

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和5年9月4日(2023.9.4)

【国際公開番号】WO2021/041569

【公表番号】特表2022-546701(P2022-546701A)

【公表日】令和4年11月7日(2022.11.7)

【年通号数】公開公報(特許)2022-204

【出願番号】特願2022-513214(P2022-513214)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 5/071(2010.01)

C 1 2 N 1/21(2006.01)

C 1 2 Q 1/68(2018.01)

C 1 2 N 15/867(2006.01)

C 1 2 N 15/861(2006.01)

C 1 2 N 15/864(2006.01)

C 1 2 N 15/869(2006.01)

C 1 2 N 9/16(2006.01)

C 1 2 N 15/55(2006.01)

10

20

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 1/21

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/867 Z Z N A

C 1 2 N 15/861 Z

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/869 Z

C 1 2 N 9/16 Z

C 1 2 N 15/55

30

【手続補正書】

【提出日】令和5年8月25日(2023.8.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

40

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

C L U S T . 1 3 3 1 2 0、C L U S T . 0 9 9 1 2 9、C L U S T . 3 4 2 2 0 1、  
C L U S T . 1 9 5 0 0 9、又はC L U S T . 0 5 7 0 5 9のエンジニアリングされた天然に存在しないクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(C R I S P R)  
- C a sシステムであって、

( a ) C R I S P R 関連タンパク質が配列番号 3 0 1、1 ~ 5 0、1 0 1 - 1 4 5、3 0  
2 - 3 4 1、5 0 1 - 5 2 1、又は6 0 1 - 6 8 2のいずれか1つに記載のアミノ酸配列  
と少なくとも8 0 % (例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7

50

%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質又は前記CRISPR関連タンパク質をコードする核酸；及び

(b)ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイド

を含み、

前記CRISPR関連タンパク質が、前記RNAガイドに結合し、前記スペーサー配列に相補的な前記標的核酸配列を修飾することができる、CRISPR-Casシステム。

【請求項2】

i)前記ダイレクトリピート配列が、配列番号51~72、85~87、95~100、又は900~915のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む；

ii)前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号1又は配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である；

iii)前記CRISPR関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の認識能を有し、前記PAM配列が、5'-TTN-3'又は5'-TN-3'として記載される核酸配列を含む；

iv)前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド~約55ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、20~35ヌクレオチドを含む；

v)前記ダイレクトリピート配列が、配列番号146~162のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む；

vi)前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号101、配列番号102、又は配列番号103に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である；

v)前記CRISPR関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の認識能を有し、前記PAM配列が、5'-GTN-3'、5'-TG-3'、5'-TR-3'、又は5'-RATG-3'として記載される核酸配列を含む；又は

vi)前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド~約55ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、26~51ヌクレオチドを含む、

請求項1に記載のシステム。

【請求項3】

a)

i)前記ダイレクトリピート配列が、配列番号342~362のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む；

ii)前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号301に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である；

i i i) 前記 C R I S P R 関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ ( P A M ) 配列の認識能を有し、前記 P A M 配列が、5' - A A G - 3'、5' - A A D - 3'、5' - A A R - 3'、5' - R A A G - 3' ( 配列番号 9 2 1 )、5' - R A A R - 3' ( 配列番号 9 2 2 )、5' - R A A D - 3' ( 配列番号 9 2 3 ) として記載される核酸配列を含む；若しくは  
i v) 前記 R N A ガイドの前記スペーサー配列が、約 1 2 ヌクレオチド ~ 約 6 2 ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記 R N A ガイドの前記スペーサー配列が、1 9 ~ 4 0 ヌクレオチドを含む；

b)

i) 前記ダイレクトリポート配列が、配列番号 5 2 2 ~ 5 3 2 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のヌクレオチド配列を含む；

10

i i) 前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 5 0 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) の同一性を有するタンパク質である；

i i i) 前記 C R I S P R 関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ ( P A M ) 配列の認識能を有し、前記 P A M 配列が、5' - T T N - 3' として記載される核酸配列を含む；若しくは

i v) 前記 R N A ガイドの前記スペーサー配列が、約 1 5 ヌクレオチド ~ 約 5 5 ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記 R N A ガイドの前記スペーサー配列が、2 0 ~ 3 9 ヌクレオチドを含む；又は

20

c)

i) 前記ダイレクトリポート配列が、配列番号 6 8 3 ~ 7 3 4 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のヌクレオチド配列を含む；

i i) 前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 6 0 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) の同一性を有するタンパク質である；

30

i i i) 前記 C R I S P R 関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ ( P A M ) 配列の認識能を有し、前記 P A M 配列が、5' - G T N - 3' として記載される核酸配列を含む；若しくは

i v) 前記 R N A ガイドの前記スペーサー配列が、約 1 5 ヌクレオチド ~ 約 5 0 ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記 R N A ガイドの前記スペーサー配列が、2 0 ~ 4 4 ヌクレオチドを含む、

