

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-534285

(P2017-534285A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 6
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 31/5517 (2006.01)	A 6 1 K 31/5517	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-523864 (P2017-523864)	(71) 出願人	596060697
(86) (22) 出願日	平成27年10月30日 (2015.10.30)		マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
(85) 翻訳文提出日	平成29年7月3日 (2017.7.3)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州 O 2 1 3 9 ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア ヴェニュー・7 7
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/058304	(74) 代理人	100102842
(87) 国際公開番号	W02016/070037		弁理士 葛和 清司
(87) 国際公開日	平成28年5月6日 (2016.5.6)	(72) 発明者	ルー, ティモシー, クアンター
(31) 優先権主張番号	62/073, 126		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 2 9、チャールズタウン、ハーバード プレイス 1
(32) 優先日	平成26年10月31日 (2014.10.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/166, 302		
(32) 優先日	平成27年5月26日 (2015.5.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C R I S P R についての超並列コンビナトリアル遺伝学

(57) 【要約】

本明細書に記載されるのは、C R I S P R ガイド配列および足場配列、および単一細胞またはプールされた集団内にコードされた遺伝要素の組合わせの迅速な同定のためのバーコードを含む遺伝要素の高次の組合わせの迅速な生成を可能にする、方法および組成物である。本明細書にさらに記載されるのは、エピジェネティック遺伝子の阻害剤の組成物および、細胞増殖を低減するためおよび／または癌を処置するための方法である。

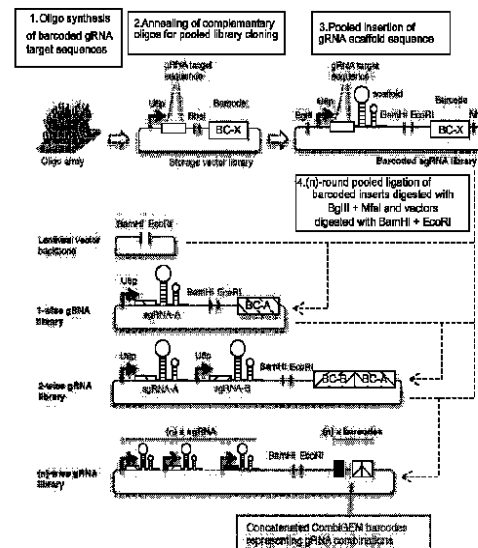


FIG. 15

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、遺伝子構築物：

第 1 DNA 要素であって、

CRISPR ガイド配列、および

足場配列

を含む、前記第 1 DNA 要素；

第 1 DNA 要素に隣接する第 1 適合末端要素および第 2 適合末端要素であって、ここで第 1 および第 2 適合末端要素は、互いにアニーリングすることができる、前記適合末端要素；

バーコード要素；

バーコード要素に隣接する第 3 適合末端要素および第 4 適合末端要素であって、ここで第 3 および第 4 適合末端要素は、互いにアニーリングすることができるが、しかし第 1 または第 2 適合末端要素にアニーリングすることはできない、前記適合末端要素；および第 4 適合末端要素と第 1 適合末端要素の間に位置する分離部位であって、ここで、前記 DNA 要素、第 1 適合末端要素、および第 2 適合末端要素は分離部位の一方の側にあり、バーコード要素、第 3 適合末端要素、および第 4 適合末端要素は分離部位の反対側にある、前記分離部位。

【請求項 2】

第 1 DNA 要素の上流にプロモーター要素をさらに含む、請求項 1 に記載の遺伝子構築物。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の遺伝子構築物を含む、ベクター。

【請求項 4】

以下を含む、遺伝子構築物：

複数の DNA 要素であって、ここで該複数の DNA 要素の各 DNA 要素は、CRISPR ガイド配列および足場配列を含む、前記複数の DNA 要素；

複数の DNA 要素に隣接する第 1 適合末端要素および第 2 適合末端要素であって、ここで第 1 および第 2 適合末端要素は、互いにアニーリングすることができる、前記適合末端要素；

複数のバーコード要素；

複数のバーコード要素に隣接する第 3 適合末端要素および第 4 適合末端要素であって、ここで第 3 および第 4 適合末端要素は、互いにアニーリングすることができるが、しかし第 1 または第 2 適合末端要素にアニーリングすることはできない、前記適合末端要素；および

複数の DNA 要素と複数のバーコード要素の間に位置する、分離部位。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の遺伝子構築物、および

CRISPR ガイド配列の各々の上流に位置するプロモーター配列、

を含む、ベクター。

【請求項 6】

コンビナトリアルベクターを生成するための、以下を含む方法：

(a) 以下を含む第 1 遺伝子構築物を含有するベクターを提供すること：

CRISPR ガイド配列；

CRISPR ガイド配列に隣接する第 2 適合末端要素および第 1 制限酵素のための第 1 認識部位；

バーコード要素；および

バーコード要素に隣接する第 3 適合末端要素および第 2 制限酵素のための第 2 認識部位；

(b) 第 1 遺伝子構築物を第 1 認識部位で切断して、第 5 適合末端要素を生じ、ベクター

10

20

30

40

50

を第2認識部位で切断して、第6適合末端要素を生じること；

(c) 以下を含む足場要素を提供すること；

足場配列；

第1適合末端要素および第4適合末端要素を含む、分離部位；および

足場要素に隣接する第7適合末端要素および第8適合末端要素、ここで第7適合末端要素は、第5適合末端要素にアニーリングすることができ、第8適合末端要素は、第6適合末端要素にアニーリングすることができる；

(d) 足場要素を、切断された第1遺伝子構築物にアニーリングすること、ここでアニーリングは、互いにアニーリングすることができる、ベクターおよび足場要素内の適合末端要素で起こり、アニーリング後、足場要素はCRISPRガイド配列とバーコード要素の間に組み込まれ、分離部位は、足場配列とバーコード要素の間に位置し、こうしてコンビナトリアルベクターが作製される。

【請求項7】

以下をさらに含む、請求項6に記載の方法；

(a) 請求項C1に記載のコンビナトリアルベクターを提供すること；

(b) ベクターを、足場要素内の分離部位で切断して、第1適合末端要素および第4適合末端要素を生じること；

(c) 以下を含む第2遺伝子構築物を提供すること；

CRISPRガイド配列；

足場配列；

バーコード要素；および

第2遺伝子構築物に隣接する第2適合末端要素および第3適合末端要素、ここで第2遺伝子構築物の第2適合末端要素は、ベクターの第1適合末端要素にアニーリングすることができ、第2遺伝子構築物の第3適合末端要素は、ベクターの第4適合末端要素にアニーリングすることができる；

(d) 第2遺伝子構築物を切断ベクターにアニーリングすること、ここでアニーリングは、互いにアニーリングすることができる、第2遺伝子構築物およびベクター内の適合末端要素で起こり、アニーリング後に、第2遺伝子構築物はベクター内に組み込まれて、こうして、連結されたバーコード要素および連結されたCRISPRガイドと足場配列を含むコンビナトリアルベクターが作製される。

【請求項8】

コンビナトリアルベクターが、CRISPRガイド配列の上流にプロモーター要素をさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

方法が反復的である、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】

第1認識部位と第2認識部位が、同一の認識部位配列を有し、第1制限酵素と第2制限酵素が、同一の制限酵素である、請求項6～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

以下を含む、遺伝子構築物；

少なくとも2つのCRISPRガイド配列；

バーコード要素；および

各CRISPRガイド配列の間、およびバーコード要素と該バーコード要素に最も近いCRISPRガイド配列との間に位置する、制限認識部位。

【請求項12】

以下を含む、遺伝子構築物；

複数のDNA要素であって、各々が

CRISPRガイド配列；および

足場配列；

を含む、前記複数のDNA要素；

10

20

30

40

50

バーコード要素；および

前記複数のDNA要素の各DNA要素の上流に位置するプロモーター配列。

【請求項13】

バーコード要素が、遺伝子構築物の5'末端に位置する、請求項11または12に記載の遺伝子構築物。

【請求項14】

バーコード要素が、遺伝子構築物の3'末端に位置する、請求項11または12に記載の遺伝子構築物。

【請求項15】

請求項11～14のいずれか一項に記載の遺伝子構築物のいずれかを含む、ベクター。

10

【請求項16】

コンビナトリアルベクターを生成するための、以下を含む方法：

(a) 以下を含むベクターを提供すること：

複数のCRISPRガイド配列；

バーコード要素、ここでバーコード要素は、複数のCRISPRガイド配列の下流に位置する；

任意に、複数のCRISPRガイド配列の少なくとも1つの上流に位置する、プロモーター配列；および

複数の制限酵素のための複数の認識部位、ここで複数の認識部位の各々は、複数のCRISPRガイド配列の1つの下流に位置する；

20

(b) ベクターを、複数の認識部位の少なくとも1つにおいて、複数の制限酵素の少なくとも1つで切断して、第1適合末端要素および第2適合末端要素を生じること；

(c) 以下を含む第1足場要素を提供すること：

足場配列、

任意にプロモーター配列、および

第1足場要素に隣接する第3適合末端要素および第4適合末端要素、ここで第3適合末端要素は、切断されたベクターの第1適合末端要素にアニーリングすることができ、第4適合末端要素は、切断されたベクターの第2適合末端要素にアニーリングすることができる；

(d) 第1足場要素を、切断されたベクターにアニーリングすること、ここでアニーリングは、第1足場要素および切断されたベクター内の適合末端要素で起こり、アニーリング後、第1足場要素は、複数のCRISPRガイド配列の1つの下流に組み込まれ、こうしてコンビナトリアルベクターが生成される。

30

【請求項17】

方法が反復的である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

コンビナトリアルベクターを生成するための、以下を含む方法：

(a) 以下を含むベクターを提供すること：

複数のCRISPRガイド配列、

バーコード要素、ここでバーコード要素は、複数のCRISPRガイド配列の上流に位置する、

40

任意に、複数のCRISPRガイド配列の少なくとも1つの上流に位置する、プロモーター配列、および

複数の制限酵素のための複数の認識部位、ここで複数の認識部位の各々は、複数のCRISPRガイド配列の1つの上流に位置する；

(b) ベクターを、複数の認識部位の少なくとも1つにおいて、複数の制限酵素の少なくとも1つで切断して、第1適合末端要素および第2適合末端要素を生じること；

(c) 以下を含む第1足場要素を提供すること：

任意に足場配列、

プロモーター配列、および

50

第1足場要素に隣接する第3適合末端要素および第4適合末端要素、ここで第3適合末端要素は、切断されたベクターの第1適合末端要素にアニーリングすることができ、第4適合末端要素は、切断されたベクターの第2適合末端要素にアニーリングすることができる；

(d) 第1足場要素を、切断されたベクターにアニーリングすること、ここでアニーリングは、第1足場要素および切断されたベクター内の適合末端要素で起こり、アニーリング後、第1足場要素は、複数のCRISPRガイド配列の1つの上流に組み込まれ、こうしてコンビナトリアルベクターが生成される。

【請求項19】

方法が反復的である、請求項18に記載の方法。

10

【請求項20】

表2に記載のエピジェネティック遺伝子の組合わせから選択される2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とする2または3以上の阻害剤を含む、組成物。

【請求項21】

2または3以上の阻害剤の各々が、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止するか、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

阻害剤の各々が、CRISPRガイド配列および足場配列；shRNA；および小分子からなる群から選択される、請求項20または21に記載の組成物。

20

【請求項23】

阻害剤の少なくとも1つが、CRISPRガイド配列および足場配列であり；組成物がさらに、Cas9エンドヌクレアーゼを含むかまたはコードする、請求項22に記載の組成物。

【請求項24】

CRISPRガイド配列またはshRNAが、組換え発現ベクターから発現される、請求項22または23に記載の組成物。

【請求項25】

エピジェネティック遺伝子の組合わせが、BRD4とKDM4CまたはBRD4とKDM6Bを含む、請求項20～24のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項26】

BRD4の阻害剤が、JQ1（（6S）-4-（4-クロロフェニル）-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-酢酸1,1-ジメチルエチルエステル）である、請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

KDM4Cの阻害剤が、SD70（N-（フラン-2-イル（8-ヒドロキシキノリン-7-イル）メチル）イソブチルアミド）である、請求項25または26に記載の組成物。

【請求項28】

KDM6Bの阻害剤が、GSK-J4（エチル3-（（6-（4,5-ジヒドロ-1H-ベンゾ[d]アゼピン-3（2H）-イル）-2-（ピリジン-2-イル）ピリミジン-4-イル）アミノ）プロパノアート、一塩酸塩）である、請求項25または26に記載の組成物。

40

【請求項29】

細胞の増殖を低減する方法であって、細胞を、表2に記載のエピジェネティック遺伝子の組合わせから選択される2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とする2または3以上の阻害剤の組合わせと接触させることを含む、前記方法。

【請求項30】

細胞が癌細胞である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

癌細胞が卵巣癌細胞である、請求項30に記載の方法。

50

【請求項 3 2】

2 または 3 以上の阻害剤の各々が、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止するか、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する、請求項 2 9～3 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 3】

阻害剤の各々が、C R I S P Rガイド配列および足場配列；s h R N A；および小分子からなる群から選択される、請求項 2 9～3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4】

阻害剤の少なくとも1つが、C R I S P Rガイド配列および足場配列であり；組成物がさらに、C a s 9エンドヌクレアーゼを含むかまたはコードする、請求項 3 3 に記載の組成物。

10

【請求項 3 5】

C R I S P Rガイド配列またはs h R N Aが、組換え発現ベクターから発現される、請求項 3 3 または 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

エピジェネティック遺伝子の組み合わせが、BRD4とKDM4CまたはBRD4とKDM6Bを含む、請求項 2 9～3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 7】

BRD4の阻害剤が、JQ1（（6 S）－4－（4－クロロフェニル）－2，3，9－トリメチル－6 H－チエノ〔3，2－f〕〔1，2，4〕トリアゾロ〔4，3－a〕〔1，4〕ジアゼピン－6－酢酸1，1－ジメチルエチルエステル）である、請求項 3 6 に記載の組成物。

20

【請求項 3 8】

KDM4Cの阻害剤が、SD70（N－（フラン－2－イル（8－ヒドロキシキノリン－7－イル）メチル）イソブチルアミド）である、請求項 3 6 または 3 7 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

KDM6Bの阻害剤が、GSK-J4（エチル3－（（6－（4，5－ジヒドロ－1 H－ベンゾ〔d〕アゼピン－3（2 H）－イル）－2－（ピリジン－2－イル）ピリミジン－4－イル）アミノ）プロパノアート、一塩酸塩）である、請求項 3 6 または 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

対象における癌を処置する方法であって、対象に、表 2 に記載のエピジェネティック遺伝子の組み合わせから選択される 2 または 3 以上のエピジェネティック遺伝子を標的とする 2 または 3 以上の阻害剤の組み合わせを投与することを含み、ここで 2 または 3 以上の阻害剤の各々は、有効量で投与される、前記方法。

30

【請求項 4 1】

阻害剤の各々が、C R I S P Rガイド配列、s h R N A、および小分子からなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

組み合わせで投与される 2 または 3 以上の阻害剤の各々の有効量が、組み合わせで投与されない場合の阻害剤の有効量より少ない、請求項 4 1 に記載の方法。

40

【請求項 4 3】

2 または 3 以上の阻害剤の各々が、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止するか、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する、請求項 4 0～4 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 4】

阻害剤の各々が、C R I S P Rガイド配列および足場配列；s h R N A；および小分子からなる群から選択される、請求項 4 0～4 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 5】

阻害剤の少なくとも 1 つが、C R I S P Rガイド配列および足場配列であり；組成物がさらに、C a s 9エンドヌクレアーゼを含むかまたはコードする、請求項 4 4 に記載の組

50

成物。

【請求項 46】

CRISPRガイド配列またはshRNAが、組換え発現ベクターから発現される、請求項 44 または 45 に記載の組成物。

【請求項 47】

エピジェネティック遺伝子の組み合わせが、BRD4とKDM4CまたはBRD4とKDM6Bを含む、請求項 40～46 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 48】

BRD4の阻害剤が、JQ1（（6S）-4-（4-クロロフェニル）-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-酢酸1,1-ジメチルエチルエステル）である、請求項 47 に記載の組成物。

10

【請求項 49】

KDM4Cの阻害剤が、SD70（N-（フラン-2-イル（8-ヒドロキシキノリン-7-イル）メチル）イソブチルアミド）である、請求項 47 または 48 に記載の組成物。

【請求項 50】

KDM6Bの阻害剤が、GSK-J4（エチル3-（（6-（4,5-ジヒドロ-1H-ベンゾ[d]アゼピン-3（2H）-イル）-2-（ピリジン-2-イル）ピリミジン-4-イル）アミノ）プロパノアート、一塩酸塩）である、請求項 47 または 48 に記載の組成物。

【請求項 51】

細胞の増殖を低減するエピジェネティック遺伝子の阻害剤の組み合わせを同定するための方法であって、

第1細胞集団および第2細胞集団を、2または3以上のCRISPRガイド配列および足場配列およびCas9エンドヌクレアーゼの複数の組み合わせと接触させること；

第1細胞集団および第2細胞集団を、第2細胞集団が第1細胞集団より長い期間培養されるように、培養すること；

第1細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組み合わせ、および第2細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組み合わせを同定すること；

第1細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の各組み合わせの存在量を、第2細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の各組み合わせの存在量と比較すること；および

第2細胞集団においては不在であるかまたは低減された存在量であるが、第1細胞集団においては存在するかまたは増加した存在量である、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組み合わせを、細胞増殖を低減するCRISPRガイド配列と足場配列の組み合わせとして同定すること；

を含む、前記方法。

【請求項 52】

細胞の増殖を低減するために阻害すべき遺伝子の組み合わせを同定する方法であって、

第1細胞集団および第2細胞集団を、2または3以上のCRISPRガイド配列および足場配列およびCas9エンドヌクレアーゼの複数の組み合わせと接触させること；

第1細胞集団および第2細胞集団を、第2細胞集団が第1細胞集団より長い期間培養されるように、培養すること；

第1細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組み合わせ、および第2細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組み合わせを同定すること；

第1細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の各組み合わせの存在量を、第2細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の各組み合わせの存在量と比較すること；および

第2細胞集団においては不在であるかまたは低減された存在量であるが、第1細胞集団に

20

30

40

50

においては存在するかまたは増加した存在量である、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせを、増殖を低減するために阻害すべき遺伝子として同定すること；

を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、35 U.S.C. § 119(e)のもとで、2014年10月31日に提出された米国仮出願第62/073,126号、および2015年5月26日に提出された米国仮出願第62/166,302号の利益を主張する；これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の財政的支援

本発明は、政府の財政的支援により、国立衛生研究所から付与された助成金番号OD008435のもとで行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、CRISPRガイド配列および足場配列を含む遺伝要素の高次の組合わせを迅速に生成するため、および前記遺伝要素の容易な同定のための、方法および組成物に関する。本発明はまた、エピジェネティック遺伝子を標的として細胞増殖を阻害する阻害剤、および関連する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / Cas システムは、初めに細菌および古細菌種において、外来遺伝物質（例えば、プラスミドおよびバクテリオファージ）に対する防御機構として発見された。天然に存在するCRISPR / Cas システムは、3つの成分、すなわち、標的配列に相補的なガイドRNA配列、第3成分であるエンドヌクレアーゼの部位へのリクルートを支援する足場RNA、の発現に依存する。多くの細菌および古細菌種においては、外来遺伝物質を分解するためにCRISPR / Cas システムが用いられているが、該システムは広範な原核生物および真核生物で使用するために適合され、遺伝子ノックアウト、突然変異誘発および発現活性化または抑制を含む多くの方法のために使用されている (Hsu, et al., Cell(2014) 157(6): 1262-1278)。遺伝子操作されたCRISPR / Cas システムでは、3つの独立した成分の必要性は、標的配列に結合するCRISPRガイドRNA配列と足場RNAの両方（これらは、個々のガイドRNA配列および足場配列によって形成された構造を模倣し、エンドヌクレアーゼを適切な標的部位にリクルートするのに十分である）を含む小さなガイドRNA (sgRNA) の発現によって、回避することができる (Jinek et al., Science (2012) 337(6096):816-821)。

【発明の概要】

【0005】

2つ以上のsgRNA（ガイド配列および足場配列）を含む複数のCRISPRシステムの発現のための、ベクターおよび遺伝要素の生成は非常に面倒であり、伝統的なクローニング法を用いて構築されたCRISPRシステムのライブラリーの複雑性は非常に限定されている。本明細書に記載の方法は、CRISPRガイド配列と足場配列をそれぞれが含む複数のsgRNA、およびCRISPRガイド配列の同一性の指標として検出および使用され得る連結されたバーコード要素、を含むベクターの生成を可能にする。本方法はまた、非常に複雑なベクターのライブラリーの簡単かつ迅速な生成を提供する。

【0006】

本発明の側面は、以下を含む遺伝子構築物を提供する：C R I S P Rガイド配列および足場配列を含む、第1 D N A要素；第1 D N A要素に隣接する第1適合末端（compatible end）要素および第2適合末端要素であって、ここで第1および第2適合末端要素は、互いにアニーリングすることができる、前記適合末端要素；バーコード要素；バーコード要素に隣接する第3適合末端要素および第4適合末端要素であって、ここで第3および第4適合末端要素は、互いにアニーリングすることができるが、しかし第1または第2適合末端要素にアニーリングすることはできない、前記適合末端要素；および、第4適合末端要素と第1適合末端要素の間に位置する分離部位であって、ここで、前記D N A要素、第1適合末端要素、および第2適合末端要素は分離部位の一方の側にあり、バーコード要素、第3適合末端要素、および第4適合末端要素は分離部位の反対側にある、前記分離部位。

10

【0007】

いくつかの態様において、遺伝子構築物は、第1 D N A要素の上流にプロモーター要素をさらに含む。

側面は、本明細書に記載の任意の遺伝子構築物を含むベクターを提供する。

他の側面は、以下を含む遺伝子構築物を提供する：複数のD N A要素であって、ここで該複数のD N A要素の各D N A要素は、C R I S P Rガイド配列および足場配列を含む、前記複数のD N A要素；複数のD N A要素に隣接する第1適合末端要素および第2適合末端要素であって、ここで第1および第2適合末端要素は、互いにアニーリングすることができる、前記適合末端要素；複数のバーコード要素；複数のバーコード要素に隣接する第3適合末端要素および第4適合末端要素であって、ここで第3および第4適合末端要素は、互いにアニーリングすることができるが、しかし第1または第2適合末端要素にアニーリングすることはできない、前記適合末端要素；および、複数のD N A要素と複数のバーコード要素の間に位置する、分離部位。

20

他の側面は、本明細書に記載の任意の遺伝子構築物、およびC R I S P Rガイド配列の各々の上流に位置するプロモーター配列を含む、ベクターを提供する。

【0008】

さらに他の側面は、コンビナトリアルベクターを生成するための、以下を含む方法を提供する：（a）以下：C R I S P Rガイド配列；C R I S P Rガイド配列に隣接する第2適合末端要素および第1制限酵素のための第1認識部位；バーコード要素；およびバーコード要素に隣接する第3適合末端要素および第2制限酵素のための第2認識部位、を含む第1遺伝子構築物を含有するベクターを提供すること；（b）第1遺伝子構築物を第1認識部位で切断して、第5適合末端要素を生じ、ベクターを第2認識部位で切断して、第6適合末端要素を生じること；（c）以下：足場配列；第1適合末端要素および第4適合末端要素を含む、分離部位；および足場要素に隣接する第7適合末端要素および第8適合末端要素、を含む足場要素を提供すること、ここで第7適合末端要素は、第5適合末端要素にアニーリングすることができ、第8適合末端要素は、第6適合末端要素にアニーリングすることができる；（d）足場要素を、切断された第1遺伝子構築物にアニーリングすること、ここでアニーリングは、互いにアニーリングすることができる、ベクターおよび足場要素内の適合末端要素で起こり、アニーリング後、足場要素はC R I S P Rガイド配列とバーコード要素の間に組み込まれ、分離部位は、足場配列とバーコード要素の間に位置し、こうしてコンビナトリアルベクターが作製される。

30

40

【0009】

いくつかの態様において、方法は、以下をさらに含む：（a）本明細書に記載の任意のコンビナトリアルベクターを提供すること；（b）ベクターを、足場要素内の分離部位で切断して、第1適合末端要素および第4適合末端要素を生じること；（c）以下：C R I S P Rガイド配列；足場配列；バーコード要素；および第2遺伝子構築物に隣接する第2適合末端要素および第3適合末端要素、を含む第2遺伝子構築物を提供すること、ここで第2遺伝子構築物の第2適合末端要素は、ベクターの第1適合末端要素にアニーリングすることができ、第2遺伝子構築物の第3適合末端要素は、ベクターの第4適合末端要素にアニーリングすることができる；および、（d）第2遺伝子構築物を切断ベクターにアニ

50

ーリングすること、ここでアニーリングは、互いにアニーリングすることができる、第2遺伝子構築物およびベクター内の適合末端要素で起こり、アニーリング後に、第2遺伝子構築物はベクター内に組み込まれて、こうして連結されたバーコード要素および連結されたCRISPRガイドと足場配列を含むコンビナトリアルベクターが作製される。

【0010】

いくつかの態様において、コンビナトリアルベクターは、CRISPRガイド配列の上流に1または2以上のプロモーターをさらに含む。いくつかの態様において、方法は反復的である。いくつかの態様において、第1認識部位と第2認識部位は、同一の認識部位配列を有し、第1制限酵素と第2制限酵素は、同一の制限酵素である。

本発明の他の側面は、少なくとも2つのCRISPRガイド配列；バーコード要素；ならびに各CRISPRガイド配列の間、およびバーコード要素と該バーコード要素に最も近いCRISPRガイド配列との間に位置する、制限認識部位、を含む、遺伝子構築物を提供する。

10

他の側面は、複数のDNA要素であって、各々がCRISPRガイド配列および足場配列を含む、前記複数のDNA要素；バーコード要素；および前記複数のDNA要素の各DNA要素の上流に位置するプロモーター配列、を含む、遺伝子構築物を提供する。いくつかの態様において、バーコード要素は、遺伝子構築物の5'末端に位置する。いくつかの態様において、バーコード要素は、遺伝子構築物の3'末端に位置する。

他の側面は、本明細書に記載の遺伝子構築物のいずれかを含む、ベクターを提供する。

【0011】

20

さらに他の側面は、コンビナトリアルベクターを生成するための、以下を含む方法を提供する：

(a) 以下を含むベクターを提供すること：複数のCRISPRガイド配列；バーコード要素、ここでバーコード要素は、複数のCRISPRガイド配列の下流に位置する；任意に、複数のCRISPRガイド配列の少なくとも1つの上流に位置する、プロモーター配列；および複数の制限酵素のための複数の認識部位；ここで複数の認識部位の各々は、複数のCRISPRガイド配列の1つの下流に位置する；(b) ベクターを、複数の認識部位の少なくとも1つにおいて、複数の制限酵素の少なくとも1つで切断して、第1適合末端要素および第2適合末端要素を生じること；(c) 以下を含む第1足場要素を提供すること：足場配列、任意にプロモーター配列、および第1足場要素に隣接する第3適合末端要素および第4適合末端要素；ここで第3適合末端要素は、切断されたベクターの第1適合末端要素にアニーリングすることができ、第4適合末端要素は、切断されたベクターの第2適合末端要素にアニーリングすることができる；および(d) 第1足場要素を、切断されたベクターにアニーリングすること、ここでアニーリングは、第1足場要素および切断されたベクター内の、適合末端要素で起こり、アニーリング後、第1足場要素は、複数のCRISPRガイド配列の1つの下流に組み込まれ、こうしてコンビナトリアルベクターが生成される。いくつかの態様において、方法は反復的である。

30

【0012】

他の側面は、コンビナトリアルベクターを生成するための、以下を含む方法を提供する：(a) 以下を含むベクターを提供すること：複数のCRISPRガイド配列；バーコード要素、ここでバーコード要素は、複数のCRISPRガイド配列の上流に位置する；任意に、複数のCRISPRガイド配列の少なくとも1つの上流に位置する、プロモーター配列；および、複数の制限酵素のための複数の認識部位、ここで複数の認識部位の各々は、複数のCRISPRガイド配列の1つの上流に位置する；(b) ベクターを、複数の認識部位の少なくとも1つにおいて、複数の制限酵素の少なくとも1つで切断して、第1適合末端要素および第2適合末端要素を生じること；(c) 以下を含む第1足場要素を提供すること：任意に足場配列、プロモーター配列、および第1足場要素に隣接する第3適合末端要素および第4適合末端要素、ここで第3適合末端要素は、切断されたベクターの第1適合末端要素にアニーリングすることができ、第4適合末端要素は、切断されたベクターの第2適合末端要素にアニーリングすることができる；(d) 第1足場要素を、切断さ

40

50

れたベクターにアニーリングすること、ここでアニーリングは、第1足場要素および切断されたベクター内の適合末端要素で起こり、アニーリング後、第1足場要素は、複数のCRISPRガイド配列の1つの上流に組み込まれ、こうしてコンビナトリアルベクターが生成される。いくつかの態様において、方法は反復的である。

【0013】

本発明の側面は、表2に記載のエピジェネティック遺伝子の組合わせから選択される2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とする2または3以上の阻害剤を含む、組成物を提供する。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤の各々は、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止するか、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する。いくつかの態様において、阻害剤の各々は、CRISPRガイド配列および足場配列；shRNA；および小分子からなる群から選択される。いくつかの態様において、阻害剤の少なくとも1つは、CRISPRガイド配列および足場配列であり；組成物はさらに、Cas9エンドヌクレアーゼを含むかまたはコードする。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列またはshRNAは、組換え発現ベクターから発現される。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM4CまたはBRD4とKDM6Bを含む。いくつかの態様において、BRD4の阻害剤は、JQ1（（6S）-4-（4-クロロフェニル）-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-酢酸1,1-ジメチルエチルエステル）である。いくつかの態様において、KDM4Cの阻害剤は、SD70（N-（フラン-2-イル（8-ヒドロキシキノリン-7-イル）メチル）イソブチルアミド）である。いくつかの態様において、KDM6Bの阻害剤は、GSK-J4（エチル3-（（6-（4,5-ジヒドロ-1H-ベンゾ[d]アゼピン-3（2H）-イル）-2-（ピリジン-2-イル）ピリミジン-4-イル）アミノ）プロパノアート、一塩酸塩）である。

【0014】

他の側面は、細胞の増殖を低減する方法であって、細胞を、表2に記載のエピジェネティック遺伝子の組合わせから選択される2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とする2または3以上の阻害剤の組合わせと接触させることを含む、前記方法を提供する。いくつかの態様において、細胞が癌細胞である。いくつかの態様において、癌細胞が卵巣癌細胞である。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤の各々は、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止するか、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する。いくつかの態様において、阻害剤の各々は、CRISPRガイド配列および足場配列；shRNA；および小分子からなる群から選択される。いくつかの態様において、阻害剤の少なくとも1つは、CRISPRガイド配列および足場配列であり；組成物はさらに、Cas9エンドヌクレアーゼを含むかまたはコードする。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列またはshRNAは、組換え発現ベクターから発現される。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM4CまたはBRD4とKDM6Bを含む。いくつかの態様において、BRD4の阻害剤は、JQ1（（6S）-4-（4-クロロフェニル）-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-酢酸1,1-ジメチルエチルエステル）である。いくつかの態様において、KDM4Cの阻害剤は、SD70（N-（フラン-2-イル（8-ヒドロキシキノリン-7-イル）メチル）イソブチルアミド）である。いくつかの態様において、KDM6Bの阻害剤は、GSK-J4（エチル3-（（6-（4,5-ジヒドロ-1H-ベンゾ[d]アゼピン-3（2H）-イル）-2-（ピリジン-2-イル）ピリミジン-4-イル）アミノ）プロパノアート、一塩酸塩）である。

【0015】

他の側面は、対象における癌を処置する方法であって、対象に、表2に記載のエピジェネティック遺伝子の組合わせから選択される2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とする2または3以上の阻害剤の組合わせを投与することを含み、ここで2または

3以上の阻害剤の各々は、有効量で投与される、前記方法が提供される。いくつかの態様において、阻害剤の各々は、CRISPRガイド配列、shRNA、および小分子からなる群から選択される。いくつかの態様において、組合わせて投与される2または3以上の阻害剤の各々の有効量は、組合わせて投与されない場合の阻害剤の有効量より少ない。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤の各々は、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止するか、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する。いくつかの態様において、阻害剤の各々は、CRISPRガイド配列および足場配列；shRNA；および小分子からなる群から選択される。いくつかの態様において、阻害剤の少なくとも1つは、CRISPRガイド配列および足場配列であり；組成物はさらに、Cas9エンドヌクレアーゼを含むかまたはコードする。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列またはshRNAは、組換え発現ベクターから発現される。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM4CまたはBRD4とKDM6Bを含む。いくつかの態様において、BRD4の阻害剤は、JQ1（（6S）-4-（4-クロロフェニル）-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-酢酸1,1-ジメチルエチルエステル）である。いくつかの態様において、KDM4Cの阻害剤は、SD70（N-（フラン-2-イル（8-ヒドロキシキノリン-7-イル）メチル）イソブチルアミド）である。いくつかの態様において、KDM6Bの阻害剤は、GSK-J4（エチル3-（（6-（4,5-ジヒドロ-1H-ベンゾ[d]アゼピン-3（2H）-イル）-2-（ピリジン-2-イル）ピリミジン-4-イル）アミノ）プロパノアート、一塩酸塩）である。

【0016】

他の側面は、細胞の増殖を低減する、エピジェネティック遺伝子の阻害剤の組合わせを同定するための方法であって、以下：第1細胞集団および第2細胞集団を、2または3以上のCRISPRガイド配列および足場配列およびCas9エンドヌクレアーゼの複数の組合わせと接触させること；第1細胞集団および第2細胞集団を、第2細胞集団が第1細胞集団より長い期間培養されるように、培養すること；第1細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせ、および第2細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせを同定すること；第1細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の各組合わせの存在量を、第2細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の各組合わせの存在量と比較すること；および、第2細胞集団においては不在であるかまたは低減された存在量であるが、第1細胞集団においては存在するかまたは増加した存在量である、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせを、細胞増殖を低減するCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせとして同定すること；を含む方法を提供する。

【0017】

さらに他の側面は、細胞の増殖を低減するために阻害すべき遺伝子の組合わせを同定する方法であって、以下：第1細胞集団および第2細胞集団を、2または3以上のCRISPRガイド配列および足場配列およびCas9エンドヌクレアーゼの複数の組合わせと接触させること；第1細胞集団および第2細胞集団を、第2細胞集団が第1細胞集団より長い期間培養されるように、培養すること；第1細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせ、および第2細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせを同定すること；第1細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の各組合わせの存在量を、第2細胞集団における、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の各組合わせの存在量と比較すること；および、第2細胞集団においては不在であるかまたは低減された存在量であるが、第1細胞集団においては存在するかまたは増加した存在量である、2または3以上のCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせを、増殖を低減するために阻害すべき遺伝子として同定すること；を含む方法を提供する。

【0018】

本発明のこれらおよび他の側面、ならびにその様々な態様は、本発明の図面および詳細な説明を参照してより明らかになるであろう。

本発明の限定の各々は、本発明の様々な態様を包含することができる。したがって、任意の1つの要素または要素の組合わせを含む本発明の各限定は、本発明の各側面に含めることができることが予期される。本発明は、その用途において、以下の説明に記載されるか図面に示される構成の詳細および構成要素の配置に限定されない。本発明は、他の態様が可能であり、様々な方法で実現されるか、実施されることが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0019】

