(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7125895号
(P7125895)

(45)発行日　令和4年8月25日(2022.8.25)

(24)登録日　令和4年8月17日(2022.8.17)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/10 (2006.01)		C12N	15/10	Z
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	
C12N 15/64 (2006.01)		C12N	15/64	Z
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12N 5/078(2010.01)		C12N	5/078	

請求項の数　54　（全94頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-535834(P2018-535834)
(86)(22)出願日　平成28年12月30日(2016.12.30)
(65)公表番号　特表2019-500885(P2019-500885A)
(43)公表日　平成31年1月17日(2019.1.17)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/082942
(87)国際公開番号　WO2017/118598
(87)国際公開日　平成29年7月13日(2017.7.13)
審査請求日　令和1年12月11日(2019.12.11)
(31)優先権主張番号　1600417.8
(32)優先日　平成28年1月10日(2016.1.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(73)特許権者　517386055
エスエヌアイピーアール・テクノロジーズ・リミテッド
ＳＮＩＰＲ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ ＬＩＭＩＴＥＤ
英国イーシー１ブイ・２エヌエックス、ロンドン、シティ・ロード１５２番、ケンプ・ハウス
(74)代理人　100173185
弁理士　森田 裕
(74)代理人　100162503
弁理士　今野 智介
(74)代理人　100204582
弁理士　大栗 由美
(72)発明者　ジャスパー・クルーブ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　インサイチュー（ｉｎ ｓｉｔｕ）における組換え誘導性核酸鎖

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ドナー核酸鎖から、核酸配列を取り込む（retrieving）方法であって、

（ａ）第１の核酸鎖（first nucleic acid strand）を含む核酸ベクターを用意することであり、第１の鎖が、

ｉ．鎖間の相同組換え（homologous recombination）のための、ドナー鎖（donor strand）の第１のヌクレオチド配列（first nucleotide sequence）（ＮＳ１）と相同な、第１の相同アーム（homology arm）（ＨＡ１）と；

ｉｉ．鎖間の相同組換えのための、ドナー鎖の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

ｉｉｉ．ＨＡ１の３’末端を、ＨＡ２の５’末端へと接続する、介在ヌクレオチド配列（intervening nucleotide sequence）とを含み、

ＨＡ１が、第１の鎖内のＨＡ２に対して５’側にあり；ＮＳ１が、ドナー鎖内のＮＳ２の３’側にあり、ドナー鎖が、ＮＳ１とＮＳ２との間に、取込み配列（retrieval sequence）（ＲＳ）を含むことと；

（ｂ）第１の鎖を、ドナー鎖と組み合わせることと；

（ｃ）ＨＡ１の５’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の５’側にフランキングする（flanking）第１の鎖の第１の切断部位（first cut site）（ＣＳ１）の、ヌクレアーゼによる切断；および／またはＨＡ２の３’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の３’側にフランキングする第１の鎖の第２の切断部位（ＣＳ２）の、ヌクレアーゼによる切断

することと；
工程（ｂ）および（ｃ）を、任意の順序において、または同時に実行することと；および
（ｄ）切断された第１の鎖の、ドナー鎖との相同組換えを実行し、これにより、第１の鎖のギャップ修復が、ＲＳを、ＨＡ１とＨＡ２との間に取り込んだベクターを作製することとを含む方法。
【請求項２】
（ｅ）ベクターまたはそのＲＳ配列を単離またはシーケンシングすることをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
工程（ｄ）の生成物（product）が、環状ベクターである、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
工程（ｂ）～（ｄ）を、宿主細胞内で実施する、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
ベクターが、工程（ａ）において、環状であり、環状ベクターを、工程（ｂ）における細胞へと導入する、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
ベクターが、ＢＡＣ、ＹＡＣ、ＰＡＣ、コスミド、またはプラスミドである、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
それぞれの切断部位モチーフを使用して、工程（ｃ）の前記各切断を方向付け、前記各モチーフを、相同組換えにより破壊する、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
ドナー鎖が、細胞の染色体またはエピソームの鎖である、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
ＲＳが、少なくとも１０ｋｂの長さである、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
ヌクレアーゼによる切断が、Ｃａｓによる切断、メガヌクレアーゼによる切断、亜鉛フィンガータンパク質媒介型切断、またはＴＡＬＥＮ媒介型切断である、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記切断がＣａｓヌクレアーゼによる切断であり、工程（ａ）において、ベクターが、
Ａ．ＣＳ１を含む、第１のプロトスペーサー配列（first protospacer sequence）（ＰＳ１）と；
Ｂ．ＰＳ１の３’末端と隣接する第１のＰＡＭ（Ｐ１）と；
Ｃ．ＨＡ１と
を含み（５’～３’方向に）；
ＰＳ１のシード配列（seed sequence）（Ｓ１）が、ＣＳ１を、Ｐ１へと接続し、工程（ａ）において、ベクターが、
Ｄ．ＨＡ２と；
Ｅ．ＣＳ２を含む、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）と；
Ｆ．ＰＳ２の３’末端と隣接する第２のＰＡＭ（Ｐ２）とを含み（５’～３’方向に）；
ＰＳ２のシード配列（Ｓ２）が、ＣＳ２を、Ｐ２へと接続する、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
ＨＡ１が、Ｓ１およびＰ１を含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】

ＰＳ２の残余が、ＨＡ２の３’末端にある、請求項１１または１２に記載の方法。
【請求項１４】
工程（ｃ）において、同じガイドＲＮＡ（guide RNA）（ｇＲＮＡ１）を使用して、Ｃａｓによる、ＣＳ１およびＣＳ２の切断をガイドする、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
工程（ｄ）の前に、または工程（ｄ）中に、ドナー鎖を、ＮＳ２の５’末端において、もしくは前記末端の５’側にフランキングして切断し；かつ／またはＮＳ１の３’末端において、もしくは前記末端の３’側にフランキングして切断する、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
生成物ベクターの前記ＲＳの全部または一部を、さらなる核酸鎖へと挿入することをさらに含む、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記さらなる鎖（further strand）との相同組換えにおいて、ＨＡ１および／またはＨＡ２を使用して、ＲＳ配列を、さらなる鎖へと挿入する、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
さらなる鎖が、細胞に含まれ、工程（ｄ）のベクター生成物を、前記相同組換えの前に、細胞へと挿入する、請求項１６または１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記さらなる鎖が、胚性幹細胞または免疫細胞に含まれる、請求項１６～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
幹細胞生成物を、組織または非ヒト生物へと発生させることを含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
さらなる鎖の突然変異を、ＲＳの、さらなる鎖への前記挿入により除去する、請求項１６～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
さらなる鎖生成物または前記生成物中のＲＳを、単離またはシーケンシングすることを含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
インビトロの標的ヒト細胞において、遺伝子の突然変異を補正するための、請求項１６～２２のいずれか１項に記載の方法であって、標的細胞が、前記さらなる鎖を含み、さらなる鎖が、前記遺伝子の突然変異を含み、
（ｉ）第２のヒト細胞を得、請求項１から１５のいずれか１項に記載の方法を、第２の細胞内部において実行することであり、工程（ｄ）の生成物ベクター内のＲＳが、前記遺伝子欠損を含むことと；
（ｉｉ）遺伝子操作を使用して、欠損を補正し、これにより、補正されたＲＳ配列を含む生成物ベクターを作製することと；
（ｉｉｉ）補正されたＲＳ配列を、補正されていない標的細胞へと挿入することであり、補正されたＲＳ配列が、補正されていないＲＳ配列を補充するかまたは置きかえ、これにより、補正された標的細胞を作製することとを含む、方法。
【請求項２４】
（ｉｖ）補正された細胞を培養するか、または組織を、補正された細胞もしくはその後代から発生させることをさらに含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
標的細胞内の、補正されていないＲＳ配列の、補正されたＲＳ配列にフランキングするＨＡ１および／またはＨＡ２による相同組換えを使用し、これにより、補正されていないＲＳ配列を置きかえる、請求項２３または２４に記載の方法。

【請求項２６】
補正されていないＲＳ配列と、補正されたＲＳ配列とが、補正された突然変異だけにより異なっている、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
工程（ｉｉｉ）において、補正された閉環状生成物ベクターを、標的細胞または後代へと挿入する、請求項２３～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
補正されたＲＳが、少なくとも１０ｋｂの長さである、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
細胞が、同じヒト対象の細胞である、請求項２３～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
細胞が、同じ細胞型である、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）を作製するための、請求項１～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
工程（ｂ）および／または（ｄ）において、ベクターが、閉環状ベクター（closed circular vector）である、請求項１～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
工程（ｂ）において、ベクターが、スーパーコイル状である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
ＨＡ１とＨＡ２との間の配列を、第１の鎖から欠失させ、かつ／またはＮＳ１とＮＳ２との間の配列を、ドナー鎖から欠失させる、請求項１～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
ＲＳを、ドナー鎖から欠失させる、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記切断が、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断（cutting by a Cas nuclease）であり、ＨＡ１の５’末端におけるプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ、または前記末端の５’側にフランキングするプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せを、工程（ｄ）により破壊し、これにより、ＰＳ１を、第１の鎖内で、非機能的とする、および／またはＨＡ２の３’末端におけるプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ、または前記末端の３’側にフランキングするプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せを、工程（ｄ）により破壊し、これにより、ＰＳ２を、第１の鎖内で、非機能的とする、請求項１～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
ドナー配列を、第１の鎖へと挿入し、かつ／または配列を、第１の鎖から欠失させて、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたは新たなマーカー配列を形成する、請求項１～３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
工程（ｄ）の後、新たな組合せのプロトスペーサーのＣａｓによる切断を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
その後に、さらなる配列の第１の鎖への挿入を含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
ドナー配列を、ドナー鎖から欠失させて、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたは新たなマーカー配列を形成する、請求項１～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
工程（ｄ）の後のドナー鎖において、新たな組合せのプロトスペーサーのＣａｓによる切断を含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】

その後に、さらなる配列の、ドナー鎖への挿入またはドナー鎖からの欠失を含む、請求項４１に記載の方法。

【請求項４３】

欠失が生じた、修飾ドナー鎖またはドナー核酸配列の領域を単離またはコピーすることを含む、請求項１～４２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４４】

工程（ｄ）において、ＲＳを、第１の鎖へと挿入し、挿入された配列が、修飾された第１の鎖からの発現について機能的である、請求項１～４３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４５】

方法が、挿入された配列の発現産物を検出または単離することを含む、請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】

工程（ｂ）～（ｄ）を、宿主細胞内で実施し、ＲＳを、ドナー鎖から欠失させ、（ｉ）欠失が、宿主細胞に対して致死性である、または（ｉｉ）方法が、細胞の生存能、増殖（growthまたはproliferation）を下方調節する、または（ｉｉｉ）方法が、細胞の生存能、増殖を上方調節する、請求項１～４５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４７】

細菌細胞または古細菌細胞において実行する、請求項２３～３０に従属しない場合の、請求項１～２２および請求項３１～４６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４８】

大腸菌（E. coli）細胞において実行する、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

原核細胞の集団において実行されて、前記細胞を死滅させ、細胞が、同じ種または株のものである、請求項２３～３０に従属しない場合の、請求項１～２２および請求項３１～４８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５０】

工程（ｂ）～（ｄ）を、宿主細胞内で実施し、ヌクレアーゼがＣａｓであり、工程（ｃ）において、Ｃａｓによる切断が、第１の鎖内のプロトスペーサー配列内にあり、プロトスペーサーが、シード配列を含み、シード配列が、細胞ゲノムにおいて、希少であるか、または見出されないヌクレオチド配列を含む、請求項１～４９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５１】

ヒトにおける遺伝子欠損を処置するための、請求項７に従属しない場合の請求項２３～３０のいずれか１項に記載の、補正細胞、補正ベクター、または補正ＲＳ配列を含むＤＮＡ断片であって、

切断部位モチーフを含む、補正細胞、補正ベクター、または補正ＲＳ配列を含むＤＮＡ断片。

【請求項５２】

対象における疾患または状態を処置または防止する、ヒト対象または動物対象への投与のための、請求項１～６および８～５０のいずれか１項に記載の方法により得ることが可能な、ベクター生成物、核酸鎖生成物、細胞生成物、またはＲＳ生成物であって、

切断部位モチーフを含む、ベクター生成物、核酸鎖生成物、細胞生成物、またはＲＳ生成物。

【請求項５３】

取込み配列（retrieved sequence）（ＲＳ）のコレクションを含む複数のベクターを作製するための方法であって、前記コレクションは互いに異なる第１のＲＳ配列および第２のＲＳ配列を含み、前記方法は請求項１～５０のいずれか１項に記載の方法を実施し、各ベクターを得ることを含む、方法。

【請求項５４】

ベクターは、細胞試料から取り込まれたゲノム断片のコレクションを含む、ＢＡＣベク

ターまたはＹＡＣベクターである、請求項５３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、インサイチューにおいて、組換え誘導性核酸鎖を作製するように、細胞において切断された（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼを使用して正確に切断された）ベクターとの相同組換え（homologous recombination）により、宿主細胞の染色体ＤＮＡなど、標的核酸を取り込む（retrieving）か、または修飾することに関する。
【背景技術】
【０００２】
ＴＡＲ（ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ）（transformation-associated recombination (TAR)）によるクローニングは、哺乳動物のゲノムから、大型の染色体領域を単離するための方法であって、酵母である出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）に依拠する方法である。ＴＡＲによるクローニングにおいては、全ゲノムＤＮＡを、細胞から抽出し、目的の遺伝子に特異的なターゲティング配列を保有するベクターと共に、酵母細胞へと共形質転換する。酵母へと共形質転換されると、ベクターのフックと、目的の遺伝子にフランキングする標的ゲノム配列との間において、相同組換えが生じて、環状ＹＡＣ（酵母人工染色体）を形成する。ＴＡＲにより、サイズが２５０ｋｂまでの範囲にわたる領域が単離されている。配列が、ＹＡＣ以外のベクター内にあることを要請される場合、下流における使用のために、ＹＡＣからＢＡＣへの配列の移動など、その後の操作が要請される。
【０００３】
Nat Commun. 2015 Sep 1; 6:8101. doi: 10.1038/ncomms9101; "Cas9-Assisted Targeting of Chromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters", Jiang W et alを参照する。著者らは、インビトロ（in vitro）において、ＲＮＡガイド型Ｃａｓ９ヌクレアーゼにより、標的ゲノムセグメントを、細菌の染色体から、２つの指定遺伝子座において切り出し、ギブソンアセンブリーにより、クローニングベクターへとライゲーションするクローニング法について記載した。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
細菌細胞内～動物細胞内および植物細胞内の範囲にわたる、多様な種類の原核細胞内および真核細胞内の核酸の正確な修飾のために、操作ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系が使用されている（例えば、Jiang W et al (2013)を参照されたい）。組換え誘導性の遊離末端を、標的核酸内に作出する、標的核酸の切断が提起されている。これらの末端は、例えば、パートナー配列の、標的への挿入のための、相同性指向修復（ＨＤＲ）機構による、パートナー核酸との相同組換えを促進する。しかし、現行のＣａｓベースの技法は、宿主細胞ゲノム（または他の標的核酸）を探索して、所望のＣａｓにマッチするＰＡＭ部位を見出し、次いで、ゲノムにおいて、隣接する、十分に固有のプロトスペーサー配列となる配列だけを選択する必要により制限されている。プロトスペーサー／ＰＡＭの組合せは、オフ標的切断の可能性を最小化するように、固有であることが理想的であるが、これを実際に達成することは、困難でありうる。これは、ヒト、および精度が最重要である他の状況における、遺伝子治療のための有用性を制限する。さらに、既にゲノム内に存在する部位を使用する必要は、相同組換えのために、所望されるゲノム領域を自由にターゲティングする柔軟性を減殺する。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
第１の構成においては、本発明は、
ドナー核酸鎖から、核酸配列を取り込む方法であって、
（ａ）第１の核酸鎖（first nucleic acid strand）を含む核酸ベクターを用意すること

であり、第１の鎖が、
ｉ．鎖間の相同組換えのための、ドナー鎖（donor strand）の第１のヌクレオチド配列（first nucleotide sequence）（ＮＳ１）と相同な、第１の相同アーム（homology arm）（ＨＡ１）と；
ｉｉ．鎖間の相同組換えのための、ドナー鎖の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；
ｉｉｉ．ＨＡ１の３’末端を、ＨＡ２の５’末端へと接続する、介在ヌクレオチド配列（intervening nucleotide sequence）とを含み、
ＨＡ１が、第１の鎖内のＨＡ２に対して５’側にあり；ＮＳ１が、ドナー鎖内のＮＳ２の３’側にあり、ドナー鎖が、ＮＳ１とＮＳ２との間に、取込み配列（retrieval sequence）（ＲＳ）を含むことと；
（ｂ）第１の鎖を、ドナー鎖と組み合わせることと；
（ｃ）ＨＡ１の５’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の５’側にフランキングする（flanking）第１の鎖の第１の切断部位（first cut site）（ＣＳ１）の、ヌクレアーゼによる切断；および／またはＨＡ２の３’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の３’側にフランキングする第１の鎖の第２の切断部位（ＣＳ２）の、ヌクレアーゼによる切断であり；
工程（ｂ）および（ｃ）を、任意の順序において、または同時に実行する切断と；
（ｄ）切断された第１の鎖の、ドナー鎖との相同組換えを実行し、これにより、第１の鎖のギャップ修復が、ＲＳを、ＨＡ１とＨＡ２との間に取り込んだベクターを作製することと；
（ｅ）適宜、ベクターまたはそのＲＳ配列を単離またはシーケンシングすることと
を含む方法を提供する。
【０００６】
ある例においては、工程（ｂ）～（ｄ）を、宿主細胞内で実施し；かつ／または工程（ｄ）の生成物（product）は、環状ベクターである。
【０００７】
代替法においては、ＨＡ１は、第１の鎖内のＨＡ２に対して５’側にあり；ＮＳ１は、ドナー鎖内のＮＳ２の５’側にあり、ドナー鎖は、ＮＳ１とＮＳ２との間に、取込み配列（ＲＳ）を含み、工程（ｃ）は代わりに、ＨＡ１の５’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の５’側にフランキングする第１の鎖の第１の切断部位（ＣＳ１）の、ヌクレアーゼによる切断；および／またはＨＡ２の３’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の３’側にフランキングする第１の鎖の第２の切断部位（ＣＳ２）の、ヌクレアーゼによる切断を含む。ベクターは、工程（ｃ）のすぐ前に、直鎖状であると有利である。
【０００８】
第２の構成においては、本発明は、
核酸配列を修飾する方法であって、
（ａ）第１の核酸鎖を含む核酸ベクターを用意することであり、第１の鎖が、
ｉ．鎖間の相同組換えのための、さらなる核酸鎖の第１のヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相同な、第１の相同アーム（ＨＡ１）と；
ｉｉ．鎖間の相同組換えのための、ドナー鎖の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；
ｉｉｉ．ＨＡ１の３’末端を、ＨＡ２の５’末端へと接続する、介在配列（ＩＳ）とを含み、
ＨＡ２が、第１の鎖内のＨＡ１に対して５’側にあり；ＮＳ２が、さらなる鎖（further strand）内のＮＳ１の５’側にあり、さらなる鎖が、ＮＳ１とＮＳ２との間に、配列（ＤＳ）を含んでもよいことと；
（ｂ）第１の鎖を、さらなる鎖と組み合わせることと；
（ｃ）ＨＡ１の３’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の３’側にフランキングする第１の鎖の切断部位（ＣＳ３）の、ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ）によ

る切断、および／またはＨＡ２の５’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の５’側にフランキングする第１の鎖の切断部位（ＣＳ４）の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用することであり；
工程（ｂ）および（ｃ）を、任意の順序において、または同時に実行することと；
（ｄ）第１の鎖の、さらなる鎖との相同組換えまたは部位特異的組換えを実行し、これにより、ＩＳを、ＮＳ１と、ＮＳ２との間に挿入した生成物である、さらなる鎖を作製し、ＤＳを、さらなる鎖から欠失させてもよいことと；
（ｅ）（ｄ）の後で、適宜、ベクター、生成物であるさらなる鎖、またはそのＩＳを、単離またはシーケンシングすることと
を含む方法を提供する。

【０００９】
第３の構成においては、本発明は、
例えば、任意の先行する態様による方法における、第２の核酸鎖との相同組換えに適する、第１の核酸鎖を作製する方法であって、
（ａ）第２の鎖の、第１のヌクレオチド配列および第２のヌクレオチド配列（ＮＳ１およびＮＳ２）を同定することであり、適宜、ＮＳ１を、第２の鎖内のＮＳ２の３’側となるように選択することと；
（ｂ）別の核酸鎖において、
ｉ．ＨＡ１とＮＳ１との相同組換えのための、第２の鎖の第１の所定の標的ヌクレオチド配列であるＮＳ１と相補的な第１の相同アーム（ＨＡ１）と；
ｉｉ．ＨＡ２とＮＳ２との相同組換えのための、第２の鎖の第２の所定の標的ヌクレオチド配列であるＮＳ２と相補的な第２の相同アーム（ＨＡ２）と；
ｉｉｉ．ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（first protospacer sequence）（ＰＳ１）であり、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼ（first Cas nuclease）とコグネイト（cognate）であり、ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端にあるか、もしくは前記末端の５’側にフランキングするＰＳ１；および／またはＰＡＭ（Ｐ２）と隣接する、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）であり、Ｐ２が、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するための、前記第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なるＣａｓヌクレアーゼ（different Cas nuclease）とコグネイトであり、ＣＳ２が、ＨＡ２の３’末端にあるか、もしくは前記末端の３’側にフランキングするＰＳ２と
を組み合わせ、
これにより、第１の鎖を作製することと
を含む、作製する方法を提供する。

【００１０】
第４の構成においては、本発明は、
原核宿主細胞の生存能、増殖（growthまたはproliferation）を阻害する方法であって、
（ａ）第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＡＭ（Ｐ１）と隣接するプロトスペーサー配列（ＰＳ１）を含む第１のベクターを用意することと；
（ｂ）毒素もしくは毒素前駆体；または毒素もしくは毒素前駆体をコードする配列を含むベクターを用意することであり、毒素が、原核細胞に対して毒性であることと；
（ｃ）細胞を、ベクターと組み合わせることであり、ベクターを、細胞へと導入し、細胞内に毒素をもたらすことと；
（ｄ）第１のＣａｓヌクレアーゼを使用して、第１のベクターの、ＰＳ１の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断（Cas nuclease cutting）を使用することであり、切断が、細胞内の毒素活性を促進し、これにより、細胞を死滅させるか、または細胞の増殖を低減することと
を含む方法を提供する。

【００１１】

第５の構成においては、本発明は、
宿主細胞を形質転換する方法であって、
（ａ）第１の核酸ベクターを用意することであり、ベクターが、第１の状態にあり、
ｉ．第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトである、ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、プロトスペーサー配列（ＰＳ１）と；
ｉｉ．ベクターの第１の状態をマーキングするための第１のマーカー配列（marker sequence）を含む、第１のヌクレオチド配列と
を含むことと；
（ｂ）細胞を、ベクターと組み合わせることであり、ベクターを、細胞へと導入することと；
（ｃ）第１のＣａｓヌクレアーゼを使用して、第１のベクターの、ＰＳ１の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用することであり、切断が、ベクターを、第２の状態へと転換し、マーカー配列を、非機能的とすることと；
（ｄ）適宜、マーカーが、細胞において非機能的であることを検出することにより、第２の状態を検出することと
を含む方法を提供する。
【００１２】
第６の構成においては、本発明は、
第１の核酸鎖を含み、細胞が、第２の核酸鎖を含み、第１の鎖が、
（ａ）第１の相同アーム（ＨＡ１）がフランキングする挿入配列（ＩＳ）であり、ＨＡ１が、第２の鎖の所定のヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相補的であり、ＨＡ１が、一方または両方の鎖を修飾するように、真核細胞内の、ＮＳ１との相同組換えが可能であるＩＳと；
（ｂ）ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であって、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり；
ＣＳ１が、ＨＡ１の末端にあるか、またはこれにフランキングし、ＣＳ１を、第１のＣａｓにより切断して、第１の鎖の切断をもたらすことが可能であり、ＨＡ１が、ＮＳ１との相同組換えが可能である
ＰＳ１と
を含む、真核細胞の形質転換のためのベクターを提供する。
【００１３】
第７の構成においては、本発明は、
ベクターが、第３の構成において言及されたベクターの前駆体であり、前駆体ベクターが、５’～３’の順に、
（ａ）ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であり、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＳ１と；
（ｂ）Ｐ１のすぐ３’側の第１のヌクレオチド配列であり、第１の配列が、第２の核酸配列を、前駆体ベクターへとクローニングするための、Ｐ１の３’末端と隣接するか、または前記末端の３’側にフランキングする第１のクローニング部位を含み、第２の配列が、ＨＡ１およびＨＡ２の一方または両方を含む、第１のヌクレオチド配列と
を含み；
（ｃ）前駆体核酸を得ることと；
（ｄ）核酸内のクローニング部位を同定するか、または核酸内のクローニング部位を創出することと；
（ｅ）核酸内のＰＳ１／Ｐ１の組合せを同定するか、または核酸内の組合せを創出することと
を含み；
（ｄ）と（ｅ）とを、任意の順に、または同時に実行し、（ｄ）および（ｅ

）のうちの少なくとも１つが、前記創出する工程を含み、これにより前記前駆体ベクターを作製し、単離してもよい、
前駆体ベクターを作製する方法を提供する。
【００１４】
第８の構成においては、本発明は、
真核細胞内の核酸を修飾する方法であって、
（ａ）真核細胞を用意することであり、
ｉ．閉環状核酸ベクターであり、第１の核酸鎖を含むベクターと；
ｉｉ．第２の核酸鎖であり、細胞の染色体に含まれる、第２の鎖と；
ｉｉｉ．Ｃａｓヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列、および核局在化シグナル（ＮＬＳ）をコードするヌクレオチド配列と
を含有する真核細胞を用意することと；
（ｂ）組換え誘導性ベクターの核酸を作製するように、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用して、細胞内部のベクターの第１の鎖を切断することと；
（ｃ）切断された第１の鎖と、第２の鎖との間で、細胞内部の相同組換えを使用し、第１の鎖と、第２の鎖との間で、少なくとも１０ｋｂの連続ヌクレオチドの配列を交換し、これにより、少なくとも１つの修飾鎖を形成することと；
（ｄ）適宜、修飾鎖または細胞を単離またはシーケンシングすることと
を含む方法を提供する。
【００１５】
本発明はまた、任意の態様に従う、ベクター、ファージ、細胞、組成物、コレクション、集団、医薬、抗生剤、使用、および方法も提供する。本発明は、本発明の方法により得ることが可能な、修飾鎖、第１の鎖、ドナー鎖、さらなる鎖、ベクター、組成物、医薬、またはキットを提供する。
【００１６】
ある例においては、本明細書の１つの構成についての任意の特色を、そのような組合せの、本明細書の、１または複数の請求項への可能な包含のために、本発明の異なる構成と組み合わせる。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１】図１は、大型のヌクレオチド配列を交換するために、閉環状ベクター（closed circular vector）を、インサイチューの真核細胞において、Ｃａｓによる切断と組み合わせることを示す概略図である。
【図２】図２Ａおよび図２Ｂは、本発明における使用のための、単一アームのベクターを示す。
【図３】図３Ａは、環状ベクターが、２つのＣａｓ切断部位（例えば、本発明に従う、取込みベクターまたはインサートベクターとしての使用のための）を含む変化形を示す。図３Ｂは、ＰＡＭ部位が、相同アームにおいて同定され、アームへと操作されているか、もしくはアームが、標的核酸の配列から選択されている変化形、または適切に配置されたＰＡＭを含有する細胞を示す。
【図４】図４Ａは、取込みベクター内に、２つの組換え誘導性末端をもたらす、マーカー断片の放出を示す。図４Ｂに見られる通り、ドナー鎖を伴うＨＲは、所望のＲＳを含有するドナー断片を取り込む。図４Ｃに例示される閉環状ベクターは、遺伝子治療において使用することもでき、インビトロにおいて、または任意の原核細胞内もしくは真核細胞内において、閉環状ベクターに保有されることにより操作可能となるＲＳを含有する、大型の配列または極めて大型の配列とのＨＲを使用して、標的核酸を修飾するのに使用することもできる。図４Ｄにおいて示される通り、これは、ＲＭＣＥによるＲＳの挿入を可能とし、また、変化を、標的へと、特異的に導入することも可能とする。
【図５】図５Ａは、インサート配列（例えば、調節エレメントまたはエクソン配列）を挿入するための、その後における、標的とのＨＲ工程（図５Ｂ）において使用しうる、組換

え誘導性核酸断片の放出を示す。図５Ｃにおいては、ベクター相同アームは、標的鎖において隔てられた［欠失させる配列（四角ボックス）を含む配列だけ隔てられた］配列と相補的である。ＩＳは、挿入しない（in）。
【図６】図６Ａおよび図６Ｂは、Ｃａｓによる切断が、第１の相同アームと近接する、１つの部位におけるものである、インサートベクターの適用を示す。この例においては、標的配列の置きかえが生じる（図６Ｂ）。
【図７】図７Ａおよび図７Ｂは、どのようにして、挿入（すなわち、標的配列の欠失が関与する置きかえではない）が実行されるのかを示す。
【図８】図８Ａは、Ｃａｓベクターを伴う、本発明のベクターの共形質転換を例示する。図８Ｂは、Ｃａｓ９配列を、本発明のベクターに組み入れた変化形を示す。
【図９】図９Ａは、本発明の前駆体ベクターを示す。クローニング部位を、１または複数の相同アーム（ＨＡ１および／またはＨＡ２）を差し入れる（drop in）、その後の使用のために、ベクターへと操作する。これを、不適合のＳＳＲ（ｌｏｘ部位）に対してＲＭＣＥを使用する、図９Ｂおよび図９Ｃにおいて例示する。図９Ｄおよび図９Ｅは、制限エンドヌクレアーゼを使用する変化形を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
本発明は、その多様な構成において、当技術分野の問題のうちの１または複数に取り組み、宿主細胞標的核酸ではなく、ベクター核酸に焦点を絞る解決策を提供して、切断（例えば、Ｃａｓによる切断）のための、特異的な所定の部位のデザインを可能とする。このようにして、本発明は、使用者が、切断に特異的な部位を選び出し、操作することが自由であり、これにより、標的核酸内の限定的な部位だけを選び出す必要を回避する、柔軟な系を提供する。操作は、ベクターを作製する、標準的なリコンビニアリング法または他の技法を使用して、インビトロにおいて簡単に実施することができ、この場合、切断（例えば、Ｃａｓによる切断）部位は、注意深くデザインされ、配置されている。これは、使用者が、切断（例えば、Ｃａｓによる切断）を、その後における、標的核酸との相同組換え法において使用しうる、相同アームおよびマーカーに近接して、自由に配置することを可能とする。
【００１９】
本発明の態様について、Ｃａｓによる切断の使用に言及しながら記載するが、代替法においては、他の切断手段、例えば、制限エンドヌクレアーゼによる切断、ＴＡＬＥＮ媒介型切断、亜鉛フィンガー媒介型切断、およびメガヌクレアーゼによる切断も使用することができる。ある例においては、切断は、ヌクレアーゼによる切断、ガイド型ヌクレアーゼによる切断、またはＲＮＡガイド型ヌクレアーゼによる切断など、酵素的である。
【００２０】
したがって、本発明は、組換え誘導性核酸鎖を作製するように、Ｃａｓヌクレアーゼまたは他の切断手段を使用して正確に切断されたベクターとの相同組換えにより、宿主細胞の染色体ＤＮＡなどの標的核酸を修飾することに関する。一態様においては、本発明は、相同組換えを促進するように、組換え誘導性末端を、ベクター核酸内の相同アームと近接して配置する、正確な切断を伴う。このようにして、精度または効率を高めることができる。ある例においては、この態様は、取込みベクターまたは挿入ベクターの文脈においては、特に有用であり、相同組換えを促進する切断のための、標的内の適切な位置を見出す必要を回避する。
【００２１】
本発明の別の利点は、極めて大型のインサート配列（例えば、１００ｋｂまたはこれを超える）を伴うベクターを構築する能力である。初期工程においては、空ベクターを、例えば、閉環状ベクターとして、宿主細胞へと導入することができる。その後における、Ｃａｓまたは他の手段による、細胞の内部のベクターの切断は、インサイチューにおいて、相同組換えによる、大型のインサート配列の、宿主核酸への挿入のための、組換え誘導性末端をもたらす。これは、操作および精製が困難であり、標的細胞への取込み（taken up

）が不良である、大型の配列を作製するのに、細胞の外部において切断することに関する、当技術分野における既往の問題を回避する（例えば、Jiang et al (2015)（下掲）を参照されたい）。Jiang et al (2015)は、細胞の外部における操作時における、長いＤＮＡ断片の機械的せん断に起因する、それらの技法における効率の低減と、長いＤＮＡによるギブソンアセンブリーのライゲーション効率の低下とを同定した。さらに、アガロースゲル内に包埋される細胞への要件は、ギブソンアセンブリーに十分なＤＮＡのアベイラビリティーを大きく制限した。

【００２２】

得られるベクター核酸の操作に焦点を絞ることにより、本発明は、切断を方向付けるのに使用されるプロトスペーサーなどのモチーフの正確な配列における柔軟性を提供するので有利である。この点において、使用者は、宿主細胞型において見出されないか、またはこのような宿主細胞においては希少であるか、または細胞ゲノム内のＲＳにおいては見出されない配列モチーフを有する、プロトスペーサー配列などの配列を選び出すことが可能である。ある例においては、ベクターのプロトスペーサーは、原核生物において見出される配列［細菌プリブノーボックスの配列；細菌のリーダー配列（例えば、Ｐｅｌ　Ｂ）；細菌の－１０配列または細菌の－３５エレメント配列（例えば、ＴＡＴＡＡＴまたはＴＴＧＡＣＡ）；細菌の上流プロモーターエレメント（ＵＰエレメント）配列；細菌の調節配列もしくはオペロン配列；または細菌の複製起点配列など］に基づきうる。このようにして、Ｃａｓによる切断を、真核細胞（ヒト細胞など）において見出されないか、または見出されても希少である配列により方向付けるが、これは、標的細胞内部のオフ標的Ｃａｓによる切断を回避する一助となる。代替法においては、本発明は、それらの固有性を決定するのに、宿主細胞のゲノム配列に対してあらかじめ点検された、完全な合成プロトスペーサー配列の使用を可能とする。これらの利益は、例えば（for embodiment）、細胞および生物の遺伝子治療における適用を見出す。本発明はまた、例えば、インビトロにおけるリコンビニアリングを使用する、インビトロにおける標的核酸の修飾にも適用可能である。

【００２３】

したがって、ある特定の構成における発明の利点は、ベクター内の切断（例えば、Ｃａｓによる切断）、切断部位をあらかじめデザインし、簡単に操作する能力、切断モチーフ（例えば、プロトスペーサー）の固有性をあらかじめ点検し、制御する能力、相同アーム、インサート配列、およびマーカーに照らして、切断部位の配置を選び出す能力、ならびに組換え誘導性基質を作製するのに、切断を、標的細胞の内部に制約することにより、適合性のベクターフォーマットにおいて、極めて大型の配列を操作し、使用する能力に焦点を絞ることに基づく。ＰＣＲ［例えば、取込み配列（retrieved sequence）内に、配列エラーを導入しうる］への依拠を回避することは、有益である。さらに、本発明のある特定の構成を使用して取り込まれる配列は、細胞または生物（例えば、ヒト、マウス、植物、酵母、または細菌）などの遺伝子治療のための、細胞の遺伝子操作において、修飾配列をもたらす、その後のリコンビニアリングなど、多くの下流の適用における、さらなる使用のための準備のできたベクターをもたらすように取り込まれる。

【００２４】

さらに、配列の取込み（retrieval）は、ＴＡＲ（ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ）など、既往の技法によっては必要な、酵母細胞など、特異的な細胞型に限定されない。ＴＡＲは、酵母細胞への形質転換の前に、直鎖状ＴＡＲベクターへと断片を導入するための、細胞内のＤＮＡを抽出および調製するために、細胞の外部の工程に依拠する。細胞の外部におけるゲノム断片の作出（ゲノムＤＮＡのせん断による）はまた、Jiang et al 2015 (infra)による、ＣＡＴＣＨ法の特色でもある。この方法は、細胞の外部の、保護的ゲル培地中における、ＤＮＡせん断工程に続く、インビトロにおける、断片の、ベクターへの、ギブソンアセンブリーにより実施しなければならない。これらの既往の方法と異なり、一部の構成における本発明は、組換え誘導性末端の作出、およびさらなる使用のための準備のできたベクターへの、配列の取込

みのために、細胞内部の保護的環境において実施すると有利であり、加えて、せん断およびこれを制御する必要は、これらの発明の構成の特色ではない。本発明の態様においては、大型のゲノムの断片（例えば、ＹＡＣなどにおいて、１００～２５０ｋｂ、または最大で１Ｍｂ）の、このようなインサートサイズに適応しうる、新生時直鎖化環状ベクター（ＢＡＣおよびＹＡＣなど）への、直接的な細胞内捕捉を可能とするベクターを、細胞内のインサイチューにおいて、組換え誘導性核酸末端を創出することにより構築しうると有利である。複数の実施形態において、これは、取込み配列の一部または全部を、標的細胞のゲノムまたはエピソームへと挿入するための、標的細胞への導入など、下流の手順のために極めて有用な、大型のインサートを伴う環状（例えば、閉環状、例えば、スーパーコイル状）ベクターの創出を方向付けることを可能とするので有利である。この目的で、本発明のベクター内の取込み配列に、取込み配列の、標的細胞ゲノムへの、相同組換えによる挿入のためにたやすく使用しうる相同アームをフランキングさせうることは有用である。

【００２５】

相同組換えは、ＤＮＡを切断することにより作製される、組換え誘導性（遊離）末端により誘発される。切断された末端は、当業者に公知の通り、効率を増強する。本発明は、切断（例えば、Ｃａｓによる切断）の焦点を、宿主細胞ゲノム内に既に存在する部位ではなく、あらかじめデザインする（すなわち、操作する）ことができる、第１の鎖内の部位に絞るので有用である。ある例においては、第１の鎖は、ＢＡＣまたはプラスミドまたはファージなどのベクター中に存在し得る。これは、第２の鎖またはドナー鎖、例えば、細胞の染色体またはエピソームの鎖との相同組換えを実行する前に、プロトスペーサー／ＰＡＭ組合せまたは他の切断モチーフの位置および性格を、正確に選び出し、あらかじめ決定しうるように、第１の鎖の前操作を可能とする。ある例においては、その後の相同組換えのための切断の位置は、公知であり、第１の鎖内またはベクター内の他の所望のエレメント（例えば、プロモーター、選択マーカー、ｌｏｘ部位など）位置に照らして制御することができる（例えば、図２Ａ、３Ａ、３Ｂ、５Ａ、６Ａ、８Ａ、および９Ａ）。したがって、これは、宿主細胞のゲノム内に既に存在する部位は、切断モチーフまたはプロトスペーサーの性格および位置、ならびに関連する（コグネイトの）ＰＡＭの性格を指定するので、既に存在する部位の使用を上回る利点をもたらす。この場合、ヌクレアーゼの選出しは、利用可能な切断モチーフの性格により指定される、例えば、Ｃａｓは、許容可能なＰＡＭの性格により指定される（またはこの逆である）のに対し、本発明においては、モチーフ／ヌクレアーゼ（例えば、ＰＡＭ／Ｃａｓの組合せ）の選出しは、これを可能とする方法を実行する前に、第１の鎖の操作として、自由に行うことができる。さらに、所定のプロトスペーサーＰＳ１（および、適宜、ＰＳ２）を選び出すか、またはデザインすることにより、本発明は、宿主細胞ゲノムの、任意の所望の領域への、相同組換えのターゲティング（あらかじめ存在する宿主細胞の部位により指定されるのではない）を可能とする。本発明においては、ベクター内（標的核酸内ではなく）の所定の切断モチーフ（例えば、プロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ）を伴う使用のために、１または複数の相同アーム（ＨＡ１、ＨＡ２）をデザインし、組み入れることにより、標的核酸内の相同性配列の、より自由な選出しがなされるが、これは、標的内の相同組換えの位置を、制御し、より自由に選択しうることを意味する。既往の方法においては、固有のプロトスペーサー部位、適切なＰＡＭ、およびマッチするＣａｓを注意深く選択する必要が、切断および標的鎖との相同組換えの正確な位置の選出しを、厳しく制約し、指定する。これは、改変される宿主細胞ゲノム（例えば、生物の遺伝子治療または治療のためのヒト細胞の改変のために）内の正確な位置（この正確な位置は、使用に適切なプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたは他の切断モチーフを有さない場合がある）を選び出そうと望む場合には、所望されないこの正確な位置は、使用に適切なプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたは他の切断モチーフを有さない場合がある。これに代わって、本発明は、これらの選出しを、代わりに、第１の鎖のデザインへと移動させることにより、これらの問題を回避する。したがって、第１の鎖の意図的なデザインにより、本発明は、宿主細胞鎖において修飾される位置の選出しにおいて、より大きな柔軟性をもたらし、使用されるＣａｓヌクレアーゼまたは

