

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年9月24日(2020.9.24)

【公表番号】特表2020-505000(P2020-505000A)

【公表日】令和2年2月20日(2020.2.20)

【年通号数】公開・登録公報2020-007

【出願番号】特願2019-532936(P2019-532936)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	9/22	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	9/22	Z N A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	

【手続補正書】

【提出日】令和2年8月13日(2020.8.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

Casタンパク質、二本鎖標的ポリヌクレオチドにおいて標的核酸配列を認識する少なくとも1つのターゲッティングRNA分子、および前記標的ポリヌクレオチドを含む、核タンパク質複合体であって、

前記Casタンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも77%の同一性の配列を有し、

前記二本鎖標的ポリヌクレオチドが、前記標的核酸配列を含む標的核酸鎖、ならびに前記標的核酸配列に相補的であるプロトスペーサー核酸配列および前記プロトスペーサー配列の3'末端に直接隣接したプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を含む非標的核酸鎖を含み、前記PAM配列が、5'-NNNNCNN-3'を含み、前記核タンパク質複合体がヒト細胞におけるものではない、核タンパク質複合体。

【請求項2】

標的核酸配列を含む二本鎖標的ポリヌクレオチドを有する形質転換非ヒト細胞であって、前記二本鎖標的ポリヌクレオチドが、前記標的核酸配列を含む標的核酸鎖、および前記標的核酸配列に相補的であるプロトスペーサー核酸配列を含む非標的核酸鎖を含み、前記細胞が、

配列番号1のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも77%の同一性の配列を有する、Cas(CRISPR clustered regularly interspaced short palindromic repeat:クラスター化し規則的に間

隔を置いた短い回文配列の繰り返し) associated : C R I S P R 関連) タンパク質、

前記標的核酸鎖中の前記標的核酸配列を認識する少なくとも 1 つのターゲティング RNA 分子であって、前記非標的鎖が、前記プロトスペーサー配列の 3' 末端に直接隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列をさらに含み、前記 PAM 配列が 5' - N N N C N N - 3' を含む、少なくとも 1 つのターゲティング RNA 分子、および

少なくとも 1 つの前記 Cas タンパク質および前記ターゲティング RNA 分子をコードする核酸を含む発現ベクターを含む、形質転換非ヒト細胞。

#### 【請求項 3】

前記 Cas タンパク質が、発現ベクターから発現される、請求項 2 に記載の形質転換細胞。

#### 【請求項 4】

前記結合、切断、標識もしくは改変、または前記核タンパク質複合体が、20 と 100 の間の温度で、30 と 80 の間の温度で、37 と 78 の間の温度で、好ましくは 55 超の温度で、より好ましくは 55 と 80 の間の温度で、さらにより好ましくは、55 と 65 の間または 60 と 65 の間の温度で発生する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

#### 【請求項 5】

前記標的核酸配列を含む前記二本鎖標的ポリヌクレオチドが前記 Cas タンパク質により切断され、好ましくは前記切断が DNA 切断である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

#### 【請求項 6】

前記標的配列を含む前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖 DNA であり、前記結合、切断、標識または改変が、前記標的ポリヌクレオチド中の二本鎖切断をもたらす、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

#### 【請求項 7】

前記 Cas タンパク質が、前記二本鎖 DNA を切断するヌクレアーゼ活性を欠いても、なお前記標的ポリヌクレオチドの遺伝子サイレンシングが存在する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

#### 【請求項 8】

前記 PAM 配列が、5' - N N N N C N N A - 3' [配列番号 47] を含み、好ましくは、前記 PAM 配列が、5' - N N N N C S A A - 3' [配列番号 48] を含み、より好ましくは、前記 PAM 配列が、5' - N N N N C C A A - 3' [配列番号 50] を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

#### 【請求項 9】

前記結合、切断、標識または改変が、20 と 70 の間の温度で起こり、好ましくは、前記結合、切断、標識または改変が、25 と 65 の間の温度で起こる、請求項 8 に記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

#### 【請求項 10】

前記 Cas タンパク質が、細菌、古細菌またはウイルスから、好ましくは好熱性細菌から得られ、より好ましくは、前記 Cas タンパク質が、ゲオバチルス (Geobacillus) 属種、好ましくはゲオバチルス・サーモデニトリフィカンス (Geobacillus thermodenitrificans) から得ることができる、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

#### 【請求項 11】

前記細胞が原核細胞であるか、または前記核タンパク質複合体が原核細胞中にある、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

#### 【請求項 12】

前記ターゲティング RNA 分子が、c r R N A および t r a c r R N A を含む、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