添付の図面は、縮尺通りに描くことを意図していない。明確にするために、すべての構成要素がすべての図面でラベル付けされてはいない。図面においては以下である：

【図1】図1は、本発明の非限定的な態様を示す概略図である。ステップ1および2においてオリゴヌクレオチドライブラリーを合成し、対応するオリゴヌクレオチド対と一緒にアニールする。各オリゴヌクレオチドは、CRISPRガイド配列、2つのBbsI制限認識部位、およびバーコード要素を含む。ステップ3において、オリゴヌクレオチドをワンポットライゲーション反応で保存ベクターにライゲートして、オリゴヌクレオチドを含むベクターを得る。ステップ4において、ベクターをBbsI制限認識部位で消化して、足場配列と、BamHIおよびEcoRI制限認識部位によって形成される分離部位の挿入を可能にする。バーコード化ガイドRNAライブラリーは、CRISPRガイド配列、足場配列、分離部位、およびバーコード要素を含む、追加の要素の挿入のために、分離部位で反復的に消化されることができ、連鎖状のバーコード要素を有する複雑なガイドRNAライブラリーをもたらす。配列は、上から下へ、配列番号364～366に対応する。

【0020】

【図2AB】図2Aおよび2Bは、本発明の非限定的な態様を示す概略図である。図2Aのステップ1において、複数のCRISPRガイド配列および該CRISPRガイド配列の下流の単一のバーコード要素をそれぞれが含むオリゴヌクレオチドが合成される。制限認識部位(RE)は、各CRISPRガイド配列の後に存在する。ステップ2において、プールされた合成オリゴヌクレオチドをワンポットライゲーション反応でデスティネーションベクターにライゲートする。ステップ3に示すように、ベクターは、各CRISPRガイド配列に続く制限認識部位の各々において、異なる制限酵素で順次消化されることができて、足場要素の挿入を可能にし、場合によってはプロモーター要素が下流のCRISPRガイド配列の発現を駆動することを可能にして、こうして単一のバーコード要素を有する複数のCRISPRガイド配列および足場配列をコードする、バーコード化コンビナトリアルガイドRNAライブラリーがもたらされる。図2Bのステップ1において、オリゴヌクレオチドが合成され、それぞれは複数のCRISPRガイド配列および該CRISPRガイド配列の上流の単一のバーコード要素を含む。制限認識部位(RE)は、各CRISPRガイド配列の後に存在する。ステップ2において、プールされた合成オリゴヌクレオチドをワンポットライゲーション反応でデスティネーションベクターにライゲートする。ステップ3に示すように、ベクターは、各CRISPRガイド配列に続く制限認識部位のそれぞれにおいて、異なる制限酵素で順次消化されることができ、足場要素の挿入を可能にし、場合によってはプロモーター要素が下流のCRISPRガイド配列の発現を駆動することを可能にして、こうして単一のバーコード要素を有する複数のCRISPRガイド配列および足場配列をコードする、バーコード化コンビナトリアルガイドRNAライブラリーをもたらす。

【0021】

【図3A～3D】図3A～3Dは、高カバレッジコンビナトリアルgRNAライブラリーの生成および、該ライブラリーのヒト細胞への効率的な送達を示す。図3Aは、大腸菌から抽出されたプラスミドプール内の1ワイズgRNAライブラリーについてのバーコードリードの累積分布を表し、予想される全ての組合わせについて完全なカバレッジを示す。

図 3 B は、プラスミドプールおよびレンチウイルス感染OVCAR8-ADR-Cas9細胞プールの両方における 2 ワイズ g R N A ライブラリーを表し、予想される全ての組み合わせについてのほぼ完全なカバレッジを示す。大部分のバーコード化 g R N A の組み合わせは、組み合わせ当たりの平均のバーコードリードの 5 倍の範囲内から検出された（陰影領域によって強調され、矢印によって示される）。図 3 C は、プラスミドプールと感染OVCAR8-ADR-Cas9細胞プール内のバーコード表示（representation）（正規化されたバーコードカウントの $\log_2$ 値）の間の高い相関を示し、ヒト細胞内への、2 ワイズライブラリーの効率的なレンチウイルス送達を示す。図 3 D は、2 ワイズ g R N A ライブラリーでの感染後 5 日間培養したOVCAR8-ADR-Cas9細胞における、2 つの生物学的複製間のバーコード表示の高い再現性を示す。R は、ピアソン相関係数である。

10

【0022】

【図 4 A - 4 C】図 4 A ~ 4 C は、癌細胞の増殖を阻害する g R N A の組み合わせの、ハイスループットスクリーニングを用いた同定を示す。図 4 A は、OVCAR8-ADR-Cas9細胞をバーコード化 2 ワイズ g R N A ライブラリーに感染させて 15 日または 20 日間培養した、ハイスループットスクリーニングの概略図を示す。細胞プール内のバーコード表示は、Illumina HiSeqを使用して同定および定量し、2 つのプール間で比較した。図 4 B（右パネル）は、細胞増殖を調節することが見出された 2 ワイズ g R N A 組み合わせを、20 日対 15 日間の培養細胞における正規化されたバーコードカウントの間の $\log_2$ 比でランク付けして示す。図 4 B（左パネル）は、同じ g R N A を対照 g R N A と対にして示す。対照 g R N A 対との組み合わせは、白三角で強調して示されている。別の生物学的複製において確認された g R N A の組み合わせの抗増殖効果は、白抜きの丸で強調されている（図 12 参照）。標識された g R N A の組み合わせをさらに確認した。図 4 C は、癌細胞の増殖を調節する 2 ワイズの組み合わせの確認を示す。OVCAR8-ADR-Cas9細胞集団を、示された 2 ワイズ g R N A 組み合わせに感染させ、15 日間培養した。次いで同数の細胞を再プレートし、示されるように追加の期間培養した。MTTアッセイを用いて細胞生存率を測定し、吸光度測定（ $OD_{570} - OD_{650}$ ）（ $n = 3$ ）によって特徴付けた。データは、平均±標準偏差（SD）を表す。

20

【0023】

【図 5 A - 5 D】図 5 A ~ 5 D は、KDM4CとBRD4またはKDM6BとBRD4のコンビナトリアル阻害が、ヒト卵巣癌細胞の増殖を阻害することを示す。図 5 A は、示された単一またはコンビナトリアル g R N A を発現するレンチウイルスに感染したOVCAR8-ADR-Cas9細胞の、対照 g R N A を発現するレンチウイルスに感染した細胞と比較した、細胞生存率の倍率変化を示す。細胞を 15 日間培養し、次いで同数の感染細胞を再プレートし、さらに 5 日間培養した。図 5 B は、示された s h R N A を発現するレンチウイルスに同時感染したOVCAR8-ADR細胞の、対照 s h R N A を発現するレンチウイルスに感染した細胞と比較した、細胞生存率の倍率変化を示す。細胞を 9 日間培養し、次いで同数の感染細胞を再プレートし、さらに 4 日間培養した。図 5 C は、SD70とJQ1を用いて、示した濃度で 5 日間処理したOVCAR8-ADR細胞の、薬剤を投与しなかった対照細胞と比較した、細胞増殖阻害のパーセンテージを示す。予想されるBliss独立性モデルおよびHSAモデルに基づいて計算された超過阻害も、SD70とJQ1の組み合わせについて示される（中央パネルおよび右パネル）。図 5 D は、GSK-J4とJQ1を用いて示した濃度で 7 日間処理したOVCAR8-ADR細胞の、薬剤を投与しなかった対照細胞と比較した、細胞増殖阻害のパーセンテージを示す。予想されるBliss独立性モデルおよびHSAモデルに基づいて計算された超過阻害も、GSK-J4とJQ1の組み合わせについて示される（中央パネルおよび右パネル）。細胞生存率は、MTTアッセイによって測定した。データは、平均±SDを表す（図 5 A について $n = 3$ 、図 5 B ~ 図 5 D について $n = 6$ ）。アスタリスク（* $P < 0.05$ ）およびハッシュ（# $P < 0.05$ ）は、示された試料の間および薬物処理試料と薬物なしの対照試料の間の、有意差を表す。

30

40

【0024】

【図 6 A - 6 E】図 6 A ~ 6 E は、コンビナトリアル g R N A 発現構築物のレンチウイルス送達が、効率的な標的遺伝子抑制を提供することを示す。図 6 A は、ヒト細胞における

50

レンチウイルスコンビナトリアル g R N A 発現構築物を試験するための、戦略の概略図を示す。レンチウイルスが生成され、これは、それぞれ U B C および C M V プロモーターの制御下で R F P および G F P をコードする遺伝子と、R F P (R F P - s g 1 または R F P - s g 2) および G F P (G F P - s g 1) 配列を標的とする g R N A のタンデム U 6 プロモーター駆動発現カセットを含んでいた。レンチウイルスを用いて、OVCAR8-ADRまたはOVCAR8-ADR-Cas9細胞を感染させ、G F P および R F P 発現は、フローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡を用いて評価した。図 6 B は、示された g R N A 発現構築物をコードするレンチウイルスで 4 日間感染させた細胞における、G F P および R F P 発現を評価する、フローサイトメトリー散布図を示す。コンビナトリアル g R N A 発現構築物をコードするレンチウイルスは、R F P および G F P 蛍光に対して陽性である細胞の割合をOVCAR8-ADR-Cas9細胞において減少させたが、OVCAR8-ADR細胞では減少させなかった。図 6 C は、示された g R N A 発現構築物をコードするレンチウイルスによる感染後 4 日目の、G F P 陽性細胞 (左欄) および R F P 陽性細胞 (右欄) の割合を示す。図 6 D は、示された g R N A 発現構築物をコードするレンチウイルスの感染後 8 日目の、G F P 陽性細胞 (左欄) および R F P 陽性細胞 (右欄) の割合を示す。R F P および G F P を標的とする g R N A の間の限定された交差反応性が、検出された。図 6 B のデータは、4 日間感染させた細胞のフローサイトメトリー測定値を表し、図 6 C および 6 D の定量化は、平均±標準偏差 (n = 3) を表す。図 6 E は、コンビナトリアル g R N A 発現構築物が、OVCAR8-ADR-Cas9細胞において R F P および G F P 蛍光レベルを効果的に抑制するが、感染後 3 日目のOVCAR8-ADR細胞においてはそうではないことを実証する、代表的な蛍光顕微鏡写真を示す。

【 0 0 2 5 】

【図 7 A - 7 C】図 7 A ~ 7 C は、OVCAR8-ADR-Cas9細胞における標的遺伝子の g R N A の切断効率を示す。図 7 A は、OVCAR8-ADR-Cas9細胞においてSurveyorアッセイを用いて検出された挿入欠失百分率を示す要約表を表す。細胞を、スクリーニングライブラリーからランダムに選択された 8 つの異なる g R N A で、8 または 1 2 日間感染させた。Surveyorアッセイで検出された未切断および切断 P C R 産物の予想されるサイズを、塩基対で列挙する。図 7 B および 7 C は、示された g R N A で感染されていないかまたは 8 日間もしくは 1 2 日間感染されたOVCAR8-ADR-Cas9細胞における、D N A 切断効率についてのSurveyorアッセイ結果を示すアガロースゲルを表す。

【 0 0 2 6 】

【図 8 A B】図 8 A および 8 B は、OVCAR8-ADR-Cas9細胞の標的遺伝子における二重 g R N A 発現構築物の切断効率を示す。図 8 A は、Surveyorアッセイで検出された未切断および切断 P C R 産物の、塩基対で列挙した予想サイズを示す (上のパネル) 。アガロースゲルは、示された単一または二重 g R N A 発現構築物で 1 2 日間感染させたOVCAR8-ADR-Cas9細胞において、Surveyorアッセイを用いて検出した挿入欠失百分率を示す (下のパネル) 。図 8 B は、ベクター対照、または示された単一もしくは二重 g R N A 構築物で 1 5 日間感染させたOVCAR8-ADR-Cas9細胞における、タンパク質レベルを示す免疫ブロット分析である。

【 0 0 2 7 】

【図 9 A - 9 C】図 9 A ~ 9 C は、二重 g R N A 発現構築物に感染した単一細胞由来のOVCAR8-ADR-Cas9クローンについての標的アレルの D N A アライメントを示す。図 9 A は、B M I 1 および P H F 8 を標的とする s g R N A を発現するレンチウイルスに感染したOVCAR8-ADR-Cas9細胞からの配列のアライメントを示す。配列は、上から下に、それぞれ配列番号 2 0 3、2 0 4、2 0 3、2 0 3、2 0 4、2 0 4、2 0 3、2 0 5、2 0 6、2 0 6、2 0 3、2 0 3、2 0 4、2 0 7、2 0 8、2 0 9、2 0 4、2 1 0、2 0 8、2 0 8、2 1 0、2 1 0、2 0 3、2 1 9、2 0 6、2 0 6、2 0 8、2 0 8、2 2 0、2 2 0、2 2 1、2 2 2、2 0 4、2 0 4、2 2 3、2 2 4、2 0 4、2 0 4、2 0 3、2 0 3、2 0 4、および 2 0 4 に対応する。図 9 B は、BRD4およびKDM4Cを標的とする g R N A を発現するレンチウイルスに感染したOVCAR8-ADR-Cas9細胞からの配列のアライメントを示す。OVCAR8-ADR-Cas9細胞をレンチウイルスに 1 2 日間感染させ、単一細胞としてプレートした

。各単一細胞拡大クローン (single-cell-expanded clone) のゲノム DNA を抽出した。標的アレルを PCR で増幅し、Sanger シーケンシングのために TA クローニングにより TOPO ベクターに挿入した。各クローンの 2 つのアレルの配列が示されている。ヌクレオチドの変異および挿入は太字で、欠失は「-」で示されている。標的遺伝子の野生型 (WT) 配列を参照として示し、20 bp の gRNA 標的に下線を引き、PAM 配列を太字斜体で示す。配列は、上から下へ、それぞれ配列番号 211、212、211、211、213、213、211、211、214、214、211、215、212、216、211、211、217、218、211、211、212、212、211、211、225、226、211、211、226、227、211、211、212、212、211、228、226、229、211、211、229、226、211、211、230、および 226 に対応する。図 9C は、単一および二重遺伝子編集細胞の頻度を示すベン図である。示された二重 gRNA 発現構築物を有する OVCAR8-ADR-Cas9 細胞を、単一細胞として FACS によりプレートした。標的とされたアレルは、全ゲノム増幅単一細胞 40 個から、Illumina MiSeq を用いてシーケンシングした。単一細胞の 75% (すなわち 30/40) および 80% (すなわち 32/40) は、それぞれ少なくとも 1 つの変異アレルを、標的 BMI1 および PHF8 遺伝子座に保持していた。単一細胞の 62.5% (すなわち、25/40) は、少なくとも 1 つの変異アレルを、BMI1 と PHF8 遺伝子の両方に含んでいた。各単一細胞の 2 つのアレルの配列を表 6 に示す。Sanger シーケンシングによる単一細胞由来クローン (図 9B) および Illumina MiSeq による全ゲノム増幅された単一細胞 (図 9C) から決定された同様の突然変異アレル頻度が観察された。

10

20

【0028】

【図 10AB】図 10A および 10B は、コンビナトリアル gRNA スクリーニングのための生物学的複製の間の、バーコード定量化の高い再現性を示す。図 10A は、2 ワイズ gRNA ライブラリーによる感染後に 15 日間培養した OVCAR8-ADR-Cas9 細胞についての、2 つの生物学的複製の間のバーコード表示 (正規化バーコードカウントの $\log_2$ 数値) を比較する散布図を表す。図 10B は、2 ワイズ gRNA ライブラリーによる感染後に 20 日間培養した OVCAR8-ADR-Cas9 細胞についての、2 つの生物学的複製の間のバーコード表示 (正規化バーコードカウントの $\log_2$ 数値) を比較する散布図を表す。R は、ピアソン相関係数である。

【0029】

30

【図 11】図 11 は、発現構築物内に異なる順序で配置された同一の gRNA 組み合わせの間での、バーコード定量化における一貫した倍数変化を示す。変動係数 (CV; 20 日対 15 日間培養の OVCAR8-ADR-Cas9 細胞についての、正規化バーコードカウントの倍数変化の SD/平均として定義される) は、様々な順序で配置された各 2 ワイズ gRNA 組み合わせについて決定された (すなわち、sgRNA-A + sgRNA-B および sgRNA-B + sgRNA-A)。細胞増殖スクリーニングにおいて、2 ワイズ gRNA の組み合わせの 82% より多くは $CV < 0.2$ を有し、2 ワイズ gRNA 組み合わせの 95% は $CV < 0.4$ を有した。

【0030】

40

【図 12A-12C】図 12A~12C は、癌細胞増殖を阻害する gRNA 対を同定するコンビナトリアルスクリーニングのための、生物学的複製を示す。図 12A は、図 4B で使用した同じ 2 ワイズ gRNA ライブラリーに感染させた OVCAR8-ADR-Cas9 細胞についての、 $\log_2$ 倍数変化を示す。増殖を調節するガイド RNA 対の組み合わせ (右パネル) およびそれらの gRNA + 対照カウンター の組み合わせ (すなわち、遺伝子標的化 gRNA + 対照 gRNA; 左パネル) を、正規化バーコードカウントの $\log_2$ 比で 20 日間と 15 日間の培養細胞を比較してランク付けした。別の生物学的複製において確認された gRNA 組み合わせの抗増殖効果は、白抜き丸で強調されており (図 4B)、対照 gRNA 対との組み合わせは白三角で強調されている。標識された gRNA の組み合わせは、図 4C でさらに確認した。図 12B は、2 ワイズ gRNA ライブラリーに感染した OVCAR8-ADR-Cas9 細胞の 2 つの生物学的複製間の、20 日対 15 日間の培養細胞についての正規化バーコード

50

カウントの $\log_2$ 比を示す、散布図を表す。図 1 2 C は、プールされたスクリーニングにおける gRNA の組合わせについての $\log_2$ 比の頻度分布を示す。示した $\log_2$ 比は、2 つの生物学的複製の平均から計算した。

【0031】

【図 1 3】図 1 3 は、プールされたスクリーニングと検証データにおける、個々のヒットの間の高い整合性を示す。各 2 ワイズ gRNA 組合わせについて、プールされたスクリーニングデータ（「スクリーニング表現型」）から得られた 20 日対 15 日間の培養細胞の正規化バーコードカウントの倍率変化をその相対的細胞生存率に対して、個々の細胞増殖アッセイから決定されたベクター対照（「バリデーション表現型」）と比較してプロットしたものである（ $R = 0.932$ ）。スクリーニング表現型のデータは、2 つの生物学的複製の平均である；個々のバリデーション表現型は、3 つの独立した実験の平均を表す。R は、ピアソン相関係数である。

【0032】

【図 1 4 A - 1 4 F】図 1 4 A ~ 1 4 F は、OVCAR8-ADR 細胞における標的遺伝子の、shRNA 媒介ノックダウンを示す。図 1 4 A は、対照 shRNA または KDM4C を標的とする shRNA を発現する OVCAR8-ADR 細胞における、KDM4C の相対的 mRNA レベルを示す。図 1 4 B は、対照 shRNA または BRD4 を標的とする shRNA を発現する OVCAR8-ADR 細胞における、BRD4 の相対的 mRNA レベルを示す。図 1 4 C は、対照 shRNA または KDM6B を標的とする shRNA を発現する OVCAR8-ADR 細胞における、KDM6B の相対的 mRNA レベルを示す。mRNA レベルは qRT-PCR によって定量し、アクチン mRNA レベルに対して正規化した。データは、平均 $\pm$ SD ($n = 3$) を表す。また、図 1 4 D ~ 1 4 F は、対照 shRNA または KDM4C、BRD4、もしくは KDM6B を標的とする shRNA を発現する OVCAR8-ADR 細胞における、相対タンパク質レベルのウェスタンブロット分析を示す。測定されたタンパク質レベルは、アクチンレベルに対して正規化し、対照 shRNA 試料に対して正規化し、相対的タンパク質レベルとして下のグラフにプロットした。アスタリスク（* $P < 0.05$ ）は、遺伝子標的化 shRNA 対対照 shRNA を発現する細胞間の、mRNA またはタンパク質レベルの有意差を表す。

【0033】

【図 1 5】図 1 5 は、バーコード化コンビナトリアル gRNA ライブラリーをアセンブルするための戦略を示す。バーコード化 gRNA オリゴ対を合成し、アニールし、プールされた形式で保存ベクターにクローニングした。gRNA 足場配列を有するオリゴを、プールされた保存ベクターライブラリーに挿入して、バーコード化 sgRNA ライブラリーを作製した。詳細なアセンブリ工程を図 1 に示す。CombiGEM 戦略を用いて、コンビナトリアル gRNA ライブラリーを構築した。sgRNA ライブラリーから BglII および MfeI 消化により調製されたプールされたバーコード化 sgRNA 挿入物を、BamHI および EcoRI 消化を用いて、デスティネーションベクターで生成された適合するオーバーハングを介してライゲートした。反復ワンポットライゲーションは、一端に連結された gRNA に対応するユニークなバーコードを有する n ワイズ gRNA ライブラリーを作成し、こうして、プールされた集団内の個々のコンビナトリアルメンバーの、次世代シーケンシングを介した追跡を可能にする。

【0034】

【図 1 6 A - 1 6 E】図 1 6 A ~ 1 6 E は、OVCAR8-ADR-Cas9 細胞の標的ゲノム遺伝子座における gRNA での挿入欠失分析についての、ディープシーケンシングからの結果を示す。細胞は、示された sgRNA で 15 日間感染させ、次いでディープシーケンシングに供した。図 1 6 A は挿入欠失頻度を示す。図 1 6 B はフレームシフト突然変異およびフレーム内突然変異のパーセンテージを示す。図 1 6 C は挿入欠失サイズの分布を示す。図 1 6 D は、単一の sgRNA（KDM4C または BRD4）（上のグラフ）、または二重 gRNA 発現構築物（KDM4 または BRD4）（下のグラフ）で 15 日間感染させた OVCAR8-ADR-Cas9 細胞における標的ゲノム遺伝子座の、ディープシーケンシングによって分析された挿入欠失の分布を示す。図 1 6 E は、単一の sgRNA（PHF8 または BMI1）（上のグラフ）、また

は二重 g R N A 発現構築物 (PHF8またはBMI1) (下のグラフ) で 15 日間感染させた OVCAR8-ADR-Cas9 細胞における標的ゲノム遺伝子座の、ディープシーケンシングによって分析された挿入欠失の分布を示す。

【0035】

【図 17A-17C】図 17A~17C は、混合細胞集団内の増殖促進性 g R N A および抗増殖性 g R N A の頻度の数学的モデリングを示す。図 17A は、最初に抗増殖性 g R N A (f_s) および増殖促進性 (f_f) g R N A を含有する細胞の異なる画分 (すなわち、2、5 または 10%) を有する細胞集団における、増殖促進性 g R N A および抗増殖性 g R N A の相対頻度のシミュレーションを示す。相対頻度は、最初の時点と比較した、所与の時間におけるバーコード存在量として定義される。この例では、C R I S P R-C a s 9 システム (p) による遺伝子摂動によって改変された増殖速度を有する細胞の画分を 1.0 (すなわち 100%) とし、抗増殖性クローンの倍加時間 ($T_{doubling, m}$) は 48 時間である。図 17B および 17C は、パラメータ: p、 $T_{doubling, m}$ 、 f_s および f_f の変化に関する、混合細胞集団における抗増殖性 g R N A のモデル化された相対頻度を示す。図 17B および図 17C の各グラフにおいて、線は上から下へ、 $p = 0.2$ 、 $p = 0.4$ 、 $p = 0.6$ 、 $p = 0.8$ および $p = 1.0$ を表す。図 17A~17C に示すように、増殖促進クローンの倍加時間は 12 時間とした。詳細な定義は、例 3 に記載されている。

【0036】

【図 18】図 18 は、個々の g R N A 組合わせについてのプールされたスクリーニングデータおよび確認データを示す。各 g R N A 組合わせについて、プールされたスクリーニングデータから得られた 20 日対 15 日間の培養細胞 (「スクリーニング表現型」) についての正規化されたバーコードカウントの倍数変化を、個々の細胞増殖アッセイから決定されたベクター対照 (「バリデーション表現型」) と比較して、その相対的細胞生存率に対してプロットした。各個々の s g R N A のスクリーニング表現型は、3 つの対照 s g R N A のそれぞれと対になった対応する s g R N A の倍数変化から平均した。スクリーニングデータのデータは 2 つの生物学的複製の平均であり、個々の確認データは平均 $\pm$ S D ($n \geq 3$) を表す。

【0037】

【図 19】図 19 は、KDM4C、KDM6B、および BRD4 を標的とする g R N A の、オンターゲットおよびオフターゲットの挿入欠失生成速度の測定値を示す。各行は、20 bp ガイド配列 (黒色) に続く 3 bp の P A M 配列 (灰色) に対応するゲノム遺伝子座を表す。太字の黒いフォントの配列は、g R N A のオンターゲットゲノム配列を表す。KDM4C-sg1、KDM6B-sg2、および BRD4-sg3 の各破線の下には、C R I S P R デザイン (Ranra et al., Nature Protocols (2013)8: 2281-2308) および CCTop (Stemmer, PLoS One(2015)10:e0124633) ツールを用いて同定された、すべての予測されたエキソンオフターゲットゲノム配列が示されている。BRD4-sg2 について予測された 5 つのエキソン/イントロンオフターゲット部位も評価した。下線を付したヌクレオチドは、オフターゲット配列の、オンターゲット配列からの差を強調する。各ゲノム遺伝子座は、~10,000 の細胞から P C R 増幅され、>420 万回のリードでディープシーケンシングされた。n. d. は、ゲノム配列の P C R がシーケンシングのための特定のアンプリコンを提供できなかったことを示す。上から下への配列は、配列番号 368~393 に対応する。

【0038】

【図 20A B】図 20A~20B は、KDM4C および BRD4 フレームシフト突然変異の両方を有する OVCAR8-ADR-Cas9 細胞における、減少した増殖を示す。図 20A は、KDM4C および BRD4 フレームシフト突然変異の両方を有する単一細胞拡大 OVCAR8-ADR-Cas9 突然変異体クローン (すなわち、図 9B に示すクローン #3 に由来する) の、細胞増殖アッセイを示す。同数の細胞をプレートし、M T T アッセイ前に 5 日間培養した。データは、対照 OVCAR8-ADR-Cas9 細胞に対する吸光度測定 ($OD_{570} - OD_{650}$) の平均 $\pm$ S D ($n = 3$) を表す。アスタリスク (* $P < 0.01$) は、対照細胞と突然変異細胞との間の有意差を表

す。図 20 B は、図 20 A の対照および突然変異細胞におけるタンパク質レベルの、イムノプロット分析を表す。

【0039】

【図 21 A B】図 21 A ~ 21 B は、gRNA 発現構築物に感染させた OVCAR8-ADR-Cas9 細胞の、RNA シーケンシング分析を示す。図 21 A は、それぞれの単一または二重 gRNA によって標的化された OVCAR8-ADR-Cas9 細胞の各試料（カラム）における、各遺伝子転写物（列）の相対発現レベルを示す、代表的なヒートマップを表す。示された gRNA（単数または複数）に感染した OVCAR8-ADR-Cas9 細胞において、ベクター対照と比較して有意に差次的に発現していると同定された転写物は、ヒートマップに含まれる。値は、 $10 \log_2$ 変換した FPKM であり、RNA-seq を用いて測定し、転写物を中心に平均する。転写物および試料の階層的クラスタリングは、ピアソンの相関に基づいて実施した。図 21 B は、ベクター対照と比較した場合、示された gRNA で感染させた OVCAR8-ADR-Cas9 細胞において同定された、差次的に発現された遺伝子について、生物学的プロセスの上位 10 位の豊富な遺伝子セットを示す（Q 値 < 0.05）。遺伝子セット（y 軸）に関連して差次的に発現された遺伝子のサブセット（x 軸）は、表中で灰色に陰影付けされている。

10

【0040】

【図 22 A B】図 22 A ~ 22 B は、KDM4C と BRD4、および KDM6B と BRD4 の、さらなる癌細胞系の細胞増殖に対する効果を示す。図 22 A は、コンビナトリアル gRNA 発現構築物が、乳癌 MDA-MB231-Cas9 および膵臓癌 Bx-PC3-Cas9 細胞において標的蛍光遺伝子を効果的に抑制することを示す。構成的プロモーターから発現される RFP および GFP 遺伝子を含むレンチウイルスベクターを、RFP および GFP 配列を標的とする gRNA のタンデム U6 プロモーター駆動発現カセット有りまたは無しで、GFP および RFP 発現の分析のためにフローサイトメトリー下で、MDA-MB231-Cas9 および Bx-PC3-Cas9 細胞に送達した。詳細な戦略は、図 6 に記載されている。コンビナトリアル gRNA 発現構築物をコードするレンチウイルスは、RFP および GFP 蛍光について陽性の細胞の割合を、感染後 4 日目に減少させた。図 22 B は、示された単一またはコンビナトリアル gRNA を発現するレンチウイルスに感染した MDA-MB231-Cas9 および Bx-PC3-Cas9 細胞を、14 日間培養したことを示す。次いで、同数の感染細胞を再プレートし、さらに 5 日間培養した。対照 sgRNA に対する細胞生存率を、MTT アッセイによって決定した。データは、生物学的複製からの平均 ± SD（n = 6）を表す。アスタリスク（*P < 0.05）は、示された試料間の有意差を表す。これらの結果は、エピジェネティック遺伝子を標的とするコンビナトリアル gRNA が、細胞の背景に依存して可変表現型を有し得ることを示している。

20

30

【0041】

詳細な説明

2 つ以上の sgRNA（ガイド配列および足場配列）を含む複数の CRISPR システムの発現のためのベクターおよび遺伝要素の生成は非常に困難であり、伝統的なクローニング法を用いて構築された CRISPR システムのライブラリーの複雑性は、非常に限定されている。本明細書に記載の方法は、連結されたバーコードおよび CRISPR ガイド配列および足場配列を有するベクターをもたらす。本方法は、コンビナトリアル遺伝子スクリーニングのための大きなライブラリーを構築するのに、潜在的に高度に効率的であり、多数のオリゴヌクレオチドを容易にプリントすることができ、標的特異性決定領域を有するガイド配列をこれらのオリゴヌクレオチド上にプリントすることができるという事実に影響を及ぼすが、その理由は、ガイド配列およびバーコード要素が短いためである。

40

【0042】

本明細書に記載の CRISPR 構築物およびベクターを生成するための超並列コンビナトリアル遺伝学アプローチは、宿主細胞の核酸を標的とすることができる CRISPR システムの成分（CRISPR ガイド配列および足場配列）を含む遺伝子構築物の、コンビナトリアルセットの迅速な生成を可能にする。この方法はまた、複数の組み合わせオーダーのプールされたスクリーニング（例えば、ペアワイズ（2 通り）、3 ワイズ（3 通り）、

50

およびnワイズ（n通り）の組合わせをプールして同時にスクリーニングすることができる）を可能にし、所定の用途に必要とされる最小限の組合わせを同定する。本明細書に記載の方法を用いて生成されたもの等の遺伝子構築物のコンビナトリアルセットは、細胞プロセスまたは表現型、例えば癌細胞増殖を調節するために相乗的に相互作用する遺伝子および遺伝子経路の同定に、有用であり得る。本明細書にさらに記載されるのは、一緒に阻害された場合に細胞の増殖を減少させるなどの抗癌効果を有する、本明細書に記載のコンビナトリアルCRISPR構築物を用いて同定された、エピジェネティック遺伝子の新規な組合わせである。

【0043】

本開示の側面は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるPCT公開W02014/00542に見出すことができる、超並列コンビナトリアル遺伝学アプローチにおいて使用される、遺伝子構築物、遺伝子構築物を含むベクター、コンビナトリアルベクター、およびコンビナトリアルベクターを生成する方法に関する。本明細書において、「遺伝子構築物」は、CRISPRガイド配列および足場配列およびバーコード要素を含む1または2以上のDNA要素を指し、ここで各DNA要素はバーコード要素に関連している。本明細書中で使用する場合、特定のDNA要素とバーコード要素の間の関連とは、特定のDNA要素とバーコード要素が、常に同一の遺伝子構築物内に含まれることを意味する。したがって、遺伝子構築物内の特定のバーコード要素の存在または検出は、関連する特定のDNA要素（単数または複数）もまた、同一の遺伝子構築物内に存在することを示す。

【0044】

宿主細胞において、CRISPRガイド配列と足場配列を含むDNA要素が転写され、宿主細胞内の特定の標的核酸にエンドヌクレアーゼをリクルートするように機能するCRISPR小ガイドRNA（sgRNA）を形成し、その結果、部位特異的CRISPR活性が生じ得る。本明細書において、「CRISPRガイド配列」は、宿主細胞中の標的核酸配列に相補的な核酸配列を指す。CRISPRガイド配列は、sgRNAを標的核酸配列（標的部位とも呼ばれる）に標的化する。標的核酸に相補的なCRISPRガイド配列は、15～25ヌクレオチド、18～22ヌクレオチド、または19～21ヌクレオチドの長さであってよい。いくつかの態様において、標的核酸に相補的なCRISPRガイド配列は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様において、標的核酸に相補的なCRISPRガイド配列は、20ヌクレオチド長である。

【0045】

CRISPRガイド配列は、CRISPRガイド配列が標的核酸にハイブリダイズすることができる場合、宿主細胞中の標的核酸に相補的であることが理解されるであろう。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列は、標的核酸に少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または少なくとも100%、相補的である（米国特許第8,697,359号も参照、これはCRISPRガイド配列と標的ポリヌクレオチド配列の相補性についての教示に関して、参照により組み込まれる）。CRISPRガイド配列と標的核酸の3'末端付近の標的核酸との間のミスマッチが、ヌクレアーゼ切断活性を消失させることが実証されている（Upadhyay, et al. Genes Genome Genetics (2013) 3(12):2233-2238）。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列は、標的核酸の3'末端（例えば、標的核酸の3'末端の最後の5、6、7、8、9または10ヌクレオチド）に、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または少なくとも100%、相補的である。

【0046】

CRISPRガイド配列は、当分野で知られている任意の供給源から得ることができる。例えば、CRISPRガイド配列は、宿主細胞の核酸中に存在する、示された長さの任意の核酸配列であってよい（例えば、ゲノム核酸および／またはゲノム外（extra-genomic）核酸）。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列は、転写因子、シグナル

伝達タンパク質、トランスポーター等をコードする核酸などの所望の核酸を標的とするように、設計および合成されてもよい。いくつかの態様において、C R I S P Rガイド配列は、エピジェネティック遺伝子を標的とするよう、設計および合成されてもよい。例えば、C R I S P Rガイド配列は、表 2 に示されるエピジェネティック遺伝子の任意の組合わせを標的とするように設計されてよい。いくつかの態様において、C R I S P Rガイド配列は、表 1 に提供される例示的な C R I S P Rガイド配列のいずれかを含む。

【0047】

本明細書で使用する「足場配列」はtracrRNAとも呼ばれ、相補的なC R I S P Rガイド配列に結合（ハイブリダイズ）した標的核酸にエンドヌクレアーゼをリクルートする核酸配列を指す。少なくとも1つのステムループ構造を含み、エンドヌクレアーゼをリクルートする任意の足場配列は、本明細書に記載の遺伝要素およびベクターにおいて使用され得る。例示的な足場配列は当業者に明らかであり、例えば、Jinek, et al. Science (2012) 337(6096):816-821、Ran, et al. Nature Protocols (2013) 8:2281-2308、P C T 出願W02014/093694、およびP C T 出願W02013/176772に見出すことができる。

