

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-501473
(P2025-501473A)

(43)公表日 令和7年1月22日(2025.1.22)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全136頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-534426(P2024-534426)			(71)出願人	523142607
(86)(22)出願日	令和4年12月9日(2022.12.9)				北京幹細胞与再生医学研究院
(85)翻訳文提出日	令和6年8月7日(2024.8.7)				BEIJING INSTITUTE F
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/137920				OR STEM CELL AND REG
(87)国際公開番号	WO2023/104185				ENERATIVE MEDICINE
(87)国際公開日	令和5年6月15日(2023.6.15)				中華人民共和国100101北京市朝陽
(31)優先権主張番号	PCT/CN2021/136761				区大屯路甲3号
(32)優先日	令和3年12月9日(2021.12.9)				3A, Datun Road, Cha
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				oyang District, Bei
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(71)出願人	520176566
		最終頁に続く			中国科学院動物研究所
					INSTITUTE OF ZOOLOG
					Y, CHINESE ACADEMY O
					F SCIENCES
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンジニアリングされたC a s 1 2 bエフェクタータンパク質及びその使用方法

(57)【要約】

本願は、1つ又は複数のタイプの変異を含み、活性（例えば、遺伝子編集活性）を向上させるか、又はヌクレアーゼ活性を解消した、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はその誘導体を提供する。また、エンジニアリングされたC a s 1 2 bエフェクタータンパク質、エンジニアリングされたgRNA（例えば、sgRNA又はtracrRNA）、エンジニアリングされたCRISPR-C a s 1 2 bシステム、及びそれらの使用方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼに対して、1つ、2つ又は3つのタイプの変異を含み、前記変異は、

(1) 前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換、及び／又は

(2) 前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてDNA二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換、及び／又は

(3) 前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼのR u v Cドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基又は疎水性アミノ酸残基への置換を含む、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

10

【請求項 2】

前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼは野生型 C a s 1 2 bヌクレアーゼである、請求項 1 に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 3】

前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼはS E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 4】

前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてP A M と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

20

【請求項 5】

前記P A M と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は3次元構造においてP A M から10 Å 以内にある、請求項 4 に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 6】

前記P A M と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び475の位置のうちの1つ又は複数にあり、前記アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 4 又は 5 に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

30

【請求項 7】

前記P A M と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D 116 及びE 475 のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含み、前記アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 8】

前記正電荷を帯びたアミノ酸残基はR 又はK である、請求項 4 ～ 7 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

40

【請求項 9】

前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてP A M と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換は、D 116 R、及びE 475 R の置換のうちの1つ又は複数であり、前記アミノ酸残基は、S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 4 ～ 8 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 10】

前記エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 2 又は 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

50

【請求項 1 1】

前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいて前記 D N A二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換を含む、請求項 1～10のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 1 2】

前記 D N A二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基は、標的鎖の3'末端に対する P A Mにおける最後の塩基対と相互作用する、請求項 1 1に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 1 3】

前記前記 D N A二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基は、118及び119の位置のうちの1つ又は複数にあり、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1に従って番号付けされる、請求項 1 1又は12に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 1 4】

前記芳香環を有するアミノ酸残基は Y、F、又は Wである、請求項 1 1～13のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 1 5】

前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいて D N A二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換は、Q119Y、Q119F、又はQ119Wであり、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1に従って番号付けされる、請求項 1 1～14のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 1 6】

前記エンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 4～6のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1～3及び11～15のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 1 7】

前記エンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼは、前記参照 C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいて前記 R u v Cドメイン内に位置し、かつ前記一本鎖 D N A基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基又は疎水性アミノ酸残基への置換を含む、請求項 1～16のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 1 8】

前記 R u v Cドメインにおいて前記一本鎖 D N A基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造において前記一本鎖 D N A基質から10 Å以内にある、請求項 1 7に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 1 9】

前記 R u v Cドメインにおいて前記一本鎖 D N A基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、300、301、304、329、636、639、647、682、757、758、761、764、768、852、854、856、857、858、860、862、863、865、866、867、869、938、956、957、958、994、1093、及び1097の位置のうちの1つ又は複数にあり、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1に従って番号付けされる、請求項 1 7又は18に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 2 0】

E636、Q639、T647、Q682、I757、E758、E761、K768、Q854、N857、D858、N865、Q866、I994、Q1093、及びW1097のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換を含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1に従って番号付けされる、請求項 1 7～19のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【請求項 2 1】

前記正電荷を帯びたアミノ酸残基は R 又は K である、請求項 1 7 ～ 2 0 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【請求項 2 2】

前記参照 C a s 1 2 b ヌクレアーゼにおいて前記 R u v C ドメイン内に位置し、かつ前記一本鎖 D N A 基質と相互作用する 1 つ又は複数のアミノ酸残基の置換は、E 6 3 6 R、Q 6 3 9 R、T 6 4 7 R、Q 6 8 2 R、I 7 5 7 R、E 7 5 8 R、E 7 6 1 R、Q 8 5 4 R、N 8 5 7 K、D 8 5 8 R、I 9 9 4 R、Q 1 0 9 3 R、及び W 1 0 9 7 R の置換のうちの 1 つ又は複数であり、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 1 7 ～ 2 1 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

10

【請求項 2 3】

S E Q I D N O : 7 ～ 1 3 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 3 及び 1 7 ～ 2 2 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【請求項 2 4】

E 7 5 8、E 7 6 1、E 8 6 3、N 8 6 5、Q 8 6 6、Q 8 6 9、Q 9 5 6、及び Q 1 0 9 3 のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数から疎水性アミノ酸残基への置換を含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 1 7 ～ 1 9 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

20

【請求項 2 5】

前記疎水性アミノ酸残基は、W、Y、F、又は M である、請求項 1 7 ～ 1 9、及び 2 4 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【請求項 2 6】

前記参照 C a s 1 2 b ヌクレアーゼにおいて前記 R u v C ドメイン内に位置し、かつ前記一本鎖 D N A 基質と相互作用する 1 つ又は複数のアミノ酸残基の置換は、N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、Q 8 6 6 M、Q 8 6 9 M、Q 1 0 9 3 W、及び Q 1 0 9 3 Y の置換のうちの 1 つ又は複数であり、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 1 7 ～ 1 9、2 4、及び 2 5 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

30

【請求項 2 7】

S E Q I D N O : 1 4 ～ 1 9 のアミノ酸配列のいずれかを含む、請求項 1 ～ 3、1 7 ～ 1 9、及び 2 4 ～ 2 6 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【請求項 2 8】

(1) D 1 1 6 R、(2) E 4 7 5 R、(3) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R、(4) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R、(5) Q 1 1 9 Y、(6) Q 1 1 9 F、(7) Q 1 1 9 W、(8) I 7 5 7 R、(9) E 7 5 8 R、(10) E 7 6 1 R、(11) K 7 6 8 R、(12) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R、(13) I 7 5 7 R + E 7 6 1 R、(14) I 7 5 7 R + K 7 6 8 R、(15) E 7 5 8 R + E 7 6 1 R、(16) E 7 5 8 R + K 7 6 8 R、(17) E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(18) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + E 7 6 1 R、(19) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + K 7 6 8 R、(20) I 7 5 7 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(21) E 7 5 8 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(22) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(23) Q 8 6 6 M、(24) Q 8 6 9 M、(25) Q 8 6 6 M + Q 8 6 9 M、(26) E 6 3 6 R、(27) Q 8 5 4 R、(28) N 8 5 7 K、(29) N 8 6 5 W、(30) N 8 6 5 Y、(31) Q 1 0 9 3 W、(32) Q 1 0 9 3 Y、及び(33) D 8 5 8 R の置換のいずれか又はそれらの組み合わせを含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

40

【請求項 2 9】

50

(1) Q 8 6 6 M + Q 8 6 9 M、(2) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R、及び(3) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 Rの置換のいずれか又はそれらの組み合わせを含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 1 ~ 3、及び 2 8 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【請求項 3 0】

S E Q I D N O : 2 0 ~ 2 2 のアミノ酸配列のいずれかを含む、請求項 1 ~ 3、2 8、及び 2 9 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【請求項 3 1】

前記参照 C a s 1 2 b ヌクレアーゼの 8 5 5 ~ 8 5 9 番目のアミノ酸残基を含む柔軟性領域の柔軟性を向上させる 1 つ又は複数の変異をさらに含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

10

【請求項 3 2】

柔軟性を向上させる前記 1 つ又は複数の変異は N 8 5 6 G を含む、請求項 3 1 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【請求項 3 3】

請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又はその機能的誘導体を含む、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

20

【請求項 3 4】

前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又はその機能的誘導体は酵素活性を有する、請求項 3 3 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

【請求項 3 5】

i) D N A 分子中の二本鎖の断裂を誘導する、及び／又は i i) D N A 分子中の一本鎖の断裂を誘導することができる、請求項 3 3 又は 3 4 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

【請求項 3 6】

前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼの酵素的不活性化変異体を含む、請求項 3 3 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

30

【請求項 3 7】

前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼの酵素的不活性化変異体は、D 5 7 0 A、E 8 4 8 A、R 7 8 5 A、E 8 4 8 A、R 9 1 1 A、及び D 9 7 7 A からなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸残基の置換を含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、請求項 3 6 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

【請求項 3 8】

前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼの酵素的不活性化変異体は、S E Q I D N O : 7 9 ~ 8 1 のアミノ酸配列のいずれかを含む、請求項 3 6 又は 3 7 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

40

【請求項 3 9】

前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又はその機能的誘導体と融合する機能ドメインをさらに含む、請求項 3 3 ~ 3 8 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

【請求項 4 0】

前記機能ドメインは、翻訳開始ドメイン、転写リプレッサードメイン、トランス活性化ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、核酸塩基編集ドメイン、逆転写酵素ドメイン、レポータードメイン、及びヌクレアーゼドメインからなる群から選択される、請求項 3 9 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

50

【請求項 41】

前記転写リプレッサードメインは K r u (ウムラウト) p p e l 関連ボックス (K R A B) ドメインである、請求項 40 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

【請求項 42】

前記 K R A B ドメインは S E Q I D N O : 7 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 41 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質。

【請求項 43】

S E Q I D N O : 2 5 ~ 5 3 の配列のいずれかを含む、シングルガイド R N A (s g R N A) 。

【請求項 44】

(a) 請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ、請求項 3 3 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質、又はそれらをコードする核酸と、

(b) 標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列、又は前記 g R N A をコードする核酸を含むガイド R N A (g R N A) と、を含み、

前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又は前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質と前記 g R N A は、前記標的核酸に特異的に結合する C R I S P R 複合体を形成し、前記標的核酸の修飾を誘導することができる、エンジニアリングされた C R I S P R - C a s 1 2 b システム。

【請求項 45】

前記 g R N A は c r R N A 及び t r a c r R N A を含む、請求項 4 4 に記載のエンジニアリングされた C R I S P R - C a s 1 2 b システム。

【請求項 46】

前記エンジニアリングされた C R I S P R - C a s 1 2 b システムは、複数の c r R N A をコードする前駆体 g R N A アレイを含む、請求項 4 4 又は 4 5 に記載のエンジニアリングされた C R I S P R - C a s 1 2 b システム。

【請求項 47】

前記 g R N A は s g R N A である、請求項 4 4 に記載のエンジニアリングされた C R I S P R - C a s 1 2 b システム。

【請求項 48】

前記 s g R N A は、S E Q I D N O : 2 3 ~ 5 3 の配列のいずれかを含む、請求項 4 7 に記載のエンジニアリングされた C R I S P R - C a s 1 2 b システム。

【請求項 49】

(a) S E Q I D N O : 1 ~ 2 2 及び 7 9 ~ 8 1 のアミノ酸配列のいずれかを含む C a s 1 2 b ヌクレアーゼもしくは C a s 1 2 b エフェクタータンパク質、又はそれらをコードする核酸と、

(b) 標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含む g R N A 、又は前記 g R N A をコードする核酸

を含み、
前記 g R N A は、S E Q I D N O : 2 5 ~ 5 3 の配列のいずれかを含むエンジニアリングされた足場を含み、

前記 C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又は前記 C a s 1 2 b エフェクタータンパク質と前記 g R N A は、前記標的核酸に特異的に結合する C R I S P R 複合体を形成し、前記標的核酸の修飾を誘導することができる、エンジニアリングされた C R I S P R - C a s 1 2 b システム。

【請求項 50】

前記 g R N A は、c r R N A 及び t r a c r R N A を含み、前記 t r a c r R N A は、エンジニアリングされた足場又はその一部を含む、請求項 4 9 に記載のエンジニアリングされた C R I S P R - C a s 1 2 b システム。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

複数の crRNA をコードする前駆体 gRNA アレイを含む、請求項 4 9 又は 5 0 に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システム。

【請求項 5 2】

前記 gRNA は sgRNA である、請求項 4 9 に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システム。

【請求項 5 3】

前記エンジニアリングされた Cas12b ヌクレアーゼ、前記エンジニアリングされた Cas12b エフェクタータンパク質、前記 Cas12b ヌクレアーゼ、又は前記 Cas12b エフェクタータンパク質をコードする 1 つ又は複数のベクターを含む、請求項 4 4 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システム。

10

【請求項 5 4】

前記 1 つ又は複数のベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項 5 3 に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システム。

【請求項 5 5】

前記 1 つ又は複数のベクターは、前記 gRNA をさらにコードする、請求項 5 3 又は 5 4 に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システム。

【請求項 5 6】

サンプル中の標的核酸を検出する方法であって、

20

(a) 前記サンプルを請求項 4 4 ~ 5 5 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システム及び標識検出核酸と接触させるステップであって、前記 gRNA は、前記標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含み、前記標識検出核酸は前記 gRNA のガイド配列とハイブリダイズしない一本鎖のものである、ステップと、(b) 前記エンジニアリングされた Cas12b ヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質によって前記標識検出核酸を切断して生じる検出可能なシグナルを測定することで、前記標的核酸を検出するステップと、を含む、方法。

【請求項 5 7】

前記標的核酸を請求項 4 4 ~ 5 5 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システムと接触させるステップを含む、標的配列を含む標的核酸を修飾する方法。

30

【請求項 5 8】

インビトロで行われる、請求項 5 6 又は 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記標的核酸は細胞内に存在する、請求項 5 6 又は 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記細胞は、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、又は動物細胞である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

エキスピボで行われる、請求項 5 6 又は 5 7 に記載の方法。

40

【請求項 6 2】

インビボで行われる、請求項 5 6 又は 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記エンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システムによって前記標的核酸を切断するか、又は前記標的核酸中の前記標的配列を変化させる、請求項 5 7 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記エンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システムによって前記標的核酸の発現を変化させる、請求項 5 7 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

50

前記標的核酸はゲノムDNAである、請求項56～64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項66】

前記標的配列は、疾患又は病状に関連する、請求項56～65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

前記エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、複数のcrRNAをコードする前駆体ガイドRNAアレイを含み、各crRNAは、異なるガイド配列を含む、請求項56～66のいずれか一項に記載の方法。

【請求項68】

個体の細胞における標的核酸に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、

10

請求項44～55のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムを用いて前記個体の細胞中の前記標的核酸を修飾することで、前記疾患又は病状を治療するステップを含む、方法。

【請求項69】

前記疾患又は病状は、がん、心血管疾患、遺伝性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、眼疾患、細菌感染症、及びウイルス感染症からなる群から選択される、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

修飾された標的核酸を含むエンジニアリングされた細胞であって、

前記標的核酸は、請求項57～67のいずれか一項に記載の方法で修飾されている、エンジニアリングされた細胞。

20

【請求項71】

1つ又は複数の請求項70に記載のエンジニアリングされた細胞を含む、エンジニアリングされた非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【関連出願の相互参照】

本願は、2021年12月9日に出願された国際特許出願第PCT/CN2021/136761号の優先権を主張しており、その内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。

30

【0002】

電子配列リストについて

電子配列リスト(253112000541SEQLIST.xml;サイズ:111,583バイト;及び作成日:2022年11月22日)の内容は、全体として引用により本明細書に組み込まれている。

【0003】

本願は、一般にバイオテクノロジー分野に関する。より具体的には、本願は、活性(例えば、遺伝子編集活性)を改善したか、又はヌクレアーゼ活性を解消したエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質及びエンジニアリングされたgRNA足場、並びにそれらの使用方法に関する。

40

【背景技術】

【0004】

ゲノム編集は、ゲノム研究やさまざまな応用において重要かつ有用な技術である。ゲノム編集には、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート(CRISPR)-Cas系、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)系、及びジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)系を含む、さまざまな系が利用可能である。

【0005】

CRISPR-Cas系は、効率的かつ経済的なゲノム編集技術であり、酵母や植物が

50

ラゼブラフィッシュやヒトなどに至るまで、さまざまな真核生物で広く使用されている (Van der Oost 2013, Science 339: 768-770, and Charpentier and Doudna, 2013, Nature 495: 50-51に記載)。CRISPR-Cas系は、Casエフェクタータンパク質とCRISPR RNA (crRNA) を組み合わせることにより、古細菌や細菌に適応免疫を提供する。現在までに、6つのタイプ (タイプI~VI) を含む2つのクラス (クラス1およびクラス2) のCRISPR-Cas系が、系の優れた機能と進化したモジュール性に基づいて特徴付けられている。クラス2のCRISPR-Cas系のうち、タイプII Cas9系とV-A/B/E/JタイプCas12a/Cas12b/Cas12e/Cas12f/Cas12j系はゲノム編集に使用されており、生物医学研究に広い将来性を提供している。

10

【発明の概要】

【0006】

従来のCRISPR-Cas系には、遺伝子編集の効率が限られていることなど、さまざまな制限がある。本願は、複数の遺伝子座にまたがる効率的なゲノム編集のための改良された方法及びシステムを提供する。具体的には、改善された酵素活性を有するエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質、エンジニアリングされた足場を含むエンジニアリングされたgRNA (例えば、sgRNA又はtracrRNA)、並びに、前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質及び/又はエンジニアリングされたgRNAを遺伝子編集に使用する方法が本明細書に提供される。一態様において、本願は、参照Cas12bヌクレアーゼに対して1つ、2つ又は3つのタイプの変異を含むエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼであって、前記変異は、(1) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基 (例えば、R、H、K) への置換、及び/又は(2) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖 (dsDNA) の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基 (例えば、F、Y、W) への置換、及び/又は(3) Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいて一本鎖DNA (ssDNA) 基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基 (例えば、R、H、K) 又は疎水性アミノ酸残基 (例えば、F、Y、W、M) への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼを提供する。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは野生型Cas12bヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、アリシクロパチルス・アシドフィルス (AaCas12b) 由来のCas12bヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0007】

上記のいずれかに記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼのいくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換を含む。いくつかの実施形態において、PAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造においてPAMから10 Å (例えば、9、8、7、6、5、4、3、2、1以下) 以内にある。PAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び475の位置のうちの1つ又は複数に位置する。いくつかの実施形態において、PAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D116、K123、D130、D132、N144、K145、E153、D173、Q222、D395、N400、及びE475のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、PAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D116及びE475のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形

40

50

態において、正電荷を帯びたアミノ酸残基は、R又はKである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、D116R及びE475Rの置換のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 2又は3のアミノ酸配列を含む。

【0008】

上記のいずれかに記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼのいくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換を含む。いくつかの実施形態において、DNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基は、標的鎖の3'末端に対するPAMにおける最後の塩基対と相互作用する。いくつかの実施形態において、DNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基は、118及び119の位置のうちの1つ又は複数に位置する。いくつかの実施形態において、芳香環を有するアミノ酸残基は、Y、F、又はWである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換は、Q119Y、Q119F又はQ119Wである。いくつかの実施形態において、アミノ酸残基は、SEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 4～6のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0009】

上記のいずれかに記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼのいくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてRuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基又は疎水性アミノ酸残基への置換を含む。いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造において前記一本鎖DNA基質から10 Å（例えば、9、8、7、6、5、4、3、2、1以下）以内にある。いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、前記一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、300、301、304、329、636、639、647、682、757、758、761、764、768、852、854、856、857、858、860、862、863、865、866、867、869、938、956、957、958、994、1093、及び1097の位置のうちの1つ又は複数に位置する。いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、前記一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D300、K301、E304、N329、E636、Q639、T647、Q682、I757、E758、E761、E764、K768、E852、Q854、N856、N857、D858、P860、S862、E863、N865、Q866、L867、Q869、E938、E956、G957、E958、I994、Q1093、及びW1097のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、E636、Q639、T647、Q682、I757、E758、E761、K768、Q854、N857、D858、N865、Q866、I994、Q1093、及びW1097のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換を含む。いくつかの実施形態において、正電荷を帯びたアミノ酸残基は、R又はKである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、E636R、Q639R、T647R、Q682R、I757R、E758R、E761R、Q854R、N857K、D858R、I994R、Q1093R、及びW1097Rの置換のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、E758、

E 7 6 1、E 8 6 3、N 8 6 5、Q 8 6 6、Q 8 6 9、Q 9 5 6、及び Q 1 0 9 3 のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数から疎水性アミノ酸残基への置換を含む。いくつかの実施形態において、前記疎水性アミノ酸残基は、W、Y、F 又は M、例えば W、Y 又は M である。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、Q 8 6 6 M、Q 8 6 9 M、Q 1 0 9 3 W、及び Q 1 0 9 3 Y の置換のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、前記アミノ酸残基は、S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 7 ~ 1 9 のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0010】

上記のいずれかに記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼのいくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、(1) D 1 1 6 R、(2) E 4 7 5 R、(3) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R、(4) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R、(5) Q 1 1 9 Y、(6) Q 1 1 9 F、(7) Q 1 1 9 W、(8) I 7 5 7 R、(9) E 7 5 8 R、(10) E 7 6 1 R、(11) K 7 6 8 R、(12) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R、(13) I 7 5 7 R + E 7 6 1 R、(14) I 7 5 7 R + K 7 6 8 R、(15) E 7 5 8 R + E 7 6 1 R、(16) E 7 5 8 R + K 7 6 8 R、(17) E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(18) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + E 7 6 1 R、(19) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + K 7 6 8 R、(20) I 7 5 7 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(21) E 7 5 8 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(22) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(23) Q 8 6 6 M、(24) Q 8 6 9 M、(25) Q 8 6 6 M + Q 8 6 9 M、(26) E 6 3 6 R、(27) Q 8 5 4 R、(28) N 8 5 7 K、(29) N 8 6 5 W、(30) N 8 6 5 Y、(31) Q 1 0 9 3 W、(32) Q 1 0 9 3 Y、及び(33) D 8 5 8 R の置換のいずれかの又はそれらの組み合わせを含み、アミノ酸残基は、S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、(1) Q 8 6 6 M + Q 8 6 9 M、(2) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R、及び(3) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R の置換のいずれか又はそれらの組み合わせを含み、アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 2 0 ~ 2 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0011】

上記のいずれかに記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼのいくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 1 ~ 2 2 のいずれかと少なくとも約 8 5 % (例えば、少なくとも約 8 8 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又はそれ以上のいずれか) の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 2 ~ 2 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む (又はそれらから構成される、若しくは実質的にそれらから構成される)。

【0012】

上記のいずれかに記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼのいくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、参照 C a s 1 2 b ヌクレアーゼの1つ又は複数の変異をさらに含み、前記変異は、アミノ酸残基 8 5 5 ~ 8 5 9 を含むフレキシブル領域の柔軟性を向上させる。いくつかの実施形態において、柔軟性を向上させる1つ又は複数の変異は、N 8 5 6 G を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸位置番号は S E Q I D N O : 1 を参照する。

【0013】

本願の一態様は、(1) D 1 1 6 R、(2) E 4 7 5 R、(3) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R、(4) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R、(5) Q 1 1 9 Y、(6) Q 1 1 9 F、(7) Q 1 1 9 W、(8) I 7 5 7 R、(9) E 7 5 8 R、(10) E 7 6 1 R、(1

1) K 7 6 8 R、(12) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R、(13) I 7 5 7 R + E 7 6 1 R、(14) I 7 5 7 R + K 7 6 8 R、(15) E 7 5 8 R + E 7 6 1 R、(16) E 7 5 8 R + K 7 6 8 R、(17) E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(18) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + E 7 6 1 R、(19) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + K 7 6 8 R、(20) I 7 5 7 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(21) E 7 5 8 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(22) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(23) Q 8 6 6 M、(24) Q 8 6 9 M、(25) Q 8 6 6 M + Q 8 6 9 M、(26) E 6 3 6 R、(27) Q 8 5 4 R、(28) N 8 5 7 K、(29) N 8 6 5 W、(30) N 8 6 5 Y、(31) Q 1 0 9 3 W、(32) Q 1 0 9 3 Y、及び(33) D 8 5 8 Rの変異のいずれか又は複数を含み、前記アミノ酸位置番号は S E Q I D N O : 1 を参照する、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼを提供する。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、(1) Q 8 6 6 M + Q 8 6 9 M、(2) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R、及び(3) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 Rの置換のいずれか又はそれらの組み合わせを含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 Rである置換を含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる。

10

【0014】

本願の一態様は、S E Q I D N O : 2 ~ 2 2 のいずれかと少なくとも約 8 5 % (例えば、少なくとも約 8 8 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又はそれ以上のいずれか) の配列同一性を有する、又は S E Q I D N O : 2 ~ 2 2 のいずれかのアミノ酸配列を含む (又はそれらから構成される、若しくは実質的にそれらから構成される) エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼを提供する。

20

【0015】

本願の一態様は、上記のいずれかに記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ、そのバリエーション、又は機能的誘導体を含むエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又はその機能的誘導体は、酵素活性を有する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、D N A 分子における二本鎖切断を誘導してもよい。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、D N A 分子における一本鎖切断を誘導してもよい。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼの酵素不活性変異体を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼの酵素不活性変異体は、D 5 7 0 A、E 8 4 8 A、R 7 8 5 A、E 8 4 8 A、R 9 1 1 A、及び D 9 7 7 A からなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸残基の置換を含み、アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼの酵素不活性突然変異体は、S E Q I D N O : 7 9 ~ 8 1 のいずれかのアミノ酸配列、又は S E Q I D N O : 7 9 ~ 8 1 のいずれかと少なくとも約 8 5 % (例えば、少なくとも約 8 8 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又はそれ以上のいずれか) の配列同一性を有する変異体を含む (又はそれらから構成される、若しくは実質的にそれらから構成される)。

30

40

【0016】

上記のいずれかに記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質のいくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又はその機能的誘導体に融合する機能ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記機能ドメインは、翻訳開始ドメイン、転写リプレッサードメイン、トランス活性化ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、核酸塩基編集ドメイン、逆転写酵素ドメイン、レポータードメイン

50

、及びヌクレアーゼドメインからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、転写抑制ドメインは、SEQ ID NO: 72のアミノ酸配列を含むような、Kru (ウムラウト、以下同じ) ppe l 関連ボックス (KRAB) ドメインである。

【0017】

上記のいずれかに記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質のいくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、エンジニアリングされたCasヌクレアーゼ又はその機能的誘導体のN末端部分を含む第1ポリペプチドと、エンジニアリングされたCasヌクレアーゼ又はその機能的誘導体のC末端部分を含む第2ポリペプチドと、を含み、前記第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは、ガイド配列を含むガイドRNAの存在下で相互に会合し、ガイド配列に相補的な標的配列を含む標的核酸に特異的に結合するCRISPR複合体を形成してもよい。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体のN末端のアミノ酸残基1〜Xを含む第1ポリペプチドと、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体のX+1番目の残基からそのC末端を含む第2ポリペプチドと、を含み、第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは、ガイド配列を含むガイドRNAの存在下で相互に会合し、ガイド配列に相補的な標的配列を含む標的核酸に特異的に結合するCRISPR複合体を形成してもよい。いくつかの実施形態において、前記第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは、それぞれ二量化ドメインを含む。いくつかの実施形態において、第1二量化ドメイン及び第2二量化ドメインは、誘導剤の存在下で相互に会合する。いくつかの実施形態において、第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは、二量化ドメインを含まない。

10

20

【0018】

本願の別の態様は、SEQ ID NO: 25〜53の配列のいずれかを含むシングルガイドRNA (sgRNA) を提供する。

【0019】

本願の別の態様は、(a) 上記のいずれかに記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼによるエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、上記のいずれかに記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質によるエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質、又はそれらをコードする核酸と、(b) 標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドRNA、又は前記ガイドRNAをコードする核酸と、を含み、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質とガイドRNAは、標的配列を含む標的核酸に特異的に結合するCRISPR複合体を形成し、標的核酸の修飾を誘導する、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムを提供する。いくつかの実施形態において、前記ガイドRNAはcrRNA及びtracrRNAを含む。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、複数のcrRNAをコードする前駆体ガイドRNAのアレイを含む。いくつかの実施形態において、前記ガイドRNAはシングルガイドRNA (sgRNA) である。いくつかの実施形態において、sgRNAはSEQ ID NO: 23〜53のいずれかの配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質をコードする1つ又は複数のベクターを含む。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。いくつかの実施形態において、AAVベクターは、さらにガイドRNAをコードする。

30

40

【0020】

本願の別の態様は、(a) 上記のいずれかに記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼによるエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、上記のいずれかに記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質によるエンジニ

50

アリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質、SEQ ID NO: 1 ~ 22 及び 79 ~ 81 のいずれかのアミノ酸配列を含む Cas 12 b ヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質、又はそれらをコードする核酸と、(b) 標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含む gRNA、又は gRNA をコードする核酸と、を含み、前記 gRNA は、SEQ ID NO: 25 ~ 53 のいずれかの配列を含むエンジニアリング足場を含み、前記 Cas 12 b ヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリング）又はそのエフェクタータンパク質及び gRNA は、標的核酸に特異的に結合する CRISPR 複合体を形成し、標的核酸の修飾を誘導する、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムを提供する。いくつかの実施形態において、前記 gRNA は crRNA 及び tracrRNA を含み、前記 tracrRNA はエンジニアリングされた足場又はその一部を含む。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムは、複数の crRNA をコードする前駆体 gRNA アレイを含む。いくつかの実施形態において、gRNA は sgRNA である。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムは、エンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質をコードする 1 つ又は複数のベクター、又は Cas 12 b ヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質を含む。いくつかの実施形態において、前記 1 つ又は複数のベクターは AAV ベクターである。いくつかの実施形態において、前記 1 つ又は複数のベクターは、さらに gRNA をコードする。

10

20

【0021】

本願の一態様は、サンプル中の標的核酸を検出する方法であって、(a) サンプルを上記のいずれかに記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムおよび標識検出核酸と接触させるステップであって、前記 gRNA は、標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含み、前記標識検出核酸はガイド gRNA のガイド配列とハイブリダイズしない一本鎖のものである、ステップと、(b) エンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質によって標識検出核酸を切断して生じる検出可能なシグナルを測定することで、標的核酸を検出するステップと、を含む、方法を提供する。

【0022】

本願の一態様は、標的配列を含む標的核酸を修飾する方法であって、標的核酸を、上記のいずれかに記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムと接触させるステップを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記方法は、インビトロで行われる。いくつかの実施形態において、標的核酸は細胞内に存在する。いくつかの実施形態において、細胞は細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、又は動物細胞（例えば、哺乳動物細胞）である。いくつかの実施形態において、前記方法は、エクスピボで行われる。いくつかの実施形態において、前記方法はインビボで行われる。いくつかの実施形態において、前記標的核酸は分解される。いくつかの実施形態において、前記標的核酸における標的配列は、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムによって変化される。いくつかの実施形態において、標的核酸の発現は、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムによって変化される。いくつかの実施形態において、標的核酸はゲノム DNA である。いくつかの実施形態において、標的配列は、疾患又は病状に関連する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムは、複数の crRNA をコードする前駆体ガイド RNA のアレイを含み、それぞれの crRNA は 1 つの異なるガイド配列を含む。

30

40

【0023】

本願の別の態様は、個体の細胞における標的核酸に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、上記のいずれかに記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムによるエンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムを用いて、前記個体の細胞における標的核酸を修飾することで、該疾患又は病状を治療するステップを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は、がん、

50

心血管疾患、遺伝性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、眼疾患、細菌感染症、及びウイルス感染症からなる群から選択される。

【0024】

また、修飾された標的核酸を含むエンジニアリングされた細胞であって、前記標的核酸は、上記のいずれかに記載の方法で修飾されている、エンジニアリングされた細胞を提供する。また、その1つ又は複数のエンジニアリングされた細胞を含むエンジニアリングされた非ヒト動物を提供する。

【0025】

また、上記のいずれかの方法に用いられる組成物、キット及び製品を提供する。

【0026】

明確化のために、個々の実施形態の文脈で説明された本開示の特定の特徴は、単一の実施形態においても組み合わせで提供され得ることが理解されるべきである。逆に、簡潔さのために、単一の実施形態の文脈で説明された本開示の複数の特徴は、単独であるいは任意の適切なサブ組み合わせで提供されてもよい。本開示は、特定の方法ステップ、試薬又は条件、又は組成物の成分に関連する実施形態のすべての組み合わせを具体的に包含し、それぞれの組み合わせが個別かつ明示的に開示されているかのように本明細書で開示される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】野生型 A a C a s 1 2 b において P A M と相互作用するアミノ酸残基が R で置換された、例示的な A a C a s 1 2 b バリエーションの遺伝子編集効率（% 挿入／欠失）を示す。D 1 1 6 R 又は E 4 7 5 R 置換を有する A a C a s 1 2 b バリエーションは、野生型（W T ） A a C a s 1 2 b と比較して編集効率が向上したことを示した。

【図2】野生型 A a C a s 1 2 b において D N A 二重鎖の開裂に関与するアミノ酸残基が芳香族アミノ酸残基で置換された、例示的な A a C a s 1 2 b バリエーションの遺伝子編集効率を示す。Q 1 1 9 Y、Q 1 1 9 F 又は Q 1 1 9 W 置換を有する A a C a s 1 2 b バリエーションは、野生型 A a C a s 1 2 b と比較して、遺伝子編集効率が向上したことを示す。

【図3】野生型 A a C a s 1 2 b において R u v C ドメイン内に位置し、一本鎖 D N A 基質と相互作用するアミノ酸残基が R で置換された、例示的な A a C a s 1 2 b バリエーションの遺伝子編集効率を示す。

【図4A】野生型 A a C a s 1 2 b において R u v C ドメイン内に位置し、一本鎖 D N A と相互作用するアミノ酸残基がリジン（K）又はアルギニン（R）残基で置換された、例示的な A a C a s 1 2 b バリエーションの遺伝子編集効率を示す。図4Aは、ゲノム部位 C C R 5 - 3 における編集効率を示し、図4Bは、ゲノム部位 R N F 2 ~ 5 における編集効率を示す。E 6 3 6 R、I 7 5 7 R、E 7 5 8 R、E 7 6 1 R、Q 8 5 4 R、D 8 5 8 R、E 7 5 8 K、I 9 9 4 R、N 8 5 7 K、又は D 8 5 8 K 置換を有する A a C a s 1 2 b バリエーションは、W T A a C a s 1 2 b と比較して遺伝子編集効率が最も向上したことを示す。

【図4B】野生型 A a C a s 1 2 b において R u v C ドメイン内に位置し、一本鎖 D N A と相互作用するアミノ酸残基がリジン（K）又はアルギニン（R）残基で置換された、例示的な A a C a s 1 2 b バリエーションの遺伝子編集効率を示す。図4Aは、ゲノム部位 C C R 5 - 3 における編集効率を示し、図4Bは、ゲノム部位 R N F 2 ~ 5 における編集効率を示す。E 6 3 6 R、I 7 5 7 R、E 7 5 8 R、E 7 6 1 R、Q 8 5 4 R、D 8 5 8 R、E 7 5 8 K、I 9 9 4 R、N 8 5 7 K、又は D 8 5 8 K 置換を有する A a C a s 1 2 b バリエーションは、W T A a C a s 1 2 b と比較して遺伝子編集効率が最も向上したことを示す。

【図5】野生型 A a C a s 1 2 b において R u v C ドメイン内に位置し、一本鎖 D N A 基質と相互作用するアミノ酸残基が疎水性アミノ酸残基 W、Y、F 又は M で置換された、例示的な A a C a s 1 2 b バリエーションの遺伝子編集効率を示す。N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、Q 8 6 6 M、Q 8 6 9 M、Q 1 0 9 3 W、又は Q 1 0 9 3 Y 置換を有する A a C a s 1 2

b バリエントは、WT A a C a s 1 2 b と比較して遺伝子編集効率が最も向上したことを示す。

【図6】WT A a C a s 1 2 b と比較した、組み合わせ変異を有する例示的な A a C a s 1 2 b バリエントの遺伝子編集効率を示す。

【図7】A a C a s 1 2 b バリエント Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R は、WT A a C a s 1 2 b 及び対応する単一変異体と比較して遺伝子編集効率が著しく向上したことを示す。

【図8】アリシクロバチルス・アシディフィルス (A l i c y c l o b a c i l l u s a c i d i p h i l u s) C a s 1 2 b (A a C a s 1 2 b) (SEQ ID NO: 1)、アリシクロバチルス・カケガウエンシス (A l i c y c l o b a c i l l u s k a k e g a w e n s i s) C a s 1 2 b (A k C a s 1 2 b) (SEQ ID NO: 54)、アリシクロバチルス・マクロスポランギダス (A l i c y c l o b a c i l l u s m a c r o s p o r a n g i i d u s) C a s 1 2 b (A m C a s 1 2 b) (SEQ ID NO: 55)、バチルス属 (B a c i l l u s s p.) V 3 - 1 3 C a s 1 2 b (B s 3 C a s 1 2 b) (SEQ ID NO: 56)、バチルス (B a c i l l u s) C a s 1 2 b (B s C a s 1 2 b) (SEQ ID NO: 57)、ラセエラ・セディミニス (L a c e y e l l a s e d i m i n i s) C a s 1 2 b (L s C a s 1 2 b) (SEQ ID NO: 58)、バチルス・ヒサシ (B a c i l l u s h i s a s h i i) C a s 1 2 b (B h C a s 1 2 b) (SEQ ID NO: 59)、及びスピロヘータ菌 (S p i r o c h a e t e s b a c t e r i u m) C a s 1 2 b (S b C a s 1 2 b) (SEQ ID NO: 60) を含む、C a s 1 2 b タンパク質のアミノ酸配列アラインメントを示す。本明細書に記載された A a C a s 1 2 b に基づく置換は、本明細書に記載された C a s 1 2 b オルトログのいずれかにおける対応するアミノ酸位置で行うことができる。

【図9】エンジニアリングされた足場を有する s g R N A が、A a C a s 1 2 b バリエント Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R の遺伝子編集効率を大幅に向上させたことを示す。対照として、A a C a s 1 2 b A a - s g 足場又は A a c C a s 1 2 b s g R N A 足場 (V 0) を有する s g R N A を用いる。

【図10A】CMVプロモーターの制御下にある A a C a s 1 2 b バリエント Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A 及び U 6 プロモーターの制御下にある s g R N A をコードする例示的な構築物の模式図である。

【図10B】A a C a s 1 2 b (Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R) 及び A a C a s 1 2 b (Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A) のヌクレアーゼ活性の尺度としての T 7 E I 測定結果を示す。s g R N A 1 及び s g R N A 2 は、H B G 1 / 2 における標的部位を特異的に認識する。陰性対照としては、H B G 1 / 2 配列を標的としない対照 s g R N A を用いる。

【図11A】CMVプロモーターの制御下にある A a C a s 1 2 b バリエント Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A + E 8 4 8 A 又は Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A + D 9 7 7 A 及び U 6 プロモーターの制御下にある s g R N A をコードする例示的な構築物の模式図である。

【図11B】s g R N A 1 及び s g R N A 2 によって媒介される A a C a s 1 2 b (Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R)、A a C a s 1 2 b (Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A + E 8 4 8 A) 及び A a C a s 1 2 b (Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A + D 9 7 7 A) が H B G 1 / 2 における標的部位を特異的に認識するヌクレアーゼ活性の尺度としての T 7 E I 測定結果を示す。陰性対照としては、H B G 1 / 2 配列を標的としない対照 s g R N A を用いる。

