(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-520504
(P2023-520504A)
(43)公表日　令和5年5月17日(2023.5.17)

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/09 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/09 | １１０ | ４Ｂ０５０ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *1/19 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 1/19 | ＺＮＡ | ４Ｂ０６５ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *1/21 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 1/21 | | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *1/15 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 1/15 | | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/10 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/10 | | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全280頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-560154(P2022-560154)
(86)(22)出願日　令和3年3月31日(2021.3.31)
(85)翻訳文提出日　令和4年11月29日(2022.11.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/025257
(87)国際公開番号　WO2021/202800
(87)国際公開日　令和3年10月7日(2021.10.7)
(31)優先権主張番号　63/085,752
(32)優先日　令和2年9月30日(2020.9.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/026,562
(32)優先日　令和2年5月18日(2020.5.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/026,277
最終頁に続く

(71)出願人　518015608
アーバー バイオテクノロジーズ， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４０， ケンブリッジ， エイコーン パーク ドライブ ２０， タワー ５００
(74)代理人　110001139
ＳＫ弁理士法人
(74)代理人　100130328
弁理士　奥野 彰彦
(74)代理人　100130672
弁理士　伊藤 寛之
(72)発明者　ショーン， シャオロン
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドラ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドを含む組成物及びその使用

(57)【要約】
本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを作製する方法、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを特徴付けるプロセス、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む細胞及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを使用する方法に関する。本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む複合体、複合体を作製する方法、複合体を特徴付けるプロセス、複合体を含む細胞及び複合体を使用する方法に更に関する。

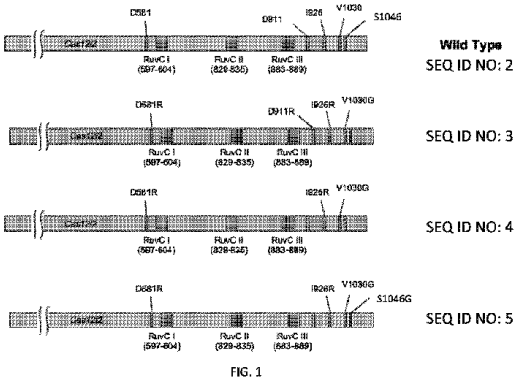


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド。
【請求項２】
配列番号４に示される配列を含む、請求項１に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド。
【請求項３】
配列番号５に示される配列を含む、請求項１又は２に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド。
【請求項４】
配列番号４９５に示される配列を含む、請求項１に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド。
【請求項５】
配列番号４９６に示される配列を含む、請求項１に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド。
【請求項６】
表２の置換を更に含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド。
【請求項７】
配列番号２に示される配列を含むＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの変異体である、請求項１～６のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物であって、ＲＮＡガイド又は前記ＲＮＡガイドをコードする核酸を更に含み、前記ＲＮＡガイドは、ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含む、組成物。
【請求項９】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記スペーサー配列は、約１１～約５０ヌクレオチドを含む、請求項８～１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記スペーサー配列は、約１５～約３５ヌクレオチドを含む、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記スペーサー配列は、標的核酸配列に結合し、前記標的核酸配列は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列に隣接している、請求項８～１２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つの核局在化シグナル（ＮＬＳ）、少なくとも１つの核外移行シグナル（ＮＥＳ）又は少なくとも１つのＮＬＳ及び少なくとも１つのＮＥＳを更に含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は請求項８～１３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ペプチドタグ、蛍光タンパク質、塩基編集ドメイン、ＤＮＡメチル化ドメイン、ヒストン残基修飾ドメイン、局在化因子、転写修飾

因子、光依存性制御因子、化学物質誘導性因子又はクロマチン可視化因子を更に含む、請求項１～７若しくは１４のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は請求項８～１４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６】
ナノ粒子、リポソーム、エキソソーム、微小胞又は遺伝子銃を含む送達システムに存在する、請求項８～１５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７】
請求項１～７、１４又は１５のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードする核酸分子。
【請求項１８】
請求項１～１７のいずれか一項に記載の組成物又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む細胞。
【請求項１９】
真核細胞又は原核細胞である、請求項１８に記載の細胞。
【請求項２０】
哺乳類細胞又は植物細胞である、請求項１８又は１９に記載の細胞。
【請求項２１】
ヒト細胞である、請求項１８～２０のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項２２】
請求項１～７、１４又は１５のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、任意選択でＲＮＡガイド及び／又は細胞とを含む組成物又は製剤。
【請求項２３】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、複合体を形成し、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、前記ＲＮＡガイドとの増加した複合体形成を呈する、組成物。
【請求項２４】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、複合体を形成し、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、前記ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性を呈する、組成物。
【請求項２５】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、複合体を形成し、及び前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、親ポリペプチド及び前記ＲＮＡガイドと比較して、増加したタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、組成物。
【請求項２６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した複合体形成、前記ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項２３～２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した複合体形成、前記ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項２３～２６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した複合体形成、前記ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項２３～２７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記変異体二元複合体の$T_m$値が親複合体

のＴｍ値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した複合体形成、前記ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項２３～２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０】
前記親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項２３～２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する、請求項２３～３０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２】
前記同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、請求項２３～３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性を更に欠いている、請求項２３～３３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した酵素活性を更に呈する、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する、請求項２３～３５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変化したオンターゲット結合を呈する、請求項２３～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変化したオフターゲット結合を呈する、請求項２３～３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとによって形成される複合体よりも減少した複合体解離を呈する、組成物。
【請求項４０】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記ＲＮＡガイドは、親複合体のＲＮＡガイドよりも減少している、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドからの解離を呈する、組成物。
【請求項４１】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとによって形成される複合体よりも増加した安定性を呈する、組成物。
【請求項４２】
前記変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した三元複合体形成、標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項３９～４１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４３】
前記変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した安定性を呈する、請求項３９～４２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４４】
前記変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した安定性を呈する、請求項３９～４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４５】
前記変異体二元複合体は、前記変異体二元複合体の$T_m$値が前記親複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した三元複合体形成、前記標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項３９～４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４６】
前記親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項３９～４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する、請求項３９～４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４８】
前記同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる、請求項４７に記載の組成物。
【請求項４９】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、請求項３９～４８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性を更に欠いている、請求項３９～４９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した酵素活性を更に呈する、請求項３９～４９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５２】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する、請求項３９～５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変化したオンターゲット結合を呈する、請求項３９～５２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変化したオフターゲット結合を呈する、請求項３９～５３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５５】
請求項３９～５４のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを、請求項３９～５４のいずれか一項に記載のＲＮＡガイド、例えばＲＮＡガイドと複合体化する方法。
【請求項５６】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、前記標的核酸との増加した三元複合体形成を呈する、組成物。
【請求項５７】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物であ

って、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、前記標的核酸への増加した結合親和性を呈する、組成物。

【請求項５８】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、増加したタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、組成物。

【請求項５９】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、増加したタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する、組成物。

【請求項６０】

前記変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した三元複合体形成、前記標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項５６～５９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６１】

前記変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した三元複合体形成、前記標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項５６～６０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６２】

前記変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した三元複合体形成、前記標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項５６～６１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６３】

前記変異体二元複合体は、前記二元複合体の$T_m$値が前記親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した三元複合体形成、前記標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する、請求項５６～６２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６４】

親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項５６～６３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６５】

前記変異体二元複合体は、前記親二元複合体と同等以上の酵素活性を呈する、請求項５６～６４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６６】

前記同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる、請求項６５に記載の組成物。

【請求項６７】

前記変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、請求項５６～６６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６８】

前記変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する、請求項５６～６７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６９】

前記変異体二元複合体は、酵素活性を更に欠いている、請求項５６～６８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７０】

前記変異体二元複合体は、増加した酵素活性を更に呈する、請求項５６～６８のいずれ

か一項に記載の組成物。
【請求項７１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する、請求項５６～７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７２】
前記変異体二元複合体は、増加した標的核酸複合体形成、標的核酸活性及び／又は標的核酸特異性を呈する、請求項５６～７１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７３】
前記変異体二元複合体は、変化したオンターゲット結合を呈する、請求項５６～７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７４】
前記変異体二元複合体は、変化したオフターゲット結合を呈する、請求項５６～７３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７５】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体と前記標的核酸とは、変異体三元複合体を形成し、前記変異体三元複合体は、親三元複合体よりも減少した複合体解離を呈する、組成物。
【請求項７６】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体と前記標的核酸とは、変異体三元複合体を形成し、前記標的核酸は、親三元複合体よりも減少している、前記変異体三元複合体からの解離を呈する、組成物。
【請求項７７】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体と前記標的核酸とは、変異体三元複合体を形成し、前記変異体三元複合体は、親三元複合体よりも増加した安定性を呈する、組成物。
【請求項７８】
前記変異体三元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した安定性を呈する、請求項７５～７７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７９】
前記変異体三元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した安定性を呈する、請求項７５～７８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８０】
前記変異体三元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した安定性を呈する、請求項７５～７９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８１】
前記変異体三元複合体は、前記変異体三元複合体の$T_m$値が前記親三元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した安定性を呈する、請求項７５～８０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８２】
親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項７５～８１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する、請求項７５～８２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８４】

前記同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる、請求項８３に記載の組成物。
【請求項８５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、請求項７５～８４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８６】
前記変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する、請求項７５～８５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８７】
前記変異体三元複合体は、増加した安定性を呈する、請求項７５～８６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８８】
前記変異体二元複合体は、酵素活性を更に欠いている、請求項７５～８７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８９】
前記変異体二元複合体は、増加した酵素活性を更に呈する、請求項７５～８７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する、請求項７５～８９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９１】
前記変異体二元複合体は、増加した標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性及び／又は標的核酸結合特異性を呈する、請求項７５～９０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９２】
前記変異体二元複合体は、変化したオンターゲット結合を呈する、請求項７５～９１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９３】
前記変異体二元複合体は、変化したオフターゲット結合を呈する、請求項７５～９２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９４】
請求項７５～９３のいずれか一項に記載の変異体二元複合体を、請求項７５～９３のいずれか一項に記載の標的核酸、例えばＤＮＡと複合体化する方法。
【請求項９５】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸への増加した結合親和性を呈する、組成物。
【請求項９６】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の標的遺伝子座への増加した標的結合親和性を呈する、組成物。
【請求項９７】
前記変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項９５又は９６に記載の組成物。
【請求項９８】
前記変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項９５～９７のいずれか一項に記載

の組成物。
【請求項９９】
前記変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項９５～９８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１００】
前記変異体二元複合体は、前記二元複合体のＴｍ値が前記親二元複合体のＴｍ値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項９５～９９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０１】
親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項９５～１００のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０２】
前記変異体二元複合体は、前記親二元複合体と同等以上の酵素活性を呈する、請求項９５～１０１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０３】
前記同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる、請求項１０２に記載の組成物。
【請求項１０４】
前記変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、請求項９５～１０３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０５】
前記変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する、請求項９５～１０４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０６】
前記変異体二元複合体は、酵素活性を更に欠いている、請求項９５～１０５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０７】
前記変異体二元複合体は、増加した酵素活性を更に呈する、請求項９５～１０５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する、請求項９５～１０７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０９】
前記変異体二元複合体は、増加した標的核酸複合体形成、標的核酸活性及び／又は標的核酸特異性を呈する、請求項９５～１０８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１０】
前記変異体二元複合体は、変化したオンターゲット結合を呈する、請求項９５～１０９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１１】
前記変異体二元複合体は、変化したオフターゲット結合を呈する、請求項９５～１１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１２】
複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座と特異的に結合する、組成物。
【請求項１１３】
複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組

成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座の増加したオンターゲット結合を呈する、組成物。

【請求項１１４】

複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座との増加したオンターゲット結合を呈する、組成物。

【請求項１１５】

複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とのオンターゲット三元複合体形成を呈する、組成物。

【請求項１１６】

複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座との増加した三元複合体形成を呈する、組成物。

【請求項１１７】

前記変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、前記標的核酸との増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１１２～１１６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１１８】

前記変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、前記標的核酸との増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１１２～１１７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１１９】

前記変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、前記標的核酸との増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１１２～１１８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１２０】

前記変異体二元複合体は、前記二元複合体のＴ$_m$値が前記親二元複合体のＴ$_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、前記標的核酸との増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１１２～１１９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１２１】

親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項１１２～１２０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１２２】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する、請求項１１２～１２１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１２３】

前記同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる、請求項１２２に記載の組成物。

【請求項１２４】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、請求項１１２～１２３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１２５】

前記変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する、請求項１１２～１２４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１２６】
前記変異体二元複合体は、酵素活性を更に欠いている、請求項１１２～１２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２７】
前記変異体二元複合体は、増加した酵素活性を更に呈する、請求項１１２～１２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する、請求項１１２～１２７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２９】
前記変異体二元複合体は、増加した標的核酸三元複合体形成、標的核酸結合親和性及び／又は標的核酸結合特異性を呈する、請求項１１２～１２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３０】
前記変異体二元複合体は、変化したオンターゲット結合を呈する、請求項１１２～１２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３１】
前記変異体二元複合体は、変化したオフターゲット結合を呈する、請求項１１２～１３０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３２】
請求項１１２～１３１のいずれか一項に記載の変異体二元複合体を、請求項１１２～１３１のいずれか一項に記載の標的核酸、例えばＤＮＡと複合体化する方法。
【請求項１３３】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の標的遺伝子座への増加したオンターゲット結合親和性を呈する、組成物。
【請求項１３４】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の非標的遺伝子座への減少した結合親和性を呈する、組成物。
【請求項１３５】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸のオンターゲット遺伝子座における増加した活性を呈する、組成物。
【請求項１３６】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと前記ＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、前記変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の非標的遺伝子座における減少した活性を呈する、組成物。
【請求項１３７】
前記変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、前記標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１３３～１３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３８】
前記変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、前記標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１３３

～１３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３９】
前記変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、前記標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１３３～１３８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４０】
前記変異体二元複合体は、前記二元複合体のＴｍ値が前記親二元複合体のＴｍ値よりも少なくとも８℃高いとき、前記標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１３３～１３９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４１】
前記親二元複合体は、配列番号２のアミノ酸配列を含む親ポリペプチドを含む、請求項１３３～１４０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４２】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する、請求項１４１に記載の組成物。
【請求項１４３】
前記同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる、請求項１４２に記載の組成物。
【請求項１４４】
前記変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、請求項１３３～１４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４５】
前記変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する、請求項１３３～１４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した二元複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する、請求項１３３～１４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４７】
複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の変異体二元複合体を形成し、前記複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座への増加したオンターゲット結合を呈する、組成物。
【請求項１４８】
複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の変異体二元複合体を形成し、前記複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の非標的遺伝子座への減少したオフターゲット結合を呈する、組成物。
【請求項１４９】
複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の変異体二元複合体を形成し、前記複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座における増加したオンターゲット活性を呈する、組成物。
【請求項１５０】
複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物であって、前記別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の変異体二元複合体を形成し、前記複数の変異体二元複合体は、複数の親二

元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の非標的遺伝子座における減少したオフターゲット活性を呈する、組成物。
【請求項１５１】
前記複数の変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、前記標的核酸の前記標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１４７～１５０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５２】
前記複数の変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、前記標的核酸の前記標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１４７～１５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５３】
前記複数の変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、前記標的核酸の前記標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１４７～１５２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５４】
前記複数の変異体二元複合体は、前記二元複合体の$T_m$値が前記親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、前記標的核酸の前記標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する、請求項１４７～１５３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５５】
前記複数の親二元複合体は、配列番号２のアミノ酸配列を含む親ポリペプチドを含む、請求項１４７～１５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する、請求項１４７～１５５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５７】
前記同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる、請求項１５６に記載の組成物。
【請求項１５８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する、請求項１４７～１５７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５９】
前記複数の変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する、請求項１４７～１５８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した二元複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する、請求項１４７～１５９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６１】
請求項１４７～１６０のいずれか一項に記載の変異体二元複合体を、請求項１４７～１６０のいずれか一項に記載の標的核酸、例えばＤＮＡと複合体化する方法。
【請求項１６２】
請求項１４７～１６１のいずれか一項に記載の複数の変異体二元複合体を、請求項１４７～１６１のいずれか一項に記載の標的核酸、例えばＤＮＡと複合体化する方法。
【請求項１６３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列のＤ５８１、Ｇ６２４、Ｆ６２６、Ｄ８３５、Ｌ８３６、Ｐ８６８、Ｓ８７９、Ｄ９１１、Ｉ９２６、Ｖ１０２０、Ｖ１０３０、Ｅ１０３５及びＳ１０４６置換の少なくとも１つを含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１又は１３３～１６０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列のＤ５８１Ｇ、Ｄ５８１Ｒ、Ｇ６２４Ｒ、Ｆ６２６Ｇ、Ｆ６２６Ｒ、Ｄ８３５Ｇ、Ｄ８３５Ｒ、Ｌ８３６Ｇ、Ｌ８３６Ｒ、Ｐ８６８Ｇ、Ｐ８６８Ｒ、Ｐ８６８Ｔ、Ｓ８７９Ｇ、Ｓ８７９Ｒ、Ｄ９１１Ｇ、Ｄ９１１Ｒ、Ｉ９２６Ｇ、Ｉ９２６Ｒ、Ｖ１０２０Ｇ、Ｖ１０２０Ｒ、Ｖ１０３０Ｇ、Ｖ１０３０Ｒ、Ｅ１０３５Ｇ、Ｅ１０３５Ｒ、Ｓ１０４６Ｇ及びＳ１０４６Ｒ置換の少なくとも１つを含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列のＤ５８１Ｒ、Ｇ６２４Ｒ、Ｆ６２６Ｒ、Ｐ８６８Ｔ、Ｄ９１１Ｒ、Ｉ９２６Ｒ、Ｖ１０３０Ｇ、Ｅ１０３５Ｒ及びＳ１０４６Ｇ置換の少なくとも１つを含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０、１６３又は１６４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表１に掲載される少なくとも１つの置換を含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１６５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つのアミノ酸配列又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１６６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、エピトープペプチド、核局在化シグナル及び核外移行シグナルの少なくとも１つを含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１６７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６９】
前記ＲＮＡガイドは、ＤＮＡターゲティング配列を含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１６８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７０】
前記ＤＮＡターゲティング配列は、ＲＮＡガイドである、請求項１６９に記載の組成物。
【請求項１７１】
前記ＤＮＡターゲティング配列は、１３～３０ヌクレオチドである、請求項１６９又は１７０に記載の組成物。
【請求項１７２】
前記ＲＮＡガイドは、ＤＮＡターゲティング配列に連結されたダイレクトリピート配列を含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１７１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７３】
標的核酸を更に含む、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７４】
前記標的核酸は、細胞に存在する、請求項１７３に記載の組成物。
【請求項１７５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、ベクター、例えば発現ベクターにコードされる、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１７４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７６】
請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１７５の

いずれか一項に記載の組成物を含む細胞。
【請求項１７７】
請求項１７５に記載のベクターを発現させる方法。
【請求項１７８】
請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１７５のいずれか一項に記載の組成物を作製する方法。
【請求項１７９】
請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１７５のいずれか一項に記載の組成物を送達する方法。
【請求項１８０】
請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０若しくは１６３～１７５のいずれか一項に記載の組成物又はその１つ以上の成分を含むキット又はシステム。
【請求項１８１】
前記ＲＮＡガイドは、４３ヌクレオチド又は約４３ヌクレオチドを含むか又はそれからなる、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０又は１６３～１７５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８２】
前記ＲＮＡガイドは、ｔｒａｃｒレスＲＮＡガイドである、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０、１６３～１７５又は１８１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドよりも約４０倍高い酵素活性を更に呈する、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０、１６３～１７５、１８１又は１８２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記親ポリペプチドと比較して、増加したオンターゲット特異性を呈する、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０、１６３～１７５又は１８１～１８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、前記親ポリペプチドと比較して、減少したオフターゲット特異性を呈する、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０、１６３～１７５又は１８１～１８４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、５'－ＮＴＴＮ－３'配列（式中、Ｎは、任意のヌクレオチドである）に隣接する欠失を選択的に誘導する、請求項２３～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０、１６３～１７５又は１８１～１８５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８７】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流にある、請求項１８６に記載の組成物。
【請求項１８８】
前記親ポリペプチドは、前記欠失を誘導しない、請求項１８６又は１８７に記載の組成物。
【請求項１８９】
前記欠失の長さは、Ｃａｓ９ポリペプチド誘導性欠失の長さよりも大きい、請求項１８６～１８８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９０】
前記欠失は、細胞の遺伝子にある、請求項１８６～１８９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９１】

前記欠失は、最大で約４０ヌクレオチド長である、請求項１８６～１９０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９２】
前記欠失は、約４ヌクレオチド～４０ヌクレオチド長である、請求項１８６～１９１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９３】
前記欠失は、約４ヌクレオチド～２５ヌクレオチド長である、請求項１８６～１９２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９４】
前記欠失は、約１０ヌクレオチド～２５ヌクレオチド長である、請求項１８６～１９３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９５】
前記欠失は、約１０ヌクレオチド～１５ヌクレオチド長である、請求項１８６～１９４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９６】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まる、請求項１８６～１９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９７】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まる、請求項１８６～１９６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９８】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まる、請求項１８６～１９７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９９】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まる、請求項１８６～１９８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２００】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まる、請求項１８６～１９９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０１】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まる、請求項１８６～２００のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０２】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０３】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０４】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０５】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０６】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０７】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２０８】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０９】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１０】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２０９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１１】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１２】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２１１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１３】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２１２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１４】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２１３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１５】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２１４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１６】
前記欠失は、前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる、請求項１８６～２１５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１７】
前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'（式中、Ｙは、Ｃ又はＴであり、Ｂは、Ａを除く任意のヌクレオチドであり、Ｄは、Ｃを除く任意のヌクレオチドであり、及びＲは、Ａ又はＧである）である、請求項１８６～２１６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１８】
前記５'－ＮＴＴＮ－３'配列は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'である、請求項１８６～２１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１９】
前記欠失は、前記遺伝子、例えばＢ２Ｍ、ＴＲＡＣ、ＰＤＣＤ１のエクソンにある、請求項１８６～２１８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２２０】
前記欠失は、前記遺伝子の突然変異とオーバーラップしている、請求項１８６～２１９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２１】
前記欠失は、前記遺伝子の挿入とオーバーラップしている、請求項１８６～２２０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２２】
前記欠失は、前記遺伝子のリピート伸長を取り除く、請求項１８６～２２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２３】
前記欠失は、前記遺伝子の一方又は両方のアレルを破壊する、請求項１８６～２２２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２４】
前記欠失は、真核細胞又は原核細胞に誘導される、請求項１８６～２２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２５】
前記欠失は、動物細胞、植物細胞若しくは真菌細胞に誘導されるか、又は前記細胞は、動物細胞、植物細胞若しくは真菌細胞に由来する、請求項１８６～２２４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２６】
前記欠失は、哺乳類細胞に誘導されるか又は哺乳類細胞に由来する、請求項１８６～２２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２７】
前記欠失は、ヒト細胞に誘導されるか又はヒト細胞に由来する、請求項１８６～２２６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２８】
前記欠失は、初代細胞に誘導される、請求項１８６～２２７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２９】
前記欠失は、細胞株に誘導される、請求項１８６～２２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３０】
前記欠失は、Ｔ細胞に誘導される、請求項１８６～２２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３１】
前記欠失は、幹細胞（例えば、全能性／全能性幹細胞、多能性幹細胞、複能性幹細胞、少能性幹細胞若しくは単能性幹細胞）、分化細胞又は最終分化細胞に誘導される、請求項１８６～２３０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３２】
２つ以上の（例えば、マルチプレックス化された標的化欠失）欠失は、誘導される、請求項１８６～２３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３３】
細胞において欠失を達成する方法であって、請求項１～１６、２２～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０、１６３～１７５又は１８１～２３２のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は複合体を前記細胞のＤＮＡと接触させることを含む方法。
【請求項２３４】
請求項１～１６、２２～５４、５６～９３、９５～１３１、１３３～１６０、１６３～１７５又は１８１～２３２のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、細胞とを含む組成物又は製剤。

【請求項２３５】
請求項１～２３４のいずれか一項に記載の組成物を作製する方法。
【請求項２３６】
請求項１～２３５のいずれか一項に記載の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを、請求項１～２３５のいずれか一項に記載のＲＮＡガイド、例えばＲＮＡガイドと複合体化する方法。
【請求項２３７】
請求項１～２３６のいずれか一項に記載の変異体二元複合体を標的核酸と複合体化する方法。
【請求項２３８】
請求項１～２３７のいずれか一項に記載の組成物を送達する方法。
【請求項２３９】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと核酸との間の相互作用を増加させる置換を含む、組成物。
【請求項２４０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む、請求項２３９に記載の組成物。
【請求項２４１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む、請求項２３９に記載の組成物。
【請求項２４２】
前記相互作用は、静電相互作用である、請求項２３９に記載の組成物。
【請求項２４３】
前記相互作用は、非特異的相互作用である、請求項２３９に記載の組成物。
【請求項２４４】
前記相互作用は、芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用である、請求項２３９に記載の組成物。
【請求項２４５】
前記置換は、核酸界面にあるか又はそれに隣接している、請求項２３９に記載の組成物。
【請求項２４６】
前記核酸は、ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含むＲＮＡガイドである、請求項２３９～２４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２４７】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項２４６に記載の組成物。
【請求項２４８】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む、請求項２４６に記載の組成物。
【請求項２４９】
前記置換は、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと前記ダイレクトリピート配列との間の相互作用を増加させる、請求項２４６～２４８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５０】
前記置換は、親ポリペプチドと比較して、二元複合体形成を増加させる、請求項２３９～２４９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む二元複合体は、親二元複合体と比較して、増加した安定性を呈する、請求項２３９～２５０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２５２】
前記置換は、アルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、チロシン又はセリン置換である、請求項２３９～２５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５３】
前記置換は、ＲＮＡ結合界面にある、請求項２３９～２５２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５４】
前記置換は、Ｗｅｄｇｅドメイン又はＲｅｃ２ドメインにおける置換である、請求項２３９～２５３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５５】
前記置換は、表４に掲載される置換である、請求項２３９～２５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項２３９～２５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表４に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項２３９～２５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項２３９～２５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５９】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表４に掲載される置換を更に有する、請求項２３９～２５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６０】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む、請求項２４６又は２４９～２５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６１】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む、請求項２４６又は２４９～２５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６２】
前記核酸は、標的核酸である、請求項２３９～２４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６３】
前記核酸は、二本鎖ＤＮＡである、請求項２３９～２４５又は２６２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６４】
前記置換は、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと前記二本鎖ＤＮＡとの間の相互作用を増加させる、請求項２６３に記載の組成物。
【請求項２６５】
前記二本鎖ＤＮＡは、ＰＡＭ配列を含む、請求項２６３又は２６４に記載の組成物。
【請求項２６６】
前記置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる、請求項２３９

～２４５又は２６２～２６５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する、請求項２３９～２４５又は２６２～２６６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６８】
前記置換は、アルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン置換である、請求項２３９～２４５又は２６２～２６７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６９】
前記置換は、二本鎖ＤＮＡ結合界面にある、請求項２３９～２４５又は２６２～２６８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７０】
前記置換は、Ｒｅｃ１ドメイン、ＰＩドメイン又はＷｅｄｇｅドメインにおける置換である、請求項２３９～２４５又は２６２～２６９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７１】
前記置換は、表５に掲載される置換である、請求項２３９～２４５又は２６２～２７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７２】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項２３９～２４５又は２６２～２７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表５に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項２３９～２４５又は２６２～２７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項２３９～２４５又は２６２～２７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表５に掲載される置換を更に有する、請求項２３９～２４５又は２６２～２７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７６】
前記核酸は、一本鎖ＤＮＡである、請求項２３９～２４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７７】
前記一本鎖ＤＮＡは、非標的鎖を含む、請求項２７６に記載の組成物。
【請求項２７８】
前記一本鎖ＤＮＡは、標的鎖を含む、請求項２７６に記載の組成物。
【請求項２７９】
前記置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる、請求項２３９～２４５又は２７６～２７８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する、請求項２３９～２４５又は２７６～２７９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２８１】
前記置換は、アルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はアラニン置換である、請求項２３９～２４５又は２７６～２８０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８２】
前記置換は、一本鎖ＤＮＡ結合界面にある、請求項２３９～２４５又は２７６～２８１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８３】
前記置換は、ＰＩドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｗｅｄｇｅドメイン、ＲｕｖＣドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＮｕｃドメインにおける置換である、請求項２３９～２４５又は２７６～２８２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８４】
前記置換は、表６に掲載される置換である、請求項２３９～２４５又は２７６～２８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項２３９～２４５又は２７６～２８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表６に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項２３９～２４５又は２７６～２８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項２３９～２４５又は２７６～２８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表６に掲載される置換を更に有する、請求項２３９～２４５又は２７６～２８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８９】
前記置換は、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド分子との間の相互作用を増加させる、請求項２３９～２４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９０】
前記ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド分子は、ＲＮＡガイドのスペーサー配列と標的鎖とを含むヘテロ二重鎖である、請求項２８９に記載の組成物。
【請求項２９１】
前記置換は、前記ヘテロ二重鎖を安定化させる、請求項２３９～２４５又は２８９若しくは２９０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９２】
前記置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる、請求項２３９～２４５又は２８９～２９１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する、請求項２３９～２４５又は２８９～２９２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２９４】
前記置換は、アルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン置換である、請求項２３９～２４５又は２８９～２９３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９５】
前記置換は、Ｒｅｃ１ドメイン、ＰＩドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＲｕｖＣ２モチーフにおける置換である、請求項２３９～２４５又は２８９～２９４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９６】
前記置換は、表７に掲載される置換である、請求項２３９～２４５又は２８９～２９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項２３９～２４５又は２８９～２９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表７に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項２３９～２４５又は２８９～２９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９９】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項２３９～２４５又は２８９～２９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３００】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表７に掲載される置換を更に有する、請求項２３９～２４５又は２８９～２９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０１】
前記置換は、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、（ａ）二本鎖ＤＮＡ二重鎖、及び／又は（ｂ）ＲＮＡガイドのスペーサー配列と標的鎖とを含むヘテロ二重鎖の塩基との間の相互作用を増加させる、請求項２３９～２４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０２】
前記二本鎖ＤＮＡ二重鎖は、ＰＡＭ配列を含む、請求項３０１に記載の組成物。
【請求項３０３】
前記相互作用は、芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用である、請求項２３９～２４５又は３０１若しくは３０２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０４】
前記置換は、Ｒループを安定化させる、請求項２３９～２４５又は３０１～３０３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０５】
前記置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる、請求項２３９～２４５又は３０１～３０４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する、請求項２３９～２４５又は３０１～３０５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０７】

前記置換は、アルギニン、リジン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、ヒスチジン、グルタミン、トレオニン又はバリン置換である、請求項２３９～２４５又は３０１～３０６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０８】
前記置換は、Ｗｅｄｇｅドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン又はＲｕｖＣドメインにおける置換である、請求項２３９～２４５又は３０１～３０７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０９】
前記置換は、表８に掲載される置換である、請求項２３９～２４５又は３０１～３０８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項２３９～２４５又は３０１～３０８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表８に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項２３９～２４５又は３０１～３０８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１２】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項２３９～２４５又は３０１～３０８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表８に掲載される置換を更に有する、請求項２３９～２４５又は３０１～３０８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１４】
前記親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項２３９～３１３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、増加した酵素活性を呈する、請求項２３９～３１４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１６】
ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含むＲＮＡガイドを更に含む、請求項２３９～３１５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１７】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項３１６に記載の組成物。
【請求項３１８】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む、請求項３１６に記載の組成物。
【請求項３１９】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む、請求項３１６に記載の組成物。
【請求項３２０】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３１６に記載の組成物。

【請求項３２１】
請求項２３９～３２０のいずれか一項に記載の組成物を含む細胞。
【請求項３２２】
前記組成物は、前記細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない、請求項３２１に記載の細胞。
【請求項３２３】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＤＮＡ結合中の前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの可動性を増加させる置換を含む、組成物。
【請求項３２４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む、請求項３２３に記載の組成物。
【請求項３２５】
前記Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３２３に記載の組成物。
【請求項３２６】
前記置換は、ＤＮＡへの前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの結合を増加させる、請求項３２３～３２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２７】
前記置換は、二本鎖ＤＮＡへの前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの結合を増加させる、請求項３２３～３２６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２８】
前記置換は、一本鎖ＤＮＡへの前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの結合を増加させる、請求項３２３～３２７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２９】
前記置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる、請求項３２３～３２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する、請求項３２３～３２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３１】
前記置換は、バルクアミノ酸から、より小さい側鎖を有するアミノ酸への置換である、請求項３２３～３３０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３２】
前記置換は、アラニン、バリン、グリシン又はセリン置換である、請求項３２３～３３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３３】
前記置換は、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのヘリックスＩＩドメインにある、請求項３２３～３３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３４】
前記置換は、表９に掲載される置換である、請求項３２３～３３３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項３２３～３３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表９に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項３２３～３３２のいずれか

一項に記載の組成物。
【請求項３３７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３２３～３３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表９に掲載される置換を更に有する、請求項３２３～３３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３９】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成中に形成されるドメイン間界面を安定化させる置換を含む、組成物。
【請求項３４０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む、請求項３３９に記載の組成物。
【請求項３４１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３３９に記載の組成物。
【請求項３４２】
前記ドメイン間界面は、一本鎖ＤＮＡが前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの活性部位と接触するときに形成される、請求項３３９～３４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４３】
前記ドメイン間界面は、ヘリックスＩＩドメイン－Ｎｕｃドメイン界面である、請求項３３９～３４２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４４】
前記置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる、請求項３３９～３４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する、請求項３３９～３４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４６】
前記置換は、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン又はリジン置換である、請求項３３９～３４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４７】
前記置換は、表１０に掲載される置換である、請求項３３９～３４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項３３９～３４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４９】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表１０に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項３３９～３４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５０】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配

列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３３９～３４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表１０に掲載される置換を更に有する、請求項３３９～３４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５２】
前記親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項３２３～３５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、増加した酵素活性を呈する、請求項３２３～３５２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５４】
ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含むＲＮＡガイドを更に含む、請求項３２３～３５３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５５】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項３５４に記載の組成物。
【請求項３５６】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む、請求項３５４に記載の組成物。
【請求項３５７】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む、請求項３５４に記載の組成物。
【請求項３５８】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３５４に記載の組成物。
【請求項３５９】
請求項３２３～３５８のいずれか一項に記載の組成物を含む細胞。
【請求項３６０】
前記組成物は、前記細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない、請求項３５９に記載の細胞。
【請求項３６１】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物であって、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット特異性を増加させる置換を含む、組成物。
【請求項３６２】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む、請求項３６１に記載の組成物。
【請求項３６３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３６１に記載の組成物。
【請求項３６４】
前記置換は、オンターゲットＤＮＡ結合を増加させる、請求項３６１～３６３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６５】
前記置換は、オフターゲットＤＮＡ結合を減少させる、請求項３６１～３６４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３６６】
前記置換は、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット三元複合体形成を増加させる、請求項３６１～３６５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含むオンターゲット三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する、請求項３６１～３６６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６８】
前記置換は、ＲＮＡガイドのスペーサー配列と接触するアミノ酸の置換である、請求項３６１～３６７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６９】
前記置換は、バルクアミノ酸から、より小さい側鎖を有するアミノ酸への置換である、請求項３６１～３６８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７０】
前記置換は、アラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン置換である、請求項３６１～３６９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７１】
前記置換は、Ｗｅｄｇｅドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＲｕｖＣドメインにおける置換である、請求項３６１～３７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７２】
前記置換は、ヘリックスＩＩドメインにおける置換である、請求項３６１～３７１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７３】
前記置換は、表１１に掲載される置換である、請求項３６１～３７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項３６１～３７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表１１に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項３６１～３７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３６１～３７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表１１に掲載される置換を更に有する、請求項３６１～３７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７８】
前記置換は、前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの触媒反応速度（Ｋｃａｔ）を減少させる、請求項３６１～３６７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７９】
前記置換は、アラニン、セリン、トレオニン、バリン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン又はイソロイシン置換である、請求項３６１～３６７又は３７８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８０】

前記置換は、Ｗｅｄｇｅドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＲｕｖＣドメインにおける置換である、請求項３６１～３６７又は３７８若しくは３７９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８１】

前記置換は、ＲｕｖＣドメインにおける置換である、請求項３６１～３６７又は３７８～３８０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８２】

前記置換は、表１２に掲載される置換である、請求項３６１～３６７又は３７８～３８１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８３】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む、請求項３６１～３６７又は３７８～３８１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８４】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表１２に掲載される置換を更に有する配列を含む、請求項３６１～３６７又は３７８～３８１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８５】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３６１～３６７又は３７８～３８１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８６】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表１２に掲載される置換を更に有する、請求項３６１～３６７又は３７８～３８１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８７】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、増加したオンターゲット酵素活性を呈する、請求項３６１～３８６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８８】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、減少したオフターゲット酵素活性を呈する、請求項３６１～３８７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８９】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オンターゲット編集の１０％以下であるオフターゲット編集を呈する、請求項３６１～３８８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３９０】

前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オンターゲット編集の５％以下であるオフターゲット編集を呈する、請求項３６１～３８８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３９１】

ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含むＲＮＡガイドを更に含む、請求項３６１～３９０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３９２】

前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項３９１に記載の組成物。

【請求項３９３】

前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む、請求項３９１に記載の組成物。

【請求項３９４】

前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む、請求項３９１に記載の組成物。
【請求項３９５】
前記ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む、請求項３９１に記載の組成物。
【請求項３９６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、オフターゲット結合に対するオンターゲット結合のより高い比を呈する、請求項３６５～３９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９７】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、オフターゲット活性に対するオンターゲット活性のより高い比を呈する、請求項３６５～３９６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９８】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、オフターゲット編集に対するオンターゲット編集のより高い比を呈する、請求項３６５～３９７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９９】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、より少ないオフターゲット結合を呈する、請求項３６５～３９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４００】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、より少ないオフターゲット活性を呈する、請求項３６５～３９６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０１】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、より少ないオフターゲット編集を呈する、請求項３６５～３９７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０２】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも１０％少ない、請求項３６５～４０１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０３】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも２０％少ない、請求項３６５～４０２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０４】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも３０％少ない、請求項３６５～４０３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０５】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも４０％少ない、請求項３６５～４０４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４０６】
前記変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも５０％少ない、請求項３６５～４０５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０７】
請求項３６５～４０６のいずれか一項に記載の組成物を含む細胞。
【請求項４０８】
前記組成物は、前記細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない、請求項４０７に記載の細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表
本願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出された配列表を含み、この配列表は、全体として参照により本明細書に援用される。２０２１年３月３１日に作成された前記ＡＳＣＩＩ複製物は、名称が５１４５１－００８ＷＯ５＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ＿０３＿３０＿２０２１＿ＳＴ２５であり、サイズが１，５８９，４０１バイトである。
【背景技術】
【０００２】
クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）及びＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子、まとめてＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムとして知られるものは、古細菌及び細菌において外来性の遺伝要素から特定の種を防御する適応免疫系である。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
上記の背景に鑑みて、本発明は、先行技術に上回る特定の利点及び進歩を提供する。
【課題を解決するための手段】
【０００４】
本明細書に開示される本発明は、具体的な利点又は機能に限定されないが、本発明は、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを提供する。
【０００５】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの一態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。
【０００６】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号５に示される配列を含む。
【０００７】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４９５に示される配列を含む。
【０００８】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４９６に示される配列を含む。
【０００９】
変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２の１つ以上の置換を更に含む。
【００１０】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２に示される配列を含むＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの変異体である。

【００１１】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物をなおも更に提供し、この組成物は、ＲＮＡガイド又はＲＮＡガイドをコードする核酸を更に含み、ＲＮＡガイドは、ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含む。

【００１２】

組成物の一態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００１３】

組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。

【００１４】

組成物の別の態様において、スペーサー配列は、約１１～約５０ヌクレオチドを含む。

【００１５】

組成物の別の態様において、スペーサー配列は、約１５～約３５ヌクレオチドを含む。

【００１６】

組成物の別の態様において、スペーサー配列は、標的核酸配列に結合し、この標的核酸配列は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列に隣接している。

【００１７】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つの核局在化シグナル（ＮＬＳ）、少なくとも１つの核外移行シグナル（ＮＥＳ）又は少なくとも１つのＮＬＳ及び少なくとも１つのＮＥＳを更に含む。

【００１８】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ペプチドタグ、蛍光タンパク質、塩基編集ドメイン、ＤＮＡメチル化ドメイン、ヒストン残基修飾ドメイン、局在化因子、転写修飾因子、光依存性制御因子、化学物質誘導性因子又はクロマチン可視化因子を更に含む。

【００１９】

組成物の別の態様において、組成物は、ナノ粒子、リポソーム、エキソソーム、微小胞又は遺伝子銃を含む送達システムに存在する。

【００２０】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードする核酸分子をなおも更に提供する。

【００２１】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む細胞をなおも更に提供する。

【００２２】

細胞の一態様において、細胞は、真核細胞又は原核細胞である。

【００２３】

細胞の別の態様において、細胞は、哺乳類細胞又は植物細胞である。

【００２４】

細胞の別の態様において、細胞は、ヒト細胞である。

【００２５】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、任意選択でＲＮＡガイド及び／又は細胞とを含む組成物又は製剤をなおも更に提供する。

【００２６】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも

更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、複合体を形成し、この変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイドとの増加した複合体形成を呈する。

【００２７】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、複合体を形成し、このＣａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性を呈する。

【００２８】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、複合体を形成し、及びＣａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、親ポリペプチド及びＲＮＡガイドと比較して、増加したタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。

【００２９】

組成物の一態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した複合体形成、ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００３０】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した複合体形成、ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００３１】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した複合体形成、ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００３２】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変異体二元複合体のＴｍ値が親複合体のＴｍ値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した複合体形成、ＲＮＡガイドへの増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００３３】

組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む。

【００３４】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する。

【００３５】

組成物の別の態様において、同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる。

【００３６】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。

【００３７】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性を更に欠いている。

【００３８】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した酵素活性を更に呈する。

【００３９】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する。

【００４０】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変化したオンターゲット結合を呈する。

【００４１】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変化したオフターゲット結合を呈する。

【００４２】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親ポリペプチドとＲＮＡガイドとによって形成される複合体よりも減少した複合体解離を呈する。

【００４３】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、このＲＮＡガイドは、親複合体のＲＮＡガイドよりも減少している、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドからの解離を呈する。

【００４４】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親ポリペプチドとＲＮＡガイドとによって形成される複合体よりも増加した安定性を呈する。

【００４５】

組成物の一態様において、変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した三元複合体形成、標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００４６】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した安定性を呈する。

【００４７】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した安定性を呈する。

【００４８】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変異体二元複合体の$T_m$値が親複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した三元複合体形成、標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００４９】

組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む。

【００５０】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する。

【００５１】

組成物の別の態様において、同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる。

【００５２】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。

【００５３】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性を更に欠いている。

【００５４】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した酵素活性

を更に呈する。

【００５５】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する。

【００５６】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変化したオンターゲット結合を呈する。

【００５７】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変化したオフターゲット結合を呈する。

【００５８】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを、本明細書に記載されるとおりのＲＮＡガイド、例えばＲＮＡガイドと複合体化する方法をなおも更に提供する。

【００５９】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物をなおも更に提供し、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸との増加した三元複合体形成を呈する。

【００６０】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸への増加した結合親和性を呈する。

【００６１】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、増加したタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。

【００６２】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、増加したタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する。

【００６３】

組成物の一態様において、変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した三元複合体形成、標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００６４】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した三元複合体形成、標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００６５】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した三元複合体形成、標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００６６】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、二元複合体の$T_m$値が親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した三元複合体形成、標的核酸への増加した結合親和性及び／又は増加した安定性を呈する。

【００６７】
組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む。
【００６８】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、親二元複合体と同等以上の酵素活性を呈する。
【００６９】
組成物の別の態様において、同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる。
【００７０】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。
【００７１】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する。
【００７２】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、酵素活性を更に欠いている。
【００７３】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した酵素活性を更に呈する。
【００７４】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する。
【００７５】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した標的核酸複合体形成、標的核酸活性及び／又は標的核酸特異性を呈する。
【００７６】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変化したオンターゲット結合を呈する。
【００７７】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変化したオフターゲット結合を呈する
【００７８】
本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、変異体二元複合体と標的核酸とは、変異体三元複合体を形成し、この変異体三元複合体は、親三元複合体よりも減少した複合体解離を呈する。
【００７９】
本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、変異体二元複合体と標的核酸とは、変異体三元複合体を形成し、この標的核酸は、親三元複合体よりも減少している、変異体三元複合体からの解離を呈する。
【００８０】
本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、変異体二元複合体と標的核酸とは、変異体三元複合体を形成し、この変異体三元複合体は、親三元複合体よりも増加した安定性を呈する。
【００８１】
組成物の一態様において、変異体三元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した安定性を呈する。
【００８２】

組成物の別の態様において、変異体三元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した安定性を呈する。

【００８３】

組成物の別の態様において、変異体三元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した安定性を呈する。

【００８４】

組成物の別の態様において、変異体三元複合体は、変異体三元複合体のＴ$_m$値が親三元複合体のＴ$_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した安定性を呈する。

【００８５】

組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む。

【００８６】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する。

【００８７】

組成物の別の態様において、同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる。

【００８８】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。

【００８９】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する。

【００９０】

組成物の別の態様において、変異体三元複合体は、増加した安定性を呈する。

【００９１】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、酵素活性を更に欠いている。

【００９２】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した酵素活性を更に呈する。

【００９３】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する。

【００９４】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性及び／又は標的核酸結合特異性を呈する。

【００９５】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変化したオンターゲット結合を呈する。

【００９６】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変化したオフターゲット結合を呈する。

【００９７】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体二元複合体を、本明細書に記載されるとおりの標的核酸、例えばＤＮＡと複合体化する方法をなおも更に提供する。

【００９８】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸への増加した結合親和性を呈する。

【００９９】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも

更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の標的遺伝子座への増加した標的結合親和性を呈する。

【０１００】

組成物の一態様において、変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１０１】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１０２】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１０３】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、二元複合体の$T_m$値が親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１０４】

組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む。

【０１０５】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、親二元複合体と同等以上の酵素活性を呈する。

【０１０６】

組成物の別の態様において、同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる。

【０１０７】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。

【０１０８】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する。

【０１０９】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、酵素活性を更に欠いている。

【０１１０】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した酵素活性を更に呈する。

【０１１１】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する。

【０１１２】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した標的核酸複合体形成、標的核酸活性及び／又は標的核酸特異性を呈する。

【０１１３】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変化したオンターゲット結合を呈する。

【０１１４】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変化したオフターゲット結合を呈する。

【０１１５】

本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、これらの変異体二元複合体は、標

的核酸の２つ以上の標的遺伝子座と特異的に結合する。
【０１１６】
本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、これらの変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座の増加したオンターゲット結合を呈する。
【０１１７】
本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、これらの変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座との増加したオンターゲット結合を呈する。
【０１１８】
本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、これらの変異体二元複合体は、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とのオンターゲット三元複合体形成を呈する。
【０１１９】
本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、これらの変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座との増加した三元複合体形成を呈する。
【０１２０】
組成物の一態様において、変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、標的核酸との増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。
【０１２１】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、標的核酸との増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。
【０１２２】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、標的核酸との増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。
【０１２３】
組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、二元複合体の$T_m$値が親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、標的核酸との増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。
【０１２４】
組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む。
【０１２５】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する。
【０１２６】
組成物の別の態様において、同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる。
【０１２７】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。
【０１２８】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する。

【０１２９】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、酵素活性を更に欠いている。

【０１３０】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した酵素活性を更に呈する。

【０１３１】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加したＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する。

【０１３２】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した標的核酸三元複合体形成、標的核酸結合親和性及び／又は標的核酸結合特異性を呈する。

【０１３３】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変化したオンターゲット結合を呈する。

【０１３４】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、変化したオフターゲット結合を呈する。

【０１３５】

本発明は、本明細書に記載される変異体二元複合体を、本明細書に記載されるとおりの標的核酸、例えばＤＮＡと複合体化する方法をなおも更に提供する。

【０１３６】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の標的遺伝子座への増加したオンターゲット結合親和性を呈する。

【０１３７】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の非標的遺伝子座への減少した結合親和性を呈する。

【０１３８】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸のオンターゲット遺伝子座における増加した活性を呈する。

【０１３９】

本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の非標的遺伝子座における減少した活性を呈する。

【０１４０】

組成物の一態様において、変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１４１】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１４２】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１４３】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、二元複合体の$T_m$値が親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１４４】

組成物の別の態様において、親二元複合体は、配列番号２のアミノ酸配列を含む親ポリペプチドを含む。

【０１４５】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する。

【０１４６】

組成物の別の態様において、同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる。

【０１４７】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。

【０１４８】

組成物の別の態様において、変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する。

【０１４９】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した二元複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する。

【０１５０】

本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の変異体二元複合体を形成し、これらの複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座への増加したオンターゲット結合を呈する。

【０１５１】

本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の変異体二元複合体を形成し、これらの複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の非標的遺伝子座への減少したオフターゲット結合を呈する。

【０１５２】

本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の変異体二元複合体を形成し、これらの複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座における増加したオンターゲット活性を呈する。

【０１５３】

本発明は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む組成物をなおも更に提供し、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の変異体二元複合体を形成し、これらの複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の非標的遺伝子座における減少したオフターゲット活性を呈する。

【０１５４】

組成物の一態様において、複数の変異体二元複合体は、ある範囲の温度、例えば２０℃～６５℃にわたり、標的核酸の標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１５５】

組成物の別の態様において、複数の変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、標的核酸の標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１５６】

組成物の別の態様において、複数の変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、標的核酸の標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１５７】

組成物の別の態様において、複数の変異体二元複合体は、二元複合体の$T_m$値が親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、標的核酸の標的遺伝子座における増加した三元複合体形成及び／又は増加した安定性を呈する。

【０１５８】

組成物の別の態様において、複数の親二元複合体は、配列番号２のアミノ酸配列を含む親ポリペプチドを含む。

【０１５９】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと同等以上の酵素活性を呈する。

【０１６０】

組成物の別の態様において、同等以上の酵素活性は、約２０℃～約９０℃の温度範囲で起こる。

【０１６１】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を呈する。

【０１６２】

組成物の別の態様において、複数の変異体二元複合体は、増加した安定性及び／又はタンパク質－ＤＮＡ相互作用を呈する。

【０１６３】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、増加した二元複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を呈する。

【０１６４】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体二元複合体を、本明細書に記載されるとおりの標的核酸、例えばＤＮＡと複合体化する方法をなおも更に提供する。

【０１６５】

本発明は、本明細書に記載される複数の変異体二元複合体を、本明細書に記載されるとおりの標的核酸、例えばＤＮＡと複合体化する方法をなおも更に提供する。

【０１６６】

本明細書に記載される組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの一態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列のＤ５８１、Ｇ６２４、Ｆ６２６、Ｄ８３５、Ｌ８３６、Ｐ８６８、Ｓ８７９、Ｄ９１１、Ｉ９２６、Ｖ１０２０、Ｖ１０３０、Ｅ１０３５及びＳ１０４６置換の少なくとも１つを含む。

【０１６７】

組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列のＤ５８１Ｇ、Ｄ５８１Ｒ、Ｇ６２４Ｒ、Ｆ６２６Ｇ、Ｆ６２６Ｒ、Ｄ８３５Ｇ、Ｄ８３５Ｒ、Ｌ８３６Ｇ、Ｌ８３６Ｒ、Ｐ８６８Ｇ、Ｐ８６８Ｒ、Ｐ８６８Ｔ、Ｓ８７９Ｇ、Ｓ８７９Ｒ、Ｄ９１１Ｇ、Ｄ９１１Ｒ、Ｉ９２６Ｇ、Ｉ９２６Ｒ、Ｖ１０２０Ｇ、Ｖ１０２０Ｒ、Ｖ１０３０Ｇ、Ｖ１０３０Ｒ、Ｅ１０３

５Ｇ、Ｅ１０３５Ｒ、Ｓ１０４６Ｇ及びＳ１０４６Ｒ置換の少なくとも１つを含む。

【０１６８】

組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列のＤ５８１Ｒ、Ｇ６２４Ｒ、Ｆ６２６Ｒ、Ｐ６６８Ｔ、Ｄ９１１Ｒ、Ｉ９２６Ｒ、Ｖ１０３０Ｇ、Ｅ１０３５Ｒ及びＳ１０４６Ｇ置換の少なくとも１つを含む。

【０１６９】

組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表１に掲載される少なくとも１つの置換を含む。

【０１７０】

組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つのアミノ酸配列又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０１７１】

組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、エピトープペプチド、核局在化シグナル及び核外移行シグナルの少なくとも１つを含む。

【０１７２】

組成物の別の態様において、ＲＮＡガイドは、ＤＮＡターゲティング配列を含む。

【０１７３】

組成物の別の態様において、ＤＮＡターゲティング配列は、ＲＮＡガイドである。

【０１７４】

組成物の別の態様において、ＤＮＡターゲティング配列は、１３～３０ヌクレオチドである。

【０１７５】

組成物の別の態様において、ＲＮＡガイドは、ＤＮＡターゲティング配列に連結されたダイレクトリピート配列を含む。

【０１７６】

組成物の別の態様において、組成物は、標的核酸を更に含む。

【０１７７】

組成物の別の態様において、標的核酸は、細胞に存在する。

【０１７８】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、ベクター、例えば発現ベクターにコードされる。

【０１７９】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物を含む細胞をなおも更に提供する。

【０１８０】

本発明は、本明細書に記載されるとおりのベクターを発現させる方法をなおも更に提供する。

【０１８１】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物を作製する方法をなおも更に提供する。

【０１８２】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物を送達する方法をなおも更に提供する。

【０１８３】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物又はその１つ以上の成分を含むキット又はシステムをなおも更に提供する。

【０１８４】

本明細書に記載される組成物の一態様において、ＲＮＡガイドは、４３ヌクレオチド又

は約４３ヌクレオチドを含むか又はそれからなる。
【０１８５】
組成物の別の態様において、ＲＮＡガイドは、ｔｒａｃｒレスＲＮＡガイドである。
【０１８６】
組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドよりも約４０倍高い酵素活性を更に呈する。
【０１８７】
組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、増加したオンターゲット特異性を呈する。
【０１８８】
組成物又はＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、減少したオフターゲット特異性を呈する。
【０１８９】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、５'－ＮＴＴＮ－３'配列（式中、Ｎは、任意のヌクレオチドである）に隣接する欠失を選択的に誘導する。
【０１９０】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流にある。
【０１９１】
組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、欠失を誘導しない。
【０１９２】
組成物の別の態様において、欠失の長さは、Ｃａｓ９ポリペプチド誘導性欠失の長さよりも大きい。
【０１９３】
組成物の別の態様において、欠失は、細胞の遺伝子にある。
【０１９４】
組成物の別の態様において、欠失は、最大で約４０ヌクレオチド長である。
【０１９５】
組成物の別の態様において、欠失は、約４ヌクレオチド～４０ヌクレオチド長である。
【０１９６】
組成物の別の態様において、欠失は、約４ヌクレオチド～２５ヌクレオチド長である。
【０１９７】
組成物の別の態様において、欠失は、約１０ヌクレオチド～２５ヌクレオチド長である。
【０１９８】
組成物の別の態様において、欠失は、約１０ヌクレオチド～１５ヌクレオチド長である。
【０１９９】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まる。
【０２００】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まる。
【０２０１】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まる。
【０２０２】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まる。
【０２０３】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチ

ド～約１０ヌクレオチド以内に始まる。
【０２０４】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まる。
【０２０５】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２０６】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる。
【０２０７】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２０８】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２０９】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１０】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１１】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１２】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１３】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１４】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１５】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１６】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５ヌクレオチド～約１０ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１７】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。

【０２１８】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド以内に終わる。
【０２１９】
組成物の別の態様において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド以内に終わる。
【０２２０】
組成物の別の態様において、５'－ＮＴＴＮ－３'配列は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'（式中、Ｙは、Ｃ又はＴであり、Ｂは、Ａを除く任意のヌクレオチドであり、Ｄは、Ｃを除く任意のヌクレオチドであり、及びＲは、Ａ又はＧである）である。
【０２２１】
組成物の別の態様において、５'－ＮＴＴＮ－３'配列は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'である。
【０２２２】
組成物の別の態様において、欠失は、遺伝子、例えばＢ２Ｍ、ＴＲＡＣ、ＰＤＣＤ１のエクソンにある。
【０２２３】
組成物の別の態様において、欠失は、遺伝子の突然変異とオーバーラップしている。
【０２２４】
組成物の別の態様において、欠失は、遺伝子の挿入とオーバーラップしている。
【０２２５】
組成物の別の態様において、欠失は、遺伝子のリピート伸長を取り除く。
【０２２６】
組成物の別の態様において、欠失は、遺伝子の一方又は両方のアレルを破壊する。
【０２２７】
組成物の別の態様において、欠失は、真核細胞又は原核細胞に誘導される。
【０２２８】
組成物の別の態様において、欠失は、動物細胞、植物細胞若しくは真菌細胞に誘導されるか、又は細胞は、動物細胞、植物細胞若しくは真菌細胞に由来する。
【０２２９】
組成物の別の態様において、欠失は、哺乳類細胞に誘導されるか又は哺乳類細胞に由来する。
【０２３０】
組成物の別の態様において、欠失は、ヒト細胞に誘導されるか又はヒト細胞に由来する。
【０２３１】
組成物の別の態様において、欠失は、初代細胞に誘導される。
【０２３２】
組成物の別の態様において、欠失は、細胞株に誘導される。
【０２３３】
組成物の別の態様において、欠失は、Ｔ細胞に誘導される。
【０２３４】
組成物の別の態様において、欠失は、幹細胞（例えば、全能性（ｔｏｔｉｐｏｔｅｎｔ）／全能性（ｏｍｎｉｐｏｔｅｎｔ）幹細胞、多能性幹細胞、複能性幹細胞、少能性幹細

胞若しくは単能性幹細胞）、分化細胞又は最終分化細胞に誘導される。
【０２３５】
組成物の別の態様において、２つ以上の（例えば、マルチプレックス化された標的化欠失）欠失は、誘導される。
【０２３６】
本発明は、細胞において欠失を達成する方法をなおも更に提供し、この方法は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は複合体を細胞のＤＮＡと接触させることを含む。
【０２３７】
本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、細胞とを含む組成物又は製剤をなおも更に提供する。
【０２３８】
本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物を作製する方法をなおも更に提供する。
【０２３９】
本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを、本明細書に記載されるＲＮＡガイド、例えばＲＮＡガイドと複合体化する方法をなおも更に提供する。
【０２４０】
本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体二元複合体を標的核酸と複合体化する方法をなおも更に提供する。
【０２４１】
本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物を送達する方法をなおも更に提供する。
【０２４２】
本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物をなおも更に提供し、この変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと核酸との間の相互作用を増加させる置換を含む。
【０２４３】
組成物の一態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。
【０２４４】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む。
【０２４５】
組成物の別の態様において、相互作用は、静電相互作用である。
【０２４６】
組成物の別の態様において、相互作用は、非特異的相互作用である。
【０２４７】
組成物の別の態様において、相互作用は、芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用である。
【０２４８】
組成物の別の態様において、置換は、核酸界面にあるか又はそれに隣接している。
【０２４９】
組成物の別の態様において、核酸は、ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含むＲＮＡガイドである。
【０２５０】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。
【０２５１】

組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。

【０２５２】

組成物の別の態様において、置換は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとダイレクトリピート配列との間の相互作用を増加させる。

【０２５３】

組成物の別の態様において、置換は、親ポリペプチドと比較して、二元複合体形成を増加させる。

【０２５４】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む二元複合体は、親二元複合体と比較して、増加した安定性を呈する。

【０２５５】

組成物の別の態様において、置換は、アルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、チロシン又はセリン置換である。

【０２５６】

組成物の別の態様において、置換は、ＲＮＡ結合界面にある。

【０２５７】

組成物の別の態様において、置換は、Ｗｅｄｇｅドメイン又はＲｅｃ２ドメインにおける置換である。

【０２５８】

組成物の別の態様において、置換は、表４に掲載される置換である。

【０２５９】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。

【０２６０】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表４に掲載される置換を更に有する配列を含む。

【０２６１】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。

【０２６２】

組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表４に掲載される置換を更に有する。

【０２６３】

組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。

【０２６４】

組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む。

【０２６５】

組成物の別の態様において、核酸は、標的核酸である。

【０２６６】

組成物の別の態様において、核酸は、二本鎖ＤＮＡである。

【０２６７】

組成物の別の態様において、置換は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡとの間の相互作用を増加させる。

【０２６８】
組成物の別の態様において、二本鎖ＤＮＡは、ＰＡＭ配列を含む。
【０２６９】
組成物の別の態様において、置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる。
【０２７０】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する。
【０２７１】
組成物の別の態様において、置換は、アルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン置換である。
【０２７２】
組成物の別の態様において、置換は、二本鎖ＤＮＡ結合界面にある。
【０２７３】
組成物の別の態様において、置換は、Ｒｅｃ１ドメイン、ＰＩドメイン又はＷｅｄｇｅドメインにおける置換である。
【０２７４】
組成物の別の態様において、置換は、表５に掲載される置換である。
【０２７５】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０２７６】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表５に掲載される置換を更に有する配列を含む。
【０２７７】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。
【０２７８】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表５に掲載される置換を更に有する。
【０２７９】
組成物の別の態様において、核酸は、一本鎖ＤＮＡである。
【０２８０】
組成物の別の態様において、一本鎖ＤＮＡは、非標的鎖を含む。
【０２８１】
組成物の別の態様において、一本鎖ＤＮＡは、標的鎖を含む。
【０２８２】
組成物の別の態様において、置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる。
【０２８３】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する。
【０２８４】
組成物の別の態様において、置換は、アルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はアラニン置換である。
【０２８５】
組成物の別の態様において、置換は、一本鎖ＤＮＡ結合界面にある。

【０２８６】
組成物の別の態様において、置換は、ＰＩドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｗｅｄｇｅドメイン、ＲｕｖＣドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＮｕｃドメインにおける置換である。
【０２８７】
組成物の別の態様において、置換は、表６に掲載される置換である。
【０２８８】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０２８９】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表６に掲載される置換を更に有する配列を含む。
【０２９０】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。
【０２９１】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表６に掲載される置換を更に有する。
【０２９２】
組成物の別の態様において、置換は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド分子との間の相互作用を増加させる。
【０２９３】
組成物の別の態様において、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド分子は、ＲＮＡガイドのスペーサー配列と標的鎖とを含むヘテロ二重鎖である。
【０２９４】
組成物の別の態様において、置換は、ヘテロ二重鎖を安定化させる。
【０２９５】
組成物の別の態様において、置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる。
【０２９６】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する。
【０２９７】
組成物の別の態様において、置換は、アルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン置換である。
【０２９８】
組成物の別の態様において、置換は、Ｒｅｃ１ドメイン、ＰＩドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＲｕｖＣ２モチーフにおける置換である。
【０２９９】
組成物の別の態様において、置換は、表７に掲載される置換である。
【０３００】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０３０１】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表７に掲載される置換を更に有する配列を含む。

【０３０２】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３０３】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表７に掲載される置換を更に有する。
【０３０４】
組成物の別の態様において、置換は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、（ａ）二本鎖ＤＮＡ二重鎖、及び／又は（ｂ）ＲＮＡガイドのスペーサー配列と標的鎖とを含むヘテロ二重鎖の塩基との間の相互作用を増加させる。
【０３０５】
組成物の別の態様において、二本鎖ＤＮＡ二重鎖は、ＰＡＭ配列を含む。
【０３０６】
組成物の別の態様において、相互作用は、芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用である。
【０３０７】
組成物の別の態様において、置換は、Ｒループを安定化させる。
【０３０８】
組成物の別の態様において、置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる。
【０３０９】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する。
【０３１０】
組成物の別の態様において、置換は、アルギニン、リジン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、ヒスチジン、グルタミン、トレオニン又はバリン置換である。
【０３１１】
組成物の別の態様において、置換は、Ｗｅｄｇｅドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン又はＲｕｖＣドメインにおける置換である。
【０３１２】
組成物の別の態様において、置換は、表８に掲載される置換である。
【０３１３】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０３１４】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表８に掲載される置換を更に有する配列を含む。
【０３１５】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３１６】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表８に掲載される置換を更に有する。
【０３１７】
組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む。

【０３１８】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、増加した酵素活性を呈する。
【０３１９】
組成物の別の態様において、組成物は、ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含むＲＮＡガイドを更に含む。
【０３２０】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。
【０３２１】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。
【０３２２】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。
【０３２３】
２３９．組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３２４】
本発明は、本明細書に記載される組成物を含む細胞をなおも更に提供する。
【０３２５】
細胞の一態様において、組成物は、細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない。
【０３２６】
本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物をなおも更に提供し、この変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＤＮＡ結合中の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの可動性を増加させる置換を含む。
【０３２７】
組成物の一態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。
【０３２８】
組成物の別の態様において、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３２９】
組成物の別の態様において、置換は、ＤＮＡへの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの結合を増加させる。
【０３３０】
組成物の別の態様において、置換は、二本鎖ＤＮＡへの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの結合を増加させる。
【０３３１】
組成物の別の態様において、置換は、一本鎖ＤＮＡへの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの結合を増加させる。
【０３３２】
組成物の別の態様において、置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる。
【０３３３】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する。
【０３３４】
組成物の別の態様において、置換は、バルクアミノ酸から、より小さい側鎖を有するア

ミノ酸への置換である。
【０３３５】
組成物の別の態様において、置換は、アラニン、バリン、グリシン又はセリン置換である。
【０３３６】
組成物の別の態様において、置換は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのヘリックスＩＩドメインにある。
【０３３７】
組成物の別の態様において、置換は、表９に掲載される置換である。
【０３３８】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０３３９】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表９に掲載される置換を更に有する配列を含む。
【０３４０】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３４１】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表９に掲載される置換を更に有する。
【０３４２】
本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物をなおも更に提供し、この変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成中に形成されるドメイン間界面を安定化させる置換を含む。
【０３４３】
組成物の一態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。
【０３４４】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３４５】
組成物の別の態様において、ドメイン間界面は、一本鎖ＤＮＡが変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの活性部位と接触するときに形成される。
【０３４６】
組成物の別の態様において、ドメイン間界面は、ヘリックスＩＩドメイン－Ｎｕｃドメイン界面である。
【０３４７】
組成物の別の態様において、置換は、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成を増加させる。
【０３４８】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する。
【０３４９】
組成物の別の態様において、置換は、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン又はリジン置換である。
【０３５０】

組成物の別の態様において、置換は、表１０に掲載される置換である。
【０３５１】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０３５２】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表１０に掲載される置換を更に有する配列を含む。
【０３５３】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３５４】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表１０に掲載される置換を更に有する。
【０３５５】
組成物の別の態様において、親ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を含む。
【０３５６】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、増加した酵素活性を呈する。
【０３５７】
組成物の別の態様において、組成物は、ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含むＲＮＡガイドを更に含む。
【０３５８】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。
【０３５９】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。
【０３６０】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。
【０３６１】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３６２】
本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物を含む細胞をなおも更に提供する。
【０３６３】
細胞の一態様において、組成物は、細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない。
【０３６４】
本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物をなおも更に提供し、この変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット特異性を増加させる置換を含む。
【０３６５】
組成物の一態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。
【０３６６】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列

