

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

長さ修飾された形態の配列番号 18 を含む単離された t r a c r R N A であって、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (C R I S P R) - C R I S P R 関連 (C a s) (C R I S P R - C a s) エンドヌクレアーゼ系において活性を示す、単離された t r a c r R N A。

【請求項 2】

前記長さ修飾された形態の配列番号 18 が、短縮形態の配列番号 18 からなる、請求項 1 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 3】

前記短縮形態の配列番号 18 が、
5' 末端で 1 ~ 20 個のヌクレオチドを欠いている配列番号 18、
3' 末端で 1 ~ 10 個のヌクレオチドを欠いている配列番号 18、ならびに
5' 末端で 1 ~ 20 個のヌクレオチド、及び 3' 末端で 1 ~ 10 個のヌクレオチドを欠いている配列番号 18
からなる群から選択されるメンバーからなる、請求項 2 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 4】

前記短縮形態の配列番号 18 が、配列番号 2、30 ~ 33、及び 36 ~ 39 からなる群から選択されるメンバーからなる、請求項 2 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 5】

前記短縮形態の配列番号 18 が、配列番号 2 または 38 からなる、請求項 2 に記載の単離された t r a c r R N A。

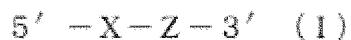
【請求項 6】

少なくとも 1 個の化学修飾されたヌクレオチドを更に含む、請求項 1 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 7】

長さ修飾された形態の式 (I) を有する、単離された c r R N A であって、

【数 1】



式中、X が、約 20 個のユニバーサルヌクレオチドを含む標的特異的プロトスペーサードメインを含む配列を表し、Z が、約 20 個のヌクレオチドを含む t r a c r R N A 結合ドメインを含む配列を表し、

前記単離された c r R N A が、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (C R I S P R) - C R I S P R 関連 (C a s) (C R I S P R - C a s) エンドヌクレアーゼ系において活性を示す、単離された c r R N A。

【請求項 8】

前記長さ修飾された形態の式 (I) が、短縮形態の式 (I) からなる、請求項 7 に記載の単離された c r R N A。

【請求項 9】

前記短縮形態の式 (I) が、

前記 Z ドメインの 3' 末端で 1 ~ 8 ヌクレオチドを欠いている式 (I)、及び

17、18、19、または 20 個のヌクレオチドを有する標的特異的プロトスペーサードメインに対応するために前記 X ドメインの 5' 末端でヌクレオチドを欠いている式 (I)

からなる群から選択されるメンバーからなる、請求項 8 に記載の単離された c r R N A。

【請求項 10】

少なくとも 1 個の化学修飾されたヌクレオチドを更に含む、請求項 7 に記載の単離され

10

20

30

40

50

た c r R N A。

【請求項 1 1】

前記長さ修飾された形態の式 (I) が、配列番号 4 2 9 ~ 4 3 9 からなる、請求項 1 0 に記載の単離された c r R N A。

【請求項 1 2】

化学修飾された形態の配列番号 2、1 8、3 0 ~ 3 3、及び 3 6 ~ 3 9 のうちの 1 つを含む、単離された t r a c r R N A であって、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (C R I S P R) - C R I S P R 関連 (C a s) (C R I S P R - C a s) エンドヌクレアーゼ系において活性を示す、単離された t r a c r R N A。

【請求項 1 3】

前記化学修飾された形態の配列番号 2、1 8、3 0 ~ 3 3、及び 3 6 ~ 3 9 のうちの 1 つが、リボース修飾、末端修飾基、及びヌクレオチド間修飾結合からなる群から選択される修飾を有する、化学修飾されたヌクレオチドを含む、請求項 1 2 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 1 4】

修飾を有する前記化学修飾されたヌクレオチドが、2 ' O M e、2 ' F、二環式核酸、及びロックされた核酸 (L N A) からなる群から選択されるリボース修飾からなる、請求項 1 3 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 1 5】

修飾を有する前記化学修飾されたヌクレオチドが、プロパンジオール (C 3) スペーサー、N、N - ジエチル - 4 - (4 - ニトロナフタレン - 1 - イルアゾ) - フェニルアミン (「 Z E N」)、及び反転 d T 残基からなる群から選択される末端修飾基からなる、請求項 1 3 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 1 6】

修飾を有する前記化学修飾されたヌクレオチドが、ホスホロチオエート修飾からなるヌクレオチド間修飾結合からなる、請求項 1 3 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 1 7】

前記単離された t r a c r R N A が、配列番号 1 0 0、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 3 6、4 4 9、及び 5 5 1 からなる群から選択される、請求項 1 3 に記載の単離された t r a c r R N A。

【請求項 1 8】

化学修飾された形態の式 (I) を含む、単離された c r R N A であって、

【数 2】



式中、X が、約 1 7 個のヌクレオチド ~ 約 2 0 個のヌクレオチドを含む標的特異的プロトスペーサードメインを含む配列を表し、Z が、約 1 2 個のヌクレオチド ~ 約 1 9 個のヌクレオチドを含む t r a c r R N A 結合ドメインを含む配列を表し、

前記単離された c r R N A が、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (C R I S P R) - C R I S P R 関連 (C a s) (C R I S P R - C a s) エンドヌクレアーゼ系において活性を示す、単離された c r R N A。

【請求項 1 9】

前記化学修飾された形態の式 (I) が、リボース修飾、末端修飾基、及びヌクレオチド間修飾結合からなる群から選択される修飾を有する、化学修飾されたヌクレオチドを含む、請求項 1 8 に記載の単離された c r R N A。

【請求項 2 0】

修飾を有する前記化学修飾されたヌクレオチドが、2 ' O M e、2 ' F、二環式核酸、及びロックされた核酸 (L N A) からなる群から選択されるリボース修飾からなる、請求項 1 9 に記載の単離された c r R N A。

【請求項 21】

修飾を有する前記化学修飾されたヌクレオチドが、プロパンジオール（C3）スパーサー、N，N－ジエチル－4－（4－ニトロナフタレン－1－イルアゾ）－フェニルアミン（「ZEN」）、及び反転dT残基からなる群から選択される末端修飾基からなる、請求項19に記載の単離されたcrRNA。

【請求項 22】

修飾を有する化学修飾された前記ヌクレオチドが、ホスホロチオエート修飾からなるヌクレオチド間修飾結合からなる、請求項19に記載の単離されたtracrRNA。

【請求項 23】

前記化学修飾された形態の式（I）が、配列番号429～439から選択される、請求項19に記載の単離されたtracrRNA。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条の下、2014年12月18日及び2015年10月9日出願の「CRISPR-BASED COMPOSITIONS AND METHODS OF USE」と題する、通し番号62/093, 588及び62/239, 546を持つ米国仮特許出願への優先権の利益を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

配列表

本出願は、EFS-Webを介してASCIIフォーマットで提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2015年12月18日作成のこのASCIIコピーは、IDT01-008-US-ST25.txtという名称であり、177, 163バイトサイズである。

【0003】

本発明は、CRISPR系における使用のための修飾された組成物、及びそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

30

【0004】

部位特異的DNA切断のための、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列（CRISPR）及び関連Casタンパク質（CRISPR-Cas系）の使用は、多くの生物学的用途に対する優れた可能性を示してきた。CRISPRは、ゲノム編集、内在性遺伝子に対する転写抑制因子（CRISPRi）及び活性因子（CRISPRa）のゲノムスケール特異的標的、及びCas酵素によるRNA指向型DNA標的の他の用途に使用されている。

【0005】

CRISPR-Cas系は、細菌及び古細菌に天然であり、ウイルス及びプラスミドに対する適応免疫を提供する。試験及び治療試薬に潜在的に適応され得るCRISPR-Cas系の3つのクラスが存在するが、II型CRISPR系は、標的DNAの二本鎖切断を媒介するために、単一CRISPR関連（Cas）ヌクレアーゼ（具体的に、Cas9）を、適切なガイドRNA、CRISPR活性化RNA：トランス活性化crRNA（crRNA：tracrRNA）対を含む細菌内の天然複合体と同様の2部RNA系、または人工キメラ単一ガイドRNA（sgRNA）のいずれかとの複合体中で用いることにおける望ましい特徴を有する。哺乳類系において、これらのRNAは、RNA転写を駆動するRNA Pol IIIプロモーター（U6またはH1等）、ウイルスベクター、及びインビトロ転写に続く一本鎖RNAを含有するDNAカセットの形質移入によって導入されてきた（Xu, T., et al., Appl Environ Microbiol, 2014, 80(5): p. 1544-52を参照されたい）。

40

50

【0006】

C R I S P R - C a s 9系において、例えば、化膿性連鎖球菌に存在する系を例として使用すると (S. py. または S py)、天然 c r R N A は、約 42 b p 長であり、標的配列に相補的な約 20 塩基の 5' 領域 (プロトスペーサー配列とも称される)、及び t r a c r R N A 配列の相補性領域に対応する典型的に約 22 塩基長の 3' 領域を含む。天然 t r a c r R N A は、約 85~90 塩基長であり、c r R N A に相補的な領域を含む 5' 領域、ならびに 5' 上流の約 10 塩基領域を有する。t r a c r R N A の残りの 3' 領域は、二次構造 (本明細書では「t r a c r R N A 3' テール」と称される) を含む。

【0007】

J i n e k らは、C R I S P R - C a s 9 系の正常機能に必要な c r R N A 及び t r a c r R N A の部分を多角的に調査した (S c i e n c e, 2012. 337 (6096) : p. 816-21)。彼らは、C R I S P R - C a s 9 において依然として機能し得る切断された c r R N A : t r a c r R N A 断片を考案し、c r R N A は、野生型 42 個のヌクレオチドであり、t r a c r R N A は、75 個のヌクレオチドに切断されていた。彼らはまた、c r R N A 及び t r a c r R N A が、リンカーループで連結され、単一ガイド R N A (s g R N A) を形成する実施形態を開発し、異なる実施形態では、99~123 個のヌクレオチドの間で異なる。天然 2 部 c r R N A : t r a c r R N A 複合体の構成を図 1 に示し、人工 s g R N A 単一ガイドの 99 個のヌクレオチド実施形態を図 2 に示す。

【0008】

少なくとも 2 つのグループが、化膿性連鎖球菌 C a s 9 (S p y C a s 9) の結晶構造を解明してきた。J i n e k, M らにおいて、この構造は、ガイド R N A または標的 D N A のいずれかとの複合体中でヌクレアーゼを示さなかった。彼らは、分子モデリング実験を実行して R N A 及び D N A との複合体中のタンパク質間の予測的相互作用を明らかにした (S c i e n c e, 2014. 343, p. 1215, D O I : 10. 1126 / s c i e n c e / 1247997)。

【0009】

N i s h i m a s u, H らにおいて、S p y C a s 9 の結晶構造は、s g R N A 及びその標的 D N A との複合体において 2.5 Å 解像度で示される (C e l l, 2014. 156 (5) : p. 935-49、その全体が本明細書に組み込まれる)。この結晶構造は、C a s 9 酵素に対する 2 つのローブ、認識ローブ (R E C)、及びヌクレアーゼローブ (N U C) を特定した。s g R N A : 標的 D N A ヘテロ二重鎖 (負の電荷を持つ) は、2 つのローブ間の正の電荷を持つ溝内にある。既知のタンパク質との構造的類似性を示さず、したがって C a s 9 特異的機能ドメインのような R E C ローブは、互いに相補的な c r R N A 及び t r a c r R N A の部分と相互作用する。

【0010】

別のグループ、B r i n e r ら (M o l C e l l, 2014. 56 (2) : p. 333-9、その全体が本明細書に組み込まれる) は、天然 c r R N A : t r a c r R N A 二重鎖及び s g R N A 内の 6 つの保存モジュールを特定し、特徴付けを行った。

【0011】

C R I S P R - C a s 9 系は、ゲノム工学において以下の通り用いられる。c r R N A の一部分は、標的配列にハイブリダイズする。t r a c r R N A の一部分は、c r R N A の一部分にハイブリダイズする。C a s 9 ニュクレアーゼは、構築体全体に結合し、切断を指向する。この C a s 9 は、エンドヌクレアーゼ H N H 及び R u v C に相同的な 2 つのドメインを含み、H N H ドメインは、c r R N A に相補的な D N A 鎖を切断し、R u v C 様ドメインは、非相補鎖を切断する。これは、ゲノム D N A において二本鎖破断をもたらす。非相同末端結合 (N H E J) によって修復された場合、この切断は、典型的に 1 つ以上の塩基だけシフトし、天然 D N A 配列の崩壊につながり、多くの場合、この事象がタンパク質をコードする遺伝子のコード化エキソン内で起こる場合、フレームシフト突然変異につながる。この破断はまた、相同性依存的組み換え (H D R) によって修復され、新たな遺伝子材料の、実験操作を介した、C a s 9 切断によって創出された切断部位への挿入を

許す。

【0012】

哺乳類細胞へのガイドRNA送達のための現在の方法のうちの一部には、内在性転写のためのRNA Pol I I Iプロモーターを含有する二本鎖DNA (dsDNA) の形質移入、ウイルス送達、インビトロ転写 (IVT) 産物としてのRNAの形質移入、またはIVT産物の微量注入が含まれる。これらの方法には各々短所がある。哺乳類細胞に導入された非修飾外因性RNAは、Toll様受容体 (TLR)、RIG-I、OAS I、及び病原体関連分子パターン (PAMP) を認識する他の受容体による認識を介して自然免疫応答を開始することが知られている。しかしながら、大部分の公表された試験において、T7 RNAポリメラーゼによってインビトロ転写された (IVT) RNAが、細胞に送達される。このタイプのRNAペイロードは、自然免疫応答のトリガーであることが示されてきた。上記の代替送達方法の各々は、それら独自の短所も同様に有する。例えば、dsDNAカセットは、統合につながり得、RNA Pol I I Iプロモーターによって内因的に駆動されるガイドRNA転写は、構成的に持続し得、転写されるRNAの量は制御不可能である。

10

【0013】

RNAは、血清中及び細胞中に存在するヌクレアーゼによって速やかに分解される。IVT方法または化学合成によって作製された非修飾CRISPR RNAトリガー (crRNA、tracrRNA、及びsgRNA) は、哺乳類細胞への送達中または送達後に速やかに分解される。RNAが、ヌクレアーゼ耐性を得るように化学修飾された場合、より優れた活性が認識される。血清中及び細胞中に存在する最も強力な分解活性は、3'エキソヌクレアーゼである (Eder et al., Antisense Research and Development 1:141-151, 1991)。故に、合成オリゴヌクレオチドを「末端ブロッキングすること」は、多くの場合、ヌクレアーゼ安定性を改善する。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) 及び二本鎖低分子干渉RNA (siRNA) の化学修飾は、十分に研究されてきており、現在では良好なアプローチが実施されている (レビューについては、Kurreck, Eur. J. Biochem., 270:1628-1644, 2003、Behlke, Oligonucleotides, 18:305-320, 2008、Lennox et al., Gene Therapy, 18:1111-1120, 2011を参照されたい)。したがって、CRISPR/CasのRNA構成要素と共に使用するための化学修飾戦略を考案することが望ましい。入手可能な化学修飾の基本的ツールボックスは、当業者には周知であるが、RNA種及びエフェクタータンパク質の相互作用に対して部位特異的修飾が有する効果は容易に予測されず、有効な修飾パターンは、通常は経験的に決定されなければならない。場合によって、RNAの配列は、修飾パターンの有効性に影響を及ぼし得、異なる配列構成に用いられる修飾パターンの調整を必要とし、かかる方法の実地応用をより困難にする。

20

30

【0014】

したがって、細胞へのその毒性を低減し、哺乳細胞内での寿命及び機能性を拡張する一方で、依然としてCRISPR/Cas系におけるそれらの意図された目的を果たすようにガイドRNAを修飾する必要性が存在する。本明細書に記載される本発明の方法及び組成物は、CRISPR-Cas系における使用のためのRNA及び修飾RNAオリゴヌクレオチドを提供する。本発明のこれら及び他の利点、ならびに追加の発明の特徴は、本明細書に提供される本発明の説明から明らかとなるであろう。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】 Xu, T., et al., Appl Environ Microbiol, 2014. 80 (5) : p. 1544-52

【非特許文献2】 Science, 2012. 337 (6096) : p. 816-21

50

【非特許文献3】Science, 2014. 343, p. 1215, DOI:10.1126/science/1247997

【非特許文献4】Cell, 2014. 156 (5): p. 935-49

【非特許文献5】Mol Cell, 2014. 56 (2): p. 333-9

【非特許文献6】Eder et al., Antisense Research and Development 1:141-151, 1991

【非特許文献7】Kurreck, Eur. J. Biochem., 270:1628-1644, 2003

【非特許文献8】Behlke, Oligonucleotides, 18:305-320, 2008

【非特許文献9】Lennox et al., Gene Therapy, 18:1111-1120, 2011

【発明の概要】

【0016】

本発明は、CRISPR系における使用のための修飾された組成物、及びそれらの使用方法に関する。これらの組成物は、修飾されたヌクレオチド間結合、ならびにCRISPR-Cas系のガイド鎖 (crRNA: tracrRNAまたはsgRNA) として機能する2'-O-アルキル及び2'-O-フルオロ修飾されたRNAオリゴヌクレオチドを含む。組成物はまた、エキソヌクレアーゼ攻撃を妨げる反転dT塩基または他の非ヌクレオチド修飾因子 (例えば、プロパンジオール基 (C3スパーサー)、ナフチルアゾ修飾因子、または他の当該技術分野において周知であるようなもの) 等の末端修飾を含む。

【0017】

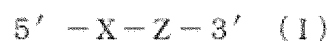
第1の態様において、長さ修飾された形態の配列番号18を含む単離されたtracrRNAが提供される。単離されたtracrRNAは、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (CRISPR)-CRISPR関連 (Cas) (CRISPR-Cas) エンドヌクレアーゼ系において活性を示す。

【0018】

第2の態様において、長さ修飾された形態の式 (I) を含む単離されたcrRNAが提供され、

【0019】

【数1】



式中、Xが、約20個の標的特異的ヌクレオチドを含む標的特異的プロトスパーサードメインを含む配列を表し、Zが、約20個のヌクレオチドを含むユニバーサルtracrRNA結合ドメインを含む配列を表す。単離されたcrRNAは、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (CRISPR)-CRISPR関連 (Cas) (CRISPR-Cas) エンドヌクレアーゼ系において活性を示す。

【0020】

第3の態様において、化学修飾された形態の配列番号2、18、30~33、及び36~39のうちの1つを含む単離されたtracrRNAが提供される。単離されたtracrRNAは、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (CRISPR)-CRISPR関連 (Cas) (CRISPR-Cas) エンドヌクレアーゼ系において活性を示す。

【0021】

第4の態様において、化学修飾された形態の式 (I) を含む単離されたcrRNAが提供され、

【0022】

【数 2】



式中、Xが、約17個のヌクレオチド～約20個のヌクレオチドを含む標的特異的プロトスペーサードメインを含む配列を表し、Zが、約12個のヌクレオチド～約19個のヌクレオチドを含むユニバーサルtracrRNA結合ドメインを含む配列を表す。単離されたcrRNAは、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列(CRISPR)－CRISPR関連(Cas)(CRISPR－Cas)エンドヌクレアーゼ系において活性を示す。

10

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】42塩基非修飾crRNA(配列番号46)及び89塩基非修飾tracrRNA(配列番号18)との野生型(WT)天然2部crRNA:tracrRNA複合体の図である。小文字は、RNAを表す。

【図2】crRNA及びtracrRNA要素を、新たなヘアピンループの付加を通じて単一配列に融合する、99塩基人工単一ガイドRNA(配列番号428)(sgRNA)の図である。小文字は、RNAを表す。

【図3】実施例2において試験された全長及び切断されたtracrRNA種のアラインメントを示す。配列は、RNAであり、5'～3'が示される。アラインメントは、一番上の89塩基WT tracrRNA配列(配列番号18)に基づいている。内部間隙は、内部切断/欠失の部位を表す。大文字は、RNAを表す。

20

【図4】実施例3において試験された全長及び切断されたcrRNA及びtracrRNA種のアラインメントを示す。アラインメントは、それらそれぞれのグループ分けの一番上の42塩基WT crRNA(配列番号46)及び89塩基WT tracrRNA(配列番号18)配列に基づいている。crRNAの20塩基の5'ドメインは、配列特異的であり、ヒトHPRT1を標的とする。下線が引かれた3'ドメインは、tracrRNAの5'末端に向かう領域に結合する。crRNAの3'末端に結合する、tracrRNAの5'ドメインに下線が引かれている。大文字は、RNAを表す。

【図5】36塩基crRNA(配列番号48)及び67塩基tracrRNA(配列番号2)との切断された2部crRNA:tracrRNA複合体の図である。小文字は、RNAを表す。

30

【図6】最適化された切断及び化学修飾tracrRNA(配列番号134)の一実施形態の構造を示す概略である。長さは、67塩基である。RNAは小文字であり、2'OMe RNAは大文字である。ホスホロチオエート(PS)ヌクレオチド間結合は、「*」によって示される。RNAから2'OMe RNAに変換された場合に大幅な機能喪失につながる残基は、大きな矢印によって特定され、RNAから2'OMe RNAに変換された場合に中度の機能喪失につながる残基は、小さな矢印によって特定される。

【図7】最適化された切断及び化学修飾crRNA(配列番号239)の一実施形態の構造を示す概略である。長さは、36塩基である。RNAは小文字であり、2'OMe RNAは大文字である。ホスホロチオエート(PS)ヌクレオチド間結合は、「*」によって示される。RNAから2'OMe RNAに変換された場合に大幅な機能喪失につながる残基は、大きな矢印によって特定され、RNAから2'OMe RNAに変換された場合に中度の機能喪失につながる残基は、小さな矢印によって特定される。5'末端20塩基プロトスペーサードメインが示され、これはこの場合、ヒトHPRT1遺伝子に特異的な配列である。3'末端16塩基tracrRNA結合ドメインが示される。

40

【図8】実施例8において用いられる、最適化された切断/修飾crRNA:tracrRNA複合体の一実施形態の構造を示す概略である。crRNAは、5'プロトスペーサードメイン20塩基に下線が引かれて一番上に位置付けられ、これはこの場合、標的ヒト

50

H P R T 1 部位 3 8 2 8 5 に特異的であり、3'末端は、16塩基 t r a c r R N A 結合ドメインである。t r a c r R N A は、下に整列される。R N A は小文字であり、2' O M e R N A は大文字であり、「*」は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を示す。この図は、c r R N A 配列番号 1 7 8 及び t r a c r R N A 配列番号 1 0 0 によって形成された複合体を示す。

【図 9】高度に修飾された、最適化された切断／修飾 c r R N A : t r a c r R N A 複合体の一実施形態の構造を示す概略である。c r R N A は、5'プロトスペーサードメイン 20 塩基に下線が引かれて一番上に位置付けられ、これはこの場合、標的ヒト H P R T 1 部位 3 8 2 8 5 に特異的であり、3'末端は、16塩基 t r a c r R N A 結合ドメインである。t r a c r R N A は、下に整列される。R N A は小文字であり、2' O M e R N A は大文字であり、「*」は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を示す。この図は、c r R N A 配列番号 4 4 6 及び t r a c r R N A 配列番号 1 3 4 によって形成された複合体を示す。

【図 10】実施例 10 において用いられる、c r R N A 修飾パターンを示す概略である。オリゴヌクレオチド配列（それぞれ配列番号 4 2 9 ~ 4 3 9、出現順）の 5' ~ 3' が示される。小文字 = R N A、下線 = 2' - O - メチル R N A、C 3 = C 3 スペーサー（プロパンジオール修飾因子）、* = ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、Z E N = ナフチルーアゾ修飾因子。5' 標的特異的プロトスペーサードメインが示される。各標的部位の配列が異なるため、塩基は、このドメイン内で「N」によって示されるが、用いられる修飾パターンは一定のままである。3' ユニバーサル t r a c r R N A 結合ドメインが示される。修飾パターンは、表 10 と図 10 との間で参照のために番号付けされている。

【図 11】ヒト H P R T 1 遺伝子内の 12 の異なる部位で試験された 11 の異なる修飾パターンで作製された c r R N A を使用し、哺乳類細胞内で T 7 E 1 アッセイを使用して観察された機能的遺伝子編集を示す、表 10 のデータのプロットである。全ての c r R N A 変異型は、最適化された修飾 t r a c r R N A （配列番号 1 0 0）と対合された。

【図 12】ユニバーサルであり、任意の配列構成において適用され得る、c r R N A 修飾パターン 6 を使用して高度に修飾された、最適化された切断／修飾 c r R N A : t r a c r R N A 複合体の一実施形態の構造を示す概略である。c r R N A （配列番号 4 4 0）は、5'プロトスペーサードメイン 20 塩基に下線が引かれて（N 塩基）一番上に位置付けられ、3'末端は、16塩基 t r a c r R N A 結合ドメインである。t r a c r R N A は、下に整列される（配列番号 1 3 4）。R N A は小文字であり、2' O M e R N A は大文字であり、「*」は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を示す。

【図 13】インターフェロンシグナル伝達経路に関与する 2 つの遺伝子、I F I T 1 及び I F I T M 1 の相対発現レベルを示す、異なる C R I S P R g R N A で形質移入された H E K - C a s 9 細胞からの R T - q P C R データのプロットを示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明の態様は、C R I S P R 系における使用のための修飾された組成物、及びそれらの使用方法に関する。

【0025】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含有する）、ポリリボヌクレオチド（D-リボースを含有する）、及びプリンまたはピリミジン塩基の N グリコシドである任意の他のタイプのポリヌクレオチドを指す（単一ヌクレオチドは、「塩基」または「残基」とも称される）。「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、及び「ポリヌクレオチド」という用語間で意図される長さの区別はなく、これらの用語は、交換可能に使用され得る。これらの用語は、分子の一次構造のみを指す。故に、これらの用語には、二本鎖及び一本鎖 D N A、ならびに二本鎖及び一本鎖 R N A が含まれる。本発明における使用のために、オリゴヌクレオチドは、塩基、糖、またはリン酸塩骨格が修飾されるヌクレオチド類似体、ならびに非プリン若しくは非ピリミジンヌクレオチド類似体を含むこともできる。オリゴヌクレ

オチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド（例えば、2' 修飾を持つヌクレオチド、合成塩基類似体等）、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。

【0026】

本発明の組成物は、自然免疫系の活性化を潜在的に低減する任意の修飾を含む。修飾は、従来のホスホジエステル結合において、リボース糖において、またはRNAの核酸塩基において配置または置換され得る。かかる組成物は、例えば、2'-O-メチル修飾されたRNA等の修飾されたヌクレオチドを含み得る。

【0027】

より広義には、「修飾されたヌクレオチド」という用語は、ヌクレオシド、核酸塩基、ペントース環、またはリン酸基に対する1つ以上の修飾を有するヌクレオチドを指す。例えば、修飾されたヌクレオチドは、アデノシンーリン酸塩、グアノシンーリン酸塩、ウリジンーリン酸塩、及びシチジンーリン酸塩を含有するリボヌクレオチド、ならびにデオキシアデノシンーリン酸塩、デオキシグアノシンーリン酸塩、デオキシチミジンーリン酸塩、及びデオキシシチジンーリン酸塩を含有するデオキシリボヌクレオチドを除外する。修飾には、メチルトランスフェラーゼ等のヌクレオチドを修飾する酵素による修飾から生じる、天然に存在するものが含まれる。修飾されたヌクレオチドは、合成または非天然に存在するヌクレオチドも含む。修飾は、塩基類似体及びユニバーサル塩基も含む。ヌクレオチドにおける合成または非天然に存在する修飾には、2' 修飾を有するもの、例えば、2'-O-アルキル（2'-O-メチルを含む）、2'-フルオロ、2'-メトキシエトキシ、2'-アシル、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、4'-チオ、二環式核酸、4'-CH₂-O-2'-架橋、4'-(CH₂)₂-O-2'-架橋、2'-LNA、及び2'-O-(N-メチルカルバメート)、または塩基類似体を含むものが挙げられる。かかる修飾基は、例えば、Ecksteinらの米国特許第5,672,695号、及びMatulic-Adamicらの米国特許第6,248,878号に記載されている。

【0028】

2'-O-メチルの使用は、siRNA文献（Behlke, M. A., *Oligonucleotides*, 2008. 18(4): p. 305-19を参照されたい）ならびにmRNA送達（Sahin, U. et al., *Nat Rev Drug Discov*, 2014. 13(10): p. 759-80を参照されたい）に記録されている。Sahinらは、2'-OMe修飾及び「非免疫原性」mRNAを超えて拡張するmRNA治療薬の修飾を説明している。

【0029】

「リボヌクレオチド」という用語は、天然及び合成、非修飾及び修飾リボヌクレオチドを包含する。修飾には、糖部分、塩基部分、及び／またはオリゴヌクレオチド内のリボヌクレオチド間の結合への変化が含まれる。

