

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7581046号  
(P7581046)

(45)発行日 令和6年11月12日(2024.11.12)

(24)登録日 令和6年11月1日(2024.11.1)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 1 1 0
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22 Z N A
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47
請求項の数 32 (全49頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-511253(P2020-511253)	(73)特許権者	592017633
(86)(22)出願日	平成30年8月22日(2018.8.22)		ザ ジェネラル ホスピタル コーボレイ
(65)公表番号	特表2020-532967(P2020-532967 A)		ション
(43)公表日	令和2年11月19日(2020.11.19)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
(86)国際出願番号	PCT/US2018/047577	(74)代理人	100092783
(87)国際公開番号	WO2019/040650		弁理士 小林 浩
(87)国際公開日	平成31年2月28日(2019.2.28)	(74)代理人	100120134
審査請求日	令和3年8月17日(2021.8.17)		弁理士 大森 規雄
(31)優先権主張番号	62/549,303	(74)代理人	100186897
(32)優先日	平成29年8月23日(2017.8.23)		弁理士 平川 さやか
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	
(31)優先権主張番号	62/641,687	(72)発明者	鈴木 康仁
(32)優先日	平成30年3月12日(2018.3.12)		ジョン, キース, ジェイ .
最終頁に続く			アメリカ合衆国 0 1 8 9 0 マサチュー
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 変更された P A M 特異性を有する遺伝子操作された C R I S P R - C a s 9 ヌクレアーゼ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 において以下の位置 : D 1 1 3 5、S 1 1 3 6、G 1 2 1 8、E 1 2 1 9、R 1 3 3 5 および T 1 3 3 7 の 6 つすべてで変異を有し、かつ、配列番号 1 のアミノ酸配列において少なくとも 9 5 % の同一性を有する、単離された化膿性連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) C a s 9 ( S p C a s 9 ) タンパク質であって、

以下の変異を有する、前記タンパク質 :

( i ) N G T N P A M を標的とし、以下から選択される変異 :

I R A V Q L、V R A V Q L、L R S V Q L、L R K I Q K、L R S V Q K、V R K L L R、L W K I Q K、V R K I Q K、G R K I Q K、V R M H C K、L C R Q Q R、C W S H Q R、S W R V V V、S W K V L K、M W V H L N、K R R C K V、S R M H C K、G W K L L R、G W K Q Q K、V A K L L R、V A K I Q K、V A K I L R、G R K I L R、M Q S V Q L、または T A H F K V バリエント ;

( i i ) N G C N P A M を標的とし、以下から選択される変異 :

M Q K S E R、V R K S E R、I C K S E R、L W L E T R、L C R Q Q R、C W S H Q R、I C C C E R、M C S F E R、L W R V V A、W M Q A Y G、L R S V E R、L W R V V A、L W R S E Y、L W M R E Q、F M Q W V N、Y C S W V G、M C A W C G、または F M Q W V R バリエント ;

( i i i ) N G A N P A M を標的とし、以下から選択される変異 :

L W K I Q K、L C R Q Q R、C W S H Q R、L R L S A R、K W M M C G、A W N F Q

V、LWTTLN、CWCQCV、VRMHCK、MRARKE、AEEQQR、GWEKVR、NRAVNG、LRSYLH、VQDAQR、GWRQSK、AWLCLS、KWARVV、SRMHCK、VKMAKG、SRTHTQ、QRKTRE、またはLWEVIRバリエント。

【請求項 2】

D10、E762、D839、H983またはD986；およびH840またはN863での変異からなる群から選択されるヌクレアーゼ活性を減少させる1つまたは複数の変異をさらに含む、請求項1に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 3】

前記変異が、

(i) D10AまたはD10N、および

(ii) H840A、H840NまたはH840Y

での変異である、請求項2に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 4】

N497、R661、N692、M694、Q695、H698、K810、K848、Q926、K1003およびR1060での変異からなる群から選択される特異性を増加させる1つまたは複数の変異をさらに含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 5】

前記変異が、

N692A、Q695A、Q926A、H698A、N497A、R661A、M694A、K810A、K848A、K1003A、R0160A、Y450A/Q695A、L169A/Q695A、Q695A/Q926A、Q695A/D1135E、Q926A/D1135E、Y450A/D1135E、L169A/Y450A/Q695A、L169A/Q695A/Q926A、Y450A/Q695A/Q926A、R661A/Q695A/Q926A、N497A/Q695A/Q926A、Y450A/Q695A/D1135E、Y450A/Q926A/D1135E、Q695A/Q926A/D1135E、L169A/Y450A/Q695A/Q926A、L169A/R661A/Q695A/Q926A、Y450A/R661A/Q695A/Q926A、N497A/Q695A/Q926A/D1135E、R661A/Q695A/Q926A/D1135E、およびY450A/Q695A/Q926A/D1135E；N692A/M694A/Q695A/H698A、N692A/M694A/Q695A/H698A/Q926A；N692A/M694A/Q695A/Q926A；N692A/M694A/H698A/Q926A；N692A/Q695A/H698A/Q926A；M694A/Q695A/H698A/Q926A；N692A/Q695A/H698A；N692A/M694A/Q695A；N692A/H698A/Q926A；N692A/M694A/Q926A；N692A/M694A/H698A；M694A/Q695A/H698A；M694A/Q695A/Q926A；Q695A/H698A/Q926A；G582A/V583A/E584A/D585A/N588A/Q926A；G582A/V583A/E584A/D585A/N588A；T657A/G658A/W659A/R661A/Q926A；T657A/G658A/W659A/R661A；F491A/M495A/T496A/N497A/Q926A；F491A/M495A/T496A/N497A；K918A/V922A/R925A/Q926A；または918A/V922A/R925A；K855A；K810A/K1003A/R1060A；またはK848A/K1003A/R1060Aの変異を含む、請求項4に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 6】

K526および/またはR691での変異をさらに含む、請求項4または5に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 7】

K 5 2 6 A および / または R 6 9 1 A の変異をさらに含む、請求項 6 に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 8】

任意の介在リンカーで異種性機能ドメインと融合された請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたタンパク質を含む融合タンパク質であって、前記リンカーが、前記融合タンパク質の活性を妨げない、融合タンパク質。

【請求項 9】

前記異種性機能ドメインが、

- ( i ) 転写活性化ドメインであり、
- ( i i ) 転写サイレンサーまたは転写抑制ドメインであり、
- ( i i i ) DNA のメチル化状態を改変する酵素であり、
- ( i v ) ヒストンサブユニットを改変する酵素であり、
- ( v ) 塩基エディターであり、
- ( v i ) 生物学的テザーであり、または
- ( v i i ) F o k I である、

請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

前記転写活性化ドメインが、V P 1 6、V P 6 4、r T A、N F - B p 6 5 または複合性 V P R ( V P 6 4 - p 6 5 - r T A ) からのものである、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

前記転写抑制ドメインが、クルッペル関連ボックス ( K R A B ) ドメイン、E R F リプレッサードメイン ( E R D ) もしくは m S i n 3 A 相互作用ドメイン ( S I D ) であり、または前記転写サイレンサーが、ヘテロクロマチンタンパク質 1 ( H P 1 ) である、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

D N A のメチル化状態を改変する前記酵素が、D N A メチルトランスフェラーゼ ( D N M T ) または T E T タンパク質である、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

前記 T E T タンパク質が、T E T 1 である、請求項 12 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

ヒストンサブユニットを改変する前記酵素が、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ ( H A T )、ヒストンデアセチラーゼ ( H D A C )、ヒストンメチルトランスフェラーゼ ( H M T ) またはヒストンデメチラーゼである、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

前記生物学的テザーが、M S 2、C s y 4 またはラムダ N タンパク質である、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

前記塩基エディターが、( a ) シチジンデアミナーゼドメイン、または ( b ) アデノシンデアミナーゼである、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

シチジンデアミナーゼドメインが、アポリボタンパク質 B m R N A 編集酵素、デアミナーゼの触媒ポリペプチド様 ( A P O B E C ) ファミリー、活性化誘導シチジンデアミナーゼ ( A I D )、シトシンデアミナーゼ 1 ( C D A 1 ) および C D A 2、ならびに t R N A に作用するシトシンデアミナーゼ ( C D A T ) からなる群から選択される、請求項 16 に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

A P O B E C が、A P O B E C 1、A P O B E C 2、A P O B E C 3 A、A P O B E C 3 B、A P O B E C 3 C、A P O B E C 3 D / E、A P O B E C 3 F、A P O B E C 3 G、A P O B E C 3 H または A P O B E C 4 である、請求項 17 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 19】

A I D が、活性化誘導シチジンデアミナーゼ ( A I C D A ) である、請求項 17 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 20】

アデノシンデアミナーゼが、アデノシンデアミナーゼ 1 ( A D A 1 )、A D A 2 ; R N A 1 に作用するアデノシンデアミナーゼ ( A D A R 1 )、A D A R 2、A D A R 3 ; t R N A 1 に作用するアデノシンデアミナーゼ ( A D A T 1 )、A D A T 2、A D A T 3 ; および天然に存在するまたは遺伝子操作された t R N A 特異的アデノシンデアミナーゼ ( T a d A ) からなる群から選択される、請求項 16 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする単離された核酸。

## 【請求項 22】

請求項 21 に記載の単離された核酸を含むベクター。

## 【請求項 23】

単離された核酸が、以下の位置 : D 1 1 3 5、S 1 1 3 6、G 1 2 1 8、E 1 2 1 9、R 1 3 3 5 および T 1 3 3 7 の 6 つすべてで変異を有する、単離された化膿性連鎖球菌 ( S treptococcus pyogenes ) C a s 9 ( S p C a s 9 ) タンパク質を発現するための 1 つまたは複数の制御ドメインに作動可能に連結された、請求項 22 に記載のベクター。

## 【請求項 24】

請求項 21 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

## 【請求項 25】

請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を発現する、請求項 24 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 26】

哺乳動物細胞である、請求項 24 または 25 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 27】

細胞のゲノムを変更する e x v i v o または i n v i t r o の方法であって、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の単離されたタンパク質もしくは融合タンパク質、および前記細胞の前記ゲノムの選択された部分に相補的な領域を有するガイド R N A を、前記細胞で発現させること、または前記細胞をこれらと接触させることを含む方法。

## 【請求項 28】

前記単離されたタンパク質または融合タンパク質が、核局在化配列、細胞透過性ペプチド配列および / またはアフィニティタグの 1 つまたは複数を含む、請求項 27 に記載の e x v i v o または i n v i t r o の方法。

## 【請求項 29】

前記細胞が、幹細胞であるか、動物細胞であるか、または胚における細胞である、請求項 27 または 28 に記載の e x v i v o または i n v i t r o の方法 (ただし、ヒト胚を除く。 )。

## 【請求項 30】

前記幹細胞が、胚性幹細胞、間葉系幹細胞または人工多能性幹細胞である、請求項 29 に記載の e x v i v o または i n v i t r o の方法。

## 【請求項 31】

二本鎖 D N A ( d s D N A ) 分子を変更する e x v i v o または i n v i t r o の方法であって、前記 d s D N A 分子を、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の単離されたタンパク質または融合タンパク質、および前記 d s D N A 分子の選択された部分に相補的な領域を有するガイド R N A と接触させることを含む方法。

## 【請求項 32】

前記融合タンパク質および R N A が、リボヌクレオタンパク質複合体にある、請求項 27 に記載の e x v i v o または i n v i t r o の方法。

## 【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

## 優先権の主張

本出願は、2017年8月23日に出願された米国仮特許出願第62/549,303号、および2018年3月12日に出願された同第62/641,687号の利益を主張する。前述の全内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

## 連邦政府による支援を受けた研究または開発

本発明は、米国国立衛生研究所によって付与された、助成金番号GM105378、GM107427、GM118158およびGM088040の政府支援により行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

## 【0003】

## 技術分野

本発明は、少なくとも一部は、変更および改善されたプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)特異性を有する遺伝子操作されたクラスター化した規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)/CRISPR関連タンパク質9(Cas9)、ならびにゲノム工学、エピゲノム工学およびゲノム標的化におけるそれらの使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

CRISPR-Cas9ヌクレアーゼは、多種多様な生物体および細胞の種類において、効率が良く、カスタマイズ可能なゲノム編集を可能にする(Sander & Joung, Nat Biotechnol 32, 347-355 (2014); Hsuet al., Cell 157, 1262-1278 (2014); Doudna & Charpentier, Science 346, 1258096 (2014); Barrangou & May, Expert Opin Biol Ther 15, 311-314 (2015))。Cas9による標的部位認識は、crRNAおよびtracrRNAとして公知の2つの短いRNAによって導かれ(Deltcheva et al., Nature 471, 602-607 (2011); Jinek et al., Science 337, 816-821 (2012))、これらは融合してキメラ単一ガイドRNA(sgRNA)とすることができる(Jinek et al., Science 337, 816-821 (2012); Jinek et al., Elife 2, e00471 (2013); Mali et al., Science 339, 823-826 (2013); Cong et al., Science 339, 819-823 (2013))。sgRNA(crRNAに由来する)の5'末端は、標的DNA部位と塩基対形成することができ、それによって、Cas9/sgRNA複合体による部位特異的切断の直接リプログラミングを可能にする(Jinek et al., Science 337, 816-821 (2012))。しかしながら、Cas9は、sgRNAと塩基対形成するDNAの近位にある特異的プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)も認識しなければならず(Mojica et al., Microbiology 155, 733-740 (2009); Shah et al., RNA Biol 10, 891-899 (2013); Jinek et al., Science 337, 816-821 (2012); Sapranaukas et al, Nucleic Acids Res 39, 9275-9282 (2011); Horvath et al., J Bacteriol 190, 1401-1412 (2008))、この要件は、配列特異的な認識を開始するために必要であるが(Sternberg et al., Nature 507, 62-67 (2014))、これはまた、ゲノム編集のためにこれらのヌクレアーゼの標的化範囲を制限し得る。幅広く使用される化膿性連鎖球菌(Streptococcus pyogenes) Cas9(SpCas9)は、短いNGG PAMを認識し(Jinek et al., Science 337, 816-821 (2012); Jiang et al., Nat Biotechnol 31, 233-239 (2013))、これは、ランダムなDNA配列の8bpごとに1回生じる。一方、これまでに特徴付けられた他のCas9オルソログは、より長いPAMを認識することができる(Horvath et al., J Bacteriol 190, 1401-1412 (2008); Fonfara et al., Nucleic Acids Res 42, 2577-2590 (2014); Esvelt et al., Nat Methods 10, 1116-1121 (2013); Ran et al., Nature 520, 186-191 (2015); Zhang et al., Mol Cell 50, 488-503 (2013))。例えば、ウイルス送達のためにより適切ないくつかのより小さなCas9オルソログの1つである黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) Cas9(SaCas9)は(Horvath et al., J Bacteriol 190, 1401-1412 (2008); Ran et al., Nature 520, 186-191 (20

10

20

30

40

50

15) ; Zhang et al., Mol Cell 50, 488-503 (2013) )、ランダムなDNAの32bpごとに1回生じると予想されるより長いNNGRRTPAMを認識する。Cas9オルソログの標的化範囲の広幅化は、小さな遺伝要素（例えば、転写因子結合部位（Canver et al. Nature. 527(7577):192-7 (2015) ; Vierstra et al., Nat Methods. 12(10):927-30 (2015) )の改変、またはPAM内に配列の相違を位置させることによるアレル特異的変更を行うこと（Courtney, D.G. et al. Gene Ther. 23(1):108-12 (2015)）を含むさまざまな適用のために重要である。本発明者らは、以前に、NGAおよびNGCGPAM配列により部位を認識することができるSpCas9のバリエーションを遺伝子操作により作製したが（Kleinstiver et al, Nature 2015 ; 国際公開第2016/141224号パンフレット）、それにもかかわらず多くの代替のPAM配列は標的化できないままである。

10

# 【発明の概要】

## 【0005】

本明細書に記載されるように、一般に使用される化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）Cas9（SpCas9）を、構造情報、細菌選択に基づく指向進化およびコンビナトリアル設計を使用して、新規なPAM配列を認識するように遺伝子操作した。これらの変更されたPAM特異性バリエーションは、野生型SpCas9によって効率よく標的化することができないヒト細胞中のレポーター部位および内在性遺伝子部位の安定した編集を可能にする。本知見は、本明細書において「バリエーション」または「本バリエーション」と総称される、幅広く有用なSpCas9バリエーションを提供する。

20

## 【0006】

第1の態様において、本発明は、以下の位置：D1135、S1136、G1218、E1219、R1335および／もしくはT1337の3つ、4つ、5つまたは6つすべてで、例えば、D1135、S1136、G1218、E1219、R1335および／もしくはT1337（D1135X / S1136X / G1218X / E1219X / R1335X / T1337X、ここで、Xは、任意のアミノ酸である）の2つ、3つ、4つ、5つまたはすべてで、変異を有し、例えば、示された変異を有する配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも80%、90%または95%同一である配列を含む、単離された化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）Cas9（SpCas9）タンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、バリエーションSpCas9タンパク質は、表A、1、2または3に示される変異のセット、例えば、以下の変異のセットの1つ：LRSVQL、LRKIQK、LRSVQK、LWKIQK、VRKIQK、LWKIQK、IRAVQL、VRKLRS、GRKIQK、SWRVVV、SWKVLK、TAHFKV、MSGVKC、LRSVRS、SKTLRP、MWVHLN、TWSMRG、KRRCKV、VRAVQL、VSSVRS、VRSVRS、SRMHCK、GWKLLR、GWKOQK、VAKLLR、VAKIQK、VAKILR、GRKILR、VRKLLR、IRAVQL、VRKIQK、またはVRMHCKバリエーション（例えば、NGTN PAMについて）；MQKSER、VRKSER、ICKSER、LRsver、LWLETR、LSRWER、MQSVQL、VRREER、ICCCER、LSRWQR、LWRVVA、WMQAYG、LWRSEY、SQSWRS、LKAWRS、LWGWQH、MCSFER、LWMREQ、LWRVVA、HSSWVR、MWSEPT、GSNYQS、FMQWVN、YCSWVG、MCAWCG、FMQWVR、またはSSKWPAバリエーション（例えば、NGCN PAMについて）；LRSVRS、SRQMRG、MRARKE、SRMHCK、VRREQR、VRGEQR、LRLSAR、AWTEVTR、KWMMCG、VRGAKE、AWNFGV、LWTTLN、SRMHCK、CWCQCV、AEEQQR、GWEKVR、NRAVNG、LRSYLH、VRGNNR、VQDAQR、GWRQSK、AWLCLS、KWARVV、MWAARP、SRMHCK、VKMAKG、QRKTRE、LCRQQR、CWSHQR、SRTHHTQ、LWEVIR、VSSVRS、VRSVRS、IRAVRS、SRSVRS、LWKIQK、またはVRMHCKバリエーション（例えば、NGAN PAMについて）を含む。いくつかの実施形態において、

30

40

50

変異は、V S R E E R ( V R E Rとしても公知)またはV S R E Q R ( V R Q Rとしても公知)ではない。

【0007】

いくつかの実施形態において、バリエーションSpCas9タンパク質は、D10、E762、D839、H983またはD986;およびH840またはN863での変異からなる群から選択されるヌクレアーゼ活性を減少させる1つまたは複数の変異を含む。いくつかの実施形態において、変異は、(i)D10AまたはD10N、および(ii)H840A、H840NまたはH840Yである。

