(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-508117
(P2025-508117A)
(43)公表日　令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類　FI
C12N 9/22 (2006.01)　C12N 9/22　ZNA
C12N 15/55 (2006.01)　C12N 15/55
C12N 15/31 (2006.01)　C12N 15/31
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/09　100
C12N 15/11 (2006.01)　C12N 15/11　Z
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全33頁）

(21)出願番号　特願2024-553724(P2024-553724)
(86)(22)出願日　令和5年1月30日(2023.1.30)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月5日(2024.11.5)
(86)国際出願番号　PCT/CN2023/073828
(87)国際公開番号　WO2023/169093
(87)国際公開日　令和5年9月14日(2023.9.14)
(31)優先権主張番号　202210237008.4
(32)優先日　令和4年3月10日(2022.3.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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
最終頁に続く

(71)出願人　520479722
チンタオ、キングアグルート、ケミカル、コンパウンド、カンパニー、リミテッド
QINGDAO KINGAGROOT CHEMICAL COMPOUND CO.,LTD.
中華人民共和国シャントン、チンタオ、ファンタオ、ディストリクト、チンロンへ、ロード、ナンバー５３
NO.５３,QINGLONGHE ROAD,HUANGDAO DISTRICT,QINGDAO,SHANDONG,CHINA
(74)代理人　100120031
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　人工ヌクレアーゼおよびその使用

(57)【要約】
本開示は、生細胞を編集するための人工ヌクレアーゼおよびその使用を提供する。

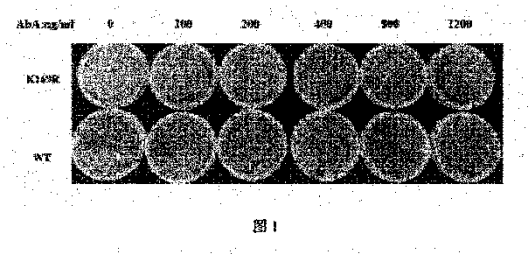


図１

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１に記載されているアミノ酸配列と比較して以下の突然変異：１６９位のアミノ酸はリジンからアルギニンへと突然変異されている、を有するアミノ酸配列を含んでなる、人工ヌクレアーゼ。
【請求項２】
前記アミノ酸配列がまた、以下の群：５８９位のアミノ酸は、アスパラギンから任意の他のアミノ酸、好ましくはヒスチジンへと突然変異されている；５３５位のアミノ酸は、リジンから任意の他のアミノ酸、好ましくはアルギニンへと突然変異されている；５６３位のアミノ酸は、リジンから任意の他のアミノ酸、好ましくはアルギニンへと突然変異されている；６０１位のアミノ酸は、スレオニンから任意の他のアミノ酸、好ましくはアルギニンへと突然変異されている；６２４位のアミノ酸は、セリンから任意の他のアミノ酸、好ましくはアルギニンへと突然変異されている、から選択される１つ以上の突然変異を有する、請求項１に記載の人工ヌクレアーゼ。
【請求項３】
前記アミノ酸配列が更に、配列番号１に記載されている前記アミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の配列同一性を有する、請求項１または２に記載の人工ヌクレアーゼ。
【請求項４】
配列番号２、配列番号３、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３および配列番号１４からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、請求項１～３のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ。
【請求項５】
配列番号１に記載されているアミノ酸配列を有するヌクレアーゼと比較して酵母において改善された編集活性を有する、請求項１～４のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ。
【請求項６】
請求項１～５のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼの１つまたは２つ以上を組合せで含んでなる酵素カクテル。
【請求項７】
細胞のゲノム中の標的領域を改変する方法であって、
（ａ）細胞を、
請求項１～５のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ；
前記ヌクレアーゼと複合体化する能力を有する人工ガイド核酸；ならびに
前記標的領域に対して相補的であり、および前記標的領域と比べて配列中に変化を有する核酸をコードする編集配列
と接触させること；ならびに
（ｂ）前記ヌクレアーゼ、ガイド核酸および編集配列が、前記細胞の前記ゲノムの標的領域中でゲノム編集を作出することを可能とすること
を含む、方法。
【請求項８】
前記人工ガイド核酸および前記編集配列が単一の核酸として提供される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記単一の核酸が更に、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）部位中の突然変異を含んでなる、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】

（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ；
（ｂ）前記ヌクレアーゼと複合体化する能力を有する人工ガイド核酸；および
（ｃ）細胞のゲノム中の標的領域の配列と比べて配列中に変化を有する編集配列
を含む核酸ガイドヌクレアーゼシステムであって；
前記システムが、前記ヌクレアーゼ、前記人工ガイド核酸、および前記編集配列により促進される前記細胞のゲノム中の標的領域中のゲノム編集を結果としてもたらす、
システム。
【請求項１１】
前記人工ガイド核酸および前記編集配列が単一の核酸として提供される、請求項１０に記載のシステム。
【請求項１２】
前記単一の核酸が更に、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）部位中の突然変異を含んでなる、請求項１１に記載のシステム。
【請求項１３】
（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ；および
（ｂ）前記ヌクレアーゼと複合体化する能力を有する人工ガイド核酸であって、ＵＡＵＵ、ＵＵＵＵ、ＵＧＵＵ、ＵＣＵＵ、ＵＣＵＵＵまたはＵＡＧＵの配列を含んでなるループ配列を含んでなる、人工ガイド核酸
を含む、組成物。
【請求項１４】
前記人工ガイド核酸が異種人工ガイド核酸である、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記ヌクレアーゼが、特定の生物からの細胞における使用のためのコドン最適化された核酸配列によりコードされる、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１６】
（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ；および
（ｂ）前記ヌクレアーゼと複合体化する能力を有する異種人工ガイド核酸
を含む、核酸ガイドヌクレアーゼシステム。
【請求項１７】
（ｃ）標的領域の配列と比べて配列中に変化を有する編集配列を更に含んでなる、請求項１６に記載のシステム。
【請求項１８】
前記標的化システムが、前記ヌクレアーゼ、前記異種人工ガイド核酸、および前記編集配列により促進される前記標的領域中の編集を結果としてもたらす、請求項１７に記載のシステム。
【請求項１９】
前記人工ガイド核酸が、ＵＡＵＵ、ＵＵＵＵ、ＵＧＵＵ、ＵＣＵＵ、ＵＣＵＵＵまたはＵＡＧＵの配列を含んでなるループ配列を含んでなる、請求項１６に記載のシステム。
【請求項２０】
前記ヌクレアーゼが、特定の生物からの細胞における使用のためのコドン最適化された核酸配列によりコードされる、請求項１６に記載のシステム。
【請求項２１】
請求項１～５のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼを含んでなる遺伝子編集用のキット。
【請求項２２】
製剤またはキットの調製における請求項１～５に記載の人工ヌクレアーゼの使用であって、前記製剤またはキットが、（ｉ）ゲノム編集；（ｉｉ）標的核酸診断；（ｉｉｉ）疾患処置のために使用される、使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本発明は、生細胞を編集するための人工ヌクレアーゼおよびその応用に関する。
【背景技術】
【０００２】
以下の議論において、ある特定の物品および方法が、背景技術および導入の目的のために記載される。本明細書に含まれるいかなる記載も、先行技術の「承認」とみなされるべきではない。本出願人は、本明細書中で参照される方法は、適用可能な法定条項の下で先行技術を構成しないことを適切な場合に実証する権利を明示的に保持する。
【０００３】
生細胞のゲノムに対して精密で、標的化された変化を実行する能力は、生物医学研究および開発において長い間存在している目標である。最近、遺伝子配列、およびそれゆえ遺伝子機能のマニピュレーションを可能とする様々なヌクレアーゼが同定されている。これらのヌクレアーゼは核酸ガイドヌクレアーゼを含む。核酸ガイドヌクレアーゼが認識できる標的配列の範囲は、しかしながら、所望される標的配列の近くに位置するべき特定のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の必要性により制約されている。ＰＡＭは、ｇＲＮＡ／ヌクレアーゼ複合体により認識される短いヌクレオチド配列であり、複合体は生細胞中での標的配列の編集を指令する。異なる核酸ガイドヌクレアーゼのための精密なＰＡＭ配列および長さの要求は様々であるが；ＰＡＭは、典型的には、標的配列に隣接するかまたは近接する２～７塩基対の配列であり、ヌクレアーゼに依存して、標的配列の５’または３’にあることができる。核酸ガイドヌクレアーゼの操作は、ＰＡＭ選好性の変更を可能とし得、異なる生物における編集最適化を可能とし得、および／または酵素忠実度を変更し得；すべての変化は、ある特定の編集タスクのための特定の核酸ガイドヌクレアーゼの汎用性を増加させ得る。
【０００４】
そのため、中国特許出願公開第１１１５１１９０６号明細書、中国特許出願公開第１１３２２７３６８号明細書などの、改善されたヌクレアーゼに対する必要性が、核酸ガイドヌクレアーゼ遺伝子編集の技術分野において存在する。本明細書に記載される人工ヌクレアーゼはこの必要性もまた満たす。
【発明の概要】
【０００５】
この概要は、本発明の詳細な説明において下記に更に記載される単純化された形態において概念の選択を導入するために提供される。この概要は、クレームされる主題の鍵となるまたは必須の特色を同定することは意図されず、クレームされる主題の範囲を限定するために使用されることもまた意図されない。クレームされる主題の他の特色、詳細、用途、および利点は、付随する図面において図示されるおよび添付の特許請求の範囲において定義される本発明の態様を含む以下に記載される本発明の詳細な説明から明らかとなる。
【０００６】
本発明は、配列番号１に記載されているアミノ酸配列と比較して以下の突然変異：１６９位のアミノ酸はリジンからアルギニンへと突然変異されている、を有するアミノ酸配列を含んでなる人工ヌクレアーゼを提供する。
【０００７】
１つの特定の実施形態において、アミノ酸配列はまた、以下の群：５８９位のアミノ酸は、アスパラギンから任意の他のアミノ酸、好ましくはヒスチジンへと突然変異されている；５３５位のアミノ酸は、リジンから任意の他のアミノ酸、好ましくはアルギニンへと突然変異されている；５６３位のアミノ酸は、リジンから任意の他のアミノ酸、好ましくはアルギニンへと突然変異されている；６０１位のアミノ酸は、スレオニンから任意の他のアミノ酸、好ましくはアルギニンへと突然変異されている；６２４位のアミノ酸は、セリンから任意の他のアミノ酸、好ましくはアルギニンへと突然変異されている、から選択される１つ以上の突然変異を有する。
【０００８】

別の特定の実施形態において、アミノ酸配列は更に、配列番号１に記載されているアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の配列同一性を有する。

【０００９】

本発明はまた、配列番号２、配列番号３、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３および配列番号１４からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる人工ヌクレアーゼを提供する。