番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３６７】
組成物の別の態様において、置換は、オンターゲットＤＮＡ結合を増加させる。
【０３６８】
組成物の別の態様において、置換は、オフターゲットＤＮＡ結合を減少させる。
【０３６９】
組成物の別の態様において、置換は、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット三元複合体形成を増加させる。
【０３７０】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含むオンターゲット三元複合体は、親三元複合体と比較して、増加した安定性を呈する。
【０３７１】
組成物の別の態様において、置換は、ＲＮＡガイドのスペーサー配列と接触するアミノ酸の置換である。
【０３７２】
組成物の別の態様において、置換は、バルクアミノ酸から、より小さい側鎖を有するアミノ酸への置換である。
【０３７３】
組成物の別の態様において、置換は、アラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン置換である。
【０３７４】
組成物の別の態様において、置換は、Ｗｅｄｇｅドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＲｕｖＣドメインにおける置換である。
【０３７５】
組成物の別の態様において、置換は、ヘリックスＩＩドメインにおける置換である。
【０３７６】
組成物の別の態様において、置換は、表１１に掲載される置換である。
【０３７７】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０３７８】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表１１に掲載される置換を更に有する配列を含む。
【０３７９】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３８０】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表１１に掲載される置換を更に有する。
【０３８１】
組成物の別の態様において、置換は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの触媒反応速度（Ｋｃａｔ）を減少させる。
【０３８２】
組成物の別の態様において、置換は、アラニン、セリン、トレオニン、バリン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン又はイソロイシン置換である。
【０３８３】
組成物の別の態様において、置換は、Ｗｅｄｇｅドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｒｅｃ

２ドメイン又はＲｕｖＣドメインにおける置換である。
【０３８４】
組成物の別の態様において、置換は、ＲｕｖＣドメインにおける置換である。
【０３８５】
組成物の別の態様において、置換は、表１２に掲載される置換である。
【０３８６】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０３８７】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列と少なくとも９５％の同一性を有し、且つ表１２に掲載される置換を更に有する配列を含む。
【０３８８】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３８９】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６のいずれか１つ又は配列番号４９５～５１２のいずれか１つに示される配列を含み、且つ表１２に掲載される置換を更に有する。
【０３９０】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、増加したオンターゲット酵素活性を呈する。
【０３９１】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、減少したオフターゲット酵素活性を呈する。
【０３９２】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オンターゲット編集の１０％以下であるオフターゲット編集を呈する。
【０３９３】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オンターゲット編集の５％以下であるオフターゲット編集を呈する。
【０３９４】
組成物の別の態様において、組成物は、ダイレクトリピート配列とスペーサー配列とを含むＲＮＡガイドを更に含む。
【０３９５】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つと少なくとも９５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。
【０３９６】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２～４９４のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。
【０３９７】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４に示される配列を含む。
【０３９８】
組成物の別の態様において、ダイレクトリピート配列は、配列番号４９２に示され、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３、配列番号５、配列番号４９５及び配列番号４９６のいずれか１つに示される配列を含む。
【０３９９】
本発明は、本明細書に記載されるとおりの組成物を含む細胞をなおも更に提供する。

【０４００】
細胞の一態様において、組成物は、細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない。
【０４０１】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、オフターゲット結合に対するオンターゲット結合のより高い比を呈する。
【０４０２】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、オフターゲット活性に対するオンターゲット活性のより高い比を呈する。
【０４０３】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、オフターゲット編集に対するオンターゲット編集のより高い比を呈する。
【０４０４】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、より少ないオフターゲット結合を呈する。
【０４０５】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、より少ないオフターゲット活性を呈する。
【０４０６】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ９ポリペプチドと比較して、より少ないオフターゲット編集を呈する。
【０４０７】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも１０％少ない。
【０４０８】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも２０％少ない。
【０４０９】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも３０％少ない。
【０４１０】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも４０％少ない。
【０４１１】
組成物の別の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集は、Ｃａｓ９ポリペプチドによるオフターゲット結合、オフターゲット活性及び／又はオフターゲット編集よりも少なくとも５０％少ない。
【０４１２】
更に別の態様において、本発明は、本明細書に記載される組成物を含む細胞を提供する

。
【０４１３】
細胞の一態様において、組成物は、細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない。
【０４１４】
定義
本発明は、詳細な実施形態に関して且つ特定の図を参照して説明されることになるが、本発明は、それらに限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。以下に示されるとおりの用語は、特に指示がない限り、概してその一般的な意味で理解されるものとする。
【０４１５】
本明細書で使用されるとき、用語「活性」は、生物学的活性を指す。一部の実施形態において、活性とは、エフェクター活性を指す。一部の実施形態において、活性には、酵素活性、例えばエフェクターの触媒能力が含まれる。例えば、活性には、ヌクレアーゼ活性が含まれ得る。一部の実施形態において、活性には、結合活性、例えばエフェクターによるＲＮＡガイド及び／又は標的核酸への結合活性が含まれる。
【０４１６】
本明細書で使用されるとき、用語「～に隣接している」は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列が別のヌクレオチド又はアミノ酸配列に近接していることを指す。一部の実施形態において、ヌクレオチド配列は別のヌクレオチド配列に対し、それらの２つの配列を分けるヌクレオチドがない場合に隣接している。一部の実施形態において、ヌクレオチド配列は別のヌクレオチド配列に対し、それらの２つの配列を少数のヌクレオチド（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０ヌクレオチド）が分けている場合に隣接している。一部の実施形態において、第１の配列は第２の配列に対し、それらの２つの配列が約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４又は１５ヌクレオチドによって分かれている場合に隣接している。一部の実施形態において、用語「～に隣接している」は、タンパク質残基が別のタンパク質残基と相互作用することを指して使用される。一部の実施形態において、用語「～に隣接している」は、タンパク質残基がヌクレオチド又は核酸と相互作用することを指して使用される。一部の実施形態において、用語「～に隣接している」は、タンパク質ドメイン又はモチーフが別のタンパク質ドメイン又はモチーフと相互作用することを指して使用される。一部の実施形態において、用語「～に隣接している」は、タンパク質ドメイン又はモチーフがヌクレオチド又は核酸配列と相互作用することを指して使用される。本明細書で使用されるとき、用語「～に隣接している」は、本開示の修飾された細胞におけるインデル（挿入／欠失）の位置取りを指して使用される。
【０４１７】
本明細書で使用されるとき、用語「複合体」は、２つ以上の分子の集合体を指す。一部の実施形態において、複合体は、互いに相互作用している（例えば、結合している、接触した状態になっている、接着している）ポリペプチド及び核酸分子を含む。
【０４１８】
本明細書で使用されるとき、用語「二元複合体」は、２つの分子（例えば、ポリペプチド及び核酸分子）の集合体を指す。一部の実施形態において、二元複合体とは、ポリペプチドとターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）との集合体を指す。一部の実施形態において、二元複合体とは、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）を指す。本明細書で使用されるとき、用語「変異体二元複合体」は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとの集合体を指す。本明細書で使用されるとき、用語「親二元複合体」は、親ポリペプチドとＲＮＡガイドとの又は参照ポリペプチドとＲＮＡガイドとの集合体を指す。
【０４１９】
本明細書で使用されるとき、用語「三元複合体」は、３つの分子（例えば、ポリペプチド及び２つの核酸分子）の集合体を指す。一部の実施形態において、「三元複合体」は、ポリペプチドと、ＲＮＡ分子と、ＤＮＡ分子との集合体を指す。一部の実施形態において

、三元複合体とは、ポリペプチドと、ターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）と、標的核酸（例えば、標的ＤＮＡ分子）との集合体を指す。一部の実施形態において、「三元複合体」は、二元複合体（例えば、リボ核タンパク質）と第３の分子（例えば、標的核酸）との集合体を指す。本明細書で使用されるとき、用語「変異体三元複合体」、「変異体Ｃａｓ１２ｉ２三元複合体」及び「Ｃａｓ１２ｉ２変異体三元複合体」は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸との（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２リボ核タンパク質と標的核酸との）集合体を指す。本明細書で使用されるとき、用語「親三元複合体」、「親Ｃａｓ１２ｉ２三元複合体」及び「Ｃａｓ１２ｉ２親三元複合体」は、親ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸との（例えば、親リボ核タンパク質と標的核酸との）又は参照ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸との（例えば、参照リボ核タンパク質と標的核酸との）集合体を指す。

【０４２０】

本明細書で使用されるとき、用語「欠失」は、核酸配列中のヌクレオチドの喪失又は除去を指す。欠失は、生物のゲノムにおける欠失であり得る。欠失は、細胞における欠失であり得る。欠失は、ＤＮＡ配列であり得る。欠失は、ＲＮＡ配列であり得る。欠失は、フレームシフト突然変異又は非フレームシフト突然変異であり得る。本明細書に記載されるＣａｓ１２ｉ２誘導性欠失とは、核酸分子からの約４ヌクレオチド～１００ヌクレオチド、約４ヌクレオチド～５０ヌクレオチド、約４ヌクレオチド～４０ヌクレオチド、約４ヌクレオチド～２５ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～２５ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～１５ヌクレオチドなど、最大で約１００ヌクレオチドの欠失を指すことができる。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＣａｓ１２ｉ２誘導性欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流に現れる。一部の実施形態において、用語「Ｃａｓ１２ｉ２誘導性」は、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによってＤＮＡ切断が誘導される結果として生じる欠失を指す。一部の実施形態において、用語「Ｃａｓ１２ｉ２誘導性」は、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによってＤＮＡ切断が誘導され且つ細胞のＤＮＡ修復機構によって修復される結果として生じる欠失を指す。

【０４２１】

本明細書で使用されるとき、用語「ドメイン」は、ポリペプチドの別個の機能的及び／又は構造的単位を指す。一部の実施形態において、ドメインは、保存されたアミノ酸配列を含み得る。

【０４２２】

本明細書で使用されるとき、用語「編集効率」及び「インデル活性」は、酵素（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）が配列にインデル（挿入／欠失）を導入する能力を指す。例えば、一部の実施形態において、１０個の標的遺伝子座の各々にインデルを導入する酵素は、１００％の編集効率を呈する。１０個の標的遺伝子座のうちの５個にインデルを導入する酵素は、５０％の編集効率を呈する。別の例において、複数の細胞の５０％において標的遺伝子座にインデルを導入する酵素は、５０％の編集効率を呈する。本明細書で使用されるとき、用語「編集効率」、「インデル活性」及び「オンターゲット編集」は、酵素（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）が標的遺伝子座にインデルを選択的に導入する能力を指す。一部の実施形態では、標的遺伝子座における編集効率が、非標的遺伝子座における編集効率と比較される。一部の実施形態では、標的遺伝子座における編集が、非標的遺伝子座における編集と比較される。

【０４２３】

本明細書で使用されるとき、用語「エフェクター活性」は、生物学的活性を指す。一部の実施形態において、エフェクター活性には、酵素活性、例えばエフェクターの触媒能力が含まれる。例えば、エフェクター活性には、ヌクレアーゼ活性が含まれ得る。

【０４２４】

本明細書で使用されるとき、用語「界面」は、核酸分子又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの別個のドメイン／モチーフ若しくは別個のドメイン／モチーフの一部分と接触している（例えば、それと相互作用するか又はそれに隣接している）変異体Ｃａｓ１２ｉ

２ポリペプチド（例えば、ドメイン／モチーフ又はドメイン／モチーフの一部分）の１つ以上の残基を指す。一部の態様において、界面は、隣接するドメイン又はモチーフ間に埋もれている表面積である。一部の態様において、界面は、ポリペプチドとリガンド（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）との間にある、ポリペプチドとリガンドとが接触をなす表面積である。本明細書で使用されるとき、用語「核酸界面」は、核酸配列（例えば、ＤＮＡ配列又はＲＮＡ配列）に近接している（例えば、それに隣接している）か又はそれと相互作用する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基を指す。本明細書で使用されるとき、用語「ＲＮＡ結合界面」は、ＲＮＡガイド（例えば、ＲＮＡガイドのダイレクトリピート）に近接している（例えば、それに隣接している）か又はそれと相互作用する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基を指す。本明細書で使用されるとき、用語「二本鎖ＤＮＡ結合界面」は、二本鎖ＤＮＡに近接している（例えば、それに隣接している）及び／又はそれと相互作用する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基を指す。本明細書で使用されるとき、用語「一本鎖ＤＮＡ結合界面」は、一本鎖ＤＮＡに近接している（例えば、それに隣接している）及び／又はそれと相互作用する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基を指す。本明細書で使用されるとき、用語「ドメイン間界面」は、あるドメインが別のドメインに近接している（例えば、それに隣接している）ものを指す。一部の実施形態において、ドメイン間界面（例えば、ヘリックスＩＩドメイン－Ｎｕｃドメイン界面）は、複合体形成時（例えば、三元複合体形成時）に形成される。

【０４２５】

本明細書で使用されるとき、用語「親」、「親ポリペプチド」及び「親配列」は、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを作製するため変化が作り出される元のポリペプチド（例えば、出発ポリペプチド）を指す。一部の実施形態において、親は、１つ以上の指定された位置に１つ以上の変異がある変異体の同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。例示的実施形態において、変異とは、ポリペプチド配列内にあるアミノ酸の変更を指す。親は、天然に存在する（野生型）ポリペプチドであり得る。詳細な実施形態において、親は、配列番号２のポリペプチドと少なくとも６０％、少なくとも６１％、少なくとも６２％、少なくとも６３％、少なくとも６４％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７２％、少なくとも７３％、少なくとも７４％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、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％又は１００％の同一性を有するポリペプチドである。一部の実施形態において、変異には、結合、融合又は他の変更など、親の元のアミノ酸配列を変化させることのない構造的変更が含まれ得る。一部の実施形態では、親ポリペプチド配列がアミノ酸変異及び構造的変更を含む。

【０４２６】

本明細書で使用されるとき、「複数の変異体二元複合体」は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む複数の二元複合体を指す。複数の親ポリペプチド（例えば、配列番号２の野生型Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド親）を含む複数の二元複合体は、本明細書では「複数の親二元複合体」と称される。複数のＣａｓ１２ｉ２ポリペプチド、例えば、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、２つ以上の別個のターゲティング部分、例えば、２つ以上の別個のＲＮＡガイドとが、個別に、２つ以上の二元複合体（例えば、複数の二元複合体）を形成する。かかる実施形態において、複合体形成は、単一の組成物で同時に又は独立に別々の組成物で達成され得る。

【０４２７】

本明細書で使用されるとき、用語「プロトスペーサー隣接モチーフ」又は「ＰＡＭ」は、ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ１２ｉ２などの酵素又はその変異体）とターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）とを含む二元複合体が結合する標的配列に隣接するＤＮＡ配列を指す。一部の実施形態において、ＰＡＭは酵素活性に必要である。二本鎖標的の場合、ターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）が標的の第１の鎖に結合し、本明細書

に記載されるとおりのＰＡＭ配列が第２の相補鎖に存在する。例えば、一部の実施形態において、ＲＮＡガイドが標的鎖（例えば、スペーサー相補鎖）に結合し、本明細書に記載されるとおりのＰＡＭ配列が非標的鎖（即ち非スペーサー相補鎖）に存在する。一部の実施形態において、標的鎖（即ちスペーサー相補鎖）は、５'－ＮＡＡＮ－３'配列を含む。

【０４２８】

本明細書で使用されるとき、用語「参照組成物」、「参照分子」、「参照配列」、「参照」及び「参照複合体」は、陰性対照又は親（例えば、親配列、親タンパク質、野生型タンパク質又は親配列を含む複合体）など、対照を指す。例えば、参照分子とは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの比較対象となるＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドを指す。同様に、参照ＲＮＡガイドは、修飾ＲＮＡガイドの比較対象となるターゲティング部分を指す。変異体又は修飾分子は、配列（例えば、変異体又は修飾分子は参照分子とＸ％の配列同一性又は相同性を有し得る）、熱安定性又は活性（例えば、変異体又は修飾分子は参照分子のＸ％の活性を有し得る）を基準として参照分子と比較され得る。例えば、参照分子がＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドである場合、変異体又は修飾分子は、参照Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの１０％以下の活性を有すると特徴付けられ得るか、又は参照Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの少なくとも１０％高い活性を有すると特徴付けられ得る。参照Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの例としては、天然に存在する非修飾Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、例えば、古細菌又は他の細菌種由来の天然に存在するＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドが挙げられる。特定の実施形態において、参照Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、その比較対象となる変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと最も近い配列同一性又は相同性を有する天然に存在するＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドである。特定の実施形態において、参照Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを得るため突然変異が作り出されることになった天然に存在する配列又は既知の配列を有する親分子である。

【０４２９】

本明細書で使用されるとき、用語「ＲＮＡガイド」又は「ＲＮＡガイド配列」は、本明細書に記載されるポリペプチドを標的核酸へと標的化することを容易にする任意のＲＮＡ分子を指す。例えば、ＲＮＡガイドは、標的核酸を認識する（例えば、それに結合する）分子であり得る。ＲＮＡガイドは、特異的な核酸配列と相補的であるように設計されるものであり得る。ＲＮＡガイドは、ＤＮＡターゲティング配列とダイレクトリピート（ＤＲ）配列とを含む。用語のＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、プレｃｒＲＮＡ及び成熟ｃｒＲＮＡも、本明細書ではＲＮＡガイドを指して使用される。

【０４３０】

本明細書で使用されるとき、用語「実質的に同一」は、参照配列とある程度の同一性を有する配列、ポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。

【０４３１】

本明細書で使用されるとき、用語「ターゲティング部分」は、別の分子又は成分を標的核酸へと標的化することを容易にする分子又は成分（例えば、核酸及び／又はＲＮＡガイド）を指す。一部の実施形態において、ターゲティング部分は、標的核酸と特異的に相互作用するか又はそれと会合する。

【０４３２】

本明細書で使用されるとき、用語「標的核酸」、「標的配列」、「標的基質」及び「オンターゲット遺伝子座」は、ターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）が特異的に結合する核酸配列を指す。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドのＤＮＡターゲティング配列は、標的核酸に結合する。標的遺伝子座への二元複合体の結合は、本明細書では「オンターゲット結合」と称される。

【０４３３】

本明細書で使用されるとき、用語「非標的」及び「オフターゲット」は、ターゲティング部分が特異的に結合する配列又は特異的に結合することが意図される配列以外の核酸配列を指す。非標的遺伝子座は、ターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）の意図しない標的である。非標的遺伝子座への二元複合体の結合は、本明細書では「オフターゲット

結合」と称される。一部の実施形態において、非標的遺伝子座は、標的核酸上の遺伝子座である。一部の実施形態において、非標的遺伝子座は、標的核酸以外の核酸（例えば、非標的核酸）上の遺伝子座である。

【０４３４】

本明細書で使用されるとき、用語「上流」及び「下流」は、ある核酸分子中の単一の核酸（例えば、ＤＮＡ）配列内での相対的な位置を指す。本明細書で使用されるとき、用語「上流」及び「下流」は、２つの配列の互いに対する位置取りを指す。「上流」及び「下流」は、それぞれ、ＲＮＡ転写が起こる５'から３'の向きに関する。第１の配列は、第１の配列の３'末端が第２の配列の５'末端より前に現れるとき、第２の配列の上流にある。第１の配列は、第１の配列の５'末端が第２の配列の３'末端より後ろに現れるとき、第２の配列の下流にある。本明細書で使用されるとき、用語「上流」及び「下流」は、５'－ＮＴＴＮ'－３'配列に対する欠失の相対的な位置取りを指して使用される。本明細書で使用されるとき、５'－ＮＴＴＮ－３'配列はＣａｓ１２ｉ２誘導性欠失の上流にあり、及びＣａｓ１２ｉ２誘導性欠失は５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流にある。

【０４３５】

本明細書で使用されるとき、用語「変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド」及び「変異体エフェクターポリペプチド」は、親ポリペプチドと比較して１つ以上の残基位置に変化、例えば、置換、挿入、欠失及び／又は融合を含むポリペプチドを指す。本明細書で使用されるとき、用語「変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド」及び「変異体エフェクターポリペプチド」は、配列番号２のポリペプチドと比較して変化を含んでいるポリペプチドを指す。

【図面の簡単な説明】

【０４３６】

【図１】野生型Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号２）及び配列番号３～５、４９５又は４９６に示されるＣａｓ１２ｉ２変異体を示す概略図である。ＲｕｖＣモチーフ及び突然変異した残基が図示される。

【図２】オーバーラップＰＣＲ法による単一突然変異の導入及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２配列を発現する線状ＤＮＡ鋳型の作成を示す。

【図３Ａ】ａ）野生型Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号２）、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２、及びｂ）ｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）で調製したＲＮＰがＡＡＶＳ１　ｄｓＤＮＡ標的（配列番号１５０）に結合する能力を示すＤＮＡ　ＥＭＳＡゲルである。結合したｄｓＤＮＡ及び未結合ｄｓＤＮＡバンドが指示される。

【図３Ｂ】ａ）野生型Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号２）、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２、及びｂ）ｃｒＲＮＡ２（配列番号１４８）で調製したＲＮＰがＶＥＧＦＡ　ｄｓＤＮＡ標的（配列番号１５１）に結合する能力を示すＤＮＡ　ＥＭＳＡゲルである。結合したｄｓＤＮＡ及び未結合ｄｓＤＮＡバンドが指示される。

【図３Ｃ】ａ）野生型Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号２）、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２、及びｂ）ｃｒＲＮＡ３（配列番号１４９）で調製したＲＮＰがＥＭＸ１　ｄｓＤＮＡ標的（配列番号１５２）に結合する能力を示すＤＮＡ　ＥＭＳＡゲルである。結合したｄｓＤＮＡ及び未結合ｄｓＤＮＡバンドが指示される。

【図３Ｄ】ａ）野生型Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号２）、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２、及びｂ）ｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）で調製したＲＮＰがＥＭＸ１　ｄｓＤＮＡ標的（配列番号１５２）に結合する能力を示すＤＮＡ　ＥＭＳＡゲルである。未結合ｄｓＤＮＡバンドが指示される。

【図３Ｅ】ａ）ｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）及びＤＮＡ標的１（配列番号１５０）、ｂ）ｃｒＲＮＡ２（配列番号１４８）及びＤＮＡ標的２（配列番号１５１）、ｃ）ｃｒＲＮＡ３（配列番号１４９）及びＤＮＡ標的３（配列番号１５２）、並びにｄ）ｃｒＲＮＡ

１（配列番号１４７）及びＤＮＡ標的３（配列番号１５２）を含む試料の移動を示すゲルである。
【図４】変異体Ｃａｓ１２ｉ２活性を測定する実施例１０に記載される蛍光枯渇アッセイの概略図である。
【図５Ａ－５Ｔ】野生型Ｃａｓ１２ｉ２（実線）、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２（点線）及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２（破線）についてのＧＦＰ枯渇比（非標的／標的）のグラフである。枯渇比値は、１２時間にわたって取った測定値から計算した。２０個のＧＦＰ標的を示す：ｔｏｐ１（図５Ａ）、ｔｏｐ２（図５Ｂ）、ｔｏｐ３（図５Ｃ）、ｔｏｐ４（図５Ｄ）、ｔｏｐ５（図５Ｅ）、ｔｏｐ６（図５Ｆ）、ｔｏｐ７（図５Ｇ）、ｔｏｐ８（図５Ｈ）、ｔｏｐ９（図５Ｉ）、ｔｏｐ１０（図５Ｊ）、ｂｏｔ１（図５Ｋ）、ｂｏｔ２（図５Ｌ）、ｂｏｔ３（図５Ｍ）、ｂｏｔ４（図５Ｎ）、ｂｏｔ５（図５Ｏ）、ｂｏｔ６（図５Ｐ）、ｂｏｔ７（図５Ｑ）、ｂｏｔ８（図５Ｒ）、ｂｏｔ９（図５Ｓ）、ｂｏｔ１０（図５Ｔ）。
【図６Ａ】次世代シーケンシングによって評価したときの、野生型Ｃａｓ１２ｉ２、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２で標的化した１５ヵ所の遺伝子領域のインデル測定値を示す。
【図６Ｂ】図６Ａのデータを使用して、野生型Ｃａｓ１２ｉ２、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２の標的となる能力があることが分かった１５ヵ所の遺伝子領域の割合を示す。
【図７Ａ】野生型Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号２）又は配列番号３～５、４９５若しくは４９６、４６、４７、５０～６３、６５～６８、７９、８４、８７～９０、９５～９７、９９、１０１、１０３、１０４、１１２、１１４～１１８、１２３、１３０及び１３１のＣａｓ１２ｉ２変異体を使用したＡＡＶＳ１標的上のインデル率を比較する。
【図７Ｂ】野生型Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号３～５、４９５若しくは４９６、４６、４７、５０～６３、６５～６８、７６、７９、８４、８６～９０、９５～９７、９９、１０１、１０３、１０４、１１２及び１１４～１２４のＣａｓ１２ｉ２変異体を使用したＥＭＸ１標的上のインデル率を比較する。
【図７Ｃ】野生型Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号３～５、４９５若しくは４９６、４６、４７、５０～６３、６５～６８、７６、７９、８４、８６～９０、９５～９７、９９、１０１、１０３、１０４、１１２及び１１４～１２４のＣａｓ１２ｉ２変異体を使用したＶＥＧＦＡ１標的上のインデル率を比較する。
【図８】配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２と、様々な濃度のＢ２Ｍを標的化する幾つかの個別のｃｒＲＮＡとを含む変異体二元複合体による初代Ｔ細胞におけるインデル活性を示す。エラーバーは、代表的な１ドナーからの４テクニカルレプリケートの平均値の標準偏差を表す。
【図９】配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２と、様々な濃度のＢ２Ｍを標的化する幾つかの個別のｃｒＲＮＡとを含む変異体二元複合体による初代Ｔ細胞におけるＢ２Ｍ発現低下を示す。エラーバーは、代表的な１ドナーからの４テクニカルレプリケートの平均値の標準偏差を表す。
【図１０】様々な濃度のＢ２Ｍを標的化する変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰを初代Ｔ細胞に導入してから７日後の（ＤＡＰＩ染色による）細胞の生存能力を示す。エラーバーは、代表的な１ドナーからの４テクニカルレプリケートの平均値の標準偏差を表す。
【図１１Ａ】配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２と、様々な濃度のＴＲＡＣを標的化する幾つかの個別のｃｒＲＮＡとを含む変異体二元複合体による初代Ｔ細胞におけるインデル活性。エラーバーは、代表的な１ドナーからの４テクニカルレプリケートの平均値の標準偏差を表す。
【図１１Ｂ】様々な濃度のＴＲＡＣを標的化する変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰを初代Ｔ細胞に導入してから７日後の（ＤＡＰＩ染色による）細胞の生存能力を示す。エラーバーは、代表的な１ドナーからの４テクニカルレプリケートの平均値の標準偏差を表す。
【図１２Ａ】配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２と、様々な濃度のＰＤＣＤ１を標的化す

る幾つかの個別のｃｒＲＮＡとを含む変異体二元複合体による初代Ｔ細胞におけるインデル活性を示す。エラーバーは、代表的な１ドナーからの４テクニカルレプリケートの平均値の標準偏差を表す。

【図１２Ｂ】様々な濃度のＰＤＣＤ１を標的化する変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰを初代Ｔ細胞に導入してから７日後の（ＤＡＰＩ染色による）細胞の生存能力を示す。エラーバーは、代表的な１ドナーからの４テクニカルレプリケートの平均値の標準偏差を表す。

【図１３】例示的オンターゲット配列及び非標的配列を使用して、どのようにレーベンシュタイン距離（編集距離）を計算するかを示す概略図である。オンターゲット配列及び４つの非標的配列を示し、各々が１、２、３又は４の編集距離を有する。各置換、挿入又は欠失残基が太字で指示される。標的配列及び各非標的配列のＰＡＭ配列は、点線の左側に指示される。

【図１４Ａ】配列番号３のＣａｓ１２ｉ２変異体を使用した８個のＡＡＶＳ１遺伝子座、８個のＥＭＸ１遺伝子座及び８個のＶＥＧＦＡ遺伝子座上のオンターゲットインデル比率を示し、更に、標的遺伝子座と比較して１、２、３又は４の編集距離を有する遺伝子座上のオフターゲットインデル比率を示す。

【図１４Ｂ】配列番号４のＣａｓ１２ｉ２変異体を使用した８個のＡＡＶＳ１遺伝子座、８個のＥＭＸ１遺伝子座及び８個のＶＥＧＦＡ遺伝子座上のオンターゲットインデル比率を示し、更に、標的遺伝子座と比較して１、２、３又は４の編集距離を有する遺伝子座上のオフターゲットインデル比率を示す。

【図１４Ｃ】配列番号５のＣａｓ１２ｉ２変異体を使用した８個のＡＡＶＳ１遺伝子座、８個のＥＭＸ１遺伝子座及び８個のＶＥＧＦＡ遺伝子座上のオンターゲットインデル率を示し、更に、標的遺伝子座と比較して１、２、３又は４の編集距離を有する遺伝子座上のオフターゲットインデル率を示す。

【図１５】実施例１６においてＣａｓ１２ｉ２変異体の特異性及び活性の分析に使用したタグメンテーションベースのタグ組込み部位シーケンシング（ＴＴＩＳＳ）方法のステップを示す概略図である。

【図１６Ａ】標的ＡＡＶＳ１＿Ｔ５における配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及びＳｐＣａｓ９についてのオンターゲット及びオフターゲットリードを示す。

【図１６Ｂ】標的ＥＭＸ１＿Ｔ２における配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及びＳｐＣａｓ９についてのオンターゲット及びオフターゲットリードを示す。

【図１６Ｃ】標的ＥＭＸ１＿Ｔ４における配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及びＳｐＣａｓ９についてのオンターゲット及びオフターゲットリードを示す。

【図１６Ｄ】標的ＶＥＧＦＡ＿Ｔ６における配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及びＳｐＣａｓ９についてのオンターゲット及びオフターゲットリードを示す。

【図１７Ａ】ＥＭＸ１＿Ｔ６及びＶＥＧＦＡ＿Ｔ７において幾つかの改変Ｃａｓ１２ｉ２変異体によって誘導されたインデルを示すグラフである。

【図１７Ｂ】ＥＭＸ１＿Ｔ６及びＶＥＧＦＡ＿Ｔ７において配列番号３～５及び４９５のＣａｓ１２ｉ２変異体によって誘導されたインデルを示すグラフである。

【図１８】ＡＡＶＳ１＿Ｔ６、ＡＡＶＳ１＿Ｔ７、ＥＭＸ１＿Ｔ２、ＥＭＸ１＿Ｔ６及びＶＥＧＦＡ＿Ｔ５において配列番号４、４９５及び４９６のＣａｓ１２ｉ２変異体によって誘導されたインデルを示すグラフである。

【図１９】Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのドメイン構造を示す概略図である。

【図２０Ａ】Ｃａｓ１２ｉ２構造におけるＤ５８１Ｒ置換の位置を図示する。Ｄ５８１Ｒ置換は、ＰＡＭ配列のＤＮＡと静電接触を形成し得る。Ｄ５８１Ｒは非標的鎖と相互作用し得る。

【図２０Ｂ】Ｃａｓ１２ｉ２構造における、活性部位に近いＩ９２６Ｒ及びＶ１０３０Ｇ置換の位置を図示する。Ｉ９２６Ｒは、活性部位に近い一本鎖ＤＮＡと相互作用することができ、Ｒｅｃ１との界面を安定化させる。Ｖ１０３０Ｇは、構造のＣ末端部分にある。

【図２０Ｃ】ダイレクトリピートによる不対の非スタッキング塩基の安定化を図示する。ダイレクトリピート配列は、広い範囲にわたってＣａｓ１２ｉ２と相互作用する。加えて

、一部のＲＮＡガイド塩基が互いに対合する。しかしながら、一部の塩基は、露出したまま残り（星印）、例えば、露出した塩基は、他の塩基と対合せず、Ｃａｓ１２ｉ２との相互作用が多くない。Ｃａｓ１２ｉ２とＲＮＡガイドとの間の、特に露出した領域における相互作用を増加させる置換により、二元複合体が安定化し、酵素活性が増加し得る。
【図２１Ａ】三元複合体形成を示す概略図である。ＰＡＭの下流にある二本鎖ＤＮＡが融解し、ＲＮＡガイドのスペーサーが標的鎖に結合して、ヘテロ二重鎖が形成される。ＰＡＭ配列は、インタクトな二本鎖ＤＮＡとして残るため、末端ＰＡＭ二本鎖ＤＮＡ塩基対が環境及びタンパク質に部分的に露出することになる。ヘテロ二重鎖の末端塩基対も露出する。露出した塩基は、「ヘテロ二重鎖末端」及び「ｄｓＤＮＡ二重鎖末端」と指示される。
【図２１Ｂ】Ｃａｓ１２ｉ２構造中のＤＮＡ融解及びヘテロ二重鎖アニーリング部位における露出した塩基を示す。本明細書には、二本鎖ＤＮＡ二重鎖及びヘテロ二重鎖の末端を安定化させる置換が記載される。こうした置換により、最初の標的の巻き戻しに対するエネルギー障壁が下がり得る。
【図２２Ａ】二元複合体から三元複合体への移行に必要なコンホメーション変化を示す。二元構造と三元構造との間のＣα位におけるほとんどの変化は、ヘリックスＩＩドメインに見られる。ベクトルは、Ｃαの移動≧３．０Å、軸の周りにおけるヘリックスＩＩの約２５°回転を示す。本明細書には、三元複合体形成を亢進させる置換が記載される。
【図２２Ｂ】置換によってヘリックスＩＩドメインの可動性が増加し得るようなヘリックスＩＩドメイン中の領域を示す。図２２Ｂは、置換によってヘリックスＩＩドメインとＮｕｃドメインとの間の界面が安定化し得るようなＣａｓ１２ｉ２構造中の領域を更に示す。
【発明を実施するための形態】
【０４３７】
本開示は、配列番号２のエフェクターの新規変異体並びにその作製及び使用方法に関する。本開示は、配列番号２のエフェクターの変異体を含む複合体並びにその作製及び使用方法に更に関する。一部の態様において、本明細書には、１つ以上の特性を備える複合体を含む組成物が記載される。一部の態様において、複合体を含む組成物を送達する方法が記載される。
【０４３８】
組成物
一部の態様において、本明細書に記載される本発明は、複合体（例えば、二元複合体）を含む組成物を含む。一部の態様において、本明細書に記載される本発明は、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとターゲティング部分とを含む複合体を含む組成物を含む。一部の実施形態において、本発明の組成物は変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含み、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイドとの複合体形成の増加を示す。
【０４３９】
一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む複合体を含み、ここで、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、親ポリペプチド及びＲＮＡガイドと比較して、より高い結合親和性を有する。
【０４４０】
一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む複合体を含み、ここで、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、親ポリペプチド及びＲＮＡガイドと比較して、より強力なタンパク質－ＲＮＡ相互作用を有する。一部の実施形態において、タンパク質－ＲＮＡ相互作用は、イオン相互作用である。
【０４４１】
一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む複合体を含み、この複合体は、親ポリペプチドとＲＮＡガイドとによって

形成される複合体よりも安定性が高い。

【０４４２】

一部の態様において、本明細書に記載される本発明は、複合体（例えば、三元複合体）を含む組成物を含む。一部の実施形態において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含み、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイド及び標的核酸との複合体形成（例えば、三元複合体形成）の増加を示す。

【０４４３】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む二元複合体を含み、この組成物は、標的核酸を更に含む。一部の実施形態において、二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸との三元複合体形成の増加を示す。

【０４４４】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含み、ここで、Ｃａｓ１２ｉ２変異体ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、親ポリペプチド及びＲＮＡガイドと比較して、標的核酸に対してより高い結合親和性を有する。

【０４４５】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む二元複合体を含み、この組成物は、標的核酸を更に含む。一部の実施形態において、二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸に対してより高い結合親和性を有する。

【０４４６】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含む三元複合体を含み、ここで、三元複合体は、親ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とによって形成される複合体よりも安定性が高い。

【０４４７】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む二元複合体を含み、この組成物は、標的核酸を更に含む。一部の実施形態において、二元複合体は、親二元複合体と標的核酸とによって形成される三元複合体よりも安定性の高い標的核酸との三元複合体を形成する。

【０４４８】

一部の態様において、本明細書に記載される本発明は、複合体（例えば、三元複合体）を含む組成物を含む。一部の実施形態において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを含み、この変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、親二元複合体と比較して、標的核酸に対してより高い結合親和性を有する変異体二元複合体を形成する。

【０４４９】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む二元複合体を含み、この組成物は、標的核酸を更に含む。一部の実施形態において、二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の標的遺伝子座に対してより高い標的結合親和性を有する。

【０４５０】

一部の態様において、本発明の組成物は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む。一部の実施形態において、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座のより高いオンターゲット結合を示す。

【０４５１】

一部の態様において、本発明の組成物は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと

、２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む。一部の実施形態において、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とのより高いオンターゲット三元複合体形成を示す。

【０４５２】

一部の態様において、本発明の組成物は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含む。一部の実施形態において、別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とより安定性の高い三元複合体を形成する。

【０４５３】

一部の態様において、本明細書に記載される本発明は、複合体を含む組成物を含む。一部の実施形態において、本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む二元複合体を含む。

【０４５４】

一部の実施形態において、本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸の標的遺伝子座とを含む三元複合体を含む。一部の実施形態において、本発明の組成物は、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上の別個のＲＮＡガイドとを含み、この別個のＲＮＡガイドは、個別に、別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと変異体二元複合体を形成する。

【０４５５】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含み、この変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、親二元複合体と比較して、標的核酸の標的遺伝子座に対してより高いオンターゲット結合親和性を有する変異体二元複合体を形成する。一部の実施形態において、本発明の組成物は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座に対してより高いオンターゲット結合を有する複数の変異体二元複合体を含む。

【０４５６】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む二元複合体を含み、この二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の非標的遺伝子座に対してより低い結合親和性を有する。一部の実施形態において、本発明の組成物は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の非標的遺伝子座に対してより低いオフターゲット結合を示す複数の変異体二元複合体を含む。

【０４５７】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む二元複合体を含み、この二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸のオンターゲット遺伝子座においてより高い活性を有する。一部の実施形態において、本発明の組成物は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座においてより高いオンターゲット活性を有する複数の変異体二元複合体を含む。

【０４５８】

一部の態様において、本発明の組成物は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む二元複合体を含み、この二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の非標的遺伝子座においてより低い活性を有する。一部の実施形態において、本発明の組成物は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の非標的遺伝子座においてより低いオフターゲット活性を有する複数の変異体二元複合体を含む。

【０４５９】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド

一部の実施形態において、本発明の組成物は、本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０４６０】

一部の実施形態において、本発明のポリペプチドは、親ポリペプチドの変異体であり、ここで、親は、配列番号１などのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるか又は配列番号２などのアミノ酸配列を含む。

【０４６１】

【表１】

表1. 親配列。

| 配列番号 | 配列 | 説明 |
|---|---|---|
| 1 | ATGAGCAGCGCGATCAAAAGCTACAAGAGCGTTCTGCGTCCGAACGA<br>GCGTAAGAACCAACTGCTGAAAAGCACCATTCAGTGCCTGGAAGACG<br>GTAGCGCGTTCTTTTTCAAGATGCTGCAAGGCCTGTTTGGTGGCATC<br>ACCCCGGAGATTGTTCGTTTCAGCACCGAACAGGAGAAACAGCAACA<br>GGATATCGCGCTGTGGTGCGCGGTTAACTGGTTCCGTCCGGTGAGCC<br>AAGACAGCCTGACCCACACCATTGCGAGCGATAACCTGGTGGAGAAG<br>TTTGAGGAATACTATGGTGGCACCGCGAGCGACGCGATCAAACAGTA<br>CTTCAGCGCGAGCATTGGCGAAAGCTACTATTGGAACGACTGCCGTC<br>AACAGTACTATGATCTGTGCCGTGAGCTGGGTGTTGAGGTGAGCGAC<br>CTGACCCATGATCTGGAGATCCTGTGCCGTGAAAAGTGCCTGGCGGT<br>TGCGACCGAGAGCAACCAGAACAACAGCATCATTAGCGTTCTGTTTG<br>GCACCGGCGAAAAAGAGGACCGTAGCGTGAAACTGCGTATCACCAAG<br>AAAATTCTGGAGGCGATCAGCAACCTGAAAGAAATCCCGAAGAACGT | 親<br>ポリペプチドを<br>コードする<br>ヌクレオチド<br>配列 |

【０４６２】

【表２】

| | | |
|---|---|---|
| | TGCGCCGATTCAAGAGATCATTCTGAACGTGGCGAAAGCGACCAAGG | |
| | AAACCTTCCGTCAGGTGTATGCGGGTAACCTGGGTGCGCCGAGCACC | |
| | CTGGAGAAATTTATCGCGAAGGACGGCCAAAAAGAGTTCGATCTGAA | |
| | GAAACTGCAGACCGACCTGAAGAAAGTTATTCGTGGTAAAAGCAAGG | |
| | AGCGTGATTGGTGCTGCCAGGAAGAGCTGCGTAGCTACGTGGAGCAA | |
| | AACACCATCCAGTATGACCTGTGGGCGTGGGGCGAAATGTTCAACAA | |
| | AGCGCACACCGCGCTGAAAATCAAGAGCACCCGTAACTACAACTTTG | |
| | CGAAGCAACGTCTGGAACAGTTCAAAGAGATTCAGAGCCTGAACAAC | |
| | CTGCTGGTTGTGAAGAAGCTGAACGACTTTTTCGATAGCGAATTTTT | |
| | CAGCGGCGAGGAAACCTACACCATCTGCGTTCACCATCTGGGTGGCA | |
| | AGGACCTGAGCAAACTGTATAAGGCGTGGGAGGATGATCCGGCGGAC | |
| | CCGGAAAACGCGATTGTGGTTCTGTGCGACGATCTGAAAAACAACTT | |
| | TAAGAAAGAGCCGATCCGTAACATTCTGCGTTACATCTTCACCATTC | |
| | GTCAAGAATGCAGCGCGCAGGACATCCTGGCGGCGGCGAAGTACAAC | |
| | CAACAGCTGGATCGTTATAAAAGCCAAAAGGCGAACCCGAGCGTTCT | |
| | GGGTAACCAGGGCTTTACCTGGACCAACGCGGTGATCCTGCCGGAGA | |
| | AGGCGCAGCGTAACGACCGTCCGAACAGCCTGGATCTGCGTATTTGG | |
| | CTGTACCTGAAACTGCGTCACCCGGACGGTCGTTGGAAGAAACACCA | |
| | TATCCCGTTCTACGATACCCGTTTCTTCCAAGAAATTTATGCGGCGG | |
| | GCAACAGCCCGGTTGACACCTGCCAGTTTCGTACCCCGCGTTTCGGT | |
| | TATCACCTGCCGAAACTGACCGATCAGACCGCGATCCGTGTTAACAA | |
| | GAAACATGTGAAAGCGGCGAAGACCGAGGCGCGTATTCGTCTGGCGA | |
| | TCCAACAGGGCACCCTGCCGGTGAGCAACCTGAAGATCACCGAAATT | |
| | AGCGCGACCATCAACAGCAAAGGTCAAGTGCGTATTCCGGTTAAGTT | |
| | TGACGTGGGTCGTCAAAAAGGCACCCTGCAGATCGGTGACCGTTTCT | |
| | GCGGCTACGATCAAAACCAGACCGCGAGCCACGCGTATAGCCTGTGG | |
| | GAAGTGGTTAAAGAGGGTCAATACCATAAAGAGCTGGGCTGCTTTGT | |
| | TCGTTTCATCAGCAGCGGTGACATCGTGAGCATTACCGAGAACCGTG | |
| | GCAACCAATTTGATCAGCTGAGCTATGAAGGTCTGGCGTACCCGCAA | |
| | TATGCGGACTGGCGTAAGAAAGCGAGCAAGTTCGTGAGCCTGTGGCA | |
| | GATCACCAAGAAAAACAAGAAAAAGGAAATCGTGACCGTTGAAGCGA | |
| | AAGAGAAGTTTGACGCGATCTGCAAGTACCAGCCGCGTCTGTATAAA | |
| | TTCAACAAGGAGTACGCGTATCTGCTGCGTGATATTGTTCGTGGCAA | |
| | AAGCCTGGTGGAACTGCAACAGATTCGTCAAGAGATCTTTCGTTTCA | |
| | TTGAACAGGACTGCGGTGTTACCCGTCTGGGCAGCCTGAGCCTGAGC | |
| | ACCCTGGAAACCGTGAAAGCGGTTAAGGGTATCATTTACAGCTATTT | |
| | TAGCACCGCGCTGAACGCGAGCAAGAACAACCCGATCAGCGACGAAC | |
| | AGCGTAAAGAGTTTGATCCGGAACTGTTCGCGCTGCTGGAAAAGCTG | |
| | GAGCTGATTCGTACCCGTAAAAAGAAACAAAAAGTGGAACGTATCGC | |
| | GAACAGCCTGATTCAGACCTGCCTGGAGAACAACATCAAGTTCATTC | |
| | GTGGTGAAGGCGACCTGAGCACCACCAACAACGCGACCAAGAAAAAG | |
| | GCGAACAGCCGTAGCATGGATTGGTTGGCGCGTGGTGTTTTTAACAA | |
| | AATCCGTCAACTGGCGCCGATGCACAACATTACCCTGTTCGGTTGCG | |
| | GCAGCCTGTACACCAGCCACCAGGACCCGCTGGTGCATCGTAACCCG | |
| | GATAAAGCGATGAAGTGCCGTTGGGCGGCGATCCCGGTTAAGGACAT | |
| | TGGCGATTGGGTGCTGCGTAAGCTGAGCCAAAACCTGCGTGCGAAAA | |
| | ACATCGGCACCGGCGAGTACTATCACCAAGGTGTTAAAGAGTTCCTG | |
| | AGCCATTATGAACTGCAGGACCTGGAGGAAGAGCTGCTGAAGTGGCG | |
| | TAGCGATCGTAAAAGCAACATTCCGTGCTGGGTGCTGCAGAACCGTC | |
| | TGGCGGAGAAGCTGGGCAACAAAGAAGCGGTGGTTTACATCCCGGTT | |
| | CGTGGTGGCCGTATTTATTTTGCGACCCACAAGGTGGCGACCGGTGC | |

【０４６３】

【表３】

| | | |
|---|---|---|
| | GGTGAGCATCGTTTTCGACCAAAAACAAGTGTGGGTTTGCAACGCGG<br>ATCATGTTGCGGCGGCGAACATCGCGCTGACCGTGAAGGGTATTGGC<br>GAACAAAGCAGCGACGAAGAGAACCCGGATGGTAGCCGTATCAAACT<br>GCAGCTGACCAGC | |
| 2 | MSSAIKSYKSVLRPNERKNQLLKSTIQCLEDGSAFFFKMLQGLFGGI<br>TPEIVRFSTEQEKQQQDIALWCAVNWFRPVSQDSLTHTIASDNLVEK<br>FEEYYGGTASDAIKQYFSASIGESYYWNDCRQQYYDLCRELGVEVSD<br>LTHDLEILCREKCLAVATESNQNNSIISVLFGTGEKEDRSVKLRITK<br>KILEAISNLKEIPKNVAPIQEIILNVAKATKETFRQVYAGNLGAPST<br>LEKFIAKDGQKEFDLKKLQTDLKKVIRGKSKERDWCCQEELRSYVEQ<br>NTIQYDLWAWGEMFNKAHTALKIKSTRNYNFAKQRLEQFKEIQSLNN<br>LLVVKKLNDFFDSEFFSGEETYTICVHHLGGKDLSKLYKAWEDDPAD<br>PENAIVVLCDDLKNNFKKEPIRNILRYIFTIRQECSAQDILAAAKYN<br>QQLDRYKSQKANPSVLGNQGFTWTNAVILPEKAQRNDRPNSLDLRIW<br>LYLKLRHPDGRWKKHHIPFYDTRFFQEIYAAGNSPVDTCQFRTPRFG<br>YHLPKLTDQTAIRVNKKHVKAAKTEARIRLAIQQGTLPVSNLKITEI<br>SATINSKGQVRIPVKFDVGRQKGTLQIGDRFCGYDQNQTASHAYSLW<br>EVVKEGQYHKELGCFVRFISSGDIVSITENRGNQFDQLSYEGLAYPQ<br>YADWRKKASKFVSLWQITKKNKKKEIVTVEAKEKFDAICKYQPRLYK<br>FNKEYAYLLRDIVRGKSLVELQQIRQEIFRFIEQDCGVTRLGSLSLS<br>TLETVKAVKGIIYSYFSTALNASKNNPISDEQRKEFDPELFALLEKL<br>ELIRTRKKKQKVERIANSLIQTCLENNIKFIRGEGDLSTTNNATKKK<br>ANSRSMDWLARGVFNKIRQLAPMHNITLFGCGSLYTSHQDPLVHRNP<br>DKAMKCRWAAIPVKDIGDWVLRKLSQNLRAKNIGTGEYYHQGVKEFL<br>SHYELQDLEEELLKWRSDRKSNIPCWVLQNRLAEKLGNKEAVVYIPV<br>RGGRIYFATHKVATGAVSIVFDQKQVWVCNADHVAAANIALTVKGIG<br>EQSSDEENPDGSRIKLQLTS | 親<br>ポリペプチド |

【００６４】

本発明のある態様において、変異体ポリペプチド配列は、１つ以上の変異を含む。

【００６５】

本明細書に記載される親ポリペプチドをコードする核酸配列は、参照核酸配列、例えば配列番号１と実質的に同一であり得る。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、参照核酸配列、例えば、親ポリペプチドをコードする核酸配列、例えば配列番号１と最小約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％又は少なくとも約９９．５％の配列同一性を有する配列を含む核酸によってコードされる。２つのかかる核酸間のパーセント同一性は、２つの最適にアラインメントした核酸配列を手動で調べることによるか、又は標準パラメータを用いるソフトウェアプログラム若しくはアルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮ、ＣＬＵＳＴＡＬ）を使用することにより決定し得る。２つの核酸配列が実質的に同一であるという一つの指標は、ストリンジェントな（例えば、中程度乃至高いストリンジェンシーの範囲内にある）条件下で、その核酸分子が他方の相補配列にハイブリダイズすることである。

【００６６】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、参照核酸配列、例えば、親ポリペプチドをコードする核酸配列、例えば配列番号１と少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％又はそれより高い配列同一性、しかし１００％ではない配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【００６７】

一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２と５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の、しかし１００％ではない同一性を有するポリペプチド配列を含む。一部の実施形態において、本発明の変異体

Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号２と５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％より高い、しかし１００％ではない同一性を有するポリペプチド配列を含む。

【０４６８】

一部の実施形態において、本発明は、１つ以上の参照ポリペプチド、例えば親ポリペプチドに対して、指定される程度のアミノ酸配列同一性、例えば、配列番号２のアミノ酸配列に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は更に少なくとも９９％の、しかし１００％ではない配列同一性を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドについて記載する。相同性又は同一性は、本明細書に記載されるとおり、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮ又はＣＬＵＳＴＡＬなどのプログラムを使用した、アミノ酸配列アラインメントによって決定することができる。

【０４６９】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドの１つ以上の（例えば、幾つかの）アミノ酸に変化を含み、ここで、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、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、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６２、１６４、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００個又はそれを超えるものが変化している。

【０４７０】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２に掲載されるアミノ酸置換の１つ以上を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｄ５８１、Ｇ６２４、Ｆ６２６、Ｄ８３５、Ｌ８３６、Ｐ８６８、Ｓ８７９、Ｄ９１１、Ｉ９２６、Ｖ１０２０、Ｖ１０３０、Ｅ１０３５及びＳ１０４６置換の少なくとも１つを含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｄ５８１Ｒ、Ｇ６２４Ｒ、Ｆ６２６Ｒ、Ｄ８３５Ｒ、Ｌ８３６Ｒ、Ｐ８６８Ｒ、Ｓ８７９Ｒ、Ｄ９１１Ｒ、Ｉ９２６Ｒ、Ｖ１０２０Ｒ、Ｖ１０３０Ｒ、Ｅ１０３５Ｒ及びＳ１０４６Ｒ置換の少なくとも１つを含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｄ５８１Ｇ、Ｆ６２６Ｇ、Ｄ８３５Ｇ、Ｌ８３６Ｇ、Ｐ８６８Ｇ、Ｓ８７９Ｇ、Ｄ９１１Ｇ、Ｉ９２６Ｇ、Ｖ１０２０Ｇ、Ｖ１０３０Ｇ、Ｅ１０３５Ｇ及びＳ１０４６Ｇ置換の少なくとも１つを含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｄ５８１Ｒ、Ｇ６２４Ｒ、Ｆ６２６Ｒ、Ｄ８３５Ｒ、Ｌ８３６Ｒ、Ｐ８６８Ｔ、Ｓ８７９Ｒ、Ｄ９１１Ｒ、Ｉ９２６Ｒ、Ｖ１０２０Ｇ、Ｖ１０３０Ｇ、Ｅ１０３５Ｒ及びＳ

１０４６Ｇ置換の少なくとも１つ並びに表２に掲載される少なくとも１つの追加の置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つを含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つ並びに表２に掲載される少なくとも１つの追加の置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号５のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４９５のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４９６のアミノ酸配列を含む。

【０４７１】

【表４】

表2. 変異体Cas12i2ポリペプチドの単一アミノ酸置換。

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 1 | M | |
| 2 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 3 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 4 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 5 | I | R, G, A, K, Q, N, H, W, F, Y, M |
| 6 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 7 | S | P, R, G, A, K, Q, N, H |
| 8 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 9 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 10 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 11 | V | R, K, G, A, Q, N, H |
| 12 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 13 | R | A, G, K, Q, N, H |
| 14 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 15 | N | R, D, G, A, K, Q, H |
| 16 | E | R, D, G, A, K, Q, N, H |
| 17 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 18 | K | R, G, A, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 19 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 20 | Q | R, K, G, A, N, H |
| 21 | L | R, M, G, A, K, Q, N, H |
| 22 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 23 | K | R, N, G, A, Q, H |
| 24 | S | R, D, G, A, K, Q, N, H |
| 25 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 26 | I | R, F, G, A, K, Q, N, H |
| 27 | Q | R, N, G, A, K, H |
| 28 | C | R, W, G, A, K, Q, N, H |
| 29 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 30 | E | R, D, G, A, K, Q, N, H |
| 31 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 32 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 33 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 34 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 35 | F | R, V, G, A, K, Q, N, H |
| 36 | F | R, G, A, K, Q, N, H |

【０４７２】

【表５】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 37 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 38 | K | R, D, G, A, Q, N, H |
| 39 | M | R, G, A, K, Q, N, H |
| 40 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 41 | Q | R, V, G, A, K, N, H |
| 42 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 43 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 44 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 45 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 46 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 47 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 48 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 49 | P | R, H, G, A, K, Q, N |
| 50 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 51 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 52 | V | R, A, G, K, Q, N, H |
| 53 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 54 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 55 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 56 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 57 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 58 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 59 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 60 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 61 | Q | R, S, G, A, K, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 62 | Q | R, K, G, A, K, N, H |
| 63 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 64 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 65 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 66 | A | R, D, G, K, Q, N, H |
| 67 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 68 | W | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 69 | C | R, G, A, K, Q, N, H |
| 70 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 71 | V | R, I, G, A, K, Q, N, H |
| 72 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 73 | W | R, G, A, K, Q, N, H |
| 74 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 75 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 76 | P | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 77 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 78 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 79 | Q | R, K, G, A, N, H |
| 80 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 81 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 82 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 83 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 84 | H | R, G, A, K, Q, N |
| 85 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 86 | I | R, Q, G, A, K, N, H |

【０４７３】

【表６】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 87 | A | R, T, G, K, Q, N, H |
| 88 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 89 | D | R, E, G, A, K, Q, N, H |
| 90 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 91 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 92 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 93 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 94 | K | R, L, G, A, Q, N, H |
| 95 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 96 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 97 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 98 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 99 | Y | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 100 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 101 | G | R, H, A, K, Q, N |
| 102 | T | R, E, G, A, K, Q, N, H |
| 103 | A | R, P, G, K, Q, N, H |
| 104 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 105 | D | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 106 | A | R, F, G, K, Q, N, H |
| 107 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 108 | K | R, Q, G, A, N, H |
| 109 | Q | R, E, G, A, K, N, H |
| 110 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 111 | F | R, G, A, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 112 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 113 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 114 | S | R, N, G, A, K, Q, N, H |
| 115 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 116 | G | R, D, A, K, Q, N, H |
| 117 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 118 | S | R, K, G, A, K, Q, N, H |
| 119 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 120 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 121 | W | R, G, A, K, Q, N, H |
| 122 | N | R, V, G, A, K, Q, H |
| 123 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 124 | C | R, G, A, K, Q, N, H |
| 125 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 126 | Q | R, L, G, A, K, N, H |
| 127 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 128 | Y | R, F, G, A, K, Q, N, H |
| 129 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 130 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 131 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 132 | C | R, A, G, K, Q, N, H |
| 133 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 134 | E | R, N, G, A, K, Q, N, H |
| 135 | L | R, I, G, A, K, Q, N, H |
| 136 | G | R, A, K, Q, N, H |

【０４７４】

【表７】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 137 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 138 | E | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 139 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 140 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 141 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 142 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 143 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 144 | H | R, G, A, K, Q, N |
| 145 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 146 | L | R, A, G, K, Q, N, H |
| 147 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 148 | I | R, T, G, A, K, Q, N, H |
| 149 | L | R, M, G, A, K, Q, N, H |
| 150 | C | R, G, A, K, Q, N, H |
| 151 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 152 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 153 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 154 | C | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 155 | L | R, I, G, A, K, Q, N, H |
| 156 | A | R, P, G, K, Q, N, H |
| 157 | V | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 158 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 159 | T | R, K, G, A, Q, N, H |
| 160 | E | R, D, G, A, K, Q, N, H, L |
| 161 | S | R, D, G, A, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 162 | N | R, F, G, A, K, Q, H |
| 163 | Q | R, N, G, A, K, H, M |
| 164 | N | R, A, G, K, Q, H, M, W, F |
| 165 | N | R, G, A, K, Q, H, M, P, F, Y, W |
| 166 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 167 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 168 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 169 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 170 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 171 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 172 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 173 | G | R, A, K, Q, N, H, S |
| 174 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 175 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 176 | E | R, K, G, A, K, Q, N, H |
| 177 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 178 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 179 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 180 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 181 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 182 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 183 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 184 | L | R, A, G, K, Q, N, H |
| 185 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 186 | I | R, M, G, A, K, Q, N, H |

【０４７５】

【表８】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 187 | T | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 188 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 189 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 190 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 191 | L | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 192 | E | R, N, G, A, K, Q, H |
| 193 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 194 | I | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 195 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 196 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 197 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 198 | K | R, D, G, A, Q, N, H |
| 199 | E | R, K, G, A, Q, N, H |
| 200 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 201 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 202 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 203 | N | R, T, G, A, K, Q, H |
| 204 | V | R, W, G, A, K, Q, N, H |
| 205 | A | R, E, G, K, Q, N, H |
| 206 | P | R, E, G, A, K, Q, N, H |
| 207 | I | R, Y, G, A, K, Q, N, H |
| 208 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 209 | E | R, D, G, A, K, Q, N, H |
| 210 | I | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 211 | I | R, G, A, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 212 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 213 | N | R, K, G, A, Q, H |
| 214 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 215 | A | R, F, G, K, Q, N, H |
| 216 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 217 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 218 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 219 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 220 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 221 | T | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 222 | F | R, K, G, A, Q, N, H |
| 223 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 224 | Q | R, K, G, A, N, H |
| 225 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 226 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 227 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 228 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 229 | N | R, S, G, A, K, Q, H |
| 230 | L | R, G, A, K, Q, N, H, S |
| 231 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 232 | A | R, G, K, Q, N, H, S |
| 233 | P | R, G, A, K, Q, N, H, S |
| 234 | S | R, G, A, K, Q, N, H, P |
| 235 | T | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 236 | L | R, G, A, K, Q, N, H |

【０４７６】

【表９】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 237 | E | R, V, G, A, K, Q, N, H, S |
| 238 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 239 | F | R, D, G, A, K, Q, N, H |
| 240 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 241 | A | R, K, G, Q, N, H |
| 242 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 243 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 244 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 245 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 246 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 247 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 248 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 249 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 250 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 251 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 252 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 253 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 254 | Q | R, I, G, A, K, N, H |
| 255 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 256 | D | R, K, G, A, Q, N, H |
| 257 | L | R, F, G, A, K, Q, N, H |
| 258 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 259 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 260 | V | R, D, G, A, K, Q, N, H |
| 261 | I | R, A, G, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 262 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 263 | G | R, K, A, K, Q, N, H |
| 264 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 265 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 266 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 267 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 268 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 269 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 270 | W | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 271 | C | R, P, G, A, K, Q, N, H |
| 272 | C | R, N, G, A, K, Q, H |
| 273 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 274 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 275 | E | R, K, G, A, Q, N, H |
| 276 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 277 | R | K, G, A, Q, N, H |
| 278 | S | R, E, G, A, K, Q, N, H |
| 279 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 280 | V | R, I, G, A, K, Q, N, H |
| 281 | E | R, A, G, K, Q, N, H |
| 282 | Q | R, S, G, A, K, N, H |
| 283 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 284 | T | R, I, G, A, K, Q, N, H |
| 285 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 286 | Q | R, P, G, A, K, N, H |

【０４７７】

【表１０】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 287 | Y | R, F, G, A, K, Q, N, H |
| 288 | D | R, G, A, K, Q, N, H, S |
| 289 | L | R, Q, G, A, K, N, H, M |
| 290 | W | R, N, G, A, K, Q, H |
| 291 | A | R, S, G, K, Q, N, H |
| 292 | W | R, G, A, K, Q, N, H |
| 293 | G | R, S, A, K, Q, N, H |
| 294 | E | R, A, G, K, Q, N, H |
| 295 | M | R, G, A, K, Q, N, H |
| 296 | F | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 297 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 298 | K | R, N, G, A, Q, H |
| 299 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 300 | H | R, G, A, K, Q, N |
| 301 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 302 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 303 | L | R, I, G, A, K, Q, N, H |
| 304 | K | R, Q, G, A, N, H |
| 305 | I | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 306 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 307 | S | R, N, G, A, K, Q, H |
| 308 | T | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 309 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 310 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 311 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 312 | N | R, L, G, A, K, Q, H |
| 313 | F | R, Y, G, A, K, Q, N, H |
| 314 | A | R, T, G, K, Q, N, H |
| 315 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 316 | Q | R, E, G, A, K, N, H |
| 317 | R | K, G, A, Q, N, H |
| 318 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 319 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 320 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 321 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 322 | K | R, N, G, A, Q, H |
| 323 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 324 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 325 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 326 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 327 | L | R, G, A, K, Q, N, H, V |
| 328 | N | R, D, G, A, K, Q, H, S |
| 329 | N | R, G, A, K, Q, H, S |
| 330 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 331 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 332 | V | R, A, G, K, Q, N, H |
| 333 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 334 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 335 | K | R, I, G, A, Q, N, H |
| 336 | L | R, G, A, K, Q, N, H |

【０４７８】

【表１１】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 337 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 338 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 339 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 340 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 341 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 342 | S | G, R, A, K, Q, N, H |
| 343 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 344 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 345 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 346 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 347 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 348 | E | R, G, A, K, Q, N, H, S |
| 349 | E | R, N, G, A, K, Q, H, S |
| 350 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 351 | Y | R, F, G, A, K, Q, N, H, S |
| 352 | T | R, V, G, A, K, Q, N, H |
| 353 | I | R, V, G, A, K, Q, N, H |
| 354 | C | R, G, A, K, Q, N, H |
| 355 | V | R, K, G, A, Q, N, H |
| 356 | H | R, G, A, K, Q, N |
| 357 | H | R, G, A, K, Q, N, S |
| 358 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 359 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 360 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 361 | K | R, G, A, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 362 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 363 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 364 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 365 | K | R, E, G, A, Q, N, H |
| 366 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 367 | Y | R, F, G, A, K, Q, N, H |
| 368 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 369 | A | R, I, G, K, Q, N, H |
| 370 | W | R, G, A, K, Q, N, H |
| 371 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 372 | D | R, E, G, A, K, Q, N, H |
| 373 | D | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 374 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 375 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 376 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 377 | P | R, M, G, A, K, Q, N, H |
| 378 | E | R, D, G, A, K, Q, N, H |
| 379 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 380 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 381 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 382 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 383 | V | R, G, A, K, Q, N, H, D, E |
| 384 | L | R, Y, G, A, K, Q, N, H |
| 385 | C | R, G, A, K, Q, N, H |
| 386 | D | R, G, A, K, Q, N, H, E, D |

【０４７９】

【表１２】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 387 | D | R, G, A, K, Q, N, H, E |
| 388 | L | R, C, G, A, K, Q, N, H |
| 389 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 390 | N | R, D, G, A, K, Q, H |
| 391 | N | R, K, G, A, Q, H |
| 392 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 393 | K | R, S, G, A, Q, N, H |
| 394 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 395 | E | R, G, A, K, Q, N, H, S |
| 396 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 397 | I | R, G, A, K, Q, N, H, V |
| 398 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 399 | N | R, G, A, K, Q, H, S |
| 400 | I | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 401 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 402 | R | G, A, K, Q, N, H, S |
| 403 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 404 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 405 | F | R, Y, G, A, K, Q, N, H |
| 406 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 407 | I | R, Y, G, A, K, Q, N, H |
| 408 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 409 | Q | R, D, G, A, K, N, H |
| 410 | E | R, K, G, A, Q, N, H |
| 411 | C | R, I, G, A, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 412 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 413 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 414 | Q | R, K, G, A, N, H |
| 415 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 416 | I | R, F, G, A, K, Q, N, H |
| 417 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 418 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 419 | A | R, D, G, K, Q, N, H |
| 420 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 421 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 422 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 423 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 424 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 425 | Q | R, L, G, A, K, N, H |
| 426 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 427 | D | R, E, G, A, K, Q, N, H |
| 428 | R | K, G, A, Q, N, H |
| 429 | Y | R, N, G, A, K, Q, H |
| 430 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 431 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 432 | Q | R, K, G, A, K, N, H |
| 433 | K | R, G, A, Q, N, H, S |
| 434 | A | R, I, G, K, Q, N, H |
| 435 | N | R, H, G, A, K, Q |
| 436 | P | R, G, A, K, Q, N, H |

【０４８０】

【表１３】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 437 | S | R, T, G, A, K, Q, N, H |
| 438 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 439 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 440 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 441 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 442 | Q | R, T, G, A, K, N, H |
| 443 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 444 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 445 | T | R, N, G, A, K, Q, H |
| 446 | W | R, G, A, K, Q, N, H |
| 447 | T | R, G, A, K, Q, N, H, S, M |
| 448 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 449 | A | R, S, G, K, Q, N, H |
| 450 | V | R, T, G, A, K, Q, N, H |
| 451 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 452 | L | R, T, G, A, K, Q, N, H |
| 453 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 454 | E | R, P, G, A, K, Q, N, H |
| 455 | K | R, N, G, A, Q, H |
| 456 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 457 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 458 | R | V, G, A, K, Q, N, H |
| 459 | N | R, K, G, A, Q, H |
| 460 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 461 | R | G, A, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 462 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 463 | N | R, A, G, K, Q, H |
| 464 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 465 | L | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 466 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 467 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 468 | R | M, G, A, K, Q, N, H |
| 469 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 470 | W | R, G, A, K, Q, N, H |
| 471 | L | R, V, G, A, K, Q, N, H |
| 472 | Y | R, T, G, A, K, Q, N, H |
| 473 | L | R, M, G, A, K, Q, N, H |
| 474 | K | R, T, G, A, Q, N, H |
| 475 | L | R, V, G, A, K, Q, N, H |
| 476 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 477 | H | R, G, A, K, Q, N |
| 478 | P | R, D, G, A, K, Q, N, H |
| 479 | D | R, N, G, A, K, Q, H |
| 480 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 481 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 482 | W | R, G, A, K, Q, N, H |
| 483 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 484 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 485 | H | R, G, A, K, Q, N |
| 486 | H | R, G, A, K, Q, N |