【0048】

用語「標的核酸」、「標的部位」および「標的配列」は、本明細書全体で互換的に使用され、本明細書に記載のC R I S P Rガイド配列によって標的とされ得る、宿主細胞中の任意の核酸配列をいう。標的核酸には、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）が下流（3'側）に隣接し、PAMは、エンドヌクレアーゼと相互作用し、かつ標的核酸へのエンドヌクレアーゼ活性の標的化にさらに関与し得る。一般に、標的核酸に隣接するPAM配列は、エンドヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼが由来する供給源に依存すると考えられている。例えば、Streptococcus pyogenesに由来するCas9エンドヌクレアーゼについては、PAM配列はNGGである。Staphylococcus aureus由来のCas9エンドヌクレアーゼについては、PAM配列はNNGRR Tである。Neisseria meningitidisに由来するCas9エンドヌクレアーゼについては、PAM配列はNNNNGA T Tである。Streptococcus thermophilus由来のCas9エンドヌクレアーゼについては、PAM配列はNNA G A Aである。Treponema denticola由来のCas9エンドヌクレアーゼについては、PAM配列はN A A A A Cである。Cpf1ヌクレアーゼの場合、PAM配列はT T Nである。

【0049】

いくつかの態様において、C R I S P Rガイド配列および足場配列は、別個の転写物として発現される。かかる態様において、C R I S P Rガイド配列はさらに、足場配列の一部に相補的であり、かつ足場配列に結合（ハイブリダイズ）してエンドヌクレアーゼを標的核酸にリクルートするように機能する、さらなる配列を含む。他の態様においてC R I S P Rガイド配列および足場配列は、単一の転写物として、単一のガイドRNA（sgRNA）と呼ばれ得るキメラRNAとして、発現される。sgRNAは、標的核酸への結合（ハイブリダイズ）と、標的核酸へのエンドヌクレアーゼのリクルートの両方の、二重の機能を有する。かかる態様において、足場配列は、リンカーループ配列をさらに含んでもよい。

【0050】

バーコード要素は、遺伝子構築物の識別子として使用することができ、ベクターまたは遺伝要素中の1または2以上の特定のC R I S P Rガイド配列の存在を示すことができる。1セットのバーコード要素のメンバーは、各バーコード要素がそのセットの他のバーコード要素と容易に区別できるように、十分にユニークな核酸配列を有する。バーコード要素は、任意の長さのヌクレオチドであり得るが、30ヌクレオチド未満の長さが好ましい。いくつかの態様において、バーコード要素は、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、25、26、27、28、29、または30以上のヌクレオチドの長さである。バーコード要素の検出および1つのバーコード要素または複数のバーコード要素の核酸配列の決定は、遺伝子構築物の関連するDNA要素の存在を決定するために使用される。本明細書に記載のバーコード

要素は、シーケンシングまたはマイクロアレイ法を含む当技術分野で知られている任意の方法によって、検出することができる。

【0051】

図1は、本発明に関連する遺伝子構築物の非限定的な例のいくつかの概略図を示す。図1のステップ4において、「ガイド配列」と称されるCRISPRガイド配列および「足場」と称される足場配列を含むDNA要素には、「BamHI」で示される第1適合末端要素と、「BglII」で示される第2適合末端要素が隣接しており、これらの末端要素は互いにアニーリングすることができる。遺伝子構築物はまた、「バーコード」と称されるバーコード要素を含み、これには、「EcoRI」で示される第3適合末端要素と、「MfeI」で示される第4適合末端要素が隣接しており、これらの末端要素は互いにアニーリングすることができるが、第1および第2の適合末端要素にアニーリングすることはできない。遺伝子構築物はまた、分離部位を、バーコード要素が分離部位の一方の側に位置し、DNA要素が分離部位の他方の側に位置するようにして、含む。図1はまた、DNA要素の発現（転写）を可能にする、DNA要素の上流（DNA要素に対して5'）のプロモーター要素も示す。なお図1は、DNA要素がバーコード要素の上流（バーコード要素に対して5'）であるとして示しているが、この配置は逆にすることもできる。

10

【0052】

適合末端は、当業者に明らかな様々な方法で作製することができ、種々の異なる配列から構成され得る。本明細書中で使用する場合、「適合末端要素」とは、互いにライゲーションまたはアニーリングすることができるDNAの領域を指す。互いにライゲーションまたはアニーリングすることができる適合末端要素は当業者には明らかであり、互いにヌクレオチド配列が相補的であり、したがって互いに塩基対形成することができる末端要素を指す。いくつかの非限定的な態様において、適合末端要素は、適合オーバーハングを有する制限部位、ギブソンアセンブリ配列、または任意の他のDNAアセンブリ方法の機能性要素であって、以下：リコンビナーゼ、メガヌクレアーゼ、TALエフェクター／ジンクフィンガーヌクレアーゼ、トランス切断（trans-cleaving）リボザイム／DNAザイムまたはインテグララーゼなど、を含むものから構成することができる。

20

【0053】

いくつかの態様において、ギブソンアセンブリを使用して、適合オーバーハングを生成する。ギブソンアセンブリは、複数のDNA断片を単一の反応で結合可能な等温DNA末端連結技術を指す。この方法は、Gibson et al. (2009) Nature Methods 6:343-5にさらに記載されており、これは参照により組み込まれる。

30

【0054】

他の態様において、制限消化を用いて、適合末端を図1に示すように生成する。この方法を使用して、2つのユニークな制限酵素が適合オーバーハングを生成する。これらのオーバーハングをライゲートすると、どちらの酵素によっても認識されない瘢痕（scar）が形成される。適合オーバーハングを生成する任意の制限酵素を使用できることが、理解されるべきである。いくつかの非限定的な態様において、標準的な生物学的部分、例えばBIOBRICKS（登録商標）（The BioBricks Foundation）またはBglBricks（Anderson et al. (2010) Journal of Biological Engineering 4:1）、およびかかる標準的な生物学的部分に関連する酵素が使用される。BIOBRICKS（登録商標）またはBglBricksなどの標準的な生物学的部分の使用は、当業者には日常的である。古典的な制限酵素（I型、IIまたはIII型の制限酵素など）も用いることができるが、他のDNA切断分子も使用できることが、理解されるべきである。例えば、標的リボザイムは、特定の標的部位の切断に使用することができる。メガヌクレアーゼはまた、挿入されたDNA要素との干渉の可能性を最小化するために、利用することができる。TALまたはZFヌクレアーゼもまた、長いDNA部位を標的化して、挿入されたDNA要素内の内部切断の確率を最小化するために使用することができる。さらに、TOPO（登録商標）クローニングを用いて、制限消化およびライゲーションを達成することができる。

40

【0055】

50

いくつかの態様において、第1適合末端要素は、制限酵素BamHIによる認識および切断によって生成され、第2適合末端要素は、制限酵素BglIIIによる認識および切断によって生成される。いくつかの態様において、第3適合末端要素は、制限酵素MfeIによる認識および切断によって生成され、第4適合末端要素は、制限酵素EcoRIによる認識および切断によって生成される。

【0056】

本明細書において、遺伝子構築物の「分離部位」は、構築物の線状化を可能にする領域を指す。分離部位は、そこでの切断が構築物を線状化し、追加の遺伝要素の挿入を可能にし得る、構築物の核酸内の部位であることが理解されるべきである。いくつかの態様において、分離部位は、制限酵素認識部位である。例えば図1において、分離部位は、それぞれBamHIおよびEcoRI認識部位によって示される、第1および第4適合末端要素によって形成される。対応する制限酵素（BamHIおよびEcoRI）を用いた構築物の切断は、構築物を線状化し、追加の遺伝子構築物の挿入を可能にする。いくつかの態様において、分離部位は、1つの認識部位によって形成される。いくつかの態様において、分離部位は、2つ以上の認識部位によって形成される。

【0057】

本発明の側面は、本明細書に記載の遺伝子構築物を含むコンビナトリアルベクターを生成するための方法に関する。図1のステップ3に示すように、この方法は、以下を含有するベクター：「20bpガイド配列」で示されるCRISPRガイド配列と、それに隣接する、「BglIII」で示される第2適合末端要素、および「BfeI」で示される第1制限酵素に対する第1の認識部位を含む、第1の遺伝子構築物；「バーコード」で示されるバーコード要素と、それに隣接する、「MfeI」で示される第3適合末端要素、および第2制限酵素に対する第2認識部位；を提供することを含む。いくつかの態様において、ベクターは、図2のステップ2に示すように、適合末端を含む第1遺伝子構築物を切断されたベクターにアニーリングおよびライゲートすることによって、生成することができる。いくつかの態様において、第1の遺伝子構築物は、例えばオリゴヌクレオチドアレイ合成によって、合成される。第1遺伝子構築物は、第1認識部位で切断されることができて第5適合末端要素が得られ、第2認識部位で切断されることができて第6適合末端要素が得られる。「BamHI」および「EcoRI」で示される足場配列および分離部位を含む足場要素が提供され、これには、切断されたベクターの第5適合末端要素にアニーリングすることができる第7適合末端要素、および切断されたベクターの第6適合末端要素にアニーリングすることができる第8適合末端要素が隣接する。足場要素は、適合する末端要素を用いて、ベクターの切断された第1遺伝子構築物にアニールされる。アニーリング後、足場要素はCRISPRガイド配列とバーコード要素の間に組み込まれ、分離部位は足場配列とバーコード要素の間に位置する。

【0058】

様々な異なる酵素の組合わせを用いて、第1および第2認識部位を切断できることが理解されるべきである。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列とバーコード要素の外側に位置する2つの認識部位は、適合末端と足場要素とを生成する同じ制限酵素によって認識される。他の態様において、CRISPRガイド配列とバーコード要素の外側に位置する2つの制限部位は、2つの異なる制限酵素によって認識され、その各々は、足場要素を有する適合末端を生成する。

【0059】

本発明のさらなる側面は、コンビナトリアル構築物、およびコンビナトリアル構築物を生成するための方法に関する。本明細書において、「コンビナトリアル構築物」は、複数のDNA要素を含む遺伝子構築物を指す。本明細書において、複数のDNA要素は、1より多くのDNA要素を指し、各DNA要素は、CRISPRガイド配列と骨格配列を含む。図1のステップ5に示すように、コンビナトリアル構築物の生成は、本発明に関連する第1遺伝子構築物を含むベクターを、これを遺伝子構築物内の分離部位で切断することにより、線形化することを含むことができる。本発明に関連する第2遺伝子構築物は、切断

されたベクターに挿入され、ベクターにアニーリングおよびライゲートされることができる。本明細書において、「挿入物」は、切断されたベクターに挿入されることを意図した遺伝子構築物を指す。いくつかの態様において、挿入物は、PCRまたは制限消化などによりベクターから精製される。挿入物は、挿入物内の末端の適合末端要素と線状化ベクター内のそれらの適合成分のアニーリングによって、ライゲートすることができる。

【0060】

図1のステップ5の(n)ワイズガイドRNAライブラリーは、複数のDNA要素と複数の対応するバーコード要素を含む、組合わせ後のコンビナトリアル構築物を示す。図1のステップ5に示す非限定的な例において、遺伝子構築物は、4つの異なるDNA要素と4つの対応するバーコード要素を含む。コンビナトリアル構築物はさらに、複数のバーコード要素と複数のDNA要素との間に位置する分離部位を含む。

10

【0061】

コンビナトリアル構築物を生成するための本明細書に記載の方法は、反復的であることができる。例えば、図1に示すコンビナトリアルベクターは、分離部位で再度切断され、さらなる挿入のための分離部位を維持しながら、1または2以上のさらなる挿入物をコンビナトリアル構築物にライゲートすることができる。重要なことに、反復プロセスを通して遺伝子構築物内のDNA要素の数が増加し続けると、各DNA要素に関連するユニークなバーコードは、それらの関連するDNA要素と同じ遺伝子構築物内に維持される。いくつかの態様において、組合わせプロセスは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または21回以上、反復される。いくつかの態様において、プロセスはn回反復され、ここでnは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または20を超える数である。

20

【0062】

コンビナトリアル構築物は、任意数のDNA要素および関連するバーコード要素を含むことができることが、理解されるべきである。いくつかの態様において、コンビナトリアル構築物は、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、または100を超えるDNA要素および関連するバーコード要素を含む。

30

【0063】

本発明の別の側面は、単一のバーコード要素に関連する2以上のCRISPRガイド配列を含む、遺伝子構築物およびベクターに関する。図2は、本発明に関連する遺伝子構築物の、非限定的な例のいくつかの概略図を示す。図2Aおよび2Bのステップ1は、「20bpガイド配列A」、「20bpガイド配列B」および「20bpガイド配列C」と示される3つのCRISPRガイド配列、「バーコード」によって示されるバーコード要素、および、各CRISPRガイド配列の間、およびバーコード要素とバーコード要素に最も近いCRISPRガイド配列との間に位置する認識部位、を含む遺伝子構築物を示す。いくつかの態様において、バーコード要素は、図2Aに示すように、CRISPRガイド配列の下流に位置してよい。他の態様において、バーコード要素は、図2Bに示すように、CRISPRガイド配列の上流に位置してよい。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列の間およびバーコード要素とバーコード要素に最も近いCRISPRガイド配列の間に位置する認識部位は、それぞれ異なる制限酵素に対する異なる認識部位である。いくつかの態様において、少なくとも2つのCRISPRガイド配列、バーコード要素、および認識部位を含む遺伝子構築物は、オリゴヌクレオチドアレイ合成などの当技術分

40

50

野で知られた任意の方法によって合成される。

【0064】

さらに本発明の範囲内であるのは、複数のDNA要素と1つのバーコード要素を含む、遺伝子構築物である。図2のステップ3において、遺伝子構築物は、それぞれがCRISPRガイド配列と足場配列を含む3つのDNA要素、バーコード要素、および各DNA要素の上流に位置するプロモーター配列、を含む。いくつかの態様において、バーコード要素は、図2Aに示すように、CRISPRガイド配列の下流に位置してよい。他の態様において、バーコード要素は、図2Bに示すように、CRISPRガイド配列の上流に位置してよい。

【0065】

本発明の側面は、本明細書に記載の遺伝子構築物を含むコンビナトリアルベクターを生成するための方法に関する。いくつかの態様において、この方法は、複数のCRISPRガイド配列および複数のCRISPRガイド配列の下流に位置するバーコード要素を含むベクターを、提供することを含む。図2Aおよび2Bのステップ1に見られるように、3つのCRISPRガイド配列は「20bpガイド配列A」、「20bpガイド配列B」、および「20bpガイド配列C」として示し、バーコード要素は「バーコード」で示している。ベクターはまた、複数の制限酵素のための複数の認識部位を含む。図2Aのステップ1に示すように、各認識部位はCRISPRガイド配列の下流に位置し、「RE1」、「RE2」および「RE3」によって示される。図2Bのステップ1に示すように、各認識部位はCRISPRガイド配列の上流に位置し、「RE1」、「RE2」および「RE3」によって示される。いくつかの側面において、ベクターはまた、CRISPRガイド配列の少なくとも1つの上流に位置する、プロモーター配列を含む。CRISPRガイド配列の少なくとも1つの下流の適合末端要素は、当分野で知られている任意の方法によって生成される。いくつかの態様において、ベクターは、認識部位の少なくとも1つにおいて制限酵素で切断されて、第1適合末端要素と第2適合末端要素を生じる。足場要素が提供され、これは足場配列と、任意にプロモーター配列、および切断されたベクターの第1適合末端要素と第2適合末端要素にそれぞれアニーリングすることができる、第3適合末端要素と第4適合末端要素を含む。足場要素は、足場要素内の末端の適合末端要素と、切断されたベクター内のそれらの適合要素のアニーリングによって、切断されたベクターにアニールされる。本明細書に記載の方法は反復的であってよく、複数のCRISPRガイド配列および足場配列および1つのバーコード要素を含有する、コンビナトリアルベクターをもたらす。

【0066】

コンビナトリアルベクターは、1つのバーコード要素に関連する任意の数のDNA要素を含むことができることが、理解されるべきである。いくつかの態様において、コンビナトリアル構築物は、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、または101以上のDNA要素および1つのバーコード要素を含む。1つのバーコード要素に関連するDNA要素の数は、CRISPRガイド配列、バーコード、および認識部位を含む、合成可能な遺伝子構築物の長さに依存し得る。

【0067】

本明細書に記載の構築物またはベクターのいずれかにおいて、1または2以上のRNAドメインを、1または2以上のCRISPRガイド配列に挿入することができる。いくつかの態様において、CRISPRガイド配列は、1または2以上のRNAドメインに融合

される。いくつかの態様において、RNAは、非コードRNAまたはその断片である。かかる態様において、RNAドメインは、DNA座に標的化され得る。かかる構築物またはベクターは、CRISPRディスプレイのために使用され得る。

【0068】

本発明のさらなる側面は、遺伝子構築物またはベクター内の1または2以上のDNA要素を同定するための方法に関する。組合わせ事象の後、特定のDNA要素（単数または複数）と関連するユニークなバーコードは、特定のDNA要素と同じ遺伝子構築物内にとどまる。したがって、バーコード要素または複数のバーコード要素の同定は、同じ遺伝子構築物内の関連するDNA要素または複数のDNA要素の同定を可能にする。いくつかの態様において、バーコード要素および／またはDNA要素の配列は、シーケンシングまたはマイクロアレイ分析によって決定される。DNA配列を決定する任意の手段は、1または2以上のバーコード要素および対応するDNA要素の同定に適合可能であることが、理解されるべきである。重要なことに、図1のステップ5に示されるようなコンビナトリアル構築物において、複数のバーコード要素は互いに近接しているので、複数のバーコード要素、したがって複数のDNA要素を、DNAシーケンシングなどの方法によって同時に、迅速に同定することが可能である。

【0069】

本発明のさらなる側面は、超並列コンビナトリアル遺伝学の方法と適合する、本明細書に記載の2または3以上の遺伝子構築物を含むライブラリーに関する。本明細書において、遺伝子構築物のライブラリーは、2または3以上の遺伝子構築物の集合を指す。いくつかの態様において、各ユニークなDNA要素がプラスミド上に存在する、遺伝子構築物のライブラリーが生成される。このプラスミドライブラリーをプールして、ベクターライブラリーを形成することができる。挿入物ライブラリーは、例えば、ベクターライブラリー上でPCRを行うことによって生成することができる。第1の組合わせ事象において、全てのベクターをすべての挿入物と対にして、ペアワイズ組合わせの完全なコンビナトリアルセットを生成することができる。このペアワイズライブラリーと挿入物ライブラリーとの間のさらなる反応は、単一ベクターライブラリーから生じるトリワイズ、クワッドワイズまたはクワッドワイズより上のライブラリーを導くことができる。コンビナトリアル構築物のライブラリーを使用して、コンビナトリアル構築物の前記ライブラリーを発現する宿主細胞のスクリーニングを行うことができる。いくつかの態様において、コンビナトリアル構築物のライブラリーは、DNA要素または、DNA要素と、表1に示される例示的なCRISPRガイド配列などのエビジェネティック遺伝子を標的とするCRISPRガイド配列との組合わせを、含む。

【0070】

コンビナトリアル工程はin vitroで行われるので、この技術は、DNAを受容することができる任意の宿主細胞または生物に拡大縮小することができることが、理解されるべきである。いくつかの態様において、宿主細胞は細菌細胞である。いくつかの態様において、生物は細菌であり、構築物はプラスミドまたはファージ上に担持される。いくつかの態様において、宿主細胞は酵母細胞である。他の態様において、生物は酵母であり、構築物はプラスミドまたはシャトルベクター上に担持される。他の態様において、宿主細胞は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞である。かかる態様において、本明細書に記載される遺伝子構築物は、プラスミド上に担持され得るか、またはレンチウイルスもしくはアデノウイルスなどのウイルスによって送達されることができる。

【0071】

本明細書に記載の遺伝子構築物およびベクターは、CRISPRガイド配列および足場配列を含むCRISPRシステムの構成要素の発現に関する。CRISPRシステムが発現される宿主細胞は、エンドヌクレアーゼなどの1または2以上のさらなるCRISPR成分を発現し得る。いくつかの態様において、宿主細胞は、エンドヌクレアーゼ、例えばCasエンドヌクレアーゼも発現する。いくつかの態様において、Casエンドヌクレアーゼは、Cas1、Cas2、またはCas9エンドヌクレアーゼである。いくつかの態

様において、宿主細胞は、*Streptococcus pyogenes*、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus thermophilus*、または*Treponema denticola*由来のCas9エンドヌクレアーゼを発現する。いくつかの態様において、Cas9エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞または生物における発現のためにコドン最適化されてもよい。いくつかの態様において、エンドヌクレアーゼは、Cas9ホモロジーまたはオルソログである。

【0072】

いくつかの態様において、Cas9エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに修飾して、タンパク質の活性を改変する。いくつかの態様において、Cas9エンドヌクレアーゼは、触媒的に不活性なCas9である。例えば、dCas9は、触媒的に活性な残基（D10およびH840）の変異を含み、ヌクレアーゼ活性を有さない。代替的にまたはさらに、Cas9エンドヌクレアーゼは、別のタンパク質またはその一部に融合されてもよい。いくつかの態様において、dCas9は、KRABドメインなどのリプレッサードメインに融合される。いくつかの態様において、かかるdCas9融合タンパク質は、多重遺伝子抑制（例えば、CRISPR干渉（CRISPRi））のために本明細書に記載の構築物と共に用いられる。いくつかの態様において、dCas9は、VP64またはVPRなどのアクチベータードメインに融合される。いくつかの態様において、かかるdCas9融合タンパク質は、多重遺伝子活性化（例えば、CRISPR活性化（CRISPRa））のために本明細書に記載の構築物と共に使用される。いくつかの態様において、dCas9は、ヒストンデメチラーゼドメインまたはヒストンアセチルトランスフェラーゼドメインなどのエピジェネティック調節ドメインに融合される。いくつかの態様において、dCas9は、LSD1またはp300、またはその一部に融合される。いくつかの態様において、dCas9融合物は、CRISPRに基づくエピジェネティックな調節のために使用される。いくつかの態様において、dCas9またはCas9は、FokIヌクレアーゼドメインに融合される。いくつかの態様において、FokIヌクレアーゼドメインに融合されたCas9またはdCas9は、多重遺伝子編集に使用される。いくつかの態様において、Cas9またはdCas9は、蛍光タンパク質（例えば、GFP、RFP、mCherryなど）に融合される。いくつかの態様において、蛍光タンパク質に融合されたCas9／dCas9タンパク質は、ゲノム遺伝子座の多重標識および／または可視化のために使用される。

【0073】

代替的またはさらに、エンドヌクレアーゼはCpfIヌクレアーゼである。いくつかの態様において、宿主細胞は、*Provetella*種または*Francisella*種に由来するCpfIヌクレアーゼを発現する。いくつかの態様において、CpfIヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞または生物における発現のためにコドン最適化されてもよい。

【0074】

本発明は、原核細胞および真核細胞を含む、DNAが導入され得る任意の細胞型を包含する。いくつかの態様において、細胞は細菌細胞であり、例えば、*Escherichia*種、*Streptomyces*種、*Zymonas*種、*Acetobacter*種、*Citrobacter*種、*Synechocystis*種、*Rhizobium*種、*Clostridium*種、*Corynebacterium*種、*Streptococcus*種、*Xanthomonas*種、*Lactobacillus*種、*Lactococcus*種、*Bacillus*種、*Alcaligenes*種、*Pseudomonas*種、*Aeromonas*種、*Azotobacter*種、*Comamonas*種、*Mycobacterium*種、*Rhodococcus*種、*Gluconobacter*種、*Ralstonia*種、*Acidithiobacillus*種、*Microlunatus*種、*Geobacter*種、*Geobacillus*種、*Arthrobacter*種、*Flavobacterium*種、*Serratia*種、*Saccharopolyspora*種、*Thermus*種、*Stenotrophomonas*種、*Chromobacterium*種、*Sinorhizobium*種、*Saccharopolyspora*種、*Agrobacterium*種、および*Pantoea*種である。細菌細胞は、*Escherichia coli*（*E. coli*）細胞などのグラム陰性細胞、または*Bacillus*種などのグラム陽性細胞であることができる。

【0075】

他の態様において、細胞は、酵母細胞などの真菌細胞、例えば、*Saccharomyces*種、*Schizosaccharomyces*種、*Pichia*種、*Phaffia*種、*Kluyveromyces*種、*Candida*種、*Talaromyces*種、*Brettanomyces*種、*Pachysolen*種、*Debaryomyces*種、*Yarrowia*種、および工業的ポリ

ポイド酵母株である。好ましくは、酵母株は、*S. cerevisiae*株である。真菌の他の例としては、*Aspergillus*種、*Penicillium*種、*Fusarium*種、*Rhizopus*種、*Acremonium*種、*Neurospora*種、*Sordaria*種、*Magnaporthe*種、*Allomyces*種、*Ustilago*種、*Botrytis*種、および *Trichoderma*種が挙げられる。

他の態様において、細胞は、藻類細胞、植物細胞、昆虫細胞、げっ歯類細胞または哺乳動物細胞であり、これは、げっ歯類細胞またはヒト細胞（例えば、ヒト胎児腎臓細胞（例えば、HEK293T細胞））、ヒト真皮線維芽細胞、OVCAR8細胞もしくはOVCAR8-ADR細胞などのヒト癌細胞を含む。いくつかの態様において、細胞は、ヒト卵巣癌細胞などのヒト癌細胞である。

【0076】

本明細書でさらに提供されるのは、エピジェネティック遺伝子を標的とする阻害剤を含む組成物である。本明細書において、用語「エピジェネティック遺伝子」は、細胞内の別の分子またはプロセスのエピジェネティックな調節に影響を与える、任意の遺伝子を指す。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子は、エピジェネティックな調節に関与するタンパク質をコードする。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子は、エピジェネティックな調節に影響を与えるRNA（例えば、マイクロRNA）などの核酸をコードする。一般にエピジェネティクスは、細胞のゲノムDNAの突然変異を伴わない、分子またはプロセスに対する任意の改変を指す（Jaenisch and Bird Nat. Gene. (2003)33:245-254）。エピジェネティックな調節には、細胞内でのDNA媒介プロセスが関与し、例えば、転写、DNA修復、および、以下の機構を介した複製が関与する：DNAメチル化、ヒストン修飾、ヌクレオソームリモデリング、およびRNA媒介標的化（Dawson and Kouzarides Cell (2012) 150 (1) : 12-27）。エピジェネティック遺伝子の非限定的な例としては、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、MBD1、MBD2、CREBBP、EP300、HDAC1、HDAC2、SIRT1、CARM1、EZH1、EZH2、MLL、MLL2、NSD1、PRMT1、PRMT2、PRMT3、PRMT5、PRMT6、PRMT7、SETD2、KDM1A、KDM1B、KDM2A、KDM2B、KDM3A、KDM3B、KDM4A、KDM4B、KDM4C、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM6A、KDM6B、PHF2、PHF8、BMI1、BRD1、BRD3、BRD4、ING1、ING2、ING3、ING4、およびING5が挙げられる。

【0077】

本明細書において、用語「阻害剤」は、任意の分子、例えばタンパク質、核酸、または小分子であって、エピジェネティック遺伝子の発現を低減または防止する、またはエピジェネティック遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を低減または防止するものを指す。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の2または3以上の阻害剤の組み合わせは、エピジェネティック遺伝子の発現を、阻害剤の組み合わせの不在下でのエピジェネティック遺伝子の発現と比較して、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、または少なくとも65%、低減する。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の2または3以上の阻害剤の組み合わせは、エピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を、阻害剤の組み合わせの不在下でエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性と比較して、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、または少なくとも65%、低減する。

【0078】

いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の阻害剤の組み合わせは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または少なくとも10もしくは11種以上のエピジェネティック遺伝子の阻害剤を含む。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の阻害剤の組み合わせは、エピジェネティック遺伝子の2つの阻害剤を含む。いくつかの態様において、阻害剤の組み合わせは、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11以上のエピジェネティック遺伝子を阻害する。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の阻害剤の組み合わせは、2つのエピジェネティック遺伝子を標的として阻害する、2つの阻害剤を含む。

【0079】

いくつかの態様において、阻害剤の組合わせの少なくとも1つの阻害剤は、直接的または間接的に、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止するか、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する、タンパク質である。例えばタンパク質は、エピジェネティック遺伝子の発現を低減または防止するリプレッサー、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質のアロステリック阻害剤であってよい。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とするタンパク質である。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、表2に示されるエピジェネティック遺伝子の任意の組合わせを標的とするタンパク質である。

【0080】

いくつかの態様において、阻害剤の組合わせの少なくとも1つの阻害剤は、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止するか、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する、核酸である。いくつかの態様において、核酸は、足場配列とともにエンドヌクレアーゼをエピジェネティック遺伝子にリクルートする、CRISPRガイド配列である。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とする、CRISPRガイド配列である。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、表2に示すエピジェネティック遺伝子の組合わせのいずれかを標的とする、CRISPRガイド配列である。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、表1に提供されるエピジェネティック遺伝子を標的とする例示的なCRISPRガイド配列から選択される、CRISPRガイド配列である。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM4Cを含む。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM6Bを含む。

【0081】

いくつかの態様において、核酸は、細胞のRNA干渉(RNAi)経路によって処理されて、標的遺伝子の発現を沈黙させる(例えば、mRNAレベルおよび/またはタンパク質産生を低減する)、shRNAである。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とするshRNAである。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、表2に示すエピジェネティック遺伝子の組合わせのいずれかを標的とする、shRNAである。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、表4に提供されるエピジェネティック遺伝子を標的とする例示的なshRNAから選択される、shRNAである。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM4Cを含む。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM6Bを含む。

【0082】

いくつかの態様において、阻害剤の組合わせの少なくとも1つの阻害剤は、エピジェネティック遺伝子の発現を低減もしくは防止する、またはエピジェネティック遺伝子がコードするタンパク質の活性を低減もしくは防止する、小分子である。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、2または3以上のエピジェネティック遺伝子を標的とする、小分子である。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、表2に示すエピジェネティック遺伝子の組合わせのいずれかを標的とする、小分子である。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM4Cを含む。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の組合わせは、BRD4とKDM6Bを含む。

【0083】

BRD4の発現を低減もしくは防止するか、またはBRD4によってコードされるタンパク質の活性を低減もしくは防止する任意の小分子は、本明細書に記載の組成物および方法と適合し得る。BRD4阻害剤の例としては、限定はされないが、JQ1((6S)-4-(4-クロロフェニル)-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-酢酸1,1-ジメチルエチルエステル)、MS417(メチル[(6S)-4-(4-クロロフェニル)-2,3,9-トリメチル

10

20

30

40

50

ル-6H-チエノ[3, 2-f][1, 2, 4]トリアゾロ[4, 3-a][1, 4]ジアゼピン-6-イル]アセテート)、またはRVX-208(2-[4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3, 5-ジメチルフェニル]-5, 7-ジメトキシ-4(3H)-キナゾリノン)が挙げられる。いくつかの態様において、BRD4阻害剤はJQ1である。さらなるBRD4阻害剤は当業者に明らかであり、例えば、PCT公報WO 2014/154760 A1、およびVidler et al. J. Med. Chem. (2013) 56: 8073-8088に見出すことができる。

【0084】

KDM4C(JMJD2とも呼ばれる)の発現を低減もしくは防止するか、またはKDM4Cによってコードされるタンパク質の活性を低減もしくは防止する任意の小分子は、本明細書に記載の組成物および方法と適合し得る。いくつかの態様において、KDM4C阻害剤は、SD70(N-(フラン-2-イル(8-ヒドロキシキノリン-7-イル)メチル)イソブチルアミド)またはカフェ酸である。さらなるKDM4C阻害剤は当業者に明らかであり、例えば、Leurs et al. Bioorg. & Med. Chem. Lett. (2012) 22(12): 5811-5813およびHamada et al. Bioorg. & Med. Chem. Lett. (2009) 19: 2852-2855に見出すことができる。

【0085】

KDM6B(JMJD3とも呼ばれる)の発現を低減もしくは防止するか、またはKDM6Bによってコードされるタンパク質の活性を低減もしくは防止する任意の小分子は、本明細書に記載の組成物および方法と適合し得る。KDM6B阻害剤の例としては、限定はされないが、GSK-J4(エチル3-((6-(4, 5-ジヒドロ-1H-ベンゾ[d]アゼピン-3(2H)-イル)-2-(ピリジン-2-イル)ピリミジン-4-イル)アミノ)プロパノエート、モノ塩酸塩)、GSK-J1(N-[2-(2-ピリジニル)-6-(1, 2, 4, 5-テトラヒドロ-3H-3-ベンズアゼピン-3-イル)-4-ピリミジニル]-β-アラニン)、およびIOX1(8-ヒドロキシ-5-キノリンカルボン酸; 8-ヒドロキシ-5-キノリンカルボン酸)が挙げられる。いくつかの態様において、KDM6B阻害剤はGSK-J4である。さらなるKDM4C阻害剤は、当業者に明らかである。

【0086】

2または3以上の阻害剤の組合わせは、2または3以上のタンパク質阻害剤、2または3以上のCRISPRガイド配列、2または3以上のshRNA、または2または3以上の小分子阻害剤を含み得る。いくつかの態様において、2または3以上の阻害剤は、異なる種類の阻害剤(例えば、タンパク質、核酸、小分子)である。いくつかの態様において、組合わせは、タンパク質阻害剤および1または2以上のさらなる阻害剤(例えば、CRISPRガイド配列、shRNA、および/または小分子阻害剤)を含む。他の態様において、組合わせは、CRISPRガイド配列および1または2以上のさらなる阻害剤(例えば、タンパク質、shRNA、および/または小分子阻害剤)を含む。他の態様において、組合わせは、shRNAおよび1または2以上のさらなる阻害剤(例えば、タンパク質、CRISPRガイド配列、および/または小分子阻害剤)を含む。他の態様において、組合わせは、小分子阻害剤および1または2以上のさらなる阻害剤(例えば、タンパク質、shRNA、および/またはshRNA)を含む。

【0087】

本明細書に記載の方法および組成物は、癌細胞または増殖の低下が望まれる他の細胞などの細胞の増殖を低減するために、有用であり得る。いくつかの態様において、細胞を、エピジェネティック遺伝子の2または3以上の阻害剤の組合わせ(例えば、表2に示されるエピジェネティック遺伝子を標的とする阻害剤の組合わせ)と接触させると、細胞の増殖が部分的または完全に低減される。いくつかの態様において、細胞を、エピジェネティック遺伝子の2または3以上の阻害剤の組合わせと接触させると、阻害剤の組合わせと接触していない細胞と比較して、細胞の増殖が部分的または完全に低減される。いくつかの態様において、細胞をエピジェネティック遺伝子の2または3以上の阻害剤の組合わせと接触させると、阻害剤の組合わせと接触していない細胞と比較して、細胞の増殖が少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、または少なくとも65%、低減される。いくつかの態様において、細胞を

、エピジェネティック遺伝子の2または3以上の阻害剤の組合わせと接触させると、癌細胞の増殖は、阻害剤の組合わせと接触している非癌細胞と比較して、部分的または完全に低減される。細胞増殖は、当技術分野で知られている任意の方法によって、例えば細胞生存率アッセイ、MTTアッセイ、またはBrdU細胞増殖アッセイを用いて、評価および定量することができる。