【0030】

「Cas9タンパク質」という用語は、好適なガイドRNA（例えば、sgRNAまたは二重crRNA:tracrRNA組成物）と複合されて活性CRISPR-Casエンドヌクレアーゼ系を形成する場合に生化学活性及び生物活性を有する野生型及び突然変異型のCas9を包含する。これには、本発明における実施例として用いられる化膿性連鎖球菌Cas9からの異なるアミノ酸配列を有するオルソログ及びCas9変異型が含まれる。

【0031】

「長さ修飾された」という用語は、その用語がRNAを修飾する場合、短縮または切断された形態のヌクレオチド配列を欠いている基準RNA、または追加のヌクレオチド配列を含む細長い形態の基準RNAを指す。

【0032】

「化学修飾された」という用語は、その用語がRNAを修飾する場合、化学修飾された

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを含有する基準RNAの形態、またはそのRNAに共有結合された非ヌクレオチド化学基を指す。本明細書に記載される、化学修飾されたRNAは、概して、オリゴヌクレオチド合成手順を使用して調製された合成RNAを指し、修飾されたヌクレオチドは、RNAオリゴヌクレオチドの合成中に組み込まれる。しかしながら、化学修飾されたRNAはまた、合成後に好適な修飾剤で修飾された合成RNAオリゴヌクレオチドを含む。

【0033】

出願人は、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列（CRISPR）-CRISPR関連（Cas）（CRISPR-Cas）エンドヌクレアーゼ系において頑強な活性を示す、新規のcrRNA及びtracrRNAオリゴヌクレオチド組成物を発見した。このオリゴヌクレオチド組成物には、長さ修飾された形態のcrRNA及びtracrRNA、ならびに化学修飾された形態のcrRNA及びtracrRNAが含まれる。長さ修飾された形態のcrRNA及びtracrRNAは、費用効果があり、効率的なオリゴヌクレオチド合成プロトコルが日常的に入手可能である、これらのRNAの活性形態を調製するのを可能にする。化学修飾された形態のcrRNA及びtracrRNAは、細胞状況及びインビボ状況において、改善された安定性等のある特定の特性で調整可能な活性剤を提供する。長さ修飾された形態のcrRNA及びtracrRNAは、CRISPR-Casエンドヌクレアーゼ系状況において活性を有する広範囲の組成物にアクセスするのを可能にする修飾も含み得る。これらのオリゴヌクレオチド組成物及びCRISPR-Casエンドヌクレアーゼ系におけるそれらの特性が後述される。

【0034】

長さ修飾された形態のcrRNA及びtracrRNA

【0035】

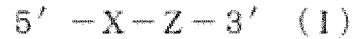
図1は、野生型化膿性連鎖球菌crRNA：tracrRNA複合体の表示を示し、例示的な単離されたcrRNA（配列番号46）は、単離されたtracrRNA（配列番号18）と対合される。第1の態様において、長さ修飾された形態の配列番号18を含む単離されたtracrRNAが提供される。単離されたtracrRNAは、CRISPR-Casエンドヌクレアーゼ系において活性を示す。一態様において、単離されたtracrRNAは、欠失された配列情報を有する長さ修飾された形態の配列番号18ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、長さ修飾された形態の配列番号18には、短縮または切断された形態の配列番号18が含まれ、配列番号18は、5'末端で1~20個のヌクレオチド、及び3'末端で1~10個のヌクレオチドだけ短縮され得る。かかる短縮または切断された形態の配列番号18は、CRISPR-Casエンドヌクレアーゼ系において機能的に競合するcrRNAと対合される場合に活性を保持する。tracrRNAの5'末端の短縮が行われ、crRNAの3'末端と対合する配列へと延びる場合、これらのドメインにおいて結合親和性を増強する化学修飾を使用して、改善された活性が得られ得る。crRNAの3'末端の短縮が行われ、tracrRNAの5'末端と対合する配列へと延びる場合、これらのドメインにおいて結合親和性を強化する化学修飾を使用して、改善された活性が得られ得る。短縮または切断された形態を有する長さ修飾された形態の配列番号18の好ましい実施例には、配列番号2、30~33、及び36~39が含まれる。短縮または切断された形態を有する長さ修飾された形態の配列番号18の非常に好ましい実施例には、配列番号2が含まれる。各々の短縮または切断された形態を有する前述の例示的な長さ修飾された形態の配列番号18の場合、配列番号2、30~33、及び36~69は、化学的に非修飾のヌクレオチドからなる。

【0036】

第2の態様において、長さ修飾された形態の式（I）を含む単離されたcrRNAが提供され、

【0037】

【数 3】



式中、Xが、標的特異的プロトスペーサードメインを含む配列を表し、Zが、t r a c r R N A結合ドメインを含む配列を表す。

【0038】

標的特異的プロトスペーサードメイン（式（I）のXドメイン）は、典型的に、C R I S P R - C a s エンドヌクレアーゼ系によって標的されたDNAの領域に対して相補性を有する約20個のヌクレオチドを含む。t r a c r R N A結合ドメイン（式（I）のZドメイン）は、典型的に、大部分のC R I S P R エンドヌクレアーゼ系において約20個のヌクレオチドを含む（天然S. p y. バージョンにおいて、このドメインは、22個のヌクレオチドである）。単離されたc r R N Aは、C R I S P R - C a s エンドヌクレアーゼ系において活性を示す。

【0039】

一態様において、単離されたc r R N Aは、欠失された配列情報を有する長さ修飾された形態の式（I）を含む。一部の実施形態において、長さ修飾された形態の式（I）には、短縮または切断された形態の式（I）が含まれ、式（I）は、Zドメインの3'末端で1～8個のヌクレオチドだけ短縮され得る。長さ修飾された形態の式（I）は、17、18、19、または20個のヌクレオチドを有する標的特異的プロトスペーサードメインに対応するためにXドメインの5'末端で短縮され得る。かかる長さ修飾された形態の式（I）の非常に好ましい実施例には、19または20個のヌクレオチドを有する標的特異的プロトスペーサードメインが含まれる。17～20個のヌクレオチドの長さであり、かつ／またはZドメインの3'末端で1～8個のヌクレオチドを欠いている、標的特異的プロトスペーサー（Xドメイン）を持つ短縮または切断された形態を有する例示的な長さ修飾された形態の式（I）は、化学的に非修飾のヌクレオチドからなり得る。

【0040】

かかる短縮または切断された形態の式（I）は、C R I S P R - C a s エンドヌクレアーゼ系において競合するt r a c r R N Aと対合される場合に活性を保持する。長さ修飾された形態の式（I）を有する式（I）の単離されたc r R N Aの好ましい実施形態には、化学的に非修飾のヌクレオチド及び化学修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。

【0041】

化学修飾された形態のc r R N A及びt r a c r R N A

【0042】

第3の態様において、化学修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチド化学修飾因子を含む単離されたt r a c r R N Aが提供される。単離されたt r a c r R N Aは、C R I S P R - C a s エンドヌクレアーゼ系において活性を示す。一態様において、単離されたt r a c r R N Aは、リボース修飾、末端修飾基、及びヌクレオチド間修飾結合からなる群から選択される修飾を有する、化学修飾されたヌクレオチドを含む。例示的なリボース修飾には、2' O - アルキル（例えば、2' O M e）、2' F、二環式核酸、及びロックされた核酸（L N A）が含まれる。例示的な末端修飾基には、プロパンジオール（C 3）スペーサー及びナフチル - アゾ修飾因子（N, N - ジエチル - 4 - （4 - ニトロナフタレン - 1 - イルアゾ） - フェニルアミン、または「Z E N」）、ならびに反転d T 残基が含まれる。例示的なヌクレオチド間修飾結合には、ホスホロチオエート修飾が含まれる。一態様において、化学修飾された形態を有する単離されたt r a c r R N Aには、配列番号46及びその長さ修飾された形態、例えば、短縮または切断された形態の配列番号46が含まれる。化学修飾されたヌクレオチドを有する好ましい短縮または切断された形態の配列番号46には、化学修飾されたヌクレオチドを有する配列番号2、30～33、及び36～39が含まれる。C R I S P R - C a s エンドヌクレアーゼ系において頑強な活性を持つ化学修飾されたヌクレオチドを有する単離されたt r a c r R N Aの更に他の例を

、実施例において提示する。

【0043】

第4の態様において、化学修飾されたヌクレオチドを含む単離されたc r R N Aが提供される。単離されたc r R N Aは、C R I S P R-C a s エンドヌクレアーゼ系において活性を示す。一態様において、単離されたc r R N Aは、リボース修飾、末端修飾基、及びヌクレオチド間修飾結合からなる群から選択される修飾を有する、化学修飾されたヌクレオチドを含む。例示的なリボース修飾には、2' O-アルキル（例えば、2' OMe）、2' F、二環式核酸、及びロックされた核酸（L N A）が含まれる。例示的な末端修飾基には、プロパンジオール（C 3）スペーサー及びナフチル-アゾ修飾因子（N，N-ジエチル-4-（4-ニトロナフタレン-1-イルアゾ）-フェニルアミン、または「Z E N」）、ならびに反転d T残基が含まれる。例示的なヌクレオチド間修飾結合には、ホスホロチオエート修飾が含まれる。一態様において、化学修飾された形態を有する単離されたc r R N Aには、式（I）のc r R N A及びその長さ修飾された形態が含まれる。好ましい短縮または切断された形態の、化学修飾されたヌクレオチドを有する式（I）のc r R N Aは、配列番号429～439を含む。化学修飾されたヌクレオチドを有する単離されたc r R N Aの非常に好ましい実施例には、配列番号434及び435が含まれる。これらの特定の単離されたc r R N A種は、C R I S P R-C a s エンドヌクレアーゼ系においてコンピテントt r a c r R N Aと複合された場合に高い活性を示す化学修飾されたヌクレオチドを有する「ユニバーサル」c r R N Aを表す。C R I S P R-C a s エンドヌクレアーゼ系において頑強な活性を持つ化学修飾されたヌクレオチドを有する単離されたc r R N Aの更に他の例を、実施例において提示する。

【0044】

前述の単離された、長さ修飾された、及び化学修飾されたc r R N A及びt r a c r R N Aは、好ましくは2'-OH基（例えば、特に2' OMe、2' F、二環式核酸、ロックされた核酸）での化学修飾、及び末端ブロッキング修飾（例えば、Z E N、C 3スペーサー、反転d T）を含む。両方のタイプの一般修飾の使用は、単離された、長さ修飾された、及び化学修飾されたc r R N A及びt r a c r R N Aに、生物学的状況における単離された、長さ修飾された、及び化学修飾されたc r R N A及びt r a c r R N Aの生化学的安定性及び免疫寛容を提供する。

【0045】

前述の単離された、長さ修飾された、及び化学修飾されたc r R N A及びt r a c r R N Aは、異なる組み合わせで混合されて、活性c r R N A：t r a c r R N AをC a s 9のガイドRNAとして形成することができる。例えば、単離され、長さ修飾されたt r a c r R N Aは、単離され、化学修飾されたc r R N Aと組み合わせ、活性c r R N A：t r a c r R N AをC a s 9のガイドRNAとして形成することができる。実施例は、活性c r R N A：t r a c r R N AをC a s 9のガイドRNAとしてもたらず、単離された、長さ修飾された、及び化学修飾されたc r R N A及びt r a c r R N Aの異なる組み合わせの例証を提供する。

【0046】

単離された、長さ修飾された、及び化学修飾されたc r R N A及びt r a c r R N Aの一方（または両方）に含まれる特定の化学修飾されたヌクレオチドを必要とする程度は、結果として生じる活性c r R N A：t r a c r R N Aが、C a s 9のガイドRNAとして機能する用途に依存する。C R I S P R-C a s エンドヌクレアーゼ系のある特定の生化学アッセイにおいて、特にヌクレアーゼが最小または不在であり得る場合、C R I S P R-C a s エンドヌクレアーゼ系のC a s 9の結果として得られるガイドRNAの頑強な活性を生じるために、広範囲に化学修飾されたc r R N A及びt r a c r R N Aを必要としない場合がある。これは、ヌクレアーゼへの耐性を付与する化学修飾されたヌクレオチドが、ヌクレアーゼが最小または不在である場合に必須でないという事実に寄与する。ある特定の生物学的（インビボ）状況において、c r R N A及びt r a c r R N Aを含む混合物は、リボソームナノ粒子等の担体ビヒクル内の細胞に送達され、単離された、長さ修飾

された、及び化学修飾された c r R N A 及び t r a c r R N A は、血流に直接送達されるか、または単離された「裸の」R N A 混合物として臓器系に注入される c r R N A 及び t r a c r R N A の混合物より広範囲でない化学修飾されたヌクレオチドを必要とし得る。化学修飾された c r R N A 及び t r a c r R N A に存在する化学修飾の程度は、インビボでの（すなわち、関連生物学的状況における、例えば、血流中または細胞内の）関連 R N A 分子の半減期を既定し得る。したがって、化学修飾された c r R N A 及び t r a c r R N A の修飾プロファイルを使用して、C R I S P R − C a s エンドヌクレアーゼ系における C a s 9 のガイド R N A として結果として得られる c r R N A : t r a c r R N A 二重鎖の生化学活性及び生物活性を微調整することができる。

【0047】

先行技術は、C a s 9 が s g R N A と相互作用するため、C a s 9 の構造に焦点を当てているが、本明細書に記載の開示される設計パターンは、前述の c r R N A : t r a c r R N A 二重 R N A 系を企図する。一本鎖ガイド R N A は、治療設計の簡素性等のいくつかの利得を提供する。しかしながら、標準固相ホスホルアミダイト R N A 合成は、長さが増加するにつれてオリゴヌクレオチドの収率の低下を示し、この問題は、長さが 60 ~ 70 塩基を超えるとより明らかになる。これは、特に一部の商用または治療用途に必要とされる、より大きな規模での、一部の t r a c r R N A ならびにキメラ s g R N A の頑強な費用効果のある合成を妨げる。この理由から、本発明は、s g R N A だけでなく、代替二重 c r R N A : t r a c r R N A の、C a s 9 のガイド R N A としての実施形態を企図する。しかしながら、C R I S P R − C a s エンドヌクレアーゼ系において C a s 9 と複合された場合に頑強な活性を有する単離されたガイド R N A は、本明細書に提供される単離された、長さ修飾された、及び化学修飾された形態の c r R N A 及び t r a c r R N A に基づいて、適切な c r R N A 及び t r a c r R N A の、人工単分子 s g R N A としての結合または合成によって操作され得る。このタイプの長い単一ガイドは、より短い鎖の直接合成によるか、または合成後化学共役によって得ることができる。

【0048】

長さ修飾された、及び化学修飾された t r a c r R N A 組成物の設計は、長さが 80 個超のヌクレオチドである t r a c r R N A オリゴヌクレオチドと関連付けられた潜在的合成問題に取り組んでいる。2' − O M e 修飾された R N A モノマーのカップリング効率（2' − O H 上に保護基を有効に含有する）は、R N A モノマーのカップリングより優れている。2' − O M e 修飾された R N A を組み込むことは、いくつかの利点を提供する。第 1 に、より長いオリゴヌクレオチドが、完全 2' − O M e または R N A / 2' − O M e 混合オリゴヌクレオチドのいずれかとして合成されるのを可能にする。第 2 に、本発明の方法及び組成物は、c r R N A : t r a c r R N A の合成及び形質移入につながり、免疫系による検出を回避し得る。外来性の非修飾 R N A が、哺乳類細胞ならびに全動物において自然免疫応答を誘起することも周知である。2' O M e 修飾されたオリゴヌクレオチドを使用することは、ヌクレアーゼに対する R N A 安定性（第 3 の利点）を付与するとともに、免疫原性トリガーと関連付けられる細胞死及び毒性を低減することができる。異なる化学部分を有する他の開示される修飾ヌクレオチド（例えば、2' F、他の 2' O − アルキル、L N A、及び他の二環式ヌクレオチド）が、ヌクレアーゼへの耐性を付与することに関し同様の利得及び利点をもたらし得るため、これらの利点は、2' − O M e 修飾自体に固有ではない。

【0049】

別の実施形態において、c r R N A に相補的な t r a c r R N A 部分は、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチドを含有し、更なる実施形態において、c r R N A に相補的な t r a c r R N A 部分は、10 % 超の修飾された残基で構成され、更なる実施形態において、c r R N A に相補的でない t r a c r R N A 部分は、50 % 超の修飾された残基で構成され、更なる実施形態、c r R N A に相補的でない t r a c r R N A 部分は、90 % 超の修飾された残基で構成される。

【0050】

別の実施形態において、c r R N A 部分は、非修飾であり、t r a c r R N A 部分は、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチドで構成される。更なる実施形態において、c r R N A 部分は、非修飾であり、t r a c r R N A 部分は、10%超の修飾された塩基で構成される。

【0051】

別の実施形態において、式(I)の単離されたc r R N Aは、経験的に決定される修飾を用いて設計される。図7及び10に描かれる通り、Zドメイン(t r a c r R N A結合ドメイン)の3'末端における12個のヌクレオチド及びXドメイン(プロトスペーサードメイン内)の5'末端における10~12個のヌクレオチドは、化学修飾されたヌクレオチドでの置換を受けやすいユニバーサルヌクレオチドを表し、結果として得られるR N Aは、C R I S P R-C a s エンドヌクレアーゼ系において頑強な活性を保持する。Zドメイン(t r a c r R N A結合ドメイン)の5'末端内の更に他のヌクレオチドは、化学修飾されたヌクレオチドでの置換に不寛容である(図7)。しかし、式(I)の単離されたc r R N A内の他の部位が、化学修飾されたヌクレオチドを許容し、C R I S P R-C a s エンドヌクレアーゼ系における活性を保持する能力は、主に経験的に決定される。c r R N Aのt r a c r R N A結合ドメイン(Zドメイン)は、定常であり(すなわち、標的部位が異なっても配列が変化しない)、そのため本明細書に記載される修飾パターンは、標的部位に関係なく全てのc r R N Aに対してユニバーサルであり、広く適用され得る。c r R N Aのプロトスペーサー(Xドメイン)は、標的により異なり、このドメイン内の塩基位置のうちのいくつかの、化学修飾への寛容は、配列構成により異なり、部位の最大化学修飾が望まれる場合、経験的最適化から利得を享受し得る。しかしながら、標的特異的プロトスペーサー(X)ドメイン内の残基の一部は、配列構成への考慮なく修飾され得る。このドメインの5'末端における10~12個の残基は、修飾されたc r R N Aの完全活性が維持されるという予想とともに、2'修飾された残基で置換され得る。プロトスペーサー(X)ドメインの3'末端に向かう残りの8~10個の塩基は、配列構成に応じて、修飾に寛容である場合とそうでない場合がある。完全活性を維持しながら、プロトスペーサー(X)ドメインの20個の塩基のうちの17個が修飾され得る1つの配列構成を図7に示す。部位が修飾により低下された活性であったことを示す。

【0052】

C a s 9系ツールの用途は多く、異なる。それらには、植物遺伝子編集、酵母遺伝子編集、ノックアウト/ノックイン動物系の急速生成、疾患状態の動物モデルの生成、疾患状態の補正、レポーター遺伝子の挿入、及び全ゲノム機能性スクリーニングが含まれるが、これらに限定されない。

【0053】

本発明の実用性は、C a s 9のD10A及びH840a二重突然変異体等のC a s 酵素の突然変異体バージョンを、転写活性因子(C R I S P R a)及び抑制因子(C R I S P R i)との融合タンパク質として含めることによって更に拡大される(Xu, T., et al., Appl Environ Microbiol, 2014, 80(5): p. 1544-52を参照されたい)。C a s 9-s g R N A複合体を使用して、一本鎖m R N Aを同様に標的とすることもできる(O'Connell, M. R., et al., Nature, 516: 263, 2014を参照されたい)。d s D N Aを標的とするのと同じ方法で、c r R N A:t r a c r R N AをP A M m e r D N Aオリゴヌクレオチドと共に使用して、C a s 9切断を標的m R N Aに指向するか、またはそれをO'Connellにより説明されるm R N A捕捉アッセイにおいて使用することができる。

【0054】

C R I S P R/C a s 9用途に合成R N Aオリゴヌクレオチドを送達するアプローチを用いることにより、1)質量分光法を使用して別個のR N A配列を確認すること、2)2'-O M e修飾されたR N Aを十分に寛容される位置に選択的に挿入して、安定性を付与し、免疫原性を回避する一方で機能有効性を付与すること、3)制御された過渡効果のために細胞に導入されるR N Aの量を特異的に制御すること、及び4)R N Aに内在的に転

写されるが、相同性指向型修復経路、または統合事象をもたらす非相同性末端接合のいずれかにおいて基質にもなり得るdsDNAを導入することに関する懸念を排除することを可能にする。これらの統合事象は、crRNAまたはtracrRNA要素の長期の望まれない発現につながり得る。更に、統合は、他の遺伝子をランダムかつ予測不能な様式で崩壊し得、細胞の遺伝子材料を、望まれない、潜在的に有害な方法で変更する。したがって、本発明は、一過性であり、crRNAガイドにより指向されると意図されるあらゆる改変以外のゲノムの永続する証拠または変化を残さないように、細胞内のCRISPR経路の要素の一過性発現を導入する手段として望ましい。

【0055】

CRISPR-Casエンドヌクレアーゼ系

10

【0056】

コンピテントCRISPR-Casエンドヌクレアーゼ系は、単離されたCas9タンパク質、ならびに二重crRNA:tracrRNAの組み合わせ及びキメラsgRNAのうちの1つから選択される単離されたガイドRNAで形成されたリボヌクレオタンパク質(RNP)複合体を含む。一部の実施形態において、単離された、長さ修飾された、及び/または化学修飾された形態のcrRNA及びtracrRNAは、精製されたCas9タンパク質(例えば、配列番号407~410)、Cas9タンパク質をコードする単離されたmRNA(例えば、配列番号413)、またはCas9タンパク質をコードする遺伝子(例えば、配列番号411及び412)と発現ベクター内で複合される。ある特定のアクセシにおいて、単離された、長さ修飾された、及び/または化学修飾された形態のcrRNA及びtracrRNAは、Cas9遺伝子をコードする内在性発現カセットからCas9タンパク質を安定して発現する細胞株に導入され得る。他のアクセシにおいて、長さ修飾された及び/または化学修飾された形態のcrRNA及びtracrRNAの混合物は、Cas9 mRNAまたはCas9タンパク質のいずれかとの組み合わせで細胞に導入され得る。

20

【実施例】

【0057】

実施例1

本実施例は、化学修飾及び切断されたガイドRNAの、インビトロCas9 DNA切断アクセシにおける機能性を説明する。

30

【0058】

示されるようにWT配列に対して様々な化学修飾及び切断を有するCrRNA及びtracrRNAオリゴヌクレオチドを合成した(表1)。

【0059】

【表 1】

表1：様々なcrRNA及びtracrRNA対を持つCas9エンドヌクレアーゼによるHPRT1標的DNAの切断のインビトロ生化学試験。

cr/t racr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断
		tracrRNA配列		
1A	1	uuauauuccaacaacacuuucgugguuuu agagcuauugcu	35	+++
	2	agcauagcaaguuaaaaauaaggcu aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu ggcaccgagucggugcuiu	67	
1B	1	uuauauuccaacaacacuuucgugguuuu agagcuauugcu	35	---
	3	<u>guuggaaccacuucaaaaacagcaua</u> <u>gcaaguuaaaaauaaggcuaguccg</u> <u>uuaucaaacuuugaaaaaaguggcacc</u> <u>gagucggugcuiuuuuuu</u>	89	
1C	1	uuauauuccaacaacacuuucgugguuuu agagcuauugcu	35	---
	4	<u>agcauagcaaguuaaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuiu</u>	67	
2A	5	uuauauuccaacaacacuuucgugguuuu agagcuauugcuguuuuug	41	+++
	2	agcauagcaaguuaaaaauaaggcu aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu ggcaccgagucggugcuiu	67	
2B	5	uuauauuccaacaacacuuucgugguuuu agagcuauugcuguuuuug	41	---
	6	<u>guuggaaccacuucaaaaacagcaua</u> <u>gcaaguuaaaaauaaggcuaguccg</u> <u>uuaucaaacuuugaaaaaaguggcacc</u> <u>gagucggugcuiuuuuuu</u>	89	
2C	5	uuauauuccaacaacacuuucgugguuuu agagcuauugcuguuuuug	41	---
	4	<u>agcauagcaaguuaaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuiu</u>	67	
3A	7	<u>uuauauuccaacaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcuguuuuug</u>	41	---
	2	agcauagcaaguuaaaaauaaggcu aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu ggcaccgagucggugcuiu	67	
3B	7	<u>uuauauuccaacaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcuguuuuug</u>	41	---

10

20

30

40

cr/t tracr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断
		tracrRNA配列		
3 C	6	<u>GUUGGAACCAUUCAAAAACAGCAUA</u> <u>GCAAGUUA AAAAUAAAGGCUAGUCCG</u> <u>UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC</u> <u>GAGUCGGUGCUUUUUUU</u>	89	—
	7	<u>UUAUAUCCCAACACUUCGUGGUUUU</u> <u>AGAGCUAUGCUGUUUUUG</u>	41	
4 A	4	<u>AGCAUAGCAAGUUA AAAAUAAAGGCU</u> <u>AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU</u> <u>GGCACCAGAGUCGGUGCUUU</u>	67	—
	8	<u>UUAUAUCCCAACACUUCGUGGUUUU</u> <u>AGAGCUAUGCUGUUUUUG</u>	41	
4 B	2	<u>AGCAUAGCAAGUUA AAAAUAAAGGCU</u> <u>AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU</u> <u>GGCACCAGAGUCGGUGCUUU</u>	67	—
	8	<u>UUAUAUCCCAACACUUCGUGGUUUU</u> <u>AGAGCUAUGCUGUUUUUG</u>	41	
4 C	6	<u>GUUGGAACCAUUCAAAAACAGCAUA</u> <u>GCAAGUUA AAAAUAAAGGCUAGUCCG</u> <u>UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC</u> <u>GAGUCGGUGCUUUUUUU</u>	89	—
	8	<u>UUAUAUCCCAACACUUCGUGGUUUU</u> <u>AGAGCUAUGCUGUUUUUG</u>	41	
5 A	4	<u>AGCAUAGCAAGUUA AAAAUAAAGGCU</u> <u>AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU</u> <u>GGCACCAGAGUCGGUGCUUU</u>	67	—
	9	<u>UUAUAUCCCAACACUUCGUGGUUUU</u> <u>AGAGCUAUGCU</u>	35	
5 B	2	<u>AGCAUAGCAAGUUA AAAAUAAAGGCU</u> <u>AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU</u> <u>GGCACCAGAGUCGGUGCUUU</u>	67	—
	9	<u>UUAUAUCCCAACACUUCGUGGUUUU</u> <u>AGAGCUAUGCU</u>	35	
5 C	6	<u>GUUGGAACCAUUCAAAAACAGCAUA</u> <u>GCAAGUUA AAAAUAAAGGCUAGUCCG</u> <u>UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC</u> <u>GAGUCGGUGCUUUUUUU</u>	89	—
	9	<u>UUAUAUCCCAACACUUCGUGGUUUU</u> <u>AGAGCUAUGCU</u>	35	
6 A	4	<u>AGCAUAGCAAGUUA AAAAUAAAGGCU</u> <u>AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU</u> <u>GGCACCAGAGUCGGUGCUUU</u>	67	—
	10	<u>UUAUAUCCCAACACUUCGUGGUUUU</u> <u>AGAGCUAUGCU</u>	35	

10

20

30

cr/t tracr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断
		tracrRNA配列		
	2	agcauagcaaguuaaaaaagggcu aguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcuuu	67	
6B	10	uuauauccaacacuuucgug <u>guuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	—
	6	<u>guuggaacc</u> auucaaacaagcaua <u>kcaaguu</u> aaaaa <u>aaagkcu</u> aguccg <u>uuaucaacuug</u> aaaaaaguggcacc <u>gagucggugcuuuuuuu</u>	89	
6C	10	uuauauccaacacuuucgug <u>guuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	—
	4	<u>agcauagcaaguu</u> aaaaa <u>aaagggcu</u> <u>aguccguuaucaacuug</u> aaaaaagu <u>ggcaccgagucggugc</u> uuu	67	
1G	1	uuauauccaacacuuucgugguuuu agagcuauugcu	35	+++
	11	agcauagcaaguuaaaaaagggcu aguccguuaucaacuugaaaaaagu ggcaccgagucggugcuuu	67	
1K	1	uuauauccaacacuuucgugguuuu agagcuauugcu	35	++
	12	<u>agcauagcaaguu</u> aaaaa <u>aaaggcu</u> <u>aguccguuaucaacuug</u> aaaaaagu <u>ggcaccgagucggugc</u> uuu	67	
1L	1	uuauauccaacacuuucgugguuuu agagcuauugcu	35	+++
	13	<u>agcauagcaaguu</u> aaaaa <u>aaagggcu</u> <u>aguccguuaucaacuug</u> aaaaaagu <u>ggcaccgagucggugc</u> uuu	67	
14A	14	uuauauccaacacuuucgugguuuu <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	2	agcauagcaaguuaaaaaagggcu aguccguuaucaacuugaaaaaagu ggcaccgagucggugcuuu	67	
14G	14	uuauauccaacacuuucgugguuuu <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	11	agcauagcaaguuaaaaaagggcu aguccguuaucaacuugaaaaaagu ggcaccgagucggugcuuu	67	
14K	14	uuauauccaacacuuucgugguuuu <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	12	<u>agcauagcaaguu</u> aaaaa <u>aaaggcu</u> <u>aguccguuaucaacuug</u> aaaaaagu	67	

