

(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 1	テーマコード (参考)	
C 12 N 15/115 (2010.01)	C 12 N 15/115	Z	4 B 0 6 5
C 12 N 15/12 (2006.01)	C 12 N 15/12	Z N A	
C 12 N 15/11 (2006.01)	C 12 N 15/11	Z	
C 12 N 15/31 (2006.01)	C 12 N 15/31		
C 12 N 15/19 (2006.01)	C 12 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 インテリア セラピューティクス, インコ ーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2139, ケンブリッジ, エリー ストリ ート 40, スイート 130
(86) (22) 出願日	平成30年8月14日 (2018.8.14)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(85) 翻訳文提出日	令和2年3月17日 (2020.3.17)	(74) 代理人	100093676 弁理士 小林 純子
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/046772	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(87) 國際公開番号	W02019/036513	(74) 代理人	100153693 弁理士 岩田 耕一
(87) 國際公開日	平成31年2月21日 (2019.2.21)		
(31) 優先権主張番号	62/545,883		
(32) 優先日	平成29年8月15日 (2017.8.15)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

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ス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スクレオチドを含む。

【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、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斷配列である、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。

20

【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。

【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 3 9】

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 3 8 に記載の D N A 。

【請求項 4 0】

前記タンパク質が、増殖因子である、請求項 3 8 に記載の D N A 。

【請求項 4 1】

前記タンパク質が、C a s 9 または修飾 C a s 9 である、請求項 3 8 に記載の D N A 。

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の D N A によりコードされる m R N A 。

【請求項 4 3】

前記 D N A がベクター内にある、請求項 1 ~ 4 2 のいずれかに記載の D N A 。

【請求項 4 4】

前記ベクターが宿主細胞内にある、請求項 4 3 に記載の D N A 。

【請求項 4 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ポリ A テールをコードするヌクレオチドを含む D N A 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 4 3 に記載の D N A 。

【請求項 4 6】

請求項 4 3 に記載の D N A ベクターから m R N A を產生する方法であつて、

- 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 D N A を R N A ポリメラーゼと接触させることと、を含む、方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本開示は、安定化されたメッセンジャー RNA (m R N A) および安定化された m R N A をコードする D N A の分野に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

ポリアデニル化は、メッセンジャー RNA (m R N A) 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、m R N A 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、m R N A は D N A から生成されるため、ターミナルトランスフェラーゼは m R N A 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 m R N A 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。

【0 0 0 3】

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、m R N A の核からの輸送、翻訳、および m R N A の分解の抑制に役立つ。核からの輸送がない場合、m R N A 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。

【0 0 0 4】

現在、m R N A 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。m R N A は、対象の細胞が細胞内で m R N A によってコードされるタンパク質を産

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鑄型からの転写により調製され得る。mRNAの產生中、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）ヌクレオチドが含まれる。

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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

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。

20

【0040】

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を产生する方法が含まれ、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、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を含むかまたは含有する。

、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。

【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を產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

10

20

30

40

50

で測定された分泌型胚性アルカリホスファターゼ(S E A P) 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S E A P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S E A P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S E A P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S E A P阻害率を示す。

【図6】対照の形質転換および保存溶液(T S S)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T T R遺伝子を標的とする)と、配列番号6(H i C a s 9 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m RNAのいずれかと、を配合した液体ナノ粒子(L N P)の投与の7日後のマウスの血清トランスサイレチン(T T R)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S E A P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S E A P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m RNA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、m RNA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、m RNA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(S e r g e e v a O V e t a l , B i o c h e m i s t r y (M o s c o w) 8 1 (7) : 7 0 9 - 7 2 2 (2 0 1 6) 参照)。

【0054】

10

20

30

40

50

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、エク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。

【0055】

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产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產生させる。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H10またはH7サブタイプに対する予防ワクチンである。

10

【0056】

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的のタンパク質）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

【0057】

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12（I L - 1 2）などのサイトカインの発現を引き起こす。

30

【0058】

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

【0059】

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。

【0060】

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 Cas 9 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 Cas 9 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 Cas 9 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 Cas 9 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。

10

【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、Fok1 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。

20

【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。言い換えると、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。

30

【0064】

本明細書で使用される「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。

40

【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

50

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。

【 0 0 6 7 】

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

【 0 0 6 8 】

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 (U n i p r o t 参照番号 : P 1 1 9 4 0)。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

【 0 0 6 9 】

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

【 0 0 7 0 】

40

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個のアデニンヌクレオチドを含む。

【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】

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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いてもよい。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

40

50

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き、任意選択的に1個以上の非アデニンヌクレオチドが続き、任意選択的に1個以上のアデニンヌクレオチドが続き、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るよい。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ある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。

30

【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。

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】

10

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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

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き、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。

40

【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。

【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個より大きくてよい。

10

20

30

40

【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、およびTTT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とすることができます。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】

50

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だろう。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と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】

I I I . 使用方法

本発明のDNAは、DNAによりコードされるmRNAの产生に使用され得る。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の产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とを含むポリ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とを含むポリ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予想収量)であってよい。治療用mRNA产生のために、プラスミドは100mg、1g、10g、またはそれ以上の規模で产生され得る。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。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態では、本発明のDNAベクターからmRNAを產生する方法が含まれる。いくつかの実施形態では、DNAベクターからmRNAを產生する方法は、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、またはとりわけブソイドウリジン、N-1-メチルブソイドウリジン、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使用することができる。

【 0 1 0 9 】

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。

【 0 1 1 0 】

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」、「a n」、および「t h e」、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（i n c l u d e）」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。

【 0 1 1 1 】**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	AAAAAAAAAA AAAA AAAAAAAA AAAAAAAA GCGAAAAAAA AAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAACCGAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAA AAAAAAAA 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	AAAAAAAAAA AAAA AAAAAAAA AAAAAAAA GCGAAAAAAA AAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAACCGAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAA AAAAAAAA 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	AAAAAAAAAA AAAA AAAAAAAA AAAAAGCGAA AAAA AAAAAAAA AAACCGAAAA AAAA AAAAAAAA AGTGA AAAAAA AAAA AAAAAAAA AAAA	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	AAAA AAAAAAAA AAAAAGAAA AAAAAAAA AAACAAAAAA AAAAAAAA TAAAAAAA AAAAAATAA AAAAAAAA AAAACAAAAA AAAA AAAAAAAA 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	AAAA AAAAAAAA AAAAAGAAA AAAAAAAA AAACAAAAAA AAAAAAAA TAAAAAAA AAAAAATAA AAAAAAAA AAAACAAAAA AAAA AAAAAAAA ACA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAA AAAAAAAA AAAA AAAAAAAA AAAA AAAAAAAA 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 GGCTCTGCTTGTGTGTGTGTGAGGCCTTATT CGGATCCATGGATAAGAAGTACTCAATCGGCTGGATATC GGA ACTAATTCCGTGGGTGGGCAGTGATCACGGATGAAT ACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCTGGGAACAC	6