【0008】

いくつかの実施形態において、バリエーションSpCas9タンパク質は、N497、K526、R661、R691、N692、M694、Q695、H698、K810、K848、Q926、K1003および/もしくはR0160での変異からなる群から選択される特異性を増加させる1つまたは複数の変異を含む。いくつかの実施形態において、変異は、N692A、Q695A、Q926A、H698A、N497A、K526A、R661A、R691A、M694A、K810A、K848A、K1003A、R0160A、Y450A/Q695A、L169A/Q695A、Q695A/Q926A、Q695A/D1135E、Q926A/D1135E、Y450A/D1135E、L169A/Y450A/Q695A、L169A/Q695A/Q926A、Y450A/Q695A/Q926A、R661A/Q695A/Q926A、N497A/Q695A/Q926A、Y450A/Q695A/D1135E、Y450A/Q926A/D1135E、Q695A/Q926A/D1135E、L169A/Y450A/Q695A/Q926A、L169A/R661A/Q695A/Q926A、Y450A/R661A/Q695A/Q926A、N497A/Q695A/Q926A/D1135E、R661A/Q695A/Q926A/D1135E、およびY450A/Q695A/Q926A/D1135E;N692A/M694A/Q695A/H698A、N692A/M694A/Q695A/H698A/Q926A;N692A/M694A/Q695A/Q926A;N692A/M694A/H698A/Q926A;N692A/Q695A/H698A/Q926A;M694A/Q695A/H698A/Q926A;N692A/Q695A/H698A;N692A/M694A/Q695A;N692A/H698A/Q926A;N692A/M694A/Q926A;N692A/M694A/H698A;M694A/Q695A/H698A;M694A/Q695A/Q926A;Q695A/H698A/Q926A;G582A/V583A/E584A/D585A/N588A/Q926A;G582A/V583A/E584A/D585A/N588A;T657A/G658A/W659A/R661A/Q926A;T657A/G658A/W659A/R661A;F491A/M495A/T496A/N497A/Q926A;F491A/M495A/T496A/N497A;K918A/V922A/R925A/Q926A;または918A/V922A/R925A;K855A;K810A/K1003A/R1060A;またはK848A/K1003A/R1060Aである。いくつかの実施形態において、タンパク質は、K526またはR691での変異を含まない。

【0009】

本明細書において、任意の介在リンカーで異種性機能ドメインと融合された本明細書に記載の単離されたバリエーションSpCas9タンパク質を含む融合タンパク質であって、リンカーが、融合タンパク質の活性を妨げない、融合タンパク質も提供する。いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、転写活性化ドメインである。いくつかの実施形態において、転写活性化ドメインは、VP64またはNF- $\kappa$ Bp65からのものである。いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、転写サイレンサーまたは転写抑制ドメインである。いくつかの実施形態において、転写抑制ドメインは、クルップル関連ボックス(KRAB)ドメイン、ERFリプレッサードメイン(ERD)またはmsin3A相互作用ドメイン(SID)である。いくつかの実施形態において、転写サイレン

10

20

30

40

50

サーは、ヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1)、例えば、HP1 または HP1 である。いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、DNA のメチル化状態を改変する酵素である。いくつかの実施形態において、DNA のメチル化状態を改変する酵素は、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) または TET タンパク質である。いくつかの実施形態において、TET タンパク質は、TET1 である。いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、ヒストンサブユニットを改変する酵素である。いくつかの実施形態において、ヒストンサブユニットを改変する酵素は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT)、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ (HMT) またはヒストンデメチラーゼである。

#### 【0010】

いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、塩基エディター、例えば、シチジンデアミナーゼドメイン、例えば、APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3D/E、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H もしくは APOBEC4 を含む、アポリボタンパク質 B mRNA 編集酵素、デアミナーゼの触媒ポリペプチド様 (APOBEC) ファミリー；活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID)、例えば、活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AICDA)；シトシンデアミナーゼ 1 (CDA1) もしくは CDA2；または tRNA に作用するシトシンデアミナーゼ (CDA1) からのものである。いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、アデノシン DNA 塩基を改変するデアミナーゼであり、例えば、デアミナーゼは、アデノシンデアミナーゼ 1 (ADA1)、ADA2；RNA1 に作用するアデノシンデアミナーゼ (ADAR1)、ADAR2、ADAR3；tRNA1 に作用するアデノシンデアミナーゼ (ADAT1)、ADAT2、ADAT3；および天然に存在するまたは遺伝子操作された tRNA 特異的アデノシンデアミナーゼ (TadA) である。いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、生物学的テザーである。いくつかの実施形態において、生物学的テザーは、MS2、Csy4 またはラムダ N タンパク質である。いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、FokI である。

#### 【0011】

いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、内因性 DNA 修復もしくは塩基除去修復 (BER) 経路を阻害または増強する酵素、ドメインあるいはペプチド、例えば、BER を開始するウラシルの除去を媒介するウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG、ウラシル N - グリコシラーゼまたは UNG としても公知) を阻害するウラシル DNA グリコシラーゼ阻害剤；あるいはバクテリオファージ Mu からの Gam などの DNA 末端結合タンパク質である。

#### 【0012】

本明細書において、本明細書に記載のバリエーション SpCas9 タンパク質をコードする単離された核酸、および任意選択で、本明細書に記載のバリエーション SpCas9 タンパク質を発現するための 1 つまたは複数の制御ドメインに作動可能に連結された、単離された核酸を含むベクターも提供する。本明細書において、任意選択で、本明細書に記載のバリエーション SpCas9 タンパク質を発現する、本明細書に記載の核酸を含む宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞も提供する。本明細書において、本明細書に記載のバリエーション SpCas9 タンパク質、およびバリエーションタンパク質によって標的化される PAM 配列を有する配列を標的化するガイド RNA を含むリボヌクレオタンパク質 (RNP) 複合体も提供する。

#### 【0013】

本明細書において、本明細書に記載の単離されたバリエーション SpCas9 タンパク質、および細胞のゲノムの選択された部分に相補的な領域を有するガイド RNA を、細胞で発現させることによって、細胞のゲノムを変更する方法を提供する。

#### 【0014】

本明細書において、バリエーションタンパク質、および細胞のゲノムの選択された部分に相

10

20

30

40

50

補的な領域を有するガイドRNAを、細胞で発現させることによって、細胞のゲノムを変更する、例えば、選択的に変更するための方法を提供する。

【0015】

細胞を、本明細書に記載のタンパク質バリエーション、および細胞のゲノムの選択された部分に相補的な領域を有するガイドRNAと接触させることによって、細胞のゲノムを変更する、例えば、選択的に変更するための方法も提供する。

【0016】

いくつかの実施形態において、単離されたタンパク質または融合タンパク質は、核局在化配列、細胞透過性ペプチド配列および/もしくはアフィニティタグの1つまたは複数を含む。

【0017】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態において、細胞は、幹細胞、例えば、胚性幹細胞、間葉系幹細胞もしくは人工多能性幹細胞であるか、生きている動物における細胞であるか、あるいは胚、例えば、哺乳動物、昆虫もしくは魚類（例えば、ゼブラフィッシュ）の胚における細胞または胚細胞である。

【0018】

さらに、本明細書において、二本鎖DNA（dsDNA）分子を変更するための方法、例えば、インビトロの方法を提供する。この方法は、dsDNA分子を、1つまたは複数の本明細書に記載のバリエーションタンパク質、およびdsDNA分子の選択された部分に相補的な領域を有するガイドRNAと接触させることを含む。

【0019】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、この発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。方法および材料は、本発明における使用のために本明細書に記載され、当技術分野において公知の他の適切な方法および材料を使用することもできる。材料、方法および例は、説明のみを目的とし、限定することを意図するものではない。本明細書において列挙される、すべての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースのエントリおよび他の参照は、それらの全体が参照によって組み込まれる。矛盾がある場合には、定義を含む本明細書が支配する。

【0020】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかになる。

【0021】

本特許または本出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラーの図面を伴う本特許または本出願公開の写しは、申請および必要な料金の支払により、特許庁によって提供されるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1A～1Bは、SpCas9 PAMバリエーションライブラリーの生成およびスクリーニングに関する。(a) PAM認識のために重要な6つの位置で多様なアミノ酸の組み合わせを有するSpCas9バリエーションライブラリーを生成するために、変性オリゴライブラリーをSpCas9コード配列の3つの領域にクローニングして、赤で強調された6つのコドンランダム化した。(b) 細菌選択アッセイの概略図、ここで、SpCas9バリエーションおよびsgRNAは、1つのプラスミドから発現し、第2のプラスミドは、誘導毒性遺伝子およびカスタマイズ化標的部をコードする。両方のプラスミドは、細菌に同時形質転換され、毒性プラスミドの標的部でコードされるPAMを認識することができるSpCas9 PAMバリエーションを保有する細胞のみが、毒性遺伝子の発現を誘導する培地上で生存することができる（選択培地は10 mMのアラビノースを含有する）。

【図2-1】図2A～2Fは、NGTN PAMを有する部位を認識する細菌選択から得

10

20

30

40

50

られた S p C a s 9 P A M バリエントに関する。( A ~ F ) N G T G、N G T T、N G T C または N G T A P A M 配列を運ぶ陽性選択プラスミドに対する初期スクリーニングからの S p C a s 9 バリエントをコードするプラスミドを、細菌スクリーニングアッセイで再スクリーニングして、N G T N P A M 配列を有する標的部位に対する活性を評価した。パネル C、E および F について、バリエントはまた、N G A G、N G A T、N G A C および N G A A P A M を有する標的部位に対してスクリーニングした。示された P A M を有する部位におけるバリエントのおおよその活性を、非選択培地(クロラムフェニコールのみ)におけるコロニーの数を選択培地(クロラムフェニコール + 10 m M のアラビノース)のものと比較することによって計算し、生存 % を計算した(表 1)。数字にアスタリスクがあるバリエントは、以前のアッセイにおいて試験されたプラスミドを示し(この図の上側パネルに示される)、これらのバリエントのアミノ酸配列は表 1 に見ることができる。

10

【図 2 - 2】図 2 - 1 と同様である。

【図 3】図 3 A ~ 3 C は、ヒト細胞における S p C a s 9 N G T N P A M バリエントの活性に関する。( A、B ) N G T A、N G T C、N G T T および N G T G P A M を保有する E G F P における部位に対する、( 選択によって得られたか、または合理的に設計された ) さまざまな S p C a s 9 バリエントの活性を評価するためのヒト細胞 E G F P 破壊アッセイ。エラーバーは、n = 2 ~ 7 についての s . e . m を表す。( C ) N G T G、N G T A、N G T C または N G T T P A M を保有する部位に対する、S p C a s 9 - N G T N P A M バリエント、S p C a s 9 - L R S V Q L バリエントを行うトップの 1 つの内在性遺伝子破壊活性。T 7 E 1 アッセイによって定量された遺伝子破壊。

20

【図 4】図 4 A ~ 4 F は、N G C N P A M を有する部位を認識する細菌選択から得られた S p C a s 9 P A M バリエントに関する。( A ~ B ) N G C G、N G C T、N G C C または N G C A P A M 配列を運ぶ陽性選択プラスミドに対する初期スクリーニングからの S p C a s 9 バリエントをコードするプラスミドを、細菌スクリーニングアッセイで再スクリーニングして、N G C N P A M 配列を有する標的部位に対する活性を評価した。示された P A M を有する部位におけるバリエントのおおよその活性を、非選択培地(クロラムフェニコールのみ)におけるコロニーの数を選択培地(クロラムフェニコール + 10 m M のアラビノース)のものと比較することによって計算し、生存 % を計算した(表 2)。数字にアスタリスクがあるバリエントは、以前のアッセイにおいて試験されたプラスミドを示し(この図の上側パネルに示される)、これらのバリエントのアミノ酸配列は表 2 に見ることができる。

30

【図 5 - 1】図 5 A ~ 5 E は、ヒト細胞における S p C a s 9 N G C N P A M バリエントの活性に関する。( A ~ E ) N G C A、N G C C、N G C T および N G C G P A M を保有する E G F P における部位に対する、( 選択によって得られたか、または合理的に設計された ) さまざまな S p C a s 9 バリエントの活性を評価するためのヒト細胞 E G F P 破壊アッセイ。( A ) N G C A P A M 部位、( B ) N G C C P A M 部位、( C ) N G C T P A M 部位、( D ) N G C C および N G C T P A M 部位、ならびに( E ) さまざまな N G C N P A M 部位を有する部位に対する活性。

【図 5 - 2】図 5 - 1 と同様である。

40

【図 6】図 6 A ~ 6 B は、N G A N P A M を有する部位を認識する細菌選択から得られた S p C a s 9 P A M バリエントに関する。( A ~ B ) N G A G、N G A T、N G A C または N G A A P A M 配列を運ぶ陽性選択プラスミドに対する初期スクリーニングからの S p C a s 9 バリエントをコードするプラスミドを、細菌スクリーニングアッセイで再スクリーニングして、N G A N P A M 配列を有する標的部位に対する活性を評価した。示された P A M を有する部位におけるバリエントのおおよその活性を、非選択培地(クロラムフェニコールのみ)におけるコロニーの数を選択培地(クロラムフェニコール + 10 m M のアラビノース)のものと比較することによって計算し、生存 % を計算した(表 3)。これらのバリエントのアミノ酸配列は表 3 に見ることができる。

【図 7】図 7 A ~ 7 B は、ヒト細胞における S p C a s 9 N G A N P A M バリエントの

50

活性に関する。(A ~ B) (A) NGAA、NGAC、NGATおよびNGAG PAM、または(B)さまざまなNGAC PAMを保有するEGFPにおける部位に対する、(選択によって得られたか、または合理的に設計された)さまざまなSpCas9バリエーションの活性を評価するためのヒト細胞EGFP破壊アッセイ。

【図8】ヒト細胞におけるSpCas9 PAMバリエーションとxCas9のヌクレアーゼ活性の比較。内因性遺伝子破壊活性をT7E1アッセイによって評価した。

【図9 - 1】図9は、ヒト細胞の内因性部位におけるSpCas9 PAMバリエーションとxCas9の塩基編集活性の比較に関する。(A) SpCas9 PAMバリエーションのBE3バージョン(Komor et al., Nature. 2016 May 19;533(7603):420-4)を、CRISPRessoによって行った標的化ディープシーケンシングおよび解析によって評価される、CからTへの塩基編集活性について試験した(Pinello et al., Nat Biotechnol. 2016 Jul 12; 34(7): 695-697; Nat Biotechnol. 2016 Jul 12; 34(7): 695-697)。x軸に表示された編集されたシトシンヌクレオチドは、Cas9標的配列の最もPAMから遠位の位置として位置1から番号付けされる。(B) SpCas9 PAMバリエーションのABE7.10バージョン(Gaudelli et al., Nature. 2017 Nov 23;551(7681):464-471)を、CRISPRessoによって行った標的化ディープシーケンシングおよび解析によって評価される、AからGへの塩基編集活性について試験した。x軸に表示された編集されたアデニンヌクレオチドは、Cas9標的配列の最もPAMから遠位の位置として位置1から番号付けされる。

【図9 - 2】図9 - 1と同様である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

表1: NGTN PAMを保有する部位に対する細菌のバリエーションの選択結果および活性

表2: NGCN PAMを保有する部位に対する細菌のバリエーションの選択結果および活性

表3: NGAN PAMを保有する部位に対する細菌のバリエーションの選択結果および活性

【0024】

化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (SpCas9) によるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の認識は、標的DNA認識の重要な第1ステップであり、SpCas9が結合およびDNAを加水分解することを可能にする。CRISPR-Cas9ヌクレアーゼは、ゲノム編集のために幅広く使用されているが<sup>1-4</sup>、Cas9が切断することができる配列の範囲は、標的部位における特異的PAMについての必要性によって制限される<sup>5, 6</sup>。例えば、これまでに最も安定かつ幅広く使用されているCas9であるSpCas9は、主に、NGG PAMを認識する。結果として、多くの場合、さまざまなゲノム編集の応用のために必要な正確さで二本鎖の破壊(DSB)を標的化することは困難であり得る。加えて、Cas9による不完全なPAM認識は、望まない標的外変異の生成をもたらす<sup>7, 8</sup>。意図的に変更および/または改善されたPAM特異性を有するCas9誘導体は、これらの限界に対処するだろう。

【0025】

結晶構造から、野生型SpCas9が2つのアルギニンアミノ酸側鎖(R1333およびR1335)を利用して、塩基を、基準のNGG PAM配列のグアニンに特異的に接触させることが明らかである。しかしながら、PAM認識を変更し、かつSpCas9の標的範囲を改善するために、本発明者らおよび他者は、これらのアルギニンのいずれか1つまたは両方の単純な変異は、PAM選好性を転換しないことを示した(Anders et al, Nature 2014; Kleinstiver et al, Nature 2015; 国際公開第2016/141224号パンフレット)。本発明者らは、以前に、NGAおよびNGCG PAM配列を標的化することができるSpCas9のバリエーションを進化させるための選択アプローチに着手したが(Kleinstiver et al, Nature 2015; 国際公開第2016/141224号パンフレット)、しかしながら、多くの代替のPAM配列は、標的化できないままである。

【0026】

現在アクセスできないPAM配列の標的化を可能にすることによってSpCas9の有

用性をさらに拡大するために、本発明者らは、新規な P A M 配列を認識する能力がある S p C a s 9 バリエーションについて選択するための代替戦略を考えた。S p C a s 9 コード配列内のある特定の位置が P A M 認識のために重要であることが以前に確立されており (Kleinstiver et al., Nature 2015 ; 国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 1 2 2 4 号パンフレット)、本発明者らは、P A M 相互作用ドメインの 3 つの別々の領域内の 6 つのアミノ酸をランダム化して、これらの位置 : D 1 1 3 5 / S 1 1 3 6、G 1 2 1 8 / E 1 2 1 9 および R 1 3 3 5 / T 1 3 3 7 で多様なコドン使用頻度を有する S p C a s 9 バリエーションのライブラリーを生成させる集中飽和変異生成アプローチを実施した。そうするために、本発明者らは、コードされたこれらの 6 つのアミノ酸を含有する S p C a s 9 のコドンで、N N S ヌクレオチドトリプレット (ここで、N は任意のヌクレオチドであり、S は G または C である) をコードするランダム化オリゴヌクレオチドカセットを連続してクローニングした (図 1 A)。次いで、得られる S p C a s 9 バリエーションのライブラリーを、以前に記載されたようにして (Kleinstiver et al., Nature 2015)、本発明者らの細菌陽性選択アッセイを使用する選択に供して、さまざまな N G N N P A M 配列を保有する標的部位を切断することができるバリエーションを特定した (図 1 B)。簡潔には、発現した S p C a s 9 バリエーションが陽性選択プラスミドにおいてコードされる標的部位 (P A M およびスパーサー配列) を認識することができる場合にのみ、細菌は、選択条件 (1 0 m M のアラビノース上に蒔かれ、これは、c c d B 毒性遺伝子の転写を誘導する) で生存することができる。強い P A M 認識は、選択プラスミドの加水分解をもたらし、c c d B 発現の誘導を防ぎ、それによって、細菌の増殖を可能にする。このように、S p C a s 9 ライブラリーのスクリーニングの間に、1 0 m M のアラビノースを含有する培地で増殖するコロニーは、目的とする代替 P A M を持つ部位を標的化することができる S p C a s 9 P A M バリエーションをコードすると予想される (図 1 B)。