請求項 1 又は 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

a) 前記 C R I S P R 関連タンパク質が、

40

i) 少なくとも 1 つの R u v C ドメイン又は少なくとも 1 つの分割された R u v C ドメインを含む；

i i) 触媒残基 ( 例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸 ) を含む；若しくは

i i i) 前記標的核酸を切断する；

b) 前記 C R I S P R 関連タンパク質が、ペプチドタグ、蛍光タンパク質、塩基編集ドメイン、DNAメチル化ドメイン、ヒストン残基修飾ドメイン、局在化因子、転写修飾因子、光ゲート制御因子、化学誘導性因子、又はクロマチン可視化因子を更に含む；

c) 前記 C R I S P R 関連タンパク質をコードする前記核酸が、

i) 細胞での発現にコドン最適化される；

i i) プロモーターに作動可能に連結されている；若しくは

50

i i i) ベクター内にあり、必要に応じて前記ベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ファージベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、又は単純ヘルペスベクターを含む；

i v) DNA分子である；又は

d) 前記標的核酸が、PAM配列を含む、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 5】

前記 CRISPR 関連タンパク質及び RNA ガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じ、必要に応じて

i) 前記標的核酸の前記修飾が、二本鎖切断イベントである；

i i) 前記標的核酸の前記修飾が、一本鎖切断イベントである；

i i i) 前記標的核酸の前記修飾により、挿入イベントが生じる；又は

i v) 前記標的核酸の前記修飾により、欠失イベントが生じる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 6】

i) ドナー鋳型核酸を更に含み、必要に応じて前記ドナー鋳型核酸が DNA である；又は  
i i)

a) ナノ粒子、リボソーム、エキソソーム、微小胞、又は遺伝子銃を含む送達組成物中に存在する；若しくは

b) 細胞内にあり、必要に応じて前記細胞が真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞、若しくは原核細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 7】

i) (a) CRISPR 関連タンパク質が配列番号 301 ~ 341 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100%) 同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR 関連タンパク質；及び

(b) ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含む RNA ガイド；

i i) (a) CRISPR 関連タンパク質が配列番号 1 ~ 50 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100%) 同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR 関連タンパク質又は前記 CRISPR 関連タンパク質をコードする核酸；及び

(b) ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含む RNA ガイド；

i i i) (a) CRISPR 関連タンパク質が配列番号 101 ~ 145 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100%) 同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR 関連タンパク質；及び

(b) ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含む RNA ガイド；

i v) (a) CRISPR 関連タンパク質が配列番号 501 ~ 521 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100%) 同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR 関連タンパク質；及び

(b) ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含む RNA ガイド；又は

10

20

30

40

50

v) (a) CRISPR関連タンパク質が配列番号601~682のいずれか1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) 同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質；及び

(b) ダイレトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイド

を含む、細胞。

【請求項8】

i) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号301に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) の同一性を有するタンパク質である；若しくは

2) 5'-AAG-3'、5'-AAD-3'、5'-AAR-3'、5'-RAAG-3' (配列番号921)、5'-RAAR-3' (配列番号922)、5'-RAAD-3' (配列番号923)として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレトリピート配列が、配列番号342~362のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) 同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約12ヌクレオチド~約62ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、19~40ヌクレオチドを含む；

ii) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号1又は配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) の同一性を有するタンパク質である；若しくは

2) 5'-TTN-3'又は5'-TN-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレトリピート配列が、配列番号51~72、85~87、95~100、又は900~915のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) 同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド~約55ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、20~35ヌクレオチドを含む；

iii) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号101、配列番号102、又は配列番号103に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) の同一性を有するタンパク質である；若しくは

2) 5'-GTN-3'、5'-TG-3'、5'-TR-3'、又は5'-RATG-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレトリピート配列が、配列番号146~162のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) 同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

10

20

30

40

50

c) 前記スペーサー配列が、約 15ヌクレオチド～約 55ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、26～51ヌクレオチドを含む；

iv) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号501に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質であり；

2) 5'-TTN-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレクトリピート配列が、配列番号522～532のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約 15ヌクレオチド～約 55ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、20～39ヌクレオチドを含む；又は

v) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号601に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である；若しくは

2) 5'-GTN-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレクトリピート配列が、配列番号683～734のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約 15ヌクレオチド～約 50ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、20～44ヌクレオチドを含む、

請求項7に記載の細胞。

【請求項9】

前記細胞が真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である、又は前記細胞が原核細胞である、請求項7又は8に記載の細胞。

【請求項10】

標的核酸を修飾する方法において使用するための、エンジニアリングされた天然に存在しないCRISPR-Casシステムを含む組成物であって、前記方法は、

(a) CRISPR関連タンパク質が配列番号301、1～50、101～145、302～341、501～521又は601～682のいずれか1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質又は前記CRISPR関連タンパク質をコードする核酸；及び

(b) ダイレクトリピート配列と前記標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイド；

を含む、前記エンジニアリングされた天然に存在しないCRISPR-Casシステムを、前記標的核酸に送達することを含み、

前記CRISPR関連タンパク質がRNAガイドへの結合能を有し、

前記CRISPR関連タンパク質及びRNAガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じる、組成物。

【請求項11】

i) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

10

20

30

40

50

1) 配列番号301に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である；若しくは

2) 5'-AAG-3'、5'-AAD-3'、5'-AAR-3'、5'-RAAG-3' (配列番号921)、5'-RAAR-3' (配列番号922)、5'-RAAD-3' (配列番号923)として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレクトリピート配列が、配列番号342~362のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約12ヌクレオチド~約62ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、19~40ヌクレオチドを含む；

ii) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号1又は配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である；若しくは