**【請求項 1 3】**

前記少なくとも1つのターゲティングRNA分子の長さが、35～200ヌクレオチド残基の範囲である、および／または、前記標的核酸配列が、15～32ヌクレオチド残基長である、請求項1から12のいずれかに記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

**【請求項 1 4】**

前記Casタンパク質の前記ヌクレアーゼ活性が、不活性でもよく、前記Casタンパク質が、少なくとも1つの機能的部分、好ましくは、タンパク質をさらに含み、任意選択で、ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼ-ヌクレアーゼ、DNAメチラーゼ、ヒストンメチラーゼ、アセチラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、転写(共)活性化因子、転写リプレッサー、DNA結合タンパク質、DNA構築タンパク質、マーカータンパク質、レポータータンパク質、蛍光タンパク質、リガンド結合タンパク質、シグナルペプチド、細胞内局在配列、抗体エピトープまたは親和性精製タグ、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)から選択される、請求項1から13のいずれかに記載の形質転換細胞または核タンパク質複合体。

**【請求項 1 5】**

二本鎖標的ポリヌクレオチドに結合する、これを切断する、標識するまたは改変する方法であって、前記二本鎖標的ポリヌクレオチドが、標的核酸配列を含む標的核酸鎖、および前記標的核酸配列に相補的であるプロトスペーサー核酸配列を含む非標的核酸を含み、前記方法が、

a. 少なくとも1つのターゲティングRNA分子を設計するステップであって、前記ターゲティングRNA分子が、前記標的鎖の前記標的配列を認識し、前記非標的鎖が、前記プロトスペーサー配列の3'末端に直接隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列をさらに含み、前記PAM配列が、5' - NNNNCNN - 3'を含む、ステップ、

b. 前記ターゲティングRNA分子およびCasタンパク質を含むリボ核タンパク質複合体を形成するステップであって、前記単離Casタンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも77%の同一性の配列を有する、ステップ、および

c. 前記リボ核タンパク質複合体が、前記標的ポリヌクレオチドに結合する、これを切断する、標識するまたは改変する、ステップを含み、ヒト細胞において使用されない方法。

**【請求項 1 6】**

標的核酸配列を含む二本鎖標的ポリヌクレオチドに結合する、切断する、標識するまたは改変するための、少なくとも1つのターゲッティングRNA分子およびCasタンパク質の使用であって、

前記二本鎖標的ポリヌクレオチドが、前記標的核酸配列を含む標的核酸鎖、および前記標的核酸配列に相補的であるプロトスペーサー核酸配列を含む非標的核酸鎖を含み、

前記Casタンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも77%の同一性の配列を有し、

前記少なくとも1つのターゲッティングRNA分子が、前記標的配列を認識し、

前記非標的核酸鎖が、前記プロトスペーサー核酸配列の3'末端に直接隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列をさらに含み、前記PAM配列が、5' - NNNNCNN - 3'を含み、前記使用が、ヒト細胞におけるものではない、使用。

**【請求項 1 7】**

請求項3から14のいずれか一項に記載の特徴のいずれかをさらに含む、請求項15に記載の方法または請求項16に記載の使用。

**【手続補正2】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

発明者らは、Thermocas9：好熱性細菌であるゲオバチルス・サーモデニトリフィカヌス(*Geobacillus thermodenitrificans*)T12のCRISPR-CasII型系からRNA-ガイドDNA-エンドヌクレアーゼを発見して、特徴付けた。発明者らは、驚くべきことに、幅広い温度範囲にわたる、そのin vitroで活性を示し、熱安定性に対するsgRNA-構造の重要性を実証し、幅広い温度範囲にわたる、in vivoでのゲノム編集に、Thermocas9を適用した。

本開示は、以下の[1]から[106]を含む。

[1] 標的核酸配列を含む二本鎖標的ポリヌクレオチドに結合する、切断する、標識するまたは改変するための、少なくとも1つのターゲッティングRNA分子およびCasタンパク質の使用であって、

上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが、上記標的核酸配列を含む標的核酸鎖、および上記標的核酸配列に相補的であるプロトスペーサー核酸配列を含む非標的核酸鎖を含み、

上記Casタンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも77%の同一性の配列を有し、

上記少なくとも1つのターゲッティングRNA分子が、上記標的配列を認識し、

上記非標的核酸鎖が、上記プロトスペーサー核酸配列の3'末端に直接隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列をさらに含み、上記PAM配列が、5'-NNNNCNNN-3'を含み、上記使用が、ヒト細胞におけるものではない、使用。

[2] 上記結合、切断、標識または改変が、20と100の間の温度で、30と80の間の温度で、37と78の間の温度で、好ましくは55超の温度で、より好ましくは55と80の間の温度で、さらにより好ましくは、55と65の間または60と65の間の温度で起こる、上記[1]に記載の使用。

