

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7700222号
(P7700222)

(45)発行日 令和7年6月30日(2025.6.30)

(24)登録日 令和7年6月20日(2025.6.20)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 1 1 0
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22 Z N A
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113 Z
A 0 1 K	67/027(2024.01)	A 0 1 K	67/027
請求項の数 11 (全31頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2023-519164(P2023-519164)	(73)特許権者	510273880
(86)(22)出願日	令和3年8月12日(2021.8.12)		コリア ユニバーシティ リサーチ アンド
(65)公表番号	特表2023-544987(P2023-544987 A)		ビジネス ファウンデーション
(43)公表日	令和5年10月26日(2023.10.26)		KOREA UNIVERSITY RE
(86)国際出願番号	PCT/KR2021/010740		SEARCH AND BUSINESS
(87)国際公開番号	WO2022/065689		FOUNDATION
(87)国際公開日	令和4年3月31日(2022.3.31)		大韓民国、0 2 8 4 1 ソウル、ソンプ
審査請求日	令和5年5月11日(2023.5.11)		クーグ、アナムーロ 1 4 5
(31)優先権主張番号	10-2020-0123432	(73)特許権者	519001383
(32)優先日	令和2年9月24日(2020.9.24)		ソウル ナショナル ユニバーシティ ア
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		ールアンドディービー ファウンデシ
(31)優先権主張番号	10-2021-0106637		ョン
(32)優先日	令和3年8月12日(2021.8.12)		大韓民国 0 8 8 2 6 ソウル クァナッ
	最終頁に続く	(73)特許権者	クーク クァナックーロ 1
			523106654
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 編集効率が向上したプライム編集ベースの遺伝子編集用組成物およびその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) i) C R I S P R / C a s 9 タンパク質またはその変異体、
ii) 逆転写酵素 (R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e)、
および
iii) クロマチン調節ペプチド (C h r o m a t i n - m o d u l a t i n g p e p t i d e s) を含む、融合タンパク質またはそれをコード化する核酸と、
(b) ガイドRNAまたはそれをコード化する核酸と、を含み、
前記C R I S P R / C a s 9 タンパク質変異体は、R u v CドメインまたはH N Hドメインのいずれか1つが不活性化されるニッカーゼ (n i c k a s e) であり、
前記ガイドRNAは、p e g R N A (p r i m e e d i t i n g g u i d e R N A) およびd s g R N A (d e a d s i n g l e g u i d e R N A) を含み、
前記クロマチン調節ペプチドは、高ー移動性グループヌクレオソーム結合ドメイン1 (h i g h - m o b i l i t y g r o u p n u c l e o s o m e b i n d i n g d o m a i n 1、H N 1)、および ヒストンH1中央球状ドメイン (h i s t o n e H 1 c e n t r a l g l o b u l a r d o m a i n、H 1 G) であり、
前記融合タンパク質は、
N末端ー [H N 1] - [C a s 9] - [H 1 G] - [逆転写酵素] - C末端、または
N末端ー [H N 1] - [C a s 9] - [逆転写酵素] - [H 1 G] - C末端の構成になり、

前記dsgRNAは、pegRNA結合部位から5～70nt離れた位置に結合して前記融合タンパク質のクロマチンアクセシビリティを向上させることを特徴とする、哺乳動物細胞の遺伝子編集用組成物。

【請求項2】

前記融合タンパク質は、N-末端およびC-末端にそれぞれ核局在化シグナル(nuclear localization signal、NLS)配列をさらに含むことを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子編集用組成物。

【請求項3】

前記逆転写酵素(Reverse Transcriptase)またはその変異体は、モロニー Maus 白血病ウイルス(Moloney murine leukemia virus、M-MLV)に由来することを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子編集用組成物。

10

【請求項4】

前記融合タンパク質は、配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子編集用組成物。

【請求項5】

前記dsgRNAは、10～20ヌクレオチド(nt)長で構成されることを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子編集用組成物。

【請求項6】

前記遺伝子編集用組成物は、非標的DNA鎖に相補的に結合して標的DNA鎖の切断を誘導するsgRNA(single guide RNA)をさらに含むことを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子編集用組成物。

20

【請求項7】

前記組成物は、遺伝子編集効率および標的特異性が増進されることを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子編集用組成物。

【請求項8】

請求項1に記載の遺伝子編集用組成物をin vitroまたはex vivo上で標的核酸配列を含む標的領域(region)と接触させるステップを含む、遺伝子編集方法。

【請求項9】

請求項1に記載の遺伝子編集用組成物を含む、遺伝子編集キット。

30

【請求項10】

請求項1に記載の遺伝子編集用組成物をヒトを除いた哺乳動物細胞に導入して遺伝子組換え哺乳動物細胞を得るステップと、

前記得られた遺伝子組換え哺乳動物細胞をヒトを除いた哺乳動物代理母の卵管に移植するステップと、を含む、ヒトを除いた遺伝子組換え哺乳動物の製造方法。

【請求項11】

前記哺乳動物細胞は、哺乳動物の胚細胞であることを特徴とする、請求項10に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、遺伝子編集効率が向上したプライム編集ベースの遺伝子編集用組成物、前記組成物を用いた遺伝子編集方法、遺伝子編集用キット、および遺伝子組換え哺乳動物の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

CRISPR-Casシステムは、所望の標的突然変異を効率的に誘導可能なヌクレアーゼ(nucleases)、塩基エディター(base editors)、遺伝子トランスポザーゼ(transposases)のような様々な進歩したゲノム編集ツールとして進化してきた。特にCRISPRシステムに基づいて開発されたシトシン塩基エデ

50

イター (cytosine base editor、CBE) およびアデニン塩基エディター (adenine base editor、ABE) は、マウスを含む様々な有機体において、C・GをT・Aに、A・TをG・Cに効率的に置換することができる。また、最近の研究から、ヒト細胞においてCからGに塩基編集が可能なC-to-G塩基エディター (C-to-G base editors) としてCGBE1が報告されている。しかし、1つ以上の塩基の挿入、置換、または切断のような正確な標的突然変異の生成は、細胞内の相同組換え修復 (homology-directed repair、HDR) の低い効率性による遺伝子編集の制限により依然として難しい実状である。

【0003】

このような要求に応じて開発された新しい概念のゲノム編集ツールであるプライムエディター (Prime editor、PE) は、DNAの二本鎖のうち一本鎖のみを切断するように改変されたCas9ニッカーゼ (Cas9 nickase-H840A) および逆転写酵素 (Reverse transcriptase、RT) で構成された融合タンパク質である。プライムエディターは、所望の編集配列をコード化する新しい形態のガイドRNAであるpegRNA (prime editing guide RNA) を必要とする。前記pegRNAは、標的遺伝子の非標的鎖に相補的な塩基配列 (primer binding site、PBS) および編集しようとする塩基配列を含む逆転写酵素の鋳型鎖部位 (RT template) を有する。プライムエディターのCas9ニッカーゼが標的遺伝子の非標的鎖を切断し、逆転写酵素がpegRNAのRT鋳型鎖に基づいて編集された塩基配列が含まれた新しいDNA鎖を合成し、その後、細胞内修復過程により従来のDNA塩基配列が除去され、新たに合成された編集形態のDNA塩基配列がこれに代わる。このような精巧なゲノム編集システムを介して、二本鎖DNAの切断や供与DNA無しに塩基から塩基への置換、小さい大きさの挿入および欠失を含む標的突然変異の生成が可能である。しかし、プライムエディターもまた塩基エディターよりはその頻度が低いが、オフターゲット (off-target) の問題が発生し、特に逆転写酵素により追加の塩基配列の挿入および欠失が発生して正確な編集が難しいという問題がある。さらに、上記問題とともに、現在開発された塩基エディターおよびプライムエディターは、非常に低い効率の限界がある。例えば、プライムエディターの中でも最も効率が良いPE3は、遺伝子編集効率が20～50%に過ぎない。

【0004】

ヒトを含む生命体の細胞内の遺伝物質は常に突然変異にさらされており、突然変異の蓄積は様々な変異表現型を誘導し、その一部は疾患と関連がある。従って、プライム編集を利用した精巧な遺伝子編集技術は、遺伝疾患の治療のためのツールとして利用可能であり、病原性変異因子を確認し、疾病メカニズムの研究などに幅広く利用可能である。従って、公知のプライムエディターよりも精巧であるとともに編集効率が改善されたプライムエディターおよびそれを用いた遺伝子編集技術の開発が必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】Int J Mol Sci. 2020 Aug 28; 21 (17): 6240.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

プライム編集ベースの遺伝子編集の上記問題を克服するために、本発明者らは、proximal dead sgRNA (ds gRNA) および／またはクロマチン調節ペプチド (chromatin-modulating peptides、CMPs) を用いて改善されたプライムエディターを開発し、その著しく増進されたゲノム編集効率および標的特異性などを具体的な実験により確認することで本発明を完成した。

【0007】

そこで、本発明は、遺伝子編集効率が改善されたプライム編集ベースの遺伝子編集用組

成物を提供することを目的とする。

【0008】

また、本発明は、前記遺伝子編集用組成物を用いた遺伝子編集方法を提供することを他の目的とする。

【0009】

また、本発明は、前記遺伝子編集用組成物を含む遺伝子編集用キットを提供することをまた他の目的とする。

【0010】

また、本発明は、前記遺伝子編集用組成物を用いてヒトを除いた遺伝子組換え哺乳動物を製造する方法を提供することをさらに他の目的とする。

【0011】

ただし、本発明が解決しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に限定されず、言及していない他の課題は、以下の記載から当業者に明確に理解され得る。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記のような本発明の目的を達成するために、本発明は、(a) i) CRISPR/Cas9タンパク質またはその変異体、および ii) 逆転写酵素 (Reverse Transcriptase) またはその変異体を含む、融合タンパク質またはそれをコード化する核酸と、

(b) ガイドRNAまたはそれをコード化する核酸と、を含み、

この際、前記ガイドRNAは、pegRNA (prime editing guide RNA) および ds gRNA (dead single guide RNA) を含み、前記 ds gRNA は、10～20bp長であることを特徴とする、遺伝子編集用組成物を提供する。

【0013】

本発明の一実施形態として、前記 ds gRNA は、pegRNA 結合部位から5～70ヌクレオチドが離れた位置に結合して前記融合タンパク質のクロマチンアクセシビリティを増加させ得る。

【0014】

本発明の他の実施形態として、前記遺伝子編集用組成物は、非標的DNA鎖に相補的に結合して標的DNA鎖の切断を誘導する sgRNA (single guide RNA) をさらに含み得る。

【0015】

また、本発明は、(a) i) CRISPR/Cas9タンパク質またはその変異体、ii) 逆転写酵素 (Reverse Transcriptase) またはその変異体、および iii) クロマチン調節ペプチド (Chromatin-modulating peptides) を含む、融合タンパク質またはそれをコード化する核酸と、

(b) ガイドRNAまたはそれをコード化する核酸と、を含み、

前記ガイドRNAは、pegRNA (prime editing guide RNA) および ds gRNA (dead single guide RNA) であることを特徴とする、遺伝子編集用組成物を提供する。