2) 5'-TTN-3'又は5'-TN-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレクトリピート配列が、配列番号51~72、85~87、95~100、又は900~915のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド~約55ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、20~35ヌクレオチドを含む；

iii) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号101、配列番号102、又は配列番号103に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である；若しくは

2) 5'-GTN-3'、5'-TG-3'、5'-TR-3'、又は5'-RATG-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレクトリピート配列が、配列番号146~162のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド~約55ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、26~51ヌクレオチドを含む；

iv) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号501に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質であり；

2) 5'-TTN-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレクトリピート配列が、配列番号522~532のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%

10

30

40

50

、 86%、 87%、 88%、 89%、 90%、 91%、 92%、 93%、 94%、 95%、 96%、 97%、 98%、 99%又は100%）同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド～約55ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、20～39ヌクレオチドを含む；又は

v) a) 前記CRISPR関連タンパク質が、

1) 配列番号601に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）の同一性を有するタンパク質である；若しくは

2) 5'-GTN-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有し；

b) 前記ダイレクトリピート配列が、配列番号683～734のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）同一のヌクレオチド配列を含む；若しくは

c) 前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド～約50ヌクレオチドを含み、必要に応じて前記スペーサー配列が、20～44ヌクレオチドを含む、請求項10に記載の組成物。

**【請求項12】**

請求項1～6のいずれか一項に記載のシステムを含む組成物であって、前記システムを細胞内の標的核酸に結合させる方法において使用するための組成物であり、前記方法は、

(a) 前記システムを提供すること；及び

(b) 前記システムを前記細胞に送達すること

を含み、前記細胞が前記標的核酸を含み、前記CRISPR関連タンパク質が前記RNAガイドに結合し、前記スペーサー配列が前記標的核酸に結合し、必要に応じて前記細胞が真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である、組成物。

**【請求項13】**

i) 前記標的核酸が、

a) DNA分子である；若しくは

b) PAM配列を含む；又は

ii)

a) 前記標的核酸の前記修飾が、二本鎖切断イベントである；

b) 前記標的核酸の前記修飾が、一本鎖切断イベントである；

c) 前記標的核酸の前記修飾により、挿入イベントが生じる；若しくは

d) 前記標的核酸の前記修飾により、欠失イベントが生じる、

請求項10～12のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項14】**

標的核酸の編集方法、標的核酸の発現を改変する方法において使用するための、請求項1～6のいずれか一項に記載のシステムを含む組成物であって、前記方法は、前記システムを前記標的核酸に接触させることを含む、組成物。

**【請求項15】**

インビトロ又はエキソビポでの

(a) 標的核酸のターゲティング及び編集方法；

(b) 核酸の認識に応じた一本鎖核酸の非特異的分解方法；

(c) 二本鎖標的のスペーサー相補鎖の認識に応じた二本鎖標的の非スペーサー相補鎖のターゲティング及びニッキング方法；

(d) 二本鎖標的核酸のターゲティング及び切断方法；

(e) 試料中の標的核酸の検出方法；

(f) 二本鎖核酸の特異的編集方法；

10

20

30

40

50

- ( g ) 二本鎖核酸の塩基編集方法；
  - ( h ) 細胞における遺伝子型特異的又は転写状態特異的細胞死又は休眠の誘導方法；
  - ( i ) 二本鎖核酸標的におけるインデルの作成方法；
  - ( j ) 二本鎖核酸標的への配列の挿入方法；又は
  - ( k ) 二本鎖核酸標的における配列の欠失又は逆位形成方法
- における請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のシステムの使用。

【請求項 16】

哺乳動物細胞において標的核酸へ挿入又は欠失を導入する方法において使用するための、C R I S P R 関連タンパク質をコードする核酸配列及び R N A ガイド（又は前記 R N A ガイドをコードする核酸）を含む組成物であって、前記方法は、

10

( a ) 前記 C R I S P R 関連タンパク質をコードする前記核酸配列であって、前記 C R I S P R 関連タンパク質が配列番号 3 0 1、1 ~ 5 0、1 0 1 ~ 1 4 5、3 0 2 ~ 3 4 1、5 0 1 ~ 5 2 1、又は 6 0 1 ~ 6 8 2 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %（例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 %）同一のアミノ酸配列を含むもの；及び

( b ) ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含む前記 R N A ガイド（又は前記 R N A ガイドをコードする前記核酸）；のトランスフェクションを含み、

20

前記 C R I S P R 関連タンパク質が R N A ガイドへの結合能を有し、

前記 C R I S P R 関連タンパク質及び R N A ガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じる、

哺乳動物細胞において標的核酸へ挿入又は欠失を導入する、組成物。

【請求項 17】

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 3 0 1、1、1 0 1、5 0 1、又は 6 0 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %（例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 %）同一のアミノ酸配列を含み、必要に応じて

i ) 前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 1、1 0 1、3 0 1、5 0 1、又は 6 0 1 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む；