【図12A】CMVプロモーターの制御下で K R A B に融合する A a C a s 1 2 b (Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A + D 9 7 7 A) と、U 6 プロモーターの制御下にある s g R N A をコードする例示的な構築物の模式図である。

【図12B】S C N 9 A 遺伝子の異なる部位を標的とする異なる s g R N A によって媒介

10

20

30

40

50

される A a C a s 1 2 b (Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A + D 9 7 7 A) - K R A B 融合タンパク質でトランスフェクションされたマウス N 2 a 細胞におけるマウス N a v 1 . 7 の m R N A 相対レベルを示す。対照としては、s g R N A トランスフェクションを行わなかったものを用いる。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本願は、参照 C a s 1 2 b ヌクレアーゼに対して1つ、2つ又は3つのタイプの変異を導入することにより酵素活性（例えば、遺伝子編集活性）を向上させたエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼが提供される。また、ヌクレアーゼ活性を低下又は解消したエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質（例えば、d C a s 1 2 b）が提供される。また、（野生型又はエンジニアリングされた） C a s 1 2 b ヌクレアーゼとともに使用された場合、C a s 1 2 b 酵素活性（例えば、遺伝子編集活性）を向上させることができる、エンジニアリングされた足場配列を有するエンジニアリングされたガイドRNA（gRNA）が提供される。また、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質、前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又はエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質を使用する方法、及び／又はエンジニアリングされた gRNA が提供される。

10

【0029】

Ⅰ. 定義

特に定義されない限り、本明細書で用いられるすべての技術的及び科学的用語は、当業者が一般的に理解する意味と同じ意味を有する。

20

【0030】

本明細書で使用される場合、「C a s 1 2 b タンパク質」という用語は、最も広い意味で用いられ、親又は参照 C a s 1 2 b タンパク質（例えば、S E Q I D N O : 1 の A a C a s 1 2 b タンパク質を含む）、その誘導体又はバリエーション（例えば、エンジニアリングされた C a s 1 2 b、d C a s 1 2 b、又はエンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質）、及びオリゴヌクレオチド結合断片などのその機能断片を含む。

【0031】

本明細書で使用される場合、「エフェクタータンパク質」とは、部位特異的結合活性、一本鎖DNA切断若しくは編集活性、二本鎖DNA切断若しくは編集活性、一本鎖RNA切断若しくは編集活性、又は転写制御活性などの活性を有するタンパク質を意味する。

30

【0032】

本明細書で使用される場合、「ガイドRNA」及び「gRNA」は、交換的に使用することができる、C a s 1 2 b ヌクレアーゼ又はエフェクタータンパク質及び標的核酸（例えば、二重螺旋DNA）と複合体を形成することができるRNAを意味する。ガイドRNAは、単一のRNA分子を含んでもよく、2つ以上のRNA分子における相補領域のハイブリダイズによって互いに会合した2つ以上のRNA分子を含んでもよい。デュアルRNAガイド C a s ヌクレアーゼ（例えば、C a s 1 2 b）と組み合わせて使用する場合、ガイドRNAはc rRNA及びt r a c rRNA、又はシングルガイドRNA（s gRNA）を含む。「c rRNA」又は「C R I S P R RNA」は、標的核酸（例えば、二重螺旋DNA）の標的配列と十分な相補性を有するガイド配列を含み、C R I S P R 複合体が標的核酸の配列に特異的に結合するようにガイドする。前記「t r a c rRNA」又は「トランス活性化C R I S P R RNA」は、c rRNAに部分的に相補的であり、塩基対を形成し、c rRNAの成熟過程において役割を果たすことができる。「シングルガイドRNA」又は「s gRNA」は、c rRNA及びt r a c rRNAとを単一分子で融合させたエンジニアリングされたガイドRNAである。

40

【0033】

本明細書で使用される場合、「C R I S P R アレイ」という用語は、C R I S P R 繰り返し配列及びスペーサー領域を含む核酸（例えば、DNA）断片を意味し、最初のC R I S P R 繰り返し配列の最初のヌクレオチドから始まり、最後の（末端）C R I S P R 繰り返し配列の最後のヌクレオチドで終わる。

50

返し配列の最後のヌクレオチドで終了する。一般に、C R I S P Rアレイ内の各スペーサー領域は、2つの繰り返し配列の間に位置する。本明細書で使用される場合、「C R I S P R繰り返し配列」又は「C R I S P R直接繰り返し配列」又は「直接繰り返し配列」は、C R I S P Rアレイにおける配列変化がほとんどない又は無い複数の短い直接繰り返し配列を意味する。好適には、V-I直接繰り返し配列がステム・ループ構造を形成してもよい。

【0034】

本明細書で使用される場合、「ドナーテンプレート核酸」又は「ドナーテンプレート」は、交換的に使用することができ、本明細書に記載のC R I S P R酵素が標的核酸を変化させた後、1つ又は複数の細胞タンパク質によって標的核酸の構造を変化させることができる核酸分子を意味する。いくつかの例では、ドナーテンプレート核酸は二本鎖核酸である。いくつかの例では、ドナーテンプレート核酸は一本鎖核酸である。いくつかの例では、ドナーテンプレート核酸は線状である。いくつかの例では、ドナーテンプレート核酸は環状（例えば、プラスミド）である。いくつかの例では、ドナーテンプレート核酸は外因性核酸分子である。いくつかの例では、ドナーテンプレート核酸は内因性核酸分子（例えば、染色体）である。

【0035】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」及び「ヌクレオチド配列」という用語は、交換的に使用することができ、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、それらの組み合わせ、及び類似物を含む任意の長さのヌクレオチドの重合形態を指す。「オリゴヌクレオチド」及び「オリゴ」は、交換的に使用することができ、長さが約50ヌクレオチド以下の短いポリヌクレオチドを指す。

【0036】

本明細書で使用される場合、「相補性」とは、従来のワトソン-クリック塩基対合によって、1つの核酸が他の核酸と水素結合を形成する能力を指す。相補性パーセントとは、第2核酸と水素結合（すなわち、ワトソン-クリック塩基対合）を形成することができる核酸分子中の残基のパーセント（例えば、10個中約5、6、7、8、9、10個、それぞれ約50%、60%、70%、80%、90%及び100%相補）を表す。「完全に相補的」とは、1つの核酸配列の連続する全ての残基が、別の核酸配列の連続する同数の残基と水素結合を形成することを意味する。本明細書で使用される「実質的に相補的」とは、約40、50、60、70、80、100、150、200、250又はそれ以上のヌクレオチドの領域において、相補程度が少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%のうちのいずれかであるか、又は2つの核酸がストリンジェンス条件下でハイブリダイズすることを意味する。

【0037】

本明細書で使用されるハイブリダイズの「ストリンジェンス条件」とは、標的配列に相補的な核酸が主として標的配列にハイブリダイズし、非標的配列にほとんどハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェンス条件は、通常、配列に依存し、さまざまな要因によって変化する。一般に、配列が長いほど、その配列が標的配列に特異的にハイブリダイズする温度が高くなる。ストリンジェンス条件の非限定的な例は、Tijssen (1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay,」 Elsevier, N, Y. に詳細に記載されている。

【0038】

「ハイブリダイズ」とは、1つ又は複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化された複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対合、フーグスティーン (Hoogsteen) 結合、又はそ

10

20

30

40

50

つの他の成分を少なくとも実質的に含まないことを意味する。

【0044】

本明細書で使用される場合、「オルトログ (orthologue)」又は「オルトログ (ortholog)」という用語は、当業者が通常理解する意味を有する。さらに、本明細書で言及されるタンパク質の「オルトログ」とは、異なる種に属するタンパク質であり、そのオルトログであるタンパク質と同一又は類似の機能を有するタンパク質を意味する。

【0045】

本明細書で使用される場合、「同一性」という用語は、2つのポリペプチド間又は2つの核酸間の配列マッチングを意味するために用いられる。比較対象の2つの配列におけるある位置が同一の塩基又はアミノ酸モノマーサブユニットによって占められている場合（例えば、2つのDNA分子のそれぞれの位置がアデニンによって占められている場合、又は2つのポリペプチドのそれぞれの位置がリジンによって占められている場合）、各分子はその位置において同じである。2つの配列間の「同一性パーセント」は、2つの配列が共有するマッチングする位置の数を比較する位置の数 $\times 100$ で割った関数である。例えば、2つの配列の10個の位置のうち6個の位置がマッチングする場合、2つの配列は60%の同一性を有する。例えば、DNA配列CTGACTとCAGGTTは50%の同一性を共有している（合計6個の位置のうち3個の位置がマッチングしている）。一般に、このような比較は、2つの配列が最大の同一性を生み出すように整列されたときに行われる。このようなアライメントは、例えば、コンピュータプログラム（例えば、Alignプログラム (DNASTAR, Inc.) などの）によって簡単に行うことができる、Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453の方法によって実現することができる。また、ALIGNプログラム (バージョン2.0) に統合されたE. MeyersとW. Millerのアルゴリズム (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)) を用いて、PAM 120重み付き残基テーブルを用いてもよい。2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ギャップ長ペナルティ12とギャップペナルティ4を用いて決定される。さらに、GCGソフトウェアパッケージ (www.gcg.comに入手可能) に統合されたGAPプログラムのNeedleman 及びWunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) アルゴリズムを用いて、Blossum 62行列又はPAM250行列とギャップ重み16、14、12、10、8、6又は4と長さ重み1、2、3、4、5又は6を用いて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを決定することができる。

【0046】

本明細書で使用される場合、「細胞」は、特定の個々の細胞だけでなく、その細胞の子孫又は潜在的な子孫を意味する。変異又は環境の影響により、後続世代において特定の修飾が起こることができるので、そのような子孫は実際に親細胞と同じではない可能性があるが、ここで用いられる用語の範囲に含まれる。

【0047】

本明細書で使用される場合、「形質導入」及び「トランスフェクション」という用語は、目的のタンパク質又は分子を発現するために、感染試薬（例えば、ウイルス）又は他の手段を用いて細胞にDNAを導入するために、当該分野で知られているすべての方法を含む。ウイルス又はウイルス様試薬に加えて、リン酸カルシウム、デンドリマー、リポソーム又はカチオン性ポリマー（例えば、DEAE-デキストラン又はポリエチレンジアミン）を用いた方法などの化学的トランスフェクション方法；エレクトロポレーション、細胞押し出し (cell squeezing)、ソノポレーション、フォトトランスフェクション、穿刺感染、プロトプラスト融合、プラスミド送達、トランスポゾン等の非化学的方法；遺伝子銃、磁気トランスフェクション又は磁気支援トランスフェクション、粒子衝撃等の粒子に基づく方法；ヌクレオフェクション等のハイブリダイズ方法等が挙げられる。

【0048】

本明細書で使用される「トランスフェクション」又は「形質転換」又は「形質導入」という用語は、外来性核酸を宿主細胞に移送又は導入するプロセスを指す。「トランスフェクション」又は「形質転換」又は「形質導入」された細胞は、外来性核酸によってトランスフェクション、形質転換、又は形質導入された細胞である。

【0049】

「インビボ」とは、細胞を取得した生物の体内であることを意味する。「エクスビボ」又は「インビトロ」とは、細胞を取得した生体の体外であることを意味する。

【0050】

本明細書で使用される場合、「治療」又は「処置」は、有益又は望ましい結果（臨床的結果を含む）を得る方法である。本願の目的のために有益又は望ましい臨床結果としては、疾患に起因する1つ又は複数の症状の緩和、疾患の程度の低減、疾患の安定化（例えば、疾患の進行の防止又は遅延）、疾患の拡大（例えば、転移）の防止又は遅延、疾患の再発の防止又は遅延、疾患の再発率の低下、疾患の進行の遅延又は低減、疾患の状態の改善、疾患の緩和（一部又は全部）の提供、疾患の治療に必要な他の1つ又は複数の薬物の用量の減少、疾患の進行の遅延、生活の質の向上、及び／又は生存期間の延長のうちの1つ又は複数が含まれるが、それらに限定されない。「治療」は、がんの病理的結果を減らすことも含む。本願の方法は、それらの治療の態様のいずれか1つ又は複数を考慮する。

【0051】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、特定の病症、病状又は疾患を治療（例えば、その1つ又は複数の症状を改善、軽減、弱める、及び／又は遅延させる）するのに十分な化合物又は組成物の量を指す。当該分野で理解されているように、「有効量」は、1つ又は複数の用量であってもよい、すなわち、望ましい治療終点を達成するために単一又は複数の用量が必要とされてもよい。

【0052】

治療目的で用いられるとき、「被験者」、「個体」又は「患者」は、本明細書で交換的に使用することができ、哺乳動物（ヒト；家畜及び農場動物；犬、馬、猫、ハムスター、モルモット、ウサギ、サル、羊、牛など、動物園、スポーツ、又はペット動物を含む）、鳥、爬虫類、魚などの任意の動物を指す。いくつかの実施形態において、個体はヒト個体である。

【0053】

本明細書に記載された本願の実施形態には、「から構成される」及び／又は「実質的にから構成される」実施形態が含まれることが理解されるべきである。

【0054】

本明細書において、値又はパラメータの「約」との言及は、その値又はパラメータそのものに対する変化を含む（及び記述する）。例えば、「約X」の記述には、「X」の記述も含まれる。

【0055】

本明細書で使用される場合、値又はパラメータ「ではない」との言及は、通常、値又はパラメータの「以外」を意味して記述する。例えば、この方法がX型がんの治療に用いられないとは、この方法がX型以外のがんの治療に用いられることを意味する。

【0056】

本明細書で使用される「約X～Y」とは、「約X～約Y」と同じ意味を有する。

【0057】

本明細書及び添付される請求の範囲において使用される場合、単数形式「一」、「1つ」、及び「該（the）」は、文脈が特に明示的に規定しない限り、複数の参照を含む。また、特許請求の範囲は、任意の要素を除外するように書かれてもよいことに留意すべきである。したがって、この声明は、特許請求の範囲の要素を記述する際に、「のみ」、「唯一」などの専用用語を使用するか、又は「否定的」な制限を使用するための先行基礎となることを意図している。

【0058】

10

20

30

40

50

本明細書において、「A及び／又はB」において使用される「及び／又は」という用語は、AとB、A又はB、A（単独）、及びB（単独）を含むことを意図している。同様に、本明細書において、「A、B、及び／又はC」において使用される「及び／又は」という用語は、A、B、及びC；A、B又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；及びC（単独）の各実施形態を包含することを意図している。

【0059】

当業者は、ウラシルを「u」で及びチミンを「t」で表す代わりに、ウラシル及びチミンの両方を「t」で表すことができることを理解する。リボ核酸の文脈において、特に明記されない限り、「t」はウラシルを表すと理解されるべきである。

10

【0060】

II. Cas12bヌクレアーゼ及びエフェクタータンパク質

本願は、標的結合、二本鎖切断活性、ニッカーゼ活性、及び／又は遺伝子編集活性などの活性を向上させたエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ及びエフェクタータンパク質を提供する。また、ヌクレアーゼ活性を低下又は解消するエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ（dCas12b）が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体のいずれかを含む、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質（例えば、Cas12bヌクレアーゼ、Cas12bニッカーゼ、Cas12b融合エフェクタータンパク質、又は切断Cas12bエフェクタータンパク質）が提供される。

20

【0061】

エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ

本願は、一態様において、活性（例えば、標的結合、二本鎖切断活性、ニッカーゼ活性、及び／又は遺伝子編集活性）を改善したエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質を提供する。

【0062】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対して1つ、2つ、又は3つのタイプの変異を含み、前記変異は、（1）参照Cas12bヌクレアーゼにおいてプロト Spacer 隣接モチーフ（PAM）と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）への置換、及び／又は（2）参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖（dsDNA）の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、F、Y、W）へ置換、及び／又は（3）参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）又は疎水性アミノ酸残基（例えば、F、Y、W、M）への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、天然に存在する野生型Cas12bヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、天然バリエーションCas12bヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、アリシクロパチルス・アシドフィルス（AaCas12b）由来のCas12bヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼと比較して向上した活性（例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上向上）（例えば、標的結合、二本鎖切断活性、ニッカーゼ活性、及び／又は遺伝子編集活性）を有する。

30

40

【0063】

エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、以下のセクションA～Cに記載

50

された1つ又は複数の変異を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、本願における1つ又は複数の変異は、既知のCas12b変異のいずれか（例えば、以下のセクションDに記載された変異）と結合して、活性を改善したエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼを生成してもよい。

【0064】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、1つ又は複数の変異は、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R又はK）への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、前記1つ又は複数の変異は、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、W、Y又はF）への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、前記1つ又は複数の変異は、参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R又はK）への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、前記1つ又は複数の変異は、参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの疎水性アミノ酸残基（例えば、W、Y、F又はM）への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、前記1つ又は複数の変異は、1) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）への置換、及び2) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、F、Y、W）への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、前記1つ又は複数の変異は、1) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えばR、H、K）への置換、及び2) 参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えばR、H、K）又は疎水性アミノ酸残基（例えばF、Y、W、M）への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、前記1つ又は複数の変異は、1) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸残基（例えばF、Y、W）への置換、及び2) 参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えばR、H、K）又は疎水性アミノ酸残基（例えばF、Y、W、M）への置換を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む。

【0066】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、前記1つ又は複数の変異は、1) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてP

A Mと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）への置換、2）参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてDNAの二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、F、Y、W）への置換、及び3）参照C a s 1 2 bヌクレアーゼのR u v Cドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）への置換を含む、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照C a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 1のアミノ酸配列を含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、参照C a s 1 2 bヌクレアーゼに対する1つ又は複数の変異を含み、前記1つ又は複数の変異は、1）参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてP A Mと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）への置換、2）参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてDNA二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、F、Y、W）への置換、及び3）参照C a s 1 2 bヌクレアーゼのR u v Cドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互参照する1つ又は複数のアミノ酸残基からの疎水性アミノ酸残基（例えば、F、Y、W、M）への置換を含む、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼが提供される。いくつかの実施形態において、参照C a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 1のアミノ酸配列を含む。

【0068】

本明細書に記載された変異は、参照C a s 1 2 bヌクレアーゼの構造に基づいて設計され得る。Yang H., et al. Cell 167:1814-1828 (2016) 及びLiu L. et al. Mol. Cell 65:310-322 (2017) には、アリシクロバチルス・アシドテレストリス (Alicyclobacillus acidoterrestris) Cas12bとsgRNAが結合されて二元複合体が得られ、さらに標的DNAに結合されて三元複合体の結晶構造が得られることが記載されている。簡単に言えば、前記結晶構造は、2つの不連続なREC（認識、残基15～386、658～783）とNUC（ヌクレアーゼ、残基1～14、387～658、及び784～1129）ローブを示し、各ローブ（lobe）はいくつかのドメインから構成される。前記crRNA（又はシングルガイドRNA、sgRNA）は、2つのローブ間の中央通路に結合される。PAM認識は配列特異的であり、主にREC1（helical-1）及びWED-II（OBD-II）ドメインとの相互作用を介して起こる。sgRNA-標的DNAヘテロ二本鎖は、主に配列が独立するようにRECローブに結合される。

【0069】

BhCas12b (SEQ ID NO: 59)、Bs3Cas12b (SEQ ID NO: 56)、LsCas12b (SEQ ID NO: 58)、SbCas12b (SEQ ID NO: 60)、AkCas12b (SEQ ID NO: 54)、AmCas12b (SEQ ID NO: 55)、BsCas12b (SEQ ID NO: 57)、及びDiCas12bなどの他のCas12bオルトログは、AaCas12b (SEQ ID NO: 1) および本明細書に記載の他の例示的な参照Cas12bタンパク質と同様のドメイン構造を有し、そして、エンジニアリングされたAaCas12bタンパク質は、本明細書に記載される例示的なエンジニアリングされたAaCas12bタンパク質に対応する切断位置を使用して、いずれかのオルソログに基づいて設計してもよいことが理解されるべきである。対応位置とは、2つのポリペプチドのアミノ酸配列が互いに整列しているときに、この2つのポリペプチドにおける位置が互いに揃っていることを意味する。本願の図8を参照する。さらに、Teng F. et al., Cell Discovery (2019) 5:23の図S2は、AaCas12b、AkCas12b、AmCas12b、Bs3Cas12b、BsCas12b、LsCas12b、BhCas12b、及びSbCas12bのアライメントを提供し、その全体は

引用により本願に組み込まれている。

【0070】

A. 参照Cas12bにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）への置換を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、1、2、3、4、5又は6個のアミノ酸置換を含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造においてPAMから15 Å（例えば、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1又はそれ以下のいずれか以内）Å以内のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造においてPAMから10 Å以内のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造においてPAMから9 Å以内のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、PAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び475の位置のうちの1つ又は複数に位置する。いくつかの実施形態において、PAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D116、K123、D130、D132、N144、K145、E153、D173、Q222、D395、N400、及びE475のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、PAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D116及びE475のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

【0072】

本願の文脈において、D116とは、引用されたアミノ酸配列における116番目のアミノ酸D（アスパラギン酸）を指す。一般的に使用されるアミノ酸の3文字の略語と1文字の略語は以下の通りである。

【0073】

Ala (A)	Leu (L)	Gln (Q)	Ser (S)
Arg (R)	Lys (K)	Glu (E)	Thr (T)
Asn (N)	Met (M)	Gly (G)	Trp (W)
Asp (D)	Phe (F)	His (H)	Tyr (Y)
Cys (C)	Pro (P)	Ile (I)	Val (V)

【0074】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸は位置Xにあり、アミノ酸はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる」とは、参照酵素Cas12bのアミノ酸配列とSEQ ID NO: 1とを配列相同性に基づいてアライメントしたとき、SEQ ID NO: 1におけるX位置に対応する、参照酵素Cas12bのある位置にあるアミノ酸残基を指す。例えば、図8は、Cas12bオルトログのアミノ酸配列（SEQ ID NO: 1及び54～60）の相同性アラインメントを示す。当業者は、Clustal Omegaなどの公知のソフトウェアを用いて、任意の参照Cas12bヌクレアーゼのアミノ酸

配列をSEQ ID NO: 1とアライメントし、SEQ ID NO: 1の位置Xに対応するアミノ酸位置を決定することができる。

【0075】

いくつかの実施形態において、正電荷を帯びたアミノ酸残基は、R、H又はKである。いくつかの実施形態において、正電荷を帯びたアミノ酸残基はRである。いくつかの実施形態において、正電荷を帯びたアミノ酸残基はKである。

【0076】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換は、D116R、K123R、D130R、D132R、N144R、K145R、E153R、D173R、Q222R、D395R、N400R、及びE475Rの置換のうちの1つ又は複数である。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換は、D116R及びE475Rの置換のうちの1つ又は複数である。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、D116R変異を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、E475R変異を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

【0077】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 2又は3のアミノ酸配列と少なくとも約85%の配列同一性（例えば、少なくとも約87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性のいずれか）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 2又は3のアミノ酸配列を含む。

【0078】

B. 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸残基への置換

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、F、Y、W）への置換を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、1、2、3、4、5又は6個のアミノ酸残基の置換を含む。

【0079】

いくつかの実施形態において、DNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基は、PAMにおいて標的鎖の3'末端に対する最後の塩基対と相互作用する。例えば、AaCas12bが認識するPAM配列は、5'-TTN-3'塩基対である。PAMにおいて標的鎖の3'末端に対する最後の塩基対は、PAM配列の3'末端のN塩基で形成された塩基対であり、その後には標的部位の配列が続く。

【0080】

いくつかの実施形態において、DNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基は、Q118及びQ119のような118及び119の位置のうちの1つ又は複数に位置する。いくつかの実施形態において、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

【0081】

いくつかの実施形態において、芳香環を有するアミノ酸残基はY、F又はWである。いくつかの実施形態において、DNA二重鎖の開裂に関与するアミノ酸残基は、F、Y又はWで置換される。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、i) Q118Y、Q118F、又はQ118W；及び／又はii) Q119Y、Q119F又はQ119Wのいずれかを含む。いくつかの実施形態において、アミ

10

20

30

40

50

ノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

【0082】

いくつかの実施形態において、前記参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つまたは複数のアミノ酸残基からの芳香環を有するアミノ酸への置換は、Q119Y、Q119FまたはQ119Wである。いくつかの実施形態において、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

【0083】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 4、5又は6のアミノ酸配列と少なくとも約85%の配列同一性（例えば、少なくとも約88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性のいずれか）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 4、5又は6のアミノ酸配列を含む。

【0084】

C. 参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいて一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基又は疎水性アミノ酸残基への置換

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてRuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）への置換を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてRuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの疎水性アミノ酸残基（例えば、F、Y、W、M）への置換を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、1、2、3、4、5又は6個のアミノ酸残基の置換を含む。

【0085】

いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造において一本鎖DNA基質から15 Å（例えば、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1又はそれ以下のいずれか以内）以内にある。いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造において一本鎖DNA基質から10 Å以内にある。いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造において一本鎖DNA基質から9 Å以内にある。

【0086】

RuvCドメインは、Cas12bタンパク質の活性ドメインであり、一本鎖DNA又は二本鎖DNAの切断を担当する。タンパク質の一次配列において、RuvCドメインは、第1RuvCドメイン（RuvC-1）、第2RuvCドメイン（RuvC-II）及び第3RuvCドメイン（RuvC-III）を含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、300、301、304、329、636、639、647、682、757、758、761、764、768、852、854、856、857、858、860、862、863、865、866、867、869、938、956、957、958、994、1093、及び1097の位置のうちの1つ又は複数に位置する。いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D300、K301、E304、N329、E636、Q639、T647、Q682、I757、E758、E761、E764、K768、E852、Q854、N856、N857、D858、P86

0、S862、E863、N865、Q866、L867、Q869、E938、E956、G957、E958、I994、Q1093、及びW1097のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D300、K301、E636、Q639、T647、Q682、I757、E758、E761、K768、Q854、N857、D858、N865、Q866、Q869、I994、Q1093、及びW1097のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、RuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、E636、I757、E758、E761、Q854、N857、D858、N865、Q866、Q869、及びQ1093のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

10

【0088】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてRuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）への置換を含む。いくつかの実施形態において、正電荷を帯びたアミノ酸残基はRである。いくつかの実施形態において、正電荷を帯びたアミノ酸残基はKである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、D300R、K301R、E304R、N329R、E636R、Q639R、T647R、Q682R、I757R、E758R、E761R、E764R、K768R、E852R、Q854R、N856R、N857R、D858R、P860R、S862R、E863R、N865R、Q866R、L867R、Q869R、E938R、E956R、G957R、E958R、I994R、Q1093R、W1097R、E636K、Q639K、T647K、Q682K、I757K、E758K、E761K、Q854K、N857K、D858K、N865K、Q866K、I994K、Q1093K、及びW1097Kの置換のうちの1つ又は複数を含み、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、D300R、K301R、E636R、Q639R、T647R、Q682R、I757R、E758R、E761R、K768R、Q854R、N857R、D858R、N865R、Q866R、I994R、Q1093R、W1097R、E636K、Q639K、T647K、Q682K、I757K、E758K、E761K、Q854K、N857K、D858K、N865K、I994K、Q1093K、及びW1097Kの置換のうちの1つ又は複数を含み、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、E636R、I757R、E758R、E761R、Q854R、D858R、E636K、I757K、E758K、E761K、Q854K、N857K、及びD858Kの置換のうちの1つ又は複数を含み、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、E636R、I757R、E758R、E761R、Q854R、及びD858Rの置換のうちの1つ又は複数を含み、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、E636K、I757K、E758K、E761K、Q854K、N857K、及びD858Kの置換のうちの1つ又は複数を含み、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

20

30

40

【0089】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼにおいてRuvCドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基の置換は、E636R、I757R、E758R、E761R、Q854R、N857K、及びD858Rの置換のうちの1つ又は複数であり、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従

50

って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 7 ~ 1 3のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性（例えば、少なくとも約88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性のいずれか）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 7 ~ 1 3のアミノ酸配列のいずれかを含む。
【0090】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてR u v Cドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基からの疎水性アミノ酸残基への置換を含む。いくつかの実施形態において、前記疎水性アミノ酸残基は、A、M、L、I、V、C、Y、F又はWである。いくつかの実施形態において、前記疎水性アミノ酸残基はW、Y、F又はMである。いくつかの実施形態において、前記疎水性アミノ酸残基はW、Y又はMである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、i) E 7 5 8 W、E 7 5 8 Y、E 7 5 8 F又はE 7 5 8 M、ii) E 7 6 1 W、E 7 6 1 Y、E 7 6 1 F又はE 7 6 1 M、iii) E 8 6 3 W、E 8 6 3 Y、E 8 6 3 F又はE 8 6 3 M、iv) N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、N 8 6 5 F又はN 8 6 5 M、v) Q 8 6 6 W、Q 8 6 6 F、Q 8 6 6 Y又はQ 8 6 6 M、vi) Q 8 6 9 W、Q 8 6 9 Y、Q 8 6 9 F又はQ 8 6 9 M、vii) E 9 5 6 W、E 9 5 6 Y、E 9 5 6 F又はE 9 5 6 M、及びviii) Q 1 0 9 3 W、Q 1 0 9 3 F、Q 1 0 9 3 Y又はQ 1 0 9 3 Mの置換のうちの1つ又は複数を含み、アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、i) E 7 5 8 W、E 7 5 8 Y又はE 7 5 8 M、ii) E 7 6 1 Y、iii) N 8 6 5 W、N 8 6 5 F又はN 8 6 5 Y、iv) Q 8 6 6 M、v) Q 8 6 9 M、及びvi) Q 1 0 9 3 W、Q 1 0 9 3 F、Q 1 0 9 3 Y又はQ 1 0 9 3 Mの置換のうちの1つ又は複数を含み、アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、i) N 8 6 5 W又はN 8 6 5 Y、ii) Q 8 6 6 M、iii) Q 8 6 9 M、及びiv) Q 1 0 9 3 W又はQ 1 0 9 3 Yの置換のうちの1つ又は複数を含み、アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、8 6 5 W、8 6 5 Y、8 6 6 M、8 6 9 M、1 0 9 3 W、及び1 0 9 3 Yの置換のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてR u v Cドメイン内に位置し、一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基の置換は、N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、Q 8 6 6 M、Q 8 6 9 M、Q 1 0 9 3 W、及びQ 1 0 9 3 Yの置換のうちの1つ又は複数である。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、Q 8 6 6 M及びQ 8 6 9 M置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1に従って番号付けされる。

【0091】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 1 4 ~ 2 0のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性（例えば、少なくとも約88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性のいずれか）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O : 1 4 ~ 2 0のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0092】

D. その他の変異

上記セクションA～Cに記載されたいずれか1つ又は複数の変異は、標的結合、標的特異性、二本鎖切断活性、ニッカーゼ活性、及び／又は遺伝子編集活性などのC a s 1 2 b活性を向上させる、既知のいずれか1つ又は複数の変異と組み合わせてもよい。例示的な

変異は、以下の文献WO2022120520、WO2022040909、WO2022042557、CN113308451A、及びCN112195164Aに記載されており、それらの内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。

【0093】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bタンパク質は、N末端からC末端まで、第1WEDドメイン(WED-I)、第1RECドメイン(REC1)、第2WEDドメイン(WED-II)、第1RuvCドメイン(RuvC-I)、BHドメイン、第2RECドメイン(REC2)、第2RuvCドメイン(RuvC-II)、第1Nucドメイン(Nuc-I)、第3RuvCドメイン(RuvC-III)、及び第2Nucドメイン(Nuc-II)のうちの1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、他の1つ又は複数の変異(例えば、挿入、欠失、置換)が、1つ又は複数のそのようなドメインに存在してもよい。

10

【0094】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、参照Cas12bヌクレアーゼにおける柔軟性領域の柔軟性を向上させる1つ又は複数の柔軟性領域変異をさらに含む。参照Cas12bヌクレアーゼにおける柔軟性領域は、当該分野で知られている任意の方法を用いて決定することができる。いくつかの実施形態において、複数の柔軟性領域は、参照酵素のアミノ酸配列のみに基づいて決定される。いくつかの実施形態において、複数の柔軟性領域は、例えば、二次構造、結晶構造、NMR構造等を含む、参照酵素の構造情報に基づいて決定される。

20

【0095】

いくつかの実施形態において、複数の柔軟性領域は、PredyFlexy、FoldUnfold、PROFbval、Flexserv、FlexPred、DynaMine、及びDisomineの群から選択されるプログラムを用いて決定される。いくつかの実施形態において、複数の柔軟性領域はランダムクリンプ(random crimp)に位置する。いくつかの実施形態において、複数の柔軟性領域は、参照Cas12bヌクレアーゼのDNA及び／又はRNA相互作用ドメインに位置する。いくつかの実施形態において、柔軟性領域の長さは、少なくとも約5(例えば、5)アミノ酸である。

【0096】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、1つ又は複数の変異を含み、前記変異は、アミノ酸残基855～859の柔軟性領域の柔軟性を向上させ、前記アミノ酸残基は、SEQ ID NO: 1に従って番号付けされ、参照Cas12bヌクレアーゼと比較して、(少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍又はそれ以上)向上させた活性(例えば、標的結合、二本鎖切断活性、ニッカーゼ活性、及び／又は遺伝子編集活性)を有する。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼはAaCas12bである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、1つ又は複数の変異は、柔軟性領域に1つ又は複数(例えば、2つ)のG残基を挿入することを含む。いくつかの実施形態において、前記1つ又は複数のG残基は、柔軟性領域における柔軟性アミノ酸残基のN末端に挿入され、柔軟性アミノ酸残基は、G、S、N、D、H、M、T、E、Q、K、R、A、及びPからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、前記柔軟性アミノ酸残基は、G>S>N>D>H>M>T>E>Q>K>R>A>Pのプリファレンスに従って選択される。いくつかの実施形態において、前記1つ又は複数の変異は、柔軟性領域における疎水性アミノ酸残基をG残基で置換することを含み、前記疎水性アミノ酸残基は、L、I、V、C、Y、F及びWからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、柔軟性を向上させる1つ又は複数の変異は、N856Gを含む。

30

40

【0097】

E. 変異の組み合わせ

50

本明細書のセクションA～Dに記載の方法を用いて、例示的な配列表の複数のアミノ酸置換を組み合わせ得られるエンジニアリングされた酵素は、いずれも本願の範囲内である。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、上記セクションA～Dに記載された1つ又は複数の変異（例えば、置換）を含む。

【0098】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、(1) 116、(2) 475、(3) 119及び475、(4) 119、475、及び758、(5) 119、(6) 636、(7) 757、(8) 758、(9) 761、(10) 768、(11) 858、(12) 854、(13) 857、(14) 119、475、及び758、(15) 768、(16) 757及び758、(17) 757及び761、(18) 757及び768、(19) 758及び761、(20) 758及び768、(21) 761及び768、(22) 757、758、及び761、(23) 757、758、及び768、(24) 757、761及び768、(25) 758、761、及び768、(26) 757、758、761、及び768、(27) 865、(28) 866、(29) 869、(30) 1093、及び(31) 866及び869のアミノ酸残基位置のいずれかにおける置換又は置換の組み合わせを含み、アミノ酸位置番号はSEQ ID NO: 1に対するものである。

10

【0099】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、(1) D116、(2) E475、(3) Q119及びE475、(4) Q119、E475、及びE758、(5) Q119、(6) E636、(7) I757、(8) E758、(9) E761、(10) K768、(11) D858、(12) Q854、(13) N857、(14) Q119、E475、及びE758、(15) K768、(16) I757及びE758、(17) I757及びE761、(18) I757及びK768、(19) E758及びE761、(20) E758及びK768、(21) E761及びK768、(22) I757、E758、及びE761、(23) I757、E758、及びK768、(24) I757、E761及びK768、(25) E758、E761、及びK768、(26) I757、E758、E761、及びK768、(27) N865、(28) Q866、(29) Q869、(30) Q1093、及び(31) Q866及びQ869のアミノ酸残基のいずれかにおける置換又は置換の組み合わせを含み、アミノ酸位置番号は、SEQ ID NO: 1に対するものである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、(1) Q866+Q869、(2) Q119+E475、及び(3) Q119+E475+E758のアミノ酸残基のいずれかにおける置換又は置換の組み合わせを含み、アミノ酸残基は、SEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。いくつかの実施形態において、アミノ酸位置D116及び／又はE475における置換は、正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R又はK）による置換である。いくつかの実施形態において、アミノ酸位置Q119における置換は、芳香族側鎖を有するアミノ酸残基（例えば、Y、F又はW）による置換である。いくつかの実施形態において、アミノ酸位置E636、I757、E758、E761、K768、Q854、D858、及び／又はN857における置換は、正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R又はK）による置換である。いくつかの実施形態において、アミノ酸位置N865、Q866、Q869及び／又はQ1093における置換は、疎水性アミノ酸残基（例えば、W、Y又はM）による置換である。

20

30

40

【0100】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、(1) 116R、(2) 475R、(3) 119F及び475R、(4) 119F、475R、及び758R、(5) 119Y、(6) 119F、(7) 119W、(8) 636R、(9) 757R、(10) 758R、(11) 761R、(12) 854R、(13) 857K、(14) 768R、(15) 757R及び758R、(16) 757R及び761R、(17) 757R及び768R、(18) 758R及び761R、(19) 7

50

5 8 R 及び 7 6 8 R、(20) 7 6 1 R 及び 7 6 8 R、(21) 7 5 7 R、7 5 8 R、及び 7 6 1 R、(22) 7 5 7 R、7 5 8 R、及び 7 6 8 R、(23) 7 5 7 R、7 6 1 R、及び 7 6 8 R、(24) 7 5 8 R、7 6 1 R、及び 7 6 8 R、(25) 7 5 7 R、7 5 8 R、7 6 1 R、及び 7 6 8 R、(26) 8 6 5 W、(27) 8 6 5 Y、(28) 8 6 6 M、(29) 8 6 9 M、(30) 1 0 9 3 W、(31) 1 0 9 3 Y、(32) 8 6 6 M 及び 8 6 9 M、及び (33) 8 5 8 R のアミノ酸残基のいずれか 1 つ若しくは複数、又はそれらの組み合わせを含み、アミノ酸位置番号は、S E Q I D N O : 1 に対するものである。

【0101】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、(1) D 1 1 6 R、(2) E 4 7 5 R、(3) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R、(4) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R、(5) Q 1 1 9 Y、(6) Q 1 1 9 F、(7) Q 1 1 9 W、(8) I 7 5 7 R、(9) E 7 5 8 R、(10) E 7 6 1 R、(11) K 7 6 8 R、(12) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R、(13) I 7 5 7 R + E 7 6 1 R、(14) I 7 5 7 R + K 7 6 8 R、(15) E 7 5 8 R + E 7 6 1 R、(16) E 7 5 8 R + K 7 6 8 R、(17) E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(18) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + E 7 6 1 R、(19) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + K 7 6 8 R、(20) I 7 5 7 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(21) E 7 5 8 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(22) I 7 5 7 R + E 7 5 8 R + E 7 6 1 R + K 7 6 8 R、(23) Q 8 6 6 M、(24) Q 8 6 9 M、(25) Q 8 6 6 M + Q 8 6 9 M、(26) E 6 3 6 R、(27) Q 8 5 4 R、(28) N 8 5 7 K、(29) N 8 6 5 W、(30) N 8 6 5 Y、(31) Q 1 0 9 3 W、(32) Q 1 0 9 3 Y、及び (33) D 8 5 8 R の置換のいずれか又はそれらの組み合わせを含み、アミノ酸位置番号は、S E Q I D N O : 1 に対するものである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、(1) Q 8 6 6 M + Q 8 6 9 M、(2) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R、及び (3) Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R の置換のいずれか又はそれらの組み合わせを含み、アミノ酸残基は、S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる。