[3] 上記標的核酸配列を含む上記ポリヌクレオチドが上記Casタンパク質により切斷され、好ましくは、上記切斷がDNA切斷である、上記[1]または上記[2]に記載の使用。

[4] 上記標的配列を含む上記標的核酸鎖が二本鎖DNAであり、上記使用が、上記標的核酸配列を含む上記ポリヌクレオチド中の二本鎖切斷をもたらす、上記[1]から[3]のいずれかに記載の使用。

[5] 上記標的核酸配列を含む上記ポリヌクレオチドが二本鎖DNAであり、上記Casタンパク質が上記二本鎖DNAを切斷する能力を欠き、上記使用が上記ポリヌクレオチドの遺伝子サイレンシングをもたらす、上記[1]または上記[2]に記載の使用。

[6] 上記Casタンパク質を含む上記ポリヌクレオチドが、変異D8AおよびH582Aを含む、上記[5]に記載の使用。

[7] 上記PAM配列が、5'-NNNNCNNA-3'[配列番号47]を含む、上記[1]から[6]のいずれかに記載の使用。

[8] 上記PAM配列が、5'-NNNNCSAA-3'[配列番号48]を含む、上記[1]から[7]のいずれかに記載の使用。

[9] 上記PAM配列が、5'-NNNNCCAA-3'[配列番号50]を含む、上記[8]に記載の使用。

[10] 上記結合、切断、標識または改変が、20と70の間の温度で起こる、上記[8]または上記[9]に記載の使用。

[11] 結合、切断、標識または改変が、25と65の間の温度で起こる、上記[7]から[10]のいずれかに記載の使用。

[12] 上記Casタンパク質が、細菌、古細菌またはウイルスから、好ましくは好熱性細菌から得られる、上記[1]から[11]のいずれかに記載の使用。

[13] 上記Casタンパク質が、ゲオバチルス(*Geobacillus*)属種、好ましくはゲオバチルス・サーモデニトリフィカヌス(*Geobacillus thermodenitrificans*)から得るこ

とができる、上記 [ 1 ] から [ 12 ] のいずれかに記載の使用。

[ 14 ] 上記ターゲティング RNA 分子が、c r RNA および t r a c r RNA を含む、上記 [ 1 ] から [ 13 ] のいずれかに記載の使用。

[ 15 ] 上記少なくとも 1 つのターゲティング RNA 分子の長さが、35 ~ 200 ヌクレオチド残基の範囲である、上記 [ 1 ] から [ 14 ] のいずれかに記載の使用。

[ 16 ] 上記標的核酸配列が、15 ~ 32 ヌクレオチド残基長である、上記 [ 1 ] から [ 15 ] のいずれかに記載の使用。

[ 17 ] 上記 Cas タンパク質が、少なくとも 1 つの機能的部分をさらに含む、上記 [ 1 ] から [ 16 ] のいずれかに記載の使用。

[ 18 ] 上記 Cas タンパク質が、少なくとも 1 つのさらなる機能的または非機能的タンパク質を含むタンパク質複合体の一部として提供され、任意選択で、上記少なくとも 1 つのさらなるタンパク質が、少なくとも 1 つの機能的部分をさらに含む、上記 [ 1 ] から [ 17 ] のいずれかに記載の使用。

[ 19 ] 上記 Cas タンパク質またはさらなるタンパク質が、上記 Cas タンパク質またはタンパク質複合体の N 終端および / もしくは C 終端、好ましくは C 終端に融合または連結している、少なくとも 1 つの機能的部分を含む、上記 [ 17 ] または上記 [ 18 ] に記載の使用。

[ 20 ] 上記少なくとも 1 つの機能的部分がタンパク質であり、任意選択で、ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼ - ヌクレアーゼ、DNA メチラーゼ、ヒストンメチラーゼ、アセチラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、転写 (共) 活性化因子、転写リプレッサー、DNA 結合タンパク質、DNA 構築タンパク質、マーカータンパク質、レポータータンパク質、蛍光タンパク質、リガンド結合タンパク質、シグナルペプチド、細胞内局在配列、抗体エピトープまたは親和性精製タグ、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP) から選択される、上記 [ 17 ] から [ 19 ] のいずれかに記載の使用。

[ 21 ] 上記 Cas 9 ヌクレアーゼの天然の活性が不活化されており、上記 Cas タンパク質が少なくとも 1 つの機能的部分に連結している、上記 [ 20 ] に記載の使用。

[ 22 ] 上記少なくとも 1 つの機能的部分がヌクレアーゼドメイン、好ましくは Fok I ヌクレアーゼドメインである、上記 [ 20 ] または上記 [ 21 ] に記載の使用。

