



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202321454 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：111127813

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 07 月 25 日

(51) Int. Cl.：

*C12N15/12 (2006.01)**C12N15/63 (2006.01)**C12N15/64 (2006.01)**C12Q1/6897 (2018.01)*

(30) 優先權：2021/07/26

美國

63/225,802

(71) 申請人：美商夏洛克生物科學公司 (美國) SHERLOCK BIOSCIENCES, INC. (US)

美國

(72) 發明人：拉梅舍 普拉迪普 RAMESH, PRADEEP (US)；布萊克 威廉 BLAKE, WILLIAM JEREMY (US)；曼寧 布倫丹 MANNING, BRENDAN JOHN (IE)

(74) 代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：76 項 圖式數：17 共 119 頁

(54) 名稱

經改良之 CRISPR-CAS 技術

(57) 摘要

本揭示案提供經改良之 CRISPR-Cas 蛋白(例如，經改良之熱穩定性)。

The present disclosure provides improved CRISPR-Cas proteins (e.g., improved thermostability).

【發明摘要】

【中文發明名稱】經改良之 CRISPR-CAS 技術

【英文發明名稱】IMPROVED CRISPR-CAS TECHNOLOGIES

【中文】

本揭示案提供經改良之 CRISPR-Cas 蛋白(例如，經改良之熱穩定性)。

【英文】

The present disclosure provides improved CRISPR-Cas proteins (*e.g.*, improved thermostability).

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】經改良之 CRISPR-CAS 技術

【英文發明名稱】IMPROVED CRISPR-CAS TECHNOLOGIES

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 已發現各種規律間隔重複短迴文序列簇 CRISPR 相關(「Cas」)蛋白具有旁切(反式)裂解活性及改良熱穩定性，可用於在例如偵測(例如，診斷)系統中偵測所關注之特定核酸及作為治療劑(例如，基因編輯)。參見，例如，Sashital *Genome Med* 2018:10, 32 之評述。

【發明內容】

【0002】 本揭示案提供特徵在於熱穩定活性及/或 Cas 蛋白旁切活性之經改良 CRISPR-Cas 蛋白。本揭示案亦提供改良之嚮導 RNA 技術。

【0003】 本揭示案尤其確認某些 Cas 酶之使用問題，特別包括在某些旁切活性檢定中。例如，本揭示案記載某些用途，包括例如某些此等旁切活性檢定包括涉及在高溫下孵育一段時間的步驟，並且各種 Cas 酶在此等條件下可能不夠穩定無法保持足夠活性水準(例如，旁切活性)。在許多實施例中，此一步驟可為或包含核酸延長及/或擴增步驟。

【0004】 替代地或附加地，本揭示案提供了以下見解：使用 Cas 酶之各種反應之特別理想實施例，包括例如某些旁切活性檢定，係可以在單個反應容器(亦即，所謂「一鍋」)檢定中進行的反應。本揭示案認識到其活性(例如，旁切裂解

活性)不夠穩定無法在任何及所有高溫步驟(其可為或包括例如一或多個核酸延長及/或擴增步驟)中維持足夠活性的 Cas 酶在此等一鍋檢定中可能沒有用。本揭示案進一步記載某些 Cas 蛋白(例如, Cas13 及 Cas12)在相關溫度下,例如,在通常執行核酸延長及/或擴增反應之溫度下(例如,高於約 60-65°C)不夠穩定。

【0005】 本揭示案涵蓋以下認識:各種 Cas 蛋白(例如, Cas9)之熱穩定變異體已經描述且/或另外可公開獲得(參見,例如, Mougiakos 等人 *Nat Commun.* 8:1647, 2017)。熟習此項技術者能夠將此等熱穩定變異體與相關非熱穩定同源物(例如, 異種同源物)比較,以便評估可為達成熱穩定性所必需及/或足夠的序列變化及/或元件,並且進一步可在其他同源物(例如,異種同源物)中鑑別此等序列變化及/或元件且/或可將該等變化及/或元件引入其中。更進一步,熟習此項技術者熟知天然存在之熱穩定 Cas 蛋白之潛在來源(例如,在高溫條件下例如在海噴口中存活,或者在其他方面嗜熱的微生物中)。因此,熟習此項技術者,藉由閱讀本揭示案,可容易地鑑別及/或開發合適熱穩定 Cas 蛋白以如本文所述來使用。

【0006】 在一些實施例中,可用熱穩定 Cas 蛋白為 Cas12 或 Cas13 同源物(例如,異種同源物)。在一些實施例中,可用熱穩定 Cas 蛋白為 Cas 酶,其包括與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有 80%、85%、90%、99%或 100%序列一致性的胺基酸序列。

【0007】 替代地或附加地,在一些實施例中,可用熱穩定 Cas 蛋白在高於約 50°C 之溫度下運作(例如,其旁切裂解活性充分起作用);在一些實施例中,高於選自由以下組成之群的溫度:約 55°C、約 56°C、約 57°C、約 58°C、約 59°C、約 60°C、約 61°C、約 62°C、約 63°C、約 64°C、約 65°C、約 66°C、約 67°C、約 68°C、約 69°C、約 70°C、約 71°C、約 72°C、約 73°C、約 74°C、約 75°C、約 76°C、約 77°C、約 78°C、約 79°C、約 80°C、約 81°C、約 82°C、約 83°C、約 84°C、約 85°C、約 86°C、約 87°C、約 88°C、約 89°C、約 90°C、約 91°C、

約 92°C、約 93°C、約 94°C、約 95°C、約 96°C、約 97°C、約 98°C、約 99°C、約 100°C、或其組合。在許多實施例中，可用熱穩定 Cas 蛋白在高於約 60°C 之溫度下運作(例如，其旁切裂解活性充分起作用)。

【0008】 在一些實施例中，可用熱穩定 Cas 蛋白在執行核酸延長及/或擴增反應之溫度範圍內運作(例如，其旁切裂解活性充分起作用)；熟習此項技術者完全熟悉各種此類反應及其運作的溫度範圍。在一些實施例中，此溫度範圍可高於選自由以下組成之群的溫度：約 60°C、約 61°C、約 62°C、約 63°C、約 64°C、65°C、約 66°C、約 67°C、約 68°C、約 69°C、約 70°C、約 71°C、約 72°C、約 73°C、約 74°C、約 75°C、約 76°C、約 77°C、約 78°C、約 79°C、約 80°C、約 81°C、約 82°C、約 83°C、約 84°C、約 85°C、約 86°C、約 87°C、約 88°C、約 89°C、約 90°C、約 91°C、約 92°C、約 93°C、約 94°C、約 95°C、約 96°C、約 97°C、約 98°C、約 99°C、約 100°C、或其組合。在一些實施例中，溫度範圍可為約 60°C 至約 90°C。在一些實施例中，溫度範圍可為約 60°C 至約 80°C。在一些實施例中，溫度範圍可為約 60°C 至約 75°C。在一些實施例中，溫度範圍可為約 65°C 至約 90°C。在一些實施例中，溫度範圍可為約 60°C 至約 80°C。在一些實施例中，溫度範圍可為約 60°C 至約 75°C。

【0009】 因此，如本文闡明，在一些實施例中，可用熱穩定 Cas 蛋白為 Cas12 或 Cas13 同源物(例如，異種同源物)，例如，包括與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有 80%、85%、90%、99%或 100%序列一致性之胺基酸序列的 Cas 酶，其在高於約 50°C 之溫度下，並且在一些實施例中高於約 60°C，例如在約 60-65°C 內及/或以上熱穩定。熟習此項技術者，藉由閱讀本揭示案尤其認識到，在一些實施例中，可用熱穩定 Cas 蛋白 Cas12(例如，SEQ ID NO 1-10，或其例如與其具有至少 90%、95%、99%或更大胺基酸序列一致性的變異體)或 Cas13(或其例如與其具有至少 90%、95%、99%或更大胺基酸序列一致性的變異體)，其活性(例

如,其靶結合及旁切裂解活性)例如在 60-65°C 範圍內之溫度下足夠熱穩定以便在如本文描述之檢定(例如,在一些實施例中,一鍋檢定)中運作。例如,在一些實施例中,足夠熱穩定活性為與如本文描述之合適參考熱穩定 Cas 蛋白(例如,Aac 或 RS9)合理地可比較的活性(例如,在約 25%內)。

【0010】 在一些實施例中,本揭示案描述偵測方法,其包括以下步驟:使包括在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及被選擇或工程化以便與靶核酸序列互補之嚮導 RNA 的 CRISPR-Cas 複合物與潛在包括靶核酸序列之核酸的樣品接觸。

【0011】 在一些實施例中,接觸步驟包含使 CRISPR-Cas 複合物及樣品與易受藉由 Cas 蛋白旁切活性來實現之裂解影響的報告子接觸。在一些實施例中,接觸步驟包含在高於該溫度下孵育一段時間。在一些實施例中,偵測方法進一步包含擴增存在於樣品中之核酸的步驟。在一些實施例中,擴增步驟利用熱穩定核酸聚合酶。在一些實施例中,擴增及接觸步驟在單一容器中執行。

【0012】 在一些實施例中,Cas 蛋白為 Cas12 蛋白。在一些實施例中,Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO: 1 至少 80%一致的胺基酸序列。在一些實施例中,Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO: 2 至少 80%一致的胺基酸序列。在一些實施例中,Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中,Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有 80%序列一致性的胺基酸序列。

【0013】 在一些實施例中,在使用具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白來執行偵測檢定之方法中,改良包含使用具有熱穩定旁切裂解活性之 Cas 蛋白。在一些實施例中,Cas 蛋白為 Cas12 蛋白。在一些實施例中,Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO: 1 至少 80%一致的胺基酸序列。在一些實施例中,Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO: 2 至少 80%一致的胺基酸序列。在一些實施例中,Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10

中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，執行偵測檢定之方法在單一反應容器中進行。在一些實施例中，熱穩定旁切裂解活性在高於約 60°C 溫度下熱穩定。在一些實施例中，熱穩定旁切裂解活性在高於約 65°C 溫度下熱穩定。

【0014】 熟習此項技術者知道用於 Cas 蛋白之分類系統，其用於定義例如 Cas12 型與 Cas13 型 Cas 蛋白的。具體而言，熟習此項技術者熟悉 Cas12 與 Cas13 特有之序列元件。參見例如 Koonin 等人, *Curr Opin Microbiol.*, 2017 年 6 月; 37: 67-78, Makarova 等人, *Nat Rev Microbiol.*, 2015 年 11 月; 13(11): 722736, Shmakov 等人, *Mol Cell.*, 2015 年 11 月 5 日; 60(3): 385-397, Yan 及 Hunnewell 等人, *Science*, 2018 年 12 月 6 日, Yan 等人, *Mol Cell.*, 2018 年 4 月 19 日; 70, 327339, Makarova 等人, *Nat Rev Microbiol.*, 2011 年 6 月; 9(6): 467-477, Makarova 等人, *CRISPR Journal*, 2018, 第 1 卷, 第 5 期, Shmakov 等人, *Nat Rev Microbiol.*, 2017 年 3 月; 15(3): 169-182, Yan 及 Hunnewell 等人, *Science*, 2019 年 1 月 4 日; 363, 8891, Abudayyeh 等人, *Science*, 2016 年 8 月 5 日; 353, 6299, Gootenberg 及 Abudayyeh 等人, *Science*, 2017 年 4 月 28 日, 356, 438-442, Gootenberg 及 Abudayyeh 等人, *Science*, 2018 年 4 月 27 日; 360, 439-444。

【0015】 熟習此項技術者進一步認識到在許多實施例中，如藉由本揭示案來提供之 Cas12(例如，熱穩定 Cas12)之特徵在於與例示 Cas 蛋白(例如，SEQ ID NO:1-10 中之任一者)之總體序列相似性程度及/或存在 Cas12、Cas13、其亞種，及/或熱穩定 Cas 蛋白特有的一或多個序列元件。在一些實施例中，存在特徵序列元件及可適度地較低的特定總體序列一致性-例如 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或 95%(特徵序列元件)指示如本文描述的所提供 Cas 蛋白。或者，在一些實施例中，如本文描述之所提供 Cas 蛋白展示與例示 Cas(例如，SEQ ID NO:1-10 中之任一者)的較高序列一致性(例如，

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)，與存在此特徵序列元件無關。在一些實施例中，一或多個特徵序列元件及較高(例如，90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列一致性均存在。

【0016】 在一些態樣中，本揭示案提供偵測方法，該方法包括以下步驟：使 CRISPR-Cas 複合物與潛在地包括靶核酸序列的樣品接觸，該複合物包含：在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白；及經選擇或工程化來與靶核酸序列互補的嚮導 RNA。在一些實施例中，接觸步驟包含使 CRISPR-Cas 複合物及樣品與易受藉由 Cas 蛋白旁切活性來實現之裂解影響的報告子接觸。在一些實施例中，接觸步驟包括在高於該溫度下孵育一段時間。

【0017】 在一些實施例中，所提供偵測方法包括(例如，進一步包括)擴增存在於樣品中之核酸的步驟。在一些實施例中，擴增步驟可利用熱穩定核酸聚合酶。在一些實施例中，擴增及接觸步驟在單一容器中及/或在沒有間插組分移除步驟及/或清洗步驟的情況下執行。

【0018】 在一些實施例中，本文所述技術利用作為 Cas12 蛋白之 Cas 蛋白。在一些實施例中，此 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80% 一致的胺基酸序列。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有至少 80% 序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，此 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之一或多者具有至少 80% 序列一致性的胺基酸序列。

【0019】 在一些態樣中，本揭示案提供使用具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白來執行偵測檢定的經改良方法，改良包括使用具有熱穩定旁切裂解活性之 Cas 蛋白。在一些實施例中，用於此等實施例中之 Cas 蛋白為 Cas12 蛋白。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80% 一致的胺基酸序列。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之一

或多者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【0020】 在一些實施例中，執行偵測檢定的所提供方法(例如，經改良方法在單一反應容器中進行。在一些實施例中，在利用具有熱穩定旁切裂解活性之 Cas 蛋白的所提供技術中，此活性在高於約 60°C 溫度下熱穩定。在一些實施例中，此活性在高於約 65°C 溫度下熱穩定。在一些實施例中，Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之一或多者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【0021】 在一些態樣中，本揭示案提供組成物(及尤其工程化或另外非天然存在組成物)，其包括：(a)在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白；及(b)至少一種能夠與此熱穩定 Cas 蛋白形成複合物並且引導複合物結合至靶核酸序列的嚮導。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO: 1-10 中之一或多者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。在一些實施例中，所利用嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。在一些實施例中，所利用嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【0022】 在一些態樣中，本揭示案提供組成物(及尤其工程化或另外非天然存在組成物)，其包括：(a)多核苷酸，其編碼在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白；及至少一種能夠與 Cas 蛋白形成複合物並且引導複合物結合至靶核酸序列的嚮導。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1-10 中之一或多者具有至少 80%序列一致

性的胺基酸序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。在一些實施例中，所利用嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。在一些實施例中，所利用嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【0023】 在一些態樣中，本揭示案提供用於修飾靶核酸中之核苷酸的組成物(及尤其工程化或另外非天然存在組成物)，其包括在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白。在一些實施例中，組成物包含(例如，進一步包含)至少一個能夠與 Cas 蛋白形成複合物並且引導複合物結合至靶核酸序列的嚮導序列。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 至少 80% 一致的胺基酸序列。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO: 1-10 中之一或多者具有至少 80% 序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白經修飾以便減少脫靶效應。在一些實施例中，靶核酸中之核苷酸之修飾治療由點突變導致之疾病。在一些實施例中，靶核酸中之核苷酸之修飾使由靶核酸序列來編碼之基因失活。在一些實施例中，靶核酸中之核苷酸之修飾將由靶核酸序列來編碼之基因產物加以修飾。在一些實施例中，靶核酸中之核苷酸之修飾調節由靶核酸序列來編碼之基因產物之表現水準。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。在一些實施例中，所利用嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。在一些實施例中，所利用嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【0024】 在一些態樣中，本揭示案提供載體系統，其包含有包含以下之一或多個載體：(a)第一調控元件，其可操作地連接至編碼在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白的核苷酸序列；及(b)第二調控元件，其可操作地連接至編碼嚮導之核苷酸序列。在一些實施例中，核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。在一些實施例中，核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO:1-10 中之一或多者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。在一些實施例中，編碼 Cas 蛋白之核苷酸序列經密碼子最佳化。在一些實施例中，(a)及(b)包含於單一載體中。在一些實施例中，(a)及(b)包含於個別載體中。在一些實施例中，載體系統包含病毒載體。

【0025】 在一些態樣中，本揭示案提供裂解細胞中之至少一個靶核酸的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至至少一種靶核酸的嚮導接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一種嚮導形成複合物並且在至少一個靶核酸中引起斷裂。

【0026】 在一些態樣中，本揭示案提供改變細胞中之至少一個靶核酸之表現的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至至少一種靶核酸的嚮導接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一種嚮導形成複合物並且在至少一個靶核酸中引起斷裂。

【0027】 在一些態樣中，本揭示案提供改變細胞中之至少一個靶核酸之表現的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至至少一種靶核酸的嚮導接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一種嚮導形成複合物並且編輯至少一個靶核酸序列。

【0028】 在一些態樣中，本揭示案提供修飾細胞中之至少一個靶核酸的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之

Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至至少一種靶核酸的嚮導接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一種嚮導形成複合物並且編輯至少一個靶核酸序列。

【0029】 在一些實施例中，編輯靶核酸包含將酬載核酸插入於靶核酸序列處。在一些實施例中，核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。在一些實施例中，核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之一或多者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸之不同區域的兩個嚮導序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸之複數個不同區域的複數個嚮導序列。在一些實施例中，所利用嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。在一些實施例中，所利用嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【0030】 在一些態樣中，本揭示案提供編碼在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白的核酸。在一些實施例中，核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。在一些實施例中，核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之一或多者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【0031】 在一些態樣中，本揭示案提供治療有需要之個體之病症或疾病的方法，包括向個體投與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至靶核酸之嚮導。在一些實施例中，核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。在一些實施例中，核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之一或多者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸之不同區域的兩個

嚮導序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸之複數個不同區域的複數個嚮導序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。在一些實施例中，所利用至少一種嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白能夠與嚮導形成複合物並且在靶核酸中導致斷裂。在一些實施例中，所利用 Cas 蛋白能夠與嚮導形成複合物並且編輯靶核酸序列。

【0032】 在一些態樣中，本揭示案提供其中 Cas 蛋白與修飾實體締合的組成物。在一些實施例中，修飾實體為腺苷去胺酶。在一些實施例中，修飾實體為胞苷去胺酶。

【0033】 在一些態樣中，本揭示案提供包括本揭示案之 Cas 蛋白的醫藥組成物。

【0034】 在一些態樣中，本揭示案提供描述 Cas 蛋白特徵之方法，包括評估以下中之一或多者：(a)順式裂解活性；(b)反式裂解活性；(c)靈敏度；(d)對於 RNA 或 DNA 靶核酸之偏好；(e)對於 RNA 或 DNA 非靶核酸之偏好；及(f)酶穩定性。

【圖式簡單說明】

【0035】

圖 1 展示候選熱穩定 Cas 蛋白、Pal1、Pal2 低 MW、Pal2 高 MW、及 Pal3 之示例性特徵描述。

圖 2 展示在 56°C 下的示例性 Pal1 及 Pal2 活性。

圖 3 展示在具有不同示例性嚮導的情況下，在 37°C、56°C、及 70°C 下的 Pal1 之示例性活性。

圖 4 展示與對照比較，在 56°C 及 70°C 下之 Pal1 之示例性活性。此等資料表明

Pal1 之活性對於靶 DNA 具有特異性。

圖 5 展示 Pal1 之示例性溫度概況。

圖 6 展示在具有不同示例性嚮導的情況下，在 37°C、56°C、及 70°C 下的 Pal2 高 MW 之示例性活性。

圖 7 展示與對照比較，在 56°C 下 Pal2 高 MW 之示例性活性。此等資料表明 Pal2 高 MW 之活性對於靶 DNA 具有特異性。

圖 8 展示 Pal2 高 MW 之示例性溫度概況。

圖 9 展示遵循供應商(ThermoFisher)推薦方案來執行之示例性蛋白熱位移檢定。

簡言之，Cas 酶(PAL1、PAL2、PAL3、PAL4、PAL5、PAL6、PAL8、PAL9、或 PAL10)(500 ng/uL)與蛋白熱位移染料(8x)蛋白熱位移緩衝液混合並且安置於 QuantStudio 5 qPCR 儀器中以便追蹤隨著溫度緩慢增加引起之螢光變化。提取熔融溫度(T_m)之資料分析藉由獲得 X4-M4 通道中之原始螢光強度之一階導數來進行。

圖 10：展示與靶向 SARS CoV2 之 N 基因或 Orflab 基因之工程化單一嚮導 RNA(sgRNA)複合的熱穩定 PAL5 Cas12b 之旁切活性信號。非靶對照(NTC)以灰色展示。標靶以經純化體外轉錄(IVT) RNA 形式來提供。

圖 11：展示與靶向 SARS CoV2 之 N 基因或 Orflab 基因之工程化單一嚮導 RNA(sgRNA)複合的熱穩定 PAL5 Cas12b 之旁切活性信號。非靶對照(NTC)以灰色展示。以低濃度提供之標靶首先使用 LAMP 來擴增，其產物同時使用 PAL5 Cas12b 來偵測。

圖 12：展示與靶向 Sars CoV2 之 N 基因之工程化單一嚮導 RNA(sgRNA)複合的熱穩定 PAL8 Cas12b 之旁切活性信號。存在展示高於背景之明確信號的經測試之 sgRNA 之兩個變異體(N-1)及(N-5)。非靶對照(NTC)以灰色展示。標靶以經純化體外轉錄(IVT) RNA 形式來提供。

圖 13：展示與靶向 SARS CoV2 之 N 基因(SCoV2-N1)之工程化單一嚮導 RNA(sgRNA)複合的熱穩定 PAL8 Cas12b 之旁切活性信號。非靶對照(NTC)以灰色展示。以低濃度提供之標靶首先使用 LAMP 來擴增，其產物同時使用 PAL8 Cas12b 來偵測。

圖 14：展示與靶向 SARS CoV2 之 N 基因之工程化單一嚮導 RNA(sgRNA)複合的熱穩定 PAL9 Cas12b 之旁切活性信號。存在展示高於背景之明確信號的經測試之 sgRNA 之三個變異體(N-1)、(N-2)、及(N-3)。非靶對照(NTC)以灰色展示。標靶以經純化體外轉錄(IVT) RNA 形式來提供。

圖 15：展示與靶向 Sars CoV2 之 N 基因之工程化單一嚮導 RNA(sgRNA)複合的熱穩定 PAL9 Cas12b 之旁切活性信號。非靶對照(NTC)以灰色展示。存在展示高於背景之明確信號的經測試之 sgRNA 之三個變異體(N-1)、(N-2)、及(N-3)。以低濃度提供之標靶首先使用 LAMP 來擴增，其產物同時使用 PAL9 Cas12b 來偵測。

圖 16：展示與靶向 SARS CoV2 之 N 基因之工程化單一嚮導 RNA(sgRNA)複合的熱穩定 PAL10 Cas12b 之旁切活性信號。存在展示高於背景之明確信號的經測試之 sgRNA 之兩個變異體(N-1)及(N-3)。非靶對照(NTC)以灰色展示。標靶以經純化體外轉錄(IVT) RNA 形式來提供。

圖 17：展示與靶向 Sars CoV2 之 N 基因之工程化單一嚮導 RNA(sgRNA)複合的熱穩定 PAL10 Cas12b 之旁切活性信號。非靶對照(NTC)以灰色展示。存在展示高於背景之明確信號的經測試之 sgRNA 之兩個變異體(N-1)及(N-3)。以低濃度提供之標靶首先使用 LAMP 來擴增，其產物同時使用 PAL10 Cas12b 來偵測。

【實施方式】

定義

【0036】 **投與**：如本文使用，術語「投與」通常係指將組成物投與個體或系

統。普通熟習此項技術者知道可在合適情況下用於投與個體例如人類的各種途徑。例如，在一些實施例中，投與可為眼部、經口、非經腸、局部等。在一些具體實施例中，投與可以為支氣管(例如，藉由支氣管滴注)、口腔、真皮(其可以為或包括例如真皮局部投與、皮內投與、皮間投與、透皮投與等中之一或多者)、腸內、動脈內、皮內、胃內、髓內、肌肉內、鼻內、腹膜內、鞘內、靜脈內、心室內、特定器官內(例如肝內)、黏膜、鼻腔、口腔、直腸、皮下、舌下、局部、氣管(例如，藉由氣管內滴注)、陰道、玻璃體等。在一些實施例中，投與可涉及間歇性給藥(例如，複數個劑量在時間上分離)及/或週期性(例如，個別劑量分隔一段共同時間)給藥。在一些實施例中，投與可涉及連續給藥(例如，灌注)至少一段選定時間。

【0037】 劑：如本文使用，術語「劑」可係指任何化學類別之化合物、分子、或實體包括例如小分子、多肽、核酸、糖、脂質、金屬、或其組合或複合物。在一些實施例中，術語「劑」可係指包含聚合物之化合物、分子、或實體。在一些實施例中，該術語可係指包含一或多個聚合物部分之化合物或實體。在一些實施例中，術語「劑」可係指實質上不含特定聚合物或聚合物部分的化合物、分子、或實體。在一些實施例中，該術語可係指缺少或實質上不含任何聚合物或聚合物部分的化合物、分子、或實體。

【0038】 胺基酸：在其最廣泛意義中，如本文使用，術語「胺基酸」係指例如經由形成一或多個肽鍵，可併入、併入或已併入多肽鏈中之化合物及/或物質。在一些實施例中，胺基酸具有一般結構 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{COOH}$ 。在一些實施例中，胺基酸為天然存在之胺基酸。在一些實施例中，胺基酸為非天然胺基酸；在一些實施例中，胺基酸為 D-胺基酸；在一些實施例中，胺基酸為 L-胺基酸。「標準胺基酸」係指通常發現於天然存在肽中之二十種標準 L-胺基酸中之任一者。

「非標準胺基酸」係指除了標準胺基酸以外的任何胺基酸，不論是否其合成製

備或獲自天然來源。在一些實施例中，胺基酸，包括多肽中之羧基及/或胺基末端胺基酸，可含有與以上一般結構比較的結構改變。例如，在一些實施例中，與一般結構比較，胺基酸可藉由甲基化、醯胺化、乙醯化、聚乙二醇化、糖化、磷酸化，及/或取代(例如，胺基、羧酸基團、一或多個質子，及/或經基)來修飾。在一些實施例中，與含有在其他方面相同的未修飾胺基酸之多肽比較，此修飾可例如改變含有修飾胺基酸之多肽的循環半衰期。在一些實施例中，與含有在其他方面相同的未修飾胺基酸之多肽比較，此修飾不顯著改變含有修飾胺基酸之多肽的相關活性。如自上下文清楚，在一些實施例中，術語「胺基酸」可用於係指遊離氨基酸；在一些實施例中其可用於係指多肽之胺基酸殘基。

【0039】 類似物：如本文使用，術語「類似物」係指與參考物質共有一或多個特定結構特徵、元件、組分、或部分的物質。通常，「類似物」展示與參考物質之顯著結構相似性，例如共有核心或一致結構，但是亦以一或多種某些個別方式不同。在一些實施例中，類似物為可例如藉由參考物質之化學調處自參考物質產生之物質。在一些實施例中，類似物物質可經由執行與產生參考物質之過程實質上類似(例如與其共有複數個步驟)的合成過程來產生。在一些實施例中，類似物可經由執行與用於產生參考物質之過程不同的合成過程來產生。

【0040】 動物：如本文使用係指動物界之任何成員。在一些實施例中，「動物」係指任一性別並且處於任何發育階段中之人類。在一些實施例中，「動物」係指處於任何發育階段中之非人類動物。在某些實施例中，非人類動物為哺乳動物(例如，齧齒動物、小鼠、大鼠、兔、猴、犬、貓、綿羊、牛、靈長類動物，及/或豬)。在一些實施例中，動物包括但不限於哺乳動物、鳥類、爬行動物、兩棲動物、魚、昆蟲，及/或蠕蟲。在一些實施例中，動物可為轉殖基因動物、遺傳工程化動物，及/或純系。

【0041】 大約：如本文使用，如應用於一或多個所關注值的術語「大約」或

「約」係指與所陳述參考值類似的值。在某些實施例中，術語「大約」或「約」係指在任一方向上(大於或小於)落於所陳述參考值之 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或更少內的值範圍，除非另外說明或另外自上下文顯而易見(除了當此數字超過可能值之 100%以外)。

【0042】 結合：應瞭解如本文使用之術語「結合」通常係指兩個或兩個以上實體之間或之中的非共價締合。「直接」結合涉及實體或部分之間的物理接觸；間接結合涉及經由與一或多個中間實體之物理接觸的物理相互作用。兩個或兩個以上實體之間之結合可通常在各種情形中之任一者中評估，包括當孤立地研究相互作用實體或部分時或在更複雜系統之情形中(例如，在共價或以其他方式與承載實體締合時及/或在生物系統或細胞中)。若在所評估條件下，相關實體更可能彼此締合，而不是與其他可獲得結合搭配物締合，則兩個實體之間之結合可被視為「特異性的」。

【0043】 生物樣品：如本文使用，術語「生物樣品」通常係指獲自或衍生自如本文描述之所關注生物來源(例如，組織或有機體或細胞培養物)的樣品。在一些實施例中，所關注來源包含有機體，諸如動物或人類。在一些實施例中，生物樣品為或包含生物組織或流體。在一些實施例中，生物樣品可為或包含骨髓；血液；血細胞；腹水；組織或細針生檢樣品；含有細胞之體液；自由漂浮之核酸；痰；唾液；尿；腦脊液、腹膜液；胸水；糞便；淋巴；婦科液體；皮膚拭子；陰道拭子；口腔拭子；鼻拭子；洗滌液或灌洗液，例如導管灌洗液或支氣管肺泡灌洗液；吸出物；刮擦物；骨髓標本；組織生檢標本；手術標本；糞便、其他體液、分泌物及/或排泄物；及/或由此產生之細胞等。在一些實施例中，生物樣品為或包含獲自個體之細胞。在一些實施例中，所獲得細胞為或包括來自獲得樣品之個體的細胞。在一些實施例中，樣品為藉由任何合適手段直接獲自

所關注來源的「初級樣品」。例如，在一些實施例中，初級生物樣品藉由選自由以下組成之群之方法來獲得：生檢(例如，細針抽吸或組織生檢)、手術、收集體液(例如，血液、淋巴、糞便等)等。在一些實施例中，如自上下文清楚，術語「樣品」係指藉由處理(例如，藉由移除一或多種組分及/或將一或多種試劑添加至)初級樣品來獲得之製劑。例如，過濾使用半透膜。此「經處理樣品」可包含例如自樣品中提取或藉由使初級樣品經受諸如 mRNA 之擴增或反轉錄、某些組分之分離及/或純化等之技術來獲得的核酸或蛋白。

【0044】 **癌症**：術語「癌症」、「惡性腫瘤」、「贅生物」、「腫瘤」、及「惡瘤」在本文中用於係指展現相對異常、不受控制及/或自主生長，以致於其展現特徵在於細胞增殖顯著失去控制的異常生長表型的細胞。在一些實施例中，腫瘤可為或包含癌症前期(例如，良性)、惡性、轉移前、轉移性，及/或非轉移性的細胞。在一些實施例中，相關癌症之特徵可在於實體腫瘤。在一些實施例中，相關癌症之特徵可在於血液腫瘤。一般而言，此項技術已知的不同類型癌症之實例包括例如造血系統癌症，包括白血病、淋巴瘤(霍奇金氏瘤及非霍奇金氏瘤)、骨髓瘤及骨髓增殖性病變；肉瘤，黑色素瘤，腺瘤，實體組織癌，口腔、咽喉、喉及肺之鱗狀細胞癌，肝癌，泌尿生殖系統癌如前列腺癌、宮頸癌、膀胱癌、子宮癌及子宮內膜癌及腎細胞癌，骨癌，胰腺癌，皮膚癌，皮膚或眼內黑色素瘤，內分泌系統癌，甲狀腺癌，甲狀旁腺癌，頭頸癌，乳腺癌，胃腸癌及神經系統癌，良性病變諸如乳頭狀瘤等。

【0045】 **載劑**：如本文使用，係指與組成物一起投與之稀釋劑、佐劑、賦形劑、或媒劑。在一些示範性實施例中，載劑可包括無菌液體，例如像水及油，包括石油、動物、植物或合成來源之油，例如像花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及其類似油。在一些實施例中，載劑為或包括一或多種固體組分。

【0046】 **組成物**：熟習此項技術者認識到如本文使用之術語「組成物」可用

於係指包含一或多種指定組分的離散物理實體。通常，除非另外規定，否則組成物可為任何形式，例如，氣體、凝膠、液體、固體等。

【0047】 含有：本文描述為「包括」一或多個指名元件或步驟的組成物或方法為開放式的，意味著指名元件或步驟為必需的，但是在組成物或方法之範圍內，可添加其他元件或步驟。為了避免累贅陳述，亦應瞭解描述為「包括」(或原本「包括」)一或多個指名元件或步驟之任何組成物或方法亦描述「基本上由相同指名元件或步驟組成」(或原本「基本上由其組成」)的對應、更受限組成物或方法，意味著該組成物或方法包括指名必需元件或步驟並且亦可包括不實質性影響組成物或方法之基本及新穎特徵的額外元件或步驟。亦應瞭解本文描述為「包括」一或多個指名元件或步驟或「基本上由其組成」的任何組成物或方法亦描述「由指名元件或步驟組成」(或「由其組成」)的對應、更受限、及封閉式組成物或方法，排斥任何其他未指名元件或步驟。在本文揭示之任何組成物或方法中，任何指名元件或步驟之已知或經揭示均等物可取代該元件或步驟。

【0048】 經設計：如本文使用，術語「經設計」涉及具有以下條件之因子：(i)其結構藉由或曾藉由人工來選擇；(ii)藉由需要人工之過程來產生；及/或(iii)與天然物質及其他已知因子不同。

【0049】 確定：本文所述許多方法包括「確定」步驟。普通熟習此項技術者，藉由閱讀本說明書，認識到此「確定」可利用熟習此項技術者可獲得之各種技術中之任一者，包括例如本文明確提及之特定技術或經由使用該等技術來完成。在一些實施例中，確定涉及調處物理樣品。在一些實施例中，確定涉及考量及/或調處資料或資訊，例如使用電腦或適於執行相關分析的其他處理單元。在一些實施例中，確定涉及自來源接收有關資訊及/或材料。在一些實施例中，確定涉及將樣品或實體之一或多個特徵與類似參考進行比較。

【0050】 工程化：通常，術語「工程化」係指藉由人工來調處之態樣。例如，

當在自然界中不以該順序連接在一起的兩個或兩個以上序列藉由人工調處以便在工程化多核苷酸中彼此直接連接及/或當多核苷酸中之特定殘基為非天然存在的且/或經由人工操作導致與在自然界中不與其連接之實體或部分連接時，多核苷酸被視為「工程化的」。例如，在本發明之一些實施例中，工程化多核苷酸包含在自然界中與第一編碼序列可操作締合但是不與第二編碼序列可操作締合的調控序列，其藉由人工連接以使得其與第二編碼序列可操作締合。同等地，若細胞或有機體經受調處，以使得相對於合適參考細胞諸如未以此方式調處之在其他方面相同的細胞，其遺傳、後成，及/或表型特性得以改變，則細胞或有機體被視為「工程化」。在一些實施例中，調處為或包含遺傳調處，以使得其遺傳資訊改變(例如，先前不存在的新遺傳物質例如藉由轉型、交配、體細胞雜交、轉染、轉導、或其他機制來引入，或先前存在之遺傳物質例如藉由取代或缺失突變，或藉由交配方案而得以改變或移除)。在一些實施例中，工程化細胞為如下細胞，其經調處以使得相對於此合適參考細胞，其以改變量及/或根據改變時序含有及/或表現所關注之特定劑(例如，蛋白、核酸，及/或其特定形式)。作為慣例並且熟習此項技術者理解，工程化多核苷酸或細胞之子代通常仍然被稱為「工程化」，即使實際調處對於先前實體來執行亦如此。

【0051】 **賦形劑**：如本文使用，係指可包含於醫藥組成物中以便例如提供或有助於所需堅實度或穩定效應的非治療性劑。合適醫藥賦形劑包括例如澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、大米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇及其類似物質。

