

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-532961

(P2020-532961A)

(43) 公表日 令和2年11月19日 (2020. 11. 19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115 Z	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	
C 1 2 N 15/19 (2006.01)	C 1 2 N 15/19	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-508506 (P2020-508506)	(71) 出願人	518196169
(86) (22) 出願日	平成30年8月14日 (2018. 8. 14)		インテリア セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和2年3月17日 (2020. 3. 17)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/046772		2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0, スイート 1 3 0
(87) 国際公開番号	W02019/036513	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成31年2月21日 (2019. 2. 21)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	62/545, 883	(74) 代理人	100093676
(32) 優先日	平成29年8月15日 (2017. 8. 15)		弁理士 小林 純子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100153693
			弁理士 岩田 耕一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 メッセンジャーリボ核酸 (mRNA) をコードする安定化された核酸

(57) 【要約】

本開示は、ポリアデニル化 (ポリ A) テールの分野に関する。いくつかの実施形態では、DNA は、目的のタンパク質をコードするヌクレオチドに対して 3' に位置するポリ A テールをコードし、前記ポリ A テールは、1 個以上の非アデニンヌクレオチドを含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

目的のタンパク質をコードするヌクレオチドに対して 3' に位置するポリアデニル化（ポリ A）テールをコードするヌクレオチドを含む DNA であって、前記ポリ A テールが、少なくとも 8 個の連続するアデニン（A）ヌクレオチドの第 1 のホモポリマー配列と、1 個以上の非アデニン（A）ヌクレオチドを含む中断配列と、を含む、DNA。

【請求項 2】

前記ポリ A テールが、少なくとも連続するアデニン（A）ヌクレオチドの第 2 のホモポリマー配列をさらに含む、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 3】

前記ポリ A テールが、少なくとも 8 個の連続するアデニン（A）ヌクレオチドの 3 個以上のホモポリマー配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の DNA。

【請求項 4】

前記第 1 および / または以降のホモポリマー配列が、少なくとも 10、15、20、25、30、35、または 40 個の連続するアデニンヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 5】

前記 1 個以上の非アデニンヌクレオチドが、アデニンヌクレオチドのみを含有する類似または同じ長さの 3' テールを含む DNA において起こる損失と比較して、DNA 複製中の 1 個以上のアデニンヌクレオチドの損失を防止する、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 6】

前記 1 個以上の非アデニンヌクレオチドが、ポリ（A）結合タンパク質が一続きの連続するアデニンヌクレオチドに結合することができるように、前記連続するアデニンヌクレオチドを中断するように配置される、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 7】

前記ポリ A テールが、少なくとも 50 個の総アデニンヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 8】

前記ポリ A テールが、40 ~ 1000 個、40 ~ 900 個、40 ~ 800 個、40 ~ 700 個、40 ~ 600 個、40 ~ 500 個、40 ~ 400 個、40 ~ 300 個、40 ~ 200 個、または 40 ~ 100 個の総アデニンヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 9】

前記ポリ A テールが 95 ~ 100 個の総アデニンヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 10】

前記ポリ A テールが、90、91、92、93、94、95、96、または 97 個の総アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 11】

前記ポリ A テールが、96 または 97 個の総アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 12】

前記 1 個以上の中断配列が、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 1 個の連続する一続きの 2 ~ 10 個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 13】

前記 1 個以上の中断配列が、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 2 個以上の非アデニンヌクレオチドを包含する 1 個の連続する一続きの 2 ~ 10 個のヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記非アデニンヌクレオチド（複数可）が、少なくとも 8、9、10、11、または 12 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する、請求項 12 または 13 に記載の DNA。

【請求項 15】

前記 1 個以上の非アデニンヌクレオチドが、少なくとも 8 ～ 50 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 16】

前記 1 個以上の非アデニンヌクレオチドが、少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する、請求項 1 に記載の DNA。

10

【請求項 17】

前記中断配列が、トリヌクレオチド、ジヌクレオチド、またはモノヌクレオチドの中断配列である、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の DNA。

【請求項 18】

前記ポリ A テールが、8 ～ 50 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 1 個の連続する一続きの 2 ～ 10 個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の DNA。

【請求項 19】

前記ポリ A テールが、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 1 個の連続する一続きの 2 ～ 10 個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の DNA。

20

【請求項 20】

前記ポリ A テールが、8 ～ 50 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ～ 19 のいずれかに記載の DNA。

30

【請求項 21】

前記ポリ A テールが、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の DNA。

【請求項 22】

前記ポリ A テールが、2 個以上の非アデニンヌクレオチドまたは 2 個以上の連続する一続きの 2 ～ 10 個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の DNA。

40

【請求項 23】

前記 2 個以上の非アデニンヌクレオチドまたは 2 個以上の連続する一続きの 2 ～ 10 個の非アデニンヌクレオチドが、前記ポリ A テール内で不規則的に離間している、請求項 1 ～ 22 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 24】

前記ポリ A テールが、12 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 2、3、4、もしくは 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ～ 23 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 25】

50

前記ポリ A テールが、16 個の連続アデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 2、3、4、もしくは 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ~ 24 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 26】

前記ポリ A テールが、25 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 2、3、4、もしくは 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ~ 25 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 27】

前記ポリ A テールが、30 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 2、3、4、もしくは 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ~ 26 のいずれかに記載の DNA。

10

【請求項 28】

前記ポリ A テールが、39 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 2、3、4、もしくは 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する、請求項 1 ~ 27 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 29】

前記非アデニンヌクレオチドが、グアニン、シトシン、またはチミンである、請求項 1 ~ 28 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 30】

前記非アデニンヌクレオチドが、グアニンヌクレオチドである、請求項 29 に記載の DNA。

20

【請求項 31】

前記非アデニンヌクレオチドが、シトシンヌクレオチドである、請求項 29 に記載の DNA。

【請求項 32】

前記非アデニンヌクレオチドが、チミンヌクレオチドである、請求項 29 に記載の DNA。

【請求項 33】

a . グアニンおよびチミンヌクレオチド、
b . グアニンおよびシトシンヌクレオチド、
c . チミンおよびシトシンヌクレオチド、または
d . グアニン、チミンおよびシトシンヌクレオチドから選択される、2 個以上の非アデニンヌクレオチドを含む、請求項 29 に記載の DNA。

30

【請求項 34】

前記非アデニンヌクレオチドが、グアニン、シトシン、およびチミンから選択される 1 個の非アデニンヌクレオチドからなる、請求項 1 ~ 33 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 35】

前記非アデニンヌクレオチドが、グアニン、シトシン、およびチミンのうちの 1 個以上から選択される 2 個の非アデニンヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 34 のいずれかに記載の DNA。

40

【請求項 36】

前記非アデニンヌクレオチドが、グアニン、シトシン、およびチミンのうちの 1 個以上から選択される 3 個の非アデニンヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 35 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 37】

前記アデニンヌクレオチドが、アデノシンーリン酸である、請求項 1 ~ 36 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 38】

前記タンパク質が、治療用タンパク質である、請求項 1 ~ 37 のいずれかに記載の DNA。

50

【請求項 39】

前記タンパク質が、サイトカインまたはケモカインである、請求項 38 に記載の DNA。

【請求項 40】

前記タンパク質が、増殖因子である、請求項 38 に記載の DNA。

【請求項 41】

前記タンパク質が、Cas9 または修飾 Cas9 である、請求項 38 に記載の DNA。

【請求項 42】

請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の DNA によりコードされる mRNA。

【請求項 43】

前記 DNA がベクター内にある、請求項 1 ~ 42 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 44】

前記ベクターが宿主細胞内にある、請求項 43 に記載の DNA。

【請求項 45】

前記 1 個以上の非アデニンヌクレオチドが、アデニンヌクレオチドのみを含有する類似または同じ長さのポリ A テールをコードするヌクレオチドを含む DNA において起こる損失と比較して、宿主細胞の増殖中のベクター内のポリ A テールをコードするヌクレオチドの損失を防止する、請求項 43 に記載の DNA。

【請求項 46】

請求項 43 に記載の DNA ベクターから mRNA を産生する方法であって、
a . 前記ポリ A テールの下流の前記ベクターを直線化することと、
b . 前記直線化されたベクターを変性させることと、
c . グアニン、シトシン、ウラシル、およびアデニンヌクレオチドの存在下で、前記変性 DNA を RNA ポリメラーゼと接触させることと、を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、安定化されたメッセンジャーリボ核酸 (mRNA) および安定化された mRNA をコードする DNA の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリアデニル化は、メッセンジャー RNA (mRNA) の 3' 末端に複数のアデニンヌクレオチドを付加して、ポリ A テールを形成するプロセスである。ポリ A テールは、他の塩基が配列を中断することなく、アデノシン-リン酸などの複数の反復アデニンヌクレオチドで構成されている。ポリ A テールは、mRNA の核外輸送、翻訳、および安定性にとって重要である。自然界では、mRNA は DNA から生成されるため、ターミナルトランスフェラーゼは mRNA の 3' 末端にアデニンヌクレオチドを付加する。この酵素プロセスは、エクスピボで mRNA を生成する際に適用できるが、プロセスを制御するのは難しく、長さの異なるポリ A テールが生じる。プラスミドのポリ A テールをコードすることにより、ポリ A テールの不均一性を減らすことができる。ただし、不均一性が排除されるわけではなく、プラスミドの潜在的な不安定性などの追加の欠点もある。

【0003】

ポリ A テールは、ポリ A 結合タンパク質の結合部位として機能する。ポリ A 結合タンパク質は、mRNA の核からの輸送、翻訳、および mRNA の分解の抑制に役立つ。核からの輸送がない場合、mRNA は通常、エキソソームによって分解される。ポリ A 結合タンパク質は、翻訳に必要なタンパク質を補充する。

【0004】

現在、mRNA は治療用分子として、例えばさまざまな病気や障害の治療に使用されている。mRNA は、対象の細胞が細胞内で mRNA によってコードされるタンパク質を産

10

20

30

40

50

生するように、タンパク質の代わりに対象に送達される。これらおよび他の目的のために、mRNAは、しばしばプラスミドに含有されるDNA鋳型からの転写により調製され得る。mRNAの産生中、ポリAテールは、プラスミドからの転写後に酵素的にmRNAに付加され得るか、プラスミド自体にコード化され得る。ポリAテールがプラスミドにコードされている場合、ポリAテールはプラスミドDNA複製のサイクルで短くなる（すなわち、アデニンヌクレオチドを失う）場合があり、結果として生じるDNAおよび後続のmRNA集団に大きな変動をもたらす可能性がある。したがって、当該技術分野においてDNA複製中にポリAアデニンヌクレオチドをコードするヌクレオチドの漸進的損失に対して安定で抵抗性のあるポリAテールをコードするプラスミドの設計に対する必要性が存在する。

10

【発明の概要】

【0005】

本明細書では、目的のタンパク質をコードするヌクレオチドに対して3'に位置する連続するアデニンヌクレオチドを含むポリアデニル化（ポリA）テールをコードするDNA、およびそのポリAテールを含むmRNAであって、ポリAテールが非アデニンヌクレオチド「アンカー」を挿入することにより安定化される、DNA、およびmRNA、が開示されている。

【0006】

本明細書で使用する「ポリAテール」という用語は、mRNA分子上のポリAテール、またはDNAプラスミド内のポリAテールをコードする配列を指す。ポリAテールは、プラスミド内の相補的なDNA配列によってコードされていてもよい。DNA配列内の反復チミン（T）ヌクレオチドの配列、例えば、ホモポリマーT配列は、mRNAのポリAテールをコードし得る。2個以上の連続するアデノシン（例えば、アデノシンまたはデオキシアデノシン）、チミジン、または他のヌクレオチドは、ホモポリマーと呼ばれる。天然のポリAテールは、長く連続するホモポリマーA配列で構成されている。

20

【0007】

本明細書に開示される非アデニンヌクレオチドアンカーは、規則的または不規則的に間隔を空けてポリAテールを中断し、ポリAテールをコードするDNAならびにDNAから生成されるmRNAを安定化する。例示的な非アデニンヌクレオチドアンカーを表4に提供する。例えば、アンカー配列は、ポリAテール内の2個のアデニンヌクレオチドホモポリマー配列に隣接している。

30

【0008】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質をコードするヌクレオチドに対して3'に位置するポリアデニル化（ポリA）テールをコードするヌクレオチドを含むDNA組成物であって、ポリAテールは少なくとも8個の連続するアデニン（A）ヌクレオチドを含み、かつ1個以上の非アデニン（A）ヌクレオチドが包含される。

【0009】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、または90個の連続するアデニンヌクレオチドを含む。