他のヌクレアーゼの選出しにも、柔軟性をもたらすことができる。加えて、切断される組換え誘導性末端を相同アーム配列と隣り合わせの近くに置くことを達成および制御することができ、細胞の内部またはインビトロの、インサイチューにおける相同組換え法時に、ベクターからの検出可能な欠失およびベクターへの挿入を可能とするために、ベクターマーカーまたはインサート配列の、切断される末端に照らした配置を、あらかじめ決定することもできる（例えば、図５Ａ、５Ｂ、６Ｂ、および８Ａを参照されたい）。本発明はまた、インサイチューにおける相同組換えのための正確な切断を指し示す、新たなマーカーを創出する可能性も提供する（例えば、図５Ａを参照されたい）。ある例では、これは、リコンビニアリング法のために有用でありうる。

【００２６】

通例、本発明はまた、ドナー鎖または標的鎖から、例えば、ベクター内の第１の鎖への配列の取込みの可能性も提供する（例えば、図４Ｂを参照されたい）。これは、例えば、リコンビニアリング法および／またはさらなる標的鎖の修飾または細胞の改変における、その後の使用のためのベクターを作製する方法のベクターの文脈においては、さらなる修飾のための、配列を取り込むために有用である。ある例においては、これは、その後における、取込み配列の、標的鎖への、相同組換えによる挿入法（例えば、図４Ｃ）、または取込み配列の、標的鎖または細胞ゲノムへの、その後におけるｃｒｅ－ｌｏｘによる挿入（例えば、図４Ｄ）のために、生成物である第１の鎖（取り込まれるインサートにフランキングする第１の鎖など）へと操作されるｃｒｅ－ｌｏｘ部位を使用する方法において有用である。ある例においては、第１の鎖内の取込み配列を、その後の細胞改変法（例えば、ヒト、動物、または植物の遺伝子治療のための）において使用する。代替法においては、本発明は、標的鎖への配列の挿入（例えば、図５Ａおよび５Ｂを参照されたい）、または標的鎖からの配列の欠失（例えば、図５Ｃを参照されたい）のために、第１の鎖の切断（例えば、Ｃａｓによる切断）を使用して、その後における、標的鎖との相同組換えまたは部位特異的組換え（例えば、ｌｏｘ部位、例えば、不適合のｌｏｘ部位を使用するＲＭＣＥを使用して）のための組換え誘導性核酸を放出する可能性を提供する。図５Ａにおいて示される通り、組換え誘導性鎖の放出は、新たな第１の鎖マーカー配列（例えば、ＰＣＲまたは検出用マーカーを発現させることにより検出可能な）を創出しうる。

【００２７】

したがって、一実施形態においては、本発明は、第１の鎖へと挿入された配列を、標的核酸鎖を修飾するか、または標的細胞（例えば、原核細胞、真核細胞、植物細胞、動物細胞、またはヒト細胞）のゲノムを改変するための、相同組換えまたは部位特異的組換え（例えば、ｃｒｅ－ｌｏｘを使用する）の方法において使用する、さらなる工程を提供する。１つの例においては、インサート配列の一部または全部を使用して、標的内の配列を置きかえるか、もしくは標的内に配列を挿入する（標的配列の共時的な欠失を伴うかまたは伴わずに）か、または標的内の配列を欠失させる。方法は、標的細胞に含まれる、生成物である標的鎖または修飾核酸を単離またはシーケンシングすることを含んでもよい。ある例においては、挿入または置きかえは、標的核酸鎖内の１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０ヌクレオチド、またはこれらの数のコドンを変化させる。ある例においては、この方法は、標的鎖配列（例えば、標的鎖に含まれる遺伝子）を、活性、不活性とするか、またはその活性を増大させるか、もしくはその活性を減少させる（例えば、活性とは、遺伝子によりコードされるタンパク質の発現である）。ある例においては、これは、標的内の遺伝子欠損を補正する（例えば、ヒト細胞の遺伝子治療のために）。

【００２８】

ある例においては、本発明は、生成物である第１の鎖を、リコンビニアリング法において使用して、工程（ｄ）において、第１の鎖へと挿入されたドナー配列の全部または一部を含む、さらなる鎖を作製することをさらに含む。方法は、さらなる鎖生成物を、相同組換えまたは部位特異的組換えによる、標的細胞ゲノムの改変の方法において使用すること、適宜、生成物である標的細胞を単離すること、および／または医学的使用のために、標的細胞を、ヒト対象または動物対象へと投与すること、および／またはこのような標的細

胞の集団を培養し、集団またはその試料を単離することを含んでもよい。ある例においては、配列は、ドナー鎖から（例えば、ヒト対象の、ヒト細胞の染色体ＤＮＡから）取り込まれ、取込み配列は、生成物である第１の鎖内にある。次いで、この取込み配列を、遺伝子操作（例えば、取込み配列内の、望ましくない突然変異を補正する、例えば、リコンビニアリングまたは突然変異）により修飾する。これは、さらなる鎖をもたらす。次いで、修飾（例えば、突然変異の補正）を含むこの鎖の配列を、標的細胞の鎖（例えば、ヒト細胞、例えば、細胞が、第１の細胞と同じ種類または異なる種類である、例えば、異なるヒトの細胞、または異なるヒト対象に由来する細胞の染色体のＤＮＡ鎖）へと挿入する。ある例においては、取込み配列を、ヒト対象の第１の細胞から単離し、方法を、インビトロにおいて使用して、取込み配列内の遺伝子欠損を補正し、補正を、同じヒト対象に由来するｉＰＳ細胞へと挿入して、遺伝子の補正（ｉＰＳ細胞のゲノムにおいて、遺伝子欠損を消失させてもよい）を含むｉＰＳ細胞を作製する。ｉＰＳ細胞を培養して、ヒト治療（例えば、ヒト治療のための組織）のための、ｉＰＳ細胞の集団または分化細胞の集団を作製してもよい。ある例においては、治療は、前記ヒト対象の治療である。このようにして、遺伝子治療を実施することができ、この場合、方法は、異なるヒトに由来するヒトＤＮＡ配列を使用する（例えば、配列が、ヒト対象ゲノムと対比して、未知であるか、また望ましくない変化を有し得るヒトＢＡＣ供給源を使用する）必要を伴わずに、エクスビボ（ex vivo）における、遺伝子欠損（例えば、一塩基多型；ＳＮＰ）の正確な補正を可能とする。したがって、発明は、ＤＮＡの突然変異または別のヒトの配列を導入しない、ヒト対象の治療のためのものである。これは、ヒト対象の、ヒト遺伝子治療のための、正確かつ高度に保存的な遺伝子変化に有用である。本発明は、これらの目的のうちのいずれかおよび全てのために、本明細書の生成物である、鎖、ベクター、集団、または細胞のうちのいずれかを提供する。

【００２９】

ある例においては、補正は、対象の遺伝子治療のための、ヒト対象の遺伝子（例えば、遺伝子のエクソン内および／または調節配列内）の、１つ、２つ、もしくは３つ、またはこれを超えるＳＮＰの補正である。代替法においては、対象は、非ヒト動物（例えば、齧歯動物、マウスまたはラット）である。代替法においては、対象は、植物または酵母である。代替法においては、対象は、昆虫である。代替法においては、対象は、細菌または原虫である。

【００３０】

本発明は、標的鎖から配列を欠失させる相同組換え工程における、標的鎖の修飾による、正確な小型の欠失および大型の欠失を可能とする。これは、ある例においては、標的鎖内の遺伝子または調節配列を不活化させるのに有用（例えば、ドナー鎖が、例えば、プラスミドに含まれる、染色体またはエピソームのものである場合など、ドナー鎖を含む宿主細胞を改変するために）である。ある例においては、欠損配列を、このような宿主細胞のゲノムから消失させることができる。別の例においては、例えば、ヒトの病原体細胞など、原核細胞である細胞を、改変により、死滅させるか、またはその増殖を阻害することができる。例は、細菌細胞、例えば、大腸菌（E. coli）、黄色ブドウ球菌（S. aureus）、緑膿菌（P. aeruginosa）、化膿レンサ球菌（S. pyogenes）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（S. thermophilus）、または本明細書において開示される別の細菌細胞である。ある例においては、細胞は、植物細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、ヒト細胞、齧歯動物細胞、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、または古細菌細胞であり、この場合、方法を使用して、宿主細胞の配列を、第１の鎖に由来する配列により置きかえる。ドナー配列を、第１の鎖に取り込んでもよい（第１の鎖へと挿入してもよい）。第１の鎖は、ＢＡＣ、ＰＡＣ、ＹＡＣ、またはプラスミドなどのベクターに含まれうる。

【００３１】

ある例においては、第１の鎖は、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＢＡＣ）、ＰＡＣ、およびプラスミドから選択されるベクターに含まれ、取込み配列は、ベクターへと挿入される。生成物ベクターは、取込み配列の５’末端における、第１のＣａｓヌク

レアーゼによる切断部位、もしくは前記末端の５’側にフランキングする、第１のＣａｓヌクレアーゼによる切断部位および／または取込み配列の３’末端における、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断部位、もしくは前記末端の３’側にフランキングする、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断部位を含んでもよい。いずれの切断部位が存在してもよく、Ｃａｓ部位は、同じＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）とコグネイトであってもよい。本発明は、本発明の方法により得られるか、または得ることが可能な、任意のこのようなベクターを提供する。本発明は、前記ベクターのライブラリー（例えば、ＢＡＣライブラリー）を作製するため、本発明の方法を提供するが、この場合、ベクターは、本発明の方法により得られるか、または得ることが可能である。ある例においては、第１の取込み配列または各取込み配列は、例えば、同じであるかまたは異なる（２つ、３つ、または４つなど）ヒトゲノムに由来するヒト配列である。ある例においては、異なるヒトゲノムは、１０００人ゲノムプロジェクトにより規定される同じ民族集団のヒトゲノム（例えば、ある例においては、異なるヒトゲノムは、１０００人ゲノムプロジェクトにより規定される異なる民族集団のヒトゲノムである）である。ある例においては、民族集団は、１～１４、例えば、番号３、４、または９：

１＝ＡＳＷ；２＝ＣＥＵ；３＝ＣＨＢ；４＝ＣＨＳ；５＝ＣＬＭ；６＝ＦＩＮ；７＝ＧＢＲ；８＝ＩＢＳ；９＝ＪＰＴ；１０＝ＬＷＫ；１１＝ＭＸＬ；１２＝ＰＵＲ；１３＝ＴＳＩ；１４＝ＹＲＩ

から選択される。

【００３２】

ある例においては、本発明は、このようなベクター（例えば、ＢＡＣ）ライブラリーを提供する。Ｃａｓ切断部位の組入れは、本明細書において記載される、さらなる鎖との、その後における相同組換えのための、本発明に従う、１つまたは２つの遊離末端を伴う組換え誘導性核酸の作出を容易とする。ある例においては、ライブラリーが、ヒト取込み配列を含む場合、組換え誘導性核酸を使用して、取り込まれたヒト配列の、細胞ゲノムへの挿入（適宜、細胞ゲノムの配列を共時的に置きかえる）により、ヒト細胞または非ヒト動物細胞を改変することができる。ある例においては、ヒト細胞は、ｉＰＳ細胞である。ある例においては、細胞は、齧歯動物細胞、マウス細胞またはラット細胞である。本発明は、例えば、ヒトまたは動物の治療のために、この方法により得られるか、または得ることが可能な、このような細胞を提供する。本発明は、例えば、ヒトまたは動物の治療のために、この方法により得られるか、または得ることが可能な、このような細胞から発生させた組織を提供するが、この場合、細胞は、多能性細胞、複能性細胞、または全能性細胞（例えば、ヒトまたは動物ｉＰＳ細胞）であり、組織は、ヒト組織ではないか、またはヒトに含まれない。

【００３３】

本発明の任意の方法についての例では、最大で３００、２００、１００、７５、５０、２５、１５、１０、５、または１ｋｂの鎖であるＤＮＡ（例えば、連続配列としての）を、第１の鎖および／またはさらなる鎖へと挿入する。挿入は、複数の工程（例えば、本発明の方法に従う各工程）によるものでありうる。ある例においては、方法は、ＤＮＡの、第１の鎖および／またはさらなる鎖への、複数の挿入を含み、最大で３Ｍｂ、２Ｍｂ、１Ｍｂまたは９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１００、５０、２５、１５、１０、５、または１ｋｂの、取り込まれたＤＮＡ（例えば、連続配列としての）を、第１の鎖または各鎖へと挿入する。本発明は、このような生成物である、第１の鎖もしくはさらなる鎖、またはこれを含む細胞を提供する。加えて、または代替的に、３Ｍｂ、２Ｍｂ、１Ｍｂ、または９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００ｋｂを超えない鎖を挿入する。

【００３４】

本発明の任意の方法についての例では、最大で３００、２００、１００、７５、５０、２５、１５、１０、５、または１ｋｂの第１の鎖であるＤＮＡ（例えば、連続配列としての）を、ドナー鎖へと（第１の鎖への配列の取込みを伴うかまたは伴わずに）挿入する。

ある例においては、加えて、または代替的に、最大で３００、２００、１００、５０、７５、２５、１５、１０、５、または１ｋｂのドナー鎖であるＤＮＡ（例えば、連続配列としての）を、第１の鎖へと挿入する。挿入は、複数の工程（例えば、本発明の方法に従う各工程）によるものでありうる。ある例においては、方法は、第１の鎖のＤＮＡの、ドナー鎖への複数の挿入を含み、最大で３Ｍｂ、２Ｍｂ、１Ｍｂまたは９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１００、５０、２５、１５、１０、５、または１ｋｂの第１の鎖であるＤＮＡ（例えば、連続配列としての）を、ドナー鎖へと挿入する。本発明は、このような生成物であるドナー鎖、またはこれを含む宿主細胞を提供する。加えて、または代替的に、３Ｍｂ、２Ｍｂ、１Ｍｂ、または９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００ｋｂを超えない鎖を挿入する。

【００３５】

本発明の任意の方法についての例では、最大で３Ｍｂ、２Ｍｂ、１Ｍｂまたは９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１００、５０、２５、１５、１０、５、または１ｋｂの第１の鎖であるＤＮＡ（例えば、連続配列としての）を欠失させる。ある例においては、加えて、または代替的に、最大で３Ｍｂ、２Ｍｂ、１Ｍｂまたは９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１００、５０、２５、１５、１０、５、または１ｋｂのドナー鎖またはさらなる鎖であるＤＮＡ（例えば、連続配列としての）を欠失させる。本発明は、このような生成物であるドナー鎖、またはこれを含む宿主細胞を提供する。欠失は、複数の工程（例えば、本発明の方法に従う各工程）によるものでありうる。ある例においては、第１の鎖からの欠失と、第１の鎖への挿入とは、同時的である。ある例においては、ドナー鎖からの欠失と、ドナー鎖への挿入とは、同時的である。ある例においては、さらなる鎖からの欠失と、さらなる鎖への挿入とは、同時的である。加えて、または代替的に、３Ｍｂ、２Ｍｂ、１Ｍｂ、または９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００ｋｂを超えない鎖を欠失させる。

【００３６】

本発明は、インサイチューにおいて、ガイドＲＮＡ（guide RNA）をもたらすために、１または複数の配列を組み入れる可能性を提供する。配列は、単一のガイドＲＮＡ（すなわち、キメラｇＲＮＡ）、またはｔｒａｃｒＲＮＡと組み合わされて、ｇＲＮＡをもたらすｃｒＲＮＡ（cRNA）をコードしうる。ある例においては、ｇＲＮＡまたはｔｒａｃｒＲＮＡは、第１の鎖（例えば、第１のベクターを含む鎖）に含まれるか、または異なる核酸（例えば、第２のベクター）に含まれる、１または複数の配列によりコードされる（例えば、図８Ａおよび８Ｂを参照されたい）。代替的に、ｔｒａｃｒＲＮＡは、細胞の内部のＣａｓによる切断のために、第１の鎖を導入する、標的細胞によりコードされる。この場合、標的細胞は、内因性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を含み（例えば、このような系を含むように操作された真核細胞もしくは原核細胞であるか、または天然においてこのような系を含む、細菌細胞または古細菌細胞であり）、ｔｒａｃｒＲＮＡは、内因性ｔｒａｃｒＲＮＡである。

【００３７】

ＣａｓヌクレアーゼＣａｓ９またはＣａｓ３）は、標的細胞へと導入される（またはインビトロにおいて、第１の核酸と混合される）場合もあり、標的細胞へと導入されるか、またはインビトロにおいて、第１の鎖およびガイドＲＮＡまたはこれらをコードする配列と組み合わされる、第１の鎖（または第１のベクター）または別の核酸（例えば、第２のベクター）に含まれる配列によりコードされる場合もある（例えば、図８Ａおよび８Ｂを参照されたい）。代替法においては、標的細胞は、内因性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を含み、Ｃａｓは、内因性ＣａｓヌクレアーゼＣａｓ９またはＣａｓ３）である。代替法においては、本発明は、Ｃａｓによる切断の代わりに、ｃｐｆ１による切断と、コグネイト部位とを使用し、本明細書における本開示は、変更すべきことは変更して、Ｃａｓの代わりに、ｃｐｆ１に適用される。

【００３８】

本発明のさらなる利点は、カスタムメイドのベクターの作製に適応させるのに有用な、

ユニバーサルの前駆体ベクターを構築する可能性である。ユニバーサルベクターは、標的細胞ゲノムまたは標的核酸の、所望の領域および所定の領域をターゲティングするように選択された相同アームを挿入するための、１または複数のクローニング部位を含むようにデザインすることができる。ユニバーサルベクターは、１または複数の切断部位（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断部位）であって、各々が、相同アームを挿入するための、それぞれの部位（「クローニング部位」）にフランキングするか、またはこれとすぐ隣接する切断部位を備える。このようにして、組換え誘導性末端の配置は、その後における相同組換えのための相同アームに照らして制御することができる。ベクター内のＳＳＲ部位（例えば、ｌｏｘ部位）に照らした配置は、ｃｒｅ－ｌｏｘによる、本明細書において記載される、さらなる鎖または第２の鎖への、配列の挿入における、その後の使用のために、制御することができる。図９Ａ～９Ｅにおいて示される通り、ある例においては、各クローニング部位は、制限エンドヌクレアーゼ部位（例えば、ＥｃｏＲ１、ＢａｍＨ１、または他の部位）の場合もあり、ＳＳＲ部位（例えば、ｌｏｘＰ、ｌｏｘ２１１、ｌｏｘ２２７２、ｆｒｔ、または他の部位）の場合もある。示される通り、本発明の方法は、このようなユニバーサルの前駆体ベクターを用意することと、相同アームを、Ｃａｓヌクレアーゼ部位と隣接するベクターへと組み合わせることとを含む。一実施形態においては、アームは、制限エンドヌクレアーゼにより切断された核酸に含まれ、この場合、エンドヌクレアーゼもまた、前駆体ベクターのクローニング部位を切断するのに使用されており、切断部位は、組み換えられて、アームは、ベクターへと挿入され、これにより、本発明の方法における使用のための、第１の鎖を含むベクターが作製される。代替法においては、前駆体ベクターのクローニング部位と、アームを含む核酸とにおける、適合性のＳＳＲ部位を、部位特異的組換えのために使用し、これにより、アームを、Ｃａｓヌクレアーゼ部位と隣接するか、またはこれにフランキングするベクターへと挿入し、これにより、本発明の方法における使用のための、第１の鎖を含むベクターを作製する。

【００３９】

本発明のユニバーサルの前駆体ベクターの概念のさらなる適用においては、第１のベクターのコレクションを作製する方法であって、各ベクターが、本発明の方法における使用のための第１の鎖を含む方法が提供される。この作製法においては、複数の前駆体ベクターを、各々がそれぞれの相同アームを含む、複数の核酸と組み合わせるが、この場合、方法は、相同アームを、ベクターへとクローニングすることを含み、各生成物ベクターは、切断（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ）部位と隣接するか、またはこれにフランキングする、少なくとも１つの前記相同アームを含み、これにより、各々が、本発明の方法における使用のための第１の鎖を含む、ベクターのコレクションを作製する。ある例においては、核酸の各々を、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断し、この場合、前駆体ベクターのクローニング部位も、同じエンドヌクレアーゼにより切断し、前駆体ベクター内の切断部位を、切断された核酸と組み換えられることにより、相同アームを、前駆体ベクターへと挿入する。代替法においては、ＳＳＲによる組換えを使用して、アームを、前駆体ベクター内の、適合性のＳＳＲ部位へと挿入する。ある例においては、第１の細胞のゲノムＤＮＡ（例えば、全ゲノムＤＮＡ、または細胞（ｃｅｌ）の、１または複数の染色体またはエピソームのＤＮＡ）を切断することにより、核酸を得るが、この場合、切断は、前記制限エンドヌクレアーゼによるものであり、これにより、同じエンドヌクレアーゼにより切断されるクローニング部位を有する、複数の前駆体ベクターと組み合わされる、切断された核酸の集団を作製し、複数の切断された核酸配列を、複数の前駆体ベクターへと挿入して、各々が、前記本発明の方法における使用のための第１の鎖を含む、生成物ベクターのコレクションを作製する。これは、細胞の、多くの異なるゲノム配列、または標的核酸の、異なる配列を取り込むために有用であり、取込み配列は、本発明における使用のために、例えば、細胞（例えば、第１の細胞と同じ種類の細胞、または異なる種に由来する細胞、または種の異なるメンバーに由来する細胞であり、例えば、第１の細胞は、第１のヒト対象の細胞であり、取込み配列は、異なるヒト対象または同じヒト対象の細胞に由来する）からの、さらなる配列の取込みのために、生成物ベクター内の相同アームとして作用しうる。

加えて、または代替的に、生成物ベクターは、取込み配列と隣接するか、またはこれにフランキングするインサート配列を含み、この場合、インサート配列を、さらなる核酸鎖または標的細胞ゲノムまたはエピソームへと挿入するための相同アームとして、取込み配列を使用する。これは、１つの細胞内または細胞集団内の複数の部位において挿入し、ある例においては、細胞内または細胞集団内に挿入された配列の多様な効果を決定することを可能とする。これを使用して、例えば、標的細胞のゲノム内に、インサート配列（例えば、外来の遺伝子配列）の発現に所望される、１または複数の部位を見出すことができる。ある例においては、標的細胞は、原核（例えば、細菌）細胞または酵母細胞であり、方法は、インサート配列の生成物の、産業的製造または実験室内の製造のための、細胞集団を作出するために有用でありうる。別の例においては、標的細胞は、真核細胞（例えば、ヒト細胞、例えば、ＣＨＯ細胞またはＨＥＫ２９３細胞またはＣｏｓ細胞）であり、方法は、インサート配列の生成物の、産業的製造または実験室内の製造のための、細胞集団を作出するために有用でありうる。本発明は、インサート配列の生成物を発現させるために、このような原核細胞または真核細胞を作製する方法を含み、インサート配列の生成物を発現させることを含み、生成物を単離することを含んでもよい。本発明は、本明細書において開示される任意の産業、例えば、医学的使用、または薬、化粧品、食品、環境製品、飲料品、水、もしくは石油化学製品の作製もしくは処理における使用のための生成物を含む。

【００４０】

本発明に従う、細胞へと導入された各核酸（例えば、第１の鎖またはベクター）は、細胞核に局在化することが従来公知である、１または複数の核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含みうる。

【００４１】

ある実施形態においては、１または複数のヌクレオチド配列を、細胞のゲノムへと（例えば、染色体またはエピソームへと）挿入する。次いで、挿入された配列は、ベイト部位、すなわち、本発明の方法において、それぞれのベクター（第１の鎖）の相同アームと相同であり、これとハイブリダイズする配列として作用しうる。例えば、Ｎ１および／またはＮ２は、細胞のゲノムへと挿入された配列であることが可能であり、これらは、ＨＡ１およびＨＡ２のそれぞれと相同である。ベイト部位の挿入は、各ベイト配列にフランキングする、１または複数の部位特異的組換え部位（例えば、ｌｏｘまたはｆｒｔ部位）を使用する、ＳＳＲによる挿入など、任意の利用可能な方法を使用して行うことができる。１または複数のベイト部位を、ランダムに挿入することができ、次いで、これにより、例えば、複数のレシピエント細胞内の、異なる場所における、挿入された配列の効果を評価するように、ドナー鎖からの、ランダム（所定ではない）ＲＳ配列の取込み、またはレシピエント細胞のゲノム内のランダム部位への、ＩＳまたはＲＳの挿入を可能とする。ある実施形態においては、各ベイトヌクレオチド配列に、トランスポゾンのＬＴＲ（ｌｏｎｇ ｔｅｒｍｉｎａｌ ｒｅｐｅａｔ）［long terminal repeat (LTR)］がフランキングし（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃ ＬＴＲまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ ＬＴＲがフランキングし）、結果として得られる核酸は、細胞ゲノム内の、ベイト配列のコピーの、ランダムであり、複数であってもよい挿入のために、発現させたそれぞれのトランスポザーゼを使用して、細胞へと導入される。ある例においては、５’～３’の順に：トランスポゾンＬＴＲ、ＮＳ１、適宜、スペーサー配列、ＮＳ２、および同じトランスポゾン型のＬＴＲを含むヌクレオチド配列を、細胞へと導入し、ＮＳ１／ＮＳ２の組合せを、その後における本発明の鎖またはベクターの相同アームとのＨＲのための準備のできた細胞のゲノムへと挿入する。このようにして、ＮＳ１／ＮＳ２ベイト配列を使用して、適切な相同アームがフランキングするＲＳまたは任意の他の配列を、細胞のゲノムへと挿入することができる。ある例においては、単一種類のベイト配列（例えば、ＮＳ１またはＮＳ２）だけを、細胞ゲノム内に挿入し、これを、相同なＨＡ（例えば、ワンアームの鎖またはベクター）を含むベクター（第１の鎖）を使用する、本発明のＲＳ取込み法において使用する。所定の配列のベイト配列の使用は、元の細胞ゲノムにおいては見出されない配列が選び出されるか、またはデザインされるので、有利であり、これは、意図されないゲノム部位に

おける、本発明の鎖またはベクターとのＨＲイベントの可能性を低減する。例えば、細胞は、真核細胞（例えば、ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞またはラット細胞）であり、ベイト配列は、細菌配列またはウイルス配列である。

【００４２】

したがって、本発明は、以下の実施形態を提供する。

【００４３】

１．ドナー核酸鎖から、核酸配列を取り込む方法であって、

（ａ）第１の核酸鎖を含む核酸ベクターを用意することであり、第１の鎖が、

ｉ．鎖間の相同組換えのための、ドナー鎖の第１のヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相同な、第１の相同アーム（ＨＡ１）と；

ｉｉ．鎖間の相同組換えのための、ドナー鎖の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

ｉｉｉ．ＨＡ１の３’末端を、ＨＡ２の５’末端へと接続する、介在ヌクレオチド配列とを含み、

ＨＡ１が、第１の鎖内のＨＡ２に対して５’側にあり；ＮＳ１が、ドナー鎖内のＮＳ２の３’側にあり、ドナー鎖が、ＮＳ１とＮＳ２との間に、取込み配列（ＲＳ）を含むことと；

（ｂ）第１の鎖を、ドナー鎖と組み合わせることと；

（ｃ）ＨＡ１の５’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の５’側にフランキングする第１の鎖の第１の切断部位（ＣＳ１）の切断（例えば、ヌクレアーゼ または Ｃａｓヌクレアーゼによる切断）；および／またはＨＡ２の３’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の３’側にフランキングする第１の鎖の第２の切断部位（ＣＳ２）の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断であり；

工程（ｂ）および（ｃ）を、任意の順序において、または同時に実行する切断と；

（ｄ）切断された第１の鎖の、ドナー鎖との相同組換えを実行し、これにより、第１の鎖のギャップ修復が、ＲＳを、ＨＡ１とＨＡ２との間に取り込んだベクターを作製することと；

（ｅ）適宜、ベクターまたはそのＲＳ配列を単離またはシーケンシングすることとを含む方法。

【００４４】

代替法においては、工程（ｄ）は、ＳＳＲ（ＨＲではない）を使用する。

【００４５】

ある例においては、Ｃａｓ、例えば、Ｃａｓ９を使用して、切断を実施する。

【００４６】

代替法においては、実施形態１は、

１ａ．核酸配列を修飾する方法であって、

（ａ）第１の核酸鎖を含む核酸ベクターを用意することであり、第１の鎖が、

ｉ．鎖間の相同組換えのための、さらなる核酸鎖の第１のヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相同な、第１の相同アーム（ＨＡ１）と；

ｉｉ．鎖間の相同組換えのための、ドナー鎖の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

ｉｉｉ．ＨＡ１の３’末端を、ＨＡ２の５’末端へと接続する、介在配列（ＩＳ）とを含み、

ＨＡ２が、第１の鎖内のＨＡ１に対して５’側にあり；ＮＳ２が、さらなる鎖内のＮＳ１の５’側にあり、さらなる鎖が、ＮＳ１とＮＳ２との間に、配列（ＤＳ）を含んでもよいことと；

（ｂ）第１の鎖を、さらなる鎖と組み合わせることと；

（ｃ）ＨＡ１の３’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の３’側にフランキングする第１の鎖の切断部位（ＣＳ３）の切断（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用する）；および／またはＨＡ２の５’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の５’側にフランキングする第１の鎖の切断部位（ＣＳ４）の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断であ

り；
工程（ｂ）および（ｃ）を、任意の順序において、または同時に実行する切断と；
（ｄ）第１の鎖の、さらなる鎖との相同組換えまたは部位特異的組換えを実行し、これにより、ＩＳを、ＮＳ１と、ＮＳ２との間に挿入した生成物である、さらなる鎖を作製し、ＤＳを、さらなる鎖から欠失させてもよいことと；
（ｅ）（ｄ）の後で、適宜、ベクター、生成物であるさらなる鎖、またはそのＩＳを、単離またはシーケンシングすることと
を含む方法を提供する。
【００４７】
方法１ａにおいては、第１の鎖を、ＣＳ１およびＣＳ２の両方において切断しなくてもよい。
【００４８】
本明細書においては代替的に、実施形態１への言及を、実施形態１ａへの言及として読むものとする。
【００４９】
ある例においては、本明細書において使用されるＣａｓは、Ｃａｓ９であり、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９であってもよく、黄色ブドウ球菌Ｃａｓ９であってもよい。ある例においては、ＨＡ１は、ＮＳ１の配列と同一（または少なくとも９０または９５％同一）であり、かつ／またはＨＡ２は、ＮＳ２の配列と同一（または少なくとも９０または９５％同一）である。
【００５０】
本明細書における、本発明の任意の構成においては、第１の鎖、ベクター、または、本明細書における、任意の他の鎖もしくはベクターは、１または複数の核局在化シグナル配列である、ＮＬＳ（例えば、方法を、真核細胞において実行する場合）を適宜含んでもよい。例えば、Ｃａｓヌクレオチド配列、ｇＲＮＡをコードする配列、またはＩＳ配列は、１または複数のＮＬＳを含みうる。
【００５１】
ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端にあるか、もしくは前記末端の５’側にフランキングする場合、ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端とすぐ隣接する（すなわち、切断（例えば、Ｃａｓによる切断）は、ＨＡ１の、最初の（最も５’側の）ヌクレオチドの、すぐ５’側である）か；または切断（例えば、Ｃａｓによる切断）が、ＨＡ１の最初のヌクレオチドの５’側にある（例えば、末端の５’側の、１ｋｂ、または５００、２５０、２００、１５０、５０、２５、２０、１０、もしくは５ヌクレオチドを超えないヌクレオチドだけ、末端から隔てられている）ことを意味する。ＣＳ２が、ＨＡ２の３’末端にあるか、もしくは前記末端の３’側にフランキングする場合、ＣＳ２が、ＨＡ２の３’末端とすぐ隣接する（すなわち、切断（例えば、Ｃａｓによる切断）は、ＨＡ２の、最後の（最も３’側の）ヌクレオチドの、すぐ３’側である）か；または切断（例えば、Ｃａｓによる切断）が、ＨＡ２の最後のヌクレオチドの３’側にある（例えば、末端の３’側の、１ｋｂ、または５００、２５０、２００、１５０、５０、２５、２０、１０、もしくは５ヌクレオチドを超えないヌクレオチドだけ、末端から隔てられている）ことを意味する。
【００５２】
ＣＳ３が、ＨＡ１の３’末端にあるか、もしくは前記末端の３’側にフランキングする場合、ＣＳ３が、ＨＡ１の３’末端とすぐ隣接する（すなわち、切断（例えば、Ｃａｓによる切断）は、ＨＡ１の、最初の（最も３’側の）ヌクレオチドの、すぐ３’側である）か；または切断（例えば、Ｃａｓによる切断）が、ＨＡ１の最後のヌクレオチドの３’側にある（例えば、末端の３’側の、１ｋｂ、または５００、２５０、２００、１５０、５０、２５、２０、１０、もしくは５ヌクレオチドを超えないヌクレオチドだけ、末端から隔てられている）ことを意味する。ＣＳ４が、ＨＡ２の５’末端にあるか、もしくは前記末端の５’側にフランキングする場合、ＣＳ４が、ＨＡ２の５’末端とすぐ隣接する（すなわち、切断（例えば、Ｃａｓによる切断）は、ＨＡ２の、最初の（最も５’側の）ヌクレオチドの、すぐ

５’側である）か；または切断（例えば、Ｃａｓによる切断）が、ＨＡ２の最初のヌクレオチドの５’側にある（例えば、末端の５’側の、１ｋｂ、または５００、２５０、２００、１５０、５０、２５、２０、１０、もしくは５ヌクレオチドを超えないヌクレオチドだけ、末端から隔てられている）ことを意味する。

【００５３】

本明細書においては、末端「において」および末端「にフランキングすること」という概念を、同様のものであると理解するものとする。

【００５４】

方法は、前記相同組換え（ＨＲ）の前に、切断部位モチーフを使用して、ドナー鎖またはさらなる鎖の、切断（例えば、Ｃａｓ媒介型切断、メガヌクレアーゼ媒介型切断、亜鉛フィンガータンパク質媒介型切断、またはＴＡＬＥＮ媒介型切断）を方向付けることを含んでもよく、この場合、ＨＲを、切断された第１の鎖と、ドナー／さらなる鎖とにより実行する。モチーフを、相同組換えにより破壊し（例えば、ドナー鎖を切断するために使用される、ドナー鎖内またはさらなる鎖内のプロトスペーサーおよび／またはＰＡＭを破壊し）てもよい。

【００５５】

方法は、前記相同組換え（ＨＲ）による、ＲＳの取込みの前に、それぞれの切断部位モチーフを使用して、第１の鎖または取込みベクターの、各切断（例えば、Ｃａｓ媒介型切断、メガヌクレアーゼ媒介型切断、亜鉛フィンガータンパク質媒介型切断、ＴＡＬＥＮ媒介型切断、または制限エンドヌクレアーゼによる切断）を方向付けることを含んでもよく、この場合、モチーフを、相同組換えにより破壊する（例えば、第１の鎖またはベクター切断するために使用される、ドナー鎖内またはさらなる鎖内のプロトスペーサーおよび／またはＰＡＭを破壊する）。

【００５６】

ある例においては、第１の鎖生成物内に挿入される核酸配列には、一方または両方の側において、部位特異的組換え（ＳＳＲ）部位（例えば、ｌｏｘＰまたは不適合のｌｏｘ部位、例えば、ｌｏｘＰおよびｌｏｘ５１１、またはｌｏｘＰおよびｌｏｘ２２７２）がフランキングする（例えば、実施形態１のＨＲ工程の後で付加される）［これは、インサート配列を、標的内の、マッチするＳＳＲ部位によるＲＭＣＥ（例えば、図４Ｄを参照されたい）により、その後、さらなる核酸鎖（例えば、標的細胞の染色体）へと挿入しうるように、リコンビナーゼ媒介型カセット交換（ＲＭＣＥ）を、不適合のｌｏｘ部位と共に使用することを可能とする］。したがって、ある例においては、本発明は、この第１の鎖生成物を、標的核酸鎖（例えば、標的細胞、例えば、インビトロにおける、例えば、ヒト、細菌細胞、植物細胞、酵母細胞、または齧歯動物細胞の染色体またはエピソームに含まれる）との部位特異的組換え法において使用することをさらに含み、この場合、部位特異的部位の間のインサート配列を、標的核酸内の適合性のＳＳＲ部位との組換えにより、標的核酸鎖へと挿入する。

【００５７】

ある例においては、ドナー鎖もしくはさらなる鎖を含む細胞および／または標的細胞は、ヒト細胞（例えば、インビトロにおける）である。ある例においては、細胞は、リンパ球、Ｂ細胞、またはＴ細胞（例えば、ヒト細胞）である。一実施形態においては、本発明の方法を使用して、例えば、Ｔ細胞のゲノムへと、ＤＮＡを挿入し、かつ／またはＴ細胞のゲノムから、ＤＮＡを欠失させることにより、例えば、生成物Ｔ細胞内に、抗原受容体をもたらすために、１または複数のＤＮＡ配列を挿入することにより、ヒトＴ細胞を改変する。本発明は、この方法により得られるか、または得ることが可能な、このようなＴ細胞生成物を提供する。方法は、Ｔ細胞またはその後代を単離することと、適宜、疾患または状態（例えば、がんまたは自己免疫疾患もしくは自己免疫状態）を処置または防止するために、細胞または後代（またはその集団）を、ヒト対象へと投与することとを含んでもよい。ある例においては、本発明は、疾患または状態（例えば、がんまたは自己免疫疾患もしくは自己免疫状態）を処置または防止するための、本発明の方法により得られるか、

または得ることが可能な、細胞（例えば、Ｔ細胞またはＢ細胞）生成物を提供する。ある例においては、本発明は、疾患または状態（例えば、がんまたは自己免疫疾患もしくは自己免疫状態）を処置または防止するための医薬に含まれる場合の、このような細胞もしくはその後代、またはその集団を提供する。

【００５８】

ある例においては、ドナー鎖もしくはさらなる鎖を含む細胞および／または標的細胞は、細菌種または細菌株［例えば、ヒトまたは動物の病原体であるか、あるいは食品、飲料、石油化学物質、または環境水（例えば、水路）もしくは工業用水の貯水池に含まれる］の細胞である。ある例においては、細胞は、ヒトまたは動物のマイクロバイオーム種またはマイクロバイオーム株の細菌細胞（例えば、ヒトまたは動物の、消化管、口腔、膣、皮膚、または腋窩の、マイクロバイオーム種またはマイクロバイオーム株）である。ある例においては、本発明は、前記細菌株または細菌種により媒介されるヒトまたは動物における疾患または状態を処置または防止するための方法の生成物である細胞（またはその後代）を提供する。ある例においては、本発明は、ヒトまたは動物への、ヒトもしくは動物の病原体である種または株の細菌、またはヒトもしくは動物のマイクロバイオーム種またはマイクロバイオーム株（例えば、ヒトまたは動物の、消化管、口腔、膣、皮膚、または腋窩の、マイクロバイオーム種またはマイクロバイオーム株）の細菌の感染を処置または防止するための方法を提供する。ある例においては、本発明は、食品、飲料、石油化学物質、または環境水（例えば、水路）もしくは工業用水の貯水池における細菌の増殖を死滅させるか、または阻害するための方法を提供する。

【００５９】

２．工程（ｂ）～（ｄ）を、宿主細胞内で実施し；ドナー鎖が、細胞の染色体またはエピソームの鎖であってもよい、実施形態１の方法。

【００６０】

ある例においては、細胞は、真核細胞（例えば、ヒト細胞、非ヒト動物細胞、酵母細胞、または植物細胞）である。

【００６１】

ある例においては、方法を、ヒト（例えば、この場合、方法は、美容法である）、胚（例えば、非ヒト胚）、接合体（例えば、非ヒト接合体）、生殖細胞（例えば、ヒト生殖細胞または非ヒト生殖細胞）、または非ヒト動物において実行する。

【００６２】

ある例においては、方法を、インビトロにおいて実行する。ある例においては、方法を、インビボ（in vivo）（例えば、ヒトまたはヒト胚ではない）において実行する。

【００６３】

本発明における使用のために、ベクターを、細胞へと、例えば、注射もしくは電気穿孔により、または細胞融合により導入することができる。

【００６４】

３．ベクターが、工程（ａ）において、環状であり、環状ベクターを、工程（ｂ）における細胞へと導入する、実施形態２の方法。

【００６５】

４．第１の鎖、ドナー鎖、またはさらなる鎖（例えば、第１の鎖）が、ＢＡＣに含まれる、実施形態１、２、または３の方法。

【００６６】

例えば、ドナー鎖は、ＢＡＣに含まれ、この場合、ＲＳは、前記ＢＡＣのヒト配列または齧歯動物（例えば、マウス）配列である。

【００６７】

５．ベクターが、工程（ａ）において、環状であり、かつ／または工程（ｄ）の生成物が、環状ベクターである、任意の先行する実施形態の方法。

【００６８】

この態様は、ベクター内の、大型（＞１０ｋｂ）または極めて大型（＞１００ｋｂ）の

、ＩＳまたはＲＳに適応させるのに有利である。これは、当技術分野で公知の、ＨＲまたはＳＳＲのために、大型の直鎖状核酸断片を操作および精製する問題を回避する［本発明のこの実施形態は、インサイチューにおいて、ＨＲのために、組換え誘導性直鎖状基質をもたらすが、初期または後続の操作工程（鎖を組み合わせるか、または第１の鎖を、標的細胞へと導入する工程など）は、環状基質により実行され、これは、大型の取込み断片の使用または大型の断片の挿入を容易とするので］。さらに、環状ベクターは、本発明の方法を、細胞において実施するために、細胞により、たやすく取り込まれるので、本発明に有用である。ある例においては、ベクターは、閉環状ベクター（例えば、スーパーコイル状閉環状ベクター）である。本発明者は、これが、細胞により、極めて効率的に取り込まれることを認識した。スーパーコイル状ＤＮＡは、大腸菌を、ほどけた開環状ＤＮＡより、少なくとも１００倍良好に形質転換する。