【0052】 **表現**：如本文使用，術語核酸序列之「表現」係指自核酸序列產生任何基因產物。在一些實施例中，基因產物可為轉錄物。在一些實施例中，基因產物可為多肽。在一些實施例中，核酸序列之表現涉及以下中之一或多者：(1)

自 DNA 序列產生 RNA 模板(例如，藉由轉錄)；(2)處理 RNA 轉錄物(例如，藉由剪接、編輯等)；(3)將 RNA 轉譯成多肽或蛋白；及/或(4)多肽或蛋白之轉譯後修飾。

【0053】 **功能**：如本文使用，「功能」生物分子為呈其展現性質及/或活性之形式的生物分子，該分子之特徵在於該性質及/或活性。生物分子可具有兩個功能(亦即，雙功能)或許多功能(亦即，多功能)。

【0054】 **基因**：如本文使用，術語「基因」係指編碼產物(例如，RNA 產物及/或多肽產物)的染色體中之 DNA 序列。在一些實施例中，基因包括編碼序列(亦即，編碼特定產物之序列)；在一些實施例中，基因包括非編碼序列。在一些特定實施例中，基因可包括編碼(例如，外顯子)及非編碼(例如，內含子)序列兩者。在一些實施例中，基因可包括一或多個調控元件，其例如可控制或影響基因表現之一或多個態樣(例如，細胞類型特異性表現、可誘導表現等)。

【0055】 **基因產物或表現產物**：如本文使用，術語「基因產物」或「表現產物」通常係指自基因轉錄之 RNA(處理前及/或後)或藉由自基因轉錄之 RNA 來編碼之多肽(修飾前及/或後)。

【0056】 **基因組**：如本文使用，術語「基因組」係指藉由個別有機體或細胞攜帶之總遺傳資訊，藉由其染色體之完整 DNA 序列來表示。

【0057】 **同源性**：如本文使用，術語「同源性」係指聚合物分子之間，例如，核酸分子(例如，DNA 分子及/或 RNA 分子)之間及/或多肽分子之間的總體相關性。在一些實施例中，若聚合物分子之序列至少 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 99%一致，聚合物分子被視為彼此「同源」。在一些實施例中，若聚合物分子之序列至少 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 99%類似，則聚合物分子被視為彼此「同源」。

【0058】 宿主細胞：如本文使用，係指外源 DNA(重組或以其他方式)引入其中之細胞。熟習此項技術者在閱讀本揭示案後理解此等術語不僅係指特定標的細胞，而且係指此細胞之子代。因為由於突變或環境影響而導致某些修飾可發生於後續世代中，所以此子代可事實上與親本細胞不一致，但是仍然包含在如本文使用之術語「宿主細胞」範圍內。在一些實施例中，宿主細胞包括選自任何生命王國之原核及真核細胞，其適合於表現外源 DNA(例如，重組核酸序列)。示例性細胞包括原核生物及真核生物之細胞(單細胞或多細胞)，細菌細胞(例如，大腸桿菌、芽孢桿菌屬、鏈黴菌屬等之菌株)、分枝桿菌細胞、真菌細胞、酵母細胞(例如，釀酒酵母(*S. cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*S. pombe*)、巴斯德畢赤酵母(*P. pastoris*)、甲醇畢赤酵母(*P. methanolica*)等)、植物細胞、昆蟲細胞(例如，SF-9、SF-21、桿狀病毒感染之昆蟲細胞、粉紋夜蛾(*Trichoplusia ni*)等)、非人類動物細胞、人類細胞、或細胞融合例如像融合瘤或四源雜交瘤。在一些實施例中，細胞為人類、猴、猿、倉鼠、大鼠、或小鼠細胞。在一些實施例中，細胞為真核的並且選自以下細胞：CHO(例如，CHO K1、DXB-1 1 CHO、Veggie-CHO)、COS(例如，COS-7)、視網膜細胞、Vero、CV1、腎(例如，HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60，(例如，BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、塞爾托利細胞、BRL 3 A 細胞、HT1080 細胞、骨髓瘤細胞、腫瘤細胞、及衍生自前述細胞之細胞株。在一些實施例中，細胞包含一或多種病毒基因。

【0059】 人類：在一些實施例中，人類為胚胎、胎兒、嬰兒、兒童、青少年、成人、或老年人。

【0060】 一致性：如本文使用，術語「一致性」係指聚合物分子之間，例如，核酸分子(例如，DNA 分子及/或 RNA 分子)之間及/或多肽分子之間的總體相關

性。在一些實施例中，若聚合物分子之序列至少 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 99%一致，則聚合物分子被視為彼此「實質上一致」。兩個核酸或多肽序列之一致性百分比之計算例如可藉由出於最佳比較目的來比對兩個序列而執行(例如，為了最佳比對，可將空位引入第一及第二序列中之一者或兩者中並且為了比較目的，可忽略不一致序列)。在某些實施例中，為了比較目的來比對之序列之長度為參考序列之長度的至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或實質上 100%。然後比較對應位置之核苷酸。當第一序列中之位置藉由與第二序列中之對應位置相同的殘基(例如，核苷酸或胺基酸)來佔據，則該等分子在該位置處為一致的。兩個序列之間之一致性百分比隨著序列共用之一致位置之數目而變化，考慮到為了最佳比對兩個序列而需要引入的空位之數目、及各空位之長度。兩個序列之間的序列之比較及一致性百分比之確定可使用數學演算法來完成。例如，兩個核苷酸序列之間之一致性百分比可使用 Meyers 及 Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17)之演算法來確定，其併入 ALIGN 程式(版本 2.0)中。在一些示範性實施例中，用 ALIGN 程式來進行的核酸序列比較使用 PAM120 權重殘基表、12 之空位長度罰分及 4 之空位罰分。兩個核苷酸序列之間的一致性百分比可替代地使用利用 NWSgapdna.CMP 矩陣之 GCG 軟體包中之 GAP 程式來確定。

【0061】 「改良」、「增加」、「抑制」或「減少」：如本文使用，術語「改良」、「增加」、「抑制」、「減少」或其語法等效物指示相對於基線或其他參考量測的值。在一些實施例中，合適參考量測可為或包含在其他方面可比較的條件下，在不存在(例如，之前及/或之後)特定劑或治療時，或在合適可比較的參考劑存在下，在特定系統中(例如，在單一個體中)之量測。在一些實施例中，合適參考量測可為或包含在已知或預期在相關劑或治療存在下以特定方式作出

反應之類似系統中的量測。

【0062】 **腹膜內**：如本文使用之片語「腹膜內投與」及「腹膜內地投與」具有其在此項技術中理解之含義，係指將化合物或組成物投與個體之腹膜。

【0063】 **活體外**：如本文使用之術語「活體外」係指在人為環境中，例如，在試管或反應容器中，在細胞培養物等中，而非在多細胞有機體內發生的事件。

【0064】 **活體內**：如本文使用係指在多細胞有機體，諸如人類及非人類動物內發生的事件。在基於細胞之系統的情形中，該術語可用於係指在活細胞(而非例如活體外系統)內發生的事件。

【0065】 **分離**：如本文使用，係指(1)與在最初產生(不論在自然界中及/或在實驗環境中)時與其締合的至少一些組分分離，及/或(2)藉由人工來設計、產生、製備，及/或製造的物質及/或實體。分離物質及/或實體可自與其最初締合之其他組分的約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、或超過約 99% 分離。在一些實施例中，經分離之劑為約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、或超過約 99% 純。如本文使用，若物質實質上不含其他組分，則其為「純的」。在一些實施例中，如熟習此項技術者理解，在與某些其他組分例如像一或多種載劑或賦形劑(例如，緩衝劑、溶劑、水等)組合之後，物質可仍然被視為「分離」或甚至「純的」；在此等實施例中，物質之分離或純度百分比在不包括此等載劑或賦形劑的情況下計算。僅給出一實例，在一些實施例中，當滿足以下條件時，在自然界中出現之生物聚合物諸如多肽或多核苷酸被視為「分離的」，a)根據其起源或衍生來源，不與在自然界中，在其原生狀態下伴隨其的一些或所有組分締合；b)其實質上不含來自在自然界中產生其之物種的相同物種之其他多肽或核酸；c)藉由不是在自然界中產生其之物種的細胞或其他表現系統

來表現或以其他方式與來自該細胞或系統之組分締合。因此，例如，在一些實施例中，化學合成或在與在自然界產生其之細胞系統不同的細胞系統中合成的多肽被視為「分離」多肽。替代地或附加地，在一些實施例中，經受一或多種純化技術之多肽可被視為「分離」多肽，只要其與 a)在自然界中與其締合；及/或 b)在最初產生時與其締合之其他組分分離。

【0066】 **連接子**：如本文使用，用於係指將不同要素彼此連接的多要素劑之彼部分。例如，普通熟習此項技術者認識到其結構包括兩個或兩個以上功能或組織域的多肽通常包括將此等域彼此連接的處於此等域之間的胺基酸之鏈段。在一些實施例中，包括連接子元件之多肽具有通式 S1-L-S2 之總體結構，其中 S1 及 S2 可相同或不同並且表示藉由連接子來彼此締合之兩個域。在一些實施例中，多肽連接子為至少 2、3、4、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、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多個胺基酸之長度。在一些實施例中，連接子之特徵在於其傾向於不採用剛性三維結構，而是實情為向多肽提供可撓性。在工程化多肽(例如，嵌合系統)時可適當地使用之各種不同連接子元件在此項技術中為已知的(參見例如，Holliger, P.等人(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J.等人(1994) Structure 2: 1121-1123)。

【0067】 **部分**：熟習此項技術者認識到「部分」為如本文描述的具有特定結構及/或活性之規定化學基團或實體。

【0068】 **核酸**：如本文使用，在其最廣泛意義中，係指併入或可併入寡核苷酸鏈中之任何化合物及/或物質。在一些實施例中，核酸為經由磷酸二酯鍵，併入或可併入寡核苷酸鏈中之化合物及/或物質。如自上下文清楚，在一些實施例中，「核酸」係指個別核酸殘基(例如，核苷酸及/或核苷)；在一些實施例中，

「核酸」係指包括個別核酸殘基之寡核苷酸鏈。在一些實施例中，「核酸」為或包含 RNA；在一些實施例中，「核酸」為或包含 DNA。在一些實施例中，核酸為、包含、或由一或更多個天然核酸殘基組成。在一些實施例中，核酸為、包含、或由一或多個核酸類似物組成。在一些實施例中，核酸類似物與核酸之不同之處在於其不利用磷酸二酯主鏈。例如，在一些實施例中，核酸為、包含、或由一或多個「肽核酸」組成，其在此項技術中為已知的並且在主鏈中具有肽鍵代替磷酸二酯鍵，被視為在本發明之範圍內。替代地或附加地，在一些實施例中，核酸具有一或多個硫代磷酸酯及/或 5'-N-亞磷鹽胺鍵聯而非磷酸二酯鍵。在一些實施例中，核酸為、包含、或由一或多種天然核苷(例如，腺苷、胸苷、鳥苷、胞苷、尿苷、去氧腺苷、去氧胸苷、去氧鳥苷、及去氧胞苷)組成。在一些實施例中，核酸為、包含、或由一或多種核苷類似物(例如，2-胺基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5 丙炔基-胞苷、C-5 丙炔基-尿苷、2-胺基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-胺基腺苷、7-去氫腺苷、7-去氫鳥苷、8-氧腺苷、8-氧鳥苷、0(6)-甲基鳥嘌呤、2-硫胞苷、甲基化鹼基、嵌入鹼基、及其組合)組成。在一些實施例中，與天然核酸中之糖比較，核酸包含一或多種經修飾糖(例如，2'-氟核糖、核糖、2'-去氧核糖、阿拉伯糖、及己糖)。在一些實施例中，核酸具有編碼功能基因產物諸如 RNA 或蛋白的核苷酸序列。在一些實施例中，核酸包括一或多個內含子。在一些實施例中，核酸藉由自天然來源中分離、藉由基於互補模板之聚合來酶促合成(活體內或活體外)、在重組細胞或系統中增殖、及化學合成中之一或多者來製備。在一些實施例中，核酸為至少 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、

800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000 或更多個殘基長。在一些實施例中，核酸為部分或全部單鏈；在一些實施例中，核酸為部分或全部雙鏈。在一些實施例中，核酸具有核苷酸序列，該序列包括至少一個元件，該元件編碼多肽，或為編碼該多肽之序列的補體。在一些實施例中，核酸具有酶促活性。

【0069】 可操作地連接：如本文使用，係指所描述部件處於允許其以其預期方式來起作用之關係中的並置。「可操作連接至」功能元件之控制元件以一定方式締合，該方式使得功能元件之表現及/或活性在與控制元件相容之條件下達成。在一些實施例中，「可操作連接之」控制元件(例如，共價連接)與所關注編碼元件相鄰；在一些實施例中，控制元件與所關注功能元件反式起作用或以其他方式起作用。

【0070】 經口：如本文使用之片語「經口投與」及「經口地投與」具有其在此項技術中理解之含義，係指藉由口腔來投與化合物或組成物。

【0071】 患者：如本文使用，術語「患者」係指例如出於實驗、診斷、預防、美容，及/或治療目的，投與或可投與所提供組成物的任何有機體。典型患者包括動物(例如，哺乳動物諸如小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類動物，及/或人類)。在一些實施例中，患者為人類。在一些實施例中，患者患有或易患一或多種病症或疾患。在一些實施例中，患者顯示病症或疾患之一或多個症狀。在一些實施例中，患者被確診患有一或多種病症或疾患。在一些實施例中，病症或疾患為或包括癌症，或存在一或多個腫瘤。在一些實施例中，患者接受或已接受診斷及/或治療疾病、病症或疾患之某些療法。

【0072】 酬載：通常，如本文使用之術語「酬載」係指可藉由與另一個實體締合來遞送或傳送的試劑。在一些實施例中，此締合可為或包括共價鍵；在一些實施例中此締合可為或包括非共價相互作用。在一些實施例中，締合可為直

接的；在一些實施例中，締合可為間接的。術語「酬載」不限於特定化學特性或類型；例如，在一些實施例中，酬載可為或包含例如任何化學類別之實體，包括例如脂質、金屬、核酸、多肽、糖(例如，多糖)、小分子、或其組合或複合物。在一些實施例中，酬載可為或包含生物調節劑、可偵測劑(例如，染料、螢光團、放射性標籤等)、偵測劑、營養物、治療劑等或其組合。在一些實施例中，酬載可為或包含細胞或有機體，或其部分、提取物或組分。在一些實施例中，酬載可為或包含天然產物，因為其在自然界中發現及/或獲得；替代地或附加地，在一些實施例中，該術語可用於係指一或多個人造實體，因為其經由人工操作來設計、工程化，及/或產生且/或不存在於自然界中。在一些實施例中，酬載可為或包含呈分離或純形式之試劑；在一些實施例中，此試劑可呈粗形式。

【0073】 醫藥學上可接受：如本文使用，片語「醫藥學上可接受」係指在合理的醫學判斷之範疇內，適用於與人類及動物之組織接觸而無不當毒性、刺激、過敏反應或其他問題或併發症，且與合理的效益/風險比率相稱之彼等化合物、材料、組成物，及/或劑型。

【0074】 醫藥學上可接受之載劑：如本文使用，術語「醫藥學上可接受之載劑」意謂醫藥學上可接受之材料、組成物或媒劑，諸如液體或固體填充劑、稀釋劑、賦形劑、或溶劑囊封材料，其涉及將標的化合物自一個器官或身體部分載運或運輸至另一個器官或身體部分。各載劑必須在與調配物之其他成分相容並且對於患者無害的意義上為「可接受的」。可以用作醫藥學上可接受之載劑的材料之一些實例包括：糖，例如乳糖、葡萄糖及蔗糖；澱粉，例如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及乙酸纖維素；粉狀黃耆膠；麥芽；明膠；滑石；賦形劑，例如可可脂及栓劑蠟；油類，例如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油及大豆油；二醇類，例如丙二醇；多元醇，例如甘油、山梨糖醇、甘露醇及聚乙二醇；酯類，例如

油酸乙酯及月桂酸乙酯；瓊脂；緩衝劑，例如氫氧化鎂及氫氧化鋁；海藻酸；無熱原水；等滲鹽水；林格氏溶液；乙醇；pH 緩衝溶液；聚酯、聚碳酸酯及/或聚酞；及其他用於醫藥製劑中之無毒相容物質。

【0075】 醫藥學上可接受之鹽：術語「醫藥學上可接受之鹽」係指適合於在醫藥情形中使用的化合物之鹽：亦即在合理醫學判斷範疇內，適合用於與人類及低等動物之組織接觸而沒有不當毒性、刺激、過敏反應等，並且與合理的利益/風險比相稱的鹽。此項技術中熟知醫藥學上可接受之鹽。例如，S. M. Berge 等人在 J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977)中詳細地描述醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，醫藥學上可接受之鹽包括但不限於無毒酸加成鹽，其為與諸如鹽酸、氫溴酸、磷酸、硫酸、及過氯酸之無機酸，或與諸如乙酸、順丁烯二酸、酒石酸、檸檬酸、琥珀酸、或丙二酸之有機酸，或藉由使用諸如離子交換之用於此項技術中的其他方法所形成之具有胺基之鹽。在一些實施例中，醫藥學上可接受之鹽包括但不限於己二酸鹽、海藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙烷磺酸鹽、甲酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡庚糖酸鹽、甘油磷酸鹽、葡萄糖酸鹽、半硫酸鹽(hemisulfate)、庚酸鹽、己酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基-乙烷磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、甲烷磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽(pamoate)、果膠酸鹽(pectinate)、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、丁二酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、對甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽、戊酸鹽及其類似鹽。代表性鹼或鹼土金屬鹽包括鈉鹽、鋰鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽、及其類似鹽。在一些實施例中，醫藥學上可接受之鹽適當時包括無毒銨、四級銨及使用平衡離子形成之胺陽離子，

該等平衡離子諸如鹵化物、氫氧化物、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、具有 1 至 6 個碳原子之烷基、磺酸根及芳基磺酸根。

【0076】 **多肽**：如本文使用係指胺基酸之聚合物鏈。在一些實施例中，多肽具有在自然界中出現之胺基酸序列。在一些實施例中，多肽具有不在自然界中出現之胺基酸序列。在一些實施例中，多肽具有經工程化之胺基酸序列，因為其經由操作人工來設計及/或產生。在一些實施例中，多肽可包含或由天然胺基酸、非天然胺基酸、或兩者組成。在一些實施例中，多肽可包含或由僅天然胺基酸或僅非天然胺基酸組成。在一些實施例中，多肽可包含 D-胺基酸、L-胺基酸、或兩者。在一些實施例中，多肽可包含僅 D-胺基酸。在一些實施例中，多肽可包含僅 L-胺基酸。在一些實施例中，多肽可包括一或多個附掛基團或其他修飾，例如，修飾或連接至一或多個胺基酸側鏈，該等側鏈在多肽之 N 端、多肽之 C 端、或其任何組合處。在一些實施例中，此等附掛基團或修飾可選自由以下組成之群：乙醯化、醯胺化、脂化、甲基化、聚乙二醇化等，包括其組合。在一些實施例中，多肽可為環狀，且/或可包含環狀部分。在一些實施例中，多肽不為環狀且/或不包含任何環狀部分。在一些實施例中，多肽為線性。在一些實施例中，多肽可為或包含訂住多肽。在一些實施例中，術語「多肽」可附加於參考多肽、活性、或結構之名稱；在此類情況下，其在本文中用於係指共有相關活性或結構並且因此可被視為相同類別或家族之多肽之成員的多肽。對於每一個此類別，本說明書提供且/或熟習此項技術者知道其胺基酸序列及/或功能已知之類別中之示例性多肽；在一些實施例中，此等示例性多肽為多肽類別或家族之參考多肽。在一些實施例中，多肽類別或家族之成員展示與該類別之參考多肽；在一些實施例中與該類別中之所有多肽的顯著序列同源性或一致性、與其共有共同序列模體(例如，特徵序列元件)，及/或與其共有共同活性(在一些實施例中，處於可比較的水準下或在指定範圍內)。例如，在一些實施例中，成

員多肽展示至少約 30-40%，並且通常大於約 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的與參考多肽之總體序列同源性或一致性程度且/或包括至少一個表現出通常大於 90%或甚至 95%、96%、97%、98%、或 99%之非常高序列一致性的區域(例如，保守區域，其可在一些實施例中為或包含特徵序列元件)。此保守區域通常涵蓋至少 3-4 個並且通常多達 20 或更多個胺基酸；在一些實施例中，保守區域涵蓋具有至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或更多個連續胺基酸的至少一個鏈段。在一些實施例中，相關多肽可包含或由母體多肽之片段組成。在一些實施例中，可用多肽可包含或由複數個片段組成，與在所關注多肽中之空間佈置相比，該等片段中之每一者以相對於彼此之不同空間佈置存在於相同母體多肽中(例如，在母體中直接連接之片段在所關注多肽中可空間分離或反之亦然，且/或與在母體中相比，片段可在所關注多肽中以不同順序存在)，以使得所關注多肽為其母體多肽之衍生物。在一些實施例中，「多肽」可被稱為「蛋白」(例如，術語「Cas 蛋白」可用於係指如本文定義之「Cas 多肽」；在一些實施例中，「Cas12 蛋白」可經由考量與如本文描述之合適參考多肽的同源性或一致性百分比，及/或所共有的特徵序列元件來與例如「Cas13 蛋白」區分。

【0077】 蛋白：如本文使用，術語「蛋白」係指多肽(亦即，藉由肽鍵來彼此連接的至少兩個胺基酸之串)。蛋白可包括除了胺基酸以外的部分(例如，其可為糖蛋白、蛋白多糖等)且/或可另外處理或修飾。普通熟習此項技術者認識到「蛋白」可為如藉由細胞來產生的完整多肽鏈(具有或不具有信號序列)，或可為其特徵部分。一般熟習此項技術者認識到蛋白可有時包括例如藉由一或多個二硫鍵或相關其他手段來連接的一個以上多肽鏈。多肽可含有 L-胺基酸、D-胺基酸、或兩者並且可含有在此項技術中已知的各種胺基酸修飾或類似物中之任一者。可用修飾包括例如末端乙醯化、醯胺化、甲基化等。在一些實施例中，蛋白可

包含天然胺基酸、非天然胺基酸、合成胺基酸、及其組合。術語「肽」通常用於係指具有少於約 100 個胺基酸、少於約 50 個胺基酸、少於 20 個胺基酸、或少於 10 個胺基酸之長度的多肽。在一些實施例中，蛋白為抗體、抗體片段、其生物活性部分，及/或其特徵部分。

【0078】 純的：如本文使用，若試劑或實體實質上不含其他組分，則其為「純的」。例如，含有超過約 90%之特定試劑或實體的製劑通常被視為純製劑。在一些實施例中，試劑或實體為至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%純。

【0079】 重組：如本文使用，意指藉由重組手段來設計、工程化、製備、表現、產生、製造，及/或分離的多肽，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體來表現之多肽；自重組、組合人類多肽文庫分離之多肽；自動物(例如，小鼠、兔、綿羊、魚等)分離之多肽，對於編碼多肽或其一或多個組分、部分、元件或域及/或引導其表現的一或多個基因或基因組分而言，該等多肽為轉殖基因的或以其他方式調處來表現該一或多個基因或基因組分；及/或以任何其他手段來製備、表現、產生或分離之多肽，該手段涉及剪接選定核酸序列元件或將其彼此連接，化學合成選定序列元件，及/或另外產生編碼多肽或其一或多個組分、部分、元件或域且/或引導其表現之核酸。在一些實施例中，此等選定序列元件中之一或多者存在於自然界中。在一些實施例中，此等選定序列元件中之一或多者在電腦中設計。在一些實施例中，一或多個此等選定序列元件由例如來自例如像所關注原始有機體(例如，人類、小鼠等)之生殖系中之天然或合成來源之已知序列元件的誘變(例如，活體內或活體外)產生。

【0080】 參考：如本文使用，描述相對於其執行比較之標準或對照。例如，在一些實施例中，所關注之試劑、動物、個體、群體、樣品、序列或值與參考或對照試劑、動物、個體、群體、樣品、序列或值進行比較。在一些實施例中，

參考或對照實質上同時與所關注之測試或確定來測試及/或確定。在一些實施例中，參考或對照為視情況在有形媒體中具體實現的歷史參考或對照。通常，如熟習此項技術者理解，參考或對照在與所評估參考或對照類似的條件或情況下來確定或表徵。熟習此項技術者認識到何時存在足夠相似性來證明依賴特定可能參考或對照及/或與其比較為合理的。在一些實施例中，合適參考 Cas 蛋白序列可見於文獻報導或序列資料庫(例如，GENBANK)中。僅給出熟習此項技術者已知的幾個實例，在一些實施例中，合適參考 Cas12 蛋白或合適參考 Cas13 蛋白可為例如在以下文獻中描述之蛋白中之任一者：Koonin 等人, *Curr Opin Microbiol.*, 2017 年 6 月; 37: 67-78，Makarova 等人, *Nat Rev Microbiol.*, 2015 年 11 月; 13(11): 722-736，Shmakov 等人, *Mol Cell.*, 2015 年 11 月 5 日; 60(3): 385-397，Yan 及 Hunnewell 等人, *Science*, 2018 年 12 月 6 日，Yan 等人, *Mol Cell.*, 2018 年 4 月 19 日; 70, 327-339，Makarova 等人, *Nat Rev Microbiol.*, 2011 年 6 月; 9(6): 467-477，Makarova 等人, *CRISPR Journal*, 2018, 第 1 卷，編號 5，Shmakov 等人, *Nat Rev Microbiol.*, 2017 年 3 月; 15(3): 169-182，Yan 及 Hunnewell 等人, *Science*, 2019 年 1 月 4 日; 363, 88-91，Abudayyeh 等人, *Science*, 2016 年 8 月 5 日; 353, 6299，Gootenberg 及 Abudayyeh 等人, *Science*, 2017 年 4 月 28 日, 356, 438-442，Gootenberg 及 Abudayyeh 等人, *Science*, 2018 年 4 月 27 日; 360, 439-444。或者，在一些實施例中，本文所述例示 Cas 蛋白(例如，SEQ ID NO：1-10 中之一者)可充當其他蛋白相對於其進行比較的參考。

【0081】 樣品：如本文使用，術語「樣品」通常係指獲自或衍生自如本文描述之所關注來源的材料之等分試樣。在一些實施例中，所關注來源為生物或環境來源。在一些實施例中，所關注來源可為或包含細胞或有機體，諸如微生物、植物、或動物(例如，人類)。在一些實施例中，所關注來源為或包含生物組織或流體。在一些實施例中，生物組織或流體可為或包含羊水、房水、腹水、膽汁、

骨髓、血液、母乳、腦脊液、叮嚀、乳糜、舌苔、射精、內淋巴、滲出液、糞便、胃酸、胃液、淋巴、黏液、心包液體、外淋巴液、腹膜液、胸膜液、膿液、稀黏液、唾液、皮脂、精液、血清、包皮垢、痰液、滑液、汗液、眼淚、尿液、陰道分泌物、玻璃體液、嘔吐物，及/或其組合或組分。在一些實施例中，生物流體可為或包含細胞內流體、細胞外流體、血管內流體(血漿)、間隙流體、淋巴流體，及/或跨細胞流體。在一些實施例中，生物流體可為或包含植物滲出物。在一些實施例中，生物組織或樣品可藉由例如抽吸、生檢(例如細針或組織生檢)、拭子(例如口腔、鼻腔、皮膚或陰道拭子)、刮擦、手術、洗滌或灌洗(例如，支氣管肺泡、導管、鼻、眼、口腔、子宮、陰道或其他洗滌或灌洗)來獲得。在一些實施例中，生物樣品為或包含獲自個體之細胞。在一些實施例中，樣品為藉由任何合適手段直接獲自所關注來源的「初級樣品」。在一些實施例中，如自上下文清楚，術語「樣品」係指藉由處理(例如，藉由移除一或多種組分及/或將一或多種試劑添加至)初級樣品而獲得之製劑。例如，過濾使用半透膜。此「經處理樣品」可包含例如自樣品中提取或藉由使初級樣品經受諸如核酸之擴增或反轉錄、某些組分之分離及/或純化等之技術來獲得的核酸或蛋白。

【0082】 單一核苷酸多態性(SNP)：如本文使用，術語「單一核苷酸多態性」或「SNP」係指已知替代鹼基將一個等位基因與另一個等位基因區分的基因組中之特定鹼基位置。在一些實施例中，一個或幾個 SNP 及/或 CNP 足以將複雜遺傳變異體彼此區分以致於出於分析目的，一個或一組 SNP 及/或 CNP 可被視為特定變異體、性狀、細胞類型、個體、物種等或其集合所特有的。在一些實施例中，一個或一組 SNP 及/或 CNP 可被視為定義特定變異體、性狀、細胞類型、個體、物種等或其集合。

【0083】 個體：如本文使用，術語「個體」係指有機體，通常哺乳動物(例如，人類，在一些實施例中包括產前人類形式)。在一些實施例中，個體患有相關疾

病、病症或疾患。在一些實施例中，個體易患疾病、病症或疾患。在一些實施例中，個體顯示疾病、病症或疾患之一或多個症狀或特徵。在一些實施例中，個體不顯示疾病、病症或疾患之任何症狀或特徵。在一些實施例中，個體為具有疾病、病症或疾患之易感性或風險所特有的一或多個特徵的人。在一些實施例中，個體為患者。在一些實施例中，個體為投與及/或已投與診斷及/或療法之個體。

【0084】 實質上：如本文使用，術語「實質上」係指展現所關注特徵或性質之完全或接近完全範圍或程度的定性條件。普通熟習生物技術者中理解生物及化學現象很少地(若有的話)達到完成及/或進行至完成或達成或避免絕對結果。因此，術語「實質上」在本文中用於捕獲在許多生物及化學現象中固有的潛在缺少完全性。

【0085】 治療：如本文使用，術語「治療」(亦「治療」或「治療」)係指投與部分地或完全地減輕，改善，緩解，抑制特定疾病、病症，及/或疾患、延遲其發作、減少其嚴重程度，及/或減少其一或多個症狀、特徵，及/或病因之發生率的療法。在一些實施例中，此治療可為不展現相關疾病、病症及/或疾患之跡象的個體及/或僅展現疾病、病症，及/或疾患之早期跡象的個體。替代地或附加地，此治療可為展現相關疾病、病症及/或疾患之一或多個既定跡象的個體。在一些實施例中，治療可為診斷為患有相關疾病、病症，及/或疾患之個體。在一些實施例中，治療可為已知具有在統計上與患上相關疾病、病症，及/或疾患之風險增加相關的一或多個易感性因子的個體。因此，在一些實施例中，治療可為預防性的；在一些實施例中，治療可為治療性的。

【0086】 腫瘤：如本文使用，術語「腫瘤」係指細胞或組織之異常生長。在一些實施例中，腫瘤可包含癌症前期(例如，良性)、惡性、轉移前、轉移性，及/或非轉移性的細胞。在一些實施例中，腫瘤與癌症相關，或為癌症之表現。在

一些實施例中，腫瘤可為分散腫瘤或液體腫瘤。在一些實施例中，腫瘤可為實體腫瘤。

【0087】 **載體**：如本文使用，係指能夠運輸其連接之另一個核酸的核酸分子。一種類型之載體為「質體」，其係指額外 DNA 區段可連接至其中的圓形雙鏈 DNA 環。另一類型之載體為病毒載體，其中額外 DNA 區段可連接至病毒基因組中。某些載體能夠在引入其之宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌複製起點之細菌載體及附加型哺乳動物載體)。其他載體(例如，非附加型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞中後整合至宿主細胞之基因組中，並且由此與宿主基因組一起複製。另外，某些載體能夠指導與其可操作連接之基因的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。標準技術可用於重組 DNA、寡核苷酸合成、及組織培養及轉型(例如，電穿孔、脂質轉染)。酶促反應及純化技術可根據製造商之說明書或如在此項技術中通常完成或如本文描述來執行。前述技術及程序可通常根據習知方法來執行，該等方法在此項技術中為熟知的並且如在整個本說明書中引用及論述之各種一般及更特定參考文獻中描述。參見例如，Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))，其出於任何目的以引用方式併入本文。

某些實施例之詳細描述

CRISPR-Cas 技術

【0088】 通常，Cas 蛋白及/或嚮導為 CRISPR-Cas 技術之主要成分。CRISPR-Cas 技術或 CRISPR-Cas 系統共同地係指在表現 CRISPR 相關(「Cas」)基因或引導其活性中所涉及的轉錄物及其他元件，包括編碼 Cas 基因之序列，tracr(反式活化 CRISPR)序列(例如，tracrRNA 或活性部分 tracrRNA)，tracr 配合序列(在內源性 CRISPR 系統之情形中，涵蓋「正向重複」及 tracrRNA 處理之部分正向重複)，嚮導(在內源性 CRISPR 系統之情形中，亦被稱為「間隔子」)，或

如本文使用之術語「RNA」(例如，指導 Cas 之 RNA，諸如本文揭示之 Cas 蛋白，例如，CRISPR RNA 及反式活化(tracr)RNA 或單一嚮導 RNA(sgRNA)(嵌合 RNA))或來自 CRISPR 基因座之其他序列及轉錄物。通常，CRISPR-Cas 技術之特徵在於促進在靶核酸位點處形成 CRISPR 複合物之元件(在內源性 CRISPR 系統之情形中，亦被稱為原型間隔物)。在一些實施例中，tracrRNA 並非必需的。

【0089】 在本揭示案之工程化或非天然存在技術之一些實施例中，正向重複可包涵天然存在之序列或非天然存在序列。在一些實施例中，正向重複(DR)可為天然存在長度及/或序列。在一些實施例中，正向重複可為 36 個核苷酸(nt)之長度，但是更長或更短正向重複可變化。例如，在一些實施例中，正向重複可為 30nt 或更長，諸如 30-100 nt 或更長。例如，正向重複可為 30 nt、40nt、50nt、60nt、70nt、70nt、80nt、90nt、100nt 或更長之長度。在一些實施例中，本揭示案之正向重複可包括插入天然存在直接重複之 5'與 3'末端之間的合成核苷酸序列。在某些實施例中，插入序列可為自身互補，例如，20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或 100%自身互補。此外，本揭示案之正向重複可包括核苷酸之插入，諸如適體或結合至轉接蛋白的序列(用於與功能域締合)。在某些實施例中，含有此插入的正向重複之一個末端大約為短 DR 之第一半部並且該末端大約為短 DR 之第二半部。在一些實施例中，直接重複可在電腦中鑑別。

【0090】 在一些實施例中，Cas 蛋白為熱穩定 Cas 蛋白。

【0091】 在形成 CRISPR 複合物之情形中，「靶核酸序列」係指包括嚮導序列之嚮導具有(例如，被設計成具有)與其互補性的序列，其中靶核酸序列與嚮導序列之間之雜交促進形成 CRISPR 複合物。在一些實施例中，靶核酸包含任何多核苷酸，諸如 DNA 或 RNA 多核苷酸。在一些實施例中，靶核酸位於細胞之細胞核或細胞質中。在一些實施例中，靶核酸為離體的。在一些實施例中，靶核酸存在於活體外系統中。在一些實施例中，靶核酸存在於樣品中，例如，在生

物樣品中或在環境樣品中。

【0092】 在一些實施例中，嚮導(例如，恆定域及/或間隔子)為約或超過約 5、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、75、100、125、150、160、170、180、190 或更多個核苷酸之長度。在一些實施例中，嚮導為少於約 200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、75、50、45、40、35、30、25、20、15、12、或更少核苷酸之長度。在一些實施例中，嚮導為 10-30 個核苷酸長，諸如 20-30 個或 20-40 個核苷酸長或更長，諸如 30 個核苷酸長或約 30 個核苷酸長以便有利於 CRISPR-Cas 效應物。在某些實施例中，嚮導為 10-30 個核苷酸長，諸如 20-30 個核苷酸長，諸如 30 個核苷酸長。在某些實施例中，嚮導為 90-200 個核苷酸長，諸如 100-190 個核苷酸長，諸如 110-180 個核苷酸長，諸如 120-170 個核苷酸長。嚮導引導 CRISPR 複合物以序列特異性方式結合至靶核酸的能力可藉由任何合適檢定來評估。例如，在一些實施例中，將足以形成 CRISPR 複合物之 CRISPR 系統之組分，包括待測試之嚮導序列，提供至具有對應靶核酸序列之宿主細胞，諸如如在本文中別處論述，藉由用編碼 CRISPR-Cas 技術之組分的載體或載體系統來轉染，隨後評估靶核酸序列內之優先裂解。類似地，在一些實施例中，例如，藉由提供靶核酸、CRISPR 複合物之組分，包括待測試之嚮導序列及不同於測試嚮導序列之對照嚮導序列，並且將測試與對照嚮導序列反應之間的在靶核酸序列處之結合或裂解速率進行比較，從而在試管中評估靶核酸之裂解。其他檢定為可能的，並且為熟習此項技術者思及。