[ 23 ] 上記少なくとも 1 つの機能的部分がマーカータンパク質である、上記 [ 20 ] から [ 22 ] のいずれかに記載の使用。

[ 24 ] 二本鎖標的ポリヌクレオチドに結合する、これを切断する、標識するまたは改変する方法であって、上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが、標的核酸配列を含む標的核酸鎖、および上記標的核酸配列に相補的であるプロトスペーサー核酸配列を含む非標的核酸を含み、上記方法が、

a . 少なくとも 1 つのターゲティング RNA 分子を設計するステップであって、上記ターゲティング RNA 分子が、上記標的鎖の上記標的配列を認識し、上記非標的鎖が、上記プロトスペーサー配列の 3' 末端に直接隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列をさらに含み、上記 PAM 配列が、5' - N N N N C N N - 3' を含む、ステップ、

b . 上記ターゲティング RNA 分子および Cas タンパク質を含むリボ核タンパク質複合体を形成するステップであって、上記単離 Cas タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 77 % の同一性の配列を有する、ステップ、および

c . 上記リボ核タンパク質複合体が、上記標的ポリヌクレオチドに結合する、これを切断する、標識するまたは改変する、ステップ

を含み、ヒト細胞において使用されない方法。

[ 25 ] 上記結合、切断、標識または改変が、20 と 100 の間の温度で、30 と 80 の間の温度で、37 と 78 の間の温度で、好ましくは 55 超の温度で、より好ましくは 55 と 80 の間の温度で、さらにより好ましくは、55 と 65 の間または 60 と 65 の間の温度で起こる、上記 [ 24 ] に記載の方法。

[ 26 ] 上記標的核酸配列を含む上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが上記 Cas タンパク質により切断され、好ましくは上記切断が DNA 切断である、上記 [ 24 ] または上記 [

25]に記載の方法。

[27]上記標的ポリヌクレオチドが二本鎖DNAであり、上記使用が、上記ポリヌクレオチド中の二本鎖切斷をもたらす、上記[24]から[26]のいずれかに記載の方法。

[28]上記標的核酸配列を含む上記標的ポリヌクレオチドが二本鎖DNAであり、上記Casタンパク質が、上記二本鎖DNAを切斷する能力を欠き、上記方法が、上記標的ポリヌクレオチドの遺伝子サイレンシングをもたらす、上記[24]または上記[25]に記載の方法。

[29]上記PAM配列が、5'-NNNNCNNA-3' [配列番号47]を含む、上記[24]から[28]のいずれかに記載の方法。

[30]上記PAM配列が、5'-NNNNCSAA-3' [配列番号48]を含む、上記[29]に記載の方法。

[31]上記PAM配列が、5'-NNNNCCAA-3' [配列番号50]を含む、上記[30]に記載の方法。

[32]上記結合、切斷、標識または改変が、20と70の間の温度で起こる、上記[30]または上記[31]に記載の方法。

[33]結合、切斷、標識または改変が、25と65の間の温度で起こる、上記[29]から上記[32]のいずれかに記載の方法。

[34]上記Casタンパク質が、細菌、古細菌またはウイルスから、好ましくは好熱性細菌から得られる、上記[24]から[33]のいずれかに記載の使用。

[35]上記Casタンパク質が、ゲオバチルス(*Geobacillus*)属種、好ましくはゲオバチルス・サーモデニトリフィカンス(*Geobacillus thermodenitrificans*)から得ることができ、上記[24]から[34]のいずれかに記載の方法。

[36]上記ターゲティングRNA分子が、cRNAおよびtRNAを含む、上記[24]から[35]のいずれかに記載の方法。

[37]上記少なくとも1つのターゲティングRNA分子の長さが、35~200ヌクレオチド残基の範囲である、上記[24]から[36]のいずれかに記載の方法。

[38]上記標的核酸配列が、15~32ヌクレオチド残基長である、上記[24]から[37]のいずれかに記載の方法。

[39]上記Casタンパク質が、少なくとも1つの機能的部分をさらに含む、上記[24]から[39]のいずれかに記載の方法。

[40]上記Casタンパク質が、少なくとも1つのさらなる機能的または非機能的タンパク質を含むタンパク質複合体の一部として提供され、任意選択で、上記少なくとも1つのさらなるタンパク質が、少なくとも1つの機能的部分をさらに含む、上記[24]から[40]のいずれかに記載の方法。

[41]上記Casタンパク質またはさらなるタンパク質が、上記Casタンパク質またはタンパク質複合体のN終端および/もしくはC終端、好ましくはC終端に融合または連結している、少なくとも1つの機能的部分を含む、上記[39]または上記[40]に記載の方法。