10

20

30

40

説明	配列	配列番号
	CGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTG CTGTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCA AACGTACCGCGAGGCAGCCTACACCCGGCGGAAGAACG CATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTCGAACGAAATGGCA AAGGTCGACGACAGCTTCTCCACCGCCTGGAAGAACG TCCTGGTGGAGGAGGACAAGAACGATGAACGGCATCCTAT CTTGGAAACATCGTCACGAAGTGGCGTACACGAAAG TACCCGACCATCTACCATCTCGGAAGAACGTTGGTTGACT CAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTGGCCCT CGCCCATATGATCAAATTCCGGACACTTCCGTATCGAA GGCGATCTGAACCCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTT TCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTGAAAGA AAACCCAATCAATGCTAGCGCGTCGATGCCAAGGCCATC CTGTCCGCCGGCTGCGAAGTCGCGCGCCTCGAAAACC TGATCGCACAGCTGCCGGAGAGAAAAAGAACGGACTTT CGGCAACTTGTGCTCTCACTGGGACTCACTCCCAAT TTCAAGTCAAATTGACCTGGCGAGGACGCGAAGCTGC AACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATT GCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACCGGGATCTGTTCC GCCGCTAAGAACCTTCGGACGCAATCTGCTGTCCGATA TCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTAG CGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGAT CTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTG AAAAGTACAAGGAGATCTCTCGACCACTGCAAGAACG GTACGCGGGTACATCGATGGAGGGCGTAGCCAGGAAGAG TTCTATAAGTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACG GAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCT GCTCCGGAAACAGAGAACCTTGACAACGGATCCATTCCC CACCAAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTGGC GCCAGGGAGCTTTACCCATTCCCTAAGGACAACCGGGA AAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCGTATTAC GTGGGCCACTGGCGCGGGCAATTGCGCTTGCCTGGA TGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTGGAAATT CGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTGGCACAAGCTTC ATCGAACGAAATGACCAACTCGACAAGAACCTCCAAACG AGAAGGTGCTTCTAAGCACGACGCCCTTACGAATACTT CACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAATACGTTACT	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	GAAGGAATGAGGAAGCCGGCTTCTGTCGGAGAACAGA AGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAA GGTACCGTCAAGCAGCTAAAGAGGACTACTTCAAGAAG ATCGAGTGTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGTGGAGG ACAGATTCAACGCTTCGCTGGAACCTATCATGATCTCCT GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGGAGGAG AACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCTGACCTTGACCC TTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGAC CTACGCTCATCTCTCGACGATAAGGTATGAAACAACTC AAGCGCCGCCGGTACACTGGTGGGGCCCTCCCGCA AGCTGATCAACGGTATTCGCATAAACAGAGCGGTAAAC TATCCTGGATTCCTCAATCGGATGGCTTCGCTAATCGT AACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTA AGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTCCGGACAGGGAGA CTCACTCCATGAACACATCGCAATCTGGCCGGTTCGCCG GCGATTAAGAAGGGATTCTGCAAACGTGAAGGTGGTCG ACGAGCTGGTGAAGGTATGGACGGCACAAACCGGAGAA TATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAG AAGGGCCAGAAAAACTCCCGCAGGATGAAGCGGATCG AAGAAGGAATCAAGGAGCTGGCAGCCAGATCCTGAAAGA GCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAACGTC TACCTGTACTATTCGAAATGGACGGGACATGTACGTGG ACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGT GGACCACATCGTCCACAGTCCTTCTGAAGGTGACTCG ATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAG GGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAA GATGAAGAATTACTGGCGGAGCTCCTGAATGCGAAGCTG ATTACCCAGAGAAAGTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGC GCGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCTCAA ACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGAGATTACCAAGCACGTG GCGCAGATCTGGACTCCCGCATGAACACTAAACGACG AGAACGATAAGCTCATCCGGAAAGTGAAGGTGATTACCC GAAAAGCAAACCTGTGTCGGACTTCGGAAGGACTTCAG TTTACAAAGTGAAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGC ATGACGCATACCTAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGAT CAAAAAGTACCTAAACTGAATCGGAGTTGTACGGA GACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGT	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	CCGAACAGGAATCGGGAAAGCACTGCGAAATACTTCTT TTACTCAAACATCATGAACCTTTCAAGACTGAAATTACG CTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAA CTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAG GGACTTCGCAACTGTTGCAAAGTGCTCTATGCCCAA GTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGAT TTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAA GCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTAC GGAGGATTGATTGCCGACTGTCGCATACTCCGCTCG TGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAGCTCAA ATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGATTACCATCATGGAACGA TCCTCGTTCGAGAAGAACCGATTGATTCTCGAGGCAG AGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAAC CCCCAAGTACTCACTGTTGAACTGGAAAATGGTCGGAAG CGCATGCTGGCTTCGGCCGAGAACTCCAAAAGGAATG AGCTGGCCTTGCGTAGCAAGTACGTCAACTCCCTATCT TGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTACCGGAAGAT AACGAACAGAACAGCTTCTGGAGCAGCACAAGCATT ATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCGAGTTTCAA GCGCGTGTCCCTGCCACGCCAACCTCGACAAAGTCCTG TCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAAC AGGCCGAGAACATTATCCACTGTTCACCTGACTAACCT GGGAGCCCCAGCCGCCTCAAGTACTTCGATACTACTATC GATCGCAAAAGATAACCGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACG CGACCCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAAC TAGGATCGATCTGTCGAGCTGGTGGCGATGGCGGTGGA TCTCGAAAAAGAAGAGAAAGGTGAATGAGCTAGCCATC ACATTAAAAGCATCTCAGCTTACCATGAGATAAGAGAA AGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCTCTCTTTCTTT TTCGTTGGTGTAAAGCCAACCCGTCTAAAAAACATAA ATTTCTTAATCATTGCTCTTCTGTGCTCAAT TAATAAAAATGGAAAGAACCTCGAGAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA	10 20 30 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 CTAATTCGGT GGGTTGGGCA GTGATCACGG ATGAATACAA AGTGCCGTCC AAGAAGTTCA AGGTCCCTGGG GAACACCGAT AGACACAGCA TCAAGAAGAA TCTCATCGGA GCCCTGCTGT TTGACTCCGG CGAAACCGCA GAAGCGACCC GGCTCAAACG TACCGCGAGG CGACGCTACA CCCGGCGGAA GAATCGCATC TGCTATCTGC AAGAAATCTT TTGAAACGAA ATGGCAAAGG TGGACGACAG CTTCTTCCAC CGCCTGGAAG AATCTTCCT GGTGGAGGAG GACAAGAAGC ATGAACGGCA TCCTATCTT GGAAACATCG TGGACGAAGT GGCGTACCAAC GAAAAGTACC CGACCATCTA CCATCTGCC AAGAAGTTGG TTGACTCAAC TGACAAGGCC GACCTCAGAT TGATCTACTT GGCCCTCGCC CATATGATCA AATTCCCGGG ACACCTCCTG ATCGAAGGCG ATCTGAACCC TGATAACTCC GACGTGGATA AGCTGTTCAT TCAACTGGTG CAGACCTACA ACCAACTGTT CGAAGAAAAC CCAATCAATG CCAGCGCGT CGATGCCAAG GCCATCCTGT CCGCCCCGCT GTGAAAGTCG CGGCGCCTCG AAAACCTGAT CGCACAGCTG CCGGGAGAGA AGAAGAACGG ACTTTCGGC AACTTGATCG CTCTCTCACT GGGACTCACT CCCAATTCA AGTCCAATT TGACCTGGCC GAGGACGCGA AGCTGCAACT CTCAAAGGAC ACCTACGACG ACGACTTGGA CAATTGCTG GCACAAATTG GCGATCAGTA CGCGGATCTG TTCCCTGCCG 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 CTGGAAAAGA TGGACGGAAC CGAAGAACTG CTGGTCAAGC TGAACAGGGA GGATCTGCTC CGCAAACAGA GAACCTTGA CAACGGAAGC ATTCCACACC AGATCCATCT GGGTGAGCTG CACGCCATCT TGCAGCGCCA GGAGGACTTT TACCCATTCC TCAAGGACAA CCGGGAAAAG ATCGAGAAAA TTCTGACGTT CCGCATCCCG TATTACGTGG GCCCACTGGC GCGCGGCAAT TCGCGCTTCG CGTGGATGAC TAGAAAATCA GAGGAAACCA TCACTCCTG GAATTTCGAG GAAGTTGTGG ATAAGGGAGC TTGGCACAA TCCTTCATCG AACGAATGAC CAACTTCGAC AAGAATCTCC CAAACGAGAA GGTGCTTCCT AAGCACAGCC TCCTTACGA ATACTTCACT GTCTACAAACG AACTGACTAA AGTGAATAC GTTACTGAAG GAATGAGGAA GCCGGCCTT CTGAGCGGAG AACAGAAGAA AGCGATTGTC GATCTGCTGT TCAAGACCAA CCGCAAGGTG ACCGTCAAGC AGCTTAAAGA GGACTACTTC AAGAAGATCG AGTGTTCGA CTCAGTGGAA ATCAGCGGAG TGGAGGACAG ATTCAACGCT TCGCTGGAA CCTATCATGA TCTCCTGAAG ATCATCAAGG ACAAGGACTT CCTTGACAAC GAGGAGAACG AGGACATCCT GGAAGATATC GTCCTGACCT TGACCCCTTT CGAGGATCGC GAGATGATCG AGGAGAGGCT TAAGACCTAC GCTCATCTCT TCGACGATAA GGTGATGAAA CAACTCAAGC GCCGCCGGTA CACTGGTTGG GGCCGCCCTCT CCCGCAAGCT GATCAACGGT ATTCGCGATA AACAGAGCGG TAAAATATC CTGGATTTC TCAAATCGGA TGGCTTCGCT AATCGTAACT TCATGCGAGTT GATCCACGAC GACAGCCTGA CCTTTAAGGA GGACATCCAG	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	AAAGCACAAAG TGAGCGGACA GGGAGACTCA CTCCATGAAC ACATCGCGAA TCTGGCCGGT TCGCCGGCGA TTAAGAAGGG AATCCTGCAA ACTGTGAAGG TGGTGGACGA GCTGGTGAAG GTCATGGGAC GGCACAAACC GGAGAAATATC GTGATTGAAA TGGCCCGAGA AAACCAAGACT ACCCAGAAGG GCCAGAAGAA CTCCCGCGAA AGGATGAAGC GGATCGAAGA AGGAATCAAG GAGCTGGCA GCCAGATCCT GAAAGAGCAC CCGGTGGAAA ACACGCAGCT GCAGAACGAG AAGCTCTACC TGTACTATTG GCAAATGGA CGGGACATGT ACGTGGACCA AGAGCTGGAC ATCAATCGGT TGTCTGATTA CGACGTGGAC CACATCGTTC CACAGTCCTT TCTGAAGGAT GACTCCATCG ATAACAAGGT GTTGACTCGC AGCGACAAGA ACAGAGGGAA GTCAGATAAT GTGCCATCGG AGGAGGTCGT GAAGAAGATG AAGAATTACT GGCAGGCAGCT CCTGAATGCG AAGCTGATTA CCCAGAGAAA GTTTGACAAT CTCACTAAAG CCGAGCGCGG CGGACTCTCA GAGCTGGATA AGGCTGGATT CATCAAACGG CAGCTGGTCG AGACTCGGCA GATTACCAAG CACGTGGCCG AGATCCTGGA CTCCCGCATG AACACTAAAT ACGACGAGAA CGATAAGCTC ATCCGGGAAG TGAAGGTGAT TACCCCTGAAA AGCAAACCTG TGTGGACTT TCGGAAGGAC TTTCAGTTT ACAAAAGTGAG AGAAATCAAC AACTACCATC ACGCGCATGA CGCATAACCTC AACGCTGTGG TCGGCACCGC CCTGATCAAG AAGTACCCCTA AACTTGAATC GGAGTTGTG TACGGAGACT ACAAGGTCTA CGACGTGAGG AAGATGATAG CCAAGTCCGA ACAGGAAATC GGGAAAGCAA CTGCGAAATA CTTCTTTAC TCAAACATCA TGAACCTCTT CAAGACTGAA ATTACGCTGG CCAATGGAGA AATCAGGAAG AGGCCACTGA TCGAAACTAA CGGAGAAACG GGCGAAATCG TGTGGACAA GGGCAGGGAC	10
		20
		30
		40