【０４８１】

【表１４】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 487 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 488 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 489 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 490 | Y | R, H, G, A, K, Q, N |
| 491 | D | R, N, G, A, K, Q, N, H |
| 492 | T | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 493 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 494 | F | R, Y, G, A, K, Q, N, H |
| 495 | F | R, Y, G, A, K, Q, N, H |
| 496 | Q | R, E, G, A, K, N, H, S |
| 497 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 498 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 499 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 500 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 501 | A | R, Y, G, K, Q, N, H |
| 502 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 503 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 504 | S | R, G, G, A, K, Q, N, H |
| 505 | P | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 506 | V | R, P, G, A, K, Q, N, H |
| 507 | D | R, T, G, A, K, Q, N, H |
| 508 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 509 | C | R, G, A, K, Q, N, H |
| 510 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 511 | F | R, P, G, A, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 512 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 513 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 514 | P | R, K, G, A, K, Q, N, H |
| 515 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 516 | F | R, G, A, K, Q, N, H |
| 517 | G | R, A, K, Q, N, H |
| 518 | Y | R, G, A, K, Q, N, H |
| 519 | H | R, G, A, K, Q, N |
| 520 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 521 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 522 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 523 | L | R, I, G, A, K, Q, N, H |
| 524 | T | R, S, G, A, K, Q, N, H |
| 525 | D | R, G, A, K, Q, N, H |
| 526 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 527 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 528 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 529 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 530 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 531 | V | R, L, G, A, K, Q, N, H |
| 532 | N | R, K, G, A, Q, H |
| 533 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 534 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 535 | H | R, G, A, K, Q, N |
| 536 | V | R, G, A, K, Q, N, H |

【０４８２】

【表１５】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 537 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 538 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 539 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 540 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 541 | T | R, G, A, K, Q, N, H, Y |
| 542 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 543 | A | R, G, K, Q, N, H |
| 544 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 545 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 546 | R | G, A, K, Q, N, H |
| 547 | L | R, G, A, K, Q, N, H |
| 548 | A | R, N, G, K, Q, N, H |
| 549 | I | R, G, A, K, Q, N, H |
| 550 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 551 | Q | R, G, A, K, N, H |
| 552 | G | R, N, A, K, Q, N, H |
| 553 | T | R, V, G, A, K, Q, N, H |
| 554 | L | R, A, G, A, K, Q, N, H |
| 555 | P | R, G, A, K, Q, N, H |
| 556 | V | R, G, A, K, Q, N, H |
| 557 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 558 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 559 | L | R, F, G, A, K, Q, N, H |
| 560 | K | R, D, G, A, Q, N, H |
| 561 | I | R, G, A, K, Q, N, H |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 562 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 563 | E | R, G, A, K, Q, N, H |
| 564 | I | R, T, G, A, K, Q, N, H |
| 565 | S | R, N, G, A, K, Q, H |
| 566 | A | R, F, G, K, Q, N, H |
| 567 | T | R, G, A, K, Q, N, H |
| 568 | I | R, V, G, A, K, Q, N, H |
| 569 | N | R, G, A, K, Q, H |
| 570 | S | R, G, A, K, Q, N, H |
| 571 | K | R, G, A, Q, N, H |
| 572 | G | R, N, A, K, Q, N, H |
| 573 | Q | R, D, G, A, K, N, H |
| 574 | V | R, I, G, A, K, Q, N, H |
| 575 | R | T, H, K, N, G, A, Q |
| 576 | I | R, H, K, N, G, A, Q |
| 577 | P | R, S, H, K, N, G, A, Q, T, V, Y, F, L |
| 578 | V | R, H, K, N, G, A, Q |
| 579 | K | R, H, N, G, A, Q |
| 580 | F | R, V, H, K, N, G, A, Q |
| 581 | D | R, H, K, N, G, A, Q |
| 582 | V | R, G, H, K, N, G, A, Q |
| 583 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 584 | R | G, K, H, K, N, A, Q |
| 585 | Q | R, G, Y, H, K, N, A |
| 586 | K | R, G, H, N, A, Q |

【０４８３】

【表１６】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 587 | G | R, H, K, N A, Q |
| 588 | T | R, G, K, H, N A, Q |
| 589 | L | R, G, H, K, N A, Q |
| 590 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 591 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 592 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 593 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 594 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 595 | F | R, G, I, H, K, N, A, Q |
| 596 | C | R, G, M, H, K, N, A, Q |
| 597 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 598 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 599 | D | A |
| 600 | Q | R, G, K, N, H, A, D, C, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 601 | N | R, G, K, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 602 | Q | R, G, K, N, H, A, D, C, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 603 | T | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, W, Y, V |
| 604 | A | R, G, K, N, H, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 605 | S | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, T, W, Y, V |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 606 | H | R, G, K, N, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 607 | A | R, G, K, N, H, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 608 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 609 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 610 | L | R, G, I, H, K, N, A, Q |
| 611 | W | R, G, H, K, N, A, Q |
| 612 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 613 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 614 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 615 | K | R, G, E, H, N, A, Q |
| 616 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 617 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 618 | Q | R, G, T, H, K, N, A |
| 619 | Y | R, G, S, H, K, N, A, Q |
| 620 | H | R, G, K, N, A, Q |
| 621 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 622 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 623 | L | R, G, N, H, K, A, Q |
| 624 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 625 | C | R, G, H, K, N, A, Q, A, Q |
| 626 | F | R, G, W, H, K, N, A, Q |
| 627 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 628 | R | G, H, K, N, A, Q |

【０４８４】

【表１７】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 629 | F | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 630 | I | R, G, V, H, K, N, A, Q |
| 631 | S | R, G, E, H, K, N, A, Q |
| 632 | S | R, G, D, H, K, N, A, Q |
| 633 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 634 | D | R, G, K, H, K, N, A, Q |
| 635 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 636 | V | R, G, T, H, K, N, A, Q |
| 637 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 638 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 639 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 640 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 641 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 642 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 643 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 644 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 645 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 646 | F | R, G, V, H, K, N, A, Q, Y |
| 647 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 648 | Q | R, G, H, K, N, A, |
| 649 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 650 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 651 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 652 | E | R, G, D, H, K, N, A, Q |
| 653 | G | R, H, K, N, A, Q |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 654 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 655 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 656 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 657 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 658 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 659 | Y | R, G, F, H, K, N, A, Q |
| 660 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 661 | D | R, G, E, H, K, N, A, Q |
| 662 | W | R, G, H, K, N, A, Q |
| 663 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 664 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 665 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 666 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 667 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 668 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 669 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 670 | V | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 671 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 672 | L | R, G, S, H, K, N, A, Q |
| 673 | W | R, G, H, K, N, A, Q |
| 674 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 675 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 676 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 677 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 678 | K | R, G, H, N, A, Q |

【０４８５】

【表１８】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 679 | N | R, G, K, N, A, Q |
| 680 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 681 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 682 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 683 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 684 | I | R, G, D, H, K, N, A, Q |
| 685 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 686 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 687 | V | R, G, K, H, N, A, Q |
| 688 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 689 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 690 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 691 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 692 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 693 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 694 | D | R, G, K, H, N, A, Q |
| 695 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 696 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 697 | C | R, G, H, K, N, A, Q |
| 698 | K | R, G, W, H, N, A, Q |
| 699 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 700 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 701 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 702 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 703 | L | R, G, H, K, N, A, Q |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 704 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 705 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 706 | F | R, G, W, H, K, N, A, Q |
| 707 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 708 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 709 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 710 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 711 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 712 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 713 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 714 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 715 | R | G, L, H, K, N, A, Q |
| 716 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 717 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 718 | V | R, G, M, H, K, N, A, Q |
| 719 | R | G, K, H, N, A, Q |
| 720 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 721 | K | R, G, N, H, A, Q |
| 722 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 723 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 724 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 725 | E | R, G, N, H, K, A, Q |
| 726 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 727 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 728 | Q | R, G, H, K, N, A |

【０４８６】

【表１９】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 729 | I | R, G, F, H, K, N, A, Q |
| 730 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 731 | Q | R, G, A, H, K, N, A |
| 732 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 733 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 734 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 735 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 736 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 737 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 738 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 739 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 740 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 741 | C | R, G, F, H, K, N, A, Q, S |
| 742 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 743 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 744 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 745 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 746 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 747 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 748 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 749 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 750 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 751 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 752 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 753 | T | R, G, S, H, K, N, A, Q |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 754 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 755 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 756 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 757 | V | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 758 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 759 | A | R, G, N, H, K, Q |
| 760 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 761 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 762 | G | R, S, H, K, N, A, Q |
| 763 | I | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 764 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 765 | Y | R, G, S, H, K, N, A, Q |
| 766 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 767 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 768 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 769 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 770 | T | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 771 | A | R, G, N, H, K, Q |
| 772 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 773 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 774 | A | R, G, N, H, K, Q |
| 775 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 776 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 777 | N | R, G, E, H, K, A, Q |
| 778 | N | R, G, H, K, A, Q |

【０４８７】

【表２０】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 779 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 780 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 781 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 782 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 783 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 784 | Q | R, G, D, H, K, N, A |
| 785 | R | G, K, Q, H, N, A, Q |
| 786 | K | R, G, E, H, N, A, Q |
| 787 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 788 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 789 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 790 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 791 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 792 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 793 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 794 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 795 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 796 | L | R, G, M, H, K, N, A, Q |
| 797 | E | R, G, V, H, K, N, A, Q |
| 798 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 799 | L | R, G, I, H, K, N, A, Q |
| 800 | E | R, G, H, K, N, A, Q, S |
| 801 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 802 | I | R, G, K, H, N, A, Q |
| 803 | R | G, H, K, N, A, Q |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 804 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 805 | R | G, N, H, K, A, Q |
| 806 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 807 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 808 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 809 | Q | R, G, E, H, K, N, A, Q |
| 810 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 811 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 812 | E | R, G, S, H, K, N, A, Q |
| 813 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 814 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 815 | A | R, G, S, H, K, N, Q |
| 816 | N | R, G, S, H, K, A, Q |
| 817 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 818 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 819 | I | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 820 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 821 | T | R, G, I, H, K, N, A, Q |
| 822 | C | R, G, A, H, K, N, A, Q |
| 823 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 824 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 825 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 826 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 827 | I | R, G, V, H, K, N, A, Q |
| 828 | K | R, G, H, N, A, Q |

【０４８８】

【表２１】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 829 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 830 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 831 | R | G, V, H, K, N, A, Q |
| 832 | G | R, V, H, K, N, A, Q |
| 833 | E | A |
| 834 | G | R, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 835 | D | R, G, K, N, H, A, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 836 | L | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 837 | S | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, T, W, Y, V |
| 838 | T | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, W, Y, V |
| 839 | T | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, W, Y, V |
| 840 | N | R, G, K, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 841 | N | R, G, K, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 842 | A | R, G, K, N, H, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 843 | T | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, W, Y, V |
| 844 | K | R, G, N, H, A, D, C, Q, E, I, |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| | | L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 845 | K | R, G, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 846 | K | R, G, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 847 | A | R, G, K, N, H, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 848 | N | R, G, K, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 849 | S | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, T, W, Y, V |
| 850 | R | G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 851 | S | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, T, W, Y, V |
| 852 | M | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, F, P, S, T, W, Y, V |
| 853 | D | R, G, K, N, H, A, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 854 | W | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, Y, V |
| 855 | L | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 856 | A | R, G, K, N, H, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |

【０４８９】

【表２２】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 857 | R | G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 858 | G | R, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 859 | V | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y |
| 860 | F | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, P, S, T, W, Y, V |
| 861 | N | R, G, K, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 862 | K | R, G, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 863 | I | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 864 | R | G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 865 | Q | R, G, K, N, H, A, D, C, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 866 | L | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 867 | A | R, G, K, N, H, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 868 | P | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, S, T, W, Y, V |
| 869 | M | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| | | I, L, F, P, S, T, W, Y, V |
| 870 | H | R, G, K, N, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 871 | N | R, G, K, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 872 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 873 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 874 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 875 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 876 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 877 | C | R, G, K, N, H, A, D, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 878 | G | R, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 879 | S | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, T, W, Y, V |
| 880 | L | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 881 | Y | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, T, W, V |
| 882 | T | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, S, W, Y, V |
| 883 | S | R, G, K, N, H, A, D, C, Q, E, I, L, M, F, P, T, W, Y, V |
| 884 | H | R, G, K, N, A, D, C, Q, E, I, |

【０４９０】

【表２３】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| | | L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 885 | Q | R, G, K, N, H, A, D, C, E, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V |
| 886 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 887 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 888 | L | R, G, F, H, K, N, A, Q |
| 889 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 890 | H | R, G, K, N, A, Q |
| 891 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 892 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 893 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 894 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 895 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 896 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 897 | M | R, G, K, H, N, A, Q |
| 898 | K | R, E, H, N, A, Q |
| 899 | C | R, G, A, H, K, N, Q |
| 900 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 901 | W | R, G, F, Y, H, K, N, A, Q |
| 902 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 903 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 904 | I | R, G, V, H, K, N, A, Q |
| 905 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 906 | V | R, G, P, H, K, N, A, Q |
| 907 | K | R, G, S, H, N, A, Q |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 908 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 909 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 910 | G | R, K, H, K, N, A, Q |
| 911 | D | R, G, E, H, K, N, A, Q |
| 912 | W | R, G, Y, H, K, N, A, Q |
| 913 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 914 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 915 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 916 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 917 | L | R, G, F, H, K, N, A, Q |
| 918 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 919 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 920 | N | R, G, W, H, K, A, Q |
| 921 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 922 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 923 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 924 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 925 | N | R, G, T, H, K, A, Q, D, E |
| 926 | I | R, G, S, H, K, N, A, Q |
| 927 | G | R, T, H, K, N, A, Q |
| 928 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 929 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 930 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 931 | Y | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 932 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |

【０４９１】

【表２４】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 933 | H | R, G, K, N, A, Q |
| 934 | Q | R, G, E, H, K, N, A |
| 935 | G | R, A, H, K, N, A, Q |
| 936 | V | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 937 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 938 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 939 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 940 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 941 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 942 | H | R, G, K, N, A, Q |
| 943 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 944 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 945 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 946 | Q | R, G, D, H, K, N, A |
| 947 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 948 | L | R, G, D, H, K, N, A, Q |
| 949 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 950 | E | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 951 | E | R, G, P, H, K, N, A, Q |
| 952 | L | R, G, K, H, K, N, A, Q |
| 953 | L | R, G, M, H, K, N, A, Q |
| 954 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 955 | W | R, G, F, H, K, N, A, Q |
| 956 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 957 | S | R, G, H, K, N, A, Q |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 958 | D | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 959 | R | G, K, H, N, A, Q |
| 960 | K | R, G, H, K, N, A, Q |
| 961 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 962 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 963 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 964 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 965 | C | R, G, H, K, N, A, Q |
| 966 | W | R, G, H, K, N, A, Q |
| 967 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 968 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 969 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 970 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 971 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 972 | L | G, I, H, K, N, A, Q |
| 973 | A | R, G, L, H, K, N, Q |
| 974 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 975 | K | R, G, D, H, N, A, Q |
| 976 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 977 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 978 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 979 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 980 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 981 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 982 | V | R, G, H, K, N, A, Q |

【０４９２】

【表２５】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 983 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 984 | Y | R, G, I, H, K, N, A, Q |
| 985 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 986 | P | R, G, H, K, N, A, Q |
| 987 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 988 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 989 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 990 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 991 | R | G, H, K, N, A, Q |
| 992 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 993 | Y | R, G, H, K, N, A, Q |
| 994 | F | R, G, L, H, K, N, A, Q |
| 995 | A | R, G, S, H, K, N, A, Q |
| 996 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 997 | H | R, G, K, N, A, Q |
| 998 | K | R, G, P, H, N, A, Q |
| 999 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1000 | A | R, G, T, H, K, N, Q |
| 1001 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1002 | G | R, D, H, K, N, A, Q |
| 1003 | A | R, G, S, H, K, N, Q |
| 1004 | V | R, G, S, H, K, N, A, Q |
| 1005 | S | R, G, K, H, N, A, Q |
| 1006 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1007 | V | R, G, H, K, N, A, Q |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 1008 | F | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1009 | D | R, G, N, H, K, A, Q |
| 1010 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 1011 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 1012 | Q | R, G, E, H, K, N, A |
| 1013 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1014 | W | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1015 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1016 | C | R, G, N, H, K, A, Q |
| 1017 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 1018 | A | R, G, S, H, K, N, Q |
| 1019 | D | A |
| 1020 | H | R, G, K, N, A, Q |
| 1021 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1022 | A | R, G, H, K, N, Q, S |
| 1023 | A | R, G, H, K, N, Q |
| 1024 | A | R, G, V, H, K, N, Q |
| 1025 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 1026 | I | R, G, H, K, N, A, Q, V |
| 1027 | A | R, G, V, H, K, N, Q |
| 1028 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1029 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1030 | V | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1031 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 1032 | G | R, H, K, N, A, Q |

【０４９３】

【表２６】

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 1033 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1034 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 1035 | E | R, G, I, H, K, N, A, Q |
| 1036 | Q | R, G, H, K, N, A |
| 1037 | S | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1038 | S | R, G, E, H, K, N, A, Q |
| 1039 | D | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1040 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1041 | E | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1042 | N | R, G, H, K, A, Q |
| 1043 | P | R, G, H, K, N, A, Q |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| 位置 | 野生型残基 | 置換 |
| 1044 | D | R, G, K, H, N, A, Q |
| 1045 | G | R, H, K, N, A, Q |
| 1046 | S | R, G, K, H, K, N, A, Q |
| 1047 | R | G, K, H, K, N, A, Q |
| 1048 | I | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1049 | K | R, G, H, N, A, Q |
| 1050 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1051 | Q | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1052 | L | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1053 | T | R, G, H, K, N, A, Q |
| 1054 | S | R, G, H, K, N, A, Q |

【０４９４】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２に掲載されるアミノ酸置換の１つ以上を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、図１に図示される配列番号３～５、４９５又は４９６のいずれか１つに示される配列を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号６～１４６のいずれか１つに示される配列を含む。

【０４９５】

一部の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、１つ以上の個別の（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９個又はそれを超える）変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。かかる実施形態において、個別の変異体ポリペプチドは、独立に、表２に掲載されるアミノ酸置換の１つ以上を含み得る。一部の実施形態において、個別の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、図１に図示される配列番号３～５、４９５又は４９６のいずれか１つに示される配列を含む。一部の実施形態において、個別の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号６～１４６のいずれか１つに示される配列を含む。

【０４９６】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表３に示されるとおりの突然変異又は一組の突然変異を含み、ここで、突然変異は、配列番号２の配列を基準としたものである。

【０４９７】

【表２７】

表3. Cas12i2変異体置換及び配列。

| 配列番号 | 突然変異(配列番号2を基準とする) |
|---|---|
| 3 | D581R D911R I926R V1030G |
| 4 | D581R I926R V1030G |
| 5 | D581R I926R V1030G S1046G |
| 6 | D581R |
| 7 | L589R |

【０４９８】

【表２８】

| | |
|---|---|
| 8 | E652R |
| 9 | T770R |
| 10 | Q820R |
| 11 | D835R |
| 12 | L836R |
| 13 | K862R |
| 14 | P868R |
| 15 | S879R |
| 16 | S883R |
| 17 | D911R |
| 18 | W912R |
| 19 | N925R |
| 20 | I926R |
| 21 | Q1010G |
| 22 | V1030G |
| 23 | D581R D911R I926R |
| 24 | L836R D911R |
| 25 | D581R L836R D911R I926R |
| 26 | D581R L836R S879R |
| 27 | D581R L836R D911R |
| 28 | D581R S879R |
| 29 | L836R D911R I926R |
| 30 | D581R L836R S879R D911R |
| 31 | L589R L836R S879R D911R |
| 32 | D581 D835G D911R I926R |
| 33 | D581R D911R I926R V1030G |
| 34 | D581R D911R I926R S1046G |
| 35 | D835G L836R D911R |
| 36 | L836R D911R V1030G |
| 37 | L836R D911R S1046G |
| 38 | D581R D835G L836R D911R I926R |
| 39 | D581R L836R D911R I926R V1030G |
| 40 | D581R L836R D911R I926R S1046G |
| 41 | D581R D835G S879R |
| 42 | L836R D911R I926R V1030G |
| 43 | D581R L836R S879R S1046G |
| 44 | D581R L836R S879R D911R S1046G |
| 45 | L836R D911R I926R S1046G |
| 46 | D581R P868R I926R V1030G |
| 47 | D581R P868R I926R V1030G S1046G |
| 48 | D581R P868R D911R I926R V1030G |

【０４９９】

【表２９】

| | |
|---|---|
| 49 | D581R D911R I926R V1030G S1046G |
| 50 | D581R P868R D911R I926R V1030G S1046G |
| 51 | D581K D911R I926R V1030G |
| 52 | D581N D911R I926R V1030G |
| 53 | D581H D911R I926R V1030G |
| 54 | D581R D911R I926K V1030G |
| 55 | D581R D911R I926N V1030G |
| 56 | D581R D911R I926H V1030G |
| 57 | D581R D911R I926R V1030K |
| 58 | D581R D911R I926R V1030N |
| 59 | D581R D911R I926R V1030H |
| 60 | D581R G587R D911R I926R V1030G |
| 61 | D581R L623R D911R I926R V1030G |
| 62 | D581R G624R D911R I926R V1030G |
| 63 | D581R F626R D911R I926R V1030G |
| 64 | D581R G633R D911R I926R V1030G |
| 65 | D581R L654R D911R I926R V1030G |
| 66 | D581R Q674R D911R I926R V1030G |
| 67 | D581R T676R D911R I926R V1030G |
| 68 | D581R K677R D911R I926R V1030G |
| 69 | D581R N679G D911R I926R V1030G |
| 70 | D581R A689G D911R I926R V1030G |
| 71 | D581R K692G D911R I926R V1030G |
| 72 | D581R Q727G D911R I926R V1030G |
| 73 | D581R Q728G D911R I926R V1030G |
| 74 | D581R Q739G D911R I926R V1030G |
| 75 | D581R L754G D911R I926R V1030G |
| 76 | D581R T756G D911R I926R V1030G |
| 77 | D581R G762R D911R I926R V1030G |
| 78 | D581R K776R D911R I926R V1030G |
| 79 | D581R L801R D911R I926R V1030G |
| 80 | D581R R803G D911R I926R V1030G |
| 81 | D581R S817G D911R I926R V1030G |
| 82 | D581R L823R D911R I926R V1030G |
| 83 | D581R N826R D911R I926R V1030G |
| 84 | D581R G834R D911R I926R V1030G |
| 85 | D581R S837G D911R I926R V1030G |
| 86 | D581R S837R D911R I926R V1030G |
| 87 | D581R T838R D911R I926R V1030G |
| 88 | D581R T839R D911R I926R V1030G |
| 89 | D581R H870R D911R I926R V1030G |

【０５００】

【表３０】

| | |
|---|---|
| 90 | D581R G876R D911R I926R V1030G |
| 91 | D581R G878R D911R I926R V1030G |
| 92 | D581R Y881R D911R I926R V1030G |
| 93 | D581R D886R D911R I926R V1030G |
| 94 | D581R P887R D911R I926R V1030G |
| 95 | D581R V889R D911R I926R V1030G |
| 96 | D581R D894R D911R I926R V1030G |
| 97 | D581R K895R D911R I926R V1030G |
| 98 | D581R D911R I926R G929R V1030G |
| 99 | D581R D911R I926R E930R V1030G |
| 100 | D581R D911R I926R L948R V1030G |
| 101 | D581R D911R I926R E949R V1030G |
| 102 | D581R D911R I926R E950R V1030G |
| 103 | D581R D911R I926R P964R V1030G |
| 104 | D581R D911R I926R K979R V1030G |
| 105 | D581R D911R I926R A1018R V1030G |
| 106 | D581R D911R I926R D1019R V1030G |
| 107 | D581R D911R I926R V1021R V1030G |
| 108 | D581R D911R I926R A1022R V1030G |
| 109 | D581R D911R I926R N1025R V1030G |
| 110 | D581R D911R I926R V1030R |
| 111 | D581R D911R I926R V1030G G1032R |
| 112 | D581R D911R I926R V1030G E1035R |
| 113 | D581R D911R I926R V1030G S1037R |
| 114 | D581R G834R D911R N925R I926R E930R V1030G E1035R |
| 115 | D581R G834R D911R N925R I926R V1030G |
| 116 | D581R G834R D911R I926R E930R V1030G |
| 117 | D581R G834R D911R I926R V1030G E1035R |
| 118 | D581R D911R N925R I926R V1030G E1035R |
| 119 | D581R G834R D911R N925R I926R E930R V1030R E1035R |
| 120 | D581R G834R D911R N925R I926R V1030R |
| 121 | D581R G834R D911R I926R E930R V1030R |
| 122 | D581R G834R D911R I926R V1030R E1035R |
| 123 | D581R D911R N925R I926R V1030R E1035R |
| 124 | D581R G624R G834R D911R N925R I926R E930R V1030G E1035R |
| 125 | D581R L623R G624R L654R L801R G834R P868R G876R S883R K895R D911R N925R I926R E930R L948R K979R A1022R V1030G E1035R |
| 126 | D581R G587R L623R G624R F626R L654R Q674R K677R L801R G834R S837R T838R P868R G876R Y881R S883R D886R D894R K895R D911R N925R I926R E930R L948R E949R K979R A1022R V1030G E1035R |
| 127 | D581R G624R G834R N925R I926R E930R V1030G E1035R |

【０５０１】

【表３１】

| | |
|---|---|
| 128 | D581R L623R G624R L654R L801R G834R P868R G876R S883R K895R N925R I926R E930R L948R K979R A1022R V1030G E1035R |
| 129 | D581R G587R L623R G624R F626R L654R Q674R K677R L801R G834R S837R T838R P868R G876R Y881R S883R D886R D894R K895R N925R I926R E930R L948R E949R K979R A1022R V1030G E1035R |
| 130 | R575H |
| 131 | Q645R |
| 132 | D581R G587R D911R V1030G S1046G |
| 133 | D581R G624R D911R V1030G S1046G |
| 134 | D581R F626R D911R V1030G S1046G |
| 135 | D581R D911R V1030G E1035R S1046G |
| 136 | D581R G587R G624R D911R V1030G S1046G |
| 137 | D581R G587R F626R D911R V1030G S1046G |
| 138 | D581R G587R D911R V1030G E1035R S1046G |
| 139 | D581R G624R F626R D911R V1030G S1046G |
| 140 | D581R G624R D911R V1030G E1035R S1046G |
| 141 | D581R F626R D911R V1030G E1035R S1046G |
| 142 | D581R G587R G624R F626R D911R V1030G S1046G |
| 143 | D581R G587R G624R D911R V1030G E1035R S1046G |
| 144 | D581R G587R F626R D911R V1030G E1035R S1046G |
| 145 | D581R G624R F626R D911R V1030G E1035R S1046G |
| 146 | D581R G587R G624R F626R D911R V1030G E1035R S1046G |
| 495 | D581R G624R F626R I926R V1030G E1035R S1046G |
| 496 | D581R G624R F626R P868T I926R V1030G E1035R S1046G |
| 497 | D581K I926R V1030G S1046G G587R F626R |
| 498 | D581K I926R V1030G S1046G G587R G624R |
| 499 | D581R I926R V1030G S1046G G587R G624R F626R |
| 500 | D581R I926R V1030G S1046G G587R G624R F626R V967K |
| 501 | D581R I926R V1030G S1046G L855Q |
| 502 | D581R I926R V1030G S1046G H870S |
| 503 | D581R I926R V1030G S1046G A867Q |
| 504 | D581R I926R V1030G S1046G V859T |
| 505 | D581R I926R V1030G S1046G P868T |
| 506 | D581R I926R V1030G S1046G R857S |
| 507 | D581R I926R V1030G S1046G N871P |
| 508 | D581R I926R V1030G S1046G R850L |
| 509 | D581R I926R V1030G S1046G Q602L |
| 510 | D581R I926R V1030G S1046G M869L |
| 511 | D581R I926R V1030G S1046G L880W |
| 512 | D581R I926R V1030G S1046G M869W |

【０５０２】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表３に示されるポリペプチドである。表３の置換は、配列番号２の配列を基準としたものである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表３に掲載されるアミノ酸置換の１つ以上を含む。

【０５０３】

一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するポリペプチド配列を含む。一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％より高い又は１００％の同一性を有するポリペプチド配列を含む。

【０５０４】

一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸５９７～６０７の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸５９７～６０４の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸８３０～８３３の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。

一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸８２９～８３５の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸８８２～８８８の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸８８３～８８９の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。表２を参照されたい。

【０５０５】

一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸６００～６０７の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸８３３～８７１の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。一部の実施形態において、配列番号２のアミノ酸８７７～８８５の１つ以上のアミノ酸が変化又は突然変異している。表２を参照されたい。

【０５０６】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのＲｕｖＣドメインを含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのＲｕｖＣモチーフ（例えば、１、２又は３個のＲｕｖＣモチーフ）を含む。本明細書に開示されるＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドのドメインを図１９に図示する。Ｗｅｄｇｅドメインは、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基１～１４及び４４２～５８６を含む。Ｒｅｃ１ドメインは、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基１５～１７６及び２７０～４４１を含む。Ｒｅｃ１ドメイン内で、ヘリックスＩドメインは残基１５～１７６及び２７０～３２７を含み、ヘリックスＩＩドメインは残基３２８～４４１を含む。ＰＩドメインは、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基１７７～２６９を含む。Ｒｅｃ２ドメインは、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基６３８～８２８を含む。Ｎｕｃドメインは、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基８８０～１０１７を含む。ＲｕｖＣモチーフは、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの残基５８７～６３７（ＲｕｖＣ１）、残基８２９～８７９（ＲｕｖＣ２）及び残基１０１８～１０５４（ＲｕｖＣ３）を含む。

【０５０７】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０５０８】

本明細書に記載される変更は、１つ以上のアミノ酸の変更であり得るが、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドに対する変更は、アミノ末端及び／又はカルボキシル末端伸長部としてのポリペプチドの融合など、構造的又は実体的性質のものでもあり得る。例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、追加のペプチド、例えば１つ以上のペプチドを含有し得る。追加のペプチドの例としては、ポリヒスチジンタグ（Ｈｉｓタグ）、Ｍｙｃ及びＦＬＡＧなど、標識用のエピトープペプチドを挙げることができる。一部の実施形態において、本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）又は黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ））などの検出可能な部分と融合することができる。

【０５０９】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つの（例えば、２、３、４、５、６個又はそれを超える）核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つの（例えば、２、３、４、５、６個又はそれを超える）核外移行シグナル（ＮＥＳ）を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つの（例えば、２、３、４、５、６個又はそれを超える）ＮＬＳ及び少なくとも１つの（例えば、２、３、４、５、６個又はそれを超える）ＮＥＳを含む。

【０５１０】

一部の実施形態において、本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、自己不活性化型であり得る。Ｅｐｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，"Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａ Ｓｅｌｆ－Ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ＡＡＶ Ｖｅｃｔｏｒｓ"，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２４（２０１６）：Ｓ５０（全体として参照により援用される）を参照されたい。

【０５１１】

一部の実施形態において、本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、特定の宿主細胞又は生物における使用向けにコドン最適化され得る。例えば、核酸は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜又は非ヒト霊長類を含めた任意の非ヒト真核生物向けにコドン最適化され得る。コドン使用表が、例えば、ｗｗｗ．ｋａｚｕｓａ．ｏｒｊｐ／ｃｏｄｏｎ／で利用可能な「Ｃｏｄｏｎ Ｕｓａｇｅ Ｄａｔａｂａｓｅ」にて容易に利用可能であり、これらの表を幾つもの方法で適合させることができる。Ｎａｋａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）（全体として参照により本明細書に援用される）を参照されたい。特定の配列を特定の宿主細胞における発現用にコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズムも、Ｇｅｎｅ Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ、ＰＡ）など、利用可能である。

【０５１２】

変異体ポリペプチドの機能

本明細書で使用されるとき、「生物学的に活性な一部分」は、親ポリペプチドの少なくとも１つの機能を（例えば完全に、部分的に、最小限に）保持している一部分（例えば、「最小」又は「コア」ドメイン）である。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと少なくとも同程度の活性である酵素活性を保持している。従って、一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドよりも高い酵素活性を有する。

【０５１３】

また、酵素活性、例えば、ヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼ活性を有し、且つ先述のアラインメント方法のいずれかを用いてアラインメントしたとき、親ポリペプチド及び配列番号２のいずれか１つのアミノ酸配列と５０、４０、３５、３０、２５、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２又は１アミノ酸残基だけ異なるアミノ酸配列を含む本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドも提供される。一部の実施形態において、酵素活性を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、先述のアラインメント方法のいずれかを用いてアラインメントしたとき、親ポリペプチド及び配列番号２のいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０５１４】

一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性を亢進させる少なくとも１つの変化又は突然変異を含む。一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと同等以上の酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の少なくとも１つを有する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合

活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性を亢進させる少なくとも１つの変化又は突然変異を含み、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４と少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０５１５】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の亢進を含み、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～５、４９５又は４９６のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０５１６】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の亢進を含み、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０５１７】

本発明の一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ポリペプチドが核酸（例えば、ＲＮＡガイド又はＤＮＡ）と相互作用する（例えば、結合するか又は複合体を形成する）能力を変化させる置換を含む。本発明の一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、核酸（例えば、ＲＮＡガイド又はＤＮＡ）に対するポリペプチドの親和性を変化させる置換を含む。

【０５１８】

一部の実施形態において、Ｄ５８１Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の亢進を呈する。一部の実施形態において、Ｄ５８１Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＮＴＳと相互作用する。一部の実施形態において、Ｄ５８１Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＰＡＭ配列骨格と相互作用する。一部の実施形態において、Ｄ５８１Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＰＡＭ配列におけるＤＮＡとの静電相互作用の亢進を呈する。一部の実施形態において、Ｄ５８１Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、核酸との斥力相互作用を減少させる。一部の実施形態において、Ｄ５８１Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｒループ安定性を亢進させる。図２０Ａを参照されたい。

【０５１９】

一部の実施形態において、Ｖ１０３０Ｇ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の亢進を呈する。一部の実施形態において、Ｖ１０３０Ｇ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＮＴＳと相互作用する。一部の実施形態において、Ｖ１０３０Ｇ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ１２ｉ２活性部位の近くにある。図２０Ｂを参照されたい。

【０５２０】

一部の実施形態において、Ｉ９２６Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の亢進を呈する。一部の実施形態において、Ｉ９２６Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｃａｓ１２ｉ２活性部位の近くの一本鎖ＤＮＡと相互作用する。一部の実施形態において、Ｉ９２６Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、一本鎖ＤＮＡを安定化させる。図２０Ｂを参照されたい。

【０５２１】

一部の実施形態において、Ｇ６２４Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の亢進を呈する。一部の実施形態において、Ｇ６２４Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＮＴＳと相互作用する。一部の実施形態において、Ｇ６２４Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｒループ安定性を亢進させる。

【０５２２】

一部の実施形態において、Ｆ６２６Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の亢進を呈する。一部の実施形態において、Ｆ６２６Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＮＴＳと相互作用する。一部の実施形態において、Ｆ６２６Ｒ置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｒループ安定性を亢進させる。

【０５２３】

一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約２０℃～約９０℃の温度範囲、例えば、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃、６５℃又はそれ超えるもののいずれか１つにおいて、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の少なくとも１つを有する。一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約２０℃～約２５℃の温度において又は約３７℃の温度において、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の少なくとも１つを有する。

【０５２４】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約７．３～約８．６の範囲のｐＨ（例えば、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６又はこれらの値の任意の組み合わせの間の範囲内にある任意の値）を有する緩衝液中において、親ポリペプチドと比較して、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の亢進を呈する。

【０５２５】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＴｍ値が親ポリペプチドのＴｍ値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、親ポリペプチドと比較して、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の少なくとも１つを呈する。一実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＴｍ値が親ポリペプチドのＴｍ値よりも少なくとも８℃高いとき、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の亢進を呈する。

【０５２６】
一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたり、親ポリペプチドと比較して、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の少なくとも１つの増加を呈する。一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、親ポリペプチドと比較して、酵素活性、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成、ＲＮＡガイド結合活性、ＲＮＡガイド親和性、ＲＮＡガイド結合特異性、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用、タンパク質安定性、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は三元複合体における安定性の少なくとも１つの増加を呈する。
【０５２７】
また、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性の減少を示し、且つ先述のアラインメント方法のいずれかを用いてアラインメントしたとき、親ポリペプチド及び配列番号２のいずれか１つのアミノ酸配列と５０、４０、３５、３０、２５、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２又は１アミノ酸残基だけ異なるアミノ酸配列を含む本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドも提供される。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性の減少を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、先述のアラインメント方法のいずれかを用いてアラインメントしたとき、親ポリペプチド及び配列番号２のいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０５２８】
一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性を減少させた少なくとも１つの変化又は突然変異を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性を減少させた少なくとも１つの変化又は突然変異を含み、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号４と少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０５２９】
一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性を減少させる少なくとも１つの変化又は突然変異を含む。一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性の減少を含み、及び

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～５、４９５又は４９６のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０５３０】

一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性の減少を含み、及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０５３１】

一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性の少なくとも１つを親ポリペプチドと同等以下のレベルで呈する。一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約２０℃～約９０℃の温度範囲、例えば、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃、６５℃又はそれを超えるもののいずれか１つにおいて、同等の又は減少したＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性を有する。一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約２０℃～約２５℃の温度において又は約３７℃の温度において、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性の少なくとも１つを果たす。

【０５３２】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約７．３～約８．６の範囲のｐＨ（例えば、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６又はこれらの値の任意の組み合わせの間の範囲内にある任意の値）を有する緩衝液中において、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における減少した活性を呈する。

【０５３３】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの$T_m$値が親ポリペプチドの$T_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における活性の少なくとも１つを呈する。一実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの$T_m$値が親ポリペプチドの$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、ＲＮＡガイドからの解離（二元複合体の解離）、標的核酸からの解離（三元複合体の解離）、非標的核酸へのオフターゲット結合及び／又は標的核酸の非標的遺伝子座における減少した活性を呈する。

【０５３４】

ＲＮＡガイド相互作用の増加

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとの間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化を含む。図２０Ｃを参照されたい。一部の実施形態において、変

異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとの間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化は、１つ以上のアミノ酸をアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、セリン又はチロシン残基に置換することである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＲＮＡ結合界面における１つ以上のアミノ酸からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、セリン又はチロシン残基への置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸４４１～５８６又は６３７～８２８からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、セリン又はチロシン残基のいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのドメイン（例えば、Ｗｅｄｇｅドメイン又はＲｅｃ２ドメイン）における１つ以上のアミノ酸からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、セリン又はチロシン残基への変化を含む。一部の実施形態において、こうした１つ又は複数のＲＮＡ結合界面置換は、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイド結合又はＲＮＡガイド結合親和性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。

【０５３５】

一部の実施形態において、置換は、親ポリペプチドと比べてＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成を増加させる。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドがＲＮＡガイドのダイレクトリピート配列と相互作用する能力を変化させることのできる置換の非限定的な例を表４に示す。一部の実施形態において、表４に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成の亢進を呈する。一部の実施形態において、表４に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドを含む二元複合体と比較して、ＲＮＡガイドと安定性のより高い二元複合体を形成する。

【０５３６】

【表３２】

表4. ダイレクトリピート配列接触を増加させる置換。

| 残基 | 置換 |
|---|---|
| N459 | R, K, H |
| T513 | N |
| P514 | Q |
| H519 | R, K |
| V536 | N |
| T541 | R, Y |
| E542 | Q, K |
| F646 | Y, R, H, Q |
| Y651 | H, R, K, Q |
| L654 | N, Q |
| L703 | N |
| C741 | N, S |
| L749 | N |
| L801 | R, K |
| T804 | K, R, Q |
| E812 | Q |
| A815 | R |
| N816 | H |
| Q820 | K, R |

【０５３７】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表４に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表４に掲載される１つ以上の置換を含む。

【０５３８】

一部の実施形態において、ＲＮＡガイド複合体（二元複合体）形成の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｌ６５４Ｋ　Ｑ６５８Ａ、Ｌ５２０Ｋ　Ｑ４９６Ｎ又はＬ５２０Ｋ　Ｑ４９６Ｓを含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｌ６５４Ｋ　Ｑ６５８Ａ、Ｌ５２０Ｋ　Ｑ４９６Ｎ又はＬ５２０Ｋ　Ｑ４９６Ｓ置換を更に含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｌ６５４Ｋ　Ｑ６５８Ａ、Ｌ５２０Ｋ　Ｑ４９６Ｎ又はＬ５２０Ｋ　Ｑ４９６Ｓ置換及び表４に掲載される１つ以上の置換を更に含む。

【０５３９】

一部の実施形態において、表４に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、Ｌ６５４Ｋ　Ｑ６５８Ａ、Ｌ５２０Ｋ　Ｑ４９６Ｎ又はＬ５２０Ｋ　Ｑ４９６Ｓ置換及び表４に掲載される１つ以上の置換を更に含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、酵素活性の（例えば、約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％、６

３％、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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５４０】

二本鎖ＤＮＡ相互作用の増加

一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて二本鎖ＤＮＡとの相互作用を増加させる変化を含む。一部の実施形態において、二本鎖ＤＮＡとの相互作用の増加は、静電相互作用の増加である。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡとの間の親和性を増加させる変化を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡとの間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるＰＡＭ配列への結合を増加させる。

【０５４１】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡとの間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化は、１つ以上のアミノ酸をアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン残基に置換することである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、二本鎖ＤＮＡ結合界面における１つ以上のアミノ酸からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン残基への置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸１４０～１９０、２２０～３００、４４０～４８０又は５６０～５７０からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン残基のいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのドメイン（例えば、Ｒｅｃ１ドメイン、ＰＩドメイン又はＷｅｄｇｅドメイン）における１つ以上のアミノ酸からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン残基への変化を含む。一部の実施形態において、１つ又は複数の二本鎖ＤＮＡ結合界面置換は、親ポリペプチドと比較して、二本鎖ＤＮＡ相互作用及び／又は親和性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。一部の実施形態において、１つ又は複数の二本鎖ＤＮＡ結合界面置換は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるＰＡＭ配列への結合を約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％、５

４％、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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。

【０５４２】

一部の実施形態において、二本鎖ＤＮＡ相互作用を増加させる置換は、親ポリペプチドと比べて三元複合体形成を増加させる。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが二本鎖ＤＮＡと相互作用する能力を変化させることのできる置換の非限定的な例を表５に示す。一部の実施形態において、表５に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて二本鎖ＤＮＡ相互作用（三元複合体形成）の増加を呈する。一部の実施形態において、表５に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、より安定性の高い三元複合体を形成する。

【０５４３】

【表３３】

表 5. 二本鎖相互作用を変化させる置換。

| 残基 | 置換 |
|---|---|
| T147 | R, K |
| T174 | R, K, N, Q |
| E178 | Q, N |
| N229 | R, K |
| E237 | Q, N, S |
| Y287 | K, H |
| D288 | N, S |
| L289 | K, H, N, R |
| T447 | R, K |
| N448 | R, K, H |
| I451 | R |
| L452 | K, H |
| Y472 | R, K |
| T562 | R, K |
| E563 | R, K |
| T567 | N |

【０５４４】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表５に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表５に掲載される１つ以上の置換を含む。

【０５４５】

一部の実施形態において、二本鎖ＤＮＡ相互作用の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ　Ｎ４４８Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｒ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｙ４７２Ｒ、Ｎ２２９Ｒ　Ｑ２２４Ｎ又はＮ２２９Ｋ　Ｑ２２４Ｎを含む。一部の実施形態において、三元複合体形成／安定性の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ　Ｎ４４８Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｒ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｙ４７２Ｒ、Ｎ２２９Ｒ　Ｑ２２４Ｎ又はＮ２２９Ｋ　Ｑ２２４Ｎを含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ　Ｎ４４８Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２

Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｒ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｙ４７２Ｒ、Ｎ２２９Ｒ　Ｑ２２４Ｎ又はＮ２２９Ｋ　Ｑ２２４Ｎ置換を更に含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ　Ｎ４４８Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｒ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｙ４７２Ｒ、Ｎ２２９Ｒ　Ｑ２２４Ｎ又はＮ２２９Ｋ　Ｑ２２４Ｎ置換並びに表４及び／又は表５に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表４及び／又は表５にあるいずれか１つ以上の置換を含む。一部の実施形態において、表４及び／又は表５にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、二本鎖ＤＮＡ相互作用及び／又は親和性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５４６】

一部の実施形態において、表４及び／又は表５に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ、Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｋ　Ｎ４４８Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｔ５６２Ｒ　Ｅ５６３Ｒ、Ｉ４５１Ｒ　Ｌ４５２Ｋ　Ｙ４７２Ｒ、Ｎ２２９Ｒ　Ｑ２２４Ｎ又はＮ２２９Ｋ　Ｑ２２４Ｎ置換並びに表４及び／又は表５に掲載される１つ以上の置換を更に含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、酵素活性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５４７】

一本鎖ＤＮＡ相互作用の増加

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて一本鎖ＤＮＡとの相互作用を増加させる変化を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡとの間の親和性を増加させる変化を含む。一部の実施形態において、一本鎖ＤＮＡは、非標的鎖（ＮＴＳ）を含む。一部の実施形態において、一本鎖ＤＮＡ（例えば、ＮＴＳ）との増加する相互作用は、ＰＡＭ配列と変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの活性部位との間の相互作用である。一部の実施形態において、一本鎖ＤＮＡは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの活性部位において又はその近くで変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと相互作用する一本鎖ＤＮＡを含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと一本鎖ＤＮＡとの間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化は、Ｒループを安定化させる。本明細書で使用されるとき、「Ｒループ」は、標的鎖（ＴＳ）及び一本鎖非標的鎖（ＮＴＳ）と対合したＲＮＡガイドを含む核酸を指す。

【０５４８】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと一本鎖ＤＮＡとの間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化は、１つ以上のアミノ酸をアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はアラニン残基に置換することである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、一本鎖ＤＮＡ結合界面における１つ以上のアミノ酸からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はアラニン残基への置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸２３０～２６０、３５０～４００、５８０～６３０、７００～７６０、８３０～９００又は９２０～１０３５からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はアラニン残基のいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのドメイン／モチーフ（例えば、ＰＩドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｗｅｄｇｅドメイン、ＲｕｖＣ１モチーフ、Ｒｅｃ２ドメイン、ＲｕｖＣ２モチーフ、Ｎｕｃドメイン又はＲｕｖＣ３モチーフ）における１つ以上のアミノ酸からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はアラニン残基への変化を含む。一部の実施形態において、１つ又は複数の一本鎖ＤＮＡ結合界面置換は、親ポリペプチドと比較して、一本鎖ＤＮＡ相互作用及び／又は親和性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。

【０５４９】

一部の実施形態において、一本鎖ＤＮＡ相互作用を増加させる置換は、親ポリペプチドと比べて三元複合体形成を増加させる。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが一本鎖ＤＮＡと相互作用する能力を変化させることのできる置換の非限定的な例を表６に示す。一部の実施形態において、表６に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて一本鎖ＤＮＡ相互作用（三元複合体形成）の増加を呈する。一部の実施形態において、表６に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、より安定性の高い三元複合体を形成する。

【０５５０】

【表３４】

表 6. 一本鎖相互作用を変化させる置換。

| 残基 | 置換 | 接触 |
|---|---|---|
| T235 | K | NTS ssDNA |
| D256 | K, N, R | NTS ssDNA |
| G360 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| D362 | K, R | ssDNA (活性部位の近く) |
| V383 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| L384 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| N390 | Q | ssDNA (活性部位の近く) |
| N391 | R, Q | ssDNA (活性部位の近く) |
| G587 | K, R | NTS ssDNA |
| T588 | R, K | NTS ssDNA |
| T603 | K, R, Q | ssDNA (活性部位の近く) |
| Y619 | R, K | NTS ssDNA |
| E622 | R, K, A | NTS ssDNA |
| E709 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| Y712 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| D716 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| S752 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| D835 | K | ssDNA (活性部位の近く) |
| N840 | K | ssDNA (活性部位の近く) |
| F876 | R, K | NTS ssDNA |
| Y881 | K, R | ssDNA (活性部位の近く) |
| H884 | K | ssDNA (活性部位の近く) |
| D894 | K, R | NTS ssDNA |
| N925 | K, R | ssDNA (活性部位の近く) |
| E930 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| S957 | R, K | ssDNA (活性部位の近く) |
| D958 | K, N, R | ssDNA (活性部位の近く) |
| V1030 | R, K | NTS ssDNA |

【０５５１】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表６に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表６に掲載される１つ以上の置換を含む。

【０５５２】

一部の実施形態において、一本鎖ＤＮＡ相互作用の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ　Ｑ５９０Ｒ又はＧ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ　Ｑ５９０Ｋを含む。一部の実施形態において、三元複合体形成／安定性の増加を呈する変異体Ｃａｓ

１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ　Ｑ５９０Ｒ又はＧ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ　Ｑ５９０Ｋを含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ　Ｑ５９０Ｒ又はＧ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ　Ｑ５９０Ｋ置換を更に含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ　Ｑ５９０Ｒ又はＧ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ　Ｑ５９０Ｋ置換並びに表４及び／又は表５及び／又は表６に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表４及び／又は表５及び／又は表６にあるいずれか１つ以上の置換を含む。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、一本鎖ＤＮＡ相互作用及び／又は親和性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５５３】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、一本鎖ＤＮＡ安定性を増加させる置換を含む（例えば、置換は、一本鎖ＤＮＡと変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの活性部位との間の静電相互作用を増加させる）。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、一本鎖ＤＮＡ安定性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが一本鎖ＤＮＡを安定化させる能力を変化させることのできる置換の非限定的な例を表６に示す。一部の実施形態において、表６に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて一本鎖ＤＮＡ安定性の増加を呈する。

【０５５４】

一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ、Ｇ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｋ　Ｑ５９０Ｒ又はＧ５８７Ｒ　Ｔ５８８Ｒ　Ｑ５９０Ｋ置換並びに表４及び／又は表５及び／又は表６に掲載される１つ以上の置換を更に含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、酵素活性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５５５】

ヘテロ二重鎖相互作用の増加

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド分子との相互作用を増加させる置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドとの間の親和性を増加させる変化を含む。一部の実施形態において、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド分子は、ヘテロ二重鎖である。本明細書で使用されるとき、「ヘテロ二重鎖」は、ＲＮＡガイドのスペーサーと標的鎖（ＴＳ）とによって形成される二重らせんを指す。本明細書で使用されるとき、用語「シード領域」は、ヘテロ二重鎖中でＰＡＭ配列の直ちに下流にあるＴＳ部分を指す。シード領域は、ヘテロ二重鎖中のＲＮＡガイドと対合する第１の塩基を含み、ＲＮＡ－ＤＮＡ結合及びＴＳの置換に必要である。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとヘテロ二重鎖との間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化は、非特異的核酸接触を増加させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとヘテロ二重鎖との間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化は、親ポリペプチドと比べて三元複合体形成／安定性を増加させる。

【０５５６】
一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとヘテロ二重鎖との間の相互作用及び／又は親和性を増加させる変化は、１つ以上のアミノ酸をアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン残基に置換することである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ヘテロ二重鎖と接触する１つ以上のアミノ酸からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン残基への置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸１１０～１３０、１５０～１７０、２５０～３２０、３４０～４００、４２０～４５０、６７０～７２０、７７０～８１０又は８３０～８７０からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン残基のいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのドメイン／モチーフ（例えば、Ｒｅｃ１ドメイン、ＰＩドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＲｕｖＣ２モチーフ）における１つ以上のアミノ酸からアルギニン、リジン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン又はセリン残基への変化を含む。一部の実施形態において、１つ又は複数の核酸界面置換は、親ポリペプチドと比較して、ヘテロ二重鎖相互作用及び／又は親和性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。

【０５５７】
一部の実施形態において、ヘテロ二重鎖相互作用を増加させる置換は、親ポリペプチドと比べて三元複合体形成／安定性を増加させる。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドがヘテロ二重鎖と相互作用する能力を変化させることのできる置換の非限定的な例を表７に示す。一部の実施形態において、表７に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてヘテロ二重鎖相互作用（三元複合体形成）の増加を呈する。一部の実施形態において、表７に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、より安定性の高い三元複合体を形成する。

【０５５８】

【表３５】

表 7. ヘテロ二重鎖相互作用を変化させる置換。

| 残基 | 置換 | 接触 |
|---|---|---|
| G116 | K, N, R | ヘテロ二重鎖 |
| S118 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| Y119 | K, R | ヘテロ二重鎖 |
| A156 | K, N | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| S161 | R, K, Q | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| N165 | R, K | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| E294 | Q | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| N297 | K | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| T308 | K, R, H, N | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| N312 | R, H, K | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| Q316 | R, K | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| E343 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| S346 | R, K, Q | ヘテロ二重鎖 |
| E348 | R, K, Q, H | ヘテロ二重鎖 |

【０５５９】

【表３６】

| | | |
|---|---|---|
| Y351 | K, H, N | ヘテロ二重鎖 |
| V355 | K, R | ヘテロ二重鎖 |
| H357 | K | ヘテロ二重鎖 |
| E378 | K, R | ヘテロ二重鎖 |
| V382 | R | ヘテロ二重鎖 |
| D386 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| E395 | K, Q | ヘテロ二重鎖 |
| N399 | R | ヘテロ二重鎖 |
| Q424 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| Q425 | K, R | ヘテロ二重鎖 |
| D427 | R | ヘテロ二重鎖 |
| S431 | R, K | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| V438 | R, K, Q | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| N441 | R, K | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| I675 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| N679 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| E683 | K | ヘテロ二重鎖 |
| V685 | K, R, N | ヘテロ二重鎖 |
| V687 | R, Q, K | ヘテロ二重鎖 |
| E691 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| A695 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| Y712 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| D716 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| S775 | R | ヘテロ二重鎖 |
| S781 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| D782 | R, N | ヘテロ二重鎖 |
| E783 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| Q784 | R | ヘテロ二重鎖 |
| E797 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| E800 | N, S, Q | ヘテロ二重鎖 |
| N841 | R, K | ヘテロ二重鎖 |
| L855 | K | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| Q856 | K | ヘテロ二重鎖 |
| N861 | K, R | ヘテロ二重鎖(シード領域) |
| Q865 | R, K | ヘテロ二重鎖(シード領域) |

【０５６０】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表７に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表７に掲載される１つ以上の置換を含む。

【０５６１】
一部の実施形態において、ヘテロ二重鎖相互作用の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｅ６９１Ｒ　Ａ６９５Ｒ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｒ　Ｅ３４３Ｓ、Ｄ７８２Ｒ　Ｄ７９３Ｎ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｋ　Ｅ３４３Ｓ又はＤ７８２Ｋ　Ｄ７９３Ｎを含む。一部の実施形態において、三元複合体形成／安定性の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｅ６９１Ｒ　Ａ６９５Ｒ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｒ　Ｅ３４３Ｓ、Ｄ７８２Ｒ　Ｄ７９３Ｎ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｋ　Ｅ３４３Ｓ又はＤ７８２Ｋ　Ｄ７９３Ｎを含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｅ６９１Ｒ　Ａ６９５Ｒ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｒ　Ｅ３４３Ｓ、Ｄ７８２Ｒ　Ｄ７９３Ｎ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｋ　Ｅ３４３Ｓ又はＤ７８２Ｋ　Ｄ７９３Ｎ置換を更に含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｅ６９１Ｒ　Ａ６９５Ｒ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｒ　Ｅ３４３Ｓ、Ｄ７８２Ｒ　Ｄ７９３Ｎ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｋ　Ｅ３４３Ｓ又はＤ７８２Ｋ　Ｄ７９３Ｎ置換並びに表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７にあるいずれか１つ以上の置換を含む。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ヘテロ二重鎖相互作用及び／又は親和性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５６２】
一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、Ｅ６９１Ｒ　Ａ６９５Ｒ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｋ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｒ　Ｅ３４３Ｓ、Ｄ７８２Ｒ　Ｄ７９３Ｎ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ｇ、Ｓ７８Ｒ　Ｖ４３８Ａ、Ｓ３４６Ｋ　Ｅ３４３Ｓ又はＤ７８２Ｋ　Ｄ７９３Ｎ置換並びに表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７に掲載される１つ以上の置換を更に含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、酵素活性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５６３】
二本鎖ＤＮＡ二重鎖及びヘテロ二重鎖安定性の増加
三元複合体形成時、ＰＡＭ配列の下流にある二本鎖ＤＮＡが融解して（例えば、巻き戻して）標的鎖（ＴＳ）と非標的鎖（ＮＴＳ）とになる。ＲＮＡガイドのスペーサーがＴＳに結合して、ヘテロ二重鎖と称される二重らせんを形成する。ＰＡＭ配列は融解せず、インタクトな二本鎖ＤＮＡとして残る。この結果、これらの末端ＰＡＭ　ｄｓＤＮＡ塩基対が環境及びタンパク質に露出することになり、これはエネルギー的に不利であり得る。同様に、ヘテロ二重鎖の末端塩基対も露出し、エネルギー的に不利であり得る。図２１を参照されたい。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、露出した二本鎖ＤＮＡ二重鎖の末端ＰＡＭ塩基又はヘテロ二重鎖の末端塩基との間の芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用を増加させる変化は、三元複合体形成時に融解するＤＮＡの安定性を増加させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡ二重鎖又はヘテロ二重鎖の露出した塩基との間の芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用を増加させる変化は、三元複合体形成時のＲループ安定性を増加させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡ二重鎖又はヘテロ二重鎖の露出した塩基との間の芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用を増加させる変化は、三元複合体形成を増加させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡ二重鎖又はヘテロ二重鎖の露出した塩基との間の芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用を増加させる変化は、三元複合体安定性を増加させる。図２０Ｄを参照されたい。

【０５６４】
一部の実施形態において、芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用を増加させる変化は、１つ以上の残基をアルギニン、リジン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、ヒスチジン、グルタミン、トレオニン又は

バリン残基で置換することである。一部の実施形態において、芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用を増加させる変化は、二本鎖ＤＮＡ二重鎖及び／又はヘテロ二重鎖と接触している１つ以上の残基をアルギニン、リジン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、ヒスチジン、グルタミン、トレオニン又はバリン残基で置換することである。一部の実施形態において、芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用を増加させる変化は、表８に掲載される置換である。一部の実施形態において、表８に掲載される置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと二本鎖ＤＮＡ二重鎖又はヘテロ二重鎖の露出した塩基との間の芳香族、疎水性、ファンデルワールス及び／又はカチオン－π相互作用の増加を呈する。一部の実施形態において、変化には、末端二重鎖塩基対に隣接するアミノ酸を正電荷、芳香族、疎水性又は分枝鎖アミノ酸（例えば、アルギニン、リジン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、ヒスチジン、グルタミン、トレオニン、イソロイシン又はバリン）で置換することにより、二本鎖ＤＮＡ及びヘテロ二重鎖にとってエネルギー的に一層有利な条件を作り出すことが含まれる。

【０５６５】

【表３７】

表 8. R ループを安定化させる置換。

| 残基 | 置換 |
|---|---|
| I5 | K, R, W, F, Y |
| Q163 | K, M, R |
| N164 | H, R, K, Q, M, W, F |
| P577 | T, V |
| M869 | Q |

【０５６６】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表８に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表８に掲載される１つ以上の置換を含む。

【０５６７】

一部の実施形態において、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の増加（例えば、ＤＮＡ及び／又はＲループの融解を安定化させることによる）を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｑ１６３Ｎ　Ｎ１６４Ｗ、Ｑ１６３Ｍ　Ｎ１６４Ｗ、Ｑ１６３Ｍ　Ｎ１６４Ｑ、Ｑ１６３Ｎ　Ｎ１６４Ｑ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｙ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｆ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｈ又はＩ５Ｍ　Ｐ５７７Ｌを含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｑ１６３Ｎ　Ｎ１６４Ｗ、Ｑ１６３Ｍ　Ｎ１６４Ｗ、Ｑ１６３Ｍ　Ｎ１６４Ｑ、Ｑ１６３Ｎ　Ｎ１６４Ｑ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｙ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｆ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｈ又はＩ５Ｍ　Ｐ５７７Ｌ置換を更に含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つを含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｑ１６３Ｎ　Ｎ１６４Ｗ、Ｑ１６３Ｍ　Ｎ１６４Ｗ、Ｑ１６３Ｍ　Ｎ１６４Ｑ、Ｑ１６３Ｎ　Ｎ１６４Ｑ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｙ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｆ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｈ又はＩ５Ｍ　Ｐ５７７Ｌ置換並びに表４、表５、表６、表７及び／又は表８からの１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表４、表５、表６、表７及び／又は表８にあるいずれか１つ以上の置換を含む。一部の実施形態において、表４、表５、表６、表７及び／又は表８にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５６８】

一部の実施形態において、表４、表５、表６、表７及び／又は表８に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４、表５、表６、表７及び／又は表８に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、Ｑ１６３Ｎ　Ｎ１６４Ｗ、Ｑ１６３Ｍ　Ｎ１６４Ｗ、Ｑ１６３Ｍ　Ｎ１６４Ｑ、Ｑ１６３Ｎ　Ｎ１６４Ｑ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｙ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｆ、Ｉ５Ｇ　Ｐ５７７Ｈ又はＩ５Ｍ　Ｐ５７７Ｌ置換並びに表４、表５、表６、表７及び／又は表８に掲載される１つ以上の置換を更に含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、酵素活性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５６９】

コンホメーション変化の増加

コンホメーション変化、例えば、ＲＮＡガイド又は標的ＤＮＡの結合を受けた変化は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの機能に影響を与え、例えば、コンホメーション変化により、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの反応速度が変化し得る。三元複合体形成時にＣａｓ１２ｉ２のＲｅｃ１（ヘリックスＩＩ）ドメインが動き、回転して、ＤＮＡ結合に適応する。図２２Ａ及び図２２Ｂを参照されたい。一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメインの動き（例えば、可動性又はコンホメーション変化）を増加させる変化は、ＤＮＡ結合／ＤＮＡ結合親和性を増加させる。一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメインにおける可動性を増加させる置換、例えば、バルクアミノ酸から、側鎖が小さい又は一層小さいアミノ酸（アラニン、バリン、グリシン又はセリン残基）への置換は、三元複合体形成を増加させる。一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメインの動き（例えば、可動性又はコンホメーション変化）を増加させる変化は、三元複合体安定性を増加させる。一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメインのコンホメーション変化を増加させる変化は、１つ以上の残基をアラニン、バリン、グリシン又はセリン残基で置換することである。一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメインの可動性を増加さ

せる変化は、１つ以上の残基をアラニン、バリン、グリシン又はセリン残基で置換することである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ヘリックスＩＩドメインの近くにある１つ以上のアミノ酸の変化を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ヘリックスＩＩドメインの近くにある１つ以上のアミノ酸からアラニン、バリン、グリシン又はセリンへの変化を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸３２７～３３０からアラニン、バリン、グリシン又はセリンのいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表９に示される置換を含む。

【０５７０】

【表３８】

表9. ヘリックスIIドメインの可動性を変化させる置換。

| 残基 | 置換 |
|---|---|
| H300 | A |
| L327 | V, A |
| N328 | G, S |
| N329 | G, S |
| L330 | A |
| A434 | G |
| P436 | A, G |

【０５７１】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表９に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表９に掲載される１つ以上の置換を含む。

【０５７２】

一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメイン可動性を増加させる変化は、表９に掲載される置換である。一部の実施形態において、表９に掲載される置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ヘリックスＩＩドメイン可動性の約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの増加を呈する。一部の実施形態において、ＤＮＡ結合／ＤＮＡ親和性を増加させる変化は、表９に掲載される置換である。一部の実施形態において、表９に掲載される置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＤＮＡ結合／ＤＮＡ親和性の約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％、８

４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの増加を呈する。一部の実施形態において、表９に掲載される置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５７３】

一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメイン可動性の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ａ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｓ　Ｌ３３０Ａ又はＬ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａを含む。一部の実施形態において、ＤＮＡ結合／親和性の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ａ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｓ　Ｌ３３０Ａ又はＬ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａを含む。一部の実施形態において、三元複合体形成／安定性の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ａ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｓ　Ｌ３３０Ａ又はＬ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａを含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ａ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｓ　Ｌ３３０Ａ又はＬ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ置換を更に含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ａ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｓ　Ｌ３３０Ａ又はＬ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ置換並びに表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９にあるいずれか１つ以上の置換を含む。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＤＮＡ結合／親和性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５７４】

一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ａ　Ｎ３２８Ｓ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ、Ｌ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｓ　Ｌ３３０Ａ又はＬ３２７Ｖ　Ｎ３２８Ｇ　Ｎ３２９Ｇ　Ｌ３３０Ａ置換並びに表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９に掲載される１つ以上の置換を更に含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、酵素活性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５７５】

一部の実施形態において、標的一本鎖ＤＮＡがＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドの活性部位

にあるとき形成されるＮｕｃとヘリックスＩＩとの間の界面の連結を増加させる変化は、二元複合体から三元複合体への移行を増加させる。一部の実施形態において、Ｎｕｃとヘリックスの間の界面の連結を増加させる変化は、三元複合体形成を増加させる。図２２Ｂを参照されたい。一部の実施形態において、Ｎｕｃとヘリックスの間の界面の連結を増加させる変化は、三元複合体安定性を増加させる。一部の実施形態において、Ｎｕｃとヘリックスの間の界面の連結を増加させる変化は、１つ以上の残基をアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基で置換することである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸３８０～３９０又は９１０～９３０からアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン又はリジンのいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表１０に示される置換を含む。

【０５７６】

【表３９】

表 10. Nuc 及びヘリックス II 界面における連結を増加させる置換。

| 残基 | 置換 |
|---|---|
| V383 | D, E |
| D386 | E |
| D387 | E |
| Q919 | K |
| N925 | D, E, R, K |

【０５７７】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表１０に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表１０に掲載される１つ以上の置換を含む。

【０５７８】

一部の実施形態において、表１０にある置換は、Ｎｕｃとヘリックスの間の界面の連結を増加させる。一部の実施形態において、表１０にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、Ｎｕｃとヘリックスの間の界面の連結を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。一部の実施形態において、表１０に掲載される置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５７９】

一部の実施形態において、ＮｕｃとヘリックスＩＩとの間の界面の連結の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８６Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８６Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８７Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８３Ｄ、Ｑ９１９Ｋ　Ｖ３８３Ｅ、Ｄ３８６Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｄ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｋ３６５Ｒ又はＤ３６２Ｅ　Ｎ９２５Ｋを含む。一部の実施形態において、三元複合体形成／安定性の増加を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、２つ以上の置換、例えば、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８６Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８６Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８７Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８３Ｄ、Ｑ９１９Ｋ　Ｖ３８３Ｅ、Ｄ３８６Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｄ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｋ３６５Ｒ又はＤ３６２Ｅ　Ｎ９２５Ｋを含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８６Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８６Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８７Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８３Ｄ、Ｑ９１９Ｋ　Ｖ３８３Ｅ、Ｄ３８６Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｄ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｋ３６５Ｒ又はＤ３６２Ｅ　Ｎ９２５Ｋ置換を更に含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８６Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８６Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８７Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８３Ｄ、Ｑ９１９Ｋ　Ｖ３８３Ｅ、Ｄ３８６Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｄ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｋ３６５Ｒ又はＤ３６２Ｅ　Ｎ９２５Ｋ置換並びに表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０にあるいずれか１つ以上の置換を含む。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＮｕｃとヘリックスＩＩとの間の界面の連結の（例えば、約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％、４

６％、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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０にある置換の１つ以上を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、三元複合体形成及び／又は三元複合体安定性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５８０】