40

【0010】

場合によっては、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、アデニンヌクレオチドのみを含有する類似または同じ長さの3'テールを含むDNAにおいて起こる損失と比較して、DNA複製中の1個以上のアデニンヌクレオチドの損失を防止する。

【0011】

いくつかの実施形態では、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、ポリ（A）結合タンパク質が一続きの連続するアデニンヌクレオチドに結合できるように、連続するアデニンヌクレオチドを中断するように配置される。

【0012】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、少なくとも50個の総アデニンヌクレオチ

50

ドを含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、40～500個の総アデニンヌクレオチドを含む。

【0014】

場合によっては、ポリAテールは95～100個の総アデニンヌクレオチドを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、90、91、92、93、94、95、96、または97個の総アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0016】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、96または97個の総アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0017】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、1個の非アデニンヌクレオチドまたは1個の連続する一続きの2～10個の非アデニンヌクレオチドを、含むかまたは含有する。

【0018】

いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、または12個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。

【0019】

場合によっては、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8～50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。

【0020】

いくつかの実施形態では、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。

【0021】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、8～50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態において、ポリAテールは、8～50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチド、を含むかまたは含有する。いくつかの実施形態において、ポリAテールは、ポリAテールの長さに沿って任意の場所に不規則的に離間された、1個以上の非アデニンヌクレオチドまたは1個以上の連続する一続きの2～10個の非アデニンヌクレオチドを有し、このポリAテールの長さに沿って任意の場所には、少なくとも8個の連続するアデニンがある。例えば、ポリAテールは、長さ70～1000ヌクレオチドで、1個以上の一続きの少なくとも8個の連続するアデニンがある限り、長さに沿って不規則に離間された（単一のまたはグループ化された）任意の数の非アデニンを有することができる。

【0022】

場合によっては、ポリAテールは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0023】

場合によっては、ポリAテールは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29

10

20

30

40

50

、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチドか、または少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0024】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、8～50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0025】

場合によっては、ポリAテールは8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0026】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、ポリAテール内で不規則的に離間された中断配列として、2個以上の非アデニンヌクレオチドまたは2個以上の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0027】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、ポリAテール内に不規則的に離間された2個以上の非アデニンヌクレオチドまたは2個以上の少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0028】

いくつかの例において、ポリAテールは、12個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または、2、3、4、もしくは5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0029】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、16個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または2、3、4、もしくは5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0030】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、25個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチドまたは2、3、4、もしくは5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0031】

いくつかの例において、ポリAテールは、30個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または2、3、4、もしくは5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0032】

いくつかの実施形態において、ポリAテールは、39個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチドまたは2、3、4、もしくは5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0033】

いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドはグアニン、シトシン、またはチミンである。場合によっては、非アデニンヌクレオチドはグアニンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドはシトシンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドはチミンヌクレオチドである。

【0034】

10

20

30

40

50

いくつかの場合、2個以上の非アデニンヌクレオチドが存在する場合、非アデニンヌクレオチドは、a) グアニンおよびチミンヌクレオチド、b) グアニンおよびシトシンヌクレオチド、c) チミンおよびシトシンヌクレオチド、またはd) グアニン、チミンおよびシトシンヌクレオチド、から選択されてもよい。

【0035】

いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンから選択される1個の非アデニンヌクレオチドからなる。

【0036】

場合によっては、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンのうちの1個以上から選択される2個の非アデニンヌクレオチドを含む。

10

【0037】

いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンのうちの1個以上から選択される3個の非アデニンヌクレオチドを含む。

【0038】

アデニンヌクレオチドは、アデノシンーリン酸であり得る。

【0039】

いくつかの実施形態では、mRNAによってコードされるタンパク質は治療用タンパク質である。場合によっては、タンパク質はサイトカイン、ケモカイン、増殖因子、Cas9または修飾Cas9である。

【0040】

20

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のDNAのいずれかによってコードされるmRNAが含まれる。

【0041】

いくつかの実施形態では、DNAはベクター内にある。ベクターは、昆虫、細菌、または哺乳動物（例えば、ヒト）細胞を含む宿主細胞内にあってもよい。

【0042】

いくつかの実施形態では、1個以上の非アデニンヌクレオチドが、アデニンヌクレオチドのみを含有する類似または同じ長さのポリAテールをコードするヌクレオチドを含むDNAにおいて起こる損失と比較して、宿主細胞の増殖中にベクター内のポリAテールをコードするヌクレオチドの損失を防止する。

30

【0043】

本明細書に記載のDNAベクターのいずれかからmRNAを産生する方法が包含され、ポリAテールの下流のベクターを直線化することと、直線化されたベクターを変性させることと、グアニン、シトシン、ウラシル、およびアデニンヌクレオチドの存在下で、変性DNAをRNAポリメラーゼと接触させることと、を含む。

【0044】

いくつかの実施形態では、本開示は、目的のタンパク質をコードするヌクレオチドに対して3'に位置するポリアデニル化（ポリA）テールをコードするヌクレオチドを含むDNAを含み、ポリAテールは少なくとも8個の連続するアデニン（A）ヌクレオチドの第1のホモポリマー配列と、1個以上の非アデニン（A）ヌクレオチドを含む中断配列と、を含む。いくつかのそのような実施形態では、ポリAテールは、少なくとも連続するアデニン（A）ヌクレオチドの第2のホモポリマー配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリAテールは、少なくとも8個の連続するアデニン（A）ヌクレオチドの3個以上のホモポリマー配列を含む。いくつかの実施形態では、第1および/または以降のホモポリマー配列は、少なくとも10、15、20、25、30、35、または40個の連続するアデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、アデニンヌクレオチドのみを含有する類似または同じ長さの3'テールを含むDNAにおいて起こる損失と比較して、DNA複製中の1個以上のアデニンヌクレオチドの損失を防止する。いくつかの実施形態では、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、ポリ（A）結合タンパク質が一続きの連続するアデニンヌクレオチドに結合できるように、連続

40

50

するアデニンヌクレオチドを中断するように配置される。一部の実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 50 個の総アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、40 ~ 1000 個、40 ~ 900 個、40 ~ 800 個、40 ~ 700 個、40 ~ 600 個、40 ~ 500 個、40 ~ 400 個、40 ~ 300 個、40 ~ 200 個、または 40 ~ 100 個の総アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは 95 ~ 100 個の総アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、90、91、92、93、94、95、96、または 97 個の総アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、96 または 97 個の総アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、1 個以上の中断配列は、1 個の非アデニンヌクレオチドまたは 1 個の連続する一続きの 2 ~ 10 個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、1 個以上の中断配列は、1 個の非アデニンヌクレオチドまたは 2 個以上の非アデニンヌクレオチドを包含する 1 個の連続する一続きの 2 ~ 10 個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチド（複数可）は、少なくとも 8、9、10、11、または 12 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態では、1 個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも 8 ~ 50 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態では、1 個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。

10

20

30

40

50

【0045】

いくつかの実施形態では、前の段落で説明したように、中断配列は、トリヌクレオチド、ジヌクレオチドまたはモノヌクレオチドの中断配列である。いくつかのこのような実施形態では、ポリ A テールは、8 ~ 50 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 1 個の連続する一続きの 2 ~ 10 個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 1 個の連続する一続きの 2 ~ 10 個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、8 ~ 50 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、2 個以上の非アデニンヌクレオチドまたは 2 個以上の連続する一続きの 2 ~ 10 個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、2 個以上の非アデニンヌクレオチドまたは 2 個以上の連続する一続きの 2 ~ 10 個の非アデニンヌクレオチドは、ポリ A テール内で不規則的に離間している。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、12 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 2、3、4、もしくは 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、16 個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1 個の非アデニンヌクレオチド、または 2、3、4、もしくは 5 個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは

、25個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチドまたは2、3、4、もしくは5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、30個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチドまたは2、3、4、もしくは5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態において、ポリAテールは、39個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチドまたは2、3、4、もしくは5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、またはチミンである。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、グアニンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、シトシンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、チミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、DNAは、(a)グアニンおよびチミンヌクレオチド、(b)グアニンおよびシトシンヌクレオチド、(c)チミンおよびシトシンヌクレオチド、または(d)グアニン、チミン、およびシトシンヌクレオチド、から選択される2個以上の非アデニンヌクレオチドを含む。上記のいくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンから選択される1個の非アデニンヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンのうちの1個以上から選択される2個の非アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンのうちの1個以上から選択される3個の非アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、アデニンヌクレオチドはアデノシンーリン酸である。いくつかの実施形態では、タンパク質は治療用タンパク質である。いくつかの実施形態では、タンパク質はサイトカインまたはケモカインである。いくつかの実施形態では、タンパク質は増殖因子である。いくつかの実施形態では、タンパク質はCas9または修飾Cas9である。

10

20

30

40

50

【0046】

本開示はまた、前の段落に記載されているDNAによりコードされるmRNAも包含する。

【0047】

いくつかの実施形態では、前述の段落に記載されたDNAは、ベクター内に含まれてもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは宿主細胞内に含まれる。DNAがベクター内にある場合、いくつかの実施形態では、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、アデニンヌクレオチドのみを含有する類似または同じ長さのポリAテールをコードするヌクレオチド含むDNAにおいて起こる損失と比較して、宿主細胞の増殖中のベクター内のポリAテールをコードするヌクレオチドの損失を防止する。

【0048】

本開示は、本明細書に記載のDNAベクターからmRNAを産生する方法であって、(a)ポリAテールの下流のベクターを直線化することと、(b)直線化されたベクターを変性させることと、(c)グアニン、シトシン、ウラシル、およびアデニンヌクレオチドの存在下で、変性DNAをRNAポリメラーゼと接触させることと、を含む、方法も包含する。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】は、増殖のラウンドにわたり長さが減少するアデノシンのみを含有するポリAテールをエンコードする配列を示す。各クローンは、クローンをコードするプラスミドを発現する宿主細胞の増殖/精製の連続するラウンドによって生成されたDNAを指す。

【図2】2個の増殖継代にわたって非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールのサイズの保持を示す。

【図3】アデノシンのみを含有するポリAテールを有するCas9 mRNAまたは非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有するCas9 mRNA、およびSEAPを標的とするシングルガイドRNA(配列番号8)を使用するCas9 mRNAアッセイ

で測定された分泌型胚性アルカリホスファターゼ (SEAP) レベルを示す。

【図4】アデノシンのみを含有するポリAテールを有する Cas9 mRNA または非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有する Cas9 mRNA、および SEAP を標的とするシングルガイドRNA (配列番号8) を使用し、24時間のインキュベーションして、Cas9 mRNA アッセイで測定した SEAP 阻害率を示す。

【図5】アデノシンのみを含有するポリAテールを有する Cas9 mRNA または非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有する Cas9 mRNA、および SEAP を標的とするシングルガイドRNA (配列番号8) を使用し、48時間インキュベーションして、Cas9 mRNA アッセイで測定した SEAP 阻害率を示す。

【図6】対照の形質転換および保存溶液 (TSS) 緩衝液の投与、または配列番号9のシングルガイドRNA (マウス TTR 遺伝子を標的とする) と、配列番号6 (HiCas9 mRNA) もしくは配列番号7 (中断されたポリA mRNA) によりコードされる mRNA のいずれかと、を配合した液体ナノ粒子 (LNP) の投与の7日後のマウスの血清トランスサイレチン (TTR) レベルを示す。

【図7】アデノシンのみを含有するポリAテールを有する Cas9 mRNA、または非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有する Cas9 mRNA、および SEAP を標的とするシングルガイドRNA (配列番号8) を使用し、48時間インキュベーションして、Cas9 mRNA アッセイで測定された SEAP 阻害率を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

本明細書に開示されるのは、目的のタンパク質をコードするヌクレオチドに対して3'に位置するポリアデニル化テールをコードするDNAであり、ポリAテールは1個以上の非アデニンヌクレオチドを含む。DNA複製中、1個以上の非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールをコードするDNAは、アデニンヌクレオチドのみから構成されるポリAテールと比較して、ポリAテール内のアデニンヌクレオチドの漸進的損失が少ないことを示し得る。したがって、1個以上の非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールをコードするDNAを含むプラスミドが提供される。そのようなDNAによってコードされるmRNAも含まれる。DNAとRNAの両方は、非中断のポリAテールを含む同様の分子よりも、アデニンヌクレオチドの進行性の損失に対してより大きな安定性を示し得る。

