(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7640527号
(P7640527)

(45)発行日　令和7年3月5日(2025.3.5)

(24)登録日　令和7年2月25日(2025.2.25)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｎ　15/55　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/55	ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	1/15	
Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	1/19	
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	1/21	

ＦＩ

請求項の数　33　（全96頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-509175(P2022-509175)
(86)(22)出願日　令和2年8月11日(2020.8.11)
(65)公表番号　特表2022-545385(P2022-545385A)
(43)公表日　令和4年10月27日(2022.10.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/045759
(87)国際公開番号　WO2021/030344
(87)国際公開日　令和3年2月18日(2021.2.18)
審査請求日　令和5年8月10日(2023.8.10)
(31)優先権主張番号　62/885,483
(32)優先日　令和1年8月12日(2019.8.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/901,875
(32)優先日　令和1年9月18日(2019.9.18)
最終頁に続く

(73)特許権者　521282169
ライフエディット セラピューティクス，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，ノース カロライナ ２７７０１，ダーラム，モリス ストリート ３００，スイート ３００
(74)代理人　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺 陽一
(74)代理人　100141977
弁理士　中島 勝
(74)代理人　100138210
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びその活性断片及び変異体ならびに使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、前記ポリヌクレオチドが、配列番号１１７に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＧＮポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、上記核酸分子。

【請求項２】

前記ＲＧＮポリペプチドが、標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができるガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合した場合に、ＲＮＡガイド配列特異的な様式でＤＮＡ分子の前記標的ＤＮＡ配列に結合することができる、請求項１に記載の核酸分子。

【請求項３】

ＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドに異種性のプロモーターに機能的に連結されている、請求項１又は２に記載の核酸分子。

【請求項４】

前記ＲＧＮポリペプチドが、配列番号１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項５】

前記ＲＧＮポリペプチドが、配列番号１１７のアミノ酸配列を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項６】

前記ＲＧＮポリペプチドがヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼとして機能することができる、請求項１～４のいずれか一項に記載の核酸分子。
【請求項７】
前記ＲＧＮポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに機能的に融合されている、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸分子。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか一項に定義される核酸分子を含むベクター。
【請求項９】
標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができるｇＲＮＡをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列をさらに含み、ガイドＲＮＡが、配列番号１１８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡを含む、請求項８に記載のベクター。
【請求項１０】
ｇＲＮＡが、配列番号１１９に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するｔｒａｃｒＲＮＡを含む、請求項９に記載のベクター。
【請求項１１】
請求項１～７のいずれか一項に定義される核酸分子、又は請求項８～１０のいずれか一項に定義されるベクターを含む細胞。
【請求項１２】
ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を結合するためのシステムであって、前記システムは、
ａ）１つ以上のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列を含む１つ以上のポリヌクレオチド又は前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができる１つ以上のガイドＲＮＡ；及び
ｂ）配列番号１１７に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチド；又は該ＲＧＮポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド
を含み、
１つ以上のガイドＲＮＡが、該ＲＧＮポリペプチドをＤＮＡ分子の該標的ＤＮＡ配列に結合させるために、該ＲＧＮポリペプチドと複合体を形成することができる上記システム。
【請求項１３】
１つ以上のガイドＲＮＡをコードし、ＲＧＮポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の少なくとも１つが、ヌクレオチド配列に異種性のプロモーターに機能的に連連結されている、請求項１２に記載のシステム。
【請求項１４】
標的ＤＮＡ配列が細胞内にある、請求項１２又は１３に記載のシステム。
【請求項１５】
前記ＲＧＮポリペプチドが、配列番号１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１２～１４のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１６】
前記ＲＧＮポリペプチドが、配列番号１１７のアミノ酸配列を含む、請求項１２～１５のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１７】
前記ＲＧＮポリペプチドがヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼとして機能し得る、請求項１２～１５のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１８】
前記ＲＧＮポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに機能的に連結されている、請求項１２～１７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１９】
前記システムが、１つ以上のドナーポリヌクレオチド、又は１つ以上のドナーポリヌクレオチドをコードする１つ以上のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１２～１６のい

ずれか一項に記載のシステム。
【請求項２０】
ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列の結合に使用するための、請求項１２～１９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２１】
ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列の切断又は修飾に使用するための、請求項１２～１９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２２】
ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列の切断及び／又は修飾に使用するための組成物であって、
ａ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）が、配列番号１１７に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＧＮポリペプチド；及び
ｂ）（ａ）のＲＧＮを標的ＤＮＡ配列に標的化することができる１つ以上のガイドＲＮＡを含み、
１つ以上のガイドＲＮＡが標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズし、それによって、該ＲＧＮポリペプチドを該標的ＤＮＡ配列に結合させ、該標的ＤＮＡ配列の切断及び／又は修飾が起こる上記組成物。
【請求項２３】
前記ＲＧＮポリペプチドが、配列番号１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２に記載の組成物。
【請求項２４】
前記ＲＧＮポリペプチドが、配列番号１１７のアミノ酸配列を含む、請求項２２又は２３に記載の組成物。
【請求項２５】
前記ＲＧＮポリペプチドがヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼとして機能する、請求項２２～２３のいずれか一項に記載の使用するための組成物。
【請求項２６】
前記ＲＧＮポリペプチドが塩基編集ポリペプチドに機能的に連結されている、請求項２２～２５のいずれか一項に記載の使用するための組成物。
【請求項２７】
標的ＤＮＡ配列が細胞内にある、請求項２２～２６のいずれか一項に記載の使用するための組成物。
【請求項２８】
前記ＲＧＮポリペプチドが発現され、前記標的ＤＮＡ配列を切断して修飾されたＤＮＡ配列を含むＤＮＡ分子を生成する条件下で前記細胞を培養する工程；及び前記修飾された標的ＤＮＡ配列を含む細胞を選択する工程をさらに含む、請求項２７に記載の使用するための組成物。
【請求項２９】
配列番号１１７に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチド。
【請求項３０】
前記ＲＧＮポリペプチドが配列番号１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のＲＧＮポリペプチド。
【請求項３１】
前記ＲＧＮポリペプチドが配列番号１１７のアミノ酸配列を含む、請求項２９又は３０に記載のＲＧＮポリペプチド。
【請求項３２】
前記ＲＧＮポリペプチドがヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼとして機能する、請求項２９又は３０に記載のＲＧＮポリペプチド。
【請求項３３】
前記ＲＧＮポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに機能的に連結されている、請求項２

９～３２のいずれか一項に記載のＲＧＮポリペプチド。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、分子生物学及び遺伝子編集の分野に関する。
【０００２】
ＥＦＳ－ＷＥＢを介してテキストファイルとして提出された配列リストの参照
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介してＡＳＣＩＩフォーマットで提出された配列リストを含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。２０２０年８月１１日に作成されたこのＡＳＣＩＩコピーは、Ｌ１０３４３８_１１７０ＷＯ_００４９_２_Ｓｅｑ_Ｌｉｓｔ．ｔｘｔという名前であり、サイズは４８９，３２６バイトである。
【背景技術】
【０００３】
標的ゲノムの編集又は修飾は、基礎研究及び応用研究のための重要なツールとなりつつある。最初の方法は、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガー融合タンパク質又はＴＡＬＥＮのようなヌクレアーゼを操作することであり、それぞれの特定の標的配列に特異的な、プログラム可能な配列特異的ＤＮＡ結合ドメインを有するキメラヌクレアーゼの生成を必要とした。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ細菌系のＣｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質のようなＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、特定の標的配列と特異的にハイブリダイズするガイドＲＮＡとヌクレアーゼを複合体化することによって、特異的配列の標的化を可能にする。標的特異的ガイドＲＮＡを作製することは、各標的配列についてキメラヌクレアーゼを作製することよりもコストがかからず、効率が良い。このようなＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、エラーを起こしやすい非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を介して修復され、特定のゲノム位置に突然変異を導入する配列特異的二本鎖切断の導入を介して、任意選択的にゲノムを編集するために使用することができる。あるいは、相同性指向性修復を介して、異種ＤＮＡをゲノム部位に導入してもよい。
【発明の概要】
【０００４】
目的の標的配列を結合するための組成物及び方法を提供する。組成物は、目的の標的配列を切断又は修飾し、目的の標的配列を検出し、目的の配列の発現を修飾するのに使用することを見出す。組成物は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＮＡＧＮ）ポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、それをコードする核酸分子、及び核酸分子を含むベクター及び宿主細胞を含む。関心対象の標的配列を結合するためのＣＲＩＳＰＲシステムも提供され、ここで、ＣＲＩＳＰＲシステムは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼポリペプチド及び１つ以上のガイドＲＮＡを含む。従って、本明細書に開示される方法は、関心対象の標的配列を結合するため、及びいくつかの実施形態において、関心対象の標的配列を切断又は修飾するために描かれる。目的の標的配列は、例えば、導入されたドナー配列との非相同末端結合又は相同方向修復の結果として修飾することができる。さらに、検出一本鎖ＤＮＡを用いてＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を検出するための方法及びキットが提供される。
【発明を実施するための形態】
【０００５】
本明細書に記載される本発明の多くの修正及び他の実施形態は、これらの発明が関連する当業者が、前述の説明及び関連図面に提示される教示の利益を有することを想起するであろう。したがって、本発明は、開示された特定の実施形態に限定されるものではなく、修正及び他の実施形態は、添付の実施形態の範囲内に含まれることが意図されていることが理解されるべきである。本明細書では特定の用語を使用するが、それらは、限定の目的のためではなく、一般的及び記述的意味においてのみ使用される。
【０００６】

Ｉ．概要

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）は、ゲノム内の単一部位の標的操作を可能にし、治療及び研究応用のための遺伝子ターゲティングの文脈において有用である。哺乳動物を含む種々の生物において、例えば、非相同末端結合及び相同組換えを刺激することによって、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼがゲノム工学のために使用されてきた。本明細書に記載される組成物及び方法は、ポリヌクレオチド中に一本鎖又は二本鎖切断を作製するため、ポリヌクレオチドを修飾するため、ポリヌクレオチド内の特定の部位を検出するため、又は特定の遺伝子の発現を修飾するために有用である。

【０００７】

本明細書に開示されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的配列を修飾することによって遺伝子発現を変化させることができる。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、クラスター化規則的間隔短パリンドローム反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼシステムの一部としてガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）により標的配列に向けられる。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼと複合体を形成し、ＲＮＡガイドヌクレアーゼを標的配列に結合させ、いくつかの実施形態では、標的配列に一本鎖又は二本鎖切断を導入するので、ＲＧＮは「ＲＮＡガイド下」とみなされる。標的配列が切断された後、切断は修復され、修復過程中に標的配列のＤＮＡ配列が修飾される。従って、本明細書では、宿主細胞のＤＮＡ中の標的配列を修飾するためにＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用する方法を提供する。例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを用いて、真核細胞又は原核細胞のゲノム座位における標的配列を修飾することができる。

【０００８】

ＩＩ．ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ

本明細書に提供されるのは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼである。用語「ＲＮＡガイドヌクレアーゼ」は、配列特異的な様式で特定の標的ヌクレオチド配列に結合し、ポリペプチドと複合体化され、標的配列とハイブリダイズするガイドＲＮＡ分子によって標的ヌクレオチド配列に向けられるポリペプチドを指す。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、結合時に標的配列を切断することができるが、用語「ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ」は、標的配列に結合するが切断しないヌクレアーゼ死ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼも含む。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼによる標的配列の切断は、一本鎖又は二本鎖切断をもたらすことができる。二本鎖核酸分子の一本鎖を切断することができるだけのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、本明細書ではニッカーゼと称される。

【０００９】

本明細書に開示されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼには、ＡＰＧ０５７３３．１、ＡＰＧ０６２０７．１、ＡＰＧ０１６４７．１、ＡＰＧ０８０３２．１、ＡＰＧ０５７１２．１、ＡＰＧ０１６５８．１、ＡＰＧ０６４９８．１、ＡＰＧ０９１０６．１、ＡＰＧ０９８８２．１、ＡＰＧ０２６７５．１、ＡＰＧ０１４０５．１、ＡＰＧ０６２５０．１、ＡＰＧ０６８７７．１、ＡＰＧ０９０５３．１、ＡＰＧ０４２９３．１、ＡＰＧ０１３０８．１、ＡＰＧ０６６４６．１、ＡＰＧ０９７４８、及びＡＰＧ０７４３３．１　ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼが含まれ、これらのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７又は２３５として記載され、それらの活性断片又は変異体は、ＲＮＡ誘導された配列特異的な方法で標的ヌクレオチド配列に結合する能力を保持する。これらの実施形態の一部では、ＡＰＧ０５７３３．１、ＡＰＧ０６２０７．１、ＡＰＧ０１６４７．１、ＡＰＧ０８０３２．１、ＡＰＧ０５７１２．１、ＡＰＧ０１６５８．１、ＡＰＧ０６４９８．１、ＡＰＧ０９１０６．１、ＡＰＧ０９８８２．１、ＡＰＧ０２６７５．１、ＡＰＧ０１４０５．１、ＡＰＧ０６２５０．１、ＡＰＧ０６８７７．１、ＡＰＧ０９０５３．１、ＡＰＧ０４２９３．１、ＡＰＧ０１３０８．１、ＡＰＧ０６６４６．１、ＡＰＧ０９７４８、又はＡＰＧ０７４３３．１　ＲＧＮの活性断片又は変異体は、一本鎖又は二本鎖の標的配列を切断することができる。いくつかの実施形態において、ＡＰＧ０５７３３．１、ＡＰＧ０６２０７．１、ＡＰＧ０１６４７．１、ＡＰＧ０８０３２．１、ＡＰＧ０５７

１２．１、ＡＰＧ０１６５８．１、ＡＰＧ０６４９８．１、ＡＰＧ０９１０６．１、ＡＰＧ０９８８２．１、ＡＰＧ０２６７５．１、ＡＰＧ０１４０５．１、ＡＰＧ０６２５０．１、ＡＰＧ０６８７７．１、ＡＰＧ０９０５３．１、ＡＰＧ０４２９３．１、ＡＰＧ０１３０８．１、ＡＰＧ０６６４６．１、ＡＰＧ０９７４８、又はＡＰＧ０７４３３．１　ＲＧＮの活性な変異体は、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７又は２３５として示されるアミノ酸配列に対して少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態においてＡＰＧ０５７３３．１、ＡＰＧ０６２０７．１、ＡＰＧ０１６４７．１、ＡＰＧ０８０３２．１、ＡＰＧ０５７１２．１、ＡＰＧ０１６５８．１、ＡＰＧ０６４９８．１、ＡＰＧ０９１０６．１、ＡＰＧ０９８８２．１、ＡＰＧ０２６７５．１、ＡＰＧ０１４０５．１、ＡＰＧ０６２５０．１、ＡＰＧ０６８７７．１、ＡＰＧ０９０５３．１、ＡＰＧ０４２９３．１、ＡＰＧ０１３０８．１、ＡＰＧ０６６４６．１、ＡＰＧ０９７４８、又はＡＰＧ０７４３３．１　ＲＧＮの活性断片は、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、又は２３５に示されるアミノ酸配列と少なくとも５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０又はそれ以上の連続したアミノ酸残基を含む。本明細書中で提供されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ガイドＲＮＡと相互作用するために、少なくとも１つのヌクレアーゼドメイン（例えば、ＤＮａｓｅ、ＲＮａｓｅドメイン）及び少なくとも１つのＲＮＡ認識及び／又はＲＮＡ結合ドメインを含むことができる。本明細書に提供されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに見出され得るさらなるドメインは、ＤＮＡ結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質－タンパク質相互作用ドメイン、及び二量体化ドメインを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本明細書で提供されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％から１つ又は複数のＤＮＡ結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質間相互作用ドメイン、及び二量体化ドメインを含み得る。

【００１０】

標的ヌクレオチド配列は、本明細書に提供されるＲＮＡガイドヌクレアーゼによって結合され、ＲＮＡガイドヌクレアーゼに関連するガイドＲＮＡとハイブリダイズする。次に、ポリペプチドがヌクレアーゼ活性を有する場合には、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼによって標的配列を切断することができる。用語「切断」又は「切断」は、標的配列内で一本鎖又は二本鎖切断のいずれかを生じ得る標的ヌクレオチド配列の骨格内の少なくとも１つのホスホジエステル結合の加水分解を指す。現在開示されているＲＧＮは、エンドヌクレアーゼとして機能するポリヌクレオチド内のヌクレオチドを切断することができ、又はエキソヌクレアーゼであってもよく、ポリヌクレオチドの末端（５’及び／又は３’末端）から連続するヌクレオチドを除去する。他の実施形態において、開示されたＲＧＮは、ポリヌクレオチドの任意の位置内の標的配列のヌクレオチドを切断することができ、従って、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼの両方として機能する。現在開示されているＲＧＮによる標的ポリヌクレオチドの切断は、ねじれた切断又は平滑末端を生じ得る。

【００１１】

現在開示されているＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、細菌又は古細菌種に由来する野生型配列であり得る。あるいは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、野生型ポリペプチドの変異体又は断片であってもよい。野生型ＲＧＮは、例えば、ヌクレアーゼ活性を変化させるか、又はＰＡＭ特異性を変化させるように修飾することができる。いくつかの実施形態において、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、天然に存在しない。

【００１２】

ある態様において、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ニッカーゼとして機能し、標的ヌクレ

オチド配列の一本鎖を切断するのみである。このようなＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、単一の機能性ヌクレアーゼドメインを有する。これらの実施形態のいくつかにおいて、ヌクレアーゼ活性が減少又は除去されるように、さらなるヌクレアーゼドメインが突然変異されている。

【００１３】

他の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を完全に欠損しているか、又は低下したヌクレアーゼ活性を示し、本明細書では、ヌクレアーゼ死又はヌクレアーゼ不活性と称する。ＰＣＲ媒介突然変異誘発及び部位特異的突然変異誘発のような、アミノ酸配列に突然変異を導入するための当技術分野で公知の任意の方法を、ニッカーゼ又はヌクレアーゼ死ＲＧＮを生成するために使用することができる。例えば、各々が参照によりその全体が援用される、米国特許出願公開第２０１４／００６８７９７号、及び米国特許第９，７９０，４９０号を参照されたい。

【００１４】

ヌクレアーゼ活性を欠くＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを用いて、融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、又は低分子ペイロードを特定のゲノム位置に送達することができる。これらの実施形態のいくつかにおいて、ＲＧＮポリペプチド又はガイドＲＮＡは、特定の配列の検出を可能にするために、検出可能な標識に融合され得る。非限定的な例として、ヌクレアーゼ死ＲＧＮは、検出可能な標識（例えば、蛍光タンパク質）に融合され得、疾患関連配列の検出を可能にするために、疾患に関連する特定の配列に標的化され得る。

【００１５】

あるいは、ヌクレアーゼ死滅ＲＧＮは、所望の配列の発現を変化させるために、特定のゲノム位置を標的とすることができる。いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼ死ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの標的配列への結合は、標的ゲノム領域内のＲＮＡポリメラーゼ又は転写因子の結合を妨害することによって、標的配列又は標的配列による転写制御下にある遺伝子の発現の抑制をもたらす。他の実施形態では、ＲＧＮ（例えば、ヌクレアーゼ死滅ＲＧＮ）又はその複合体化ガイドＲＮＡは、標的配列に結合すると、標的配列又は標的配列による転写制御下にある遺伝子の発現を抑制又は活性化するいずれかに作用する発現モジュレーターをさらに含む。これらの態様のいくつかにおいて、発現モジュレーターは、エピジェネティックなメカニズムを介して、標的配列又は調節された遺伝子の発現をモジュレートする。

【００１６】

他の実施形態において、ヌクレアーゼ死滅ＲＧＮ又はニッカーゼ活性のみを有するＲＧＮは、塩基編集ポリペプチド、例えば、デアミナーゼポリペプチド又はヌクレオチド塩基を脱アミノ化し、１つのヌクレオチド塩基から別のヌクレオチド塩基への転換をもたらす活性変異体又はその断片への融合を介して標的ポリヌクレオチドの配列を修飾するために、特定のゲノム位置を標的とすることができる。塩基編集ポリペプチドは、そのＮ末端又はＣ末端でＲＧＮに融合することができる。さらに、塩基編集ポリペプチドは、ペプチドリンカーを介してＲＧＮに融合され得る。このような組成物及び方法に有用なデアミナーゼポリペプチドの非限定的な例としては、シチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼ（例えば、全体が参照により本明細書に援用される、Gaudelli et al. (2017) Nature 551:464-471、米国特許出願公開第２０１７／０１２１６９３号及び第２０１８／００７３０１２号、ならびにＷＯ２０１８／０２７０７８に記載されるアデノシンデアミナーゼ塩基編集、又はＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０６８０７９に開示されるデアミナーゼのいずれか）が挙げられる。さらに、ＲＧＮと塩基編集酵素との間の特定の融合タンパク質は、デアミナーゼにより核酸分子中のチミジン、デオキシチミジン、又はチミンへのシチジン、デオキシシチジン、又はシトシンの突然変異率を増加させる少なくとも１つのウラシル安定化ポリペプチドを含んでもよいことが当技術分野で公知である。ウラシル安定化ポリペプチドの非限定的な例としては、２０２０年７月１５日に出願された米国仮出願第６３／０５２，１７５号に記載されたもの、及び塩基編集効率を高めることができるウラシルグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）ドメイン（配列番号２６１）が挙げられる（参照によ

り本明細書に援用される、米国特許第１０，１６７，５４７号）。従って、融合タンパク質は、本明細書に記載されるＲＧＮ、又はその変種、デアミナーゼ、及び場合によりＵＧＩなどの少なくとも１つのウラシル安定化ポリペプチドを含んでもよい。

【００１７】

ポリペプチド又はドメインに融合されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、リンカーによって分離又は連結され得る。本明細書中で使用される用語「リンカー」は、２つの分子又は部分を連結する化学基又は分子、例えば、結合ドメイン及びヌクレアーゼの切断ドメインを指す。ある態様において、リンカーは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼのｇＲＮＡ結合ドメインと、デアミナーゼのような塩基編集ポリペプチドとを結合する。いくつかの態様において、リンカーは、ヌクレアーゼ死滅ＲＧＮ及びデアミナーゼを結合する。典型的には、リンカーは、２つの基、分子、又は他の部分の間に配置され、又はそれらに隣接して配置され、共有結合を介して各々に連結され、かくして、２つを連結する。ある態様において、リンカーは、アミノ酸又は複数のアミノ酸（例えば、ペプチド又はタンパク質）である。ある態様において、リンカーは、有機分子、基、ポリマー、又は化学部分である。いくつかの実施形態において、リンカーは、長さが１－５のアミノ酸であり、例えば、長さは５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３０－３５、３５－４０、４０－４５、４５－５０、５０－６０、６０－７０、７０－８０、８０－９０、９０－１００、１００－１５０、又は１５０－２００アミノ酸である。より長い又はより短いリンカーもまた意図される。

【００１８】

現在開示されているＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、細胞の核へのＲＧＮの輸送を増強するために、少なくとも１つの核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含むことができる。核局在化シグナルは当該分野で公知であり、一般に一連の塩基性アミノ酸を含む（例えば、Lange et al., J. Biol. Chem. (2007) 282:5101-5105）．特定の実施形態では、ＲＧＮは、２、３、４、５、６又はそれ以上の核局在化シグナルを含む。核局在化シグナルは、異種ＮＬＳであり得る。現在開示されているＲＧＮに有用な核局在化シグナルの非限定的な例は、ＳＶ４０ラージＴ抗原、ヌクレオパスミン、及びｃ－Ｍｙｃの核局在化シグナルである（例えば、Ray et al. (2015) Bioconjug Chem 26(6):1004-7を参照されたい）。特定の実施態様において、ＲＧＮは、配列番号１２５又は１２７で示されるＮＬＳ配列を含む。ＲＧＮは、そのＮ末端、Ｃ末端、又はＮ末端とＣ末端の両方に１つ以上のＮＬＳ配列を含むことができる。例えば、ＲＧＮは、Ｎ末端領域に２つのＮＬＳ配列、Ｃ末端領域に４つのＮＬＳ配列を含むことができる。

【００１９】

特定の細胞内位置にポリペプチドを局在化させる当技術分野で公知の他の局在化シグナル配列をＲＧＮを標的化するために使用することもでき、これには、限定されないが、色素体局在配列、ミトコンドリア局在配列、及び色素体及びミトコンドリアの両方を標的化する二重標的化シグナル配列が含まれる（例えば、Nassoury and Morse (2005) Biochim Biophys Acta 1743:5-19; Kunze and Berger (2015) Front Physiol dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.00259; Herrmann and Neupert (2003) IUBMB Life 55:219-225; Soll (2002) Curr Opin Plant Biol 5:529-535; Carrie and Small (2013) Biochim Biophys Acta 1833:253-259; Carrie et al. (2009) FEBS J 276:1187-1195; Silva-Filho (2003) Curr Opin Plant Biol 6:589-595; Peeters and Small (2001) Biochim Biophys Acta 1541:54-63; Murcha et al. (2014) J Exp Bot 65:6301-6335; Mackenzie (2005) Trends Cell Biol 15:548-554; Glaser et al. (1998) Plant Mol Biol 38:311-338を参照されたい）。

【００２０】

特定の実施形態では、現在開示されているＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ＲＧＮの細胞取り込みを促進する少なくとも１つの細胞浸透ドメインを含む。細胞浸透ドメインは、当技術分野で公知であり、一般に、正に荷電したアミノ酸残基（すなわち、ポリカチオン性細

胞浸透ドメイン）、交互極性アミノ酸残基及び非極性アミノ酸残基（すなわち、両親媒性細胞浸透ドメイン）、又は疎水性アミノ酸残基（すなわち、疎水性細胞浸透ドメイン）（例えば、Milletti F. (2012) Drug Discov Today 17:850-860を参照されたい）のストレッチを含む。細胞浸透ドメインの非限定的な例は、ヒト免疫不全ウイルス１からのトランス活性化転写アクチベーター（ＴＡＴ）である。

【００２１】

核局在化シグナル、色素体局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナル、二重標的局在化シグナル、及び／又は細胞浸透ドメインは、アミノ末端（Ｎ末端）、カルボキシル末端（Ｃ末端）、又はＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの内部位置に位置することができる。

【００２２】

現在開示されているＲＧＮは、リンカーペプチドを介して直接的又は間接的に、切断ドメイン、デアミナーゼドメイン、又は発現モジュレータードメインなどのエフェクタードメインに融合することができる。このようなドメインは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの内部位置に位置することができる。これらの実施形態のいくつかにおいて、融合タンパク質のＲＧＮ成分は、ヌクレアーゼで死んだＲＧＮである。

【００２３】

いくつかの実施形態において、ＲＧＮ融合タンパク質は、ポリヌクレオチド（すなわち、ＲＮＡ、ＤＮＡ、又はＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド）を切断することができる任意のドメインであり、制限エンドヌクレアーゼ及びホーミングヌクレアーゼ、例えば、タイプIISエンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）を含むがこれらに限定されない切断ドメインを含む（Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993）。

【００２４】

他の実施形態では、ＲＧＮ融合タンパク質は、ヌクレオチド塩基を脱アミノ化し、１つのヌクレオチド塩基から別のヌクレオチド塩基への変換をもたらすデアミナーゼドメインを含み、シチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼ塩基編集（例えば、Gaudelli et al. (2017) Nature 551:464-471；米国特許出願公開第２０１７／０１２１６９３号及び第２０１８／００７３０１２号、米国特許第９，８４０，６９９号、及び国際公開第ＷＯ２０１８／０２７０７８号）を含むが、これらに限定されない。

【００２５】

いくつかの実施形態において、ＲＧＮ融合タンパク質のエフェクタードメインは、転写をアップレギュレート又はダウンレギュレートするのに役立つドメインである発現モジュレータードメインであり得る。発現モジュレータードメインは、エピジェネティック修飾ドメイン、転写リプレッサードメイン、又は転写活性化ドメインであり得る。

【００２６】

これらの実施形態のいくつかにおいて、ＲＧＮ融合タンパク質の発現モジュレーターは、ＤＮＡ又はヒストンタンパク質を共有結合的に修飾して、ＤＮＡ配列を変化させることなく、ヒストン構造及び／又は染色体構造を変化させ、遺伝子発現の変化（すなわち、アップレギュレーション又はダウンレギュレーション）をもたらすエピジェネティック修飾ドメインを含む。エピジェネティック修飾の非限定的な例としては、リジン残基のアセチル化又はメチル化、アルギニンメチル化、セリン及びトレオニンリン酸化、ならびにヒストンタンパク質のリシンユビキチン化及びスモイル化、ならびにＤＮＡ中のシトシン残基のメチル化及びヒドロキシメチル化が挙げられる。エピジェネティック修飾ドメインの非限定的な例としては、ヒストンアセチルトランスフェラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヒストンメチルトランスフェラーゼドメイン、ヒストンデメチラーゼドメイン、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼドメイン、及びＤＮＡデメチラーゼドメインが挙げられる。

【００２７】

他の実施形態では、融合タンパク質の発現モジュレーターは、転写制御エレメント及び／又は転写調節タンパク質、例えばＲＮＡポリメラーゼ及び転写因子と相互作用して、少

なくとも１つの遺伝子の転写を減少又は終結させる転写リプレッサードメインを含む。転写リプレッサードメインは、当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、Ｓｐ１様リプレッサー、ＩκＢ、及びＫｒＵｐｐｅｌ会合ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインを含む。

【００２８】

さらに他の実施形態では、融合タンパク質の発現モジュレーターは、少なくとも１つの遺伝子の転写を増加又は活性化するために、転写制御エレメント及び／又はＲＮＡポリメラーゼ及び転写因子などの転写調節タンパク質と相互作用する転写活性化ドメインを含む。転写活性化ドメインは、当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、単純ヘルペスウイルスＶＰ１６活性化ドメイン及びＮＦＡＴ活性化ドメインを含む。

【００２９】

現在開示されているＲＧＮポリペプチドは、検出可能な標識又は精製タグを含むことができる。検出可能な標識又は精製タグは、リンカーペプチドを介して直接的又は間接的に、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＲＮＡガイドヌクレアーゼの内部位置に位置することができる。これらの実施形態のいくつかにおいて、融合タンパク質のＲＧＮ成分は、ヌクレアーゼで死んだＲＧＮである。他の実施形態では、融合タンパク質のＲＧＮ成分は、ニッカーゼ活性を有するＲＧＮである。

【００３０】

検出可能な標識は、可視化され得るか、又は他の方法で観察され得る分子である。検出可能な標識は、融合タンパク質（例えば、蛍光タンパク質）としてＲＧＮに融合され得るか、又は視覚的に又は他の手段によって検出され得るＲＧＮポリペプチドに複合された小分子であり得る。融合タンパク質として現在開示されているＲＧＮに融合することができる検出可能な標識は、限定されるものではないが、蛍光タンパク質又は特異的抗体で検出することができるタンパク質ドメインを含む任意の検出可能なタンパク質ドメインを含む。蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＥＧＦＰ、ＺｓＧｒｅｅｎ１）及び黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、ＥＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗ１）が挙げられる。低分子検出可能な標識の非限定的な例としては、^{3}Ｈ及び^{35}Ｓのような放射性標識が挙げられる。

【００３１】

ＲＧＮポリペプチドはまた、精製タグを含むことができ、これは、タンパク質又は融合タンパク質を混合物（例えば、生物学的試料、培養培地）から単離するために利用することができる任意の分子である。精製タグの非限定的な例としては、ビオチン、マイク、マルトース結合タンパク質、及びグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼが挙げられる。

【００３２】

ＩＩ．ガイドＲＮＡ

本開示は、同じものをコードするガイドＲＮＡ及びポリヌクレオチドを提供する。用語「ガイドＲＮＡ」は、標的配列とハイブリダイズし、関連するＲＮＡガイドヌクレアーゼの標的ヌクレオチド配列への直接的な配列特異的結合に十分な標的ヌクレオチド配列と相補性を有するヌクレオチド配列を指す。従って、ＲＧＮのそれぞれのガイドＲＮＡは、ＲＧＮに結合して特定の標的ヌクレオチド配列に結合するようにＲＧＮを誘導することができる１つ以上のＲＮＡ分子（一般に、１つ又は２つ）であり、ＲＧＮがニッカーゼ又はヌクレアーゼ活性を有する場合には、標的ヌクレオチド配列も切断することができる。一般に、ガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含み、いくつかの実施形態では、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む。ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの両方を含む天然ガイドＲＮＡは、一般に、ｃｒＲＮＡの反復配列及びｔｒａｃｒＲＮＡの抗反復配列を介して互いにハイブリダイズする２つの別々のＲＮＡ分子を含む。

【００３３】

ＣＲＩＳＰＲアレイ内の天然の同方向反復配列は、一般に、２８～３７塩基対の長さの範囲であるが、その長さは、約２３ｂｐ～約５５ｂｐの間で変化し得る。ＣＲＩＳＰＲア

レイ内のスペーサー配列は、一般に、約３２～約３８ｂｐの長さの範囲であるが、その長さは、約２１ｂｐ～約７２ｂｐの間であり得る。各ＣＲＩＳＰＲアレイは、一般に、ＣＲＩＳＰＲ反復スペーサー配列の５０ユニット未満を含む。ＣＲＩＳＰＲは、ＣＲＩＳＰＲアレイの大部分を構成する一次ＣＲＩＳＰＲ転写物とよばれる長い転写物の一部として転写される。一次ＣＲＩＳＰＲ転写産物はＣａｓタンパク質によって切断され、ｃｒＲＮＡを生成するか、場合によってはプレｃｒＲＮＡを生成する。プレｃｒＲＮＡはさらに別のＣａｓタンパク質によって成熟ｃｒＲＮＡにプロセシングされる。成熟ｃｒＲＮＡはスペーサー配列及びＣＲＩＳＰＲ反復配列を含む。プレｃｒＲＮＡが成熟（又はプロセシングされた）ｃｒＲＮＡにプロセシングされるいくつかの態様において、成熟は、約１～約６個以上の５’、３’、又は５’及び３’ヌクレオチドの除去を含む。目的の特定の標的ヌクレオチド配列をゲノムエディティング又は標的化する目的のために、プレｃｒＲＮＡ分子の成熟中に除去されるこれらのヌクレオチドは、ガイドＲＮＡを生成又は設計するために必要ではない。

【００３４】

ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）は、スペーサー配列及びＣＲＩＳＰＲ反復配列を含む。「スペーサー配列」は、目的の標的ヌクレオチド配列と直接ハイブリダイズするヌクレオチド配列である。スペーサー配列は、目的の標的配列と完全に又は部分的に相補的であるように操作される。種々の実施形態において、スペーサー配列は、約８ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド、又はそれ以上を含むことができる。例えば、スペーサー配列は、長さが約約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０又はそれ以上のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態においてスペーサー配列とその対応する標的配列の間の相補性の程度は、場合により適切なアラインメントアルゴリズムを用いて整列させた場合、約５０％、約６０％、約７０％、約７５％、約８０％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％又はそれ以上である。特定の実施態様において、スペーサー配列は、二次構造を含まず、これは、当該技術分野において公知である任意の適切なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムを用いて予測することができ、例えば、限定されないが、ｍＦｏｌｄ（例えば、Zuker and Stiegler (1981) Nucleic Acids Res. 9:133-148を参照されたい）及びＲＮＡｆｏｌｄ（例えば、Gruber et al. (2008) Cell 106(1):23-24を参照されたい）が挙げられる。

【００３５】

ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ反復配列は、ｔｒａｃｒＲＮＡにハイブリダイズするのに十分な相補性を有する領域を含むヌクレオチド配列を含む。様々な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ反復配列は、約８ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド、又はそれ以上を含むことができる。例えば、ＣＲＩＳＰＲ反復配列は、長さが約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０又はそれ以上であり得る。ある態様において、ＣＲＩＳＰＲ反復配列は、長さが約２１ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ反復配列とその対応するｔｒａｃｒＲＮＡ配列の間の相補性の程度は、場合により適切なアラインメントアルゴリズムを用いて整列させた場合、約５０％、約６０％、約７０％、約７５％、約８０％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％又はそれ以上である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ反復配列は、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７のヌクレオチド配列、又はガイドＲＮＡ内に含まれる場合に、本明細書で提供される関連するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの配列特異的結合を目的の標的配列に向けることができる活性変異体又はその断片

が含む。特定の実施形態において、野生型配列の活性ＣＲＩＳＰＲ反復配列変異体は、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３又は２８７として示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、野生型配列の活性ＣＲＩＳＰＲ反復配列断片は、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７として示されるヌクレオチド配列の少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含む。

【００３６】

ある態様において、ｃｒＲＮＡは、天然に存在しない。これらの実施形態のいくつかにおいて、特異的ＣＲＩＳＰＲ反復配列は、本質的には操作されたスペーサー配列に連結されておらず、ＣＲＩＳＰＲ反復配列は、スペーサー配列に対して異種性であると考えられる。ある態様において、スペーサー配列は、天然に存在しない操作された配列である。