【0016】

本発明の一実施形態として、前記クロマチン調節ペプチドは、高移動性グループヌクレオソーム結合ドメイン1 (high-mobility group nucleosome binding domain 1、HN1)、ヒストンH1中央球状ドメイン (histone H1 central globular domain、H1G)、またはこれらの組み合わせであり得る。

【0017】

本発明の他の実施形態として、前記クロマチン調節ペプチドは、化学的結合により直接的に、リンカーにより間接的に、またはこれらの組み合わせにより前記 CRISPR/C

10

20

30

40

50

a s 9 タンパク質または逆転写酵素に連結され得る。

【0018】

本発明のまた他の実施形態として、前記融合タンパク質は、

N末端－[HN1]－[Cas9]－[H1G]－[逆転写酵素]－C末端、またはN末端－[HN1]－[Cas9]－[逆転写酵素]－[H1G]－C末端の構成からなり得る。

【0019】

本発明のさらに他の実施形態として、前記融合タンパク質は、N－末端およびC－末端にそれぞれ核局在化シグナル(nuclear localization signal、NLS)配列をさらに含み得る。

【0020】

本発明のさらに他の実施形態として、前記CRISPR/Cas9タンパク質変異体は、ニッカーゼ(nickase)であり得る。

【0021】

本発明のさらに他の実施形態として、前記CRISPR/Cas9タンパク質変異体は、RuvCドメインまたはHNHドメインのいずれか1つが不活性化され得る。

【0022】

本発明のさらに他の実施形態として、前記逆転写酵素(Reverse Transcriptase)またはその変異体は、モロニー Maus 白血病ウイルス(Moloney murine leukemia virus、M-MLV)に由来し得る。

【0023】

本発明のさらに他の実施形態として、前記融合タンパク質は、配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列からなり得る。

【0024】

本発明のさらに他の実施形態として、前記ds gRNAは、10～20ヌクレオチド長で構成され得る。

【0025】

本発明のさらに他の実施形態として、前記ds gRNAは、pegRNA結合部位から5～70ヌクレオチドが離れた位置に結合して前記融合タンパク質のクロマチンアクセシビリティを向上させ得る。

【0026】

本発明のさらに他の実施形態として、前記遺伝子編集用組成物は、遺伝子編集効率および標的特異性が増進されることを特徴とする。

【0027】

また、本発明は、(a) i) CRISPR/Cas9タンパク質またはその変異体、ii) 逆転写酵素(Reverse Transcriptase)またはその変異体、およびiii) クロマチン調節ペプチド(Chromatin-modulating peptides)を含む、タンパク質またはそれをコード化する核酸と、

(b) ガイドRNAまたはそれをコード化する核酸と、を含み、

前記ガイドRNAは、pegRNA(prime editing guide RNA)およびds gRNA(dead single guide RNA)であることを特徴とする、遺伝子編集用組成物を提供する。

【0028】

本発明の一実施形態として、前記i) CRISPR/Cas9タンパク質またはその変異体、および前記ii) 逆転写酵素(Reverse Transcriptase)またはその変異体が融合して細胞内に伝達されるか、またはi) およびii) をそれぞれ別に発現させてプラスミドDNA、RNA、またはタンパク質の形態で細胞内に伝達し得る。

【0029】

また、本発明は、前記遺伝子編集用組成物をin vitroまたはex vivo上で標的核酸配列を含む標的領域(region)と接触させるステップを含む、遺伝子編集

10

20

30

40

50

方法を提供する。

【0030】

また、本発明は、前記遺伝子編集用組成物を含む、遺伝子編集用キットを提供する。

【0031】

また、本発明は、前記遺伝子編集用組成物をヒトを除いた哺乳動物細胞に導入して遺伝子組換え哺乳動物細胞を得るステップと、

前記得られた遺伝子組換え哺乳動物細胞をヒトを除いた哺乳動物代理母の卵管に移植するステップと、を含む、ヒトを除いた遺伝子組換え哺乳動物の製造方法を提供する。

【0032】

本発明の一実施形態として、前記哺乳動物細胞は、哺乳動物の胚細胞であり得る。

【発明の効果】

【0033】

本発明では、`dead sgRNA (ds gRNA)` および／またはクロマチン調節ペプチド (`chromatin-modulating peptides`、`CMPs`) を用いて性能が改善されたプライムエディターを開発し、その著しく増進されたゲノム編集効率および標的特異性を確認し、標的遺伝子の突然変異動物モデルを作製して次世代への突然変異の伝達および表現型の変化などを確認した。従って、本発明に係る改善されたプライムエディターを含む遺伝子編集用組成物は、ヒト化動物モデルの作製および研究、遺伝工学技術分野、および遺伝疾患の治療手段などの様々な用途として有用に活用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】哺乳動物のゲノムにおいてプライム編集システムを検証した結果であって、図1aは、`tdTomato`を発現するレポーター`HEK293T`細胞の`AAVS1`遺伝子において`tdTomato`遺伝子に対する標的突然変異設計を示した概略図、および前記細胞において`PE3`の編集効率を示した顕微鏡イメージおよびサンガーシーケンシングクロマトグラム結果を示したものであり、図1bは、`PE3`をトランスフェクションさせるかまたはさせていない細胞を11日間培養後に`FACS`により`tdTomato`-陰性および`tdTomato`-陽性細胞を計数した結果である。

【図2】マウス遺伝子`Igf2`および`Adamts20`の標的部位で様々な長さの`pegRNAs`および`ds gRNA`を用いてプライム編集効率を最適化した結果であって、図2aは、前記2種の遺伝子標的においてそれぞれ標的突然変異設計を示した概略図であり、図2bは、マウス由来`NIH/3T3`細胞においてプライマー結合部位 (`PBS`) および逆転写酵素鋳型長の様々な組み合わせによる`PE3`および`CMR-PE3`のプライム編集効率を比較して示した結果である。

【図3】マウス由来`NIH/3T3`または`C2C12`細胞において順序通りに`Igf2`、`Adamts20`、`Casp1`、`Hoxd13`、`Angpt1`、および`Ksr2`それぞれの遺伝子内の標的に対して`ds gRNA`使用可否 (`PE3`、`PE3+ds gRNA`) による`PE3`のプライム編集効率を比較分析した結果である。

【図4】クロマチン調節ペプチド (`CMP`) 結合によるプライム編集効率の増進効果を確認した結果であって、図4aは、`CMP`が結合した2種類の融合タンパク質 (`CMP-PE-V1`、`CMP-PE-V2`) 構造を描いたものであり、図4bおよび図4cは、それぞれ`CMP-PE-V1`および`CMP-PE-V2`のアミノ酸配列を構成別に区分して示したものであり、図4dは、`NIH/3T3`または`C2C12`細胞において`Igf2`、`Adamts20`、`Casp1`、`Hoxd13`、`Angpt1`、および`Ksr2`それぞれの遺伝子内の標的に対して`CMP` (`HN1`、`H1G`) 結合可否によるプライム編集効率を比較分析した結果であり、図4eは、ヒト細胞である`HEK293T`細胞において`HEK3`配列を標的としてプライム編集効率を比較分析した結果である。

【図5】`NIH/3T3`および`C2C12`細胞において`Igf2`、`Adamts20`、`Casp1`、`Hoxd13`、`Angpt1`、および`Ksr2`それぞれの遺伝子内の標的に対

10

20

30

40

50

してPE3、ds gRNAを用いたPE3+ds gRNA、CMPが結合したCMP-PE3-V1、およびCMPとds gRNAを共に用いたCMP-PE3-V1+ds gRNAのプライム編集効率を比較分析した結果である。

【図6】PE3、PE3+ds gRNA、CMP-PE3-V1、およびCMP-PE3-V1+ds gRNAの各プライム編集システムが注入されたマウス胚において標的突然変異の生成頻度を分析した結果であって、図6aは、Igf2での結果であり、図6bは、Adamts20、Hoxd13、Angpt1、Ksr2、およびArでの結果を示したものである。

【図7】NIH/3T3およびC2C12細胞においてDNase I digestion分析後、リアルタイムqPCRによりそれぞれ完全なゲノムDNAの分画を測定した結果であって、図7aは、前記各細胞においてIgf2、Adamts20、Casp1、Hoxd13、Angpt1、およびKsr2標的遺伝子座で完全なゲノムDNAの分画を測定した結果であり、図7bは、前記2つの細胞株にDNase Iを2~16Uに異なるように処理し、完全なゲノムDNAの分画を測定した結果であり、図7cは、C2C12細胞にPE3、PE3+ds gRNA、CMP-PE3-V1、またはCMP-PE3-V1+ds gRNAをコード化するプラスミドをトランスフェクションさせた後、Igf2標的遺伝子座で完全なゲノムDNAの分画を測定した結果である。

【図8】ds gRNAを用いたPE3を介してマウスにおいて標的突然変異の生成を誘導した結果であって、図8aは、Igf2遺伝子のexon4において標的突然変異設計を示した概略図であり、図8bは、Igf2においてproximal ds gRNA+7を用いたPE3により誘導された標的突然変異（GからCへの置換およびTAの挿入）を有する2つのマウスの遺伝子型およびサンガーシーケンシングクロマトグラム結果を示したものであり、図8cは、作製されたIgf2突然変異マウスのF1世代マウス7匹に対してサンガーシーケンシングおよびジェノタイピングにより標的突然変異可否を確認した結果である。

【図9】本発明に係るプライムエディターのオフターゲット効果を分析した結果であって、図9aは、野生型および図8で作製された突然変異Igf2 #1およびIgf2 #2マウスに対してIgf2標的突然変異の生成に用いられたpegRNAおよびns gRNAの潜在的オフターゲット部位で挿入／欠失（indel）頻度を測定して示した結果であり、図9bは、野生型（Igf2 WT）およびIgf2 #1マウスに対して全ゲノムシーケンシングを実施し比較した結果であり、図9cは、潜在的オフターゲット（OT）位置に対する塩基配列を比較しサンガーシーケンシングクロマトグラムを示した結果である。

【図10】Igf2突然変異マウスの表現型を確認した結果であって、図10aは、Igf2^{P+/m-}雄（F1）を野生型雌マウスと交配して得られたIgf2突然変異マウス（MUT（Igf2^{P-/m+}））の小人症表現型を示すイメージであり、図10bは、前記Igf2突然変異マウスとIgf2野生型マウスの体重を測定して比較した結果である。

【図11】本発明に係る3種類の編集効率が改善されたプライム編集システムの構成および作用メカニズムを従来の公知のPE3と比較して描いたものである。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明者らは、proximal ds gRNA（dead sgRNA）および／またはクロマチン調節ペプチド（chromatin-modulating peptides、CMPs）を用いて従来の問題が改善されたプライムエディターを開発し、その優れた編集効率および標的特異性を確認することで本発明を完成した。

【0036】

そこで、本発明は、（a）i）CRISPR/Cas9タンパク質またはその変異体、およびii）逆転写酵素（Reverse Transcriptase）またはその変異体を含む、融合タンパク質またはそれをコード化する核酸と、

（b）ガイドRNAまたはそれをコード化する核酸と、を含み、

10

20

30

40

50

この際、前記ガイドRNAは、pegRNA (prime editing guide RNA) およびdsgRNA (dead single guide RNA) を含み、前記dsgRNAは、10～20nt長であることを特徴とする、遺伝子編集用組成物を提供する。