【0051】

目的のタンパク質は、任意の天然または非天然タンパク質であり得る。本明細書で使用する「タンパク質」とは、連続するアミノ酸の任意の配列を指す。そのようなものとして、タンパク質は、天然に存在するタンパク質の完全なアミノ酸配列を含むタンパク質を指し得る。さらに、タンパク質は、全長タンパク質の断片を含むアミノ酸配列を指し得る。タンパク質は、天然に存在する配列、1つ以上の修飾を伴う天然に存在する配列、または自然界には存在しない人工的な配列であってよい。

【0052】

目的のタンパク質は、対象において治療に使用してもよく、またはこのタンパク質は生化学反応で使用してもよい。治療用タンパク質には、例えば、とりわけ増殖因子、ワクチンまたは免疫腫瘍学の抗原、および酵素が含まれる。治療用タンパク質は、天然に存在するものまたは修飾されるものであってよい。特定の状況では、修飾タンパク質は融合タンパク質であってよい。

【0053】

いくつかの実施形態では、mRNAによるタンパク質の発現は、疾患の治療として使用するためのものである。いくつかの実施形態では、mRNAによるタンパク質の発現は、癌免疫療法、感染症に対するワクチン接種、I型アレルギーに対する寛容性を誘導するため、代替療法として、または再生医療として使用するためのものである (Sergeev et al, Biochemistry (Moscow) 81(7): 709-722 (2016) 参照)。

【0054】

いくつかの実施形態では、自己樹状細胞は、前立腺特異抗原（P S A）をコードする m R N A により、エキスピボでトランスフェクトされて転移性前立腺癌を有する対象の T 細胞免疫応答を調節する。

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態では、m R N A は予防ワクチンである。いくつかの実施形態では、m R N A は 1 個以上の抗原タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、抗原タンパク質（複数可）はウイルスタンパク質である。いくつかの実施形態では、m R N A は体の細胞に抗原タンパク質を産生および発現させる。いくつかの実施形態では、m R N A は、危険または疾患なしに、または個体間で広がることなく、抗原タンパク質の発現を引き起こす。いくつかの実施形態では、抗原タンパク質の発現は、対象の免疫系に抗体を産生させる。いくつかの実施形態では、これらの抗体は、ウイルスを中和し、ウイルスへの曝露後の将来の感染を防ぐことができる。いくつかの実施形態では、m R N A は感染症の予防ワクチンである。いくつかの実施形態では、m R N A は、インフルエンザ、チクングニア熱、ジカ、サイトメガロウイルス、ヒトメタニューモウイルス（H M P V）、またはパラインフルエンザウイルス 3 型（P I V 3）に対する予防ワクチンである。いくつかの実施形態では、m R N A はインフルエンザ H 1 0 または H 7 サブタイプに対する予防ワクチンである。

10

【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態では、m R N A は個別化癌ワクチンである。いくつかの実施形態では、m R N A は、癌を有する対象の免疫系を刺激して、癌細胞を認識し、応答を開始する。いくつかの実施形態では、この応答は個々の患者の癌または腫瘍に合わせて調整される。いくつかの実施形態では、m R N A は、患者の特定の新抗原（患者の癌または腫瘍に存在する突然変異を有する独特のタンパク質）をコード化する。いくつかの実施形態では、m R N A は患者の特定の新抗原の発現を引き起こす。いくつかの実施形態では、新抗原の発現は、患者において特定の免疫応答を誘発して、癌細胞を認識し破壊する。いくつかの実施形態では、m R N A は個別化癌ワクチンとして有用である。いくつかの実施形態では、m R N A は、抗 P D - 1 療法などの 1 個以上のチェックポイント阻害剤抗体とともに個別化癌ワクチンとして有用である。

20

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態では、m R N A は腫瘍内免疫腫瘍学に有用である。いくつかの実施形態では、腫瘍への m R N A の注入は、オフターゲット効果を低減し、かつ / または全身投与と比較してより強力であり得る。いくつかの実施形態では、m R N A は、C D 1 3 4 のリガンドである O X 4 0 L（C D 2 5 2）の発現を引き起こす。いくつかの実施形態では、m R N A は、インターロイキン 1 2（I L - 1 2）などのサイトカインの発現を引き起こす。

30

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、m R N A は、局所療法のためにタンパク質の発現を引き起こす。いくつかの実施形態では、m R N A は、より多くの血管の作成および局所組織における血液供給の改善を引き起こす。いくつかの実施形態では、m R N A は血管内皮増殖因子 A（V E G F - A）の発現を引き起こす。いくつかの実施形態では、V E G F - A の発現は局所的かつ一過性である。いくつかの実施形態では、V E G F - A の局所および一過性発現は、心不全または心臓発作後、糖尿病性創傷治癒、または他の虚血性血管疾患の治療に有用である。

40

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、m R N A は補充療法のためのタンパク質の発現を引き起こす。いくつかの実施形態では、タンパク質は肺サーファクタントタンパク質 B である。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、m R N A は、クラス 2 C R I S P R 関連 C a s エンドヌクレアーゼ、例えば C a s 9 / C s n 1（C a s 9）などの R N A ガイド型エンドヌクレアーゼの発現を引き起こす。例示的な C a s 9 配列は U n i P r o t Q 9 9 Z W 2 である。いく

50

つかの実施形態では、タンパク質は、修飾された Cas9 または別の機能性タンパク質またはペプチドに融合した Cas9 タンパク質である。不活性な 1 個の触媒ドメインである RuvC または HNH のいずれかを有する Cas9 の修飾バージョンは、「ニッカーゼ」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、組成物および方法はニッカーゼを含む。いくつかの実施形態では、組成物および方法は、標的 DNA の二本鎖切断ではなくニックを誘導するニッカーゼ Cas9 を含む。

【0061】

いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、1 個の機能的ヌクレアーゼドメインのみを含有するように修飾されてもよい。例えば、Cas タンパク質は、核酸切断活性を低下させるために、ヌクレアーゼドメインの 1 つが変異または完全または部分的に欠失するように修飾されてもよい。いくつかの実施形態では、活性が低下した RuvC ドメインを有するニッカーゼ Cas が使用される。いくつかの実施形態では、不活性 RuvC ドメインを有するニッカーゼ Cas が使用される。いくつかの実施形態では、活性が低下した HNH ドメインを有するニッカーゼ Cas が使用される。いくつかの実施形態では、不活性 HNH ドメインを有するニッカーゼ Cas が使用される。

【0062】

いくつかの実施形態では、キメラ Cas タンパク質は DNA によってコードされ、タンパク質の 1 個のドメインまたは領域は異なるタンパク質の一部で置き換えられる。いくつかの実施形態では、Cas ヌクレアーゼドメインは、FokI などの異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は修飾されたヌクレアーゼであってもよい。

【0063】

I. 非アデニンヌクレオチドを含むポリ A テールをコードする DNA

本明細書で使用する場合、「ポリ A テール」とは、mRNA の 3' 末端にアデノシンまたは他のアデニンヌクレオチドを含む配列を指す。天然のポリ A テールはアデニンヌクレオチドのみで構成される場合があるが、本発明の「ポリ A テール」は 1 個以上の非アデニンヌクレオチド「アンカー」により安定化される。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 8 個の連続するアデニンヌクレオチドと、非アデニンヌクレオチドを含む 1 個以上の中断配列とを含む。言い換えれば、本発明のポリ A テールは、少なくとも 8 個の連続するアデニンを含むが、中断またはアンカー配列内に 1 個以上の非アデニンヌクレオチドも含む。本明細書に開示される中断配列は、規則的または不規則に間隔を空けてポリ A テールを中断し、ポリ A テールをコードする DNA ならびに DNA から生成される mRNA を安定化する。例示的な中断配列を表 4 に提供する。

【0064】

本明細書で使用する「非アデニンヌクレオチド」は、アデニンを含まない任意の天然または非天然ヌクレオチドを指す。グアニン、チミン、およびシトシンヌクレオチドは、非アデニンヌクレオチドの例である。

【0065】

天然のポリ A テールは、DNA から mRNA への転写後に開始されるポリアデニル化プロセスで追加される。しかし、分子生物学の手法では、ポリ A テールは、目的のタンパク質をコードするプラスミド内の DNA の部分によってコードされることがよくある。この場合、ポリ A テールのサイズ（すなわち、ポリ A テールに含まれるアデニンヌクレオチドの数）は、これらの連続するアデニンヌクレオチドをコードするプラスミド内の DNA ヌクレオチドの数に直接依存している。

【0066】

ポリ A テールをコードする DNA ヌクレオチドの数は、例えば宿主細胞でのプラスミドの増殖中の DNA 複製中に徐々に減少する場合がある。プラスミド内の連続するアデニンをコードするヌクレオチドの数が減少すると、完全長のポリ A テールをコードするプラスミドの収量が低下し、結果としてポリ A テールが短い mRNA の安定性が低下し、かつ/または分解が増加する場合がある。例えば、40 個の連続するアデニンヌクレオチドのポ

リ A テールを有する m R N A は、90 個以上のヌクレオチドのポリ A テールを有する m R N A よりも安定性が低いと予想されるかもしれない。安定性が低いとは、m R N A がより迅速に分解される場合があることを意味し、その結果、標的タンパク質の発現は、ポリ A テールが短い m R N A から減少する。そのため、宿主細胞内での D N A 複製の複数のラウンドにわたって D N A プラスミド内のポリ A テールの長さを維持することは有益である。さらに、ポリ A テールは翻訳に重要である場合があり、より長いポリ A テールを維持すると、m R N A からのタンパク質発現が結果として改善される場合がある。

【0067】

目的のタンパク質をコードするヌクレオチドに対して 3' に位置するポリ A テールに 1 個以上の非アデニンヌクレオチドを含めると、アデニンヌクレオチドのみを含有する類似または同じ長さの 3' ポリ A テールを含む D N A において起こる損失と比較して、D N A 複製中の 1 個以上のアデニンヌクレオチドの損失を防止し得る。より長いポリ A テールの存在はまた、m R N A からのタンパク質翻訳の効率を改善する場合がある。

10

【0068】

A. アデニンヌクレオチド

本発明のポリ A テール中の連続するアデニンヌクレオチドの数は、ポリ A 結合タンパク質が連続するアデノシンに結合できるように設計されている。本明細書で使用する「ポリ - A 結合タンパク質」、「ポリ A 結合タンパク質」、または「ポリアデニレート結合タンパク質」とは、m R N A のポリ A テールに結合するタンパク質を指す。ポリ A 結合タンパク質は、翻訳開始を調節するように機能する場合がある。ポリ A テールに結合することにより、ポリ A 結合タンパク質は Z C C H C 6 / Z C C H C 1 1 によるウリジル化からそれらを保護し、m R N A の安定性に寄与する。ポリ A 結合タンパク質は、細胞質と核の間を往復する非翻訳 m R N A を含有する細胞質メッセンジャーリボ核タンパク質 (m R N P) 顆粒に局在している可能性がある。例示的なポリ A 結合タンパク質は P A B P C 1 である (UniProt 参照番号: P11940)。本発明の D N A は、m R N A に転写されると、1 個以上のポリ A 結合タンパク質がポリ A テールを結合する能力を保持するように、十分な連続するアデニンヌクレオチドをコードし得る。この機能的な数の連続するアデニンヌクレオチドの後に、中断非アデニンヌクレオチドアンカーが配置される。

20

【0069】

いくつかの実施形態では、1 個以上の非アデニンヌクレオチドは、ポリ A 結合タンパク質が連続する一続きのアデニンヌクレオチドに結合できるように、連続するアデニンヌクレオチド (すなわち、アデニンヌクレオチドホモポリマーまたは「ホモポリマー A」) を中断するように配置される。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 8 個の連続するアデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 8 個の連続するアデニンヌクレオチドは、8、9、10、11、および / または 12 個の連続するヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 10、15、20、25、30、35、および / または 40 個の連続するアデニンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、および / または 90 個の連続するアデニンヌクレオチドを含む。例えば、ポリ A R N A 配列のホモポリマーは、少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、または 40 個の連続するアデノシンヌクレオチドを含んでもよい。例えば、ポリ A テールをコードするプラスミド配列のホモポリマーは、少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、または 40 個の連続するチミジンヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、異なる長さの 2 個以上のホモポリマー A 配列を含み、例えば、ポリ A テールの中断配列は不規則的に離間されている。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、規則的に離間された中断配列と、同じ長さの 2 個以上のホモポリマーとを含む。

30

40

【0070】

50

いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 8 個の連続するアデニンヌクレオチドの第 1 ホモポリマー配列、少なくとも 5 個の連続するアデニンヌクレオチドの第 2 ホモポリマー配列、および 1 個以上の非アデニンヌクレオチドを含むアンカーを含む。