【００６９】

６．ベクターが、ＢＡＣ、ＹＡＣ、ＰＡＣ、プラスミド または コスミドであり、ドナー鎖が、ＢＡＣ、ＹＡＣ、ＰＡＣ、コスミド、またはプラスミドに含まれてもよい、任意の先行する実施形態の方法。

【００７０】

環状ＹＡＣ／ＢＡＣとしてのＹＡＣの回収および潜在的な有用性の詳細については、Nucleic Acids Res. 2000 Sep 1; 28(17): e81; PMCID: PMC110718; Massimo Cocchia et alが参照される。ある例においては、本発明のベクターは、最長で２５０、５００、または６７０ｋｂのＩＳまたはＲＳを含む環状ＹＡＣである。

【００７１】

ある例においては、ベクターは、最長で２５０または３００ｋｂのＩＳまたはＲＳを含む環状ＢＡＣである。

【００７２】

７．ＲＳまたはＩＳが、少なくとも１ｋｂの長さである、任意の先行する実施形態の方法。

【００７３】

８．ＲＳまたはＩＳが、少なくとも１０ｋｂの長さである、実施形態７の方法。

【００７４】

９．ＲＳまたはＩＳが、少なくとも１００ｋｂの長さである、実施形態７の方法。

【００７５】

例えば、ＲＳは、少なくとも１、１０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ｋｂ、または１Ｍｂの長さであり、工程（ｄ）の生成物は、ＲＳを含む閉環状ベクターである。例えば、ＩＳは、少なくとも１、１０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ｋｂ、または１Ｍｂの長さであり、工程（ａ）のベクターは、ＩＳを含む閉環状ベクターである。

【００７６】

１０．ＣＳ１またはＣＳ３が、ＨＡ１から、２５０ｎｔ（すなわち、２５０連続ヌクレオチド）を超えない、任意の先行する実施形態の方法。

【００７７】

「ｎｔ」という用語は、連続ヌクレオチドを指す。

【００７８】

１１．ＣＳ２またはＣＳ４が、ＨＡ２から、２５０ｎｔを超えない、任意の先行する実施形態の方法。

【００７９】

１２．ＨＡ１およびＨＡ２の各々が、少なくとも１５ｎｔの長さである、任意の先行する実施形態の方法。

【００８０】

ある例においては、ＨＡ１は、少なくとも５０、１００、１５０、２００、３００、４

００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ｎｔの長さ、または少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、５０、もしくは１００ｋｂの長さである。ある例においては、ＨＡ２は、少なくとも５０、１００、１５０、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ｎｔの長さ、または少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、５０、もしくは１００ｋｂの長さである。

【００８１】

１３．ＨＡ１およびＨＡ２が、少なくとも０．２ｋｂの全長を含む、任意の先行する実施形態の方法。

【００８２】

ある例においては、ＨＡ１およびＨＡ２は、少なくとも０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、５０、または１００ｋｂの長さの全長を含むか、またはこれらからなる。

【００８３】

１４．ＨＡ１およびＨＡ２が、ＮＳ１およびＮＳ２のそれぞれと同質（すなわち、１００％同一なヌクレオチド配列）である、任意の先行する実施形態の方法。

【００８４】

ある実施形態においては、ＨＡ１およびＨＡ２は、各々、ＮＳ１およびＮＳ２のそれぞれのヌクレオチド配列と、少なくとも８０、８５、９０、または９５％同一である。

【００８５】

１５．ＲＳの、Ｃａｓによる切断、第１の鎖への取込み、またはＩＳの、さらなる鎖への挿入が、マーカー配列（例えば、第１の検出用マーカーを発現させるための配列）を、第１の鎖またはベクターから欠失させるか、または不活化させ、マーカー配列の欠失（例えば、マーカー配列によりコードされる検出用マーカーの非存在）を検出することを含んでもよい、任意の先行する実施形態の方法。

【００８６】

マーカーの例（例えば、方法を、細胞において実行する場合の）は、抗生剤耐性マーカー、例えば、当業者に公知の、ネオ、ハイグロマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコール（chlormaphenicol）、ピューロマイシン（例えば、ｐｕｒｏ－ｄｅｌｔａＴＫ）などの耐性マーカーである。ある例においては、マーカーは、本発明の方法により創出される配列であり、この場合、マーカー配列は、方法の生成物内には存在するが、方法の出発鎖内には存在しない。したがって、マーカー配列は、ＰＣＲ、例えば、ジャンクションＰＣＲにより検出可能である。

【００８７】

ある例においては、マーカー配列は、ＨＰＲＴ配列であり、方法を、細胞の内部において実行する。ＨＰＲＴを欠く細胞を、６－チオグアニン（６－ＴＧ）に対する耐性により選択する。したがって、この例においては、結果として得られる細胞は、６－ＴＧに対して耐性であるので、ＲＳの、第１の鎖への挿入、またはＩＳの、第１の鎖からの欠失（およびさらなる鎖への挿入）により、ＨＰＲＴ配列の欠失または不活化を選択することができる。別の例は、下記において、さらに説明される、チミジンキナーゼを発現させるためのｔｋ配列である。

【００８８】

１６．第１の鎖またはベクターが、方法によって欠失されないマーカー配列（例えば、第２の検出用マーカーを発現させるためのもの）を含み；工程（ｄ）の後で、実施形態１５の方法が欠失させたマーカー配列（または発現産物）（例えば、ＨＰＲＴ配列）の非存在の検出を伴うかまたは伴わずに、マーカー配列［またはその発現産物（product）］の存在を検出することを含んでもよい、任意の先行する実施形態の方法。

【００８９】

ＮｅｏＲ、ＨｙｇＲ、およびＰｕｒｏＲは、哺乳動物細胞内および他の細胞において、マーカーとして広く使用されている。耐性配列を保有する細胞は、Ｇ４１８（ＮｅｏＲ配

列により付与される耐性）、ハイグロマイシン（ＨｙｇＲ配列により付与される耐性）、またはピューロマイシン（ＰｕｒｏＲ配列により付与される耐性）の投与により決定することができる。したがって、一例においては、この実施形態番号１６におけるマーカーは、ＮｅｏＲ、ＨｙｇＲ、およびＰｕｒｏＲから選択される。

【００９０】

したがって、本発明における使用のための適切な選択剤は、以下の通りである。

Ｇ４１８：ゲンタマイシンと同様の、アミノグリコシド抗生剤。原虫および蠕虫に加えて、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、および哺乳動物細胞に対しても毒性である。

ハイグロマイシン：細菌、真菌、および高等真核生物におけるタンパク質合成を阻害する、アミノグリコシド抗生剤。

ピューロマイシン：原核生物および真核生物のいずれにおいても、タンパク質の合成を阻害する、広域スペクトル抗生剤。

【００９１】

ある例においては、方法は、陽性－陰性選択マーカーの検出を使用して、ＲＳを、第１の鎖へと挿入したか、またはＩＳを、第１の鎖から欠失させたことを決定することを含む。この例においては、方法を、細胞において実行し、方法を経た細胞は、陰性選択薬剤下において存続し、陽性薬剤（例えば、上記で言及した抗生剤耐性などの抗生剤耐性）の存在下において増殖する。ガンシクロビルは、チミジンキナーゼ（ｔｋ）配列を含有する任意の細胞を死滅させる。こうして、本発明の方法は、細胞において実施することができ、第１の鎖は、上記の実施形態１５に従うマーカーとしてのチミジンキナーゼを発現させるために、ｔｋを含む。本発明の方法においては、相同組換えまたはＳＳＲの成功を経た細胞を、抗生剤下において増殖させて、組換えについて選択し、ガンシクロビル下において増殖させて、方法に従う組換えを経ることに成功しなかった（すなわち、ｔｋ配列を保持した）任意の細胞を死滅させる。

【００９２】

１７．工程（ａ）において、ベクターが、

Ａ．ＣＳ１を含む、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）と；

Ｂ．ＰＳ１の３’末端と隣接する第１のＰＡＭ（Ｐ１）と；

Ｃ．ＨＡ１と

を含み（５’～３’方向に）；

ＰＳ１のシード配列（seed sequence）（Ｓ１）が、ＣＳ１を、Ｐ１へと接続し、

ＨＡ１が、Ｓ１およびＰ１を含んでもよい、任意の先行する実施形態の方法。

【００９３】

１８．工程（ａ）において、ベクターが、

Ｄ．ＨＡ２と；

Ｅ．ＣＳ２を含む、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）と；

Ｆ．ＰＳ２の３’末端と隣接する第２のＰＡＭ（Ｐ２）と

を含み（５’～３’方向に）；

ＰＳ２のシード配列（Ｓ２）が、ＣＳ２を、Ｐ２へと接続し、

ＰＳ２の残余が、ＨＡ２の３’末端にあってもよい、任意の先行する実施形態の方法。

【００９４】

本明細書による、本発明の任意の態様においては、各プロトスペーサー（例えば、ＰＳ１またはＰＳ２）は、１５～４５連続ヌクレオチド、例えば、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５連続ヌクレオチドからなる。例えば、ＰＳ１は、１８～２１ヌクレオチド、例えば、２０ヌクレオチドからなる。例えば、ＰＳ２は、１８～２１ヌクレオチド、例えば、２０ヌクレオチドからなる。本明細書による、本発明の任意の態様においては、各シード配列（例えば、Ｓ１またはＳ２）は、２～１５連続ヌクレオチド、例えば、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、または２連続ヌクレオチドからなる。例えば、Ｓ１は、５～１２または８～１２ヌクレオチド、例えば、１２ヌクレオチドからなる。例えば、Ｓ２は、５～１２または８～１２ヌクレオチド、例えば、１２ヌ

クレオチドからなる。
【００９５】
本明細書による、本発明の任意の態様においては、各ＰＡＭ（例えば、Ｐ１またはＰ２）は、２、３、４，または５連続ヌクレオチドである。ＰＡＭの選出しは、当業者に公知である通り、切断に使用されるＣａｓにマッチする。ある例においては、ＰＡＭは、本明細書において開示される、任意のＰＡＭである。
【００９６】
本明細書による、本発明の任意の態様においては、Ｃａｓによる切断される各部位は、例えば、コグネイトＰＡＭの、すぐ５’側の、２～５、例えば、２、３、４，または５ヌクレオチドである。例えば、ＣＳ１は、Ｐ１の５’側の３または４ヌクレオチドである。例えば、ＣＳ２は、Ｐ２の５’側の３または４ヌクレオチドである。
【００９７】
１９．同じヌクレアーゼ［例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）］を使用して、ＣＳ１およびＣＳ２を切断する、任意の先行する実施形態の方法。
【００９８】
２０．同じガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１）を使用して、Ｃａｓによる、ＣＳ１およびＣＳ２の切断をガイドする、任意の先行する実施形態の方法。
【００９９】
ある例においては、Ｐ１とＰ２とは、同じＰＡＭ配列からなり、ＣＳ１は、ＣＳ２が、Ｐ２の５’側であるのと同じ数のヌクレオチドだけ、Ｐ１の５’側である。加えて、または代替的に、ＰＳ１は、ＰＳ２と同じ配列からなる。加えて、または代替的に、Ｓ１は、Ｓ２と同じ配列からなる。ある例においては、Ｐ１に対するＰＳ１の配列の関係（およびＰＳ１の配列がＰ１を含むこと）は、Ｐ２に対するＰＳ２の配列の関係（およびＰＳ２の配列がＰ２を含むこと）と同じであり、Ｐ１とＰ２とは、同じＣａｓ９とコグネイトであってもよい。
【０１００】
「～とコグネイト（cognate to）」または「～とコグネイト（cognate with）」または同様の用語は、当業者にたやすく理解されるであろう。例えば、ＰＡＭ　ＮＧＧは、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９と共に機能し、したがって、このＰＡＭは、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９とコグネイトである。
【０１０１】
２１．前記ＰＳ２の残余が、ＮＳ２に含まれる（例えば、ＮＳ２の３’末端において）か、またはドナー鎖内のＮＳ２と隣接する（例えば、ＮＳ２の３’末端と隣接するか、または前記末端の３’側にフランキングする）である、実施形態１８に従属する場合、実施形態２０の方法。
【０１０２】
２２．ＮＳ１およびＮＳ２が、工程（ｃ）において使用される、Ｃａｓヌクレアーゼにより認識される、プロトスペーサー／ＰＡＭ部位にはないか、またはこれと隣接しない、任意の先行する実施形態の方法。
【０１０３】
したがって、方法においては、ドナー鎖またはさらなる鎖を、Ｃａｓヌクレアーゼにより切断しない。代替的な実施形態においては、ドナー鎖またはさらなる鎖を、Ｃａｓヌクレアーゼにより切断する。これは、ＨＲのために有用である。
【０１０４】
２３．工程（ｄ）の前に、または工程（ｄ）中に、ドナー鎖またはさらなる鎖を、ＮＳ２の５’末端において、もしくは前記末端の５’側にフランキングして切断し；かつ／またはＮＳ１の３’末端において、もしくは前記末端の３’側にフランキングして切断する、実施形態１～２１のうちのいずれか１つの方法。
【０１０５】
２４．生成物ベクターの前記ＲＳの全部または一部を、さらなる核酸鎖へと挿入するこ

とをさらに含み、生成物ベクターが、閉環状ベクターであってもよく、ベクターを、ＲＳの外部において（例えば、ＨＡ１およびＨＡ２の外部において）切断し（例えば、Ｃａｓを使用して）、かつ／またはＲＳを、さらなる鎖へと挿入する前に、さらなる鎖を切断する（例えば、Ｃａｓを使用して）、任意の先行する実施形態の方法。

【０１０６】

例えば、さらなる鎖を、実施形態２３において規定した通りに切断する。

【０１０７】

２５．前記さらなる鎖との相同組換えにおいて、ＨＡ１および／またはＨＡ２を使用して、ＲＳ配列を、さらなる鎖へと挿入し；前記さらなる鎖が、ＮＳ１およびＮＳ２、または各々が、ＮＳ１およびＮＳ２と、少なくとも８０、９０もしくは９５％同一な（または１００％同一な）配列を含んでもよい、実施形態２４の方法。

【０１０８】

２６．さらなる鎖が、細胞に含まれ、工程（ｄ）のベクター生成物（例えば、閉環状ベクターまたはスーパーコイル状ベクター）を、前記相同組換えの前に、細胞へと挿入する、実施形態２５の方法。

【０１０９】

２７．前記さらなる鎖が、幹細胞、例えば、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）（例えば、インビトロにおけるヒトｉＰＳ細胞）；免疫細胞（例えば、Ｔ細胞またはＢ細胞）；胚性幹細胞（例えば、マウスＥＳ細胞またはラットＥＳ細胞）に含まれ；幹細胞生成物を、組織または非ヒト生物（例えば、マウスまたはラット）へと発生させることを含んでもよい、実施形態２４、２５、または２６の方法。

【０１１０】

例えば、幹細胞は、多能性幹細胞、複能性幹細胞、または全能性幹細胞である。ある例においては、幹細胞は、非ヒト幹細胞であり、インビトロにおける幹細胞である。

【０１１１】

２８．遺伝子治療のための、実施形態２４～２７のうちのいずれか１つの方法であって、さらなる鎖の突然変異を、ＲＳの、さらなる鎖への、前記相同組換え挿入により除去し；さらなる鎖生成物または前記生成物中のＲＳを、単離またはシーケンシングすることを含んでもよい方法。

【０１１２】

ある例においては、遺伝子治療は、ヒト、動物、植物、または酵母細胞の治療である。別の例においては、治療は、ヒト、動物、または植物の治療である。

【０１１３】

２９．細胞または後代が、前記さらなる鎖を含み、さらなる鎖が、前記遺伝子の突然変異を含み、

（ｉ）第２のヒト細胞（例えば、標的細胞の後代または祖先、例えば、同じ培養物から培養された細胞）を得、実施形態１～２４のうちのいずれか１つの方法を、第２の細胞内部において実行することであり、工程（ｄ）の生成物ベクター内のＲＳが、前記遺伝子欠損を含むことと；

（ｉｉ）遺伝子操作（例えば、リコンビニアリング）を使用して、欠損を補正し、これにより、補正されたＲＳ配列を含む生成物ベクターを作製することと；

（ｉｉｉ）補正されたＲＳ配列を、補正されていない標的細胞または補正されていないその後代（例えば、ｉＰＳ細胞）へと挿入すること（例えば、閉環状ベクターまたはスーパーコイル状ベクターなど、補正された生成物ベクターを挿入することにより）であり、補正されたＲＳ配列が、補正されていないＲＳ配列を補充するかまたは置きかえ、これにより、補正された標的細胞またはその後代を作製することと；

（ｉｖ）適宜、補正された細胞を培養するか、または組織を、補正された細胞から発生させることと

を含む、インビトロの標的ヒト細胞またはその後代において、遺伝子の突然変異を補正するための、実施形態２４～２８のうちのいずれか１つの［例えば、工程（ｄ）においてＨ

Ｒを使用する、実施形態１に従属しない（dependent from）場合における］方法。
【０１１４】
３０．標的細胞内または後代内の、補正されていないＲＳ配列の、補正されたＲＳ配列にフランキングするＨＡ１および／またはＨＡ２による相同組換えを使用し、これにより、補正されていないＲＳ配列を置きかえ；補正されていないＲＳ配列と、補正されたＲＳ配列とが、補正された突然変異だけにより異なってもよい、実施形態２９の方法。
【０１１５】
３１．工程（ｉｉｉ）において、補正された閉環状生成物ベクターを、標的細胞または後代へと挿入し；補正されたＲＳが、少なくとも１０または１００ｋｂの長さであってもよい、実施形態２９または３０の方法。
【０１１６】
補正ＲＳは、最大で３００ｋｂであってもよく、かつ／またはベクターは、ＢＡＣであってもよい。
【０１１７】
３２．細胞が、同じヒト対象の細胞であり、同じ細胞型（例えば、同じヒト対象に由来する、成体幹細胞または臍帯血幹細胞）であってもよい、実施形態２９～３１のうちのいずれか１つの方法。
【０１１８】
３３．ヒトにおける遺伝子欠損を処置するための、実施形態２９～３２のうちのいずれか１つに列挙される、補正細胞、補正ベクター、または補正ＲＳ配列。
【０１１９】
ある例においては、方法は、ヒト対象を医学的に処置する方法であって、対象へと、対象から発生させた、補正された細胞もしくは後代（例えば、ｉＰＳ細胞）または組織を投与し、これにより、対象における医学的処置を得ることを含む方法を提供する。
【０１２０】
３４．さらなる鎖が、免疫細胞、例えば、Ｔ細胞またはＢ細胞（例えば、ヒト細胞）に含まれ；さらなる鎖内のＲＳが、抗原受容体またはその鎖もしくはドメイン（例えば、Ｔ細胞受容体またはＢ細胞受容体、例えば、キメラ抗原受容体またはその構成要素）をコードしてもよい、実施形態２４～３２のうちのいずれか１つの方法。
【０１２１】
３５．キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）（例えば、ヒトＣＡＲ－Ｔ細胞）を作製するための、実施形態１～３２および３４のうちのいずれか１つの方法。
【０１２２】
３６．第１のベクターが、アデノウイルスベクターである、実施形態１～３５のうちのいずれか１つの方法。
【０１２３】
３７．さらなる鎖が、アデノウイルスベクターに含まれる、実施形態２４、２５、または２６の方法。
【０１２４】
３８．リコンビニアリング法である、実施形態１～２６のうちのいずれか１つの方法。
【０１２５】
ある例においては、方法を、インビトロの、細菌細胞（例えば、大腸菌細胞）において実行する。
【０１２６】
３９．対象における疾患または状態を処置または防止するように、ベクター生成物、鎖生成物、もしくは細胞生成物、またはＲＳ生成物を、ヒト対象または動物対象へと投与すること；あるいは対象における疾患または状態を処置または防止する、ヒト対象または動物対象への投与のための、任意の先行する実施形態の方法により得ることが可能な、ベクター生成物、核酸鎖生成物、もしくは細胞生成物、またはＲＳ生成物を含む、任意の先行する実施形態の方法。

【０１２７】
４０．工程（ｂ）および／または（ｄ）において、ベクターが、閉環状ベクターである、任意の先行する実施形態の方法。
【０１２８】
例えば、ベクターは、スーパーコイル状であってもよい、共有結合的な閉環状ベクターである。ある例においては、方法を、細胞において実行し、工程（ｂ）において、細胞を、複数の前記ベクターと組み合わせる。ある例においては、複数は、複数の前記閉環状ベクターを含み、前記環状ベクターのうちの１または複数を、細胞へと導入する。 ある例においては、１または複数のベクターを、注射、電気穿孔、または細胞融合により、細胞へと導入する。
【０１２９】
４１．工程（ｂ）において、ベクターが、スーパーコイル状である、実施形態４０の方法。
【０１３０】
これは、方法において、大型（＞１０ｋｂ）または極めて大型（＞１００ｋｂ）のＲＳまたはＩＳを、取り込むか、または挿入する、本発明における細胞の効率的な形質転換に、特に有用である。
【０１３１】
４２．ＨＡ１とＨＡ２との間［例えば、ベクターが、工程（ａ）において環状である場合、ＨＡ２の３’末端と、ＨＡ１の５’末端との間］の配列を、第１の鎖から欠失させ、かつ／またはＮＳ１とＮＳ２との間の配列を、ドナー鎖またはさらなる鎖から欠失させる、任意の先行する実施形態の方法。
【０１３２】
４３．ＲＳを、ドナー鎖から欠失させる、実施形態１に従属しない場合における、実施形態４２の方法。
【０１３３】
４４．ＨＡ１の５’末端におけるプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ、または前記末端の５’側にフランキングするプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せを、工程（ｄ）により破壊する、例えば、ＰＳ１配列を欠失させ、これにより、ＰＳ１を、第１の鎖内で、非機能的とする、実施形態１に従属しない場合における、任意の先行する実施形態の方法。
【０１３４】
これは、次の実施形態である方法によりもたらされる変化を確定するために有用である。
【０１３５】
４５．ＨＡ２の３’末端におけるプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ、または前記末端の３’側にフランキングするプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せを、工程（ｄ）により破壊する、例えば、ＰＳ２配列および／またはＰ２を欠失させ、これにより、ＰＳ２を、第１の鎖内で、非機能的とする、実施形態１に従属しない場合における、任意の先行する実施形態の方法。
【０１３６】
４６．ドナー鎖またはさらなる鎖の配列を、第１の鎖へと挿入し、かつ／または配列（例えば、ＩＳ）を、第１の鎖から欠失させて、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ［例えば、ベクターが、実施形態１の工程（ｄ）において、環状である場合、ＨＡ２の３’末端と、ＨＡ１の５’末端との間の］または新たなマーカー配列を形成する、任意の先行する実施形態の方法。
【０１３７】
４７．ドナー鎖配列を、ＣＳ１のすぐ５’側に挿入し、ドナー配列と、ＰＳ１配列とが併せて、Ｐ１と隣接する新たなプロトスペーサーを形成し（または前記相同組換えが生じたことを検出するための、新たなマーカー配列を形成し）；かつ／またはドナー配列を、ＣＳ２のすぐ３’側に挿入し、ドナー配列と、ＰＳ２配列とが併せて、Ｐ２と隣接する新たなプロトスペーサーを形成する（または前記相同組換えが生じたことを検出するための、新

たなマーカー配列を形成する）、実施形態１に従属しない場合における、実施形態４６の方法。

【０１３８】

新たなマーカーは、例えば、本明細書において開示される、抗生剤耐性マーカー配列でありうる。方法は、新たなマーカー配列またはその発現産物の存在を検出することを含んでもよい。

【０１３９】

４８．工程（ｄ）の後において、例えば、その後における、さらなる配列の、第１の鎖への挿入のための、または実施形態２４～３２および３４～３７のうちのいずれか１つの方法を実行するための、新たな組合せのプロトスペーサーを切断するＣａｓを含むか；適宜、工程（ｃ）において使用されるＣａｓと異なるＣａｓヌクレアーゼを使用して、新たな組合せのプロトスペーサーを切断することを含むか；または前記新たなマーカー（maker）を検出することを含む、実施形態４６または４７の方法。

【０１４０】

４９．ドナー配列を、ドナー鎖またはさらなる鎖から欠失させて、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ（例えば、ＮＳ２の３’末端と、ＮＳ１の５’末端との間における）または新たなマーカー配列を形成する、任意の先行する実施形態の方法。

【０１４１】

５０．新たなプロトスペーサー／ＰＡＭ配列またはマーカーの配列が、工程（ｄ）の前に、ドナー鎖ドナーまたはさらなる鎖において見出される、ヌクレオチド配列（ＮＳ３およびＮＳ４）に含まれ、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたはマーカー配列を、工程（ｄ）におけるドナー配列（例えば、ＲＳ）またはさらなる鎖の配列の欠失、およびＮＳ３の、ＮＳ４への接続の後において形成する、実施形態４９の方法。

【０１４２】

５１．工程（ｄ）の後のドナー鎖またはさらなる鎖において、例えば、その後における、さらなる配列の、ドナー鎖への挿入またはドナー鎖からの欠失のための、新たな組合せのプロトスペーサーを切断するＣａｓを含むか；適宜、工程（ｃ）において使用されるＣａｓと異なるＣａｓヌクレアーゼを使用して、ドナー鎖またはさらなる鎖において、新たな組合せのプロトスペーサーを切断することを含むか；またはドナー鎖において前記新たなマーカーを検出することを含む、実施形態４９または５０の方法。

【０１４３】

５２．工程（ｄ）の前に、ＮＳ３が、欠失させるドナー鎖またはさらなる鎖の配列の５’側にフランキングし、ＮＳ４が、欠失させるドナー配列またはさらなる配列の３’側にフランキングし、工程（ｄ）において、配列を、欠失させ、ＮＳ３の３’末端を、ＮＳ４の５’末端へと接続し、これにより、ドナー鎖またはさらなる鎖において、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたはマーカー配列を形成する、実施形態５１の方法。

【０１４４】

ある例においては、ＮＳ３は、欠失させる配列の５’末端とすぐ隣接するか、または前記末端の５’側から１０ヌクレオチド以内にある。ある例においては、ＮＳ４は、欠失させる配列の３’末端とすぐ隣接するか、または前記末端の３’側から１０ヌクレオチド以内にある。

【０１４５】

５３．欠失が生じた場合に、修飾ドナー鎖もしくは修飾されたさらなる鎖、またはドナー核酸配列もしくはさらなる核酸配列の修飾領域を単離またはコピーすることを含む、任意の先行する実施形態の方法。

【０１４６】

例えば、単離またはコピーすることは、ＰＣＲを使用する。

【０１４７】

５４．ＲＳまたはＩＳが、調節エレメント、タンパク質をコードする配列、エクソン、またはマーカー配列を含むか、またはこれらからなる、任意の先行する実施形態の方法。

【０１４８】
５５．工程（ｄ）において、ＲＳを、第１の鎖へと挿入し、挿入された配列が、修飾された第１の鎖からの発現について機能的であり、適宜、挿入された配列の発現産物を検出することを含む、実施形態１に従属する場合における、任意の先行する実施形態の方法。
【０１４９】
５６．挿入された配列が、第１の鎖の調節エレメントと機能的な配置において挿入される、タンパク質をコードする配列、エクソン、またはマーカー配列であり、これにより、調節エレメントが、修飾された第１の鎖からの、ドナー配列の発現を制御することが可能である、実施形態５５の方法。
【０１５０】
５７．挿入されたドナー配列が、マーカー配列であり、方法が、修飾された第１の鎖またはさらなる鎖内のマーカー配列を検出するか；または発現したマーカーを検出することを含み、マーカーが、工程（ｄ）の前に、検出可能ではない、任意の先行する実施形態の方法。
【０１５１】
５８．ＲＳを、ドナー鎖から欠失させ、欠失が、宿主細胞に対して致死性である、実施形態２の方法、または、実施形態２に従属しない場合における、任意の先行する実施形態の方法。
【０１５２】
５９．細胞の生存能、増殖を下方調節する（例えば、細胞を死滅させる）、実施形態２の方法、または、実施形態２に従属しない場合における、任意の先行する実施形態の方法。
【０１５３】
６０．細胞の生存能、増殖を上方調節する（例えば、細胞を死滅させる）、実施形態２の方法、または、実施形態２に従属しない場合における、実施形態３～５８のうちのいずれか１つの方法。
【０１５４】
６１．細菌細胞または古細菌細胞、例えば、大腸菌細胞において実行される、実施形態２の方法、または、実施形態２に従属しない場合における、任意の先行する実施形態の方法。
【０１５５】
６２．細胞が、ヒト病原体種のものである、実施形態６１の方法。
【０１５６】
６３．細胞が、ヒトマイクロバイオーム種、例えば、ヒト消化管マイクロバイオーム種の細胞である、実施形態６１または６２の方法。
【０１５７】
６４．第１の鎖が、バクテリオファージの核酸鎖であり、宿主細胞に、バクテリオファージを感染させることにより、バクテリオファージ鎖を、宿主細胞へと導入する、実施形態６１～６３のうちのいずれか１つの方法。
【０１５８】
６５．細胞が、内因性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を含み、工程（ｃ）において、内因性の宿主Ｃａｓを使用して切断する、実施形態２の方法、または、実施形態２に従属しない場合における、任意の先行する実施形態の方法。
【０１５９】
６６．外因性Ｃａｓ、または外因性Ｃａｓをコードする配列を、細胞へと導入せずに実行される、実施形態２の方法、または、実施形態２に従属しない場合における、任意の先行する実施形態の方法。
【０１６０】
６７．細胞において実行されて、原核細胞の集団を死滅させ、細胞が、同じ種または株のものである、実施形態２の方法、または、実施形態２に従属しない場合における、任意の先行する実施形態の方法。

【０１６１】
これは、例えば、ヒト、動物、食品、飲料、化粧品、石油化学物質、または環境物質（例えば、土壌または水または水性流体）における、細菌集団の処理、除去、または防止のための抗生剤法として有用である。
【０１６２】
６８．集団が、原核（例えば、細菌）細胞の混合集団に含まれ、混合集団内の、全部ではないが一部の細胞を、選択的に死滅させ、死滅させる細胞が、第１の鎖を導入し、ＣＳ１および／またはＣＳ２を、Ｃａｓにより切断した細胞である、実施形態６７の方法。
【０１６３】
６９．ＰＳ１およびＰ１が、死滅させる細胞のＣａｓヌクレアーゼ（例えば、内因性Ｃａｓ）とコグネイトではあるが、死滅させない集団内の細胞とコグネイトではなく、ＣＳ１を、死滅させる細胞において、選択的に切断し；かつ／またはＰＳ２およびＰ２が、死滅させる細胞のＣａｓヌクレアーゼ（例えば、内因性Ｃａｓ）とコグネイトではあるが、死滅させない集団内の細胞とコグネイトではなく、ＣＳ２を、死滅させる細胞において、選択的に切断する、実施形態６７または６８の方法。
【０１６４】
７０．生成物集団または前記生成物の試料を単離することを含む、実施形態６７～６９のうちのいずれか１つの方法。
【０１６５】
７１．ドナー鎖、細胞、または集団が、食品、食物成分、または前駆体成分；飲料；水（例えば、ヒト摂取に意図される）；工業用物質または環境物質（例えば、油、石油製品、土壌、または水路もしくは貯水池；あるいは油、石油製品、土壌、水、食品、食品成分もしくは食品前駆体、または飲料もしくは飲料成分もしくは飲料前駆体を回収または処理するための装置）に含まれる、任意の先行する実施形態の方法。
【０１６６】
７２．工程（ｃ）が、第１の鎖を、ＰＳ１とハイブリダイズして、ＰＳ１を切断するように、Ｃａｓをガイドする、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）へと曝露することを含み；工程（ｃ）が、ｇＲＮＡ１またはそのｃｒＲＮＡ配列を、工程（ｂ）において使用される（例えば、第１の鎖の一部として）ヌクレオチド配列から発現させることを含んでもよく；かつ／または工程（ｃ）が、第１の鎖を、ＰＳ２とハイブリダイズして、ＰＳ２を切断するように、Ｃａｓをガイドする、ｇＲＮＡ１または第２のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ２、例えば、単一のｇＲＮＡ）へと曝露することを含み；工程（ｃ）が、ｇＲＮＡ１もしくはｇＲＮＡ２またはこれらのｃｒＲＮＡ配列を、工程（ｂ）において使用される（例えば、第１の鎖の一部として）ヌクレオチド配列から発現させることを含んでもよい任意の先行する実施形態の方法。
【０１６７】
７３．第１の鎖または各鎖が、ｄｓＤＮＡである、任意の先行する実施形態の方法。
【０１６８】
例えば、前記鎖（例えば、第１の鎖およびドナー鎖、または第１の鎖およびさらなる鎖）の全ては、ｄｓＤＮＡ鎖である。
【０１６９】
７４．第１の鎖または各鎖が、ｓｓＤＮＡである、任意の先行する実施形態の方法。
【０１７０】
例えば、前記鎖（例えば、第１の鎖およびドナー鎖、または第１の鎖およびさらなる鎖）の全ては、ｓｓＤＮＡ鎖である。
【０１７１】
７５．工程（ｃ）において、Ｃａｓによる切断が、第１の鎖内のプロトスペーサー配列（例えば、ＰＳ１および／またはＰＳ２）内にあり、プロトスペーサーが、シード配列（例えば、Ｓ１またはＳ２）を含み、シード配列が、細胞ゲノムにおいて、希少であるか、または見出されないヌクレオチド配列を含む、任意の先行する実施形態の方法（例えば、

真核細胞、例えば、ヒト細胞において実行される場合の）。

【０１７２】

これは、方法において使用される鎖の、所望される位置以外の場所における、オフ部位切断の可能性を最小化するのに有用である。オフ部位切断は、例えば、ヒト細胞の遺伝子治療においては、回避しなければならない。したがって、本発明は、原核配列を使用して、真核（例えば、ヒトまたは動物または植物または酵母）標的細胞内の、Ｃａｓによる切断を方向付けることの有用性を実現する。したがって、本発明は、この概念についてのさらなる実施形態を、以下の通りに提供する。

【０１７３】

７６．シード配列が、原核生物の開始コドン、例えば、ＧＴＧコドンおよび／もしくはＴＴＧコドンを含み、シード配列が、ＡＴＧコドンを含まなくてもよい、実施形態７５の方法。

【０１７４】

７７．シード配列が、シャインダルガノ配列を含み、例えば、シード配列が、ＧＡＧＧまたはＡＧＧＡＧＧを含む、実施形態７５または７６の方法。

【０１７５】

７８．工程（ｃ）において、Ｃａｓによる切断が、原核生物（例えば、大腸菌）、古細菌、またはウイルスにおける使用に最適化されているか、または細胞ゲノムにおいて見出されないプロトスペーサー配列内にある、任意の先行する実施形態の方法（例えば、真核細胞、例えば、ヒト細胞において実行される場合の）。

【０１７６】

この実施形態は、原核生物などにおける配列は、これらの生物における使用のために最適化され（コドン最適化され）、したがって、配列の最適化は、真核生物における使用のための最適化と異なるという観察に基づく。これは、方法を、真核（例えば、ヒト、例えば、ｉＰＳ）細胞において実施する場合に、切断の特異性の可能性を増大させる。

【０１７７】

７９．プロトスペーサー配列（例えば、最大で２５、２１、または２０連続ヌクレオチドである）が、細菌プリブノーボックスの配列；細菌のリーダー配列（例えば、ＰｅｌＢ）；細菌の－１０配列または細菌の－３５エレメント配列（例えば、ＴＡＴＡＡＴまたはＴＴＧＡＣＡ）；細菌の上流プロモーターエレメント（ＵＰエレメント）配列；細菌の調節配列もしくはオペロン配列；または細菌の複製起点配列を含む、実施形態７８の方法。

【０１７８】

８０．例えば、実施形態１に従属しない場合における、任意の先行する実施形態に記載の方法における、第２の核酸鎖との相同組換えに適する、第１の核酸鎖を作製する方法であって、

（ａ）第２の鎖の、第１のヌクレオチド配列および第２のヌクレオチド配列（ＮＳ１およびＮＳ２）を同定することであり、適宜、ＮＳ１を、第２の鎖内のＮＳ２の３’側となるように選択することと；

（ｂ）別の核酸鎖において、

ｉ．ＨＡ１とＮＳ１との相同組換えのための、第２の鎖の第１の所定の標的ヌクレオチド配列であるＮＳ１と相補的な第１の相同アーム（ＨＡ１）と；

ｉｉ．ＨＡ２とＮＳ２との相同組換えのための、第２の鎖の第２の所定の標的ヌクレオチド配列であるＮＳ２と相補的な第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

ｉｉｉ．ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であり、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり、ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端にあるか、もしくは前記末端の５’側にフランキングするＰＳ１；および／またはＰＡＭ（Ｐ２）と隣接する、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）であり、Ｐ２が、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するための、前記第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なるＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり、ＣＳ２が、ＨＡ２の３’末端にあるか、もしくは前記末端の３

’側にフランキングするＰＳ２と
を組み合わせ、
　　これにより、第１の鎖を作製することと
を含む、作製する方法。
【０１７９】
　８１．第１の鎖生成物が、閉環状ベクターに含まれ、ベクターが、スーパーコイル状であってもよい、実施形態８０の方法。
【０１８０】
　８２．第１の鎖生成物が、ＢＡＣ、ＹＡＣ、ＰＡＣ、コスミド、またはプラスミドであるベクターに含まれる、実施形態８０または８１の方法。
【０１８１】
　８３．ＣＳ１が、ＨＡ１の前記末端から、２５０ｎｔを超えない、実施形態８０～８２のうちのいずれか１つの方法。
【０１８２】
　ある例においては、ＣＳ１は、ＨＡ１の前記末端から、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、または２５０ｎｔを超えない。
【０１８３】
　８４．ＣＳ２が、ＨＡ２の前記末端から、２５０ｎｔを超えない、実施形態８０～８３のうちのいずれか１つの方法。
【０１８４】
　ある例においては、ＣＳ１は、ＨＡ２の前記末端から、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、または２５０ｎｔを超えない。
【０１８５】
　８５．ＨＡ１およびＨＡ２の各々が、少なくとも１５ｎｔの長さである、実施形態８０～８４のうちのいずれか１つの方法。
【０１８６】
　ある例においては、ＨＡ１は、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、７００、８００、または９００ｎｔであり、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、５０、１００、２００、３００、４００、または５００ｋｂの長さである。ある例においては、ＨＡ２は、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、７００、８００、または９００ｎｔであり、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、５０、１００、２００、３００、４００、または５００ｋｂの長さである。
【０１８７】
　８６．ＨＡ１およびＨＡ２が、少なくとも０．２ｋｂの全長を含む、実施形態８０～８５のうちのいずれか１つの方法。
【０１８８】
　ある例においては、ＨＡ１およびＨＡ２は、少なくとも０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、５０、または１００ｋｂの全長を含むか、またはこれらからなる。
【０１８９】
　８７．ＨＡ１およびＨＡ２が、ＮＳ１およびＮＳ２のそれぞれと、同質であるか、または少なくとも８０、９０、もしくは９５％同一である、実施形態８０～８６のうちのいずれか１つの方法。
【０１９０】
　８８．第１の鎖生成物が、
　Ｇ．ＣＳ１を含む、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）と；

Ｈ．ＰＳ１の３’末端と隣接する第１のＰＡＭ（Ｐ１）と；
Ｉ．ＨＡ１と
を含み（５’～３’方向に）、
ＰＳ１のシード配列（Ｓ１）が、ＣＳ１を、Ｐ１へと接続し、
ＨＡ１が、Ｓ１およびＰ１を含んでもよく；かつ／または
第１の鎖生成物が、
Ｊ．ＨＡ２と；
Ｋ．ＣＳ２を含む、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）と；
Ｌ．ＰＳ２の３’末端と隣接する第２のＰＡＭ（Ｐ２）とを含み、
ＰＳ２のシード配列（Ｓ２）が、ＣＳ２を、Ｐ２へと接続し、
ＰＳ２の残余が、ＨＡ２の３’末端にあってもよい、
実施形態８０～８７のうちのいずれか１つの方法。

【０１９１】

８９．第１の鎖内に、前記第１のＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９）をコードする、発現可能なヌクレオチド配列をもたらすことを含み；第１の鎖が、ＰＳ１と相補的なｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードする、発現可能なヌクレオチド配列を含む（または第１の鎖を、これを含むさらなる鎖と組み合わせる）か；または配列が、宿主細胞において、適宜、宿主細胞の配列によりコードされるｔｒａｃｒＲＮＡと共に、ｇＲＮＡ１を形成する、発現可能なｃｒＲＮＡをコードする、実施形態８０～８８のうちのいずれか１つの方法。

【０１９２】

ある例においては、ｔｒａｃｒＲＮＡは、ベクター配列、例えば、第１のベクターまたは第１のベクターと組み合わせる（例えば、方法を実施する場合に、細胞へと共形質転換される）別のベクターによりコードされる。

【０１９３】

９０．工程（ｂ）の後において、同じＣａｓヌクレアーゼであってもよい、ＣａｓによるＣＳ１および／またはＣＳ２の切断を含む、実施形態８０～８９のうちのいずれか１つの方法。