#### 【 0 0 2 7 】

変更された P A M 特異性を有する遺伝子操作された C a s 9 バリエーション

この研究において遺伝子操作された S p C a s 9 バリエーションは、野生型 S p C a s 9 によってアクセス可能な標的部位の範囲を大いに増加させ、効率がよい H D R を実施するため、N H E J 媒介インデルを小さな遺伝要素に標的化するため、および P A M についての要件を利用して同じ細胞中の 2 つの異なるアレルの間を区別するために、C R I S P R - C a s 9 プラットフォームを使用する機会をさらに増強する。以前はアクセス可能ではなかった N G T N および N G C H (ここで、H は、A、C または T である) P A M 含有部位を現在標的化することができるバリエーション、ならびに N G A C に対する活性を改善することができるバリエーションの選択および合理的設計は、正確かつ高分解能のゲノム編集のための見込みを改善する。変更された P A M 特異性 S p C a s 9 バリエーションは、細菌およびヒト細胞の両方において S p C a s 9 によって現在標的化できない内在性遺伝子部位を効率よく破壊することができ、これらが、いろいろな異なる細胞の種類および生物体において働くことを示唆する。

#### 【 0 0 2 8 】

本明細書に記載のすべての S p C a s 9 バリエーションは、例えば、単純な部位指定変異生成によって、既存の広く使用されているベクターに迅速に組み込むことができ、それらは、P A M 相互作用ドメイン内に含有される少数の変異のみを必要とするので、バリエーションはまた、S p C a s 9 プラットフォームに以前に記載された他の改善とともに働くはずである (例えば、トランケート s g R N A (Tsai et al., Nat Biotechnol 33, 187-197 (2015) ; Fu et al., Nat Biotechnol 32, 279-284 (2014))、ニッカーゼ変異 (Mali et al., Nat Biotechnol 31, 833-838 (2013) ; Ran et al., Cell 154, 1380-1389 (2013))、二量体 F o k I - d C a s 融合体 (Guilinger et al., Nat Biotechnol 32, 577-582 (2014) ; Tsai et al., Nat Biotechnol 32, 569-576 (2014)) ; および高フィデリティバリエーション (Kleinstiver et al. Nature 2016))。

#### 【 0 0 2 9 】

変更された P A M 特異性を有する S p C a s 9 バリエーション

したがって、本明細書において、S p C a s 9 バリエントを提供する。S p C a s 9 野生型配列は以下の通りである。

【 0 0 3 0 】

【 化 1 - 1 】

10	20	30	40	50	60
MDKKYSIGLD	IGTNSVGWAV	ITDEYKVPSK	KFKVLGNTDR	HSIKKNLIGA	LLFDSGETAE
70	80	90	100	110	120
ATRLKRTARR	RYTRRKNRIC	YLQEIFSNE	AKVDDSFHR	LEESFLVEED	KKHERHPIFG
130	140	150	160	170	180
NIVDEVAYHE	KYPTIYHLRK	KLVDSTDKAD	LRLIYLALAH	MIKFRGHFLI	EGDLNPDNSD
190	200	210	220	230	240
VDKLFQILVQ	TYNQLFEENP	INASGVDAKA	ILSARLSKSR	RLENLIAQLP	GEKKNGLFGN
250	260	270	280	290	300
LIALSLGLTP	NFKSNFDLAE	DAKLQLSKDT	YDDDLNLLA	QIGDQYADLF	LAAKNLSDAI
310	320	330	340	350	360
LLSDILRVNT	EITKAPLSAS	MIKRYDEHHQ	DLTLLKALVR	QQLPEKYKEI	FFDQSKNGYA
370	380	390	400	410	420
GYIDGGASQE	EFYKFIKPIL	EKMDGTEELL	VKLNREDLLR	KQRTFDNGSI	PHQIHLGELH
430	440	450	460	470	480
AILRRQEDFY	PFLKDNREKI	EKILTFRIPY	YVGPLARGNS	RFAWMTRKSE	ETITPWNFEE
490	500	510	520	530	540
VVDKGASAQS	FIERMTNFDK	NLPNEKVLPK	HSLLYEYFTV	YNELTKVKYV	TEGMRKPAFL
550	560	570	580	590	600
SGEQKAIVD	LLFKTNRKVT	VKQLKEDYFK	KIECFDSVEI	SGVEDRFNAS	LGTYHDLKI
610	620	630	640	650	660
IKDKDFLDNE	ENEDILEDIV	LTLTLFEDRE	MIEERLKTYA	HLFDDKVMKQ	LKRRRYTGWG
670	680	690	700	710	720
RLSRKLINGI	RDQSGKTIIL	DFLKSDGFAN	RNFQMQLIHD	SLTFKEDIQK	AQVSGQGDSL
730	740	750	760	770	780
HEHIANLAGS	PAIKKGILQT	VKVVDLVKV	MGRHKPENIV	IEMARENQTT	QKGQKNSRER
790	800	810	820	830	840
MKRIEEGIKE	LGSQILKEHP	VENTQLQNEK	LYLYYLQNGR	DMYVDQELDI	NRLSDYDVDH
850	860	870	880	890	900
IVPQSFLKDD	SIDNKVLTRS	DKNRGKSDNV	PSEEVKKMK	NYWRQLLNAK	LITQRKFDNL
910	920	930	940	950	960
TKAERGGLSE	LDKAGFIKRQ	LVETRQITKH	VAQILDSRMN	TKYDENDKLI	REVKVITLKS
970	980	990	1000	1010	1020
KLVSDFRKDF	QFYKVVREINN	YHHAHDAYLN	AVVGTAIIKK	YPKLESEFVY	GDYKVVDVRK
1030	1040	1050	1060	1070	1080
MIKSEQEIG	KATAKYFFYS	NIMNFFKTEI	TLANGEIRKR	PLIETNGETG	EIVWDKGRDF
1090	1100	1110	1120	1130	1140
ATVRKVLSP	QVNIVKKTEV	QTGGFSKESI	LPKRNSDKLI	ARKKDWDPKK	YGGFDSPTVA

【 0 0 3 1 】

10

20

30

40

50

## 【化 1 - 2】

```

1150      1160      1170      1180      1190      1200
YSVLVVAKE KGKSKKLKSV KELLGITIME RSSFEKNPID FLEAKGYKEV KKDLIILKPK

1210      1220      1230      1240      1250      1260
YSLFELENGR KRMLASAGEL QKGNELALPS KYVNFYLYAS HYEKLKGSPE DNEQKQLFVE

1270      1280      1290      1300      1310      1320
QHKHYLDEII EQISEFSKRV ILADANLDKV LSAYNKHRDK PIREQAENII HLFTLTNLGA

1330      1340      1350      1360
PAAFKYFDTT IDRKYRSTK EVLDATLIHQ SITGLYETRI DLSQLGGD (配列番号1)

```

10

## 【0032】

本明細書に記載の S p C a s 9 バリエーションは、以下の位置：D 1 1 3 5、S 1 1 3 6、G 1 2 1 8、E 1 2 1 9、R 1 3 3 5 および / もしくは T 1 3 3 7、例えば、D 1 1 3 5 X / S 1 1 3 6 X / G 1 2 1 8 X / E 1 2 1 9 X / R 1 3 3 5 X / T 1 3 3 7 X (ここで、X は、任意のアミノ酸である) の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つすべてで (またはこれらと類似の位置)、変異を含むことができる。いくつかの実施形態において、S p C a s 9 バリエーションは、配列番号 1 のアミノ酸配列と、少なくとも 80%、例えば、少なくとも 85%、90% または 95% 同一であり、例えば、配列番号 1 の残基の最大で 5%、10%、15% または 20% まで、例えば、保存的変異で置き換えられた、相違を有する。好ましい実施形態において、本バリエーションは、所望の親の活性、例えば、ヌクレアーゼ活性 (親が、ニックアーゼまたは死 C a s 9 である場合を除く) ならびに / またはガイド RNA および標的 DNA と相互作用する能力を保持する。

20

## 【0033】

2 つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較の目的のために整列される (例えば、ギャップは、最適な整列のための第 1 および第 2 のアミノ酸もしくは核酸配列の一方または両方に導入することができ、非相同配列は、比較の目的のために無視することができる)。比較の目的のために整列された参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも 80% であり、いくつかの実施形態において、少なくとも 90% または 100% である。次いで、対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置でのヌクレオチドが比較される。第 1 の配列中の位置は、第 2 の配列中の対応する位置と同じヌクレオチドによって占められ、その結果、分子は、その位置で同一である (本明細書で 사용되는場合、核酸の「同一性」は核酸の「相同性」と同等である)。2 つの配列の間の同一性パーセントは、2 つの配列の最適な整列化のために導入することが必要な、ギャップの数およびそれぞれのギャップの長さを考慮して、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。2 つのポリペプチドまたは核酸配列の間の同一性パーセントは、当技術分野における技能内であるさまざまな方法、例えば、S m i t h W a t e r m a n A l i g n m e n t (Smith, T. F. and M. S. Waterman (1981) J Mol Biol 147:195-7); G e n e M a t c h e r P l u s (商標) に組み込まれた「B e s t F i t」(Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics, 482-489 (1981))、S c h w a r z a n d D a y h o f (1979) Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhof, M.O., Ed, pp 353-358; B L A S T プログラム (基本的なローカルアライメント検索ツール; (Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990) J Mol Biol 215: 403-10)、B L A S T - 2、B L A S T - P、B L A S T - N、B L A S T - X、W U - B L A S T - 2、A L I G N、A L I G N - 2、C L U S T A L、または M e g a l i g n (D N A S T A R) ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して、決定される。加えて、当業者は、比較される配列の長さに対する最大の整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、整列を測定するための適切なパラメータを決定することができる。一般に、タンパク質または核酸のためには、比較の長さは、最大で、か

30

40

50

つ全長を含む、任意の長さ（例えば、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または100%）であり得る。本組成物および方法の目的のために、配列の全長の少なくとも80%が、BLASTアルゴリズムおよび初期設定パラメーターを使用して整列される。

#### 【0034】

本発明の目的のために、2つの配列の間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、ギャップペナルティ12、ギャップ拡張ペナルティ4およびフレームシフトギャップペナルティ5でBlossum62スコアリング行列を使用して達成することができる。

#### 【0035】

保存的置換は、典型的には、以下の群内での置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

10

#### 【0036】

いくつかの実施形態において、SpCas9バリエーションは、表1、2または3に示される変異のセット、例えば、以下の変異のセットの1つ：D1135X/S1136X/G1218X/E1219X/R1335X/T1337X；SpCas9-LWKIQK、LWKIQK、IRAVQL、SWRVVV、SWKVLK、TAHFVKV、MSGVKC、LRSVRS、SKTLRP、MWVHLN、TWSMRG、KRRCKV、VRQVQL、VSSVRS、VRSVRS、SRMHCK、GRKIQK、GWKLLR、GWKOQK、VAKLLR、VAKIQK、VAKILR、GRKILR、VRKLLR、LRQVQL、IRAVQL、VRKIQK、VRMHCK、LRKIQK、LRQVQK、またはVRKIQKバリエーション（例えば、NGTN PAMについて）；WMQAYG、MQKSER、LWRSEY、SQSWRS、LKAWRS、LWGWQH、MCSFER、LWMREQ、LWRVVA、HSSWVR、MWSEPT、GSNYQS、FMQWVN、YCSWVG、MCAWCG、LWLETR、FMQWVR、SSKWPA、LSRWQR、ICCCER、VRKSER、またはICKSERバリエーション（例えば、NGCN PAMについて）；またはLRLSAR、AWTEVTR、KWMMC G、VRGAKE、MRARKE、AWNFAQV、LWTTLN、SRMHCK、CWCQCV、AEEQQR、GWEKVR、NRAVNG、SRQMRG、LRSYLH、VRGNNR、VQDAQR、GWRQSK、AWLCLS、KWARVV、MWAARP、SRMHCK、VKMAKG、QRKTRE、LCRQQR、CWSHQR、SRTH TQ、LWEVIR、VSSVRS、VRSVRS、LRSVRS、IRAVRS、SRSVRS、LWKIQK、VRMHCK、またはSRMHCK（例えば、NGAN PAMについて）を含む。いくつかの実施形態において、SpCas9バリエーションは、D1135L/S1136R/G1218S/E1219V/R1335X/T1337X、例えば、LRQVQLまたはLRSVRSを含む。いくつかの実施形態において、D1135での残基は、L、G、I、V、MまたはSである。いくつかの実施形態において、S1136での残基は、R、Q、W、SまたはCである。いくつかの実施形態において、G1218での残基は、S、K、S、R、L、C、G、AまたはQである。いくつかの実施形態において、E1219での残基は、V、I、S、E、W、C、AまたはRである。いくつかの実施形態において、R1335での残基は、R、Q、E、V、TまたはKである。いくつかの実施形態において、T1337での残基は、S、K、L、R、A、E、TまたはGである。いくつかの実施形態において、バリエーションは、表Aにおける変異のセットの1つを含む。

20

30

40

#### 【0037】

【表 1】

表 A		
NGTN PAM	NGCN PAM	NGAN PAM
LRSVRS	<b>MQKSER</b>	VRGAKE
GRKIQK	LWRVVA	MRARKE
<b>LRSVQL</b>	LWLETR	SRQMRG
IRAVQL	LSRWQR	<b>LRSVRS</b>
LRKIQK	ICCCER	
LRSVQK	VRKSER	
VRKIQK	ICKSER	

10

## 【0038】

いくつかの実施形態において、SpCas9 バリアントはまた、タンパク質のヌクレアーゼ部分を触媒的に不活性にするために、Cas9 のヌクレアーゼ活性を低減もしくは破壊する以下のアミノ酸の位置の 1 つ：D10、E762、D839、H983 または D986、および H840 または N863、例えば、D10A / D10N および H840A / H840N / H840Y で変異を含み、これらの位置での置換は、アラニン（これらは、Nishimasu al., Cell 156, 935-949 (2014) にある）、または他の残基、例えば、グルタミン、アスパラギン、チロシン、セリンもしくはアスパラギン酸塩、例えば、E762Q、H983N、H983Y、D986N、N863D、N863S または N863H であろう（国際公開第 2014 / 152432 号パンフレットを参照されたい）。いくつかの実施形態において、バリアントは、D10A もしくは H840A での変異（一本鎖ニックアーゼを生成する）、または D10A および H840A での変異（ヌクレアーゼ活性を無効にし、この変異は死 Cas9 または dCas9 として公知である）を含む。

20

## 【0039】

いくつかの実施形態において、SpCas9 バリアントはまた、タンパク質の特異性を増加させる（すなわち、標的外の効果を低減する）1 つまたは複数のアミノ酸の位置で変異を含む。いくつかの実施形態において、SpCas9 バリアントは、以下の残基：N497、K526、R661、R691、N692、M694、Q695、H698、K810、K848、Q926、K1003 および / もしくは R0160 で、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、10、11、12 または 13 すべての変異を含む。いくつかの実施形態において、変異は、N692A、Q695A、Q926A、H698A、N497A、K526A、R661A、R691A、M694A、K810A、K848A、K1003A、R0160A、Y450A / Q695A、L169A / Q695A、Q695A / Q926A、Q695A / D1135E、Q926A / D1135E、Y450A / D1135E、L169A / Y450A / Q695A、L169A / Q695A / Q926A、Y450A / Q695A / Q926A、R661A / Q695A / Q926A、N497A / Q695A / Q926A、Y450A / Q695A / D1135E、Y450A / Q926A / D1135E、Q695A / Q926A / D1135E、L169A / Y450A / Q695A / Q926A、L169A / R661A / Q695A / Q926A、Y450A / R661A / Q695A / Q926A、N497A / Q695A / Q926A / D1135E、R661A / Q695A / Q926A / D1135E、および Y450A / Q695A / Q926A / D1135E；N692A / M694A / Q695A / H698A、N692A / M694A / Q695A / H698A / Q926A；N692A / M694A / Q695A / Q926A；N692A / M694A / H698A / Q926A；N692A / Q695A / H698A / Q926A；M694A / Q695A / H698A / Q926A；N692A / Q695A / H698A；N692A / M694A / Q695A；N692A / H698A / Q926A；N69

30

40

50

2 A / M 6 9 4 A / Q 9 2 6 A ; N 6 9 2 A / M 6 9 4 A / H 6 9 8 A ; M 6 9 4 A / Q 6 9 5 A / H 6 9 8 A ; M 6 9 4 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A ; Q 6 9 5 A / H 6 9 8 A / Q 9 2 6 A ; G 5 8 2 A / V 5 8 3 A / E 5 8 4 A / D 5 8 5 A / N 5 8 8 A / Q 9 2 6 A ; G 5 8 2 A / V 5 8 3 A / E 5 8 4 A / D 5 8 5 A / N 5 8 8 A ; T 6 5 7 A / G 6 5 8 A / W 6 5 9 A / R 6 6 1 A / Q 9 2 6 A ; T 6 5 7 A / G 6 5 8 A / W 6 5 9 A / R 6 6 1 A ; F 4 9 1 A / M 4 9 5 A / T 4 9 6 A / N 4 9 7 A / Q 9 2 6 A ; F 4 9 1 A / M 4 9 5 A / T 4 9 6 A / N 4 9 7 A ; K 9 1 8 A / V 9 2 2 A / R 9 2 5 A / Q 9 2 6 A ; または 9 1 8 A / V 9 2 2 A / R 9 2 5 A ; K 8 5 5 A ; K 8 1 0 A / K 1 0 0 3 A / R 1 0 6 0 A ; または K 8 4 8 A / K 1 0 0 3 A / R 1 0 6 0 A である。例えば、米国特許第 9 5 1 2 4 4 6 号 ; Kleinstiver et al., Nature. 2016 Jan 28;529(7587):490-5 ; Slaymaker et al., Science. 2016 Jan 1;351(6268):84-8 ; Chen et al., Nature. 2017 Oct 19;550(7676):407-410 ; Tsai and Joung, Nature Reviews Genetics 17:300-312 (2016) ; Vakulskas et al., Nature Medicine 24:1216-1224 (2018) ; Casini et al., Nat Biotechnol. 2018 Mar;36(3):265-27を参照されたい。いくつかの実施形態において、本バリエーションは、K 5 2 6 または R 6 9 1 での変異を含まない。

#### 【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態において、S p C a s 9 バリエーションは、以下の位置 : L 1 6 9 A、Y 4 5 0、N 4 9 7、R 6 6 1、Q 6 9 5、Q 9 2 6 および / もしくは D 1 1 3 5 E の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つまたは 7 つすべてで変異を含み、例えば、いくつかの実施形態において、バリエーション S p C a s 9 タンパク質は、以下 : N 4 9 7、R 6 6 1、Q 6 9 5 および Q 9 2 6 の 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つすべてで、例えば、以下の変異 : N 4 9 7 A、R 6 6 1 A、Q 6 9 5 A および Q 9 2 6 A の 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つすべてで、変異を含む。いくつかの実施形態において、バリエーション S p C a s 9 タンパク質は、Q 6 9 5 および / または Q 9 2 6 で、ならびに任意選択で、例えば、限定されないが、Y 4 5 0 A / Q 6 9 5 A、L 1 6 9 A / Q 6 9 5 A、Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A、Q 6 9 5 A / D 1 1 3 5 E、Q 9 2 6 A / D 1 1 3 5 E、Y 4 5 0 A / D 1 1 3 5 E、L 1 6 9 A / Y 4 5 0 A / Q 6 9 5 A、L 1 6 9 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A、Y 4 5 0 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A、R 6 6 1 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A、N 4 9 7 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A、Y 4 5 0 A / Q 6 9 5 A / D 1 1 3 5 E、Y 4 5 0 A / Q 9 2 6 A / D 1 1 3 5 E、Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A / D 1 1 3 5 E、L 1 6 9 A / Y 4 5 0 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A、L 1 6 9 A / R 6 6 1 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A、Y 4 5 0 A / R 6 6 1 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A、N 4 9 7 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A / D 1 1 3 5 E、R 6 6 1 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A / D 1 1 3 5 E、および Y 4 5 0 A / Q 6 9 5 A / Q 9 2 6 A / D 1 1 3 5 E を含む、L 1 6 9、Y 4 5 0、N 4 9 7、R 6 6 1 および D 1 1 3 5 E の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つすべてで変異を含む。例えば、Kleinstiver et al., Nature 529:490-495 (2016) ; 国際公開第 2 0 1 7 / 0 4 0 3 4 8 号パンフレット ; 米国特許第 9 , 5 1 2 , 4 4 6 号を参照されたい。