【００１０】

別の特定の実施形態において、人工ヌクレアーゼは、配列番号１に記載されているアミノ酸配列を有するヌクレアーゼと比較して酵母において改善された編集活性を有する。

【００１１】

本発明はまた、人工ヌクレアーゼの１つまたは２つ以上を組合せで含んでなる酵素カクテルを提供する。

【００１２】

本発明はまた、細胞のゲノム中の標的領域を改変する方法であって、

（ａ）細胞を、

人工ヌクレアーゼ；

ヌクレアーゼと複合体化する能力を有する人工ガイド核酸；ならびに

標的領域に対して相補的であり、および標的領域と比べて配列中に変化を有する核酸をコードする編集配列

と接触させること；ならびに

（ｂ）ヌクレアーゼ、ガイド核酸および編集配列が、細胞のゲノムの標的領域中でゲノム編集を作出することを可能とすること

を含む、方法を提供する。

【００１３】

１つの特定の実施形態において、人工ガイド核酸および編集配列は単一の核酸として提供される。

【００１４】

別の特定の実施形態において、単一の核酸は更に、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）部位中の突然変異を含んでなる。

【００１５】

本発明はまた、

（ａ）人工ヌクレアーゼ；

（ｂ）ヌクレアーゼと複合体化する能力を有する人工ガイド核酸；および

（ｃ）細胞のゲノム中の標的領域の配列と比べて配列中に変化を有する編集配列

を含んでなる核酸ガイドヌクレアーゼシステムであって、

上記システムが、ヌクレアーゼ、人工ガイド核酸、および編集配列により促進される細胞のゲノム中の標的領域中のゲノム編集を結果としてもたらす、

システムを提供する。

【００１６】

１つの特定の実施形態において、人工ガイド核酸および編集配列は単一の核酸として提供される。

【００１７】

別の特定の実施形態において、単一の核酸は更に、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）部位中の突然変異を含んでなる。

【００１８】

本発明はまた、

（ａ）人工ヌクレアーゼ；および
（ｂ）ヌクレアーゼと複合体化する能力を有する人工ガイド核酸であって、ＵＡＵＵ、ＵＵＵＵ、ＵＧＵＵ、ＵＣＵＵ、ＵＣＵＵＵまたはＵＡＧＵの配列を含んでなるループ配列を含んでなる、人工ガイド核酸
を含んでなる組成物を提供する。
【００１９】
１つの特定の実施形態において、人工ガイド核酸は異種人工ガイド核酸である。
【００２０】
別の特定の実施形態において、ヌクレアーゼは、特定の生物からの細胞における使用のためのコドン最適化された核酸配列によりコードされる。
【００２１】
本発明はまた、
（ａ）人工ヌクレアーゼ；および
（ｂ）ヌクレアーゼと複合体化する能力を有する異種人工ガイド核酸
を含んでなる核酸ガイドヌクレアーゼシステムを提供する。
【００２２】
１つの特定の実施形態において、システムは更に、（ｃ）標的領域の配列と比べて配列中に変化を有する編集配列を含んでなる。
【００２３】
別の特定の実施形態において、標的化システムは、ヌクレアーゼ、異種人工ガイド核酸、および編集配列により促進される標的領域中の編集を結果としてもたらす。
【００２４】
別の特定の実施形態において、人工ガイド核酸は、ＵＡＵＵ、ＵＵＵＵ、ＵＧＵＵ、ＵＣＵＵ、ＵＣＵＵＵまたはＵＡＧＵの配列を含んでなるループ配列を含んでなる。
【００２５】
別の特定の実施形態において、ヌクレアーゼは、特定の生物からの細胞における使用のためのコドン最適化された核酸配列によりコードされる。
【００２６】
本発明はまた、人工ヌクレアーゼを含んでなる遺伝子編集用のキットを提供する。
【００２７】
本発明はまた、（ｉ）ゲノム編集；（ｉｉ）標的核酸診断；（ｉｉｉ）疾患処置のための調製物またはキットの調製における人工ヌクレアーゼの使用を提供する。
【００２８】
本発明のこれらの態様ならびに他の特色および利点は、下記においてより詳細に記載される。
【図面の簡単な説明】
【００２９】
【図１】ＴＤＯ／－Ｔｒｐ／－Ｌｅｕ／－Ｕｒａプレート上のＡｂＡに対する突然変異体Ｋ１６９Ｒおよび野生型ｄＭａｄ７（ＷＴ）の活性化強度を表す。
【図２】３－ＡＴに対するｄＭａｄ７の各々の突然変異体の耐性を表す。
【図３】Ｍａｄ７二重突然変異体のインビトロ酵素活性アッセイを表す。
【図４】イネプロトプラスト中のＭａｄ７突然変異体によるＯｓＰＰＯ１遺伝子編集のシークエンシング結果を表す。
【図５】イネプロトプラスト中のＭａｄ７突然変異体によるＯｓＹＳＡ遺伝子編集のシークエンシング結果を表す。
【図６】上パネルは、Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ突然変異体によるイネＯｓＧＤＩ１遺伝子編集の結果を表し；下パネルは、Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ突然変異体によるイネＳ－ＯｓＧＤＩ１遺伝子編集の結果を表す。
【図７】ダイズの毛状根系におけるＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈの編集効率試験を表す。

【図８】Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈによるゼブラフィッシュチロシナーゼ遺伝子（ｔｙｒ）編集のシークエンシング結果を表す。
【図９】Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９ＨによるブタＳＯＣＳ２遺伝子編集のシークエンシング結果を表す。
【発明を実施するための形態】
【００３０】
【表１】

配列番号	名称
配列番号１	Ｍａｄ７
配列番号２	Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ
配列番号３	Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ
配列番号４	ｄＭａｄ７
配列番号５	ｄＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ
配列番号６	ｄＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５３５Ｒ
配列番号７	ｄＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５６３Ｒ
配列番号８	ｄＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ
配列番号９	ｄＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｔ６０１Ｒ
配列番号１０	ｄＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｓ６２４Ｒ
配列番号１１	Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５３５Ｒ
配列番号１２	Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５６３Ｒ
配列番号１３	Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｔ６０１Ｒ
配列番号１４	Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｓ６２４Ｒ

【００３１】
発明の詳細な説明
添付の図面との繋がりで下記に示される記載は、開示される主題の様々な、実例的な実施形態の記載であることが意図される。特定の特色および機能性が各々の実例的な実施形態との繋がりで記載されるが；開示される実施形態がそれらの特定の特色および機能性の各々を伴わずに実施され得ることは当業者に明らかである。更に、１つの実施形態との繋がりで記載される機能性のすべては、明示的に記載されるか、または特色もしくは機能が追加の実施形態と不適合である場合を除いて、本明細書に記載される追加の実施形態に適用可能であることが意図される。例えば、所与の特色または機能が、１つの実施形態との繋がりで明示的に記載されているが、代替的な実施形態との繋がりでは明示的に記載されていない場合、特色または機能は、それが代替的な実施形態と不適合でなければ、代替的な実施形態との繋がりで採用、利用、または実行され得ることが理解されるべきである。
【００３２】
本明細書に記載される技術の実施は、そうではないと指し示されない限り、当業者の技術的範囲内にある、有機化学、ポリマー技術、分子生物学（組換え技術を含む）、細胞生物学、生化学、生物学的エマルション生成、およびシークエンシング技術の従来技術および記載を用いることができる。そのような従来技術は、ポリマーアレイ合成、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよびライゲーション、ならびに標識を使用するハイブリダイゼーションの検出を含む。好適な技術の特定の実例は、本明細書の実施例を参照することにより得られてもよい。しかしながら、他の同等の従来の手順もまた、当然ながら使用され得る。そのような従来技術および記載は、標準的な実験室マニュアル、例えばGreen, et al., Eds. (1999), Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), Genetic Variation: A Laboratory Manual; Dieffenbach, Dveksler, Eds. (2003), PCR Primer: A Laboratory Manual; Bowtell and Sambrook (2003), DNA Microarrays: A

Molecular Cloning Manual; Mount (2004), Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis; Sambrook and Russell (2006), Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual; and Sambrook and Russell (2002), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (すべてCold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) Biochemistry (4th edition) W. H. Freeman, New York N.Y.; Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London; Nelson and Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry, 3rd edition., W. H. Freeman Pub., New York, N. Y.; Berg et al. (2002) Biochemistry, 5th Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N. Y.; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, Eds., John Wiley & Sons 1998); Mammalian Chromosome Engineering-Methods and Protocols (G. Hadlaczky, Ed., Humana Press 2011); Essential Stem Cell Methods, (Lanza and Klimanskaya, Eds., Academic Press 2011)において見出すことができ、これらのすべては、全体が参照によりすべての目的のために本明細書に援用される。ヌクレアーゼ特異的技術は、例えば、Genome Editing and Engineering from TALENs and CRISPRs to Molecular Surgery, Appasani and Church, 2018;およびCRISPR: Methods and Protocols, Lindgren and Charpentier, 2015において見出すことができ；これらの両方は、全体が参照によりすべての目的のために本明細書に援用される。酵素操作のための基本的な方法は、Enzyme Engineering Methods and Protocols, Samuelson, Ed., 2013; Protein Engineering, Kaumaya, Ed., (2012);およびKaur and Sharma, "Directed Evolution: An Approach to Engineer Enzymes", Crit. Rev. Biotechnology, 26: 165-69 (2006)において見出され得る。

【００３３】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が他に明確に規定しなければ、複数の指示対象を含むことが留意される。そのため、例えば、「オリゴヌクレオチド」（an oligonucleotide）への言及は１つ以上のオリゴヌクレオチドを指し、ならびに「自動化されたシステム」（an automated system）への言及は、当業者に公知である該システムと共に使用するための同等のステップおよび方法を含む、などである。追加的に、本明細書において使用され得る「左」、「右」、「上」、「下」、「前」、「後」、「側部」、「高さ」、「長さ」、「幅」、「より上」（upper）、「より下」（lower）、「内部」、「外部」、「内側の」、および「外側の」などの用語は、基準点を単に記載し、任意の特有の方向性または構成に本開示の実施形態を必然的に限定するものではない。更には、「第１」、「第２」、「第３」などの用語は、本明細書に開示されている多数の部分、構成要素、ステップ、操作、機能、および／または基準点のうちの１つを単に同定し、同様に任意の特有の構成または方向性に本開示の実施形態を必然的に限定するものではない。

【００３４】

他に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において言及されるすべての刊行物は、本明細書に記載される発明との繋がりで使用され得るデバイス、方法および細胞集団を記載および開示する目的のために参照により援用される。

【００３５】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限との間の各々の介在する値、およびその記載される範囲内の任意の他の記載されるまたは介在する値が本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限および下限は、より小さい範囲に独立的に含まれ得、そしてまた本発明に包含され、記載される範囲内の任意の特に除外される限度の対象となる。記載される範囲が限度の１つまたは両方を含む場合、それらの含まれる限度のいずれかまたは両方を除外した範囲もまた本発明に含まれる。