【０１９４】

９１．細胞内、例えば、原核細胞において実行される、実施形態８０～９０のうちのいずれか１つの方法。

【０１９５】

９２．リコンビニアリングを含む、実施形態９１の方法。

【０１９６】

９３．ＮＳ１およびＮＳ２が、例えば、原核細胞の、必須遺伝子、抗生剤耐性遺伝子、または毒性遺伝子の配列にフランキングする、実施形態８０～９２のうちのいずれか１つの方法。

【０１９７】

ある例においては、原核細胞は、本明細書において記載される、任意の原核細胞（例えば、ヒト病原体細胞）である。

【０１９８】

９４．方法の生成物を、抗生剤と組み合わせて含む、抗生剤組成物または抗生剤キットをさらに作製し、ＮＳ１およびＮＳ２が、抗生剤耐性遺伝子（例えば、前記原核細胞の）の配列にフランキングし、抗生剤が、核酸と組み合わされた抗生剤である、実施形態９３の方法。

【０１９９】

９５．第１の鎖内に（または、第１の鎖に加えて、さらなる核酸鎖上に）、ＰＳ１および／もしくはＰＳ２と相補的なガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードする、ヌクレオチド配列をさらに含むか；または配列が、細胞において、ｇＲＮＡ１を形成する（適宜、宿主細胞の配列によりコードされるｔｒａｃｒＲＮＡと共に）、ｃ

ｒＲＮＡをコードし；かつ／あるいは第１の鎖内に（または、第１の鎖に加えて、さらなる核酸鎖上に）、ＰＳ２と相補的な、第２のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ２、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードする、ヌクレオチド配列をさらに含むか；または配列が、細胞において、ｇＲＮＡ２を形成する（適宜、宿主細胞の配列によりコードされるｔｒａｃｒＲＮＡと共に）、ｃｒＲＮＡをコードする実施形態８０～９４のうちのいずれか１つの方法。

【０２００】

ある例においては、ｔｒａｃｒＲＮＡは、ベクター配列、例えば、第１のベクターまたは第１のベクターと組み合わせる（例えば、方法を実施する場合に、細胞へと共形質転換される）別のベクターによりコードされる。

【０２０１】

９６．実施形態８０～９５のうちのいずれか１つの、第１の鎖を含む組成物、組成物製品、またはキット製品を作製することをさらに含み、組成物が、農業用薬剤（例えば、除草剤または肥料）、食品、食物成分、または前駆体成分；飲料；水性組成物（例えば、ヒト摂取を意図される）；工業用物質または環境物質（例えば、油、石油製品、土壌、または水路もしくは貯水池；または油、石油製品、土壌、水、食品、食品成分もしくは食品前駆体、または飲料もしくは飲料成分もしくは飲料前駆体を回収もしくは処理するための装置を伴う使用のためのもの）である、実施形態８０～９５のうちのいずれか１つの方法。

【０２０２】

９７．ヒトまたは非ヒト動物における疾患または状態を処置および／または防止するための、実施形態８０～９５のうちのいずれか１つの、第１の鎖を含む医薬、組成物製品、またはキット製品を作製することをさらに含む、実施形態８０～９５のうちのいずれか１つの方法。

【０２０３】

９８．工程（ｂ）が、

（ｉ）細胞の、クローニングされたゲノム配列であって、ＨＡ２およびＨＡ１と、適宜、これらの間の接続配列（joining sequence）（ＪＳ１）とを含む（５’～３’方向に）配列を含む核酸鎖（例えば、ＢＡＣに含まれる）を得ることと；

（ｉｉ）第１の相同性ボックス（first homology box）（ＨＢ１）および第２の相同性ボックス（ＨＢ２）を含む（５’～３’方向に）ターゲティング配列を得ることであり；ＨＢ２の配列が、ＨＡ２の配列、もしくはＪＳ１の５’末端における配列、またはＨＡ２～ＪＳ１の５’末端にわたる配列と同一であり；ＨＢ１の配列が、ＨＡ１の配列、もしくはＪＳ１の３’末端における配列、またはＨＡ１～ＪＳ１の３’末端にわたる配列と同一であり；ターゲティング配列が、ＨＢ１の５’末端を、ＨＢ２の３’末端へと接続する接続配列（ＪＳ２）を含み；ＪＳ２が、前記ＰＳ１／Ｐ１／ＣＳ１の組合せ、および／または前記ＰＳ２／Ｐ２／ＣＳ２の組合せを含み、ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端から、２５０ｎｔを超えず；ＣＳ２が、ＨＡ２の３’末端から、２５０ｎｔを超えないことと；

（ｉｉｉ）工程（ｉ）の核酸鎖と、ターゲティング配列の相同性ボックスとの相同組換え（例えば、リコンビニアリングを使用する）を実行して、

ａ．ＣＳ１とＣＳ２との間の選択用マーカー配列を含んでもよい、ＨＡ２、ＰＳ２（ＣＳ２を含む）、Ｐ２、ＰＳ１（ＣＳ１を含む）、Ｐ１、およびＨＡ１；

ｂ．ＨＡ２、ＰＳ２（ＣＳ２を含む）、Ｐ２、およびＨＡ１；または

ｃ．ＨＡ２、ＰＳ１（ＣＳ１を含む）、Ｐ１、およびＨＡ１

を含む（５’～３’方向に）核酸鎖（第１の核酸鎖）を作製することと

を含む、実施形態８０～９７のうちのいずれか１つの方法。

【０２０４】

９９．前記細胞が、工程（ｉ）の細胞、またはその後代もしくは祖先であり；実施形態２８～３２、３４、および３５のうちのいずれか１つの方法を実行して、前記ヒト細胞の遺伝子治療を実行するか、または前記ＣＡＲ－Ｔ細胞を作製することを含んでもよい、ヒト細胞の遺伝子治療のために、第１の鎖もしくはベクターを作製するか、またはＣＡＲ－Ｔ細胞を作製するための、実施形態９８の方法。

【０２０５】
１００．ＨＡ１とＨＡ２との間の取込み配列（ＲＳ）またはＩＳを含んでもよく、ＲＳが、実施形態１～７９のうちのいずれか１つに規定されるもの、例えば、ヒトもしくは動物のための遺伝子治療のためのもの、またはヒトもしくは動物における細菌感染を処置もしくは防止するためのものである、実施形態８０～９９のうちのいずれか１つの方法により得ることが可能な、第１の鎖、ベクター、組成物、医薬、またはキット。
【０２０６】
１０１．第１の鎖内のプロトスペーサー配列（例えば、ＰＳ１および／またはＰＳ２）を含み、プロトスペーサーが、シード配列（例えば、Ｓ１またはＳ２）を含み、シード配列が、ヒト細胞ゲノムにおいて、希少であるか、または見出されないヌクレオチド配列を含む、ヒト細胞の遺伝子治療における使用のための、実施形態１００の、第１の鎖またはベクター。
【０２０７】
１０２．シード配列が、原核生物の開始コドン、例えば、ＧＴＧコドンおよび／もしくはＴＴＧコドンを含み、シード配列が、ＡＴＧコドンを含まなくてもよい、実施形態１０１の、第１の鎖またはベクター。
【０２０８】
１０３．シード配列が、シャインダルガノ配列を含み、例えば、シード配列が、ＧＡＧＧまたはＡＧＧＡＧＧを含む、実施形態１０１または１０２の、第１の鎖またはベクター。
【０２０９】
１０４．原核生物（例えば、大腸菌）、古細菌、もしくはウイルスにおける使用に最適化されているか、またはヒト細胞ゲノムにおいて見出されない、プロトスペーサー配列（例えば、ＰＳ１および／またはＰＳ２）を含む、実施形態１０１～１０３のうちのいずれか１つの、第１の鎖またはベクター。
【０２１０】
１０５．プロトスペーサー配列（例えば、最大２５または２０の連続ヌクレオチドである）が、細菌プリブノーボックスの配列；細菌のリーダー配列（例えば、Ｐｅｌ　Ｂ）；細菌の－１０配列または細菌の－３５エレメント配列（例えば、ＴＡＴＡＡＴまたはＴＴＧＡＣＡ）；細菌の上流プロモーターエレメント（ＵＰエレメント）配列；細菌の調節配列もしくはオペロン配列；または細菌の複製起点配列を含む、実施形態１０４の、第１の鎖またはベクター。
【０２１１】
１０６．ヒトもしくはヒト細胞の遺伝子治療（例えば、実施形態２８～３２のうちのいずれか１つに従う方法における）ための、またはヒトにおける疾患または状態（例えば、がんまたは自己免疫疾患もしくは自己免疫状態）を処置もしくは防止する、ヒトへの投与のために、キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）（例えば、ヒトＣＡＲ－Ｔ細胞）を作製するための、実施形態１０１～１０５のうちのいずれか１つの、第１の鎖またはベクター。
【０２１２】
１０７．原核宿主細胞の生存能、増殖を阻害する方法であって、
（ｅ）第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＡＭ（Ｐ１）と隣接するプロトスペーサー配列（ＰＳ１）を含む第１のベクターを用意することと；
（ｆ）毒素もしくは毒素前駆体；または毒素もしくは毒素前駆体をコードする配列を含むベクターを用意することであり、毒素が、原核細胞に対して毒性であることと；
（ｇ）細胞を、ベクターと組み合わせることであり、ベクターを、細胞へと導入し、細胞内に毒素をもたらすことと；
（ｈ）第１のＣａｓヌクレアーゼを使用して、第１のベクターの、ＰＳ１の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用することであり、切断が、細胞内の毒素活性を促進し、これにより、細胞を死滅させるか、または細胞の増殖を低減することと
を含む方法。

【０２１３】
ある例においては、本発明の任意の構成の方法は、ヒトまたは動物の身体または胚に対する、治療法、予防法、または診断法ではない。ある例においては、方法は、美容法、または化粧品、医薬、食品、飲料、水、もしくは石油化学物質を作製または処理するための方法である。
【０２１４】
１０８．第１のＣａｓを、ＰＳ１とハイブリダイズする、細胞内の、第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のガイドＲＮＡ）によりガイドし、これにより、Ｃａｓが、ＰＳ１を切断する、実施形態１０７の方法。
【０２１５】
ｇＲＮＡ１をコードする配列は、細胞へと導入されるベクター（例えば、第１のベクター）に含まれてもよい。
【０２１６】
１０９．工程（ｄ）の前に、ｇＲＮＡ１、または細胞内にｇＲＮＡ１をもたらすための配列を、細胞内にもたらすことを含み、配列が、工程（ｃ）において、細胞へと導入される、第１のベクターまたは別のベクターに含まれる、実施形態１０８の方法。
【０２１７】
ある例においては、配列は、ｃｒＲＮＡをコードするか、または発現可能なＣＲＩＳＰＲアレイを含む。
【０２１８】
１１０．第１のＣａｓヌクレアーゼが、細胞に対して内因性である、実施形態１０７～１０９のうちのいずれか１つの方法。
【０２１９】
１１１．宿主細胞を形質転換する方法であって、
（ａ）第１の核酸ベクターを用意することであり、ベクターが、第１の状態にあり、
ｉ．第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトである、ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、プロトスペーサー配列（ＰＳ１）と；
ｉｉ．ベクターの第１の状態をマーキングするための第１のマーカー配列を含む、第１のヌクレオチド配列と
を含むことと；
（ｂ）細胞を、ベクターと組み合わせることであり、ベクターを、細胞へと導入することと；
（ｃ）第１のＣａｓヌクレアーゼを使用して、第１のベクターの、ＰＳ１の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用することであり、切断が、ベクターを、第２の状態へと転換し、マーカー配列を、非機能的とするか、または欠失させることと；
（ｄ）適宜、マーカーが、細胞において非機能的であるか、またはベクターから欠失していることを検出することにより、第２の状態を検出することと
を含む方法。
【０２２０】
マーカー配列は、本明細書において開示される、任意のマーカー配列、例えば、ｔｋ配列またはＨＰＲＴ配列でありうる。
【０２２１】
１１２．切断されたベクターが、細胞の染色体またはエピソームの核酸との相同組換えを経ることを可能とすることにより、マーカー配列を非機能的とするか、または欠失させる、実施形態１１１の方法。
【０２２２】
１１３．ベクター配列を、宿主核酸へと挿入する、実施形態１１２の方法。
【０２２３】
１１４．宿主核酸の配列を、ベクターへと挿入する、実施形態１１１または１１２の方法。

【０２２４】
１１５．ＰＳ１および／またはＰ１を、ベクターにおいて、宿主配列の挿入により破壊する、実施形態１１４の方法。
【０２２５】
１１６．マーカー配列を、Ｃａｓによりベクターから切り出し、相同組換えにより、宿主核酸の配列を、ベクターへと挿入することにより、ベクターに、ギャップ修復を施す、実施形態１１１～１１５のうちのいずれか１つの方法。
【０２２６】
１１７．ＰＳ１および／またはＰ１を、ベクターにおいて、切断により破壊する、実施形態１０７～１１６のうちのいずれか１つの方法。
【０２２７】
１１８．外因性Ｃａｓ、または外因性Ｃａｓをコードする配列を、細胞へと導入せずに、１または複数の細胞において実行される、実施形態１０７～１１６のうちのいずれか１つの方法。
【０２２８】
例えば、細胞は、本明細書において記載される原核細胞、例えば、細菌細胞または古細菌細胞またはヒト病原体細胞またはヒトマイクロバイオーム細胞である。
【０２２９】
１１９．細胞において実行され、ＰＳ１およびＰ１が、工程の切断を実行するために、細胞に対して内因性であるＣａｓとコグネイトである、実施形態１０７～１１８のうちのいずれか１つの方法。
【０２３０】
１２０．細胞において実行されて、原核細胞の集団を死滅させ、細胞が、同じ種または株のものである、実施形態１０７～１１９のうちのいずれか１つの方法。
【０２３１】
１２１．集団が、食品、食物成分、または前駆体成分；飲料；水（例えば、ヒト摂取に意図される）；工業用物質または環境物質（例えば、油、石油製品、土壌、または水路もしくは貯水池；あるいは油、石油製品、土壌、水、食品、食品成分もしくは食品前駆体、または飲料もしくは飲料成分もしくは飲料前駆体を回収または処理するための装置）に含まれる、実施形態１２０の方法。
【０２３２】
１２２．集団が、原核（例えば、細菌）細胞の混合集団に含まれ、混合集団内の、全部ではないが一部の細胞を、選択的に死滅させ、死滅させる細胞が、第１のベクターまたは第１の鎖を導入し、ＰＳ１を、Ｃａｓにより切断した細胞である、実施形態１２０または１２１の方法。
【０２３３】
１２３．第１のベクターもしくは第１の鎖が、細胞において、ＰＳ１と相補的なｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードする配列を含むか；またはベクターもしくは鎖が、細胞において、適宜、宿主細胞の配列によりコードされるｔｒａｃｒＲＮＡと共に、ｇＲＮＡ１を形成する、発現可能なｃｒＲＮＡをコードする、実施形態１２２の方法。
【０２３４】
ｔｒａｃｒＲＮＡは、ベクター配列、例えば、第１のベクターによりコードされてもよい。
【０２３５】
１２４．ＰＳ１およびＰ１が、死滅させる細胞のＣａｓヌクレアーゼ（例えば、内因性Ｃａｓ）とコグネイトではあるが、死滅させない集団内の細胞とコグネイトではなく、ＰＳ１を、死滅させる細胞において、選択的に切断する、実施形態１２２または１２３の方法。
【０２３６】

１２５．混合集団が、ヒトまたは非ヒト動物のマイクロバイオーム集団、例えば、消化管、膣、腋窩、または口腔のマイクロバイオーム集団である、実施形態１２２～１２４のうちのいずれか１つの方法。

【０２３７】

１２６．実施形態１２５の生成物集団、または前記生成物の試料を単離することを含む、実施形態１２５の方法。

【０２３８】

１２７．第１の核酸鎖を含み、細胞が、第２の核酸鎖を含み、第１の鎖が、

（ａ）第１の相同アーム（ＨＡ１）がフランキングする挿入配列（ＩＳ）であり、ＨＡ１が、第２の鎖の所定のヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相補的であり、ＨＡ１が、一方または両方の鎖を修飾するように、細胞内の、ＮＳ１との相同組換えが可能であるＩＳと；

（ｂ）ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であって、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり；

ＣＳ１が、ＨＡ１の末端にあるか、またはこれにフランキングし、ＣＳ１を、第１のＣａｓにより切断して、第１の鎖の切断をもたらすことが可能であり、ＨＡ１が、ＮＳ１との相同組換えが可能である

ＰＳ１と

を含む、細胞（例えば、真核細胞）の形質転換のためのベクター。

【０２３９】

ある例においては、ＩＳは、ＨＡ１とすぐ隣接する、例えば、ＨＡ１の５’末端または３’末端と隣接する。ある例においては、Ｐ１は、ＰＳ１（の３’側）とすぐ隣接する。ある例においては、ＣＳ１は、ＩＳに含まれない。例えば、ＣＳ１は、ＩＳから最も離れたＨＡ１の末端にあるか、または前記末端は、ＣＳ１とＩＳとの相同組換えである。

【０２４０】

１２８．細胞を形質転換することが可能な閉環状ベクターであり、ＩＳが、加えて、少なくとも１０ｋｂのヌクレオチド配列（例えば、ヒト配列）を含み、環状ベクターが、ＨＡ１とＮＳ１との相同組換えのために、細胞を形質転換することが可能である、実施形態１２７のベクター。

【０２４１】

例えば、ＩＳは、少なくとも５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ｋｂ、または１Ｍｂの長さである。

【０２４２】

ＩＳ配列は、ＨＡ１とＮＳ１との相同組換えにより、第２の鎖への挿入が可能である。

【０２４３】

１２９．スーパーコイル状である、実施形態１２８のベクター。

【０２４４】

１３０．第１の鎖が、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のガイドＲＮＡ）と組み合わされているか；またはｇＲＮＡ１をもたらすための、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わされているか、もしくはこれを含み、ｇＲＮＡ１が、ＰＳ１を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ１と相補的なヌクレオチド配列を含む、実施形態１２７、１２８、または１２９のベクター。

【０２４５】

ｇＲＮＡ１は、Ｃａｓを、ＰＳ１へとガイドして、ＰＳ１を切断するために、ＰＳ１、Ｐ１、および第１のＣａｓとコグネイトである。

【０２４６】

１３１．ＣＳ１が、ＨＡ１から、２５０ｎｔを超えて離れない、実施形態１２７～１３０のうちのいずれか１つのベクター。

【０２４７】

ある例においては、ＣＳ１は、ＨＡ１の前記末端から、３、４、５、６、７、８、９、

１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、または２５０ｎｔを超えない。

【０２４８】

１３２．

（ａ）第１の鎖が、細胞内の、ＨＡ２とＮＳ２との相同組換え、および一方または両方の鎖の前記修飾のための、第２の鎖の第２の所定の標的ヌクレオチド配列であるＮＳ２と相補的な第２の相同アーム（ＨＡ２）を含み；

（ｂ）ＩＳが、ＨＡ１とＨＡ２との間にあり；

（ａ）第１の鎖が、ＰＡＭ（Ｐ２）と隣接する、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）を含み、Ｐ２が、切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なるＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり；

ＣＳ２が、ＨＡ２の末端にあるか、またはこれにフランキングし、ＣＳ２を、Ｃａｓにより切断して、第１の鎖の切断をもたらすことが可能であり、ＨＡ２が、ＮＳ２との相同組換えが可能である、

実施形態１２７～１３１のうちのいずれか１つのベクター。

（ｄ）ＨＡ１の５’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の５’側にフランキングする第１の鎖のＣＳ１；および／またはＨＡ２の３’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の３’側にフランキングする第１の鎖の第２の切断部位（ＣＳ２）の、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９、適宜、化膿レンサ球菌もしくは黄色ブドウ球菌Ｃａｓ９）による切断。

【０２４９】

例えば、Ｐ１は、ＰＳ１（の３’側）とすぐ隣接する。ある例においては、ＣＳ１は、ＩＳに含まれない。ある例においては、ＣＳ１は、ＩＳから最も離れたＨＡ１の末端にあるか、または前記末端は、ＣＳ１とＩＳとの相同組換えである。

【０２５０】

ある例においては、ＩＳは、ＨＡ１を、ＨＡ２と直接接続する。ある例においては、ベクター（例えば、環状ベクター）は、取込みベクターであり、ＨＡ１は、第１の鎖内のＨＡ２に対して５’側にあり；ＮＳ１は、第２の鎖内のＮＳ２の３’側にあり、この場合、第２の鎖は、ＮＳ１とＮＳ２との間に、取込み配列（ＲＳ）を含み、ＩＳは、ＨＡ１およびＨＡ２が、それぞれ、ＮＳ１およびＮＳ２と組み換えられ、ＲＳが、第１の鎖へと取り込まれると欠失する、マーカー配列を含んでもよい。

【０２５１】

別の例においては、ベクターは、挿入ベクターであり、ＨＡ１は、第１の鎖内のＨＡ２に対して５’側にあり；ＮＳ１は、第２の鎖内のＮＳ２の３’側にあり、ＨＡ１およびＨＡ２が、それぞれ、ＮＳ１およびＮＳ２と組み換えられると、ＩＳの配列（例えば、少なくとも１０ｋｂの配列）を、第２の鎖へと挿入する。ＩＳは、ＨＡ１とＨＡ２との間にあり、ＨＡ１およびＨＡ２が、それぞれ、ＮＳ１およびＮＳ２と組み換えられるとまた、第２の鎖へと挿入もされ、かつ／または第１の鎖から欠失もする、マーカー配列を含んでもよい。これは、相同組換えの成功が生じたことを決定するために有用である。第２の鎖は、ＮＳ１を、ＮＳ２へと接続するヌクレオチド配列を含んでもよい（または、代替的に、ＮＳ１は、ＮＳ２と直接隣接する）。

【０２５２】

１３３．第１の鎖が、５’～３’方向に、（ｉ）ＣＳ１、Ｐ１、ＨＡ１、ＩＳ、ＨＡ２、ＣＳ２、およびＰ２；または（ｉｉ）ＣＳ２、Ｐ２、ＨＡ２、ＩＳ、ＨＡ１、ＣＳ１、およびＰ１を含む、実施形態１３２のベクター。

【０２５３】

１３４．選択肢（ｉ）が該当し、Ｐ１が、ＨＡ１に、例えば、ＨＡ１の５’末端の５’側にフランキングして、または前記末端において含まれるか；または選択肢（ｉｉ）が該当し、Ｐ２が、ＨＡ２に、例えば、ＨＡ２の３’末端の３’側にフランキングして、または前記末端において含まれる、実施形態１３３のベクター。

【０２５４】
１３５．ＣＳ２が、ＨＡ２から、２５０ｎｔを超えない、実施形態１３２、１３３、または１３４のベクター。
【０２５５】
ある例においては、ＣＳ２は、ＨＡ２の前記末端から、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、または２５０ｎｔを超えない。
【０２５６】
１３６．ＨＡ１およびＨＡ２の各々が、少なくとも１００ｎｔの長さである、実施形態１２７～１３５のうちのいずれか１つのベクター。
【０２５７】
ある例においては、ＨＡ１は、少なくとも５０ または 少なくとも１００、１５０、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ｎｔの長さ、または少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、５０、もしくは１００ｋｂの長さである。ある例においては、ＨＡ２は、少なくとも５０ または 少なくとも１００、１５０、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ｎｔの長さ、または少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、５０、もしくは１００ｋｂの長さである。
【０２５８】
１３７．ＨＡ１およびＨＡ２が、少なくとも０．２ｋｂの全長を含む、実施形態１２７～１３６のうちのいずれか１つのベクター。
【０２５９】
ある例においては、ＨＡ１およびＨＡ２は、少なくとも０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、５０、または１００ｋｂの長さの全長を含むか、またはこれらからなる。
【０２６０】
１３８．ＨＡ１およびＨＡ２が、ＮＳ１およびＮＳ２のそれぞれと同質（すなわち、１００％同一なヌクレオチド配列）である、実施形態１２７～１３７のうちのいずれか１つのベクター。
【０２６１】
ある例においては、ＨＡ１およびＨＡ２は、各々、ＮＳ１およびＮＳ２のそれぞれのヌクレオチド配列と、少なくとも８０、８５、９０、または９５％同一である。
【０２６２】
１３９．第１の鎖または各鎖が、ｄｓＤＮＡである、実施形態１２７～１３８のうちのいずれか１つのベクター。
【０２６３】
１４０．第１の鎖または各鎖が、ｓｓＤＮＡである、実施形態１２７～１３８のうちのいずれか１つのベクター。
【０２６４】
１４１．ＰＳ１および／またはＰＳ２が各々、細胞ゲノムにおいて、希少であるか、または見出されないヌクレオチド配列（例えば、ヒト細胞ゲノム）を含むシード配列を含む、実施形態１２７～１４０のうちのいずれか１つのベクター。
【０２６５】
１４２．各シード配列が、原核生物の開始コドン、例えば、ＧＴＧコドンおよび／もしくはＴＴＧコドンを含み、シード配列が、ＡＴＧコドンを含まなくてもよい、実施形態１４１のベクター。
【０２６６】
１４３．各シード配列が、シャインダルガノ配列を含み、例えば、シード配列が、ＧＡＧＧまたはＡＧＧＡＧＧを含む、実施形態１４１または１４２のベクター。
【０２６７】

１４４．ＰＳ１および／またはＰＳ２が各々、原核生物（例えば、大腸菌）、古細菌、またはウイルスにおける使用に最適化されているか、または細胞ゲノム（例えば、ヒト細胞ゲノム）において見出されない、実施形態１４１～１４３のうちのいずれか１つのベクター。

【０２６８】

１４５．前記各プロトスペーサー配列（例えば、最大２５または２０の連続ヌクレオチドである）が、細菌プリブノーボックスの配列；細菌のリーダー配列（例えば、ＰｅｌＢ）；細菌の－１０配列または細菌の－３５エレメント配列（例えば、ＴＡＴＡＡＴまたはＴＴＧＡＣＡ）；細菌の上流プロモーターエレメント（ＵＰエレメント）配列；細菌の調節配列もしくはオペロン配列；または細菌の複製起点配列を含む、実施形態１４４のベクター。

【０２６９】

１４６．第１のＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９）をコードする、発現可能な核酸と組み合わせされているか、もしくはこれを含むか；または前記Ｃａｓと組み合わされている、実施形態１２７～１４５のうちのいずれか１つのベクター。

【０２７０】

１４７．前記真核細胞（例えば、インビトロにおける、ヒト細胞、例えば、ヒト幹細胞、またはｉＰＳ細胞）の内部にある、実施形態１２７～１４６のうちのいずれか１つのベクター。

【０２７１】

１４８．閉環状ベクター（例えば、スーパーコイル状ベクター）の集団を含む、ベクターのコレクションであって、前記各環状ベクターが、実施形態１２７～１４７のうちのいずれか１つに従うものであり、例えば、各ベクター内のＩＳが、少なくとも１０ｋｂの長さの配列（例えば、ヒト配列）を含むコレクション。

【０２７２】

１４９．実施形態１２７～１４８のうちのいずれか１つのベクター、組合せ、またはコレクションを含む、抗生剤（例えば、抗菌剤または抗古細菌剤）組成物。

【０２７３】

１５０．ヒトにおける疾患または状態（例えば、細菌感染または肥満）を処置または防止するための医薬であって、実施形態１２７～１４９のうちのいずれか１つのベクター、組合せ、またはコレクションを含む医薬。

【０２７４】

１５１．ベクターまたはコレクションの各ベクターが、さらに実施形態１００～１０６のうちのいずれか１つに従うものである、実施形態１２７～１５０のうちのいずれか１つに従う、ベクター、組合せ、コレクション、抗生剤、または医薬。

【０２７５】

１５２．例えば、ベクターが、実施形態８０において言及されたベクターの前駆体であり、前駆体ベクターが、５’～３’の順に、

（ａ）ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であり、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＳ１と；

（ｂ）Ｐ１のすぐ３’側の第１のヌクレオチド配列であり、第１の配列が、第２の核酸配列を、前駆体ベクターへとクローニングするための、Ｐ１の３’末端と隣接するか、または前記末端の３’側にフランキングする第１のクローニング部位を含み、第２の配列が、ＨＡ１およびＨＡ２の一方または両方を含む、第１のヌクレオチド配列と

を含み；

（ｃ）前駆体核酸を得ることと；

（ｄ）核酸内のクローニング部位を同定するか、または核酸内のクローニング部位を創出することと；

（ｅ）核酸内のＰＳ１／Ｐ１の組合せを同定するか、または核酸内の組合せを創出する

こととを含み；

（ｄ）と（ｅ）とを、任意の順に、または同時に実行し、（ｄ）および（ｅ）のうちの少なくとも１つが、前記創出する工程を含み、これにより前記前駆体ベクターを作製し、単離してもよい、

前駆体ベクターを作製する方法。

【０２７６】

代替法においては、

１５２ａ．例えば、任意の先行する実施形態の方法における、第２の核酸鎖との相同組換えに適する、第１の核酸鎖を作製する方法であって、

（ａ）第２の鎖の、第１のヌクレオチド配列および第２のヌクレオチド配列（ＮＳ１およびＮＳ２）を同定することであり、適宜、ＮＳ１を、第２の鎖内のＮＳ２の３’側となるように選択することと；

（ｂ）別の核酸鎖において、

ｉ．ＨＡ１とＮＳ１との相同組換えのための、第２の鎖の第１の所定の標的ヌクレオチド配列であるＮＳ１と相補的な第１の相同アーム（ＨＡ１）と；

ｉｉ．ＨＡ２とＮＳ２との相同組換えのための、第２の鎖の第２の所定の標的ヌクレオチド配列であるＮＳ２と相補的な第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

ｉｉｉ．ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であり、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり、ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端にあるか、もしくは前記末端の５’側にフランキングするＰＳ１；および／またはＰＡＭ（Ｐ２）と隣接する、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）であり、Ｐ２が、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するための、前記第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なるＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり、ＣＳ２が、ＨＡ２の３’末端にあるか、もしくは前記末端の３’側にフランキングするＰＳ２と

を組み合わせ、

これにより、第１の鎖を作製することと

を含む、作製する方法が提供される。

【０２７７】

１５３．生成物ベクターが、環状ベクター、例えば、閉環状ベクターである、実施形態１５２または１５２ａによる方法。

【０２７８】

１５４．クローニング部位が、ＣＳ１から、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、１００、２００、または２５０ｎｔを超えて離れない、実施形態１５２または１５３の方法。

【０２７９】

１５５．前駆体ベクターが、第１のクローニング部位の３’側に、第２のクローニング部位を含み、核酸内の第２のクローニング部位を同定するか、または核酸内の第２のクローニング部位を創出することを含む、実施形態１５２～１５４のうちのいずれか１つの方法。

【０２８０】

１５６．前駆体ベクターが、ＰＡＭ（Ｐ２）と隣接する、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）であって、Ｐ２が、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するための、前記第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なるＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり；第２のクローニング部位が、ＰＳ２の５’末端と隣接するか、または前記末端の５’側にフランキングするＰＳ２を含む、実施形態１５５の方法。

【０２８１】

１５７．ＰＳ２／Ｐ２の組合せを同定または創出することを含み、前記第２のクローニング部位およびＰＳ２／Ｐ２の組合せのうちの少なくとも１つを創出する、実施形態１５６の方法。

【０２８２】
１５８．前駆体ベクターが、クローニング部位の間に、マーカー配列（例えば、検出用マーカーを発現させるためのもの）を含み、第２の配列を、クローニング部位へと挿入すると、マーカーが、ベクターから失われる、実施形態１５５、１５６、または１５７の方法。
【０２８３】
マーカー配列は、本明細書において開示される、任意のマーカー配列、例えば、ｔｋ配列またはＨＰＲＴ配列でありうる。
【０２８４】
１５９．第１のクローニング部位または各クローニング部位が、制限エンドヌクレアーゼ部位（例えば、同じエンドヌクレアーゼにより認識される部位）である、実施形態１５２～１５８のうちのいずれか１つの方法。
【０２８５】
１６０．第１のクローニング部位または各クローニング部位が、部位特異的組換え（ＳＳＲ）部位（例えば、同じＳＳＲ部位）であり；第１の部位または各部位が、ｌｏｘまたはｆｒｔ部位であってもよい、実施形態１５２～１５８のうちのいずれか１つの方法。
【０２８６】
ある例においては、不適合のｌｏｘ部位（例えば、ｌｏｘＰおよびｌｏｘ５１１；またはｌｏｘＰおよびｌｏｘ２２７２）を使用する。
【０２８７】
１６１．前記第２の核酸配列を得ることと、第２の配列を、クローニング部位へとクローニングすることとをさらに含み、ＨＡ１およびＨＡ２を、Ｐ１の３’側の前駆体ベクターへと挿入し、マーカー配列を、ベクターから欠失させ、（ｉ）マーカー配列の、ベクターからの喪失、またはマーカー発現産物の喪失、（ｉ）ベクター内のＨＡ１配列の存在、および（ｉｉｉ）ベクター内のＨＡ２配列の存在のうちの少なくとも１つを検出してもよく、生成物ベクターを単離してもよい、実施形態１５５～１６０のうちのいずれか１つの方法。
【０２８８】
１６２．生成物である前駆体ベクターを作製した後において、同じＣａｓヌクレアーゼであってもよい、Ｃａｓによる、ＣＳ１および／またはＣＳ２の切断を使用することを含む、実施形態１５６～１６０の方法。
【０２８９】
１６３．前記第２の核酸配列を得ることと、第２の配列を、第１のクローニング部位へとクローニングすることとをさらに含み、ＨＡ１およびＨＡ２を、Ｐ１の３’側の前駆体ベクターへと挿入し、生成物ベクターを単離してもよい、実施形態１５２～１６２のうちのいずれか１つの方法。
【０２９０】
１６４．その後、実施形態１～７９のうちのいずれか１つに従う、さらなる方法において、生成物ベクターを使用することを含み、実施形態１６１、１６２、または１６３の生成物であるベクターが、さらなる方法において、前記第１の鎖をもたらす、実施形態１６１、１６２、または１６３の方法。
【０２９１】
１６５．工程（ｂ）が、実施形態１５２～１６４のうちのいずれか１つの方法を使用する、実施形態８０～９９のうちのいずれか１つの方法。
【０２９２】
１６６．実施形態１５２～１６３のうちのいずれか１つの方法により得ることが可能な前駆体ベクター。
【０２９３】
１６７．ｄｓＤＮＡベクターであり、環状ベクターであってもよい、実施形態１６６のベクター。

【０２９４】
１６８．ｓｓＤＮＡベクターであり、環状ベクターであってもよい、実施形態１６６のベクター。
【０２９５】
１６９．ＰＳ１および／またはＰＳ２が各々、細胞ゲノムにおいて、希少であるか、または見出されないヌクレオチド配列（例えば、ヒト細胞ゲノム）を含むシード配列を含む、実施形態１６６～１６８のうちのいずれか１つのベクター。
【０２９６】
１７０．各シード配列が、原核生物の開始コドン、例えば、ＧＴＧコドンおよび／もしくはＴＴＧコドンを含み、シード配列が、ＡＴＧコドンを含まなくてもよい、実施形態１６９のベクター。
【０２９７】
１７１．各シード配列が、シャインダルガノ配列を含み、例えば、シード配列が、ＧＡＧＧまたはＡＧＧＡＧＧを含む、実施形態１６９または１７０のベクター。
【０２９８】
１７２．ＰＳ１および／またはＰＳ２が各々、原核生物（例えば、大腸菌）、古細菌、またはウイルスにおける使用に最適化されているか、または細胞ゲノム（例えば、ヒト細胞ゲノム）において見出されない、実施形態１６９～１７１のうちのいずれか１つのベクター。
【０２９９】
１７３．前記各プロトスペーサー配列（例えば、最大２５または２０の連続ヌクレオチドである）が、細菌プリブノーボックスの配列；細菌のリーダー配列（例えば、ＰｅｌＢ）；細菌の－１０配列または細菌の－３５エレメント配列（例えば、ＴＡＴＡＡＴまたはＴＴＧＡＣＡ）；細菌の上流プロモーターエレメント（ＵＰエレメント）配列；細菌の調節配列もしくはオペロン配列；または細菌の複製起点配列を含む、実施形態１７２のベクター。
【０３００】
１７４．第１のＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９）をコードする、発現可能な核酸と組み合わせされているか、もしくはこれを含むか；または前記Ｃａｓと組み合わされている、実施形態１６６～１７３のうちのいずれか１つのベクター。
【０３０１】
１７５．前駆体ベクターが、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のガイドＲＮＡ）と組み合わされているか；またはｇＲＮＡ１をもたらすための、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わされているか、もしくはこれを含み、ｇＲＮＡ１が、ＰＳ１を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ１と相補的なヌクレオチド配列を含む、実施形態１６６～１７４のうちのいずれか１つのベクターまたは組合せ。
【０３０２】
ｇＲＮＡ１は、Ｃａｓを、ＰＳ１へとガイドして、ＰＳ１を切断するために、ＰＳ１、Ｐ１、および第１のＣａｓとコグネイトである。
【０３０３】
１７６．前駆体ベクターが、実施形態１５６の方法により得られ、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ２、例えば、単一のガイドＲＮＡ）と組み合わされているか；またはｇＲＮＡ２をもたらすための、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わされているか、もしくはこれを含み、ｇＲＮＡ２が、ＰＳ２を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ２と相補的なヌクレオチド配列を含む、実施形態１６６～１７５のうちのいずれか１つのベクターまたは組合せ。
【０３０４】
ｇＲＮＡ２は、Ｃａｓを、ＰＳ２へとガイドして、ＰＳ２を切断するために、ＰＳ２、Ｐ２、および第１のＣａｓとコグネイトである。
【０３０５】

本発明は、以下の条項を提供する。

【０３０６】

１．ドナー核酸配列を、原核細胞内または真核細胞内（例えば、ヒト細胞内、例えば、ｉＰＳ細胞内）に取り込む方法であって、

（ａ）第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＡＭ（Ｐ１）と隣接するプロトスペーサー配列（ＰＳ１）を含む鎖である、第１の核酸鎖（例えば、操作ベクターに含まれる）を用意することと；

（ｂ）第１の鎖を、宿主細胞へと導入して、細胞の内部のドナー核酸鎖を、第１の鎖と組み合わせることと；

（ｃ）第１のＣａｓヌクレアーゼにより、第１の鎖の、ＰＳ１の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用することと；

（ｄ）切断された第１の鎖が、細胞の内部のドナー鎖との相同組換えを経ることを可能とすることであり、ドナー鎖の配列を、第１の鎖へと挿入して、修飾された第１の鎖を形成し、これにより、ドナー配列の挿入を介して、ＰＳ１および／またはＰ１が、修飾された第１の鎖において、再形成されないことと

を含む方法。

【０３０７】

ある例においては、ドナー鎖は、細胞の染色体またはエピソームの核酸に含まれる。

【０３０８】

２．真核細胞内または原核細胞内のドナー核酸配列を欠失させる方法であって、

（ａ）第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＡＭ（Ｐ１）と隣接するプロトスペーサー配列（ＰＳ１）を含む鎖である、第１の核酸鎖（例えば、操作ベクターに含まれる）を用意することと；

（ｂ）第１の鎖を、宿主細胞へと導入して、細胞の内部のドナー核酸鎖を、第１の鎖と組み合わせることと；

（ｃ）第１のＣａｓヌクレアーゼにより、第１の鎖の、ＰＳ１の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用することと；

（ｄ）切断された第１の鎖が、細胞の内部のドナー鎖との相同組換えを経ることを可能とすることであり、ドナー鎖の配列を、欠失させて、修飾されたドナー鎖を形成し、ＰＳ１および／またはＰ１が、修飾されたドナー鎖内の欠失部において、または欠失部のフランキングにおいて形成されないことと

を含む方法。

【０３０９】

３．工程（ｃ）または（ｄ）において、配列を、第１の鎖および／またはドナー鎖から欠失させる、条項１または２の方法。

【０３１０】

４．ＰＳ１配列を欠失させ、ＰＳ１を、第１の鎖内で、非機能的とする、任意の先行する条項の方法。

【０３１１】

５．Ｐ１配列を欠失させ、Ｐ１を、第１の鎖内で、非機能的とする、任意の先行する条項の方法。

【０３１２】

６．ドナー配列を、第１の鎖へと挿入するか、または配列を、第１の鎖から欠失させて、Ｐ１と隣接する、新たなプロトスペーサーを形成し；工程（ｄ）の後において、新たなプロトスペーサーを切断することを含んでもよい、任意の先行する条項の方法。

【０３１３】

７．新たなプロトスペーサーを切断して、さらなる、修飾された第１の鎖への配列の挿入、またはこれからの配列の欠失のための、さらなる核酸鎖との相同組換えのために使用される、さらなる、修飾された第１の鎖を作製する、条項６の方法。

【０３１４】

８．ドナー配列を、第１の鎖へと挿入するか、または配列を、第１の鎖から欠失させて、ＰＳ１と隣接する、新たなＰＡＭを形成し；工程（ｄ）の後において、第１のＣａｓと異なるＣａｓヌクレアーゼを使用して、ＰＳ１を切断することを含んでもよい、条項１～５のうちのいずれか１つの方法。