【0071】

いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、1 個以上のセットの 8 ~ 50 個の連続するアデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、1 個以上のセットの 8 ~ 100 個の連続するアデニンヌクレオチドを含む。複数のセットの連続するアデニンヌクレオチド、すなわち複数のホモポリマー配列を有するポリ A テールの場合、各セットのアデニンヌクレオチドは同じ長さである必要はない。

【0072】

連続するアデニンヌクレオチドの数に加えて、ポリ A テールは総アデニンヌクレオチドの数によっても特徴付けられ得る。総アデニンヌクレオチドの数は、単にポリ A テールのすべてのアデニンヌクレオチドの合計である。したがって、アデニンヌクレオチドの連続または非連続グループの異なるグループのすべてのアデニンヌクレオチドは、ポリ A テールの総アデニンヌクレオチドの数に含まれることになる。

【0073】

いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、40 ~ 50、50 ~ 60、60 ~ 70、70 ~ 80、80 ~ 90、90 ~ 100、100 ~ 110、110 ~ 120、120 ~ 130、130 ~ 140、140 ~ 150、150 ~ 160、160 ~ 170、170 ~ 180、180 ~ 190、190 ~ 200、200 ~ 210、210 ~ 220、220 ~ 230、230 ~ 240、240 ~ 250、250 ~ 260、260 ~ 270、270 ~ 280、280 ~ 290、290 ~ 300、300 ~ 310、310 ~ 320、320 ~ 330、330 ~ 340、340 ~ 350、350 ~ 360、360 ~ 370、370 ~ 380、380 ~ 390、390 ~ 400、400 ~ 410、410 ~ 420、420 ~ 430、430 ~ 440、440 ~ 450、450 ~ 460、460 ~ 470、470 ~ 480、480 ~ 490、490 ~ 500、500 ~ 510、510 ~ 520、520 ~ 530、530 ~ 540、540 ~ 550、550 ~ 560、560 ~ 570、570 ~ 580、580 ~ 590、または 590 ~ 600 個の総アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 8、9、10、12、25、30、50ヌクレオチド長の 1 個以上のホモポリマー A 配列を含む。

【0074】

いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、40 ~ 1000、40 ~ 900、40 ~ 800、40 ~ 700、40 ~ 600、40 ~ 500、40 ~ 400、40 ~ 300、40 ~ 200、または 40 ~ 100 個の総アデニンヌクレオチドを含む。

【0075】

いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 40 個の総アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 50 個の総アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、少なくとも 40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、または 300 個の

【0076】

いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、90、91、92、93、94、95、96、または 97 個の総アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリ A テールは、96 または 97 個の総アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0077】

いくつかの実施形態では、アデニンヌクレオチドはアデノシンーリン酸である。ヌクレオチドは修飾されていてもよい。

【0078】

B．非アデニンヌクレオチドを含む中断配列

本発明の非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、またはチミンなどの天然または非天然ヌクレオチドを含むかまたはそれからなってもよい。ヌクレオチドは修飾されていてもよい。

【0079】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、そうでなければアデニンヌクレオチドのみから構成されるポリAテールに1個の非アデニンヌクレオチドを含む。1個の非アデニンヌクレオチドは、アデニンヌクレオチドの配列を中断し得る。1個の非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンから選択されてもよい。いくつかの実施形態では、1個の非アデニンヌクレオチドはグアニンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、1個の非アデニンヌクレオチドはシトシンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、1個の非アデニンヌクレオチドはチミンヌクレオチドである。中断配列は、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド配列であり得る。中断配列は、1、2、3、4、5個、またはそれ以上の非アデニンヌクレオチドを含んでもよく、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の長さのヌクレオチドであってもよい。

【0080】

いくつかの実施形態において、単一の非アデニンヌクレオチドは、連続するアデニンヌクレオチドのセットまたはグループを中断し得る。1個の非アデニンヌクレオチドは、ポリA結合タンパク質が連続する一続きのアデニンヌクレオチドに結合できるような方法で、連続するアデニンヌクレオチドを中断するように配置されてもよい。

【0081】

いくつかの実施形態では、ポリAテールに2個以上の非アデニンヌクレオチドが存在する。2個以上の非アデニンヌクレオチドは、ポリA結合タンパク質が連続する一続きのアデニンヌクレオチドに結合できるような方法で、連続するアデニンヌクレオチドを中断するように配置され得る。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、ポリA結合タンパク質の結合を可能にするのに十分である、各一連の連続するアデニンヌクレオチドにおけるアデニンヌクレオチドの数で、連続するアデニンヌクレオチドの2個以上のセットの間に散在している。

【0082】

非アデニンヌクレオチドは、2個以上の非アデニンヌクレオチドの一続き内にあってもよい。非アデニンヌクレオチドは、1個以上の非アデニンヌクレオチドを含む2～10個の連続するヌクレオチドの一続き内にあってもよい。非アデニンヌクレオチドは、連続するアデニンヌクレオチド、例えば2個以上のホモポリマーA配列の2個以上のセットの間に散在する中断配列にあってもよい。いくつかの実施形態では、連続する非アデニンヌクレオチドの数は、1、2、3、4、または5個であり得る。いくつかの実施形態では、連続する一続きの2～10個の非アデニンヌクレオチドが存在する。いくつかの実施形態では、少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む連続する一続きの2～10個のヌクレオチドが存在する。

【0083】

連続する非アデニンヌクレオチドは、同じヌクレオチドの2個以上であってもよく、または連続する非アデニンヌクレオチドは互いに異なってもよい。例えば、非アデニンヌクレオチドは、2個以上のグアニン、シトシン、またはチミンヌクレオチドであり得る。非アデニンヌクレオチドは、グアニンおよびチミンヌクレオチド、グアニンおよびシトシンヌクレオチド、チミンおよびシトシンヌクレオチド、またはグアニン、チミンおよびシトシンヌクレオチドでもあり得る。非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンの1個以上から選択される2個の非アデニンヌクレオチドを含んでもよい。非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンの1個以上から選択される3個の非アデニンヌクレオチドを含んでもよい。非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、およびチミンの1個以上から選択される4個以上の非アデニンヌクレオチド

を含んでもよい。ポリ A テールは、規則的または不規則な間隔で非アデニンヌクレオチド間にアデニンヌクレオチドを含んでもよい。例えば、ポリ A テールにはパターンを有すると見ることができ、パターンは規則的または不規則的である。パターンの鍵となるのは、長さに沿ってどこかに少なくとも 8 個の連続するアデニンが存在する限り、ポリ A テールのどこかに 1 個以上の非アデニンヌクレオチドが存在することである。いくつかの実施形態では、アデニンヌクレオチドが、8 個以上のアデニンの後のどこかで 1 個以上の非アデニンヌクレオチドにより「中断」されるところで、ポリ A は、長さに沿ったどこかに少なくとも 8 個の連続するアデニンヌクレオチドの一続きを含み得る。中断配列は、1 個の非アデニンヌクレオチド、または任意選択的に少なくとも 2 個の非アデニンヌクレオチドを含む、2 ~ 10 個の連続するヌクレオチドであり得る。少なくとも 2 個の非アデニンヌクレオチドを含むヌクレオチドの各 1 つまたは連続する一続きの後に、1 個以上のアデニンが続く、任意選択的に 1 個以上の非アデニンヌクレオチドが続く、任意選択的に 1 個以上のアデニンヌクレオチドが続く、同様にしてポリ A テールの終わりまで続く。アデニンヌクレオチド / 非アデニンヌクレオチドのこのパターンは、規則的または不規則な間隔で繰り返され得る。あるいは、ポリ A の全長に沿って少なくとも 2 個の非アデニンヌクレオチドを任意選択で含む、1 個のみのまたは 1 個の連続する一続きの 2 ~ 10 個のヌクレオチドが存在する場合など、パターンがない場合がある。

10

【0084】

II. ポリ A テールのアデニンおよび非アデニンヌクレオチドの例示的なパターン

本発明のポリ A テールは、連続するアデニンヌクレオチドおよび 1 個以上の非アデニンヌクレオチドなどの多数の異なるパターンの中断配列を含むかまたはそれからなってもよい。

20

【0085】

ポリ A テールは、1 個または一連の連続するアデニンヌクレオチドで始まり、その後に非アデニンヌクレオチドが続いていてもよい。一連のアデニンヌクレオチドで始まるポリ A テールとは、ポリ A テールの 5' 末端が、1 個または一連の連続するアデニンヌクレオチドと連続するアデニンヌクレオチドの後にくる 1 個以上の非アデニンヌクレオチドとで構成されることを意味する。「後」とは、非アデニンヌクレオチドが一連の連続するアデニンヌクレオチドに対して 3' であることを意味する。

【0086】

いくつかの実施形態では、ポリ A テールの 5' 末端は、一連の連続するアデニンヌクレオチドと、それに続く 1 個以上の非アデニンヌクレオチド（複数可）から構成されてもよい。いくつかの実施形態では、1 個以上の非アデニンヌクレオチド（複数可）は、少なくとも 8、9、10、11、または 12 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態では、1 個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも 8 ~ 50 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態では、1 個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも 8 ~ 100 個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアデニンヌクレオチドの後にあり、その後に少なくとも 8 個の連続するアデニンヌクレオチドが続く。

30

40

【0087】

いくつかの実施形態では、ポリ A テールの 5' 末端は、1 ~ 8 個のアデニンヌクレオチドと、それに続く 1 個以上の非アデニンヌクレオチド（複数可）から構成される。そのような実施形態では、非アデニンヌクレオチド（複数可）の後にさらにアデニンヌクレオチドが続く。1 個以上の非アデニンヌクレオチドに続くアデニンヌクレオチドは、別の非アデニンヌクレオチドの前に少なくとも 8 個のアデニンヌクレオチドを含む。

【0088】

ポリ A テールを開始する連続するアデニンヌクレオチドのグループのサイズの範囲はさまざまであり得る。いくつかの実施形態では、ポリ A テールの 5' 末端は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、1

50

9、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100個の連続するアデニンヌクレオチドから構成される。第1の非アデニンヌクレオチドが1~7個のアデニンヌクレオチドの後に入る場合、ポリAテールはさらに、非アデニンヌクレオチドの後に一続きの少なくとも8個のアデニンヌクレオチドを含む。

【0089】

いくつかの実施形態では、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。

【0090】

ポリAテールは、3'末端で一続きの非アデニンヌクレオチドで終わってもよい。ポリAテールの3'末端の非アデニンヌクレオチドの数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の非アデニンヌクレオチドであってよい。あるいは、ポリAテールの3'末端は、1個以上のアデニンヌクレオチドで構成されていてもよい。

【0091】

本発明のポリAテールは、連続するアデニンヌクレオチドの1個の配列と、それに続く1個以上の非アデニンヌクレオチドと、任意選択的に、それに続く追加のアデニンヌクレオチドとを含むことができる。本発明のポリAテールはまた、1個以上の非アデニンヌクレオチドにより中断された連続するアデニンヌクレオチドの2個以上の配列も含み得る。連続するアデニンヌクレオチドの配列は、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドであってよい。中断配列中の非アデニンヌクレオチドの数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の非アデニンヌクレオチドであってよい。

【0092】

本発明のポリAテールはまた、非アデニンヌクレオチドが中断または散在している2個以上の一連の連続するアデニンヌクレオチドを含んでもよい。中断配列の長さは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のヌクレオチドであってよい。中断配列の長さは、1~3、1~5、1~10、2~10、2~8、2~6、または2~5個のヌクレオチドであってよい。本発明のポリAテールは、連続するアデニンヌクレオチドの2個以上のセットと、連続するアデニンヌクレオチドの各セットの間に、1個の非アデニンヌクレオチド、または2個以上の連続する一続きの2~10個の非アデニンヌクレオチドを含む中断配列と、を含み得る。本発明のポリAテールは、連続するアデニンヌクレオチドの2個以上のセットと、連続するアデニンヌクレオチドの各セット間に、1個の非アデニンヌクレオチド、または少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む2個以上の連続する一続きの2~10個のヌクレオチドと、を含み得る。本発明のポリAテールは、それぞれが1個以上の非アデニンヌクレオチドを含む、連続するアデニンヌクレオチドの2個以上のセットと1個以上の中断配列とを含み得る。セットはそれぞれ、同じ数または異なる数のアデニンヌクレオチドを含んでもよい。連続するアデニンヌクレオチドの複数のセットを伴う実施形態では、連続するアデニンヌクレオチドの各セットは、ポリA結合タンパク質の結合を可能にするのに十分な長さであり得る。