説明	配列	配列番号
	TTCGCAACTG TTCGCAAAGT GCTCTCTATG CCGCAAGTCA ATATTGTGAA GAAAACCGAA GTGCAAACCG GCGGATTTTC AAAGGAATCG ATCCTCCCAA AGAGAAATAG CGACAAGCTC ATTGCACCGA AGAAAGACTG GGACCCGAAG AAGTACGGAG GATTGATTC GCCGACTGTC GCATACTCCG TCCTCGTGGT GGCCAAGGTG GAGAAGGGAA AGAGCAAGAA GCTCAAATCC GTCAAAGAGC TGCTGGGGAT TACCATCATG GAACGATCCT CGTTCGAGAA GAACCCGATT GATTTCTGG AGGCAGAAGGG TTACAAGGAG GTGAAGAAGG ATCTGATCAT CAAACTGCC AAGTACTCAC TGTTGAACT GGAAAATGGT CGGAAGCGCA TGCTGGCTTC GGCCGGAGAA CTCCAGAAAG GAAATGAGCT GGCTTGCT AGCAAGTACG TCAACTTCCT CTATCTTGCT TCGCACTACG AGAAACTCAA AGGGTCACCG GAAGATAACG AACAGAAGCA GCTTTCTGT GAGCAGCACCA AGCATTATCT GGATGAAATC ATCGAACAAA TCTCCGAGTT TTCAAAGCGC GTGATCCTCG CCGACGCCAA CCTCGACAAA GTCCTGTCGG CCTACAATAA GCATAGAGAT AAGCCGATCA GAGAACAGGC CGAGAACATT ATCCACTTGT TCACCCGTAC TAACCTGGGA GCTCCAGCCG CCTTCAAGTA CTTCGATACT ACTATCGACC GCAAAGATA CACGTCCACC AAGGAAGATTC TGGACCGCAG CCTGATCCAC CAAAGCATCA CTGGACTCTA CGAAACTAGG ATCGATCTGT CGCAGCTGGG TGGCGATGGT GGCGGTGGAT CCTACCCATA CGACGTGCCT GACTACGCC CGGGAGGTGG TGGCCCCAAG AAGAAACGGA AGGTGTGATA GCTAGCCATC ACATTTAAAAA GCATCTCAGC CTACCATGAG AATAAGAGAA AGAAAATGAA GATCAATAGC TTATTCTATCT CTTTTCTTT TTCGTTGGTG TAAAGCCAAC ACCCTGTCTA AAAAACATAA ATTCTTTAA TCATTTGCC TCTTTCTCT	10
		20
		30
		40

説明	配列	配列番号
	GTGCTTCAAT TAATAAAAAA TGGAAAGAAC CTCGAGAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAGCGA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAAC CGAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAA AAAAAAAA A	
SEAP を標的とするシングルガイド RNA	mC*mU*mC*C CUGAUGGAGA UGACAGGUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAUA GGCUAGUCCG 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*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm 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ヌクレオチドを含む例 示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAC AAAAAAAAAAATAAAAAAAAAACAAAAAAAGAA AAAAAAAAACAAAAAAATAAAAAAAAAAA	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ヌクレオチドを含む例 示的なポリ A テールの配列	AAAAAAAAATAAAAAAAAAATAAAAAACAAAAAA AAAGAAAAAAAAATAAAAAAAACAAAAAAACAAAAAAAT AAAAAAAAGAAAAAAACAAAAAAATAAAAAAA	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	TCTTCCTTCAGTCTGAAACCTCAGCTCGAGAAAAAAA AAATGGAAAAAAACGGAAAAAAAGGTAAAA	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	AAAAAAAAATATAAAAAAAAAACATAAAAAAAAAACG 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	TCTTCCTTCAGTCTGAAACCTCAGAATTCTAGCTG AGAAAAAAATCGAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAC TCAAAAAAAAGATAAAAAAAACCTAAAAAA AAAATGTAAAAAAAAAGGGAAAGTCTTCATATCGGT TCTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	13 10
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	TCTTCCTTCAGTCTGAAACCTCAGCTCGAGGAAGACAAG GGAAAAAAAAACGCAAAAAAAACACAAAAAA AAAATGCAAAAAAAATCGAAAAAAATCTAAA AAAAAAAACGTTCATATCGGTTCTAGACCACACTTCTTA CTGAGGTCCC	14 20
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	TCTTCCTTCAGTCTGAAACCTCAGCTCGAGAAAAATT GAAAAAAAAACCCAAAAAAAGACAAAAAAA AAATAGAAAAAAAGTTAAAAAAACTGAAAA AAAAAAATTTAAAAAAATCTAGACCACACTTCTT ACTGAGGTCCC	15 30
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	TCTTCCTTCAGTCTGAAACCTCAGAATTCTAGCTG AGAAAAAAAATGGAAAAAAACGGAAAAAAA AAAAGGTAAAAAAATATAAAAAAAACATAAA AAAAAAAACGAAAAAAACGTAAAAAAACT CAAAAAAAAGATAAAAAAAACCTAAAAAA AAATGTAAAAAAAAAGGGAAAGTCTTCATATCGGT CTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	16 40
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	TCTTCCTTCAGTCTGAAACCTCAGCTCGAGGAAGACAAG GGAAAAAAAAACGCAAAAAAAACACAAAAAA AAAATGCAAAAAAAATCGAAAAAAATCTAAA	17

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	AAAAAAAAACGAAAAAAAAACCCAAAAAAAAGA CAAAAAAAAATAGAAAAAAAAGTTAAAAAAA AAACTGAAAAAAAATTTAAAAAAAATCTAGAC 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	AAAAAAAAAAATGGAAAAAAACGGAAAAAAA AAGGTAAAAAAAATATAAAAAACATAAAAA AAAAAAACGAAAAAAACGTAAAAAAACTCA AAAAAAAGATAAAAAACCTAAAAAAA ATGTAAAAAAAGGGAAAAACGCAAAAA AAAAACACAAAAAAATGCAAAAAAAATCGA AAAAAAATCTAAAAAAACGAAAAAAA CCCAAAAAAGACAAAAAAATAGAAAAAA AAAAAGTTAAAAAAACTGAAAAAAATTAA AAAAAAA	18
100PA-97 個のアデニ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 AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAA	19
pUC-M seq2 フォワードプライマー	GGGTTATTGTCTCATGAGCG	20
pUC-M seq リバースプライマー	TTTGTGATGCTCGTCAGGG	21
RN-Bcl11a for	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAG	22
RN-Bcl11a rev	GGGACCTCAGTAAGAAGTGTGG	23
Liv-U 枯渇 (Liv-Udepleted) : 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	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTTGCTTGTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCTTATTGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGAACAAACAGCGT CGGATGGGAGTCATCACAGACGAATACAAGTCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTCAAGAA	24
		40