【００３７】

トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ又はｔｒａｃｒＲＮＡ分子は、ｃｒＲＮＡのＣＲＩＳＰＲ反復配列とハイブリダイズするのに十分な相補性を有する領域を含むヌクレオチド配列を含み、これを本明細書では抗反復領域と称する。ある態様において、ｔｒａｃｒＲＮＡ分子は、二次構造（例えば、ステム－ループ）を有する領域、又は対応するｃｒＲＮＡとハイブリダイズすることによって二次構造を形成する領域をさらに含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ反復配列に対して完全又は部分的に相補的であるｔｒａｃｒＲＮＡの領域は、分子の５’末端であり、ｔｒａｃｒＲＮＡの３’末端は二次構造を含む。この二次構造領域は、一般に、アンチ反復配列に隣接して見出されるネクサスヘアピンを含むいくつかのヘアピン構造を含む。ネクサスヘアピンは、しばしば、ｔｒａｃｒＲＮＡの多くのネクサスヘアピンに見られる、モチーフＵＮＡＮＮＡ、ＣＮＡＮＮＧ、ＣＮＡＮＮＵ、ＵＮＡＮＮＧ、ＵＮＡＮＮＣ、又はＣＮＡＮＮＵ（それぞれ配列番号８、３７、４５、５３、６８、及び１０２）を有する、ヘアピンステムの基部に保存されたヌクレオチド配列を有する。ｔｒａｃｒＲＮＡの３’末端には、構造や数が異なる末端ヘアピン構造が存在することが多いが、しばしばＧＣに富むＲｈｏ非依存性転写ターミネーターヘアピンと、それに続く３’末端Ｕ’のストリングを含む。例えば、各々全体が参照により本明細書に援用される、Briner et al. (2014) Molecular Cell 56:333-339, Briner and Barrangou (2016) Cold Spring Harb Protoc; doi: 10.1101/pdb.top090902, and U.S. Publication No. 2017/0275648を参照されたい。

【００３８】

様々な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ反復配列に対して完全又は部分的に相補的であるｔｒａｃｒＲＮＡの抗反復領域は、約８ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド、又はそれ以上を含む

例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡアンチ反復配列とＣＲＩＳＰＲ反復配列との間の塩基対形成の領域は、長さが約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０、又はそれ以上のヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ反復配列に対して完全又は部分的に相補的であるｔｒａｃｒＲＮＡの抗反復領域は、長さが約２０ヌクレオチドである。いくつかの実施形態においてＣＲＩＳＰＲ反復配列とその対応するｔｒａｃｒＲＮＡ配列の間の相補性の程度は、場合により適切なアラインメントアルゴリズムを用いて整列させた場合、約５０％、約６０％、約７０％、約７５％、約８０％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％又はそれ以上である。

【００３９】
種々の実施形態において、ｔｒａｃｒＲＮＡ全体は、約６０ヌクレオチド～約１４０ヌクレオチドを含むことができる。例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡは、長さが約６０、約６５、約７０、約７５、約８０、約８５、約９０、約９５、約１００、約１０５、約１１０、約１１５、約１２０、約１２５、約１３０、約１３５、約１４０、又はそれ以上のヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、ｔｒａｃｒＲＮＡは約８０～約９０ヌクレオチドの長さであり、約８０、約８１、約８２、約８３、約８４、約８５、約８６、約８７、約８８、約８９、及び約９０ヌクレオチドの長さである。ある態様において、ｔｒａｃｒＲＮＡは、長さが約８５ヌクレオチドである。
【００４０】
特定の実施形態では、ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、又は１１９のヌクレオチド配列、又は、ガイドＲＮＡ内に含まれる場合に、本明細書で提供される関連するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの配列特異的結合を目的の標的配列に向けることができる活性変異体又はその断片を含む。特定の実施形態において、野生型配列の活性なｔｒａｃｒＲＮＡ配列変異体は、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６として示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はそれ以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、野生型配列の活性なｔｒａｃｒＲＮＡ配列断片は、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６として示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含む。
【００４１】
２つのポリヌクレオチド配列は、２つの配列が厳密な条件下で互いにハイブリダイズする場合、実質的に相補的であるとみなすことができる。同様に、ＲＧＮに結合したガイドＲＮＡが厳密な条件下で標的配列に結合する場合、ＲＧＮは、配列特異的な様式で特定の標的配列に結合すると考えられる。「ストリンジェントな条件」又は「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、２つのポリヌクレオチド配列が、他の配列（例えば、バックグラウンドの少なくとも２倍）よりも検出可能に高い程度で互いにハイブリダイズする条件を意味する。厳密な条件は、配列依存性であり、異なる状況で異なるであろう。典型的には、ストリンジェントな条件は、ｐＨ７．０～８．３において、塩濃度が約１．５ＭのＮａイオン、典型的には約０．０１～１．０ＭのＮａイオン濃度（又は他の塩）未満であり、温度は、短い配列（例えば、１０～５０ヌクレオチド）については少なくとも約３０℃であり、長い配列（例えば、５０ヌクレオチドを超える）ホルムアミドのような不安定化剤を加えることによって、厳しい条件を達成することもできる。例示的な低ストリンジェンシー条件には、３７℃での３０～３５％ホルムアミド、１Ｍ　ＮａＣｌ、１％ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝液とのハイブリダイゼーション、及び１×～２×ＳＳＣ（２０×ＳＳＣ＝３．０Ｍ　ＮａＣｌ／０．３Ｍクエン酸三ナトリウム）（５０～５５℃）での洗浄が含まれる。中程度のストリンジェンシー条件の例には、４０～４５％ホルムアミド、１．０Ｍ　ＮａＣｌ、１％ＳＤＳ（３７℃）でのハイブリダイゼーション、及び０．５×～１×ＳＳＣ（５５～６０℃）での洗浄が含まれる。高ストリンジェンシー条件には、５０％ホルムアミド、１Ｍ　ＮａＣｌ、３７℃での１％ＳＤＳでのハイブリダイゼーション、及び６０～６５℃での０．１×ＳＳＣでの洗浄が含まれる。オプションで、洗浄バッファーは約０．１％～約１％ＳＤＳを含む場合がある。ハイブリダイゼーションの持続時間は一般に約２４時間未満であり、通常約４～約１２時間である。洗浄時間の持続時間は、少なくとも平衡に達するのに十分な時間の長さである。

【００４２】
Ｔｍは、相補的標的配列の５０％が完全に一致した配列にハイブリダイズする温度（規定されたイオン強度及びｐＨ下で）である。ＤＮＡ－ＤＮＡハイブリッドの場合、Ｔｍは、Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284の式：Ｔｍ＝８１．５℃＋１６．６（ｌｏｇ Ｍ）＋０．４１（％ＧＣ）－０．６１（％形態）－０．６１（％形態）－５００／Ｌから近似することができる。ここで、Ｍは一価陽イオンのモル濃度、％ＧＣはＤＮＡ中のグアＭは一価カチオンのモル濃度、％ＧＣはＤＮＡ中のグアノシン及びシトシンヌクレオチドのパーセンテージ、％形態はハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドのパーセンテージ、Ｌは塩基対のハイブリッドの長さである。一般に、厳しい条件は、特定の配列及び規定されたイオン強度及びｐＨにおけるその相補性について、熱融点（Ｔｍ）よりも約５℃低いように選択される。しかしながら、厳しいストリンジェントな条件では、熱融点（Ｔｍ）よりも１、２、３、又は４℃低いハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を利用することができる。適度に厳しい条件では、熱融点（Ｔｍ）よりも６、７、８、９、又は１０℃低いハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を利用することができる。低ストリンジェンシー条件では、熱融点（Ｔｍ）よりも１１、１２、１３、１４、１５、又は２０℃低いハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を利用することができる。この式、ハイブリダイゼーション及び洗浄組成物、及び所望のＴｍを用いて、当業者は、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄溶液のストリンジェンシーの変動が本質的に記載されていることを理解するであろう。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範なガイドは、Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); and Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)に見出すことができる。Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)を参照されたい。

【００４３】
ガイドＲＮＡは、単一ガイドＲＮＡ又は二重ガイドＲＮＡシステムであってもよい。単一のガイドＲＮＡは、単一のＲＮＡ分子上にｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを含むが、二重ガイドＲＮＡシステムは、ｃｒＲＮＡ及び２つの異なるＲＮＡ分子上に存在し、ｃｒＲＮＡのＣＲＩＳＰＲ反復配列の少なくとも一部及びｃｒＲＮＡのＣＲＩＳＰＲ反復配列と完全に又は部分的に相補的であり得るｔｒａｃｒＲＮＡの少なくとも一部を介して互いにハイブリダイズしたｔｒａｃｒＲＮＡを含む。ガイドＲＮＡが単一ガイドＲＮＡであるいくつかの態様において、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、リンカーヌクレオチド配列によって分離される。一般に、リンカーヌクレオチド配列は、リンカーヌクレオチド配列のヌクレオチド内又はそれを含む二次構造の形成を回避するために、相補的塩基を含まないものである。いくつかの実施形態において、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡの間のリンカーヌクレオチド配列は、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２ヌクレオチド、又はそれ以上の長さである。特定の実施形態では、単一ガイドＲＮＡのリンカーヌクレオチド配列は、長さが少なくとも４ヌクレオチドである。ある態様において、リンカーヌクレオチド配列は、配列番号１２３として示されるヌクレオチド配列である。

【００４４】
単一ガイドＲＮＡ又は二重ガイドＲＮＡは、化学的に、又はインビトロ転写を介して合成することができる。ＲＧＮとガイドＲＮＡとの間の配列特異的結合を決定するためのアッセイは当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、検出可能な標識（例えば、ビオチン）でタグ付けすることができ、検出可能な標識（例えば、ストレプトアビジンビーズ）を介してガイドＲＮＡ：ＲＧＮ複合体を捕捉するプルダウン検出アッセイで使用することができる、発現されたＲＧＮとガイドＲＮＡとの間のインビトロ結合アッセイを

含む。ガイドＲＮＡに無関係な配列又は構造を有する制御ガイドＲＮＡを、ＲＮＡへのＲＧＮの非特異的結合のための陰性対照として用いることができる。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、配列番号４、１２、１９、２６、３３、４１、４９、５７、６４、７２、７８、８５、９２、９８、１０６、１１３、又は１２０であり、スペーサーは、配列は任意の配列であり、ポリＮ配列として示される。

【００４５】

ある態様において、ガイドＲＮＡは、ＲＮＡ分子として標的細胞、細胞小器官、又は胚に導入され得る。ガイドＲＮＡは、インビトロで転写することも、化学的に合成することもできる。他の実施形態では、ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列が、細胞、細胞小器官、又は胚に導入される。これらの態様のいくつかにおいて、ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、プロモーター（例えば、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーター）に作動可能に連結される。プロモーターは、天然プロモーターであってもよく、又はガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列に対して異種であってもよい。

【００４６】

種々の実施形態において、ガイドＲＮＡは、本明細書に記載されるように、リボ核タンパク質複合体として標的細胞、細胞小器官、又は胚に導入することができ、ここで、ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼポリペプチドに結合される。

【００４７】

ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの標的ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションを介して、関連するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを対象の特定の標的ヌクレオチド配列に向ける。標的ヌクレオチド配列は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又は両方の組み合わせを含み得、一本鎖又は二本鎖であり得る。標的ヌクレオチド配列は、ゲノムＤＮＡ（すなわち、染色体ＤＮＡ）、プラスミドＤＮＡ、又はＲＮＡ分子（例えば、メッセンジャーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、トランスファーＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ）であり得る。標的ヌクレオチド配列は、インビトロ又は細胞においてＲＮＡ誘導ヌクレアーゼによって結合（及びいくつかの実施形態においては切断）され得る。ＲＧＮが標的とする染色体配列は、核、色素体、又はミトコンドリアの染色体配列であり得る。いくつかの態様において、標的ヌクレオチド配列は、標的ゲノムにおいて独特である。

【００４８】

標的ヌクレオチド配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に隣接している。プロトスペーサー隣接モチーフは、一般に、標的ヌクレオチド配列から約１から約１０ヌクレオチド以内であり、これには、標的ヌクレオチド配列から約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、又は約１０ヌクレオチドが含まれる。ＰＡＭは、標的配列の５’又は３’であり得る。いくつかの実施形態において、ＰＡＭは、現在開示されているＲＧＮの標的配列の３’である。一般に、ＰＡＭは、約３～４ヌクレオチドのコンセンサス配列であるが、特定の実施形態では、長さが２、３、４、５、６、７、８、９、又はそれ以上のヌクレオチドであり得る。様々な実施形態において、現在開示されているＲＧＮによって認識されるＰＡＭ配列は、配列番号７、１５、２２、２９、３６、４４、５２、６０、６７、８１、８８、１０１、１０９、又は１１６として示されるコンセンサス配列を含む。

【００４９】

特定の実施形態において、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、又は活性変異体若しくはその断片は、それぞれ、配列番号７、１５、２２、２９、３６、４４、５２、６０、６７、８１、８８、１０１、１０９、又は１１６に示されるＰＡＭ配列に隣接する標的ヌクレオチドに結合する。いくつかの実施形態において、配列番号５４若しくは１３７を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、又はその活性変異体若しくは断片は、配列番号１４７として示されるＰＡＭ配列に隣接する標的ヌクレオチド配列に結合する。これらの実施形態のいくつかにおいて、ＲＧＮは、それぞれ配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０

４、１１１、又は１１８に示されるＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むガイド配列、又はそれらの活性変異体若しくは断片、及び配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、又は１１９に示されるｔｒａｃｒＲＮＡ配列、又はそれらの活性変異体又は断片に結合する。ＲＧＮシステムは、本明細書の実施例１、ならびに表１及び２にさらに記載される。

【００５０】

所与のヌクレアーゼ酵素に対するＰＡＭ配列特異性が酵素濃度によって影響されることは、当技術分野において周知である（例えば、Karvelis et al. (2015) Genome Biol 16:253を参照されたい）。これは、ＲＧＮ、又は細胞、細胞小器官、又は胚に送達されるリボ核タンパク質複合体の量を発現するために使用されるプロモーターを改変することによって改変され得る。

【００５１】

ＲＧＮは、その対応するＰＡＭ配列を認識すると、特異的切断部位で標的ヌクレオチド配列を切断することができる。本明細書中で用いる場合、切断部位は、ヌクレオチド配列がＲＧＮによって切断される標的ヌクレオチド配列内の２つの特定のヌクレオチドから構成される。切断部位は、５’又は３’方向のいずれかのＰＡＭからの１番目及び２番目、２番目及び３番目、３番目及び４番目、４番目及び５番目、５番目及び６番目、７番目及び８番目、又は８番目及び９番目のヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態において、切断部位は、５’又は３’方向のいずれかで、ＰＡＭから１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又は２０ヌクレオチドを超え得る。いくつかの態様において、切断部位は、ＰＡＭから４ヌクレオチド離れている。他の態様において、切断部位は、ＰＡＭから少なくとも１５ヌクレオチド離れている。ＲＧＮは標的ヌクレオチド配列を切断することができ、ねじれ末端を生じるため、いくつかの実施形態において、切断部位は、ポリヌクレオチドの正（＋）鎖上のＰＡＭからの２つのヌクレオチドの距離、及びポリヌクレオチドの負（－）鎖上のＰＡＭからの２つのヌクレオチドの距離に基づいて定義される。

【００５２】

ＰＡＭは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの特徴とみなされる（Szczelkun et al., PNAS, 111: 9798-9803, 2014; Sternberg et al., Nature 507: 62-67, 2014）。興味深いことに、ＡＰＧ０６６４６．１及びＡＰＧ０４２９３．１はＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとして機能し、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９ヌクレアーゼと同じドメインの多くを有するが、それらはそれぞれ典型的なＰＡＭ相互作用ドメイン（ＰＩＤ；Ｉｎｔｅｒｐｒｏ：ＩＰＲ０３２２３７；Ｐｆａｍ：ＰＦ１６５９５）を欠いている。従って、ＡＰＧ０６６４６．１及びＡＰＧ０４２９３．１はまた、上記のように２～５ヌクレオチドのモチーフである典型的なＰＡＭ要求性を有しない。その代わり、これらのタンパク質は、そのＣ末端にユニークなＤＮＡ認識ドメイン（ＡＰＧ０６６４６．１の残基８２１～１０９２（全長配列は配列番号１１７）；ＡＰＧ０４２９３．１の残基１０６４～１４０１（全長配列は配列番号１０３）を有する。これらのユニークなＤＮＡ認識ドメインは、ゲノム標的配列（配列番号１０９；表２を参照）の近傍の単一ヌクレオチドモチーフに基づいて、ヌクレアーゼがゲノム標的部位で切断することを可能にする。

【００５３】

ＡＰＧ０４２９３．１はまた、そのＮ末端（残基１４４～２７６）の近位に１３３アミノ酸残基のユニークな特徴ドメインを有する。このドメインの機能は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９ヌクレアーゼにおいても、一般的に当技術分野においても知られていない。

【００５４】

ＩＩＩ．ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡをコードするヌクレオチド

本開示は、現在開示されているＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡを含むポリヌクレオチド、ならびに現在開示されているＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡをコードするヌク

レオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。現在開示されているポリヌクレオチドには、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７のヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列、又はガイドＲＮＡ内に含まれる場合に関連するＲＮＡガイドヌクレアーゼの配列特異的結合を目的の標的配列に向けることができる活性変異体又はその断片を含むか又はコードするものが含まれる。配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６のヌクレオチド配列を含むｔｒａｃｒＲＮＡ、又はガイドＲＮＡ内に含まれる場合に、関連するＲＮＡガイドヌクレアーゼの配列特異的結合を目的の標的配列に向けることができる活性変異体又はその断片を含む又はコードするポリヌクレオチドも開示される。配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、又は２３５として示されるアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、及びＲＮＡ誘導配列特異的様式で標的ヌクレオチド配列に結合する能力を保持するそれらの活性断片又は変異体も提供される。

【００５５】

用語「ポリヌクレオチド」の使用は、本開示をＤＮＡを含むポリヌクレオチドに限定することを意図しない。当業者は、ポリヌクレオチドがリボヌクレオチド、及びリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの組み合わせを含むことができることを認識するであろう。このようなデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドには、天然に存在する分子及び合成類似体の両方が含まれる。これらには、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ＰＮＡ－ＤＮＡキマー、ロックされた核酸（ＬＮＡ）、及びホスホチオレート結合配列が含まれる。本明細書に開示されるポリヌクレオチドはまた、一本鎖形態、二本鎖形態、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、三本鎖構造、ステム－及びループ構造などを含むが、これらに限定されない全ての形態の配列を包含する。

【００５６】

ＲＧＮをコードする核酸分子は、目的の生物における発現のためにコドンを最適化することができる。「コドンを最適化された」コード配列は、特定の宿主細胞の好ましいコドン使用又は転写条件の頻度を模倣するように設計されたそのコドン使用頻度を有するポリヌクレオチドコード配列である。特定の宿主細胞又は生物における発現は、翻訳されたアミノ酸配列が変化しないように、核酸レベルでの１つ又は複数のコドンの変化の結果として増強される。核酸分子は、完全に又は部分的に、コドンを最適化することができる。広範囲の生物に対する好みの情報を提供するコドン表及び他の参考文献は、当該技術分野で入手可能である（例えば、Ｃａｍｐｂｅｌｌ及びＧｏｗｒｉ（１９９０）Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌを参照されたい）。植物に好まれるコドンの使い方については９２：１－１１。植物好ましい遺伝子を合成するための方法が当技術分野で利用可能である。例えば、本明細書に参考として援用される、米国特許第５，３８０，８３１号、第５，４３６，３９１号、及びMurray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498を参照されたい。

【００５７】

本明細書中で提供されるＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡをコードするポリヌクレオチドは、インビトロでの発現又は目的の細胞、オルガネラ、胚、又は生物における発現のための発現カセットで提供され得る。カセットは、ポリヌクレオチドの発現を可能にする、本明細書に提供されるＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡをコードするポリヌクレオチドに機能し得るように連結された５’及び３’調節配列を含むであろう。カセットは、さらに、生物に共形質転換される少なくとも１つの追加の遺伝子又は遺伝的要素を含んでもよい。追加の遺伝子又はエレメントが含まれる場合、そのコンポーネントは機能的に連結される。「機能的に連結された」という用語は、２つ以上の要素間の機能的な連結を意味することを意図している。例えば、プロモーターと目的のコード領域（例えば、ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡをコードする領域）との間の機能可能な連結は、目的のコード領域

の発現を可能にする機能的連結である。操作可能に連結されたエレメントは、隣接するものであっても、非隣接するものであってもよい。２つのタンパク質コード領域の連結を指すために使用される場合、機能的に連結されることにより、コード領域が同じリーディングフレーム内にあることが意図される。あるいは、追加の遺伝子又はエレメントを、複数の発現カセット上に提供することができる。例えば、現在開示されているＲＧＮをコードするヌクレオチド配列は、１つの発現カセット上に存在することができ、一方、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、又は完全ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、別個の発現カセット上に存在することができる。このような発現カセットには、調節領域の転写調節下にあるポリヌクレオチドの挿入のための複数の制限部位及び／又は組換え部位が提供される。発現カセットは、選択マーカー遺伝子をさらに含むことができる。

【００５８】

発現カセットは、転写の５’－３’方向に、本発明の転写（及び、いくつかの実施形態では、翻訳）開始領域（すなわち、プロモーター）、ＲＧＮ－、ｃｒＲＮＡ－、ｔｒａｃｒＲＮＡ－及び／又はｓｇＲＮＡ－をコードするポリヌクレオチド、ならびに目的の生物において機能性である転写（及び、いくつかの実施形態では、翻訳）終結領域を含む。本発明のプロモーターは、宿主細胞においてコード配列の発現を指向又は駆動することができる。調節領域（例えば、プロモーター、転写調節領域、及び翻訳終結領域）は、宿主細胞に対して、又は互いに、内因性であっても、又は異種性であってもよい。本明細書中で使用される場合、配列に関して「異種性」とは、外来種に由来する配列、又は、同じ種に由来する場合、意図的なヒトの介入によって、組成及び／又はゲノム座におけるその天然型から実質的に改変された配列である。本明細書中で用いるように、キメラ遺伝子は、コード配列に対して異種性である転写開始領域に機能し得るように連結されたコード配列を含む。

【００５９】

便利な終結領域は、Ａ．ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓのＴｉプラスミド、例えば、オクトピンシンターゼ及びノパリンシンターゼ終結領域から入手可能である。Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; 及びJoshi et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:9627-9639も参照されたい。

【００６０】

追加の調節シグナルには、転写開始開始部位、オペレーター、アクチベーター、エンハンサー、他の調節エレメント、リボソーム結合部位、開始コドン、終結シグナルなどが含まれるが、これらに限定されない。例えば、米国特許第５，０３９，５２３号及び第４，８５３，３３１号；欧州特許第０４８０７６２Ａ２号; Sambrook et al. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)（以下、「Sambrook 11」）; Davis et al., eds. (1980) Advanced Bacterial Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, N.Y.、及びそこに引用される参考文献を参照されたい。

【００６１】

発現カセットを調製する際に、種々のＤＮＡ断片を操作して、ＤＮＡ配列を適切な方向に、そして適宜、適切な読み枠内に提供することができる。この目的のために、アダプター又はリンカーを用いて、ＤＮＡ断片又は他の操作を結合させて、便利な制限部位、不要なＤＮＡの除去、制限部位の除去などを提供することができる。この目的のために、インビトロ突然変異誘発、プライマー修復、制限、アニーリング、再置換、例えば、遷移及びトランスバージョンが関与し得る。

【００６２】

本発明の実施において、多数のプロモーターを使用することができる。プロモーターは、所望の結果に基づいて選択することができる。核酸は、構成的、誘導可能、成長段階特

異的、細胞型特異的、組織好適、組織特異的、又は対象生物における発現のための他のプロモーターと組み合わせることができる。例えば、参照により本明細書に援用される、ＷＯ９９／４３８３８、ならびに米国特許第８，５７５，４２５号；第７，７９０，８４６号；第８，１４７，８５６号；第８，５８６、８３２号；第７，７７２，３６９号；第７，５３４，９３９号；第６，０７２，０５０号；第５，６５９，０２６号；第５，６０８，１４９号；第５，６０８，１４４号；第５，６０４，１２１号；第５，５６９，５９７号；第５，４６６，７８５号；第５，３９９，６８０号；第５，２６８，４６３号；第５，６０８，１４２号；及び第６，１７７，６１１号に記載のプロモーターを参照されたい。

【００６３】

植物における発現のために、構成的プロモーターには、ＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターも含まれる（Odell et al. (1985) Nature 313:810-812); rice actin (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163-171); ubiquitin (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632 and Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-588); 及びMAS (Velten et al. (1984) EMBO J. 3:2723-2730）。

【００６４】

誘導性プロモーターの例は、低酸素又は寒冷ストレスによって誘導されるＡｄｈ１プロモーター、熱ストレスによって誘導されるＨｓｐ７０プロモーター、ＰＰＤＫプロモーター、及び光によって誘導されるペプカルボキシラーゼプロモーターである。また、セーフナー誘導性のＩｎ２－２プロモーターのような、化学的に誘導性であるプロモーター（米国特許第５，３６４，７８０号）、Ａｘｉｇ１プロモーター（オーキシン誘導性でタペタム特異的であるがカルスでも活性を有する）（ＰＣＴ／ＵＳ０１／２２１６９）、ステロイド応答性プロモーター（例えば、Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421-10425 and McNellis et al. (1998) Plant J. 14(2):247-257におけるエストロゲン誘導性のＥＲＥプロモーター、及びテトラサイクリン誘導性及びテトラサイクリン抑制性プロモーター（例えば、Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237、米国特許第５，８１４，６１８号及び第５，７８９，１５６号参照）有用である。これらの文献は参照により本明細書に援用される。

【００６５】

組織特異的又は組織好ましいプロモーターを用いて、特定の組織内で発現構築物の発現を標的化することができる。ある態様において、組織特異的又は組織好ましいプロモーターは、植物組織において活性である。植物の発生制御下にあるプロモーターの例には、葉、根、果実、種子、花などの特定の組織において優先的に転写を開始するプロモーターが含まれる。「組織特異的」プロモーターは、特定の組織においてのみ転写を開始するプロモーターである。遺伝子の恒常的な発現とは異なり、組織特異的な発現は、いくつかのレベルの遺伝子調節の相互作用の結果である。従って、相同又は近縁の植物種由来のプロモーターは、特定の組織における導入遺伝子の効率的で信頼できる発現を達成するために使用することが好ましい。いくつかの態様において、発現は、組織好ましいプロモーターを含む。「好ましい組織」プロモーターは、特定の組織において、必ずしも完全に、又は単独でではなく、選択的に転写を開始するプロモーターである。

【００６６】

ある態様において、ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡをコードする核酸分子は、細胞型特異的プロモーターを含む。「細胞型特異的」プロモーターは、１つ以上の器官における特定の細胞型における発現を主に駆動するプロモーターである。植物において機能する細胞型特異的プロモーターが主として活性であり得る植物細胞のいくつかの例としては、例えば、ＢＥＴＬ細胞、根の維管束細胞、葉、茎細胞、及び幹細胞が挙げられる。核酸分子はまた、細胞型好ましいプロモーターを含むことができる。「細胞型好ましい」プロモーターは、主に、１つ又は複数の器官における特定の細胞型において、ほとんど（必ずしも完全に、又は単独ではないが）発現を駆動するプロモーターである。植物における細胞型好ましいプロモーターが選択的に活性であり得る植物細胞のいくつかの

例は、例えば、ＢＥＴＬ細胞、根の維管束細胞、葉、茎細胞、及び幹細胞を含む。

【００６７】

ＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡをコードする核酸配列は、例えばインビトロｍＲＮＡ合成などのファージＲＮＡポリメラーゼによって認識されるプロモーター配列に機能し得るように連結され得る。そのような態様において、インビトロ転写ＲＮＡは、本明細書に記載される方法で使用するために精製することができる。例えば、プロモーター配列は、Ｔ７、Ｔ３、又はＳＰ６プロモーター配列、又はＴ７、Ｔ３、又はＳＰ６プロモーター配列の変異体であり得る。そのような実施形態において、発現されたタンパク質及び／又はＲＮＡは、本明細書に記載されるゲノム修飾の方法での使用のために精製することができる。

【００６８】

ある態様において、ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡをコードするポリヌクレオチドはまた、ポリアデニル化シグナル（例えば、植物におけるＳＶ４０ポリＡシグナル及び他の機能的シグナル）及び／又は少なくとも１つの転写終結配列に連結され得る。 さらに、ＲＧＮをコードする配列は、本明細書の他の箇所に記載されているように、少なくとも１つの核局在化シグナル、少なくとも１つの細胞浸透ドメイン、及び／又は特定の細胞内位置へタンパク質を輸送することができる少なくとも１つのシグナルペプチドをコードする配列に連結することもできる。

【００６９】

ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡをコードするポリヌクレオチドは、ベクター又は複数のベクター中に存在することができる。「ベクター」とは、宿主細胞に核酸を移入、送達、又は導入するためのポリヌクレオチド組成物をいう。適切なベクターには、プラスミドベクター、ファージミド、コスミド、人工／ミニ染色体、トランスポゾン、及びウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター）が含まれる。ベクターは、さらなる発現制御配列（例えば、エンハンサー配列、Ｋｏｚａｋ配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列）、選択可能なマーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製起点などを含むことができる。追加情報は、「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003又は「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3rd edition, 2001に見出すことができる。

【００７０】

ベクターはまた、形質転換細胞の選択のための選択マーカー遺伝子を含むことができる。選択可能なマーカー遺伝子は、形質転換された細胞又は組織の選択に利用される。マーカー遺伝子には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼＩＩ（ＮＥＯ）及びヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（ＨＰＴ）などの抗生物質耐性をコードする遺伝子、ならびにグルホシナートアンモニウム、ブロモキシニル、イミダゾリノン、及び２，４－ジクロロフェノキシアセテート（２，４－Ｄ）などの除草剤化合物に対する耐性を付与する遺伝子が含まれる。

【００７１】

いくつかの実施形態において、ＲＧＮポリペプチドをコードする配列を含む発現カセット又はベクターは、ｃｒＲＮＡ及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡをコードする配列、又はガイドＲＮＡを作製するために組み合わされたｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡをさらに含むことができる。ｃｒＲＮＡ及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡをコードする配列は、目的の生物又は宿主細胞におけるｃｒＲＮＡ及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡの発現のために、少なくとも１つの転写制御配列に操作可能に連結することができる。例えば、ｃｒＲＮＡ及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡをコードするポリヌクレオチドは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（ＰｏｌＩＩＩ）によって認識されるプロモーター配列に作動可能に連結され得る。適切なＰｏｌＩＩＩプロモーターの例としては、哺乳動物Ｕ６、Ｕ３、Ｈ１、及び７ＳＬ ＲＮＡプロモーター、ならびにイネＵ６及びＵ３プロモーターが挙げられるが、これらに限定され

ない。

【００７２】

示されるように、ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び／又はｓｇＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む発現構築物を用いて、目的の生物を形質転換することができる。形質転換のための方法は、対象とする生物にヌクレオチド構築物を導入することを含む。「導入する」ことにより、構築物が宿主細胞の内部にアクセスするように、ヌクレオチド構築物を宿主細胞に導入することが意図される。本発明の方法は、ヌクレオチド構築物が宿主生物の少なくとも１つの細胞の内部へのアクセスを得ることのみを目的として、宿主生物にヌクレオチド構築物を導入するための特定の方法を必要としない。宿主細胞は、真核細胞又は原核細胞であり得る。特定の実施形態では、真核生物宿主細胞は、植物細胞、哺乳動物細胞、又は昆虫細胞である。植物及び他の宿主細胞にヌクレオチド構築物を導入する方法は、限定されるものではないが、安定形質転換方法、一過性形質転換方法、及びウイルス媒介方法を含む当該分野で公知である。

【００７３】

この方法は、植物全体を含む植物、ならびに植物器官（例えば、葉、茎、根など）、種子、植物細胞、増殖物、胚及びその子孫などの形質転換された生物をもたらす。植物細胞は、分化又は未分化であり得る（例えば、仮骨、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉細胞、根細胞、師部細胞、花粉）。

【００７４】

「トランスジェニック生物」又は「形質転換された生物」又は「安定して形質転換された」生物又は細胞若しくは組織とは、本発明のＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ、又は組み込んだ生物を指す。他の外因性又は内因性の核酸配列又はＤＮＡ断片を宿主細胞に取り込むこともできることが認識されている。アグロバクテリウム及びバイオリスティックを介した形質転換は、植物細胞の形質転換に主に用いられる２つのアプローチである。しかしながら、宿主細胞の形質転換は、感染、トランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクション、微粒子銃又はパーティクルガン法、エレクトロポレーション、シリカ／カーボンファイバー、超音波媒介、ＰＥＧ媒介、リン酸カルシウム共沈殿、ポリカチオンＤＭＳＯ技術、ＤＥＡＥ、デキストラン手順、及びウイルス媒介、リポソーム媒介などによって行うことができる。ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、及び／又はトラクターＲＮＡをコードするポリヌクレオチドのウイルス媒介導入には、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス媒介性の導入及び発現、ならびにカウリモウイルス、ジェミニウイルス、及びＲＮＡ植物ウイルスの使用が含まれる。

【００７５】

形質転換プロトコールならびにポリペプチド又はポリヌクレオチド配列を植物に導入するためのプロトコールは、形質転換を標的とする宿主細胞（例えば、モノコット又は双子葉植物細胞）のタイプに依存して変化し得る。形質転換の方法は当技術分野で公知であり、米国特許第８，５７５，４２５号、第７，６９２，０６８号、第８，８０２，９３４号、第７，５４１，５１７号に記載されているものを含む。Rakoczy-Trojanowska, M. (2002) Cell Mol Biol Lett. 7:849-858; Jones et al. (2005) Plant Methods 1:5; Rivera et al. (2012) Physics of Life Reviews 9:308-345; Bartlett et al. (2008) Plant Methods 4:1-12; Bates, G.W. (1999) Methods in Molecular Biology 111:359-366; Binns and Thomashow (1988) Annual Reviews in Microbiology 42:575-606; Christou, P. (1992) The Plant Journal 2:275-281; Christou, P. (1995) Euphytica 85:13-27; Tzfira et al. (2004) TRENDS in Genetics 20:375-383; Yao et al. (2006) Journal of Experimental Botany 57:3737-3746; Zupan and Zambryski (1995) Plant Physiology 107:1041-1047; Jones et al. (2005) Plant Methods 1:5も参照されたい。

【００７６】

形質転換は、細胞への核酸の安定な又は一過性の取込みをもたらすことができる。「安

定した形質転換」とは、宿主細胞に導入されたヌクレオチド構築物が宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その子孫に遺伝することができることを意味する。「一過性の形質転換」とは、ポリヌクレオチドが宿主細胞に導入され、宿主細胞のゲノムに組み込まれないことを意味する。

【００７７】

葉緑体の形質転換方法は、当技術分野において公知である。例えば、Svab et al. (1990) Proc. Nail. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606を参照されたい。この方法は、選択マーカーを含むＤＮＡの粒子銃による送達、及び相同組換えを介した色素体ゲノムへのＤＮＡの標的化に依存する。さらに、色素体形質転換は、サイレント色素体媒介導入遺伝子のトランス活性化によって、組織に好まれる核コード化及び色素体指向性ＲＮＡポリメラーゼの発現によって達成することができる。このようなシステムは、McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305において報告されている。

【００７８】

形質転換された細胞は、慣用的な方法に従って、植物のようなトランスジェニック生物に成長させることができる。例えば、McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84を参照されたい。次に、これらの植物を成長させ、同じ形質転換株又は異なる株で受粉させ、得られた雑種が所望の表現型特性の構成的発現を同定した。所望の表現型特性の発現が安定に維持され、遺伝されることを確実にするために、２世代以上の世代を成長させ、次に、所望の表現型特性の発現が確実に達成されるように、収穫した種子を得ることができる。このようにして、本発明は、本発明のヌクレオチド構築物、例えば、本発明の発現カセットを有する形質転換種子（「トランスジェニック種子」とも呼ばれる）を、それらのゲノムに安定に組み込んで提供する。

【００７９】

あるいは、形質転換された細胞を生物に導入してもよい。これらの細胞は、生体由来であり得、ここで、細胞は、エクスビボのアプローチで形質転換される。

【００８０】

本明細書に提供される配列は、限定されるものではないが、単子葉植物及び双子葉植物を含む任意の植物種の形質転換に使用することができる。目的の植物の例には、限定されないが、トウモロコシ（トウモロコシ）、ソルガム、小麦、ヒマワリ、トマト、アブラナ科植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウキビ、サツマイモ、タバコ、大麦、及び油糧種子菜種、アブラナ属、アルファルファ、ライ麦、キビ、サフラワー、ピーナッツ、サツマイモ、カッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、柑橘類、ココア、お茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイヤ、カシュー、マカダミア、アーモンド、オート麦、野菜、装飾品、及び針葉樹が挙げられる。

【００８１】

野菜には、トマト、レタス、緑豆、リマ豆、エンドウ豆、及びキュウリ、カンタループ、及びムスクメロンのようなクルクミン属のメンバーが含まれるが、これらに限定されない。観賞用植物には、ツツジ、アジサイ、ハイビスカス、バラ、チューリップ、水仙、ペチュニア、カーネーション、ポインセチア、キクなどがあるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の植物は、作物植物（例えば、トウモロコシ、ソルガム、コムギ、ヒマワリ、トマト、クルーシファー、コショウ、ジャガイモ、ワタ、米、ダイズ、サトウキビ、サトウキビ、タバコ、オオムギ、油糧種子菜種など）である。

【００８２】

本明細書で使用される場合、植物という用語は、植物細胞、植物プロトプラスト、植物を再生することができる植物細胞組織培養物、植物カルス、植物塊、及び植物又は植物の一部（胚、花粉、卵子、種子、葉、花、枝、果実、穀粒、耳、穂軸、殻、茎、根、根端、葯など）において無傷である植物細胞を含む。穀物とは、種の成長又は繁殖以外の目的で、商業的生産者によって生産される成熟種子を意味する。再生植物の子孫、変異体、及び