【0088】

本発明の他の側面は、対象における癌を処置するための方法および組成物に関する。癌は、制御不能または異常に制御された細胞増殖および他の悪性細胞特性を特徴とする疾患である。本明細書において、「癌」という用語は、当技術分野で知られている任意の種類の癌を指し、これには限定なく、乳癌、胆道癌、膀胱癌、脳癌、子宮頸癌、絨毛癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、血液新生物、T細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫、毛状細胞白血病、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、AIDS関連白血病および成人T細胞白血病／リンパ腫、上皮内新生物、肝臓癌、肺癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、皮膚癌、精巣癌、甲状腺癌、および腎癌が含まれる。癌細胞は、in vivo（すなわち、生物中）、ex vivo（すなわち、生物から除去され、in vitroで維持される）、またはin vitroにおける癌細胞であってよい。

10

【0089】

この方法は、対象に、エピジェネティック遺伝子の2または3以上の阻害剤の組合わせを有効量で投与することを含む。いくつかの態様において、対象は、癌を有するか、有すると疑われるか、または発症するリスクのある対象である。いくつかの態様において、対象は哺乳動物対象であり、限定されないが、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、げっ歯類または霊長類を含む。いくつかの態様において、対象は、患者などのヒト対象である。ヒト対象は、小児または成人対象であってよい。対象が癌を有する「リスクがある」とみなされるか否かは、熟練した医師が決定することができる。

20

【0090】

本明細書において、「処置する」とは、疾患を、改善する、治癒する、悪化を防止する、進行の速度を低下させる、または再発を防止する（すなわち、再発防止）ことが含まれる。組成物の有効量は、組成物の治療効果をもたらす量を指す。例えば、対象における癌を処置するための方法において、エピジェネティック遺伝子を標的とする阻害剤の組合わせの有効量は、例えば癌細胞の増殖を低減もしくは防止する、または癌細胞に細胞毒性であるなどの、抗癌効果を提供する任意の量である。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子を標的とする阻害剤の有効量は、エピジェネティック遺伝子を標的とする1または2以上の追加の阻害剤と同時に、またはこれと組み合わせて投与した場合に、エピジェネティック遺伝子を標的とする1または2以上の追加の阻害剤の不在下で投与した場合の阻害剤の有効量と比べて、低減される。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子を標的とする阻害剤は、エピジェネティック遺伝子を標的とする1または2以上の追加の阻害剤の不在下で投与した場合に、癌細胞の増殖を低減または防止しない。

30

【0091】

エピジェネティック遺伝子を標的とする阻害剤またはエピジェネティック遺伝子（例えば、表2に示されるエピジェネティック遺伝子の組合わせ）を標的とする阻害剤の組合わせは、当分野で知られている任意の方法を用いて、対象に投与され得る。いくつかの態様において、阻害剤は、局所、経腸、または非経口の投与経路によって投与される。いくつかの態様において、阻害剤は、静脈内、筋肉内、または皮下に投与される。

40

【0092】

本明細書に記載されるエピジェネティック遺伝子の任意の阻害剤は、当分野で知られている任意の方法によって、対象に投与されるか、または細胞に送達されるか、または細胞と接触されてよい。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子の阻害剤は、細胞に、ナノ粒子、細胞透過性ペプチド、ポリマー、リボソーム、または組換え発現ベクターによって、送達される。他の態様において、エピジェネティック遺伝子の阻害剤は、1または2以上のナノ粒子、細胞透過性ペプチド、および／またはポリマーに、コンジュゲ

50

ートされる。他の態様において、エピジェネティック遺伝子の阻害剤は、リボソーム内に含有される。

【0093】

さらに提供されるのは、細胞または細胞集団の増殖を低減または防止するエピジェネティック遺伝子の阻害剤の組合わせを同定するための方法である。図4Aに示すように、方法は、細胞の2つの集団を、エピジェネティック遺伝子を標的とするCRISPRガイド配列および足場配列（例えば、バーコード化CRISPRライブラリー）およびCas9エンドヌクレアーゼのコンビナトリアルライブラリーと、接触させることを含む。細胞の2つの集団は、異なる持続時間の間培養される。例えば、1つの細胞集団を15日間培養し、他の細胞集団を20日間培養する。2または3以上のCRISPRガイド配列および足場配列の組合わせの同定は、細胞の各集団について、例えばシーケンシング法によって決定される。例えば、CRISPRガイド配列および足場配列は、CRISPRガイド配列のユニークな識別子であるバーコードをシーケンシングすることによって、同定することができる。より長い時間培養された細胞の集団におけるCRISPRガイド配列と足場配列の各組合わせの存在量を、より短い時間培養された細胞の集団におけるCRISPRガイド配列と足場配列の各組合わせの存在量と比較する。細胞の増殖を低減させたCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせの存在量は、より長い時間培養された細胞の集団において、より短い時間培養された細胞の集団よりも少ないであろう。かかる組合わせは、細胞増殖を低減するエピジェネティック遺伝子の阻害剤の組合わせとして、同定される。

10

20

【0094】

阻害された場合に細胞または細胞集団の増殖を低減または防止するエピジェネティック遺伝子の組合わせを同定するための、他の方法が提供される。図4Aに示すように、方法は、細胞の2つの集団を、エピジェネティック遺伝子を標的とするCRISPRガイド配列および足場配列（例えば、バーコード化CRISPRライブラリー）およびCas9エンドヌクレアーゼのコンビナトリアルライブラリーと、接触させることを含む。細胞の2つの集団は、異なる持続時間の間培養される。例えば、1つの細胞集団を15日間培養し、他の細胞集団を20日間培養する。2または3以上のCRISPRガイド配列および足場配列の組合わせの同定は、細胞の各集団について、例えばシーケンシング法によって決定される。例えば、CRISPRガイド配列および足場配列は、CRISPRガイド配列のユニークな識別子であるバーコードをシーケンシングすることによって、同定することができる。より長い時間培養された細胞の集団におけるCRISPRガイド配列と足場配列の各組合わせの存在量を、より短い時間培養された細胞の集団におけるCRISPRガイド配列と足場配列の各組合わせの存在量と比較する。細胞の増殖を低減したCRISPRガイド配列と足場配列の組合わせの存在量は、より長い時間培養された細胞の集団において少ないであろう。かかる組合わせは、細胞増殖を低減または防止する阻害剤により標的化され得るエピジェネティック遺伝子の組合わせとして、同定される。

30

【0095】

いくつかの態様において、本発明に関連するエピジェネティック遺伝子を標的とする1または2以上の遺伝子または阻害剤は、組換え発現ベクターにおいて発現される。本明細書において、「ベクター」は、所望の配列（単数または複数）が、制限およびライゲーション（例えば、CombiGEM法を使用して）により、または異なる遺伝子環境間の輸送のためもしくは宿主細胞（例えば、癌細胞）での発現のための組換えによって挿入され得る、多数の核酸のいずれかであってよい。ベクターは典型的にはDNAからなるが、RNAベクターも利用可能である。ベクターには、限定はされないが、プラスミド、フォスミド、ファージミド、ウイルスゲノムおよび人工染色体が含まれる。いくつかの態様において、ベクターはレンチウイルスベクターである。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子を標的とする2または3以上の遺伝子または阻害剤は、同じ組換え発現ベクター上に発現される。いくつかの態様において、エピジェネティック遺伝子を標的とする2または3以上の遺伝子または阻害剤は、2または3以上の組換え発現ベクター上に発現される

40

50

。

【0096】

クローニングベクターは、自律的に複製することができるか、または宿主細胞中のゲノムに組み込まれたものであり、ベクターが決定可能な様式で切断され所望のDNA配列がライゲートされ得る1または2以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によって、または適合末端を有する挿入物が組み込まれ得て、新しい組換えベクターが宿主細胞中で複製するその能力を保持する制限部位によって、さらに特徴付けられる。プラスミドの場合、所望の配列の複製は、宿主細菌などの宿主細胞内でプラスミドのコピー数が増加するにつれて何回でも、または宿主が有糸分裂によって複製する前に宿主あたりわずか1回だけ、起こり得る。ファージの場合、複製は、溶解相の間に能動的に、または溶原相の間に受動的に、

10

【0097】

発現ベクターは、所望のDNA配列が、制限およびライゲーションまたは組換えによって挿入され得て、これが調節配列に作動可能に連結されて、RNA転写物として発現されることができるものである。ベクターはさらに、ベクターで形質転換またはトランスフェクトされているかまたはいない細胞の同定に用いるのに適した、1または2以上のマーカー配列を含むことができる。マーカーは、例えば、抗生物質または他の化合物に対する耐性または感受性のいずれかを増加または減少させるタンパク質をコードする遺伝子、その活性が当分野で知られている標準的なアッセイによって検出可能な酵素（例えば、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼまたはアルカリホスファターゼ）をコードする遺伝子、および、形質転換されたかトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニー、またはプラークの表現型に、視覚的に影響を与える遺伝子を含む（例えば、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質）。好ましいベクターは、それらが作動可能に連結されているDNAセグメント中に存在する構造遺伝子産物の、自己複製および発現が可能なベクターである。

20

【0098】

本明細書において、コード配列および調節配列が「作動可能に」連結されると言われるのは、コード配列の発現または転写を制御配列の影響または制御下に置くような様式で、共有結合される場合である。コード配列が機能的タンパク質に翻訳されることが望ましい場合に、2つのDNA配列が作動可能に連結されていると言われるのは、5'調節配列中のプロモーターの誘導がコード配列の転写をもたらす場合、および、2つのDNA配列の間の連結の性質が、（1）フレームシフト突然変異の導入をもたらさず、（2）コード領域の転写を指令するプロモーター領域の能力を妨害せず、または（3）対応するRNA転写物をタンパク質に翻訳する能力を妨害しない場合である。したがって、プロモーター領域がコード配列に作動可能に連結されるのは、プロモーター領域が、得られる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳され得るように、そのDNA配列の転写に影響を及ぼすことができる場合であろう。

30

【0099】

核酸分子が細胞内で発現される場合、様々な転写制御配列（例えば、プロモーター／エンハンサー配列）を用いてその発現を指向させることができる。プロモーターは、天然のプロモーター、すなわちその遺伝子の発現の正常な調節を提供する、その内因性の状況における遺伝子のプロモーターであり得る。いくつかの態様において、プロモーターは構成的であり得る、すなわち、プロモーターは調節されておらず、その関連遺伝子の継続的な転写を可能にする。種々の条件付プロモーターも使用することができ、例えば、分子の存在または不在により制御されるプロモーターである。いくつかの態様において、プロモーターは、RNAポリメラーゼIIプロモーター、例えば哺乳動物RNAポリメラーゼIIプロモーターである。いくつかの態様において、プロモーターはヒトユビキチンCプロモーター（UBCp）である。いくつかの態様において、プロモーターはウイルスプロモーターである。いくつかの態様において、プロモーターは、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター（CMVp）である。いくつかの態様において、プロモーターはRNAポリメラーゼIIIプロモーターである。RNAポリメラーゼIIIプロモーターの例としては、

40

50

限定はされないが、H1プロモーター、U6プロモーター、マウスU6プロモーター、ブタU6プロモーターが挙げられる。いくつかの態様において、プロモーターはU6プロモーター（U6p）である

【0100】

遺伝子発現のために必要とされる調節配列の正確な性質は、種または細胞型によって異なるが、一般に、必要に応じて、転写および翻訳の開始にそれぞれ関与する5'非転写および5'非翻訳配列、例えばTATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などを含む。特に、かかる5'非転写調節配列は、作動可能に連結された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含む、プロモーター領域を含む。調節配列はまた、必要に応じてエンハンサー配列または上流アクチベーター配列を含み得る。本発明のベクターは、5'リーダーまたはシグナル配列を任意に含み得る。適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および裁量の範囲内である。

10

【0101】

発現に必要な全ての要素を含む発現ベクターは市販されており、当業者に知られている。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012を参照。細胞は、異種DNA（RNA）の、細胞への導入によって遺伝子操作される。その異種DNA（RNA）は、転写要素の作動可能な制御下に置かれて、宿主細胞における異種DNAの発現を可能にする。

本発明に関連する核酸分子は、当技術分野で標準的な方法および技術を用いて、細胞（単数または複数）に導入することができる。例えば、核酸分子は、化学的形質転換およびエレクトロポレーション、ウイルス形質導入、粒子衝撃などを含む形質転換などの標準的なプロトコルによって、導入することができる。いくつかの態様において、ウイルス形質導入は、レンチウイルスを用いて達成される。核酸分子の発現はまた、核酸分子をゲノムに組み込むことによって達成され得る。

20

【0102】

本発明は、その用途において、以下の説明に示され図面に描かれた構成要素の構成および配置の詳細に、限定されない。本発明は別の態様でも可能であり、様々な方法で実施または実行されることができる。また、本明細書で使用される表現および用語は、説明目的のためであり、限定とみなされるべきではない。「含む（including）」、「含む（comprising）」、または「有する」、「含有する」、「伴う」、およびそれらのバリエーションの使用は、その後列挙される項目およびその均等物ならびに追加の項目を包含することを意味する。

30

本発明は、以下の実施例によりさらに例示されるが、これらはさらなる限定として解釈されるべきではない。本出願を通して引用された参考文献（参考文献、発行済み特許、公開特許出願、および同時係属中の特許出願を含む）は、特に本明細書に引用された教示について、ここに参照によって明示的に組み込まれる。

【実施例】

【0103】

例1

図1に示すように、バーコード化CRISPR分子の高複雑性コンビナトリアルライブラリーを、本明細書に記載の方法を用いて作製することができる。ステップ1では、大規模CRISPRガイドRNA（gRNA）ライブラリーを、各CRISPRガイド配列についての順方向および逆方向オリゴヌクレオチド（例えば、オリゴF-AおよびオリゴR-A；オリゴF-BおよびオリゴR-B）を含む、アレイベースのオリゴヌクレオチド合成を用いて生成した。合成されたオリゴヌクレオチドの長さは、最終生成物ライブラリーの複雑性とは無関係である。次にステップ2において、gRNAについてのオリゴヌクレオチド対を単離してアニールする。各gRNAに対するオリゴヌクレオチドは、20塩基対のCRISPRガイド配列、2つのBbsI部位、およびバーコード要素を含む。オリゴヌクレオチドはまた、オリゴヌクレオチドの保存ベクターへのライゲーションのための5'および3'一本鎖オーバーハング領域を含んでよい。ステップ3において、BbsIおよびMf

40

50

eI オーバーハングを含むアニールされたオリゴ対を、gRNA ライブラリーをBbsIとMfeIで消化したAwp28保存ベクターに挿入するためのワンポットライゲーション反応に、一緒にプールした。これにより、それぞれがCRISPRガイド配列、2つのBbsI部位、およびバーコード要素を含むAwp28保存ベクターのライブラリーが得られる。

【0104】

次いでステップ4において、保存ベクターのプールされたライブラリーは、BbsIを用いてワンポット消化を受け、CRISPRガイド配列とバーコード要素との間でベクターを開いて、CRISPRガイド配列とバーコードの間にgRNA足場要素を挿入できるようにした。gRNA足場要素の挿入物は、足場要素の3'末端の制限認識部位BamHIおよびEcoRIによって形成される分離部位を含むため、gRNA保存ベクターのライブラリーは反復クローニング工程に供されて、ステップ5に示すように、Cas9ヌクレアーゼまたはエフェクターを用いてコンビナトリアル遺伝子ノックアウト、活性化または抑制を媒介することができる複数のgRNA発現カセットを包含する、より複雑なnワイズバーコード化ライブラリーを生成可能である。簡潔には、バーコード化ガイドRNAライブラリーは、分離部位の制限認識部位に相補的な制限酵素（例えば、BamHIおよびEcoRI）を用いて、消化される。消化は、CRISPRガイド配列、足場配列、分離部位、およびバーコード要素をコードする追加のセグメントの挿入を可能にする。同じセットの制限酵素を複数回のクローニングに使用して(n)ワイズライブラリーを構築できるため、この戦略の利点の1つは、(n+1)ワイズライブラリーが、必要な制限酵素のセットを増加させないことである。

(m) gRNAメンバーの(n)ワイズライブラリーを構築するには、(n+2)回のクローニング工程が必要である。この戦略のさらなる利点は、同じCRISPRガイドライブラリーを使用して高次複雑性ライブラリーを生成できることである。

【0105】

例2：

図2Aに示すように、バーコード化CRISPR分子の複雑なコンビナトリアルライブラリーを、本明細書に記載の方法を用いて作製することができる。ステップ1において、複数のCRISPRガイド配列および単一のバーコード要素を単一のオリゴヌクレオチド上に合成して、大規模コンビナトリアルgRNAライブラリーを生成した。制限認識部位は、各CRISPRガイド配列の後に存在した。ガイド配列およびバーコードは、異なる制限酵素部位によって互いに連結されている。図2Aの遺伝子構築物およびベクターは、3つのCRISPRガイド配列およびCRISPRガイド配列の下流に位置するバーコード要素を含む、例示的なオリゴヌクレオチドを示す。

【0106】

ステップ2において、プールされた合成オリゴヌクレオチドを、ワンポットアセンブリでデスティネーションベクターにライゲートした。デスティネーションベクターは、CRISPRガイド配列の少なくとも1つの発現を駆動するプロモーターを含むことができる。ステップ3に示すように、ベクターを、異なる制限酵素を有する各CRISPRガイド配列に続く制限認識部位のそれぞれで、順次消化し、足場要素の、および場合によってはプロモーター要素の挿入を可能にして、下流のCRISPR配列の発現を駆動する。この方法は、Cas9ヌクレアーゼまたはエフェクターを用いたコンビナトリアル遺伝子ノックアウト、活性化または抑制のための、複数のCRISPRガイド配列と足場配列および単一のバーコード要素をコードする、バーコード化コンビナトリアルガイドRNAライブラリーの生成をもたらした。

【0107】

図2Bは、バーコード化CRISPR分子の複雑なコンビナトリアルライブラリーを生成するための、別の戦略を示す。ステップ1において、複数のCRISPRガイド配列および単一のバーコード要素を、単一のオリゴヌクレオチド上に合成して、大規模コンビナトリアルgRNAライブラリーを生成した。制限認識部位は、CRISPRガイド配列の各々の後に存在し、また1つの制限認識部位が第1のCRISPRガイド配列の上流にも

、プロモーター要素の挿入のために存在した。ガイド配列およびバーコードは、異なる制限酵素部位によって互いに連結されている。図2Bの遺伝子構築物およびベクターは、3つのCRISPRガイド配列およびCRISPRガイド配列の上流に位置するバーコード要素を含む、例示的なオリゴヌクレオチドを示す。

【0108】

ステップ2において、プールされた合成オリゴヌクレオチドを、ワンポットアセンブリのデスチネーションベクターにライゲートした。デスチネーションベクターは、CRISPRガイド配列の少なくとも1つの発現を駆動するプロモーターを含むことができる。ステップ3に示すように、ベクターを、異なる制限酵素を有する各CRISPRガイド配列に続く制限認識部位のそれぞれで、順次消化し、足場要素の、および場合によってはプロモーター要素の挿入を可能にして、下流のCRISPR配列の発現を駆動する。この方法は、Cas9ヌクレアーゼまたはエフェクターを用いたコンビナトリアル遺伝子ノックアウト、活性化または抑制のための、複数のCRISPRガイド配列と足場配列および単一のバーコード要素をコードする、バーコード化コンビナトリアルガイドRNAライブラリーの生成をもたらした。

10

【0109】

図2Aおよび2Bに示す戦略を使用して、(m) gRNAメンバーの(n) ワイズライブラリーを(n+1)回のクローニング工程で構築することができる。生成されるライブラリーの複雑性は、ステップ1で合成されたオリゴヌクレオチドの長さに依存する。足場配列の挿入を可能にする制限認識部位は、各CRISPRガイド配列ならびにプロモーター要素について異なるため、オリゴヌクレオチドの複雑性(すなわち、CRISPRガイド配列の数)を増加させると、消化工程に必要な制限酵素の数も増加する。

20

【0110】

例3:

CombiGEMベースのDNAアセンブリ法を、バーコード化コンビナトリアルgRNAライブラリーの効率的かつスケラブルなアセンブリに使用した。ライブラリーはレンチウイルスによってヒト細胞に送達され、これにより、プールされたアッセイでバーコードシーケンシングによって追跡され得るユニークなgRNAの組合わせを有する、遺伝的に超多様性の細胞集団が作製された。CombiGEM-CRISPRと呼ばれるこの戦略は、単純なワンポットクローニング工程を使用して、高次コンビナトリアルgRNAライブラリーのスケラブルなアセンブリを可能にし、コンビナトリアル遺伝子機能の系統的解析へのワークフローを簡素化および加速する。

30

【0111】

最初のバーコード化sgRNAライブラリーを作製するために、バーコード化gRNA標的配列のライブラリーをコードするオリゴ対のアレイを初めに合成し、アニールし、保存ベクター中のU6プロモーターの下流にクローニングするために等しい比率でプールした(図1)。続いて、gRNAの足場配列を、保存ベクターライブラリーにワンポットライゲーション反応で挿入した。CombiGEM法を、高次コンビナトリアルgRNAライブラリーのスケラブルなアセンブリに適用した(図1)。バーコード化sgRNA構築物内では、BamHIおよびEcoRI部位はgRNA配列とそのバーコードの間に位置し、BglIIおよびMfeI部位は末端に位置した。これらの制限酵素部位の戦略的配置は、酵素消化の際にバーコードのそのgRNA配列からの分離、および挿入物のライゲーション時にそれぞれのgRNAを表すバーコードの連結をもたらす。1ワイズライブラリーを構築するために、バーコード化sgRNA発現ユニットを、保存ベクターのBglIIおよびMfeIでの制限消化によって調製し、BamHIおよびEcoRIで消化されたレンチウイルスデスチネーションベクター中の、適合するDNA末端に結合した。次に1ワイズライブラリーは、2ワイズライブラリー(ここでは各sgRNAを表すバーコードが各レンチウイルス構築物の一端に局在している)を生成するため、バーコード化sgRNA発現ユニットのプールされた挿入の次の回のための、デスチネーションベクターとして機能した。このプロセスは、高次バーコード化コンビナトリアルgRNAライブラリーを生成するために、反復的に繰り返す

40

50

ことができる。コンビナトリアル gRNA の同一性は、各組合わせについてユニークな連結されたバーコードの検出によって、追跡することができる（例えばハイスループットシーケンシングなどにより）。

【0112】

我々のレンチウイルスコンビナトリアル gRNA 発現システムの機能性を評価するために、緑色蛍光タンパク質（GFP）および赤色蛍光タンパク質（RFP）をコードする配列を標的とする gRNA の組合わせを構築した（表 1）。コンビナトリアル遺伝子摂動表現型を、フローサイトメトリー（図 6 A および 6 B）および蛍光顕微鏡（図 6 E）を用いて決定した。二重の RFP および GFP レポーターをバーコード化コンビナトリアル gRNA 発現ユニットと共に運ぶレンチウイルスを用いて、ヒトコドン最適化 Cas9 スクレアーゼ（OVCAR8-ADR-Cas9）を安定に発現するヒト卵巣癌細胞（OVCAR8-ADR）（Honma, et al., Nat. Med. (2008) 14: 939-948）を感染させた（図 6 A）。活性な gRNA は、GFP および RFP をコードする配列を標的とし、GFP と RFP の発現をノックアウトするための挿入欠失を生成すると予想された。GFP および RFP 蛍光レベルの効率的な抑制が観察されたが、これは、GFP および RFP 二重陰性集団が、ベクター対照における < 0.7% と比較して、Cas9 スクレアーゼおよび、RFP と GFP の両方を標的とする gRNA 発現単位を有する細胞において、感染後 4 日目および 8 日目の両方で観察された主要集団であるからである（～全集団の 83～97%）（図 6 C および 6 D）。この抑制は、GFP および／または RFP を標的とする gRNA を発現するが Cas9 スクレアーゼを有さない対照細胞株では、観察されなかった（図 6 B）。遺伝子摂動の特異性が確認されたが、これは、GFP を標的とする sgRNA のみを有する細胞は GFP シグナルの消失を示したが、RFP シグナルは消失しなかったからである。同様に、RFP を標的とする sgRNA を含む細胞は RFP 発現の低下を示したが、GFP 発現に影響はなかった（図 6 E）。これらの結果は、単一のヒト細胞内で複数の遺伝子の発現を同時に抑制し得るコンビナトリアル gRNA 構築物をコードするレンチウイルスベクターの能力を実証する。

【0113】

多様なエピジェネティックな修飾は協同的に作用して、遺伝子発現パターンを調節する傾向があり（Wang, et al. Nat. Genet. (2008) 40:897-903）、コンビナトリアルエピジェネティックモジュレーションが、有効な癌治療のための有望な戦略として出現している（Dawson, et al. Cell (2012) 150: 12-27; Juergens, et al. Cancer Discov. (2011) 1: 598-607）。本明細書に記載の CombiGEM-CRISPR 方法および組成物を用いて、エピジェネティック遺伝子摂動の、抗癌表現型に対するコンビナトリアル効果を系統的に評価した。GeCKOv2 ライブラリーに基づき、50 のエピジェネティック遺伝子のセット（1 遺伝子当たり 3 個の sgRNA）および 3 個の対照 sgRNA を標的とする、153 個のバーコード化 sgRNA を含むライブラリーを構築した（Shalem, et al. Science (2014) 343:84-87）（表 1）。

【0114】

【表 1 - 1】

表 1: sgRNA 標的配列

sgRNA ID	sgRNA 標的配列
GFP-sg1	GGGCGAGGAGCTGTTACCG (配列番号 7)
RFP-sg1	CACCCAGACCATGAAGATCA (配列番号 8)
RFP-sg2	CCACTTCAAGTGCACATCCG (配列番号 9)
Control-sg1	ATCGTTTCCGCTTAACGGCG (配列番号 10)
Control-sg2	AAACGGTACGACAGCGTGTG (配列番号 11)
Control-sg3	CCATCACCGATCGTGAGCCT (配列番号 12)
DNMT1-sg1	CTAGACGTCCATTCACTTCC (配列番号 13)
DNMT1-sg2	TTTCCAAACCTCGCACGCCC (配列番号 14)
DNMT1-sg3	ACGTAAAGAAGAATTATCCG (配列番号 15)
DNMT3A-sg1	CCGCCCCACCTTCCGTGCCG (配列番号 16)
DNMT3A-sg2	TGGCGCTCCTCCTTGCCACG (配列番号 17)
DNMT3A-sg3	CCGCTCCGCAGCAGAGCTGC (配列番号 18)
DNMT3B-sg1	AGAGTCGCGAGCTTGATCTT (配列番号 19)
DNMT3B-sg2	ATCCGCACCCCGGAGATCAG (配列番号 20)
DNMT3B-sg3	GAAGACTCGATCCTCGTCAA (配列番号 21)
DNMT3L-sg1	AGGGATCTGCGCCCCATGTA (配列番号 22)
DNMT3L-sg2	ACTCACCTTCTATATTTCGC (配列番号 23)
DNMT3L-sg3	CACCAAAATCACGTCCATGC (配列番号 24)
MBD1-sg1	TCACCCGTAGGCAACGTCGC (配列番号 25)
MBD1-sg2	GTGTCCAGCGACGTTGCCTA (配列番号 26)
MBD1-sg3	ACGTTGTGCAAAGACTGTCTG (配列番号 27)
MBD2-sg1	CGGCGACTCCGCCATAGAGC (配列番号 28)
MBD2-sg2	GGAGCCGGTCCCTTTCCCGT (配列番号 29)
MBD2-sg3	AGTCTTGAAAGCGCATGCCA (配列番号 30)
CREBBP-sg1	AGCGGCTCTAGTATCAACCC (配列番号 31)
CREBBP-sg2	GAATCACATGACGCATTGTC (配列番号 32)
CREBBP-sg3	CCCGCAAATGACTGGTCACG (配列番号 33)
EP300-sg1	CTGTCAGAATTGCTGCGATC (配列番号 34)
EP300-sg2	CTTGGCAAGACTTGCTGAC (配列番号 35)
EP300-sg3	TAGTTCCCCTAACCTCAATA (配列番号 36)
HDAC1-sg1	ACACCATTCGTAACGTTGCC (配列番号 37)
HDAC1-sg2	TCACTCGAGATGCGCTTGTC (配列番号 38)
HDAC1-sg3	AGAATGCTGCCGCACGCACC (配列番号 39)
HDAC2-sg1	TCCGTAATGTTGCTCGATGT (配列番号 40)

【 0 1 1 5 】

【表 1 - 2】

HDAC2-sg2	TCCAACATCGAGCAACATTA (配列番号 41)
HDAC2-sg3	TACAACAGATCGTGTAATGA (配列番号 42)
SIRT1-sg1	GTTGACTGTGAAGCTGTACG (配列番号 43)
SIRT1-sg2	AACAGGTTGCGGGAATCCAA (配列番号 44)
SIRT1-sg3	TACCCAGAACATAGACACGC (配列番号 45)
CARM1-sg1	CTCGCCGTTTCGCGTCGCCGA (配列番号 46)
CARM1-sg2	CCCGTACTCACGGCTGTAGA (配列番号 47)
CARM1-sg3	GGGCCACGTACCGTTGGGTG (配列番号 48)
EZH1-sg1	ACAGGCTTCATTGACTGAAC (配列番号 49)
EZH1-sg2	AGCTGATCAATAACTATGAT (配列番号 50)
EZH1-sg3	CCTCATCTGAGTACTGATTC (配列番号 51)
EZH2-sg1	ACACGCTTCCGCCAACAAAC (配列番号 52)
EZH2-sg2	TGCGACTGAGACAGCTCAAG (配列番号 53)
EZH2-sg3	AAAACCTTCATCTCCCATATA (配列番号 54)
MLL-sg1	GTACAAATTGTACGACGGAG (配列番号 55)
MLL-sg2	GACCCCTCGGCGGTTTATAG (配列番号 56)
MLL-sg3	TATATTGCGACCACCAAAC (配列番号 57)
MLL2-sg1	CAGAGAGCACACGCCGCAC (配列番号 58)
MLL2-sg2	GGAACCGCTGGCAGTCGCGC (配列番号 59)
MLL2-sg3	CTCCCGCTGCCCGTGTAGAC (配列番号 60)
NSD1-sg1	CTGGCTCGAGATTTAGCGCA (配列番号 61)
NSD1-sg2	AATCTGTTTCATGCGCTTACG (配列番号 62)
NSD1-sg3	GATTCCAGTACCAGTACATT (配列番号 63)
PRMT1-sg1	CTCACCGTGGTCTAACTTGT (配列番号 64)
PRMT1-sg2	GGATGTCATGTCCTCAGCGT (配列番号 65)
PRMT1-sg3	TTTGACTCCTACGCACACTT (配列番号 66)
PRMT2-sg1	CGTGGATGAGTACGACCCCG (配列番号 67)
PRMT2-sg2	TCTTCTGTGCACACTATGCG (配列番号 68)
PRMT2-sg3	CTGTCCCAGAAGTGAATCGC (配列番号 69)
PRMT3-sg1	GCCATGTGCTCGTTAGCGTC (配列番号 70)
PRMT3-sg2	GCCTGACGCTAACGAGCACA (配列番号 71)
PRMT3-sg3	GAATTCATGTACTCAACTGT (配列番号 72)
PRMT5-sg1	CGGAATGCGGGGTCCGAAC (配列番号 73)
PRMT5-sg2	CAGCATAACAGCTTTATCCGC (配列番号 74)
PRMT5-sg3	ATGAACTCCCTCTTGAAACG (配列番号 75)
PRMT6-sg1	ATTGTCCGGCGAGGACGTGC (配列番号 76)
PRMT6-sg2	CTTCGCCACGCGCTGTCTCA (配列番号 77)
PRMT6-sg3	GACGGTACTGGACGTGGGCG (配列番号 78)
PRMT7-sg1	CAATCCGACCACGGGGTCTG (配列番号 79)
PRMT7-sg2	GAGGTTCAAACCGCCTGCTA (配列番号 80)
PRMT7-sg3	TAAAGTCGGCTGGTGACACC (配列番号 81)
SETD2-sg1	AGTTCTTCTCGGTGTCCAAA (配列番号 82)
SETD2-sg2	GACTATCAGTTCCAGAGATA (配列番号 83)
SETD2-sg3	AACTTACGAAGGAAGGTCTT (配列番号 84)
KDM1A-sg1	TTACCTTCGCCCCGCTTGCGC (配列番号 85)

【表 1 - 3】

KDM1A-sg2	CCGGCCCTACTGTCGTGCCT (配列番号 86)
KDM1A-sg3	AGAGCCGACTTCCTCATGAC (配列番号 87)
KDM1B-sg1	CATACCGCATCGATAAGTCT (配列番号 88)
KDM1B-sg2	ATAGCCAAGACTTATCGATG (配列番号 89)
KDM1B-sg3	GAACATACCTTCTGTAGTAA (配列番号 90)
KDM2A-sg1	ACGCTACTATGAGACCCAG (配列番号 91)
KDM2A-sg2	TATGGCAGGGAGTCGTCGCA (配列番号 92)
KDM2A-sg3	GTAACGAATCCTTTCTTCTT (配列番号 93)
KDM2B-sg1	CCTCGTTCTCGTCGTATCGC (配列番号 94)
KDM2B-sg2	GCGTTACTACGAGACGCCCCG (配列番号 95)
KDM2B-sg3	CTTGGTCAAGCGTCCGACTG (配列番号 96)
KDM3A-sg1	TAAATGCCGAGAGTGTGCT (配列番号 97)
KDM3A-sg2	GTCTGTCAAAACCGACTTCC (配列番号 98)
KDM3A-sg3	GATACTGCTTGGCTGTACTG (配列番号 99)
KDM3B-sg1	TCTTGATGCGCGCCCCGTG (配列番号 100)
KDM3B-sg2	GCCTTGACTGTTACCGGCTC (配列番号 101)
KDM3B-sg3	TCCTGAGCCGGTAACAGTCA (配列番号 102)
KDM4A-sg1	ACTCCGCACAGTTAAAACCA (配列番号 103)
KDM4A-sg2	GCGGAAGTCTCGAACAGTCA (配列番号 104)
KDM4A-sg3	TTCCACTCACTTATCGCTAT (配列番号 105)
KDM4B-sg1	CCCCGCGTACTTCTCGCTGT (配列番号 106)
KDM4B-sg2	GTATGATGACATCGACGACG (配列番号 107)
KDM4B-sg3	TCACCAGGTACTGTACCCCG (配列番号 108)
KDM4C-sg1	CCTTTGCAAGACCCGCACGA (配列番号 109)
KDM4C-sg2	AGTAGGCTTCGTGTGATCAA (配列番号 110)
KDM4C-sg3	GTCTAAAGGAGCCCATCGTG (配列番号 111)
KDM5A-sg1	CATGAACCCCAACGTGCTAA (配列番号 112)
KDM5A-sg2	CTGGGATTCAAATAACTCGG (配列番号 113)
KDM5A-sg3	TCTCTGGTATGAAAGTGCCG (配列番号 114)
KDM5B-sg1	GTCCGCGAACTCTTCCCAGC (配列番号 115)
KDM5B-sg2	TCGAAGACCGGGCACTCGGG (配列番号 116)
KDM5B-sg3	GGACTTATTTTCAGCTTAATA (配列番号 117)
KDM5C-sg1	CTTACCGCCATGACACACTT (配列番号 118)
KDM5C-sg2	GATAAACAATGCGTTCGTAG (配列番号 119)
KDM5C-sg3	GGGCTACCCGAGCCCACCGA (配列番号 120)
KDM5D-sg1	GATTTACTCCTCGCGTCCAA (配列番号 121)
KDM5D-sg2	AAAGACTTACCGCGGGTGGG (配列番号 122)
KDM5D-sg3	TAAGGCCCGACATGGAACCG (配列番号 123)
KDM6A-sg1	ACTGTAAACTGTAGTACCTC (配列番号 124)
KDM6A-sg2	CAGCATTATCTGCATACCAG (配列番号 125)
KDM6A-sg3	AGACTATGAGTCTAGTTTAA (配列番号 126)
KDM6B-sg1	TACCACAGCGCCCTTCGATA (配列番号 127)
KDM6B-sg2	ATCCCCCTCCTCGTAGCGCA (配列番号 128)
KDM6B-sg3	CAAAGGCTTCCCGTGCAGCG (配列番号 129)
PHF2-sg1	TTCTGCACGGGCTTGACGTC (配列番号 130)

