

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-519652
(P2016-519652A)

(43) 公表日 平成28年7月7日(2016.7.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/315 (2006.01)	C07K 14/315 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C084
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4H045
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 256 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-501357 (P2016-501357)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月12日 (2014.3.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年10月28日 (2015.10.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/023828
 (87) 国際公開番号 W02014/150624
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014.9.25)
 (31) 優先権主張番号 61/903, 232
 (32) 優先日 平成25年11月12日 (2013.11.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/906, 211
 (32) 優先日 平成25年11月19日 (2013.11.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/907, 216
 (32) 優先日 平成25年11月21日 (2013.11.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515251115
 カリブー・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94710, パークリー, セブンスストリート2929, スイート120
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 アンドリュー・ポール・メイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94121, サンフランシスコ, トゥエンティーナインスアベニュー564

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸ターゲティング核酸の組成物および方法

(57) 【要約】

本開示は、核酸ターゲティング核酸およびそれらの複合体を使用するための組成物および方法を提供する。ゲノム操作とは、特定の核酸配列の欠失、挿入、変異または置換によってゲノムを変更することを意味することができる。変更は、遺伝子または位置特異的であってもよい。ゲノム操作は、核酸を切断し、それによって変更のための部位を生成するためにヌクレアーゼを使用してもよい。非ゲノム核酸の操作も企図する。

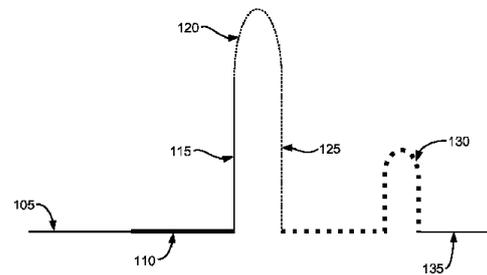


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

2つの複合体が互いに近接しているかどうかを検出するための方法であって、

(a) 第1の標的核酸を第1の複合体と接触させる工程であって、前記第1の複合体は、第1の部位特異的ポリペプチド、第1の改変された核酸ターゲティング核酸および第1のエフェクタータンパク質を含み、前記エフェクタータンパク質は、前記改変された核酸ターゲティング核酸に結合するように適合されており、前記第1のエフェクタータンパク質は、分割システムの第1の部分を含む非天然配列を含む、工程、および

(b) 第2の標的核酸を第2の複合体と接触させる工程であって、前記第2の複合体は、第2の部位特異的ポリペプチド、第2の改変された核酸ターゲティング核酸および第2のエフェクタータンパク質を含み、前記エフェクタータンパク質は、前記改変された核酸ターゲティング核酸に結合するように適合されており、前記第2のエフェクタータンパク質は、分割システムの第2の部分を含む非天然配列を含む、工程を含む前記方法。

10

【請求項 2】

前記分割システムは、個々には活性化されていないが、複合体を形成すると活性のあるタンパク質複合体を生じる2つ以上のタンパク質断片を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記第1の部分と前記第2の部分の間の相互作用を検出する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記検出する工程は、前記第1および第2の複合体が互いに近接していることを示す、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出する工程は遺伝子移動事象の発生を決定することを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

前記遺伝子移動事象は転座を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記遺伝子移動事象の前に、前記分割システムの前記2つの部分は相互作用しない、請求項5に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記遺伝子移動事象の後に、前記分割システムの前記2つの部分は相互作用する、請求項5に記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子移動事象は、BCRとAb1遺伝子の間の転座である、請求項5に記載の方法。

【請求項 10】

前記分割システムは、分割GFPシステム、分割ユビキチンシステム、分割転写因子システムおよび分割親和性タグシステムまたはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択する、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記検出する工程は遺伝子型を示す、請求項3に記載の方法。

【請求項 12】

前記遺伝子型に基づいて疾患の処置の経過を決定することをさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記疾患を処置する工程をさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記処置する工程は、薬物を投与することを含む、請求項13に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記処置する工程は、核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドを含む複合体を投与することを含み、前記複合体は、前記疾患に關与する遺伝子エレメントを改変することができる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

核酸ターゲティング核酸の P - ドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 17】

核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸。

10

【請求項 18】

多重化遺伝子ターゲティング剤を含む組成物であって、前記多重化遺伝子ターゲティング剤は 1 つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、前記核酸モジュールは非天然配列を含み、前記核酸モジュールは、Cas9 のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも 10 % のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに結合するように構成されており、前記核酸モジュールは標的核酸にハイブリダイズするように構成されている前記組成物。

【請求項 19】

改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、野生型部位特異的ポリペプチドと比較して第 2 のプロトスペーサー隣接モチーフを標的とするように適合されているように改変されている前記組成物。

20

【請求項 20】

ドナーポリヌクレオチドをタグ付けした細胞を生成するための方法であって、

(a) 部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体を使用して細胞内で標的核酸を切断する工程、

(b) ドナーポリヌクレオチドを切断した標的核酸に挿入する工程、

(c) 前記ドナーポリヌクレオチドを有する前記細胞を増殖させる工程、および

(d) 前記ドナーポリヌクレオチドをタグ付けした細胞の起源を決定する工程

を含む前記方法。

【請求項 21】

(a) エフェクタータンパク質と、

(b)

(i) 6 つの連続するヌクレオチドにおいて crRNA に対して少なくとも 50 % の配列同一性、

(ii) 6 つの連続するヌクレオチドにおいて tracrRNA に対して少なくとも 50 % の配列同一性、および

(iii) 非天然配列

を含み、

前記エフェクタータンパク質に結合するように適合されている核酸とを含む組成物。

30

【請求項 22】

Cas9 のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも 10 % のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドをさらに含み、前記核酸が前記ポリペプチドに結合する、請求項 21 に記載の組成物。

40

【請求項 23】

前記ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインにおいて Cas9 のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも 60 % のアミノ酸配列同一性を含む、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記ポリペプチドは Cas9 である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記核酸はリンカー配列をさらに含み、前記リンカー配列は、6 つの連続するヌクレオ

50

チドにおいてc r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む前記配列および6つの連続するヌクレオチドにおいてt r a c r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む前記配列とを連結する、請求項21に記載の組成物。

【請求項26】

前記非天然配列は、5'末端および3'末端またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される前記核酸に位置する、請求項21に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、その内容全体を参照により本明細書に組み入れる、2013年5月1日出願の米国特許仮出願第61/818,386号[代理人整理番号44287-710.101]、2013年11月11日出願の米国特許仮出願第61/902,723号[代理人整理番号44287-710.103]、2013年5月1日出願の米国特許仮出願第61/818,382号[代理人整理番号44287-712.101]、2013年7月29日出願の米国特許仮出願第61/859,661号[代理人整理番号44287-712.102]、2013年7月26日出願、米国特許仮出願第61/858,767号[代理人整理番号44287-713.102]、2013年5月10日出願、米国特許仮出願第61/822,002号[代理人整理番号44287-717.101]、2013年6月7日出願、米国特許仮出願第61/832,690号[代理人整理番号44287-719.101]、2013年11月19日出願、米国特許仮出願第61/906,211号[代理人整理番号44287-719.102]、2013年11月5日出願、米国特許仮出願第61/900,311号[代理人整理番号44287-719.103]、2013年7月12日出願、米国特許仮出願第61/845,714号[代理人整理番号44287-721.101]、2013年9月27日出願、米国特許仮出願第61/883,804号[代理人整理番号44287-721.102]、2013年3月14日出願、米国特許仮出願第61/781,598号[代理人整理番号44287-722.101]、2013年11月4日出願、米国特許仮出願第61/899,712号[代理人整理番号44287-727.101]、2013年8月14日出願、米国特許仮出願第61/865,743号[代理人整理番号44287-733.101]、2013年11月22日出願、米国特許仮出願第61/907,777号[代理人整理番号44287-734.101]、2013年11月12日出願、米国特許仮出願第61/903,232号[代理人整理番号44287-751.101]、2013年11月19日出願、米国特許仮出願第61/906,335号[代理人整理番号44287-752.101]、2013年11月21日出願、米国特許仮出願第61/907,216号[代理人整理番号44287-753.101]の恩典を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、A S C I Iフォーマットで電氣的に提出され、その全体を参照によって本明細書に組み入れる、配列表を含む。2014年3月10日作成のこのA S C I Iコピーは、44287-722-601__SeqListと命名され、7,828,964バイトの大きさである。

【背景技術】

【0003】

ゲノム操作とは、特定の核酸配列を欠失すること、挿入すること、変異すること、または置換することによってゲノムを変更することを指し得る。この変更は、遺伝子または位置特異的であり得る。ゲノム操作は、ヌクレアーゼを用いて核酸を切断し、それによって変更の部位を生成する。非ゲノム核酸の操作も企図される。ヌクレアーゼドメインを含むタンパク質は、核酸ターゲティング核酸との複合体を形成することによって標的核酸を結合および切断し得る。一例では、切断は、標的核酸中の二重鎖破壊をもたらし得る。核酸

10

20

30

40

50

は、例えば、内因性の非相同末端連結 (NHEJ) 機構によって修復され得る。さらなる例では、一片の核酸を挿入してもよい。核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドの改変は、ゲノム操作に用いられるべき新しい機能を導入し得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

一態様では、本開示は、操作された核酸ターゲティング核酸であって、核酸ターゲティング核酸の P - ドメインに変異を含む、核酸ターゲティング核酸を提供する。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、核酸ターゲティング核酸の CRISPR 反復と tracrRNA 配列の間の二重鎖の最終の対のヌクレオチドの下流で開始する。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、リンカー配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、CRISPR 反復および tracrRNA 配列を連結する。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、単離された操作された核酸ターゲティング核酸である。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、組換えの操作された核酸ターゲティング核酸である。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、標的核酸にハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、2つの隣接するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、3つの隣接するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、4つの隣接するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、5つの隣接するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、6つまたはそれ以上の隣接するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、二重鎖の最後の対のヌクレオチドの1ヌクレオチド下流で開始する。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、二重鎖の最後の対のヌクレオチドの2ヌクレオチド下流で開始する。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、二重鎖の最後の対のヌクレオチドの3ヌクレオチド下流で開始する。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、二重鎖の最後の対のヌクレオチドの4ヌクレオチド下流で開始する。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、二重鎖の最後の対のヌクレオチドの5ヌクレオチド下流で開始する。いくつかの実施形態では、P - ドメインは、二重鎖の最後の対のヌクレオチドの6ヌクレオチドまたはそれ以上下流で開始する。いくつかの実施形態では、変異は、1つまたはそれ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の変異は、互いに隣接する。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の変異は、互いから隔てられる。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、異なるプロトスペーサー隣接モチーフに対してハイブリダイズすることを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、異なるプロトスペーサー隣接モチーフは、少なくとも4ヌクレオチド含む。いくつかの実施形態では、異なるプロトスペーサー隣接モチーフは、少なくとも5ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、異なるプロトスペーサー隣接モチーフは、少なくとも6ヌクレオチド含む。いくつかの実施形態では、異なるプロトスペーサー隣接モチーフは、少なくとも7つまたはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、異なるプロトスペーサー隣接モチーフは、2つの非隣接領域を含む。いくつかの実施形態では、異なるプロトスペーサー隣接モチーフは、3つの非隣接領域を含む。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも低い解離定数で標的核酸に結合することを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも大きい特異性で標的核酸に結合することを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも、標的核酸中の非特異的配列に対する操作された核酸ターゲティング核酸の結合を低下するように適合されている。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、2つのヘアピンをさらに含む、ここで2つのヘアピンのうちの1つが、6つの連続するヌクレオチドにまたがって CRISPR RNA に対して少なくとも50%同一性を含むポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドと、6つの連続するヌクレオチドにおいて *t r a c r R N A* に対して少なくとも50%同一性を含むポリヌクレオチドの間の二重鎖を含み；ここで2つのヘアピンのうちの1つが第1のヘアピンのうちの3'であり、ここで第2のヘアピンが、操作されたP-ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2のヘアピンは、核酸が標的核酸と接触される場合、脱二重鎖するように適合されている。いくつかの実施形態では、P-ドメインは、操作された核酸ターゲティング核酸の領域を含む第1のポリヌクレオチドとハイブリダイズし、標的核酸を含む第2のポリヌクレオチドにハイブリダイズし、第1のまたは第2のポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、6つの連続するヌクレオチドにおいて *t r a c r R N A* に対して少なくとも50%同一性を含む。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、6つの連続するヌクレオチドにおいて *C R I S P R* 反復に対して少なくとも50%の同一性を含むポリヌクレオチドと、6つの連続するヌクレオチドにおいて *t r a c r R N A* 配列に対して少なくとも50%の同一性を含むポリヌクレオチドの間の二重鎖の下流に位置する。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、プロトスペーサー隣接モチーフを含む。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリペプチドに対して結合するように適合されている。いくつかの実施形態では、変異は、P-ドメインへの1つまたはそれ以上のヌクレオチドの挿入を含む。いくつかの実施形態では、変異は、P-ドメインからの1つまたはそれ以上のヌクレオチドの欠失を含む。いくつかの実施形態では、変異は、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、核酸ターゲティング核酸が異なるプロトスペーサー隣接モチーフに対してハイブリダイズすることを可能にするように構成されている。いくつかの実施形態では、異なるプロトスペーサー隣接モチーフは、5'-NGGNG-3'、5'-NNA A A A W-3'、5'-NNNNGATT-3'、5'-GNNNCNNA-3'、および5'-NNNACA-3'、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるプロトスペーサー隣接モチーフを含む。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも低い解離定数で結合することを可能にするように構成されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも大きい特異性で結合することを可能にするように構成されている。いくつかの実施形態では、変異は、標的核酸中の非特異的配列に対する操作された核酸ターゲティング核酸の結合を、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも低下するように構成されている。

【0005】

一態様では、本開示は、標的核酸を改変するための方法であって、標的核酸を、核酸ターゲティング核酸のP-ドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸と接触させる工程と、標的核酸を改変する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、標的核酸中にドナーポリヌクレオチドを挿入する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸を切断する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸の転写を改変する工程を含む。

【0006】

一態様では、本開示は、核酸ターゲティング核酸のP-ドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0007】

一態様では、本開示は、核酸ターゲティング核酸のP-ドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸；および緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、部位特異的ポリペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、ドナーポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、使用説明書をさらに備える。

【0008】

一態様では、本開示は、核酸ターゲティング核酸のP-ドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸；および緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、部位特異的ポリペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、ドナーポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、使用説明書をさらに備える。

一態様では、本開示は、核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸を提供する。いくつかの実施形態では、バルジは、核酸ターゲティング核酸のCRISPR反復とtracrRNA配列の間の二重鎖内に位置する。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、リンカー配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、CRISPR反復およびtracrRNA配列を連結する。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、単離された操作された核酸ターゲティング核酸である。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、組換えの操作された核酸ターゲティング核酸である。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも1つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および1つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも1つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および少なくとも2つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも1つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および少なくとも3つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも1つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および少なくとも4つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも1つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および少なくとも5つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも2つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および1つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも3つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および少なくとも2つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも4つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および少なくとも3つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、少なくとも5つの不对のヌクレオチドをCRISPR反復上に、および少なくとも4つの不对のヌクレオチドをtracrRNA配列上に含む。いくつかの実施形態では、バルジは、tracrRNA配列上の少なくとも1つのヌクレオチドとの不安定な対を形成するように適合されている、CRISPR反復上の少なくとも1つのヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、変異は、1つまたはそれ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の変異は互いに隣接される。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の変異は、互いから隔てられる。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、異なる部位特異的ポリペプチドに結合することを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、異なる部位特異的ポリペプチドは、Cas9の相同体である。いくつかの実施形態では、異なる部位特異的ポリペプチドは、Cas9の変異されたバージョンである。いくつかの実施形態では、異なる部位特異的ポリペプチドは、RuvCヌクレアーゼドメイン、およびHNHヌクレアーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるヌクレアーゼドメイン中でCas9に対して10%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が異なるプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、部位特異的ポリペプチドに対して、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも低い解離定数で結合することを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、部位特異的ポリペプチドに対して、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも大きい特異性で結合することを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が部位特異的ポリペプチドを指向して、標的核酸を操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも大きい特異性で切断することを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも、操作された核酸ターゲティング核酸の標的核酸中の非特異的配列に対する結合を低下するように適合され

10

20

30

40

50

ている。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、標的核酸に対してハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、変異は、バルジへの1つまたはそれ以上のヌクレオチドの挿入を含む。いくつかの実施形態では、変異は、バルジからの1つまたはそれ以上のヌクレオチドの欠失を含む。いくつかの実施形態では、変異は、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、操作されていない核酸ターゲティング核酸と比較して、異なるプロトSpacer隣接モチーフに対してハイブリダイズすることを可能にするように構成されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも低い解離定数で部位特異的ポリペプチドに対して結合することを可能にするように構成されている。いくつかの実施形態では、変異は、操作された核酸ターゲティング核酸が、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも大きい特異性で部位特異的ポリペプチドに対して結合することを可能にするように構成されている。いくつかの実施形態では、変異は、標的核酸中の非特異的配列に対する操作された核酸ターゲティング核酸の結合を、操作されていない核酸ターゲティング核酸よりも低減するように構成されている。

10

20

30

40

50

【0009】

一態様では、本開示は、標的核酸を改変するための方法であって、標的核酸を、核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸と接触させる工程と；標的核酸を改変する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、ドナーポリヌクレオチドを標的核酸に挿入する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸を切断する工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸の転写を改変する工程を含む。