【０３１５】

９．ＰＳ１を、前記異なるＣａｓにより切断して、さらなる、修飾された第１の鎖への配列の挿入、またはこれからの配列の欠失のための、さらなる核酸鎖との相同組換えのために使用される、さらなる、修飾された第１の鎖を作製する、条項８の方法。

【０３１６】

１０．工程（ｃ）または（ｄ）が、第１の鎖のマーカー配列（例えば、抗生剤耐性遺伝子の配列）を欠失させ、工程（ｄ）の後において、マーカーの非存在または低減を検出することを含んでもよい、条項１～４のうちのいずれか１つの方法。

【０３１７】

１１．第１の鎖の配列を、ドナー鎖へと挿入するか、または配列を、ドナー鎖から欠失させて、（ｉ）ＰＡＭと隣接する、新たなプロトスペーサーを形成し；工程（ｄ）の後において、新たなプロトスペーサーを切断することを含んでもよく、かつ／または（ｉｉ）ドナー鎖内の、新たなマーカー配列を形成し、例えば、マーカー配列が、検出用マーカーを発現させるために機能的である、任意の先行する条項の方法。

【０３１８】

１２．（ｉ）新たなプロトスペーサーを切断して、さらなる修飾ドナー鎖への配列の挿入、もしくはこれからの配列の欠失のための、さらなる核酸鎖との相同組換えのために使用される、さらなる修飾ドナー鎖を作製し、かつ／または（ｉｉ）マーカーを検出して、工程（ｄ）にいて、相同組換えが生じたことを決定する、条項１１の方法。

【０３１９】

１３．新たなプロトスペーサー配列およびＰＡＭ配列またはマーカーの配列が、工程（ｄ）の前に、ドナー鎖において見出される、ヌクレオチド配列（ＮＳ３およびＮＳ４）に含まれ、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたはマーカー配列を、工程（ｄ）におけるドナー配列の欠失、およびＮＳ３の、ＮＳ４への接続の後において形成する、条項１１または１２の方法。

【０３２０】

１４．工程（ａ）における第１の鎖が、第１の相同アーム（ＨＡ１）を含み、ＨＡ１が、ドナー核酸鎖の、所定の第１のヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相同であり；工程（ｄ）において、相同組換えを、ＨＡ１と、ＮＳ１との間において実行して、修飾鎖を作製し；工程（ｄ）の前に、ＮＳ１が、欠失させるドナー配列の３’側にフランキングし、ＮＳ３が、ＮＳ１の５’末端にあり（ＮＳ１の５’末端にあるか、または最大で１０ヌクレオチド隔たっており）、ＮＳ４が、欠失させるドナー配列の５’側にフランキングし、工程（ｄ）において、ドナー配列を、欠失させ、ＮＳ３の５’末端を、ＮＳ４の３’末端へと接続し、これにより、ドナー鎖において、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたはマーカー配列を形成する、条項１３の方法。

【０３２１】

１５．工程（ａ）における第１の鎖が、第１の相同アーム（ＨＡ１）を含み、ＨＡ１が、ドナー核酸鎖の、所定の第１のヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相同であり；工程（ｄ）において、相同組換えを、ＨＡ１と、ＮＳ１との間において実行して、修飾鎖を作製し；工程（ｄ）の前に、ＮＳ１が、欠失させるドナー配列の５’側にフランキングし、ＮＳ３が、ＮＳ１の３’末端にあり（ＮＳ１の３’末端にあるか、または最大で１０ヌクレオチド隔たっており）、ＮＳ４が、欠失させるドナー配列の３’側にフランキングし、工程（ｄ）において、ドナー配列を、欠失させ、ＮＳ３の３’末端を、ＮＳ４の５’末端へと接続し、これにより、ドナー鎖において、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたはマーカー配列を形成する、条項１３の方法。

【０３２２】

１６．工程（ａ）における第１の鎖が、第１の相同アームおよび第２の相同アーム（それぞれ、ＨＡ１およびＨＡ２）を含み、ＨＡ１が、ドナー核酸鎖のＮＳ１と相同であり、かつ、ＨＡ２が、ドナー核酸鎖の、所定の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同であり；介在配列が、工程（ｄ）の前に、ドナー鎖内のＮＳ１を、ＮＳ２へと接続し、欠失させる配列を含み、ＮＳ２が、ＮＳ４を含み；欠失配列が、ＨＡ１とＮＳ１との相同組換え、およびＨＡ２とＮＳ２との相同組換えを指し示すための配列（マーカー配列）を含んでもよく；欠失配列を、ドナー鎖から工程（ｄ）において、ＨＡ１とＮＳ１との相同組換え、およびＨＡ２とＮＳ２との相同組換えにより、欠失させる、条項１４または１５の方法。

【０３２３】

１７．工程（ｄ）の前に、切断部位モチーフを使用して、ドナー鎖の切断（例えば、Ｃａｓ媒介型切断、メガヌクレアーゼ媒介型切断、亜鉛フィンガータンパク質媒介型切断、またはＴＡＬＥＮ媒介型切断）を方向付けることを含み、工程（ｄ）を、実行する。切断される第１の鎖およびドナー鎖により任意の先行する条項の方法。

【０３２４】

１８．工程（ｄ）において、相同組換えにより、モチーフを破壊する（例えば、条項１７に従う切断のために使用された。ドナー鎖内のプロトスペーサーおよび／またはＰＡＭを破壊する）、条項１７の方法。

【０３２５】

１９．工程（ａ）における第１の鎖が、

（ａ）ＨＡ１が、ドナー核酸鎖の、所定の第１のヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相同である、第１の相同アーム（ＨＡ１）と；

（ｂ）ＰＳ１に含まれる、第１の切断部位（ＣＳ１）であって、ＣＳ１が、工程（ｃ）において、第１のＣａｓにより切断されるＣＳ１と

を含み、

（ｉ）ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端にあるか、もしくは（of）前記末端の５’側にフランキングするか；または（ｉｉ）ＣＳ１が、ＨＡ１の３’末端にあるか、もしくは３’末端の３’側にフランキングし；

工程（ｄ）が、切断される第１の鎖のＨＡ１が、ドナー鎖のＮＳ１との相同組換えを経ることを可能とすることを含み、ドナー鎖の配列を、第１の鎖へと挿入し、かつ／またはドナー配列を欠失させる、

任意の先行する条項の方法。

【０３２６】

２０．工程（ａ）における第１の鎖が、

（ｃ）ドナー核酸鎖の、所定の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同である、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

（ｄ）相同アームを接続する介在配列と

を含み、

（ｅ）介在配列が、欠失配列を含み、欠失配列が、ＨＡ１とＮＳ１との相同組換え、およびＨＡ２とＮＳ２との相同組換えを指し示すための配列（マーカー配列）を含んでもよく；工程（ｃ）もしくは（ｄ）において、ＨＡ１とＮＳ１との相同組換え、およびＨＡ２とＮＳ２との相同組換えにより、欠失配列を、第１の鎖から欠失させるか；または

（ｆ）介在配列が、ＣＳ１（例えば、ＣＳ１は、ＨＡ１および／またはＨＡ２から、２５０ｎｔを超えて離れない）を含み、ＮＳ１およびＮＳ２が、ドナー鎖から欠失させる配列の、いずれの側にフランキングしてもよい、条項１９の方法。

【０３２７】

２１．工程（ａ）における第１の鎖が、

（ｅ）ドナー核酸鎖の、第２の所定のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同である、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

（ｆ）工程（ｃ）において、第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なる（第２の）Ｃａｓヌクレアーゼにより、第２の切断部位（ＣＳ２）において切断される、第２のプロトスペ

ーサー（ＰＳ２）およびコグネイトＰＡＭ（Ｐ２）と
を含み、
（ｉ）ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端にあるか、もしくは前記末端の５’側にフランキングし、かつ、ＣＳ２が、ＨＡ２の３’末端にあるか、もしくはＨＡ２の前記末端の３’側にフランキングするか；または（ｉｉ）ＣＳ１が、ＨＡ１の３’末端にあるか、もしくはＨＡ１の３’末端の３’側にフランキングし、かつ、ＣＳ２が、ＨＡ２の５’末端にあるか、もしくはＨＡ２の５’末端の５’側にフランキングし；
工程（ｄ）が、切断される第１の鎖の、ＨＡ１が、ドナー鎖のＮＳ１との相同組換えを経、かつ、ＨＡ２が、ＮＳ２との相同組換えを経ることを可能とすることを含み、ドナー鎖の配列を、第１の鎖へと挿入する、
条項１９または２０の方法。

【０３２８】

２２．工程（ａ）の第１の鎖（stand）が、第２のプロトスペーサー（ＰＳ２）およびコグネイトＰＡＭ（Ｐ２）を含み、ＰＳ２が、工程（ｃ）において、第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なる（第２の）Ｃａｓヌクレアーゼにより切断され、ＰＳ１およびＰＳ２を切断することが、第１の鎖の配列を、ＰＳ１とＰＳ２との間において切り出す、任意の先行する条項の方法。

【０３２９】

２３．切り出された配列が、第１の鎖のマーカー配列を、細胞において、非機能的とし、工程（ｄ）の後において、マーカーの非存在または低減を検出することを含んでもよい、条項２２の方法。

【０３３０】

２４．ＰＳ１およびＰＳ２の切断が、ドナー核酸と組み換えられる、切断された第１の鎖の末端をもたらし、ドナー核酸の配列を、末端の間の第１の鎖へと挿入する、条項２１～２３のうちのいずれか１つの方法。

【０３３１】

２５．ＰＳ２および／またはＰ２が、修飾された第１の鎖において、ドナー配列の挿入により再形成されない、条項２０～２４のうちのいずれか１つの方法。

【０３３２】

２６．修飾された第１の鎖内の、修飾ドナー鎖またはドナー核酸配列の修飾領域を、単離またはコピーする（例えば、ＰＣＲを使用して）ことを含む、任意の先行する条項の方法。

【０３３３】

２７．欠失が生じた、修飾ドナー鎖またはドナー核酸配列の修飾領域を、単離またはコピーする（例えば、ＰＣＲを使用して）ことを含む、任意の先行する条項の方法。

【０３３４】

２８．工程（ｄ）において、ドナー配列を、第１の鎖へと挿入し、挿入された配列が、調節エレメント、タンパク質をコードする配列、エクソン、またはマーカー配列を含むか、またはこれらからなる、任意の先行する条項の方法。

【０３３５】

２９．工程（ｄ）において、ドナー配列を、第１の鎖へと挿入し、挿入された配列が、修飾された第１の鎖からの発現のために、機能的である、任意の先行する条項の方法。

【０３３６】

３０．挿入された配列が、第１の鎖の調節エレメントと機能的な配置において挿入される、タンパク質をコードする配列、エクソン、またはマーカー配列であり、これにより、調節エレメントが、修飾された第１の鎖からの、ドナー配列の発現を制御することが可能である、条項２９の方法。

【０３３７】

３１．工程（ｄ）において、ドナー配列を、第１の鎖へと挿入し、挿入されたドナー配列が、マーカー配列であり、方法が、修飾された第１の鎖内のマーカー配列を検出するか

；または発現したマーカーを検出することを含み、マーカーが、工程（ｄ）の前に、検出可能ではない、任意の先行する条項の方法。

【０３３８】

３２．工程（ｄ）の前に、第１の鎖へと挿入される前記配列の、一方もしくは両方の末端におけるドナー核酸鎖、または一方もしくは両方の末端にフランキングするドナー核酸鎖の、Ｃａｓによる切断を使用することを含み、第１のＣａｓヌクレアーゼまたは第２のＣａｓヌクレアーゼを使用してもよい、先行する条項に従う方法。

【０３３９】

例えば、切断は、両方の末端における切断であり、両方の末端にフランキングする切断であり、５’末端における切断および３’末端にフランキングする切断であり、５’末端にフランキングする切断および３’末端における切断であり、５’末端における切断であり、３’末端における切断である。

【０３４０】

３３．ドナー鎖が、宿主細胞の染色体またはエピソームの核酸に含まれる、任意の先行する条項の方法。

【０３４１】

３４．ドナー核酸配列を、工程（ｄ）において、宿主細胞の染色体またはエピソーム（例えば、プラスミド）から欠失させる、条項３３に従う方法。

【０３４２】

３５．染色体またはエピソームからの欠失が、宿主細胞に対して致死性である、条項３４の方法。

【０３４３】

３６．細胞の生存能、増殖を下方調節する（例えば、細胞を死滅させる）、条項３３～３５のうちのいずれか１つの方法。

【０３４４】

３７．細胞の生存能、増殖を上方調節する、条項３３～３５のうちのいずれか１つの方法。

【０３４５】

３８．工程（ｄ）の後において、改変細胞、修飾された第１の鎖、修飾されたドナー鎖、および／または方法により、宿主の核酸配列を欠失させた、宿主の染色体もしくはエピソームの修飾核酸を単離することを含む、任意の先行する条項の方法。

【０３４６】

３９．細菌細胞または古細菌細胞、例えば、大腸菌細胞において実行される、任意の先行する条項の方法。

【０３４７】

４０．細胞が、ヒト病原体種のものである、条項３９の方法。

【０３４８】

４１．細胞が、ヒトマイクロバイオーム種、例えば、ヒト消化管マイクロバイオーム種の細胞である、条項３９または４０の方法。

【０３４９】

４２．リコンビニアリング法である、任意の先行する条項の方法。

【０３５０】

４３．細胞が、内因性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を含み、工程（ｃ）において、内因性の宿主Ｃａｓを使用して切断する、任意の先行する条項の方法。

【０３５１】

４４．外因性Ｃａｓ、または外因性Ｃａｓをコードする配列を、細胞へと導入せずに実行される、任意の先行する条項の方法。

【０３５２】

４５．細胞において実行されて、原核細胞の集団を死滅させ、細胞が、同じ種または株のものである、任意の先行する条項の方法。

【０３５３】
４６．集団が、原核（例えば、細菌）細胞の混合集団に含まれ、混合集団内の、全部ではないが一部の細胞を、選択的に死滅させ、死滅させる細胞が、第１の鎖を導入し、ＰＳ１を、Ｃａｓにより切断した細胞である、条項４５の方法。
【０３５４】
４７．ＰＳ１およびＰ１が、死滅させる細胞のＣａｓヌクレアーゼ（例えば、内因性Ｃａｓ）とコグネイトではあるが、死滅させない集団内の細胞とコグネイトではなく、ＰＳ１を、死滅させる細胞において、選択的に切断する、条項４５または４６の方法。
【０３５５】
４８．生成物集団または前記生成物の試料を単離することを含む、条項４５～４７のうちのいずれか１つの方法。
【０３５６】
４９．細胞または集団が、食品、食物成分、または前駆体成分；飲料；水（例えば、ヒト摂取に意図される）；工業用物質または環境物質（例えば、油、石油製品、土壌、または水路もしくは貯水池；あるいは油、石油製品、土壌、水、食品、食品成分もしくは食品前駆体、または飲料もしくは飲料成分もしくは飲料前駆体を回収または処理するための装置）に含まれる、条項４５～４８のうちのいずれか１つの方法。
【０３５７】
５０．切断が、第１の鎖を、細胞において、ＰＳ１とハイブリダイズして、ＰＳ１を切断するように、Ｃａｓをガイドする、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）へと曝露することを含み；工程が、工程（ｂ）において、導入された（例えば、第１の鎖の一部として）ヌクレオチド配列から、ｇＲＮＡ１またはそのｃｒＲＮＡ配列を発現させることを含んでもよい、任意の先行する条項の方法。
【０３５８】
５１．第１の鎖または各鎖が、ｄｓＤＮＡである、任意の先行する条項の方法。
【０３５９】
５２．第１の鎖または各鎖が、ｓｓＤＮＡである、任意の先行する条項の方法。
【０３６０】
５３．第１の鎖および／またはドナー鎖が、ＢＡＣ、ＰＡＣ、ＹＡＣ、コスミド、またはプラスミドに含まれる、任意の先行する条項の方法。
【０３６１】
５４．第１の鎖が、切断の前に環状である、任意の先行する条項の方法。
【０３６２】
本明細書の任意の態様においては、第１の鎖またはベクター（例えば、第１の鎖またはドナー鎖またはさらなる鎖のベクター）は、直鎖状ＤＮＡである。
【０３６３】
５５．細胞が、細菌細胞であり、第１の鎖が、バクテリオファージの核酸鎖であり、宿主細胞に、バクテリオファージを感染させることにより、バクテリオファージ鎖を、宿主細胞へと導入する、条項１～５２および５４のうちのいずれか１つの方法。
【０３６４】
５６．ＨＡ１が、ＣＳ１から、２５０ｎｔ（または本明細書において開示される任意の他の間隔）を超えて離れない、条項１９の方法、または、条項１９に従属しない場合における、任意の先行する条項の方法。
【０３６５】
５７．ＨＡ１が、少なくとも１５連続ヌクレオチド（または本明細書において開示される任意の他の長さ）を含む、条項１４～１６および１９のうちのいずれか１つの方法、または、条項１４～１６および１９のうちのいずれか１つに従属しない場合における、任意の先行する条項の方法、または条項（claim）５６の方法。
【０３６６】
５８．ＨＡ１の配列が、ＮＳ１と同質（または本明細書において開示される任意の他の

同一性％）である、条項１４～１６および１９のうちのいずれか１つの方法、または、条項１４～１６および１９のうちのいずれか１つに従属しない場合における、任意の先行する条項の方法、または条項５６または５７の方法。

【０３６７】

５９．ＨＡ２が、ＣＳ２から、２５０ｎｔ（または本明細書において開示される任意の他の間隔）を超えて離れない、条項２１の方法、または、条項１６または２０に従属しない場合における、任意の先行する条項の方法、または条項５６、５７、または５８の方法。

【０３６８】

６０．ＨＡ２が、少なくとも１５連続ヌクレオチド（または本明細書において開示される任意の他の長さ）を含む、条項１６および２０～２２のうちのいずれか１つの方法、または、条項１６および２０～２２のうちのいずれか１つに従属しない場合における、任意の先行する条項の方法、または条項５６～５９のいずれか１つの方法。

【０３６９】

６１．ＨＡ２の配列が、ＮＳ２と同質（または本明細書において開示される任意の他の同一性％）である、条項１６および２０～２２のうちのいずれか１つの方法、または、条項１６および２０～２２のうちのいずれか１つに従属しない場合における、任意の先行する条項の方法、または条項５６～６０の方法。

【０３７０】

６２．例えば、任意の先行する条項に従う方法において、第２の核酸鎖との相同組換えに適する第１の核酸鎖（例えば、取込みベクターに含まれる）を作製する方法であって、核酸鎖において、

（ａ）相同組換えにより、ＩＳを、第２の鎖へと挿入するための、第２の鎖の、第１の所定の標的ヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相補的な、第１の相同アーム（ＨＡ１）を含む（またはこれからなる）挿入配列（ＩＳ）と；

（ｂ）ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であって、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり；

ＣＳ１が、ＨＡ１の末端にあるか、またはこれにフランキングし、ＣＳ１を、Ｃａｓにより切断する場合、ＨＡ１が、ＩＳの前記挿入のために、ＮＳ１との相同組換えが可能であるＰＳ１とを組み合わせること

を含む、作製する方法。

【０３７１】

本明細書の任意の態様においては、１つの鎖もしくはベクター、または各鎖もしくは各ベクターを、例えば、単離する。

【０３７２】

６３．核酸鎖において、

（ｃ）第２の鎖の、第２の所定の標的ヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相補的な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

（ｄ）適宜、第２のＰＡＭ（Ｐ２）と隣接する、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）であって、Ｐ２が、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するためのＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり、ＣＳ２を、Ｃａｓにより切断する場合、ＨＡ２が、ＩＳの前記挿入のために、ＮＳ２との相同組換えが可能であるＰＳ２とをさらに組み合わせること

を含む、条項６２の方法。

【０３７３】

６４．ＣＳ２を、Ｐ２とコグネイトであるＣａｓヌクレアーゼにより切断することを含む、条項６３の方法。

【０３７４】

６５．ＣＳ１およびＣＳ２を、同じＣａｓヌクレアーゼにより切断することを含む、条項６４の方法。

【０３７５】
６６．ＮＳ１およびＮＳ２が、細胞の必須遺伝子、抗生剤耐性遺伝子、または毒性遺伝子の配列にフランキングする、条項６２～６５のうちのいずれか１つの方法。
【０３７６】
６７．方法の生成物を、抗生剤と組み合わせて含む、抗生剤組成物または抗生剤キットをさらに作製し、ＮＳ１およびＮＳ２が、抗生剤耐性遺伝子の配列にフランキングし、抗生剤が、核酸と組み合わされた抗生剤である、条項６６の方法。
【０３７７】
６８．ＣＳ１が、ＨＡ１および／またはＨＡ２から、２５０ｎｔを超えて離れない、条項６２～６７のうちのいずれか１つの方法。
【０３７８】
６９．鎖が、条項５１～６１のうちのいずれか１つにおいて規定されている通りである、条項６２～６８のうちのいずれか１つの方法。
【０３７９】
７０．ＣＳ１を、第１のＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９、適宜、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９または黄色ブドウ球菌Ｃａｓ９）により切断することを含む、条項６２～６９のうちのいずれか１つの方法。
【０３８０】
７１．第１の鎖内に（または、第１の鎖に加えて、さらなる核酸鎖上に）、ＰＳ１と相補的なｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列をさらに含むか；または配列が、細胞において、適宜、宿主細胞の配列によりコードされるｔｒａｃｒＲＮＡと共に、ｇＲＮＡ１を形成するｃｒＲＮＡをコードする、条項５２～７０のうちのいずれか１つの方法。
【０３８１】
ある例においては、ｔｒａｃｒＲＮＡは、ベクター配列、例えば、第１のベクターによりコードされる。
【０３８２】
７２．方法の第１の鎖の生成物が、ベクター内、例えば、スーパーコイル状ベクターであってもよい、閉環状ベクター内にある、条項１～７１のうちのいずれか１つの方法。
【０３８３】
７３．条項６２～７２のうちのいずれか１つの方法により得ることが可能な、操作された第１の核酸鎖であって、
（ａ）原核細胞のドナー核酸鎖の、第１の所定の標的ヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相補的な、第１の相同アーム（ＨＡ１）と；
（ｂ）ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であり、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＳ１と；
（ｇ）ドナー核酸鎖の、所定の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同である、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；
（ｃ）相同アームを接続する介在配列であり、ＣＳ１を含むか；またはＣＳ１が、介在配列の外部にあり、かつ、ＨＡ１の末端にあるか、もしくはＨＡ１の末端にフランキングする介在配列と
を含む鎖。
【０３８４】
７４．ＮＳ１およびＮＳ２が、細胞の必須遺伝子、抗生剤耐性遺伝子、または毒性遺伝子の配列にフランキングする、条項１６、２０、または２１の方法を実行するための、条項７３の核酸鎖。
【０３８５】
７５．ＮＳ１およびＮＳ２が、抗生剤耐性遺伝子の配列にフランキングし、抗生剤が、核酸と組み合わされた抗生剤である、抗生剤と組み合わせた、条項７４の核酸鎖。

【０３８６】
７６．ＣＳ１が、ＨＡ１および／またはＨＡ２から、２５０ｎｔを超えて離れない、条項７３、７４、または７５の核酸鎖。
【０３８７】
７７．第１の鎖もしくはさらなる鎖が、ＰＳ１と相補的なｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードする、発現可能なヌクレオチド配列を含むか；または配列が、細胞において、適宜、宿主細胞の配列、第１の鎖、もしくはさらなる鎖によりコードされるｔｒａｃｒＲＮＡと共に、ｇＲＮＡ１を形成する、発現可能なｃｒＲＮＡをコードする、適宜、さらなる核酸鎖と組み合わせた、条項７３～７６のうちのいずれか１つの第１の核酸鎖。
【０３８８】
ある例においては、ｔｒａｃｒＲＮＡは、ベクター配列、例えば、第１のベクターによりコードされる。
【０３８９】
７８．ＣＳ１が、介在配列の外部にあり、かつ、ＨＡ１の末端にあるか、またはＨＡ１の末端にフランキングし、工程（ｃ）において、第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なる（第２の）Ｃａｓヌクレアーゼにより、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するための、第２のプロトスペーサー（ＰＳ２）およびコグネイトＰＡＭ（Ｐ２）を含み、ＣＳ２が、介在配列の外部にあり、かつ、ＨＡ２の末端にあるか、またはＨＡ２の末端にフランキングする、条項７３～７７のうちのいずれか１つの、第１の核酸鎖。
【０３９０】
７９．第１の鎖もしくはさらなる鎖が、ＰＳ２と相補的なｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ２、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードする、発現可能なヌクレオチド配列を含むか；または配列が、細胞において、適宜、宿主細胞の配列、第１の鎖、もしくはさらなる鎖によりコードされるｔｒａｃｒＲＮＡと共に、ｇＲＮＡ２を形成する、発現可能なｃｒＲＮＡをコードする、適宜、前記さらなる核酸鎖または別のさらなる核酸鎖と組み合わせた、条項７８の、第１の核酸鎖。
【０３９１】
ある例においては、ｔｒａｃｒＲＮＡは、ベクター配列、例えば、第１のベクターによりコードされる。
【０３９２】
８０．ｇＲＮＡ１をコードする配列およびｇＲＮＡ２をコードする配列（またはそれぞれのｃｒＲＮＡをコードする配列）が、同じ核酸鎖、適宜、第１の鎖に含まれる、条項７７に従属しない場合における、条項７８の第１の核酸鎖。
【０３９３】
８１．第１のＣａｓヌクレオチド配列が、第１の鎖、前記さらなる核酸鎖、または別のさらなる核酸鎖に含まれ；Ｐ２が、第１のＣａｓとコグネイトであってもよい、前記第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列（例えば、Ｃａｓ９）と組み合わせた、条項７７～８０のうちのいずれか１つの第１の核酸鎖。
【０３９４】
８２．条項５１～６１のうちのいずれか１つにおいて規定されている通りである、条項７３～８１のうちのいずれか１つの核酸鎖。
【０３９５】
８３．条項７３～８２のうちのいずれか１つの核酸鎖を含む、抗微生物性組成物。
【０３９６】
８４．条項８３の第１の組成物を含む、食品、飲料、または工業用流体（例えば、保存水）。
【０３９７】
８５．前記第１のベクターが、条項７３～８４のうちのいずれか１つにおいて規定されている、第１の核酸鎖を含み、前記さらなる鎖が、組成物に含まれ、各さらなる鎖が、第

１のベクターと異なるベクターに含まれる、１または複数の核酸ベクターを含む組成物。
【０３９８】
８６．第１の鎖を含む第１のベクターと、前記第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列を含む第２のベクターと、適宜、第３のベクターとを含み、第１のベクター、第２のベクター、または第３のベクターが、条項７７において言及された、前記ｇＲＮＡ１をコードするヌクレオチド配列を含み；第１のベクター、第２のベクター、または第３のベクターが、条項７９において言及された、前記ｇＲＮＡ２をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい、条項８５の、第１の組成物。
【０３９９】
本明細書の任意の態様においては、前記Ｃａｓまたは各Ｃａｓは、ニッカーゼであってもよく、Ｃａｓヌクレアーゼのうちの１つ（例えば、第１のＣａｓ）は、ニッカーゼであってもよい。
【０４００】
８７．第１のベクターまたは各ベクターが、ｄｓＤＮＡベクターである、条項８５または８６の、第１の組成物。
【０４０１】
８８．第１のベクターまたは各ベクターが、ｓｓＤＮＡベクターである、条項８５または８６の、第１の組成物。
【０４０２】
８９．第１のベクターまたは各ベクターが、ＢＡＣ、ＰＡＣ、ＹＡＣ、またはプラスミドである、例えば、全てのベクターが、プラスミドであるか、または第１のベクターが、ＢＡＣであり、他のベクターが、プラスミドである、条項８５～８８のうちのいずれか１つの組成物。
【０４０３】
９０．第１のベクターまたは各ベクターが、切断の前に環状である、条項８５～８９のうちのいずれか１つの組成物。
【０４０４】
９１．（ａ）第１のベクターが、ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であり、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＳ１とを含む、操作された第１の核酸鎖を含み；
（ｂ）前記組合せの、第１のベクターまたは別のベクターが、ＰＳ１を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ１と相補的なｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードする、発現可能なヌクレオチド配列を含むか；または発現可能な配列が、ｔｒａｃｒＲＮＡと共に、ｇＲＮＡ１を形成するｃｒＲＮＡをコードする、
第１のベクターまたはベクターの組合せ。
【０４０５】
９２．第１のＣａｓヌクレオチド配列が、第１のベクターに含まれ、（ｂ）の、前記発現可能な配列が、前記組合せの、第１のベクターまたは別のベクターに含まれる、前記第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列（例えば、Ｃａｓ９）と組み合わせた、条項９１のベクターまたは組合せ。
【０４０６】
９３．ＣＳ１が、前記第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列、またはその調節エレメントの配列に含まれ、ＣＳ１が、第１のＣａｓにより切断されて、その発現可能なヌクレオチド配列からの、第１のＣａｓの発現を下方調節するか、または不活化させることが可能である、条項９２のベクターまたは組合せ。
【０４０７】
９４．第１のＣａｓヌクレオチド配列が、第１のベクターと組み合わせた第２のベクターに含まれ；（ｂ）の、前記発現可能な配列が、前記組合せの、第１のベクターまたは別のベクター（例えば、前記第２のベクター）に含まれる、前記第１のＣａｓをコードする

、発現可能なヌクレオチド配列（例えば、Ｃａｓ９）と組み合わせた、条項９１のベクターまたは組合せ。

【０４０８】

９５．第１の鎖が、第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なる（第２の）Ｃａｓヌクレアーゼにより、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するための、第２のプロトスペーサー（ＰＳ２）およびコグネイトＰＡＭ（Ｐ２）を含む、条項９１～９４のうちのいずれか１つのベクターまたは組合せ。

【０４０９】

９６．ＣＳ１およびＣＳ２を切断するとベクターから切出し可能な介在配列（ＩＳ）により、Ｐ１およびＰ２を接続し、ＩＳが、調節エレメント、タンパク質をコードする配列、エクソン、またはマーカー配列を含む、条項９５のベクターまたは組合せ。

【０４１０】

９７．第１のプライマーが、ＩＳのヌクレオチド配列と相補的であり、第２のプライマーは、ＩＳの外部のヌクレオチド配列と相補的であり、プライマーが、第１のベクター内のマーカーの存在を検出することが可能である、条項９６のベクターまたは組合せ、ならびに第１のＰＣＲプライマーおよび第２のＰＣＲプライマーを含むキット。

【０４１１】

９８．ＣＳ１およびＣＳ２を切断するとベクターから切出し可能な介在配列（ＩＳ）により、Ｐ１およびＰ２を接続し、ＩＳが、（ｉ）Ｐ１配列およびＰＳ２配列を含むか、または（ｉｉ）Ｐ２配列およびＰＳ１配列を含み、介在配列の切出しが、配列（ｉ）または（ｉｉ）の非存在により検出可能である、条項９５のベクターまたは組合せ。

【０４１２】

９９．第１のベクターが、所定の標的ヌクレオチド配列（それぞれ、ＮＳ１およびＮＳ２）との相同組換えのために、それぞれ、ＣＳ１およびＣＳ２にフランキングする（例えば、これらのすぐ５’側および３’側に）、第１の相同アームおよび第２の相同アーム（ＨＡ１およびＨＡ２）を含む、条項９６～９８のうちのいずれか１つのベクターまたは組合せ。

【０４１３】

１００．ＮＳ１およびＮＳ２が、原核細胞ゲノムの配列である、例えば、必須遺伝子、毒性遺伝子、または抗生剤耐性遺伝子の配列（例えば、エクソン内もしくは調節エレメント内の、またはこれらにフランキングする）である、条項９９のベクターまたは組合せ。

【０４１４】

１０１．例えば、ヒトもしくは動物の遺伝子治療のためであり、方法を、ヒト細胞内もしくは動物細胞において実行する場合は、ヒト細胞もしくは動物細胞の遺伝子治療のために、ヒトもしくは非ヒト動物における疾患または状態を、処置、防止、もしくは診断するか；または方法を、細菌細胞において実行する場合は、ヒトもしくは動物における細菌感染を処置もしくは防止するための、条項９１～１００のうちのいずれか１つのベクターまたは組合せ。

【０４１５】

本発明はまた、以下の段落も提供する。

【０４１６】

１．原核宿主細胞の生存能、増殖を阻害する方法であって、

（ａ）第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであるＰＡＭ（Ｐ１）と隣接するプロトスペーサー配列（ＰＳ１）を含む第１のベクターを用意することと；

（ｂ）毒素もしくは毒素前駆体；または毒素もしくは毒素前駆体をコードする配列を含むベクターを用意することであり、毒素が、原核細胞に対して毒性であることと；

（ｃ）細胞を、ベクターと組み合わせることであり、ベクターを、細胞へと導入し、細胞内に毒素をもたらすことと；

（ｄ）第１のＣａｓヌクレアーゼを使用して、第１のベクターの、ＰＳ１の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用することであり、切断が、細胞内の毒素活性を促進し、これ

により、細胞を死滅させるか、または細胞の増殖を低減することと
を含む方法。
【０４１７】
２．切断が、毒素の発現または毒素の活性を抑制するベクター配列を切断する、段落１の方法。
【０４１８】
３．切断が、毒素の発現または毒素の活性のサプレッサーの発現または活性に要請されるベクター配列を切断する、段落１または２の方法。
【０４１９】
４．切断が、細胞内の毒素の発現のために、毒素前駆体の配列を、毒素をコードする配列へと転換し；ＰＳ１が、毒素もしくは前駆体をコードする配列に含まれてもよく、ＰＳ１が、その調節エレメント（例えば、プロモーター配列またはサプレッサー配列）に含まれてもよい、任意の先行する段落の方法。
【０４２０】
５．切断が、毒素の活性化因子の発現または活性の増大、または毒素もしくは前駆体をコードする配列を調節するプロモーターの活性の増大を引き起こす、任意の先行する段落の方法。
【０４２１】
ある例においては、活性化因子は、第１のベクターにコードされる。
【０４２２】
６．切断が、細胞内の毒素の発現を促進する、任意の先行する段落の方法。
【０４２３】
７．第１のベクターが、抗毒素をコードする核酸配列（ＡＴ）を含み、工程（ｄ）が、細胞内の第１のベクターの、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用して、細胞内の抗毒素を低減するか、または消失させることを含み、切断が、細胞内の毒素活性を促進し、細胞を死滅させる、段落１、２、または５の方法。
【０４２４】
８．切断が、抗毒素をコードする核酸配列からの発現を不活化させるか、または低減する、段落７の方法。
【０４２５】
９．第１のベクターのＡＴ配列が、第１のＣａｓ切断部位を含むか、または、一方の側において、これにフランキングされ；前記配列（ＡＴ）が、第２のＣａｓ切断部位を含むか、または、他方の側において、これにフランキングされ、各部位が、それぞれのＰＡＭの５’側において隣接する、それぞれのプロトスペーサー内にあり、プロトスペーサーのうちの１つ、およびそれぞれのＰＡＭが、ＰＳ１およびＰ１であり、Ｃａｓによる切断を、工程（ｄ）において使用して、第１の部位および第２の部位を切断し、これにより、抗毒素配列（またはプロモーター配列）を、第１のベクターから切り出し、第１のベクターからの抗毒素の発現を、低減するか、または消失させた、段落７または８の方法。
【０４２６】
１０．工程（ｃ）の生成物が、抗毒素をコードする配列を含む細胞であり、第１のベクターが、抗抗毒素剤の核酸配列（ＡＡＴ）を含み、工程（ｄ）が、細胞内の第１のベクターの、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用して、細胞内の薬剤を増大させるか、または薬剤の抗抗毒素活性を増大させ、これにより、細胞内の抗毒素の発現または活性を低減するか、または消失させることを含み、切断が、細胞内の毒素活性を促進し、細胞を死滅させる、段落１の方法。
【０４２７】
１１．抗毒素が、細胞によりコードされる、例えば、宿主細胞染色体のヌクレオチド配列、または宿主エピソーム（例えば、プラスミド）のヌクレオチド配列によりコードされる、段落１０の方法。
【０４２８】

１２．抗毒素が、工程（ｃ）のベクターにコードされる、段落１０の方法。

【０４２９】

１３．薬剤が、核酸、例えば、ＤＮＡである、段落１０～１２のうちのいずれか１つの方法。

【０４３０】

ある例においては、薬剤（例えば、ＤＮＡ薬剤断片）は、抗毒素遺伝子（例えば、エクソンまたはその調節エレメント）とハイブリダイズして、抗毒素の発現を阻害または低減する。例えば、ＤＮＡ断片は、抗毒素遺伝子（例えば、調節エレメントまたはそのエクソン）内の配列と相同である、１または複数の領域を含み、これにより、１または複数のＤＮＡ配列断片を、抗毒素遺伝子へと挿入し、これにより、抗毒素遺伝子の発現を不活化させるか、または低減する（挿入は、遺伝子配列の欠失を伴う場合もあり、伴わない場合もある）。代替的に、薬剤は、抗毒素またはそのサブユニットをコードするｍＲＮＡとハイブリダイズする。ある例においては、断片は、抗毒素遺伝子（例えば、エクソンまたはその調節エレメント）の、ヌクレアーゼによる切断（例えば、Ｃａｓによる切断）をガイドして、抗毒素の発現を阻害または低減するガイドＲＮＡをコードする。ｇＲＮＡは、宿主の内因性ＣａｓとコグネイトのＲＮＡの場合もあり、ベクターによりコードされるＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９）コグネイトの場合もある。ＤＮＡ断片の配列を、抗毒素遺伝子へと挿入する、ある例においては、挿入された配列は、細胞に対して毒性である毒素をコードする場合もあり、Ｃａｓを、抗毒素遺伝子、または細胞内の任意の他のヌクレオチド配列、例えば、宿主の染色体の配列、または宿主のエピソームの配列、例えば、宿主の必須遺伝子、毒性遺伝子、または抗生剤耐性遺伝子の配列へとターゲティングするためのガイドＲＮＡをコードする場合もある。このようにして、ＤＮＡ断片の配列を挿入することにより、抗毒素（例えば、抗生剤）遺伝子を、不活化させるか、または活性を低減し、さらに、挿入された配列（例えば、細胞において機能するプロモーターを含む配列；または配列を、この内因性プロモーターと共に、機能的な配置において挿入する場合、抗毒素遺伝子の内因性プロモーターを使用する配列）は、細胞内のさらなる部位（例えば、その切断が、細胞の殺滅の一助となる部位）を改変するのに使用しうる、機能的なガイドＲＮＡ（例えば、単一のｇＲＮＡ）を発現させうる。

【０４３１】

発明のこの構成および他の構成においては一般に、ＤＮＡ断片を、ベクターから放出するように、細胞（例えば、原核細胞または真核細胞）へと導入されたベクターの、Ｃａｓによる切断を含む方法が提供される。ある例においては、断片のヌクレオチド配列を、相同組換えにより、宿主の染色体の核酸、または宿主のエピソームの核酸（例えば、ＤＮＡ）へと（または導入されたベクターへと）挿入する。ある例においては、挿入は、宿主核酸の遺伝子を下方調節する（例えば、不活化させる）か、または上方調節する（例えば、活性化させる）。これに加えて、または代替的に、挿入された配列は、所望のＲＮＡを発現させる場合もあり、所望のタンパク質をコードする場合もある（例えば、ＤＮＡ断片の作製、および宿主核酸への挿入の成功を指し示し、これにより、マーカーを使用して検出される、１または複数の宿主細胞を選択する方法における、さらなる工程を可能とするマーカー）。別の実施形態においては、挿入された配列は、宿主の染色体の核酸内、または宿主のエピソームの核酸内のそれぞれの位置をターゲティングするために（または、代替的に、例えば、Ｃａｓによる切断を介する、細胞内のＤＮＡ断片の作製の成功を指し示すために、上方調節または下方調節される選択マーカーなど、ベクターにより保有される遺伝子を改変するように導入されたベクター内の配列をターゲティングするために）、細胞において発現させるガイドＲＮＡ（例えば、単一のガイドＲＮＡ）をコードする。したがって、本発明の主題は、標的配列への相同な挿入のためのＤＮＡを放出するのに、細胞内のＣａｓによる切断を利用するが、ここにおいては、この挿入が、その標的配列を上方調節または下方調節して、例えば、Ｃａｓによる切断および標的への挿入の成功についてのマーカー、または所望の発現産物（タンパク質、またはＲＮＡ、例えば、ｇＲＮＡ）を作製するための、ノックオンの有用性を有する配列の、標的への組込みについてのマーカー

をもたらすことが重要である。発現させたこのｇＲＮＡは、例えば、Ｃａｓ媒介型切断をガイドするための、細胞における、さらなる宿主またはベクターの改変、細胞内の活性化または不活化（宿主またはベクター配列の）のために援用することができる。ＤＮＡ断片が、内因性調節エレメントの影響下における挿入のための配列をターゲティングする、相同アームを含む場合、これは、内因性調節による制御（例えば、プロモーターによる制御またはエンハンサーによる制御）を利用して、挿入された配列の発現、例えば、細胞（例えば、増殖および複製の細胞周期）に照らして微調整された、挿入された配列の一過性の発現を制御するために有用である。