#### 【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態において、S p C a s 9 バリエーションはまた、以下の位置 : F 4 9 1、M 4 9 5、T 4 9 6、N 4 9 7、G 5 8 2、V 5 8 3、E 5 8 4、D 5 8 5、N 5 8 8、T 6 5 7、G 6 5 8、W 6 5 9、R 6 6 1、N 6 9 2、M 6 9 4、Q 6 9 5、H 6 9 8、K 9 1 8、V 9 2 2、および / または R 9 2 5 の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つまたはそれ以上で、および任意選択で Q 9 2 6 で変異を含み、好ましくは、以下の位置 : F 4 9 1、M 4 9 5、T 4 9 6、N 4 9 7、G 5 8 2、V 5 8 3、E 5 8 4、D 5 8 5、N 5 8 8、T 6 5 7、G 6 5 8、W 6 5 9、R 6 6 1、N 6 9 2、M 6 9 4、Q 6 9 5、H 6 9 8、K 9 1 8、V 9 2 2 および / もしくは R 9 2 5 の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つまたはそれ以上で、および任意選択で Q 9 2 6 で変異を有する配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一である配列、ならびに任意選択で核局在化配列、細胞透過性ペプチド配列および / もしくはアフィニティタグの 1 つまたは複数を含

10

20

30

40

50

む。

【0042】

いくつかの実施形態において、タンパク質は、以下：N692、M694、Q695、およびH698；G582、V583、E584、D585、およびN588；T657、G658、W659、およびR661；F491、M495、T496、およびN497；またはK918、V922、R925、およびQ926の1つ、2つ、3つまたは4つすべてで変異を含む。

【0043】

いくつかの実施形態において、タンパク質は、以下の変異：N692A、M694A、Q695A、およびH698A；G582A、V583A、E584A、D585A、およびN588A；T657A、G658A、W659A、およびR661A；F491A、M495A、T496A、およびN497A；またはK918A、V922A、R925A、およびQ926Aの1つ、2つ、3つ、4つまたはすべてを含む。

10

【0044】

いくつかの実施形態において、タンパク質は、変異：N692A/M694A/Q695A/H698Aを含む。

【0045】

いくつかの実施形態において、タンパク質は、変異：N692A/M694A/Q695A/H698A/Q926A；N692A/M694A/Q695A/Q926A；N692A/M694A/H698A/Q926A；N692A/Q695A/H698A/Q926A；M694A/Q695A/H698A/Q926A；N692A/Q695A/H698A；N692A/M694A/Q695A；N692A/H698A/Q926A；N692A/M694A/Q926A；N692A/M694A/H698A；M694A/Q695A/H698A；M694A/Q695A/Q926A；Q695A/H698A/Q926A；G582A/V583A/E584A/D585A/N588A/Q926A；G582A/V583A/E584A/D585A/N588A；T657A/G658A/W659A/R661A/Q926A；T657A/G658A/W659A/R661A；F491A/M495A/T496A/N497A/Q926A；F491A/M495A/T496A/N497A；K918A/V922A/R925A/Q926A；または918A/V922A/R925Aを含む。例えば、Chen et al., "Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy," bioRxiv, doi.org/10.1101/160036 (August 12, 2017)を参照されたい。

20

30

【0046】

いくつかの実施形態において、バリエーションタンパク質は、R780、K810、R832、K848、K855、K968、R976、H982、K1003、K1014、K1047および/もしくはR1060、例えば、R780A、K810A、R832A、K848A、K855A、K968A、R976A、H982A、K1003A、K1014A、K1047Aおよび/もしくはR1060A、例えば、K855A；K810A/K1003A/R1060A；(eSpCas9 1.0とも称される)；またはK848A/K1003A/R1060A (eSpCas9 1.1とも称される)の1つまたは複数で変異を含む (Slaymaker et al., Science. 2016 Jan 1;351(6268):84-8を参照されたい)。

40

【0047】

本明細書において、SpCas9バリエーションをコードする単離された核酸、任意選択でバリエーションタンパク質を発現するための1つまたは複数の制御ドメインと作動可能に連結された単離された核酸を含むベクター、ならびに、核酸を含み、および任意選択でバリエーションタンパク質を発現する宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞も提供する。

【0048】

本明細書に記載のバリエーションは、細胞のゲノムを変更するために使用することができ、この方法は、一般に、細胞中のバリエーションタンパク質を、細胞のゲノムの選択された部分

50

に相補的な領域を有するガイドRNAと一緒に発現させることを含む。細胞のゲノムを選択的に変更するための方法は、当技術分野において、公知であり、例えば、米国特許第8,697,359号；米国特許出願公開第2010/0076057号；米国特許出願公開第2011/0189776号；米国特許出願公開第2011/0223638号；米国特許出願公開第2013/0130248号；国際公開第2008/108989号パンフレット；国際公開第2010/054108号パンフレット；国際公開第2012/164565号パンフレット；国際公開第2013/098244号パンフレット；国際公開第2013/176772号パンフレット；米国特許出願公開第2015/0050699号；米国特許出願公開第2015/0045546号；米国特許出願公開第2015/0031134号；米国特許出願公開第2015/0024500号；米国特許出願公開第2014/0377868号；米国特許出願公開第2014/0357530号；米国特許出願公開第2014/0349400号；米国特許出願公開第2014/0335620号；米国特許出願公開第2014/0335063号；米国特許出願公開第2014/0315985号；米国特許出願公開第2014/0310830号；米国特許出願公開第2014/0310828号；米国特許出願公開第2014/0309487号；米国特許出願公開第2014/0304853号；米国特許出願公開第2014/0298547号；米国特許出願公開第2014/0295556号；米国特許出願公開第2014/0294773号；米国特許出願公開第2014/0287938号；米国特許出願公開第2014/0273234号；米国特許出願公開第2014/0273232号；米国特許出願公開第2014/0273231号；米国特許出願公開第2014/0273230号；米国特許出願公開第2014/0271987号；米国特許出願公開第2014/0256046号；米国特許出願公開第2014/0248702号；米国特許出願公開第2014/0242702号；米国特許出願公開第2014/0242700号；米国特許出願公開第2014/0242699号；米国特許出願公開第2014/0242664号；米国特許出願公開第2014/0234972号；米国特許出願公開第2014/0227787号；米国特許出願公開第2014/0212869号；米国特許出願公開第2014/0201857号；米国特許出願公開第2014/0199767号；米国特許出願公開第2014/0189896号；米国特許出願公開第2014/0186958号；米国特許出願公開第2014/0186919号；米国特許出願公開第2014/0186843号；米国特許出願公開第2014/0179770号；米国特許出願公開第2014/0179006号；米国特許出願公開第2014/0170753号；Makarova et al., "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems" 9(6) Nature Reviews Microbiology 467-477 (1-23) (Jun. 2011)；Wiedenheft et al., "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea" 482 Nature 331-338 (Feb. 16, 2012)；Gasiunas et al., "Cas9-crRNA ribonucleo protein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria" 109(39) Proceedings of the National Academy of Sciences USA E2579-E2586 (Sep. 4, 2012)；Jinek et al., "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity" 337 Science 816-821 (Aug. 17, 2012)；Carroll, "A CRISPR Approach to Gene Targeting" 20(9) Molecular Therapy 1658-1660 (Sep. 2012)；2012年5月25日に出願された米国出願第61/652,086号；Al-Attar et al., Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs): The Hallmark of an Ingenious Antiviral Defense Mechanism in Prokaryotes, Biol Chem. (2011) vol. 392, Issue 4, pp. 277-289；Hale et al., Essential Features and Rational Design of CRISPR RNAs That Function With the Cas RAMP Module Complex to Cleave RNAs, Molecular Cell, (2012) vol. 45, Issue 3, 292-302を参照されたい。

#### 【0049】

本明細書に記載のバリエーションタンパク質は、前述の参照文献に記載のSpCas9タンパク質の代わりに、表1、2または3によるPAM配列を有する配列を標的化するガイド

10

20

30

40

50

R N A とともに使用することができる。

【 0 0 5 0 】

加えて、本明細書に記載のバリエーションは、当技術分野において公知の野生型 C a s 9 または他の C a s 9 変異（上記に記載の d C a s 9 または C a s 9 ニッカーゼなど）の代わりに、融合タンパク質、例えば、国際公開第 2 0 1 4 / 1 2 4 2 8 4 号パンフレットに記載の異種性機能ドメインを有する融合タンパク質において使用することができる。例えば、好ましくは、1 つもしくは複数のヌクレアーゼ低減変異または致死変異を含むバリエーションは、C a s 9 の N または C 末端において、転写活性化ドメインもしくは他の異種性機能ドメイン（例えば、転写リプレッサー（例えば、K R A B、E R D、S I D など、例えば、e t s 2 リプレッサー因子（E R F）のリプレッサードメイン（E R D）の 4 7 3 ~ 5 3 0 番目のアミノ酸、K O X 1 の K R A B ドメインの 1 ~ 9 7 番目のアミノ酸、もしくは M a d m S I N 3 相互作用ドメイン（S I D）の 1 ~ 3 6 番目のアミノ酸；Beerli et al., PNAS USA 95:14628-14633 (1998)を参照されたい）、またはヘテロクロマチンタンパク質 1（H P 1、s w i 6 としても公知）などのサイレンサー、例えば、H P 1 もしくは H P 1 ；M S 2 コートタンパク質、エンドリボヌクレアーゼ C s y 4 もしくはラムダ N タンパク質に結合したものなどの固定 R N A 結合配列に融合された長い非コード R N A（l n c R N A）をリクルートすることができるタンパク質またはペプチド；D N A のメチル化状態を改変する酵素（例えば、D N A メチルトランスフェラーゼ（D N M T）または T E T タンパク質）；ヒストンサブユニットを改変する酵素（例えば、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（H A T）、ヒストンデアセチラーゼ（H D A C）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ（例えば、リジンまたはアルギニン残基のメチル化のため）もしくはヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンまたはアルギニン残基の脱メチル化のため））に融合させることができる。

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、塩基エディター、例えば、シトシン D N A 塩基を改変するデアミナーゼ、例えば、A P O B E C 1、A P O B E C 2、A P O B E C 3 A、A P O B E C 3 B、A P O B E C 3 C、A P O B E C 3 D / E、A P O B E C 3 F、A P O B E C 3 G、A P O B E C 3 H および A P O B E C 4 を含む、アポリボタンパク質 B m R N A 編集酵素、デアミナーゼの触媒ポリペプチド様（A P O B E C）ファミリー（例えば、Yang et al., J Genet Genomics. 2017 Sep 20;44(9):423-437を参照されたい）；活性化誘導シチジンデアミナーゼ（A I D）、例えば、活性化誘導シチジンデアミナーゼ（A I C D A）；シトシンデアミナーゼ 1（C D A 1）および C D A 2；ならびに t R N A に作用するシトシンデアミナーゼ（C D A T）からのシチジンデアミナーゼである。以下の表に例示的な配列を提示し、他の配列を使用することもできる。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 2】

デアミナーゼ	GenBank 受託番号	
	核酸	アミノ酸
<b>hAID/AICDA</b>	NM_020661.3 アイズフォーム 1 NM_020661.3 アイズフォーム 2	NP_065712.1 バリエント 1 NP_065712.1 バリエント 2
<b>APOBEC1</b>	NM_001644.4 アイズフォーム a NM_005889.3 アイズフォーム b	NP_001635.2 バリエント 1 NP_005880.2 バリエント 3
<b>APOBEC2</b>	NM_006789.3	NP_006780.1
<b>APOBEC3A</b>	NM_145699.3 アイズフォーム a NM_001270406.1 アイズフォーム b	NP_663745.1 バリエント 1 NP_001257335.1 バリエント 2
<b>APOBEC3B</b>	NM_004900.4 アイズフォーム a NM_001270411.1 アイズフォーム b	NP_004891.4 バリエント 1 NP_001257340.1 バリエント 2
<b>APOBEC3C</b>	NM_014508.2	NP_055323.2
<b>APOBEC3D/E</b>	NM_152426.3	NP_689639.2
<b>APOBEC3F</b>	NM_145298.5 アイズフォーム a NM_001006666.1 アイズフォーム b	NP_660341.2 バリエント 1 NP_001006667.1 バリエント 2
<b>APOBEC3G</b>	NM_021822.3 (アイズフォーム a)	NP_068594.1 (バリエント 1)
<b>APOBEC3H</b>	NM_001166003.2	NP_001159475.2 (バリエント SV-200)
<b>APOBEC4</b>	NM_203454.2	NP_982279.1
<b>CDA1*</b>	NM_127515.4	NP_179547.1

\* 出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)S288C 由来

## 【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、アデノシン DNA 塩基を改変するデアミナーゼであり、例えば、デアミナーゼは、アデノシンデアミナーゼ 1 (ADA1)、ADA2; RNA1 に作用するアデノシンデアミナーゼ (ADAR1)、ADAR2、ADAR3 (例えば、Savva et al., Genome Biol. 2012 Dec 28;13(12):252を参照されたい); tRNA1 に作用するアデノシンデアミナーゼ (ADAT1)、ADAT2、ADAT3 (Keegan et al., RNA. 2017 Sep;23(9):1317-1328およびSchaub and Keller, Biochimie. 2002 Aug;84(8):791-803を参照されたい); および天然に存在するまたは遺伝子操作された tRNA 特異的アデノシンデアミナーゼ (TadA) (例えば、Gaudelli et al., Nature. 2017 Nov 23;551(7681):464-471 (NP\_417054.2 (大腸菌 (*Escherichia coli*) 株 K - 12 亜株 MG1655) を参照されたい; 例えば、Wolf et al., EMBO J. 2002 Jul 15;21(14):3841-51を参照されたい) である。以下の表に例示的な配列を提示し、他の配列を使用することもできる。

## 【 0 0 5 4 】

10

20

30

40

50

【表 3】

デアミナーゼ	GenBank 受託番号	
	核酸	アミノ酸
ADA (ADA1)	NM_000022.3 バリアント 1	NP_000013.2 アイソフォーム 1
ADA2	NM_001282225.1	NP_001269154.1
ADAR	NM_001111.4	NP_001102.2
ADAR2 (ADARB1)	NM_001112.3 バリアント 1	NP_001103.1 アイソフォーム 1
ADAR3 (ADARB2)	NM_018702.3	NP_061172.1
ADAT1	NM_012091.4 バリアント 1	NP_036223.2 アイソフォーム 1
ADAT2	NM_182503.2 バリアント 1	NP_872309.2 アイソフォーム 1
ADAT3	NM_138422.3 バリアント 1	NP_612431.2 アイソフォーム 1

## 【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、内因性 DNA 修復もしくは塩基除去修復 (BER) 経路を阻害または増強する、酵素、ドメインあるいはペプチド、例えば、チミン DNA グリコシラーゼ (TDG; GenBank 受託番号 NM\_003211.4 (核酸) および NP\_003202.3 (タンパク質))、またはウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG、ウラシル N - グリコシラーゼまたは UNG としても公知; GenBank 受託番号 NM\_003362.3 (核酸) および NP\_003353.1 (タンパク質))、または BER を開始するウラシルの除去を媒介する UNG を阻害するウラシル DNA グリコシラーゼ阻害剤 (UGI) (例えば、Mol et al., Cell 82, 701-708 (1995); Komor et al., Nature. 2016 May 19;533(7603)を参照されたい); あるいは DNA 修復酵素を阻害およびより正確な編集をもたらす (意図的ではない塩基編集がより少ない)、遊離 DNA 末端に結合するバクテリオファージ Mu からのタンパク質である Gam などの DNA 末端結合タンパク質である。例えば、Komor et al., Sci Adv. 2017 Aug 30;3(8):eaao4774を参照されたい。

## 【 0 0 5 6 】

例えば、使用することもできる当技術分野において公知の、Komor et al., Nature. 2016 May 19;533(7603):420-4; Nishida et al., Science. 2016 Sep 16;353(6305). pii: aaf8729; Rees et al., Nat Commun. 2017 Jun 6;8:15790; または Kim et al., Nat Biotechnol. 2017 Apr;35(4):371-376)を参照されたい。

## 【 0 0 5 7 】

多くのドメインについての配列は、DNA 中のメチル化シトシンのヒドロキシル化を触媒する。例示的なタンパク質としては、10 - 11 転位 (TET) 1 ~ 3 ファミリー、DNA 中で 5 - メチルシトシン (5 - mC) を 5 - ヒドロキシメチルシトシン (5 - hmC) に変換する酵素が挙げられる。

## 【 0 0 5 8 】

ヒト TET 1 ~ 3 についての配列は、当技術分野において公知であり、以下の表に示す。

## 【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 4】

遺伝子	GenBank 受託番号	
	アミノ酸	核酸
TET1	NP_085128.2	NM_030625.2
TET2*	NP_001120680.1 (バリエント 1) NP_060098.3 (バリエント 2)	NM_001127208.2 NM_017628.4
TET3	NP_659430.1	NM_144993.1

\* バリエント(1)は、より長い転写を表し、かつより長いアイソフォーム(a)をコードする。バリエント(2)は、バリエント 1 と比較して、5'UTR において、および 3'UTR において、ならびにコード配列で相違する。得られるアイソフォーム(b)は、より短く、アイソフォーム a と比較して、明確に異なる C 末端を有する。

10

## 【0060】

いくつかの実施形態において、触媒ドメインの全長配列のすべてまたは一部は、例えば、7つの高度に保存されたエクソンによってコードされる、システインリッチ拡張および 2OGFeDOドメインを含む触媒モジュール、例えば、1580～2052番目のアミノ酸を含むTet1触媒ドメイン、1290～1905番目のアミノ酸を含むTet2、および966～1678番目のアミノ酸を含むTet3を含むことができる。3つすべてのTetタンパク質中の重要な触媒残基および全長配列についてのこれらの補助物質を示す配列について（例えば、配列2cを参照されたい）、Iyer et al., Cell Cycle. 2009 Jun 1;8(11):1698-710. Epub 2009 Jun 27の図1を参照されたい；いくつかの実施形態において、配列は、Tet1の1418～2136番目のアミノ酸またはTet2/3の対応する領域を含む。