【0010】

一態様では、本開示は、核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター；および標的核酸を改変する工程を提供する。

【0011】

一態様では、本開示は、核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸および標的核酸を改変する工程；および緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、部位特異的ポリペプチドをさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは、ドナーポリヌクレオチドをさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

【0012】

一態様では、本開示は、ドナーポリヌクレオチドをタグ付けした細胞を生成するための方法であって、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体を用いて細胞中で標的核酸を切断する工程と、ドナーポリヌクレオチドを切断された標的核酸中に挿入する工程と、ドナーポリヌクレオチドを担持する細胞を増殖する工程と、ドナーポリヌクレオチドをタグ付けした細胞の起源を決定する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、*in vivo*で行われる。いくつかの実施形態では、方法は、*in vitro*で行われる。いくつかの実施形態では、方法は、インサイチュで行われる。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、細胞のある集団を生成する。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、細胞株を生じる。いくつかの実施形態では、方法は、細胞中で核酸の核酸配列を決定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、核酸配列は、細胞の起源を決定する。いくつかの実施形態では、決定する工程は、細胞の遺伝子型を決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、細胞を分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、細胞を脱分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、細胞を分化する工程、次いで細胞を脱分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、細胞を継代する工程を含む。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、細胞が分裂することを誘導する工程を含む。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、細胞が細胞周期に入るように誘導する工

程を含む。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、転移を形成する細胞を含む。いくつかの実施形態では、増殖する工程は、多能性細胞を分化した細胞に分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、分化した細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、脱分化した細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、真核生物細胞株である。いくつかの実施形態では、細胞は、初代細胞株である。いくつかの実施形態では、細胞は、患者由来の細胞株である。いくつかの実施形態では、方法は、生物体へ細胞を移植する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、生物体は、ヒトである。いくつかの実施形態では、生物体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、生物体は、ヒト、イヌ、ラット、マウス、ニワトリ、魚、ネコ、植物および霊長類からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、方法は、細胞を選択する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは、1つの細胞状態で発現される標的核酸に挿入される。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは、複数の細胞型で発現される標的核酸中に挿入される。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは、多能性状態で発現される標的核酸中に挿入される。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは、分化した状態で発現される標的核酸に挿入される。

10

20

30

40

50

【0013】

一態様では、本開示は、クローンとして増殖された細胞株を作成するための方法であって、細胞中に、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体を導入する工程と、複合体を標的核酸に接触させる工程と、標的核酸を切断する工程であって、切断は複合体によって行われる、工程と、それによって切断された標的核酸を生成する工程と、ドナーポリヌクレオチドを切断された標的核酸に挿入する工程と、細胞を増殖する工程であって、増殖する工程によってクローンとして増殖された細胞株が生じる、工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、293-T細胞、褐色細胞腫、神経芽細胞腫線維芽細胞、横紋筋肉腫、後根神経節細胞、NSO細胞、CV-1(ATCC CCL70)、COS-1(ATCC CRL1650)、COS-7(ATCC CRL1651)、CHO-K1(ATCC CCL61)、3T3(ATCC CCL92)、NIH/3T3(ATCC CRL1658)、HeLa(ATCC CCL2)、C1271(ATCC CRL1616)、BS-C-1(ATCC CCL26)、MRC-5(ATCC CCL171)、L細胞、HEK-293(ATCC CRL1573)およびPC12(ATCC CRL-1721)、HEK293T(ATCC CRL-11268)、RBL(ATCC CRL-1378)、SH-SY5Y(ATCC CRL-2266)、MDCK(ATCC CCL-34)、SJ-RH30(ATCC CRL-2061)、HepG2(ATCC HB-8065)、ND7/23(ECACC 92090903)、CHO(ECACC 85050302)、Vera(ATCC CCL81)、Caco-2(ATCC HTB 37)、K562(ATCC CCL243)、Jurkat(ATCC TIB-152)、Per.Co、Huvec(ATCCヒト初代PCS100-010)、マウスCRL2514、CRL2515、CRL2516)、HuH-7D12(ECACC01042712)、293(ATCC CRL10852)、A549(ATCC CCL185)、IMR-90(ATCC CCL186)、MCF-7(ATC HTB-22)、U-2OS(ATCC HTB-96)、およびT84(ATCC CCL248)、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は分化した細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は多能性細胞である。

【0014】

一態様では、本開示は、多重の細胞型解析のための方法であって、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体を用いて2つまたはそれ以上の細胞中で少なくとも1つの標的核酸を切断して、2つの切断された標的核酸を作成する工程、異なるドナーポリヌクレオチドを各々の切断された標的核酸に挿入する工程、および2つまた

はそれ以上の細胞を分析する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、分析する工程は、2つまたはそれ以上の細胞を同時に分析する工程を含む。いくつかの実施形態では、分析する工程は、標的核酸の配列を決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、分析する工程は、2つまたはそれ以上の細胞を比較する工程を含む。いくつかの実施形態では、分析する工程は、2つまたはそれ以上の細胞の遺伝子型を決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、細胞は分化した細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は脱分化した細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は真核生物細胞株である。いくつかの実施形態では、細胞は初代細胞株である。いくつかの実施形態では、細胞は、患者由来の細胞株である。いくつかの実施形態では、複数のドナーポリヌクレオチドは、細胞中の複数の切断された標的核酸に挿入される。

10

【0015】

一態様では、本開示は、3'ハイブリダイズ伸長を含む操作された核酸ターゲティング核酸と、3'ハイブリダイズ伸長に対してハイブリダイズされるドナーポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、3'ハイブリダイズ伸長は、ドナーポリヌクレオチドの5'から少なくとも5ヌクレオチドにハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、3'ハイブリダイズ伸長は、ドナーポリヌクレオチド中の少なくとも5つの隣接するヌクレオチドに対してハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、3'ハイブリダイズ伸長は、ドナーポリヌクレオチドの全てに対してハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、3'ハイブリダイズ伸長は、逆転写鋳型を含む。いくつかの実施形態では、逆転写鋳型は、逆転写酵素によって逆転写されるように適合されている。いくつかの実施形態では、組成物は、逆転写されたDNAポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、逆転写されたDNAポリヌクレオチドは、逆転写鋳型にハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドはDNAである。いくつかの実施形態では、3'ハイブリダイズ伸長はRNAである。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、単離された操作された核酸ターゲティング核酸である。いくつかの実施形態では、操作された核酸ターゲティング核酸は、組換えの操作された核酸ターゲティング核酸である。

20

【0016】

一態様では、本開示は、標的核酸中にドナーポリヌクレオチドを導入するための方法であって、標的核酸を、3'ハイブリダイズ伸長を含む操作された核酸ターゲティング核酸およびドナーポリヌクレオチドを含む組成物と接触させる工程であって、ドナーポリヌクレオチドが3'ハイブリダイズ伸長にハイブリダイズされる工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、標的核酸を切断して、切断された標的核酸を生成する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、切断する工程は、部位特異的ポリペプチドによって行われる。いくつかの実施形態では、方法は、ドナーポリヌクレオチドを切断された標的核酸に挿入する工程をさらに含む。

30

【0017】

一態様では、本開示は、エフェクタータンパク質と、crRNAに対して6つの連続するヌクレオチドにおいて少なくとも50%の配列同一性、tracrRNAに対して6つの連続するヌクレオチドにおいて少なくとも50%の配列同一性；および非天然配列を含み、エフェクタータンパク質に結合するように適合されている核酸とを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドをさらに含み、ここで核酸は、ポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して、ヌクレアーゼドメイン中で少なくとも60%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、Cas9である。いくつかの実施形態では、核酸は、リンカー配列をさらに含み、ここでリンカー配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列お

40

50

よび6つの連続するヌクレオチドにおいて *t r a c r R N A* に対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列を連結する。いくつかの実施形態では、非天然配列は、5'末端および3'末端、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される核酸の一部に位置する。いくつかの実施形態では、核酸は、2つの核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、単一の連続の核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、非天然配列は、*C R I S P R R N A* 結合タンパク質結合配列を含む。いくつかの実施形態では、非天然配列は、*C a s 5 R N A* 結合配列、*C a s 6 R N A* 結合配列、および *C s y 4 R N A* 結合配列、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される結合配列を含む。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、*C R I S P R R N A* 結合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、*C a s 5*、*C a s 6*、および *C s y 4*、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるタンパク質に対して少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質のRNA結合ドメインは、*C a s 5*、*C a s 6*、および *C s y 4*、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるタンパク質のRNA結合ドメインに対して少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、*C a s 5*、*C a s 6*、および *C s y 4*、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、1つまたはそれ以上の非天然配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、非天然配列は、エフェクタータンパク質に対して酵素活性を付与する。いくつかの実施形態では、酵素活性は、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチル化活性、脱アセチル化活性、ユビキチン化活性、脱ユビキチン化活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、トランスポーゼース活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、リモデリング活性、プロテアーゼ活性、酸化還元酵素活性、トランスフェラーゼ活性、加水分解酵素活性、リアーゼ活性、イソメラーゼ活性、シンターゼ活性、シンテターゼ活性、および脱ミリストイル化活性、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、核酸はRNAである。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、RNA結合タンパク質およびDNA結合タンパク質を含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、ドナーポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは、DNA結合タンパク質に直接結合され、かつここでRNA結合タンパク質は、核酸ターゲティング核酸に結合される。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドの5'末端は、DNA結合タンパク質に結合される。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドの3'末端は、DNA結合タンパク質に結合される。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドの少なくとも5ヌクレオチドが、DNA結合タンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、核酸は単離された核酸である。いくつかの実施形態では、核酸は組換えの核酸である。

【0018】

一態様では、本開示は、ドナーポリヌクレオチドを標的核酸に導入するための方法であって、標的核酸を、部位特異的ポリペプチドとエフェクタータンパク質および核酸を含む組成物とを含む複合体と接触させる工程であって、核酸は、6つの連続するヌクレオチドについて *c r R N A* に対して少なくとも50%の配列同一性、6つの連続するヌクレオチドにおいて *t r a c r R N A* に対して少なくとも50%の配列同一性；および非天然配列を含み、核酸は、エフェクタータンパク質に結合するように適合されている、工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、標的核酸を切断する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、切断する工程は、部位特異的ポリペプチドによって行われる。いくつかの実施形態では、方法は、ドナーポリヌクレオチドを標的核酸に挿入する工

程をさらに含む。

【0019】

一態様では、本開示は、標的核酸を調整するための方法であって、標的核酸を1つまたはそれ以上の複合体と接触させる工程であって、各々の複合体が部位特異的ポリペプチド、ならびにエフェクタータンパク質と、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性、6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性；および非天然配列を含み、エフェクタータンパク質に結合するように適合されている核酸と含む組成物を含む、工程、ならびに標的核酸を調整する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、調整する工程は、エフェクタータンパク質によって行われる。いくつかの実施形態では、調整する工程は、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチル化活性、脱アセチル化活性、ユビキチン化活性、脱ユビキチン化活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、トランスポーゼース活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性、リモデリング活性、プロテアーゼ活性、酸化還元酵素活性、トランスフェラーゼ活性、加水分解酵素活性、リアーゼ活性、イソメラーゼ活性、シンターゼ活性、シンテターゼ活性、および脱ミリスチル化活性、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される活性を含む。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は1つまたはそれ以上のエフェクタータンパク質を含む。

10

20

【0020】

一態様では、本開示は、2つの複合体が互いに対して近位であるか否かを決定するための方法であって、第1の標的核酸を第1の複合体と接触させる工程であって、第1の複合体は、第1の部位特異的ポリペプチド、第1の改変された核酸ターゲティング核酸、および第1のエフェクタータンパク質を含み、ここでエフェクタータンパク質は、改変された核酸ターゲティング核酸に結合するように適合されており、ここで第1のエフェクタータンパク質は、分割システムの第1の部分を含む非天然配列を含む、工程と、第2の標的核酸を第2の複合体と接触させる工程であって、第2の複合体は、第2の部位特異的ポリペプチド、第2の改変された核酸ターゲティング核酸、および第2のエフェクタータンパク質を含み、ここでエフェクタータンパク質は、改変された核酸ターゲティング核酸に結合するように適合されており、ここで第2のエフェクタータンパク質は、分割システムの第2の部分を含む非天然配列を含む、工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1の標的核酸および第2の標的核酸は、同じポリヌクレオチドポリマー上にある。いくつかの実施形態では、分割システムは、個々には活性ではないが、複合体に形成された場合、活性なタンパク質複合体を生じる2つまたはそれ以上のタンパク質フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1の部分と第2の部分の間の相互作用を検出する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、検出する工程は、第1のおよび第2の複合体が互いに近位であることを示す。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、標的核酸を切断できないように適合されている。いくつかの実施形態では、検出する工程は、遺伝子移動事象の発生を決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子移動事象は、転座を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子移動事象の前に、分割システムの2つの部分は、相互作用しない。いくつかの実施形態では、遺伝子移動事象の後に、分割システムの2つの部分は、相互作用する。いくつかの実施形態では、遺伝子移動事象は、BCR遺伝子とAb1遺伝子の間の転座である。いくつかの実施形態では、その相互作用は、分割システムを活性化する。いくつかの実施形態では、相互作用は、複合体によって結合される標的核酸がすぐ近くであることを示す。いくつかの実施形態では、分

30

40

50

割システムは、分割GFPシステム、分割ユビキチンシステム、分割転写因子システム、および分割親和性タグシステム、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、分割システムは、分割GFPシステムを含む。いくつかの実施形態では、検出する工程は、遺伝子型を示す。いくつかの実施形態では、方法は、遺伝子型に基づいて疾患の処置の経過を決定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、疾患を処置する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、処置する工程は、薬物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、処置する工程は、核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドを含む複合体を投与することを含み、複合体は、疾患に關与する遺伝子エレメントを改変することができる。いくつかの実施形態では、改変する工程は、核酸配列を遺伝子エレメントに追加する工程、遺伝子エレメントにおける核酸配列を置き換える工程、および遺伝子エレメントから核酸配列を欠失させる工程、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、方法は、介護者から患者に遺伝子型を連絡する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、連絡する工程は、記憶メモリシステムから遠隔のコンピュータへ連絡する工程を含む。いくつかの実施形態では、検出する工程は疾患を診断する。いくつかの実施形態では、方法は、診断を介護者から患者に連絡する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、検出する工程は、一塩基多型(SNP)の存在を示す。いくつかの実施形態では、方法は、遺伝子移動事象の発生を介護者から患者へ連絡する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、連絡する工程は、記憶メモリシステムから遠隔のコンピュータへ連絡する工程を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9に対して少なくとも20%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9に対して少なくとも60%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して、ヌクレアーゼドメイン中で少なくとも60%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9である。いくつかの実施形態では、改変された核酸ターゲティング核酸は、非天然配列を含む。いくつかの実施形態では、非天然配列は、5'末端、および3'末端、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される改変された核酸ターゲティング核酸の一部に配置される。いくつかの実施形態では、改変された核酸ターゲティング核酸は、2つの核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、6つの連続するヌクレオチドにおいてCRISPR反復に対して少なくとも50%の同一性を含む第1の部分、および6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNA配列に対して少なくとも50%の同一性を含む第2の部分を含む単一の連続の核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、第1の部分および第2の部分は、リンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、非天然配列は、CRISPR RNA結合タンパク質結合配列を含む。いくつかの実施形態では、非天然配列は、Cas5 RNA結合配列、Cas6 RNA結合配列、およびCsy4 RNA結合配列、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される結合配列を含む。いくつかの実施形態では、改変された核酸ターゲティング核酸は、エフェクタータンパク質に結合するように適合されている。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、CRISPR RNA結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、Cas5、Cas6、およびCsy4、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるタンパク質に対して少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質のRNA結合ドメインは、Cas5、Cas6、およびCsy4、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるタンパク質のRNA結合ドメインに対して少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、Cas5、Cas6、およびCsy4、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸はRNAである。いくつかの実施形態では、標的核酸はDNAである。いくつかの実施形態では、相互作用は、親和性タグを形成する工程を含む。いくつかの実施形態では、検出する工程は、親和性タグを捕捉する工程を含む。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、方法は、第1のおよび第2の複合体に対して結合した核酸を配列決定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、捕捉の前に核酸を断片化する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、相互作用は、活性化されたシステムを形成する。いくつかの実施形態では、方法は、第1の標的核酸または第2の標的核酸の転写を変更する工程をさらに含み、ここで変更は、活性化されたシステムによって行われる。いくつかの実施形態では、第2の標的核酸は、第1の標的核酸には結合されない。いくつかの実施形態では、第2の標的核酸の転写を変更する工程は、トランスで行われる。いくつかの実施形態では、第1の標的核酸の転写を変更する工程は、シスで行われる。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2の標的核酸は、内因性の核酸、および外因性の核酸、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、変更する工程は、第1のまたは第2の標的核酸の転写を増大する工程を含む。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2の標的核酸は、細胞死を生じる1つまたはそれ以上の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2の標的核酸は、細胞溶解誘導性ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2の標的核酸は、免疫細胞補充性抗原をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2の標的核酸は、アポトーシスに關与する1つまたはそれ以上の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、アポトーシスに關与する1つまたはそれ以上の遺伝子は、カスパーゼを含む。いくつかの実施形態では、アポトーシスに關与する1つまたはそれ以上の遺伝子は、サイトカインを含む。いくつかの実施形態では、アポトーシスに關与する1つまたはそれ以上の遺伝子は、腫瘍壊死因子(TNF)、TNF受容体1(TNFR1)、TNF受容体2(TNFR2)、Fas受容体、FasL、カスパーゼ-8、カスパーゼ-10、カスパーゼ-3、カスパーゼ-9、カスパーゼ-3、カスパーゼ-6、カスパーゼ-7、Bcl-2、およびアポトーシス誘導性因子(AIF)、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2の標的核酸は、1つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸は、複数の標的核酸を標的とする。いくつかの実施形態では、検出する工程は、遺伝的データを生成する工程を含む。いくつかの実施形態では、方法は、遺伝的データを記憶メモリシステムから遠隔のコンピュータへ連絡する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝的データは、遺伝子型を示す。いくつかの実施形態では、遺伝的データは、遺伝子移動事象の発生を示す。いくつかの実施形態では、遺伝的データは遺伝子の空間的位置を示す。