30

i i ) 前記トランスフェクションが、一過性トランスフェクションである；又は

i i i ) 前記細胞がヒト細胞である、

請求項 16 に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 5 1 8】

40

他の実施形態

本発明はその詳細な説明を伴い説明されているが、前述の説明は例示であり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定する意図はないことが理解されるべきである。他の態様、利点、及び変形例が、以下の特許請求の範囲内にある。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

( 項目 1 )

C L U S T . 1 3 3 1 2 0、C L U S T . 0 9 9 1 2 9、C L U S T . 3 4 2 2 0 1、C L U S T . 1 9 5 0 0 9、又は C L U S T . 0 5 7 0 5 9 のエンジニアリングされた天然に存在しないクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート ( C R I S P R ) - C a s システムであって、

50

(a) CRISPR関連タンパク質が配列番号1~50、101-145、301-341、501-521、又は601-682のいずれか1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質又は前記CRISPR関連タンパク質をコードする核酸；及び

(b) ダイレトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイドを含み、

前記CRISPR関連タンパク質が、前記RNAガイドに結合し、前記スペーサー配列に相補的な前記標的核酸配列を修飾することができる、CRISPR-Casシステム。

(項目2)

前記ダイレトリピート配列が、配列番号51~72、85~87、95~100、又は900~915のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）同一のヌクレオチド配列を含む、項目1に記載のシステム。

(項目3)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号1又は配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）の同一性を有するタンパク質である、項目1又は2に記載のシステム。

(項目4)

前記CRISPR関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の認識能を有し、前記PAM配列が、5'-TTN-3'又は5'-TN-3'として記載される核酸配列を含む、項目3に記載のシステム。

(項目5)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド~約55ヌクレオチドを含む、項目1~4のいずれか一項に記載のシステム。

(項目6)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、20~35ヌクレオチドを含む、項目1~5のいずれか一項に記載のシステム。

(項目7)

前記ダイレトリピート配列が、配列番号146~162のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）同一のヌクレオチド配列を含む、項目1又は2に記載のシステム。

(項目8)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号101、配列番号102、又は配列番号103に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）の同一性を有するタンパク質である、項目1、2、又は7のいずれか一項に記載のシステム。

(項目9)

前記CRISPR関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の認識能を有し、前記PAM配列が、5'-GTN-3'、5'-TG-3'、5'-TR-3'、又は5'-RATG-3'として記載される核酸配列を含む、項目1、2、7、又は8のいずれか一項に記載のシステム。

10

20

30

40

50

(項目10)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド～約55ヌクレオチドを含む、項目1、2、又は7～9のいずれか一項に記載のシステム。

(項目11)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、26～51ヌクレオチドを含む、項目1、2、又は7～10のいずれか一項に記載のシステム。

(項目12)

前記ダイレクトリピート配列が、配列番号342～362のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）同一のヌクレオチド配列を含む、項目1又は2に記載のシステム。

(項目13)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号301に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）の同一性を有するタンパク質である、項目1、2、又は12のいずれか一項に記載のシステム。

(項目14)

前記CRISPR関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の認識能を有し、前記PAM配列が、5'-AAG-3'、5'-AAD-3'、5'-AAR-3'、5'-RAAG-3'（配列番号921）、5'-RAAR-3'（配列番号922）、5'-RAAD-3'（配列番号923）として記載される核酸配列を含む、項目1、2、12、又は13のいずれか一項に記載のシステム。

(項目15)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、約12ヌクレオチド～約62ヌクレオチドを含む、項目1、2、又は12～14のいずれか一項に記載のシステム。

(項目16)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、19～40ヌクレオチドを含む、項目15に記載のシステム。

(項目17)

前記ダイレクトリピート配列が、配列番号522～532のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）同一のヌクレオチド配列を含む、項目1又は2に記載のシステム。

(項目18)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号501に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）の同一性を有するタンパク質である、項目1又は2に記載のシステム。

(項目19)

前記CRISPR関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の認識能を有し、前記PAM配列が、5'-TTN-3'として記載される核酸配列を含む、項目1、2、又は18のいずれか一項に記載のシステム。

(項目20)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド～約55ヌクレオチドを含む、項目1、2、18又は19のいずれか一項に記載のシステム。

(項目21)

10

20

30

40

50

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、20～39ヌクレオチドを含む、項目20に記載のシステム。

(項目22)

前記ダイレクトリピート配列が、配列番号683～734のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) 同一のヌクレオチド配列を含む、項目1又は2に記載のシステム。

(項目23)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号601に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) の同一性を有するタンパク質である、項目1、2、又は22のいずれか一項に記載のシステム。

10

(項目24)

前記CRISPR関連タンパク質がプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の認識能を有し、前記PAM配列が、5'-GTN-3'として記載される核酸配列を含む、項目1、2、22、又は23のいずれか一項に記載のシステム。

(項目25)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド～約50ヌクレオチドを含む、項目1、2、又は22～24のいずれか一項に記載のシステム。

20

(項目26)

前記RNAガイドの前記スペーサー配列が、20～44ヌクレオチドを含む、項目25に記載のシステム。

(項目27)

前記CRISPR関連タンパク質が、少なくとも1つのRuvCドメイン又は少なくとも1つの分割されたRuvCドメインを含む、項目1～26のいずれか一項に記載のシステム。

(項目28)