【００３６】
以下の記載において、多数の特定の詳細が、本発明のより徹底的な理解を提供するために記載される。しかしながら、本発明がこれらの特定の詳細の１つ以上を伴わずに実施され得ることは当業者に明らかである。他の事例において、当業者に周知の特色および手順は、本発明を不明瞭にすることを回避するために、記載されていない。
【００３７】
用語「相補的な」は、本明細書において使用される場合、ヌクレオチド間のワトソン－クリック塩基対合を指し、特に、２つの水素結合によりアデニン残基に連結されたチミンまたはウラシル残基ならびに３つの水素結合により連結されたシトシンおよびグアニン残基を用いて、互いに水素結合したヌクレオチドを指す。一般に、核酸は、特定される第２のヌクレオチド配列に対して「パーセントの相補性」または「パーセントの相同性」を有するとして記載されるヌクレオチド配列を含んでなる。例えば、ヌクレオチド配列は、特定される第２のヌクレオチド配列に対して８０％、９０％、または１００％の相補性を有してもよく、これは、配列の１０個のヌクレオチドのうちの８個、１０個のヌクレオチドのうちの９個、または１０個のヌクレオチドのうちの１０個が、特定される第２のヌクレオチド配列に対して相補的であることを指し示す。例えば、ヌクレオチド配列３’－ＴＣＧＡ－５’はヌクレオチド配列５’－ＡＧＣＴ－３’に対して１００％相補的であり；およびヌクレオチド配列３’－ＴＣＧＡ－５’はヌクレオチド配列５’－ＴＴＡＧＣＴＧＧ－３’の領域に対して１００％相補的である。
【００３８】
用語ＤＮＡ「制御配列」は、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、内部リボソーム進入部位、核局在化配列、およびエンハンサーなどを集合的に指し、これらは、レシピエント細胞中でのコーディング配列の複製、転写および翻訳を集合的に提供する。選択されたコーディング配列が、適切な宿主細胞中で複製、転写、および、一部の構成要素について、翻訳される能力を有する限り、これらのタイプの制御配列のすべてが存在する必要があるわけではない。
【００３９】
本明細書において使用される場合、用語「ドナーＤＮＡ」または「ドナー核酸」は、核酸ガイドヌクレアーゼを使用して相同組換えにより座位中にＤＮＡ配列改変（挿入、欠失、置換）を導入するために設計された核酸を指す。相同組換え修復のために、ドナーＤＮＡは、「切断部位」またはゲノム標的配列中の編集されるべき部位の隣接領域に対して十分な相同性を有しなければならない。１つ以上の相同アームの長さは、例えば、為されている改変のタイプおよびサイズに依存する。多くの事例において、好ましくは、ドナーＤＮＡは、ゲノム標的座位に対して配列相同性がある２つの領域（例えば、２つの相同アーム）を有する。好ましくは、「挿入」領域または「ＤＮＡ配列改変」領域（細胞中でゲノム標的座位に導入されることが予想される核酸改変）は、２つの相同領域の間に位置する。ＤＮＡ配列改変は、１つの特定の部位または複数の特定の部位において標的ゲノムＤＮＡ配列の１つ以上の塩基を変化させてもよい。変化は、標的配列の１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、５０、７５、１００、１５０、２００、３００、４００、または５００以上の塩基対を変化させることを含んでもよい。欠失または挿入は、標的配列の１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、７５、１００、１５０、２００、３００、４００、または５００以上の塩基対の欠失または挿入であってもよい。
【００４０】
用語「ガイド核酸」または「ガイドＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」は、１）ゲノム標的座位とハイブリダイズする能力を有するガイド配列、および２）核酸ガイドヌクレアーゼと相互作用または複合体化する能力を有するスキャフォールド配列を含んでなるポリヌクレオチドを指す。
【００４１】
「相同性」または「同一性」または「類似性」は、２つのペプチドの間の、または、本

開示の文脈においてより多くの場合に２つの核酸分子の間の、配列類似性を指す。用語「相同領域」または「相同アーム」は、標的ゲノムＤＮＡ配列とある特定の程度の相同性を有するドナーＤＮＡ上の領域を指す。相同性は、比較目的のためにアライメントされてもよい各々の配列中の位置を比較することにより決定され得る。比較される配列中の位置が同じ塩基またはアミノ酸により占有される場合、分子はその位置において相同的である。配列間の相同性の程度は、配列により共有されるマッチするまたは相同的な位置の数の関数である。

【００４２】

「作動可能に連結した」は、そのように記載される構成要素が、それらの通常の機能を行うために構成されている、エレメントの配置を指す。そのため、コーディング配列に作動可能に連結した制御配列は、コーディング配列の転写、および一部の場合において、翻訳に影響する能力を有する。制御配列がコーディング配列の発現を指令するために機能する限り、制御配列はコーディング配列と連続している必要はない。そのため、例えば、翻訳されないが転写される介在配列がプロモーター配列とコーディング配列との間に存在することができ、およびプロモーター配列は依然として、コーディング配列に「作動可能に連結している」と考えることができる。実際に、そのような配列は、同じ連続するＤＮＡ分子（すなわち、染色体）上に存在する必要はなく、および調節の変更を結果としてもたらす相互作用を依然として有し得る。

【００４３】

「プロモーター」または「プロモーター配列」は、ＲＮＡポリメラーゼに結合し、およびポリヌクレオチドまたはポリペプチド－コーディング配列、例えばメッセンジャーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、小核ＲＮＡまたは核小体低分子ＲＮＡ、ガイドＲＮＡ、または任意のクラスの任意のＲＮＡポリメラーゼＩ、ＩＩもしくはＩＩＩにより転写される任意の種類のＲＮＡの転写を開始させる能力を有するＤＮＡ調節領域である。プロモーターは、構成的または誘導性であってもよく、および一部の実施形態において、特には選択が用いられる多くの実施形態において、核酸ガイドヌクレアーゼ編集システムの少なくとも１つの構成要素の転写は誘導性プロモーターの制御下にある。

【００４４】

本明細書において使用される場合、用語「選択マーカー」は、人工的な選択のために好適な形質を付与する、細胞に導入される遺伝子を指す。一般に使用される選択マーカーは当業者に周知である。薬物選択マーカー、例えばアンピシリン／カルベニシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、テトラサイクリン、ゲンタマイシン、ブレオマイシン、ストレプトマイシン、リファンピシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ブラストサイジン、およびＧ４１８が用いられてもよい。他の実施形態において、選択マーカーは、ヒト神経増殖因子受容体（ＭＡｂを用いて検出される；例えば米国特許第６，３６５，３７３号明細書などに記載されている）；切断型ヒト増殖因子受容体（ＭＡｂを用いて検出される）；突然変異体ヒトジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ；蛍光ＭＴＸ基質が利用可能）；分泌型アルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ；蛍光基質が利用可能）；ヒトチミジル酸シンターゼ（ＴＳ；抗がん剤フルオロデオキシウリジンに対する耐性を付与する）；ヒトグルタチオンＳ－トランスフェラーゼアルファ（ＧＳＴＡ１；グルタチオンを幹細胞選択的アルキル化剤ブスルファンにコンジュゲートする；ＣＤ３４＋細胞中の化学予防的選択マーカー）；造血幹細胞におけるＣＤ２４細胞表面抗原；Ｎ－（ホスホノアセチル）－Ｌ－アスパルテート（ＰＡＬＡ）に対する耐性を付与するヒトＣＡＤ遺伝子；ヒト多薬物耐性－１（human multi-drug resistance-1；ＭＤＲ－ｌ；薬物耐性の増加により選択されるかまたはＦＡＣＳにより富化されるＰ－糖タンパク質表面タンパク質）；ヒトＣＤ２５（ＩＬ－２ａ；Ｍａｂ－ＦＩＴＣにより検出可能）；O^6－メチルグアニンＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ；カルムスチンにより選択可能）；およびシチジンデアミナーゼ（ＣＤ；Ａｒａ－Ｃにより選択可能）を含むが、これらに限定されない。「選択培地」は、本明細書において使用される場合、選択マーカーについてまたは反して選択する化学的化合物または生物学的部分が加えられている細胞

増殖培地を指す。

【００４５】

用語「標的ゲノムＤＮＡ配列」、「標的配列」、または「ゲノム標的座位」は、核酸ガイドヌクレアーゼ編集システムを使用して少なくとも１つのヌクレオチドの変化が期待される、インビトロもしくはインビボでの、または細胞もしくは細胞集団の核酸（例えば、ゲノム）中の任意の座位を指す。標的配列はゲノム座位または染色体外座位であってもよい。

【００４６】

「ベクター」は、細胞に送達されるべきおよび／または細胞中で発現されるべき１つ以上の所望される配列を含んでなる様々な核酸のいずれかである。ベクターは、ＤＮＡから典型的には構成されるが、ＲＮＡベクターもまた利用可能である。ベクターは、プラスミド、フォスミド、ファージミド、ウイルスゲノム、合成染色体などを含むが、これらに限定されない。本明細書において使用される場合、語句「操作されたベクター」は、本開示の核酸ガイドヌクレアーゼシステムおよび方法において使用されるヌクレアーゼのためのコーディング配列を含んでなる。細菌システムにおいて、操作されたベクターはまた、λＲｅｄリコンビニアリングシステムまたはその同等物を含んでもよい。操作されたベクターはまた、選択マーカーを典型的には含んでなる。本明細書において使用される場合、語句「編集ベクター」は、ドナー核酸およびｇＲＮＡのためのコーディング配列を含んでなり、ドナー核酸は、編集が起こった後に標的配列中のＰＡＭまたはスペーサーにおいてヌクレアーゼが結合することを予防する標的配列に対する変更を任意選択的に含む。編集ベクターはまた、選択マーカーおよび／またはバーコードを含んでもよい。一部の実施形態において、操作されたベクターおよび編集ベクターは組み合わせられてもよく；すなわち、操作されたベクターの内容物は編集ベクター上に見出されてもよい。更に、操作され、編集されたベクターは、例えば、ヌクレアーゼコーディング配列、リコンビニアリングシステムコーディング配列（存在する場合）、ドナー核酸、ガイド核酸、および１つ以上の選択マーカーに作動可能に連結した、制御配列を含んでなる。

【００４７】

ゲノムシステム中での核酸ガイドヌクレアーゼの一般的な編集

本開示は、様々なＰＡＭ選好性、異なる生物における最適化された編集効率、および／または変更されたＲＮＡガイド酵素忠実度を含んでなる操作された遺伝子編集ヌクレアーゼを提供する。ある特定の人工ヌクレアーゼは、例えば、酵母または哺乳動物細胞において、増強された効率を呈するが、それらは、古細菌、原核、ならびに真核（例えば、酵母、真菌、植物および動物）細胞を含むすべての細胞タイプを編集するために使用されてもよい。

【００４８】

本明細書に記載される人工ヌクレアーゼバリアントは、生物のゲノム中の特定の標的領域を編集するために核酸ガイドヌクレアーゼ（例えば、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ）が使用されるＲＮＡガイド酵素編集システムを改善する。細胞中の適切な合成ガイド核酸と複合体化した核酸ガイドヌクレアーゼは、所望される位置において細胞のゲノムを切断することができる。ガイド核酸は、核酸ガイドヌクレアーゼが、特定の標的配列においてＤＮＡを認識および切断することを助ける。ガイド核酸のヌクレオチド配列をマニピュレートすることにより、核酸ガイドヌクレアーゼは、適切なプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）が近くにある限り切断のために任意のＤＮＡ配列を標的化するためにプログラムされてもよい。