[42]上記少なくとも1つの機能的部分がタンパク質であり、任意選択で、ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼ-ヌクレアーゼ、DNAメチラーゼ、ヒストンメチラーゼ、アセチラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、転写(共)活性化因子、転写リプレッサー、DNA結合タンパク質、DNA構築タンパク質、マーカータンパク質、レポータータンパク質、蛍光タンパク質、リガンド結合タンパク質、シグナルペプチド、細胞内局在配列、抗体エピトープまたは親和性精製タグ、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)から選択される、上記[39]から[41]のいずれかに記載の方法。

[43]上記Cas9ヌクレアーゼの天然の活性が不活化されており、上記Casタンパク質が少なくとも1つの機能的部分に連結している、上記[42]に記載の方法。

[44]上記少なくとも1つの機能的部分がヌクレアーゼドメイン、好ましくはFokIヌクレアーゼドメインである、上記[42]または上記[43]に記載の方法。

[45]上記少なくとも1つの機能的部分がマーカータンパク質である、上記[42]か

ら [ 4 4 ] のいずれかに記載の方法。

[ 4 6 ] 上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが d s D N A であり、上記少なくとも 1 つの機能的部分がヌクレアーゼまたはヘリカーゼ - ヌクレアーゼであり、上記改変が、所望の遺伝子座における一本鎖または二本鎖切断である、上記 [ 2 0 ] に記載の使用または上記 [ 4 2 ] に記載の方法。

[ 4 7 ] 上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが d s D N A であり、上記機能的部分が、 D N A 改変酵素（例えば、メチラーゼまたはアセチラーゼ）、転写活性因子または転写リプレッサーから選択され、上記結合、切断、標識または改変が、遺伝子発現の改変をもたらす、上記 [ 2 0 ] に記載の使用、または上記 [ 4 2 ] に記載の方法。

[ 4 8 ] 上記結合、切断、標識または改変が、 i n v i v o で行われる、上記 [ 2 0 ] に記載の使用、または上記 [ 4 2 ] に記載の方法。

[ 4 9 ] 上記結合、切断、標識または改変が、好熱性生物において、好ましくは好熱性原核生物、より好ましくはゲオバチルス ( Geobacillus ) 属種において起こる、上記 [ 4 8 ] に記載

の使用または方法。

[ 5 0 ] 上記結合、切断、標識または改変が、中温生物において、好ましくは中温性原核生物、より好ましくはシュードモナス ( Pseudomonas ) 属種において起こる、上記 [ 4 8 ] に記載の使用または方法。

[ 5 1 ] 上記結合、切断、標識または改変が、所望の位置に、所望のヌクレオチド配列を改変または欠失および / もしくは挿入をもたらし、かつ / または上記結合、切断、標識または改変が、所望の遺伝子座にサイレンシング遺伝子発現をもたらす、上記 [ 1 ] から [ 4 ] 、 [ 7 ] から [ 2 3 ] 、もしくは [ 4 6 ] のいずれかに記載の使用、または上記 [ 2 4 ] から [ 2 7 ] 、 [ 2 9 ] から [ 4 6 ] のいずれかに記載の方法。

[ 5 2 ] 標的核酸配列を含む二本鎖標的ポリヌクレオチドを有する形質転換非ヒト細胞であって、上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが、上記標的核酸配列を含む標的核酸鎖、および上記標的核酸配列に相補的であるプロトスペーサー核酸配列を含む非標的核酸鎖を含み、上記細胞が、

配列番号 1 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 7 % の同一性の配列を有する、 C a s ( C R I S P R ( c l u s t e r e d r e g u l a r l y i n t e r s p a c e d s h o r t p a l i n d r o m i c r e p e a t : クラスター化し規則的に間隔を置いた短い回文配列の繰り返し ) a s s o c i a t e d : C R I S P R 関連 ) タンパク質、

上記標的核酸鎖中の上記標的核酸配列を認識する少なくとも 1 つのターゲティング R N A 分子であって、上記非標的鎖が、上記プロトスペーサー配列の 3 ' 末端に直接隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ ( P A M ) 配列をさらに含み、上記 P A M 配列が 5 ' - N N N C N N - 3 ' を含む、少なくとも 1 つのターゲティング R N A 分子、および

少なくとも 1 つの上記 C a s タンパク質および上記ターゲティング R N A 分子をコードする核酸を含む発現ベクターを含む、形質転換非ヒト細胞。

[ 5 3 ] 上記 C a s タンパク質および上記ターゲティング R N A 分子により、上記細胞中の上記標的ポリヌクレオチドの結合、切断、標識または改変が可能になり、上記結合、切断、標識または改変が、 2 0 と 1 0 0 の間の温度で、 3 0 と 8 0 の間の温度で、 3 7 と 7 8 の間の温度で、好ましくは 5 5 超の温度で、より好ましくは 5 5 と 8 0 の間の温度で、さらにより好ましくは、 5 5 と 6 5 の間または 6 0 と 6 5 の間の温度で起こる、上記 [ 5 2 ] に記載の形質転換細胞。