【０４３２】

１４．薬剤が、タンパク質である、段落１０～１２のうちのいずれか１つの方法。

【０４３３】

１５．第１のベクターが、ＤＮＡベクターであり、第１のベクターのＡＡＴ配列が、第１のＣａｓ切断部位を含むか、または、一方の側において、これにフランキングされ；前記配列（ＡＡＴ）が、第２のＣａｓ切断部位を含むか、または、他方の側において、これにフランキングされ、各部位が、それぞれのＰＡＭの５’側において隣接する、それぞれのプロトスペーサー内にあり、プロトスペーサーのうちの１つ、およびそれぞれのＰＡＭが、ＰＳ１およびＰ１であり、Ｃａｓによる切断を、工程（ｄ）において使用して、第１の部位および第２の部位を切断し、これにより、抗抗毒素剤を、第１のベクターから放出し、例えば、相同組換えによる、抗抗毒素配列の、宿主細胞の染色体またはエピソームの核酸への挿入により、細胞内の抗毒素の発現を低減するか、または消失させる、段落１３の方法。

【０４３４】

１６．第１の部位および第２の部位を、同じＣａｓヌクレアーゼ分子種（例えば、内因性Ｃａｓまたはベクターによりコードされる性Ｃａｓ）により切断する、段落９または１５の方法。

【０４３５】

１７．第１の部位および第２の部位を、異なるＣａｓヌクレアーゼ分子種（例えば、いずれのＣａｓも、細胞に対して内因性であるか；一方のＣａｓが、内因性であり、他方のＣａｓが、ベクター配列によりコードされるか；またはいずれのＣａｓも、ベクター配列によりコードされる）により切断する、段落９または１５の方法。

【０４３６】

１８．切断された第１のベクター配列（例えば、抗毒素またはＡＡＴ配列）が、宿主細胞の核酸と組み換えられて、ベクターから抗毒素ヌクレオチド配列を欠失させた組換え生成物を作製することを可能とすることを含む、段落７～１７のうちのいずれか１つの方法。

【０４３７】

１９．宿主細胞の配列を、ベクターへと挿入して、例えば、抗毒素配列またはＡＡＴ配列を置きかえる、段落１８の方法。

【０４３８】

２０．ＤＮＡ薬剤が、宿主細胞の核酸と組み換えられて、薬剤配列を、抗毒素ヌクレオチド配列またはその調節エレメントへと挿入した組換え生成物を作製することを可能とし、これにより、抗毒素の発現または活性を低減するか、または消失させることを含む、段落１３の方法、または、段落１３に従属しない場合における、段落１５～１９の方法。

【０４３９】

２１．抗毒素ヌクレオチド配列または調節エレメント配列を、宿主細胞の核酸から欠失させる、段落２０の方法。

【０４４０】

２２．第１のＣａｓを、ＰＳ１とハイブリダイズする、細胞内の、第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のガイドＲＮＡ）によりガイドし、これにより、Ｃａｓが、ＰＳ１を切断する、任意の先行する段落の方法。

【０４４１】

ある例においては、ｇＲＮＡ１をコードする配列は、細胞へと導入されるベクター（例えば、第１のベクター）に含まれる。

【０４４２】

２３．工程（ｄ）の前に、ｇＲＮＡ１、または細胞内にｇＲＮＡ１をもたらすための配列を、細胞内にもたらすことを含み、配列が、工程（ｃ）において、細胞へと導入される、第１のベクターまたは別のベクターに含まれてもよい、段落２２の方法。

【０４４３】

２４．第１のＣａｓヌクレアーゼまたは各Ｃａｓヌクレアーゼが、細胞に対して内因性である、任意の先行する段落の方法。

【０４４４】

２５．工程（ｄ）の前に、第１のＣａｓヌクレアーゼまたは各Ｃａｓヌクレアーゼを、細胞へと導入するか、または前記Ｃａｓをコードする、それぞれのヌクレオチド配列（例えば、第１のベクターまたは別のベクターに含まれる）を、細胞へと導入する、段落１～２３のうちのいずれか１つの方法。

【０４４５】

２６．第１のＣａｓまたは各Ｃａｓが、Ｃａｓ９（例えば、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９または黄色ブドウ球菌Ｃａｓ９）である、任意の先行する段落の方法。

【０４４６】

２７．第１のＣａｓまたは各Ｃａｓが、大腸菌Ｃａｓである、段落１～２５のうちのいずれか１つの方法。

【０４４７】

２８．毒素が、抗生剤、例えば、抗生剤医薬である、任意の先行する段落の方法。

【０４４８】

２９．毒素および抗毒素が、原核毒素／抗毒素モジュール、例えば、Ｉ型モジュールもしくはＩＩ型モジュールまたはプラスミド付加（addiction）モジュールの構成要素である、任意の先行する段落の方法。

【０４４９】

例えば、モジュールは、Ｉ型モジュール、例えば、Ｈｏｋ－Ｓｏｋモジュールである。例えば、モジュールは、ＩＩ型モジュール、例えば、ＨｉＣａ－ＨｉｃＢモジュールである。例えば、モジュールは、ｔａｄ－ａｔａ型毒素－抗毒素モジュールである。例えば、モジュールは、プラスミド付加モジュールである。

【０４５０】

３０．宿主細胞を形質転換する方法であって、

（ａ）第１の核酸ベクターを用意することであり、ベクターが、第１の状態にあり、

ｉ．第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトである、ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）と；

ｉｉ．ベクターの第１の状態をマーキングするための第１のマーカー配列を含む、第１のヌクレオチド配列と

を含むことと；

（ｂ）細胞を、ベクターと組み合わせることであり、ベクターを、細胞へと導入することと；

（ｃ）第１のＣａｓヌクレアーゼを使用して、第１のベクターの、ＰＳ１の、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断を使用することであり、切断が、ベクターを、第２の状態へと転換し、マーカー配列を、非機能的とすることと；

（ｄ）適宜、マーカーが、細胞において非機能的であることを検出することにより、第２の状態を検出することと

を含む方法。

【０４５１】

３１．切断されたベクターが、細胞の染色体またはエピソームの核酸との相同組換えを経ることを可能とすることにより、マーカー配列を非機能的とする、段落３０の方法。

【０４５２】
３２．ベクター配列を、宿主核酸へと挿入する、段落３１の方法。
【０４５３】
３３．宿主核酸の配列を、ベクターへと挿入する、段落３１または３２の方法。
【０４５４】
３４．ＰＳ１および／またはＰ１を、ベクターにおいて、宿主配列の挿入により破壊する、段落３３の方法。
【０４５５】
３５．ＰＳ１および／またはＰ１を、ベクターにおいて、切断により破壊する、任意の先行する段落の方法。
【０４５６】
３６．切断が、細胞内の毒素の細胞傷害活性を促進し、これにより、細胞を死滅させるか、または細胞の増殖を低減する、段落３０～３５のうちのいずれか１つの方法。
【０４５７】
３７．毒素が、抗生剤、例えば、抗生剤医薬である、段落３６の方法。
【０４５８】
３８．切断が、ベクターから、マーカー配列を切り出し、これにより、マーカーを、非機能的とする、段落３０～３７のうちのいずれか１つの方法。
【０４５９】
３９．ＰＳ１が、第１のＣａｓにより切断される標的部位を含み、標的部位が、マーカー配列の５’末端にあるか、またはマーカー配列の５’側にフランキングする、任意の先行する段落の方法。
【０４６０】
４０．ベクターが、工程（ｃ）において、第１のＣａｓヌクレアーゼまたは異なる（第２の）Ｃａｓヌクレアーゼにより切断される、第２のプロトスペーサー（ＰＳ２）およびコグネイトＰＡＭ（Ｐ２）を含み、ＰＳ１およびＰＳ２の切断が、細胞内のマーカーを、非機能的とする、任意の先行する段落の方法。
【０４６１】
４１．ＰＳ２が、切断される標的部位を含み、標的部位が、マーカー配列の３’末端にあるか、またはマーカー配列の３’側にフランキングする、段落４０の方法。
【０４６２】
４２．マーカー配列を、ベクターから切り出し、ベクターが、宿主核酸の配列の、ベクターへの、相同組換えによる挿入を介して、ギャップ修復を経る、段落３９に従属しない場合における、段落４１の方法。
【０４６３】
４３．ＰＳ１および／またはＰ１を破壊する、段落４２の方法。
【０４６４】
４４．ＰＳ２および／またはＰ２を破壊する、段落４２または４３の方法。
【０４６５】
４５．挿入される宿主核酸の配列が、調節エレメント、タンパク質をコードする配列、エクソン、または第２のマーカー配列である、段落３３、段落３３に従属する場合における、段落３３～４４のうちのいずれか１つ、または段落４２～４４のうちのいずれか１つに従う方法。
【０４６６】
４６．挿入された配列が、ベクターからの発現のために機能的である、段落４５の方法。
【０４６７】
４７．挿入された配列が、ベクターの調節エレメントと機能的な配置において挿入され、これにより、調節エレメントが、ベクターからの、宿主配列の発現を制御する、タンパク質をコードする配列、エクソン、または第２のマーカー配列である、段落４６の方法。
【０４６８】

４８．宿主配列が、第２のマーカー配列であり、ベクター内の第２のマーカー配列を検出すること；または第２のマーカーを検出することであって、第２のマーカーが、工程（ｃ）の前に、細胞において検出可能ではなく、かつ、第２のマーカー配列が、工程（ｃ）の前に、第１のベクターにおいて検出可能ではないことを含む、段落４５～４７のうちのいずれか１つの方法。

【０４６９】

４９．前記宿主核酸の、一方もしくは両方の末端における宿主配列、または一方もしくは両方の末端にフランキングする宿主配列の、Ｃａｓによる切断を使用することを含む、段落３３、段落３３に従属する場合における、段落３４～４８のうちのいずれか１つ、または段落４２～４８のうちのいずれか１つに従う方法。

【０４７０】

５０．宿主核酸の配列を、宿主細胞の染色体またはエピソーム（例えば、プラスミド）から欠失させ；染色体またはエピソームからの欠失が、細胞に対して致死性であってもよい、段落３３、段落３３に従属する場合における、段落３４～４９のうちのいずれか１つ、または段落４２～４９のうちのいずれか１つに従う方法。

【０４７１】

５１．宿主核酸の、Ｃａｓによる切断、またはベクターもしくは第１の鎖への挿入が、細胞の生存能、増殖を下方調節する（例えば、細胞を死滅させる）、任意の先行する段落の方法。

【０４７２】

５２．宿主核酸の、Ｃａｓによる切断、またはベクターもしくは第１の鎖への挿入が、細胞の生存能、増殖を上方調節する、任意の先行する段落の方法。

【０４７３】

５３．宿主細胞において実行され、改変細胞、修飾された第１のベクターもしくは第１の鎖、および／または方法により宿主の核酸配列を欠失させた、宿主の染色体またはエピソームの修飾核酸を単離することを含む、任意の先行する段落の方法。

【０４７４】

５４．細菌細胞または古細菌細胞、例えば、大腸菌細胞において実行される、任意の先行する段落の方法。

【０４７５】

５５．細胞が、ヒト病原体種のものである、段落５４の方法。

【０４７６】

５６．細胞が、ヒトマイクロバイオーム種、例えば、ヒト消化管マイクロバイオーム種の細胞である、段落５４または５５の方法。

【０４７７】

５７．インビトロにおいて実行される、ヒトまたは動物の、医学的な治療、予防、または診断のための、任意の先行する段落の方法。

【０４７８】

５８．インビトロにおいて実行される、任意の先行する段落の方法。

【０４７９】

５９．リコンビニアリング法である、段落５８の方法。

【０４８０】

６０．インビボ（例えば、ヒトまたはヒト胚ではない）において実行される、段落１～５７のうちのいずれか１つの方法。

【０４８１】

６１．ヒト（例えば、この場合、方法は、美容法である）、胚（例えば、非ヒト胚）、接合体（例えば、非ヒト接合体）、生殖細胞（例えば、ヒト生殖細胞または非ヒト生殖細胞）、または非ヒト動物において実行される、段落１～５７および６０のうちのいずれか１つの方法。

【０４８２】

６２．外因性Ｃａｓ、または外因性Ｃａｓをコードする配列を、細胞へと導入せずに、１または複数の細胞において実行される、任意の先行する段落の方法。

【０４８３】

６３．細胞において実行され、ＰＳ１およびＰ１が、工程の切断を実行するために、細胞に対して内因性であるＣａｓとコグネイトである、任意の先行する段落の方法。

【０４８４】

６４．細胞において実行されて、原核細胞の集団を死滅させ、細胞が、同じ種または株のものである、任意の先行する段落の方法。

【０４８５】

６５．集団が、食品、食物成分、または前駆体成分；飲料；水（例えば、ヒト摂取に意図される）；工業用物質または環境物質（例えば、油、石油製品、土壌、または水路もしくは貯水池；あるいは油、石油製品、土壌、水、食品、食品成分もしくは食品前駆体、または飲料もしくは飲料成分もしくは飲料前駆体を回収または処理するための装置）に含まれる、段落６４の方法。

【０４８６】

６６．集団が、原核（例えば、細菌）細胞の混合集団に含まれ、混合集団内の、全部ではないが一部の細胞を、選択的に死滅させ、死滅させる細胞が、第１のベクターまたは第１の鎖を導入し、ＰＳ１を、Ｃａｓにより切断した細胞である、段落６４または６５の方法。

【０４８７】

６７．第１のベクターもしくは第１の鎖が、細胞において、ＰＳ１と相補的なｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のｇＲＮＡ）をコードする配列を含むか；またはベクターもしくは鎖が、細胞において、適宜、宿主細胞の配列によりコードされるｔｒａｃｒＲＮＡと共に、ｇＲＮＡ１を形成する、発現可能なｃｒＲＮＡをコードする、段落６６の方法。

【０４８８】

６８．ＰＳ１およびＰ１が、死滅させる細胞のＣａｓヌクレアーゼ（例えば、内因性Ｃａｓ）とコグネイトではあるが、死滅させない集団内の細胞とコグネイトではなく、ＰＳ１を、死滅させる細胞において、選択的に切断する、段落６６または６７の方法。

【０４８９】

６９．混合集団が、ヒトまたは非ヒト動物のマイクロバイオーム集団、例えば、消化管、膣、腋窩、または口腔のマイクロバイオーム集団である、段落６６～６８のうちのいずれか１つの方法。

【０４９０】

７０．段落６９の生成物集団または前記生成物の試料を単離することを含む、段落６９の方法。

【０４９１】

７１．疾患または状態（例えば、肥満）を処置または防止するために、前記試料またはその後代試料を、ヒトへと移植することを含む、段落７０の方法。

【０４９２】

７２．ヒト対象または非ヒト動物対象における、原核細胞（例えば、細菌）感染を処置または防止する方法であって、任意の先行する段落の方法を実行して、対象における細菌細胞を死滅させ、これにより、感染を処置または防止することを含む方法。

【０４９３】

７３．第１の鎖または第１のベクターもしくは各ベクターが、ｄｓＤＮＡベクターである、任意の先行する段落の方法。

【０４９４】

７４．第１の鎖または第１のベクターもしくは各ベクターが、ｓｓＤＮＡベクターである、任意の先行する段落の方法。

【０４９５】

７５．第１の鎖または第１のベクターが、切断の前に環状である、任意の先行する段落

の方法。
【０４９６】
７６．第１の鎖または第１のベクターが、ＢＡＣ、ＰＡＣ、ＹＡＣ、またはプラスミドである、任意の先行する段落の方法。
【０４９７】
７７．細菌宿主細胞において実行され、第１のベクターが、第１のベクターまたは第１の鎖を導入するために、宿主細胞に感染することが可能なバクテリオファージであり（または第１の鎖が、バクテリオファージに含まれ）、細胞に、バクテリオファージを感染させることにより、ベクターまたは鎖を、細胞へと導入する、段落１～７５のうちのいずれか１つの方法。
【０４９８】
７８．（ａ）相同組換えによる、ＩＳの、第２の鎖への挿入のための、第２の鎖の所定の標的ヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相補的である第１の相同アーム（ＨＡ１）とすぐ隣接するか、ＨＡ１がフランキングする挿入配列（ＩＳ）と；
（ｂ）ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であって、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり；
ＣＳ１が、ＨＡ１の末端にあるか、またはこれにフランキングし、ＣＳ１を、Ｃａｓにより切断する場合、ＨＡ１が、ＩＳの前記挿入のために、ＮＳ１との相同組換えが可能であるＰＳ１と
を含む、第１の核酸鎖（例えば、ベクター、例えば、取込みベクターまたはインサートベクターに含まれる）（適宜、本明細書の任意の方法における使用のための）。
【０４９９】
７９．ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端にある、段落７８の核酸鎖。
【０５００】
８０．Ｐ１が、第１の鎖内のｎヌクレオチド（ｎ＝３～５連続ヌクレオチド、例えば、３連続ヌクレオチド）のシード配列（Ｓ１）のすぐ３’側にあり、Ｓ１が、Ｐ１を、ＣＳ１へと接続し、（ｉ）ＮＳ１のｎヌクレオチド（例えば、３連続ヌクレオチド）の、最も５’側の配列が、Ｓ１の配列と異なり、かつ／または（ｉｉ）第２の核酸鎖内のＮＳ１のすぐ５’側の、１３連続ヌクレオチドの配列が、第１の核酸内のＣＳ１のすぐ５’側の、１３連続ヌクレオチドの配列と異なる、段落７９の核酸鎖。
【０５０１】
ある例においては、（ｉ）において、差違は、前記連続ヌクレオチドのうちの、１つ、２つ、３つ、４つ、もしくは５つ、または全てである。例えば、Ｓ１が、３ヌクレオチドの長さである場合、例えば、ＮＳ１の３番目のヌクレオチドにおいて差違がある。例えば、ＮＳ１の２番目および３番目のヌクレオチド、または３番目および４番目のヌクレオチドにおいて差違がある。
【０５０２】
例えば、（ｉｉ）において、配列は、３、４、５、６，７、８、９、１０、１１、もしくは１２、またはこれを超えるヌクレオチド位置を除き、配列において同一である。
【０５０３】
８１．ＮＳ１の最も５’側のヌクレオチドが、Ｓ１の最も５’側のヌクレオチド異なり；Ｓ１が、３連続ヌクレオチドの長さであってもよく、Ｐ１が、Ｃａｓ９（例えば、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９）とコグネイトである、段落８０の核酸鎖。
【０５０４】
８２．ＣＳ１が、ＨＡ１の５’末端にフランキングする、段落７８の核酸鎖。
【０５０５】
８３．ＣＳ１が、ＨＡ１の３’末端にある、段落７８の核酸鎖。
【０５０６】
８４．ＣＳ１が、第１の鎖内のｎヌクレオチド（ｎ＝３～５連続ヌクレオチド、例えば

、３連続ヌクレオチド）のシード配列（Ｓ２）のすぐ５’側にあり、Ｓ２が、Ｐ１を、ＣＳ１へと接続し（ｉ）ＮＳ１のすぐ３’側の第２の鎖の、ｎヌクレオチド（例えば、３連続ヌクレオチド）の配列が、Ｓ２の配列と異なり、かつ／または（ｉｉ）ＨＡ１の１３連続ヌクレオチドの、最も３’側の配列が、ＮＳ１の１３連続ヌクレオチドの、最も３’側の配列と異なる、段落８３の核酸鎖。

【０５０７】

８５．（ｉ）の前記第２の鎖配列の、最も５’側のヌクレオチドが、Ｓ２の最も５’側のヌクレオチドと異なり；Ｓ２が、３連続ヌクレオチドの長さであってもよく、Ｐ１が、Ｃａｓ９（例えば、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９）とコグネイトである、段落８４の核酸鎖。

【０５０８】

８６．ＣＳ１が、ＨＡ１の３’末端にフランキングする、段落７８の核酸鎖。

【０５０９】

８７．ＨＡ１の、ＮＳ１との組換えにより、ＩＳを、第２の核酸鎖へと挿入する場合、第１の鎖が、Ｐ１と組み合わせたＰＳ１を再創出することが可能ではない、段落７８～８６のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５１０】

８８．ＨＡ１の、ＮＳ１との組換えにより、ＩＳを、第２の核酸鎖へと挿入する場合、第１の鎖が、ＣＳ１を再創出することが可能ではない、段落７８～８７のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５１１】

８９．ＩＳが、ドナー配列を含み、ＨＡ１が、ＩＳの５’側にあり、ＣＳ１を、Ｃａｓにより切断する場合、ＨＡ１が、ＩＳを挿入するための、ＮＳ１との相同組換えが可能である、段落７８～８８のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５１２】

９０．ＩＳが、ドナー配列を含み、ＨＡ１が、ＩＳの３’側にあり、ＣＳ１を、Ｃａｓにより切断する場合、ＨＡ１が、ＩＳを挿入するための、ＮＳ１との相同組換えが可能である、段落７８～８８のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５１３】

９１．第１の核酸が、さらなるプロトスペーサーおよびコグネイトＰＡＭを含み、さらなるプロトスペーサーおよびＰＡＭの一方または両方が、ＩＳに含まれる、段落８９または９０の核酸鎖。

【０５１４】

９２．さらなるＰＡＭが、Ｐ１とコグネイトであるＣａｓと異なるＣａｓとコグネイトである、段落９１の核酸鎖。

【０５１５】

９３．ＩＳが、調節エレメント、タンパク質をコードする配列、エクソン、またはマーカー配列をコードする配列を含む、段落８９～９２のうちのいずれか１つの核酸。

【０５１６】

９４．ＩＳが、

（ｅ）第２の鎖の、第２の所定の配列（ＮＳ２）と相補的な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；

（ｆ）第２のＰＡＭ（Ｐ２）と隣接する、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）であって、Ｐ２が、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するためのＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり、

ＣＳ２を、Ｃａｓにより切断する場合、ＨＡ２が、ＩＳの前記挿入のために、ＮＳ２との相同組換えが可能であるＰＳ２と

を含む、段落７８～９３のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５１７】

９５．Ｐ２が、第１のＣａｓとコグネイトである、段落９４の核酸鎖。

【０５１８】

９６．ＨＡ１およびＨＡ２が、ＨＡ１とＨＡ２との間の配列を伴わずに、適宜、第１の核酸鎖内のＨＡ１およびＨＡ２にフランキングする任意の配列の挿入を伴わずに、併せた挿入が可能である、段落９４または９５の核酸鎖。

【０５１９】

９７．ＮＳ１およびＮＳ２が、第２の核酸鎖において、距離を置いて隔てられており、ＨＡ１およびＨＡ２が、第２の鎖へと挿入されて、ＮＳ１とＮＳ２との間の配列を欠失させることが可能である、段落９４、９５、または９６の核酸鎖。

【０５２０】

９８．ＮＳ１およびＮＳ２が、第２の核酸鎖において、距離を置いて隔てられておらず、ＨＡ１およびＨＡ２が、ＮＳ１とＮＳ２との間の配列を欠失させずに、第２の鎖へと挿入されることが可能である、段落９４、９５、または９６の核酸鎖。

【０５２１】

９９．ＩＳが、ドナーＨＡ１とＨＡ２との間の配列を含む、段落９４～９８のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５２２】

１００．第１の核酸が、さらなるプロトスペーサーおよびコグネイトＰＡＭを含み、さらなるプロトスペーサーおよびＰＡＭの一方または両方が、ＩＳに含まれる、段落９９の核酸鎖。

【０５２３】

１０１．さらなるＰＡＭが、Ｐ１とコグネイトであるＣａｓと異なるＣａｓとコグネイトである、段落１００の核酸鎖。

【０５２４】

１０２．さらなるＰＡＭが、Ｐ２とコグネイトであるＣａｓと異なるＣａｓとコグネイトである、段落１００または１０１の核酸鎖。

【０５２５】

１０３．ＩＳが、調節エレメントをコードする配列、タンパク質をコードする配列、エクソン、所定の制限エンドヌクレアーゼ部位、さらなるＣａｓ切断部位、またはマーカー配列を含む、段落９４～１０２のうちのいずれか１つの核酸。

【０５２６】

１０４．ＣＳ１が、第１の核酸鎖内の、配列（ＴＳ１）のすぐ３’側にあり、Ｐ２が、第１の鎖内の、シード配列（Ｓ２’）のすぐ３’側にあり、Ｓ２’が、Ｐ２を、ＣＳ２へと接続し、配列ＴＳ１－Ｓ２が、Ｐ２とコグネイトである、さらなるプロトスペーサーではなく、ＨＡ１の、ＮＳ１との組換え、およびＨＡ２の、ＮＳ２との組換え、およびＣＳ１とＣＳ２との間の配列の、鎖からの欠失がなされると、ＴＳ１－Ｓ２の形成が可能であり、これにより、ＴＳ１－Ｓ２が、Ｐ２とコグネイトであるＣａｓにより切断されることが可能ではない、段落７９または８２に従属しない場合における、段落９４～１０３のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５２７】

１０５．ＣＳ１が、第１の核酸鎖内の、配列（ＴＳ１）のすぐ３’側にあり、Ｐ２が、第１の鎖内の、シード配列（Ｓ２’）のすぐ３’側にあり、Ｓ２’が、Ｐ２を、ＣＳ２へと接続し、配列ＴＳ１－Ｓ２が、Ｐ２とコグネイトである、さらなるプロトスペーサー（ＰＳ３）であり、ＨＡ１の、ＮＳ１との組換え、およびＨＡ２の、ＮＳ２との組換え、およびＣＳ１とＣＳ２との間の配列の、鎖からの欠失がなされると、ＰＳ３の形成が可能である、段落７９または８２に従属しない場合における、段落９４～１０３のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５２８】

１０６．Ｐ１が、第１の核酸鎖内の、シード配列（Ｓ１）のすぐ３’側にあり、Ｓ１が、Ｐ１を、ＣＳ１へと接続し、ＩＳが、Ｐ１とコグネイトであるプロトスペーサー（ＰＳ４）を形成する、第２の核酸鎖への挿入が可能であり、ＰＳ４が、その３’末端において、Ｓ１を含み、その５’末端において、第２の鎖の核酸配列を含む、段落７８～１０５のうちの

いずれか１つの核酸鎖。
【０５２９】
１０７．鎖が、細胞を形質転換することが可能なマルチコピーベクターに含まれない、段落７８～１０６のうちのいずれか１つの核酸鎖。
【０５３０】
１０８．鎖が、インビトロまたは細胞において、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のガイドＲＮＡ）、またはｇＲＮＡ１をもたらすための、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わされており、ｇＲＮＡ１が、ＰＳ１を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ１と相補的なヌクレオチド配列を含む、段落７８～１０７のうちのいずれか１つの核酸鎖。
【０５３１】
ｇＲＮＡ１は、Ｃａｓを、ＰＳ１へとガイドして、ＰＳ１を切断するために、ＰＳ１、Ｐ１、および第１のＣａｓとコグネイトである。
【０５３２】
１０９．鎖が、インビトロまたは細胞において、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ２、例えば、単一のガイドＲＮＡ）、またはｇＲＮＡ２をもたらすための、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わされており、ｇＲＮＡ２が、ＰＳ２を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ２と相補的なヌクレオチド配列を含む、段落９４に従属しない場合における、段落７８～１０８のうちのいずれか１つの核酸鎖。
【０５３３】
ｇＲＮＡ１は、Ｃａｓを、ＰＳ２へとガイドして、ＰＳ２を切断するために、ＰＳ２、Ｐ２、およびＣａｓとコグネイトである。
【０５３４】
１１０．鎖が、インビトロまたは細胞において、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ３、例えば、単一のガイドＲＮＡ）、またはｇＲＮＡ３をもたらすための、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わされており、ｇＲＮＡ３が、ＰＳ３を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ３と相補的なヌクレオチド配列を含む、段落１０５に従属しない場合における、段落７８～１０９のうちのいずれか１つの核酸鎖。
【０５３５】
ｇＲＮＡ１は、Ｃａｓを、ＰＳ３へとガイドして、ＰＳ３を切断するために、ＰＳ３、Ｐ３、およびＣａｓとコグネイトである。
【０５３６】
１１１．鎖が、インビトロまたは細胞において、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ４、例えば、単一のガイドＲＮＡ）、またはｇＲＮＡ４をもたらすための、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わされており、ｇＲＮＡ４が、ＰＳ４を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ４と相補的なヌクレオチド配列を含む、段落１３０に従属しない場合における、段落７８～１１０のうちのいずれか１つの核酸鎖。
【０５３７】
ｇＲＮＡ１は、Ｃａｓを、ＰＳ４へとガイドして、ＰＳ４を切断するために、ＰＳ４、Ｐ４、およびＣａｓとコグネイトである。
【０５３８】
１１２．ｇＲＮＡをもたらすための、第１のヌクレオチド配列または各ヌクレオチド配列が、それぞれのＰＳと相補的な配列を含むｃｒＲＮＡをコードするヌクレオチド配列である、段落１０８～１１１のうちのいずれか１つの核酸鎖。
【０５３９】
１１３．ｔｒａｃｒＲＮＡが、ｃｒＲＮＡの配列と相補的な配列を含み、ガイドＲＮＡが、前記ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの配列を含む、ｔｒａｃｒＲＮＡ、またはｔｒａｃｒＲＮＡをもたらすための、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わせた、段落１１２の核酸鎖。
【０５４０】

１１４．鎖が、前記第２の鎖と組み合わされている、段落７８～１１３のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５４１】

１１５．第１の鎖または前記組合せが、宿主細胞内にある、段落７８～１１４のうちのいずれか１つの核酸鎖。

【０５４２】

１１６．宿主細胞が、ｔｒａｃｒＲＮＡを発現させ、ｔｒａｃｒＲＮＡが、ｃｒＲＮＡの配列と相補的な配列を含み、ガイドＲＮＡが、前記ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの配列を含む、段落１１２に従属しない場合における、段落１１５の核酸鎖。

【０５４３】

１１７．細胞が、細菌細胞または古細菌細胞、例えば、大腸菌細胞である、段落１１５または１１６の核酸鎖。

【０５４４】

１１８．細胞が、ヒト病原体種のものである、段落１１７の核酸鎖。

【０５４５】

１１９．細胞が、ヒトマイクロバイオーム種、例えば、ヒト消化管マイクロバイオーム種の細胞である、段落１１７または１１８の核酸鎖。

【０５４６】

１２０．ヒトまたは動物の、医学的な治療、予防、または診断のための、段落７８～１１９のうちのいずれか１つの核酸。

【０５４７】

１２１．インビトロにおける、段落７８～１２０のうちのいずれか１つの核酸。

【０５４８】

１２２．リコンビニアリング試薬と組み合わせた、段落７８～１２１のうちのいずれか１つの核酸。

【０５４９】

１２３．インビボ（例えば、ヒトまたはヒト胚ではない）における、段落７８～１２０のうちのいずれか１つの核酸。

【０５５０】

１２４．第１の核酸が、第１のベクターに含まれる、段落７８～１２３のうちのいずれか１つの核酸。

【０５５１】

１２５．第１の核酸、および前記ｇＲＮＡをコードする配列が、第１のベクターまたはベクターの組合せに含まれる、段落１０８～１１３のうちのいずれか１つに従属しない場合における、段落７８～１２４のうちのいずれか１つの核酸。

【０５５２】

１２６．ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする核酸が、前記第１のベクターまたはベクターの組合せに含まれる、段落１１３の核酸。

【０５５３】

１２７．第１の核酸および前記ｇＲＮＡ１をコードする配列（および、適宜、ｇＲＮＡ２をコードする配列）が、前記第１のベクターに含まれる、段落１２５～１２６のうちのいずれか１つの核酸。

【０５５４】

１２８．第２のベクターが、第１の核酸および前記ｇＲＮＡ１をコードする配列（および、適宜、ｇＲＮＡ２をコードする配列）を含む、第２のベクターと組み合わせた、段落１２４に従う第１のベクター。

【０５５５】

１２９．第２のベクターが、前記第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列（例えば、Ｃａｓ９）を含む、段落１２８のベクターの組合せ。

【０５５６】

１３０．前記第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列（例えば、Ｃａｓ９）を含む、第３のベクターと組み合わせた、段落１２８のベクターの組合せ。
【０５５７】
１３１．第１のベクターが、前記第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列（例えば、Ｃａｓ９）を含む、段落１２８のベクターの組合せ。
【０５５８】
１３２．ｇＲＮＡ１およびｇＲＮＡ２が、同じプロモーターから転写され、ｇＲＮＡ１およびｇＲＮＡ２をコードするヌクレオチド配列が、前記第１のベクター、または前記組合せの共通のベクターに含まれる、段落１０８～１１３のうちのいずれか１つに従属する場合における、段落７８～１３１のうちのいずれか１つの核酸または組合せ。
【０５５９】
１３３．核酸または組合せが、内因性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を含む細胞に含まれ、Ｐ１が、ＰＳ１を切断するための、前記系のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトである、段落７８～１３２のうちのいずれか１つの核酸または組合せ。
【０５６０】
１３４．前記第１のＣａｓ、または前記Ｃａｓヌクレアーゼをコードする、発現可能なヌクレオチド配列と組み合わせた、段落７８～１３３のうちのいずれか１つの核酸または組合せ。
【０５６１】
１３５．ＨＡ１およびＨＡ２が、細菌の単一の株または種の、固有の配列（ＮＳ１およびＮＳ２）とハイブリダイズすることが可能である、段落７８～１３４のうちのいずれか１つの核酸または組合せ。
【０５６２】
１３６．前記細菌種または細菌株が、食品、食物成分、または前駆体成分；飲料；水（例えば、ヒト摂取に意図される）；工業用物質または環境物質（例えば、油、石油製品、土壌、または水路もしくは貯水池；あるいは油、石油製品、土壌、水、食品、食品成分もしくは食品前駆体、または飲料もしくは飲料成分もしくは飲料前駆体を回収または処理するための装置）において見出され；核酸または組合せを、これらのうちのいずれかと組み合わせてもよい、段落１３５の核酸または組合せ。
【０５６３】
１３７．種または株が、ヒトまたは非ヒト動物のマイクロバイオーム種またはマイクロバイオーム株、例えば、消化管、膣、腋窩、または口腔のマイクロバイオーム集団である、段落１３５または１３６の核酸または組合せ。
【０５６４】
１３８．実施形態７８～１３７のうちのいずれか１つの、第１の核酸または組合せを含む、抗生剤（例えば、抗菌剤または抗古細菌剤）組成物。
【０５６５】
１３９．ヒトにおける疾患または状態（例えば、細菌感染または肥満）を処置または防止するための医薬であって、段落７８～１３８のうちのいずれか１つの、第１の核酸、抗生剤、または組合せを含む医薬。
【０５６６】
１４０．第１のベクターまたは各ベクターが、ｄｓＤＮＡベクターである、段落１２４に従属しない場合における、段落１２４の核酸、または段落１２５～１３９のうちのいずれか１つの核酸もしくは組合せ。
【０５６７】
１４１．第１のベクターまたは各ベクターが、ｄｓＤＮＡベクターである、段落１２４に従属しない場合における、段落１２４の核酸、または段落１２５～１３９のうちのいずれか１つの核酸もしくは組合せ。
【０５６８】
１４２．第１のベクターまたは各ベクターが、ＢＡＣ、ＰＡＣ、ＹＡＣ、またはプラス

ミドである、段落１４０または１４１の核酸または組合せ。
【０５６９】
１４３．第１のベクターが、切断の前に環状である、段落１４０、１４１、または１４２の核酸または組合せ。
【０５７０】
１４４．第１のベクターが、第１のベクターの導入のために、宿主細胞に感染し、その中のＰＳ１を切断することが可能なバクテリオファージである、段落１２４に従属しない場合における、段落１２４の核酸、または段落１２５～１３９のうちのいずれか１つの核酸もしくは組合せ。
【０５７１】
１４５．ＨＡ１が、ＣＳ１から、２５０ｎｔを超えずに隔てられた、任意の先行する段落の、方法、核酸、組合せ、抗生剤、または医薬。
【０５７２】
１４６．ＨＡ１が、少なくとも１５連続ヌクレオチドを含む、任意の先行する段落の、方法、核酸、組合せ、抗生剤、または医薬。
【０５７３】
１４７．ＨＡ１の配列が、ＮＳ１と同質である、任意の先行する段落の、方法、核酸、組合せ、抗生剤、または医薬。
【０５７４】
１４８．ＨＡ２が、ＣＳ２から、２５０ｎｔを超えずに隔てられた、任意の先行する段落の、方法、核酸、組合せ、抗生剤、または医薬。
【０５７５】
１４９．ＨＡ２が、少なくとも１５連続ヌクレオチドを含む、任意の先行する段落の、方法、核酸、組合せ、抗生剤、または医薬。
【０５７６】
１５０．ＨＡ２の配列が、ＮＳ２と同質である、任意の先行する段落の、方法、核酸、組合せ、抗生剤、または医薬。
【０５７７】
１５１．第２の核酸鎖との相同組換えに適する、第１の核酸鎖を作製する方法であって、核酸鎖において、
（ａ）相同組換えにより、ＩＳを、第２の鎖へと挿入するための、第２の鎖の、第１の所定の標的ヌクレオチド配列（ＮＳ１）と相補的な、第１の相同アーム（ＨＡ１）を含む（またはこれからなる）挿入配列（ＩＳ）と；
（ｂ）ＰＡＭ（Ｐ１）と隣接する、第１のプロトスペーサー配列（ＰＳ１）であって、Ｐ１が、第１の切断部位（ＣＳ１）において、ＰＳ１を切断するための、第１のＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり；
ＣＳ１が、ＨＡ１の末端にあるか、またはこれにフランキングし、ＣＳ１を、Ｃａｓにより切断する場合、ＨＡ１が、ＩＳの前記挿入のために、ＮＳ１との相同組換えが可能であるＰＳ１とを組み合わせること
を含む方法。
【０５７８】
１５２．核酸鎖において、
（ｃ）第２の鎖の、第２の所定の標的ヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相補的な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；
（ｄ）第２のＰＡＭ（Ｐ２）と隣接する、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）であって、Ｐ２が、第２の切断部位（ＣＳ２）において、ＰＳ２を切断するためのＣａｓヌクレアーゼとコグネイトであり、
ＣＳ２を、Ｃａｓにより切断する場合、ＨＡ２が、ＩＳの前記挿入のために、ＮＳ２との相同組換えが可能であるＰＳ２とをさらに組み合わせること
を含む、段落１５１の方法。

【０５７９】
１５３．ＣＳ１を、第１のＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９、適宜、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９または黄色ブドウ球菌Ｃａｓ９）により切断することを含む、段落１５１または１５２の方法。
【０５８０】
１５４．ＣＳ２を、Ｐ２とコグネイトであるＣａｓヌクレアーゼにより切断することを含む、段落１５２または１５３の方法。
【０５８１】
１５５．ＣＳ１およびＣＳ２を、同じＣａｓヌクレアーゼにより切断することを含む、段落１５４の方法。
【０５８２】
１５６．ＨＡ１（および、また、ＨＡ２であってもよい）と、第２の核酸鎖との相同組換えを実行することであって、ＩＳを、第２の鎖へと挿入することと；適宜、前記相同組換えの後において、修飾された第２の核酸鎖および／または第１の核酸鎖を単離またはシーケンシングすることとを含む、段落１５３～１５５のうちのいずれか１つの方法。
【０５８３】
１５７．核酸鎖を修飾する方法であって、
（ａ）段落７８～１５０のうちのいずれか１つに従う第１の核酸鎖、または段落１５１～１５６のうちのいずれか１つの方法により作製される第１の核酸鎖を用意することと；
（ｂ）ＣＳ１を、第１のＣａｓ（例えば、化膿レンサ球菌Ｃａｓ９または黄色ブドウ球菌Ｃａｓ９であってもよい、Ｃａｓ９）により切断することと；
（ｃ）ＨＡ１（および、また、ＨＡ２であってもよい）と、第２の核酸鎖との相同組換えを実行することであり、ＩＳを、第２の鎖へと挿入することと；
（ｄ）適宜、前記相同組換えの後において、修飾された第２の核酸鎖および／または第１の核酸鎖を単離またはシーケンシングすることと
を含む方法。
【０５８４】
１５８．前記相同組換えの前に、ＮＳ１とＮＳ２との間の、第２の核酸鎖を切断すること（例えば、Ｃａｓによる切断を使用して）を含む、段落１５７の方法。
【０５８５】
１５９．第２の核酸鎖の切断が、第１のＣａｓヌクレアーゼによりなされる、段落１５８の方法。
【０５８６】
１６０．第１の核酸鎖または第２の核酸鎖に含まれるマーカーを、前記相同組換えにより破壊し、前記マーカーの非存在を検出して、相同組換えが生じたことを決定することを含む、段落１５７～１５９のうちのいずれか１つの方法。
【０５８７】
１６１．第１の核酸鎖または第２の核酸鎖に含まれるマーカーを、前記相同組換えにより形成し、前記マーカーの存在を検出して、相同組換えが生じたことを決定することを含む、段落１５７～１５９のうちのいずれか１つの方法。
【０５８８】
１６２．ＩＳが、ドナー配列を含み、ＨＡ１が、ＩＳの５’側にあり、ＨＡ１とＮＳ１との相同組換えを実行することを含み、ＩＳを、第２の核酸配列へと挿入する、段落１５７～１６１のうちのいずれか１つの方法。
【０５８９】
１６３．さらなるプロトスペーサーおよびＰＡＭが、ＩＳに含まれ、ＩＳの、第２の核酸鎖への挿入の後において、さらなるプロトスペーサーの、Ｃａｓによる切断を使用することを含み、さらなるプロトスペーサーが、切断部位において、ＣＳ３を切断する、段落１６２の方法。
【０５９０】

１６４．さらなるプロトスペーサーを切断するために、Ｐ１またはＰ２とコグネイトではないＣａｓを使用する、段落１６３の方法。

【０５９１】

１６５．ＣＳ３におけるさらなる配列、またはＣＳ３にフランキングするさらなる配列を挿入するか、または欠失させるように、相同組換えを実行することを含む、段落１６３または１６４の方法。