【0102】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、D 1 1 6 R、K 1 2 3 R、D 1 3 0 R、D 1 3 2 R、N 1 4 4 R、K 1 4 5 R、E 1 5 3 R、D 1 7 3 R、Q 2 2 2 R、D 3 9 5 R、N 4 0 0 R、及び E 4 7 5 R の置換のうちの 1 つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、Q 1 1 8 Y、Q 1 1 8 F、Q 1 1 8 W、Q 1 1 9 Y、Q 1 1 9 F、及び Q 1 1 9 W の置換のうちの 1 つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、D 3 0 0 R、K 3 0 1 R、E 3 0 4 R、N 3 2 9 R、E 6 3 6 R、Q 6 3 9 R、T 6 4 7 R、Q 6 8 2 R、I 7 5 7 R、E 7 5 8 R、E 7 6 1 R、E 7 6 4 R、K 7 6 8 R、E 8 5 2 R、Q 8 5 4 R、N 8 5 6 R、N 8 5 7 R、D 8 5 8 R、P 8 6 0 R、S 8 6 2 R、E 8 6 3 R、N 8 6 5 R、Q 8 6 6 R、L 8 6 7 R、Q 8 6 9 R、E 9 3 8 R、E 9 5 6 R、G 9 5 7 R、E 9 5 8 R、I 9 4 4 R、Q 1 0 9 3 R、及び W 1 0 9 7 R の置換のうちの 1 つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、E 6 3 6 K、Q 6 3 9 K、T 6 4 7 K、Q 6 8 2 K、I 7 5 7 K、E 7 5 8 K、E 7 6 1 K、Q 8 5 4 K、N 8 5 7 K、D 8 5 8 K、N 8 6 5 K、Q 8 6 6 K、I 9 9 4 K、Q 1 0 9 3 K、及び W 1 0 9 7 K の置換のうちの 1 つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、E 7 5 8 W、E 7 5 8 Y、E 7 5 8 F、E 7 5 8 M、E 7 6 1 W、E 7 6 1 Y、E 7 6 1 F、E 7 6 1 M、E 8 6 3 W、E 8 6 3 Y、E 8 6 3 F、E 8 6 3 M、N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、N 8 6 5 F、N 8 6 5 M、Q 8 6 6 W、Q 8 6 6 Y、Q 8 6 6 F、Q 8 6 6 M、Q 8 6 9 W、Q 8 6 9 Y、Q 8 6 9 F、Q 8 6 9 M、E 9 5 6 W、E 9 5 6 Y、E 9 5 6 F、E 9 5 6 M、Q 1 0 9 3 W、Q 1 0 9 3 Y、Q 1 0 9 3 F、及び Q 1 0 9 3 M の置換のうちの 1 つ又は複数を含む。いくつか

の実施形態において、アミノ酸位置番号はSEQ ID NO: 1に対するものである。

【0103】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、Q866及びQ869におけるアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、Q866M及びQ869Mのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸位置番号はSEQ ID NO: 1に対するものである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 20のアミノ酸配列と少なくとも約85%の配列同一性（例えば、少なくとも約88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性のいずれか）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む。

10

【0104】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、Q119及びE475におけるアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、Q119F及びE475Rのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸位置番号はSEQ ID NO: 1に対するものである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列と少なくとも約85%の配列同一性（例えば、少なくとも約88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性のいずれか）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含む。

20

【0105】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、Q119、E475及びE758におけるアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、Q119F、E475R及びE758Rのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸位置番号はSEQ ID NO: 1に対するものである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 22のアミノ酸配列と少なくとも約85%の配列同一性（例えば、少なくとも約88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性のいずれか）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 22のアミノ酸配列を含む。

30

【0106】

参照Cas12bヌクレアーゼ

いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、AaCas12b、又はそのオルトログである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、天然に存在するCas12bヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは野生型Cas12bヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼである。

40

【0107】

本願のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ及びエフェクタータンパク質を提供するために、様々な生物由来のCas12bヌクレアーゼを参照Cas12bヌクレアーゼとすることができる。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは酵素活性を有する。いくつかの実施形態において、参照Cas12bは、標的二重螺旋核酸（例えば、二重螺旋DNA）の両鎖を切断するヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12bは、標的二重螺旋核酸（例えば、二重螺旋DNA）の一本鎖を切断するニッカーゼである。いくつかの実施形態において、参照Cas12b

50

ヌクレアーゼは酵素的に非活性である（例えば、dCas12b）。Cas12b又はその機能的誘導体と一定の配列同一性（例えば、少なくとも約60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%又はそれ以上）を有するオルトログは、本願のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はエフェクタータンパク質を設計する基礎とすることができる。いくつかの実施形態において、参照Cas12bヌクレアーゼは変異体Cas12bであるが、上記セクションA～Eに記載された変異のいずれも含まない。

【0108】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、天然に存在するCas12bヌクレアーゼの機能バリエーションに基づくものである。いくつかの実施形態において、前記機能バリエーションは、アミノ酸置換、挿入及び／又は欠失などの1つ又は複数の変異を有する。例えば、機能バリエーションは、天然に存在する野生型のCas12bヌクレアーゼと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のアミノ酸置換を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ又は複数の置換は保存的な置換である。いくつかの実施形態において、機能バリエーションは、天然に存在するCas12bヌクレアーゼの全てのドメインを有する。いくつかの実施形態において、機能バリエーションは、天然に存在するCas12bヌクレアーゼの1つ又は複数のドメインを有しない。

【0109】

V-B型CRISPR-Cas12b（C2c1とも呼ばれる）系は、Cas9及びCas12aとは異なる特徴を持つ、デュアルRNAガイド（すなわち、crRNA及びtracrRNA）のDNAエンドヌクレアーゼ系として同定されている（Shmakov, S. et al. Mol. Cell 60, 385-397 (2015)）。まず、Cas12bがcrRNA／tracrRNA二本鎖体と再構成されると、インビトロでPAM部位の遠位端に交差端を生成することが報告された。次に、Cas12bのRuvCドメインはCas9及びCas12aのRuvCドメインと類似しているが、仮定Nucドメインは、Cas9のHNHドメイン及びCas12aのNucドメインと配列又は構造的に類似していない。さらに、Cas12bタンパク質は、最も広く使用されているSpCas9及びCas12aよりも小さい（例えば、AacCas12b：1,129アミノ酸（aa）；SpCas9：1,369個のaa；AscCas12a：1,353個のaa；LbCas12a：1,228個のaa）、これにより、遺伝子治療においてCas12bがアデノ随伴ウイルス（AAV）媒介のインビボ送達に適している。Cas12bは、小さいサイズのCas9タンパク質（例えば、SaCas9及びCjCas9）に比べて、より簡単なPAM配列（例えば、AacCas12b：5'-TTN-3'）を認識し、これにより、ゲノムにおけるCas12bの標的範囲がSaCas9：5'-NNGRRT-3'、CjCas9：5'-NNNNRYAC-3'と比較して大幅に増加した。さらに、Cas12bはオフターゲット効果が最小であるため、治療や臨床応用のより安全な選択肢とすることができる。

【0110】

本願のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質を提供するために、様々な生物由来のCas12b（C2c1）ヌクレアーゼを参照Cas12bヌクレアーゼとすることができる。例示的なCas12bヌクレアーゼは、例えば、Shmakov, S. et al. Mol. Cell 60, 385-397 (2015)、Shmakov, S. et al. Nat. Rev. Microbiol. 15, 169-182 (2017)、WO2016205764、及びWO2020087631に記載されており、それらの内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。

【0111】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、参照Cas12bタンパク質（例えば、参照Cas12bヌクレアーゼ）に基づくものであり、前記参照Cas12bタンパク質は、アリシクロバチルス・アシディフ

ィルス由来のCas12b蛋白(AaCas12b)、アリシクロバチルス・カケガウェンシス由来のCas12b(AkCas12b)、アリシクロバチルス・マクロスポランギダス由来のCas12b(AmCas12b)、バチルス・ヒサシ由来のCas12b(BhCas12b)、バチルス属由来のBsCas12b、バチルス属由来のBs3Cas12b、デサルフォビブリオ・イノピナトゥス(Desulfovibrio inopinatus)由来のCas12b(DiCas12b)、ラセエラ・セディミニス由来のCas12b(LsCas12b)、スピロヘータ菌由来のCas12b(SbCas12b)、ツベリバチルス・カリダス(Tuberibacillus calidus)由来のCas12b(TcCas12b)、及びそれらの機能的誘導体から選択される。天然に存在するCas12bタンパク質の配列は、例えばUniProtKB ID: T0D7A2、A0A6I3SPI6、及びA0A6I7FUC4で知られており、それらは全体として引用により本明細書に組み込まれている。

10

【0112】

いくつかの実施形態において、参照Cas12bタンパク質は、アリシクロバチルス・アシディフィルス(AaCas12b)由来のCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体である。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、参照Cas12bタンパク質に基づくものであり、この参照Cas12bタンパク質は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列と少なくとも約85%（例えば、少なくとも約88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%のいずれか）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む参照Cas12bヌクレアーゼに基づく。

20

【0113】

なお、参照Cas12bタンパク質又はその断片と一定の配列同一性（例えば、少なくとも約60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%又はそれ以上のいずれか）を有するオルトログは、本願のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質を設計する基礎とすることができる。当業者は、目的及び用途に応じて、本願で使用するのに適したCas12bオルトログ又はその断片の配列同一性パーセントを決定することができる。配列同一性値を決定する方法は、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 及びSequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)に記載されている。WO2020/087631には、様々なCas12bオルトログが記載されており、その内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、参照Cas12bタンパク質に基づくものであり、前記参照Cas12bタンパク質は、SEQ ID NO: 54~60のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも約85%（例えば、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%のいずれか）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

【0114】

50

エンジニアリングされた Cas 1 2 b の活性

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼは、参照 Cas 1 2 b ヌクレアーゼと比較して向上した活性を有する。いくつかの実施形態において、活性は標的 DNA 結合活性である。いくつかの実施形態において、活性は、部位特異的ヌクレアーゼ活性である。いくつかの実施形態において、活性は二本鎖 DNA 切断活性である。いくつかの実施形態において、活性は、例えば、部位特異的 DNA 切断活性又は非特異的 DNA 切断活性を含む一本鎖 DNA 切断活性である。いくつかの実施形態において、活性は、部位特異的 RNA 切断活性又は非特異的 RNA 切断活性のような一本鎖 RNA 切断活性である。いくつかの実施形態において、活性はインビトロで測定される。いくつかの実施形態において、活性は、例えば、細菌細胞、植物細胞、又は真核細胞などの細胞において測定される。いくつかの実施形態において、活性は、哺乳動物細胞（例えば、げっ歯動物細胞又はヒト細胞）において測定される。いくつかの実施形態において、活性は、ヒト細胞（例えば、293T細胞）において測定される。いくつかの実施形態において、活性は、マウス細胞（例えば、Hepa1-6細胞）において測定される。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼは、参照 Cas 1 2 b ヌクレアーゼと比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍又はそれ以上の高い活性のいずれかを有する。エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼの部位特異的ヌクレアーゼ活性は、本明細書に提供される事例に記載されたように、PCR、シーケンシング、又はゲル移動アッセイを含む、当該分野で公知の方法を用いて測定することができる。

10

20

【0115】

いくつかの実施形態において、活性は、細胞における遺伝子編集活性である。いくつかの実施形態において、細胞は、細菌細胞、植物細胞又は真核細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞、例えばげっ歯動物細胞又はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は293T細胞である。いくつかの実施形態において、前記活性は、マウス細胞（例えば、Hepa1-6細胞）において測定される。いくつかの実施形態において、活性は、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼによる標的核酸の部位特異的切断及び非相同末端結合（NHEJ）機構によるDNA修復など、細胞内の標的ゲノム部位における挿入／欠失形成活性である。いくつかの実施形態において、活性は、細胞内の標的ゲノム部位に外来性核酸配列の挿入、例えば、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼによる標的核酸の部位特異的切断及び相同組換え（HR）機構によるDNA修復である。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼによる切断後の相同組換えは、さらにドナーテンプレートの導入を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼは、参照 Cas 1 2 b ヌクレアーゼと比較して、細胞（例えば、ヒト細胞、293T細胞又はマウスHepa1-6細胞）のゲノム部位において、少なくとも約20%（例えば、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍又はそれ以上のいずれか）の向上した遺伝子編集活性（例えば、挿入／欠失形成）を有する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼは、参照 Cas 1 2 b ヌクレアーゼよりも多くの数（例えば、2、3、4、5、10、20、50、100又はそれ以上）のゲノム部位を編集することができる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼの共有PAM配列は、参照 Cas 1 2 b ヌクレアーゼと同じである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼは、参照 Cas 1 2 b ヌクレアーゼと比較して、より多く（例えば、1、2、3、4、5、10、20、50、100又はそれ以上）のPAM配列を認識する。

30

40

【0116】

細胞におけるエンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼの切断又は遺伝子編集

50

効率は、例えば、T7エンドヌクレアーゼ1 (T7E1) アッセイ、PCR、標的DNAシーケンシング (例えば、サンガー配列及び第2世代シーケンシングを含む)、欠失追跡挿入及び欠失 (TIDE) アッセイ、又はアンプリコン解析による挿入／欠失検出 (IDAA) アッセイを含む、当該分野で知られている任意の方法を用いて決定することができる。例えば、Sentmanat MF et al., 「A survey of validation strategies for CRISPR-Cas9 editing,」 Scientific Reports, 2018, 8, article number 888を参照し、その内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。いくつかの実施形態において、例えば、本明細書の実施例に記載されているように、細胞におけるエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼの遺伝子編集効率は、標的次世代シーケンシング (NGS) を用いて測定される。エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼの切断又は遺伝子編集効率を決定するためのゲノム部位としては、CCR5、AAVS、CD34、RNF2、SCN9A、HBG1／2及びEMX1が含まれるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼは、ヒト細胞ゲノムにおける参照Cas12bヌクレアーゼの平均切断又は遺伝子編集効率と比較して、少なくとも約1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、100又はそれ以上の遺伝子座を切断又は編集することができる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼの切断又は遺伝子編集効率 (例えば、挿入／欠失率) は、参照Cas12bヌクレアーゼの少なくとも約10%、20%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍又はそれ以上である。

10

20

【0117】

エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質

本願はまた、本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、バリエーション (例えば、dCas12b) 又は機能的誘導体のいずれかに基づくエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、バリエーション、又は機能的誘導体のいずれかを含む (又はそれらから構成される、若しくは実質的にそれらから構成される)。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、以下の「機能的誘導体」セクションに記載された機能的誘導体のいずれかのような、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼの機能的誘導体を含む。

30

【0118】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は酵素活性を有する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、標的二本鎖核酸 (例えば、二本鎖DNA) の両鎖を切断するヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、標的二本鎖核酸 (例えば、二本鎖DNA) の一本鎖を切断するニッカーゼである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ (dCas12b) の酵素不活性変異体を含む。Cas12bヌクレアーゼ活性部位における1つ又は複数のアミノ酸残基の変異は、触媒的に死んだCas12b (dCas12b) を引き起こすことができる。例えば、AaCas12b (SEQ ID NO: 1) のD570A、E848A、R785A、E848A、R911A、及び／又はD977A変異体は、ヒト細胞におけるヌクレアーゼ活性が有意に低下した (例えば、少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上のいずれかの低下) 又はない。例えば、Teng F. et al., Cell Discovery, 4, Article number: 63 (2018) を参照し、その内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。いくつかの実施形態において、エンジニアリン

40

50

グされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、A a C a s 1 2 b の D 5 7 0 A、E 8 4 8 A、R 7 8 5 A、E 8 4 8 A、R 9 1 1 A 及び D 9 7 7 A に対する 1 つ又は複数の変異を有するエンジニアリングされた C a s 1 2 b を含む。いくつかの実施形態において、D 5 7 0 A、E 8 4 8 A、R 7 8 5 A、E 8 4 8 A、R 9 1 1 A 及び D 9 7 7 A からなる群から選択される 1 つ又は複数の変異が、Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R 変異を含む A a C a s 1 2 b にさらに導入される。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼの酵素不活性変異体は、S E Q I D N O : 7 9 ~ 8 1 のアミノ酸配列のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、A a C a s 1 2 b の R 7 8 5 A 変異に対応する変異を有するエンジニアリングされた C a s 1 2 b を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、A a C a s 1 2 b の R 9 1 1 A 変異に対応する変異を有するエンジニアリングされた C a s 1 2 b を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、A a C a s 1 2 b の D 9 7 7 A 変異に対応する変異を有するエンジニアリングされた C a s 1 2 b を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、A a C a s 1 2 b の E 8 4 8 A 変異に対応する変異を有するエンジニアリングされた C a s 1 2 b を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、A a C a s 1 2 b の D 5 7 0 A 変異に対応する変異を有するエンジニアリングされた C a s 1 2 b を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、A a C a s 1 2 b の D 5 7 0 A + E 8 4 8 A 変異又は A a C a s 1 2 b の D 5 7 0 A + D 9 7 7 A 変異に対応する変異を有するエンジニアリングされた C a s 1 2 b を含む。

10

20

30

40

50

【0119】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ニッカーゼが提供される。いくつかの実施形態において、翻訳開始ドメイン、転写リプレッサードメイン（例えば、K r u p p e l 関連ボックス（K R A B）ドメイン）、トランス活性化ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、核酸塩基編集ドメイン（例えば、シトシン塩基エディター（C B E）又はアデニン塩基エディター（A B E）ドメイン）、逆転写酵素ドメイン、レポータードメイン（例えば、蛍光ドメイン）、又はヌクレアーゼドメイン（例えば、Z F N ドメイン）などの機能ドメインに融合した、エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ、そのバリエーション又は機能的誘導体を含む、エンジニアリングされた C a s 1 2 b 融合エフェクタータンパク質が提供される。いくつかの実施形態において、シトシンデアミナーゼドメイン又はアデノシンデアミナーゼドメインに融合した、本明細書に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ（例えば、S E Q I D N O : 7 9 ~ 8 1 のいずれか）の触媒的に非活性バリエーションのいずれかを含む、エンジニアリングされた C a s 1 2 b 塩基エディターが提供される。いくつかの実施形態において、K R A B ドメイン又はその機能断片（例えば、Z I M 3 K R A B ドメイン（S E Q I D N O : 7 2））に融合した、本明細書に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ（例えば、S E Q I D N O : 7 9 ~ 8 1 のいずれか）の触媒的に非活性バリエーションのいずれかを含む、エンジニアリングされた C a s 1 2 b 塩基エディターが提供される。いくつかの実施形態において、逆転写酵素ドメインに融合した、本明細書に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ（例えば、S E Q I D N O : 7 9 ~ 8 1 のいずれか）の触媒的に非活性バリエーションのいずれかを含む、エンジニアリングされた C a s 1 2 b プライムエディターが提供される。いくつかの実施形態において、切断 C a s 1 2 b エフェクタータンパク質系が提供される。

【0120】

バリエーション／機能的誘導体

本願はまた、本明細書に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼのバリエーション及び機能的誘導体のいずれかを提供する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼの機能バリエーションのいずれ

かを含む（又はそれらから構成される、若しくは実質的にそれらから構成される）エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質が提供される。いくつかの実施形態において、機能バリエーションのアミノ酸配列は、対応するエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ（例えば、SEQ ID NO: 2～22のいずれか）のアミノ酸配列と比較して、少なくとも1つのアミノ酸残基の違い（例えば、欠失、挿入、置換、及び／又は融合）を有する。いくつかの実施形態において、機能バリエーションは、アミノ酸の置換、挿入及び／又は欠失などの1つ又は複数の変異を有する。例えば、機能バリエーションは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のアミノ酸置換のいずれかを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ又は複数の置換は保存的な置換である。いくつかの実施形態において、機能バリエーションは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼの全てのドメインを有する。いくつかの実施形態において、機能バリエーションは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼの1つ又は複数のドメインを有しない。

10

【0121】

本明細書に記載のCas12bバリエーションタンパク質（例えば、ニックアーゼCas12bタンパク質、不活性又は触媒的に不活性化されたCas12b（dCas12b）、融合Cas12b）のいずれかについて、前記Cas12bバリエーションは、本明細書に記載されたCas12bタンパク質配列のいずれかと同じパラメータ（例えば、ドメイン、配列同一性パーセントなど）を含んでいてもよい。

【0122】

Cas12b機能バリエーションにおける例示的な変異は、WO2016205764、WO2016205749及びWO2020/087631に記載されており、それらの内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。

20

【0123】

触媒活性

いくつかの実施形態において、機能バリエーションは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼの非変異形態と比較して異なる触媒活性を有する。いくつかの実施形態において、変異（例えば、アミノ酸の置換、挿入及び／又は欠失）は、Cas12bエフェクタータンパク質の触媒ドメイン（例えば、RuvCドメイン）内に位置する。いくつかの実施形態において、バリエーションは、複数の触媒ドメインにおける変異を含む。二本鎖標的核酸の一方の鎖を切断するが、他方の鎖を切断しないCas12bエフェクタータンパク質は、本明細書において「ニックアーゼ」（例えば、「ニックアーゼCas」）と呼ばれる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼのニックアーゼ変異体を含む（又はそれらから構成される、若しくは実質的にそれらから構成される）。実質的にヌクレアーゼ活性を有しないCas12bタンパク質を、本明細書では、デッドCas12bタンパク質（「dCas12b」）と呼ぶ（ただし、Cas12bエフェクタータンパク質を融合させる場合、ヌクレアーゼ活性は、後述する異種ポリペプチド（融合パートナー）によって提供されてもよい）。いくつかの実施形態において、Cas12bエフェクタータンパク質は、変異Cas12bのDNA切断活性が、変異していない形態よりも約25%、20%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%またはそれ以下のいずれかのDNA切断活性が低い場合、実質的に全てのDNA切断活性を欠くと考えられる。

30

40

【0124】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼはdCas12bである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12b機能バリエーションは、AaCas12b（SEQ ID NO: 1）のD570Aに対応する変異を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12b機能バリエーションは、AaCas12bのE848Aに対応する変異を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12b機能バリエーションは、AaCas12bのR785Aに対応する変異を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリング

50

された Cas 12 b 機能バリエーションは、AaCas12b の E848A に対応する変異を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b 機能バリエーションは、AaCas12b の R991A に対応する変異を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b 機能バリエーションは、AaCas12b の D977A に対応する変異を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b 機能バリエーションは、BthCas12b の D573A に対応する変異を含む。いくつかの実施形態において、AaCas12b の触媒活性のない又は実質的に活性のないバリエーション (Q119F + E475R + E758R) は、D570A、E848A 及び D977A からなる群から選択される 1 つ又は複数の置換をさらに含み、前記アミノ酸位置は SEQ ID NO: 22 に対応する。いくつかの実施形態において、dCas12b は SEQ ID NO: 79 ~ 81 のアミノ酸配列のいずれかを含む。

10

【0125】

切断 Cas 12 b エフェクタータンパク質

本明細書に記載された CRISPR-Cas 12 b システムは、本節における切断 Cas 12 b 部分を含む任意の一对のポリペプチド (本明細書において「切断 Cas 12 b ポリペプチド」ともいう) を含むことができる。例示的な切断 Cas 12 b タンパク質系は、例えば、PCT/CN2020/111057 及び PCT/CN2021/114339 に記載されており、それらの内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。

【0126】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas ヌクレアーゼ、その機能バリエーション又は機能的誘導体 (本節では、「親 Cas 12 b タンパク質」とも呼ばれる) のいずれかの N 末端部分を含む第 1 ポリペプチドと、エンジニアリングされた Cas ヌクレアーゼ、そのバリエーション、又はその機能的誘導体の C 末端部分を含む第 2 ポリペプチドと、を含み、前記第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドは、ガイド配列を含むガイド RNA の存在下で相互に会合し、ガイド配列に相補的な標的配列を含む標的核酸に特異的に結合する CRISPR 複合体を形成する、切断 Cas 12 b エフェクタータンパク質が提供される。いくつかの実施形態において、前記第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドは、それぞれ二量化ドメインを含む。いくつかの実施形態において、前記第 1 二量化ドメイン及び第 2 二量化ドメインは、誘導剤 (例えば、ラパマイシン) の存在下で互いに会合する。いくつかの実施形態において、前記第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドは、いずれの二量化ドメインも含まない。いくつかの実施形態において、切断 Cas 12 b エフェクタータンパク質は自己誘導である。

20

30

【0127】

切断 Cas 12 b 部分は、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼ、そのバリエーション又は機能バリエーションに基づいて設計される。

【0128】

Cas 12 b タンパク質は、複数の構造ドメインを有する。いくつかの実施形態において、親 Cas 12 b タンパク質は、N 末端から C 末端まで、第 1 WED ドメイン (WED-I; OBD-I ドメインとも呼ばれる)、第 1 REC ドメイン (REC1)、第 2 WED ドメイン (WED-II; OBD-II ドメインとも呼ばれる)、第 1 RuvC ドメイン (RuvC-I)、ブリッジヘリックス (BH) ドメイン、第 2 RuvC ドメイン (RuvC-II)、第 1 Nuc ドメイン (Nuc-I; UK-I ドメインとも呼ばれる)、第 3 RuvC ドメイン (RuvC-II)、及び第 2 Nuc ドメイン (Nuc-II; UK-II ドメインとも呼ばれる) を含む。ドメイン境界は、天然に存在する Cas 12 b タンパク質の結晶構造 (例えば、AaCas12b の PDB ID 番号: 5U30、5U31、5U33、5U34、及び 5WQE)、及び/又は親 Cas 12 b タンパク質の既知の機能ドメインとの配列相同性に基づいて、当該分野で公知の方法を用いて決定することができる。いくつかの実施形態において、AaCas12b は、WEB-I ドメイン (アミノ酸残基 1 ~ 14)、REC1 ドメイン (アミノ酸残基 15 ~ 386)、WED-

40

50

I Iドメイン（アミノ酸残基387～518）、RuvC-Iドメイン（アミノ酸残基519～628）、BHドメイン（アミノ酸残基629～658）、REC2ドメイン（アミノ酸残基659～783）、RuvC-IIドメイン（アミノ酸残基784～900）、Nuc-Iドメイン（アミノ酸残基901～974）、RuvC-IIIdメイン（アミノ酸残基975～993）、及びNuc-IIドメイン（アミノ酸残基994～1129）を有し、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

【0129】

2つの切断Cas12b部分が実質的に機能的Cas12bを含むため、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション、又は機能的誘導体が切断される。Cas12bは、二本鎖核酸の一本鎖又は二本鎖を切断するヌクレアーゼなどのゲノム編集酵素（標的DNA及びガイドRNAと複合体を形成する場合）として機能することができる。あるいは、触媒ドメインの典型的な変異により、触媒活性がほとんどないか、あるいは触媒活性が全くないDNA結合タンパク質である触媒的に死んだCas12b（dCas12b）であってもよい。参照Cas12b活性部位の1つ又は複数のアミノ酸残基の変異は、AaCas12bのD570A、E848A、R785A、E848A、R911A及び／又はD977A変異体のような、触媒的に死んだCas12bをもたらすことができる。

【0130】

本明細書に記載の切断Cas12b部分は、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション又は機能的誘導体（本明細書では、「親Cas12bタンパク質」と呼ばれる。SEQ ID NO: 2～22及びSEQ ID NO: 79～81のいずれか）（例えば、全長Cas12bタンパク質又はその機能バリエーション）が、親Cas12bタンパク質のN末端部分がC末端部分から分離する点である切断位置において半分に分割されるように設計されている。いくつかの実施形態において、前記N末端部分は、アミノ酸残基1～Xを含み、前記C末端部分は、アミノ酸残基X+1から親Cas12bタンパク質のC末端までを含む。この例では、番号は連続しているが、これは必ずしも必要というわけではなく、これは、再構成されたCas12bタンパク質の十分なDNA結合活性が保持され、必要に応じて、親Cas12bタンパク質と比較して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上のDNAニッカーゼ又は二本鎖切断活性が保持されながら、アミノ酸（又はそれらをコードするヌクレオチド）は、いずれかの切断端の末端からトリミングされ、及び／又はポリペプチド鎖の内部領域における変異（例えば、挿入、欠失、置換）も考えられるためである。

【0131】

本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼに対して、いくつかのN-及び／又はC-末端の切断又は欠失、及び／又は内部変異を有する切断Cas12b部分も考えられる。当業者は、例えば標準的な配列アライメントツールを用いて、本明細書に記載の例示的な切断Cas12bポリペプチドに関する情報を使用して、他のCas12bタンパク質及び機能バリエーションに基づいて対応する切断Cas12bポリペプチドを設計するために容易に使用することができる。

【0132】

切断位置は、例えば、リング内のような柔軟性領域内に位置してもよい。好ましくは、アミノ酸配列の中断が構造的特徴（例えば、 α ヘリックス又は β シート）の部分的又は完全な破壊につながる場所で、切断位置が発生する。非構造化領域（結晶構造に表示されない領域、結晶内で「凍結」するのに十分に構造化されていないため、結晶構造に表示されない領域）が一般的に好ましい選択である。切断は、親Cas12bタンパク質の表面に露出した非構造化領域で行われ得ることが考えられる。

【0133】

いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、ガイドRNA及び／又は標的RNAとの相互作用に関与するアミノ酸残基又はその近傍（例えば、約10、8、6、5、4、3、2又は1のアミノ酸残基以内）で切断されていない。例えば、AaCas

12bタンパク質のアミノ酸残基4～9、118～122、143～144、442～446、573～574、742～746、753～754、792～796、800～819、835～839、897～900及び973～978は、シングルガイドRNA及び／又は標的DNAとの相互作用に参与し、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。

【0134】

いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基516～793に対応するアミノ酸残基内のアミノ酸残基で切断されており、その番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、WED-Iドメイン及びRuvC-Iドメインに接するアミノ酸残基で切断されている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基516～519に対応するアミノ酸残基内のアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、BHドメイン及びREC2ドメインに接するアミノ酸残基で切断されている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基621～627に対応するアミノ酸残基内のアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、REC2ドメイン及びRuvC-Iドメインに接するアミノ酸残基で切断されている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基777～793に対応するアミノ酸残基内のアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質はRC2ドメイン内で切断されている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基659～664、676～684、又は702～706に対応するアミノ酸残基内のアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。

【0135】

いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基518に対応するアミノ酸残基から約20個以下（例えば、約18、16、14、12、10、8、7、6、5、4、3、2又は1のいずれか）のアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基518に対応するアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基658に対応するアミノ酸残基から約20以下（例えば、約18、16、14、12、10、8、7、6、5、4、3、2又は1のいずれか）のアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基658に対応するアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基783に対応するアミノ酸残基から約20個以下（例えば、約18、16、14、12、10、8、7、6、5、4、3、2又は1のいずれか）のアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、AaCas12bタンパク質のアミノ酸残基783に対応するアミノ酸残基で切断されており、番号はSEQ ID NO: 1に基づいている。

【0136】

いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質のN末端部分は、AaCas12bタンパク質のWED-I、REC1、WED-II、RuvC-I、及びBHドメインを含み、親Cas12bタンパク質のC末端部分は、AaCas12bタンパク質の

REC2、RuvC-II、Nuc-I、RuvC-II I、及びNuc-IIドメインを含む。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質のN末端部分は、親Cas12bタンパク質の1～658番目のアミノ酸残基を含み、親Cas12bタンパク質のC末端部分は、親Cas12bタンパク質の659～1129番目のアミノ酸残基を含み、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

【0137】

いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質のN末端部分は、親Cas12bタンパク質のWED-I、REC1、WED-II、RuvC-I、BH及びREC2ドメインを含み、親Cas12bタンパク質のC末端部分は、親Cas12bタンパク質のRuvC-II、Nuc-I、RuvC-II I及びNuc-IIドメインを含む。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質のN末端部分は、親Cas12bタンパク質の1～783番目のアミノ酸残基を含み、親Cas12bタンパク質のC末端部分は、親Cas12bタンパク質の784～1129番目のアミノ酸残基を含み、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

10

【0138】

いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質のN末端部分は、親Cas12bタンパク質のWED-I、REC1、WED-II、RuvC-I、及びBHドメインを含み、親Cas12bタンパク質のC末端部分は、親Cas12bタンパク質のRuvC-II、Nuc-I、RuvC-II I、及びNuc-IIドメインを含み、親Cas12bタンパク質のREC2ドメインは、親Cas12bタンパク質のN末端部分と親Cas12bタンパク質のC末端部分との間で切断されている。

20

【0139】

いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質のN末端部分は、親Cas12bタンパク質のWED-I、REC1、及びWED-IIドメインを含み、親Cas12bタンパク質のC末端部分は、親Cas12bタンパク質のRuvC-I、BH、REC2、RuvC-II、Nuc-I、RuvC-II I、及びNuc-IIドメインを含む。いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質のN末端部分は、親Cas12bタンパク質の1～518番目のアミノ酸残基を含み、親Cas12bタンパク質のC末端部分は、親Cas12bタンパク質の519～1129番目のアミノ酸残基を含み、アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる。

30

【0140】

切断点は通常、コンピュータ上で設計され、構築物にクローニングされる。2つの切断Cas12b部分、すなわちN末端部分及びC末端部分は、組み合わせて機能的Cas12bタンパク質を形成し、好ましくは、親Cas12bタンパク質の少なくとも約70%又はそれ以上のアミノ酸配列、例えば、親Cas12bタンパク質の少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又はそれ以上のアミノ酸配列のいずれかを含む。いくつかのトリミングと変異が予想される。非機能ドメインは完全に削除できる。すべての切断Cas12bシステムに対して、2つの切断Cas12b部分を一緒に組み合わせ、所望のCas12b機能を回復又は再構成することができる。再構成されたCas12bタンパク質又はCRISPR複合体(Cas12b+ガイドRNA複合体)の活性は、当該分野で公知の方法を用いて評価することができる。例えば、T7エンドヌクレアーゼI(T7EI)アッセイを用いて細胞内のヌクレアーゼ活性を評価することができる。遺伝子編集活性はDNAシーケンシングによっても評価することができる。

40

【0141】

いくつかの実施形態において、親Cas12bタンパク質は、3、4、5又は6のような2つ以上の部分に切断される。

【0142】

切断Cas12bエフェクタータンパク質は、それぞれ1つ又は複数の二量化ドメインを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記第1ポリペプチドは、第1切断

50

C a s 1 2 b エフェクター部分に融合した第 1 二量化ドメインを含み、前記第 2 ポリペプチドは、第 2 切断 C a s 1 2 b エフェクター部分に融合した第 2 二量化ドメインを含む。前記二量化ドメインは、ペプチドリinker（例えば、G S リンカーなどの柔軟性ペプチドリinker）又は化学結合を介して、切断 C a s 1 2 b エフェクター部分に融合してもよい。いくつかの実施形態において、二量化ドメインは、切断 C a s 1 2 b エフェクター部分の N 末端に融合する。いくつかの実施形態において、二量化ドメインは、切断 C a s 1 2 b エフェクター部分の C 末端に融合する。

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態において、切断 C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、二量化ドメインを含まない。

【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態において、前記二量化ドメインは、2つの切断 C a s 1 2 b エフェクター部分の会合を促進する。いくつかの実施形態において、切断 C a s 1 2 b エフェクター部分は、誘導剤によって機能的 C a s 1 2 b エフェクタータンパク質への会合又は二量化を誘導する。いくつかの実施形態において、切断 C a s 1 2 b エフェクタータンパク質は、誘導可能な二量化ドメインを含む。いくつかの実施形態において、二量化ドメインは誘導可能な二量化ドメインではない、すなわち、二量化ドメインは誘導剤の存在なしに二量化する。

【 0 1 4 5 】

誘導剤は、誘導エネルギー源、又はガイド RNA 以外の誘導分子（例えば s g RNA）であってもよい。誘導剤は、二量化ドメインの二量化を誘導することによって、2つの切断 C a s 1 2 b エフェクター部分を機能的 C a s 1 2 b エフェクタータンパク質に再構成する作用を有する。いくつかの実施形態において、誘導剤は、誘導可能な二量化ドメインの誘導会合によって2つの切断 C a s 1 2 b エフェクター部分を結合する。いくつかの実施形態において、誘導剤がなければ、2つの切断 C a s 1 2 b エフェクター部分は、機能的 C a s 1 2 b エフェクタータンパク質として再構築するために互いに会合しない。いくつかの実施形態において、誘導剤が存在しない場合、2つの切断 C a s 1 2 b エフェクター部分は、ガイド RNA（例えば s g RNA）の存在下で機能的 C a s 1 2 b エフェクタータンパク質に再構成することができる。

【 0 1 4 6 】

本願の誘導剤は、熱、超音波、電磁エネルギーや化合物であってもよい。いくつかの実施形態において、誘導剤は抗生物質、小分子、ホルモン、ホルモン誘導体、ステロイド又はステロイド誘導体である。いくつかの実施形態において、誘導剤は、アブシシン酸（A B A）、ドキシサイクリン（D O X）、キュマート（c u m a t e）、ラパマイシン、4-ヒドロキシタモキシフェン（4 O H T）、エストロゲン、又はエクジソンである。いくつかの実施形態において、切断 C a s 1 2 b エフェクター系は、抗生物質に基づく誘導系、電磁エネルギーに基づく誘導系、小分子に基づく誘導系、核内受容体に基づく誘導系、及びホルモンに基づく誘導系からなる群から選択される誘導剤制御系である。いくつかの実施形態において、切断 C a s 1 2 b エフェクター系は、テトラサイクリン（T e t）／D O X 誘導系、光誘導系、A B A 誘導系、キュマート（c u m a t e）リプレッサー／オペロン系、4 O H T／エストロゲン誘導系、エクジソンに基づく誘導系、及び F K B P 1 2／F R A P（F K B P 1 2-ラパマイシン複合体）誘導系からなる群から選択される誘導物制御系である。このような誘導剤は、本明細書及び P C T／U S 2 0 1 3／0 5 1 4 1 8 においても議論されており、その内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。F R B／F K B P／ラパマイシン系は P a u l m u r u g a n a n d G a m b h i r, C a n c e r R e s, A u g u s t 1 5, 2 0 0 5 6 5; 7 4 1 3; 及び C r a b t r e e e t a l., C h e m i s t r y & B i o l o g y 1 3, 9 9-1 0 7, J a n 2 0 0 6 に記載されており、それぞれの内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態において、切断 Cas 1 2 b エフェクタータンパク質対は、二量化ドメイン（例えば、FRB 及び FKBP）の二量化が誘導されるまで分離され、非活性的であり、それにより、機能的 Cas 1 2 b エフェクターヌクレアーゼの再組み立てにつながる。いくつかの実施形態において、誘導可能な二量体の第 1 半分（例えば、FRB）を含む第 1 切断 Cas 1 2 b エフェクタータンパク質は、誘導可能な二量体の第 2 半分（例えば、FKBP）を含む第 2 切断 Cas 1 2 b エフェクタータンパク質とは別に送達され、及び／又は別に局在化される。

【0148】

本明細書に記載の誘導剤により制御される分断 Cas 1 2 b エフェクター系に使用可能な他の例示的な FKBP に基づく誘導系には、FK506 の存在下でカルシニーリン A（CNA）と二量化する FKBP、FKCsA の存在下で CyP-Fas と二量化する FKBP、ラパマイシンの存在下で FRB と二量化する FKBP、クマイシンの存在下で GryB と二量化する GryrB、ジベレリンの存在下で GID1 と二量化する GAI、HaxS の存在下で HaloTag と二量化する Snap-tag が含まれるが、それらに限定されない。

10

【0149】

FKBP ファミリー自体の代替案も考えられる。例えば、FK1012 の存在下で、FKBP はホモ二量化（すなわち、1 つの FKBP が他の FKBP と二量化）を起こす。

【0150】

いくつかの実施形態において、二量化ドメインは FKBP であり、誘導剤は FK1012 である。いくつかの実施形態において、二量化ドメインは GryB であり、誘導剤はクマイシンである。いくつかの実施形態において、二量化ドメインは ABA であり、誘導剤はジベレリンである。