一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｄ　Ｄ３８６Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｖ３８３Ｅ　Ｄ３８６Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８７Ｅ、Ｑ９１９Ｋ　Ｄ３８３Ｄ、Ｑ９１９Ｋ　Ｖ３８３Ｅ、Ｄ３８６Ｅ　Ｄ３８７Ｅ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｒ、Ｎ９２５Ｄ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｅ　Ｄ３６２Ｋ、Ｎ９２５Ｄ　Ｋ３６５Ｒ、Ｎ９２５Ｅ　Ｋ３６５Ｒ又はＤ３６２Ｅ　Ｎ９２５Ｋ置換並びに表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０に掲載される１つ以上の置換を更に含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、酵素活性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５８１】

一部の実施形態において、変化は、ＮｕｃとヘリックスＩＩとの間の界面の連結を減少させる。一部の実施形態において、ＮｕｃとヘリックスＩＩとの間の界面の連結を減少させる変化は、三元複合体形成を増加させる。一部の実施形態において、ＮｕｃとヘリックスＩＩとの間の界面の連結を減少させる変化は、１つ以上の残基をアスパラギン又はセリン残基で置換することである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸３８６、３８７、９１５及び９５６からアスパラギン又はセリンへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｄ３８６Ｎ　Ｒ９１５Ｓ、Ｄ３８７Ｎ　Ｒ９５６Ｓ、Ｄ３８６Ｎ　Ｄ３８７Ｎ　Ｒ９１５Ｓ　Ｒ９５６Ｓ又はＤ３８６Ｎ　Ｄ３８７Ｎ　Ｒ９１５Ｓ　Ｒ９２２Ｓ　Ｒ９５６Ｓ置換を含む。一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つを含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、Ｄ３８６Ｎ　Ｒ９１５Ｓ、Ｄ３８７Ｎ　Ｒ９５６Ｓ、Ｄ３８６Ｎ　Ｄ３８７Ｎ　Ｒ９１５Ｓ　Ｒ９５６Ｓ又はＤ３８６Ｎ　Ｄ３８７Ｎ　Ｒ９１５Ｓ　Ｒ９２２Ｓ　Ｒ９５６Ｓ置換を更に含む。

【０５８２】

忠実度の増加

一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオンターゲット特異性を増加させる変化を含む。一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオンターゲット結合を増加させる変化を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとオンターゲットＤＮＡとの間の相互作用（例えば、親和性）を増加させる変化を含む。

【０５８３】

一部の実施形態において、オンターゲット特異性を増加させる変化は、１つ以上のアミノ酸をアラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン残基に置換することである。一部の態様において、オンターゲット特異性を増加させる変化は、ＲＮＡガイドのスペーサー配列に接触する残基をトランケートすること（例えば、スペーサー配列に接触する残基を、より小さい側鎖を有する残基で置換すること）である。一部の態様において、オンターゲット特異性を増加させる変化は、ＲＮＡガイドのスペーサー配列に接触する残基をトランケートすること、例えば、アラニン、セリン又はバリンへの置換である。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＲＮＡガイドのスペーサー配列に接触する１つ以上のアミノ酸からアラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン残基への置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸２９０～３２０、３４０～３６０、３９０～４５０、５５０～５８０、７１０～７２０、７６０～８１０又は８３０～８７０からアラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン残基のいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのドメイン／モチーフ（例えば、Ｗｅｄｇｅドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＲｕｖＣ２モチーフ）における１つ以上のアミノ酸からアラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン残基への変化を含む。一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメインにおけるトランケート型の置換により、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドがオンターゲット結合特異性の増加を呈することになる。一部の態様において、以下のヘリックスＩＩ残基の１つ以上がトランケートされる：Ｅ３４８、Ｅ３４９、Ｅ３９５、Ｉ３９７、Ｒ３９８、Ｎ３９９、Ｙ３５１、Ｈ３５６、Ｈ３５７、Ｋ３９４及びＲ４２８。一部の実施形態において、この１つ又は複数の置換は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオンターゲット特異性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。一部の実施形態において、この１つ又は複数の置換は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット結合を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。一部の実施形態において、この１つ又は複数の置換は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット結合親和性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。

【０５８４】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドがオンターゲットＤＮＡに選択的に結合する能力を変化させることのできる変化の非限定的な例は、表１１に掲載される置換である。一部の実施形態において、表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオンターゲット特異性の増加を呈する。一部の実施形態において、表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオンターゲット結合の増加を呈する。一部の実施形態において、表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオンターゲット結合親和性の増加を呈する。本明細書で使用されるとき、用語「ＴＳシード」は、ＲＮＡガイドと二重鎖を形成するシード配列を指し、用語「ガイドシード」は、ＴＳシード配列と対合するＲＮＡガイドを指す。

【０５８５】

【表４０】

表 11. オンターゲット特異性を増加させる置換。

| 残基 | 置換 | 接触 |
|---|---|---|
| K9 | A, N | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| Y119 | A | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| N296 | A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| T301 | A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| K304 | A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| I305 | A | ヘテロ二重鎖 TS/ガイドシード |
| K306 | A | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| T308 | A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| R309 | Q, A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| N312 | A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| S346 | A | ヘテロ二重鎖ガイド |
| E348 | A, S | ヘテロ二重鎖ガイド |
| E349 | A, S | ヘテロ二重鎖 TS |
| Y351 | A, S, H | ヘテロ二重鎖 TS |
| H356 | A, S | ヘテロ二重鎖 TS |
| H357 | A, S | ヘテロ二重鎖 TS |
| K394 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| E395 | A, S | ヘテロ二重鎖 TS |
| I397 | V, A | ヘテロ二重鎖 TS |
| R398 | A, S | ヘテロ二重鎖ガイド |
| N399 | A, S | ヘテロ二重鎖ガイド |
| R402 | A, S | ヘテロ二重鎖ガイド |
| R428 | A, Q | ヘテロ二重鎖ガイド |

【０５８６】

【表４１】

| | | |
|---|---|---|
| K433 | A, S | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| N435 | A | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| N441 | A | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| Q442 | A | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| T445 | A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| S565 | A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| T567 | A | ヘテロ二重鎖 TS シード |
| R575 | A, Q | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| K678 | A, N | ヘテロ二重鎖 TS |
| R715 | A, Q | ヘテロ二重鎖ガイド |
| R719 | A, Q | ヘテロ二重鎖ガイド |
| K761 | A, N | ヘテロ二重鎖 TS |
| Y765 | A | ヘテロ二重鎖 TS/ガイド |
| S766 | A | ヘテロ二重鎖ガイド |
| S769 | A | ヘテロ二重鎖ガイド |
| A774 | G | ヘテロ二重鎖ガイド |
| K776 | A | ヘテロ二重鎖 TS/ガイド |
| P779 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| D782 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| R785 | A, Q | ヘテロ二重鎖 TS |
| E800 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| T804 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| K807 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| T838 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| T839 | A | ヘテロ二重鎖ガイド |
| N841 | A | ヘテロ二重鎖ガイド |
| K844 | A, N | ヘテロ二重鎖 TS |
| K845 | A, N | ヘテロ二重鎖 TS/ガイド |
| N848 | A | ヘテロ二重鎖ガイド |
| S849 | G | ヘテロ二重鎖ガイド |
| M852 | A, S | ヘテロ二重鎖 TS/ガイド |
| L855 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| R857 | A, N | ヘテロ二重鎖 TS |
| N861 | A | ヘテロ二重鎖 TS |
| K862 | A, N | ヘテロ二重鎖ガイド |
| Q865 | A | ヘテロ二重鎖ガイドシード |
| M866 | A | ヘテロ二重鎖ガイドシード |

【０５８７】

一部の実施形態において、オンターゲット特異性を増加させる変化（例えば、表１１に掲載される置換）は、オンターゲット三元複合体形成及び／又はオンターゲット三元複合体安定性（例えば、オンターゲット三元複合体形成／安定性）を更に増加させる。一部の実施形態において、オンターゲット特異性を増加させる変化は、親ポリペプチドと比較して、オン三元形成及び／又はオンターゲット三元複合体安定性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。

【０５８８】
一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオフターゲット特異性を減少させる変化を含む。一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオフターゲット結合を減少させる変化を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べて変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとオフターゲットＤＮＡとの間の相互作用（例えば、親和性）を減少させる変化を含む。
【０５８９】
一部の実施形態において、オフターゲット特異性を減少させる変化は、１つ以上のアミノ酸をアラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン残基に置換することである。一部の態様において、オフターゲット特異性を減少させる変化は、ＲＮＡガイドのスペーサー配列に接触する残基をトランケートすること（例えば、スペーサー配列に接触する残基を、より小さい側鎖を有する残基で置換すること）である。一部の態様において、オフターゲット特異性を減少させる変化は、ＲＮＡガイドのスペーサー配列に接触する残基をトランケートすること、例えば、アラニン、セリン又はバリンへの置換である。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、ＲＮＡガイドのスペーサー配列に接触する１つ以上のアミノ酸からアラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン残基への置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸２９０～３２０、３４０～３６０、３９０～４５０、５５０～５８０、７１０～７２０、７６０～８１０又は８３０～８７０からアラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン残基のいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのドメイン／モチーフ（例えば、Ｗｅｄｇｅドメイン、Ｒｅｃ１ドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン又はＲｕｖＣ２モチーフ）における１つ以上のアミノ酸からアラニン、セリン、バリン、グルタミン又はアスパラギン残基への変化を含む。一部の実施形態において、ヘリックスＩＩドメインにおけるトランケート型置換により、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドがオフターゲット結合特異性の減少を呈することになる。一部の態様において、以下のヘリックスＩＩ残基の１つ以上がトランケートされる：Ｅ３４８、Ｅ３４９、Ｅ３９５、Ｉ３９７、Ｒ３９８、Ｎ３９９、Ｙ３５１、Ｈ３５６、Ｈ３５７、Ｋ３９４及びＲ４２８。一部の実施形態において、この１つ又は複数の置換は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるオフターゲット特異性を約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％又は１００％減少させる。一部の実施形態において、この１つ又は複数の置換は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット結合を約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％又は１００％減少させる。一部の実施形態において、この１つ又は複数の置換は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット結合親和性を約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％又は１００％減少させる。

【０５９０】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドがオフターゲットＤＮＡに結合する能力を変化させることのできる変化の非限定的な例は、表１１に掲載される置換である。一部の実施形態において、表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオフターゲット特異性の減少を呈する。一部の実施形態において、表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオフターゲット結合の減少を呈する。一部の実施形態において、表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオフターゲット結合親和性の減少を呈する。

【０５９１】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット特異性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット特異性を約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％又は１００％減少させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット結合を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット結合を約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％又は１００％減少させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット結合親和性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット結合親和性を約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％又は１００％減少させる。

【０５９２】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表１１に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表１１に掲載さ

れる１つ以上の置換を含む。

【０５９３】

一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オンターゲット酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オンターゲット酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット酵素活性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０５９４】

一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オフターゲット酵素活性に対するオンターゲット酵素活性の比の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オフターゲット酵素活性に対するオンターゲット酵素活性の比の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）のオンターゲット酵素活性は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット酵素活性よりも少なくとも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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ高い。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃ

ａｓ１２ｉ２ポリペプチド）のオンターゲット酵素活性は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット酵素活性よりも少なくとも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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ高い。

【０５９５】

一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性は、オンターゲット遺伝子座における酵素活性の１０％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）の酵素活性は、オンターゲット遺伝子座における酵素活性の１０％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性は、オンターゲット遺伝子座における酵素活性の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）の酵素活性は、オンターゲット遺伝子座における酵素活性の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。これに対して、オフターゲット遺伝子座におけるＳｐＣａｓ９の酵素活性は、オンターゲット遺伝子座における酵素活性の最大で９５％（例えば、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％、４９％、４８％、４７％、４６％、４５％、４４％、４３％、４２％、４１％、４０％、３９％、３８％、３７％、３６％、３５％、３４％、３３％、３２％、３１％、３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。実施例１６を参照されたい。

【０５９６】

一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの編集効率は、オンターゲット遺伝子座における編集効率の１０

％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）の編集効率は、オンターゲット遺伝子座における編集効率の１０％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの編集効率は、オンターゲット遺伝子座における編集効率の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）の編集効率は、オンターゲット遺伝子座における編集効率の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。これに対して、オフターゲット遺伝子座におけるＳｐＣａｓ９の編集効率は、オンターゲット遺伝子座における編集効率の最大で９５％（例えば、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％、４９％、４８％、４７％、４６％、４５％、４４％、４３％、４２％、４１％、４０％、３９％、３８％、３７％、３６％、３５％、３４％、３３％、３２％、３１％、３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。実施例１６を参照されたい。

【０５９７】

一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによる編集は、オンターゲット遺伝子座における編集の１０％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）による編集は、オンターゲット遺伝子座における編集の１０％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによる編集は、オンターゲット遺伝子座における編集の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）による編集は、オンターゲット遺伝子座における編集の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。これに対して、オフターゲット遺伝子座におけるＳｐＣａｓ９の編集は、オンターゲット遺伝子座における編集の最大で９５％（例えば、９５％、９４％、９３％、９２％

、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％、４９％、４８％、４７％、４６％、４５％、４４％、４３％、４２％、４１％、４０％、３９％、３８％、３７％、３６％、３５％、３４％、３３％、３２％、３１％、３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。実施例１６を参照されたい。

【０５９８】

一部の態様において、親ポリペプチドと比べてオンターゲット特異性を増加させる変化を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して触媒反応速度（Ｋｃａｔ）を減少させる変化である。Ｋｃａｔが減少すると（例えば、遅くなると）、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドがオンターゲット配列とオフターゲット配列との間を区別することが可能になる。一部の実施形態において、触媒反応速度を減少させる変化は、１つ以上のアミノ酸を、アラニン、セリン、トレオニン、バリン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン又はイソロイシンに置換することである。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、１つ以上のアミノ酸６００～６０５、８３５～８４０又は１０２０～１０３０からアラニン、セリン、トレオニン、バリン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン又はイソロイシンのいずれか１つへの置換を含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、少なくとも１つのＲｕｖＣドメイン／モチーフ（例えば、ＲｕｖＣ１、ＲｕｖＣ２又はＲｕｖＣ）における１つ以上のアミノ酸からアラニン、セリン、トレオニン、バリン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン又はイソロイシンへの変化を含む。一部の実施形態において、１つ又は複数の置換は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを約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％又は９９％減少させる。

【０５９９】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット特異性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超え

るもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット結合を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオンターゲット結合親和性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。

【０６００】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、オフターゲット特異性を約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％又は１００％減少させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット結合を約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％又は１００％減少させる。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット結合親和性を約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％又は１００％減少させる。

【０６０１】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを変化させることのできる変化の非限定的な例は、表１２に掲載される置換である。一部の実施形態において、表１２に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオンターゲット特異性の増加を呈する。一部の実施形態において、表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオンターゲット結合の増加を呈する。一部の実施形態において、表１２に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオンターゲット結合親和性の増加を呈する。一部の実施形態において、表１２に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオフターゲット特異性の減少を呈する。一部の実施形態において、表１１に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオフターゲット結合の減少を呈する。一部の実施形態において、表１２に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比べてオフターゲット結合親和性の減少を呈する。

【０６０２】

【表４２】

表 12. オンターゲット特異性を増加させる置換。

| | |
|---|---|
| Q600 | A, S, T, V |
| Q602 | L, A, S, M |
| T603 | S, V, N, A |
| L836 | S, T, V, N, A |
| S837 | A, T, V, L, I |
| A1022 | S |
| I1026 | V, A, N |

【０６０３】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット特異性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させて、オフターゲット特異性を約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％又は１００％減少させる。

【０６０４】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット結合を約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％、６

９％、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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させて、オフターゲット結合を約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％又は１００％減少させる。

【０６０５】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ減少させる１つ又は複数の置換は、更に、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット結合親和性を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させて、オフターゲット結合親和性を約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％又は１００％減少させる。

【０６０６】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫｃａｔを減少させる変化（例えば、表１２に掲載される置換）は、オフターゲット三元複合体形成に対するオンターゲット三元複合体形成の比を更に増加させる。一部の実施形態において、Ｋｃａｔを減少させる変化は、親ポリペプチドと比較して、オフターゲット三元複合体形成に対するオンターゲット三元複合体形成の比を約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ増加させる。

【０６０７】

一部の実施形態において、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表１２に掲載される１つ以上の置換を更に含む。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、表２及び表１２に掲載される１つ以上の置換を含む。

【０６０８】

一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オンターゲット酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オンターゲット酵素活性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット酵素活性の（例えば、約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージの）増加を呈する。

【０６０９】

一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又

は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オフターゲット酵素活性に対するオンターゲット酵素活性の比の増加を呈する。一部の実施形態において、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、オフターゲット酵素活性に対するオンターゲット酵素活性の比の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）のオンターゲット酵素活性は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット酵素活性よりも少なくとも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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ高い。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）のオンターゲット酵素活性は、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのオフターゲット酵素活性よりも少なくとも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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％若しくはそれを超えるもの又はこれらの間にある任意のパーセンテージだけ高い。

【０６１０】

一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）の酵素活性は、オンターゲット遺伝子座における酵素活性の１０％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又

は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）の酵素活性は、オンターゲット遺伝子座における酵素活性の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。これに対して、オフターゲット遺伝子座におけるＳｐＣａｓ９の酵素活性は、オンターゲット遺伝子座における酵素活性の最大で９５％（例えば、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％、４９％、４８％、４７％、４６％、４５％、４４％、４３％、４２％、４１％、４０％、３９％、３８％、３７％、３６％、３５％、３４％、３３％、３２％、３１％、３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。実施例１６を参照されたい。

【０６１１】

一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）の編集効率は、オンターゲット遺伝子座における編集効率の１０％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）の編集効率は、オンターゲット遺伝子座における編集効率の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。これに対して、オフターゲット遺伝子座におけるＳｐＣａｓ９の編集効率は、オンターゲット遺伝子座における編集効率の最大で９５％（例えば、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％、４９％、４８％、４７％、４６％、４５％、４４％、４３％、４２％、４１％、４０％、３９％、３８％、３７％、３６％、３５％、３４％、３３％、３２％、３１％、３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。実施例１６を参照されたい。

【０６１２】

一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１及び／又は表１２に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）による編集は、オンターゲット遺伝子座における編集の１０％以下（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。一部の実施形態において、オフターゲット遺伝子座における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、表４及び／又は表５及び／又は表６及び／又は表７及び／又は表

８及び／又は表９及び／又は表１０及び／又は表１１に掲載される１つ以上の置換を含む配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）による編集は、オンターゲット遺伝子座における編集の５％以下（例えば、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。これに対して、オフターゲット遺伝子座におけるＳｐＣａｓ９の編集は、オンターゲット遺伝子座における編集の最大で９５％（例えば、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％、４９％、４８％、４７％、４６％、４５％、４４％、４３％、４２％、４１％、４０％、３９％、３８％、３７％、３６％、３５％、３４％、３３％、３２％、３１％、３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％又は０％）である。実施例１６を参照されたい。

【０６１３】

ターゲティング部分

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの組成物又は複合体は、標的核酸と結合し且つ変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと相互作用するターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド、アンチセンス、オリゴヌクレオチド、ペプチドオリゴヌクレオチドコンジュゲート）を含む。ターゲティング部分は、標的核酸と（例えば、標的核酸に対する特異的結合親和性で）結合し得る。一部の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、２つ以上のターゲティング部分、例えば、２つ以上のＲＮＡガイド（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９個又はそれを超える）を含む。

【０６１４】

一部の実施形態において、ターゲティング部分は、ＲＮＡガイドを含むか又はＲＮＡガイドである。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを特定の核酸配列に向かわせる。当業者は、特定の種類のＲＮＡガイドについての以下の例を読めば、一部の実施形態においてＲＮＡガイドが部位特異的であることを理解するであろう。即ち、一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、１つ以上の標的核酸配列（例えば、特異的ＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ配列）と特異的に会合し、標的化されない核酸配列（例えば、非特異的ＤＮＡ又はランダム配列）には会合しない。組成物内に２つ以上のガイドがある場合、その２つ以上のガイドは、本明細書に記載されるとおりの２つ以上の別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、同じ又は異なる配列を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）を、２つ以上の（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９個又はそれを超える）標的核酸又は標的核酸の２つ以上の（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９個又はそれを超える）標的遺伝子座へと標的化し得る。

【０６１５】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの組成物はＲＮＡガイドを含み、これは本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと会合し、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを標的核酸配列（例えば、ＤＮＡ）に向かわせる。

【０６１６】

ＲＮＡガイドは、標的配列の１つ以上のヌクレオチド、例えば、部位特異的配列又は部位特異的標的を標的化し得る（例えば、それと会合するか、それに向けられるか、それと接触するか又はそれと結合し得る）。一部の実施形態において、変異体エフェクター核タンパク質（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド＋ＲＮＡガイド）は、ＲＮＡガイド中のＤＮＡターゲティング配列と相補的な標的核酸（例えば、配列特異的基質又は標的核酸）に結合すると、活性化する。

【０６１７】

一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、約７ヌクレオチド～約１００ヌクレオチドの長さを有するスペーサーを含む。例えば、ＤＮＡターゲティングセグメントは、約７ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約５０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約４０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約２０ヌクレオチド又は約７ヌクレオチド～約１９ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、スペーサーは、約７ヌクレオチド～約２０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約３５ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約４０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約４５ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約５０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約６０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約７０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約９０ヌクレオチド、約７ヌクレオチド～約１００ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約３５ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約４０ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約４５ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約５０ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約６０ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約７０ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約９０ヌクレオチド又は約１０ヌクレオチド～約１００ヌクレオチドの長さを有し得る。

【０６１８】

一部の実施形態において、ＲＮＡガイドのスペーサーは、概して、７～５０ヌクレオチド又は７～３０ヌクレオチド（例えば、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又は５０ヌクレオチド）の長さを有し、且つ特異的標的核酸配列と相補的であるように設計され得る。一部の詳細な実施形態において、ＲＮＡガイドは、例えば、あるゲノム遺伝子座の、特異的ＤＮＡ鎖と相補的であるように設計され得る。一部の実施形態において、ＤＮＡターゲティング配列は、例えば、あるゲノム遺伝子座の、特異的ＤＮＡ鎖と相補的であるように設計される。

【０６１９】

ＲＮＡガイドは、参照核酸配列の相補鎖と実質的に同一であり得る。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、参照核酸配列、例えば標的核酸の相補鎖と最小約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％又は少なくとも約９９．５％の配列同一性を有する配列を含む。２つのかかる核酸間のパーセント同一性は、２つの最適にアラインメントした核酸配列を手動で調べることによるか、又は標準パラメータを用いるソフトウェアプログラム若しくはアルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮ、ＣＬＵＳＴＡＬ）を使用することにより決定し得る。

【０６２０】

一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、標的核酸の相補鎖と少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％又は少なくとも約９９．５％の配列同一性を有する。

【０６２１】

一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、７～５０ヌクレオチド（例えば、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又は５０ヌクレオチド）の長さの、且つ標的核酸と少なくとも８０％、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％相補的なスペーサーを含む。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、標的ＤＮＡ配列と少なくとも８０％、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％相補的な配列を含む。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、標的ゲノム配列と少なくとも８０％、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％相補的な配列を含む。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、最大で５０の長さの、且つ標的核酸と少なくとも８０％、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％相補的な配列、例えばＲＮＡ配列を含む。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、標的ＤＮＡ配列と少なくとも８０％、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％相補的な配列を含む。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、標的ゲノム配列と少なくとも８０％、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％相補的な配列を含む。

【０６２２】

特定の実施形態において、ＲＮＡガイドは、ＤＮＡターゲティング配列に連結されたダイレクトリピート配列を含むか、それから本質的になるか又はそれを備える。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、ダイレクトリピート配列とＤＮＡターゲティング配列とを含むか、又はダイレクトリピート－ＤＮＡターゲティング配列－ダイレクトリピート配列を含む。一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、トランケートされたダイレクトリピート配列とＤＮＡターゲティング配列とを含み、これはプロセシング後の又は成熟したｃｒＲＮＡに典型的なものである。一部の実施形態において、本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドはＲＮＡガイドと複合体を形成し、ＲＮＡガイドは、ＲＮＡガイドの少なくとも一部分と相補的な部位特異的標的核酸との会合へと複合体を向かわせる。

【０６２３】

一部の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、表１３の配列又は表１３の配列の一部分と少なくとも９０％同一である。一部の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、表１３の配列又は表１３の配列の一部分と少なくとも９５％同一である。一部の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、表１３の配列又は表１３の配列の一部分である。

【０６２４】

一部の実施形態において、配列番号４９２のダイレクトリピート配列は、成熟した（例えば、プロセシング後の）ダイレクトリピート配列である。一部の実施形態において、ｃｒＲＮＡ（例えば、成熟ｃｒＲＮＡ）は、配列番号４９２のダイレクトリピートとスペーサーとを含む。一部の実施形態において、配列番号４９３及び４９４のダイレクトリピート配列は、プロセシングされていないダイレクトリピート配列である。一部の実施形態において、ｃｒＲＮＡ（例えば、プレｃｒＲＮＡ）は、配列番号４９３の第１のダイレクトリピートと、スペーサーと、配列番号４９３の第２のダイレクトリピート配列とを含む（例えば、これらの２つのダイレクトリピート配列がスペーサーに隣接する）。一部の実施形態において、ｃｒＲＮＡ（例えば、プレｃｒＲＮＡ）は、配列番号４９４の第１のダイレクトリピートと、スペーサーと、配列番号４９４の第２のダイレクトリピート配列とを含む（例えば、これらの２つのダイレクトリピート配列がスペーサーに隣接する）。

【０６２５】

【表４３】
表 13. ダイレクトリピート配列。

| 配列識別番号 | ダイレクトリピート配列 |
|---|---|
| 配列番号 493 | GUUGCAAAACCCAAGAAAUCCGUCUUUCAUUGACGG |
| 配列番号 494 | GCAACACCUAAGAAAUCCGUCUUUCAUUGACGGG |
| 配列番号 492 | AGAAAUCCGUCUUUCAUUGACGG |

【０６２６】
一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドに対応するＰＡＭには、５'－ＮＴＴＮ－３'（式中、Ｎは、任意のヌクレオチドである）が含まれる。一部の実施形態において、ＰＡＭは、５'－ＴＴＨ－３'、５'－ＴＴＹ－３'又は５'－ＴＴＣ－３（式中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、Ｈは、Ａ、Ｃ又はＴであり、及びＹは、Ｃ又はＴである）を含む。一部の実施形態において、ＰＡＭは、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３（式中、Ｂは、Ａを除く任意のヌクレオチドであり、Ｄは、Ｃを除く任意のヌクレオチドであり、及びＲは、Ａ又はＧである）を含む。一部の実施形態において、ＰＡＭは、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'を含む。

【０６２７】
一部の実施形態において、本明細書に記載される組成物又は複合体は、１つ以上の（例えば、２、３、４、５、６、７、８個又はそれを超える）ＲＮＡガイド、例えば、複数のＲＮＡガイドを含む。

【０６２８】
一部の実施形態において、ＲＮＡガイドは、例えば、国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット及び国際公開第２０１５／０７００８３号パンフレット（これらの各々の内容全体は、参照により本明細書に援用される）と同様の構成を有する。

【０６２９】
修飾
ＲＮＡガイド又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードする核酸配列のいずれかは、参照配列、詳細には親ポリリボヌクレオチドを基準として１つ以上の共有結合性の修飾を含み得、それらは、本発明の範囲内に包含される。

【０６３０】
例示的修飾としては、糖、核酸塩基、ヌクレオシド間結合（例えば、結合リン酸に対する／リン酸ジエステル結合に対する／リン酸ジエステル骨格に対する）及びこれらの任意の組み合わせに対する任意の修飾を挙げることができる。本明細書に提供される例示的修飾の幾つかについて、以下に詳述する。

【０６３１】
ＲＮＡガイド又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの成分をコードする核酸配列のいずれかは、糖、核酸塩基又はヌクレオシド間結合に対する（例えば、結合リン酸に対する／リン酸ジエステル結合に対する／リン酸ジエステル骨格に対する）などの、任意の有用な修飾を含み得る。ピリミジン核酸塩基の１つ以上の原子が、任意選択で置換されているアミノ、任意選択で置換されているチオール、任意選択で置換されているアルキル（例えば、メチル又はエチル）又はハロ（例えば、クロロ又はフルオロ）に交換又は置換され得る。特定の実施形態において、修飾（例えば、１つ以上の修飾）は、糖及びヌクレオシド間結合の各々に存在する。修飾は、リボ核酸（ＲＮＡ）からデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）、グリコール核酸（ＧＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）又はこれらのハイブリッド）への修飾であり得る。本明細書には、更なる修飾が記載される。

【０６３２】

一部の実施形態において、修飾は、化学的又は細胞的に誘導された修飾を含み得る。例えば、細胞内ＲＮＡ修飾の非限定的な幾つかの例が、Ｌｅｗｉｓ ａｎｄ Ｐａｎによって"ＲＮＡ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ｃｏｏｐｅｒａｔｅ ｔｏ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡ－ｐｒｏｔｅｉｎ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ"ｆｒｏｍ Ｎａｔ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ，２０１７，１８：２０２－２１０に記載されている。

【０６３３】

種々の糖修飾、ヌクレオチド修飾及び／又はヌクレオシド間結合（例えば、骨格構造）が、配列中の様々な位置に存在し得る。当業者は、ヌクレオチド類似体又は他の１つ又は複数の修飾が、配列の機能を実質的に減少させることがないような、配列の任意の１つ又は複数の位置にあり得ることを理解するであろう。配列は、約１％～約１００％（全ヌクレオチド含量で見たとき又は１種類以上のヌクレオチド、即ちＡ、Ｇ、Ｕ若しくはＣの任意の１つで見たときのいずれか）又は任意の間に介在するパーセンテージ（例えば、１％～２０％＞、１％～２５％、１％～５０％、１％～６０％、１％～７０％、１％～８０％、１％～９０％、１％～９５％、１０％～２０％、１０％～２５％、１０％～５０％、１０％～６０％、１０％～７０％、１０％～８０％、１０％～９０％、１０％～９５％、１０％～１００％、２０％～２５％、２０％～５０％、２０％～６０％、２０％～７０％、２０％～８０％、２０％～９０％、２０％～９５％、２０％～１００％、５０％～６０％、５０％～７０％、５０％～８０％、５０％～９０％、５０％～９５％、５０％～１００％、７０％～８０％、７０％～９０％、７０％～９５％、７０％～１００％、８０％～９０％、８０％～９５％、８０％～１００％、９０％～９５％、９０％～１００％及び９５％～１００％）の修飾ヌクレオチドを含み得る。

【０６３４】

一部の実施形態において、糖修飾（例えば、２'位又は４'位における）又は配列の１つ以上のリボヌクレオチドにおける糖の交換及びまた骨格修飾は、リン酸ジエステル結合の修飾又は交換を含み得る。配列の具体的な例としては、限定はされないが、リン酸ジエステル結合の修飾又は交換を含め、修飾骨格又はヌクレオシド間修飾などの非天然ヌクレオシド間結合を含む配列が挙げられる。修飾骨格を有する配列としては、とりわけ、骨格にリン原子を有しないものが挙げられる。本願の目的上及びときに当技術分野で言及されることもあるとおり、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を有しない修飾されたＲＮＡもオリゴヌクレオシドであると見なすことができる。詳細な実施形態において、配列は、そのヌクレオシド間骨格にリン原子があるリボヌクレオチドを含むことになる。

【０６３５】

修飾された配列骨格としては、例えば、ホスホロチオエート類、キラルホスホロチオエート類、ホスホロジチオエート類、リン酸トリエステル類、アミノアルキルホスホトリエステル類、ホスホン酸メチル及び他のホスホン酸アルキル類、例えば、３'－アルキレンホスホン酸類及びキラルホスホン酸類など、ホスフィネート類、ホスホロアミデート類、例えば、３'－アミノホスホロアミデート類及びアミノアルキルホスホロアミデート類など、チオノホスホロアミデート類、チオノアルキルホスホネート類、チオノアルキルホスホトリエステル類及びボラノホスフェート類であって、通常の３'－５'結合を有するもの、これらの２'－５'結合型の類似体及び隣接するヌクレオシド単位対が３'－５'から５'－３'に又は２'－５'から５'－２'に結合している反転した極性を有するものを挙げることができる。様々な塩、混合塩及び遊離酸形態も包含される。一部の実施形態において、配列は、負電荷又は正電荷であり得る。

【０６３６】

配列に取り込まれ得る修飾ヌクレオチドは、ヌクレオシド間結合（例えば、リン酸骨格）上で修飾することができる。本明細書において、ポリヌクレオチド骨格の文脈では、語句「リン酸塩」と「リン酸ジエステル」とは同義的に使用される。骨格リン酸基は、酸素原子の１つ以上を異なる置換基に交換することによって修飾し得る。更に、修飾されたヌクレオシド及びヌクレオチドは、修飾されていないリン酸部分から本明細書に記載される

とおりの別のヌクレオシド間結合への全面的な交換を含み得る。修飾されたリン酸基の例としては、限定はされないが、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート類、ボラノホスフェート類、ボラノリン酸エステル類、ホスホン酸水素塩類、ホスホロアミデート類、ホスホロジアミデート類、ホスホン酸アルキル又はアリール類及びリン酸トリエステル類が挙げられる。ホスホロジチオエート類は、両方の非結合酸素が硫黄に交換されている。リン酸リンカーは、結合酸素を窒素（架橋型ホスホロアミデート類）、硫黄（架橋型ホスホロチオエート類）及び炭素（架橋型メチレンホスホン酸類）に交換することによっても修飾され得る。

【０６３７】

α－チオ置換されたリン酸部分が提供されると、非天然ホスホロチオエート骨格結合を通じてＲＮＡ及びＤＮＡポリマーに安定性が付与される。ホスホロチオエートＤＮＡ及びＲＮＡは、ヌクレアーゼ耐性の増加、従って細胞環境での半減期の延長を示す。

【０６３８】

具体的な実施形態において、修飾されたヌクレオシドとしては、α－チオ－ヌクレオシド（例えば、５'－Ｏ－（１－チオホスフェート）－アデノシン、５'－Ｏ－（１－チオホスフェート）－シチジン（ａ－チオ－シチジン）、５'－Ｏ－（１－チオホスフェート）－グアノシン、５'－Ｏ－（１－チオホスフェート）－ウリジン又は５'－Ｏ－（１－チオホスフェート）－プソイドウリジン）が挙げられる。

【０６３９】

本明細書には、リン原子を含有しないヌクレオシド間結合を含め、本発明において用いられ得る他のヌクレオシド間結合が記載される。

【０６４０】

一部の実施形態において、配列は、１つ以上の細胞傷害性ヌクレオシドを含み得る。例えば、細胞傷害性ヌクレオシドは、二官能性修飾など、配列に取り込まれ得る。細胞傷害性ヌクレオシドとしては、限定はされないが、アデノシンアラビノシド、５－アザシチジン、４'－チオ－アラシチジン、シクロペンテニルシトシン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、シトシンアラビノシド、１－（２－Ｃ－シアノ－２－デオキシ－β－Ｄ－アラビノ－ペントフラノシル）－シトシン、デシタビン、５－フルオロウラシル、フルダラビン、フロクスウリジン、ゲムシタビン、テガフールとウラシルとの組み合わせ、テガフール（（ＲＳ）－５－フルオロ－１－（テトラヒドロフラン－２－イル）ピリミジン－２，４（１Ｈ，３Ｈ）－ジオン）、トロキサシタビン、テザシタビン、２'－デオキシ－２'－メチリデンシチジン（ＤＭＤＣ）及び６－メルカプトプリンを挙げることができる。更なる例としては、リン酸フルダラビン、Ｎ４－ベヘノイル－１－β－Ｄ－アラビノフラノシルシトシン、Ｎ４－オクタデシル－１－β－Ｄ－アラビノフラノシルシトシン、Ｎ４－パルミトイル－１－（２－Ｃ－シアノ－２－デオキシ－β－Ｄ－アラビノ－ペントフラノシル）シトシン及びＰ－４０５５（シタラビン５'－エライジン酸エステル）が挙げられる。

【０６４１】

一部の実施形態において、配列は、１つ以上の転写後修飾（例えば、キャッピング、切断、ポリアデニル化、スプライシング、ポリＡ配列、メチル化、アシル化、リン酸化、リジン及びアルギニン残基のメチル化、アセチル化及びチオール基及びチロシン残基のニトロシル化等）を含む。１つ以上の転写後修飾は、ＲＮＡにおいて同定されている１００を超える異なるヌクレオシド修飾のいずれかなど（Ｒｏｚｅｎｓｋｉ，Ｊ，Ｃｒａｉｎ，Ｐ，ａｎｄ　ＭｃＣｌｏｓｋｅｙ，Ｊ．（１９９９）．Ｔｈｅ　ＲＮＡ　Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｄａｔａｂａｓｅ：１９９９　ｕｐｄａｔｅ．Ｎｕｃｌ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２７：１９６－１９７）、任意の転写後修飾であり得る。一部の実施形態において、第１の単離核酸がメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を含む。一部の実施形態において、このｍＲＮＡは、ピリジン－４－オンリボヌクレオシド、５－アザ－ウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオウリジン、４－チオ－プソイドウリジン、２－チオ－プソイドウリジン、５－ヒドロキシウリジン、３－メチルウリジン、５－カルボキシメチル－ウ

リジン、１－カルボキシメチル－プソイドウリジン、５－プロピニル－ウリジン、１－プロピニル－プソイドウリジン、５－タウリノメチルウリジン、１－タウリノメチル－プソイドウリジン、５－タウリノメチル－２－チオ－ウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－ウリジン、５－メチル－ウリジン、１－メチル－プソイドウリジン、４－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、２－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－ジヒドロプソイドウリジン、２－メトキシウリジン、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－プソイドウリジン及び４－メトキシ－２－チオ－プソイドウリジンからなる群から選択される少なくとも１つのヌクレオシドを含む。一部の実施形態において、ｍＲＮＡは、５－アザ－シチジン、プソイドイソシチジン、３－メチル－シチジン、Ｎ４－アセチルシチジン、５－ホルミルシチジン、Ｎ４－メチルシチジン、５－ヒドロキシメチルシチジン、１－メチル－プソイドイソシチジン、ピロロ－シチジン、ピロロ－プソイドイソシチジン、２－チオ－シチジン、２－チオ－５－メチル－シチジン、４－チオ－プソイドイソシチジン、４－チオ－１－メチル－プソイドイソシチジン、４－チオ－１－メチル－１－デアザ－プソイドイソシチジン、１－メチル－１－デアザ－プソイドイソシチジン、ゼブラリン、５－アザ－ゼブラリン、５－メチル－ゼブラリン、５－アザ－２－チオ－ゼブラリン、２－チオ－ゼブラリン、２－メトキシ－シチジン、２－メトキシ－５－メチル－シチジン、４－メトキシ－プソイドイソシチジン及び４－メトキシ－１－メチル－プソイドイソシチジンからなる群から選択される少なくとも１つのヌクレオシドを含む。一部の実施形態において、ｍＲＮＡは、２－アミノプリン、２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－アデニン、７－デアザ－８－アザ－アデニン、７－デアザ－２－アミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２－アミノプリン、７－デアザ－２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２，６－ジアミノプリン、１－メチルアデノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６－スレオニルカルバモイルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－スレオニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、７－メチルアデニン、２－メチルチオ－アデニン及び２－メトキシ－アデニンからなる群から選択される少なくとも１つのヌクレオシドを含む。一部の実施形態において、ｍＲＮＡは、イノシン、１－メチル－イノシン、ワイオシン、ワイブトシン、７－デアザ－グアノシン、７－デアザ－８－アザ－グアノシン、６－チオ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－８－アザ－グアノシン、７－メチル－グアノシン、６－チオ－７－メチル－グアノシン、７－メチルイノシン、６－メトキシ－グアノシン、１－メチルグアノシン、Ｎ２－メチルグアノシン、Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、８－オキソ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシン、１－メチル－６－チオ－グアノシン、Ｎ２－メチル－６－チオ－グアノシン及びＮ２，Ｎ２－ジメチル－６－チオ－グアノシンからなる群から選択される少なくとも１つのヌクレオシドを含む。

【０６４２】

配列は、分子の全長に沿って一様に修飾されても又はされなくてもよい。例えば、１つ以上又は全ての種類のヌクレオチド（例えば、天然に存在するヌクレオチド、プリン又はピリミジン又はＡ、Ｇ、Ｕ、Ｃ、Ｉ、ｐＵのいずれか１つ以上又は全て）が、配列中又はその所与の所定の配列領域中で一様に修飾されても又はされなくてもよい。一部の実施形態において、配列は、プソイドウリジンを含む。一部の実施形態において、配列はイノシンを含み、これは、配列が内因性ＲＮＡかウイルスＲＮＡかを免疫系が特徴付けるのに役立ち得る。イノシンの取り込みは、ＲＮＡ安定性の向上／分解の低下も媒介し得る。例えば、Ｙｕ，Ｚ．ｅｔ　ａｌ．（２０１５）ＲＮＡ　ｅｄｉｔｉｎｇ　ｂｙ　ＡＤＡＲ１　ｍａｒｋｓ　ｄｓＲＮＡ　ａｓ　"ｓｅｌｆ"．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．２５，１２８３－１２８４（これは、全体として参照により援用される）を参照されたい。

【０６４３】
標的核酸
本明細書に開示される方法は、種々の標的核酸に適用可能である。一部の実施形態において、標的核酸は、ＤＮＡ遺伝子座など、ＤＮＡである。一部の実施形態において、標的核酸は、細胞の核にある。一部の実施形態において、標的核酸は、ゲノムＤＮＡ遺伝子座である。一部の実施形態において、標的核酸は、一本鎖（例えば、一本鎖ＤＮＡ）である。一部の実施形態において、標的核酸は、二本鎖（例えば、二本鎖ＤＮＡ）である。一部の実施形態において、標的核酸は、一本鎖領域及び二本鎖領域の両方を含む。一部の実施形態において、標的核酸は線状である。一部の実施形態において、標的核酸は環状である。一部の実施形態において、標的核酸は、メチル化ヌクレオチド、損傷したヌクレオチド又はヌクレオチド類似体など、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、標的核酸は修飾されていない。
【０６４４】
一部の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、１つ以上の（例えば、２、３、４、５、６、７、８個又はそれを超える）標的核酸、例えば、複数の標的核酸を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、標的核酸の１つ以上の（例えば、２、３、４、５、６、７、８個又はそれを超える）標的遺伝子座、例えば、複数の標的遺伝子座を含む。
【０６４５】
標的核酸は、約１０ｂｐ、２０ｂｐ、３０ｂｐ、４０ｂｐ、５０ｂｐ、６０ｂｐ、７０ｂｐ、８０ｂｐ、９０ｂｐ、１００ｂｐ、２００ｂｐ、５００ｂｐ、１０００ｂｐ、２０００ｂｐ、５０００ｂｐ、１０ｋｂ、２０ｋｂ、５０ｋｂ、１００ｋｂ、２００ｋｂ、５００ｋｂ、１Ｍｂ若しくはそれを超えるもの又はその間にある任意の長さの少なくともいずれか１つなど、任意の長さであり得る。標的核酸は、任意の配列も含み得る。一部の実施形態において、標的核酸は、少なくとも約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％又はそれを超えるもののいずれか１つのＧＣ含量を有するなど、ＧＣリッチである。一部の実施形態において、標的核酸は、少なくとも約７０％、８０％又はそれを超えるＧＣ含量を有する。一部の実施形態において、標的核酸は、非ＧＣリッチ標的核酸中にあるＧＣリッチ断片である。一部の実施形態において、標的核酸はＧＣリッチでない。一部の実施形態において、標的核酸は、１つ以上の二次構造又は高次構造を有する。一部の実施形態において、標的核酸は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体による標的核酸への接触が不能となる、クロマチンにおけるような凝縮状態にはない。
【０６４６】
一部の実施形態において、標的核酸は、細胞に存在する。一部の実施形態において、標的核酸は、細胞の核に存在する。一部の実施形態において、標的核酸は、細胞にとって内因性である。一部の実施形態において、標的核酸は、ゲノムＤＮＡである。一部の実施形態において、標的核酸は、染色体ＤＮＡである。一部の実施形態において、標的核酸は、タンパク質コード遺伝子若しくはコード領域などのその機能領域又はプロモーター、エンハンサー、５'若しくは３'非翻訳領域など、調節エレメントである。一部の実施形態において、標的核酸は、トランスポゾン、ｍｉＲＮＡ、ｔＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、リボザイム又はｌｉｎｃＲＮＡなど、非コード遺伝子である。一部の実施形態において、標的核酸は、プラスミドである。
【０６４７】
一部の実施形態において、標的核酸は、細胞にとって外因性である。一部の実施形態において、標的核酸は、ウイルスＤＮＡ又はウイルスＲＮＡなど、ウイルス核酸である。一部の実施形態において、標的核酸は、水平伝播性のプラスミドである。一部の実施形態において、標的核酸は、細胞のゲノムに組み込まれる。一部の実施形態において、標的核酸は、細胞のゲノムに組み込まれない。一部の実施形態において、標的核酸は、細胞内のプラスミドである。一部の実施形態において、標的核酸は、染色体外アレイに存在する。
【０６４８】

一部の実施形態において、標的核酸は、単離ＤＮＡ又は単離ＲＮＡなど、単離核酸である。一部の実施形態において、標的核酸は、無細胞環境に存在する。一部の実施形態において、標的核酸は、プラスミドなど、単離ベクターである。一部の実施形態において、標的核酸は、超高純度プラスミドである。

【０６４９】

一部の実施形態において、標的試料は、ターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）の少なくとも一部分にハイブリダイズする標的核酸中のセグメントを含み得る。一部の実施形態において、標的試料は、標的核酸を１コピーのみ有する。一部の実施形態において、標的試料は、標的核酸を少なくとも約２、３、４、５、１０、１００コピー又はそれを超えるもののいずれか１つなど、２コピー以上有する。例えば、ウイルス又は細菌のゲノム中に反復する配列（例えば、標的核酸配列）を含む標的試料及びその反復する配列が、ターゲティング部分の少なくとも一部分によって標的化され得る。

【０６５０】

一部の実施形態において、標的核酸は、核酸の容易に接触可能な領域に存在する。一部の実施形態において、標的核酸は、遺伝子のエクソンにある。一部の実施形態において、標的核酸は、遺伝子のエクソン－イントロン接合部にわたる。一部の実施形態において、標的核酸は、遺伝子の調節領域など、非コード領域に存在する。標的核酸が細胞にとって外因性である一部の実施形態において、標的核酸は、その細胞のゲノムに見出されない配列を含む。

【０６５１】

好適なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件としては、細胞に通常存在する生理的条件が挙げられる。他の好適なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件（例えば、無細胞系における条件）は、当技術分野において公知であり；例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ（前掲）を参照されたい。標的核酸中、ターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）と相補的な、且つそれとハイブリダイズする鎖は、「相補鎖」と称され、標的核酸中、「相補鎖」と相補的な（従ってＲＮＡガイドと相補的でない）鎖は、「相補的でない鎖」又は「非相補鎖」と称される。

【０６５２】

二元複合体

一部の態様において、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとターゲティング部分とは、複合体を形成する。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ターゲティング部分、例えば、本明細書に記載されるとおりのＲＮＡガイドとは、複合体（例えば、二元複合体、例えば、リボ核タンパク質、即ちＲＮＰ）を形成する。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、二元複合体を形成する。

【０６５３】

本明細書に記載される二元複合体は、一部の実施形態では、少なくとも１つのＲＮＡガイドと会合する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含み、ここで、各ＲＮＡガイドは、ＤＮＡなどの標的核酸を標的化する。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体（例えば、変異体二元複合体）は、標的核酸にニックを入れ得るか又はそれを切断し得るヌクレアーゼ活性などの酵素活性を含む。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、単独又は一緒のいずれでも、天然には存在しない。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとの間の複合体形成により、親ポリペプチド及びＲＮＡガイドと比較して、安定性及び／又はこれら２つの間のタンパク質－ＲＮＡ相互作用が亢進し得る。

【０６５４】

概して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）とは、約１：１のモル比で互いに結合して変異体二元複合体を形成する。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）とが結合すると、変異体二元複合体が形成され、これは、ＲＮＡガイドをポリペプチドに負荷すると称される。

【０６５５】
一部の実施形態において、二元複合体は、１ガイド規則に従い、即ち、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、複合体中の結合したＲＮＡガイドから解離しないか、又はＲＮＡガイドを未結合の遊離ＲＮＡに取り替えない。一部の実施形態において、三元複合体は、１二元複合体規則に従い、即ち、変異体二元複合体は、結合した標的核酸（例えば、標的ＤＮＡ基質）から解離しないか、又は標的核酸を未結合の遊離核酸に取り替えない。
【０６５６】
二元複合体の機能性
一部の態様において、変異体二元複合体は、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つを亢進させる少なくとも１つの変化又は突然変異を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。
【０６５７】
一部の態様において、変異体二元複合体は、少なくとも１つの変化又は突然変異を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含み、及び変異体二元複合体は、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離、標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を示す。
【０６５８】
一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）とは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの増加を呈する。
【０６５９】
一部の実施形態において、変異体二元複合体は、親二元複合体の酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％高く変異体二元複合体の酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つを増加させる少なくとも１つの変化又は突然変異を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。
【０６６０】
一部の実施形態において、変異体二元複合体は、約２０℃～約６５℃の範囲の温度、例えば、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つにおいて、親二元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈する。
【０６６１】
一部の実施形態において、変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨ（例えば、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６又はこれらの値の任意の組み合わせの間の範囲内

にある任意の値）を有する緩衝液中において、親二元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈する。

【０６６２】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、変異体二元複合体の$T_m$値が親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、親二元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈する。一実施形態において、変異体二元複合体は、変異体二元複合体の$T_m$値が親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いときに、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈する。

【０６６３】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたり、親二元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの増加を呈する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、親二元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの増加を呈する。

【０６６４】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、変異体二元複合体の酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つを増加させる少なくとも１つの変化又は突然変異を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含み、及び変異体二元複合体は、配列番号４と少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６６５】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を含み、及び変異体二元複合体は、配列番号３～５、４９５又は４９６のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６６６】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少

なくとも１つの亢進を含み、及び変異体二元複合体は、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６６７】

一部の態様において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）とは、変異体二元複合体を形成し、この変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を呈し、親二元複合体の非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％低くなり得る。

【０６６８】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、親二元複合体の非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％低い、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６６９】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、約２０℃～約６５℃の範囲の温度、例えば、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つにおいて、親二元複合体と比較して、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６７０】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨ（例えば、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６又はこれらの値の任意の組み合わせの間の範囲内にある任意の値）を有する緩衝液中において、親二元複合体と比較して、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６７１】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、変異体二元複合体の$T_m$値が親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、親二元複合体と比較して、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。一実施形態において、変異体二元複合体は、変異体二元

複合体のＴm値が親二元複合体のＴm値よりも少なくとも８℃高いときに、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の減少の少なくとも１つを呈する。

【０６７２】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を含み、及び変異体二元複合体は、配列番号４のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６７３】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を含み、及び変異体二元複合体は、配列番号３～５、４９５又は４９６のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６７４】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性、二元複合体解離及び／又は標的核酸からの解離の少なくとも１つの減少を含み、及び変異体二元複合体は、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６７５】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたり、親ポリペプチドとＲＮＡガイドとによって形成される複合体と比較して、複合体（変異体二元複合体又は変異体三元複合体）解離及び／又は標的遺伝子座からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、親ポリペプチドとＲＮＡガイドとによって形成される複合体と比較して、複合体（変異体二元複合体又は変異体三元複合体）解離及び／又は標的遺伝子座からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６７６】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたり、親二元複合体と比較して、複合体（変異体二元複合体又は変異体三元複合体）解離及び／又は標的遺伝子座からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、親二元複合体と比較して、複合体（変異体二元複合体又は変異体三元複合体）解離及び／又は標的遺伝子座からの解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６７７】

三元複合体

一部の態様において、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、ターゲティング部分及び標的核酸は、複合体を形成する。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ターゲティング部分、例えば、本明細書に記載

されるとおりのＲＮＡガイドと、標的核酸（例えば、ＤＮＡ）とが複合体（例えば、三元複合体、例えば、ＤＮＡに結合したリボ核タンパク質）を形成する。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的ＤＮＡとが三元複合体を形成する。

【０６７８】

本明細書に記載される三元複合体は、一部の実施形態では、少なくとも１つのＲＮＡガイドと会合する（即ち変異体二元複合体を形成する）変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含み、ここで、各ＲＮＡガイドは、ＤＮＡなどの標的核酸を標的化し、それと会合する（即ち変異体三元複合体を形成する）。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体（例えば、変異体二元複合体）は、変異体三元複合体の標的核酸にニックを入れ得るか又はそれを切断し得るヌクレアーゼ活性などの酵素活性を含む。一部の実施形態において、変異体三元複合体は、ヌクレアーゼ活性などの酵素活性を含む。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、ＲＮＡガイド及び標的核酸は、単独又は一緒のいずれでも、天然には存在しない。

【０６７９】

概して、変異体二元複合体、例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとターゲティング部分とは、標的核酸に約１：１のモル比で結合して変異体三元複合体を形成する。変異体二元複合体が標的核酸、例えば標的ＤＮＡ基質に結合すると、変異体三元複合体が形成され、これは、変異体二元複合体を標的核酸に負荷すると称される。

【０６８０】

概して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）と、標的核酸とは、互いに約１：１：１のモル比で会合して変異体三元複合体を形成する。

【０６８１】

一部の実施形態において、標的核酸は、１つ又は複数の変異体二元複合体の１つ以上の標的遺伝子座を含む。一部の実施形態において、標的核酸は、１つ又は複数の変異体二元複合体の１つ以上の非標的遺伝子座を含む。

【０６８２】

三元複合体の機能性

一部の態様において、変異体三元複合体は、少なくとも１つの変化又は突然変異を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含み、及び変異体三元複合体は、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を示す。

【０６８３】

一部の態様において、変異体三元複合体は、少なくとも１つの変化又は突然変異を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含み、及び変異体三元複合体は、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を示す。

【０６８４】

一部の態様において、変異体二元複合体及び標的核酸（例えば、ＤＮＡ）は変異体三元複合体を形成し、この変異体三元複合体は、親二元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの増加を呈する。

【０６８５】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、親二元複合体の酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、

１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％高い変異体三元複合体の酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つを呈する。

【０６８６】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、約２０℃～約６５℃の範囲の温度、例えば、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つにおいて、親三元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈する。

【０６８７】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨ（例えば、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６又はこれらの値の任意の組み合わせの間の範囲内にある任意の値）を有する緩衝液中において、親三元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈する。

【０６８８】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、変異体三元複合体のＴ$_m$値が親三元複合体のＴ$_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、親三元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈する。一実施形態において、変異体三元複合体は、変異体三元複合体のＴ$_m$値が親三元複合体のＴ$_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈する。

【０６８９】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたり、親三元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの増加を呈する。一部の実施形態において、変異体三元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、親三元複合体と比較して、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの増加を呈する。

【０６９０】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的

核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈し、及び変異体三元複合体は、配列番号４のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６９１】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈し、及び変異体三元複合体は、配列番号３～５、４９５又は４９６のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６９２】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、酵素活性、標的核酸複合体形成、標的核酸結合活性、標的核酸親和性、標的核酸結合特異性、タンパク質－核酸相互作用、三元複合体形成、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合特異性及び／又は安定性の少なくとも１つの亢進を呈し、及び変異体三元複合体は、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０６９３】

一部の態様において、変異体二元複合体及び標的核酸（例えば、ＤＮＡ）は変異体三元複合体を形成し、この変異体三元複合体は、親二元複合体と比較して、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６９４】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、変異体三元複合体の標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈し、これは、親二元複合体の標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％低くなり得る。

【０６９５】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つの温度で、親三元複合体と比較して、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６９６】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、ある範囲の温度、約２０℃～約６５℃にわたり、親三元複合体と比較して、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフター

ゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。一部の実施形態において、変異体三元複合体は、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたり、親三元複合体と比較して、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。一部の実施形態において、変異体三元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、親三元複合体と比較して、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６９７】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、親三元複合体と比べて、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。一実施形態において、変異体三元複合体は、親三元複合体と比べて、約７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５又は８．６のｐＨで、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６９８】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、変異体三元複合体の$T_m$値が参照分子の$T_m$値又は参照値の$T_m$、例えば親三元複合体の$T_m$よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。一実施形態において、変異体三元複合体は、変異体三元複合体の$T_m$値が参照分子の$T_m$値又は参照値の$T_m$、例えば親三元複合体の$T_m$よりも少なくとも８℃高いとき、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの減少を呈する。

【０６９９】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの少なくとも１つの減少を呈し、及び変異体三元複合体は、配列番号４のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０７００】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの少なくとも１つの減少を呈し、及び変異体三元複合体は、配列番号３～５、４９５又は４９６のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０７０１】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、標的遺伝子座からの解離、非標的核酸へのオフターゲット結合、標的核酸の非標的遺伝子座における活性及び／又は三元複合体解離の少なくとも１つの少なくとも１つの減少を呈し、及び変異体三元複合体は、配列番

号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む。

【０７０２】

一部の実施形態において、変異体三元複合体は、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたり、親三元複合体と比較して安定性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体三元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたり、親三元複合体と比較して安定性の増加を呈する。

【０７０３】

一部の態様において、変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の非標的遺伝子座における活性の減少を呈する。一部の実施形態において、非標的活性は、オンターゲット遺伝子座配列から特定のレーベンシュタイン距離（例えば、１、２、３又は４の編集距離）にあるＰＡＭ隣接配列において評価される。一部の実施形態において、変異体二元複合体による非標的遺伝子座での活性は、親二元複合体による非標的遺伝子座での活性よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％低くなり得る。

【０７０４】

複数の複合体

一部の実施形態において、２つ以上の（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９個又はそれを超える）別個の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、２つ以上の（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９個又はそれを超える）別個のターゲティング部分とが個別の変異体二元複合体を形成し、ここで、別個の変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたって標的核酸への結合親和性の増加、標的核酸の標的遺伝子座への標的結合親和性の増加、三元複合体形成の増加及び／又は安定性の増加の特徴の少なくとも１つ以上を呈する。かかる実施形態において、複合体形成は、単一の組成物で同時に達成され得るか、又は別々の組成物で独立に達成され得る。

【０７０５】

一部の態様において、複数のＣａｓ１２ｉ２ポリペプチド、例えば、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、２つ以上の別個のターゲティング部分、例えば、２つ以上の別個のＲＮＡガイドとが、個別に二元複合体を形成する。例えば、配列番号ＡＡの第１のＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドが配列番号ＢＢのＲＮＡガイドと（例えば、約１：１のモル比で）第１の二元複合体を形成し、及び配列番号ＡＡの第２のＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドが配列番号ＤＤのＲＮＡガイドと（例えば、約１：１のモル比で）第２の二元複合体を形成する。一部の実施形態において、これらの２つの二元複合体は、標的核酸の別個の標的遺伝子座と特異的に結合する。例えば、第１の二元複合体（例えば、配列番号ＡＡのＣａｓ１２ｉ２ポリペプチド／配列番号ＢＢのＲＮＡガイド）が標的核酸の標的遺伝子座ＣＣと（例えば、１：１のモル比で）特異的に結合して第１の三元複合体を形成し得、第２の二元複合体（例えば、配列番号ＡＡのＣａｓ１２ｉ２ポリペプチド／配列番号ＹＹのＲＮＡガイド）が標的核酸の標的遺伝子座ＺＺと（例えば、１：１のモル比で）特異的に結合して第２の三元複合体を形成し得る。本明細書で使用されるとき、用語「二元複合体」は、１つ以上の別個の二元複合体、例えば、別個の標的遺伝子座（例えば、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座）を標的化する別個のターゲティング部分（例えば、別個のＲＮＡガイド）を各々有する二元複合体を指す。本明細書で使用されるとき、用語「三元複合体」は、１つ以上の別個の三元複合体、例えば、別個の標的遺伝子座に結合した別個のターゲティング部分（例えば、別個のＲＮＡガイド）を含む三元複合体を指す。

【０７０６】
一部の態様において、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上のターゲティング部分（例えば、２つ以上のＲＮＡガイド）とが複数の変異体二元複合体を形成し、この複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座へのオンターゲット結合の増加を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体によるオンターゲット結合は、２つ以上の標的遺伝子座への複数の親二元複合体のオンターゲット結合よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％高くなり得る。

【０７０７】
一部の態様において、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上のターゲティング部分（例えば、２つ以上のＲＮＡガイド）とが複数の変異体二元複合体を形成し、この複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座におけるオンターゲット活性の増加を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体によるオンターゲット活性は、複数の親二元複合体のオンターゲット活性よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％高くなり得る。

【０７０８】
一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つの温度で、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座と複数の変異体三元複合体を形成する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、ある範囲の温度、約２０℃～約６５℃にわたって複数の変異体三元複合体を形成する。

【０７０９】
一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つの温度で、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座のオンターゲット結合の増加、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とのオンターゲット三元複合体形成の増加及び／又は安定性の増加を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、ある範囲の温度、約２０℃～約６５℃にわたり、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座のオンターゲット結合の増加、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とのオンターゲット三元複合体形成の増加及び／又は安定性の増加を呈する。

【０７１０】
一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つの温度で、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座からの解離の減少を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、ある範囲の温度、約２０℃～約６５℃にわた

り、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座からの解離の減少を呈する。

【０７１１】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたり、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座からの解離の減少を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数のある範囲のインキュベーション時間にわたり、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座からの解離の減少を呈する。

【０７１２】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、複数の親二元複合体よりも標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座からの解離の減少を呈する。一実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５又は８．６のｐＨで、複数の親二元複合体よりも標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座からの解離の減少を呈する。

【０７１３】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数の変異体二元複合体の$T_m$値が参照複合体の対応する$T_m$値又は参照$T_m$値、例えば、複数の親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座からの解離の減少を呈する。一実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数の変異体二元複合体の$T_m$値が参照複合体の対応する$T_m$値又は参照$T_m$値、例えば、複数の親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座からの解離の減少を呈する。

【０７１４】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、複数の親二元複合体よりも標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座のオンターゲット結合の増加、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とのオンターゲット三元複合体形成の増加及び／又は安定性の増加を呈する。一実施形態において、複数の二元複合体は、約７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５又は８．６のｐＨで、複数の親二元複合体よりも標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座のオンターゲット結合の増加、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とのオンターゲット三元複合体形成の増加及び／又は安定性の増加を呈する。

【０７１５】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約７．３～８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中で安定している。一実施形態において、複数の変異体二元複合体は、約７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５又は８．６のｐＨで安定している。

【０７１６】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体の$T_m$値が、参照複合体の対応する$T_m$値又は参照$T_m$値、例えば、複数の親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高い場合、複数の変異体二元複合体は安定しているものであり得る。例えば、特定の実施形態において、複数の変異体二元複合体の$T_m$値が参照複合体の対応する$T_m$値又は参照$T_m$値、例えば、複数の親二元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高い場合、複数の変異体二元複合体は安定している。

【０７１７】
一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数の変異体二元複合体のＴ$_m$値が参照複合体の対応するＴ$_m$値又は参照Ｔ$_m$値、例えば、複数の親二元複合体のＴ$_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、安定性の増加を呈する。一実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数の変異体二元複合体のＴ$_m$値が参照複合体の対応するＴ$_m$値又は参照Ｔ$_m$値、例えば、複数の親二元複合体のＴ$_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、安定性の増加を呈する。
【０７１８】
一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体（例えば、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の別個のターゲティング部分とから形成される二元複合体）は、標的核酸の複数の標的遺伝子座に特異的に結合する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、２つ以上の（例えば、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、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６２、１６４、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００個又はそれを超える）標的遺伝子座とのオンターゲット結合の増加を呈する。
【０７１９】
一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体（例えば、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数のＲＮＡガイドとから形成される二元複合体）は、標的核酸の複数の標的遺伝子座に特異的に結合する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、２つ以上の（例えば、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、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６２、１６４、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７

０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００個又はそれを超える）標的遺伝子座とのオンターゲット結合の増加を呈する。

【０７２０】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体（例えば、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数の別個のターゲティング部分とから形成される二元複合体）は、標的核酸の複数の標的遺伝子座との三元複合体形成を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、２つ以上の（例えば、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、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６２、１６４、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００個又はそれを超える）標的遺伝子座との三元複合体形成の増加を呈する。

【０７２１】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体（例えば、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと複数のＲＮＡガイドとから形成される二元複合体）は、標的核酸の複数の標的遺伝子座との三元複合体形成を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、２つ以上の（例えば、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、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６２、１６４、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００個又はそれを超える）標的遺伝子座との三元複合体形成の増加を呈する。

【０７２２】
一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つの温度で安定性の増加を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、ある範囲の温度、約２０℃～約６５℃にわたって標的遺伝子座における三元複合体形成の増加及び／又は安定性の増加を呈する。
【０７２３】
一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたって安定性の増加を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、ある範囲のインキュベーション時間にわたって安定性の増加を呈する。
【０７２４】
一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、約７．３～８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中で安定性の増加を呈する。一実施形態において、複数の変異体三元複合体は、約７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５又は８．６のｐＨで安定性の増加を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、約７．３～８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中で安定性の増加を呈する。一実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、約７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５又は８．６のｐＨで安定性の増加を呈する。
【０７２５】
一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の変異体三元複合体の$T_m$値が参照複合体の$T_m$値又は$T_m$参照値、例えば、複数の親三元複合体の$T_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高い場合、安定性の増加を呈する。例えば、特定の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の変異体三元複合体の$T_m$値が参照複合体の$T_m$値又は$T_m$参照値、例えば、複数の親三元複合体の$T_m$値よりも少なくとも８℃高い場合、安定性の増加を呈する。
【０７２６】
一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、ある範囲の温度、インキュベーション時間、ｐＨ値及び$T_m$値で２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。
【０７２７】
一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、約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℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃又は６５℃のいずれか１つの温度でそれらの２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、ある範囲の温度、約２０℃～約６５℃にわたってそれらの２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。
【０７２８】
一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のい

ずれか１つのインキュベーション時間にわたってそれらの２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の親三元複合体と比較して、ある範囲のインキュベーション時間にわたってそれらの２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。

【０７２９】

一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、約７．３～約８．６の範囲のｐＨを有する緩衝液中において、複数の親三元複合体よりもそれらの２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、約７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５又は８．６のｐＨで、複数の親三元複合体よりもそれらの２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。

【０７３０】

一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、複数の変異体三元複合体のＴ$_m$値が参照複合体のＴ$_m$値又はＴ$_m$参照値、例えば、複数の親三元複合体のＴ$_m$値よりも少なくとも１℃、２℃、３℃、４℃、５℃、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃又は２０℃高いとき、それらの２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体三元複合体は、変異体三元複合体のＴ$_m$値が参照複合体のＴ$_m$値又はＴ$_m$参照値、例えば、複数の親三元複合体のＴ$_m$値よりも少なくとも８℃高いとき、それらの２つ以上の標的遺伝子座の解離の減少を呈する。

【０７３１】

一部の態様において、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上のターゲティング部分（例えば、２つ以上のＲＮＡガイド）とが複数の変異体二元複合体を形成し、この複数の変異体二元複合体は、複数の親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の非標的遺伝子座へのオフターゲット結合の減少を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体によるオフターゲット結合は、２つ以上の非標的遺伝子座への親二元複合体のオフターゲット結合よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％低くなり得る。

【０７３２】

一部の態様において、複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと２つ以上のターゲティング部分（例えば、２つ以上のＲＮＡガイド）とが複数の変異体二元複合体を形成し、この複数の変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して、標的核酸の２つ以上の非標的遺伝子座におけるオフターゲット活性の減少を呈する。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体によるオフターゲット活性は、複数の親二元複合体のオフターゲット活性よりも少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％低くなり得る。