【００４９】

人工ヌクレアーゼは、編集されるべき細胞にポリペプチドとして送達されてもよく；代替的に、人工ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、編集されるべき細胞中に形質転換またはトランスフェクトされる。人工ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、特有の細胞、例えば古細菌、原核または真核細胞中での発現のためにコドン最適化されてもよい。真核細胞は、酵母、真菌、藻類、植物、動物、またはヒト細胞であ

ることができる。真核細胞は、特有の生物、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長動物を含む非ヒト哺乳動物を含むがこれらに限定されない、哺乳動物のものであるかまたはそれに由来してもよい。用いられる人工ヌクレアーゼの選択は、多くの要因、例えば、いずれのタイプの編集が標的配列中で為されるべきか、および適切なＰＡＭが所望される標的配列の近くに位置するかどうかに依存する。人工ヌクレアーゼは、ベクター（例えば、操作されたベクター）上のＤＮＡ配列によりコードされてもよく、および構成的または誘導性プロモーターの制御下にあってもよい。一部の実施形態において、ヌクレアーゼをコードする配列は誘導性プロモーターの制御下にあり、および誘導性プロモーターは、ガイド核酸の転写を制御する誘導性プロモーターとは別々であるが同じであってもよく；すなわち、別々の誘導性プロモーターがヌクレアーゼおよびガイド核酸配列の転写を駆動してもよいが、２つの誘導性プロモーターは同じタイプの誘導性プロモーターであってもよい。代替的に、ヌクレアーゼの発現を制御する誘導性プロモーターは、ガイド核酸の転写を制御する誘導性プロモーターとは異なってもよい。

【００５０】

一般に、ガイド核酸（例えば、ｇＲＮＡ）は、適合性の核酸ガイドヌクレアーゼと複合体化し、および次に標的配列とハイブリダイズし、それによりヌクレアーゼを標的配列に方向付けることができる。ある特定の態様において、ＲＮＡガイド酵素編集システムは、組み合わさってガイド核酸として機能する２つの別々のガイド核酸分子、例えば、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）およびトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を使用してもよい。本明細書に記載される人工ヌクレアーゼと共に使用される他の態様において、ガイド核酸は、ｃｒＲＮＡ配列およびｔｒａｃｒＲＮＡ配列の両方を含んでなる単一のガイド核酸であってもよい。ガイド核酸はＤＮＡまたはＲＮＡであることができ；代替的に、ガイド核酸はＤＮＡおよびＲＮＡの両方を含んでもよい。一部の実施形態において、ガイド核酸は、修飾されたまたは天然に存在しないヌクレオチドを含んでもよい。ガイド核酸がＲＮＡを含んでなる場合、ｇＲＮＡは、ポリヌクレオチド分子、例えばプラスミド、直鎖状構築物上のＤＮＡ配列によりコードされてもよく、またはコーディング配列は、編集カセット内に存在してもよく、および構成的プロモーターの制御下にあるか、もしくは一部の実施形態において、以下に記載されるように誘導性プロモーターの制御下にある。

【００５１】

ガイド核酸はガイド配列を含んでなり、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズするためおよび標的配列への複合体化した核酸ガイドヌクレアーゼの配列特異的結合を指令するための標的配列との十分な相補性を有するポリヌクレオチド配列である。好適なアライメントアルゴリズムを使用して最適にアライメントされた場合の、ガイド配列と、対応する標的配列との間の相補性の程度は、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、もしくは９９％以上または約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、もしくは９９％以上よりも高い。最適なアライメントは、配列アライメントのための任意の好適なアルゴリズムを使用して決定されてもよい。一部の実施形態において、ガイド配列は、約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、もしくは７５以上または約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、もしくは７５以上よりも多くのヌクレオチドの長さである。一部の実施形態において、ガイド配列は、約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０よりも少ないヌクレオチドの長さである。好ましくは、ガイド配列は、１０～３０もしくは１５～２０ヌクレオチドの長さ、または１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０ヌクレオチドの長さである。

【００５２】

本開示の方法および組成物において、ガイド核酸は、典型的には、プラスミドまたはベクターにより発現される配列として提供され、ならびにガイド配列およびスキャフォール

ド配列の両方を単一の転写物としてプロモーターの制御下で、および一部の実施形態において、誘導性プロモーターの制御下で含んでなる。ガイド核酸は、ガイド配列が所望される標的配列に対して相補的となり、それによりガイド配列と標的配列との間のハイブリダイゼーションを可能とするようにガイド配列を変更することにより、所望される標的配列を標的化するために操作され得る。一般に、標的配列中に編集を生成するために、ｇＲＮＡ／ヌクレアーゼ複合体は、ガイドＲＮＡにより決定されるように標的配列に結合し、およびヌクレアーゼは、標的配列に隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列を認識する。標的配列は、原核もしくは真核細胞にとって内因性もしくは外因性の任意のポリヌクレオチド、または任意のインビトロポリヌクレオチドであることができる。例えば、標的配列は、真核細胞の核中に存在するポリヌクレオチドであることができる。標的配列は、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列または非コーディング配列（例えば、調節性ポリヌクレオチド、イントロン、ＰＡＭ、もしくは「ジャンクＤＮＡ」）であることができる。

【００５３】

ガイド核酸は、２０１９年３月２６日に発行された米国特許第１０，２４０，１６７号明細書；２０１９年４月２３日に発行された米国特許第１０，２６６，８４９号明細書；２０１８年６月２２日に発行された米国特許第９，９８２，２７８号明細書；２０１９年７月１５日に発行された米国特許第１０，３５１，８７７号明細書；および２０１９年７月３０日に発行された米国特許第１０，３６２，４２２号明細書；ならびに２０１９年２月１４日に出願されたcc第１６／２７５，４３９号明細書；２０１９年２月１４日に出願された米国特許出願公開第１６／２７５，４６５号明細書；２０１９年８月２３日に出願された米国特許出願公開第１６／５５０，０９２号明細書；および２０１９年８月２６日に出願された米国特許出願公開第１６／５５２，５１７号明細書などに記載されるように、ドナー核酸をコードする編集カセットの部分であってもよい。代替的に、ガイド核酸は、編集カセットの部分でなくてもよく、代わりに、操作されたまたは編集ベクター骨格上にコードされてもよい。例えば、ガイド核酸をコードする配列を最初にベクター骨格中にアセンブルまたは挿入することができ、続いてドナー核酸を、例えば、編集カセット中に挿入することができる。他の場合において、例えば、編集カセット中の、ドナー核酸を最初にベクター骨格中に挿入またはアセンブルすることができ、続いてガイド核酸をコードする配列を挿入することができる。更に他の場合において、（例えば、編集カセット中に挿入された）ガイド核酸およびドナー核酸をコードする配列は、同時に但し別々にベクター中に挿入またはアセンブルされる。更に他の実施形態において、ガイド核酸をコードする配列およびドナー核酸をコードする配列は両方とも編集カセット中に含まれる。

【００５４】

標的配列はＰＡＭと関連付けられ、ＰＡＭは、ｇＲＮＡ／ヌクレアーゼ複合体により認識される短いヌクレオチド配列である。異なる核酸ガイドヌクレアーゼのための精密なＰＡＭ配列および長さの要求は様々であるが；ＰＡＭは、典型的には、標的配列に隣接するかまたは近接する２～７塩基対の配列であり、ヌクレアーゼに依存して、標的配列の５’または３’にあることができる。核酸ガイドヌクレアーゼのＰＡＭ相互作用ドメインの操作は、ＰＡＭ特異性の変更を可能とするか、忠実度を改善するか、または忠実度を減少させてもよい。ある特定の実施形態において、標的配列のゲノム編集は、標的配列、例えば、細胞のゲノムＤＮＡ中に所望されるＤＮＡ変更を導入すること、および標的配列中のプロトスペーサー突然変異（ＰＡＭ）領域を除去して、標的配列中のプロトスペーサー突然変異（ＰＡＭ）領域を突然変異させるかまたは不活性化することの両方を行う。標的配列においてＰＡＭを不活性化することは、例えば、編集のその後のラウンドにおける合成ガイド核酸と複合体化した核酸ガイドヌクレアーゼへの引き続いての曝露において、その標的配列における細胞ゲノムの追加の編集を不可能にする。そのため、所望される標的配列編集および変更されたＰＡＭを有する細胞は、標的配列に対して相補的な合成ガイド核酸と複合体化した核酸ガイドヌクレアーゼを使用して選択され得る。第１の編集事象を起こさなかった細胞は切断されて、二本鎖ＤＮＡは破壊され、およびそのため生存し続けない

。所望される標的配列編集およびＰＡＭ変更を含有する細胞は、これらの編集された細胞は必要なＰＡＭ部位をもはや含有しないので、切断されず、増殖および繁殖を続ける。

【００５５】

核酸ガイドヌクレアーゼが認識できる標的配列の範囲は所望される標的配列の近くに位置するべき特定のＰＡＭの必要性により制約されている。結果として、ゲノム編集のために必要な精度で編集を標的化することは多くの場合に困難であり得る。ヌクレアーゼは、一部のＰＡＭ（例えば、カノニカルなＰＡＭ）を非常によく認識することができ、および他のＰＡＭ（例えば、非カノニカルなＰＡＭ）をより低くまたは乏しく認識することができることが見出されている。本明細書に開示されるある特定の人工ヌクレアーゼは異なるＰＡＭを認識するので、人工ヌクレアーゼは、編集のために標的化され得る標的配列の数を増加させ；すなわち、人工ヌクレアーゼはゲノム中の「ＰＡＭデザート」（PAM deserts）の領域を減少させる。そのため、人工ヌクレアーゼは、認識されるＰＡＭ配列の数（多様性）を増加させることにより編集され得る標的配列の範囲を拡大する。更に、いくつかの異なるＰＡＭに隣接する標的配列が単一の編集実行において編集され得るように、人工ヌクレアーゼのカクテルが細胞に送達されてもよい。

【００５６】

核酸ガイドヌクレアーゼシステムの別の構成要素はドナー核酸である。一部の実施形態において、ドナー核酸は、ガイド核酸と同じポリヌクレオチド（例えば、編集ベクターまたは編集カセット）上にあり、ならびにガイド核酸と同じプロモーターの制御下（例えば、単一のプロモーターがガイド核酸およびドナー核酸の両方の転写を駆動する）にあってもよい（但し、必ずしもそうでなくてもよい）。ドナー核酸は、ｇＲＮＡ／ヌクレアーゼ複合体の一部分として核酸ガイドヌクレアーゼによりニッキングまたは切断される標的配列との相同組換えのための鋳型として働くために設計される。ドナー核酸のポリヌクレオチドは、任意の好適な長さ、例えば約２０、２５、５０、７５、１００、１５０、２００、５００、もしくは１０００または約２０、２５、５０、７５、１００、１５０、２００、５００、もしくは１０００より多くのヌクレオチドの長さであってもよい。ある特定の好ましい態様において、ドナー核酸は、２０～３００ヌクレオチド、より好ましくは５０～２５０ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドとして提供され得る。ドナー核酸は、標的配列の一部分に対して相補的な領域（例えば、相同アーム）を含んでなる。最適にアライメントされた場合に、ドナー核酸は、例えば、約２０、２５、３０、３５、４０、５０、６０、７０、８０、または９０以上のヌクレオチドにより、標的配列とオーバーラップする（標的配列に対して相補的である）。多くの実施形態において、ドナー核酸は、ドナー核酸と標的鋳型との間で突然変異したまたは異なる隣接領域において２つの相同アーム（標的配列に対して相補的な領域）を含んでなる。ドナー核酸は、標的配列と比較して少なくとも１つの突然変異または変更、例えば標的配列と比較して挿入、欠失、改変、またはその任意の組合せを含んでなる。