20

【0151】

いくつかの実施形態において、切断 Cas 1 2 b エフェクター部分は、誘導剤の存在なしで機能的 Cas 1 2 b エフェクタータンパク質に会合／二量化するために、自動誘導（すなわち、自動活性化又は自己誘導）され得る。いかなる理論や仮説に拘束されることなく、切断 Cas 1 2 b エフェクター部分の自動誘導は、ガイド RNA（例えば、sgRNA）への結合によって媒介され得る。いくつかの実施形態において、第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドは、二量化ドメインを含まない。いくつかの実施形態において、第 1

30

【0152】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の切断 Cas 1 2 b エフェクター系（誘導剤制御及び自動誘導系を含む）の再構成された Cas 1 2 b エフェクタータンパク質は、親 Cas 1 2 b エフェクタータンパク質の編集効率の少なくとも約 70 %（例えば、少なくとも約 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % 又はそれ以上、又は 100 % のいずれか）の編集効率を有する。

【0153】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の誘導剤により制御される切断 Cas 1 2 b エフェクター系の再構成 Cas 1 2 b エフェクタータンパク質は、誘導剤の存在なし（すなわち、自動誘導による）において、親 Cas 1 2 b エフェクタータンパク質の編集効率の約 50 % 以下（例えば、約 50 %、45 %、40 %、35 %、30 %、25 %、20 %、15 %、10 %、5 % 又はそれ以下の効率、又は 0 % の効率のいずれか）を有する。

40

【0154】

融合 Cas 1 2 b エフェクタータンパク質

本願はまた、リンカー、核局在化／輸出配列、機能ドメイン及び／又はレポータータンパク質などの追加のタンパク質ドメイン及び／又は成分を含む、エンジニアリングされた Cas 1 2 b エフェクタータンパク質を提供する。

【0155】

50

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、エンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼ、そのバリエーション又は機能的誘導体の核酸標的ドメインに加えて、1つ又は複数の異種タンパク質ドメイン（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のドメインのいずれか）を含むタンパク質複合体である。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、エンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼ、そのバリエーション又は機能的誘導体に融合する1つ又は複数の異種タンパク質ドメイン（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のドメインのいずれか）を含む融合タンパク質である。

【0156】

いくつかの実施形態において、本願のエンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、（例えば、1つ又は複数のペプチドリンカー、例えば、GSペプチドリンカーなどの融合タンパク質を介して）1つ又は複数の機能ドメインを含むか、又は、（例えば、複数のタンパク質の共発現を介して）1つ又は複数の機能ドメインと会合してもよい。いくつかの実施形態において、1つ又は複数の機能ドメインは酵素ドメインである。それらの機能ドメインは、例えば、DNA及び／又はRNAメチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、RNA切断活性、DNA切断活性、核酸結合活性、及びスイッチング活性（例えば、光誘導）などの様々な活性を有していてもよい。いくつかの実施形態において、1つ又は複数の機能ドメインは、トランス活性化ドメイン（すなわち、トランス活性化ドメイン）又はリプレッサードメインである。いくつかの実施形態において、トランス活性化ドメイン又はリプレッサードメインは、クロマチン修飾剤を動員することができる。いくつかの実施形態において、1つ又は複数の機能ドメインはヒストン修飾ドメインである。いくつかの実施形態において、1つ又は複数の機能ドメインは、トランスポザーゼドメイン、HR（相同組換え）メカニカルドメイン、組換え酵素ドメイン及び／又はインテグラーゼドメインである。いくつかの実施形態において、機能ドメインは、Kruppel 関連ボックス（KRAB）、VP64、VP16、Fok1、p65、HSF1、MyoD1、ピオチン-APEX、APOBEC1、AID、PmCDA1、Tad1、及びM-MLV逆転写酵素である。いくつかの実施形態において、機能ドメインは、翻訳プロモータードメイン、転写リプレッサードメイン、トランス活性化ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、核酸塩基編集ドメイン（例えば、CBE又はABEドメイン）、逆転写酵素ドメイン、レポータードメイン（例えば、蛍光ドメイン）、及びヌクレアーゼドメインからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、機能ドメインは、ZIM3のKRABドメインのようなKRABドメインである。いくつかの実施形態において、KRABドメインは、SEQ ID NO: 72のアミノ酸配列を含む。

【0157】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質における1つ又は複数の機能ドメインの局在化は、機能ドメインの正しい空間的配向を可能にし、帰属機能効果を有する標的に影響を与える。例えば、機能ドメインが転写活性化因子（例えば、VP16、VP64又はp65）である場合、当該転写活性化因子は、標的転写に影響を与えることを許容する空間的配向に配置される。同様に、転写リプレッサーは標的の転写に影響を与えるように局在化され、ヌクレアーゼ（例えば、Fok1）は標的を切断又は部分的に切断するように局在化される。いくつかの実施形態において、機能ドメイン（例えば、SEQ ID NO: 72を含むようなKRABドメイン）は、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質（例えば、SEQ ID NO: 81のようなSEQ ID NO: 79~81のいずれか）のN末端に位置する。いくつかの実施形態において、機能ドメイン（例えば、SEQ ID NO: 72を含むようなKRABドメイン）は、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質（例えば、SEQ ID NO: 81のようなSEQ ID NO: 79~81のいずれか）のC末端に位置する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされ

10

20

30

40

50

た Cas 12 b エフェクタータンパク質は、N 末端の第 1 機能ドメイン及び C 末端の第 2 機能ドメインを含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、1 つ又は複数の機能ドメイン（例えば、KRAB ドメイン）に融合した、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼのいずれかの触媒不活性変異体（例えば、SEQ ID NO: 79 ~ 81 のいずれか）を含む。

【0158】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は転写活性化因子である。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、トランス活性化ドメインに融合した、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼの酵素的な不活性化バリエーションのいずれか（例えば、SEQ ID NO: 79 ~ 81 のいずれか）を含む。いくつかの実施形態において、トランス活性化ドメインは、VP64、p65、HSF1、VP16、MyoD1、HSF1、RTA、SET7/9 及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、トランス活性化ドメインは、VP64、p65 及び HSF1 を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、それぞれ 1 つのトランス活性化ドメインに融合した 2 つの切断 Cas 12 b エフェクターポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、さらに 1 つ又は複数の核局在配列（例えば、SEQ ID NO: 61、62 及び 82 のいずれか）を含む。

【0159】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は転写リプレッサーである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、転写リプレッサードメイン（例えば、KRAB）に融合した、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼの酵素的な不活性化バリエーション（例えば、SEQ ID NO: 79 ~ 81 のいずれか）のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、前記転写リプレッサードメインは、Kruppel 関連ボックス（KRAB）、EnR、NuE、NcoR、SID、SID4X、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、それぞれ転写リプレッサードメインに融合した 2 つの切断 Cas 12 b エフェクターポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、さらに 1 つ又は複数の核局在配列（例えば、SEQ ID NO: 61、62 及び 82 のいずれか）を含む。

【0160】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、シトシンエディター又はアデノシンエディターなどの塩基エディターである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質は、核酸塩基編集ドメイン（例えば、シトシン塩基編集（CBE）ドメイン又はアデノシン塩基編集（ABE）ドメイン）に融合した、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼの酵素的な不活性化バリエーションのいずれか（例えば、SEQ ID NO: 79 ~ 81 のいずれか）を含む。いくつかの実施形態において、核酸塩基編集ドメインは、DNA を編集するためのドメインである。いくつかの実施形態において、核酸塩基編集ドメインは、デアミナーゼ活性を有する。いくつかの実施形態において、核酸塩基編集ドメインは、シトシンデアミナーゼドメインである。いくつかの実施形態において、核酸塩基編集ドメインは、アデノシンデアミナーゼドメインである。Cas ヌクレアーゼに基づく塩基エディターの一例は、例えば、WO2018/165629A1 及び WO2019/226953A1 に記載されており、それらの内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。例示的な CBE ドメインとしては、活性化誘導シトシンデアミナーゼ又は AID（例えば、hAID）、アポリポタンパク質 B mRNA 編集複

10

20

30

40

50

合体又はAPOBEC（例えば、ラットAPOBEC1、hAPOBEC3 A/B/C/D/E/F/G）及びPmCDA1が含まれるが、それらに限定されない。例示的なABEドメインとしては、TadA、ABE8及びそれらのバリエーションが含まれるが、それらに限定されない（例えば、Gaudelli et al., 2017, Nature 551: 464-471; 及びRichter et al., 2020, Nature Biotechnology 38: 883-891; それぞれの内容は、全体として引用により本明細書に組み込まれている）。いくつかの実施形態において、前記機能ドメインは、APOBEC1ドメイン、例えばラットAPOBEC1ドメインである。いくつかの実施形態において、前記機能ドメインはTadAドメインである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、さらに1つ又は複数の核局在配列（例えば、SEQ ID NO: 61、62及び82のいずれか）を含む。

10

【0161】

いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、プライムエディターである。Cas9に基づくプライムエディターは、例えば、A. Anzalone et al., Nature, 2019, 576 (7785): 149-157に記載されており、その内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、逆転写酵素ドメインに融合した、本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼのニックーゼバリエーションのいずれかを含む。いくつかの実施形態において、機能ドメインは逆転写酵素ドメインである。いくつかの実施形態において、逆転写酵素ドメインは、M-MLV逆転写酵素、又はそのバリエーション、例えば、D200N、T306K、W313F、T330P及びL603Wの1つ又は複数の変異を有するM-MLV逆転写酵素である。いくつかの実施形態において、プライムエディターを含むエンジニアリングされたCRISPR/Cas12bシステムが提供される。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR/Cas12bシステムは、例えば、プライムエディターと同じエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼに基づく第2Cas12bニックーゼをさらに含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR/Cas12bシステムは、プライマー結合部位及び逆転写酵素（RT）テンプレート配列を含むプライムエディターガイドRNA（pegRNA）を含む。

20

30

【0162】

いくつかの実施形態において、本願は、1つ又は2つの切断Cas12bエフェクター部分に会合（すなわち、結合又は融合）する1つ又は複数の機能ドメイン（例えば、1、2、3、4、5、6又はそれ以上）を有する切断Cas12bエフェクター系を提供する。前記機能ドメインは、第1及び／又は第2切断Cas12bエフェクタータンパク質の一部として、この構築物内の融合として提供されてもよい。機能ドメインは、通常、ペプチドリンカー（例えば、GSリンカー）を介して、切断Cas12bエフェクタータンパク質の他の部分（例えば、切断Cas12bエフェクター部分）に融合する。この機能ドメインは、触媒的に不活性化されたCas12bエフェクターに基づいて、切断Cas12bエフェクター系を利用した機能を再調整するために使用することができる。

40

【0163】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、1つ又は複数の核局在配列（NLS）及び／又は1つ又は複数の核外輸送配列（NES）を含む。例示的なNLS配列としては、例えば、PKKKRKV（SEQ ID NO: 82）、PKKKRKVPG（SEQ ID NO: 61）、及びASPKK RKV（SEQ ID NO: 62）が含まれる。NLS及び／又はNESは、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質におけるポリペプチド鎖のN末端及び／又はC末端に作動可能に連結されている。

50

【0164】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、レポータータンパク質などの追加の成分をコードすることができる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、GFPなどの蛍光タンパク質を含む。このような系はゲノム部位のイメージングを可能にすることができる（例えば、「Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System」 Chen B et al. Cell 2013を参照）。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、ゲノム部位のイメージングに使用することができる誘導可能な切断Casエフェクター系である。

10

【0165】

エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム

また、(a) 本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション若しくは誘導體（例えば、SEQ ID NO: 2～22及び79～81のいずれか）、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質（例えば、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、ニックアーゼ、切断Cas12bタンパク質、転写リプレッサー、転写活性化剤、塩基エディター又はプライムエディター）、又はそれらをコードする核酸のいずれかと、(b) 標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドRNA、又はガイドRNAをコードする1つ又は複数の核酸と、を含み、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質とガイドRNAは、標的配列を含む標的核酸に特異的に結合し、標的核酸の修飾を誘導するCRISPR複合体を形成することができる、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムが提供される。いくつかの実施形態において、(a) 参照Cas12bヌクレアーゼに対して1つ、2つ又は3つのタイプの変異を含むエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質であって、前記変異は、(1) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び475の位置のうちの1つ又は複数の）の正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）による置換、及び／又は(2) Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、118及び119の位置のうちの1つ又は複数の）の芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、F、Y、W）による置換、及び／又は(3) 参照Cas12bヌクレアーゼのRuVCDメインにおいてssDNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、300、301、304、329、636、639、647、682、757、758、761、764、768、852、854、856、857、858、860、862、863、865、866、867、869、938、956、957、958、994、1093、及び1097の位置のうちの1つ又は複数の）正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）又は疎水性アミノ酸残基（例えば、F、Y、W、M）による置換を含み、前記参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む、又はエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質をコードする核酸を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質と、(b) 標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むgRNA、又は前記gRNAをコードする核酸と、を含み、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質とgRNAは、標的配列を含む標的核酸に特異的に結合し、標的核酸の修飾を誘導するCRISPR複合体を形成することができる、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムが提供される。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション若しくは誘導體、又はエンジニアリングされたCas12bエフ

20

30

40

50

エクタータンパク質及び／又はガイドRNAをコードする1つ又は複数の核酸を含む。いくつかの実施形態において、前記gRNAは、crRNA及びtracrRNAを含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、例えば、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション若しくは誘導体、又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質によって複数のcrRNAに加工され得る前駆体ガイドRNAアレイを含む。いくつかの実施形態において、前記gRNAはsgRNAである。いくつかの実施形態において、前記sgRNAはSEQ ID NO: 23~53のいずれかの足場配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション若しくは誘導体、又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質及び／又はガイドRNAをコードする1つ又は複数のベクターを含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション若しくは誘導体、又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質及び／又はガイドRNAは、1つ又は複数のベクター（例えば、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター）によってコードされる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、ガイドRNAに結合するエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション若しくは誘導体、又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質を含むリボヌクレオタンパク質(RNP)複合体を含む。

10

20

30

40

50

【0166】

いくつかの実施形態において、(a) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含むCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質（例えば、ニッカーゼ、切断Cas12bタンパク質、転写リプレッサー、転写活性化剤、塩基エディター又はプライムエディター(priming editor)）、本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション又は誘導体のいずれか（例えば、SEQ ID NO: 2~22及びSEQ ID NO: 79~81のいずれか）、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質（例えば、ニッカーゼ、切断Cas12bタンパク質、転写リプレッサー、転写活性化剤、塩基エディター又はプライムエディター）、又はそれらをコードする核酸と、(b) 標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むgRNA、又はgRNAをコードする核酸と、を含み、前記gRNAはSEQ ID NO: 25~53の配列のいずれかを含むエンジニアリング足場を含み、i) 前記Cas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション若しくは誘導体、又はエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質と、ii) 前記gRNAは、標的核酸に特異的に結合するCRISPR複合体を形成し、標的核酸の修飾を誘導することができる、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムが提供される。いくつかの実施形態において、(a) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含むCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質（例えば、ニッカーゼ、切断Cas12bタンパク質、転写リプレッサー、転写活性化剤、塩基エディター又はプライムエディター）、又は、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質であって、参照Cas12bヌクレアーゼに対して1つ、2つ又は3つのタイプの変異を含み、前記変異は、(1) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び475の位置のうちの1つ又は複数の）の正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）による置換、及び／又は(2) 参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、118及び119の位置のうちの1つ又は複数の）による芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、F、Y、W）による置換、及び／又は(3) 参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいてssDNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、300、301、304、329、636、639、647

、682、757、758、761、764、768、852、854、856、857、858、860、862、863、865、866、867、869、938、956、957、958、994、1093、及び1097の位置のうちの1つ又は複数)の正電荷を帯びたアミノ酸残基(例えば、R、H、K)又は疎水性アミノ酸残基(例えば、F、Y、W、M)による置換を含み、前記参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列、またはCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質をコードする核酸を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質と、(b)標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むgRNA、又は前記gRNAをコードする核酸と、を含み、前記gRNAは、SEQ ID NO: 25~53の配列のいずれかを含むエンジニアリング足場を含み、i)前記Cas12bヌクレアーゼ又若しくはそのエフェクタータンパク質、又はエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質と、ii)前記gRNAは、標的核酸に特異的に結合するCRISPR複合体を形成し、標的核酸の修飾を誘導することができる、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムが提供される。いくつかの実施形態において、(a)SEQ ID NO: 1~22及びSEQ ID NO: 79~81のアミノ酸配列のいずれかを含むCas12bヌクレアーゼ若しくはCas12bエフェクタータンパク質、又はそれらをコードする核酸と、(b)標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むgRNA、又は前記gRNAをコードする核酸と、を含み、前記gRNAは、SEQ ID NO: 25~53の配列のいずれかを含むエンジニアリング足場を含み、前記Cas12bヌクレアーゼ又はCas12bエフェクタータンパク質と、前記gRNAは、標的核酸に特異的に結合するCRISPR複合体を形成し、標的核酸の修飾を誘導することができる、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムが提供される。いくつかの実施例において、前記gRNAは、crRNA及びtracrRNAを含み、前記tracrRNAは、エンジニアリング足場又はその一部を含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、複数のcrRNAをコードする前駆体gRNAアレイを含む。いくつかの実施形態において、前記gRNAはsgRNAである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質、Cas12bヌクレアーゼ又はCas12bエフェクタータンパク質をコードする1つ又は複数のベクターを含む。いくつかの実施形態において、前記1つ又は複数のベクターはAAVベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ又は複数のベクターはさらにgRNAをコードする。

10

20

30

40

50

【0167】

PAM

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、そのバリエーション又は誘導体、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質、Cas12bヌクレアーゼ又はCas12bエフェクタータンパク質Cas12bは、5'-TTN-3'配列(NはA、T、G又はCである)を含む(又はそれらから構成される)PAMを認識する。いくつかの実施形態において、前記PAMは、5'-TTC-3'、5'-TTA-3'、5'-TTT-3'、又は5'-TTG-3'を含む、又はそれらから構成される。

【0168】

ガイドRNA

本願のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、任意の適切なガイドRNAを含んでいてもよい。ガイドRNA(gRNA)は、関心のある標的核酸中の標的配列(例えば、細胞内の関心のあるゲノム部位)とハイブリダイズ可能なガイド配列(又はスペーサー)を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記gRNAは、ガイド配列を含むCRISPR RNA(crRNA)配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のcrRNAは、直接繰り返し(DR)配列及びスペーサ

一配列を含む。ある実施形態において、前記 *crRNA* は、ガイド配列又はスペーサー配列に連結された直接繰り返し配列を含む（実質的にそれから構成される、又はそれから構成される）。ある実施形態において、前記直接繰り返し配列は、ガイド配列又はスペーサー配列の上流（すなわち、5'）に位置してもよい。他の実施形態において、直接繰り返し配列は、ガイド配列又はスペーサー配列の下流（すなわち、3'）に位置してもよい。いくつかの実施形態において、前記 *crRNA* は、直接繰り返し配列、スペーサー配列、及び直接繰り返し配列（DR-スペーサー-DR）を含み、これは典型的な前駆体 *crRNA*（*pre-crRNA*）構成である。いくつかの実施形態において、*crRNA* は、切断された直接繰り返し配列及びスペーサー配列を含み、これは、典型的な加工又は成熟 *crRNA* である。いくつかの実施形態において、*crRNA* は、変異した DR 配列及びスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、*gRNA* は、トランス活性化 CRISPR RNA（*tracrRNA*）配列を含む。いくつかの実施形態において、*tracrRNA* は、DR 配列の 5' 末端の *crRNA* に融合する。いくつかの実施形態において、ガイド RNA はシングルガイド RNA（*sgRNA*）である。いくつかの実施形態において、*gRNA* 又は *sgRNA* は、*tracrRNA* 及び *crRNA* を含む。いくつかの実施形態において、*sgRNA* は SEQ ID NO: 23~53 の配列のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、*tracrRNA* は、SEQ ID NO: 23~53 の配列のいずれか又はその一部を含む。

10

20

30

40

50

【0169】
いくつかの実施形態において、*gRNA* は、参照 Cas12b タンパク質の CRISPR 遺伝子座に天然に存在しない非相同 *crRNA* 配列及び／又は *tracrRNA* 配列を含む。例えば、AaCas12b、AkCas12b、AmCas12b、BhCas12b、BsCas12b、Bs3Cas12b、LsCas12b 及び SbCas12b の相同 *tracrRNA* 及び *crRNA* 配列、並びに例示的な *sgRNA* 配列は、Teng F. et al., Cell Discovery (2019) 5: 23 の図 S4 及び図 S8 に記載されており、その内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。

【0170】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載の CRISPR-Cas12b システムは、1つ又は複数の *gRNA*（例えば、*crRNA*、*tracrRNA*、又は *sgRNA*）（例えば、1、2、3、4、5、10、15 又はそれ以上）、又はそれらをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、2つ以上の *gRNA* は、異なる標的部位、例えば、同じ標的 DNA 若しくは遺伝子の 2 つの標的部位、又は 2 つの異なる標的 DNA 若しくは遺伝子の 2 つの標的部位を標的にする。

【0171】
本明細書に記載の *gRNA* の配列及び長さは最適化されてもよい。いくつかの実施形態において、*gRNA* の最適な長さは、*crRNA* の加工形態を認識することによって、又は *crRNA* の経験的長さ調査によって決定することができる。いくつかの実施形態において、*gRNA* は、*gRNA* 足場領域のように塩基修飾を含む。

【0172】
スペーサーは、*gRNA*（例えば、*crRNA* 又は *sgRNA*）が機能するために十分な相補性を有する（すなわち、Cas12b ヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質を標的部位に向ける）であれば、完全に相補的である必要はない。Cas12b ヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質の *gRNA* 媒介による編集又は切断効率は、1つ又は複数のミスマッチ（例えば、スペーサー／標的配列のミスマッチに沿った位置を含むスペーサー配列と標的配列との間の 1 又は 2 つのミスマッチ）を導入することによって調整され得る。ミスマッチ（例えば、二重ミスマッチ）がスペーサーのより中心的な位置（すなわち、スペーサーの 3' 又は 5' 末端ではない）に位置する場合、切断効率に大きな影響を与える。したがって、スペーサー配列上のミスマッチの位置を選択することにより、Cas12b

ヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質の編集又は切断効率を調整することができる。例えば、標的配列の編集又は切断を100%未満（例えば、細胞の集団において）行うことが望ましい場合、スペーサー配列と標的配列との間の1又は2つのミスマッチをスペーサー配列に導入することができる。

【0173】

いくつかの実施形態において、ガイド配列又はスペーサーは、標的配列と少なくとも1つのミスマッチを有するように設計され、ガイド配列と標的配列との間で形成されるヘテロダブレックスは、標的Aと対向するガイド配列中の不對C、又は標的Cと対向するガイド配列中の不對Aを含み、標的配列上の脱アミノ化（例えば、塩基編集）を行う。いくつかの実施形態において、このA-C又はC-Aミスマッチに加えて、適切なアライメントアルゴリズムを用いて最適なアライメントを行った場合、相補性の程度は約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%又はそれ以上である。

10

【0174】

ガイド配列は、適切な長さを有してもよい。いくつかの実施形態において、ガイド配列又はスペーサー配列の長さは、約10nt～約50ntである。いくつかの実施形態において、ガイド配列又はスペーサー配列の長さは、少なくとも約16ヌクレオチド、好ましくは約16～約100ヌクレオチド、より好ましくは約16～約50ヌクレオチド（例えば、約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、50ヌクレオチドのいずれか）である。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、約16～約27ヌクレオチド、例えば、約17～約24ヌクレオチド、約18～約24ヌクレオチド、又は約18～約22ヌクレオチドのいずれかである。いくつかの実施形態において、ガイド配列は、例えば、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34又は35ヌクレオチドのいずれかを含む、約18～約35ヌクレオチドである。

20

【0175】

いくつかの実施形態において、ガイド配列又はスペーサー配列は、標的配列と少なくとも約60%（例えば、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のいずれか）相補的である。いくつかの実施形態において、スペーサー配列と標的核酸（例えば、DNA）の標的配列との間に、少なくとも約15個（例えば、少なくとも約16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50またはそれ以上のいずれか）の塩基対が存在する。

30

【0176】

最適なアライメントは、任意の適切な配列アライメントアルゴリズムを用いて決定することができる。それらの非限定例としては、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler変換に基づくアルゴリズム（例えば、Burrows-Wheeler Aligner）、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign（Novocraft Technologies; www.novocraft.comから入手可能）、ELAND（Illumina, San Diego, CA）、SOAP（soap.genomics.org.cnから入手可能）、及びMaq（maq.sourceforge.netから入手可能）が含まれる。核酸を標的とする複合体の標的核酸配列への配列特異的結合をガイドするガイド配列の能力（核酸を標的とするガイドRNA内では、任意の適切なアッセイによって評価することができる。例えば、核酸を標的とする複合体を形成するのに十分な核酸を標的とするCRISPR系の成分（試験対象ガイド配列を含む）は、核酸を標的とする複合体成分をコードするベクターでトランスフェクションし、その後、本明細書に記載のSurveyorアッセイによって、標的核酸配列内の

40

50

優先的な標的（例えば、切断）を評価することによって、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に供給することができる。同様に、標的核酸配列の切断は、試験管において、標的核酸配列と、核酸を標的とする複合体の成分（試験対象ガイド配列と、試験対象ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含む）とを提供し、試験対象ガイド配列と対照ガイド配列の反応間の標的配列における結合又は切断速度を比較することによって評価することができる。他の測定も可能であり、当業者にとって行われる。

【0177】

本明細書で使用される場合、標的核酸は、標的配列又は標的核酸配列と交換可能に用いられ、*crRNA*又は*gRNA*におけるスペーサーの全部又は一部に相補的な核酸配列を含む特定の核酸を意味する。いくつかの例では、標的核酸は遺伝子又は遺伝子内の配列を含む。いくつかの例では、標的核酸は、非コード領域（例えば、プロモーター）を含む。いくつかの例では、標的核酸は一本鎖である。いくつかの例では、標的核酸は二本鎖である。標的核酸は、*DNA*又は*RNA*配列（例えば*mRNA*）のような任意の標的核酸配列を標的にするように選択され得る。

【0178】

標的核酸は、*PAM*、すなわち*CRISPR*複合体によって認識される短配列と会合するべきである。*CRISPR-Cas*タンパク質の性質に応じて、標的配列は、*DNA*二本鎖における相補配列（標的配列の相補配列）が*PAM*の上流又は下流に位置するように選択されるべきである。本願の一実施形態において、標的配列の相補配列は、*PAM*の下流又は3'に位置する。*PAM*の正確な配列及び長さに対する要件は、使用される*Cas12b*タンパク質に依存する。

【0179】

「*tracrRNA*」配列又は類似の用語は、ハイブリダイズを行うために、*crRNA*配列と十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、最適アライメントのとき、*tracrRNA*配列と*crRNA*配列との間の相補性の程度は、両者のうち短い配列の長さに沿って、約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%以上である。いくつかの実施形態において、*tracr*配列の長さは、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50又はそれ以上のヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、*tracr*配列及び*crRNA*配列は、単一のトランスクリプト内に含まれており、両者間のハイブリダイズにより、二次構造（例えば、1つ又は複数のヘアピン構造）を有するトランスクリプトが生成される。一般に、相補性の程度は、2つの配列のうち短い配列の長さに沿って、ガイド配列と*tracr*配列の最適なアライメントを参照する。最適なアライメントは任意の適切なアライメントアルゴリズムによって決定することができ、さらに二次構造を考慮することができる。

【0180】

本明細書に記載の*Cas12b*タンパク質と対応する*gRNA*（例えば*crRNA*）との結合を媒介することができる任意の*gRNA*足場、*tracrRNA*又は*DR*配列は、本願に用いることができる。いくつかの実施形態において、*gRNA*足場、*tracrRNA*又は*DR*配列は、5'又は3'末端に近い（スペーサー配列の直ぐ隣）ステム・ループ構造を含む。「ステム・ループ構造」とは、二本鎖（ステム）部分を形成することが知られている又は予測されるヌクレオチドの領域を含み、その領域の一端が実質的に一本鎖ヌクレオチドの連結領域（ループ）によって連結されている二次構造を有する核酸を意味する。「ヘアピン」構造という用語は、本明細書においても、ステム・ループ構造を指すために用いられる。このような構造は、当該分野でよく知られており、それらの用語は当該分野で一般に知られている意味に従って用いられる。ステム・ループ構造は正確な塩基対合を必要としない。したがって、ステムは1つ又は複数の塩基ミスマッチを含んでいてもよい。あるいは、塩基対合は正確であってもよい、すなわち、ミスマッチを含まないものであってもよい。

【0181】

いくつかの実施形態において、gRNA足場、tracrRNA又はDRは、野生型足場、tracrRNA又はDRの「機能バリエーション」、例えば、「機能的に切断されたバージョン」、「機能的に延長されたバージョン」又は「機能的に置換されたバージョン」である。gRNA足場、tracrRNA又はDRの「機能バリエーション」は、参照足場、tracrRNA又はDR（例えば、親DR）の5'及び／又は3'が延長（機能的に延長されたバージョン）又は切断された（機能的に切断されたバージョン）バリエーションであり、又は、前記参照足場、tracrRNA又はDR（例えば、親DR）の少なくとも約20%（例えば、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上）の機能性、すなわち、Cas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質の対応するsgRNA又はcrRNAへの結合を媒介する機能を維持しながら、参照足場、tracrRNA又はDR（例えば、親DR）に対する1つ又は複数のヌクレオチドの1つ又は複数の挿入、欠失、及び／又は置換（機能置換バージョン）を含む。gRNA足場、tracrRNA又はDR機能バリエーションは、通常、Cas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリング）又はそのエフェクタータンパク質に結合するために有用なステム・ループ様の二次構造又はその一部を保持する。いくつかの実施形態において、gRNA足場、tracrRNA若しくはDR、又はその機能バリエーションは、Cas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質に結合するために有用な少なくとも2個（例えば、2、3、4、5又はそれ以上）のステム・ループ様二次構造又はその一部を含む。

10

20

【0182】

いくつかの実施形態において、DR又はその機能バリエーションは、少なくとも約16ヌクレオチド（nt）、例えば、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又はそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、DRは、約20nt～約40nt、例えば、約20nt～約30nt、約22nt～約40nt、約23nt～約38nt、約23nt～約36nt、又は約30nt～約40ntを含む。いくつかの実施形態において、DRは、22nt、23nt又は24ntを含む。いくつかの実施形態において、DRは35nt、36nt、又は37ntを含む。いくつかの実施形態において、sgRNA足場又はその機能バリエーションは、約50nt～約180nt、例えば、約70nt～約140nt、又は約90nt～約120ntのいずれかを含む。

30

【0183】

いくつかの実施形態において、sgRNAは、スペーサー配列の5'末端付近に位置するステム・ループ構造（例えば、1、2、3、4又はそれ以上のステム・ループ）を含む足場配列を含む。いくつかの実施形態において、ステムは、相補的なX及びY配列を含む少なくとも約4bpを含むが、より多い（例えば、5、6、7、8、9、10、11又は12）又はより少ない（例えば、3、2）塩基対のステムも考えられる。したがって、例えば、X2-10及びY2-10（X及びYは任意の相補的なヌクレオチド群を表す）が考えられる。いくつかの実施形態において、X及びYヌクレオチドから構成されるステムは、ループとともに、全体的な二次構造の中で完全なヘアピンを形成し、また、これは有利であり、塩基対の数は完全なヘアピンを形成するための任意の数であってもよい。いくつかの実施形態において、任意の相補的なX：Y塩基対合配列（例えば、長さの観点から）は、ガイド分子全体の二次構造が保持されている限り許容される。いくつかの実施形態において、X：Y塩基対から構成されるステムを連結するループは、ガイド分子の全体的な二次構造を中断しない限り、同じ長さ（例えば、4又は5ヌクレオチド）又はそれ以上の任意の配列であってもよい。いくつかの実施形態において、ステムは、相補的なX及びY配列を含む約5～7bpを含むが、より多い又は少ない塩基対のステムも考えられる。いくつかの実施形態において、非ワトソン・クリック塩基対合が考えられ、そのような対

40

50

合は、通常、その位置のステム・ループ構造を保持する。いくつかの実施形態において、足場配列に含まれるステムは、相互にハイブリダイズされる5対の相補塩基を含み（例えば、それらから構成される）、ループ長さは6、7、8又は9ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、ステムは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つの塩基対を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、ステム・ループ構造は、長さ5ヌクレオチドの第1ステムヌクレオチド鎖と、長さ5ヌクレオチドの第2ステムヌクレオチド鎖と、前記第1ステムヌクレオチド鎖と第2ステムヌクレオチド鎖との間に配置された環状ヌクレオチド鎖と、を含み、第1ステムヌクレオチド鎖と第2ステムヌクレオチド鎖は互いにハイブリダイズしてもよく、前記環状ヌクレオチド鎖は、6、7又は8個のヌクレオチドを含む

10

【0184】

いくつかの実施形態において、前記ガイド分子の天然ヘアピン又はステム・ループ構造は、延長されるか、又は延長されたステム・ループによって置換される。いくつかの場合では、ステムの延長がCRISPR-Casタンパク質とのガイド分子の集合(組み立て)を強化することが示されている(Chen et al., Cell, (2013); 155(7): 1479-1491)。いくつかの実施形態において、ステム・ループのステムは、少なくとも1、2、3、4、5又はそれ以上の相補塩基対（すなわち、ガイド分子に2、4、6、8、10又はそれ以上のヌクレオチドを付加することに対応する）に延長されている。いくつかの実施形態において、それらは、ステムの末端に位置し、ステム・ループのループに隣接する。

20

【0185】

本明細書で使用される場合、2種以上のsgRNA又はtracrRNAの二次構造が実質的に同一又は実質的に異なっていないとは、それらのsgRNA又はtracrRNAが、長さの差が1、2又は3ヌクレオチド以下のステム及び／又はループを含むことを意味する。それらのsgRNA又はtracrRNAのヌクレオチド配列は、ヌクレオチドのタイプ(A、U、G又はC)に関して、配列アライメントによって比較されたときに、1、2、3、4、5、6、7又は8以下のヌクレオチドが異なる。いくつかの実施形態において、2つ以上のsgRNA又はtracrRNAの二次構造が実質的に同一又は実質的に異なっていないとは、前記sgRNA又はtracrRNAが、相補塩基で異なる最大1対のステムを含み、及び／又はヌクレオチドの長さで異なる最大1本のループを含み、及び／又は長さが同一であるが塩基のミスマッチを有するステムを含むことを意味する。

30

【0186】

いくつかの実施形態において、本願の任意のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質を標的部位に導くことができるgRNA足場配列は、SEQ ID NO: 23～53のいずれか又はその機能的な切断バージョンに示される足場配列と比較して二次構造上実質的な違いを生じない、ヌクレオチドの付加、挿入、欠失、置換からなる群から選択される1つ又は複数のヌクレオチド変化を含む。いくつかの実施形態において、gRNA足場は、SEQ ID NO: 25～53の配列のいずれかを含む、又は約10nt（例えば、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1nt）以下の違いを含むそのバリエーションを含む。

40

【0187】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAはcrRNAを含む。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、複数のcrRNAをコードする前駆体ガイドRNAのアレイを含む。いくつかの実施形態において、Cas12bエフェクタータンパク質は、前駆体ガイドRNAアレイを切断し、複数のcrRNAを生成する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、複数のcrRNAをコードする前駆体ガイドRNAのアレイを含み、それぞれのcrRNAは異なるガイド配列を含む。いくつかの実施形態において、前駆体ガイドRNAアレイによってコードされるcrRNAは、tracrRNAと

50

会合する。

【0188】

構築物及びベクター

本願はまた、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas12b エフェクタータンパク質（エンジニアリングされた Cas12b ヌクレアーゼを含む）のいずれかをコードする構築物、ベクター及び発現系が提供される。いくつかの実施形態において、構築物、ベクター、又は発現系は、1つ又は複数の gRNA（例えば、sgRNA）又は crRNA アレイをさらに含む。

【0189】

「ベクター」とは、単離された核酸を含み、単離された核酸を細胞内に送達するために有用な物質の組成物である。本分野では、線形ポリヌクレオチド、イオン性又は両親媒性化合物に関連するポリヌクレオチド、プラスミド及びウイルスを含むがそれらに限定されない、様々なベクターが知られている。一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生体において機能する複製起点、プロモーター配列、便利な制限酵素部位、及び1つ又は複数の選択可能なマーカーを含む。また、「ベクター」という用語は、例えば、ポリリジン化合物、リボソーム等の核酸の細胞への移動を容易にする非プラスミド及び非ウイルス化合物を含むことを意味する。

【0190】

いくつかの実施形態において、ベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターの例としては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、及びそれらの誘導体が含まれるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態において、ベクターはファージベクターである。ウイルスベクター技術は当該分野でよく知られており、例えば Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 及び他のウイルス学と分子生物学マニュアルに記載されている。

【0191】

哺乳動物の細胞への遺伝子移動のために、多くのウイルスに基づく系が開発されている。例えば、レトロウイルスは遺伝子伝達系に便利なプラットフォームを提供している。異種核酸は、当該分野で公知の技術を用いてベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次いで、組換えウイルスを単離し、インビトロ又はエキスビボのエンジニアリングされた哺乳動物細胞に送達することができる。当該分野では、複数のレトロウイルス系が知られている。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターが用いられる。当該分野では、様々なアデノウイルスベクターが知られている。いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターが用いられる。いくつかの実施形態において、自己不活性化レンチウイルスベクターが用いられる。

【0192】

ある実施形態において、ベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、例えば、AAV2、AAV8 又は AAV9 であり、これは、単一用量で投与されてもよく、前記単一用量は、少なくとも 1×10^5 個の粒子（粒子単位、pu と呼ばれる）のアデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスを含む。いくつかの実施形態において、用量は、少なくとも約 1×10^6 個の粒子、少なくとも約 1×10^7 個の粒子、少なくとも約 1×10^8 個の粒子、又は少なくとも約 1×10^9 個の粒子のアデノ随伴ウイルスである。送達方法及び用量は、例えば、WO 2016/205764 及び米国特許第 8,454,972 号に記載されており、それらの内容は、全体として引用により本明細書に組み込まれている。

【0193】

いくつかの実施形態において、前記ベクターは組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターである。例えば、いくつかの実施形態において、修飾された AAV ベクターを送達に用いることができる。修飾された AAV ベクターは、AAV1、AV2、AAV5、

AAV6、AAV8、AAV8.2、AAV9、AAVrh10、修飾されたAAVベクター（例えば、修飾されたAAV2、修飾されたAAV3、修飾されたAAV6）、及び疑似型AAV（例えば、AAV2/8、AAV2/5、及びAAV2/6）を含むいくつかのカプシドタイプの1つ又は複数に基づいていてもよい。rAAV粒子を生成するために使用できる例示的なAAVベクター及び技術は、当該分野で知られている（例えば、Aponte-Ubillus et al. (2018) Appl. Microbiol. Biotechnol. 102 (3): 1045-54; Zhong et al. (2012) J. Genet. Syndr. Gene Ther. S1: 008; West et al. (1987) Virology 160: 38-47 (1987); Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3251-60); 米国特許第4,797,368号及び米国特許第5,173,414号、及び国際公開第WO 2015/054653及びWO 93/24641号を参照し、それぞれは引用により本明細書に組み込まれている）。

10

【0194】

Cas9及びその他のCas12bタンパク質を送達するための公知のAAVベクターのいずれかは、本願のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、エフェクタータンパク質又は系を送達するために使用することができる。

【0195】

ベクターを哺乳動物細胞に導入する方法は当該分野で知られている。前記ベクターは、物理的、化学的又は生物学的方法により宿主細胞に伝達することができる。

20

【0196】

ベクターを宿主細胞に導入する物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、パーティクルボンバードメント、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等が含まれる。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を製造する方法は、当該分野でよく知られている。例えば、Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New Yorkを参照する。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、エレクトロポレーションによって細胞に導入される。

30

【0197】

異種核酸を宿主細胞に導入する生物学的方法としては、DNA及びRNAベクターの使用が含まれる。ウイルスベクターは哺乳動物（例えばヒト）の細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用されている方法となっている。

