202241970

(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 202241970 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：111100459 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 01 月 05 日

(51)Int. Cl.： *C07K19/00 (2006.01)* *C12N15/10 (2006.01)*
C12N15/113 (2010.01) *C12N9/22 (2006.01)*

(30)優先權：2021/01/05 日本 2021-000378

(71)申請人：學校法人川崎學園 (日本) KAWASAKI GAKUEN EDUCATIONAL FOUNDATION (JP)
日本

(72)發明人：伊藤達男 ITO, TATSUO (JP) ；清水由梨香 SHIMIZU, YURIKA (JP)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：34 共 91 頁

(54)名稱

包含人類之生物之細胞中的轉錄產物、以及經基因導入之 RNA 及其複合物純化工具

(57)摘要

本發明提供一種 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其係於具有螺旋區、可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物、且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas)蛋白質或具有核酸酶活性之 CRISPR-Cas 蛋白質中，包含前述螺旋區之包含 N 末端側之 N 區與包含 C 末端之 C 區、能夠應答刺激而結合之第 1 因子與第 2 因子，且 N 區與第 1 因子、C 區與第 2 因子分別連結，第 1 因子與第 2 因子藉由包含蛋白酶識別序列之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子藉由包含自切肽之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子經非共價鍵結而成，前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物具有(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(非共價鍵結)-(第 2 因子)-(C 區)之結構，前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集具有(N 區)-(第 1 因子)與(第 2 因子)-(C 區)之 2 個部分。

202241970

【發明摘要】

【中文發明名稱】

包含人類之生物之細胞中的轉錄產物、以及經基因導入之 RNA 及其複合物純化工具

【中文】

本發明提供一種 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其係於具有螺旋區、可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物、且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas)蛋白質或具有核酸酶活性之 CRISPR-Cas 蛋白質中，包含前述螺旋區之包含 N 末端側之 N 區與包含 C 末端之 C 區、能夠應答刺激而結合之第 1 因子與第 2 因子，且 N 區與第 1 因子、C 區與第 2 因子分別連結，第 1 因子與第 2 因子藉由包含蛋白酶識別序列之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子藉由包含自切肽之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子經非共價鍵結而成，前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物具有(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(非共價鍵結)-(第 2 因子)-(C 區)之結構，前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集具有(N 區)-(第 1 因子)與(第 2 因子)-(C 區)之 2 個部分。

【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】

包含人類之生物之細胞中的轉錄產物、以及經基因導入之 RNA 及其複合物純化工具

【技術領域】

發明領域

【0001】 本發明係關於一種 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物或集、聚核苷酸或其互補鏈、載體、轉形體、擔載體、標的 RNA 之純化方法、細胞內環境之解析方法、新型冠狀病毒之預防或治療劑、基於 mRNA 之剪接異常之疾病之治療劑。

【先前技術】

發明背景

【0002】 據認為，人類 RNA 於生物體內存在約 34 萬個，其中成為研究對象之 RNA 為約 300 個，人類 RNA 之約 99%之功能尚未解明。另一方面，人類蛋白質之數量為約 21000 個，其中約 70%成為研究對象。

【0003】 人類 RNA 之功能解明落後之原因在於：RNA 為於每細胞中短暫性表現之基因，且抗體識別或利用生物素等之標記較為困難，因此難以於任意條件下將具有特定之鹼基序列之 RNA 純化。

【發明內容】

發明概要

[發明欲解決之課題]

【0004】 本發明之一個目的在於提供一種能夠進行 RNA 分子功能評價之標的化技術。

【0005】 又，本發明之另一目的在於將具有特定之鹼基序列之 RNA 於細胞

內之行為可視化。

【0006】進一步，本發明之目的在於提供一種新型冠狀病毒之預防或治療劑、或者基於 mRNA 之剪接異常之疾病之治療劑。

[用以解決課題之手段]

【0007】本發明提供以下之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物或集、聚核苷酸或其互補鏈、載體、轉形體、擔載體、標的 RNA 之純化方法、細胞內環境之解析方法、新型冠狀病毒之預防或治療劑、基於 mRNA 之剪接異常之疾病之治療劑。

項 1. 一種 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其係於具有螺旋區、可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物、且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas(dead Cas))蛋白質或具有核酸酶活性之 CRISPR-Cas 蛋白質中，包含前述螺旋區之包含 N 末端側之 N 區與包含 C 末端之 C 區、能夠應答刺激而結合之第 1 因子與第 2 因子，且 N 區與第 1 因子、C 區與第 2 因子分別連結，第 1 因子與第 2 因子藉由包含蛋白酶識別序列之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子藉由包含自切肽之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子經非共價鍵結而成，前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物具有(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(非共價鍵結)-(第 2 因子)-(C 區)之結構，前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集具有(N 區)-(第 1 因子)與(第 2 因子)-(C 區)之 2 個部分。

項 2. 如項 1 所記載之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述 N 區包含螺旋區之 N 末端側之一部分胺基酸序列，前述 C 區包含螺旋區之 C 末端側之一部分胺基酸序列。

項 3. 如項 1 所記載之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述 N 區包含源自韋德纖毛菌(Leptotrichia wadei)之 Cas13a(序列 ID：WP_021746774.1)之螺旋區之 N 末端側之一部分胺基酸序列中的 164 個胺基酸，前述 C 區包含螺旋區之 C 末端側之一部分胺基酸序列中的 1,003 個胺基酸。

項 4. 如項 1 至 3 中任一項所記載之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述第 1 因子包含 nMAG 或 pMAG，前述第 2 因子包含 pMAG 或 nMAG。

項 5. 一種聚核苷酸或其互補鏈，編碼如項 1 至 4 中任一項所記載之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物集。

項 6. 一種或二種載體，係包含如項 5 所記載之 1 種或 2 種聚核苷酸或其互補鏈。

項 7. 如項 6 所記載之載體，其中前述載體為腺病毒載體、腺相關病毒載體或質體載體。

項 8. 如項 7 所記載之載體，其中前述載體為 2 種載體，其中一載體具有(N 區)-(第 1 因子)之結構，另一載體具有(第 2 因子)-(C 區)之結構。

項 9. 如項 6 至 8 中任一項所記載之載體，其中前述載體進一步包含編碼與標的 RNA 相對應之引導 RNA 之聚核苷酸。

項 10. 一種轉形體，係藉由如項 6 至 9 中任一項所記載之載體轉形而成。

項 11. 如項 1 至 4 中任一項所記載之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集、如項 5 所記載之聚核苷酸或其互補鏈、如項 6 至 9 中任一項所記載之載體或如項 10 所記載之轉形體，其中前述標的 RNA 為與生物體功能及疾病相關之一組 lncRNA(長鏈非編碼 RNA(long noncoding RNA)))、及 ncRNA(非編碼 RNA(noncoding RNA))。

項 12. 如項 11 所記載之轉形體，其中前述轉形體為轉形哺乳動物細胞或轉形非人類哺乳動物。

項 13. 如項 1 至 4 中任一項所記載之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集、如項 5 所記載之聚核苷酸或其互補鏈、如項 6 至 9 中任一項所記載之載體或如項 10 至 12 中任一項所記載之轉形體，其中前述標的 RNA 為源自 RNA 病毒之 RNA、新型冠狀病毒之 RNA、源自合成基因之 RNA、lncRNA、引導 RNA 能夠靶向之 30nt 以上之 ncRNA 或前體 RNA。

項 14. 一種標的 RNA 純化用擔載體，係將可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas)蛋白質擔載於固相擔載體而成。

項 15. 一種標的 RNA 之純化方法，包括如下步驟：使引導 RNA 與標的 RNA 作用於如項 14 所記載之擔載體，而於前述擔載體上形成包含前述標的 RNA、前述引導 RNA 及前述 CRISPR-dCas 蛋白質之複合物之步驟；及使選自於由標的 RNA 及基因組 DNA、蛋白質、標的以外之 RNA 所構成群組中之標的 RNA 結合因子自前述複合物中溶出之步驟。

項 16. 一種細胞內環境之解析方法，包括如下步驟：將多個引導 RNA 導入如項 10 所記載之轉形體或於其中表現之步驟；使前述轉形體溶解並使 RNA 捕獲粒子捕獲標的 RNA 之步驟；及對前述 RNA 捕獲粒子所結合之標的 RNA 進行解析之步驟。

項 17. 如項 16 所記載之解析方法，其中前述轉形體為 iPS 細胞。

項 18. 如項 16 或 17 所記載之解析方法，其包括如下步驟：將藉由標的 RNA、引導 RNA 及經光活化之 dCas 蛋白質之複合物形成所產生之細胞的表現系回收之步驟。

項 19. 一種新型冠狀病毒之預防或治療劑，以脂質代謝控制物質作為有效成分。

項 20. 如項 19 所記載之新型冠狀病毒之預防或治療劑，其中脂質代謝控制物質具有 HMG-CoA 還原酶抑制作用或乙醯 CoA 還原酶抑制作用。

項 21. 如項 19 或 20 所記載之新型冠狀病毒之預防或治療劑，其中脂質代謝控制物質為阿托伐他汀或瑞舒伐他汀。

項 22. 一種基於 mRNA、rRNA(核糖體 RNA)及 lncRNA 之剪接異常之疾病之治療劑，以如項 6 至 9 中任一項所記載之載體作為有效成分。

項 23. 如項 1 所記載之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質為具有核酸酶活性之 Cas13 蛋白。

[發明之效果]

【0008】 根據本發明，能夠容易地將具有所欲之鹼基序列之 lncRNA(長鏈非編碼 RNA)純化。

【0009】 本發明之基於該分割位置之 Cas13 蛋白向肽之分割亦可應用於具有核糖核酸酶活性之 Cas13(Cas13)，可用作活化 Cas13。

【0010】 本發明之分割 Cas13/dCas13 可應用於前述以外之公知之 Cas13/dCas13 之用途。

【0011】 又，根據本發明，可將細胞內之標的 RNA 純化或捕獲，而對細胞內環境進行解析。

【0012】 藉由使用經標記之刺激活化 dCas13，可將具有所欲之鹼基序列之 lncRNA 之細胞內行為可視化。

【0013】 進一步，可提供一種針對以剪接異常作為主要原因之疾病之治療劑。

【0014】進一步，可提供一種 RNA 病毒、尤其是新型冠狀病毒感染症之預防或治療用藥。

【圖式簡單說明】

【0015】

圖 1 表示 RNA 複合物純化方法，Trans RNA 免疫沈澱(Trans RNA Immunoprecipitation，TRIP)。

圖 2 表示對 RNA 功能之修飾解析的應用，精確 RNA 序列修飾 (Precision RNA Sequence Modification，PRSM)。

圖 3 表示光活化 Cas13(PAdCas13)系統之構建。

圖 4 表示光活化 Cas13(PAdCas13)系統之構建。

圖 5 表示光活化 Cas13(PAdCas13)系統之構建。

圖 6 表示以高選擇性靶向 lncRNAs(Target lncRNAs with high selectivity)。

圖 7 表示以人類之 XIST RNA 為標的之 RNA 可視化實施例。使用藉由 GFP 標記之 dCas13，於活細胞中可確認到 XIST RNA 局部存在於細胞核內。

圖 8 表示 TRIP 法實施模型圖。

圖 9 表示以 SARS-CoV-2 之非轉譯區作為對象之 TRIP 法之概要。

圖 10 表示自 pGL3-SARS-CoV-2.ORF1-啟動子之轉錄(Transcript from pGL3-SARS-CoV-2.ORF1-Promoter)。

圖 11 表示 ChIP(Chromatin immunoprecipitation，染色質免疫沈澱)之操作說明。

圖 12 表示以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價 1。

圖 13 表示以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價 2。

圖 14 表示源自 SARS-CoV-2 之 RNA 於人類之細胞內結合之 RNA 之種類；本體富集解析。

圖 15 表示以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價 3。

圖 16 表示以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價 4。

圖 17 係表示 S565 之氫鍵參與阿托伐他汀、瑞舒伐他汀與 HMG-CoA 之結合之資料。

圖 18 表示以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價 5。

圖 19 表示 TRIP 法中所使用之 DNA 免疫沈澱之概要。

圖 20A 表示光敏性切換系統之模擬試驗。

圖 20B 表示 PA-dCas13 蛋白質之性能評價試驗。(A)表示對各細胞組分實施西方墨點而確認具有靶向 lncRNA XIST 之引導 RNA 之 dCas13 蛋白質於核成分中表現，(B)表示對各細胞組分實施西方墨點而確認 dCas13 向引導 RNA 所靶向之 RNA 局部存在之部位(核)移行。

圖 21 表示驗證 XIST RNA 之結合區是否與組蛋白碼有關之實施例之概要。

圖 22A 表示於 ChIP-seq 分析中之應用(Application to ChIP-seq analysis)。左圖為將 XIST RNA 於 DNA 上之結合區於基因之轉錄起始區周圍是否具有規則性的可視化圖。左起第 2 行為以 XIST 為對象進行 TRIP 法之試驗結果。左起第 1 行為未使用 crRNA 之陰性試驗。左起第 3、4、5 行為以組蛋白修飾為對象之集積圖。右圖，為將來自左圖之轉錄起始區之集積區圖表化而成者。最上為以 XIST 為對象進行 TRIP 法之試驗結果。示出與第三段之 H3K4me3 相似之累積圖案，可見 XIST 為轉錄控制因子。

圖 22B 表示集積於轉錄起始部位(TSS)之標的 RNA(XIST)之性質。將由引導 RNA 所規定之標的設定為長鏈非編碼 RNA XIST，實施染色質免疫沈澱法，與現有技術加以比較。本發明之技術可藉由 1 個或 2 個引導 RNA 以較高之解析度進行檢測。就可當即實現 ON/OFF 之方面、可進行 RNA 分子內之比較之方面而言，不僅為現有技術，而且為原始之 dCas13 蛋白質亦難以實現之革新性之性能。

X 軸表示與轉錄起始部位之距離(右端為 5,000bp，左端為-5,000bp)、Y 軸表示向轉錄起始區之集積平均值。

圖 23 表示於設計 XIRT crRNA 之方面作為參考之 RNA 結構解析資料、結構預測圖、及結合於 XIST 序列之預想蛋白質組。

圖 24 表示利用 dCas13 之 XIST RNA 之功能控制驗證試驗。

於導入有與圖 23 上圖之 crRNA 之編號相當之 crRNA 之細胞內，對 XIST RNA 之特定之序列導入 dCas13，藉此確認對經由 XIST RNA 之 H3(組蛋白 H3)向基因組上之誘導是否受到抑制。可知於導入有 crRNA1、2、3、5 之細胞中，H3 與基因組區之結合受到抑制，於靶向 crRNA1、2、3、5 之情形時，XIST 之功能受到抑制。

圖 25 表示使用光活化 Cas13(PAdCas13)系統之用途。為利用 SC-序列之 RNA 表現形解析。

圖 26 表示裘馨氏(Duchenne)肌營養性萎縮症致病因子肌縮蛋白基因變異之前體 RNA 水準下之修復。表示以裘馨氏肌營養性萎縮症為對象之外顯子-略過治療用藥之開發。

圖 27A 表示 pLKO5.U6.crRNA(基因名稱).tRFP.v1。

圖 27B 表示 pLKO5.U6.crRNA(基因名稱).tRFP.v1。

圖 28A 表示 pENTR1A.dCas13a.GFP。

圖 28B 表示 pENTR1A.dCas13a.GFP。

圖 28C 表示 pENTR1A.dCas13a.GFP。

圖 28D 表示 pENTR1A.dCas13a.GFP。

圖 29A 表示 pGL3-SARS-CoV-2.ORF1-啟動子。

圖 29B 表示 pGL3-SARS-CoV-2.ORF1-啟動子。

圖 29C 表示 pGL3-SARS-CoV-2.ORF1-啟動子。

圖 30 表示已確認經由源自病毒之 5'UTR 之轉譯抑制之 esiRNA cDNA 靶序列。

圖 31 表示 PD-1 陽性 T 細胞/NK 細胞之 PD-1 pre-mRNA。

圖 32 表示靶向 PD-1 pre-mRNA 之內含子 1、2 之引導 RNA。

圖 33 表示利用 dCas13 之 PD-1 活性去除淋巴細胞之製作。使用綜合性 RNA 標的解析而成功製作 PD-1 表現控制 T 細胞。利用處於右圖(a)之區域之細胞內包之引導 RNA 序列及 dCas13 蛋白質的活體外製藥之開發將成為可能：可提供較 CAR-T 細胞療法(Kymriah)更安全之細胞治療用藥。

圖 34 表示在融合了源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR RNA 基因資訊之螢光素酶(Luciferase)RNA 下，觀測轉譯活性的亢進。

【實施方式】

【0016】 作為本發明中成為分離純化、功能解明、疾病之預防或治療之標的之 RNA，可例舉 lncRNA、源自包括新型冠狀病毒 RNA 在內之 RNA 病毒之 RNA、具有剪接異常之 RNA 等。

【0017】 於本發明中，作為具有螺旋區、可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物、且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas 蛋白質或具有核酸酶活性之 CRISPR-Cas 蛋白質，可例舉 Cas5/dCas5、Cas6/dCas6、Cas7/dCas7、Cas9/dCas9、Cas10/dCas10、Cas11/dCas11、Cas13/dCas13，宜為 Cas13/dCas13。

【0018】 CRISPR-dCas 蛋白質與 CRISPR-Cas 蛋白質具有螺旋區，於前述螺旋區之任一位置處切斷，分成切斷點至 N 末端側之 N 區與切斷點至 C 末端側之 C 區，形成使 N 區與第 1 因子結合而成之(N 區)-(第 1 因子)、及使 C 區與第 2 因子結合而成之(第 2 因子)-(C 區)之 2 個多肽。藉由利用包含蛋白酶識別序列之連接子或包含自切肽之連接子將該等多肽結合，可形成以(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽

之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)表示之 1 個蛋白質(CRISPR-dCas/Cas 蛋白質)，亦可製成包含(N 區)-(第 1 因子)之多肽與包含(第 2 因子)-(C 區)之多肽之集(CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物集)。該集為「具有 2 個部分之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物集」。以(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)表示之 1 個蛋白質在蛋白酶識別序列或自切肽被切斷，而成為包含(N 區)-(第 1 因子)之多肽與包含(第 2 因子)-(C 區)之多肽之集。若第 1 因子與第 2 因子藉由刺激而結合，則形成以(N 區)-(第 1 因子)-(非共價鍵結)-(第 2 因子)-(C 區)表示之 1 個複合物，本說明書中存在將該複合物與以(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)表示之蛋白質合併稱為「CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物」之情況。前述複合物於不存在刺激之情況下，非共價鍵結被切斷，成為包含(N 區)-(第 1 因子)之多肽與包含(第 2 因子)-(C 區)之多肽之集，第 1 因子與第 2 因子之間之非共價鍵結的形成與切斷可藉由刺激之有無而可逆地產生。作為促進第 1 因子與第 2 因子之結合之刺激，可例舉光(白色光、藍色光等)、熱(高溫、低溫)、pH(酸性、中性、鹼性)、壓力等物理刺激、配體與受體之組合、化學物質等。於刺激為光之情形時，可為第 1 因子與第 2 因子之一者為 nMAG，另一者為 pMAG。「非共價鍵結」包括第 1 因子與第 2 因子之結合，例如於第 1 因子與第 2 因子為 nMAG 與 pMAG 之情形時，nMAG 與 pMAG 之結合包括於「非共價鍵結」中。

【0019】蛋白酶識別序列可藉由細胞內之蛋白酶而切斷，亦可與 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質一起將可在蛋白酶識別序列切斷之蛋白酶導入細胞內。前述連接子之長度可由業者適當選擇，宜為由 3 個～100 個構成、更宜為由 5～60 個胺基酸構成之肽。作為蛋白酶識別序列，可使用該領域公知之各種蛋白酶識別序列(J.Biol.Chem., Vol.283, No.30, p20897, 2008)。適宜之蛋白酶識別序列

為導入 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物或蛋白質衍生物集之細胞內之細胞內蛋白酶識別序列。作為細胞內蛋白酶識別序列，例如可例舉細胞內蛋白酶之弗林蛋白酶(Furin)、PC7、及 PACE4 所識別之胺基酸序列。前述連接子為由蛋白酶識別序列構成之肽，或可於蛋白酶識別序列之 N 末端側及/或 C 末端側進一步包含胺基酸序列。作為自切肽，例如可例舉文獻(Szymczak-Workman, Andrea L et al. "Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors." Cold Spring Harbor protocols vol. 2012,2 199-204. 1 Feb. 2012, doi:10.1101/pdb.ip067876)所記載者，該文獻之整體作為參考而引用至本說明書中。作為自切肽，例如可例舉 T2A、P2A、E2A、F2A 等，但不受該等限制。