[ 5 4 ] 上記標的核酸配列を含む上記標的核酸鎖が C a s タンパク質により切断され、好ましくは上記切断が D N A 切断である、上記 [ 5 2 ] または上記 [ 5 3 ] に記載の形質転換細胞。

[ 5 5 ] 上記標的配列を含む上記標的ポリヌクレオチドが二本鎖 D N A であり、上記結合、切断、標識または改変が、上記標的ポリヌクレオチド中の二本鎖切断をもたらす、上記

[ 5 2 ] から [ 5 4 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 5 6 ] 上記標的核酸配列を含む上記標的ポリヌクレオチドが二本鎖 D N A であり、上記 C a s タンパク質が、上記二本鎖 D N A を切断する能力を欠き、上記結合、切断、標識または改変が、上記標的ポリヌクレオチドの遺伝子サイレンシングをもたらす、上記 [ 5 2 ] または上記 [ 5 3 ] に記載の形質転換細胞。

[ 5 7 ] 上記 P A M 配列が、5' - N N N N C N N A - 3' [ 配列番号 4 7 ] を含む、上記 [ 5 2 ] から [ 5 6 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 5 8 ] 上記 P A M 配列が、5' - N N N N C S A A - 3' [ 配列番号 4 8 ] を含む、上記 [ 5 7 ] に記載の形質転換細胞。

[ 5 9 ] 上記 P A M 配列が、5' - N N N N C C A A - 3' [ 配列番号 5 0 ] を含む、上記 [ 5 8 ] に記載の形質転換細胞。

[ 6 0 ] 上記結合、切断、標識または改変が、20 と 70 の間の温度で起こる、上記 [ 5 8 ] または上記 [ 5 9 ] に記載の形質転換細胞。

[ 6 1 ] 結合、切断、標識または改変が、25 と 65 の間の温度で起こる、上記 [ 5 7 ] から [ 上記 [ 6 0 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 6 2 ] 上記 C a s タンパク質が、細菌、古細菌またはウイルスから、好ましくは好熱性細菌から得られる、上記 [ 5 2 ] から [ 6 1 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 6 3 ] 上記 C a s タンパク質が、ゲオバチルス ( Geobacillus ) 属種、好ましくはゲオバチルス・サーモデニトリフィカンス ( Geobacillus thermodenitrificans ) から得ることができる、上記 [ 5 2 ] から [ 6 2 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 6 4 ] 上記細胞が原核細胞である、上記 [ 5 2 ] から [ 6 3 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 6 5 ] 上記細胞が真核細胞である、上記 [ 5 2 ] から [ 6 3 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 6 6 ] 上記ターゲティング R N A 分子が、c r R N A および t r a c r R N A を含む、上記 [ 5 2 ] から [ 6 5 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 6 7 ] 上記少なくとも 1 つのターゲティング R N A 分子の長さが、35 ~ 200 ヌクレオチド残基の範囲である、上記 [ 5 2 ] から [ 6 6 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 6 8 ] 上記標的核酸配列が、15 ~ 32 ヌクレオチド残基長である、上記 [ 5 2 ] から [ 6 7 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 6 9 ] 上記 C a s タンパク質が、少なくとも 1 つの機能的部分をさらに含む、上記 [ 5 2 ] から [ 6 8 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 7 0 ] 上記 C a s タンパク質が、少なくとも 1 つのさらなる機能的または非機能的タンパク質を含むタンパク質複合体の一部として提供され、任意選択で、上記少なくとも 1 つのさらなるタンパク質が、少なくとも 1 つの機能的部分をさらに含む、上記 [ 5 2 ] から [ 6 9 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 7 1 ] 上記 C a s タンパク質またはさらなるタンパク質が、上記 C a s タンパク質またはタンパク質複合体の N 終端および / または C 終端に、好ましくは N 終端に融合または連結している、少なくとも 1 つの機能的部分を含む、上記 [ 6 9 ] または上記 [ 7 0 ] に記載の形質転換細胞。

[ 7 2 ] 上記少なくとも 1 つの機能的部分がタンパク質であり、任意選択で、ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼ - ヌクレアーゼ、D N A メチラーゼ、ヒストンメチラーゼ、アセチラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、転写 ( 共 ) 活性化因子、転写リブレッサー、D N A 結合タンパク質、D N A 構築タンパク質、マーカータンパク質、レポータータンパク質、