20

## 【0061】

他の触媒モジュールは、Iyer et al., 2009において特定されたタンパク質からのものであり得る。

## 【0062】

いくつかの実施形態において、異種性機能ドメインは、生物学的テザーであり、MS2コートタンパク質、エンドリボヌクレアーゼCsy4またはラムダNタンパク質のすべてまたは一部（例えば、これらからのDNA結合ドメイン）を含む。これらのタンパク質は、dCas9 gRNA標的化配列によって特異化された場所に特異的ステムループ構造を含有するRNA分子をリクルートするために使用することができる。例えば、MS2コートタンパク質、エンドリボヌクレアーゼCsy4またはラムダNに融合されたdCas9バリエントは、XISTまたはHOTAIRなどの長い非コードRNA(lncRNA)をリクルートするために使用することができ、例えば、Csy4、MS2またはラムダN結合配列に連結された、Keryer-Bibens et al., Biol. Cell 100:125-138 (2008)を参照されたい。あるいは、Csy4、MS2またはラムダNタンパク質結合配列は、例えば、Keryer-Bibens et al. (上記)に記載の別のタンパク質と連結され得、このタンパク質は、本明細書に記載の方法および組成物を使用して、dCas9バリエント結合部位に標的化することができる。いくつかの実施形態において、Csy4は、触媒的に不活性である。いくつかの実施形態において、Cas9バリエント、好ましくは、dCas9バリエントは、国際公開第2014/204578号パンフレットに記載のFokIと融合される。

30

40

## 【0063】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、dCas9バリエントおよび異種性機能ドメインの間にリンカーを含む。これらの融合タンパク質（または連結された構造中の融合タンパク質の間）で使用することができるリンカーは、融合タンパク質の機能を妨げない任意の配列を含むことができる。好ましい実施形態において、リンカーは、短く、例えば、2～20アミノ酸であり、典型的には、フレキシブルである（すなわち、グリシ

50

ン、アラニンおよびセリンなどの高自由度のアミノ酸を含む)。いくつかの実施形態において、リンカーは、G G G S (配列番号 2) もしくは G G G G S (配列番号 3) からなる 1 つまたは複数のユニット、例えば、G G G S (配列番号 2) もしくは G G G G S (配列番号 3) ユニットの 2 つ、3 つ、4 つまたはそれ以上のリピートを含む。他のリンカー配列を使用することもできる。

#### 【0064】

##### 送達および発現系

本明細書に記載の C a s 9 バリエーションを使用するために、これらをコードする核酸からこれらを発現することが望ましくあり得る。これは、いろいろな方法で行うことができる。例えば、C a s 9 バリエーションをコードする核酸は、複製および/もしくは発現のために、原核細胞または真核細胞に形質転換するための中間ベクターにクローニングすることができる。中間ベクターは、典型的には、C a s 9 バリエーションの産生のために C a s 9 バリエーションをコードする核酸の貯蔵または操作のための、原核ベクター、例えば、プラスミド、またはシャトルベクターもしくは昆虫ベクターである。C a s 9 バリエーションをコードする核酸は、植物細胞、動物細胞、好ましくは、哺乳動物細胞もしくはヒト細胞、真菌細胞、細菌細胞または原生動物細胞への投与のために、発現ベクターにクローニングすることもできる。

#### 【0065】

発現を得るために、C a s 9 バリエーションをコードする配列は、典型的には、直接転写のためのプロモーターを含有する発現ベクターにサブクローニングされる。適切な細菌および真核プロモーターは、当技術分野において周知であり、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3d ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); および Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 2010) に記載されている。遺伝子操作されたタンパク質を発現させるための細菌発現系は、例えば、大腸菌 (E. coli)、バチルス種 (Bacillus sp.) およびサルモネラ (Salmonella) で利用可能である (Palva et al., 1983, Gene 22:229-235)。このような発現系のためのキットが市販されている。哺乳動物細胞、酵母および昆虫細胞のための真核発現系は、当技術分野において周知であり、これも市販されている。

#### 【0066】

核酸の直接発現のために使用されるプロモーターは、特定の適用に依存する。例えば、強い構成的プロモーターは、典型的には、融合タンパク質の発現および精製のために使用される。対照的に、C a s 9 バリエーションが遺伝子制御のためにインビボで投与されるべきである場合、構成的プロモーターまたは誘導プロモーターのいずれかを、C a s 9 バリエーションの特定の使用に応じて、使用することができる。加えて、C a s 9 バリエーションの投与のための好ましいプロモーターは、H S V T K などの弱いプロモーター、または同様の活性を有するプロモーターであり得る。プロモーターは、トランス活性化に応答するエレメント、例えば、低酸素応答エレメント、G a l 4 応答エレメント、l a c リプレッサー応答エレメント、ならびにテトラサイクリン調節系および R U - 4 8 6 系などの低分子調節系 (例えば、Gossen & Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547; Oligino et al., 1998, Gene Ther., 5:491-496; Wang et al., 1997, Gene Ther., 4:432-441; Neering et al., 1996, Blood, 88:1147-55; および Rendahl et al., 1998, Nat. Biotechnol., 16:757-761 を参照されたい) を含むこともできる。

#### 【0067】

プロモーターに加えて、発現ベクターは、典型的には、原核または真核のいずれかの宿主細胞での核酸の発現のために必要なすべての追加エレメントを含有する転写ユニットまたは発現カセットを含有する。したがって、典型的な発現カセットは、例えば、C a s 9 バリエーションをコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター、および例えば、転写物、転写終結、リボソーム結合部位または翻訳終結の効率がよいポリアデニル化のために必要な任意のシグナルを含有する。カセットの追加エレメントは、例えば、エンハン

サー、および異種スプライシングイントロンシグナルを含んでいてもよい。

【0068】

細胞に遺伝情報を運ぶために使用される特定の発現ベクターは、C a s 9 パリアントの意図される使用、例えば、植物、動物、細菌、真菌、原性動物などにおける発現に関して選択される。標準的な細菌発現ベクターとしては、p B R 3 2 2 系プラスミド、p S K F、p E T 2 3 D などのプラスミド、ならびに G S T および L a c Z などの市販のタグ融合発現系が挙げられる。

【0069】

真核ウイルスからの制御エレメントを含有する発現ベクターは、多くの場合、真核発現ベクター、例えば、S V 4 0 ベクター、パピローマウイルスベクターおよびエプスタインバーウイルスに由来するベクターにおいて使用される。他の例示的な真核ベクターとしては、p M S G、p A V 0 0 9 / A +、p M T O 1 0 / A +、p M A M n e o - 5、バキュロウイルス p D S V E が挙げられ、任意の他のベクターは、S V 4 0 早期プロモーター、S V 4 0 後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核細胞における発現のために効果的であることが示されているその他のプロモーターの指示の下でタンパク質の発現を可能にする。

10

【0070】

C a s 9 パリアントを発現するためのベクターとしては、ガイド R N A の発現を推進する、R N A P o l I I I プロモーター、例えば、H 1、U 6 または 7 S K プロモーターを挙げることができる。これらのヒトプロモーターは、プラスミドのトランスフェクション後、哺乳動物細胞中において C a s 9 パリアントの発現を可能にする。

20

【0071】

いくつかの発現系は、チミジンキナーゼ、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼおよびジヒドロ葉酸レダクターゼなどの安定的にトランスフェクトされた細胞株の選択のためのマーカーを有する。例えば、昆虫細胞においてバキュロウイルスベクターをポリヘドリンプロモーターまたは他の強いバキュロウイルスプロモーターの指示の下、配列をコードする g R N A とともに使用する、高収率の発現系も適切である。

【0072】

典型的に発現ベクターに含まれるエレメントは、大腸菌 (E. coli) において機能するレプリコン、組み換えプラスミドを保有する細菌の選択を可能にする抗生物質耐性をコードする遺伝子、および組み換え配列の挿入を可能にするプラスミドの非必須領域のユニークな制限部位も含む。

30

【0073】

標準的なトランスフェクション方法を使用して、大量のタンパク質を発現する、細菌、哺乳動物、酵母または昆虫の細胞株を生成し、次いで、これは、標準的な技術を使用して精製される (例えば、Colley et al., 1989, J. Biol. Chem., 264:17619-22; Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990) を参照されたい)。真核細胞および真核細胞の形質転換は、標準的な技術に従って行われる (例えば、Morrison, 1977, J. Bacteriol. 132:349-351; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362 (Wu et al., eds, 1983) を参照されたい)。

40

【0074】

外来ヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するための任意の公知の手順を使用してもよい。これらは、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション、ネイキッド D N A、プラスミドベクター、ウイルスベクター、エピソームおよびインテグレーションの両方、ならびにクローニングされたゲノム D N A、c D N A、合成 D N A、または他の外来遺伝物質を宿主細胞に導入するための任意の他の周知の方法を含む (例えば、Sambrook et al. (上記) を参照されたい)。使用される特定の遺伝子操作手

50

順は、Cas9 バリアントを発現する能力がある宿主細胞に少なくとも 1 つの遺伝子を成功裏に導入する能力があることのみが必要である。

【0075】

あるいは、本方法は、Cas9 バリアントタンパク質およびガイドRNAと一緒に、例えば、複合体として、送達することを含み得る。例えば、Cas9 バリアントおよびgRNAは、宿主細胞中で過剰発現および精製され、次いで、ガイドRNA（例えば、試験管中）と複合体化して、リボヌクレオタンパク質（RNP）を形成し、細胞に送達することができる。いくつかの実施形態において、バリアントCas9は、細菌Cas9発現プラスミドの使用によって、細菌から発現および精製することができる。例えば、Hisタグ化バリアントCas9タンパク質は、細菌細胞中で発現し、次いで、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製することができる。RNPの使用は、ヌクレアーゼもしくはガイドをコードするか、またはmRNAとしてヌクレアーゼをコードするプラスミドDNAを送達する必要性を回避する。RNP送達はまた、おそらく、RNPの半減期がより短く、ヌクレアーゼおよびガイドの持続的発現がないので（プラスミドから取得する場合）、特異性を改善し得る。RNPは、例えば、脂質媒介トランスフェクションまたはエレクトロポレーションを使用して、インピボまたはインピトロで細胞に送達することができる。例えば、Liang et al. "Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection." Journal of biotechnology 208 (2015): 44-53 ; Zuris, John A., et al. "Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo." Nature biotechnology 33.1 (2015): 73-80 ; Kim et al. "Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins." Genome research 24.6 (2014): 1012-1019を参照されたい。

【0076】

本発明は、ベクター、およびベクターを含む細胞を含む。

【実施例】

【0077】

本発明を以下の実施例においてさらに記載し、これは、特許請求の範囲に記載の本発明の範囲を限定するものではない。

【0078】

方法

以下の材料および方法を実施例1において使用した。

【0079】

プラスミドおよびオリゴヌクレオチド

T7E1アッセイのための内因性ヒト遺伝子標的部位を増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドの配列は表4に見られる。

【0080】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4		
T7E1 実験のために使用されたプライマー		配列番号:
配列	説明	
GGAGCAGCTGGTCAGAGGGG	U2OS ヒト細胞中で <i>EMX1</i> を標的化するフォワードプライマー	4
CCATAGGGAAGGGGACACTGG	U2OS ヒト細胞中で <i>EMX1</i> を標的化するリバースプライマー	5
GGGCCGGGAAAGAGTTGCTG	U2OS ヒト細胞中で <i>FANCF</i> を標的化するフォワードプライマー	6
GCCCTACATCTGCTCTCCCTCC	U2OS ヒト細胞中で <i>FANCF</i> を標的化するリバースプライマー	7
CCAGCACAACCTACTCGCACTTGAC	U2OS ヒト細胞中で <i>RUNX1</i> を標的化するフォワードプライマー	8
CATCACCAACCCACAGCCAAGG	U2OS ヒト細胞中で <i>RUNX1</i> を標的化するリバースプライマー	9
GATGAGGGCTCCAGATGGCAC	U2OS ヒト細胞中で <i>VEGFA</i> を標的化するフォワードプライマー	10
GAGGAGGGAGCAGGAAAGTGAGG	U2OS ヒト細胞中で <i>VEGFA</i> を標的化するリバースプライマー	11

## 【 0 0 8 1 】

細菌 *Cas9* / *sgRNA* 発現プラスミドを、*Cas9* および *sgRNA* を別々に発現させるための 2 つの T7 プロモーターを用いて、以前に記載されるようにして (Kleinstiver et al., Nature 2015)、構築した。D 1 1 3 5、S 1 1 3 6、G 1 2 1 8、E 1 2 1 9、R 1 3 3 5 および T 1 3 3 7 の位置で可変アミノ酸を含有する細菌発現プラスミドを、これらの位置でランダム化コドンコードするオリゴヌクレオチドを、親 *SpCas9* 細菌発現ベクターにクローニングすることによって生成した (図 1)。

## 【 0 0 8 2 】

ヒト細胞での発現のために、*SpCas9* における点変異を、pCMV-T7-h*SpCas9*-NLS-3xFLAGベクター (JDS246; 配列は、ここで、[addgene.org/43861/sequences/](http://addgene.org/43861/sequences/)に見られる) への等温アセンブリーによって生成した。

## 【 0 0 8 3 】

*sgRNA* の U6 発現のためのプラスミド (所望のスペーサーオリゴをクローニングすることができる) を、BsmBI 消化 BPK1520 に適切にアニーリングされたオリゴをクローニングすることによって生成した。

## 【 0 0 8 4 】

*SpCas9* バリエントを進化させるための細菌系陽性選択アッセイ

陽性選択プラスミド (埋め込まれた標的部位を有する) を含有する形質転換受容性のある大腸菌 (*E.coli*) BW25141 (DE3)<sup>23</sup> を *Cas9* / *sgRNA* をコードするプラスミドで形質転換した。SOB 培地中での回収の 60 分後、形質転換体を、クロラムフェニコール (非選択的) またはクロラムフェニコール + 10 mM アラビノース (選択的) のいずれかを含有する LB プレートに蒔いた。

## 【 0 0 8 5 】

新規 PAM を切断することができる *SpCas9* バリエントについて選択するために、ランダム化 D 1 1 3 5 X / S 1 1 3 6 X / G 1 2 1 8 X / E 1 2 1 9 X / R 1 3 3 5 X / T 1 3 3 7 X *SpCas9* ライブラリーをコードするプラスミドを、目的とする PAM を有する標的部位をコードする陽性選択プラスミドを既に保有している大腸菌 (*E.coli*) BW25141 (DE3) 細胞にエレクトロポレーションした。生存コロニーを、終夜増殖させ、ミニプレップして、*SpCas9*-XXXXXX 発現プラスミドを抽出し、個々に、以前に記載の PAM 配列を有する陽性選択を含有する大腸菌 (*E.coli*) BW25141 (DE3) 細胞に再形質転換して、生存表現型とそのプラスミドの連結を再試験し、それによって、偽陽性クローンを排除した。一般に、約 300 クローンを、追跡実験で再スクリーニングした。二次スクリーニングにおける真正の生存コロニーの *SpCas9* 発現プラスミドを、シーケンシングして、特異性の変更をもたらす D 1 1 3 5、S 1 1 3 6、G 1 2 1 8、E 1 2 1 9、R 1 3 3 5 および / または T 1 3 3 7 の位置でのアミノ

酸を特定した（表 1 ～ 3 を参照されたい）。シーケンシングされたクローンにおいて観察された変異を、生存クローンにおけるそれらの頻度、および（いくつかの場合では）ヒト細胞系 E G F P 破壊アッセイにおける活性に基づいて、さらなる評価のために選択した。

#### 【 0 0 8 6 】

##### ヒト細胞培養およびトランスフェクション

E G F P - P E S T レポーター遺伝子の単一の統合されたコピーを保有する U 2 O S 細胞および U 2 O S . E G F P 細胞 (Reyon, D. et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat Biotechnol 30, 460-465 (2012)) を、10 % の F B S、ペニシリン / ストレプトマイシンおよび 2 m M の G l u t a M A X ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) を有する A d v a n c e d D M E M 培地中、37 °C、5 % C O 2 で培養した。細胞株の特定を、S T R プロファイリング ( A T C C ) およびディープシーケンシングによって検証し、細胞を、マイコプラズマ汚染について 2 週間に 1 回試験した。U 2 O S . E G F P 培養培地に、追加で、400 μ g / m L の G 4 1 8 を補充した。細胞を、L o n z a 4 D - スクレオフェクターの D N - 1 0 0 プログラムを使用して、製造者の指示書に従って、750 n g の C a s 9 プラスミドおよび 250 n g の s g R N A プラスミドで同時トランスフェクトした。空の U 6 プロモータープラスミドと一緒にトランスフェクトされた C a s 9 プラスミドを、すべてのヒト細胞実験について、陰性対照として使用した。

#### 【 0 0 8 7 】

##### ヒト細胞 E G F P 破壊アッセイ

E G F P 破壊実験を、以前に記載されたようにして (Fu, Y. et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat Biotechnol 31, 822-826 (2013); Reyon, D. et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat Biotechnol 30, 460-465 (2012))、行った。トランスフェクションのおよそ 52 時間後、F o r t e s s a フローサイトメーター ( B D B i o s c i e n c e s ) を使用して、トランスフェクトされた U 2 O S . E G F P 細胞中の E G F P 蛍光を測定した。C a s 9 および空の U 6 プロモータープラスミドの陰性対照トランスフェクションを使用して、すべての実験について、約 2 . 5 % のバックグラウンドの E G F P のロスを確認した。

#### 【 0 0 8 8 】

##### T 7 E 1 アッセイ

T 7 E 1 アッセイを、以前に記載されたようにして<sup>15</sup>、行った。U 2 O S ヒト細胞のために、ゲノム DNA を、A g e n c o u r t D N A d v a n c e G e n o m i c D N A 単離キット ( B e c k m a n C o u l t e r G e n o m i c s ) を使用して、トランスフェクションの約 72 時間後に、トランスフェクトされた細胞から抽出した。ヒト細胞のゲノム DNA からの標的遺伝子座を、表 4 に列挙したプライマーを使用して増幅した。概略で 200 n g の精製 P C R 産物を、変性させ、アニーリングし、および T 7 E 1 ( N e w E n g l a n d B i o L a b s ) で消化した。変異生成頻度を、以前に記載されたようにして<sup>15</sup>、Q i a x c e l キャピラリー電気泳動装置 ( Q I a g e n ) を使用して定量化した。

#### 【 0 0 8 9 】

##### [実施例 1]

現在アクセスできない P A M 配列の標的化を可能にすることによって S p C a s 9 の有用性をさらに拡大するために、本発明者らは、新規な P A M 配列を認識する能力がある S p C a s 9 バリエーションについて選択するための代替戦略を考えた。S p C a s 9 コード配列内のある特定の位置が P A M 認識のために重要であることが以前に確立されており (Kleinstiver et al., Nature 2015)、本発明者らは、6 つの位置でアミノ酸をランダム化して、P A M 相互作用ドメイン: D 1 1 3 5 / S 1 1 3 6、G 1 2 1 8 / E 1 2 1 9 および R 1 3 3 5 / T 1 3 3 7 の 3 つの別々の領域内で多様なコドン使用頻度を有する S p C a s 9 バリエーションのライブラリーを生成させる、集中変異生成アプローチを実施した。そ

10

20

30

40

50

うするために、本発明者らは、コードされたこれらの6つのアミノ酸を含有するSpCas9のコドンで、NNSヌクレオチドトリプレット(ここで、Nは任意のヌクレオチドであり、SはGまたはCである)をコードするランダム化オリゴヌクレオチドカセットを連続してクローニングした(図1A)。次いで、得られるSpCas9バリエーションのライブラリーを、以前に記載されたようにして(Kleinstiver et al., Nature 2015)、さまざまなNGNN PAM配列をコードする標的部位に対して、本発明者らの細菌陽性選択アッセイでスクリーニングした(図1B)。簡潔には、SpCas9が陽性選択プラスミドにおいてコードされる標的部位(PAMおよびスペーサー配列)を認識することができる場合にのみ、細菌は、選択条件(10 mMのアラビノース上に蒔かれ、これは、ccdB毒性遺伝子の転写を誘導する)で生存することができる。強いPAM認識は、選択プラスミドの加水分解をもたらし、ccdB発現の誘導を防ぎ、細菌の増殖を可能にする。このように、SpCas9ライブラリーのスクリーニングの間に、10 mMのアラビノースを含有する培地で増殖したコロニーは、代替PAMを標的化することができるSpCas9 PAMバリエーションをコードすると予想される(図1B)。