【0198】

ベクターを宿主細胞に導入する化学的方法としては、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系、水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、リポソームなどの脂質系が含まれる。インビトロ送達ベクターとして使用される例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、ナノ粒子中のRNPとして送達される。

40

【0199】

いくつかの実施形態において、CRISPR-Cas12bシステム又はその成分をコードするベクター又は発現系は、例えば、早期段階で及び大規模でCRISPR-Cas12bシステムを含む及び／又はそれに修飾された細胞を単離又は効率的に選択する方法を提供する1つ又は複数の選択可能又は検出可能なマーカーを含む。

【0200】

レポーター遺伝子は、潜在的にトランスフェクションされた細胞を同定し、制御配列の機能を評価するために使用することができる。一般に、レポーター遺伝子は、受容体生体又は組織に存在しない、又は発現しない遺伝子であり、コードするポリペプチドの発現は

50

、容易に検出可能な特性（例えば、酵素活性）によって表現される遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAが受容体細胞に導入された後の適切な時期に測定される。適切なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、又は緑色蛍光タンパク質遺伝子（例えば、U i - T e i e t a l . F E B S L e t t e r s 479: 79-82 (2000)）を含むことができる。

【0201】

宿主細胞における異種核酸の存在を確認する他の方法としては、例えば、当業者によく知られている分子生物学アッセイ、例えば、サザンブロット (Southern blotting)、ノーザンブロット (Northern blotting)、RT-PCR、PCR；特定のペプチドの有無を検出するなどの生化学的アッセイ、例えば、免疫学的方法 (ELISAやウェスタンブロット) が含まれる。

10

【0202】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 bヌクレアーゼ又はエフェクタータンパク質及び／又はガイドRNAをコードする核酸配列は、プロモーターに動作可能に連結されている。いくつかの実施形態において、プロモーターは、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 bシステムを用いてエンジニアリングされた細胞に対して内因性プロモーターである。例えば、エンジニアリングされた Cas 12 bエフェクタータンパク質をコードする核酸は、当該分野で知られている任意の方法を用いて、内在性プロモーターの下流にあるエンジニアリングされた哺乳動物細胞のゲノムにノックインすることができる。いくつかの実施形態において、前記内因性プロモーターは、豊富なタンパク質（例えば、β-アクチン）のプロモーターである。いくつかの実施形態において、内因性プロモーターは、例えば、エンジニアリングされた哺乳動物細胞の内因性活性化シグナルによって誘導される誘導性プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた哺乳動物細胞はT細胞であり、前記プロモーターは、T細胞活性化依存性プロモーター（例えば、IL-2プロモーター、NFATプロモーター、又はNFκBプロモーター）である。

20

【0203】

いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 bシステムを用いたエンジニアリングされた細胞に対して異種プロモーターである。哺乳動物細胞における遺伝子発現のために様々なプロモーターが検討されており、当該分野で知られているいずれのプロモーターも本願において使用することができる。プロモーターは、構成的プロモーター、又は誘導性プロモーターなどの制御されたプロモーターに大きく分類することができる。

30

【0204】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 bエフェクタータンパク質及び／又はガイドRNAをコードする核酸配列は、構成的プロモーターに動作可能に連結されている。構成的プロモーターは、宿主細胞における異種遺伝子（トランスジェニックとも呼ばれる）の構成的発現を可能にする。本明細書で考慮される例示的な構成的プロモーターとしては、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ヒト伸長因子-1α (hEF1α)、ユビキチンCプロモーター (Ubiquitin C) (Ubiquitin C)、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター (PGK)、サルウイルス40早期プロモーター (SV40)、及びCMV早期エンハンサー (CAG) に結合した鶏β-アクチンプロモーターが含まれるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) 早期エンハンサー要素、プロモーター、鶏β-アクチン遺伝子の第1エクソン及び第1イントロン、及びウサギβ-グロビン遺伝子のスプリッシング受容体を含むCAGプロモーターである。

40

【0205】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 bタンパク質及び／又はガイドRNAをコードする核酸配列は、誘導性プロモーターに動作可

50

能に連結されている。誘導型プロモーターは、制御型プロモーターのカテゴリーに属する。誘導性プロモーターは、物理的条件、微小環境又は宿主細胞の生理状態、誘導剤（すなわち、誘導薬剤）、又はそれらの組み合わせなどの1つ又は複数の条件によって誘導され得る。いくつかの実施形態において、誘導条件は、誘導剤、放射線（例えば、電離放射線、光）、温度（例えば、熱）、酸化還元状態、腫瘍環境、及び、エンジニアリングされたC R I S P R - C a s 1 2 bシステムによってエンジニアリングされる細胞の活性化状態からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、プロモーターは、低分子誘導剤（例えば、化合物）によって誘導され得る。いくつかの実施形態において、前記低分子は、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、アルコール、金属又はステロイドからなる群から選択される。化学的に誘導されたプロモーターは最も広く研究されている。このようなプロモーターは、低分子化学物質（例えば、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、アルコール、ステロイド、金属及びその他の化合物）の存在又は不存在によって転写活性が調節されるプロモーターを含む。トランステトラサイクリン制御トランス活性化因子（*r t T A*）とテトラサイクリン反応要素プロモーター（*T R E*）を有するドキシサイクリン誘導系は現在最も成熟した系である。W O 9 4 2 9 4 4 2は、テトラサイクリン反応プロモーターによる真核細胞における遺伝子発現のストリンジェンス制御を記載している。W O 9 6 0 1 3 1 3には、テトラサイクリンによって調節される転写調整剤が開示されている。さらに*T e t*技術（例えば、*T e t - o n*系）は、例えば*T e t S y s t e m s . c o m*などのウェブサイトに記載されている。公知の化学制御プロモーターは、本願のエンジニアリングされたC R I S P R - C a s 1 2 bタンパク質及び／又はガイドRNAをコードする発現を駆動するために使用することができる。

10

20

【0206】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はエフェクタータンパク質をコードする核酸配列は、コドン最適化されている。いくつかの実施形態において、発現構築物は、前記エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はエフェクタータンパク質のC末端に動作可能に連結されたタグ（例えば、10xH i sタグ）をコードする。いくつかの実施形態において、各エンジニアリングされた切断C a s 1 2 b構築物は、G F P又はR F Pなどの蛍光タンパク質をコードする。レポータータンパク質は、例えば顕微鏡を用いて、エンジニアリングされた切断C a s 1 2 bタンパク質の共局在化及び／又は二量化を評価するために使用することができる。エンジニアリングされたC a s 1 2 bエフェクタータンパク質をコードする核酸配列は、T 2 A、P 2 A、E 2 A又はF 2 Aペプチドなどの自己分解ペプチドをコードする配列を用いて、別の成分をコードする核酸配列に融合してもよい。

30

【0207】

いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はエフェクタータンパク質をコードする核酸配列を含む、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）のための発現構築物が提供される。いくつかの実施形態において、前記発現構築物は、p C A G - 2 A - e G F Pベクターに挿入された、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はエフェクタータンパク質をコードするコドン最適化配列を含み、それにより、前記C a s 1 2 bタンパク質はe G F Pに動作可能に連結される。いくつかの実施形態において、第2ベクターは、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）におけるガイドRNA（例えば、s g RNA、c r RNA、又はp r e - c r RNAアレイ）を発現するために提供される。いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードする配列は、p U C 1 9 - U 6 - A a - s g RNAベクター骨格内で発現する。

40

【0208】

いくつかの実施形態において、C a s 1 2 bタンパク質をコードする核酸とg RNAをコードする核酸とは、異なるベクター上に存在する。いくつかの実施形態において、C a s 1 2 bタンパク質をコードする核酸とg RNAをコードする核酸とは、同一ベクター上に存在する。いくつかの実施形態において、C a s 1 2 bタンパク質をコードする核酸とg RNAをコードする核酸とは、C M Vプロモーター及びU 6プロモーターなどの異なる

50

プロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、Cas12bタンパク質をコードする核酸は、gRNAをコードする核酸の上流に位置する。いくつかの実施形態において、Cas12bタンパク質をコードする核酸は、gRNAをコードする核酸の下流に位置する。いくつかの実施形態において、Cas12bタンパク質をコードする核酸とgRNAをコードする核酸とは、標的核酸と接触するか、又は同時に細胞内に導入される。いくつかの実施形態において、Cas12bタンパク質をコードする核酸とgRNAをコードする核酸とは、標的核酸と接触するか、又はgRNAをコードする核酸の前にCas12bタンパク質をコードする核酸を導入するか、又はgRNAをコードする核酸の後にCas12bタンパク質をコードする核酸を導入するなど、順次細胞に導入される。いくつかの実施形態において、細胞はすでにCas12bタンパク質を発現している。いくつかの実施形態において、gRNAをコードする核酸のみが細胞に導入される。いくつかの実施形態において、細胞はすでにgRNAを発現している。いくつかの実施形態において、Cas12bタンパク質をコードする核酸のみが細胞に導入される。

10

20

30

40

50

【0209】

III. 使用方法

本願の一態様は、本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、エフェクタータンパク質又はCRISPR-Cas12bシステムのいずれかを用いて、標的核酸又は修飾核酸をインビトロ、エクスピボ又はインビボで検出する方法、並びに、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、エフェクタータンパク質又はCRISPR-Cas12bシステムを用いた治療又は診断方法を提供する。また、細胞中の核酸の検出又は修飾、及び被験者の疾患又は病状の治療又は診断における、本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、エフェクタータンパク質又はCRISPR-Cas12bシステムの使用、及び、核酸の検出又は修飾（例えば、細胞内）及び被験者の疾患又は病状の治療又は診断に用いる薬物の製造における、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ、エフェクタータンパク質又はエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムの1つ又は複数の成分を含む組成物の使用が提供される。

【0210】

修飾方法

いくつかの実施形態において、本願は、標的核酸を、本明細書に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム又はその成分のいずれかと接触させるステップを含む、標的配列を含む標的核酸を修飾する方法を提供する。例えば、Cas12bタンパク質又はそれをコードする核酸が既に存在する場合、さらにgRNA又はそれをコードする核酸を提供すればよい。gRNA又はそれをコードする核酸が既に存在する場合、さらにCas12bタンパク質又はそれをコードする核酸を提供すればよい。いくつかの実施形態において、標的核酸をCRISPR-Cas12bシステム（例えば、エンジニアリングされた、天然に存在しない）と接触させる（例えば、インビトロ、エクスピボ、又はインビボ）ステップを含み、前記CRISPR-Cas12bシステムは、（a）エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質（例えば、ニックアーゼ、切断Cas12bタンパク質、転写リプレッサー、転写活性化剤、塩基エディター又はプライムエディター）であって、参照Cas12bヌクレアーゼに対して1つ、2つ又は3つのタイプの変異を含み、前記変異は、（1）参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び475の位置のうちの1つ又は複数）の正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）による置換、及び／又は（2）参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、118及び119の位置のうちの1つ又は複数）の芳香環を有するアミノ酸残基（例えば、F、Y、W）による置換、及び／又は（3）参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいてssDNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、300、301、304、

3 2 9、6 3 6、6 3 9、6 4 7、6 8 2、7 5 7、7 5 8、7 6 1、7 6 4、7 6 8、
8 5 2、8 5 4、8 5 6、8 5 7、8 5 8、8 6 0、8 6 2、8 6 3、8 6 5、8 6 6、
8 6 7、8 6 9、9 3 8、9 5 6、9 5 7、9 5 8、9 9 4、1 0 9 3、及び1 0 9 7の
位置のうちの1つ又は複数の)の正電荷を帯びたアミノ酸残基(例えば、R、H、K)又は
疎水性アミノ酸残基(例えば、F、Y、W、M)による置換を含み、前記参照C a s 1 2
bヌクレアーゼは、S E Q I D N O: 1のアミノ酸配列、またはエンジニアリング
されたC a s 1 2 bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質をコードする核酸
を含む、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパ
ク質と、(b)標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むg R N A、又はg R N A
をコードする核酸と、を含み、前記ガイド配列が標的核酸の標的配列とハイブリダイズす
ることにより、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はそのエフェクター
タンパク質が、標的核酸の標的配列と接触することを媒介し、これにより、エンジニアリ
ングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質による標的核酸の
修飾につながる、標的配列を含む標的核酸を修飾する方法が提供される。いくつかの実施
形態において、前記g R N Aは、S E Q I D N O: 2 3及びS E Q I D N O: 2
5 ~ 5 3の配列のいずれかを含む足場を含む。いくつかの実施形態において、エンジニア
リングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質は、S E Q I
D N O: 2 ~ 2 2及びS E Q I D N O: 7 9 ~ 8 1のアミノ酸配列のいずれかを含
む。いくつかの実施形態において、標的核酸をC R I S P R-C a s 1 2 bシステム(例
えば、エンジニアリングされた、天然に存在しない)と接触させる(例えば、インヒドロ
、エキスピボ、又はインピボ)ステップを含み、前記C R I S P R-C a s 1 2 bシステ
ムは、(a)S E Q I D N O: 1のアミノ酸配列を含むC a s 1 2 bヌクレアーゼ若
しくはそのエフェクタータンパク質(例えば、ニックアーゼ、切断C a s 1 2 bタンパク質
、転写リプレッサー、転写活性化剤、塩基エディター又はプライムエディター)、又は、
エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質
であって、参照C a s 1 2 bヌクレアーゼに対して1つ、2つ又は3つのタイプの変異を
含み、前記変異は、(1)参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてP A Mと相互作用する
1つ又は複数のアミノ酸残基(例えば、1 1 6、1 2 3、1 3 0、1 3 2、1 4 4、1 4
5、1 5 3、1 7 3、2 2 2、3 9 5、4 0 0、及び4 7 5の位置のうちの1つ又は複数
)の正電荷を帯びたアミノ酸残基(例えば、R、H、K)による置換、及び/又は(2)
参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてD N A二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のア
ミノ酸残基(例えば、1 1 8及び1 1 9の位置のうちの1つ又は複数)の芳香環を有する
アミノ酸残基(例えば、F、Y、W)による置換、及び/又は(3)参照C a s 1 2 bヌ
クレアーゼのR u v Cドメインにおいてs s D N A基質と相互作用する1つ又は複数のア
ミノ酸残基(例えば、3 0 0、3 0 1、3 0 4、3 2 9、6 3 6、6 3 9、6 4 7、6 8
2、7 5 7、7 5 8、7 6 1、7 6 4、7 6 8、8 5 2、8 5 4、8 5 6、8 5 7、8 5
8、8 6 0、8 6 2、8 6 3、8 6 5、8 6 6、8 6 7、8 6 9、9 3 8、9 5 6、9 5
7、9 5 8、9 9 4、1 0 9 3、及び1 0 9 7の位置のうちの1つ又は複数の)の正電荷を
帯びたアミノ酸残基(例えば、R、H、K)又は疎水性アミノ酸残基(例えば、F、Y、
W、M)による置換を含み、前記参照C a s 1 2 bヌクレアーゼは、S E Q I D N O
: 1のアミノ酸配列、又はC a s 1 2 bヌクレアーゼ(例えば、エンジニアリング)若し
くはそのエフェクタータンパク質をコードする核酸を含む、エンジニアリングされたC a
s 1 2 bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質と、(b)標的核酸の標的配
列に相補的なガイド配列を含むg R N A、又はg R N Aをコードする核酸と、を含み、前
記g R N Aは、S E Q I D N O: 2 5 ~ 5 3の配列のいずれかを含むエンジニアリン
グされた足場を含む、前記ガイド配列が標的核酸の標的配列とハイブリダイズすること
により、C a s 1 2 bヌクレアーゼ(例えば、エンジニアリングされた)又はそのエフェク
タータンパク質が、標的核酸の標的配列と接触することを媒介し、これによりC a s 1 2
bヌクレアーゼ(例えば、エンジニアリング)又はそのエフェクタータンパク質による標
的核酸の修飾につながる、標的配列を含む標的核酸を修飾する方法が提供される。いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態において、エンジニアリングされた Cas 12 b ヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質は、SEQ ID NO: 2~22 及び SEQ ID NO: 79~81 のアミノ酸配列のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、この方法は、修復／ドナー核酸を含む修復／ドナーテンプレートを提供するステップをさらに含み、前記修復／ドナー核酸は、（例えば、相同組換えを介して）標的配列において修飾された標的核酸に組み込まれ得る。いくつかの実施形態において、標的核酸の修飾は、標的核酸における変異（例えば、機能喪失変異）を野生型（又は無害バージョン）配列に修復する。いくつかの実施形態において、標的核酸の修飾は、外来配列を導入する。いくつかの実施形態において、この方法はインビトロで行われる。いくつかの実施形態において、標的核酸は細胞内に存在する。いくつかの実施形態において、細胞は、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、又は動物細胞（例えば、ヒト又はマウス細胞などの哺乳動物細胞）である。いくつかの実施形態において、この方法はエクスピボで行われる。いくつかの実施形態において、この方法はインビボで行われる。いくつかの実施形態において、標的核酸は、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムによって切断されるか、又は標的核酸における標的配列がそれによって変化する（例えば、塩基編集される）。いくつかの実施形態において、標的核酸の発現は、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムによって変化する。いくつかの実施形態において、標的核酸は、細胞内のようなゲノム DNA である。いくつかの実施形態において、標的配列は、疾患又は病状に関連する。いくつかの実施形態において、標的配列を修飾する方法は、標的配列に関連する疾患又は病状を治療する。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムは、複数の crRNA をコードする前駆体ガイド RNA のアレイを含み、それぞれの crRNA は異なるガイド配列を含む。

10

20

【0211】

いくつかの実施形態において、本願は、本明細書に記載の標的核酸を修飾する方法のいずれかを用いて、個体の細胞における標的核酸を修飾することで、疾患又は病状を治療するステップを含む、個体の細胞における標的核酸に関連する疾患又は病状を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は、がん、心血管疾患、遺伝性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、眼疾患、細菌感染症及びウイルス感染症からなる群から選択される。

【0212】

本明細書に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas 12 b システムは、CRISPR-Cas 12 b システムにおけるエンジニアリングされた Cas 12 b エフェクタータンパク質のタイプに応じて、細胞における標的核酸をさまざまな方法で修飾することができる。いくつかの実施形態において、この方法は、標的核酸の部位特異的切断を誘導する。いくつかの実施形態において、この方法は、細菌細胞、植物細胞、又は動物細胞（例えば、哺乳動物細胞）などの細胞内のゲノム DNA を切断する。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞内のゲノム DNA を切断することによって細胞を殺す。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞内のウイルス核酸を切断する。いくつかの実施形態において、この方法は、有害又は疾患関連変異を非疾患関連配列に修復するなど、標的核酸の塩基編集を行う。いくつかの実施形態において、この方法は、標的核酸の発現を（例えば、少なくとも約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍又はそれ以上のいずれか）を向上させる（例えば、発現を低下させる有害な変異を修復する）。いくつかの実施形態において、この方法は、標的核酸の発現を（例えば、少なくとも約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍又はそれ以上のいずれか）低下させる（例えば、発現をアップレギュレートする有害な変異を修復する）。

30

40

【0213】

いくつかの実施形態において、この方法は、細胞における標的核酸の発現レベルを変化させる（例えば、増加又は減少させる）。いくつかの実施形態において、この方法は、例

50

例えば、トランス活性化ドメインに融合する酵素的不活性化 Cas12b タンパク質（例えば、SEQ ID NO: 79～81 のいずれか）に基づくエンジニアリングされた Cas12b エフェクタータンパク質を用いて、細胞における標的核酸の発現レベルを向上させる。いくつかの実施形態において、この方法は、例えば、転写リプレッサードメイン（例えば、KRABドメイン）に融合した酵素的不活性化 Cas12b タンパク質（例えば、SEQ ID NO: 79～81 のいずれか）に基づくエンジニアリングされた Cas12b エフェクタータンパク質を用いて、細胞における標的核酸の発現レベルを低下させる。いくつかの実施形態において、この方法は、例えば、エピジェネティック修飾ドメインに融合した酵素的不活性化 Cas12b タンパク質（例えば、SEQ ID NO: 79～81 のいずれか）に基づくエンジニアリングされた Cas12b エフェクタータンパク質を用いて、細胞における標的核酸にエピジェネティック修飾を導入する。いくつかの実施形態において、この方法は、例えば、シトシンデアミナーゼドメイン又はアデノシンデアミナーゼドメイン（例えば、TadA）又はそれらの機能断片に融合した酵素不活性化 Cas12b タンパク質（例えば、SEQ ID NO: 79～81 のいずれか）に基づくエンジニアリングされた Cas12b エフェクタータンパク質を用いて、細胞における標的核酸に塩基編集を導入する。エンジニアリングされた Cas12b エフェクタータンパク質が含む機能ドメインに応じて、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas12b システムは、他の修飾を標的核酸を導入するために使用することができる。

10

【0214】

いくつかの実施形態において、この方法は、細胞における標的核酸の標的配列を変化させる。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞における標的核酸に変異を導入する。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞内の1つ又は複数の内因性 DNA 修復経路（例えば非相同末端結合（NHEJ）又は相同性指向的組換え（HDR））を用いて、CRISPR 複合体の配列特異的切断に起因する標的 DNA における二本鎖切断を修復する。例示的な変異には、挿入、欠失、置換、及びフレームシフトが含まれるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態において、この方法は、標的遺伝子座にドナー DNA を挿入する。いくつかの実施形態において、前記ドナー DNA の挿入により、選択マーカー又はレポータータンパク質が細胞に導入される。いくつかの実施形態において、ドナー DNA の挿入は、遺伝子のノックインにつながる。いくつかの実施形態において、ドナー DNA の挿入はノックアウト変異を引き起こす。いくつかの実施形態において、ドナー DNA の挿入は、単一ヌクレオチド置換などの置換変異を引き起こす。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞の表現型変化を誘導する。

20

30

【0215】

いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システムは、遺伝子回路（genetic circuit）の一部として使用されるか、又は細胞のゲノム DNA に遺伝子回路を挿入するために使用される。本明細書に記載の誘導剤により制御されるエンジニアリングされた切断 Cas12b エフェクタータンパク質は、遺伝回路の構成要素として特に有用であってもよい。遺伝子回路は遺伝子治療に有用であってもよい。遺伝回路を設計し使用方法及び技術は、当該分野で知られている。さらに、例えば、Brophy, Jennifer AN, and Christopher A. Voigt. 「Principles of genetic circuit design.」Nature methods 11.5 (2014): 508 を参照することができる。

40

【0216】

本明細書に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas12b システムは、広範な標的核酸を修飾するために使用することができる。いくつかの実施形態において、標的核酸は細胞内に存在する。いくつかの実施形態において、標的核酸はゲノム DNA である。いくつかの実施形態において、標的核酸は染色体外 DNA である。いくつかの実施形態において、標的核酸は細胞に対して外因性である。いくつかの実施形態において、標的核酸はウイルス DNA などのウイルス核酸である。いくつかの実施形態において、標的核

50

酸は、細胞内のプラスミドである。いくつかの実施形態において、標的核酸は水平移入されたプラスミドである。いくつかの実施形態において、標的核酸はmRNAなどのRNAである。

【0217】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、単離されたDNAのような単離された核酸である。いくつかの実施形態において、標的核酸は、細胞フリー環境に存在する。いくつかの実施形態において、標的核酸は、プラスミドのような単離されたベクターである。いくつかの実施形態において、標的核酸は単離された線形DNA断片である。

【0218】

本明細書に記載の方法は、任意の適切な細胞タイプに適用可能である。いくつかの実施形態において、細胞は、細菌、酵母細胞、真菌細胞、藻類細胞、植物細胞、又は動物細胞（例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞）である。いくつかの実施形態において、細胞は、組織生検などの天然由来源から単離された細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、インビトロで培養された細胞株から単離された細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は初代細胞株に由来する。いくつかの実施形態において、細胞は不死化された細胞株に由来する。いくつかの実施形態において、細胞は遺伝子エンジニアリングされた細胞である。

【0219】

いくつかの実施形態において、細胞は、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ハムスター、牛、ヒツジ、ヤギ、馬、ロバ、豚、鹿、鶏、アヒル、ガチョウ、ウサギ、魚を含むが、それらに限定されない生体由来の動物細胞である。

【0220】

いくつかの実施形態において、細胞は、トウモロコシ、小麦、大麦、オート麦、イネ、大豆、オイルパーム、サフラワー、ゴマ、タバコ、亜麻、綿花、ヒマワリ、ハトムギ、キビ、コウリャン、アブラナ、大麻、野菜作物、飼料作物、工業作物、木本作物、及びバイオマス作物からなる群から選択される生体由来の植物細胞である。

【0221】

いくつかの実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、Neuro 2A (N2a) 細胞などのマウス細胞である。いくつかの実施形態において、細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、ヒト細胞はヒト胚腎臓293T (HEK293T又は293T) 細胞又はHeLa細胞である。いくつかの実施形態において、哺乳動物細胞は、免疫細胞、肝細胞、腫瘍細胞、幹細胞、ニューロン細胞、受精卵、筋肉細胞及び皮膚細胞からなる群から選択される。

【0222】

いくつかの実施形態において、細胞は、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラー(NK)T細胞、iNK-T細胞、NK-T様細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、腫瘍浸潤T細胞、及び樹状細胞(DC)活性化T細胞からなる群から選択される免疫細胞である。いくつかの実施形態において、この方法は、CAR-T細胞、CAR-NK細胞、又はTCR-T細胞などの修飾免疫細胞を生成する。

【0223】

いくつかの実施形態において、前記細胞は胚性幹(ES)細胞、誘導性多能幹(iPS)細胞、配偶子の前駆細胞、配偶子、受精卵、又は胚中の細胞である。

【0224】

本明細書に記載の方法は、標的細胞をインビボ、エクスビボ又はインビトロで修飾するために使用することができ、修飾された細胞の子孫又は細胞株が修飾された表現型を保持するように、細胞を変化させる方法で行うことができる。修飾された細胞及び子孫は、植物又は動物等の多細胞生物の一部であり、ゲノム編集や遺伝子治療等のエクスビボ又はインビボ応用を有することができる。

【0225】

いくつかの実施形態において、修飾方法はエクスビボで行われる。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

において、エンジニアリングされたC R I S P R - C a s 1 2 bシステムが細胞に導入された後、修飾された細胞（例えば、哺乳動物細胞）がエクスピボで増殖する。いくつかの実施形態において、修飾された細胞は、少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、12日、又は14日のいずれかだけ増殖させるために培養される。いくつかの実施形態において、修飾された細胞は、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、12日、又は14日のいずれか以下で培養される。いくつかの実施形態において、修飾された細胞はさらに評価又はスクリーニングされ、1つ又は複数の所望の表現型又は特性を有する細胞を選択するか、又はP C Rやシーケンシングによって評価又はスクリーニングされる。

【0226】

10

いくつかの実施形態において、標的配列は、疾患又は病状に関連する配列である。例示的な疾患又は病状には、がん、血液疾患、心血管疾患、遺伝性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経系疾患、神経変性疾患、眼疾患、細菌感染症、及びウイルス感染症が含まれるが、それらに限定されない。いくつかの実施例において、前記疾患又は病状は、移植片対宿主病（G v H D）又は宿主対移植片病（H v G）疾患である。いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は遺伝疾患である。いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は単遺伝子疾患又は病状である。いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は多遺伝子疾患又は病状である。

【0227】

20

いくつかの実施形態において、標的配列は、野生型配列と比較して変異を有する。いくつかの実施形態において、標的配列は、疾患又は病状に関連する一塩基多型（S N P）を有する。

【0228】

いくつかの実施形態において、標的核酸に挿入されたドナーDNAは、レポータータンパク質、抗原特異的受容体、治療用タンパク質、抗生物質耐性タンパク質、RNA i分子、サイトカイン、キナーゼ、抗原、抗原特異的受容体、キメラ受容体、サイトカイン受容体、及び自殺ポリペプチドからなる群から選択される生物産物をコードする。いくつかの実施形態において、ドナーDNAは治療用タンパク質、例えばサイトカインをコードする。いくつかの実施形態において、ドナーDNAは、遺伝子治療に有用な治療用タンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、ドナーDNAは治療用抗体をコードする。いくつかの実施形態において、ドナーDNAは、キメラ抗原受容体（C A R）又はエンジニアリングされたT C Rなどのエンジニアリングされた受容体をコードする。いくつかの実施形態において、ドナーDNAは、低分子RNA（例えば、s i R N A、s h R N A、又はm i R N A）又は長鎖ノンコーディングRNA（l i n c R N A）などの治療用RNAをコードする。

30

【0229】

本明細書に記載の方法は、2つ以上（例えば、2、3、4、5、6、8、10又はそれ以上）の異なる標的遺伝子座の多重遺伝子編集又は制御に用いることができる。いくつかの実施形態において、この方法は、複数の標的核酸又は標的核酸配列を検出又は修飾する。いくつかの実施形態において、この方法は、標的核酸を複数（例えば、2、3、4、5、6、8、10又はそれ以上）のc r R N A配列を含むガイドRNAと接触させるステップを含み、それらの前記c r R N Aはそれぞれ異なる標的配列を含む。

40

【0230】

また、本明細書に記載の修飾方法のいずれかを用いて生成された修飾標的核酸を含むエンジニアリングされた細胞が提供される。前記エンジニアリングされた細胞は、細胞治療に有用である。自己細胞又は同種異系細胞を用いて、本明細書に記載の方法によってエンジニアリングされた細胞を作製し、細胞治療を行うことができる。

【0231】

本明細書に記載の方法は、遺伝的バリエーションを研究するために、同質遺伝子型細胞株（例えば、哺乳動物細胞）を生成するためにも使用することができる。

50

【0232】

また、本明細書に記載のエンジニアリングされた細胞を含むエンジニアリングされた植物又は非ヒト動物が提供される。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた植物又は非ヒト動物は、ゲノムが編集された植物又は非ヒト動物である。前記エンジニアリングされた非ヒト動物は、疾患モデルとして用いることができる。

【0233】

非ヒトゲノム編集又はトランスジェニック動物を生成するための技術は、前核マイクロインジェクション、ウイルス感染、胚性幹細胞及び誘導多能幹（iPS）細胞の形質転換を含むがそれらに限定されないが、当該分野でよく知られている。使用できる詳細な方法としては、Sundberg及びIchiki（2006, Genetically Engineered Mice Handbook, CRC Press）及びGibson（2004, A Primer Of Genome Science 2nd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer）に記載されている方法が含まれるが、それらに限定されない。

【0234】

エンジニアリングされた動物は、牛科動物、馬科動物、羊科動物、犬科動物、鹿科動物、猫科動物、ヤギ、豚、霊長類、及びゾウ、鹿、シマウマ、ラクダなどのあまり一般的ではない哺乳類など、任意の適切な種であってもよいが、それらに限定されない。

【0235】

治療方法

また、本明細書に記載の細胞における標的核酸を修飾する方法のいずれかを用いた治療方法、及び本明細書に記載の標的核酸を検出する方法のいずれかを用いた診断方法が提供される。

【0236】

いくつかの実施形態において、本願は、標的核酸を、本明細書に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムのいずれかと接触させるステップを含み、ガイドRNAのガイド配列は標的核酸の標的配列に相補的であり、Cas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質（例えば、SEQ ID NO: 1～22及び79～81のいずれかを含む）とガイドRNAは、相互に関連して標的核酸に結合し、標的核酸を修飾することで、疾患又は病状を治療する、個体細胞における標的核酸に関連する疾患又は病状を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、変異（例えば、ノックアウト又はノックイン変異）が標的核酸に導入される。いくつかの実施形態において、標的核酸の発現が増強される。いくつかの実施形態において、標的核酸の発現が抑制される。

【0237】

いくつかの実施形態において、本願は、本明細書に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムのいずれか、及び治療剤をコードするドナーDNAの有効量を個体に投与するステップを含み、前記ガイドRNAのガイド配列は、個体の標的核酸の標的配列に相補的であり、前記Cas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質（例えば、SEQ ID NO: 1～22及び79～81のいずれかを含む）とガイドRNAは、相互に関連して標的核酸に結合し、ドナーDNAを標的配列に挿入することにより、疾患又は病状を治療する、個体の疾患又は病状を治療する方法を提供する。

【0238】

いくつかの実施形態において、本願は、修飾された標的核酸を含むエンジニアリングされた細胞の有効量を個体に投与するステップを含み、前記エンジニアリングされた細胞は、前記細胞を本明細書に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムのいずれかと接触させることによって製造され、前記ガイドRNAのガイド配列は、標的核酸の標的配列に相補的であり、前記Cas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質（例えば、SEQ ID NO: 1～

22及び79～81のいずれかを含む)とガイドRNAは相互に関連して標的核酸に結合し、標的核酸を修飾する、個体の疾患又は病状を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記エンジニアリングされた細胞は免疫細胞である。

【0239】

いくつかの実施例において、標的核酸を個体と接触させるか(例えば、エキスピボ、又はインピボ)、CRISPR-Cas12bシステム(例えば、エンジニアリングされた、天然に存在しない)の有効量を個体に投与するステップを含み、前記CRISPR-Cas12bシステムは、(a)エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質(例えば、ニックアーゼ、切断Cas12bタンパク質、転写リプレッサー、転写活性化剤、塩基エディター又はプライムエディター)であって、参照Cas12bヌクレアーゼに対して1つ、2つ又は3つのタイプの変異を含み、前記変異は、(1)参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基(例えば、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び475の位置のうちの1つ又は複数)の正電荷を帯びたアミノ酸残基(例えば、R、H、K)による置換、及び/又は(2)参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基(例えば、118及び119の位置のうちの1つ又は複数)の芳香環を有するアミノ酸残基(例えば、F、Y、W)による置換、及び/又は(3)参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいてssDNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基(例えば、300、301、304、329、636、639、647、682、757、758、761、764、768、852、854、856、857、858、860、862、863、865、866、867、869、938、956、957、958、994、1093、及び1097の位置のうちの1つ又は複数)の正電荷を帯びたアミノ酸残基(例えば、R、H、K)又は疎水性アミノ酸残基(例えば、F、Y、W、M)による置換を含み、前記参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列、またはエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質をコードする核酸を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質と、(b)標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むgRNA、又は前記gRNAをコードする核酸と、を含み、前記ガイド配列が標的核酸の標的配列とハイブリダイズすることにより、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質が、標的核酸の標的配列と接触することを媒介し、これにより、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質による標的核酸の修飾につながることににより、疾患又は病状を治療する、個体(例えば、ヒト)細胞における標的核酸に関連する疾患又は病状を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、標的核酸を個体と接触させるか(例えば、エキスピボ、又はインピボ)、又はCRISPR-Cas12bシステム(例えば、エンジニアリングされた、天然に存在しない)の有効量を個体に投与するステップを含み、前記CRISPR-Cas12bシステムは、(a)SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含むCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質(例えば、ニックアーゼ、切断Cas12bタンパク質、転写リプレッサー、転写活性化剤、塩基エディター又はプライムエディター)、又は、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質であって、参照Cas12bヌクレアーゼに対して1つ、2つ又は3つのタイプの変異を含み、前記変異は、(1)参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基(例えば、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び475の位置のうちの1つ又は複数)の正電荷を帯びたアミノ酸残基(例えば、R、H、K)による置換、及び/又は(2)参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基(例えば、118及び119の位置のうちの1つ又は複数)の芳香環を有するアミノ酸残基(例えば、F、Y、W)による置換、及び/又は(3)参照Cas12bヌクレアーゼのRuvCドメインにおいてssDNA基

10

20

30

40

50

質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基（例えば、300、301、304、329、636、639、647、682、757、758、761、764、768、852、854、856、857、858、860、862、863、865、866、867、869、938、956、957、958、994、1093、及び1097の位置のうちの1つ又は複数の）の正電荷を帯びたアミノ酸残基（例えば、R、H、K）又は疎水性アミノ酸残基（例えば、F、Y、W、M）による置換を含み、前記参照Cas12bヌクレアーゼは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列、又はCas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリング）若しくはそのエフェクタータンパク質をコードする核酸を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質と、（b）標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含むgRNA、又は前記gRNAをコードする核酸と、を含み、前記gRNAは、SEQ ID NO: 25～53の配列のいずれかを含むエンジニアリングされた足場を含み、前記ガイド配列が標的核酸の標的配列とハイブリダイズすることにより、Cas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた）又はそのエフェクタータンパク質が、標的核酸の標的配列と接触することを媒介し、これによりCas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリング）又はそのエフェクタータンパク質による標的核酸の修飾につながることに、疾患又は病状を治療する、個体（例えば、ヒト）細胞における標的核酸に関連する疾患又は病状を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質は、SEQ ID NO: 2～22及びSEQ ID NO: 79～81のアミノ酸配列のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、この方法は、標的核酸（例えば、エクスピボ、又はインスピボ）を、修復／ドナー核酸の有効量と接触させるか、又は有効量の修復／ドナー核酸を個体に投与するステップをさらに含み、前記修復／ドナー核酸は、標的配列に（例えば、相同組換えを介して）修飾された標的核酸に組み込むことができる。いくつかの実施形態において、前記標的核酸の修飾は、標的核酸における変異（例えば、機能喪失変異）を野生型（又は無害バージョン）配列に修復する。いくつかの実施形態において、前記標的核酸の修飾は、外来配列を導入する。

10

20

30

40

50

【0240】

いくつかの実施形態において、個体はヒトである。いくつかの実施形態において、個体は、例えば、げっ歯動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター）、ペット（例えば、猫、犬、ウサギ）、又は農場動物（例えば、馬、牛、羊、ヤギ、ロバ、豚）などのモデル動物である。いくつかの実施形態において、個体は哺乳動物である。

【0241】

いくつかの実施形態において、疾患又は病状は、個体（例えば、ヒト）における標的核酸の異常（例えば、病原点突然変異）に関連する。いくつかの実施形態において、疾患又は病状は、CRISPR-Cas12bシステム又は複合体による標的核酸の修飾（例えば、切断、塩基編集又は修復）（例えば、修復異常）によって治療される。いくつかの実施形態において、疾患は、1つ又は複数の標的遺伝子の過剰発現又は誤発現（例えば、ミスセンス突然変異、フレームシフト突然変異、ナンセンス突然変異）によって引き起こされ、前記CRISPR-Cas12bシステム又は複合体は、1つ又は複数の標的遺伝子を標的にして、切断、塩基編集、又は配列修復（例えば、さらに修復／ドナーテンプレートを導入して、相同組換えにより、CRISPR-Cas12bシステム又は複合体を介して、切断された標的遺伝子を修復する）などの標的修飾をすることができる。

【0242】

いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は、がん、心血管疾患、遺伝性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、眼疾患、細菌感染症、及びウイルス感染症からなる群から選択される。

【0243】

いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は、トランスサイレチンアミロイドーシス（ATTR）（例えば、トランスサイレチン関連野生型アミロイドーシス（ATTR

w t)、トランスサイレチン関連遺伝性アミロイドーシス (A T T R m)、家族性アミロイド多発神経障害 (F A P、A T T R - P N) 又は家族性アミロイド心筋症 (F A C、A T T R - C M)、嚢胞性線維症、遺伝性血管浮腫 (H A E)、糖尿病、進行性デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベーカー型筋ジストロフィー (B M D)、 α -1アンチトリプシン欠損症 (A A T 欠乏)、ポンベ病、筋強直性ジストロフィー、ハンチントン病、脆弱X症候群 (F X S)、フリードライヒ運動失調症 (F R D A)、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、前頭側頭型認知症 (F T D)、遺伝性慢性腎臓病、高脂血症、高コレステロール血症 (例えば、家族性高コレステロール血症)、レーベル先天性黒内障 (L C A)、鎌状赤血球症 (S C D)、およびベータサラセミアからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、C R I S P R - C a s 1 2 b システム又は複合体は、脂質ナノ粒子を介してパッケージングされ、送達される。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は静脈内注射又は輸注によって個体に投与される。