【0021】

一態様では、本開示は、部位特異的ポリペプチド、非天然配列を含む改変された核酸ターゲティング核酸、非天然配列に結合するように適合されているエフェクタータンパク質、および緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、使用説明書をさらに備える。

【0022】

一態様では、本開示は、改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸は非天然配列を含む、前記ベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。

【0023】

一態様では、本開示は、改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸がエフェクタータンパク質および部位特異的ポリペプチドに結合するように構成された配列を含む、前記ベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、プロモーターに対して作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。

10

20

30

40

50

【0024】

一態様では、本開示は、非天然配列を含む改変された核酸ターゲティング核酸、部位特異的ポリペプチド、およびエフェクタータンパク質をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、プロモーターに対して作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。

【0025】

一態様では、本開示は、エフェクタータンパク質と、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性、6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性；および非天然配列を含む、エフェクタータンパク質に結合するように適合されている核酸とを含む組成物を含む遺伝子的に改変された細胞を提供する。

10

【0026】

一態様では、本開示は、改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを含む遺伝的に改変された細胞であって、改変された核酸ターゲティング核酸が非天然配列を含む、細胞を提供する。

【0027】

一態様では、本開示は、改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを含む遺伝的に改変された細胞であって、改変された核酸ターゲティング核酸は、エフェクタータンパク質、および部位特異的ポリペプチドに結合するように構成されている配列を含む、細胞を提供する。

20

【0028】

一態様では、本開示は、非天然配列を含む改変された核酸ターゲティング核酸、部位特異的ポリペプチド、およびエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを含む遺伝的に改変された細胞を提供する。

【0029】

一態様では、本開示は、非天然配列を含む改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター、および緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、使用説明書をさらに備える。

【0030】

一態様では、本開示は、改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸は、エフェクタータンパク質、および部位特異的ポリペプチドに結合するように構成されている配列を含む、ベクター、ならびに緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

30

【0031】

一態様では、本開示は、非天然配列を含む改変された核酸ターゲティング核酸、部位特異的ポリペプチド、およびエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター、ならびに緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

40

【0032】

一態様では、本開示は、多重化遺伝子ターゲティング剤を含む組成物であって、多重化遺伝子ターゲティング剤は、1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは非天然配列を含み、かつここで核酸モジュールは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに結合するように構成され、ここで核酸モジュールは、標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、核酸モジュールは、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性を含む第1の配列、および6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性を含む第2の配列を含む。いくつかの実施形態では、組成物は

50

、第1のおよび第2の配列を連結するリンカー配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の核酸モジュールは、1つまたはそれ以上の標的核酸にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の核酸モジュールは、1つまたはそれ以上の核酸モジュールのスペーサー領域中で、少なくとも1つのヌクレオチドずつ異なる。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の核酸モジュールは、RNAである。いくつかの実施形態では、多重化遺伝子ターゲティング剤は、RNAである。いくつかの実施形態では、非天然配列は、リボザイムを含む。いくつかの実施形態では、非天然配列は、エンドリボヌクレアーゼ結合配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列は、核酸モジュールの5'末端に位置する。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列は、核酸モジュールの3'末端に位置する。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列は、CRISPRエンドリボヌクレアーゼによって結合されるように適合されている。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列は、RAMPドメインを含むエンドリボヌクレアーゼによって結合されるように適合されている。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列は、Cas5スーパーファミリーメンバーエンドリボヌクレアーゼ、およびCas6スーパーファミリーメンバーエンドリボヌクレアーゼ、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるエンドリボヌクレアーゼによって結合されるように適合されている。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列は、Csy4、Cas5、およびCas6からなる群から選択されるタンパク質に対して少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を含むエンドリボヌクレアーゼによって結合されるように適合されている。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列は、Csy4、Cas5、およびCas6からなる群から選択されるタンパク質のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を含むエンドリボヌクレアーゼによって結合されるように適合されている。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列はヘアピンを含む。いくつかの実施形態では、ヘアピンは、少なくとも4つの連続するヌクレオチドをステムループ構造中に含む。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼ結合配列は、

```

5' - GUUCACUGCCGUAUAGGCAGCUAAGAAA - 3' ;
5' - GUUGCAAAGGGAUUGAGGCCCCGUAAGGGGAUUGCGAC -
3' ;
5' - GUUGCAAACCCUCGUUAGCCUCGUAGAGGAUUGAAAC -
3' ;
5' - GGAUCGAUAACCCACCCCGAAGAAAAGGGGACGAGAAC -
- 3' ;
5' - GUCGUCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC -
3' ;
5' - GAUAUAAACCUAAUUAACCUAGAGAGGGGACGGAAAC -
3' ;
5' - CCCCAGUCACCUUCGGGAGGGGACGGAAAC - 3' ;
5' - GUUCCA AUUA AUUCUUA AACCCUAUUAAGGGAUUGAAAC
- 3' 。
5' - GUUGCAAAGGGAUUGAGGCCCCGUAAGGGGAUUGCGAC -
3' ;
5' - GUUGCAAACCCUCGUUAGCCUCGUAGAGGAUUGAAAC -
3' ;
5' - GGAUCGAUAACCCACCCCGAAGAAAAGGGGACGAGAAC -
- 3' ;
5' - GUCGUCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC -
3' ;
5' - GAUAUAAACCUAAUUAACCUAGAGAGGGGACGGAAAC -

```

10

20

30

40

50

3' ;
 5' - C C C C A G U C A C C U C G G G A G G G G A C G G A A A C - 3' ;
 5' - G U U C C A A U U A A U C U U A A A C C C U A U U A G G G A U U G A A A C
 - 3' ,
 5' - G U C G C C C C C C A C G C G G G G G C G U G G A U U G A A A C - 3' ;
 5' - C C A G C C G C C U U C G G G C G G C U G U G U G U U G A A A C - 3' ;
 5' - G U C G C A C U C U A C A U G A G U G C G U G G A U U G A A A U - 3' ;
 5' - U G U C G C A C C U U A U A U A G G U G C G U G G A U U G A A A U - 3' ;

および

5' - G U C G C G C C C C G C A U G G G G C G C G U G G A U U G A A A - 3'、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される配列に対して少なくとも60%同一性を含む。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の核酸モジュールは、異なるエンドリボヌクレアーゼによって結合されるように適合されている。いくつかの実施形態では、多重化遺伝子ターゲティング剤は、単離された多重化遺伝子ターゲティング剤である。いくつかの実施形態では、多重化遺伝子ターゲティング剤は、組換えの多重化遺伝子ターゲティング剤である。

10

【0033】

一態様では、本開示は、多重化遺伝子ターゲティング剤をコードするポリヌクレオチドを含むベクターであって、多重化遺伝子ターゲティング剤は、1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは、非天然配列を含み、かつここで核酸モジュールは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに対して結合するように構成されており、ここで核酸モジュールは、標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている、ベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、プロモーターに対して作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。

20

【0034】

一態様では、本開示は、多重化遺伝子ターゲティング剤を含む遺伝的に改変された細胞であって、多重化遺伝子ターゲティング剤は、1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは非天然配列を含み、ここで核酸モジュールは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに結合するように構成されており、ここで核酸モジュールは、標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている、細胞を提供する。

30

【0035】

一態様では、本開示は、多重化遺伝子ターゲティング剤をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを含む遺伝的に改変された細胞であって、多重化遺伝子ターゲティング剤は1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは非天然配列を含み、ここで核酸モジュールは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに対して結合するように構成されており、ここで核酸モジュールは標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている、細胞を提供する。

40

【0036】

一態様では、本開示は、多重化遺伝子ターゲティング剤であって、多重化遺伝子ターゲティング剤は1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは非天然配列を含み、ここで核酸モジュールはCas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに対して結合するように構成されており、ここで核酸モジュールは標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている多重化遺伝子ターゲティング剤と、緩衝液とを備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

【0037】

一態様では、本開示は、多重化遺伝子ターゲティング剤をコードするポリヌクレオチド

50

配列を含むベクターであって、ここで多重化遺伝子ターゲティング剤は1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは非天然配列を含み、かつ、ここで核酸モジュールはCas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに対して結合するように構成されており、ここで核酸モジュールは標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されているベクターと、緩衝液とを備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

【0038】

一態様では、本開示は、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに対して結合し、標的核酸にハイブリダイズする核酸を生成するための方法であって、多重化遺伝子ターゲティング剤を導入する工程であって、多重化遺伝子ターゲティング剤は1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは非天然配列を含み、ここで核酸モジュールはCas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに対して結合するように構成されており、ここで核酸モジュールは宿主細胞内の標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている、工程と、多重化遺伝子ターゲティング剤を1つまたはそれ以上の核酸モジュールにプロセッシングする工程と、プロセッシングした1つまたはそれ以上の核酸モジュールを1つまたはそれ以上の標的核酸に細胞中で接触させる工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、標的核酸を切断する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、標的核酸を改変する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸の転写を変更する工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、ドナーポリヌクレオチドを標的核酸に挿入する工程を含む。

10

20

【0039】

一態様では、本開示は、第1のヌクレアーゼドメイン、第2のヌクレアーゼドメイン、および挿入されたヌクレアーゼドメインを含む、改変された部位特異的ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも15%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、第1のヌクレアーゼドメインは、HNHドメイン、およびRuvCドメイン、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2のヌクレアーゼドメインは、HNHドメイン、およびRuvCドメイン、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、HNHドメインを含む。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインはRuvCドメインを含む。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、第1のヌクレアーゼドメインに対してN末端である。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、第2のヌクレアーゼドメインに対してN末端である。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、第1のヌクレアーゼドメインに対してC末端である。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、第2のヌクレアーゼドメインに対してC末端である。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、第1のヌクレアーゼドメインに対して直列である。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、第2のヌクレアーゼドメインに対して直列である。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、第1のまたは第2のヌクレアーゼドメインとは異なる部位で標的核酸を切断するように適合されている。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、DNA-RNAハイブリッド中でRNAを切断するように適合されている。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、DNA-RNAハイブリッド中でDNAを切断するように適合されている。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、標的核酸に対する改変された部位特異的ポリペプチドの結合の特異性を増大するように適合されている。いくつかの実施形態では、挿入されたヌクレアーゼドメインは、標的核酸に対する改変された部位特異

30

40

50

的ポリペプチドの結合の強度を増大するように適合されている。

【0040】

一態様では、本開示は、第1のヌクレオチドドメイン、第2のヌクレオチドドメイン、および挿入されたヌクレオチドドメインを含む、改変された部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0041】

一態様では、本開示は、第1のヌクレオチドドメイン、第2のヌクレオチドドメイン、および挿入されたヌクレオチドドメインを含む改変された部位特異的ポリペプチドと、緩衝液とを備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

10

【0042】

一態様では、本開示は、改変された部位特異的ポリペプチドを含み、ここでポリペプチドが、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して第2のプロトスペーサー隣接モチーフを標的とするように適合されるように改変されている組成物を提供する。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、アミノ酸付加、アミノ酸置換、アミノ酸交換、およびアミノ酸欠失、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される改変によって改変される。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、非天然配列を含む。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、第2のプロトスペーサー隣接モチーフを、野性型部位特異的ポリペプチドよりも大きい特異性で標的とするように適合されている。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、第2のプロトスペーサー隣接モチーフを、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して低い解離定数で標的とするように適合されている。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、第2のプロトスペーサー隣接モチーフを、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して高い解離定数で標的とするように適合されている。いくつかの実施形態では、第2のプロトスペーサー隣接モチーフは、5'-NGGNG-3'、5'-NNA A A A W-3'、5'-NNNNGATT-3'、5'-GNNNCNNA-3'、および5'-NNNACA-3'、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるプロトスペーサー隣接モチーフを含む。

20

【0043】

一態様では、本開示は、改変された部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、ここでポリペプチドが、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して第2のプロトスペーサー隣接モチーフを標的とするように適合されるように改変されている、ベクターを提供する。

30

【0044】

一態様では、本開示は、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して第2のプロトスペーサー隣接モチーフを標的とするように適合されているように改変されている改変された部位特異的ポリペプチドと、緩衝液とを備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

【0045】

一態様では、本開示は、改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物であって、ここでポリペプチドが、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して第2の核酸ターゲティング核酸を標的とするように適合されているように改変されている、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、アミノ酸付加、アミノ酸置換、アミノ酸交換、およびアミノ酸欠失、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される改変によって改変されている。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、非天然配列を含む。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、第2の核酸ターゲティング核酸を、野性型部位特異的ポリペプチドよりも大きい特異性で標的とするように適合されている。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、第2の核酸ターゲティング核酸を、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して低い解離定数で標的とするように適合されている。いくつかの実施形態では

40

50

、 改変された部位特異的ポリペプチドは、第 2 の核酸ターゲティング核酸を、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して高い解離定数で標的とするように適合されている。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、第 2 の核酸ターゲティング核酸の t r a c r R N A 部分を標的とする。

【 0 0 4 6 】

一態様では、本開示は、改変された部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、ここでポリペプチドが、第 2 の核酸ターゲティング核酸を、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して標的とするように適合されているように改変されているベクターを提供する。

【 0 0 4 7 】

一態様では、本開示は、改変された部位特異的ポリペプチドであって、ここでポリペプチドが、第 2 の核酸ターゲティング核酸を野性型部位特異的ポリペプチドと比較して標的とするように適合されるように改変されているポリペプチドと、緩衝液とを備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

【 0 0 4 8 】

一態様では、本開示は、配列番号 8 と比較して架橋らせん中に改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、標的核酸を切断するように構成されている。

【 0 0 4 9 】

一態様では、本開示は、配列番号 8 と比較して高度に塩基性のパッチ中に改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、標的核酸を切断するように構成されている。

【 0 0 5 0 】

一態様では、本開示は、配列番号 8 と比較してポリメラーゼ様ドメイン中に改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、標的核酸を切断するように構成されている。

【 0 0 5 1 】

一態様では、本開示は、配列番号 8 と比較して、架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物を提供する。

【 0 0 5 2 】

一態様では、本開示は、配列番号 8 と比較して、架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む改変された部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【 0 0 5 3 】

一態様では、本開示は、配列番号 8 と比較して、架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む改変された部位特異的ポリペプチドと、緩衝液とを備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは核酸ターゲティング核酸をさらに備える。

【 0 0 5 4 】

一態様では、本開示は、配列番号 8 と比較して、架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む遺伝的に改変された細胞を提供する。

【 0 0 5 5 】

一態様では、本開示は、ゲノム操作のための方法であって、標的核酸を複合体と接触させる工程であって、複合体は、改変された部位特異的ポリペプチドを含み、ポリペプチドは、配列番号 8 と比較して、架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼ

10

20

30

40

50

ドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含み、および核酸ターゲティング核酸を含む工程と、標的核酸を改変する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、接触させる工程は、複合体を、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフに接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、接触させる工程は、複合体を、未改変の部位特異的ポリペプチドと比較して、長い標的核酸配列に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸を切断する工程を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸はRNAを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸はDNAを含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、ハイブリダイズしたRNAおよびDNAのRNA鎖を切断する工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、ハイブリダイズしたRNAおよびDNAのDNA鎖を切断する工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸中に、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部、またはそれらの任意の組み合わせを挿入する工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸の転写活性を改変する工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸の1つまたはそれ以上のヌクレオチドの欠失を含む。

10

【0056】

一態様では、本開示は、配列番号8と比較して改変されたヌクレアーゼドメインを含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、標的核酸を切断するように構成されている。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、RuvCドメインヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、HNHヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、HNHヌクレアーゼドメインの複製を含む。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、未改変の部位特異的ポリペプチドと比較して標的核酸についてアミノ酸配列の特異性を増大するように適合されている。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、未改変の部位特異的ポリペプチドと比較して核酸ターゲティング核酸についてアミノ酸配列の特異性を増大するように適合されている。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、アミノ酸追加、アミノ酸置換、アミノ酸交換、およびアミノ酸欠失、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される改変を含む。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、挿入された非天然配列を含む。いくつかの実施形態では、非天然配列は、改変された部位特異的ポリペプチドに対して酵素活性を付与する。いくつかの実施形態では、酵素活性は、ヌクレアーゼ活性、メチラーゼ活性、アセチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポーゼース活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、リモデリング活性、プロテアーゼ活性、酸化還元酵素活性、トランスフェラーゼ活性、加水分解酵素活性、リアーゼ活性、イソメラーゼ活性、シンターゼ活性、シンテターゼ活性、および脱ミリストイル化活性、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、酵素活性は、標的核酸の転写を調整するように適合されている。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、プロトスペーサー隣接モチーフ配列（ここへ未改変の部位特異的ポリペプチドが結合するように適合されている）とは異なるプロトスペーサー隣接モチーフ配列に対してアミノ酸配列の結合を可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼドメインは、核酸ターゲティング核酸（ここへ未改変の部位特異的ポリペプチドが結合するように適合されている）とは異なる核酸ターゲティング核酸に対してアミノ酸配列の結合を可能にするよ