【0093】

いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、ポリAテールと

10

20

30

40

50

規則的な間隔で位置する中断配列である。規則的な間隔とは、連続するアデニンヌクレオチドのセット数の後に非アデニンヌクレオチドが繰り返しの様式で続くことを意味する。

【0094】

いくつかの実施形態では、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、ポリAテールと不規則な間隔で位置する。不規則な間隔とは、連続するアデニンヌクレオチドのセット数の後に非アデニンヌクレオチドが続く、その後に最初のセットとは異なる数のアデニンを含む連続するアデニンヌクレオチドの別のセットが続くことを意味する。

【0095】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは8～50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチド非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは8～50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または1個の連続する一続きの2～10個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは8～100個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチド非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは8～100個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または1個の連続する一続きの2～10個の非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

10

【0096】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは8～50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは8～50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは8～100個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは8～100個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。

20

30

【0097】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または非アデニンヌクレオチドを含む1個の連続する一続きの2～10個のヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0098】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1個の非アデニンヌクレオチド、または少なくとも2個の非アデニンヌクレオチドを含む1個の連続する一続きの2～10ヌクレオチドを含むかまたは含有する。

40

【0099】

いくつかの実施形態では、非アデニンヌクレオチドの数は、1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、連続するア

50

デニンヌクレオチドの数は、8～50個のアデニンヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドごとに1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。

【0100】

ポリAテールの連続するアデニンヌクレオチドの数は、12、16、25、30、または39個である。連続するアデニンヌクレオチドの数はまた39個を超えてもよい。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、12個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、16個の連続するアデニンヌクレオチドごとに1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、25個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、30個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、39個の連続するアデニンヌクレオチドごとに、1、2、3、4、または5個の連続する非アデニンヌクレオチドを含むかまたは含有する。連続する非アデニンヌクレオチドの数はまた5個より大きくてもよい。

【0101】

例示的なトリヌクレオチド中断配列には、GCG、CCG、GTG、TGG、CGG、GGT、TAT、CAT、CGT、CTC、GAT、CCT、TGT、CGC、CAC、TGC、TCG、TCT、CCC、GAC、TAG、GTT、CTG、およびTTTが含まれる。63個の可能なトリヌクレオチド中断配列、および末端Aを省く36個のトリヌクレオチド中断配列がある。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、TGG、CGG、GGT、TAT、CAT、CGT、CTC、GAT、CCT、TGT、CGC、CAC、TGC、TCG、TCT、CCC、GAC、TAG、GTT、CTG、およびTTTから選択される1個以上のトリヌクレオチド中断配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、ポリAテールをコードする配列内またはポリAテール内の3個以上のヌクレオチド間のハイブリダイゼーションおよびアニーリングを最小限に抑えるように設計された複数の中断配列を含む。特定の実施形態では、3個以上のヌクレオチド間のアニーリングを最小限に抑える中断配列は、末端Aを省く34個のトリヌクレオチド中断配列から選択される。いくつかの実施形態では、3個以上のヌクレオチド間のアニーリングを最小限に抑える中断配列は、TGG、CGG、GGT、TAT、CAT、CGT、CTC、GAT、CCT、TGT、CGC、CAC、TGC、TCG、TCT、CCC、GAC、TAG、GTT、CTG、およびTTTから選択される。いくつかの実施形態、例えば配列番号18では、ポリAテールは、TGG、CGG、GGT、TAT、CAT、CGT、CTC、GAT、CCT、TGT、CGC、CAC、TGC、TCG、TCT、CCC、GAC、TAG、GTT、CTG、TTT、およびCGから選択されるジヌクレオチドおよび/またはトリヌクレオチド中断配列を含む。特定の実施形態では、ポリAテールは、GCG、CCG、およびGTGから選択されるトリヌクレオチド中断配列を含む。例示的なジヌクレオチド中断配列には、CG、GC、CC、GG、TT、CT、TC、GT、およびTGが含まれる。15個の可能なジヌクレオチド中断配列と、末端Aを含まない9個のジヌクレオチドがある。モノヌクレオチド中断配列はC、G、およびTとすることができる。上記の任意のヌクレオチド配列に関して、RNA配列(mRNAなど)に言及する場合、DNA配列とは対照的に、TはUに置き換えられることに注意されたい。

【0102】

当業者は、連続するアデニンヌクレオチドと１個以上の非アデニンヌクレオチドとを有するポリＡテールをコードするＤＮＡの多くの異なるパターンを設計することができる。少なくとも８個の連続するアデニンヌクレオチドと１個以上のアデニンヌクレオチドを含むいくつかの例示的なポリＡテールを、例えば、配列番号１～５、１０、１１、および１８に提示する。

【０１０３】

III．使用方法

本発明のＤＮＡは、ＤＮＡによりコードされるｍＲＮＡの産生に使用され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは本発明のＤＮＡによってコードされる。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、本発明のＤＮＡはｍＲＮＡの産生のために調製される。いくつかの実施形態では、ＤＮＡはベクター内にある。いくつかの実施形態では、ベクターは宿主細胞内にある。いくつかの実施形態では、本発明のＤＮＡによりコードされるｍＲＮＡは、ＤＮＡによりコードされる目的のタンパク質を翻訳するために使用される。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、１個以上の非アデニンヌクレオチドは、アデニンヌクレオチドのみを含有する類似または同じ長さの３'テールを含むＤＮＡで起こる損失と比較して、ＤＮＡ複製中の１個以上のアデニンヌクレオチドの損失を防止する。ＤＮＡの複製は、ＤＮＡ精製のためのプラスミドの増殖に必要なステップである。したがって、少なくとも８個の連続するアデニンヌクレオチドと１個以上の非アデニンヌクレオチドを含むポリＡテールをコードする本発明のＤＮＡを含むプラスミドは、アデニンヌクレオチドのみから構成されるポリＡテールをコードするプラスミドと比較して、プラスミドのもう１回の増殖のラウンドおよび精製にわたって改善された安定性を示し得る。

【０１０６】

少なくとも８個の連続するアデニンヌクレオチドと１個以上の非アデニンヌクレオチドを含むポリＡテールをコードする配列を含む本発明のＤＮＡを含むプラスミドは、連続するアデニンヌクレオチドのみから構成されるポリＡテールをコードする配列を含むＤＮＡを含むプラスミドと比較して、宿主細胞内で成長した場合により高い安定性を有し得る。ＤＮＡ配列を有するプラスミドを発現する宿主細胞の増殖中、連続するアデニンヌクレオチドと１個以上の非アデニンヌクレオチドを含むポリＡテールをコードするＤＮＡ配列は、アデニンヌクレオチドのみから構成されるポリＡテールと比較して、ポリＡテールをコードするＤＮＡの長さの減少に耐性があり得る。いくつかの実施形態では、１個以上の非アデニンヌクレオチドを含むポリＡテールをコードするＤＮＡを含むプラスミドは、アデニンヌクレオチドのみを含むポリＡテールをコードするＤＮＡを含むプラスミドと比較して、宿主細胞の増殖中のアデニンの損失を防止する。

【０１０７】

当業者に知られているベクターを増殖および精製する任意の手段を、プラスミドをコードする宿主細胞の増殖に使用してもよい。ベクターの増殖と精製のプロセスは、プラスミド調製とも呼ぶことができる。プラスミド精製の標準的なステップには、細菌培養の増殖、細菌の収穫と溶解、およびプラスミドＤＮＡの精製が含まれる。プラスミドＤＮＡを精製するための多くのキットがさまざまなメーカーから入手できる。プラスミド調製のステップは、ミニプレパレーション（２０～４０μgまたは５０～１００μgのプラスミドＤＮＡの予想収量）、ミディプレパレーション（１００～３５０μgのプラスミドＤＮＡの予想収量）、マキシプレパレーション（５００～８５０μgのプラスミドＤＮＡの予想収量）、メガプレパレーション（１．５～２．５mgのプラスミドＤＮＡの予想収量）、またはギガプレパレーション（７．５～１０mgのプラスミドＤＮＡの予想収量）であってよい。治療用ｍＲＮＡ産生のために、プラスミドは１００mg、１g、１０g、またはそれ以上の規模で産生され得る。本明細書に記載の非アデニンヌクレオチドを有するポリＡテールをコードするプラスミドの安定性および複製効率の増加は、そのような規模で作製されたプラスミドの一貫性および効率を改善し得る。

【0108】

いくつかの実施形態では、本発明のDNAベクターからmRNAを産生する方法が包含される。いくつかの実施形態では、DNAベクターからmRNAを産生する方法は、ポリAテールの下流でベクターを直線化することと、直線化されたベクトルを変性することと、グアニン、シトシン、ウラシル、アデニンなどのRNAヌクレオチド、またはとりわけプソイドウリジン、N-1-メチルプソイドウリジン、メトキシウリジンなどのこうしたヌクレオチドの化学修飾バージョンの存在下で変性されたDNAをRNAポリメラーゼと接触させることと、を含む。ヌクレオチド残基の塩基、糖、骨格修飾などの修飾残基は、mRNA、ポリヌクレオチド、および本明細書に記載の方法で 사용할 ことができる。

【0109】

この説明および例示的な実施形態は、限定として解釈されるべきではない。本明細書および添付の特許請求の目的のために、特に明記しない限り、本明細書および特許請求の範囲で使用される量、パーセンテージ、または割合、および他の数値を表すすべての数字は、どの場合においても用語「約」によって、まだそのように修正されていない範囲で修正されていると理解されるべきである。したがって、そうでないことが示されない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。非常に少なくとも、および均等論の適用を特許請求の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数を考慮して、通常の丸め手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

【0110】

本明細書および添付の特許請求の範囲で 使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」、および任意の単語の単数形の使用は、明示的かつ明確に1個の指示対象に限定されない限り、複数の指示対象を含めることに留意されたい。本明細書で 使用される「含める(include)」という用語およびその文法上の変形は、リスト内のアイテムの列挙が、リストされたアイテムに置換または追加できる他の同様のアイテムを除外しないように、非限定的であることを意図している。

【0111】

配列の説明

この表は、本明細書で参照される特定の配列のリストを提供する。下の表のDNA配列のRNAバージョンを参照する場合、TはUに置き換えられることをここでも留意されたい。下の表のRNA配列のDNAバージョンを参照する場合、UはTに置き換えられる。

10

20

30

【表 1】

表 1

説明	配列	配列番号
30 個、30 個、および 39 個の連続するアデノシンを有する非アデニンヌクレオチドを含み、非アデニンヌクレオチドで終わる例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GCGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAACCGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAACCC	1
30PA-30 個、30 個、および 39 個の連続するアデノシンを有する非アデニンヌクレオチドを含む例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GCGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAACCGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAA	2
25PA-25 個の連続するアデノシンの 4 個のセットを有する非アデニンヌクレオチドを含む例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAGCGAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAACCGAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AGTGAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA	3
16PA-16 個の連続するアデノシンの 6 個のセットを有する非アデニンヌクレオチドを含む例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAA AAAAAGAAA AAAAAAAAAA AAACAAAAA AAAAAAAAAA TAAAAAAAAA AAAAAATAA AAAAAAAAAA AAAACAAAAA AAAAAAAAA A	4
16PA 長い-16 個の連続するアデノシンと 63 個の連続するアデノシンの 6 個のセットを有する非アデニンヌクレオチドを含む例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAA AAAAAGAAA AAAAAAAAAA AAACAAAAA AAAAAAAAAA TAAAAAAAAA AAAAAATAA AAAAAAAAAA AAAACAAAAA AAAAAAAAA ACAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAA	5
97 個のアデノシンから構成されるポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGC GGCTCTGCTTGTTCTGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATT CGGATCCATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATC GGAACATAATTCCGTGGGTGGGCAGTGATCACGGATGAAT ACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACAC	6

10

20

30

40

40

説明	配列	配列番号
	<p>GAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGA AGAAAGCAATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAA GGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAG ATCGAGTGTTCGACTCAGTGGAATCAGCGGGGTGGAGG ACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCT GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAG AACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCC TTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGAC CTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCTC AAGCGCCGCCGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCGCA AGTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAC TATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGT AAGTTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTA AGGAGGACATCCAAAAGCACAAGTGTCGGACAGGGAGA CTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCG GCGATTAAGAAGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCG ACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAACCCGGAGAA TATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACAGACTACCCAG AAGGGCCAGAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCG AAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGA GCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTC TACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGG ACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGT GGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCG ATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAG GGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAA GATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTG ATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGC GCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAA ACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTG GCGCAGATCTTGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACG AGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCT GAAAAGCAAACCTTGTGTCGGACTTTGGAAGGACTTTGAG TTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGC ATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGAT CAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGA GACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGT</p>	

