
		AU 2018261800 A1	05 Dec 2019
		AU 2018388413 A1	11 Jun 2020
		AU 2019243315 A1	24 Sep 2020
		BR 112019023080 A2	09 Jun 2020
		BR 112020011017 A2	17 Nov 2020
		BR 112020019205 A2	05 Jan 2021
		CA 2977929 A1	08 Oct 2015
		CA 3056933 A1	08 Nov 2018
		CA 3083779 A1	27 Jun 2019
		CA 3093020 A1	03 Oct 2019
		CA 3111211 A1	05 Mar 2020
		CN 111279336 A	12 Jun 2020
		CN 111542594 A	14 Aug 2020
		CN 111954715 A	17 Nov 2020
		EP 3611000 A1	19 Feb 2020
		EP 3619627 A1	11 Mar 2020
		EP 3643462 A1	29 Apr 2020
		EP 3728563 A1	28 Oct 2020
		EP 3775228 A1	17 Feb 2021
		EP 3844703 A1	07 Jul 2021
		IL 275177 A	30 Jul 2020
		IL 277611 A	30 Nov 2020
		JP 2020523716 A	06 Aug 2020
		JP 2021152931 A	30 Sep 2021
		JP 2021506236 A	22 Feb 2021
		JP 2021519061 A	10 Aug 2021
		KR 20200015517 A	12 Feb 2020
		KR 20200102454 A	31 Aug 2020
		KR 20200127250 A	10 Nov 2020
		SG 11201908661U A	30 Oct 2019
		SG 11202005173S A	29 Jun 2020

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2022/031849	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		**Patent Family Member/s**	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		SG 11202008977U A	29 Oct 2020
		US 2015348153 A1	03 Dec 2015
		US 9292871 B2	22 Mar 2016
		US 2015278922 A1	01 Oct 2015
		US 9361638 B2	07 Jun 2016
		US 2016005095 A1	07 Jan 2016
		US 9373138 B2	21 Jun 2016
		US 2016005091 A1	07 Jan 2016
		US 9396491 B2	19 Jul 2016
		US 2016155174 A1	02 Jun 2016
		US 9430790 B2	30 Aug 2016
		US 2015277681 A1	01 Oct 2015
		US 9430794 B2	30 Aug 2016
		US 2016155184 A1	02 Jun 2016
		US 9436957 B2	06 Sep 2016
		US 2016155173 A1	02 Jun 2016
		US 9449338 B2	20 Sep 2016
		US 2016155180 A1	02 Jun 2016
		US 9466081 B2	11 Oct 2016
		US 2016155171 A1	02 Jun 2016
		US 9524519 B2	20 Dec 2016
		US 2016155177 A1	02 Jun 2016
		US 9734526 B2	15 Aug 2017
		US 2017004588 A1	05 Jan 2017
		US 9767520 B2	19 Sep 2017
		US 2016379213 A1	29 Dec 2016
		US 9824408 B2	21 Nov 2017
		US 2017256001 A1	07 Sep 2017
		US 9922380 B2	20 Mar 2018
		US 2017256003 A1	07 Sep 2017
		US 9922381 B2	20 Mar 2018
		US 2016379298 A1	29 Dec 2016
		US 10002396 B2	19 Jun 2018
		US 2017236196 A1	17 Aug 2017
		US 10121186 B2	06 Nov 2018
		US 2018232817 A1	16 Aug 2018

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2022/031849	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		**Patent Family Member/s**	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		US 10152756 B2	11 Dec 2018
		US 2016155176 A1	02 Jun 2016
		US 10332170 B2	25 Jun 2019
		US 2016155175 A1	02 Jun 2016
		US 10366429 B2	30 Jul 2019
		US 2018025442 A1	25 Jan 2018
		US 10497037 B2	03 Dec 2019
		US 2017256000 A1	07 Sep 2017
		US 10504193 B2	10 Dec 2019
		US 2019306137 A1	03 Oct 2019
		US 10511580 B2	17 Dec 2019
		US 2017345105 A1	30 Nov 2017
		US 10621653 B2	14 Apr 2020
		US 2019230070 A1	25 Jul 2019
		US 10643266 B2	05 May 2020
		US 2020127985 A1	23 Apr 2020
		US 10650441 B1	12 May 2020
		US 2020076782 A1	05 Mar 2020
		US 10650443 B2	12 May 2020
		US 2019281030 A1	12 Sep 2019
		US 10726472 B2	28 Jul 2020
		US 2020195623 A1	18 Jun 2020
		US 10769717 B2	08 Sep 2020
		US 2020242682 A1	30 Jul 2020
		US 10825079 B2	03 Nov 2020
		US 2019007381 A1	03 Jan 2019
		US 10832310 B2	10 Nov 2020
		US 2020069734 A1	05 Mar 2020
		US 10927346 B2	23 Feb 2021
		US 2020358749 A1	12 Nov 2020
		US 10977716 B2	13 Apr 2021
		US 2019141021 A1	09 May 2019
		US 11004139 B2	11 May 2021
		US 2020402138 A1	24 Dec 2020
		US 11074640 B2	27 Jul 2021
		US 2020382480 A1	03 Dec 2020