10

【0244】

いくつかの実施形態において、標的核酸はP C S K 9である。いくつかの実施形態において、疾患又は病状は心血管疾患である。いくつかの実施形態において、疾患又は病状は冠状動脈疾患である。いくつかの実施形態において、この方法は、個体のコレステロールレベルを低下させる。いくつかの実施形態において、この方法は、個体における糖尿病を治療する。いくつかの実施形態において、疾患又は病状は家族性高コレステロール血症のような高コレステロール血症である。

【0245】

20

いくつかの実施形態において、標的核酸はH B G 1及び／又はH B G 2である。いくつかの実施形態において、疾患又は病状は鎌状赤血球症又はベータサラセミアである。いくつかの実施形態において、疾患又は病状は遺伝性胎児ヘモグロビン持続症 (H P F H)、H b S - 遺伝子欠失H P F H、又は点突然変異によるH b S - H P F Hである。

【0246】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、主要なH I V - 1 共同受容体をコードするC - C ケモカイン受容体 (C C R) 5 (C C R 5) である。いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は、感染症、例えば、A I D S である。いくつかの実施形態において、前記疾患又は病状は、がん (例えば、乳がん又は前立腺がん)、アテローム性動脈硬化症、脳卒中又は炎症性腸疾患 (I B D) などの非感染症である。

30

【0247】

いくつかの実施形態において、標的核酸はC D 3 4 である。いくつかの実施形態において、疾患又は病状はがんである。

【0248】

いくつかの実施形態において、標的核酸はリングフィンガータンパク質2 (R N F 2) である。いくつかの実施形態において、疾患又は病状は、L u o - S c h o c h - Y a m a m o t o 症候群又は非特異的症候群性知的障害などの神経系疾患である。

【0249】

検出方法

本願はまた、活性が向上したエンジニアリングされたC a s 1 2 b ヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質 (例えば、S E Q I D N O : 2 ~ 2 2 及び7 9 ~ 8 1 のいずれかを含む) のいずれか、又はC R I S P R - C a s 1 2 b システムを用いて標的核酸を検出する方法を提供する。検出剤としてC a s 1 2 b エフェクタータンパク質を使用することは、V型C R I S P R / C a s 1 2 タンパク質 (例えば、C a s 1 2 a、C a s 1 2 b、C a s 1 2 c、C a s 1 2 d、C a s 1 2 e (C a s X) 及びC a s 1 2 i) が標的DNAの検出によって活性化されると、非標的一本鎖DNA (s s DNA) を乱雑に切断することができるという発見の利点を利用する。C a s 1 2 b タンパク質を検出剤として用いる方法は、例えばU S 1 0 2 5 3 3 6 5 及びW O 2 0 2 0 / 0 5 6 9 2 4 に記載されており、それらの内容は全体として引用により本明細書に組み込まれている。いくつかの実施形態において、サンプル中の標的核酸の検出により、疾患又は病状を診断する

40

50

。

【0250】

いくつかの実施形態において、Cas12bエフェクタータンパク質がガイドRNAによって活性化されると、サンプルがガイドRNAのハイブリダイズする標的DNAを含む（すなわち、サンプルが標的DNAを含む）場合、Cas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質は、一本鎖核酸（例えば、非標的ssDNA又はRNA、すなわち、ガイドRNAのガイド配列がハイブリダイズしない一本鎖核酸）を乱雑に切断するヌクレアーゼとなる。したがって、標的DNA（二本鎖又は一本鎖）がサンプル中に存在する場合（例えば、場合によっては閾値よりも高い量）、サンプル中の一本鎖核酸が切断され、これは任意の簡便な検出方法（例えば、DNA又はRNAなどの標識された一本鎖検出核酸）によって検出することができる。Cas12bはssDNA及びssRNAを切断することができる。

10

【0251】

いくつかの実施形態において、(a) サンプルを、(i) 本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質（例えば、SEQ ID NO: 2~22及び79~81のいずれかを含む）のいずれか、(ii) 標的DNAとハイブリダイズするガイド配列を含むガイドRNA、及び(iii) 一本鎖の検出核酸（すなわち、「一本鎖検出核酸」）であって、ガイドRNAのガイド配列とハイブリダイズしないものの接触させるステップと、(b) エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質によって一本鎖検出核酸を切断して生じる検出可能なシグナルを測定するステップと、を含む、サンプル中の標的DNA（例えば、二本鎖又は一本鎖）を検出する方法が提供される。いくつかの実施形態において、(a) サンプルを、(i) 本明細書に記載のCas12bヌクレアーゼ（例えば、エンジニアリングされた又は野生型）又はそのエフェクタータンパク質（例えば、SEQ ID NO: 1~22及び79~81のいずれかを含む）のいずれか、(ii) 標的DNAとハイブリダイズするガイド配列を含むガイドRNA、及びSEQ ID NO: 25~53の配列のいずれかを含むエンジニアリングされた足場、及び(iii) 一本鎖の検出核酸（すなわち、「一本鎖検出核酸」）であって、ガイドRNAのガイド配列とハイブリダイズしないものと接触させるステップと、(b) エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質によって一本鎖検出核酸を切断して生じる検出可能なシグナルを測定するステップと、を含む、サンプル中の標的DNA（例えば、二本鎖又は一本鎖）を検出する方法が提供される。いくつかの実施形態において、(a) サンプルを、本明細書に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム及び標識された検出核酸と接触させるステップであって、前記gRNAは、標的核酸の標的配列に相補的なガイド配列を含み、前記標識された検出核酸は、gRNAのガイド配列とハイブリダイズしない一本鎖のものである、ステップと、(b) エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムによって標識された検出核酸を切断して生じる検出可能なシグナルを測定することにより、前記標的核酸を検出するステップと、を含む、サンプル中の標的核酸を検出する方法が提供される。いくつかの場合、一本鎖検出核酸は、蛍光発光染料対を含む（例えば、蛍光発光染料対は蛍光エネルギー共鳴移動（FRET）対、クエンチング剤／蛍光対である）を含む。いくつかの場合、前記標的DNAはウイルスDNA（例えば、パピローマウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、パルボウイルスなど）である。いくつかの実施形態において、一本鎖検出核酸はDNAである。いくつかの実施形態において、一本鎖検出核酸はRNAである。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、この方法はインビトロで行われる。いくつかの実施形態において、前記標的核酸は、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、又は動物細胞などの細胞内に存在する。いくつかの実施形態において、この方法はエクスピボで行われる。いくつかの実施形態において、この方法はインビボで行われる。いくつかの実施形態において、前記標的核酸はゲノムDNAである。いくつかの実施形態

20

30

40

50

において、前記標的配列は疾患又は病状に関連する。

【0252】

本開示のサンプル中の標的DNA（一本鎖又は二本鎖）を検出する方法は、標的DNAを高感度で検出することができる。いくつかの場合、本開示の方法は、複数のDNA（標的DNA及び複数の非標的DNAを含む）を含むサンプル中に存在する標的DNAを検出するために使用することができ、ここで、前記標的DNAは、 10^6 個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーとして存在する（例えば、 10^6 個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA、 10^5 個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA、 10^4 個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA、 10^3 個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA、 10^2 個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA、50個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA、20個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA、10個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA、又は5個の非標的DNAあたり1つ又は複数のコピーの標的DNA）。

10

【0253】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質（例えば、SEQ ID NO: 2~22のいずれかを含む）は、参照Cas12bヌクレアーゼ（例えば、SEQ ID NO: 1）と比較して、より高い感度で標的DNAを検出することができる。いくつかの実施形態において、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、参照Cas12bヌクレアーゼと比較して、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上の感度で標的DNAを検出することができる。

20

【0254】

送達方法

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム若しくはその成分、その核酸分子、又はその成分をコードする若しくは提供する核酸分子は、プラスミド又はウイルスベクター（例えば、上記の「構築物及びベクター」のサブセクションに記載されたベクターのいずれか）などの複数の送達系によって宿主細胞に送達することができる。いくつかの実施形態又は方法において、前記エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はそのエフェクタータンパク質及びそのホモログRNAガイドから構成されるリボ核タンパク質複合体のヌクレオフェクション又はエレクトロポレーションなどの他の方法によって送達することができる。

30

【0255】

いくつかの実施形態において、前記送達は、ナノ粒子又はエクソソームを介して行われる。

【0256】

いくつかの実施形態において、対合されたCas12bニッカーゼ複合体は、ナノ粒子又は他の直接タンパク質送達方法によって直接送達されてもよく、それにより、2つの対合されたcrRNA要素を含む複合体が共同送達される。さらに、タンパク質は、ウイルスベクターによって細胞に送達されたり、細胞に直接送達されて、2つの対合されたスパーサー領域を含むCRISPRアレイを直接送達してダブルニッキングを行ったりしてもよい。いくつかの場合、RNAを直接送達するために、RNAは、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）（特に、三分岐型N-アセチルガラクトサミン）などの少なくとも1つの糖部分に結合してもよい。いくつかの実施形態において、CRISPR-Cas12bシステム又はその成分は、脂質ナノ粒子を介してパッケージングされ、送達される。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は静脈内注射又は輸注によって個体に投与される。

40

【0257】

50

IV. キット及び製品

また、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質、エンジニアリングされた足場を含む sgRNA（例えば、SEQ ID NO: 25～53 のいずれか）、又はエンジニアリングされた CRISPR-Cas 1 2 b システムの 1 つ又は複数の成分を含む、組成物、キット、単位用量、及び製品が提供される。

【0258】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のエンジニアリングされた Cas 1 2 b ヌクレアーゼ若しくはそのエフェクタータンパク質、又はエンジニアリングされた CRISPR-Cas 1 2 b システムのいずれかをコードする 1 つ又は複数の AAV ベクターを含むキットが提供される。いくつかの実施形態において、前記キットは、エンジニアリングされた足場を含む sgRNA（例えば、SEQ ID NO: 25～53 のいずれか）のような 1 つ又は複数のガイド RNA をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記キットはドナー DNA をさらに含む。いくつかの実施形態において、キットは、ヒト細胞などの細胞をさらに含む。

10

【0259】

前記キットは、エンジニアリング細胞の増殖を可能にするために、容器、試薬、培地、サイトカイン、緩衝液、抗体などの 1 つ又は複数の追加成分を含んでいてもよい。キットは、組成物の投与のための手段をさらに含んでいてもよい。

【0260】

キットは、標的核酸を検出又は修飾する方法など、本明細書に記載のエンジニアリングされた CRISPR-Cas 1 2 b システムを使用するための説明書をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットは、疾患又は病状の治療又は診断のための説明書を含む。キットの成分の使用に関する説明書は、通常、予想される治療の用量、投与スケジュール、及び投与経路に関する情報を含む。前記容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、多用量パッケージ）、又はサブ単位用量であってもよい。例えば、キットは、個体に長期的に有効な治療を提供するために、本明細書に開示された組成物の十分な用量を含むものを提供することができる。キットは、組成物の複数の単位用量と、薬局（例えば、病院薬局や調剤薬局）で保管及び使用するのに十分な数に包装された使用説明書をさらに含んでいてもよい。

20

30

【0261】

本願のキットは、適切なパッケージを採用する。適切な包装には、バイアル、ボトル、缶、柔軟性包装（例えば、密封されたポリエステルフィルム又はビニール袋）などが含まれるが、それらに限定されない。キットは任意に、緩衝液及び解釈情報などの追加のコンポーネントを提供してもよい。したがって、本願は、バイアル（例えば、密閉されたバイアル）、ボトル、缶、柔軟性包装などを含む製品も提供する。

【0262】

前記製品は、容器と、容器上又は容器に関連するラベル又はパッケージインサートとを含んでいてもよい。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが挙げられる。前記容器は、ガラスやプラスチック等の複数の材料から形成されてもよい。一般に、前記容器は、本明細書に記載された疾患又は病状の治療に有効な組成物を収容し、無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は静脈内溶液バッグ又は皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアルであってもよい）。ラベル又はパッケージインサートは、当該組成物が個体の特定の状態を治療するために使用されていることを示す。ラベル又はパッケージインサートには、組成物を個体に投与するための説明書がさらに含まれている。

40

【0263】

パッケージインサートとは、通常、治療製品の商業包装に含まれる説明書であり、それらの治療製品の適応症、用法、用量、投与、禁忌及び／又は使用に関する警告に関する情報を含む。

50

【0264】

さらに、前記製品は、注射用静菌水（B W F I）、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液、ブドウ糖溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第2容器をさらに含んでもよい。また、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジを含む、商業的及びユーザーの観点から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0265】

例示的な実施形態

実施形態1． エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼであって、参照C a s 1 2 bヌクレアーゼに対して、1つ、2つ又は3つのタイプの変異を含み、前記変異は、

(1) 前記参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてプロトスペーサー隣接モチーフ（P A M）と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換、及び／又は

(2) 前記参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてD N A二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換、及び／又は

(3) 前記参照C a s 1 2 bヌクレアーゼのR u v Cドメインにおいて一本鎖D N A基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基又は疎水性アミノ酸残基への置換を含む、エンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【0266】

実施形態2． 前記参照C a s 1 2 bヌクレアーゼは野生型C a s 1 2 bヌクレアーゼである、実施形態1に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【0267】

実施形態3． 前記参照C a s 1 2 bヌクレアーゼはS E Q I D N O : 1のアミノ酸配列を含む、実施形態1又は2に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【0268】

実施形態4． 前記参照C a s 1 2 bヌクレアーゼにおいてP A Mと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換を含む、実施形態1～3のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【0269】

実施形態5． 前記P A Mと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は3次元構造においてP A Mから9 Å以内にある、実施形態4に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【0270】

実施形態6． 前記P A Mと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、116、123、130、132、144、145、153、173、222、395、400、及び／又は475の位置のうちの1つ又は複数にあり、前記アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1に従って番号付けされる、実施形態4又は5に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【0271】

実施形態7． 前記P A Mと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D116、K123、D130、D132、N144、K145、E153、D173、Q222、D395、N400、及び／又はE475のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含み、前記アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1に従って番号付けされる、実施形態6に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【0272】

実施形態8． 前記P A Mと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、D116及びE475のアミノ酸残基のうちの1つ又は複数を含み、前記アミノ酸残基はS E Q I D N O : 1に従って番号付けされる、実施形態7に記載のエンジニアリングされたC a s 1 2 bヌクレアーゼ。

【0273】

実施形態9． 前記正電荷を帯びたアミノ酸残基はR又はKである、実施形態4～8のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0274】

実施形態10． 前記参照Cas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換は、D116R及び／又はE475Rの置換のうちの1つ又は複数であり、前記アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる、実施形態9に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0275】

実施形態11． 前記参照Cas12bヌクレアーゼにおいて前記DNA二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換を含む、実施形態1～10のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0276】

実施形態12． 前記DNA二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基は、標的鎖の3'末端に対するPAMにおける最後の塩基対と相互作用する、実施形態11に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0277】

実施形態13． 前記DNA二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基は、118及び／又は119の位置のうちの1つ又は複数にあり、前記アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる、実施形態11又は12に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0278】

実施形態14． 前記芳香環を有するアミノ酸残基はY、F又はWである、実施形態11～13のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0279】

実施形態15． 前記参照Cas12bヌクレアーゼにおいてDNA二本鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換は、Q119Y、Q119F又はQ119Wであり、前記アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる、実施形態14に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0280】

実施形態16． 前記参照Cas12bヌクレアーゼにおいて前記RuvCドメイン内に位置し、前記一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基又は疎水性アミノ酸残基への置換を含む、実施形態1～16のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0281】

実施形態17． 前記RuvCドメインにおいて前記一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、3次元構造において前記一本鎖DNA基質から9 Å以内にある、実施形態16に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0282】

実施形態18． 前記RuvCドメインにおいて前記一本鎖DNA基質と相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基は、300、301、304、329、636、639、647、682、757、758、761、764、768、852、854、856、857、858、860、862、863、865、866、867、869、938、956、957、958、994、1093、及び／又は1097の位置のうちの1つ又は複数にあり、前記アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる、実施形態17に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0283】

実施形態 19. R u v C ドメイン内に位置し、一本鎖 DNA 基質と相互作用する 1 つ又は複数のアミノ酸残基は、D 3 0 0、K 3 0 1、E 3 0 4、N 3 2 9、E 6 3 6、Q 6 3 9、T 6 4 7、Q 6 8 2、I 7 5 7、E 7 5 8、E 7 6 1、E 7 6 4、K 7 6 8、E 8 5 2、Q 8 5 4、N 8 5 6、N 8 5 7、D 8 5 8、P 8 6 0、S 8 6 2、E 8 6 3、N 8 6 5、Q 8 6 6、L 8 6 7、Q 8 6 9、E 9 3 8、E 9 5 6、G 9 5 7、E 9 5 8、I 9 9 4、Q 1 0 9 3、及び／又は W 1 0 9 7 のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数を含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、実施形態 18 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【0284】

実施形態 20. E 6 3 6、I 7 5 7、E 7 5 8、E 7 6 1、Q 8 5 4、N 8 5 7、N 8 6 5、Q 8 6 6、Q 8 6 9、及び／又は Q 1 0 9 3 のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換を含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、実施形態 19 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

10

【0285】

実施形態 21. 前記正電荷を帯びたアミノ酸残基は R 又は K である、実施形態 20 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【0286】

実施形態 22. 前記参照 C a s 1 2 b ヌクレアーゼにおいて前記 R u v C ドメイン内に位置し、前記一本鎖 DNA 基質と相互作用する 1 つ又は複数のアミノ酸残基の置換は、E 6 3 6 R、I 7 5 7 R、E 7 5 8 R、E 7 6 1 R、Q 8 5 4 R 及び／又は N 8 5 7 K の置換のうちの 1 つ又は複数であり、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、実施形態 21 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

20

【0287】

実施形態 23. E 7 5 8、E 7 6 1、E 8 6 3、N 8 6 5、Q 8 6 6、Q 8 6 9、Q 9 5 6 及び／又は Q 1 0 9 3 のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数から疎水性アミノ酸残基への置換を含み、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、実施形態 19 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【0288】

実施形態 24. 前記疎水性アミノ酸残基は、W、Y、F 又は M である、実施形態 23 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

30

【0289】

実施形態 25. 前記参照 C a s 1 2 b ヌクレアーゼにおいて前記 R u v C ドメイン内に位置し、前記一本鎖 DNA 基質と相互作用する 1 つ又は複数のアミノ酸残基の置換は、N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、Q 8 6 6 M、Q 8 6 9 M、Q 1 0 9 3 W 及び／又は Q 1 0 9 3 Y の置換のうちの 1 つ又は複数であり、前記アミノ酸残基は S E Q I D N O : 1 に従って番号付けされる、実施形態 24 に記載のエンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼ。

【0290】

実施形態 26. 前記エンジニアリングされた C a s 1 2 b ヌクレアーゼは、(1) D 1 1 6 R、(2) E 4 7 5 R、(3) Q 1 1 9 F 及び E 4 7 5 R、(4) Q 1 1 9 F、E 4 7 5 R、及び E 7 5 8 R、(5) Q 1 1 9 Y、(6) Q 1 1 9 F、(7) Q 1 1 9 W、(8) I 7 5 7 R、(9) E 7 5 8 R、(10) E 7 6 1 R、(11) K 7 6 8 R、(12) I 7 5 7 R 及び E 7 5 8 R、(13) I 7 5 7 R 及び E 7 6 1 R、(14) I 7 5 7 R 及び K 7 6 8 R、(15) E 7 5 8 R 及び E 7 6 1 R、(16) E 7 5 8 R 及び K 7 6 8 R、(17) E 7 6 1 R 及び K 7 6 8 R、(18) I 7 5 7 R、E 7 5 8 R、及び E 7 6 1 R、(19) I 7 5 7 R、E 7 5 8 R、及び K 7 6 8 R、(20) I 7 5 7 R、E 7 6 1 R 及び K 7 6 8 R、(21) E 7 5 8 R、E 7 6 1 R、及び K 7 6 8 R、(22) I 7 5 7 R、E 7 5 8 R、E 7 6 1 R、及び K 7 6 8 R、(23) Q 8 6 6 M、(24) Q

40

50

8 6 9 M、並びに、(25) Q 8 6 6 M及びQ 8 6 9 Mの置換のいずれか又はそれらの組み合わせを含み、前記アミノ酸残基はSEQ ID NO: 1に従って番号付けされる、実施形態1～3のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0291】

実施形態27. SEQ ID NO: 20～22のいずれかと少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態1～26のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0292】

実施形態28. 1つ又は複数の変異をさらに含み、前記変異は、アミノ酸残基855～859を含む柔軟性領域の柔軟性を向上させ、前記アミノ酸位置は、SEQ ID NO: 1に従って番号付けされる、実施形態1～27のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0293】

実施形態29. 柔軟性を向上させる1つ又は複数の変異はN856Gを含む、実施形態28に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0294】

実施形態30. エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼであって、(1) D116R、(2) E475R、(3) Q119F及びE475R、(4) Q119F、E475R、及びE758R、(5) Q119Y、(6) Q119F、(7) Q119W、(8) Q119F及びE475R、(9) Q119F、E475R及びE758R (10) E636R、(11) I757R、(12) E758R、(13) E761R、(14) Q854R、(15) N857K、(16) Q119F、E475R、及びE758R、(17) K768R、(18) I757R及びE758R、(19) I757R及びE761R、(20) I757R及びK768R、(21) E758R及びE761R、(22) E758R及びK768R、(23) E761R及びK768R、(24) I757R、E758R、及びE761R、(25) I757R、E758R、及びK768R、(26) I757R、E761R及びK768R、(27) E758R、E761R、及びK768R、(28) I757R、E758R、E761R、及びK768R (29) N865W、(30) N865Y、(31) Q866M、(32) Q869M、(33) Q1093W、(34) Q1093Y、及び／又は(35) Q866M及びQ869Mの変異のうちのいずれか1つ又は複数を含み、前記アミノ酸位置は、SEQ ID NO: 1に従って番号付けされる、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0295】

実施形態31. SEQ ID NO: 2～22のいずれか一項に記載のアミノ酸配列を含む、エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ。

【0296】

実施形態32. 実施形態1～31のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体を含む、エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0297】

実施形態33. 前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体は酵素活性を有する、実施形態32に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0298】

実施形態34. 前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、DNA分子中の二本鎖断裂を誘導することができる、実施形態32又は33に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0299】

実施形態35. 前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は

、DNA分子中の一本鎖の断裂を誘導することができる、実施形態32又は33に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0300】

実施形態36． 前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質は、前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼの酵素的不活性化変異を含む、実施形態32に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0301】

実施形態37． 前記酵素的不活性化変異は、D570A、R785A、E848A、R911A及び／又はD977Aを含む、実施形態36に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0302】

実施形態38． 前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体に融合する機能ドメインをさらに含む、実施形態32～37のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0303】

実施形態39． 前記機能ドメインは、翻訳開始子ドメイン、転写リプレッサードメイン、トランス活性化ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、核酸塩基編集ドメイン、逆転写酵素ドメイン、レポータードメイン、及びヌクレアーゼドメインからなる群から選択される、実施形態38に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0304】

実施形態40． エンジニアリングされたCasヌクレアーゼ又はその機能的誘導体のN末端部分を含む第1ポリペプチドと、エンジニアリングされたCasヌクレアーゼ及びその機能的誘導体のC末端部分を含む第2ポリペプチドと、を含み、前記第1ポリペプチド及び前記第2ポリペプチドは、ガイド配列を含むガイドRNAの存在下で相互に会合し、前記ガイド配列に相補的な標的配列を含む標的核酸に特異的に結合するクラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパンドロームリピート（CRISPR）複合体を形成することができる、実施形態32～37のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0305】

実施形態41． エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体のN末端アミノ酸残基1～Xを含む第1ポリペプチドと、X+1位の残基から前記エンジニアリングされたCas12bヌクレアーゼ又はその機能的誘導体のC末端を含む第2ポリペプチドと、を含み、前記第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは、ガイド配列を含むガイドRNAの存在下で相互に会合し、ガイド配列に相補的な標的配列を含む標的核酸に特異的に結合するクラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパンドロームリピート（CRISPR）複合体を形成することができる、実施形態40に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0306】

実施形態42． 前記第1ポリペプチド及び前記第2ポリペプチドは、それぞれ二量化ドメインを含む、実施形態40又は41に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0307】

実施形態43． 前記第1二量化ドメイン及び前記第2二量化ドメインは、誘導物の存在下で相互に会合する、実施形態42に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0308】

実施形態44． 前記第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは、二量化ドメインを含まない、実施形態40又は41に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質。

【0309】

実施形態45. (a) 実施形態32～44のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質、又は前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質をコードする核酸と、(b) 標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドRNA、又は前記ガイドRNAをコードする核酸と、を含み、前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質と前記ガイドRNAは、前記標的配列を含む標的核酸に特異的結合するCRISPR複合体を形成し、前記標的核酸の修飾を誘導することができる、エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム。

【0310】

10

実施形態46. 前記gRNAは、crRNA及びtracrRNAを含む、実施形態45に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム。

【0311】

実施形態47. 複数のcrRNAをコードする前駆体ガイドRNAアレイを含む、実施形態45又は46に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム。

【0312】

実施形態48. 前記ガイドRNAはシングルガイドRNA(sgRNA)である、実施形態45～47のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム。

20

【0313】

実施形態49. 前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質をコードする1つ又は複数のベクターを含む、実施形態45～48のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム。

【0314】

実施形態50. 前記1つ又は複数のベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、実施形態49に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム。

【0315】

実施形態51. 前記AAVベクターは、さらに前記ガイドRNAをコードする、実施形態50に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム。

30

【0316】

実施形態52. サンプル中の標的核酸を検出する方法であって、(a) 前記サンプルを、実施形態45～51のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステム及び標識検出核酸接触と接触させるステップであって、前記標識検出核酸は、前記ガイドRNAのガイド配列とハイブリダイズしない一本鎖のものである、ステップと、(b) 前記エンジニアリングされたCas12bエフェクタータンパク質によって前記標識検出核酸を切断して生じる検出可能なシグナルを測定することで、前記標的核酸を検出するステップと、を含む、方法。

【0317】

40

実施形態53. 標的配列を含む標的核酸を修飾する方法であって、前記標的核酸を実施形態45～51のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムと接触させるステップを含む、方法。

【0318】

実施形態54. インビトロで行われる、実施形態53に記載の方法。

【0319】

実施形態55. 前記標的核酸は細胞内に存在する、実施形態53に記載の方法。

【0320】

実施形態56. 前記細胞は、細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、又は動物細胞である、実施形態55に記載の方法。

50

【0321】

実施形態57. エクスビボで行われる、実施形態53に記載の方法。

【0322】

実施形態58. インビボで行われる、実施形態53に記載の方法。

【0323】

実施形態59. 前記エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムによって前記標的核酸を切割するか、又は前記標的核酸中の前記標的配列を変化させる、実施形態53～58のいずれか一項に記載の方法。

【0324】

実施形態60. 前記エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムによって前記標的核酸の発現を変化させる、実施形態53～58のいずれか一項に記載の方法。

【0325】

実施形態61. 前記標的核酸はゲノムDNAである、実施形態53～60のいずれか一項に記載の方法。

【0326】

実施形態62. 前記標的配列は、疾患又は病状に関連する、実施形態53～61のいずれか一項に記載の方法。

【0327】

実施形態63. 前記エンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムは、複数のcrRNAをコードする前駆体ガイドRNAアレイを含み、各crRNAは、異なるガイド配列を含む、実施形態53～62のいずれか一項に記載の方法。

【0328】

実施形態64. 個体の細胞における標的核酸に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、実施形態45～51のいずれか一項に記載のエンジニアリングされたCRISPR-Cas12bシステムを用いて前記個体の細胞中の前記標的核酸を修飾することで、前記疾患又は病状を治療するステップを含む、方法。

【0329】

実施形態65. 前記疾患又は病状は、がん、心血管疾患、遺伝性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、眼疾患、細菌感染症、及びウイルス感染症からなる群から選択される、実施形態64に記載の方法。

【0330】

実施形態66. 修飾された標的核酸を含むエンジニアリングされた細胞であって、前記標的核酸は、実施形態53～63のいずれか一項に記載の方法で修飾されている、エンジニアリングされた細胞。

【0331】

実施形態67. 1つ又は複数の実施形態66に記載のエンジニアリングされた細胞を含む、エンジニアリングされた非ヒト動物。

【実施例】

【0332】

以下の実施例は、本願を例示するためにのみ用いられるものであり、従って、本願をいかなるよう限定するものと見なすべきではない。以下の実施例及び詳細な説明は、例示的な意図であって、限定的なものではない。

【0333】

方法

プラスミドの構築

AaCas12bのコード配列は、ヒト細胞における発現及び合成のためにコドン最適化された。PCRに基づく部位特異的突然変異誘発によってエンジニアリングされたAaCas12bタンパク質変異体をコードする核酸配列を生成した。具体的には、参照AaCas12bタンパク質をコードするDNA配列は、変異部位を中心に2つに分割されて

10

20

30

40

50

いる。2対のプライマーを設計し、2部分のDNA配列をそれぞれ増幅し、Gibsonクロニングによって1つのDNA断片に組み立て、pCAG-2A-eGFPベクターに組み込んだ。参照AaCas12bタンパク質をコードするDNAを複数のセグメントに切断した後、PCR及びGibsonクロニングを用いて増幅及び組み立てを行うことによって、変異組み合わせを構築した。pCAG-2A-eGFPベクターのXmaI部位とNheI部位の間に、前記エンジニアリングされたAaCas12bタンパク質をコードするDNAを挿入した。AaCas12bタンパク質バリエーションの変異部位は、当該分野で一般的に使用されているタンパク質構造可視化ソフトウェア（例えば、PyMol又はChimera）を用いてAaCas12bの結晶構造の解析に基づいて設計された。AaCas12bの結晶構造は、RCSB PDBデータベースで、アクセス番号6LTU、6LTR、6LU0、6LTPで入手可能である。pCAG-2A-eGFPベクターを用いてヒト293T細胞で前記AaCas12bバリエーションを発現させた。sgRNA足場をコードするDNA配列をde novo合成し、GibsonクロニングによってpUC19-U6骨格に組み立てた。スパーサー配列をコードする核酸も同じpUC19-U6骨格に連結された。

10

【0334】

細胞培養、トランスフェクション、及び蛍光活性化細胞選別（FACS）

1%ペニシリン・ストレプトマイシン（Gibco）と10%胎児牛血清（Gibco）を含有するDMEM（Gibco）中でHEK293T細胞を培養した。細胞を24ウェルプレート（Corning）に接種し、細胞コンフルエンスが70%になるまで16時間培養した。Lipofectamine 3000（Invitrogen）を用いて、AaCas12bタンパク質をコードするプラスミド600ngと、異なる量のsgRNAをコードするプラスミドを24ウェルプレートの各ウェルの細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション68時間後、トリプシン-EDTA（0.05%）（Gibco）で前記HEK293T細胞を消化し、GFPシグナル（トランスフェクションの成功を示す）に基づいてMoFlo XDP（Beckman Coulter）を用いてFACS選別を行った。

20

【0335】

ゲノム修飾のための標的化されたディープシーケンシング解析

FACSにより選別されたGFP陽性HEK293T細胞を緩衝液Lで溶解し、55℃で3時間インキュベートした後、95℃で10分間インキュベートした。対応するプライマーペアを用いて、異なる遺伝子座における標的部位を含むdsDNA断片をPCR増幅した。標的化されたディープシーケンシングのために、前記細胞溶解物をテンプレートDNAとして直接使用し、バーコードPCR増幅を行った。PCR産物を精製した後、いくつかのライブラリに集めてハイスループットシーケンシングを行った。CRISPResso2ソフトウェアを用いて、挿入又は欠失を含む読み取りの割合を算出することにより、挿入／欠失の頻度（%）を分析した。本願では、挿入／欠失の頻度（%）の指標を用いて、異なるエンジニアリングされたCas12bタンパク質及び／又は異なるsgRNA足場の存在下での遺伝子編集効率を比較して分析した。総読み取りの0.05%未満の読み取りは廃棄された。

30

40

【0336】

実施例1：参照AaCas12bヌクレアーゼにおいてPAMと相互作用する1つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基への置換

PAMと相互作用するアミノ酸残基に単一点突然変異を有するエンジニアリングされたAaCas12b酵素を上記の方法に従って設計して発現させた。簡単に言えば、AaCas12bにおけるPAMの9Å以内の10個のアミノ酸：D116、K123、D130、D132、N144、K145、E153、D173、Q222、D395、N400、及びE475を選択し、各アミノ酸残基をアルギニン（R）で置換した。標的部位CR5-11（SEQ ID NO：63）、CD34-7（SEQ ID NO：64）及びRNF2-1（SEQ ID NO：65）に対するsgRNAをコードする核酸

50

を設計し、pUC19-U6骨格にクローニングし、この核酸は、5'から3'まで、Aa-sgsgRNA足場配列をコードするDNA (SEQ ID NO: 23) -スパーサー配列をコードするDNAを含む。Lipofectamine 3000 (Invitrogen)を用いて、AaCas12bタンパク質をコードするプラスミド600ngとsgRNAをコードするプラスミド300ngを、上記の方法で24ウェルプレートの各ウェル内のHEK293T細胞にトランスフェクションした。対照として野生型AaCas12b (SEQ ID NO: 1)を用いた。AaCas12b酵素におけるアミノ酸置換及びそれに対応する遺伝子編集効率を図1及び表1に示す。アミノ酸置換D116R (SEQ ID NO: 2)又はE475R (SEQ ID NO: 3)を有するAaCas12bバリエーションは、野生型AaCas12bと比較して遺伝子編集効率の向上を示した。図1に示すように、3つのゲノム部位におけるAaCas12b-D116R (SEQ ID NO: 2)及びAaCas12b-E475R (SEQ ID NO: 3)の平均遺伝子編集効率は約20%を超え、一方、参照野生型AaCas12bヌクレアーゼの平均遺伝子編集効率は約6%であった。AaCas12b-D116R (SEQ ID NO: 2)及びAaCas12b-E475R (SEQ ID NO: 3)変異体の挿入／欠失の頻度は、このような試験を用いた他のAaCas12b変異体の挿入／欠失の頻度より有意に高かった。AaCas12b-D395Rは、野生型AaCas12bと比較して、CD34-7遺伝子座で高い遺伝子編集効率を達成したが、試験された他の遺伝子座では、そうではなかった。

10

20

30

40

【0337】

【表1】

異なる遺伝子座における異なるAaCas12bの遺伝子編集効率

AaCas12b バリエーション	CCR5-11の 挿入／欠失(%)	CD34-7の 挿入／欠失(%)	RNF2-1の 挿入／欠失(%)
WT (SEQ ID NO: 1)	2.87	9.20	6.60
D116R (SEQ ID NO: 2)	9.09	32.75	24.74
K123R	2.28	3.59	3.73
D130R	0.00	0.00	0.00
D132R	1.83	4.56	2.58
N144R	3.25	8.67	5.33
K145R	2.18	4.68	3.70
E153R	3.00	7.42	7.09
D173R	0.11	0.12	0.15
Q222R	0.00	0.07	0.00
D395R	1.54	22.84	1.37
N400R	0.04	2.96	0.59
E475R (SEQ ID NO: 3)	8.15	51.42	18.70

【0338】

実施例2：参照AaCas12bヌクレアーゼにおいてDNA二重鎖の開裂に関与する1つ又は複数のアミノ酸残基から芳香環を有するアミノ酸残基への置換

DNA二重鎖の開裂に関与するアミノ酸残基に単一の置換を行ったエンジニアリングされたAaCas12bヌクレアーゼを、上記の方法に従って設計して発現させた。簡単に言えば、アミノ酸残基Q118又はQ119は芳香族アミノ酸残基（例えば、Y、F又はW）によって置換される。ここでは、実施例1と同様のsgRNAコードプラスミドを用いた。Lipofectamine 3000 (Invitrogen)を用いて、Aa

50

C a s 1 2 b タンパク質をコードするプラスミド 6 0 0 n g と s g R N A をコードするプラスミド 3 0 0 n g を、上記の方法で 2 4 ウェルプレートの各ウェル内の H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクションした。対照として野生型 A a C a s 1 2 b (S E Q I D N O : 1) を用いた。A a C a s 1 2 b 酵素におけるアミノ酸置換及びそれに対応する遺伝子編集効率を図 2 及び表 2 に示す。アミノ酸置換 Q 1 1 9 Y、Q 1 1 9 F 又は Q 1 1 9 W を有する A a C a s 1 2 b は、野生型 A a C a s 1 2 b と比較して、試験されたすべての遺伝子座において遺伝子編集効率の向上を示した。A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9 Y、A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9 F 及び A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9 W 変異体の挿入／欠失頻度は、このような試験を用いた他の A a C a s 1 2 b 変異体 (Q 1 1 8 Y、Q 1 1 8 F、Q 1 1 8 W) の挿入／欠失の頻度より有意に高かった。

10

【 0 3 3 9 】

【表 2】

異なる遺伝子座における異なる A a C a s 1 2 b の遺伝子編集効率

AaCas12bバリエーション	CCR5-11の 挿入／欠失(%)	CD34-7の 挿入／欠失(%)	RNF2-1の 挿入／欠失(%)
WT (SEQ ID NO: 1)	2. 87	9. 20	6. 60
Q118Y	0. 00	0. 07	0. 00
Q118F	0. 03	0. 09	0. 04
Q118W	0. 08	0. 41	0. 29
Q119Y (SEQ ID NO: 4)	5. 84	12. 77	12. 00
Q119F (SEQ ID NO: 5)	6. 98	22. 28	15. 66
Q119W (SEQ ID NO: 6)	9. 56	14. 95	11. 32

20

【 0 3 4 0 】

実施例 3：参照 A a C a s 1 2 b ヌクレアーゼの R u v C ドメインにおいて一本鎖 D N A 基質と相互作用する 1 つ又は複数のアミノ酸残基から正電荷を帯びたアミノ酸残基又は疎水性アミノ酸残基への置換

一本鎖 D N A 基質と相互作用する R u v C ドメイン内のアミノ酸残基に単一のアミノ酸置換を行ったエンジニアリングされた A a C a s 1 2 b ヌクレアーゼを上記の方法に従って設計して発現させた。標的部位 C C R 5 - 3 (S E Q I D N O : 6 6) 及び R N F 2 - 5 (S E Q I D N O : 6 7) に対する s g R N A をコードする核酸を設計し、p U C 1 9 - U 6 骨格にクローニングし、この核酸は、5' から 3' まで、A a - s g s g R N A 足場配列をコードする D N A (S E Q I D N O : 2 3) - スペース配列をコードする D N A を含む。L i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0 (I n v i t r o g e n) を用いて、A a C a s 1 2 b タンパク質をコードするプラスミド 6 0 0 n g と s g R N A をコードするプラスミド 3 0 0 n g を 2 4 ウェルプレートの各ウェル内の H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクションした。対照として野生型 A a C a s 1 2 b (S E Q I D N O : 1) を用いた。

30

40

【 0 3 4 1 】

第 1 群の A a C a s 1 2 b 変異体では、表 3 の各アミノ酸残基は、正電荷を帯びたアミノ酸残基であるアルギニン (R) によって置換されていた。A a C a s 1 2 b 酵素におけるアミノ酸置換及びそれに対応する遺伝子編集効率を図 3 ~ 4 B 及び表 3 に示す。