10

20

30

40

cr/t tracr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断
		tracrRNA配列		
		<u>ggcaccgagucggugcuuu</u>		
14L	14	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	13	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
15A	15	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	2	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
15G	15	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	11	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
15K	15	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	12	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
15L	15	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	13	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
16A	16	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	2	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
16G	16	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	11	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
16K	16	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	12	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucacaacuuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	

10

20

30

40

cr/t racr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断
		tracrRNA配列		
16L	16	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	13	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucaacuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
1H	1	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	17	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucaacuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
2D	5	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcuguuuuug</u>	41	+++
	18	<u>guuggaaccacuucaaaaacagcaua</u> <u>gcaaguuaaaaauaaggcuaguccg</u> <u>uuaucaacuugaaaaaaguggcacc</u> <u>gagucggugcuuuuuuu</u>	89	
2E	5	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcuguuuuug</u>	41	+++
	19	<u>guuggaaccacuucaaaaacagcaua</u> <u>gcaaguuaaaaauaaggcuaguccg</u> <u>uuaucaacuugaaaaaaguggcacc</u> <u>gagucggugcuuuuuuu</u>	89	
2F	5	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcuguuuuug</u>	41	+++
	20	<u>guuggaaccacuucaaaaacagcaua</u> <u>gcaaguuaaaaauaaggcuaguccg</u> <u>uuaucaacuugaaaaaaguggcacc</u> <u>gagucggugcuuuuuuu</u>	89	
2I	5	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcuguuuuug</u>	41	++
	21	<u>guuggaaccacuucaaaaacagcaua</u> <u>gcaaguuaaaaauaaggcuaguccg</u> <u>uuaucaacuugaaaaaaguggcacc</u> <u>gagucggugcuuuuuuu</u>	89	
7A	22	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	—
	2	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucaacuugaaaaaagu</u> <u>ggcaccgagucggugcuuu</u>	67	
9A	23	<u>uuauaucccaacacuuucgugguuuu</u> <u>agagcuauugcu</u>	35	+++
	2	<u>agcauagcaaguuaaaauaaggcu</u> <u>aguccguuaucaacuugaaaaaagu</u>	67	

10

20

30

40

c r / t r a c r R N A 対	配列番 号	c r R N A 配列	長さ	切断
		t r a c r R N A 配列		
		<u>g g c a c c g a g u c g g u g c u u u</u>		
10A	24	<u>u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u</u> <u>a g a g c u a u g c u</u>	35	+++
	2	<u>a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u</u> <u>a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u</u> <u>g g c a c c g a g u c g g u g c u u u</u>	67	
3D	7	<u>u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u</u> <u>a g a g c u a u g c u g u u u u u g</u>	41	—
	18	<u>g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a</u> <u>g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g</u> <u>u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c</u> <u>g a g u c g g u g c u u u u u u u</u>	89	
4D	8	<u>u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u</u> <u>a g a g c u a u g c u g u u u u u g</u>	41	—
	18	<u>g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a</u> <u>g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g</u> <u>u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c</u> <u>g a g u c g g u g c u u u u u u u</u>	89	
8D	25	<u>u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u</u> <u>a g a g c u a u g c u g u u u u u g</u>	41	—
	18	<u>g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a</u> <u>g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g</u> <u>u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c</u> <u>g a g u c g g u g c u u u u u u u</u>	89	
13D	26	<u>u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u</u> <u>a g a g c u a u g c u g u u u u u g</u>	41	+++
	18	<u>g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a</u> <u>g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g</u> <u>u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c</u> <u>g a g u c g g u g c u u u u u u u</u>	89	
13I	26	<u>u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u</u> <u>a g a g c u a u g c u g u u u u u g</u>	41	+++
	21	<u>g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a</u> <u>g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g</u> <u>u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c</u> <u>g a g u c g g u g c u u u u u u u</u>	89	

オリゴヌクレオチド配列の5'～3'を示す。小文字＝RNA、下線＝2'-O-メチルRNA、斜体＝2'-フルオロRNA。RNAオリゴヌクレオチドの長さを示す（塩基）。アガロースゲル電気泳動により可視化されるc r R N A : t r a c r R N A 対の各々を持つ組み換えC a s 9 によるD N A 標的の切断の相対効率は、完全切断を示す「+++」、中間レベルの切断を示す「++」及び「+」、ならびに切断なしを示す「—」で示される。

【0060】

c r R N A は、好適な「N G G」P A M 部位に隣接したヒトH P R T 1 遺伝子内の部位にマッチする19塩基プロトスペーサーガイド配列を含有していた。ヒトH P R T 1 遺伝子からの938塩基対領域を、p C R - B l u n t ベクター（L i f e T e c h n o l o g i e s）にクローン化した。C a s 9 切断アッセイにおいて使用する前に、制限エンドヌクレアーゼX m a I（N e w E n g l a n d B i o L a b s）での消化によりプラスミドを系統化した。H P R T 1 標的断片の配列を以下に示す。標的P A M 部位は、太字で示され、プロトスペーサーガイド配列結合部位は下線が引かれている。

【0061】

10

20

30

40

【化 1】

H P R T 1 標的配列配列番号 2 7

GAATGTTGTGATAAAAGGTGATGCTCACCTCTCCACACCCTTTTATAGTTTAGGGATTGTATTTCCAAGG
 TTTCTAGACTGAGAGCCCTTTTCATCTTTGCTCATTGACACTCTGTACCCATTAATCCTCCTTATTAGCTC
 CCCTTCAATGGACACATGGGTAGTCAGGGTGCAGGTCTCAGAACTGTCCCTCAGGTTCCAGGTGATCAACC
 AAGTGCCTTGTCTGTAGTGTCAACTCATTGCTGCCCCCTTCCTAGTAATCCCATTAATTTAGCTCTCCATTT
 CATAGTCTTTCTCCTTGGGTGTGTTAAAAGTGACCATGGTACACTCAGCACGGATGAAATGAAACAGTGTTTA
 GAAACGTCAGTCTTCTCTTTTGTAAATGCCCTGTAGTCTCTCTGTATGTTATATGTCACATTTTGTAAATTAA
 CAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCCACGAAGTGTGGATATAAGCCAGACTGTAAGTGAATTACTTTTTTTTG
 TCAATCATTTAAACCATCTTTAACCTAAAAGAGTTTTATGTGAAATGGCTTATAATTGCTTAGAGAATATTT
 GTAGAGAGGCACATTTGCCAGTATTAGATTTAAAAGTGATGTTTTCTTTATCTAAATGATGAATTATGATT
 CTTTTTAGTTGTTGGATTTGAAATTCCAGACAAGTTTGTGTTAGGATATGCCCTTGACTATAATGAATACT
 TCAGGGATTTGAATGTAAGTAATTGCTTCTTTTTCTCACTCATTTTTCAAAACACGCATAAAAAATTTAGGA
 AAGAGAATTGTTTTCTCCTTCCAGCACCTCATAATTTGAACAGACTGATGGTCCCATTAGTCACATAAAG
 CTGTAGTCTAGTACAGACGTCCTTAGAACTGGAACCTGGCCAGGCTAGGGTGACACTTCTTGTTGGCTGAA
 ATAGTTGAACAGCTT

10

【0062】

c r R N A 及び t r a c r R N A 対を、組み換え S p y C a s 9 (N e w E n g l a n d B i o L a b s) によるヒト H P R T 1 遺伝子のクローン化断片を含有する系統化されたプラスミド DNA の分解を指向する能力について試験した。c r R N A : t r a c r R N A を、D u p l e x B u f f e r (3 0 m M H E P E S p H 7 . 5 、 1 0 0 m M 酢酸カリウム) 中、1 5 0 n M 濃度でアニールした。S p y C a s 9 (1 5 n M) を、c r R N A : t r a c r R N A で 1 0 分間、3 7 ° C で 1 : 1 モル比でプレインキュベートした。後次に、3 n M の系統化された標的プラスミドを添加し、3 7 ° C で 1 時間インキュベートした。反応産物を、1 % アガロースゲル上で 1 2 5 V で 1 時間分離した。製造元のプロトコルに従い、G e l R e d (B i o t i u m) 後染色によりバンドを可視化した。ゲルを U V トランスイルミネーター上で撮像し、結果を上表 1 に要約する。

20

【0063】

天然の野生型 (W T) C R I S P R R N A は、5 ' 末端に 1 9 ~ 2 0 塩基プロトスペーサードメイン (標的核酸に結合するガイド) 、及び 3 ' 末端に t r a c r R N A に結合する 2 2 塩基ドメインを有する。故に、W T c r R N A は、4 1 ~ 4 2 塩基長である。W T t r a c r R N A は、8 9 塩基長である。W T 型 c r R N A : t r a c r R N A 対が、標的 DNA の完全切断を支持していたことを観察した (c r / t r a c r R N A 対 2 D) 。追加として、6 7 塩基 t r a c r R N A と対合された 3 5 塩基 c r R N A (1 9 塩基プロトスペーサー及び 1 6 塩基 t r a c r R N A 結合ドメイン) を持つ切断されたバージョンの試薬が、標的 RNA の完全切断を支持していたことを観察した (c r / t r a c r R N A 対 1 A) 。c r R N A t r a c r R N A 結合領域は、3 ' 末端の切断された 6 塩基であった (配列番号 1) 。t r a c r R N A を、両末端で切断した (配列番号 2) 。短い c r R N A と長い t r a c r R N A との対合組は、長い c r R N A と短い t r a c r R N A との対合組と同様の切断を示した (対 2 A) 。これらの発見は、C a s 9 標的認識及び切断を指向するための短い RNA 構成要素の使用を許すため重要である。より短い RNA オリゴヌクレオチドは、より安価で化学合成があまり困難でなく、精製の必要が少なく、長い RNA オリゴヌクレオチドより高い収率を付与する。

30

40

【0064】

天然の c r R N A 及び t r a c r R N A (図 1) の一部の要素を欠失させて機能的 s g R N A (図 2) を作製した。しかしながら、s g R N A 内で c r R N A を t r a c r R N A に結合する二重鎖核酸の量は、1 1 塩基対に限定され、これは典型的に、生物学的塩条件における二重鎖形成には短すぎる。複合体は、単分子ヘアピン構造に起因して s g R N A フォーマットで安定しているが、2 つの RNA に分裂した同じ配列は不安定となる。したがって、どの長さの二重鎖ドメインが、最小だが機能的な 2 分子 (2 部) C R I S P R

50

複合体を作製する必要があるかどうか、またはこの複合体がCas9による標的切断を指向するように機能するかどうかは不明であった。本実施例は、わずか15塩基を塩基対合させることが、crRNAプロトスペーサードメイン（配列番号1及び2）に相補的な標的に対してCas9ヌクレアーゼ活性を指向する、2部crRNA：tracrRNA複合体の機能を可能にすることを実証する。

【0065】

2'OMe RNAによるcrRNAの完全化学修飾は寛容でなかった（対3A及び対5A）。更に、crRNAの22塩基tracrRNA結合ドメインの完全2'OMe修飾は、標的切断を支持せず（対4A、対6A）、プロトスペーサードメインの完全2'OMe修飾は、切断を支持しなかった（対7A）。2'OMe RNAでのtracrRNAの完全化学修飾も寛容でなかった（対1B、1C、及び対2B、2C）。

10

【0066】

重要なことに、両方のCRISPR RNA種の一部の高度に2'OMe修飾されたバージョンは、切断を支持した。対1Kは、3'末端に29個の2'OMe残基を有するtracrRNAによる高度な切断活性を示す（配列番号11）。対1Lは、5'末端の9個の2'OMe残基、及び3'末端の29個の2'OMe残基による高度な切断活性を示す（配列番号13）。故に、短いバージョンのtracrRNAにおける67個のRNA残基のうちの38個は、インビトロ切断アッセイにおいて、活性の喪失なく2'OMe RNAに変換され得る（57%）。

20

【0067】

対14Aは、crRNAの3'末端における11塩基（22塩基tracrRNA結合ドメインの50%）が、2'OMe RNAで修飾され、標的切断を支持できることを実証する（配列番号14）。修飾されたcrRNAは、修飾されたtracrRNAと対合される場合に完全な活性を保持する（対14L、配列番号13及び14）。crRNAの5'末端に向かう11塩基の修飾（ガイド、プロトスペーサードメイン、塩基2～12個における）は、標的切断を支持し（対15A）、この修飾は、修飾されたtracrRNAと対合される場合にも機能的である（対15L、配列番号13及び15）。crRNAの5'末端及び3'末端に向かう2'OMe修飾は、修飾されたtracrRNAと対合される場合でも（対16L、配列番号13及び16）、35個の残基のうちの22個が修飾され（63%）、依然として切断を支持するように（対16A）複合され得る（配列番号16）。

30

【0068】

上述されるcrRNA：tracrRNA対は全て、2'OMe RNAを修飾因子として用いた。追加の試験は、2'F修飾がまた、Cas9により寛容であり、標的DNAの切断を可能にしたことを示した。対9Aは、全てのピミジン塩基に2'F修飾を持つcrRNA（配列番号23）を用い、この設計は、完全標的切断を支持した。同様に、crRNAの完全2'F修飾は、完全標的切断を支持した（対10A、配列番号24）。2'OMe及び2'F修飾の併用は、crRNA及びtracrRNAの両方の完全修飾を可能にし得る。本実施例における試験は、インビトロ生化学解析で用いられる。性能は、配列が細胞核環境で機能する必要がある哺乳類遺伝子編集の状況において異なり得る。

40

【0069】

実施例2

この実施例は、哺乳類細胞内でSpy Cas9ヌクレアーゼによるゲノム編集を指向する、切断されたtracrRNAの機能を実証する。

【0070】

機能的Cas9ヌクレアーゼ及びRNAトリガーの両方（単一sgRNAまたは二重crRNA：tracrRNA対）は、CRISPRゲノム編集が起こるように哺乳類細胞の核内に存在しなければならない。Cas9を発現する大きなプラスミドベクターの形質移入は不十分であり、実験的結果に変化性を加える。crRNA及びtracrRNAの長さ及び化学組成物の変化が、他の変数の不在下で哺乳類細胞内で及ぼす影響を正確に評

50

価するために、Spy Cas 9を安定して発現する細胞株が構築された。

【0071】

G418下で安定したベクター統合及び選択を持つSpy Cas 9（ヒトコドン最適化された）の構成的発現を有するHEK293細胞株を、下記の通り発達させた。ヒト最適化されたSpy Cas 9は、pcDNA3.1発現ベクターに結紮され（Life Technologies）、リポフェクタミン2000（Life Technologies）を使用してHEK293に形質移入された。形質移入された細胞を、ネオマイシンを使用して選択的圧力下に置かれる前に2日間成長させた。7日後、限界希釈技法を使用して、細胞を単一コロニーに播種した。モノクローナルコロニーを、Cas 9活性についてスクリーニングし、最高レベルの発現を有するクローンをその後の試験に使用した。Cas 9の単一コピー統合事象は、液滴デジタルPCR（ddPCR）を使用して決定した。抗Cas 9抗体を使用するウェスタンブロットは、低いが一定のCas 9タンパク質の発現を示した。この細胞株は、以降「HEK-Cas 9」と称される。

10

【0072】

このHEK-Cas 9細胞株を後次試験に用いた。逆形質移入フォーマットにおいて、抗HPRT1 crRNA：tracrRNA複合体を、リポフェクタミンRNAiMAX（Life Technologies）と混合し、HEK-Cas 9細胞に形質移入した。96ウェルプレートフォーマットにおいて1ウェル当たり40,000個の細胞を用いて形質移入を行った。0.75 μLの脂質試薬中30 nMの最終濃度でRNAを導入した。細胞を37℃で48時間インキュベートした。QuickExtract溶液（Epicentre）を使用して、ゲノムDNAを単離した。ゲノムDNAは、KAPA HiFi DNAポリメラーゼ（Roche）及び関心対象のHPRT領域を標的とするプライマー（HPRT順方向プライマー：AAGAA TGT TGT GAT AAA AGG T GAT GCT（配列番号28）、HPRT逆方向プライマー：ACACA TCC CAT GG GACTTCTG CCTC（配列番号29））で増幅させた。PCR産物を溶解し、NEB緩衝液2（New England BioLabs）中で再アニールして、ヘテロ二重鎖形成を可能にし、続いて2単位のT7エンドヌクレアーゼ1（T7EI、New England BioLabs）で1時間、37℃で消化した。消化された産物を、断片アナライザー（Advanced Analytics）上で可視化した。標的されたDNAの切断パーセントは、切断産物の平均モル濃度／（切断産物の平均モル濃度＋未切断バンドのモル濃度）×100として計算した。

20

30

【0073】

5'末端、3'末端、内部、またはそれらの組み合わせに欠失を有するtracrRNA（表2）を合成した。tracrRNAを、5'末端にHPRT1を標的とする19塩基プロトスペーサードメイン、及び3'末端に16塩基tracrRNA結合ドメインを有する、非修飾切断抗HPRT1 crRNA配列番号1（表1）と複合した。対合されたcrRNA：tracrRNA RNAオリゴヌクレオチドを、HEK-Cas 9細胞に形質移入し、上記の通り処理した。断片アナライザーを使用して行われる産物の定量的測定と共に、T7EI mismatches エンドヌクレアーゼ切断アッセイを使用して、HPRT1遺伝子内の切断率を比較することにより、相対遺伝子編集活性を評価した。野生型化膿性連鎖球菌crRNA：tracrRNA複合体の表示を図1に示す（crRNA配列番号46をtracrRNA配列番号18と対合させる）。本実施例において試験されたtracrRNA内の欠失の相対位置を、配列アラインメントフォーマットで図3に示す。

40

【0074】

【表 2】

表 2 : Cas 9 エンドヌクレアーゼによる哺乳類細胞内の遺伝子編集の効率に対する tracrRNA における長さ切断の効果。

配列番号	tracrRNA 配列 5' ~ 3'	切断 (%)	長さ	切断位置
18	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u	38	89	—
30	c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u	26	74	5' - 12 塩基 3' - 3 塩基
31	a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	32	70	5' - 15 塩基 3' - 4 塩基
2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	57	67	5' - 18 塩基 3' - 4 塩基
32	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	47	65	5' - 18 塩基 3' - 6 塩基
33	c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	27	63	5' - 20 塩基 3' - 6 塩基
34	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	0	55	5' - 18 塩基 Int - 10 塩基 3' - 6 塩基
35	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	0	49	5' - 18 塩基 Int - 16 塩基 3' - 6 塩基
36	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c	53	64	5' - 18 塩基 3' - 7 塩基
37	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a	56	63	5' - 18 塩基

10

20

30

40

配列番号	tracrRNA配列5' ~3'	切断 (%)	長さ	切断位置
	acuuugaaaaaaguggcacc gagucggug			3' - 8塩基
38	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccguuauca acuuugaaaaaaguggcacc gagucggug	56	62	5' - 18塩基 3' - 9塩基
39	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccguuauca acuuugaaaaaaguggcacc gagucgg	53	61	5' - 18塩基 3' - 10塩基
40	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccguuauca acuuugaaaaaagugccgag ucgg	5	58	5' - 18塩基 Int - 3塩基 3' - 10塩基
41	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccaacuuga aaaaguggcaccgagucg gugcu	0	59	5' - 18塩基 Int - 6塩基 3' - 6塩基
42	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccaacuuga aaaaguggcaccgagucg g	0	55	5' - 18塩基 Int - 6塩基 3' - 10塩基
43	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccaacuuga aaaagugccgagucgg	0	52	5' - 18塩基 Int - 9塩基 3' - 10塩基
44	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccguuauca acuuugaaaaaagug	0	49	5' - 18塩基 3' - 22塩基
45	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccguuauca gcaccgagucggugcu	0	52	5' - 18塩基 Int - 13塩基 3' - 6塩基
427	agcauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccgucaacu ugaaaaaaguggcaccgag	4	64	5' - 18塩基 Int - 3塩基

10

20

30

40

配列番号	tracrRNA配列5' ~3'	切断 (%)	長さ	切断位置
	ucggugcuuu			基 3' - 4塩基

オリゴヌクレオチド配列の5' ~ 3'を示す。小文字 = RNA。RNAオリゴヌクレオチドの長さを示す（塩基）。切断試験において除去された5'末端、3'末端、及び内部

50

(int)におけるRNA残基の数を示す。各種の相対機能的活性は、T7EIヘテロ二重鎖アッセイにおいて切断%により示される。

【0075】

この実施例は、哺乳類細胞における遺伝子編集の目的のために、tracrRNAが、5'末端及び3'末端の両方からの著しい欠失を寛容し、完全な機能性を保持し得ることを実証する。5'末端からの18塩基の欠失は、十分に寛容された。5'末端からの20塩基の欠失は、恐らくcrRNAの結合の低い親和性に起因して、低減した活性につながった。この低減した長さまたは更に短い長さは、Tm強化修飾を用いて短い二重鎖形成領域を安定させる場合に機能的である可能性がある。3'末端から最大10個の塩基の欠失は、十分に寛容された。追加の欠失は、活性の喪失をもたらした。ヘアピン要素またはヘアピン要素間の間隔を中断した内部欠失は、機能的でなかった。

10

【0076】

要するに、この実施例は、野生型(WT、配列番号18)の89塩基長から67塩基長(配列番号2)、または62塩基長(配列番号38)、または61塩基長(配列番号39)へのtracrRNAの切断は、高い機能的活性を保持したことを実証する。この種の短縮されたtracrRNAの使用は、より安価かつWT89塩基RNAよりも容易に化学的方法により製造される。切断された種(配列番号2、配列番号38、及び配列番号39)の一部は、89塩基WT tracrRNAにわたって増加した機能的活性を示した。したがって、より安価かつ容易に化学的方法により製造されることに加えて、本発明の短縮されたtracrRNAは、改善された活性を示した。

20

【0077】

実施例3

実施例1及び2は、それぞれ42塩基及び89塩基のWT長より短いcrRNA:tracrRNA複合体が、哺乳類遺伝子編集においてより高い機能的活性を示し得ることを実証した。本実施例は、これらのRNA種の長さの更なる最適化を示す。

【0078】

示される通り異なる長さを有する、一連のcrRNA及びtracrRNA(表3)を合成した。crRNAの3'末端、tracrRNAの5'末端、及び/またはtracrRNAの3'末端において切断を行った。crRNA及びtracrRNAを、表3に示される通り対合した。crRNAは全て、5'末端及び可変長3'末端でHPRT1を標的とする20塩基プロトスペーサードメイン(tracrRNA結合ドメイン)を用いた。本実施例において試験されたcrRNA及びtracrRNA配列のアラインメントを図4に示し、各機能的ドメインに対する切断の位置を明らかにする。

30

【0079】

対合されたcrRNA:tracrRNA RNAオリゴヌクレオチドを、HEK-Cas9細胞に形質移入し、実施例2に記載される通り処理した。断片アナライザーを使用して行われる産物の定量的測定と共に、T7EI mismatches endonuclease切断アッセイを使用して、HPRT1遺伝子内の切断率を比較することにより、相対遺伝子編集活性を評価した。結果を表3に示す。欠失の相対位置を、配列アラインメントフォーマットで図4に示す。

40

【0080】

【表 3】

表 3 : Cas9 エンドヌクレアーゼによる哺乳類細胞内の遺伝子編集の効率に対する crRNA 及び tracrRNA 両方における長さ切断の効果。

cr / tracr RNA 対	配列番 号	crRNA 配列	長さ	切断 %
		tracrRNA 配列		
42 / 8 9	46	cuuauauccaacacuuucgug guuuuagagcuaugcuguuu ug	42	25
	18	guuggaaccgauucaaaaacag cauagcaaguuaaaaauaagg cuaguccguuaucaacuuga aaaaguggcaccgagucggu gcuuuuuuuu	89	
39 / 8 9	47	cuuauauccaacacuuucgug guuuuagagcuaugcuguu	39	31
	18	guuggaaccgauucaaaaacag cauagcaaguuaaaaauaagg cuaguccguuaucaacuuga aaaaguggcaccgagucggu gcuuuuuuuu	89	
36 / 8 9	48	cuuauauccaacacuuucgug guuuuagagcuaugcu	36	38
	18	guuggaaccgauucaaaaacag cauagcaaguuaaaaauaagg cuaguccguuaucaacuuga aaaaguggcaccgagucggu gcuuuuuuuu	89	
34 / 8 9	49	cuuauauccaacacuuucgug guuuuagagcuaug	34	21
	18	guuggaaccgauucaaaaacag cauagcaaguuaaaaauaagg cuaguccguuaucaacuuga aaaaguggcaccgagucggu gcuuuuuuuu	89	
42 / 7 4	46	cuuauauccaacacuuucgug guuuuagagcuaugcuguuu ug	42	35
	50	caaaaacagcauagcaaguu aaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcacc gagucggugcuuuu	74	
39 / 7 4	47	cuuauauccaacacuuucgug guuuuagagcuaugcuguu	39	34

10

20

30

40

cr / t tracr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断 %
		tracrRNA配列		
	50	caaaaacagcauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaaguggcacc gagucggugcuuuu	74	
36 / 7 4	48	cuuaauauccaacaacuucgug guuuuagagcuaugcu	36	26
	50	caaaaacagcauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaaguggcacc gagucggugcuuuu	74	
34 / 7 4	49	cuuaauauccaacaacuucgug guuuuagagcuaug	34	20
	50	caaaaacagcauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaaguggcacc gagucggugcuuuu	74	
42 / 7 0	46	cuuaauauccaacaacuucgug guuuuagagcuaugcuguuu ug	42	55
	51	aacagcauagcaaguuaaaaa uaaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaaguggcaccgag ucggugcuuu	70	
39 / 7 0	47	cuuaauauccaacaacuucgug guuuuagagcuaugcuguu	39	48
	51	aacagcauagcaaguuaaaaa uaaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaaguggcaccgag ucggugcuuu	70	
36 / 7 0	48	cuuaauauccaacaacuucgug guuuuagagcuaugcu	36	32
	51	aacagcauagcaaguuaaaaa uaaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaaguggcaccgag ucggugcuuu	70	
34 / 7 0	49	cuuaauauccaacaacuucgug guuuuagagcuaug	34	9
	51	aacagcauagcaaguuaaaaa uaaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaaguggcaccgag ucggugcuuu	70	
42 / 6 7	46	cuuaauauccaacaacuucgug guuuuagagcuaugcuguuu	42	36

10

20

30

40

cr / t tracr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断 %
		tracrRNA配列		
		ug		
	2	agcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaaguggcaccgagucg gugcuuu	67	
39 / 6 7	47	cuuauauccaacacucgug guuuuagagcuauugcuguu	39	41
	2	agcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaaguggcaccgagucg gugcuuu	67	
36 / 6 7	48	cuuauauccaacacucgug guuuuagagcuauugcu	36	57
	2	agcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaaguggcaccgagucg gugcuuu	67	
34 / 6 7	49	cuuauauccaacacucgug guuuuagagcuauug	34	44
	2	agcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaaguggcaccgagucg gugcuuu	67	
42 / 6 5	46	cuuauauccaacacucgug guuuuagagcuauugcuguuu ug	42	50
	52	agcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaaguggcaccgagucg gugcu	65	
39 / 6 5	47	cuuauauccaacacucgug guuuuagagcuauugcuguu	39	46
	52	agcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaaguggcaccgagucg gugcu	65	
36 / 6 5	48	cuuauauccaacacucgug guuuuagagcuauugcu	36	47
	52	agcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaaguggcaccgagucg gugcu	65	

10

20

30

40

c r / t r a c r RNA対	配列番 号	c r RNA配列	長さ	切断 %
		t r a c r RNA配列		
34/6 5	49	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g a g c u a u g	34	16
	52	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	65	
42/6 3	46	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g a g c u a u g c u g u u u u g	42	6
	53	c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	63	
39/6 3	47	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g a g c u a u g c u g u u	39	13
	53	c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	63	
36/6 3	48	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g a g c u a u g c u	36	28
	53	c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	63	
34/6 3	49	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g a g c u a u g	34	33
	53	c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u	63	

10

20

30

オリゴヌクレオチド配列の5'～3'を示す。小文字＝RNA。RNAオリゴヌクレオチドの長さを示す（塩基）。各c r RNA：t r a c r RNA対の相対機能的活性は、T7E1ヘテロ二重鎖アッセイにおいて切断%により示される。