10

20

30

40

【表 1 - 4】

PHF2-sg2	GACGTCAAGCCCCGTGCAGAA (配列番号 131)
PHF2-sg3	CAGTGACGTGCGAGAACTACG (配列番号 132)
PHF8-sg1	TCTGACGAACGTAGGGCTCC (配列番号 133)
PHF8-sg2	GGCTTAGTGAAAAAACGCCG (配列番号 134)
PHF8-sg3	CCTCGCCATCATTCCTGTG (配列番号 135)
BMI1-sg1	AACGTGTATTGTTCTGTTACC (配列番号 136)
BMI1-sg2	TCCTACCTTATATTCTAGTAG (配列番号 137)
BMI1-sg3	AAAGGTTTACCATCAGCAGA (配列番号 138)
BRD1-sg1	CACCGTGTCTCTATAGAGCCG (配列番号 139)
BRD1-sg2	CGGCGCGAGGTGGACAGCAT (配列番号 140)
BRD1-sg3	CGACTCACCGGCTGCGATCC (配列番号 141)
BRD3-sg1	CGACGTGACGTTTGCAGTGA (配列番号 142)
BRD3-sg2	CAAAGGTCGGAAGCCGGCTG (配列番号 143)
BRD3-sg3	CATCACTGCAAACGTCACGT (配列番号 144)
BRD4-sg1	ACTAGCATGTCTGCGGAGAG (配列番号 145)
BRD4-sg2	TCTAGTCCATCCCCATTAC (配列番号 146)
BRD4-sg3	GGGAACAATAAAGAAGCGCT (配列番号 147)
ING1-sg1	GAGATCGACGCGAAATACCA (配列番号 148)
ING1-sg2	TATAAATCCGCGCCCGAAAG (配列番号 149)
ING1-sg3	CCCATACCAGTTATTGCGCT (配列番号 150)
ING2-sg1	GCAGCAGCAACTGTACTCGT (配列番号 151)
ING2-sg2	GCAGCGACTCCACGCACTCA (配列番号 152)
ING2-sg3	GATCTTCAAGAAGACCCCGC (配列番号 153)
ING3-sg1	TCTCGCGCATTTCCGTGAAG (配列番号 154)
ING3-sg2	CTTCACGGAAATGCGCGAGA (配列番号 155)
ING3-sg3	TCGATACTGCATTTGTAATC (配列番号 156)
ING4-sg1	GCTGCTCGTGCTCGTTCCAA (配列番号 157)
ING4-sg2	CCTAGAAGGCCGACTCAAA (配列番号 158)
ING4-sg3	GGCACTACTCATATACTCAG (配列番号 159)
ING5-sg1	GATCTGCTTCAAAGCGCGCC (配列番号 160)
ING5-sg2	CTTCCAGCTGATGCGAGAGC (配列番号 161)
ING5-sg3	GAAGTTCCTCTGAAGTTCGC (配列番号 162)

【0118】

これらの50のエピジェネティック遺伝子の発現を、OVCAR8-ADR細胞でqRT-PCRを用いて評価した。2ワイズ（153×153個のsgRNA=23,409個の全組合わせ）のプールしたバーコードgRNAライブラリーを、CombiGEM法を用いて生成した。レンチウイルスプールを生成して、ライブラリーをOVCAR8-ADR-Cas9細胞に送達した。プールした細胞集団からのゲノムDNAの単離を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるバイアスなしの（unbiased）バーコード増幅のために実施した。大腸菌に保存されたプラスミドプールおよび感染したヒト細胞プールにおける、個々のバーコード化組合わせの表示を、Illumina HiSeqシーケンシングを用いて定量した（図3A～3D）。2ワイズライブラリーのほぼ完全なカバレッジが、プラスミドおよび感染細胞プールの両方で、試料当たり約2300万～3400万のリードで達成され（図3B）、バーコード化gRNA組合わせの比較的均一な分布が観察された（図3Aおよび3B）。さらに、プラスミドプー

10

20

30

40

50

ルおよび感染細胞プールにおけるバーコード表示の間の高い相関（図 3 C）と、感染細胞プールについての生物学的複製において表されるバーコードの高い再現性があった（図 3 D）。このように、CombiGEM-CRISPRを用いて、バーコード化コンビナトリアル gRNA ライブラリーを効率的にアセンブルしてヒト細胞に送達することが可能である。

【0119】

OVCAR8-ADR-Cas9細胞における内在性遺伝子を編集する gRNA の機能を確認するために、Surveyorアッセイを行って、ライブラリーからの gRNA に標的化された 8 つの無作為に選択された遺伝子座における、切断効率を推定した。1. 9%~26.2%の範囲の挿入欠失生成効率が、感染後 12 日目に観察された（図 7 A~7 C）。感染後 12 日目の gRNA 標的遺伝子座全てについて、DNA ミスマッチの切断が検出された（図 7 A および 8 A）。同時切断効率は、本発明者らの二重 gRNA システムにおいて、複数の遺伝子座で決定され、個々の gRNA または二重 gRNA を発現する細胞において、匹敵するレベルの切断が観察された（図 7 A および 8 A）。個々の gRNA および二重 gRNA の発現細胞における、標的タンパク質レベルの枯渇も検出された（図 8 B）。これらの結果は、多重化システムが gRNA の活性を妨げないことを示した。単一細胞内の二重 gRNA によって指向された二重切断事象を、感染集団全体から区別するために、二重 gRNA に感染した単一細胞由来のクローンを単離し、両方の標的ゲノム遺伝子座に挿入、欠失または突然変異を有する細胞を Sanger シーケンシングで検出した（図 9 A および 9 B）。

【0120】

挿入欠失生成効率は、標的ゲノム遺伝子座でディープシーケンシングを行うことによって推定された。異なる gRNA の間で、挿入欠失を生成する速度の大きな変動（すなわち、14~93%；図 16 A）およびフレームシフト変異（すなわち、すべての挿入欠失のうち 52~95%；図 16 B）が観察された。さらに、A375メラノーマ細胞を用いた前の研究（Shalem et al. 2014 Science 343:84-7）で確認された gRNA は、OVCAR8-ADR-Cas9細胞において、活性の低下（例えば、NF1-sg4 および MED12-sg1 s gRNA について）および差別的な挿入欠失生成の選好（例えば、NF1-sg1 s gRNA について）を示した（図 16 C）。かかる相違は部分的に、標的遺伝子座でのクロマチン接近可能性の変化（Wu et al. (2014) Nat. Biotechnol. 32: 670-6）および細胞型の間で異なり得る DNA 破損修復機構（Ghezraoui et al (2014) Mol Cell 55:829-42）による可能性がある。オンターゲット切断速度の改善（Donesch et al (2014) Nat Biotechnol 32:1262-7）およびオフターゲット切断の最小化を含む、gRNA 設計最適化における継続的な努力は、広範囲の細胞型における大規模な遺伝子摂動スクリーニングへのそれらの適用性を改善する、より効率的な gRNA セットの作製を可能にするはずである。挿入欠失生成を、gRNA により多重化システムにおいてさらに評価した。ディープシーケンシング分析により、s gRNA または二重 gRNA システムの下で発現された同一の gRNA について、ほぼ同程度の挿入欠失生成頻度および選好が検出された（図 16 D）。単一細胞内の二重 gRNA によって指向される二重切断事象を、集団全体に分布する切断事象から区別するために、二重 gRNA 構築物に感染した単一細胞に由来するクローンを単離した。標的とされた両方のゲノム遺伝子座における挿入、欠失、または突然変異を有する細胞が検出された（図 9 A~9 C；表 6）。本発明者らの結果は、CombiGEM コンビナトリアル gRNA ライブラリーが、OVCAR8-ADR-Cas9細胞において二重遺伝子変異体を生成するために使用できることを示す。

【0121】

OVCAR8-ADR-Cas9細胞を用いたプールされたコンビナトリアル遺伝子スクリーニングを開始して、癌細胞の増殖を調節する gRNA の組合わせを同定した。数学的モデルを構築し、ある集団内の各ライブラリーメンバーの存在量の相対的变化が、様々なパラメータにどのように依存するかを示した（下の方法の節を参照；図 17 A および 17 B）。異なる gRNA の組合わせを有する異種亜集団を含む集団をシミュレートした。具体的には、全集団の特定のパーセンテージは、シミュレーションの開始時に、抗増殖性（ f_s ）および増殖促進性（ f_f ）gRNA の組合わせを有する亜集団を含むと定義された。各亜集団内

では、細胞の一部は、シミュレーションの開始時にCRISPR-Cas9システム（p）により突然変異させられ、倍化時間が改変された（ $T_{\text{doubling}, m}$ ）。このモデルは、全細胞集団において抗増殖性gRNAセットを有するバーコード化細胞の表示が、シミュレーション条件下（すなわち、 f_s および $f_f = 2, 5$ 、または 10% ； $p = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8$ または 1.0 ； $T_{\text{doubling}, m} = 36, 48$ 、または 60 時間）で、約 $23 \sim 97\%$ 枯渇され得ることを示す（図17B）。一般に、突然変異効率の増加、抗増殖性細胞の倍加時間の増加、増殖促進性細胞の倍加時間の減少、ならびに集団中の増殖促進性の組合わせの割合の増加（図17C）は、全集団における抗増殖性バーコードの、より大きなバーコード枯渇をもたらすことが予想される。

【0122】

実験的スクリーニングにおいて、癌細胞の増殖を調節するgRNAの組合わせを同定するために、2ワイズコンビナトリアルgRNAライブラリーに感染したOVCAR8-ADR-Cas9細胞集団を15日および20日間培養し、次いでゲノムDNAを細胞から単離し、組み込まれたバーコードについてバイアスなしの増幅および定量化に供した（図4A、10Aおよび10B）。20日と15日の群の間のバーコード存在量（百万回のリード当たりで正規化）を比較して、 $\log_2$ （バーコードカウント比）値を得た（図4A、10Aおよび10B）。細胞増殖を阻害するガイドRNAの組合わせは、負の $\log_2$ 比をもたらすと予想され、一方、成長利点を与えられた細胞は、正の $\log_2$ 比を有すると予想された。変動性を低減するために、15日群の ~ 100 未満の絶対リードを有する組合わせを除外し、各gRNA対（すなわち、sgRNA-A + sgRNA-BおよびsgRNA-B + sgRNA-A）の2つの潜在的配列の $\log_2$ 比を平均した（図11）。各gRNA組合わせの $\log_2$ 比を、2つの生物学的複製について決定し、ランク付けした（図5Bおよび12A）。大部分のgRNAの組合わせは、15日群と20日群の間にバーコード表示に有意な変化を示さず、これには内部対照として、ヒトゲノムにオンターゲット遺伝子座を有さない、GeCKOv2ライブラリー（Shalem et al (2014) Science 343: 84-7）からの3つの対照gRNAを含む。61のgRNAの組合わせは、両方の生物学的複製物においてかなりの抗増殖効果（ $\log_2$ 比 < -0.90 ）を示し（Q値 < 0.01 、表2および図12B）、癌細胞の増殖を抑制する能力についてさらに検討するための遺伝子の潜在的なセットをもたらした。

【0123】

10

20

30

【表 2 - 1】

表2: プールされたスクリーニングに基づく、
OVCAR8-ADR細胞増殖を阻害する2ワイズsgRNAヒット

sgRNA-A	sgRNA-B	Log ₂ 比 20日／15日 複製1	Log ₂ 比 20日／15日 複製2	Zスコア 複製1	Zスコア 複製2	Q値
BRD4_sg3	MLL_sg3	-2.61	-3.32	-8.45	-10.72	7.01E-33
BMI1_sg2	HDAC2_sg3	-3.91	-1.93	-12.62	-6.29	3.41E-32
BMI1_sg2	KDM1B_sg3	-1.34	-3.71	-4.39	-11.99	1.20E-23
ING3_sg3	BMI1_sg1	-3.68	-1.11	-11.87	-3.64	4.57E-21
BRD4_sg3	KDM6A_sg2	-2.30	-2.20	-7.45	-7.15	1.52E-18
BRD4_sg3	PHF2_sg2	-1.57	-2.88	-5.12	-9.31	4.05E-18
BMI1_sg2	PRMT6_sg1	-2.80	-1.59	-9.05	-5.19	1.19E-17
ING3_sg2	KDM5A_sg2	-2.28	-2.04	-7.40	-6.65	3.48E-17
KDM5B_sg3	MLL_sg3	-3.17	-1.05	-10.23	-3.47	2.61E-16
KDM6A_sg3	KDM6A_sg2	-1.95	-2.26	-6.35	-7.33	2.61E-16
BRD4_sg3	KDM4C_sg1	-1.48	-2.28	-4.84	-7.40	7.88E-13
KDM6B_sg1	KDM3A_sg2	-0.98	-2.70	-3.23	-8.74	3.00E-12
ING3_sg3	KDM6A_sg2	-1.46	-2.10	-4.79	-6.81	2.02E-11
PRMT5_sg3	PRMT5_sg3	-1.54	-1.92	-5.04	-6.26	9.13E-11
BRD4_sg3	BRD4_sg2	-2.45	-1.00	-7.93	-3.30	1.24E-10
BMI1_sg2	NSD1_sg3	-2.19	-1.20	-7.13	-3.94	2.68E-10
BMI1_sg2	MBD2_sg3	-1.44	-1.93	-4.70	-6.27	3.94E-10
BMI1_sg2	KDM1A_sg1	-1.62	-1.40	-5.29	-4.59	5.85E-08
KDM3A_sg2	PRMT5_sg3	-1.28	-1.72	-4.21	-5.62	6.62E-08
BRD4_sg3	EP300_sg3	-1.28	-1.71	-4.22	-5.58	7.28E-08
BMI1_sg2	KDM3A_sg1	-1.47	-1.48	-4.79	-4.85	1.32E-07
BRD4_sg3	KDM6B_sg1	-1.20	-1.64	-3.94	-5.35	5.58E-07

【 0 1 2 4 】

【表 2 - 2】

PHF8_sg2	KDM1A_sg1	-1.11	-1.69	-3.65	-5.52	8.77E-07
KDM6A_sg3	HDAC2_sg3	-1.03	-1.77	-3.40	-5.77	8.77E-07
BRD4_sg3	KDM6B_sg2	-0.92	-1.86	-3.05	-6.05	1.13E-06
PRMT5_sg3	HDAC1_sg1	-1.26	-1.43	-4.15	-4.68	3.14E-06
PHF8_sg2	PRMT5_sg3	-1.60	-1.08	-5.23	-3.57	3.50E-06
BRD4_sg3	PHF2_sg1	-1.51	-1.13	-4.94	-3.71	5.35E-06
BRD4_sg3	EZH2_sg3	-1.02	-1.57	-3.38	-5.12	8.80E-06
PRMT5_sg3	EZH1_sg1	-0.96	-1.62	-3.19	-5.28	9.53E-06
KDM6A_sg2	KDM5A_sg2	-1.48	-1.04	-4.86	-3.44	1.72E-05
BRD4_sg3	KDM2B_sg2	-1.00	-1.49	-3.30	-4.88	2.59E-05
KDM6B_sg3	PRMT5_sg3	-1.03	-1.43	-3.41	-4.67	3.60E-05
BRD4_sg1	KDM6B_sg1	-1.30	-1.15	-4.27	-3.79	3.74E-05
KDM1A_sg3	PRMT5_sg3	-1.52	-0.91	-4.96	-3.01	4.81E-05
PRMT5_sg3	EP300_sg2	-1.41	-1.00	-4.61	-3.31	5.44E-05
BRD4_sg3	PRMT5_sg2	-1.46	-0.91	-4.79	-3.02	7.59E-05
KDM5D_sg2	MLL_sg3	-1.01	-1.34	-3.35	-4.40	9.28E-05
BRD4_sg3	PRMT5_sg3	-1.03	-1.33	-3.39	-4.35	9.28E-05
PHF2_sg1	PRMT5_sg3	-1.19	-1.13	-3.92	-3.71	1.32E-04
PRMT5_sg2	DNMT1_sg1	-1.28	-1.02	-4.21	-3.37	1.54E-04
KDM6A_sg2	KDM5C_sg1	-1.28	-1.01	-4.19	-3.34	1.73E-04
BMI1_sg2	KDM6A_sg2	-0.96	-1.30	-3.17	-4.25	2.47E-04
KDM1A_sg1	PRMT5_sg3	-0.95	-1.29	-3.15	-4.24	2.68E-04
BRD4_sg2	KDM2B_sg1	-1.06	-1.17	-3.51	-3.85	2.82E-04
KDM4A_sg2	PRMT5_sg3	-1.07	-1.16	-3.52	-3.81	3.18E-04
PRMT6_sg2	PRMT5_sg2	-1.02	-1.13	-3.37	-3.74	6.20E-04
KDM2B_sg3	PRMT5_sg3	-1.13	-1.01	-3.73	-3.34	6.95E-04
KDM6B_sg1	MLL_sg3	-0.92	-1.19	-3.05	-3.90	9.39E-04
BRD4_sg3	BMI1_sg2	-0.94	-1.14	-3.11	-3.76	1.10E-03
KDM5A_sg3	NSD1_sg3	-0.91	-1.14	-3.03	-3.75	1.37E-03
BRD4_sg3	KDM3A_sg2	-0.92	-1.13	-3.04	-3.74	1.37E-03
KDM6B_sg3	PRMT7_sg3	-1.11	-0.90	-3.65	-3.00	1.85E-03
BRD3_sg3	KDM4C_sg1	-0.99	-1.01	-3.27	-3.33	2.13E-03
KDM4C_sg1	PRMT5_sg3	-0.93	-1.06	-3.08	-3.51	2.15E-03
KDM3B_sg1	PRMT5_sg3	-1.00	-0.99	-3.31	-3.28	2.15E-03
PRMT5_sg2	MBD1_sg1	-0.94	-1.04	-3.11	-3.42	2.47E-03
EP300_sg3	MBD1_sg3	-0.92	-1.03	-3.05	-3.41	2.93E-03
ING3_sg1	BRD4_sg3	-0.99	-0.96	-3.28	-3.17	2.93E-03
KDM1A_sg1	HDAC2_sg3	-0.94	-0.95	-3.12	-3.14	4.71E-03
PRMT5_sg2	CARM1_sg1	-0.95	-0.91	-3.14	-3.02	5.78E-03

【 0 1 2 5 】

スクリーニングからのヒットの確認を、OVCAR8-ADR-Cas9細胞の増殖を阻害する g R N A 対の能力（すなわち、5日以内に約33%）を、レンチウイルスを介して送達された対応する g R N A 対を用いて、個々の（プールされていない）細胞増殖アッセイにおいて評

10

20

30

40

50

価することにより、実施した（図4C）。プールされたスクリーニングから集められたデータと、個々の確認アッセイからのデータの間には、高い一貫性があった（図13）。まとめると、本明細書に記載の方法は、卵巢癌細胞に対して抗増殖効果を発揮することができるバーコード化コンビナトリアル gRNA の体系的スクリーニングのための、実験的パイプラインを提供する。

【0126】

エピジェネティック遺伝子を標的とする多くの gRNA は、他のエピジェネティック遺伝子標的化 gRNA と組み合わせて用いると、対照 gRNA と組み合わせて使用した場合に比べて、より強い抗増殖効果を示した（図4Bおよび12A）。

gRNA のオフターゲット活性を、ディープシーケンシングにより評価したところ、CRISPR設計および2つの gRNA の CCTop ツールによって計算上予測されたすべてのエクソンオフターゲットゲノム座位で、低い挿入欠失生成率（すなわち 0.15 ~ 0.38%）が明らかになった（図19）。まとめると、卵巢癌細胞に対して抗増殖効果を発揮することができるバーコード化コンビナトリアル gRNA の体系的スクリーニングのための実験パイプラインが確立され、確認された。

【0127】

gRNA 対が確認アッセイにより確認され（図5Aおよび8）、KDM4CおよびBRD4を標的とする shRNA 対（図5Bおよび14）は同時に、ガン細胞増殖の相乗的減少をもたらした。さらに、小分子KDM4C阻害剤SD70（Jin, et al. PNAS (2014) 111:9235-9240）および小分子BRD4阻害剤JQ1（Asangani, et al. Nature (2014) 510:278-282）（図5C）は、OVCAR8-ADR細胞の増殖を相乗的に阻害した。同様に、KDM6BとBRD4を同時に標的とする gRNA 対（図5Aおよび8）および shRNA 対（図5Bおよび14）は、KDM6B/6A阻害剤GSK-J4（Kruidenier, et al. Nature(2012)488:404-408）とJQ1の同時処置の場合のように、相乗作用を示した（図5D）。小分子薬物のこれらのペアワイズの組み合わせの両方の間の相乗効果が、Blissの独立性モデル（Bliss Ann. Appl. Biol. (1939)6:585-615）および最高単一薬剤モデル（Borisy, et al. PNAS (2003) 100: 7977-7982）の両方によって、確認された（図5Cおよび5D）。

【0128】

本明細書に記載の方法は、癌細胞の増殖を阻害する新規エピジェネティック標的遺伝子対の同定および、相乗的薬物療法の潜在的開発を可能にする。この方法はまた、CRISPR-Cas9に基づくシステムの有用性を、ハイスループット容量で全身多重化遺伝子摂動スクリーニングを実施するために拡大する。

これらの方法はまた、観察された表現型の基礎となるメカニズムの研究など、生物学的調査の新しい分野の特定にも役立ち得る。例えば、遺伝子発現パターンを、KDM4CとBRD4、またはKDM6BとBRD4の両方を標的とする gRNA をコードするレンチウイルスに感染させた細胞集団において、評価した（図21A）。有意に摂動された遺伝子は、TNF α /NF κ Bシグナル伝達、p53経路、およびアポトーシスを含む癌関連経路に関与する遺伝子セットと関連していた（図21B）。さらに、エピジェネティックな摂動のコンビナトリアル効果は複雑であり、異なる細胞型に応じて変化し得る（図22Aおよび22B）。

【0129】

方法

ベクター構築

ベクターを、制限酵素消化、ライゲーション、PCR、およびギブソンアセンブリを含む標準的な分子クローニング技術を用いて構築した（表3）。カスタムオリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologiesから購入した。ベクター構築物を大腸菌DH5 α 株に形質転換し、50 μ g/mlのカルベニシリン（Teknova）を用いて構築物を保有するコロニーを単離した。Plasmid MiniまたはMidiキット（Qiagen）を用いて、DNAを抽出および精製した。ベクター構築物の配列を、Genewiz DNAシーケンシングサービスで確認した。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

【 表 3 - 1 】

表3:構築物

構築物ID	デザイン
pAWp28	pBT264-U6p-{2xBbsI}-sgRNA 足場 -{MfeI}
pAWp28-1	pBT264-U6p-GFP-sg1
pAWp28-2	pBT264-U6p-RFP-sg1
pAWp28-3	pBT264-U6p-RFP-sg2
pAWp28-4	pBT264-U6p-KDM4C-sg1
pAWp28-5	pBT264-U6p-PHF2-sg1
pAWp28-6	pBT264-U6p-KDM6B-sg2
pAWp28-7	pBT264-U6p-PHF2-sg2
pAWp28-8	pBT264-U6p-DNMT1-sg1
pAWp28-9	pBT264-U6p-DNMT3B-sg1
pAWp28-10	pBT264-U6p-PRMT2-sg3
pAWp28-11	pBT264-U6p-HDAC2-sg1
pAWp28-12	pBT264-U6p-ING4-sg1
pAWp28-13	pBT264-U6p-KDM1B-sg3
pAWp28-14	pBT264-U6p-KDM2A-sg3
pAWp28-15	pBT264-U6p-PRMT6-sg1
pAWp28-16	pBT264-U6p-BMI1-sg2
pAWp28-17	pBT264-U6p-PHF8-sg2
pAWp9	pFUGW-UBCp- <i>RFP</i> -CMVp- <i>GFP</i> -{BamHI+EcoRI}
pAWp9-1	pFUGW-UBCp- <i>RFP</i> -CMVp- <i>GFP</i> -U6p-GFP-sg1
pAWp9-2	pFUGW-UBCp- <i>RFP</i> -CMVp- <i>GFP</i> -U6p-RFP-sg1
pAWp9-3	pFUGW-UBCp- <i>RFP</i> -CMVp- <i>GFP</i> -U6p-RFP-sg2
pAWp9-4	pFUGW-UBCp- <i>RFP</i> -CMVp- <i>GFP</i> -U6p-RFP-sg1-U6p-GFP-sg1
pAWp9-5	pFUGW-UBCp- <i>RFP</i> -CMVp- <i>GFP</i> -U6p-RFP-sg2-U6p-GFP-sg1

【 0 1 3 1 】

10

20

30

【表 3 - 2】

pAWp11	pFUGW-CMVp
pAWp12	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i>
pAWp12-1	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-BRD4-sg3]-[U6p-PHF2-sg1]
pAWp12-2	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-BRD4-sg3]-[U6p-KDM6B-sg2]
pAWp12-3	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-BRD4-sg3]-[U6p-KDM4C-sg1]
pAWp12-4	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-BRD4-sg3]-[U6p-PHF2-sg2]
pAWp12-5	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-BRD4-sg3]
pAWp12-6	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-KDM4C-sg1]
pAWp12-7	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-KDM6B-sg2]
pAWp12-8	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-DNMT1-sg1]
pAWp12-9	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-DNMT3B-sg1]
pAWp12-10	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-PRMT2-sg3]
pAWp12-11	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-HDAC2-sg1]
pAWp12-12	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-ING4-sg1]
pAWp12-13	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-KDM1B-sg3]
pAWp12-14	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-KDM2A-sg3]
pAWp12-15	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-PRMT6-sg1]
pAWp12-16	pFUGW-CMVp- <i>GFP</i> -[U6p-BMI1-sg2]-[U6p-PHF8-sg2]
pAWp21	pLKO.1-Control sh
pAWp21-1	pLKO.1-KDM4C-sh1
pAWp21-2	pLKO.1-KDM4C-sh2
pAWp21-3	pLKO.1-KDM6B-sh
pAWp21-4	pLKO.1-BRD4-sh1
pAWp21-5	pLKO.1-BRD4-sh2
pAWp30	pFUGW-EFSp- <i>Cas9-P2A-Zeo</i>

10

20

30

【0132】

特定の遺伝子を標的とする shRNA をコードするレンチウイルスベクターを生成するために、センス配列およびアンチセンス配列を有するオリゴヌクレオチド対を合成し、アニールし、AgeI および EcoRI で消化した pLKO.1 ベクター 29 (Addgene プラスミド #10879) にライゲーションによりクローニングした。shRNA センス配列およびアンチセンス配列は、siRNA Selection Program (sirna.wi.mit.edu/) に基づいて設計および構築した (表 4)。

【0133】

40

【表 4】

表4:個々のバリデーションアッセイに使用したshRNAアンチセンス配列

shRNA ID	shRNA アンチセンス配列
対照 -sh	CGAGGGCGACTTAACCTTAGG (配列番号 163)
KDM4C-sh1	AAATCTTCGTAATCCAAGTAT (配列番号 164)
KDM4C-sh2	GTAATACCGGGTGTTCGATG (配列番号 165)
KDM6B-sh	ATTAATCCACACGAGGTCTCC (配列番号 166)
BRD4-sh1	TATAGTAATCAGGGAGGTTCA (配列番号 167)
BRD4-sh2	TTTAGACTTGATTGTGCTCAT (配列番号 168)

【0134】

C a s 9 タンパク質および選択マーカーとしてゼオシン (Zeocin) 耐性をコードする pAWp30 レンチウイルス発現ベクターを生成するために、EFS プロモーターおよび C a s 9 配列を Adgene プラスミド #49535 から増幅し、一方ゼオシン配列は、Adgene プラスミド #25736 から、Phusion D N A ポリメラーゼ (New England Biolabs) を用いた P C R により増幅した。P C R 産物を、pAWp11 レンチウイルスベクター骨格に、Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs) を用いてクローニングした。

【0135】

特定の遺伝子を標的とする s g R N A の、U 6 プロモーター (U 6 p) 駆動発現を含む保存ベクターを構築するために、20 b p の s g R N A 標的配列を有するオリゴ対を合成し、アニールし、BbsI 消化した pAWp28 ベクターに T 4 リガーゼ (New England Biolabs) を用いてクローニングした。単一またはコンビナトリアル s g R N A (単数または複数) の U 6 p 駆動発現のためのレンチウイルスベクターを構築するために、保存ベクターを BgIII および MfeI 酵素 (Thermo Scientific) で消化して U 6 p - s g R N A 発現カセットを調製し、これを pAWp12 ベクター骨格または単一 s g R N A 発現ベクターに、それぞれ、ベクターを BamHI および EcoRI 酵素 (Thermo Scientific) で消化することによって生成された適合性粘着末端を介したライゲーションを用いて、挿入した。二重 R F P および G F P 蛍光タンパク質レポーターと共に s g R N A を発現させるために、U 6 p 駆動 s g R N A 発現カセットを、上記と同じ戦略を用いて pAWp12 の代わりに pAWp9 レンチウイルスベクター骨格に挿入した。pAWp9 ベクターは、pAWp7 ベクター骨格から、ユニークな BamHI および EcoRI 部位をベクターに導入して U 6 p - s g R N A 発現カセットの挿入を可能にすることにより、改変した。

【0136】

バーコード化コンビナトリアル s g R N A ライブラリープールのアセンブリ

バーコード化 s g R N A 配列を有する 153 のオリゴ対 (オリゴ F - (x) およびオリゴ R - (x)、ここで $x = 1 \sim 153$) を合成し、アニールして、20 b p の s g R N A 標的配列、2 つの BbsI 制限部位、各 s g R N A にユニークであるが少なくとも 2 つの塩基によって互いに異なる 8 b p のバーコード、およびその末端に 5' オーバーハングを有する、二本鎖挿入物を生成した。プールされた保存ベクターライブラリーを生成するために、153 個のアニールされた挿入物を等しい比率で混合し、適合末端を介したワンポットのライゲーション反応を介して、pAWp28 保存ベクター (BbsI および MfeI で消化) にクローニングした。バーコード化 s g R N A ライブラリーを構築するために、別のワンポットライゲーション反応を、BbsI で消化されプールされた保存ベクターライブラリーと、オリゴ対 S 1 および S 2 の合成およびアニールによって調製された、s g R N A 足場配列、BamHI および EcoRI 制限部位、およびその末端の 5' オーバーハングを含む挿入物とを用いて行った。プールされた保存ベクターおよびバーコード化 s g R N A ライブラリーは両方とも Endura コンピテント細胞 (Lucigen) において調製され、Plasmid Midi キット (Qiagen) によって精製された。

【0137】

単一またはコンビナトリアル g R N A を有するプールされたレンチウイルスベクターライブラリーを、上記の単一およびコンビナトリアル s g R N A 構築物の生成と同じ戦略で、ただし、アセンブリを、個別のものの代わりにプールされた挿入物およびベクターを用いて、構築した。簡単に説明すると、プールされた U 6 p - s g R N A 挿入物は、プールされた保存ベクターライブラリーの BglII および MfeI によるワンポット消化によって生成された。デスティネーションレンチウイルスベクター (pAWp12) を BamHI および EcoRI で消化した。消化された挿入物およびベクターを、それらの適合末端 (すなわち、BamHI + BglII および EcoRI + MfeI) を介してライゲートして、プールされた 1 ワイズ s g R N A ライブラリー (153 個の s g R N A) をレンチウイルスベクター中に作製した。1 ワイズ s g R N A ベクターライブラリーを再び BamHI および EcoRI で消化し、同じ U 6 p - s g R N A 挿入物プールにライゲートして、2 ワイズ s g R N A ライブラリーをアセンブルした (153 × 153 の s g R N A = 合計 23,409 個の組み合わせ)。プールされたアセンブリ工程の後、s g R N A はベクター構築物の一端に局在化され、それらのそれぞれのバーコードは他端で連結された。レンチウイルス s g R N A ライブラリープールを XL10-Gold ウルトラコンピテント細胞 (Agilent Technologies) に調製し、Plasmid Midi キット (Qiagen) で精製した。

【0138】

細胞培養

HEK293T 細胞を ATC から入手し、10% 熱不活性化ウシ胎仔血清および 1X 抗生物質-抗真菌剤 (Life Technologies) を添加した DMEM 中、37°C、5% CO₂ で培養した。OVCAR8-ADR 細胞は、T.Ochiya (日本国立がんセンター研究所) からのギフトであった。OVCAR8-ADR 細胞の同一性は認証された (Genetica DNA Laboratories)。Cas9 タンパク質を安定に発現する OVCAR8-ADR 細胞 (OVCAR-ADR-Cas9) を、OVCAR8-ADR 細胞を pAWp30 ベクターでレンチウイルス感染させることにより生成し、200 μg/ml の Zeocin (Life Technologies) の存在下で 3 週間選択した。OVCAR8-ADR および OVCAR8-ADR-Cas9 細胞を、10% 熱不活性化ウシ胎仔血清および 1X 抗生物質抗真菌剤を添加した RPMI 中、37°C、5% CO₂ で培養した。薬物処理については、細胞生存率アッセイの前に、SD70 (Xcessbio #M60194)、GSK-J4 (Cayman Chemical #12073)、および/または (+) -JQ1 (Cayman Chemical #11187) を指定された薬物用量で用いて、OVCAR8-ADR 細胞を処理した。

【0139】

レンチウイルスの生成と形質導入

レンチウイルスを生成し、6 ウェルのフォーマットで HEK293T 細胞にパッケージングした。HEK293T 細胞を、トランスフェクション前に約 70% のコンフルエンスに維持した。FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Promega) を、100 μl の OptiMEM 培地 (Life Technologies) 中の 0.5 μg のレンチウイルスベクター、1 μg の pCMV-dR8.2-dvpr ベクター、および 0.5 μg の pCMV-VSV-G ベクターと混合し、細胞培養物に添加する前に、室温で 15 分間インキュベートした。培養培地を翌日交換した。新たに生成されたウイルスを含む上清を、トランスフェクションの 48 時間後および 96 時間後に回収し、0.45 μm ポリエーテルスルホン膜 (Pall) で濾過した。500 μl の濾過したウイルス上清を使用して、8 μg/ml のポリブレン (Sigma) の存在下で 250,000 個の細胞を一晩感染させ、個々のベクター構築物を形質導入した。スクリーニングに用いるプールされたレンチウイルスライブラリー生成のために、レンチウイルス生成および形質導入を、同じ実験手順を用いてスケールアップした。濾過したウイルス上清を、Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit (Millipore) を用いて濃縮した。細胞を、8 μg/ml ポリブレンの存在下で、0.3~0.5 の感染多重度で感染させて、多くの細胞での単一コピーの組込みを確実にし、これは、30~40% の感染効率に相当した。スクリーニングで使用された細胞の総数は、ライブラリーのカバレッジを維持し、レンチウイルスのゲノムへのランダムな組込みに起因する偽性効果を低減するために、ライブラリーのサイズより約 300 倍多かった。細胞培養培地を、感染の翌日に交換し、実験の前に示された時間培養した