【0093】 在一些實施例中，嚮導序列與其對應靶核酸序列之間的互補性程度可為約或超過約 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、或 100%；在一些實施例中，嚮導或 RNA 或 crRNA 可為約或超過約 5、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、75、或更多個核苷酸之長度；或在一些實施例中，嚮導或 RNA 或 crRNA 可為少於約 75、50、45、40、35、30、25、20、15、12、或更少核苷酸之長度；並且有利地 tracr RNA 為 30 或 50 個核苷酸之長度。在一些實施例中，嚮導序列與其對應靶核酸序列之間的互補性程度大於 94.5%或 95%或 95.5%或 96%或 96.5%或 97%或 97.5%或 98%或 98.5%或 99%或 99.5%或 99.9%、或 100%。在一些實施例中，靶核酸序列與嚮導之間之少於 100%或 99.9%或 99.5%或 99%或 99%或 98.5%或 98%或 97.5%或 97%或 96.5%或 96%或 95.5%或 95%或 94.5%或 94%或 93%或 92%或 91%或 90%或 89%或 88%或 87%或 86%或 85%或 84%或 83%或 82%或 81%或 80%互補性為脫靶的，有利地靶核酸序列與嚮導之間之 100%或 99.9%或 99.5%或 99%或 99%或 98.5%或 98%或 97.5%或 97%或 96.5%或 96%或 95.5%或 95%或 94.5%互補性為脫靶的。

【0094】 在一些實施例中，裂解活性(例如，效率)之調節可藉由在嚮導序列與靶核酸序列之間，包括沿著嚮導序列/靶核酸序列的不匹配位置引入不匹配，例如，1 或更多個不匹配，諸如 1 或 2 個不匹配來充分利用。不希望受任何一種理論束縛，在一些實施例中，藉由選擇沿著嚮導序列之不匹配位置，可調節裂解活性(例如，效率)。例如，在一些實施例中，若(例如，在細胞群中)需要標靶之少於 100%裂解，則可在嚮導序列中引入嚮導序列與靶核酸序列之間的 1 或更多個，諸如較佳 2 個不匹配。在一些實施例中，不匹配位置沿著嚮導序列愈居中，裂解活性愈低(例如，

【0095】 在一些實施例中，形成 CRISPR 複合物(包括雜交至靶核酸序列並且與一或多種 Cas 蛋白複合的嚮導序列)在靶核酸序列中或附近(例如，距其 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、或更多個鹼基對內)導致裂解。不希望受任何一種理論束縛，靶核酸序列中或附近之裂解位點位置可取決於例如次級結構，尤其在 RNA 標靶的情況下。在一些情況下，在內源性 CRISPR 系統之情形

中，形成 CRISPR 複合物(包括雜交至靶核酸序列並且與一或多種 Cas 蛋白複合的嚮導序列)導致在靶核酸序列中或附近(例如，距其 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、或更多個鹼基對內)將一或兩個鏈(若適當)裂解。

熱穩定 Cas 蛋白

【0096】 如本文描述，本揭示案確認某些 Cas 蛋白，例如如上所述的具有旁切活性之 Cas 蛋白之問題，因為某些此等蛋白活性在較高溫度下不夠穩定。例如，當在受益於或需要較高溫度(例如，在執行核酸延長及/或擴增之溫度下)之系統或檢定中，及/或在細胞或有機體(例如，僅在較高溫度下存活或茁壯成長之嗜熱有機體)中利用 Cas 蛋白時，上述情況可證明尤其具有挑戰性。另外，本揭示案進一步令人驚訝地展示，對於一些蛋白而言，在溫度升高時之活性損失可為不可逆的。此現實增加藉由本揭示案提供之見解的意義：具有熱穩定活性之 Cas 蛋白(例如，「熱穩定 Cas 蛋白」)，尤其包括具有熱穩定旁切活性之 Cas 蛋白為尤其合乎需要的。

【0097】 因此，本揭示案提供經改良之 Cas 蛋白，並且尤其提供具有旁切活性之經改良 Cas 蛋白，並且進一步提供利用如本文描述之熱穩定 Cas 蛋白(例如，其旁切活性為熱穩定的)的經改良技術。

【0098】 在一些實施例中，本揭示案提供用於結合至、偵測，及/或修飾靶核酸中之核苷酸的非天然存在或工程化組成物，其包括如本文描述之熱穩定 Cas 蛋白(例如，在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白)。在一些此類實施例中，所提供組成物包括非天然存在或工程化組成物，其包括如本文描述之熱穩定 Cas 蛋白(例如，在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白)及至少一種能夠與熱穩定 Cas 蛋白形成複合物並且引導複合物結合至靶核酸的嚮導。在一些實施例中，所提供組成物包含 Cas 蛋白/嚮導複合物。在一些實施例中，所提供組成物包含結合至靶核酸的 Cas 蛋

白/嚮導複合物。在一些實施例中，所提供組成物包含與易受旁切裂解影響的核酸組合的 Cas 蛋白；在一些此類實施例中，此敏感性核酸不包括嚮導結合位點且/或不與確實包括此嚮導結合位點之靶核酸連接及/或以其他方式與其相關。在一些實施例中，敏感性核酸經標記以使得其裂解(例如，經由如本文提供之 Cas 蛋白的旁切活性)可偵測(例如，藉由釋放螢光或可見顏色)。

【0099】 在一些實施例中，本揭示案提供非天然存在或工程化組成物，其包括編碼如本文描述之熱穩定 Cas 蛋白(例如，在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白)的多核苷酸；在一些此類實施例中，此組成物可與至少一種能夠與 Cas 蛋白形成複合物並且引導複合物結合至靶核酸序列的嚮導組合(例如，與其組合使用)。

【0100】 在一些實施例中，本文提供之 Cas 酶(例如，具有熱穩定旁切裂解活性)為不具有可證明的旁切裂解活性，或具有可證明的旁切裂解活性，但是如本文描述，在高於相關溫度下失去此活性的 Cas 酶之同源物(例如，異種同源物)。

【0101】 在一些實施例中，如本文描述之具有熱穩定旁切裂解活性之 Cas 酶為 Cas12(例如，Cas12a 或 Cas12b)酶。在一些實施例中，如本文描述之具有熱穩定旁切裂解活性之 Cas 酶為包括與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有 80%、85%、90%、99%或 100%序列一致性之胺基酸序列的 Cas 酶。在一些實施例中，如本文描述的經改良旁切活性檢定使用包括與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有 80%、85%、90%、99%或 100%序列一致性之胺基酸序列的 Cas 酶來執行。

密碼子最佳化

【0102】 不希望受任何一種理論束縛，一些物種展現密碼子偏差(亦即，有機體使用密碼子之差異)，其可與藉由使用 mRNA 中之密碼子的 mRNA 之轉譯效率相關，其對應於特定有機體中之該密碼子之 tRNA 物質的豐度。密碼子最佳化之許多方法在此項技術中為已知的。在一些實施例中，密碼子藉由計算方法來

最佳化。

【0103】 在一些實施例中，密碼子最佳化係指藉由相對於合適參考序列(例如，原生序列)，置換至少一個密碼子(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、或更多個密碼子)來修飾核酸序列以便增強細胞中之表現。在一些實施例中，合適參考序列之密碼子用在細胞之基因中更頻繁使用或最常使用，同時保持藉由核酸序列來編碼之原生胺基酸序列的密碼子來置換。

【0104】 在一些實施例中，編碼本揭示案之 Cas 蛋白的核苷酸序列經密碼子最佳化。在一些實施例中，編碼本揭示案之 Cas 蛋白之核苷酸序列經密碼子最佳化以便在真核細胞中表現。在一些此類實施例中，真核細胞為人類細胞。在一些實施例中，編碼本揭示案之 Cas 蛋白之核苷酸序列經密碼子最佳化以便在原核細胞中表現。

修飾實體

【0105】 在一些實施例中，本揭示案之 Cas 蛋白與一或多個修飾實體締合(例如，融合，亦即，共價連接或非共價結合)為嵌合系統，其可例如藉由化學修飾核苷酸鹼基來修飾(例如，編輯)核酸序列(例如，靶核酸序列)及/或核酸(例如，靶核酸)結構。在一些實施例中，修飾實體具有鹼基編輯活性。

【0106】 在一些實施例中，修飾實體為去胺酶。在一些此類實施例中，修飾實體為胞苷去胺酶或其功能片段。在一些實施例中，胞苷去胺酶或其功能片段包含與在此項技術中已知之任何胞苷去胺酶 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更大的序列(亦即，核苷酸或胺基酸)一致性。在一些實施例中，胞苷去胺酶或其功能片段展示胞苷去胺酶活性(例如，將 C 轉化至 U)。在一些此類實施例中，修飾實體為腺苷去胺酶或其功能片段。在一些實施例中，腺苷去胺酶或其功能片段包含與在此項技術中已知

之任何腺苷去胺酶 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列(亦即，核苷酸或胺基酸)一致性。在一些實施例中，腺苷去胺酶或其功能片段展示腺苷去胺酶活性(例如，將 A 轉化至 I)。

【0107】 在一些實施例中，修飾實體以位點特異性方式來修飾靶核酸序列。在一些實施例中，例如，修飾實體活性包括甲基轉移酶活性、去甲基化酶活性、乙醯轉移酶活性、去乙醯化酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素連接酶活性、去泛素化活性、腺苷酸化活性、去腺苷酸化活性、SUMO 化活性、去 SUMO 化活性、核糖基化活性、去核糖基化活性、肉豆蔻醯化活性、去肉豆蔻醯化活性、整合酶活性、轉座酶活性、重組酶活性、聚合酶活性、連接酶活性、解旋酶活性或核酸酶活性，其中任何一種都可以修飾 DNA 或 DNA 相關多肽(例如，組蛋白或 DNA 結合蛋白)。

【0108】 在一些實施例中，本揭示案之嵌合系統包含一個修飾實體。在一些實施例中，嵌合系統包含複數個修飾實體(例如，至少兩個修飾實體)。在一些實施例中，嵌合系統包含 Cas 蛋白 C 末端之修飾實體。在一些實施例中，嵌合系統包含 Cas 蛋白 N 末端之修飾實體。在一些實施例中，嵌合系統之修飾實體及 Cas 蛋白直接連接。在一些實施例中，嵌合系統之修飾實體及 Cas 蛋白間接地連接(例如，藉由連接子)。

熱穩定 Cas 蛋白之示例性表徵

【0109】 本揭示案尤其提供表徵 Cas 蛋白(例如，本揭示案之熱穩定 Cas 蛋白)的方法。在一些實施例中，Cas 蛋白針對以下中之一或多者表徵：*順式*(例如，靶核酸)裂解活性、*反式*或「旁切」(例如，非靶核酸)裂解活性、靈敏度、對於 RNA 及/或 DNA 靶核酸之偏好、對於 RNA 及/或 DNA 非靶核酸之偏好，及/或酶穩定性。

【0110】 在一些實施例中，Cas 蛋白以一個嚮導為特徵。在一些實施例中，Cas

蛋白以一個以上嚮導(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、75、100、250、500、750、1,000、或更多個嚮導序列)為特徵。在一些此類實施例中，一個以上嚮導包含不同嚮導序列。

【0111】 在一些實施例中，Cas 蛋白在特定溫度下表徵。在一些此類實施例中，特定溫度包括 25°C、30°C、35°C、37°C、40°C、42°C、45°C、47°C、50°C、52°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、60°C、62°C、65°C、67°C、70°C、72°C、80°C、90°C、或 100°C。在一些實施例中，Cas 蛋白在溫度範圍內表徵。在一些此類實施例中，溫度範圍包括 10-100°C、20-90°C、30-80°C、40-70°C、50-70°C、10-90°C、10-80°C、10-70°C、20-100°C、20-80°C、20-70°C、30-100°C、30-90°C、或 30-70°C。在一些實施例中，Cas 蛋白在複數個溫度下表徵。在一些此類實施例中，複數個溫度包括 10-100°C 之間的任何溫度之任何組合。

順式裂解活性

【0112】 在一些實施例中，本文描述之熱穩定 Cas 蛋白針對順式(例如，靶核酸)裂解活性進行特徵描述。在一些實施例中，順式裂解活性藉由活體外裂解檢定來表徵。在一些此類實施例中，活體外裂解檢定包括例如在宿主細胞中表現 Cas 蛋白，製備細胞裂解物，製備(例如，擴增)靶核酸(例如，DNA 及/或 RNA)，將含有 Cas 之細胞裂解物與靶核酸及嚮導一起孵育，及與合適參考標準相比，評估裂解活性(例如，藉由凝膠電泳、報告子)。在一些實施例中，合適參考標準為表現不展現順式裂解活性之對照蛋白(例如，綠色螢光蛋白)的宿主細胞。

【0113】 在一些實施例中，順式裂解活性藉由離體裂解檢定來表徵。在一些此類實施例中，離體裂解檢定包含，例如，在宿主細胞中表現 Cas 蛋白及嚮導，自宿主細胞中提取所關注之多核苷酸(例如，DNA 及/或 RNA)，及測序以便確定裂解活性(例如，插入、缺失，及/或突變模式)。在一些實施例中，測序包含深度測序。在一些實施例中，測序包含下一代測序。

【0114】 在一些實施例中，*順式*裂解活性藉由端點檢定來表徵。在一些實施例中，*順式*裂解活性藉由動力學檢定來表徵。

反式裂解活性

【0115】 在一些實施例中，如本文描述之 Cas 蛋白針對反式或「旁切」(例如，非靶核酸)裂解活性進行特徵描述。反式或「旁切」活性為 Cas 蛋白結合靶核酸(例如，成為「活化」Cas 蛋白)之後的非靶核酸之非特異性裂解活性。在一些實施例中，在識別靶核酸後，Cas 蛋白之反式裂解活性得以活化，以使得其裂解非靶核酸(DNA 或 RNA 或兩者，此取決於酶)。在一些實施例中，反式裂解活性藉由報告子來評估。在一些此類實施例中，報告子包含相關可裂解核酸(例如，DNA 或 RNA)，其適當地被組配(例如，經標記)以使得其由於活化旁切活性所導致的裂解可偵測(例如，將螢光團與淬滅劑分離以使得螢光變得可偵測等)。在一些實施例中，使用陰性對照(例如，非靶核酸對照)。在一些此類實施例中，反式裂解活性在活體外評估。

【0116】 在一些實施例中，反式裂解活性藉由端點檢定來表徵。在一些實施例中，反式裂解活性藉由動力學檢定來表徵。

靈敏度

【0117】 在一些實施例中，如本文描述之 Cas 蛋白針對靈敏度進行表徵。在一些實施例中，靈敏度藉由評估 80%、85%、90%、95%、99%、或更多時間可偵測、裂解，及/或修飾之靶核酸的最低濃度來評估。在一些此類實施例中，藉由使 Cas 酶與靶核酸之稀釋液(例如，連續稀釋液)接觸，評估靶核酸之偵測、裂解，及/或修飾，從而確定靈敏度。

對於 RNA 或 DNA 靶核酸及/或非靶核酸之偏好

【0118】 在一些實施例中，如本文描述之 Cas 蛋白針對 RNA 或 DNA 靶核酸(例如，*順式*裂解活性)及/或非目標核酸(例如，反式或「旁切」裂解活性)之偏好進

行特徵描述。

【0119】 在一些實施例中，如本文描述之 Cas 蛋白針對 RNA 或 DNA 靶核酸(例如，*順式*裂解活性)之偏好進行特徵描述。在一些此類實施例中，藉由與 RNA 靶核酸相比，比較使 Cas 蛋白與 DNA 靶核酸接觸時的裂解活性，評估 *順式* Cas 蛋白活性，從而將偏好進行特徵描述。在一些實施例中，DNA 靶核酸為雙鏈 DNA。在一些實施例中，DNA 靶核酸為單鏈 DNA。

【0120】 在一些實施例中，本文描述之 Cas 蛋白針對 RNA 或 DNA 非靶核酸(例如，*反式*或「旁切」裂解活性)之偏好進行特徵描述。在一些此類實施例中，藉由與 RNA 非靶核酸相比，比較使 Cas 蛋白與 DNA 非靶核酸接觸時的 *反式*裂解活性，評估 *trans*Cas 蛋白活性，從而將偏好進行特徵描述。在一些實施例中，DNA 非靶核酸為雙鏈 DNA。在一些實施例中，DNA 非靶核酸為單鏈 DNA。在一些實施例中，非靶核酸包含報告子(例如，報告子，其中裂解將螢光團與淬滅劑分離以使得螢光變得可偵測等)。在一些此類實施例中，報告子為 DnaseAlert。在一些此類實施例中，報告子為 RnaseAlert。

酶穩定性

【0121】 在一些實施例中，如本文描述之熱穩定 Cas 蛋白針對酶穩定性進行特徵描述。在一些此類實施例中，酶穩定性藉由評估酶變性(例如，使用蛋白熔融法)進行特徵描述。在一些實施例中，評估酶變性包括使 Cas 蛋白與緩衝液及染料混合並且運行熔融曲線。不希望受任何一種理論束縛，在一些實施例中，隨著溫度增加，Cas 蛋白展開，暴露染料可結合之疏水性區域。在染料結合後，染料發螢光。在一些此類實施例中，將隨著溫度變化之螢光變化相對於熔融曲線之溫度來作圖。在一些實施例中，可確定 Cas 蛋白之熔融溫度並且與合適參考標準(例如，具有已知熱穩定性之 Cas 蛋白，例如，Aac 及/或 RS9)比較。在一些此類實施例中，熔融溫度之變化與蛋白穩定性(例如，熱穩定性)及活性之變化

相關。

靶核酸

【0122】 在一些實施例中，根據本揭示案之可用靶核酸不限於特定長度；在一些實施例中，靶核酸為任何長度之核苷酸(寡核苷酸或多核苷酸)，包括嚮導序列所雜交之序列。在一些實施例中，靶核酸包含三維結構。在一些實施例中，靶核酸序列包含編碼及/或非編碼區域。在一些實施例中，靶核酸序列包含外顯子、內含子、mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、shRNA、miRNA、核酶、cDNA、質體、載體、外源性核苷酸序列，及/或內源性核苷酸序列。在一些實施例中，靶核酸序列包含修飾核苷酸，例如，包括甲基化核苷酸或核苷酸類似物。在一些實施例中，靶核酸序列可穿插有非核酸組分。在一些實施例中，靶核酸為單鏈、雙鏈、或多鏈 DNA 或 RNA、基因組 DNA、cDNA、DNA-RNA 併合體、或包括嘌呤及嘧啶鹼基或其他天然、化學或生化修飾、非天然、或衍生核苷酸鹼基之聚合物。

【0123】 在一些實施例中，靶核酸藉由 CRISPR-Cas 技術來識別並且結合如本文描述之 Cas 蛋白。在一些實施例中，由於 Cas 蛋白結合及活性導致靶核酸被修飾或裂解或藉由靶核酸來編碼之基因具有改變之表現。在一些實施例中，靶核酸序列包含特異性、可識別、原型間隔物相鄰模體(PAM)。

嚮導

【0124】 在本揭示案之一些實施例中，CRISPR-Cas 技術包含至少一種包括嚮導序列的嚮導。在一些實施例中，嚮導序列為具有足夠互補性之核苷酸序列，使得嚮導能夠雜交至特定靶核酸。在一些實施例中，嚮導包含與靶核酸序列互補的嚮導序列。在一些實施例中，嚮導序列與靶核酸序列 50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多互補。在一些實施例中，嚮導

序列為 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、或更多個核苷酸之長度。

【0125】 在一些實施例中，本揭示案之技術利用複數個嚮導。在一些實施例中，複數個嚮導包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、250、500、750、1,000 或更多個嚮導。在一些實施例中，兩個或兩個以上嚮導包含相同嚮導序列。在一些實施例中，兩個或兩個以上嚮導包含不同嚮導序列。在一些實施例中，兩個或兩個以上嚮導序列雜交至相同靶核酸之不同靶位點。在一些實施例中，兩個或兩個以上嚮導序列雜交至不同靶核酸序列。

【0126】 在一些實施例中，嚮導引導 CRISPR-Cas 技術序列特異性結合至靶核酸的能力可藉由任何合適檢定來評估。例如，可將足以形成 CRISPR 複合物的本文揭示之 CRISPR-Cas 技術之部件，包括待測試之嚮導序列，提供至具有對應(例如互補)靶核酸序列之細胞，諸如藉由用編碼 CRISPR-Cas 技術(例如如在本文中別處論述)之部件的載體來轉染，隨後表徵靶核酸序列內的優先裂解。類似地，例如藉由提供靶核酸、包括待測試之嚮導序列的 CRISPR-Cas 技術之部件及包含不同於測試嚮導序列之嚮導序列的對照嚮導，並且比較測試與對照嚮導序列反應之間的在靶核酸處之結合或裂解速率，可在試管中評估靶核酸之裂解。其他檢定為可能的，並且將為熟習此項技術者思及。嚮導序列可被選擇來靶向任何靶核酸序列。在一些實施例中，靶核酸序列為細胞之基因組內之核酸序列。示例性靶核酸包括在靶基因組中獨特的核酸。

【0127】 在一些實施例中，組成物包含 Cas 蛋白及異源嚮導序列，例如，在自然界中，嚮導序列及 Cas 蛋白不存在於相同細胞或相同物種中。

【0128】 在一些實施例中，如本文描述之 CRISPR-Cas 技術使用包括嚮導序列之 crRNA 或類似多核苷酸，其中多核苷酸為 RNA、DNA 或 RNA 及 DNA 之混

合物，且/或其中多核苷酸包含一或多個核苷酸類似物。在一些此類實施例中，該序列可包含任何結構，包括但不限於原生 crRNA 之結構，諸如隆起、髮夾或莖環結構。在一些實施例中，包括嚮導序列之多核苷酸與可為 RNA 或 DNA 序列之第二多核苷酸序列形成雙鏈體。

【0129】 在一些實施例中，本揭示案之嚮導包含非天然存在核酸及/或非天然存在核苷酸，及/或核苷酸類似物，及/或化學修飾。非天然存在核酸可包括例如天然及非天然存在核苷酸之混合物。在一些實施例中，非天然存在核苷酸及/或核苷酸類似物在核糖、磷酸鹽，及/或鹼基部分處經修飾。在一些實施例中，嚮導包含核糖核苷酸及非核糖核苷酸。在一些此類實施例中，嚮導包含一或多個核糖核苷酸及一或多個去氧核糖核苷酸。在一些實施例中，嚮導包含一或多個非天然存在核苷酸或核苷酸類似物諸如具有硫代磷酸酯鍵、硼酸磷酸酯鍵的核苷酸，包括核糖環之 2'與 4'碳之間之亞甲基橋的鎖核酸(LNA)核苷酸，或橋接核酸(BNA)。修飾核苷酸之其他實例包括但不限於 2'-O-甲基類似物、2'-去氧類似物、2-硫尿苷類似物、N6-甲基腺苷類似物、或 2'-氟類似物。修飾鹼基之進一步實例包括但不限於 2-氨基嘌呤、5-溴-尿苷、假尿苷(Y)、N1-甲基假尿苷(me1 Y)、5-甲氧基尿苷(5moU)、肌苷、7-甲基鳥苷。嚮導 RNA 化學修飾之實例包括但不限於在一或多個末端核苷酸處併入 2'-O-甲基(M)、2'-O-甲基 3'硫代磷酸酯(MS)、S-受限乙基(cEt)、或 2'-O-甲基 3'thioPACE(MSP)。在一些實施例中，如與未修飾嚮導 RNA 相比，此等化學修飾嚮導 RNA 可包含增加的穩定性及增加的活性，然而中靶與脫靶特異性為不可預測的。(參見 Hendel, 2015, Nat Biotechnol. 33(9):985-9, doi: 10.1038/nbt.3290, 2015 年 6 月 29 日公佈; Allerson 等人, J. Med. Chem. 2005, 48:901-904; Bramsen 等人, Front. Genet., 2012, 3:154; Deng 等人, PNAS, 2015, 112:11870-11875; Sharma 等人, MedChemComm., 2014, 5:1454-1471; Li 等人, Nature Biomedical Engineering, 2017, 1, 0066 DOI:

10.1038/s41551-017-0066)。

【0130】 在一些實施例中，嚮導之 5'及/或 3'末端藉由各種功能部分來修飾，包括螢光染料、聚乙二醇、膽固醇、蛋白、或偵測標籤。(參見 Kelly 等人, 2016, *J. Biotech.* 233:74-83)。在一些實施例中，嚮導在結合至靶核酸之區域中包含核糖核苷酸，並且在結合至 Cas 蛋白之區域中包含一或多個去氧核糖核苷酸及/或核苷酸類似物。在一些實施例中，去氧核糖核苷酸及/或核苷酸類似物併入嚮導序列中，例如不限於 5'及/或 3'末端、莖-環區域、及種子區。在一些實施例中，修飾不在莖-環區域之 5'手柄中。在一些實施例中，嚮導之莖-環區域之 5'手柄中之化學修飾可消除其功能(參見 Li 等人, *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1:0066)。在一些實施例中，嚮導序列之至少 1、2、3、4、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、35、40、45、50、75 或更多個核苷酸經化學修飾。在一些實施例中，嚮導之 3'或 5'末端之 3-5 個核苷酸經化學修飾。在一些實施例中，僅次要修飾引入種子區中，諸如 2'-F 修飾。在一些實施例中，將 2'-F 修飾引入嚮導之 3'末端處。在一些實施例中，嚮導之 5'及/或 3'末端處之三至五個核苷酸用 T-O-甲基(M)、2'-O-甲基-3'-硫代磷酸酯(MS)、S-受限乙基(cEt)、或 2'-O-甲基-3'-thioPACE(MSP)來化學修飾。在一些實施例中，此等修飾可增強基因組編輯效率(參見 Hendel 等人, *Nat. Biotechnol.* (2015) 33(9): 985-989)。在一些實施例中，嚮導之所有磷酸二酯鍵用硫代磷酸酯(PS)取代以便增強基因破壞水準。在一些實施例中，嚮導之 5'及/或 3'末端處之超過五個核苷酸用 2'-OMe、2'-F 或 S-受限乙基(cEt)來化學修飾。在一些實施例中，此等化學修飾嚮導可介導增強基因破壞水準(參見 Ragdarm 等人, 0215, *PNAS*, E7110-E7111)。在一些實施例中，嚮導經修飾以便在其 3'及/或 5'末端處包含化學部分。在一些實施例中，此等部分包括但不限於胺、疊氮化物、炔烴、硫基、二苯并環辛炔(DBCO)、或羅丹明。在

一些實施例中，化學部分藉由連接子諸如烷基鏈來偶聯至嚮導序列。在一些實施例中，經修飾嚮導之化學部分可用於將嚮導連接至另一個分子，諸如 DNA、RNA、蛋白、或奈米顆粒。在一些實施例中，此等化學修飾嚮導可用於例如鑑別或富集通常藉由 CRISPR 系統來編輯之細胞(參見 Lee 等人, eLife, 2017, 6:e25312, DOI: 10.7554)。

【0131】 在一些實施例中，嚮導之修飾為化學修飾、插入、缺失或分裂。在一些實施例中，化學修飾包括但不限於併入 2'-O-甲基(M)類似物、2'-去氧類似物、2-硫尿苷類似物、N6-甲基腺苷類似物、2'-氟類似物、2-氨基嘌呤、5-溴-尿苷、假尿苷(Y)、N1-甲基假尿苷(me 1 Y)、5-甲氧基尿苷(5moU)、肌苷、7-甲基鳥苷、2'-O 甲基-3'-硫代磷酸酯(MS)、S-受限乙基(cEt)、硫代磷酸酯(PS)、或 2'-O-甲基-3'-thioPACE(MSP)。在一些實施例中，嚮導包含一個或多個硫代磷酸酯修飾。在一些實施例中，嚮導之至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、或 25 個核苷酸經化學修飾。在一些實施例中，種子區中之一或多個核苷酸經化學修飾。在一些實施例中，3'末端中之一或多個核苷酸經化學修飾。在一些實施例中，5'手柄中沒有一個核苷酸經化學修飾。在一些實施例中，種子區中之化學修飾為次要修飾，諸如併入 2'-氟類似物。在一些實施例中，Cpf1 CrRNA 之 3'末端處之此等化學修飾改良基因切割效率(參見 Li，等人，Nature Biomedical Engineering, 2017, 1:0066)。

【0132】 在一些實施例中，嚮導之 5'手柄之環經修飾。在一些實施例中，嚮導之 5'手柄之環經修飾以便具有缺失、插入、分裂、或化學修飾。在一些實施例中，環包含 3、4、或 5 個核苷酸。

【0133】 在一些實施例中，嚮導包含經由非磷酸二酯鍵來化學連接或偶聯之部分。在一些實施例中，在非限制性實例中，嚮導序列包含正向重複序列部分及靶向序列部分，其經由非核苷酸環來化學連接或偶聯。在一些實施例中該等，

該等部分經由非磷酸二酯共價連接子來連接。共價連接子之實例包括但不限於選自由以下組成之群的化學部分：胺甲酸酯、醚、酯、醯胺、亞胺、脒、胺基三嗪、脞、二硫化物、硫醚、硫酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磺醯胺、磺酸鹽、磺、亞磺、脲、硫脲、醯肼、脰、三唑、光不穩定鍵聯、形成 C-C 鍵之基團諸如 Diels-Alder 環化添加對或閉環複分解對、及邁克爾反應對。

【0134】 在一些實施例中，嚮導之部分首先使用標準亞磷醯胺合成方案來合成(Herdewijn, P. 編, *Methods in Molecular Biology* Vol 288, *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Humana Press, New Jersey (2012))。在一些實施例中，非靶向嚮導部分可使用在此項技術中已知之標準方案來官能化以便含有用於連接反應的合適官能基(Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press (2013))。官能基之實例包括但不限於羥基、胺、羧酸、羧酸鹵化物、羧酸活性酯、醛、羰基、氯羰基、咪唑基羰基、醯肼、半卡肼、硫基半卡肼、硫醇、馬來醯亞胺、鹵烷基、磺醯基、烯丙基、炔丙基、二烯、炔烴、及疊氮化物。在一些實施例中，一旦嚮導之非靶向部分經官能化，共價化學鍵或鍵聯可在兩個寡核苷酸之間形成。化學鍵之實例包括但不限於基於以下之化學鍵：胺甲酸酯、醚、酯、醯胺、亞胺、脒、胺基三嗪、脞、二硫化物、硫醚、硫酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磺醯胺、磺酸鹽、磺、亞磺、脲、硫脲、醯肼、脰、三唑、光不穩定鍵聯、形成 C-C 鍵之基團諸如 Diels-Alder 環化添加對或閉環複分解對、及邁克爾反應對。

【0135】 在一些實施例中，嚮導之一或多個部分可化學合成。在一些實施例中，化學合成使用自動、固相寡核苷酸合成機與 2'-乙醯氧基乙基原酸酯(2'-ACE)(Scaringe 等人, *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120: 11820-11821; Scaringe, *Methods Enzymol.* (2000) 317: 3-18)或 2'-硫羰胺基甲酸酯(2'-TC)化學(Dellinger 等人, *J. Am. Chem. Soc.* (2011) 133: 11540-11546; Hendel 等人, *Nat. Biotechnol.*

(2015) 33:985-989)。

【0136】 在一些實施例中，嚮導部分可使用各種生物偶聯反應、環、橋、及非核苷酸連結，經由糖、核苷酸間磷酸二酯鍵、嘌呤及嘧啶殘基之修飾來共價連接。Sletten 等人, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2009) 48:6974-6998; Manoharan, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2004) 8: 570-9; Behlke 等人, *Oligonucleotides* (2008) 18: 305-19; Watts, et al., *Drug. Discov. Today* (2008) 13: 842-55; Shukla 等人, *ChemMedChem* (2010) 5: 328-49。

【0137】 在一些實施例中，嚮導部分可使用點擊化學來共價連接。在一些實施例中，嚮導部分可使用三唑連接子來共價連接。在一些實施例中，嚮導部分可使用 Huisgen 1,3-偶極環加成反應來共價連接，該反應涉及炔烴及疊氮化物來產生高度穩定三唑連接子(He 等人, *ChemBioChem* (2015) 17: 1809-1812; WO 2016/186745)。在一些實施例中，嚮導部分藉由連接 5'-己炔部分及 3'-疊氮化物部分來共價相連。在一些實施例中，5'-己炔嚮導部分及 3'-疊氮化物嚮導部分中之一者或兩者可用 2'-乙醯氧基乙基原酸酯(2'-ACE)基團來保護，其可隨後使用 Dharmacon 方案來移除(Scaringe 等人, *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120: 11820-11821; Scaringe, *Methods Enzymol.* (2000) 317: 318)。

【0138】 在一些實施例中，嚮導部分可經由連接子(例如，非核苷酸環)來共價連接，該連接子包括諸如間隔物、附件、生物偶聯物、發色團、報告子基團、染料標記 RNA、及非天然存在核苷酸類似物的部分。更具體而言，用於本發明用途之合適間隔物包括但不限於聚醚(例如，聚乙二醇，多元醇，聚丙二醇或乙二醇及丙二醇之混合物)、聚胺基團(例如，精胺、精脒及聚合物其類似物)、聚酯(例如，聚(丙烯酸乙酯))、多聚磷酸二酯、伸烷基、及其組合。在一些實施例中，合適附件包括可添加至連接子以便向連接子添加額外性質的任何部分，諸如但不限於螢光標記物。合適生物偶聯物包括但不限於肽、糖苷、脂質、膽固

醇、磷脂、二醯基甘油及二烷基甘油、脂肪酸、烴、酶受質、類固醇、生物素、地高辛、碳水化合物、多糖。合適發色團、報告子基團、及染料標記 RNA 包括但不限於螢光染料諸如螢光素及羅丹明、化學發光、電化學發光、及生物發光標誌物化合物。將兩個 RNA 組分偶聯的示例性連接子之設計亦描述於 WO 2004/015075 中。

【0139】 在一些實施例中，根據本揭示案之可用連接子(例如，非核苷酸環)不限於特定長度；在一些實施例中，可用連接子為任何長度之連接子。在一些實施例中，連接子具有等於約 0-16 個核苷酸之長度。在一些實施例中，連接子具有等於約 0-8 個核苷酸的長度。在一些實施例中，連接子具有等於約 0-4 個核苷酸的長度。在一些實施例中，連接子具有等於約 2 個核苷酸的長度。示例性連接子設計亦描述於 WO2011/008730 中。

多重處理

【0140】 在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術利用複數個嚮導。不希望受任何一種理論束縛，使用複數個嚮導使得能夠靶向複數個靶核酸。在一些實施例中，複數個嚮導被串聯配置並且可視情況藉由核酸序列(例如，DR 序列)來分離。在一些實施例中，串聯中之一個以上嚮導之位置不影響活性。

【0141】 在一些實施例中，如本文描述之 CRISPR-Cas 技術利用複數個嚮導用於多重處理。在一些實施例中，使用一種以上 Cas 蛋白。在一些實施例中，使用單一 Cas 蛋白。在一些此類實施例中，單一 Cas 蛋白與複數個嚮導，例如，至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 15、至少 20、至少 30、至少 40、至少 50、至少 60、至少 70、至少 80、至少 90、至少 100、至少 150、至少 200、至少 250、至少 300、至少 350、至少 400、至少 450、至少 500、至少 750、至少 1,000 或更多個嚮導一起遞送。

【0142】 在一些實施例中，嚮導或複數個嚮導雜交至複數個靶核酸。在一些

實施例中，CRISPR-Cas 技術裂解及/或編輯複數個靶核酸。在一些此類實施例中，裂解及/或編輯使靶核酸或複數個靶核酸之核苷酸變異、插入，及/或缺失。在一些實施例中，核苷酸之突變、插入，及/或缺失導致藉由靶核酸來編碼或藉由靶核酸之調控元件來控制的基因之基因表現改變。