【０７３３】

特に注記しない限り、本明細書に提供される全ての組成物及び複合体及びポリペプチドは、その組成物又は複合体又はポリペプチドの活性レベルに関して言及され、市販の供給材料に存在し得る不純物、例えば、残留溶媒又は副産物は含めない。酵素成分の重量は、全活性タンパク質を基準とする。パーセンテージ及び比の全ては、特に指示されない限り、重量単位で計算する。パーセンテージ及び比の全ては、特に指示されない限り、全組成物を基準として計算する。例示される組成物中、酵素レベルは、全組成物に対する重量単位の純酵素によって表され、及び特に指定されない限り、成分は全組成物に対する重量によって表される。

【０７３４】
活性
本明細書における本発明では、オンターゲット特異性がより高く、１つ又は複数のオフターゲット遺伝子座のニッキング又は切断など、オフターゲット効果が低下した変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及び変異体二元複合体が記載される。オフターゲット効果は、発生頻度が低いとしても、遺伝的不安定性及び遺伝子機能の破壊につながり得る。
【０７３５】
一部の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、オフターゲット相互作用の減少及び／又は１つ又は複数の非標的遺伝子座における活性の減少、例えば、非標的核酸との相互作用及び／又は活性の減少を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、変異体二元複合体）を含む複合体、例えば二元複合体を含む。実際、本例の中では、本発明が、オンターゲット活性の増加及びオフターゲット活性の減少を示す変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドに関することが示される。
【０７３６】
一部の実施形態において、オンターゲット遺伝子座及び非標的遺伝子座は、同じ核酸上（例えば、同じ染色体上）にある。一部の実施形態において、オンターゲット遺伝子座及び非標的遺伝子座は、異なる核酸上（例えば、異なる染色体上）にある。
【０７３７】
一部の実施形態において、オンターゲット活性及びオフターゲット活性の測定は、実施例６に示されるとおり、初めにオンターゲット遺伝子座配列から特定のレーベンシュタイン距離（編集距離とも称される）の非標的遺伝子座配列を同定すること及びオンターゲット遺伝子座及び非標的遺伝子座の両方でインデルを測定することによって行われる。編集距離とは、第１の配列（例えば、オフターゲット配列）を第２の配列（例えば、オンターゲット配列）に変更するために必要な最小数の編集（例えば、挿入、欠失又は置換）を指す。例えば、編集距離が２のオフターゲット配列の配列をオンターゲット配列に変更するには、２つの編集（例えば、２つの挿入、２つの欠失、２つの置換、１つの挿入と１つの欠失、１つの挿入と１つの置換又は１つの欠失と１つの置換）が必要である。５つの例示的配列：オンターゲット配列、編集距離が１のオフターゲット配列、編集距離が２のオフターゲット配列、編集距離が３のオフターゲット配列及び編集距離が４のオフターゲット配列を図１３に示す。
【０７３８】
一部の実施形態において、変異体二元複合体は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、標的遺伝子座を標的化するターゲティング部分（例えば、ＲＮＡガイド）とで形成され、標的遺伝子座及び非標的遺伝子座でこの変異体二元複合体の活性（例えば、ヌクレアーゼ活性）を測定することにより、オンターゲット活性及びオフターゲット活性の両方が決定される。一部の実施形態において、実施例１４に記載されるとおり、オフターゲット活性の測定には、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれを超える編集距離を有する配列が選択される。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、非標的遺伝子座において活性の減少又は編集の欠損を呈する。
【０７３９】
従って、本発明との関連において、変異体二元複合体と親二元複合体との間のオフターゲット活性（例えば、オフターゲットヌクレアーゼ活性）の減少及び／又はオンターゲット活性（例えば、オンターゲットヌクレアーゼ活性）の増加の程度は、約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％、７

７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％又はそれを超える差であり得る。

【０７４０】

一部の実施形態において、変異体二元複合体によるオフターゲット活性は、親二元複合体によるオフターゲット活性と比較して、少なくとも約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％又は１００％減少する。

【０７４１】

一部の実施形態において、変異体二元複合体によるオンターゲット活性は、親二元複合体によるオンターゲット活性と比較して、少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超えて増加する。

【０７４２】

一部の実施形態において、参照と比較したときの、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（オンターゲット活性）の増加は、参照と比較したときの、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（オンターゲット活性）は、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）と逆の関連性がある。一部の実施形態において、参照（例えば、親二元複合体によるオンターゲット活性）と比較したときの、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える増加は、参照（例えば、親二元複合体によるオフターゲット活性）と比

較したときの、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える減少と関連性がある。一部の実施形態において、参照と比較したときの、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（オンターゲット活性）の増加は、参照と比較したときの、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少を生じさせる。

【０７４３】

一部の実施形態において、参照と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（オンターゲット活性）の増加は、参照と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）は、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）と逆の関連性がある。一部の実施形態において、参照（例えば、親二元複合体によるオンターゲット活性）と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（オンターゲット活性）の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える増加は、参照（例えば、親二元複合体によるオフターゲット活性）と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える減少と関連性

がある。一部の実施形態において、参照と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加は、参照と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少を生じさせる。

【０７４４】

結合活性

本明細書で使用されるとき、用語「結合親和性」は、概して、第１の薬剤（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及び／又は二元複合体）が第２の薬剤（例えば、ターゲティング部分及び／又は標的核酸のオンターゲット遺伝子座）と相互作用する全体的な結合特性を指す。一部の実施形態において、結合親和性は特定の条件下で評価又は測定され得、全体的な結合特性は、限定はされないが、第１の薬剤及び／又は第２の薬剤の表面組成（例えば、限定はされないが、第２の薬剤の存在下における第１の薬剤の濃度）、分子間結合親和性（例えば、イオン結合形成）、アビディティ並びに結合相互作用の周囲／環境条件、例えば、限定はされないが、第１の薬剤及び／若しくは第２の薬剤の濃度並びに／又は第１の薬剤と第２の薬剤との間の結合相互作用時の第３の薬剤（例えば、標的核酸、非標的核酸及び／又は干渉薬剤）の存在を含め、第１の薬剤及び／又は第２の薬剤の１つ以上の固有の特性に依存し得る。

【０７４５】

当技術分野では、薬剤の結合親和性を決定する種々の尺度が公知である。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのターゲティング部分に対する結合親和性は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによるターゲティング部分への結合に関する解離定数（ＫＤ）によって指示され得る。一部の実施形態において、二元複合体の標的核酸に対する結合親和性は、二元複合体による標的核酸への結合に関する解離定数（ＫＤ）によって指示され得る。解離定数（ＫＤ）は、概して二元又は三元複合体が別々の薬剤へと可逆的に分離する（解離する）傾向を測定する平衡定数である。これらの実施形態では、解離定数が高いほど、低い結合親和性を示している。代わりに、第１の薬剤（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は二元複合体）の第２の薬剤（例えば、ターゲティング部分又は標的核酸）に対する結合親和性は、第１の薬剤による第２の薬剤への結合に関する会合定数（ＫＡ）によって指示され得る。

【０７４６】

一部の実施形態において、結合親和性は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は二元複合体による非ターゲティング部分又は非標的核酸への（非特異的な）結合に関する解離定数（ＫＤ）によって指示される。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの非標的核酸に対する結合親和性は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドによる非ターゲティング部分への結合に関する解離定数（ＫＤ）によって指示され得る。一部の実施形態において、二元複合体の非標的核酸に対する結合親和性は、二元複合体による非標的核酸への結合に関する解離定数（ＫＤ）によって指示され得る。解離定数（ＫＤ）は、概して二元又は三元複合体が別々の薬剤へと可逆的に分離する（解離する）傾向を測定する平衡定数である。これらの実施形態では、解離定数が高いほど、低い結合親和性を示している。代わりに、第１の薬剤（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は二元複合体）の第２の薬剤（例えば、非ターゲティング部分又は非標的核酸）に対する結合親和性は、第１の薬剤による第２の薬剤への結合に関する会合定数（ＫＡ）によって指示され得る。

【０７４７】

一部の実施形態では、例えば、ＥＬＩＳＡなどの「サンドイッチ」方法又は任意の他の検出方法を用いた、当技術分野において公知の検出方法を実施して、結合親和性を測定することができる。

【０７４８】

一部の実施形態において、本発明のＫＤ値は、第１の薬剤の第２の薬剤に対する非特異的結合に特徴的であると言われるＫＤ値を下回り得る。当業者によって認識されるであろ

うとおり、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む二元又は三元複合体のＫＤ値は、親ポリペプチドを含む二元又は三元複合体と比較して、一定の範囲内にあり得る。親ポリペプチドを含む二元又は三元複合体の上述のＫＤは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む二元又は三元複合体のＫＤ値の上限であり得る。それぞれの二元又は三元複合体中の個別の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのＫＤ値が異なるＫＤ値を呈し得ることは、本発明の範囲内にある。

【０７４９】

本発明との関連において、変異体二元複合体と親二元複合体との間の非標的遺伝子座に対する結合親和性の減少及び／又はオンターゲット結合親和性の増加の程度は、約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％又はそれを超える差であり得る。

【０７５０】

一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オフターゲット結合親和性）は、非標的遺伝子座に対する親二元複合体の結合親和性と比較して、少なくとも約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％又は１００％減少する。

【０７５１】

一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オフターゲット結合親和性）は、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の親二元複合体の結合親和性と比較して、少なくとも約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％又は１００％減少する。

【０７５２】

一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）は、標的遺伝子座に対する親二元複合体の結合親和性と

比較して、少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超えて増加する。

【０７５３】

一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）は、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の親二元複合体の結合親和性と比較して、少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超えて増加する。

【０７５４】

本発明との関連において、変異体二元複合体と親二元複合体との間のオフターゲット結合の減少及び／又はオンターゲット結合の増加の程度は、約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％又はそれを超える差であり得る。

【０７５５】

一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体のオフターゲット結合は、非標的遺伝子座に対する親二元複合体のオフターゲット結合と比較して、少なくとも約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％又は１００％減少する。

【０７５６】

一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体のオフターゲット結合は、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の親二元複合体のオフターゲット結合と比較して、少なくとも約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％又は１００％減少する。

【０７５７】

一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体のオンターゲット結合は、標的遺伝子座に対する親二元複合体のオンターゲット結合と比較して、少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超えて増加する。

【０７５８】

一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体のオンターゲット結合は、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の親二元複合体のオンターゲット結合と比較して、少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超えて増加する。

【０７５９】

一部の実施形態において、参照と比較したときの、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）の増加は、参照と比較したとき

の、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オフターゲット結合親和性）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）は、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オフターゲット結合親和性）と逆の関連性がある。一部の実施形態において、参照（例えば、親二元複合体によるオンターゲット結合親和性）と比較したときの、標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合親和性の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える増加は、参照（例えば、親二元複合体によるオフターゲット結合親和性）と比較したときの、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合親和性の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える減少と関連性がある。一部の実施形態において、参照と比較したときの、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）の増加は、参照と比較したときの、標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）の増加を生じさせる。

【０７６０】

一部の実施形態において、参照と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）の増加は、参照と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オフターゲット結合親和性）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）は、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オフターゲット結合親和性）と逆の関連性がある。一部の実施形態において、参照（例えば、親二元複合体によるオンターゲット結合親和性）と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える増加は、参照（例えば、親二元複合体によるオフターゲット結合親和性）と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オフターゲット結合親和性）の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える減少と関連性がある。一部の実施形態において、参照と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オンターゲット結合親和性）の増加は、参照と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性（例えば、オフターゲット結合親和性）の減少を生じさせる。

【０７６１】

一部の実施形態において、参照と比較したときの、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合（例えば、オンターゲット結合）の増加は、参照と比較したときの、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合（例えば、オフターゲット結合）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合（例えば、オンターゲット結合）は、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合（例えば、オフターゲット結合）と逆の関連性がある。一部の実施形態において、参照（例えば、親二元複合体によるオンターゲット結合）と比較したときの、標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える増加は、参照（例えば、親二元複合体によるオフターゲット結合）と比較したときの、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の結合の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える減少と関連性がある。一部の実施形態において、参照と比較したときの、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合（例えば、オンターゲット結合）の増加は、参照と比較したときの、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合（例えば、オフターゲット結合）の減少を生じさせる。

【０７６２】

一部の実施形態において、参照と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合（例えば、オンターゲット結合）の増加は、参照と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合（例えば、オフターゲット結合）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合（例えば、オンターゲット結合）は、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合（例えば、オフターゲット結合）と逆の関連性がある。一部の実施形態において、参照（例えば、親二元複合体によるオンターゲット結合）と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合（オンターゲット結合）の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える増加は、参照（例えば、親二元複合体によるオフターゲット結合）と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の結合（例えば、オフターゲット結合）の少なくとも約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％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％又はそれを超える減少と関連性がある。一部の実施形態において、参照と比較したときの、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合（例えば、オンターゲット結合）の増加は、参照と比較したときの、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合（例えば、オフターゲット結合）の減少を生じさせる。

【０７６３】

一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性の増加

は、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加と関連性がある。一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性の増加は、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加を生じさせる。

【０７６４】

一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性の増加は、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性の増加は、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加を生じさせる。

【０７６５】

一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合の増加は、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加と関連性がある。一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合の増加は、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加を生じさせる。

【０７６６】

一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合の増加は、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合の増加は、２つ以上の標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加を生じさせる。

【０７６７】

一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性の減少は、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性の減少は、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少を生じさせる。

【０７６８】

一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性の減少は、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性の減少は、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少を生じさせる。

【０７６９】

一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合の減少は、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合の減少は、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少を生じさせる。

【０７７０】

一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合の減少は、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合の減少は、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オフターゲット活性）の減少を生じさせる。

【０７７１】
一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性の減少は、標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加と関連性がある。一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性の減少は、非標的遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加を生じさせる。
【０７７２】
一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性の減少は、２つ以上のオンターゲット遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性の減少は、２つ以上のオンターゲット遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加を生じさせる。
【０７７３】
一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合の減少は、オンターゲット遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加と関連性がある。一部の実施形態において、非標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合の減少は、オンターゲット遺伝子座における変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加を生じさせる。
【０７７４】
一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合の減少は、２つ以上のオンターゲット遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の非標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合の減少は、２つ以上の非標的遺伝子座における複数の変異体二元複合体の活性（例えば、オンターゲット活性）の増加を生じさせる。
【０７７５】
一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性は、親二元複合体と比較したときの、変異体二元複合体のオフターゲット活性（例えば、非標的遺伝子座における）に対するオンターゲット活性（例えば、標的遺伝子座における）の比と関連性がある。一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合親和性の増加は、親二元複合体と比較したときの、変異体二元複合体のオフターゲット活性（例えば、非標的遺伝子座における）に対するオンターゲット活性（例えば、標的遺伝子座における）の比の増加と関連性があり且つ／又はそれを生じさせる。
【０７７６】
一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性は、複数の親二元複合体と比較したときの、複数の変異体二元複合体のオフターゲット活性（例えば、２つ以上の非標的遺伝子座における）に対するオンターゲット活性（例えば、２つ以上の標的遺伝子座における）の比と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合親和性の増加は、複数の親二元複合体と比較したときの、複数の変異体二元複合体のオフターゲット活性（例えば、２つ以上の非標的遺伝子座における）に対するオンターゲット活性（例えば、２つ以上の標的遺伝子座における）の比の増加と関連性があり且つ／又はそれを生じさせる。
【０７７７】
一部の実施形態において、変異体二元複合体による標的遺伝子座への結合は、親二元複合体と比較したときの、変異体二元複合体のオフターゲット活性（例えば、非標的遺伝子座における）に対するオンターゲット活性（例えば、標的遺伝子座における）の比と関連性がある。一部の実施形態において、標的遺伝子座に対する変異体二元複合体の結合の増加は、親二元複合体と比較したときの、変異体二元複合体のオフターゲット活性（例えば

、非標的遺伝子座における）に対するオンターゲット活性（例えば、標的遺伝子座における）の比の増加と関連性があり且つ／又はそれを生じさせる。

【０７７８】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体による２つ以上の標的遺伝子座への結合は、複数の親二元複合体と比較したときの、複数の変異体二元複合体のオフターゲット活性（例えば、２つ以上の非標的遺伝子座における）に対するオンターゲット活性（例えば、２つ以上の標的遺伝子座における）の比と関連性がある。一部の実施形態において、２つ以上の標的遺伝子座に対する複数の変異体二元複合体の結合の増加は、複数の親二元複合体と比較したときの、複数の変異体二元複合体のオフターゲット活性（例えば、２つ以上の非標的遺伝子座における）に対するオンターゲット活性（例えば、２つ以上の標的遺伝子座における）の比の増加と関連性があり且つ／又はそれを生じさせる。

【０７７９】

一部の実施形態において、変異体二元複合体についてのオフターゲット結合親和性に対するオンターゲット結合親和性の比は、親二元複合体と比較したときの、オンターゲット活性（例えば、標的遺伝子座における）と関連性がある。一部の実施形態において、変異体二元複合体についてのオフターゲット結合親和性に対するオンターゲット結合親和性の比の増加は、親二元複合体と比較したときの、オンターゲット活性（例えば、標的遺伝子座における）の増加と関連性があり且つ／又はそれを生じさせる。

【０７８０】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体についてのオフターゲット結合親和性に対するオンターゲット結合親和性の比は、複数の親二元複合体と比較したときの、オンターゲット活性（例えば、２つ以上の標的遺伝子座における）と関連性がある。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体についてのオフターゲット結合親和性に対するオンターゲット結合親和性の比の増加は、複数の親二元複合体と比較したときの、オンターゲット活性（例えば、２つ以上の標的遺伝子座における）の増加と関連性があり且つ／又はそれを生じさせる。

【０７８１】

一部の実施形態において、変異体二元複合体についてのオフターゲット結合に対するオンターゲット結合の比は、親二元複合体と比較したときの、オンターゲット活性（例えば、標的遺伝子座における）と関連性がある。一部の実施形態において、変異体二元複合体についてのオフターゲット結合に対するオンターゲット結合の比の増加は、親二元複合体と比較したときの、オンターゲット活性（例えば、標的遺伝子座における）の増加と関連性があり且つ／又はそれを生じさせる。

【０７８２】

一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体についてのオフターゲット結合に対するオンターゲット結合の比は、複数の親二元複合体と比較したときの、オンターゲット活性（例えば、２つ以上の標的遺伝子座における）と関連性がある。一部の実施形態において、複数の変異体二元複合体についてのオフターゲット結合に対するオンターゲット結合の比の増加は、複数の親二元複合体と比較したときの、オンターゲット活性（例えば、２つ以上の標的遺伝子座における）の増加と関連性があり且つ／又はそれを生じさせる。

【０７８３】

インデル活性

一部の実施形態において、変異体二元複合体、変異体三元複合体形成又は変異体複合体のオンターゲット結合は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列（式中、Ｎは、任意のヌクレオチドである）に隣接する欠失（例えば、ヌクレオチド欠失又はＤＮＡ欠失）を生じさせるＤＮＡ切断を誘導する。一部の実施形態において、変異体複合体のオンターゲット結合は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列（式中、Ｙは、Ｃ又はＴであり、Ｂは、Ａを除く任意のヌクレオチドであり、Ｄは、Ｃを除

く任意のヌクレオチドであり、及びＲは、Ａ又はＧである）に隣接する欠失を生じさせる。一部の実施形態において、変異体複合体のオンターゲット結合は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列に隣接する欠失を生じさせる。一部の実施形態において、変異体二元複合体、変異体三元複合体形成又は変異体複合体のオンターゲット結合は、Ｔ／Ｃリッチ配列に隣接する欠失を生じさせる。

【０７８４】

一部の実施形態において、変異体二元複合体、変異体三元複合体形成又は変異体複合体のオンターゲット結合は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流に欠失を生じさせる。一部の実施形態において、変異体二元複合体、変異体三元複合体形成又は変異体複合体のオンターゲット結合は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流に欠失を生じさせる。一部の実施形態において、変異体二元複合体、変異体三元複合体形成又は変異体複合体のオンターゲット結合は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流に欠失を生じさせる。一部の実施形態において、変異体二元複合体、変異体三元複合体形成又は変異体複合体のオンターゲット結合は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流に欠失を生じさせる。

【０７８５】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。

【０７８６】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。

【０７８７】
一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まる。

【０７８８】
一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まる。

【０７８９】
一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。

【０７９０】
一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約１０～約１５

ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まる。

【０７９１】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０７９２】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０７９３】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２

５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。

【０７９４】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。

【０７９５】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０７９６】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２

８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０７９７】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０７９８】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'

－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０７９９】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８００】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５

'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０１】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０２】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１

０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約５～約１５ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０３】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０４】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３

'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０５】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約５～約１０ヌクレオチド以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０６】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、

６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０７】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０８】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ

－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約５～約１０ヌクレオチド（例えば、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８０９】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８１０】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり

、且つ５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２０～約３０ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８１１】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８１２】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３

'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２０～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８１３】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８１４】

一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＮ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＮＴＴＹ－３'、５'－ＮＴＴＣ－３'、５'－ＮＴＴＴ－３'、５'－ＮＴＴＡ－３'、５'－ＮＴＴＢ－３'、５'－ＮＴＴＧ－３'、５'－ＣＴＴＹ－３'、５'－ＤＴＴＲ'３'、５'－ＣＴＴＲ－３'、５'－ＤＴＴＴ－３'、５'－ＡＴＴＮ－３'又は５'－ＧＴＴＮ－３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－３'配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、且つ５'－ＣＴＴＴ－３'、５'－ＣＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＴ－３'、５'－ＧＴＴＣ－３'、５'－ＴＴＴＣ－３'、５'－ＧＴＴＡ－３'又は５'－ＧＴＴＧ－

３'配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約１０～約１５ヌクレオチド（例えば、約８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）以内に始まり、Ｔ／Ｃリッチ配列の下流の約２５～約３０ヌクレオチド（例えば、約２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３ヌクレオチド）以内に終わる。

【０８１５】

一部の実施形態において、欠失は、最大で約４０ヌクレオチド長（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４又は４５ヌクレオチド）である。一部の実施形態において、欠失は、約４ヌクレオチド～約４０ヌクレオチド長（例えば、約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又は４５ヌクレオチド）である。一部の実施形態において、欠失は、約４ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド長（例えば、約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又は２８ヌクレオチド）である。一部の実施形態において、欠失は、約１０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド長（例えば、約７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８ヌクレオチド）である。一部の実施形態において、欠失は、約１０ヌクレオチド～約１５ヌクレオチド長（例えば、約７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７ヌクレオチド）である。

【０８１６】

一部の実施形態において、欠失を有する遺伝子は、細胞の核に存在する。一部の実施形態において、欠失を有する遺伝子は、細胞にとって内因性である。一部の実施形態において、欠失を有する遺伝子は、ゲノムＤＮＡである。一部の実施形態において、欠失を有する遺伝子は、染色体ＤＮＡである。一部の実施形態において、欠失を有する遺伝子は、タンパク質コード遺伝子（例えば、Ｂ２Ｍ、ＴＲＡＣ又はＰＤＣＤ１をコードする遺伝子）又はコード領域などのその機能領域又は調節エレメント、例えばプロモーター、エンハンサー、５'又は３'非翻訳領域等である。一部の実施形態において、欠失は、エクソン（例えば、Ｂ２Ｍ、ＴＲＡＣ又はＰＤＣＤ１のエクソン）又はイントロンにある。一部の実施形態において、欠失を有する遺伝子は、トランスポゾン、ｍｉＲＮＡ、ｔＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、リボザイム又はｌｎｃＲＮＡなど、非コード遺伝子である。

【０８１７】

一部の実施形態において、欠失は、遺伝子の発現を変化させる。一部の実施形態において、欠失は、遺伝子の機能を変化させる。一部の実施形態において、欠失は、遺伝子を不活性化させる。一部の実施形態において、欠失は、フレームシフト欠失である。一部の実施形態において、欠失は、非フレームシフト欠失である。一部の実施形態において、欠失は、細胞毒性又は細胞死（例えば、アポトーシス）につながる。

【０８１８】

一部の実施形態において、変異体二元複合体（例えば、親ポリペプチドと比較してターゲティング部分との複合体形成の増加を呈する変異体二元複合体）は、Ｂ２Ｍに本明細書に記載される欠失を生じさせるＤＮＡ切断を誘導する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、表２２のｃｒＲＮＡを含む。Ｂ２Ｍにおけるインデル活性を図８に示し、Ｂ２Ｍ発現の低下を図９に示す。実施例１３を参照されたい。

【０８１９】

一部の実施形態において、変異体二元複合体（例えば、親ポリペプチドと比較してター

ゲティング部分との複合体形成の増加を呈する変異体二元複合体）は、ＴＲＡＣに本明細書に記載される欠失を生じさせるＤＮＡ切断を誘導する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、表２３のｃｒＲＮＡを含む。ＴＲＡＣにおけるインデル活性を図１１Ａに示す。実施例１３を参照されたい。

【０８２０】

一部の実施形態において、変異体二元複合体（例えば、親ポリペプチドと比較してターゲティング部分との複合体形成の増加を呈する変異体二元複合体）は、ＰＤＣＤ１に本明細書に記載される欠失を生じさせるＤＮＡ切断を誘導する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、表２３のｃｒＲＮＡを含む。ＰＤＣＤ１におけるインデル活性を図１２Ａに示す。実施例１３を参照されたい。

【０８２１】

一部の実施形態において、欠失は、遺伝子の突然変異とオーバーラップしている。一部の実施形態において、欠失は、遺伝子内の挿入とオーバーラップしている。例えば、一部の実施形態において、欠失は、遺伝子のリピート伸長を取り除く。一部の実施形態において、欠失は、遺伝子の一方のアレルを破壊する。一部の実施形態において、欠失は、遺伝子の両方のアレルを破壊する。

【０８２２】

一部の実施形態において、欠失は、真核細胞又は原核細胞に誘導される。一部の実施形態において、欠失は、動物細胞、植物細胞若しくは真菌細胞に誘導されるか、又は細胞は、動物細胞、植物細胞若しくは真菌細胞に由来する。一部の実施形態において、欠失は、哺乳類細胞に誘導されるか又は哺乳類細胞に由来する。一部の実施形態において、欠失は、ヒト細胞に誘導されるか又はヒト細胞に由来する。一部の実施形態において、欠失は、初代細胞に誘導される。一部の実施形態において、欠失は、細胞株に誘導される。一部の実施形態において、欠失は、Ｔ細胞に誘導される。一部の実施形態において、欠失は、幹細胞（例えば、全能性（ｔｏｔｉｐｏｔｅｎｔ）／全能性（ｏｍｎｉｐｏｔｅｎｔ）幹細胞、多能性幹細胞、複能性幹細胞、少能性幹細胞若しくは単能性幹細胞）、分化細胞又は最終分化細胞に誘導される。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、細胞に本明細書に記載される欠失を生じさせるＤＮＡ切断を選択的に誘導する（例えば、変異体二元複合体は非標的変異体三元複合体を形成しないか、又は変異体二元複合体は、親二元複合体と比較して高いオフターゲット欠失に対するオンターゲット欠失の比を生じさせるＤＮＡ切断を誘導する。一部の実施形態において、本明細書に記載される欠失は、非修飾細胞と比較して、変異体二元複合体によって誘導される追加の欠失を欠く細胞に誘導される。例えば、一部の実施形態において、本明細書に記載される欠失は、非修飾細胞と比較して、約１０ヌクレオチド長より長い又はそれよりも短い追加の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド誘導性欠失（例えば、約４０、３０、２５、２０、１５、１０、９、８、７、６、５、４又は３ヌクレオチド長の追加の欠失）を欠く細胞に誘導される。一部の実施形態において、欠失は、非修飾細胞と比較して、約１０ヌクレオチド長より長い又はそれよりも短いＣａｓ１２ｉ２ポリペプチド誘導性挿入（例えば、約１０、９、８、７、６、５、４、３、２又は１ヌクレオチド長の挿入）を欠く細胞に誘導される。一部の実施形態において、２つ以上の（例えば、マルチプレックス化された標的化欠失）欠失が誘導される。

【０８２３】

一部の態様において、本明細書に記載される本発明は、細胞において欠失を達成する方法を含み、ここで、この方法は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを細胞のＤＮＡと接触させることを含む。

【０８２４】

一部の態様において、本明細書に記載される本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ターゲティング部分と、細胞とを含む組成物又は製剤を包含する。

【０８２５】

調製

一部の実施形態において、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、（ａ）本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを産生する細菌を培養すること、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを単離すること、任意選択で、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを精製すること及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをＲＮＡガイドと複合体化することによって調製し得る。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、（ｂ）公知の遺伝子工学技術、具体的には細菌から本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードする遺伝子を単離すること、組換え発現ベクターを構築すること及び次にＲＮＡガイドを発現する適切な宿主細胞にそのベクターを移入することであって、組換えタンパク質が発現すると、それが宿主細胞においてＲＮＡガイドと複合体化することによっても調製され得る。代わりに、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、（ｃ）インビトロ共役転写－翻訳システム及び次にＲＮＡガイドとの複合体化によって調製し得る。本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの調製に使用し得る細菌は、それが本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを産生できる限り、特に限定されない。細菌の一部の非限定的な例としては、本明細書に記載される大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞が挙げられる。

【０８２６】

ベクター

本発明は、本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの発現用ベクターを提供するか、又は本明細書に記載される変異体をコードする核酸がベクターに取り込まれ得る。一部の実施形態において、本発明のベクターは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態において、本発明のベクターは、本変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【０８２７】

本発明は、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物の調製に使用され得るベクターも提供する。一部の実施形態において、本発明は、細胞に本明細書に記載される組成物又はベクターを含む。一部の実施形態において、本発明は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを含む組成物又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするベクター若しくは核酸を細胞において発現させる方法を含む。この方法は、組成物、例えば、ベクター又は核酸を提供するステップ及び組成物を細胞に送達するステップを含み得る。

【０８２８】

天然又は合成ポリヌクレオチドの発現は、典型的には、目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチド、例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列をプロモーターに作動可能に連結し、且つそのコンストラクトを発現ベクターに取り込むことによって実現する。発現ベクターは、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをそれが含み、且つ真核細胞における複製及び組込みに好適であり得る限りは、特に限定されない。

【０８２９】

典型的な発現ベクターは、転写及び翻訳ターミネーター、開始配列及び所望のポリヌクレオチドの発現に有用なプロモーターを含む。例えば、ＲＮＡポリメラーゼ用の認識配列を担持するプラスミドベクター（ｐＳＰ６４、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ等）が使用され得る。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するものを含むベクターは、長期にわたる安定した組込み、トランス遺伝子の安定した組込み及び娘細胞におけるその伝播が可能であるため、長期遺伝子導入の実現に好適なツールである。ベクターの例としては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター及びシーケンシングベクターが挙げられる。発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。

【０８３０】

ウイルスベクター技術は、当技術分野において周知であり、種々のウイルス学及び分子生物学マニュアルに記載されている。ベクターとして有用であるウイルスとしては、限定はされないが、ファージウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及びレンチウイルスが挙げられる。一般に、好適なベクターは、少

なくとも１つの生物で機能する複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位及び１つ以上の選択可能なマーカーを有する。

【０８３１】

ベクターの種類は特に限定されず、宿主細胞で発現することのできるベクターを適切に選択することができる。更に具体的に言えば、宿主細胞の種類に応じて、ポリヌクレオチドからの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの発現を確実にするプロモーター配列が適切に選択され、このプロモーター配列及びポリヌクレオチドが、発現ベクターの調製のため、様々なプラスミド等のいずれかに挿入される。

【０８３２】

追加のプロモーターエレメント、例えば、配列を亢進させるものは、転写開始頻度を調節する。典型的には、これらは開始部位の３０～１１０ｂｐ上流の領域に位置するが、最近になって、幾つものプロモーターが開始部位の下流にも同様に機能エレメントを有することが示されている。プロモーターに応じて、転写を活性化させるために個別のエレメントが協働的又は独立に機能し得るように見える。

【０８３３】

更に、本開示は、構成的プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターも本開示の一部として企図される。誘導性プロモーターの使用は、それが作動可能に連結されているポリヌクレオチド配列の発現を、かかる発現が所望されるときにオンにするか、又は発現が所望されないときに発現をオフにする能力を有する分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例としては、限定はされないが、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター及びテトラサイクリンプロモーターが挙げられる。

【０８３４】

導入されることになる発現ベクターは、ウイルスベクターを通じたトランスフェクション又は感染が求められる細胞集団からの発現細胞の同定及び選択を促進するため、選択可能なマーカー遺伝子又はレポーター遺伝子のいずれか一方又は両方も有し得る。他の態様において、選択可能なマーカーは別々のＤＮＡ片に担持され、コトランスフェクション手順で使用され得る。選択可能なマーカー及びレポーター遺伝子の両方に、宿主細胞における発現を可能にするため適切な転写制御配列が隣接し得る。かかるマーカーの例としては、真核細胞培養用のジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子並びに大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）及び他の細菌の培養用のテトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。かかる選択マーカーの使用により、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に移入され、次に支障なく発現したかどうかを確かめることができる。

【０８３５】

組換え発現ベクターの調製方法は特に限定されず、その例としては、プラスミド、ファージ又はコスミドを使用した方法が挙げられる。

【０８３６】

発現方法

本発明は、本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを翻訳することを含む、タンパク質発現方法を含む。

【０８３７】

一部の実施形態では、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの発現に、本明細書に記載される宿主細胞が使用される。宿主細胞は特に限定されず、好ましくは様々な公知の細胞を使用することができる。宿主細胞の具体的な例としては、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）などの細菌、酵母（出芽酵母、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）及び分裂酵母、シゾサッカロマイセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ））、線虫（カエノラブディティス・エレガンス（Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ ｅｌｅｇａｎｓ））、アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ）卵母細胞及び動物細胞（例えば、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞及びＨ

ＥＫ２９３細胞）が挙げられる。上記に記載される発現ベクターを宿主細胞に移入する方法、即ち形質転換方法は、特に限定されず、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、リポソーム法及びＤＥＡＥデキストラン法など、公知の方法を用いることができる。

【０８３８】

宿主を発現ベクターで形質転換した後、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの産生のため、宿主細胞を培養、育成又は育種し得る。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの発現後、従来の方法（例えば、ろ過、遠心、細胞破壊、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等）に従い宿主細胞を収集し、培養物から変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを精製することなどを行い得る。

【０８３９】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド発現方法は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの少なくとも５アミノ酸、少なくとも１０アミノ酸、少なくとも１５アミノ酸、少なくとも２０アミノ酸、少なくとも５０アミノ酸、少なくとも１００アミノ酸、少なくとも１５０アミノ酸、少なくとも２００アミノ酸、少なくとも２５０アミノ酸、少なくとも３００アミノ酸、少なくとも４００アミノ酸、少なくとも５００アミノ酸、少なくとも６００アミノ酸、少なくとも７００アミノ酸、少なくとも８００アミノ酸、少なくとも９００アミノ酸又は少なくとも１０００アミノ酸の翻訳を含む。一部の実施形態において、タンパク質発現方法は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの約５アミノ酸、約１０アミノ酸、約１５アミノ酸、約２０アミノ酸、約５０アミノ酸、約１００アミノ酸、約１５０アミノ酸、約２００アミノ酸、約２５０アミノ酸、約３００アミノ酸、約４００アミノ酸、約５００アミノ酸、約６００アミノ酸、約７００アミノ酸、約８００アミノ酸、約９００アミノ酸、約１０００アミノ酸又はそれを超える翻訳を含む。

【０８４０】

宿主細胞における成熟変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの産生レベルの決定には、種々の方法を用いることができる。かかる方法としては、限定はされないが、例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体のいずれか又は本明細書の他の部分に記載されるとおりの標識タグを利用する方法が挙げられる。例示的方法としては、限定はされないが、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＭＡ）、蛍光イムノアッセイ（ＦＩＡ）及び蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）が挙げられる。これら及び他のアッセイについては、当技術分野において周知である（例えば、Ｍａｄｄｏｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１５８：１２１１［１９８３］を参照されたい）。

【０８４１】

本開示は、細胞における変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドのインビボ発現方法であって、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするポリリボヌクレオチドを宿主細胞に提供することであって、ポリリボヌクレオチドが変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードすること、細胞において変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを発現させること及び細胞から変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを入手することを含む方法を提供する。

【０８４２】

変化又は突然変異の導入

１つ又は複数の変異体ポリペプチドをコードする核酸配列は、当技術分野において公知の合成方法によって作成され得る。親ポリペプチドをコードする核酸配列それ自体をフレームワークとして使用すると、変化又は突然変異を一度に１つ以上挿入して、親ポリペプチドをコードする核酸配列を変化させることができる。同じように、ポリペプチド配列が合成的に合成されるときにそこに変更を導入することにより、親ポリペプチドを変化又は突然変異させ得る。これは、当技術分野において周知の方法によって達成し得る。

【０８４３】

親ポリペプチド配列への変化又は突然変異の作製及び導入は、当業者に公知の任意の方法を用いて達成することができる。詳細には、一部の実施形態において、ＰＣＲ用のオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより、変異体ポリペプチドをコードする核酸配

列に１つ以上の変化又は突然変異を含むＤＮＡ鋳型を迅速合成し得る。部位特異的突然変異誘発も、個別のペプチド又は生物学的に機能性の同等のタンパク質若しくはペプチドを、基礎をなすＤＮＡの特異的突然変異誘発を通して調製するのに有用な技法として用いられ得る。この技法は、ヌクレオチド配列の１つ以上の変更をＤＮＡに導入することにより、前述の考慮点の１つ以上を取り入れた、変異体を容易に調製及び試験する能力を更に提供する。部位特異的突然変異誘発は、所望の突然変異のＤＮＡ配列並びに十分な数の隣接ヌクレオチドをコードする特異的オリゴヌクレオチド配列を用いた変異体の作製を可能にし、横断される欠失接合部が両側に安定した二重鎖を形成するのに十分なサイズ及び配列の複雑さのプライマー配列を提供する。典型的には、変化させる配列の接合部の両側に約５～１０残基がある、約１７～２５ヌクレオチド長のプライマーが好ましい。

【０８４４】

アミノ末端及び／又はカルボキシル末端伸長部としてのポリペプチドの融合など、構造的変異の導入も、親ポリペプチドへの変化又は突然変異の導入と同様に達成することができる。親ポリペプチド又は変異体ポリペプチドをコードする核酸配列に、追加のペプチドをコードする適切な核酸配列を含めることにより、親ポリペプチド又は変異体ポリペプチドに追加のペプチドが加えられ得る。任意選択で、追加のペプチドは、合成ポリペプチドの作製を通じて変異体ポリペプチドに直接付加され得る。

【０８４５】

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、親ポリペプチドと比較して、標的核酸の２つ以上の遺伝子座（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９個又はそれを超える）とのオンターゲット結合の増加を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを作製する方法も提供する。

【０８４６】

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、複数の別個のＲＮＡガイドと個別に複合体化したとき、複数の親ポリペプチド及びＲＮＡガイドと比較して、標的核酸の２つ以上の遺伝子座とのオンターゲット結合の増加を示す複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、同じアミノ酸配列を有する別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）を作製する方法も提供する。

【０８４７】

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、親ポリペプチドと比較して、標的核酸の２つ以上の標的遺伝子座とのオンターゲット三元複合体形成の増加を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを作製する方法も提供する。

【０８４８】

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、複数の別個のＲＮＡガイドと個別に複合体化したとき、複数の親ポリペプチド及びＲＮＡガイドと比較して、標的核酸の２つ以上の遺伝子座との三元複合体形成の増加を示す複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、同じアミノ酸配列を有する別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）を作製する方法も提供する。

【０８４９】

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、親ポリペプチドと比較して、標的化する標的核酸又は標的遺伝子座の数の増加を呈するＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドを作製する方法も提供する。

【０８５０】

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、複数の親ポリペプチド及びＲＮＡガイドと比較して、複数の別個のＲＮＡガイドと個別に複合体化したとき、標的化する標的核酸又は標的遺伝子座の数の増加を呈する複数の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（例えば、同じアミノ酸配列を有する別々の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド）を作製する方法も提供する。

【０８５１】

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの安定性を亢進させる方法も提供する。Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの安定性は、熱変性アッセイ、サーマルシフトアッセイ、示差走査熱量測定法（ＤＳＣ）、示差走査型蛍光定量法（ＤＳＦ）、等温滴定熱量測定法（ＩＴＣ）、パルスチェイス法、ブリーチチェイス法、シクロヘキシミドチェイス法、円偏光二色性（ＣＤ）分光法、結晶化及び蛍光ベースの活性アッセイによって決定することができるか又はそれを含み得るが、これらに限定されるものではない。

【０８５２】

機能性に関する変異体選択

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、二元複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を亢進させる方法を提供する。

【０８５３】

ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、三元複合体形成、オンターゲット結合親和性、オンターゲット結合活性、オンターゲット結合及び／又はオンターゲット結合特異性を亢進させる方法も提供する。ある態様において、本発明は、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、二元複合体（例えば、リボ核タンパク質）のオンターゲット結合親和性（例えば、親和性又は標的と相互作用するまでにかかる時間）、オンターゲット結合活性（例えば、標的と相互作用しているときのエフェクター活性）、オンターゲット結合（例えば、標的との相互作用の強度）及び／又はオンターゲット結合特異性（例えば、特定の標的に対する優先度）を亢進させる方法も提供する。

【０８５４】

一部の実施形態において、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、オンターゲット結合及び／又は活性の増加を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。また、かかる実施形態では、親ポリペプチドと比較して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドにおけるオフターゲット結合及び／又は活性も減少し得る。更に、オンターゲット結合対オフターゲット結合に関して特異性の増加又は減少があり得る。

【０８５５】

一部の実施形態において、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、ＲＮＡガイドと複合体化したとき、オンターゲット結合の増加を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。また、かかる実施形態では、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとを含む複合体におけるオフターゲット結合も減少し得る。更に、オンターゲット結合／活性対オフターゲット結合／活性に関して特異性の増加又は減少があり得る。

【０８５６】

特定の実施形態において、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を亢進させる変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。特定の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、安定性及び／又はＲＮＡ相互作用並びに変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性を促進する少なくとも１つの変化を含む。

【０８５７】

特定の実施形態において、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、（ａ）酵素活性を欠いているが、しかし（ｂ）亢進した安定性及び／又はタンパク質－ＲＮＡ相互作用を保持している変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。特定の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、安定性及び／又はＲＮＡ相互作用を促進するが、しかし変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性を促進しない少なくとも１つの変化を含む。

【０８５８】

特定の実施形態において、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することによ

り、（ａ）酵素活性を亢進させ、且つ（ｂ）二元複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を亢進させる変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。特定の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、ＲＮＡガイド複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性並びに変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性を促進する少なくとも１つの変化を含む。

【０８５９】

特定の実施形態において、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、（ａ）酵素活性を欠いているが、しかし（ｂ）亢進した二元複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を保持している変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。特定の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、二元複合体形成、ＲＮＡガイド結合活性及び／又はＲＮＡガイド結合特異性を促進するが、しかし変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性を促進しない少なくとも１つの変化を含む。

【０８６０】

特定の実施形態において、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、（ａ）酵素活性を亢進させ、且つ（ｂ）オンターゲット三元複合体形成、オンターゲット結合親和性、オンターゲット結合活性及び／又はオンターゲット結合特異性を亢進させる変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。特定の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット三元複合体形成、オンターゲット結合親和性、オンターゲット結合活性及び／又はオンターゲット結合特異性並びに変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性を促進する少なくとも１つの変化を含む。

【０８６１】

特定の実施形態において、親ポリペプチド配列に変化又は突然変異を導入することにより、（ａ）酵素活性を欠いているが、しかし（ｂ）亢進したオンターゲット三元複合体形成、オンターゲット結合親和性、オンターゲット結合活性及び／又はオンターゲット結合特異性を保持している変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。特定の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、オンターゲット三元複合体形成、オンターゲット結合親和性、オンターゲット結合活性及び／又はオンターゲット結合特異性を促進するが、しかし変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの酵素活性を促進しない少なくとも１つの変化を含む。

【０８６２】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）ＲＮＡ親和性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）ＲＮＡ親和性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）ＲＮＡ親和性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８６３】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）二元複合体形成の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部

の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）二元複合体形成の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）二元複合体形成の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８６４】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）ＲＮＡガイド結合活性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）ＲＮＡガイド結合活性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）ＲＮＡガイド結合活性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８６５】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）ＲＮＡガイド結合特異性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）ＲＮＡガイド結合特異性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）ＲＮＡガイド結合特異性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８６６】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）タンパク質－ＲＮＡ相互作用の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）タンパク質－ＲＮＡ相互作用の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活

性の保持及び（ｂ）タンパク質－ＲＮＡ相互作用の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８６７】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）タンパク質安定性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）タンパク質安定性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）タンパク質安定性の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８６８】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）ＲＮＡガイドからの解離の減少を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）ＲＮＡガイドからの解離の減少を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）ＲＮＡガイドからの解離の減少を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８６９】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）三元複合体形成の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）三元複合体形成の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２の親ポリペプチドと比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）三元複合体形成の亢進を呈する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を

含む。

【０８７０】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）標的核酸に対する結合親和性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）標的核酸に対する結合親和性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）標的核酸に対する結合親和性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８７１】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）オンターゲット結合活性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）オンターゲット結合活性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）オンターゲット結合活性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８７２】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）オンターゲット結合特異性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）オンターゲット結合特異性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）オンターゲット結合特異性の亢進を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含

む。

【０８７３】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）非標的核酸へのオフターゲット結合の減少を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）非標的核酸へのオフターゲット結合の減少を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）非標的核酸へのオフターゲット結合の減少を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８７４】

一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の減少及び（ｂ）標的核酸からの解離の減少を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の増加及び（ｂ）標的核酸からの解離の減少を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、配列番号２の親ポリペプチドに少なくとも１つの変化が導入されることにより、配列番号２のポリペプチドを含む親二元複合体と比べて、（ａ）酵素活性の保持及び（ｂ）標的核酸からの解離の減少を呈する変異体二元複合体を形成する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドが作製される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの特徴を有する変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、配列番号３～１４６及び４９５～５１２のいずれか１つと少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０８７５】

変異体二元複合体化

概して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとは約１：１のモル比で互いに結合して変異体二元複合体を形成する。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及びＲＮＡガイドは、単独又は一緒のいずれでも、天然には存在しない。

【０８７６】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを宿主細胞で過剰発現させて、本明細書に記載されるとおり精製し、次にＲＮＡガイドと（例えば、試験管内で）複合体化することにより、変異体エフェクターＲＮＰ（例えば、変異体二元複合体）を形成することができる。

【０８７７】

一部の実施形態において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたって標的核酸への結合親和性の増加、オンターゲット結合活性の増加、オンターゲット結合特異性の増加、標的核酸との三元複合体形成の増加及び／又は安定性の増加を呈する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたって非標的核酸へのオフターゲット結合の減少及び／又は標的核酸からの解離の減

少を呈する。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、ある範囲のインキュベーション時間にわたって標的核酸複合体形成、標的核酸活性及び／又は標的核酸特異性の増加を呈する。

【０８７８】

一部の実施形態において、二元複合体の複合体化は、約２０℃～約５５℃の範囲の温度、例えば、約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℃、５０℃又は５５℃のいずれか１つにおいて起こり得る。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたってＲＮＡガイドから解離しないか、又は遊離ＲＮＡに結合しない。一部の実施形態において、二元複合体形成後、変異体エフェクターリボ核タンパク質複合体がＲＮＡガイドを別のＲＮＡに取り替えることはない。

【０８７９】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとは、二元複合体化緩衝液中で複合体化される。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは緩衝液中に貯蔵され、これは、ＲＮＡガイドとの複合体形成のため二元複合体化緩衝液に交換される。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、二元複合体化緩衝液中に貯蔵される。

【０８８０】

一部の実施形態において、二元複合体化緩衝液は、約７．３～８．６の範囲のｐＨを有する。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．３である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．４である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．５である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．６である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．７である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．８である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．９である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．０である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．１である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．２である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．３である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．４である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．５である。一実施形態において、二元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．６である。

【０８８１】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの熱安定性は、ＲＮＡガイドを加えること、例えばＲＮＡガイドを結合することなど、有利に作用する条件下で増加し得る。

【０８８２】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを宿主細胞にて過剰発現させて、ＲＮＡガイドと複合体化した後に、本明細書に記載されるとおり精製することができる。一部の実施形態では、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ又はＤＮＡが細胞に導入され、そのため変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは細胞において発現する。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドを所望の標的核酸へと案内するＲＮＡガイドも、単一のｍＲＮＡ又はＤＮＡコンストラクトから細胞に同時、別々又は逐次的のいずれであれ導入され、従って必要不可欠なリボ核タンパク質複合体が細胞に形成されることになる。

【０８８３】

変異体二元複合体の安定性及び機能性を評価する

本明細書には、特定の実施形態において、最適な変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／

ＲＮＡガイド複合体（本明細書では変異体二元複合体と称される）を同定する方法であって、（ａ）試料中に変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及びＲＮＡガイドを組み合わせて変異体二元複合体を形成すること；（ｂ）変異体二元複合体の値を測定すること；及び（ｃ）変異体二元複合体の値が参照分子の値よりも大きい場合、変異体二元複合体が参照分子より優れていて最適であると決定することを含む方法が提供される。一部の実施形態において、値としては、限定はされないが、安定性測定値（例えば、$T_m$値、熱安定性）、二元複合体形成速度、ＲＮＡガイド結合特異性及び／又は複合体活性を挙げることができる。

【０８８４】

一部の実施形態において、最適な変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体（即ち変異体二元複合体）は、（ａ）試料中に変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及びＲＮＡガイドを組み合わせて変異体二元複合体を形成するステップ；（ｂ）変異体二元複合体の$T_m$値を検出するステップ；及び（ｃ）変異体二元複合体の$T_m$値が参照分子の$T_m$値又は$T_m$参照値より少なくとも８℃高い場合、変異体二元複合体が安定していると決定するステップによって同定される。

【０８８５】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体（即ち変異体二元複合体）の熱安定性を測定するステップを含む方法としては、限定なしに、変異体二元複合体の安定性を決定する方法、安定した変異体二元複合体を促進する条件を決定する方法、安定した変異体二元複合体に関してスクリーニングする方法及び安定した変異体二元複合体を形成するのに最適なｇＲＮＡを同定する方法を挙げることができる。特定の実施形態において、変異体二元複合体の熱安定性値が測定され得る。

【０８８６】

加えて、特定の実施形態において、参照分子の熱安定性値も測定され得る。特定の実施形態において、変異体二元複合体は、変異体二元複合体の測定された熱安定性値が、本明細書に記載されるとおりの、同じ実験条件下で測定された参照分子の測定された熱安定性値又は熱安定性参照値よりも高い場合、安定していると決定され得る。特定の実施形態において、参照分子は、ＲＮＡガイドの存在のない変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドであり得る。

【０８８７】

特定の実施形態において、測定される熱安定性値は、変性温度値であり得る。これらの実施形態では、熱安定性参照値は、変性温度参照値である。特定の実施形態において、測定される熱安定性値は、$T_m$値であり得る。これらの実施形態では、熱安定性参照値は、$T_m$参照値であり得る。特定の実施形態において、熱安定性値は、サーマルシフトアッセイを用いて測定され得る。特定の実施形態において、熱安定性の測定に使用されるアッセイには、限定はされないが、熱変性アッセイ、サーマルシフトアッセイ、示差走査熱量測定法（ＤＳＣ）、示差走査型蛍光定量法（ＤＳＦ）、等温滴定熱量測定法（ＩＴＣ）、パルスチェイス法、ブリーチチェイス法、シクロヘキシミドチェイス法、円偏光二色性（ＣＤ）分光法、結晶化及び蛍光ベースの活性アッセイを含めた、本明細書に記載される技法が関わり得る。

【０８８８】

特定の実施形態において、変異体二元複合体の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体形成速度、ＲＮＡガイド結合特異性及び／又は複合体活性が参照分子の値又は参照値（例えば、親ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体（本明細書では親二元複合体と称される）の値）よりも高い場合、変異体二元複合体が同定され得る。例えば、特定の実施形態において、変異体二元複合体の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体形成速度、ＲＮＡガイド結合特異性及び／又は複合体活性の値が参照分子の値又は参照値（例えば、親二元複合体の値）よりも少なくともＸ％高い場合、変異体二元複合体が同定され得る。特定の実施形態において、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載されるとおり、変異体二元複合体の活性を測定することを含むステップを更に含み

得る。
【０８８９】
変異体三元複合体化
一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とは、変異体三元複合体を（例えば、試験管内又は細胞にて）形成する。概して、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とは、約１：１：１のモル比で互いに会合して変異体三元複合体を形成する。変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、ＲＮＡガイド及び標的核酸は、単独又は一緒のいずれでも、天然には存在しない。
【０８９０】
一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの変異体二元複合体（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドとＲＮＡガイドとの複合体）は、標的核酸と（例えば、試験管内又は細胞にて）更に複合体化されて、変異体三元複合体を形成する。
【０８９１】
一部の実施形態において、三元複合体の複合体化は、約２０℃～約５５℃の範囲の温度、例えば、約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℃、５０℃又は５５℃のいずれか１つで起こる。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、約３７℃で少なくとも約１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、１時間、２時間、３時間、４時間又はそれを超える時間数のいずれか１つのインキュベーション時間にわたって標的核酸から解離しないか、又は遊離核酸（例えば、遊離ＤＮＡ）に結合しない。一部の実施形態において、三元複合体形成後、変異体二元複合体が標的核酸を別の核酸に取り替えることはない。
【０８９２】
一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、ＲＮＡガイド及び標的核酸は、三元複合体化緩衝液中で複合体化される。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは緩衝液中に貯蔵され、これは、ＲＮＡガイド及び標的核酸との複合体形成のため三元複合体化緩衝液に交換される。一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、三元複合体化緩衝液中に貯蔵される。
【０８９３】
一部の実施形態において、変異体二元複合体及び標的核酸は、三元複合体化緩衝液中で複合体化される。一部の実施形態において、変異体二元複合体は緩衝液中に貯蔵され、これは、標的核酸との複合体形成のため三元複合体化緩衝液に交換される。一部の実施形態において、変異体二元複合体は、三元複合体化緩衝液中に貯蔵される。
【０８９４】
一部の実施形態において、三元複合体化緩衝液は、約７．３～８．６の範囲のｐＨを有する。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．３である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．４である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．５である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．６である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．７である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．８である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約７．９である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．０である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．１である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．２である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．３である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．４である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．５である。一実施形態において、三元複合体化緩衝液のｐＨは、約８．６である。
【０８９５】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの熱安定性は、ＲＮＡガイド及び標的核酸を加えることなど、有利に作用する条件下で増加し得る。

【０８９６】

変異体三元複合体安定性及び機能性を評価する

本明細書には、特定の実施形態において、最適な変異体三元複合体を同定する方法であって、（ａ）変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを試料中に組み合わせて変異体三元複合体を形成すること；（ｂ）変異体三元複合体の値を測定すること；及び（ｃ）変異体三元複合体の値が参照分子の値よりも大きい場合、変異体三元複合体が参照分子より優れていて最適であると決定することが提供される。一部の実施形態において、値としては、限定はされないが、安定性測定値（例えば、$T_m$値、熱安定性）、三元複合体形成速度、ＤＮＡ結合親和性測定値、ＤＮＡ結合特異性測定値及び／又は複合体活性測定値（例えば、ヌクレアーゼ活性測定値）を挙げることができる。

【０８９７】

一部の実施形態において、最適な変異体三元複合体は、（ａ）変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドと、ＲＮＡガイドと、標的核酸とを試料中に組み合わせて変異体三元複合体を形成するステップ；（ｂ）変異体三元複合体の$T_m$値を検出するステップ；及び（ｃ）変異体三元複合体の$T_m$値が参照分子の$T_m$値又は$T_m$参照値より少なくとも８℃高い場合、変異体三元複合体が安定していると決定するステップによって同定される。

【０８９８】

変異体三元複合体の熱安定性を測定するステップを含む方法としては、限定なしに、変異体三元複合体の安定性を決定する方法、安定した変異体三元複合体を促進する条件を決定する方法、安定した変異体三元複合体に関してスクリーニングする方法及び最適な二元複合体を同定して安定した変異体三元複合体を形成する方法を挙げることができる。特定の実施形態において、変異体三元複合体の熱安定性値が測定され得る。

【０８９９】

加えて、特定の実施形態において、参照分子の熱安定性値も測定され得る。特定の実施形態において、変異体三元複合体の測定された熱安定性値が、本明細書に記載されるとおりの、同じ実験条件下で測定された参照分子の測定された熱安定性値又は熱安定性参照値よりも高い場合、変異体三元複合体は安定していると決定され得る。特定の実施形態において、参照分子は、ＲＮＡガイド及び／又は標的核酸の存在のない変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドであり得る。

【０９００】

特定の実施形態において、測定される熱安定性値は、変性温度値であり得る。これらの実施形態では、熱安定性参照値は、変性温度参照値である。特定の実施形態において、測定される熱安定性値は、$T_m$値であり得る。これらの実施形態では、熱安定性参照値は、$T_m$参照値であり得る。特定の実施形態において、熱安定性値は、サーマルシフトアッセイを用いて測定され得る。特定の実施形態において、熱安定性の測定に使用されるアッセイには、限定はされないが、示差走査型蛍光定量法（ＤＳＦ）、示差走査熱量測定法（ＤＳＣ）又は等温滴定熱量測定法（ＩＴＣ）を含めた、本明細書に記載される技法が関わり得る。

【０９０１】

特定の実施形態において、変異体三元複合体の三元複合体形成、ＤＮＡ結合親和性速度、ＤＮＡ結合特異性及び／又は複合体活性（例えば、ヌクレアーゼ活性）が参照分子の値又は参照値（例えば、親三元複合体の値）よりも高い場合、変異体三元複合体が同定され得る。例えば、特定の実施形態において、変異体三元複合体の三元複合体形成速度、ＤＮＡ結合親和性、ＤＮＡ結合特異性及び／又は複合体活性の値が参照分子の値又は参照値（例えば、親三元複合体の値）よりも少なくともＸ％高い場合、変異体三元複合体が同定され得る。特定の実施形態において、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載されるとおりの変異体三元複合体の活性を測定することを含むステップを更に含み得る。

【０９０２】

送達

本明細書に記載される組成物又は複合体は、例えば、担体及び／又はポリマー担体、例えばリポソームなどの担体を含め、製剤化され、公知の方法によって細胞（例えば、原核生物、真核生物、植物、哺乳類等のもの）に送達され得る。かかる方法としては、限定はされないが、トランスフェクション（例えば、脂質媒介性、カチオン性ポリマー、リン酸カルシウム、デンドリマー）；エレクトロポレーション又は他の膜破壊方法（例えば、ヌクレオフェクション）、ウイルス送達（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、ＡＡＶ）、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクタイルボンバードメント（「遺伝子銃」）、フュージェン、ダイレクトソニックローディング、セルスクイージング、光トランスフェクション、プロトプラスト融合、インペールフェクション、マグネトフェクション、エキソソーム媒介性トランスファー、脂質ナノ粒子媒介性トランスファー及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【０９０３】

一部の実施形態において、本方法は、１つ以上の核酸（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、ＲＮＡガイド、ドナーＤＮＡ等をコードする核酸）、その１つ以上の転写物及び／又は予め形成された変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体（即ち変異体二元複合体）を細胞に送達することを含む。例示的細胞内送達方法としては、限定はされないが、ウイルス又はウイルス様薬剤；リン酸カルシウム、デンドリマー、リポソーム又はカチオン性ポリマー（例えば、ＤＥＡＥ－デキストラン又はポリエチレンイミン）を使用するものなど、化学ベースのトランスフェクション方法；マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、セルスクイージング、ソノポレーション、光トランスフェクション、インペールフェクション、プロトプラスト融合、細菌接合、プラスミド又はトランスポゾンの送達など、非化学的方法；遺伝子銃、マグネトフェクション又は磁石補助型トランスフェクション、パーティクルボンバードメントを用いるなど、粒子ベースの方法；及びヌクレオフェクションなどのハイブリッド方法が挙げられる。一部の実施形態において、本願は、かかる方法によって作製される細胞及びかかる細胞を含むか又はそれから作製される生物（動物、植物又は真菌など）を更に提供する。

【０９０４】

細胞

本明細書に記載される組成物又は複合体は、種々の細胞に送達され得る。一部の実施形態において、細胞は、単離細胞である。一部の実施形態において、細胞は、細胞培養物中にある。一部の実施形態において、細胞は、エキソビボである。一部の実施形態において、細胞は生体から入手され、細胞培養物中に維持される。一部の実施形態において、細胞は単細胞生物である。

【０９０５】

一部の実施形態において、細胞は、原核細胞である。一部の実施形態において、細胞は、細菌細胞であるか又は細菌細胞に由来する。一部の実施形態において、細菌細胞は、親ポリペプチドの由来である細菌種に関係がない。一部の実施形態において、細胞は、古細菌細胞であるか又は古細菌細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞は、真核細胞である。一部の実施形態において、細胞は、植物細胞であるか又は植物細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞は、真菌細胞であるか又は真菌細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞は、動物細胞であるか又は動物細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞は、無脊椎動物細胞であるか又は無脊椎動物細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞は、脊椎動物細胞であるか又は脊椎動物細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞は、哺乳類細胞であるか又は哺乳類細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞は、ヒト細胞である。一部の実施形態において、細胞は、ゼブラフィッシュ細胞である。一部の実施形態において、細胞は、げっ歯類細胞である。一部の実施形態において、細胞は、ときに人工細胞と呼ばれることもある、合成的に作られたものである。

【０９０６】

一部の実施形態において、細胞は、細胞株に由来する。組織培養用の多種多様な細胞株

が当技術分野において公知である。細胞株の例としては、限定はされないが、２９３Ｔ、ＭＦ７、Ｋ５６２、ＨｅＬａ及びこれらのトランスジェニック変種が挙げられる。細胞株は、当業者に公知の種々の供給源から利用可能である（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓａｓ、Ｖａ．）を参照されたい）。一部の実施形態において、１つ以上の核酸（Ａｇｏコードベクター及びｇＤＮＡなど）又は本明細書に記載されるＡｇｏ－ｇＤＮＡ複合体をトランスフェクトした細胞を使用して、標的核酸に修飾を含む新規細胞株を構築するため１つ以上のベクター由来の配列を含む新規細胞株が構築される。一部の実施形態において、１つ以上の核酸（変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするベクター及びＲＮＡガイドなど）又は本明細書に記載される変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体（即ち変異体二元複合体）が一過性に又は非一過性にトランスフェクトされた細胞又はかかる細胞に由来する細胞株は、１つ以上の試験化合物の評価において使用される。

【０９０７】

一部の実施形態において、細胞は、初代細胞である。例えば、初代細胞の培養物を０回、１回、２回、４回、５回、１０回、１５回又はそれを超えて継代することができる。一部の実施形態において、初代細胞は、任意の公知の方法によって個体から採取される。例えば、白血球は、アフェレーシス、白血球アフェレーシス、密度勾配分離等によって採取され得る。皮膚、筋肉、骨髄、脾臓、肝臓、膵臓、肺、腸、胃などの組織からの細胞は、生検によって採取することができる。採取された細胞の分散又は懸濁には、適切な溶液が用いられ得る。かかる溶液は、概して、低濃度の許容可能な緩衝液と併せた、好都合にはウシ胎仔血清又は他の天然に存在する因子を補足した平衡塩類溶液（例えば標準生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、ハンクス平衡塩類溶液等）であり得る。緩衝液には、ＨＥＰＥＳ、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液等が含まれ得る。細胞は、直ちに使用され得るか、又は細胞は、（例えば、凍結することにより）貯蔵され得る。凍結細胞は解凍することができ、再使用可能なものであり得る。細胞は、ＤＭＳＯ、血清、培地緩衝液（例えば、１０％ＤＭＳＯ、５０％血清、４０％緩衝培地）及び／又は細胞を凍結温度で保存するために使用される他の何らかのかかる一般的な溶液中に凍結され得る。

【０９０８】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドは、標的核酸（例えばゲノムＤＮＡ）に二本鎖切断又は一本鎖切断を誘導するヌクレアーゼ活性を有する。二本鎖切断は、相同性依存的組換え（ＨＤＲ）、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）又は代替的非相同末端結合（Ａ－ＮＨＥＪ）を含め、細胞の内因性ＤＮＡ修復経路を刺激し得る。ＮＨＥＪは、相同な鋳型の必要性なしに切断された標的核酸を修復することができる。そのため、標的核酸中に１つ以上のヌクレオチドの欠失又は挿入が生じ得る。ＨＤＲは、ドナーＤＮＡなど、相同な鋳型で起こり得る。相同な鋳型は、標的核酸切断部位に隣接する配列に相同な配列を含み得る。ある場合には、ＨＤＲは、切断された標的核酸に外因性ポリヌクレオチド配列を挿入することができる。ＮＨＥＪ及び／又はＨＤＲによる標的ＤＮＡの修飾は、例えば、突然変異、欠失、変化、組込み、遺伝子修正、遺伝子置換、遺伝子タグ付加、トランス遺伝子ノックイン、遺伝子破壊及び／又は遺伝子ノックアウトにつながり得る。

【０９０９】

一部の実施形態において、細胞培養物を同期させると、本方法の効率が亢進する。一部の実施形態において、ＨＤＲ媒介性遺伝子編集には、Ｓ期及びＧ２期の細胞が使用される。一部の実施形態において、どの細胞周期にある細胞でも、本方法に供することができる。一部の実施形態において、細胞がオーバープレーティングになると、本方法の有効性が大幅に低下する。一部の実施形態において、本方法は、約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％又は７０％のいずれか１つ以下のコンフルエンシーで細胞培養物に適用される。

【０９１０】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド／ＲＮＡガイド複合体（

即ち変異体二元複合体）が細胞内の標的核酸に結合すると、１つ以上の内因性細胞分子又はＤＮＡ修復経路以外の経路が動員され、標的核酸が修飾される。一部の実施形態において、変異体二元複合体が結合すると、１つ以上の内因性細胞分子又は経路による標的核酸への接触が遮断され、それにより標的核酸が修飾される。例えば、変異体二元複合体が結合すると、内因性転写又は翻訳機構が遮断され、標的核酸の発現が減少し得る。

【０９１１】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達は、細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない。一部の実施形態において、細胞は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、細胞は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達から少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間又はそれを超えて経過した後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも７０％（例えば、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％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも７０％（例えば、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％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達から少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間又はそれを超えて経過した後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも８０％（例えば、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも８０％（例えば、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達から少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間又はそれを超えて経過した後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドの送達から少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間又はそれを超えて経過した後も生存能力を保っている。

【０９１２】

一部の実施形態において、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達

は、細胞の生存能力に実質的に影響を及ぼさない。一部の実施形態において、細胞は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、細胞は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達から少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間又はそれを超えて経過した後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも７０％（例えば、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％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも７０％（例えば、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％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達から少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間又はそれを超えて経過した後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも８０％（例えば、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも８０％（例えば、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達から少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間又はそれを超えて経過した後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達後も生存能力を保っている。一部の実施形態において、複数の細胞中の少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）が、変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、ＲＮＰ）の送達から少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間又はそれを超えて経過した後も生存能力を保っている。

【０９１３】

キット

本発明は、例えば、本明細書に記載される方法を実行するために使用することのできるキットも提供する。一部の実施形態において、キットは、本発明の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド、例えば、表２の置換を含む変異体又は表３の変異体ポリペプチドを含む。一部の実施形態において、キットは、かかる変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、任意選択で、ポリヌクレオチドは、例えば本明細書に記載