前記CRISPR関連タンパク質が、触媒残基(例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸)を含む、項目1～27のいずれか一項に記載のシステム。

30

(項目29)

前記CRISPR関連タンパク質が、前記標的核酸を切断する、項目1～28のいずれか一項に記載のシステム。

(項目30)

前記CRISPR関連タンパク質が、ペプチドタグ、蛍光タンパク質、塩基編集ドメイン、DNAメチル化ドメイン、ヒストン残基修飾ドメイン、局在化因子、転写修飾因子、光ゲート制御因子、化学誘導性因子、又はクロマチン可視化因子を更に含む、項目1～29のいずれか一項に記載のシステム。

(項目31)

前記CRISPR関連タンパク質をコードする前記核酸が、細胞での発現にコドン最適化される、項目1～30のいずれか一項に記載のシステム。

40

(項目32)

前記CRISPR関連タンパク質をコードする前記核酸が、プロモーターに作動可能に連結されている、項目1～31のいずれか一項に記載のシステム。

(項目33)

前記CRISPR関連タンパク質をコードする前記核酸が、ベクター内にある、項目1～32のいずれか一項に記載のシステム。

(項目34)

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ファージベクタ

50

一、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、又は単純ヘルペスベクターを含む、  
項目 3 3 に記載のシステム。

( 項目 3 5 )

前記標的核酸が DNA 分子である、項目 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のシステム。

( 項目 3 6 )

前記標的核酸が、PAM 配列を含む、項目 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のシステム。

( 項目 3 7 )

前記 CRISPR 関連タンパク質が、非特異的ヌクレアーゼ活性を含む、項目 1 ~ 3 6  
のいずれか一項に記載のシステム。

( 項目 3 8 )

前記 CRISPR 関連タンパク質及び RNA ガイドによる前記標的核酸のターゲティング  
により、前記標的核酸の修飾が生じる、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のシステム

( 項目 3 9 )

前記標的核酸の前記修飾が、二本鎖切断イベントである、項目 3 8 に記載のシステム。

( 項目 4 0 )

前記標的核酸の前記修飾が、一本鎖切断イベントである、項目 3 8 に記載のシステム。

( 項目 4 1 )

前記標的核酸の前記修飾により、挿入イベントが生じる、項目 3 8 に記載のシステム。

( 項目 4 2 )

前記標的核酸の前記修飾により、欠失イベントが生じる、項目 3 8 に記載のシステム。

( 項目 4 3 )

前記修飾により細胞毒性又は細胞死が生じる、項目 3 8 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の  
システム。

( 項目 4 4 )

ドナー鑄型核酸を更に含む、項目 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のシステム。

( 項目 4 5 )

前記ドナー鑄型核酸が DNA である、項目 4 4 に記載のシステム。

( 項目 4 6 )

前記ドナー鑄型核酸が RNA である、項目 4 4 に記載のシステム。

( 項目 4 7 )

前記システムが t r a c r RNA を含まない、項目 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載のシ  
ステム。

( 項目 4 8 )

前記 CRISPR 関連タンパク質が自己プロセッシングである、項目 1 ~ 4 7 のいずれか  
一項に記載のシステム。

( 項目 4 9 )

前記システムが、ナノ粒子、リポソーム、エキソソーム、微小胞、又は遺伝子銃を含む  
送達組成物中に存在する、項目 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のシステム。

( 項目 5 0 )

細胞内にある、項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステム。

( 項目 5 1 )

前記細胞が真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である、項目 5 0 に記  
載のシステム。

( 項目 5 2 )

前記細胞が原核細胞である、項目 5 0 に記載のシステム。

( 項目 5 3 )

( a ) CRISPR 関連タンパク質が配列番号 1 ~ 5 0 のいずれか 1 つに記載のアミノ  
酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %  
、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %

10

20

30

40

50

、 97%、98%、99%又は100%)同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質又は前記CRISPR関連タンパク質をコードする核酸；及び  
 (b)ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイドを含む、細胞。

(項目54)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号1又は配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である、項目53に記載の細胞。

10

(項目55)

前記CRISPR関連タンパク質が、5'-TTN-3'又は5'-TN-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有する、項目53又は54に記載の細胞。

(項目56)

前記ダイレクトリピート配列が、配列番号51~72、85~87、95~100、又は900~915のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む、項目53~55のいずれか一項に記載の細胞。

20

(項目57)

前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド~約55ヌクレオチドを含む、項目53~56のいずれか一項に記載の細胞。

(項目58)

前記スペーサー配列が、20~35ヌクレオチドを含む、項目53~57のいずれか一項に記載の細胞。

(項目59)

(a)配列番号101~145のいずれか1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質；及び  
 (b)ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイドを含む、細胞。

30

(項目60)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号101、配列番号102、又は配列番号103に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である、項目59に記載の細胞。

40

(項目61)

前記CRISPR関連タンパク質が、5'-GTN-3'、5'-TG-3'、5'-TR-3'、又は5'-RATG-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有する、項目59又は60に記載の細胞。

(項目62)

前記ダイレクトリピート配列が、配列番号146~162のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む、項目59~61のいずれか一項に記載の細胞。

50

(項目 6 3)

前記スパーサー配列が、約 1 5 ヌクレオチド～約 5 5 ヌクレオチドを含む、項目 5 9 ～ 6 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 4)