【0037】

前記遺伝子編集用組成物は、非標的DNA鎖に相補的に結合して標的DNA鎖の切断を誘導するsgRNA (single guide RNA) をさらに含み得、好ましくは、前記ガイドRNAは、本発明においてnicking sgRNAを意味し得る。

【0038】

本発明で用いられる用語、「遺伝子編集 (gene editing)」は、遺伝子矯正、ゲノム編集など同一の意味として用いられ得る。遺伝子編集は、標的遺伝子内の標的部位に1つ以上の塩基に対して突然変異を誘発する変異 (置換、挿入、または欠失) を意味する。好ましくは、前記遺伝子編集は、標的遺伝子の二本鎖切断 (double-stranded DNA cleavage) を伴わないものであり得、より好ましくは、プライム編集 (prime editing) を介して行われるものであり得る。

【0039】

本発明の一実施形態において、前記1つ以上の塩基に対して突然変異を誘発する変異または遺伝子編集は、標的部位に終止コドンを生産させるか、または野生型と異なるアミノ酸をコードするコドンを生産させることで、標的遺伝子を不活性化 (knock-out) させる。または、開始コドン进行他のアミノ酸に置換して遺伝子を不活性化させるかまたは遺伝子変異を編集するか、挿入または欠失によるフレームシフト (frameshift) により遺伝子を不活性化させるかまたは遺伝子変異を編集するか、タンパク質を生産しない非コードDNA配列に変異を導入するか、または疾病を誘発する野生型と異なる配列のDNAを野生型と同一の配列に変化させるなどの様々な形態であり得るが、これらに限定されるものではない。

【0040】

本発明において、用語「塩基配列」は、当該塩基を含むヌクレオチドの配列を意味し、ヌクレオチド配列、核酸配列、またはDNA配列と同一の意味として用いられ得る。

【0041】

本発明において、前記「標的遺伝子 (target gene)」は、遺伝子編集の対象となる遺伝子を意味し、「標的部位 (target siteまたはtarget region)」は、標的遺伝子内の標的的特異的ヌクレアーゼによる遺伝子編集または矯正が起こる部位を意味し、一例において、前記標的的特異的ヌクレアーゼがRNA-ガイドヌクレアーゼ (RNA guided engineered nuclease、RGEN) を含む場合、標的遺伝子内のRNA-ガイドヌクレアーゼが認識する配列 (PAM配列) の5'末端および／または3'末端に隣接して位置し得る。

【0042】

また、本発明は、(a) i) CRISPR/Cas9タンパク質またはその変異体、ii) 逆転写酵素 (Reverse Transcriptase) またはその変異体、およびiii) クロマチン調節ペプチド (Chromatin-modulating peptides) を含む、融合タンパク質またはそれをコード化する核酸と、

(b) ガイドRNAまたはそれをコード化する核酸と、を含み、

前記ガイドRNAは、pegRNA (prime editing guide RNA) およびdsgRNA (dead single guide RNA) であることを特徴とする、遺伝子編集用組成物を提供する。

【0043】

前記遺伝子編集用組成物は、非標的DNA鎖に相補的に結合して標的DNA鎖の切断を誘導するsgRNA (single guide RNA) をさらに含み得、好ましくは、前記ガイドRNAは、本発明においてnicking sgRNAを意味し得る。

【0044】

10

20

30

40

50

本発明において、前記クロマチン調節ペプチドは、ヌクレオソームの再配列および／またはクロマチンの再形成を容易にするためにヌクレオソームおよび／または染色体タンパク質と相互作用する染色体タンパク質またはその断片を意味する。より具体的に、前記クロマチン調節ペプチドは、高ー移動性グループヌクレオソーム結合ドメイン1 (high-mobility group nucleosome binding domain 1、HN1) またはその断片、ヒストンH1中央球状ドメイン (histone H1 central globular domain、H1G) またはその断片、またはこれらの組み合わせであり得るが、これらに限定されるものではない。

【0045】

前記高ー移動性グループヌクレオソーム結合ドメイン (HMGN) は、クロマチンの構造および機能を調節する染色体タンパク質であり、前記ヒストンH1中央球状ドメイン (histone H1 central globular domain、H1G) は、「リンカーヒストン」とも知られたヒストンH1を構成するドメインである。ヒストンH1は、ヌクレオソームアレイの圧縮状態を調節し、形態に影響を与え、前記中央球状ドメインは、ヌクレオソーム上のリンカーDNAのentry/exit部位近くに結合することが知られている。

【0046】

前記クロマチン調節ペプチドは、化学的結合により直接的に、リンカーにより間接的に、またはこれらの組み合わせにより前記CRISPR/Cas9タンパク質または逆転写酵素に連結され得る。具体的に、少なくとも1つのクロマチン調節ペプチドは、CRISPR/Cas9タンパク質のN-末端、C-末端、および／または内部位置に連結され得る。好ましくは、本発明の融合タンパク質は、CRISPR/Cas9タンパク質または逆転写酵素に連結された2つのクロマチン調節ペプチドを含む。より好ましくは、前記融合タンパク質において、HMGN1 (HN1) は、Cas9タンパク質またはその変異体のN-末端に連結され得、前記ヒストンH1中央球状ドメイン (H1G) は、Cas9タンパク質またはその変異体のC-末端または逆転写酵素のC-末端に連結され得る。最も好ましくは、前記融合タンパク質は、i) N末端-[HN1]-[Cas9]-[H1G]-[逆転写酵素]-C末端、またはii) N末端-[HN1]-[Cas9]-[逆転写酵素]-[H1G]-C末端の構成からなり得る。

【0047】

本発明において、前記融合タンパク質は、少なくとも1つの核局在化シグナル、少なくとも1つの細胞ー透過ドメイン、少なくとも1つのマーカードメイン、またはこれらの組み合わせをさらに含み得、好ましくは、N-末端およびC-末端にそれぞれ核局在化シグナル (nuclear localization signal、NLS) 配列をさらに含み得るが、これに限定されるものではない。

【0048】

本発明に係る前記融合タンパク質は、配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列からなり得る。この際、前記融合タンパク質は、配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%、96%、97%、98%、99%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0049】

本発明において、「Cas9 (CRISPR associated protein 9) タンパク質」は、DNAウイルスに対する特定のバクテリアの免疫学的防御において重要な役割をするタンパク質であり、遺伝工学の応用に多く用いられるが、前記タンパク質の主な機能がDNAを切断することであるため、細胞のゲノムを改変する際に適用することができる。具体的に、CRISPR/Cas9は、3世代の遺伝子ハサミであり、利用しようとする特定の塩基配列を認識し切断して編集し、ゲノムの目的部位に特定の遺伝子を挿入するかまたは特定の遺伝子の活動を停止させる操作を簡単、迅速、かつ、効率性よく実施するのに有用である。Cas9タンパク質または遺伝子情報は、NCBI (Na

10

20

30

40

50

tional Center for Biotechnology Information) の GenBank のような公知のデータベースから得ることができるが、これに限定されるものではない。また、Cas9 タンパク質は、その目的に合わせて、当業者が追加のドメインを適宜連結し得る。本発明において、Cas9 タンパク質は、野生型 Cas9 だけでなく、遺伝子編集のための核酸分解酵素の機能を有するものであれば、Cas9 の変異体を全て含み得る。

【0050】

本発明において、前記 Cas9 変異体は、DNA 二本鎖を切断するエンドヌクレアーゼ活性を失うように変異したものを意味し得る。例えば、前記 Cas9 変異体は、エンドヌクレアーゼ活性を失い、ニッカーゼ活性を有するように変異した Cas9 タンパク質、およびエンドヌクレアーゼ活性とニッカーゼ活性を全て失うように変異した Cas9 タンパク質の中から選択された 1 種以上であり得、好ましくは、Cas9 ニッカーゼ (Cas9 nickase) であり得る。

【0051】

前記 Cas9 ニッカーゼは、ヌクレアーゼの触媒活性ドメイン (例えば、Cas9 の RuvC または HNH ドメイン) において変異が起こって不活性化されたものであり得る。具体的に、10 位のアスパラギン酸 (D10)、762 位のグルタミン酸 (E762)、840 位のヒスチジン (H840)、854 位のアスパラギン (N854)、863 位のアスパラギン (N863)、および 986 位のアスパラギン酸 (D986) などからなる群から選択された 1 つ以上が任意の他のアミノ酸に置換された突然変異を含み得、好ましくは、本発明の Cas9 ニッカーゼは、840 位のヒスチジンがアラニンに置換 (H840A) された変異を含み得るが、これに限定されるものではない。

【0052】

前記 Cas9 タンパク質またはその変異体は、その由来が限定されず、非限定的な例示として、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、フランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、リステリア・イノクア (*Listeria innocua*)、またはストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) に由来し得る。

【0053】

前記 Cas9 タンパク質またはその変異体は、微生物から分離したもの、または組換え的方法または合成的方法などのように人為的または非自然発生 (non-naturally occurring) のものであり得る。前記 Cas9 は、in vitro で予め転写された mRNA または予め生産されたタンパク質の形態、または標的細胞または生体内で発現するために組換えベクターに含まれた形態で用いられ得る。一実施形態において、前記 Cas9 は、組換え DNA (Recombinant DNA、rDNA) により作られた組換えタンパク質であり得る。組換え DNA は、様々な有機体から得られた異種または同種遺伝物質を含むために分子クローニングのような遺伝子組換え方法により人工的に作られた DNA 分子を意味する。

【0054】

本発明において、「逆転写酵素 (reverse transcriptase)」は、RNA を鋳型として DNA を合成する能力を有する酵素をいう。本発明において、逆転写酵素は、野生型逆転写酵素だけでなく、上記のように RNA を鋳型として DNA を合成する機能を有するものであれば、逆転写酵素の変異体を全て含み得、逆転写酵素またはその変異体は、好ましくは、モロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus、M-MLV) に由来し得るが、これに限定されるものではない。

【0055】

本発明で用いられる用語「ガイド RNA (guide RNA)」は、標的遺伝子内の

標的部位内の特異的な塩基配列（標的配列）にハイブリダイゼーション可能な標的化配列を含むRNAを意味し、生体外（*in vitro*）または生体（または、細胞）内でCasのようなヌクレアーゼタンパク質と結合し、それを標的遺伝子（または、標的部位）にガイドする役割をする。

【0056】

前記ガイドRNAは、複合体を形成するヌクレアーゼの種類および／またはその由来微生物に応じて適宜選択され得る。例えば、本発明のガイドRNAは、pegRNA、dead sgRNA、またはnicking sgRNAであり得る。

【0057】

前記ガイドRNAは、標的遺伝子（標的部位）内の標的配列と相補的な配列（標的化配列）を有する部分であるスペーサ領域（Spacer region、Target DNA recognition sequence、base pairing regionなどと称する）、およびCas9タンパク質結合のためのヘアピン（hairpin）構造を含み得る。より具体的には、標的遺伝子内の標的配列と相補的な配列を含む部分、Casタンパク質結合のためのヘアピン構造、およびターミネータ（Terminator）配列を含み得る。追加的に、前記pegRNAは、標的遺伝子の非標的鎖に相補的な塩基配列（primer binding site、PBS）および編集しようとする塩基配列を含む逆転写酵素の鋳型鎖部位（RT template）を有する。