突然変異体も、これらの部分が導入されたポリヌクレオチドを含むことを条件として、本発明の範囲に含まれる。さらに、例えば大豆を含め、本明細書に開示された配列を保持する処理された植物製品又は副産物が提供される。

【００８３】

ＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡをコードするポリヌクレオチドは、古細菌及び細菌（例えば、Bacillus sp.、Klebsiella sp.、Streptomyces sp.、Rhizobium sp.、Escherichia sp.、Pseudomonas sp.、Salmonella sp.、Shigella sp.、Vibrio sp.、Yersinia sp.、Mycoplasma sp.、Agrobacterium、Lactobacillus sp.）を含むが、これらに限定されない任意の原核生物種を形質転換するために使用することもできる。

【００８４】

ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡをコードするポリヌクレオチドは、動物（例えば、哺乳動物、昆虫、魚、鳥、及び爬虫類）、真菌、アメーバ、藻類、及び酵母を含むがこれらに限定されない任意の真核生物種を形質転換するために使用することができる。

【００８５】

従来のウイルス及び非ウイルスベースの遺伝子導入方法を用いて、哺乳動物細胞又は標的組織に核酸を導入することができる。そのような方法は、ＣＲＩＳＰＲシステムの成分をコードする核酸を、培養中、又は宿主生物中の細胞に投与するために用いることができる。非ウイルスベクター送達システムには、ＤＮＡプラスミド、ＲＮＡ（例えば、本明細書に記載されるベクターの転写物）、裸の核酸、及び送達ビヒクルと複合体化された核酸（例えば、リポソーム）が含まれる。ウイルスベクター送達システムには、細胞への送達後にエピソームゲノム又は組込まれたゲノムのいずれかを有するＤＮＡ及びＲＮＡウイルスが含まれる。遺伝子療法手順の概説については、Anderson, Science 256: 808-813 (1992); Nabel & Feigner, TIBTECH 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993); Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10): 1149-1154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology, Doerfler and Bohm (eds) (1995); 及びYu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)を参照されたい。

【００８６】

核酸の非ウイルス送達の方法には、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン又は脂質：核酸コンジュゲート、裸のＤＮＡ、人工ビリオン、及び薬剤増強ＤＮＡの取り込みが含まれる。リポフェクションは、例えば、米国特許第５，０４９，３８６号、第４，９４６，７８７号；及び第４，８９７，３５５号に記載され、リポフェクション試薬が市販されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）及びＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適したカチオン性及び中性脂質には、Ｆｅｉｇｎｅｒ、ＷＯ９１／１７４２４；ＷＯ９１／１６０２４のものが含まれる。送達は、細胞（例えば、インビトロ又はエクスビボ投与）又は標的組織（例えば、インビボ投与）であり得る。免疫脂質複合体のような標的化リポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291- 297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); 米国特許第４，１８６，１８３号、第４，２１７，３４４号、第４，２３５，８７１号、第４，２６１，９７５号、第４，４８５，０５４号、第４，５０１，７２８号、第４，７７４，０８５号、第４，８３７，０２８号、及び第４，９４６，７８７号を参照されたい）。

【００８７】
核酸の送達のためのＲＮＡ又はＤＮＡウイルスベースのシステムの使用は、体内の特定の細胞にウイルスを標的化し、ウイルスペイロードを核に輸送するための高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与することができ（インビボ）、又は細胞をインビトロで処理するために使用することができ、修飾された細胞は、必要に応じて患者に投与することができる（エクスビボ）。従来のウイルスベースのシステムには、遺伝子導入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴及び単純ヘルペスウイルスベクターが含まれ得る。宿主ゲノムへの組込みはレトロウイルス、レンチウイルス、及びアデノ随伴ウイルス遺伝子導入法で可能であり、しばしば挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。さらに、多くの異なる細胞型及び標的組織において、高い形質導入効率が観察されている。

【００８８】
レトロウイルスの親和性は、外来のエンベロープタンパク質を取り込み、標的細胞の潜在的標的集団を拡大することによって変化させることができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入又は感染することができ、典型的には高いウイルス力価を産生するレトロウイルスベクターである。したがって、レトロウイルス遺伝子導入系の選択は標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、外来配列の最大６～１０ｋｂのパッケージング能力を有するシス作用性の長鎖末端反復配列からなる。最小のシス作用性ＬＴＲは、ベクターの複製及びパッケージングに十分であり、次に、治療遺伝子を標的細胞に組み込んで、永久的な導入遺伝子発現を提供するために使用される。広く使用されるレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）、ギボンアパ白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、シミアン免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、及びそれらの組み合わせに基づくものが含まれる（例えば、Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-2739 (1992); Johann et al., J. Viral. 66:1635-1640 (1992); Sommnerfelt et al., Viral. 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Viral. 63:2374-2378 (1989); Miller et al., 1. Viral. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700)を参照されたい）。

【００８９】
一過性発現が好ましい用途では、アデノウイルスベースのシステムを使用することができる。アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。このようなベクターを用いて、高い力価及び発現レベルが得られている。このベクターは、比較的単純なシステムで大量に生産することができる。アデノ随伴ウイルス（「ＡＡＶ」）ベクターを用いて、例えば、核酸及びペプチドのインビトロ生産、ならびにインビボ及びエクスビボ遺伝子治療手順で、標的核酸で細胞を形質導入することもできる（例えば、West et al., Virology 160:38-47 (1987); 米国特許第４，７９７，３６８号；ＷＯ９３／２４６４１; Katin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, 1. Clin. Invest. 94:1351 (1994）を参照されたい）。組換えＡＡＶベクターの構築は、米国特許を含む多くの刊行物に記載され、例えば、米国特許第５，１７３，４１４号; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); and Samulski et al., 1. Viral. 63:03822-3828 (1989)が挙げられる。パッケージング細胞は、典型的には、宿主細胞に感染可能なウイルス粒子を形成するために使用される。このような細胞には、アデノウイルスをパッケージングする２９３細胞、及びレトロウイルスをパッケージングするΨＪ２細胞又はＰＡ３１７細胞が含まれる。

【００９０】
遺伝子治療に使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージする細胞系を作製することによって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージング及びその後の宿主への組込みに必要な最小のウイルス配列を含み、他のウイルス配列は、発現されるポリヌクレオチドの発現カセットで置き換えられる。欠損したウイ

ルス機能は、典型的にはパッケージング細胞系によってトランスに供給される。例えば、遺伝子治療において使用されるＡＡＶベクターは、典型的には、宿主ゲノムへのパッケージング及び組込みに必要なＡＡＶゲノムからのＩＴＲ配列のみを有する。ウイルスＤＮＡは、他のＡＡＶ遺伝子、すなわちｒｅｐ及びｃａｐをコードするがＩＴＲ配列を欠くヘルパープラスミドを含む細胞系にパッケージされる。

【００９１】

細胞系はまた、ヘルパーとしてアデノウイルスに感染させることもできる。ヘルパーウイルスは、ＡＡＶベクターの複製及びヘルパープラスミドからのＡＡＶ遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ＩＴＲ配列が欠損しているため、かなりの量はパッケージングされていない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがＡＡＶよりも感受性が高い熱処理によって低減することができる。細胞への核酸の送達のためのさらなる方法は、当業者に公知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれるＵＳ２０００３／００８７８１７を参照されたい。

【００９２】

ある態様において、宿主細胞は、本明細書に記載される１以上のベクターで一過性又は非一過性にトランスフェクションされる。いくつかの態様において、細胞は、それが被験体中で自然に生じるので、トランスフェクションされる。ある態様において、トランスフェクトされる細胞は、被験体から採取される。いくつかの態様において、細胞は、被験体、例えば、細胞株から採取された細胞に由来する。組織培養のための多種多様な細胞株が当技術分野で公知である。細胞株の例には、限定されないが、Ｃ８１６１、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ、ＭＯＬＴ、ｍＩＭＣＤ－３、ＮＨＤＦ、ＨｅＬａＳ３、Ｈｕｈｌ、Ｈｕｈ４、Ｈｕｈ７、ＨＵＶＥＣ、ＨＡＳＭＣ、ＨＥＫｎ、ＨＥＫａ、ＭｉａＰａ細胞、Ｐａｎｅｌ、ＰＣ－３、ＴＦｌ、ＣＴＬＬ－２、ＣＩＲ、Ｒａｔ６、ＣＶＩ、ＲＰＴＥ、Ａ１Ｏ、Ｔ２４、１８２、Ａ３７５、ＡＲＨ－７７、Ｃａｌｕｌ、ＳＷ４８０、ＳＷ６２０、ＳＫＯＶ３、ＳＫ－ＵＴ、ＣａＣｏ２、Ｐ３８８Ｄｌ、ＳＥＭ－Ｋ２、ＷＥＨＩ－２３１、ＨＢ５６、ＴＩＢ５５、ｌｕｒｋａｔ、１４５．０１、ＬＲＭＢ、Ｂｃｌ－１、ＢＣ－３、ＩＣ２１、ＤＬＤ２、Ｒａｗ２６４．７、ＮＲＫ、ＮＲＫ－５２Ｅ、ＭＲＣ５、ＭＥＦ、ＨｅｐＧ２、ＨｅＬａ　Ｂ、ＨｅＬａ　Ｔ４、ＣＯＳ、ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－６、ＣＯＳ－Ｍ６Ａ、ＢＳ－Ｃ－１サル腎臓上皮、ＢＡＬＢ／３Ｔ３マウス胚線維芽細胞、３Ｔ３Ｓｗｉｓｓ、３Ｔ３－Ｌｌ、１３２－ｄ５ヒト胎児線維芽細；１０．１マウス線維芽細胞、２９３－Ｔ、３Ｔ３、７２１、９Ｌ、Ａ２７８０、Ａ２７８０ＡＤＲ、Ａ２７８０ｃｉｓ、Ａ１７２、Ａ２０、Ａ２５３、Ａ４３１、Ａ－５４９、ＡＬＣ、Ｂ１６、Ｂ３５、ＢＣＰ－Ｉ細胞、ＢＥＡＳ－２Ｂ、ｂＥｎｄ．３、ＢＨＫ－２１、ＢＲ　２９３、ＢｘＰＣ３、Ｃ３Ｈ－１０Ｔｌ／２、Ｃ６／３６、Ｃａｌ－２７、ＣＨＯ、ＣＨＯ－７、ＣＨＯ－ＩＲ、ＣＨＯ－Ｋｌ、ＣＨＯ－Ｋ２、ＣＨＯ－Ｔ、ＣＨＯ　Ｄｈｆｒ－／－、ＣＯＲ－Ｌ２３、ＣＯＲ－Ｌ２３／ＣＰＲ、ＣＯＲ－Ｌ２３５０１０、ＣＯＲＬ２３／Ｒ２３、ＣＯＳ－７、ＣＯＶ－４３４、ＣＭＬ　Ｔｌ、ＣＭＴ、ＣＴ２６、Ｄ１７、ＤＨ８２、ＤＵ１４５、ＤｕＣａＰ、ＥＬ４、ＥＭ２、ＥＭ３、ＥＭＴ６／ＡＲ１、ＥＭＴ６／ＡＲ１０．０、ＦＭ３、Ｈ１２９９、Ｈ６９、ＨＢ５４、ＨＢ５５、ＨＣＡ２、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、Ｈｅｐａｌｃｌｃ７、ＨＬ－６０、ＨＭＥＣ、ＨＴ－２９、ｌｕｒｋａｔ、ｌＹ細胞、Ｋ５６２細胞、Ｋｕ８１２、ＫＣＬ２２、ＫＧｌ、ＫＹＯｌ、ＬＮＣａｐ、Ｍａ－Ｍｅｌ　１－４８、ＭＣ－３８、ＭＣＦ－７、ＭＣＦ－ｌ０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５、ＭＤＣＫＩＩ、ＭＤＣＫＩＩ、ＭＯＲ／０．２Ｒ、ＭＯＮＯ－ＭＡＣ　６、ＭＴＤ－ｌＡ、ＭｙＥｎｄ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＣＰＲ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ１０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ２０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ４、ＮＩＨ－３Ｔ３、ＮＡＬＭ－１、ＮＷ－１４５、ＯＰＣＮ／ＯＰＣＴ細胞株、Ｐｅｅｒ、ＰＮＴ－ｌＡ／ＰＮＴ２、ＲｅｎＣａ、ＲＩＮ－５Ｆ、ＲＭＡ／ＲＭＡＳ、Ｓａｏｓ－２細胞、Ｓｆ－９、ＳｋＢｒ３、Ｔ２、Ｔ－４７Ｄ、Ｔ８４、ＴＨＰｌ細胞株、Ｕ３７３、Ｕ８７、Ｕ９３７、ＶＣａＰ、Ｖｅｒｏ細胞ＷＭ３９、ＷＴ－４９、Ｘ６３、ＹＡＣ－１、ＹＡＲ、及びそれらのトランスジェニック変形体が含まれる。細胞株は、当業者に公知の種々の供給

源から入手可能である（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓａｓ，Ｖａ．）を参照されたい）。

【００９３】

いくつかの態様において、本明細書に記載される１以上のベクターでトランスフェクトされた細胞は、１以上のベクター由来配列を含む新しい細胞系を確立するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲシステムの成分で一時的にトランスフェクションされ（例えば、１以上のベクターの一過性のトランスフェクション、又はＲＮＡによるトランスフェクション）、かつＣＲＩＳＰＲ複合体の活性を介して修飾された細胞を用いて、修飾を含むが他のいずれかの外因性配列を欠く細胞を含む新規細胞系を確立する。ある態様において、本明細書に記載される１以上のベクターで一過性又は非一過性にトランスフェクトされた細胞、又はそのような細胞に由来する細胞株は、１以上の試験化合物の評価に使用される。

【００９４】

ある態様において、本明細書に記載される１以上のベクターは、非ヒトトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物を産生するために使用される。ある態様において、トランスジェニック動物は、マウス、ラット、又はウサギのような哺乳動物である。

【００９５】

ＩＶ．ポリペプチド及びポリヌクレオチドの変種及び断片

本開示は、天然に存在する（すなわち、野生型）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの活性変異体及び断片を提供し、そのアミノ酸配列は、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、又は２３５として、ならびに配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７として示される配列、及び天然に存在するｔｒａｃｒＲＮＡの活性変異体及び断片、例えば、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６、及びそれをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

【００９６】

変異体又は断片の活性は、対象のポリヌクレオチド又はポリペプチドと比較して変化させることができるが、変異体及び断片は、対象のポリヌクレオチド又はポリペプチドの機能性を保持すべきである。例えば、変異体又は断片は、目的のポリヌクレオチド又はポリペプチドと比較した場合に、活性の増加、活性の減少、活性の異なるスペクトル、又は活性の任意の他の変化を有し得る。

【００９７】

本明細書に開示されているような天然ＲＧＮポリペプチドの断片及び変異体は、配列特異的なＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合活性を保持するであろう。特定の実施形態では、本明細書に開示されているような天然ＲＧＮポリペプチドの断片及び変異体は、ヌクレアーゼ活性（一本鎖又は二本鎖）を保持するであろう。

【００９８】

本明細書に開示されたもののような天然に存在するＣＲＩＳＰＲ反復の断片及び変異体は、ガイドＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡを含む）の一部が、配列特異的な様式で、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ（ガイドＲＮＡと複合体化された）に結合し、標的ヌクレオチド配列にガイドする能力を保持するであろう。

【００９９】

本明細書に開示されているような天然に存在するｔｒａｃｒＲＮＡの断片及び変異体は、ガイドＲＮＡ（ＣＲＩＳＰＲＲＮＡを含む）の一部が、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ（ガイドＲＮＡと複合体化された）を配列特異的な様式で標的ヌクレオチド配列にガイドする能力を保持するであろう。

【０１００】

用語「断片」とは、本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の一部を指す。「

断片」又は「生物学的に活性な部分」には、生物学的活性を保持するのに十分な数の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが含まれる（すなわち、ガイドＲＮＡ内に含まれる場合、配列特異的な方法でＲＧＮに結合し、標的ヌクレオチド配列に向ける）。「断片」又は「生物学的に活性な部分」には、生物学的活性を保持するのに十分な数の連続したアミノ酸残基を含むポリペプチドが含まれる（すなわち、ガイドＲＮＡと複合体化された場合、配列特異的な様式で標的ヌクレオチド配列に結合する）。ＲＧＮタンパク質の断片は、代替の下流開始部位の使用により、全長配列よりも短いものを含む。ＲＧＮタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、又は２３５の１０、２５、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０又はそれ以上の連続したアミノ酸残基を含むペプチドであり得る。このような生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製され得、配列特異的ＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合活性について評価され得る。ＣＲＩＳＰＲ反復配列の生物学的に活性な断片は、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７の少なくとも８個の連続アミノ酸を含むことができる。ＣＲＩＳＰＲ反復配列の生物学的に活性な部分は、例えば、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７の８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又は２０個の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであり得る。ｔｒａｃｒＲＮＡの生物学的に活性な部分は、例えば、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６の８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであり得る。

【０１０１】

一般に、「変異体」は、実質的に類似した配列を意味することを意図している。ポリヌクレオチドについては、改変体は、天然ポリヌクレオチド内の１つ以上の内部部位における１つ以上のヌクレオチドの欠失及び／又は付加、及び／又は天然ポリヌクレオチド内の１つ以上の部位における１つ以上のヌクレオチドの置換を含む。本明細書中で使用される場合、「天然」又は「野生型」ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、それぞれ、天然に存在するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を含む。ポリヌクレオチドについては、保存的変異体は、遺伝暗号の縮重のために、目的の遺伝子の天然アミノ酸配列をコードする配列を含む。これらのような天然に存在する対立遺伝子変異体は、周知の分子生物学的技術、例えば、以下に概説するようなポリメラーゼ連鎖反応及びハイブリダイゼーション技術を用いて同定することができる。変種ポリヌクレオチドはまた、例えば、部位特異的突然変異誘発を用いることによって生成されるが、依然として目的のポリペプチド又はポリヌクレオチドをコードするもののような、合成誘導ポリヌクレオチドを含む。一般に、本明細書に開示される特定のポリヌクレオチドの変異体は、本明細書の他の場所に記載されている配列アラインメントプログラム及びパラメーターによって決定される、その特定のポリヌクレオチドに対して少なくとも約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上の配列同一性を有する。

【０１０２】

本明細書に開示される特定のポリヌクレオチド（すなわち、参照ポリヌクレオチド）の変種は、変種ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドと参照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドとの間の％配列同一性の比較によって評価することもできる。任意の２つのポリペプチド間のパーセント配列同一性は、本明細書の他の箇所に記

載された配列アラインメントプログラム及びパラメーターを用いて計算することができる。本明細書に開示されるポリヌクレオチドの任意の所与の対が、それらがコードする２つのポリペプチドによって共有されるパーセント配列同一性の比較によって評価される場合、２つのコードされるポリペプチド間のパーセント配列同一性は、少なくとも約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上の配列同一性である。

【０１０３】

特定の実施形態では、現在開示されているポリヌクレオチドは、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、又は２３５のアミノ酸配列に対して、少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼポリヌクレオチドをコードする。

【０１０４】

本発明のＲＧＮポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、約１～１５個のアミノ酸残基、約１～１０個のアミノ酸残基、約６～１０個のアミノ酸、わずか５個のアミノ酸、わずか４個のアミノ酸、わずか３個のアミノ酸、わずか２個のアミノ酸、又はわずか１個のアミノ酸残基によって異なる。特定の実施形態では、ポリペプチドは、Ｎ末端又はＣ末端の切断を含むことができ、これは、ポリペプチドのＮ又はＣ末端のいずれかから、少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０アミノ酸又はそれ以上の欠失を含むことができる。

【０１０５】

特定の実施形態において、現在開示されているポリヌクレオチドは、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７として示されるヌクレオチド配列にして、少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はそれ以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲリピートを含むか又はコードする。

【０１０６】

現在開示されているポリヌクレオチドは、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６として示されるヌクレオチド配列に対して、少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はそれより大きな同一性を有するヌクレオチド配列を含むｔｒａｃｒＲＮＡを含むか又はコードすることができる。

【０１０７】

本発明のＣＲＩＳＰＲ反復又はｔｒａｃｒＲＮＡの生物学的に活性な変異体は、約１～１５ヌクレオチド、約１～１０、約６～１０、わずか５、わずか４、わずか３、わずか２、又はわずか１ヌクレオチドだけ異なることがある。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、５’又は３’切断を含むことができ、これは、ポリヌクレオチドの５’又は３’末端から少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０ヌクレオチド又はそれ以上の欠失を含むことができる。

【０１０８】

改変は、ＲＧＮポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲ反復、及び本明細書中に提供されるｔｒａｃｒＲＮＡに対してなされ得、改変タンパク質及びポリヌクレオチドを作製し得ることが認識される。ヒトによって設計された変化は、部位特異的突然変異誘発技術を適用することによって導入することができる。あるいは、本明細書に開示された配列に構造的及び／又は機能的に関連する天然、未知又は未同定のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドもまた、本発明の範囲内で同定することができる。保存的アミノ酸置換は、ＲＧＮタンパク質の機能を変化させない非保存領域で行われ得る。あるいは、ＲＧＮの活性を改善する改変を行ってもよい。

【０１０９】

変異型ポリヌクレオチド及びタンパク質はまた、ＤＮＡシャフリングのような変異原性及び組換え技術に由来する配列及びタンパク質を含む。そのような手順では、本明細書に開示される１つ又は複数の異なるＲＧＮタンパク質（例えば、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、又は２３５）を操作して、所望の特性を持つ新しいＲＧＮタンパク質を作成する。このようにして、組換えポリヌクレオチドのライブラリーは、実質的な配列同一性を有し、インビトロ又はインビボで相同的に組換えされ得る配列領域を含む関連配列ポリヌクレオチドの集団から生成される。例えば、この方法を用いて、目的のドメインをコードする配列モチーフを、本明細書中に提供されるＲＧＮ配列と他の既知のＲＧＮ遺伝子との間でシャッフルして、酵素の場合に増大したK_mのような改善された目的の特性を有するタンパク質をコードする新規遺伝子を得ることができる。このようなＤＮＡシャフリングのための戦略は、当該技術分野で公知である。Crameri et al. (1998) Nature 391:288-291; 米国特許第５，６０５，７９３号及び第５，８３７，４５８号を参照されたい。「シャフリングされた」核酸は、本明細書に記載される任意のシャフリング手順などのシャフリング手順によって生成される核酸である。シャッフルされた核酸は、２つ以上の核酸（又は特徴ストリング）を、例えば、人工的で、任意に再帰的な様式で、組換え（物理的又は事実上）することによって生成される。一般に、１以上のスクリーニング工程は、対象核酸を同定するためのシャッフリング工程に使用され；このスクリーニング工程は、任意の組換え工程の前後に行うことができる。いくつかの（全てではないが）シャフリング実施形態において、スクリーニングされるべきプールの多様性を増加させるために、選択の前に複数回の組換えを実施することが望ましい。組換えと選択の全体的な過程は、オプションとして再帰的に繰り返される。状況に応じて、シャフリングは、組換え及び選択の全体的なプロセスを指すことができ、あるいは、単に、全体的なプロセスの組換え部分を指すことができる。

【０１１０】

本明細書中で使用される場合、２つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」又は「同一性」は、指定された比較ウィンドウにわたって最大一致のために整列されたときに同じである２つの配列中の残基を参照する。配列同一性のパーセンテージがタンパク質に関して使用される場合、同一でない残基位置は、しばしば保存的アミノ酸置換によって異なることが認識され、ここで、アミノ酸残基は、類似の化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換され、従って、分子の機能的特性を変化させない。保存的置換において配列が異なる場合、パーセント配列同一性は、置換の保存的性質を補正するために上方に調節され得る。このような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」又は「類似性」を有するといわれる。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。典型的には、これは、完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとして保存的置換をスコア化することを含み、それによって、パーセンテージ配列同一性を増加させる。従って、例えば、同一のアミノ酸が１のスコアを与えられ、非保存的置換がゼロのスコアを与えられる場合、保存的置換はゼロと１の間のスコアを与えられる。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムＰＣ／ＧＥＮＥ（Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）で実施されたように計算される。

【０１１１】
本明細書で用いる場合、「配列同一性のパーセンテージ」とは、比較ウィンドウ上で２つの最適に整列された配列を比較することによって決定される値を意味し、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分は、２つの配列の最適な整列のための参照配列（付加又は欠失を含まない）と比較して、付加又は欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。パーセンテージは、両方の配列において同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が生じる位置の数を決定して、一致した位置の数を生じさせ、一致した位置の数を比較ウィンドウにおける位置の総数で割り、結果に１００を掛けて、配列同一性のパーセンテージを生じることによって計算される。
【０１１２】
特に明記しない限り、本明細書で提供される配列同一性／類似性値は、以下のパラメーターを用いてＧＡＰバージョン１０を用いて得られる値を指す：ＧＡＰ重量５０及び長さ重量３、及びｎｗｓｇａｐｄｎａ．ｃｍｐスコアリングマトリックスを用いたヌクレオチド配列についての％同一性及び％類似性；ＧＡＰ重量８及び長さ重量２を用いたアミノ酸配列についての％同一性及び％類似性；及びＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックス；又はそれらと同等のプログラム。「等価なプログラム」により、問題の２つの配列に対して、ＧＡＰバージョン１０によって生成された対応するアラインメントと比較した場合に、同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基マッチ及び同一のパーセントの配列同一性を有するアラインメントを生成する、任意の配列比較プログラムが意図される。
【０１１３】
２つの配列は、それらが、定義されたアミノ酸置換マトリックス（例えば、ＢＬＯＳＵＭ６２）、ギャップ存在ペナルティ及びギャップ延長ペナルティを用いて類似性スコアリングのために整列され、その配列のペアに対して可能な最高スコアに到達する場合、「最適に整列」される。アミノ酸置換マトリックス及び２つの配列間の類似性の定量におけるそれらの使用は、当技術分野で周知であり、例えば、Dayhoff et al. (1978) 「A model of evolutionary change in proteins」、In 「Atlas of Protein Sequence and Structure」、Vol. 5, Suppl. 3 (ed. M. O. Dayhoff), pp. 345-352. Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C. and Henikoff et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-1091に記載されている。ＢＬＯＳＵＭ６２マトリックスは、シークエンスアラインメントプロトコルにおけるデフォルトのスコアリング置換マトリックスとしてしばしば使用される。ギャップ存在ペナルティは、整列した配列の１つに単一のアミノ酸ギャップを導入するために課され、ギャップ延長ペナルティは、すでに開いているギャップに挿入された追加の空のアミノ酸位置に対して課される。アラインメントは、アラインメントが開始され、終了する各配列のアミノ酸位置によって定義され、任意選択的に、片方又は両方の配列にギャップ又は複数のギャップを挿入することによって定義され、可能な限り最高のスコアに到達する。最適なアライメント及びスコアリングは手動で行うことができるが、このプロセスは、例えば、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に開示され、National Center for Biotechnology Information Website (www.ncbi.nlm.nih.gov)にて公衆に利用可能なギャップ付きＢＬＡＳＴ　２．０のようなコンピュータに実装されたアライメントアルゴリズムの使用によって容易になる。マルチプルアラインメントを含む最適なアラインメントは、例えば、ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖを介して入手可能であり、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402によって記載されたＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを用いて調製することができる。
【０１１４】
基準配列と最適に整列されたアミノ酸配列に関して、アミノ酸残基は、整列において残基が対合される基準配列中の位置に「対応する」。「位置」は、Ｎ末端に対するその位置に基づいて、参照配列中の各アミノ酸を連続的に同定する番号で示される。最適なアラインメントを決定する際に考慮しなければならない欠失、挿入、切断、融合などのために、一般に、Ｎ末端から単に数えることによって決定される試験シークエンス中のアミノ酸残

基数は、必ずしも参照シークエンス中のその対応する位置の数と同じではないであろう。例えば、整列した試験配列中に欠失がある場合、欠失部位における基準配列中の位置に対応するアミノ酸は存在しないであろう。整列した参照配列中に挿入がある場合、その挿入は、参照配列中の任意のアミノ酸位置に対応しない。切断又は融合の場合、対応する配列中のいずれのアミノ酸にも対応しない、参照配列又は整列配列中のアミノ酸のストレッチが存在し得る。

【０１１５】

Ｖ．抗体

本発明のＲＧＮポリペプチドを含むＲＧＮポリペプチド又はリボヌクレオプロテインに対する抗体（配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７、あるいはそれらの活性変異体又は断片）も含まれる。抗体を産生する方法は、当該分野で周知である（例えば、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; 及び米国特許第４，１９６，２６５号を参照されたい）。これらの抗体は、ＲＧＮポリペプチド又はリボ核タンパク質の検出及び単離のためのキットに使用することができる。したがって、本開示は、例えば、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７の配列を有するポリペプチドを含む、本明細書に記載のポリペプチド又はリボヌクレオタンパク質に特異的に結合する抗体を含むキットを提供する。

【０１１６】

ＶＩ．目的の配列に結合する系及びリボ核タンパク質複合体並びにそれらを合成する方法

本開示は、対象の標的配列を結合するためのシステムを提供し、ここで、該システムは、同じものをコードする少なくとも１つのガイドＲＮＡ又はヌクレオチド配列、及び同じものをコードする少なくとも１つのＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はヌクレオチド配列を含む。ガイドＲＮＡは、目的の標的配列にハイブリダイズし、ＲＧＮポリペプチドと複合体を形成し、それによってＲＧＮポリペプチドを標的配列に結合させる。これらの実施形態のいくつかにおいて、ＲＧＮは、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、もしく２３５、又はそれらの活性変異体又は断片を含む。様々な実施形態において、ガイドＲＮＡは、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、若しくは２８７を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列、又はその活性変異体若しくは断片のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６のヌクレオチド配列を含むｔｒａｃｒＲＮＡ、又はその活性変異体若しくは断片を含む。システムのガイドＲＮＡは、単一ガイドＲＮＡ又は二重ガイドＲＮＡであってもよい。特定の実施形態では、システムは、ガイドＲＮＡに対して異種性であるＲＮＡガイドヌクレアーゼを含み、ここで、ＲＧＮ及びガイドＲＮＡは天然に複合体化されていない。

【０１１７】

本明細書に提供される目的の標的配列を結合するためのシステムは、少なくとも１つのタンパク質に結合したＲＮＡの少なくとも１つの分子であるリボ核タンパク質複合体であり得る。本明細書に提供されるリボ核タンパク質複合体は、ＲＮＡ成分としての少なくとも１つのガイドＲＮＡ、及びタンパク質成分としてのＲＮＡガイドヌクレアーゼを含む。このようなリボ核タンパク質複合体は、ＲＧＮポリペプチドを天然に発現し、目的の標的配列に特異的な特定のガイドＲＮＡを発現するように操作された細胞又は生物から精製することができる。あるいは、リボ核タンパク質複合体は、ＲＧＮポリペプチド及びガイドＲＮＡをコードするポリヌクレオチドで形質転換され、ＲＧＮポリペプチドの発現及びガイドＲＮＡを可能にする条件下で培養された細胞又は生物から精製することができる。したがって、ＲＧＮポリペプチド又はＲＧＮリボ核タンパク質複合体を作製するための方法が提供される。そのような方法は、ＲＧＮポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を

含む細胞、及びいくつかの実施形態では、ＲＧＮポリペプチド（及びいくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ）が発現される条件下で、ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む細胞を培養することを含む。次に、ＲＧＮポリペプチド又はＲＧＮリボ核タンパク質を、培養細胞の溶解物から精製することができる。

【０１１８】

生物学的試料の溶解物からＲＧＮポリペプチド又はＲＧＮリボ核タンパク質複合体を精製する方法は、当該分野で公知である（例えば、サイズ排除及び／又はアフィニティークロマトグラフィー、２Ｄ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ、逆相クロマトグラフィー、免疫沈降）。特定の方法では、ＲＧＮポリペプチドは組換え的に産生され、その精製を助けるための精製タグを含み、これには、限定されないが、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）、タンデムアフィニティー精製（ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、Ｅ２、ＦＬＡＧ、ＨＡ、ｎｕｓ、Ｓｏｆｔａｇ １、Ｓｏｆｔａｇ ３、Ｓｔｒｅｐ、ＳＢＰ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、ＨＳＶ、ＫＴ３、Ｓ、Ｓ１、Ｔ７、Ｖ５、ＶＳＶ－Ｇ、６ｘＨｉｓ、１０ｘＨｉｓ、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（ＢＣＣＰ）、及びカルモジュリンが含まれる。一般に、標識ＲＧＮポリペプチド又はＲＧＮリボ核タンパク質複合体は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製される。他の形態のクロマトグラフィー又は例えば免疫沈降を含めて、当技術分野で公知の他の同様の方法を単独で又は組み合わせて使用することができることが理解されるであろう。

【０１１９】

「単離された」又は「精製された」ポリペプチド、又はその生物学的に活性な部分は、その天然環境において見出されるように、ポリペプチドに通常付随する、又はポリペプチドと相互作用する成分を実質的に又は本質的に含まない。かくして、単離された又は精製されたポリペプチドは、組換え技術により生産される場合には、他の細胞材料、又は培養培地を実質的に含まず、又は化学的に合成される場合には、化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない。細胞物質を実質的に含まないタンパク質は、約３０％、２０％、１０％、５％、又は１％（乾燥重量）未満の汚染タンパク質を有するタンパク質の調製物を含む。本発明のタンパク質又はその生物学的に活性な部分が組換え的に産生される場合、最適な培養培地は、化学的前駆体又は目的の非タンパク質化学物質の約３０％、２０％、１０％、５％又は１％（乾燥重量）未満を表す。

【０１２０】

目的の標的配列を結合及び／又は切断するための本明細書に提供される特定の方法は、インビトロで組み立てられたＲＧＮリボ核タンパク質複合体の使用を含む。ＲＧＮリボ核タンパク質複合体のインビトロアセンブリは、ＲＧＮポリペプチドがガイドＲＮＡに結合することを可能にする条件下で、ＲＧＮポリペプチドをガイドＲＮＡと接触させる当技術分野で公知の任意の方法を用いて行うことができる。本明細書で使用する場合、「接触」、「接触」、「接触」とは、所望の反応を実施するのに適した条件下で所望の反応の成分を一緒に置くことを指す。ＲＧＮポリペプチドは、生体試料、細胞溶解物、又は培養培地から精製することができ、インビトロ翻訳によって産生され、又は化学的に合成することができる。ガイドＲＮＡは、生体試料、細胞溶解物、又は培養培地から精製され、インビトロで転写され、又は化学的に合成され得る。ＲＧＮポリペプチド及びガイドＲＮＡは、ＲＧＮリボ核タンパク質複合体のインビトロアセンブリを可能にするために、溶液（例えば、緩衝生理食塩水溶液）中で接触させることができる。

【０１２１】

ＶＩＩ．標的配列の結合、除去又は変更の方法

本開示は、目的の標的ヌクレオチド配列を結合、切断、及び／又は修飾するための方法を提供する。この方法は、同じものをコードする少なくとも１つのガイドＲＮＡ又はポリヌクレオチド、及び同じものをコードする少なくとも１つのＲＧＮポリペプチド又はポリヌクレオチドを含むシステムを、標的配列、又は標的配列を含む細胞、細胞小器官、又は

胚に送達することを含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、ＲＧＮは、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、又は２３５のアミノ酸配列、又はその活性変異体若しくは断片を含む。様々な実施形態において、ガイドＲＮＡは、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７のヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列、又はその活性変異体若しくは断片を含む。特定の実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６のヌクレオチド配列を含むｔｒａｃｒＲＮＡ、又はその活性変異体若しくは断片を含む。システムのガイドＲＮＡは、単一ガイドＲＮＡ又は二重ガイドＲＮＡであってもよい。システムのＲＧＮは、ヌクレアーゼ死ＲＧＮであってもよく、ニッカーゼ活性を有していてもよく、又は融合ポリペプチドであってもよい。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、塩基編集ポリペプチド、例えば、シチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼを含む。他の実施形態では、ＲＧＮ融合タンパク質は逆転写酵素を含む。他の実施形態では、ＲＧＮ融合タンパク質は、全体が参照により本明細書に援用される、２０２０年１月２７日に出願された米国仮出願６２／９６６，２０３に記載されているように、ヌクレオチド除去修復（ＮＥＲ）又は転写共役ヌクレオチド除去修復（ＴＣ－ＮＥＲ）経路（Wei et al., 2015, PNAS USA 112(27):E3495-504 ; Troelstra et al., 1992, Cell 71:939-953; Marnef et al., 2017, J Mol Biol 429(9):1277-1288）のメンバーなどの機能性核酸修復複合体のメンバーを救出するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、ＲＧＮ融合タンパク質は、ＣＳＢ（van den Boom et al., 2004, J Cell Biol 166(1):27-36; van Gool et al., 1997, EMBO J 16(19):5955-65；その例は配列番号２６８として示される）（これはＴＣ－ＮＥＲ（ヌクレオチド除去修復）経路であり、他のメンバーの救出として機能する）を含む。さらなる実施形態において、ＲＮＡＧＮＡＢＰ融合タンパク質は、配列番号２６８のアミノ酸残基３５６～３９４含むＣＳＢの酸性ドメインなどのＣＳＢの活性ドメインを含む（Teng et al., 2018, Nat Commun 9(1):4115）。