【0143】 在一些實施例中，複數個嚮導序列能夠雜交至複數個不同靶核酸或相同靶核酸之不同區域(例如，序列)。在一些實施例中，使用具有複數個如本文描述之嚮導的 CRISPR-Cas 技術提供改變複數個基因產物之表現的方法。在一些實施例中，該方法包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至至少一個靶核酸之嚮導序列接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一種嚮導形成複合物並且在至少一個靶核酸中引起斷裂。在一些實施例中，該方法包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至至少一個靶核酸之嚮導接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一種嚮導形成複合物並且編輯至少一個靶核酸序列。

修飾靶核酸序列之方法

【0144】 在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術可用於修飾靶核酸序列(例如，基因編輯)。在一些實施例中，修飾靶核酸序列可在藉由靶核酸序列來調控或編碼之基因產物之表現中，導致基因沈默或表現水準改變(例如，增加或減少)。在一些實施例中，本揭示案之 CRISPR-Cas 技術可用於靶核酸序列之位點特異性修飾。在一些實施例中，靶核酸序列之位點特異性修飾在藉由靶核酸序列來調控或編碼之基因產物之表現中，導致基因沈默或表現水準改變(例如，增加或減少)。因此，在一些實施例中，如本文描述之 CRISPR-Cas 技術用於修飾靶核酸序列的方法中。在一些實施例中，如本文描述之 CRISPR-Cas 技術用於修飾細胞(例如，原核或真核細胞)中之靶核酸的方法中。

【0145】 在一些實施例中，本揭示案之方法包含誘導細胞中之一或多個核苷酸修飾，包括向細胞遞送如在本文中別處論述之載體或載體系統。在一些實施例中，突變包括經由嚮導、RNA、或 sgRNA，在細胞之各靶核酸序列處引入、缺失、或取代一或多個核苷酸或酬載。在一些實施例中，突變包括經由嚮導，在該(等)細胞之各靶核酸序列處引入、缺失、或取代 1-75 個核苷酸。在一些實施例中，突變包括經由嚮導，在該(等)細胞之各靶核酸序列處引入、缺失、或取代 1、5、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、或 75 個核苷酸。在一些實施例中，突變包括經由嚮導，在該(等)細胞之各靶核酸序列處引入、缺失、或取代 5、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、或 75 個核苷酸。在一些實施例中，突變包括經由嚮導，在該(等)細胞之各靶核酸序列處引入、缺失、或取代 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、或 75 個核苷酸。在一些實施例中，突變包括經由嚮導，在該(等)細胞之各靶核酸序列處引入、缺失、或取代 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、或 75 個核苷酸。在一些實施例中，突變包括經由嚮導，在該(等)細胞之各靶核酸序列處引入、缺失、或取代 40、45、50、75、100、200、300、400 或 500 個核苷酸。

【0146】 在一些實施例中，為了最小化毒性及脫靶效應，對所遞送 Cas mRNA 或蛋白及嚮導之濃度進行控制。在一些實施例中，例如，藉由測試細胞或真核生物動物模型中之不同濃度並且使用深度測序分析潛在脫靶基因組基因座處之修飾程度，確定 Cas mRNA 或蛋白及嚮導之最佳濃度。

【0147】 在一些實施例中，本揭示案之技術提供裂解細胞中之靶核酸的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之

Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至至少一個靶核酸的嚮導序列接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一個嚮導序列形成複合物並且在至少一個靶核酸中引起斷裂。

【0148】 在一些實施例中，本揭示案之技術提供改變由細胞中之靶核酸來調控或編碼之基因之表現的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至至少一個靶核酸的嚮導序列接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一個嚮導序列形成複合物並且在至少一個靶核酸中引起斷裂。

【0149】 在一些實施例中，本揭示案之技術提供改變由細胞中之靶核酸來調控或編碼之基因之表現的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至至少一個靶核酸的嚮導序列接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一個嚮導序列形成複合物並且編輯至少一個靶核酸序列。

【0150】 在一些實施例中，本揭示案之技術提供修飾細胞中之靶核酸的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至至少一個靶核酸之嚮導序列接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一個嚮導序列形成複合物並且編輯至少一個靶核酸序列。

【0151】 在一些實施例中，方法包括使 CRISPR-Cas 技術結合至靶核酸及實現靶核酸之裂解。在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術藉由引入雙鏈斷裂來裂解靶核酸雙鏈體(例如，DNA 或 RNA 雙鏈體)。在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術藉由引入單鏈斷裂來裂解靶核酸雙鏈體(例如，DNA 或 RNA 雙鏈體)。

【0152】 在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術包含外源供體模板核酸(例如，DNA 分子或 RNA 分子)，其包含所關注核酸序列(例如供體模板核酸序列)。在一些實施例中，供體模板核酸序列與其置換之基因組序列不一致。在一些實施例中，供體模板核酸序列可含有相對於基因組序列的至少一個或更多個

單一鹼基變化、插入、缺失、倒置或重排，只要存在支援同源介導修復的足夠同源性。不希望受任何一種理論束縛，在藉由本文所述 CRISPR-Cas 技術來誘導之裂解事件消除後，細胞之分子機制在修復及/或消除裂解事件中利用外源供體模板核酸。或者，細胞之分子機制可在修復及/或消除裂解事件中利用內源性供體模板。

【0153】 在一些實施例中，供體模板核酸序列包含與裂解位點處之基因組序列的足夠同源性，與距裂解位點之例如約 50 個鹼基、40 個鹼基、30 個鹼基、20 個鹼基、15 個鹼基、10 個鹼基、5 個鹼基、或 1 個鹼基內的側接裂解位點之核苷酸序列的例如 70%、80%、85%、90%、95%、或 100%同源性。不希望受任何一種理論束縛，與側接裂解位點之核苷酸序列的同源性支援其與其帶有同源性之基因組序列之間的同源介導修復。例如，在一些實施例中，供體與基因組序列之間的大約 25、50、100、或 200 個核苷酸，或超過 200 個核苷酸之序列同源性(或 10 與 200 之間之任何整數值，或更多的核苷酸)支援同源介導修復。

【0154】 在一些實施例中，根據本揭示案之可用供體模板核酸不限於特定長度；在一些實施例中，供體模板核酸為任何長度之核苷酸(寡核苷酸或多核苷酸)。例如，在一些實施例中，供體模板核酸包含 10 個核苷酸或更多、25 個核苷酸或更多、50 個核苷酸或更多、100 個核苷酸或更多、250 個核苷酸或更多、500 個核苷酸或更多、1,000 個核苷酸或更多、500 個核苷酸或更多等。

插入

【0155】 在一些實施例中，如本文描述之 CRISPR-Cas 技術用於藉由將一或多個核苷酸插入靶核酸來編輯靶核酸序列。在一些實施例中，插入為無痕插入(例如，預期核酸序列插入靶核酸中在裂解事件消除後，不導致額外非預期核酸序列)。

【0156】 在一些實施例中，插入在編碼基因產物之靶核酸序列之編碼區域內

產生框移突變。在一些實施例中，本文提供之 CRISPR-Cas 技術導致在靶核酸中少於 50%、少於 40%、少於 30%、少於 20%、少於 19%、少於 18%、少於 17%、少於 16%、少於 15%、少於 14%、少於 13%、少於 12%、少於 11%、少於 10%、少於 9%、少於 8%、少於 7%、少於 6%、少於 5%、少於 4%、少於 3%、少於 2%、少於 1%、少於 0.9%、少於 0.8%、少於 0.7%、少於 0.6%、少於 0.5%、少於 0.4%、少於 0.3%、少於 0.2%、少於 0.1%、少於 0.09%、少於 0.08%、少於 0.07%、少於 0.06%、少於 0.05%、少於 0.04%、少於 0.03%、少於 0.02%、或少於 0.01% 插入形成。

【0157】 在一些實施例中，為了計算插入頻率，針對側接可發生插入之窗口之兩側的兩個 10 bp 序列的精確匹配，對測序讀取進行掃描。例如，若未定位精確匹配，則讀取自分析中排除。若此插入窗口之長度精確地匹配參考序列，則讀取分類為不含有插入。若插入窗口比參考序列長兩個或兩個以上鹼基，則測序讀取分類為插入。在一些實施例中，本文提供之修飾實體可限制核酸區域中之插入形成。在一些實施例中，區域在藉由修飾實體來靶向之核苷酸處或藉由修飾實體來靶向之核苷酸之 2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸內的區域。

【0158】 在一些實施例中，在靶核酸處形成之插入之數目可取決於核酸(例如，細胞之基因組內之靶核酸)暴露於修飾實體的時間量。在一些實施例中，在靶核酸(例如，細胞之基因組內之核酸)暴露於修飾實體至少 1 小時、至少 2 小時、至少 6 小時、至少 12 小時、至少 24 小時、至少 36 小時、至少 48 小時、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天、至少 7 天、至少 10 天、或至少 14 天之後，確定插入之數目或比例。應瞭解如本文描述之修飾實體之特徵，在一些實施例中，可應用於嵌合系統、或使用本文提供之嵌合系統的方法中之任一者。

缺失

【0159】 在一些實施例中，如本文描述之 CRISPR-Cas 技術用於藉由使靶核酸

之一或多個核苷酸缺失來編輯靶核酸序列。

【0160】 在一些實施例中，缺失在編碼基因產物之靶核酸序列之編碼區域內產生框移突變。在一些實施例中，本文提供之 CRISPR-Cas 技術在靶核酸中導致少於 50%、少於 40%、少於 30%、少於 20%、少於 19%、少於 18%、少於 17%、少於 16%、少於 15%、少於 14%、少於 13%、少於 12%、少於 11%、少於 10%、少於 9%、少於 8%、少於 7%、少於 6%、少於 5%、少於 4%、少於 3%、少於 2%、少於 1%、少於 0.9%、少於 0.8%、少於 0.7%、少於 0.6%、少於 0.5%、少於 0.4%、少於 0.3%、少於 0.2%、少於 0.1%、少於 0.09%、少於 0.08%、少於 0.07%、少於 0.06%、少於 0.05%、少於 0.04%、少於 0.03%、少於 0.02%、或少於 0.01% 缺失形成。

【0161】 在一些實施例中，為了計算缺失頻率，針對側接可發生插入之窗口之兩側的兩個 10 bp 序列的精確匹配，對測序讀取進行掃描。例如，若未定位精確匹配，則讀取自分析中排除。若此缺失窗口之長度精確地匹配參考序列，則讀取分類為不含有插入。若插入窗口比參考序列短兩個或兩個以上鹼基，則測序讀取分類為缺失。在一些實施例中，本文提供之修飾實體可限制核酸區域中之缺失形成。在一些實施例中，區域在藉由修飾實體來靶向之核苷酸處或藉由修飾實體來靶向之核苷酸之 2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸內的區域。

【0162】 在一些實施例中，在靶核酸處形成之缺失之數目可取決於靶核酸(例如，細胞之基因組內之靶核酸)暴露於修飾實體的時間量。在一些實施例中，在靶核苷酸序列(例如，細胞之基因組內之核酸)暴露於修飾實體至少 1 小時、至少 2 小時、至少 6 小時、至少 12 小時、至少 24 小時、至少 36 小時、至少 48 小時、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天、至少 7 天、至少 10 天、或至少 14 天之後，確定缺失之數目或比例。應瞭解如本文描述之修飾實體之特徵，在一些實施例中，可應用於嵌合系統、或使用本文提供之嵌合系統的方法中之任一者。

突變

【0163】 在一些實施例中，如本文描述之 CRISPR-Cas 技術用於藉由使靶核酸之一或多個核苷酸突變來編輯靶核酸序列。在一些實施例中，突變為點突變。在一些實施例中，突變為沈默突變(例如，相對於相關參考胺基酸序列，該突變不導致胺基酸序列之變化)。在一些實施例中，突變引入非天然存在終止密碼子。在一些實施例中，突變引入非天然存在起始密碼子。在一些實施例中，突變移除天然存在終止密碼子。在一些實施例中，突變移除天然存在起始密碼子。

【0164】 在一些實施例中，需要產生及/或使用嵌合系統(例如，包括 Cas 蛋白及如本文中別處描述之修飾實體)，其有效地修飾(例如，突變或去胺基)靶核酸序列內之特定核苷酸，而不在靶核酸序列中產生大量插入或缺失。在一些實施例中，本文揭示之任何嵌合系統能夠產生比插入/缺失更大比例的預期修飾(例如，點突變或去胺基)。

【0165】 在一些實施例中，本揭示案之嵌合系統修飾靶核酸中之單一核苷酸。在一些實施例中，修飾修復及/或校正 G-A 或 C-T 點突變、T-C 或 A-G 點突變、或致病性單一核苷酸多態性。

【0166】 在一些實施例中，本文揭示之任何嵌合系統能夠在靶核酸序列(例如，個體之基因組內之核酸)中有效地產生預期突變，例如像點突變，而不產生大量非預期突變，諸如非預期點突變。在一些實施例中，本文提供之任何嵌合系統能夠產生至少 0.01% 之預期突變(亦即，至少 0.01% 鹼基編輯效率)。在一些實施例中，本文提供之任何嵌合系統能夠產生至少 0.01%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 99% 預期突變。

【0167】 在一些實施例中，本文所述嵌合系統能夠產生大於 1:1 的預期點突變與插入/缺失或非預期點突變之比率。在一些實施例中，本文提供之鹼基編輯器

能夠產生至少 1.5:1、至少 2:1、至少 2.5:1、至少 3:1、至少 3.5:1、至少 4:1、至少 4.5:1、至少 5:1、至少 5.5:1、至少 6:1、至少 6.5:1、至少 7:1、至少 7.5:1、至少 8:1、至少 8.5:1、至少 9:1、至少 10:1、至少 11:1、至少 12:1、至少 13:1、至少 14:1、至少 15:1、至少 20:1、至少 25:1、至少 30:1、至少 40:1、至少 50:1、至少 100:1、至少 200:1、至少 300:1、至少 400:1、至少 500:1、至少 600:1、至少 700:1、至少 800:1、至少 900:1、或至少 1000:1、或更大的預期點突變與插入/缺失或非預期點突變之比率。

【0168】 在一些實施例中，預期突變及插入/缺失之數目可使用例如如在以下文獻中描述之任何合適方法來確定：國際 PCT 申請案第 PCT/2017/045381 號 (WO2018/027078)及第 PCT/US2016/058344 號(WO2017/070632)；Komor, A.C. 等人，「Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage」Nature 533, 420-424 (2016); Gaudelli, N.M.等人, 「Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage」Nature 551, 464-471 (2017); 及 Komor, A.C.等人,「Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity」Science Advances 3:eaao4774 (2017)；其整個內容以引用形式併入本文。

基因表現水準之改變

【0169】 在一些實施例中，本揭示案之 CRISPR-Cas 技術用於改變(例如，增加或減少)藉由靶核酸來調控或編碼之基因產物之基因表現。在一些實施例中，基因表現水準藉由例如基因或啟動子插入、缺失、突變、基因表現失活、基因表現活化、酶工程學、定向進化、基於知識之設計、隨機誘變方法、基因改組，及/或密碼子最佳化來改變。

【0170】 在一些實施例中，改變基因表現水準包括靶向 DNA。在一些實施例

中，靶向 DNA 包含靶向調控元件。在一些此類實施例中，調控元件包括例如啟動子、增強子、內部核糖體進入位點(IRES)、及其他表現控制元件(例如，轉錄終止信號，諸如多聚腺苷酸信號及聚 U 序列)。

【0171】 在一些實施例中，改變基因表現水準包括靶向 RNA。在一些實施例中，靶向 RNA 包含靶向 RNA 處理。在一些此類實施例中，靶向 RNA 處理包括靶向例如 RNA 剪接(包括選擇性剪接)、RNA 聚合酶、病毒複製、tRNA 生物合成、及 RNA 活化。

酬載

【0172】 在一些實施例中，本揭示案提供靶向在靶核酸位點處插入酬載核酸的方法。在一些此類實施例中，該方法包含使靶核酸與本文所述技術及酬載核酸(例如，包括酬載核酸之供體模板核酸)接觸。在一些實施例中，本揭示案提供靶向自靶核酸位點切除酬載核酸的方法，該方法包括使靶核酸與本文所述技術接觸。

【0173】 在一些實施例中，供體模板核酸在載體諸如 AAV 病毒載體中，或以線性單鏈或雙鏈 DNA 片段形式遞送。在一些實施例中，為了藉由同源介導修復(HDR)來插入供體模板核酸，供體模板核酸包含待插入所關注基因座中之酬載核酸以及與側接所需插入位點之內源性序列同源的側接序列。在一些實施例中，為了插入小於例如 1kb 長度之較短酬載，側接同源序列可較短，例如，15 至 200 個核苷酸範圍內之長度。在其他情況下，為了插入例如 1kb 或更大長度的較長酬載，需要例如大於 200 個核苷酸長度之較長同源側接序列來促進有效 HDR。在一些實施例中，為了在與模板 DNA 側接區域同源之序列之間進行 HDR，將靶基因組基因座裂解可顯著增加 HDR 頻率。在一些實施例中，促進 HDR 之裂解事件包括但不限於 dsDNA 裂解、雙重切口、及單一鏈切口活性。

【0174】 在一些實施例中，酬載核酸不限於特定核酸；在一些實施例中，酬

載核酸包含所關注之任何核酸。在一些實施例中，例如，酬載核酸為線性或圓形的。在一些實施例中，例如，酬載核酸為質體、病毒基因組、RNA 及/或 DNA 多核苷酸。在一些實施例中，酬載核酸為修飾核酸。在一些實施例中，供體模板核酸為雙鏈(例如，DNA 或 RNA)。在一些實施例中，供體模板核酸為單鏈(例如，DNA 或 RNA)。設計外源供體模板核酸之方法描述於例如 WO2016094874 中，其整個內容明確以引用方式併入本文。在一些實施例中，酬載核酸為可用於治療、預防，及或診斷病症及/或疾病的核酸。

載體系統及載體

【0175】 在一些實施例中，本揭示案之 CRISPR-Cas 技術包括遞送及/或表現 Cas 蛋白、嵌合系統、嚮導，及/或供體模板核酸的系統。在一些實施例中，系統包含載體及/或載體系統。遞送嚮導及供體模板核酸之方法以及外源表現蛋白及多肽之方法在此項技術中為熟知的並且熟習此項技術者認識到可成功利用各種技術。

【0176】 編碼 Cas 蛋白及/或嵌合系統或提供本揭示案之嚮導或供體模板核酸的重組多核苷酸(例如，DNA 或 RNA)可藉由各種可獲得方法來製備。例如，所需序列可使用限制酶自 DNA 中切除，可使用例如聚合酶鏈反應，自質體或基因組多核苷酸序列擴增，或可使用化學合成技術來合成。在一些實施例中，已知方法之組合用於製備重組多核苷酸。

【0177】 在一些實施例中，將編碼本揭示案之 Cas 蛋白及/或嵌合系統的重組多核苷酸選殖至能夠表現 Cas 蛋白及/或嵌合系統之載體中。在一些實施例中，將提供本揭示案之嚮導或供體模板核酸之重組多核苷酸選殖至載體中。選殖可根據各種可獲得方法(例如，Gibson 組裝、限制消化及連接等)來執行。在一些實施例中，載體係病毒載體。在一些實施例中，載體係非病毒載體。在一些實施例中，載體為質體。

【0178】 在一些實施例中，能夠表現之載體包含編碼本揭示案之 Cas 蛋白及/或嵌合系統的重組多核苷酸，其可操作地連接至控制表現之一或多個序列(例如，啟動子、起始信號、終止信號、多聚腺苷酸信號、活化劑、抑制劑等)。在一些實施例中，控制表現之一或多個序列被選擇來達成所需表現水準。在一些實施例中，利用控制表現的一個以上序列(例如，啟動子)。在一些實施例中，控制表現之一個以上序列(例如，啟動子)用於達成編碼複數個蛋白及/或多肽的複數個重組多核苷酸之所需表現水準。在一些實施例中，複數個重組蛋白及/或多肽自相同載體(例如，雙順反子載體、三順反子載體、多順反子)表現。在一些實施例中，複數個重組多肽得以表現，其中之每一者自個別載體表現。

【0179】 在一些實施例中，包括編碼本揭示案之 Cas 蛋白及/或嵌合系統之重組多核苷酸的載體用於藉由活體外蛋白質合成來表現 Cas 蛋白及/或嵌合系統。

【0180】 在一些實施例中，包括編碼本揭示案之 Cas 蛋白或嵌合系統之重組多核苷酸的能夠表現之載體用於在宿主細胞中表現 Cas 蛋白或嵌合系統。在一些實施例中，能夠提供本揭示案之嚮導及/或供體模板核酸的載體用於將嚮導及/或供體模板核酸提供至宿主細胞。宿主細胞可選自各種可獲得及已知宿主細胞(例如，人類胚胎腎(HEK)細胞、懸浮 HEK293 細胞、中國倉鼠卵巢細胞)，其適合於表現本文揭示之 CRISPR-Cas 技術。

【0181】 將載體引入宿主中之各種方法在此項技術中為已知的。在一些實施例中，載體可使用轉染來引入宿主細胞中。在一些實施例中，轉染例如使用磷酸鈣轉染、脂質轉染、或聚乙烯亞胺介導轉染來完成。在一些實施例中，載體可使用轉導來引入宿主細胞中。

【0182】 在一些實施例中，將載體引入宿主細胞中之後，培養轉型宿主細胞允許表現該等重組多核苷酸。在一些實施例中，轉型宿主細胞培養至少 12 小時、16 小時、20 小時、24 小時、28 小時、32 小時、36 小時、40 小時、44 小時、48

小時、52 小時、56 小時、60 小時、64 小時、68 小時、72 小時或更長。轉型宿主細胞在根據選定宿主細胞之要求的生長條件(例如，溫度、二氧化碳水準、生長培養基)中培養。熟習此項技術者認識到選定宿主細胞之培養條件在此項技術中為熟知的。

用途

【0183】 如本文描述之 CRISPR-Cas 技術具有多種用途，包括例如修飾(例如，缺失、插入、突變、易位、失活、或活化)複數個細胞類型及組織中之靶核酸序列及例如在基於特定高靈敏度酶促報告子解鎖(SHERLOCK)之檢定中，偵測靶核酸(例如，DNA 及/或 RNA)。在一些實施例中，本文所述熱穩定 Cas 蛋白尤其可用於嗜熱有機體中之靶核酸之基因編輯及/或偵測。進一步應用包括但不限於追蹤及標記核酸、富集檢定(例如，自樣品中提取所需序列)、偵測循環腫瘤 DNA、製備下一代文庫、篩檢藥物、診斷及提供疾病及病症之預測、治療各種遺傳疾病或病症、及治療各種非遺傳疾病或病症、或經由調處基因組來增強健康。

基因編輯

【0184】 在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術用於基因編輯。在一些實施例中，基因編輯導致基因沈默事件，或在所需靶基因之表現中的表現之改變(例如，增加或減少)。因此，在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術用於改變由靶核酸來調控或編碼之基因產物之表現水準的方法中。在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術用於修飾所需細胞中之靶核酸的方法中。在一些實施例中，本文揭示之技術提供細胞(例如，真核或原核)中之靶核酸之位點特異性修飾的方法，以便實現所表現基因產物之基因表現或功能的所需修飾。

【0185】 在一些實施例中，本揭示案提供工程化、非天然存在 CRISPR-Cas 技術，其包括：在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas

蛋白；及至少一個能夠與熱穩定 Cas 蛋白形成複合物並且引導複合物結合至至少一個靶核酸的嚮導序列。

【0186】 在一些實施例中，本揭示案提供裂解細胞中之至少一個靶核酸的方法，其包括：使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至至少一個靶核酸的嚮導序列接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一個嚮導序列形成複合物並且在至少一個靶核酸中引起斷裂。

【0187】 在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞中之至少一個靶核酸之表現的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至至少一個靶核酸之嚮導序列接觸，其中 Cas 蛋白能夠與嚮導序列形成複合物並且編輯至少一個靶核酸序列。

【0188】 在一些實施例中，本揭示案提供修飾細胞中之至少一個靶核酸的方法，包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至至少一個靶核酸之嚮導序列接觸，其中 Cas 蛋白能夠與嚮導序列形成複合物並且編輯至少一個靶核酸序列。

【0189】 在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞中之至少一個靶核酸之表現的方法，其包括：使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至至少一種靶核酸的嚮導接觸，其中 Cas 蛋白能夠與至少一種嚮導形成複合物並且編輯至少一個靶核酸序列。

【0190】 因此，在一些實施例中，Cas 蛋白與 SEQ ID No：1-10 中之任一者具有約 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 一致性。在一些實施例中，Cas 蛋白與 SEQ ID NO：1 一致。在一些實施例中，Cas 蛋白與 SEQ ID NO：2 一致。

【0191】 在一些實施例中，本揭示案之方法包含使本揭示案之 CRISPR-Cas 系統與至少一個靶核酸接觸並且實現至少一個靶核酸之裂解。在一些實施例

中，CRISPR-Cas 技術藉由引入雙鏈斷裂來裂解靶 DNA 或 RNA 雙鏈體。在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術藉由引入單鏈斷裂或切口來裂解靶 DNA 或 RNA。

【0192】 在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術包含具有以位點特異性方式修飾靶 DNA 之修飾實體的嵌合系統，其中修飾活性包括甲基轉移酶活性、去甲基化酶活性、乙醯轉移酶活性、去乙醯化酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素連接酶活性、去泛素化活性、腺苷酸化活性、去腺苷酸化活性、SUMO 化活性、去 SUMO 化活性、核糖基化活性、去核糖基化活性、肉豆蔻醯化活性、去肉豆蔻醯化活性、整合酶活性、轉座酶活性、重組酶活性、聚合酶活性、連接酶活性、解旋酶活性或核酸酶活性，其中任何一種都可以修飾 DNA 或 DNA 相關多肽(例如，組蛋白或 DNA 結合蛋白)。

【0193】 在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術包含嵌合系統，該等系統包括可藉由化學修飾核苷酸鹼基來編輯 DNA 序列的一或多個修飾實體，包括可修飾腺苷或胞嘧啶鹼基並且充當位點特異性修飾實體的去胺酶。各種修飾實體在此項技術中為已知的並且可用於本文所述方法及系統中。整個本揭示案中之示例性修飾實體描述於例如 Rees 及 Liu *Nature Review Genetics*, 2018, 19(12): 770-788 中，其內容以引用方式併入本文。

【0194】 在一些實施例中，修飾實體活性導致引入一或多個終止密碼子，以便例如使一或多個基因沈默。在一些實施例中，修飾實體活性導致移除一或多個終止密碼子。在一些實施例中，修飾實體活性導致引入一或多個起始密碼子。在一些實施例中，修飾實體活性導致移除一或多個起始密碼子，以便例如使一或多個基因沈默。在一些實施例中，修飾實體藉由改變胺基酸序列來導致蛋白功能改變。

【0195】 在一些實施例中，本揭示案之 Cas 蛋白藉由與組蛋白融合，後成地修飾靶核酸。在一些實施例中，Cas 蛋白藉由與後成修飾酶諸如讀取、寫入或擦

除蛋白融合，後成地修飾靶核酸。在一些實施例中，Cas 蛋白與組蛋白修飾酶融合以便改變靶核酸之選定區域中之組蛋白修飾模式。組蛋白修飾可以許多不同方式發生，包括例如甲基化、乙醯化、泛素化、磷酸化、及許多不同組合，導致 DNA 結構變化。在一些實施例中，組蛋白修飾導致轉錄抑制或活化。

【0196】 在一些實施例中，本揭示案之 Cas 蛋白經由與轉錄活化蛋白、轉錄抑制蛋白、小分子/藥物反應轉錄調控劑、或可誘導轉錄調控劑融合，增加或減少轉錄，從而調節靶核酸之轉錄。在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術用於控制靶編碼 mRNA(亦即，蛋白編碼基因)之表現，其中結合導致基因表現增加或減少。

【0197】 在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術用於藉由編輯遺傳調控元件諸如啟動子或增強子來控制基因調控。

【0198】 在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術用於控制靶非編碼 RNA 之表現，包括 tRNA、rRNA、snoRNA、siRNA、miRNA、及長 ncRNA。

【0199】 在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術用於靶向工程化染色質環結構。不希望受任何一種理論束縛，調控基因組區域之間之染色質環的靶向工程化提供調處內源性染色質結構並且使得能夠形成新的增強子-啟動子連接以便克服遺傳缺陷或抑制異常增強子-啟動子連接的手段。

【0200】 在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術用於活細胞成像。例如，在一些實施例中，將螢光標記 Cas 蛋白靶向輸送至重複基因組區域諸如著絲粒及端粒以便在整個細胞週期中追蹤原生染色質基因座並且確定 3D 核空間中之轉錄活性及非活性區域的差異定位。

治療方法

【0201】 如熟習此項技術者容易瞭解，在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術可用於各種治療應用中之一或多者中。因此，在一些實施例中，提供治療有需要之個體之病症或疾病的方法。在一些此類實施例中，該方法包

含向個體投與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠雜交至靶核酸之嚮導序列。

【0202】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術可用於編輯靶核酸序列以便修飾靶核酸(例如，藉由插入、缺失、或突變一或多個核苷酸)。例如，在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術包含外源供體模板核酸(例如，DNA 分子或 RNA 分子)，其包含所需核酸序列(例如，酬載核酸)。不希望受任何一種理論束縛，在以本文所述 CRISPR-Cas 技術來誘導之裂解事件消除後，細胞之分子機制可在修復及/或消解裂解事件中利用外源供體模板核酸。替代地或附加地，在一些實施例中，細胞之分子機制可在修復及/或消解裂解事件中利用內源性模板。在一些實施例中，本文所述 CRISPR-Cas 技術用於修飾靶核酸，由此產生插入、缺失，及/或點突變。在一些此類實施例中，插入為無痕插入(亦即，將規定核酸序列插入靶核酸中在裂解事件消除後，不產生額外非預期核酸序列)。

【0203】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術用於治療各種疾病及病症，例如，遺傳病症、單成因疾病、可藉由核酸酶活性來治療之疾病、各種癌症等。在一些實施例中，本文描述之方法用於治療個體，例如，哺乳動物，諸如人類患者。在一些實施例中，哺乳動物個體亦可為馴化哺乳動物，諸如但不限於犬、貓、馬、猴、兔、大鼠、小鼠、奶牛、山羊、或綿羊。

【0204】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術用於藉由插入有益臨床變異體或抑制性突變來校正致病性突變。

【0205】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術用於治療由 RNA、毒性 RNA，及/或突變 RNA(例如，剪接缺陷或截斷)之過度表現所造成的疾病。

【0206】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術靶向影響 RNA 依賴性功能之反式作用突變，該等突變導致各種疾病。

【0207】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術用於靶向破壞順式作

用剪接編碼之突變，該等突變可導致剪接缺陷及疾病。

【0208】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術用於尤其針對 RNA 病毒的抗病毒活性。在一些實施例中，RNA 病毒為例如沙粒病毒科 (*Arenaviridae*)、動脈病毒科 (*Arteriviridae*)、星狀病毒科 (*Astroviridae*)、雙核糖核酸病毒科 (*Birnaviridae*)、博爾納病毒科 (*Bornaviridae*)、布尼亞病毒科 (*Bunyaviridae*)、杯狀病毒科 (*Caliciviridae*)、冠狀病毒科 (*Coronaviridae*)、黃病毒科 (*Flaviviridae*)、絲狀病毒科 (*Filoviridae*)、肝炎病毒科 (*Hepeviridae*)、諾達病毒科 (*Nodaviridae*)、線頭病毒科 (*Nymaviridae*)、正黏病毒科 (*Orthomyxoviridae*)、副黏病毒科 (*Paramyxoviridae*)、小雙核糖核酸病毒科 (*Picobirnaviridae*)、小核糖核酸病毒科 (*Picornaviridae*)、肺病毒科 (*Pneumoviridae*)、呼腸孤病毒科 (*Reoviridae*)、彈狀病毒科 (*Rhabdoviridae*)、或披膜病毒科 (*Togaviridae*) 之病毒。在一些實施例中，Cas 蛋白使用被選擇來靶向病毒 RNA 序列之合適 RNA 嚮導來靶向病毒 RNA。

【0209】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術用於治療個體(例如，哺乳動物個體，例如，人類個體)中之癌症。例如，在一些實施例中，本文所述 Cas 蛋白被程式規劃具有靶向異常(例如，包含點突變或替代地剪接)並且存在於癌細胞中之 RNA 分子的嚮導，以便誘導癌細胞中之細胞死亡(例如，經由細胞凋亡)。

【0210】 進一步，在一些實施例中，本文描述之 CRISPR-Cas 技術用於治療個體中之感染性疾病。例如，在一些實施例中，本文所述 Cas 蛋白被程式規劃具有靶向藉由感染物(例如，細菌、病毒、寄生蟲或原蟲)來表現之 RNA 分子的嚮導序列，以便靶向並且誘導感染物細胞之細胞死亡。在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術治療細胞內感染物感染宿主個體之細胞的疾病。在一些實施例中，藉由程式規劃 Cas 蛋白來靶向藉由感染物基因來編碼之 RNA 分子，被

感染物感染之細胞得以靶向並且誘導細胞死亡。

【0211】 在一些實施例中，本文揭示之 CRISPR-Cas 技術適用於產生細胞供治療性遞送。在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術可用於產生，例如，嵌合抗原受體(CAR) T 細胞、體細胞(例如，造血幹細胞(HSC)、間質幹細胞(MSC))、及永生細胞株(例如，神經幹細胞株 CTX)。在一些此類實施例中，將藉由 CRISPR-Cas 技術產生之細胞投與個體(例如，以便治療病症及/或疾病)。

【0212】 在一些實施例中，本文提供組成物、醫藥組成物、載體、宿主細胞、及套組，其包括本文所述工程化系統之蛋白及/或多核苷酸中之任一者。

旁切活性檢定

【0213】 熟習此項技術者立即認識到本文提供之技術廣泛地適用於達成偵測廣泛範圍之核酸，包括例如來自感染物(例如，病毒、微生物、寄生蟲等)之核酸、指示特定生理狀態或狀況(例如，疾病、病症或疾患例如像癌症或發炎性或代謝性疾病、病症或疾患之存在或狀態等)之核酸、產前核酸等。

【0214】 在一些實施例中，靶核酸藉由包括如本文描述之 Cas 酶及嚮導的檢定來偵測。在一些實施例中，嚮導之結構可影響 Cas 蛋白/嚮導複合物之活性。在一些實施例中，Cas 蛋白/嚮導複合物之結構有助於 Cas 旁切活性之熱穩定性。

【0215】 熟習此項技術者非常清楚已經及正在開發的使用 Cas 蛋白旁切活性之有用偵測(例如，診斷)檢定不斷增長。參見例如，Sashital *Genome Med* 2018:10, 32。此外，熟習此項技術者非常清楚基於 Cas 蛋白旁切活性之「CRISPR/Cas 生物感測系統之詳細分類」最近變得可公開獲得。參見 Li 等人 *Trends Biotechnol.* 37:730, July 2019 之評述。

【0216】 特別受到關注之格式包括基於 Cas13(例如，基於 Cas13a 或 Cas13b)系統，包括所謂「SHERLOCK」及/或「HUDSON」系統(參見，例如，Gootenberg 等人，*Science* 356:438，2017；Gootenberg 等人，*Science* 360:339，2018；Myhrvold

等人, *Science* 360:444, 2018; 亦參見 US10266887)及基於 Cas12(例如, 基於 Cas12a 或 Cas12b)系統, 包括所謂「HOLMES」或「DETECTR」系統(參見, 例如, Cheng 等人 CN 專利檔 CN107488710A; PCT/CN18/82769 及 US 16/631,157; Li 等人 *Cell Disc.*4:20, 2018; Chen 等人 *Science* 360:436, 2018; Li, L.等人 2018 年 7 月 26 日 bioRxiv 線上發佈 [http://dx. doi.org/10.1101/362889](http://dx.doi.org/10.1101/362889); US10253365)。Cas13a 及 Cas13b 酶已被用於 SHERLOCK 及/或 HUDSON 系統中; Cas 12a 及 Cas 12b 均類似。