【0058】

前記ガイドRNAの標的配列とハイブリダイゼーション可能なガイドRNAの標的化配列は、前記標的配列が位置するDNA鎖（すなわち、PAM配列（5'-NGG-3'（NはA、T、G、またはCである）が位置するDNA鎖）またはその相補的鎖のヌクレオチド配列と50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、99%以上、または100%の配列相補性を有するヌクレオチド配列を意味し、前記相補的鎖のヌクレオチド配列と相補的結合が可能である。

【0059】

前記ガイドRNAは、RNAの形態で使用（または、前記組成物に含まれる）されるか、またはそれをコードするDNAを含むプラスミドの形態で使用（または、前記組成物に含まれる）され得る。

【0060】

本発明において、前記ds gRNAは、10～20 nt（ヌクレオチド）長で構成され得、好ましくは11～19 nt、12～18 nt、13～17 nt、13～16 nt、最も好ましくは14～15 nt長であり得るが、これらに限定されるものではない。

【0061】

また、前記ds gRNAは、pegRNA結合部位、好ましくは、pegRNAのスペーサ（spacer）部位から5～70 nt（ヌクレオチド）、好ましくは6～65 nt、最も好ましくは7～62 nt離れた位置に結合して前記融合タンパク質のクロマチンアクセシビリティを増加させ得る。

【0062】

本発明で用いられる用語、「クロマチンアクセシビリティ（Chromatin accessibility）」とは、主にヒストン（histone）、転写因子（transcription factor、TF）、クロマチン修飾酵素（chromatin-modifying enzymes）、およびクロマチンリモデリング複合体（chromatin-remodelling complexes）で構成されたDNAおよび関連タンパク質により形成された複合体であるクロマチンの物理的圧縮レベルを意味する。真核生物ゲノムは、一般的にヒストン8量体（octamer）を囲んでいる～147 bpのDNAを含むヌクレオソームに圧縮されるが、ヌクレオソームの占有率は、ゲノムにおいて均一でなく、組織および細胞類型に応じて異なる。ヌクレオソームは、一般的に転写調節因子（例えば、転写因子）と相互作用するシス調節因子（エンハンサーおよびプロモーター）が存在するゲノム位置で枯渇して接近可能なクロマチンを生成するこ

10

20

30

40

50

となる。遺伝子編集（遺伝子矯正）に関しては、クローズドゲノム領域よりもオープンゲノム領域を標的とする gRNA の活性に有意な差があり、Cas9 の効率が局所的クロマチンアクセシビリティにより影響を受けるため、クロマチンアクセシビリティと CRISPR-Cas9 媒介の遺伝子編集効率性との間に正の相関関係があることが公知となっている。

【0063】

本発明の他の態様として、本発明は、前記遺伝子編集用組成物を *in vitro* または *ex vivo* 上で標的核酸配列を含む標的領域（*region*）と接触させるステップを含む、遺伝子編集方法を提供する。

【0064】

前記遺伝子編集用組成物は、好ましくは、真核細胞に適用され得、前記真核細胞は、好ましくは、ヒトなどの霊長類、マウスなどの齧歯類を含む哺乳動物に由来し得るが、これらに限定されるものではない。

【0065】

本発明のまた他の態様として、本発明は、前記遺伝子編集用組成物を含む、遺伝子編集用キットを提供する。

【0066】

本発明において、前記キットは、前記遺伝子編集用組成物とともに、バッファ（*buffer*）およびデオキシリボヌクレオチド-5-トリホスフェート（*dNTP*）のような遺伝子編集を実施する際に必要な物質（試薬）を全て含み得る。また、前記キットの特定の反応で用いられる試薬の最適量は、本明細書における開示事項を習得した当業者により容易に決定され得る。

【0067】

本発明のさらに他の態様として、前記遺伝子編集用組成物をヒトを除いた哺乳動物細胞に注入して遺伝子組換え哺乳動物細胞を得るステップと、前記得られた遺伝子組換え哺乳動物細胞をヒトを除いた哺乳動物代理母の卵管に移植するステップと、を含む、ヒトを除いた遺伝子組換え哺乳動物の製造方法を提供する。

【0068】

本発明の前記遺伝子編集組成物の導入により、哺乳動物細胞において40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、99%以上、または100%の遺伝子編集効率（例えば、塩基置換、挿入、または欠失）を達成することができる。

【0069】

本発明において、前記哺乳動物細胞に遺伝子編集用組成物を導入するステップは、i) 前記細胞を本発明に係るプライム編集用融合タンパク質、*pegRNA*、*ns gRNA*、および *ds gRNA* をコード化するプラスミドベクターまたはウイルスベクターでトランスフェクションさせるか、

ii) 前記細胞に融合タンパク質をコード化する *mRNA*、*pegRNA*、*ns gRNA*、および *ds gRNA* の混合物またはこれらのそれぞれを直接注入するか、または

iii) 前記細胞に融合タンパク質、*pegRNA*、*ns gRNA*、および *ds gRNA* の混合物または複合体形態のリボヌクレオタンパク質を直接注入して行われ得る。

【0070】

前記直接注入は、前記 ii) または iii) の各 *mRNA* およびガイド *RNA* またはリボヌクレオタンパク質が組換えベクターを用いず、細胞膜および／または核膜を通過してゲノム（*genome*）に伝達されることを意味し得、例えば、ナノ粒子、電気穿孔法、リポフェクション（*lipofection*）、マイクロインジェクション（*microinjection*）などにより行われ得る。

【0071】

前記遺伝子編集組成物が導入される哺乳動物細胞は、ヒトなどの霊長類、マウスなどの

10

20

30

40

50

齧歯類を含む哺乳動物の胚であり得、好ましくは、ヒトを除いた哺乳動物の胚であり得る。例えば、前記胚は、過剰排卵誘発された雌の哺乳動物と雄の哺乳動物を交配して得られた受精胚を前記雌の哺乳動物の卵管から採取し得る。前記塩基編集用組成物が適用（注入）される胚は、受精された1細胞期の胚（zygote）であり得る。

【0072】

前記得られた遺伝子組換え哺乳動物細胞は、前記遺伝子編集組成物の導入により、標的遺伝子に塩基置換、挿入、または欠失突然変異が発生した細胞であり得る。

【0073】

前記遺伝子組換え哺乳動物細胞、好ましくは、卵管に遺伝子組換え胚細胞の移植を受ける哺乳動物は、前記胚細胞が由来する哺乳動物と同種の哺乳類（代理母）であり得る。

10

【0074】

また、本発明は、前記方法により製造された、遺伝子組換え哺乳動物を提供する。

【0075】

以下、本発明の理解を助けるために好ましい実施例を提示する。ただし、下記の実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、下記の実施例により本発明の内容が限定されるものではない。

【0076】

[実施例]

実施例1. 実験方法

1-1. プラスミドDNAの構築

20

NEBuilder（登録商標）HiFi DNA Assembly Master Mix（E2621L、NEB）を用いて、HN1（High-mobility group nucleosome binding domain 1）およびH1G（Histone H1 central globular domain）オリゴをpCMV-PE2（#132775、Addgene）においてnCas9の両面に融合させ、製造会社のプロトコルに従って、クロマチン調節ペプチドプライムエディター（chromatin-modulating peptide prime editor）を構築した。

【0077】

また、Igfb2、Adamts20、Casp1、およびHoxd13遺伝子に特定の突然変異を誘発させるためのpegRNA発現ベクターを作製するために、pU6-pegRNA-GG-受容体ベクター（#132777、Addgene）にスペーサ（spacer）、プライム結合部位（prime binding site）、および逆転写酵素鋳型（reverse transcriptase template oligos）配列をBsaI酵素切断部位に挿入した。nsgRNAおよびdsgRNA発現ベクターは、pRG2-GGベクター（#104174、Addgene）に挿入した。追加的に、本実施例で用いられた各標的遺伝子に特異的なpegRNAs、nsgRNA、およびdsgRNAの配列を下記表1～3に整理して示した。

30

【0078】

40

【表 1】

pegRNA	配列(5' to 3')		PBS 長 (nt)	RT 鑄型長 (nt)	配列 番号
tdTomato_G to C / T ins_8-17	Spacer	CGCATGGAGGGCTCC ATGAA	8	17	3
	Primer Binding Site	ATGGAGCC			4
	RT template	GAAGTCAGTGGCGGT TC			5
Igf2_G to C / TA ins_9-14	Spacer	TATTGGAAGAACTTG CCCAC	9	14	6
	Primer Binding Site	GGCAAGTTC			7
	RT template	AGATACCGCGTGTA			8
Adamts20_CG to AA_11-13	Spacer	AGTGAATAAGAAGA CGTACT	11	13	9
	Primer Binding Site	ACGTCTTCTTA			10
	RT template	GACCGGCCTTAGT			11
Casp1_TAGG del_12-12	Spacer	GTCTTGTCTCTTATA GGAGA	12	12	12
	Primer Binding Site	CCTATAAGAGAC			13
	RT template	ACCTCTTTCACT			14
Hoxd13_G to T_10-15	Spacer	GAGGCATACATCTCC ATGGA	10	15	15
	Primer Binding Site	ATGGAGATGT			16
	RT template	GACTGGTAGACCTCC			17

10

20

30

40

50

Angpt1_CGG to TGA_11-13	Spacer	CACATTGCCCCATGTT GAATC	11	13	18
	Primer Binding Site	TCAACATGGGC			19
	RT template	GATATAACTGAAT			20
Ksr2_TGAT ins_8-14	Spacer	TCCTGCCCTGGCTCC GTGGT	8	14	21
	Primer Binding Site	ACGGAGCC			22
	RT template	GTGGCCCCACCTGAT			23
Ar_G to T_13-13	Spacer	TCTCACTTGTGGCAG CTGCA	13	13	24
	Primer Binding Site	AGCTGCCACAAGT			25
	RT template	AAGAAGACCTTGA			26

【表 2】

Nicking sgRNA	配列(5' to 3')	配列番号
tdTomato-nsgRNA	GCCCTCGATCTCGAACTCAG	27
Igf2-nsgRNA	CTTCCCCAGATACCGCGTGT	28
Adamt20-nsgRNA	AGCTCGTGTTCAAGGACATG	29
Casp1-nsgRNA	CTGTCAGAAGTCTTGTGCTC	30
Hoxd13-nsgRNA	GATCCTTGGCACAGTACACC	31
Angpt1-nsgRNA	GATATAACTGAATTCAACAT	32
Ksr2-nsgRNA	ACCTGATACGGAGCCAGGGC	33
Ar-nsgRNA	AGGGGAAAATATCAGGAAGT	34