前記スパーサー配列が、2 6 ～ 5 1 ヌクレオチドを含む、項目 5 9 ～ 6 3 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 5)

( a ) 配列番号 3 0 1 ～ 3 4 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のアミノ酸配列を含む、C R I S P R 関連タンパク質；及び

( b ) ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスパーサー配列とを含む R N A ガイド

を含む、細胞。

(項目 6 6)

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 3 0 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) の同一性を有するタンパク質である、項目 6 5 に記載の細胞。

(項目 6 7)

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、5 ' - A A G - 3 '、5 ' - A A D - 3 '、5 ' - A A R - 3 '、5 ' - R A A G - 3 ' ( 配列番号 9 2 1 )、5 ' - R A A R - 3 ' ( 配列番号 9 2 2 )、5 ' - R A A D - 3 ' ( 配列番号 9 2 3 ) として記載される核酸配列を含む P A M 配列の認識能を有する、項目 6 5 又は 6 6 に記載の細胞。

(項目 6 8)

前記ダイレクトリピート配列が、配列番号 3 4 2 ～ 3 6 2 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のヌクレオチド配列を含む、項目 6 5 ～ 6 7 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 9)

前記スパーサー配列が、約 1 2 ヌクレオチド～約 6 2 ヌクレオチドを含む、項目 6 5 ～ 6 8 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 7 0)

前記スパーサー配列が、1 9 ～ 4 0 ヌクレオチドを含む、項目 6 5 ～ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 7 1)

( a ) 配列番号 5 0 1 ～ 5 2 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のアミノ酸配列を含む、C R I S P R 関連タンパク質；及び

( b ) ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスパーサー配列とを含む R N A ガイド

を含む、細胞。

(項目 7 2)

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 5 0 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) の同一性を有するタンパク質である、項目 7 1 に記載の細胞。

(項目 7 3)

10

20

30

40

50

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、5' - T T N - 3' として記載される核酸配列を含む P A M 配列の認識能を有する、項目 7 1 又は 7 2 に記載の細胞。

( 項目 7 4 )

前記ダイレトリピート配列が、配列番号 5 2 2 ~ 5 3 2 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のヌクレオチド配列を含む、項目 7 1 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 7 5 )

前記スパーサー配列が、約 1 5 ヌクレオチド ~ 約 5 5 ヌクレオチドを含む、項目 7 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の細胞。

10

( 項目 7 6 )

前記スパーサー配列が、2 0 ~ 3 9 ヌクレオチドを含む、項目 7 1 ~ 7 5 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 7 7 )

( a ) 配列番号 6 0 1 ~ 6 8 2 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のアミノ酸配列を含む、C R I S P R 関連タンパク質；及び

( b ) ダイレトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスパーサー配列とを含む R N A ガイドを含む、細胞。

20

( 項目 7 8 )

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 6 0 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) の同一性を有するタンパク質である、項目 7 7 に記載の細胞。

( 項目 7 9 )

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、5' - G T N - 3' として記載される核酸配列を含む P A M 配列の認識能を有する、項目 7 7 又は 7 8 に記載の細胞。

30

( 項目 8 0 )

前記ダイレトリピート配列が、配列番号 6 8 3 ~ 7 3 4 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のヌクレオチド配列を含む、項目 7 7 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 8 1 )

前記スパーサー配列が、約 1 5 ヌクレオチド ~ 約 5 0 ヌクレオチドを含む、項目 7 7 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 8 2 )

前記スパーサー配列が、2 0 ~ 4 4 ヌクレオチドを含む、項目 7 7 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の細胞。

40

( 項目 8 3 )

前記細胞が t r a c r R N A を含まない、項目 5 3 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 8 4 )

前記細胞が真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である、項目 5 3 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の遺伝子修飾された細胞。

( 項目 8 5 )

前記細胞が原核細胞である、項目 5 3 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 8 6 )

50

標的核酸を修飾する方法であって、

( a ) C R I S P R 関連タンパク質が配列番号 1 ~ 5 0 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のアミノ酸配列を含む、 C R I S P R 関連タンパク質又は前記 C R I S P R 関連タンパク質をコードする核酸；及び

( b ) ダイレトリピート配列と前記標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含む R N A ガイド；

を含む、エンジニアリングされた天然に存在しない C R I S P R - C a s システムを、標的核酸に送達することを含み、

前記 C R I S P R 関連タンパク質が R N A ガイドへの結合能を有し、

前記 C R I S P R 関連タンパク質及び R N A ガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じる、方法。

( 項目 8 7 )

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 1 又は配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % 又は 1 0 0 % ) の同一性を有するタンパク質である、項目 8 6 に記載の方法。

( 項目 8 8 )

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、 5 ' - T T N - 3 ' 又は 5 ' - T N - 3 ' として記載される核酸配列を含む P A M 配列の認識能を有する、項目 8 6 又は 8 7 に記載の方法。

( 項目 8 9 )

前記ダイレトリピート配列が、配列番号 5 1 ~ 7 2、 8 5 ~ 8 7、 9 5 ~ 1 0 0、又は 9 0 0 ~ 9 1 5 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のヌクレオチド配列を含む、項目 8 6 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 9 0 )