【0081】

試験された化合物の全てが、HEK-Cas9細胞内のHPRT1遺伝子座におけるCRISPR/Cas編集を指向した。効率は、6%～57%まで広く異なっていた。最も有効なc r RNA+t r a c r RNAの組み合わせは、36塩基c r RNA（配列番号48）と67mer t r a c r RNA（配列番号2）であった。切断され、最適化されたc r RNA：t r a c r RNA複合体の概略表示を図5に示す。この場合、c r RNAのt r a c r RNA結合ドメインは、WT22塩基配列から16塩基に切断された（3'末端）。これは、t r a c r RNAの5'末端においてc r RNA結合ドメインにハイブリダイズする。t r a c r RNAは、5'末端で18塩基、及び3'末端で4塩基が切断されて活性67塩基産物を生成した。この対の場合、t r a c r RNAの5'末端によるc r RNAの3'末端のハイブリダイゼーション時に丸い末端が形成される。70塩基t r a c r RNA（配列番号51）と対合された42塩基（WT）c r RNA（配列番号46）を含む他のバージョンもまた、高い活性を示した。

40

【0082】

試験された最短c r RNAは、34塩基長（配列番号49）であり、一般に長い変異型

50

よりも低い活性を示した。この変異型と *t r a c r R N A* との間で形成されたより短い二重鎖ドメインは、36塩基 *c r R N A* 変異型と比較して低減された結合親和性 (T_m) を有し、34塩基複合体は、37℃で不安定であった。2'OMe RNA、2'F RNA、またはLNA残基等の結合親和性 (T_m) を増加させる化学修飾の使用は、この短い二重鎖ドメインの安定性を増加させ、改善された活性につながり、この設計の非常に短い *c r R N A* の使用を可能にする。 T_m 強化修飾の広範囲の使用は、*c r R N A* において、用いられる修飾残基の種類及び数に応じて、例えば、13塩基、または12塩基、または11塩基、または10塩基、または9塩基、または8塩基、またはそれより短い、更に短い *t r a c r R N A* 結合ドメインの使用を可能にする。

【0083】

10

実施例 4

実施例 1、2、及び 3 は、それぞれ 42 塩基及び 89 塩基の WT 長より短い *c r R N A* : *t r a c r R N A* 複合体が、哺乳類遺伝子編集においてより高い機能的活性を示し得ることを実証した。そのような実施例において、全ての切断は、RNA のユニバーサルドメインにおいて行われた。本実施例は、切断が、ガイド *c r R N A* の標的特異的プロトスペーサードメインに対して有する効果を試験する。

【0084】

示される通り、20、19、18、または17塩基のプロトスペーサードメイン長を有する一連の *c r R N A* (表 4) を合成した。16mer ユニバーサル *t r a c r R N A* 結合配列を 3' 末端で使用し、*c r R N A* の 5' 末端で切断を行った。*c r R N A* を、非修飾 67mer *t r a c r R N A* (配列番号 2) と対合させた。*c r R N A* は、ヒト H P R T 1 遺伝子の同じエキソン内で 4 つの異なる部位を標的とした。

20

【0085】

対合された *c r R N A* : *t r a c r R N A* RNA オリゴヌクレオチドを、HEK-293細胞に形質移入し、実施例 2 に記載される通り処理した。断片アナライザーを使用して行われる産物の定量的測定と共に、T7E1 ミスマッチエンドヌクレアーゼ切断アッセイを使用して、H P R T 1 遺伝子内の切断率を比較することにより、相対遺伝子編集活性を評価した。結果を表 4 に示す。

【0086】

【表 4】

表 4 : Cas 9 エンドヌクレアーゼによる哺乳類細胞内の遺伝子編集の効率に対する cr RNA の 5' プロトスペアードメインにおける長さ切断の効果。

配列番号	cr RNA 配列 5' ~ 3'	長さ プロトスペアードメイン	切断 (%)	HPRT1 部位
48	<u>c u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u g</u> c u	20	64	38285
1	<u>u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u g</u> c u	19	62	
54	<u>u a u a u c c a a c a c u u c g</u> <u>u g g u u u u a g a g c u a u g c</u> u	18	57	
55	<u>a u a u c c a a c a c u u c g u</u> <u>g g u u u u a g a g c u a u g c u</u>	17	42	
56	<u>a a u u a u g g g g a u u a c u a</u> <u>g g a g u u u u a g a g c u a u g</u> c u	20	78	38087
57	<u>a u u a u g g g g a u u a c u a</u> <u>g g a g u u u u a g a g c u a u g</u> c u	19	81	
58	<u>u u a u g g g g a u u a c u a g</u> <u>g a g u u u u a g a g c u a u g c</u> u	18	82	
59	<u>u a u g g g g a u u a c u a g g</u> <u>a g u u u u a g a g c u a u g c u</u>	17	82	
60	<u>a u u u c a c a u a a a a c u c u</u> <u>u u u g u u u u a g a g c u a u g</u> c u	20	52	38358
61	<u>u u u c a c a u a a a a c u c u</u> <u>u u u g u u u u a g a g c u a u g</u> c u	19	30	
62	<u>u u c a c a u a a a a c u c u u</u> <u>u u g u u u u a g a g c u a u g c</u> u	18	12	
63	<u>u c a c a u a a a a c u c u u u</u> <u>u g u u u u a g a g c u a u g c u</u>	17	0	
64	<u>u c c a u u u c a u a g u c u u u</u> <u>c c u g u u u u a g a g c u a u g</u> c u	20	70	38094
65	<u>c c a u u u c a u a g u c u u u</u> <u>c c u g u u u u a g a g c u a u g</u> c u	19	71	

配列番号	cr RNA 配列 5' ~ 3'	長さ プロトスペアードメイン	切断 (%)	HPRT1 部位
66	<u>c a u u u c a u a g u c u u u c</u> <u>c u g u u u u a g a g c u a u g c</u> u	18	52	
67	<u>a u u u c a u a g u c u u u c c</u> <u>u g u u u u a g a g c u a u g c u</u>	17	0	

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド配列の 5' ～ 3' を示す。小文字 = RNA。標的特異的プロトスペーサードメインに下線が引かれ、長さを示す（塩基）。各種の相対機能的活性は、T7E1 ヘテロ二重鎖アッセイにおいて切断%により示される。

【0087】

試験された4つの部位のうち、1つ（部位38087）は、4つのcrRNA全てに関して高い活性を示し、プロトスペーサードメインが短縮されても変化がなかった。部位38285は、20及び19塩基プロトスペーサーcrRNA（配列番号48及び1）に関して同様の有効性、18塩基バージョン（配列番号54）に関してわずかな減少、及び17塩基バージョン（配列番号55）に関して大幅な減少。部位38094は、20及び19塩基プロトスペーサーcrRNA（配列番号64及び65）に関して同様の有効性、18塩基バージョン（配列番号66）に関して中度の減少を示し、17塩基バージョン（配列番号67）に関して活性を示さなかった。部位38358は、20塩基バージョン（配列番号60）に関して良好な活性、19塩基バージョン（配列番号61）に関して低い活性、18塩基バージョン（配列番号62）に関して更に低い活性を示し、17塩基バージョン（配列番号63）に関して活性を示さなかった。

【0088】

短縮された17塩基プロトスペーサーガイドドメインの使用は、野生型20塩基ドメインと比較して、望まれないオフターゲット事象の発生を低下させることができる（Fuet al., Nature Biotechnol., 32:279, 2014）。オンターゲット有効性が、配列構成特異的に異なること、及び20塩基及び19塩基プロトスペーサーガイドドメインが一般に有効であるが、18塩基プロトスペーサードメインが使用される場合に活性が減少し始め、17塩基プロトスペーサードメインが使用される場合に活性が著しく減少することを観察する。したがって、望ましいオンターゲット効率を維持するために、20及び19塩基標的特異的プロトスペーサーガイドドメインの使用が本明細書で用いられる。プロトスペーサーガイドドメインの著しい切断は、多くの場合、Cas9エンドヌクレアーゼによるDNA標的のオンターゲット切断を低下させる。Tmを強化する（標的DNA配列に対するcrRNAのプロトスペーサー標的特異的ドメインの結合親和性を増加させる）化学修飾の使用は、より短い配列の使用を可能にし得、それにより、17塩基プロトスペーサーガイドは、非修飾20塩基プロトスペーサーガイドドメインと同様のオンターゲット有効性を示し得る。

【0089】

実施例5

本実施例は、切断されたcrRNA:tracrRNA複合体が、複数部位において改善された遺伝子編集活性を示すことを実証する。先の実施例は、ヒトHRPT1遺伝子内の単一部位での哺乳類細胞におけるCRISPR遺伝子編集のトリガーとしての、切断されたRNAの有効性を試験した。部位/配列特異的効果が存在し得る。本実施例は、ヒトHRPT1遺伝子のエキソン内の12部位において、本発明の切断された種の改善された性能を実証する。

【0090】

3'末端に16merユニバーサルtracrRNA結合配列を持つヒトHRPT1遺伝子内の12部位に特異的な20塩基のプロトスペーサードメイン長を有する、一連のcrRNA（表5）を合成した。crRNAを、非修飾67mertracrRNA（配列番号2）と対合させた。WT長さcrRNA:tracrRNA複合体を使用して、同じ12部位を試験し、crRNAは、WT89mertracrRNA（配列番号18）と複合された3'末端に22merユニバーサルtracrRNA結合配列を持つ20塩基プロトスペーサーガイドを含んでいた。

【0091】

対合されたcrRNA:tracrRNA RNAオリゴヌクレオチドを、HEK-Cas9細胞に形質移入し、実施例2に記載される通り処理した。断片アナライザーを使用して行われる産物の定量的測定と共に、T7E1 mismatches エンドヌクレアーゼ切断アッ

セイを使用して、H P R T 1 遺伝子内の切断率を比較することにより、相対遺伝子編集活性を評価した。結果を表 5 に示す。

【 0 0 9 2 】

【 表 5 】

表 5 : C a s 9 エンドヌクレアーゼによる哺乳類細胞内の遺伝子編集の効率に対する c r RNA 及び t r a c r RNA 両方における長さ切断の効果。

c r / t r a c r RNA 対	配列番 号	c r RNA 配列	長さ	切断 %
		t r a c r RNA 配列		
3 8 0 9 4 短	6 4	u c c a u u u c a u a g u c u u u c c u g u u u u a g a g c u a u g c u	3 6	5 5
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	6 7	
3 8 0 9 4 長	6 8	u c c a u u u c a u a g u c u u u c c u g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	4 2	3 1
	1 8	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u	8 9	
3 8 2 3 1 短	6 9	u u u u g u a a u u a a c a g c u u g c g u u u u a g a g c u a u g c u	3 6	7
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	6 7	
3 8 2 3 1 長	7 0	u u u u g u a a u u a a c a g c u u g c g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	4 2	0
	1 8	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u	8 9	
3 8 3 7 1 短	7 1	c u u a g a g a a u a u u u g u a g a g g u u u u a g a g c u a u g c u	3 6	5 7
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	6 7	
3 8 3 7 1 長	7 2	c u u a g a g a a u a u u u g u a g a g g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	4 2	2 7
	1 8	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u	8 9	

10

20

30

40

c r / t r a c r RNA対	配列番 号	c r RNA配列	長さ	切断 %
		t r a c r RNA配列		
		u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u u		
3850 9短	73	u u g a c u a u a a u g a a u a c u u c g u u u u a g a g c u a u g c u	36	56
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	67	
3850 9長	74	u u g a c u a u a a u g a a u a c u u c g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	42	7
	18	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u u	89	
3857 4短	75	c a a a a c a c g c a u a a a a a u u u g u u u u a g a g c u a u g c u	36	58
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	67	
3857 4長	76	c a a a a c a c g c a u a a a a a u u u g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	42	22
	18	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u u	89	
3808 7短	56	a a u u a u g g g g a u u a c u a g g a g u u u u a g a g c u a u g c u	36	60
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	67	
3808 7長	77	a a u u a u g g g g a u u a c u a g g a g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	42	53
	18	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u	89	

10

20

30

40

cr/t racr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断 %
		tracrRNA配列		
		cggugcuuuuuuu		
3813 3短	78	ggucacuuuuuacacacccc aguuuuagagcuaugcu	36	53
	2	agcauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucac uugaaaaaguggcacccgag ucggugcuuu	67	
3813 3長	79	ggucacuuuuuacacacccc aguuuuagagcuaugcugu uuug	42	37
	18	guuggaaccgaucaaaaaca gcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucac uugaaaaaguggcacccgag ucggugcuuuuuuu	89	
3828 5短	48	cuuauaucccaacacuuucgu gguuuuagagcuaugcu	36	38
	2	agcauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucac uugaaaaaguggcacccgag ucggugcuuu	67	
3828 5長	46	cuuauaucccaacacuuucgu gguuuuagagcuaugcugu uuug	42	8
	18	guuggaaccgaucaaaaaca gcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucac uugaaaaaguggcacccgag ucggugcuuuuuuu	89	
3828 7短	80	ggcuuauaucccaacacuuuc gguuuuagagcuaugcu	36	48
	2	agcauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucac uugaaaaaguggcacccgag ucggugcuuu	67	
3828 7長	81	ggcuuauaucccaacacuuuc gguuuuagagcuaugcugu uuug	42	6
	18	guuggaaccgaucaaaaaca gcauagcaaguuaaaauaa ggcuaguccguuaucac uugaaaaaguggcacccgag	89	

10

20

30

40

c r / t r a c r RNA対	配列番 号	c r RNA配列	長さ	切断 %
		t r a c r RNA配列		
			c g g u g c u u u u u u u	
3 8 3 5 8短	6 0	a u u u c a c a u a a a a c u c u u u u g u u u u a g a g c u a u g c u	3 6	4 2
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	6 7	
3 8 3 5 8長	8 2	a u u u c a c a u a a a a c u c u u u u g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	4 2	8
	1 8	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u	8 9	
3 8 6 3 6短	8 3	u c a a a u u a u g a g g u g c u g g a g u u u u a g a g c u a u g c u	3 6	2 6
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	6 7	
3 8 6 3 6長	8 4	u c a a a u u a u g a g g u g c u g g a g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	4 2	1 6
	1 8	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u	8 9	
3 8 6 7 3短	8 5	u a c a g c u u u a u g u g a c u a a u g u u u u a g a g c u a u g c u	3 6	4 5
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	6 7	
3 8 6 7 3長	8 6	u a c a g c u u u a u g u g a c u a a u g u u u u a g a g c u a u g c u g u u u u g	4 2	3 2
	1 8	g u u g g a a c c a u u c a a a a c a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u	8 9	

10

20

30

40

50

cr / t tracr RNA対	配列番 号	crRNA配列	長さ	切断 %
		tracrRNA配列		
		c g g u g c u u u u u u u		

オリゴヌクレオチド配列の5'～3'を示す。小文字＝RNA。RNAオリゴヌクレオ

チドの長さを示す（塩基）。各 crRNA : tracrRNA 対の相対機能的活性は、T7E1 ヘテロ二重鎖アッセイにおいて切断 % により示される。

【0093】

HEK-Cas9 細胞における CRISPR 媒介型遺伝子編集の相対効率は、配列構成により異なっていた。しかしながら、全ての場合において、より短い最適化された RNA ガイド（36mer crRNA 及び 67mer tracrRNA）は、WT RNA（42mer crRNA 及び 89mer tracrRNA）より高い効率を示した。本発明の短縮された、最適化されたガイド RNA の使用は、WT RNA に対して標的された DNA の Cas9 切断を改善し、遺伝子編集率を改善する。

【0094】

実施例 6

実施例 1 は、インビトロ生化学標的 DNA 切断アッセイにおいて、Cas9 で機能化された化学修飾パターンについて説明した。この実施例は、哺乳類細胞内で Spy-Cas9 スクレアーゼによるゲノム編集を指向する、化学修飾された tracrRNA の機能を実証する。最適な修飾パターンは、インビトロ用途とインビボ用途との間で異なる。

【0095】

リボース修飾 2'-OMe RNA 及び LNA；末端修飾基プロパンジオールスパーサー及びナフチルアゾ修飾因子（N，N-ジエチル-4-（4-ニトロナフタレン-1-イルアゾ）-フェニルアミン、または「ZEN」）；及びホスホロチオエート修飾を持つ選択ヌクレオチド間結合を含む、様々な化学修飾を有する一連の tracrRNA（表 6）を合成した。ナフチルアゾ修飾された構造、及びエキソヌクレアーゼ攻撃を遮断するための末端基として使用するためのナフチルアゾ修飾因子及びプロパンジオール修飾因子の使用については、Lennox et al., Molecular Therapy Nucleic Acids 2:e117 (2013) を参照されたい。表 6 に列挙される tracrRNA を、5' 末端に HPRT1 を標的とする 19 塩基プロトスパーサードメイン、及び 3' 末端に 16 塩基 tracrRNA 結合ドメインを有する、非修飾切断抗 HPRT1 crRNA 配列番号 1（表 1）と複合した。対合された crRNA : tracrRNA RNA オリゴヌクレオチドを、HEK-Cas9 細胞に形質移入し、上記の通り処理した。断片アナライザーを使用して行われる産物の定量的測定と共に、T7E1 ミスマッチエンドヌクレアーゼ切断アッセイを使用して、HPRT1 遺伝子内の切断率を比較することにより、相対遺伝子編集活性を評価した。

【0096】

10

20

30

【表 6】

表 6：哺乳類細胞における t r a c r RNAオリゴヌクレオチド修飾パターンの最適化

配列番号	t r a c r RNA配列 (5' ~ 3')	切断 (%)
2	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	65
4	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	0
11	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	56
17	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	12
12	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	20
13	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	64
87	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	61
88	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	60
89	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcuuu	64
90	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcu	60
91	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcu	61
92	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcu	59
93	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcu	57
94	agcauagcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaaguggcaccgagu cggugcu	57

10

20

30

40

配列番号	t r a c r RNA配列 (5' ~3')	切断 (%)
95	<u>a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c</u> <u>g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u</u> <u>c g g u g c u</u>	62
96	<u>a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c</u> <u>g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u</u> <u>c g g u g c u</u>	62
97	C3- <u>a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u u u</u> -C3	53
98	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	58
99	C3- <u>a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u u u</u> -C3	20
100	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	63
101	<u>a * g * c * a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g</u> <u>u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g</u> <u>a g u c g g u g c * u * u * u</u>	55
102	<u>a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c</u> <u>g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u</u> <u>c g g u g c u u u</u>	39
103	<u>a * g * c * a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g</u> <u>u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g</u> <u>a g u c g g u g c * u * u * u</u>	54
104	<u>a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c</u> <u>g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u</u> <u>c g g u g c u u u</u> -ZEN	55
105	ZEN- <u>a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g</u> <u>u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g</u> <u>a g u c g g u g c u u u</u> -ZEN	23
106	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g * g * u</u>	58
107	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	8
108	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
109	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	11

10

20

30

40

配列番号	t r a c r RNA配列 (5' ~3')	切断 (%)
110	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	61
111	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	61
112	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	62
113	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	62
114	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	61
115	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	14
116	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	60
117	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	60
118	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	15
119	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
120	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	7
121	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	14
122	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	11
123	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
124	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0

10

20

30

40

配列番号	t r a c r RNA配列 (5' ~3')	切断 (%)
125	<u>a*g*c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
126	<u>a*g*c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	64
127	<u>a*g*c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
128	<u>a*g*c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
129	<u>+ a * + g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a</u> <u>g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c</u> <u>g a g u c g g u g c u * + t * + t</u>	57
130	<u>C3-a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u u u - I n v T</u>	
131	<u>C3-a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u - C 3</u>	58
132	<u>C3-a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u - I n v T</u>	59
133	<u>a g c a u a g c a * a * g * u * u * a * a * a * a * u * a</u> <u>* a * g * g * c * u * a * g * u * c * c * g * u * u * a *</u> <u>u * c * a * a * c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a g u</u> <u>c g g u g c u u u</u>	0
134	<u>a*g*c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	58
135	<u>a*g*c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	19
136	<u>a*g*c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g * g * u</u>	54
137	<u>a*g*c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g * g * u</u>	13
138	<u>a*g*c a u a g c a a g T T A A A A T A A G G C T A G T</u> <u>C C G T T a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
139	<u>a*g*c a u a g c a a g T T A A A A T A A G g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u>	0

10

20

30

40

配列番号	t r a c rRNA配列 (5' ~ 3')	切断 (%)
	<u>g u c g g u g c u * u * u</u>	
140	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g G C T A G T</u> <u>C C G T T a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
141	<u>a * g * c a u a g c a a g u u u s s s s u s s g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
142	<u>a * g * c a u a g c a a g u u u s s s s u s s g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	4
143	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
144	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	52
145	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	63
146	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	0
147	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	62
148	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	57
149	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	47
150	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	61
151	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	61
152	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	61
153	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	61

10

20

30

40

配列番号	t r a c r RNA配列 (5' ~ 3')	切断 (%)
154	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	50
155	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	46
156	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	59
157	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	2
158	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	18
159	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	50
160	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	58
161	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	14
162	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>	8

10

20

オリゴヌクレオチド配列の5' ~ 3'を示す。大文字=DNA、小文字=RNA；下線=2'-O-メチルRNA；斜体=2'-フルオロRNA；+a、+c、+t、+g=LNA；C3=C3スペーサー（プロパンジオール修飾因子）；*=ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；ZEN-ナフチル-アゾ修飾因子；Inv-dT=反転dT。各種の相対機能的活性は、T7EIヘテロ二重鎖アッセイにおいて切断%により示される。

30

【0097】

修飾は、通常、非修飾オリゴヌクレオチドを分解するエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼの存在に起因して、合成核酸が細胞内環境で良好に機能するために必須である。オリゴヌクレオチドへのヌクレアーゼ耐性を付与する、広範囲の修飾が説明されてきた。所与の適用に功を奏する修飾の正確な組み合わせ及び用いる順序は、配列構成及び生物学的機能に必要なタンパク質相互作用の性質により異なり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチド（RNase H1と相互作用する）及びsiRNA（DICER、AGO2、及び他のタンパク質と相互作用する）の化学修飾に関する広範囲の先行研究が行われてきた。化学修飾は、CRISPR-crRNA：tracrRNA複合体の機能を改善することが予想される。しかしながら、修飾の種類及び／または修飾のパターンがCas9との合成RNAの機能的複合と適応するかを予測することは不可能である。本発明は、哺乳類細胞においてCas9媒介型遺伝子編集を指向する高レベルの機能を保持する、tracrRNAの最小、中度、及び広範囲の化学修飾パターンを定義する。

40

【0098】

表6の結果は、広範囲の修飾が、tracrRNAの5'及び3'末端ドメイン全体で寛容されることを実証する。tracrRNAの内部ドメインの修飾は、恐らく折り畳まれたRNAの変化した構造及び／または2'-OMe修飾による重要なRNA残基の2'-

50

OHとのタンパク質接点の遮断に起因して、低減された活性を示した。例えば、化合物配列番号100は、39/67残基を2'OMe RNAで修飾させ(58%)、非修飾配列と比較して完全な活性を保持する。配列番号134は、46/67残基を2'OMe RNAで修飾させ(69%)、非修飾配列と比較してほぼ完全な活性を保持する(図6)。配列番号134は、tracrRNAの切断された67mer変異型である。配列番号134をモデルとして使用し、2'OMe RNAによる5'ドメイン内の11個の連続残基の修飾は、活性の喪失なく寛容された。2'OMe RNAによる3'ドメイン内の35個の連続残基の修飾は、活性の喪失なく寛容された。3'ドメインに存在する2つのヘアピン構造は、これらの特徴のいずれかの欠失が活性の喪失をもたらすため、機能に必須であるが(実施例2、図3)、これらのドメインの両方が、機能を低下させることなく2'OMe RNAにより完全に修飾され得ることは記録に値する。配列番号134及び100の両方が、5'末端及び3'末端にホスホロチオエート(PS)修飾されたヌクレオチド間結合も有し、これがエキソヌクレアーゼ攻撃に対して追加の保護を提供することに留意されたい。

10

【0099】

修飾された場合に活性の大幅な低減または完全な喪失につながる特定の残基が特定された。67塩基tracrRNA(例えば、配列番号134)を基準として使用し、残基U12、A15、G26、U27、G30、U31、及びU32における天然RNAの2'OMe RNAの配列置換の5'末端から開始することは、活性の実質的な喪失につながった(図6)。修飾された場合に、小さいが著しい活性の低減につながる特定の残基も特定された。67塩基tracrRNA(例えば、配列番号134)を基準として使用し、残基U13、U18、C23、U24、及びC28における天然RNAの2'OMe RNAの配列置換の5'末端から開始することは、活性の低減につながった(図6)。この試験は、2'OMe RNAを使用して行った。これらの位置における2'F、LNA、DNA等の他の修飾の使用は、より良好に寛容され得る。配列番号134における非修飾RNAの中央21残基ドメインを、2'-F RNAで完全に(配列番号141)または部分的に(配列番号142及び143)修飾した。これらの変異型は機能的でなかった。配列番号134における非修飾RNAの中央21残基ドメインを、DNAで完全に(配列番号138)または部分的に(配列番号139及び140)修飾した。これらの変異型は機能的でなかった。このドメイン内の単離された残基の修飾は機能し得るが、このドメイン内の修飾の大きな連続ブロックが、tracrRNAの活性を低減する。

20

30

【0100】

tracrRNAの中央ドメイン内で2'OMe RNAを使用して、どの個々の残基が修飾され得るかを更に調査するために、単一塩基修飾2'OMe RNA「ウォーク」を行った(配列番号144~162)。このシリーズ内で、残基A14、A19、A20、G21、G22、A25、及びC29としての修飾は、活性の喪失を示さず、修飾の候補である。

【0101】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、多くの場合、完全なPS修飾を使用して作製され、全てのヌクレオチド結合がホスホロチオエート修飾される。タンパク質エフェクター分子RNase H1(ASO指向型mRNA分解を媒介する)が、機能的基質/酵素複合体を形成する場合に、ASO内のPS修飾を寛容するため、この広範なレベルの修飾が可能である。一方で、siRNAは、完全PS修飾を寛容せず、広範なPS修飾は、エフェクタータンパク質AGO2(siRNA指向型mRNA分解を媒介する)との生産的相互作用を妨げる。内部RNAループ内のtracrRNAの広範囲のPS修飾は、Cas9との機能的相互作用を妨げる(配列番号133、29PS修飾)。限定されたPS末端修飾は、活性の喪失なく行われ得る(配列番号98及び101、各末端の2~3PP結合)。広範囲でないPS修飾は、中央ドメイン内で寛容され得る。特に、RNase切断マッピング(一連の血清または細胞抽出希釈におけるtracrRNAのインキュベーションを使用して、RNase攻撃に最も感受性のある部位を見出す)を使用して、1つのみま

40

50

たはいくつかの結合の P S 修飾が機能を妨げることなく R N A を安定させ得る重要な部位を特定することができる。

【0102】

P S 修飾が化学毒性に寄与する適用が存在する。この場合、エキソヌクレアーゼ攻撃を遮断する他の方法の使用が望ましい。選択肢には、反転 d T 等の末端修飾因子、または d スペーサー、C 3 スペーサー（プロパンジオール）、Z E N（ナフチルアゾ修飾因子）等の塩基脱落基が含まれる。かかる末端修飾基の配置は、末端 P S ヌクレオチド間結合の必要性を排除し得る。

【0103】

実施例 7

実施例 1 は、インビトロ生化学標的 D N A 切断アッセイにおいて、C a s 9 で機能化された化学修飾パターンについて説明した。この実施例は、哺乳類細胞内で S p y C a s 9 ヌクレアーゼによるゲノム編集を指向する、化学修飾された c r R N A の機能を実証する。最適な修飾パターンは、インビトロ用途とインビボ用途との間で異なる。

【0104】

リボース修飾 2 ' O M e R N A、2 ' F、及び L N A；末端修飾基プロパンジオールスペーサー及びナフチルアゾ修飾因子（N，N－ジエチル－4－（4－ニトロナフタレン－1－イルアゾ）－フェニルアミン、または「Z E N」）、及び反転 d T 残基；ならびにホスホロチオエート修飾を持つ選択ヌクレオチド間結合を含む、様々な化学修飾を有する一連の c r R N A（表 7）を合成した。ナフチルアゾ修飾された構造、及びエキソヌクレアーゼ攻撃を遮断するための末端基として使用するためのナフチルアゾ修飾因子及びプロパンジオール修飾因子の使用については、L e n n o x e t a l.，M o l e c u l a r T h e r a p y N u c l e i c A c i d s 2：e117 2013 を参照されたい。c r R N A は、5 ' 末端で H P R T 1 を標的とする 19 塩基プロトスペーサードメイン（配列番号 1、9、10、14～16、22～24、163～173）または 3 ' 末端に 16 塩基 t r a c r R N A 結合ドメインを持つ同じ部位を標的とする 20 塩基プロトスペーサードメイン（配列番号 48、174～237）のいずれかを有していた。表 7 に列挙される c r R N A を、非修飾切断（67 塩基）t r a c r R N A 配列番号 2（表 1）または化学修飾された切断（67 塩基）t r a c r R N A 配列番号 100（表 6）と複合した。2 つの t r a c r R N A の使用は、修飾された t r a c r R N A と対合された場合、化学修飾された c r R N A の機能が異なるかどうかの決定を可能にする。対合された c r R N A：t r a c r R N A R N A オリゴヌクレオチドを、H E K－C a s 9 細胞に形質移入し、前述の通り処理した。断片アナライザーを使用して行われる産物の定量的測定と共に、T 7 E I ミスマッチエンドヌクレアーゼ切断アッセイを使用して、H P R T 1 遺伝子内の切断率を比較することにより、相対遺伝子編集活性を評価した。