【0217】 如在此項技術中已知, 並且在本文引用之參考文獻中描述, 利用 Cas 蛋白旁切裂解活性之典型偵測檢定涉及使包括具有旁切活性之 Cas 蛋白及與所關注靶核酸序列互補之嚮導的合適 CRISPR-Cas 複合物與可含有靶核酸之樣品接觸。在識別靶核酸序列後, Cas 蛋白之旁切活性得以活化, 以使得其裂解無關核酸(DNA 或 RNA 或兩者, 取決於酶)。提供相關可裂解核酸之報告子, 其適當地被組配(例如, 經標記)以使得其由於活化旁切活性所導致的裂解可偵測(例如, 將螢光團與淬滅劑分離以使得螢光變得可偵測等)。

【0218】 在許多檢定中, 產生及/或擴增靶核酸序列(例如, 自 RNA 複製至 DNA 及/或例如藉由引子延長、DNA 複製(例如, 藉由聚合酶鏈反應)及/或轉錄來擴增)。參見例如, 上述 Li 評述(Li 等人 *Trends Biotechnol.* 37:730, 2019 年 7 月)之圖 3 及 4。

【0219】 因此, 在許多實施例中, 旁切活性檢定包括以下步驟(1)靶核酸複製及/或擴增; (2)靶核酸結合; 及(3)信號釋放及/或偵測。

【0220】 通常, 將所提供技術應用於一或多個樣品以便評估樣品中之一或多個靶核酸之存在及/或水準。在一些實施例中, 樣品為生物樣品; 在一些實施例中, 樣品為環境樣品。在一些實施例中, 樣品為粗樣品(例如, 初級樣品或經歷最少處理之樣品)。

【0221】 在一些實施例中，對樣品以下處理(例如，核酸部分地或大致上自初級樣品中分離或純化)；在一些實施例中，僅執行最少處理(亦即，樣品為粗樣品)。

【0222】 通常，如本文描述之旁切活性檢定為活體外檢定。在一些實施例中，其可為無細胞檢定(例如，可實質上不含完整細胞，或在一些實施例中，不含細胞碎片)。

【0223】 在一些實施例中，如本文描述之旁切活性檢定對於樣品來執行，該等樣品為生物(例如，血液、唾液、淚液、尿液等)或環境(例如，土壤、水等)初級樣品或自該等樣品製備。

【0224】 在一些實施例中，核酸偵測及靶結合步驟在單一容器中執行；在一些實施例中，靶結合信號釋放步驟在單一容器中執行；在一些實施例中，(1)靶複製及/或擴增；(2)靶結合；及(3)信號釋放及/或偵測之步驟在單一容器中執行；在一些實施例中，所有步驟在單一容器中執行，亦即，所提供改良檢定為一鍋檢定。

【0225】 在一些實施例中，如本文描述之經改良旁切活性檢定為活體外檢定。在一些實施例中，其可為無細胞檢定(例如，可實質上不含完整細胞，或在一些實施例中，不含細胞碎片)。

【0226】 在一些實施例中，如本文描述之經改良旁切活性檢定對於樣品來執行，該等樣品為生物(例如，血液、唾液、淚液、尿液等)或環境(例如，土壤、水等)初級樣品或自該等樣品製備。

醫藥組成物

【0227】 在一些實施例中，本揭示案尤其提供包括本揭示案之 CRISPR-Cas 技術的醫藥組成物。在一些實施例中，醫藥組成物包含在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一個能夠與熱穩定 Cas 蛋白形成複合物並且引導複合物結合至至少一個靶核酸的嚮導序列。在一些實施例

中，醫藥組成物進一步包含供體模板核酸。

【0228】 在一些實施例中，醫藥組成物包含可表現及/或提供本揭示案之 CRISPR-Cas 技術的載體或載體系統。

【0229】 在一些實施例中，本揭示案之 CRISPR-Cas 技術藉由與合適醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑組合來配製成醫藥組成物。

【0230】 在一些實施例中，本揭示案之 CRISPR-Cas 技術在醫藥學上可接受之媒劑中配製成醫藥組成物。在一些此類實施例中，例如，醫藥學上可接受之媒劑可為藉由監管機構批准之媒劑。

【0231】 在一些實施例中，媒劑係指與本發明化合物一起配製以便投與個體的稀釋劑、佐劑、賦形劑、或載劑。在一些此類實施例中，醫藥媒劑可為脂質，例如，脂質體，例如，脂質體樹形化合物；液體，諸如水及油，包括石油、動物、植物或合成來源之油，諸如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及其類似油，鹽水；阿拉伯樹膠、明膠、澱粉糊、滑石、角蛋白、矽膠體、尿素、及其類似物質。在一些實施例中，使用輔助、穩定、增稠、潤滑及著色劑。在一些實施例中，醫藥組成物配製成固體、半固體、液體或氣體形式之製劑，諸如錠劑、膠囊劑、散劑、顆粒劑、軟膏、溶液、栓劑、注射劑、吸入劑、凝膠劑、微球、及氣溶膠。

【0232】 在一些實施例中，投與本文所述 CRISPR-Cas 技術可以不同方式達成。在一些實施例中，投與包含經口、經頰、直腸、非經腸、腹膜內、皮內、經皮、氣管內、眼內等投與。在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術可在投與之後為全身性的或可藉由使用區域性投與、壁內投與、或使用用於將活性劑量保持於植入位點處的植入物而為定域的。在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術經配製以達成即刻活性或其可經配製用於持續釋放。

【0233】 在一些實施例中，治療方法包含治療中樞神經系統之疾病或病症。

在一些此類實施例中，可能需要將 CRISPR-Cas 技術配製成橫越血腦障壁(BBB)之醫藥組成物。例如，在一些實施例中，藉由諸如甘露糖醇或白三烯之滲透手段，或在生化上藉由使用血管活性物質諸如緩激肽，穿過血腦障壁(BBB)之藥物遞送必然伴有破壞 BBB。在一些實施例中，使用 BBB 開口將 CRISPR-Cas 技術靶向輸送至大腦。在一些實施例中，當組成物藉由血管內注射來投與時，BBB 破壞劑與本發明之治療性組成物共同投與。在一些實施例中，使用橫越 BBB 之其他策略，例如，使用內源性傳送系統，包括小窩蛋白-1 介導胞吞作用、載體介導轉運蛋白諸如葡萄糖及胺基酸載體、胰島素或運鐵蛋白之受體介導胞吞作用、及活性流出物轉運蛋白諸如 p-糖蛋白。

【0234】 在一些實施例中，CRISPR-Cas 技術藉由局部遞送，例如，藉由鞘內遞送來遞送至 BBB 後面。

【0235】 在一些實施例中，提供有效量之包括 CRISPR-Cas 技術的製劑。在一些實施例中，待投與之如本文描述之醫藥組成物之有效量或有效劑量之計算在熟習此項技術者之技能內，並且對於熟習此項技術者而言為例行程序。在一些此類實施例中，待投與之最終量取決於投與途徑及待治療之病症或疾患之性質。

【0236】 在一些實施例中，給予特定患者之有效量取決於各種因素，其中一些因素在各患者之間為不同的。有能力的臨床醫生能夠根據需要來確定投與患者以便停止或逆轉疾病病狀進展之醫藥組成物的有效量。例如，在一些實施例中，使用 LD50 動物資料，及藥劑可利用之其他資訊，臨床醫生可根據投與途徑來確定個體之最大安全劑量。在一些實施例中，例如，在投與治療性組成物至其中之流體更大的情況下，靜脈內投與劑量可超過鞘內投與劑量。在一些實施例中，醫藥組成物以更高劑量，或以重複劑量投與，以便保持治療濃度。使用普通技能，有能力的臨床醫生能夠在常規臨床試驗期間最佳化特定醫藥組成物之劑量。

【0237】 在一些實施例中，取決於所需調配物，醫藥組成物包括醫藥學上可接受、無毒載劑稀釋劑，其定義為通常用於配製醫藥組成物供動物或人類投與的媒劑。在一些實施例中，稀釋劑被選擇來不影響組合之生物活性。在一些此類實施例中，例如，稀釋劑為蒸餾水、緩衝水、生理鹽水、PBS、林格氏溶液、葡萄糖溶液、及漢克溶液。在一些實施例中，醫藥組成物包括其他載劑，佐劑，或無毒、非治療性、非免疫原性穩定劑，賦形劑及其類似物質。在一些實施例中，醫藥組成物包括模擬生理條件之額外物質，諸如 pH 調整及緩衝劑、毒性調整劑、濕潤劑及清潔劑。

【0238】 在一些實施例中，醫藥組成物包含各種穩定劑中之任一者，諸如抗氧化劑。在一些實施例中，其中醫藥組成物包含多肽，多肽與各種熟知化合物複合，該等化合物增強多肽之活體內穩定性，或另外增強其藥理學性質(例如，相對於合適參考標準，增加多肽之半衰期、減少其毒性、及增強溶解性或吸收)。無限制地，此等修飾或複合劑之實例包括硫酸酯、葡糖酸酯、檸檬酸酯及磷酸酯。在一些實施例中，包括組成物之核酸或多肽的醫藥組成物可與相對於合適參考標準，增強其活體內屬性的分子複合。此等分子包括例如碳水化合物、聚胺、胺基酸、其他肽、離子(例如，鈉、鉀、鈣、鎂、錳)、及脂質。

【0239】 在一些實施例中，用於配製高純度之醫藥組成物的組分實質上不含潛在有害的污染物(例如，至少國家食品(NF)級，通常至少分析級，並且更通常至少醫藥級)。在一些實施例中，預期用於活體內使用之組成物為無菌的。在一些實施例中，只要給定醫藥組成物必須在使用之前合成，所得產物通常實質上不含可在合成或純化過程期間存在的任何潛在毒性劑，尤其任何內毒素。

【0240】 在一些實施例中，投與醫藥組成物用於預防性及/或治療性治療。在一些實施例中，醫藥組成物之毒性及治療功效根據標準醫藥程序，諸如在細胞培養物及/或實驗動物中確定，包括例如確定 LD50(對於 50%群體致死之劑量)

及/或 ED50(在 50%群體中治療有效之劑量)。

套組

【0241】 在另一態樣中，本揭示案提供含有以上組成物及方法中揭示之任何一個或多個元件的套組。在一些實施例中，套組包含如本文描述之載體及/或載體系統。在一些實施例中，套組包含如本文描述之 CRISPR-Cas 技術之一個或多個組分，諸如 Cas 蛋白、嚮導、供體模板核酸及/或編碼或提供該等組分之多核苷酸、載體，及/或載體系統(例如，DNA 或 RNA)。在一些實施例中，套組包含使用套組的呈一或多種語言之說明書。在一些此類實施例中，說明書針對本文所述特定應用及/或方法。元件可個別地或組合提供。套組可提供於任何合適容器中。在一些實施例中，合適容器為例如小瓶、瓶子、或試管。

【0242】 在一些實施例中，套組包含在使用本文所述一個或多個元件之過程中使用的一或多種試劑。試劑可提供於任何合適容器中。例如，在一些實施例中，套組提供一或多種反應或儲存緩衝劑。試劑可以在特定檢定中可用的形式，或在使用之前需要添加一或多種其他組分形式(例如，濃縮物或凍乾形式)提供。在一些實施例中，緩衝劑不限於特定緩衝劑；在一些實施例中，緩衝劑可為任何緩衝劑，包括但不限於碳酸鈉緩衝劑、碳酸氫鈉緩衝劑、硼酸鹽緩衝劑、三羥甲基胺基甲烷緩衝劑、MOPS 緩衝劑、HEPES 緩衝劑、及其組合。在一些實施例中，緩衝液為鹼性的。在一些實施例中，緩衝劑具有約 7 至約 10 之 pH。在一些實施例中，套組包含一或多個對應於嚮導序列之寡核苷酸，用於插入載體中以便將嚮導序列與調控元件可操作地連接。在一些實施例中，套組包含同源重組模板多核苷酸。在一些實施例中，套組包含一個或多個載體及/或一個或多個本文所述多核苷酸。套組可有利地允許提供本發明之系統的所有元件。

範例

實例 1：示例性熱穩定 Cas 蛋白候選物

【0243】 本實例描述某些熱穩定 Cas 蛋白候選物。

【0244】 表 1：熱穩定 Cas 蛋白之示例性序列。

SEQ ID NO:	Cas 酶	推定序列
1	Cas12a	MKSLAQFQONLYALQKTLRFELKPEGHTRETfNRWLEEIEKE QASENENIVYQDLLRAKKYEEKIKIILDEYHKDFIEQALAYAN LLELEKYEELYRKSNRTSEEEEFENTKESLRKQIANIFIKNP NKTVQERWKFLFSKKLIQNELIVWVKGNIELLSEKLKNEFP DESSIISTIEDFKYFTTYFRNYHENRKNLYSNEDKFSTIAHRLI HENLPKFIDNIAIYQKAKAVLNINEVEKELGLPEDTLDKIFSL DFFSKALTQKGIDQYNYFLGGKTENEVKKIKGLNEFINLYN QQQQDKNQRLPFLKVLYKLPLFERTSTSFRFEPIENDRDIE RIGKFYYNDLKQYRDDSQGDTTDILSGINTLLRHVHDYRDG LYVNGGITLTQISQKIFGSWSYINNALAYFYDTYIDASGV DH QGERKPKKQKQIQEKTWLVKQKQFPVILVEKALSEYKSIET NEDLKTRISDTTLCDFFKRCGNDDNGQDLFDRIEARLREKN EEGYSLEDLLKKEFTTERKLMQDKTKTLLIKNFLDVIQGDK DDITAGLLHFVKCLIPRTEISEKNELFYSGMEKYLNLSEVTP LYNKARNYLTQKPYSIEKVKLNFENSTLLDGWDENEESDNS CVLLRKRGGYYL GIMNKKHNMIFDRKIYPKATEGEAYYEK MIYKLLPGAYKMLPKVFFSEKNIDYFKPSEEILRIRNTASYS KNGQPQEGYQKASFSIEDCRKYIDFFKKCIANHWDWQKFN FNFSPTEYYQSIDEFYREIERQGYKIDFVKIPESYNQLIKENK LYLFKIYNKDFSEKKKSKGKDNLHTLYWKMLFDEKNLKD V VLKLNGEAEVFFRQKSILYNEEIWNKGHHYSELKDRFSYPII SNKRYAEDKFFLHVPITLNFKADGINNVNMMVNEFIKDNRD IHIIGIDRGERHLLYVSVINQKGDIVEQCSLNEIVTEYNGKIFK KNYHEELDNLEKERDRARKDWQTIANIKELKEGYLSHV IHK ISKLILKYNAIVVMEDLNSGFKRGRQKVEKQVYQNFEKQLI EKLNYLVLKESNVDEPGGVLRAYQLANKFETFKKL GKQSGI IFYVPAAYTSAIDPVTGYIQYLYPLKQADSVEKARKFY SQFK RISYNPHKQWFEFSFDYNDFNIIYHGKSSWTICTTNTERYM WNRLLNNGHGGEELVYVTNELELLFGEYNIYGDGKDIKQQ ITDVQDIDVDRTAKQFYKRINELLNLTLKLRHNNGKKGADE EDYILSPVEPYFDSRFESRKPSMQQTL PINADANGAFNIARK GLLLERLNQLGVVEFEKTKKSNNKKTQWLPHELWVEY AQ NHTRK

2	Cas12a	MQDKTGWSSFTNKYSLSKTLRFELKPVGNTQKMLEDGDFV QKDRERQENYKKVKPFMDKLRHREFIKEALNNLKLEGLTEY FEIFKKFRKDKNNKELKNAEKKLRQIIGRCYTETAQIWVEK YKEFGFKKKNIGFLFEEGVFELMKLYGNDEASQIEKNGEV LSIFDGWKGFLGYFKKFFETRNNFYKDDGTSTAVSTRIINEN LKIYLDNLIKYNKIKDKVDFKEADILQENKLNLSDFNFVESY AKYSLQKGIDYYNEILGGKTLKNGTKLKGLENEVINEYKQK
		NKSGELSKFKMLKKQILGEGEDRTLFEIENEDELKDVLKD FFYNADPKITLFTLLEDDFFSNTEKYKDELDKIYFNTVAINGI LHRWVDDSGVFQKYLFEVLKSNKLVKSNHYDKKEDSYKFP DFISFEHIKVALENCERDGLKDKFWKEKYTKECLTENGLA NLWQEFLEIYKCEFKKLYDYKTDDNDCYLQYRDNYKKYIL DANFNPKEKSAKDIIKDYLDVLSIYQLAKYFALEKKKVWT TDYETGDFYYEYIKFYEDTYEQIIPYNLVRNYLTRKPINTA KKWKLNFDNAYLASGWDKDEVSNTLVILRRDEQYYLAI MKKGKNKIFEKKFSCGEFEKMEYKQIAEASSDIHNLVLMND GSCRRCIKMHDKRKYWPLDISIIKEKKSYAKENFVRRDFERF VNYMKKCSLLYWKEYDLKFSDTSTYKNINDFTNEIASQGY KLSFSAIPESYINEKNNNGELYLFQIYNKDFGIKTEGNKNLH TMYWESIFSEENRFRNFIVKLNKGAEIFYRPKSEQVEKEQRN FTREIKNRRYTENKIYFHCPTLNRISRENVKKFNNGINNYIA TNPINILGVDRGEKHLVYYAIVDQDQGLIDAEDATGSFNTI GSTDYHRLLEEKAKDREKERKDWDLIRGIKDLKKGYISLVV RKIADLAIKYNAIIIFEDLNTRFKQIRGGMEKSVYQQLEKALI NKLSFLVNKGEKDPEQAGHLLKAYQLAAPFQTFDKMGRQT GIIFYTQASYTSKIDPITGWRPNLYLK YRNIDDSKESIKKFKSI LFNKEKNRFEFTYDLKDFVDFEEDKIPEKTEWTLCSSVERH KWNRMNNNNKGGYEVYKDLTENFYKLFDENNISMNKDIV DQVESISNGNFFRQFIYLFNLVCQIRNTDEKAEDVDKRDFIL SPVEPFFDSRRAKDFKAYGDNLPKNGDENGAYNIARKGVLI KKIKEYYNQNGSCDKLGWGDLSISHKEWDDFATNN
3	Cas12a	MDSYEQFTKLYPIQKTIRFELKPQGRTKEHFDNSNFLEKDRE RDDNYKILKEVIDDYHREFIDECLSNIQLNWDDLKKFSEEYR RSKEKKNNRDSESEQKRMSTTSETRAINKNKNLEAEQKRM GEIVSAFKKDDRFBKHLFSEKLF SILLKNQIYEKGTLEEIEAFD

	CFNKFSGYFKSFHENRKNMYSDEDEKETAISYRIINENFPKLL DNFEKYQYVCREYPEQIREAESTLAEAGCYIKMDEIFSIDNF NNVMMQGGKESGISRYNLAIGGIVQGTGEKPKGLNEFLNL AYQNEPNGRKKIRMEPLYKQILSKEESFSYRLEAFTDDSQLL SAIRSFFDIVEKDKNGNIFDRAVNLMSFSNYDTSKIYIRKAY LNQVSKEIFGYRGKSDSKPAKTADESLNKSGGWEKLGQML RDYKADSIGDRNLEKTCKKVDKWLDSDFTLSLILGAISLA GSNETFEAYVSEICVARRNIDKEKEKEKNINVEKISGDTSIQ IICALLDVQEFFHLLSPFQLHPNTPHDWTFYAEFNDIYDKL SAITPLYNQARNHLTKKNLDTSKIKLNFNNPTLANGWDVN KEYENTAVILIRDGKYLLGIMNPKNKRKIKFDEGSGAGPFY QKMVYKLLPGPYRMLPKVFFAKKNIDYYNPSQEIREGYKA GKHKKGKEFDKGKFCHKLIDFFKESIQKNENWKVDFKFSPT ESYDDISEFYQEVEKQGYRMYFVNIPSDTIDRYVEGGDMFL FQIYNKDFAKGAKGNKDMHTLYWNAVFSEENLQKGVMKL SGEAELEFYRKKSDIKDPPHREGEILVNRTYIDRTHVSGVMGE QNTVKESRIPVPDEIHKNLFDYYNHGRELTKEEKEYCDKVG SFKAYYGIVKDRRYLENKMYFHVPLTLNFKAIGEKRINKMA IEKFLTDENACIIGIDRGERNLLYYSIIDRNGKIIDQKSLNVID GFDYHEKLSQRQTEREVARQSWNSIGKIKDLKEGYLAKAV HEISKMAIKYNAIVVLEDLHFGFKKGRLKVEKQIYQKFEEM LINKLNYLVFKDVSDSSDAGGVLNAYQLTAPLESFSKLGKQ SGILFYVPAAFTSVIDPTTGFDVDFNSSSITSTQKKKEFLQRF SIVYSARDGGIFAFTFDYRNFSKIATDHRNMWTVYTHGERI RYVRDEKCYKTTDPTKRIKEALSGIEYDDGSDIRDKITQSGD NNLINTVYHSFMDTIKMRNKDGRIDYIISPVKNRNGEFFRSD YKHRDFPVDADANGAYHIALKGELLMRMIGKTYDSNSDK MPKLEHKDWFEFMQTRGDQ
--	---

4	Cas12b	MCVSRLPWFNITLTGKLNQRQLNQMCVSRLPWFCTPKGQL AATPKTVVAQQENAMLAIRDVHEAAPADLKTVAQRLEPG YFVTQFPKQQMTGDEARAEALFAACQKKFKELAEYEDG YRQCLDALGPNLSLPRLGKPKGAYPYAVVFKLMPTNATW ECFKRVTASLYKRAQKGVVSPVSADSIADVVRTNDEPLFEYF TNLALVRPPGNKDRAVWFEFDLAAFIEAIKSPHQFFQDTIKR EQAVAQIKAKLDAMDGGQGRAASGEEDALPGFEGDDRITLL RELVTDTLGYLAEADASTSPGGKIEYSIQERTVIRGFAEVKRR WRDLVEKGKATEDALLKVLAEEQTEHRDDFGSATLYRELA KPKFQPIWRDPGTQPWHADDPRAWLEYRELGRELEDKQR PIRFTPVHPVHSPRFFIFPKKKGGGRFGTVHEPGQLRVMAGI VAQTQHGWEVPVVRITYAAPRLRRDQLRDDVETDLESRPW LQPMMQALGLPEPDTADFSNCRVTLQPSAPDDIQLTFPVDV SADKLTTAIGKAARWAKQFNLFDPDGNFYNASLRWPHEKK PSKPPVPWHEALDNFSVLAADLGQRCAGAFARLEVRANDD FAGKPSRFIGETPGKKWRAALVAAGMLRLPGEEQTVWRPG ATGPNFHTELSGSRGRMARPHEADDTADLLRAFDCEESLM PADWRTSLSFPEQNDKLLVAARRYQSRLARLHRWCWFLTD EKKRQTALDEIREAEDMPAADDPQLTDKLRALLQKQAAL PGLLVRLANRILPLRGRSWQWETHPKADCHLLTQTGPALP DVWIRGQRGLSMQRIEQIEELRRRFQSLNQMQRREIGGKPI RRDDSDPDCCPDLLDKLDQIKEQRANQAAHMILAEALGLRL APPPADKRQLRASRDVHGQYVKSREPVDVIEDLSRYRSSQ GRAPRENSRLMKWCHRAVRDKLRELCEPFGIPVVETPAAYS SRFCSSRGVAGFRAVEVGPGFDREFPMMMLKDREDEGEVP RQLILQVATLNQGRDGKPPRTLLAPLAGGPIFVPIVDKLNGA DIQPALAQADINAAINLGLRAIADPRLWSIHPRCRTQRQGDQ MLTREKRKFGETGQPLAVHRADGVKPDDTRNPNFFADISGS LPAWESATLDGQHLLSGRCLRSEIKKRQWQRCAEINDRRMN RWMKGE
---	--------	--

5	Cas12b	MTELQTQRAYTLRLKGIDEKDQSWRDALWKTHEAVNKGA KVFGDWLLTLRGGLDHTLADAEIPGEKGKPDRAPTQEERK HRRILLALSWLSVESERGAPEEFIVATGKEPAATRNDKVIAA LKDILRGRNLTEEKISEWTEVCTPSLSAAIREDAVWVNRSRA FDEAVKRIGSSLTREEVWDMLECFFGSRNAYLAPVKISEDES SDGEQEEKAKDLVQKAGQWLSSRFGTGEGADFAKMAAVY AKIAAWAGNAQAGTTGNEVINNLATALREFTPKSNDLKGV LDLISGPGYKSATRNLKQIANTKTVTREDISKLQETAGEDS EECATKTGSKGKRAYADAILKDVESVCGFTYRIDKDGQPVS VADYSKYDEDYKWGSSRHKEFAVMLDHAARRVSLAHTWI KRAEAERRKFEEDSKKIMQVPQAAKDWLDAYCAQRSEASG ALEPYRIRKRAIQGWKEIIASWNKPDCKTAEDRIAAARQLQ DDPEIEKFGDIQLFEALAEDDAQCVWKKEDGTLDPEILINYT LASEAMFKKQHFKVPSYRHPDAFLYPVFCDFGNSRWELDFS IREAATKLKEIEAKIEKQRQEVHKVQQALEKCENDEKRPKM EERLKEAQKKLQESQNYGEYLHSNNKITMVLFDGTFVKKHI FAWQSKRLTKDLALYQEPSADPKNVVS RADRLGRAVASVG INDAVKVAGLFEQENWNGRLQAPRQQLEAIAQYVEKHGW DNKAEMRASIKWFITFS AKLQSKGPWNEFARKHGLKEDP HYWPHA EK NENRTAHSRLLSRLPGLRVLSVDLGHRYAAA CAVWEALGSEAFKKDIEGKRIIRGDTDENALYCHTEHEANG KKHITIYRRIGADTL PDGAHHPAPWARLDRQFLIKLQGEDE QAREASNEEIWKVHQLENTLGRRTPLIDRLIAGGWGYTEKQ KARLEVLTNLGWCPTNKT DNQEEGDEEETAILSKPSLLVDD LMFSAVRTLR LALKRHGDRARIAHYLITDEKTKPGGVKEKL DKNGRVELLLDALGLWHDLFSSPGWHDEKAKQLWNAYIA GLLPEGELQQA KSVTTSAALGGQQKKEKKEKLRAVAEALY LNSDLCHSLNEVWRKRWEEDDKQWRIYIRWFKDWIMPRG ANAKSPAIRHVGGLSLTRLATLTFERRKVQVGFFTRLHPDG TKTETREDFGQKTLD TLEHLREQRVKQLASRIVEAALGIGSE DKRHWDGKKRPRQRIADPRFVPCHAVVIENLTHYRPEETRT RREN RQIMEWASSKVKKYLSEICQLHGLHLREVSAAYTSHQ DSRTGAPGIRCQDVSLIEFMKSPFWRKQVAQAEKKQKEGK GDAVERYLCELNQKWKGASEEEWRKAGFVRIPLRGGEIFV SAAGHDSPA AKGIHADLNAAANIGLRALLDPDWSGKWWY VPCNSSTMCPARDKVTGSAAVNPGQPLQVSAQLESDDAAK DTKKRKKKGDGKSKEIINLWRDISSYPLEDTRGGTWSNKT VYWNRVQSNVVHILQNQMKG
---	--------	--

6	Cas12b	MPETTQRAYTLRLQGHDPKDASWREALWKTHEAVNRGAK AFGDWLLTLRGGLDHSLADEGAPGQTPTEEQRKQRRILLAL SWLSVESENGAPQEYTVPHDRDNESGARQNWKTREALREIL KNRGC RDDEIESWCHDCEPSL TSAIRKDAVWVNRSKAFDN AVQSIPNFSREEIWDLLG CFFVSSQAYLAPLESPKDDKPDAS KKDSSKDLIQSAGQWLSRRFGRGKGLNFARLAETYEAIAR WASVANPGDTNDLIADLAKTLNAETPELDGILKVVS GPGHK SKTRNLLRSLSAVNHITKDTLQRLKDTANEDAKKAKLKKG EKGHRAYAYKVLEAVEDACGFTYLQEGDRAKHCEFAVML DHAARRVSSLHTWIKRAEAERRRFEIDTKKKDQLPPSVKEW LDTYCQKRSKETGAVEPYRIRRG AIEGWKEIVEAWSKAGTT TAEDRKHEARRLPDNP HIDKSGDIKLFEDLALEDALPVWHA NGDPNPPDPQLLIDYVEGSEAEFKKRAFKVPTYCHPDPLV HPVFCDYGCSRWNVSFAIQPVKKQKLSSEEKLPAGLLDL LHGTAIRPVALRWQSKRFARDLALNTTDSSDKPNEVTRADR FGCALAKCPSSQKIRIRGLFEEKYWNGRLQAPRPELTALAK RVAKYGWDKKARKLRNSL NWFITFSANLRPSGPWEEYTKY AEKAFSSNASAKPSVSRGGFWVHASPNKRGKMAQLRLCR LPELRVLSVDLGHRYAAACAVWETLSKSAFEQEIHERKILR GGTGPNDLFCHTQHDTNGQSKVTIYRRIGADTL PNGTPHPA PWARLDRQFLIKLPGEEREARKASPTELANVEKLEKELGLK TSENRVKRIDDLMSDTLRTVRQALRRHSLRARIAFNLATLR DQSDGDEESQSKQKRDTRWNNTVKIWHSLLESNEWTDDW AKALWDELGPLSDPQKADDAEWLKLAAEFYTRWQEDEQ TWRERLRWLRRWILPRGSQAASQKGSIRHVGGLSLTRLATI KTLYQVLKAYHMLKPDNSRKNIPAE GDEALQNFGQKILD DLEHMREQRVKQLASRIVEAALGLGRMKQVTIGKDPKRPR EPVDQSCHAVVIENLTHYRPEKRQTRREN RQLMDWSAAKV KKYLKECCQLHGLHLVEVSASYTSRQDSRTGAPGIRCQEV LTDFLKKNFWREQVKQAKQRLSEGKANARDRYLCQLNER WGNAPAPVTQTAIRLRIPLNGGELFVSADQNSPASKGIQAD LNAAANIGLRAITDPDWPGAWWYVPCEANTFKPVKDKVA GSAAIDSNVSLKKDSPNSEK PASDRKSRTSKSMINLWCDTSS KSLSEKDQWQESAPYWEDVAARTINILQASLACSTTNSQ
7	Cas12a	MKSLAQFQNLIALQKTLRFELKPEGHTRETFNRWLEEIEKE QASENENIVYQDLLRAKKY EKIKIILDEYHKDFIEQALAYAN LTELEKYEELYRKS NRTSEEEEFENTKESLRKQIANIFIKNP NKT VQERWKFLFSKKLIQNELIVWVKGN YELLSEKLKNEFP DESSIISTIEDFKYFTTYFRNYHENRKNLYSNEDKFSTIAHRLI HENLPKFIDNIAIYQKAKAVLNINEVEKELGLPEDTLDKIFSL DFFSKALTQKGIDQYNYFLGGKTENEVKKIKGLNEFINLYN QQQQDKNQRLPFLKVLYKLPLFERTSTSFRFEPIENDRDLIE RIGKFYYNDLKQYRDDSQGDTTDILSGINTLLRHVHDYRDG LYVNGGITLTQISQKIFGWSYINNALAYFYDTYIDASGV DH

		QGERKPKKQKQIQEKTWLVKQKQFPVILVEKALSEYKSIET NEDLKTRISDTTLCDFFKRCGNDDNGQDLFDRIEARLREKN EEGYSLEDLLKKEFTTERKLMQDKTKTLLIKNFLDVIQGDK DDITAGLLHFVKCLIPRTEISEKNELFYSGMEKYLNILSEVTP LYNKARNYLTQKPYSIEKVKLNFENSTLLDGWDENEESDNS CVLLRKRGYYYLGIMNKKHNMIFDRKIYPKATEGEAYYEK MIYKLLPGAYKMLPKVFFSEKNIDYFKPSEEILRIRNTASYS KNGQPQEGYQKASFSIEDCRKYIDFFKKCIANHWDWQKFN FNFSPTEYYQSIDEFYREIERQGYKIDFVKIPESYINQLIKENK LYLFKIYNKDFSEKKKSKGKDNLHTLYWKMLFDEKNLKD VLKLNGEAEVFFRQKSILYNEEIWNKGHHYSELKDRFSYP SNKRYAEDKFFLHVPITLNFKADGINNVNMMVNEFIKDN IHIIGIDRGERHLLYVSVINQKGDIVEQCSLNEIVTEYNGKIF KNYHEELDNLEKERDRARKDWQTIANIKELKEGYLSHVIHK ISKLILKYNAIVVMEDLNSGFKRGRQKVEKQVYQNFEKQLI EKLNYLVLKESNVDEPGGVLRAYQLANKFETFKKLKGQSGI IFYVPAAYTSAIDPVTGYIQYLYPLKQADSVEKARKFYSQFK RISYNPHKQWFEFSFDYNDFNIIYHGKSSWTICTTNTERYM WNRLLNNGHGGEELVYVTNELELLFGEYNIIYGDGKDIKQ ITDVQDIDVDRTAKQFYKRINELNLTLKLRHNNGKKGADE EDYILSPVEPYFDSRFESRKPSMQQTLPINADANGAFNIARK GLLLERLNQLGVVEFEKTKKSNNKKTQWLPHELWVEYQA NHTRK
8	Cas12b	MAYQNGKEQPTVTNQRAYTLRLSGTNDQDSIWRNRLWHT HEAVNKGAKTFGDWLLTMRGGLCHTLAEADVPGKGNKPA RHPTPQEIRSRRVVLALSWLSVESQHGAPERHLVSHDLDIAT GERKNWKTVEALREILHGRCLCKELIDEWANDCRDSLSATI REDAVWVNRSKAFDLAACKIGASLTREELWDFLQPFFANK

	HGYLQMDTVAGVTNGDSETDAEEAKEDSSEEKAKDLSQK AGQWLSSRFGTGTGADFSRFSKVYEVLAARCGSVAVGVSG VEAIRILAGTLADFSPGSNDIEGMLGLMSGPGYKSATRNILQ KINTLQTVSQQDLDRLEASEKDALQSKQKVGGKGSRPYA NAILQDVEAACGICYAGTGESPARHWQYAVILDHAARRVS MAHSWIKRAEEQRSKFEIEKDKLDHVPKDALAWLDAFCAR RSSESGASDAYRIRRSVDGWKQVVAWAALPPKPENQGS ELLSDAESARIQAARELQDTVEKFGDIQLFEALSLTGAKCV WQPDGRPDAQPLLDYVAGTDAISKKQRFKVPAYRHPDALL HPVFCDFGNSRWNNYAIHRAPEKLTPAQQLLEKKKAEIDK AELTLAKAGDAAKQANISEKINGLRAAFIQQQEKVAWLNS RHAMTMSLWDGTHIEDTPLIWQSKRFGSDIGQPVEAQPLPV SRADRFGRAVALAQDNVPVIPSGLFDLSDWNGRLQAPRRQ LEAIAAIRDSAKLSVNEKQQLVAKRIQSIRWLLTFSAKLQSH GPFIAAQAQHGFWDWRYGAHGPENKSRQGLAKLILCRLPGLR ILSVDLGHRYAAACAVWETLNAGQIQKACLDAGKEAPGPC TLYLHLKQIANGKEKKTIFRRIAADTLPDGSPHPAPWARLD RQFLIKLQGEDRDARLATSEEIAAVEQMENELGVVRQLKRK GRELLVDELMSDALRTLRLGLRRHGVRRARIAFNLTANKRIR PGGKEEVLDQEGRVLLLTETLLAWYELYTAERWTDEPARE LWNRHIQPLLGATILQNTVNQEDTPSAAKRRKLREETSGKL KHVAEEIAKNDSLRCRQLHVLWSAQWQTEDVIWRTRLRMM RRWLLPRGVKRNAQLRISIRDVGGLSLTRIASFKSLYQVQK AYQMRPHPEDPRLNIPERGDSRLENFGQRVLDAMERMREN RVKQLASRIAEAAALGIGGETGISSKDGSQKKRPTERSSDPRF APCHAVVIEDLTHYRPDETQTRRENRLMSWSSSKVKKYL GEACELNGLYLREVSPAYTSRQDSRTGAPGLRCNDVTVVEF NNSPFWRKQVGAAEKNQKEGNKGDARERYLLSIEEGIRGA ANDRDIFRIPVKGGEIFVSACITDGGNNAKKNAPPGLQADLN AAANIGLRAIFDPDWEGRWWYIPCDAAATLCPDAKKFIGC KAVDPTKPLRVVAEEGAISASGIGSKKSGRKKNAATDGTRI VNLWRDPSGAPIHRDVLRSP EWQDYAGYWNEVQHRVIRNL KTCYEQTSQQEDPFVSQDADKPF
--	--