前記スペーサー配列が、約 1 5 ヌクレオチド ~ 約 5 5 ヌクレオチドを含む、項目 8 6 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 9 1 )

前記スペーサー配列が、 2 0 ~ 3 5 ヌクレオチドを含む、項目 8 6 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 9 2 )

標的核酸を修飾する方法であって、

( a ) 配列番号 1 0 1 ~ 1 4 5 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のアミノ酸配列を含む、 C R I S P R 関連タンパク質；及び

( b ) ダイレトリピート配列と前記標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含む R N A ガイド；

を含む、エンジニアリングされた天然に存在しない C R I S P R - C a s システムを、標的核酸に送達することを含み、

前記 C R I S P R 関連タンパク質が R N A ガイドへの結合能を有し、

前記 C R I S P R 関連タンパク質及び R N A ガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じる、方法。

( 項目 9 3 )

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、又は配列番号 1 0 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8

10

20

30

40

50

4 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %)の同一性を有するタンパク質である、項目92に記載の方法。

(項目94)

前記CRISPR関連タンパク質が、5'-GTN-3'、5'-TG-3'、5'-TR-3'、又は5'-RATG-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有する、項目92又は93に記載の方法。

(項目95)

前記ダイレトリート配列が、配列番号146~162のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む、項目92~94のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目96)

前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド~約55ヌクレオチドを含む、項目92~95のいずれか一項に記載の方法。

(項目97)

前記スペーサー配列が、26~51ヌクレオチドを含む、項目92~96のいずれか一項に記載の方法。

(項目98)

20

標的核酸を修飾する方法であって、

(a) 配列番号301~341のいずれか1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質；及び

(b) ダイレトリート配列と前記標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイド；

を含む、エンジニアリングされた天然に存在しないCRISPR-Casシステムを、標的核酸に送達することを含み、

前記CRISPR関連タンパク質がRNAガイドへの結合能を有し、

30

前記CRISPR関連タンパク質及びRNAガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じる、方法。

(項目99)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号301に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の同一性を有するタンパク質である、項目98に記載の方法。

(項目100)

前記CRISPR関連タンパク質が、5'-AAG-3'、5'-AAD-3'、5'-AAR-3'、5'-RAAG-3' (配列番号921)、5'-RAAR-3' (配列番号924)、5'-RAAD-3' (配列番号923)として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有する、項目98又は99に記載の方法。

(項目101)

前記ダイレトリート配列が、配列番号342~362のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のヌクレオチド配列を含む、項目98~100のいずれか一項に記載の方法。

(項目102)

前記スペーサー配列が、約12ヌクレオチド~約62ヌクレオチドを含む、項目98~

50

101のいずれか一項に記載の方法。

(項目103)

前記スペーサー配列が、19～40ヌクレオチドを含む、項目98～102のいずれか一項に記載の方法。

(項目104)

標的核酸を修飾する方法であって、

(a) 配列番号501～521のいずれか1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%

又は100%) 同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質；及び

(b) ダイレクトリピート配列と前記標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイド；

を含む、エンジニアリングされた天然に存在しないCRISPR-Casシステムを、標的核酸に送達することを含み、

前記CRISPR関連タンパク質がRNAガイドへの結合能を有し、

前記CRISPR関連タンパク質及びRNAガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じる、方法

(項目105)

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号501に記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) の同一性を有するタンパク質である、項目104に記載の方法。

(項目106)

前記CRISPR関連タンパク質が、5'-TTN-3'として記載される核酸配列を含むPAM配列の認識能を有する、項目104又は105に記載の方法。

(項目107)

前記ダイレクトリピート配列が、配列番号522～532のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) 同一のヌクレオチド配列を含む、項目104～106のいずれか一項に記載の方法。

(項目108)

前記スペーサー配列が、約15ヌクレオチド～約55ヌクレオチドを含む、項目104～107のいずれか一項に記載の方法。

(項目109)

前記スペーサー配列が、20～39ヌクレオチドを含む、項目104～108のいずれか一項に記載の方法。

(項目110)

標的核酸を修飾する方法であって、

(a) 配列番号601～682のいずれか1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%

又は100%) 同一のアミノ酸配列を含む、CRISPR関連タンパク質；及び

(b) ダイレクトリピート配列と前記標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイド；

を含む、エンジニアリングされた天然に存在しないCRISPR-Casシステムを、標的核酸に送達することを含み、

前記CRISPR関連タンパク質がRNAガイドへの結合能を有し、

前記CRISPR関連タンパク質及びRNAガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じる、方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 1 1)

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、配列番号 6 0 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % (例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 %) の同一性を有するタンパク質である、項目 1 1 0 に記載の方法。

(項目 1 1 2)

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、5' - G T N - 3' として記載される核酸配列を含む P A M 配列の認識能を有する、項目 1 1 0 又は 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記ダイレクトリピート配列が、配列番号 6 8 3 ~ 7 3 4 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % (例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 %) 同一のヌクレオチド配列を含む、項目 1 1 0 ~ 1 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 4)

前記スペーサー配列が、約 1 5 ヌクレオチド ~ 約 5 0 ヌクレオチドを含む、項目 1 1 0 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 5)