説明	配列	配列番号
	GACAAGAACGAAAGACACCCGATCTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTAGAGGACACTTCTGATCGAAGGGAGACCTGAACCC GGACAAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAACGCAAAGCTGAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAC ACAGAAATCAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTGACCAGAGCAAGAACGGATAACGAGGATAACA TCGACGGAGGGCAAGCCAGGAAGAACATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAACACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAACGGACTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTGACAACCGAACGGATCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAACAGAGAACGGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTCAAGATCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAACACAGCAGATTGCAATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAACAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAACAGAAGAAGGCAATCGC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAGAACAGATCGAATGCTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGAACAGATTCAACGCA AGCCTGGAAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAGATA CACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCAACAGAAAATTCATGCGAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGGCCGGCAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAGGTCGTGACGAACGGTCAAG GTCACTGGAAAGACACAAGCCGAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACCTGGAAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCGAACATCGCC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCATCGTCC CGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGAGGACTGAGC GAACCTGGACAAGGCAGGATTATCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAAGTCAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCAGTTCTACAAGGTAG AGAAATCAACAACCTACCAACCGACGACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTGCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA TGAACCTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAAGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAA	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAAGAAGTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCGCAAAGGTC GAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAGGAAC TGCTGGAAATACAATCATGAAAGAAGCAGCTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGATAACAAGGA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTCGAACTGGAAACCGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACACTGGCACTGCC AGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAAGCA GCTGTTCTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGAGCACCAGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAACGACTGACCTGA GCCAGCTGGAGGGAGACGGAGGGAGGAAAGCCGAAGAAC GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCTCTTTCTTTCTGTTGGTGTAAAGCCA ACACCCCTGTCTAAAAACATAATTCTTTAATCATTG CCTCTTTCTGTGCTCAATTAAATAAAAATGGAAAGA ACCTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	10 20 30
配列番号 3 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTGTTGT GTGTCGTTGCAGGCCTATTGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGAACAAACAGCGT CGGATGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA	25

説明	配列	配列番号
	AGAAGATAACACAAGAAGAAAGAACAGAACATCTGCTACCTGC AGGAAATCTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTCCTGGTCGAAGAA GACAAGAACGAAAGACACCCGATTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAAGAGGACACTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCGACTGTTGAGAAAACCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGAACTCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGACTGACACCGAACTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCACTACCGACGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAC ACAGAAATCACAAAGGACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATAACGACGAACACCCACAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTGACCAAGAGCAAGAACGGGATACGAGGATACA TCGACGGAGGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTGACAAACGGAAAGCATCCCGCACAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTGAGAACATCCGACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTC ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACTCGACAAGAACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAACAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAACAGAAAGGTACAGTCAGC	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA CACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAAATTCAATGCAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGAAACCTGGCAGGAAGCCGGCAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAGGTGTCGACGAACGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGAAAATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTGACCGAGACTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCATCGTCC CGCAGAGCTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCGGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTGACAAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGAGGACTGAGC GAACCTGGACAAGGCAGGATTCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAAGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAGGTATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCA AGAAATCAACAACTACCACCAACGACACGACGCACACTG AACGCACTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTGTCACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAACTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGCAAGGTCACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCGCAAGGTC GAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGAAATACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGATAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACACTGGCACTGCC AGCAAGTACGTCAACTTCGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTCGTCAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGAGCACCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCTGGAGCACAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTGATCTTTCTTTCTGTTGGTGTAAAGCCA ACACCCGTCTAAAAAACATAAATTCTTAATCATTTG CCTCTTTCTGTGCTTCAATTATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAGAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAGAAAAAA AAAAGTGAAGAAAAAAAGAAAAAA 	10 20 30 40
配列番号 4 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTTGCTTGTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCTTATTGGATCGGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATGGACTGGACATCGAACAAACAGCGT CGGATGGCAGTCATCACAGACGAATAAGGTCCCGAGC	26

説明	配列	配列番号
	AAGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTCGACAGCGG AGAACACAGCAGAACAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATAACACAAGAAGAAAGAACAGAACATCTGCTACCTGC AGGAAATCTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTCAAGAA GACAAGAACGACGAAAGAACCCGATTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAACGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAAGGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTCGAAGAAAACCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAACAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAACGAAACGGACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGACTGACACCGAACCTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAACGCAAGACTGCGAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCACTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACTGACGAACACCCACAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAACAGACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAACGACTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTGACAAACGGAAGCATCCCGCACAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAACAGAGAACACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAACAGGAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTGAGAACCTGGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAACAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAACGACTGTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTACATCGAACAGATGAC AAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	AACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAACAGAACAGGTCACAGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAACAGGTCACAGTC AGCTGAAGGAAGACTACTCAAGAACAGAACAGGTCACAGTC CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGAACAGATCAACGC AGCCTGGAACATACCAACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAACAGAACATC GGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTGAAAGACAGA GAAATGATCGAAGAACAGACTGAAGAACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAACAGATA CACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAACAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGAACAGAACATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCAACACAGAACATTGACAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGAACATCCAG AAGGCACAGGTCAGGCAGGGAGAACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCGGCAATCAAGAACGG AATCCTGCAAGACAGTCAGGTCGACGAACTGGTCAAG GTCACTGGGAAGACACAAGCCGGAAACATCGTATCGAA TGGCAAGAGAACCAAGACAACACAGAACAGGACAGAAC CAGCAGAGAACAGAACATGAAGAGAACAGAACAGAAC GAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTC ACACACAGCTGCAAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAAGAGAACATGTACGTCGACCAGGAAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATGACAACAAGGT CCTGACAAGAACAGAACAGAACAGAGAACAGAAC GTCCCGAGCGAAGAACAGTCGTCAGAACAGATGAAGAAC GGAGACAGCTGCTGAACGAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTGACAAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACCTGGACAAGGCAGGATTGATCAAGAGAACAGCTGGTC AAACAAGAACAGATCACAAAGCACGTCGACAGATCCTGG CAGCAGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAGCTG ATCAGAGAACAGTCAGGTCATCACACTGAAGAGAACAGCTGG TCAGCGACTTCAGAACAGGACTTCCAGTTCTACAAGGT AGAAATCAACAACCTACCAACACAGCAGAACAGAAC AACGCAGTCGTCGGAACACGCACTGATCAAGAACAGT AGCTGGAAAGCGAATTGTCACGGAGACTACAAGGT CTA	