9	Cas12b	MKRLAETALADKVKCETNSRPKGERAYANSILHDVESACG FTYRVDKGEQVPVSDYSHYANDYRWGPANHSEFAVMLD HAARRVSLAHTWIKRAEAERRQFEENAKKIDKVPKVAREW LDSLCAERSIVLGALEPYRIRRAVDGWKHVVAAWSKSDC KTAQDRITAARLLQEDPEIDKFGDIQLFEALAEDHAVCVWQ RDGEAGKTSDPQLLDYALAAEAEFKKRHFVKPAYRHPEAF WHPVFCDFGQSRWKICFDVHKNRQSRRQRACANRISRKICF DVHKKRQTLRLSLEVWTGSKMLDMPLCWQCKRLARDLAL GQDHHKKDRSCQVTRADRLGRAVSNVARNQEVQILGLFEQE YWNGRLQAPRPQLEALGRYIEKHGWDAKAQKSCRAIRWM ISFSPRLQPAGPWGKFAEKLQLNPNPKYWPHAEDNKDRGSR SKLILCRLPGLRVLSVDLGHRYAAACAVWEAVDAEQVKEA CQAAGHREPNENDLYLHLKKRTTKQKKGSQGVVEETTIYR RIGADTLPDCTPHAPWARLDRQFLIRLQGEEDEARAASNE EVWAVHKLEAELGRTIPLIDRLLGAGWGQTEKQKARLKAL RELGWTPANKCQAFNSTDETELRRPSLAVDELMLDAVGTL RLALKRHGDRARIARYLITDERTKPGGVKEKLDENGRIELL QDALIIWHGLFSSPRWRDDAAKQLWNEHIAKLVG EQNLVE VSEDASGSE RRTKQKQNREKLREAAKALVDDVALRQALHD MWKRRWEEEDREWRRRLRWFKDWVLP RREQARKAYS RP AETGSSSHPKRRARYAAIRRVGGLSLTRLATLTFERRKVQV GFFTRLKPDGTKAEAKEGFGQSTLDALEHLRAQRVKQLAS RIVEAALGVGRIRRFPGVKNP KRPDTPVDKPCHAIVIENLTH YRPEETRTRREN RQLMTWSSSKIKKYLA EACQLYGLHLREV TAA YTSRQDSRTGAPGLRCQDVPVKEFMRS LFWRKEVAQA EKKLTAGKGSSYERLLCELNQRWKD NSPGDGKRAELLRLP HKGGEIFVSAAPDSPAARGLQADLNAAANIGLRALTDPDWP GKWWHVPCNAVTFRPVEDKVKGSAAVKLDQSLRQVAHPQ SKDPGAKKSKEIVNLWCDISSLP LEHREWKL DWEPYPAYW NNVQCRVIRVLQGKV
---	--------	---

10	Cas12b	MANAKVKTTTTSYTLNAPSDTTDRSPLWHRIFRTHYAIC CGAREFGKLLLDLRGGLPTSLAQLGEGIAENDRRQTQRGTR RILALGWLSVEDLDHARNDPHRVQDTAPGSPLDQDLAEKIL RKILITKGIKSEEEQSNWISDCLPALTANIRPDVWVNRAES FAQWQRGTQPGAQPPTPEEAQQILFSLCGESLVTTLTPEQPA AAGQKQPDQETSPDPEEQTDRPPAAPSADDEMDPSNASRGI FGDLFGENAEGKRSRSQGKDNFACAVRDFLCANPTPSADAI TEFREKQKPREPNPPGPEKYPPEVSTSGAPTAVAKRYRKLL VCAGLWPKSADEDGSSRNSAKTKFADPKEPQKTEIQINALD LIDACNQAAPADDSGTSPKAGRVFAPAWASNIAEKVASAT QMPANAKSLNEFKRLMFALAARRFSQTQSWTRRNEAERH MAAARQDAAVARLREIDPDHKAQDWLRGYEQRRADQSGS NGEFRITRRMIGEAEAVFKAWAGTNSAAERELKTVAVQTT AEKFGDAALYSEIARNTAAEAVWRSGSAPEILDQWVKLRK AQSDQQRTRVPRFCHPNAFRHPTWCEFGESSKPGVWYAWN PKSKPRKPEVGGEGDGTRRLWVLLPDFNSGIGQAVPLRWRS KRLSKDLGEALQPSDAPIPRADRVSIAAAGLNLEGANGVPA RYRPSLPFSENTKGWNARLQANRTALLHLESKWDAEAATW RDGGRSLLALKWFTTFPELAMSEGPGRAIHPKLGWNSEPH SDLNRAQKRGGNAKLILSRLPGLRVLSVDLGHRYAAACAV WETLTTEQMNAACQAKNHTQPAESDMYVHLAHPTERVVK SGRKKKGQNLIQTTVYRRIAADTLPDGTPHPAPWGRLDRQFL IKLQGEQRPTRAASKNEADLANALFHRLGLRSDADSENKSR AVDKLMARTVRVATLGLKRHARRAKIAYALDPNTKAIPGM GGSSAAFTPGDEPHIHLTDALFDWQSLATDAKWDDAHAR SLWNHHIATLPGGFHLENPTPRDESAHEPSRQRQRSGDDAL RATLKPIAEKLSKADRQEVHAAWKKYWGDSGDGQSAIVPKV LQGQRGPEKTTPSASASGWHGKIRWITDWIMGKYLEGCTG HAWKHDVGGLSVSRITTMKSLYQLHKAFAAMRATPEKPRGA PEKGESNLGAAQGILTAMESMRQQRVKQLASRIAEAAALGA GIERRSDNGRELQRPRERVDDPRFAACHAVVVEDLTNYRPD EMQTRRENRLMQWASSKVKKYLSEACQLHGLYLRGVPA GYTSRQDSRTGAPGVRCGDIPVEELMAAPRWRRQILTAECT RRENNTGTARDRYILTLEKYRLLTAEQRKKTPPARIPVKG GDLFVSADPDSPAASGIQADLNAAANIGLKALIDPDWPGRW WYIPCDATTHKPSPERTRGSAAVDCDVPLGPDSTGTPEDRD AKPKKNQRNSKIAGRQSAIINLWRDPTHLPKENPSAWCES KKYWNQVEHNVVKVIESKGQKLTQTAEAAATGESASSPPIAP TDVPW
----	--------	--

實例 2：額外候選熱穩定 Cas 蛋白之示例性特徵描述

【0245】 本實例展示示例性熱穩定 Cas 蛋白 Pal1(SEQ ID NO. 1)、Pal2 低 MW、Pal2 高 MW(SEQ ID NO. 2)、及 Pal3(SEQ ID NO. 3)之特徵描述。在以

DnaseAlert 作為報告子之僅 Cas 反應中，在 37°C 及 56°C 下，各酶與四個嚮導(指定為 342-353)一起測試。對於各反應，螢光信號相對於時間來作圖(圖 1)。在 56°C 下，Pal1 展示對於兩個嚮導之低活性。對於 Pal2 低 MW 或 Pal3，未觀察到活性，而在 56°C 下，對於 Pal2 高 MW，觀察到對於兩個嚮導之活性。在 56°C 下，Pal1 及 Pal2 活性展示於圖 2 中。使用此等酶之研究的額外結果展示於圖 3-8 中。如可發現，在 56°C 及 70°C 下，Pal1 展示對於兩個嚮導之活性；Pal1 在 57°C 下展示最大活性並且在至少 67°C 下展示顯著活性。在 56°C 下，Pal2 高 MW 展示對於兩個嚮導之活性；Pal2 高 MW 亦在 47-52°C 下展示最大活性並且在多達至少 57°C 下展示顯著活性。在 37°C、56°C、或 70°C 下，未觀察到 Pal2 低 MW、或 Pal3-6 中之任一者的顯著活性。因此，熟習此項技術者理解此等酶至少在約 56°C 下及/或在 56°C 與 70°C 之範圍內為熱穩定的。此等特定例示酶亦可描述為熱活性的，因為在諸如 37°C 之較低溫度下，其相關活性極大地減少及/或未偵測到。不希望受任何特定理論束縛，應注意嗜熱有機體之酶通常可在此等溫度下展示減少(或不可偵測的)活性。

【0246】 為了進一步對示例性熱穩定 Cas 蛋白 Pal1(SEQ ID NO : 1)、Pal2(SEQ ID NO : 2)、Pal3(SEQ ID NO : 3)、Pal4(SEQ ID NO : 4)、Pal5(SEQ ID NO : 5)、Pal6(SEQ ID NO : 6)、Pal8(SEQ ID NO:8)、Pal9(SEQ ID NO : 9)、及 Pal10(SEQ ID NO : 10)進行特徵描述，酶變性使用示例性蛋白熔融法來評估。將 Cas 蛋白與緩衝劑及染料混合並且運作熔融曲線。隨著溫度增加，Cas 蛋白展開。當示例性 Cas 蛋白展開時，疏水性區域暴露，導致染料結合至 Cas 蛋白。在結合後，染料發螢光。將隨著溫度變化之螢光變化相對於熔融曲線之溫度來作圖。計算 Cas 蛋白之熔融溫度並且與合適參考標準(例如，具有已知熱穩定性之 Cas 蛋白，例如，Aac 及/或 RS9)比較。熔融溫度之變化與蛋白穩定性(例如，熱穩定性)及活性之變化相關(圖 9)。圖 9 示出 Cas 蛋白(PAL1-10)具有與參考熱穩定蛋白 Aac

及 RS9 可比較的熱穩定活性，亦即，Cas 蛋白 PAL1-10 為熱穩定的。

實例 3：與嚮導 RNA 複合之熱穩定 Cas 蛋白之旁切活性信號

【0247】 本實例進一步展示本文所述 Cas 蛋白之旁切活性。與不同工程化嚮導 RNA 複合之熱穩定 Cas 蛋白(PAL5、PAL8、PAL9、及 PAL10)之旁切活性在兩個不同檢定中測試：沒有靶擴增之檢定(僅 cas)及具有靶擴增之檢定(RT-SLK)。工程設計具有不同目標及長度之嚮導 RNA(SEQ ID NO：11-19)。工程化嚮導 RNA 展示於表 2 中。

【0248】 表 2：熱穩定 Cas12b 酶之單一嚮導 RNA(sgRNA)序列。sgRNA 恆定域呈斜體並且間隔子呈粗體。

SEQ ID NO:	序列名稱	序列	酶 /PAL
11	crEF82 (SCoV2-N)	<i>GUUCCUACAGGGAACUCCA</i> <i>U</i> UCCAAUGGGUG <i>UGUCU</i> UCCCCU <i>UCAAUGGGUUUAGCACCAUU</i> <i>GGGUUGAUCAGAAUCUGAUCAACCGACAC</i> CUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGC	5
12	crEF88 (SCoV2-O)	<i>GUUCCUACAGGGAACUCCA</i> <i>U</i> UCCAAUGGGUG <i>UGUCU</i> UCCCCU <i>UCAAUGGGUUUAGCACCAUU</i> <i>GGGUUGAUCAGAAUCUGAUCAACCGACA</i> CCGUCUAUAAUCCGUUUAUGAUUGAU	5
13	crJP97 (SCoV2-N-1)	<i>GCGCCUACAGGGCGCAU</i> <i>UCCAAA</i> UCCACGACA <i>UGUGUCU</i> UCCCCU <i>UCGUUGGGUUUAGCAUC</i> <i>GUGGAGUCGAUCACACUCAGGUGUGCGGAGU</i> <i>GCAUGCACUUUGACAACUUGGCGCGCUGCGC</i> <i>GAGCGCGAAAACGCGCAGGCCAGCGCGCCGA</i> <i>UGAUCGACUGACAC</i> CUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGC	8

14	crJP101 (SCoV2- N-5)	<i>CAAAUCCACGACAUGUGUCUUCCCCUUCGUU GGGUUUAGCAUCGUGGAGUCGAUCACACUCA GGUGUGCGGAGUGCAUGGCGCGCUGCGCGA GCGCGAAAACGCGCAGGCCAGCGCGCCG CUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGC</i>	8
15	crJP103 (SCoV2- N-1)	<i>GGCUAUAGGCCACAGGAAGCCACGGAAUGUG UCGUCCCCUUCAAUGGGGCUUGGCACCGUGGC GUCGAUCAGUUUUGUUCGACUGAGGACAAA AGGUGCCGACGUCGGCACCAACCUGAUCGAC GGACAC CUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGC</i>	9
16	crJP104 (SCoV2- N-2)	<i>GGCUAUAGGCCACAGGAAGCCACGGAAUGUG UCGUCCCCUUCAAUGGGGCUUGGCACCGUGGC GUCGAUCAGUUUUGUUCGACUGAGGAAAAC CGACGUCGGCACCAACCUGAUCGACGGACAC CUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGC</i>	9
17	crJP105 (SCoV2- N-3)	<i>GGCUAUAGGCCACAGGAAGCCACGGAAUGUG UCGUCCCCUUCAAUGGGGCUUGGCACCGUGGC GUCGAUCAGUUUUGUUCACCAACCUGAUCGA CGGACAC CUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGC</i>	9
18	crJP107 (SCoV2- N-1)	<i>CCUCCUAAAGGGAGGCAGAACUCCGAGUAUG UGUCUUCCCCGUCAUUGGGCUUGGCACUCG GGGUCAAUCUAAUUCACUUUGGAAAACCGAAG UGAAUCAGAUCGACCGACAC CUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGC</i>	10
19	crJP109 (SCoV2- N-3)	<i>CCUCCUAAAGGGAGGCAGAACUCCGAGUAUG UGUCUUCCCCGUCAUUGGGCUUGGCACUCG GAUUCACUUUGGAAAACCGAAGUGAAUGACAC CUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGC</i>	10

僅 Cas 反應(圖 10、12、14 及 16)：

【0249】 僅 Cas 反應包含與工程化嚮導 RNA 複合之相關 Cas 酶，該嚮導 RNA 雜交至其預期標靶，該標靶供應為純 gBlock DNA。詳細地，對於僅 Cas 反應，標靶之擴增與 Cas 偵測分開地執行(僅 Pal5)。在一些實驗中，單鏈 DNA 靶(寡核苷酸)以 100nM 之濃度直接添加至 Cas 反應。對於 Pal5，在 20uL 反應(1X Warmstart RT-LAMP 混合物(NEB)，1X 引子混合物)中，自 100cp/uL (200 cp/反應)之 SARS-CoV-2 基因組 RNA 開始的 LAMP 擴增標靶使用 N 基因或 O 基因特異性 LAMP 引子來擴增。在 60C 下培育反應物 40 min。對於所有僅 Cas 反應，將 5 uL 之 ssDNA 標靶或 LAMP 擴增產物添加至 250nM Pal 酶、250nM 相應嚮導、8 mM MgCl₂、及 250nM DNase Alert。Cas 酶之活化在 60C 下在 QS5 PCR 機器中監測並且每分鐘量測螢光。

RealTime SHERLOCK(RT-SLK)反應(圖 11、13、15 及 17)：

【0250】 對於 RT-SLK 反應，靶核酸首先使用 LAMP 來指數擴增，而擴增材料同時使用與其嚮導 RNA 複合之 Cas 酶來偵測。詳細地，對於 RT-SLK 反應，基於 LAMP 之擴增與單一試管中之 Cas 讀出聯繫起來。20uL RT-SLK 反應之最終濃度如下，1x Warmstart RT-LAMP 混合物(NEB)與 1x LAMP 引子(引子集 N 或引子集 O)、0.01 U/uL TIPP (熱穩定無機磷酸酶(NEB))、125nM C7-FAM 報告子或 DNase Alert(250nM)、250nM Cas 酶及 250nM 相應嚮導 RNA 組合。作為起始靶物，使用 100 cp/uL(200 cp/反應)之 SARS-CoV-2 基因組 RNA 並且將反應物安置於 QS5 PCR 機器中，在 60C 下孵育並且每分鐘監測及量測螢光。

【0251】 圖 10-17 示出所測試熱穩定 Cas 蛋白(PAL5、PAL8、PAL9 及 PAL10)在「一鍋」偵測檢定中起作用，從而實現簡單分子診斷。此外，圖 11、13、15 及 17 示出熱穩定 Cas 蛋白 PAL5、PAL8、PAL9 及 PAL10 與諸如 LAMP 之化學致能擴增(RT-SLK 反應)相容。將擴增及偵測組合於一鍋中之能力減少總體診斷檢定或治療檢定之複雜性。

【0252】 圖 10 及 11 示出藉由簡單交換嚮導(在表 2 中以粗體來標記)之可變域，嚮導 RNA 實現多個標靶，在此處 SCoV2-N 或 SCV2-O 之偵測。因此，複合至嚮導 RNA crEF82 或嚮導 RNA crEF88 之 PAL5 能夠偵測其標靶。兩個嚮導 RNA 具有不同性能水準但是均展示高於背景之明確信號。

【0253】 圖 14-17 示出與 PAL9 或 PAL10 複合的不同長度之嚮導 RNA 都保持完全功能(都展示高於背景之明確信號)。此證明與更長嚮導 RNA(例如，crJP103、crJP104、或 crJP107)相比，較小嚮導 RNA(例如，crJP105、或 crJP109)在診斷或治療檢定中不損害功能活性。

等效物

【0254】 熟習此項技術者認識到，或能夠僅使用常規實驗來確定本文所述本發明之特定實施例的許多等效物。本發明之範圍不意欲局限於上述說明書，而是如以下申請專利範圍所陳述：

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種偵測方法，其包括以下步驟：

使 CRISPR-Cas 複合物與潛在地包含靶核酸序列的樣品接觸，該 CRISPR-Cas 複合物包含：

在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性(collateral cleavage activity)之 Cas 蛋白；及

經選擇或工程化來與靶核酸序列互補的嚮導 RNA。

【請求項 2】 如請求項 1 之方法，其中該接觸步驟包括使該 CRISPR-Cas 複合物及樣品與易受藉由 Cas 蛋白旁切活性來實現之裂解影響的報告子接觸。

【請求項 3】 如請求項 1 或請求項 2 之方法，其中該接觸步驟包括在高於該溫度下孵育一段時間。

【請求項 4】 如前述請求項中任一項之方法，進一步包括擴增存在於該樣品中之核酸的步驟。

【請求項 5】 如請求項 4 之方法，其中該擴增步驟利用熱穩定核酸聚合酶。

【請求項 6】 如請求項 4 或請求項 5 之方法，其中該擴增步驟及該接觸步驟在單一容器中執行。

【請求項 7】 如請求項 1 之方法，其中該 Cas 蛋白為 Cas12 蛋白。

【請求項 8】 如請求項 7 之方法，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 至少 80%一致的胺基酸序列。

【請求項 9】 如請求項 7 之方法，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 10】 如請求項 1 之方法，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 11】 在一種使用具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白來執行偵測檢定之方

法中，其改良包括使用具有熱穩定旁切裂解活性之 Cas 蛋白。

【請求項 12】 如請求項 11 之改良，其中該 Cas 蛋白為 Cas12 蛋白。

【請求項 13】 如請求項 12 之改良，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。

【請求項 14】 如請求項 12 之改良，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 15】 如請求項 11 之改良，其中執行偵測檢定之方法在單一反應容器中進行。

【請求項 16】 如請求項 11 之改良，其中該熱穩定旁切裂解活性在高於約 60°C 溫度下熱穩定。

【請求項 17】 如請求項 11 之改良，其中該熱穩定旁切裂解活性在高於約 65°C 溫度下熱穩定。

【請求項 18】 如請求項 11 之改良，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 19】 一種非天然存在或工程化之組成物，其包含：

(a) 具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白，其在高於至少 60-65°C 之溫度下係熱穩定；及

(b) 至少一種嚮導，該嚮導能夠與該熱穩定 Cas 蛋白形成複合物並且引導該複合物結合至靶核酸序列。

【請求項 20】 如請求項 19 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。

【請求項 21】 如請求項 19 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 22】 如請求項 19 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩

個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 23】 如請求項 19 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 24】 如請求項 19 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 25】 如請求項 19 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 26】 一種非天然存在或工程化之組成物，其包含：

(a) 多核苷酸，該多核苷酸編碼具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白，該 Cas 蛋白在高於至少 60-65°C 之溫度下係熱穩定；及

(b) 至少一種能夠與該 Cas 蛋白形成複合物並且引導該複合物結合至靶核酸序列的嚮導。

【請求項 27】 如請求項 26 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80% 一致的胺基酸序列。

【請求項 28】 如請求項 26 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80% 序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 29】 如請求項 26 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 30】 如請求項 26 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 31】 如請求項 26 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 32】 如請求項 26 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 33】 一種用於修飾靶核酸中之核苷酸的非天然存在或經工程化之組成物，其包含在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白。

【請求項 34】 如請求項 33 之組成物，進一步包含至少一個能夠與該 Cas 蛋白形成複合物並且引導該複合物結合至靶核酸序列的嚮導序列。

【請求項 35】 如請求項 33 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。

【請求項 36】 如請求項 33 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 33】 如請求項 33 之組成物，其中該 Cas 蛋白已經修飾以便減少脫靶效應。

【請求項 34】 如請求項 33 之組成物，其中該靶核酸中之核苷酸之修飾治療由點突變導致之疾病。

【請求項 35】 如請求項 33 之組成物，其中該靶核酸中之核苷酸之修飾使由該靶核酸序列來編碼之基因失活。

【請求項 36】 如請求項 33 之組成物，其中該靶核酸中之核苷酸之修飾將由該靶核酸序列來編碼之基因產物加以修飾。

【請求項 37】 如請求項 33 之組成物，其中該靶核酸中之核苷酸之修飾調節由該靶核酸序列來編碼之基因產物之表現水準。

【請求項 38】 如請求項 34 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 39】 如請求項 34 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 40】 如請求項 34 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至原核細胞中

之一或多個靶核酸序列。

【請求項 41】 如請求項 34 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 42】 一種載體系統，其包含有包含以下之一或多個載體：

(a) 第一調控元件，其可操作地連接至編碼具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白的核苷酸序列，該 Cas 蛋白在高於至少 60-65°C 之溫度下係熱穩定；及

(b) 第二調控元件，其可操作地連接至編碼嚮導之核苷酸序列。

【請求項 43】 如請求項 42 之載體系統，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 44】 如請求項 42 之載體系統，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 45】 如請求項 42 之載體系統，其中該編碼 Cas 蛋白之核苷酸序列經密碼子最佳化。

【請求項 46】 如請求項 42 之載體系統，其中(a)及(b)包含於單一載體中。

【請求項 47】 如請求項 43 之載體系統，其中(a)及(b)包含於個別載體中。

【請求項 48】 如請求項 42 之載體系統，其中該載體系統包含病毒載體。

【請求項 49】 一種裂解細胞中之至少一個靶核酸的方法，其包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至該至少一個靶核酸的嚮導接觸，其中該 Cas 蛋白能夠與該至少一種嚮導形成複合物並且在該至少一個靶核酸中引起斷裂。

【請求項 50】 一種改變細胞中之至少一個靶核酸之表現的方法，其包括使該細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至該至少一個靶核酸的嚮導接觸，其中該 Cas 蛋白能夠與該至少一種嚮導形成複合物並且在該至少一個靶核酸中引起斷裂。

【請求項 51】 一種改變細胞中之至少一個靶核酸之表現的方法，其包括使該細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至該至少一個靶核酸的嚮導接觸，其中該 Cas 蛋白能夠與該至少一種嚮導形成複合物並且編輯該至少一個靶核酸序列。

【請求項 52】 一種修飾細胞中之至少一個靶核酸的方法，其包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至該至少一個靶核酸的嚮導接觸，其中該 Cas 蛋白能夠與該至少一種嚮導形成複合物並且編輯該至少一個靶核酸序列。

【請求項 53】 如請求項 52 之方法，其中編輯該靶核酸包括在該靶核酸序列處插入酬載核酸。

【請求項 54】 如請求項 49-53 中任一項之方法，其中核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 55】 如請求項 49-53 中任一項之方法，其中核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 56】 如請求項 49-53 中任一項之方法，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 57】 如請求項 49-53 中任一項之方法，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 58】 如請求項 49-53 中任一項之方法，其中該嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 59】 如請求項 49-53 中任一項之方法，其中該嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

- 【請求項 60】 一種核酸，其編碼具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白，該 Cas 蛋白在高於至少 60-65°C 之溫度下係熱穩定。
- 【請求項 61】 如請求項 60 之核酸，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。
- 【請求項 62】 如請求項 60 之核酸，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。
- 【請求項 63】 一種治療有需要之個體之病症或疾病的方法，包括向該個體投與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至靶核酸之嚮導。
- 【請求項 64】 如請求項 63 之方法，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。
- 【請求項 65】 如請求項 63 之方法，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。
- 【請求項 66】 如請求項 63 之方法，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸之不同區域的兩個嚮導序列。
- 【請求項 67】 如請求項 64 之方法，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸之複數個不同區域的複數個嚮導序列。
- 【請求項 68】 如請求項 63 之方法，其中該至少一種嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。
- 【請求項 69】 如請求項 64 之方法，其中該至少一個嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。
- 【請求項 70】 如請求項 63 之方法，其中該 Cas 蛋白能夠與該嚮導形成複合物並且在該靶核酸中引起斷裂。
- 【請求項 71】 如請求項 63 之方法，其中該 Cas 蛋白能夠與該嚮導形成複合物

並且編輯該靶核酸序列。

【請求項 72】 如請求項 1-41 中任一項之組成物，其中該 Cas 蛋白與修飾實體締合。

【請求項 73】 如請求項 72 之組成物，其中該修飾實體為腺苷去胺酶。

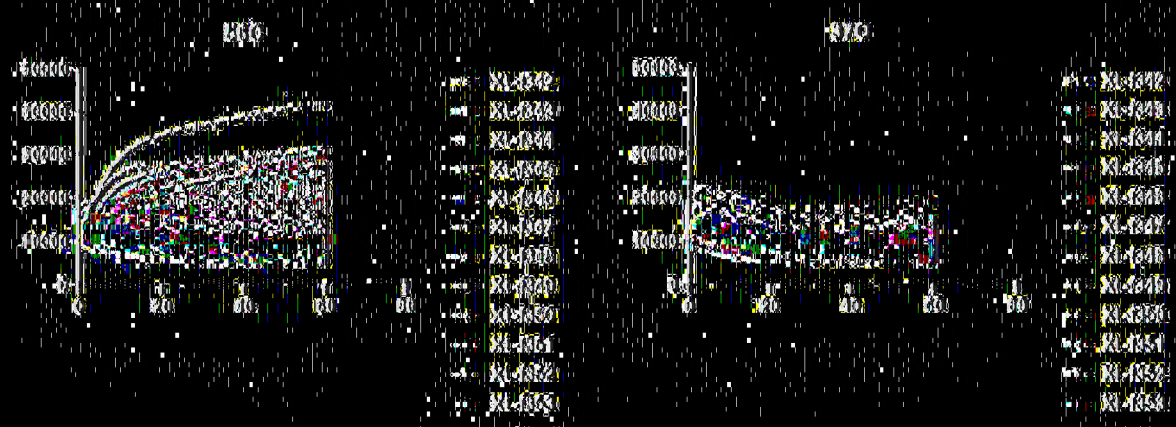
【請求項 74】 如請求項 72 之組成物，其中該修飾實體為胞苷去胺酶。

【請求項 75】 如請求項 1-41 中任一項之醫藥組成物。

【請求項 76】 一種表徵 Cas 蛋白之方法，包括評估以下中之一或多者：

- (a) 順式裂解活性；
- (b) 反式裂解活性；
- (c) 靈敏度；
- (d) 對於 RNA 或 DNA 靶核酸之偏好；
- (e) 對於 RNA 或 DNA 非靶核酸之偏好；及
- (f) 酶穩定性。

【發見開式】



【開式】

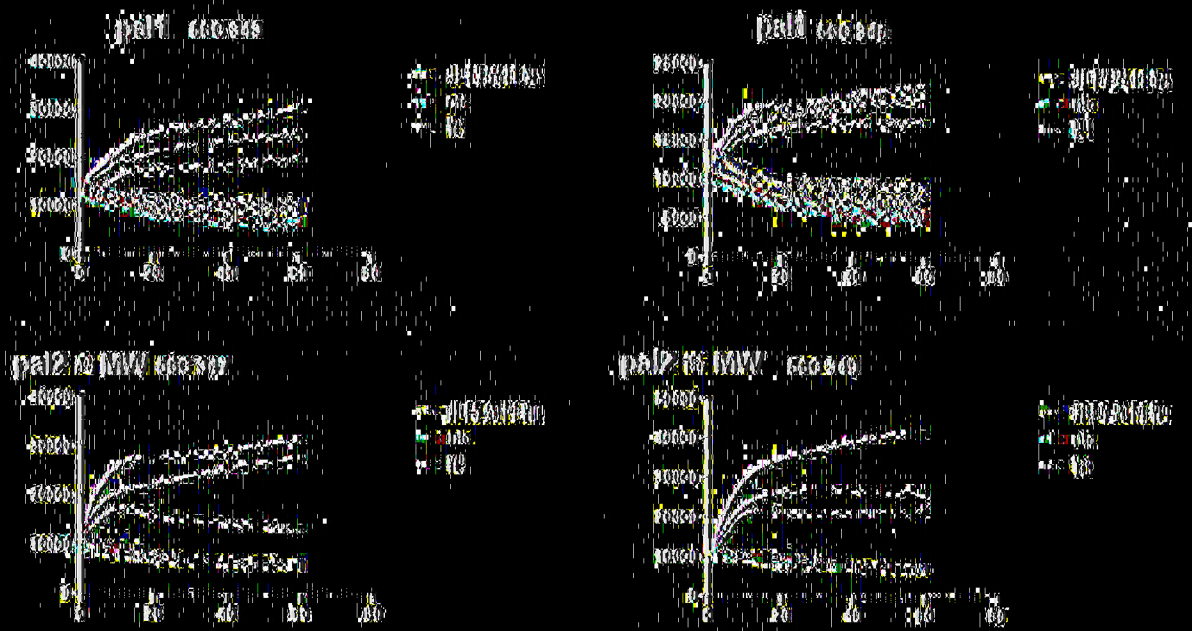
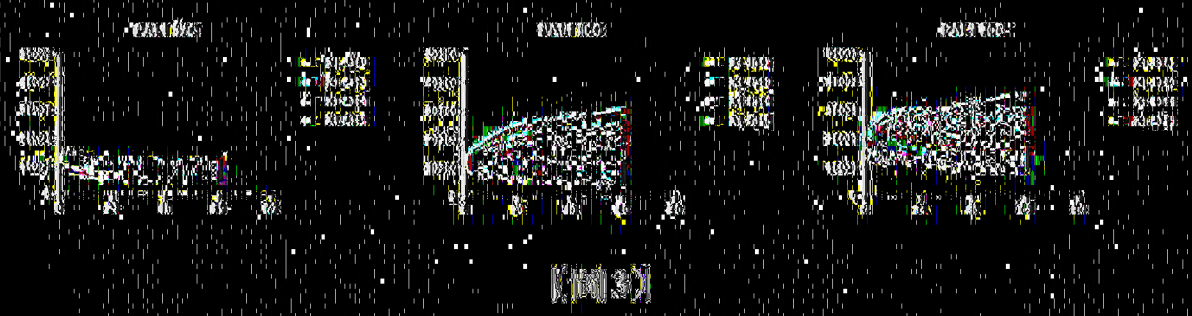


Figure 2



【圖3】

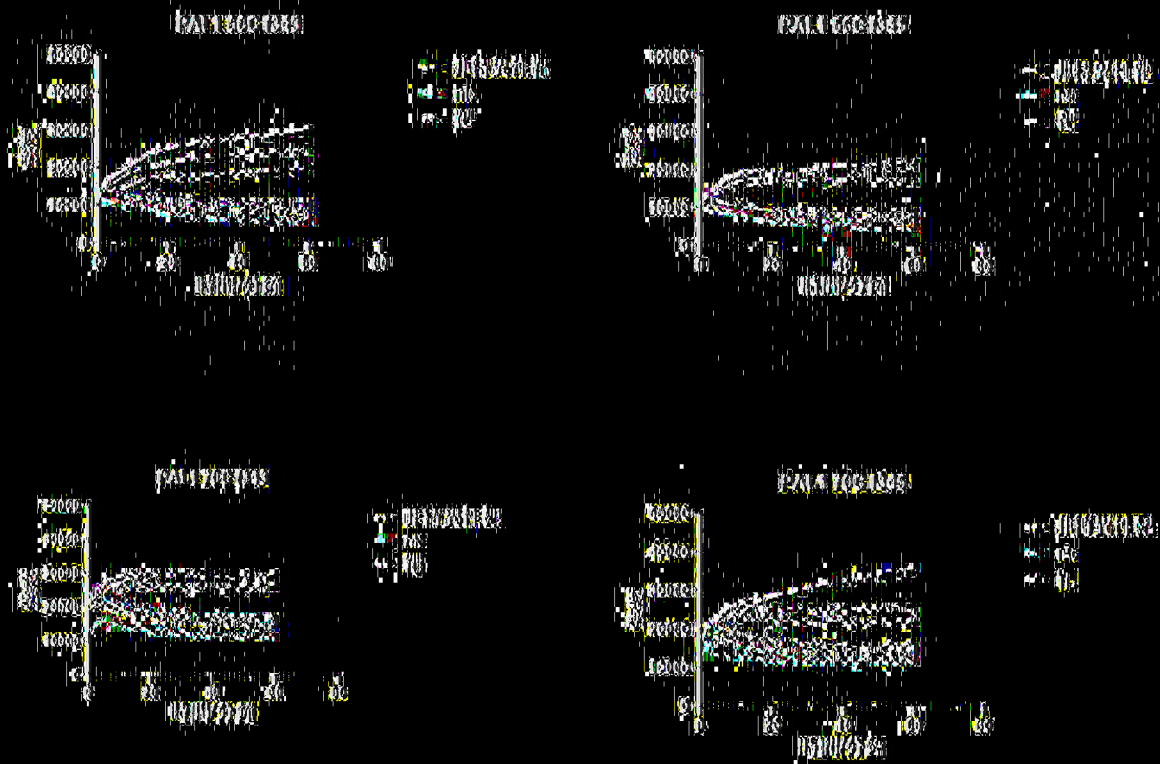
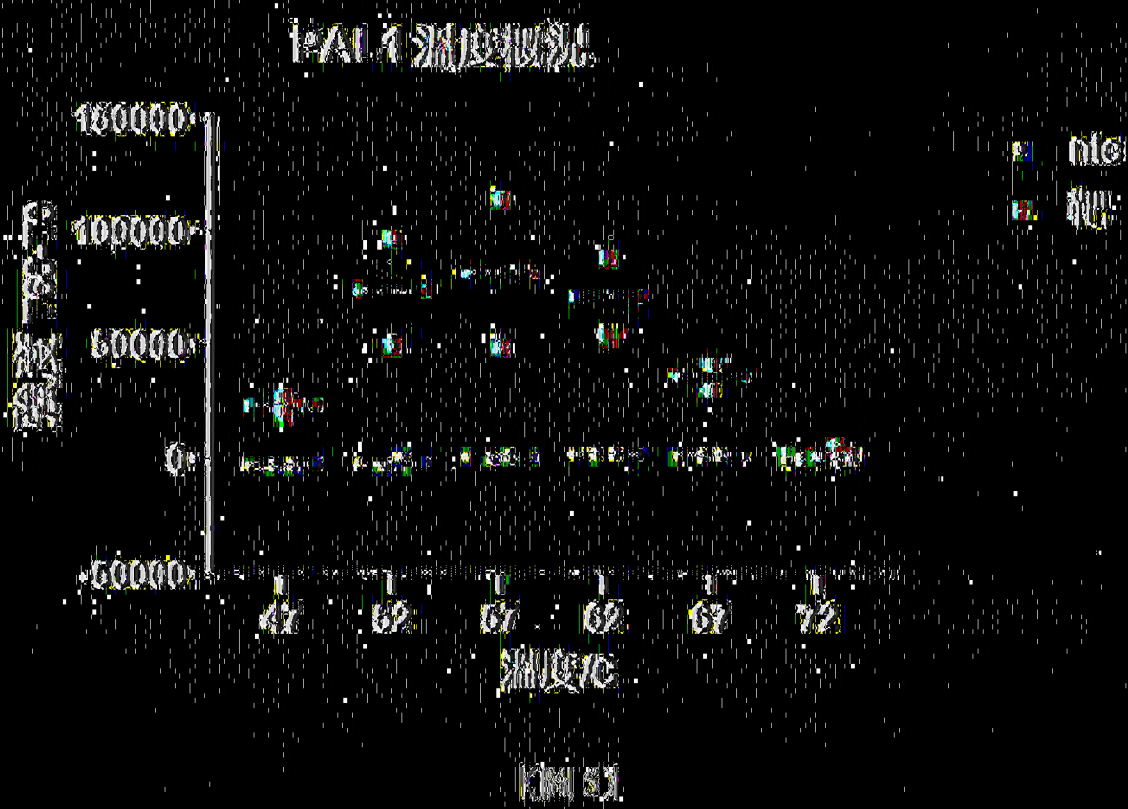
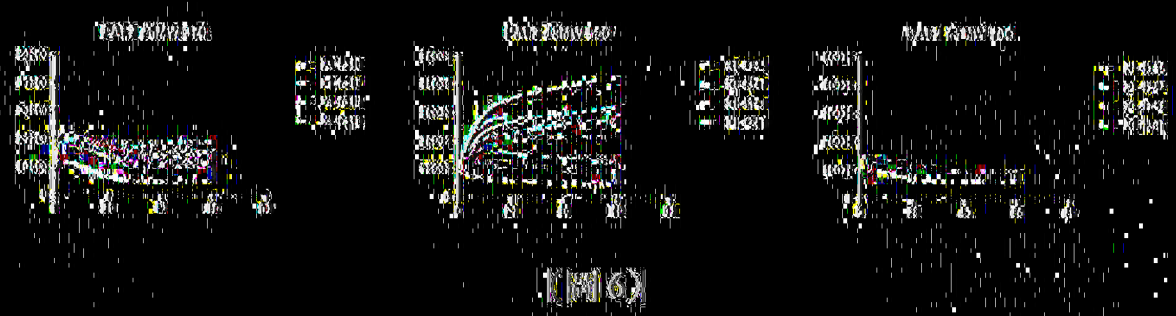
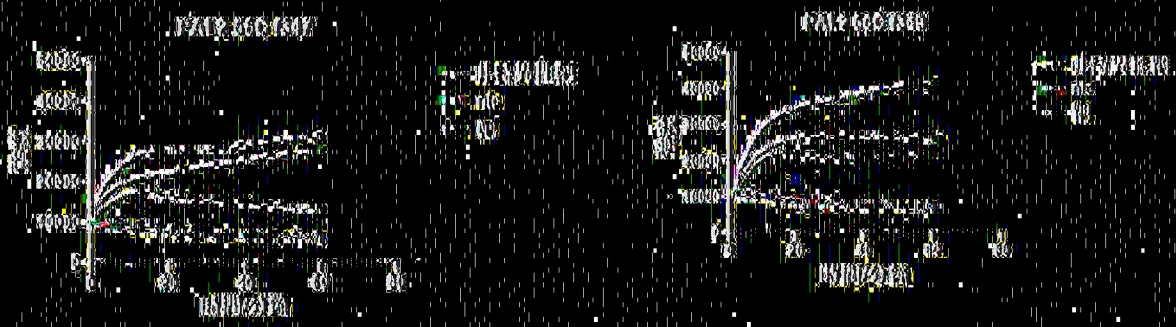