40

説明	配列	配列番号
配列番号 1 を含むポリ A テールを有する T7 プロ モーターと Cas9 mRNA	TAATACGACT CACTATAGGG TCCCGCAGTC GGCGTCCAGC GGCTCTGCTT GTTCGTGTGT GTGTCGTTGC AGGCCTTATT CGGATCTGCC ACCATGGATA AGAAGTACTC GATCGGGCTG GATATCGGAA CTAATTCCGT GGGTTGGGCA GTGATCACGG ATGAATACAA AGTGCCGTCC AAGAAGTTCA AGGTCCTGGG GAACACCGAT AGACACAGCA TCAAGAAGAA TCTCATCGGA GCCCTGCTGT TTGACTCCGG CGAAACCGCA GAAGCGACCC GGCTCAAACG TACCGCGAGG CGACGCTACA CCCGGCGGAA GAATCGCATC TGCTATCTGC AAGAAATCTT TTCGAACGAA ATGGCAAAGG TGGACGACAG CTTCTTCCAC CGCCTGGAAG AATCTTTCCT GGTGGAGGAG GACAAGAAGC ATGAACGGCA TCCTATCTTT GGAAACATCG TGGACGAAGT GGCGTACCAC GAAAAGTACC CGACCATCTA CCATCTGCGG AAGAAGTTGG TTGACTCAAC TGACAAGGCC GACCTCAGAT TGATCTACTT GGCCCTCGCC CATATGATCA AATTCCGCGG AACTTTCCTG ATCGAAGGCG ATCTGAACCC TGATAACTCC GACGTGGATA AGCTGTTCAT TCAACTGGTG CAGACCTACA ACCAACTGTT CGAAGAAAAC CCAATCAATG CCAGCGGCGT CGATGCCAAG GCCATCCTGT CCGCCCGGCT GTCGAAGTCG CGGCGCCTCG AAAACCTGAT CGCACAGCTG CCGGGAGAGA AGAAGAACGG ACTTTTCGGC AACTTGATCG CTCTCTCACT GGGACTCACT CCCAATTTC AATCCAATTT TGACCTGGCC GAGGACGCGA AGCTGCAACT CTCAAAGGAC ACCTACGACG ACGACTTGGA CAATTTGCTG GCACAAATTG GCGATCAGTA CGCGGATCTG TTCCTTGCCG CTAAGAACCT TTCGGACGCA ATCTTGCTGT CCGATATCCT GCGCGTGAAC ACCGAAATAA CCAAAGCGCC GCTTAGCGCC TCGATGATTA AGCGGTACGA CGAGCATCAC CAGGATCTCA CGCTGCTCAA AGCGCTCGTG	7

10

20

30

40

説明	配列	配列番号
	AGACAGCAAC TGCCTGAAAA GTACAAGGAG ATTTTCTTCG ACCAGTCCAA GAATGGGTAC GCAGGGTACA TCGATGGAGG CGCCAGCCAG GAAGAGTTCT ATAAGTTCAT CAAGCCAATC CTGGAAGA TGGACGGAAC CGAAGAACTG CTGGTCAAGC TGAACAGGGA GGATCTGCTC CGCAAACAGA GAACCTTTGA CAACGGAAGC ATTCCACACC AGATCCATCT GGGTGAGCTG CACGCCATCT TCGGGCGCCA GGAGGACTTT TACCCATTCC TCAAGGACAA CCGGGAAAAG ATCGAGAAAA TTCTGACGTT CCGCATCCCG TATTACGTGG GCCCACTGGC GCGCGGCAAT TCGCGCTTCG CGTGGATGAC TAGAAAATCA GAGGAAACCA TCACTCCTTG GAATTTGAG GAAGTTGTGG ATAAGGGAGC TTCGGCACAA TCCTTCATCG AACGAATGAC CAACTTCGAC AAGAATCTCC CAAACGAGAA GGTGCTTCCT AAGCACAGCC TCCTTTACGA ATACTTCACT GTCTACAACG AACTGACTAA AGTGAAATAC GTTACTGAAG GAATGAGGAA GCCGGCCTTT CTGAGCGGAG AACAGAAGAA AGCGATTGTC GATCTGCTGT TCAAGACCAA CCGCAAGGTG ACCGTCAAGC AGCTTAAAGA GGACTACTTC AAGAAGATCG AGTGTTTCGA CTCAGTGGA ATCAGCGGAG TGGAGGACAG ATTCAACGCT TCGCTGGGAA CCTATCATGA TCTCCTGAAG ATCATCAAGG ACAAGGACTT CTTGACAAC GAGGAGAACG AGGACATCCT GGAAGATATC GTCCTGACCT TGACCCTTTT CGAGGATCGC GAGATGATCG AGGAGAGGCT TAAGACCTAC GCTCATCTCT TCGACGATAA GGTCATGAAA CAACTCAAGC GCCGCCGGTA CACTGGTTGG GGCCGCCTCT CCCGCAAGCT GATCAACGGT ATTCGCGATA AACAGAGCGG TAAACTATC CTGGATTTC TCAAATCGGA TGGCTTCGCT AATCGTAACT TCATGCAGTT GATCCACGAC GACAGCCTGA CCTTTAAGGA GGACATCCAG	

[illegible]

説明	配列	配列番号
	TTCGCAACTG TTCGCAAAGT GCTCTCTATG CCGCAAGTCA ATATTGTGAA GAAAACCGAA GTGCAAACCG GCGGATTTTC AAAGGAATCG ATCCTCCCAA AGAGAAATAG CGACAAGCTC ATTGCACGCA AGAAAGACTG GGACCCGAAG AAGTACGGAG GATTGATTTC GCCGACTGTC GCATACTCCG TCCTCGTGGT GGCCAAGGTG GAGAAGGGAA AGAGCAAGAA GCTCAAATCC GTCAAAGAGC TGCTGGGGAT TACCATCATG GAACGATCCT CGTTCGAGAA GAACCCGATT GATTTCTGG AGGCGAAGGG TTACAAGGAG GTGAAGAAGG ATCTGATCAT CAAACTGCCC AAGTACTCAC TGTTGGAAGT GGAAAATGGT CGGAAGCGCA TGCTGGCTTC GGCCGGAGAA CTCCAGAAAG GAAATGAGCT GGCCTTGCCT AGCAAGTACG TCAACTTCCT CTATCTTGCT TCGCACTACG AGAAACTCAA AGGGTCACCG GAAGATAACG AACAGAAGCA GCTTTTCGTG GAGCAGCACA AGCATTATCT GGATGAAATC ATCGAACAAA TCTCCGAGTT TTCAAAGCGC GTGATCCTCG CCGACGCCAA CCTCGACAAA GTCCTGTCGG CCTACAATAA GCATAGAGAT AAGCCGATCA GAGAACAGGC CGAGAACATT ATCCACTTGT TCACCCTGAC TAACCTGGGA GCTCCAGCCG CCTTCAAGTA CTTGATACT ACTATCGACC GCAAAAGATA CACGTCCACC AAGGAAGTTC TGGACGCGAC CCTGATCCAC CAAAGCATCA CTGGACTCTA CGAAACTAGG ATCGATCTGT CGCAGCTGGG TGGCGATGGT GGCGGTGGAT CCTACCCATA CGACGTGCCT GACTACGCCT CCGGAGGTGG TGGCCCCAAG AAGAAACGGA AGGTGTGATA GCTAGCCATC ACATTTAAAA GCATCTCAGC CTACCATGAG AATAAGAGAA AGAAAATGAA GATCAATAGC TTATTTCATCT CTTTTTCTTT TTCGTTGGTG TAAAGCCAAC ACCCTGTCTA AAAAACATAA ATTTCTTTAA TCATTTTGCC TCTTTTCTCT	

説明	配列	配列番号
	GTGCTTCAAT TAATAAAAAA TGGAAAGAAC CTCGAGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAGCGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAC CGAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAA AAAAAAAAAA A	
SEAP を標的とするシングルガイド RNA	mC*mU*mC*C CUGAUGGAGA UGACAGGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUGAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAmA mAmAmAmGmU mGmGmCmAmC mCmGmAmGmU mCmGmGmUmG mCmU*mU*mU *mU	8
マウス TTR を標的とするシングルガイド RNA	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU* mU*mU*mU	9
12PA-12 個の連続するアデノシンの 9 個のセットとモノヌクレオチド中 断配列を有する非アデニンヌクレオチドを含む例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAACA AAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAGAA AAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAA	10
8PA-8 個の連続するアデノシンの 12 個のセットとモノヌクレオチド中 断配列を有する非アデニンヌクレオチドを含む例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAA AAAGAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAT AAAAAAAAAGAAAAAAAAACAAAAAAAAATAAAAAA	11
ポリ A-1 12 個の連続するアデノシンの 6 回の繰り返しを	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGAAAAAAAAA AAATGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGTAAAA	12

10

20

30

40

説明	配列	配列番号
隔てる 5 個の中断配列を含む配列に隣接する Bcl11a プライマーアニーリング部位	AAAAAAAAATATAAAAAAAAAAACATAAAAAAAAAAACG TTCATATCGGTTCTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	
ポリ A-2 12 個の連続するアデノシンの 6 個のセットを隔てる 5 個の中断配列を含む配列に隣接する Bcl11a プライマーアニーリング部位	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGAATTCATCTAGCTCG AGAAAAAATTCGAAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAAC TCAAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAA AAAATGTAAAAAAAAAGGGAAAGTCTTCATATCGGT TCTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	1 3
ポリ A-3 12 個の連続するアデノシンの 6 個のセットを隔てる 5 個の中断配列を含む配列に隣接する Bcl11a プライマーアニーリング部位	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGGAAGACAAG GGAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAACACAAAAAAAA AAAATGCAAAAAAAAAATCGAAAAAAAAATCTAAA AAAAAAAAACGTTTCATATCGGTTCTAGACCACACTTCTTA CTGAGGTCCC	1 4
ポリ A-4 12 個の連続するアデノシンの 7 個のセットを隔てる 6 個の中断配列を含む配列に隣接する Bcl11a プライマーアニーリング部位	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGAAAAATTC GAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAGACAAAAAAAA AAATAGAAAAAAAAAGTTAAAAAAAAAACTGAAAA AAAAAAATTTAAAAAAAAAACTAGACCACACTTCTT ACTGAGGTCCC	1 5
ポリ A 1-2 12 個の連続するアデノシンの 12 個のセットを隔てる 11 個の中断配列を含む配列に隣接する Bcl11a プライマーアニーリング部位	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGAATTCATCTAGCTCG AGAAAAAAAAAATGGAAAAAAAAAACGGAAAAAAAA AAAAGGTAAAAAAAAAATATAAAAAAAAAACATAAA AAAAAAAAACGAAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAACT CAAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAA AAATGTAAAAAAAAAGGGAAAGTCTTCATATCGGTT CTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	1 6
ポリ A 3-4 12 個の連続するアデノシンの 13 個のセットを	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGGAAGACAAG GGAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAACACAAAAAAAA AAAATGCAAAAAAAAAATCGAAAAAAAAAACTCTAAA	1 7

10

20

30

40

説明	配列	配列番号
隔てる 12 個の中断配列を含む配列に隣接する Bcl11a プライマーアニーリング部位	AAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACCAAAAAAAAAAAGA CAAAAAAAAAAATAGAAAAAAAAAAAAAGTTAAAAAAAA AAACTGAAAAAAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAAAATCTAGAC CACACTTCTTACTGAGGTCCC	
300PA 12 個の連続するアデノシンの 13 回の繰り返しを隔てる 24 個の中断配列を含む例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAAATGGAIAAAAAAAAAACGGAAAAAAAA AAGGTAAAAAAAAAATATAAAAAAAAAAACATAAAAA AAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAACTCA AAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAA ATGTAAAAAAAAAAGGGAIAAAAAAAAAACGCAAAAA AAAAACACAAAAAAAAAATGCAAAAAAAAAAATCGA AAAAAAAAAATCTAAAAAAAAAACGAAAAAAAA CCCAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAATAGAAAAAA AAAAAGTTAAAAAAAAAACTGAAAAAAAAAATTTAA AAAAAAAA	1 8
100PA-97 個のアデニンヌクレオチドホモポリマーを含む例示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA	1 9
pUC-M seq2 フォワードプライマー	GGGTATTGTCTCATGAGCG	2 0
pUC-M seq リバースプライマー	TTTTGTGATGCTCGTCAGGG	2 1
RN-Bcl11a for	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAG	2 2
RN-Bcl11a rev	GGGACCTCAGTAAGAAGTGTGG	2 3
Liv-U 枯渇 (Liv-U depleted) : 98 個の連続するアデノシンから構成されるポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAGAACAGAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTCGAAGAA	2 4