【 0 3 4 2 】

50

【表 3】

異なる遺伝子座における異なる *AaCas12b* の遺伝子編集効率

AaCas12bバリエント	CCR5-3の 挿入／欠失(%)	RNF2-5の 挿入／欠失(%)
WT	11.54	4.63
D300R	16.50	6.38
K301R	18.83	9.84
E304R	7.37	2.79
N329R	3.56	0.32
E636R (SEQ ID NO: 7)	34.92	19.54
Q639R	22.75	11.00
T647R	26.25	16.53
Q682R	22.73	12.47
I757R (SEQ ID NO: 8)	37.69	24.15
E758R (SEQ ID NO: 9)	61.70	49.84
E761R (SEQ ID NO: 10)	38.78	27.33
E764R	12.18	5.14
K768R	23.53	12.28
E852R	11.17	10.33
Q854R (SEQ ID NO: 11)	34.66	26.88
N856R	2.66	0.79
N857R	14.85	10.22
D858R (SEQ ID NO: 12)	46.16	42.42
P860R	1.22	0.13
S862R	1.49	0.30
E863R	1.48	0.17
N865R	17.78	19.48
Q866R	24.89	14.88
L867R	1.72	0.18
Q869R	9.49	2.11
E938R	1.92	1.17
E956R	0.81	0.29
G957R	1.37	1.00
E958R	5.65	2.97
I994R	28.14	27.87
Q1093R	14.68	10.62
W1097R	17.38	26.37

【0343】

第2群の *AaCas12b* 変異体では、表4の各アミノ酸残基は、正電荷を帯びたアミノ酸残基であるリジン（K）によって置換されていた。*AaCas12b* 酵素におけるアミノ酸置換及びそれに対応する遺伝子編集効率を表4及び図4A～4Bに示す。

【0344】

表3～4及び図3～4Bに示すように、アミノ酸置換D300R、K301R、E636R、Q639R、T647R、Q682R、I757R、E758R、E761R、K768R、Q854R、N857R、D858R、N865R、Q866R、I994R、Q1093R、W1097R、E636K、Q639K、T647K、Q682K、I757K、E758K、E761K、Q854K、N857K、D858K、N865K、I994K、Q1093K、又はW1097Kを有する *AaCas12b* 変異体は、野生型 *AaCas12b* と比較して、試験された両遺伝子座における遺伝子編集効率を向上させた。*AaCas12b* E636R、I757R、E758R、E761R、Q85

4 R、D 8 5 8 R、E 7 5 8 K、N 8 5 7 K、I 9 9 4 R、及び D 8 5 8 K 変異体の挿入／欠失の頻度は、このような試験された他の A a C a s 1 2 b 変異体（正電荷を帯びたアミノ酸残基によって置換された）を用いた場合の挿入／欠失の頻度より有意に高かった。

【 0 3 4 5 】

【表 4】

異なる遺伝子座における異なる A a C a s 1 2 b の遺伝子編集効率

AaCas12bバリエント	CCR5-3の 挿入／欠失(%)	RNF2-5の 挿入／欠失(%)
WT	11. 54	4. 63
E636K	39. 58	26. 45
Q639K	24. 23	12. 68
T647K	28. 84	17. 31
Q682K	18. 46	12. 10
I757K	22. 40	8. 53
E758K	50. 37	38. 27
E761K	28. 20	16. 90
Q854K	24. 24	17. 08
N857K (SEQ ID NO: 13)	45. 97	43. 19
D858K	42. 27	41. 78
N865K	20. 81	7. 27
Q866K	12. 39	2. 70
I994K	14. 20	8. 66
Q1093K	20. 60	23. 15
W1097K	21. 66	33. 05

【 0 3 4 6 】

第 3 群の A a C a s 1 2 b 変異体では、以下のアミノ酸残基：E 7 5 8、E 7 6 1、E 8 6 3、N 8 6 5、Q 8 6 6、Q 8 6 9、E 9 5 6 及び Q 1 0 9 3 は、それぞれ、疎水性アミノ酸残基（例えば、Y、F、M又はW）によって置換されていた。A a C a s 1 2 b 酵素におけるアミノ酸置換及びそれに対応する遺伝子編集効率を図 5 及び表 5 に示す。アミノ酸置換 E 7 5 8 W、E 7 5 8 Y、E 7 5 8 M、E 7 6 1 Y、N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、N 8 6 5 F、Q 8 6 6 M、Q 8 6 9 M、Q 1 0 9 3 W、Q 1 0 9 3 Y、Q 1 0 9 3 F 又は Q 1 0 9 3 M を有する A a C a s 1 2 b 変異体は、野生型 A a C a s 1 2 b と比較して、試験された 2 つの遺伝子座において遺伝子編集効率の向上を示した。A a C a s 1 2 b N 8 6 5 W、N 8 6 5 Y、Q 8 6 6 M、Q 8 6 9 M、Q 1 0 9 3 W 及び Q 1 0 9 3 Y 変異体の挿入／欠失の頻度は、このような試験された他の A a C a s 1 2 b 変異体（疎水性アミノ酸残基によって置換された）挿入／欠失の頻度より有意に高かった。

【 0 3 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 5】

異なる遺伝子座における異なるAaCas12bの遺伝子編集効率

AaCas12bバリエーション	CCR5-3の 挿入／欠失(%)	RNF2-5の 挿入／欠失(%)
WT	11.54	4.63
E758W	24.31	17.13
E758Y	34.73	17.20
E758F	11.57	3.87
E758M	22.39	9.52
E761W	5.17	1.87
E761Y	21.47	11.78
E761F	8.02	4.06
E761M	9.86	4.55
E863W	1.48	0.36
E863Y	5.58	0.52
E863F	1.49	0.35
E863M	2.86	0.48
N865W (SEQ ID NO: 14)	32.50	23.18
N865Y (SEQ ID NO: 15)	51.61	55.65
N865F	14.85	9.85
N865M	6.25	2.49
Q866W	2.95	0.27
Q866Y	1.24	0.27
Q866F	4.71	1.47
Q866M (SEQ ID NO: 16)	50.09	47.76
Q869W	7.93	0.61
Q869Y	8.47	1.83
Q869F	10.70	2.57
Q869M (SEQ ID NO: 17)	20.65	15.71
E956W	4.73	1.88
E956Y	5.57	1.71
E956F	4.90	2.85
E956M	2.66	0.59
Q1093W (SEQ ID NO: 18)	29.32	26.26
Q1093Y (SEQ ID NO: 19)	23.73	27.12
Q1093F	15.97	12.65
Q1093M	18.14	9.92

【0348】

実施例4：実施例1～3の変異の組み合わせ及びその遺伝子編集効率の特徴付け

実施例1、2及び3でスクリーニングされた所望の遺伝子編集効率を有するアミノ酸置換、すなわちQ866M、Q869M、I757R、E758R、E761R、K768R及びI757Rを用いて、複数の変異、すなわち、Q866M+Q869M、I757R+E758R、I757R+E761R、I757R+K768R、E758R+E761R、E758R+K768R、E761R+K768R、I757R+E758R+E761R、I757R+E758R+K768R、I757R+E761R+K768R、E758R+E761R+K768R、及びI757R+E758R+E761R+K768Rを有するAaCas12bタンパク質を製造した。標的部位CCR5-3 (SEQ ID NO: 66)、CCR5-11 (SEQ ID NO: 63)、CD34-

1 (SEQ ID NO: 68)、及びRNF2-5 (SEQ ID NO: 67) に対するsgRNAをコードする核酸を製造し、pUC19-U6骨格にクローニングし、この核酸は、5'から3'まで、Aa-sg sgRNA足場配列をコードするDNA (SEQ ID NO: 23) -スパーサー配列をコードするDNAを含む。対照として野生型AaCas12b (SEQ ID NO: 1) を用いた。Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて、上記のAaCas12bタンパク質をコードするプラスミド600ng、sgRNAをコードするプラスミド300ngを、24ウェルプレートの各ウェル内のHEK293T細胞にトランスフェクションした。それらの遺伝子編集効率を図6及び表6に示す。アミノ酸置換の組み合わせを有するAaCas12b変異体は、野生型AaCas12bと比較して、試験されたすべての遺伝子座で有意に向上した遺伝子編集効率を示した。Q866M+Q869M、E758R+E761R、E758R+E768R、I757R+E758R+K768R、及びE758R+E761R+K768RなどのAaCas12b組み合わせ変異体の特定の遺伝子座において、対応する単一変異体と比較して、遺伝子編集効率が向上している。

10

【0349】

【表6】

異なる遺伝子座における異なるAaCas12bの遺伝子編集効率

AaCas12bバリエーション	CCR5-3の 挿入／欠失 (%)	CCR5-11の 挿入／欠失 (%)	CD34-1の 挿入／欠失 (%)	RNF2-5の 挿入／欠失 (%)
WT	14.52	3.42	2.16	6.17
Q866M (SEQ ID NO: 16)	45.78	14.21	7.98	51.87
Q869M (SEQ ID NO: 17)	17.16	8.03	6.11	20.01
Q866M+Q869M (SEQ ID NO: 20)	56.97	17.48	12.39	70.75
I757R (SEQ ID NO: 8)	38.29	6.51	5.29	23.37
E758R (SEQ ID NO: 9)	54.69	12.97	6.55	44.75
E761R (SEQ ID NO: 10)	41.32	12.22	4.17	26.48
K768R	23.14	2.61	2.76	14.33
I757R+E758R	49.55	14.89	8.48	50.96
I757R+E761R	28.80	11.21	5.94	23.57
I757R+K768R	40.14	7.24	9.45	34.32
E758R+E761R	56.90	13.48	5.64	49.74
E758R+K768R	62.90	7.57	7.85	56.64
E761R+K768R	43.56	10.26	5.86	38.56
I757R+E758R+E761R	15.24	9.45	3.26	19.00
I757R+E758R+K768R	50.13	12.45	8.93	56.24
I757R+E761R+K768R	29.07	9.77	6.83	27.37
E758R+E761R+K768R	55.44	12.94	6.63	60.03
I757R+E758R+E761R+K768R	34.10	8.81	4.56	28.23

20

30

40

【0350】

AaCas12b-Q119F+E475R及びAaCas12b-Q119F+E475R+E758Rは、上記のように生成された。ここでは、実施例1と同様のsgRNAコードプラスミドを用いた。対照として野生型AaCas12b (SEQ ID NO: 1) を用いた。Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて、上記のAaCas12bタンパク質をコードするプラスミド600ng、sgRNAをコードするプラスミド300ngを24ウェルプレートの各ウェル内のHEK293

50

T細胞にトランスフェクションした。それらの遺伝子編集効率を図7及び表7に示す。その結果、野生型AaCas12bと比較して、AaCas12b-Q119F+E475RとAaCas12b-Q119F+E475R+E758Rは、試験されたすべての遺伝子座で遺伝子編集効率を著しく向上させたことが明らかになった。AaCas12b-Q119F+E475R+E758Rは、野生型AaCas12b又は単一の置換を有する対応するAaCas12bバリエーションと比較して、試験されたすべての遺伝子座（CCR5-11、CD34-7、及びRNF2-1）において、遺伝子編集効率の最も顕著な向上を示した。

【0351】

【表7】

異なる遺伝子座における異なるAaCas12bの遺伝子編集効率

AaCas12bバリエーション	CCR5-11の 挿入／欠失(%)	CD34-7の 挿入／欠失(%)	RNF2-1の 挿入／欠失(%)
WT	3.06	9.71	6.72
Q119F (SEQ ID NO: 5)	7.02	22.02	16.21
E475R (SEQ ID NO: 3)	8.29	52.13	18.87
Q119F+E475R (SEQ ID NO: 21)	12.95	51.89	23.39
E758R (SEQ ID NO: 9)	6.46	10.87	8.31
Q119F+E475R+E758R (SEQ ID NO: 22)	35.68	59.39	42.22

10

20

【0352】

実施例5：エンジニアリングされた足場を有するsgRNAを用いたエンジニアリングされたAaCas12bの遺伝子編集活性の増強

本実施例では、実施例4のAaCas12b変異体（Q119F+E475R+E758R）を用いて、エンジニアリングされた足場を有する複数のsgRNAの遺伝子編集活性を試験した。標的部位CCR5-11（SEQ ID NO: 63）に対するsgRNAをコードする核酸を設計し、pUC19-U6骨格にクローニングし、この核酸は、5'から3'まで、sgRNA足場配列をコードするDNA-スパーサー配列をコードするDNAを含む。Lipofectamine 3000（Invitrogen）を用いて、AaCas12bバリエーションタンパク質をコードするプラスミド600ng、エンジニアリングされた足場を有するsgRNAをコードするプラスミド300ng（SEQ ID NO: 25~53；AaCas12b sgRNA足場V0に基づいて修飾されたもの）、AaCas12b sgRNA足場（SEQ ID NO: 24；V0、対照；H. Yang et al., Cell. 2016; 167(7): 1814-1828.e12）、又はAaCas12b Aa-sg足場（SEQ ID NO: 23；対照）を24ウェルプレートの各ウェル内のHEK293T細胞にトランスフェクションした。それらの遺伝子編集効率を図9に示す。図9のデータから、すべてのsgRNAエンジニアリングされた足場が、AaCas12b sgRNA足場（V0）と比較して、AaCas12b（Q119F+E475R+E758R）バリエーションの遺伝子編集効率を著しく向上させたことが示された。すべてのsgRNAエンジニアリングされた足場（V1及びV8を除く）は、Aa-sg足場と比較して、AaCas12b（Q119F+E475R+E758R）バリエーションの遺伝子編集効率を著しく向上させた。

30

40

【0353】

実施例6：不活性化ヌクレアーゼ活性を有するエンジニアリングされたAaCas12b

不活性化AaCas12bタンパク質を生成するために、実施例4のAaCas12b

50

(Q119F+E475R+E758R) バリエント (SEQ ID NO: 22) を、核酸加水分解ドメインに追加の単一点突然変異 (D570A) を含むようにさらに修飾した (図10A)。i) CMVプロモーターの制御下にあるAaCas12b (Q119F+E475R+E758R) 又はAaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A) (SEQ ID NO: 79)、及びii) U6プロモーターの制御下にある対照sgRNA (ヘモグロビンサブユニット $\gamma 1/2$ (HBG1/2) 内の任意の配列を標的にしない)、sgRNA1 (HBG1/2に対する標的配列SEQ ID NO: 70)、又はsgRNA2 (HBG1/2に対する標的配列SEQ ID NO: 71) を共通にコードするプラスミドを、上記と同様の方法でHEK293細胞にトランスフェクションした (表8; プラスミドの構築は図10Aを参照)。それらのsgRNAは、sgRNA足場 (V9) (SEQ ID NO: 53) を用いて構築された。トランスフェクション3日後、トランスフェクションされた細胞からゲノムDNAを抽出した。切断効率を決定するために、T7エンドヌクレアーゼI (T7EI) ミスマッチ検出アッセイを実施した (M. Crispo et al., PLoS One. 2015; 10 (8): e0136690)。T7EIアッセイに用いたプライマー配列を表9に示す。

10

20

30

40

50

【0354】

図10Bに示すように、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A) の触媒活性は、sgRNA1又はsgRNA2の指導下でHBG1/2の2つの異なる標的部位を切断したとき、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R) と比較して有意に低下した。

【0355】

【表8】

PAM及びHBG1/2を標的とするsgRNAの標的部位

sgRNA	PAM	標的配列
sgRNA1	TTG	AGATAGTGTGGGGAAGGGGC (SEQ ID NO: 70)
sgRNA2	TTT	GCATTGAGATAGTGTGGGA (SEQ ID NO: 71)

【0356】

【表9】

T7EIアッセイに用いたプライマー配列

SEQ ID NO	プライマー配列
69	TCCTGCACTGAAACTGTTGC
78	TCCTGAGAAGCGACCTGGA

【0357】

エンジニアリングされたAaCas12bのヌクレアーゼ活性をさらに低下させるために、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A) に追加の点突然変異を導入し、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+E848A) (SEQ ID NO: 80) 又はAaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+D977A) (SEQ ID NO: 81) (図11A) を生成した。上記と同様の方法を用いて、i) CMVプロモーターの制御下にあるAaCas12b (Q119F+E475R+E758R)、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+E848A)、又はAaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+D977A)、及びii) U6プロモーターの制御下にあるsgRNA1 (HBG1/2に対する標的配列SEQ ID NO: 70) 又はsgRNA2 (HBG1/2に対する標的SEQ ID NO: 71) を共通にコードするプラスミドをHEK293細胞にトランスフェクションした (プラスミド

構築は図11Aを参照)。陰性対照として、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R)、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+E848A)、又はAaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+D977A)をコードするプラスミドを、対照sgRNA (ヘモグロビンサブユニットγ1/2 (HBG1/2) 内のいずれの配列も標的としない)と同様に、いずれのsgRNAコード配列も有しないHEK293細胞にトランスフェクションした。図11Bに示すように、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+E848A)及びAaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+D977A)の両方は、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R)のヌクレアーゼ活性を完全に解消した。

10

【0358】

実施例7：エンジニアリングされたAaCas12b融合タンパク質を用いた転写抑制
実施例6からのAaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+D977A) (SEQ ID NO: 81)をさらにエンジニアリングして、標的遺伝子の転写をサイレンスさせる融合タンパク質を生成した。AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+D977A) (核局在化配列NLSの2つのコピーが隣接する)を、転写抑制モジュールZIM3のKruppel関連ボックス (KRAB) ドメイン (SEQ ID NO: 72) に融合し、抑制的クロマチン修飾因子を動員した。KRABは、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+D977A) のC末端又はN末端に融合し、融合タンパク質はそれぞれCd12bk及びNd12bkと命名された。同じプラスミドはまた、U6プロモーターの制御下でSCN9A遺伝子 (電位依存性ナトリウムチャンネル1.7Nav1.7をコードする) における異なる標的部位を特異的に認識するsgRNAをコードしている (図12A; 表10)。それらのsgRNAを構築するには、sgRNA足場 (V9) (SEQ ID NO: 53) を用いた。

20

【0359】

Cd12bkとNd12bk融合タンパク質がSCN9Aの転写をサイレンスさせるためにクロマチン修飾複合体を動員できるかどうかを調べるため、融合タンパク質とsgRNAをコードするプラスミドをNeuro2A (N2a; マウス神経堤由来の細胞株) 細胞にトランスミクションした。対照として、Cd12bkをコードするプラスミドを、対照sgRNA (SCN9A内のいずれの配列も標的としない)と同様にN2a細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション3日後、トランスフェクションされた細胞を採取し、RNA抽出キット (Vazyme、商品番号RC112-01) を用いてRNAを抽出した。各サンプルにおけるNav1.7のmRNAレベルをqPCRによって決定した。対照sgRNA (「Cd12bk-non-target」) を用いてデータをCd12bkに正規化した。図12Bに示すように、Cd12bk又はNd12bkは、sgRNA-msg6、sgRNA-msg8、sgRNA-msg13又はsgRNA-msg18とともにSCN9Aの転写を大きく抑制し、そのうち、sgRNA-msg8及びsgRNA-msg13は最も強い抑制を示した。Nd12bkもsgRNA-msg11とともにSCN9Aの転写を大きく抑制することができる。それらの結果は、KRABに融合したdAaCas12b (例えば、AaCas12b (Q119F+E475R+E758R+D570A+D977A)) は真核細胞における標的転写制御ツールとして有用である。

30

40

【0360】

【表 10】

*PAM*及び*SCN9A*を標的とする*sgRNA*の標的部位

sgRNA	PAM	標的部位
msg6	TTA	GCTGCCCCGCCACACTGGCGC (SEQ ID NO: 73)
msg8	TTG	GGCGTGGTGATGCTAGGGAT (SEQ ID NO: 74)
msg11	TTC	TAGTCTGCTCAGGATGAAGC (SEQ ID NO: 75)
msg13	TTC	AATCCTGCCCACTGTGCAGG (SEQ ID NO: 76)
msg18	TTC	CCTTGATCAGAATCCGCAG (SEQ ID NO: 77)

10

【0361】

以上、本願の実施形態について図面を参照して説明したが、本願は、上記の具体的な実施形態や応用分野に限定されない。上記の具体的な実施形態は、例示的であり、指導的なものであって、限定的なものではない。本明細書の教示を受け、かつ、本願の特許請求の範囲から逸脱することなく、当業者は、さらに多くの形態を想到することができ、それらの形態は、すべて本願の保護範囲に属する。

【0362】

20

30

40

50

例示的な配列

#	配列
SEQ ID NO: 1	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG
野生型 A a C a s 1 2 b	V R Y Y T E W L S L L R Q E N L Y R R S P N G D G E Q E C Y K T
	A E E C K A E L L E R L R A R Q V E N G H C G P A G S D D E L L
	Q L A R Q L Y E L L V P Q A I G A K G D A Q Q I A R K F L S P L
	A D K D A V G G L G I A K A G N K P R W V R M R E A G E P G W E
	E E K A K A E A R K S T D R T A D V L R A L A D F G L K P L M R
	V Y T D S D M S S V Q W K P L R K G Q A V R T W D R D M F Q Q A
	I E R M M S W E S W N Q R V G E A Y A K L V E Q K S R F E Q K N
	F V G Q E H L V Q L V N Q L Q Q D M K E A S H G L E S K E Q T A
	H Y L T G R A L R G S D K V F E K W E K L D P D A P F D L Y D T
	E I K N V Q R R N T R R F G S H D L F A K L A E P K Y Q A L W R
	E D A S F L T R Y A V Y N S I V R K L N H A K M F A T F T L P D
	A T A H P I W T R F D K L G G N L H Q Y T F L F N E F G E G R H
	A I R F Q K L L T V E D G V A K E V D D V T V P I S M S A Q L D
	D L L P R D P H E L V A L Y F Q D Y G A E Q H L A G E F G G A K
	I Q Y R R D Q L N H L H A R R G A R D V Y L N L S V R V Q S Q S
	E A R G E R R P P Y A A V F R L V G D N H R A F V H F D K L S D
	Y L A E H P D D G K L G S E G L L S G L R V M S V D L G L R T S
	A S I S V F R V A R K D E L K P N S E G R V P F C F P I E G N E
	N L V A V H E R S Q L L K L P G E T E S K D L R A I R E E R Q R
	T L R Q L R T Q L A Y L R L L V R C G S E D V G R R E R S W A K
	L I E Q P M D A N Q M T P D W R E A F E D E L Q K L K S L Y G I
	C G D R E W T E A V Y E S V R R V W R H M G K Q V R D W R K D V
	R S G E R P K I R G Y Q K D V V G G N S I E Q I E Y L E R Q Y K
	F L K S W S F F G K V S G Q V I R A E K G S R F A I T L R E H I
	D H A K E D R L K K L A D R I I M E A L G Y V Y A L D D E R G K
	G K W V A K Y P P C Q L I L L E E L S E Y Q F N N D R P P S E N
	N Q L M Q W S H R G V F Q E L L N Q A Q V H D L L V G T M Y A A
	F S S R F D A R T G A P G I R C R R V P A R C A R E Q N P E P F
	P W W L N K F V A E H K L D G C P L R A D D L I P T G E G E F F
	V S P F S A E E G D F H Q I H A D L N A A Q N L Q R R L W S D F
	D I S Q I R L R C D W G E V D G E P V L I P R T T G K R T A D S
	Y G N K V F Y T K T G V T Y Y E R E R G K K R R K V F A Q E E L
	S E E E A E L L V E A D E A R E K S V V L M R D P S G I I N R G
	D W T R Q K E F W S M V N Q R I E G Y L V K Q I R S R V R L Q E
	S A C E N T G D I

10

20

30

40

【 0 3 6 3 】

50

SEQ ID NO: 2	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGRAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGCLKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFEEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDL IPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRRLWSD DISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTY YERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDP SG I INRG DWTRQKEFWSMVNQRIE GYL VKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 3	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL

10

20

30

40

50

【0364】

A a C a s 1 2 b - E 4 7 5 R	QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGCLKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVF EKWEKLD PDAPFDLYDT E I K N V Q R R N T R R F G S H D L F A K L A E P K Y Q A L W R EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHP I W T R F D K L G G N L H Q Y T F L F N E F G E G R H A I R F Q K L L T V E D G V A K E V D D V T V P I S M S A Q L D D L L P R D P H E L V A L Y F Q D Y G A E Q H L A G R F G G A K I Q Y R R D Q L N H L H A R R G A R D V Y L N L S V R V Q S Q S E A R G E R R P P Y A A V F R L V G D N H R A F V H F D K L S D Y L A E H P D D G K L G S E G L L S G L R V M S V D L G L R T S A S I S V F R V A R K D E L K P N S E G R V P F C F P I E G N E N L V A V H E R S Q L L K L P G E T E S K D L R A I R E E R Q R T L R Q L R T Q L A Y L R L L V R C G S E D V G R R E R S W A K L I E Q P M D A N Q M T P D W R E A F E D E L Q K L K S L Y G I C G D R E W T E A V Y E S V R R V W R H M G K Q V R D W R K D V R S G E R P K I R G Y Q K D V V G G N S I E Q I E Y L E R Q Y K F L K S W S F F G K V S G Q V I R A E K G S R F A I T L R E H I D H A K E D R L K K L A D R I I M E A L G Y V Y A L D D E R G K G K W V A K Y P P C Q L I L L E E L S E Y Q F N N D R P P S E N N Q L M Q W S H R G V F Q E L L N Q A Q V H D L L V G T M Y A A F S S R F D A R T G A P G I R C R R V P A R C A R E Q N P E P F P W W L N K F V A E H K L D G C P L R A D D L I P T G E G E F F V S P F S A E E G D F H Q I H A D L N A A Q N L Q R R L W S D F D I S Q I R L R C D W G E V D G E P V L I P R T T G K R T A D S Y G N K V F Y T K T G V T Y Y E R E R G K K R R K V F A Q E E L S E E E A E L L V E A D E A R E K S V V L M R D P S G I I N R G D W T R Q K E F W S M V N Q R I E G Y L V K Q I R S R V R L Q E S A C E N T G D I
S E Q I D N O : 4 A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9 Y	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG V R Y Y T E W L S L L R Q E N L Y R R S P N G D G E Q E C Y K T A E E C K A E L L E R L R A R Q V E N G H C G P A G S D D E L L QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQYIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGCLKPLMR

10

20

30

40

【 0 3 6 5 】

50

	VYTDS DMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFEEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKDVVGGNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGSRFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDERGK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTY YERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAE LLVEADEAREKSVVLMRDP SG I INRG DWTRQKEFWSMVNQRIEGLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 5 A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9 F	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQE IARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDS DMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA

10

20

30

40

【 0 3 6 6 】

50

	HYLTGRALRGSDKVFEEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLSD YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKDVVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDL IPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTY YERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAE L LVEADEAREKSVVLMRDP SGI INRG DWTRQKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO : 6 A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9W	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQW IARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFEEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD

10

20

30

40

【 0 3 6 7 】

50

	ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDEVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKDVVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDL LVGTMYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTY YERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAE LLVEADEAREKSVVLMRDP SGI INRG DWTRQKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO : 7 A a C a s 1 2 b - E 6 3 6 R	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVFEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK

10

20

30

40

【 0 3 6 8 】

50

	IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIRERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKDVVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFGELLNQAQVHDLLVGTMYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTADS YG NKVFYTKTGVTYYERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDP SG IINRG DWTRQKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 8 AaCas1 2b-175 7R	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDEL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGGAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVF EKWEKLD PDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS

10

20

30

40

【0369】

50

	ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVG GNSREQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYAA FSSRFDARTGAPGIR CRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTYYERER GKKRRKVFAQEEL S EEEAE L LVEADEAREKSVVLMRDP SG I INRG DWTRQKEFWSMVNQRIEGYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 9 AaCas1 2b-E75 8R	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVFEKWEKLD PDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRRERSWAK

10

20

30

40

【0370】

50

	L I E Q P M D A N Q M T P D W R E A F E D E L Q K L K S L Y G I C G D R E W T E A V Y E S V R R V W R H M G K Q V R D W R K D V R S G E R P K I R G Y Q K D V V G G N S I R Q I E Y L E R Q Y K F L K S W S F F G K V S G Q V I R A E K G S R F A I T L R E H I D H A K E D R L K K L A D R I I M E A L G Y V Y A L D D E R G K G K W V A K Y P P C Q L I L L E E L S E Y Q F N N D R P P S E N N Q L M Q W S H R G V F Q E L L N Q A Q V H D L L V G T M Y A A F S S R F D A R T G A P G I R C R R V P A R C A R E Q N P E P F P W W L N K F V A E H K L D G C P L R A D D L I P T G E G E F F V S P F S A E E G D F H Q I H A D L N A A Q N L Q R R L W S D F D I S Q I R L R C D W G E V D G E P V L I P R T T G K R T A D S Y G N K V F Y T K T G V T Y Y E R E R G K K R R K V F A Q E E L S E E E A E L L V E A D E A R E K S V V L M R D P S G I I N R G D W T R Q K E F W S M V N Q R I E G Y L V K Q I R S R V R L Q E S A C E N T G D I
S E Q I D N O : 10 A a C a s 1 2 b - E 7 6 1 R	M A V K S M K V K L R L D N M P E I R A G L W K L H T E V N A G V R Y Y T E W L S L L R Q E N L Y R R S P N G D G E Q E C Y K T A E E C K A E L L E R L R A R Q V E N G H C G P A G S D D E L L Q L A R Q L Y E L L V P Q A I G A K G D A Q Q I A R K F L S P L A D K D A V G G L G I A K A G N K P R W V R M R E A G E P G W E E E K A K A E A R K S T D R T A D V L R A L A D F G L K P L M R V Y T D S D M S S V Q W K P L R K G Q A V R T W D R D M F Q Q A I E R M M S W E S W N Q R V G E A Y A K L V E Q K S R F E Q K N F V G Q E H L V Q L V N Q L Q Q D M K E A S H G L E S K E Q T A H Y L T G R A L R G S D K V F E K W E K L D P D A P F D L Y D T E I K N V Q R R N T R R F G S H D L F A K L A E P K Y Q A L W R E D A S F L T R Y A V Y N S I V R K L N H A K M F A T F T L P D A T A H P I W T R F D K L G G N L H Q Y T F L F N E F G E G R H A I R F Q K L L T V E D G V A K E V D D V T V P I S M S A Q L D D L L P R D P H E L V A L Y F Q D Y G A E Q H L A G E F G G A K I Q Y R R D Q L N H L H A R R G A R D V Y L N L S V R V Q S Q S E A R G E R R P P Y A A V F R L V G D N H R A F V H F D K L S D Y L A E H P D D G K L G S E G L L S G L R V M S V D L G L R T S A S I S V F R V A R K D E L K P N S E G R V P F C F P I E G N E N L V A V H E R S Q L L K L P G E T E S K D L R A I R E E R Q R T L R Q L R T Q L A Y L R L L V R C G S E D V G R R E R S W A K L I E Q P M D A N Q M T P D W R E A F E D E L Q K L K S L Y G I C G D R E W T E A V Y E S V R R V W R H M G K Q V R D W R K D V R S G E R P K I R G Y Q K D V V G G N S I E Q I R Y L E R Q Y K

10

20

30

40

【 0 3 7 1 】

50

	FLKSWSF F GK VSGQV I RAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTM YAA FSSRFDARTGAPGIR CRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPRTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTYYERER GKKRRKVFAQEEL S EEEAE L LVEADEAREKSVVLMRDP SG I INRG DWTRQKEFWSMVNQR IEGYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 11 A a C a s 1 2 b - Q 8 5 4 R	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG V RYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVFEKWEKLDPDAPFDLYDT E IKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH A I RFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK I QYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHFDKLSD YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERS QLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSWSF F GK VSGQV I RAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEY R FNDRPPSEN

10

20

30

40

【0372】

50

	NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDL IPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLRRLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVL I PRTTGKRTADS YGNKVIFYTKTGVTYYERERGGKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDPG I INRG DWTRQKEFWSMVNQRI EGYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 12 A a C a s 1 2 b - D 8 5 8 R	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSMDSSVQWKPLRKGGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHVLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAVEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVGNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGSRFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDERGK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNNRRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDL IPTGEGEFF

10

20

30

40

【 0 3 7 3 】

50

	VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTADS YGNKVFYTKTGVTYYERERGGKKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDPSGI INRG DWTRQKEFWSMVNQRI EGYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 13	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGCLKPLMR VYTDSMDSSVQWKPLRKGGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFEEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGFEGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLSD YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRA EKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNKDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTM YAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTADS YGNKVFYTKTGVTYYERERGGKKRRKVFAQEEL

10

20

30

40

【0374】

50

	SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDPSGI INRG DWTRQKEFWSMVQNQRI EGYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 14 A a C a s 1 2 b - N 8 6 5W	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGCLKPLMR VYTDSMDSSVQWKPLRKGGAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHVLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFKEWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLSD YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVGNS IEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQV IRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN <u>WQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTM YAA</u> FSSRFDARTGAPGIRCRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPRTTGKRTADS YGKVKFYTKTGVTYYERERGGKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDPSGI INRG DWTRQKEFWSMVQNQRI EGYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI

10

20

30

40

【 0 3 7 5 】

50

SEQ ID NO: 15	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGCLKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFEEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN YQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTM YAA FSSRFDARTGAPGIRCR RVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWSD F DISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTY YERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDP SG I INRG DWTRQKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 16	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL

10

20

30

40

【0376】

50

A a C a s 1 2 b - Q 8 6 6M	QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGCLKPLMR VYTDSMDSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFKEWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHP IWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYA AVFRLVGDNHRA FVHFDKLS D YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVGNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGSRFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDERGK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NMLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDL IPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTY YERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDP SGI INRG DWTRQKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 17 A a C a s 1 2 b - Q 8 6 9M	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGCLKPLMR

10

20

30

40

【0377】

50

	VYTDS DMSSVQWKPLRKGGAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVFEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKDVVGGNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGSRFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDERGK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMMWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWSD DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTY YERERGGKRRKVFAQEEL SEEEAE LLVEADEAREKSVVLMRDP SG I INRG DWTRQKEFWSMVNQRIEGYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 18 AaCas1 2b-Q10 93W	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDS DMSSVQWKPLRKGGAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA

10

20

30

40

【0378】

50

	HYLTGRALRGSDKVF EKWEKLD PDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHP IWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHFDKLSD YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKDVVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGSRF AITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDL IPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTADS YG NKVFYTKTGVTY YERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAE L LVEADEAREKSVVLMRDP SG I INRG DWTRWKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 19 A a C a s 1 2 b - Q 1 0 93 Y	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYLTGRALRGSDKVF EKWEKLD PDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD

10

20

30

40

【 0 3 7 9 】

50

	ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDEVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKDVVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDL LVGTMYAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTY YERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAE LLVEADEAREKSVVLMRDP SGI INRG DWTRYKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI	10
SEQ ID NO : 20 Q866M+ Q869M	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVFEKWEKLDPDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGEFGGAK	30
		40

【0380】

	IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKDVVG GNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RF AITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NMLMMWSHRGVFGELLNQAQVHDLLVGTM YAA FSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWSD F DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTYYERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDP SG IINRG DWTRQKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 21 AaCas1 2b-Q11 9F+E47 5R	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQE IARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVF EKWEKLD PDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGRFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRAFVHFDKLS YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS

10

20

30

40

【0381】

50

	ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK LIEQPM DANQMT PDWREAFED ELQKLKSLYGI CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKDV RSGERP KIRGYQKD VVGNSIEQIEYLERQYK FLKSW SFFGKVSGQVIRAEKGS RFAITLREHI DHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDER GK GKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSEN NQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTMYAA FSSRFDARTGAPGIR CRRVPARCAREQNPEPF PWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEFF VSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLLWSDF DISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTADS YGNKV FYTKTGVTYYERER GKKRRKVFAQEEL SEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDP SGI INRG DWTRQKEFWSMVNQRIE GYLVKQIRSRVRLQE SACENTGDI
SEQ ID NO: 22 AaCas1 2b-Q11 9F+E47 5R+E75 8R	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQE IARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVFEKWEKLD PDAPFDLYDT EIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLA GRFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHFDKLSD YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTS ASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGNE NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQR TLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAK

10

20

30

40

【0382】

50

	L I E Q P M D A N Q M T P D W R E A F E D E L Q K L K S L Y G I C G D R E W T E A V Y E S V R R V W R H M G K Q V R D W R K D V R S G E R P K I R G Y Q K D V V G G N S I R Q I E Y L E R Q Y K F L K S W S F F G K V S G Q V I R A E K G S R F A I T L R E H I D H A K E D R L K K L A D R I I M E A L G Y V Y A L D D E R G K G K W V A K Y P P C Q L I L L E E L S E Y Q F N N D R P P S E N N Q L M Q W S H R G V F Q E L L N Q A Q V H D L L V G T M Y A A F S S R F D A R T G A P G I R C R R V P A R C A R E Q N P E P F P W W L N K F V A E H K L D G C P L R A D D L I P T G E G E F F V S P F S A E E G D F H Q I H A D L N A A Q N L Q R R L W S D F D I S Q I R L R C D W G E V D G E P V L I P R T T G K R T A D S Y G N K V F Y T K T G V T Y Y E R E R G K K R R K V F A Q E E L S E E E A E L L V E A D E A R E K S V V L M R D P S G I I N R G D W T R Q K E F W S M V N Q R I E G Y L V K Q I R S R V R L Q E S A C E N T G D I
S E Q I D N O : 7 9 A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A	M A V K S M K V K L R L D N M P E I R A G L W K L H T E V N A G V R Y Y T E W L S L L R Q E N L Y R R S P N G D G E Q E C Y K T A E E C K A E L L E R L R A R Q V E N G H C G P A G S D D E L L Q L A R Q L Y E L L V P Q A I G A K G D A Q F I A R K F L S P L A D K D A V G G L G I A K A G N K P R W V R M R E A G E P G W E E E K A K A E A R K S T D R T A D V L R A L A D F G L K P L M R V Y T D S D M S S V Q W K P L R K G Q A V R T W D R D M F Q Q A I E R M M S W E S W N Q R V G E A Y A K L V E Q K S R F E Q K N F V G Q E H L V Q L V N Q L Q Q D M K E A S H G L E S K E Q T A H Y L T G R A L R G S D K V F E K W E K L D P D A P F D L Y D T E I K N V Q R R N T R R F G S H D L F A K L A E P K Y Q A L W R E D A S F L T R Y A V Y N S I V R K L N H A K M F A T F T L P D A T A H P I W T R F D K L G G N L H Q Y T F L F N E F G E G R H A I R F Q K L L T V E D G V A K E V D D V T V P I S M S A Q L D D L L P R D P H E L V A L Y F Q D Y G A E Q H L A G R F G G A K I Q Y R R D Q L N H L H A R R G A R D V Y L N L S V R V Q S Q S E A R G E R R P P Y A A V F R L V G D N H R A F V H F D K L S D Y L A E H P D D G K L G S E G L L S G L R V M S V A L G L R T S A S I S V F R V A R K D E L K P N S E G R V P F C F P I E G N E N L V A V H E R S Q L L K L P G E T E S K D L R A I R E E R Q R T L R Q L R T Q L A Y L R L L V R C G S E D V G R R E R S W A K L I E Q P M D A N Q M T P D W R E A F E D E L Q K L K S L Y G I C G D R E W T E A V Y E S V R R V W R H M G K Q V R D W R K D V R S G E R P K I R G Y Q K D V V G G N S I R Q I E Y L E R Q Y

10

20

30

40

【 0 3 8 3 】

50

	KFLKSWSF F GKVSGQV I RAEKGS RFAITLREH IDHAKEDRLKKLADRI I MEALGYVYALDDERG KGKWWAKYPPCQL I LLEELSEYQFNNDRPPSE NNQLMQWSHRGV F QELLNQAQVHDLLVGTMYA AFSSRFDARTGAPG I RCRRV PARCAREQNPEP FPWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEF FVSPFSAEEGDFHQ I HADLNAAQNLQRRLWSD FDISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTAD SYGNKVFYTKTGVTYYERER GKKRRKVFAQEE LSEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDP SGI INR GDWTRQKEFWSMVNQRI EGYLVKQIRSRVRLQ ESACENTGDI
SEQ ID NO: 80 A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A + E 8 4 8 A	MAVKSMKVKLRLDNMPE I RAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQA I GAKGDAQE I ARKFLSPL ADKDAVGGLG I AKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFG LKPLMR VYTDSDMSSVQWKPLRK GQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVFEKWEKLDPDAPFDLYDT E IKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNS I VRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH A I RFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVP I SMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLA GRFGGAK I QYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHFDKLSD YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSV A LGLRT SASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPI EGN ENLVAVHERSQLLLKLPGETESKDLRA I REERQ RTL RQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWA KL I EQPMDANQMTPDWREAFED ELQKLKSLYG I CGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKD VRSGERP KIRGYQKDVG GNS I RQ I EYLERQY KFLKSWSF F GKVSGQV I RAEKGS RFAITLREH IDHAKEDRLKKLADRI I MEALGYVYALDDERG KGKWWAKYPPCQL I LL A ELSEYQFNNDRPPS