【0020】 N 區與 C 區可具有或不具有螺旋區之一部分胺基酸，可將螺旋區之胺基酸序列加以改變，亦可附加或插入新胺基酸序列，亦可具有蛋白酶識別序列或者源自自切肽或連接子之胺基酸序列。

【0021】 本發明包含編碼 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物集之聚核苷酸或其互補鏈。作為此種聚核苷酸，可例舉以下者：

(i)編碼(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)之聚核苷酸；

(ii)編碼包含(N 區)-(第 1 因子)之多肽之聚核苷酸與編碼包含(第 2 因子)-(C 區)之多肽之聚核苷酸經由合適之間隔子核苷酸序列連結而成之 1 種聚核苷酸

(iii)由編碼包含(N 區)-(第 1 因子)之多肽之聚核苷酸與編碼包含(第 2 因子)-(C 區)之多肽之聚核苷酸構成之 2 種聚核苷酸之集。

【0022】 本發明之載體包含前述(i)～(iii)之任一者，於前述(i)與(ii)之情形時為 1 種載體，於前述(iii)之情形時成為 2 種載體之集。

【0023】 作為載體，可使用質體載體與病毒載體之任一者。作為病毒載體，

可例舉腺相關病毒載體、腺病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體。作為質體載體，可例舉 Gateway 系統用入門載體(pENTR 等)、基因重組用供體載體、並列移動用之目標載體等。

【0024】載體除了編碼 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物集之聚核苷酸或其互補鏈以外，可編碼至少 1 種引導 RNA。

【0025】本發明之轉形體可藉由利用本發明之載體將宿主細胞轉形而製作。作為宿主，可例舉人類、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、倉鼠、山羊、犬、猴等哺乳動物。於宿主細胞為人類以外之哺乳動物之 ES 細胞或受精卵之情形時，可由轉形細胞製作非人類哺乳動物，本發明之轉形體包括非人類哺乳動物。

【0026】本發明之標的 RNA 純化用擔載體係將可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物且不具有核酸酶活性之多種 CRISPR-dCas(死 Cas)蛋白質擔載於固相擔載體而成。作為不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas)蛋白質，可例舉 dCas5、dCas6、dCas7、dCas9、dCas10、dCas11、dCas13，宜為 dCas13。

【0027】作為用以擔載 CRISPR-dCas 蛋白質之固相擔載體，可利用矽藻土、活性碳、氧化鋁、氧化鈦、交聯處理澱粉粒子、纖維素系高分子、甲殼素及殼聚糖衍生物等公知之擔載體。

【0028】作為 CRISPR-dCas 蛋白質於固相擔載體之固定化方法，可利用物理吸附法、離子結合法、覆埋法、共價結合法等作為蛋白質之固定化方法而公知之方法，其中共價結合法之長期穩定性優異而較理想。作為使 dCas 蛋白質共價結合之方法，可利用使用甲醛、乙二醛、戊二醛等具有醛基之化合物或利用多官能基性醯化劑之方法、使硫氫基交聯之方法等各種方法。標的 RNA 純化用擔載體宜為填充於柱反應器中使用。

【0029】圖 1 例示出使用本發明之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物進行細

胞內或細胞溶解液中之標的 RNA 之功能解析之方法。於圖 1 中，使用光活化 dCas13 作為 CRISPR-dCas 蛋白質，不活化 dCas13 係照射藍色光或白色光前(暗處)之 dCas13，活化 dCas13 係照射包括藍色光或白色光在內之光後(亮處)之 dCas13。於照射光之前，crRNA、不活化 dCas13、標的 RNA 是分散存在，但若藉由光照射而生成活化 dCas13，則形成 crRNA-活化 dCas13-標的 RNA 之複合物。標的 RNA 存在與 DNA、標的以外之 RNA、蛋白質等結合之情形。

【0030】 於圖 1 中，示出將 DNA、RNA 或蛋白質於標的 RNA 複合物化之例。於 DNA 或 RNA 結合於標的 RNA 之情形時，使該 DNA 或 RNA 與標的 RNA 分離，並進行即時 PCR(qPCR)下一代定序(NGS)解析，藉此可特定出標的 RNA 所結合之 DNA 或 RNA。又，於蛋白質結合於標的 RNA 之情形時，使該蛋白質與標的 RNA 分離並進行蛋白質組解析，藉此可特定出標的 RNA 所結合之蛋白質。如上所述，藉由對結合於標的 RNA 之 DNA、RNA、蛋白質進行解析，可解明標的 RNA 之功能。進一步，標的 RNA 之序列可將 qPCR 與 NGS 加以組合並藉由解析而確定。可藉由該等解析而對細胞內環境進行解析。例如圖 2 示出對 iPS 細胞進行分化誘導後之細胞內環境之解析結果。

【0031】 crRNA 之序列可基於根據 RNA 高次結構預測之 crRNA 之演算法而設計。對於標的 RNA 純化用擔載體，預先使多數 crRNA 結合於 CRISPR-dCas 蛋白質，確定其所結合之樣品中之多數標的 RNA 之序列，藉此可獲得標的 RNA 之資訊。例如，可自源自疾病之細胞之樣品中確定疾病時所表現之一組 lncRNA(長鏈非編碼 RNA)，或於已確定疾病時所表現之一組 lncRNA 之序列之情形時，對其表現形式會因藥物候選化合物而如何變化進行監控，藉此可篩選有效之藥物候選化合物。由於一疾病與 lncRNA 之關係多為已知，故而可以此種資訊作為參考來設計 crRNA。

【0032】 於本發明之較佳之一實施形態中，為了對細胞內之 lncRNA 之表

現、分佈、移動等進行觀察，可利用光活化 dCas 蛋白質系統(PAdCas 系統)。

【0033】 圖 2 表示將本發明之細胞應用於 PRSM(精確 RNA 序列修飾)之一例。

【0034】 圖 3～5 表示本發明之 PAdCas 系統之一例。PAdCas 系統於暗處將 CRISPR-dCas 蛋白質分為包含引導 RNA 識別區之 N 末端側部分(相當於圖 3～5 之 ILwaCas13a.N-N MAG)與包含 HEPN 區之第 2 部分(相當於圖 3～5 之 ILwaCas13a.C-P MAG)，若對包含該等之細胞照射藍色光或白色光，則 nMAG 與 pMAG 之構型發生變化，該等會結合，藉此成為活性型之 dCas 蛋白質，可藉由活性型 dCas 之標記(例如綠色螢光蛋白質等螢光蛋白質)檢測細胞內之 crRNA 與標的 RNA 結合所形成之複合物。

nMAG 與 pMAG 之鹼基序列及胺基酸序列為文獻已知(Nature Communications volume 6, Article number: 6256 (2015))。

【0035】 本發明所使用之可與引導RNA及標的RNA形成複合物且具有或不具有RNA核酸酶活性之蛋白質/CRISPR-Cas/dCas蛋白質可對RNA剪接機構進行控制。例如於裘馨氏肌營養性萎縮症中，於對第44號外顯子導入有終止密碼子之患者之情形時，藉由將本發明之Cas13與用以略過外顯子44之引導RNA導入細胞內，而可治療裘馨氏肌營養性萎縮症。

【0036】 將如裘馨氏肌營養性萎縮症之以 RNA 之剪接異常作為主要原因之疾病示於以下之表 1～4。

【0037】[表 1]

表 1

關鍵字表.疾病中模擬剪接變化及測試剪接改變療法所常用之動物(Commonly used animals to model splicing changes and test splice-altering therapies in disease).

疾病	動物模型	療法	效果	參考
阿茲海默病及其他 Tau 蛋白病	表現 N296H 變異 Tau 蛋白同功異型物之小鼠模型	PNA, SMaRT	PNA 治療於活體外誘導 *MAPT* 外顯子 10 略過。攜帶外顯子 10 至 13 之 *MAPT* 反式剪接供體質體之轉染於活體內誘導外顯子 10 包含。	[86-88] [89]
	表現具有缺失外顯子 19 之 *Apoer2* 基因之基因嵌入小鼠模型。	SSO	SSO 治療於活體外及活體內增加 *ApoER2* 外顯子 19 之包含。治療改善 AD 小鼠之海馬基底突觸傳遞、學習及記憶。	
肌萎縮性側索硬化	表現 Q331K 突變 TDP-43 之小鼠模型， 表現 R521C 突變 FUS 之小鼠 於 *Tardbp* 基因中表現 Q101X 突變之小鼠模型	SSO	SSO 治療於活體外誘導 *FUS* 外顯子 7 略過。	[32, 37, 41, 90]
自閉症類群障礙症	表現具有缺失外顯子 7 及 8 之 nSR100/Srrm4 同功異型物之小鼠模型	N/A	N/A	[91]
自體免疫疾病	過度表現 *1/4Ctla4* 剪接變異體之基因嵌入小鼠模型	SSO	用 SSO 治療於活體外及活體內誘導 *CTLA4* 外顯子 2 之略過，增加 liCTLA-4 同功異型物之表現。剪接同功異型物之誘導於 NOD 小鼠中延遲糖尿病發作且降低其發病率。	[92-94]
乳癌	表現人類Δ*16HER2* 之基因嵌入小鼠模型，	小分子(達可替尼 (Dacomitinib))	達可替尼治療於活體外及活體內完全抑制 Δ16HER2 驅動之癌發生。於Δ16HER2 小鼠中，治療完全消除同原乳房腫瘤形成。	[95-98]
	表現 *ERBB4* 同功異型物 *CYT-1* 及 *CYT-2* 之基因嵌入小鼠	SSO	SSO 治療於活體外誘導 *ERBB4* 外顯子 26 之略過，由此增加 CYT-2 同功異型物表現。	
囊腫性纖維化	攜載於外顯子 9 中具有突變 *CFTR* 基因 ($TG_{12}T_5$插入)之 YAC 的基因轉殖小鼠模型	SSO, ExSpeU1, CRISPR/Cas9	用 SSO 或外顯子特異性 U1 snRNA 治療於活體外誘導 *CFTR* 外顯子 16 之正確包含。用 CRISPR/Cas9 治療於活體外誘導 *CFTR* 內含子 12、21 及 22 中之隱蔽外顯子之略過。	[99-102]
耳聾	表現於內含子 12 及外顯子 13 上具有缺失之 nSR100/Srrm4 同功異型物之小鼠模型	N/A	N/A	[103]
裘馨氏肌肉萎縮症	如[11]中所綜述之多個模型：包括攜帶犬 *DMD* 基因之內含子 6 中之 A＞G 突變的犬模型	SSO, SMaRT, CRISPR Cas9	含有 *Dmd* 內含子 22 及外顯子 23 之反式剪接 AAV 載體之轉染於活體內及活體外誘導 WT 蛋白之表現。SSO 治療誘導 *Dmd* 外顯子 51 之略過，產生框內 mRNA	[11, 12, 15, 84, 104-106]

【0038】[表 2]

疾病	動物模型	療法	效果	參考
	表現突變 *Prpf3* 或 *PrfPf8* 之基因嵌入小鼠		嚴重患病基因轉殖小鼠，治療不足以延遲或阻止感光體退化。	
蕾特氏症	*Mecp2* 基因缺失之基因剔除小鼠模型	N/A	N/A	[144]
橫紋肌肉瘤	表現人類 *MDM2ALT1* 之基因轉殖小鼠模型	SSO	SSO 治療於活體外誘導 *MDM2* 外顯子 4 至 11 之包含，由此增加 MDM2 全長蛋白表現。	[145, 146]
脊髓性肌肉萎縮	如[147]中所綜述之多個模型：包括於外顯子 7 中攜帶突變人類 *Smn* 基因(C＞T)之基因嵌入小鼠模型 異型接合 *Smn* 外顯子 2 基因剔除小鼠 於外顯子 7 中攜帶突變人類 Smn 基因(TTT 插入)之基因嵌入小鼠模型	SSO、小分子(7-哌**口井**基香豆素)、ExSpeU1	用 SSO、小分子或外顯子特異性 U1 snRNA 治療於活體內及患者細胞內誘導 *SMN2* 外顯子 7 之保留。小鼠研究中之 SSO 治療展示肌肉形態及運動功能之顯著改善以及預期壽命延長。用 SSO RG7800 治療已進入臨床試驗。	[12, 148-153]
尤塞氏症候群	於 *Ush1c* 基因之外顯子 3 中攜帶 G＞A 突變之基因嵌入小鼠模型	SSO	用 SSO 治療於活體外及活體內誘導 *Ush1c* 外顯子 3 之正確包含。經 SSO 治療之基因轉殖 216AA 小鼠展示耳聾之治療性矯正。	[154, 155]
X 性聯無 γ 球蛋白血症	於內含子 4 中攜帶突變人類 *BTK* 基因(A＞T)之基因嵌入小鼠模型及 具有 *BTK* 基因剔除之小鼠模型	SSO	用 SSO 治療誘導患者細胞中 *BTK* 內含子 3 中之隱蔽外顯子的略過。	[156, 157]
β-地中海貧血症	於內含子 2 (C＞T)、內含子 1 (G＞A)或(T＞C)中攜帶突變人類 *HBB* 基因之基因嵌入小鼠模型	PNA, SSO	用 PNA 治療於活體外誘導 *HBB* 內含子 2 中隱蔽外顯子之略過。用 ASO 治療於活體內誘導 *HBB* 內含子 2 中隱蔽外顯子之略過。於 IVS2-654 小鼠中，治療改善紅血球形態及血紅蛋白位準。	[158-160]

N/A = 不可用

【0039】[表 3]

疾病	動物模型	療法	效果	參考
萊伯氏先天性黑矇症	*於 CEP290* 基因之內含子 26 中攜帶 A＞G 突變之基因嵌入小鼠模型	SSO, CRISPR/Cas9	SSO 及 CRISPR/Cas9 治療於活體外誘導 *CEP290* 內含子 26 中隱蔽外顯子之略過。	[124, 125]
黑色素瘤	表現 *Mdm4-S* (外顯子 6 缺失)之基因剔除小鼠	SSO	用 SSO 治療於活體外及活體內誘導 *Mdm4* 外顯子 6 之略過。於源自患者之小鼠異種移植中，治療減少腫瘤生長且使其對 BRAFV600E 抑制敏感。	[126, 127]
1A 型肌肉萎縮症	*於 Lama2* 基因之內含子 2 中攜帶 G＞A 突變之小鼠模型	CRISPR/Cas9	用含有 CRISPR/Cas9 組分之 AAV 治療於活體內誘導 *Lama2* 基因中外顯子 8 之包含。dy^{2J}/dy^{2J} 小鼠之基因組編輯展示改善之肌肉架構及減少之纖維化，伴隨後肢麻痹及活動性之改善。	[52]
骨髓發育不良症候群與急性骨髓性白血病	表現 K700E 突變 Sf3b1 之基因嵌入小鼠模型	小分子(E7107、H3B-8800)	用 E7107 治療於 *Srsf2* 突變小鼠中產生分佈廣泛之內含子保留且減少白血病負荷。用 H3B-8800 治療於小鼠異種移植中產生剪接調節且抑制腫瘤生長。	[21, 22, 24, 128- 130]
	表現 P95H 突變 Srsf2 之基因嵌入小鼠模型			
	Hnrnpk 基因缺失之異型接合基因剔除小鼠模型			
	表現 S34F 突變 U2AF1 同功異型物之小鼠模型			
1 型肌肉強直症	表現於 3' UTR 中具有 250 個 CTG 重複序列之突變 *HSA* 基因之基因嵌入小鼠模型	小分子(手黴素 A)	用手黴素 A 治療於活體內誘導 *Clcn1* 外顯子 7a 之包含。	[131,132]
C 型尼-皮二氏症	*於 Npc1* 基因之內含子 9 中攜帶 G＞A 突變之小鼠模型	SSO	用 SSO 治療抑制患者細胞中 *Npc1* 內含子 9 中隱蔽外顯子之包含。	[133, 134]
龐貝氏症	*於 Gaa* 基因上具有經干擾/缺失之外顯子 6 之基因剔除小鼠模型	SSO	用 SSO 治療抑制患者細胞中 *Gaa* 內含子 15 中隱蔽外顯子之包含。	[135]
普拉德-威利症候群	*Snord115* 基因缺失之基因剔除小鼠模型	SSO	用 SSO 治療於活體外及活體內誘導 *HTR2C* 外顯子 5b 包含。於禁食小鼠及遺傳改變、食慾過盛小鼠二者中，治療減少食物攝入。	[136,137]
攝護腺癌	表現人類 *AR3/AR-V7* 之基因嵌入小鼠	小分子(氯硝柳胺)	氯硝柳胺治療於活體外及活體內均誘導 AR-V7 蛋白酶體降解。於小鼠異種移植中，治療減少恩雜魯胺抗性(enzalutamideresistant)攝護腺癌之腫瘤生長。	[138,139]
色素性視網膜炎	表現突變 Prpf31 之斑馬魚及小鼠模型	SMaRT	含有 *Rho* 外顯子 2-5 及人工內含子 2 之反式剪接 AAV 載體之轉染於活體內誘導野生型蛋白之表現。儘管如此，於	[140-143]

【0040】[表 4]

疾病	動物模型	療法	效果	參考
	於 *Dmd* 基因中之外顯子 23 中攜帶 C＞T 突變或攜帶外顯子 52 之缺失之小鼠模型 *Dmd* 外顯子 50 缺失之小鼠模型		活體內。CRISPR/Cas9 於活體內誘導 *Dmd* 基因中外顯子 51 之略過。 WT 蛋白質之治療及恢復於結構及功能二者上誘導肌肉正常化。於患者中，SSO 治療降低喪失行走能力之發生率。	
癲癇症	缺失基因 *Kdm1a/Lsd1* 中外顯子 E8a (neuroLSD1 空)之基因剔除小鼠模型	N/A	N/A	[107]
家族性自主神經功能失調症	於內含子 20 中攜帶突變人類 *IKBKAP* 基因 (T＞C)之基因嵌入小鼠模型 具有 *Ikbkap* 基因剔除之小鼠模型	小分子(活動素)	活動素治療於患者中誘導 *IKBKAP* 外顯子 20 包含。	[108,109]
福山型肌肉萎縮症	攜帶外顯子 10 經含 SINEVNTR-*Alu* 之人類外顯子 10 置換之突變 *Fktn* 之基因嵌入小鼠模型	SSO	SSO 治療於活體內破壞福山蛋白(*fukutin*)異常外顯子 11 之包含。治療恢復福山蛋白之正常功能。	[110, 111]
B 型血友病	表現具有突變外顯子 5 之人類因子 9 之小鼠模型	ExSpeU1	用外顯子特異性 U1 snRNA 治療於活體外誘導 *F9* 外顯子 5 包含。	[101, 112, 113]
伴有乳酸中毒之遺傳性肌病	於 *ISCU* 基因之內含子 4 中攜帶 G＞C 突變之小鼠模型	SSO	SSO 治療於活體外誘導隱蔽 *ISCU* 外顯子 4a 之略過。	[114, 115]
I 型遺傳性高酪胺酸血症	於 *Fah* 基因之外顯子 8 中攜帶 G＞A 突變之小鼠模型	CRISPR/Cas9	CRISPR/Cas9 治療於活體內誘導 *Fah* 中外顯子 8 之包含。治療改善 $fah^{mut/mut}$ 小鼠之肝損傷。	[116]
亨廷頓病	攜帶 150 個 CAG 重複序列向 *HTT* 基因之外顯子 1 中之插入的基因嵌入小鼠模型	SMaRT	具有 21 個 CAG 重複序列之 *HTT* 外顯子 1 反式剪接供體質體之轉染於活體外消除外顯子 1 略過。	[117, 118]
早年衰老症候群	於 *Lmna* 基因之外顯子 11 中攜帶 C＞T 突變之基因嵌入小鼠模型	SSO	用 SSO 治療於活體外誘導 *Lmna* 外顯子 11 之正確包含。	[119, 120]
肥厚性心肌症	於 *Mybpc3* 基因之外顯子 6 中攜帶 G＞A 突變之基因嵌入小鼠模型	SMaRT	含有 *Mybpc3* 外顯子 1-6 之反式剪接 AAV 載體之轉染於活體內誘導外顯子 6 之包含。儘管治療修復 cMyBP-C 蛋白，但其仍不足以改善 KI 小鼠中之心臟表型。	[121, 122]
低磷酸酯酶症	於 *Alpl* 基因之內含子 9 中攜帶 T＞G 突變之小鼠模型	N/A	N/A	[123]