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2022/031849	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		**Patent Family Member/s**	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		US 11080777 B2	03 Aug 2021
		US 2020014671 A1	09 Jan 2020
		US 11244377 B2	08 Feb 2022
		US 2019356641 A1	21 Nov 2019
		US 11250493 B2	15 Feb 2022
		US 2020014670 A1	09 Jan 2020
		US 11282131 B2	22 Mar 2022
		US 2021180017 A1	17 Jun 2021
		US 11365394 B2	21 Jun 2022
		US 2018019984 A1	18 Jan 2018
		US 2020178669 A1	11 Jun 2020
		US 2021024959 A1	28 Jan 2021
		US 2021087537 A1	25 Mar 2021
		US 2021163895 A1	03 Jun 2021
		US 2021174426 A1	10 Jun 2021
		US 2021174427 A1	10 Jun 2021
		US 2021174428 A1	10 Jun 2021
		US 2021174429 A1	10 Jun 2021
		US 2021326964 A1	21 Oct 2021
		US 2021350443 A1	11 Nov 2021
		US 2021358015 A1	18 Nov 2021
		US 2022148073 A1	12 May 2022
		US 2022156820 A1	19 May 2022
		WO 2015153474 A1	08 Oct 2015
		WO 2018204822 A1	08 Nov 2018
		WO 2019126748 A1	27 Jun 2019
		WO 2020046906 A1	05 Mar 2020
CN 110904239 A	24 March 2020	CN 110904239 A	24 Mar 2020
		CN 110904239 B	10 Nov 2020
WO 2020030984 A2	13 February 2020	WO 2020030984 A2	13 Feb 2020
		AU 2019319377 A1	11 Mar 2021

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/US2022/031849

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		BR 112021002476 A2	27 Jul 2021
		CA 3109083 A1	13 Feb 2020
		CA 3109105 A1	13 Feb 2020
		CN 112567031 A	26 Mar 2021
		CN 113227367 A	06 Aug 2021
		EA 202190454 A1	22 Apr 2021
		EP 3833751 A2	16 Jun 2021
		EP 3835418 A1	16 Jun 2021
		IL 280631 A	25 Mar 2021
		JP 2021532819 A	02 Dec 2021
		KR 20200018345 A	19 Feb 2020
		KR 102096592 B1	02 Apr 2020
		KR 20200018364 A	19 Feb 2020
		KR 102096604 B1	02 Apr 2020
		PH 12021550256 A1	03 Nov 2021
		SG 11202101227T A	30 Mar 2021
		US 2021222140 A1	22 Jul 2021
		US 2021292722 A1	23 Sep 2021
		WO 2020032711 A1	13 Feb 2020
WO 2021067788 A1	08 April 2021	WO 2021067788 A1	08 Apr 2021
		AU 2020358863 A1	12 May 2022
		CA 3153197 A1	08 Apr 2021
		EP 4038190 A1	10 Aug 2022
		US 2022136014 A1	05 May 2022
CN 110684823 A	14 January 2020	CN 110684823 A	14 Jan 2020
WO 2021178933 A2	10 September 2021	WO 2021178933 A2	10 Sep 2021
		GB 2603704 A	10 Aug 2022
WO 2022056489 A1	17 March 2022	WO 2022056489 A1	17 Mar 2022

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/0789(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0789	

(32)優先日　令和3年9月21日(2021.9.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/262,169
(32)優先日　令和3年10月6日(2021.10.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/280,026
(32)優先日　令和3年11月16日(2021.11.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/299,664
(32)優先日　令和4年1月14日(2022.1.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/308,766
(32)優先日　令和4年2月10日(2022.2.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/323,014
(32)優先日　令和4年3月23日(2022.3.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/331,076
(32)優先日　令和4年4月14日(2022.4.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＰＹＴＨＯＮ
２．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者　デヴォート，オードラ
アメリカ合衆国 ９４６０８ カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー １５４５
(72)発明者　バターフィールド，クリスティーナ
アメリカ合衆国 ９４６０８ カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー １５４５
(72)発明者　アレクサンダー，リサ
アメリカ合衆国 ９４６０８ カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー １５４５
(72)発明者　ゴルツマン，ダニエラ，エス．，エー．
アメリカ合衆国 ９４６０８ カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー １５４５

Fターム（参考）　4B065　AA93X AB01 BA05 BD50 CA44