【０５９２】

１６６．ＨＡ１とＨＡ２との間に配列を挿入せず、適宜、ＨＡ１およびＨＡ２にフランキングする配列の、第１の核酸鎖内の挿入を伴わずに、ＨＡ１およびＨＡ２を、第２の核酸へと挿入することを含む、段落１５７～１６５のうちのいずれか１つの方法。

【０５９３】

１６７．ＮＳ１とＮＳ２との間の配列を欠失させることを含む、段落１５７～１６６のうちのいずれか１つの方法。

【０５９４】

１６８．細胞（例えば、細菌細胞、例えば、ヒトの病原体細胞）において実行され、第２の核酸鎖が、細胞の染色体またはエピソームに含まれ、配列の欠失が、細胞を死滅させる、段落１６７の方法。

【０５９５】

１６９．ＮＳ１とＮＳ２との間の配列を欠失させずに、ＩＳを挿入することを含む、段落１５７～１６６のうちのいずれか１つの方法。

【０５９６】

１７０．ＣＳ１を切断する前に、第１の核酸鎖を、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１、例えば、単一のガイドＲＮＡ）と組み合わせることを含み、ｇＲＮＡ１が、ＰＳ１を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ１と相補的なヌクレオチド配列を含む、段落１５７～１６９のうちのいずれか１つの方法。

【０５９７】

１７１．ＣＳ１を切断する前に、第１の核酸を、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ２、例えば、単一のガイドＲＮＡ）と組み合わせることを含み、ｇＲＮＡ２が、ＰＳ２を切断するように、Ｃａｓをガイドするための、ＰＳ２と相補的なヌクレオチド配列を含む、段落１５７～１７０のうちのいずれか１つの方法。

【０５９８】

１７２．第１の鎖が、第１のベクターに含まれ、ＣＳ１を切断する前に、ベクターを、宿主細胞へと導入することを含み、ＣＳ１を、宿主細胞において切断し、第２の鎖との相同組換えを、宿主細胞において実行する、段落１５７～１７１のうちのいずれか１つの方法。

【０５９９】

１７３．細胞が、細菌細胞または古細菌細胞、例えば、大腸菌細胞である、段落１７２の方法。

【０６００】

１７４．細胞が、ヒト病原体種のものである、段落１７２または１７３の方法。

【０６０１】

１７５．細胞が、ヒトマイクロバイオーム種、例えば、ヒト消化管マイクロバイオーム種の細胞である、段落１７２、１７３、または１７４の方法。

【０６０２】

１７６．第１のＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９）が、細胞に対して内因性である、段落１７３～１７５のうちのいずれか１つの方法。

【０６０３】

１７７．ＣＳ１を切断する前に、第１のＣａｓを、細胞へと導入するか、または細胞へと、第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列を導入することと、ＣＳ１を切断する前に、細胞において、前記Ｃａｓをさらに発現させることとを含む、段落１５

７～１７６のうちのいずれか１つの方法。
【０６０４】
１７８．インビトロにおける、段落１５７～１７７のうちのいずれか１つの方法。
【０６０５】
１７９．核酸鎖を修飾するように、リコンビニアリングを含む、段落１５７～１７８のうちのいずれか１つの方法。
【０６０６】
１８０．インビボ（例えば、ヒトまたはヒト胚ではない）における、段落１５７～１７７のうちのいずれか１つの方法。
【０６０７】
１８１．ヒトまたは動物における疾患または状態を、処置、防止、または診断する、ヒトまたは動物の、医学的な治療、予防、または診断のための、段落１５７～１７７および１８０のうちのいずれか１つの方法。
【０６０８】
１８２．細胞が、真核細胞である、段落１７２の方法。
【０６０９】
１８３．ＣＳ１を切断する前に、第１のＣａｓを、細胞へと導入するか、または細胞へと、第１のＣａｓをコードする、発現可能なヌクレオチド配列を導入することと、ＣＳ１を切断する前に、細胞において、前記Ｃａｓをさらに発現させることとを含む、段落１８２の方法。
【０６１０】
１８４．食品、食物成分、または前駆体成分；飲料；水（例えば、ヒト摂取に意図される）；工業用物質または環境物質（例えば、油、石油製品、土壌、または水路もしくは貯水池；あるいは油、石油製品、土壌、水、食品、食品成分もしくは食品前駆体、または飲料もしくは飲料成分もしくは飲料前駆体を回収または処理するための装置）へと、第１の核酸をさらに組み入れることを含む、段落１５７～１８３のうちのいずれか１つの方法。
【０６１１】
１８５．ヒトまたは非ヒト動物のマイクロバイオーム種またはマイクロバイオーム株、例えば、消化管、膣、腋窩、または口腔のマイクロバイオーム集団である、細菌種もしくは細菌株、または古細菌種もしくは古細菌株へと、核酸を導入するための組成物へと、第１の核酸をさらに組み入れることを含む、段落１５７～１８４のうちのいずれか１つの方法。
【０６１２】
１８６．抗生剤（例えば、抗菌剤または抗古細菌剤）組成物、またはヒトにおける疾患もしくは状態（例えば、細菌感染または肥満）を処置もしくは防止するための医薬へと、第１の核酸をさらに組み入れることを含む、段落１５７～１８５のうちのいずれか１つの方法。
【０６１３】
１８７．細胞において実行され、ＣＳ１の切断が、細胞を死滅させるか、または細胞の増殖を低減する、段落１５７～１８３のうちのいずれか１つの方法。
【０６１４】
１８８．ＰＳ１が、ベクターの抗毒素ヌクレオチド配列に含まれ、かつ／または前記相同組換えにより、抗毒素配列を、第１の鎖から欠失させる、段落１８７の方法。
【０６１５】
１８９．ＰＳ１が、第１の鎖の抗抗毒素剤の核酸配列（ＡＡＴ）に含まれるか、またはこれにフランキングし、薬剤が、宿主細胞の抗毒素活性を消失させるか、または低減することが可能である、段落１８８の方法。
【０６１６】
１９０．細胞において実行され、ＣＳ１の切断が、細胞内の毒素の細胞傷害活性を促進する、段落１５７～１８３および１８７～１８９のうちのいずれか１つの方法。

【０６１７】
１９１．第１の核酸が、段落７８～１５０のうちのいずれか１つに従う、段落１５７～１９０のうちのいずれか１つの方法。
【０６１８】
１９２．細胞（例えば、原核細胞または真核細胞）内の核酸を修飾する方法であって、
（ａ）細胞を用意することであり、
ｉ．閉環状核酸ベクター（例えば、ＢＡＣ）であり、第１の核酸鎖を含むベクターと；
ｉｉ．第２の核酸鎖であり、細胞の染色体に含まれる、第２の鎖と
ｉｉｉ．Ｃａｓヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列と、適宜、核局在化シグナル（ＮＬＳ）をコードするヌクレオチド配列と
を含有する細胞を用意することと；
（ｂ）組換え誘導性ベクターの核酸を作製するように、Ｃａｓ（例えば、Ｃａｓ９）ヌクレアーゼによる切断を使用して、細胞内部のベクターの第１の鎖を切断することと；
（ｃ）切断された第１の鎖と、第２の鎖との間で、細胞内部の相同組換えを使用し、第１の鎖と、第２の鎖と間で、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、または３００ｋｂの連続ヌクレオチドの配列を交換し、これにより、少なくとも１つの修飾鎖を形成することと；
（ｄ）適宜、修飾鎖または細胞を単離またはシーケンシングすることと
を含む方法。
【０６１９】
１９３．第１の鎖内の相同アームを、前記相同組換えのために使用し、Ｃａｓによる切断が、相同アームから、１ｋｂを超えて離れない鎖を切断する、段落１９２の方法。
【０６２０】
１９４．少なくとも０．５ｋｂの相同性を、前記相同組換えのために使用する、段落１９２または１９３の方法。
【０６２１】
１９５．交換が、第１の鎖または第２の鎖の相同性指向修復（ＨＤＲ）を含む、段落１９２～１９４のうちのいずれか１つの方法。
【０６２２】
１９６．第２の鎖が切断されない、段落１９２～１９４のうちのいずれか１つの方法。
【０６２３】
１９７．前記配列が、少なくとも１００ｋｂの、連続ヌクレオチドの配列である、段落１９２～１９６のうちのいずれか１つの方法。
【０６２４】
１９８．工程（ａ）の前に、ベクターを、細胞へと、スーパーコイル状閉環状ベクターとして導入する、段落１９２～１９７のうちのいずれか１つの方法。
【０６２５】
１９９．細胞が、ヒト細胞、マウス細胞、植物細胞、または酵母細胞である、段落１９２～１９８のうちのいずれか１つの方法。
【０６２６】
２００．前記配列が、ヒト配列である、段落１９２～１９９のうちのいずれか１つの方法。
【０６２７】
２０１．前記配列が、第２の鎖から取り込まれ、第１の鎖へと挿入される、段落１９２～２００のうちのいずれか１つの方法。
【０６２８】
２０２．前記配列を、第１の鎖から、第２の鎖へと挿入する、段落１９２～２０１のうちのいずれか１つの方法。
【０６２９】

２０３．インビトロにおいて、ヒト細胞内の突然変異を補正するための遺伝子治療法であって、段落１９２～２０２のうちのいずれか１つの方法を、ヒト細胞（例えば、ｉＰＳ細胞またはＴ細胞）において実行して、前記突然変異を補正することを含み、突然変異が、工程（ａ）における第２の鎖に含まれる遺伝子治療法。

【０６３０】

２０４．ヒトＣＡＲ－Ｔ細胞を作製する方法であって、段落１９２～２０３のうちのいずれか１つの方法を、ヒトＴ細胞（またはその前駆体細胞）において実行することを含み、前記配列が、キメラ抗原受容体の、タンパク質、サブユニット、またはドメインを発現させるための配列である方法。

【０６３１】

ある例においては、段落１９２～２０４のうちのいずれか１つの方法における第１の鎖は、本発明の、任意の態様、実施形態、例、または条項において列挙される第１の鎖の特色を有し、これにより、これらの特色のうちのいずれかは、段落１９２～２０４のうちのいずれかと組合せ可能である。ある例においては、段落１９２～２０４のうちのいずれか１つの方法における第２の鎖は、本発明の、任意の態様、実施形態、例、または条項において列挙されるドナー鎖またはさらなる鎖の特色を有し、これにより、これらの特色のうちのいずれかは、段落１９２～２０４のうちのいずれかと組合せ可能である。

【０６３２】

本明細書の任意の態様においては、ＨＡ１およびＨＡ１は、方法を実施する細胞と同じ種または株（すなわち、ＮＳ１およびＮＳ２の、同じ種または株）に由来する。例えば、種は、ヒト、マウス、またはラット、例えば、マウス１２９株またはＣ５７／ＢＬ６株である。

【０６３３】

ベクター生成物が、ドナー鎖から取り込まれたＲＳを含有する第１の鎖を含む構成においては、生成物ベクターは、ＨＡ１およびＨＡ２の、それぞれ、３’および５’にフランキングするヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ）切断部位（またはＨＡ１およびＨＡ２の、それぞれ、３’末端および５’末端におけるヌクレアーゼ切断部位、もしくはこれらにフランキングするヌクレアーゼ切断部位）であって、組換え誘導性末端を伴う配列の作製を可能とするためのヌクレアーゼ切断部位を含んでもよく、その後のＨＲまたはＳＳＲによる、例えば、標的細胞または核酸の、さらなる鎖への、ＲＳの挿入のためのＲＳも含む。ある例においては、まず、ＣＳ１／ＣＳ２を切断した後で、さらなる切断部位を、ＣＳ１およびＣＳ２を切断するのに使用されるＣａｓと異なるＣａｓヌクレアーゼ、ならびに／またはさらなる部位を切断するためのｇＲＮＡにより切断し、第１の鎖（例えば、ＲＳを取り込んだ細胞へと導入される）と組み合わせる。

【０６３４】

配列ライブラリー、配列コレクション、およびこれらの使用

本発明は、取込み配列（ＲＳ）のコレクションまたはライブラリーを作製するために有用である。ある実施形態においては、本発明は、本発明の取込み法により得ることが可能であり（または得られ）、互いと異なる、例えば、互いの変異体である、複数のタンパク質をコードする、第１のＲＳ配列および第２のＲＳ配列を含む、取込み配列（ＲＳ）のコレクションを含む、複数のベクターの作製において、有用性を見出す。ある実施形態においては、第１のＲＳおよび第２のＲＳの、のベサイズは、１～６００ｋｂ、例えば、１～５００、４００、３００、２００、２５０、１５０または１００ｋｂであり、各配列は、２５０または３００ｋｂを超えないサイズであってもよい。例えば、ベクターは、細胞試料から取り込まれたゲノム断片のコレクションを含む、ＢＡＣベクターまたはＹＡＣベクターである。試料は、同じ種類の複数の細胞を含む場合もあり、異なる種類の複数の細胞を含む場合もあり、例えば、齧歯動物、マウス、ラット、ヒト、細菌種または細菌株、酵母種または酵母株など、同じ生物から得られる細胞でありうるが、この場合、配列は、同じウイルスの種または株のものである。ある例においては、本発明は、ヒトまたは動物のゲノムのうちの、複数の取り込まれたゲノム断片を含むベクターコレクションを作製する

ために有用である。このようにして、本発明は、個々のヒトのための、オーダーメイドコレクションであって、例えば、ヒトゲノムの全部もしくは一部をシーケンシングするために有用であり、かつ／または診断的使用、治療的使用、または予防的使用のためのトランスジェニック細胞を作製するために、細胞へと挿入するための配列供給源としての使用など、１または複数のヒトにおける前記診断的使用、治療的使用、および／または予防的使用のための１または複数のゲノム断片の供給源として有用でありうるオーダーメイドコレクションを作製する手段をたやすく提供する。例えば、１または複数の取込み配列（ＲＳ）を、本発明のベクターから、シーケンシングし、単離し、かつ／またはコピーし、方法において使用するが、この場合、配列（またはその修飾形もしくは補正形）を、インビトロにおいて、レシピエント細胞へと挿入し、細胞を、患者における疾患または状態を処置または防止するために、動物（例えば、ヒトまたは動物患者）へと投与してもよく、細胞を、前記投与のための組織または血液試料へと発生させてもよい。レシピエント細胞は、ヒト多能性細胞または動物多能性細胞（例えば、ヒトｉＰＳ細胞）、幹細胞、胚性幹細胞（例えば、非ヒト脊椎動物細胞、例えば、齧歯動物ＥＳ細胞、ラットＥＳ細胞、またはマウスＥＳ細胞）、または免疫細胞（例えば、ヒト免疫細胞または造血幹細胞）でありうる。このようにして、例えば、患者における疾患または状態を処置または防止するために、ヒト患者へと投与される、改変ヒト免疫細胞（例えば、ＣＡＲ－Ｔ細胞またはＮＫ細胞）を作製することができる。

【０６３５】

取込みベクターにおいて、比較的小型の相同アーム（例えば、１５～５０ｂｐという小型の）を使用し、かつ／またはそれらの配列が、ドナー核酸とのいくつかのミスマッチを有する（例えば、各アームの配列は、そのそれぞれのＮＳ１またはＮＳ２との、４０～２０％のミスマッチを含む）アームを使用することにより、これは、例えば、生物（例えば、ヒト、齧歯動物、マウスまたはラット）の１または複数の細胞に由来する、ランダムなゲノム断片のコレクションを作製するのに、ドナーからランダムな（所定ではないかまたは未知の）ＲＳを取り込むために有用でありうる。

【０６３６】

本発明のベクターは、配列が公知の、１または複数の相同アーム（例えば、ＨＡ１およびＨＡ２）がフランキングするＲＳを含むので有利である。これは、いくつかの利点をもたらす。例えば、相同アームを使用して、ＲＳを、レシピエント細胞（例えば、本明細書において言及される細胞）へと挿入することができ、挿入が、相同アームにより指定される、あらかじめ規定されたゲノム位置であるので有利である。通例、相同アームは、ＲＳが、相同組換えによる、レシピエント細胞への挿入の準備ができる前に、相同アームを付加するための、さらなる煩瑣なクローニングまたは他の工程に対する必要を伴わずに、本発明の方法により、ＲＳと組み合わせて提供される。

【０６３７】

各々が、公知の配列の、１または複数の相同アームがフランキングするＲＳを含む、本発明のベクターもまた、植物、動物（例えば、ヒト、齧歯動物、マウスまたはラット）、酵母、細菌、またはウイルスのゲノムに由来する配列コレクションなど、ゲノム断片（ＲＳ）のライブラリーまたはコレクションを作製するために有用である。ある実施形態においては、これは、たやすくカタログ化するかまたは秩序立てうる配列ライブラリー、例えば、哺乳動物（例えば、ヒトまたはマウス）ライブラリーを作製するために有用である。当技術分野においては、基準ゲノム配列（例えば、ヒト、細菌、マウス、または酵母の基準ゲノム配列）が利用可能であり、これらを使用して、各対が、それぞれの種類の取込みベクター（本発明の第１の鎖）を構築するのに使用される、複数の異なるＨＡ１／ＨＡ２対を選択することができる。次いで、このような複数のベクターを、それぞれの生物から得られる、１または複数の細胞（例えば、植物細胞、動物細胞（例えば、ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞またはラット細胞）、酵母細胞、または細菌細胞）と組み合わせ、本発明の方法において、複数のＲＳ（ベクター内の、異なるＨＡ１／ＨＡ２対の使用のために、異なるＲＳが取り込まれる）を取り込むのに使用する。ある実施形態においては、

少なくとも第１の取込みベクターおよび第２の取込みベクターを、同じ細胞へと導入するが、この場合、ベクターは、異なるＨＡ１／ＨＡ２対を含み、第１のＲＳおよび第２の異なるＲＳは、細胞の染色体またはエピソームから取り込まれる。加えて、または代替的に、複数の異なる取込みベクターを、複数の細胞（例えば、同じ生物、または、例えば、細菌もしくは酵母の同じ種もしくは株から得られた細胞、あるいは同じ臓器または組織から得られた細胞）と組み合わせるが、この場合、ベクターを、細胞へと導入し、複数のＲＳを、細胞から取り込む。ある実施形態においては、１または複数の取込みＲＳを、ベクターから、単離、シーケンシング、またはコピーする。ＲＳを、本明細書において開示されるさらなる適用（例えば、遺伝子治療のための）のうちの１または複数において使用することができる。

【０６３８】

ＨＡ１／ＨＡ２対は、基準配列（例えば、個体（例えば、ヒト）または種のゲノム配列または染色体配列）についての知見を使用してデザインしうるので、ＨＡ１／ＨＡ２対の類縁のゲノムまたは染色体における順序または位置も公知となり、これは、取込みベクター（それらのそれぞれのＲＳを含む）を、基準ゲノム内の、公知の順序または位置に照らして、秩序立てるかもしくはカタログ化するか、または標識化することを可能とするので有利である。これは、ライブラリーのカタログまたはデータベースの、自動化支援型またはコンピューター支援型の集成を可能とする。したがって、例えば、どの２つのベクターが、同じ染色体において、重複するか、隣接するか、連続し、かつ／または細胞の初期試料を得た生物のゲノム内の同じ遺伝子座に含まれるＲＳを含むのかを決定することが可能である。これは、生物または細胞のゲノム配列の、秩序立てられるかまたはカタログ化されたベクターライブラリーのアセンブリーを、大幅に簡略化する。ある実施形態においては、ベクターを、固有に標識することができ（例えば、１または複数の従来のヌクレオチド配列バーコードを含めることにより）、これにより、基準ゲノム配列内の、公知の位置、染色体、または順序を同定する。これは、例えば、ＭｉＳｅｑ（商標）などを使用する、次世代シーケンシング法を使用する、ハイスループットシーケンシングに有用である。ある例においては、各ベクターのＨＡ１およびＨＡ２の一方または両方は、バーコード識別子（および制限部位またはヌクレアーゼ部位（例えば、Ｃａｓによる切断部位）を、同定が生じたら、ＲＳの放出を可能とするように、バーコードもしくは相同アームにフランキングして、またはバーコード内もしくは相同アーム内に適宜組み入れてもよい）を含む。異なるバーコードを使用して、異なる位置（基準配列またはゲノムに照らした）を同定することにより、取込みＲＳの各型を同定し、そのそれぞれのベクターおよび基準における位置と相関させることができる。例えば、本発明は、バーコードまたは識別子を使用して、取込み配列を分取し、配列を順序づける（例えば、基準ゲノム配列、例えば、該当する場合、ヒト、マウス、酵母または細菌の基準配列に照らして帰せられる順序に従い順序づけられた複数の取込み配列を含む配列の集成を、コンピュータにより集成する）ことを含む。これは、インビトロにおいて、細胞に由来する全ゲノムＤＮＡをせん断し（まとめられると有用でありうる、断片の範囲およびサイズをさらに低減する）、個々の配列を精製および単離し、アダプターの末端を、配列へと付加（例えば、インビトロにおいて、ＰＣＲまたはギブソンアセンブリーを使用して）し、次いで、修飾配列断片を、複数のベクター（ＢＡＣなど）へとクローニングして、ライブラリーを創出することを伴う、現行の技法より、はるかに簡便である。この場合、多くの煩瑣な工程（損傷を引き起こし、方法の効率を低下させ、得られる断片のサイズを制限する、有害な配列のせん断を含む）が使用される。さらに、次いで、ベクターの順序付け、同定、またはカタログ化は、時間を要する、多くのベクターインサートのシーケンシングに続き、このような情報に基づく、このような順序付けなども要請する。本発明は、複数の実施形態において、大型の断片を、細胞の、それほど苛酷ではない環境内部の、取込みベクター内に捕捉することができ、捕捉は、ベクター（環状ベクターなど）へと直接なされ、これは、さらなる操作を伴わずに、下流の使用のために、直接有用であり、ドナー配列内のＲＳの位置は、公知であり（かつ、上記で論じた通り、容易に同定およびカタログ化することができ）、ＲＳには、識別

子配列において（ＲＳの同定を支援するのに）使用することが可能であり、かつ／または下流における、レシピエント配列または細胞ゲノムへの挿入（例えば、相同組換えによる）のためにも使用しうる、公知の配列がフランキングするので有用であるので、優れている。本発明は、配列を取り込み、ベクターへの挿入のために核酸を加工するのに、ＰＣＲに依拠する必要を回避するので有用であり、したがって、本発明により、ＰＣＲ由来のヌクレオチド配列エラー（例えば、ドナーのＲＳ配列を、誤って変化させる、１または複数のヌクレオチドの挿入、欠失、および／または置換）の可能性は回避される。本発明の生成物ベクターおよびＲＳは、直接有用であり、したがって、いかなるＰＣＲ工程に対する必要も伴わず、また、拡大工程または培養工程に対する必要も伴わない（所望の場合は、取り込まれたＲＳベクターの拡大または培養を、方法に組み入れうるが）。本発明は、複数の異なる取込みベクターを、ドナー配列試料（例えば、細胞集団）と、簡便に組み合わせることにより、複数のＲＳの取込みを行いうるように、マルチプレックス化することができる。本発明はまた、単一の種類の取込みベクター前駆体（ユニバーサルベクター）を援用しうるので、実行が容易でもありうる。ユニバーサルベクターは、標的細胞ゲノムまたは標的核酸の、所望の領域および所定の領域をターゲティングするように選択された相同アームを挿入するための、１または複数のクローニング部位を含むようにデザインすることができる。ユニバーサルベクターは、１または複数の切断部位であって、各々が、相同アームを挿入するための、それぞれの部位（「クローニング部位」）にフランキングするか、またはこれとすぐ隣接する切断部位を備える。本明細書においては、この実施形態について、Ｃａｓによる切断に言及しながら記載するが、ガイド型ヌクレアーゼ（例えば、ＲＮＡガイド型ヌクレアーゼ）または制限エンドヌクレアーゼなど、異なる手段による切断のために、たやすく改変することができる。

【０６３９】

ある実施形態においては、本発明は、動物のゲノム、臓器、または組織の、複数の異なる配列を含むベクター（例えば、環状ベクター）のコレクションを提供するが、この場合、各配列は、本発明の方法を使用して取り込まれたＲＳから得られるか、またはコピーされている。ある例においては、動物は、ヒトまたは齧歯動物、ラットまたはマウスである。代替法においては、コレクションは、同じ種の複数の動物（例えば、１例、２例、またはこれを超えるヒト）の、このような配列を含む。ある例においては、前記の複数に含まれる配列は、それぞれの配列を同定する、例えば、配列、ゲノムにおける位置、および染色体における位置の供給源（例えば、ヒト）の、１つであるか、これを超えるか、または全てを同定する識別子（例えば、ヌクレオチド配列タグまたはバーコード）と関連する。

【０６４０】

上記で説明した通り、どのＲＳ配列を取り込むのかの選出しは、本発明における相同アームの選出しにより、容易に制御される。このようにして、例えば、ドナー細胞内または生物ゲノム内のドナー配列において、互いと隣接するか、互いと連続するか、または重複する、第１のＲＳおよび第２のＲＳを取り込むことができる。第３のＲＳを取り込んでもよいが、この場合、第３のＲＳは、ドナー細胞内または生物ゲノム内の、第１のＲＳまたは第２のＲＳと、隣接するか、連続するか、または重複する。このようにして、複数のＲＳを取り込むこと（および、適宜、これらを同定するか、順序付けるか、またはカタログ化すること）により、比較的大型の配列断片を使用して（とりわけ、ＲＳを、ＢＡＣまたはＹＡＣなどの環状ベクターへと取り込む場合）、比較的少数の工程により、ドナーの染色体またはエピソームを渉猟することが可能である。例えば、これはとりわけ、複数の取込みＲＳが、ドナーにおいて重複するＲＳおよび／または連続するＲＳを含む場合に容易とされる。ある実施形態においては、ドナーにおいて重複するＲＳまたは連続するＲＳを含む取込みＲＳは、操作配列（例えば、ＤＮＡ配列）または細胞ゲノム（例えば、ｉＰＳまたはＥＳ細胞ゲノム）を作製する方法において有用である。この目的で、本発明は、インビトロにおいて、操作配列（例えば、ＤＮＡ配列）または細胞ゲノムを作製する方法であって、（ａ）レシピエントの核酸配列（例えば、前記細胞に含まれる、例えば、ＤＮＡ配列）を用意することと；（ｂ）第１のインサート配列を、レシピエント配列へと（また

はこの末端に）挿入することと；（ｃ）インサート配列が、部分的に重複するか、またはすぐ連続するように、第２のインサート配列を、第１のインサート配列へと（またはこの末端に）挿入することと；（ｄ）第１のインサート配列および第２のインサート配列を含む配列またはゲノムまたは細胞を単離することと；適宜、（ｄ）結果として得られる細胞、組織または非ヒト脊椎動物を作製することとを含み、第１のインサート配列が、本発明に従う方法を使用して、ベクターへと取り込まれた、第１のＲＳの配列を含み；第２のインサート配列が、本発明に従う方法を使用して、ベクターへと取り込まれた、第２のＲＳの配列を含み；ＲＳが、本発明の方法において、前記取込みのために使用されたドナー配列において、すぐ連続するか、または部分的に重複する方法を提供する。ある例においては、前記各インサート配列は、配列（ＲＳ）により接続されて隔てられた、それぞれの、第１の相同アーム（ＨＡ１）第２の相同アーム（ＨＡ２）を含み、この場合、第１のインサート配列のＨＡ２は、第１のインサート配列のＲＳの３’側であり、第２のインサート配列のＨＡ１は、第２のインサート配列のＲＳの５’側であり、第２のインサート配列のＨＡ１は、第１のインサート配列のＨＡ２と同一であるか、もしくはこれと部分的に重複するか、または第１のインサート配列のＲＳに含まれるか、あるいは第２のインサート配列のＨＡ１は、第１のインサート配列のＨＡ２と、少なくとも９０、９５、または９８％同一である配列を含む。ある例においては、第３のインサート配列を、挿入するが、この場合、第３のインサート配列は、配列（ＲＳ）により接続されて隔てられた、それぞれの、第１の相同アーム（ＨＡ１）第２の相同アーム（ＨＡ２）を含み、第３のインサート配列のＨＡ１は、そのＲＳの５’側であり、第３のインサート配列のＨＡ１は、第２のインサート配列のＨＡ２と同一であるか、もしくはこれと部分的に重複するか、または第２のインサート配列のＲＳに含まれる。ある例においては、各インサート配列を、そのそれぞれのＨＡ１／ＨＡ２対を使用して、相同組換えにより挿入する。インサート配列のＨＡ配列のうちのいずれも、他のＨＡ配列のうちのいずれとも同じではないので有利である。

【０６４１】

本発明は、配列の取込みを伴う、その多様な態様において、医学、法医学、診断法（例えば、疾患、疾患、疾患と関連する突然変異、遺伝、系統、および親子についての個別診断法）、考古学、系統発生学、人類学、食品生産、油生産および石油生産、環境への適用（例えば、修復）、農業、および他の産業状況における、多くの適用を見出す。ある例においては、本発明は、細胞または核酸の供給源を同定する方法であって、細胞が、ドナー核酸の配列を含むか、または供給源が、前記ドナーを含み、ＲＳを、ベクターへと取り込むための、本明細書の方法を含み、取込みＲＳをシーケンシングすることと、配列を使用して、細胞または供給源を同定することとをさらに含むか、または、核酸プローブを使用して、配列をプローブし、細胞または供給源を同定することをさらに含む方法を提供する。例えば、配列またはプローブを、基準配列と比較して、前記同定を実行する。法医学の例においては、基準は、ヒト（例えば、ヒトの犯罪容疑者）または微生物の基準配列でありうる。診断法または品質管理の例においては、基準は、微生物（例えば、細菌、古細菌、酵母、またはウイルス）の基準配列でありうる。品質管理の例として述べると、本発明は、産業工程、例えば、食品もしくは飲料の生産工程もしくは保存工程；油もしくは石油の回収工程もしくは処理工程；または農業工程のＱＣにおいて使用することができる。ある例においては、取込み配列と、基準配列とは、１または複数のＳＮＰ（例えば、ヒト配列についてのヒトＳＮＰ）だけ異なり、方法は、前記差違を決定することを含む。ある例においては、取込み配列と、基準配列とは、１または複数のＳＮＰ（例えば、ヒト配列についてのヒトＳＮＰ）を共有し、方法は、取込み配列内および基準配列内の、前記ＳＮＰの存在を決定することを含む。有用な基準配列データベースの例は、１０００人ゲノムデータベースおよびＥｎｓｅｍｂｌである。ある例においては、本発明は、動物（例えば、ヒト）の出生前診断法、または動物（例えば、ヒト）の親子を決定する方法であって、動物に由来する、１または複数の細胞を用意することと、本発明に従うＲＳ配列を取り込む方法を実行することとを含み、前記第１の鎖を含む取込みベクターを、前記１または複数の細胞へと導入し、各ベクターが、動物の親（または親と疑われる動物）のうちの一方に

おいて見出される配列に対応するＨＡ１／ＨＡ２を含む方法を提供する。ある例においては、全てのＨＡ１／ＨＡ２対は、親のうちの一方だけにおける配列に対応する。親子を決定する方法においては、例えば、ＲＳおよび前記第１の親におけるＳＮＰのマッチにより指し示されるが、ＲＳおよび前記第２の親におけるＳＮＰのマッチによっては指し示されない通り、前記一方の親は、１または複数の取込み配列が、前記親（第１の親）には含まれるが、他の（疑われる）親（第２の親）には含まれない場合に、動物（例えば、ヒト）の親であると決定される。ある例においては、ＲＳは、Ｙ染色体の配列ではない。ある例においては、ＲＳは、Ｘ染色体の配列［この場合、本発明の方法は、ＲＳまたは一方の親から受け継いだＳＮＰの存在を同定しうるが、他の親から受け継いだＳＮＰの存在は同定しえない（例えば、各親からＸ染色体を受け継いだ女児においてもなお）］である。診断法または本発明の任意の他の方法においては、取込みベクターまたは他のベクターは、ＨＡ１およびＨＡ２を接続する配列を含むが、この場合、配列は、ベクターが導入されるか、またはそれが単離される細胞においては見出されない。したがって、ベクターは、それが、ゲノム配列（ＨＡ１およびＨＡ２など）を、同じゲノム（例えば、細菌または酵母のベクター配列）に由来しない配列と組み合わせるので、非自然発生である。ある例においては、本発明の取込み法を使用して、宿主細胞のゲノム内の遺伝子配列のコピー数を決定する。

【０６４２】

ある例においては、ドナー鎖またはドナー細胞は、動物、例えば、脊椎動物、哺乳動物、ヒト、齧歯動物、マウスまたはラットの臓器または血液の、核酸または細胞である。例えば、ドナー鎖またはドナー細胞は、動物、例えば、脊椎動物、哺乳動物、ヒト、齧歯動物、マウスまたはラットの、肝臓、腎臓、脳、皮膚、肺、乳房、前立腺、ＧＩ組織、脾臓、骨髄、膵臓、胆嚢、口腔、舌、咽頭、ＣＮＳ組織、腸、直腸、膣、陰嚢、精巣、眼、耳、鼻、毛髪、毛包、尿道、卵巣、または子宮に由来する。例えば、ドナー鎖またはドナー細胞は、動物、例えば、脊椎動物、哺乳動物、ヒト、齧歯動物、マウスまたはラットの、造血細胞、造血幹細胞、臍帯血、乳児血液、成体血液、リンパ球、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、マクロファージ、血小板産生細胞、または単球に由来する。

【０６４３】

本明細書において、ＲＳ配列を使用し、さらなる核酸鎖へと挿入する場合、挿入は、取込みＲＳ自体（すなわち、本発明の取込み法の直接的生成物）の挿入の場合もあり、取込みＲＳのコピー（所望に応じ、その突然変異または修飾の後であってもよい）の挿入の場合もある。

【０６４４】

ドナー鎖内または細胞ゲノムにおいて見出されないか、または見出されても希少である、ベクター（第１の鎖）上の切断部位を使用することは有利でありうる。例えば、Ｃａｓによる切断は、ベクターだけをターゲティングし、ゲノムはターゲティングしないようにデザインすることができる。ＴＡＬＥＮまたは亜鉛フィンガーによる切断を使用する場合はまた、特異性もデザインすることができる。制限エンドヌクレアーゼを使用して、ベクターを切断しうるが、この場合、エンドヌクレアーゼは、細胞（ドナー鎖）のゲノムにおいて見出されないか、取り込まれるＲＳ配列において見出されないか、または細胞（ドナー鎖ゲノム）において見出されるが希少であるに過ぎないベクター内のモチーフを認識する。例は、８つの塩基対配列のうちの最初のＧＣの後方で切断するＮｏｔＩであり；７つおよび８つの塩基対認識配列を伴う制限酵素はまた、レアカッターエンドヌクレアーゼでもありうる。レアカッターエンドヌクレアーゼの例は、１８塩基対の配列を認識するホーミングエンドヌクレアーゼである、メガヌクレアーゼＩ－ＳｃｅＩである。切断を実行するのに使用される、１または複数の構成要素は、細胞へと、タンパク質、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）として導入することもでき、細胞へと導入される、第１の鎖またはベクターに含まれるヌクレオチド配列にコードさせることもできる。配列は、細胞において発現し、構成要素は産生される。構成要素の核酸配列は、１または複数の核局在化シグナル（ＮＬＳ）と組み合わせて、細胞核へと局在化させることができる。例えば、Ｃａｓ酵素は、

タンパク質として導入することもでき、細胞において発現するか、または細胞内の、それぞれのＣａｓの転写および発現のためのＤＮＡにより（例えば、第１の鎖または導入されるベクターにより）コードされる、ＣａｓをコードするｍＲＮＡとして導入することもできる。代替的に、細胞（細胞が、細菌細胞または古細菌細胞である場合）が発現させる内因性Ｃａｓを利用して、切断を実行することもできるが；この場合、１または複数のｃｒＲＮＡ（または単一のガイドＲＮＡ）をコードする配列を、細胞へと（例えば、ｍＲＮＡとして、またはベクターもしくは第１の鎖によりコードされる配列として）導入すると、発現したＲＮＡは、内因性のＣａｓが、本発明の切断を実行することをガイドするように、作動可能である。

【０６４５】

本明細書において記載される特定の実施形態は、例示を目的として示されるものであり、本発明の限定として示されるものではないことが理解されるであろう。本発明の主要な特色は、本発明の範囲から逸脱しない限り、多様な実施形態において援用することができる。当業者は、規定の研究だけを使用して、本明細書において記載される具体的な手順との多数の同等物を認識するか、または確認することが可能であろう。このような同等物は、本発明の範囲内にあると考えられ、特許請求の範囲の対象となる。本明細書において言及される、全ての刊行物および特許出願は、本発明が関する技術分野の当業者の技術性のレベルを示す。全ての刊行物および特許出願（ならびにそれらの米国における同等物）は、各個別の刊行物または特許出願が、参照により組み込まれることが、具体的かつ個別に指し示された場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。特許請求の範囲および／または本明細書において、「～を含むこと」という用語と共に使用される場合の、「ある（a）」または「ある（an）」という語の使用は、「１つの」を意味しうるが、また、「１または複数の」、「少なくとも１つの」、および「１つまたは１つを超える」という意味とも合致する。特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物だけ、または代替物が相互に排他的であることを指すことが明示的に指し示されない限りにおいて、「および／または」を意味するように使用されるが、本開示は、代替物だけ、および「および／または」を指す定義を支持する。本出願を通して、「約」という用語は、値が、値を決定するのに援用されるデバイス、方法についての誤差の固有の変動、または研究対象間に存在する変動を含むことを指し示すように使用される。

【０６４６】

本明細書および特許請求の範囲において使用される「～を含むこと（comprising）」（ならびに、「～を含む（comprise）」および「～を含む（comprises）」など、「～を含むこと（comprising）」の任意の形態）、「～を有すること（having）」（ならびに、「～を有する（have）」および「～を有する（has）」など、「～を有すること（having）」の任意の形態）、「～を含むこと（including）」（ならびに、「～を含む（includes）」および「～を含む（include）」など、「～を含むこと（including）」の任意の形態）、または「～を含有すること（containing）」（ならびに、「～を含有する（contains）」および「～を含有する（contain）」など、「～を含有すること（containing）」の任意の形態）という語は、包含的またはオープンエンドなものであり、列挙されていない、さらなる要素または方法の工程を除外するものではない。

【０６４７】

本明細書において使用される「またはその組合せ」という用語または同様の用語は、用語に先行して列挙された項目についての、全ての順列および組合せを指す。例えば、「Ａ、Ｂ、Ｃ、またはこれらの組合せ」とは、Ａ、Ｂ、Ｃ、ＡＢ、ＡＣ、ＢＣ、またはＡＢＣのうちの少なくとも１つを含むことを意図し、特定の文脈において、順序が重要である場合はまた、ＢＡ、ＣＡ、ＣＢ、ＣＢＡ、ＢＣＡ、ＡＣＢ、ＢＡＣ、またはＣＡＢのうちの少なくとも１つを含むことも意図する。この例に続けると、ＢＢ、ＡＡＡ、ＭＢ、ＢＢＣ、ＡＡＡＢＣＣＣＣ、ＣＢＢＡＡＡ、ＣＡＢＡＢＢなどなど、１または複数の項目または項の反復を含有する組合せが明示的に含まれる。文脈からそうでないことが明らかでない限りにおいて、当業者は、いずれの組合せにおいても、項目または項の数は限定されない

ことを理解するであろう。

【０６４８】

文脈からそうでないことが明らかでない限りにおいて、本開示の任意の部分は、本開示の任意の他の部分と組み合わせて読むことができる。

【０６４９】

本明細書において開示され、特許請求される組成物および／または方法の全ては、本開示に照らして、不要な実験を伴わずに作製し、実行することができる。本発明の組成物および方法について、好ましい実施形態との関係で記載してきたが、当業者には、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱しない限りにおいて、本明細書において記載される組成物および／もしくは方法、ならびに方法の工程または工程の連鎖に、変動を適用しうることが明らかであろう。当業者に明らかな、全てのこのような同様の代用および改変は、付属の特許請求の範囲により規定される、本発明の精神、範囲、および概念の中にあるものとみなされる。

【０６５０】

本発明を、以下の非限定的な実施例において、より詳細に記載する。

【実施例１】

【０６５１】

大型のヌクレオチド配列のために、閉環状ベクターを、真核細胞内のインサイチューにおけるＣａｓによる切断と組み合わせること（ヒト細胞による遺伝子治療適用）

これは、以下の可能な遺伝子治療手順を目的として記載することができる。態様は、例示されており（図１）、ＤＮＡ　ＢＡＣなどの閉環状ベクターの集団を構築することにより実行することができ、集団は、スーパーコイル状ベクターを含む。陽性－陰性選択を可能とするために、ベクターの各々は、ベクター骨格内のハイグロマイシン耐性遺伝子と、下記で記載されるＨＰＲＴ遺伝子とを含みうる。環状ベクターは、相同アームおよび化膿レンサ球菌Ｃａｓ９切断部位（すなわち、本明細書において記載されるＨＡ２、ＰＳ２、ＣＳ２、Ｐ２、ＰＳ１、ＣＳ１、Ｐ１、ＨＡ１）を含むように操作することができる。ＰＳ１およびＰＳ２は、Ｐ１およびＰ２（各々がＴＧＧ配列である）と同様に、同一であり、これにより、ＣＳ１およびＣＳ２の両方が、Ｃａｓ９により切断されることを可能とするであろう。単一の（キメラ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１）をコードする配列は、ベクター内に含まれるであろう。ＣＳ１は、ＨＡ１から１０ヌクレオチド離れ、ＣＳ２は、ＨＡ２から１０ヌクレオチド離れるであろう。ＨＡ１およびＨＡ２は併せて、３ｋｂのヌクレオチド配列を含みうる。したがって、Ｃａｓによる切断は、ＨＡ１とＨＡ２とを接続する配列を切り出し、これにより、接続配列が切り出されると、切断されたベクターの各々が、ＨＰＲＴ遺伝子配列を喪失する切断ベクターをもたらしうる。結果として得られる切断ベクターは、ＨＡ２の５’側に、ＨＡ１を有する。