【0041】 本發明進一步提供一種能夠抑制包括人類在內之哺乳動物之體內之新型冠狀病毒的增殖之新型冠狀病毒之治療用藥。

【0042】 根據本發明者之研究，可知新型冠狀病毒之蛋白質係利用哺乳動物、尤其是人類之脂質代謝路徑而生物合成。作為可抑制脂質代謝路徑中之新型冠狀病毒蛋白質之生物合成，藉此預防病毒感染，進一步即便於已感染病毒之情形時亦可藉由抑制病毒之增殖而緩和新型冠狀病毒感染症之症狀，抑制重症化者，本發明者對脂質代謝控制物質進行了試驗，結果發現，藉由將脂質代謝控制物質投予至人類等哺乳動物、尤其是未被投予脂質代謝控制物質之人類，而可預防新型冠狀病毒之感染症，即便於患有新型冠狀病毒感染症之情形時，亦可抑制或至少延遲自輕症轉變為中度症、或自中度症轉變為重症。藉由自感染新型冠狀病毒之前起服用脂質代謝控制物質，可抑制新型冠狀病毒於體內之增殖，因此可抑制感染症之發病。脂質代謝控制物質之毒性較低，因此對於新型冠狀病毒感染之預防而言尤其有用。脂質代謝控制物質之投予量為人類成人每天 1～150 mg 左右，可將其分為 1 天 1 次～4 次投予。

【0043】 作為脂質代謝控制物質，可例舉美伐他汀、阿托伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀、氟伐他汀及洛伐他汀，但不限定於該等。脂質代謝控制物質宜具有 HMG-CoA 還原酶抑制作用。作為較佳之脂質代謝控制物質，可例舉阿托伐他汀與瑞舒伐他汀。

【0044】 藉由將本發明應用於 NK 細胞，可抑制 PD-1。例如取出胸膜轉移或腹膜轉移患者之肋膜積液或腹膜積液，抑制肋膜積液或腹膜積液所含之 NK 細胞之 PD-1，並返回至肋膜積液或腹膜積液，藉此可治療胸膜轉移或腹膜轉移。

【0045】 例如可將抗 PD-1 抗體與本發明之 dCas13 複合物加以組合。

【0046】 藉由抑制使用抗 PD1 抗體與本發明之 dCas13 複合物之正常之 PD-1 mRNA 之成熟，不僅自抗體消除 PD-1 表現 T 細胞之活化，而且自 T 細胞

之內部亦消除 PD-1 表現，藉此可更有效地治療癌症。具體而言，可使靶向 PD-1 之 pre-mRNA 之 dCas13 於人類淋巴細胞中表現，而對依賴於來自外部之刺激之剪接進行控制。

[實施例]

【0047】 以下，基於實施例進一步詳細地說明本發明。

實施例 1：使用 Trans RNA 免疫沈澱(TRIP)之 RNA 複合物純化方法(圖 1)

作為 CRISPR-dCas 蛋白質(例如 CRISPR-dCas 13，以下有時簡記為「dCas13」)而已知之 RNA 標的序列之識別及結合系統，係包含標的序列之 28 個核苷酸之引導 RNA(crRNA)與如能夠藉由光照射而結合之 pMAG 與 nMag 之組合般以分割成兩部分之方式所設計之不具有核酸酶活性之 dCas 蛋白質之複合物，會識別作為標的之基因而形成複合物。例如，於圖 1 中，於 pMAG 與 nMag 分割成兩部分之 dCas13 之情形時，不活化 dCas13 對應於光照射前 pMAG 與 nMAG 分離之狀態，活化 dCas13 對應於光照射後 pMAG 與 nMAG 結合之狀態。不活化 dCas13 與活化 dCas13 亦可使用例如可藉由使用熱休克蛋白之溫度使結合狀態與非結合狀態可逆地變化之系統。分割成兩部分之 dCas 蛋白質為不活性(Inactive)狀態，但可藉由光、熱等外部刺激結合而再次活化(Activated)。此處，再次活化(Activated)意指 CRISPR-dCas 蛋白質形成標的 RNA 與 crRNA 之複合物。可使用 TRIP 技術提取作為標的之 RNA、crRNA 及 dCas13 之複合物。前述複合物可包含與標的 RNA 結合之其他 RNA、DNA、蛋白質等各種因子。視情形亦可自細胞提取液中排除特定 RNA(核糖體 RNA 等)等。於圖 1 中，「開啟&免疫沈澱&清洗」意指藉由光照射(開啟)將不活化 dCas13 轉化為活化 dCas13，使所獲得之前述複合物免疫沈澱(immunoprecipitation)，其後清洗而去除複合物以外之成分。藉由其後之提取(extraction)將標的 RNA(RNA)與其所結合之 DNA、蛋白質(protein)或標的以外之 RNA 分離，藉由下一代定序確定 DNA/RNA 之序列，於

蛋白質之情形時可實施蛋白質組解析。

【0048】 於圖 1 中，對細胞提取液應用 TRIP 技術，但於 TRIP 技術中，利用 Cas13 或 dCas13 之 RNA 標記方法可應用於細胞內、細胞提取液之任一者。

【0049】 實施例 2

(1)RNA 功能於修飾解析中之應用(精確 RNA 序列修飾(PRSM))

利用 Cas13 或 dCas13 對標的 RNA 標記自身是修飾作為標的之 RNA 之功能這件事，可實現導入有 crRNA 庫之細胞單元中之綜合性的 RNA 之功能解析。標的 RNA 之功能修飾可藉由利用外部刺激自不活性-Cas13/dCas13 切換為活性-Cas13/dCas13 而進行調節，而可於試驗者所期望之時間點對導入有 crRNA、及 Cas13 或 dCas13 之細胞內之現象進行觀察。

【0050】 於圖 2 中對微滴-定序(Droplet-Sequencing，Drop-Seq)中之用途進行說明。於在試驗者所希望之時間點對導入任意 crRNA(圖 2 中為 crRNA 庫)、及 Cas13/dCas13 且已進行向活性-Cas13/dCas13 切換轉化之細胞組施行微滴-定序之情形時，crRNA 所靶向之 RNA 之功能可藉由活性-Cas13/dCas13 修飾。其結果為，根據所導入之 crRNA 之序列，各細胞表現出不同之表現系，因此可藉由下一代定序對作為各細胞之表現系之轉錄產物的表現量進行解析。於使用單細胞 RNA-seq(scRNA-seq)技術之情形時，可追蹤各種細胞系統之軌跡，因此可藉由使用以分子及細胞生物學水準預先設計之 crRNA 庫，而鑑定出成為標的之 RNA 所具有之表現系、及負責 RNA 之功能之序列。圖 2 中之磁珠(Beads)係結合有與多種 RNA 互補之多數序列(例如標的 RNA 或引導 RNA 之反義聚核苷酸)，標的 RNA 會結合於該磁珠。

【0051】 微滴-定序為公知之方法(文獻名：Shapiro E, et.al. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. Nat Rev Genet. 2013 Sep;14(9):618-30. doi: 10.1038/nrg3542. Epub 2013 Jul 30. PMID:

23897237. Alizadeh AA, et.al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. Nat Med. 2015 Aug;21(8):846-53. doi: 10.1038/nm.3915. PMID: 26248267; PMCID: PMC4785013.)。於圖 2 中，示出將微滴-定序與將 crRNA 及光活化 dCas13(PA-dCas13)導入 iPS 細胞(iPSC)中之本發明加以組合之實施形態。PA-dCas13 與 crRNA 可藉由脂質體、lipofectamine 等能夠將蛋白質、RNA 導入細胞內之公知之方法導入 iPS 細胞內，亦可將編碼 PA-dCas13 與 crRNA 之質體載體、病毒載體等導入 iPS 細胞，使 crRNA 與光活化 dCas13(PA-dCas13)於細胞內表現。

【0052】 (2)光活化 Cas13(PAdCas13)系統之構建

進行 Cas13 蛋白質之結構解析，於預想對 HEPN-1 及 HEPN-2 等標的 RNA 之識別、及與 crRNA 之結合之影響較少之螺旋 1 (Helical 1)區分割成 2 個肽(圖 3)。分割而成之各肽作為 dCas13 之 N 末端肽(Cas13a.N:REC LOBE)、C 末端肽(Cas13a.C:NUC LOBE)而分成兩個肽。

【0053】 於本實施例中，創造如下可再次獲得本來之功能之機構：藉由在 dCas13a.N 之 C 末端側與 dCas13a.C 之 N 末端側分別附加具有光敏性地結合之性質之肽(pMAG 與 nMAG)，使得藉由光(藍色光)刺激分割成兩部分之肽再結合，而於 Cas13 所具有之 crRNA 之誘導下與標的 RNA 形成複合物(圖 4、圖 5)。經分割之 Cas13/dCas13 肽功能之再次獲得可使用之方法不僅有光刺激、溫度、壓力等物理刺激，而且亦可以離子梯度、藥劑刺激等化學性之刺激代替。

【0054】 實施例 3：利用以人類之 XIST RNA 為標的之 crRNA 之 RNA 純化試驗

使用 RNA ChIP 法，藉由經由 dCas13 之免疫沈澱(TRIP 法)由細胞提取液進行與 XIST RNA 及 XIST 結合之 RNA 之純化。藉由下一代定序法可確認可以較高之純化度提取 XIST RNA(圖 6)。作為應對 Gateway(註冊商標)特異性重組之人

門載體，製作 pENTR1A.dCas13a.GFP(圖 28A)，進行向哺乳動物細胞表現載體之重組。藉由將 XIST 基因序列插入 pLKO5.U6.crRNA(基因名稱).tRFP.v1(圖 27A)而製作恆常表現以 XIST 作為標的之 crRNA 之慢病毒載體。

【0055】 圖 7 表示以人類之 XIST RNA 為標的之 RNA 可視化實施例，使用藉由 GFP 標記之光活化 dCas13(PAdCas13)，可於活細胞中確認 XIST RNA 局部存在於細胞核內。

【0056】 圖 8 係 TRIP 法實施模型圖。又，圖 9 表示源自 SARS-CoV-2 之 RNA 與人類細胞內因子之相互作用驗證試驗之概要。

【0057】 預測源自病毒之 RNA 序列之二級結構，設計能夠靶向之 crRNA。或作為使源自病毒之 RNA 與可由 crRNA 靶向之 Tag 序列(螢光素酶序列)融合而成之合成 RNA 表現載體，而準備 pGL3-SARS-CoV-2.ORF1-啟動子(圖 29A)。於本試驗中，藉由將 XIST 基因序列插入 pLKO5.U6.crRNA(基因名稱).tRFP.v1 而製作恆常表現以螢光素酶基因作為標的之 crRNA 之慢病毒載體。於病毒感染細胞內(或感染模型細胞)使靶向病毒 RNA 之 crRNA 或靶向 Tag 序列之 crRNA 與 dCas13 表現，於任意時間點轉化為活性-Cas13/dCas13 後，使用 TRIP 法，將源自病毒之 RNA 與其複合物純化。於 DNA/RNA 之情形時，實施下一代定序。於蛋白質之情形時，實施蛋白質組解析。將實際進行之以 SARS-CoV-2 之非轉譯區作為對象之 TRIP 法之概要示於圖 10。嘗試解明於人類之細胞內源自 SARS-CoV-2 之非轉譯序列合成自身之蛋白質之機制。

【0058】 圖 11 表示 Tag 序列(該圖中為螢光素酶蛋白質之 RNA)與 SARS-CoV-2 之非轉譯區之融合 RNA 之結構解析、及用於 TRIP 法之 crRNA 序列之設計方法。可知 SARS-CoV-2 之非轉譯區表現出獨特之結構。

【0059】 將 TRIP 法所使用之 RNA 免疫沈澱之概要示於圖 12。

【0060】 圖 12 係用以對藉由 TRIP 法回收之純化度進行確認之 qPCR 解

析。於將圖 9、圖 10 之 Tag 融合 SARS-CoV-2 之非轉譯區序列或僅有 Tag 序列導入 HEK293T 細胞、及 A549 細胞後，進行以 Tag 序列作為標的之 TRIP 法，針對所回收之 RNA，比較研究 SARS-CoV-2 之非轉譯區序列之回收效率。僅於導入 Tag 融合 SARS-CoV-2 且已進行經由 Cas13 之免疫沈澱之細胞中可進行該 RNA 序列之回收。

【0061】 圖 13 表示以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價之 1 例。於圖 13 中，箭頭表示藉由免疫沈澱所獲得之參與脂質代謝之基因群。如圖 13 所示，可知 SARS-CoV-2 之非轉譯區序列之 RNA 對於人類之細胞內結合之 RNA 序列具有特異性，顯著結合於細胞內之代謝機構。

【0062】 圖 14 為以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價的其他例。藉由本體富集解析可知，圖 13 中所回收之 RNA 群之功能為脂質代謝機構。

【0063】 圖 15 為以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價的其他例。為對於導入 Tag 融合 SARS-CoV-2 之非轉譯區序列或僅有 Tag 序列之細胞中是否發生脂質代謝機構之基因表現變化進行驗證之試驗。

【0064】 對藉由 GO 解析所提取之與脂質代謝相關之基因之轉錄活性是否因 SARS-CoV-2 之 5'UTR 基因表現之更新而變化進行研究。

【0065】 ACAA2、HMGcs、FADS1/2、SCD 均為與脂質代謝至膽固醇代謝相關之因子。於使 pGL3-5'UTR 於 HEK293T、A549 細胞中表現之情形時，與使 pGL3 表現之情形相比，可顯著地確認基因表現之變化。

【0066】 圖 16(b)係圖 15(a)之結果之解釋圖。於提高源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR 之表現的系統中，A549 中向 PUFA 系之代謝亢進，HEK293T 細胞中膽固醇代謝之系亢進。

【0067】 圖 16(c)使用作為市售藥之他汀嘗試抑制 HMGcs。藉由他汀抑制

了由源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR 提高之螢光素酶蛋白質之表現。此時無法確認細胞之增殖抑制及螢光素酶 RNA 之轉錄抑制。

【0068】 圖 16(d)係藉由 esiRNA 進行 HMGcs 及 ACAA2 之表現抑制，確認到由源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR 提高之螢光素酶蛋白質之表現抑制。將藉由 esiRNA(MISSION(註冊商標) esiRNA：由 21bp 之數百個 siRNA 之不均質的混合物所構成)所靶向之序列之範圍示於圖 17。

【0069】 根據以上，可知脂質代謝之控制會抑制由源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR 提高之螢光素酶蛋白質之表現。任一抑制系均未確認到對細胞株之毒性，又，亦未確認到螢光素酶 mRNA 表現抑制。因此，表明由源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR 提高之螢光素酶蛋白質之表現抑制依賴於螢光素酶蛋白質之轉譯抑制。

【0070】 如圖 17 所示，可認為於阿托伐他汀及瑞舒伐他汀與 HMG-CoA 結合時具有多個結合點(S565)為具有 SARS-CoV-2 之增殖抑制作用之理由之一。

【0071】 圖 18 為以 SARS-CoV-2 作為標的之 TRIP 解析方法之性能評價的其他例，表示 SARS-CoV-2 之非轉譯區序列於包括人類在內之宿主細胞內形成複合物之定律。為了使 SARS-CoV-2(圖中為 CoV19)之非轉譯區序列與源自人類之 RNA 結合，對人類側之因子要求一定之序列，由此預想存在媒介 SARS-CoV-2 之非轉譯區序列與人類 RNA 之結合之蛋白質。

【0072】 圖 19 為 TRIP 法所使用之 DNA 免疫沈澱之概要，表示與 XIST RNA 結合之 DNA 之提取及解析順序。

【0073】 圖 20 表示光敏性切換系統之模擬試驗。僅於施加光刺激之細胞中可實現經由 dCas13-crRNA 之 XIST-DNA 複合物之純化。所生成之基因組 DNA 可藉由針對已知之 XIST RNA 結合區之 qPCR 法進行檢測。

【0074】 圖 21 表示於圖 19 之基礎上，對 XIST RNA 之結合區是否與組蛋白碼有關進行驗證之實施例之概要。

【0075】 圖 22A 之左圖為將 XIST RNA 於 DNA 上之結合區於基因之轉錄起始區周圍是否具有規則性可視化之圖。左起第 2 行為以 XIST 為對象進行 TRIP 法之試驗結果。左起第 1 行為未使用 crRNA 之陰性試驗。左起第 3、4、5 行為以組蛋白修飾為對象之集積圖。右圖為將來自左圖之轉錄起始區之集積區圖表化而成者。最上為以 XIST 為對象進行 TRIP 法之試驗結果。示出與第三段之 H3K4me3 相似之集積圖案，可見 XIST 為轉錄控制因子。

【0076】 圖 22B 為一結果圖，是基於靶向 lncRNA 之 XIST 的 gRNA-dCas13 介導之拉下(TRIP)的結果提取 XIST，對該 XIST 所靶向之基因組 DNA 組進行 DNA 定序，由該 DNA 定序之結果確認向轉錄起始區之集積。已知經分離之 DNA 為與 XIST RNA 進行相互作用之 DNA，與組蛋白修飾銜接而參與基因之轉錄控制。本試驗之結果表示對以超過現有技術(例如 ChIRP，參照文獻：Mol Cell. 2011 Nov 18; 44 (4): 667-78)之集積量(峰之高度)與較高之分解度(峰寬窄)進行 XIST 標的序列之提取進行實證之結果。

【0077】 圖 23 為於設計 XIST crRNA 之方面作為參考之 RNA 結構解析資料、結構預測圖、及與 XIST 序列結合之蛋白質組預想圖。

【0078】 圖 24 為利用 dCas13 進行之 XIST RNA 之功能控制驗證試驗結果。

於導入有相當於圖 23 上圖之 crRNA 之編號的 crRNA 之細胞內將 dCas13 誘導至 XIST RNA 之特定之序列，藉此確認經由 XIST RNA 之 H3(組蛋白 H3)向基因組上之誘導是否受到抑制。可知於導入有 crRNA1、2、3、5 之細胞中 H3 與基因組區之結合受到抑制，於靶向 crRNA1、2、3、5 之情形時，XIST 之功能受到抑制。

【0079】 圖 25 為使用光活化 Cas13(PAdCas13)系統之用途。

利用圖 24 中之用途，可進行綜合性之 RNA 功能解析(圖 2 之精確 RNA 序列修飾(PRSM)法)。作為用途例，於使用 iPS 細胞之分化誘導試驗中，可於試驗者

所期望之時間點抑制標的 RNA 之序列特異性之功能。

【0080】 圖 26 為裘馨氏(Duchenne)肌營養性萎縮症致病因子肌縮蛋白基因突變之前體 RNA 水準下之修復。作為利用 Cas13/dCas13 之 RNA 剪接機構之控制及治療應用之可能性研究，而嘗試肌縮蛋白基因之剪接控制。以 RNA 之剪接異常作為主要原因之疾病如附圖所示。

【0081】 實施例 4：PD-1 陽性 T 細胞/NK 細胞之 PD-1 pre-mRNA(圖 31)

具有識別癌細胞並排除之能力之 T 細胞因表現 PD-1，而將癌細胞誤認為自體細胞，然藉由使用 dCas13，從處於癌細胞周圍之 T 細胞中製作有意地抑制 PD-1 之表現而特異性地攻擊癌細胞之基因非修飾嵌合抗原受體 T 細胞，從而開發新穎免疫療法(圖 31)。

【0082】 作為標的者係 PD-1 pre-mRNA 之外顯子 2 之表現，目的在於藉由使與 PD-1 之內含子 1 及內含子 2 結合之剪接控制蛋白質之功能序列之結構發生變化，而對 PD-1 之 pre-mRNA 至成熟 mRNA 之行程進行控制。示出靶向各序列之引導 RNA 之序列(圖 32)。

【0083】 提高腫瘤細胞攻擊性能之基因非修飾嵌合抗原受體 T 細胞之製作

圖 33 左圖：對於作為 PD-1 表現細胞之人類 CD8+T 細胞株 EBT-8，導入 PA-dCas13 恆常表現系後，進行靶向 PD-1 之 pre-mRNA 之引導 RNA 之導入。引導 RNA 之導入係藉由慢病毒載體進行，將上文所述之 PD-1 標的引導 RNA 之 1-18 全部同時導入。

圖 33 右圖：於 a 之區中，於 EBT-8 中確認到 PD-1 之選擇性之表現抑制。

【0084】 藉由源自患者腹膜積液之淋巴細胞製作成功抑制表現之嵌合抗原受體 T 細胞，對腹膜轉移之動物模型中之有效性、及安全性進行評價。

【0085】 實施例 5

對融合有源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR RNA 基因資訊之螢光素酶 RNA 中之

轉譯活性的亢進進行觀測(圖 34)

圖 34a：於 SARS-CoV-2 之 RNA 基因組中 5'UTR 基因之區相當於存在於 ORF1A 序列之 3'側之 261nt。將該 5'UTR 區之序列以融合之形式插入 pGL3-啟動子載體之螢光素酶 RNA 序列之 Kozak 序列的 3'側。

【0086】 圖 34b：對於 HEK293T、及 A549 細胞中螢光素酶蛋白質之表現是否依賴於 pGL3-啟動子或 pGL3-5'UTR 載體之導入量而增加進行比較計測。對於 HEK293T、及 A549 細胞中融合有源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR RNA 基因資訊之螢光素酶蛋白質的表現亢進進行觀測。由此暗示，源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR 中包含使於人類之細胞內融合之 mRNA 之轉譯活性亢進之序列。