【０１２２】

特定の実施形態では、ＲＧＮ及び／又はガイドＲＮＡは、ＲＧＮ及び／又はガイドＲＮＡ（又はＲＧＮ及びガイドＲＮＡの少なくとも１つをコードするポリヌクレオチド）が導入される細胞、細胞小器官、又は胚に対して異種性である。

【０１２３】

本方法がガイドＲＮＡ及び／又はＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを送達することを含む実施形態では、次に、細胞又は胚を、ガイドＲＮＡ及び／又はＲＧＮポリペプチドが発現される条件下で培養することができる。様々な態様において、本方法は、標的配列をＲＧＮリボ核タンパク質複合体と接触させることを含む。ＲＧＮリボ核タンパク質複合体は、ヌクレアーゼが死んでいるか、又はニッカーゼ活性を有するＲＧＮを含み得る。いくつかの実施形態において、リボ核タンパク質複合体のＲＧＮは、塩基編集ポリペプチドを含む融合ポリペプチドである。ある態様において、本方法は、標的配列を含む細胞、細胞小器官、又は胚にＲＧＮリボ核タンパク質複合体を導入することを含む。ＲＧＮリボ核タンパク質複合体は、生物学的試料から精製されたもの、組換え的に製造され、その後精製されたもの、又は本明細書に記載されるようにインビトロで組み立てられたものであり得る。標的配列、細胞小器官、又は胚と接触するＲＧＮリボ核タンパク質複合体がインビトロで組み立てられている実施形態では、この方法は、標的配列、細胞、細胞小器官、又は胚と接触する前に、複合体のインビトロアセンブリをさらに含むことができる。

【０１２４】

精製された又はインビトロで組み立てられたＲＧＮリボ核タンパク質複合体は、限定されるものではないが、エレクトロポレーションを含む、当技術分野で公知の任意の方法を用いて、細胞、細胞小器官、又は胚に導入することができる。あるいは、ガイドＲＮＡを

コードする、又はそれを含むＲＧＮポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを、当該技術分野で公知の任意の方法（例えば、エレクトロポレーション）を用いて、細胞、細胞小器官、又は胚に導入することができる。

【０１２５】

標的配列、細胞、細胞小器官、又は標的配列を含む胚への送達又は接触に際して、ガイドＲＮＡは、配列特異的な様式で標的配列に結合するようにＲＧＮに指示する。ＲＧＮがヌクレアーゼ活性を有する態様において、ＲＧＮポリペプチドは、結合時に目的の標的配列を切断する。その後、標的配列は、非相同末端結合、又は提供されたドナーポリヌクレオチドによる相同修復などの内因性修復機構を介して修飾され得る。

【０１２６】

ＲＧＮポリペプチドの標的配列への結合を測定する方法は当技術分野で公知であり、クロマチン免疫沈降アッセイ、ゲル移動度シフトアッセイ、ＤＮＡプルダウンアッセイ、レポーターアッセイ、マイクロプレート捕獲及び検出アッセイを含む。同様に、標的配列の切断又は修飾を測定する方法は当該分野で公知であり、分解産物の検出を容易にするために、適切な標識（例えば、放射性同位体、蛍光物質）の標的配列への付着の有無にかかわらず、ＰＣＲ、配列決定、又はゲル電気泳動を用いて切断が確認されるインビトロ又はインビボ切断アッセイを含む。あるいは、ニッキング誘発指数増幅反応（ＮＴＥＸＰＡＲ）アッセイを用いることができる（例えば、Zhang et al. (2016) Chem. Sci. 7:4951-4957を参照されたい）。インビボ切断は、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイ（Guschin et al. (2010) Methods Mol Biol 649:247-256）を用いて評価することができる。

【０１２７】

いくつかの態様において、本方法は、２つ以上のガイドＲＮＡと複合体化された単一タイプのＲＧＮの使用を含む。複数のガイドＲＮＡは、１つの遺伝子の異なる領域を標的とすることも、複数の遺伝子を標的とすることもできる。

【０１２８】

ドナーポリヌクレオチドが提供されない実施形態では、ＲＧＮポリペプチドによって導入された二本鎖切断は、非相同末端連結（ＮＨＥＪ）修復プロセスによって修復され得る。ＮＨＥＪの誤りを起こしやすい性質のために、二本鎖切断の修復は標的配列の修飾をもたらすことができる。本明細書中で使用される「修飾」とは、核酸分子に関する「修飾」とは、１以上のヌクレオチドの欠失、挿入、又は置換、又はそれらの組み合わせであり得る、核酸分子のヌクレオチド配列の変化を指す。標的配列の修飾は、改変されたタンパク質産物の発現又はコード配列の不活性化をもたらすことができる。

【０１２９】

ドナーポリヌクレオチドが存在する実施形態では、導入された二本鎖切断の修復の過程において、ドナーポリヌクレオチド中のドナー配列を標的ヌクレオチド配列に組み込むか、又は交換することができ、その結果、外因性ドナー配列が導入される。従って、ドナーポリヌクレオチドは、目的の標的配列に導入されることが望ましいドナー配列を含む。いくつかの実施形態において、ドナー配列は、新たに組み込まれたドナー配列がＲＧＮによって認識され、切断されないように、元の標的ヌクレオチド配列を改変する。ドナー配列の統合は、標的ヌクレオチド配列に隣接する配列と実質的な配列同一性を有するフランキング配列のドナーポリヌクレオチド内に包含することによって増強され得、相同性指向修復プロセスを可能にする。ＲＧＮポリペプチドが二本鎖ねじれ切断を導入する実施形態において、ドナーポリヌクレオチドは、適合性オーバーハングに隣接するドナー配列を含み、二本鎖切断の修復中に、非相同修復プロセスによるオーバーハングを含む切断された標的ヌクレオチド配列へのドナー配列の直接連結を可能にする。

【０１３０】

本方法がニッカーゼである（すなわち、二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖を切断することができるのみである）ＲＧＮの使用を含む実施形態において、本方法は、同一の又は重複する標的配列を標的とし、ポリヌクレオチドの異なる鎖を切断する２つのＲＧＮニッカーゼを導入することを含むことができる。例えば、二本鎖ポリヌクレオチドの正（＋）鎖

のみを切断するＲＧＮニッカーゼを、二本鎖ポリヌクレオチドの負（－）鎖のみを切断する第二のＲＧＮニッカーゼと共に導入することができる。

【０１３１】

様々な実施形態では、標的ヌクレオチド配列を結合させ、標的配列を検出するための方法が提供され、この方法は、同じものをコードする少なくとも１つのガイドＲＮＡ又はポリヌクレオチド、及び（コード配列が導入される場合）ガイドＲＮＡ及び／又はＲＧＮポリペプチドを発現する少なくとも１つのＲＧＮポリペプチドを、細胞、細胞小器官、又は胚に導入することを含み、ここで、ＲＧＮポリペプチドはヌクレアーゼ不活性ＲＧＮであり、検出可能な標識をさらに含む。検出可能な標識は、融合タンパク質（例えば、蛍光タンパク質）としてＲＧＮに融合され得るか、又は視覚的に又は他の手段によって検出され得るＲＧＮポリペプチドにコンジュゲートされ得るか、又はＲＧＮポリペプチド内に組み込まれた小分子であり得る。

【０１３２】

また、標的配列の調節下で標的配列又は対象遺伝子の発現を調節するための方法も本明細書中に提供される。方法は、細胞、細胞小器官、又は胚に、同じものをコードする少なくとも１つのガイドＲＮＡ又はポリヌクレオチド、及び（コード配列が導入された場合）ガイドＲＮＡ及び／又はＲＧＮポリペプチドを発現する、同じものをコードする少なくとも１つのＲＧＮポリペプチド又はポリヌクレオチドを導入することを含み、ここで、ＲＧＮポリペプチドはヌクレアーゼ死ＲＧＮである。これらの実施形態のいくつかにおいて、ヌクレアーゼ死ＲＧＮは、本明細書に記載される発現モジュレータードメイン（すなわち、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン又は転写リプレッサードメイン）を含む融合タンパク質である。

【０１３３】

本開示はまた、目的の標的ヌクレオチド配列を結合及び／又は修飾する方法を提供する。本方法は、少なくとも１つのガイドＲＮＡ又はそれをコードするポリヌクレオチドを含み、少なくとも１つの融合ポリペプチドは、本発明のＲＧＮ及び塩基編集ポリペプチド、例えば、シチジンデアミナーゼ若しくはアデノシンデアミナーゼ、又は融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むシステムを、標的配列、又は標的配列を含む細胞、細胞小器官、若しくは胚に送達することを含む。

【０１３４】

当業者であれば、現在開示されている方法のいずれかを使用して、単一の標的配列又は複数の標的配列を標的とすることができることを理解するであろう。したがって、方法は、単一の遺伝子及び／又は複数の遺伝子内の複数の異なる配列を標的とすることができる、複数の別個のガイドＲＮＡと組み合わせた単一のＲＧＮポリペプチドの使用を含む。また、本明細書には、複数の異なるガイドＲＮＡが、複数の異なるＲＧＮポリペプチドと組み合わせて導入される方法も包含される。これらのガイドＲＮＡ及びガイドＲＮＡ／ＲＧＮポリペプチド系は、単一の遺伝子及び／又は複数の遺伝子内の複数の異なる配列を標的とすることができる。

【０１３５】

１つの態様において、本発明は、上記の方法及び組成物において開示された要素のいずれか１つ以上を含むキットを提供する。いくつかの態様において、キットは、ベクターシステム及びキットを使用するための命令を含む。いくつかの実施形態において、ベクターシステムは、（ａ）ｃｒＲＮＡ配列をコードするＤＮＡ配列に機能し得るように連結された第１の調節エレメント、及びコードされたｃｒＲＮＡ配列の上流にガイド配列を挿入するための１つ以上の挿入部位を含み、発現された場合、前記ガイド配列は、真核細胞において、ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を標的配列に向け、前記ＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記ガイドＲＮＡポリヌクレオチドと複合体化されたＣＲＩＳＰＲ酵素を含む；及び／又は（ｂ）核局在化配列を含む前記ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素をコードする酵素に要素は、個別に、又は組み合わせて提供することができ、バイアル、ボトル、又はチューブなどの任意の適切な容器に提供することができる。

【０１３６】
いくつかの実施態様において、キットは、１以上の言語での指示を含む。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載される１以上の要素を利用するプロセスにおいて使用するための１以上の試薬を含む。試薬は、任意の適切な容器に入れて提供することができる。例えば、キットは、１つ以上の反応又は貯蔵バッファーを提供することができる。試薬は、特定のアッセイにおいて使用可能な形態で、又は使用前に１つ以上の他の成分の追加を必要とする形態（例えば、濃縮又は凍結乾燥形態）で提供することができる。緩衝液は、限定されるものではないが、炭酸ナトリウム緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、ＭＯＰＳ緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液、及びそれらの組み合わせを含む任意の緩衝液とすることができる。いくつかの態様において、緩衝液はアルカリ性である。いくつかの態様において、緩衝液は、約７～約１０のｐＨを有する。
【０１３７】
いくつかの態様において、キットは、ガイド配列及び調節エレメントを操作可能に連結するように、ベクターへの挿入のためのガイド配列に対応する１つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、キットは、相同組換え鋳型ポリヌクレオチドを含む。一態様では、本発明は、ＣＲＩＳＰＲシステムの１つ以上の要素を使用する方法を提供する。本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチドを修飾するための有効な手段を提供する。本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、移動、不活性化、活性化、塩基編集）を含む広範な有用性を有する。従って、本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、例えば、遺伝子治療、薬物スクリーニング、疾患診断、及び予後における広範な用途を有する。例示的なＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズしたガイド配列と複合体化されたＣＲＩＳＰＲ酵素を含む。
【０１３８】
ＶＩＩＩ．標的ポリヌクレオチド
１つの態様において、本発明は、真核細胞における標的ポリヌクレオチドを修飾する方法を提供し、それはインビボ、エクスビボ又はインビトロであり得る。ある態様において、本方法は、ヒト又は非ヒト動物又は植物（微細藻類を含む）由来の細胞又は細胞集団をサンプリングし、細胞又は細胞を改変することを含む。培養は、エクスビボのいずれの段階でも起こりうる。細胞又は細胞は、非ヒト動物又は植物（微細藻類を含む）に再導入され得る。
【０１３９】
植物育種家は、自然の多様性を利用して、収量、品質、均一性、耐性、有害生物に対する耐性などの望ましい性質のために最も有用な遺伝子を組み合わせている。これらの望ましい品質には、成長、日長の好み、温度要件、花又は生殖の発達の開始日、脂肪酸含有量、昆虫抵抗性、耐病性、線虫抵抗性、真菌抵抗性、除草剤抵抗性、干ばつ、熱、湿気、寒さ、風、及び高塩分を含む不利な土壌条件を含むさまざまな環境要因に対する耐性も含まれる。これらの有用な遺伝子の供給源には、在来又は外来の品種、家宝の品種、野生植物の近縁種、及び誘発された突然変異、例えば、植物材料を突然変異誘発剤で処理することが含まれる。本発明を用いて、植物育種家には、突然変異を誘発するための新しいツールが提供される。従って、当業者は、有用な遺伝子の供給源についてゲノムを分析することができ、また所望の特性又は形質を有する品種において、有用な遺伝子の増加を誘導するために本発明を使用し、これまでの変異原性物質よりも精度が高く、従って、植物育種プログラムを加速し、改善することができる。
【０１４０】
ＲＧＮ系の標的ポリヌクレオチドは、真核細胞に対して内因性又は外因性の任意のポリヌクレオチドであり得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、真核細胞の核内に存在するポリヌクレオチドであり得る。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列、又は非コード配列（例えば、調節ポリヌクレオチド又はジャンクＤＮＡ）であり得る。理論に拘束されることを望まないが、標的配列は、ＰＡＭ（プロト

スペーサー隣接モチーフ）、すなわち、ＣＲＩＳＰＲ複合体によって認識される短い配列と結合すべきであると考えられる。ＰＡＭの正確な配列及び長さの必要条件は、使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素によって異なるが、ＰＡＭは、典型的には、プロトスペーサー（すなわち、標的配列）に隣接する２～５塩基対配列である。

【０１４１】

ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドは、多数の疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチド、ならびにシグナル伝達生化学経路関連遺伝子及びポリヌクレオチドを含み得る。標的ポリヌクレオチドの例には、シグナル伝達生化学経路に関連する配列、例えば、シグナル伝達生化学経路関連遺伝子又はポリヌクレオチドが含まれる。標的ポリヌクレオチドの例には、疾患関連遺伝子又はポリヌクレオチドが含まれる。「疾患関連」遺伝子又はポリヌクレオチドは、非疾患対照の組織又は細胞と比較して、疾患に罹患した組織に由来する細胞において異常なレベル又は異常な形態で転写又は翻訳産物を産生している任意の遺伝子又はポリヌクレオチドを指す。これは、異常に高いレベルで発現するようになる遺伝子であってもよく、異常に低いレベルで発現するようになる遺伝子であってもよく、その発現の変化は、疾患の発生及び／又は進行と相関する。疾患関連遺伝子とはまた、疾患の病因（例えば、因果突然変異）に関与する遺伝子と直接的に関与する、又は連鎖不均衡にある突然変異又は遺伝的変異を有する遺伝子を指す。転写又は翻訳された産物は、既知又は未知であってもよく、さらに、正常レベル又は異常レベルであってもよい。疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチドの例は、McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) 及びNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.) (the World Wide Webで利用可能）から利用可能である。

【０１４２】

ＣＲＩＳＰＲシステムは、関心のあるゲノム配列を標的とする際の比較的容易さのために特に有用であるが、原因となる突然変異に対処するためにＲＧＮが何をすることができるかという問題は依然として残っている。１つのアプローチは、ＲＧＮ（好ましくは、ＲＧＮの不活性又はニッカーゼ変異体）と、塩基編集酵素又はシチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼ塩基編集のような塩基編集酵素の活性ドメインとの間の融合タンパク質を生成することである（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，８４０，６９９号）。いくつかの実施形態において、本方法は、（ａ）本発明のＲＧＮ及びデアミナーゼのような塩基編集ポリペプチドを含む融合タンパク質と、（ｂ）（ａ）の融合タンパク質を標的とするｇＲＮＡと、ＤＮＡ鎖の標的ヌクレオチド配列とを接触させることを含み、ここで、ＤＮＡ分子は、ヌクレオチド塩基の脱アミノに適した量及び条件下で、融合タンパク質及びｇＲＮＡと接触される。ある態様において、標的ＤＮＡ配列は、疾患又は障害に関連する配列を含み、ヌクレオチド塩基の脱アミノ化は、疾患又は障害に関連しない配列をもたらす。いくつかの実施態様において、標的ＤＮＡ配列は、作物植物の対立遺伝子に存在し、ここで、対象となる形質の特定の対立遺伝子は、農業学的価値の低い植物をもたらす。ヌクレオチド塩基の脱アミノ化は、形質を改善し、植物の農業的価値を増大させる対立遺伝子をもたらす。

【０１４３】

ある態様において、ＤＮＡ配列は、疾患又は障害に関連するＴ→Ｃ又はＡ→Ｇ点突然変異を含み、突然変異体Ｃ又はＧ塩基の脱アミノ化は、疾患又は障害に関連しない配列をもたらす。いくつかの実施形態において、脱アミノ化は、疾患又は障害に関連する配列における点突然変異を修正する。

【０１４４】

ある態様において、疾患又は障害に関連する配列は、タンパク質をコードし、ここで、脱アミノ化は、疾患又は障害に関連する配列に終止コドンを導入し、コードされたタンパク質の切断をもたらす。いくつかの態様において、接触は、疾患又は障害を有する、有する、又はそれと診断されやすい対象において、インビボで実施される。ある態様において、疾患又は障害は、ゲノムにおける点突然変異又は単一塩基突然変異に関連する疾患であ

る。ある態様において、疾患は、遺伝性疾患、がん、代謝性疾患、又はリソソーム蓄積疾患である。

【０１４５】

塩基編集を用いた原因突然変異の修飾

本発明のＲＧＮ－塩基編集融合タンパク質に依存するアプローチを用いて是正することができる遺伝的に遺伝した疾患の例は、Ｈｕｒｌｅｒ症候群である。ＭＰＳ－１としても知られるハンラー症候群は、α－Ｌ－イズロニダーゼ（ＩＤＵＡ）の欠損の結果、リソソームにデルマタン硫酸とヘパラン硫酸が蓄積することによって分子レベルで特徴づけられるリソソーム蓄積症を引き起こす。この疾患は一般に、α－Ｌ－イズロニダーゼをコードするＩＤＵＡ遺伝子の突然変異によって引き起こされる遺伝性疾患である。一般的なＩＤＵＡ突然変異はＷ４０２Ｘ及びＱ７０Ｘであり、いずれもナンセンス突然変異であり、翻訳の早期終結をもたらす。このような突然変異は、正確なゲノム編集（ＰＧＥ）アプローチによって十分に対処される。なぜなら、一塩基の復帰、例えば、塩基編集アプローチによって、野生型コード配列が復元され、その結果、遺伝子座の内因性調節メカニズムによって制御されるタンパク質発現がもたらされるからである。さらに、ヘテロ接合体は無症候性であることが知られているため、これらの突然変異の１つを標的とするＰＧＥ療法は、突然変異した対立遺伝子の１つのみを是正する必要があるため、この疾患患者の大部分に有用であろう（参照により本明細書に援用される、Bunge et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3(6): 861-866）。

【０１４６】

Ｈｕｒｌｅｒ症候群の現在の治療法には、酵素補充療法及び骨髄移植がある（参照により本明細書に援用される、Vellodi et al. (1997) Arch. Dis. Child. 76(2): 92-99; Peters et al. (1998) Blood 91(7): 2601-2608）。酵素補充療法は、Ｈｕｒｌｅｒ症候群患者の生存及び生活の質に劇的な影響を及ぼしてきたが、このアプローチには、高価で時間のかかる週１回の注入が必要である。さらなるアプローチには、発現ベクター上のＩＤＵＡ遺伝子の送達、又は血清アルブミン（米国特許第９，９５６，２４７号（参照により本明細書に組み込まれる））のような高度に発現された遺伝子座への遺伝子の挿入が含まれる。しかし、これらのアプローチでは、元のＩＤＵＡ遺伝子座を正しいコード配列に復元することはできない。ゲノム編集戦略には、多くの利点があるだろう。特に、遺伝子発現の調節は健康な個体に存在する自然のメカニズムによって制御されるだろう。さらに、塩基編集を用いると、二本鎖ＤＮＡ切断を引き起こす必要はなく、腫瘍抑制メカニズムの破壊により、大きな染色体再編成、細胞死、又は発がん性を引き起こす可能性がある。一般的な戦略は、本発明のＲＧＮ－塩基編集融合タンパク質を用いて、ヒトゲノム中の特定の疾患を引き起こす突然変異を標的とし、修正することに向けられ得る。塩基編集によって是正され得る標的疾患に対する同様のアプローチもまた追求され得ることが理解されるであろう。他の種、特に一般的な家庭ペット又は家畜における疾患を引き起こす突然変異を標的とする同様のアプローチもまた、本発明のＲＧＮを用いて配備することができることがさらに認識されるであろう。一般的な家庭のペット及び家畜には、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジ、トリ、ロバ、ヘビ、フェレット、サーモンなどの魚、及びエビが含まれる。

【０１４７】

標的欠失による原因突然変異の修飾

本発明のＲＧＮはまた、原因突然変異がより複雑であるヒトの治療アプローチにおいても有用であり得る。例えば、Ｆｒｉｅｄｒｅｉｃｈ運動失調症やＨｕｎｔｉｎｇｔｏｎ病のようないくつかの疾患は、遺伝子の特定の領域における３ヌクレオチドモチーフの反復が有意に増加し、発現されたタンパク質の機能又は発現能力に影響を与える結果である。Ｆｒｉｅｄｒｅｉｃｈ運動失調（ＦＲＤＡ）は、脊髄の神経組織の進行性変性をもたらす常染色体劣性疾患である。ミトコンドリアのフラタキシン（ＦＸＮ）タンパク質レベルの低下は、細胞レベルで酸化的損傷と鉄欠乏を引き起こす。ＦＸＮ発現の減少は、体細胞及び生殖細胞系ＦＸＮ遺伝子のイントロン１内のＧＡＡトリプレットの拡大と関連付けられ

ている。ＦＲＤＡ患者では、ＧＡＡ反復は７０を超えることが多く、ときには１０００を超える（最も一般的には６００～９００）トリプレットからなるが、非罹患者では約４０反復以下である（すべてが参照により本明細書に援用される、Pandolfo et al. (2012) Handbook of Clinical Neurology 103: 275-294; Campuzano et al. (1996) Science 271: 1423-1427; Pandolfo (2002) Adv. Exp. Med. Biol. 516: 99-118）。

【０１４８】

Ｆｒｉｅｄｒｅｉｃｈ運動失調（ＦＲＤＡ）を引き起こす３塩基反復配列の拡大は、ＦＲＤＡ不安定領域と呼ばれるＦＸＮ遺伝子内の特定の遺伝子座で起こる。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）は、ＦＲＤＡ患者細胞における不安定領域を切除するために使用され得る。このアプローチは、１）ヒトゲノム中の対立遺伝子を標的とするようにプログラムされ得るＲＧＮ及びガイドＲＮＡ配列；及び２）ＲＧＮ及びガイド配列の送達アプローチを必要とする。ゲノム編集に使用される多くのヌクレアーゼ、例えばＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来の一般的に使用されるＣａｓ９ヌクレアーゼ（ＳｐＣａｓ９）は、大きすぎて、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターにパッケージすることができない。これは、ＳｐＣａｓ９を使用するアプローチをより困難にする。

【０１４９】

本発明のある種のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ガイドＲＮＡと共にＡＡＶベクターにパッケージングするのに適している。２つのガイドＲＮＡを詰め込むには第２のベクターが必要であろうが、このアプローチは、ＳｐＣａｓ９のようなより大きなヌクレアーゼで必要とされるものと比較して有利である。ＳｐＣａｓ９は、２つのベクターの間でタンパク質配列を分割することを必要とする可能性がある。本発明は、ゲノム不安定性の領域が除去される本発明のＲＧＮを使用する戦略を包含する。このような戦略は、ハンチントン病のような類似の遺伝的基礎を有する他の疾患及び疾患にも適用可能である。本発明のＲＧＮを使用する同様の戦略は、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジ、トリ、ロバ、ヘビ、フェレット、サーモンなどの魚、及びエビを含む、農業上又は経済的に重要な非ヒト動物における同様の疾患及び障害にも適用可能である。

【０１５０】

標的突然変異誘発による原因突然変異の修飾

本発明のＲＧＮは、有益な効果をもたらす破壊的突然変異を導入することもできる。ヘモグロビンをコードする遺伝子、特にβグロビン鎖（ＨＢＢ遺伝子）の遺伝的欠損は、鎌状赤血球貧血やサラセミアなど、異常ヘモグロビン症として知られる多くの疾患の原因となりうる。

【０１５１】

成人のヒトでは、ヘモグロビンは２つのアルファ（α）様グロビン鎖と２つのベータ（β）様グロビン鎖と４つのヘム基からなるヘテロ四量体である。成人では、α２β２四量体はヘモグロビンＡ（ＨｂＡ）又は成人ヘモグロビンと呼ばれる。典型的には、α及びβグロビン鎖は、約１：１の比率で合成され、この比率は、ヘモグロビン及び赤血球（ＲＢＣ）の安定化に関して重要であると思われる。発育中の胎児では、ヘモグロビンの別の形である胎児ヘモグロビン（ＨｂＦ）が産生され、ヘモグロビンＡよりも酸素に対する結合親和性が高く、母親の血流を介して酸素を胎児の体系に送達することができる。胎児のヘモグロビンは２本のαグロビン鎖も含むが、成人のβグロビン鎖の代わりに２本の胎児のγグロビン鎖（すなわち、胎児のヘモグロビンはα２γ２）をもつ。γβグロビンの産生からのスイッチの調節は非常に複雑であり、主にβグロビンの転写の同時アップレギュレーションを伴うγグロビンの転写のダウンレギュレーションを伴う。妊娠約３０週では、胎児におけるガンマグロビンの合成は低下し始めるが、βグロビンの産生は増加する。生後約１０カ月までに、新生児のヘモグロビンはほぼすべてのα２β２であるが、一部のＨｂＦは成人期まで持続する（総ヘモグロビンの約１～３％）。異常ヘモグロビン症患者の大多数では、ガンマグロビンをコードする遺伝子は存在するが、前述のように分娩前後に生じる正常な遺伝子抑制のために、発現は比較的低い。

【０１５２】

鎌状赤血球症は、βグロビン遺伝子（ＨＢＢ）のＶ６Ｅ変異（ＤＮＡレベルでＧＡＧからＧＴＧへ）によって引き起こされ、その結果生じるヘモグロビンは、「ヘモグロビンＳ」又は「ＨｂＳ」と呼ばれ、低酸素条件下ではＨｂＳ分子が凝集し、線維性沈降物を形成する。これらの凝集体は赤血球の異常又は「鎌状化」を引き起こし、その結果、細胞の柔軟性が失われる。鎌状赤血球はもはや毛細血管床に押し込むことができず、鎌状赤血球患者では血管閉塞性クリーゼを引き起こすことがある。さらに、鎌状赤血球は正常赤血球よりも脆弱であり、溶血に向かう傾向があり、最終的には患者に貧血を引き起こす。

【０１５３】

鎌状赤血球症患者の治療と管理は、抗生物質治療、疼痛管理、及び急性エピソード中の輸血を含む生涯にわたる提案である。１つのアプローチはヒドロキシウレアの使用であり、これはガンマグロビンの産生を増加させることによってその効果を部分的に発揮する。しかし、慢性ヒドロキシウレア療法の長期的な副作用はまだ不明であり、治療は望ましくない副作用をもたらし、患者ごとに様々な有効性を有する可能性がある。鎌状赤血球症治療の有効性が増大しているにもかかわらず、患者の平均余命は５０代半ばから後半にすぎず、この疾患に関連する罹病は患者の生活の質に重大な影響を及ぼす。

【０１５４】

サラセミア（αサラセミア及びβサラセミア）もヘモグロビンに関連する疾患であり、典型的にはグロビン鎖の発現低下を伴う。これは、遺伝子の調節領域における突然変異、又は発現の低下若しくは低下したレベル又は機能的グロビンタンパク質をもたらすグロビンコード配列における突然変異によって起こり得る。サラセミアの治療には通常、輸血と鉄キレート療法がある。骨髄移植は、重症サラセミア患者の治療にも使用されているが、適切なドナーが同定できる場合には、重大なリスクを伴う。

【０１５５】

ＳＣＤ及びβサラセミアの治療に提案されているアプローチの１つは、異常な成人ヘモグロビンをＨｂＦが機能的に置き換えるように、γグロビンの発現を増加させることである。上述のように、ヒドロキシウレアを有するＳＣＤ患者の治療は、一部には、ガンマグロビン発現の増加に対するその効果に起因して成功したと考えられる（すべてが参照により本明細書に援用される、DeSimone (1982) Proc Nat’l Acad Sci USA 79(14):4428-31; Ley, et al., (1982) N. Engl. J. Medicine, 307: 1469-1475; Ley, et al., (1983) Blood 62: 370-380; Constantoulakis et al., (1988) Blood 72(6):1961-1967）。ＨｂＦの発現を増加させるには、γグロビン発現の調節に関与する産物をもつ遺伝子の同定が必要である。そのような遺伝子の１つはＢＣＬ１１Ａである。ＢＣＬ１１Ａは、成体赤血球前駆細胞において発現されるジンクフィンガータンパク質をコードし、その発現のダウンレギュレーションは、ガンマグロビン発現の増加を導く（参照により本明細書に組み込まれるSankaran et at (2008) Science 322: 1839）。ＢＣＬ１１Ａ遺伝子を標的とする阻害性ＲＮＡの使用が提案されているが（例えば、本明細書に参考として援用される米国特許公開第２０１１／０１８２８６７号）、この技術には、完全なノックダウンが達成されない可能性、そのようなＲＮＡの送達に問題がある可能性、及びＲＮＡが連続的に存在しなければならず、生涯にわたって複数の治療を必要とすることを含む、いくつかの潜在的な欠点がある。

【０１５６】

本発明のＲＧＮは、ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域を標的にしてＢＣＬ１１Ａの発現を破壊し、それによってガンマグロビンの発現を増加させるために使用され得る。この標的破壊は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって達成することができ、それにより、本発明のＲＧＮは、ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域内の特定の配列を標的とし、二本鎖切断を生じ、細胞の装置が切断を修復し、典型的には、同時に有害な突然変異を導入する。他の疾患標的について記載されているものと同様に、本発明のＲＧＮは、比較的小さいサイズのために、他の既知のＲＧＮよりも利点を有し得、これは、ＲＧＮ及びそのガイドＲＮＡのための発現カセットをインビボ送達のための単一のＡＡＶベクターにパッケージングすることを可能にする。本発明のＲＧＮを使用する同様の戦略は、ヒト及び農業的又は経済的

に重要な非ヒト動物の両方における類似の疾患及び障害にも適用可能である。
【０１５７】
ＩＸ．ポリヌクレオチドの遺伝的修飾を含む細胞
本明細書に提供されるのは、本明細書に記載されるように、ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡによって媒介されるプロセスを用いて修飾された目的の標的配列を含む細胞及び生物である。これらの実施形態のいくつかにおいて、ＲＧＮは、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、１３７、又は２３５のアミノ酸配列、又はそれらの活性変異体若しくは断片を含む。様々な実施形態において、ガイドＲＮＡは、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、２４０、２７３、又は２８７のヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を、又はその活性変異体若しくは断片を含む。特定の実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、２４１、２７４、又は２８６のヌクレオチド配列を含むｔｒａｃｒＲＮＡ、又はその活性変異体若しくは断片を含む。システムのガイドＲＮＡは、単一ガイドＲＮＡ又は二重ガイドＲＮＡであってもよい。
【０１５８】
修飾された細胞は、真核細胞（例えば、哺乳動物、植物、昆虫細胞）又は原核細胞であり得る。また、本明細書に記載されるように、ＲＧＮ、ｃｒＲＮＡ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡを利用する方法によって修飾された少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む細胞小器官及び胚も提供される。遺伝子操作された細胞、生物、細胞小器官、胚は、修飾されたヌクレオチド配列に対してヘテロ接合体であってもホモ接合体であってもよい。
【０１５９】
細胞、生物、細胞小器官、又は胚の染色体修飾は、発現の変化（アップレギュレーション又はダウンレギュレーション）、不活性化、又は改変されたタンパク質産物の発現、又は組込まれた配列をもたらすことができる。染色体修飾が、遺伝子の不活性化又は非機能性タンパク質産物の発現のいずれかをもたらす場合、遺伝的に修飾された細胞、生物、細胞小器官、又は胚は、「ノックアウト」と呼ばれる。ノックアウト表現型は、欠失突然変異（すなわち、少なくとも１つのヌクレオチドの欠失）、挿入突然変異（すなわち、少なくとも１つのヌクレオチドの挿入）、又はナンセンス突然変異（すなわち、停止コドンが導入されるような少なくとも１つのヌクレオチドの置換）の結果であり得る。
【０１６０】
あるいは、細胞、生物、細胞小器官、又は胚の染色体修飾は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列の染色体組込みから生じる「ノックイン」を生成することができる。これらの実施形態のいくつかにおいて、コード配列は、野生型タンパク質をコードする染色体配列が不活性化されるが、外因性に導入されたタンパク質が発現されるように染色体に組み込まれる。
【０１６１】
他の実施形態において、染色体修飾は、変異タンパク質産物の産生をもたらす。発現された変異型タンパク質産物は、少なくとも１つのアミノ酸置換及び／又は少なくとも１つのアミノ酸の付加又は欠失を有することができる。改変された染色体配列によりコードされる改変されたタンパク質産物は、野生型タンパク質と比較した場合、改変された特徴又は活性を示すことができ、これには、改変された酵素活性又は基質特異性が含まれるが、これらに限定されない。
【０１６２】
さらに他の実施形態において、染色体修飾は、タンパク質の変化した発現パターンをもたらすことができる。非限定的な例として、タンパク質産物の発現を制御する調節領域における染色体変化は、タンパク質産物の過剰発現又はダウンレギュレーション、又は変化した組織又は時間的発現パターンをもたらすことができる。
【０１６３】

Ｘ．標的ＤＮＡ又は一本鎖ＤＮＡを検出するためのキット及び方法

いくつかのＲＧＮ（例えば、配列番号５４及び１３７として示されるＡＰＧ０９１０６．１及びＡＰＧ０９７４８）は、標的ＤＮＡの検出によって一旦活性化されると、非標的一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を無差別に切断することができる。従って、本明細書には、試料中の標的ＤＮＡ（二本鎖又は一本鎖）を検出するための組成物及び方法が提供される。いくつかの実施形態において、所望の標的は、ＲＮＡ、例えばゲノム、又はＲＮＡウイルスのゲノムの一部、例えばコロナウイルスとして存在し得る。ある態様において、コロナウイルスは、ＳＡＲＳ様コロナウイルスであり得る。さらなる態様において、コロナウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ、又はコウモリＳＡＲＳ様コロナウイルス、例えば、コウモリ－ＳＬ－ＣｏＶＺＣ４５（アクセッションＭＧ７７２９３３）であり得る。標的がＲＮＡとして存在する態様において、標的は、ＲＧＮによって効果的に標的化され得るＤＮＡ分子に逆転写され得る。逆転写に続いて、熱サイクルを含む当技術分野で公知のＲＴ－ＰＣＲ法のような増幅工程、又はＲＴ－ＬＡＭＰ（逆転写ループ媒介等温増幅）のような等温法を用いてもよい（Notomi et al., Nucleic Acids Res 28: E63, (2000)）。

【０１６４】

これらの組成物及び方法は、ガイドＲＮＡとハイブリダイズせず、非標的ｓｓＤＮＡである検出ｓｓＤＮＡの使用を含む。いくつかの実施形態において、検出ｓｓＤＮＡは、検出ｓｓＤＮＡの切断後に検出可能なシグナルを提供する検出可能な標識を含む。非限定的な例は、蛍光体／クエンチャー対を含む検出ｓｓＤＮＡであって、検出ｓｓＤＮＡが、そのシグナルが、非常に近接したクエンチャーの存在によって抑制されるとき、全体（すなわち、残されていない）であるとき、蛍光を発しない検出ｓｓＤＮＡである。検出ｓｓＤＮＡの切断は、クエンチャーの除去をもたらし、次に、蛍光標識を検出することができる。蛍光標識又は色素の非限定的な例としては、Ｃｙ５、フルオレセイン（例えば、ＦＡＭ、６　ＦＡＭ、５（６）ＦＡＭ、ＦＩＴＣ）、Ｃｙ３、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素、及びテキサスレッドが挙げられる。クエンチャーの非限定的な例としては、Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ（登録商標）　ＦＱ、Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ（登録商標）　ＲＱ、Ｑｘ１クエンチャー、ＡＴＴ０クエンチャー、及びＱＳＹ染料が挙げられる。　いくつかの実施形態において、検出ｓｓＤＮＡは、ＺＥＮ（商標）、ＴＡＯ（商標）、及びＢｌａｃｋ　Ｈｏｌｅ　Ｑｕｅｎｃｈｅｒ（登録商標）のような内部クエンチャーなどの第２クエンチャーを含み、バックグラウンドを低下させ、シグナル検出を増加させることができる。