。

【0140】

バーコードシーケンシングのための試料の調製

バーコードシーケンシングのため試料を培養細胞から調製するために、ゲノムDNAの抽出および調製を、DNeasy Blood & Tissueキット(Qiagen)を製造業者のプロトコルに従って用いて実施した。バーコード化sgRNAプラスミドライブラリーについては、大腸菌に形質転換されたプラスミドDNAをPlasmid Midiキット(Qiagen)を用いて抽出した。DNA濃度は、Quant-iT PicoGreen dsDNAアッセイキット(Life Technologies)を用いて決定した。

【0141】

プールされたベクターおよび感染細胞ライブラリー内の、各組合わせを表すユニークなバーコードを含有する約360bpの断片を、プラスミド/ゲノムDNA試料から、Kapa Hotstart Ready Mix(Kapa Biosystems)を用いてPCR増幅した。プラスミドDNAについては、1ngのDNA鋳型を25μlのPCR反応のために添加した。ゲノムDNAについては、800ngのDNAを50μlのPCR反応のために添加し、各ゲノムDNA試料について合計64回のPCR反応を実施して、増幅される細胞ゲノムの数が、ライブラリーサイズの100倍を超えることを確実にした。さらに、PCRパラメータを最適化して、PCRバイアスを避けるために、PCR増幅工程を指数期に維持することを確実にした。Illuminaアンカー配列および8塩基対のインデックスバーコードを、多重シーケンシングのためのPCRの間に加えた。バーコード配列を増幅するために使用するプライマー対配列は：5'-AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACGGATCCGCAACGGGAATTTC-3'(配列番号1)および5'-CAAGCAGAAAGACGGCATACGAGATNNNNNNNNNGGTTGCGTCAGCAAAACACAG-3'(配列番号2)であり、ここでNNNNNNNNNNは、各実験試料に割り当てられた特定のインデックスバーコードを示す。

【0142】

次いで、バーコード配列を含むPCR産物を、断片サイズに基づき、1.5%アガロースゲルで泳動させることにより精製し、さらにQIAquick Gel Extractionキット(Qiagen)を用いて抽出した。PCR産物濃度は、KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix(Kapa Biosystems)およびIllumina Library Quantificationキット(Kapa Biosystems)を用いた定量PCRにより決定した。定量PCRに用いたフォワードプライマーおよびリバースプライマーは、それぞれ、5'-AATGATACGGCGACCAACCGAG-3'(配列番号3)および5'-CAAGCAGAAAGACGGCATACGAG-3'(配列番号4)であった。次に、異なる試料からのPCR産物を、試料多重シーケンシングのために所望の比率でプールし、CombiGEMバーコードプライマー(5'-CCACCGAGATCTACACGGATCCGCAACGGGAATTTC-3'(配列番号5))およびインデックスバーコードプライマー(5'-GTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTCTGACGCAACC-3'(配列番号6))を有するIllumina HiSeqシステムにロードした。

【0143】

バーコードシーケンシングデータ解析

各sgRNA組合わせについてのバーコードリードは、Illuminaシーケンシングデータから処理した。各組合わせを表すバーコードリードは、バーコードをインデックス化することによって分類した各試料について百万回のリードごとに正規化した。細胞増殖の尺度として、20日目と15日目の群を比較した、正規化されたバーコードリードのバーコードカウント比を、倍率変化として計算した。増殖促進表現型および抗増殖表現型はそれぞれ、 >1 および <1 の正規化バーコードリードの倍率変化を有したが、表現型の変化は倍率変化 $=1$ をもたらさなかった。15日目の、 ~ 100 未満の絶対リードを与えたバーコードは、データの信頼性向上のためにフィルタリングして除去した。各同一のsgRNA組合わせの異なる可能な次数の倍率変化を平均すると、倍率変化における高い一貫性が観

10

20

30

40

50

察された（すなわち、82%および95%を超える組合わせについて、それぞれ変動係数（CV）＜0.2および＜0.4）（図11）。計算された倍率変化を対数変換して、 $\log_2$ 比を得た。同じレンチウイルスライブラリーの独立した感染を有する2つの生物学的複製で、スクリーニングを行った。組合わせを $\log_2$ 比により、全実験条件にわたってランク付けした。トップヒット（白丸）のセットは、両方の生物学的複製において対照sgRNA（白抜きの三角形）のみを有するsgRNAの組合わせの平均から少なくとも3標準偏差である $\log_2$ 比を有するものとして、定義した（図4B、12A、および12B）。

【0144】

細胞生存率アッセイ

MTT比色アッセイを実施して、細胞生存率を評価した。96ウェルごとに、100 μ lのMTT（3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド）溶液（Sigma）を細胞培養物に添加した。細胞を、37℃、5%CO₂で3時間インキュベートした。生存細胞は、可溶性MTT塩を不溶性青ホルマザン結晶に変換する。ホルマザン結晶を100 μ lの可溶化緩衝液で37℃で溶解した。570nmおよび650nm（参照）の光学濃度（OD）での吸光度読み取りを、Synergy H1マイクロプレートリーダー（BioTek）を用いて測定した。

【0145】

薬物相乗効果の定量化

Bliss独立（BI）モデル（Bliss Ann. Appl. Biol. (1939)26: 585-615）および最高単独薬剤（HSA）モデル（Borisys, et al., PNAS(2003)100: 7977-7982）は、薬物の組合わせ間の相乗効果を評価するために一般的に使用される方法である。

BIモデルに基づき、予想される効果（ $E_{E \times P}$ ）は次式で与えられる：

$$E_{E \times P} = E_A + E_B - (E_A \times E_B),$$

式中、 E_A は、ある濃度の薬物A単独で観察される増殖阻害効果であり、 E_B は、ある濃度の薬物B単独で観察される増殖阻害効果である。 E_{Obs} は、それぞれ E_A および E_B と同じ濃度における、薬物の組合わせ（A+B）の観察された増殖阻害効果である。各効果は、0と1との間の分数阻害として表される。 $E_{Obs} - E_{E \times P} > 0$ の場合、2つの薬物は相乗的に相互作用すると考えられる。

【0146】

HSAモデルはBIモデルに類似しているが、ただしHSAモデルによれば、 $E_{E \times P}$ は、組合わせの薬物が単独で、薬物組合わせ（A+B）と同じ濃度において作り出す成長阻害効果（ E_A または E_B ）の大きい方と、等しい。

2つの薬物が相乗的であると考えられるのは、我々の基準の厳密性を増強するために、両方のモデルにおいて少なくとも2つの異なる濃度の組合わせについて、 $E_{Obs} - E_{E \times P} > 0.1$ （すなわち、図5Cおよび5Dの予測されたBIモデルおよびHSAモデルに対して、>10%超の超過阻害）である場合である。

【0147】

フローサイトメトリー

細胞は、感染後4日目および8日目に回収した。試料を洗浄し、2%ウシ胎仔血清を補充した1×PBSに再懸濁した。細胞の塊を除去するために、再懸濁した細胞を細胞ストレーナーに通してから、LSRII Fortessaフローサイトメーター（Becton Dickinson）にロードした。試料あたり少なくとも20,000件のイベントを収集した。適切なレーザーセットおよびフィルターを、細胞試料に基づいて選択した。前方散乱および側方散乱を使用して、適切な細胞集団を同定した。データを、製造業者の組込みソフトウェアを使用して分析した。

【0148】

蛍光顕微鏡

培養細胞を、倒立蛍光顕微鏡（Zeiss）下で、レンチウイルス感染3日後に直接観察した。画像は、Zeissの組込みソフトウェアを使用して捕捉した。

【0149】

イムノプロット解析

細胞を、プロテアーゼ阻害剤を補充した $2 \times \text{RIP A}$ 緩衝液中で溶解した。溶解物を乳棒モーターミキサー (Agros) を用いて 30 秒間ホモジナイズし、次いで 15, 000 rpm、 4°C で 15 分間遠心分離した。上清を、BCA アッセイ (Thermo Scientific) を用いて定量した。タンパク質を、 99°C で 5 分間変性させた後、4 ~ 15 % ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad) でゲル電気泳動を行った。タンパク質をニトロセルロース膜に、80 V、 4°C で 2 時間かけて移した。使用した一次抗体は、抗 BRD4 (1 : 2, 000、Cell Signaling #13400)、抗 KDM4C (1 : 1, 000、Abcam ab85454)、抗 KDM6B (1 : 1, 000、Abcam ab85392)、および抗 β -アクチン (1 : 4, 000、Abcam ab6276) であった。使用した二次抗体は、HRP 結合抗ウサギ IgG (1 : 2, 000、Cell Signaling #7074) および HRP 結合抗マウス IgG (1 : 4, 000、Cell Signaling #7076) であった。膜は、SuperSignal West Pico 化学発光基質 (Thermo Scientific) で現像し、ChemiDoc Touch イメージングシステム (BioRad) を用いて画像化した。

10

【0150】

ゲノム改変に関する Surveyor アッセイおよびシーケンシング解析

Surveyor アッセイを実施して、DNA 切断効率を評価した。ゲノム DNA を細胞培養物から、QuickExtract DNA 抽出溶液 (Epicentre) を用いて製造業者のプロトコルに従って抽出した。標的遺伝子座を含むアンプリコンを、PCR により、Phusion DNA ポリメラーゼおよび表 5 に示すプライマーを用いて生成した。約 200 ng の PCR アンプリコンを変性させ、自己アニールし、1.5 μl の Surveyor スクレアーゼ (Transgenomic) で 42°C で 30 分間インキュベートした。次いで、試料を 2 % アガロースゲル上で分析した。DNA バンド強度を ImageJ ソフトウェアを用いて定量し、挿入欠失発生を以下の式で推定した (Ran et al., Nat. Protoc. (2013) 8: 2281-2308)。

20

挿入欠失 (%) = $100 \times (1 - (1 - f_{\text{cut}}))$ の平方根)

ここで $f_{\text{cut}} = (b + c) / (a + b + c)$ であり、a は未切断 PCR アンプリコンのバンド強度であり、b および c は、各切断バンドの強度である。標的とされたアレルの予想された未切断バンドおよび切断バンドは、図 7 および 8 にリストされている。

【0151】

Sanger シーケンシングを実施して、コンビナトリアル sgRNA の発現によって生成されたゲノム改変を分析した。コンビナトリアル sgRNA 構築物を感染させた細胞を 12 日間培養し、培養物の連続希釈によって単一細胞として 96 ウェルプレートに再プレートした。ゲノム DNA を、5 ~ 21 日間培養した後に単離された単一細胞拡張クローンから、QuickExtract DNA 抽出溶液を用いて抽出し、標的アレルを含むアンプリコンを、PCR により上記のように調製した。PCR アンプリコンを TOPO ベクターに、TA Cloning キット (Life Technologies) を用いて製造業者のプロトコルに従ってクローニングし、ヌクレオチド突然変異、挿入および欠失を、Sanger シーケンシングを用いて同定した。

30

【0152】

【表 5】

表5: Surveyor アッセイおよび Sanger シーケンシングに使用したPCRプライマーのリスト

標的 sgRNA ID	フォワードプライマー(5'から 3')	リバースプライマー(5'から 3')
BMI1-sg2	AGAAATTAAACGGCTACCCCTCCA (配列番号 169)	GTTGGTACAAAGTGGTGAAGGC (配列番号 183)
BRD4-sg2	TCCATAGTGTCTTGAGCACCCAC (配列番号 170)	ACGTGGCTTCATTGTACATCCT (配列番号 184)
BRD4-sg3	CACTTGCTGATGCCAGTAGGAG (配列番号 171)	AAGCACATGCTTCAGGCTAACA (配列番号 185)
DNMT1-sg1	GTGAATAGCTTGGGAATGTGGG (配列番号 172)	TCATCTGCTCTTACGCTTAGCC (配列番号 186)
DNMT3B-sg1	GCCACACTCTACATGGGAGC (配列番号 173)	CTCGGCAACCCTCCATACAT (配列番号 187)
HDAC2-sg1	GACTTTTCCATCAGGGACACCT (配列番号 174)	AACCATGCACAGAATCCAGATTTA (配列番号 188)
ING4-sg1	GGTGGACAAACACATTTCGGC (配列番号 175)	AAGAGTTCTTGGCGCAGACA (配列番号 189)
KDM1B-sg3	CCTATCATTGCCCCAAGGAGTC (配列番号 176)	TCGTCCAAGTTACAGTCATCACA (配列番号 190)
KDM2A-sg3	CTAGGCCTCCGACAGTTGTAAT (配列番号 177)	TCCTCTGGTGCACAGAAAAGTC (配列番号 191)
KDM4C-sg1	AGCCACCCTTGGTTGGTTTT (配列番号 178)	TTCTCTCCAGACACTGCCCT (配列番号 192)
KDM6B-sg2	GGTAAGGGAACTCTGGGGC (配列番号 179)	GTGCCCAGAACTACTGCCAT (配列番号 193)
PHF8-sg2	CTCCCTCCCTTCCTAAGGCT (配列番号 180)	GAGGTGAGTTCCAGCTTCCC (配列番号 194)
PRMT2-sg3	ATTGCCTTAAGTCGACACCTGAT (配列番号 181)	CACCTTACAGGCACTGCGTT (配列番号 195)
PRMT6-sg1	GACTGTAGAGTTGCCGGAACAG (配列番号 182)	CTCCCTCCCTAGAGGCTATGAG (配列番号 196)

【 0 1 5 3 】

【表 6 - 1】

表6: BMI1-sg2およびPHF8-sg2発現構築物を保有する
OVCAR8-ADR-Cas9単一細胞における標的アレルの配列。
太字のヌクレオチドはPAM配列を示し;
下線のヌクレオチドは、塩基対の挿入または変異を示す。

単一細胞	sgRNA ID	配列(5'から3')	配列番号	挿入欠失
1	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAG----- GTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	231	-10bp
1	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAG----- GTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	231	-10bp
1	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAC----- TTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGGGAAACC AGTGAAGACC	232	-10bp
1	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAC----- TTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGGGAAACC AGTGAAGACC	232	-10bp
2	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATA----- GGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAG GAC	233	-9bp
2	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGT--- GGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAG GAC	234	-3bp
2	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA- CGCCG TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACAC AAGGGGAAACCAGTGAAGACC	235	-1bp
2	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA-C--- TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	236	-5bp
3	BMI1-sg2	ACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTTCAAC AGTTTCCTACCTTATATTC <u>IGTGATCIGTGG</u> TCTG GTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	237	2mut & +4bp

【 0 1 5 4 】

【表 6 - 2】

3	BMI1-sg2	ACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTTCAAC AGTTTCCTACCTTATATTCT GTGATCTGTGGTCTG GTCTTGTGAACCTTGGACATCACAAATAGGAC	237	2mut & +4bp
3	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CG TGGATCTT CAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	238	-3bp
3	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CG TGGATCTT CAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	238	-3bp
4	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGGTCT GGTCTTGTGAACCTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
4	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGGTCT GGTCTTGTGAACCTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
4	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCC TGGATCTT CAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
4	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCC TGGATCTT CAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
5	BMI1-sg2	ATTTC AACAGTTTCCTACCTTATATACTATACTAT <u>ATATATATATATATACTATATATATAGTGGTCTG</u> GTCTTGTGAACCTTGGACATCACAAATAGGAC	241	+30bp
5	BMI1-sg2	ATTTC AACAGTTTCCTACCTTATATACTATACTAT <u>ATATATATATATATACTATATATATAGTGGTCTG</u> GTCTTGTGAACCTTGGACATCACAAATAGGAC	241	+30bp
5	PHF8-sg2	CTCTCATGTTTTCTGGCTTAGTGAAAAAACT TTCA <u>CTAAGTTTTTACTTAGTGGATCTTCAAAGGGGCA</u> TGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	242	+16bp & 2mut
5	PHF8-sg2	CTCTCATGTTTTCTGGCTTAGTGAAAAAACT TTCA <u>CTAAGTTTTTACTTAGTGGATCTTCAAAGGGGCA</u> TGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	242	+16bp & 2mut
6	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC----- TGGTCTGGTCTTGTGAACCTTGGACATCACAAATA GGAC	243	-5bp
6	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTAC----- TTGTGAACCTTGGACATCACAAATAGGAC	244	-24bp
6	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CATGGATCTT CAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	245	-4bp & 1mut
6	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACG--- TGGATCTT CAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp

【表 6 - 3】

7	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCT----- AGTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAA TAGGAC	247	-10bp
7	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCT----- AGTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAA TAGGAC	247	-10bp
7	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
7	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
8	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCT--- GTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	248	1mut & -3bp
8	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCT--- GTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	248	1mut & -3bp
8	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
8	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
9	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
9	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC----- TGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATA GGAC	243	-5bp
9	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA---- CATGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	245	-4bp & 1mut
9	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
10	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
10	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT

【表 6 - 4】

10	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACTAAAGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	249	3mut
10	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
11	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
11	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTAC----- TAGTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAA ATAGGAC	250	-11bp
11	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
11	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
12	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
12	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
12	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
12	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
13	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
13	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
13	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGA----- ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGGGAA ACCAGTGAAGACC	251	-13bp
13	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGA----- ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGGGAA ACCAGTGAAGACC	251	-13bp
14	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT

【表 6 - 5】

14	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
14	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACG--- TGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
14	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACG--- TGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
15	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
15	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
15	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CGTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
15	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CGTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
16	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
16	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC----- TGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATA GGAC	243	-5bp
16	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CATGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	245	-4bp & 1mut
16	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CGTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
17	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC--- GTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	234	-3bp
17	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC--- GTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	234	-3bp
17	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCC TGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT

【表 6 - 6】

17	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCG TGG ATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
18	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGG TCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
18	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGG TCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
18	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCG TGG ATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
18	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCG TGG ATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
19	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGG TCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
19	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTC CA A----- GTGG TCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	252	-14bp & 1mut
19	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CG TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
19	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CATGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	245	-4bp & 1mut
20	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGG TCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
20	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGG TCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
20	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAC--- GTGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGG GGAAACCAGTGAAGACC	253	-3bp
20	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAC--- GTGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGG GGAAACCAGTGAAGACC	253	-3bp
21	BMI1- sg2	ACAAC T CCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT AACAGTTTCCTACCTTATATTCAG A TAG TGG TCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	254	+1bp
21	BMI1- sg2	ACAAC T CCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT AACAGTTTCCTACCTTATATTCAG A TAG TGG TCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	254	+1bp

【表 6 - 7】

21	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCC TGG ATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT	
21	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACG--- TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp	
22	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTA----- GTGG TCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	255	-14bp	10
22	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC--TAG- GGT TCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAG GAC	256	-3bp	
22	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp	
22	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp	20
23	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAG----- TTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	257	-13bp	
23	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATA----- TAG TGG TCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAA ATAGGAC	258	-5bp	
23	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp	30
23	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp	
24	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCA--- GTGG TCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	239	-3bp	
24	BMI1-sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTA----- GTGG TCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	255	-14bp	40
24	PHF8-sg2	TCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCTTAG TGAAAAAACATGCC CGTGG ATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	259	+3bp & 2mut	
24	PHF8-sg2	TCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCTTAG TGAAAAAACATGCC CGTGG ATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	259	+3bp & 2mut	

【表 6 - 8】

25	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCA--- GTGGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	239	-3bp
25	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCA--- GTGGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	239	-3bp
25	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGAT CTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
25	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGAT CTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
26	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCA GTGGT CT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
26	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCA GT --- GGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAG GAC	234	-3bp
26	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGAT CTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
26	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAA--- CGTGGAT CTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
27	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTAT----- TGGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATA GGAC	260	-9bp
27	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTAT----- TGGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATA GGAC	260	-9bp
27	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACG CGTGGAT CTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
27	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACG--- TGGAT CTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
28	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACA----- GTGGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	261	-22bp
28	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACA----- GTGGT CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	261	-22bp

10

20

30

40

【表 6 - 9】

28	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CG TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
28	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CG TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
29	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGG TCT GGTCTTGTGAACCTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
29	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC----- TGG TCTGGTCTTGTGAACCTGGACATCACAAATA GGAC	243	-5bp
29	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- <u>CATGG</u> ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	245	-4bp & 1mut
29	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CG TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
30	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGG TCT GGTCTTGTGAACCTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
30	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAG TGG TCT GGTCTTGTGAACCTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
30	PHF8- sg2	TCTCATGTTTTCTGGCTTAGTGAAAT CTAAGCTT <u>AGTGAAATCTAAGCCGTGG</u> ATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	262	+17bp & 1mut
30	PHF8- sg2	TCTCATGTTTTCTGGCTTAGTGAAAT CTAAGCTT <u>AGTGAAATCTAAGCCGTGG</u> ATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	262	+17bp & 1mut
31	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC TTATAT TGG TCTG GTCTTGTGAACCTGGACATCACAAATAGGAC	263	5mut
31	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTA----- GTGG TCTGGTCTTGTGAACCTGGACATCACAAAT AGGAC	255	-14bp
31	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CG TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
31	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA--- CG TGG ATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAG GGGAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp

10

20

30

40

【表 6 - 1 0】

32	BMI1- sg2	TCAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
32	BMI1- sg2	TCAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATA--- TAGTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAA ATAGGAC	264	-3bp & 1mut
32	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
32	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
33	BMI1- sg2	TCAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAG----- AACTTGGACATCACAAATAGGAC	265	-18bp
33	BMI1- sg2	TCAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAG----- AACTTGGACATCACAAATAGGAC	265	-18bp
33	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
33	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
34	BMI1- sg2	TCAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
34	BMI1- sg2	TCAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
34	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
34	PHF8- sg2	GTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT AGTGAAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	266	+1bp
35	BMI1- sg2	TAATTACAAACAAGGAATTTCAACAGTTTCCTAC CTTATATTCAGTATAATATATTCATTAGTGGTCTG GTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	267	+14bp
35	BMI1- sg2	TAATTACAAACAAGGAATTTCAACAGTTTCCTAC CTTATATTCAGTATAATATATTCATTAGTGGTCTG GTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	267	+14bp
35	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTG----- GATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGGGA AACCAGTGAAGACC	268	-13bp

【表 6 - 1 1】

35	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTG----- GATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGGGA AACCAGTGAAGACC	268	-13bp
36	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC-- TAGTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAA ATAGGAC	269	-2bp
36	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC-- TAGTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAA ATAGGAC	269	-2bp
36	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACG--- TGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	246	-3bp
36	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
37	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTATATAGTGGTCTG GTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	270	3mut
37	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCAGTAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	239	WT
37	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA-C--- TGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	236	-5bp
37	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAA-C--- TGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGGG GAAACCAGTGAAGACC	236	-5bp
38	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCA--- GTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	239	-3bp
38	BMI1- sg2	TAATTACAAACAAGGAATTTCAACAGTTTCCTAC CTTATATTTCAGGTAGTGAATCTGAATAGTGGTCT GGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	271	+14bp
38	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAC--- GTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGG GGAAACCAGTGAAGACC	253	-3bp
38	PHF8- sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAAC--- GTGGATCTTCAAAGGGGCATGATACACACAAGG GGAAACCAGTGAAGACC	253	-3bp
39	BMI1- sg2	TACAACTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTT----- CTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	272	-15bp

【表 6 - 1 2】

39	BMI1-sg2	TACAACCTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTCA--- GTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAAT AGGAC	239	-3bp
39	PHF8-sg2	ACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCTTAGTGAATCTT CAAAGGGATCTTCAAAAAGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	273	+11bp & 4mut
39	PHF8-sg2	ACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCTTAGTGAATCTT CAAAGGGATCTTCAAAAAGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	273	+11bp & 4mut
40	BMI1-sg2	TACAACCTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATT----- GTGAACTTGGACATCACAAATAGGAC	274	-18bp
40	BMI1-sg2	TACAACCTCCAATAATAATTACAAACAAGGAATTT CAACAGTTTCCTACCTTATATTC--- AGTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGGACATCACAAA TAGGAC	275	-3bp
40	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT
40	PHF8-sg2	CGTTCTGACTCACAATCTCTCATGTTTTTCTGGCT TAGTGAAAAAACGCCGTGGATCTTCAAAGGGGC ATGATACACACAAGGGGAAACCAGTGAAGACC	240	WT

【0165】

RNA抽出および定量的RT-PCR (qRT-PCR)

RNAを細胞から、TRIzol Plus RNA精製キット (Life Technologies) を用いて製造業者のプロトコルに従って抽出し、PureLinkオンカラムDNaseキット (Life Technologies) で処理した。RNA品質および濃度は、NanoDrop分光光度計を用いて決定した。RNA試料を、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies)、Random Primer Mix (New England Biolabs) およびRNase OUT (Invitrogen) を用いて逆転写した。遺伝子発現レベルを評価するために、定量的PCRを、LightCycler480システム (Roche) 上でSYBR FAST qPCR MasterMix (KAPA) を用いて行った。データを、LifeCyler480 SW 1.1 組み込みソフトウェアを使用して、定量し分析した。PCRプライマーは、PrimerBlast (NCBI) を用いて設計し、評価した。プライマー配列を表7に示す。

【0166】

【表 7】

表7: qRT-PCRに使用したPCRプライマー

標的遺伝子 ID	フォワードプライマー(5'から 3')	リバースプライマー(5'から 3')
BRD4	GTTGATGTGATTGCCGGCTC (配列番号 197)	TTAGGCAGGACCTGTTTCGG (配列番号 200)
KDM4C	CGTACGGGTTTCATGCAAGTT (配列番号 198)	CGTTTGCTTAAGAGCACCTCC (配列番号 201)
KDM6B	CCCCTCACCGCCTATCAGTA (配列番号 199)	TCTTGAACAAGTCGGGGTCCG (配列番号 202)

【0167】

【表 8 - 1】

表8: 挿入欠失検出のためのディープシーケンシングに使用したPCRプライマー

標的 gRNA ID	標的 部位の 種類	標的 20 bp gRNA 標的配列 (5'から3')	配列 番号	フォワードプライマー (5'から3')	配列 番号	リバースプライマー (5'から3')	配列 番号
NF1- sg1	オン ターゲット	GTTGT GCTCA GTACT GACTT	276	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GGTATCTGTGGTT GATGCAGTTTCC	304	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- AGTAGTGAGGCC GCTTATAACC	332
NF1- sg4	オン ターゲット	TTTCA GCTTC CAATA AAAAC	277	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GGTATCTGTGGTT GATGCAGTTTCC	304	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- AGTAGTGAGGCC GCTTATAACC	332
NF2- sg2	オン ターゲット	ATTCC ACGGG AAGGA GATCT	278	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GCACAGAGCTGC TGCTTGGAGTG	305	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- TAACAAGGAGAT GCCCTGGCTGG	333
MED1 2-sg1	オン ターゲット	AGGAT TGAAG CTGAC GTTCT	279	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CGCTTTCCTGCCT CAGGATGAAC	306	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- AGGTCATGAAGG CAAACTCAGCC	334
PHF8- sg2	オン ターゲット	GGCTT AGTGA AAAAA CGCCG	280	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- TTGGAAGAGAAG GATCTGCTGAGG C	307	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- CACCTGTCAAAA GTCCTACTCCGG	335
BMI- sg2	オン ターゲット	TCCTA CCTTAT ATTCA GTAG	281	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GCTACCCTCCACA AAGCACACAC	308	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- CCTGGAGACCAG CAAGTATTGTCC	336
KDM4 C-sg1	オン ターゲット	CCTTTG CAAGA CCCGC ACGA	109	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CCTTCAGAAACA ATGTCCCAAATCG	309	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- GTCCTCTGAACCC CAGCTGTAAG	337
KDM4 C-sg1	オフ ターゲット	GCTTT GCCCC AACCG CACGA	282	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- AGCCTTTCTGAGA GCGGGCTAG	310	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- CAAACAGAGGCC AAAGGGTGTCCC	338
KDM4 C-sg1	オフ ターゲット	CCTAG GCCAG ACCTG CACGA	283	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GCCTCCTCTCATC CTCTCGCTTC	311	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- ACAGGAGGTCGT GGTGCAGTTCTC	339

【 0 1 6 8 】

【表 8 - 2】

KDM4 C-sg1	オフ ターゲット	GCTCT GGAAG ACCCG CACCA	284	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GATTGGCTCCAA GCGGCCATCAAA C	312	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- TTGTGTGAGGAA CGTTGACGCTACC	340
KDM4 C-sg1	オフ ターゲット	CCTTAT CAAGA CCCAC ACCA	285	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- TTGAACTCAAGG CTCAGCCAACAG GC	313	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- GAGCGTAGGTCC TCTGCATGGAG	341
KDM6 B-sg2	オン ターゲット	ATCCC CCTCCT CGTAG CGCA	286	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CAACTCAGGCTG GATGCATCGG	314	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- CCACAGAATGAC AGGAACCCATGG	342
KDM6 B-sg2	オフ ターゲット	CTGCT CCTCCT CGTAG CGCT	287	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- TTGGTGGCCGCTG AGTGTGTGTAC	315	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- ACTGAGCAGAGC CTAGGAGGCAG	343
KDM6 B-sg2	オフ ターゲット	TGCGC CCTCCT CCTAG CGCA	288	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CAGCATGTTGAC ATAGCGGC	316	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- TGTTGCCAGATCC AGAGGCGTC	344
KDM6 B-sg2	オフ ターゲット	CTCCTC CTCCG CGTAG CGCT	289	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- TGAGAGGAGATG AGTCGGGGTC	317	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- AACTGGCCCGAG TAGTCGGAGCAG	345
KDM6 B-sg2	オフ ターゲット	CTGCC CCTCCT GGTAG CGCC	290	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GACGGGTCAAAG CCTCAGGAGAG	318	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- TCCTCAGAGTGTG TGGAAGTGCTGG	346
KDM6 B-sg2	オフ ターゲット	AACCA GCTCC TCGTA GCTCA	291	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- TTAGCTGCCCAGC TCACAGCTACC	319	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- AAGAGCTCCTAG GGGAGGATCAG	347
KDM6 B-sg2	オフ ターゲット	ACCGC CCTCCT CCTAG CTCA	292	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GAGCCCCAAGAG CGAGACAA	320	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- TGGCAGGAGCAC AGCCTAAGGA	348
KDM6 B-sg2	オフ ターゲット	AGCCC GCTCC TCGTG GGGCA	293	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GGCGCTCAGAAG GCTGTGCAG	321	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- ACACCCGCCTCG GAGATCAACAC	349
BRD4- sg3	オン ターゲット	GGGAA CAATA AAGAA	294	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT-	322	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT-	350

【表 8 - 3】

		GCGCT		CCTAGGTGACACT GGACTTTTGC		CCACCCCTACATC TCACCTTGTTG	
BRD4- sg3	オフ ターゲット	TGGAA AAACA AAGAA GAGCT	295	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- AGGTTACCTCAG GCTGCTCAGAAG	323	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- GTGAGGTTTCCAC GTGCCAGC	351
BRD4- sg3	オフ ターゲット	GGGAA GTATA AGGAA GAGCT	296	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CGTCTCTCTCCAT GTGAGCTTGTG	324	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- CCAACAATTCCA GGTATGAAACTC CC	352
BRD4- sg3	オフ ターゲット	GTGAG CAATA AAGCA GCCCT	297	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GGAAAGATCATC TGATCAGGCCCAT C	325	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- CTCCCCACTTGT GGTTCCTAATCC	353
BRD4- sg2	オン ターゲット	TCTAG TCCAT CCCC ATTAC	298	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CTTGTTAGGGTTG GAGGTCTCTGG	326	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- GTAGAGTGCCTG GTGAAGAATGTG	354
BRD4- sg2	オフ ターゲット	AATAT TCCATT CCCCA TTAC	299	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- AAGGCCCGTAAA GGGCAAGTTCAG	327	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- TCCAGACTGTTGT TCAGTCCTGT	355
BRD4- sg2	オフ ターゲット	TGTTGT CCATA CCTCA TTAC	300	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- GGTGACAGGAAG CTGTGGAACAT	328	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- CTCTGGATTGCCC CACACCTAGTC	356
BRD4- sg2	オフ ターゲット	TCTAG GTCAT GCACC ATTAC	301	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CTCACTGTGATCT GACACCAAACAC	329	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- GCATGCTTGCTTT CTGAAGGTGGC	357
BRD4- sg2	オフ ターゲット	CCCAT TCCTTC CCCCA TTAC	302	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CTAGTTGCCTTCA TGCCTTACAGAC	330	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- TTCCAAGCAAGT GAGCTTCAGCAC C	358
BRD4- sg2	オフ ターゲット	TCCAC ACCTT CCCC ATTAC	303	ACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTT CCGATCT- CTGCTCCCACTCC AGACTACCC	331	GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCT TCCGATCT- CCACCCATGACA CAGGAGGG	359

10

20

30

40

【表 9】

表9:挿入欠失検出のための全ゲノム増幅に使用したPCRプライマー

標的 sgRNA ID	フォワードプライマー(5'から 3')	リバースプライマー(5'から 3')
BMI1-sg2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTA TAAGAGACAGGCTACCCTCCACAA AGCACACAC (配列番号 360)	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGCCTGGAGACCAGCAAG TATTGTCC (配列番号 362)
PHF8-sg2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTA TAAGAGACAGTTGGAAGAGAAGGA TCTGCTGAGGC (配列番号 361)	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGCACCTGTCAAAAGTCCT ACTCCGG (配列番号 363)

10

【0171】

RNA-Se q およびデータ分析

RNAを細胞から、TRIzol Plus RNA精製キット (Life Technologies) を用い製造業者のプロトコルに従って抽出し、PureLinkオンカラムDNaseキット (Life Technologies) で処理した。RNA品質および濃度は、NanoDrop分光光度計を用いて決定した。RNA試料を、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies)、Random Primer Mix (New England Biolabs) およびRNase OUT (Invitrogen) を用いて逆転写した。シーケンシングライブラリーは、Illumina Library Prepキットを用いて、1 μg の全RNAの入力量で開始し、製造業者の推奨に従って調製した。PCR増幅後、ライブラリーを2%アガロースゲル (E-Gel EX, Invitrogen) 上で300+/-25bpにサイズ選択し、Illumina HiSeq 2000装置でシングルエンドシーケンシングに供した。RNA-Se q 実験を2つの生物学的複製で実施した。

20

【0172】

cDNA断片の生のシングルエンドリードを、TopHat2 (Kim et al., Genome Biol(2013)14: R36) およびBowtie (Langmead, et al., Genome Biol(2009) 10:R25) を用いて、ヒトトランスクリプトーム (RefSeq, hg19) に整列させた。試料間で差次的に発現された遺伝子は、Cuffdiff2 (Trapnell et al., Nat Biotechnol (2013)31: 46-53) とバイアス補正オプションを用いてコールされ、ミトコンドリアおよびリボソームRNA転写物にマッピングするリードをマスキングする。遺伝子が差次的に発現されたとしてコールされるのは、試験した条件の少なくとも1つにおいて百万回のリード当たりキロベース当たり、最小0.1断片 (FPKM) を満たし、絶対log₂ 倍数変化が少なくとも0.5であり、複数仮説補正後のP値 (Q値) が0.05未満である場合である。遺伝子セット濃縮分析は、MSigDBデータベース (broadinstitute.org/gsea/index.jsp) を用いて行った (Subramanian, et al. Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102:15545-50)。