【0087】 圖 34c：藉由 qPCR 法確認於圖 34b 所實施之試驗中螢光素酶 mRNA 之表現量是否發生變化。未確認到螢光素酶 mRNA 之轉錄亢進。

根據以上結果，可獲得表明源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR 中包含使於人類之細胞內融合之 mRNA 之轉譯活性亢進之序列的結果。

源自 SARS-CoV-2 之 5'UTR 可作為提高任意 mRNA 之轉譯效率之新穎的類 IRES 序列，而期待於分子遺傳學研究中之應用。

【符號說明】

(無)

序列表

<110> 學校法人川崎學園(KAWASAKI GAKUEN EDUCATIONAL FOUNDATION)

<120> 包含人類之生物之細胞中的轉錄產物、以及經基因導入之RNA及其複合物純化工具

<140> 111100459
<141> 2022-01-05

<150> JP 2021-000378
<151> 2021-01-05

<160> 25

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1
<211> 310
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> crRNA

<400> 1
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag 60

ataattagaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt tatatatctt gtggaaagga 240

cgaaacaccg atttagacta ccccaaaaac gaaggggact aaaacggaga cgtgaccgtc 300

tccttttttt 310

<210> 2
<211> 5228
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> dCas13a

<400> 2
accatgaaag tgaccaaggt cgacggcatc agccacaaga agtacatcga agagggcaag 60

ctcgtgaagt ccaccagcga ggaaaaccgg accagcgaga gactgagcga gctgctgagc 120

atccggctgg acatctacat caagaacccc gacaacgcct ccgaggaaga gaaccggatc 180

agaagagaga acctgaagaa gttctttagc aacaaggtgc tgcacctgaa ggacagcgtg 240

ctgtatctga agaaccggaa agaaaagaac gccgtgcagg acaagaacta tagcgaagag 300

gacatcagcg agtacgacct gaaaaacaag aacagcttct ccgtgctgaa gaagatcctg 360

ctgaacgagg acgtgaactc tgaggaactg gaaatctttc ggaaggacgt ggaagccaag 420

ctgaacaaga tcaacagcct gaagtacagc ttcgaagaga acaaggccaa ctaccagaag 480

atcaacgaga acaacggtac ccatactctt tatgcccccg gtggatatga cattatggga 540

tatctggacc agatcggcaa ccggccaaac ccgcaggtgg aactgggccc cgtggataca 600

tcctgcgcct tgattctttg tgacctgaaa cagaaagaca ccccgatagt ttacgcgagt 660

gaagccttcc tctacatgac aggttacagc aacgcagagg tgctgggccg gaattgccgg 720

tttctgcaaa gccctgacgg catggtgaag cccaagagca cccggaagta cgtggatagt 780

aacacaatca atactatgcg caaggcaatc gacaggaatg ccgaggtgca ggttgaagta 840

gtcaatttta aaaagaatgg acagcgattt gttaatttcc tgactatgat acctgttagg 900

gacgaaacag gcgagtatcg atactctatg ggattccagt gcgaaacaga aggcggaagc 960

ggtggcggat ccggcagcgg cgccaccaac ttcagcctgc tgaagcaggc cggcgacgtg 1020

gaggagaacc ccggcccccc cgagggcgga catactcttt atgcccccgg tggatatgac 1080

attatgggat atctgaggca gatcaggaac cggccaaacc cgcaggtgga actgggcccc 1140

gtggatacat cctgcgcctt gattctttgt gacctgaaac agaaagacac cccgatagtt 1200

tacgcgagtg aagccttcct ctacatgaca ggttacagca acgcagaggt gctgggccgg 1260

aattgccggt ttctgcaaag ccctgacggc atggtgaagc ccaagagcac ccggaagtac 1320

gtggatagta acacaatcaa tactatgcgc aaggcaatcg acaggaatgc cgaggtgcag 1380

gttgaagtag tcaattttaa aaagaatgga cagcgatttg ttaatttcct gactatgata 1440

cctgttaggg acgaaacagg cgagtatcga tactctatgg gattccagtg cgaaacagaa 1500

ggtaccgtgg aaaaagtggg cggcaagagc aagcggaaca tcatctacga ctactacaga 1560

gagagcgcca agcgcaacga ctacatcaac aacgtgcagg aagccttcga caagctgtat 1620

aagaaagagg atatcgagaa actgtttttc ctgatcgaga acagcaagaa gcacgagaag 1680

tacaagatcc gcgagtacta tcacaagatc atcggccgga agaacgacaa agagaacttc 1740

gccaagatta tctacgaaga gatccagaac gtgaacaaca tcaaagagct gattgagaag 1800

atccccgaca tgtctgagct gaagaaaagc caggtgttct acaagtacta cctggacaaa 1860

gaggaactga acgacaagaa tattaagtac gccttctgcc acttcgtgga aatcgagatg 1920

tcccagctgc tgaaaaacta cgtgtacaag cggctgagca acatcagcaa cgataagatc 1980

aagcggatct tcgagtacca gaatctgaaa aagctgatcg aaaacaaact gctgaacaag 2040

ctggacacct acgtgcggaa ctgcggcaag tacaactact atctgcaagt gggcgagatc 2100

gccacctccg actttatcgc ccggaaccgg cagaacgagg ccttcctgag aaacatcatc 2160

ggcgtgtcca gcgtggccta cttcagcctg aggaacatcc tggaaaccga gaacgagaac 2220

ggtatcaccg gccggatgcg gggcaagacc gtgaagaaca acaagggcga agagaaatac 2280

gtgtccggcg aggtggacaa gatctacaat gagaacaagc agaacgaagt gaaagaaaat 2340

ctgaagatgt tctacagcta cgacttcaac atggacaaca agaacgagat cgaggacttc 2400

ttcgccaata tcgatgaggc catctctagt attgctcacg gcatcgtgca tttcaacctg 2460

gaactggaag gcaaggacat cttcgccttc aagaatatcg cccccagcga gatctccaag 2520

aagatgtttc agaacgaaat caacgaaaag aagctgaagc tgaaaatctt caagcagctg 2580

aacagcgcca acgtgttcaa ctactacgag aaggatgtga tcatcaagta cctgaagaat 2640

accaagttca acttcgtgaa caaaaacatc cccttcgtgc ccagcttcac caagctgtac 2700

aacaagattg aggacctgcg gaataccctg aagttttttt ggagcgtgcc caaggacaaa 2760

gaagagaagg acgcccagat ctacctgctg aagaatatct actacggcga gttcctgaac 2820

aagttcgtga aaaactccaa ggtgttcttt aagatcacca atgaagtgat caagattaac 2880

aagcagcgga accagaaaac cggccactac aagtatcaga agttcgagaa catcgagaaa 2940

accgtgcccg tggaatacct ggccatcatc cagagcagag agatgatcaa caaccaggac 3000

aaagaggaaa agaataccta catcgacttt attcagcaga ttttcctgaa gggcttcatc 3060

gactacctga acaagaacaa tctgaagtat atcgagagca acaacaacaa tgacaacaac 3120

gacatcttct ccaagatcaa gatcaaaaag gataacaaag agaagtacga caagatcctg 3180

aagaactatg agaagcacaa tcggaacaaa gaaatccctc acgagatcaa tgagttcgtg 3240

cgcgagatca agctggggaa gattctgaag tacaccgaga atctgaacat gttttacctg 3300

atcctgaagc tgctgaacca caaagagctg accaacctga agggcagcct ggaaaagtac 3360

cagtccgcca acaaagaaga aaccttcagc gacgagttgg aactgatcaa cctgctgaac 3420

ctggacaaca acagagtgac cgaggacttc gagctggaag ccaacgagat cggcaagttc 3480

ctggacttca acgaaaacaa aatcaaggac cggaaagagc tgaaaaagtt cgacaccaac 3540

aagatctatt tcgacggcga gaacatcatc aagcaccggg ccttctacaa tatcaagaaa 3600

tacggcatgc tgaatctgct ggaaaagatc gccgataagg ccaagtataa gatcagcctg 3660

aaagaactga aagagtacag caacaagaag aatgagattg aaaagaacta caccatgcag 3720

cagaacctgc accggaagta cgccagaccc aagaaggacg aaaagttcaa cgacgaggac 3780

tacaaagagt atgagaaggc catcggcaac atccagaagt acacccacct gaagaacaag 3840

gtggaattca atgagctgaa cctgctgcag ggcctgctgc tgaagatcct gcaccggctc 3900

gtgggctaca ccagcatctg ggagcgggac ctgagattcc ggctgaaggg cgagtttccc 3960

gagaaccact acatcgagga aattttcaat ttcgacaact ccaagaatgt gaagtacaaa 4020

agcggccaga tcgtggaaaa gtatatcaac ttctacaaag aactgtacaa ggacaatgtg 4080

gaaaagcgga gcatctactc cgacaagaaa gtgaagaaac tgaagcagga gaagaaagac 4140

ctgtatattg caaactacat cgctcacttt aattatattc ctcatgccga gattagcctg 4200

ctggaagtgc tggaaaacct gcggaagctg ctgtcctacg accggaagct gaagaacgcc 4260

atcatgaagt ccatcgtgga cattctgaaa gaatacggct tcgtggccac cttcaagatc 4320

ggcgctgaca agaagatcga aatccagacc ctggaatcag agaagatcgt gcacctgaag 4380

aatctgaaga aaaagaaact gatgaccgac cggaacagcg aggaactgtg cgaactcgtg 4440

aaagtcatgt tcgagtacaa ggccctggaa ggaggaggtg gaagcggagg aggaggaagc 4500

ggaggaggag gtagcgtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg 4560

gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc 4620

gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg 4680

ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc 4740

gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag 4800

cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagaccc gcgccgaggt gaagttcgag 4860

ggcgacaccc tggtgaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac 4920

atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac 4980

aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc 5040

tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca cccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc 5100

ccgacaacca ctacctgagc acccagtccg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg 5160

atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc 5220

tgtactaa 5228

<210> 3
<211> 2272
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SASRS-CoV-2.0

<400> 3
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa 60

ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atcgctgact aatttttttt atttatgcag 120

aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 180

gcctaggctt ttgcaaaaag cttcttccca ggtaacaaac caaccaactt tcgatctctt 240

gtagatctgt tctctaaacg aactttaaaa tctgtgtggc tgtcactcgg ctgcatgctt 300

agtgcactca cgcagtataa ttaataacta attactgtcg ttgacaggac acgagtaact 360

cgtctatctt ctgcaggctg cttacggttt cgtccgtgtt gcagccgatc atcagcacat 420

ctaggtttcg tccgggtgtg accgaaaggt aagccaccat ggaagacgcc aaaaacataa 480

agaaaggccc ggcgccattc tatccgctgg aagatggaac cgctggagag caactgcata 540

aggctatgaa gagatacgcc ctggttcctg gaacaattgc ttttacagat gcacatatcg 600

aggtggacat cacttacgct gagtacttcg aaatgtccgt tcggttggca gaagctatga 660

aacgatatgg gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg cagtgaaaac tctcttcaat 720

tctttatgcc ggtgttgggc gcgttattta tcggagttgc agttgcgccc gcgaacgaca 780

tttataataa cgtgaattgc tcaacagtat gggcatttcg cagcctaccg tggtgttcgt 840

ttccaaaaag gggttgcaaa aaattttgaa cgtgcaaaaa aagctcccaa tcatccaaaa 900

aattattatc atggattcta aaacggatta ccagggattt cagtcgatgt acacgttcgt 960

cacatctcat ctacctcccg gttttaatga atacgatttt gtgccagagt ccttcgatag 1020

ggacaagaca attgcactga tcatgaactc ctctggatct actggtctgc ctaaaggtgt 1080

cgctctgcct catagaactg cctgcgtgag attctcgcat gccagagatc ctatttttgg 1140

caatcaaatc attccggata ctgcgatttt aagtgttgtt ccattccatc acggttttgg 1200

aatgtttact acactcggat atttgatatg tggatttcga gtcgtcttaa tgtatagatt 1260

tgaagaagag ctgtttctga ggagccttca ggattacaag attcaaagtg cgctgctggt 1320

gccaacccta ttctccttct tcgccaaaag cactctgatt gacaaatacg atttatctaa 1380

tttacacgaa attgcttctg gtggcgctcc cctctctaag gaagtcgggg aagcggttgc 1440

caagaggttc catctgccag gtatcaggca aggatatggg ctcactgaga ctacatcagc 1500

tattctgatt acacccgagg gggatgataa accgggcgcg gtcggtaaag ttgttccatt 1560

ttttgaagcg aaggttgtgg atctggatac cgggaaaacg ctgggcgtta atcaaagagg 1620

cgaactgtgt gtgagaggtc ctatgattat gtccggttat gtaaacaatc cggaagcgac 1680

caacgccttg attgacaagg atggatggct acattctgga gacatagctt actgggacga 1740

agacgaacac ttcttcatcg ttgaccgcct gaagtctctg attaagtaca aaggctatca 1800

ggtggctccc gctgaattgg aatccatctt gctccaacac cccaacatct tcgacgcagg 1860

tgtcgcaggt cttcccgacg atgacgccgg tgaacttccc gccgccgttg ttgttttgga 1920

gcacggaaag acgatgacgg aaaaagagat cgtggattac gtcgccagtc aagtaacaac 1980

cgcgaaaaag ttgcgcggag gagttgtgtt tgtggacgaa gtaccgaaag gtcttaccgg 2040

aaaactcgac gcaagaaaaa tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat 2100

cgccgtgtaa ttctagagtc ggggcggccg gccgcttcga gcagacatga taagatacat 2160

tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat 2220

ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag tt 2272

<210> 4
<211> 164
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Cas13.N.a.a

<400> 4

Met Lys Val Thr Lys Val Asp Gly Ile Ser His Lys Lys Tyr Ile Glu
1 5 10 15

Glu Gly Lys Leu Val Lys Ser Thr Ser Glu Glu Asn Arg Thr Ser Glu
20 25 30

Arg Leu Ser Glu Leu Leu Ser Ile Arg Leu Asp Ile Tyr Ile Lys Asn
35 40 45

Pro Asp Asn Ala Ser Glu Glu Glu Asn Arg Ile Arg Arg Glu Asn Leu
50 55 60

Lys Lys Phe Phe Ser Asn Lys Val Leu His Leu Lys Asp Ser Val Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Asn Arg Lys Glu Lys Asn Ala Val Gln Asp Lys Asn Tyr
85 90 95

Ser Glu Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Asp Leu Lys Asn Lys Asn Ser Phe
100 105 110

Ser Val Leu Lys Lys Ile Leu Leu Asn Glu Asp Val Asn Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Glu Ile Phe Arg Lys Asp Val Glu Ala Lys Leu Asn Lys Ile Asn
130 135 140

Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Glu Glu Asn Lys Ala Asn Tyr Gln Lys Ile
145 150 155 160

Asn Glu Asn Asn

<210> 5
<211> 1003
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> dCas13.C.a.a

<400> 5

Val Glu Lys Val Gly Gly Lys Ser Lys Arg Asn Ile Ile Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

Tyr Arg Glu Ser Ala Lys Arg Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Val Gln Glu
20 25 30

Ala Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Lys Glu Asp Ile Glu Lys Leu Phe Phe
35 40 45

Leu Ile Glu Asn Ser Lys Lys His Glu Lys Tyr Lys Ile Arg Glu Tyr
50 55 60

Tyr His Lys Ile Ile Gly Arg Lys Asn Asp Lys Glu Asn Phe Ala Lys
65 70 75 80

Ile Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Asn Val Asn Asn Ile Lys Glu Leu Ile
85 90 95

Glu Lys Ile Pro Asp Met Ser Glu Leu Lys Lys Ser Gln Val Phe Tyr

100 105 110

Lys Tyr Tyr Leu Asp Lys Glu Glu Leu Asn Asp Lys Asn Ile Lys Tyr
115 120 125

Ala Phe Cys His Phe Val Glu Ile Glu Met Ser Gln Leu Leu Lys Asn
130 135 140

Tyr Val Tyr Lys Arg Leu Ser Asn Ile Ser Asn Asp Lys Ile Lys Arg
145 150 155 160

Ile Phe Glu Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Leu Ile Glu Asn Lys Leu Leu
165 170 175

Asn Lys Leu Asp Thr Tyr Val Arg Asn Cys Gly Lys Tyr Asn Tyr Tyr
180 185 190

Leu Gln Val Gly Glu Ile Ala Thr Ser Asp Phe Ile Ala Arg Asn Arg
195 200 205

Gln Asn Glu Ala Phe Leu Arg Asn Ile Ile Gly Val Ser Ser Val Ala
210 215 220

Tyr Phe Ser Leu Arg Asn Ile Leu Glu Thr Glu Asn Glu Asn Gly Ile
225 230 235 240

Thr Gly Arg Met Arg Gly Lys Thr Val Lys Asn Asn Lys Gly Glu Glu
245 250 255

Lys Tyr Val Ser Gly Glu Val Asp Lys Ile Tyr Asn Glu Asn Lys Gln
260 265 270

Asn Glu Val Lys Glu Asn Leu Lys Met Phe Tyr Ser Tyr Asp Phe Asn
275 280 285

Met Asp Asn Lys Asn Glu Ile Glu Asp Phe Phe Ala Asn Ile Asp Glu
290 295 300

Ala Ile Ser Ser Ile Ala His Gly Ile Val His Phe Asn Leu Glu Leu
305 310 315 320

Glu Gly Lys Asp Ile Phe Ala Phe Lys Asn Ile Ala Pro Ser Glu Ile
325 330 335

Ser Lys Lys Met Phe Gln Asn Glu Ile Asn Glu Lys Lys Leu Lys Leu
340 345 350

Lys Ile Phe Lys Gln Leu Asn Ser Ala Asn Val Phe Asn Tyr Tyr Glu
355 360 365

Lys Asp Val Ile Ile Lys Tyr Leu Lys Asn Thr Lys Phe Asn Phe Val
370 375 380

Asn Lys Asn Ile Pro Phe Val Pro Ser Phe Thr Lys Leu Tyr Asn Lys
385 390 395 400

Ile Glu Asp Leu Arg Asn Thr Leu Lys Phe Phe Trp Ser Val Pro Lys
405 410 415

Asp Lys Glu Glu Lys Asp Ala Gln Ile Tyr Leu Leu Lys Asn Ile Tyr
420 425 430

Tyr Gly Glu Phe Leu Asn Lys Phe Val Lys Asn Ser Lys Val Phe Phe
435 440 445

Lys Ile Thr Asn Glu Val Ile Lys Ile Asn Lys Gln Arg Asn Gln Lys
450 455 460

Thr Gly His Tyr Lys Tyr Gln Lys Phe Glu Asn Ile Glu Lys Thr Val
465 470 475 480

Pro Val Glu Tyr Leu Ala Ile Ile Gln Ser Arg Glu Met Ile Asn Asn
485 490 495

Gln Asp Lys Glu Glu Lys Asn Thr Tyr Ile Asp Phe Ile Gln Gln Ile

500 505 510

Phe Leu Lys Gly Phe Ile Asp Tyr Leu Asn Lys Asn Asn Leu Lys Tyr
515 520 525

Ile Glu Ser Asn Asn Asn Asn Asp Asn Asn Asp Ile Phe Ser Lys Ile
530 535 540

Lys Ile Lys Lys Asp Asn Lys Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn
545 550 555 560

Tyr Glu Lys His Asn Arg Asn Lys Glu Ile Pro His Glu Ile Asn Glu
565 570 575

Phe Val Arg Glu Ile Lys Leu Gly Lys Ile Leu Lys Tyr Thr Glu Asn
580 585 590

Leu Asn Met Phe Tyr Leu Ile Leu Lys Leu Leu Asn His Lys Glu Leu
595 600 605

Thr Asn Leu Lys Gly Ser Leu Glu Lys Tyr Gln Ser Ala Asn Lys Glu
610 615 620

Glu Thr Phe Ser Asp Glu Leu Glu Leu Ile Asn Leu Leu Asn Leu Asp
625 630 635 640

Asn Asn Arg Val Thr Glu Asp Phe Glu Leu Glu Ala Asn Glu Ile Gly
645 650 655

Lys Phe Leu Asp Phe Asn Glu Asn Lys Ile Lys Asp Arg Lys Glu Leu
660 665 670

Lys Lys Phe Asp Thr Asn Lys Ile Tyr Phe Asp Gly Glu Asn Ile Ile
675 680 685

Lys His Arg Ala Phe Tyr Asn Ile Lys Lys Tyr Gly Met Leu Asn Leu
690 695 700

Leu Glu Lys Ile Ala Asp Lys Ala Lys Tyr Lys Ile Ser Leu Lys Glu
705 710 715 720

Leu Lys Glu Tyr Ser Asn Lys Lys Asn Glu Ile Glu Lys Asn Tyr Thr
725 730 735

Met Gln Gln Asn Leu His Arg Lys Tyr Ala Arg Pro Lys Lys Asp Glu
740 745 750

Lys Phe Asn Asp Glu Asp Tyr Lys Glu Tyr Glu Lys Ala Ile Gly Asn
755 760 765

Ile Gln Lys Tyr Thr His Leu Lys Asn Lys Val Glu Phe Asn Glu Leu
770 775 780

Asn Leu Leu Gln Gly Leu Leu Leu Lys Ile Leu His Arg Leu Val Gly
785 790 795 800

Tyr Thr Ser Ile Trp Glu Arg Asp Leu Arg Phe Arg Leu Lys Gly Glu
805 810 815

Phe Pro Glu Asn His Tyr Ile Glu Glu Ile Phe Asn Phe Asp Asn Ser
820 825 830

Lys Asn Val Lys Tyr Lys Ser Gly Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ile Asn
835 840 845