【0105】

10

20

30

【表 7】

表 7 : 哺乳類細胞における crRNA オリゴヌクレオチド修飾パターンの最適化

配列番号	crRNA 配列 (5' ~ 3')	切断% tracrRNA 配列番号 2	切断% tracrRNA 配列番号 100
1	uuauauccaaacacuuucgugg uuuuagagcuaugcu	63	61
9	<u>uuauauccaaacacuuucgugg</u> <u>uuuuagagcuaugcu</u>	1	0
10	<u>uuauauccaaacacuuucgugg</u> <u>uuuuagagcuaugcu</u>	0	1
22	<u>uuauauccaaacacuuucgugg</u> <u>uuuuagagcuaugcu</u>	1	1
23	uuauauccaaacacuuucgugg uuuuagagcuaugcu	5	ND
24	uuauauccaaacacuuucgugg uuuuagagcuaugcu	3	5
14	uuauauccaaacacuuucgugg uuuuagagcuaugcu	63	26
15	<u>uuauauccaaacacuuucgugg</u> uuuuagagcuaugcu	5	3
16	uuauauccaaacacuuucgugg <u>uuuuagagcuaugcu</u>	5	5
163	C3-uuauauccaaacacuuucg ugguuuuagagcuaugcu-C 3	65	49
164	u*u*a*uaucsaacacuuucg ugguuuuagagcuaugcu*u*g*c* u	65	65
165	<u>uuauauccaaacacuuucgugg</u> <u>uuuuagagcuaugcu</u>	0	3
166	uuauauccaaacacuuucgugg uuuuagagcuaugcu	54	42
167	uuauauccaaacacuuucgugg <u>uuuuagagcuaugcu</u>	49	58
168	uuauauccaaacacuuucgugg <u>uuuuagagcuaugcu</u>	64	60
169	uuauauccaaacacuuucgugg <u>uuuuagagcuaugcu</u>	16	16
170	uuauauccaaacacuuucgugg uuuuagagcuaugcu	3	3
171	<u>uuauauccaaacacuuucgugg</u> uuuuagagcuaugcu	42	62

10

20

30

40

配列番号	crRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA 配列番号2	切断% tracrRNA 配列番号100
172	<u>uuauau</u> ccaaacac <u>uucgug</u> uuuuagagcuaugcu	4	13
173	<u>uuauau</u> ccaaacac <u>uucgug</u> uuuuagagcuaugcu	1	1
48	c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uucgug</u> guuuuagagcuaugcu	61	60
174	<u>cuuauau</u> ccaaacac <u>uucgug</u> guuuuagagcuaugcu	60	59
175	c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uucgug</u> guuuuagagcuaug <u>cu</u>	62	60
176	<u>cuuauau</u> ccaaacac <u>uucgug</u> guuuuagagcuaug <u>cu</u>	61	59
177	c <u>*u*u*</u> auauccaaacac <u>uuc</u> gugguuuuagagcua <u>*g*c*</u> <u>u</u>	60	59
178	<u>c*u*u*</u> auauccaaacac <u>uuc</u> gugguuuuagagcua <u>*g*c*</u> <u>u</u>	61	59
179	C3-c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uuc</u> gugguuuuagagcuaugcu	61	58
180	c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uucgug</u> guuuuagagcuaugcu-C3	57	59
181	C3-c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uuc</u> gugguuuuagagcuaugc u-C3	62	59
182	ZEN-c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uuc</u> cgugguuuuagagcuaugcu	64	62
183	c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uucgug</u> guuuuagagcuaugcu-ZEN	62	60
184	ZEN-c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uuc</u> cgugguuuuagagcuaugc u-ZEN	64	64
185	ZEN-c <u>uuauau</u> ccaaacac <u>uuc</u> cgugguuuuagagcuaug <u>c</u> u-ZEN	60	63
186	<u>u*u*a*</u> auauccaaacac <u>uucg</u> ugguuuuagagcua <u>*g*c*</u> <u>u</u>	64	62
187	<u>c*u*u*</u> auauccaaacac <u>uuc</u> gugguuuuagagcua <u>*g*c*</u> <u>u</u>	65	65

10

20

30

40

配列番号	crRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA 配列番号2	切断% tracrRNA 配列番号100
188	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
189	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	63	64
190	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	64	62
191	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	64	63
192	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	64	64
193	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	64	65
194	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	60	63
195	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	63	62
196	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	62	63
197	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	61	64
198	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	61	64
199	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	63	68
200	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	59	67
201	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	63	67

10

20

30

40

配列番号	c rRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA 配列番号2	切断% tracrRNA 配列番号100
202	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	60	69
203	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	53	67
204	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	54	67
205	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	59	62
206	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	58	61
207	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	50	60
208	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	7
209	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
210	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
211	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
212	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	56	68
213	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	41	64
214	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	53	67
215	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	2

10

20

30

40

配列番号	c rRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA 配列番号2	切断% tracrRNA 配列番号100
216	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
217	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
218	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
219	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
220	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0
221	+ c * + t * u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g * + c * + t	58	61
222	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	31	54
223	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	6	60
224	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	27	57
225	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	2
226	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	2	25
227	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	3	31
228	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	4	35
229	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	0	0

10

20

30

40

配列番号	crRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA 配列番号2	切断% tracrRNA 配列番号100
230	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	0	0
231	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	0	1
232	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	0	0
233	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	33	67
234	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	24	66
235	C3- <u>c u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u g c</u> <u>u-C3</u>	56	65
236	C3- <u>c u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u g c</u> <u>u-C3</u>	11	55
237	C3- <u>c u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u g c</u> <u>u-InvT</u>	62	65
238	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	17	67
239	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	39	66
240	C3- <u>c u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u g c u</u> <u>-C3</u>	27	63
241	C3- <u>c u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u g c u</u> <u>-C3</u>	14	46
242	ZEN- <u>c u u a u a u c c a a c a c u u</u> <u>c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u</u> <u>-ZEN</u>	41	67
243	ZEN- <u>c u u a u a u c c a a c a c u u</u> <u>c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u</u> <u>-ZEN</u>	23	24

10

20

30

40

配列番号	c rRNA配列 (5' ~3')	切断% t r a c r R NA 配列番号2	切断% t r a c r R N A 配列番号100
244	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	ND	60
245	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	ND	65
246	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	ND	64
247	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	ND	64
248	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	ND	63
249	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	ND	53
250	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> G U G G U U U U a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	0	2
251	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> G U G g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	0	0
252	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g G U U U U a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	0	18
253	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	0	3
254	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	5	0
255	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * <u>u</u>	0	0
256	C3- <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u g c <u>u</u> -C3	27	53
257	C3- <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> g u g g u u u u a g a g c u a u g c <u>u</u> -C3	10	50

10

20

30

40

配列番号	crRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA 配列番号2	切断% tracrRNA 配列番号100
258	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	29	47
259	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a * u * g * c</u> <u>c</u>	7	45
260	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u * a * u * g</u>	0	4
261	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c * u * a * u</u>	0	0
262	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g * c * u * a</u>	0	0
263	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a * g * c * u</u>	0	0
264	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c</u> <u>* u</u>	50	62
265	<u>c*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g * u * u * u * u a g a g c u a u</u> <u>* g * c * u</u>	45	59
266	<u>c*u*u*a u a u c c a * a * c * a *</u> <u>c * u * u * c * g * u * g * g u u u a</u> <u>g a g c u a u * g * c * u</u>	26	36
267	<u>c*u*u*a u a u c c a * a * c * a *</u> <u>c * u * u * c * g * u * g * g * u * u *</u> <u>u * u a g a g c u a u * g * c * u</u>	20	34
268	<u>C3-c u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u g c</u> <u>u-C3</u>	27	59
269	<u>C3-c u u a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g * u * u * u * u a g a g c u a u</u> <u>g c u-C3</u>	45	60
270	<u>C3-c u u a u a u c c a * a * c * a *</u> <u>c * u * u * c * g * u * g * g u u u a</u> <u>g a g c u a u g c u-C3</u>	16	43
271	<u>C3-c u u a u a u c c a * a * c * a *</u> <u>c * u * u * c * g * u * g * g * u * u *</u> <u>u * u a g a g c u a u g c u-C3</u>	22	45
272	<u>c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g</u> <u>g u u u u a g a g c u a u g c u</u>	63	57
273	<u>c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g</u> <u>g u u u u a g a g c u a u g c u</u>	59	60

10

20

30

40

配列番号	c rRNA配列 (5' ~ 3')	切断% t r a c r R NA 配列番号2	切断% t r a c r R N A 配列番号100
274	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	63	63
275	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	64	62
276	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	0	1
277	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	5	16
278	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	64	61
279	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	64	63
280	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	30	49
281	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	56	60
282	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	53	61
283	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	0	3
284	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	0	2
285	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	2	8
286	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	48	61
287	a * u * a * u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * u	0	0
288	u * a * u * c c a a c a c u u c g u g u u u u a g a g c u a u * g * c * u	0	0
289	+ A * + T * a * u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * u	2	14
290	+ T * + A * u * c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u * g * c * u	0	0

オリゴヌクレオチド配列の5' ~ 3'を示す。大文字=DNA、小文字=RNA；下線=2'-O-メチルRNA；斜体=2'-フルオロRNA；+a、+c、+t、+g=LNA；C3=C3スペーサー（プロパンジオール修飾因子）；*=ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；ZEN-ナフチル-アゾ修飾因子；InvT=反転dT。各種の相対機能的活性は、示されたcrRNAが示されたtracrRNAと対合される場合、T7EIヘテロ二重鎖アッセイにおける切断%によって示される。ND=決定されない。

【0106】

一部の種類の化学修飾は、通常、非修飾オリゴヌクレオチドを分解するエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼの存在に起因して、合成核酸が細胞内環境で良好に機能するために必須である。オリゴヌクレオチドへのヌクレアーゼ耐性を付与する、広範囲の修飾が説明されてきた。所与の適用に功を奏する修飾の正確な組み合わせ及び用いる順序は、配列構成、及び生物学的機能に必要なタンパク質相互作用の性質により異なり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチド（RNase H1と相互作用する）及びsiRNA（DI

10

20

30

40

50

CER、AGO2、及び他のタンパク質と相互作用する）の化学修飾に関する広範囲の先行研究が行われてきた。化学修飾は、CRISPR crRNA:tracrRNA複合体の機能を改善することが予想される。しかしながら、修飾の種類及び／または修飾のパターンが、RNAの、Cas9との機能的関連付けと適応するかを予測することは不可能である。本発明は、哺乳類細胞においてCas9媒介型遺伝子編集を指向する高レベルの機能を保持する、crRNAの最小、中度、及び広範囲の化学修飾パターンを定義する。実施例7における調査は、ヒトHPRT1遺伝子内の単一部位を標的として行った。良好に機能するcrRNAの20塩基5'末端プロトスペーサーガイドドメインの修飾パターンが、配列構成により異なり得ることに留意されたい。しかしながら、本明細書で定義される、良好に機能する3'末端tracrRNA結合ドメインの修飾パターンは、異なる部位が標的とされる場合に隣接したプロトスペーサードメインの配列が変化すると影響を受けるため、ここで示される3'ドメイン修飾は、「ユニバーサル」となる可能性がある。

10

【0107】

表7の結果は、広範囲の修飾が、crRNAの5'及び3'末端全体で寛容されることを実証する。crRNAの内部ドメイン内のある特定の選択位置の修飾は、恐らく折り畳まれたRNAの変化した構造及び／または2'OMe修飾による重要なRNA残基の2'-OHとのタンパク質接点の遮断に起因して、低減された活性または活性の全体遮断につながる。例えば、化合物配列番号204は、21/36残基を2'OMe RNAで修飾させ（58%）、非修飾配列と比較して完全な活性を保持する。化合物配列番号239は、2'OMe RNAで修飾された30/36残基を有し（83%）、非修飾配列と比較して完全な活性を保持する。これらの化合物の両方は、5'末端及び3'末端に3つのホスホロチオエート（PS）修飾されたヌクレオチド間結合も有し、これがエキソヌクレアーゼ攻撃に対して追加の保護を提供する。対照的に、配列番号165は、4/36残基（11%）のみを2'OMe RNAで修飾させるが、活性の全喪失を有する。

20

【0108】

配列の大きなブロックは、crRNAの5'末端及び3'末端において2'OMe修飾に寛容であったが、分子の中央部分におけるある特定の残基の修飾は、不活化につながった。crRNAの中央ドメイン内で2'OMe RNAを使用して、どの個々の残基が修飾され得るかを更に調査するために、単一塩基修飾2'OMe RNA「ウォーク」を行った（配列番号272～286）。活性の大幅な低減または完全な喪失につながる特定の残基（crRNA内の位置）が特定された。36塩基crRNA配列番号239をモデルとして使用し、配列の5'末端から番号を付けて、残基U15及びU16の天然RNAの2'OMe RNAの置換は、活性の実質的な喪失につながり、残基U19は、中度の活性の喪失につながった（図7）。これら3つの部位は、標的特異的プロトスペーサーガイドドメイン内にあるため、配列は標的により異なる（残基15、16、及び19、図7）。ある特定の配列構成において、これらの部位は、修飾に寛容となることが可能である。ユニバーサルtracrRNA結合ドメイン（残基21～36）内で、残基U22、U23、及びU24の天然RNAに対する2'OMe RNAの置換は、実質的な活性の喪失につながった。このドメインが配列構成により変化しないとすると、これらの部位は、標的配列が変化するにつれて修飾寛容が異ならない可能性がある。20塩基標的特異的プロトスペーサーガイドドメイン内の修飾の配列特異的効果は、実施例10において更に詳細に試験される。

30

40

【0109】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、多くの場合、完全なPS修飾を用いて作製され、全てのヌクレオチド結合がホスホロチオエート修飾される。タンパク質エフェクター分子RNase H1が、機能的基質／酵素複合体を形成する場合に、ASO内のPS修飾を寛容するため、この広範囲のレベルの修飾が可能である。一方で、siRNAは、完全PS修飾を寛容せず、広範囲のPS修飾は、エフェクタータンパク質AGO2との生産的相互作用を妨げる。crRNAの限定されたPS末端修飾は、活性の喪失なく行われ得る（

50

配列番号 177、178、239等は、各末端で 3PS 結合を有する)。末端修飾は、これがエキソヌクレアーゼ攻撃からの追加の保護を加えるため望ましい。選択内部部位の PS 修飾が寛容されてもよく、エンドヌクレアーゼ攻撃からの追加の保護を提供し得る。配列番号 264 を塩基修飾パターンとして使用し、内部結合を、tracrRNA 結合ドメイン (配列番号 265) 内、プロトスペーサーガイドドメインの 3' 末端内 (種領域) (配列番号 266)、または両方の領域 (配列番号 267) で PS 修飾した。増加レベルの PS 修飾は、低減された機能的活性につながり、配列番号 267 は、修飾の少ない配列番号 264 変異型の活性の約 50% を有する。配列番号 267 は、修飾された 35 個のヌクレオチド間結合のうちの 21 個を有し、ヌクレアーゼ曝露に対して安定となる。高ヌクレアーゼ環境への曝露が必要とされる場合 (研究または治療適用のための直接 IV 投与等)、この高度に修飾された変異型は、実際に修飾の少ない変異型よりも高い活性を示し、より速やかに分解される。

10

【0110】

PS 修飾が化学毒性に寄与する実験的設定が存在する。この場合、エキソヌクレアーゼ攻撃を遮断する他の方法の使用が望ましい。crRNA は、エキソヌクレアーゼ攻撃を遮断するように 5' 末端及び 3' 末端のいずれかまたは両方に配置された C3 スペーサー (プロパンジオール修飾因子) または ZEN (ナフチルアゾ修飾因子) を有し、PS 修飾の必要性を省く。この戦略は、PS 末端ブロック修飾を排除するために用いられ得る (配列番号 179~186 を参照されたい)。この戦略を使用して、より高度に修飾された crRNA 変異型の PS 含有量を低減することができる。配列番号 271 は、配列番号 267 と同じパターンで PS 修飾された内部プロトスペーサードメイン及び tracrRNA 結合ドメインを有するが、(21 個ではなく) 15 個の PS ヌクレオチド間結合のみを用い、改善された活性を示す。したがって、内部 PS 修飾を持つ非塩基末端ブロックの組み合わせを使用して、高い活性を維持しながらヌクレアーゼを増加させることができる。

20

【0111】

実施例 8

以下の実施例は、本発明の修飾された CRISPR crRNA 及び tracrRNA の改善された能力を実証する。実施例 2~7 は、crRNA:tracrRNA 複合体の、30nM 濃度でのヒト HEK-Cas9 細胞への形質移入を用いた。実験的試験は、この用量が、用量応答曲線の上肩部を表し、それにより、高用量の RNA を使用することが、遺伝子編集効率を改善しなかったが、低用量の使用が低い遺伝子編集効率をもたらしたことを以前に示していた。それらの測定は、非修飾 RNA を使用して行った。本実施例は、非修飾 RNA と比較して、本発明の新たな最適化された化学修飾 RNA の用量応答を再審査し、化学修飾 (すなわち、ヌクレアーゼ安定化) が、低用量で使用され得る、より強力な化合物をもたらすことを実証する。

30

【0112】

実施例 5 は、本発明の切断されたガイド RNA が、ヒト HPRT1 遺伝子内の 12 部位において WT RNA よりも優れて機能したことを実証した。これらの部位のうちの 4 つ (38087、38231、38133、及び 38285) を、本実施例において、非修飾と修飾 RNA との比較のために選択した。非修飾 crRNA を、非修飾 tracrRNA (配列番号 2) と 1:1 モル比で対合させた。非修飾 crRNA を、修飾された tracrRNA (配列番号 100) と 1:1 モル比で対合させた。修飾された crRNA を、修飾された tracrRNA (配列番号 100) と 1:1 モル比で対合させた。配列を表 8 に示す。RNA を、前述のとおり、30nM、10nM、及び 3nM 濃度で HEK-Cas9 細胞に形質移入した。細胞を 37℃ で 48 時間インキュベートし、次いで、DNA に関して処理し、T7EI ミスマッチエンドヌクレアーゼ活性における HPRT1 遺伝子座での切断率を比較することにより、遺伝子編集活性の証拠について試験し、産物の定量的測定は、前述の通り、断片アナライザーを使用して行った。結果を表 8 に示す。

40

【0113】

【表 8】

表 8：修飾対非修飾 crRNA：tracrRNA 複合体が Cas 9 媒介型遺伝子編集を哺乳類細胞内で指向する能力の増加。

cr/tracrRNA 対	配列番号	crRNA 配列	30nM 切断 %	10nM 切断 %	3nM 切断 %
		tracrRNA 配列			
38087 Un-cr Un-tr	56	aa uua ugg gga uua cuagg ag uuu uag agc uaugcu	80	76	35
	2	ag cau agc aag uua aaaa ua agg cuag ucc guu auca ac uug aaaa ag ugg cac ccg ag uc ggu gcu uu			
38087 Un-cr Mod-tr	56	aa uua ugg gga uua cuagg ag uuu uag agc uaugcu	83	76	50
	100	<u>a*~~g~~*cauagc</u> aag uua aaaa ua aggcua gucc guu auca <u>acuug aaaa ag ugg cac ccg</u> <u>agucggugcu*u*u</u>			
38087 Mod-cr Mod-tr	445	<u>a*a*u</u> *ua ugg gga uua cu agg aguuu uag agc ua u* <u>g</u> <u>*c*u</u>	77	77	54
	100	<u>a*~~g~~*cauagc</u> aag uua aaaa ua aggcua gucc guu auca <u>acuug aaaa ag ugg cac ccg</u> <u>agucggugcu*u*u</u>			
38231 Un-cr Un-tr	69	uuu ugu aaaa uua ac agcuug cguuuu uag agc uaugcu	31	4	0
	2	ag cau agc aag uua aaaa ua agg cuag ucc guu auca ac uug aaaa ag ugg cac ccg ag uc ggu gcu uu			
38231 Un-cr Mod-tr	69	uuu ugu aaaa uua ac agcuug cguuuu uag agc uaugcu	45	14	1
	100	<u>a*~~g~~*cauagc</u> aag uua aaaa ua aggcua gucc guu auca <u>acuug aaaa ag ugg cac ccg</u> <u>agucggugcu*u*u</u>			
38231 Mod-cr Mod-tr	446	<u>u*u*u</u> *u*ug uaa uua ac agc uug cguuuu uag agc ua u* <u>g</u> <u>*c*u</u>	48	25	4
	100	<u>a*~~g~~*cauagc</u> aag uua aaaa ua aggcua gucc guu auca <u>acuug aaaa ag ugg cac ccg</u> <u>agucggugcu*u*u</u>			
38133	78	gg uca cuuuu uaa cac accc ag uuuu uag agc uaugcu	73	61	27

10

20

30

40

c r / t r a c r RNA対	配列番 号	c r RNA配列	30nM 切断 %	10nM 切断 %	3nM 切断 %
		t r a c r RNA配列			
Un-c r Un-t r	2	agcauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucac uugaaaaaaguggcacccgag ucggugcuuu			
3813 3 Un-c r Mod- tr	78	ggucacuuuuuaacacaccc aguuuuuagagcuaugcu			
	100	<u>a*g*c<u>cauagca</u>aguuaaaa</u> <u>uaaggcuaguccguuauc</u> <u>a<u>cuugaaaaa</u>aguggcacccg</u> <u>aguccggugcu*u*u</u>	74	61	37
3813 3 Mod- cr Mod- tr	447	<u>g*g*u*cacuuuuuaacaca</u> <u>cccaguuuuagagcua<u>u</u>*g</u> <u>*c*u</u>			
	100	<u>a*g*c<u>cauagca</u>aguuaaaa</u> <u>uaaggcuaguccguuauc</u> <u>a<u>cuugaaaaa</u>aguggcacccg</u> <u>aguccggugcu*u*u</u>	75	66	55
3828 5 Un-c r Un-t r	48	cuuauauccaacacuuucgu gguuuuuagagcuaugcu			
	2	agcauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucac uugaaaaaaguggcacccgag ucggugcuuu	66	16	2
3828 5 Un-c r Mod- tr	48	cuuauauccaacacuuucgu gguuuuuagagcuaugcu			
	100	<u>a*g*c<u>cauagca</u>aguuaaaa</u> <u>uaaggcuaguccguuauc</u> <u>a<u>cuugaaaaa</u>aguggcacccg</u> <u>aguccggugcu*u*u</u>	67	16	5
3828 5 Mod- cr Mod- tr	178	<u>c*u*u*auauccaacacuu</u> <u>cguugguuuuagagcua<u>u</u>*g</u> <u>*c*u</u>			
	100	<u>a*g*c<u>cauagca</u>aguuaaaa</u> <u>uaaggcuaguccguuauc</u> <u>a<u>cuugaaaaa</u>aguggcacccg</u> <u>aguccggugcu*u*u</u>	62	60	26

10

20

30

オリゴヌクレオチド配列の5'～3'を示す。小文字＝RNA、下線＝2'-O-メチルRNA、*＝ホスホロチオエートヌクレオチド間結合。非修飾c r RNA＝Un-c r。非修飾t r a c r RNA＝Un-t r。修飾されたc r RNA＝Mod-c r。修飾されたt r a c r RNA＝Mod-tr。各種の相対機能的活性は、試験された各用量に関して、T7EIヘテロ二重鎖アッセイにおいて切断%により示される。

【0114】

40

一般に、c r RNA及びt r a c r RNAの修飾は、RNAが過剰に存在する場合、RNAが高用量で形質移入されると遺伝子編集効率にわずかな影響を及ぼした。より低い用量で、修飾された試薬は、改善された能力を示し、場合によっては顕著に能力を改善した。改善の程度は、部位により異なっていた。非常に有能な部位38087は、試験された全てのc r RNA/t r a c r RNA変異型により30nM及び10nM用量で非常に効率的な遺伝子編集を示し、3nMの修飾されたt r a c r RNAの使用（c r RNAのいずれかと共に）、改善された活性を示した。38231等の低能力部位は、修飾されたRNAを使用して試験された最高用量（30nM）においても改善された遺伝子編集効率を示した。t r a c r RNA単独の修飾は、単独で利得を示したが、c r RNA及びt r a c r RNAの両方が修飾された場合に最も優れた利得が認識された。図8は、HPRT1

50

部位 38285 に特異的な修飾 *t r a c r R N A* (配列番号 100) と対合された 1 つの有効な修飾 *c r R N A* (配列番号 178) の概略を示す。図 9 もまた、H P R T 1 部位 38285 に特異的な修飾 *t r a c r R N A* (配列番号 134) と対合された高度に機能的な *c r R N A* (配列番号 239) である、より高度に修飾された対の概略を示す。

【0115】

本実施例は、*c r R N A* : *t r a c r R N A* 複合体の、H E K - C a s 9 細胞への形質移入を用い、C a s 9 タンパク質が構成的に発現される。したがって、形質移入された R N A は、C a s 9 タンパク質に即時結合することができ、ヌクレアーゼによる細胞質中の分解の危険性を最小限に抑える。*c r R N A* 及び／または *t r a c r R N A* の化学修飾の利得は、C a s 9 タンパク質が作製されている間、形質移入された R N A が細胞ヌクレアーゼへの曝露から生き残らなければならない場合により優れていることが期待される。C a s 9 m R N A または C a s 9 発現ベクターが標的 R N A と共形質移入されるプロトコルを使用する場合に起こり、それにより C a s 9 は、既に細胞内で発現しないようにすることが期待される。R N A は、血清 (I V 投与後) 及び細胞性細胞質ヌクレアーゼに存在する両方のヌクレアーゼに曝露され得る場合、高度に修飾された R N A を使用する利得は、インビボ適用 (医学的治療等) に関して最大となるであろう。

【0116】

実施例 9

実施例 2 ~ 8 は、C a s 9 を構成的に発現する哺乳類細胞内で C a s 9 媒介ゲノム編集を誘起する、切断及び／または化学修飾された C R I S P R *c r R N A* 及び／または *t r a c r R N A* の活性を実証する。本実施例は、本発明の切断された修飾 R N A 組成物は、C a s 9 タンパク質に結合することができ、この複合体は、ヒト細胞に形質移入され得ること、更にリボヌクレオタンパク質 (R N A) 複合体の形質移入が、非常に効率的なゲノム編集を誘起するのに十分であることを実証する。

【0117】

ヒト H P R T 1 部位 38285 に特異的な試薬を、本実施例に用いられた。非修飾 *c r R N A* を、非修飾 *t r a c r R N A* と 1 : 1 モル比で対合させた。修飾 *c r R N A* を、修飾 *t r a c r R N A* と 1 : 1 モル比で対合させた。修飾 *c r R N A* を、修飾 *t r a c r R N A* と 1 : 1 モル比で対合させた。配列を表 9 に示す。増加量の R N A i M A X 脂質形質移入試薬を使用して (1 . 2 μ L、H E K - C a s 9 細胞内の 30 n M R N A 単独形質移入の場合、96 ウェルフォーマットで 100 μ L 形質移入あたりに使用される 0 . 75 μ L 量にわたって増加した)、C a s 9 タンパク質 (C a r i b o u B i o s c i e n c e s) の *c r R N A* : *t r a c r R N A* との 1 : 1 複合体を 10 n M 濃度で用いたことを除いて上記の通り、R N A を非修飾 H E K 293 細胞に形質移入した。細胞を 37 °C で 48 時間インキュベートし、次いで、DNA に関して処理し、T 7 E I ミスマッチエンドヌクレアーゼ活性における H P R T 1 遺伝子座での切断率を比較することにより、遺伝子編集活性の証拠について試験し、産物の定量的測定は、前述の通り、断片アナライザーを使用して行った。結果を表 9 に示す。

【0118】

【表 9】

表 9：修飾対非修飾 crRNA：tracrRNA 複合体が Cas 9 媒介型遺伝子編集を哺乳類細胞内で指向する能力の増加。

cr/t racr RNA対	配列番 号	crRNA配列	10nM 切断 %
		tracrRNA配列	
3828 5 Un-c r Un-t r	48	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	42
	2	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u	
3828 5 Un-c r Mod- tr	48	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u	41
	100	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c</u> <u>u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u</u> <u>g g c a c c g a g u c g g u g c u * u * u</u>	
3828 5 Mod- cr Mod- tr	178	<u>c * u * u * a u a u c c a a c a c u u c g u g g u</u> <u>u u u a g a g c u a u * g * c * u</u>	54
	100	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c</u> <u>u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u</u> <u>g g c a c c g a g u c g g u g c u * u * u</u>	

10

20

オリゴヌクレオチド配列の 5'～3'を示す。小文字＝RNA、下線＝2'-O-メチルRNA、*＝ホスホロチオエートヌクレオチド間結合。非修飾 crRNA＝Un-c r。非修飾 tracrRNA＝Un-t r。修飾された crRNA＝Mod-c r。修飾された tracrRNA＝Mod-t r。各複合体の相対機能的活性は、試験された各用量に関して、T7E1ヘテロ二重鎖アッセイにおいて切断%により示される。