蛍光タンパク質、リガンド結合タンパク質、シグナルペプチド、細胞内局在配列、抗体エピトープまたは親和性精製タグ、例えば緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) から選択される、上記 [ 6 9 ] から [ 7 1 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 7 3 ] 上記 C a s 9 ヌクレアーゼの天然の活性が不活化されており、上記 C a s タンパク質が少なくとも 1 つの機能的部分に連結している、上記 [ 7 2 ] に記載の形質転換細胞

。

[ 74 ] 上記少なくとも 1 つの機能的部分がヌクレアーゼドメイン、好ましくは F o k I ヌクレアーゼドメインである、上記 [ 69 ] から [ 73 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 75 ] 上記少なくとも 1 つの機能的部分がマーカタンパク質である、上記 [ 69 ] から [ 73 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 76 ] 上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが d s D N A であり、上記少なくとも 1 つの機能的部分がヌクレアーゼまたはヘリカーゼ - ヌクレアーゼであり、上記改変が、所望の遺伝子座における一本鎖または二本鎖切断である、上記 [ 69 ] から [ 74 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 77 ] 上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが d s D N A であり、上記機能的部分が、 D N A 改変酵素（例えば、メチラーゼまたはアセチラーゼ）、転写活性因子または転写リプレッサーから選択され、上記結合、切断、標識または改変が、遺伝子発現の改変をもたらす、上記 [ 69 ] から [ 73 ] のいずれかに記載の形質転換細胞、または上記 [ 42 ] に記載の方法。

[ 78 ] 上記 C a s タンパク質が、発現ベクターから発現される、上記 [ 69 ] から [ 74 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 79 ] 上記結合、切断、標識または改変が、所望の位置に、所望のヌクレオチド配列を改変または欠失および／もしくは挿入をもたらし、かつ／または上記結合、切断、標識または改変が、所望の遺伝子座にサイレンシング遺伝子発現をもたらす、上記 [ 52 ] から [ 78 ] のいずれかに記載の形質転換細胞。

[ 80 ] C a s タンパク質、二本鎖標的ポリヌクレオチドにおいて標的核酸配列を認識する少なくとも 1 つのターゲッティング R N A 分子、および上記標的ポリヌクレオチドを含む、核タンパク質複合体であって、

上記 C a s タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 77 % の同一性の配列を有し、

上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが、上記標的核酸配列を含む標的核酸鎖、ならびに上記標的核酸配列に相補的であるプロトスペーサー核酸配列および上記プロトスペーサー配列の 3 ' 末端に直接隣接したプロトスペーサー隣接モチーフ ( P A M ) 配列を含む非標的核酸鎖を含み、上記 P A M 配列が、 5 ' - N N N N C N N - 3 ' を含み、上記核タンパク質複合体がヒト細胞におけるものではない、核タンパク質複合体。

[ 81 ] 20 と 100 の間の温度で、 30 と 80 の間の温度で、 37 と 78 の間の温度で、好ましくは 55 超の温度で、より好ましくは 55 と 80 の間の温度で、さらにより好ましくは、 55 と 65 の間または 60 と 65 の間の温度で発生する、上記 [ 80 ] に記載の核タンパク質複合体。

[ 82 ] 上記標的核酸配列を含む上記二本鎖標的ポリヌクレオチドが上記 C a s タンパク質により切断され、好ましくは上記切断が D N A 切断である、上記 [ 80 ] または上記 [ 81 ] に記載の核タンパク質複合体。

[ 83 ] 上記標的配列を含む上記標的ポリヌクレオチドが二本鎖 D N A であり、上記結合、切断、標識または改変が、上記標的ポリヌクレオチド中の二本鎖切断をもたらす、上記 [ 80 ] から [ 82 ] のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 84 ] 上記標的核酸配列を含む上記標的ポリヌクレオチドが二本鎖 D N A であり、上記 C a s タンパク質が、上記二本鎖 D N A を切断する能力を欠き、上記核タンパク質複合体が存在することにより、上記標的ポリヌクレオチドの遺伝子サイレンシングがもたらされる、上記 [ 80 ] または上記 [ 81 ] に記載の核タンパク質複合体。

[ 85 ] 上記 P A M 配列が、 5 ' - N N N N C N N A - 3 ' [ 配列番号 47 ] を含む、上記 [ 80 ] から [ 84 ] のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 86 ] 上記 P A M 配列が、 5 ' - N N N N C S A A - 3 ' [ 配列番号 48 ] を含む、上記 [ 85 ] に記載の核タンパク質複合体。