Phe Tyr Lys Glu Leu Tyr Lys Asp Asn Val Glu Lys Arg Ser Ile Tyr
850 855 860

Ser Asp Lys Lys Val Lys Lys Leu Lys Gln Glu Lys Lys Asp Leu Tyr
865 870 875 880

Ile Ala Asn Tyr Ile Ala His Phe Asn Tyr Ile Pro His Ala Glu Ile
885 890 895

Ser Leu Leu Glu Val Leu Glu Asn Leu Arg Lys Leu Leu Ser Tyr Asp

900 905 910

Arg Lys Leu Lys Asn Ala Ile Met Lys Ser Ile Val Asp Ile Leu Lys
915 920 925

Glu Tyr Gly Phe Val Ala Thr Phe Lys Ile Gly Ala Asp Lys Lys Ile
930 935 940

Glu Ile Gln Thr Leu Glu Ser Glu Lys Ile Val His Leu Lys Asn Leu
945 950 955 960

Lys Lys Lys Lys Leu Met Thr Asp Arg Asn Ser Glu Glu Leu Cys Glu
965 970 975

Leu Val Lys Val Met Phe Glu Tyr Lys Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
980 985 990

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
995 1000

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 6
gggaccgggg gttccgcgtc tagtttct 28

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 7
gggaccgggg gttccgcgtc tagtttct 28

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 8
ggacagagcc ctggactgga gctggggg 28

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 9
gagacaggag atcgagacct tcgtgggg 28

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 10
tgtgagggga cacggtctcg tcacgtct 28

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 11
ccacgagcag ggctggggag aaggtggg 28

<210> 12

<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 12
ccccggtggg tcggggaagg agtggaga 28

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 13
tgtgttggag aagctgcagg tgaaggtg 28

<210> 14
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 14
gtcccactgt ccacgccgga gcctccgg 28

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 15
gtgcatcttc cttctccgag acgtcacc 28

<210> 16
<211> 28
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 16
cgtcttcgac gtcggagtgc atcttcct 28

<210> 17
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 17
cgggctccct acactcgtcc accggccc 28

<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 18
ccggcccctc cgaaacaccc cggtgggt 28

<210> 19
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 19
aggagtggag agaggtagag agtctgag 28

<210> 20
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 20
cgcccgtctc gagtcccact gtccacgc 28

<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 21
gcctccgggg ccccgtcccc actcgact 28

<210> 22
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 22
ctcggccagg accccaccca caggggag 28

<210> 23
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引導RNA

<400> 23
caggggagga cgtgtcctag tcctcgag 28

<210> 24
<211> 414
<212> DNA
<213> 智人

<400> 24
cccgaaagtg tgtgtctcct gaggagttca cagaaataat gaaccaaaga gagcaattct 60

accataaggt gaatttctcc ccacctggtg acacaaacag ccttttccca ggtacttggt 120

acctggagcg agtggacgag cagcatcgcc gaaagtatgc ccggcgtccc gtctaaaggt 180

gttctgcaga tccatggaaa gcttcctggg aaacgtatgc tagcagagct tctccccgtg 240

aatcatattt ttaagatccc actcttagct ggtaaatgaa tttgaatcga catagtagcc 300

ccataagcat cagccctgta gagtgaggag ccatctctag cgggcccttc attcctctcc 360

atgctgcaat cactgtcctg ggcttatggt gctatggact aggggtcctt tgtg 414

<210> 25
<211> 489
<212> DNA
<213> 智人

<400> 25
gcagtcacag cagagatgga aagctgctaa tgatgctggc tactttaatg atgaaatggc 60

accaattgaa gtgaagacaa agaaaggaaa acagacaatg caggtagacg agcatgctcg 120

gccccaaacc accctggaac agttacagaa acttcctcca gtattcaaga aagatggaac 180

tgttactgca gggaatgcat cgggtgtagc tgatggtgct ggagctgtta tcatagctag 240

tgaagatgct gttaagaaac ataacttcac accactggca agaattgtgg gctactttgt 300

atctggatgt gatccctcta tcatgggtat tggtcctgtc cctgctatca gtggggcact 360

gaagaaagca ggactgagtc ttaaggacat ggatttggta gaggtgaatg aagcttttgc 420

tccccagtac ttggctgttg agaggagttt ggatcttgac ataagtaaaa ccaatgtgaa 480

tggaggagc 489

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，針對前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物，係於具有螺旋區、可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物，且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas (dead Cas))蛋白質或具有核酸酶活性之 CRISPR-Cas 蛋白質中，包含前述螺旋區之包含 N 末端側之 N 區與包含 C 末端之 C 區、能夠應答刺激而結合之第 1 因子與第 2 因子，且 N 區與第 1 因子、C 區與第 2 因子分別連結，第 1 因子與第 2 因子藉由包含蛋白酶識別序列之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子藉由包含自切肽之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子經非共價鍵結而成，使前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物具有(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(非共價鍵結)-(第 2 因子)-(C 區)之結構；針對前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，具有(N 區)-(第 1 因子)與(第 2 因子)-(C 區)之 2 個部分。

【請求項2】 如請求項 1 之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述 N 區包含螺旋區之 N 末端側之一部分胺基酸序列，前述 C 區包含螺旋區之 C 末端側之一部分胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項1之CRISPR-dCas/Cas蛋白質及蛋白質衍生物、或CRISPR-dCas/Cas蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述N區包含源自韋德纖毛菌(Leptotrichia wadei)之Cas13a(序列ID：WP_021746774.1)之螺旋區之N末端側之一部分胺基酸序列中的164個胺基酸，前述C區包含螺旋區之C末端側之一部分胺基酸序列中的1,003個胺基酸。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、

或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述第 1 因子包含 nMAG 或 pMAG，前述第 2 因子包含 pMAG 或 nMAG。

【請求項5】 一種聚核苷酸或其互補鏈，編碼如請求項 1 至 4 中任一項之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物集。

【請求項6】 一種或二種載體，係包含如請求項 5 之 1 種或 2 種聚核苷酸或其互補鏈。

【請求項7】 如請求項 6 之載體，其中前述載體為腺病毒載體、腺相關病毒載體或質體載體。

【請求項8】 如請求項 7 之載體，其中前述載體為 2 種載體，其中一載體具有(N 區)-(第 1 因子)之結構，另一載體具有(第 2 因子)-(C 區)之結構。

【請求項9】 如請求項 6 至 8 中任一項之載體，其中前述載體進一步包含編碼與標的 RNA 相對應之引導 RNA 之聚核苷酸。

【請求項10】一種轉形體，係藉由如請求項 6 至 9 中任一項之載體轉形而成。

【請求項11】如請求項 1 至 4 中任一項之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集、如請求項 5 之聚核苷酸或其互補鏈、如請求項 6 至 9 中任一項之載體或如請求項 10 之轉形體，其中前述標的 RNA 為與生物體功能及疾病相關之一組 lncRNA(長鏈非編碼 RNA(long noncoding RNA))及/或 ncRNA(非編碼 RNA(noncoding RNA))。

【請求項12】如請求項 10 或 11 之轉形體，其中前述轉形體為轉形哺乳動物細胞或轉形非人類哺乳動物。

【請求項13】如請求項 1 至 4 中任一項之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集、如請求項 5 之聚核苷酸或其互補鏈、如請求項 6 至 9 中任一項之載體或如請求項 10 至 12 中任一項

之轉形體，其中前述標的 RNA 為源自 RNA 病毒之 RNA、新型冠狀病毒之 RNA、源自合成基因之 RNA、lncRNA、引導 RNA 能夠靶向之 30nt 以上之 ncRNA 或前體 RNA。

【請求項14】一種標的 RNA 純化用擔載體，係將可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas)蛋白質擔載於固相擔載體而成。

【請求項15】一種標的 RNA 之純化方法，包括如下步驟：使引導 RNA 與標的 RNA 作用於如請求項 14 之擔載體而於前述擔載體上形成包含前述標的 RNA、前述引導 RNA 及前述 CRISPR-dCas 蛋白質之複合物之步驟；及使選自於由標的 RNA 及基因組 DNA、蛋白質、標的以外之 RNA 所構成群組中之標的 RNA 結合因子自前述複合物中溶出之步驟。

【請求項16】一種細胞內環境之解析方法，包括如下步驟：將多個引導 RNA 導入如請求項 10 之轉形體中或於其中表現之步驟；使前述轉形體溶解並使 RNA 捕獲粒子捕獲標的 RNA 之步驟；及對前述 RNA 捕獲粒子所結合之標的 RNA 進行解析之步驟。

【請求項17】如請求項 16 之解析方法，其中前述轉形體為 iPS 細胞。

【請求項18】如請求項 16 或 17 之解析方法，其包括如下步驟：將藉由標的 RNA、引導 RNA 及經光活化之 dCas 蛋白質之複合物形成所產生之細胞的表現系回收之步驟。

【請求項19】一種新型冠狀病毒之預防或治療劑，以脂質代謝控制物質作為有效成分。

【請求項20】如請求項 19 之新型冠狀病毒之預防或治療劑，其中脂質代謝控制物質具有 HMG-CoA 還原酶抑制作用或乙醯 CoA 還原酶抑制作用。

【請求項21】如請求項 19 或 20 之新型冠狀病毒之預防或治療劑，其中脂

質代謝控制物質為阿托伐他汀或瑞舒伐他汀。

【請求項22】一種基於 mRNA、rRNA(核糖體 RNA)及 lncRNA 之剪接異常之疾病之治療劑，以如請求項 6 至 9 中任一項之載體作為有效成分。

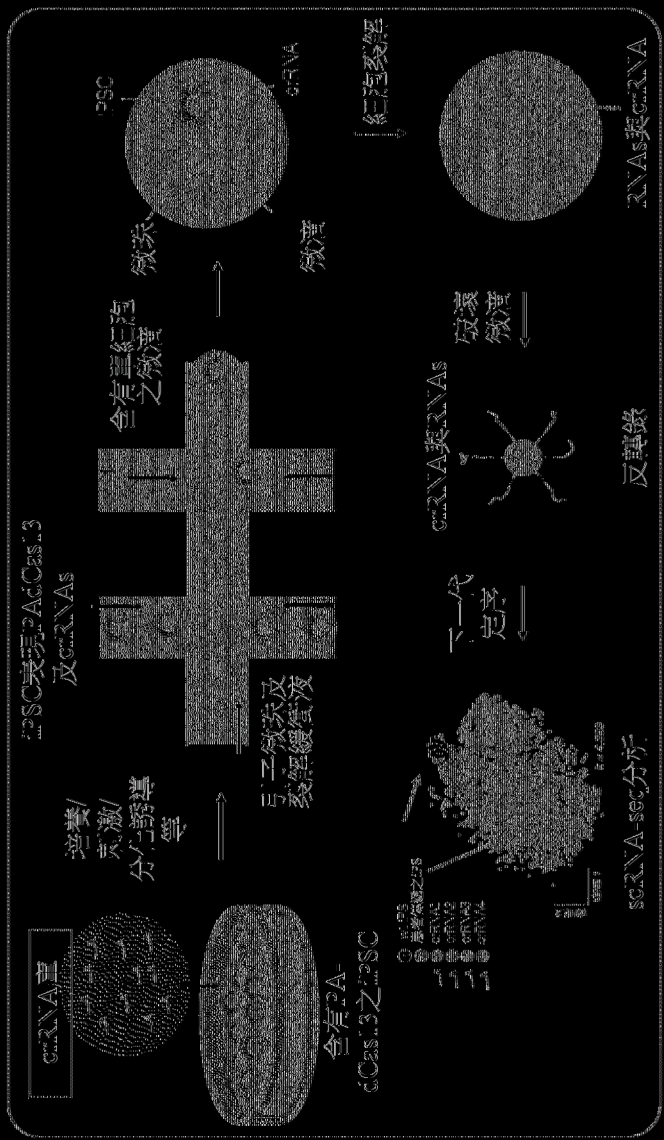
【請求項23】如請求項 1 之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質為具有核酸酶活性之 Cas13 蛋白。

【發明圖式】


Trans RNA免疫沈澱
此系統使得下等能夠分析來自
不同細胞階段之細胞狀態。
各細胞
dCas13捕獲目
特異性crRNA
靶向之分子
不活性dCas13
活性dCas13
提取特異性RNA
之周圍環境
DNA
RNA
蛋白質
各類型分子之分析

【圖1】

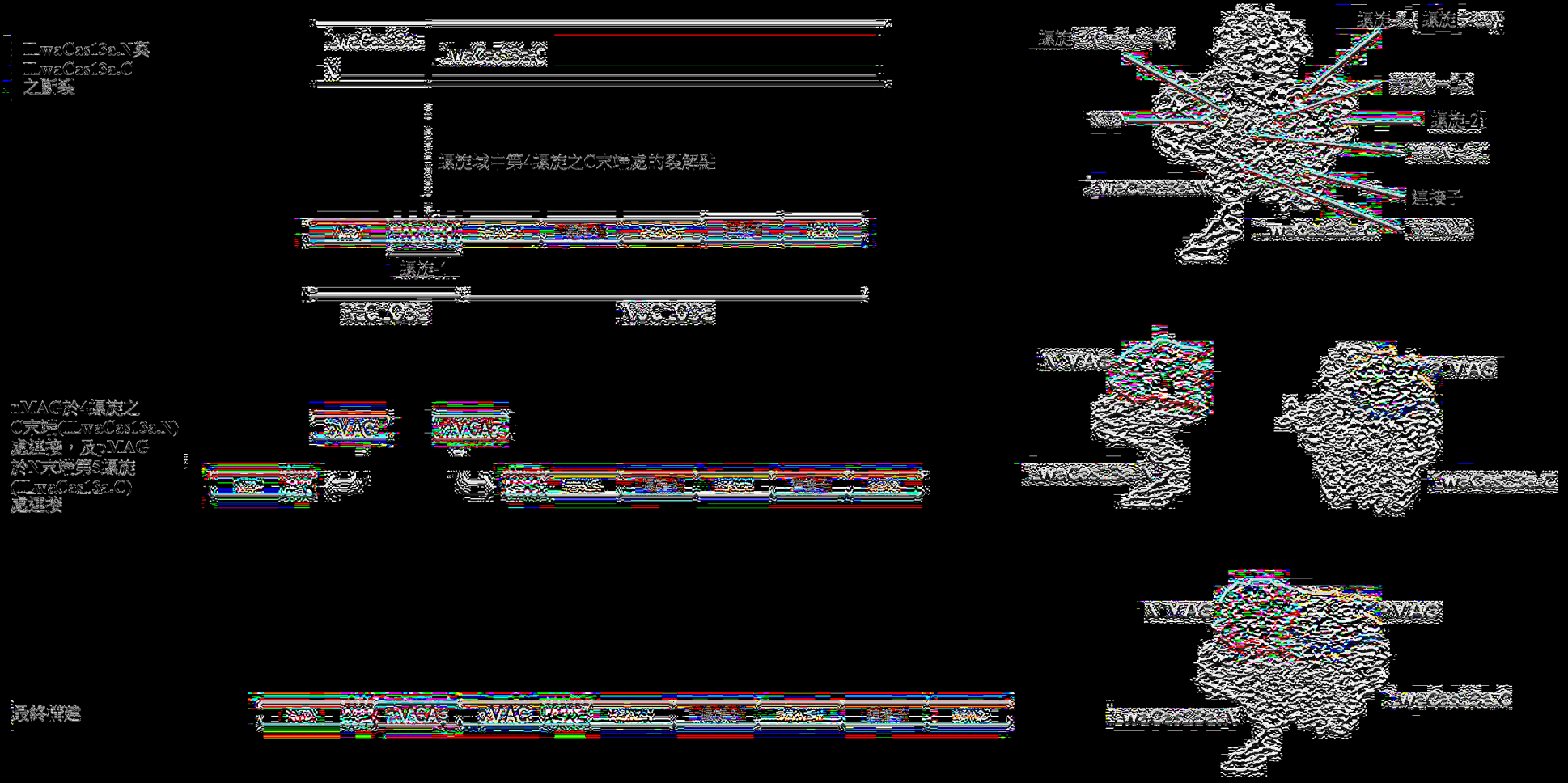
藉由單細胞定序技術進行之
混合RNA序列修飾(PRSM)



【圖2】

111100159
2022.10.19
2022.11.01 第31卷 第11期 1391-1396

光活化(PA) Cas13效力系的构建



無活性或結構
tracrRNA
crRNA
引導RNA
crRNA
tracrRNA
引導RNA
無活性或結構
活性：CasΦ-3a/3b或
CasΦ-3a/3b之雙重改良版本或
Cas12j活性結構區域。
活性：CasΦ-3a/3b或
CasΦ-3a/3b之雙重改良版本或
Cas12j活性結構區域。
11
11
crRNA
引導RNA
crRNA
引導RNA
無活性或結構
無活性或結構

圖 7

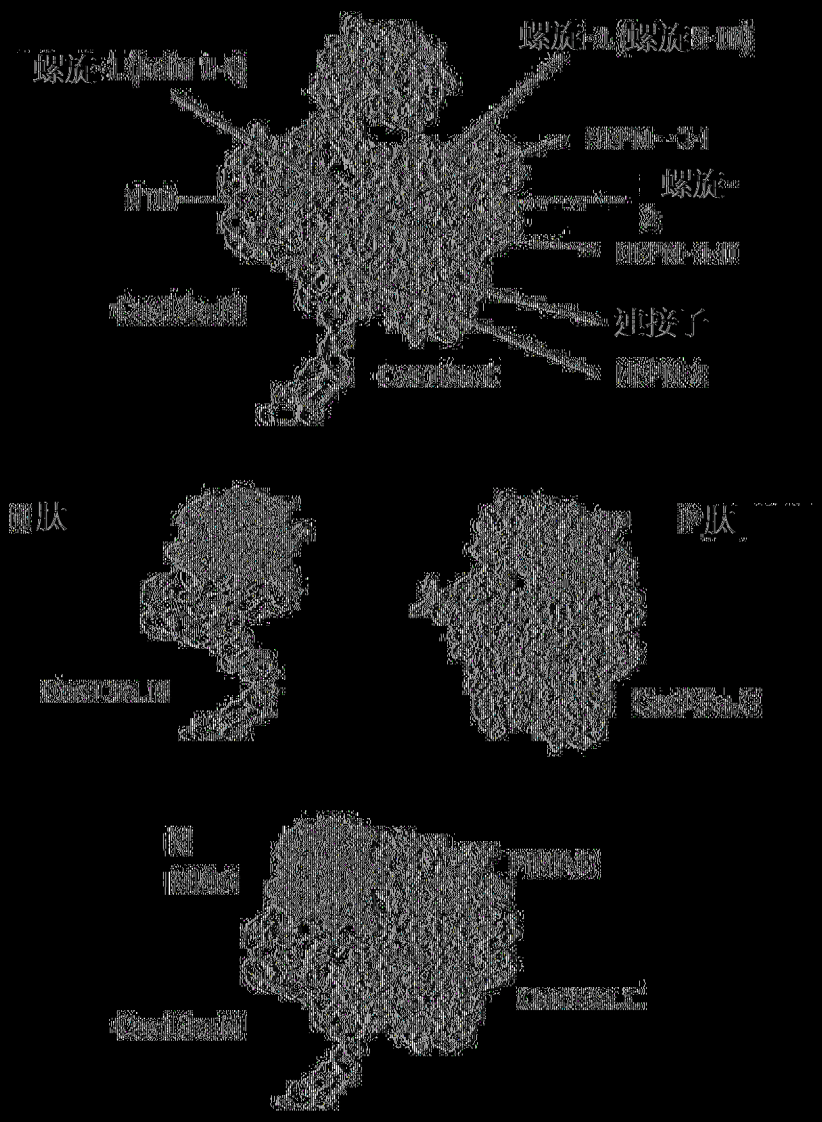
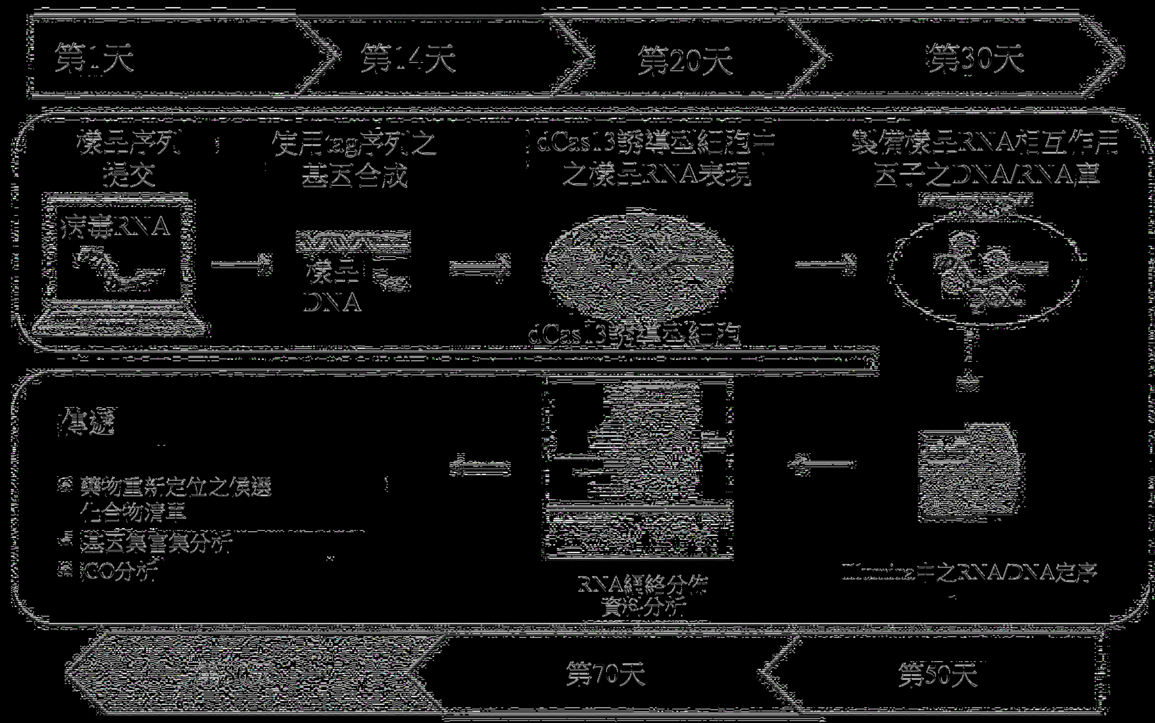