【0090】

本発明者らは、最初に、NGTG、NGTT、NGTCおよびNGTA PAMを有する標的部位をコードする陽性選択プラスミドにおいて、ランダム化されたD1135X/S1136X/G1218X/E1219X/R1335X/T1337X SpCas9ライブラリー(SpCas9-XXXXXX、ここで、Xは、任意のアミノ酸である)をスクリーニングした。それぞれの異なるPAM選択のために、アラビノース選択からの48の生存コロニーを集め、クロラムフェニコール含有培地中で終夜増殖させて、プラスミドをコードするヌクレアーゼを回収した。一次スクリーニングにおいて偽陽性の割合を低減するために、すべての推定上のPAMバリエーションプラスミドを、その後、標的部位をコードする陽性選択プラスミドに対して、およびそれらが最初にスクリーニングされたPAMに対して、再スクリーニングした(データは示さない)。この再スクリーニングアッセイにおいて少なくとも50%生存の真正バリエーションのサブセットをシーケンシングして、1135、1136、1218、1219、1335、1337番目の残基でのアミノ酸を特定し(表1)、次いで、これらのバリエーションを、NGTG、NGTT、NGTCおよびNGTA PAMに対してより広範にスクリーニングして、NGTN部位に対する活性を評価した(図2a~2bおよび表1)。注意:この記載以降、細菌アッセイにおいて、SpCas9バリエーションは、それらのバリエーション番号(vNGTN-#)によって記載し、またはヒトアッセイにおいて「アミノ酸名称」によって記載し、ここで、アミノ酸名称は、SpCas9-XXXXXXの形式であり、ここで、6つのXは、1135、1136、1218、1219、1335および1337番目の位置でのアミノ酸識別を表す(表1~3において見られる)。再スクリーニングはわずかな傾向を特定し、ここで、いくつかの場合において、バリエーションは、最初に選択されたもの(例、vNGTN-1、-3、-12、-27、-28など)に対するNGTN PAMに対して最も高い活性を有し、いくつかのバリエーションは、NGTN PAM(例、vNGTN-15、-31、-35など、これは、NGTCおよびNGTAを標的化することができる)の組み合わせを標的化することができ、いくつかのバリエーションは、NGTN PAM(例、vNGTN-9、-10、-30など)のすべてを標的化することができる(図2A~2Bおよび表1)。これらの結果に基づいて、新規なバリエーションを、初期スクリーニングにおいて十分に行われたクローン中の1135、1136、1218、1219、1335および1337番目の位置でアミノ酸を生じる頻度に基づいて、合理的に設計した。これらの合理的に設計されたNGTNバリエーションを、NGTG、NGTT、NGTCおよびNGTA PAM(図2C~2F)に対する細菌スクリーニングにおいて評価し、いくつかの場合において、NGAN PAM(NGAG、NGAT、NGAC、NGAA;図2C、2E~2F)に対してもスクリーニングした。再び、上記の嗜好性と一致した性質を有する多数の興味深いバリエーションを特定したが、とりわけ、PAM(例、NGTGもしくはNGAG PAMを標的化することができるvNGTG-37、またはNGTCおよびNGAC PA

MにおけるvNGTG - 18ならびに - 41など)の4番目の位置での選好性を与え得るいくつかの追加バリエーション、NGTN PAM(例、vNGTN - 40、 - 46、 - 48など)のすべてを標的化することができる追加バリエーション、およびNGTNもしくはNGAN PAM(例、vNGTN - 7、 - 44、 - 59など; 図2C ~ 2Fおよび表1)のすべてまたはほぼすべてを標的化することができるバリエーションを特定した。

#### 【0091】

細菌中のNGTN PAM部位を標的化することができるいくつかのバリエーションを特定し、本発明者らは、これらの選好性がヒト細胞における真正な活動に翻訳されるか否かを決定することを試みた。本発明者らのヒトU2OS EGFP破壊アッセイにおける12の異なるNGTN PAMバリエーションの初期スクリーニングにおいて、本発明者らは、NGTTおよびNGTG PAM(例、SpCas9 - GRKIQK、 - VAKLLR、 - VRKLLRなど)を安定して標的化し得るバリエーション、およびすべてのNGTN PAM部位(例、SpCas9 - LRSVQL、 - IRAVQLなど)を改変し得るいくつかのバリエーションを特定した(図3A)。ヒト細胞EGFP破壊アッセイにおいてこれらのバリエーションおよび追加の合理的に設計されたバリエーションのサブセットのさらなるスクリーニングは、SpCas9 - LRSVQL、 - LRKIQK、 - LRSVQKなどを、NGTN PAM配列を標的化することができる有望なバリエーションとして特定した(図3B)。ヒト細胞でのNGTN PAM配列におけるSpCas9 - LRSVQLの活性をより厳しく特徴付けるために、本発明者らは、ヒトU2OS細胞において、EMX1、FANCFおよびRUNX1遺伝子にわたる32の異なる内因性部位にわたって、このヌクレアーゼバリエーションの活性を調べた。この解析は、NGTG、NGTA、NGTCおよびNGTT PAMを持つさまざまな内因性部位におけるSpCas9 - LRSVQLの安定した活性を明らかにした(図3C、本発明者らの選択および合理的に設計したPAMバリエーションが公表されたSpCas9バリエーションで以前に標的化できなかった多数の遺伝子座にわたって効率よく機能することができることを実証する)。

#### 【0092】

本発明者らは、SpCas9 - VRER(D1135V/G1218R/R1335E/T1337R置換をコードする)と呼ばれるNGCG PAM部位(Kleinstiver et al., Nature, 2015)を効率的に標的化することができるSpCas9バリエーションを以前に記載した。このバリエーションは、以前にアクセス可能ではなかった部位の標的化を可能にするが、これは、拡張されたNGCG PAMを有する部位における活性を制限する。現在NGCT、NGCCおよびNGCAを含むNGCN PAMをすべて潜在的に標的化することによってSpCas9 PAMバリエーションの有用性を拡大するために、本発明者らは、上記に記載のものに対する同様の選択を行ったが、NGCG、NGCT、NGCCまたはNGCA PAMのいずれかを有する標的部位を保有する陽性選択プラスミドに対するSpCas9 - XXXXXライブラリーをスクリーニングした(図4A ~ 4Bおよび表2)。本発明者らがNGTN選択で観察したものと酷似して、NGCNバリエーションの再スクリーニングは、バリエーションが、最初に選択されたNGCN PAM(例、vNGCN - 3、 - 8、 - 9、 - 17など)に対して最も高い活性を有する場合、いくつかのバリエーションが、NGCN PAM(例、vNGCN - 10など、これは、NGCT、NGCCおよびNGCAを標的化することができる)の組み合わせを標的化することができること、ならびにいくつかのバリエーションがNGCN PAM(例、vNGCN - 1、 - 2、 - 5、 - 18、 - 26など)のすべてを標的化することができることを特定した(図4A ~ 4Bおよび表2)。さまざまな合理的に生成されたNGCNバリエーションを、SpCas9 - XXXXXX選択クローンにおけるアミノ酸富化の観察に基づいてクローニングし、NGCN PAMに対する活性について細菌中で試験した(図4A ~ 4B、表2、データは示さない)。

#### 【0093】

次に、本発明者らは、本発明者らのU2OS EGFP破壊アッセイにおけるさまざまなNGCN選択SpCas9 PAMバリエーションの活性を調べて、それらの再標的化PA

M選好性およびヌクレアーゼ活性がヒト細胞で再現されるか否かを決定した(図5A~5D)。本発明者らは、NGCA PAM(SpCas9-MQKSER、-LWRVVA、-LWLETRなど;図5A)、NGCC PAM(SpCas9-MQKSER、-LSRWQR、-ICCCERなど;図5A)、NGCT PAM(SpCas9-MQKSER;図5C)、またはNGCCおよびNGCT PAM(SpCas9-MQKSER、-VRKSER、-ICKSERなど;図5C)に対する多数のバリエーションの活性を観察した。さらに、全部で15のNGCA、NGCC、NGCTおよびNGCG部位に対するSpCas9-MQKSER、-VRKSER、-ICKSERバリエーションの試験は、すべてのクラスのNGCN PAMに対するそれぞれのバリエーションの安定した活性を明らかにした(図5E)。いくつかの場合において、これらのバリエーションは、公表されたSpCas9-VRER(例えば、図5B~5Cに示される)より優れ得るが、これは、一般に、SpCas9-VRERによって効率的に標的化されないことが以前に示されたPAMに対してであった。まとめると、これらの新しいバリエーションは、SpCas9-MQKSER、およびすべてのNGCN PAMに対して安定した活性を有する他のバリエーションにより、以前にアクセス可能であったNGCGの代わりに、NGCT、NGCCおよびNGCAに、SpCas9の標的化を拡大する。

#### 【0094】

加えて、本発明者らは、SpCas9-VQR(D1135V/R1335Q/T1337R; Kleinstiver et al., Nature, 2015)およびSpCas9-VRQR(D1135V/G1218R/R1335Q/T1337R; Kleinstiver and Pattanayak et al., Nature, 2016)と呼ばれるNGAN PAM部位を効率的に標的化することができるSpCas9バリエーションも以前に記載している。しかしながら、これらのバリエーションは、NGAG>NGAA=NGAT>NGACの順で、NGAN PAMのサブクラスへの選好性を有し、すなわち、これらは、NGAC PAM部位に対する準最適な活性を有する。NGAN PAMのSpCas9標的化を潜在的に改善するために、本発明者らは、NGAG、NGAT、NGACおよびNGAA PAMをコードする陽性選択プラスミドに対する上記に記載のSpCas9-XXXXXXライブラリーによる選択を行った(図6A~6Bおよび表3)。NGANバリエーションの再スクリーニングは、クローンが、最初に選択されたNGAN PAM(例、NGAGにおけるvNGAN-1、-2、-17、-26から-30など、NGAIにおけるvNGAN-32、NGACにおけるvNGAN-4、-5、-40、-41など)に対する最も高い活性を有すること、いくつかのバリエーションがNGAN PAM(例、NGAIおよびNGACを標的化することができるvNGAN-20、-21など、またはNGAGおよびNGACを標的化することができるvNGAN-22)の組み合わせを標的化することができること、ならびにいくつかのバリエーションがNGAN PAM(例、vNGAN-3、-13、-25、-31など)のすべてを標的化することができることを明らかにした(図6A~6Bおよび表3)。

#### 【0095】

多数のSpCas9-XXXXXXバリエーションが細菌スクリーニングにおける強いNGAC PAM標的化を明らかにしたので、多くのバリエーションを、本発明者らのヒト発現ベクターにサブクローニングして、本発明者らのヒト細胞U2OS EGFP破壊アッセイにおいて活性を調べた。EGFPにおける単一のNGAA、NGAC、NGATおよびNGAG PAM部位に対するバリエーションのサブセットの初期スクリーニングは、ある特定のバリエーションが、NGAC PAMを保有する部位でSpCas9-VQRよりも潜在的に優れていることを明らかにした(図7A)。図7Aからのバリエーションおよび追加で選択されたバリエーションのより広範囲におよぶ試験は、複数のSpCas9バリエーションが、SpCas9-LRSVRS、-MRARKE、-SRQMRGなどを含む、EGFP破壊アッセイ(図7B)において調べられたNGAC PAMの一部または4つすべてに対するSpCas9-VRQRと比べて活性が改善されていることを明らかにした。

#### 【0096】

次いで、本発明者らは、本発明者らのSpCas9バリエーションの活性を、緩和されたN

G P A M選好性が報告されている x C a s 9 と呼ばれる最近記載された S p C a s 9 P A Mバリエーション (Hu et al., Nature volume 556, pages 57-63 (05 April 2018)) と比較した。本発明者らの以前の結果と一致して、本発明者らは、V R Q Rバリエーション (V S R E Q Rとしても公知) を有する N G A P A Mを有する部位、V R E R (V S R E E Rとしても公知) および M Q K S E Rバリエーションを有する N G C G P A Mを有する部位、ならびに L R S V Q Lバリエーションを有する N G T P A Mを有する部位の安定したヌクレアーゼ標的化 (T 7 E 1 アッセイによって評価された場合に、15 ~ 50 %の間) を観察した (図 8)。しかしながら、x C a s 9バリエーションにより、N G A、N G C Gまたは N G T P A Mを有する部位の標的化は、10 %超の効率を観察されず、さらにまた、本発明者らは、x C a s 9が、野生型 S p C a s 9と比較して、N G G P A Mを有する標的部位で平均で約 2 分の 1 の効果であったことを観察した (図 8)。これらの結果は、本発明者らの S p C a s 9 P A Mバリエーションが、x C a s 9と比較した場合に、いろいろな P A Mに対してより効果的なヌクレアーゼであることを実証する。

【0097】

#### [実施例 2]

正確な単一の塩基編集イベントを行うための能力は、最近、遺伝子操作された S p C a s 9 塩基エディター (B E) コンストラクトを使用して実証され (例えば、Komor et al., Nature. 2016 May 19;533(7603):420-4; Nishida et al., Science. 2016 Sep 16; 353(6305); Kim et al., Nat Biotechnol. 2017 Apr;35(4):371-376; Komor et al., Sci Adv. 2017 Aug 30;3(8):eaao4774; および Gaudelli et al., Nature. 2017 Nov 23;551(7681):464-471を参照されたい)、これは、非標的 DNA 鎖の s s DNA 到達性を引き起こす R ループを形成する S p C a s 9 - g R N A の形成を利用する。したがって、異種性のシチジンまたはアデニンデアミナーゼ酵素ドメインの S p C a s 9 への融合体は、露出した s s DNA 鎖上で作用し得、それぞれ、C から T への変更 (いわゆる、シトシン塩基エディター、または C B E) または A から G への変更 (いわゆる、アデノシン塩基エディター、または A B E) の効率がよい導入をもたらす。細胞の塩基除去修復 (B E R) は、ウラシル塩基を除去するためにウラシル DNA グリコシラーゼ (U D G; ウラシル N - グリコシラーゼまたは U N G としても公知) を利用するので、この内因性プロセスは、シチジン B E によって生成した編集を効率的に元に戻してしまう可能性がある。これは、シチジンの脱アミノ化がウラシル中間体をもたらすからである。したがって、シチジン B E の効率を改善するために、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (U G I) などの異種エフェクタードメインはまた、S p C a s 9 と融合して、U D G を阻害することができ、B E R の開始を覆し、シチジン B E の有効性を増加させる。

【0098】

したがって、本発明者らは、本発明者らの S p C a s 9 P A Mバリエーションの拡大された標的範囲が、以前にアクセス可能ではなかった部位の編集を可能にすることによって、塩基エディターの有用性を改善することができるか否かを決定することを試みた。そうするために、本発明者らは、B E 3 (Komor et al., Nature. 2016 May 19;533(7603):420-4) P A Mバリエーションを構築して、N G A および N G T P A Mを有する部位を認識する能力がある C B E を生成した。本発明者らは、N G A P A Mを有する部位において、C B E - V R Q Rバリエーションが、編集ウィンドウにおいて 7.5 % ~ 64.2 % の間の C から T への変換を示した一方で、x C a s 9 が、同じ部位において 0 % ~ 19.9 % の C から T への編集を示したことを見出した (図 9 A)。同様に、N G T P A Mを有する部位において、C B E - L R S V Q Lバリエーションは、10.8 % ~ 50.3 % の間の C から T への変換を示した一方で、C B E - x C a s 9 が、同じ部位において 0 % ~ 28.5 % の C から T への編集を示した (図 9 A)。本発明者らは、N G G P A Mを有する部位において、野生型 S p C a s 9 (52.5 % ~ 62.4 %) と比較して、C B E - x C a s 9 による C から T への編集活性 (26.7 % ~ 37.2 %) の著しい減少も観察した (図 9 A)。これらの結果は、V R Q R および L R S V Q L の B E 3 バージョンが、それぞれ、x C a s 9 より約 2 倍大きい割合で、N G A および N G T P A Mを有する部位にお

いて、効果的なCBEであることを実証する。

【0099】

次に、本発明者らは、本発明者らのPAMバリエーションのABE(7.10)(Gaudelli et al., Nature. 2017 Nov 23;551(7681):464-471)バージョンを構築して、ヒト細胞におけるAからGへの変換を媒介するABEとしてそれらの有効性を決定した。本発明者らは、ABE-xCas9で観察された0%~12.5%の編集と比較して、NGAPAMを有する部位において、ABE-VRQRによるAからGへの強い編集活性(8.0%~77.3%)を観察した(図9B)。同様に、NGCGPAMを有する部位において、ABE-VRER(0%~75.9%)およびABE-MSQKER(5.4%~90.4%)バリエーションは、またもや、AからGへの編集について、ABE-xCas9(0%~62.3%)より優れていた(図9B)。本発明者らは、NGGPAMを有する部位において、野生型SpCas9(13.9%~50.4%)と比較して、ABE-xCas9によるAからGへの編集の減少(0%~16.9%)も観察した(図9B)。本発明者らの結果は、VRQRのABE(7.10)バージョンが、NGAPAMを有する部位におけるAからGへの編集の媒介に効果的であること、ならびにVRERおよびMSQKERのABE(7.10)バージョンが、NGCGPAMを有する部位において効果的であることを明らかにする。

【0100】

参考文献

【0101】

10

20

30

40

50

## 【表 6 - 1】

1. Sander, J.D. & Joung, J.K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32, 347-355 (2014).
2. Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-1278 (2014).
3. Doudna, J.A. & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096 (2014). 10
4. Barrangou, R. & May, A.P. Unraveling the potential of CRISPR-Cas9 for gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 15, 311-314 (2015).
5. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821 (2012).
6. Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C. & Doudna, J.A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62-67 (2014).
7. Hsu, P.D. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31, 827-832 (2013). 20
8. Tsai, S.Q. et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* 33, 187-197 (2015).
9. Hou, Z. et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013).
10. Fonfara, I. et al. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 42, 2577-2590 (2014). 30
11. Esvelt, K.M. et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods* 10, 1116-1121 (2013).
12. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823 (2013).
13. Horvath, P. et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 190, 1401-1412 (2008). 40

## 【 0 1 0 2 】

## 【表 6 - 2】

- |     |  |    |
|-----|--|----|
| 14. | Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. & Jinek, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. <i>Nature</i> 513, 569-573 (2014).   |    |
| 15. | Reyon, D. et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. <i>Nat Biotechnol</i> 30, 460-465 (2012).  |    |
| 16. | Fu, Y. et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. <i>Nat Biotechnol</i> 31, 822-826 (2013).  | 10 |
| 17. | Chen, Z. & Zhao, H. A highly sensitive selection method for directed evolution of homing endonucleases. <i>Nucleic Acids Res</i> 33, e154 (2005).  |    |
| 18. | Doyon, J.B., Pattanayak, V., Meyer, C.B. & Liu, D.R. Directed evolution and substrate specificity profile of homing endonuclease I-SceI. <i>J Am Chem Soc</i> 128, 2477-2484 (2006).   |    |
| 19. | Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L.A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. <i>Nat Biotechnol</i> 31, 233-239 (2013).   | 20 |
| 20. | Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. <i>Science</i> 339, 823-826 (2013).  |    |
| 21. | Hwang, W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. <i>Nat Biotechnol</i> 31, 227-229 (2013).  |    |
| 22. | Chylinski, K., Le Rhun, A. & Charpentier, E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. <i>RNA Biol</i> 10, 726-737 (2013).  | 30 |
| 23. | Kleinstiver, B.P., Fernandes, A.D., Gloor, G.B. & Edgell, D.R. A unified genetic, computational and experimental framework identifies functionally relevant residues of the homing endonuclease I-BmoI. <i>Nucleic Acids Res</i> 38, 2411-2427 (2010). |    |
| 24. | Gagnon, J.A. et al. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. <i>PLoS One</i> 9, e98186 (2014).  | 40 |