20

30

40

50

うに適合されている。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、未改変の部位特異的ポリペプチドよりも長い標的核酸配列に対して結合するように適合されている。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、二本鎖DNAを切断するように適合されている。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、ハイブリダイズしたRNAおよびDNAのRNA鎖を切断するように適合されている。いくつかの実施形態では、改変された部位特異的ポリペプチドは、ハイブリダイズしたRNAおよびDNAのDNA鎖を切断するように適合されている。いくつかの実施形態では、組成物は、改変された核酸ターゲティング核酸をさらに含み、ここで部位特異的ポリペプチドの改変は、改変された核酸ターゲティング核酸に対して部位特異的ポリペプチドが結合することを可能にするように適合されている。いくつかの実施形態では、改変された核酸ターゲティング核酸および改変された部位特異的ポリペプチドは、代償性の変異を含む。

10

【0057】

一態様では、本開示は、配列決定するための標的核酸を濃縮するための方法であって、標的核酸と、核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドを含む複合体とを接触させる工程、複合体を用いて標的核酸を濃縮させる工程、ならびに標的核酸の配列を決定する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、増幅工程を含まない。いくつかの実施形態では、方法は、標的核酸の配列を解析する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、濃縮の前に標的核酸を断片化する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、RNAを含む。いくつかの実施形態では、方法は、核酸ターゲティング核酸が2つのRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、方法は、2つのRNA分子各々の一部と一緒にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、方法は、2つのRNA分子のうちの1つがCRISPR反復配列を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して相同である。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、2つのRNA分子のうちの1つは、tracrRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、tracrRNA配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して相同である。いくつかの実施形態では、tracrRNA配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、ダブルガイド核酸である。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、1つの連続のRNA分子を含み、ここで連続のRNA分子は、2つのドメインおよびリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、連続のRNA分子の各々の2つのドメインの一部は、一緒にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、連続のRNA分子は、CRISPR反復配列を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して相同である。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、連続のRNA分子は、tracrRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、tracrRNA配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して相同である。いくつかの実施形態では、tracrRNA配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸である。いくつかの実施形態では、接触させる工程は、核酸ターゲティング核酸の一部と標的核酸の一部とをハイブリダイズする工程を含む。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、6~20ヌクレオチドを含む領域にまたがって標的核酸とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも20%の相同性を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9に対して少なくとも60%の相同性を含む。いくつかの実施形態で

20

30

40

50

は、部位特異的ポリペプチドは、操作されたヌクレアーゼドメインを含み、ここでヌクレアーゼドメインは、操作されていないヌクレアーゼドメインを含む部位特異的ポリペプチドと比較して低下したヌクレアーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、標的核酸中に一本鎖の破壊を導入する。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼドメインは、保存されているアスパラギン酸の変異を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼドメインは、D10A変異を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼドメインは、保存されたヒスチジンの変異を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼドメインは、H840A変異を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、親和性タグを含む。いくつかの実施形態では、親和性タグは、部位特異的ポリペプチドのN末端、部位特異的ポリペプチドのC末端、表面アクセス可能領域、またはそれらの任意の組み合わせに位置する。いくつかの実施形態では、親和性タグは、ビオチン、FLAG、His6x、His9x、および蛍光タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、核酸親和性タグを含む。いくつかの実施形態では、核酸親和性タグは、核酸ターゲティング核酸の5'末端、核酸ターゲティング核酸の3'末端、表面アクセス可能領域、またはそれらの任意の組み合わせに位置する。いくつかの実施形態では、核酸親和性タグは、低分子、蛍光標識、放射性標識、またはそれらの任意の組み合わせを含む群より選択される。いくつかの実施形態では、核酸親和性タグは、Csy4、Cas5、Cas6、またはそれらの任意の組み合わせに結合するように構成されている配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸親和性タグは、5'-GUUCACUGCCGUUAUAGGCAGCUAAGA A-3'に対して50%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、方法は、疾患を診断する工程、および患者特異的な処置決定を行う工程、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。いくつかの実施形態では、決定する工程は、遺伝子型を決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、方法は、記憶メモリシステムから遠隔のコンピュータへ配列を連絡する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、濃縮は、複合体の親和性タグを捕捉剤と接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、捕捉剤は、抗体を含む。いくつかの実施形態では、捕捉剤は、固体支持体を含む。いくつかの実施形態では、捕捉剤は、Csy4、Cas5、およびCas6からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、捕捉剤は、イミダゾールの非存在下で酵素活性の低下を含む。いくつかの実施形態では、捕捉剤は、活性化可能な酵素学的ドメインを含み、ここで活性化可能な酵素学的ドメインは、イミダゾールと接触することによって活性化される。いくつかの実施形態では、捕捉剤は、Cas6ファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、捕捉剤は親和性タグを含む。いくつかの実施形態では、捕捉剤は、ヌクレアーゼドメイン中に変異を含む、条件付きで酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、保存されたヒスチジンの変異。いくつかの実施形態では、変異は、H29A変異を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、複合体に対して結合される。いくつかの実施形態では、標的核酸は、複合体に結合されない切り出された核酸である。いくつかの実施形態では、複数の複合体は、複数の標的核酸に接触される。いくつかの実施形態では、複数の標的核酸は、少なくとも1ヌクレオチドずつ異なる。いくつかの実施形態では、複数の複合体は、少なくとも1ヌクレオチドずつ異なる複数の核酸ターゲティング核酸を含む。

【0058】

一態様では、本開示は、核酸を切り出すための方法であって、標的核酸を、2つまたはそれ以上の複合体と接触させる工程であって、各々の複合体は部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む、工程、および標的核酸を切断する工程であって、切り出された標的核酸を生成する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、切断する工程は、部位特異的ポリペプチドのヌクレアーゼドメインによって行われる。いくつかの実施形態では、方法は、増幅を含まない。いくつかの実施形態では、方法は、切り出された標的核酸を濃縮する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、切り出された標的核酸を配列決定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、核酸ター

ゲティング核酸は、RNAである。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は2つのRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、各々の2つのRNA分子の一部と一緒にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、2つのRNA分子の1つは、CRISPR反復配列を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して相同である配列を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、2つのRNA分子の1つは、tracrRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、tracrRNA配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して相同である。いくつかの実施形態では、tracrRNA配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸はダブルガイド核酸である。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は1つの連続のRNA分子を含み、ここで連続のRNA分子は、2つのドメインおよびリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、連続のRNA分子の各々の2つのドメインの一部と一緒にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、連続のRNA分子は、CRISPR反復配列を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して相同である。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、連続のRNA分子は、tracrRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、tracrRNA配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して相同である。いくつかの実施形態では、tracrRNA配列は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸である。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、標的核酸とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、ある領域（領域は、少なくとも6ヌクレオチドおよび多くとも20ヌクレオチド含む）にまたがって標的核酸とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドはCas9である。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも20%の相同性を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9に対して少なくとも60%の相同性を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは親和性タグを含む。いくつかの実施形態では、親和性タグは、部位特異的ポリペプチドのN末端、部位特異的ポリペプチドのC末端、表面アクセス可能領域、またはそれらの任意の組み合わせに位置する。いくつかの実施形態では、親和性タグは、ビオチン、FLAG、His6x、His9x、および蛍光タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、核酸親和性タグを含む。いくつかの実施形態では、核酸親和性タグは、核酸ターゲティング核酸の5'末端、核酸ターゲティング核酸の3'末端、表面アクセス可能領域、またはそれらの任意の組み合わせに位置する。いくつかの実施形態では、核酸親和性タグは、低分子、蛍光標識、放射性標識、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、核酸親和性タグは、Csy4、Cas5、Cas6、またはそれらの任意の組み合わせに結合し得る配列である。いくつかの実施形態では、核酸親和性タグは、GUUCACUGCCGUAUAGGCAGCUAAGA A Aに対する50%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、標的核酸は、2つまたはそれ以上の複合体に結合されない切り出された核酸である。いくつかの実施形態では、2つまたはそれ以上の複合体は、複数の標的核酸に接触させられる。いくつかの実施形態では、複数の標的核酸は、少なくとも1つのヌクレオチドずつ異なる。いくつかの実施形態では、2つまたはそれ以上の複合体は、少なくとも1つのヌクレオチドずつ異なる核酸ターゲティング核酸を含む。

【0059】

10

20

30

40

50

一態様では、本開示は、標的核酸のライブラリーを生成するための方法であって、複数の標的核酸を、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体と接触させる工程と、複数の標的核酸を切断する工程と、複数の標的核酸を精製して、標的核酸のライブラリーを作成する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、標的核酸のライブラリーをスクリーニングする工程をさらに含む。

【0060】

一態様では、本開示は、第1の複合体（第1の部位特異的ポリペプチドおよび第1の核酸ターゲティング核酸を含む）、第2の複合体（第2の部位特異的ポリペプチドおよび第2の核酸ターゲティング核酸を含む）を含み、ここで第1のおよび第2の核酸ターゲティング核酸が異なる組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、第1のまたは第2の複合体によって結合される標的核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の部位特異的ポリペプチドおよび第2の部位特異的ポリペプチドは同じである。いくつかの実施形態では、第1の部位特異的ポリペプチドおよび第2の部位特異的ポリペプチドは異なる。

10

【0061】

一態様では、本開示は、少なくとも1ヌクレオチド異なる2つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸、および部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0062】

一態様では、本開示は、少なくとも1ヌクレオチド異なる2つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸、および部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを含む遺伝的に改変された宿主細胞を提供する。

20

【0063】

一態様では、本開示は、少なくとも1ヌクレオチド異なる2つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター、および適切な緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、捕捉剤、固体支持体、配列決定アダプター、および陽性対照、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。

【0064】

一態様では、本開示は、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して低下した酵素活性を含む部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸、および捕捉剤を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは、洗浄緩衝液、安定化緩衝液、再構成緩衝液、または希釈緩衝液を含む群から選択される緩衝液をさらに備える。

30

【0065】

一態様では、本開示は、2つまたはそれ以上のニッカーゼを用いて標的核酸を切断するための方法であって、標的核酸を、第1の複合体および第2の複合体と接触させる工程であって、ここで第1の複合体は、第1のニッカーゼおよび第1の核酸ターゲティング核酸を含み、かつここで第2の複合体は、第2のニッカーゼおよび第2の核酸ターゲティング核酸を含み、ここで標的核酸は、第1の鎖の上に第1のプロトスペーサー隣接モチーフおよび第2の鎖の上に第2のプロトスペーサー隣接モチーフを含み、ここで第1の核酸ターゲティング核酸は、第1のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズするように適合されており、かつここで第2の核酸ターゲティング核酸は、第2のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズするように適合されている工程と、標的核酸の第1のおよび第2の鎖にニックングする工程であって、ニックングする工程が、切断された標的核酸を生成する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1のおよび第2のニッカーゼは同じである。いくつかの実施形態では、第1のおよび第2のニッカーゼは異なる。いくつかの実施形態では、第1のおよび第2の核酸ターゲティング核酸は異なる。いくつかの実施形態では、第1のプロトスペーサー隣接モチーフと第2のプロトスペーサー

40

50

隣接モチーフの間に125未満のヌクレオチドが存在する。いくつかの実施形態では、第1のおよび第2のプロトスペーサー隣接モチーフは、配列NGGを含み、ここでNは任意のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2のニッカーゼは、少なくとも1つの実質的に不活性なヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2のニッカーゼは、保存されたアスパラギン酸の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異はD10A変異である。いくつかの実施形態では、第1のまたは第2のニッカーゼは、保存されたヒスチジンの変異を含む。いくつかの実施形態では、変異はH840A変異である。いくつかの実施形態では、第1のプロトスペーサー隣接モチーフと第2のプロトスペーサー隣接モチーフの間に15未満のヌクレオチドが存在する。いくつかの実施形態では、第1のプロトスペーサー隣接モチーフと第2のプロトスペーサー隣接モチーフの間に10未満のヌクレオチドが存在する。いくつかの実施形態では、第1のプロトスペーサー隣接モチーフと第2のプロトスペーサー隣接モチーフの間に5未満のヌクレオチドが存在する。いくつかの実施形態では、第1のおよび第2のプロトスペーサー隣接モチーフは互いに隣接する。いくつかの実施形態では、ニッキングする工程は、第1のニッカーゼが第1の鎖をニッキングする工程、および第2のニッカーゼが第2の鎖をニッキングする工程を含む。いくつかの実施形態では、ニッキングする工程は、スティッキエンド切断を生じる。いくつかの実施形態では、ニッキングする工程はブラントエンド切断を生じる。いくつかの実施形態では、方法は、切断された標的核酸にドナーポリヌクレオチドを挿入する工程をさらに含む。

10

20

【0066】

一態様では、本開示は、各々の核酸分子が核酸結合タンパク質結合部位を含む複数の核酸分子であって、複数の核酸分子のうち少なくとも1つは核酸ターゲティング核酸をコードし、複数の核酸分子のうち1つは部位特異的ポリペプチドをコードする核酸分子、および複数の核酸結合タンパク質を含む融合ポリペプチドであって、複数の核酸結合タンパク質は、それらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合するように適合されている融合ポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上の複数の核酸結合タンパク質は、非天然配列を含む。いくつかの実施形態では、非天然配列は、N末端、C末端、表面アクセス可能領域、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される位置に位置する。いくつかの実施形態では、非天然配列は、核局在シグナルをコードする。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質は、リンカーによって隔てられる。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質のうちいくつかは、同じ核酸結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質の全てが、同じ核酸結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質は、異なる核酸結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質は、RNA結合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、RNA結合タンパク質は、I型のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートシステム(Type I Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat system)のエンドリボヌクレアーゼ、II型のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートシステム(Type II Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat system)のエンドリボヌクレアーゼ、またはIII型のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートシステム(Type III Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat system)のエンドリボヌクレアーゼ、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、RNA結合タンパク質は、Cas5、Cas6、およびCsy4、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質は、DNA結合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、核酸結合タンパク質結合部位は、I型、II型およびIII型のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートシステム(Clustered Regularly I

30

40

50

nterspaced Short Palindromic Repeat system)の核酸結合タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される核酸結合タンパク質に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、核酸結合タンパク質結合部位は、Cas6、Cas5、およびCsy4、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される核酸結合タンパク質に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子のいくつかは、同じ核酸結合タンパク質結合部位を含む。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、同じ核酸結合タンパク質結合部位を含む。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子のうち同じ核酸結合タンパク質結合部位を含むものはない。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも20%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドはCas9である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの核酸分子は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)のエンドリボヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートのエンドリボヌクレアーゼは、Csy4に対して少なくとも20%の配列類似性を含む。いくつかの実施形態では、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートのエンドリボヌクレアーゼは、Csy4に対して少なくとも60%の配列類似性を含む。いくつかの実施形態では、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートのエンドリボヌクレアーゼはCsy4である。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質は、低下した酵素活性を含む。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質は、核酸結合タンパク質結合部位に結合するように適合されているが、核酸結合タンパク質結合部位は切断できない。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、2つのRNA分子を含む。いくつかの実施形態では、各々の2つのRNA分子の一部は、一緒にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、2つのRNA分子のうち第1の分子が、8つの連続するヌクレオチドにおいて、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートのRNA配列に対して少なくとも60%の同一性を含む配列を含み、かつここで2つのRNA分子のうち第2の分子は、6つの連続するヌクレオチドにおいて、トランス活性化のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(trans-activating-Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)のRNA配列に対して少なくとも60%の同一性を含む配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、1つの連続のRNA分子を含み、ここで連続のRNA分子は、2つのドメインおよびリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、連続のRNA分子の2つのドメインの一部は、一緒にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、連続のRNA分子の第1の部分は、8つの連続するヌクレオチドにおいて、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートのRNA配列に対して少なくとも60%の同一性を含む配列を含み、かつここで連続のRNA分子の第2の部分は、6つの連続するヌクレオチドにおいて、トランス活性化のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートのRNA配列に対して少なくとも60%の同一性を含む配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、6~20ヌクレオチドにおいて標的核酸とハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、組成物は、細胞に送達されるように構成されている。いくつかの実施形態では、組成物は、細胞に対して等しい量の複数の核酸分子を送達するように構成されている。いくつかの実施形態では、組成物は、ドナーポリヌクレオチド分子をさらに含み、ここでドナーポリヌクレオチド分子は、核酸結合タンパク質結合部位を含み、ここで結合部位は、融合ポリペプチドの核酸結合タンパク質によって結合される。

【0067】

一態様では、本開示は、細胞中の細胞レベルより下の位置への核酸の送達のための方法であって、細胞に、各々の核酸分子が核酸結合タンパク質結合部位を含む複数の核酸分子であって、複数の核酸分子のうち少なくとも1つは核酸ターゲティング核酸をコードし

、複数の核酸分子のうちの一つは部位特異的ポリペプチドをコードする核酸分子、および複数の核酸結合タンパク質を含む融合ポリペプチドであって、複数の核酸結合タンパク質は、それらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合して、細胞より下の位置へ組成物を化学量論的に送達するように適合されている融合ポリペプチドを含む組成物を導入する工程と、部位特異的ポリペプチドをコードする核酸分子から翻訳された部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含むユニットを形成する工程と、標的核酸を切断する工程であって、ここでユニットの部位特異的ポリペプチドが標的核酸を切断する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、複数の核酸結合タンパク質は、それらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合する。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼは、一つまたはそれ以上の核酸結合タンパク質結合部位のうちの一つを切断する。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼは、核酸ターゲティング核酸をコードする核酸の核酸結合タンパク質結合部位を切断し、それによって核酸ターゲティング核酸を解放する。いくつかの実施形態では、細胞内の位置は、ヌクレアーゼ、ER、ゴルジ、ミトコンドリア、細胞壁、リソソーム、および核からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞内の位置とは核である。