前記スペーサー配列が、2 0 ~ 4 4 ヌクレオチドを含む、項目 1 1 0 ~ 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 6)

項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステムを、細胞内の標的核酸に結合させる方法であって、

( a ) 前記システムを提供すること；及び

( b ) 前記システムを前記細胞に送達すること

を含み、前記細胞が前記標的核酸を含み、前記 C R I S P R 関連タンパク質が前記 R N A ガイドに結合し、前記スペーサー配列が前記標的核酸に結合する、方法。

(項目 1 1 7)

前記細胞が真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である、項目 1 1 6 に記載の方法。

(項目 1 1 8)

前記システムが t r a c r R N A を含まない、項目 8 6 ~ 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 9)

前記標的核酸が D N A 分子である、項目 8 6 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 0)

前記標的核酸が P A M 配列を含む、項目 8 8 ~ 1 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 1)

前記 C R I S P R 関連タンパク質が、非特異的ヌクレアーゼ活性を含む、項目 8 8 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 2)

前記標的核酸の前記修飾が、二本鎖切断イベントである、項目 8 8 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 3)

前記標的核酸の前記修飾が、一本鎖切断イベントである、項目 8 8 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 4)

前記標的核酸の前記修飾により、挿入イベントが生じる、項目 8 8 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 5)

10

20

30

40

50

前記標的核酸の前記修飾により、欠失イベントが生じる、項目 8 8 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 2 6 )

前記標的核酸の修飾により、細胞毒性又は細胞死が生じる、項目 1 2 2 ~ 1 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 2 7 )

標的核酸の編集方法であって、項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステムを前記標的核酸に接触させることを含む、方法。

( 項目 1 2 8 )

標的核酸の発現を改変する方法であって、項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステムを前記標的核酸に接触させることを含む、方法。

( 項目 1 2 9 )

標的核酸のある部位におけるペイロード核酸の挿入を標的化する方法であって、項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステムを前記標的核酸に接触させることを含む方法。

( 項目 1 3 0 )

標的核酸のある部位からのペイロード核酸の切出しを標的化する方法であって、項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステムを前記標的核酸に接触させることを含む方法。

( 項目 1 3 1 )

DNA 標的核酸の認識に応じた一本鎖 DNA の非特異的分解方法であって、項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステムを前記標的核酸に接触させることを含む方法。

( 項目 1 3 2 )

試料中の標的核酸の検出方法であって、

( a ) 項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステム及び標識されたレポーター核酸を前記試料に接触させることであって、前記スペーサー配列が前記標的核酸にハイブリダイズすると、前記標識されたレポーター核酸の切断が起こること；及び

( b ) 前記標識されたレポーター核酸の切断によって生成される検出可能シグナルを測定することであって、それにより前記試料中における前記標的核酸の存在を検出することを含む、方法。

( 項目 1 3 3 )

インビトロ又はエキソビボでの

( a ) 標的核酸のターゲティング及び編集方法；

( b ) 核酸の認識に応じた一本鎖核酸の非特異的分解方法；

( c ) 二本鎖標的のスペーサー相補鎖の認識に応じた二本鎖標的の非スペーサー相補鎖のターゲティング及びニックング方法；

( d ) 二本鎖標的核酸のターゲティング及び切断方法；

( e ) 試料中の標的核酸の検出方法；

( f ) 二本鎖核酸の特異的編集方法；

( g ) 二本鎖核酸の塩基編集方法；

( h ) 細胞における遺伝子型特異的又は転写状態特異的細胞死又は休眠の誘導方法；

( i ) 二本鎖核酸標的におけるインデルの作成方法；

( j ) 二本鎖核酸標的への配列の挿入方法；又は

( k ) 二本鎖核酸標的における配列の欠失又は逆位形成方法

における項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のシステムの使用。

( 項目 1 3 4 )

( a ) C R I S P R 関連タンパク質をコードする核酸配列であって、前記 C R I S P R 関連タンパク質が配列番号 1 ~ 5 0、1 0 1 ~ 1 4 5、3 0 1 ~ 3 4 1、5 0 1 ~ 5 2 1、又は 6 0 1 ~ 6 8 2 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % ( 例えば、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % ) 同一のアミノ酸配列を含むもの；及び

10

20

30

40

50

( b ) ダイレクトリポート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むRNAガイド(又は前記RNAガイドをコードする核酸) ;

のトランスフェクションを含み、

前記CRISPR関連タンパク質がRNAガイドへの結合能を有し、

前記CRISPR関連タンパク質及びRNAガイドによる前記標的核酸の認識により、前記標的核酸の修飾が生じる、

哺乳動物細胞において標的核酸へ挿入又は欠失を導入する方法。

( 項目 1 3 5 )

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号 1、101、301、501、又は601のいずれか1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)同一のアミノ酸配列を含む、項目134に記載の方法。

10

( 項目 1 3 6 )

前記CRISPR関連タンパク質が、配列番号 1、101、301、501、又は601のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、項目134に記載の方法。

( 項目 1 3 7 )

前記トランスフェクションが、一過性トランスフェクションである、項目134~136のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 3 8 )

前記細胞がヒト細胞である、項目134~137のいずれか一項に記載の方法。

20

30

40

50