## 【 0 1 0 3 】

## 他の実施形態

本発明をその詳細な説明と関連して記載したが、前述の記載は、説明することを意図するものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、本発明は、添付の特許請求の範囲によって規定されることが理解されるべきである。他の態様、利点および改変は、以下の特許請求の範囲内である。

## 【 0 1 0 4 】

【表 7 - 1】

表 1: NGTN PAM に対する細菌のバリアントの選択結果および活性

試料番号	(NGTN)に対する 最初の選択	以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存:				バリアント名称	バリアントにおけるアミノ酸置換:							
		NGTG	NGTI	NGTC	NGTA		D1135	S1136	G1218	E1219	R1335	T1337		
▼NGTN-1	G	30%	0%	3%	3%	SpCas9-DKVHVR	D	K	V	H	V	R		
▼NGTN-2	G	15%	40%	40%	40%	SpCas9-NRMMRT	N	R	M	M	R	T		
▼NGTN-3	G	100%	40%	40%	10%	SpCas9-ASQLMR	A	S	Q	L	M	R		
▼NGTN-4	G	100%	40%	10%	40%	SpCas9-LRQYTR	L	R	Q	Y	T	R		
▼NGTN-5	G	100%	15%	10%	20%	SpCas9-GCACMR	G	C	A	C	M	R		
▼NGTN-6	G	100%	50%	30%	20%	SpCas9-SRSCMV	S	R	S	C	M	V		
▼NGTN-7	T	100%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LWKIQK	L	W	K	I	Q	K		
▼NGTN-8	T	50%	50%	20%	30%	SpCas9-YSAFCC	Y	S	A	F	C	C		
▼NGTN-9	T	100%	100%	70%	80%	SpCas9-IRAVQL	I	R	A	V	Q	L		
▼NGTN-10	T	100%	80%	70%	60%	SpCas9-SWRVVV	S	W	R	V	V	V		
▼NGTN-11	T	100%	80%	70%	60%	SpCas9-SWKVLK	S	W	K	V	L	K		
▼NGTN-12	T	3%	80%	3%	3%	SpCas9-LWSVGG	L	W	S	V	G	G		
▼NGTN-13	C	-	-	10%	20%	SpCas9-SRAAKW	S	R	A	A	K	W		
▼NGTN-14	C	-	-	10%	10%	SpCas9-RNGWRI	R	N	G	W	R	I		
▼NGTN-15	C	0%	3%	90%	90%	SpCas9-TAHFKV	T	A	H	F	K	V		
▼NGTN-16	C	-	-	80%	80%	SpCas9-MSGVKC	M	S	G	V	K	C		
▼NGTN-17	C	-	-	50%	50%	SpCas9-VMRCKL	V	M	R	C	K	L		
▼NGTN-18	C	-	-	75%	75%	SpCas9-LRSVRS	L	R	S	V	R	S		
▼NGTN-19	A	-	-	n/a	30%	SpCas9-RWNLR	R	W	N	L	R	R		
▼NGTN-20	A	3%	3%	0%	0%	SpCas9-VRCVRC	V	R	C	V	R	C		
▼NGTN-21	A	-	-	20%	20%	SpCas9-GRTSRC	G	R	T	S	R	C		
▼NGTN-22	A	-	-	65%	65%	SpCas9-LKLCRK	L	K	L	C	K	R		
▼NGTN-23	A	-	-	70%	65%	SpCas9-AKLCRT	A	K	L	C	R	T		
▼NGTN-24	A	-	-	75%	100%	SpCas9-SKTLRP	S	K	T	L	R	P		
▼NGTN-25	G	50%	20%	40%	40%	SpCas9-SRRSQR	S	R	R	S	Q	R		
▼NGTN-26	G	50%	20%	40%	50%	SpCas9-DKVHVR	D	K	V	H	V	R		
▼NGTN-27	G	50%	-	-	-	SpCas9-GAKLLR	G	A	K	L	L	R		
▼NGTN-28	T	20%	100%	40%	40%	SpCas9-MWAFGC	M	W	A	F	G	C		
▼NGTN-29	T	-	35%	-	-	SpCas9-GWRVTW	G	W	R	V	T	W		
▼NGTN-30	T	85%	100%	100%	80%	SpCas9-MWVHLN	M	W	V	H	L	N		
▼NGTN-31	C	-	-	100%	85%	SpCas9-TWSMRG	T	W	S	M	R	G		
▼NGTN-32	C	-	-	80%	35%	SpCas9-ISGTKN	I	S	G	T	K	N		
▼NGTN-33	C	-	-	50%	45%	SpCas9-SRAAKW	S	R	A	A	K	W		
▼NGTN-34	A	75%	75%	50%	40%	SpCas9-KCAFFC	K	C	A	F	C	C		

【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

表 1: NGTN PAM に対する細菌のバリアントの選択結果および活性

試料番号		(NGTN)に対する 最初の選択	以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存:				バリアントにおけるアミノ酸置換:									
			NGTG	NGTI	NGTC	NGTA	バリアント名称					D1135	S1136	G1218	E1219	R1335
vNGTN-35	A	-	-	100%	100%	SpCas9-KRRCKV	K	R	R	C	K	R	C	K	V	
vNGTN-36	A	-	-	90%	100%	SpCas9-MWGGRC	M	W	G	G						
vNGTN-37	生成したバリアント	80%	-	5%	3%	SpCas9-VSKLLR	V	S	K	L	L	L	L	L	R	
vNGTN-38	生成したバリアント	90%	20%	10%	10%	SpCas9-VRKLLR	V	R	K	L	L	L	L	L	R	
vNGTN-27*	G	75%	-	-	-	SpCas9-GAKLLR	G	A	K	L	L	L	L	L	R	
vNGTN-39	生成したバリアント	50%	95%	5%	2%	SpCas9-VSAVQL	V	S	A	V	Q	L	L	L	R	
vNGTN-40	生成したバリアント	90%	95%	95%	50%	SpCas9-VRAVQL	V	R	A	V	Q	L	L	L	R	
vNGTN-9*	T	90%	95%	95%	90%	SpCas9-IRAVQL	I	R	A	V	Q	L	L	L	R	
vNGTN-41	生成したバリアント	-	-	95%	90%	SpCas9-VSSVRS	V	S	S	V	R	S	S	S	S	
vNGTN-42	生成したバリアント	-	-	95%	90%	SpCas9-VRSVRS	V	R	S	V	R	S	S	S	S	
vNGTN-18*	C	-	-	100%	95%	SpCas9-LRSVRS	L	R	S	V	R	S	S	S	S	
vNGTN-43	N/A	-	-	-	-	SpCas9-SRGERT	S	R	G	E	R	T				
vNGTN-44	N/A	80%	35%	100%	90%	SpCas9-SRMHCK	S	R	M	H	C	K				
vNGTN-45	生成したバリアント					SpCas9-GRKIQK	G	R	K	I	Q	K				
vNGTN-46	生成したバリアント					SpCas9-GWKLLR	G	W	K	L	L	R				
vNGTN-47	生成したバリアント					SpCas9-GWKOQK	G	W	K	Q	Q	K				
vNGTN-48	生成したバリアント					SpCas9-VAKLLR	V	A	K	L	L	R				
vNGTN-49	生成したバリアント					SpCas9-VAKIQK	V	A	K	I	Q	K				
vNGTN-50	生成したバリアント					SpCas9-VAKILR	V	A	K	I	L	R				
vNGTN-51	生成したバリアント					SpCas9-GRKILR	G	R	K	I	L	R				
vNGTN-52	生成したバリアント	-	-	100%	90%	SpCas9-VRKLRS	V	R	K	L	R	S				
vNGTN-38	生成したバリアント	100%	85%	60%	50%	SpCas9-VRKLLR	V	R	K	L	L	R				
vNGTN-53	生成したバリアント	100%	100%	100%	100%	SpCas9-LRSVQL	L	R	S	V	Q	L				
vNGTN-18	C	-	1%	100%	100%	SpCas9-LRSVRS	L	R	S	V	R	S				
vNGTN-54	生成したバリアント	-	5%	100%	100%	SpCas9-IRAVRS	I	R	A	V	R	S				
vNGTN-55	T	100%	100%	95%	95%	SpCas9-IRAVQL	I	R	A	V	Q	L				
vNGTN-56	生成したバリアント	-	-	50%	50%	SpCas9-VRKLKR	V	R	K	L	K	R				
vNGTN-38	生成したバリアント	100%	50%	25%	25%	SpCas9-VRKLLR	V	R	K	L	L	R				
vNGTN-57	生成したバリアント	-	-	100%	100%	SpCas9-SRSVRS	S	R	S	V	R	S				
vNGTN-18	C	-	-	95%	90%	SpCas9-LRSVRS	L	R	S	V	R	S				
vNGTN-58	生成したバリアント	100%	85%	100%	100%	SpCas9-VRKIQK	V	R	K	I	Q	K				
vNGTN-7*	T	100%	85%	100%	100%	SpCas9-LWKIQK	L	W	K	I	Q	K				
vNGTN-59	生成したバリアント	100%	85%	100%	100%	SpCas9-VRMHCK	V	R	M	H	C	K				
vNGTN-44*	N/A	100%	60%	100%	95%	SpCas9-SRMHCK	S	R	M	H	C	K				
vNGTN-61	生成したバリアント	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-GRKLLR	G	R	K	L	L	R				
vNGTN-62	生成したバリアント	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LRKIQK	L	R	K	I	Q	K				

【 0 1 0 6 】

10

20

30

40

50

【 表 7 - 3 】

表 1: NGTN PAM に対する細菌のバリアントの選択結果および活性													
試料番号	(NGTN)に対する 最初の選択	以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存:				バリアント名称	バリアントにおけるアミノ酸置換:						
		NGTG	NGTI	NGTC	NGTA		D1135	S1136	G1218	E1219	R1335	T1337	
VNGTN-63	生成したバリアント	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LRSVQK	L	R	S	V	Q	K	
VNGTN-64	生成したバリアント	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-VRKIQK	V	R	K	I	Q	K	
VNGTN-65	生成したバリアント	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-GRSVQL	G	R	S	V	Q	L	
VNGTN-66	生成したバリアント	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-GRKIQL	G	R	K	I	Q	L	
*=他の実験において既にスクリーニングされたバリアントのもの													
n/a=生存はその PAM に対するその実験で評価されなかった													

【表 8 - 1】

表 2: NGCN PAM に対する細菌のバリアントの選択結果および活性												
試料番号	(NGCN)に対する 最初の選択	以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存:				バリアント名称	バリアントにおけるアミノ酸置換:					
		NGCG	NGCT	NGCC	NGCA		D1135	S1136	G1218	E1219	R1335	T1337
vNGCN-1	G	100%	100%	100%	100%	SpCas9-VMQAYG	W	M	Q	A	Y	G
vNGCN-2	G	100%	100%	100%	n/a	SpCas9-MQKSER	M	Q	K	S	E	R
vNGCN-3	G	100%	-	-	40%	SpCas9-YSV CER	Y	S	V	C	E	R
vNGCN-4	T	90%	85%	90%	95%	SpCas9-CWNWNS	C	W	N	W	N	S
vNGCN-5	T	100%	100%	100%	100%	SpCas9-LWRSEY	L	W	R	S	E	Y
vNGCN-6	T	-	95%	95%	100%	SpCas9-QSTW NK	Q	S	T	W	N	K
vNGCN-7	C	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LFEWRA	L	F	E	W	R	A
vNGCN-8	C	-	-	100%	-	SpCas9-SQSWRS	S	Q	S	W	R	S
vNGCN-9	C	-	-	100%	-	SpCas9-LKAWRS	L	K	A	W	R	S
vNGCN-10	A	-	100%	100%	100%	SpCas9-LWGWQH	L	W	G	W	Q	H
vNGCN-11	A	-	15%	15%	95%	SpCas9-LSYWAK	L	S	Y	W	A	K
vNGCN-12	A	50%	10%	20%	95%	SpCas9-RQMYQG	R	Q	M	Y	Q	G
vNGCN-13	生成したバリアント	-	-	-	-	SpCas9-LWREER	L	W	R	E	E	R
vNGCN-14	生成したバリアント	100%	5%	10%	20%	SpCas9-VSSWER	V	S	S	W	E	R
vNGCN-15	生成したバリアント	100%	3%	5%	15%	SpCas9-VSAWER	V	S	A	W	E	R
vNGCN-16	生成したバリアント	-	-	-	-	SpCas9-DWREER	D	W	R	E	E	R
vNGCN-17	生成したバリアント	100%	-	-	-	SpCas9-VSGWER	V	S	G	W	E	R
vNGCN-18	G	100%	100%	100%	100%	SpCas9-MCSFER	M	C	S	F	E	R
vNGCN-19	G	100%	-	-	25%	SpCas9-VLMYER	V	L	M	Y	E	R
vNGCN-20	G	100%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-QGANER	Q	G	A	N	E	R
vNGCN-21	G	100%	50%	15%	50%	SpCas9-GCACER	G	C	A	C	E	R
vNGCN-22	G	100%	-	-	5%	SpCas9-SRIAER	S	R	I	A	E	R

【 0 1 0 8 】

10

20

30

40

50

【 表 8 - 2 】

表 2: NGCN PAM に対する細菌のバリアントの選択結果および活性

試料番号	(NGCN)に対する 最初の選択	(以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存)				バリアント名称	バリアントにおけるアミノ酸置換:							
		NGCG	NGCI	NGCC	NGCA		D1135	S1136	G1218	E1219	R1335	T1337		
vNGCN-23	G	100%	-	-	25%	SpCas9-SRRNER	S	R	R	N	E	R		
vNGCN-10*	T	-	100%	90%	100%	SpCas9-LWGWQH	L	W	G	W	Q	H		
vNGCN-24	T	-	5%	-	-	SpCas9-WMQAVV	W	M	Q	A	V	V		
vNGCN-25	T	-	100%	-	75%	SpCas9-AYRWSK	A	Y	R	W	S	K		
vNGCN-26	T	100%	100%	30%	65%	SpCas9-LWMREQ	L	W	M	R	E	Q		
vNGCN-27	T	-	100%	5%	50%	SpCas9-LWRVVA	L	W	R	V	V	A		
vNGCN-28	T	100%	100%	n/a	75%	SpCas9-HSSWVR	H	S	S	W	V	R		
vNGCN-29	C	100%	100%	100%	85%	SpCas9-MWSEPT	M	W	S	E	P	T		
vNGCN-30	C	100%	100%	50%	80%	SpCas9-GWSMQR	G	W	S	M	Q	R		
vNGCN-31	C	-	n/a	75%	-	SpCas9-NKAWRV	N	K	A	W	R	V		
vNGCN-32	C	75%	-	95%	50%	SpCas9-LCTYEY	L	C	T	Y	E	Y		
vNGCN-33	C	80%	5%	50%	50%	SpCas9-GSNWCK	G	S	N	W	C	K		
vNGCN-34	C	85%	50%	90%	100%	SpCas9-GSNYQS	G	S	N	Y	Q	S		
vNGCN-35	A	n/a	50%	25%	90%	SpCas9-FMQWVN	F	M	Q	W	V	N		
vNGCN-36	A	40%	50%	75%	100%	SpCas9-YCSWVG	Y	C	S	W	V	G		
vNGCN-37	A	50%	-	25%	85%	SpCas9-LWKFEF	L	W	K	F	E	G		
vNGCN-38	A	25%	35%	5%	100%	SpCas9-MCAWCG	M	C	A	W	C	G		
vNGCN-39	A	50%	-	50%	50%	SpCas9-GKNWNR	G	K	N	W	N	R		
vNGCN-2*	A	100%	25%	25%	75%	SpCas9-MQKSER	M	Q	K	S	E	R		
vNGCN-40	生成したバリアント	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-VRREER	V	R	R	E	E	R		
vNGCN-41	A	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-AARWCQ	A	A	R	W	C	Q		
vNGCN-42	A	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LWLETR	L	W	L	E	T	R		
vNGCN-43	A	n/a	n/a	n/a	85%	SpCas9-FMQWVR	F	M	Q	W	V	R		
vNGCN-44	A	n/a	n/a	n/a	75%	SpCas9-SSKWPA	S	S	K	W	P	A		
vNGCN-45	C	n/a	n/a	50%	n/a	SpCas9-MWASEG	M	W	A	S	E	G		
vNGCN-46	A	n/a	n/a	n/a	100%	SpCas9-LSRWQR	L	S	R	W	Q	R		
vNGCN-47	G	90%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-YAIYER	Y	A	I	Y	E	R		
vNGCN-48	G	75%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-ICCCER	I	C	C	Y	E	R		
vNGCN-49	G	95%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-DWFEYER	D	W	F	Y	E	R		
vNGCN-50	G	80%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-REATER	R	E	A	T	E	R		
vNGCN-51	G	75%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-GWAYER	G	W	A	Y	E	R		
vNGCN-52	G	75%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-YAIYER	Y	A	I	Y	E	R		
vNGCN-53	G	85%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LSVSEER	L	S	V	S	E	R		
vNGCN-54	A	n/a	n/a	n/a	75%	SpCas9-VRAWCR	V	R	A	W	C	R		
vNGCN-55	G	75%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-KWREQR	K	W	R	E	Q	R		
vNGCN-56	G	75%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-ARGAER	A	R	G	A	E	R		

【 0 1 0 9 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

表 2: NGCN PAM に対する細菌のバリエーションの選択結果および活性													
試料番号	(NGCN)に対する 最初の選択	以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存:				バリエーション名称	バリエーションにおけるアミノ酸置換:						
		NGCG	NGCI	NGCC	NGCA		D1135	S1136	G1218	E1219	R1335	T1337	
VNGCN-57	C	n/a	n/a	75%	n/a	SpCas9-HASWCK	H	A	S	W	C	K	
VNGCN-58	G	100%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-YVRSER	Y	V	R	S	E	R	
VNGCN-59	G	80%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-QRLAER	Q	R	L	A	E	R	
VNGCN-60	A	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-AARWER	A	A	R	W	E	R	
VNGCN-61	G	75%	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LILSER	L	I	L	S	E	R	
VNGCN-62	A	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LWPSRG	L	W	P	S	R	G	
VNGCN-63	A	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LWTWIK	L	W	T	W	I	K	
VNGCN-64	生成したバリエーション	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-VRKSER	V	R	K	S	E	R	
VNGCN-65	生成したバリエーション	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-ICKSER	I	C	K	S	E	R	
VNGCN-66	C/T	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-MQSVQL	M	Q	S	V	Q	L	
VNGCN-67	生成したバリエーション	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LRSVER	L	R	S	V	E	R	
VNGCN-68	生成したバリエーション	n/a	n/a	n/a	n/a	SpCas9-LSRWER	L	S	R	W	E	R	