10

20

30

40

50

【0068】

一態様では、本開示は、ある組成物をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、組成物が、複数の核酸分子（ここで各々の核酸分子が核酸結合タンパク質結合部位を含み、ここで複数の核酸分子の少なくとも一つが核酸ターゲティング核酸をコードしており、複数の核酸分子のうちの一つが部位特異的ポリペプチドをコードする）；および融合ポリペプチド（ここで融合ポリペプチドが複数の核酸結合タンパク質を含み、ここで複数の核酸結合タンパク質が、それらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合して、組成物を細胞内の位置へ化学量論的に送達するように適合されている）を含む、ベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ベクターは、プロモーターをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ポリヌクレオチドに対して作動可能に結合される。いくつかの実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。

【0069】

一態様では、本開示は、あるベクターを含む遺伝的に改変された生物体であって、ベクターが、複数の核酸分子をコードするポリヌクレオチド配列（ここで各々の核酸分子は、核酸結合タンパク質結合部位を含み、ここで複数の核酸分子の少なくとも一つが、核酸ターゲティング核酸をコードし、複数の核酸分子のうちの一つが部位特異的ポリペプチドをコードする）、および融合ポリペプチド（ここで融合ポリペプチドが、複数の核酸結合タンパク質を含み、ここで複数の核酸結合タンパク質が、それらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合して、組成物を細胞内の位置へ化学量論的に送達するように適合されている）を含む生物体を提供する。

【0070】

一態様では、本開示は、ある組成物を含む遺伝的に改変された生物体であって、組成物が、複数の核酸分子（ここで各々の核酸分子は、核酸結合タンパク質結合部位を含み、ここで複数の核酸分子の少なくとも一つが、核酸ターゲティング核酸をコードし、複数の核酸分子のうちの一つが部位特異的ポリペプチドをコードする）；および融合ポリペプチド（ここで融合ポリペプチドが、複数の核酸結合タンパク質を含み、ここで複数の核酸結合タンパク質が、それらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合するように適合されている）を含む生物体を提供する。

【0071】

一態様では、本開示は、ある組成物を備えるキットであって、組成物が、複数の核酸分子（ここで各々の核酸分子は、核酸結合タンパク質結合部位を含み、ここで複数の核酸分子の少なくとも一つが、核酸ターゲティング核酸をコードし、複数の核酸分子のうちの一つが部位特異的ポリペプチドをコードする）、および融合ポリペプチド（ここで融合ポリペプチドが、複数の核酸結合タンパク質を含み、ここで複数の核酸結合タンパク質が、そ

これらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合するように適合されている)を含む組成物、ならびに緩衝液を備えるキットを提供する。

【0072】

一態様では、本開示は、ベクターが、複数の核酸分子をコードするポリヌクレオチド配列(ここで各々の核酸分子は、核酸結合タンパク質結合部位を含み、ここで複数の核酸分子の少なくとも1つが、核酸ターゲティング核酸をコードし、複数の核酸分子のうちの1つが部位特異的ポリペプチドをコードする)ベクター;および融合ポリペプチド(ここで融合ポリペプチドが、複数の核酸結合タンパク質を含み、ここで複数の核酸結合タンパク質が、これらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合して、組成物を細胞内の位置へ化学量論的に送達するように適合されている)、および緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。いくつかの実施形態では、緩衝液は、希釈緩衝液、再構成緩衝液、および安定化緩衝液、またはそれらの任意の組み合わせを含む群から選択される。

10

【0073】

一態様では、本開示は、対象とする遺伝子エレメント、およびレポーターエレメントを含み、ここでレポーターエレメントが、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および1つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで1つまたはそれ以上の核酸が、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列および6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列を含む、ドナーポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、対象とする遺伝子エレメントは、ある遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、対象とする遺伝子エレメントは、マイクロRNA、siRNA、および長い非コードRNA、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される非コード核酸を含む。いくつかの実施形態では、対象とする遺伝子エレメントは、非コード遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、対象とする遺伝子エレメントは、マイクロRNA、siRNA、および長い非コードRNA、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される非コード核酸を含む。いくつかの実施形態では、レポーターエレメントは、蛍光タンパク質をコードする遺伝子、化学発光タンパク質をコードする遺伝子、および抗生物質耐性遺伝子、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、レポーターエレメントは、蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、レポーターエレメントはプロモーターに対して作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは組織特異的プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、Cas9に対して10アミノ酸にまたがって少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、HNHドメイン、HNH様ドメイン、RuvCドメイン、およびRuvC様ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

20

30

40

【0074】

一態様では、本開示は、発現ベクターであって、対象とする遺伝子エレメントをコードするポリヌクレオチド配列;およびレポーターエレメントを含み、ここでレポーターエレメントは、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および1つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで1つまたはそれ以上の核酸は、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列、および6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列を含む、発現ベクターを提供する。

【0075】

一態様では、本開示は、ドナーポリヌクレオチドを含む遺伝的に改変された細胞であっ

50

て、ドナーポリヌクレオチドが、対象とする遺伝子エレメント；およびレポーターエレメントを含み、ここでレポーターエレメントが部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および1つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで1つまたはそれ以上の核酸が、6つの連続するヌクレオチドにおいてc r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列、および6つの連続するヌクレオチドにおいてt r a c r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列を含む細胞を提供する。

【0076】

一態様では、本開示は、対象とする遺伝子エレメント；およびレポーターエレメントを含み、ここでレポーターエレメントが部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および1つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで1つまたはそれ以上の核酸が、6つの連続するヌクレオチドにおいてc r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列、および6つの連続するヌクレオチドにおいてt r a c r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列を含むドナーポリヌクレオチドと；緩衝液とを備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、C a s 9に対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドと；ポリペプチドに対して結合し、標的核酸にハイブリダイズする核酸をさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書をさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは、C a s 9に対して少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは、6つの連続するヌクレオチドにおいてc r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列と、6つの連続するヌクレオチドにおいてt r a c r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列とを含む核酸をコードするポリヌクレオチドをさらに備える。

【0077】

一態様では、本開示は、レポーターエレメントを用いて細胞を選択し、レポーターエレメントを細胞から切り出すための方法であって、標的核酸を、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体と接触させる工程と；標的核酸を部位特異的ポリペプチドで切断して、切断された標的核酸を生成する工程と；対象とする遺伝子エレメントを含むドナーポリヌクレオチド；およびレポーターエレメント（ここでレポーターエレメントが、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および1つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで1つまたはそれ以上の核酸が、6つの連続するヌクレオチドにおいてc r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列および6つの連続するヌクレオチドにおいてt r a c r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列を含む、切断された標的核酸中に挿入する工程と；ドナーポリヌクレオチドに基づいて細胞を選択して、選択された細胞を生成する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、選択する工程は、疾患について処置されている対象から細胞を選択する工程を含む。いくつかの実施形態では、選択する工程は、疾患について診断されている対象から細胞を選択する工程を含む。いくつかの実施形態では、選択する工程の後、その細胞は、ドナーポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、方法はさらに、レポーターエレメントの全て、いくつかを切り出すか、または切り出さない工程であって、これによって第2の選択された細胞を生成する工程を含む。いくつかの実施形態では、切り出す工程は、レポーターエレメントの5'末端を、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体と接触させる工程であって、ここで複合体が5'末端を切断する工程を含む。いくつかの実施形態では、切り出す工程は、レポーターエレメントの3'末端を、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体と接触させる工程であって、ここで複合体が3'末端を切断する工程を含む。いくつかの実施形態では、切り出す工程は、レポーターエレメントの5'および3'末端を、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む1つまたはそれ以上の複合体と接触させる工程であって、ここで複合体が5'および3'末端を切断する工程を含む。いくつかの実施形態では、方法はさらに、第2の選択された細胞をスクリーニングする工程を含む。いくつかの実施形態では、スクリーニングする工程は、レポーターエレメントの全て

10

20

30

40

50

またはいくつかが存在しないことを観察する工程を含む。

【0078】

一態様では、本開示は、核酸を含む組成物であって、核酸は、12～30ヌクレオチド（両端を含む）であり、PAMに対して5'である配列に対してハイブリダイズするように適合されているスパーサーと；スパーサーに対して3'である第1の二重鎖と；第1の二重鎖の第1の鎖の上に少なくとも3つの不对のヌクレオチド、および第1の二重鎖の第2の鎖の上に少なくとも1つの不对のヌクレオチドを含むバルジと；二重鎖の第1の鎖および第2の鎖を連結し、少なくとも3ヌクレオチド長であるリンカーと；P-ドメインと；P-ドメインの3'であり、部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第2の二重鎖とを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、PAMに対して5'である配列は、少なくとも18ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、PAMに対して5'である配列は、PAMに対して隣接する。いくつかの実施形態では、PAMは5'-NGG-3'を含む。いくつかの実施形態では、第1の二重鎖は、スパーサーに隣接する。いくつかの実施形態では、P-ドメインは、二重鎖の1～5ヌクレオチド下流から開始し、少なくとも4ヌクレオチドを含み、かつ、5'-NGG-3'プロトスパーサー隣接モチーフ配列、化膿レンサ球菌（*S. Pyogenes*）由来のCas9のアミノ酸1096～1255に対して少なくとも50%の同一性を含む配列、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される配列に対してハイブリダイズするように適合されている。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも15%の同一性を含む。いくつかの実施形態では、核酸はRNAである。いくつかの実施形態では、核酸はA型のRNAである。いくつかの実施形態では、第1の二重鎖は、少なくとも6ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、バルジの3つの不对のヌクレオチドは、5'-AAG-3'を含む。いくつかの実施形態では、3つの不对のヌクレオチドに対する隣接は、第1の二重鎖の第2の鎖上のヌクレオチドと不安定な対を形成するヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第1の二重鎖、第2の二重鎖、およびP-ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される核酸のある領域に結合する。

10

20

【0079】

一態様では、本開示は、標的核酸を改変する方法であって、標的核酸を、核酸を含む組成物と接触させる工程であって、核酸は、12～30ヌクレオチド（両端を含む）であるスパーサーであって、PAMに対して5'である配列にハイブリダイズするように適合されているスパーサーと；スパーサーに対して3'である第1の二重鎖と；第1の二重鎖の第1の鎖の上に少なくとも3つの不对のヌクレオチド、および第1の二重鎖の第2の鎖の上に少なくとも1つの不对のヌクレオチドを含むバルジと；二重鎖の第1の鎖および第2の鎖を連結し、少なくとも3ヌクレオチド長であるリンカーと；P-ドメインと；P-ドメインの3'であり、部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第2の二重鎖とを含む、工程と；標的核酸を改変する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、部位特異的ポリペプチドと接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、接触させる工程は、スパーサーを標的核酸に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸を切断して、切断された標的核酸を生成する工程を含む。いくつかの実施形態では、切断する工程は、部位特異的ポリペプチドによって行われる。いくつかの実施形態では、方法はさらに、ドナーポリヌクレオチドを、切断された標的核酸に挿入する工程を含む。いくつかの実施形態では、改変する工程は、標的核酸の転写を改変する工程を含む。

30

40

【0080】

一態様では、本開示は、12～30ヌクレオチド（両端を含む）であり、PAMに対して5'である配列にハイブリダイズするように適合されているスパーサーと；スパーサーに対して3'である第1の二重鎖と；第1の二重鎖の第1の鎖の上に少なくとも3つの不对のヌクレオチド、および第1の二重鎖の第2の鎖の上に少なくとも1つの不对のヌクレオチドを含むバルジと；二重鎖の第1の鎖および第2の鎖を連結し、かつ少なくとも3ヌ

50

クレオチド長であるリンカーと；P - ドメインと；P - ドメインの3'であり、かつ部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第2の二重鎖と含む核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0081】

一態様では、本開示は、12~30ヌクレオチド（両端を含む）であり、PAMに対して5'である配列にハイブリダイズするように適合されているスパーサーと；スパーサーに対して3'である第1の二重鎖と；第1の二重鎖の第1の鎖の上に少なくとも3つの不對のヌクレオチド、および第1の二重鎖の第2の鎖の上に少なくとも1つの不對のヌクレオチドを含むバルジと；二重鎖の第1の鎖および第2の鎖を連結し、少なくとも3ヌクレオチド長であるリンカーと；P - ドメイン；およびP - ドメインの3'であり、部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第2の二重鎖と含む核酸を含む組成物；ならびに緩衝液を備えるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、部位特異的ポリペプチドをさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは、ドナーポリヌクレオチドをさらに備える。いくつかの実施形態では、キットは、使用説明書をさらに備える。

10

【0082】

一態様では、本開示は、合成的に設計された核酸ターゲティング核酸を作成する方法であって、12~30ヌクレオチド（両端を含む）であり、PAMに対して5'である配列にハイブリダイズするように適合されているスパーサーと；スパーサーに対して3'である第1の二重鎖と；第1の二重鎖の第1の鎖の上に少なくとも3つの不對のヌクレオチド、および第1の二重鎖の第2の鎖の上に少なくとも1つの不對のヌクレオチドを含むバルジと；二重鎖の第1の鎖および第2の鎖を連結し、少なくとも3ヌクレオチド長であるリンカーと；P - ドメインと；P - ドメインの3'であり、部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第2の二重鎖とを含む核酸を含む組成物を設計する工程を含む方法を提供する。

20

【0083】

一態様では、本開示は、核酸ターゲティング核酸のPドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸；核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸からなる群から選択される操作された核酸ターゲティング核酸を含む医薬組成物を提供する。

30

【0084】

一態様では、本開示は、3'ハイブリダイズ伸長を含む操作された核酸ターゲティング核酸と、前記3'ハイブリダイズ伸長に対してハイブリダイズされるドナーポリヌクレオチドを含む組成物；エフェクタータンパク質と、6つの連続するヌクレオチドにおいてcrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性、6つの連続するヌクレオチドにおいてtracrRNAに対して少なくとも50%の配列同一性、および非天然配列を含み、前記エフェクタータンパク質に対して結合するように適合されている核酸と含む組成物；多重化遺伝子ターゲティング剤を含む組成物であって、前記多重化遺伝子ターゲティング剤は1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで前記核酸モジュールは非天然配列を含み、ここで前記核酸モジュールはCas9のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも10%のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに結合するように構成されており、ここで前記核酸モジュールは標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている、組成物；改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して第2のプロトスパーサー隣接モチーフを標的とするように適合するように改変されている、組成物；改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して第2の核酸ターゲティング核酸を標的とするように適合されているように改変されている、組成物；配列番号8と比較して架橋らせん中に改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；配列番号8と比較して、高度に塩基性のパッチ中に改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；配列番号8と比較してポリメラーゼ様ド

40

50

メイン中に改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；配列番号 8 と比較して、架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；配列番号 8 と比較して、改変されたヌクレアーゼドメインを含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；第 1 の部位特異的ポリペプチドおよび第 1 の核酸ターゲティング核酸を含む第 1 の複合体、第 2 の部位特異的ポリペプチドおよび第 2 の核酸ターゲティング核酸を含む第 2 の複合体を含む組成物であって、前記第 1 および第 2 の核酸ターゲティング核酸が異なる、組成物；各々の核酸分子が核酸結合タンパク質結合部位を含む複数の核酸分子であって、前記複数の核酸分子のうち少なくとも 1 つは核酸ターゲティング核酸をコードし、前記複数の核酸分子の 1 つが部位特異的ポリペプチドをコードする核酸分子と、複数の前記核酸結合タンパク質を含む融合ポリペプチドであって、前記複数の核酸結合タンパク質はそれらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合するように適合されている、融合ポリペプチドを含む組成物；ならびに 12 ~ 30 ヌクレオチド（両端を含む）であり、PAM に対して 5' である配列にハイブリダイズするように適合されているスパーサーと；前記第 1 の二重鎖は、前記スパーサーに対して 3' である第 1 の二重鎖と；前記第 1 の二重鎖の第 1 の鎖の上に少なくとも 3 つの不对のヌクレオチド、および前記第 1 の二重鎖の第 2 の鎖の上に少なくとも 1 つの不对のヌクレオチドを含むバルジと；前記二重鎖の前記第 1 の鎖および前記第 2 の鎖を連結し、少なくとも 3 ヌクレオチド長であるリンカーと；P-ドメインと；前記 P-ドメインの 3' であり、部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第 2 の二重鎖を含む核酸を含む組成物；またはそれらの任意の組み合わせ；からなる群から選択される組成物を含む医薬組成物を提供する。

【0085】

一態様では、本開示は、改変された部位特異的ポリペプチドを含む医薬組成物であって、ポリペプチドが、第 1 のヌクレアーゼドメイン、第 2 のヌクレアーゼドメイン、および挿入されたヌクレアーゼドメインを含む、医薬組成物を提供する。

【0086】

一態様では、本開示は、ドナーポリヌクレオチドを含む医薬組成物であって、ポリヌクレオチドが、対象とする遺伝子エレメント、およびレポーターエレメントを含み、ここで前記レポーターエレメントが、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および 1 つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで前記 1 つまたはそれ以上の核酸が、6 つの連続するヌクレオチドにおいて crRNA に対して少なくとも 50% の配列同一性を含む配列および 6 つの連続するヌクレオチドにおいて tracrRNA に対して少なくとも 50% の配列同一性を含む配列を含む、医薬組成物を提供する。