【表 3】

dsgRNA	配列(5' to 3')	配列番号
<i>Igf2</i> _dsgRNA_-34	AGTCAGCAGGTTTC	35
<i>Igf2</i> _dsgRNA_-27	AGGTGCTAGTCAGC	36
<i>Igf2</i> _dsgRNA_+7	TGGAGACAGTCCGC	37
<i>Igf2</i> _dsgRNA_+22	GGACGCCTGCGCAG	38
<i>Adamts20</i> _dsgRNA_-13	TCAAGAGCACAGCC	39
<i>Adamts20</i> _dsgRNA_+14	TTTCTGGTGCTTGG	40
<i>Adamts20</i> _dsgRNA_+24	CGATTTTGACTTTC	41
<i>Adamts20</i> _dsgRNA_+41	CTCCGCTCACTTC	42
<i>Casp1</i> _dsgRNA_-13	CTTTGACTTCTCTA	43
<i>Casp1</i> _dsgRNA_-12	ACTTTGACTTCTCTA	44
<i>Casp1</i> _dsgRNA_+7	CAGCAAATTCTTTC	45
<i>Casp1</i> _dsgRNA_+62	GTATTCATGTCTCA	46
<i>Hoxd13</i> _dsgRNA_-12	CCCGGATCCAAAAG	47
<i>Hoxd13</i> _dsgRNA_-11	CACTTTTGGATCCG	48
<i>Hoxd13</i> _dsgRNA_+20	GCTGTTCCACCCGT	49
<i>Hoxd13</i> _dsgRNA_+24	CGGGTGGAACAGCC	50
<i>Angpt1</i> _dsgRNA_-15	CGAAATCCAGAAAA	51
<i>Angpt1</i> _dsgRNA_-11	ATCCAGAAAACGGA	52
<i>Angpt1</i> _dsgRNA_+14	CTTCCAGAACACGA	53
<i>Angpt1</i> _dsgRNA_+17	TTCCCGTCGTGTTC	54
<i>Ksr2</i> _dsgRNA_-12	TCTCCAAACAAGAT	55
<i>Ksr2</i> _dsgRNA_+7	TCCGGGGGGGCACAC	56
<i>Ar</i> _dsgRNA_-15	GGAGATGAAGCTTC	57

【0079】

1-2. リポフェクション (lipofection) および電気穿孔 (electroporation)

AAVS1 遺伝子座でtdTomatoを発現するレポーターシステムが導入されたHEK293T細胞、NIH/3T3細胞 (ATCC、CRL-1658)、およびC2C12細胞 (ATCC、CRL-1772) は、10% FBS (S001-01、Wegene) またはBCS (26170-043、Gibco) が補充されたDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; LM001-05、Wegene) で5% CO₂および37℃の条件下で培養された。本実施例では、製造会社のプロトコルに従って、0.5 μgのpegRNA、2.15 μgのPE2、0.22 μgのnsgRNAの3種類のプラスミドと、1 μLのLipofectamine 2000試薬 (11668019、Thermo Fisher Scientific

c) が含まれた $50\mu\text{L}$ の Opti-MEM (31985070、Gibco) を 2×10^4 細胞に処理してトランスフェクションさせた後、細胞を11日間培養した。

【0080】

電気穿孔は、それぞれ 1×10^5 個の NIH/3T3 細胞および C2C12 細胞に対して実施し、前記各細胞株を $3\mu\text{g}$ の PE2 または CMP-PE、 $0.7\mu\text{g}$ の pegrRNA、 $0.3\mu\text{g}$ の nsgRNA、および $0.25\mu\text{g}$ の dsgrRNA のプラスミドと混合し、製造会社のプロトコルに従って、NeonTM Transfection System (MPK1096、Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションさせた。その後、細胞を72時間培養後に回収し、標的化ディープシーケンシング (targeted deep sequencing) を行った。

10

【0081】

1-3. DNA アンプリコンの製造

トランスフェクション後、tdTomato 発現レポーター HEK293T、NIH/3T3、C2C12 細胞、およびマウス胚から DNeasy Blood & Tissue Kits (69506、Qiagen) を用いてゲノムDNAを抽出した。その後、PhusionTM High-Fidelity DNA 重合酵素 (F-530XL、Thermo Fisher Scientific) および Sungen (SG-PT02、Sungenetics) を用いて編集された標的配列を増幅させた。

【0082】

1-4. In vitro 転写

mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (AM1345、Invitrogen) を用いて PE2 および CMP-PE の転写体を製造し、MEGAclearTM Transcription Clean-Up Kit (AM1908、Invitrogen) を用いて精製した。製造会社のプロトコルに従って、T7 RNA 重合酵素 (M0251、NEB) を用いて pegrRNA、nsgRNA、および dsgrRNA の転写を誘導し、ExpinTM CleanUp SV (113-150、GeneAll) を用いて転写された RNAs を精製した。その後、NanoDrop One UV-Vis (Thermo Fisher Scientific) を用いて前記精製された RNAs を定量化した。

20

【0083】

1-5. 実験動物

本実施例の in vivo 実験は、ソウル大学校動物実験倫理委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee、IACUC) の承認を受けて行った。胚寄贈のために C57BL/6N および ICR マウスを利用し、代理母は、特定の病原体がない実験室で飼育された。

30

【0084】

1-6. マイクロインジェクション (Microinjection)

C57BL/6N の雌マウスに Hyperova (KYD-010-EX-x5、CARD) および hCG (CG10-1v1、Sigma) を48時間間隔で注入して卵巢過剰刺激を誘発し、hCG ホルモンの注入後、雌マウスを野生型 C57BL/6N の雄マウスと交配させた。受精された1細胞段階の胚を膨大部 (ampulla) から得て、2つの前核 (pronuclei) が現れるまで、M2 培地 (M7167、Sigma) で培養した。マイクロインジェクションのためのプライム編集用混合物は、 $100\mu\text{L}$ の Tris-EDTA (pH7.4) 下で、 100ng の PE2 または CMP-PE mRNA、 65ng pegrRNA、 32.5ng nsgRNA、 22ng dsgrRNA の濃度で準備した。マイクロインジェクション後には、胚盤胞 (blastocyst) への発達のために、胚を KSOM 培地 (MR-121-D、Millipore) 下で 37°C の培養器にて4日間培養した。その後、2細胞段階の胚の一部を偽妊娠代理母の卵管に移植した。

40

【0085】

50

1-7. ジェノタイピング (Genotyping) および標的化ディープシーケンシング (targeted deep sequencing)

各標的は、特異的プライマーを用いて、nested PCRにより増幅させた。PCRアンプリコンで構成されたライブラリーに対し、iSeq™ 100シーケンシングシステム (Illumina、Inc.) を用いて塩基配列分析を実施した。その後、CRISPR REGN Toolsプログラム (<http://www.rgenome.net/>) とEUNプログラム (<https://daeunyoona.com/>) により配列分析データを分析した。

【0086】

1-8. 全ゲノムシーケンシング (Whole genome sequencing) および変異検出 (variant calling)

DNeasy Blood & Tissue kit (69506、Qiagen) を用いて、マウス (C57BL/6N) の耳からゲノムDNAを分離した後、製造会社の指針に従って、Covaris S2超音波装置システムを用いてゲノムDNAをせん断し、Truseq Nano DNA sample prep kitを用いてpaired-end DNAライブラリーを製造した。ディープカバレッジ (30x) 全ゲノムシーケンシングは、Illumina Novaseq 6000プラットフォーム (Illumina) において101 base paired-endシーケンシングにより行われ、配列読み取りは、BWA-MEMを用いて、マウス参照ゲノムGRCm38/mm10に整列して行われた。単一ヌクレオチド変異と小さい挿入/欠失 (indel) は、GATK4 HaplotypeCallerを用いて検出し、マウスv142 (dbSNP142) に対してdbSNPに存在する公知の変異は、ANNOVARと注を付けた。dbSNP142に存在しない新しい変異体は、さらに分析してオフターゲット部位で位置を確認した。推定されるオフターゲット部位は、最大7-bpまたは2-bpバルジ+5bp不一致を考慮して、Cas-OFFinderの候補と比較した。全ての変異は、読み取りプロットを視角化して手動で確認した。

【0087】

1-9. DNase I digestion assayおよびqPCR

本発明者らは、従来の公知の方法に従ってDNase I digestion assayを実施した。具体的に、細胞を剥がし、冷たい1X PBSで繰り返し洗浄した後、900rpmで5分間2回スピンドウンした。次に、冷たいRSB緩衝液 (10mM Tris-HCl、10mM NaCl、および3mM MgCl₂) + 0.1% IGEPAL CA-630 (I8896、Sigma) を用いて細胞を溶解させ、4degにおいて10分間500gでスピンドウンして核をペレット化した。次に、上層液を除去し、DNase I (2-16U) を処理するかまたは処理しない条件で、核を37℃で20-30分間培養した。その後、50mM EDTAを添加して反応を停止させ、DNeasy Blood & Tissue kit (69506、Qiagen) を用いて、DNase Iにより分解されたDNAを精製した。リアルタイムqPCR (real-time qPCR) は、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Kit (KR0389、Kapa Biosystems) を用いて行い、完全なゲノムDNAの分画は、比較C_T方法を用いて測定された。前記リアルタイムqPCRに用いられたプライマー配列を下記表4に羅列した。

10

20

30

40

50

【表 4】

ターゲット	配列(5' to 3')		配列番号
Closed chromatin	Forward	GCAGCAGATGGCAAGTAATACTAAG AT	58
	Reverse	CCCTTATTCTCTGAGCATTAGACAGT TATA	59
Open chromatin	Forward	TGAGTCACAGCATCAGCATCGGGTC TCT	60
	Reverse	GGAGAGGGCCTTTTCTCTTCAAGGT TC	61
<i>Igf2</i>	Forward	TCTCCAGGACGACTTCCCCAGA	62
	Reverse	CTCCAGGTGTCATATTGGAAGAAC	63
<i>Adamts20</i>	Forward	GTGGAATCAAGAGCACAGC	64
	Reverse	CAGTGAATAAGAAGACGTAC	65
<i>Casp1</i>	Forward	AAATCACTGGTCTTGTCTCTTATAG	66
	Reverse	CAGCAAATTCTTTCACCTCTTTC	67
<i>Hoxd13</i>	Forward	TCGGCACGAGGCATACATCTCCATG	68
	Reverse	CGTTGGCTAGCGTCCAGGACTG	69
<i>Angpt1</i>	Forward	CCAGAAAACGGAGGGAGAAGA	70
	Reverse	TAGGCACATTGCCCATGTTGA	71
<i>Ksr2</i>	Forward	TCTCTCCAAACAAGATTGGATCAT	72
	Reverse	TCTCCTGCCCTGGCTCC	73

【0088】

1-10. 統計分析

データは、平均と標準偏差で示し、3回または5回の独立した繰り返し実験を行った。P値は、unpairedおよびtwo-sided Student's t-検定を用いて計算された。

【0089】

実施例2. 哺乳類ゲノムにおけるプライム編集システムの検証および編集効率の確認

本発明者らは、まず、哺乳類ゲノムにおけるプライム編集システムの適用可能性を検証しようとし、このために、HEK293T細胞のAAVS1遺伝子座でtdTomatoを発現するレポーターシステムを用いた。具体的に、図1aに絵で示すように、プライマー結合部位(PBS)長が8ntであり、逆転写酵素(RT)鋳型長が17nt(PBS8-RT17)であるプライムエディター3(prime editor 3、PE3)を用いて、前記tdTomato配列内にチミン(thymine、T)塩基を挿入することで停止コドンを生成させた。また、pegRNA(prime-editing guide RNA)は、編集される鎖における編集を抑制するために非標的鎖上のPAM配列を除去するように設計された。その後、本発明者らは、前記PE3によるtdToma

tdTomato遺伝子の編集効率を確認するために、フローサイトメトリー (flow cytometry) によりtdTomato陰性細胞をゲートして編集効率を評価した。