\*=他の実験において既にスクリーニングされたバリエーションのもの  
n/a=生存はその PAM に対するその実験で評価されなかった

【 0 1 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

表 3: NGAN PAM に対する細菌のバリアントの選択結果および活性

試料番号	(NGAN)に対する 最初の選択	以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存:					バリアントにおけるアミノ酸置換:							
		NGAG NGAI NGAC NGAA					バリアント名称							
		NGAG	NGAI	NGAC	NGAA		D1135	S1136	G1218	E1219	R1335	T1337		
vNGAN-1	G	100%	10%	5%	1%		L	R	L	S	A	R		
vNGAN-2	G	100%	-	1%	-		A	S	E	V	T	R		
vNGAN-3	T	100%	100%	95%	90%		K	W	M	M	C	G		
vNGAN-4	C	-	-	100%	-		V	R	G	A	K	E		
vNGAN-5	C	-	-	100%	-		M	R	A	R	K	E		
vNGAN-6	G	75%	-	-	-		A	E	E	Q	Q	R		
vNGAN-7	A	95%	5%	-	80%		T	R	G	S	F	R		
vNGAN-8	A	95%	10%	90%	90%		V	R	N	Y	T	K		
vNGAN-9	T	100%	100%	95%	95%		A	W	N	F	Q	V		
vNGAN-10	A	100%	35%	-	20%		W	M	R	K	V	A		
vNGAN-11	A	40%	100%	-	75%		C	W	T	C	L	Q		
vNGAN-12	A	100%	100%	5%	75%		L	W	T	T	L	N		

【 0 1 1 1 1】

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

表 3: NGAN PAM に対する細菌のバリアントの選択結果および活性

試料番号	(NGAN)に対する 最初の選択	以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存:				バリアント名称	バリアントにおけるアミノ酸置換:							
		NGAG	NGAI	NGAC	NGAA		D1135	S1136	G1218	E1219	R1335	T1337		
vNGAN-13	G	100%	95%	95%	95%	SpCas9-SRMHCK	S	R	M	H	C	K		
vNGAN-14	T	100%	100%	95%	95%	SpCas9-CWCQCVR	C	W	C	Q	C	V		
vNGAN-15	T	100%	5%	-	10%	SpCas9-GCLCVR	G	C	L	C	V	R		
vNGAN-16	C	100%	50%	-	-	SpCas9-GGCQLR	G	G	C	Q	L	R		
vNGAN-17	G	100%	-	-	-	SpCas9-AEEQQR	A	E	E	Q	Q	R		
vNGAN-18	G	90%	100%	10%	25%	SpCas9-QNNQVF	Q	N	N	Q	V	F		
vNGAN-19	T	100%	100%	-	100%	SpCas9-GWEKVR	G	W	E	K	V	R		
vNGAN-20	T	1%	100%	50%	-	SpCas9-NRAVNG	N	R	A	V	N	G		
vNGAN-21	T	1%	100%	50%	-	SpCas9-NRAVNG	N	R	A	V	N	G		
vNGAN-22	C	100%	1%	100%	-	SpCas9-SRQMRG	S	R	Q	M	R	G		
vNGAN-23	C	-	-	-	-	SpCas9-RAQPNL	R	A	Q	P	N	L		
vNGAN-24	A	50%	5%	-	100%	SpCas9-LRSYLH	L	R	S	Y	L	H		
vNGAN-25	G	100%	95%	100%	90%	SpCas9-SRMHCK	S	R	M	H	C	K		
vNGAN-26	G	100%	-	-	-	SpCas9-ACTSVR	A	C	T	S	V	R		
vNGAN-27	G	100%	-	-	-	SpCas9-MVVHIR	M	V	V	H	I	R		
vNGAN-28	G	100%	-	-	-	SpCas9-VRGNRR	V	R	G	N	N	R		
vNGAN-29	G	100%	-	-	-	SpCas9-RGFCLR	R	G	F	C	L	R		
vNGAN-30	G	100%	-	-	-	SpCas9-VQDAQR	V	Q	D	A	Q	R		
vNGAN-31	T	100%	100%	95%	95%	SpCas9-GWRQSK	G	W	R	Q	S	K		
vNGAN-32	T	5%	100%	-	-	SpCas9-AWLCLS	A	W	L	C	L	S		
vNGAN-33	T	100%	100%	-	100%	SpCas9-KWARVV	K	W	A	R	V	V		
vNGAN-34	T	80%	100%	20%	15%	SpCas9-LAAQTP	L	A	A	Q	T	P		
vNGAN-35	T	95%	100%	10%	90%	SpCas9-GWNHLQ	G	W	N	H	L	Q		
vNGAN-36	T	100%	100%	100%	5%	SpCas9-MWAAAP	M	W	A	A	P	P		
vNGAN-37	C	95%	100%	50%	30%	SpCas9-KWRCTG	K	W	R	C	T	G		
vNGAN-38	C	50%	-	100%	-	SpCas9-LAKARP	L	A	K	A	R	P		
vNGAN-39	C	100%	100%	100%	30%	SpCas9-SRMHCK	S	R	M	H	C	K		
vNGAN-40	C	-	-	100%	-	SpCas9-VKMAKG	V	K	M	A	K	G		
vNGAN-41	C	-	-	100%	-	SpCas9-QRKTRE	Q	R	K	T	R	E		
vNGAN-42	C	-	-	50%	-	SpCas9-NTAVKQ	N	T	A	V	K	Q		
vNGAN-43	A	100%	100%	50%	100%	SpCas9-LCRQQR	L	C	R	Q	Q	R		
vNGAN-44	A	100%	90%	100%	100%	SpCas9-CWSHQR	C	W	S	H	Q	R		
vNGAN-45	A	30%	90%	25%	100%	SpCas9-MWVHLN	M	W	V	H	L	N		
vNGAN-46	A	100%	100%	25%	100%	SpCas9-SRTHTQ	S	R	T	H	T	Q		
vNGAN-47	A	100%	50%	-	100%	SpCas9-LQKSMR	L	Q	K	S	M	R		
vNGAN-48	A	100%	100%	-	90%	SpCas9-LWEVIR	L	W	E	V	I	R		

【表 9 - 3】

表 3: NGAN PAM に対する細菌のバリアントの選択結果および活性

試料番号	(NGAN)に対する 最初の選択	以下に対する細菌アッセイ におけるおおよその生存:				バリアントにおけるアミノ酸置換:						
		NGAG	NGAI	NGAC	NGAA	バリアント名称	D1135	S1136	G1218	E1219	R1335	T1337
vNGTN-37	生成したバリアント	20%	-	-	-	SpCas9-VSKLLR	V	S	K	L	L	R
vNGTN-38	生成したバリアント	50%	-	-	-	SpCas9-VRKLLR	V	R	K	L	L	R
vNGTN-27*	NGTG	10%	-	-	-	SpCas9-GAKLLR	G	A	K	L	L	R
vNGTN-39	生成したバリアント	-	-	-	-	SpCas9-VSAVQL	V	S	A	V	Q	L
vNGTN-40	生成したバリアント	1%	-	-	-	SpCas9-VRAVQL	V	R	A	V	Q	L
vNGTN-9*	NGTT	5%	-	1%	-	SpCas9-IRAVQL	I	R	A	V	Q	L
vNGTN-41	生成したバリアント	1%	-	100%	-	SpCas9-VSSVRS	V	S	S	V	R	S
vNGTN-42	生成したバリアント	25%	-	100%	-	SpCas9-VRSVRS	V	R	S	V	R	S
vNGTN-18*	NGTC	25%	-	100%	-	SpCas9-LRSVRS	L	R	S	V	R	S
vNGTN-43	N/A	50%	-	-	1%	SpCas9-SRGERT	S	R	G	E	R	T
vNGTN-44	N/A	90%	80%	n/a	50%	SpCas9-SRMHCK	S	R	M	H	C	K
vNGTN-52	生成したバリアント	60%	-	75%	-	SpCas9-VRKLRS	V	R	K	L	R	S
vNGTN-38*	生成したバリアント	60%	-	-	-	SpCas9-VRKLLR	V	R	K	L	L	R
vNGTN-53	生成したバリアント	15%	5%	10%	1%	SpCas9-LRSVQL	L	R	S	V	Q	L
vNGTN-18*	NGTC	50%	5%	100%	-	SpCas9-LRSVRS	L	R	S	V	R	S
vNGTN-54	生成したバリアント	50%	5%	100%	-	SpCas9-IRAVRS	I	R	A	V	R	S
vNGTN-55	NGTT	5%	1%	1%	-	SpCas9-IRAVQL	I	R	A	V	Q	L
vNGTN-56	生成したバリアント	5%	-	35%	-	SpCas9-VRKLKR	V	R	K	L	K	R
vNGTN-38*	生成したバリアント	35%	-	-	-	SpCas9-VRKLLR	V	R	K	L	L	R
vNGTN-57	生成したバリアント	20%	-	100%	-	SpCas9-SRSVRS	S	R	S	V	R	S
vNGTN-18*	NGTC	25%	-	100%	-	SpCas9-LRSVRS	L	R	S	V	R	S
vNGTN-58	生成したバリアント	85%	5%	95%	25%	SpCas9-VRKIQK	V	R	K	I	Q	K
vNGTN-7*	NGTT	85%	100%	100%	95%	SpCas9-LWKIQK	L	W	K	I	Q	K
vNGTN-59	生成したバリアント	95%	100%	100%	90%	SpCas9-VRMHCK	V	R	M	H	C	K
vNGTN-44*	N/A	85%	90%	100%	75%	SpCas9-SRMHCK	S	R	M	H	C	K

\* = 他の実験において既にスクリーニングされたバリアントのもの

n/a = 生存はその PAM に対するその実験で評価されなかった

10

20

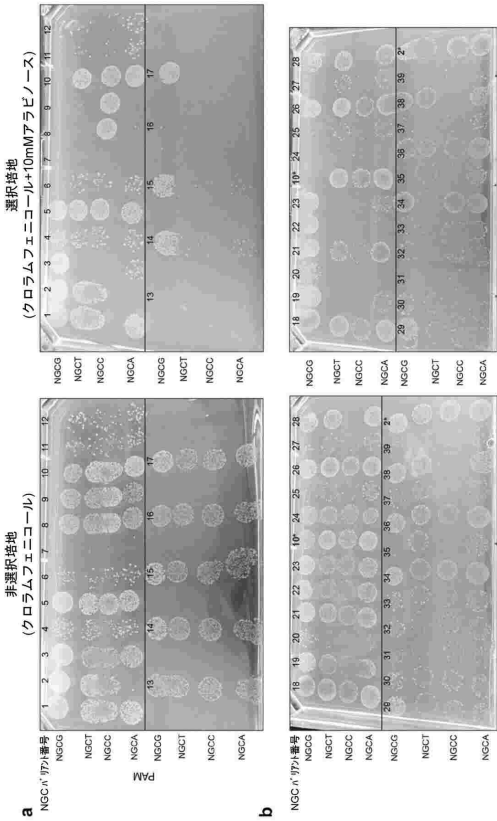
30

40

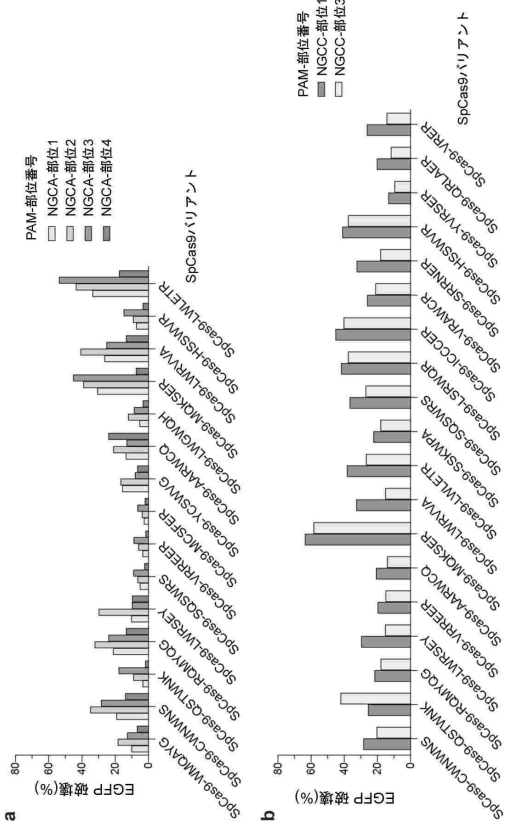
50



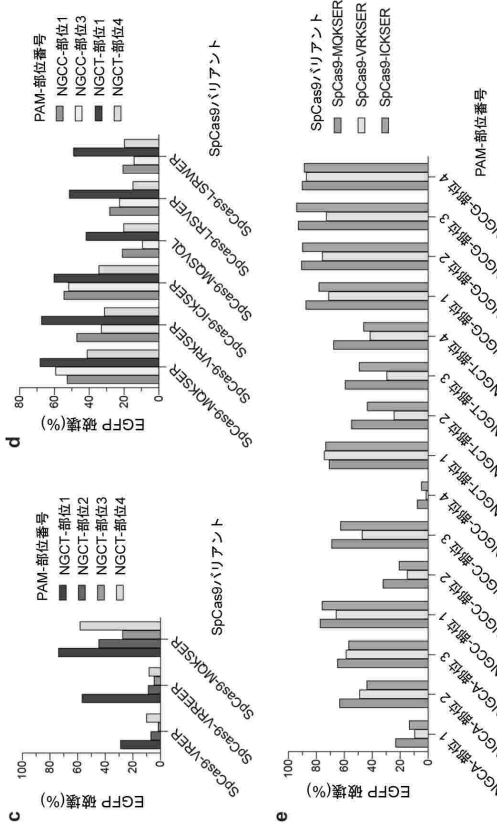
【図 4】



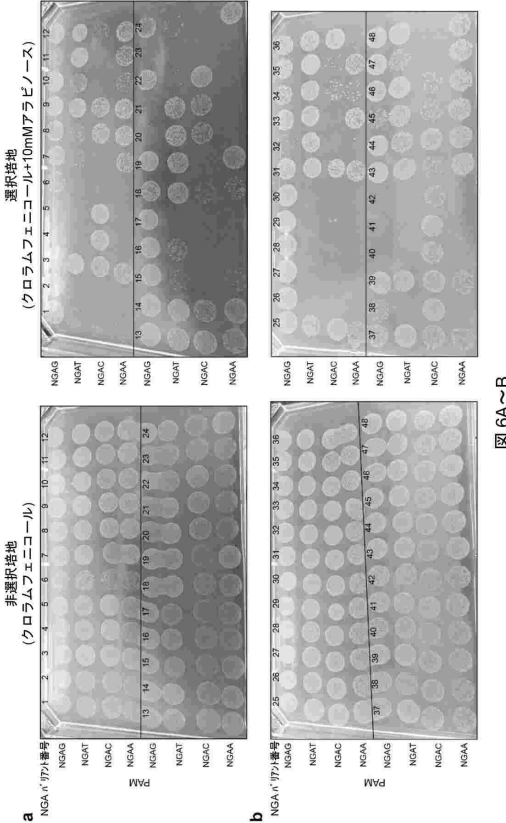
【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



【図 6】



10

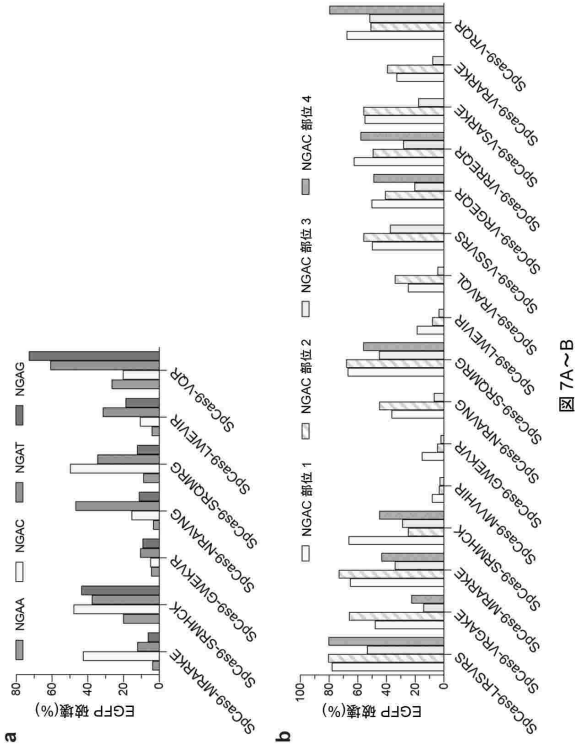
20

30

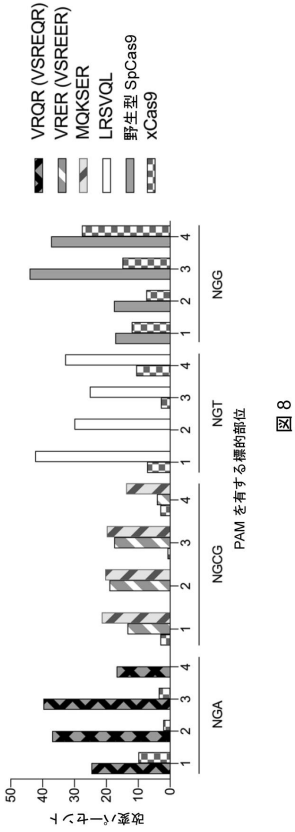
40

50

【図 7】



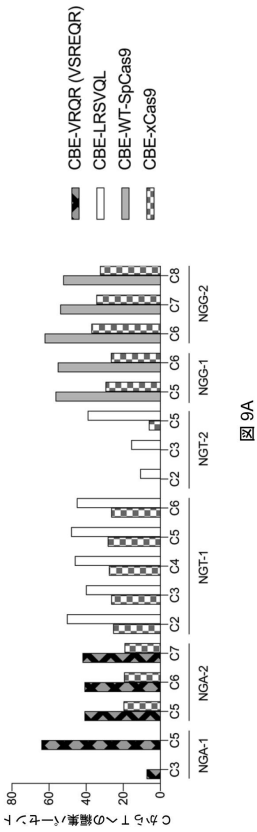
【図 8】



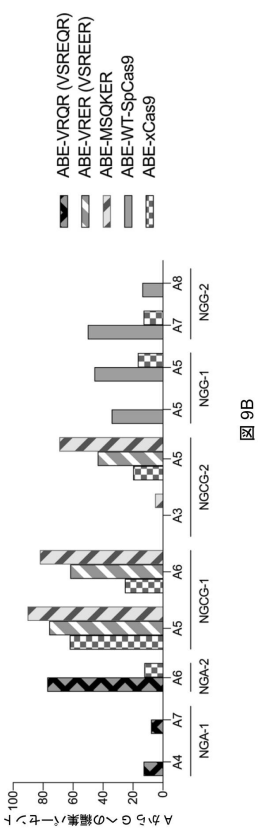
10

20

【図 9 - 1】



【図 9 - 2】



30

40

50

【配列表】  
0007581046000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54	
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N 5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735	
C 1 2 N 5/0775(2010.01)	C 1 2 N	5/0775	
C 1 2 N 5/074(2010.01)	C 1 2 N	5/074	
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

セッツ州, ウィンチェスター, マグノリア ウェイ 1

(72)発明者 クラインスティーパー, ベンジャミン

アメリカ合衆国 0 2 1 5 5 マサチューセッツ州, メッドフォード, フォース ストリート 9 3

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 0 6 3 3 ( W O , A 1 )

Kleinstiver BP, et al. , Broadening the targeting range of Staphylococcus aureus CRISPR-Cas 9 by modifying PAM recognition , Nat Biotechnol. , 33(12) , 2015年12月 , pp.1293-1298

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

R E G I S T R Y / C A P L U S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

G e n B a n k / E M B L / G e n e s e q

U n i p r o t / G e n e s e q