圖5

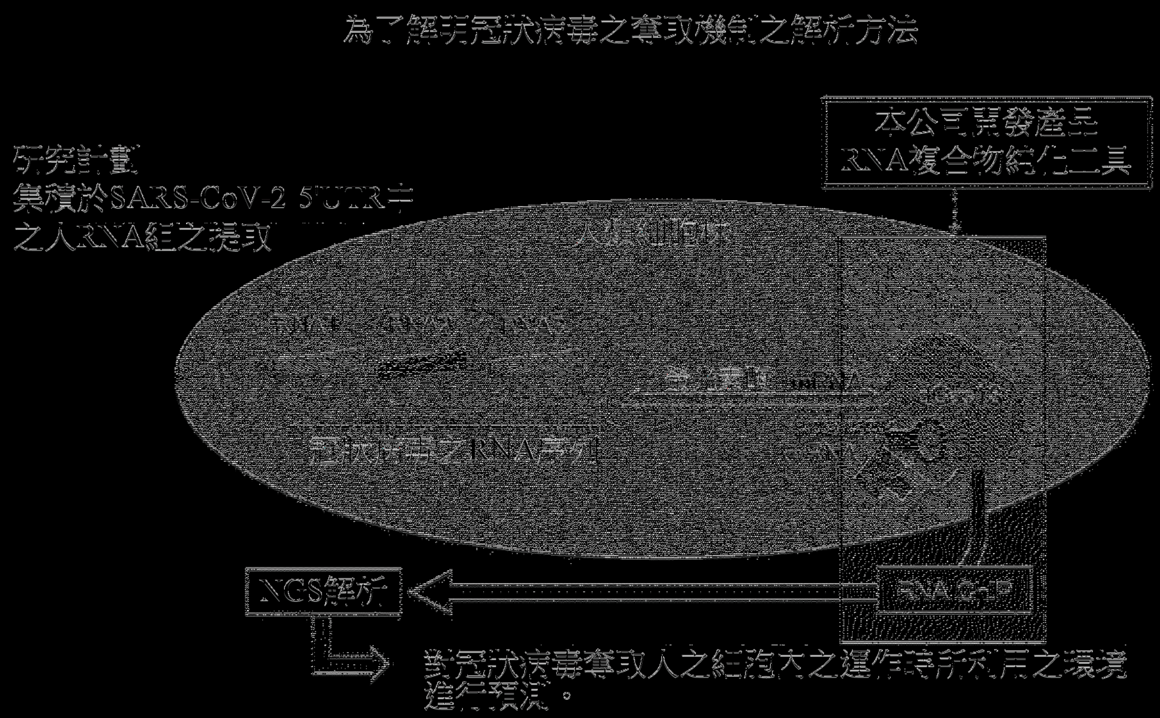
圖 6

PAGas18-EGFP + XIST cRNA
PAGas18-EGFP
PAGas18-EGFP + XIST cRNA
PAGas18-EGFP
XIST cRNA

圖 17


第1天
第14天
第20天
第30天
樣品序列提交
使用tag序列之基因合成
dCas13誘導至細胞中之樣品RNA表現
製備樣品RNA相互作用因子之DNA/RNA庫
樣品RNA
樣品DNA
dCas13結構
Illumina中之RNA/DNA定序
RNA網絡分佈資料分析
候選
藥物重新定位之候選化合物清單
基因集富集分析
GO分析
第70天
第50天

【圖8】


為了解開冠狀病毒之奪取機制之解析方法
本公司開發產品
RNA複合物純化工具
研究計畫
集積於SARS-CoV-2 5'UTR中
之人RNA組之提取
人類細胞株
冠狀病毒之RNA序列
RNA ChIP
NGS解析
對冠狀病毒奪取人之細胞內之運作時所利用之環境
進行預測。

【圖9】

發明專利說明書
新型SARS-Cov2之5'UTR RNA
發明人：
時間：


HEK293T
質粒轉染
PAdCas13-EGFP + Luc crRNA + CoV2 5'UTR
PAdCas13-EGFP + Luc crRNA + 螢光素酶
培養 48 h
RNA染色質免疫沉澱
抗GFP
ChIP-qPCR 分析
ChIP-seq 分析

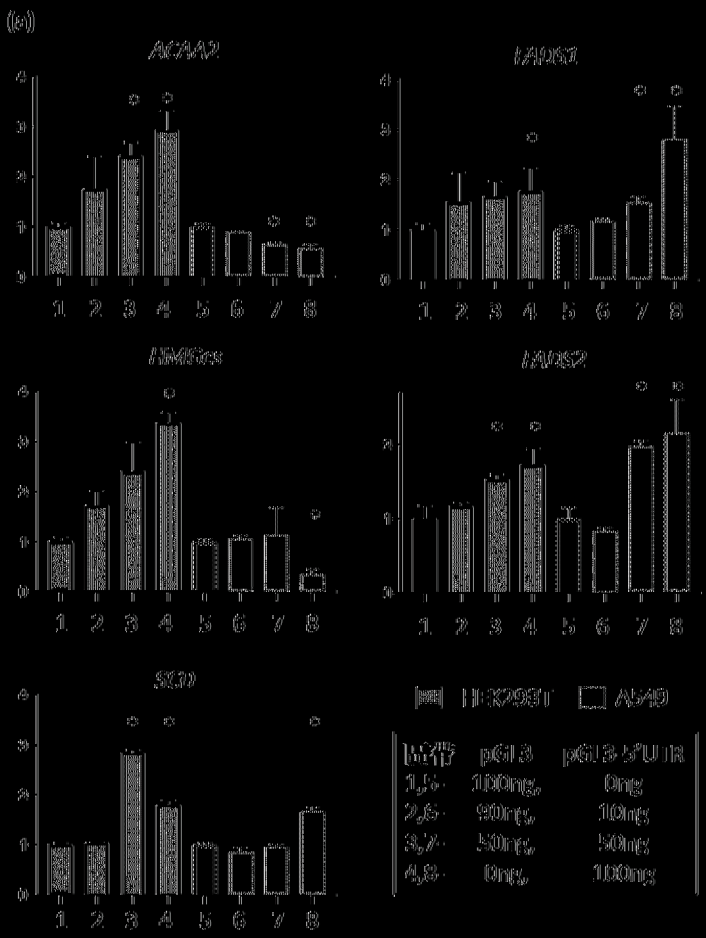
圖11

結合流感病毒SARS-CoV2蛋白質合之
人源尿之反之。
5'UTR RNA結合效應
(Ω-1-x)
(Ω-1-x)
(Ω-1-x)
研究結果，一尺已去鎖，三左鼓作起病量RNA-Sec
RNA量之水。
改善前
(Ω-1-x)

（圖2）

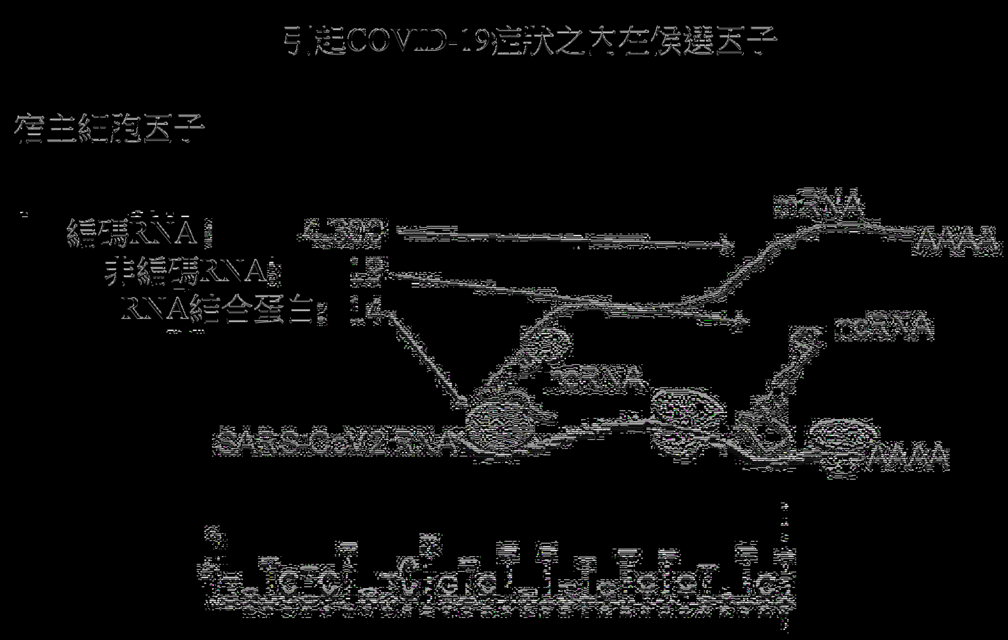
圖3

（7，5）


(a)
ACAA2
ADH1
AMPKα1
AVIS2
SCD
HEK293T
A549
組別 pGL3 pGL3-3'UTR
1,5 100ng 0ng
2,6 90ng 10ng
3,7 50ng 50ng
4,8 0ng 100ng

圖(圖15)

圖 7
用於 VC-CoA 依賴性脂肪酸氧化的代謝途徑。


引起COVID-19症狀之內在候選因子
宿主細胞因子
編碼RNA
非編碼RNA
RNA結合蛋白
mRNA
AAAA
ncRNA
SARS-CoV2 RNA
AAAA

【圖18】

於淋巴瘤先被活化之過程 (C1P)
M13
NS1 EMA
IgM
IgD
CD19
CD20
CD21
CD22
CD40
CD80
CD86
CD95
CD180
CD267
CD268
CD269
CD270
CD358
CD359
CD360
CD365
CD366
CD367
CD368
CD369
CD370
CD371
CD372
CD373
CD374
CD375
CD376
CD377
CD378
CD379
CD380
CD381
CD382
CD383
CD384
CD385
CD386
CD387
CD388
CD389
CD390
CD391
CD392
CD393
CD394
CD395
CD396
CD397
CD398
CD399
CD400
CD401
CD402
CD403
CD404
CD405
CD406
CD407
CD408
CD409
CD410
CD411
CD412
CD413
CD414
CD415
CD416
CD417
CD418
CD419
CD420
CD421
CD422
CD423
CD424
CD425
CD426
CD427
CD428
CD429
CD430
CD431
CD432
CD433
CD434
CD435
CD436
CD437
CD438
CD439
CD440
CD441
CD442
CD443
CD444
CD445
CD446
CD447
CD448
CD449
CD450
CD451
CD452
CD453
CD454
CD455
CD456
CD457
CD458
CD459
CD460
CD461
CD462
CD463
CD464
CD465
CD466
CD467
CD468
CD469
CD470
CD471
CD472
CD473
CD474
CD475
CD476
CD477
CD478
CD479
CD480
CD481
CD482
CD483
CD484
CD485
CD486
CD487
CD488
CD489
CD490
CD491
CD492
CD493
CD494
CD495
CD496
CD497
CD498
CD499
CD500
CD501
CD502
CD503
CD504
CD505
CD506
CD507
CD508
CD509
CD510
CD511
CD512
CD513
CD514
CD515
CD516
CD517
CD518
CD519
CD520
CD521
CD522
CD523
CD524
CD525
CD526
CD527
CD528
CD529
CD530
CD531
CD532
CD533
CD534
CD535
CD536
CD537
CD538
CD539
CD540
CD541
CD542
CD543
CD544
CD545
CD546
CD547
CD548
CD549
CD550
CD551
CD552
CD553
CD554
CD555
CD556
CD557
CD558
CD559
CD560
CD561
CD562
CD563
CD564
CD565
CD566
CD567
CD568
CD569
CD570
CD571
CD572
CD573
CD574
CD575
CD576
CD577
CD578
CD579
CD580
CD581
CD582
CD583
CD584
CD585
CD586
CD587
CD588
CD589
CD590
CD591
CD592
CD593
CD594
CD595
CD596
CD597
CD598
CD599
CD600
CD601
CD602
CD603
CD604
CD605
CD606
CD607
CD608
CD609
CD610
CD611
CD612
CD613
CD614
CD615
CD616
CD617
CD618
CD619
CD620
CD621
CD622
CD623
CD624
CD625
CD626
CD627
CD628
CD629
CD630
CD631
CD632
CD633
CD634
CD635
CD636
CD637
CD638
CD639
CD640
CD641
CD642
CD643
CD644
CD645
CD646
CD647
CD648
CD649
CD650
CD651
CD652
CD653
CD654
CD655
CD656
CD657
CD658
CD659
CD660
CD661
CD662
CD663
CD664
CD665
CD666
CD667
CD668
CD669
CD670
CD671
CD672
CD673
CD674
CD675
CD676
CD677
CD678
CD679
CD680
CD681
CD682
CD683
CD684
CD685
CD686
CD687
CD688
CD689
CD690
CD691
CD692
CD693
CD694
CD695
CD696
CD697
CD698
CD699
CD700
CD701
CD702
CD703
CD704
CD705
CD706
CD707
CD708
CD709
CD710
CD711
CD712
CD713
CD714
CD715
CD716
CD717
CD718
CD719
CD720
CD721
CD722
CD723
CD724
CD725
CD726
CD727
CD728
CD729
CD730
CD731
CD732
CD733
CD734
CD735
CD736
CD737
CD738
CD739
CD740
CD741
CD742
CD743
CD744
CD745
CD746
CD747
CD748
CD749
CD750
CD751
CD752
CD753
CD754
CD755
CD756
CD757
CD758
CD759
CD760
CD761
CD762
CD763
CD764
CD765
CD766
CD767
CD768
CD769
CD770
CD771
CD772
CD773
CD774
CD775
CD776
CD777
CD778
CD779
CD780
CD781
CD782
CD783
CD784
CD785
CD786
CD787
CD788
CD789
CD790
CD791
CD792
CD793
CD794
CD795
CD796
CD797
CD798
CD799
CD800
CD801
CD802
CD803
CD804
CD805
CD806
CD807
CD808
CD809
CD810
CD811
CD812
CD813
CD814
CD815
CD816
CD817
CD818
CD819
CD820
CD821
CD822
CD823
CD824
CD825
CD826
CD827
CD828
CD829
CD830
CD831
CD832
CD833
CD834
CD835
CD836
CD837
CD838
CD839
CD840
CD841
CD842
CD843
CD844
CD845
CD846
CD847
CD848
CD849
CD850
CD851
CD852
CD853
CD854
CD855
CD856
CD857
CD858
CD859
CD860
CD861
CD862
CD863
CD864
CD865
CD866
CD867
CD868
CD869
CD870
CD871
CD872
CD873
CD874
CD875
CD876
CD877
CD878
CD879
CD880
CD881
CD882
CD883
CD884
CD885
CD886
CD887
CD888
CD889
CD890
CD891
CD892
CD893
CD894
CD895
CD896
CD897
CD898
CD899
CD900
CD901
CD902
CD903
CD904
CD905
CD906
CD907
CD908
CD909
CD910
CD911
CD912
CD913
CD914
CD915
CD916
CD917
CD918
CD919
CD920
CD921
CD922
CD923
CD924
CD925
CD926
CD927
CD928
CD929
CD930
CD931
CD932
CD933
CD934
CD935
CD936
CD937
CD938
CD939
CD940
CD941
CD942
CD943
CD944
CD945
CD946
CD947
CD948
CD949
CD950
CD951
CD952
CD953
CD954
CD955
CD956
CD957
CD958
CD959
CD960
CD961
CD962
CD963
CD964
CD965
CD966
CD967
CD968
CD969
CD970
CD971
CD972
CD973
CD974
CD975
CD976
CD977
CD978
CD979
CD980
CD981
CD982
CD983
CD984
CD985
CD986
CD987
CD988
CD989
CD990
CD991
CD992
CD993
CD994
CD995
CD996
CD997
CD998
CD999
CD1000

圖 2-97

XSS波長區間(1~65Å)
強度
太陽活動平靜期
太陽活動爆發期
太陽活動平靜期
太陽活動爆發期
X射線
電離層
D層
E層
F1層
F2層
電波
無線電波
地面
第二實施例(GPS)
高空GPS衛星

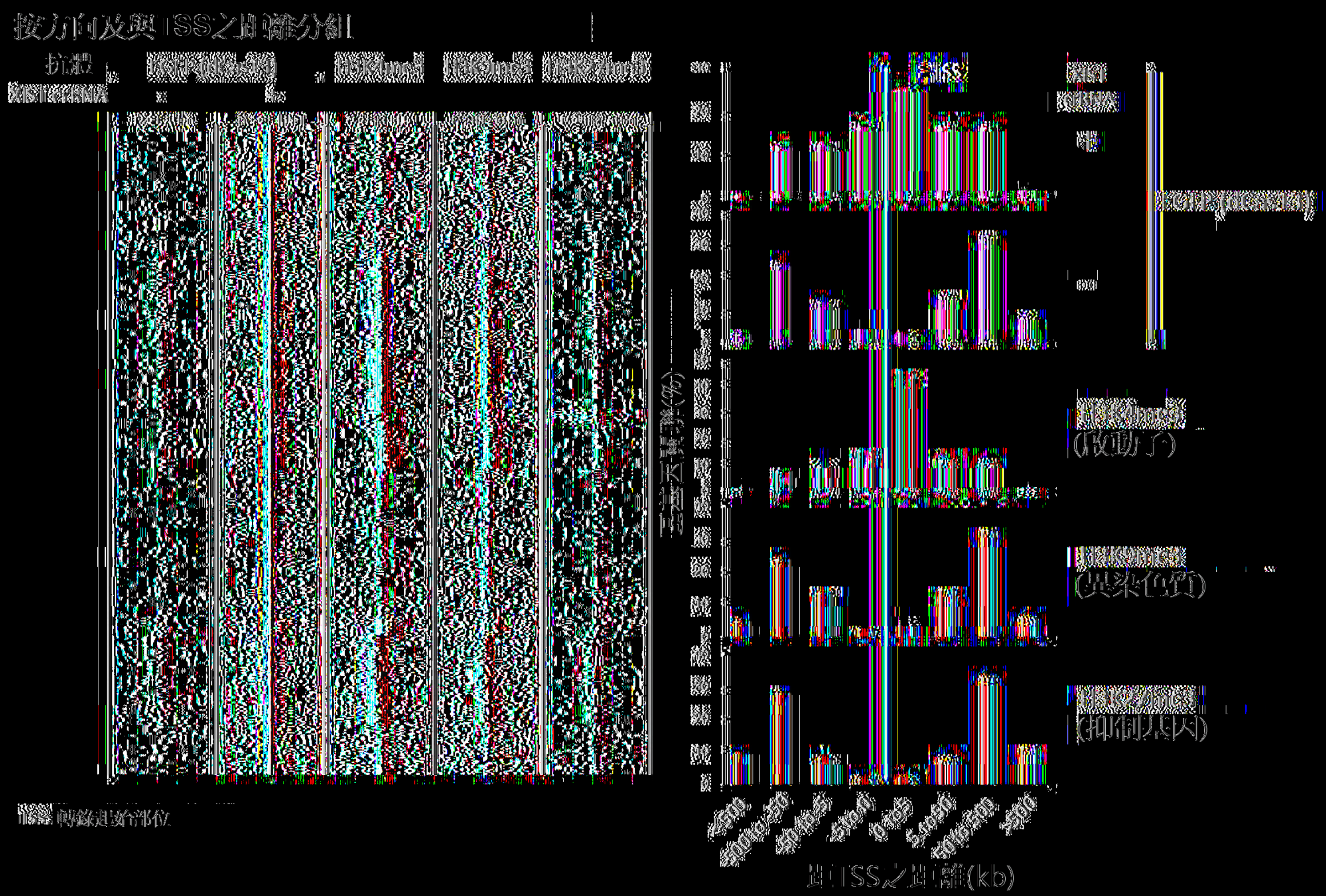
第20A圖

多核苷酸分子之Cas13蛋白質表現載體

圖 2(203)