[ 87 ] 上記 P A M 配列が、 5 ' - N N N N C C A A - 3 ' [ 配列番号 50 ] を含む、上

記 [ 8 6 ] に記載の核タンパク質複合体。

[ 8 8 ] 上記結合、切断、標識または改変が、20と70の間の温度で起こる、上記[ 8 6 ]または上記[ 8 7 ]に記載の核タンパク質複合体。

[ 8 9 ] 結合、切断、標識または改変が、25と65の間の温度で起こる、上記[ 8 5 ]から上記[ 8 8 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 0 ] 上記Casタンパク質が、細菌、古細菌またはウイルスから、好ましくは好熱性細菌から得られる、上記[ 8 0 ]から[ 8 9 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 1 ] 上記Casタンパク質が、ゲオバチルス(*Geobacillus*)属種、好ましくはゲオバチルス・サーモデニトリフィカンス(*Geobacillus thermodenitrificans*)から得ることができる、上記[ 8 0 ]から[ 9 0 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 2 ] 原核細胞中である、上記[ 8 0 ]から[ 9 1 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 3 ] 真核細胞中である、上記[ 8 0 ]から[ 9 1 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 4 ] 上記ターゲティングRNA分子が、c r RNAおよびt r a c r RNAを含む、上記[ 8 0 ]から[ 9 3 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 5 ] 上記少なくとも1つのターゲティングRNA分子の長さが、35~200ヌクレオチド残基の範囲である、上記[ 8 0 ]から[ 9 4 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 6 ] 上記標的核酸配列が、15~32ヌクレオチド残基長である、上記[ 8 0 ]から[ 9 5 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 7 ] 上記Casタンパク質が、少なくとも1つの機能的部分をさらに含む、上記[ 8 0 ]から[ 9 6 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 8 ] 上記Casタンパク質が、少なくとも1つのさらなる機能的または非機能的タンパク質を含むタンパク質複合体の一部として提供され、任意選択で、上記少なくとも1つのさらなるタンパク質が、少なくとも1つの機能的部分をさらに含む、上記[ 8 0 ]から[ 9 7 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 9 9 ] 上記Casタンパク質またはさらなるタンパク質が、上記Casタンパク質またはタンパク質複合体のN終端および/もしくはC終端、好ましくはC終端に融合または連結している、少なくとも1つの機能的部分を含む、上記[ 9 7 ]または上記[ 9 8 ]に記載の核タンパク質複合体。

[ 1 0 0 ] 上記少なくとも1つの機能的部分がタンパク質であり、任意選択で、ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼ-ヌクレアーゼ、DNAメチラーゼ、ヒストンメチラーゼ、アセチラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、転写(共)活性化因子、転写リプレッサー、DNA結合タンパク質、DNA構築タンパク質、マーカータンパク質、レポータータンパク質、蛍光タンパク質、リガンド結合タンパク質、シグナルペプチド、細胞内局在配列、抗体エピトープまたは親和性精製タグ、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)から選択される、上記[ 9 7 ]から[ 9 9 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 1 0 1 ] 上記Cas9ヌクレアーゼの天然の活性が不活化されており、上記Casタンパク質が少なくとも1つの機能的部分に連結している、上記[ 1 0 0 ]に記載の核タンパク質複合体。

[ 1 0 2 ] 上記少なくとも1つの機能的部分がヌクレアーゼドメイン、好ましくはFok Iヌクレアーゼドメインである、上記[ 9 7 ]から[ 1 0 1 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 1 0 3 ] 上記少なくとも1つの機能的部分がマーカータンパク質である、上記[ 9 7 ]から[ 1 0 1 ]のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 1 0 4 ] 上記核酸がd s DNAであり、上記少なくとも1つの機能的部分がヌクレアーゼまたはヘリカーゼ-ヌクレアーゼであり、上記標的ポリヌクレオチドが、所望の遺伝子座における一本鎖または二本鎖切断を有する、上記[ 9 7 ]から[ 1 0 2 ]のいずれかに

記載の核タンパク質複合体。

[ 105 ] 上記核酸が d s D N A であり、上記機能的部分が、D N A 改変酵素（例えば、メチラーゼまたはアセチラーゼ）、転写活性因子または転写リプレッサーから選択され、上記核タンパク質複合体形成により、遺伝子発現の改変がもたらされる、上記 [ 97 ] から [ 101 ] のいずれかに記載の核タンパク質複合体。

[ 106 ] 上記核タンパク質形成により、所望の位置に、所望のヌクレオチド配列を改変または欠失および／もしくは挿入がもたらされ、かつ／または上記核タンパク質複合体形成により、所望の遺伝子座にサイレンシング遺伝子発現がもたらされる、上記 [ 80 ] から [ 105 ] のいずれかに記載の核タンパク質複合体。