説明	配列	配列番号
	CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTACAGAACATCA TGAACCTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAAGGGAAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCGTGCAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAAC TGCTGGGAATACAATCATGGAAAGAAGCAGCTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCTGGAAAGCAAAGGGATAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTTCGAAGTGGAAAACCGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTCGTGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGAGCACCAG CATTCAAGTACTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTTTCTTTCTGTTGGTGTAAAGCCA ACACCCCTGTCTAAAAACATAAATTCTTAATCATTG CCTCTTTCTCTGTGCTCAATTATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAACAAA AAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAA AAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAA	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	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCTTATCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAACAGAACAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATAACACAAGAAGAAAGAACAGAACATCTGCTACCTGC AGGAAATCTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAG CTTCTCCACAGACTGGAAGAAAGCTCTGGTCAAGAA GACAAGAACGACGAAAGACACCCGATCTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACACACGAAAATACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAACGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACACGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAAGCTGTTGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAACAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAACGCACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAACGCAAAGCTGAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCACTACGCAACGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAC ACAGAAATCACAAAGGACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACTGACGAAACACCACAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACGGATACTGAGGATACA TCGACGGAGGGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAGCTGAACAGAGAACGACTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTGACAAACGGAAAGCATCCCCCACAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAACAGAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTGAGAACCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGAGC	27 10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	GAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAGGTCAAGTACGTACAGAACAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAACAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAACAGGTACAGTCAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAACATCGAATGCTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGAACAGATTCAACGCA AGCCTGGAACATACCCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGCCTGACACTGACACTGTTGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAACAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAACAGATA CACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAACAGTGTACACCGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTAGCGGACAGGGAGAACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGGCCGGCAATCAAGAACGG AATCCTGCAGACAGTCAGGTGTCGACGAACGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGAAACATCGTACACCGA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAACAGGAGAACAGA CAGCAGAGAAAAGAACATGAAGAGAACATCGAAGAACAG GAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGAACATGTACGTGACCGAACACTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACACATCGTCC CGCAGAGCTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGAACAGGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAACAGTCGTCAGAACAGATGAAGAAC GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTGACAAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACCTGGACAAGGCAGGATTCAAGAACAGACAGCTGGTCG AAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGA CAGCAGAACATGAACACAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAACAGTCAGGTATCACACTGAAGAGAACAGCTGG	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTACAAGGTAG AGAAATCAACAACCTACCAACCGCACACGACGCATACTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCGA AGCTGGAAAGCGAATTCTCTACGGAGACTACAAGGTCA CGACGTCAAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTACAGCAACATCA TGAACTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAGGGAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCTGAGCATGCCAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGGAAAGC ATCCTGCCAAGAGAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCTCCTGGTCGCAAAGGTC GAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGAAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAGTACAGCC TGTCGAACTGGAAAACCGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAGGTCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGAGAAACATC ATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGAGCACCGGAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCTCTTTCTTTCTGTTGGTAAAGCCA ACACCCCTGTCTAAAAACATAAATTCTTAATCATTTG CCTCTTTCTGTGCTCAATTAAATAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAACAAAAACAAA	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	AAAAAAA AAAAAAACAAAA AAAAAAA AAAAAA	
配列番号 10 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTTGCTTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCTTATCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAACAGCAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATAACACAAGAAGAACAGAACAGAACATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAACAGCTTCTGGTCAAGAA GACAAGAACGAAAGAACACCCGATCTCGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCAACGAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAACGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTGAAAGAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAACAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAACGAAACGGACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACCTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAACAGCAGCAAGCTGCACTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGAACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATAACGACGAACACCCACAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACGGATAACGCAAGGATA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAACACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAACACCTGCTGAGAAAGCAGA	28 10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	GAACATTCGACAACGGAAGCATCCGCACCAAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTAGAATCCGTACTACGTCGGACCCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACTCGAAGAAGTCGTC ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTCACAGTCTACACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGC GACCTGCTTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGATGCTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGCCTGACACTGACACTGTTGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA CACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAACTTCATGCAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTAGCGGACAGGGAGACAGCCTGACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCCGCAATCAAGAAGGG AATCCTGAGACAGTCAGGTGTCGACGAACTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACATGGGAAGGCCAGATCCTGAAAGGAACACCCGGTCGAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	GTTGACAACCTGACAAGGAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAAGTGGACAAGGCAGGATTCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAAG AGAAATCAACAACATACCGACCCACGACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCTGTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAACTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGGAAAGC ATCCTGCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGCTGCAAAGGTC GAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAA GAACCCGATCGACTTCTGGAAAGCAAAGGGATAACAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAC GCTGTTCGTCAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGAGAAAACATC ATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGAGCACCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAACGACCTGA GCCAGCTGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAC GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAGCATCTCA	10
		20
		30
		40

説明	配列	配列番号
	GCCTACCATGAGATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCTATCTTTCTTTCTGGTGTAAAGCCA ACACCCCTGTCTAAAAACATAATTCTTAATCATTG CCTCTTTCTGTGCTTCATTAAATAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAATAAAAAAAATAAAAAAA ACAAAAAAATAAAAAAAACAAAAAA GAAAAAAACAAAAAAATAAAAAAA	10
配列番号 11 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCTTATCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGTCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTCACAGCGG AGAAACAGCAGAACAGCAAAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTCAAGAA GACAAGAACGACGAAAGACACCCGATCTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAAGAGGACACTTCTGTGAGCAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTCGAAGAAAACCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAACAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGACTGACACGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAACGACGCAAAGCTGAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA	29
		20
		30
		40

説明	配列	配列番号
	TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAGAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTCAAATCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTC ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA CACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTCCCAAACAGAAAATTCATGCGACT GATCCACGACGACGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCGGCAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAGGTCGACGAATGGTCAG GTCATGGGAAGACACAAGCGGAAAATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACCTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAACGACTCGTCAAGAACGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCAAGAGACAGCTGGTCA AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAGGTCAACTCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCA AGAAATCAACAACATACCAACCCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACACGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCTGCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTACAGCAACATCA TGAACCTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAAGGGAAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAAGTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCGCAAAGGTC GAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGAAATCACAATCATGGAAAGAACGAGCTTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAGGGATAAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAACGAGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAAACTGGCACTGCC AGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGACAAACGAAACAGAAGCA GCTGTTCGTCAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGGAGAAACATC ATCCACCTGTTCACACTGACAACCTGGGAGCAGGGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAACGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTATCTCTTTCTTTCTGTGTTGTTGAAAGCCA ACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTCTTAATCATTTG CCTCTTTCTCTGTGTTCAATTATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAATAAAAAAAATAAAAAAAACAAAAAAACAAAAAA AAAAAGAAAAAAATAAAAAAAACAAAAAAACAAAAAA AATAAAAAAAAGAAAAAAACAAAAAAATAAAAAAA	10
配列番号 19 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTGTTG GTGTCGTTGCAGGCCTTATTGGATCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGTCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAACAGCAGAACGAAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATAACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTCAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTCGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACACGAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAACGCTGGTCGACAGCACAGACAAGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAAGGAGACACTTCTGATCGAAGGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAAGCTGTTGAAAGAAAACCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAACGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAACGACGCAAAGCTGCGAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCACTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA	30 20 30 40