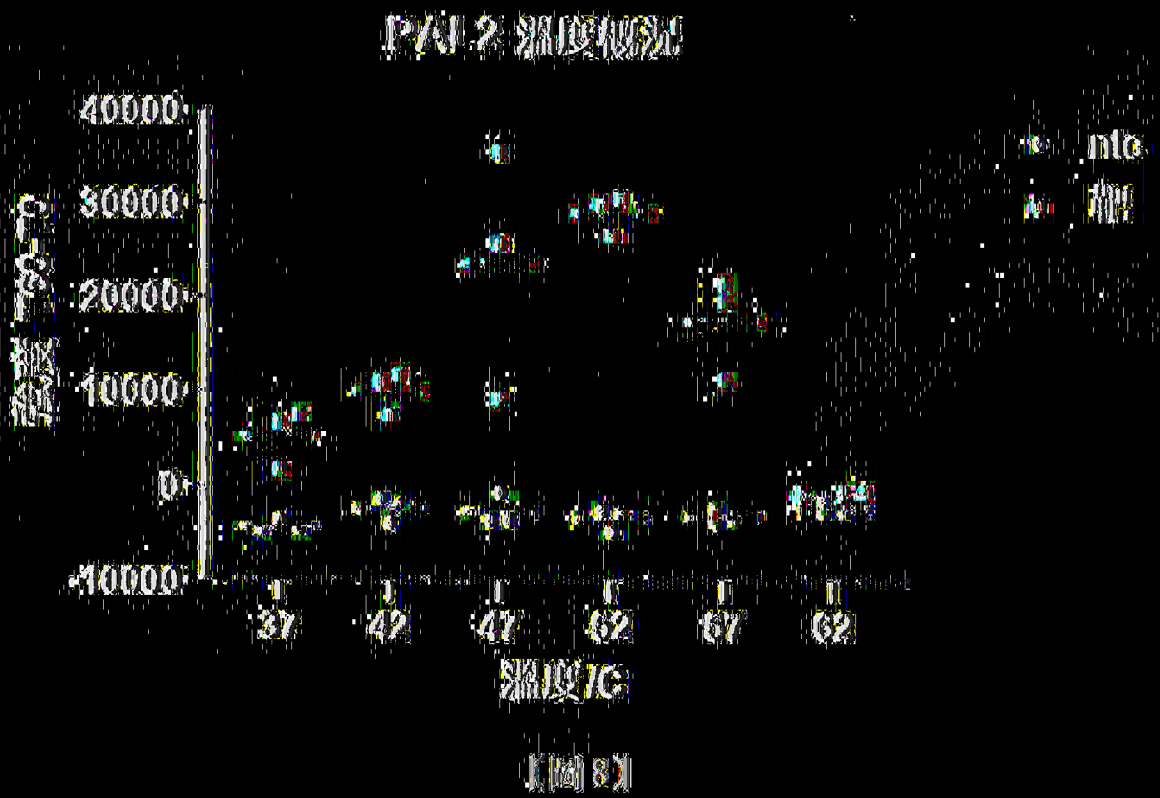
Fig. 4.2







【圖2】



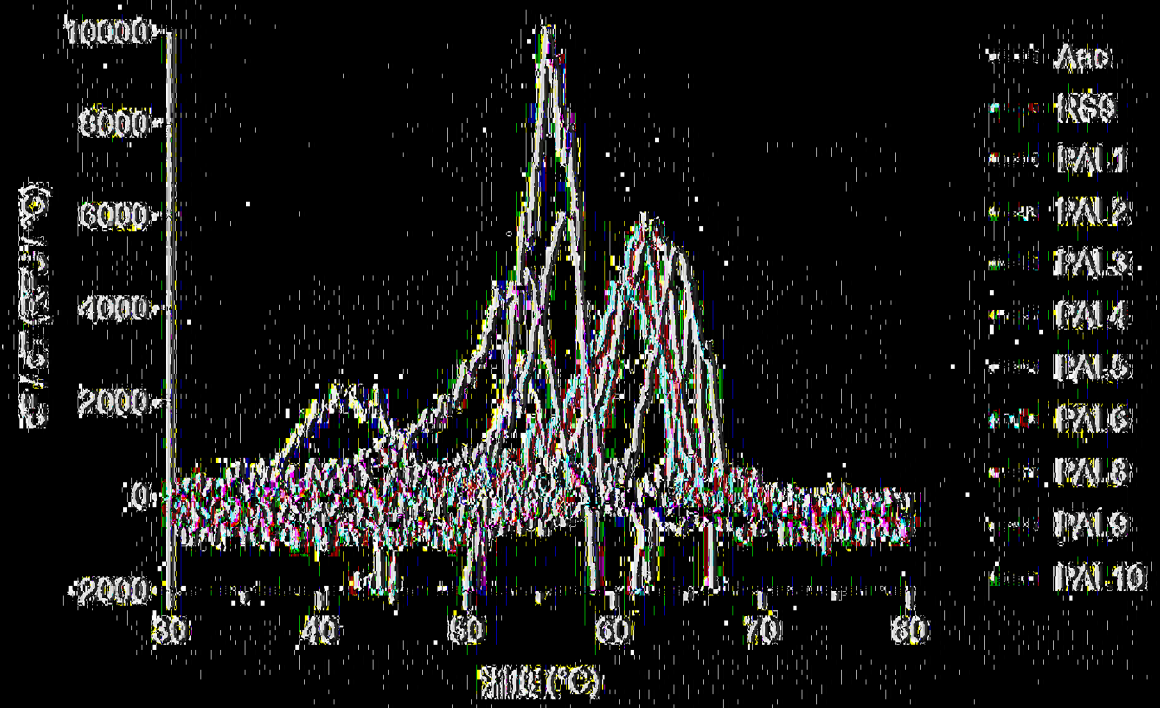
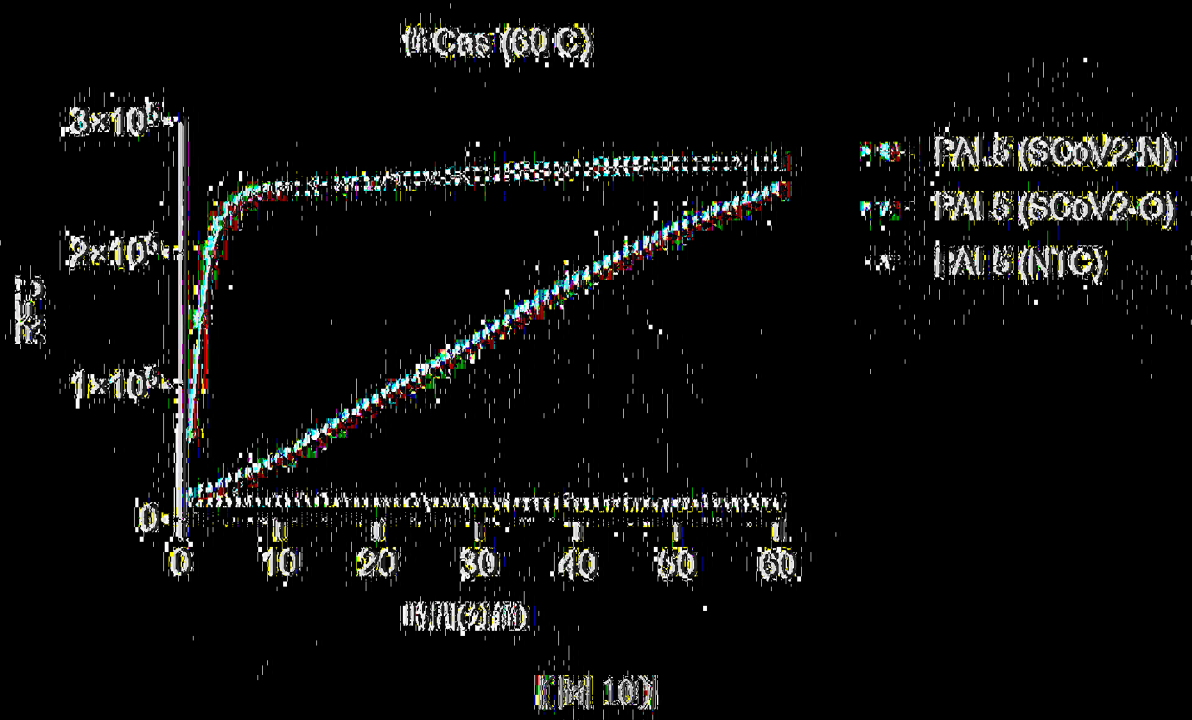
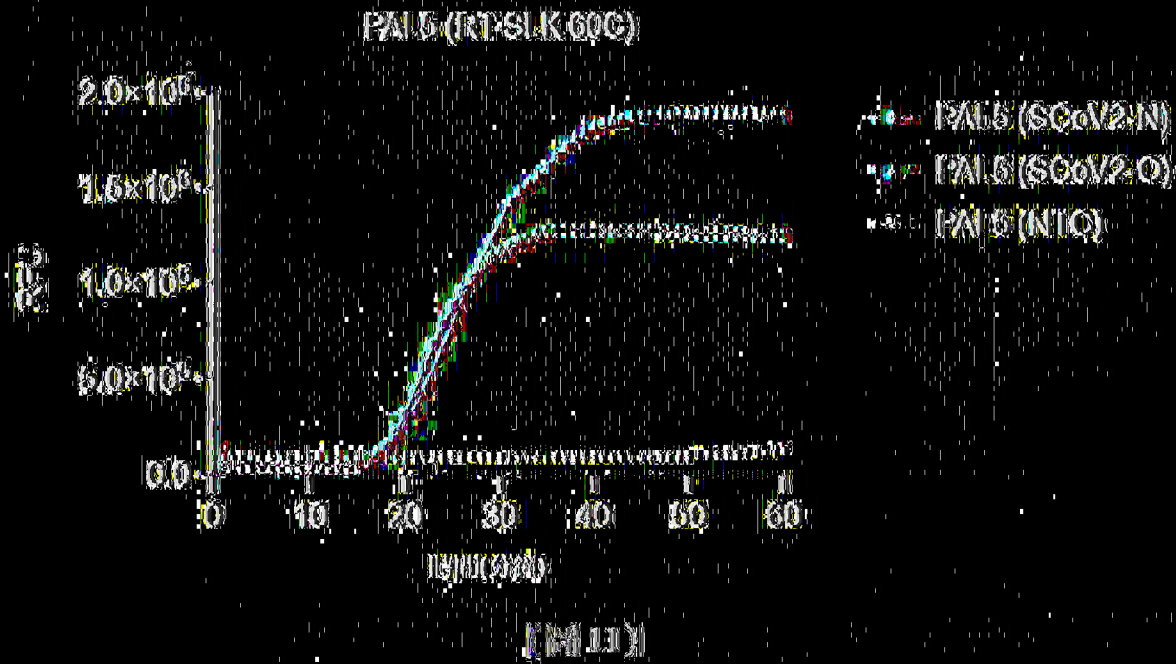
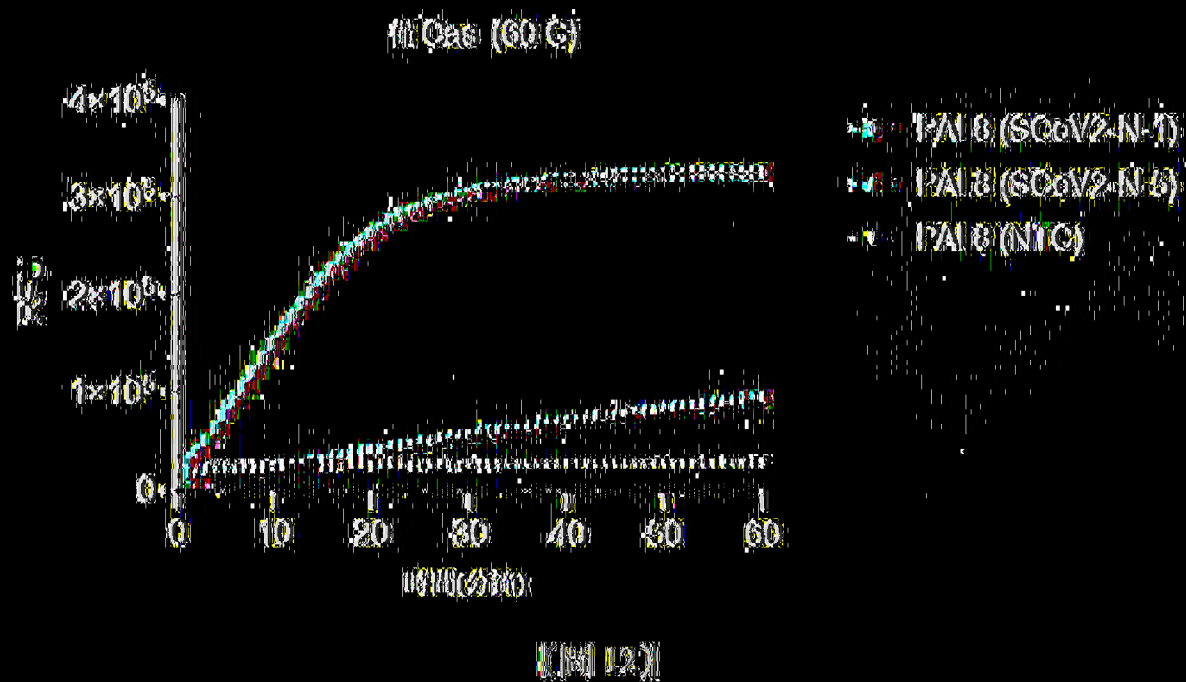


Figure 2







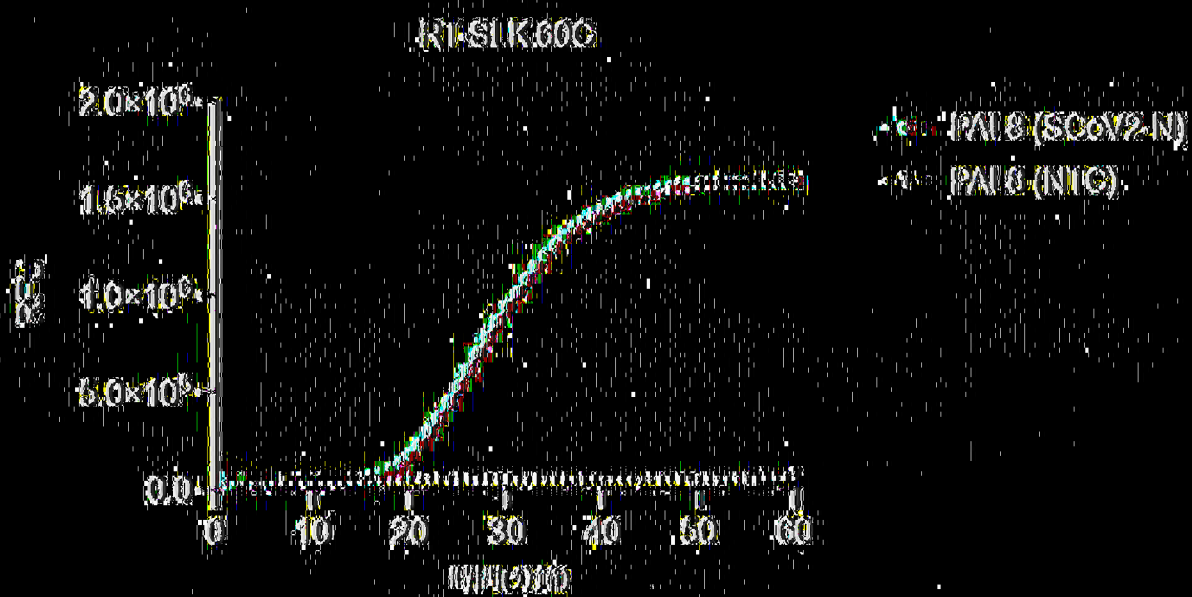
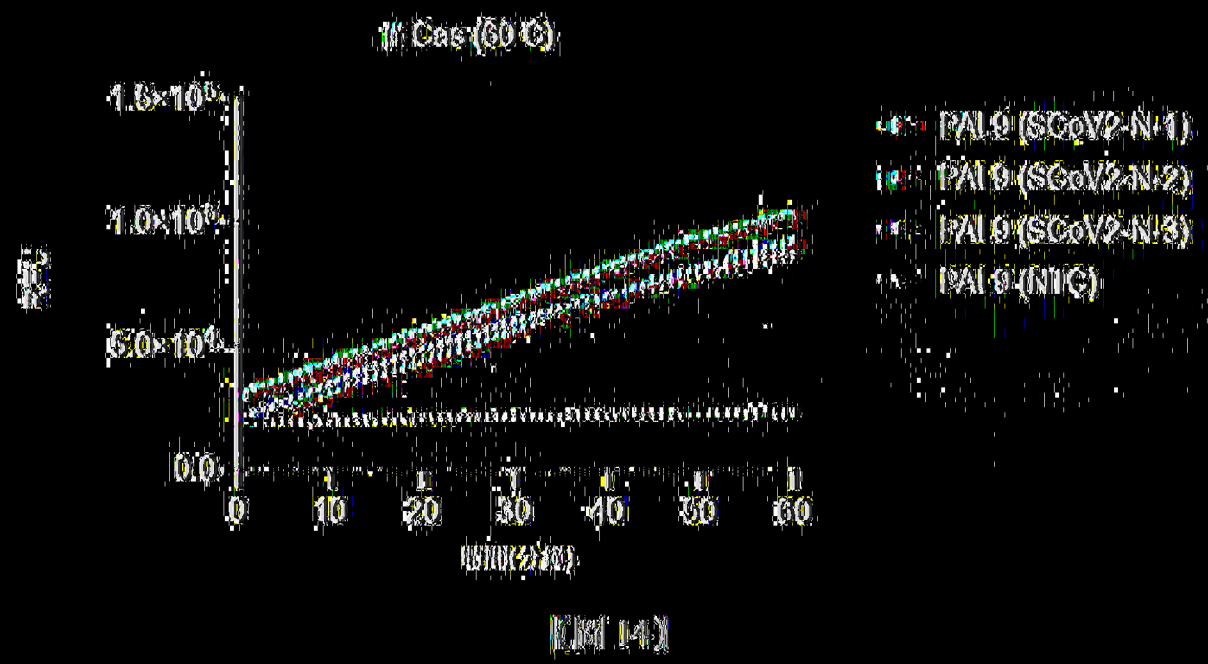
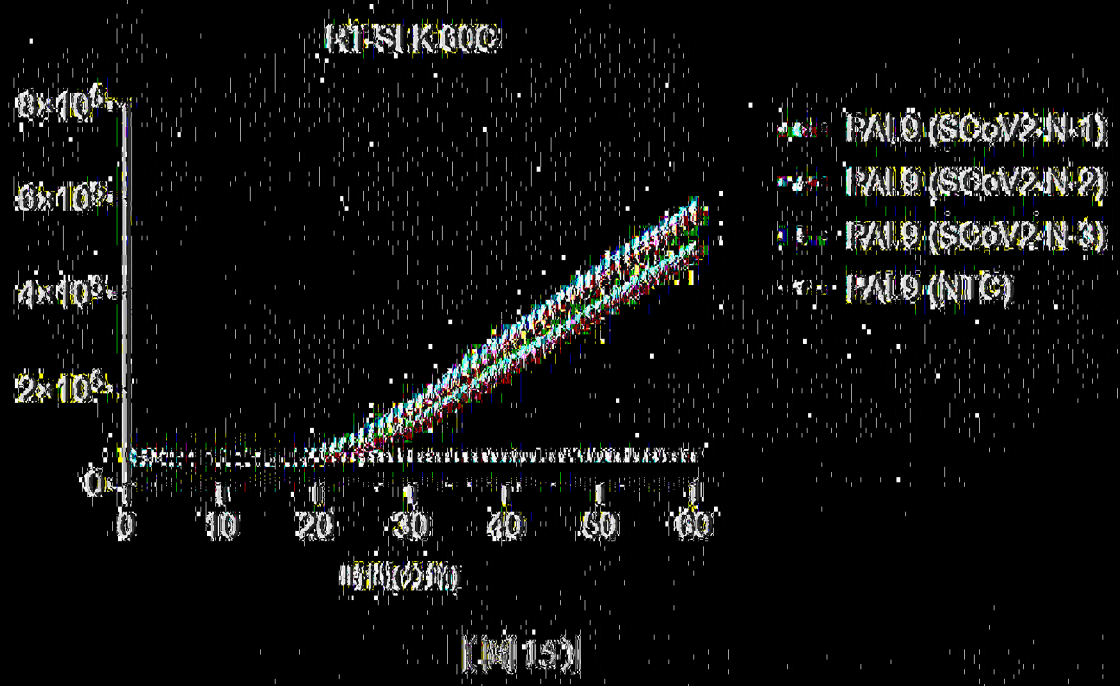
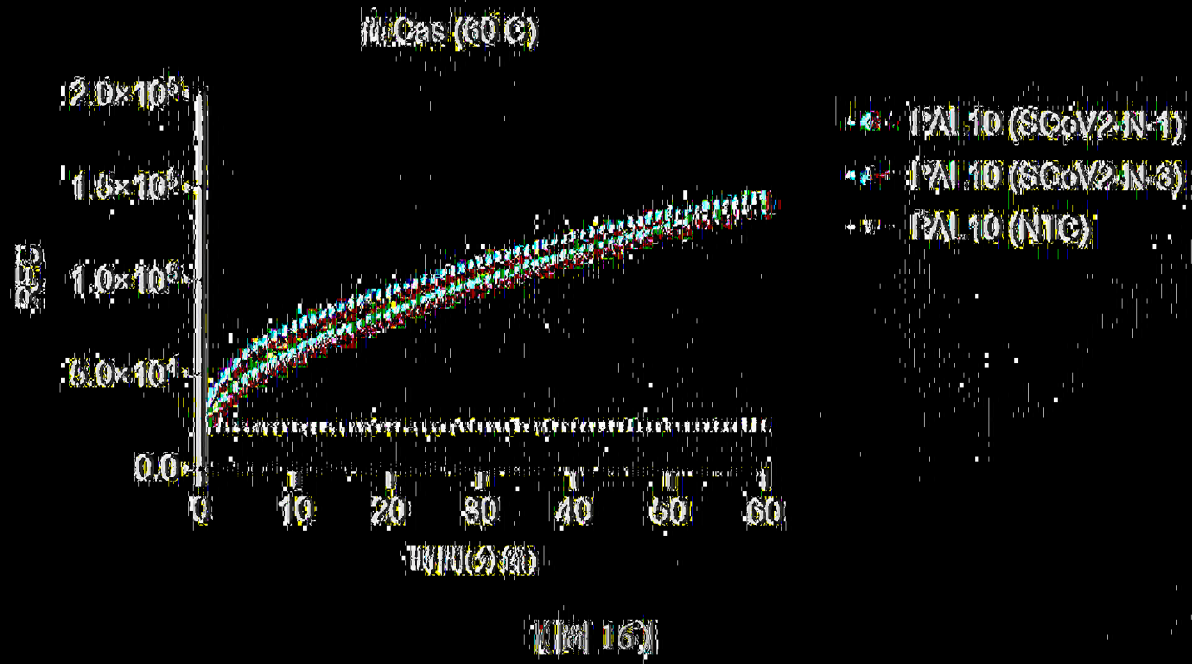