【0087】

一態様では、本開示は、核酸ターゲティング核酸の Pドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター；核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクター；ならびに標的核酸を改変する工程；改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸は非天然配列を含む、ベクター；ベクター（改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸は、エフェクタータンパク質、および部位特異的ポリペプチドに結合するように構成された配列を含む、ベクター；改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸は、非天然配列、部位特異的ポリペプチド、およびエフェクタータンパク質を含む、ベクター；多重化遺伝子ターゲティング剤をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、多重化遺伝子ターゲティング剤は 1 つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは非天然配列を含み、ここで核酸モジュールは Cas9 のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも 10% のアミノ酸配列同一性を

含むポリペプチドに結合するように構成されており、ここで核酸モジュールは標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている、ベクター；配列番号 8 と比較して架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む改変された部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター；少なくとも 1 つのヌクレオチドずつ異なる 2 つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸；および部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター；各々の核酸分子が核酸結合タンパク質結合部位を含む複数の核酸分子であって、複数の核酸分子の少なくとも 1 つは核酸ターゲティング核酸をコードし、複数の核酸分子のうちの 1 つが部位特異的ポリペプチドをコードする核酸分子と；複数の核酸結合タンパク質を含む融合ポリペプチドであって、複数の核酸結合タンパク質はそれらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合して、組成物を化学量論的に細胞内の位置に送達するように適合されている融合ポリペプチドとを含む組成物コードしているポリヌクレオチド配列を含むベクター；対象とする遺伝子エレメントをコードするヌクレオチド配列と；レポーターエレメントとを含む発現ベクターであって、レポーターエレメントは、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および 1 つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで 1 つまたはそれ以上の核酸は 6 つの連続するヌクレオチドにおいて *crRNA* に対して少なくとも 50% の配列同一性を含む配列、および 6 つの連続するヌクレオチドにおいて *tracrRNA* に対して少なくとも 50% の配列同一性を含む配列を含む、発現ベクター；ならびに 12 ~ 30 ヌクレオチド（両端を含む）であり、PAM に対して 5' である配列にハイブリダイズするように適合されているスパーサーと；スパーサーに対して 3' である第 1 の二重鎖と；第 1 の二重鎖の第 1 の鎖の上に少なくとも 3 つの不对のヌクレオチド、および第 1 の二重鎖の第 2 の鎖の上に少なくとも 1 つの不对のヌクレオチドを含むパルジと；二重鎖の第 1 の鎖および第 2 の鎖を連結し、かつ少なくとも 3 ヌクレオチド長であるリンカーと；P-ドメインと；P-ドメインの 3' であり、かつ部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第 2 の二重鎖とを含む核酸コードするポリヌクレオチド配列を含むベクター；またはそれらの任意の組み合わせ；からなる群から選択されるベクターを含む医薬組成物を提供する。

【0088】

一態様では、本開示は、疾患を処置する方法であって、対象に、核酸ターゲティング核酸の P-ドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング；核酸ターゲティング核酸のパルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸；3' ハイブリダイズ伸長を含む操作された核酸ターゲティング核酸と、前記 3' ハイブリダイズ伸長に対してハイブリダイズされるドナーポリヌクレオチドとを含む組成物；エフェクタータンパク質および核酸を含む組成物であって、前記核酸は、6 つの連続するヌクレオチドにおいて *crRNA* に対して少なくとも 50% の配列同一性、6 つの連続するヌクレオチドにおいて *tracrRNA* に対して少なくとも 50% の配列同一性、および非天然配列を含み、ここで前記核酸は前記エフェクタータンパク質に結合するように適合されている、組成物；多重化遺伝子ターゲティング剤を含む組成物であって、前記多重化遺伝子ターゲティング剤は 1 つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで前記核酸モジュールは非天然配列を含み、ここで前記核酸モジュールは Cas9 のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも 10% のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに対して結合するように構成されており、ここで前記核酸モジュールは標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されている、組成物；改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して第 2 のプロトスパーサー隣接モチーフを標的とするように適合されるように改変されている、組成物；改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、野性型部位特異的ポリペプチドと比較して第 2 の核酸ターゲティング核酸を標的とするように適合されるように改変されている、組成物；配列番号 8 と比較して架橋らせん中の改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；配列番号 8 と比較して高度に塩基性のパッチ中の改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；配列番号 8 と比較して、ポリメラーゼ様

ドメイン中に改変を含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；配列番号 8 と比較して、架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；配列番号 8 と比較して改変されたヌクレアーゼドメインを含む改変された部位特異的ポリペプチドを含む組成物；第 1 の部位特異的ポリペプチドおよび第 1 の核酸ターゲティング核酸を含む第 1 の複合体、第 2 の部位特異的ポリペプチドおよび第 2 の核酸ターゲティング核酸を含む第 2 の複合体を含む組成物であって、前記第 1 および第 2 の核酸ターゲティング核酸が異なる、組成物；各々の核酸分子が核酸結合タンパク質結合部位を含む複数の核酸分子であって、前記複数の核酸分子のうち少なくとも 1 つが核酸ターゲティング核酸をコードし、前記複数の核酸分子のうち 1 つが部位特異的ポリペプチドをコードする核酸分子と、複数の前記核酸結合タンパク質を含む融合ポリペプチドであって、前記複数の核酸結合タンパク質はそれらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に結合するように適合されている、融合ポリペプチドを含む組成物；12~30ヌクレオチド（両端を含む）であり、PAM に対して 5' である配列にハイブリダイズするように適合されているスパーサーと、前記スパーサーに対して 3' である第 1 の二重鎖と、前記第 1 の二重鎖の第 1 の鎖の上に少なくとも 3 つの不对のヌクレオチドおよび前記第 1 の二重鎖の第 2 の鎖の上に少なくとも 1 つの不对のヌクレオチドを含むバルジと、前記二重鎖の前記第 1 の鎖および前記第 2 の鎖を連結し、少なくとも 3 ヌクレオチド長であるリンカーと、P-ドメインと、前記 P-ドメインの 3' であり、部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第 2 の二重鎖とを含む核酸を含む組成物；第 1 のヌクレアーゼドメイン、第 2 のヌクレアーゼドメイン、および挿入されたヌクレアーゼドメインを含む改変された部位特異的ポリペプチド；対象とする遺伝子エレメントおよびレポーターエレメントを含むドナーポリヌクレオチドであって、前記レポーターエレメントは、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および 1 つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで前記 1 つまたはそれ以上の核酸は、6 つの連続するヌクレオチドにおいて crRNA に対して少なくとも 50% の配列同一性を含む配列および 6 つの連続するヌクレオチドにおいて tracrRNA に対して少なくとも 50% の配列同一性を含む配列を含む、ドナーポリヌクレオチド；核酸ターゲティング核酸の P-ドメインに変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸を含むポリヌクレオチド配列を含むベクター；核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に変異を含む操作された核酸ターゲティング核酸をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクター；および標的核酸を改変する工程；改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸は非天然配列を含む、ベクター；改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸はエフェクタータンパク質、および部位特異的ポリペプチドに結合するように構成されている配列を含む、ベクター；改変された核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、改変された核酸ターゲティング核酸は、非天然配列、部位特異的ポリペプチド、およびエフェクタータンパク質を含む、ベクター；多重化遺伝子ターゲティング剤をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターであって、多重化遺伝子ターゲティング剤は 1 つまたはそれ以上の核酸モジュールを含み、ここで核酸モジュールは非天然配列を含み、ここで核酸モジュールは、Cas9 のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも 10% のアミノ酸配列同一性を含むポリペプチドに結合するように構成されており、ここで核酸モジュールは標的核酸に対してハイブリダイズするように構成されているベクター；配列番号 8 と比較して、架橋らせん中の改変、高度に塩基性のパッチ、ヌクレアーゼドメイン、およびポリメラーゼドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む改変された部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター；少なくとも 1 ヌクレオチドずつ異なる 2 つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸；および部位特異的ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクター；各々の核酸分子が核酸結合タンパク質結合部位を含む複数の核酸分子であって、複数の核酸分子の少なくとも 1 つは核酸ターゲティ

ング核酸をコードし、複数の核酸分子のうちの1つは部位特異的ポリペプチドをコードする核酸分子と；複数の核酸結合タンパク質を含む融合ポリペプチドであって、複数の核酸結合タンパク質が、それらの同族の核酸結合タンパク質結合部位に対して結合して、化学量論的に組成物を細胞内の位置に送達するように適合されている融合ポリペプチドとを含む組成物コードしているポリヌクレオチド配列を含むベクター；対象とする遺伝子エレメントをコードするポリヌクレオチド配列と；レポーターエレメントとを含む発現ベクターであって、レポーターエレメントは、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および1つまたはそれ以上の核酸を含み、ここで1つまたはそれ以上の核酸は6つの連続するヌクレオチドにおいてc r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列および6つの連続するヌクレオチドにおいてt r a c r R N Aに対して少なくとも50%の配列同一性を含む配列を含む、発現ベクター；ならびに12~30ヌクレオチド（両端を含む）であり、P A Mに対して5'である配列にハイブリダイズするように適合されているスペーサーと；スペーサーに対して3'である第1の二重鎖と；第1の二重鎖の第1の鎖の上に少なくとも3つの不对のヌクレオチド、および第1の二重鎖の第2の鎖の上に少なくとも1つの不对のヌクレオチドを含むバルジと；二重鎖の第1の鎖および第2の鎖を連結し、少なくとも3ヌクレオチド長であるリンカーと；P - ドメインと；P - ドメインの3'であり、部位特異的ポリペプチドに結合するように適合されている第2の二重鎖とを含む核酸コードするポリヌクレオチド配列を含むベクター；またはそれらの任意の組み合わせを投与する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、投与する工程は、ウイルス送達によって投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、投与する工程は、電ポレーションによって投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、投与する工程は、ナノ粒子送達によって投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、投与する工程は、リポソーム送達によって投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、投与する工程は、静脈内に、皮下に、筋肉内に、経口的に、経腸的に、エアロゾルによって、非経口的に、眼科的に、肺に、経皮的に、経膈的に、光学的に、経鼻的に、および局所投与による、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される方法による投与工程を含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、植物細胞、微生物細胞、および真菌細胞、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される細胞中で行われる。

【0089】

参照による組み込み

本明細書に言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、あたかも各々の個々の刊行物、特許または特許出願を参照によって組み入れたと詳細にかつ個々に示されるのと同じ程度まで、参照によって本明細書に組み入れる。

【0090】

本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲で詳細に述べられる。本発明の特徴および利点のより優れた理解は、説明的な実施形態を述べる次の詳細な記述への参照によって得られ、そこには、本発明の原理が利用され、添付の図面は以下の通りである：

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1A】本開示のシングルガイド核酸ターゲティング核酸の典型的な実施形態を示す図である。

【図1B】本開示のシングルガイド核酸ターゲティング核酸の典型的な実施形態を示す図である。

【図2】本開示のダブルガイド核酸ターゲティング核酸の典型的な実施形態を示す図である。

【図3】標的核酸切断を利用する本開示の配列濃縮法の典型的な実施形態を示す図である。

【図4】標的核酸濃縮を利用する本開示の配列濃縮法の典型的な実施形態を示す図である。

。

。

【図5】部位特異的ポリペプチドの精製を利用する部位特異的ポリペプチドのオフ標的結合部位を決定するための本開示の方法の典型的な実施形態を示す図である。

【図6】核酸ターゲティング核酸の精製を利用する部位特異的ポリペプチドのオフ標的結合部位を決定するための本開示の方法の典型的な実施形態を示す図である。

【図7】本開示の部位特異的ポリペプチドを用いた配列に基づく配列決定法のための典型的な実施形態を例示する図である。

【図8】本開示の部位特異的ポリペプチドを用いた配列に基づく配列決定法のための典型的な実施形態を例示し、切断された生成物が配列決定される図である。

【図9】本開示の部位特異的ポリペプチドを用いた次世代シーケンスに基づく方法のための典型的な実施形態を例示する図である。

【図10】典型的なタグ付きシングルガイド核酸ターゲティング核酸を示す図である。

【図11】典型的なタグ付きダブルガイド核酸ターゲティング核酸を示す図である。

【図12】分割システム（例えば、分割蛍光システム）でタグ付き核酸ターゲティング核酸を用いる方法の典型的な実施形態を例示する図である。

【図13】5'タグ付き核酸ターゲティング核酸の、標的核酸切断へ及ぼす影響に関するいくつかの典型的なデータを示す図である。

【図14】核酸ターゲティング核酸とタグとの間にタグリンカー配列を含む、典型的な5'タグ付き核酸ターゲティング核酸を例示する図である。

【図15】多重化した標的核酸切断方法の典型的な実施形態を示す図である。

【図16】RNA核酸の化学量論的送達方法の典型的な実施形態を示す図である。

【図17】核酸の化学量論的送達方法の典型的な実施形態を示す図である。

【図18】本開示の部位特異的ポリペプチドを用いた標的核酸へのレポーター要素の継ぎ目のない挿入の典型的な実施形態を示す図である。

【図19】標的核酸からレポーター要素を除去するための典型的な実施形態を示す図である。

【図20】化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) SF370由来のPRECRISPR核酸配列およびtracr核酸配列の核酸配列の相補的な部分を示す図である。

【図21】合成シングルガイド核酸ターゲティング核酸の典型的な二次構造を示す図である。

【図22A-1】典型的なシングルガイド核酸ターゲティング核酸骨格の変種を示す図である。囲み線内のヌクレオチドは、FL-tracr-crRNA配列であると標識されたCRISPR配列と比較して変更されたヌクレオチドに相当する。

【図22A-2】図22A-1の続き。

【図22B-1】典型的なシングルガイド核酸ターゲティング核酸骨格の変種を示す図である。囲み線内のヌクレオチドは、FL-tracr-crRNA配列であると標識されたCRISPR配列と比較して変更されたヌクレオチドに相当する。

【図22B-2】図22B-1の続き。

【図23A】試験管内切断検定の典型的なデータを示す図である。結果は、複数の合成核酸ターゲティング核酸骨格配列は、部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9）によって切断を支持できることを示す。

【図23B】試験管内切断検定の典型的なデータを示す図である。結果は、複数の合成核酸ターゲティング核酸骨格配列は、部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9）によって切断を支持できることを示す。

【図23C】試験管内切断検定の典型的なデータを示す図である。結果は、複数の合成核酸ターゲティング核酸骨格配列は、部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9）によって切断を支持できることを示す。

【図24-1】相補的領域/二本鎖に変種を含む典型的な合成シングルガイド核酸ターゲティング核酸配列を示す図である。囲み線内のヌクレオチドは、FL-tracr-crRNA配列であると分類されたCRISPR配列と比較して変更されたヌクレオチドに相

10

20

30

40

50

当する。

【図 2 4 - 2】図 2 4 - 1 の続き。

【図 2 5】相補的領域 / 二本鎖の 3' 側の領域内で、シングルガイド核酸ターゲティング核酸構造に対する典型的な変種を示す図である。囲み線内のヌクレオチドは、天然の化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) SF370 の CRISPR 核酸および *tracr* 核酸配列の組合せと比較して変更されたヌクレオチドに相当する。

【図 2 5 B】図 2 5 の続き。

【図 2 6 A - 1】相補的領域 / 二本鎖の 3' 側の領域内で、シングルガイド核酸ターゲティング核酸構造に対する典型的な変種を示す図である。囲み線内のヌクレオチドは、天然の化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) SF370 の CRISPR 核酸および *tracr* 核酸配列の組合せと比較して変更されたヌクレオチドに相当する。

10

【図 2 6 A - 2】図 2 6 A - 1 の続き。

【図 2 6 B - 1】相補的領域 / 二本鎖の 3' 側の領域内で、シングルガイド核酸ターゲティング核酸構造に対する典型的な変種を示す図である。囲み線内のヌクレオチドは、天然の化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) SF370 の CRISPR 核酸および *tracr* 核酸配列の組合せと比較して変更されたヌクレオチドに相当する。

【図 2 6 B - 2】図 2 6 A - 1 の続き。

【図 2 7 A】緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (PA14) の CRISPR 反復に由来する追加のヘアピン配列を含む典型的な変種核酸ターゲティング核酸構造を示す図である。囲み線内の配列は、PA14 由来のリボヌクレアーゼ *Csy4* と結合することができる。

20

【図 2 7 B】緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (PA14) の CRISPR 反復に由来する追加のヘアピン配列を含む典型的な変種核酸ターゲティング核酸構造を示す図である。囲み線内の配列は、PA14 由来のリボヌクレアーゼ *Csy4* と結合することができる。

【図 2 8】複数の合成核酸ターゲティング核酸骨格配列が Cas9 切断を支持することを示す、試験管内切断検定の典型的なデータを示す図である。上段および下段のゲルの画像は、2 回の独立した反復で検定が行われたことを表す。

【図 2 9】複数の合成核酸ターゲティング核酸骨格配列が Cas9 切断を支持することを示す、試験管内切断検定の典型的なデータを示す図である。上段および下段のゲルの画像は、2 回の独立した反復で検定が行われたことを表す。

30

【図 3 0】標的核酸内の改変部位にドナーポリヌクレオチドを持ってくる本開示の典型的な方法を示す図である。

【図 3 1】電子情報を保存して、共有するためのシステムを示す図である。

【図 3 2】標的核酸内で平滑末端切断を生成する 2 種類のニッカーゼの典型的な実施形態を示す図である。核酸ターゲティング核酸と複合型の部位特異的改変ポリペプチドは示していない。