【０１６５】

他の実施形態において、検出ｓｓＤＮＡは、検出ｓｓＤＮＡの切断及びｓｓＤＮＡの切断がシグナルの検出を阻害又は妨げる前に検出可能なシグナルを提供する検出可能な標識を含む。そのようなシナリオの非限定的な例は、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対を含む検出ｓｓＤＮＡである。ＦＲＥＴは、第一（ドナー）フルオロフォアの励起状態から第二（アクセプター）フルオロフォアへのエネルギーの無放射移動が、非常に近接して起こるプロセスである。ドナー蛍光体の発光スペクトルは、アクセプター蛍光体の励起スペクトルとオーバーラップする。従って、アクセプター蛍光体は、検出ｓｓＤＮＡが全（すなわち、非切断）であり、アクセプター蛍光体は、検出ｓｓＤＮＡが切断されるとき、もはや蛍光を発しないであろう。なぜなら、ドナー及びアクセプター蛍光体は、もはや互いに近接していないからである。ＦＲＥＴ供与体及び受容体フルオロフォアは、当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、シアン蛍光タンパク質／緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、Ｃｙ３／Ｃｙ５、及びＧＦＰ／黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）を含む。

【０１６６】

いくつかの実施形態において、検出器ｓｓＤＮＡは、約２ヌクレオチドから約３０ヌクレオチドの長さを有し、限定されないが、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５ヌクレオチド、約２６ヌクレオチド、約２７ヌクレオチド、約２８ヌクレオチド、約２９ヌクレオチド、及び約３０ヌク

レオチドが含まれる。

【０１６７】

ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡを検出する方法は、試料をＲＧＮと接触させ、試料をＲＧＮ及びＤＮＡ分子中の標的ＤＮＡ配列とハイブリダイズさせることができるガイドＲＮＡと、ガイドＲＮＡとハイブリダイズしない検出一本鎖ＤＮＡとを接触させ、続いて、ＲＧＮによるｓｓＤＮＡの切断によって生成された検出可能なシグナルを測定し、それによってＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を検出することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、ＲＧＮ及びガイドＲＮＡとの接触の前又は同時に、試料内の核酸分子の増幅工程を含むことができる。これらの実施形態のいくつかでは、ガイドＲＮＡがハイブリダイズする特異的配列を増幅して、検出方法の感度を高めることができる。

【０１６８】

標的ＤＮＡがこれらの組成物を用いて検出され得る試料、及び検出ｓｓＤＮＡを含む方法は、核酸（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ分子）を含む、又は含むと考えられるいずれかの試料を含む。試料は、精製された核酸の合成の組み合わせ、又は呼吸スワブ（例えば、鼻咽頭スワブ）抽出物、細胞溶解物、患者サンプル、細胞、組織、唾液、血液、血清、血漿、尿、吸引物、生検サンプル、脳脊髄液、又は生物（細菌、ウイルスなど）などの生物学的試料を含む任意の供給源に由来することができる。

【０１６９】

試料とＲＧＮ、ガイドＲＮＡ、及び検出ｓｓＤＮＡとの接触は、インビトロ、エクスビボ、又はインビボでの接触を含むことができる。いくつかの実施形態において、検出ｓｓＤＮＡ及び／又はＲＧＮ及び／又はガイドＲＮＡは、例えば、横方向流装置上に固定化され、ここで、試料は、固定化検出ｓｓＤＮＡ及び／又はＲＧＮ及び／又はガイドＲＮＡと接触する。ある態様において、検出ｓｓＤＮＡ上の抗原部分に対する抗体は、切断された検出ｓｓＤＮＡと無傷の検出ｓｓＤＮＡとの区別を可能にする様式で、例えば、横方向フローデバイス上に固定化される。

【０１７０】

いくつかの態様において、方法は、試料中に存在する標的ＤＮＡの量を決定することをさらに含むことができる。試験試料中の検出可能なシグナルの測定は、参照測定（例えば、既知量の標的ＤＮＡを含む参照試料又はその系列の測定）と比較することができる。

【０１７１】

組成物及び方法の適用の非限定的な例には、一塩基多型（ＳＮＰ）検出、癌スクリーニング、細菌感染の検出、抗生物質耐性の検出、及びウイルス感染の検出が含まれる。

【０１７２】

ＲＧＮによるｓｓＤＮＡの切断によって生成された検出可能なシグナルは、蛍光シグナルの測定、ゲル上のバンドの視覚分析、比色変化、及び電気シグナルの有無を含むが、これらに限定されない、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して測定することができる。

【０１７３】

本発明は、試料中のＤＮＡ分子の標的ＤＮＡを検出するためのキットであって、該キットは、ＲＧＮポリペプチド、該ＲＧＮとハイブリダイズすることができるガイドＲＮＡ、及びＤＮＡ分子中の標的ＤＮＡ配列、ならびに該ガイドＲＮＡとハイブリダイズしない検出ｓｓＤＮＡを含む、キットを提供する。

【０１７４】

また、本明細書では、核酸の集団を接触させることによって一本鎖ＤＮＡを切断する方法が提供され、ここで、該集団は、ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列及び複数の非標的ｓｓＤＮＡを、ＲＧＮ及びＲＧＮ及び標的ＤＮＡ配列とハイブリダイズすることができるガイドＲＮＡと含む。

【０１７５】

物品「１つの（ａ）」及び「１つの（ａｎ）」は、本明細書では、物品の文法的対象物の１つ以上（すなわち、少なくとも１つ）を指すために使用される。例として、「ポリペ

プチド」は、１つ以上のポリペプチドを意味する。

【０１７６】

明細書に記載されているすべての刊行物及び特許出願は、本開示が関係する当業者のレベルを示すものである。全ての刊行物及び特許出願は、各個別の刊行物又は特許出願が、参照により援用されるように具体的かつ個別に指示されたものと同じ程度に、参照により本明細書に援用される。

【０１７７】

前述の発明は、理解を明確にする目的で、例示及び例示として、ある程度詳細に説明されてきたが、特定の変更及び修正が、添付の実施形態の範囲内で実施され得ることは明らかであろう。

【０１７８】

非限定的な実施形態は、以下を含む：

１．ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、ここで、前記ポリヌクレオチドは、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＧＮポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、

前記ＲＧＮポリペプチドが、前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができるガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合した場合に、ＲＮＡガイド配列特異的な様式でＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列に結合することができ、

ＲＧＮポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドに異種性のプロモーターに機能的に連結されている前記核酸分子。

２．前記ＲＧＮポリペプチドが、結合時に前記標的ＤＮＡ配列を切断することができる、実施形態１に記載の核酸分子。

３．前記ＲＧＮポリペプチドが二本鎖切断を生成することができる、実施形態２に記載の核酸分子。

４．前記ＲＧＮポリペプチドが一本鎖切断を生成することができる、実施形態２に記載の核酸分子。

５．前記ＲＧＮポリペプチドがヌクレアーゼ不活性である、実施形態２に記載の核酸分子。

【０１７９】

６．ＲＧＮポリペプチドが塩基編集ポリペプチドに機能的に融合されている、実施形態１～５のいずれか１つに記載の核酸分子。

７．塩基編集ポリペプチドがデアミナーゼである、実施形態６に記載の核酸分子。

８．デアミナーゼがシチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼである、実施形態７に記載の核酸分子。

９．ＲＧＮポリペプチドが１つ以上の核局在化シグナルを含む、実施形態１～８のいずれか１つに記載の核酸分子。

１０．ＲＧＮポリペプチドが、真核細胞における発現のために最適化されたコドンである、実施形態１～９のいずれか１つに記載の核酸分子。

【０１８０】

１１．標的ＤＮＡ配列がプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に隣接して位置する、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の核酸分子。

１２．実施形態１～１１のいずれか１つに記載の核酸分子を含むベクター。

１３．前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができる前記ｇＲＮＡをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態１２に記載のベクター。

１４．ガイドＲＮＡが、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡを含む、実施形態１３に記載のベクター。

１５．ｇＲＮＡがｔｒａｃｒＲＮＡを含む、実施形態１３又は１４に記載のベクター。
【０１８１】
１６．ｔｒａｃｒＲＮＡが、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、又は１１９に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する、実施形態１５に記載のベクター。
１７．前記ｇＲＮＡが単一のガイドＲＮＡである、実施形態１５又は１６に記載のベクター。
１８．ｇＲＮＡが二重ガイドＲＮＡである、実施形態１５又は１６に記載のベクター。
１９．実施形態１～１１のいずれか１つに記載の核酸分子、又は実施形態１２～１８のいずれか１つに記載のベクターを含む細胞。
２０．ＲＧＮポリペプチドが発現される条件下で実施形態１８に記載の細胞を培養することを含む、ＲＧＮポリペプチドを作製する方法。
【０１８２】
２１．配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸分子を細胞に導入し、
ここで、前記ＲＧＮポリペプチドが、前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができるガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合した場合に、ＲＮＡガイド配列特異的な方法でＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列に結合することができ、
ＲＧＮポリペプチドが発現される条件下で前記細胞を培養する
ことを含む、ＲＧＮポリペプチドを作製する方法。
２２．前記ＲＧＮポリペプチドを精製することをさらに含む、実施形態２０又は２１に記載の方法。
２３．前記細胞が、前記ＲＧＮポリペプチドに結合してＲＧＮリボ核タンパク質複合体を形成する１以上のガイドＲＮＡをさらに発現する、実施形態２０又は２１に記載の方法。
２４．前記ＲＧＮリボ核タンパク質複合体を精製する工程をさらに含む、実施形態２３に記載の方法。
２５．ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、前記ｃｒＲＮＡは、スペーサー配列及びＣＲＩＳＰＲ反復配列を含み、前記ＣＲＩＳＰＲ反復配列は、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、
ａ）前記ｃｒＲＮＡ；及び、任意選択的に、
ｂ）ｃｒＲＮＡの前記ＣＲＩＳＰＲ反復配列とハイブリダイズすることができるトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）
を含むガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドに結合した場合に、前記ｃｒＲＮＡのスペーサー配列を介して配列特異的にＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができ、
ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドに異種性のプロモーターに機能的に連結されている上記核酸分子。
【０１８３】
２６．実施形態２５に記載の核酸分子を含むベクター。
２７．前記ベクターが、前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態２６に記載のベクター。
２８．前記ｔｒａｃｒＲＮＡが、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、又は１１９に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態２７に記載のベクター。
２９．前記ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチド及び前記ｔｒａｃｒＲＮＡを

コードする前記ポリヌクレオチドが、同じプロモーターに操作可能に連結され、単一のガイドＲＮＡとしてコードされる、実施形態２７又は２８に記載のベクター。
３０．前記ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチド及び前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドが、別々のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態２７又は２８に記載のベクター。
【０１８４】
３１．前記ベクターが前記ＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記ＲＧＮポリペプチドが配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態２６～３０のいずれか１つに記載のベクター。
３２．配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、又は１１９に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、
ａ）前記ｔｒａｃｒＲＮＡ；及び
ｂ）スペーサー配列及びＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むｃｒＲＮＡであって、前記ｃｒＲＮＡの前記ＣＲＩＳＰＲ反復配列とハイブリダイズすることができるｃｒＲＮＡ
を含むガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドに結合した場合に、前記ｃｒＲＮＡのスペーサー配列を介して配列特異的にＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができ、
ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドに異種性のプロモーターに機能的に連結されている上記核酸分子。
を含む上記核酸分子。
３３．実施形態３２に記載の核酸分子を含むベクター。
３４．前記ベクターが、前記ｃｒＲＮＡをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態３３に記載のベクター。
３５．前記ｃｒＲＮＡのＣＲＩＳＰＲ反復配列が、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８と少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態３４に記載のベクター。
【０１８５】
３６．前記ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチド及び前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドが、同じプロモーターに操作可能に連結され、単一のガイドＲＮＡとしてコードされる、実施形態３４又は３５に記載のベクター。
３７．前記ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチド及び前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドが、別々のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態３４又は３５に記載のベクター。
３８．前記ベクターが前記ＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記ＲＧＮポリペプチドが配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態３３～３７のいずれか１つに記載のベクター。
３９．ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を結合するためのシステムであって、前記システムは、
ａ）１つ以上のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列を含む１つ以上のポリヌクレオチド又は前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができる１つ以上のガイドＲＮＡ；及び
ｂ）配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７と少なくとも９５％の配列同一性を有するア

ミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチド；又はＲＧＮポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド
を含み、
１つ以上のガイドＲＮＡをコードし、ＲＮＡＧＮポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、各々、前記ヌクレオチド配列に異種性のプロモーターに機能し得るように連結され；
１つ以上のガイドＲＮＡが、該ＲＧＮポリペプチドをＤＮＡ分子の該標的ＤＮＡ配列に結合させるために、該ＲＧＮポリペプチドと複合体を形成することができる上記システム。
４０．前記ｇＲＮＡが、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８と少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を含む、実施形態３９に記載のシステム。
【０１８６】
４１．ｇＲＮＡがｔｒａｃｒＲＮＡを含む、実施形態３９又は４０に記載のシステム。
４２．前記ｔｒａｃｒＲＮＡが、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、又は１１９に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態４１に記載のシステム。
４３．前記ｇＲＮＡが単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、実施形態４１又は４２に記載のシステム。
４４．前記ｇＲＮＡが二重ガイドＲＮＡである、実施形態４１又は４２に記載のシステム。
４５．標的ＤＮＡ配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に隣接して位置する、実施形態３９～４４のいずれか１つに記載のシステム。
【０１８７】
４６．標的ＤＮＡ配列が細胞内にある、実施形態３９～４５のいずれか１つに記載のシステム。
４７．細胞が真核細胞である、実施形態４６に記載のシステム。
４８．真核細胞が植物細胞である、実施形態４７に記載のシステム。
４９．真核細胞が哺乳動物細胞である、実施形態４７に記載のシステム。
５０．真核細胞が昆虫細胞である、実施形態４７に記載のシステム。
【０１８８】
５１．細胞が原核細胞である、実施形態４６に記載のシステム。
５２．１つ以上のガイドＲＮＡを転写した場合、標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができ、ガイドＲＮＡが、標的ＤＮＡ配列を直接切断するために、ＲＧＮポリペプチドと複合体を形成することができる、実施形態３９～５１のいずれか１つに記載のシステム。
５３．前記ＲＧＮポリペプチドが二本鎖切断を生成することができる、実施形態５２に記載のシステム。
５４．前記ＲＧＮポリペプチドが一本鎖切断を生成することができる、実施形態５２に記載のシステム。
５５．前記ＲＧＮポリペプチドがヌクレアーゼ不活性である、実施形態５２に記載のシステム。
【０１８９】
５６．ＲＧＮポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに機能し得るように連結されている、実施形態３９～５５のいずれか１つに記載のシステム。
５７．塩基編集ポリペプチドがデアミナーゼである、実施形態５６に記載のシステム。
５８．デアミナーゼがシチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼである、実施形態５７に記載のシステム。
５９．ＲＧＮポリペプチドが１つ以上の核局在化シグナルを含む、実施形態３９～５８

のいずれか１つに記載のシステム。
６０．ＲＧＮポリペプチドが、真核細胞における発現のために最適化されたコドンである、実施形態３９～５９のいずれか１つに記載のシステム。
【０１９０】
６１．１つ以上のガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、及びＲＧＮポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、１つのベクター上に位置する、実施形態３９～６０のいずれか１つに記載のシステム。
６２．前記システムが、１つ以上のドナーポリヌクレオチド、又は１つ以上のドナーポリヌクレオチドをコードする１つ以上のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態３９～６１のいずれか１つに記載のシステム。
６３．標的ＤＮＡ配列又は標的ＤＮＡ配列を含む細胞に、実施形態３９～６２のいずれか１つに記載のシステムを送達することを含む、ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を結合する方法。
６４．前記ＲＧＮポリペプチド又は前記ガイドＲＮＡがさらに検出可能な標識を含み、それによって前記標的ＤＮＡ配列の検出を可能にする、実施形態６３に記載の方法。
６５．前記ガイドＲＮＡ又は前記ＲＧＮポリペプチドが、発現モジュレーターをさらに含み、それによって、前記標的ＤＮＡ配列又は前記標的ＤＮＡ配列による転写制御下にある遺伝子の発現を調節する、実施形態６３に記載の方法。
【０１９１】
６６．実施形態３９～６２のいずれか１つに記載のシステムを、ＤＮＡ分子を含む標的ＤＮＡ配列又は細胞に送達し、前記標的ＤＮＡ配列の切断又は修飾が起こることを含む、ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を切断又は修飾する方法。
６７．前記修飾された標的ＤＮＡ配列が、標的ＤＮＡ配列への異種ＤＮＡの挿入を含む、実施形態６６に記載の方法。
６８．前記修飾された標的ＤＮＡ配列が、標的ＤＮＡ配列からの少なくとも１つのヌクレオチドの欠失を含む、実施形態６６に記載の方法。
６９．前記修飾された標的ＤＮＡ配列が、標的ＤＮＡ配列中の少なくとも１つのヌクレオチドの突然変異を含む、実施形態６６記載の方法。
７０．ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を結合するための方法であって、前記方法は、
ａ）ＲＧＮリボヌクレオチド複合体の形成に適した条件下で、
ｉ）標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができる１つ以上のガイドＲＮＡ；及び
ｉｉ）配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸を含むＲＧＮポリペプチド
を合わせることによって、インビトロでＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）リボヌクレオチド複合体をアセンブリし；及び
ｂ）標的ＤＮＡ配列又は標的ＤＮＡ配列を含む細胞を、インビトロでアセンブルしたＲＧＮリボヌクレオチド複合体と接触させる
ことを含み、
１つ以上のガイドＲＮＡが標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズし、それによって、該ＲＧＮポリペプチドを該標的ＤＮＡ配列に結合させる上記方法。
【０１９２】
７１．前記ＲＧＮポリペプチド又は前記ガイドＲＮＡがさらに検出可能な標識を含み、それによって前記標的ＤＮＡ配列の検出を可能にする、実施形態７０に記載の方法。
７２．前記ガイドＲＮＡ又は前記ＲＧＮポリペプチドが、発現モジュレーターをさらに含み、それによって前記標的ＤＮＡ配列の発現の調節を可能にする、実施形態７０に記載の方法。
７３．ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、該ＤＮＡ分子を、
ａ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドであって、前記ＲＧＮは、配列番

号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸を含むＲＧＮポリペプチド；及び
ｂ）（ａ）のＲＧＮを標的ＤＮＡ配列に標的化することができる１つ以上のガイドＲＮＡ；
以下と接触させることを含み、
１つ以上のガイドＲＮＡが標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズし、それによって、該ＲＧＮポリペプチドを該標的ＤＮＡ配列に結合させ、該標的ＤＮＡ配列の切断及び／又は修飾が起こる上記方法。
７４．前記ＲＧＮポリペプチドによる切断が二本鎖切断を生成する、実施形態７３に記載の方法。
７５．前記ＲＧＮポリペプチドによる切断が一本鎖切断を生成する、実施形態７３に記載の方法。
【０１９３】
７６．前記ＲＧＮポリペプチドがヌクレアーゼ不活性である、実施形態７３に記載の方法。
７７．ＲＧＮポリペプチドが塩基編集ポリペプチドに機能的に連結されている、実施形態７３～７６のいずれか１つに記載の方法。
７８．前記塩基編集ポリペプチドがデアミナーゼを含む、実施形態７７に記載の方法。
７９．前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼである、実施形態７８に記載の方法。
８０．修飾標的ＤＮＡ配列が、異種ＤＮＡの標的ＤＮＡ配列への挿入を含む、実施形態７３～７９のいずれか１つに記載の方法。
【０１９４】
８１．修飾された標的ＤＮＡ配列が標的ＤＮＡ配列からの少なくとも１つのヌクレオチドの欠失を含む、実施形態７３～７９のいずれか１つに記載の方法。
８２．修飾された標的ＤＮＡ配列が標的ＤＮＡ配列中の少なくとも１つのヌクレオチドの突然変異を含む、実施形態７３～７９のいずれか１つに記載の方法。
８３．前記ｇＲＮＡが、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を含む、実施形態７０～８２のいずれか１つに記載の方法。
８４．ｇＲＮＡがｔｒａｃｒＲＮＡを含む、実施形態７０～８３のいずれか１つに記載の方法。
８５．前記ｔｒａｃｒＲＮＡが、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、又は１１９に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態８４に記載の方法。
【０１９５】
８６．ｇＲＮＡが単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、実施形態８４又は８５に記載の方法。
８７．ｇＲＮＡが二重ガイドＲＮＡである、実施形態８４又は８５に記載の方法。
８８．前記標的ＤＮＡ配列がプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に隣接して位置する、態様６３～８７のいずれか１つに記載の方法。
８９．標的ＤＮＡ配列が細胞内にある、実施形態６３～８８のいずれか１つに記載の方法。
９０．細胞が真核細胞である、実施形態８９に記載の方法。
【０１９６】
９１．真核細胞が植物細胞である、実施形態９０に記載の方法。
９２．真核細胞が哺乳動物細胞である、実施形態９０に記載の方法。
９３．真核細胞が昆虫細胞である、実施形態９０に記載の方法。

９４．細胞が原核細胞である、実施形態８９に記載の方法。
９５．ＲＧＮポリペプチドが発現され、標的ＤＮＡ配列を切断して修飾されたＤＮＡ配列を含むＤＮＡ分子を生成する条件下で細胞を培養し；前記修飾された標的ＤＮＡ配列を含む細胞を選択することをさらに含む、実施形態８９～９４のいずれか１つに記載の方法。
【０１９７】
９６．実施形態９５に記載の方法に従って修飾された標的ＤＮＡ配列を含む細胞。
９７．細胞が真核細胞である、実施形態９６に記載の細胞。
９８．真核細胞が植物細胞である、実施形態９７に記載の細胞。
９９．実施形態９８に記載の細胞を含む植物。
１００．実施形態９８に記載の細胞を含む種子。
【０１９８】
１０１．真核細胞が哺乳動物細胞である、実施形態９７に記載の細胞。
１０２．真核細胞が昆虫細胞である、実施形態９８に記載の細胞。
１０３．細胞が原核細胞である、実施形態９６に記載の細胞。
１０４．遺伝性疾患の原因となる突然変異を修正した遺伝子修飾細胞を作製する方法であって、該方法は、細胞に
ａ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドであって、ＲＧＮポリペプチドは、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＧＮポリペプチド；又は前記ＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、ＲＧＮポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、細胞内でのＲＧＮポリペプチドの発現を可能にするためにプロモーターに作動可能に連結されるポリヌクレオチド；及び
ｂ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡは、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むｇＲＮＡ；又は前記ｇＲＮＡをコードするポリヌクレオチドであって、ｇＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドは、細胞内でのｇＲＮＡの発現を可能にするためにプロモーターに作動可能に連結されるポリヌクレオチド
を導入することを含み、
これにより、ＲＧＮ及びｇＲＮＡは原因となる突然変異のゲノム位置を標的とし、ゲノム配列を修飾して原因となる突然変異を除去する上記方法。
１０５．ＲＧＮが塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態１０４に記載の方法。
【０１９９】
１０６．塩基編集ポリペプチドがデアミナーゼである、実施形態１０５に記載の方法。
１０７．デアミナーゼがシチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼである、実施形態１０６に記載の方法。
１０８．細胞が動物細胞である、実施形態１０４～１０７のいずれか１つに記載の方法。
１０９．細胞が哺乳動物細胞である、実施形態１０４～１０７のいずれか１つに記載の方法。
１１０．細胞が、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ウシ、ブタ、又はヒト由来である、実施形態１０８に記載の方法。
【０２００】
１１１．遺伝性疾患が単一ヌクレオシド多型によって引き起こされる、実施形態１０８に記載の方法。
１１２．遺伝性疾患がハラー症候群である、実施形態１１１に記載の方法。
１１３．ｇＲＮＡが、原因となる単一ヌクレオシド多型に近接する領域を標的とするスペーサー配列をさらに含む、実施形態１１２に記載の方法。
１１４．疾患を引き起こす不安定なゲノム領域に欠失を有する遺伝子組換え細胞を作製

するための方法であって、該方法が、細胞に
ａ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドであって、ＲＧＮポリペプチドは、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；又は、前記ＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、ＲＧＮポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、細胞内でのＲＧＮポリペプチドの発現を可能にするためにプロモーターに作動可能に連結されているＲＧＮポリペプチド；及び
ｂ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡは、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むか；又は、前記ｇＲＮＡをコードするポリヌクレオチドであって、ｇＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドは、細胞内でのｇＲＮＡの発現を可能にするためにプロモーターに作動可能に連結され、さらに、ｇＲＮＡは、不安定性のゲノム領域の５’フランクを標的とするスペーサー配列を含むｇＲＮＡ；及び
ｃ）第２のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡは、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むか；又は前記ｇＲＮＡをコードするポリヌクレオチドであって、ｇＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されて、細胞における第２のｇＲＮＡの発現を可能にし、さらに、前記第２のｇＲＮＡは、不安定性のゲノム領域の３’フランクを標的とするスペーサー配列を含む第２のｇＲＮＡを導入することを含み、これにより、ＲＧＮと２つのｇＲＮＡは不安定なゲノム領域と不安定なゲノム領域の少なくとも一部を標的とする上記方法。
１１５．細胞が動物細胞である、実施形態１１４に記載の方法。
【０２０１】
１１６．細胞が哺乳動物細胞である、実施形態１１４に記載の方法。
１１７．細胞が、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ウシ、ブタ、又はヒト由来である、実施形態１１５に記載の方法。
１１８．遺伝的に遺伝する疾患が、フリードリッヒ運動失調又はハンチントン病である、実施形態１１５に記載の方法。
１１９．第１のｇＲＮＡが、不安定性のゲノム領域内又はその近傍の領域を標的とするスペーサー配列をさらに含む、実施形態１１８に記載の方法。
１２０．第２のｇＲＮＡが、不安定性のゲノム領域内又はその近位領域を標的とするスペーサー配列をさらに含む、実施形態１１８に記載の方法。
【０２０２】
１２１．ＢＣＬ１１Ａ　ｍＲＮＡ及びタンパク質発現が減少した遺伝子組換え哺乳動物造血前駆細胞を産生するための方法であって、該方法が、単離されたヒト造血前駆細胞に、
ａ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドであって、ＲＧＮポリペプチドは、配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；又は、前記ＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、ＲＧＮポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、細胞内でのＲＧＮポリペプチドの発現を可能にするためにプロモーターに作動可能に連結されているＲＧＮポリペプチド；及び
ｂ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡは、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、又は１１８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むか；又は前記ｇＲＮＡをコードするポリヌクレオチドであって、ｇＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されて、細

胞におけるｇＲＮＡの発現を可能にするｇＲＮＡ
を導入することを含み、これにより、ＲＧＮ及びｇＲＮＡは細胞内で発現され、ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域で切断され、その結果、ヒト造血前駆細胞の遺伝子改変が生じ、ＢＣＬ１１ＡのｍＲＮＡ及び／又はタンパク質発現が低下する上記方法。
１２２．ｇＲＮＡが、ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域内又はそれに近接する領域を標的とするスペーサー配列をさらに含む、実施形態１２１に記載の方法。
１２３．ガイドＲＮＡが、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、又は１１９に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むｔｒａｃｒＲＮＡを含む、実施形態１０４～１２２のいずれか１つに記載の方法。
１２４．ＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を結合するためのシステムであって、前記システムは、
ａ）１つ以上のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする１つ以上のヌクレオチド配列を含む１つ以上のポリヌクレオチド又は前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができる１つ以上のガイドＲＮＡ；及び
ｂ）配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は１１７と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチド
を含み、
ここで、１つ以上のガイドＲＮＡは標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができ、
１つ以上のガイドＲＮＡが、該ＲＧＮポリペプチドをＤＮＡ分子の該標的ＤＮＡ配列に結合させるために、該ＲＧＮポリペプチドと複合体を形成することができる上記システム。
１２５．前記ＲＧＮポリペプチドがヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼとして機能することができる、実施形態１２４に記載のシステム。
【０２０３】
１２６．前記ＲＧＮポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに機能的に融合される、実施形態１２４又は１２５に記載のシステム。
１２７．塩基編集ポリペプチドがデアミナーゼである、実施形態１２６に記載のシステム。
１２８．デアミナーゼがシチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼである、実施形態１２７に記載のシステム。
１２９．試料中のＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を検出する方法であって、以下を含む方法：
ａ）試料を
ｉ）配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、又は１３７と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドであって、前記ＲＧＮポリペプチドは、前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができるガイドＲＮＡに結合した場合に、ＲＮＡ誘導配列特異的な方法でＤＮＡ分子の前記標的ＤＮＡ配列に結合することができるＲＧＮポリペプチド；
ｉｉ）前記ガイドＲＮＡ
ｉｉｉ）ガイドＲＮＡとハイブリダイズしない検出一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）
と接触させ；及び
ｂ）ＲＧＮによる検出ｓｓＤＮＡの切断によって生成された検出可能なシグナルを測定し、それによって標的ＤＮＡを検出する上記方法。
１３０．前記試料が細胞溶解物由来のＤＮＡ分子を含む、実施形態１２９に記載の方法。
【０２０４】
１３１．前記試料が細胞を含む、実施形態１２９に記載の方法。
１３２．細胞が真核細胞である、実施形態１３１に記載の方法。
１３３．標的ＤＮＡ配列を含むＤＮＡ分子が、ＲＮＡを含む試料中に存在するＲＮＡ鋳

型分子の逆転写によって生成される、実施形態１２９に記載の方法。
１３４．ＲＮＡ鋳型分子がＲＮＡウイルスである、実施形態１３３に記載の方法。
１３５．ＲＮＡウイルスがコロナウイルスである、実施形態１３４に記載の方法。
【０２０５】
１３６．コロナウイルスがコウモリＳＡＲＳ様コロナウイルス、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ、又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、実施形態１３５に記載の方法。
１３７．ＲＮＡを含む試料が細胞を含む試料に由来する、実施形態１３３～１３６のいずれか１つに記載の方法。
１３８．検出ｓｓＤＮＡがフルオロフォア／クエンチャー対を含む、実施形態１２９～１３７のいずれか１つに記載の方法。
１３９．検出ｓｓＤＮＡが蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対を含む、実施形態１２９～１３７のいずれか１つに記載の方法。
１４０．前記ガイドＲＮＡが、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、又は２７３と少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を含む、実施形態１２９～１３９のいずれか１つに記載の方法。
【０２０６】
１４１．前記ガイドＲＮＡがｔｒａｃｒＲＮＡを含む、実施形態１２９～１４０のいずれか１つに記載の方法。
１４２．前記ｔｒａｃｒＲＮＡが、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、又は２７４に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態１４１に記載の方法。
１４３．前記ガイドＲＮＡが単一のガイドＲＮＡである、実施形態１４１又は１４２に記載の方法。
１４４．前記ガイドＲＮＡが二重ガイドＲＮＡである、実施形態１４１又は１４２記載の方法。
１４５．前記方法が、工程ａの接触の前又はそれと共に、試料中の核酸を増幅することをさらに含む、実施形態１２９～１４４のいずれか１つの記載の方法。
【０２０７】
１４６．増幅が、ＲＮＡ分子の逆転写によって生成されるＤＮＡ分子である、実施形態１４５に記載の方法。
１４７．試料中のＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列を検出するためのキットであって、該キットは、
ａ）配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、又は１３７と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドであって、前記ＲＧＮポリペプチドは、前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができるガイドＲＮＡに結合した場合、ＲＮＡ誘導配列特異的な方法でＤＮＡ分子の前記標的ＤＮＡ配列に結合することができるＲＧＮポリペプチド；
ｂ）前記ガイドＲＮＡ；及び
ｃ）ガイドＲＮＡとハイブリダイズしない検出一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）
を含む上記キット。
１４８．前記検出ｓｓＤＮＡがフルオロフォア／クエンチャー対を含む、実施形態１４７に記載のキット。
１４９．前記検出ｓｓＤＮＡが蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対を含む、実施形態１４７に記載のキット。
１５０．前記ガイドＲＮＡが、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、又は２７３に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列

を含む、実施形態１４７～１４９のいずれか１つに記載のキット。
【０２０８】
１５１．前記ガイドＲＮＡがｔｒａｃｒＲＮＡを含む、実施形態１４７～１５０のいずれか１つに記載のキット。
１５２．前記ｔｒａｃｒＲＮＡが、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、又は２７４に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態１５１のキット。
１５３．前記ガイドＲＮＡが単一のガイドＲＮＡである、実施形態１５１又は１５２に記載のキット。
１５４．前記ガイドＲＮＡが二重ガイドＲＮＡである、実施形態１５１又は１５２に記載のキット。
１５５．一本鎖ＤＮＡを切断する方法であって、前記方法は、標的ＤＮＡ配列を含むＤＮＡ分子と複数の非標的ｓｓＤＮＡを含む核酸集団を
ａ）配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、１１７、又は１３７と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドであって、前記ＲＧＮポリペプチドは、前記標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができるガイドＲＮＡに結合した場合、ＲＮＡ誘導配列特異的な方法で前記標的ＤＮＡ配列に結合することができるＲＧＮポリペプチド；及び
ｂ）前記ガイドＲＮＡ
と接触させることを含み、ＲＧＮポリペプチドは、該複数の非標的ｓｓＤＮＡを切断する上記方法。
【０２０９】
１５６．核酸の前記集団が細胞溶解物内にある、実施形態１５５に記載の方法。
１５７．前記ガイドＲＮＡが、配列番号２、１０、１７、２４、３１、３９、４７、５５、６２、７０、７６、８３、９０、９６、１０４、１１１、１１８、又は２７３に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むＣＲＩＳＰＲ反復配列を含む、実施形態１５５又は１５６に記載の方法。
１５８．前記ガイドＲＮＡがｔｒａｃｒＲＮＡを含む、実施形態１５５～１５７のいずれか１つに記載の方法。
１５９．前記ｔｒａｃｒＲＮＡが、配列番号３、１１、１８、２５、３２、４０、４８、５６、６３、７１、７７、８４、９１、９７、１０５、１１２、１１９、又は２７４に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態１５８に記載の方法。
１６０．前記ガイドＲＮＡが単一のガイドＲＮＡである、実施形態１５８又は１５９に記載の方法。
【０２１０】
１６１．前記ガイドＲＮＡが二重ガイドＲＮＡである、実施形態１５８又は１５９に記載の方法。
１６２．ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、前記ｃｒＲＮＡがスペーサー配列及びＣＲＩＳＰＲ反復配列を含み、前記ＣＲＩＳＰＲ反復配列が配列番号２４０と少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、
ａ）前記ｃｒＲＮＡ；及び任意選択的に
ｂ）ｃｒＲＮＡの前記ＣＲＩＳＰＲ反復配列とハイブリダイズすることができるトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）
を含むガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドに結合した場合に、前記ｃｒＲＮＡのスペーサー配列を介して配列特異的にＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができ、

ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドに異種性のプロモーターに機能的に連結されている核酸分子。
１６３．実施形態１６２に記載の核酸分子を含むベクター。
１６４．前記ベクターが、前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態１６３に記載のベクター。
１６５．前記ｔｒａｃｒＲＮＡが配列番号２４１と少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態１６４に記載のベクター。
【０２１１】
１６６．前記ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチド及び前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドが、同じプロモーターに作動可能に連結され、単一のガイドＲＮＡとしてコードされる、実施形態１６４又は１６５に記載のベクター。
１６７．前記ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチド及び前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドが、別々のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態１６４又は１６５に記載のベクター。
１６８．前記ベクターが、前記ＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記ＲＧＮポリペプチドが、配列番号２３５と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態１６３～１６７のいずれか１つに記載のベクター。
１６９．配列番号２４１と少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、
ａ）前記ｔｒａｃｒＲＮＡ；及び
ｂ）スペーサー配列及びＣＲＩＳＰＲ反復配列を含むｃｒＲＮＡであって、前記ｔｒａｃｒＲＮＡが、前記ｃｒＲＮＡの前記ＣＲＩＳＰＲ反復配列とハイブリダイズすることができるｃｒＲＮＡ
を含むガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ（ＲＧＮ）ポリペプチドに結合した場合に、前記ｃｒＲＮＡのスペーサー配列を介して配列特異的にＤＮＡ分子の標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズすることができ、ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドに異種性のプロモーターに機能的に連結されている上記核酸分子。
１７０．実施形態１６９に記載の核酸分子を含むベクター。
【０２１２】
１７１．前記ベクターが、前記ｃｒＲＮＡをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態１７０に記載のベクター。
１７２．前記ｃｒＲＮＡのＣＲＩＳＰＲ反復配列が、配列番号２４０と少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態１７１に記載のベクター。
１７３．前記ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチド及び前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドが、同じプロモーターに操作可能に連結され、単一のガイドＲＮＡとしてコードされる、実施形態１７１又は１７２に記載のベクター。
１７４．前記ｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチド及び前記ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする前記ポリヌクレオチドが、別々のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態１７１又は１７２に記載のベクター。
１７５．前記ベクターが、前記ＲＧＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記ＲＧＮポリペプチドが、配列番号２３５と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態１７０～１７４のいずれか１つに記載のベクター。
【０２１３】
以下の実施例は、限定としてではなく、例示として提供される。
【実施例】
【０２１４】
<u>実施例１．ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの同定</u>
１７種類のＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）が同定され、下記の表