【００５７】

前述のとおり、多くの場合にドナー核酸は編集カセットとして提供され、編集カセットはベクター骨格中に挿入され、ベクター骨格は、ｇＲＮＡの転写を駆動するプロモーターおよびｇＲＮＡのコーディング配列を含んでなってもよく、またはベクター骨格は、ｇＲＮＡの転写を駆動するプロモーターを含んでなるがｇＲＮＡそれ自体を含んでならなくてもよい。更に、１つより多くの、例えば、２、３、または４つ以上の、ガイド核酸／ドナー核酸カセットが、操作されたベクター中に挿入されてもよく、各々のガイド核酸は、別々の異なるプロモーター、別々の類似したプロモーターの制御下にあるか、またはすべてのガイド核酸／ドナー核酸ペアは単一のプロモーターの制御下にある。一部の実施形態、例えば細胞選択が用いられる実施形態において、ｇＲＮＡおよびドナー核酸の転写を駆動する（または１つより多くのｇＲＮＡ／ドナー核酸ペアを駆動する）プロモーターは誘導性プロモーターである。誘導性の編集は、編集が開始される前に、単一化された細胞が数回から多数回の細胞倍化にわたり増殖され得、これは、活性編集により引き起こされる二本鎖切断は細胞に対して高度に毒性であるので、編集を有する細胞が生存する確率を増加

させるという点において有利である。この毒性は、編集されたコロニーにおける細胞死、ならびに生存するが編集後に修復および回復しなければならない編集された細胞についての増殖における遅延の両方を結果としてもたらす。しかしながら、編集された細胞が回復する可能性を有すれば、編集された細胞のコロニーのサイズは、編集されていない細胞のコロニーのサイズに最終的に追いつく。例えば、２０１９年４月３０日に出願された米国特許出願公開第１６／３９９，９８８号明細書；２０１９年６月２６日に出願された米国特許出願公開第１６／４５４，８６５号明細書；および２０１９年８月１４日に出願された米国特許出願公開第１６／５４０，６０６号明細書を参照。更に、ガイド核酸は、例えば、所望される編集が標的配列中で互いに近くにある場合、編集カセット中の１つより多くのドナー核酸の編集を効果的に指令し得る。

【００５８】

ドナー核酸に加えて、編集カセットは１つ以上のプライマー部位を含んでもよい。プライマー部位は、例えば、プライマー部位が編集カセットの他の構成要素のうちの１つ以上の隣接領域中に位置する場合、オリゴヌクレオチドプライマーを使用することにより編集カセットを増幅するために使用され得る。

【００５９】

また、上記のとおり、ドナー核酸は、標的配列と比べて少なくとも１つの突然変異に加えて、標的配列中のＰＡＭ部位を突然変異させるか、欠失させるかまたは不活性化する１つ以上のＰＡＭ配列変更を含んでもよい。標的配列中のＰＡＭ配列変更は、ＰＡＭ部位を核酸ガイドヌクレアーゼに対して「免疫性」とし、および同じヌクレアーゼが使用される場合に編集に引き続いてのラウンドにおいて更なる編集から標的配列を保護する。

【００６０】

追加的に、編集カセットはバーコードを含んでもよい。バーコードは、ドナーＤＮＡ配列に対応する独特のＤＮＡ配列であり、その結果、バーコードは、対応する標的配列に対して為された編集を同定することができる。バーコードは４つ以上のヌクレオチドを典型的には含んでなる。一部の実施形態において、編集カセットは、ドナー核酸を表すコレクション、例えば、ドナー核酸の遺伝子ワイドまたはゲノムワイドライブラリーを含んでなる。編集カセットのライブラリーはベクター骨格中にクローニングされ、例えば、各々の異なるドナー核酸は異なるバーコードと関連付けられる。

【００６１】

追加的に、一部の実施形態において、核酸ガイドヌクレアーゼシステムの構成要素をコードする発現ベクターまたはカセットは、１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）、例えば約１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０以上または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０以上より多くのＮＬＳを含んでなる人工ヌクレアーゼを更にコードする。一部の実施形態において、人工ヌクレアーゼは、アミノ末端におけるもしくはその近くのＮＬＳ、カルボキシル末端におけるもしくはその近くのＮＬＳ、または組合せを含んでなる。

【００６２】

操作されたおよび編集ベクターは、転写されるべき構成要素配列に作動可能に連結した制御配列を含んでなる。上記のとおり、人工ヌクレアーゼ編集システムの１つ以上の構成要素の転写を駆動するプロモーターは誘導性であってもよく、および誘導性システムは、選択が行われるべき場合に用いられる可能性が高い。多数の遺伝子調節制御システムが、植物、微小生物、および動物細胞（哺乳動物細胞を含む）中での遺伝子の発現を制御するために開発されており、これは、ｐＬプロモーター（ＣＩ８５７リプレッサーの熱不活性化により誘導される）、ｐＢＡＤプロモーター（細胞増殖培地にアラビノースを加えることにより誘導される）、およびラムノース誘導性プロモーター（細胞増殖培地にラムノースを加えることにより誘導される）を含む。他のシステムは、テトラサイクリン制御転写活性化システム（Ｔｅｔ－Ｏｎ／Ｔｅｔ－Ｏｆｆ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）；Bujard and Gossen, PNAS, 89(l2):5547-555l (1992)）、Ｌａｃスイッチ誘導性システム（Wyborski et al., Environ Mol Mutagen, 28(

4):447-58 (1996); DuCoeur et al., Strategies 5(3):70-72 (1992)；米国特許第４，８３３，０８０号明細書）、エクジソン誘導性遺伝子発現システム（No et al., PNAS, 93(8):3346-335l (1996)）、ｃｕｍａｔｅ遺伝子スイッチシステム（Mullick et al., BMC Biotechnology, 6:43 (2006)）、およびタモキシフェン誘導性遺伝子発現（Zhang et al., Nucleic Acids Research, 24: 543-548 (1996)）、およびその他を含む。

【００６３】

典型的には、生細胞中でのゲノム編集を行うことは、核酸ガイドヌクレアーゼ編集を行うために必要な構成要素を用いて細胞を形質転換することを必然的に伴う。例えば、細胞は、別々の操作されたおよび編集ベクターを同時に用いて形質転換されてもよく；細胞は、人工ヌクレアーゼを既に発現していてもよく（例えば、細胞は、操作されたベクターを用いて既に形質転換されていてもよく、もしくは人工ヌクレアーゼのためのコーディング配列が細胞ゲノムに安定的に組み込まれていてもよい）、その結果、編集ベクターのみが細胞への形質転換のために必要とされ；または細胞は、核酸ガイドヌクレアーゼゲノム編集を行うために要求されるすべての構成要素を含んでなる単一のベクターを用いて形質転換されてもよい。

【００６４】

様々な送達システムが、宿主細胞中への核酸ガイドヌクレアーゼ編集システムの構成要素の導入（例えば、形質転換またはトランスフェクト）のために使用され得る。これらの送達システムは、酵母システム、リポフェクションシステム、微量注射システム、微粒子銃システム、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、脂質－核酸コンジュゲート、ビリオン、人工ビリオン、ウイルスベクター、エレクトロポレーション、細胞透過性ペプチド、ナノ粒子、ナノワイヤ、エクソソームの使用を含む。代替的に、分子トロイの木馬ウマリポソームが、血液脳関門を越えて核酸ガイドヌクレアーゼ構成要素を送達するために使用されてもよい。エレクトロポレーションの使用、特に、例えば、２０１９年１０月８日に発行された米国特許第１０，４３５，７１７号明細書；および２０１９年１０月１５日に発行された米国特許第１０，４４３，０７４号明細書；２０１９年８月２６日に出願された米国特許出願公開第１６／５５０，７９０号明細書；２０１９年６月１８日に出願された米国特許出願公開第１０／３２３，２５８号明細書；および２０１９年９月１７日に出願された米国特許出願公開第１０／４１５，０５８号明細書に記載されている（独立した機器としてのまたは自動化されたマルチモジュールシステム中のモジュールとしての）フロースルーエレクトロポレーションの使用は、特に関心対象となる。

【００６５】

細胞が、核酸ガイドヌクレアーゼ編集を行うために必要な構成要素を用いて形質転換された後に、細胞は、編集を促進する条件下で培養される。例えば、構成的プロモーターが人工ヌクレアーゼおよび／またはｇＲＮＡの転写を駆動するために使用される場合、形質転換された細胞は、典型的な培養培地中で典型的な条件（例えば、温度、CO_2雰囲気など）下で培養されることのみを必要とする。代替的に、編集が、例えば、ｇＲＮＡ、ドナーＤＮＡ、ヌクレアーゼ、または細菌の場合、リコンビニアリングシステムの転写などの、核酸ガイドヌクレアーゼ編集のために必要とされる構成要素のうちの１つ以上の転写を制御する誘導性プロモーターを活性化させることにより誘導可能である場合、細胞は誘導性条件に供される。本明細書に記載される人工ヌクレアーゼは、自動化されたシステム、例えば２０１９年４月９日に発行された米国特許第１０，２５３，３１６号明細書；２０１９年６月２５日に発行された米国特許第１０，３２９，５５９号明細書；２０１９年６月１８日に発行された米国特許第１０，３２３，２４２号明細書；および２０１９年９月２４日に発行された米国特許第１０，４２１，９５９号明細書；ならびに２０１９年５月１４日に出願された米国特許出願公開第１６／４１２，１９５号明細書；２０１９年５月２８日に出願された米国特許出願公開第１６／４２３，２８９号明細書；および２０１９年９月１４日に出願された米国特許出願公開第１６／５７１，０９１号明細書において記載される自動化されたシステムにおいて使用されてもよい。