【0090】

その結果、図1bに示すように、tdTomatoを発現する陽性対照群 (tdTomato expressing HEK293T) と比較する際に、PE3を用いてtdTomato遺伝子編集を誘導した場合 (tdTomato expressing HEK293T+PE3)、32%の細胞がtdTomato陰性であることを確認した。このような結果は、プライムエディターが、本発明のシステムにおいて所望する標的突然変異の生成を可能にすることを示唆する。

【0091】

次に、プライムエディターを用いてマウスモデルを作製するために、8個の転移突然変異または1個以上のヌクレオチド挿入または欠失を含む標的を設計しようとした。まず、図2aに示すように、2種のマウス遺伝子、すなわち、Igf2 (insulin-like growth factor 2) およびAdamts20 (a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin type-1 motifs 20) において終止コドンの生成を誘導した。Igf2遺伝子は、父系から遺伝したIgf2対立遺伝子の突然変異により小人症表現型を誘導することができる。具体的に、本発明者らは、Igf2遺伝子のexon4にTA塩基を挿入することで終止コドンを生成させ、遺伝子の機能喪失を誘導した。また、編集される鎖の持続的編集を抑制するために、PAM配列のヌクレオチドをNGGからNCGに置換させた。一方、Adamts20は、メラニン細胞 (melanocytes) の発達に関与する遺伝子であり、Adamts20遺伝子座のE584部位における早期停止コドンの生成は、典型的な白色ベルト表現型と関連があると知られている。本発明者らは、Adamts20遺伝子座のexon12においてCGをTTに置換を誘導し、早期終止コドン (E584*) およびPAM配列の改変 (NGGからNAGに) を誘導した。また、上記のようなマウス遺伝子標的において前記突然変異を誘導するために、PE (操作されたM-MLV RTと融合したnCAs9)、pegRNA、および nicking sgRNA (nsgRNA) で構成されたPE3システムを使用した。この際、前記nsgRNAは、標的DNA鎖、すなわち、非一編集鎖の切断によりDNA修復活性を促進することで編集効率性を向上させるための目的で用いられたものである。

【0092】

次に、本発明者らは、Igf2およびAdamts20標的部位でプライム編集を最適化するために、様々なPBS長 (8-14nt) およびRT鑄型長 (10-18nt) で構成されたpegRNAによる編集効率性を評価した。この際、転写終結シグナルの一部となり得る3'-末端にチミンが存在するPBS長と、pegRNA構造を妨害し得る5'-末端にシトシンが存在するRT長は除いた。その後、電気穿孔法によりPE、pegRNA、およびnsgRNAをコード化する3種類のプラスミドをNIH/3T3細胞にトランスフェクションさせ、細胞を72時間の培養後に回収して標的化ディープシーケンシングを実施した。

【0093】

実験結果、図2bに示すように、NIH/3T3細胞においてIgf2およびAdamts20標的に対するPE3媒介の編集効率が3%未満であることを確認した。このような結果から、プライムエディターをマウスモデルの作製に利用するためには、編集効率の改善が必要であると判断した。

【0094】

実施例3. ds gRNAによるプライムエディターの編集効率の増進確認

本発明者らは、プライムエディターの編集効率性を改善させるための試みとして、proximity-CRISPRアイディアに基づいて、触媒的に不活性であるエンドヌクレアーゼ (catalytically dead endonuclease) の代わりに標的部位のクロマチン構造を解くためのds gRNAsを用いた。ds gRNAは、不活性化さ

10

20

30

40

50

れた触媒作用を示し、かつ、Cas エンドヌクレアーゼをガイドし、標的部位に結合する 14～15 nt 長のガイド RNA である。そこで、本発明者らは、プライムエディターが次のような 2 つの役割をすると仮定した。その 1 つは、標的部位で pegRNA とともにプライム編集機能をすることであり、他の 1 つは、ds gRNA と標的部位に隣接したクロマチンを調節することである。本発明者らは、pegRNA のスペーサ (spacer) から 7-62 ヌクレオチド位置範囲で Ig f 2 および Adamts 20 標的部位に隣接した proximal ds gRNAs を設計した。その後、編集効率を確認するために、Ig f 2 および Adamts 20 部位で様々な pegRNA 長に proximal ds gRNA を適用し、興味深くにも proximal ds gRNA を用いた PE3 の編集効率は、大半のグループにおいて向上したことが明らかになった。従って、本発明者らは、Ig f 2 および Adamts 20 標的に対してそれぞれ最も高い効率を示した PBS 9-RT14 pegRNA および PBS 11-RT13 pegRNA を選択して後続実験を行った。

【0095】

次に、編集効率の高い ds gRNA を選別するために、Ig f 2、Adamts 20、Casp1 (4 bp 欠失)、Hoxd13 (G から T に置換)、Angpt1 (CGG から TGA に置換)、および Ksr2 (TGAT の挿入) 遺伝子に対する追加の proximal ds gRNA を設計してテストしようとした。このために、PE、pegRNA、ns gRNA、およびそれぞれの proximal ds gRNA をコード化するプラスミドを電気穿孔法により NIH/3T3 および C2C12 細胞にトランスフェクションさせ、その後、標的化ディープシーケンシングを実施した。

【0096】

その結果、図 3 に示すように、proximal ds gRNA が、PE3 に比べて、大半の標的において編集効率性を選択的に改善させたことを確認した。このような結果から、ds gRNA の適用による遺伝子編集効率は、proximal ds gRNA の位置に応じて異なり、効果的な標的突然変異を誘導するためには、各標的および細胞類型別に最適の ds gRNA のためのスクリーニングプロセスが必要であることが分かった。

【0097】

実施例 4. CMP が結合したプライムエディターの編集効率の増進確認

本発明者らは、プライムエディターの編集効率性を改善させるための他の試みとして、クロマチン調節ペプチド (chromatin-modulating peptides、CMP) である高-移動性グループヌクレオソーム結合ドメイン 1 (high-mobility group nucleosome binding domain 1、HN1) およびヒストン H1 中央球状ドメイン (histone H1 central globular domain、H1G) を用いてプライムエディターを操作した。具体的に、プライムエディターの Cas9 ニッカーゼ (Cas9 nickase、nCasp9) と逆転写酵素が融合したタンパク質に前記 HN1 および H1G を追加して 2 種類のバリエーションに製造した。図 4 a に示すように、nCasp9 の N-末端側に HN1 および C-末端側に H1G を結合させた構成の融合タンパク質を CMP-PE-V1 と称し、nCasp9 の N-末端側に HN1、nCasp9 の C-末端側に操作された M-MLV RT、および前記 RT の C-末端に H1G が結合するように操作した融合タンパク質を CMP-PE-V2 と称した。また、前記 CMP-PE-V1 および CMP-PE-V2 のアミノ酸配列を図 4 b および図 4 c にそれぞれ示した。

【0098】

本発明者らは、前記 CMP-PE3-V1 (pegRNA/ns gRNA と CMP-PE-V1) または CMP-PE3-V2 (pegRNA/ns gRNA と CMP-PE-V2) を 2 種類のマウス細胞株にそれぞれ伝達し、CMP を結合させていない PE3 を細胞に導入した場合と編集効率を比較した。その結果、図 4 b に示すように、大半の標的部位において、CMP-PE3-V1 の場合、PE3 に比べて遥かに高い編集効率を示すことを確認した。特に、CMP-PE3-V1 による編集効率は、NIH/3T3 細胞にお

いて、I g f 2 の場合は 2.55 倍、A d a m t s 2 0 の場合は 3.92 倍さらに高かった。また、ヒト細胞である H E K 2 9 3 T 細胞において、H E K 3 配列を標的として向上したプライムエディターと d e a d s g R N A を適用して編集効率を確認した。その結果を図 4 e に示した。P E 3 に比べて向上したプライム編集方法である C M P - P E - V 1 または C M P - P E - V 2 において編集効率が向上することを確認することができた。また、d e a d s g R N A を向上したプライムエディターに共に適用した際に、P E 3 や向上したエディターのみを処理したときよりも向上した効率を示すことを確認することができた (C M P - P E 3 - V 2 + d s g R N A (-11))。このような結果は、クロマチン調節ペプチド H N 1 および H 1 G を用いて操作されたプライムエディターが編集効率性を有意に向上させることを示唆する。

10

【0099】

実施例 5. d s g R N A および C M P が適用されたプライムエディターの編集効率の上昇効果の確認

さらに、前記実施例 3 および 4 の結果に基づいて、本発明者らは、C M P - P E 3 - V 1 および d s g R N A (C M P - P E 3 - V 1 + d s g R N A) をマウス細胞に共に伝達し、編集効率に対する相乗効果が現れるか否かを分析した。

【0100】

その結果、図 5 に示すように、C M P - P E 3 - V 1 および d s g R N A をマウス細胞に共に伝達した場合 (C M P - P E 3 - V 1 + d s g R N A)、P E 3 対照群に比べて I g f 2、A d a m t s 2 0、および H o x d 1 3 標的部位でそれぞれ編集効率が最大 4.20 倍、5.11 倍、および 3.56 倍向上したことが明らかになり、このような相乗効果は、細胞株と標的に応じて異なるレベルを示した。また、上記の結果から、C M P - P E 3 のみを細胞に導入させた場合 (C M P - P E 3 - V 1) には、実験した全ての標的および 2 種類の細胞類型においてプライムエディターの効率が有意に向上したのに対し、d s g R N A のみを細胞に導入した場合 (P E 3 + d s g R N A)、または C M P - P E 3 - V 1 および d s g R N A を共に導入した場合 (C M P - P E 3 + d s g R N A) には、編集効率が標的部位および細胞類型に応じて異なり得ることが分かった。

20

【0101】

さらに、本発明者らは、進歩したプライムエディターシステムをマイクロインジェクションによりマウス胚に注入して標的化突然変異の生成を誘導し、その効率を分析しようとした。具体的に、設計されたマウス標的のうち、所望しない突然変異が相対的に低い I g f 2 標的部位を選択した。その結果、図 6 a に示すように、C M P - P E 3 - V 1 が注入された胚および C M P - P E 3 - V 1 + d s g R N A が注入された胚において I g f 2 標的に対して相当高いレベルの編集効率を示した。特に C M P - P E 3 - V 1 + d s g R N A の場合、I g f 2 遺伝子の標的部位で所望の突然変異が 22 個の胚中の 21 個 (95%) に観察され、C M P - P E 3 - V 1 + d s g R N A が P E 3 および P E 3 + d s g R N A に比べて非常に高い編集効率を示すことを確認した。