１に記載されている。表１には、各ＲＧＮの名称、そのアミノ酸配列、由来、プロセシングされたｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡ配列が示されている（同定方法については実施例２を参照されたい）。表１は、さらに、一般的な単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）配列を提供し、ここで、ポリ－Ｎは、ｓｇＲＮＡの核酸標的配列を決定するスペーサー配列の位置を示す。ＲＧＮシステムＡＰＧ０５７３３．１、ＡＰＧ０６２０７．１、ＡＰＧ０１６４７．１、ＡＰＧ０８０３２．１、ＡＰＧ０２６７５．１、ＡＰＧ０１４０５．１、ＡＰＧ０６２５０．１、ＡＰＧ０４２９３．１、及びＡＰＧ０１３０８．１は、ＵＮＡのｔｒａｃｒＲＮＡのヘアピンステムの基部に保存配列を有していた（配列番号８）。ＡＰＧ０５７１２．１では、同じ位置にある配列はＣＮＡＮＮＧ（配列番号３７）である。ＡＰＧ０１６５８．１では、同じ位置にある配列はＣＮＡＮＵ（配列番号４５）である。ＲＧＮシステムＡＰＧ０６４９８．１及びＡＰＧ０６８７７．１については、ｔｒａｃｒＲＮＡのヘアピンステムの基部における保存配列はＵＮＡＮＧである（配列番号５３）。ＡＰＧ０９８８２．１及びＡＰＧ０６６４６．１では、同じ位置にある配列はＵＮＡＮＣ（配列番号６８）である。ＡＰＧ０９０５３．１では、同じ位置にある配列はＣＮＡＮＵ（配列番号１０２）である。

【０２１５】

【表１】

表1:配列ID及びCRISPR関連システムの要約

RGN ID	配列番号	由来	crRNA 反復配列（配列番号）	tracrRNA（配列番号）	sgRNA（配列番号）
APG05733.1	1	バチルス属	2	3	4
APG06207.1	9	クリセオバクテリウム属	10	11	12
APG01647.1	16	スフィンゴバクテリウム属	17	18	19
APG08032.1	23	クリセオバクテリウム属	24	25	26
APG05712.1	30	ブルセラ属	31	32	33
APG01658.1	38	ブドウ球菌属	39	40	41
APG06498.1	46	バチルス属	47	48	49
APG09106.1	54	ブレビバシラス属	55	56	57
APG09882.1	61	腸球菌属	62	63	64
APG02675.1	69	スフィンゴバクテリウム属	70	71	72
APG01405.1	75	クリセオバクテリウム属	76	77	78
APG06250.1	82	クリセオバクテリウム属	83	84	85
APG06877.1	89	バチルス属	90	91	92
APG09053.1	95	リゾビウム属	96	97	98
APG04293.1	103	ミロイデス属	104	105	106
APG01308.1	110	クリセオバクテリウム属	111	112	113
APG06646.1	117	バチルス属	118	119	120

【０２１６】

実施例２：ガイドＲＮＡの同定とｓｇＲＮＡの構築

研究中のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ系を自然に発現する細菌の培養物を、ｌｏｇ中期（ＯＤ６００～０．６００）まで増殖させ、ペレット化し、フラッシュ凍結した。ｍｉｒＶＡＮＡ ｍｉＲＮＡ単離キット（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いてペレットからＲＮＡを単離し、ＮＥＢＮｅｘｔ Ｓｍａｌｌ ＲＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｐｒｅｐキット（ＮＥＢ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）をライブラリー準備液を６％ポリアクリルアミドゲル上で分画し、２００ｎｔ未満のＲＮＡ種を捕獲し、それぞれｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを検出した。サービスプロバイダー（ＭｏＧｅｎｅ，Ｓ

ｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）により、Ｎｅｘｔ　Ｓｅｑ　５００（Ｈｉｇｈ　Ｏｕｔｐｕｔ　ｋｉｔ）上で深部配列決定（７５ｂｐ対末端）を行った読み取りは、Ｃｕｔａｄａｐｔを用いて品質をトリミングし、Ｂｏｗｔｉｅ２を用いて参照ゲノムにマッピングした。ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡ転写産物を検出するために、カスタムＲＮＡｓｅｑパイプラインをｐｙｔｈｏｎで作成した。プロセシングされたｃｒＲＮＡ境界は、天然反復スペーサーアレイの配列被覆率によって決定した。ｔｒａｃｒＲＮＡの抗反復部分は、許容ＢＬＡＳＴｎパラメーターを用いて同定した。ＲＮＡ塩基配列の深さから、アンチ反復を含む転写産物を同定することにより、プロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡの境界が確認された。ＲＮＡフォールディングソフトウェアＮＵＰＡＣＫによる二次構造予測を用いてＲＮＡの手動硬化を行った。ｓｇＲＮＡカセットは、ＤＮＡ合成により調製され、一般に以下のように設計された：（５’－＞３’）：３’末端でｃｒＲＮＡのプロセシングされた反復部分に作動可能に連結され、４ｂｐの非相補的リンカー（ＡＡＡＧ；配列番号１２３）に作動可能に連結され、その３’末端でプロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡに作動可能に連結された、２０－３０ｂｐスペー他の４ｂｐの非相補的リンカーも使用することができる。

【０２１７】

インビトロアッセイのために、ｓｇＲＮＡは、ＧｅｎｅＡｒｔ（商標）精密ｇＲＮＡ合成キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を用いて、ｓｇＲＮＡカセットのインビトロ転写により合成された。それぞれのＲＧＮポリペプチドのプロセシングされたｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡ配列を同定し、表１に示す。ＰＡＭライブラリー１及び２のために構築されたｓｇＲＮＡについては、下記を参照されたい。

【０２１８】

実施例３：各ＲＧＮのＰＡＭ要件の決定

各ＲＧＮに対するＰＡＭ必要条件は、本質的にKleinstiver et al. (2015) Nature 523:481-485 and Zetsche et al. (2015) Cell 163:759-771に適合させたＰＡＭ除去アッセイを用いて決定した。簡単に述べると、２つのプラスミドライブラリー（Ｌ１及びＬ２）をｐＵＣ１８バックボーン（ａｍｐＲ）中で作製し、各々が８つのランダムヌクレオチド（すなわち、ＰＡＭ領域）に隣接する異なる３０ｂｐプロトスペーサー（標的）配列を含有した。各ＲＧＮについてのライブラリー１及びライブラリー２の標的配列及びフランキングＰＡＭ領域を表２に示す。

【０２１９】

ライブラリーを、Ｌ１又はＬ２のプロトスペーサーに対応するスペーサー配列を含有する同族ｓｇＲＮＡと共に、本発明のＲＧＮ（大腸菌に最適化されたコドン）を含有するｐＲＳＦ－１ｂ発現ベクターを保持するＥ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞に別々にエレクトロポレーションした。形質転換反応には＞10^6ＣＦＵを得るのに十分なライブラリープラスミドを用いた。ｐＲＳＦ－１ｂ骨格中のＲＧＮ及びｓｇＲＮＡの両方は、Ｔ７プロモーターの制御下にあった。形質転換反応を１時間回収した後、カルベニシリン及びカナマイシンを含有するＬＢ培地に希釈し、一晩増殖させた。翌日、混合物を自己誘導性Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）Ｉｎｓｔａｎｔ　ＴＢ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｓｉｇｍａ）に希釈し、ＲＧＮ及びｓｇＲＮＡの発現を可能にし、さらに４時間又は２０時間増殖させた後、細胞を遠心分離し、プラスミドＤＮＡをＭｉｎｉ－ｐｒｅｐキット（Ｑｉａｇｅｎ，　Ｇｅｒｍａｎ　ｔｏｗｎ，￥３２適切なｓｇＲＮＡの存在下では、ＲＧＮによって認識されるＰＡＭを含むプラスミドが切断され、その結果、それらが集団から除去される。ＲＧＮでは認識できない、あるいは適切なｓｇＲＮＡを含まない細菌に形質転換されたＰＡＭを含むプラスミドは、生存して複製する。未切断プラスミドのＰＡＭ及びプロトスペーサー領域をＰＣＲ増幅し、公開プロトコール（１６ｓ－メタゲノムライブラリープレップガイド１５０４４２２３Ｂ、Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に従って配列決定のために調製した。サービスプロバイダー（ＭｏＧｅｎｅ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）により、ＭｉＳｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）上でディープシークエンシング（７５ｂｐシングルエンドリード）を行った。典型的には、１アンプリコン当たり１～４Ｍの読み取り値が得られた。ＰＡＭ領域を抽出し、計数し、各試料の

全読み取り値に正規化した。プラスミド切断に至るＰＡＭは、対照（すなわち、ライブラリーがＲＧＮを含むが適切なｓｇＲＮＡを欠く大腸菌に形質転換された場合）と比較して、過小表示されることによって同定された。新規なＲＧＮに対するＰＡＭ要求を表すために、問題の領域の全てのシークエンスに対する空乏比（対照における試料／周波数における周波数）を－ｌｏｇベース２変換による富化値に変換した。充分なＰＡＭは、濃縮値＞２．３（これは、空乏比＜～０．２に相当する）を有するものと定義した。両方のライブラリーでこのしきい値を超えるＰＡＭが収集され、ウェブロゴを生成するために使用され、例えば、「ウェブロゴ」として知られるインターネット上のウェブベースのサービスを使用して生成され得る。ＰＡＭ配列は、最高濃縮ＰＡＭに一貫したパターンがある場合に同定され、報告された。各ＲＧＮに対するコンセンサスＰＡＭ（濃縮係数（ＥＦ）＞２．３）を表２に示す。ＰＡＭ方向も表２に示す。本出願の他の箇所に記載されているように、ＡＰＧ０６６４６．１及びＡＰＧ０４２９３．１ヌクレアーゼは、ＰＡＭ相互作用ドメインを有さない。表２の結果は、それらが２～５ヌクレオチドである典型的なＰＡＭ要求性をもたないことを示している。ＡＰＧ０６６４６．１及びＡＰＧ０４２９３．１は、切断に必要な一塩基を有することが示された。

【０２２０】

【表２】

表2:PAM又はPAM様の測定

RGN ID	sgRNA L1 (配列番号)	sgRNA L2 (配列番号)	PAM (配列番号)	PAM 配向
APG05733.1	5	6	7	5'-標的-PAM-3'
APG06207.1	13	14	15	5'-標的-PAM-3'
APG01647.1	20	21	22	5'-標的-PAM-3'
APG08032.1	27	28	29	5'-標的-PAM-3'
APG05712.1	34	35	36	5'-標的-PAM-3'
APG01658.1	42	43	44	5'-標的-PAM-3'
APG06498.1	50	51	52	5'-標的-PAM-3'
APG09106.1	58	59	60	5'-PAM-標的-3'
APG09882.1	65	66	67	5'-標的-PAM-3'
APG02675.1	73	74	15	5'-標的-PAM-3'
APG01405.1	79	80	81	5'-標的-PAM-3'
APG06250.1	86	87	88	5'-標的-PAM-3'
APG06877.1	93	94	7	5'-標的-PAM-3'
APG09053.1	99	100	101	5'-標的-PAM-3'
APG04293.1	107	108	109	5'-標的-PAM-3'
APG01308.1	114	115	116	5'-標的-PAM-3'
APG06646.1	121	122	109	5'-標的-PAM-3'

【０２２１】

実施例４：ヌクレアーゼ活性を高めるためにガイドＲＮＡを操作する

４．１　ＲＧＮ　ＡＰＧ０９７４８及びＡＰＧ０９１０６．１

ＲＧＮの場合、ＡＰＧ０９７４８（配列番号１３７、及びＡＰＧ０９７４８のｃｒＲＮＡ反復配列、ｔｒａｃｒＲＮＡ配列、及び一般的なｓｇＲＮＡ配列は、それぞれ、配列番号２７３、２７４、及び２７５として記載され；全ての配列は、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０６８０７９（参照により本明細書に組み込まれる）に記載され、及びＡＰＧ０９１０６．１は、非常に高い配列同一性を有し、同じＰＡＭを有するが、ＲＮＡフォールディング予測を用いて、ヌクレアーゼ活性を最適化するように改変することができるガ

イドＲＮＡ中の領域を決定した。反復：アンチ反復領域におけるｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ塩基対の安定性は、反復：アンチ領域の短縮、Ｇ－Ｃ塩基対の付加、及びＧ－Ｕゆらぎ対の除去によって増加した。「最適化された」ガイド変異体を試験し、ＲＧＮ　ＡＰＧ０９７４８を用いてインビトロ切断アッセイで野生型ｇＲＮＡと比較した。

【０２２２】

ＲＮＰ形成のためのＲＧＮを作製するために、Ｃ末端Ｈｉｓ６（配列番号２７６）又はＨｉｓ１０（配列番号２７７）タグに融合したＲＧＮを含む発現プラスミドを構築し、大腸菌のＢＬ２１（ＤＥ３）株に形質転換した。発現は、５０μｇ／ｍＬカナマイシンを補充したＭａｇｉｃ　Ｍｅｄｉａ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて行った。溶解及び清澄化後、タンパク質を固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、Ｑｕｂｉｔタンパク質定量キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて、又は計算した減光係数を用いてＵＶ－ｖｉｓにより定量した。

【０２２３】

精製したＲＧＮをｓｇＲＮＡと約２：１の比で室温で２０分間インキュベートすることにより、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）を調製した。インビトロ切断反応のために、ＲＮＰを、好ましいＰＡＭ配列に隣接する標的プロトスペーサーを含有するプラスミド又は直鎖状ｄｓＤＮＡと共に室温で＞３０分間インキュベートした。ＴＲＡＣ座内の２つの標的核酸配列、ＴＲＡＣ１１（配列番号２７８）及びＴＲＡＣ１４（配列番号２７９）を試験した。ｇＲＮＡは、正しい標的核酸配列（例えば、ｇＲＮＡはＴＲＡＣ１１スペーサー配列を有し、アッセイされた標的はＴＲＡＣ１１である）と、正しい標的核酸配列（例えば、ｇＲＮＡはＴＲＡＣ１１スペーサー配列を有し、アッセイされた標的はＴＲＡＣ１４である）との両方の標的活性についてアッセイされた。プラスミド切断によって決定される活性は、アガロースゲル電気泳動によって評価される。結果を表３に示す。ガイド変種は、配列番号２８０～２８３として列挙され、スペーサー配列を備える。これらのガイド配列は、ＡＡＡＡ（配列番号２８４）の非相補的ヌクレオチドリンカーを使用する。反復：アンチ反復結合が増加した最適化ｇＲＮＡ（配列番号２８５；ポリ－Ｎはスペーサー配列の位置を示す）は、最適化されたｔｒａｃｒＲＮＡ（配列番号２８６）及び最適化されたｃｒＲＮＡ（配列番号２８７）成分を有する。最適化されたガイド変異体は、野生型ガイドＲＮＡを用いて以前に切断が検出されなかった２つの遺伝子座を切断することができた。反復：アンチ反復領域におけるハイブリダイゼーションの最適化により、ＡＰＧ０９７４８のインビトロ切断は、ＴＲＡＣ遺伝子座における複数の標的について、０％切断から１００％切断に増加した。

【０２２４】

【表３】

表3:操作されたガイド変異体を用いたAPG09748の編集効率

gRNA変異体(配列番号)	ガイド設計	アッセイ対象	ゲル 1～2 μL負荷		ゲル 2～1 μL負荷	
			無傷%	切断率	無傷%	切断%
280	最適化	TRAC11	68	32	57	43
280	最適化	TRAC14	100	0	100	0
281	最適化	TRAC11	100	0	100	0
281	最適化	TRAC14	70	30	69	31
282	WT	TRAC11	100	0	100	0
282	WT	TRAC14	100	0	100	0
283	WT	TRAC11	100	0	100	0
283	WT	TRAC14	100	0	100	0
なし		TRAC11	100	0	100	0
なし		TRAC14	100	0	100	0

【０２２５】

さらに最適化されたｇＲＮＡ変異体を設計し、アッセイした。さらに、スペーサー配列の異なる長さも試験し、スペーサー長がどのようにして切断効率に影響するかを決定した。スペーサー配列の外側のｓｇＲＮＡは、このアッセイにおいて「バックボーン」と呼ばれる。表４において、これらは「ＷＴ」（配列番号２８８、野生型配列）、及び３つの最適化されたｓｇＲＮＡ：Ｖ１（配列番号２８９）、Ｖ２（配列番号２９０）及びＶ３（配列番号２９１）として示される。これらの配列はすべて、スペーサー配列の位置を示すためにポリ－Ｎを有する。ガイドはインビトロ転写（ＩＶＴ）によりｓｇＲＮＡとして発現した。野生型ｓｇＲＮＡ骨格と比較して、Ｖ１は８７．８％同一であり、Ｖ２は９２．４％同一であり、Ｖ３は８５．５％同一である。二重ガイドＲＮＡを表すが、他の点では野生型及び上述した最適化されたｓｇＲＮＡに類似した合成気管ｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二本鎖（「合成」）も作製し、試験した。

【０２２６】

このセットのアッセイには、ＲＧＮ　ＡＰＧ０９１０６．１を使用した；さもなければ、インビトロ切断反応の方法は、上述したものと同様であった。標的核酸配列は、標的１（配列番号２９２）及び標的２（配列番号２９３）であった。結果を表４に示す。

【０２２７】

【表４】

表4:工学的ガイド変異体を用いたAPG09106．1の編集効率

RNA供給源	標的	スペーサー長	骨格	スペーサー配列番号	切断%
合成	2	18	WT	294	12.3
合成	1	20	WT	295	0
合成	2	20	WT	296	55.0
合成	1	25	WT	297	0
合成	2	25	WT	298	61.4
IVT	2	25	V1	299	1.1
IVT	2	25	V2	300	0.9
IVT	2	25	V3	301	0.7
IVT	2	20	V3	302	21.0
IVT	1	25	V3	303	2.0

【０２２８】

４．２　ＲＧＮ　ＡＰＧ０７４３３．１

ＲＮＡフォールディング予測を用いて、ＡＰＧ０７４３３．１（配列番号２３５として記載され、各々その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願２０１９／０３６７９４９及びＷＯ２０１９／２３６５６６に記載されている）のためのガイドＲＮＡ中の領域を決定した。それは、ヌクレアーゼ活性を最適化し、ウイルスベクターへのパッケージングのためのガイドＲＮＡを短くするように改変することができる。変化を起こす可能性のある部位として、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡ領域とｔｒａｃｒＲＮＡの末端ヘアピンとの間の反復：アンチ反復対の対合が同定された。反復：アンチ反復領域は、７（ＡＰＧ０７４３３．１－７ｂｐ、配列番号２３８及び２３９）、１３（ＡＰＧ０７４３３．１－１３ｂｐ、配列番号２５０及び２５１）、及び１５塩基対の長さ（ＡＰＧ０７４３３．１－１５ｂｐ、配列番号２４２及び２４３）に切断された。さらに、反復：アンチ反復領域の配列を変化させ、対合を１１塩基対に長さ（ＡＰＧ０７４３３．１－１１ｂｐ－ｓｙｎ、配列番号２４０及び２４１）に減少させ、野生型ガイドと比較してより小さなＲＮＡバルジを導入する第４の変異体を試験した。天然配列の４０ヌクレオチド（ＡＰＧ０７４３３．１－４０ｎｔ　ＴＨＰ、配列番号２５４及び２５５）及び４２ヌクレオチド（ＡＰＧ０７４３３．１－４２ｎｔ　ＴＨＰ、配列番号２４４及び２４５）への長さへの還元を含む、ｔｒａｃｒＲＮＡ中の末端ヘアピンに対しても切断を行った。これらを３５

ヌクレオチド（ＡＰＧ０７４３３．１－３５ｎｔＴＨＰ－ｓｙｎ、配列番号：２４８及び２４９）及び３９ヌクレオチド（ＡＰＧ０７４３３．１－３９ｎｔＴＨＰ－ｓｙｎ、配列番号：２４６及び２４７）にも短縮するように改変ステム－ループを設計した。１つのガイドは、１３塩基対の短縮反復：アンチ反復領域と４２ヌクレオチドの短縮末端ヘアピンを組み合わせた（ＡＰＧ０７４３３．１－１３ｂｐ４２ｎｔＴＨ、配列番号２５２及び２５３）。スペーサー長が卵割に及ぼす影響も試験した。野生型ガイドＲＮＡ主鎖上のスペーサー長２５（ＡＰＧ０７４３３．１－天然［２５］、配列番号２３６及び２３７；スペーサー配列は配列番号２７１として示される）及び１８（ＡＰＧ０７４３３．１－天然［１８］、配列番号２５６及び２５７；スペーサー配列は配列番号２７２として示される）のヌクレオチドも試験した。

【０２２９】

アニーリングバッファー（Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）中に２０μＭのｃｒＲＮＡ及び１０μＭのｔｒａｃｒＲＮＡを含む溶液を調製し、次に７８℃に１０分間加熱し、次に３７℃で３０分間加熱することにより、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡをアニーリングすることにより、以下の二重ガイドＲＮＡを調製した。ＲＮＰは、精製ＡＰＧ０７４３３．１タンパク質と共に０．５μＭでインキュベートし、二重ガイドＲＮＡをリン酸緩衝生理食塩水中１μＭで２０分間インキュベートすることにより形成した。この実験で用いたガイドＲＮＡを表５に示す。

【０２３０】

【表５】

表5. 二重ガイドRNA

二重 gRNA 名	crRNA 配列番号	tracrRNA 配列番号
APG07433.1-天然[25]	236	237
APG07433.1-7bp	238	239
APG07433.1-11bp-syn	240	241
APG07433.1-15bp	242	243
APG07433.1-42ntTHP	244	245
APG07433.1-39ntTHP-syn	246	247
APG07433.1-35ntTHP-syn	248	249
APG07433.1-13bp	250	251
APG07433.1-13bp42ntTH	252	253
APG07433.1-40ntTHP	254	255
APG07433.1-天然[18]	256	257
APG07433.1cr-13bp tr-35ntTHP	258	259

【０２３１】

これらのＲＮＰを、ＦＡＭ及びＣｙ３標識プライマーを用いた増幅によって生成された適切な標的配列（配列番号２６０）を含むＰＣＲ生成物とインキュベートして、切断生成物の正確かつ高感度の定量を容易にした。反応物は、上記のようにして製造された２５０ｎＭのＲＮＰ、及び１×Ｃｕｔｓｍａｒｔ ｂｕｆｆｅｒ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）中の１５０ｎＭのＦＡＭ及びＣｙ３標識ＰＣＲ産物を含有した。反応を３７℃で１５分間進行させ、ＲＮａｓｅ Ａを０．１ｍｇ／ｍＬに、ＥＤＴＡを４５ｍＭに添加することにより停止させた。急冷した反応物を５０℃で３０分間及び９５℃で５分間加熱した。 次に、試料を、５％ＴＢＥゲル（Ｂｉｏ－ｒａｄ）上での天然アクリルアミドゲル電気泳動を用いて分析した。 これらは、ＣｈｅｍｉＤｏｃ ＭＰイメージャー上で撮像された。 ２つの色素の各々を定量に使用することができ、各試料を２回実施した。この実験の結果を表６に示す。

【０２３２】

【表６】

表6. 切断の結果

RNP	切断%				
	Cy3チャネル		FAMチャネル		全体平均
	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	
ヌクレアーゼのみ(ガイドなし)	0	0	0	0	0
APG07433.1-天然[25]	66.41	61.16	68.81	56.85	63.3
APG07433.1-7bp	0	3.38	2.83	0	1.6
APG07433.1-11bp-syn	66.33	76.38	66.73	68	69.4
APG07433.1-15bp	50.7	65.61	54.62	59.95	57.7
APG07433.1-42ntTHP	44.81	50.59	48.84	51.77	49.0
APG07433.1-39ntTHP-syn	19.16	32.88	24.91	33.43	27.6
APG07433.1-35ntTHP-syn	26.77	38.61	32.09	40.2	34.4
APG07433.1-13bp	44.36	33.03	42.93	35.22	38.9
APG07433.1-13bp42ntTHP	35.91	36.74	33.84	39.2	36.4
APG07433.1-40ntTHP	44.52	57.14	48.34	57.84	52.0
APG07433.1-天然[18]	11.1	9.76	12.93	13.24	11.8
APG07433.1cr-13bp tr-35ntTHP	10.66	12.25	12.65	13.54	12.3

【０２３３】

この分析は、天然バックボーンがほとんどの短縮された変異体、及び短縮された標的配列（ＡＰＧ０７４３３．１－天然［１８］、配列番号２５６及び２５７）を含む変異体を上回ることを実証する。短縮された骨格配列のうち、最も高いレベルの切断を有するものは、２５ｎｔのターゲティング配列（スペーサー；配列番号２７１）、ｃｒＲＮＡについての配列番号２４０及びｔｒａｃｒＲＮＡとしての配列番号２４１を含むＡＰＧ０７４３３．１－１１ｂｐ－ｓｙｎと呼ばれる配列である。このガイドバリエーションには、ステムに操作された膨隆部を有する改変反復：アンチ反復ステムループが含まれていた。

【０２３４】

実施例５：哺乳動物細胞における遺伝子編集活性の実証

ＲＧＮ発現カセットを作製し、哺乳動物発現のためのベクターに導入した。ＲＧＮ ＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、ＡＰＧ０５７１２．１、ＡＰＧ０１６５８．１、ＡＰＧ０５７３３．１、ＡＰＧ０６４９８．１、ＡＰＧ０６６４６．１、ＡＰＧ０９８８２．１、ＡＰＧ０１４０５．１、及びＡＰＧ０１３０８．１は、それぞれ哺乳動物の発現に対してコドン最適化され（配列番号３０４、３０５、及び４１１－４１８）、ならびに発現されたタンパク質は、Ｎ末端でＳＶ４０核局在化配列（ＮＬＳ；配列番号１２５）及び３×ＦＬＡＧタグ（配列番号１２６）、及びＣ末端でヌクレオプラズミンＮＬＳ配列（配列番号１２７）に作動可能に融合した。ＮＬＳ配列の２コピーを用い、タンデムで操作可能に融合させた。各発現カセットをサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（配列番号３０６）の制御下に置いた。ＣＭＶ転写エンハンサー（配列番号３０７）もまた、ＣＭＶプロモーターを含む構築物に含まれ得ることが当技術分野で公知である。ヒトＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ Ｕ６プロモーター（配列番号３０８）の制御下で各々単一のｇＲＮＡをコードするガイドＲＮＡ発現構築物を作製し、発現ベクターに導入した。表７に示すように、ＲｅｌＡ、ＡｕｒｋＢ、ＧＡＰＤＨ、ＬＩＮＣ０１５０９、ＨＢＢ、ＣＦＴＲ、ＨＰＲＴ１、ＴＲＡ、ＥＭＸ１、及びＶＥＧＦＡを含む選択された遺伝子の標的領域を誘導する。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼＡＰＧ０９１０６．１については、特異的残基を突然変異させてタンパク質のヌクレアーゼ活性を増加させ、具体的にはＡＰＧ０９１０６のＴ８４９残基をアルギニンに突然変異させた（配列番号３０９）。この点突然変異は哺乳動物細胞の編集率を増加させた。

【０２３５】

上記の構築物を哺乳動物細胞に導入した。トランスフェクションの１日前に、１ｘ１０^{5}のＨＥＫ２９３Ｔ細胞（Ｓｉｇｍａ）を、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）＋１０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）ウシ胎児血清（Ｇｉｂｃｏ）及び１％ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ）中の２４ウェル皿に平板培養した。細胞が５０～６０％コンフルエントであった翌日、製造業者の指示に従って、ウェル当たり１．５μＬのリポフェクタミン３０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、５００ｎｇのＲＧＮ発現プラスミド＋５００ｎｇの単一ｇＲＮＡ発現プラスミドを同時トランスフェクトした。４８時間の増殖後、全ゲノムＤＮＡを、製造業者の指示に従ってゲノムＤＮＡ単離キット（Ｍａｃｈｅｒｙ－Ｎａｇｅｌ）を用いて回収した。

【０２３６】

次に、全ゲノムＤＮＡを分析して、標的遺伝子における編集の速度を決定した。ＰＣＲ増幅及びその後の増幅されたゲノム標的部位の分析に使用するためにオリゴヌクレオチドを作製した（配列番号３１０及び３１１）。すべてのＰＣＲ反応は、０．５μＭの各プライマーを含む２０μＬの反応において、１０μＬの２Ｘ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ　Ｐｈｕｓｉｏｎ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて実施した。各標的遺伝子を含む大きなゲノム領域を、まず、ＰＣＲ＃１プライマー（配列番号３１０及び３１１）を用いて、以下のプログラムを用いて増幅した：９８℃、１分；［９８℃、１０秒；６２℃、１５秒；７２℃、５分］；７２℃、５分；１２℃、永続。

【０２３７】

次に、このＰＣＲ反応の１マイクロリットルを、各ガイドに特異的なプライマー（ＰＣＲ＃２プライマー；配列番号：３６５～３７０）を用いて、９８℃、１分；［９８℃、１０秒；６７℃、１５秒；７２℃、３０秒］の３５サイクル；７２℃、５分；１２℃のプログラムを用いてさらに増幅した。ＰＣＲ＃２のためのプライマーは、Ｉｌｌｕｍｉｎａ配列決定のためのＮｅｘｔｅｒａ　Ｒｅａｄ　１及びＲｅａｄ　２トランスポザーゼアダプターオーバーハング配列を含む。

【０２３８】

２回目のＰＣＲ増幅後、製造業者の指示に従ってＰＣＲクリーンアップキット（Ｚｙｍｏ）を用いてＤＮＡを洗浄し、水中で溶出させた。２００～５００ｎｇの精製ＰＣＲ＃２生成物を２０μＬの反応中で２μＬの１０Ｘ　ＮＥＢ緩衝液２及び水と組み合わせ、次のプログラムを用いてアニールしてヘテロ二本鎖ＤＮＡを形成した：９５℃、５分；９５～８５℃、２℃／秒の速度で冷却し；８５～２５℃、０．１℃／秒の速度で冷却し；１２℃、永久に。アニーリング後、５μＬのＤＮＡを無酵素対照として除去し、１μＬのＴ７エンドヌクレアーゼＩ（ＮＥＢ）を添加し、反応物を３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーション後、５×ＦｌａｓｈＧｅｌローディング色素（Ｌｏｎｚａ）を添加し、５μＬの各反応及び対照をゲル電気泳動を用いて２．２％アガロースＦｌａｓｈＧｅｌ（Ｌｏｎｚａ）で分析した。ゲルの可視化後、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）のパーセンテージを、以下の式を用いて決定した：ＮＨＥＪ事象％＝１００ｘ［１－（１－画分切断）（１／２）］、ここで（切断された画分）は、（消化生成物の密度）／（消化生成物の密度＋未消化の親バンド）として定義される。

【０２３９】

いくつかの試料については、ＳＵＲＶＥＹＯＲ（登録商標）を用いて、哺乳動物細胞における発現後の結果を分析した。ゲノムＤＮＡ抽出の前に、トランスフェクション後７２時間、細胞を３７℃でインキュベートした。ゲノムＤＮＡは、製造業者のプロトコールに従って、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ　ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）を用いて抽出した。ＲＧＮ標的部位に隣接するゲノム領域をＰＣＲ増幅し、製造業者のプロトコールに従ってＱｉａＱｕｉｃｋ　Ｓｐｉｎ　Ｃｏｌｕｍｎ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて生成物を精製した。精製されたＰＣＲ産物の総量２００～５００ｎｇを、１μｌの１０×Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼＰＣＲ緩衝液（酵素）及び超純水と混合し、最終容量１０μｌにし、ヘテロ二本鎖形成を可能にするための再アニーリング工程

に供した：９５℃、１０分間、９５℃～８５℃、－２℃／ｓ、８５℃～２５℃、－０．２５℃／ｓ、及び２５℃で１分間の保持。

【０２４０】

再アニーリング後、製品はメーカーの推奨プロトコールに従ってＳＵＲＶＥＹＯＲ（登録商標）ヌクレアーゼ及びＳＵＲＶＥＹＯＲ（登録商標）エンハンサーＳ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で処理し、４～２０％ノベックスＴＢＥポリアクリルアミドゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で分析した。ゲルをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ　ＤＮＡ染色（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で１０分間染色し、ゲルＤｏｃゲルイメージングシステム（Ｂｉｏ－ｒａｄ）でイメージングした。定量は、相対バンド強度に基づいて行った。インデルパーセンテージは、式、１００×（１－（ｂ＋ｃ）／（ａ＋ｂ＋ｃ））１／２によって決定された。ここで、ａは未消化ＰＣＲ産物の積分強度であり、ｂ及びｃは各切断生成物の積分強度である。

【０２４１】

さらに、Ｉｌｌｕｍｉｎａオーバーハング配列を含むＰＣＲ＃２からの産物は、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　１６Ｓ　Ｍｅｔａｇｅｎｏｍｉｃ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｌｉｂｒａｒｙプロトコールに従ってライブラリー調製を行った。サービスプロバイダ（ＭＯＧｅｎｅ）によりＩｌｌｕｍｉｎａ　Ｍｉ－Ｓｅｑプラットフォーム上でディープシークエンシングを行った。典型的には、２５０ｂｐのペア末端読み取り（２×１００，０００読み取り）の２００，０００が、アンプリコン当たりに生成される。読み取り値は、編集率を計算するためにＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏ（Pinello, et al. 2016 Nature Biotech, 34:695-697）を用いて分析した。アウトプットアラインメントは、組換え部位におけるミクロ相同部位を同定するだけでなく、挿入部位及び欠失部位を確認するために手で硬化させた。各試料の総合的な編集率、削除率、挿入率を表７に示す。実験はすべてヒト細胞で行った。「標的」は、遺伝子標的内の標的配列である。各標的配列について、ガイドＲＮＡは、使用されるＲＧＮに応じて、相補的ＲＮＡスペーサー配列及び適切なｓｇＲＮＡを含んでいた。ガイドＲＮＡによる実験の選択された分解を表８．１及び８．２に示す。

【０２４２】

【表７－１】

表7:遺伝子標的の全体的な編集率

RGN	遺伝子標的	ガイド RNA (配列番号)	標的(配列番号)	全体編集率	削除率	挿入率
APG09106.1	AurkB	316	314	0.55%	100%	
APG09106.1	AurkB	312	315	0.60%	54%	46%
APG09106.1 T849R	AurkB	316	314	2.97%	98%	2.00%
APG09106.1 T849R	AurkB	312	315	2.36%	100%	
APG05712.1	RelA	419	482	0.36%	72.33%	27.67%
APG05712.1	AurkB	420	483	1.39%	25.94%	75.12%
APG05712.1	RelA	421	484	1.04%	32.10%	70.33%
APG05712.1	RelA	422	485	0.28%	64.13%	35.87%
APG01658.1	RelA	423	486	10.03%	70.66%	29.33%
APG01658.1	GAPDH	424	487	5.60%	76.96%	25.97%
APG01658.1	LINC01509	425	488	9.87%	75.10%	26.61%
APG01658.1	HBB	426	489	0.42%	63.86%	36.13%
APG01658.1	CFTR	427	490	6.06%	75.42%	27.86%
APG01658.1	AurkB	428	491	13.07%	88.02%	13.14%
APG05733.1	HPRT1	429	492	0.36%		100%
APG05733.1	AurkB	430	493	5.01%	86.40%	13.60%
APG05733.1	RelA	431	494	0.76%		100%
APG05733.1	HPRT1	432	495	0.17%	38.42%	61.58%
APG05733.1	RelA	433	496	0.96%	77.52%	22.48%
APG06498.1	TRA	434	497	35.35%	92.25%	8.29%
APG06498.1	TRA	435	498	21.04%	84.87%	16.34%
APG06498.1	TRA	436	499	10.16%	89.44%	10.69%
APG06498.1	TRA	437	500	13.21%	87.24%	15.00%
APG06498.1	TRA	438	501	13.56%	86.73%	13.66%
APG06498.1	TRA	439	502	9.62%	95.85%	19.90%
APG06498.1	TRA	440	503	1.51%	75.89%	24%
APG06498.1	TRA	441	504	2.63%	88.81%	11.76%
APG06498.1	TRA	442	505	4.27%	52.09%	47.90%
APG06646.1	TRA	443	497	0.33%	0%	100%
APG06646.1	VEGFA	444	506	4.52%	40.83%	63.79%
APG06646.1	AurkB	445	507	0.66%	69.38%	30.62%
APG06646.1	AurkB	446	508	6.55%	79.97%	20.37%
APG06646.1	TRA	447	509	2.47%	73.40%	40.81%
APG06646.1	TRA	448	510	0.14%	34.46%	65.55%

【０２４３】

【表７－２】

APG06646.1	TRA	449	511	0.61%	0%	100%
APG06646.1	AurkB	450	493	7.94%	67.95%	32.40%
APG06646.1	TRA	451	512	7.03%	86.95%	14.03%
APG06646.1	TRA	452	513	0.50%	21.80%	78.10%
APG06646.1	TRA	453	514	3.53%	86.42%	16.28%
APG06646.1	RelA	454	515	6.22%	80.39%	45.34%
APG06646.1	TRA	455	516	0.38%	0%	100%
APG06646.1	TRA	456	517	0.34%	66.76%	48.22%
APG06646.1	RelA	457	518	3.78%	75.25%	67.90%
APG06646.1	TRA	458	519	0.42%	69.61%	30.39%
APG06646.1	TRA	459	520	0.08%	100.00%	0.00%
APG06646.1	AurkB	460	521	1.09%	30.18%	69.81%
APG06646.1	AurkB	461	522	0.28%	86.60%	21.78%
APG06646.1	AurkB	462	523	10.92%	78.87%	22.05%
APG06646.1	TRA	463	504	0.08%	0%	100%
APG06646.1	TRA	464	505	2.84%	38.26%	61.47%
APG06646.1	TRA	465	524	0.43%	71.67%	28.33%
APG06646.1	TRA	466	525	0.03%	0.00%	100.00%
APG06646.1	TRA	467	526	0.08%	100%	0%
APG09882.1	RelA	468	482	0.32%	100.00%	0.00%
APG09882.1	EMX1	469	527	12.84%	82.46%	17.79%
APG09882.1	VEGFA	470	528	14.76%	92.56%	7.77%
APG09882.1	TRA	471	529	14.66%	94.19%	7.33%
APG09882.1	TRA	472	530	7.84%	95.07%	5.75%
APG09882.1	VEGFA	473	531	24.45%	88.96%	11.57%
APG09882.1	TRA	474	532	14.43%	90.24%	10.96%
APG01405.1	RelA	475	482	0.06%	0%	100%
APG01405.1	AurkB	476	533	6.81%	80.58%	20.27%
APG01405.1	AurkB	477	534	0.54%	33.83%	66.16%
APG01405.1	HPRT1	478	535	1.07%	42.14%	57.87%
APG01405.1	RelA	479	484	0.55%	2.07%	97.93%
APG01308.1	HPRT1	480	536	1.19%	80.57%	19.43%
APG01308.1	AurkB	481	537	0.90%	94.97%	6.46%