【図2】

於ChIP-seq分析中之應用



（圖22A）

圖（223）

crRNA設計及靶向Cas13標的RNA
單股結構





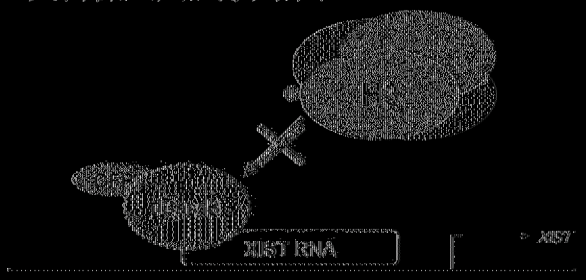
關於XIST結構預測，參見參考文獻
參考文獻

圖23

ChIP所使用之抗體

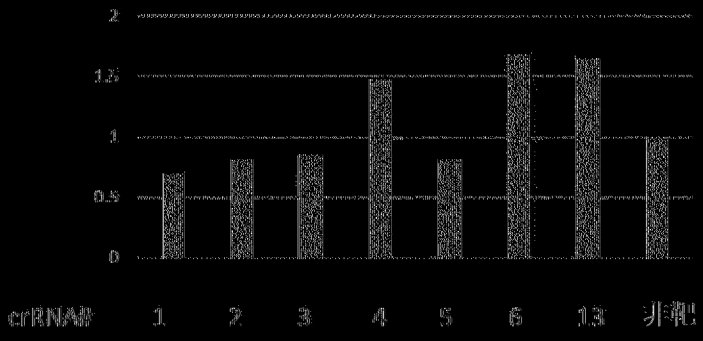
○抗H3

由於dCas13干擾，H3無法使用XIST與目標基因組序列結合



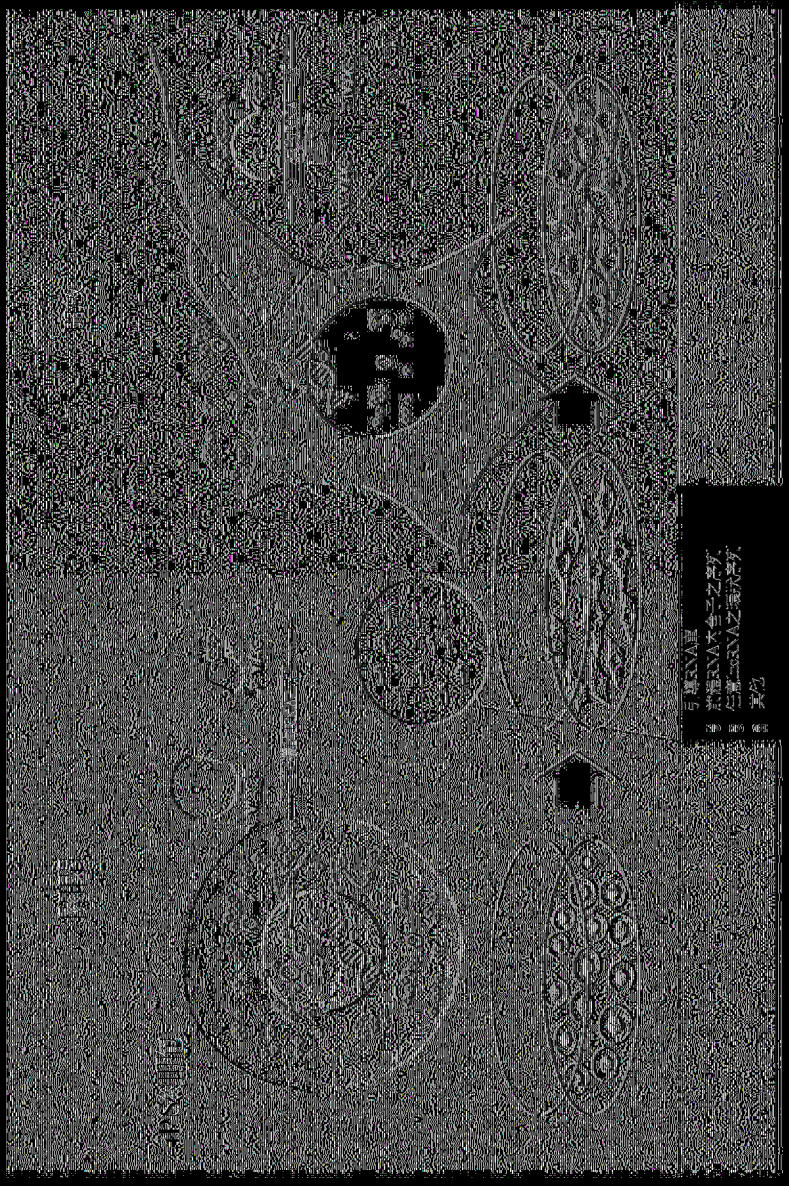
於crRNA1、2、3及5與dCas13一起使用時，H3可抑制XIST介導之與基因組特異性序列之結合。

XIST啟動子區之gDNA檢測

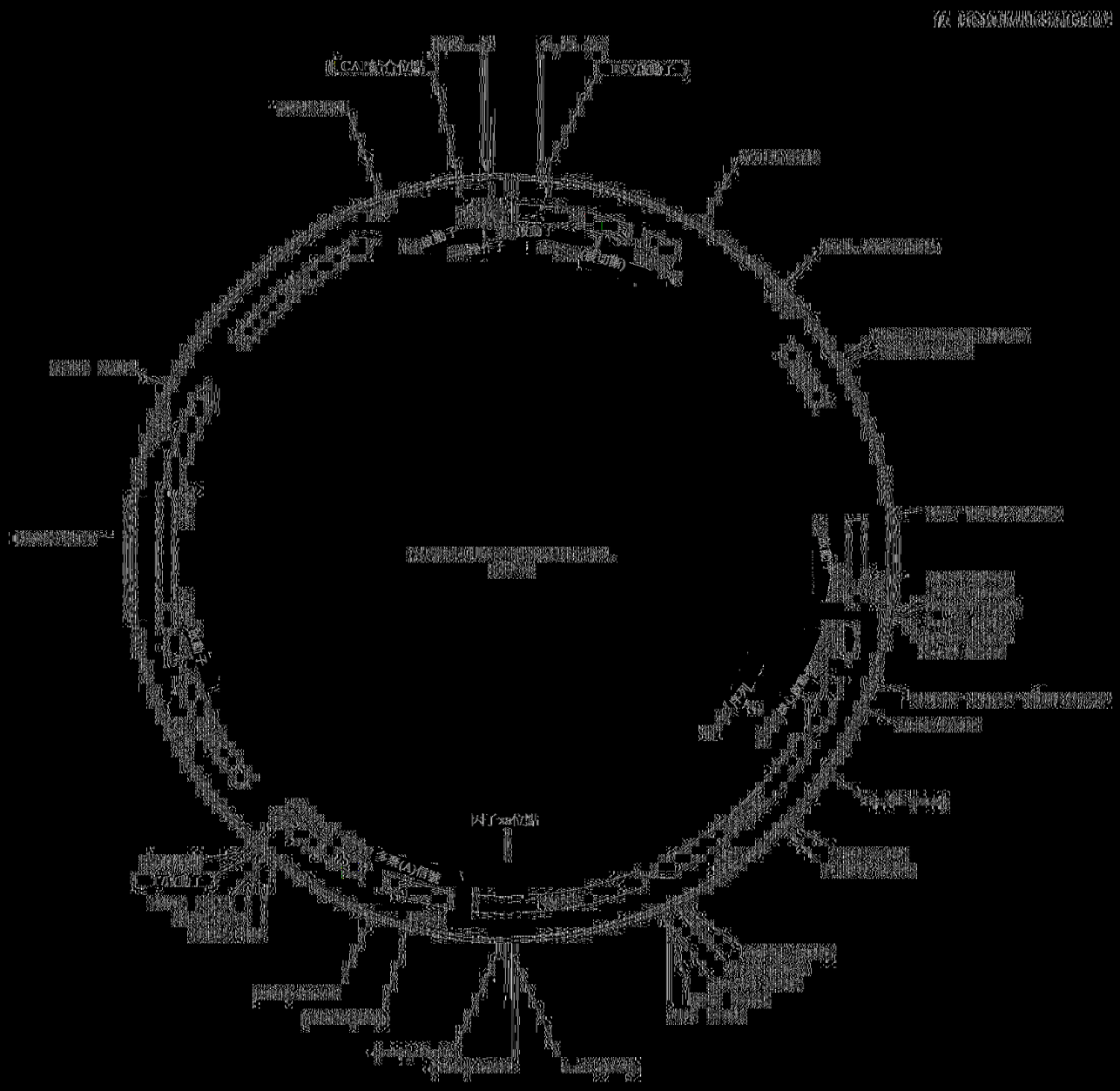


另一方面，於使用crRNA4、6及13時，H3可與基因組結合。藉由同時使用crRNA庫，表觀組被變得可能且可理解XIST序列上之功能位點。

|(圖24)|



【26】



|(圖27A)|

>pl K03.U6.crRNA.tRFP.v1　(1/17 .. 2026)　(310 bp)
GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAG
AATTAATTTGAC
TGTAAACACAAAGATATTAGTACAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAG
TTTTAAAATTAT
GTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC
TTGTGGAAAGGA
CGAAACACCGATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACGGAGACGTGACCGTCTCCTTTTT
TT

|(圖27B)|

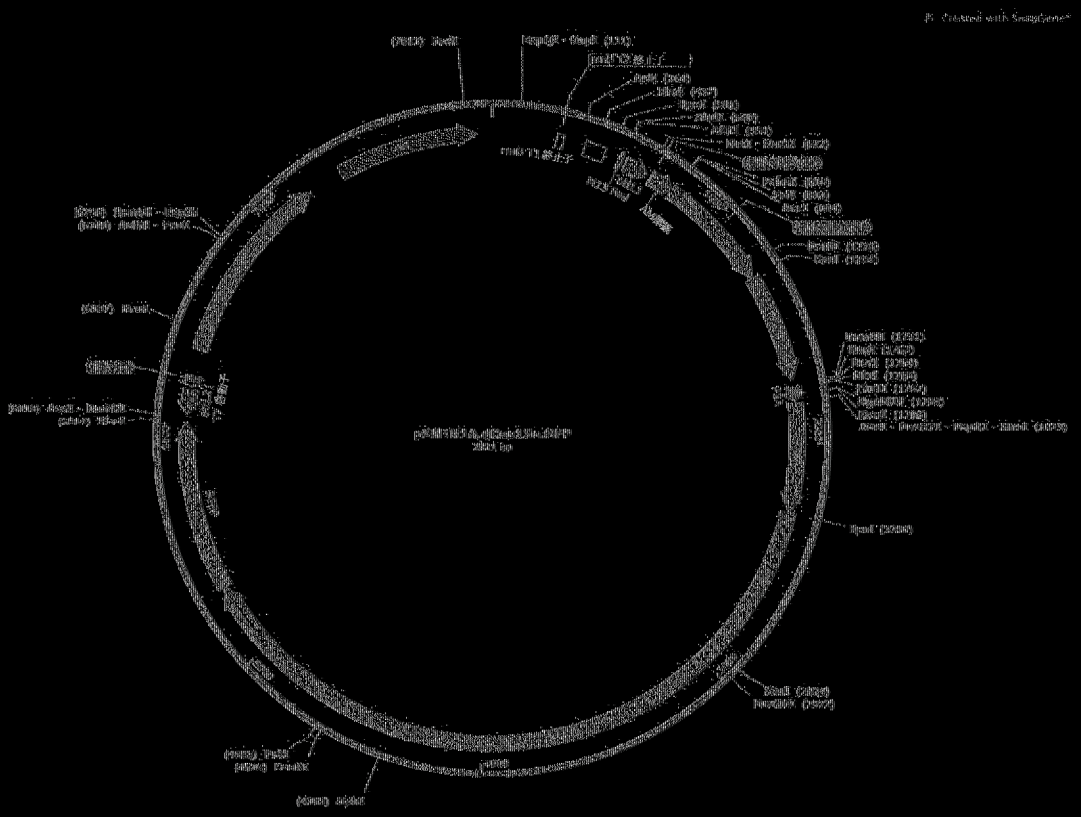


圖28A

>pUMIR AM-PA-Lun-GFP (686 ... 5013) (5229 bp)
ACCATGAAAGTGACCAAGTCGACGGCATCAGCCACAAGAAGTACATCGAAGAGGGCAAGCTCGTGAA
GTCCACCAGGA
GAAAACCGGACCAGCGAGAGACTGAGCGAGCTGCTGAGCATCGGGCTGGACATCTACATCAAGAACC
CCGACAACGCT
CCGAGGAAGAGAACCGGATCAGAAGAAGAAACCTGAAGAAGTTCTTAGCAACAAGGTGCTGCACCTG
AAGGACACCGTG
CTGTATCTGAAGAACCGGAAAGAAAAGAACGCCGTGCAGGACAAGAACTATAGCGAAGAGGACATCAG
CGAGTACGACCT
GAAAACAAAAACAGCTTCCCGTGCTGAAAAAATCCTGCTGAACGAAGACGTGAACTCTGAAGAAC
TGGAAATCTTTC
AAAAGAGCGTGGAAGCCAACCTGAACAAGATCAACAGCCTGAAGTACAGCTTCGAAGAGAACAAGGCC
AACTACCAGAAG
ATCAACGAGAACACACGGTACCATACTCTTATCCCCCGGTGATATGACATTATGGATATCTGA
CCAGATCGGAA
CGGCCAAACCCCAGGTGAACTGGCCCCCGTGGATACATCCTGCCCCTTGATCTTTGTGACCTGA
AACAGAAAGATA
CCCCGATAGTTACGCGAGTGAAGCCTTCCTCTACATGACAGGTTACAGCAACGCAGAGGTGCTGGC
CGGAATCCCG
TTTCTGCAAACCCCTGACCGCCATGTGAAGCCCAAGAGCACCCGGAAGTACGTGATAGTAACACAT
CATACTATGG
CAAGGCAATGACAGGAATCCCGAGTCAGGTGAAGTAGTCATTTAAAAAGAATGGACAGCGAT
TGTTATTCC
TGACTATGATACCGTTAGGACGAAACAGCGAGTATCGATACTCTATGGATTCAGTCGAAACA
GAAGCGGAAGC
GGTGCGGATCCGCCAGCGCCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAA
CCCCGGCCCCCT
CGAGGCGGACATACTCTTATGCCCCGGTGGATATGACATTATGGATATCTGAGCAGATCAGCA
ACCGCCAAACC
CCAGGTGGAACTGGCCCCCGTGGATACATCCTGCCCCTTGATCTTTGTGACCTGAAACAGAAAGAC
ACCCCGATAGTT
TACCGAGTGAAGCCTTCCTCTACATGACAGGTTACAGCAACGCAGAGGTGCTGGCCCGGAATCCCG
GTTTCTGCAAAG
CCCTGACCGCCATGTGAAGCCCAAGAGCACCCGGAAGTACGTGATAGTAACACATCATACTATGC
CAAGGCAATCG
ACAGGATCCCGAGTCAGGTGAAGTAGTCATTTAAAAAGAATGGACAGCGATTTGTTATTTC
CTGACTATGATA
CCTGTTAGGACGAAACAGCGAGTATCGATACTCTATGGATTCAGTCGAAACAGAAGTACCGT
GAAAAAGTGG
CGCCAAAACAAGCGAACATCATTATGATTATTACGAGAAGCGCCAAGCGAAGCATACATCA
ACAACGTCAGG
AAGCTTTGACAAGCTGTATAAGAAAGAGATATCGAGAAACTGTTTTTCCTGATGAGAACAGCAAG
AAGCACGAGAAG
TACAAGATCCGCGAGTACTATCACAAGATCATCGGCCGAAGAACGACAAAAGAGACTTCGCCAAGAT
TATCTACGAAG
GATCGAGAACGTAACACAACATCAAAGAGCTGATTGAGAAGATCGCCGGACATGTCTGAGCTGAAGAAAA
GCCAGGTGTCT
ACAAGTACTACCTGGACAAAGAGGAACTGAACGACAAGAATTATAAGTACGCCTTCTGCCACTTCGTG
GAAATCGATG
TCCGAGCTGCTGAAAAACTACGTGTACAAGCGGCTGACCAACATCAGCAACGATAAGATCAAGCGGAT
CTTCGGTATCA
GAATCTGAAAAAACTGATCGAAAACAAACTGCTAACAAACTGGATACTATCTGCGGAATTGCGGCA
AGTACACTACT
ATCTGCAAGTGGCCGAGATCGCCACCTCCGACTTTATCGCCCGGAACCGGCAGAACGAGGCCTTCCTG

|(圖28B)|

AGAAACATCATC
GGCGTGTCCAGCGTGGCCTACTTCAGCCTGAGGAACATCCTGGAAACCGAGAACGAGAACGGTATCAC
CGCCGGATGG
GGCCAGAACCGTGAGAACGACAAGGCGAAGAGAATACGTGTCGGCGAGGTGGACAAGATCTACA
ATGAGAACAAGC
AGAACGAAGTGAAAGAAATCTGAAGATGTTCTACAGCTACGACTTCAACATGGACAACAAGAACGAG
ATCGAGGACTTC
TTCGCCAATATCGATGAGGCATCTCTAGTATTGCTCAGCGCATCGTGCATTTCAACCTGAACTGGA
AGGCAAGGACAT
CTTCGCCTTCAAGATATCGCCCCAGGGAGATCTCCAAGAAGATGTTTCAAAAGGAAATCAACGAAA
AGAAGCTGAAC
TGAAAATCTTCAAGCAGCTGAACAGCGCCAACGTGTTCAACTACTACGAGAAGGATGTGATCATCAAG
TACCTGAAGAAT
ACCAAGTTCAACTTCGTGAACAAAAACATCCCCTTCGTGCCCAGCTTCACCAAGTCTATCACCAAGAT
TGAGGACTTCG
GATACCCTGAAGTTTTTTGAAGGCGTGCCAAGGACAAGAAGAAGAAGACCCCCAGATCTACCTGC
TGAAGAATATCT
ACTACGGCGAGTCCTGAACAAGTCGTGAAAACTCCAAGGTGTTCTTAAGATCACCATGAAGTG
ATCAAGATTAAC
AAGCACGGAACCAGAAAACCGGCCACTACAAGTATCAGAAGTTCGAGAACATCGAGAAAACCGTGCC
CGTGGATACCT
GGCCATCATCCAGAGCGAGAGAATGATCAACAACCAGGACAAGAAGAAAAAGATACCTACATCGACT
TTATTCAGCAG
TTTTCCTGAAGGCTTCATCGACTACCTGAACAAGAACATCTGAAGTATATCGAGAGCAACAACAAC
ATTAACAACAAC
GACATCTTCCTCCAAATCAAGATCAAAAAGGATAACAAAAGAAGTACAACAAGATCCTGAAGAACTA
TGAGAAGCACA
TCGGAACAAAGAAATCCCTCACGAATCAATGAGTTCGTGCCCGATCAACCTCGGGAAGATTCTGA
AGTACCCGAGA
ATCTGAACATGTTTACCTGATCCTGAACCTCTGAACCACAAAGACCTGACCACCTGAGGGCAGC
CTGGAAAGTAC
GAGTCGGCAACAAAGAAGAAACCTCAGCGACGAGTTGGAACTGATCAACCTGCTGAACCTGGACAA
CACAGAGTGAC
CGAGGACTTCGAACTGGAAGCCAACGAGATCGGCAAGTTCCTGGACTTCAACGAAAACAAAATCAAG
ACCGGAAGAGC
TGAAAAAGTTCGACACCAACAAGATCTATTCGACGGCGAGAACATCATCAAGCACGGGGCTTCTAC
AATATCAAGAAA
TACGGCATGCTGAATCTGCTGAACAAGATCGCCAAGGTATAAGATCAGCCTGAAAGAACT
GAAGAGTACAG
CAACAAGAAGATCAGATTGAAAAGAACTACACCATCGACAGAAGCTCCATCGGAAGTACGCCAGAC
CCAAGAAGAAG
AAAAGTTCAACGACGAGGACTACAAAGAGATAGAGAAGGCCATCGGCAACATCCAGAAGTACACCCAC
CTGAAGAACAG
CTGGATTCAATGAGCTGAACCTGCTGAGGGCCTGCTGCTGAAGATCCTGCACCGGCTCGTGGGCTA
CACCAGCATCTG
GGAGCGGACCTAAGATTCGGCTAAGGGGAATTTCCGGAAACCACTACATCGAGGAAATTTCA
ATTTCGACAACT
CAAGAATGTGAAGTACAAAAGCGGCCAGATCGTGAAAAGTATATCAACTTCTACAAAGAACTGTAC
AAGGACAATTG
GAAAGCGGAGCATCTACTCCAACAAGAAAGTGACGAAACTGAAGCAGGAGAAGAAAGACCTGTATT
TCGAAACTAGAT
CCCTCACTTTAATATATTCCTCATGCCGAAATTAGCCTCCTGAAGTCCTGAAAAACCTCCGAAAC
TCCTGTCCTAG
ACCGAAGCTGAAGAAGCCATCATGAATTCATCGTCGACATTCTGAAGAATACGGCTTCGTGGCC