30

【0102】

これに加え、マウス胚において A d a m t s 2 0、H o x d 1 3、A n g p t 1、K s r 2、および A r 遺伝子における編集効率性を検証するために、C M P - P E - V 1 および p r o x i m a l d s g R N A を用いてテストを行った。標的化ディープシーケンシングを行った結果、図 6 b に示すように、P E 3 を注入した場合に比べて、C M P - P E - V 1 および p r o x i m a l d s g R N A を注入した胚において、K s r 2 および A r 標的を除き、A d a m t s 2 0、H o x d 1 3、および A n g p t 1 標的において編集効率が改善されたことを確認した。総合的に、このような結果は、マウス胚において、p r o x i m a l d s g R N A およびクロマチン調節ペプチドを用いて編集効率が増進されたプライム編集が可能であることを示唆する。

40

【0103】

実施例 6. d s g R N A および C M P による標的部位クロマチンアクセシビリティの向上確認

50

本発明者らは、CMP-PE-V1とds gRNAが標的部位のクロマチン構造を解いてクロマチンアクセシビリティを向上させるか否かを確認するために、DNase I digestion分析およびqPCRを行って各標的部位のクロマチン状態を確認した。この際、陰性対照群（クローズドクロマチン）としてChr3:71,026,628-71,026,685（マウスゲノムbuild mm9）に位置した遺伝子を用い、陽性対照群（オープンクロマチン）としてCol6a1遺伝子を用いた。実験結果、図7aおよび図7bに示すように、NIH/3T3細胞株において、Igf2、Adamts20、およびHoxd13は、相対的に閉じられた状態のクロマチン（closed chromatin）として現れ、C2C12では、Igf2を除いた全ての標的が開かれた状態のクロマチンであると分析された。このような結果は、2つの細胞株において標的配列が同一であるとしてもクロマチン構造の状態が異なることを示唆する。

10

【0104】

さらに、クローズドクロマチン構造を有するものと確認された代表的な遺伝子であるIgf2の標的部位において、CMP-PE-V1またはds gRNAがクロマチン状態を変化させるか否かを分析した。その結果、図7cに示すように、PE3と比較する際に、CMP-PE-V1、ds gRNA、またはCMP-PE-V1+ds gRNAにより閉じられた状態のクロマチン構造が開かれた状態に徐々に変化することを確認した。このような結果は、CMP-PE-V1またはds gRNAを用いると、閉じられた状態のクロマチン構造を解き、クロマチンアクセシビリティを改善してプライム編集の効率性の向上が可能であることを立証する直接的な証拠である。

20

【0105】

実施例7．標的突然変異が誘発されたマウスモデルの作製およびオフターゲット効果の分析

次に、本発明者らは、所望しない突然変異の発生頻度が相対的に低いPBS9-RT14およびds gRNA+7を用いて、マイクロインジェクションにより、マウス胚において、図8aに示すようなIgf2の標的突然変異の生成を誘導し、前記マウス胚を代理母に移植した。その後、前記代理母から生まれた子を観察および分析した結果、図8bに示すように、最大47%の編集頻度（10匹中の2匹）で、Igf2遺伝子座でGからCへの置換およびTAの挿入が起こったことを確認した。また、上記のようなIgf2突然変異が次世代に伝達されるか否かを分析した結果、図8cに示すように、Igf2突然変異マウスから生まれた9匹のF1同腹子中の7匹が同一の突然変異を有することから、標的突然変異の生殖細胞を介した次世代への伝達が可能であることが分かった。

30

【0106】

本発明者らは、プライムエディターのオフターゲット効果（off-target effect）を評価するために、Cas-OFFinderを用いて、マウスゲノムにおいてそれぞれ最大3個のヌクレオチド不一致があるIgf2ターゲットのpegRNAおよびns gRNAによる潜在的なオフターゲット部位を確認した。その結果、図9aに示すように、野生型（Wild type）と比較した際に、潜在的なオフターゲット突然変異が検出されなかった。また、作製されたIgf2突然変異マウスにおいてオフターゲット効果を確認するために、全ゲノムシーケンシング（WGS）を実施した。その結果、図9bおよび図9cに示すように、ns gRNAの単一オフターゲット部位が発見されたが、ゲノムDNAを用いたサンガーシーケンシングにより前記部位が偽陽性であることを確認した。

40

【0107】

最後に、Igf2突然変異マウスの表現型を確認するために、Igf2^{P+/m-}雄（F1）を野生型雌マウスと交配させた。その結果、図10aおよび図10bに示すように、父系対立遺伝子から遺伝したIgf2遺伝子の突然変異を保有したIgf2^{P-/m+}マウスは、所望の突然変異遺伝子型と一致する小人症表現型を示した。このような結果は、改善された本発明に係るプライム編集システムがマウスモデルの作製に効果的に適用可能であることを示唆する。

50

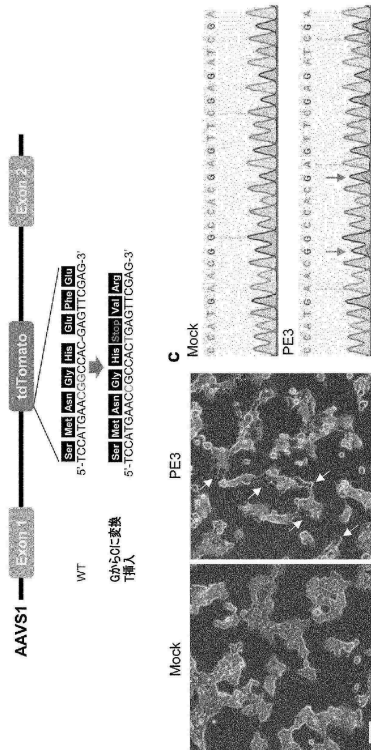
【0108】

上述した本発明の説明は例示のためのものであり、本発明が属する技術分野の通常の知識を有する者であれば、本発明の技術的思想や必須の特徴を変更せずに他の具体的な形態に容易に変形可能であることを理解することができる。従って、上述した実施例は、全ての面で例示的なものであって、限定的なものではないことを理解しなければならない。

【図面】

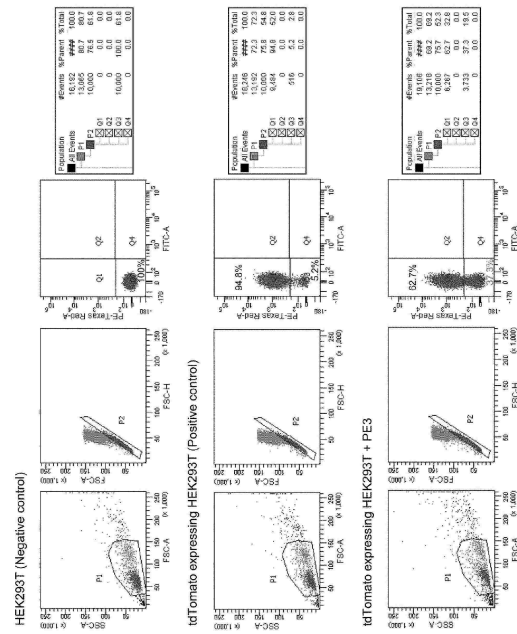
【図1a】

【図1a】



【図1b】

【図1b】



10

20

30

40

50

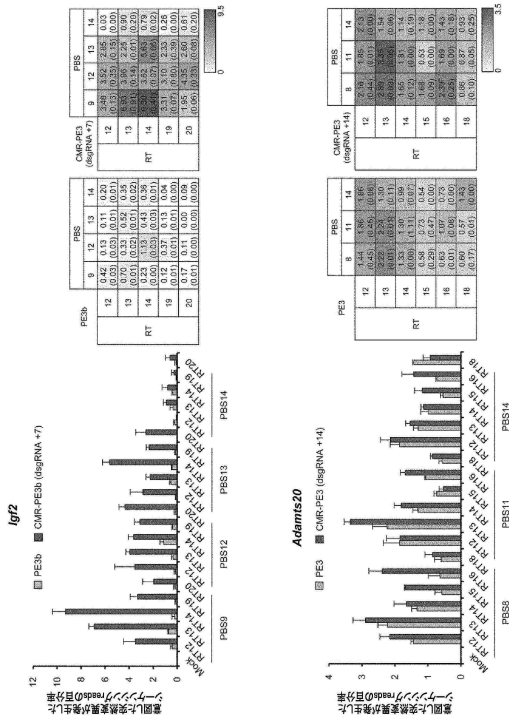
【図 2 a】

【図2a】



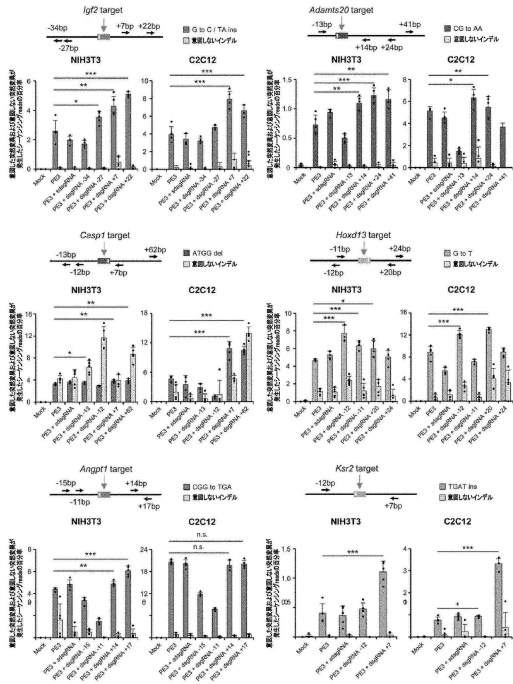
【図 2 b】

【図2b】



【図 3】

【図3】



【図 4 a】

【図4a】



10

20

30

40

50

【図 4 b】

【図4b】

- (1) **Purple:** Bipartite NLS
(2) **Green:** HNI
(3) **Yellow:** Linker
(4) **Grey :** nCas9
(5) **Light green:** H1G
(6) **Blue:** M-MLV RT

CMP-PE-V1[illegible]

【図 4 c】

【図4c】

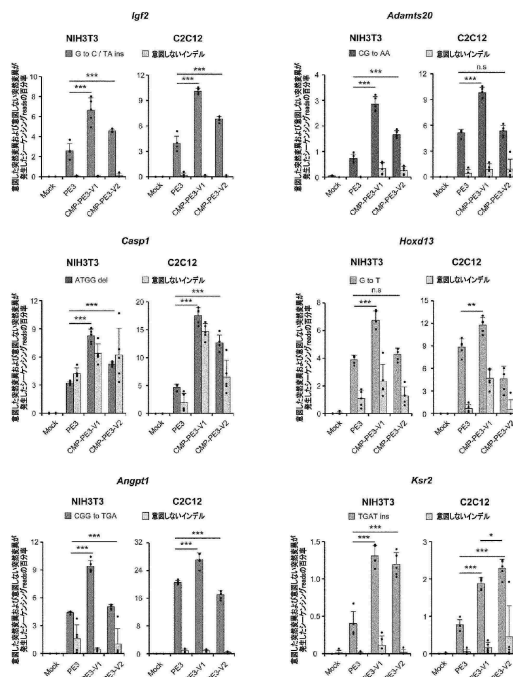
- (1) **Purple:** Bipartite NLS
(2) **Green:** HN1
(3) **Yellow:** Linker
(4) **Grey :** nCas9
(5) **Light green:** H1G
(6) **Blue:** M-MLV RT