【０２４４】

表８．１及び表８．２に、それぞれのガイドの具体的な挿入及び削除を示す。これらの表では、標的配列は太字の大文字で識別される。８ｍｅｒのＰＡＭ領域には二重の下線が付いており、主な認識ヌクレオチドは太字で示してある。挿入は小文字で識別される。削除はダッシュ（－－－）で表示される。ＩＮＤＥＬ位置は、標的配列のＰＡＭ近位端から計算され、端は位置０である。位置がエッジのターゲット側にある場合は正（＋）、エッジのＰＡＭ側にある場合は負（－）である。

【０２４５】

【表８】

表8．1：RGN APG09106．1を使用したガイド831の具体的な挿入及び削除

編集した標的配列	#読み取り	%読み取り	インデル%	タイプ	インデルの位置	サイズ
GTCTG**ATTGCCTGTCGTTGCCCCTCCCAGATCAT**GGAGGAGTTGGCAGA（野生型、配列番号 316）	92294	99.40				
GTCTG**ATTGCCTGTCGTTGCCCCTCCCA**----------AGGAGTTGGCAGA（配列番号 317）	263	0.28	54.22	削除	+19	8
GTCTG**ATTGCCTGTCGTTGCCC**ctaagtgtattaagcattgtctcagagattttGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 318）	222	0.24	45.77	挿入	+13	20

【０２４６】

【表９】

表8．2:APG09106．1 T849Rを用いたガイド831の具体的な挿入及び削除

編集した標的配列	#読み取り	%読み取り	インデル%	タイプ	インデルの位置	サイズ
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTCCCAGATCATGGAGGAGTTGGCAGA（野生型、配列番号 316）	189881	97.64				
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCC--------TGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 319）	602	0.309	13.129	削除	+14	10
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTCCCAGATC-GGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 320）	394	0.202	8.593	削除	+23	2
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTCCCAGAT-----AGGAGTTGGCAGA(配列番号 321）	399	0.205	8.702	削除	+22	5
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCaTC-------TG--GGAGTTGGCAGA(配列番号 322）	379	0.194	8.266	欠失及び変異	+16	10
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTC--------TGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 323）	350	0.179	7.633	削除	+16	8
GTCTGAT----------TGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 324）	309	0.158	6.739	削除	−1	26
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTC--------GGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 325）	280	0.143	6.106	削除	+16	9
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTCC-----aGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 326）	274	0.140	5.976	欠失及び変異	+17	7
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCC----------GGAGTTGGCAGA（配列番号 327）	251	0.129	5.474	削除	+13	15
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCC-------ATCATGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 328）	250	0.128	5.452	削除	+13	7
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTC-------CATGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 329）	231	0.118	5.038	削除	+16	6
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTCCCA----------GTACT（配列番号 330）	218	0.112	4.754	削除	+19	30
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCC-------aATCtTGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 331）	206	0.105	4.492	欠失及び変異	+14	5
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCC--------TgggATGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 332）	162	0.083	3.533	欠失及び変異	+13	8
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCCTC---------AGTTGGCAGA（配列番号 333）	158	0.081	3.446	削除	+16	14
GTCTGATTGCCTGTCGTTGCCCC--------TCATGGAGGAGTTGGCAGA（配列番号 334）	122	0.062	2.660	削除	+14	7

【０２４７】

実施例６：植物細胞における遺伝子編集活性の実証

本発明のＲＧＮのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ活性は、Li, et al., 2013 (Nat. Biotech. 31:688-691)から改変されたプロトコールを用いて植物細胞において実証される。簡単に言えば、本発明のＲＧＮの植物コドン最適化バージョン（配列番号１、９、１６、２３、３０、３８、４６、５４、６１、６９、７５、８２、８９、９５、１０３、１１０、又は117）は、N末端SV40核局在化シグナルをコードする核酸配列に作動可能に連結されて、一過性形質転換ベクターの強力な構成的35Sプロモーターの後ろにクローニングされる。適切なＰＡＭ配列に隣接する植物ＰＤＳ遺伝子の１つ以上の部位を標的とするｓｇＲＮＡ

を、第２の一過性発現ベクター中の植物Ｕ６プロモーターの後ろにクローニングする。発現ベクターをＰＥＧ媒介形質転換を用いて、Nicotiana benthamiana葉肉プロトプラストに導入した。形質転換されたプロトプラストを暗所で３６時間までインキュベートする。ゲノムＤＮＡはＤＮｅａｓｙ　Ｐｌａｎｔ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いてプロトプラストから単離した。ＲＧＮ標的部位に隣接するゲノム領域をＰＣＲ増幅し、製造業者のプロトコールに従ってＱｉａＱｕｉｃｋ　Ｓｐｉｎ　Ｃｏｌｕｍｎ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて生成物を精製する。精製されたＰＣＲ産物の総量２００～５００ｎｇを、１μｌの１０×Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼＰＣＲ緩衝液（酵素）及び超純水と混合し、最終容量１０μｌにし、ヘテロ二本鎖形成を可能にするための再アニーリング工程に供し：９５℃、１０分間、９５℃～８５℃、－２℃／ｓでの傾斜、８５℃～２５℃、－０．２５℃／ｓでの傾斜、及び２５℃で１分間保持。

【０２４８】

再アニーリング後、製品は、製造業者の推奨プロトコールに従って、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ及びＳＵＲＶＥＹＯＲエンハンサーＳ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で処理され、４～２０％のＮｏｖｅｘ　ＴＢＥポリアクリルアミドゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）ゲルをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ　ＤＮＡ染色（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で１０分間染色し、ゲルドックゲルイメージングシステム（Ｂｉｏ－ｒａｄ）でイメージングする。定量は、相対的なバンド強度に基づく。インデルパーセンテージは、式：１００×（１－（１－（ｂ＋ｃ）／（ａ＋ｂ＋ｃ））１／２）によって決定される。ここで、ａは未消化ＰＣＲ産物の積分強度であり、ｂ及びｃは各切断生成物の積分強度である。

【０２４９】

実施例７：疾患標的の同定

臨床変異体のデータベースは、ＮＣＢＩ　ＣｌｉｎＶａｒデータベースから入手した。データベースは、ＮＣＢＩ　ＣｌｉｎＶａｒウェブサイトで世界中のウェブサイトから入手可能である。このリストから病原性一塩基多型（ＳＮＰ）を同定した。ゲノム遺伝子座情報を用いて、各ＳＮＰが重なり合った領域及び周囲の領域におけるＣＲＩＳＰＲ標的を同定した。原因突然変異（「Ｃａｓｌ　Ｍｕｔ．」）を標的とするためにＡＰＧ０９７４８又はＡＰＧ０９１０６．１を含むＲＧＮシステムと組み合わせて塩基編集を用いて補正することができるＳＮＰの選択を表９．１に示す。原因突然変異（「Ｃａｓｌ　Ｍｕｔ．」）を標的とするためにＡＰＧ０６６４６．１又はＡＰＧ０１６５８．１を含むＲＧＮシステムと組み合わせて塩基編集を用いて補正することができるＳＮＰの選択を表９．２に示す。表９．１と表９．２の両方で、各疾患のエイリアスは１つだけリストされている。「ＲＳ＃」は、ＮＣＢＩウェブサイトのＳＮＰデータベースを介してＲＳ受付番号に対応する。染色体受入番号は、ＮＣＢＩのウェブサイトから見つかった受入参考情報を提供する。表９．１及び９．２はまた、各疾患について、ＲＧＮシステムＡＰＧ０９７４８又はＡＰＧ０９１０６．１（表９．１）、又はＡＰＧ０６６４６．１又はＡＰＧ０１６５８．１（表９．２）に適したゲノム標的配列情報を提供する。標的配列情報はまた、本発明の対応するＲＧＮのために必要なｓｇＲＮＡの産生のためのプロトスペーサー配列を提供する。

【０２５０】

【表１０－１】

表9．1:APG09748及びAPG09106．1の疾患標的

疾患	RS#	Casl Mut.	染色体への接近	遺伝子記号	標的(配列番号)
Stargardt病1型	1800728	A>G	NC_0001.10,NC_0001.11	ABCA4	313
グリコーゲン蓄積症1A型	1801175	C>T	NC_000017.10,NC_00017.11	G6PC	335
重症複合免疫不全症	3218716	C>T	NC_00014.8,NC_00014.9	MYH7	336
フェニルケトン尿症	5030858	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	337
高フェニルアラニン血症	5030860	T>C	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	338
α－１－アンチトリプシン欠損症	28929474	C>T	NC_00014.8,NC_00014.9	SERPINA1	339
MECP2関連疾患	28934906	G>A	NC_00023.10,NC_00023.11	MECP2	340
封入体ミオパシー2	28937594	A>G	NC_00009.11,NC_00009.12	GNE	341
フォン・ヴィルブランド病	41276738	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	VWF	342
乳がん及び／又は卵巣がん	41293455	G>A	NC_000017.10,NC_00017.11	BRCA1	343
MECP2関連疾患	61750240	G>A	NC_00023.10,NC_00023.11	MECP2	344
MEFV関連障害	61752717	T>C	NC_000016.9,NC_000016.10	MEFV	345
乳がん及び／又は卵巣がん	62625307	G>A	NC_000017.10,NC_00017.11	BRCA1	346
乳がん及び／又は卵巣がん	62625308	G>A	NC_000017.10,NC_00017.11	BRCA1	347
遺伝性がん素因症候群	63749795	C>T	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	348
遺伝性がん素因症候群	63749849	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	349
遺伝性がん素因症候群	63750636	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	350
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼII欠損症	74315294	C>T	NC_0001.10,NC_0001.11	CPT2	351
嚢胞性線維症	74597325	C>T	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	352
UDPグルコース－ヘキソース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼの欠損	75391579	A>G	NC_00009.11,NC_00009.12	GALT	353
嚢胞性線維症	75527207	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	354
アミロイド遺伝子組換えチレチンアミロイドーシス	76992529	G>A	NC_00018.9,NC_00018.10	TTR	355
嚢胞性線維症	77010898	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	356

【０２５１】

【表１０－２】

異染性白質ジストロフィー	80338815	C>T	NC_00022.10,NC_00022.11	ARSA	357
カウデン症候群3	80338844	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	SDHD	358
Smith-Lemli-Optiz症候群	80338853	G>A	NC_00011.9,NC_00011.10	DHCR7	359
乳がん及び／又は卵巣がん	80356962	C>T	NC_000017.10,NC_00017.11	BRCA1	360
乳がん及び／又は卵巣がん	80357123	G>A	NC_000017.10,NC_00017.11	BRCA1	361
先天性遺伝病	80358259	A>G	NC_00018.9,NC_00018.10	NPC1	362
乳がん及び／又は卵巣がん	80359212	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	363
ファンコニ貧血	104886457	G>A	NC_00009.11,NC_00009.12	FANCC	364
SLC26A2関連疾患	104893915	C>T	NC_000005.9,NC_000005.10	SLC26A2	365
心筋症	104894368	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	MYL2	366
X連鎖性難聴	104894396	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	GJB2	367
先天性遺伝病	104894635	C>T	NC_000017.10,NC_00017.11	SGSH	368
家族性地中海熱	104895097	C>T	NC_000016.9,NC_000016.10	MEFV	369
家族性自律神経障害	111033171	A>G	NC_00009.11,NC_00009.12	ELP1	370
シュワックマン症候群	113993993	A>G	NC_0007.13,NC_0007.14	SBDS	371
RYR1関連疾患	118192172	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	RYR1	372
セロイドリポフスチン症ニューロン2	119455955	G>A	NC_00011.9,NC_00011.10	TPP1	373
中鎖アシル補酵素A脱水素酵素欠損症	121434274	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	ACADM	374
原発性高シュウ酸尿症	121908529	G>A	NC_00002.11,NC_00002.12	AGXT	375
心筋症	121908987	C>T	NC_0007.13,NC_0007.14	PRKAG2	376
カウデン症候群	121909219	C>T	NC_000010.10,NC_000010.11	PTEN	377
心筋症	121913628	C>T	NC_00014.8,NC_00014.9	MYH7	378
先天性遺伝病	121918243	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	MMACHC	379
PTPN11関連疾患	121918457	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	PTPN11	380
若年性骨髄単球性白血病	121918462	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	PTPN11	381
若年性骨髄単球性白血病	121918466	A>G	NC_00012.11,NC_00012.12	PTPN11	382
ムコ多糖症I型	121965020	C>T	NC_00004.11,NC_0004.12	IDUA	383
セロイドリポフスチン症ニューロン1	137852700	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	PPT1	384
CHEK2関連がん感受性	137853007	G>A	NC_00022.10,NC_00022.11	CHEK2	385
大腸癌	137854568	C>T	NC_000005.9,NC_000005.10	APC	386

【０２５２】

【表１０－３】

家族性高コレステロール血症	137929307	G>A	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	387
心顔面皮膚症候群	180177035	T>C	NC_0007.13,NC_0007.14	BRAF	388
家族性乳癌	180177083	G>A	NC_000016.10,NC_00016.9	PALB2	389
MYBPC3関連疾患	200411226	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	390
RYR1関連疾患	200563280	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	RYR1	391
MYBPC3関連疾患	387907267	G>A	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	392
デスモイド病、遺伝性	397515734	C>T	NC_000005.9,NC_000005.10	APC	393
マルファン症候群／Loeys-Dietz 症候群／家族性胸部大動脈瘤及び解離	397515757	C>T	NC_000015.9,NC_000015.10	FBN1	394
免疫不全14	397518423	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	PIK3CD	395
先天性遺伝病	398123009	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	PACS1	396
Bリンパ芽球性白血病リンパ腫、ICD-O亜型なし	529008617	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	MUTYH	397
家族性乳癌	587780021	G>A	NC_00002.11,NC_00002.12	BARD1	398
家族性高コレステロール血症	746118995	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	399
家族性高コレステロール血症	769370816	G>A	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	400

【０２５３】

【表１１－１】

表9．2:APG6646．1又はAPG01658．1の疾患標的

疾患	RGN	RS#	Casl Mut.	染色体への接近	遺伝子記号	標的（配列番号）
Stargardt病1型	APG01658.1	1800553	C>T	NC_0001.10,NC_0001.11	ABCA4	538
Stargardt病1型	APG06646.1	1800553	C>T	NC_0001.10,NC_0001.11	ABCA4	539
遺伝性がん素因症候群	APG01658.1	5030804	A>G	NC_000003.11,NC_000003.12	VHL	540
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	5030804	A>G	NC_000003.11,NC_000003.12	VHL	541
フェニルケトン尿症	APG01658.1	5030851	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	542
フェニルケトン尿症	APG06646.1	5030851	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	543
黒色腫と骨髄腫	APG01658.1	11547328	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	CDK4	544
黒色腫と骨髄腫	APG06646.1	11547328	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	CDK4	545
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	11547917	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	546
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	11547917	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	547
シャルコー・マリー・ツース病	APG01658.1	61444459	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	LMNA	548
シャルコー・マリー・ツース病	APG06646.1	61444459	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	LMNA	549
アンジェルマン症候群	APG01658.1	61751362	G>A	NC_00023.10,NC_00023.11	MECP2	550
アンジェルマン症候群	APG06646.1	61751362	G>A	NC_00023.10,NC_00023.11	MECP2	551
フェニルケトン尿症	APG01658.1	62514895	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	552
フェニルケトン尿症	APG06646.1	62514895	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	553
フェニルケトン尿症	APG01658.1	62516152	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	554
フェニルケトン尿症	APG06646.1	62516152	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	555
リンチ症候群	APG01658.1	63749795	C>T	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	556
リンチ症候群	APG06646.1	63749795	C>T	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	557
遺伝性癌	APG01658.1	63749843	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH6	558
遺伝性癌	APG06646.1	63749843	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH6	559
遺伝性がん素因症候群	APG01658.1	63749849	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	560
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	63749849	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	561

【０２５４】

【表１１－２】

遺伝性がん素因症候群	APG01658.1	63750508	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	562
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	63750508	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	563
遺伝性がん素因症候群	APG01658.1	63750636	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	564
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	63750636	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	565
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	63750871	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	PMS2	566
リンチ症候群	APG01658.1	63751194	C>T	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	567
リンチ症候群	APG06646.1	63751194	C>T	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	568
リンチ症候群	APG01658.1	63751711	G>A	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	569
リンチ症候群	APG06646.1	63751711	G>A	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	570
嚢胞性線維症	APG01658.1	75039782	C>T	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	571
嚢胞性線維症	APG06646.1	75039782	C>T	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	572
難聴	APG01658.1	76434661	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	GJB2	573
難聴	APG06646.1	76434661	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	GJB2	574
嚢胞性線維症	APG01658.1	76713772	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	575
嚢胞性線維症	APG06646.1	76713772	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	576
心筋症	APG01658.1	76992529	G>A	NC_00018.9,NC_00018.10	TTR	577
心筋症	APG06646.1	76992529	G>A	NC_00018.9,NC_00018.10	TTR	578
嚢胞性線維症	APG01658.1	77010898	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	579
嚢胞性線維症	APG06646.1	77010898	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	580
嚢胞性線維症	APG01658.1	80224560	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	581
嚢胞性線維症	APG06646.1	80224560	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	CFTR	582
カウデン症候群	APG01658.1	80338844	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	SDHD	583
カウデン症候群	APG06646.1	80338844	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	SDHD	584
SLC26A4関連疾患	APG01658.1	80338849	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	SLC26A4	585
SLC26A4関連疾患	APG06646.1	80338849	G>A	NC_0007.13,NC_0007.14	SLC26A4	586
乳がん	APG01658.1	80356885	C>T	NC_000017.10,NC_000017.11	BRCA1	587
乳がん	APG06646.1	80356885	C>T	NC_000017.10,NC_000017.11	BRCA1	588
乳がん	APG01658.1	80358557	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	589
乳がん	APG06646.1	80358557	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	590
乳がん	APG01658.1	80358650	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	591
乳がん	APG06646.1	80358650	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	592

【０２５５】

【表１１－３】

乳がん	APG01658.1	80358659	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	593
乳がん	APG06646.1	80358659	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	594
乳がん	APG06646.1	80358663	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	595
乳がん	APG01658.1	80358871	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	596
乳がん	APG06646.1	80358871	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	597
乳がん	APG01658.1	80358920	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	598
乳がん	APG06646.1	80358920	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	599
乳がん	APG01658.1	80358972	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	600
乳がん	APG06646.1	80358972	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	601
乳がん	APG01658.1	80358981	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	602
乳がん	APG06646.1	80358981	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	603
乳がん	APG01658.1	80359003	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	604
乳がん	APG06646.1	80359003	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	605
乳がん	APG01658.1	80359004	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	606
乳がん	APG06646.1	80359004	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	607
乳がん	APG01658.1	80359013	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	608
乳がん	APG06646.1	80359013	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	609
乳がん	APG01658.1	80359027	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	610
乳がん	APG06646.1	80359027	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	611
乳がん	APG01658.1	80359071	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	612
乳がん	APG06646.1	80359071	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	613
乳がん	APG01658.1	80359115	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	614
乳がん	APG06646.1	80359115	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	615
乳がん	APG01658.1	80359140	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	616
乳がん	APG06646.1	80359140	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	617
乳がん	APG06646.1	80359159	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	618
乳がん	APG01658.1	80359180	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	619

【０２５６】

【表１１－４】

乳がん	APG06646.1	80359180	C>T	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	620
乳がん	APG01658.1	81002846	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	621
乳がん	APG06646.1	81002846	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	622
乳がん	APG06646.1	81002862	A>G	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	623
ファンコニ貧血	APG01658.1	104886457	G>A	NC_00009.11,NC_00009.12	FANCC	624
ファンコニ貧血	APG06646.1	104886457	G>A	NC_00009.11,NC_00009.12	FANCC	625
無軟骨形成	APG01658.1	104893915	C>T	NC_000005.9,NC_000005.10	SLC26A2	626
無軟骨形成	APG06646.1	104893915	C>T	NC_000005.9,NC_000005.10	SLC26A2	627
RYR1関連疾患	APG01658.1	118192172	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	RYR1	628
RYR1関連疾患	APG06646.1	118192172	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	RYR1	629
CHEK2関連がん感受性	APG01658.1	137853007	G>A	NC_00022.10,NC_00022.11	CHEK2	630
CHEK2関連がん感受性	APG06646.1	137853007	G>A	NC_00022.10,NC_00022.11	CHEK2	631
神経線維腫症	APG06646.1	137854550	A>G	NC_000017.10,NC_000017.11	NF1	632
神経線維腫症	APG01658.1	137854556	G>A	NC_000017.10,NC_000017.11	NF1	633
神経線維腫症	APG06646.1	137854556	G>A	NC_000017.10,NC_000017.11	NF1	634
ミオパシー	APG01658.1	193922390	C>T	NC_00014.8,NC_00014.9	MYH7	635
ミオパシー	APG06646.1	193922390	C>T	NC_00014.8,NC_00014.9	MYH7	636
QT延長症候群	APG01658.1	199473428	C>T	NC_0007.13,NC_0007.14	KCNH2	637
QT延長症候群	APG06646.1	199473428	C>T	NC_0007.13,NC_0007.14	KCNH2	638
フェニルケトン尿症	APG01658.1	199475575	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	639
フェニルケトン尿症	APG06646.1	199475575	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	640
フェニルケトン尿症	APG01658.1	199475679	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	641
フェニルケトン尿症	APG06646.1	199475679	C>T	NC_00012.11,NC_00012.12	PAH	642
MYBPC3関連疾患	APG01658.1	200411226	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	643
MYBPC3関連疾患	APG06646.1	200411226	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	644
ミオパシー	APG06646.1	267606908	T>C	NC_00014.8,NC_00014.9	MYH7	645
心筋症	APG01658.1	267607003	C>T	NC_000010.10,NC_000010.11	RBM20	646
心筋症	APG06646.1	267607003	C>T	NC_000010.10,NC_000010.11	RBM20	647
ヌーナン症候群	APG01658.1	267607048	A>G	NC_000010.10,NC_000010.11	SHOC2	648

【０２５７】

【表１１－５】

ヌーナン症候群	APG06646.1	267607048	A>G	NC_000010.10,NC_000010.11	SHOC2	649
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	267607213	G>A	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	650
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	267607213	G>A	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	651
リンチ症候群	APG01658.1	267607789	G>A	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	652
リンチ症候群	APG06646.1	267607789	G>A	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	653
リンチ症候群	APG01658.1	267607845	G>A	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	654
リンチ症候群	APG06646.1	267607845	G>A	NC_000003.11,NC_000003.12	MLH1	655
遺伝性がん素因症候群	APG01658.1	267608098	A>G	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH6	656
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	267608098	A>G	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH6	657
MYBPC3関連疾患	APG01658.1	387906397	A>G	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	658
MYBPC3関連疾患	APG06646.1	387906397	A>G	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	659
乳がん	APG01658.1	387906843	G>A	NC_000017.10,NC_000017.11	RAD51D	660
乳がん	APG06646.1	387906843	G>A	NC_000017.10,NC_000017.11	RAD51D	661
MYBPC3関連疾患	APG01658.1	387907267	G>A	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	662
MYBPC3関連疾患	APG06646.1	387907267	G>A	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	663
乳がん	APG01658.1	397507389	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	664
乳がん	APG06646.1	397507389	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	665
乳がん	APG01658.1	397507404	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	666
乳がん	APG06646.1	397507404	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	667
白血病	APG01658.1	397507545	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	PTPN11	668
白血病	APG06646.1	397507545	G>A	NC_00012.11,NC_00012.12	PTPN11	669
白血病	APG01658.1	397507547	A>G	NC_00012.11,NC_00012.12	PTPN11	670
白血病	APG06646.1	397507547	A>G	NC_00012.11,NC_00012.12	PTPN11	671
乳がん	APG01658.1	397507922	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	672
乳がん	APG06646.1	397507922	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	673
マルファン症候群	APG01658.1	397515757	C>T	NC_000015.9,NC_000015.10	FBN1	674
マルファン症候群	APG06646.1	397515757	C>T	NC_000015.9,NC_000015.10	FBN1	675

【０２５８】

【表１１－６】

MYBPC3関連疾患	APG01658.1	397516074	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	676
MYBPC3関連疾患	APG06646.1	397516074	C>T	NC_00011.9,NC_00011.10	MYBPC3	677
心筋症	APG01658.1	397516354	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	TNNI3	678
心筋症	APG06646.1	397516354	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	TNNI3	679
免疫不全	APG01658.1	397518423	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	PIK3CD	680
免疫不全	APG06646.1	397518423	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	PIK3CD	681
Bリンパ芽球性白血病リンパ腫	APG01658.1	529008617	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	MUTYH	682
Bリンパ芽球性白血病リンパ腫	APG06646.1	529008617	G>A	NC_0001.10,NC_0001.11	MUTYH	683
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	570942190	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	684
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	570942190	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	685
毛細血管拡張性運動失調症候群	APG01658.1	587776551	G>A	NC_00011.10,NC_00011.9	ATM	686
毛細血管拡張性運動失調症候群	APG06646.1	587776551	G>A	NC_00011.10,NC_00011.9	ATM	687
腺様嚢胞癌	APG01658.1	587778720	C>T	NC_000017.10,NC_000017.11	TP53	688
腺様嚢胞癌	APG06646.1	587778720	C>T	NC_000017.10,NC_000017.11	TP53	689
遺伝性がん素因症候群	APG01658.1	587779075	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	690
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	587779075	C>T	NC_00002.11,NC_00002.12	MSH2	691
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	587779333	T>C	NC_0007.13,NC_0007.14	PMS2	692
毛細血管拡張性運動失調症候群	APG01658.1	587779866	A>G	NC_00011.10,NC_00011.9	ATM	693
毛細血管拡張性運動失調症候群	APG06646.1	587779866	A>G	NC_00011.10,NC_00011.9	ATM	694
乳がん	APG01658.1	587780021	G>A	NC_00002.11,NC_00002.12	BARD1	695
乳がん	APG06646.1	587780021	G>A	NC_00002.11,NC_00002.12	BARD1	696
乳がん	APG01658.1	587781629	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	697
乳がん	APG06646.1	587781629	G>A	NC_000013.10,NC_000013.11	BRCA2	698
遺伝性がん素因症候群	APG01658.1	587782144	C>T	NC_000017.10,NC_000017.11	TP53	699
遺伝性がん素因症候群	APG06646.1	587782144	C>T	NC_000017.10,NC_000017.11	TP53	700
マルファン症候群	APG01658.1	727503054	A>G	NC_000015.9,NC_000015.10	FBN1	701
マルファン症候群	APG06646.1	727503054	A>G	NC_000015.9,NC_000015.10	FBN1	702
ヌーナン症候群	APG01658.1	727503110	T>C	NC_00012.11,NC_00012.12	KRAS	703

【０２５９】

【表１１－７】

ヌーナン症候群	APG06646.1	727503110	T>C	NC_00012.11,NC_00012.12	KRAS	704
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	746118995	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	705
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	746118995	C>T	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	706
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	748944640	G>A	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	707
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	748944640	G>A	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	708
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	765696008	G>A	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	709
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	765696008	G>A	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	710
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	769370816	G>A	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	711
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	769370816	G>A	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	712
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	769737896	C>T	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	713
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	769737896	C>T	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	714
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	771019366	A>G	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	715
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	771019366	A>G	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	716
傍神経節腫	APG01658.1	772551056	C>T	NC_0001.11,NC_0001.10	SDHB	717
傍神経節腫	APG06646.1	772551056	C>T	NC_0001.11,NC_0001.10	SDHB	718
遺伝性癌	APG01658.1	786201042	C>T	NC_00002.12,NC_00002.11	MSH6	719
遺伝性癌	APG06646.1	786201042	C>T	NC_00002.12,NC_00002.11	MSH6	720
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	875989907	G>A	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	721
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	875989907	G>A	NC_000019.9,NC_000019.10	LDLR	722
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	879254797	G>A	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	723
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	879254797	G>A	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	724
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	879254871	C>T	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	725
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	879254871	C>T	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	726
家族性高コレステロール血症	APG01658.1	879255000	T>C	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	727
家族性高コレステロール血症	APG06646.1	879255000	T>C	NC_00019.10,NC_00019.9	LDLR	728

【０２６０】

実施例８：Ｆｒｉｅｄｒｅｉｃｈ運動失調の原因となる標的突然変異

Ｆｒｉｅｄｒｅｉｃｈ運動失調（ＦＲＤＡ）を引き起こす３塩基反復配列の拡大は、ＦＲＤＡ不安定領域と呼ばれるＦＸＮ遺伝子内の特定の遺伝子座で起こる。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）は、ＦＲＤＡ患者細胞における不安定領域を切除するために使用され得る。このアプローチは、１）ヒトゲノム中の対立遺伝子を標的とするようにプログラムされ得るＲＧＮ及びガイドＲＮＡ配列；及び２）ＲＧＮ及びガイド配列の送達アプローチを必要とする。ゲノム編集に使用される多くのヌクレアーゼ、例えばＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来の一般的に使用されるＣａｓ９ヌクレアーゼ（ＳｐＣａｓ９）は、大きすぎて、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターにパッケージすることができない。このため、Ｓｐ

Ｃａｓ９を使用した実行可能なアプローチは考えにくい。

【０２６１】

ＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、及びＡＰＧ０６６４６．１のような本発明のコンパクトＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ＦＲＤＡ不安定領域の切除に特異的に適している。各ＲＧＮは、ＦＲＤＡ不安定領域の近傍にあるＰＡＭ要件を有する。さらに、これらのＲＧＮの各々は、ガイドＲＮＡと共にＡＡＶベクターにパッケージングされ得る。２つのガイドＲＮＡを詰め込むには第２のベクターが必要であろうが、このアプローチは、ＳｐＣａｓ９のようなより大きなヌクレアーゼで必要とされるものと比較して有利である。ＳｐＣａｓ９は、２つのベクター間でタンパク質配列を分割する必要がある。

【０２６２】

表１０は、ＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、又はＡＰＧ０６６４６．１をＦＲＤＡ不安定領域の５’及び３’フランクに標的化するのに適したゲノム標的配列の位置、ならびにゲノム標的に対するｓｇＲＮＡの配列を示す。いったん遺伝子座に入ると、ＲＧＮはＦＡ不安定領域を切り出す。領域の切除は、遺伝子座のＩｌｌｕｍｉｎａシークエンシングによって確認することができる。

【０２６３】

【表１２】

表10:RGNシステムのゲノム標的配列

FRDA 不安定領域に対する位置	APG09748 又は APG09106.1 のゲノム標的配列(配列番号)	APG09748 又は APG09106.1 の sgRNA(配列番号)	APG06646.1 のゲノム標的配列(配列番号)	APG06646.1 の sgRNA(配列番号)
5’	401	405	729	733
5’	402	406	730	734
3’	403	407	731	735
3’	404	408	732	736

【０２６４】

実施例９：鎌状赤血球症の原因となる突然変異を標的とする

ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域（配列番号２２０）内の標的配列は、鎌状赤血球症の症状を治癒又は軽減するために胎児ヘモグロビン（ＨｂＦ）を増加させるメカニズムを提供し得る。例えば、ゲノムワイド関連研究では、ＨｂＦレベルの上昇と関連するＢＣＬ１１Ａにおける一連の遺伝的変異が同定されている。これらの変異は、段階特異的な系統制限エンハンサー領域として機能するＢＣＬ１１Ａの非コード領域に見出されるＳＮＰの集合である。さらなる研究により、このＢＣＬ１１ＡエンハンサーがＢＣＬ１１Ａ発現のために赤血球細胞において必要であることが明らかになった（参照により本明細書に援用されるBauer et al, (2013) Science 343:253-257）。エンハンサー領域はＢＣＬ１１Ａ遺伝子のイントロン２内に見出され、イントロン２におけるＤＮａｓｅＩ過敏症の３領域（しばしば調節可能性と関連するクロマチン状態を示す）が同定された。これら３つの領域は、ＢＣＬ１１Ａの転写開始部位からのキロベースでの距離に従って、「＋６２」、「＋５８」及び「＋５５」と同定された。これらのエンハンサー領域は、約３５０（＋５５）；５５０（＋５８）；及び３５０（＋６２）ヌクレオチド長である（Ｂａｕｅｒら、２０１３）。

【０２６５】

実施例９．１：優先ＲＧＮシステムの特定

ここでは、成人ヘモグロビンのβ－グロビン産生に関与する遺伝子であるＨＢＢ遺伝子座内の結合部位へのＢＣＬ１１Ａの結合を破壊するＲＧＮ系を用いたβ－ヘモグロビン異常症の潜在的治療について述べる。このアプローチは、哺乳動物細胞においてより効率的であるＮＨＥＪを使用する。さらに、このアプローチは、インビボ送達のために単一のＡＡＶベクターにパッケージングされ得る十分に小さいサイズのヌクレアーゼを使用する。

【０２６６】

ヒトＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域（配列番号２２０）におけるＧＡＴＡ１エンハンサーモチーフは、成人ヒト赤血球におけるＨｂＦの同時再発現を伴うＢＣＬ１１Ａ発現を減少させるために、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（ＲＧＮ）を用いる破壊の理想的な標的である（Wu et al. (2019) Nat Med 387:2554）。ＡＰＧ０９７４８又はＡＰＧ０９１０６．１と適合するいくつかのＰＡＭ配列は、このＧＡＴＡ１部位を取り囲む遺伝子座において容易に明らかである。これらのヌクレアーゼは、５’－ＤＴＴＮ－３’（配列番号６０）のＰＡＭ配列を有し、サイズがコンパクトであり、単一のＡＡＶ又はアデノウイルスベクター中の適切なガイドＲＮＡと共にそれらの送達を可能にする。ＡＰＧ０６６４６．１は、そのサイズに加えて、最小限のＰＡＭ要件（配列番号１０９）を有し、このアプローチに適している。この送達アプローチは、造血幹細胞へのアクセス、及び十分に確立された安全性プロファイル及び製造技術など、他のものと比較して複数の利点をもたらす。

【０２６７】

Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ（ＳｐｙＣａｓ９）由来の一般的に使用されるＣａｓ９ヌクレアーゼは、５’－ＮＧＧ－３’（配列番号１０１）のＰＡＭ配列を必要とし、それらのいくつかはＧＡＴＡ１モチーフ近傍に存在する。しかしながら、ＳｐｙＣａｓ９のサイズは、単一のＡＡＶ又はアデノウイルスベクターへのパッケージングを妨げ、従って、このアプローチの上述の利点を忘れる。デュアルデリバリー戦略が採用され得るが、それは、著しい製造の複雑さ及びコストを追加する。さらに、二重ウイルスベクター送達は、所与の細胞での編集が成功するために、両方のベクターによる感染を必要とするので、遺伝子補正の効率を有意に低下させる。

【０２６８】

ヒトコドン最適化ＡＰＧ０９７４８（配列番号４０９）、ＡＰＧ０９１０６．１（配列番号４１０）、又はＡＰＧ０６６４６．１（配列番号４１５）をコードする発現カセットが、実施例５に記載されたものと同様に産生される。また、ＲＮＡＧＮＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、又はＡＰＧ０６６４６．１のためのガイドＲＮＡを発現する発現カセットも産生される。これらのガイドＲＮＡは、１）ＢＣＬ１１Ａエンハンサー座（標的配列）内の非コード又はコードＤＮＡ鎖のいずれかに相補的なプロトスペーサー配列、及び２）ガイドＲＮＡとＲＧＮとの会合に必要なＲＮＡ配列を含む。各ＲＧＮによる標的化のためのいくつかの潜在的ＰＡＭ配列は、ＢＣＬ１１Ａ　ＧＡＴＡ１エンハンサーモチーフを取り囲むので、強力な切断及びＮＨＥＪを介したＢＣＬ１１Ａ　ＧＡＴＡ１エンハンサー配列の破壊を生じる最良のプロトスペーサー配列を決定するために、いくつかの潜在的ガイドＲＮＡ構築物が生成される。表１１の標的ゲノム配列は、表１１に示すｓｇＲＮＡを用いて評価される。

【０２６９】

【表１３】

表11:APG06646. 1を用いたBCL11A GATA1エンハンサー座の標的配列

APG09748 又は APG0916.1(配列番号)の標的ゲノム配列	APG09748 又は APG0916.1(配列番号)の sgRNA	APG06646.1(配列番号)の標的ゲノム配列	APG06646.1(配列番号)の sgRNA
221	224	737	740
222	269	738	741
223	270	739	742