されるとおりのベクター内に含まれる。キットは、任意選択で、例えば本明細書に記載されるとおりのＲＮＡガイドを含むこともできる。本発明のキットのＲＮＡガイドは、当技術分野において公知のとおり、目的の配列を標的化するように設計され得る。エフェクター変異体及びＲＮＡガイドは、キット内の同じバイアル若しくは他のベッセル内に包装され得るか、又は別々のバイアル若しくは他のベッセルに包装されて、その内容物が使用前に混合され得るものであり得る。キットは、加えて、任意選択で、緩衝液、及び／又はエフェクター変異体、及び／又はＲＮＡガイドの使用説明書を含むことができる。

【０９１４】

本明細書に引用される参考文献及び刊行物は、全て本明細書によって参照により援用される。

【実施例】

【０９１５】

以下の例は、本発明の一部の実施形態を詳細に例示するために提供されるが、本発明の範囲を限定することを意図されず；その例示的性質から、当業者に公知の他の手順、方法論又は技法が代わりに用いられ得ることが理解されるであろう。

【０９１６】

実施例１　－　Ｃａｓ１２ｉ２変異体コンストラクトの改変

本実施例では、Ｃａｓ１２ｉ２変異体コンストラクトを作成した。

【０９１７】

ＩＤＴに注文した突然変異誘発性フォワード及び突然変異誘発性リバースプライマーを使用して、単一突然変異を含むＤＮＡ鋳型を２段階のＰＣＲステップ（図２）で構築した。最初のステップでは、３８４プレートで２セットのＰＣＲ反応を行い、２つの断片を作成した。２つのＰＣＲ断片のオーバーラップ領域に所望の単一突然変異が含まれ、２回目のＰＣＲでＤＮＡ鋳型全体をアセンブリさせた。２回目のステップでは、最初のステップからの精製した断片をオーバーラップＰＣＲ（ＯＬ　ＰＣＲ）の鋳型として使用し、ベクター骨格にアニーリングするＦｗ及びＲｖオリゴをＯＬ　ＰＣＲプライマーとして使用した。結果として生じた線状ＤＮＡ鋳型には、Ｔ７プロモーター、Ｔ７ターミネーター及びＣａｓ１２ｉ２エフェクターのオープンリーディングフレームが含まれた。

【０９１８】

これらの線状ＤＮＡ鋳型を無細胞転写及び翻訳システムで直接使用して、単一突然変異を有するＣａｓ１２ｉ２エフェクター変異体を発現させた。変異体コンストラクトを更に個別に一過性トランスフェクションベクターに移入させた。加えて、コンビナトリアル突然変異を含むＤＮＡ鋳型をＰＣＲによって調製し、続いて一過性トランスフェクションベクターに移入させた。

【０９１９】

実施例２　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体検出のための蛍光偏光アッセイ

本実施例では、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）及びＲＮＡガイドが二元複合体を形成する能力を蛍光偏光アッセイで評価する。

【０９２０】

成熟Ｃａｓ１２ｉ２ダイレクトリピート配列及び所望の２０ｂｐ　ＲＮＡガイド標的の上流にＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーター配列の逆相補体を含む線状ｓｓＤＮＡ断片が、ＩＤＴによって合成される。次に、逆相補体ｓｓＤＮＡへのユニバーサルＴ７フォワードオリゴのアニーリング（５℃／分で９５～４℃）によって線状ｄｓＤＮＡインビトロ転写（ＩＶＴ）鋳型を作成し、クレノウ断片（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）によって２５℃で１５分間埋める。次に、ＨｉＳｃｒｉｂｅ　Ｔ７高収率ＲＮＡ合成キット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、得られたＩＶＴ鋳型を３７℃で４時間にわたってＲＮＡガイドに転写する。転写後、ＲＮＡ　Ｃｌｅａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒキット（Ｚｙｍｏ）を使用して各ＲＮＡガイドを精製し、使用時まで－２０℃で貯蔵する。

【０９２１】

次にＲＮＡガイドを６－カルボキシフルオレセイン（６－ＦＡＭ）（ＩＤＴ）で標識する。１×アッセイ緩衝液（２０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭ　ＫＣｌ、５ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＤＴＴ）中の２５ｎＭ　Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）を漸増濃度の標識ＲＮＡガイド（７．５～２５０ｎＭ）でタイトレーションする。複合体を３７℃で３０分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー（Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　Ｐｒｏ、Ｔｅｃａｎ）を使用して蛍光偏光測定値を取る。

【０９２２】

種々の温度での二元複合体形成も調べる。上記に記載したとおりの更なる結合実験を等温的に２５、５０、６０及び７０℃で実施する。

【０９２３】

Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）を漸増濃度のＲＮＡガイドでタイトレーションしたときに二元複合体が形成されると（又はＲＮＡガイドを漸増濃度のＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドでタイトレーションしたときに二元複合体が形成されると）、ミリ偏光（ｍＰ）単位で蛍光偏光シグナルの変化が生じる。ある範囲のＲＮＡガイド濃度にわたる蛍光偏光シグナルの変化をプロットすることにより、結合曲線を作成する。

【０９２４】

本実施例は、ＲＮＡガイドに対するＣａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）の結合親和性をどのように決定し、比較することができるかを示している。

【０９２５】

実施例３　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体検出のためのＲＮＡ電気泳動移動度シフトアッセイ

本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体）がＲＮＡガイドに結合する能力を決定するためのＲＮＡ　ＥＭＳＡの使用について記載する。

【０９２６】

以前にＹａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８が詳説したとおり、ＩＤＴからの合成ＲＮＡガイドを5'ＥｎｄＴａｇ標識キット（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ）及びＩＲＤｙｅ　８００ＣＷマレイミド（ＬＩ－ＣＯＲ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して5'ＩＲ８００色素で標識する。標識後、ＲＮＡガイドをクリーニングし、フェノールクロロホルム抽出で濃縮する。濃度はＮａｎｏｄｒｏｐによって定量化される。

【０９２７】

ＲＮＡ結合アッセイ用に、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型Ｃａｓ１２ｉ２又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）を１×結合緩衝液（５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ７．９で２．５μＭに希釈した。次にポリペプチドを１×結合緩衝液中に２．５μＭから３７．５μＭまで段階希釈する。ポリペプチドを再び１×結合緩衝液＋５０ｎＭ　ＩＲ８００標識ＲＮＡガイドに１：１０希釈し、徹底的に混合する。これらの反応物は、０．５～５μｇ　ｔＲＮＡを更に含み得、これは、競合阻害薬としての役割を果たすことにより、ポリペプチドによるＲＮＡへの非特異的結合を減少させて、従って正確な特異的結合決定を促進する。反応物を３７℃で１時間インキュベートする。反応物に、色素の最前線を可視化するための１μＬ　１００×ブロモフェノールブルーを加え、次に反応物全体を６％ＤＮＡ　Ｒｅｔａｒｄａｔｉｏｎ　Ｇｅｌ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）に負荷し、これを８０Ｖで９０分間泳動させる。Ｌｉｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙ　ＣＬｘでゲルを画像化する。

【０９２８】

このアッセイは、ＲＮＡがゲル中を移動する速度がそのサイズによって決まるという原理に頼るものである。ＲＮＡのみの試料は、特定の距離を移動することが可能である。しかしながら、ＲＮＡがポリペプチドに結合する場合、より大きい、移動度の低いＲＮＡ複合体に相当するバンドが現れ、これはゲル上では「上方シフト」する。

【０９２９】
従って、２つのバンド：１）ＲＮＡのみのバンド及び２）ポリペプチドが結合した「上方シフトした」ＲＮＡバンドの強度が測定される。全てのＲＮＡがポリペプチドに結合した場合、上方シフトバンドのみが観察される。ポリペプチドの濃度が減少するにつれ、上方シフトバンドの強度は減少し、一方でＲＮＡのみのバンドの強度は増加する。Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）のＲＮＡ結合親和性の比較では、ポリペプチド／ＲＮＡ親和性が高いほど、低いポリペプチド濃度でも結合の特異性が高くなることによって特徴付けられる。
【０９３０】
本実施例は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２のＲＮＡガイドに対する結合親和性及びＣａｓ１２ｉ２変異体のＲＮＡガイドに対する結合親和性をどのように決定し、比較することができるかを示している。
【０９３１】
実施例４　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体のインビトロ切断アッセイ
本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰの調製方法及びＣａｓ１２ｉ２（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）ＲＮＰのインビトロ生化学的活性の決定方法について記載する。
【０９３２】
Ｃａｓ１２ｉ２ベクターを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１（ＤＥ３）（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）に形質転換し、Ｔ７プロモーター下で発現させる。形質転換細胞を最初に５ｍＬルリアブロス（Ｔｅｋｎｏｖａ）＋５０μｇ／ｍＬカナマイシン中で一晩成長させた後、続いて１Ｌ　Ｔｅｒｒｉｆｉｃブロス培地（Ｔｅｋｎｏｖａ）＋５０μｇ／ｍＬカナマイシンに接種する。細胞を０．６～０．８の$OD_{600}$になるまで３７℃で成長させて、次に０．５ｍＭ　ＩＰＴＧでタンパク質発現を誘導する。次に培養物を１８℃で更に１４～１８時間成長させる。培養物を回収し、遠心によってペレット化し、次に細胞ペレット５ｇ当たり１ｍＬの抽出緩衝液（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、５％グリセロール、０．５ｍＭ　ＴＣＥＰ）に再懸濁する。細胞を細胞破壊器（Ｃｏｎｓｔａｎｔ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｌｉｍｉｔｅｄ）で溶解させて、次に４℃にて２０，０００×ｇで２０分間遠心することによりライセートを清澄化する。清澄化したライセートに０．２％ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を加え、２０分間常に縦回転させながら４℃でインキュベートする。次にライセートを再び２０，０００×ｇで１０分間遠心する。ライセートをイオン交換クロマトグラフィーで精製する。精製後、画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で泳動させて、適切なサイズのタンパク質を含有する画分をプールし、３０ｋＤ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ１５遠心ユニットを使用して濃縮する。１２．５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．０、１２０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．５ｍＭ　ＴＣＥＰ及び５０％グリセロールでタンパク質を緩衝液交換する。次にＮａｎｏｄｒｏｐ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）を使用して濃度を測定し、タンパク質を－２０℃で貯蔵する。
【０９３３】
２：１比の合成ｃｒＲＮＡ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）とタンパク質とを使用してＲＮＰを調製する。ＲＮＰを１×ＮＥＢ２緩衝液（５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ７．９）中にて３７℃で３０分間複合体化させる。複合体化後、１×ＮＥＢ２を希釈緩衝液として使用してＲＮＰを希釈する。ｃｒＲＮＡの容積を$H_2O$で補って、アポ反応物（ＲＮＡガイドのないタンパク質）を同じように調製する。
【０９３４】
ＲＮＰ及びアポ試料に標的ｄｓＤＮＡ基質（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を２０ｎＭで加える。反応物を徹底的に混合し、次に３７℃で１時間インキュベートし、次に１μＬ　２０ｍｇ／ｍＬプロテイナーゼＫ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）でクエンチする。反応物を５０℃で更に１５分間インキュベートし、次に反応物全体を２％アガロースＥ－ｇｅｌ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）上で泳動させる。ＧｅｌＤｏｃ　ＥＺ　Ｇｅｌ　Ｉｍａｇｅｒ（ＢｉｏＲａｄ）でゲルを臭化エチジウムによって

可視化する。
【０９３５】
２種類のバンドの強度が測定される：１）完全長（切断されていない）ＤＮＡバンド及び２）１つ以上の下方シフトした切断されているＤＮＡバンド。不活性なＲＮＰは、完全長ＤＮＡバンドによって特徴付けられる。活性なＲＮＰは、１つ以上の下方シフトした切断されているＤＮＡバンドを生み出す。活性なＲＮＰの濃度が減少するにつれ、完全長バンドの強度が増加し、切断されている１つ又は複数のバンドの強度が減少する。複数のＲＮＰの活性の比較では、他よりも高い活性を有するＲＮＰほど、低いＲＮＰ濃度でも切断されたバンドの強度が高くなることによって特徴付けられる。
【０９３６】
本実施例の方法により、標的ＤＮＡに対する野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（二元複合体）のインビトロ切断活性を比較することが可能となる。
【０９３７】
実施例５　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体のインビトロ安定性アッセイ
本実施例では、Ｃａｓ１２ｉ２（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）ＲＮＰの安定性を評価する。
【０９３８】
加速安定性研究のため、実施例４に記載されるのと同じようにＲＮＰ（５μＭ）を作成し、続いて試料を２５℃で４８時間貯蔵する。
【０９３９】
ＲＮＰ試料に関してインビトロ切断アッセイ（実施例４に記載されるとおり）を実施する。これらの結果を実施例４のものと比較することにより、２５℃で４８時間貯蔵されたＣａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ）がどの程度生化学的活性を保持しているかを決定する。
【０９４０】
アポポリペプチド（ＲＮＡガイドなし）も２５℃で４８時間インキュベートする。アポ試料に対し、実施例３に記載される方法を用いてＲＮＡ　ＥＭＳＡアッセイを実施する。これらの結果を実施例３のものと比較することにより、Ｃａｓ１２ｉ２（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）がどの程度ＲＮＡガイドと二元複合体を形成することが可能であるかを決定する。
【０９４１】
２５℃で４８時間インキュベートしたアポ試料は、実施例４に記載される方法を用いてＲＮＡガイドと複合体化してＲＮＰも形成する。次に、実施例４の方法に従いインビトロ切断アッセイを実施する。アッセイ結果を実施例４のものと比較することにより、２５℃でインキュベートしたタンパク質で形成されたＣａｓ１２ｉ２　ＲＮＰの活性レベルを評価する。
【０９４２】
本実施例の方法により、野生型及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド並びに野生型及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（二元複合体）の安定性を比較することが可能になる。Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドがＲＮＡガイドに対し、そのＲＮＡガイドに対する別のＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドと比べてより高い特異的結合を実証するのは、それがより安定性の高いポリペプチドであることを示している。Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰが、別のＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドによる切断と比べて標的ＤＮＡのよりロバストなインビトロ切断を実証するのは、それがより安定性の高い二元複合体であることを示している。
【０９４３】
実施例６　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２三元複合体検出のための蛍光偏光アッセイ
本実施例では、ＲＮＡガイド、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）及び標的ＤＮＡ分子が三元複合体を形成する能力を蛍光偏光アッセイで評価する。

【０９４４】
成熟Ｃａｓ１２ｉ２ダイレクトリピート配列及び所望の２０ｂｐ　ＲＮＡガイド標的の上流にあるＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーター配列の逆相補体を含む線状ｓｓＤＮＡ断片が、ＩＤＴによって合成される。次に、逆相補体ｓｓＤＮＡへのユニバーサルＴ７フォワードオリゴのアニーリング（５℃／分で９５～４℃）によって線状ｄｓＤＮＡインビトロ転写（ＩＶＴ）鋳型を作成し、クレノウ断片（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）によって２５℃で１５分間埋める。次に、ＨｉＳｃｒｉｂｅ　Ｔ７高収率ＲＮＡ合成キット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、得られたＩＶＴ鋳型を３７℃で４時間にわたってＲＮＡガイドに転写する。転写後、ＲＮＡ　Ｃｌｅａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒキット（Ｚｙｍｏ）を使用して各ＲＮＡガイドを精製し、使用時まで－２０℃で貯蔵する。

【０９４５】
ＲＮＰを作成するため、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）とＲＮＡガイドとを１：１．２のモル比で１×アッセイ緩衝液（２０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭ　ＫＣｌ、５ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＤＴＴ）中に１０μＭ　ＲＮＰの最終モル濃度となるように組み合わせる。これらの成分を３７℃で３０分間インキュベートしてＲＮＰを形成させる。

【０９４６】
Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ）をアッセイ緩衝液中に１μＭのワーキング濃度となるように希釈する。１μＭ～１５．６ｎＭまでの７ポイント２倍希釈液を作成する。Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰを６－ＦＡＭ標識ＤＮＡ標的（ＩＤＴ）と共に３７℃で３０分間インキュベートする。インキュベーション後、マイクロプレートリーダー（Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　Ｐｒｏ、Ｔｅｃａｎ）を使用して蛍光偏光値を測定する。

【０９４７】
三元複合体形成を種々の温度で評価するため、２５、５０、６０及び７０℃の一定温度で上記のプロトコルを繰り返す。

【０９４８】
Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰによる標的ＤＮＡへの結合は、蛍光偏光値の変化によって特徴付けられる。三元複合体の形成は、経時的に見て且つ／又はＣａｓ１２ｉ２濃度の漸増に伴い変化する（例えば、増加又は減少する）ｍＰ単位として観察される。

【０９４９】
本実施例は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰの標的ＤＮＡに対する結合親和性及びＣａｓ１２ｉ２変異体ＲＮＰの標的ＤＮＡに対する結合親和性をどのように決定し、比較することができるかを示している。

【０９５０】
実施例７　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２三元複合体検出のためのＤＮＡ電気泳動移動度シフトアッセイ
本実施例は、ＤＮＡ　ＥＭＳＡを使用した、ＲＮＡガイド、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）及び標的ＤＮＡ基質が三元複合体を形成する能力の決定について記載する。

【０９５１】
Ｃａｓ１２ｉ２ベクターを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１（ＤＥ３）（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）に形質転換し、Ｔ７プロモーター下で発現させた。形質転換細胞を最初に５ｍＬルリアブロス（Ｔｅｋｎｏｖａ）＋５０μｇ／ｍＬカナマイシン中で一晩成長させた後、続いて１Ｌ　Ｔｅｒｒｉｆｉｃブロス培地（Ｔｅｋｎｏｖａ）＋５０μｇ／ｍＬカナマイシンに接種した。細胞を０．６～０．８の$OD_{600}$になるまで３７℃で成長させて、次に０．５ｍＭ　ＩＰＴＧでタンパク質発現を誘導した。次に培養物を１８℃で更に１４～１８時間成長させた。培養物を回収し、遠心によってペレット化し、次に細胞ペレット５ｇ当たり１ｍＬの抽出緩衝液（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５

、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、５％グリセロール、０．５ｍＭ　ＴＣＥＰ）に再懸濁した。細胞を細胞破壊器（Ｃｏｎｓｔａｎｔ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｌｉｍｉｔｅｄ）で溶解させて、次に４℃にて２０，０００×ｇで２０分間遠心することによりライセートを清澄化した。清澄化したライセートに０．２％ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を加え、２０分間常に縦回転させながら４℃でインキュベートした。次にライセートを再び２０，０００×ｇで１０分間遠心した。ライセートをイオン交換クロマトグラフィーで精製した。精製後、画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で泳動させて、適切なサイズのタンパク質を含有する画分をプールし、３０ｋＤ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ１５遠心ユニットを使用して濃縮した。１２．５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．０、１２０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．５ｍＭ　ＴＣＥＰ及び５０％グリセロールでタンパク質を緩衝液交換した。次にＮａｎｏｄｒｏｐ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）を使用して濃度を測定し、タンパク質を－２０℃で貯蔵した。

【０９５２】

２：１の比の合成ＲＮＡガイド（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）対ポリペプチドを用いてＲＮＰを調製した。ＲＮＡガイド配列を表１４に示す。ｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）は標的１（配列番号１５０）に対応し、ｃｒＲＮＡ２（配列番号１４８）は標的２（配列番号１５１）に対応し、及びｃｒＲＮＡ３（配列番号１４９）は標的３（配列番号１５２）に対応した。ＲＮＰを１×ＮＥＢ２緩衝液（５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭトリスＨＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ７．９）中にて３７℃で３０分間複合体化した。複合体化後、１×ＮＥＢ２を希釈緩衝液として使用して、５μＭ～３７．５μＭまでの５ポイントの１：２段階希釈を実施した。ＲＮＡガイドの容積を$H_2O$で補って、アポ反応物（ＲＮＡガイドのないポリペプチド）を同じように調製した。

【０９５３】

【表４４】

表14. DNA EMSA RNAガイド配列。

| RNAガイド | 配列 |
|---|---|
| crRNA 1 (AAVS1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGTGAGGGAGGAGAGATGCC (配列番号 147) |
| crRNA 2 (VEGFA) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGTGCCCGTGGGGACCCCCG (配列番号 148) |
| crRNA 3 (EMX1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGGATAAAACTTCTCGGAGG (配列番号 149) |

【０９５４】

オリゴから表１６のプライマーを使用したＰＣＲにより、表１５の配列のｄｓＤＮＡ標的基質を作成した（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）。ＰＣＲの前に、フォワードプライマーの５'末端を、Ｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８に記載されるとおりＩＲ８００色素で標識した。次に、Ａｍｐｌｉｔａｑ　Ｇｏｌｄ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）を使用して、ｄｓＤＮＡ基質をＩＲ８００標識フォワードプライマー及び非標識リバースプライマーで増幅した。得られたｄｓＤＮＡをＤＮＡ　Ｃｌｅａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ　Ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ）で精製し、Ｎａｎｏｄｒｏｐ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）によって定量化した。

【０９５５】

【表４５】

表15. DNA EMSA標的基質。

| 標的基質 | 配列 |
|---|---|
| 標的1 (AAVS1) | TTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCCCAGATCCTT CCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTC TCTGCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCG CTGCACCACGTGATGTCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCC GGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCCCATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCC CTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTTTCTTAGGATGGCCT TCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGCAT CATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCC ACCTCTCCATCCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATT CGGGTCACCTCTCACTCCTTTCATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTC TCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCATGGCATCTTCCAGGGGTCC GAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCACTTCAGG ACAGCATGTTTG (配列番号150) | |
| 標的2 (VEGFA) | GACCTTAATACTTACCATGGCTTTGGACCAGGGAACTAGGGGGATAGTGAGAG CAGGGAGAGGGAAGTGTGGGGAAGGTACAGGGGACCTCGACAGTGAAGCATTC TGGGGTTTTCCTCCTGCATTTCGAGCTCCCCAGCCCCCAACATCTGGTTAGTC TTTAACTTCCTCGGGTTCATAACCATAGCAGTCCAGGAGTGGTGGGCATATTC TGTGCCCGTGGGGACCCCCGGTTGTGTCCTGTTCGACTCAGAAGACTTGGAGA AGCCAGAGGCTGTTGGTGGGAGGGAAGTGAGGAGGGAGGAGGGGCTGGGTGGC TGGGCCTGTGCACCCCAGCCCCTGCCCATGCCCATGCCTTGCTCTCTTTCTGT CCTCAGTGGTCCCAGGCTGCACCCATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCA CGAAGGTGAGTCCCCCTGGCTGTTGGATGGGGTTCCCTGTCCTCTCAGGGGAT GGGTGGATGGCCTAATTCCTTTTTCTTCAGAACTGTGGGGAGGAAG (配列番号151) | |
| 標的3 (EMX1) | AACAGGCCTGAGCATCTTAGCTCTGGGAGGCAGAGGCCAAGCCTGTCTGTTTC TTACAGGACCCAGCTCAGTGCCCGGGATGGAGTACATGCTCAATAAACATGTA TTGAATTAATGAGCACATTTCTCTTTGCCCATACAAATACACACTAACTTTAT CAGTCATTCCCCTTGCTCTCTGCTGTCATTGCTCCCTCCCTGTCCCTCTCCTT CTATCTTTCCCTTGTACTTTCACAGCTGATTGTTGATTTAGATTATGCATATA CCAGTTTGTGGATAAAACTTCTCGGAGGGTTACTCAGATCAGTGTGTGAATGA GCTCTTAATCCAGATCTCAGAAGTCTGTGCACTCCCCAAGCTTTAGCCGGGTG CTAGGAGGTGGGCAACCTGGGTGACTCTGTGTGTTTAGTGGGAGTGGGGTATT CGTGCTGGGATGGCCAGTGCCTCAATCTAGGAGATGAGGGAAGAGCCCTGGGC AAGGGCTAGTTCTCCCTTCAGGTTCTAATGACTTGTTCCTCACTGCTTGGGTG CCGCCCTGGAGTATGACCAGGAAGGTACCAGTCTAAGCTTCAGTCCTG (配列番号152) | |

【０９５６】

【表４６】

表 16. DNA EMSA 標的基質作成用のプライマー。

| 標的基質 | フォワードプライマー配列 | リバースプライマー配列 |
|---|---|---|
| 標的1 (AAVS1) (配列番号150) | TTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGG (配列番号153) | GCAAACATGCTGTCCTGAAGTGGACATAGGG (配列番号154) |
| 標的2 (VEGFA) (配列番号151) | GACCTTAATACTTACCATGGCTTTGGACCAGGG (配列番号155) | CTTCCTCCCCACAGTTCTGAAGAAAAAGG (配列番号156) |
| 標的3 (EMX1) (配列番号152) | AACAGGCCTGAGCATCTTAGCTCTGG (配列番号157) | CAGGACTGAAGCTTAGACTGGTACCTTCC (配列番号158) |

【０９５７】

ＲＮＰ試料及びＡｐｏ（対照）試料を１×結合緩衝液（５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１ｍＭ　ＴＣＥＰ、１０％グリセロール、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０）＋２０ｎＭ　ＩＲ８００標識した標的ＤＮＡ基質中に１：１０希釈し、徹底的に混合した。反応物を３７℃で１時間インキュベートした。反応物に、色素の最前線を可視化するためのブロモフェノールブルーを加え、次に反応物全体を６％ＤＮＡ　Ｒｅｔａｒｄａｔｉｏｎ　Ｇｅｌ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）に負荷し、これを８０Ｖで９０分間泳動させた。Ｌｉｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙ　ＣＬｘでゲルを画像化した。

【０９５８】

図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃは、それぞれ、標的１（ＡＡＶＳ１）、標的２（ＶＥＧＦＡ）及び標的３（ＥＭＸ１）のＥＭＳＡゲルを示す。各ゲルにおいて、「Ａｐｏ」レーンには（レーン１、９及び１５）、標的ＤＮＡ＋野生型Ｃａｓ１２ｉ２（レーン１）、配列番号３のＣａｓ１２ｉ２変異体（レーン９）又は配列番号４のＣａｓ１２ｉ２変異体（レーン１５）が含まれた。「Ｒｅｆ」レーンには、標的ＤＮＡ単独（配列番号１５０、配列番

号１５１又は配列番号１５２）が含まれた。図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃのレーン２～６は、１μＭ～３７ｎＭの、野生型Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号２）を含む漸減濃度のＲＮＰに対応する。図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃのレーン９～１３は、１μＭ～３７ｎＭの、配列番号３のＣａｓ１２ｉ２変異体を含む漸減濃度のＲＮＰに対応する。図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃのレーン１６～２０は、１μＭ～３７ｎＭの、配列番号４のＣａｓ１２ｉ２変異体を含む漸減濃度のＲＮＰに対応する。

【０９５９】

図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃのゲルは、異なる距離を移動したＤＮＡのバンドを示す。このアッセイでは、ＤＮＡがゲル中を移動する速度は、そのサイズによって決まる。ＤＮＡのみの試料は、特定の距離を移動することが可能である。しかしながら、そのＤＮＡにＲＮＰが結合した場合、より大きい、移動度の低いＤＮＡ複合体に相当するバンドが現れ、これはゲル上では「上方シフト」する。従って、図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃにおいて矢印は「未結合ｄｓＤＮＡ」及び「結合ｄｓＤＮＡ」を指し示し、ここで、「結合ｄｓＤＮＡ」は、「未結合ｄｓＤＮＡ」よりも移動が少なかった。

【０９６０】

図３Ａは、最も高い濃度の野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（レーン２）について、かすかな結合ｄｓＤＮＡバンドが認められたことを示し、ＡＡＶＳ１標的ＤＮＡに結合した野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰが少量であったことが指摘される。しかしながら、結合ｄｓＤＮＡバンドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号３及び配列番号４）ＲＮＰでは強くなった。加えて、結合ｄｓＤＮＡバンドは、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドで調製したＲＮＰの複数の濃度に現れた（図３Ａのレーン９～１１における配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及び図３Ａのレーン１６～２０における配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２）。これは、配列番号３及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドで調製したＲＮＰが、ＡＡＶＳ１標的ＤＮＡに対してより高い親和性を有したことを示している。

【０９６１】

図３Ｂは、最も高い濃度の野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（レーン２）であっても、未結合ｄｓＤＮＡバンドのみが存在することを示し、野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰがＶＥＧＦＡ標的ＤＮＡと三元複合体を形成しなかったことが指摘される。しかしながら、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドで調製したＲＮＰ（図３Ｂのレーン９～１１における配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及び図３Ｂのレーン１６～２０における配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２）では、結合ｄｓＤＮＡバンドが認められた。従って、配列番号３及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドで調製したＲＮＰは、ＶＥＧＦＡ標的ＤＮＡに対して野生型Ｃａｓ１２ｉ２よりも高い親和性を有した。

【０９６２】

同様に、図３Ｃは、最も高い濃度の野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（レーン２）であっても、未結合ｄｓＤＮＡバンドのみが存在することを示し、野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰがＥＭＸ１標的ＤＮＡと三元複合体を形成しなかったことが指摘される。しかしながら、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドで調製したＲＮＰ（図３Ｃのレーン９～１２における配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及びレーン１６～２０における配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２）では、結合ｄｓＤＮＡバンドが認められた。従って、配列番号３及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドで調製したＲＮＰは、ＥＭＸ１標的ＤＮＡに対して野生型Ｃａｓ１２ｉ２よりも高い親和性を有した。

【０９６３】

図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃのデータに基づけば、配列番号３及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドで調製したＲＮＰは、ｄｓＤＮＡ標的に対する野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰの親和性と比較して、複数のｄｓＤＮＡ標的に対してより高い親和性を有した。

【０９６４】

基質ＤＮＡの上方シフトが配列依存的であることを明らかにするため、ＲＮＰをミスマッチ標的基質とインキュベートした。これらの反応は、ポリペプチドの任意の容積を１×

ＮＥＢ２緩衝液で補って、同じように行った。Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド（野生型又は変異体）、ｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）及びＤＮＡ標的３（配列番号１５２）を含む反応を図３Ｄに示す。

【０９６５】

図３Ｄのゲルでは、「Ａｐｏ」レーン（レーン１、９及び１５）に、標的３ＤＮＡ（配列番号１５２）＋野生型Ｃａｓ１２ｉ２（レーン１）、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２（レーン９）又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２（レーン１５）が含まれた。「Ｒｅｆ」レーンには、標的３ＤＮＡ単独が含まれた。図３Ｄのレーン２～６は、１μＭ～３７ｎＭの、ｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）で調製した漸減濃度の野生型Ｃａｓ１２ｉ２ＲＮＰに対応した。図３Ｄのレーン９～１３は、１μＭ～３７ｎＭの、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及びｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）で調製した漸減濃度のＲＮＰに対応した。図３Ｄのレーン１６～２０は、１μＭ～３７ｎＭの、配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及びｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）で調製した漸減濃度のＲＮＰに対応した。

【０９６６】

図３Ｄに示されるとおり、最も高い濃度の配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２で１つの弱い結合ｄｓＤＮＡ複合体が認められたのみであった。他の全てのｄｓＤＮＡはＲＮＰが未結合のままであったことから、大多数のＲＮＰが三元複合体を形成できなかったことが指摘される。従って、図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃに示されるとおりの、ＲＮＰが標的ＤＮＡ基質に結合する能力は、ＲＮＡガイド及び標的ＤＮＡ基質の配列に依存した。

【０９６７】

更に、基質ＤＮＡの上方シフトがＤＮＡ標的とＲＮＡガイドとの塩基対合に起因したのではないことを示すため、ＲＮＡガイド及びその対応する標的ＤＮＡのみを含む反応を分析した。上方シフトは認められなかった（図３Ｅ）。図３Ｅに示されるとおり、ｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）と標的１基質ＤＮＡ（配列番号１５０）とを含む試料（レーン１）は、標的１基質ＤＮＡ（レーン５）と同じ距離を移動した。ｃｒＲＮＡ２（配列番号１４８）と標的２基質ＤＮＡ（配列番号１５１）とを含む試料（レーン２）は、標的２基質ＤＮＡ（レーン６）と同じ距離を移動した。ｃｒＲＮＡ３（配列番号１４９）と標的３基質ＤＮＡ（配列番号１５２）とを含む試料（レーン３）は、標的３基質ＤＮＡ（レーン７）と同じ距離を移動した。同様に、ｃｒＲＮＡ１（配列番号１４７）と標的３基質ＤＮＡ（配列番号１５２）とを含む試料（レーン４）は、標的３基質ＤＮＡ（レーン７）と同じ距離を移動した。従って、図３Ａ、図３Ｂ及び図３Ｃで認められた結合ｄｓＤＮＡバンドは、ＲＮＡガイドと標的ＤＮＡ基質との間の塩基対合に起因するのでなく、むしろ標的ＤＮＡとのＲＮＰ結合に起因したものであった。

【０９６８】

全体的に見て、本実施例は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドで調製したＲＮＰ（二元複合体）が、複数のＤＮＡ標的に対し、それらのＤＮＡ標的に対する野生型Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰの親和性よりも高い（三元複合体を作り出すための）親和性を有したことを示している。

【０９６９】

実施例８　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２三元複合体形成の決定のためのインビトロ切断アッセイ

本実施例は、三元複合体形成の決定手段としての、Ｃａｓ１２ｉ２（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）ＲＮＰが標的ＤＮＡ基質に及ぼすインビトロ生化学的活性を評価する方法について記載する。

【０９７０】

本実施例におけるＲＮＡガイド及びｄｓＤＮＡ基質は、それぞれ、表１４及び表１５のものと同一である。このアッセイでは、ｄｓＤＮＡ基質は未標識のままである。ＲＮＰ及びアポ試料を作成して実施例７の記載と同じようにインキュベートし、次に５μＭ～３７．５ｎＭまで１×ＮＥＢ２中に段階希釈する。次にＲＮＰ及びアポ試料を１×ＮＥＢ２中に更に１：１０希釈し、２０ｎＭで標的ｄｓＤＮＡ基質を加える。反応物を徹底的に混合

し、次に３７℃で１時間インキュベートし、次に１μＬ　２０ｍｇ／ｍＬプロテイナーゼＫ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）でクエンチする。反応物を５０℃で更に１５分間インキュベートし、次に反応物全体を２％アガロースＥ－ｇｅｌ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）上に泳動させる。Ｇｅｌ　Ｄｏｃ　ＥＺ　Ｇｅｌ　Ｉｍａｇｅｒ（ＢｉｏＲａｄ）でゲルを臭化エチジウムによって可視化する。

【０９７１】

２種類のバンドの強度が測定される：１）完全長（切断されていない）ＤＮＡバンド及び２）１つ以上の下方シフトした切断されているＤＮＡバンド。不活性なＲＮＰは、完全長ＤＮＡバンドによって特徴付けられる（例えば、ＲＮＰはＤＮＡ基質と三元複合体を形成することができなかった）。活性なＲＮＰは、１つ以上の下方シフトした切断されているＤＮＡバンドを生み出す（例えば、ＲＮＰはＤＮＡ基質と三元複合体を形成することができた）。活性なＲＮＰの濃度が減少するにつれ、完全長バンドの強度が増加し、切断されている１つ又は複数のバンドの強度が減少する。複数のＲＮＰの活性の比較では、他よりも高い活性を有するＲＮＰほど、低いＲＮＰ濃度でも切断されたバンドの強度が高くなることによって特徴付けられる。

【０９７２】

本実施例の方法により、標的ＤＮＡに対する野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（二元複合体）のインビトロ切断活性を比較することが可能となる。切断活性は、ＲＮＰ（二元複合体）が標的ＤＮＡと三元複合体を形成することを示している。

【０９７３】

実施例９　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元及び三元複合体についてのインビトロ安定性アッセイ

本実施例では、Ｃａｓ１２ｉ２（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２）ＲＮＰの安定性を評価し、ここで、表８としてのａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（二元複合体）は、標的ＤＮＡ基質と三元複合体を形成することが可能である。

【０９７４】

加速安定性研究のため、実施例７に記載されるのと同じようにＲＮＰ（５μＭ）を作成し、続いて試料を２５℃で４８時間貯蔵する。

【０９７５】

ＲＮＰ試料に関して、ＤＮＡ　ＥＭＳＡアッセイ（実施例７に記載されるとおり）及びインビトロ切断アッセイ（実施例８に記載されるとおり）を実施する。これらの結果を実施例７及び実施例８のものと比較することにより、２５℃で４８時間貯蔵したＣａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（野生型又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ）が、どの程度ＤＮＡ結合及び切断活性を保持しているかを決定する。ＤＮＡ結合は、三元複合体が形成していることを示し、切断活性は、活性な三元複合体であることを示している。

【０９７６】

アポポリペプチド（ＲＮＡガイドなし）も２５℃で４８時間インキュベートする。次に、実施例７に記載される方法を用いて、アポ試料をＲＮＡガイドと複合体化することによりＲＮＰを形成する。次に、それぞれ実施例７及び実施例８の方法に従い、ＤＮＡ　ＥＭＳＡ及びインビトロ切断アッセイを実施する。ＤＮＡ　ＥＭＳＡの結果を実施例７のものと比較することにより、Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（予め複合体化したＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドを２５℃でインキュベートした後に形成される）がどの程度標的ＤＮＡと三元複合体を形成することが可能かを決定する。更に、インビトロ切断アッセイ結果を実施例８のものと比較することにより、Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（予め複合体化したＣａｓ１２ｉ２ポリペプチドを２５℃でインキュベートした後に形成される）がどの程度活性か（例えば、標的ＤＮＡと機能性の三元複合体を形成するか）を決定する。

【０９７７】

本実施例の方法により、野生型及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチド並びに野生型及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（二元複合体）の安定性を比較することが可能となる。本実施例では、標的ＤＮＡに対するインビトロ切断活性を保持しているＣａｓ１２ｉ２

ＲＮＰは、標的ＤＮＡに対するインビトロ切断活性の減少を実証するＣａｓ１２ｉ２　ＲＮＰと比較して、三元複合体を形成することが可能な、安定性のより高い二元複合体であることを示している。

【０９７８】

実施例１０　－　インビトロでのＣａｓ１２ｉ２変異体によるＧＦＰの標的化

本実施例は、蛍光枯渇アッセイ（ＦＤＡ）を用いた野生型Ｃａｓ１２ｉ２及びＣａｓ１２ｉ２変異体の活性の測定について記載する。

【０９７９】

このアッセイでは、ＧＦＰを標的化するように設計された活性ＣＲＩＳＰＲシステムが、ＧＦＰをコードする二本鎖ＤＮＡ領域に結合し、それを切断する結果、ＧＦＰ蛍光の枯渇が起こる。ＦＤＡアッセイにはインビトロ転写及び翻訳が関わるため、Ｃａｓ１２ｉ２ポリペプチドをコードするＤＮＡ鋳型及びＴ７プロモーター下にあるダイレクトリピート（ＤＲ）－スペーサー－ダイレクトリピート（ＤＲ）のプレｃｒＲＮＡ配列をコードするＤＮＡ鋳型からのＲＮＰの産生が可能となり；このスペーサーがＧＦＰを標的化する。同じワンポット反応において、ＧＦＰ及びＲＦＰも標的及び蛍光レポーターの両方として産生された（図４）。標的ＧＦＰプラスミド配列は、配列番号１５９に示され、蛍光レポーターＲＦＰプラスミド配列は、配列番号１６０に示される。ＴＥＣＡＮ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｆ　Ｐｌｅｘプレートリーダーを使用して、３７℃で１２時間にわたり２０分毎にＧＦＰ及びＲＦＰ蛍光値を測定した。ＲＦＰは標的化されないたため、その蛍光は影響を受けず、従って内部シグナル対照として使用した。

【０９８０】

野生型Ｃａｓ１２ｉ２及びＣａｓ１２ｉ２変異体の活性のスクリーニング用に、合計２０個のＧＦＰ標的（＋１個の非標的）を設計した。ＦＤＡアッセイに使用したプレｃｒＲＮＡ配列、標的配列及び非標的制御配列を表１７に掲載する。

【０９８１】

【表４７】

表 17. FDA アッセイ用のプレ CRNA 及び標的配列。

| 標的 | プレ crRNA 配列 | 標的配列 |
|---|---|---|
| top01 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTAAAGGTTGTTTTACGACAGACGATAACAGGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaaccctctctaaacggaggggttt（配列番号 161） | TAAAGGTTGTTTTACGACAGACGATAACAGG（配列番号 162） |
| top02 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAGTGTTTCGCCAAGTACCCGAGCCACATCAAGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaaccctctctaaacggaggggttt（配列番号 163） | AGTGTTTCGCCAAGTACCCGAGCCACATCAA（配列番号 164） |
| top03 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGCCAAGTACCCGAGCCACATCAAGGATTTCTGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaaccctctctaaacggaggggttt（配列番号 165） | GCCAAGTACCCGAGCCACATCAAGGATTTCT（配列番号 166） |
| top04 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTTTAAGAGCGCCATGCCGGAAGGTTATACCCGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaaccctctctaaacggaggggttt（配列番号 167） | TTTAAGAGCGCCATGCCGGAAGGTTATACCC（配列番号 168） |
| top05 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGAAGGCGACGGCGTGTACAACAAGACGCGTGCTAGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaaccctctctaaacggaggggttt（配列番号 169） | GAAGGCGACGGCGTGTACAAGACGCGTGCTA（配列番号 170） |

【０９８２】

【表４８】

| | | |
|---|---|---|
| top06 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTATCTACAATCGTGTCACGCTGACTGGTGAGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号171） | TATCTACAATCGTGTCACGCTGACTGGTGAG（配列番号172） |
| top07 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGCGTAAGAACGTTGCATTCCAATGCCCGCCGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号173） | TGCGTAAGAACGTTGCATTCCAATGCCCGCC（配列番号174） |
| top08 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGCAATGCCCGCCAAGCATTCTGTATATTCTGCGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号175） | CAATGCCCGCCAAGCATTCTGTATATTCTGC（配列番号176） |
| top09 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGCCTGACACCGTTAACAATGGCATCCGCGTGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号177） | TGCCTGACACCGTTAACAATGGCATCCGCGT（配列番号178） |
| top10 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAACCAGGCGTACGATATTGAAGGTGTGACCGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号179） | AACCAGGCGTACGATATTGAAGGTGTGACCG（配列番号180） |
| bot01 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAACCCTGTTATCGTCTGTCGTAAAACAACCTGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号181） | AACCCTGTTATCGTCTGTCGTAAAACAACCT（配列番号182） |
| bot02 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTCAAACAGTTTTGCACCTTCCGTCAATGCCGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号183） | TCAAACAGTTTTGCACCTTCCGTCAATGCCG（配列番号184） |
| bot03 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGATACCTTCGACGTCGCCTTCCAGTTCGGTGAGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号185） | ATACCTTCGACGTCGCCTTCCAGTTCGGTGA（配列番号186） |
| bot04 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGCTTTAATGGTACCCGTGGTCGCGTCACCGGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号187） | GCTTTAATGGTACCCGTGGTCGCGTCACCGG（配列番号188） |
| bot05 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGAAGCTGATGGTACGCTCTTGGGTATAACCTGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTCTTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt（配列番号189） | GAAGCTGATGGTACGCTCTTGGGTATAACCT（配列番号190） |

【０９８３】

【表４９】

| | | |
|---|---|---|
| bot06 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAG AAATCCGTCTTTCATTGACGGGTAGGTAACCATAGCAC GCGTCTTGTACACGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTC TTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt t（配列番号191） | GTAGGTAACCATAGCACGCG TCTTGTACACG（配列番号192） |
| bot07 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAG AAATCCGTCTTTCATTGACGGTCACCAGTCAGCGTGAC ACGATTGTAGATAGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTC TTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt t（配列番号193） | TCACCAGTCAGCGTGACACG ATTGTAGATAG（配列番号194） |
| bot08 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAG AAATCCGTCTTTCATTGACGGTTAAAGTTCTCACCAGT CAGCGTGACACGATGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTC TTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt t（配列番号195） | TTAAAGTTCTCACCAGTCAG CGTGACACGAT（配列番号196） |
| bot09 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAG AAATCCGTCTTTCATTGACGGTTACGCAGAATGTGACC GTCTTTCTTAAAGTGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTC TTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt t（配列番号197） | TTACGCAGAATGTGACCGTC TTTCTTAAAGT（配列番号198） |
| bot010 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAG AAATCCGTCTTTCATTGACGGGGTCACACCTTCAATAT CGTACGCCTGGTTGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTC TTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt t（配列番号199） | GGTCACACCTTCAATATCGT ACGCCTGGTTG（配列番号200） |
| 非標的_top12 | gaaattaatacgactcactatagGTTGCAAAACCCAAG AAATCCGTCTTTCATTGACGGGTGATTGCGCCTGAGCG AGACGAAATACGCGGTTGCAAAACCCAAGAAATCCGTC TTTCATTGACGGctaacccctctctaaacggaggggttt t（配列番号201） | |

【０９８４】

ＧＦＰシグナルをＲＦＰシグナルで正規化し、次に各時点における３テクニカルレプリケートの平均蛍光を取った。次に、非ＧＦＰ標的化プレｃｒＲＮＡ（これは、代わりにカナマイシン耐性遺伝子を標的化する）と共にインキュベートしたエフェクターのＧＦＰシグナルを、ＧＦＰ標的化プレｃｒＲＮＡと共にインキュベートしたエフェクターのＧＦＰシグナルで除すことにより、ＧＦＰ蛍光枯渇を計算した。得られた値は、図５Ａ～図５Ｔにおいて「枯渇比（非標的／標的）」と称される。

【０９８５】

１又はおよそ１の枯渇比（非標的／標的）は、非ＧＦＰ標的化プレｃｒＲＮＡ及びＧＦＰ標的化プレｃｒＲＮＡに関してＧＦＰ枯渇の差がほとんど乃至全くなかったことを示すものであった（例えば、１０ＲＦＵ／１０ＲＦＵ＝１）。１より大きい枯渇比（非標的／標的）は、非ＧＦＰ標的化プレｃｒＲＮＡ及びＧＦＰ標的化プレｃｒＲＮＡに関してＧＦＰ枯渇の差があったことを示すものであった（例えば、１０ＲＦＵ／５ＲＦＵ＝２）。ＧＦＰシグナルの枯渇は、エフェクターが機能性ＲＮＰを形成し、ＧＦＰコード領域内に二本鎖ＤＮＡ切断を導入することによってＧＦＰの産生に干渉したことを示すものであった。ＧＦＰ枯渇の程度は、概ねＣａｓ１２ｉ２　ＣＲＩＳＰＲシステム（野生型Ｃａｓ１２ｉ２又は変異体Ｃａｓ１２ｉ２システム）の比活性に相関した。

【０９８６】

図５Ａ～図５Ｔは、２０個のＧＦＰ標的の各々（ｔｏｐ１、ｔｏｐ２、ｔｏｐ３、ｔｏｐ４、ｔｏｐ５、ｔｏｐ６、ｔｏｐ７、ｔｏｐ８、ｔｏｐ９、ｔｏｐ１０、ｂｏｔ１、ｂｏｔ２、ｂｏｔ３、ｂｏｔ４、ｂｏｔ５、ｂｏｔ６、ｂｏｔ７、ｂｏｔ８、ｂｏｔ９、ｂｏｔ１０）について２０分毎に測定した、野生型Ｃａｓ１２ｉ２（配列番号２）、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２によって形成されるＲＮＰの枯渇比（非標的／標的）のグラフを示す。野生型Ｃａｓ１２ｉ２は実線で描かれ、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２は点線で描かれ、配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２は破線で描かれる。

【０９８７】

各標的において、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２で形成されるＲＮＰの枯渇比は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２で形成されるＲＮＰの枯渇

比よりも高かった。これは、各標的部位でＣａｓ１２ｉ２変異体の比活性が野生型Ｃａｓ１２ｉ２の比活性よりも高いことを示すものであった。

【０９８８】

更に、幾つかの標的（例えば、ｔｏｐ０１、ｔｏｐ０５、ｔｏｐ０９、ｔｏｐ１０、ｂｏｔ０２、ｂｏｔ０３、ｂｏｔ０４、ｂｏｔ０９、ｂｏｔ１０）では、野生型Ｃａｓ１２ｉ２の枯渇比は１又は約１であったことから、これらの標的部位で野生型Ｃａｓ１２ｉ２は活性でなかったことが示された（即ち、非ＧＦＰ標的化プレｃｒＲＮＡによって誘導されたＧＦＰ枯渇のいずれの計測値も、ＧＦＰ標的化プレｃｒＲＮＡによって誘導されたＧＦＰ枯渇と本質的に等しかった）。図５Ａ、図５Ｄ、図５Ｉ、図５Ｊ、図５Ｌ、図５Ｍ、図５Ｎ、図５Ｓ及び図５Ｔを参照されたい。しかしながら、これらの標的の各々において、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２又は配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２で形成されたＲＮＰの枯渇比は１より大きかったことから、部位の各々でＣａｓ１２ｉ２変異体はＧＦＰシグナルを枯渇させる活性があったことが示された。従って、Ｃａｓ１２ｉ２変異体は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２によっては標的化できなかったＧＦＰ上の部位を標的化することが可能であった。

【０９８９】

本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２変異体二元複合体が、野生型Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体と比較して、ＧＦＰ標的部位との三元複合体形成の増加を実証したことを示している。本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２変異体が、野生型Ｃａｓ１２ｉ２によっては切断が不可能なＧＦＰ標的部位で二本鎖ＤＮＡを切断することにより、標的化空間を拡げたことを更に示している。更に、Ｃａｓ１２ｉ２変異体は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２と比較して、複数のＧＦＰ標的部位で二本鎖ＤＮＡをより効率的に切断した。

【０９９０】

実施例１１　－　Ｃａｓ１２ｉ２変異体による哺乳類遺伝子の標的化

本実施例は、一過性トランスフェクションによって哺乳類細胞に導入した野生型Ｃａｓ１２ｉ２及びＣａｓ１２ｉ２変異体を使用した複数の標的に関するインデル評価について記載する。

【０９９１】

野生型Ｃａｓ１２ｉ２、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２をｐｃｄａ３．１骨格（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローニングした。次にプラスミドをマキシプレップし、１μｇ／μＬに希釈した。ＲＮＡガイド調製のため、標的配列足場を有するｕｌｔｒａｍｅｒ及びＵ６プロモーターにより、ｃｒＲＮＡをコードするｄｓＤＮＡ断片を得た。Ｕｌｔｒａｍｅｒを最終ストック濃度が１００μＭとなるようにｐＨ７．５の１０ｍＭトリス・ＨＣｌに再懸濁した。続いてワーキングストックを、この場合もやはり１０ｍＭトリス・ＨＣｌを使用して１０μＭに希釈し、ＰＣＲ反応用の鋳型として供した。以下の成分を含む５０μＬ反応液中でｃｒＲＮＡの増幅を行った：０．０２μｌの前述の鋳型、２．５μｌフォワードプライマー、２．５μｌリバースプライマー、２５μＬ　ＮＥＢ　ＨｉＦｉポリメラーゼ及び２０μｌ水。サイクル条件は、１×（９８℃で３０秒）、３０×（９８℃で１０秒、６７℃で１５秒）、１×（７２℃で２分）であった。ＰＣＲ産物を１．８×ＳＰＲＩ処理でクリーンアップし、２５ｎｇ／μＬに規格化した。調製したｃｒＲＮＡ配列及びその対応する標的配列を表１８に示す。

【０９９２】

【表５０】

表 18. 一過性トランスフェクション用の crRNA 及び標的配列。

| 標的 | crRNA 配列 | 標的配列 |
|---|---|---|
| 1 (AAVS1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGTCCCCCCAAGTTTTGGAC (配列番号 202) | TGTCCCCCCAAGTTTTGGAC (配列番号 203) |
| 2 (AAVS1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGAGAGGTGAGGGACTTGGG (配列番号 204) | GGAGAGGTGAGGGACTTGGG (配列番号 205) |
| 3 (AAVS) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTGAGAATGGTGCGTCCTAG (配列番号 206) | GTGAGAATGGTGCGTCCTAG (配列番号 207) |
| 4 (AAVS1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGGTTGTCCAGAAAAACGG (配列番号 208) | GGGGTTGTCCAGAAAAACGG (配列番号 209) |
| 5 (AAVS1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAACTGGCCCTGGCTTTGGCA (配列番号 210) | AACTGGCCCTGGCTTTGGCA (配列番号 211) |
| 6 (EMX1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGCGCAGGGCCACCTGGAC (配列番号 212) | GGGCGCAGGGCCACCTGGAC (配列番号 213) |
| 7 (EMX1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGATGGCGACTTCAGGCACA (配列番号 214) | GGATGGCGACTTCAGGCACA (配列番号 215) |
| 8 (EMX1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGATGTGATTGATGCCCAAAGG (配列番号 216) | ATGTGATTGATGCCCAAAGG (配列番号 217) |
| 9 (EMX1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGGAGGCCTGGAGTCATGG (配列番号 218) | GGGGAGGCCTGGAGTCATGG (配列番号 219) |
| 10 (EMX1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTATTATTCCCATAGGGAAGG (配列番号 220) | TATTATTCCCATAGGGAAGG (配列番号 221) |
| 11 (VEGFA) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGGGGGTGACCGCCGGAGCG (配列番号 222) | TGGGGGTGACCGCCGGAGCG (配列番号 223) |
| 12 (VEGFA) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAATCCTCCACCAGTCATGGT (配列番号 224) | AATCCTCCACCAGTCATGGT (配列番号 225) |
| 13 (VEGFA) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTTGACATTGTCCACACCTG (配列番号 226) | GTTGACATTGTCCACACCTG (配列番号 227) |
| 14 (VEGFA) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGAAATCTATTGAGGCTCTG (配列番号 228) | GGAAATCTATTGAGGCTCTG (配列番号 229) |
| 15 (VEGFA) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTTAAACTCTCCATGGACCAG (配列番号 230) | TTAAACTCTCCATGGACCAG (配列番号 231) |

【０９９３】

トランスフェクションの約１６時間前に、ＤＭＥＭ／１０％ＦＢＳ＋Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ中１００μｌの２５，０００個のＨＥＫ２９３Ｔ細胞を９６ウェルプレートの各ウェルにプレーティングした。トランスフェクション当日、細胞は７０～９０％コンフルエントであった。トランスフェクトする各ウェルについて、０．５μｌのリポフェクタミン２０００と９．５μｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭとの混合物を調製し、次に室温で５～２０分間インキュベートした（溶液１）。インキュベーション後、このリポフェクタミン：ＯｐｔｉＭＥＭ混合物を、１８２ｎｇのエフェクタープラスミド及び１４ｎｇのｃｒＲＮＡ及び１０μＬに達するまでの水を含有する別の混合物に加えた（溶液２）。溶液１及び溶液２混合物を上下にピペッティングすることによって混合し、次に室温で２５分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞が入った９６ウェルプレートの各ウェルに２０μＬの溶液１及び溶液２混合物を滴下して加えた。トランスフェクションから７２時間後、各ウェルの中心に１０μＬのＴｒｙｐＬＥを加えることにより細胞をトリプシン処理し、約５分間インキュベートする。次に各ウェルに１００μＬのＤ１０培地を加えて混合することにより、細胞を再懸濁した。次に細胞を５００ｇで１０分間スピンダウンし、上清を廃棄した。元の細胞懸濁液容積の５分の１の量になるまでＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ緩衝液を加えた。細胞を６５℃で１５分間、６８℃で１５分間及び９８℃で１０分間インキュベー

トした。

【０９９４】

２ラウンドのＰＣＲにより、次世代シーケンシング用の試料を調製した。初回ラウンド（ＰＣＲ１）は、標的に応じた特定のゲノム領域の増幅に使用した。ＰＣＲ１産物はカラム精製によって精製した。ラウンド２のＰＣＲ（ＰＣＲ２）は、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプター及びインデックスを付加するために行った。次に反応物をプールし、カラム精製によって精製した。シーケンシングランは１５０サイクルＮｅｘｔＳｅｑ　ｖ２．５中出力又は高出力キットで行った。

【０９９５】

図６Ａは、野生型Ｃａｓ１２ｉ２、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２による表１８の１５ヵ所の遺伝子領域の標的化を示す。編集された標的は、バックグラウンドを上回るインデルレベル（このアッセイでは０．５％超、点線で示される）を示した標的として定義した。同じ一組の標的に関して、野生型Ｃａｓ１２ｉ２では１５個の標的中１０個がバックグラウンドを上回って編集されたが、１５個の標的のうちの５個についてバックグラウンドを上回る編集に失敗した（図６Ａ及び図６Ｂ）。しかしながら、配列番号３の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及び配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２では、１５個の標的の各々がバックグラウンドを上回って編集された（図６Ａ及び図６Ｂ）。

【０９９６】

本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２変異体二元複合体が、野生型Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体と比較して、標的哺乳類遺伝子との三元複合体形成の増加を実証したことを示している。本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２変異体が、野生型Ｃａｓ１２ｉ２によっては編集が不可能な標的にインデルを導入することによって標的化空間を拡げたことを更に示している。

【０９９７】

実施例１２　－　Ｃａｓ１２ｉ２変異体によるインデル率の増加

本実施例は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２と比較したときの、複数の標的にわたるＣａｓ１２ｉ２変異体の酵素活性（例えば、ヌクレアーゼ活性）の増加について記載する。

【０９９８】

Ｃａｓ１２ｉ２プラスミド及びＲＮＡガイドを実施例１１に記載するとおり調製した。調製したｃｒＲＮＡ配列及びその対応する標的配列を表１９に示す。更に、細胞をトランスフェクトして回収し、実施例１１に記載するとおり、次世代シーケンシング用の試料を調製した。

【０９９９】

【表５１】

表 19. 一過性トランスフェクション用の crRNA 及び標的配列。

| 標的 | crRNA 配列 | 標的配列 |
|---|---|---|
| 1 (AAVS1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGTGAGGGAGGAGAGATGCC (配列番号 147) | GGTGAGGGAGGAGAGATGCC (配列番号 232) |
| 2 (EMX1) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTCTTGAGATGGGCTCGGGCT (配列番号 233) | TCTTGAGATGGGCTCGGGCT (配列番号 234) |
| 3 (VEGFA) | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTCCGCTCTGAGCAAGGCCCA (配列番号 235) | TCCGCTCTGAGCAAGGCCCA (配列番号 236) |

【１０００】

ＡＡＶＳ１、ＥＭＸ１及びＶＥＧＦＡにおけるインデルを比較することにより、野生型Ｃａｓ１２ｉ２及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２の性能を評価した。図７Ａ、図７Ｂ及び図７Ｃに示されるとおり、Ｃａｓ１２ｉ２変異体では、それぞれ、ＡＡＶＳ１標的、ＥＭＸ１標的及びＶＥＧＦＡ標的において、野生型Ｃａｓ１２ｉ２と比較してインデル率が増加した。点線は、ＡＡＶＳ１、ＥＭＸ１及びＶＥＧＦＡにおけるＣａｓ１２ｉ２インデル率を画定する。図７Ａの棒グラフ中の各バーに対応するＣａｓ１２ｉ２変異体の配列識別番号を表２０に示し、図７Ｂ及び図７Ｃの棒グラフ中の各バーに対応するＣａｓ１２ｉ２変異体

の配列識別番号を表２１に示す。

【１００１】

【表５２】

表 20. AAVS1 についてのインデルアッセイで使用した Cas12i2 変異体配列(図 7A)。

| バー | Cas12i2 配列番号 |
|---|---|
| 1 | 2 (WT) |
| 2 | 3 |
| 3 | 4 |
| 4 | 46 |
| 5 | 5 |
| 6 | 47 |
| 7 | 50 |
| 8 | 51 |
| 9 | 52 |
| 10 | 53 |
| 11 | 54 |
| 12 | 55 |
| 13 | 56 |
| 14 | 57 |
| 15 | 58 |
| 16 | 59 |
| 17 | 60 |
| 18 | 61 |
| 19 | 62 |
| 20 | 63 |
| 21 | 65 |
| 22 | 66 |
| 23 | 67 |
| 24 | 68 |

| バー | Cas12i2 配列番号 |
|---|---|
| 25 | 79 |
| 26 | 84 |
| 27 | 87 |
| 28 | 88 |
| 29 | 89 |
| 30 | 90 |
| 31 | 95 |
| 32 | 96 |
| 33 | 97 |
| 34 | 99 |
| 35 | 101 |
| 36 | 103 |
| 37 | 104 |
| 38 | 112 |
| 39 | 114 |
| 40 | 115 |
| 41 | 116 |
| 42 | 117 |
| 43 | 118 |
| 44 | 123 |
| 45 | 130 |
| 46 | 131 |
| 47 | 130 |

【１００２】

【表５３】

表21. EMX1(図7B)及びVEGFA(図7C)についてのインデルアッセイで使用したCas12i2 変異体配列。

| バー | Cas12i2 配列番号 |
|---|---|
| 1 | 2 (WT) |
| 2 | 3 |
| 3 | 4 |
| 4 | 46 |
| 5 | 5 |
| 6 | 47 |
| 7 | 50 |
| 8 | 51 |
| 9 | 52 |
| 10 | 53 |
| 11 | 54 |
| 12 | 55 |
| 13 | 56 |
| 14 | 57 |
| 15 | 58 |
| 16 | 59 |
| 17 | 60 |
| 18 | 61 |
| 19 | 62 |
| 20 | 63 |
| 21 | 65 |
| 22 | 66 |
| 23 | 67 |
| 24 | 68 |
| 25 | 76 |
| 26 | 79 |

| バー | Cas12i2 配列番号 |
|---|---|
| 27 | 84 |
| 28 | 86 |
| 29 | 87 |
| 30 | 88 |
| 31 | 89 |
| 32 | 90 |
| 33 | 95 |
| 34 | 96 |
| 35 | 97 |
| 36 | 99 |
| 37 | 101 |
| 38 | 103 |
| 39 | 104 |
| 40 | 112 |
| 41 | 114 |
| 42 | 115 |
| 43 | 116 |
| 44 | 117 |
| 45 | 118 |
| 46 | 119 |
| 47 | 120 |
| 48 | 121 |
| 49 | 122 |
| 50 | 123 |
| 51 | 124 |

【１００３】

本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２変異体二元複合体が、野生型Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体と比較して、哺乳類遺伝子との三元複合体形成の増加を実証したことを示している。更に、Ｃａｓ１２ｉ２変異体は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２による標的化が不可能な標的遺伝子座にインデルを導入したのみならず（実施例１１）、Ｃａｓ１２ｉ２変異体は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２と比較して、複数の標的遺伝子座で酵素活性の増加を示した。

【１００４】

実施例１３　－　Ｃａｓ１２ｉ２変異体による効率的な免疫細胞編集

本実施例は、初代Ｔ細胞における改変した変異体Ｃａｓ１２ｉ２ヌクレアーゼ（配列番号４）及びＳｐＣａｓ９対照を使用したＲＮＰトランスフェクションと、続くＦＡＣＳ染色及び複数の標的に関するインデル評価について記載する。

【１００５】

ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼは、改変型細胞療法に対する既存のエキソビボ手法の変革におけるその役割に関して大きい注目を集めている。ここで、本発明者らは、広く用いられているＣａｓ９及びＣｐｆ１　ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼシステムに代わるものとして、新規の改変型Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ変異体、Ｃａｓ１２ｉを提示する。サブタイプＶ－Ａ（Ｃａｓ１２ａ、別名Ｃｐｆ１）及びＶ－Ｂ（Ｃａｓ１２ｂ）のエフェクターは詳細に研究されているが、特徴付けられていないＣａｓ１２タンパク質のドメイン構成が独特で、ＲｕｖＣ配列が枝分かれしていることから、未探索の機能的多様性が示唆される（Ｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３６３（６４２２）：８８－９１，２０１９）。かかる機能的多様性を解き明かそうと、Ｃａｓ１２ｉの厳密な特徴付けにより、コンパクトなサイズ（１０５４アミノ酸タンパク質、４３ヌクレオチドｔｒａｃｒ無しガイドＲＮＡ）、哺乳類細胞における最適なＴリッチＰＡＭの妥当性確認、別個の編

集出力及びマルチプレックス化の可能性を含め、古典的な遺伝子修飾ヌクレアーゼに優る治療的に区別をもたらす属性が明らかになった。本発明者らは、元のＣａｓ１２ｉに優る活性の劇的な増加（約４０倍）を生み出す、且つＳｐＣａｓ９と比較して特異性の亢進を示すＣａｓ１２ｉ変異体を生じさせるＣａｓ１２ｉの改変型変異体のハイスループット判定に取り組んだ。治療上関連性のある遺伝子座を標的化するＴ細胞へのＣａｓ１２ｉ変異体のＲＮＰ媒介性送達により、ロバストな編集（複数の標的及びドナーにわたって９０％超のインデル）が明らかになった。加えて、インシリコ予測を用いた特異性研究を、標的化したＮＧＳシーケンシングと併せると、Ｃａｓ１２ｉ変異体のロバストな活性及び特異性が実証された。まとめると、これらのデータは、Ｃａｓ１２ｉのこの変異体がユニークに区別されることで、ロバスト且つ正確な改変型細胞療法が可能となることを示している。これらの研究の詳細は、以下のとおりである。

【１００６】

３例の個別のドナーからＣＤ３＋ Ｔ細胞を蘇生し、自動細胞計数器を使用してカウントした。各ドナーから試料を採取し、それぞれ、表面発現及び生存能力のフローサイトメトリー分析用に、ＣＤ３ε及びＤＡＰＩに関して染色した。細胞密度を１ｅ６細胞／ｍＬに調整し、細胞を抗ＣＤ３：ＣＤ２８抗体カクテルで３日間刺激した。

【１００７】

変異体Ｃａｓ１２ｉ２ ＲＮＰ複合体化反応は、精製した変異体Ｃａｓ１２ｉ２（４００μＭ；配列番号４）をｃｒＲＮＡ（２５０ｍＭ ＮａＣｌ中１ｍＭ；表１３及び表１４の配列を参照されたい）と１：１（エフェクター：ｃｒＲＮＡ）の容積比（２．５：１ｃｒＲＮＡ：エフェクターモル比）で混合することにより行った。ＳｐＣａｓ９ ＲＮＰ複合体化反応は、精製したＳｐＣａｓ９（Ａｌｄｅｖｒｏｎ；６２μＭ）をｓｇＲＮＡ（水中１ｍＭ；表２２の配列を参照されたい）と６．４５：１（エフェクター：ｓｇＲＮＡ）の容積比（２．５：１のｓｇＲＮＡ：エフェクターモル比）で混合することにより行った。「エフェクターのみ」対照については、変異体Ｃａｓ１２ｉ２又はＳｐＣａｓ９をタンパク質貯蔵緩衝液（２５ｍＭトリス、ｐＨ７．５、２５０ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＴＣＥＰ、５０％グリセロール）と、それぞれｃｒＲＮＡ又はｓｇＲＮＡと同じ容積比で混合した。追加の対照には、ＳｐＣａｓ９（Ａｌｄｅｖｒｏｎ）と、Ｌｅｔｈａｌ＃１（トランスフェクション対照ガイド）、プールＣＤ３又はＲＯＳＡ２６ ｓｇＲＮＡのいずれか及びＳｐＣａｓ９（Ｈｏｒｉｚｏｎ）と、Ｌｅｔｈａｌ＃１、プールＣＤ３又はＲＯＳＡ２６ ｓｇＲＮＡのいずれかを含めた。複合体化は、３７℃で３０～６０分間インキュベートした。インキュベーション後、ＲＮＰを、変異体Ｃａｓ１２ｉ２について２０μＭ、５０μＭ、１００μＭ又は１６０μＭのエフェクター濃度に、且つＳｐＣａｓ９について２０μＭ又は５０μＭに希釈した。