【図 3 3】2 種類のニッカーゼを使用し粘着末端を生成する、標的核酸のジグザグ切断の典型的な実施形態を示す図である。核酸ターゲティング核酸と複合型の部位特異的改変ポリペプチドは示していない。

40

【図 3 4】2 種類のニッカーゼを使用し中型の粘着末端を生成する、標的核酸のジグザグ切断の典型的な実施形態を示す図である。核酸ターゲティング核酸と複合型の部位特異的改変ポリペプチドは示していない。

【図 3 5 - 1】Cas9 オーソログの配列アライメントを例示する図である。下方に「X」と記したアミノ酸は、類似していると考えてもよい。下方に「Y」と記したアミノ酸は、高度に保存されるか、または全配列で同一であると考えてことができる。「X」または「Y」のないアミノ酸残基は、保存されていなくてもよい。

【図 3 5 - 2】図 3 5 - 1 の続き。

【図 3 5 - 3】図 3 5 - 2 の続き。

【図 3 5 - 4】図 3 5 - 3 の続き。

50

- 【図 3 5 - 5】図 3 5 - 4 の続き。
- 【図 3 5 - 6】図 3 5 - 5 の続き。
- 【図 3 5 - 7】図 3 5 - 6 の続き。
- 【図 3 5 - 8】図 3 5 - 7 の続き。
- 【図 3 6】標的核酸切断上で核酸ターゲティング核酸変種の機能性を示す図である。図 3 6 中でテストされる変種は、図 2 2、図 2 4、および図 2 5 に示される変種に対応する。
- 【図 3 7 A】変種核酸ターゲティング核酸を用いた試験管内切断検定を示す図である。
- 【図 3 7 B】変種核酸ターゲティング核酸を用いた試験管内切断検定を示す図である。
- 【図 3 7 C】変種核酸ターゲティング核酸を用いた試験管内切断検定を示す図である。
- 【図 3 7 D】変種核酸ターゲティング核酸を用いた試験管内切断検定を示す図である。 10
- 【図 3 8】野生型緑膿菌 (*P. aeruginosa*) 由来の C s y 4 の典型的なアミノ酸配列を示す図である。
- 【図 3 9】酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ (例えば、C s y 4) の典型的なアミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 0】緑膿菌 (*P. aeruginosa*) 由来の C s y 4 の典型的なアミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 A】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 B】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 C】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 D】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。 20
- 【図 4 1 E】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 F】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 G】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 H】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 I】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 1 J】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 2 A】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 2 B】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【図 4 2 C】典型的な C a s 6 アミノ酸配列を示す図である。
- 【発明を実施するための形態】 30
- 【0 0 9 2】
- 本明細書において用いる場合、「親和性タグ」とは、ペプチド親和性タグまたは核酸親和性タグのいずれを指してもよい。親和性タグとは一般には、分子に結合し得る (例えば、低分子、タンパク質、共有結合によって結合) タンパク質または核酸配列を指す。親和性タグは、非天然配列であってもよい。ペプチド親和性タグは、ペプチドを含んでもよい。ペプチド親和性タグは、分割システムの一部であり得るものであってもよい (例えば、2 つの不活性なペプチドフラグメントは、トランスで一緒に組み合わせさせて、活性な親和性タグを形成し得る)。核酸親和性タグは、核酸を含んでもよい。核酸親和性タグは、公知の核酸配列に対して選択的に結合し得る (例えば、ハイブリダイゼーションを通じて) 配列であってもよい。核酸親和性タグは、タンパク質に対して選択的に結合し得る配列であつてもよい。親和性タグは、天然のタンパク質に融合し得る。親和性タグは、ヌクレオチド配列に融合し得る。時には、1 つ、2 つまたは複数の親和性タグが天然のタンパク質またはヌクレオチド配列に融合してもよい。親和性タグは、*in vitro* または *in vivo* の転写の方法を用いて、核酸ターゲティング核酸に導入されてもよい。核酸親和性タグとしては、例えば、化学タグ、RNA 結合タンパク質結合配列、DNA 結合タンパク質結合配列、親和性タグ付きポリヌクレオチドに対してハイブリダイズ可能な配列、合成の RNA アプタマー、または合成の DNA アプタマーを挙げることができる。化学的核酸親和性タグの例としては、限定するものではないが、リボ - ヌクレオ三リン酸であつて、ピオチン、蛍光色素、およびジゴキシゲニンを含むものを挙げることができる。タンパク質結合核酸親和性タグの例としては、限定するものではないが、MS 2 結合配列、U 40 50

1 A 結合配列、ステムループ結合タンパク質配列、ボックスB配列、eIF4A配列、またはRNA結合タンパク質によって認識される任意の配列を挙げることができる。核酸親和性タグ付きオリゴヌクレオチドの例としては、限定するものではないが、ビオチン化オリゴヌクレオチド、2,4-ジニトロフェニルオリゴヌクレオチド、フルオレseinオリゴヌクレオチド、および第一級アミンコンジュゲートオリゴヌクレオチドが挙げることができる。

【0093】

核酸親和性タグは、RNAアプタマーであってもよい。アプタマーとしては、テオフィリン、ストレプトアビジン、デキストランB512、アデノシン、グアノシン、グアニン/キサンチン、7-メチル-GTP、アミノ酸アプタマー、例えば、アルギニン、シトルリン、バリン、トリプトファンに結合するアプタマー、シアノコバラミン、N-メチルメソポリフィリンIX、フラビン、NAD、および抗生物質アプタマー、例えば、トブラマイシン、ネオマイシン、リビドマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、ピオマイシンおよびクロラムフェニコールに結合するアプタマーを挙げることができる。

10

【0094】

核酸親和性タグは、部位特異的ポリペプチドによって結合され得るRNA配列を含んでもよい。部位特異的ポリペプチドは、条件付きで酵素学的に不活性であってもよい。RNA配列は、I型、II型、および/またはIII型のCRISPRシステムのメンバーによって結合され得る配列を含んでもよい。RNA配列は、RAMPファミリーのメンバータンパク質によって結合され得る。RNA配列は、Cas6ファミリーのメンバーのタンパク質(例えば、Csy4、Cas6)によって結合され得る。RNA配列は、Cas5ファミリーのメンバータンパク質(例えば、Cas5)によって結合されてもよい。例えば、Csy4は、高い親和性(Kd約50pM)で特定のRNAヘアピン配列に結合してもよく、3'部位でヘアピンに対してRNAを切断し得る。Cas5またはCas6ファミリーのメンバータンパク質は、以下のヌクレオチド配列に対して少なくとも約、または多くとも約30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を含むRNA配列に結合し得る：5'-GUUCACUGCCGUAUAGGCAGCUAAGAAA-3'；

20

5'-GUUCACUGCCGUAUAGGCAGCUAAGAAA-3'；

5'-GUUGCAAAGGGAUUGAGCCCCGUAAGGGGAUUGCGAC-3'；

30

5'-GUUGCAAACCUCGUUAGCCUCGUAGAGGGAUUGAAAC-3'；

5'-GGAUCGAUAACCCACCCCGAAGAAAAGGGGACGAGAAC-3'；

5'-GUCGUCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC-3'；

5'-GAUAUAACCUAUAUACCCUCGAGAGGGGACGGAAAC-3'；

5'-CCCCAGUCACCUCGGGAGGGGACGGAAAC-3'；

40

5'-GUUCCAAUUAUAUCUUAACCCUAUUAGGGGAUUGAAAC-3'。

5'-GUUGCAAAGGGAUUGAGCCCCGUAAGGGGGAUUGCGAC-3'；

5'-GUUGCAAACCUCGUUAGCCUCGUAGAGGGAUUGAAAC-3'；

5'-GGAUCGAUAACCCACCCCGAAGAAAAGGGGACGAGAAC-3'；

5'-GUCGUCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC-3'；

50

5' - GAUAUA AACCUAAUUAACCU CGAGAGGGGACGGAAAC -
 3' ;
 5' - CCCCAGUCACCU CGGGAGGGGACGGAAAC - 3' ;
 5' - GUUCCA AUUA AUUCUUA AACCCUAUUAAGGGAUUGAAAC
 - 3' ,
 5' - GUCGCC CCCCACGCGGGGGCGUGGAUUGAAAC - 3' ;
 5' - CCAGCCGCCUUCGGGCGGCGUGUGUGUUGAAAC - 3' ;
 5' - GUCGCACUCUACAUGAGUGCGUGGAUUGAAAU - 3' ;
 5' - UGUCGCACCUUAUAUAUAGGUGCGUGGAUUGAAAU - 3' ;
 および
 5' - GUCGCGCCCCCGCAUGGGGCGCGUGGAUUGAAA - 3' .

10

【0095】

核酸親和性タグは、部位特異的ポリペプチドによって結合され得るDNA配列を含んでもよい。部位特異的ポリペプチドは、条件付きで酵素学的に不活性であってもよい。DNA配列は、I型、II型、および/またはIII型のCRISPRシステムのメンバーによって結合され得る配列を含んでもよい。DNA配列は、アオイガイ(Argonaut)タンパク質によって結合されてもよい。DNA配列は、ジンクフィンガードメイン、TALEDメイン、または任意の他のDNA結合ドメインを含むタンパク質によって結合されてもよい。

20

【0096】

核酸親和性タグは、リボザイム配列を含んでもよい。適切なリボザイムとしては、ペプチジルトランスフェラーゼ23S rRNA、Rnase P、I群イントロン、II群イントロン、GIR1分岐リボザイム、リードザイム(Leadzyme)、ヘアピンリボザイム、ハンマーヘッドリボザイム、HDVリボザイム、CEB3リボザイム、VSRリボザイム、glmSリボザイム、CoTCリボザイム、および合成のリボザイムを挙げることができる。

【0097】

ペプチド親和性タグは、トラッキングまたは精製のために用いられ得るタグを含んでもよい(例えば、蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質(GFP)、YFP、RFP、CFP、mCherry、tdTomato、hisタグ、(例えば、6XHisタグ)、ヘマグルチニン(HA)タグ、FLAGタグ、Mycタグ、GSTタグ、MBPタグ、およびキチン結合タンパク質タグ、カルモジュリンタグ、V5タグ、ストレプトアビジン結合タグ、など)。

30

【0098】

核酸およびペプチド親和性タグの両方とも、低分子タグ、例えば、ビオチン、またはジギトキシン、蛍光標識タグ、例えば、フルオロセイン、ローダミン、Alexa fluor色素、シアニン3色素、シアニン5色素などを含んでもよい。

【0099】

核酸親和性タグは、核酸(例えば、核酸ターゲティング核酸)に対して5'側に配置されてもよい。核酸親和性タグは、核酸に対して3'側に配置されてもよい。核酸親和性タグは、核酸に対して5'および3'側に配置されてもよい。核酸親和性タグは、核酸内に配置されてもよい。ペプチド親和性タグは、ポリペプチド配列に対してN末端に配置されてもよい。ポリペプチド親和性タグは、ポリペプチド配列に対してC末端に配置されてもよい。ペプチド親和性タグは、ポリペプチド配列に対してN末端およびC末端に配置されてもよい。複数の親和性タグは、核酸および/またはポリペプチド配列に対して融合されてもよい。

40

【0100】

本明細書において用いる場合、「捕捉剤」は一般的にはポリペプチドおよび/または核酸を精製し得る剤を指してもよい。捕捉剤は、生物学的に活性な分子または材料(例えば、天然または合成で見出される任意の生物学的物質であってもよく、これには限定するも

50

のではないが、細胞、ウイルス、細胞下粒子、タンパク質、例としては、さらに詳細には、抗体、免疫グロブリン、抗原、リポタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質複合体、(ストレプト)アビジン-ビオチン複合体、リガンド、受容体または低分子、アプタマー、核酸、DNA、RNA、ペプチド核酸、オリゴ糖類、多糖類、リポ多糖類、細胞代謝物、ハプテン、薬理的に活性な物質、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、および糖類)が挙げられる。いくつかの実施形態では、捕捉剤は、親和性タグを含んでもよい。いくつかの実施形態では、捕捉剤は優先的に、標的ポリペプチドまたは対象とする核酸に結合し得る。捕捉剤は、混合物中で浮遊性であってもよい。捕捉剤は、粒子(例えば、ビーズ、マイクロビーズ、ナノ粒子)に結合され得る。捕捉剤は、固体または半固体表面に結合されてもよい。いくつかの場合には、捕捉剤は、標的に対して不可逆的に結合される。他の場合には、捕捉剤は、標的に可逆的に結合される(例えば、標的が溶出され得る場合、またはイミダゾールのような化学薬品の使用によって)。

10

20

30

40

50

【0101】

本明細書において用いる場合、「Cas5」は、一般的には、野性型の例示的なCas5ポリペプチド(例えば、デスルホビプリオ・ブルガリス(*D. vulgaris*)由来のCas5および/または図42に示される任意の配列)に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指してもよい。Cas5は一般的には、野性型の例示的なCas5ポリペプチド(例えば、デスルホビプリオ・ブルガリス由来のCas5)に対して多くとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指してもよい。Cas5とは、アミノ酸変化、例えば、欠失、挿入、置換、変種、変異、融合、キメラ、またはそれらの任意の組み合わせを含み得るCas5タンパク質の野性型または改変された型を指してもよい。

【0102】

本明細書において用いる場合、「Cas6」とは一般的には、野性型の例示的なCas6ポリペプチド(例えば、サーマス・サーモフィルス(*T. thermophilus*)由来のCas6、および/または図41に示される配列)に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指してもよい。Cas6は一般的には、野性型の例示的なCas6ポリペプチド(例えば、サーマス・サーモフィルス由来)に対して、多くとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指してもよい。Cas6とは、アミノ酸変化、例えば、欠失、挿入、置換、変種、変異、融合、キメラ、またはそれらの任意の組み合わせを含み得るCas6タンパク質の野性型または改変された型を指してもよい。

【0103】

本明細書において用いる場合、「Cas9」とは一般的には、野性型の例示的なCas6ポリペプチド(例えば、化膿レンサ球菌由来のCas9(配列番号8、配列番号1~256、配列番号795~1346)に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指してもよい。Cas9とは、野性型の例示的なCas9ポリペプチド(例えば、化膿レンサ球菌由来)に対して、多くとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指してもよい。Cas9とは、アミノ酸変化、例えば、欠失、挿入、置換、変種、変異、融合、キメラ、またはそれらの任意の組み合わせを含み得るCas9タンパク質の野性型または改変された型を指してもよい。

【0104】

本明細書において用いる場合、「細胞」とは一般的には生物学的細胞を指してもよい。細胞とは、生きている生物体の基本的な構造の、機能的および/または生物学的な単位であり得る。細胞は、1つまたはそれ以上の細胞を有する任意の生物体由来であってもよい。いくつかの非限定的な例としては、原核生物細胞、真核生物細胞、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞真核生物生物体の細胞、原生動物細胞、植物由来の細胞（例えば、植物の作物由来の細胞、果実、野菜、穀物、ダイズ、コーン（corn）、トウモロコシ（maize）、コムギ、種子、トマト、コメ、キャッサバ、サトウキビ、カボチャ、干し草（hay）、ジャガイモ、ワタ、大麻、タバコ、顕花植物、針葉樹、裸子植物、シダ類、ヒカゲノカズラ（clubmosses）、ツノゴケ類（hornworts）、コケ類（liverworts）、コケ（mosses））、藻細胞、（例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー（*Botryococcus braunii*）、クラミドモナス・レインハルドッテイ（*Chlamydomonas reinhardtii*）、ナンノクロロプシス・ガンジタナ（*Nannochloropsis gaditana*）、クロレラ・ピレノイドーサ（*Chlorella pyrenoidosa*）、サルガッサム・パテンス（*Sargassum patens*）カール・アガード（C. Agardh）、など）、海草（例えば、ケルプ）真菌細胞（例えば、酵母細胞、キノコ由来の細胞）、動物細胞、無脊椎動物（例えば、ショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線虫など）由来の細胞、脊椎動物（例えば、魚、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、哺乳動物（例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、ヒトなど）由来の細胞、および種々のものが挙げられる。時には、細胞は、天然の生物体由来ではない（例えば、細胞は、合成的に作製されたものでもよく、時には、人工細胞と呼ばれる）。

10

20

30

40

50

【0105】

細胞は、*in vitro*であってもよい。細胞は、*in vivo*であってもよい。細胞は単離された細胞であってもよい。細胞は、生物体の内部の細胞であってもよい。細胞は、生物体であってもよい。細胞は、細胞培養物中の細胞であってもよい。細胞は、細胞の収集のうちの一つであってもよい。細胞は、原核生物細胞であっても、または原核生物細胞由来であってもよい。細胞は、細菌細胞であってもよいし、または細菌細胞由来であってもよい。細胞は、古細菌細胞であってもよいし、または古細菌細胞由来であってもよい。細胞は、真核生物細胞であってもよいし、または真核生物細胞由来であってもよい。細胞は、植物細胞であってもよいし、または植物細胞由来であってもよい。細胞は、動物細胞であってもよいし、または動物細胞由来であってもよい。細胞は、無脊椎動物細胞であってもよいし、または無脊椎動物細胞由来であってもよい。細胞は、脊椎動物細胞であってもよいし、または脊椎動物細胞由来であってもよい。細胞は、哺乳動物細胞であってもよいし、または哺乳動物細胞由来であってもよい。細胞は、げっ歯類細胞であってもよいし、またはげっ歯類細胞由来であってもよい。細胞は、ヒト細胞であってもよいし、またはヒト細胞由来であってもよい。細胞は、微生物細胞であってもよいし、または微生物細胞由来であってもよい。細胞は、真菌細胞であってもよいし、または真菌細胞由来であってもよい。