【０６５２】

閉環状ベクターは、インビトロにおいて、疾患を患うヒト対象から得られた肝細胞へと電気穿孔することができる。細胞は、疾患を引き起こすＳＮＰを伴う遺伝子配列を含む。ＨＡ１は、ＳＮＰの３’側の配列であるＮＳ１と、１００％相補的であり、ＨＡ２は、ＳＮＰの５’側の配列であるＮＳ２と、１００％同一である。電気穿孔は、Ｃａｓ９ベクターの、細胞への導入を含み、この場合、Ｃａｓ９配列は、配列が、細胞核に侵入することが可能であるように、Ｕ６プロモーター、Ｔ７プロモーター、またはヒトプロモーターと、ＮＬＳとに作動可能に連結されている。発現したｇＲＮＡ１を使用する、細胞の内部のベクターの、Ｃａｓ９による切断は、ＨＰＲＴを切り出し、ＨＡ１／ＨＡ２の、ＮＳ１／ＮＳ２とのＨＲによるギャップ修復は、ＳＮＰを含む１０１ｋｂの遺伝子配列（ＲＳ）を取り込み、これにより、改変ベクターを作製する。適正な取込みは、陽性－陰性選択における、ハイグロマイシンおよびＧ４１８による抗生剤投与を使用して検出することができる。

【０６５３】

適正な改変ベクターを、インビトロにおけるリコンビニアリングと共に使用して、ＲＳ内のＳＮＰを補正し、これにより、各々が、２つの相同アームの間の補正ＲＳ配列を含む

、閉環状インサートベクターの集団を作製することができる。ｉＰＳ細胞は、ヒト対象に由来し、これらに電気穿孔して、Ｃａｓ９ベクターを導入し、ハイグロマイシンおよびＧ４１８の検出を使用して、ベクターを挿入する。細胞の内部のベクターの、Ｃａｓ９による切断は、補正ＲＳにフランキングする相同アームの片側１０ヌクレオチドにフランキングするインサートベクター（切断は、ベクター骨格内であり、ＲＳ内ではない）へと操作される部位を切断する。切断は、インサートベクターにより保有されるヌクレオチド配列から発現する、第２のｇＲＮＡにより行う。切断は、各々がＮＳ１およびＮＳ２と１００％相補的な相同アームがフランキングする補正ＲＳを含むＤＮＡ断片を放出し、これにより、ｉＰＳ細胞内の、断片と、欠損性遺伝子との間のＨＲは、ＨＲによる、補正ＲＳの、細胞ゲノムへの挿入を介して、ＳＮＰによる欠損を補正する。

【０６５４】

適切な分化細胞（例えば、肝臓組織グラフト）を、補正ｉＰＳ細胞から発生させ、これらを、疾患を処置または防止する、ヒト対象の遺伝子治療のために使用する。

【実施例２】

【０６５５】

内因性Ｃａｓヌクレアーゼを利用する抗生剤法

これは、以下の可能な手順を目的として記載することができる。この態様は、望ましくない化膿レンサ球菌細菌の集団に感染することが可能な、操作ファージミドの集団を構築することにより実行することができる。ファージゲノムを、相同アームおよび化膿レンサ球菌Ｃａｓ９切断部位（すなわち、本明細書において記載されるＨＡ２、ＰＳ２、ＣＳ２、Ｐ２、ＰＳ１、ＣＳ１、Ｐ１、ＨＡ１）を含むように操作する。ＰＳ１およびＰＳ２は、Ｐ１およびＰ２（各々がＴＧＧ配列である）と同様に、同一であり、これにより、ＣＳ１およびＣＳ２の両方が、Ｃａｓ９により切断されることを可能とするであろう。単一の（キメラ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１）をコードする配列は、ゲノム内に含まれるであろう。ＣＳ１は、ＨＡ１から１０ヌクレオチド離れ、ＣＳ２は、ＨＡ２から１０ヌクレオチド離れるであろう。ＨＡ１およびＨＡ２は併せて、３ｋｂのヌクレオチド配列を含みうる。したがって、Ｃａｓによる切断は、ＨＡ１とＨＡ２とを接続する配列を切り出し、これにより、切断された接続配列を、ファージベクターから切り出す、切断ファージゲノムをもたらしうる。結果として得られる切断ベクターは、ＨＡ２の５’側に、ＨＡ１を有する。

【０６５６】

ファージが、細菌に感染し、ファージ核酸を、細胞へと導入するように、操作ファージを、化膿レンサ球菌の咽頭感染を患うヒト対象へと投与する。ＨＡ１は、化膿レンサ球菌の必須遺伝子の配列の３’側の配列であるＮＳ１と１００％相補的であり；ＨＡ２は、遺伝子配列の５’側の配列であるＮＳ２と１００％同一である。Ｈｌｐ遺伝子は、必須遺伝子であるので、ターゲティングされる（Appl Environ Microbiol. 2011 Jul; 77(13): 4422-4428; doi: 10.1128/AEM.00554-11; "The Histone-Like Protein Hlp Is Essential for Growth of Streptococcus pyogenes: Comparison of Genetic Approaches To Study Essential Genes"; Julia V. Bugrysheva et al）。機能的な内因性化膿レンサ球菌Ｃａｓ９は、ファージゲノムにより保有される配列から発現する、単一のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１）を利用するので、電気穿孔は、Ｃａｓ９ベクターの、細胞への導入を除外する。発現したｇＲＮＡ１を使用する、細胞の内部のファージベクターの、Ｃａｓ９による切断は、ＨＡ１とＨＡ２とを接続する配列を切り出し、ＨＡ１／ＨＡ２の、ＮＳ１／ＮＳ２とのＨＲによるギャップ修復は、ｈｌｐ遺伝子配列（ＲＳ）を取り込み、これにより、この配列を、標的細菌細胞のゲノムから切り出す。したがって、ｈｌｐは、不活性とされるので、適正な取込みは、細胞死をもたらし、これにより、ヒトにおける感染の重症度を低減するか、またはヒトにおける感染を除去するであろう。

【０６５７】

代替的な適用においては、同様の手法を使用して、ヒト対象の消化管マイクロバイオームの混合集団内の、１または複数の細菌種をターゲティングすることができる。これは、消化管マイクロバイオームの平衡を回復させる。別の適用では、マイクロバイオームの試

料を、インビトロにおいて、バクテロイデス（Ｂａｃｔｅｒｉｏｄｅｔｅｓ）門種に感染するファージと組み合わせ、ファージを、本発明に従うベクターに取り込ませ、これにより、ターゲティングされたバクテロイデスを死滅させることができる。これは、集団内のフィルミクテス（Ｆｉｒｍｉｃｕｔｅｓ）門：バクテロイデス比を変更する。平衡回復集団の試料を、ドナーまたは異なるヒト対象へと、鼻腔内移植して、肥満を処置または防止する。

【０６５８】

代替的な適用では、同様の手法を使用して、硫黄還元菌（ＳＲＢ）をターゲティングするが、この場合、細菌は、油田に含まれるか、または油回収装置もしくは油処理装置に含まれる。このようにして、ＳＲＢを死滅させ、これにより、油田または油回収装置もしくは油処理装置の、微生物に影響される腐食を低減する。

【実施例３】

【０６５９】

ベクターのフォーマット

図２Ａおよび２Ｂは、本発明における使用のための、単一アームのベクターを示す。相同アームＨＡ１は、少なくとも１００ｋｂの長さであり、標的核酸内の標的配列であるＮＳ１と、少なくとも９０％同一である。示される通り、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ１）の存在下における、Ｃａｓによる切断は、標的との効率的なＨＲに有用である、ＨＡ１から近接した（２５０ｎｔ未満）組換え誘導性末端をもたらす。ＨＲを使用して、例えば、標的核酸へと、ＨＡ１内に含有されるＳＮＰ部位またはＰＡＭ部位を挿入することができる。例えば、ＨＲの、標的への挿入の可能性を最大化するために、配列が、ＨＡ１から１００ｎｔ以内にある場合、ＨＲを使用して、ベクター配列を、ＨＡ１の外部に挿入することができる。

【０６６０】

図３Ａは、環状ベクターが、２つのＣａｓ切断部位（例えば、本発明に従う取込みベクターまたはインサートベクターとしての使用のための）を含む変化形を示す。切断は、異なるｇＲＮＡ（示される通り）または同じｇＲＮＡによりなされうる。切断部位を切断する切断はまた、２つの異なるＣａｓヌクレアーゼ（同時または逐次的に使用される）によってもなされうる。

【０６６１】

図３Ｂは、ＰＡＭ部位が、相同アームにおいて同定され、アームへと操作されているか、もしくはアームが、標的核酸の配列から選択されている変化形、または適切に配置されたＰＡＭを含有する細胞を示す。この変化形内のＣａｓによる切断は、相同アーム内に、組換え誘導性末端をもたらして、効率的なＨＲを促進する。示される通り、第２のベクター内の切断部位を接続する配列の切出しの成功を指し示すように、マーカー（例えば、ＨＰＲＴ）を組み入れることができる。

【０６６２】

図４は、ベクター内に、２つの組換え誘導性末端をもたらす、マーカー断片の放出を示す。この場合、出発ベクターは、ＰＡＭを伴う適切なアームを見出すか、またはＰＡＭを、アームへと操作する必要に依拠しない。代わりに、ＰＡＭは、プロトスペーサー配列内にもたらされるが、これは、標的配列との適切な相同性に対する必要に拘束される場合よりたやすくデザインすることができる。図４Ｂに見られる通り、ドナー鎖を伴うＨＲは、所望のＲＳを含有するドナー断片を取り込む。取り込まれる断片は、インサイチュー（例えば、ＨＲが生じる細胞の内部）において、閉環状ベクターへと取り込まれるので、大型または極めて大型（例えば、１００ｋｂを超える）でありうる。閉環状ベクター内に入ると、ＲＳは、インビトロの、その後の遺伝子操作（例えば、リコンビニアリング）法において、たやすく使用することもでき、精製することもできる。図４Ｃに例示される閉環状ベクターは、遺伝子治療において使用することもでき、インビトロにおいて、または任意の原核細胞内もしくは真核細胞において、閉環状ベクターに保有されることにより操作可能となるＲＳを含有する、大型の配列または極めて大型の配列とのＨＲを使用して、標的

核酸を修飾するのに使用することもできる。代替法においては、ＳＳＲ部位（例えば、示される不適合のｌｏｘ部位）を、ＲＳ（例えば、リコンビニアリングにより操作される）の取込みの前または後において、ベクターへと操作することができる。ＳＳＲ部位を使用して、標的鎖内の部位と組み換えて、ＲＳを、後者へと挿入することができる。図４Ｄにおいて示される通り、これは、ＲＭＣＥによるＲＳの挿入を可能とし、また、変化を、標的へと、特異的に導入することも可能とする。生成物である標的鎖内のｌｏｘ部位に、するｐｉｇｇｙＢａｃ部位がフランキングする場合は、ＰＢトランスポザーゼの一過性の発現が、ＳＳＲ部位を切り出し、ＲＳだけを後に残すであろう。これは、ＥＳ細胞内またはｉＰＳ細胞内、例えば、ヒトｉＰＳ細胞内またはマウスＥＳ細胞において実行する場合に有用である。

【０６６３】

図５Ａは、インサート配列（例えば、調節エレメントまたはエクソン配列）を挿入するための、その後における、標的とのＨＲ工程（図５Ｂ）において使用しうる、組換え誘導性核酸断片の放出を示す。図５Ａにおいて示される通り、任意選択のマーカーを、放出断片内に組み入れることができる。これもまた示される通り、この断片の、ベクターからの切出しは、ＰＳ１の３’側配列（Ｓ１）を伴う、ＰＳ２の５’側配列（ａ）から形成される、新たなマーカー配列をもたらす。この例においては、配列であるａＳ１は、改変ベクター内には存在するが、非改変ベクター内には存在しない。ａＳ１である配列は、ＰＣＲにより検出することもでき、検出用マーカータンパク質（例えば、抗生剤耐性）をもたらすように、発現可能でもありうる。図５Ｂにおいては、標的（第２の鎖）内の配列の置きかえを示す［ここにおいては、配列（四角ボックス）を、欠失させ、その代わりに、ＩＳを挿入する］。図５Ｃにおいては、ベクター相同アームは、標的鎖において隔てられた［欠失させる配列（四角ボックス）を含む配列だけ隔てられた］配列と相補的である。ＩＳは、挿入しない。これを使用して、例えば、標的内の遺伝子を不活化させる（例えば、標的が、病原性細菌に含まれ、例えば、欠失させる配列が、必須遺伝子、毒性遺伝子、または抗生剤耐性遺伝子の配列である場合）ことができる。

【０６６４】

図６Ａおよび６Ｂは、Ｃａｓによる切断が、第１の相同アームと近接する、１つの部位におけるものである、インサートベクターの適用を示す。ＨＲにおけるターゲティングの効率および特異性は、アームの間に、インサート配列（ＩＳ）を伴う、第２のアーム（ＨＡ２）を含むことによりもたらされる。この例においては、標的配列の置きかえが生じる（図６Ｂ）。図７Ｂにおいては、挿入（すなわち、標的配列の欠失の置きかえではない）が実行される。

【０６６５】

図８Ａは、Ｃａｓベクターを伴う、本発明のベクターの共形質転換を例示する。Ｐ１およびＰ２が、同一であり、また、ＰＳ１およびＰＳ２も、同一である場合、ｇＲＮＡ１は、ＣＳ１およびＣＳ２において作用する（ｇＲＮＡ２　ＤＮＡは、省くことができる）。標的細胞が、ベクターのプロトスペーサーおよびＰＡＭとコグネイトである内因性Ｃａｓを含む場合、Ｃａｓベクターは、省くことができる。図８Ｂは、Ｃａｓ９配列を、本発明のベクターに組み入れた変化形を示す。

【０６６６】

図９Ａは、本発明の前駆体ベクターを示す。クローニング部位を、１または複数の相同アーム（ＨＡ１および／またはＨＡ２）を差し入れる、その後の使用のために、ベクターへと操作する。これを、不適合のＳＳＲ（ｌｏｘ部位）に対してＲＭＣＥを使用する、図９Ｂおよび９Ｃにおいて例示する。これは、生成物ベクターによる、標的核酸鎖の修飾または細胞の改変を実行する前に、インビトロにおいて実施することができる。図９Ｄおよび９Ｅは、制限エンドヌクレアーゼを使用する変化形を示す。

【図面】

【図１】

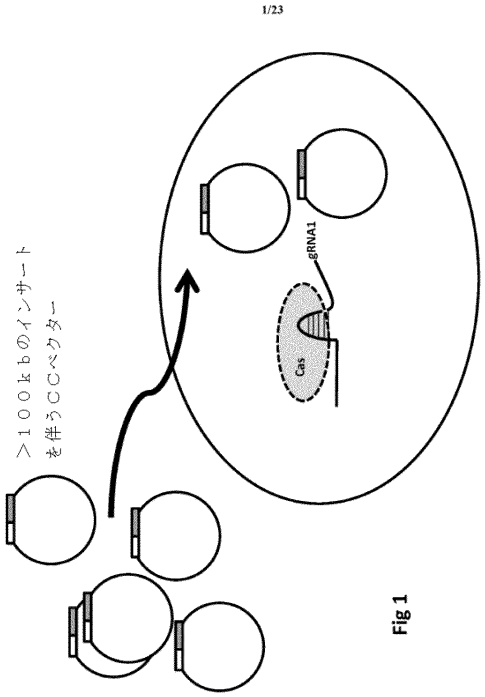


Fig 1

【図２Ａ】

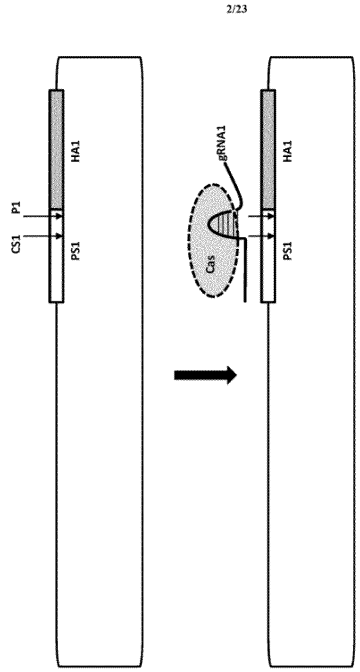


Fig 2A

【図２Ｂ】

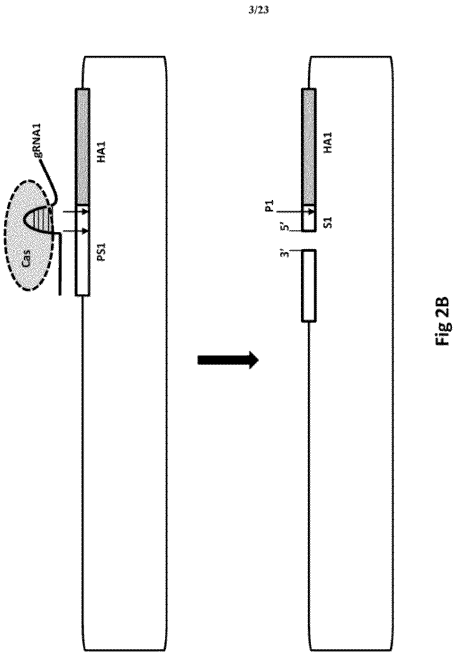


Fig 2B

【図３Ａ】

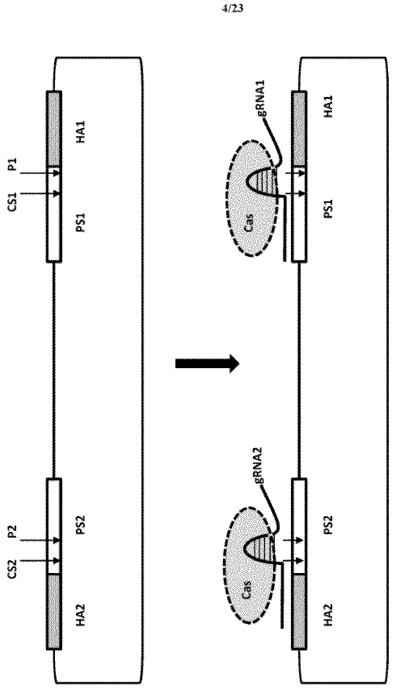


Fig 3A

【図３Ｂ】

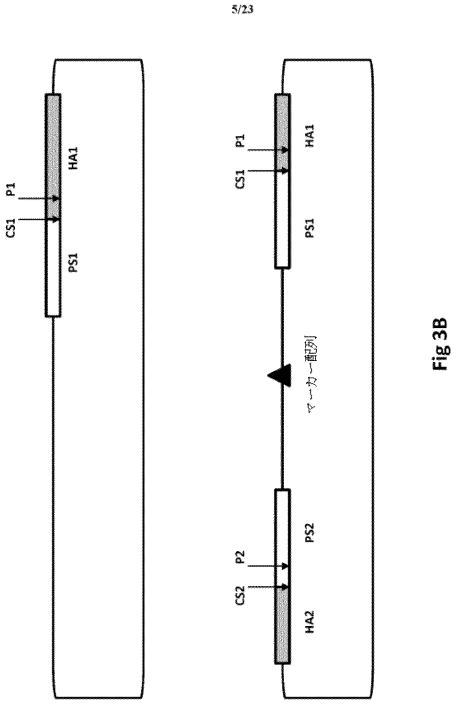


Fig 3B

【図４Ａ】

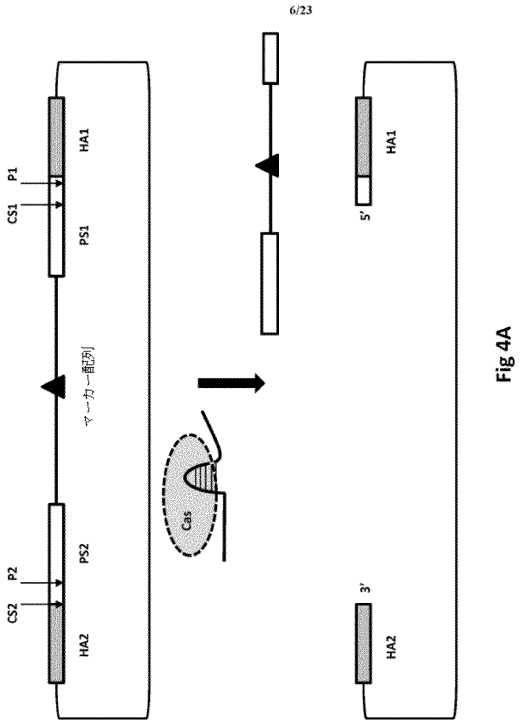


Fig 4A

【図４Ｂ】

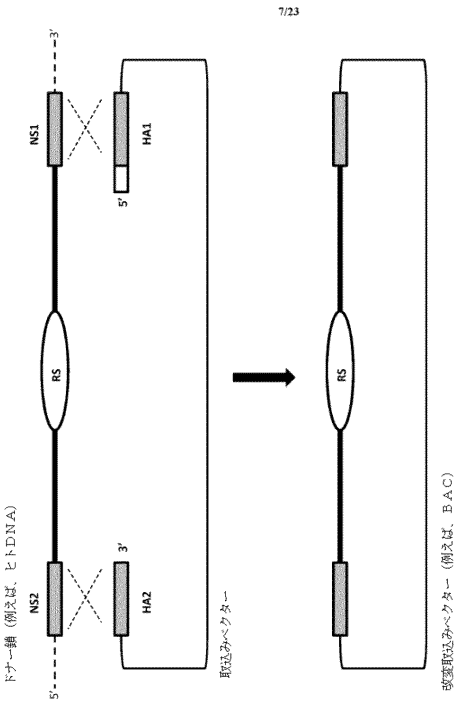


Fig 4B

【図４Ｃ】

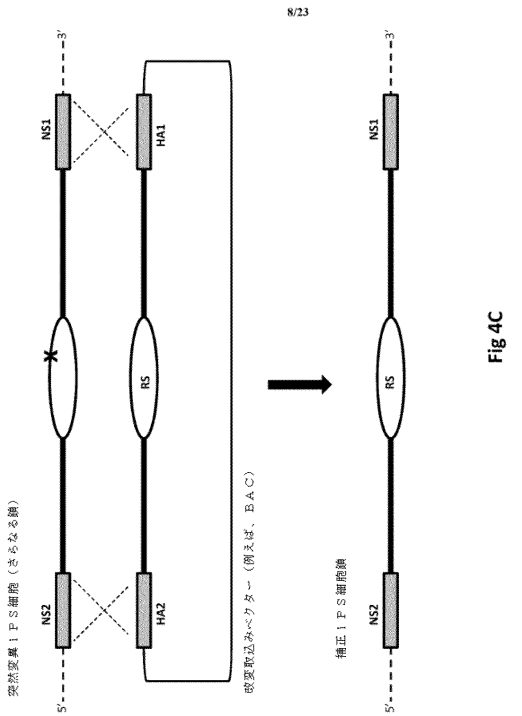


Fig 4C

【図４Ｄ】

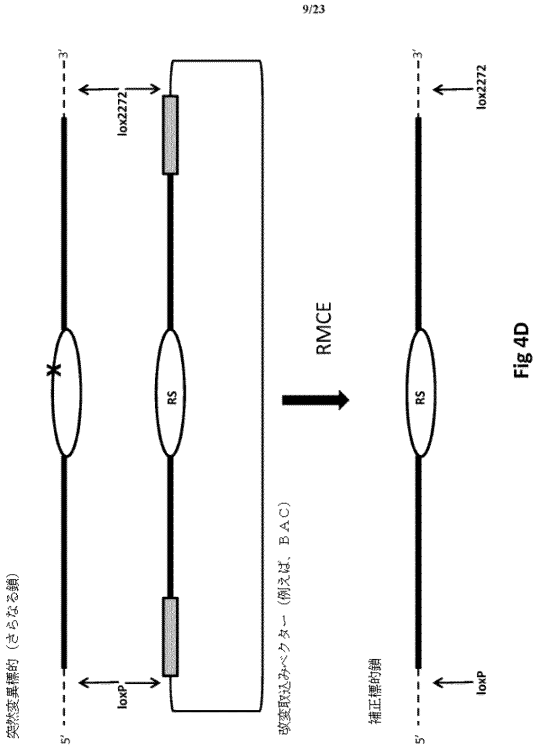


Fig 4D

【図５Ａ】

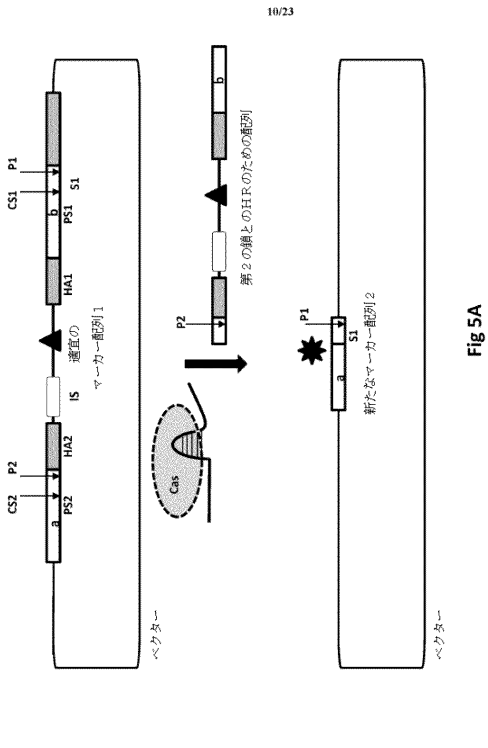


Fig 5A

【図５Ｂ】

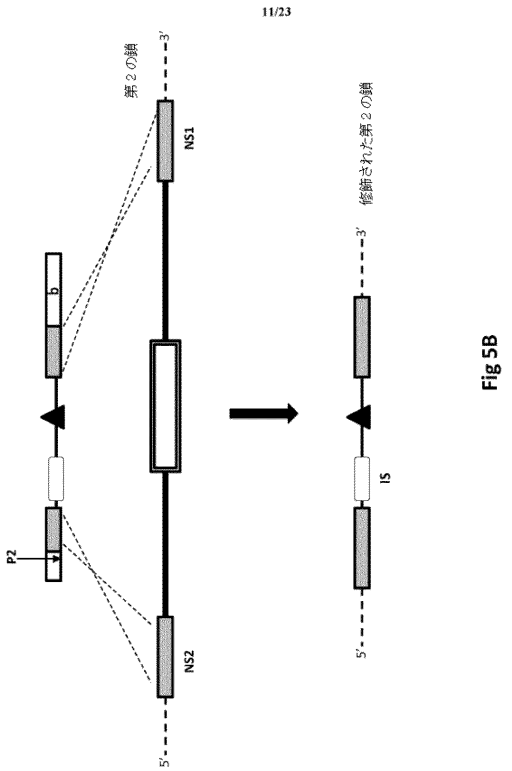


Fig 5B

【図５Ｃ】

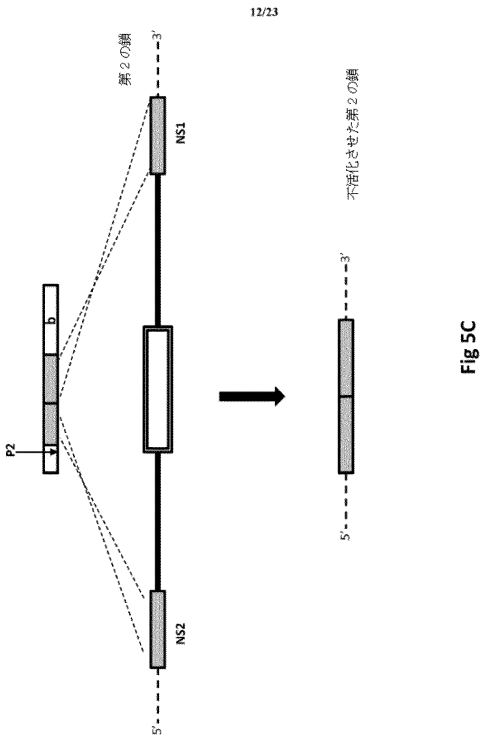


Fig 5C

【図６Ａ】

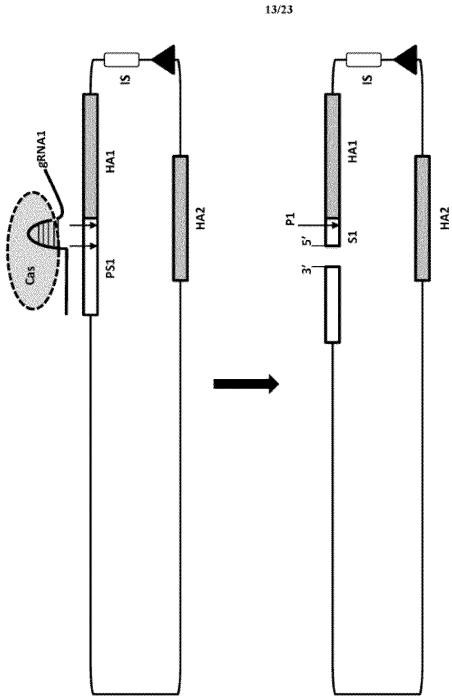


Fig 6A

【図６Ｂ】

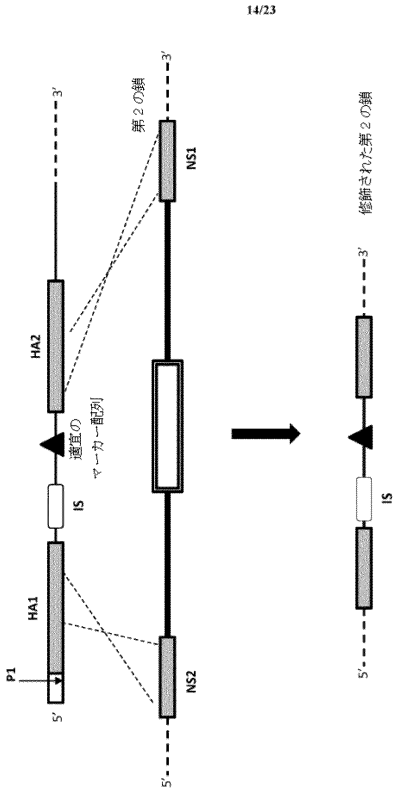


Fig 6B

【図７Ａ】

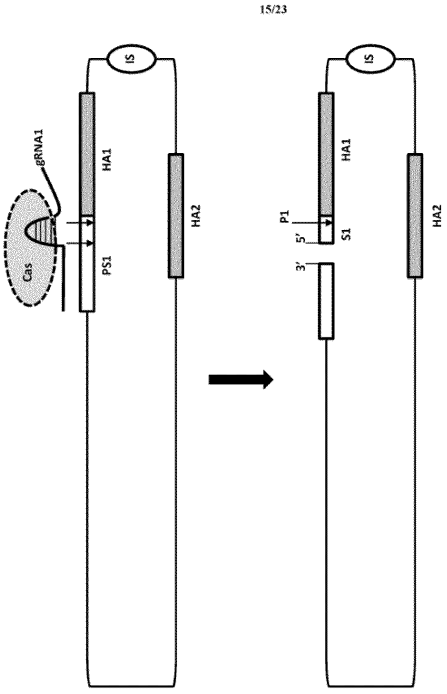


Fig 7A

【図７Ｂ】

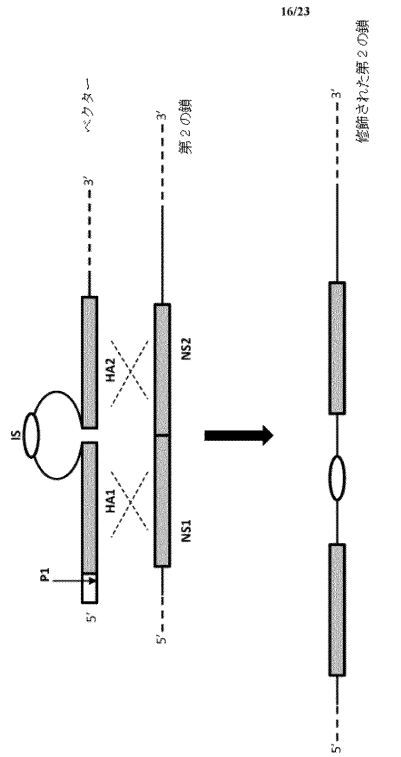


Fig 7B

【図８Ａ】

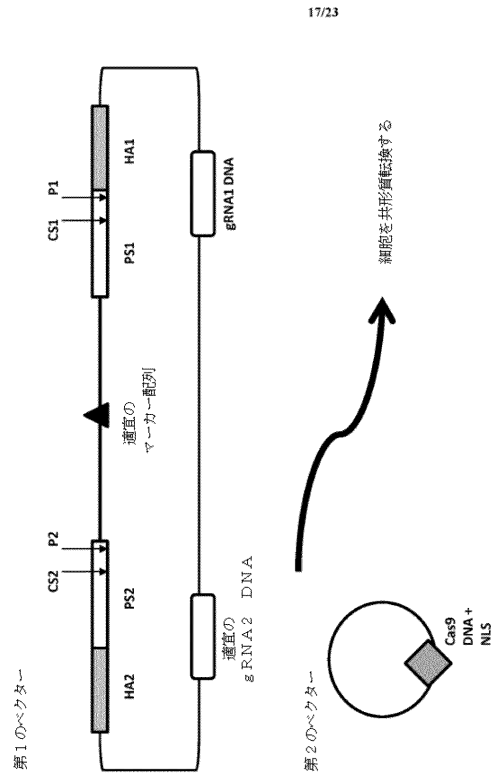


Fig 8A

【図８Ｂ】

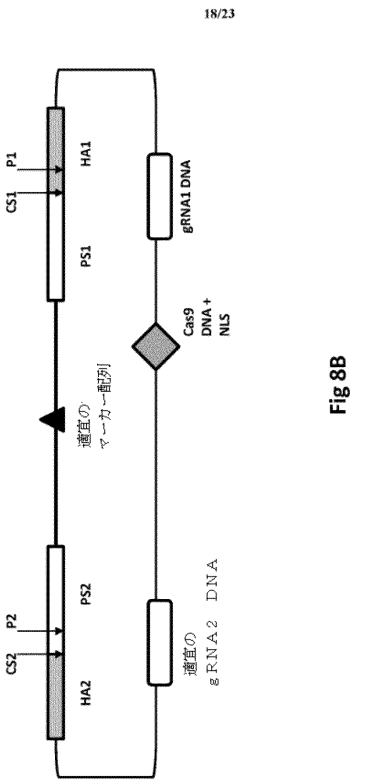


Fig 8B

【図９Ａ】

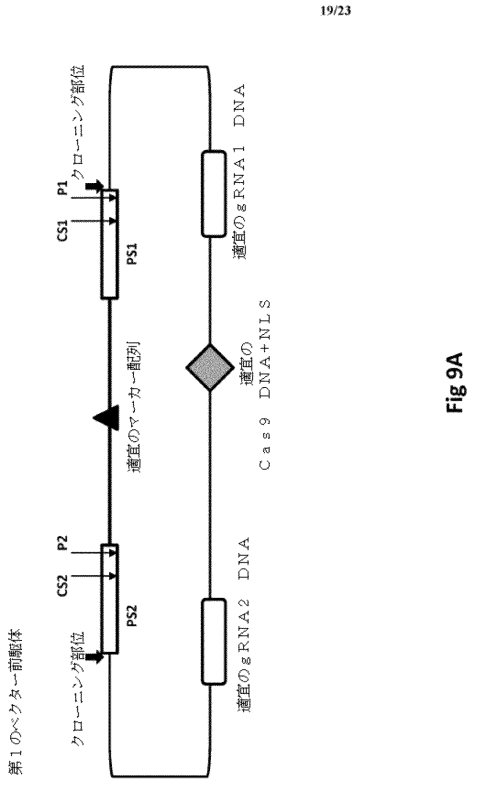


Fig 9A

【図９Ｂ】

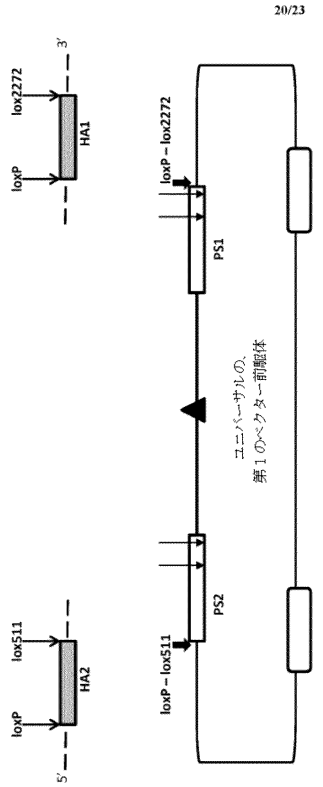


Fig 9B

【図９Ｃ】

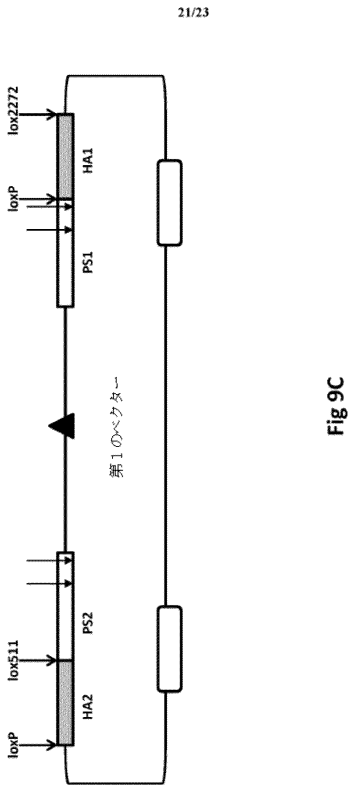


Fig 9C

【図９Ｄ】

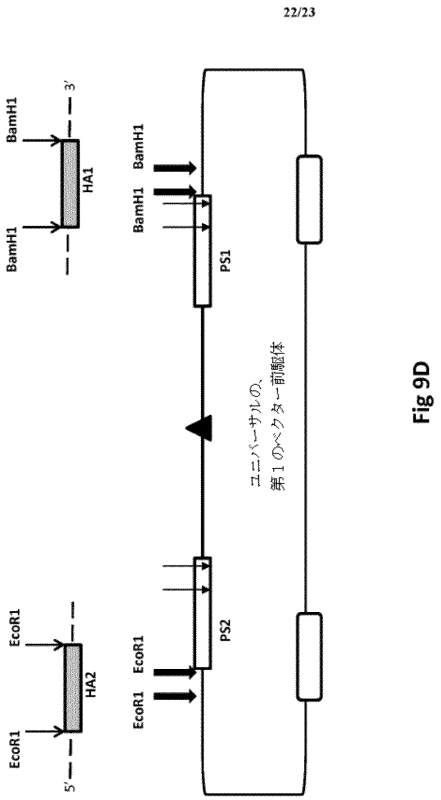


Fig 9D

【図９Ｅ】

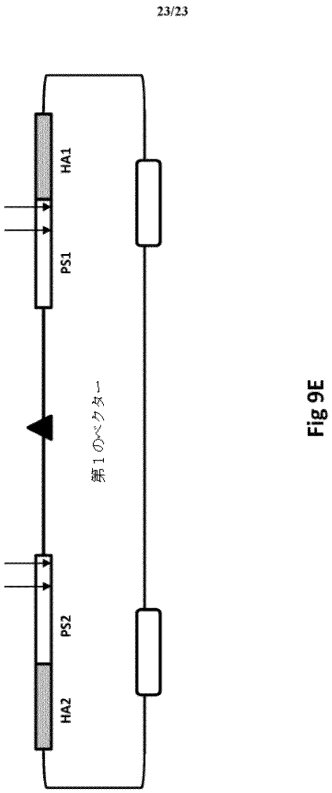


Fig 9E

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 5/0735(2010.01)		C12N	5/0735	
C12N 5/074(2010.01)		C12N	5/074	
C12N 5/0783(2010.01)		C12N	5/0783	
C12N 5/0781(2010.01)		C12N	5/0781	
C12N 15/861(2006.01)		C12N	15/861	Z
C12N 1/20 (2006.01)		C12N	1/20	E
A61K 35/76 (2015.01)		A61K	35/76	
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00	
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	45/00	
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/09	１００
		C12N	15/09	１１０

英国イーシー１ブイ・２エヌエックス、ロンドン、シティ・ロード１５２番、ケンプ・ハウス

審査官　山本 晋也

(56)参考文献　国際公開第２０１５／０９５８０４（WO，Ａ１）
Yu Hisano et al.，Scientific Reports，2015年03月05日，Vol.5, No.8841，p.1-7

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ／ＥＭＢＡＳＥ （ＳＴＮ）