【0119】

3つのCRISPR RNA 複合体の全ては、哺乳類ゲノム編集のためのRNP形質移入プロトコルにおいて良好に機能した。非修飾 crRNA＋非修飾 tracrRNA 対（配列番号 48 及び 2）ならびに非修飾 crRNA＋修飾 tracrRNA 対（配列番号 48 及び 100）は、HEK-Cas 9 プロトコルよりも RNP プロトコルにおいて、10 nM 用量で 2.5 倍良好に機能し、細胞質または核内の Cas 9 タンパク質との形質移入と結果として起こる複合との間で悪化を起こす修飾 RNA が少ないことと一致する。故に、非修飾 RNA には高用量が必要とされ、一部の設定において、非修飾 RNA がいかなるゲノム編集活性も指向できない可能性がある。一方、修飾 crRNA＋修飾 tracrRNA（配列番号 178 及び 100）は、両方のプロトコルにおいて高い効率で機能した。

30

【0120】

本発明の修飾された切断 CRISPR RNA は、直接 Cas 9 RNP 形質移入方法により良好に機能する。

40

【0121】

実施例 10

実施例 6 及び 7 において行われた化学修飾最適化試験は、様々な修飾パターンを有する tracrRNA と対合された様々な修飾パターンを有する crRNA の活性を試験した。tracrRNA は、ユニバーサルであり、同じ配列を全ての標的部位で用いる。tracrRNA の様々な修飾パターンの性能は、異なる標的部位間で同様であることが予想される。しかしながら、crRNA は、異なる標的部位間で配列が異なる。実施例 7 及び 8 で試験された最適化バージョンにおいて、crRNA の 5'-20 塩基は、標的的特異的であり（すなわち、「プロトスペーサードメイン」）、3'-16 塩基はユニバーサルで

50

ある（すなわち、「t r a c r R N A 結合ドメイン」）。t r a c r R N A のように、c r R N A のユニバーサル 16 塩基 3' ドメイン内の様々な修飾パターンの性能は、全ての標的部位において同様であると予想される。しかしながら、異なる修飾パターンの性能は、5' - 20 塩基標的特異的ドメイン内に存在する配列構成によって影響され得る可能性がある。

【0122】

低分子干渉RNA（s i R N A）に有効な修飾パターンは、配列環境によって影響されることは十分に確立されている（Behlke, Oligonucleotides 18:305-320, 2008）。s i R N A の場合、ある特定の「限定修飾」パターンは、全ての部位に適用され得るが、「重い修飾」の場合、どのパターンが所与の配列に対して機能的であり、経験的試験が必須であるかを予測することは不可能である。本実施例は、配列構成が c r R N A に及ぼす効果を試験し、5' - 20 塩基標的特異的ドメイン内の異なる修飾パターンを異なる部位で試験する。

10

【0123】

実施例6及び7における修飾試験は、ヒトHPRT1遺伝子において単一c r R N A P A Mを用いた。本試験は、異なる修飾パターンの機能的性能を比較して、以前に調べた部位を含む、ヒトHPRT1遺伝子内の12部位を調べ、全ての部位において良好な結果で用いられ得る単一修飾パターンを確立する。これら12部位に関する他の試験については、実施例5を参照されたい。

【0124】

20

3'末端に16merユニバーサルt r a c r R N A結合配列を持つヒトHPRT1遺伝子内の12部位に特異的な20塩基のプロトスペーサードメイン長を有する、一連のc r R N A（表10）を合成した。c r R N Aは、リボース修飾2'OMe RNA、末端修飾基プロパンジオールスペーサー及びナフチルアゾ修飾因子（N, N-ジエチル-4-（4-ニトロナフタレン-1-イルアゾ）-フェニルアミン、または「ZEN」）、反転d T残基；及びホスホロチオエート修飾を持つ選択ヌクレオチド間結合を含む、様々な化学修飾を使用して作製した。用いられた異なる修飾の概略表示を図10に示す。

【0125】

c r R N Aを、高度に修飾された67mer t r a c r R N A（配列番号100）と対合された。対合されたc r R N A : t r a c r R N A RNAオリゴヌクレオチドを、H E K - C a s 9細胞に形質移入し、実施例2に記載される通り処理した。断片アナライザーを使用して行われる産物の定量的測定と共に、T 7 E I ミスマッチエンドヌクレアーゼ切断アッセイを使用して、HPRT1遺伝子内の切断率を比較することにより、相対遺伝子編集活性を評価した。結果を表10及び図11に示す。

30

【0126】

【表 10】

表 10：12 標的部位にわたる哺乳類細胞における c rRNA オリゴヌクレオチド修飾パターンの最適化。

HPRT1 標的部位	配列番号	修飾 パ タ ー ン	c rRNA 配列 (5' ~ 3')	切断% t r a c r R N A 配列番号 100
38094	64	1	uccauuucuuagucuuuccu guuuuagagcuauugcu	62
38231	69	1	uuuuguaauuaacagcuugc guuuuagagcuauugcu	35
38371	71	1	cuuagagagaauauuuuguaagag guuuuagagcuauugcu	66
38509	73	1	uugacuaauaaugaauacuuc guuuuagagcuauugcu	71
38574	75	1	caaaaacacgcuaaaaaauuu guuuuagagcuauugcu	52
38087	56	1	aaauuaugggggaauuacuagga guuuuagagcuauugcu	72
38133	78	1	ggucacuuuuuaacacaccca guuuuagagcuauugcu	65
38285	48	1	cuuaauuccaacaacuucgug guuuuagagcuauugcu	62
38287	80	1	ggcuuaauuccaacaacuucg guuuuagagcuauugcu	47
38358	60	1	auuucacauaaaacucuuuu guuuuagagcuauugcu	59
38636	83	1	ucaaaauuaugagggugcugga guuuuagagcuauugcu	27
38673	85	1	uacagcuuuauugugacuaau guuuuagagcuauugcu	49
38094	291	2	<u>u*c*c*c</u> *auuucauagucuuu ccuguuuuagagcuau* <u>g*c</u> * <u>u</u>	71
38231	292	2	<u>u*u*u</u> *u*uguaauuaacagcu ugcguuuuagagcuau* <u>g*c</u> * <u>u</u>	54
38371	293	2	<u>c*u*u</u> *u*agagagaauauuuuga gagguuuuagagcuau* <u>g*c</u> * <u>u</u>	65
38509	294	2	<u>u*u*u</u> * <u>g</u> *acuauaaugaauac uucguuuuagagcuau* <u>g*c</u> * <u>u</u>	78

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番号	修飾 パ タ ー ン	c rRNA配列 (5' ~3')	切断% t r a c r R N A 配列番号100
38574	295	2	<u>c</u> * <u>a</u> * <u>a</u> *a a c a c g c a u a a a a a u u u g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	56
38087	296	2	<u>a</u> * <u>a</u> * <u>u</u> *u a u g g g g a u u a c u a g g a g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	76
38133	297	2	<u>g</u> * <u>g</u> * <u>u</u> *c a c u u u u a a c a c a c c c a g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	70
38285	178	2	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> *a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	65
38287	298	2	<u>g</u> * <u>g</u> * <u>c</u> *u u a u a u c c a a c a c u u c g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	59
38358	299	2	<u>a</u> * <u>u</u> * <u>u</u> *u c a c a u a a a a c u c u u u u g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	73
38636	300	2	<u>u</u> * <u>c</u> * <u>a</u> *a a u u a u g a g g u g c u g g a g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	29
38673	301	2	<u>u</u> * <u>a</u> * <u>c</u> *a g c u u u a u g u g a c u a a u g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	60
38094	302	3	<u>u</u> * <u>c</u> * <u>c</u> *a u u u c a u a g u c u u u c c u g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	67
38231	303	3	<u>u</u> * <u>u</u> * <u>u</u> *u g u a a u u a a c a g c u u g c g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	57
38371	304	3	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> *a g a g a a u a u u u g u a g a g g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	65
38509	305	3	<u>u</u> * <u>u</u> * <u>g</u> *a c u a u a a u g a a u a c u u c g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	79
38574	306	3	<u>c</u> * <u>a</u> * <u>a</u> *a a c a c g c a u a a a a a u u u g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	52
38087	307	3	<u>a</u> * <u>a</u> * <u>u</u> *u a u g g g g a u u a c u a g g a g u u u u a g a g c u a u * <u>g</u> * <u>c</u>	76

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番 号	修飾 パ タ ー ン	c rRNA配列 (5' ~3')	切断% t r a c r R N A 配列番号100
			<u>*u</u>	
38133	308	3	<u>g*g*u*c</u> acuuuaacacac ccaguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	66
38285	309	3	<u>c*u*u*a</u> uaucacacuu gugguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	60
38287	310	3	<u>g*g*c*u</u> uaauccacacu ucgguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	56
38358	311	3	<u>a*u*u*u</u> cacauaaaacucu uuuguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	66
38636	312	3	<u>u*c*a*a</u> auuaugaggugcu ggaguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	24
38673	313	3	<u>u*a*c*a</u> gcuuaugugacu aauguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	51
38094	314	4	<u>u*c*c*a</u> uuucauagucuuu ccuguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	68
38231	315	4	<u>u*u*u*u</u> guaauuaacagcu ugcguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	53
38371	316	4	<u>c*u*u*u</u> agagaaauuuugua gagguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	65
38509	317	4	<u>u*u*u*g</u> acuaaaugaauac uucguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	76
38574	318	4	<u>c*a*a*a</u> acacgcuaaaaaa uuuguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	51
38087	319	4	<u>a*a*u*u</u> auggggauuacua ggaguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	76
38133	320	4	<u>g*g*u*c</u> acuuuaacacac ccaguuuu <u>agagcua</u> <u>u*g*c</u> <u>*u</u>	70

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番号	修飾 パターン	crRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA A 配列番号100
38285	321	4	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	65
38287	322	4	<u>g</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	56
38358	323	4	<u>a</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>u</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	64
38636	324	4	<u>u</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>a</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	23
38673	325	4	<u>u</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	48
38094	326	5	<u>u</u> * <u>c</u> * <u>c</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	71
38231	327	5	<u>u</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>u</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	53
38371	328	5	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	69
38509	329	5	<u>u</u> * <u>u</u> * <u>g</u> * <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	77
38574	330	5	<u>c</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	51
38087	331	5	<u>a</u> * <u>a</u> * <u>u</u> * <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	80
38133	332	5	<u>g</u> * <u>g</u> * <u>u</u> * <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	70
38285	333	5	<u>c</u> * <u>u</u> * <u>u</u> * <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u>	64
38287	334	5	<u>g</u> * <u>g</u> * <u>c</u> * <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>g</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>u</u> * <u>g</u> * <u>c</u>	59

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番 号	修飾 パ ター ン	c rRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA A 配列番号100
			<u>*u</u>	
38358	335	5	<u>a*u*u*ucacauaaaaacucu</u> <u>uuuguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	64
38636	336	5	<u>u*c*a*aaauaugagguugu</u> <u>ggaguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	25
38673	337	5	<u>u*a*c*agcuuuauugugacu</u> <u>aauguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	56
38094	338	6	<u>u*c*c*auuucauagucuuu</u> <u>ccuguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	70
38231	339	6	<u>u*u*u*uguaauuaacagcu</u> <u>ugcguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	53
38371	340	6	<u>c*u*u*agagaaauuuugua</u> <u>gagguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	68
38509	341	6	<u>u*u*g*acuauaaugaauac</u> <u>uucguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	72
38574	342	6	<u>c*a*a*aacacgcuaaaaaa</u> <u>uuuguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	51
38087	343	6	<u>a*a*u*uaugggggaauuacua</u> <u>ggaguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	81
38133	344	6	<u>g*g*u*cacuuuuaaacacac</u> <u>ccaguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	71
38285	345	6	<u>c*u*u*auauccaacacuuu</u> <u>gugguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	64
38287	346	6	<u>g*g*c*uuauauccaacacu</u> <u>ucgguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	55
38358	347	6	<u>a*u*u*ucacauaaaaacucu</u> <u>uuuguuuuagagcuaa*u*g*c</u> <u>*u</u>	65

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番 号	修 飾 パ タ ー ン	c r RNA配列 (5' ~3')	切断% t r a c r R N A 配列番号100
38636	348	6	<u>u*c*a*aauuaugaggugcu</u> <u>ggaguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	24
38673	349	6	<u>u*a*c*agcuuuauugugacu</u> <u>aauguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	55
38094	350	7	<u>u*c*c*auuucauagucuuu</u> <u>ccuguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	73
38231	351	7	<u>u*u*u*uguaauuaacagcu</u> <u>ugcguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	51
38371	352	7	<u>c*u*u*agagaaauuuugua</u> <u>gagguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	73
38509	353	7	<u>u*u*g*acuaauaaugaauac</u> <u>uucguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	78
38574	354	7	<u>c*a*a*aacacgcuaaaaaa</u> <u>uuuguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	50
38087	355	7	<u>a*a*u*uaugggggaauuacua</u> <u>ggaguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	83
38133	356	7	<u>g*g*u*cacuuuuuaacacac</u> <u>ccaguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	63
38285	357	7	<u>c*u*u*auauccaaacacuu</u> <u>cguuuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	63
38287	358	7	<u>g*g*c*uuauauccaaacacu</u> <u>ucgguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	43
38358	359	7	<u>a*u*u*ucacauaaaaacucu</u> <u>uuuguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	66
38636	360	7	<u>u*c*a*aauuaugaggugcu</u> <u>ggaguuuuagagcuaa</u> *g*c * <u>u</u>	28
38673	361	7	<u>u*a*c*agcuuuauugugacu</u> <u>aauguuuuagagcuaa</u> *g*c	61

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番 号	修飾 パ タ ー ン	c rRNA配列 (5' ~3')	切断% t r a c r R N A 配列番号100
			<u>*u</u>	
38094	362	8	<u>u*c*c*a u u u c a u a g u c u u u</u> <u>c c u g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	63
38231	363	8	<u>u*u*u*u g u a a u u a a c a g c u</u> <u>u g c g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	40
38371	364	8	<u>c*u*u*u*a g a g a a u a u u u g u a</u> <u>g a g g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	64
38509	365	8	<u>u*u*u*g*a c u a u a a u g a a u a c</u> <u>u u c g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	67
38574	366	8	<u>c*a*a*a*a a c a c g c a u a a a a a</u> <u>u u u g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	18
38087	367	8	<u>a*a*u*u*u a u g g g g a u u a c u a</u> <u>g g a g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	75
38133	368	8	<u>g*g*u*u*c a c u u u u a a c a c a c</u> <u>c c a g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	48
38285	369	8	<u>c*u*u*u*a u a u c c a a c a c u u c</u> <u>g u g g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	53
38287	370	8	<u>g*g*g*c*u u a u a u c c a a c a c u</u> <u>u c g g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	24
38358	371	8	<u>a*u*u*u*u c a c a u a a a a c u c u</u> <u>u u u g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	56
38636	372	8	<u>u*c*a*a a u u a u g a g g u g c u</u> <u>g g a g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	22
38673	373	8	<u>u*a*c*a g c u u u a u g u g a c u</u> <u>a a u g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	50
38094	374	9	<u>u*c*c*c*a u u u c a u a g u c u u u</u> <u>c c u g u u u u a g a g c u a u *g*c</u> <u>*u</u>	65

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番 号	修 飾 パ タ ー ン	crRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA A 配列番号100
38231	375	9	<u>u*u*u*uguaauuaacagcu</u> <u>ugcguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	7
38371	376	9	<u>c*u*u*agagaaauuuugua</u> <u>gagguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	70
38509	377	9	<u>u*u*g*acuaauaauugaauac</u> <u>uucguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	57
38574	378	9	<u>c*a*a*aacacgcauaaaaa</u> <u>uuuguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	8
38087	379	9	<u>a*a*u*uauggggaauuacua</u> <u>ggaguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	74
38133	380	9	<u>g*g*u*cacuuuuuaacacac</u> <u>ccaguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	38
38285	222	9	<u>c*u*u*auauccaaacacuuuc</u> <u>gugguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	54
38287	381	9	<u>g*g*c*uuauauccaaacacu</u> <u>ucgguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	32
38358	382	9	<u>a*u*u*ucacauaaaaacucu</u> <u>uuuguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	58
38636	383	9	<u>u*c*a*aaauauagaggugcu</u> <u>ggaguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	19
38673	384	9	<u>u*a*c*agcuuuauugugacu</u> <u>aauguuuuagagcuaa</u> *g*c *u	55
38094	385	1 0	C3-uccauuuucauagucuuu ccuguuuuagagcuaugcu- C3	66
38231	386	1 0	C3-uuuuuguaauuaacagcu ugcguuuuagagcuaugcu- C3	54
38371	387	1 0	C3-cuuagagaaauuuugua gagguuuuagagcuaugcu-	57

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番号	修飾 パ タ ー ン	c rRNA配列 (5' ~3')	切断% tracrRNA A 配列番号100
			C3	
38509	388	1 0	C3-uugacuaauaauugaauac uucguuuuagagcuaugcu- C3	75
38574	389	1 0	C3-caaaaacacgcuaaaaaa uuuguuuagagcuaugcu- C3	50
38087	390	1 0	C3-aaauauggggauuacua ggaguuuuagagcuaugcu- C3	71
38133	391	1 0	C3-ggucacuuuuuacacac ccaguuuuagagcuaugcu- C3	68
38285	181	1 0	C3-cuuauauccaaacacuu cguuuuagagcuaugcu- C3	58
38287	392	1 0	C3-ggcuuauauccaaacacu ucgguuuagagcuaugcu- C3	57
38358	393	1 0	C3-auuucacauaaaaacucu uuuguuuagagcuaugcu- C3	64
38636	394	1 0	C3-ucaaaauauggaggugcu ggaguuuuagagcuaugcu- C3	22
38673	395	1 0	C3-uacagcuuuauugugacu aauguuuagagcuaugcu- C3	50
38094	396	1 1	ZEN-uccauuucauagucuu uccuguuuagagcuaugcu -ZEN	74
38231	397	1 1	ZEN-uuuuguaauuaacagc uugcguuuuagagcuaugcu -ZEN	44
38371	398	1 1	ZEN-cuuagagaaauuuugu agagguuuagagcuaugcu -ZEN	72
38509	399	1 1	ZEN-uugacuaauaauugaaua cuucguuuuagagcuaugcu -ZEN	74

10

20

30

40

HPRT1 標的部位	配列番号	修飾 パターン	c r RNA配列 (5' ~3')	切断% t r a c r R N A 配列番号100
38574	400	1 1	ZEN-caaaacacgcauaaaa auuuguuuuagagcuaugcu -ZEN	57
38087	401	1 1	ZEN-aaauauggggauuacu aggaguuuuagagcuaugcu -ZEN	82
38133	402	1 1	ZEN-ggucacuuuuuacaca cccaguuuuagagcuaugcu -ZEN	73
38285	184	1 1	ZEN-cuuauauccaacacuu cgugguuuuagagcuaugcu -ZEN	60
38287	403	1 1	ZEN-ggcuuauauccaacac uucgguuuuagagcuaugcu -ZEN	62
38358	404	1 1	ZEN-auuuacacauaaaaacuc uuuuguuuuagagcuaugcu -ZEN	69
38636	405	1 1	ZEN-ucaaaauuauaggugc uggaguuuuagagcuaugcu -ZEN	26
38673	406	1 1	ZEN-uacagcuuuauugugac uaauguuuuagagcuaugcu -ZEN	44

10

20

オリゴヌクレオチド配列の5' ~ 3'を示す。小文字 = RNA、下線 = 2' - O - メチルRNA、C3 = C3スペーサー（プロパンジオール修飾因子）、* = ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、ZEN = ナフチル-アゾ修飾因子。各種の相対機能的活性は、示されたc r RNAが、ヒトHPRT1内の12部位の各々において示されたt r a c r RNAと対合される場合、T7EIヘテロ二重鎖アッセイにおける切断%によって示される。

30

【0127】

修飾されたc r RNAは、ユニバーサルであり、t r a c r RNAに結合する16塩基3'末端ドメイン内で固定された修飾パターンを用いた。異なる修飾パターンを、標的的特異的である（すなわち、配列が標的部位により異なる）5'末端ドメイン内で試験／比較した。試験設定は、5'末端で開始して3'末端に向かって進む0、3、4、6、8、10、12、13、または14個の連続2'OMe RNA残基を有する変異型を含んでいた。これらの修飾パターンは、c r RNAの機能的性能を低減することが以前に実証された位置を回避した（実施例7）。非塩基修飾因子末端基（C3スペーサー、またはZEN）の使用も（追加の修飾なしに）試験した。この調査において、機能的活性を12部位全てにわたって比較した場合、試験された全ての部位は、5'末端における0 ~ 10個のRNA残基が2'OMe RNA残基で置換された場合に完全な活性を示した。1 / 12部位のみが、修飾された12残基により活性のわずかな低減を示したが、13残基が修飾された場合に3 / 12部位が活性の低減を示し、14残基が修飾された場合に4 / 12部位が活性の低減を示した。末端修飾因子（C3、ZEN）は、全ての部位において完全な活性を示した。

40

【0128】

試験された全ての部位で完全な活性を示した最高レベルのc r RNA修飾は、修飾パタ

50

【化 2】

修飾パターン6
(配列番号434)

修飾パターン 7
(配列番号 4 3 5)

10

20

实施例 1 1

30

40

【 0 1 3 6 】

【化 3】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR
YTRRNRIICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKL
VDSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDKAILS
ARLSKSRRLNLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGD
QYADLFLAANKLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQS
KNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHILRRQE
DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNF
DKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYF
KKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYA
HLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQLIHDDSLTFKEDIQKA
QVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIMARENQTTQKGQKNSRERMK
RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDHDHIVPQSFLKDDSID
NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTAKAERGGLSELDKAGFIKRLVET
RQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVG
ALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETN
GETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKDLIIKLPKYSLFELN
GRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKR
VILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGD

10

3 N L S 配列及び精製 H i s タグを含む大腸菌内の発現のためにコドン最適化された D
N A から発現される S . p y C a s 9 アミノ酸配列（配列番号 4 0 8）。

20

【0 1 3 7】

【化 4】

MGSSAPKKKRKVGIGHPAAMDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL
LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRNRIICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNI
VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYN
QLFEENPINASGVDKAILSARLSKSRRLNLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKL
QLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAANKLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLL
KALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFD
NGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN
FEEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKA
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI
VLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINR
LSDYDHDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTAKA
ERGGLSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYK
VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMN
FKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWDPKKYGGFDSP TVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGY
KEVKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDT
TIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDAAPKKKRKVDPKKKRKVAAALEHHHHHH

30

40

3 N L S 配列及び精製 H i s タグを含む大腸菌内の発現のためにコドン最適化された S
 . p y C a s 9 D N A 配列（配列番号 4 0 9）。

【0 1 3 8】

【化 5】

ATGGGCAGCAGCGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCATGGACAAAAA
GTACTCTATTGGCCTGGATATCGGGACCAACAGCGTCGGGTGGGCTGTTATCACCGACGAGTATAAAGTAC
CTTCGAAAAAGTTCAAAGTGCTGGGCAACACCGATCGCCATTCAATCAAAAAGAACTTGATTGGTGCGCTG
TTGTTTGACTCCGGGGAAACCGCCGAGGCGACTCGCCTTAAACGTACAGCACGTGCGCGGTACACTCGGCG
TAAGAATCGCATTTGCTATTTGCAGGAAATCTTTAGCAACGAGATGGCAAAAGTCGATGACTCGTTTTTCC
ACCGCCTCGAGGAAAGCTTTCTGGTGGAGGAAGACAAAAAGCATGAGCGTCACCCGATCTTCGGCAACATT
GTCGATGAAGTAGCGTATCATGAAAAATACCCAACCATTTACCACTTACGCAAAAAGCTGGTGGACAGCAC
TGACAAAGCTGATTTGCGCCTTATCTATTTAGCCCTGGCACATATGATTAAGTTTTCGTGGTCACTTCCTGA
TCGAAGGAGACTTAAATCCCGACAACAGTGATGTTGATAAATTGTTTATTTCAGCTTGTCCAACTTACAAT
CAACTGTTTCGAGGAAAACCCGATCAATGCCTCCGGTGTGGATGCAAAAGCCATTTTAAGTGCACGCCTTAG
CAAGTCCCGTCGCTTAGAAAAACCTTATCGCGCAGCTGCCCCGGCGAGAAAAAGAATGGTTTGT'TTGGAACC
TTATTGCCTTGAGCTTAGGCCTCACCCCGAATTTCAAAGTAATTTTCGATCTTGAGAAGACGCCAAATTA
CAACTGTGCAAGGATACTTATGATGACGATCTCGATAATCTGTTAGCGCAGATTGGTGACCAATACGCCGA
TCTTTTTCTGGCGGCTAAAAATCTGAGCGACGCCATCTTGCTTTCGGATATTCTCCGCGTTAACACCGAAA
TCACGAAAGCGCCTCTTAGTGCCAGCATGATTAAACGTTATGATGAACACCACCAGGACCTGACCTTACTC
AAAGCGTTGGTTCGCCAGCAACTGCCAGAGAAGTACAAAGAAATCTTCTTTGATCAGTCAAAGAATGGTTA
TGCCGGCTATATTGACGGGGGTGCAAGCCAAGAGGAATTCTACAAATTTATCAAGCCTATTCTGGAGAAAA
TGGATGGCACCGAAGAGTTATTGGTGAAGCTTAACCGTGAAGACCTCCTGCGGAAACAGCGCACATTGAT
AATGGTTCGATCCACACCAAATCCATTTGGGGGAGTTACACGCTATTTTGCGTCGCCAGGAAGACTTTTA
CCCTTTCCTGAAGGATAACCGGGAGAAAAATTGAGAAGATCCTTACCTTTCGTATTCCGTATTACGTAGGCC
CCTTAGCACGGGGTAATAGCCGTTTCGCGTGGATGACACGGAAGTCGGAAGAGACGATCACCCCGTGGAAC
TTCGAAGAGGTAGTCGACAAGGGCGCATCAGCGCAGTCTTTTATTGAACGTATGACGAATTTTCGATAAAAA
CTTGCCCAATGAGAAGGTGCTTCCGAAACATTCTTGTATATGAATATTTTACAGTTTACAACGAGCTGA
CCAAGGTTAAATACGTGACGGAAGGAATGCGCAAGCCCGCTTTTCTTAGCGGTGAGCAAAAAAAGGCGATC
GTCGACCTGTTATTCAAAACGAATCGTAAGGTGACTGTAAAGCAACTCAAAGAAGATTACTTCAAAAAGAT