説明	配列	配列番号
	AGAGATACGACGAACACCCACCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATAACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTGACAAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTGAGAATCCGTAACCGTGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCAAGGAAAGAGAAGAGC GAAGAAACAAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTC ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACTTCGACAAAGAACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGAACATACCAACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAGATA CACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCAACAGAAAATTCATGCACT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCAAC ACATCGAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAGGTCGACGAACTGGTCAG GTCATGGGAAGACACAAGCGGAAAATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG GAACACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTCCTGAAGGACGACAGCATGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCAGCGAAGAAGTCTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACGGACAAGGCAGGATTCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCA AGAAATCAACAACCTACCAACCACGCACACGACGCATACCTG AACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCGA AGCTGGAAAGCGAATTGTCACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTACAGCAACATCA TGAACTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAAGGGAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGGAAAGC ATCCTGCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAAGAAGTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGCTCTGGTCGCAAAGGT GAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGAAATCACAATCATGAAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCC TGTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCC AGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAGGCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTCGTCAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAGTACGTTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGGAGAAAACATC	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	ATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGAGCACCGGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGGAGACGGAGGGAGGAAGCCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAAGCATCTCA GCCTTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTTTTCTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCA ACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTCTTAATCATTG CCTCTTTCTGTGCTTCATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAA	10
配列番号 2 を含むポリ A テールを有する Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCAGCGGCTTGCTTGTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCTATTGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTCGACAGCGG AGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATAACACAAGAAGAAAGAACAGAACATCTGTCACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAATGGCAAAGGTGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAA GACAAGAAGCAGAAAGACACCCGATCTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG	3 1 20 30 40

説明	配列	配列番号
	GAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACCGAACAGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAACGACTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTGACAAACCGGAAGCATCCCCCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTGAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAGGTCAAGTACGTACAGAACAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAACATCGAATGCTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGAAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAACAGATA CACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAAATTCAATGCGAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGGCCGGCAATCAAGAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAGGTGTCGACGAACAGTGGTCAAG GTCAATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAACAGAGAACAGAA	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	CAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAACATCGAAGAAGGAATCAAG GAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACCGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACCTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCC CGCAGAGCTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAACGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCGGAGCGAAGAACGTCGTAAGAACGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTAACCGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAGGAGGACTGAGC GAACGGACAAGGCAGGATTCAAGAGACAGCTGGTCG AAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAAGTCAGGTCAACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAAG AGAAATCAACAACCTACCAACCGCAGCGACGACGATACCTG AACCGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTGCTTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTACAGCAACATCA TGAACCTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAAGGGAAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAGAACGACTACGGAGGATTGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCGTCGAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAACGCTGAAGAGCGTCAGGAAC TGCTGGAAATCACAATCATGGAAAGAACGAGCTTCGAAAAA GAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAGGGATAAAGGAA GTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAAGTACAGCC TGTCGAACTGGAAAACGGAAGAACGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGACAACGAAACAGAAGCA GCTGTTCGTCAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC	10 20 30 40

説明	配列	配列番号
	ATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAGTCATCCTGG CAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAACATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCTCTTTCTTTCTGGTGTAAAGCCA ACACCCCTGCTAAAAAACATAATTCTTAATCATTG CCTCTTTCTGTGCTCAATTAAATAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	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】

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、PS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。

【実施例】

【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。

【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

10

20

30

40

50

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 - Amp プレートに播種し、30 または 37 のいずれかで一晩インキュベートした。8 個のコロニーを採取し、LB - Amp 培地を有する 96 ウエルプレートに接種し、30 または 37 で一晩増殖させた (Day 1)。Day 1 の培養からの試料を新鮮な LB - Amp 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。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. coli でのプラスミド増殖後のポリ A 長

37°C			30°C	
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

10

20

30

40

50

【0118】

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. coli のコロニーから精製された DNA は、プラスミド DNA を保有する個々の E. coli からの DNA 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、PCR 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 PCR 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、PCR 増幅および配列決定中のポリメラーゼスリップページのアーティファクトによるものではない。

【0119】

別の実験では、配列番号 1 のポリ A テールを含有する pUC57 プラスミドで E. coli を形質転換し、LB - Amp 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 (Miniprep) 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、Invitrogen Purelink Quick Plasmid Miniprep 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のいずれかで一晩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で一晩増殖させた（Day1）。Day1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（Day2）。DNAをDay1およびDay2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Day1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Day2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。

20

【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テールをコードする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產生された。

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。

30

【0124】

HEK-BLueの結果は、どちらのポリAテールを有するmRNAの効果が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、ピンクへの色の変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S E A P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m R N AのS E A P編集のE C₅₀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S E A P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m R N AのS E A P編集のE C₅₀は、それぞれ0.086と0.082で類似していた。

【0128】

インビボでのm R N Aの発現と活性も確認された。配列番号6(H i C a s 9 m R N A)および配列番号7(中断されたポリA m R N A)のC a s 9 m R N Aは、配列番号9のシングルガイドR N A(マウスT T R遺伝子を標的とする)と1:1の重量比で脂質ナノ粒子(L N P)中に配合され、1 m g / k gまたは0.5 m g / k gの総R N Aで静脈内投与により、C D - 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、E L I S AによりT T Rタンパク質の血清レベルを測定した。手短にいえば、総T T R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)E L I S Aキット(A v i v a S y s t e m s B i o l o g y, C a t . O K I A 0 0 1 1 1)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S p e c t r a M a x M 5 プレートリーダーで450 n mの吸光度で読み取った。血清T T R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、S o f t M a x P r o 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T T Rノックダウン(T T R遺伝子の編集率を表す)の同等レベルを示す。血清T T R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T T R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 m R N Aを受け取ったマウスは、0.5および1 m g / k gの総R N Aでそれぞれ61.74%および69.84%の編集を示したが、非アデノシンヌクレオチドを含有するポリA m R N Aを受け取ったマウスは、0.5および1 m g / k gの総R N A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C a s 9 m R N A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C a s 9 m R N A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m R N Aの有効性と、実施例2のようにアデノシンヌクレオチドのみを含有するポリAテールを有するm R N Aの有効性を決定した。T 7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C a s 9 m R N A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P C R增幅により作成された。m R N Aは、これらのP C R産物からのインビトロ転写によって產生された。配列番号18のm R N Aは、m R N A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產生された。