10

20

30

40

説明	配列	配列番号
	<p>GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG</p>	

説明	配列	配列番号
	ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA CACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTTCGAAACAGAACTTCATGCAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGCAGAACTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAGTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTCATCAGCTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAG AGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA TGAAC TTCTTCAAGACAGAAATCAGCTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAA	

10
20
30
40

説明	配列	配列番号
	AGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAGGACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGA GAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTGAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC	

説明	配列	配列番号
	AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA CACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTTCGAAACAGAAACTTCATGCAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAAGATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAGTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAG AGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA TGAACCTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA	

10
20
30
40

説明	配列	配列番号
	AAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGG AGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCTGAAGAA GACAAGAAGCAGCAAAGACACCCGATCTTCGGAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTCTGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTCTG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG	

説明	配列	配列番号
	AACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTGGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA CACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCGAAACAGAACTTCATGCAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAGTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAGCACGTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAG AGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA	

10
20
30
40

説明	配列	配列番号
配列番号 5 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCGCGAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGT GTGTGCTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAGAACAAGAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTGGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTGGAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTGAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGC	27

10

20

30

40

10
20
30
40

説明	配列	配列番号
	TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAG AGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA TGAAGTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTTGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTCTGCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAGCCA ACACCCGTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG CCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAACAAA	

説明	配列	配列番号
	AAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA	
配列番号 10 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCGCGAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCTGTGTGT GTGTGTTGCGAGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCGTCAATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCCTGGAAACACAGACAGACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAAGACAGAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTGAAGAA GACAAGAAGCAGAAAGACACCCGATCTTCGGAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTGGAAGAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAACCTGATCGCACAGCTG CCGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTGGAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGACAGCTGTTCTGGCAGCAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACGACCTGACACTGCTGAA GGCAGTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGA	28

10

20

30

40

説明	配列	配列番号
	GAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGGGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAAC TTCGAAGAAGTCGTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAAC TTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTGGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA CACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCAAAACAGAACTTCATGCAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAAC TGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAAGATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAC TGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA	

説明	配列	配列番号
	<p> GTTGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAGCACGTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTCATCAGCTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAG AGAAATCAACAACACCACCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA TGAATTCTTCAAGACAGAAATCAGCTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTTGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAGCATCTCA </p>	

説明	配列	配列番号
	GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTCGTTGGTGTAAGCCA ACACCGCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG CCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAA GAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAA	
配列番号 11 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCCTATTCCGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGG AGAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCAGTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA	2 9

10

20

30

40

40

説明	配列	配列番号
	CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAG AGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA TGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAAGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAA GTCAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTTGCAACTGGAACCGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTGCAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAAGGAAGTCTGAGCGCAACACTGATCCAC	

40

40

説明	配列	配列番号
	GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAGCTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAGCACGTGCGACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAG AGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA TGAATTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTTCTGAAGTGGAAAACGGAAAGAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTCTGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC	

説明	配列	配列番号
	ATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTCGTTGGTGTAAGCCA ACACCCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTTG CCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
配列番号 2 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTGTTGTGT GTGTGTTGCGAGCCTTATTCGGATCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCGTTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTGAAGAA GACAAGAAGCAGGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTGGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG	3 1

10

20

30

40

説明	配列	配列番号
	<p>GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTGAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAAGTTCGAAGAAGTCGTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGTACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTTGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA CACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGCAGGATTTCGAAACAGAACTTCATGCAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTGACGCGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAAGTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA</p>	

40

[illegible]

10

20

【 0 1 1 2 】

ホスホロチオエート(PS)連結または結合とは、ホスホジエステル連結、例えばヌクレオチド塩基間の結合での1個の非架橋リン酸塩酸素を硫黄が置換する結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドはS-オリゴとも呼ばれ得る。

【 0 1 1 3 】

30

PS修飾を示すために「*」が使用され得る。本出願では、用語A*、C*、U*、またはG*を使用して、PS結合を用いて次の(例えば3')ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示し得る。

【 0 1 1 4 】

本出願では、2' - O - Meで置換され、P S結合で次の(例えば3')ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すために、用語「mA*」、「mC*」、「mU*」、または「mG*」が使用され得る。

【实施例】

【 0 1 1 5 】

以下の実施例は、特定の開示された実施形態を例示するために提供され、本開示の範囲を決して限定するものとして解釈されるべきではない。

40

【 0 1 1 6 】

実施例 1 - ポリ A コーディングのための安定したプラスミドの設計と安定性

非アデニンヌクレオチドを含むポリ A テールが設計された。連続するアデニンヌクレオチドと非アデニンヌクレオチド（例えば、中断配列）を有するこれらのポリ A テールをコードするプラスミドの安定性を、アデニンヌクレオチドのみで構成されるポリ A テールと比較した。

【 0 1 1 7 】

アデノシンのみで構成される mRNA ポリ A テールのアデノシン数の損失の問題点は、表 2 で強調されている。96 個のアデノシンのポリ A テールを含有する配列を pUC57

50

プラスミド (G e n s c r i p t) に挿入し、 E . c o l i へと形質転換させた。細胞を L B - A m p プレートに播種し、 30 または 37 のいずれかで一晚インキュベートした。 8 個のコロニーを採取し、 L B - A m p 培地を有する 96 ウェルプレートに接種し、 30 または 37 で一晚増殖させた (D a y 1)。 D a y 1 の培養からの試料を新鮮な L B - A m p 培地に加え、 30 または 37 でさらに 2 日間培養した (D a y 2)。 D N A を D a y 1 および D a y 2 の培養物から精製し、配列決定して、プラスミドのポリ A テール長を決定した。例示的な結果を以下の表 2 および図 1 に示す。

【表 2】

表 2 : E . C o l i でのプラスミド増殖後のポリ A 長

37℃			30℃	
初期コロニー サイズ	Day1 のポリ A 長	Day2 のポリ A 長	初期コロニー サイズ	Day1 のポリ A 長
Sm	95	18	Reg	80
Reg	95	68	Sm	95
Reg	95	94	Reg	39
Sm	95	なし	Reg	48
Reg	96	なし	Sm	95
Sm	36~95 混合	18	Sm	95
Sm	62	61	Reg	47
Reg	69	68	Sm	95

【 0 1 1 8 】

多くのコロニーについて、各ラウンドの増殖はポリ A テール内のアデノシン数の減少と関連しており、 1 ラウンドのみが 2 ラウンドの複製を通じて 90 個を超えるアデノシンを維持していた。さらに、細菌コロニーのサイズは、プラスミドからのポリ A テール長の損失と相関しており (すなわち、より大きなコロニーがポリ A 長の損失に対応)、より長いポリ A テールをコードする配列がプラスミド産生中の細菌の増殖を阻害する場合があることを示唆している。 E . c o l i のコロニーから精製された D N A は、プラスミド D N A を保有する個々の E . c o l i からの D N A の集団を表す。したがって、表 2 に示されている値 (および本明細書で説明されている同様の値) は、集団の平均ポリ A 長を表す。さらに、 P C R およびポリ A などの長い繰り返しの配列決定中に、ポリメラーゼがスリップすることがあり、その結果、配列が実際の配列よりわずかに短いように見える。したがって、 95 個のアデノシンを示す結果については、プラスミドが 1 個のアデノシンを失ったかどうか、または P C R アーティファクトであるかどうかは不明である。ただし、大幅な損失は、 P C R 増幅および配列決定中のポリメラーゼスリッページのアーティファクトによるものではない。

【 0 1 1 9 】

別の実験では、配列番号 1 のポリ A テールを含有する p U C 5 7 プラスミドで E . c o l i を形質転換し、 L B - A m p プレートに播種した。 8 個のクローンを 2 ラウンドの増殖で培養し、ポリ A テールをコードする配列の維持を試験した。 1 個のクローンの代表的なデータを図 2 に示す。配列番号 1 のポリ A テールでは、それをコードするプラスミドの 2 ラウンドの増殖にわたってテールのサイズに変化は見られなかった。ミニプレップ (M i n i p r e p) 1 は増殖の第 1 のラウンドを指し、一方でミニプレップ 2 は増殖の第 2 のラウンドを指す。ミニプレップは、 I n v i t r o g e n P u r e l i n k Q u i c k P l a s m i d M i n i p r e p キットを使用して実行された。

【0120】

追加の非アデノシンパターン（配列番号3）を有するポリAテールをコードするプラスミドを、E. coliでの複製に耐える能力について試験した。配列番号3のポリAテールを含有する配列をpUC19プラスミド（GenScript）に挿入し、E. coliへと形質転換させた。細胞をLB-Kanプレートに播種し、30 または37 のいずれかで一晚インキュベートした。8個のコロニーを採取し、LB-Kan培地を有する96ウェルプレートに接種し、30 または37 で一晚増殖させた（Day 1）。Day 1の培養からの試料を新鮮なLB-Kan培地に加え、30 または37 でさらに2日間培養した（Day 2）。DNAをDay 1およびDay 2の培養物から精製し、配列決定して、プラスミドのポリAテール長を決定した。配列決定された8個のDay 1の培養物のうち、6個は一続きの25、24、24および24個のアデノシンを維持し、12個のDay 2の培養物のうち、9個は一続きの25、24、24および24個のアデノシンを維持し、アデノシンのみの配列と比較してポリA保持の改善を実証した。

10

【0121】

これらのデータは、非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールをコードするDNAが、アデノシンのみを含有するポリAテールをコードするDNAと比較して、複数ラウンドのプラスミド増殖および精製にわたって安定性を改善したことを示している。

【0122】

実施例2 - 非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有する構築物の活性

実験を実施して、非アデニンヌクレオチドを含むポリAテール（中断配列）を有するmRNAの有効性と、アデノシンのみを含有するポリAテールを有するmRNAの有効性に差があるかどうかを判定した。Cas9タンパク質をコードするmRNAが、分泌型胚性アルカリホスファターゼ（SEAP）をコードするレポータープラスミド、ならびにSEAPを標的とするガイドRNAを有するHEK-293細胞にエレクトロポレーションによってトランスフェクトされるモデルシステムを使用した。mRNAからのCas9タンパク質の発現が成功すると、SEAP標的配列が切断され、SEAPの産生の減少を反映した色の変化が起こる。SEAP HEK-Blueレポーター試薬は、InvivoGenから入手した。T7プロモーターを含有し、アデノシンのみのポリAテールを有するCas9 mRNAをコードする配列（100個のアデノシンヌクレオチドを有するように設計されているが、配列決定により97個のアデノシンヌクレオチドを有すると示された）（配列番号6）、またはT7プロモーターを含み、配列番号1のポリAテールを有するCas9 mRNAをコードする配列（配列番号7）を、pUC57プラスミド（GenScript）にクローニングした。mRNAは、各mRNAをコードする直線化されたプラスミドからのインビトロ転写により産生された。

20

30

【0123】

図3は、0.005～50nMの濃度での、およびSEAPを標的とする1μMのシングルガイドRNA（配列番号8）でのHEK-Blue細胞アッセイにおける、アデノシンのみのポリAまたは配列番号1のポリAを有するCas9 mRNAの滴定を示す。

【0124】

HEK-Blueの結果は、どちらのポリAテールを有するmRNAの効果も用量反応曲線全体で類似していたことを示している。mRNAの濃度が高いと、ベースラインの青色がSEAP発現を示しているため、ピンクへの色の变化から明らかのように、SEAPレポーター遺伝子の発現が減少した。したがって、非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールは、アデノシンのみを含有するポリAテールと比較して、Cas9構築物の発現および機能の有効性を変化させなかった。

40

【0125】

配列番号6のCas9 mRNAの発現によって付与される編集の有効性も、配列番号7のCas9 mRNAと比較した（すなわち、アデノシンのみのポリAテールを配列番号1のポリAテールと比較した）。これらの実験では、HEK-Blue細胞はエレクトロポレーションによりsgRNA（配列番号8）と2個の異なるmRNAでトランスフェ

50

クトされた。

【0126】

図4は、24時間のインキュベーション後の両方の構築物のSEAP阻害率を示している。アデノシンのみを含有するポリAテールと非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有するmRNAのSEAP編集のEC₅₀は、それぞれ0.050と0.054で類似していた。

【0127】

図5は、48時間のインキュベーション後の両方の構築物のSEAP阻害率を示している。アデノシンのみを含有するポリAテールと非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有するmRNAのSEAP編集のEC₅₀は、それぞれ0.086と0.082で類似していた。