10

20

TGAGTGCTTCGACAGCGTCGAAATCTCTGGGGTAGAGGATCGGTTTAAACGCAAGTTTAGGTACCTACCATG
 ACCTGCTTAAATCATTAAAGGATAAAGACTTCTTAGATAATGAAGAGAACGAAGATATTCTCGAGGACATC
 GTCTTGACGTTAACCTTATTTGAGGATCGTGAAATGATTGAGGAACGCCTCAAACTTATGCCACCTGTT
 CGACGATAAGGTGATGAAGCAGCTGAAACGTCGGCGCTACACAGGATGGGGCCGCTTGAGTCGCAAACTTA
 TTAACGGAATCCGTGACAAGCAATCCGGCAAAACGATTCTGGATTTCTTGAAGTCGGACGGATTGCTAAT
 CGCAACTTCATGCAGTTGATCCATGATGACTCCCTGACTTTTAAAGAGGATATTCAAAAGGCGCAGGTTAG
 TGGTCAAGGCGACAGCTTACACGAACACATCGCAAAATTTGGCTGGTTCGCCGGCCATTAAAAAGGGGATCC
 TCCAGACCGTGAAAGTTGTAGATGAGCTTGTTAAGGTGATGGGTTCGTCATAAGCCCCGAAACATCGTGATT
 GAAATGGCGCGGAGAAATCAAACGACCCAGAAAGGACAAAAGAATAGCCGTGAACGGATGAAGCGGATCGA
 GGAAGGCATTAAAGAGCTGGGGTCTCAAATCTTGAAGGAACACCCTGTGGAGAACACTCAGCTCCAAAATG
 AAAAATTTTACCTGTACTATTTGCAGAACGGACGCGATATGTACGTGGACCAAGAGTTGGATATTAATCGG
 CTGAGTGACTACGACGTTGATCATATCGTCCCGCAGAGCTTCTCAAAGACGATTCTATTGACAAATAAGGT
 ACTGACGCGCTCTGATAAAAACCGTGGTAAGTCGGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTTGTGAAAAAGATGA
 AAAATTATTGGCGCCAGCTTTTAAACGCGAAGCTGATCACACAACGTAAATTCGATAATTTGACCAAGGCT
 GAACGGGGTGGCCTGAGCGAGTTAGATAAGGCAGGATTTATTAACGCCAGTTAGTGGAGACTCGTCAAAT
 CACCAAACATGTGCGCGAGATTTTGGACAGCCGATGAACACCAAGTACGATGAAAATGACAACTGATCC
 GTGAGGTGAAAGTCATTACTCTGAAGTCCAAATAGTTAGTGATTTCCGGAAGGACTTTCAATTCTACAAA
 GTCCGTGAAATTAATAACTATCATCACGCACATGACGCGTACCTGAATGCAGTGGTTGGGACCGCCCTTAT
 CAAGAAATATCCTAAGCTGGAGTCGGAGTTTGTCTATGGCGACTATAAGGTATACGATGTTTCGCAAAATGA
 TTGCGAAATCTGAGCAGGAGATCGGTAAGGCAACCGCAAAATATTTCTTTTACTCAAACATTATGAATTC
 TTTAAGACAGAAATCACTCTGGCCAACGGGGAGATTGCAAAACGTCCGTTGATCGAAACAAACGGCGAGAC
 TGGCGAAATTTGTTGGGACAAAGGGCGTGATTTTCGCGACGGTGCGCAAGGTAAGTACTGAGCATGCCCTCAAGTCA
 ATATTGTTAAGAAAACCGAAGTGCAGACGGGCGGGTTTTCAGGAAAGCATCTTACCCAAACGTAATTCA
 GATAAACTTATTGCACGCAAAAAGGACTGGGATCCGAAAAAGTATGGAGGCTTCGACAGTCCAACCGTAGC
 CTACTCTGTTCTCGTTGTAGCGAAAGTAGAAAAGGTAAATCCAAGAACTGAAATCTGTCAAGGAGTTGC
 TTGGAATCACCATTATGGAGCGTAGCTCCTTCGAGAAGAACCCGATTGACTTTCTGGAAGCCAAAGGATAT
 AAAGAGGTCAAGAAAGATCTTATCATTAAAGCTGCCTAAGTATTCACTCTTCGAGCTGGAAAATGGTCGTAA
 ACGCATGCTCGCTTCTGCCGGCGAGTTGCAGAAGGGCAATGAATTAGCACTTCCATCAAAGTACGTTAACT
 TCCTGTATTTGGCCAGCCATTACGAGAACTGAAGGGGTCTCCAGAGGACAACGAACAGAAACAATTATTT
 GTAGAGCAGCACAAAGCATTATCTTGATGAAATCATTGAGCAAATTTCCGAATTCAGTAAACGCGTAATCCT
 GGCCGATGCAAACCTCGACAAGGTGCTGAGCGCTTACAATAAGCATCGCGACAAACCTATCCGTGAGCAGG
 CTGAAAATATCATTACCTGTTTACATTAAACGAACCTGGGCGCTCCGGCCGCTTTTAAATATTTTCGACACG
 ACAATCGACCGTAAGCGCTATACCAGTACGAAAGAAGTGTTGGATGCGACCCTTATTCACCAGTCAATTAC
 AGGATTATATGAGACCCGTATCGACCTTAGCCAATTAGGTGGGGATGCGGGCCCCGAAGAAAAACGCAAG
 TGGATCCGAAGAAAAACGCAAGTGGCGGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

10

20

30

V 5 エピトープタグ及び 2 N L S 配列を含むヒト細胞内の発現のためにコドン最適化された DNA から発現される S . p y C a s 9 アミノ酸配列（配列番号 4 1 0）。

【 0 1 3 9 】

【 化 6 】

MGKPIPNPLLGLDSTAPKKRKRKVGIVPAADKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVL
 GNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSEFFHR
 LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHMIKFR
 GHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
 GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKN
 LSDAILLSDLRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA
 GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRR
 QEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDDKGASAQ
 FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKT
 NRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIV

40

LTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS
 DGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKV
 MGRHKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK
 NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDE
 NDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVY
 GDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
 KGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
 YSVLVVAKVEKGKSKLKSVELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLE
 LENGKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEII
 EQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKR
 YTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDSRADPKKKRKVEFHHTGLVDPSSVPSLSLNR

10

V 5 エピトープタグ及び 2 N L S 配列を含むヒト細胞内の発現のためにコドン最適化された S. py C a s 9 D N A 配列 (配列番号 4 1 1)。

【0140】

【化 7】

ATGGGCAAGCCCATCCCTAACCCCTGTTGGGGCTGGACAGCACCGCTCCCAAAAAGAAAAGGAAGGTGGG
 CATTACGGCGTGCTGCGGCCGACAAAAAGTACAGCATCGGCCTTGATATCGGCACCAATAGCGTGGGCT
 GGGCGTTATCACAGACGAATACAAGGTACCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGGAATACAGACAGGCAC
 TCTATCAAGAAAACTTATCGGGGCTCTGCTGTTTGACTCAGGCGAGACCGCCGAGGCCACAGGTTGAA
 GAGGACCGCAAGGCGAAGGTACACCCGGAGGAAGAAGAGGATCTGCTATCTGCAGGAGATCTTCAGCAACG
 AGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGGCTGGAGGAGAGCTTCCTTGTGAGGAGGATAAGAAG
 CACGAACGACACCCCATCTTCGGCAACATAGTCGACGAGGTGCTTATCACGAGAAGTACCCCAACCATCTA
 CCACCTGCGAAAGAAATTGGTGGATAGCACCGATAAAGCCGACTTGCGACTTATCTACTTGGCTCTGGCGC
 ACATGATTAAGTTCAGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTTAACCCCGACAACAGTGACGTAGACAAA
 TTGTTTCATCCAGCTTGACAGACCTATAACAGCTGTTGAGGAAAACCTATTAAACGCCAGCGGGGTGGA
 TGCGAAGGCCATACCTAGCGCCAGGCTGAGCAAAAGCAGGCGCTTGAGAACCTGATAGCCAGCTGCCCG
 GTGAAAAGAAGAAGCGCCTCTCGGTAATCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCAACTTCAAGAGC
 AACTTCGACCTGGCAGAAGATGCCAAGCTGCAGTTGAGTAAGGACACCTATGACGACGACTTGGACAATCT
 GCTCGCCCAATCGGCGACCACTACGCTGACCTGTTCTCGCCGCCAAGAACCTTTCTGACGCAATCCTGC
 TTAGCGATATCCTTAGGGTGAACACAGAGATACCAAGGCCCTTGGAGCGCCAGCATGATCAAGAGGTAC
 GACGAGCACCATCAGGACCTGACCCTTCTGAAGGCCCTGGTGGAGGAGCAACTGCCCAGAAAGTACAAGGA
 GATCTTTTTTCGACCAGAGCAAGAAGCGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGAGCCAGCCAAGAGGAGTTCT
 ACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGATGGCACCAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGGGAA
 GATTTGCTCCGGAAGCAGAGGACCTTTGACAACGGTAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCA
 CGCAATACTGAGGCGACAGGAGGATTTCTACCCCTTCTCAAGGACAATAGGGAGAAAATCGAAAAGATTC
 TGACCTTCAGGATCCCTACTACGTGGGCCCCTTTGCCAGGGGCAACAGCCGATTGCTTGGATGACAAGA
 AAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGTGGACAAAGGAGCAAGCGCGCAGTCTTT
 CATCGAACGGATGACCAATTTGACAAAAACCTGCCTAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTTT
 ACGAGTACTTCACCGTGACAAAGAGCTACCAAGGTGAAATATGTGACCGAGGGCATGCGAAAACCCGCT
 TTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGGAAGGTGACCGTGAA
 GCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTTGATAGCGTGAAATAAGCGGCGTGGAGGACA
 GGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACTTGTTGAAGATAATCAAAGACAAGGATTTCTGGATAAT
 GAGGAGAACGAGGATATACTCGAGGACATCGTGCTGACTTTGACCCTGTTTGAGGACCGAGAGATGATTGA
 AGAAAGGCTCAAAACCTACGCCACCTGTTGACGACAAAGTGATGAAACAACCTGAAGAGACGAAGATACA
 CCGGCTGGGGCAGACTGTCCAGGAAGCTCATCAACGGCATTAGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTG
 GATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGAACTTCATGCAGCTGATTACGATGACAGCTTGACCTT
 CAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTTAGCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAACATATTGCAAACCTGG

20

30

40

CAGGCTCCCCTGCGATCAAGAAGGGCATACTGCAGACCGTTAAGGTTGTGGACGAATTGGTCAAGGTCATG
 GGCAGGCACAAGCCCGAAAAACATAGTTATAGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAAAAGGGCCAGAA
 GAACAGCCGGGAGCGCATGAAAAGGATCGAGGAGGGTATCAAGGAACTCGGAAGCCAGATCCTCAAAGAGC
 ACCCCGTGGAGAATACCCAGCTCCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGGGACATG
 TACGTTGACCAGGAGTTGGACATCAACAGGCTTTCAGACTATGACGTGGATCACATAGTGCCCCAGAGCTT
 TCTTAAAGACGATAGCATCGACAACAAGGTCCTGACCCGCTCCGACAAAAACAGGGGCAAAAAGCGACAACG
 TGCCAAGCGAAGAGGTGGTTAAAAAGATGAAGAACTACTGGAGGCAACTGCTCAACGCGAAATTGATCACC
 CAGAGAAAAGTTCGATAACCTGACCAAGGCCGAGAGGGGCGGACTCTCCGAACCTTGACAAAGCGGGCTTCAT
 AAAGAGGCAGCTGGTCGAGACCCGACAGATCACGAAGCACGTGGCCCAAATCCTCGACAGCAGAATGAATA
 CCAAGTACGATGAGAATGACAACTCATCAGGGAAGTGAAAGTGATTACCCTGAAGAGCAAGTTGGTGTCC
 GACTTTCGCAAAGATTTCCAGTTCTACAAGGTGAGGGAGATCAACAACACCACCATGCCACGACGCATA
 CCTGAACGCCGTGGTCGGCACCGCCCTGATTAAAGAGTATCCAAAGCTGGAGTCCGAATTTGTCTACGGCG
 ACTACAAAGTTTACGATGTGAGGAAGATGATCGCTAAGAGCGAACAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCTAAG
 TATTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTCAGACCCGAGATCACACTTGCCAACGGCGAAATCAGGAA
 GAGGCCGCTTATCGAGACCAACGGTGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCCACCG
 TGAGGAAAGTCCCTGAGCATGCCCCAGGTGAATATTGTGAAAAAACTGAGGTGCAGACAGGCGGCTTTAGC
 AAGGAATCCATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGAAGAAGGACTGGGACCCCTAAGAA
 GTATGGAGGCTTCGACAGCCCCACCGTAGCCTACAGCGTGCTGGTGGTCGCGAAGGTAGAGAAGGGGAAGA
 GCAAGAACTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTCGGCATAACCATCATGGAGAGGTCCAGCTTTGAGAAGAAC
 CCCATTGACTTTTTTGAAGCCAAGGGCTACAAAGAGGTCAAAAAGGACCTGATCATCAAACTCCCCAAGTA
 CTCCCTGTTTGAATTGGAGAACGGCAGAAAGAGGATGCTGGCGAGCGCTGGGGAACTGCAAAAAGGGCAACG
 AACTGGCGCTGCCCAGCAAGTACGTGAATTTTCTGTACCTGGCGTCCCACTACGAAAAGCTGAAAGGCAGC
 CCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCATTACCTGGACGAGATAATCGAGCA
 AATCAGCGAGTTTCAGCAAGAGGGTGATTCTGGCCGACGCGAACCTGGATAAGGTCCTCAGCGCCTACAACA
 AGCACCGAGACAAACCCATCAGGGAGCAGGCCGAGAATATCATACACCTGTTCAACCTGACAAATCTGGGC
 GCACCTGCGGCATTCAAATAC'TTCGATACCACCATCGACAGGAAAAGGTACACTAGCACTAAGGAGGTGCT
 GGATGCCACCTTGATCCACCAGTCCATTACCGGCCCTGTATGAGACCAGGATCGACCTGAGCCAGCTTGAG
 GCGACTCTAGGGCGGACCCAAAAAGAAAAGGAAGGTGGAATTCCACCACACTGGACTAGTGATCCGAGC
 TCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGA

10

20

T7 RNAポリメラーゼ発現カセットとしてヒト細胞内の発現のためにコドン最適化さ
 れたS. py Cas9 DNA配列（配列番号412）。この配列は、T7 RNAポ
 リメラーゼプロモーター、V5エピトープタグ、核局在化シグナル、コドン最適化された
 Cas9配列、第2の核局在化シグナル、及びポリアデニル化シグナルを持つBGH（ウ
 シ成長ホルモン）遺伝子3' UTR要素を含む。

30

【0141】

【化8】

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGC
 CACCATGGGCAAGCCCATCCCTAACCCCTGTTGGGGCTGGACAGCACCGCTCCCAAAAAGAAAAGGAAGG
 TGGGCATTACGGCGTGCTGCGGCCGACAAAAGTACAGCATCGGCCTTGATATCGGCACCAATAGCGTG
 GGCTGGGCCGTTATCACAGACGAATACAAGGTACCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGGAATACAGACAG
 GCACTCTATCAAGAAAAACCTTATCGGGGCTCTGCTGTTTGACTCAGGCAGACCGCCGAGGCCACCAAGGT
 TGAAGAGGACCGCAAGGCGAAGGTACACCCGAGGAAGAACAGGATCTGCTATCTGCAGGAGATCTTCAGC
 AACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGGCTGGAGGAGAGCTTCCTTGTCGAGGAGGATAA
 GAAGCACGAACGACACCCCATCTTCGGCAACATAGTCGACGAGGTGCTTATCAGGAGAAGTACCCACCA
 TCTACCACCTGCGAAAGAAATTGGTGGATAGCACCGATAAAGCCGACTTGCAGCTTATCTACTTGGCTCTG
 GCGCACATGATTAAGTTAGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTTAACCCGACAAACAGTGACGTAGA
 CAAATTGTTTCATCCAGCTTGACAGACCTATAACAGCTGTTTCGAGGAAAACCTATTAACGCCAGCGGGG
 TGGATGCGAAGGCCATACTTAGCGCCAGGCTGAGCAAAAGCAGGCGCTTGAGAACCTGATAGCCAGCTG

40

CCCGGTGAAAAGAAGAACGGCCTCTTCGGTAATCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAA
 GAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGATGCCAAGCTGCAGTTGAGTAAGGACACCTATGACGACGACTTGGACA
 ATCTGCTCGCCCAAATCGGCGACCACTACGCTGACCTGTTCTCGCCGCCAAGAACCTTTCTGACGCAATC
 CTGCTTAGCGATATCCTTAGGGTGAACACAGAGATCACCAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAG
 GTACGACGAGCACCATCAGGACCTGACCTTCTGAAGGCCCTGGTGAGGCAGCAACTGCCCGAGAAGTACA
 AGGAGATCTTTTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGAGCCAGCCAAGAGGAG
 TTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGATGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAG
 GGAAGATTGCTCCGGAAGCAGAGGACCTTTGACAACGGTAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGC
 TGCACGCAATACTGAGGGCAGAGGAGGATTTCTACCCCTTCTCAAGGACAATAGGGAGAAAATCGAAAAG
 ATTCTGACCTTCAGGATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTTGCCAGGGGCAACAGCCGATTCTGCTTGGATGAC
 AAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGTGGACAAAGGAGCAAGCGCGCAGT
 CTTTCATCGAACGGATGACCAATTTGACAAAAACCTGCCTAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTG
 CTTTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTCACCAAGGTGAAATATGTGACCGAGGGCATGCGAAAACC
 CGCTTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGGAAGGTGACCG
 TGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTCTTGATAGCGTGGAATAAGCGCGCTGGAG
 GACAGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACTTGTGAAGATAATCAAAGACAAGGATTTCTTGA
 TAATGAGGAGAACGAGGATATACTCGAGGACATCGTGTGACTTTGACCTGTTTGAGGACCGAGAGATGA
 TTGAAGAAAGGCTCAAAAACCTACGCCACCTGTTGACGACAAAAGTGATGAAACAACCTGAAGAGACGAAGA
 TACACCGGCTGGGGCAGACTGTCCAGGAAGCTCATCAACGGCATTAGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
 CCTGGATTCTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCAGAACTTCATGCAGCTGATTACGATGACAGCTTGA
 CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTTAGCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAACATATTGCAAAAC
 CTGGCAGGCTCCCCTGCGATCAAGAAGGGCATACTGCAGACCGTTAAGGTTGTGGACGAATTGGTCAAGGT
 CATGGGCAGGCACAAGCCCCGAAAACATAGTTATAGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAAAAGGGCC
 AGAAGAACAGCCGGGAGCGCATGAAAAGGATCGAGGAGGGTATCAAGGAACCTCGGAAGCCAGATCCTCAA
 GAGCACCCCTGGAGAATACCCAGCTCCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGGGA
 CATGTACGTTGACCAGGAGTTGGACATCAACAGGCTTTCAGACTATGACGTGGATCACATAGTGCCCCAGA
 GCTTTCTTAAAGACGATAGCATCGACAACAAGTCTGACCCGCTCCGACAAAAACAGGGGCAAAAGCGAC
 AACGTGCCAAGCGAAGAGGTGGTTAAAAAGATGAAGAACTACTGGAGGCAACTGCTCAACGCGAAATTGAT
 CACCAGAGAAAAGTTTCGATAACCTGACCAAGGCCGAGAGGGGCGGACTCTCCGAACCTTGACAAAGCGGGCT
 TCATAAAGAGGCAGCTGGTCGAGACCCGACAGATCACGAAGCACGTGGCCCAAATCCTCGACAGCAGAATG
 AATACCAAGTACGATGAGAATGACAACTCATCAGGGAAGTGAAAGTGATTACCCTGAAGAGCAAGTTGGT
 GTCCGACTTTTCGCAAAGATTTCCAGTTCTACAAGGTGAGGGAGATCAACAACCTACCACCATGCCCACGACG
 CATACTGAACGCCGTGGTCGGCACCGCCCTGATTAAGAAGTATCCAAAGCTGGAGTCCGAATTTGTCTAC
 GGCGACTACAAAGTTTACGATGTGAGGAAGATGATCGCTAAGAGCGAACAGGAGATCGGCAAGGCCACCGC
 TAAGTATTTCTCTACAGCAACATCATGAATTTTTCAAGACCGAGATCACACTTGCCAACGGCGAAATCA
 GGAAGAGGCCGCTTATCGAGACCAACGGTGAGACCGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCC
 ACCGTGAGGAAAGTCTGAGCATGCCCCAGGTGAATATTGTGAAAAAACTGAGGTGCAGACAGGCGGCTT
 TAGCAAGGAATCCATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCTA
 AGAAGTATGGAGGCTTCGACAGCCCCACCGTAGCCTACAGCGTGCTGGTGGTCGCGAAGGTAGAGAAGGGG
 AAGAGCAAGAACTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTCGGCATAACCATCATGGAGAGGTCCAGCTTTGAGAA
 GAACCCCATTGACTTTTTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAGGTCAAAAAGGACCTGATCATCAAACCTCCCCA
 AGTACTCCCTGTTTGAATTGGAGAACGGCAGAAAGAGGATGCTGGCGAGCGCTGGGGAACCTGCAAAAGGGC
 AACGAACCTGGCGCTGCCAGCAAGTACGTGAATTTCTGTACCTGGCGTCCCACTACGAAAAGCTGAAAGG
 CAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGGGAGCAGCACAAGCATTACCTGGACGAGATAATCG
 AGCAAATCAGCGAGTTCAGCAAGAGGGTGATTCTGGCCGACGCGAACCTGGATAAGGTCCTCAGCGCTAC
 AACAAGCACCGAGACAAACCCATCAGGGAGCAGGCCGAGAATATCATACACCTGTTACCCCTGACAAATCT
 GGGCGCACCTGCGGCATTCAAATACTTCGATACCACCATCGACAGGAAAAGGTACACTAGCACTAAGGAGG
 TGCTGGATGCCACCTTGATCCACAGTCCATTACGGCCTGTATGAGACCAGGATCGACCTGAGCCAGCTT
 GGAGGCGACTCTAGGGCGGACCCAAAAAAGAAAAGGAAGGTGGAATTCACACCACTGGACTAGTGGATCC
 GAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG
 TTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTAATAAAAT

 GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA
 GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGC

10

20

30

40

発現カセット（配列番号４１２）から作製された S. py Cas9 mRNA（配列
 番号４１３）。この配列は、V5エピトープタグ、核局在化シグナル、コドン最適化され

50

た C a s 9 配列、第 2 の核局在化シグナル、及び B G H (ウシ成長ホルモン) 遺伝子 3' U T R 要素及びポリ-A テールを含む。

【 0 1 4 2 】

【 化 9 】

GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACGGGCCCUCUAGACUCGAGCGGCGCCACCAUGGGCAAGCCCA
UCCCUAACCCCCUGUUGGGGCGUGACAGCACCGCUCCCAAAAAGAAAAGGAAGGUGGGCAUUCACGGCGUG
CCUGCGGCGGACAAAAGUACAGCAUCGGCCUUGAUUUCGGCACCAUAGCGUGGGCUGGGCCGUUAUCAC
AGACGAAUACAAGGUACCCAGCAAGAAGUUAAGGUGCUGGGGAAUACAGACAGGCACUCUAUCAAGAAAA
ACCUUAUCGGGGCUCUGCUGUUGACUCAGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGGUUGAAGAGGACCGCAAGG
CGAAGGUACACCCGGAGGAAGAACAGGAUCUGCUAUUCUGCAGGAGAUUCUACAGCAACGAGAUUGGCCAAGGU
GGACGACAGCUUCUCCACAGGCUGGAGGAGAGCUUCCUUGUCGAGGAGGAUAGAAGCACGAACGACACC
CCAUCUUCGGCAACAUAGUCGACGAGGUGCGUUAUCACGAGAAGUACCCACCAUCUACCACCUGCGAAAG
AAAUUGGUGGAUAGCACCGAUAAAGCCGACUUGCGACUUAUCUACUUGGCUCUGGCGCACAUGAUUAAGUU
CAGGGGCCACUUCUGAUUCGAGGGCGACCUUAACCCCGACAACAGUGACGUAGACAAUUGUUAUCCAGC
UUGUACAGACCUAUAACAGCUGUUCGAGGAAAACCCUUAUUAACGCCAGCGGGGUGGAUGCGAAGGCCAUA
CUUAGCGCCAGGCUGAGCAAAAGCAGGCGCUUGGAGAACCUGAUAGCCCAGCUGCCCGUGAAAAGAAAGAA
CGGCCUCUUCGGUAUUCUGAUUGCCCUGAGCCUGGGCCUGACCCCAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGG
CAGAAGAUGCCAAGCUGCAGUUGAGUAAGGACACCUAUGACGACGACUUGGACAAUCUGCUCGCCCAAAUC
GGCGACCAGUACGUGACCUGUUCUUCGCCGCCAAGAACCUCUUGACGCAUCCUGCUUAGCGAUUCCU
UAGGGUGAACACAGAGAUACCAAGGCCCCCUGAGCGCCAGCAUGAUCAAGAGGUACGACGAGCACCAUC
AGGACCUGACCCUUCUGAAGGCCUGGUGAGGCAGCAACUGCCCAGAGAAGUACAAGGAGAUUUUUCGAC
CAGAGCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGAGCCAGCCAAGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAA
GCCCAUCCUGGAGAAGAUGGAUGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACAGGGAAGAUUUGCUCGGGA
AGCAGAGGACCUUUGACAACGGUAGCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCAUACUGAGG
CGACAGGAGGAUUUCUACCCCUUCCUCAAGGACAAUAGGGAGAAAAUCGAAAAGAUUCUGACCUUCAGGAU
CCCCUACUACGUGGGCCCUCUUGCCAGGGGCAACAGCCGAUUCGCUUGGAUGACAAGAAAGAGCGAGGAGA
CCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAAGUGGUGGACAAAGGAGCAAGCGCGCAGUCUUUAUCGAACGGAUG
ACCAAUUUCGACAAAACCCUGCCUAAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACAGCCUGCUUUAACGAGUACUUCAC
CGUGUACAACGAGCUCACCAAGGUGAAUUAUGUGACCGAGGGCAUGCGAAAACCCGCUUCCUGAGCGGCG
AGCAGAAGAAGGCCAUUCGUGGACCUGCUGUUAAGACCAACAGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAG
GACUACUUAAGAAGAUUCGAGUGCUUUGAUAGCGUGGAAUUAAGCGGCGUGGAGGACAGGUUCAAACGCCAG
CCUGGGCACCUACCACGACUUGUUGAAGAUAAUCAAGACAAGGAUUUCCUGGAUUAUGAGGAGAACGAGG
AUAUACUCGAGGACAUCGUGCUGACUUGGACCCUGUUGAGGACCGAGAGAUGAUUGAAGAAAGGCUCAAA
ACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAAGUGAUGAAACAACUGAAGAGACGAAGAUACACCGGCUGGGGCAG
ACUGUCCAGGAAGCUCAUCAACGGCAUUAAGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAUCCUGGAUUUCCUGAAGU
CCGACGGCUUCGCCAACCGAAACUUAUGCAGCUGAUUCACGAUGACAGCUUGACCUUCAAGGAGGACAUC
CAGAAGGCCCAGGUUAGCGGCCAGGGCGACUCCUGCAGCAACAUUUGCAAACCUGGCAGGCUCCCCUGC
GAUCAAGAAGGGCAUACUGCAGACCGUUAAGGUUGUGGACGAAUUGGUCAAGGUCAUGGGCAGGCACAAGC
CCGAAAACAUAGUUAUAGAGAUGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAAAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAG
CGCAUGAAAAGGAUCGAGGAGGGUAUCAAGGAACUCGGAAGCCAGAUCCUCAAGAGCACCCCCUGGAGAA
UACCCAGCUCCAGAACGAGAAGCUGUACCUUGUACUACCUUGCAGAACGGCAGGGACAUGUACGUUGACCAGG
AGUUGGACAUCAACAGGCUUUCAGACUAUGACGUGGAUCACAUAGUGCCCCAGAGCUUUCUUAAGACGAU
AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACCCGCUCCGACAAAACAGGGGCAAAAGCGACAACGUGCCAAGCGAAGA
GGUGGUUAAAAAGAUAGAAGACUACUGGAGGCAACUGCUCAACGCGAAAUUGAUCACCCAGAGAAAGUUCG
AUAACCUGACCAAGGCCGAGAGGGCGGACUCUCCGAACUUGACAAAGCGGGCUUCAUAAAGAGGCAGCUG
GUCGAGACCCGACAGAUACGAAGCACGUGGCCCAAUCCUCGACAGCAGAAUGAAUACCAAGUACGAUGA

10

20

30

40

GAAUGACAAACUCAUCAGGGAAGUGAAAGUGAUUACCCUGAAGAGCAAGUUGGUGUCCGACUUUCGCAAAG
 AUUUCAGUUCUACAAGGUGAGGGGAGAUCAACAACUACCACCAUGCCCACGACGCAUACCUGAACGCCGUG
 GUCGGCACCGCCCUGAUUAGAAGUAUCCAAAGCUGGAGUCCGAAUUUGUCUACGGCGACUACAAAGUUUA
 CGAUGUGAGGAAGAUGAUCGCUAAGAGCGAACAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCUAAGUAUUUCUUCUACA
 GCAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACCGAGAUACACUUGCCAACGGCGAAAUCAGGAAGAGGCCGCUUAUC
 GAGACCAACGGUGAGACCGGCGAGAUUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCCACCGUGAGGAAAGUCCU
 GAGCAUGCCCCAGGUGAAUAUUGUGAAAAAACUGAGGUGCAGACAGGCGGCUUAGCAAGGAAUCCAUC
 UGCCCCAAGAGGAACAGCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCUAAGAAGUAUGGAGGCUUC
 GACAGCCCCACCGUAGCCUACAGCGUGCUGGUGGUCGCGAAGGUAGAGAAGGGGAAGAGCAAGAAACUGAA
 GAGCGUGAAGGAGCUGCUCGGCAUAACCAUCAUGGAGAGGUCCAGCUUUGAGAAGAACCCCAUUGACUUUU
 UGGAAGCCAAGGGCUACAAAGAGGUCAAAAAGGACCUGAUCAUCAAACUCCCCAAGUACUCCUGUUUGAA
 UUGGAGAACGGCAGAAAGAGGAUGCUGGCGAGCGCUGGGGAACUGCAAAAGGGCAACGAACUGGCGCUGCC
 CAGCAAGUACGUGAAUUUCUGUACCUGGCGUCCCACUACGAAAAGCUGAAAGGCAGCCCCGAGGACAACG
 AGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCAUUAACUGGACGAGAUAAUCGAGCAAAUCAGCGAGUUC
 AGCAAGAGGGUGAUUCUGGCGGACGCGAACCUGGAUAAGGUCCUCAGCGCCUACAACAAGCACCAGACAA
 ACCCAUCAGGGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUACACCUUGUUCACCCUGACAAUUCUGGGCGCACCUGCGGCAU
 UCAAAUACUUCGAUACCACCAUCGACAGGAAAAGGUACACUAGCACUAAGGAGGUGCUGGAUGCCACCUUG
 AUCCACCAGUCCAUUACCGGCCUGUAUGAGACCAGGAUCGACCUGAGCCAGCUUGGAGGCGACUCUAGGGC
 GGACCCAAAAAAGAAAAGGAAGGUGGAUUAUCCACCACACUGGACUAGUGGAUCCGAGCUCGGUACCAAGCU
 UAAGUUUAAACCGCUGAUCAGCCUCGACUGUGCCUUCUAGUUGCCAGCCAUCUGUUGUUUGCCCCUCCCC
 GUGCCUUCUUGACCCUGGAAGGUGCCACUCCCACUGUCCUUUCCUAUAAAUGAGGAAUUGCAUCGCA
 UUGUCUGAGUAGGUGUCAUUCUAVUCUGGGGGGUGGGGUGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAUUGGGAAG
 ACAAUAGCAGGCAUGCUGGGGAUGCGGUGGGCUCUAUGGC