30

【0173】

混合集団における細胞増殖の数学的モデリング

異なるパラメータが、我々のプールされたスクリーニングの結果にどのように影響するかを推定するために、細胞増殖を、異なる増殖速度を示すgRNAの組合わせを有する混合細胞集団においてシミュレートした。所与の時間 (t) において、母集団における総細胞数 (C_N) は、異なる組合わせ (C_i; 1~N、ここでNは組合わせの総数) を含む個々の細胞数の合計によって表され、

40

【数1】

$$C_N(t) = \sum_{i=1}^N C_i(t).$$

である。

【0174】

各個々のgRNAの組合わせについて、細胞増殖は、式(1)によって表される。指数

50

関数的な細胞増殖モデルに基づき、各 g R N A の組合わせを有する細胞は、2つの集団からなる：C R I S P R - C a s 9 システムによる遺伝子破壊に起因する、改変された増殖速度（ k_m ）を有するものと、野生型増殖速度（ k_{wt} ）を有する他のもの（未改変の細胞）。前者の集団は細胞の一部（ p ）として定義され、これはC R I S P R - C a s 9 システムの切断効率によって制限される。単純化のために、我々は、 p がアッセイ期間中一定であると仮定した。

【数 2】

$$C_i(t) = p C_i(t) + (1 - p) C_i(t) = p C_0 e^{k_m t} + (1 - p) C_0 e^{k_{wt} t} \quad (式1)$$

式中、 p は、改変された増殖速度を有する突然変異細胞の割合を表し、 C_0 は、同じバーコード化 g R N A の組合わせを担持する初期細胞数を表す。細胞増殖速度（ k ）は、式（2）に従って細胞の倍加時間（ $T_{doubling}$ ）から評価される。野生型OVCAR8-ADR-Cas9細胞の倍加時間は、約 2 4 時間であると実験的に決定された（データ示さず）。

【数 3】

$$k = \ln 2 / T_{doubling} \quad (式2)$$

【0 1 7 5】

モデリングを簡単にするために、我々は全細胞集団を、式（3）に記載されているように、異なる増殖表現型を有する3つの亜集団に分けた。

【数 4】

$$C_N(t) = \sum_{i=1}^N C_i(t) \approx f_{wt} N \times C_0 e^{k_{wt} t} + f_s N \times C_{i,slow}(t) + f_f N \times C_{i,fast}(t) \quad (式3)$$

式中、 $C_{i,slow}(t)$ および $C_{i,fast}(t)$ はそれぞれ、抗増殖性 g R N A および増殖促進性 g R N A を有する細胞の、平均増殖プロファイルを表し、これは式（1）により決定される。実験開始時に、野生型として振る舞うか、または抗増殖性 g R N A および増殖促進性 g R N A を有するように振る舞う集団全体のパーセンテージは、それぞれ、 f_{wt} 、 f_s および f_f で表される。

【0 1 7 6】

この混合細胞増殖モデルに基づいて、我々は、増殖促進性 g R N A および抗増殖性 g R N A 表現の全細胞集団における相対頻度（ R, F ）をモデル化した。相対的頻度は、初期時点と比較した、所与の時点のバーコード存在量として定義される（すなわち、

【数 5】

$$R, F = \frac{F(t)}{F(t=0)}, \text{ where } F = C_i(t)/C_N(t)$$

）。プール内の組合わせの総数 N 、および初期の細胞数 C_0 は、相対頻度結果に影響を与えない。定義されたパラメータでシミュレーションを実行した後、我々は、集団における増殖促進性 g R N A および抗増殖性 g R N A の富化および枯渇をそれぞれ観察した（図 1 7 A）。富化度および枯渇度は、抗増殖性（ f_s ）応答および増殖促進性（ f_f ）応答を有すると定義された初期の g R N A 組合わせの異なるパーセンテージ（すなわち、2、5 または 1 0 %）と共に、変化することが観察された（図 1 7 A）。我々はさらに、抗増殖性 g R N A 表示の相対的頻度を、改変細胞の倍加時間（ $T_{doubling, m}$ ）および、抗増殖性 g R N A の改変された増殖速度（ p ）を有する細胞の割合を調節することによって、さらに評価した。実験中 p が一定のままであると仮定すると、全細胞集団における抗増殖性クローンの表示は、図 1 7 B～図 1 7 C に示すパラメータ範囲で、～ 2 3 % から～ 9 7 % 枯渇する可能性がある。このモデルは、細胞増殖ダイナミクスの単純化されたバージョンを、細胞集団を平均増殖速度の亜集団に分離することによって表し、細胞間の潜在的相互作用は説明しない。本発明者らのモデルに基づき、我々のスクリーニングの感度を、改変された増殖速度を有する細胞の割合を増加するための改良された g R N A 効率により、お

10

20

30

40

50

よびアッセイ時間を増加させることにより、高めることができた。

【0177】

本発明の少なくとも一態様のいくつかの側面を説明したが、様々な変更、修正、および改良が当業者には容易に想起されることを、理解すべきである。かかる変更、修正および改良は本開示の一部であることが意図され、本発明の精神および範囲内にあることが意図される。したがって、前述の説明および図面は、ほんの一例に過ぎない。

【0178】

参考文献

References

10

1. Shalem, O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**, 84–7 (2014).
2. Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M. & Lander, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* **343**, 80–4 (2014).
3. Zhou, Y. *et al.* High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* **509**, 487–491 (2014).

4. Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.-P., Velasco-Herrera, M. D. C. & Yusa, K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat. Biotechnol.* **32**, 267–73 (2014).
5. Gilbert, L. A. *et al.* Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* **159**, 647–661 (2014).
6. Konermann, S. *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* doi:10.1038/nature14136 (2014). 10
7. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–23 (2013).
8. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–6 (2013).
9. Gilbert, L. A. *et al.* CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* **154**, 442–451 (2013).
10. Cheng, A. A., Ding, H. & Lu, T. K. Enhanced killing of antibiotic-resistant bacteria enabled by massively parallel combinatorial genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12462–7 (2014). 20
11. Honma, K. *et al.* RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nat. Med.* **14**, 939–948 (2008).
12. Wang, Z. *et al.* Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* **40**, 897–903 (2008).
13. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012). 30
14. Juergens, R. A. *et al.* Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* **1**, 598–607 (2011).
15. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The Epigenomics of Cancer. *Cell* **128**, 683–692 (2007).
16. Yoo, C. B. & Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 37–50 (2006).
17. Jin, C. *et al.* Chem-seq permits identification of genomic targets of drugs against androgen receptor regulation selected by functional phenotypic screens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9235–40 (2014). 40
18. Asangani, I. a *et al.* Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature* **510**, 278–82 (2014).
19. Kruidenier, L. *et al.* A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* **488**, 404–408 (2012).

20. Bliss, C. I. THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY1. *Ann. Appl. Biol.* **26**, 585–615 (1939).
21. Borisy, A. A. *et al.* Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7977–7982 (2003).
22. Pattanayak, V. *et al.* High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* **31**, 839–43 (2013).
23. Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J. & Adli, M. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **32**, 677–683 (2014). 10
24. Wu, X. *et al.* Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 670–676 (2014).
25. Doench, J. G. *et al.* Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1262–1267 (2014).
26. Essletzbichler, P. *et al.* Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res.* **24**, 2059–2065 (2014). 20
27. Blasco, R. B. *et al.* Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell Rep.* **9**, 1219–1227 (2014).
28. Choi, P. S. & Meyerson, M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat. Commun.* **5**, 3728 (2014).
29. Moffat, J. *et al.* A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* **124**, 1283–1298 (2006).
30. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–308 (2013). 30
31. Kim D, *et al.* (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14:R36.
32. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:R25.
33. Trapnell C, *et al.* (2013) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* 31:46–53. 40
34. Subramanian A, *et al.* (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545–50.
35. Stemmer M (2015) CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* 10(4):e0124633.

本発明のいくつかの態様を本明細書に記述し説明したが、当業者は容易に、本明細書に記載された機能を実施するため、および／または結果および／もしくは1もしくは2以上の利点を得るための、種々の別の手段および／または構造を想定するであろうし、かかる変形および／または修正の各々は、本明細書に記載された本発明の態様の範囲内であると考えられる。より一般的には、当業者には容易に、本明細書に記載された全てのパラメータ、寸法、材料、および構成は例示的であることが意図され、実際のパラメータ、寸法、材料、および／または構成は、本発明の教示が用いられている1または2以上の特定の用途に依存することを理解する。当業者は、日常的な実験以上のものを用いることなく、本明細書に記載された特定の発明の態様に対する多くの均等物を認識し、または確認できるであろう。したがって、前述の態様は例示としてのみ表示されており、また添付の特許請求の範囲およびその均等物の範囲内において、本発明の態様は、具体的に記載し特許請求された以外によっても実施できることが、理解されるべきである。本開示の発明の態様は、本明細書に記載の各個々の特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法に向けられている。さらに、2または3以上のかかる特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法の任意の組み合わせは、かかる特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法が互いに矛盾しない場合には、本開示の発明の範囲内に包含される。

10

【0180】

本明細書において定義され使用される全ての定義は、辞書の定義、参照により組み込まれる文献における定義、および／または定義された用語の通常の意味を、支配すると理解すべきである。

20

明細書および特許請求の範囲においてここで使用される、不定冠詞「a」および「an」は、明確に逆が示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解すべきである。

ここで明細書および特許請求の範囲において使用される語句「および／または」は、これにより結合された要素の「いずれかまたは両方」を意味すると理解すべきであり、すなわち、要素はいくつかの場合においては結合的に存在し、別の場合には選択的に存在する。「および／または」を用いてリストされた複数の要素は、同様の様式で解釈すべきであり、すなわち、これにより結合された要素の「1または2以上」を意味する。「および／または」節によって特定して識別された要素以外の他の要素も、具体的に識別された要素に関連するかまたは関連しないかに関わらず、任意に存在してよい。したがって、非限定的な例として、「Aおよび／またはB」は、「含む」などのオープンエンドの言葉と組み合わせ使用する場合、一態様においては、Aのみ（B以外の要素を任意に含む）を指し；別の態様においては、Bのみ（A以外の要素を任意に含む）を指し；さらに別の態様においては、AとBの両方（別の要素を任意に含む）を指す、などである。

30

【0181】

ここで明細書および特許請求の範囲において使用される場合、「または」は、上記に定義した「および／または」と同じ意味を有すると理解すべきである。例えば、リスト内の項目を分離する場合、「または」または「および／または」は包括的であると解釈されるべきであり、すなわち、多数のもしくはリストされた要素の、少なくとも1つを含むこと、およびこれの1より多くを含むこと、および任意に、リストにない追加の項目を含むこと、となる。明確に逆を指示する要素、例えば「1つのみ」または「正確に1つ」、または、特許請求の範囲で使用される場合の「～からなる」は、多数のまたはリストされた要素からの正確に1つの要素の包含を指す。一般的に、本明細書で使用される用語の「または」は、「いずれか」、「1つ」、「1つのみ」または「正確に1つ」などの排他性の用語が先行する場合に、排他的代替物を示す（すなわち、「一方または他方のどちらかであるが両方ではない」）と解釈される。特許請求の範囲で使用される場合、「本質的に～からなる」は、特許法の分野で用いられるその通常の意味を有するものとする。

40

【0182】

ここで明細書および特許請求の範囲において使用される場合、1または2以上の要素のリストを参照しての「少なくとも1つ」の語句は、要素のリストの任意の1または2以上

50

の要素から選択される少なくとも1つの要素を意味するが、しかし必ずしも、要素のリスト中に具体的に挙げられた各および全ての要素の少なくとも1つを含む必要はなく、および、要素のリスト中の要素の任意の組合わせも除外しない。この定義はまた、語句「少なくとも1つ」が参照する要素のリスト内に具体的に特定された要素以外にも、具体的に特定された要素に関連するかまたは関連しないかにかかわらず、任意に要素が存在することを可能とする。したがって、非限定的例として、「AおよびBの少なくとも1つ」（または、同等に、「AまたはBの少なくとも1つ」、または、同等に、「Aおよび／またはBの少なくとも1つ」とは、以下を指すことができる：一態様において、少なくとも1つのAを、任意に1つより多くのAを含み、Bは不在である（および任意に、B以外の要素を含む）；別の態様において、少なくとも1つのBを、任意に1つより多くのBを含み、Aは不在である（および任意に、A以外の要素を含む）；さらに別の態様において、少なくとも1つのAを、任意に1つより多くのAを含み、および、少なくとも1つのBを、任意に1つより多くのBを含む（任意に、別の要素を含む）；など。

10

【0183】

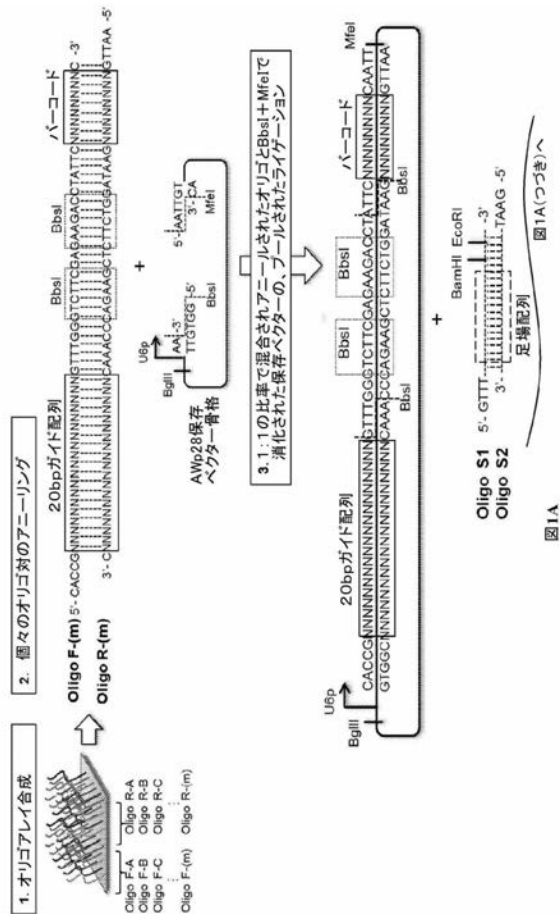
また、明確に別の指示がない限り、1より多くのステップまたは行為を含む本明細書に記載の任意の方法において、方法のステップまたは行為の順序は、本方法のステップまたは行為が引用されている順序には必ずしも限定されないことが、理解されるべきである。

本明細書で開示される全ての参考文献、特許および特許出願は、それぞれが引用されている主題に関して参照により組み込まれ、いくつかの場合においては、文書全体を包含することもできる。

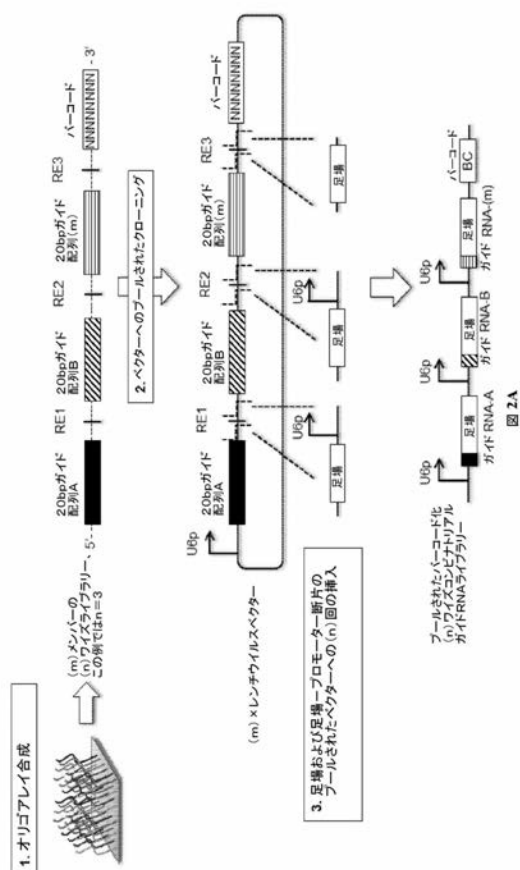
20

特許請求の範囲において、および上記明細書において、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「担持する (carrying)」、「有する」、「含有する」、「関与する」、「保持する」、「構成する」などの移行句は、オープンエンドであること、すなわち、それを含むが限定はされないことを意味すると理解すべきである。「～からなる」および「本質的に～からなる」のみは、米国特許審査便覧のセクション2111.03に記載されているように、クローズまたは半クローズの移行句とすべきである。

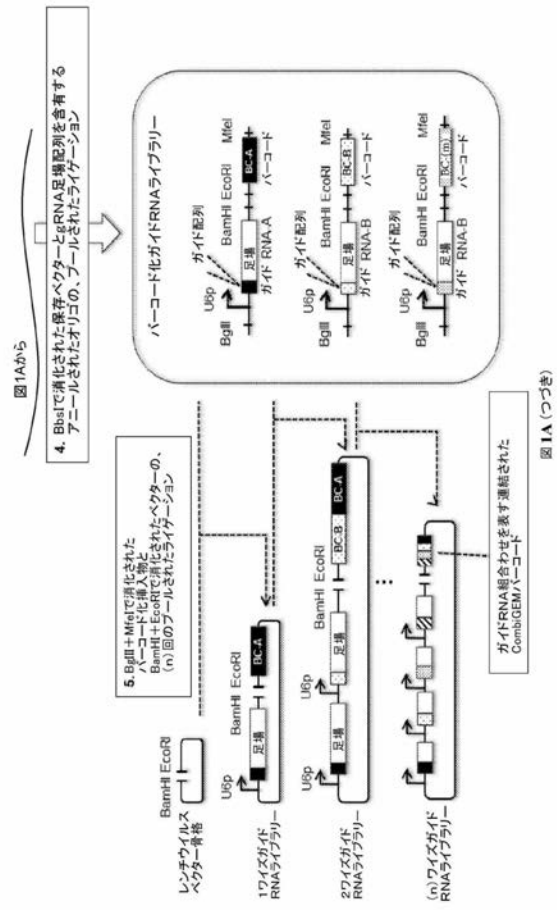
【図 1 A - 1】



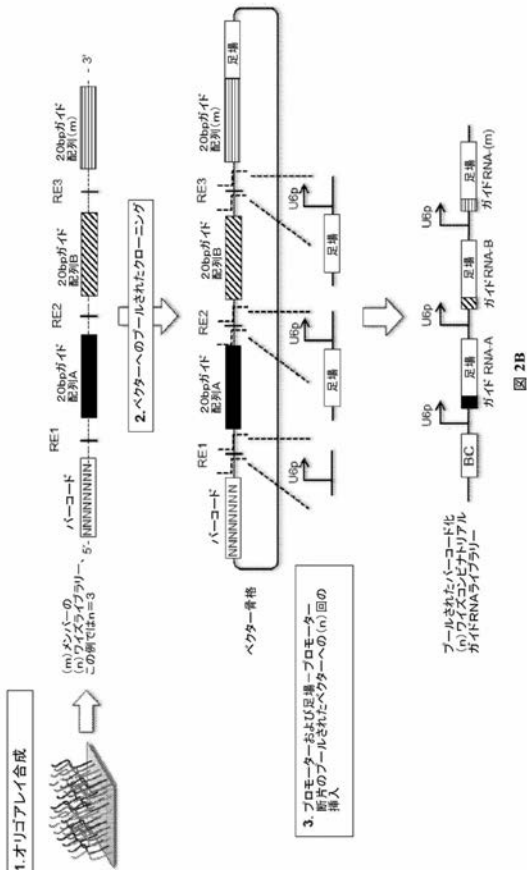
【図 2 A】



【図 1 A - 2】



【図 2 B】



【図 3 A】

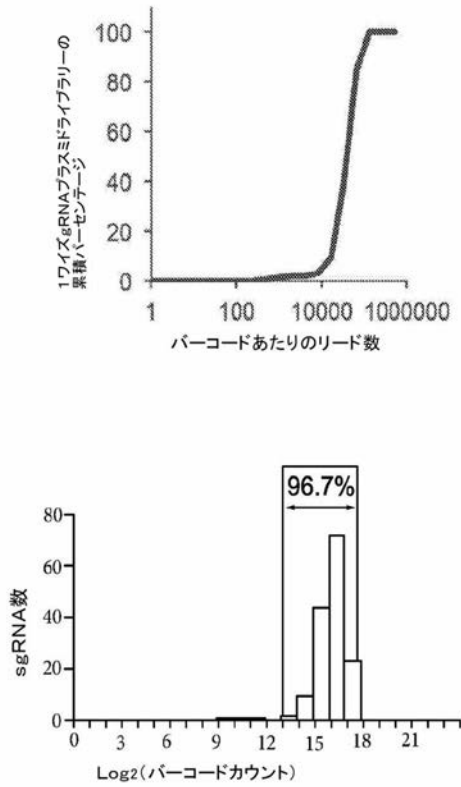


図 3A

【図 3 B】

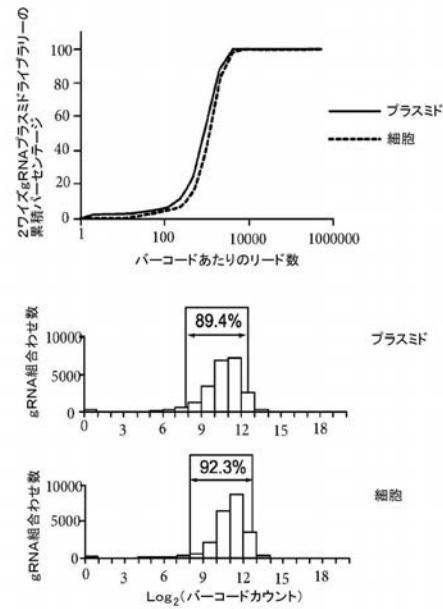
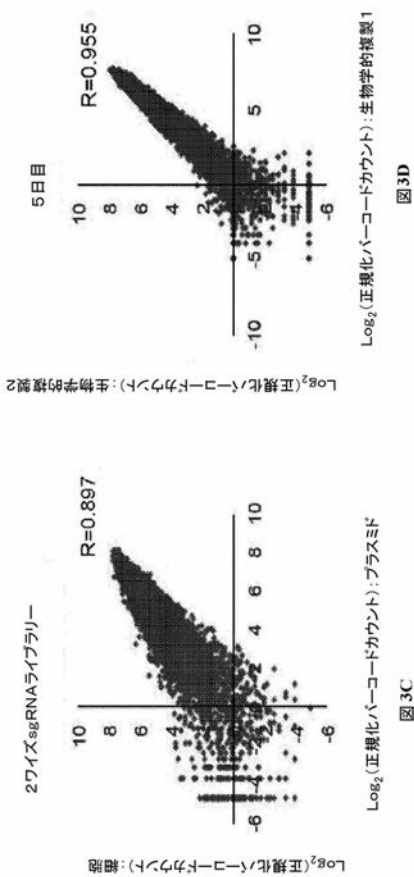
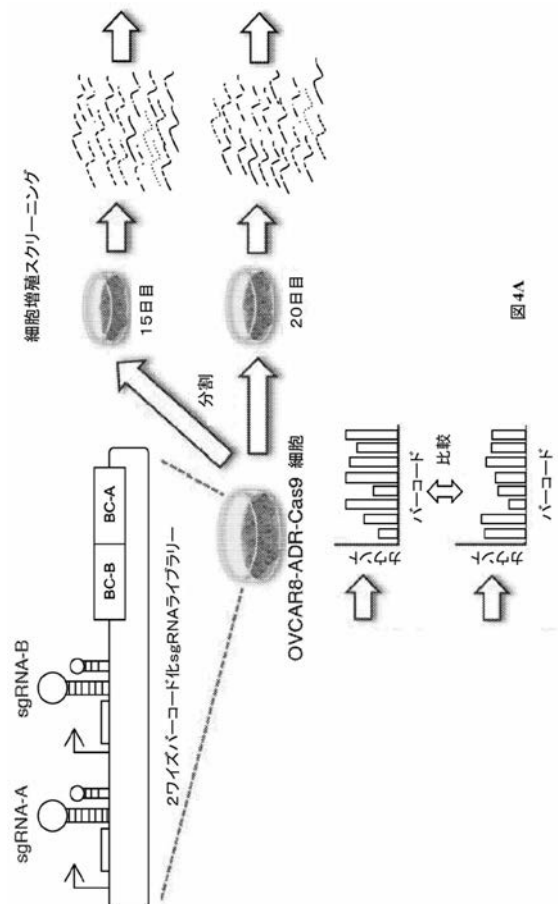


図 3B

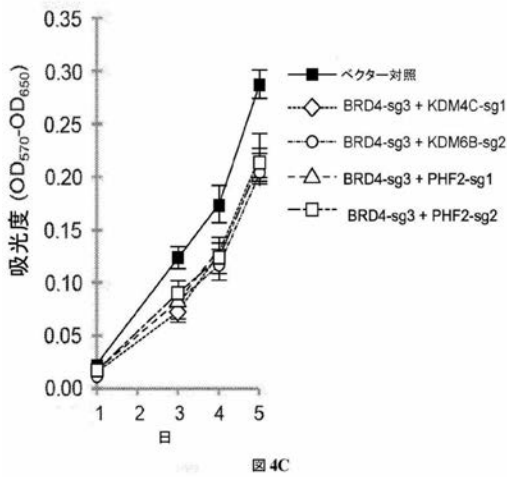
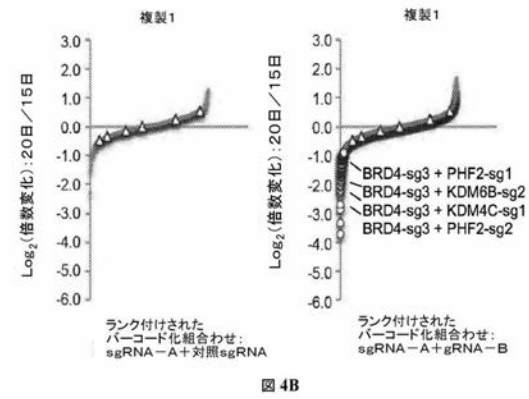
【図 3 C - 3 D】



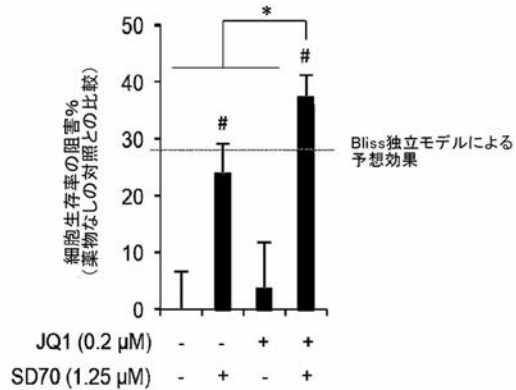
【図 4 A】



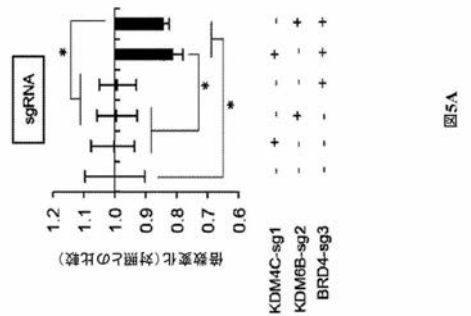
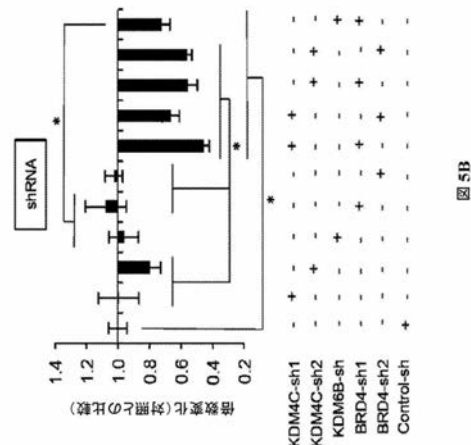
【図 4 B - 4 C】



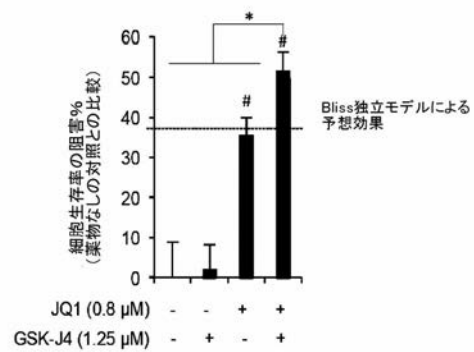
【図 5 C】



【図 5 A - 5 B】



【図 5 D】



【図 6 A】

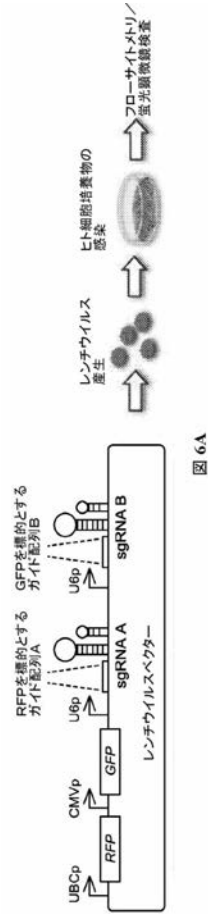


図 6A

【図 6 C - 6 D】

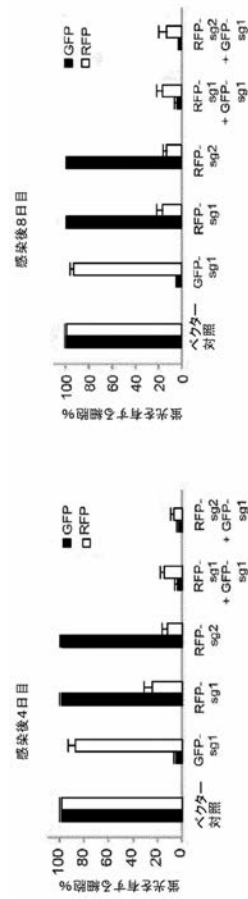


図 6C

図 6D

【図 6 B】

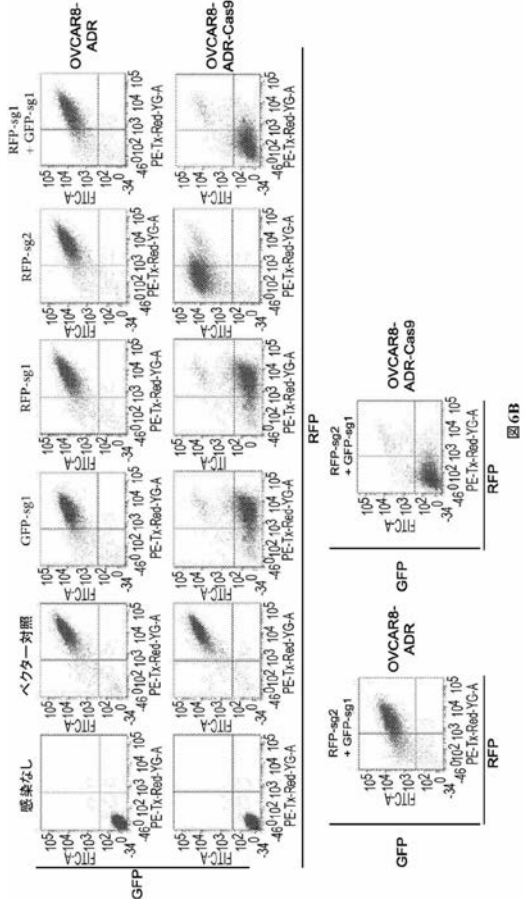


図 6B

【図 6 E】

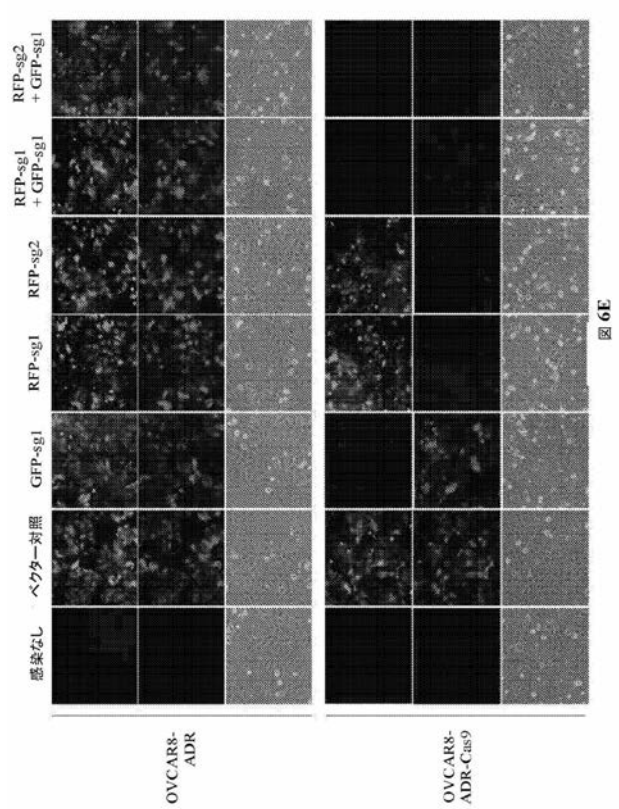


図 6E

【 図 7 A 】

sgRNA	切断なしのバンド	切断されたバンド
DNMT1-sg1	600	450/150
DNMT3B-sg1	544	400/150
PRMT2-sg3	559	370/170
HDAC2-sg1	871	500/300
ING4-sg1	502	300/200
KDM1B-sg3	499	350/150
KDM2A-sg3	455	300/150
PRMT6-sg1	849	550/300
KDM4C-sg1	419	264/155
KDM6B-sg2	489	273/216
BRD4-sg3	541	341/200

図 7A

【 図 7 B 】

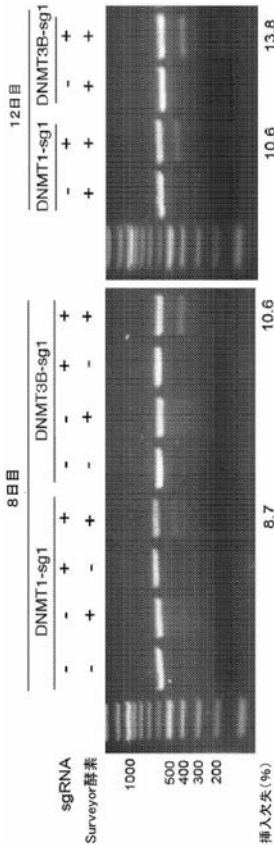


図 7B

【 図 7 C 】

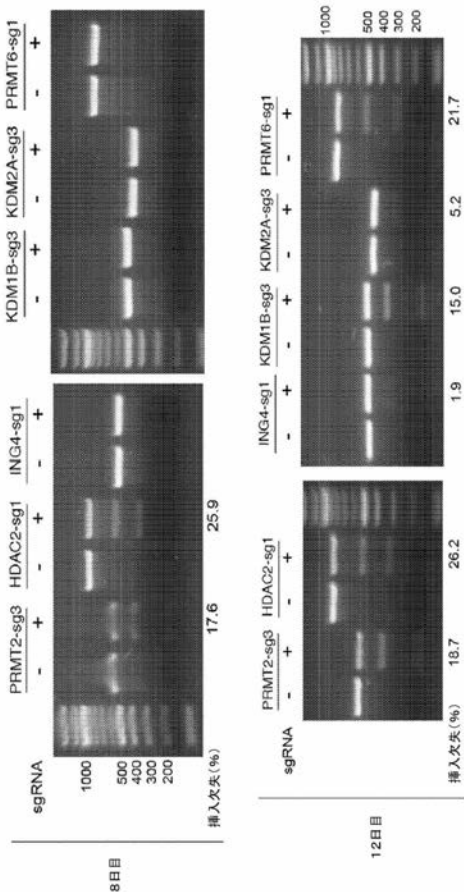


図 7C

【 図 8 A - 8 B 】

sgRNA	切断なしのバンド	切断されたバンド
KDM4C-sg1	419	264/155
KDM6B-sg2	489	273/216
BRD4-sg3	541	341/200