【0132】

図7は、0.02~6 n Mの濃度でのおよびS E A Pを標的とする1 μ MのシングルガイドR N A(配列番号8)でのH E K - B l u e 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 1 0 、もしくは配列番号 1 1 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	E C 5 0	標準誤差
98 個の連続するアデノシン	LiV (U-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

【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 1 8 [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 1 8 のアンカーシーケンスは、ポリ A テールの約 300 nt 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。

【0134】

配列番号 1 8 をクローニングするため、P o l y A - 1 (配列番号 1 2) 、P o l y A - 2 (配列番号 1 3) 、P o l y A - 3 (配列番号 1 4) 、および P o l y A - 4 (配列番号 1 5) 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 1 2 を B c l 1 1 a 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 1 3 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 1 4 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 1 8 を含む) は、p A 3 - 4 からの配列番号 1 7 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 1 6) 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 2 0 および 2 1) 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。

【0135】

得られた配列番号 1 8 (3 0 0 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

10

20

30

40

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

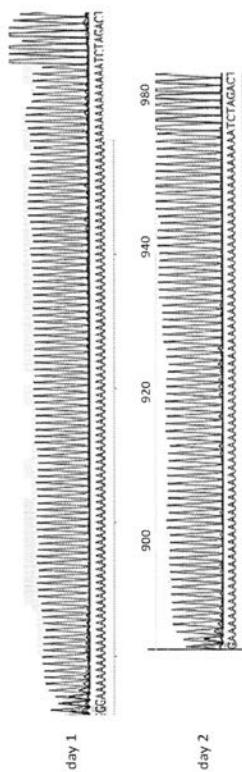
10

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

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

20

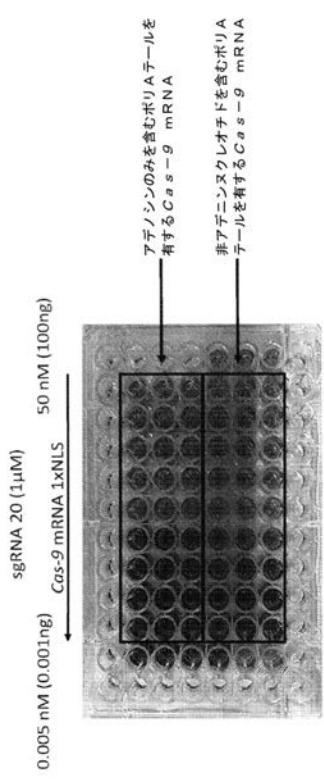
【図1】



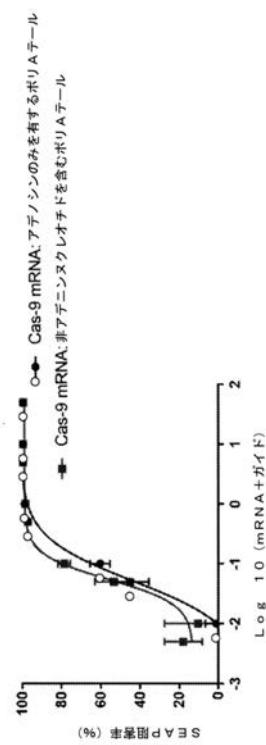
【図2】



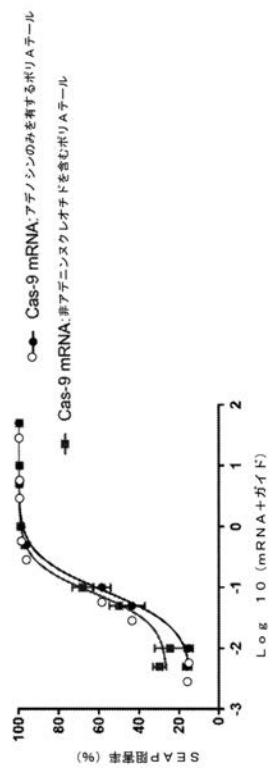
【図3】



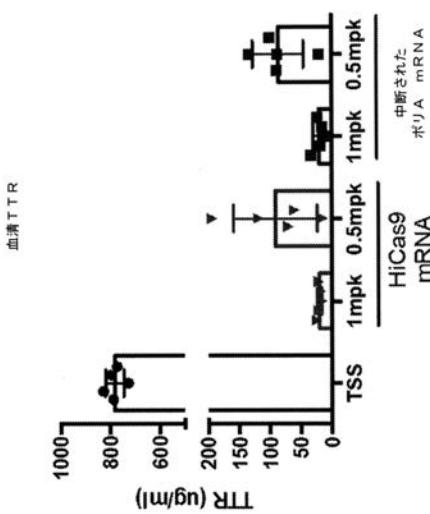
【図4】



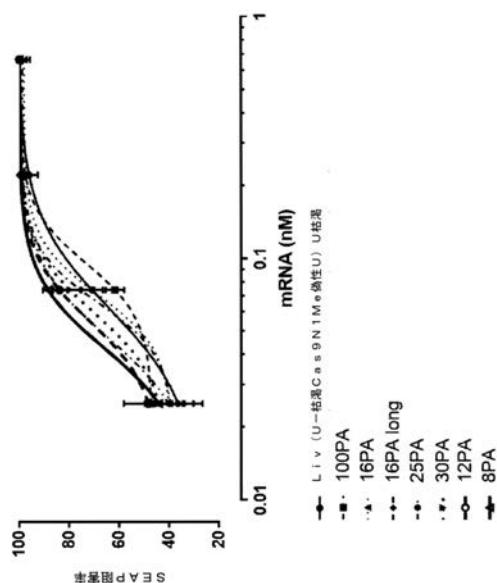
【図5】



【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 Modification", 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 the whole document ----- -----	1-37, 42-46
Y		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

Date of mailing of the international search report

26 November 2018

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

1

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 the whole document -----	1-37, 42-46
Y	-----	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.semcd.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
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/046772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 101786396	B1 24-11-2017	KR US 101786396 B1 2018119213 A1	24-11-2017 03-05-2018

フロントページの続き

(51) Int.CI.	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, T, J, 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, R, O, 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 ドンブルowski, クリスチャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, エリー ストリート 40

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