【００６６】
参照による援用
本明細書において言及されるすべての刊行物および特許出願が各々の個々の刊行物または特許出願が参照により援用されることは、個々に指し示されたのと同じ程度まで参照により本明細書に援用されるものとする。
【実施例】
【００６７】
発明の詳細な実施形態
以下の実施例は、どのように本発明を製造および使用するかの完全な開示および記載を当業者に提供するために示され、本発明者らが本発明者らの発明とみなすものの範囲を限定することは意図されず、下記の実験が行われた実験のすべてまたは唯一の実験であることを提示または含意することもまた意図されない。多数のバリエーションおよび／または修飾が、広く記載されている本発明の精神または範囲から離れることなく特定の態様において示されている発明に対して為され得ることが当業者により理解される。本態様は、したがって、すべての点において、制限的なものではなく実例的なものとして考慮されるべきである。
【００６８】
実施例１：酵母中のＭａｄ７およびその突然変異体Ｋ１６９Ｒの活性化試験
酵母中でのＭａｄ７の活性化活性を試験するために、切断活性を欠いたヌクレアーゼタンパク質（ｄＭａｄ７）およびＧＡＬ４活性化ドメイン（ＡＤ）の融合タンパク質（プラスミドはロイシン栄養要求性を同時に回復し得る）を、ｙｅａｓｔ　ｏｎｅ－ｈｙｂｒｉｄ実験を参照することにより構築した。７つのテトラサイクリンオペロンおよびＵｒａ栄養要求性の回復により駆動されるオーレオバシジンＡ（ＡｂＡ）耐性遺伝子をＹ１Ｈ酵母に導入し、ｐＧＢＫＴ７により改変されたＣｒＲＮＡ発現プラスミド（プラスミドはトリプトファン栄養要求性を同時に回復し得る）を利用してＣｒＲＮＡを発現させて、融合タンパク質の結合をガイドし、それによりオーレオバシジンＡ耐性遺伝子の発現を活性化させた（図１）。オリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によりヌクレアーゼタンパク質を増幅して、「ＭＡＰＫＫＫＲＫＶ」のタンパク質配列に対応するＤＮＡ配列「ＡＴＧＧＣＣＣＣＡＡＡＧＡＡＧＡＡＧＣＧＧＡＡＧＧＴＣ」からなるＮ末端におけるＳＶ４０核局在化配列を導入した。得られた増幅されたＤＮＡ断片および線状化されたスクリーニングプラスミドを次に大腸菌（E.coli）中に相同組換えにより形質転換し、プラスミドを抽出し、正確なプラスミドを確認した後に酵母突然変異体Ｙ１Ｈ－７ｘＴｅｔ中に形質転換した。プラスミドを含んでなる２ｍｍのコロニーを選択し、食塩水溶液中に溶解させ、10^{-1}に希釈し、０、２００、４００、８００、１２００（ｎｇ／ｍｌ）のＴＤＯ／－Ｔｒｐ／－Ｌｅｕ／－Ｕｒａを含有するプレート上に広げ、３０℃で温度自動調節インキュベーター中で連続する３日間培養した。ＣｒＲＮＡガイドヌクレアーゼの融合タンパク質はＹ１Ｈ－７ｘＴｅｔ酵母中のＡｂＡ発現を活性化できるので、それにより、酵母は、ある特定の濃度のＡｂＡを含有するＴＤＯ／－Ｔｒｐ／－Ｌｅｕ／－Ｕｒａプレート上で増殖することができる。培養物の増殖密度は、ｄＭａｄ７－ＣｒＲＮＡの活性化および７ｘＴｅｔ部位における結合活性に比例していた。分析の結果を図１に示す。突然変異体Ｋ１６９Ｒ（配列番号５）は、野生型ｄＭａｄ７（配列番号４）と比較して標的部位に対するより高い結合活性を呈した。
【００６９】
実施例２：酵母中でのヒスチジンと３－アミノ－１，２，４－トリアゾール（３－ＡＴ）との間のアンタゴニズムを利用した活性化されたＭａｄ７突然変異体の活性化能力の試験
切断活性を欠いたヌクレアーゼタンパク質（ｄＭａｄ７）およびＧＡＬ４活性化ドメイン（ＡＤ）の融合タンパク質（プラスミドはロイシンを同時に発現し得る）を、ｙｅａｓｔ　ｏｎｅ－ｈｙｂｒｉｄ実験を参照することにより構築した。３つのテトラサイクリンオペロンのプロモーター、ヒスチジン遺伝子発現カセット（Ｈｉｓ）およびＵｒａ栄養要求株の回復をＹ１Ｈ酵母に導入し、ｐＧＢＫＴ７により改変されたＣｒＲＮＡ発現プラス

ミド（プラスミドはトリプトファンを同時に発現し得る）を利用してＣｒＲＮＡを発現させて、融合タンパク質の結合をガイドし、それによりヒスチジンの発現を活性化させた。オリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によりヌクレアーゼタンパク質を増幅して、「ＭＡＰＫＫＫＲＫＶ」のタンパク質配列に対応するＤＮＡ配列「ＡＴＧＧＣＣＣＡＡＡＧＡＡＧＡＡＧＣＧＧＡＡＧＧＴＣ」からなるＮ末端におけるＳＶ４０核局在化配列を導入した。得られた増幅されたＤＮＡ断片および線状化されたスクリーニングプラスミドを大腸菌中に相同組換えにより形質転換し、プラスミドを抽出し、正確なプラスミドを確認した後に酵母突然変異体Ｙ１Ｈ－３ｘＴｅｔ中に形質転換した。プラスミドを含んでなるコロニーを選択し、ＴＤＯ／Ｔｒｐ－／Ｌｅｕ－／Ｈｉｓ－＋３－ＡＴプレート上に繰り返しスポッティングし、３０℃で温度自動調節インキュベーター中で連続する３日間培養した。ＣｒＲＮＡガイドヌクレアーゼの融合タンパク質はＹ１Ｈ－３ｘＴｅｔ酵母中のＨｉｓ発現を活性化できるので、それにより、酵母は、ある特定の濃度の３－ＡＴを含有するＴＤＯ／Ｔｒｐ－／Ｌｅｕ－／Ｈｉｓ－プレート上で増殖することができる。酵母の３－ＡＴ耐性は、ｄＭａｄ７突然変異体とＣｒＲＮＡとの間の結合活性と正の相関があった。分析の結果を図２に示す。突然変異体Ｋ１６９Ｒ（配列番号５）、Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５３５Ｒ（配列番号６）、Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５６３Ｒ（配列番号７）、Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ（配列番号８）、Ｋ１６９Ｒ／Ｔ６０１Ｒ（配列番号９）、Ｋ１６９Ｒ／Ｓ６２４Ｒ（配列番号１０）は、野生型ｄＭａｄ７（配列番号４）と比較してＣｒＲＮＡに対するより高い結合活性を呈した。

【００７０】

実施例３：Ｍａｄ７突然変異体タンパク質のインビトロ酵素活性アッセイ

Ｍａｄ７二重突然変異体タンパク質Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５３５Ｒ、Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５６３Ｒ、Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ、Ｋ１６９Ｒ／Ｔ６０１Ｒ、Ｋ１６９Ｒ／Ｓ６２４Ｒを細菌により発現させ、ＣｒＲＮＡ、および標的部位を含んでなる基質ＤＮＡをインビトロ合成を介して得た。精製されたタンパク質を最初に、合成されたＣｒＲＮＡとインキュベートしてＲＮＡ－プロテアーゼ複合体（ＲＮＰ）を形成させ、次に基質として標的部位を含んでなる二本鎖ＤＮＡを使用してＲＮＰの切断活性を活性化させ、次にフルオロフォアおよびクエンチング基を含んでなる短鎖一本鎖ＤＮＡを切断した。単一の鎖が切断された場合、クエンチされたフルオロフォアは放出され、蛍光強度は増加する。ＭＡＤ７およびその突然変異体の活性は、蛍光増分（ΔＲｎ）を測定することにより反映した。精製されたタンパク質は正確に定量化できなかったので、野生型タンパク質の量は、比較される突然変異体タンパク質の量よりも大きいまたはそれに等しいものとし、および測定された任意の突然変異体の蛍光増分が野生型の場合よりも大きかった場合、突然変異体のインビトロ切断活性は野生型の場合よりも優れていた。Ｍａｄ７二重突然変異体タンパク質Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５３５Ｒ、Ｋ１６９Ｒ／Ｋ５６３Ｒ、Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ、Ｋ１６９Ｒ／Ｔ６０１Ｒ、Ｋ１６９Ｒ／Ｓ６２４Ｒの活性はすべて野生型の場合よりも優れていたことが図３において示される。

【００７１】

実施例４：細菌中でのＭａｄ７突然変異体タンパク質のインビボ編集試験

ガラクトース代謝経路が細菌中に存在し、ガラクトースはガラクトキナーゼ（ｇａｌＫ、遺伝子ＩＤ：６６６７０９７２）によりリン酸化されて、解糖の基質であり、およびピルビン酸に代謝されるグルコース６－リン酸が最終的に形成される。十分な酸素がある場合、それは更にトリカルボン酸サイクルに入って、大量の酸性物質が製造される。ニュートラルレッドの存在下で、酸性物質は赤色となることができ、その結果、ノックアウトは色により決定され得る。λファージタンパク質を導入して、細菌が相同組換え能力を得ることを可能にし、およびｇａｌＫ相同ノックアウト断片を、λタンパク質を含んでなるベクターに接続した。プラスミドを抽出し、大腸菌Ｗ３１１０中に繁殖のために形質転換し、その結果、大腸菌が多数の組換え断片を有するようにし、ならびにその後、大腸菌をコンピテント細胞として調製し、および次にＭａｄ７／Ｍａｄ７突然変異体－ＣｒＲＮＡプラスミドを用いて形質転換した。Ｍａｄ７タンパク質およびλタンパク質を誘導を通じて

同時に製造し、および多数の相同組換え断片の存在下で、ノックアウトは容易に起こった。したがって、プレート上のクローンを採取して、ニュートラルレッドを含有する液体培地中に培養のために入れた。培養後に、濁った黄色になったものはノックアウト株であり、濁った赤色になったものは非ノックアウト株であり、透明な黄色に見えるものは死んだ株であった。代表的なデータは表１に示すとおりである。各々のタンパク質のノックアウト効率は、培養後に以下の式にしたがって算出した：

【数１】

$$\frac{\text{濁った黄色 (数)}}{\text{濁った黄色 (数)} + \text{濁った赤色 (数)}}$$

【００７２】

表１に見ることができるように、Ｍａｄ７二重突然変異体Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９ＨおよびＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｓ６２４Ｒは、野生型よりも細菌におけるｇａｌＫについてのより高いノックアウト効率を有した。

【００７３】

【表２】

表１．細菌におけるＭａｄ７およびその突然変異体のノックアウト効率

	ノックアウト株(黄色)	野生型株(赤色)	死んだ株	ノックアウト効率
Ｍａｄ７	１１	８４	１	１１．５８％
Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ	１５	７６	５	１６．４８％
Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｓ６２４Ｒ	１３	８１	２	１３．８３％

【００７４】

実施例５：イネプロトプラストにおける様々なＭａｄ７突然変異体の編集効率試験

好適なＭａｄ７標的部位をイネＯｓＰＰＯ１（ＬＯＣ４３２７９１８）およびＯｓＹＳＡ（ＬＯＣ４３３３３７９）遺伝子上に設計し、Ｍａｄ７ならびにＭａｄ７突然変異体（Ｍａｄ７－Ｋ１６９ＲおよびＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈ）のための単一標的編集試験ベクターをそれぞれ構築した。標的部位の配列はそれぞれＯｓＰＰＯ１－ＣｒＲＮＡ３：ｔｔｔｃ ａａｃｔｃｃａｇｃｔｇｃｔｇｔｔａｇａｃｔｇｔおよびＯｓＹＳＡ－ＣｒＲＮＡ１：ｔｔｔｃ ａｃｃｔｇｇｔｇｃｃｃｃｔｃｃｃｇｃｃｇｃａであった。