【0128】

インビボでのmRNAの発現と活性も確認された。配列番号6 (HiCas9 mRNA) および配列番号7 (中断されたポリA mRNA) のCas9 mRNAは、配列番号9のシングルガイドRNA (マウスTTR遺伝子を標的とする) と1:1の重量比で脂質ナノ粒子 (LNP) 中に配合され、1mg/kgまたは0.5mg/kgの総RNAで静脈内投与により、CD-1雌マウス (n=5) に投与した。投与後7日目に動物から血液を採取し、ELISAによりTTRタンパク質の血清レベルを測定した。手短にいえば、総TTR血清レベルは、マウスプレアルブミン (トランスサイレチン) ELISAキット (Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111) を使用して決定した。キットの試薬と対照は、製造元のプロトコルに従って調製した。プレートをSpectraMax M5プレートリーダーで450nmの吸光度で読み取った。血清TTRレベルは、標準曲線からの4パラメータのロジスティック曲線適合を使用して、SoftMax Proソフトウェアバージョン6.4.2によって計算した。アッセイ希釈のために最終血清値を調整した。

【0129】

図6は、投与後7日の両方のポリA構築物について、血清TTRノックダウン (TTR遺伝子の編集率を表す) の同等レベルを示す。血清TTRノックダウンの結果は、7日目に採取したマウスの肝臓のTTR遺伝子座の配列決定によって確認された。アデノシンのみのポリA mRNAを受け取ったマウスは、0.5および1mg/kgの総RNAでそれぞれ61.74%および69.84%の編集を示したが、非アデニンヌクレオチドを含有するポリA mRNAを受け取ったマウスは、0.5および1mg/kgの総RNAで63.14%および70.82%の編集を示した。

【0130】

したがって、非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有するCas9 mRNAの発現は、アデノシンのみを含有するポリAテールを有するCas9 mRNAと比較して同様の編集効果をもたらした。

【0131】

実施例3 - 追加の中断配列を含むポリAテールを有する構築物の活性

実験を実施して、非アデニンヌクレオチドを含むポリAテールを有するmRNAの有効性と、実施例2のようにアデニンヌクレオチドのみを含有するポリAテールを有するmRNAの有効性を決定した。T7プロモーターを含有し、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号10、または配列番号11を含む中断されたポリAテールを有するCas9 mRNAをコードする配列は、ポリA配列を組み込むためのプライマーを使用したPCR増幅により作成された。mRNAは、これらのPCR産物からのインビトロ転写によって産生された。配列番号18のmRNAは、mRNAをコードする直線化されたプラスミドからのインビトロ転写により産生された。

【0132】

図7は、0.02~6nMの濃度でのおよびSEAPを標的とする1μMのシングルガイドRNA (配列番号8) でのHEK-Blue細胞アッセイにおける、アデノシンのみ

10

20

30

40

50

のポリ A [1 0 0 P A] または配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 10、もしくは配列番号 11 のポリ A を有する C a s 9 m R N A の滴定を示す。具体的には、図 7 は、48 時間のインキュベーション後の構築物の S E A P 阻害率を示し、E C 5 0 値を以下の表 3 に示す。すべての構築物が活性である。

【表 3】

表 3：S E A P 阻害の E C 5 0 値

ポリ A	Cas9 mRNA 構築物	EC50	標準誤差
98 個の連続するアデノシン	Liv (Uー枯渇 (depleted) Cas9 N1Me 偽性 (pseudo) U)	0.0627	0.0118
97 個の連続するアデノシン	100PA	0.0956	0.0041
配列番号 4	16PA	0.0692	0.0087
配列番号 5	16PA 長い	0.0705	2.237
配列番号 3	25PA	0.0500	0.0213
配列番号 2	30PA	0.0591	0.0086
配列番号 10	12PA	0.0549	0.0296
配列番号 11	8PA	0.04233	0.0295

10

20

【0133】

実施例 4 - 中断配列を使用した長いポリ A のクローニング

300ヌクレオチド長のポリ A テール、配列番号 18 [3 0 0 p a] は、表 4 (以下) からの 12 個の中断配列および 12 個の連続するアデノシンの 13 個の繰り返しを含んで設計された。配列番号 T 18 のアンカーシーケンスは、ポリ A テールの約 300 n t 内のトリヌクレオチド中断配列間のハイブリダイゼーションと自己アニーリングを最小限に抑えるように設計された。以下の表 4 は、中断シーケンス間のアニーリングを最小化する中断シーケンスを示し、この実験で使用したアンカーを含む。

30

【0134】

配列番号 18 をクローニングするため、P o l y A - 1 (配列番号 12)、P o l y A - 2 (配列番号 13)、P o l y A - 3 (配列番号 14)、および P o l y A - 4 (配列番号 15) の各配列が、p U C 5 7 ミニベクター (G e n s c r i p t) で作成される。p A 1 - 2 プラスミドは、配列番号 12 を B c l 1 I プライマーで増幅し、P C R 産物を制限酵素 X h o I および A c l I で消化し、制限断片を X h o I および B s t B I で消化した配列番号 13 を含む p A 2 プラスミドに連結することにより作成される。p A 3 - 4 プラスミドは、配列番号 14 を増幅し、それをプラスミド p A 4 上の同じ制限部位に連結する、同じ方法で作成される。p A 1 - 4 プラスミド (配列番号 18 を含む) は、p A 3 - 4 からの配列番号 17 の配列を増幅し、P C R 断片を B b s I および X b a I 制限酵素で消化し、制限断片を B b s I および X b a I 制限酵素で消化された p o l y A 1 - 2 (配列番号 16) 構築物にクローニングすることにより組み立てられる。p A 1 - 2 および p A 3 - 4 への挿入物は、プライマー (配列番号 20 および 21) として [p U C - M s e q 2 フォワードプライマーおよび p U C - M s e q リバースプライマー] を使用して両方向からサンガーシーケンシングにより評価される。

40

【0135】

得られた配列番号 18 (300 P A) ポリ A 配列は、ベクターをコードするタンパク質の同じ部位にクローニングするために、X h o I および X b a I で p A 1 - 4 を消化する

50

ことにより切除される。すべてのステップは標準的な条件の下で実行される。

【表 4】

表 4 :

CGG CGT CGC
CTG CTT CTC
CAG CAT CAC
CCC CCG CCT

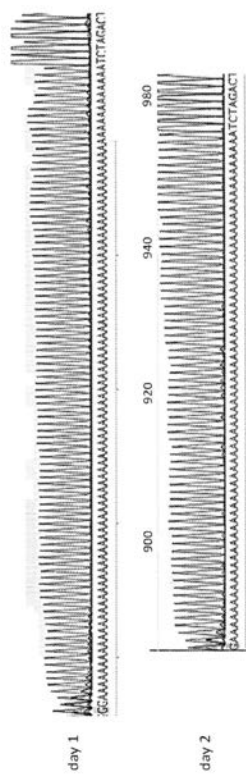
GGG GGT GGC
GCG GCT GCC
GAG GAT GAC
GTG GTT GTC

TGG TGT TGC
TTG TTT TTC
TAG TAT TAC
TCG TTC TCC

10

20

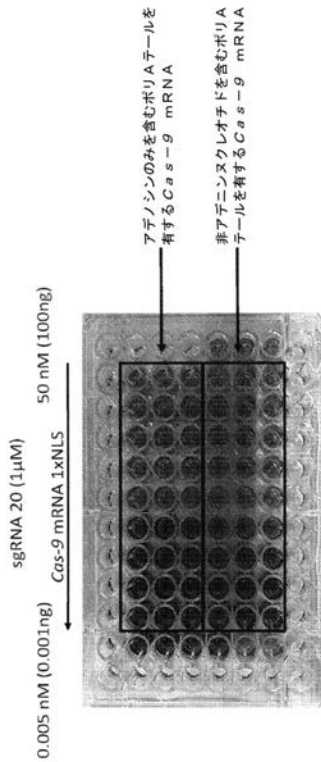
【図 1】



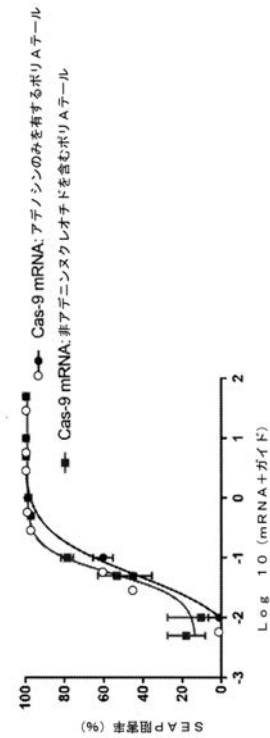
【図 2】



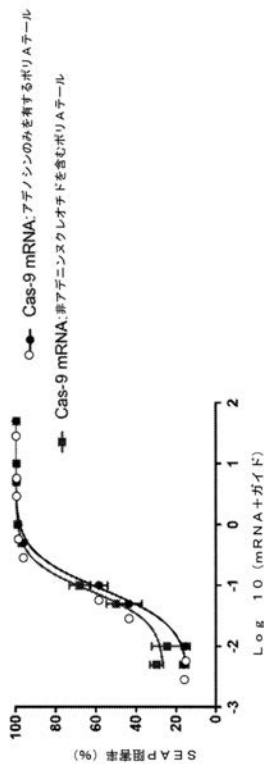
【 図 3 】



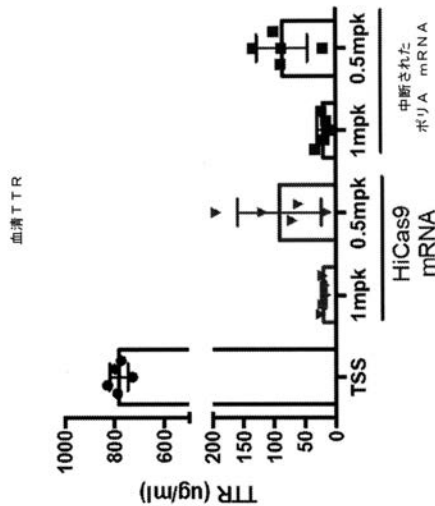
【 図 4 】



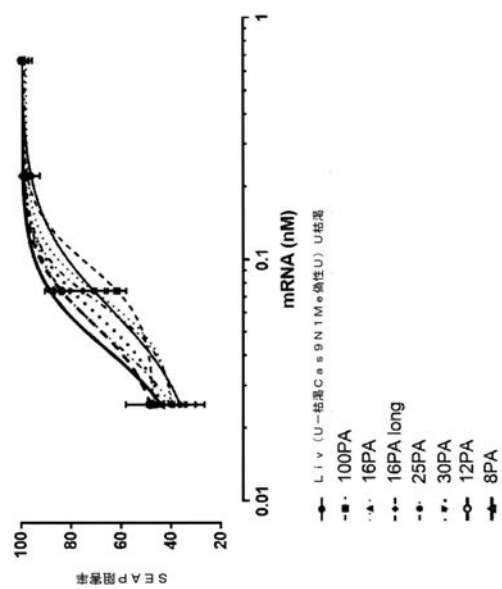
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配 列 表 】

2020532961000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/046772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/11
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHANG HYESHIK ET AL: "TAIL-seq: Genome-wide Determination of Poly(A) Tail Length and 3' End Modificat", MOLECULAR CELL, vol. 53, no. 6, 1 March 2014 (2014-03-01), pages 1044-1052, XP028635737, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2014.02.007	1-37, 42-46
Y	the whole document ----- -/--	38-41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 2018

Date of mailing of the international search report

04/12/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Young, Craig

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/046772

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIM JAECHUL ET AL: "Uridylation by TUT4 and TUT7 Marks mRNA for Degradation", CELL, CELL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 159, no. 6, 4 December 2014 (2014-12-04), pages 1365-1376, XP029110658, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2014.10.055	1-37, 42-46
Y	the whole document	38-41
A	----- AIMEE L. JALKANEN ET AL: "Determinants and implications of mRNA poly(A) tail size - Does this protein make my tail look big?", SEMINARS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY., vol. 34, 1 October 2014 (2014-10-01), pages 24-32, XP055526169, GB ISSN: 1084-9521, DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.05.018 the whole document	1-46
X,P	----- JAECHUL LIM ET AL: "Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation", SCIENCE, vol. 361, no. 6403, 19 July 2018 (2018-07-19), pages 701-704, XP055526201, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aam5794 the whole document	1-46
X,P	----- KR 101 786 396 B1 (SEOUL NATIONAL UNIV R&DB FOUNDATION [KR]; INST FOR BASIC SCIENCE [KR]) 24 November 2017 (2017-11-24) the whole document	1-46

Information on patent family members

PCT/US2018/046772

KR 101786396	B1	24-11-2017	KR	101786396	B1	24-11-2017
			US	2018119213	A1	03-05-2018

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)		C 1 2 N 15/63		Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/10		

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

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ドンブロウスキー, クリスチャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

F ターム(参考) 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA31 CA44 CA46