【１００８】

【表５４】

表 22. RNPトランスフェクション用の crRNA 及び sgRNA 配列(配列番号 237~241)。

| ガイド名 | 遺伝子 | エフェクター | PAM | 標的鎖 | crRNA/sgRNA |
|---|---|---|---|---|---|
| Cas12i2_B2M エクソン 2_ 標的 4 | B2M | Cas12i2 | CTTC | TS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrArArUrGrUrCrGrGrArUrGrGrArUrGrArArArCrC |
| Cas12i2_B2M エクソン 2_ 標的 8 | B2M | Cas12i2 | CTTT | BS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrCrUrArUrCrUrCrUrUrGrUrArArCrUrArCrArCrUrG |
| Cas12i2_B2M エクソン 2_ 標的 10 | B2M | Cas12i2 | GTTC | TS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrArCrArCrGrGrCrArGrGrCrArUrArCrUrCrArUrC |
| Cas12i2_B2M エクソン 2_ 標的 11 | B2M | Cas12i2 | CTTT | BS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrGrUrCrArCrArGrCrCrCrArArGrArGrArUrArGrUrUrA |
| SpCas9_B2M エクソン 1_ 標的 1 | B2M | SpCas9 | TGG | BS | mG*mG*mC*rCrGrArGrArUrGrUrCrUrCrGrCrCrUrCrCrGrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArArUrArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU |

【１００９】

【表５５】

表 23. RNPトランスフェクション用の crRNA 及び sgRNA 配列(配列番号 242～251)。

| ガイド名 | 遺伝子 | エフェクター | PAM | 標的鎖 | crRNA/sgRNA |
|---|---|---|---|---|---|
| Cas12i2_TRAC_ エクソン 1_標的 3 | TRAC | Cas12i2 | CTTC | TS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrArArGrArGrCrArArCrArGrUrGrCrUrGrUrGrC |
| Cas12i2_TRAC_ エクソン 1_標的 5 | TRAC | Cas12i2 | CTTC | BS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrArArCrArArCrArGrCrArUrUrArUrUrCrCrArGrA |
| Cas12i2_TRAC_ エクソン 2_標的 4 | TRAC | Cas12i2 | CTTT | TS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrGrArArArCrArGrGrUrArArGrArCrArGrGrGrGrU |
| Cas12i2_TRAC_ エクソン 3_標的 4 | TRAC | Cas12i2 | CTTT | BS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrArUrUrCrGrGrArArCrC |
| SpCas9_TRAC_ エクソン 2_標的 1 | TRAC | SpCas9 | TGG | BS | mA*mA*mG*rUrUrCrCrUrGrUrGrArUrGrUrCrArArGrCrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU |
| Cas12i2_PDCD1_ エクソン 1_標的 1 | PDCD 1 | Cas12i2 | GTTC | BS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrUrUrArGrGrUrArGrGrUrGrGrGrUrCrGrGrCrG |
| Cas12i2_PDCD1_ エクソン 2_標的 7 | PDCD 1 | Cas12i2 | CTTC | BS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrCrCrCrGrArGrGrArCrCrGrCrArGrGrCrCrArGrGrCrC |
| Cas12i2_PDCD1_ エクソン 2_標的 8 | PDCD 1 | Cas12i2 | CTTC | BS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrCrGrUrGrUrCrArCrArCrArArCrArArCrUrGrCrCrCrArA |
| Cas12i2_PDCD1_ エクソン 2_標的 9 | PDCD 1 | Cas12i2 | CTTC | BS | rArGrArArArUrCrCrGrUrCrUrUrUrCrArUrUrGrArCrGrGrCrArCrArUrGrArGrCrGrUrGrGrUrCrArGrGrGrC |
| SpCas9_PDCD1_ エクソン 1_標的 1 | PDCD 1 | SpCas9 | AGG | BS | mU*mC*mC*rArGrGrCrArUrGrCrArGrArUrCrCrCrArCrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU |

【１０１０】

希釈した複合体化反応物を３８４ウェルエレクトロポレーションプレートに各ウェル２μＬで分注した。細胞懸濁液を回収し、自動細胞計数器を用いてカウントした。細胞密度をＰ３緩衝液で１．１ｅ７細胞／ｍＬに調整し、２ｅ５細胞／反応液（１８μＬ）で分注した。変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰの最終濃度は、２μＭ、５μＭ、１０μＭ又は１６

μＭであった。ＳｐＣａｓ９　ＲＮＰの最終濃度は、２又は５μＭであった。以下の対照をセットアップした：エレクトロポレーションされない細胞のみ、Ｐ３初代細胞緩衝液中の細胞（Ｌｏｎｚａ　＃ＶＸＰ－３０３２）のみ、タンパク質貯蔵緩衝液中の細胞のみ。エレクトロポレーションされない条件を除き、エレクトロポレーション装置（プログラムＥＯ－１１５－ＡＡ、ＬｏｎｚａＨＴ）を使用してプレートをエレクトロポレーションした。ロボティクス（ＳｔａｒＬａｂ　Ｈａｍｉｌｔｏｎ）を使用して各ウェルを４つの９６ウェル編集プレート（２００μＬ総容積が入っている）に分割した。編集プレートを３７℃で７日間、４日目に１００μＬ培地交換しつつインキュベートした。

【１０１１】

７日後、プレートをスピンダウンし、上清を除去した。ペレットを２００μＬのＰＢＳ中に再懸濁した。１００μＬの試料を回収し、抗体パネル（抗Ｂ２Ｍ、抗ＴＲＡＣ、抗ＰＤ１）又は抗ＣＤ３ε抗体（Ｃａｓ９対照用のｌｅｔｈａｌ＃１、プールＣＤ３ε、ＲＯＳＡ２６、タンパク質貯蔵緩衝液及びエレクトロポレーション無し）のいずれかで染色した。全ての細胞をＤＡＰＩで染色して生存能力を評価した。残りの細胞懸濁液を９６ウェルＰＣＲプレートに移し、５００×ｇで５分間ペレット化した。上清を除去し、ペレットを－８０℃で凍結した。

【１０１２】

ｇＤＮＡ抽出のため、ペレットを室温に解凍し、最終濃度が１０００細胞／μＬとなるように適切な容積のＤＮＡ抽出緩衝液（ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ）に再懸濁した。次に試料をＰＣＲ機にて６５℃で１５分間、６８℃で１５分間、９８℃で１０分間サイクル処理した。次に試料を－２０℃で凍結した。

【１０１３】

次世代シーケンシング（ＮＧＳ）用の試料をＰＣＲラウンドによって調製した。初回ラウンド（ＰＣＲ　Ｉ）は、標的部位に隣接するゲノム領域の増幅及びＮＧＳアダプターの付加に使用した。第２ラウンド（ＰＣＲ　ＩＩ）は、ＮＧＳインデックスの付加に使用した。次に反応物をプールし、カラム精製によって精製し、蛍光光度計（Ｑｕｂｉｔ）で定量化した。１５０サイクルＮＧＳインスツルメント（ＮｅｘｔＳｅｑ　ｖ２．５）中出力又は高出力キットを使用してシーケンシングランを行い、ＮＧＳインスツルメント（ＮｅｘｔＳｅｑ　５５０）でランにかけた。

【１０１４】

ＮＧＳ分析のため、インデルマッピング機能において試料のｆａｓｔｑファイル、アンプリコン参照配列及びフォワードプライマー配列を使用した。リード毎に、ｋｍｅｒスキャンアルゴリズムを使用して、リードと参照配列との間の編集操作（マッチ、ミスマッチ、挿入、欠失）を計算した。一部の試料中に存在する少量のプライマー二量体を除去するためには、各リードの最初の３０ｎｔが参照とマッチする必要があり、マッピングヌクレオチドの半数超がミスマッチであったリードも同様にフィルタリングして除去した。これらのフィルタを通過した最大で５０，０００リードを分析に使用し、リードが挿入又は欠失を含んだ場合、それをインデルリードとしてカウントした。インデル％は、インデルを含むリードの数を分析したリードの数で除したものとして計算した（フィルタを通過するリードは、最大で５０，０００）。フィルタを通過する最小数のリードについてのＱＣ標準は、１０，０００であった。

【１０１５】

これらの結果から、複数のＢ２Ｍ標的を標的化する変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰによる初代Ｔ細胞におけるロバストなインデル活性が実証され（図８）、活性ピークは１６μＭであった。フローサイトメトリー染色により、変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ後のＴ細胞におけるＢ２Ｍタンパク質発現の有意な低下が示された（図９）。これらの結果は、加えて、初代Ｔ細胞において変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ標的化によって誘導されたＴＲＡＣ及びＰＤＣＤ１のインデルを示している（それぞれ、図１１Ａ及び図１２Ａ）。Ｂ２Ｍを標的化するＣａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（図１０）、ＴＲＡＣを標的化するＣａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（図１１Ｂ）及びＰＤＣＤ１を標的化するＣａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ（図１２Ｂ

）のエレクトロポレーションから７日後、全ての条件について細胞生存度は高いままであった。

【１０１６】

本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２変異体二元複合体（例えば、変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰ）が複数の標的と安定した三元複合体を形成し、且つ初代Ｔ細胞において活性を有することを示している。本実施例は、変異体Ｃａｓ１２ｉ２が、標的核酸への（オンターゲット）結合親和性の増加を示し、且つ初代Ｔ細胞において活性を有した安定した二元複合体（例えば、ＲＮＰ）を形成したことを更に示している。

【１０１７】

実施例１４　－　Ｃａｓ１２ｉ２変異体によるオフターゲット酵素活性の決定

本実施例は、オンターゲット遺伝子座及び非標的遺伝子座におけるＣａｓ１２ｉ２二元複合体のヌクレアーゼ活性を評価する方法について記載する。

【１０１８】

このアッセイのため、表２４の標的配列を選択した。各標的配列について、ＰＡＭ配列に隣接する他のゲノム配列を検索し、標的配列とＰＡＭ隣接配列との間のレーベンシュタイン距離を計算することにより、潜在的な非標的部位を同定した。レーベンシュタイン距離（例えば、編集距離）は、図１３に示されるとおり、ある配列を別の配列に変更する（例えば、潜在的な非標的遺伝子座の配列をオンターゲット遺伝子座の配列に変更する）ために必要な最小数の編集（例えば、挿入、欠失又は置換）に対応する。編集距離が１、２、３又は４の潜在的な非標的配列を選択しており、表２５に示す。

【１０１９】

【表５６】

表 24. オンターゲット配列及び対応する crRNA 配列。

| 標的遺伝子座 | 標的 | crRNA |
|---|---|---|
| AAVS1_T1 | TGTCCCCCCAAGTTTTGGAC（配列番号 252） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGTCCCCCCAAGTTTTGGAC（配列番号 253） |
| AAVS1_T2 | GGAGAGGTGAGGGACTTGGG（配列番号 254） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGAGAGGTGAGGGACTTGGG（配列番号 255） |
| AAVS1_T3 | GTGAGAATGGTGCGTCCTAG（配列番号 256） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTGAGAATGGTGCGTCCTAG（配列番号 257） |
| AAVS1_T4 | GGGGTTGTCCAGAAAAACGG（配列番号 258） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGGTTGTCCAGAAAAACGG（配列番号 259） |
| AAVS1_T5 | AACTGGCCCTGGCTTTGGCA（配列番号 260） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAACTGGCCCTGGCTTTGGCA（配列番号 261） |
| AAVS1_T6 | GTAGCCTCTCCCGCTCTGGT（配列番号 262） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTAGCCTCTCCCGCTCTGGT（配列番号 263） |
| AAVS1_T7 | GGGAAGTGGTTGGTCAGCAT（配列番号 264） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGAAGTGGTTGGTCAGCAT（配列番号 265） |
| AAVS1_T8 | AGCGGGTATGGGAAGGGCTT（配列番号 266） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAGCGGGTATGGGAAGGGCTT（配列番号 267） |
| EMX1_T1 | GGGCGCAGGGCCACCTGGAC（配列番号 268） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGCGCAGGGCCACCTGGAC（配列番号 269） |
| EMX1_T2 | GGATGGCGACTTCAGGCACA（配列番号 270） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGATGGCGACTTCAGGCACA（配列番号 271） |
| EMX1_T3 | ATGTGATTGATGCCCAAAGG（配列番号 272） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGATGTGATTGATGCCCAAAGG（配列番号 273） |
| EMX1_T4 | GGGGAGGCCTGGAGTCATGG（配列番号 274） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGGAGGCCTGGAGTCATGG（配列番号 275） |
| EMX1_T5 | TATTATTCCCATAGGGAAGG（配列番号 276） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTATTATTCCCATAGGGAAGG（配列番号 277） |
| EMX1_T6 | GAGCCAGTGTTGCTAGTCAA（配列番号 278） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGAGCCAGTGTTGCTAGTCAA（配列番号 279） |
| EMX1_T7 | AGCAAGGGACTATTCAGGGA（配列番号 280） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAGCAAGGGACTATTCAGGGA（配列番号 281） |
| EMX1_T8 | AAAATTGAGCAATCTACCCT（配列番号 282） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAAAATTGAGCAATCTACCCT（配列番号 283） |
| VEGFA_T1 | TGGGGGTGACCGCCGGAGCG（配列番号 284） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGGGGGTGACCGCCGGAGCG（配列番号 285） |
| VEGFA_T2 | AATCCTCCACCAGTCATGGT（配列番号 286） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAATCCTCCACCAGTCATGGT（配列番号 287） |
| VEGFA_T3 | GTTGACATTGTCCACACCTG（配列番号 288） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTTGACATTGTCCACACCTG（配列番号 289） |
| VEGFA_T4 | GGAAATCTATTGAGGCTCTG（配列番号 290） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGAAATCTATTGAGGCTCTG（配列番号 291） |
| VEGFA_T5 | TTAAACTCTCCATGGACCAG（配列番号 292） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTTAAACTCTCCATGGACCAG（配列番号 293） |
| VEGFA_T6 | GCCCATACTGGGGACCAAGG（配列番号 294） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGCCCATACTGGGGACCAAGG（配列番号 295） |
| VEGFA_T7 | GCCGTAACCCTTCGTGGGTA（配列番号 296） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGCCGTAACCCTTCGTGGGTA（配列番号 297） |
| VEGFA_T8 | AGCTCTCGTGGGGGTGGGTC（配列番号 298） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAGCTCTCGTGGGGGTGGGTC（配列番号 299） |

【１０２０】

【表５７】

表25. 非標的遺伝子座配列及び編集距離。

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| AAVS1_T1 | OT-0 | 2 | TGTCCCCCCAAGATTTGGAT (配列番号300) |
| AAVS1_T1 | OT-1 | 2 | TGTCCCCCAAACTTTTGGAC (SEQ ID NO: 301) |
| AAVS1_T1 | OT-2 | 3 | TGTCTCCGCCAAGTTTTGGA (配列番号302) |
| AAVS1_T1 | OT-3 | 3 | GTCCCCCAAAGCTTTTGGAC (配列番号303) |
| AAVS1_T1 | OT-4 | 3 | TGTCCCCAGAAGTTTTGGAA (配列番号304) |
| AAVS1_T1 | OT-5 | 3 | AGTCCCCCCAAGTCCTGGAC (配列番号305) |
| AAVS1_T1 | OT-6 | 3 | TGTCTCCACCAAGTTTTGGC (配列番号306) |
| AAVS1_T1 | OT-7 | 3 | TGTCCCCCCAAGTGTTGAAA (配列番号307) |
| AAVS1_T2 | OT-0 | 2 | GGAGGGGTGAGGGAGTTGGG (配列番号308) |
| AAVS1_T2 | OT-1 | 2 | GGAGTGGTGAGGGACTTGAG (配列番号309) |
| AAVS1_T2 | OT-2 | 2 | GGAGAGGATGGGGACTTGGG (配列番号310) |
| AAVS1_T2 | OT-3 | 2 | GAGAGGTGAGGGACTTGGGG (配列番号311) |
| AAVS1_T2 | OT-4 | 3 | GGAGAGGTGGGGGTGTTGGG (配列番号312) |

【１０２１】

【表５８】

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| AAVS1_T2 | OT-5 | 3 | GGGAGGCTGAGGCACTTGGG (配列番号313) |
| AAVS1_T2 | OT-6 | 3 | GGAGAGGGGAAGGATTTGGG (配列番号314) |
| AAVS1_T2 | OT-7 | 3 | GGAGAGGAGAGGGTACTTGG (配列番号315) |
| AAVS1_T3 | OT-0 | 2 | TGAGAATGGTGCGTCCTAGG (配列番号316) |
| AAVS1_T3 | OT-1 | 3 | GTGAGAATGGTGTGTCTTAC (配列番号317) |
| AAVS1_T3 | OT-2 | 3 | CTGAGAATGGTGGTCTCTAG (配列番号318) |
| AAVS1_T3 | OT-3 | 3 | GTGTGAATGGTGCTTCCTGG (配列番号319) |
| AAVS1_T3 | OT-4 | 3 | GTGGGAATGGCGCCTCCTAG (配列番号320) |
| AAVS1_T3 | OT-5 | 3 | CTGAGAATGGTGCTTTCTAG (配列番号321) |
| AAVS1_T3 | OT-6 | 3 | GATGAAATGGTGCTTCCTAG (配列番号322) |
| AAVS1_T3 | OT-7 | 3 | GTGAGAATGGTTCTGTCTAG (配列番号323) |
| AAVS1_T4 | OT-0 | 2 | GGGTTGTCCAGAAAAACGGT (配列番号324) |
| AAVS1_T4 | OT-1 | 2 | GAGGGTTGTCCAGAAAAAGG (配列番号325) |
| AAVS1_T4 | OT-2 | 3 | GGGGTGCTCCAGAAAAACGT (配列番号326) |
| AAVS1_T4 | OT-3 | 3 | GGGTTCTCCAGAAAAACGGA (配列番号327) |
| AAVS1_T4 | OT-4 | 3 | GGGTGTTGCCCAGAAAAAGG (配列番号328) |
| AAVS1_T4 | OT-5 | 3 | GGTGTTGTCCAGAAAGACGT (配列番号329) |
| AAVS1_T4 | OT-6 | 3 | AGGGTTGTCCCAGAAAAAGG (配列番号330) |
| AAVS1_T4 | OT-7 | 3 | TGGGTTGTATAGAAAAACGG (配列番号331) |
| AAVS1_T5 | OT-0 | 2 | ACTGGCCCTGGCTTTGGCAG (配列番号332) |
| AAVS1_T5 | OT-1 | 2 | AACTGGCCCTGGCTCTGGCC (配列番号333) |
| AAVS1_T5 | OT-2 | 3 | CAATGCCCCTGGCTTTGGCA (配列番号334) |
| AAVS1_T5 | OT-3 | 3 | AAACTGGCCCTGGCTCTGGC (配列番号335) |
| AAVS1_T5 | OT-4 | 3 | ACTGACCCTGGCTTATGGCA (配列番号336) |
| AAVS1_T5 | OT-5 | 3 | CCCTGGCTCTGGCTTTGGCA (配列番号337) |

【１０２２】

【表５９】

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| AAVS1_T5 | OT-6 | 3 | AATGGCCACTGGATTTGGCA (配列番号338) |
| AAVS1_T5 | OT-7 | 3 | AACTGTCCCTGGGCTTTGCA (配列番号339) |
| AAVS1_T6 | OT-0 | 2 | TAGCCTCTCCCGCTCTGGTT (配列番号340) |
| AAVS1_T6 | OT-1 | 3 | GCAGCCACTCCCTCTCTGGT (配列番号341) |
| AAVS1_T6 | OT-2 | 3 | GTAGACTCTCTCTCTCTGGT (配列番号342) |
| AAVS1_T6 | OT-3 | 3 | AGTGCCTCTCCTGCTCTGGT (配列番号343) |
| AAVS1_T6 | OT-4 | 3 | GTTAGCCTCTCCCTCTCTGT (配列番号344) |
| AAVS1_T6 | OT-5 | 3 | GAGTTCTCTCCCGCTCTGGT (配列番号345) |
| AAVS1_T6 | OT-6 | 3 | TAGCCTCACCTCGCTCTGGT (配列番号346) |
| AAVS1_T6 | OT-7 | 3 | GTAGTCCTCTCCCTCTCTGG (配列番号347) |
| AAVS1_T7 | OT-0 | 2 | GGGCAGTGGTTGGTGAGCAT (配列番号348) |
| AAVS1_T7 | OT-1 | 2 | GGGAGTGGTTGGTCATGCAT (配列番号349) |
| AAVS1_T7 | OT-2 | 2 | GGTAAGTGCTTGGTCAGCAT (配列番号350) |
| AAVS1_T7 | OT-3 | 2 | GGAAGTGGTTGGTCAGCATG (配列番号351) |
| AAVS1_T7 | OT-4 | 3 | GGGAAATGGTTTGTCAGCAG (配列番号352) |
| AAVS1_T7 | OT-5 | 3 | GGGAAGTGATTAGGTCACAT (配列番号353) |
| AAVS1_T7 | OT-6 | 3 | GGGAAGTTTTTGGTCATCAT (配列番号354) |
| AAVS1_T7 | OT-7 | 3 | GGAAAGTTGTTGGGCAGCAT (配列番号355) |
| AAVS1_T8 | OT-0 | 2 | AGCGGGTAGGGAAGGGTCTT (配列番号356) |
| AAVS1_T8 | OT-1 | 2 | GCGGGTATGGGAAGGGCTTT (配列番号357) |
| AAVS1_T8 | OT-2 | 3 | ACGCAGGATGGGAAGGGCTT (配列番号358) |
| AAVS1_T8 | OT-3 | 3 | AGCGGCTATGGGGAGGCCTT (配列番号359) |
| AAVS1_T8 | OT-4 | 3 | AGTAGGTATGGGAAGGGCCT (配列番号360) |
| AAVS1_T8 | OT-5 | 3 | AGAGGGTATGGGAATGGCTA (配列番号361) |
| AAVS1_T8 | OT-6 | 3 | AGCAGGTGAGGGAAGGGCTT (配列番号362) |

【１０２３】

【表６０】

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| AAVS1_T8 | OT-7 | 3 | AGTGGGTCTGGGTAGGGCTT (配列番号363) |
| EMX1_T1 | OT-0 | 2 | GGCGCAGGGCCACCTGGACC (配列番号364) |
| EMX1_T1 | OT-1 | 3 | GGGGCAGGGCCACCTGTAGC (配列番号365) |
| EMX1_T1 | OT-2 | 3 | GTGCCCAGGGCCACCCGGAC (配列番号366) |
| EMX1_T1 | OT-3 | 3 | GTTGCGCAGGGCCACTGGAC (配列番号367) |
| EMX1_T1 | OT-4 | 3 | GGGCGTGGGGCAACCTGGAC (配列番号368) |
| EMX1_T1 | OT-5 | 3 | GGCGCAGGGCACACCGGGAC (配列番号369) |
| EMX1_T1 | OT-6 | 3 | GGGCACAGGGGCCACCTGGA (配列番号370) |
| EMX1_T1 | OT-7 | 3 | AGGCACAGGGCCACTTGGAC (配列番号371) |
| EMX1_T2 | OT-0 | 2 | GATGGCGACTTCAGGCACAG (配列番号372) |
| EMX1_T2 | OT-1 | 3 | GATAGGCGATTTCAGGCACA (配列番号373) |
| EMX1_T2 | OT-2 | 3 | GGATGGCGACTGTAAGGCAA (配列番号374) |
| EMX1_T2 | OT-3 | 3 | GGATGGCGAATACAGGAACA (配列番号375) |
| EMX1_T2 | OT-4 | 3 | GCAGGGCGACTTCAGACACA (配列番号376) |
| EMX1_T2 | OT-5 | 3 | GGATGGCGAATTCAGTCACT (配列番号377) |
| EMX1_T2 | OT-6 | 4 | TGATGGAGAAATCAGGCACA (配列番号378) |
| EMX1_T2 | OT-7 | 4 | GGATGGGGCCTCCAGGCTCA (配列番号379) |
| EMX1_T3 | OT-0 | 2 | ATGTGACTTGAGCCCAAAGG (配列番号380) |
| EMX1_T3 | OT-1 | 2 | ATGTGATTTTTGCCCAAAGG (配列番号381) |
| EMX1_T3 | OT-2 | 2 | TGTGATTGATGCCCAAAGGT (配列番号382) |
| EMX1_T3 | OT-3 | 3 | ATGTAATTATGCCCCAAAGG (配列番号383) |
| EMX1_T3 | OT-4 | 3 | ATGTGATTGTTGACCAAATG (配列番号384) |
| EMX1_T3 | OT-5 | 3 | CTGTGATAGAAGCCCAAAGG (配列番号385) |
| EMX1_T3 | OT-6 | 3 | ATATGATAGATGCCCAAATG (配列番号386) |
| EMX1_T3 | OT-7 | 3 | ATTTGATGGAAGCCCAAAGG (配列番号387) |

【１０２４】

【表６１】

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| EMX1_T4 | OT-0 | 2 | GTGGAGTCCTGGAGTCATGG (配列番号388) |
| EMX1_T4 | OT-1 | 2 | GGGAGGCCTGGAGTCATGGC (配列番号389) |
| EMX1_T4 | OT-2 | 2 | GTGGGAGGCCTGGAGCATGG (配列番号390) |
| EMX1_T4 | OT-3 | 2 | GGGGAGGGTTGGAGTCATGG (配列番号391) |
| EMX1_T4 | OT-4 | 3 | GGGGAGGCCTGGAGATGATG (配列番号392) |
| EMX1_T4 | OT-5 | 3 | GGGAGGCCTCAGAGTCATGG (配列番号393) |
| EMX1_T4 | OT-6 | 3 | GGGAGGCCTTGGAATCATGG (配列番号394) |
| EMX1_T4 | OT-7 | 3 | GTGGAGTGCCTGGAGCATGG (配列番号395) |
| EMX1_T5 | OT-0 | 2 | TTATTATTCCCATGGGAAGG (配列番号396) |
| EMX1_T5 | OT-1 | 2 | TATTATTCCCATATTGAAGG (配列番号397) |
| EMX1_T5 | OT-2 | 2 | ATTATTCCCATAGGGAAGGG (配列番号398) |
| EMX1_T5 | OT-3 | 2 | TATTAATCCTATAGGGAAGG (配列番号399) |
| EMX1_T5 | OT-4 | 3 | TATTATGCCCATAGAGAAGA (配列番号400) |
| EMX1_T5 | OT-5 | 3 | TATTATTCTCAAAGGGGAGG (配列番号401) |
| EMX1_T5 | OT-6 | 3 | TATTTTTCCCATAGTGAAGA (配列番号402) |
| EMX1_T5 | OT-7 | 3 | TATTGTTCTCATAGAGAAGG (配列番号403) |
| EMX1_T6 | OT-0 | 2 | AGCCAGTGTTGCTAGTCAAG (配列番号404) |
| EMX1_T6 | OT-1 | 3 | GTAGCCGTGTTGCTAGTGAA (配列番号405) |
| EMX1_T6 | OT-2 | 3 | GAGCCACTGTTGGTACTCAA (配列番号406) |
| EMX1_T6 | OT-3 | 3 | GAGGCAGTGTTGCATAGCAA (配列番号407) |
| EMX1_T6 | OT-4 | 3 | GAGACAGTGTGGCAAGTCAA (配列番号408) |
| EMX1_T6 | OT-5 | 3 | CAGCCATTGTTGCTAGGCAA (配列番号409) |
| EMX1_T6 | OT-6 | 3 | TGCCAGTGTTGCTAAGTCAA (配列番号410) |
| EMX1_T6 | OT-7 | 3 | GAGCCACTGTTGAAAGTCAA (配列番号411) |
| EMX1_T7 | OT-0 | 3 | AGCCAGGGACTTTTCAGGGC (配列番号412) |

【１０２５】

【表６２】

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| EMX1_T7 | OT-1 | 3 | TGCAGGGGACTATTCAGAGA (配列番号413) |
| EMX1_T7 | OT-2 | 3 | AGCCAGGGACTTTTCAGGGC (配列番号414) |
| EMX1_T7 | OT-3 | 3 | ATCAAGGCACAATTCAGGGA (配列番号415) |
| EMX1_T7 | OT-4 | 3 | AGGAAGGGACTCTTCAGAGA (配列番号416) |
| EMX1_T7 | OT-5 | 3 | AGCAAGGGCCTTTCCAGGGA (配列番号417) |
| EMX1_T7 | OT-6 | 3 | AGCAAGTGATATTCAGGAGA (配列番号418) |
| EMX1_T7 | OT-7 | 3 | AGCAGGGGACATTCCAGGGA (配列番号419) |
| EMX1_T8 | OT-0 | 2 | AAATTGAGCAATCTACCCTG (配列番号420) |
| EMX1_T8 | OT-1 | 3 | AACTATTGAGCAATCTCCCT (配列番号421) |
| EMX1_T8 | OT-2 | 3 | AAAATTGAGTAATTTTCCCT (配列番号422) |
| EMX1_T8 | OT-3 | 3 | AAAATTGACCAATTCTACCC (配列番号423) |
| EMX1_T8 | OT-4 | 3 | ACAGTTGAGCATTCTACCCT (配列番号424) |
| EMX1_T8 | OT-5 | 3 | AAAGTTAGCAACTCTACCCT (配列番号425) |
| EMX1_T8 | OT-6 | 3 | AAAAATAAGCAATCTGCCCT (配列番号426) |
| EMX1_T8 | OT-7 | 3 | AATAATTGGCAATCTACTCT (配列番号427) |
| VEGFA_T1 | OT-0 | 2 | GGGGGTGACCGCCGGAGCGC (配列番号428) |
| VEGFA_T1 | OT-1 | 3 | TGGGGGAGCCGCCCGGAGCG (配列番号429) |
| VEGFA_T1 | OT-2 | 3 | TGGAGGTGACCGCCTGGGCG (配列番号430) |
| VEGFA_T1 | OT-3 | 3 | TGGGGGTGACAGCTGGTGCG (配列番号431) |
| VEGFA_T1 | OT-4 | 4 | TGGGGGTGGCAGCTGGACCG (配列番号432) |
| VEGFA_T1 | OT-5 | 4 | TGCGGGTGTCCGCCTGGACG (配列番号433) |
| VEGFA_T1 | OT-6 | 4 | TTGGGGTGACAGCCGGCGGG (配列番号434) |
| VEGFA_T1 | OT-7 | 4 | TTGGGGTGACCACAGGAGCA (配列番号435) |
| VEGFA_T2 | OT-0 | 2 | ATCCTCCACCAGTCATGGTG (配列番号436) |
| VEGFA_T2 | OT-1 | 3 | AATCCTCCCACAGTCCTGGT (配列番号437) |

【１０２６】

【表６３】

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| VEGFA_T2 | OT-2 | 3 | ATCCATCCACCAGCCATGGT (配列番号438) |
| VEGFA_T2 | OT-3 | 3 | AATCCTCCAACAGCCCTGGT (配列番号439) |
| VEGFA_T2 | OT-4 | 3 | AATCTTCCACACAGTCTGGT (配列番号440) |
| VEGFA_T2 | OT-5 | 3 | AATCCTCCACCTGTCTTGGC (配列番号441) |
| VEGFA_T2 | OT-6 | 3 | AATCCATCCACCATTCATGG (配列番号442) |
| VEGFA_T2 | OT-7 | 3 | AAGTCCTCACCAGTCATTGT (配列番号443) |
| VEGFA_T3 | OT-0 | 2 | TTGACATTGTCCACACCTGG (配列番号444) |
| VEGFA_T3 | OT-1 | 2 | GTTGACATTGACCACAGCTG (配列番号445) |
| VEGFA_T3 | OT-2 | 3 | GTTGACATGTCCAGCAGCTG (配列番号446) |
| VEGFA_T3 | OT-3 | 3 | GTGACACTTATCCACACCTG (配列番号447) |
| VEGFA_T3 | OT-4 | 3 | GTTGACTATTTTCCAACCTG (配列番号448) |
| VEGFA_T3 | OT-5 | 3 | TTTAACATTTTCCACACCTG (配列番号449) |
| VEGFA_T3 | OT-6 | 3 | GTTGACATTGCCCAGATCTG (配列番号450) |
| VEGFA_T3 | OT-7 | 3 | GAAAACATTGTCCACACCTG (配列番号451) |
| VEGFA_T4 | OT-0 | 2 | TGAAATCTAGTGAGGCTCTG (配列番号452) |
| VEGFA_T4 | OT-1 | 2 | GGAAATCCAGTGAGGCTCTG (配列番号453) |
| VEGFA_T4 | OT-2 | 2 | TGAAATCTAGTGAGGCTCTG (配列番号454) |
| VEGFA_T4 | OT-3 | 2 | GAAATCTATTGAGGCTCTGG (配列番号455) |
| VEGFA_T4 | OT-4 | 3 | AAAAATCTATTGAGGCTGTG (配列番号456) |
| VEGFA_T4 | OT-5 | 3 | GGATATCTATTAGTGCTCTG (配列番号457) |
| VEGFA_T4 | OT-6 | 3 | GGAAATATTTAGAGGCTCTG (配列番号458) |
| VEGFA_T4 | OT-7 | 3 | TGAAATCTAGTGGGGCTCTG (配列番号459) |
| VEGFA_T5 | OT-0 | 2 | TAAACTCTCCATGGACCAGG (配列番号460) |
| VEGFA_T5 | OT-1 | 3 | TTAAAATCTCCATGACCATG (配列番号461) |
| VEGFA_T5 | OT-2 | 3 | TTAATCTCTCCATGGAGCAC (配列番号462) |

【１０２７】

【表６４】

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| VEGFA_T5 | OT-3 | 3 | TTAAACTCTCTCATGGATCA (配列番号463) |
| VEGFA_T5 | OT-4 | 3 | GTTAAACTCTGCATGGACAG (配列番号464) |
| VEGFA_T5 | OT-5 | 3 | GTAAACTCTCCCTTGACCAG (配列番号465) |
| VEGFA_T5 | OT-6 | 3 | TTAAATCTCCATGAGACAAG (配列番号466) |
| VEGFA_T5 | OT-7 | 3 | TTAAACTCTACAGGACCAAG (配列番号467) |
| VEGFA_T6 | OT-0 | 2 | GCCCATGCTGGGGAACAAGG (配列番号468) |
| VEGFA_T6 | OT-1 | 2 | CCCATACTGGGGACCAAGGA (配列番号469) |
| VEGFA_T6 | OT-2 | 2 | GTCCATACTGGGAACCAAGG (配列番号470) |
| VEGFA_T6 | OT-3 | 3 | GCCCATGACAGGGGCCAAGG (配列番号471) |
| VEGFA_T6 | OT-4 | 3 | CCACAGACTGGGGACCAAGG (配列番号472) |
| VEGFA_T6 | OT-5 | 3 | GCCCATACTCGGGGACCTGG (配列番号473) |
| VEGFA_T6 | OT-6 | 3 | TCCCATAGTGGAGACCAAGG (配列番号474) |
| VEGFA_T6 | OT-7 | 3 | TACCATACTGGGGACCCAGG (配列番号475) |
| VEGFA_T7 | OT-0 | 2 | CCGTAACCCTTCGTGGGTAG (配列番号476) |
| VEGFA_T7 | OT-1 | 3 | GCTGTAATCCCTCGTGGGTA (配列番号477) |
| VEGFA_T7 | OT-2 | 3 | GCCTAACCCTGTTGTGGGTA (配列番号478) |
| VEGFA_T7 | OT-3 | 3 | GCCTAACCCTATCGTGGTTA (配列番号479) |
| VEGFA_T7 | OT-4 | 4 | GACGGAATCCTTCGTGAGTA (配列番号480) |
| VEGFA_T7 | OT-5 | 4 | GCCGTAAGCCCTTCGAGGTC (配列番号481) |
| VEGFA_T7 | OT-6 | 4 | GCGCAAAACCCTTCGTGGGT (配列番号482) |
| VEGFA_T7 | OT-7 | 4 | GCCATAACCCTACGGGGTGA (配列番号483) |
| VEGFA_T8 | OT-0 | 2 | GCTCTCGTGGGGGTGGGTCA (配列番号484) |
| VEGFA_T8 | OT-1 | 2 | AGCTCTGTGGGGGTGGGATC (配列番号485) |
| VEGFA_T8 | OT-2 | 3 | GGCTCTCATGGGGGTGTGTC (配列番号486) |
| VEGFA_T8 | OT-3 | 3 | AGCCTGGTGGGGGTGAGGTC (配列番号487) |

【１０２８】

【表６５】

| 標的遺伝子座 | 非標的参照 | 編集距離 | 非標的遺伝子座配列 |
|---|---|---|---|
| VEGFA_T8 | OT-4 | 3 | AGGCTCCGTGGGTGTGGGTC (配列番号488) |
| VEGFA_T8 | OT-5 | 3 | AGCTCTGTGGGGGTGAGGGC (配列番号489) |
| VEGFA_T8 | OT-6 | 3 | GGCTCTGTGGGGGTGGGATC (配列番号490) |
| VEGFA_T8 | OT-7 | 3 | AGCTCTCGGGGGGTGTGGGC (配列番号491) |

【１０２９】

表２４に示されるとおりの、各標的部位に対応するＲＮＡガイド配列を、実施例１１に記載されるとおり調製した。９６ウェルプレートのウェルにＨＥＫ２９３Ｔ細胞をプレーティングし、実施例１１に記載されるとおり各ウェルにＣａｓ１２ｉ２プラスミド及びＲＮＡガイド配列をトランスフェクトした。

【１０３０】

試料を回収し、実施例１１に記載されるとおりＮＧＳ用に調製した。Ｐｒｉｍｅｒ３ソ

フトウェアを使用して各非標的部位のプライマー対を同定し、編集された試料及び陰性対照（エフェクターのみ）試料における標的化したアンプリコンシーケンシング用に１２０～１４０塩基対アンプリコン内の中心に非標的配列を置いた。次に、オンターゲットアンプリコン、非標的アンプリコン及び編集されていない対照試料のＮＧＳ分析を完了した。技術的ばらつきを最小限に抑えるため、各オンターゲット及びそのオンターゲットに対応する全ての非標的についての入力材料は、同じ回収されたウェルから取った。その対を成す陰性対照試料のインデルレベルを所与として試料の非標的インデルレベルを推定する最尤推定法（ＭＬＥ）を用いることにより、バックグラウンド補正した非標的活性速度を生成した。

【１０３１】

オンターゲット編集は、標的配列においてバックグラウンドを上回るインデルレベル（本アッセイでは０．５％超）と定義された。オフターゲット編集は、対応する非標的配列の１つ以上においてバックグラウンドを上回るインデルレベル（本アッセイではＭＬＥ補正後に０．２％超）によって定義された。変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体について、各オンターゲット配列及び非標的配列のインデルレベルを計算した。

【１０３２】

図１４Ａ、図１４Ｂ及び図１４Ｃは、それぞれ、配列番号３のＣａｓ１２ｉ２変異体、配列番号４のＣａｓ１２ｉ２変異体及び配列番号５のＣａｓ１２ｉ２変異体を使用した、表２４のＡＡＶＳ１、ＥＭＸ１及びＶＥＧＦＡ遺伝子座上のオンターゲットインデル比率を示す。図１４Ａ、図１４Ｂ及び図１４Ｃは、表２５の非標的遺伝子座上のインデル比率を更に示す。ＡＡＶＳ１＿Ｔ５（編集距離２及び／又は３）及びＶＥＧＦＡ＿Ｔ６（編集距離２）に対応する非標的遺伝子座など、様々な非標的遺伝子座において、Ｃａｓ１２ｉ２変異体の各々による何らかのオフターゲット酵素活性が観察された。しかしながら、全体的に見ると、非標的遺伝子座の各々に関して最小限のオフターゲット活性が認められ、特定のオンターゲット遺伝子座（例えば、ＡＡＶＳ１＿Ｔ４、ＡＡＶＳ１＿Ｔ７、ＡＡＶＳ１＿Ｔ８、ＥＭＸ１＿Ｔ１、ＥＭＸ１＿Ｔ２、ＥＭＸ１＿Ｔ３、ＥＭＸ１＿Ｔ５、ＥＭＸ１＿Ｔ６、ＥＭＸ１＿Ｔ７、ＶＥＧＦＡ＿Ｔ４、ＶＥＧＦＡ＿Ｔ５、ＶＥＧＦＡ＿Ｔ７及びＶＥＧＦＡ＿Ｔ８）に対応するオフターゲット遺伝子座における酵素活性は、存在しないか又は無視できる程度であると決定された。従って、Ｃａｓ１２ｉ２変異体の各々は、複数の遺伝子座においてオフターゲット活性よりも高いオンターゲット活性を呈した。

【１０３３】

これらの方法を野生型Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体（例えば、親二元複合体）で繰り返す。非標的遺伝子座で酵素活性の減少を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体は、非標的遺伝子座において親二元複合体と比較して低いインデル比率を呈する。オンターゲット遺伝子座で酵素活性の増加を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体は、標的遺伝子座において親二元複合体と比較して高いインデル比率を呈する。従って、本実施例は、オンターゲット遺伝子座及び非標的遺伝子座における野生型Ｃａｓ１２ｉ２及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２の酵素活性をどのように測定し、比較し得るかを示している。

【１０３４】

実施例１５　－　Ｃａｓ１２ｉ２変異体によるオフターゲット結合活性の決定

本実施例は、Ｃａｓ１２ｉ２（野生型及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２）二元複合体によるオンターゲット配列及び非標的配列への結合を評価して比較する方法について記載する。

【１０３５】

実施例１４のオンターゲット配列及び非標的配列に対応するｄｓＤＮＡ基質を実施例７に記載されるとおり作成し、標識する。次に、実施例１４のオンターゲット配列の各々を標的化するＣａｓ１２ｉ２　ＲＮＰを実施例７の方法に従い調製する。ＲＮＡガイドの容積を$H_2O$で補って、アポ反応（ＲＮＡガイドのないＣａｓ１２ｉ２）を同じように調製する。

【１０３６】

実施例７に記載されるとおり、各ＲＮＰ又はアポ試料をオンターゲットｄｓＤＮＡ基質

及び非標的ｄｓＤＮＡ基質と共に別々に３７℃で１時間インキュベートする。反応物にブロモフェノールブルーを加え、次にそれを６％ＤＮＡ　Ｒｅｔａｒｄａｔｉｏｎ　Ｇｅｌ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）に負荷し、Ｌｉｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙ　ＣＬｘでゲルを画像化する。

【１０３７】

本アッセイでは、ＤＮＡがゲル中を移動する速度は、そのサイズによって決まる。ＤＮＡのみの試料は、特定の距離を移動することが可能である。しかしながら、そのＤＮＡにＲＮＰが結合した場合、より大きい、移動度の低いＤＮＡ複合体に相当するバンドが現れ、これはゲル上で「上方シフト」する。従って、各ＲＮＰについて、ゲルにおいて「未結合ｄｓＤＮＡ」及び「結合ｄｓＤＮＡ」バンドが同定され、ここで、「結合ｄｓＤＮＡ」は、「未結合ｄｓＤＮＡ」よりも移動が少ない。

【１０３８】

オンターゲット結合の増加を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰは、親ＲＮＰと比較して強度がより高い上方シフトしたバンドからも明らかなとおり、ｄｓＤＮＡ標的配列への結合の増加を呈する。非標的結合の減少を示す変異体Ｃａｓ１２ｉ２　ＲＮＰは、親ＲＮＰと比較して上方シフトしたバンドの強度がより低い又はそれが見当たらないことからも明らかなとおり、ｄｓＤＮＡ非標的配列への結合の減少を呈する。

【１０３９】

従って、本実施例は、野生型Ｃａｓ１２ｉ２及び変異体Ｃａｓ１２ｉ２二元複合体がオンターゲット基質及び非標的基質に及ぼす結合活性をどのように測定し、比較し得るかを示している。

【１０４０】

実施例１６　－　変異体Ｃａｓ１２ｉ２オフターゲット切断部位の決定方法

本実施例では、Ｓｃｈｍｉｄ－Ｂｕｒｇｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　７８（４）：７９４－８００（２０００）に記載されるタグメンテーションベースのタグ組込み部位シーケンシング（ＴＴＩＳＳ）方法の修正版をＣａｓ１２ｉ２変異体の特異性及び活性の分析に使用した。本明細書に記載される方法の概略図を図１５に示す。

【１０４１】

表ＸＸのＴＴＩＳＳドナーオリゴヌクレオチド及びプライマーがＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ、ＩＡ）によって合成された。「／５ｐｈｏｓ／」は５'リン酸化部位を意味し、「３ｄｄＣ／」は３'ジデオキシシチジンを意味し、及び「＊」はホスホロチオエート結合を意味する。

【１０４２】

【表６６】

表 26. TTISS 方法配列。

| | |
|---|---|
| ドナー_センス | /5phos/G*T*TGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACGCCTCTCTCCCA GCGACT*A*T （配列番号 513） |
| ドナー_アンチセンス | /5phos/A*T*AGTCGCTGGGAGAGAGGCGTTATCCTCCTCGCCCTTG CTCACA*A*C （配列番号 514） |
| トランスポゾン_ME | /5Phos/CTGTCTCTTATACA/3ddC/ （配列番号 515） |
| トランスポゾン_リード_2 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG （配列番号 516） |
| PCR_fwd_1 | GTCGCTGGGAGAGAGGCGTTATC （配列番号 517） |
| リード_2_プライミング_配列 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGT （配列番号 518） |
| PCR2_突出型プライマー1 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCAC （配列番号 519） |
| PCR2_突出型プライマー2 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCA （配列番号 520） |
| PCR2_突出型プライマー3 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTCGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTC （配列番号 521） |
| PCR2_突出型プライマー4 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTGCGTTATCCTCCTCGCCCTTGCT （配列番号 522） |
| PCR2_突出型プライマー5 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTGGCGTTATCCTCCTCGCCCTTGC （配列番号 523） |
| PCR2_突出型プライマー6 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTAGGCGTTATCCTCCTCGCCCTTG （配列番号 524） |
| PCR2_突出型プライマー7 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGGCGTTATCCTCCTCGCCCTT （配列番号 525） |
| PCR2_突出型プライマー8 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTAGAGGCGTTATCCTCCTCGCCCT （配列番号 526） |
| PCR2_突出型プライマー9 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGAGGCGTTATCCTCCTCGCCC （配列番号 527） |
| PCR2_突出型プライマー10 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTAGAGAGGCGTTATCCTCCTCGCC （配列番号 528） |
| PCR2_突出型プライマー11 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGAGAGGCGTTATCCTCCTCGC （配列番号 529） |
| PCR2_突出型プライマー12 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTGGAGAGAGGCGTTATCCTCCTCG （配列番号 530） |

【１０４３】

【表６７】

| | |
|---|---|
| PCR_rev_BC1 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAATGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号531） |
| PCR_rev_BC2 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCTCCGGAGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号532） |
| PCR_rev_BC3 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAATGAGCGGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号533） |
| PCR_rev_BC4 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGAATCTCGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号534） |
| PCR_rev_BC5 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCTGAATGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号535） |
| PCR_rev_BC6 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACGAATTCGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号536） |
| PCR_rev_BC7 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGCTTCAGGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号537） |
| PCR_rev_BC8 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGCATTAGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号538） |
| PCR_rev_BC9 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATAGCCGGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号539） |
| PCR_rev_BC10 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCGCGGAGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号540） |
| PCR_rev_BC11 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGCGAGAGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号541） |
| PCR_rev_BC12 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTATCGCTGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号542） |
| PCR_rev_BC13 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGTAGTGCGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号543） |
| PCR_rev_BC14 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGTCGACGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号544） |
| PCR_rev_BC15 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGTCTTCTGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号545） |
| PCR_rev_BC16 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAATGTCCGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号546） |
| PCR_rev_BC17 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTTGAAACGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号547） |
| PCR_rev_BC18 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCTTTACGGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号548） |
| PCR_rev_BC19 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATGCCTGGGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号549） |
| PCR_rev_BC20 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCAATAAGGGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号550） |
| PCR_rev_BC21 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGCCGTAAGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号551） |
| PCR_rev_BC22 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTAAGGCTTGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号552） |
| PCR_rev_BC23 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTGCTGCCGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号553） |
| PCR_rev_BC24 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTCAATGTGTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGT（配列番号554） |

【１０４４】

等容積のＰＣＲ２＿突出型プライマー１～ＰＣＲ２＿突出型プライマー１２を加え、１０ｍＭトリス－ＨＣｌで１０倍希釈することにより、ＰＣＲ＿ｆｗｄ＿２＿突出末端＿混合物（１０μＭ）を調製した。

【１０４５】

９６ウェルＰＣＲプレートにおいて等モル量のドナー＿センス及びドナー＿アンチセンスオリゴを混合し、この４５μＬの等モル混合物を５μＬのＩＤＴ二重鎖緩衝液（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）と混合することにより、二本鎖ＴＴＩＳＳドナーオリゴを調製した。次に、プレートをサーマルサイクラーに置き、試料を９５℃に加熱し、続いて温度を２５℃までランプ降下させるプログラムを、サイクル毎に温度を０．１℃ずつ減少させる６秒サイクルを７００回実行することによって実行することにより、オリゴを二重鎖化した。

【１０４６】

各３３２μＬの１００μＭトランスポゾン＿ＭＥ及び１００μＭのトランスポゾン＿リード＿２オリゴを８０μＬの１０×アニーリング緩衝液（３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、１５ｍＭ　ＨＣｌ）及び４０μＬの超純水（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と

組み合わせることにより、トランスポゾンＤＮＡを調製した。この混合物を９６ウェルＰＣＲプレートの８ウェルにわたって分配した。ＰＣＲプレートをサーマルサイクラーに置き、試料を９５℃に３分間加熱し、続いて温度を２５℃までランプ降下させるプログラムを、サイクル毎に温度を０．１℃ずつ減少させる６秒サイクルを７００回実行することによって実行することにより、トランスポゾンＤＮＡをアニーリングした。

【１０４７】

アニーリングステップの完了後、次にトランスポゾンＤＮＡを１００ｎｇ／μＬに希釈した。次に、３７５μＬ　１００ｎｇ／μＬトランスポゾンＤＮＡを３７５μＬグリセロール及び７５０μＬ　ＥＺ－Ｔｎ５トランスポザーゼ（Ｌｕｃｉｇｅｎ）と混合した。次にこの溶液をボルテックスすることによって混合し、室温で３０分間インキュベートして、負荷されたＴｎ５トランスポソームを形成した。トランスポソームは、使用準備が整うまで－２０℃で貯蔵した。

【１０４８】

トランスフェクション前、ＨＥＫ　２９３Ｔ細胞を２４ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）の５００μＬ　Ｄ１０培地（１０％Ｐｒｅｍｉｕｍ熱失活ＦＢＳ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）及びペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質（Ｈｙｃｌｏｎｅ）を補足したＧｌｕｔａＭａｘ及びピルビン酸塩（Ｇｉｂｃｏ）を含有するＤＭＥＭ）に各ウェル１２５，０００細胞の密度でプレーティングした。３７℃及び５％$CO_2$に設定したインキュベーターにおいて細胞を一晩培養した。

【１０４９】

プレーティングから約１５時間後に細胞をトランスフェクトした。トランスフェクトする各ウェルについて、約１．２５ｎｇ／μＬの５００ｎｇドナーオリゴ、１０００ｎｇ／μＬの３７５ｎｇ　Ｃａｓ１２ｉ２エフェクタープラスミド（配列番号４のＣａｓ１２ｉ２変異体）及び１００ｎｇ／μＬの１２５ｎｇ　ＲＮＡガイドプラスミドを最終容積が１２５μＬとなるようにＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ）に加えることにより、Ｏｐｔｉ－１溶液を形成した。ＲＮＡガイド及び標的配列は表２７に示す；ＳｐＣａｓ９を対照として使用した。別の容器にて、１２２．５μＬ　Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ培地を２．５μＬ　ＧｅｎｅＪｕｉｃｅトランスフェクション試薬（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ－Ｓｉｇｍａ）と混合することにより、Ｏｐｔｉ－２溶液を形成した。Ｏｐｔｉ－２溶液を室温で５分間インキュベートした。Ｏｐｔｉ－２のインキュベーション後、Ｏｐｔｉ－１及びＯｐｔｉ－２を一緒に混合し、室温で５～１５分間インキュベートした。インキュベーション後、Ｏｐｔｉ－１＋Ｏｐｔｉ－２溶液を２４ウェルプレートの単一のウェルに滴下して加えた。細胞をインキュベーターに約７２時間戻した。

【１０５０】

【表６８】

表 27. TTISS 用の標的及び crRNA 配列。

| 標的遺伝子座 | 標的 | crRNA | エフェクター |
|---|---|---|---|
| AAVS1_T1 | TGTCCCCCCAAGTTTTGGAC（配列番号 252） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGTCCCCCCAAGTTTTGGAC（配列番号 253） | 変異体 Cas12i2 |
| AAVS1_T3 | GTGAGAATGGTGCGTCCTAG（配列番号 256） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTGAGAATGGTGCGTCCTAG（配列番号 257） | 変異体 Cas12i2 |

【１０５１】

【表６９】

| 標的遺伝子座 | 標的 | crRNA | エフェクター |
|---|---|---|---|
| AAVS1_T5 | AACTGGCCCTGGCTTTGGCA（配列番号260） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAACTGGCCCTGGCTTTGGCA（配列番号261） | 変異体Cas12i2 |
| AAVS1_T6 | GTAGCCTCTCCCGCTCTGGT（配列番号262） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTAGCCTCTCCCGCTCTGGT（配列番号263） | 変異体Cas12i2 |
| AAVS1_T7 | GGGAAGTGGTTGGTCAGCAT（配列番号264） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGAAGTGGTTGGTCAGCAT（配列番号265） | 変異体Cas12i2 |
| AAVS1_T8 | AGCGGGTATGGGAAGGGCTT（配列番号266） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAGCGGGTATGGGAAGGGCTT（配列番号267） | 変異体Cas12i2 |
| EMX1_T1 | GGGCGCAGGGCCACCTGGAC（配列番号268） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGCGCAGGGCCACCTGGAC（配列番号269） | 変異体Cas12i2 |
| EMX1_T2 | GGATGGCGACTTCAGGCACA（配列番号270） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGATGGCGACTTCAGGCACA（配列番号271） | 変異体Cas12i2 |
| EMX1_T4 | GGGGAGGCCTGGAGTCATGG（配列番号274） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGGGAGGCCTGGAGTCATGG（配列番号275） | 変異体Cas12i2 |
| EMX1_T6 | GAGCCAGTGTTGCTAGTCAA（配列番号278） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGAGCCAGTGTTGCTAGTCAA（配列番号279） | 変異体Cas12i2 |
| EMX1_T7 | AGCAAGGGACTATTCAGGGA（配列番号280） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAGCAAGGGACTATTCAGGGA（配列番号281） | 変異体Cas12i2 |
| EMX1_T8 | AAAATTGAGCAATCTACCCT（配列番号282） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAAAATTGAGCAATCTACCCT（配列番号283） | 変異体Cas12i2 |
| VEGFA_T1 | TGGGGGTGACCGCCGGAGCG（配列番号284） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTGGGGGTGACCGCCGGAGCG（配列番号285） | 変異体Cas12i2 |
| VEGFA_T2 | AATCCTCCACCAGTCATGGT（配列番号286） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAATCCTCCACCAGTCATGGT（配列番号287） | 変異体Cas12i2 |
| VEGFA_T3 | GTTGACATTGTCCACACCTG（配列番号288） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTTGACATTGTCCACACCTG（配列番号289） | 変異体Cas12i2 |
| VEGFA_T5 | TTAAACTCTCCATGGACCAG（配列番号292） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTTAAACTCTCCATGGACCAG（配列番号293） | 変異体Cas12i2 |
| VEGFA_T6 | GCCCATACTGGGGACCAAGG（配列番号294） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGCCCATACTGGGGACCAAGG（配列番号295） | 変異体Cas12i2 |
| VEGFA_T7 | GCCGTAACCCTTCGTGGGTA（配列番号296） | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGCCGTAACCCTTCGTGGGTA（配列番号297） | 変異体Cas12i2 |
| AAVS1_T1 | GCTTTTGTCCCCCCAAGTTT（配列番号555） | GCTTTTGTCCCCCCAAGTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA | SpCas9 |

【１０５２】

【表７０】

| 標的遺伝子座 | 標的 | crRNA | エフェクター |
|---|---|---|---|
| | | GTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号556） | |
| AAVS1_T3 | TTGTGAGAATGGTGCGTCCT（配列番号557） | TTGTGAGAATGGTGCGTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号558） | SpCas9 |
| AAVS1_T5 | GCTTTAACTGGCCCTGGCTT（配列番号559） | GCTTTAACTGGCCCTGGCTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号:560） | SpCas9 |
| AAVS1_T6 | CTTTGTAGCCTCTCCCGCTC（配列番号561） | CTTTGTAGCCTCTCCCGCTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号562） | SpCas9 |
| AAVS1_T7 | TGGGAAGTGGTTGGTCAGCA（配列番号563） | TGGGAAGTGGTTGGTCAGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号564） | SpCas9 |
| AAVS1_T8 | GACTTTAGCGGGTATGGGAA（配列番号565） | GACTTTAGCGGGTATGGGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号566） | SpCas9 |
| EMX1_T1 | TCTTTGGGCGCAGGGCCACC（配列番号567） | TCTTTGGGCGCAGGGCCACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号568） | SpCas9 |
| EMX1_T2 | TGGATGGCGACTTCAGGCAC（配列番号569） | TGGATGGCGACTTCAGGCACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号570） | SpCas9 |
| EMX1_T4 | TTTGGGGAGGCCTGGAGTCA（配列番号571） | TTTGGGGAGGCCTGGAGTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号572） | SpCas9 |
| EMX1_T6 | GAGCCAGTGTTGCTAGTCAA（配列番号573） | GAGCCAGTGTTGCTAGTCAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号574） | SpCas9 |
| EMX1_T7 | CTTTAGCAAGGGACTATTCA（配列番号575） | CTTTAGCAAGGGACTATTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号576） | SpCas9 |

【１０５３】

【表７１】

| 標的遺伝子座 | 標的 | crRNA | エフェクター |
|---|---|---|---|
| EMX1_T8 | TAAAATTGAGCAATCTAC CC（配列番号577） | TAAAATTGAGCAATCTACCCGTTTTA GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA GTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号578） | SpCas9 |
| VEGFA_T1 | TGGGGGTGACCGCCGGAG CG（配列番号579） | TGGGGGTGACCGCCGGAGCGGTTTTA GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA GTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号580） | SpCas9 |
| VEGFA_T2 | CTTTAATCCTCCACCAGT CA（配列番号581） | CTTTAATCCTCCACCAGTCAGTTTTA GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA GTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号582） | SpCas9 |
| VEGFA_T3 | TTGTTGACATTGTCCACA CC（配列番号583） | TTGTTGACATTGTCCACACCGTTTTA GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA GTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号584） | SpCas9 |
| VEGFA_T5 | TTTTAAACTCTCCATGGA CC（配列番号585） | TTTTAAACTCTCCATGGACCGTTTTA GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA GTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号586） | SpCas9 |
| VEGFA_T6 | TTTGCCCATACTGGGGAC CA（配列番号587） | TTTGCCCATACTGGGGACCAGTTTTA GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA GTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号588） | SpCas9 |
| VEGFA_T7 | GCTTTGCCGTAACCCTTC GT（配列番号589） | GCTTTGCCGTAACCCTTCGTGTTTTA GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA GTGGCACCGAGTCGGTGC（配列番号590） | SpCas9 |

【１０５４】

次に、培地を取り除き、２００μＬ　ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）で１回洗浄し、５０μＬのＴｒｙｐＬＥ解離試薬（Ｇｉｂｃｏ）を加え、３７℃で５分間インキュベートすることにより、プレートから細胞を解離させた。次に、２００μＬのＤ１０培地を加え、十分に混合することにより、細胞を再懸濁した。次に再懸濁した細胞を９６ウェルＰＣＲプレートに移し、４００×ｇで１０分間スピンダウンした。上清を取り除き、ＤＮＡ抽出時まで細胞ペレットを－２０℃で貯蔵した。

【１０５５】

ペレットを５０μＬ溶解緩衝液（１ｍＭ　ＣａＣｌ２、３ｍＭ　ＭｇＣｌ２、１ｍＭＥＤＴＡ、１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ）、８Ｕ／ｍＬプロテイナーゼＫ（ＮＥＢ）、１０ｍＭトリス－ＨＣｌ）に再懸濁し、再懸濁液を６５℃で１０分間インキュベートすることにより、細胞からＤＮＡを抽出した。次に、Ｚｙｍｏ　ｇＤＮＡ　ｃｌｅａｎ　ａｎｄ　ｃｏｎｃｅｎｔｅ－５キット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を製造者の指示に従い使用し、３５μＬの１０ｍＭトリス－ＨＣｌ中に溶出させて、ｇＤＮＡを精製した。ｇＤＮＡをゲル上に可視化し、Ｑｕｂｉｔ高感度ｄｓＤＮＡキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）により、製造者の指示に従い定量化した。次にｇＤＮＡ抽出物を１０ｍＭトリス－ＨＣｌ中５０ｎｇ／μＬに正規化した。

【１０５６】

ゲノムＤＮＡのタグメンテーションを行い、これは、初めに２４μＬトランスポソーム、６μＬ　ＥＺ－Ｔｎ５　１０×反応緩衝液（Ｌｕｃｉｇｅｎ）、２４μＬ精製及び希釈ゲノムＤＮＡ及び６μＬの水の溶液を調製することによった。この溶液を十分に混合し、３７℃で２時間インキュベートした。インキュベーション後、反応物中に６μＬのＥｚ－Ｔｎ５　１０×停止液を混合した。次に反応＋停止液混合物を７０℃で１０分間加熱した。次に、Ｚｙｍｏ　ｇＤＮＡ　ｃｌｅａｎ　ａｎｄ　ｃｏｎｃｅｎｔｅ－５キットを製造者の指示に従い使用し、５０μＬ　１０ｍＭトリス－ＨＣｌ中に溶出させて、停止させた反応物を精製した。

【１０５７】
各反応につき以下の条件として、ＫＯＤ　ＨｏｔＳｔａｒｔ　ＰＣＲキット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｓｉｇｍａ）を使用してラウンド１　ＰＣＲを実施した：ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ用の５μＬ　１０×緩衝液、３μＬ　２５ｍＭ　ＭｇＳＯ４、５μＬ　ｄＮＴＰ（各２ｍＭ）、１．５μＬ　ＰＣＲ＿ｆｗｄ＿１（１０μＭ）、１．５μＬトランスポゾン＿リード＿２（１０μＭ）、１μＬ　ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（１．０Ｕ／μＬ）、１５μＬのタグ付加し且つ精製したｇＤＮＡ及び１８μＬ超純水。全ての試薬を十分に混合し、反応は、製造者の指示に従い、６０℃のアニーリング温度及び６０秒の伸長時間を用いて行った。
【１０５８】
ラウンド２　ＰＣＲは、各反応につき以下の条件で実施した：ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ用の５μＬ　１０×緩衝液、３μＬ　２５ｍＭ　ＭｇＳＯ４、５μＬ　ｄＮＴＰ（各２ｍＭ）、ＰＣＲ＿ｆｗｄ＿２＿突出末端＿混合物（１０μＭ）、１．５μＬの１リバースバーコード付加用プライマー（ＰＣＲ＿ｒｅｖ＿ＢＣ１～ＰＣＲ＿ｒｅｖ＿ＢＣ２４）（１０μＭ）、１μＬ　ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（１．０Ｕ／μＬ）、３μＬ　ＰＣＲ１産物及び３０μＬ超純水。全ての試薬を十分に混合し、反応は、製造者の指示に従い、６５℃のアニーリング温度及び６０秒の伸長時間を用いて行った。
【１０５９】
次に、Ｃｌｅａｎ－ＮＧＳビーズ（Ｂｕｌｌｄｏｇ　Ｂｉｏ）を使用した０．８×ＳＰＲＩクリーンアップにより、５０μＬ　ＰＣＲ２反応物を精製した。ＳＰＲＩ反応物は、２５μＬ　１０ｍＭトリス－ＨＣｌに溶出させた。クリーン後の反応物をプールし、そのプールを２％Ｅ－ｇｅｌ　ＥＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に負荷し、次にそれをＥ－ｇｅｌベースに１０分間泳動させた。次に得られたスメアを２５０～１０００ｂｐまで剃刀で切り出し、切り出したライブラリをゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）で製造者の指示に従い、５０μＬ中に溶出させて精製した。Ｃｌｅａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ－５キット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を製造者の指示に従い使用して、２０μＬ中に溶出させて第２のライブラリ精製を実施した。
【１０６０】
次にライブラリをＱｕｂｉｔ高感度ｄｓＤＮＡキットによって定量化し、４００ｂｐの推定平均ライブラリサイズを用いて３ｎＭに正規化した。正規化後のライブラリを３ｎＭ　ＰｈｉＸ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）と混合し、そのためライブラリ：ＰｈｉＸ比は４：１となった。次に、最終的なライブラリ：ＰｈｉＸ混合物をＩｌｌｕｍｉｎａ　ＮｅｘｔＳｅｑ５５０高出力キットに２．０ｐＭの最終濃度で負荷した。リード長は、７５／８／０／２５　Ｒ１／Ｉ１／Ｉ２／Ｒ２に設定した。
【１０６１】
シーケンシング後、ＴＴＩＳＳデータを分析してオンターゲット及びオフターゲット部位を同定した。初めに未処理のシーケンシングデータをデマルチプレックス化し、Ｉｌｌｕｍｉｎａのｂｃｌ２ｆａｓｔｑ２ソフトウェアを使用してペアエンドｆａｓｔｑファイルに変換した。ｄｓＯＤＮプライマー配列で始まらないか、又はシーケンシングクオリティが低いリードをフィルタリングして除去し、残りのリードをフォワード方向に２５ｂｐのゲノムＤＮＡ及びリバース方向に１５ｂｐのゲノムＤＮＡとなるようにトランケートした。次にトランケートしたリードを、ｂｏｗｔｉｅ２を使用してＧＲＣｈ３８ヒト参照ゲノムとアラインメントすることにより、最大断片長が１０００ｂｐとなることを可能にした（Ｌａｎｇｍｅａｄ＆Ｓａｌｚｂｅｒｇ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　９：３５７－９（２０１２）。アラインメントをフィルタリングして、正しくマッピングされたリードペアのみを含め、ＳＡＭｔｏｏｌｓを使用してＰＣＲデュプリケートをマークした（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　３５（１６）：２０７８－９（２００９）。アラインメントされた少なくとも２つのユニークなリードを有する１００ｂｐゲノムウィンドウ全てを、可能性のある組込み部位と同定し、各ウィンドウについて、その

アラインメントされたリードの頻度及び位置分布に基づきカットサイズを予測した。次に、試料に使用した１つ又は複数の標的配列からの編集距離が６以内である任意の配列について各ウィンドウを検索し、その配列についての推定カット部位を決定した。ＳｐＣａｓ９は、標的の３'末端から－４ｂｐをカットし、Ｃａｓ１２ｉ２は、標的の３'末端から３ｂｐをカットした。いかなる推定オンターゲット／オフターゲット配列もないウィンドウを取り除き、同様に、推定オンターゲット／オフターゲット配列のカット部位がウィンドウの予測カット部位から８ｂｐを超えたウィンドウも取り除いた。陰性対照試料に現れたウィンドウも取り除き、共通の切断部位を回避した。次に、残りのウィンドウ、そのオンターゲット／オフターゲット配列並びにウィンドウとアラインメントしたリードの数及び同定されたオンターゲット／オフターゲットと標的配列との間の編集距離などの関連性のあるメトリックを出力した。

【１０６２】

表２８は、各Ｃａｓ１２ｉ２及びＳｐＣａｓ９標的について測定されたオンターゲットリード及びオフターゲット数を示す。「オンターゲットリード」は、オンターゲット部位の前後１００ｂｐウィンドウにマッピングされるユニークなリードの数を指す。「オフターゲット数」は、ゲノム中、部位の前後１００ｂｐウィンドウ以内にマッピングされる少なくとも２つのユニークなリードがあった、且つ推定オフターゲット配列（例えば、ガイド配列からの編集距離が６以内の、且つその部位にマッピングされるリードの分布から予測されるカット部位から８ｂｐ以内に予測カット部位がある配列）を含んだ部位の数を指す。「最大オフターゲットリード」は、最大リード数を有するオフターゲット部位についてのリード数を指す。図１６Ａ、図１６Ｂ、図１６Ｃ及び図１６Ｄは、標的ＥＭＸ１＿Ｔ２における配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２及びＳｐＣａｓ９についてのオンターゲット及びオフターゲットリードの概略図である。オンターゲット配列に対応する（例えば、それと同一である）リード中の各塩基を中黒点で指示し、オンターゲット配列に対応しない（例えば、それと同一でない）リード中の各塩基を、シーケンシングされた塩基で指示する。