【０２７０】

ＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、又はＡＰＧ０６６４６．１がＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域を破壊する挿入又は欠失を生成する効率を評価するために、ヒト胚性腎細胞（ＨＥＫ細胞）などのヒト細胞株を用いる。ＲＧＮ発現カセット（例えば、実施例５に記載されるような）を含むＤＮＡベクターを作製する。表１１のガイドＲＮＡ配列のコ

ード配列を含む発現カセットを含む別個のベクターもまた生成される。そのような発現カセットは、実施例５に記載されているように、ヒトＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ　Ｕ６プロモーター（配列番号３０８）をさらに含むことができる。あるいは、ＲＧＮ及びガイドＲＮＡの両方の発現カセットを含む単一ベクターを使用することができる。ベクターを実施例５に記載したもののような標準的な技術を用いてＨＥＫ細胞に導入し、細胞を１～３日間培養する。この培養期間の後、ゲノムＤＮＡを単離し、挿入又は欠失の頻度を、実施例５に記載されているように、Ｔ７エンドヌクレアーゼＩ消化及び／又は直接ＤＮＡ配列決定を用いて決定する。

【０２７１】

標的ＢＣＬ１１Ａ領域を含むＤＮＡ領域を、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｎｅｘｔｅｒａ　ＸＴオーバーハング配列を含むプライマーを用いてＰＣＲにより増幅する。これらのＰＣＲアンプリコンは、Ｔ７エンドヌクレアーゼＩ消化を用いてＮＨＥＪ形成について調べるか、又はＩｌｌｕｍｉｎａ　１６Ｓ　Ｍｅｔａｇｅｎｏｍｉｃ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｌｉｂｒａｒｙプロトコール又は類似の次世代シークエンシング（ＮＧＳ）ライブラリー調製後にライブラリー調製を受けるかのいずれかである。深いシークエンシングに続いて、生成されたリードをＣＲＩＳＰＲＥＳＳＯによって分析して、編集の速度を計算する。出力アラインメントは、挿入部位と欠失部位を確認するために手動でキュレートされる。この分析は、好ましいＲＧＮ及び対応する好ましいガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を同定する。この分析の結果、ＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、又はＡＰＧ０６６４６．１のいずれかが同等に好ましいか、又は１つのＲＧＮが最も好ましいと考えられる。さらに、分析により、複数の好ましいガイドＲＮＡが存在するか、又は表１７のすべての標的ゲノム配列が等しく好ましいことが決定され得る。

【０２７２】

実施例９．２：胎児ヘモグロビン発現試験

この例では、ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域を破壊する挿入又は欠失を生じたＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、又はＡＰＧ０６６４６．１を、胎児ヘモグロビンの発現についてアッセイする。健康なヒトドナーＣＤ３４$^{+}$造血幹細胞（ＨＳＣ）を用いる。これらのＨＳＣを培養し、好ましいＲＧＮのコード領域を含む発現カセットを含むベクター及び好ましいｓｇＲＮＡを、実施例５に記載したものと同様の方法を用いて導入する。あるいは、エレクトロポレーションを使用してもよい。エレクトロポレーション後、これらの細胞は、確立されたプロトコール（例えば、参照により本明細書に援用されるGiarratana et al. (2004) Nat Biotechnology 23:69-74）を用いて、インビトロで赤血球に分化される。次に、ＨｂＦの発現を、抗ヒトＨｂＦ抗体によるウエスタンブロット法を用いて測定するか、又は高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を介して定量する。ＢＣＬ１１Ａエンハンサー遺伝子座の破壊が成功すれば、ＲＧＮのみでエレクトロポレーションされたＨＳＣと比較してＨｂＦ産生が増加するが、ガイドはないと予想される。

【０２７３】

実施例９．３：鎌状赤血球形成減少試験

この実施では、ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域を破壊する挿入又は欠失を生じたＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、又はＡＰＧ０６６４６．１を鎌状赤血球形成の減少についてアッセイする。鎌状赤血球症患者由来のドナーＣＤ３４$^{+}$造血幹細胞（ＨＳＣ）を用いる。これらのＨＳＣを培養し、好ましいＲＧＮのコード領域を含む発現カセットを含むベクターを導入し、好ましいｓｇＲＮＡを実施例５に記載したものと同様の方法を用いて導入する。あるいは、エレクトロポレーションを使用してもよい。エレクトロポレーション後、これらの細胞は、確立されたプロトコールを用いて、インビトロで赤血球に分化される（Giarratana et al. (2004) Nat Biotechnology 23:69-74）。次に、ＨｂＦの発現を、抗ヒトＨｂＦ抗体によるウエスタンブロット法を用いて測定するか、又は高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を介して定量する。ＢＣＬ１１Ａエンハンサー遺伝子座の破壊が成功すれば、ＲＧＮのみでエレクトロポレーションされたＨＳＣと比較してＨｂＦ産生が増加するが、ガイドはないと予想される。

【０２７４】
鎌状赤血球形成は、これらの分化した赤血球にメタ重亜硫酸を加えることによって誘導される。鎌状赤血球と正常赤血球の数を顕微鏡で数える。鎌状赤血球の数は、ＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、又はＡＰＧ０６６４６．１＋ｓｇＲＮＡで処理された細胞において、未処理又はＲＧＮ単独で処理された細胞よりも少ないことが予想される。
【０２７５】
実施例９．４：マウスモデルにおける疾患治療の妥当性確認
ＡＰＧ０９７４８、ＡＰＧ０９１０６．１、又はＡＰＧ０６６４６．１によるＢＣＬ１１Ａ遺伝子座の破壊の有効性を評価するために、鎌状赤血球貧血の適切なヒト化マウスモデルを用いる。好ましいＲＧＮ及び好ましいｓｇＲＮＡをコードする発現カセットは、ＡＡＶベクター又はアデノウイルスベクターにパッケージングされる。特に、アデノウイルス型Ａｄ５／３５は、ＨＳＣを標的とするのに効果的である。鎌状赤血球対立遺伝子を有するヒト化ＨＢＢ遺伝子座を含む適切なマウスモデルを、Ｂ６；ＦＶＢ－Ｔｇ（ＬＣＲ－ＨＢＡ２，ＬＣＲ－ＨＢＢ＊Ｅ２６Ｋ）５３Ｈｈｂ／Ｊ又はＢ６．Ｃｇ－Ｈｂａｔｍ１Ｐａｚ　ｂｔｍ１Ｔｏｗ　Ｔｇ（ＨＢＡ－ＨＢＢｓ）４１Ｐａｚ／ＨｈｂＪのように選択する。これらのマウスは、顆粒球コロニー刺激因子単独で、又は血中へのＨＳＣの動員のためにプレリキサーと組み合わせて処理される。次に、ＲＧＮ及びガイドプラスミドを担持するＡＡＶ又はアデノウイルスを静脈内注射し、マウスを１週間回復させる。これらのマウスから得られた血液を、メタ重亜硫酸塩を用いたインビトロ鎌状化アッセイで試験し、マウスを縦断的に追跡して、死亡率及び造血機能をモニターする。ＲＧＮ及びガイドＲＮＡを有するＡＡＶ又はアデノウイルスによる処置は、両方の発現カセットを欠くウイルス、又はＲＧＮ発現カセットを単独で有するウイルスで処置されたマウスと比較して、鎌状化、死亡、及び造血機能を改善することが期待される。
【０２７６】
実施例１０：哺乳動物細胞における塩基編集活性
シチジンデアミナーゼ－ＲＧＮ融合タンパク質を産生する発現カセットを、以下のように構築した。ＲＧＮのコード配列（本明細書に記載されるＡＰＧ０６６４６．１、及び各々全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第２０１９／０３６７９４９号及び国際公開第ＷＯ２０１９／２３６５６６号に記載されたＡＰＧ０８２９０．１）は、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれているが、哺乳動物発現のためにコドンを最適化し、ニッカーゼとして機能するように突然変異させた（それぞれ、配列番号１２８及び２６２）。 このコード配列は、そのＮ末端（配列番号１２５）にＮＬＳを含み、そのＣ末端で３ｘＦＬＡＧタグ（配列番号１２６）に作動可能に連結され、そのＣ末端でシチジンデアミナーゼに作動可能に連結された融合タンパク質（配列番号１２９～１３２）を生成する発現カセットに導入された。ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０６８０７９は、そのＣ末端上で、そのＣ末端で作動可能にＲＧＮニッカーゼに連結され、そのＣ末端で作動可能に第２のＮＬＳ（配列番号１２７）に連結されたアミノ酸リンカー（配列番号１３３）に、そのＣ末端上で作動可能に連結され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。これらの発現カセットを、哺乳動物細胞において融合タンパク質の発現を駆動することができるｐＴｗｉｓｔ　ＣＭＶベクター（Ｔｗｉｓｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）に各々導入した。哺乳動物細胞において、ヒトＵ６プロモーターの制御下でガイドＲＮＡを発現する別々のベクターも作製した。これらのガイドＲＮＡ（ｎＡＰＧ０６６４６．１については配列番号１３４～１３６、ｎＡＰＧ０８２９０．１については配列番号２６３～２６５）は、それぞれ、脱アミナーゼ－ｎＲＧＮ融合タンパク質、又はＲＧＮ自体を、塩基編集又は遺伝子編集のための標的ゲノム配列に導くことができる。
【０２７７】
５００ｎｇのシチジンデアミナーゼ－ＲＧＮ発現プラスミド又は標準ＲＧＮ発現プラスミド、及び５００ｎｇのガイドＲＮＡ発現プラスミドを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、２４ウェルプレート中で７５～９０％コンフルエントでＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に共トランスフェクトした。 次

に、細胞を３７℃で７２時間インキュベートした。 次に、ゲノムＤＮＡを、製造業者のプロトコールに従って、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ ９６組織（Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ）を用いて抽出した。 ガイドＲＮＡ標的部位に隣接するゲノム領域をＰＣＲ増幅し、製造者のプロトコールに従ってＺＲ－９６ ＤＮＡクリーン＆コンセントレーター（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を用いて生成物を精製した。次に、精製されたＰＣＲ産物を、Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｍｉｑ（２×２５０）上の次世代シークエンシングのために送った。結果は、インデル形成又は特異的シトシン突然変異について分析した。

【０２７８】

下記の表１２は、シチジン塩基の編集及び各構築物及びガイドの組み合わせの実際の形成を示す。興味深いことに、同じガイドＲＮＡを用いてＲＧＮ ＡＰＧ０６６４６．１の活性をシチジンデアミナーゼ－ｎＡＰＧ０６６４６．１の活性と比較すると、遺伝子編集よりも最大２０倍高いシチジン塩基編集が観察された。これらの結果は、特定の標的部位で低いヌクレアーゼ活性を有するＲＧＮが、その部位での効率的な塩基編集であり得ることを実証する。さらに、塩基編集アプリケーションにおけるインデル形成は、しばしば望ましくない結果であるため、ある部位で低いヌクレアーゼ活性を有するＲＧＮは、塩基編集アプリケーションに好ましい。

【０２７９】

【表１４】

表12:RGN及びシチジンデアミナーゼーnRGNのシチジン塩基編集及び遺伝子編集

RGN又はデアミナーゼーRGN	ガイドRNA	シチジン塩基編集での総読み取り%	INDEL形式での総読み取り%
ARM05-nAPG06646.1	SGN000775	8.02	0.82
ARM06CTD-nAPG06646.1	SGN000775	0	0
ARM08-nAPG06646.1	SGN000775	5.15	0.46
ARM11-nAPG06646.1	SGN000775	0.66	0
APG06646.1	SGN000775	0	0.47
ARM05-nAPG06646.1	SGN000777	2.5	0.08
ARM06CTD-nAPG06646.1	SGN000777	0.53	0
ARM08-nAPG06646.1	SGN000777	8.12	0.25
ARM11-nAPG06646.1	SGN000777	3.52	1.04
APG06646.1	SGN000777	0	1.44
ARM05-nAPG06646.1	SGN000781	13.51	0.27
ARM06CTD-nAPG06646.1	SGN000781	2.69	0.13
ARM08-nAPG06646.1	SGN000781	12.97	0.12
ARM11-nAPG06646.1	SGN000781	4.7	0.14
APG06646.1	SGN000781	0	0.65
ARM05-nAPG08290.1	SGN000143	1.35	7.04
ARM06CTD-nAPG08290.1	SGN000143	1.36	3.17
ARM08-nAPG08290.1	SGN000143	2.59	10.98
ARM11-nAPG08290.1	SGN000143	4.78	5.77
APG08290.1	SGN000143	0	6.21
ARM05-nAPG08290.1	SGN000169	4.26	12.87
ARM06CTD-nAPG08290.1	SGN000169	1.63	8.29
ARM08-nAPG08290.1	SGN000169	6.99	14.27
ARM11-nAPG08290.1	SGN000169	4.99	6.39
APG08290.1	SGN000169	0	11.85
ARM05-nAPG08290.1	SGN000173	3.26	5.51
ARM06CTD-nAPG08290.1	SGN000173	0.72	0.96
ARM08-nAPG08290.1	SGN000173	6.6	6.06
ARM11-nAPG08290.1	SGN000173	2.83	4.82
APG08290.1	SGN000173	0	2.58

【０２８０】

実施例１１：トランスｓｓＤＮＡ切断

１１．１　トランスＤＮＡ切断のアッセイ条件の決定

精製ＡＰＧ０９７４８（配列番号１３７として記載され、全体が参照により本明細書に援用される国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０６８０７９号に記載される）を、Ｃｕｔｓｍａｒｔ緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｂ７２０４Ｓ）中の単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）と共に、５０ｎＭヌクレアーゼ及び１００ｎＭ　ｓｇＲＮＡ又は２００ｎＭヌクレアーゼのいずれかの最終濃度で１０分間インキュベートした。　これらのＲＮＰ溶液を、１．５×Ｃｕｔｓｍａｒｔ緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌ

ａｂｓ　Ｂ７２０４Ｓ）中の最終濃度２５０ｎＭで、最終濃度１０ｎＭのｓｓＤＮＡ（標的又はミスマッチ陰性対照ｓｓＤＮＡ）及びレポータープローブの溶液に添加した。レポータープローブ（それぞれ、配列番号１３８及び１３９として示されるＴＢ０１２５及びＴＢ００８９）は、５’末端に蛍光色素（ＴＢ０１２５については５６－ＦＡＭ、ＴＢ００８９についてはＣｙ５）、３’末端にクエンチャー（ＴＢ０１２５については３ＩＡＢｋＦＱ、ＴＢ００８９については３ＩＡｂＲＱＳｐ）、及び場合により内部クエンチャー（内部クエンチャーＺＥＮはＴＢ０１２５上にのみ存在する）を含む。レポータープローブの切断は、蛍光色素の脱クエンチングをもたらし、従って、蛍光シグナルの増加をもたらす。蛍光強度をモニターするために、各反応の１０μｌを、マイクロプレートリーダー（ＣＬＡＲＩＯＳＴＡＲ　Ｐｌｕｓ）中で３０℃でＣｏｒｎｉｎｇ低容量３８４ウェルマイクロプレート中でインキュベートした。

【０２８１】

このアッセイに適したパラメーターを決定するために、多数の条件を探索した。クエンチされたプローブ設計又はフルオロフォア特性の効果があるかどうかを決定するために、２つのそのようなレポーターを各反応における混合物として含めた。それらは、任意の所与の反応において、互いに同じ濃度であった。全ての場合において、対照又は標的ｓｓＤＮＡ濃度（配列番号１４０及び１４１としてそれぞれ示されるＬＥ２０１又はＬＥ２０５）は、１０ｎＭであった。ＲＮＰ名は、下記の表１３に示すように、ヌクレアーゼと標的を意味する。

【０２８２】

【表１５】

表13. リボ核タンパク質複合体

RNP名	ヌクレアーゼ	sgRNA	意図された標的
APG09748.1	APG09748	27sg.1(配列番号 144)	LE201(配列番号 140)
APG09748.2	APG09748	27sg.2(配列番号 145)	LE205(配列番号 141)

【０２８３】

その結果を以下の表１４に示す。

【０２８４】

【表１６－１】

表14. トランスDNA切断アッセイの結果

				スロープ(RFU/分)	
RNP 名	[RNP](nM)	[レポーター](nM)	標的	Cy5 チャネル	FAM チャネル
APG09748.1	25nM	0	LE201	−0.30	−2.40
APG09748.1	25nM	50	LE201	420.00	46.20
APG09748.1	25nM	250	LE201	1040.40	47.40
APG09748.1	25nM	500	LE201	1090.20	57.00
APG09748.1	25nM	750	LE201	996.60	36.60
APG09748.1	25nM	1000	LE201	770.40	36.00
APG09748.1	25nM	0	LE205	0.60	−1.80
APG09748.1	25nM	50	LE205	6.00	−1.20
APG09748.1	25nM	250	LE205	16.80	−3.00
APG09748.1	25nM	500	LE205	33.00	1.80
APG09748.1	25nM	750	LE205	18.00	3.00
APG09748.1	25nM	1000	LE205	−21.60	−51.60
APG09748.2	25nM	0	LE201	−0.18	−1.80
APG09748.2	25nM	50	LE201	4.20	1.20
APG09748.2	25nM	250	LE201	42.60	3.00
APG09748.2	25nM	500	LE201	70.80	10.20
APG09748.2	25nM	750	LE201	67.80	10.80
APG09748.2	25nM	1000	LE201	55.80	7.80
APG09748.2	25nM	0	LE205	0.06	−2.40
APG09748.2	25nM	50	LE205	321.00	64.20
APG09748.2	25nM	250	LE205	669.60	63.00
APG09748.2	25nM	500	LE205	706.80	52.20
APG09748.2	25nM	750	LE205	627.00	55.20
APG09748.2	25nM	1000	LE205	534.60	46.80
APG09748.1	100nM	0	LE201	−0.42	−1.80
APG09748.1	100nM	50	LE201	1063.80	155.40
APG09748.1	100nM	250	LE201	2386.20	144.00
APG09748.1	100nM	500	LE201	3058.80	108.60
APG09748.1	100nM	750	LE201	2974.20	99.00
APG09748.1	100nM	1000	LE201	3282.00	113.40
APG09748.1	100nM	0	LE205	1.20	−0.36
APG09748.1	100nM	50	LE205	6.60	0.18
APG09748.1	100nM	250	LE205	27.00	1.80
APG09748.1	100nM	500	LE205	52.80	12.60
APG09748.1	100nM	750	LE205	57.60	9.00
APG09748.1	100nM	1000	LE205	73.80	16.20
APG09748.2	100nM	0	LE201	0.06	−0.48
APG09748.2	100nM	50	LE201	25.80	9.00

【０２８５】

【表１６－２】

APG09748.2	100nM	250	LE201	198.00	15.00
APG09748.2	100nM	500	LE201	265.80	16.20
APG09748.2	100nM	750	LE201	277.20	19.20
APG09748.2	100nM	1000	LE201	258.00	7.80
APG09748.2	100nM	0	LE205	0.12	0.00
APG09748.2	100nM	50	LE205	844.80	257.40
APG09748.2	100nM	250	LE205	2091.60	270.60
APG09748.2	100nM	500	LE205	2551.80	196.80
APG09748.2	100nM	750	LE205	2490.60	186.00
APG09748.2	100nM	1000	LE205	2511.00	138.00

【０２８６】
この実験から、１００ｎＭ濃度のＲＮＰは、一般に、２５ｎＭのＲＮＰ濃度よりも高いレポータープローブの切断速度をもたらすと結論付けられた。一般に、レポーター切断速度は、２５０～５００ｎＭのレポーター濃度までの高濃度のレポーターオリゴヌクレオチドでより高く、レポーター濃度のさらなる増加からの利益はほとんど観察されない。注目すべきことに、ＴＢ００８９レポーター（Ｃｙ５チャネルで検出される）については、特に２５０ｎＭを超えるレポーター濃度において、標的の分化を妨げる実質的に高いレベルのバックグラウンド活性が存在する。したがって、２５０ｎＭを超えるレポーター濃度は有益ではないと結論づけられた。両プローブはＲＮＰによる標的認識の観察に適していると思われる。
【０２８７】
１１．２　Ｇ０９７４８トランスＤＮＡ切断及び精製が非特異的活性に及ぼす影響
精製ＡＰＧ０９７４８を、１×ＣｕｔＳｍａｒｔ　ｂｕｆｆｅｒ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｂ７２０４Ｓ）中の単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）と共に、最終濃度２００ｎＭのヌクレアーゼ及び４００ｎＭのｓｇＲＮＡと共に３７℃で１０分間インキュベートし、これらのＲＮＰ溶液を、１．５×Ｃｕｔｓｍａｒｔ　ｂｕｆｆｅｒ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｂ７２０４Ｓ）中の最終濃度２５０ｎＭで、ｓｓＤＮＡ（標的又はミスマッチ陰性対照ｓｓレポータープローブは、５’末端に蛍光色素、及び３’末端にクエンチャーを含む。レポータープローブの切断は、蛍光色素の脱クエンチングをもたらし、従って、蛍光シグナルの増加をもたらす。蛍光強度をモニターするために、各反応の１０μｌを、マイクロプレートリーダー（ＣＬＡＲＩＯＳＴＡＲ　Ｐｌｕｓ）中、３７℃でＣｏｒｎｉｎｇ低容量３８４ウェルマイクロプレート中でインキュベートした。
【０２８８】
標的配列とのインキュベーションは、陰性対照と比較して時間の関数として蛍光強度の実質的な増加をもたらした。切断速度は、表１５に示されるように、蛍光対時間関数の直線部分の勾配として要約される。
【０２８９】
【表１７】
表15. トランスDNA切断アッセイの結果

ssDNA基質配列	スロープ(RFU／分)
ミスマッチ(LE111;配列番号 142)	549
一致(LE113;配列番号 143)	7724

【０２９０】

これらのデータは、切断されたレポータープローブを用いて明確に検出可能なＲＮＰによる負の制御から標的配列の区別を示す。

【０２９１】

１１．３　パラレルプラスミドＤＮＡライブラリーを用いたＰＡＭ測定

５ｎｔ縮重ＰＡＭ配列（ＮＮＮＮ）に先行する標的配列を含むオリゴヌクレオチド（配列番号２６６及び２６７としてそれぞれ示されるＬＥ００６８０及びＬＥ００６８８）をアニールし、ＮＥＢｕｉｌｄｅｒ　ＨｉＦｉ　ＤＮＡ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて二重消化ｐＵＣ１９プラスミドにクローン化した。　この反応の形質転換によって生じる各コロニーは、クローン性プラスミドＤＮＡ配列に対応するので、単一コロニー由来の培養物からのプラスミドＤＮＡの調製物は、元のライブラリーからサンプリングされたユニークなプラスミド調製物である。９６のコロニーのサンプリングからプラスミド調製物を得た。これらの調製物を個別にサンガー配列決定にかけて、それらのＰＡＭ配列を検証した。

【０２９２】

精製ＡＰＧ０９７４８を、室温で２０分間、最終濃度２００ｎＭヌクレアーゼ及び４００ｎＭｓｇＲＮＡで、１×ＣｕｔＳｍａｒｔ緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｂ７２０４Ｓ）中のｓｇＲＮＡ（２７ｓｇ．２）とインキュベートした。

【０２９３】

これらのＲＮＰ溶液を最終濃度１００ｎＭで、最終濃度８．３ｎＭ及びＴＢ０１２５及びＴＢ００８９レポーター（それぞれ配列番号１３８及び１３９として記載）のプラスミドＤＮＡ標的の溶液に、１．５×Ｃｕｔｓｍａｒｔ　ｂｕｆｆｅｒ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｂ７２０４Ｓ）中で、それぞれ２５０ｎＭ及び５０ｎＭで添加した。蛍光強度をモニターするために、各反応の１０μｌを、マイクロプレートリーダー（ＣＬＡＲＩＯＳＴＡＲ　Ｐｌｕｓ）中、３７℃でＣｏｒｎｉｎｇ低容量３８４ウェルマイクロプレート中でインキュベートした。

【０２９４】

少数の試料中のプラスミド濃度は、濃度正常化のための目標値を下回ったか、又は溶液の体積が、反応ウェルに意図された標的量を送達するには不十分であった。これらの試料は分析から除外されず、従って、重複の間の不整合を通して誤差の一因となることが期待される。サンガー配列決定法による評価の結果、交差汚染（ＰＡＭ領域に見られる複数の痕跡）を有すると判定されたプラスミド、又は標的配列の変化を分析から除去したプラスミドを使用した試料であって、それらの結果は下記に示されていない。分析結果は、下記の表１６に、ＦＡＭチャネルにおける勾配別の降順で示されている。

【０２９５】

【表１８－１】

表16. PAM配列

		スロープ(RFU/分)	
PAM	配列番号	Cy5 チャネル	FAM チャネル
ATATG	147	111.52	1728.13
ATATG	147	102.42	1612.86
TATTG	148	137.15	846.12
TATTG	148	148.61	799.82
CGTTC	149	151.06	744.18
CGTTC	149	134.61	735.35
TTTTT	150	167.71	731.11
TTTTT	150	149.83	711.78
CAATC	151	120.84	675.71
AATCT	152	134.67	622.52
AATCT	152	134.1	620.2
CAATC	151	96.94	608.58
AAATT	153	152.6	607.24
AAATT	153	150.57	591.77
CATCC	154	97.34	588.7
AGATA	155	214.69	579.56
TATTC	156	124.22	570.81
ATTTT	157	134.72	551.91
AGATA	155	198.45	544.81
TATTC	156	108.57	538.18
TCTTT	158	141.66	532.87
ATTTT	157	107.9	526.75
AGATC	159	106.93	497.71
AATAA	160	78.94	484.67
TCTTT	158	117.19	484.13
GATCC	161	112.85	479.91
GATCC	161	105.04	474.94
AGATC	159	106.5	473.98
ATTCA	162	115.03	473.24
AATAA	160	77.43	465.75
AAAAT	163	78.3	458.23
TTATC	164	102.14	456.73
TATCA	165	106.45	448.78
TCACT	166	167.02	429.36
CTTAT	167	82.9	418.38
TATTG	148	116.08	417.94
TCACT	166	160.29	415.64
AAAAT	163	56.43	411.26

【０２９６】

【表１８－２】

TGATA	168	89.02	406.14
TGATA	168	85.99	395.57
TACTA	169	90.61	391.06
ATTTT	157	113.18	382.59
TACTA	169	74.33	364.56
ATTTT	157	106.72	364.02
TATTG	148	93.95	341.36
CTTAT	167	76.12	336.8
ATATA	170	83.39	326.86
ATATA	170	72.98	318.2
TATCA	165	65.41	317.53
GACTC	171	56.56	302.2
GCTCA	172	22.1	293.68
TAACC	173	56.08	283.99
CGTGT	174	66.57	268.89
TAACC	173	56.55	265.45
TTTCG	175	59.55	262.91
CGTGT	174	50.71	262.37
TTTCG	175	61.42	261.65
CAGTA	176	51.81	240.09
GCTCA	172	19.08	228.08
CAGTA	176	51.09	220.25
CCCTT	177	17.83	136.69
CCTAT	178	40.4	125.81
TCCCT	179	39.93	124.6
AGGTT	180	40.96	117.18
AGGTT	180	40.81	114.79
TAACG	181	32.53	94.68
AACAG	182	8.19	91.72
CCTAT	178	34.51	87.57
TGAAC	183	10.22	86.38
TAAGT	184	19.35	85.12
TCCCT	179	26.67	83.02
TAACG	181	27.62	79.17
TAACG	181	28.89	78.55
TAACG	181	22.23	78.36
CTGTA	185	23.27	77.06
AGGGG	186	30.8	74.4
GCTGT	187	28.3	71.54
ATCTA	188	18.73	69.15
GCTGT	187	25.61	69.06

【０２９７】

【表１８－３】

TTATC	164	22.8	68.13
AACAG	182	23.98	67.27
TCAGG	189	17.25	67.04
ATGTC	190	13.91	65.93
TGCTA	191	26.33	65.73
TAAAA	192	17.32	65.43
ATCTA	188	16.88	65.3
CTGTA	185	21.81	64.15
GACTC	171	24.05	64.02
ATTCA	162	25.04	63.87
TGAAC	183	24.53	63.64
CCCTT	177	21.35	61.95
ATGTC	190	12.99	60.6
ATCAG	193	22.32	59.63
ATCAG	193	18.55	56.58
CGGGG	194	27.86	56.28
TAAAA	192	17.72	56.03
TTCTC	195	25.7	55.83
GTCAT	196	23.07	55.76
GCGTG	197	17.36	55.12
GCGTG	197	22.02	55.02
GCAAT	198	15.47	54.91
TTCTC	199	21.89	54.89
GTCAT	196	17.22	54.34
GCAAT	198	17.36	53.32
AGCAT	200	22.47	52.23
GTCAA	201	14.14	52.12
AGAGC	202	19.62	51.79
AGAGC	202	15.99	50.37
GTGGG	203	22.38	50.1
CTGAA	204	21.24	49.45
CTGAT	205	12.05	49.32
ATGAA	206	17.93	49.15
ACCTT	207	19.66	49.12
ACCTT	207	22.74	49.12
GTCAA	201	13	48.21
AACCA	208	17.81	48.04
AACCA	208	15.75	47.87
GTAAA	209	16.3	47.85
TAGGA	210	18.68	47.73
CCGAA	211	20.24	47.58

【０２９８】

【表１８－４】

AGCAT	200	22.95	47.52
CGGGG	194	20.94	47.41
GTCAT	196	15.17	47.24
CTGAA	204	20.4	46.36
GTGGG	203	19.98	46.25
TACGA	212	16.79	46.18
TGGCT	213	14.81	45.75
GTCAT	196	15.55	45.51
ATGAA	206	19.11	45.09
TAGGA	210	21.65	44.94
TTCTC	199	21.44	44.76
CCAAG	214	16.98	44.61
GTAAA	209	15.35	44.59
TGCTT	215	15.79	44.54
CTAAA	216	12.72	44.28
TGCTA	191	16	44.14
TACGA	212	16.07	44.06
TCGAT	217	22.28	43.96
TTCTC	199	15.94	42.55
CTGAT	205	16.13	42.27
TCAGG	189	11.38	41.9
CCAAG	214	11.28	41.45
AGGGG	186	16.04	41.44
TCGAT	217	18.68	40.5
CCGAA	211	15.39	39.09
CTAAA	216	10.72	30.37
GTAAC	218	4.36	9.51
TGCTT	215	−0.32	−0.7
TAAGT	184	−0.57	−1.3
CATCC	154	0.47	−1.95
TGGCT	213	−0.03	−2.2
GTAAC	219	−0.46	−2.3

【０２９９】

最も高い勾配を有する配列は、インターナショナル・アップルで既に記載されているプラスミド除去アッセイによって測定された予測ＰＡＭ（配列番号６０で記載のＤＴＴＮ）に適合するようである。ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０６８０７９は、その全体が参照により援用される。特に、標的の５’側にある２つのヌクレオチドの位置には「Ｔ」が強い選択性をもっていることがわかる。驚くべきことに、このアッセイで観察された最も活性なＰＡＭ部位（ＡＴＡＴＧ、配列番号１４７）は、ＤＴＴＮ（配列番号６０）のコンセンサスと正確に一致せず、この認識部位におけるあるレベルの柔軟性を示唆した。

【０３００】

１１．４．ＰＣＲ増幅ＤＮＡの存在下でのｓｓＤＮＡ切断活性

ＰＣＲ増幅された標的は、適切なプライマーを用いてゲノムＤＮＡ（それぞれ、配列番

号２２５及び２２６として示されるＴＲＡＣ及びＶＥＧＦアンプリコン）から作製された。ＶＥＧＦ標的（配列番号２２７として記載）を、配列ＬＥ５７３及びＬＥ５７８（それぞれ配列番号２２８及び２２９として記載）を有するプライマーにより、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞ゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅した。ＴＲＡＣ標的（配列番号２３０として示される）を、ＬＥ２５７及びＬＥ２５８（それぞれ、配列番号２３１及び２３２として示される）によってＰＣＲ増幅した。

【０３０１】

ＲＮＰは、本明細書に記載のＡＰＧ０９１０６．１ヌクレアーゼ及びｓｇＲＮＡを、１×ＮＥＢｕｆｆｅｒ ２（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）中でそれぞれ０．５μＭ及び１μＭでインキュベートすることにより形成し、室温で２０分間インキュベートした。

【０３０２】

【表１９】

表17. リボ核タンパク質複合体

RNP	ヌクレアーゼ	ガイドRNA	意図された標的
APG09106.2	APG09106.1	27sg.2(配列番号 145)	LET126 アンプリコン 無作為化 PAM アンプリコン
APG09106.836	APG09106.1	27sg.836(配列番号 233)	VEGF アンプリコン
APG09106.838	APG09106.1	27sg.838(配列番号 234)	TRAC アンプリコン

【０３０３】

切断反応は、１．５×ＮＥＢｕｆｆｅｒ ２において、５’ＴＥＸ６１５標識及び３’Ｉｏｗａ Ｂｌａｃｋ ＦＱクエンチャー及びそれぞれのＰＣＲ産物１００ｎＭを有する１．５μＭ ｓｓＤＮＡオリゴヌクレオチドレポーターを用いて行った。レポータープローブの切断は、蛍光色素の脱クエンチングをもたらし、従って、蛍光シグナルの増加をもたらす。蛍光強度をモニターするために、各反応の１０μｌを、マイクロプレートリーダー（ＣＬＡＲＩＯＳＴＡＲ Ｐｌｕｓ）中、３７℃でＣｏｒｎｉｎｇ低容量３８４ウェルマイクロプレート中でインキュベートした。動態解析の結果を表１８に示す。

【０３０４】

【表２０】

表18. トランスDNA切断アッセイの結果

RNP	標的濃度(nM)	標的	スロープ(RFU／分)
28.836	30	TRAC アンプリコン	1204
28.838	30	TRAC アンプリコン	8436
28.838	30	VEGF アンプリコン	766
28.836	30	VEGF アンプリコン	3484

【０３０５】

これらの結果は、種々の供給源からのＰＣＲ増幅ＤＮＡの存在下でのトランスｓｓＤＮＡ切断活性の特異的活性化を示す。活性はＰＣＲ増幅された基質の濃度に依存する。

【０３０６】

１１．５ 診断のためのｓｓＤＮＡ切断の利用

これらのヌクレアーゼは、標的ＤＮＡ配列の存在下で光学的に検出可能なシグナルを生成する能力があるため、細菌、ウイルス、又は真菌のような感染症の病原体の検出のための診断装置への実装のための有用性を約束する。

【０３０７】

診断手順は、試験される試料からの核酸の単離又は増幅を含み得る。また、核酸の単離又は精製を実施することなく、いくつかの試料を使用することも適切であり得る。なぜな

ら、それらは、増幅なしに（ＰＣＲなどの）検出可能であるか、又は検出又はシグナル生成を妨げる物質を含まないのに十分な量で試料中に存在し得るからである。

【０３０８】

次に、他の実施例に記載されるように形成されたＲＮＰを、前の実施例で使用されたフルオロフォア及びクエンチャー修飾された一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドなどのレポーター、又は切断時に可視又は他の点で容易に検出可能なシグナルを生成する他の種類の一本鎖ＤＮＡ基質と共に、試料（又は前項に記載されるように処理された試料）に曝露することができる。フルオロフォア－クエンチャー共役ＤＮＡオリゴヌクレオチドを使用する場合（前述の実施例におけるように）、これらは、前述の実施例に記載されているように、蛍光計を使用して検出することができる。検出を簡単にするために、上記の速度論的アッセイの代わりにエンドポイントアッセイを実施することができ、これは、アッセイが、陽性及び陰性対照に対して、固定された時間で実施され、この経過時間の終わりに読み出され得ることを意味する。

【０３０９】

これらの試薬は、ごくわずかな器具を用いて、所与の病原体又は特異的核酸配列（個体における病的対立遺伝子など）の検出を可能にする側方流動試験装置に統合することもできる。このアッセイにおいて、ｓｓＤＮＡレポーターは、フルオレセイン、ビオチン、及び／又はジゴキシゲニンのような抗体又はアフィニティー試薬捕獲に適した複数の分子にコンジュゲートされ得る。

【配列表】

0007640527000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/09	110
C12N 9/22 (2006.01)		C12N	9/22	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/030,088
(32)優先日 令和2年5月26日(2020.5.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
弁理士 池田 達則
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(72)発明者 タイソン ディー. ボーエン
アメリカ合衆国，ノース カロライナ ２７５６０，モリスビル，ウォルトンズ クリーク ロード １３７
(72)発明者 アレクサンドラ ブライナー クローリー
アメリカ合衆国，ノース カロライナ ２７５１１，ケーリー，スコット プレイス １２２０
(72)発明者 テッド ディー. エリック
アメリカ合衆国，ノース カロライナ ２７７０５，ダーラム，アルムウッド プレイス ５
(72)発明者 マイケル コイル
アメリカ合衆国，ノース カロライナ ２７５１４，チャペル ヒル，ノース エリオット ロード ４０７
審査官 上條 のぶよ
(56)参考文献 国際公開第２０１８／１７２５５６（WO，Ａ１）
特表２０１９－５２００７９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１７／１５５７１７（WO，Ａ１）
国際公開第２０１６／１８６９４６（WO，Ａ１）
国際公開第２０１７／１５５７１４（WO，Ａ１）
国際公開第２０１９／０３６１８５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１６／０３３２９８（WO，Ａ１）
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－９０
Ｃ１２Ｎ ５／１０
Ｃ１２Ｎ １／００－３８
Ｃ１２Ｎ ９／００－９９
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