【００７５】

Ｐｒｏｍｅｇａプラスミド抽出キット（Ｍｉｄｉｐｒｅｐｓ ＤＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ、Ｐｒｏｍｅｇａ、Ａ７６４０）を使用してプラスミドＤＮＡを抽出した。試験ベクターのＰＥＧ媒介性形質転換のためにイネプロトプラストを調製し、形質転換方法は“Lin et al., 2018 Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single‐cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnology Journal https://doi.org/10.1111/pbi.12870”を参照した。

【００７６】

プロトプラストＤＮＡをＣＴＡＢ法により抽出し、標的部位の編集効率をＨｉ－ＴＯＭシークエンシングにより決定した。Ｈｉ－ＴＯＭ検出プライマーを標的部位のために設計し、標的断片の長さはそれぞれ１２７ｂｐおよび１２９ｂｐであった。

ＰＰＯ１－ｓｇＲＮＡ３－Ｈｉ－ＴＯＭ－Ｆ：ｇｇａｇｔｇａｇｔａｃｇｇｔｇｔｇｃｃａａｇｇｔａｔｃｇｃｔｇｔｃａａｇｔｔｇ

ＰＰＯ１－ｓｇＲＮＡ３－Ｈｉ－ＴＯＭ－Ｒ：ＧＡＧＴＴＧＧＡＴＧＣＴＧＧＡＴＧｇｃａｇｔｃａａａｔａｇｔｇｔｇｃａａａｃａｔｇ
ＹＳＡ－Ｈｉ－ＴＯＭ－Ｆ：ＧＧＡＧＴＧＡＧＴＡＣＧＧＴＧＴＧＣｃａｇａａｔｃａｇｇｔｃｇａｃｇｇｃａｔｃ
ＹＳＡ－Ｈｉ－ＴＯＭ－Ｒ：ＧＡＧＴＴＧＧＡＴＧＣＴＧＧＡＴＧＧｇａｃｃｔｃａｔｇａａｇｇｔｇｃｔｃｇｔｃ

【００７７】

増幅された標的断片においてＨｉ－ＴＯＭシークエンシング分析を行い、代表的なシークエンシング結果を図４および図５に示している。編集結果をそれぞれ統計的に分析したところ、イネＯｓＰＰＯ１標的部位について、Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈの編集効率は４．５８％であり、Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒの編集効率は２．６２％であり、野生型Ｍａｄ７の編集効率は２．１６％であり；イネＯｓＹＳＡ標的部位について、Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈの編集効率は４．３２％であり、Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒの編集効率は２．８０％であり、野生型Ｍａｄ７の編集効率は２．１０％であることを示した。Ｍａｄ７－Ｋ１６９ＲおよびＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈの両方は、Ｍａｄ７よりも高い編集効率を有した。

【００７８】

実施例６：イネ遺伝子上のＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈの編集試験

イネ黒すじ萎縮病ウイルス（ＲＢＳＤＶ）に対して耐性のイネ物質を得るために、ＲＢＳＤＶを下方調節する２つの遺伝子、ＯｓＧＤＩ１（Ｏｓ０５ｇ０４１８０００）およびＳ－ＯｓＧＤＩ１（Ｏｓ０７ｇ０２７１０００）を選択し、ノックアウトのためのヌクレアーゼとしてＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈを使用してノックアウトした。「ＴＴＴＮ」をＰＡＭとして選択し、ノックアウト標的部位、ＯｓＧＤＩ１－ａｔｓ１およびＳ－ＯｓＧＤＩ１－ａｔｓ１を２つの遺伝子の第３のエクソン中に設計した。対応するノックアウトベクターを構築し、当技術分野において一般的に使用されるアグロバクテリウム形質転換方法を使用してイネ組織を遺伝学的に形質転換した。

【００７９】

得られたイネＴ０世代植物の全ＤＮＡをＣＴＡＢ法を使用して抽出し、ＯｓＧＤＩ１およびＳ－ＯｓＧＤＩ１の標的部位の近くの断片をＰＣＲによりそれぞれ増幅した。各々の個々の植物の増幅された断片をＢｅｉｊｉｎｇ Ｔｓｉｎｇｋｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏ．，Ｌｔｄ．に試験のために送り、標的遺伝子のノックアウトを（図６に示されるように）シークエンシング結果にしたがって確認した。

【００８０】

Ｔ０形質転換実生のノックアウト効率を統計的に分析した。その標的部位ＯｓＧＤＩ１－ａｔｓ１が編集されたイネ植物の中で、３９個の試験されたイネ植物のうちの２７個がノックアウトを有することが見出され、６９．２％のノックアウト効率であった。またＳ－ＯｓＧＤＩ１－ａｔｓ１について、４０個の試験されたイネ植物のうちの２２個がノックアウトを有することを見出され、５５．０％のノックアウト効率であった。

【００８１】

実施例７：ダイズ毛状根系におけるＭａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈの編集効率試験

当技術分野における従来技術にしたがって、好適な標的部位をダイズＦＡＤ（ＧＬＹＭＡ＿１０Ｇ２８６４００）およびＭＲＰ５ａ（ＧＬＹＭＡ＿０３Ｇ０５６０００）遺伝子上に設計し、Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈのための単一標的編集試験ベクターを構築した。またダイズをアグロバクテリウム・リゾゲネス（Agrobacterium rhizogenes）に感染させることによりダイズ毛状根を得た。蛍光マーカーを伴う毛状根を採取し、ＤＮＡを抽出し、次にハイスループットシークエンシング分析により分析した。

【００８２】

実験結果を図７に示しており、Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９ＨはＦＡＤおよびＭＲＰ５ａ遺伝子の標的領域中に明らかな突然変異を生成した。

【００８３】

実施例８：ゼブラフィッシュ胚における突然変異体Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈの効率決定

ゼブラフィッシュメラニン合成経路の必須遺伝子であり、およびそのＰＡＭ配列がｔｔｔｇであったチロシナーゼ遺伝子（ｔｙｒ、遺伝子ＩＤ：３０２０７）の標的部位ｇａｃｔｇｇａｇｇａｃｔｔｃｔｇｇｇｇａｇｇｔを設計した。化学的に合成された対応するｃｒＲＮＡを突然変異体Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈとインキュベートしてｒｎａ－プロテアーゼ複合体（ＲＮＰ）を形成させ、ＲＮＰを１μＭの濃度に調整し、ゼブラフィッシュの１細胞胚に注射した。ゼブラフィッシュ胚のメラニン形成が４８時間後に観察された。約５００個の生きた胚が異なるバッチにおいて注射後に観察され、４つの胚はメラニン欠損表現型を有することが見出された。メラニン欠損を有する胚からＤＮＡを抽出した。Ｄｒ－ＴＹＲ－Ｆ：ＧＣＧＴＣＴＣＡＣＴＣＴＣＣＴＣＧＡＣＴＣＴＴＣおよびＤｒ－ＴＹＲ－Ｒ：ＧＴＡＧＴＴＴＣＣＧＧＣＧＣＡＣＴＧＧＣＡＧを使用して標的配列を増幅し、シークエンシングした。

【００８４】

シークエンシング結果を図８に示しており、注射されていない野生型ゼブラフィッシュ胚と比較して、注射された試料は、設計された標的部位において確定的な塩基欠失突然変異を両方とも生成した。

【００８５】

実施例９：ブタ初代線維芽細胞における突然変異体Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈのノックアウト検証

ブタＳＯＣＳ２遺伝子（遺伝子ＩＤ：１０００３７９６６）のための標的部位設計：ＳＯＣＳ２遺伝子の欠失の目的を達成するために、ゲノム配列アライメント設計を通じて、標的部位ｇｇｇｔｔｃｔｃａｃｔｇａｃｔｔｃｔａａｇｇａをブタＳＯＣＳ２遺伝子コーディング配列の５’－ＵＴＲにおいて設計し、標的部位ｃｔａａａｃａｃｇｃｃｔｃｃｔｇｔａｇｃｇｔｃをブタＳＯＣＳ２遺伝子の終止コドンの後に設計した。化学的に合成された対応するｃｒＲＮＡをそれぞれＣＲ８５およびＣＲ８６と命名した。

【００８６】

Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ Ｓｔｅｍ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔを使用してブタ線維芽細胞（ＰＥＦ）にＲＮＰトランスフェクトを行った。

【００８７】

【表３】

表２．細胞トランスフェクション溶液中の各々の構成要素の量

構成要素	量/濃度
細胞塊	８０％　１２ウェル
Ｍａｄ７－Ｋ１６９Ｒ／Ｎ５８９Ｈタンパク質	２ｍｇ／ｍＬ
ｃｒＲＮＡ	２５ｐｍｏｌ／μＬ
Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ Ｓｔｅｍ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ	４μＬ
培地の総量（抗体を除く）	１ｍＬ

【００８８】

細胞をトランスフェクションの２４時間後に消化し、カウントした。１０ｃｍペトリ皿当たり２００個以下の細胞の密度で個々の１０ｃｍペトリ皿中に細胞を均一に接種し、新鮮な培地を４８時間毎に交換した。細胞が皿中で分裂した後の１０日目に、細胞は適切なサイズの単一細胞クローンに増殖することができ、それをクローニングシリンダーを使用して消化し、次に２４ウェル細胞培養プレートに移した。３～５日の連続的な培養後に、ＤＮＡ増幅標的部位を単一細胞クローンの細胞株の部分からシークエンシング検証のために抽出した。

【００８９】

結果を図９に示す。単一細胞クローンの複数の細胞株のシークエンシング結果は、確定的な断片欠失が、設計された二重標的部位において直接的に起こったことを指し示した。

【００９０】

本発明は、本発明の好ましい実施形態との繋がりで詳細に記載されるように、多くの異なる形態の実施形態により満足されるが、本開示は本発明の原理の例示として考慮されるべきであり、図示および本明細書に記載される特定の実施形態に本発明を限定することは意図されないことが理解される。多数のバリエーションが、本発明の精神から離れることなく当業者により為され得る。本発明の範囲は、添付の請求項およびそれらの等価物により判定される。要約および発明の名称は、本発明の範囲を限定するとして解釈されるべきでなく、それらの目的は、適切な権威者の他に一般大衆が、本発明の大まかな性質を迅速に決定することを可能にすることである。