10

20

30

40

【 0 3 8 4 】

50

	ENNQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTM AAFSSRFDARTGAPGIRCRVPARCAREQNPE PFPWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGE FFVSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQRRLWS DFDISQIRLRCDWGEVDGEPVLIPTTGKRTA DSYGNKVFTYTKTGVTYYERERGGKRRKVFAQE ELSEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDPGIIIN RGDWTRQKEFWSMVNQRIEGLVKQIRSRVRL QESACENTGDI
SEQ ID NO: 81 A a C a s 1 2 b - Q 1 1 9 F + E 4 7 5 R + E 7 5 8 R + D 5 7 0 A + D 9 7 7 A	MAVKSMKVKLRLDNMPEIRAGLWKLHTEVNAG VRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECYKT AEECKAELLERLRARQVENGHCGPAGSDDELL QLARQLYELLVPQAIGAKGDAQE IARKFLSPL ADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWE EEKAKAEARKSTDRTADVLRALADFGKPLMR VYTDSMDSSVQWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERMMSWESWNQRVGEAYAKLVEQKSRFEQKN FVGQEHLVQLVNQLQQDMKEASHGLESKEQTA HYL TGRALRGSDKVF EKWEKLD PDAPFDLYDT E IKNVQRRNTRRFGSHDLFAKLAEPKYQALWR EDASFLTRYAVYNSIVRKLNHAKMFATFTLPD ATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGEGRH AIRFQKLLTVEDGVAKEVDDVTVPISMSAQLD DLLPRDPHELVALYFQDYGAEQHLAGRFGGAK IQYRRDQLNHLHARRGARDVYLNLSVRVQSQS EARGERRPPYAAVFRLVGDNHRA FVHF DKLSD YLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSV A LGLRT SASISVFRVARKDELKPNSEGRVPFCFPIEGN ENLVAVHERSQLLLKLPGETESKDLRAIREERQ RTL RQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWA KLIEQPM DANQMTPDWREAFED ELQKLKSLYG ICGDREWTEAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRKD VRSGERPKIRGYQKDVVGNSIRQIEYLERQY KFLKSW SFFGKVSGQVIRA EKGS RF AITLREH IDHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDDERG KGKWWAKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSE ENNQLMQWSHRGVFQELLNQAQVHDLLVGTM AAFSSRFDARTGAPGIRCRVPARCAREQNPEP PFPWWLNKFVAEHKLDGCPLRADDLIPTGEGEF

10

20

30

40

【0385】

50

	FVSPFSAEEGDFHQIHA ^A LNAAQNLQRRLWS DFDISQIRLRCDWGEVDGEPVLI PRTTGKRTA DSYGNKVIFYTKTGVTYYERERGGKKRRKVFAQE ELSEEEAELLVEADEAREKSVVLMRDPGII N RGDWTRQKEFWSMVNQRIEGYLVKQIRSRVRL QESACENTGDI
SEQ ID NO: 23 AaCas1 2b sgR NA 足場A a-sg	UCUAAAGGACAGAAUUUUUCAACGGGUGUGCC AAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGUUG AACUUCUCAAAAAGAACGCUCGCUCAGUGUUC UGACGUCGGAUCACUGAGCGAGCGAUCUGAGA AGUGGCAC
SEQ ID NO: 24 sgRNA足 場V0 (Aa cCas12 bの足場)	GGUCUAGAGGACAGAAUUUUUCAACGGGUGUG CCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGU UGAGCUUCUCAAAUCUGAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 25 sgRNA足 場 V1	GGUCUAGAGGACAGAAAGUGCUCAACGGGUGUG CCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGU UGAGCUUCUCAAAUCUGAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 26 sgRNA足 場 V2. 1	GGUCUAGAGGACAGAAAGUGCUCAACGGGUGUG CCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGU UGAGCUUCUCA _g AAUC _c UGAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 27 sgRNA足 場 V2. 2	GGUCUAGAGGACAGAAAGUGCUCAACGGGUGUG CCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGU UGAGCUUCUCA _g AAUC _{cc} UGAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 28 sgRNA足 場 V2. 3	GGUCUAGAGGACAGAAAGUGCUCAACGGGUGUG CCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGU UGAGCUUCUCA _g AAUC _{ccc} UGAGAAGUGGC AC
SEQ ID NO: 29 sgRNA足 場 V2. 4	GGUCUAGAGGACAGAAAGUGCUCAACGGGUGUG CCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGU UGAGCUUCUCA _g AAUC _{gcc} UGAGAAGUG GCAC
SEQ ID	GGUCUAGAGGACAGAAAGUGCUCAACGGGUGUG

10

20

30

40

【0386】

50

NO: 30 s g RNA足 場 V2. 5	CCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGU UGAGCUUCUCA g g g c c AAUC g g c c c UGAGAAG UGGCAC
SEQ ID NO: 31 s g RNA足 場 V3. 1	GGcUCUAGAGGA g CAGAAGUGCUCAACGGGUG UGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCC GUUGAGCUUCUCAAAUCUGAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 32 s g RNA足 場 V3. 2	GGc c UCUAGAGGA g g CAGAAGUGCUCAACGGG UGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGC CCGUUGAGCUUCUCAAAUCUGAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 33 s g RNA足 場 V3. 3	GGc c c UCUAGAGGA g g g CAGAAGUGCUCAACG GGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAA GCCCGUUGAGCUUCUCAAAUCUGAGAAGUGGC AC
SEQ ID NO: 34 s g RNA足 場 V3. 4	GGc c c g UCUAGAGGA c g g g CAGAAGUGCUCAA CGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCA AAGCCCGUUGAGCUUCUCAAAUCUGAGAAGUG GCAC
SEQ ID NO: 35 s g RNA足 場 V3. 5	GGc c c g g UCUAGAGGA c c g g g CAGAAGUGCUC AACGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGG CAAAGCCCGUUGAGCUUCUCAAAUCUGAGAAG UGGCAC
SEQ ID NO: 36 s g RNA足 場 V4. 1	GGcUCUAGAGGA g CAGAAGUGCUCAACGGGUG UGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCC GUUGAGCUUCUCA g g g c c AAUC g g c c c UGAGA AGUGGCAC
SEQ ID NO: 37 s g RNA足 場 V4. 2	GGc c UCUAGAGGA g g CAGAAGUGCUCAACGGG UGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGC CCGUUGAGCUUCUCA g g g c c AAUC g g c c c UGA GAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 38 s g RNA足 場 V4. 3	GGc c c UCUAGAGGA g g g CAGAAGUGCUCAACG GGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAA GCCCGUUGAGCUUCUCA g g g c c AAUC g g c c c U GAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 39 s g RNA足	GGc c c g UCUAGAGGA c g g g CAGAAGUGCUCAA CGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCA AAGCCCGUUGAGCUUCUCA g g g c c AAUC g g c c

10

20

30

40

50

【 0 3 8 7 】

場 V4. 4	cUGAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 40 s g RNA 足 場 V5. 1	GGcUCUAGAGGA g CAGAAGUGCUCAACGGGUG UGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCC GUUGAGCUUCUCA g g AAUC c c UGAGAAGUGGC AC
SEQ ID NO: 41 s g RNA 足 場 V5. 2	GGc c UCUAGAGGA g g CAGAAGUGCUCAACGGG UGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGC CCGUUGAGCUUCUCA g g AAUC c c UGAGAAGUG GCAC
SEQ ID NO: 42 s g RNA 足 場 V5. 3	GGc c c UCUAGAGGA g g g CAGAAGUGCUCAACG GGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAA GCCCCGUUGAGCUUCUCA g g AAUC c c UGAGAAG UGGCAC
SEQ ID NO: 43 s g RNA 足 場 V5. 4	GGc c c g UCUAGAGGA c g g g CAGAAGUGCUCAA CGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCA AAGCCCCGUUGAGCUUCUCA g g AAUC c c UGAGA AGUGGCAC
SEQ ID NO: 44 s g RNA 足 場 V6. 1	GGcUCUAGAGGA g CAGAAGUGCUCAACGGGUG UGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCC GUUGAGCUUCUCA g g g AAUC c c c UGAGAAGUG GCAC
SEQ ID NO: 45 s g RNA 足 場 V6. 2	GGc c UCUAGAGGA g g CAGAAGUGCUCAACGGG UGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGC CCGUUGAGCUUCUCA g g g AAUC c c c UGAGAAG UGGCAC
SEQ ID NO: 46 s g RNA 足 場 V6. 3	GGc c c UCUAGAGGA g g g CAGAAGUGCUCAACG GGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAA GCCCCGUUGAGCUUCUCA g g g AAUC c c c UGAGA AGUGGCAC
SEQ ID NO: 47 s g RNA 足 場 V6. 4	GGc c c g UCUAGAGGA c g g g CAGAAGUGCUCAA CGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCA AAGCCCCGUUGAGCUUCUCA g g g AAUC c c c UGA GAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 48 s g RNA 足 場 V7. 1	GGcUCUAGAGGA g CAGAAGUGCUCAACGGGUG UGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCC GUUGAGCUUCUCA g g g c AAUC g c c c UGAGAAG UGGCAC

10

20

30

40

50

【 0 3 8 8 】

SEQ ID NO: 49 s g RNA足 場 V7. 2	GGc c cUCUAGAGGA g g CAGAAGUGCUCAACGGG UGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGC CCGUUGAGCUUCUCA g g g c AAUC g c c cUGAGA AGUGGCAC
SEQ ID NO: 50 s g RNA足 場 V7. 3	GGc c cUCUAGAGGA g g g CAGAAGUGCUCAACG GGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAA GCCCCGUUGAGCUUCUCA g g g c AAUC g c c cUGA GAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 51 s g RNA足 場 V7. 4	GGc c c gUCUAGAGGA c g g g CAGAAGUGCUCAA CGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCA AAGCCCGUUGAGCUUCUCA g g g c AAUC g c c cU GAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 52 s g RNA足 場 V8	GUCUAAAGGACAGAAUUUUUCAACGGGUGUGC CAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGUU GAACUUCAAGCGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 53 s g RNA足 場 V9	GGUCGUCUAUAGGACGGCGAGUUUUUCAACGG GUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAG CCCGUUGAGCUUCAAGAAGUGGCAC
SEQ ID NO: 54 A k C a s 1 2 b	MAVKSIKVKLRLSECPDILAGMWQLHRATNAG VRYYTEWVSLMRQEILYSRGPDGGQQCYMTAE DCQRELLRRLRNRQLHNGRQDQPGTDADLLAI SRRLYEILVLQSIGKRGDAAQIIASSFLSPLVD PNSKGGRGGEAKSGRKPAWQKMRDQGDPRWVAA REKYEQRKAVDPSKEILNSLDALGLRPLFAVF TETYRSGVDWKPLGKSQGVRTWDRDMFQQALE RLMSWESWNRRVGEERYARLFQQKMKFEQEHFA EQSHLVKLARALEADMRAASQGFEAKRGTAHQ ITRRALRGADRVFEIWKSIPEEALFSQYDEVI RQVQAEKRRDFGSHDLFAKLAEPKYQPLWRAD ETFLTRYALYNGVLRDLEKARQFATFTLPDAC VNPIWTRFESSQGSNLHKEYEFLFDHLGPGRHA VRFQRLLVVESEGAKERDSVVVPVAPSGQLDK LVLREEEKSSVALHLHDTARPDGFMAEWAGAK LQYERSTLARKARRDKQGMRSWRRQPSMLMSA AQMLEDAKQAGDVYLNISVRVKSPSEVRGQRR PPYAALFRIDDKQRRRTVNYNKLSAYLEEHPD KQIPGAPGLLSGLRVMSVDLGLRTSASISVFR

10

20

30

40

【0389】

50

	VAKKEEVEALGDGRPPHYYP IHGTDDL VAVHE RSHLI QMPGETETKQLRKLREERQAVLRPLFA QLALLRLLVRCGAADERI RTRSWQRLTKQGRE FTKRLTPSWREALELELTRLEAYCGRVPDDEW SRIVDRTVIALWRRMGKQVRDWRKQVKSGAKV KVKG YQLDVVGGNSLAQIDYLEQQYKFLRRWS FFARASGLVVRADRESHFAVALRQHIENAKRD RLKKLADRI LMEALGYVYEASGPREGQWTAQH PPCQLIILEELSAYRFSDDRPPSENSKLMAWG HRGILEELVNQAQVHDVLVGT VYAAFSSRFDA RTGAPGVR CRRV PARFVGATVDDSLPLWLTEF LDKHRLDKNLLRPDDV IPTGEGEFLVSPCGEE AARVRQVHADINAAQNLQRRLWQNF DITELRL RCDVKMGGE GTVLVPRVNNARAKQLFGKKVLV SQDGV TFFERSQTGGKPHSEKQTDLT DKELEL IAEAD EARA KSVVLFRDPSGHIGKGHWIRQRE FWSLVKQRI ESHTAERIRVRGVGSSLD
SEQ ID NO: 55 AmCas 1 2b	MNVAVKSIKVKLMLGHLPEIREGLWHLHEAVN LGVRYYTEWLALLRQGNLYRRGKDGAQECYMT AEQCRQELLVRLRDRQKRNGHTGDPGTDEELL GVARRLYELLVPQSVGKKGQAQMLASGFLSPL ADPKSEGKGT SKSGRKPAWMGMKEAGDSRWV EAKARYEANKAKDPTKQVIASLEMYGLRPLFD VFTETYKTIRWMPLGKHQGVRAWDRDMFQQSL ERLMSWESWNERVGAEFARLVDRRDRFREKHF TGQEHLVALAQRLEQEMKEASPGFESKSSQAH RITKRALRGADGIIDDWLKLSEGE PVDRFDEI LRKRQAQNPRRFGSHDLFLKLAEPVFQPLWRE DPSFLSRWASYNEVLNKLEDAKQFATFTLPSP CSNPVWARFENAEGTNIFKYDFLFDHFGKGRH GVRFQRMIVMRDGVPTVEGIVVPIAPSRQLD ALAPNDAASPIDVFVGDPAAPGAFRGQFGGAK IQYRRSALVRKGRREEKAYLCGFRLPSQRRTG TPADDAGEVFLNLSLRVESQSEQAGRRNPPYA AVFHISDQTRRVIVRYGEIERYLAEHPDTGIP GSRGLTSGLRVMSVDLGLRTSAAISVFRVAHR DELT PDAHGRQPFFFP IHGMDHLVALHERSHL IRLPGETESKKVRSIREQRLDRLNRLRSQMAS LRLLVRTGVLDEQKRDRNWERLQSSMERGGER

10

20

30

40

【0390】

50

	MPSPDWDLFQAQVRYLAQHRDASGEAWGRMVQ AAVRTLWRQLAKQVRDWRKEVRRNADKVKIRG IARDVPGGHS LAQLDYLERQYRFLRSWSAFSV QAGQVVRAERDSRFAVALREHIDNGKKDRLKK LADRI LMEALGYVYVTDGRRAGQWQAVYPPCQ LVLLEELSEYRFSNDRPPSENSQLMVWSHRGV LEELIHQAQVHDVVLVGTIPAAFSSRFDARTGA PGIRCRRVPSIPLKDAPSIPIWLSHYLKQTER DAAALRPGELIPTGDGEFLVTPAGRGASGVRV VHADINAAHNLQRRLWENFDLSDIRVRCRRE GKDGTVVLIPRLTNQRVKERYSGVIFTSEDGV SFTVGD AKTRRRSSASQGE GDDLSDEEQELLA EADDARERSVVLFRDP SGFVNGGRWTAQRAFW GMVHNRIETLLAERFSVSGAAEKVRG
SEQ ID NO: 56 Bs3Cas 12b	MAIRSIKLMKTNSGTDSIYLRKALWRTHQLI NEGIAYYMNLTLYRQEAIGDKTKEAYQAELI NIIRNQQRNNGSS EEHGSDQEILALLRQLYEL IIPSSIGESGDANQLGNKFLYPLVDPNSQSGK GTSNAGRKPWKRLKEEGNPDWELEKKKDEER KAKDPTVKIFDNLNKYGLLPLFPLFTNIQKDI EWLPLGKRQSVRKWDKDMFIQAIERLLSWESW NRRVADEYKQLKEKTESYYKEHLTGGEWIEK IRKFEKERNMELEKNAFAPNDGYFITSRQIRG WDRVYEKWSKLPESASPEELWKVVAEQQNKMS EGFGDPKVFSFLANREN RDIWRGHSERIYHIA AYNGLQKKLSRTKEQATFTLPDAIEHPLWIRY ESPGGTNLNLFKLEEKQKKNYVVTLSKIIWPS EEKWIEKENIEIPLAPSIQFNRQIKLKQHVKG KQEISFSDYSSRISLDGVLGGSRIQFNRKYIK NHKELLGEGDIGPVFFNLVVDVAPLQETRNGR LQSPIGKALKVISSDFSKVIDYKPKELMDWMN TGSASNSFGVASLLEGMRVMSIDMGQRTSASV SIFEVVKELPKDQEQKLFYSINDTELF AIHKR SFLNLNPGEVVTKNNKQQRQERRKKRQFVRSQ IRMLANVLRLETKKTPDERKKA I HKLMEIVQS YDSWTASQKEVWEKELNLLTNMAAFNDEIWKE SLVELHHRIEPYVGQIVSKWRKGLSEGRKNLA GISMWNIDELEDTRLLISWSKRSRTPGEANR IETDEPFGSSLLQHIQNVKDDRLKQMANLIIM

10

20

30

40

【0391】

50

	TALGFKYDKEEKDRYKRWKETYPACQIILFEN LNRYLFNLDRSRRENSRLMKWAHRSIPRTVSM QGEMFGLQVGDVRSSEYSSRFHAKTGAPGIRCH ALTEEDLKAGSNTLKRLIEDGFINESELAYLK KGDIIIPSGGGELFVTLSKRYKKDSDNNELTVI HADINAAQNLQKRFWQQNSEVYRVPCQLARMG EDKLYIPKSQTETIKKYFGKGSFVKNNTEQEV YKWEKSEKMKIKTDTTFDLQDLDFEDISKTI ELAQEQKKKYLTMFDPSPGYFFNNETWRPQKE YWSIVNNIIKSCLKKKILSNKVEL
SEQ ID NO: 57 B s C a s 1 2b	MAIRSIKLLKLTHTGPEAQNLRKGIWRTHRL NEGVAYYMKMLLLFRQUESTGERPKEELQEELI CHIREQQQRNQADKNTQALPLDKALEALRQLY ELLVPSSVGQSGDAQIISRKFLSPLVDPNSEG GKGTSKAGAKPTWQKKKEANDPTWEQDYEKWK KRREEDPTASVITTTLEEYGIRPIFPLYTNTVT DIAWLPLQSNQFVRTWDRDMLQQAIERLLSWE SWNKRQVEEYAKLKEKMAQLNEGLEGGQEWIS LLEQYEENRERELRENMTAANDKYRITKRQMK GWNELYELWSTFPASASHEQYKEALKRVQQRL RGRFGDAHFFQYLMEEKNRLIWKGNPQRIHYF VARNELTKRLEEAKQSATMTLPNARKHPLWVR FDARGGNLQDYLLTAEADKPRSRRFVTFSQLI WPSESGWMEKKDVEVELALSRQFYQQVKLLKN DKGKQKIEFKDKGSGSTFNGHLGGAKLQLERG DLEKEEKNFEDGEIGSVYLNVIDFEPLQEVK NGRVQAPYQQVLQLIRRPNEFPKVTTYKSEQL VEWIKASPKHSAGVESLASGFRVMSIDLGLRA AAATSIFSVEESSDKNAADFSYWIEGTPLVAV HQRSYMLRLPGEQVEKQVMEKRDERFQLHQRV KFQIRVLAQIMRMANKQYGDRWDELDSLKQAV EQKKSPLDQTDRTFWEGIVCDLTKVLPRNEAD WEQAVVQIHRKAEYVVGKAVQAWRKRFAADER KGIAGLSMWNIEELEGLRKLLISWSRTRNPQ EVNRFERGHTSHQRLLTTHIQNVKEDRLKQLSH AIVMTALGYVYDERKQEWCAEYPACQVILFEN LSQYRSNLDIRSTKENSTLMKWAHRSIPKYVHM QAEPYGIQIGDVRAEYSSRFYAKTGTPGIRCK KVRGQDLQGRRFENLQKRLVNEQFLTEEQVKQ

10

20

30

40

【0392】

50

	LRPGDIVPDDSGELFMTLTDGSGSKEVVFLQA DINAAHNLQKRFWQRYNELFKVSCRVI VRDEE EYLVPKTKSVQAKLGKGLFVKKSDTAWKDVYV WDSQAKLK GKTTFTTEESPEQLED FQE I IEE AEEAKGTYRTLFRDPSGVFFPESVWYPQKDFW GEVKRKLYGKLRERFLT KAR
SEQ ID NO: 58 L s C a s 1 2 b	MSIRSFKLKIKTKSGVNAEELRRGLWRTHQLI NDGIAYYMNWLVLRLRQEDL FIRNEETNEIEKR SKEEIQGELLERVHKQQQRNQWSGEVDDQTLL QTLRHL YEEI VPSVIGKSGNASLKARFFLGPL VDPNNKTTKDVSKSGPTPKWKMKMDAGDPNWV QEYEKYMAERQTLVRLEEMGLIPLFPMYTDEV GDIHWLPQASGYTRTWDRDMFQQA IERLLSWE SWNRRVRERRAQFEKKTHDFASRFSESDVQWM NKLREYEAQQEKSLEENAFAPNEPYALTKKAL RGWERVYHSWMRLDSAASEEAYWQEVATCQTA MRGEFGDPAIYQFLAQKENHDIWRGYPERVID FAELNHLQRELRRAKEDATFTLPDSVDHPLWV RYEAPGGTNIHG YDLVQDTKRNLTLILDKFIL PDENGSWHEVKKVPFSLAKSKQFHRQVWLQEE QKQKKREVVFYDYSTNLPHLGTLAGAKLQWDR NFLNKRTQQQIEETGEIGKVFFNISVDVRPAV EVKNGRLQNGLGKALT V LTHPDGTKIVTGWKA EQLEKWVGESGRVSSLGLDSLSEGLRVMSIDL GQRTSATVSVFEITKEAPDNPYKFFYQLEGTE LFAVHQRSFLLALPGENPPQKIKQMRI RWKE RNRIKQQVDQLSAI LRLHKKVNEDERIQAIDK LLQKVASWQLNEEIATAWNQALSQLYSKAKEN DLQWNQAIKNAHHQLEPVVGKQISLWRKDLST GRQGIAGLSLWSIEELEATKKLLTRWSKRSRE PGVVKRIERFETFAKQIQHHINQVKENRLKQL ANLIVMTALGYKYDQEQKKWIEVYPACQVVL F ENLRSYRFSYERSRRENKKLMEWSHRSIPKLV QMGGELFGLQVADVYAAYSSRYHGRTGAPGIR CHALTEADLRNETNIIHELIEAGFIKEEHRPY LQQGDLPVWSGGELFATLQKPYDNPRILTLHA DINA AQNIQKRFWHPSMWFRVNCESVMEGEIV TYVPKNKTVHKKQGKTFRFVKVEGSDVYEWAK WSKNRNKNTFSSITERKPPSSMILFRDPSGTF

10

20

30

40

【0393】

50

	FKEQEWVEQKTFWVGKVQSMIQAYMKKTI VQRM EE
SEQ ID NO: 59 B h C a s 1 2 b	MATRSFILKIEPNEEVKKGLWKTHEVLNHGIA YYMNI LKLIRQEAIYEHHEQDPKNPKKVSKE IQAELWDFVLKMQKCNSFTHEVDKDEVFNILR ELYEELVPSSVEKKGEANQLSNKFLYPLVDPN SQSGKGTASSGRKPRWYNLKIAGDPSWEEEEK KWEEDKKKDPLAKILGKLAEYGLIPLFIPYTD SNEPIVKEIKWMEKSRNQSVRRLDKDMFIQAL ERFLSWESWNLKVKEEYKVEKEYKTLEERIK EDIQALKALEQYKERQEQLLRDTLNTNEYRL SKRGLRGWREIIQKWLMKDENEPSKEYLEVFK DYQRKHPREAGDYSVYEFLSKKENHFIWRNHP EYPYLYATFCEIDKKKKDAKQQATFTLADPIN HPLWVRFEERSGSNLNKYRILTEQLHTEKLKK KLTVQLDRLIYPTESGGWEEKGKVDIVLLPSR QFYNQIFLDIEEKGKHAFTYKDESIKFPLKGT LGGARVQFDRDHLRRYPHKVESGNVGRIYFNM TVNIEPTESPVSKSLKIHRDDFPKVVNFKPKE LTEWIKDSKGKKLKSGIESLEIGLRVMSIDLG QRQAAAASIFEVVDQKPDIEGKLFFPIKGTEL YAVHRASFNIKLPGETLVKSREVLRKAREDNL KLMNQKLNFLRNVLFHFQQFEDITEREKRVTKW ISRQENS DVPLVYQDEL IQIRELMYKPYKDWV AFLKQLHKRLEVEIGKEVKHWRKSLSDGRKGL YGISLKNIDEIDRTRKFLLRWSLRPTEPGEVR RLEPGQRFAIDQLNHLNALKEDRLKKMANTI I MHALGYCYDVRKKKWQAKNPACQIILFEDLSN YNPYEERSRFENSKLMKWSRREIPRQVALQGE IYGLQVGEVGAQFSSRFHAKTGSPGIRCSVVT KEKLQDNRRFFKNLQREGRLTLDKIAVLKEGDL YPDKGGEEKFISLSKDRKCVTTTHADINAAQNLO KRFWTRTHGFYKVYCKAYQVDGQTVYIPESKD QKQKIIIEEFGEYFILLKDGVEWVNAGKLKIK KGSSKQSSSELVDS DILKDSFDLASELKGEKL MLYRDP SGNVFP SDKWMAAGVFFGKLERILIS KLTNQYSISTIEDDSSKQSM
SEQ ID NO: 60	MSFTISYPFKLIIKNKDEAKALLDTHQYMNEG VKYYLEKLLMFRQEKIFIGEDETGKRIYIEET

10

20

30

40

【0394】

50

S b C a s 1 2 b	EYKKQIEEFYLIKKTELGRNLTTLTDEFKTLM RELYICLVSSSMENKKGFPNAQQASLNIFSP FDAESKGYILKEENNNISLIHKDYGKILLKRL RDNNLIPIFTKFTDIKKITAKLSPTALDRMIF AQAIEKLLSYESWCKLMIKERFDKEVKIKELE NKCENKQERDKIFEILEKYEEERQKTFEQDSG FAKKGKFYITGRMLKGFDEIKEKWLKEKDRSE QNLINILNKYQTDNSKLVGDRNLFEFI IKLEN QCLWNGDIDYLIKIRDINKNQIWLDREMPRF TMPDFKKHPLWYRYEDPSNSNFRNYKIEVVKD ENYITITPLITERNNNEYFEENYTFNLAKLKKLS ENITFIPKSKNKEFEFIDSNDEEEDKKDQKKS KQYIKYCDTAKNTSYGKSGGIRLYFNRNELEN YKDGKKMDSYTVFTLSIRDYKSLFAKEKLQPG IFNTVDNKITSLKIQKKFGNEEQTNFLSYFTQ NQITKKDWMDEKTFQNVKELNEGIRVLSVDLG QRFFAAVSCFEIMSEIDNNKLFFNLNDQNHKI IRINDKNYYAKHIYSKTIKLSGEDDDLYKERK INKNYKLSYQERKNKIGIFTRQINKLNQLLKI IRNDEIDKEKFKELIETTKRYVKNTYNDGIIID WNNVDNKILSYENKEDVINLHKELDKKLEIDF KEFIRECRKPIFRSGGLSMQRIDFLEKLNKLNK RKWVARTQKSAESIVLTPKFGYKLKEHINELK DNRVKQGVNYILMTALGYIKDNEIKNDSKKKQ KEDWVKKNRACQIILMEKLTEYTFAEDRPREE NSKLRMWSHRQIFNFLQQKASLWGILVGDVFA PYTSKCLSDNNA PGIRCHQVTKKDLIDNSWFL KIVVKDDAFCDLIEINKENVKNKSIKINDILP LRGGELFASIKDGKLHIVQADINASRNIAKRF LSQINPFRVVLKKDKDET FHLKNEPNYLNKYY SILNFVPTNEELTFFKVEENKDIKPTKRIKMD KHEKESTDEGDDYSKNQIALFRDDSGIFFDKS LWVDGKIFWSVVKNKMTKLLRERNNKKNGSK
SEQ ID NO: 61 NLS	PKKKRKVPG
SEQ ID NO: 62 NLS	ASPKKRKV

10

20

30

40

【0395】

50

SEQ ID NO: 82 NLS	PKKKRKV
SEQ ID NO: 63 CCR5-1 1 標的部位	CTCTTCTGGGCTCCCTACAA
SEQ ID NO: 64 CD34-7 標的部位	AACCACTAGCACTAGCCTTG
SEQ ID NO: 65 RNF2-1 標的部位	TACAGGAGGCAATAACAGAT
SEQ ID NO: 66 CCR5-3 標的部位	AGGCCAAAGAATTCCTGGAA
SEQ ID NO: 67 RNF2-5 標的部位	GGCACATTAATTCACTGTGT
SEQ ID NO: 68 CD34-1 標的部位	CAGGTGACAGGCTAGGCTTC
SEQ ID NO: 72 Krüppel 関連ボックス (KRAB) ドメイン	MNNSQGRVTFEDVTVNFTQGEWQRLNPEQRNL YRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPDVILRLEQG KEPWLEEEVLGSGRAEKNGDIGGQIWPKDV KESL

10

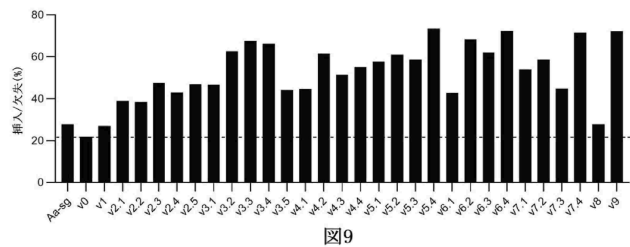
20

30

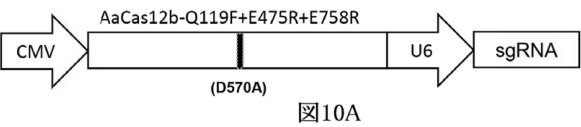
40

50

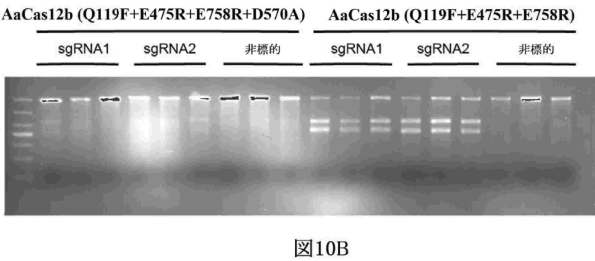
【 図 9 】



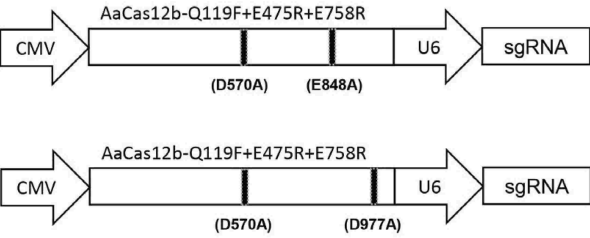
【 図 1 0 A 】



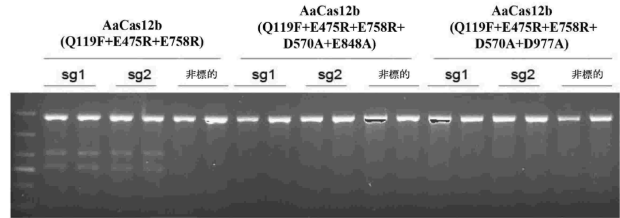
【 図 1 0 B 】



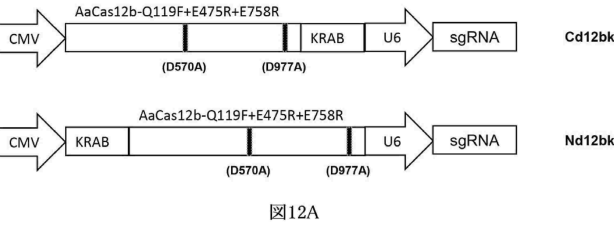
【 図 1 1 A 】



【 図 1 1 B 】



【 図 1 2 A 】



10

20

30

40

50

【図 1 2 B】

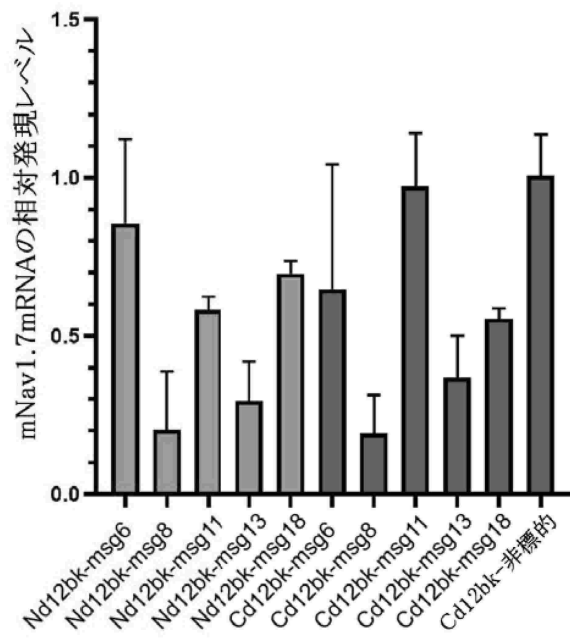


図12B

【配列表】

2025501473000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/137920																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N9/22(2006.01);C12N15/113(2010.01);C12Q1/68(2018.01)i 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) IPC: C12N; C12Q 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) CNTXT;ENTXTC;DWPI;CJFD;WPABSC;CNKI;PubMed;ISI;STN;GenBank;Baidu;CNKI: Cas12b,nuclease,mutant, positively charged amino acid,PAM,aromatic ring,hydrophobic,SEQ ID NO:1																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 113151215 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 23 July 2021 (2021-07-23) claims 1-28,description paragraph 7</td> <td>43</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 113151215 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 23 July 2021 (2021-07-23) claims 1-28,description paragraph 7</td> <td>1-42,44-71</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 113308451 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 27 August 2021 (2021-08-27) claims 1,9,11</td> <td>43</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 113308451 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 27 August 2021 (2021-08-27) claims 1,9,11</td> <td>1-42,44-71</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112195164 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 08 January 2021 (2021-01-08) the whole document</td> <td>1-71</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	CN 113151215 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 23 July 2021 (2021-07-23) claims 1-28,description paragraph 7	43	Y	CN 113151215 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 23 July 2021 (2021-07-23) claims 1-28,description paragraph 7	1-42,44-71	X	CN 113308451 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 27 August 2021 (2021-08-27) claims 1,9,11	43	Y	CN 113308451 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 27 August 2021 (2021-08-27) claims 1,9,11	1-42,44-71	A	CN 112195164 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 08 January 2021 (2021-01-08) the whole document	1-71
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	CN 113151215 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 23 July 2021 (2021-07-23) claims 1-28,description paragraph 7	43																		
Y	CN 113151215 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 23 July 2021 (2021-07-23) claims 1-28,description paragraph 7	1-42,44-71																		
X	CN 113308451 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 27 August 2021 (2021-08-27) claims 1,9,11	43																		
Y	CN 113308451 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 27 August 2021 (2021-08-27) claims 1,9,11	1-42,44-71																		
A	CN 112195164 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY,CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 08 January 2021 (2021-01-08) the whole document	1-71																		
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 27 February 2023		Date of mailing of the international search report 06 March 2023																		
Name and mailing address of the ISA/CN CHINA NATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY ADMINISTRATION 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer LV,XiaoMeng																		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. (+86) 010-53962044																		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/137920

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021178934 A1 (METAGENOMI IP TECHNOLOGIES, LLC. et al.) 10 September 2021 (2021-09-10) the whole document	1-71
A	CN 112041444 A (ARBOR BIOTECHNOLOGIES INC.) 04 December 2020 (2020-12-04) the whole document	1-71
A	WO 2021076682 A1 (PAIRWISE PLANTS SERVICES, INC.) 22 April 2021 (2021-04-22) the whole document	1-71
PX	WO 2022247873 A1 (INSTITUTE OF ZOOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 01 December 2022 (2022-12-01) claims 1-38	1-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/137920

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/137920

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **68, 69**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 68 and 69 direct to a method of treating or preventing a disease or a condition associated with a target nucleic acid in a cell of an individual, the search has been carried out and based on the use of the engineered CRISPR-Cas12b system in manufacturing the drugs. 10
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/137920

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113151215	A	23 July 2021	None			
CN	113308451	A	27 August 2021	WO	2019127087	A1	04 July 2019
				JP	2021512590	A	20 May 2021
				JP	7138712	B2	16 September 2022
				EP	3733842	A1	04 November 2020
				EP	3733842	A4	04 August 2021
				US	2021095271	A1	01 April 2021
CN	112195164	A	08 January 2021	None			
WO	2021178934	A1	10 September 2021	None			
CN	112041444	A	04 December 2020	JP	2021516970	A	15 July 2021
				WO	2019178427	A1	19 September 2019
				US	2022098579	A1	31 March 2022
				EP	3765615	A1	20 January 2021
				DE	202019005567	U1	16 February 2021
				CA	3093334	A1	19 September 2019
				US	2021123047	A1	29 April 2021
				US	11168324	B2	09 November 2021
				AU	2019236210	A1	10 September 2020
				US	2020063126	A1	27 February 2020
				US	10808245	B2	20 October 2020
				US	2020407715	A1	31 December 2020
				US	2020407716	A1	31 December 2020
WO	2021076682	A1	22 April 2021	EP	4045643	A1	24 August 2022
				US	2021115421	A1	22 April 2021
				JP	2022552409	A	15 December 2022
				AU	2020366358	A1	28 April 2022
				CA	3157707	A1	22 April 2021
				KR	20220097408	A	07 July 2022
				IL	292117	A	01 June 2022
				BR	112022007125	A2	05 July 2022
WO	2022247873	A1	01 December 2022	None			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46

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

中華人民共和國 1 0 0 1 0 1 北京市朝陽区北辰西路 1 号院 5 号

No. 5, 1 Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宣

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者 李偉

中華人民共和國、1 0 0 1 0 1 ベイジン、チャオヤン ディストリクト、バイチェン ウェストロード 1

(72)発明者 周▲き▼

中華人民共和國、1 0 0 1 0 1 ベイジン、チャオヤン ディストリクト、バイチェン ウェストロード 1

(72)発明者 陳陽燦

中華人民共和國、1 0 0 1 0 1 ベイジン、チャオヤン ディストリクト、バイチェン ウェストロード 1

F ターム (参考)	4B065	AA01X AA72X AA88X AA90X AB01 BA02
	4C084	AA13 CA18 DC22 NA13 NA14 ZA15 ZA33 ZA36 ZB07 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35 ZC21
	4C086	AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA13 NA14 ZA15 ZA33 ZA36 ZB07 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35 ZC21
	4C087	AA01 AA02 BC83 CA12 NA13 NA14 ZA15 ZA33 ZA36 ZB07 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35 ZC21
	4H045	AA10 AA20 AA30 BA10 DA89 EA60 FA72 FA74