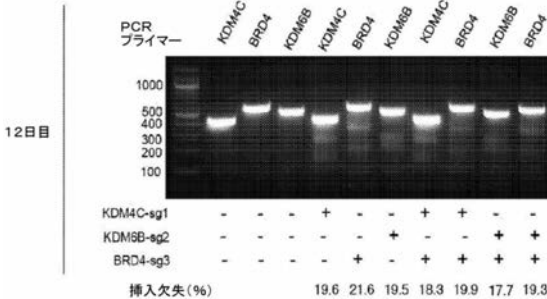


図 8A

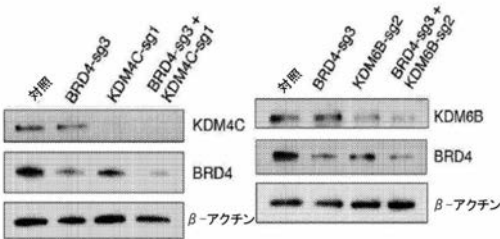


図 8B

【図 9 A - 2】

[illegible]

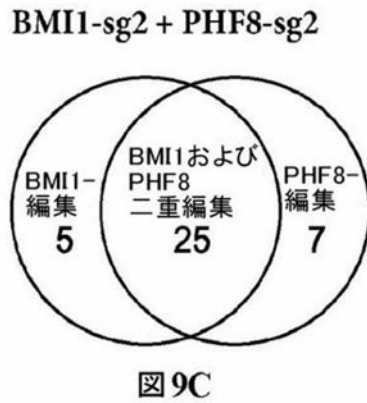
図9A(つづき)

【図 9 B - 2】

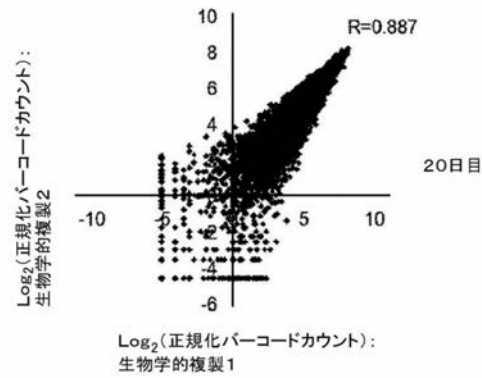
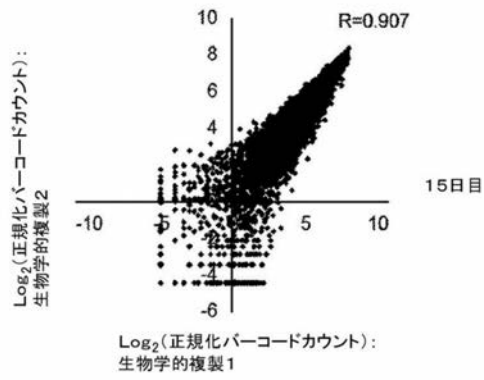
[illegible]

図 9B (つづき)

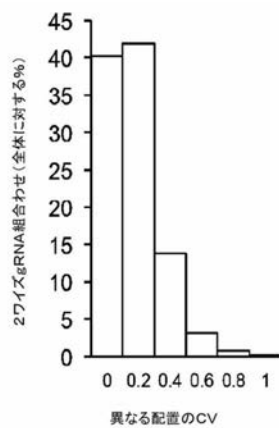
【図 9 C】



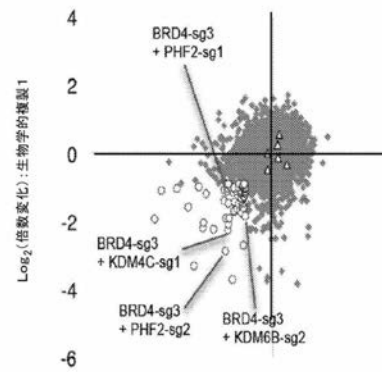
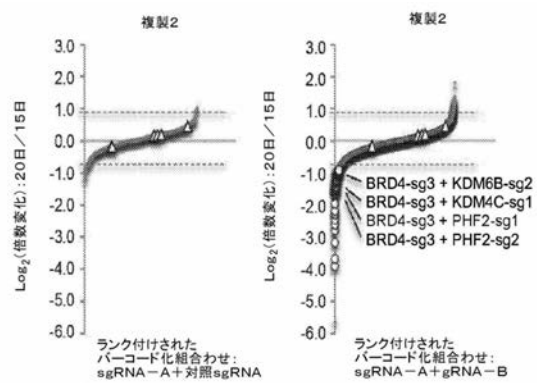
【図 10 A - 10 B】



【図 11】



【図 12 A - 12 B】



【図 1 2 C】

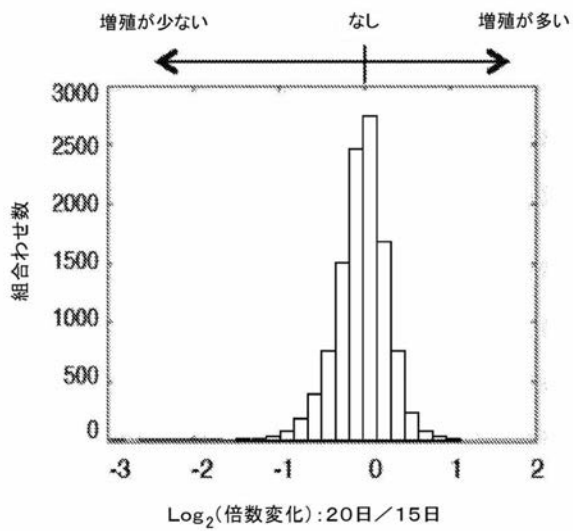


図 12C

【図 1 3】

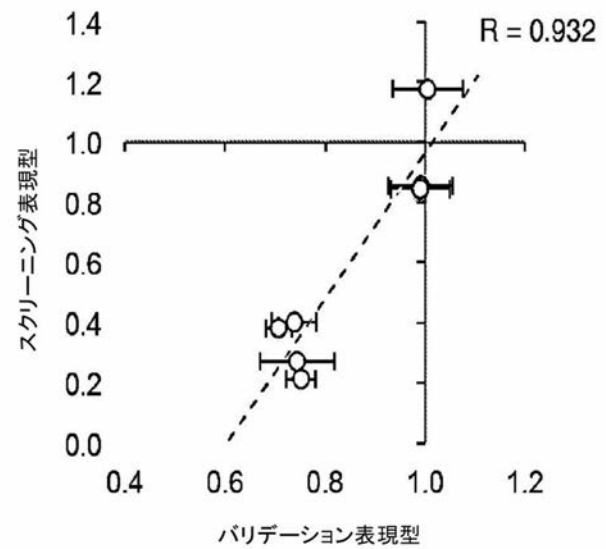
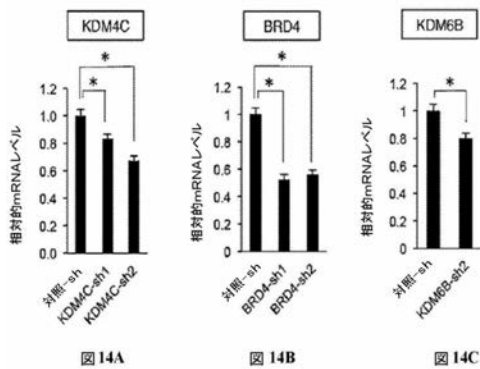
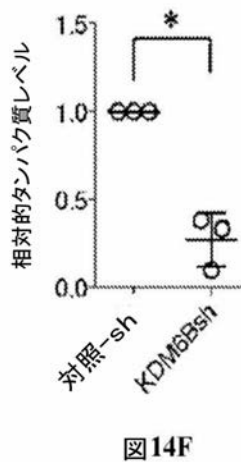
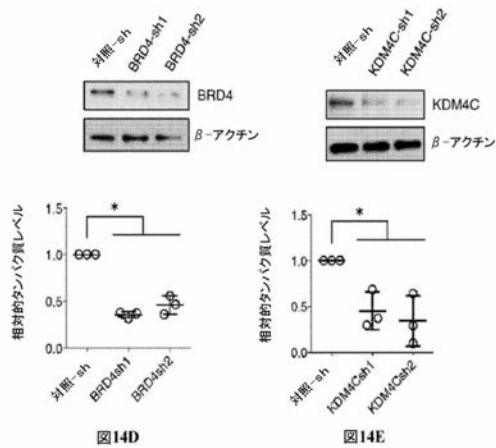
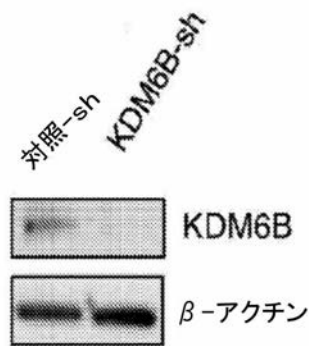


図 13

【図 1 4 A - 1 4 E】



【図 1 4 F】



【図 15】

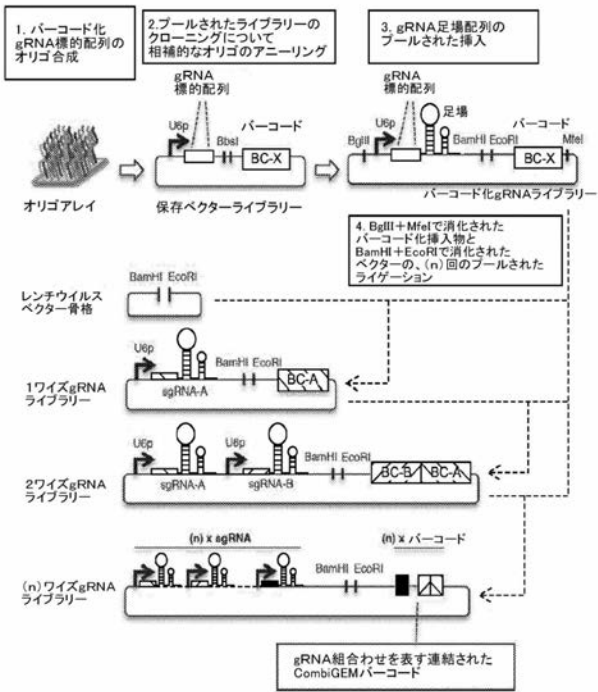


図 15

【図 16 A - 16 B】

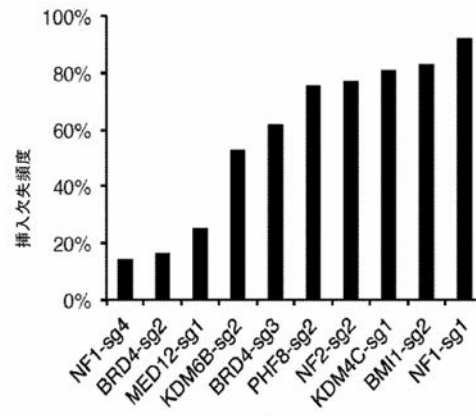


図 16A

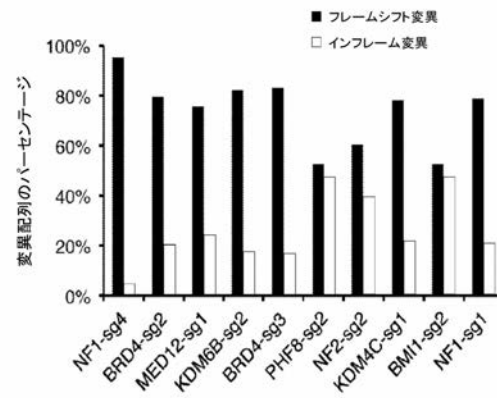
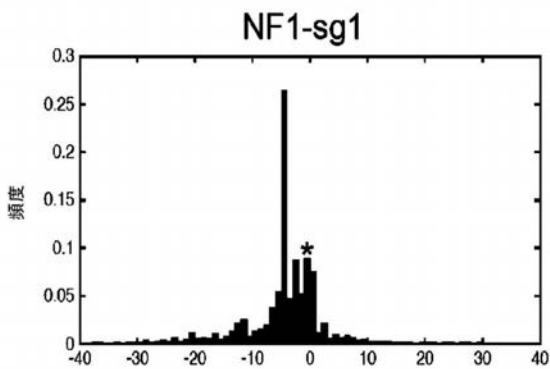


図 16B

【図 16 C - 1】



【図 16 C - 2】

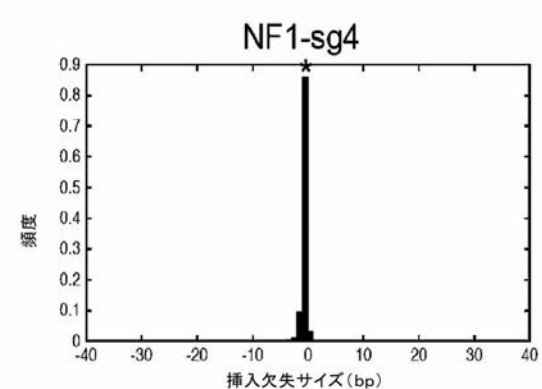
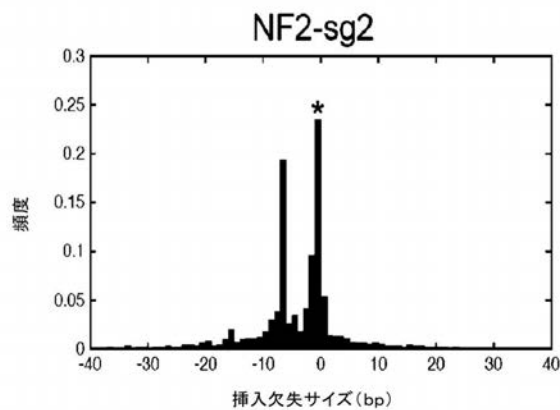
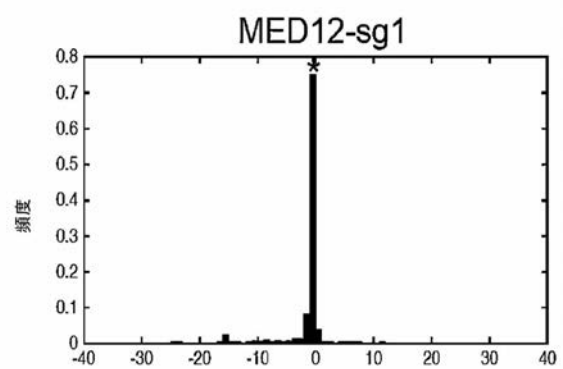


図 16C

16C (つづき)

【図 16 D】

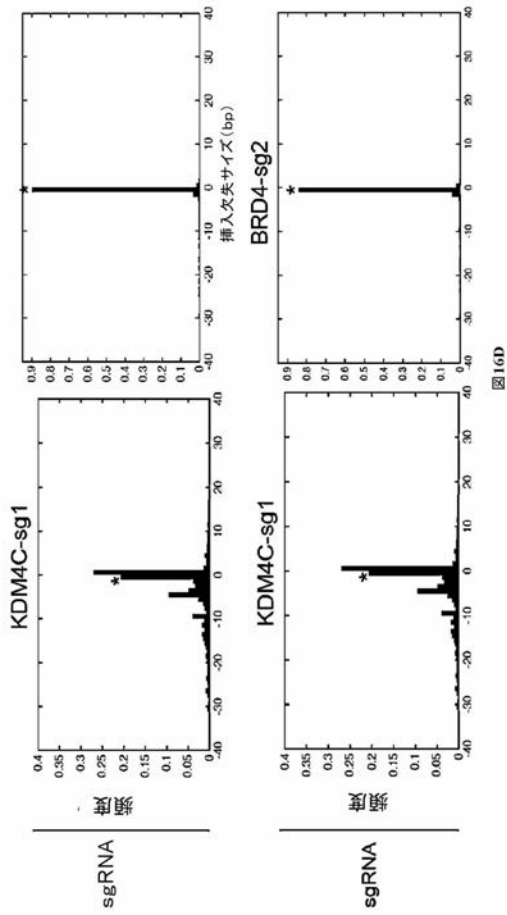


図16D

【図 17 A】

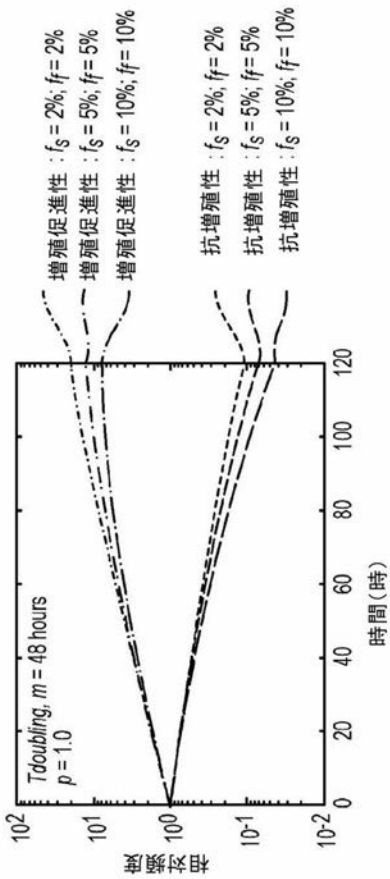


図 17A

【図 16 E】

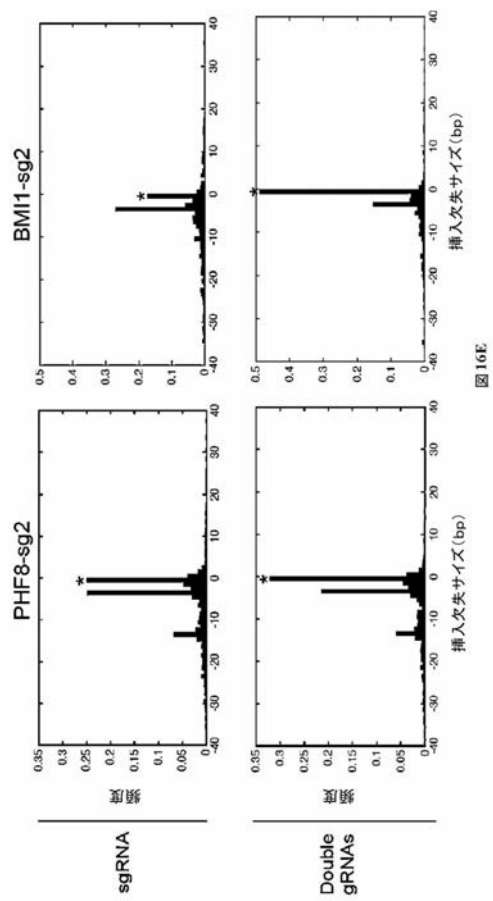


図16E

【図 17 B】

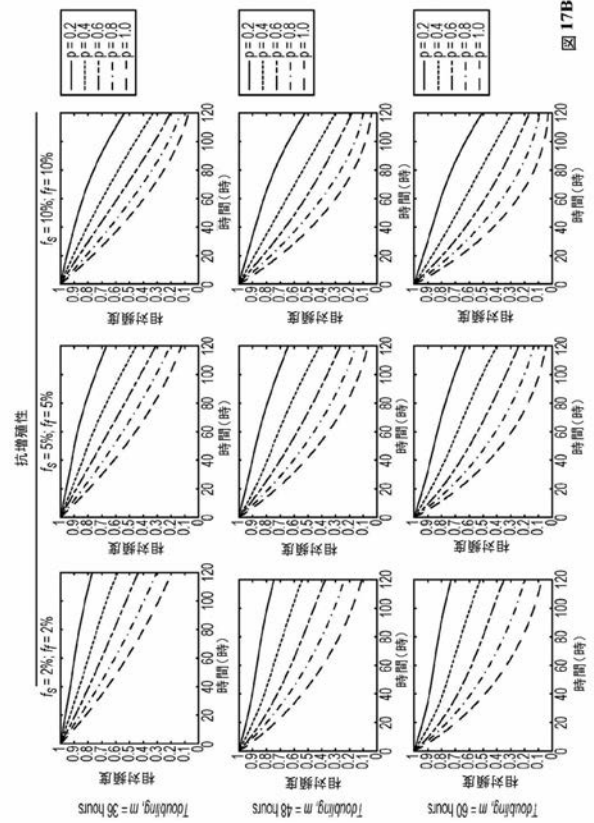


図 17B

【図 17 C】

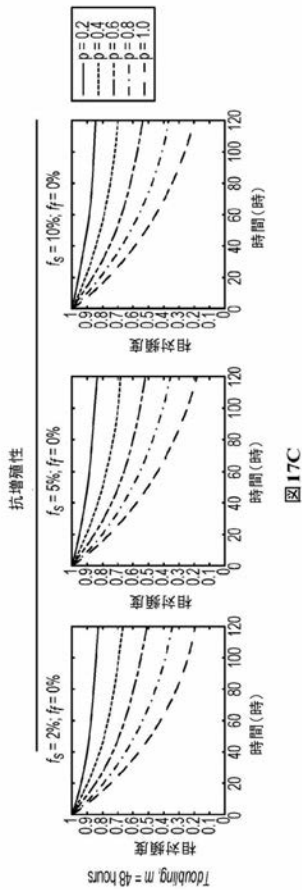


図 17C

【図 18】

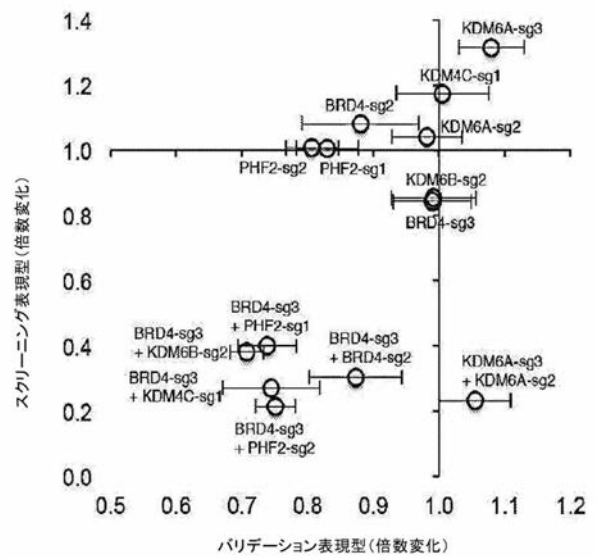


図 18

【図 19】

ガイド配列		PAM		
KDM4C-sg1	CCTTTGCAAGACCCGCACGA	TGG	80.85%	
	GCTTTGCCCGAACCACGA	GAG	0.29%	エキソン
	CCTAGGCCAGACCTGCACGA	TGG	0.23%	
	GCTCTGGAAGACCCGCACCA	GGG	0.21%	
	CCTTATCAAGACCCACACCA	GAG	0.15%	
KDM6B-sg2	ATCCCCCTCCTCGTAGCGCA	TGG	52.74%	
	TGCGCCCTCCTCCTAGCGCA	TGG	3.74%	エキソン
	CTGCCCTCCTGCTAGCGCC	TGG	1.01%	
	CTGCTCCTCCTGCTAGCGCT	GGG	0.43%	
	AACCAAGCTCCTGCTAGCTCA	GGG	0.32%	
	AGCCCGCTCCTGCTGGGGCA	CGG	0.19%	
	AGCGCCCTCCTCCTAGCTCA	GGG	0.17%	
	CTCCTCCTCCGCTAGCGCT	TGG	0.14%	
	CTCCTCCTCCTCCTACCGCA	AGG	n.d.	
	ATTCTCTCCTGCTACCGCA	AGG	n.d.	
CTCACCTCCTCCTAGCACCA	TAG	n.d.		
BRD4-sg3	GGGAACAATAAAGAAGCGCT	TGG	61.97%	
	TGGAAAAACAAGAAGAGCT	TGG	0.38%	エキソン
	GGGAAGTATAAGGAAGAGCT	CAG	0.26%	
	GTGAGCAATAAAGCAGCCCT	AAG	0.18%	
BRD4-sg2	TCTAGTCCATCCCCATTAC	TGG	16.65%	
	AATATTCCATTCCCCATTAC	TGG	0.33%	エキソン
	TGTTGTCCATACCTCATTAC	TGG	0.19%	
	TCTAGGTTCATGCACATTAC	TGG	0.19%	
	TCCACACCTTCCCCCATTTAC	TAG	0.25%	イントロン
	CCCATTTCTCCCCCATTTAC	CAG	0.21%	

図 19

【図 20 A - 20 B】

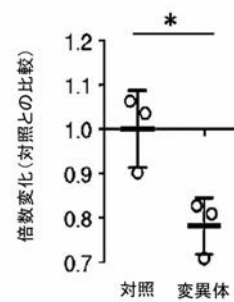


図 20A

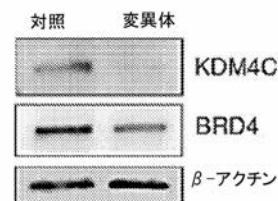


図 20B

【配列表】

2017534285000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/058304

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CAB Data, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NISSIM LIOR ET AL: "Multiplexed and Programmable Regulation of Gene Networks with an Integrated RNA and CRISPR/Cas Toolkit in Human Cells", MOLECULAR CELL, vol. 54, no. 4, 22 May 2014 (2014-05-22), pages 698-710, XP029028594, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2014.04.022 the whole document ----- -/--	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 May 2016

Date of mailing of the international search report

09/05/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, Horst

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/058304

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YUEXIN ZHOU ET AL: "High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells", NATURE, vol. 509, no. 7501, 9 April 2014 (2014-04-09), pages 487-491, XP055234634, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature13166 the whole document -----	1-19
A	GILBERT, L. A. ET AL.: "Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation", CELL, vol. 159, 23 October 2014 (2014-10-23), pages 647-661, XP002754118, cited in the application the whole document -----	1-19
A	WO 2014/005042 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 3 January 2014 (2014-01-03) cited in the application the whole document -----	1-19
A	S. K. UPADHYAY ET AL: "RNA-Guided Genome Editing for Target Gene Mutations in Wheat", G3: GENES GENOMES GENETICS, vol. 3, no. 12, 9 December 2013 (2013-12-09), pages 2233-2238, XP055195466, ISSN: 2160-1836, DOI: 10.1534/g3.113.008847 cited in the application the whole document -----	1-19
A	WO 2013/176772 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; UNIV VIENNA [AT]; DOUDNA JENNIFER A [US]; JINEK) 28 November 2013 (2013-11-28) the whole document -----	1-19
A	WO 2014/093694 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; HARVARD COLLE) 19 June 2014 (2014-06-19) the whole document -----	1-19
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/058304

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	O. SHALEM ET AL: "Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells", SCIENCE, vol. 343, no. 6166, 12 December 2013 (2013-12-12), pages 84-87, XP055115506, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1247005 cited in the application the whole document -----	1-19
A	T. WANG ET AL: "Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System", SCIENCE, vol. 343, no. 6166, 12 December 2013 (2013-12-12), pages 80-84, XP055115509, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1246981 the whole document	1-19
A	-& Tim Wang et al.,: "Supplementary Material for Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system.", Science 343:80-84,2014 12 December 2013 (2013-12-12), pages 1-28, XP002754119, DOI: 10.1126/science.1246981 Retrieved from the Internet: URL:http://science.sciencemag.org/content/sci/suppl/2013/12/11/science.1246981.DC1/Wang.SM.pdf [retrieved on 2016-02-08] the whole document -----	1-19
A,P	Jia-Wang Wang ET AL: "CRISPR/Cas9 nuclease cleavage combined with Gibson assembly for seamless cloning", BioTechniques, April 2015 (2015-04), page 161, XP055213773, England DOI: 10.2144/000114261 Retrieved from the Internet: URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861928 [retrieved on 2016-02-08] the whole document -----	1-19
A,P	W0 2015/153940 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 8 October 2015 (2015-10-08) the whole document ----- -/--	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/058304

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	KENNEDY EDWARD M ET AL: "Optimization of a multiplex CRISPR/Cas system for use as an antiviral therapeutic.", METHODS (SAN DIEGO, CALIF.) DEC 2015, vol. 91, December 2015 (2015-12), pages 82-86, XP002754120, ISSN: 1095-9130 the whole document -----	
T	XUE HUI-YING ET AL: "CRISPR-Cas9 for medical genetic screens: applications and future perspectives.", JOURNAL OF MEDICAL GENETICS FEB 2016, vol. 53, no. 2, 8 February 2016 (2016-02-08), pages 91-97, XP002754121, ISSN: 1468-6244 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/058304**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-19

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2015/058304

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-19

A genetic construct comprising a first DNA element comprising a CRISPR guide sequence and a scaffold sequence; a first compatible end element and a second compatible end element flanking the first DNA element, wherein the first and second compatible end elements are capable of annealing to each other; a barcode element; a third compatible end element and a fourth compatible end element flanking the barcode element, wherein the third and fourth compatible end elements are capable of annealing to each other but are not capable of annealing to the first or second compatible end elements; and a separation site located between the fourth compatible end element and the first compatible end element, wherein the DNA element, first compatible end element, and second compatible end element are on one side of the separation site, and the barcode element, the third compatible end element, and the fourth compatible end element are on the other side of the separation site; A genetic construct comprising a plurality of DNA elements, wherein each DNA element of the plurality of DNA element comprises a CRISPR guide sequence and a scaffold sequence; A method for generating a combinatorial vector; A genetic construct comprising at least two CRISPR guide sequences; a barcode element; and a restriction recognition site located between each CRISPR guide sequence and between the barcode element and the CRISPR guide sequence nearest to the barcode element; A genetic construct comprising a plurality of DNA elements, each comprising a CRISPR guide sequence and a scaffold sequence; a barcode element; and a promoter sequence located upstream of each of the DNA elements of the plurality of DNA elements; A method for generating a combinatorial vector, comprising (a) providing a vector comprising: a plurality of CRISPR guide sequences; a barcode element, wherein the barcode element is located downstream and/or downstream of the plurality of CRISPR guide sequences;

2. claims: 20-50

A composition comprising two or more inhibitors targeting two or more epigenetic genes selected from the combinations of epigenetic genes set forth in Table 2; wherein each of the two or more inhibitors reduce or prevent expression of an epigenetic gene or reduce or prevent activity of a protein encoded by the epigenetic gene, wherein each of the inhibitors is selected from the group consisting of a CRISPR guide sequence and scaffold sequence; an shRNA; and a small molecule; wherein the combination of epigenetic genes comprises BRD4 and KDM4C or BRD4 and KDM6B, wherein the inhibitor of BRD4 is JQ1

International Application No. PCT/US2015/058304

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

((6S)-4-(4-Chlorophenyl)-2,3,9-trimethyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepine-6-acetic acid 1,1-dimethylethyl ester), wherein the inhibitor of KDM4C is SD70

(N-(furan-2-yl(8-hydroxyquinolin-7-yl)methyl)isobutyramide), wherein the inhibitor of KDM6B is GSK-J4 (ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzo[d]azepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate, monohydrochloride); A method for reducing proliferation of a cell, comprising contacting the cell with a combination of two or more inhibitors targeting two or more epigenetic genes selected from the combinations of epigenetic genes set forth in Table 2; A method for treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a combination of two or more inhibitors targeting two or more epigenetic genes selected from the combinations of epigenetic genes set forth in Table 2, wherein each of the two or more inhibitors are administered in an effective amount;

3. claims: 51, 52

A method for identifying a combination of inhibitors of epigenetic genes that reduces proliferation of a cell, the method comprising: contacting a first population of cells and a second population of cells with a plurality of combinations of two or more CRISPR guide sequences and scaffold sequences and a Cas9 endonuclease; culturing the first population of cells and the second population of cells such that the second population of cells is cultured for a longer duration compared to the first population of cells; identifying the combinations of two or more CRISPR guide sequences and scaffold sequences in the first population of cells and the combinations of two or more CRISPR guide sequences and scaffold sequences in the second population of cells; comparing the abundance of each combination of two or more CRISPR guide sequences and scaffold sequences in the first population of cells to the abundance of each combination of two or more CRISPR guide sequences and scaffold sequences in the second population of cells; and identifying a combination of two or more CRISPR guide sequences and scaffold sequences that is absent from or in reduced abundance in the second population of cells but present in or in increased abundance in the first population of cells as a combination of CRISPR guide sequences and scaffold sequences that reduces cell proliferation; A method for identifying a combination of genes to be inhibited to reduce proliferation of a cell;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/058304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014005042	A2	03-01-2014	
		AU 2013282323 A1	19-02-2015
		CA 2877962 A1	03-01-2014
		CN 104508130 A	08-04-2015
		EP 2867361 A2	06-05-2015
		HK 1207886 A1	12-02-2016
		HK 1210217 A1	15-04-2016
		JP 2015521850 A	03-08-2015
		SG 11201408736S A	30-03-2015
		US 2015141263 A1	21-05-2015
		WO 2014005042 A2	03-01-2014
WO 2013176772	A1	28-11-2013	
		AU 2013266968 A1	20-11-2014
		CA 2872241 A1	28-11-2013
		CN 104854241 A	19-08-2015
		DE 202013012240 U1	02-02-2016
		EA 201401319 A1	29-05-2015
		EP 2800811 A1	12-11-2014
		GB 2518764 A	01-04-2015
		HK 1204003 A1	06-11-2015
		HK 1207107 A1	22-01-2016
		JP 2015523856 A	20-08-2015
		KR 20150016588 A	12-02-2015
		PE 03362015 A1	25-03-2015
		PH 12014502574 A1	21-01-2015
		SG 11201407702X A	30-12-2014
		US 2014068797 A1	06-03-2014
		US 2016046961 A1	18-02-2016
		US 2016060653 A1	03-03-2016
		US 2016060654 A1	03-03-2016
		US 2016068864 A1	10-03-2016
		WO 2013176772 A1	28-11-2013
WO 2014093694	A1	19-06-2014	
		US 2014234972 A1	21-08-2014
		US 2014248702 A1	04-09-2014
		US 2014310830 A1	16-10-2014
		WO 2014093694 A1	19-06-2014
WO 2015153940	A1	08-10-2015	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/4709 (2006.01)	A 6 1 K 31/4709	
A 6 1 K 31/55 (2006.01)	A 6 1 K 31/55	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ウォン, アラン, シウ, ラン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、ハーバード ストリート 3
3 4、アパートメント エー 2

(72)発明者 チェ, チン, ジー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、ハーバード ストリート 3
3 4、アパートメント エー 2

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ52 QR14 QR32 QR35 QR62 QR77
QR80 QS25 QX02
4C084 AA20 AA24 MA02 NA14 ZB261 ZC411
4C086 AA01 AA02 BC28 BC42 CB30 GA02 GA07 GA08 MA02 MA04
NA14 ZA81 ZB26 ZC41