【図面】

【図１】

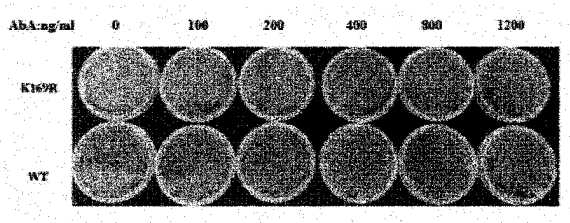


図１

【図２】

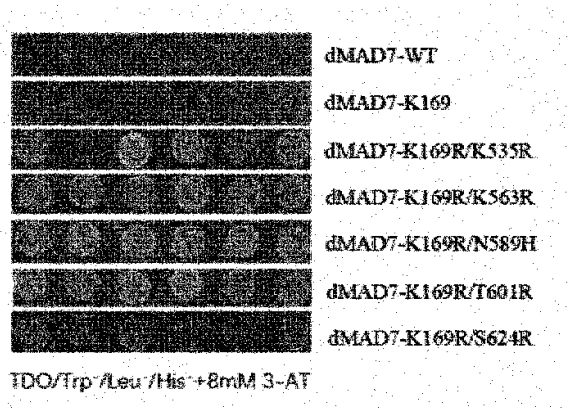


図２

【図３】

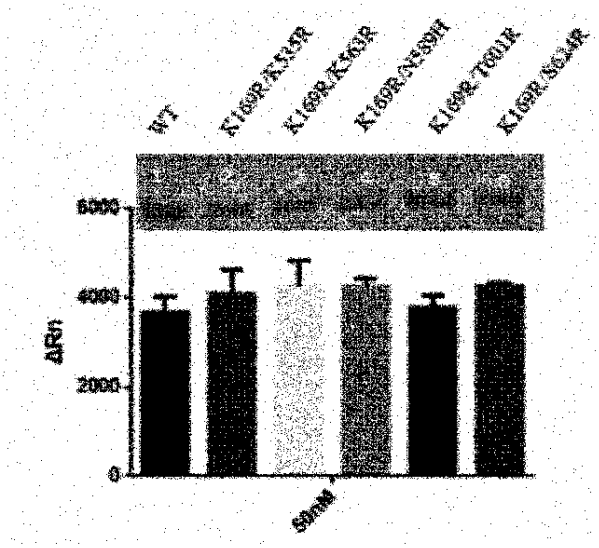


図３

【図４】



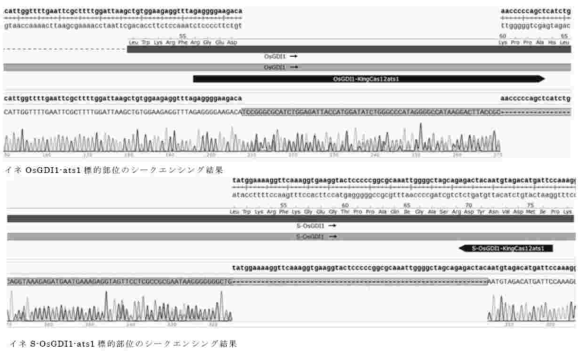
図４

【図５】

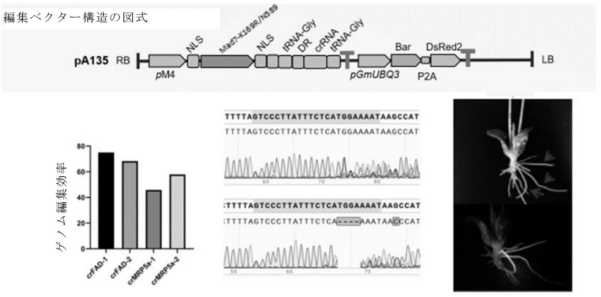


図５

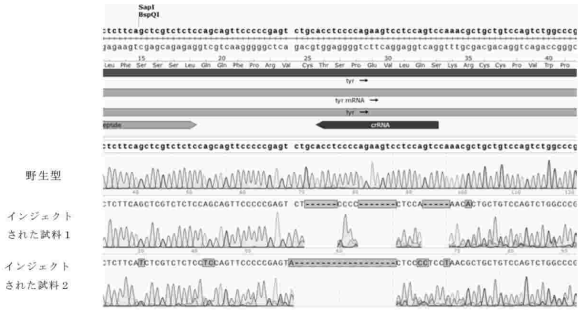
【図６】



【図７】



【図８】



【図９】

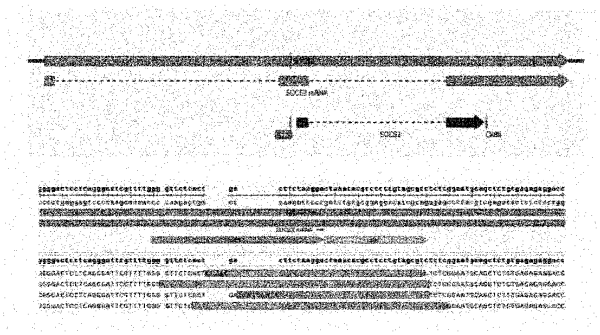


図９

【配列表】

<u>20255081170000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/073828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/22(2006.01)i;C12N15/63(2006.01)i;C12N15/62(2006.01)i

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)

IPC: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)

VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, Patentics, NCBI Genbank, EBI, STNext: 申请人, 发明人, Cpf1, K169, mad7, Mad7, 169, 563, 589, 601, 624, N589*, S624*, K169*, K563*, T601*, 突变, 变体, variant , mutation, 序列1-14

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021257716 A2 (BIO-TECHNE CORPORATION) 23 December 2021 (2021-12-23) description, pages 7 and 16-17, and claims 1-36	1-22
A	PRICE M.A et al. "Expanding and understanding the CRISPR toolbox for Bacillus subtilis with MAD7 and dMAD7" *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 117, 31 December 2020 (2020-12-31), pages 1805-1816	1-22
A	CN 113667718 A (SHANDONG SHUNFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 19 November 2021 (2021-11-19) entire document	1-22
A	US 2019360001 A1 (INSCRIPTA, INC.) 28 November 2019 (2019-11-28) entire document	1-22
A	CN 113227368 A (INSCRIPTA, INC.) 06 August 2021 (2021-08-06) entire document	1-22
A	WO 2020011985 A1 (KEYGENE N.V.) 16 January 2020 (2020-01-16) entire document	1-22

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
16 May 2023	**19 May 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/073828

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021074191 A1 (KWS SAAT SE & CO. KGAA) 22 April 2021 (2021-04-22) entire document	1-22

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/073828

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/073828

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021257716	A2	23 December 2021	WO	2021257716	A3	10 February 2022
				EP	4165180	A2	19 April 2023
CN	113667718	A	19 November 2021		None		
US	2019360001	A1	28 November 2019	US	2022162646	A1	26 May 2022
				US	11408012	B2	09 August 2022
				US	2022389417	A1	08 December 2022
				US	2018371498	A1	27 December 2018
				US	10337028	B2	02 July 2019
				US	9982279	B1	29 May 2018
CN	113227368	A	06 August 2021	CA	3115534	A1	30 April 2020
				EP	3870697	A1	01 September 2021
				EP	3870697	A4	09 November 2022
				AU	2019368215	A1	27 May 2021
				IL	282092	A	31 May 2021
				IL	282092	B	01 May 2022
				WO	2020086475	A1	30 April 2020
				US	10640754	B1	05 May 2020
				US	2021155912	A1	27 May 2021
				US	11345903	B2	31 May 2022
				US	10655114	B1	19 May 2020
				US	2020181592	A1	11 June 2020
				US	10604746	B1	31 March 2020
				US	2020123517	A1	23 April 2020
				US	2020354703	A1	12 November 2020
				US	10876102	B2	29 December 2020
WO	2020011985	A1	16 January 2020	US	2021238612	A1	05 August 2021
				EP	3821008	A1	19 May 2021
				JP	2021524266	A	13 September 2021
WO	2021074191	A1	22 April 2021	CA	3153995	A1	22 April 2021
				BR	112022006260	A2	21 June 2022
				EP	4045651	A1	24 August 2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/073828

A. **主题的分类**

C12N9/22(2006.01)i;C12N15/63(2006.01)i;C12N15/62(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. **检索领域**

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

VEN,CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, Patentics,NCBI Genbank,EBI,STNext: 申请人，发明人， Cpf1,K169,mad7,Mad7, 169,563,589,601,624,N589*,S624*,K169*,K563*,T601*，突变，变体，variant ，mutation，序列1-14

C. **相关文件**

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2021257716 A2 (BIO-TECHNE CORPORATION) 2021年12月23日 (2021-12-23) 说明书第7，16-17页，权利要求1-36	1-22
A	PRICE M.A 等. "Expanding and understanding the CRISPR toolbox for Bacillus subtilis with MAD7 and dMAD7" Biotechnology and Bioengineering, 第117卷，2020年12月31日 (2020-12-31)， 第1805-1816页	1-22
A	CN 113667718 A (山东舜丰生物科技有限公司) 2021年11月19日 (2021-11-19) 全文	1-22
A	US 2019360001 A1 (INSCRIPTA, INC.) 2019年11月28日 (2019-11-28) 全文	1-22
A	CN 113227368 A (因思科瑞普特公司) 2021年8月6日 (2021-08-06) 全文	1-22
A	WO 2020011985 A1 (KEYGENE N.V) 2020年1月16日 (2020-01-16) 全文	1-22

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。　☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
"D" 申请人在国际申请中引证的文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年5月16日	2023年5月19日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 李煦颖 电话号码 (+86) 010-53961960

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/073828

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2021074191 A1 (KWS SAAT SE & CO. KGAA) 2021年4月22日 (2021-04-22) 全文	1-22

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/073828

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/073828

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
WO	2021257716	A2	2021年12月23日	WO	2021257716	A3	2022年2月10日
				EP	4165180	A2	2023年4月19日
CN	113667718	A	2021年11月19日		无		
US	2019360001	A1	2019年11月28日	US	2022162646	A1	2022年5月26日
				US	11408012	B2	2022年8月9日
				US	2022389417	A1	2022年12月8日
				US	2018371498	A1	2018年12月27日
				US	10337028	B2	2019年7月2日
				US	9982279	B1	2018年5月29日
CN	113227368	A	2021年8月6日	CA	3115534	A1	2020年4月30日
				EP	3870697	A1	2021年9月1日
				EP	3870697	A4	2022年11月9日
				AU	2019368215	A1	2021年5月27日
				IL	282092	A	2021年5月31日
				IL	282092	B	2022年5月1日
				WO	2020086475	A1	2020年4月30日
				US	10640754	B1	2020年5月5日
				US	2021155912	A1	2021年5月27日
				US	11345903	B2	2022年5月31日
				US	10655114	B1	2020年5月19日
				US	2020181592	A1	2020年6月11日
				US	10604746	B1	2020年3月31日
				US	2020123517	A1	2020年4月23日
				US	2020354703	A1	2020年11月12日
				US	10876102	B2	2020年12月29日
WO	2020011985	A1	2020年1月16日	US	2021238612	A1	2021年8月5日
				EP	3821008	A1	2021年5月19日
				JP	2021524266	A	2021年9月13日
WO	2021074191	A1	2021年4月22日	CA	3153995	A1	2021年4月22日
				BR	112022006260	A2	2022年6月21日
				EP	4045651	A1	2022年8月24日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

フロントページの続き

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　宮嶋 学
(74)代理人　100120617
弁理士　浅野 真理
(74)代理人　100126099
弁理士　反町 洋
(74)代理人　100210675
弁理士　下山 潤
(72)発明者　モー、スートン
中華人民共和国シャントン、チンタオ、ファンタオ、ディストリクト、チンロンヘ、ロード、ナンバー５３
(72)発明者　チェン、チュン
中華人民共和国シャントン、チンタオ、ファンタオ、ディストリクト、チンロンヘ、ロード、ナンバー５３
(72)発明者　リー、シアオルー
中華人民共和国シャントン、チンタオ、ファンタオ、ディストリクト、チンロンヘ、ロード、ナンバー５３