10

20

ーポリA

【0143】

実施例12

以下の実施例は、非修飾IVTs gRNAと比較した場合に、本発明の切断され、化学修飾されたcrRNA：tracrRNA複合体により哺乳類細胞内の自然免疫系の低減された刺激を実証する。

【0144】

哺乳類細胞は、抗ウイルス免疫の一部として外来RNAを特定し、応答することが意図される種々の受容体を有する。これには、TLR-3、TLR-7、TLR8、RIG-I、MDA5、OAS、PKR等の受容体が含まれる。広義には、短いかまたは哺乳類細胞に存在する化学修飾を含有するRNA（2'OMe RNA等）は、検出を回避するか、または長い非修飾RNAより低い刺激性である。本実施例は、商用IVTs gRNA（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）を用いて、哺乳類HEK293細胞が、本発明の切断された非修飾または切断された修飾crRNA：tracrRNA複合体で形質移入される場合の、2つの免疫応答関連遺伝子（IFI1及びIFI1M1）の刺激のレベルを比較する。

30

【0145】

ヒトHPRT1部位38285に特異的なCRISPRガイドRNAを用いた。配列を以下の表11に示す。非修飾crRNA：tracrRNA複合体（配列番号48及び2）（配列番号178及び100）、ならびにsgRNA（配列番号414）を、上記実施例2に概説される通り、HEK-Cas9細胞に30nM濃度で形質移入した。SV96全RNA単離キット（Promega, Madison, WI）を使用して、形質移入の24時間後にRNAを調製した。ランダム六量体及びオリゴdTプライミングの両方を使用し、製造元の指示に従って、SuperScript（商標）-II逆転写酵素（Invitrogen, Carlsbad, CA）と共に150ngの全RNAを使用することによりcDNAを合成した。形質移入実験は、全て最低3回行った。

40

【0146】

Immolase（商標）DNAポリメラーゼ（Bioline, Randolph,

50

MA)、200 nMプライマー、及び200 nMプローブを用い、10 µL反応当たり10 ngのcDNAを使用して、定量的リアルタイムPCRを行った。用いられたサイクル条件は、以下の通りであった。95℃で10分間、続いて95℃で15秒間及び60℃で1分間の2ステップPCRを40サイクル。ABI Prism (商標) 7900 配列検出器 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) を使用して、PCR及び蛍光測定を行った。全ての反応は、2色多重化を使用して3回行った。発現データを、2つの内在性コントロール遺伝子の平均に対して正規化した。コピー数標準を線形化し、全てのアッセイに関して増幅産物をクローン化した。不明なものは、標準に対して外挿法によって推定し、絶対定量測定を確立した。ハウスキーピング内在性コントロール正規化アッセイは、HPRT1 (プライマー及びプローブ配列番号415～417) 及びSFRS9 (プライマー及びプローブ配列番号418～420) であった。免疫活性化経路アッセイは、IFITM1 (プライマー及びプローブ配列番号421～423)、IFIT1 (プライマー及びプローブ配列番号424～426) であった。ベースラインとして非形質移入細胞を使用して、これらの結果を正規化し、図13に示す。

10

【0147】

【表 11】

表 11. 実施例 12 における免疫活性化実験で用いられた核酸試薬。

配列番号	試薬	配列
48	非修飾 crRNA	c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a u g c u
2	非修飾 tracrRNA	a g c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u
178	修飾 crRNA	<u>c * u * u * a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a</u> <u>g a g c u a u * g * c * u</u>
100	修飾 tracrRNA	<u>a * g * c a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u</u> <u>c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a</u> <u>g u c g g u g c u * u * u</u>
414	IVT sgRNA	p p p - g c u u a u a u c c a a c a c u u c g u g g u u u u a g a g c u a g a a a u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u u g a a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u g c u u u u u u u
415	Hs HP RT F5 17	G A C T T T G C T T T C C T T G G T C A G
416	Hs HP RT R5 91	G G C T T A T A T C C A A C A C T T C G T G G G
1 ¹	Hs HP RT P5 54	F A M - A T G G T C A A G (Z E N) G T C G C A A G C T T G C T G G T - Z E N
418	Hs SF RS9 F 569	T G T G C A G A A G G A T G G A G T
419	Hs SF RS9 R 712	C T G G T G C T T T C T C T C A G G A T A
11 ²	Hs SF RS9 P 644	H E X - T G G A A T A T G (Z E N) C C C T G C G T A A A C T G G A - Z E N
421	Hs IF ITM1 For	C T C T T C T T G A A C T G G T G C T G T C T G
422	Hs IF ITM1 Rev	C A G G A T G A A T C C A A T G G T C A T G A G G
111 ³	Hs IF ITM1 プローブ FAM	F A M - A A G T G C C T G (Z E N) A A C A T C T G G G C C C T G A T T - Z E N

10

20

30

40

配列番号	試案	配列
424	Hs IF IT1 F or	CCATTGTCCTGGATTTAAGCGG
425	Hs IF IT1 R ev	GCCACAAAAAATCACAAGCCA
IV ⁴	Hs IF IT1プロ ーブHEX	HEX-TTTCTTTGC (ZEN) TTCCCCTAAGG CAGGCTG-ZEN

10

¹ 化合物 I は、配列番号 417 - (ZEN) - 配列番号 441 という式を有するオリゴヌクレオチドである。

2 化合物 II は、配列番号 420 - (ZEN) - 配列番号 442 という式を有するオリゴヌクレオチドである。

3 化合物 III は、配列番号 423 - (ZEN) - 配列番号 443 という式を有するオリゴヌクレオチドである。

4 化合物 IV は、配列番号 426 - (ZEN) - 配列番号 444 という式を有するオリゴヌクレオチドである。

オリゴヌクレオチド配列の 5' ~ 3' を示す。大文字 = DNA ; 小文字 = RNA ; 下線 = 2' - O - メチル RNA ; * = ホスホロチオエートヌクレオチド間結合 ; ppp = 三リン酸塩 ; ZEN = ナフチルーアゾ修飾因子、暗色失活剤 ; FAM = 6 - カルボキシフルオレセイン ; HEX = ヘキサクロロフルオレセイン。

20

【0148】

非修飾または化学修飾され、切断された crRNA : tracrRNA 複合体による処置は、ベースラインを超える IFIT1 または IFITM1 発現の検出可能な増加につながらなかった。対照的に、より長い IVT sgRNA による処置は、45 倍の IFITM1 の誘導及び 220 倍の IFIT1 の誘導につながった。故に、sgRNA を使用して、自然免疫系の著しい刺激が起こり、これは、本発明の短い crRNA : tracrRNA 複合体を使用すると不在であった。

30

【0149】

実施例 13

以下の実施例は、哺乳類 CRISPR ゲノム編集適用において高い効率で実行する、新たな高度に修飾された crRNA 及び tracrRNA 組成物を実証するために特に有効であると実施例 6 及び 7 で特定された修飾パターンを組み合わせる。

【0150】

示される通り、化学修飾を有する一連の crRNA 及び tracrRNA (表 12) を合成した。crRNA は、3' 末端の 16 塩基 tracrRNA 結合ドメインと共に、5' 末端でヒト HPRT1 遺伝子 (38285) 内の同じ部位を標的とする 20 塩基プロトスペーサードメインを用いた。67 個のヌクレオチドまたは 62 個のヌクレオチドが切断されたバージョンの tracrRNA 配列を使用して、示される通り、化学修飾を有する tracrRNA を合成した。表 12 に列挙された crRNA 及び tracrRNA を、示される通り対合させて、30 nM の濃度で HEK-Cas9 細胞に形質移入し、前述の実施例に記載される通り処理した。断片アナライザーを使用して行われる産物の定量的測定と共に、T7E1 ミスマッチエンドヌクレアーゼ切断アッセイを使用して、HPRT1 遺伝子内の切断率を比較することにより、相対遺伝子編集活性を評価した。

40

【0151】

【表 1 2】

表 1 2 : Cas 9 媒介型遺伝子編集を哺乳類細胞内で指向する高度に修飾された cr RNA : tracrRNA 複合体の活性。

cr / tra crR NA 対	配列 番号	cr RNA 配列	切断 %
		tracrRNA 配列	
1	448	c <u>*u</u> *u*au <u>au</u> cc <u>aa</u> ca <u>ca</u> cu <u>uc</u> gug <u>gu</u> uuuagag <u>cu</u> au* <u>g</u> *c <u>*u</u>	57
	2	ag <u>ca</u> uag <u>ca</u> ag <u>uu</u> aaaa <u>ua</u> agg <u>cu</u> ag <u>uc</u> cg <u>uu</u> au <u>ca</u> ac <u>u</u> gaa aaagug <u>gc</u> ac <u>cg</u> ag <u>uc</u> cgug <u>cu</u> uu	
2	448	c <u>*u</u> *u*au <u>au</u> cc <u>aa</u> ca <u>ca</u> cu <u>uc</u> gug <u>gu</u> uuuagag <u>cu</u> au* <u>g</u> *c <u>*u</u>	58
	100	<u>a</u> * <u>g</u> * <u>ca</u> uag <u>ca</u> ag <u>uu</u> aaaa <u>ua</u> agg <u>cu</u> ag <u>uc</u> cg <u>uu</u> au <u>ca</u> ac <u>u</u> g aaaaagug <u>gc</u> ac <u>cg</u> ag <u>uc</u> cgug <u>cu</u> * <u>u</u> * <u>u</u>	
3	48	cuuauaucc <u>aa</u> ca <u>ca</u> cu <u>uc</u> gug <u>gu</u> uuuagag <u>cu</u> au <u>gc</u> u	58
	449	a* <u>g</u> * <u>ca</u> uag <u>ca</u> ag <u>uu</u> aaaa <u>ua</u> agg <u>cu</u> ag <u>uc</u> cg <u>uu</u> au <u>ca</u> ac <u>u</u> g aaaaagug <u>gc</u> ac <u>cg</u> ag <u>uc</u> cgug <u>cu</u> * <u>u</u> * <u>u</u>	
4	48	cuuauaucc <u>aa</u> ca <u>ca</u> cu <u>uc</u> gug <u>gu</u> uuuagag <u>cu</u> au <u>gc</u> u	57
	450	a* <u>g</u> * <u>ca</u> uag <u>ca</u> ag <u>uu</u> aaaa <u>ua</u> agg <u>cu</u> ag <u>uc</u> cg <u>uu</u> au <u>ca</u> ac <u>u</u> g aaaaagug <u>gc</u> ac <u>cg</u> ag <u>uc</u> cgug <u>cu</u> * <u>u</u> * <u>u</u>	
5	48	cuuauaucc <u>aa</u> ca <u>ca</u> cu <u>uc</u> gug <u>gu</u> uuuagag <u>cu</u> au <u>gc</u> u	65
	451	<u>a</u> * <u>g</u> * <u>ca</u> uag <u>ca</u> ag <u>uu</u> aaaa <u>ua</u> agg <u>cu</u> ag <u>uc</u> cg <u>uu</u> au <u>ca</u> ac <u>u</u> g aaaaagug <u>gc</u> ac <u>cg</u> ag <u>uc</u> cg <u>*g</u> * <u>u</u>	

10

20

30

【0152】

オリゴヌクレオチド配列の 5' ~ 3' を示す。小文字 = RNA、下線 = 2' - O - メチル RNA、小文字斜体 = 2' F RNA ; * = ホスホロチオエートヌクレオチド間結合。各複合体の相対機能的活性は、試験された各用量に関して、T7E1 ヘテロ二重鎖アッセイにおいて切断 % により示される。

【0153】

cr RNA : tracrRNA 対 # 1 及び # 2 は、高度に 2' F RNA 修飾された cr RNA (配列番号 448、22 / 36 残基が修飾された、若しくは 61%) は、非修飾 tracrRNA (配列番号 2)、または高度に 2' OMe 修飾された tracrRNA (配列番号 100) のいずれかと対合された場合、高度に機能的であることを示す。cr RNA : tracrRNA 対 # 3 及び # 4 は、中レベル (配列番号 450、19 / 67 残基が修飾された、若しくは 28%)、または高レベル (配列番号 449、46 / 67 残基が修飾された、若しくは 69%) の 2' F RNA 修飾は、高度に機能的であることを示す。実施例 6 (特に、2' OMe 「ウォーク」、配列番号 144 ~ 162) から得られた情報を使用して、tracrRNA の内部ドメイン内で修飾され得る特定の残基を特定した (図 6 を参照されたい)。cr RNA : tracrRNA 対 # 5 は、この場合、切断された 62 ヌクレオチド設計 (配列番号 451、51 / 62 残基が 2' OMe RNA で修飾された、若しくは 82%) であった極めて高度に修飾された tracrRNA が、哺乳類細胞内で CRISPR ゲノム編集を誘起することにおいて高い能力を有することを実証

40

50

する。したがって、元の 89 RNAヌクレオチド野生型 t r a c r RNA が、本明細書において、わずか 11 個の RNA 残基が残る (11 / 62) 形態に最適化され、それにより、哺乳類自然免疫系の RNA 系活性化の危険性を著しく低減し、t r a c r RNA のヌクレアーゼ感受性 RNA 含有量を最低レベルに低減する。

【0154】

本明細書において引用される刊行物、特許出願、及び特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が、個々にかつ具体的に参照により組み込まれることが示され、その全体が本明細書に記載されているのと同じ程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

【0155】

本発明を説明する文脈における (特に以下の特許請求の範囲の文脈における) 「a」及び「an」及び「the」という用語、ならびに同様の指示語の使用は、本明細書において別途指示しない限りまたは、文脈により明らかに矛盾しない限り、単数及び複数の両方を含むものと解釈される。「含む (comprising)」、「有する」、「含む (including)」、及び「含有する」という用語は、別途記載されない限り、変更可能な用語として解釈される (すなわち、「含むが、これに限定されない」を意味する)。本明細書における値の範囲の列举は、本明細書において別途指示されない限り、その範囲内に含まれる各別個の値を個々に言及することの簡易方法として役立つことが意図されるにすぎず、各別個の値は、それが本明細書において個々に列举されるように、本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書において別途指示されない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、いずれかの適切な順序で行われ得る。本明細書において提供されるいずれの及び全ての実施例、または例示的な言語 (例えば、「等」) の使用は、本発明をより良く説明することが意図されているにすぎず、別途要求されない限り、本発明の範囲に限定を与えるものではない。本明細書におけるいかなる文言も、請求されていないいずれの要素が本発明の実施に必須であるとして示すものと解釈されるべきではない。

【0156】

本発明を実行するために発明者らに既知の最良の形態を含む、本発明の好ましい実施形態が本明細書に記載される。そのような好ましい実施形態の変型は、前述の説明を読むことで当業者には明らかとなり得る。発明者らは、当業者がこのような変型を適切に用いることを期待し、発明者らは、本発明が本明細書に具体的に記載方法とは異なる方法で実施されることを意図する。したがって、本発明は、準拠法により許可される通り、本明細書に添付される特許請求の範囲内に列举される主題の全ての修正及び同等物を含む。更に、上記要素の、それらの全ての可能な変型におけるいずれの組み合わせは、本明細書において別途指示されない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、本発明に包含される。

【図 1】

配列番号
t r a c t r a n a l e (5' ~ 3')
位置 (%)

18	GUUGGACCAUUCUAAACACGCAUGACAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUUUU	38
30	CUAAACAGUAGUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	26
31	AAACAGUAGUAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	32
2	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	57
32	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	47
33	CAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	27
34	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	9
35	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	0
36	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	53
37	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	56
38	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	53
39	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	5
41	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	0
42	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	0
43	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	0
44	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	9
45	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	0
427	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	4

cuuaauccaacacucugugguuuuaga--gcuauugcuguuuuug
|||||
c-ggaauaaaauugacggaucgacaaaaacuuaaccaagguug
u| |
a| |
guccguuaucacuuug
|||| a
|||| a
agccacggugaaa
g | | | | |
ucgugugcuuuuuuu
(配列番号 18)
cuuaauccaacacucugugguuuuaga--gcuag
|||||
|||||
c-ggaauaaaauugacggaucgacgaa
u| |
a| |
guccguuaucacuuug
|||| a
|||| a
agccacggugaaa
g | | | | |
ucgugugcuuuuu
(配列番号 18)

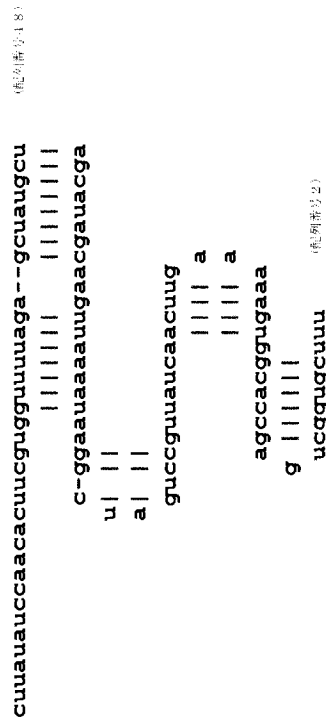
【図 2】

配列番号
c r n a t r a c t r a n a l e (5' ~ 3')
位置 (%)

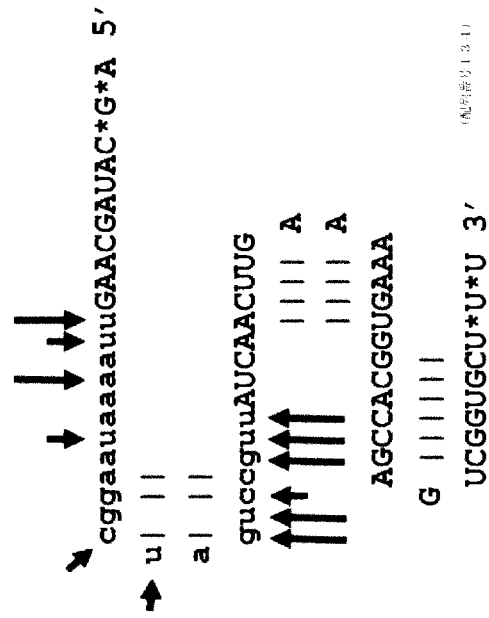
46	CUUUAUCCACACUUCGUGGUGGUUUUAGA--GCUAG	42 塩基 t r n a
47	CUUUAUCCACACUUCGUGGUGGUUUUAGA--GCUAG	39 塩基 c r n a
48	CUUUAUCCACACUUCGUGGUGGUUUUAGA--GCUAG	36 塩基 c r n a
49	CUUUAUCCACACUUCGUGGUGGUUUUAGA--GCUAG	34 塩基 c r n a
18	GUUUGGACCAUUCUAAACACGCAUGACAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	8 塩基 t r a c t r a n a
50	CUUUAUCCACACUUCGUGGUGGUUUUAGA--GCUAG	7 塩基 t r a c t r a n a
51	CUUUAUCCACACUUCGUGGUGGUUUUAGA--GCUAG	70 塩基 t r a c t r a n a
2	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	87 塩基 t r a c t r a n a
52	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	65 塩基 t r a c t r a n a
53	AGCAUAGCAAGUUAAGUUAAGUUAAGGCUUAGUCGUUUAUACACUUGUAAAGUGGACACGAGGUGGCUUUUU	63 塩基 t r a c t r a n a

図 3

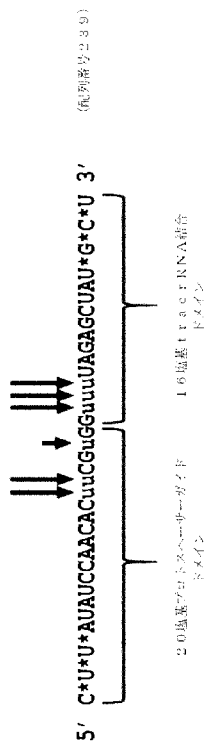
【図 5】



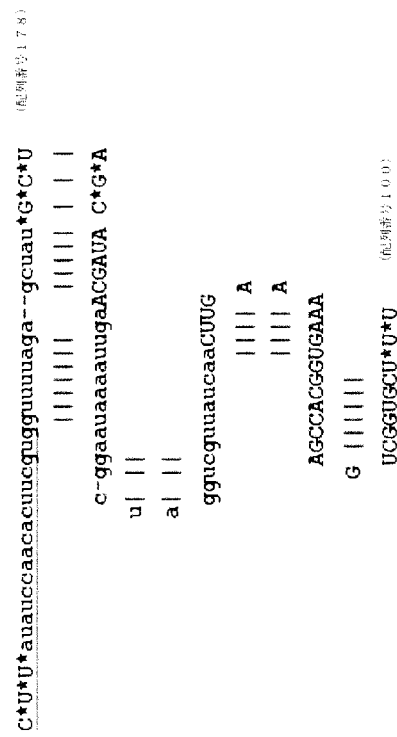
【図 6】



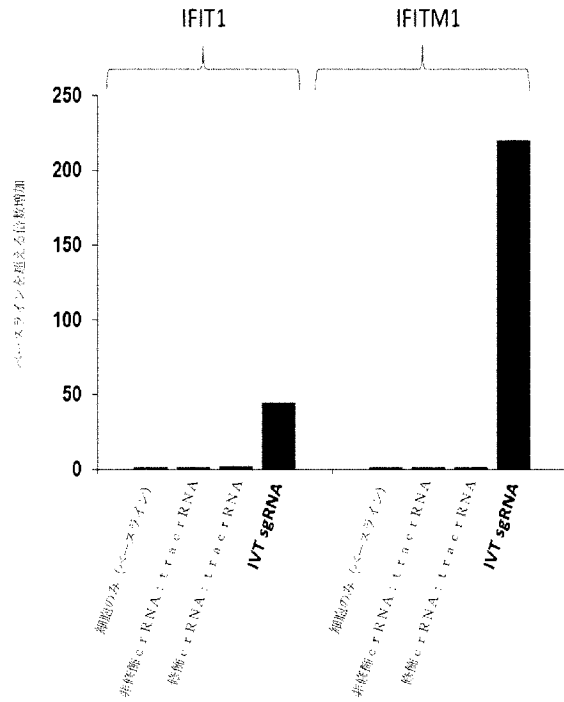
【図 7】



【図 8】



【図 13】



【配列表】

[2017538427000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/066942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. 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, 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	US 2014/273232 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; HARVARD COLLE) 18 September 2014 (2014-09-18) paragraphs [0033], [0039], [0077], [0159]; figure 6; example 1; sequences 39, 150 -----	1-6, 12-14,16
X	WO 2014/144592 A2 (GEN HOSPITAL CORP [US]) 18 September 2014 (2014-09-18) page 25, line 26 - page 26, line 32; sequences 8, 2405-2412 ----- -/--	1-10, 12-14, 16, 18-20,22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"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

16 August 2016

Date of mailing of the international search report

25/08/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Spindler, Mark-Peter

International application No
PCT/US2015/066942

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/066942

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	AYAL HENDEL ET AL: "Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 33, no. 9, 29 June 2015 (2015-06-29), pages 985-989, XP055233915, US ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3290	12-14, 18-20,22
A,P	the whole document	15-17, 21,23
E	----- WO 2016/080097 A1 (NAT UNIV CORP TOKYO MED & DENT [JP]; FASMAC CO LTD [JP]) 26 May 2016 (2016-05-26) tables 1, 2; sequences 5, 7-9 -----	1-3,7-9
E	WO 2016/089433 A1 (AGILENT TECHNOLOGIES INC [US]) 9 June 2016 (2016-06-09) the whole document -----	12-14, 16, 18-20,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/066942

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ US2015/ 066942

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-6

tracrRNA comprising a length-modified form of SEQ ID NO: 18
displaying activity in a CRISPR-Cas system

2. claims: 7-11

crRNA comprising a length-modified form of formula (I) [as
defined in claim 7] displaying activity in a CRISPR-Cas
system

3. claims: 12-23

chemically modified components of a dual guide RNA for the
CRISPR-Cas system; tracrRNA comprising a chemically-modified
form of one of SEQ ID NO: 2, 18, 30-33 and 36-39; crRNA
comprising a chemically-modified form of formula (I) [as
defined in claim 18]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/066942

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014273232 A1	18-09-2014	AU 2013359123 A1	30-07-2015
		CA 2894701 A1	19-06-2014
		CN 105121648 A	02-12-2015
		DK 2771468 T3	26-05-2015
		EP 2771468 A1	03-09-2014
		ES 2536353 T3	22-05-2015
		ES 2542015 T3	29-07-2015
		ES 2553782 T3	11-12-2015
		HK 1202586 A1	02-10-2015
		HK 1209153 A1	24-03-2016
		HK 1209154 A1	24-03-2016
		HK 1210221 A1	15-04-2016
		JP 2016093196 A	26-05-2016
		JP 2016129516 A	21-07-2016
		JP 2016504026 A	12-02-2016
		KR 20150105633 A	17-09-2015
		PT 2771468 E	02-06-2015
		PT 2784162 E	27-08-2015
		PT 2896697 E	31-12-2015
		US 2014242664 A1	28-08-2014
		US 2014273232 A1	18-09-2014
		US 2015232882 A1	20-08-2015
		US 2015247150 A1	03-09-2015
		WO 2014093712 A1	19-06-2014
-----	-----	-----	-----
WO 2014144592 A2	18-09-2014	AU 2014227653 A1	01-10-2015
		AU 2014228981 A1	01-10-2015
		AU 2014239665 A1	01-10-2015
		CA 2906553 A1	25-09-2014
		CA 2906724 A1	18-09-2014
		CA 2907198 A1	18-09-2014
		CN 105247066 A	13-01-2016
		CN 105408483 A	16-03-2016
		CN 105408497 A	16-03-2016
		EP 2970208 A2	20-01-2016
		EP 2970986 A2	20-01-2016
		EP 2971041 A1	20-01-2016
		EP 2971125 A2	20-01-2016
		JP 2016512264 A	25-04-2016
		JP 2016512691 A	09-05-2016
		JP 2016517276 A	16-06-2016
		KR 20150131250 A	24-11-2015
		KR 20150131251 A	24-11-2015
		KR 20150132395 A	25-11-2015
		US 2014295556 A1	02-10-2014
		US 2014295557 A1	02-10-2014
		US 2016010076 A1	14-01-2016
		US 2016024523 A1	28-01-2016
		US 2016024524 A1	28-01-2016
		WO 2014144288 A1	18-09-2014
		WO 2014144592 A2	18-09-2014
		WO 2014144761 A2	18-09-2014
		WO 2014152432 A2	25-09-2014
-----	-----	-----	-----
WO 2014065596 A1	01-05-2014	AU 2013335451 A1	07-05-2015
		AU 2015218519 A1	17-09-2015
		CA 2888190 A1	01-05-2014
		CN 104968784 A	07-10-2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/066942

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 105441440 A	30-03-2016
		EP 2912175 A1	02-09-2015
		HK 1212732 A1	17-06-2016
		JP 2016027807 A	25-02-2016
		JP 2016500003 A	07-01-2016
		KR 20150101446 A	03-09-2015
		KR 20150101476 A	03-09-2015
		KR 20150101477 A	03-09-2015
		KR 20150101478 A	03-09-2015
		SG 11201503059X A	29-06-2015
		US 2015284727 A1	08-10-2015
		US 2015322457 A1	12-11-2015
		US 2015344912 A1	03-12-2015
		WO 2014065596 A1	01-05-2014

WO 2014124226	A1	14-08-2014	US 2016024510 A1
			28-01-2016
			WO 2014124226 A1
			14-08-2014

WO 2016080097	A1	26-05-2016	NONE

WO 2016089433	A1	09-06-2016	NONE

フロントページの続き

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

- (72)発明者 ジャコビ, アシュリー・メイ
アメリカ合衆国、アイオワ・５２３４０、ティフィン、ウッドフィールド・ドライブ・２９５
- (72)発明者 レッティグ, ギャレット・リチャード
アメリカ合衆国、アイオワ・５２２４１、コーラルビル、デンプスター・ドライブ・２４３２
- (72)発明者 シューバート, モリー・スー
アメリカ合衆国、アイオワ・５２４０２、シーダー・ラピッズ、サークル・ヒル・コート・ノース・イースト・３０３１
- (72)発明者 ベールケ, マーク・アーロン
アメリカ合衆国、アイオワ・５２２４１、コーラルビル、ハイランド・パーク・アベニュー・９６
０