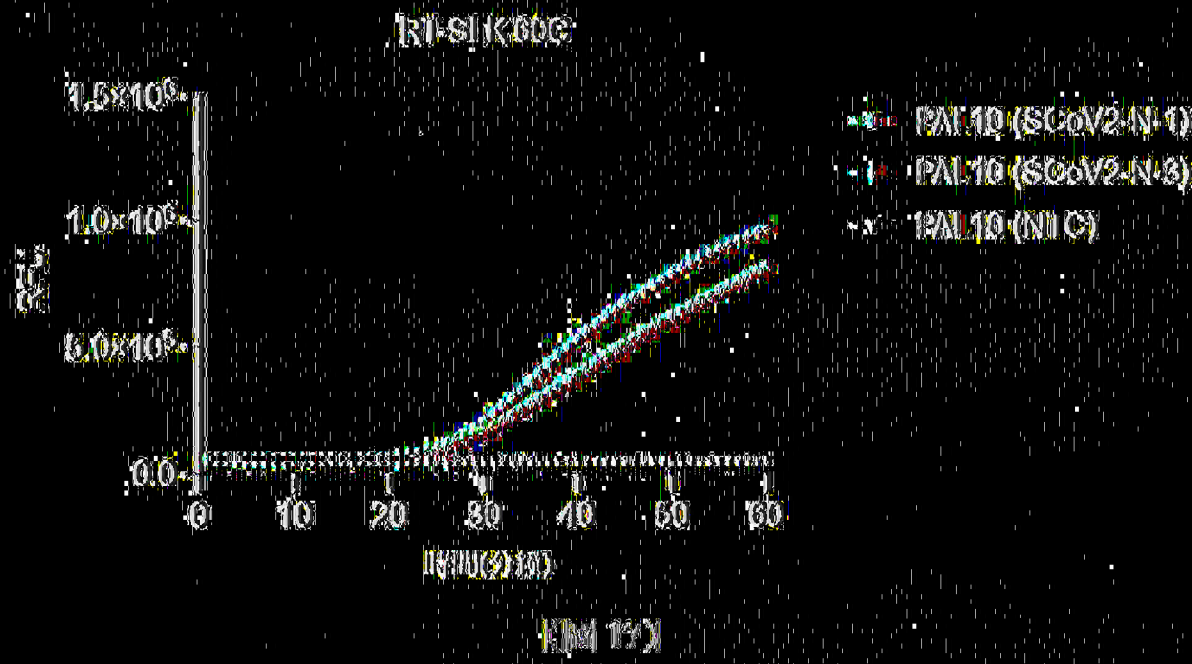
Figure 13



10
10
10







```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="111244-中文序列
表-final.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0"
productionDate="2023-01-12">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>111127813</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-07-25</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>2013065-0593</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/225, 802</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2021-07-26</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">美商夏洛克生物科學公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>SHERLOCK BIOSCIENCES, INC.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">經改良之CRISPR-CAS技術</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>19</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>1335</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..1335</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MKS LAQFQNL YALQKTLRFELKPEGHTRET FNRL EEIEKEQASENENIVYQDLLRAKKYEK
IKI ILDEYHKDFIEQALAYANL TELEKYEEL YRKS NRTSEEEEFENTKESLRKQIANIFIKNPNTVQERWKFLFSKKL
IQNELIVWVKGN YELLSEKLKNEFPDESSIISTIEDFKYFTTYFRNYHENRKNLYSNEDKFSTIAHRLIHENLPKFDNI
AIYQKAKAVLNINEVEKELGLPEDTLDKIFSLDFFSKALTQKGIDQYNYFLGGKTENEVKKIKGLNEFINLYNQQQQDKN
QRLPFLKVL YKLPLFERTSTSFRFEP IENDRDLIERIGKFYYNDLKQYRDDSQGD TTDILSGINTLLRHVHDYRDGLYVN
GGITLTQISQIFGSWSYINN ALAYFYDTYIDASGVDHQGERKPKKQKQIQEKT KWLKQKQFPVILVEKALSEYKSIETN
EDLKTRISD TTLCDFFKRCGNDNGQDLFDRIEARLREKNEEGYSLEDLLKKEFTTERKLMQDKTKTLLIKNFLDVIQGD
KDDITAGLLHFVKCLIPRTEISEKNELFYSGMEKYLNILSEVTPLYNKARNYLTQKPYSIEKVKNFENSTLLDGWDENE
ESDNSCVLLRKRGYYYL GIMNKKHNMIFDRKIYPKATEGEAYYEKMIYKLLPGAYKMLPKVFFSEKNIDYFKPSEEILRI
RNTASYSKNGQPQEGYQKASF SIEDCRKYIDFFKKCIANHWDWQKFNFNFSPTEYYQS IDEFYREIERQGYKIDFVKIPE
SYINQLIKENKLYL FKIYNKDFSEKKKSKGKDNLHTLYWKMLFDEKNLKD VVLKLNGEAEVFFRQKSILYNEEIWNKGHH
YSELKDRFSYPIISNKRYAEDKFFLHVPITLNFKADGINNVNMVNEFIKDNRDIHIIGIDRGERHLLYVSVINQKGDIV
EQCSLNEIVTEYNGKIFKKNYHEELDNLEKERDRARKDWQTIANIKELKEGYLSHV IHKISKLILKYNAIVVMEDLNSGF
KRGRQKVEKQVYQNF EKQLIEKLN YLVKESNVDEPGGVL RAYQLANKFETFKKLGKQSGIIFYVPAAYTSAIDPVTGYI
QYLYPLKQADSVEKARKFY SQFKRISYNPHKQWF EFSFDYDNFNIYHGKSSWTICTTNTERYMWNRLLNNGHGGEELVY
VTNELELLFGEYNI IYGDGDKIKQ QITDVQDIDVDRTAKQFYKRINELLNLTLKLRHNNGKKGADEEDYILSPVEPYFDS
RFESRKPSMQQTLPINADANGAFNIARKGLLLLERLNQLGV EEFKTKKSNNKKTQWLPHELWVEYAQNHTRK</INSDS
eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1273</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1273</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q2">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MQDKTGWSSFTNKYSLSKTLRFELKPVGNTQKMLEDDGVFQKDRERQENYKKVKPFMDKLHRE
EFIKEALNNLKLEGLTEYFEIFKKFRKDKNKELKNAEKKLRQIIGRCYTETAQIWVEKYKEFGFKKNIGFLFEEGVFE
LMKLKYGNDEASQIEKNGEVLISFDGWKGFLGYFKKFFETRNNFYKDDGTSTAVSTRIINENLKIYLDNLIKYNKIKDKV
DFKEADILQENKLNLSDFNFVESYAKYSLQKGIDYYNEILGGKTLKNGTKLKGLNEVINIYKQKNKSGELSKFKMLKKQI
LGEGERTLFEEIENEDELKDVLDFFYNADPKITLFTLLEDDFFSNTEKYKDELDKIYFNTVAINGILHRWVDDSGVFQ
KYLFEVLKSNKLKSNHYDKKEDSYKFPDFISFEHIKVALENCERDGLKDKFWKEKYTTKECLTENGLANLWQEFLEIYK
CEFKKLYDYKTDDNDCYLQYRDNYKKYILDANFNPKEKSAKDIKDYLDVLSIYQLAKYFALEKKKVWTTDYETGDFYY
EYIKFYEDTYEQIKPYNLVRNYLTRKPINTAKKWKLNFNDAYLASGWDKKEVSNLTVILRRDEQYYLAIMKKGKNKIF
EKKFSCGEFEKMEYKQIAEASSDIHNLVLMNDGSCRRCIKMHDKRKYWPLDISIIEKKKSYAKENFVRRDFERFVNYMKK
CSLLYWKEYDLKFSDTSTYKNINDFTNEIASQGYKLSFSAIPESYINEKNNNGELYLFQIYNKDFGIKTEGNKNLHTMYW
ESIFSEENRFRNFIVKLNKAEIFYRPKSEQVEKEQRNFTREIKNRRYTENKIYFHCPITLNRISRENVKKFNNGINNY
IATNPINILGVDREKHLVYYAIVDQDGKLIDAEDATGSFNTIGSTDYHRLLEEKAKDREKERKDWDLIRGIKDLKKGY
ISLVVRKIADLAIKYNAIIFEDLNTRFKQIRGGMEKSVYQLEKALINKLSFLVNKGEKDPEQAGHLLKAYQLAAPFQT
FDKMGRQTGIIFYTQASYTSKIDPITGWRPNLYLKRYNIDDSKESIKKFKSILFNKEKNRFEFTYDLKDFVDFEEDKIP
KTEWTLCSVERHKWNRHMNNKGGYEVYKDLTENFYKLFDENNISMNKDIVDQVESISNGNFFRQFIYLFNLVCQIRNT
DEKAEDVDKRDFILSPVEPFDSRRAKDFKAYGDNLPKNGDENGAYNIARKGVLIKKIKEYYNQNGSCDKLGWGLSIS
HKEWDDFATNN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1301</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1301</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q3">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDSYEQFTKLYPIQKTIRFELKPQGRTKEHFDNSNFLEKDRERDDNYKILKEVIDDYHREFI
DECLSNIQLNWDDLKKFSEFYRRSKEKKNNRDESEQKRMSTTSETRAINKKNLEAEQKMRGEIVSAFKKDDRFBKHLFS
EKLFSILLKNQIYEKGTLEEIEAFDCFNKFSGYFKSFHENRKNMYSDEDEKETAISYRIINENFPKLLDNFEKYQYVCREY
PEQIREAESTLAEAGCYIKMDEIFSIDNFNNVMMQGGKESGISRYNLAIGGIVQGTGEKPKGLNEFLNLAYQNEPNGRKK
IRMEPLYKQILSKEESFSYRLEAFTDDSQLLSAIRSFFDIVEKDKNGNIFDRAVNLMSFSNYDTSKIYIRKAYLNQVSK
EIFGYRGKSDSKPAKTADES LNKSGGWEKLGQMLRDYKADSIGDRNLEKTCKKVKWLDSDSDEFTLSDILGAISLAGSNET
FEAYVSEICVARRNIDKEKEKEKNINVEKISGDTESIQUIKALLDSVQEFFHLLSPFQLHPNTPHDWTFYAEFNDIYDKL
SAITPLYNQARNHLTKKNLDTSKIKLNFNNPTLANGWDVNKEYENTAVILIRDGKYLLGIMNPKNKRKIKFDEGSGAGPF
YQKMVYKLLPGPYRMLPKVFFAKKNIDYYNPSQEI REGYKAGKHKKGKEFDKGFCHKLIDFFKESI QKNENWKVDFKFS
PTESYDDISEFYQEVEKQGYRMYFVNIPSDTIDRYVEGGDMFLFQIYNKDFAKGAKGNKDMHTLYWNAVFSEENLQKGVM
KLSGEAELFYRKKSDIKDPPHREGEILVNRTYIDRTHVSGVMGEQNTVKESRIPVPDEIHKNLFDYYNHGRELTKEEKEY
CDKVGSGFAYYGIKDRRYLENKMYFHVPLTLNFKAIGEKRINKMAIEKFLT DENACIIGIDRGERNLLYYSIIDRNGKI
IDQKSLNVIDGFDYHEKLSQRQTEREVARQSWNSIGKIKDLKEGYLAKAVHEISKMAIKYNAIVVLEDLHFGFKKGRLKV
EKQIYQKFEEMLINLKNLVFKDVSDSDAGGVLNAYQLTAPLESF SKLGKQSGILFYVPAFTSVIDPTTGFDL FNSS
SITSTQKKKEFLQRFESIVYSARDGGIF AFTFDYRNFSKIATDHRNMWTVYTHGERIRYVRDEKCYKTTDPTKRIKEALS
GIEYDDGSDIRDKITQSGDNNLINTVYHSFMDTIKMRNKDGRIDYIISPVKNRNGEFFRSDYKHRDFPVDADANGAYHIA
LKGELLMRMIGKTYDSNSDKMPKLEHKDWFEFMQTRGDQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1188</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1188</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q4">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MCVSRLPWFNITLTGKLNQRQLNQM CVSRLPWFCTPKGQLAATPKTVVAQQENAMLA I IRDV
HEAAPADLKTVAQRLEPGYFVTQFPKQQMTGDEARAEAEERLFAACQKKFKELAEYEDGYRQCLDALGPNLSLPRLGRKPK
GAYPYAVVFKLMPTNATWECFKRVTASLYKRAQKGVVSPVSADSIADVRTNDEPLFEYFTNLALVRPPGNKDRAVWFEFD
LAAFIEA IKSPHQFFQDTIKREQAVAQIKAKLDAMDGGGRAASGEEDALPGFEGDDRITLLRELVTDTLGYLAEADASTS
PGGKIEYSIQERTVRGFAEVKRRWRDLVEKGKATEDALLKVLAAEQTEHRDDFGSATLYRELAKPKFQPIWRDPGTQPDWH
ADDPLRAWLEYRELGRELEDKQRP I RFTPVHPVHSPRFF IFPKKKGGGRFGTVHEPGQLRVMAGIVAQTQHGWEPPVRI
TYAAPRLRRDQLRDDVETDLESRPWLQPMQALGLPEPDTADFSNCRVTLQPSAPDDIQLTFPVDVSADKLTTAIGKAAR
WAKQFNLFDPGDNFYNASLRWPHEKKPSKPPVPWHEALDNFSVLAADLGQRCAGAFARLEVRANDDFAGKPSRF I GETPG
KKWRAALVAAGMLRLPGEEQTVWRPGATGPNFHTELSGSRGRMARPH EADDTADLLRAFDCPEESLMPADWRTSLSFPEQ
NDKLLVAARRYQSRLARLHRWCWFLTDEKKRQTALDE I REAEDMPAADDPQLTDKLRALLLQKQAALPGLLVRLANRILP
LRGRSWQWETHPKADCHLLTQTGPALPDVWIRGQRGLSMQRIEQIEELRRRFQSLNQMQRRE I GGKPP IRRDDSI PDCC
PDLLDKLDQIKEQRANQA AHMILAEALGLRLAPPPADKRQLRASRDVHGQYVKSREPVDF I VIEDLSRYRSSQGRAPREN
SRLMKWCHRAVRDKLRELCEPFGIPVVETPAAYSSRFC SRSGVAGFRAVEVGPGFDREFPWMMLKDREDEGEPPVRQLILQ
VATLNQGRDGKPPRTLLAPLAGGPIFVP IVDKLNADIQPALAQADINAA I NLGLRAIADPRLWSIHPRCRTQRQGDQML
TREKRKFGETGQPLAVHRADGVKPDTRNPNFFAD I SGSLPAWESATLDGQHLLSGRCLRSE I KKRQWQRCAE I NDRRMN
RWMKGE</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1518</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1518</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q5">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MTELQTRAYTLRLKGIDEKDQSWRDALWKTHEAVNKGAKVFGDWLLTLRGGLDHTLADAEI
PGEKGKPDRAPTQEERKHRRILLALSWLSVESERGAPEEFIVATGKEPAATRNDKVI AALKDILGRNLT EEKISEWTEV
CTPSLSAAIREDAVVWNRSAFDEAVKRIGSSLTREEVWDMLECFFGSRNAYLAPVKISEDESSDGEQEEKAKDLVQKAG
QWLSSRFGTGEGADFAKMAAVYAKIAAWAGNAQAGTTGNEVINNLATALREFTPKSNDLKGVLDLISGPGYKSATRNLLK
QIANTKTVTREDISKLQETAGEDSEECATKTGSKGKRAYADAILKDVESVCGFTYRIDKDGQPVSVADYSKYDEDYKWGS
SRHKEFAVMLDHAARRVSLAHTWIKRAEAERRKFEEDSKKIMQVPQAAKDWLDAYCAQRSEASGALEPYRIRKRAIQGWK
EIIASWNKPDCKTAEDRIAAARQLQDDPEIEKFGDIQLFEALAEDDAQVWKKEDGTLDPEILINYTLASEAMFKKQHFK
VPSYRHPDAFLYPVFCDFGNSRWELDFSIREAATKLKEIEAKIEKQRQEVHKVQQALEKCENDEKRPKMEERLKEAQKKL
QESQNYGEYLHSNNKITMVLFDGTFVKKHIFAWQSKRLTKDLALYQEPSADPKNVVSRADRLGRAVASVGINDAVKVAGL
FEQENWNGRLQAPRQQL EIAQYVEKHGWDNKA EKMRA SIKWFI TFSAKLQSKGPWNEFARKHGLKEDPHYWPHA EKNEN
RTAHSRLILSRLPGLRVLSVDLGHRYAAACAVWEALGSEAFKKDIEGKRIIRGDTDENALYCHTEHEANGKKHITIYRRI
GADTLPGAHHPAPWARLDRQFLIKLQGEDEQAREASNEEIKVHQLENTLGRRTPLIDRLIAGGWGYTEKQKARLEVLT
NLGWCPTNKTNDQEEGDEEETAILSKPSLLVDDLMSAVRTLRLALKRHGDRARIAHYLITDEKTKPGGVKEKLDKNGRV
ELLLDALGLWHDLFSSPGWHDEKAKQLWNAYIAGLLPEGELQQAQSVTTSAALGGQKKEKKEKLRAVAEALYLNSDLCH
SLNEVWRKRWEEDDKQWRIYIRWFKDWIMPRGANAKSPAIRHVGGSLSLTRLATLTEFRRKVQVGFFTRLHPDGTKTETRE
DFGQKTLDLTLEHLREQRVKQLASRIVEAALGIGSEDKRHWGKKRPRQRIADPRFVPCHAVV IENLTHYRPEETRTRREN
RQIMEWASSKVKKYLSEICQLHGLHLREVSAAYTSHQDSRTGAPGIRCQDVSLIEFMKSPFWRKQVAQAEKKQKEGKGDA
VERYLCELNQKWKGASEEWRKAGFVRIPLRGGEIFVSAAGHDSPAAGIHADLNAAANIGLRALLDPDWSGKWWYVPCN
SSTMCPARDKVTGSAAVNPGQLQVSAQLESDDAAKDTKKRKKKKGDKSKEIINLWRDISSYPLEDTRGGTWSNKT VYWN
RVQSNVVHILQNQMKG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1374</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_mol type>AA</INSDSeq_mol type>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1374</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MPETTQRAYTLRLQGHDPKDASWREALWKTHEAVNRGAKAFGDWLLTLRGGLDHSLADEGAP
GQTPTEEQRKQRRILLALSWLSVESENGAPQEYIVPHDRDNESGARQNWKTREALREILKNRGCRDDEIESWCHDCEPSL
TSAIRKDAVWVNRSKAFDNAVQSI PNFSREEIWDLLGCFVSSQAYLAPLESPKDDKPDASKKSSKDLIQSAGQWLSRR
FGRGKGLNFARLAETYEAIARWASVANPGDTNDLIADLAKTLNAETPELDGILKVVSGPGHKS KTRNLLRSLSAVNHITK
DTLQRLKDTANEDAKKAKLKKGEKGHAYAYKVLEAVEDACGFTYLQEGDRAKHCEFAVMLDHAARRVSSLHTWIKRAEA
ERRRFEIDTKKKDQLPPSVKEWLD TYCQKR SKETGAVEPYRIRRGAI EGWKEIVEAWSKAGTTTAEDRKHEARRLPDNP
IDKSGDIKLFEDLALEDALPVWHANGDPNNPPDPQL IDYVEGSEAEFKKRAFKVPTYCHPDPLVHPVFCDYGCSRWNVS
FAIQPVKKQKLSSEEKLPAGLLLDLLHGTAIRPVALRWQSKRFARDLALNTTSSDKPNEVTRADRFGCALAKCPSSQK
IRIRGLFEEKYWNGRLQAPPELTALAKRVAKYGWDKKARKLRNSLNWFITFSANLRPSGPWEEYTKYAEKAFSSNASAK
PSVSRGGFWVWHASPNKRGKMAQLRLCRLPELRLVSLDLGHRYAAACAVWETLSKSAFEQEIHERKILRGGTGPNDFCH
TQHDTNGQSKVTIYRRIGADTL PNGTPHPAPWARLDRQFLIKLPGEEREARKASPTELANVEKLEKELGLKTSENRVKRI
DDLMSDTLRTVRQALRRHSLRARI AFNLATLRDQSDGDEESQSKQKRDTRWNNTVKIWHSLLESNEWTDDWAKALWDELG
PLSDPQKADDAEWLKLAAEFYTRWQEDEQTRERLRWLRRWILPRGSQAASQKGSIRHVGGLSLTRLATIKTLYQVLKA
YHMLKPDNSRKNIPAEGDEALQNFQKILDDLEHMREQRVKQLASRIVEAALGLGRMKQVTIGKDPKRPREPVDQSCHA
VVIENLTHYRPEKRQTRRENRLMDWSAAKVKKYLKECCQLHGLHLVEVSASYTSRQDSRTGAPGIRCQEVPLTDFLKK
FWREQVKQAKQRLSEGGANARDRYLCQLNERWGNAPAPVTQTAIRLRIPLNGGELFVSADQNSPASKGIQADLNAAANIG
LRAITDPDPGAWWYVPCANTFKPVKDKVAGSAAIDSNVSLKKDSPNSEKPASDRKSRTSKSMINLWCDTSSKSLSEKD
QWQESAPYWEDVAARTINILQASLACSTTNSQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>1335</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..1335</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q7">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MKS LAQFQNL YALQKTLRFELKPEGHTRET FNRL EEIEKEQASENENIVYQDLLRAKKYEK
IKI ILDEYHKDFIEQALAYANL TELEKYEEL YRKS NRTSEEEEFENTKESLRKQIANIFIKNPNTVQERWKFLFSKKL
IQNELIVWVKGN YELLSEKLKNEFPDESSIISTIEDFKYFTTYFRNYHENRKNLYSNEDKFSTIAHRLIHENLPKFIDNI
AIYQKAKAVLNINEVEKELGLPEDTLDKIFSLDFFSKALTQKGIDQYNYFLGGKTENEVKKIKGLNEFINLYNQQQQDKN
QRLPFLKVLYKLPLFERTSTSFRFEP IENDRDLIERIGKFYYNDLKQYRDDSQGDTTDILSGINTLLRHVHDYRDGLYVN
GGITLTQISQIFGSWSYINN ALAYFYDTYIDASGVDHQGERKPKKQKQIQEKTW LKQKQFPVILVEKALSEYKSIETN
EDLKTRISD TTLCDFFKRCGNDNGQDLFDRIEARLREKNEEGYSLEDLLKKEFTTERKLMQDKTKLLIKNFLDVIQGD
KDDITAGLLHFVKCLIPRTEISEKNELFYSGMEKYLNILSEVTPLYNKARNYLTQKPYSIEKVKNFENSTLLDGWDENE
ESDNSCVLLRKRGYYYLGIMNKKHNMIFDRKIYPKATEGEAYYEKMIYKLLPGAYKMLPKVFFSEKNIDYFKPSEEILRI
RNTASYSKNGQPQEGYQKASF SIEDCRKYIDFFKKCIANHWDWQKFNFNFSPT EYYQS IDEFYREIERQGYKIDFVKIPE
SYINQLIKENKLYLFKIYNKDFSEKKKSKGKDNLHTLYWKMLFDEKNLKD VVLKLNGEAEVFFRQKSILYNEEIWNKGHH
YSELKDRFSYPIISNKRYAEDKFFLHVPITLNFKADGINNVNMVNEFIKDNRDIHIIGIDRGERHLLYVSVINQKGDIV
EQCSLNEIVTEYNGKIFKKNYHEELDNLEKERDRARKDWQTIANIKELKEGYLSHVIHKISKLILKYNAIVVMEDLNSGF
KRGRQKVEKQVYQNF EKQLIEKLN YLVKESNVDEPGGVL RAYQLANKFETFKKLGKQSGIIFYVPAAYTSAIDPVTGYI
QYLYPLKQADSVEKARKFY SQFKRISYNPHKQWF EFSFDYDNFNIYHGKSSWTICTTNTERYMWNRLNNGHGGEELVY
VTNELELLFGEYNI IYGDGKDIKQKITDVQDIDVDRTAKQFYKRINELLNLTLKLRHNNGKKGADEEDYILSPVEPYFDS
RFESRKPSMQQTLPINADANGAFNIARKGLLLLERLNQLGV EEFKTKKSNNKKTQWLPHELWVEYAQNHTRK</INSDS
eq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1520</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1520</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MAYQNGKEQPTVTNQRAYTLRLSGTNDQDSIWRNRLWHTHEAVNKGAKTFGDWLLTMRGGLC
HTLAEADVPGKGKPARHPTPQEIRSRVVLALSWSVESQHGAPERHLVSHDLDIATGERKNWKTVEALREILHGRCCLC
KELIDEWANDCRDSL SATIREDAVWVNRSKAFDLAAKIGASLTREELWDFLQPFFANKHGYLQMDTVAGVTNGDSETDA
EEAKEDSSEEKAKDLSQKAGQWLSSRFGTGTGADFSRFSKVEVLAARCGSVAVGVSGVEAIRILAGTLADFSPGSNDIE
GMLGLMSGPGYKSATRNILQKINTLQTVSQQDLRLREASEKDALQSKQKVGKGSRPYANA ILQDVEAACGICYAGTGE
SPARHWQYAVILDHAARRVSMASWIKRAEEQRSKFIEKDKLDHVPKDALAWLDAFCARRSSESGASDAYRIRRSAVDG
WKQVVAAWAALPPKPENQGSSELLSDAESARIQAARELQDTVEKFGDIQLFEALSLTGAKCVWQPDGRPDAQPLLDYVAGT
DAISKKQRFKVPAYRHPDALLHPVFCDFGNSRWNNINYAIHRAPEKLTPAQQLEKKKAEIDKAELTLAKAGDAAKQANIS
EKINGLRAAFIQQKEKVAWLNSRHAMTMSLWDGTHIEDTPLIWQSKRFGSDIGQPVEAQPLPVSRA DRFGRAVALAQDNV
PVIPSGLFDLSDWNGRLQAPRRQLEAIAAIRDSAKLSVNEKQQLVAKRIQSIRWLLTFSAKLQSHGPF IAYAAQHGF DWR
YGAHGPENKSRQGLAKLILCRLPGLRILSVDLGHRYAAACAVWETLNAGQIQKACLDAGKEAPGPCTLYLHLKQIANGKE
KKTIFRRIAADTLPDGSPHPAPWARLDRQFLIKLQGEDRDARLATSEEIAAVEQMENELGVVRQLKRKGRELLVDELMSD
ALRTLRLGLRRHGVRARIAFNLTANKRIRPGGKEEVLDQEGRVLLL TETLLAWYELYTAERWTDEPARELWNRHIQPLL G
ATILQNTVNQEDTPSAARRKLREETSGKLKHVAEEIAKNDSLRCQLHVLWSAQWQTEDVIWRTRLRMMRRWLLPRGVKR
NAQLRISIRDVGGLSLTRIASFKSLYQVQKAYQMRPHPEDPRLNIPERGDSRLENFGQRVLDAMERMREN RVKQLASRIA
EAALGIGGETGISSKDGSKKRPTESSDPRFAPCHAVVIEDLTHYRPDETQTRREN RQLMSWSSSKVKKYLGEACELNG
```

```
LYLREVSPAYTSRQDSRTGAPGLRCNDVTVVEFNNSPFWRKQVGAAEKNQKEGNKGDARERYLLSIEEGIRGAANDRDI  
RIPVKGGEIFVSACITDGGNNAKKNAPPGLQADLNAAANIGLRAIFDPDWEGRWWYIPCDAAATLCPDAKKFIGCKAVDPT  
KPLRVVAAEGAIASGIGSKKSGRKKNAATDGTRIVNLWRDPSGAPIHRDVLRSPEWQDYAGYWNEVQHRVIRNLKTCYE  
QTSQQEDPFVSQDADKPF</INSDSeq_sequence>  
  </INSDSeq>  
</SequenceData>  
<SequenceData sequenceIDNumber="9">  
  <INSDSeq>  
    <INSDSeq_length>1180</INSDSeq_length>  
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>  
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>  
    <INSDSeq_feature-table>  
      <INSDFeature>  
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>  
        <INSDFeature_location>1..1180</INSDFeature_location>  
        <INSDFeature_qual>  
          <INSDQualifier>  
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>  
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>  
          </INSDQualifier>  
          <INSDQualifier id="q9">  
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>  
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>  
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>  
          </INSDQualifier>  
        </INSDFeature_qual>  
      </INSDFeature>  
    </INSDSeq_feature-table>  
  <INSDSeq_sequence>MKRLAETALADKVKCETNSRPKGERAYANSILHDVESACGFTYRVDKGEQPVPSDYSHYAN  
DYRWGPANHSEFAVMLDHAARRVSLAHTWIKRAEAERRQFEENAKKIDKVPKVAREWLDLSLAERSIVLGALEPYRIRRR  
AVDGWKHVVAAWSKSDCKTAQDRITAARLLQEDPEIDKFGDIQLFEALAEDHAVCVWQRDGEAGKTSDPQLLIDYALAAE  
AEFKKRHFKVPAYRHPEAFWHPVFCDFGQSRWKICFDVHKNRQSRQRACANRISRKICFDVHKKRQTLRLSLEVWTGSK  
MLDMPLCWQCKRLARDLALGQDHKKDRSCQVTRADRLGRAVSNNARNQEVQILGLFEQEYWNRLQAPRPQLEALGRYIE  
KHGWDAAKQSCRAIRWMSFSRPLQPAGPWGKFAEKLQLNPNPKYWPHAEDNKDRGSRSKLILCRLPGLRVLSVDLGH  
YAAACAVWEAVDAEQVKEACQAAGHREPNNENDLYLHLKKRTTKQKKSQGVVEETIYRRIGADTLPDCTPHAPWARLD  
RQFLIRLQGEEDARAASNEEVWAVHKLEAELGRTIPLIDRLLGAGWGQTEKQKARLKALRELGWTPANKCQAFNSTDET  
ELRRPSLAVDELMLDAVGTLRLALKRHGDRARIARYLITDERTKPGGVKEKLDENGRIELLQDALI IWHGLFSSPRWRDD  
AAKQLWNEHIAKLVEQNLEVSEDASGSERRTKQKQNKREKLREAAKALVDDVALRQALHDMWKRRWEEEDREWRRRLRW  
FKDWVLPREQARKAYSRAETGSSSHPKRRARYAARRVGGSLTRLATLTFRRKVQVGFFTRLKPDGTAKAEAKEGFG  
QSTLDALEHLRAQRVKQLASRIVEAALGVGRIIRFPGVKNPKRPDTPVDKPCHAIV IENLTHYRPEETRTTRRENRLMTW
```

```
SSSKIKKYLAEACQLYGLHLREVTAA YTSRQDSRTGAPGLRCQDVPVKEFMRS LFWRKEVAQAEKKLTAGKGSSYERLLC
ELNQRWKDN SPGDGKRAELLRLPHKGGEIFVSAAPDSPAARGLQADLNAAANIGLRAL TDPDWPGKWWHVPCNAVTFRPV
EDKVKGSAAVKLDQSLRQVAHPQSKDPGAKKSKEIVNLWCDISSLPLEHREWKL DWEPYPAYWNNVQCRVIRVLQGKV</
INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1546</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1546</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MANAKVKTTTTSYTL SLNAPSDTTDRSPLWHRIFRTHYAICCGAREFGKLLLDLRGGLPTSL
AQLGEGIAENDRRQTQRGTRRILALGWLSVEDLDHARNDPHRVQDTAPGSPLDQDLAEKILRKILITKGIKSEEEQSNWI
SDCLPALTANIRPD AVVWNRAESFAQWQRGTQPGAQPPTPEEAQQILFSLCGESLVTLTLP EQPAAAGQKQPDQETSPDP
EEQTD RPPAAPSADEMDPSNASRGIFGDLFGENAEGKRSRSQKDNFACAVRDFLCANPTPSADAITEFREKQKPREPN
PPGPEKYPPEVSTSGAPTAVAKRYRKL LVCAGLWPKSADEDGSSRNSAKTKFADPK EPQKTEIQINALDLIDACNQAAPA
DDSGTSPKAGRVFAPAWASNIAEKVASATQMPANAKSLNEFKRLMFLAARRFSQTQSWTRRNEAERHMAAARQDAAVAR
LREIDPDHKAQDWLRGYEQRRADQSGSNGEFRITRRMIGEAEAVFKAWAGTNSAAERELKTVAVQT TAEKFGDAALYSEI
ARNTAAEAVWRSGSAPEILDQWVKLRKAQSDQQRTRVPRFCHPNAFRHPTWCEFGESSKPGVWYAWNPKSKPRKPEVGGE
GDGTRRLWVLLPDFNSGIGQAVPLRWR SKRLSKDLGEALQPSDAPIPRADRVSIAAAGLNLEGANGVPARYRPSLPFSEN
TKGWNARLQANRTALLHLESKWDAEAATWRDGGRSLLALKWFTTFSPELAMSEGP GRAIHPKLGWNSEPHSDLNRAQKRG
GNAKLILSRLPGLRVLSVDLGHRYAAACAVWETLTTEQMNAACQAKNHTQPAESDMYVHLAHP TERVVKSGRKKGQNLIQ
TTVYRRIAADTL PDGTPHPAPWGRLDRQFLIKLQGEQRPTRAASKNEADLANALFHLRLGLRSDADSENKSRAVDKLMART
```

```
VRVATLGLKRHARRAKIAYALDPNTKAIPGMGGSSAAFTPGDEPHIHLITDALFDWQSLATDAKWDDAHARSLWNHHIAT
LPGGFHLENPTPRDESAHEPSRQRQRSGDDALRATLKPIAEKLSKADRQEVHAAWKKYWGDSGQSAIVPKVLQGQRGPE
KTTPSASASGWHGKIRWITDWIMGKYLEGCTGHAWKHDVGGLSVSRITTMKSLYQLHKAFAMRATPEKPRGAPEKGESNL
GAAQGIILTAMESMRQQRVKQLASRIAEAAALGAGIERRSDNGRELQRPRERVDPRFAACHAVVVEDLTNYRPDEMQRRE
NRQLMQWASSKVKKYLSEACQLHGLYLRGVPAGYTSRQDSRTGAPGVRCGDIPVEELMAAPRWRRQILTAEKTRRENNTG
TARDRYILTLDEKYRLLTAEQRKKTTPARIPVKGGDLFVSADPDSPAASG IQADLNAAANIGLKALIDPDWPGRWWYIPC
DATTHKPSPERTRGSAAVDCDVPLGPDSTGTPEDRDAKPKKNQRNSKIAGRGQSAIINLWRDPHTLPIKENPSAWCESKK
YWNQVEHNVVKVIESKGQKLTQTAEAAATGESASSPPIAPTDPVPW</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>117</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q11">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
</INSDFeature_qual>
```

```
</INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>gttcctacaggaactccattccaatgggtgtgtcttccccttcaatgggttagcaccatt
gggttgatcagaatctgatcaaccgacacctcctgctagaatggctggcaatggc</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>116</INSDSeq_length>
```

```

<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..116</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql2">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gttcctacaggaactccattccaatgggtgtgtcttccccttcaatgggttttagcaccatt
gggttgatcagaatctgatcaaccgacaccgtctataatccgtttatgattgat</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>195</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..195</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql3">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gcgctacagggcgcatccaaatccacgacatgtgtcttccccttcgttgggttagcatc
gtggagtcgatcacactcaggtgtgcggagtgcacatgttgacaacttggcgcgctgcgcgagcgcgaaaacgcgcag
gccagcgcgccgatgatcgactgacacctcctgctagaatggctggcaatggc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>146</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..146</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q14">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caaatccacgacatgtgtcttccccttcgttgggttagcatcgtggagtcgatcacactca
ggtgtgcggagtgcacatggcgcgctgcgcgagcgcgaaaacgcgcaggccagcgcgccgctcctgctagaatggctggcaa
tggc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>156</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..156</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="ql5">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggctataggccacaggaagccacggaatgtgtcgtccccttcaatgggcttggcaccgtggc
gtcgatcagttttgttccgactgaggacaaaaggtgccgacgtcggcaccaacctgatcgacggacacctcctgctagaa
tggctggcaatggc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>150</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..150</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q16">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggctataggccacaggaagccacggaatgtgtcgtccccttcaatgggcttggcaccgtggc
gtcgatcagttttgttccgactgaggaaaaccgacgtcggcaccaacctgatcgacggacacctcctgctagaatggctg
gcaatggc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>126</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..126</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q17">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ggctataggccacaggaagccacggaatgtgtcgtccccttcaatgggcttggcaccgtggc
gtcgatcagttttgttccaccaacctgatcgacggacacctcctgctagaatggctggcaatggc</INSDSeq_sequen
ce>
```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>139</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..139</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>cctcctaaagggaggcagaactccgagtatgtgtcttccccgtcattgggcttggcactcgg
    ggtcaatctaattcactttggaaaaccgaagtgaatcagatcgaccgacacctcctgctagaatggctggcaatggc</I
    NSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>

```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q19">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cctcctaaagggaggcagaactccgagtatgtgtcttccccgtcattgggcttggcactcgg
attcactttggaaaaccgaagtgaatgacacctcctgctagaatggctggcaatggc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種偵測方法，其包括以下步驟：

使 CRISPR-Cas 複合物與潛在地包含靶核酸序列的樣品接觸，該 CRISPR-Cas 複合物包含：

在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性(collateral cleavage activity)之 Cas 蛋白；及

經選擇或工程化來與靶核酸序列互補的嚮導 RNA。

【請求項 2】 如請求項 1 之方法，其中該接觸步驟包括使該 CRISPR-Cas 複合物及樣品與易受藉由 Cas 蛋白旁切活性來實現之裂解影響的報告子接觸。

【請求項 3】 如請求項 1 或請求項 2 之方法，其中該接觸步驟包括在高於該溫度下孵育一段時間。

【請求項 4】 如前述請求項中任一項之方法，進一步包括擴增存在於該樣品中之核酸的步驟。

【請求項 5】 如請求項 4 之方法，其中該擴增步驟利用熱穩定核酸聚合酶。

【請求項 6】 如請求項 4 或請求項 5 之方法，其中該擴增步驟及該接觸步驟在單一容器中執行。

【請求項 7】 如請求項 1 之方法，其中該 Cas 蛋白為 Cas12 蛋白。

【請求項 8】 如請求項 7 之方法，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 至少 80%一致的胺基酸序列。

【請求項 9】 如請求項 7 之方法，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 10】 如請求項 1 之方法，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有 80%序列一致性的胺基酸序列。

- 【請求項 11】 在一種使用具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白來執行偵測檢定之方法中，其改良包括使用具有熱穩定旁切裂解活性之 Cas 蛋白。
- 【請求項 12】 如請求項 11 之改良，其中該 Cas 蛋白為 Cas12 蛋白。
- 【請求項 13】 如請求項 12 之改良，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。
- 【請求項 14】 如請求項 12 之改良，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。
- 【請求項 15】 如請求項 11 之改良，其中執行偵測檢定之方法在單一反應容器中進行。
- 【請求項 16】 如請求項 11 之改良，其中該熱穩定旁切裂解活性在高於約 60°C 溫度下熱穩定。
- 【請求項 17】 如請求項 11 之改良，其中該熱穩定旁切裂解活性在高於約 65°C 溫度下熱穩定。
- 【請求項 18】 如請求項 11 之改良，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID No. 1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。
- 【請求項 19】 一種非天然存在或工程化之組成物，其包含：
- (a) 具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白，其在高於至少 60-65°C 之溫度下係熱穩定；及
 - (b) 至少一種嚮導，該嚮導能夠與該熱穩定 Cas 蛋白形成複合物並且引導該複合物結合至靶核酸序列。
- 【請求項 20】 如請求項 19 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。
- 【請求項 21】 如請求項 19 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 22】 如請求項 19 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 23】 如請求項 19 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 24】 如請求項 19 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 25】 如請求項 19 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 26】 一種非天然存在或工程化之組成物，其包含：

(a) 多核苷酸，該多核苷酸編碼具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白，該 Cas 蛋白在高於至少 60-65°C 之溫度下係熱穩定；及

(b) 至少一種能夠與該 Cas 蛋白形成複合物並且引導該複合物結合至靶核酸序列的嚮導。

【請求項 27】 如請求項 26 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。

【請求項 28】 如請求項 26 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 29】 如請求項 26 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 30】 如請求項 26 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 31】 如請求項 26 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 32】 如請求項 26 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至真核細胞中

之一或多個靶核酸序列。

【請求項 33】 一種用於修飾靶核酸中之核苷酸的非天然存在或經工程化之組成物，其包含在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白。

【請求項 34】 如請求項 33 之組成物，進一步包含至少一個能夠與該 Cas 蛋白形成複合物並且引導該複合物結合至靶核酸序列的嚮導序列。

【請求項 35】 如請求項 33 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致的胺基酸序列。

【請求項 36】 如請求項 33 之組成物，其中該 Cas 蛋白具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項 37】 如請求項 33 之組成物，其中該 Cas 蛋白已經修飾以便減少脫靶效應。

【請求項 38】 如請求項 33 之組成物，其中該靶核酸中之核苷酸之修飾治療由點突變導致之疾病。

【請求項 39】 如請求項 33 之組成物，其中該靶核酸中之核苷酸之修飾使由該靶核酸序列來編碼之基因失活。

【請求項 40】 如請求項 33 之組成物，其中該靶核酸中之核苷酸之修飾將由該靶核酸序列來編碼之基因產物加以修飾。

【請求項 41】 如請求項 33 之組成物，其中該靶核酸中之核苷酸之修飾調節由該靶核酸序列來編碼之基因產物之表現水準。

【請求項 42】 如請求項 34 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸序列之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 43】 如請求項 34 之組成物，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸序列之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 44】 如請求項 34 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 45】 如請求項 34 之組成物，其中該嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 46】 一種載體系統，其包含有包含以下之一或多個載體：

(a) 第一調控元件，其可操作地連接至編碼具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白的核苷酸序列，該 Cas 蛋白在高於至少 60-65°C 之溫度下係熱穩定；及

(b) 第二調控元件，其可操作地連接至編碼嚮導之核苷酸序列。

【請求項 47】 如請求項 46 之載體系統，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 48】 如請求項 46 之載體系統，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 49】 如請求項 46 之載體系統，其中該編碼 Cas 蛋白之核苷酸序列經密碼子最佳化。

【請求項 50】 如請求項 46 之載體系統，其中(a)及(b)包含於單一載體中。

【請求項 51】 如請求項 47 之載體系統，其中(a)及(b)包含於個別載體中。

【請求項 52】 如請求項 46 之載體系統，其中該載體系統包含病毒載體。

【請求項 53】 一種裂解細胞中之至少一個靶核酸的方法，其包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至該至少一個靶核酸的嚮導接觸，其中該 Cas 蛋白能夠與該至少一種嚮導形成複合物並且在該至少一個靶核酸中引起斷裂。

【請求項 54】 一種改變細胞中之至少一個靶核酸之表現的方法，其包括使該細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至該至少一個靶核酸的嚮導接觸，其中該 Cas 蛋白能夠與

該至少一種嚮導形成複合物並且在該至少一個靶核酸中引起斷裂。

【請求項 55】 一種改變細胞中之至少一個靶核酸之表現的方法，其包括使該細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至該至少一個靶核酸的嚮導接觸，其中該 Cas 蛋白能夠與該至少一種嚮導形成複合物並且編輯該至少一個靶核酸序列。

【請求項 56】 一種修飾細胞中之至少一個靶核酸的方法，其包括使細胞與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至該至少一個靶核酸的嚮導接觸，其中該 Cas 蛋白能夠與該至少一種嚮導形成複合物並且編輯該至少一個靶核酸序列。

【請求項 57】 如請求項 56 之方法，其中編輯該靶核酸包括在該靶核酸序列處插入酬載核酸。

【請求項 58】 如請求項 53-57 中任一項之方法，其中核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 59】 如請求項 53-57 中任一項之方法，其中核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 60】 如請求項 53-57 中任一項之方法，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 61】 如請求項 53-57 中任一項之方法，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 62】 如請求項 53-57 中任一項之方法，其中該嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 63】 如請求項 53-57 中任一項之方法，其中該嚮導序列能夠雜交至真

核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 64】 一種核酸，其編碼具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白，該 Cas 蛋白在高於至少 60-65°C 之溫度下係熱穩定。

【請求項 65】 如請求項 64 之核酸，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 66】 如請求項 64 之核酸，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 67】 一種治療有需要之個體之病症或疾病的方法，包括向該個體投與在高於至少 60-65°C 之溫度下熱穩定的具有旁切裂解活性之 Cas 蛋白及至少一種能夠雜交至靶核酸之嚮導。

【請求項 68】 如請求項 67 之方法，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少 80%一致之胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 69】 如請求項 67 之方法，其中該核苷酸序列編碼具有與 SEQ ID NO：1-10 中之任一者具有至少 80%序列一致性的胺基酸序列的 Cas 蛋白。

【請求項 70】 如請求項 67 之方法，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至兩個不同靶核酸序列或靶核酸之不同區域的兩個嚮導序列。

【請求項 71】 如請求項 68 之方法，其中該至少一種嚮導包含能夠雜交至複數個不同靶核酸序列或靶核酸之複數個不同區域的複數個嚮導序列。

【請求項 72】 如請求項 67 之方法，其中該至少一種嚮導序列能夠雜交至原核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 73】 如請求項 68 之方法，其中該至少一個嚮導序列能夠雜交至真核細胞中之一或多個靶核酸序列。

【請求項 74】 如請求項 67 之方法，其中該 Cas 蛋白能夠與該嚮導形成複合物並且在該靶核酸中引起斷裂。

【請求項 75】 如請求項 67 之方法，其中該 Cas 蛋白能夠與該嚮導形成複合物並且編輯該靶核酸序列。

【請求項 76】 如請求項 1-45 中任一項之組成物，其中該 Cas 蛋白與修飾實體締合。

【請求項 77】 如請求項 76 之組成物，其中該修飾實體為腺苷去胺酶。

【請求項 78】 如請求項 76 之組成物，其中該修飾實體為胞苷去胺酶。

【請求項 79】 如請求項 1-45 中任一項之醫藥組成物。

【請求項 80】 一種表徵 Cas 蛋白之方法，包括評估以下中之一或多者：

- (a) 順式裂解活性；
- (b) 反式裂解活性；
- (c) 靈敏度；
- (d) 對於 RNA 或 DNA 靶核酸之偏好；
- (e) 對於 RNA 或 DNA 非靶核酸之偏好；及
- (f) 酶穩定性。