CMP-PE-V2

[illegible]

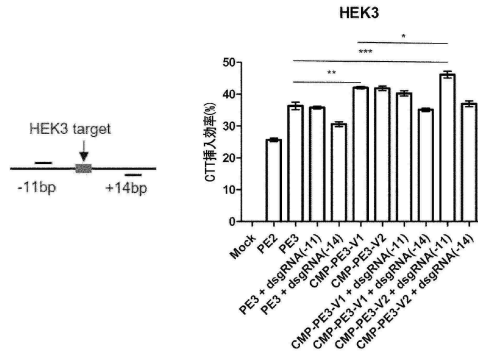
【図 4 d】

【図4d】



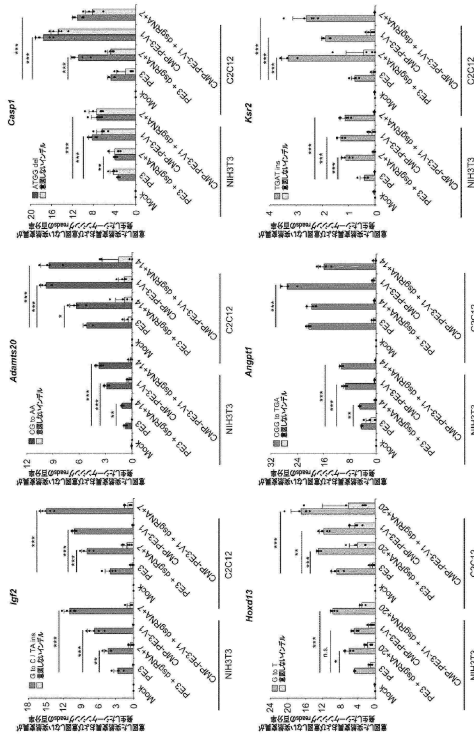
【図 4 e】

【図4e】



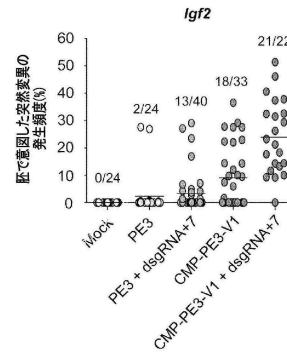
【図 5】

【図5】



【図 6 a】

【図6a】

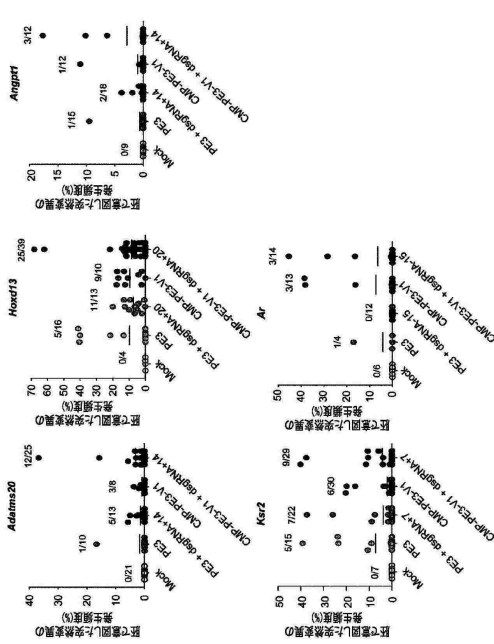


10

20

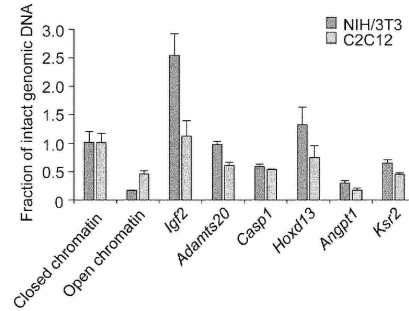
【図 6 b】

【図6b】



【図 7 a】

【図7a】



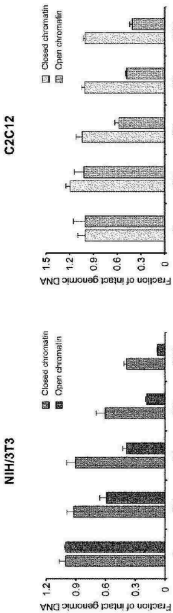
30

40

50

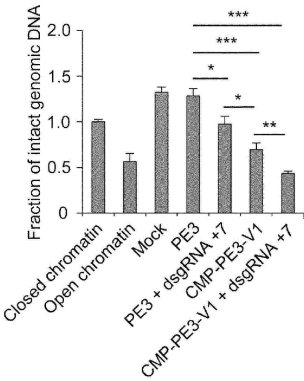
【図 7 b】

【図7b】



【図 7 c】

【図7c】

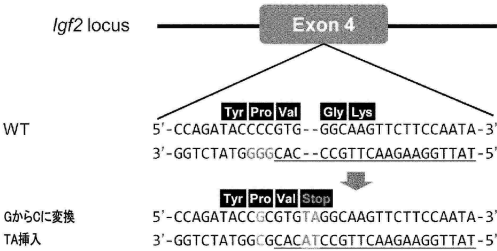


10

20

【図 8 a】

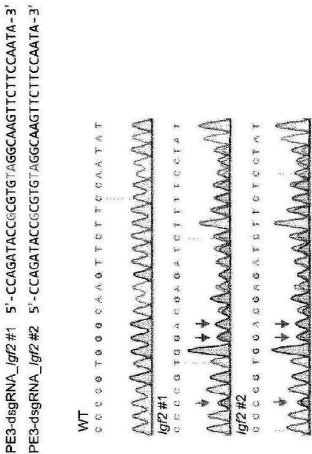
【図8a】



【図 8 b】

【図8b】

Type	Frequency (%)
C to G / TA ins	46.78
C to G / TA ins	47.05

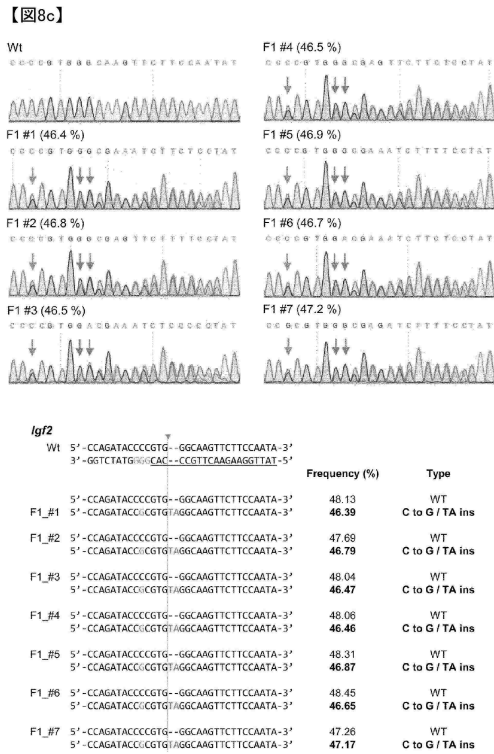


30

40

50

【図 8 c】



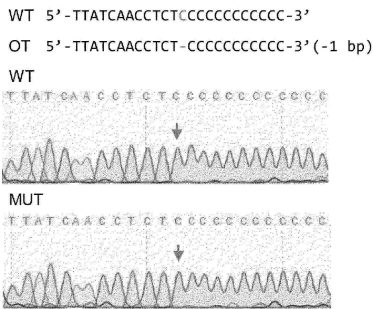
【図 9】

【図9a】

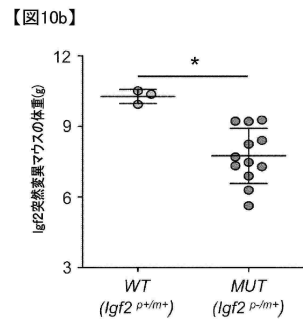
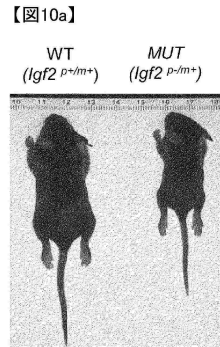
全体ゲノムの配列分析

	<i>Igf2</i> WT	<i>Igf2</i> MUT
Total variants (SNPs + Indels)	75030 + 99307	79772 + 107911
SNPs	75030	79772
SNPs after excluding dbSNP 142	43767	47876
unique SNPs	6515	10624
On-target (pegRNA)		
Up to 2bp bulge + 5bp mismatches with NRG PAM (5723)	0	0
Up to 7bp mismatches with NRG PAM (3202)	0	0
On-target (nicking sgRNA)		
Up to 2bp bulge + 5bp mismatches with NRG PAM (3615)	0	1
Up to 7bp mismatches with NRG PAM (3212)	0	0
On-target (dead sgRNA)		
Up to 3bp mismatches with NRG PAM (1224)	0	0

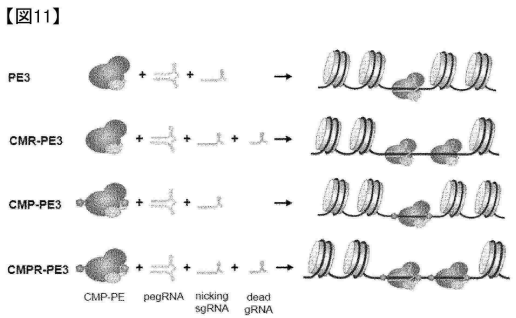
【図9b】



【図 1 0】



【図 1 1】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007700222000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

コリア マウス フェノタイピング センター

大韓民国 08826 ソウル、クァナクグ、クァナクーロ、1、ソウル ナショナル ユニバー
シティ、ベテリナリー スクール、バイオテクノロジー リサーチ ビルディング、5th フロア

(74)代理人 100112874

弁理士 渡邊 薫

(72)発明者 キム、ギョンミ

大韓民国 03024 ソウル、チョンノグ、トンイルーロ 18-ギル、9、109-701

(72)発明者 バク、ス ジ

大韓民国 17841 キョンギード、ピョンテクーシ、ドンサクーロ、397、106-1704

(72)発明者 ジョン、テ ヨン

大韓民国 12914 キョンギード、ハナムーシ、ミサガンピョンーデロ、135、1909-1
101

(72)発明者 シン、スン キュン

大韓民国 02843 ソウル、ソンブクグ、ボムンーロ 26-ギル、83-11、#302

(72)発明者 ソン、ジェ キョン

大韓民国 07986 ソウル、ヤンチョング、モクドンドンーロ、430、602-702

審査官 坂井田 京

(56)参考文献

Andrew V. Anzalone et al., Nature, 2019年, Vol.576, p.149-178

Xiao Ding et al., The CRISPR Journal, 2019年11月01日, Vol.2, Number 1, p.51-63

John C. Rose et al., Nature Communications, 2020年, Vol.11, No.2697, p.1-11

James E Dahlman et al., nature biotechnology, 2015年, Vol.33, No.11, p.1159-1161

Guanwen Liu et al., Genome Biology, 2019年, Vol.20, No.145, p.1-11

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)