【１０６３】

【表７２】

表 28. オンターゲット及びオフターゲットリード。

| 標的遺伝子座 | Cas12i2 オンターゲットリード | Cas12i2 オフターゲット数 | Cas12i2 最大オフターゲットリード | SpCas9 オンターゲットリード | SpCas9 オフターゲット数 | SpCas9 最大オフターゲットリード |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AAVS1_T1 | 289 | 0 | 0 | 79 | 0 | 0 |
| AAVS1_T3 | 251 | 1 | 4 | 747 | 1 | 14 |
| AAVS1_T5 | 410 | 1 | 71 | 291 | 1 | 6 |
| AAVS1_T6 | 507 | 2 | 4 | 674 | 1 | 9 |
| AAVS1_T7 | 725 | 2 | 12 | 87 | 1 | 4 |
| AAVS1_T8 | 66 | 1 | 13 | 864 | 1 | 29 |
| EMX1_T1 | 259 | 22 | 14 | 241 | 4 | 119 |
| EMX1_T2 | 860 | 0 | 0 | 787 | 4 | 342 |
| EMX1_T4 | 495 | 23 | 54 | 234 | 81 | 225 |
| EMX1_T6 | 522 | 0 | 0 | 329 | 0 | 0 |
| EMX1_T7 | 357 | 5 | 37 | 171 | 0 | 0 |
| EMX1_T8 | 274 | 3 | 24 | 713 | 2 | 7 |
| VEGFA_T1 | 389 | 4 | 7 | 388 | 5 | 112 |
| VEGFA_T2 | 118 | 1 | 14 | 180 | 2 | 9 |
| VEGFA_T3 | 523 | 0 | 0 | 874 | 0 | 0 |
| VEGFA_T5 | 465 | 0 | 0 | 444 | 0 | 0 |
| VEGFA_T6 | 217 | 2 | 14 | 431 | 4 | 41 |
| VEGFA_T7 | 272 | 0 | 0 | 1215 | 0 | 0 |

【１０６４】

表２８並びに図１６Ａ、図１６Ｂ、図１６Ｃ及び図１６Ｄのデータは、配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２がオンターゲットリードよりも大幅に少ないオフターゲットリードを実証したことを示している。対照的に、ＳｐＣａｓ９は、大きいリードカウントの幾つかのオフターゲットを生み出したことから、ＳｐＣａｓ９が変異体Ｃａｓ１２ｉ２と比較して高いオフターゲット編集効率を有したことが示唆される。図１６Ｂに示されるとおり、ＥＭＸ１＿Ｔ２の各Ｃａｓ１２ｉ２リードは、オンターゲットリードであった。しかしながら、ＳｐＣａｓ９リードは、大きいリードカウントの複数のＥＭＸ１＿Ｔ２オフターゲット配列を示した。図１６Ｃに示されるとおり、ＥＭＸ１＿Ｔ４について、ＳｐＣａｓ９オフターゲットリードはオンターゲットリードを超えた。表２８の「最大オフターゲットリード」欄も参照されたい。これらの結論は、選択のオフターゲット部位のディープシーケンシングによっても裏付けられ、ここでは、最大オフターゲットインデル率が変異体Ｃａｓ１２ｉ２について２．６％及びＳｐＣａｓ９について７７．７％であった。

【１０６５】

ＴＴＩＳＳ方法により、変異体Ｃａｓ１２ｉ２が５'－ＮＴＴＮ－３'ＰＡＭ配列を優先することが更に実証された。非標準ＰＡＭ配列と共に同定されたオフターゲットは、低いリードカウント及びガイドとオフターゲットとの間の大きい編集距離で現れたことから、それらのリードが真のオフターゲット部位でなく、代わりに偽陽性である可能性があることが示唆される。

【１０６６】

本実施例は、配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２が高いオンターゲット選択性及び活性を呈することを示している。ＳｐＣａｓ９によるオフターゲット結合／活性は、配列番号４の変異体Ｃａｓ１２ｉ２を超える。

【１０６７】

実施例１７　－　Ｃａｓ１２ｉ２変異体による哺乳類遺伝子の標的化

本実施例は、一過性トランスフェクションによって哺乳類細胞に導入した野生型Ｃａｓ１２ｉ２及びＣａｓ１２ｉ２変異体を使用した複数の標的に関するインデル評価について記載する。

【１０６８】

ｐｃｄａ３．１骨格（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）において、以下の突然変異：Ｄ５８１Ｒ、Ｉ９２６Ｒ、Ｖ１０３０Ｇ及びＳ１０４６Ｇを有する以前に改変した配列番号５のＣａｓ１２ｉ２変異体の上に、本実施例のＣａｓ１２ｉ２改変型変異体をクローニングした。このプラスミドは、１０Ｔ緩衝液中１μｇ／μＬとなるように規格化したｍｉｄｉ－ｐｒｅｐとしてＧｅｎｅｗｉｚに注文した。表１４に示されるとおりのｃｒＲＮＡ配列を環状化プラスミドｍｉｄｉ－ｐｒｅｐとして注文し、１０Ｔ緩衝液中１００ｎｇ／μＬに規格化した。

【１０６９】

【表７３】

表 29. 一過性トランスフェクション用の crRNA 及び標的配列。

| 標的 | crRNA 配列 | 標的配列 |
|---|---|---|
| AAVS1_T6 | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGTAGCCTCTCCCGCTCTGGT (配列番号 591) | GTAGCCTCTCCCGCTCTGGT (配列番号 592) |
| EMX1_T2 | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGGATGGCGACTTCAGGCACA (配列番号 593) | GGATGGCGACTTCAGGCACA (配列番号 594) |
| EMX1_T6 | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGAGCCAGTGTTGCTAGTCAA (配列番号 595) | GAGCCAGTGTTGCTAGTCAA (配列番号 596) |
| EMX1_T7 | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGAGCAAGGGACTATTCAGGGA (配列番号 597) | AGCAAGGGACTATTCAGGGA (配列番号 598) |
| VEGFA_T5 | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGTTAAACTCTCCATGGACCAG (配列番号 599) | TTAAACTCTCCATGGACCAG (配列番号 600) |
| VEGFA_T7 | AGAAATCCGTCTTTCATTGACGGGCCGTAACCCTTCGTGGGTA (配列番号 601) | GCCGTAACCCTTCGTGGGTA (配列番号 602) |

【１０７０】

トランスフェクションの約１６～１８時間前に、ＤＭＥＭ／１０％ＦＢＳ＋Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ中１００μＬの２５，０００個のＨＥＫ２９３Ｔ細胞を９６ウェルプレートの各ウェルにプレーティングした。トランスフェクション当日、細胞は７０～９０％コンフルエントであった。トランスフェクトする各ウェルについて、０．５μＬのリポフェクタミン２０００と９．５μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭとの混合物を調製し、次に室温で５～２０分間インキュベートした（溶液１）。インキュベーション後、このリポフェクタミン：ＯｐｔｉＭＥＭ混合物を、１８２ｎｇのエフェクタープラスミド及び１４ｎｇのｃｒＲＮＡ及び１０μＬに達するまでの水を含有する別の混合物に加えた（溶液２）。溶液１及び溶液２混合物を上下にピペッティングすることによって混合し、次に室温で２５分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞が入った９６ウェルプレートの各ウェルに２０μＬの溶液１及び溶液２混合物を滴下して加えた。トランスフェクションから７２時間後、各ウェルの中心に１０μＬのＴｒｙｐＬＥを加えることによって細胞をトリプシン処理し、約５分間インキュベートした。次に各ウェルに１００μＬのＤ１０培地を加えて混合することにより、細胞を再懸濁した。次に細胞を５００ｇで１０分間スピンダウンし、上清を廃棄した。元の細胞懸濁液容積の５分の１の量になるまでＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ緩衝液を加えた。細胞を６５℃で１５分間、６８℃で１５分間及び９８℃で１０分間インキュベートした。

【１０７１】

２ラウンドのＰＣＲにより、次世代シーケンシング用の試料を調製した。初回ラウンド（ＰＣＲ１）は、標的に応じた特定のゲノム領域の増幅に使用した。ＰＣＲ１産物はカラム精製によって精製した。ラウンド２のＰＣＲ（ＰＣＲ２）は、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプ

ター及びインデックスを付加するために行った。次に反応物をプールし、２％Ｅ－ｇｅｌＥＸに１０分間負荷し、ゲル抽出した。シーケンシングランは１５０サイクルＮｅｘｔＳｅｑ　ｖ２．５中出力又は高出力キットで行った。

【１０７２】

編集された標的は、バックグラウンドを上回るインデルレベル（このアッセイでは１．０％超）を示し、且つ次世代シーケンシングによるリードカウントが１０，０００より大きい標的として定義した。図１７Ａは、ＥＭＸ１＿Ｔ６及びＶＥＧＦＡ＿Ｔ７において幾つかの改変Ｃａｓ１２ｉ２変異体によって誘導されたインデルを示す。図１７Ｂは、ＥＭＸ１＿Ｔ６及びＶＥＧＦＡ＿Ｔ７において配列番号３～５及び４９５のＣａｓ１２ｉ２変異体によって誘導されたインデルを示す。図１８は、ＡＡＶＳ１＿Ｔ６、ＡＡＶＳ１＿Ｔ７、ＥＭＸ１＿Ｔ２、ＥＭＸ１＿Ｔ６及びＶＥＧＦＡ＿Ｔ５において配列番号４、４９５及び４９６のＣａｓ１２ｉ２変異体によって誘導されたインデルを示す。

【１０７３】

本実施例は、配列番号４９５及び配列番号４９６のＣａｓ１２ｉ２変異体が複数の標的部位でインデルレベルの増加を誘導したことを示している。

【図面】

【図１】

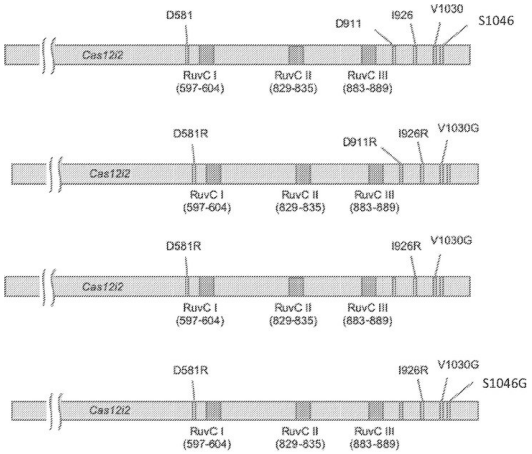



図1

【図２】

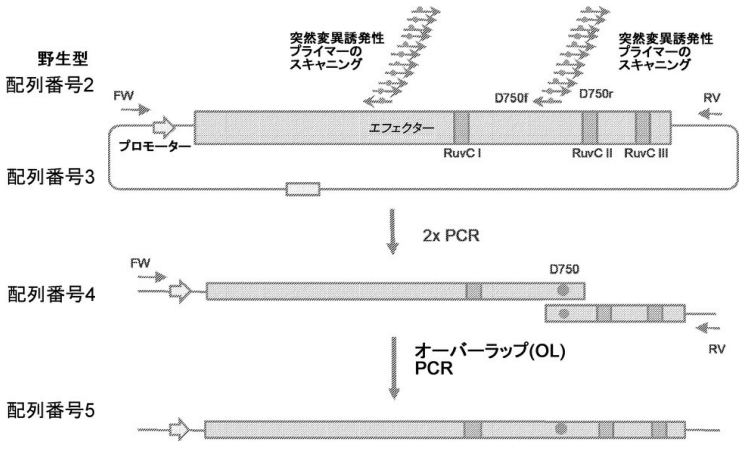



図2

【図３Ａ】

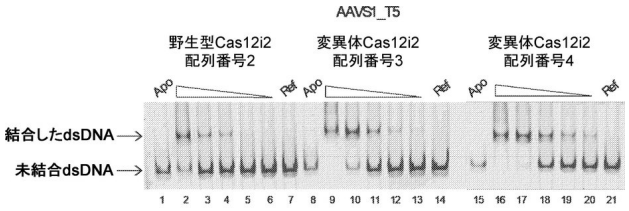



図3A

【図３Ｂ】

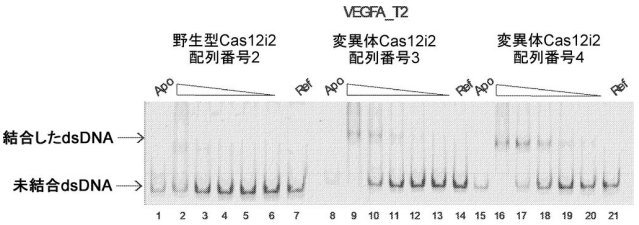



図3B

【図３Ｃ】

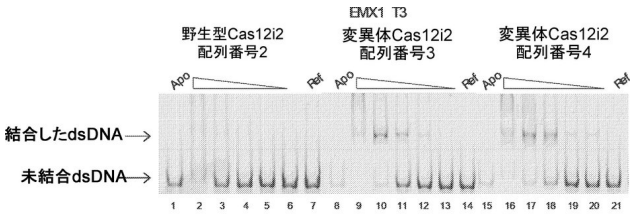



図3C

【図３Ｄ】

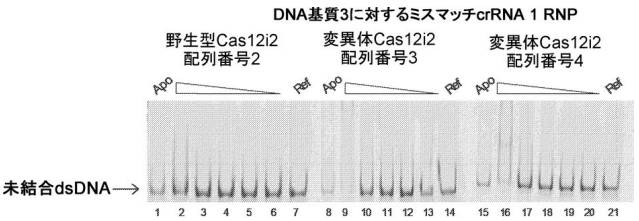



図3D

【図３Ｅ】

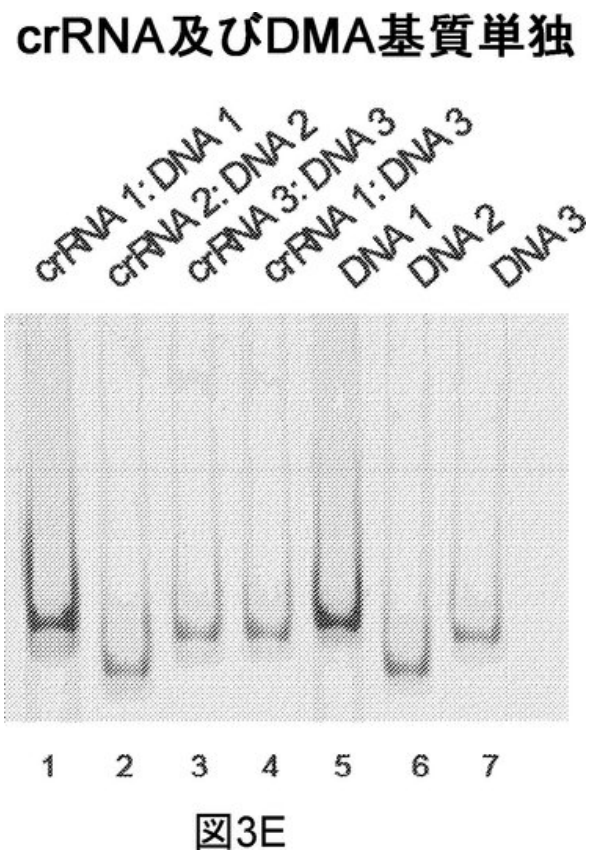



図3E

【図４】

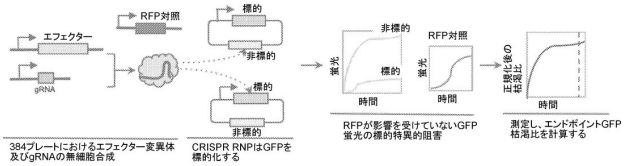



図4

【図５Ａ】

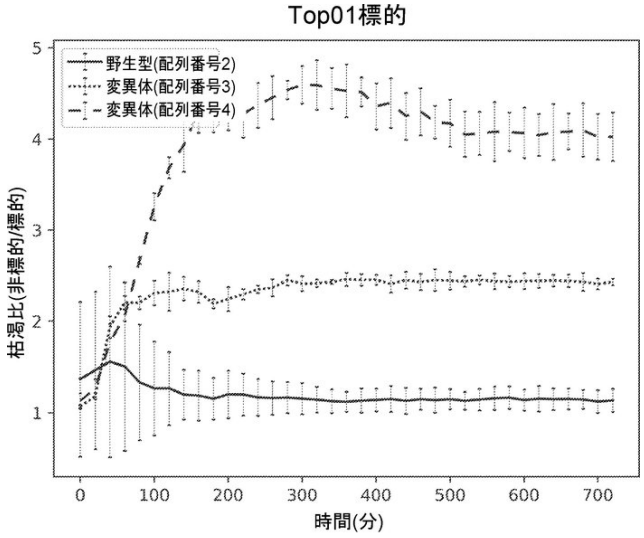



図5A

【図５Ｂ】

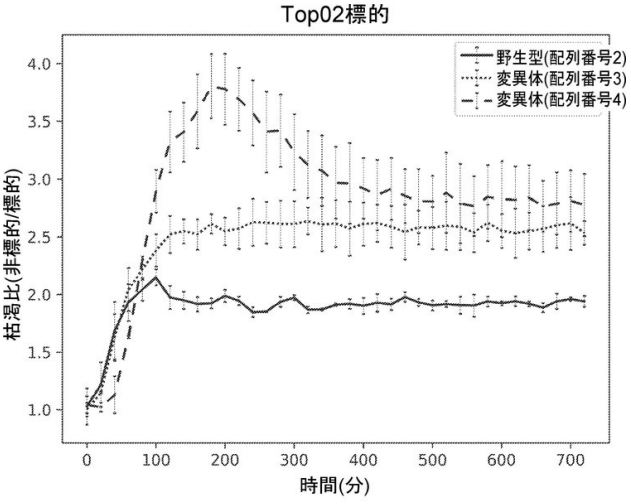



図5B

【図５Ｃ】

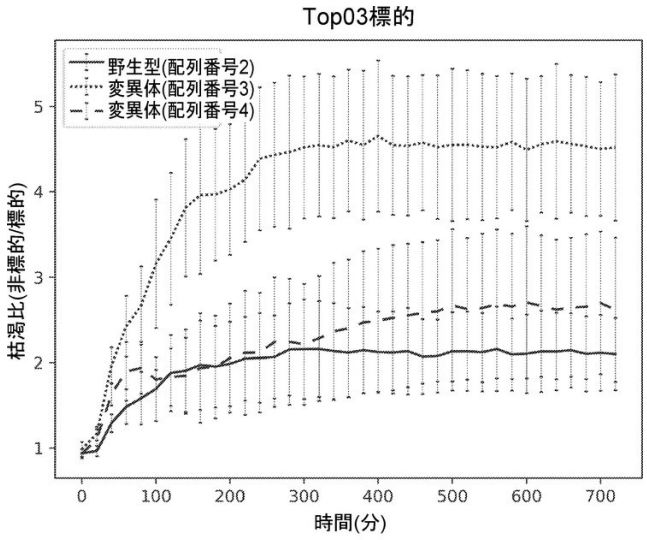



図5C

【図５Ｄ】

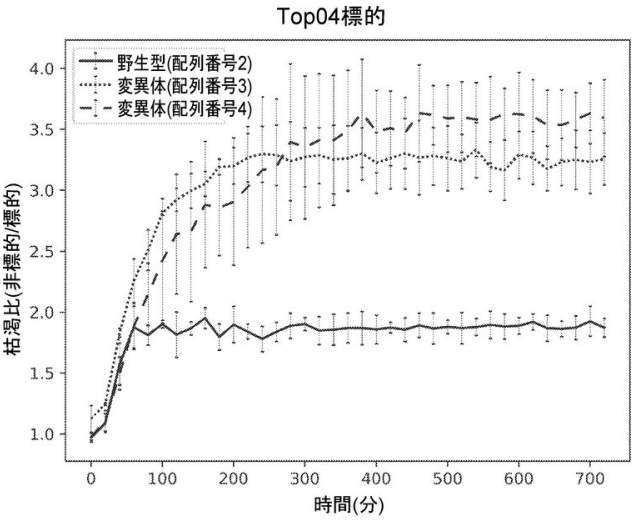



図5D

【図５Ｅ】

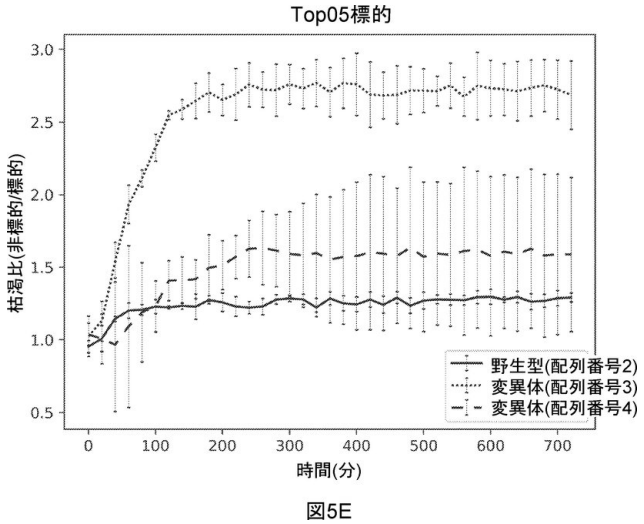



図5E

【図５Ｆ】

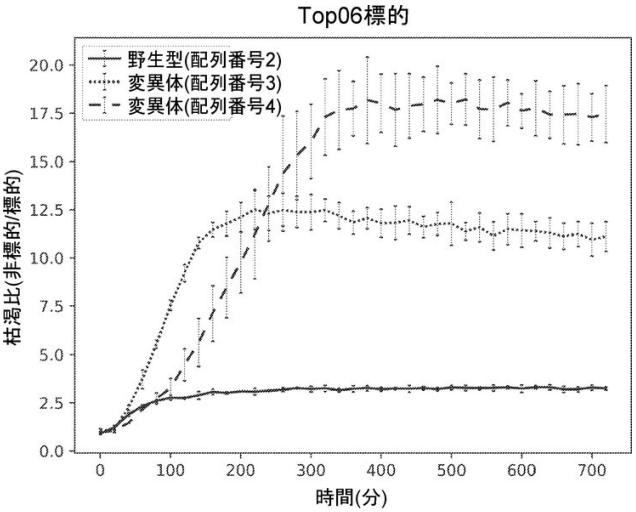



図5F

【図５Ｇ】

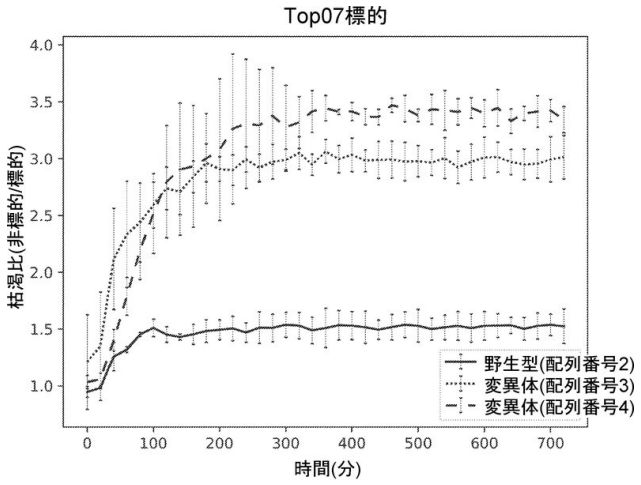



図5G

【図５Ｈ】

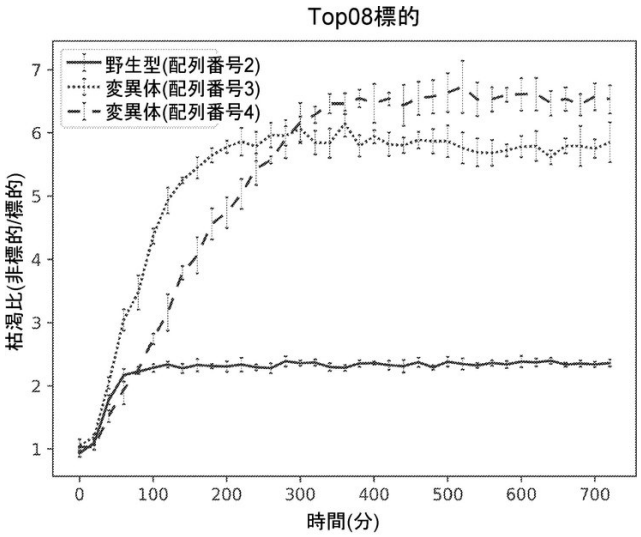



図5H

【図５Ｉ】

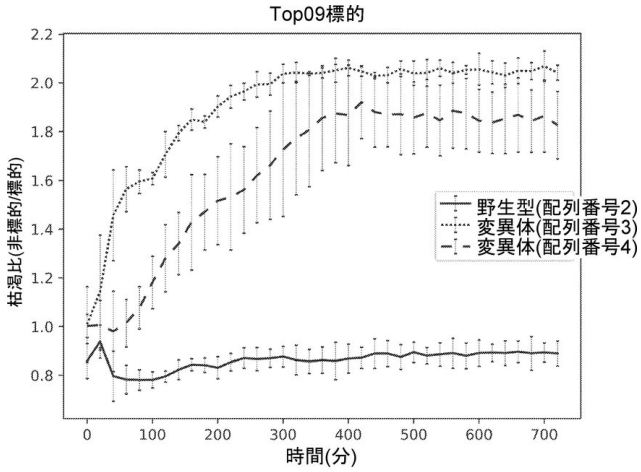



図5I

【図５Ｊ】

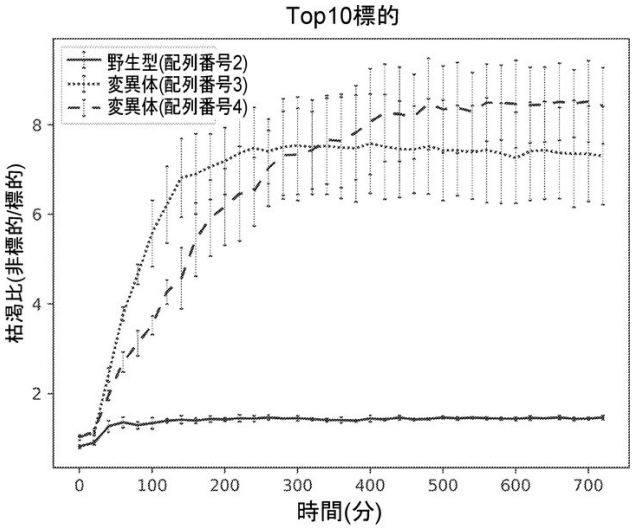



図5J

【図５Ｋ】

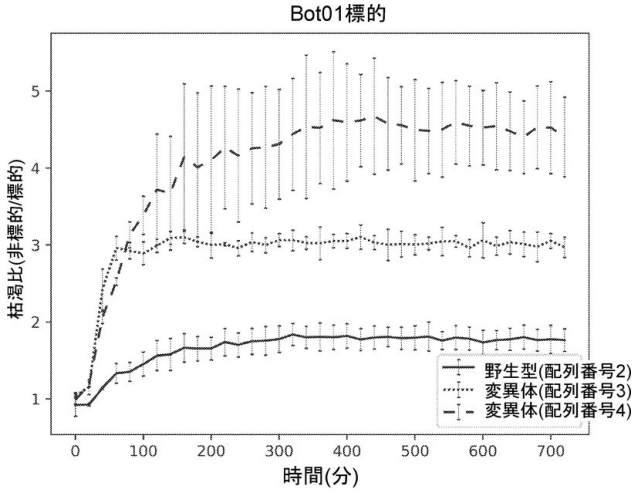



図5K

【図５Ｌ】

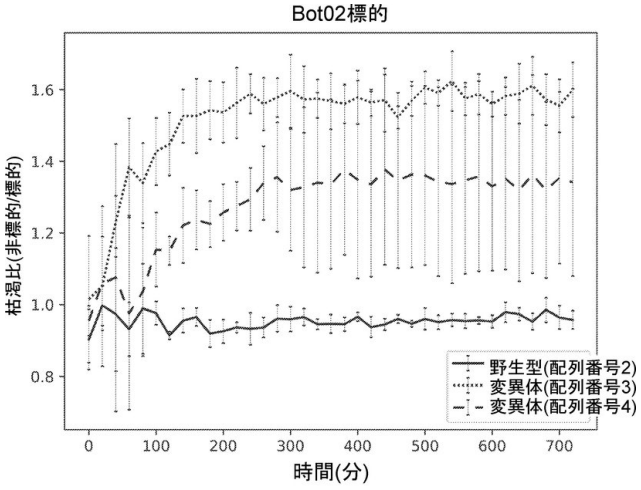



図5L

【図５Ｍ】

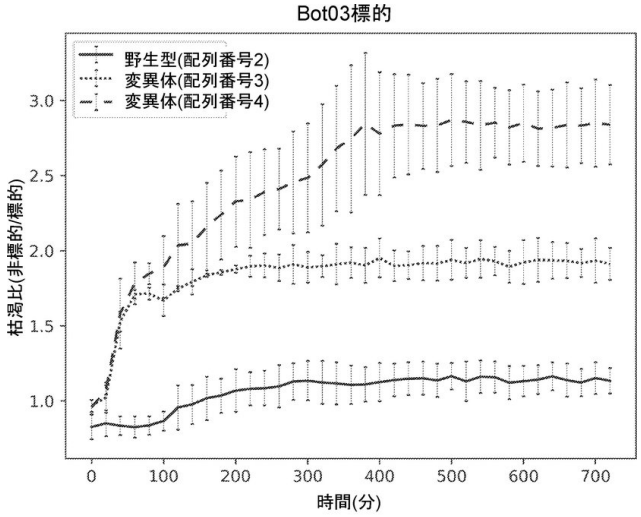



図5M

【図５Ｎ】

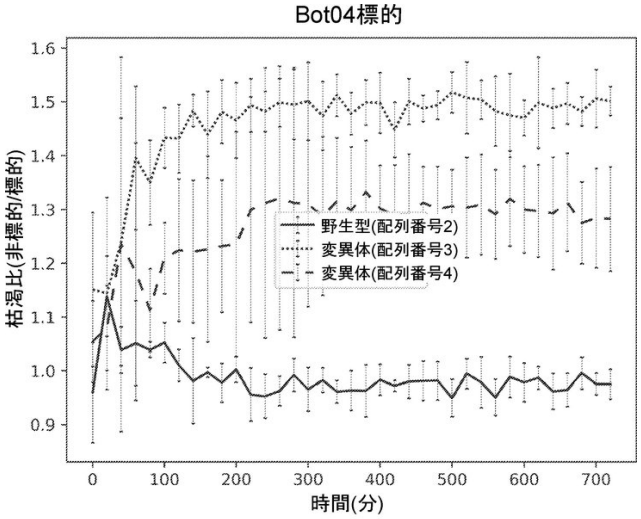



図5N

【図５Ｏ】

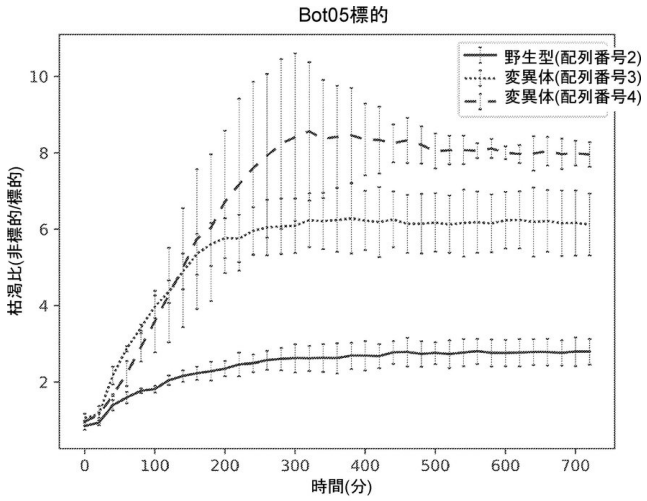



図5O

【図５Ｐ】

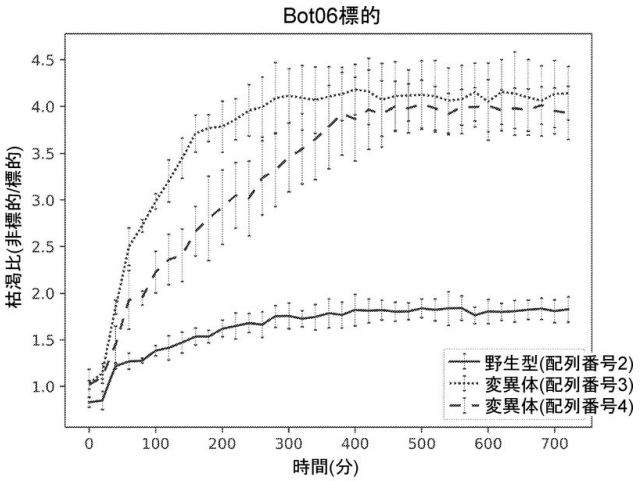



図5P

【図５Ｑ】

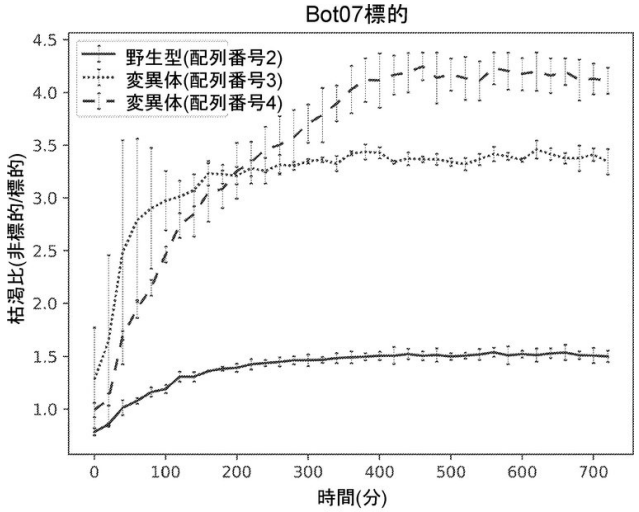



図5Q

【図５Ｒ】

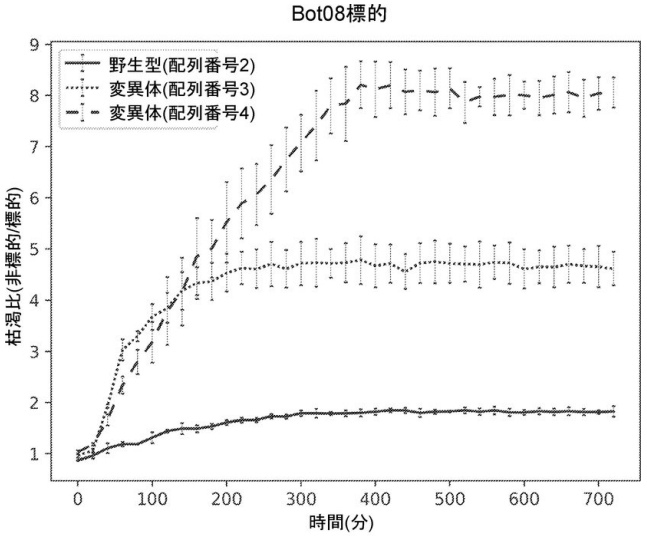



図5R

【図５Ｓ】

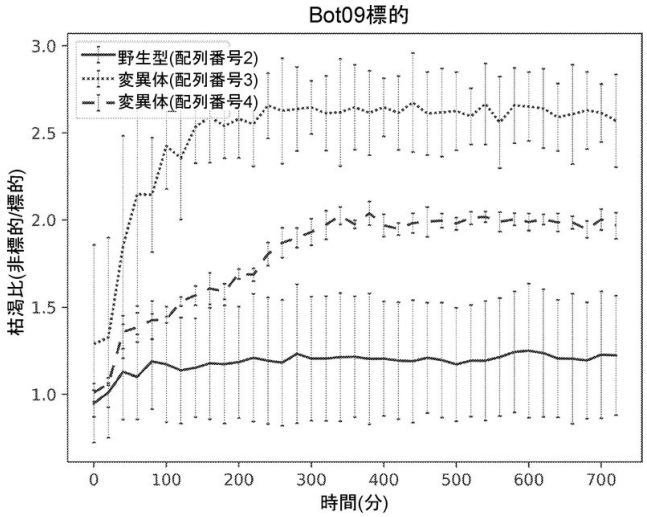



図5S

【図５Ｔ】

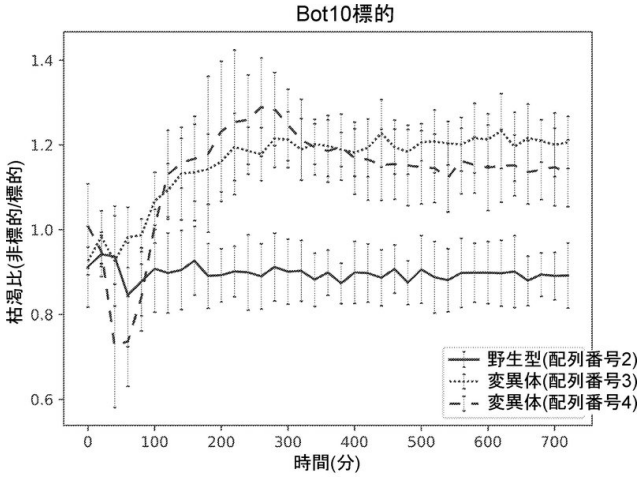



図5T

【図６Ａ】

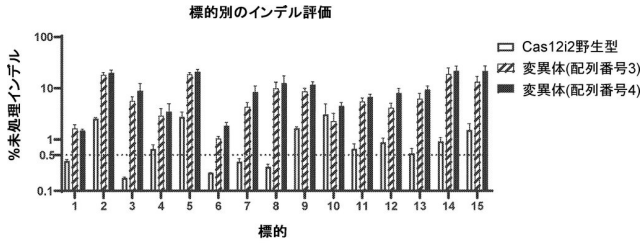



図6A

【図６Ｂ】

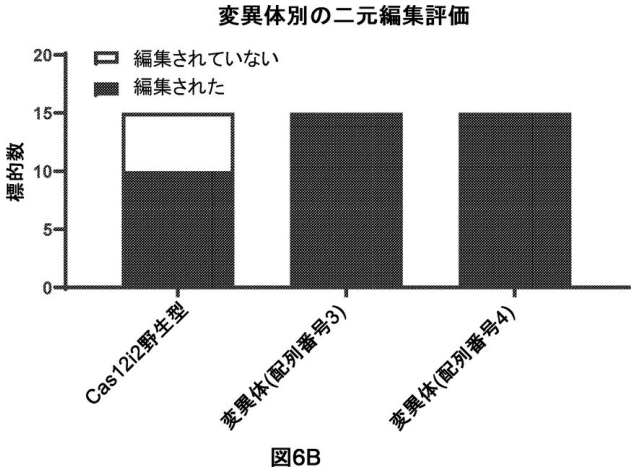



図6B

【図７Ａ】

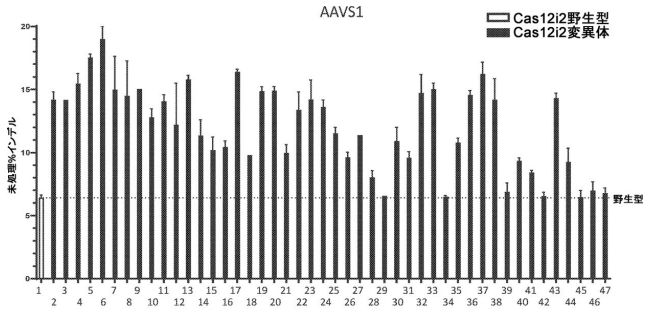



図7A

【図７Ｂ】

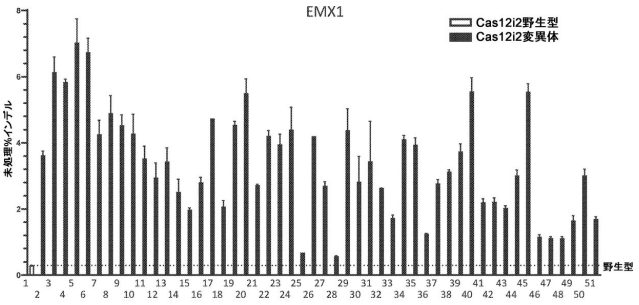



図7B

【図７Ｃ】

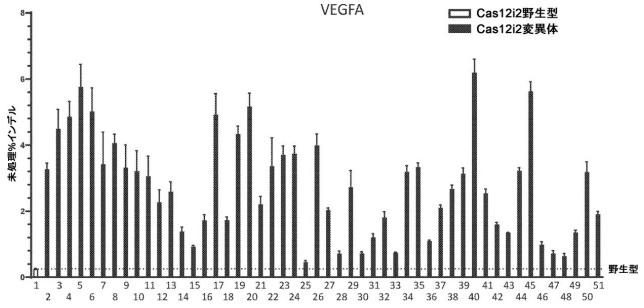



図7C

【図８】

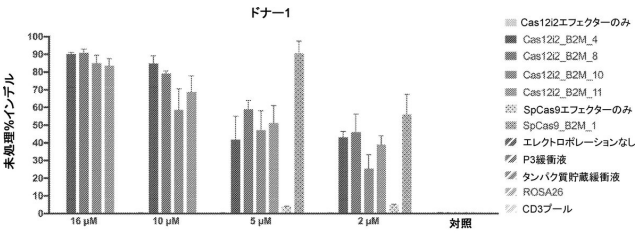



図8

【図９】

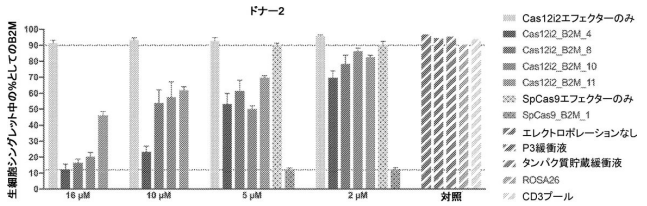



図9

【図１０】

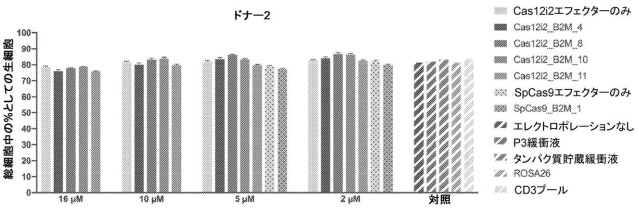



図10

【図１１Ａ】

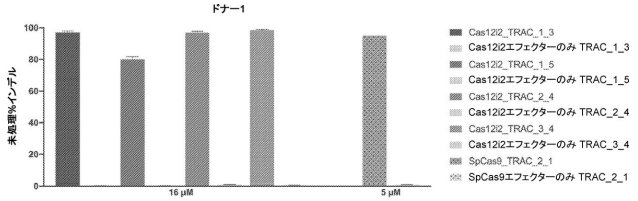



図11A

【図１１Ｂ】

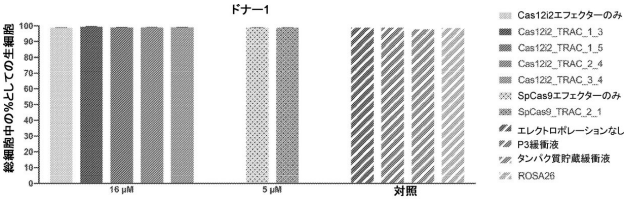



図11B

【図１２Ａ】

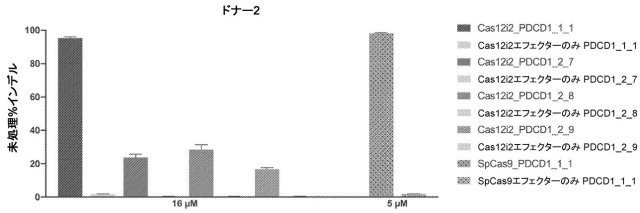



図12A

【図１２Ｂ】

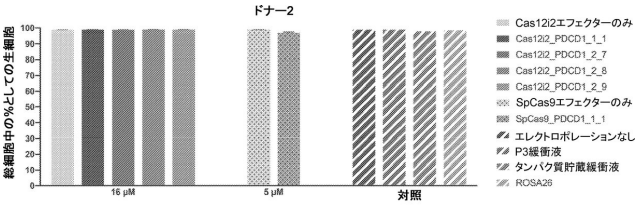



図12B

【図１３】

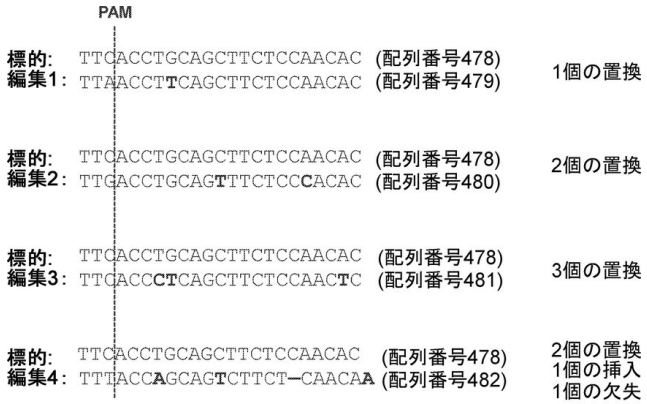



図13

【図１４Ａ】

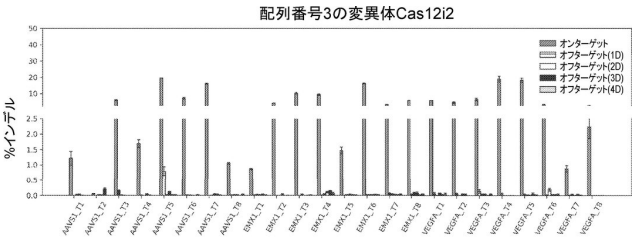



図14A

【図１４Ｂ】

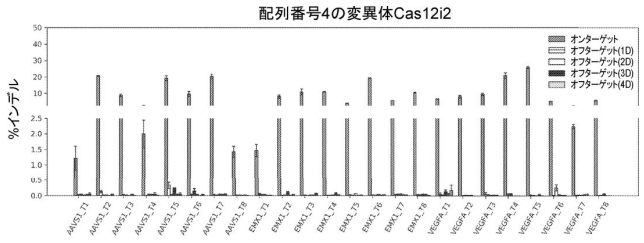



図14B

【図１４Ｃ】

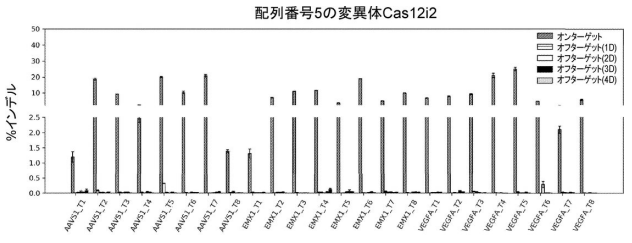



図14C

【図１５】

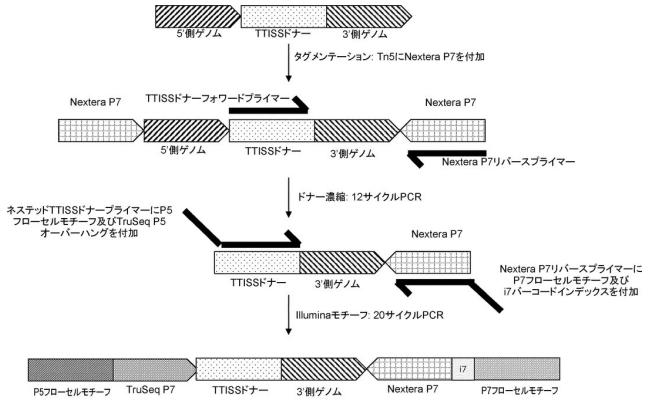



図15

【図１６Ａ】

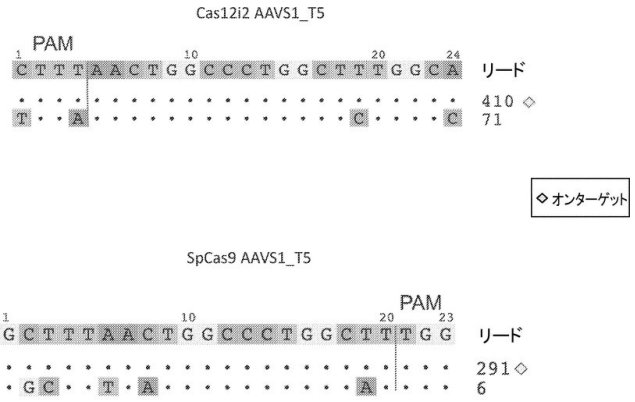



図16A

【図１６Ｂ】

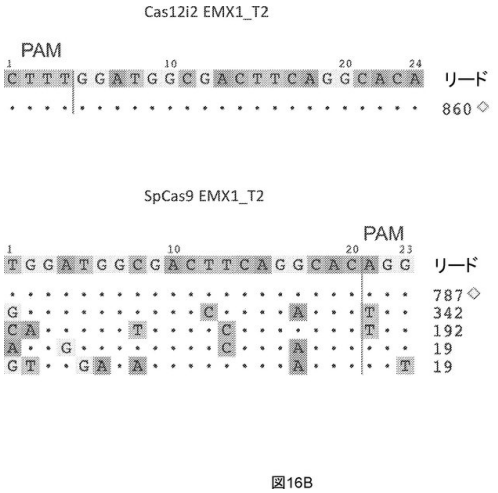
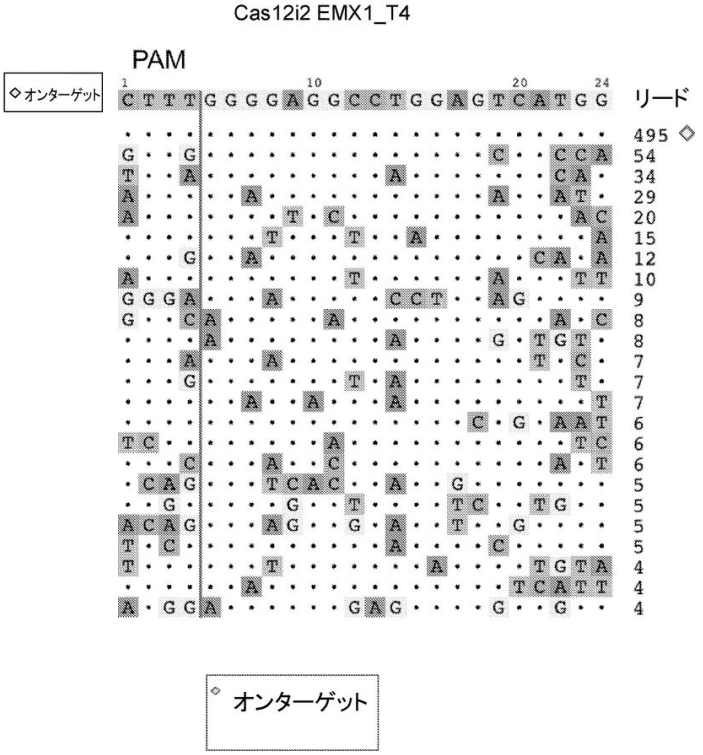


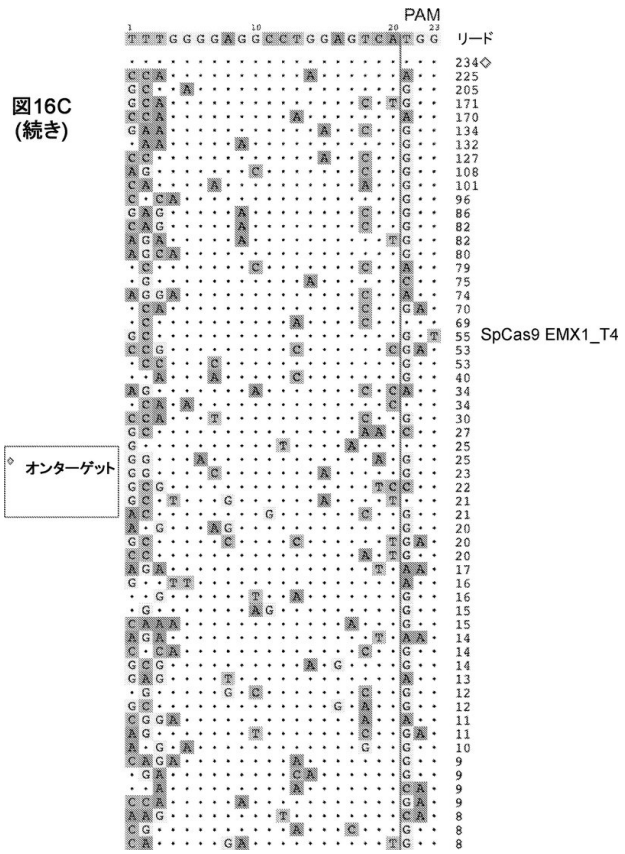

図16B

【図１６Ｃ】

図16C




【図１６Ｃ（ｃｏｎｔ．）】




【図１６Ｄ】

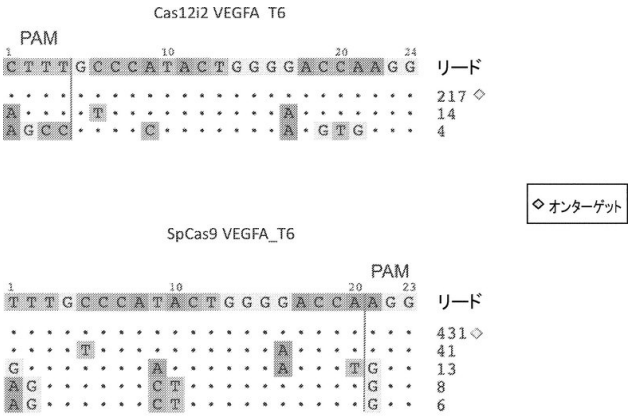



図16D

【図１７Ａ】

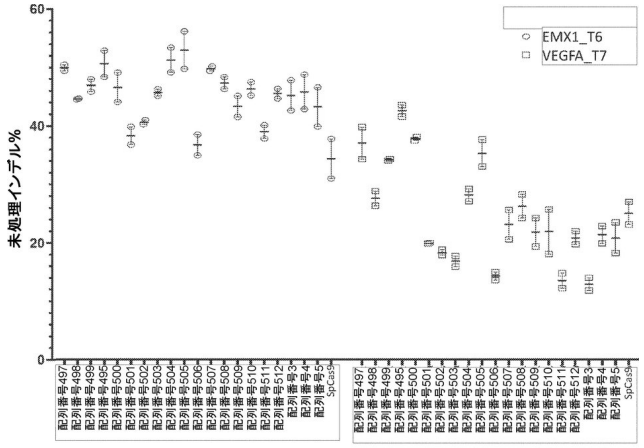



図17A

【図１７Ｂ】

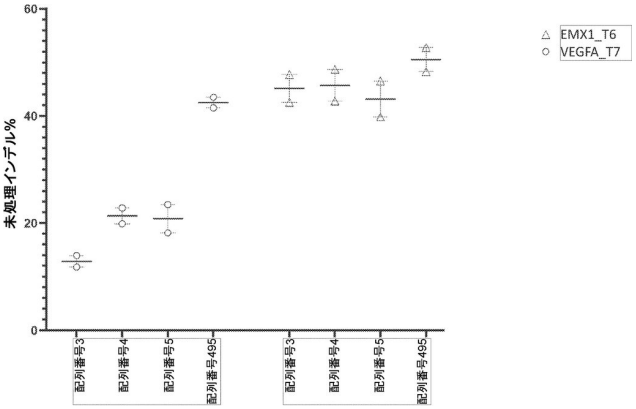



図17B

【図１８】

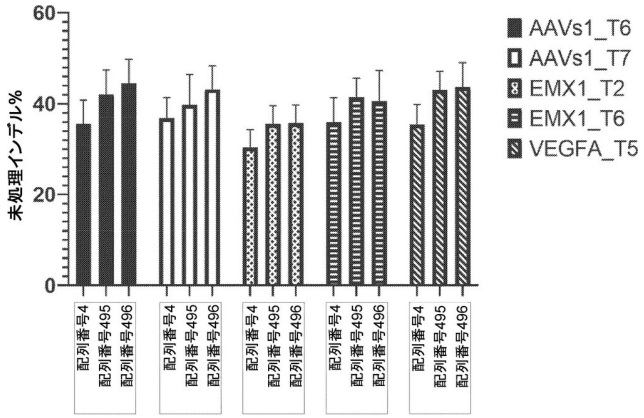



図18

【図１９】

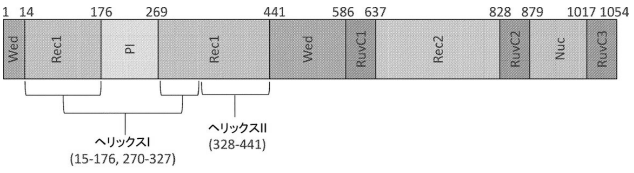



図19

【図２０Ａ】

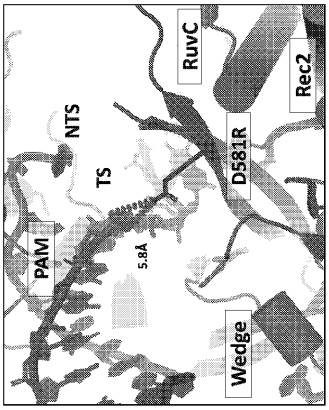
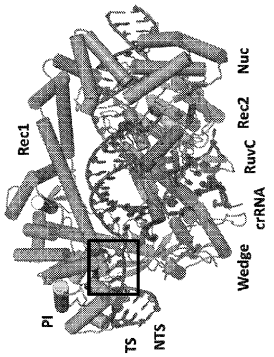
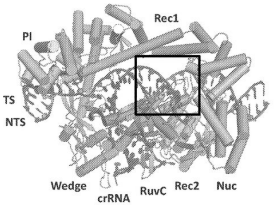



FIG. 20A




【図２０Ｂ】



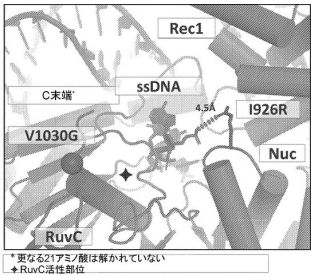




図20B

【図２０Ｃ】

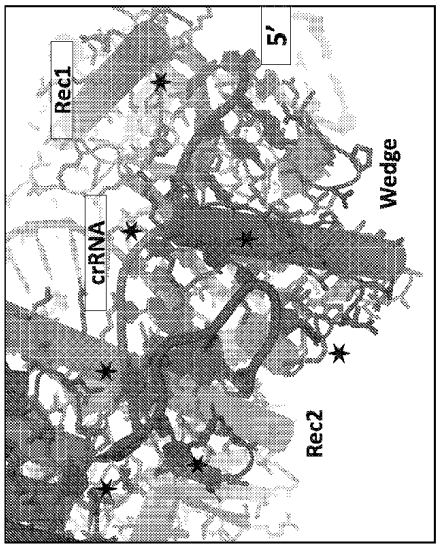



FIG. 20C

【図２１Ａ】

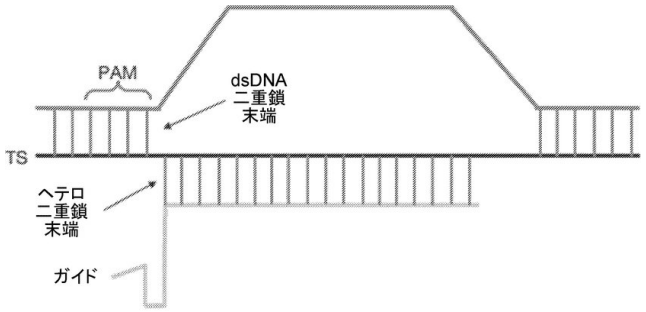



図21A

【図２１Ｂ】

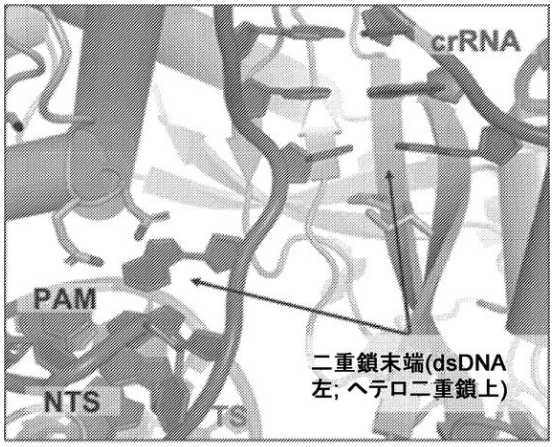



図21B

【図２２Ａ】

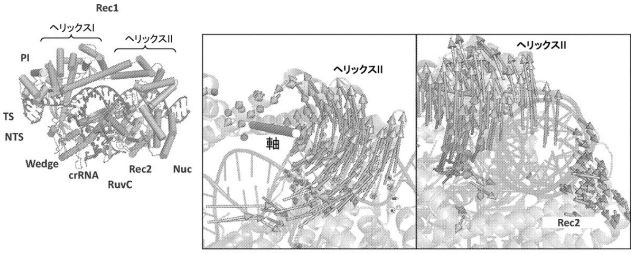



図22A

【図２２Ｂ】

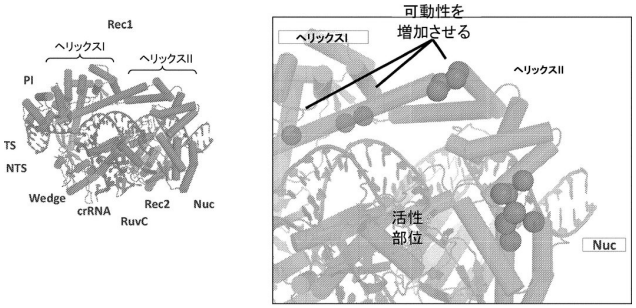



図22B

【配列表】

<u>20235205040000001.app</u>

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/025257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/22 C12N15/11
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, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 2019/178427 A1 (ARBOR BIOTECHNOLOGIES INC [US]; CHONG SHAORONG [US])<br>19 September 2019 (2019-09-19) | 1,6-22,<br>233-238 |
| A | claims 1-82; figures 5-11, 33-41; examples 2, 3, 6, 9, 10; sequences 5, 9, 10, 101<br>the whole document | 2-5 |
| | ----- | |
| X | WINSTON X. YAN ET AL: "Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems",<br>SCIENCE,<br>vol. 363, no. 6422,<br>4 January 2019 (2019-01-04), pages 88-91,<br>XP055594948,<br>US<br>ISSN: 0036-8075, DOI:<br>10.1126/science.aav7271 | 1,6-22,<br>233-238 |
| A | figures 1, 3<br>the whole document | 2-5 |
| | -/-- | |

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 5 July 2021 | 13/07/2021 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Spindler, Mark-Peter |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No
PCT/US2021/025257

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| | -& Yan Winston X. ET AL: "Suppl. Material for Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems", Science, 6 December 2018 (2018-12-06), pages 1-68, XP055820612, DOI: 10.1126/science.aav7271 Retrieved from the Internet: URL:https://science.sciencemag.org/content/sci/suppl/2018/12/05/science.aav7271.DC1/aav7271_Yan_SM.pdf [retrieved on 2021-07-02] figures S1, S14, S15; table S1 the whole document<br>----- | |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/025257

**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:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/025257

**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.: 23-232, 239-408(completely); 233-238(partially)
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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:

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.:

**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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/ US2021/ 025257

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 23-232, 239-408(completely); 233-238(partially)

The present application contains 408 claims of which 63 are independent. There is no clear distinction between the independent claims because of overlapping scope. There are so many claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, as it is particularly burdensome for a skilled person to establish the subject-matter for which protection is sought. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search (PCT Guidelines 9.19 and 9.25).

The non-compliance is aggravated by the fact that an extremely high number of claims try to define the subject-matter merely by a desired property (e.g. "exhibits increased complex formation") without providing the underlying structural features necessary to achieve said property (Articles 5 and 6 PCT) and/or define the subject-matter by reference to an activity or entity which is not part of the composition (e.g. "wherein the deletion is induced in a T cell") and renders the exact nature of the claim unclear (Article 6 PCT).

The search was hence based on the first independent claim and the corresponding independent claims 8, 17, 18, 22 and dependent claims 2-7, 9-16, 19-21 as well as independent claims 233-238 in as far as they relate to claims 1-22. Said claims relate to clearly defined subject-matter that, as far as can be understood, could reasonably be expected to be claimed later in the procedure (Cas12i2 polypeptides having at least 95% identity to a sequence set forth in any of SEQ ID NO: 3-146, 495-512).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/025257

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2019178427 A1 | 19-09-2019 | AU 2019236210 A1 | 10-09-2020 |
| | | CA 3093334 A1 | 19-09-2019 |
| | | CN 112041444 A | 04-12-2020 |
| | | DE 202019005567 U1 | 16-02-2021 |
| | | EP 3765615 A1 | 20-01-2021 |
| | | US 2020063126 A1 | 27-02-2020 |
| | | US 2020407715 A1 | 31-12-2020 |
| | | US 2020407716 A1 | 31-12-2020 |
| | | US 2021123047 A1 | 29-04-2021 |
| | | WO 2019178427 A1 | 19-09-2019 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *C12N 9/22 (2006.01)* | | C12N | 9/22 | | |
| *C12N 15/55 (2006.01)* | | C12N | 15/55 | | |
| *C12N 15/63 (2006.01)* | | C12N | 15/63 | Z | |

(32)優先日　令和2年5月18日(2020.5.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/085,862
(32)優先日　令和2年9月30日(2020.9.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/063,819
(32)優先日　令和2年8月10日(2020.8.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/147,968
(32)優先日　令和3年2月10日(2021.2.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/085,895
(32)優先日　令和2年9月30日(2020.9.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/002,999
(32)優先日　令和2年3月31日(2020.3.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/012,007
(32)優先日　令和2年4月17日(2020.4.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/003,090
(32)優先日　令和2年3月31日(2020.3.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/003,064
(32)優先日　令和2年3月31日(2020.3.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/063,831
(32)優先日　令和2年8月10日(2020.8.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/085,792
(32)優先日　令和2年9月30日(2020.9.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/026,606
(32)優先日　令和2年5月18日(2020.5.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/063,859
(32)優先日 令和2年8月10日(2020.8.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/147,850
(32)優先日 令和3年2月10日(2021.2.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/063,879
(32)優先日 令和2年8月10日(2020.8.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/026,523
(32)優先日 令和2年5月18日(2020.5.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

イブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ヒルバート， ブレンダン， ジェイ
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ウェッセルズ， クイントン， ノーマン
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ジャカイモ， ノア， マイケル
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ジブラット， ロイ
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 カート， ジェイソン， マイケル
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ディドマッソ， ティア， マリー
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ハスウェル， ジェフリー， レイモンド
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ギャリティ， アンソニー， ジェームス
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワ

ー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 マッガァ， コリン， アレクグザンダー
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 スコット， デイヴィッド， エー．
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 セルキオン， デレク， マイケル
アメリカ ０２１４０ マサチューセッツ ケンブリッジ エイコーン パーク ドライブ ２０ タワー ５００ アーバー バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド 気付

Ｆターム（参考） 4B050 CC04 LL05 LL10
4B065 AA93X AA94X AB01 AC20 BA02 BA03 CA60