ACCTTCAAGATC
GGCGCTGACAAGAAGATCGAAATCCAGACCCTGGAATCAGAGAAGATCGTGCACCTGAAGAATCTGAA
GAAAAAGAAACT
GATGACCGACCGGAACAGCGAGGAACTGTGCGAACTCGTGAAAGTCATGTTCGAGTACAAGGCCCTGG
AAGGAGGAGGTG
GAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGTAGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTG
GTGCCCATCCTG
GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCAC
CTACGGCAAGCT
GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGA
CCTACGGCGTGC
AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC
TACGTCCAGGAG
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACAC
CCTGGTGAACCG
CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACT
ACAACAGCCACA
ACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC
GAGGACGGCAGC
GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAA
CCACTACCTGAG
CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGA
TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACtaa

|(圖28D)|



【圖29A】

>pGL3-SASH3-CoV-2.Orf1b-放動了戒懲(40..2200) (2223 bp)
TGCATCTGATTAATCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCC
AGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCT
ATTCCAGAAGTA
GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTtctccgggtaacnaaccaaccaac
tttcgatctctt
gtatgatctgtttctctaaacgaactttaaaatctgtgtggctgtcactcggctgcatgcttagtgcact
cacgcagtataa
ttaataactaatttacrigtcgttgcacggcagcacgatgcacctgtatcatctcrtgcaggcgctctacggt
ttcgtccgtgtt
gcagccgatcatcagcacatctaggtttcgtccgggtgtgaccgaaaggtaag[CCATCATGGAAGACG
CCAAAAACATAA
AGAAGGCCCGCACCGATCTCATCCCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATG
AAGAGATACGCC
CTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTT
CGAAATGTCCGT
TGGTTGGCAAAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAA
ACTCTCTCAT
TCTTTATGCCGGTTTGGCGCGTTATTATCGAGTTCAGTTCCCCCGCGAACGACATTTATAT
GAACTGAATTG
CTCAACAGTATGGGATTCGCAGCCTACCGTGGTGTCGTTCCAAAAAGGGTTGCAAAAATTTT
GAACTGCAAAA
AAAGCTCCCACTACCAAAAATTATTATCATGGATTCTAAACGGATTACCAGGGATTTCAGTCGA
TGTACACGTTG
TCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTCGATAGGACAAG
ATAATTGCACTG
ATCATGAACTCCTTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGTGTGCCTCTGCTCATAGAACTGCCTGCGT
GAGATTCTCGCA
TGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTAAGTGTTGTTCCATTCC
ATCACGGTTTTG
GAATGTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTGAGTGGTCTTATGTATAGATTTGAAGAA
GAGCTGTTTCTG
AGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTGCCAA
AAGCACTCTGAT
TGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTTGTGCGCTCTCCCTCTTCTAAGAAGTCG
GCGAACGCGTTG
CCAAGTTGTTCATCTGCCAAGTATCAGCCAAGAATATGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTG
ATTACACCCAG
GGGATGATAAACCGGCCCGGTCGGTAAGTTGTTCATTTTTGAAGCGAAGTTGTGGATCTGGA
TACGGGAAAAC
GCTGGCGTTAATCAAAGAGCGAACTGTGTGTAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACA
ATCCGGAAGCGA
CCAACGCCTGATTGACAAGGATGATGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGACGAAGACGAA
CACTTCTTCATC
GTTGACCGCTGAAGTCTCTAATTAAGTCAAAGCTATCAGGTGGCTCCGCGTGATTGNATCCAT
GTTGCTCAAGA
CCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACTTCCCGCCCCG
TTGTTGTTTGG
AGCACGGAAAAGCGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAA
AAGTTGCGCGA
AGAGTTGTCGTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAAA
GATCTCATAA
GGCCAAGAAGGCGAAAGATCGCCGTGTAATTCTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTCGAGCAGACA

|(圖29B)|

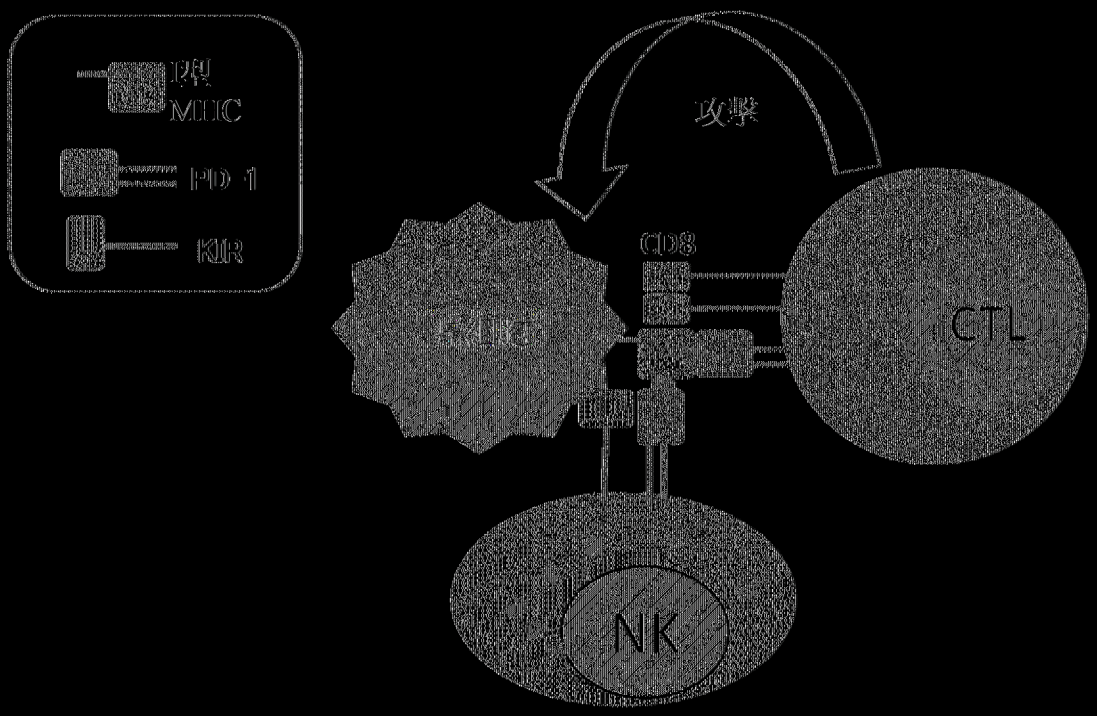
TGATAAGATACA
TTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGAT
GCTATTGCTTTA
TTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTT

|(圖29C)|

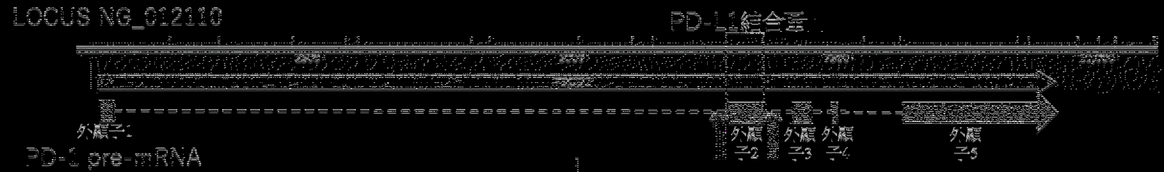
MISSION® esiRNA（Sigma）
靶向人類 HMGCS2
CCCGAAAGTGTGTGTCTCCTGAGGAGTTCACAGAAATAATGAACCAAAGAGAGCA
ATTCTACCATAAGGTGAATTTCTCCCCACCTGGTGACACAAACAGCCTTTTCCCAG
GTACTTGGTACCTGGAGCGAGTGGACGAGCAGCATCGCCCGAAAGTATGCCCGGC
GTCCCGTCTAAAGGTGTTCTGCAGATCCATGGAAAGCTTCCTGGGAAACGTATGC
TAGCAGAGCTTCTCCCCGTGAATCATATTTTAAGATCCCACTCTTAGCTGGTAAA
TGAATTTGAATCGACATAGTAGCCCCATAAGCATCAGCCCTGTAGAGTGAGGAGC
CATCTCTAGCCGGCCCTTCATTCCTCTCCATGCTGCAATCACTGTCCTCGCCTTA
TGGTGCTATGGACTAGGGGTCCTTTGTG

MISSION® esiRNA （Sigma）
靶向人類 ACAA2
GCAGTCACAGCAGAGATGGAAAGCTGCTAATGATGCTGGCTACTTTAATGATGAA
ATGGCACCAATTGAAGTGAAGACAAAGAAAGGAAAACAGACAATGCAGGTAGACG
AGCATGCTCGGCCCCAAACCACCCTGGAACAGTTACAGAAACTTCCTCCAGTATT
CAACAAAGATGGAACTGTTACTGCAGGGAATGCATCGGGTGTAGCTGATGGTGCT
GGAGCTGTTATCATAGCTAGTGAAGATGCTGTTAACAAACATAACTTCACACCACT
GGCAAGAATTGTGGGCTACTTTGTATCTGGATGTGATCCGTCTATCATGGGTATT
GGTCCTGTCCCTGCTATCAGTGGGGCACTGAAGAAAGCAGGACTGAGTCTTAAGG
ACATGGATTTGGTAGAGGTGAATGAAGCTTTTGCTCCCCAGTACTTGGCTGTTGA
GAGGAGTTTGGATCTTGACATAAGTAAAACCAATGTGAATGGAGGAGC

|（圖30）|



|（圖31）|



靶向外顯子1區之引導RNA

PD-1引導1	5'-GGGACCGGGGGTTCCGCGTCTAGTTTCT-3'
PD-1引導2	5'-GGGACCGGGGGTTCCGCGTCTAGTTTCT-3'
PD-1引導3	5'-GGACAGAGCCCTGGACTGGAGCTGGGGG-3'
PD-1引導4	5'-GAGACAGGAGATCGAGACCTTCGTGGGG-3'
PD-1引導5	5'-TGTGAGGGGACACGGTCTCGTCACGTCT-3'
PD-1引導6	5'-CCACGAGCAGGGCTGGGGAGAAGGTGGG -3'
PD-1引導7	5'-CCCCGGTGGGTCGGGGAAGGAGTGGAGA-3'
PD-1引導8	5'-TGTGTTGGAGAAGCTGCAGGTGAAGGTG-3'
PD-1引導9	5'-GTCCCACTGTCCACGCCGGAGCCTCCGG-3'

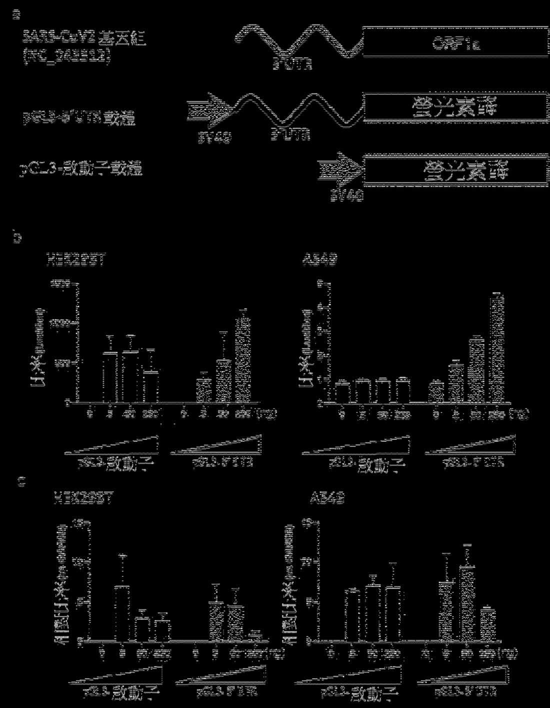
靶向外顯子2區之引導RNA

PD-1引導10	5'-GTGCATCTTCCTTCTCCGAGACGTCACC-3'
PD-1引導11	5'-CGTCTTCGACGTCGGAGTGCATCTTCCT-3'
PD-1引導12	5'-CGGGCTCCCTACACTCGTCCACCGGCCC-3'
PD-1引導13	5'-CCGGCCCCCTCCGAAACACCCCGGTGGGT-3'
PD-1引導14	5'-AGGAGTGGAGAGAGGTAGAGAGTCTGAG-3'
PD-1引導15	5'-CGCCCGTCTCGAGTCCCACTGTCCACGC-3'
PD-1引導16	5'-GCCTCCGGGGCCCCGTCCCCACTCGACT-3'
PD-1引導17	5'-CTCGGCCAGGACCCCACCCACAGGGGAG-3'
PD-1引導18	5'-CAGGGGAGGACGTGTCCTAGTCCTCGAG-3'

【圖32】

一、代表示意圖係供參照，非依比例繪製
mRNA疫苗
脂質奈米粒子
注射
肌肉細胞
細胞質
mRNA疫苗
CD8+ T細胞
CD4+ T細胞
B細胞
漿細胞
抗體
病毒
病毒蛋白質
細胞核
mRNA
核糖體
內質網
高爾基體
囊泡
細胞膜
細胞外
細胞內

圖3



螢光素酶活性

利用源自SARS-CoV-2之5'UTR序列之轉譯效率之up進

螢光素酶mRNA表現

未觀察到利用源自SARS-CoV-2之5'UTR序列之轉錄效率之變化

【圖34】

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，針對前述 CRISPR-dCas/Cas 衍生物，係於具有螺旋區、可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物，且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas (dead Cas))蛋白質或具有核酸酶活性之 CRISPR-Cas 蛋白質中，包含前述螺旋區之包含 N 末端側之 N 區與包含 C 末端之 C 區、能夠應答刺激而結合之第 1 因子與第 2 因子，且 N 區與第 1 因子、C 區與第 2 因子分別連結，第 1 因子與第 2 因子藉由包含蛋白酶識別序列之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子藉由包含自切肽之連接子而結合，或第 1 因子與第 2 因子經非共價鍵結而成，使前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物具有(N 區)-(第 1 因子)-(包含蛋白酶識別序列之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(包含自切肽之連接子)-(第 2 因子)-(C 區)、或(N 區)-(第 1 因子)-(非共價鍵結)-(第 2 因子)-(C 區)之結構；針對前述 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，具有(N 區)-(第 1 因子)與(第 2 因子)-(C 區)之 2 個部分。

【請求項2】 如請求項 1 之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述 N 區包含螺旋區之 N 末端側之一部分胺基酸序列，前述 C 區包含螺旋區之 C 末端側之一部分胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項 1 之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述N區包含源自韋德纖毛菌(Leptotrichia wadei)之Cas13a(序列ID：WP_021746774.1)之螺旋區之N末端側之一部分胺基酸序列中的164個胺基酸，前述C區包含螺旋區之C末端側之一部分胺基酸序列中的1,003個胺基酸。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、

或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中前述第 1 因子包含 nMAG 或 pMAG，前述第 2 因子包含 pMAG 或 nMAG。

【請求項5】 一種聚核苷酸或其互補鏈，編碼如請求項 1 至 4 中任一項之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物集。

【請求項6】 一種或二種載體，係包含如請求項 5 之 1 種或 2 種聚核苷酸或其互補鏈。

【請求項7】 如請求項 6 之載體，其中前述載體為腺病毒載體、腺相關病毒載體或質體載體。

【請求項8】 如請求項 7 之載體，其中前述載體為 2 種載體，其中一載體具有(N 區)-(第 1 因子)之結構，另一載體具有(第 2 因子)-(C 區)之結構。

【請求項9】 如請求項 6 至 8 中任一項之載體，其中前述載體進一步包含編碼與標的 RNA 相對應之引導 RNA 之聚核苷酸。

【請求項10】一種轉形體，係藉由如請求項 6 至 9 中任一項之載體轉形而成。

【請求項11】如請求項 1 至 4 中任一項之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集、如請求項 5 之聚核苷酸或其互補鏈、如請求項 6 至 9 中任一項之載體或如請求項 10 之轉形體，其中前述標的 RNA 為與生物體功能及疾病相關之一組 lncRNA(長鏈非編碼 RNA(long noncoding RNA))及/或 ncRNA(非編碼 RNA(noncoding RNA))。

【請求項12】如請求項 10 或 11 之轉形體，其中前述轉形體為轉形哺乳動物細胞或轉形非人類哺乳動物。

【請求項13】如請求項 1 至 4 中任一項之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集、如請求項 5 之聚核苷酸或其互補鏈、如請求項 6 至 9 中任一項之載體或如請求項 10 至 12 中任一項之轉形體，

其中前述標的 RNA 為源自 RNA 病毒之 RNA、新型冠狀病毒之 RNA、源自合成基因之 RNA、lncRNA、引導 RNA 能夠靶向之 30nt 以上之 ncRNA 或前體 RNA。

【請求項14】一種標的 RNA 純化用擔載體，係將可與引導 RNA 及標的 RNA 形成複合物且不具有核酸酶活性之 CRISPR-dCas(死 Cas)蛋白質擔載於固相擔載體而成。

【請求項15】一種標的 RNA 之純化方法，包括如下步驟：使引導 RNA 與標的 RNA 作用於如請求項 14 之擔載體而於前述擔載體上形成包含前述標的 RNA、前述引導 RNA 及前述 CRISPR-dCas 蛋白質之複合物之步驟；及使選自於由標的 RNA 及基因組 DNA、蛋白質、標的以外之 RNA 所構成群組中之標的 RNA 結合因子自前述複合物中溶出之步驟。

【請求項16】一種細胞內環境之解析方法，包括如下步驟：將多個引導 RNA 導入如請求項 10 之轉形體中或於其中表現之步驟；使前述轉形體溶解並使 RNA 捕獲粒子捕獲標的 RNA 之步驟；及對前述 RNA 捕獲粒子所結合之標的 RNA 進行解析之步驟。

【請求項17】如請求項 16 之解析方法，其中前述轉形體為 iPS 細胞。

【請求項18】如請求項 16 或 17 之解析方法，其包括如下步驟：將藉由標的 RNA、引導 RNA 及經光活化之 dCas 蛋白質之複合物形成所產生之細胞的表現系回收之步驟。

【請求項19】一種新型冠狀病毒之預防或治療劑，以脂質代謝控制物質作為有效成分。

【請求項20】如請求項 19 之新型冠狀病毒之預防或治療劑，其中脂質代謝控制物質具有 HMG-CoA 還原酶抑制作用或乙醯 CoA 還原酶抑制作用。

【請求項21】如請求項 19 或 20 之新型冠狀病毒之預防或治療劑，其中脂質代謝控制物質為阿托伐他汀或瑞舒伐他汀。

【請求項22】一種基於 mRNA、rRNA(核糖體 RNA)及 lncRNA 之剪接異常之疾病之治療劑，以如請求項 6 至 9 中任一項之載體作為有效成分。

【請求項23】如請求項 1 之 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質衍生物、或 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質及蛋白質衍生物集，其中 CRISPR-dCas/Cas 蛋白質為具有核酸酶活性之 Cas13 蛋白。