【0106】

細胞は、幹細胞であっても、または前駆細胞であってもよい。細胞としては、幹細胞（例えば、成体幹細胞、胚性幹細胞、iPS細胞）および前駆細胞（例えば、心臓前駆細胞、神経前駆細胞など）が挙げられる。細胞としては、哺乳動物の幹細胞および前駆細胞が挙げられ、これには、げっ歯類幹細胞、げっ歯類前駆細胞、ヒト幹細胞、ヒト前駆細胞などが挙げられる。クローン細胞は、細胞の子孫を含んでもよい。細胞は、標的核酸を含んでもよい。細胞は生きている生物体中であってもよい。細胞は、遺伝的に改変された細胞であってもよい。細胞は宿主細胞であってもよい。

【0107】

細胞は、全能性幹細胞であってもよいが、本開示のいくつかの実施形態では、「細胞」という用語を用いてもよく、ただし全能性幹細胞を指さない場合がある。細胞は、植物細胞

胞であってもよいが、本開示のいくつかの実施形態では、「細胞」という用語が用いられてもよく、ただし植物細胞を指さない場合もある。細胞は、多能性細胞であってもよい。例えば、細胞は、造血性の細胞系列中の他の細胞へ分化し得る多能性造血細胞であってもよいが、任意の他の非造血性細胞へ分化できなくてもよい。細胞は、全生物体へ発達できる場合がある。細胞は、全生物体へ発達できてもできなくてもよい。細胞は全生物体であってもよい。

【0108】

細胞は、初代細胞であってもよい。例えば、初代細胞の培養物が、0回、1回、2回、4回、5回、10回、15回以上継代されてもよい。細胞は、単細胞生物体であってもよい。細胞は、培養物中で増殖されてもよい。

10

【0109】

細胞は、病的な細胞であってもよい。病的な細胞は、変更された代謝、遺伝子発現および/または形態学的特徴を有してもよい。病的細胞は、癌細胞、糖尿病性細胞、およびアポトーシス細胞であってもよい。病的な細胞は、疾患に罹患した対象由来の細胞であってもよい。例示的な疾患としては、血液障害、癌、代謝障害、眼の障害、臓器障害、筋骨格障害、心疾患などが挙げられる。

【0110】

細胞が初代細胞である場合、それらは、任意の方法で個体から回収されてもよい。例えば、白血球は、アフエレーシス、白血球アフエレーシス、密度勾配分離などによって回収されてもよい。皮膚、筋肉、骨髄、脾臓、肝臓、膵臓、肺、腸、胃などのような組織由来の細胞を、生検によって回収してもよい。収集された細胞の分散または懸濁のために適切な溶液を用いてもよい。このような溶液は、一般的には、低濃度で許容可能な緩衝液と組み合わせ、ウシ胎仔血清または他の天然に存在する因子を従来のように補充された、平衡塩溶液、(例えば、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)、ハンクス平衡塩溶液など)であってもよい。緩衝液としては、HEPES、リン酸塩緩衝液、乳酸塩緩衝液などが挙げられる。細胞は、直ちに用いられてもよいし、または保管されてもよい(例えば、凍結による)。凍結細胞は、解凍されてもよく、かつ再使用されてもよい。細胞は、DMSO、血清、媒体緩衝液(例えば、10%のDMSO、50%の血清、40%の緩衝化媒体)中で凍結されてもよく、および/またはいくつかの他のこのような一般的な溶液を用いて、細胞を凍結温度で保存してもよい。

20

30

【0111】

本明細書において用いる場合、「条件付きで酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチド」とは、一般的には、配列特異的な方式でポリヌクレオチド中の核酸配列に結合し得るが、酵素的ドメインを活性にさせる1つまたはそれ以上の条件を除いて標的ポリヌクレオチドを切断し得ないポリペプチドを指してもよい。条件付きで酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、条件付きで活性化され得る酵素学的に不活性なドメインを含んでもよい。条件付きで酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、イミダゾールの存在下で、条件付きで活性化され得る。条件付きで酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、その同族のリガンドに結合できない変異した活性部位を含んでもよく、それによって酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチドが生じる。この変異した活性部位は、リガンド類似体が、変異した活性部位に結合し得、かつ部位特異的ポリペプチドに反応性であるように、リガンド類似体に結合するように設計され得る。例えば、ATP結合タンパク質は、タンパク質の活性を阻害し得、さらにATP類似体に特異的に結合するように設計されている、変異した活性部位を含んでもよい。ATP類似体の結合は、タンパク質を再活性化し得るが、ATPは活性化し得ない。条件付きで酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、1つまたはそれ以上の非天然配列(例えば、融合、親和性タグ)を含んでもよい。

40

【0112】

本明細書において用いる場合、「crRNA」は一般的には、野性型の例示的なcrRNA(例えば、化膿レンサ球菌由来のcrRNA(例えば、配列番号569、配列番号5

50

63～679)) に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有する核酸を指してもよい。crRNAは一般的には、野性型の例示的なcrRNA(例えば、化膿レンサ球菌由来のcrRNA)に対して多くとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有する核酸を指してもよい。crRNAとは、欠失、挿入、または置換、変種、変異、またはキメラのようなヌクレオチド変化を含み得る、crRNAの改変型を指してもよい。crRNAは、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにまたがって、野性型の例示的なcrRNA(例えば、化膿レンサ球菌由来のcrRNA)配列に対して少なくとも約60%の同一性を有している核酸であってもよい。例えば、crRNA配列は、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにまたがって、野性型の例示的なcrRNA配列(例えば、化膿レンサ球菌由来のcrRNA)に対して少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、または100%同一であってもよい。

10

【0113】

本明細書において用いる場合、「CRISPR反復」または「CRISPR反復配列」とは、最小CRISPR反復配列を指してもよい。

【0114】

本明細書において用いる場合、「Csy4」とは一般的には、野性型の例示的なCsy4ポリペプチド(例えば、緑膿菌(*P. aeruginosa*)由来のCsy4、図40を参照のこと)に対して、多くとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指してもよい。Csy4とは、一般的には野性型の例示的なCsy4ポリペプチド(例えば、緑膿菌由来のCsy4)に対して、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指してもよい。Csy4とは、欠失、挿入、置換、変種、変異、融合、キメラ、またはそれらの任意の組み合わせのようなアミノ酸変化を含み得る、Csy4タンパク質の野性型または改変された型を指してもよい。

20

30

【0115】

本明細書において用いる場合、「エンドリボヌクレアーゼ」は一般的には、RNAを切断し得る、ポリペプチドを指してもよい。いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼは、部位特異的ポリペプチドであってもよい。エンドリボヌクレアーゼは、CRISPRシステムのメンバーであってもよい(例えば、I型、II型、III型)。エンドリボヌクレアーゼは、反復関連ミステリアスプロテイン(Repeat Associated Mysterious Protein)(RAM)スーパーファミリーのタンパク質(例えば、Cas6、Cas6、Cas5ファミリー)を指してもよい。エンドリボヌクレアーゼとしてはまた、RNase A、RNase H、RNase I、RNase IIIファミリーのメンバー(例えば、Drosha、Dicer、RNase N)、RNase L、RNase P、RNase PhyM、RNase T1、RNase T2、RNase U2、RNase V1、RNase Vが挙げられる。エンドリボヌクレアーゼとは、条件付きで酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼを指してもよい。エンドリボヌクレアーゼとは、触媒的に不活性なエンドリボヌクレアーゼを指してもよい。

40

【0116】

本明細書において用いる場合、「ドナーポリヌクレオチド」とは、ゲノム操作または標的核酸操作の間にある部位に組み込まれ得る核酸を指してもよい。

【0117】

50

本明細書において用いる場合、「固定剤」または「架橋剤 (cross-linker)」とは一般的には、細胞を固定または架橋し得る剤を指してもよい。固定された細胞または架橋細胞は、細胞中でタンパク質 - 核酸複合体を安定化し得る。適切な固定剤および架橋剤としては、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、エタノールベースの固定剤、メタノールベースの固定剤、アセトン、酢酸、四酸化オスミウム、重クロム酸カリウム、クロム酸、過マンガン酸カリウム、水銀剤、ピクリン酸塩、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、アミン反応性 NHS - エステル架橋、例えば、ビス [スルホスクシンイミジル] スベラート (BS3)、3, 3' - ジチオビス [スルホスクシンイミジルプロピオネート] (DTSSP)、エチレングリコールビス [スルホスクシンイミジルスクシネート (スルホ - EGS)、ジスクシンイミジルグルタレート (DSG)、ジチオビス [スクシンイミジルプロピオネート] (DSP)、ジスクシンイミジルスベラート (DSS)、エチレングリコールビス [スクシンイミジルスクシネート] (EGS)、NHS - エステル / ジアジリン架橋、例えば、NHS - ジアジリン、NHS - LC - ジアジリン、NHS - SS - ジアジリン、スルホ - NHS - ジアジリン、スルホ - NHS - LC - ジアジリン、およびスルホ - NHS - SS - ジアジリンが挙げられる。

【0118】

本明細書において用いる場合、「融合」とは、1つまたはそれ以上の非天然配列 (例えば、部分) を含むタンパク質および / または核酸を指してもよい。融合は、1つまたはそれ以上の同じ非天然配列を含んでもよい。融合は、1つまたはそれ以上の異なる非天然配列を含んでもよい。融合は、キメラであってもよい。融合は、核酸親和性タグを含んでもよい。融合は、バーコードを含んでもよい。融合は、ペプチド親和性タグを含んでもよい。融合は、部位特異的ポリペプチドの細胞下局在化を提供し得る (例えば、核を標的とするための、核局在シグナル (NLS)、ミトコンドリアを標的とするためのミトコンドリア局在化シグナル、クロロプラストを標的とするためのクロロプラスト局在化シグナル、小胞体 (ER) 保持シグナルなど)。融合は、トラッキングまたは精製するために用いられ得る非天然配列 (例えば、親和性タグ) を提供し得る。融合は、低分子、例えば、ビオチンまたは色素、例えば、alex fluor 色素、シアニン (Cyanine) 3 色素、シアニン 5 色素であってもよい。融合は、安定性の増大または減少を提供し得る。

【0119】

いくつかの実施形態では、融合は、検出可能なシグナルを提供し得る部分を含む、検出可能標識を含んでもよい。検出可能なシグナルを提供し得る、適切な検出可能標識および / または部分としては、限定するものではないが、酵素、放射性同位体、特異的結合対のメンバー；フルオロフォア；蛍光タンパク質；量子ドット；などが挙げられる。

【0120】

融合は、FRET 対のメンバーを含んでもよい。使用に適した FRET 対 (ドナー / アクセプター) としては、限定するものではないが、EDANS / フルオレセイン、IAEDANS / フルオレセイン、フルオレセイン / テトラメチルローダミン、フルオレセイン / Cy5、IEDANS / DABCYL、フルオレセイン / QSY-7、フルオレセイン / LC Red 640、フルオレセイン / Cy 5.5 およびフルオレセイン / LC Red 705 が挙げられる。

【0121】

フルオロフォア / 量子ドットドナー / アクセプター対は、融合として用いられ得る。適切なフルオロフォア (「蛍光標識」) としては、その固有の蛍光特性を介して検出され得る任意の分子が挙げられ、これには励起の際に検出可能な蛍光が挙げられる。適切な蛍光標識としては、限定するものではないが、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリトロシン、クマリン、メチル - クマリン、ピレン、マラサイトグリーン (Malacite green)、スチルベン、Lucifer Yellow、Cascade Blue (商標)、テキサスレッド (Texas Red)、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5、LC Red 705 およびオレゴングリーン (Oregon green)

10

20

30

40

50

が挙げられる。

【0122】

融合は、酵素を含んでもよい。適切な酵素としては、限定するものではないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどが挙げられる。

【0123】

融合は、蛍光タンパク質を含んでもよい。適切な蛍光タンパク質としては、限定するものではないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、(例えば、Aequoria victoriaのGFP、Anguilla japonicaの蛍光タンパク質、またはそれらの変異体もしくは誘導体)、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、任意の種々の蛍光および有色のタンパク質が挙げられる。

10

【0124】

融合は、ナノ粒子を含んでもよい。適切なナノ粒子としては、蛍光ナノ粒子または発光性ナノ粒子、および磁性ナノ粒子が挙げられる。ナノ粒子(単数または複数)の任意の光学的または磁性の特性または特徴が検出され得る。

【0125】

融合は、量子ドット(QD)を含んでもよい。QDは、種々の異なる物質を含むコーティング層を塗布することによって水溶性にされ得る。例えば、QDは、両親媒性ポリマーを用いて溶解され得る。使用された例示的なポリマーとしては、オクチルアミン改変の低分子量ポリアクリル酸、ポリエチレングリコール(PEG)-誘導体化リン脂質、ポリ無水物、ブロックコポリマーなどが挙げられる。QDは、コーティング層に直接または間接的に連結され得る任意の多数の異なる官能基または連結剤を介してポリペプチドに対してコンジュゲートされ得る。広範な種々の吸収スペクトルおよび発光スペクトルを有するQDは、例えば、Quantum Dot Corp.(Hayward Calif.; 現在Invitrogenが所有)から、またはEvident Technologies(Troy, N.Y.)から市販されている。例えば、およそ525、535、545、565、585、605、655、705、および800nmのピーク発光波長を有するQDが利用可能である。従って、QDは、スペクトルの可視部分にまたがって、およびある場合には超えてさえ、ある範囲の異なる色を有してもよい。

20

【0126】

適切な放射性同位体としては、限定するものではないが ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、および ^{125}I が挙げられる。

30

【0127】

本明細書において用いる場合、「遺伝的に改変された細胞」とは、一般的には、遺伝的に改変された細胞を指してもよい。遺伝的な改変のいくつかの非限定的な例としては、挿入、欠失、逆位、転座、遺伝子融合、または1つまたはそれ以上のヌクレオチドの変化が挙げられる。遺伝的に改変された細胞は、二重鎖破壊(例えば、DNA破壊)を導入されている標的核酸を含んでもよい。遺伝的に改変された細胞は、外因的に導入された核酸(例えば、ベクター)を含んでもよい。遺伝的に改変された細胞は、本開示の外因的に導入されたポリペプチドおよび/または本開示の核酸を含んでもよい。遺伝的に改変された細胞は、ドナーポリヌクレオチドを含んでもよい。遺伝的に改変された細胞は、その遺伝的に改変された細胞のゲノム中に統合された外因性の核酸を含んでもよい。遺伝的に改変された細胞は、DNAの欠失を含んでもよい。遺伝的に改変された細胞とはまた、改変されたミトコンドリアのDNAまたはクロロプラストDNAを有する細胞を指してもよい。

40

【0128】

本明細書において用いる場合、「ゲノム操作」とは、標的核酸を改変する方法を指してもよい。ゲノム操作とは、天然の核酸への非天然核酸の組み込みを指してもよい。ゲノム操作とは、標的核酸の組み込みも欠失もない、標的核酸への部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の標的化を指してもよい。ゲノム操作とは、標的核酸の切断、および標的核酸中の外因性配列の組み込みのない標的核酸の再結合、または標的核酸の欠失を指してもよい。天然の核酸は遺伝子を含んでもよい。非天然核酸は、ドナーポリヌク

50

レオチドを含んでもよい。本開示の方法では、部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9）は、核酸（例えば、ゲノムのDNA）中に二本鎖の破壊を導入し得る。二本鎖の破壊は、細胞の内因性DNA修復経路（例えば、相同組換え（HR）および/または非相同末端結合（non-homologous end joining）（NHEJ）、またはA-NHEJ（選択的非相同末端結合））を刺激し得る。変異、欠失、変更、ならびに外来、外因性および/または別の核酸の組み込みは、二本鎖DNA破壊の部位に導入され得る。

【0129】

本明細書において用いる場合、「単離された」という用語は、ヒトの手によって、その天然の環境とは離れて存在し、従って天然の生成物ではない核酸またはポリペプチドを指してもよい。単離されたとは、実質的に純粋を意味し得る。単離された核酸またはポリペプチドは、精製型で存在してもよいし、および/または天然ではない環境で、例えば、トランスジェニック細胞中などに存在してもよい。

10

【0130】

本明細書において用いる場合、「非天然」とは、天然の核酸またはタンパク質中には見出されない核酸またはポリペプチドの配列を指してもよい。非天然とは、親和性タグを指してもよい。非天然とは、融合を指してもよい。非天然とは、変異、挿入および/または欠失を含む天然に存在する核酸またはポリペプチド配列を指してもよい。非天然配列は、非天然配列が融合されている核酸および/またはポリペプチド配列によっても呈示される活性（例えば、酵素活性、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性など）を呈してもよいし、および/またはコードしてもよい。非天然の核酸またはポリペプチドの配列は、遺伝子操作によって、天然に存在する核酸またはポリペプチド配列（またはその変種）に連結されて、キメラの核酸および/またはポリペプチドをコードしているキメラの核酸および/またはポリペプチドの配列を生成し得る。非天然配列とは、3'ハイブリダイズ伸長を指してもよい。

20

【0131】

本明細書において用いる場合、「核酸」とは一般的には、ポリヌクレオチド配列、またはそのフラグメントを指す。核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。核酸は、細胞に対して外因性であっても、または内因性であってもよい。核酸は、無細胞環境中に存在してもよい。核酸は、遺伝子であっても、またはそのフラグメントであってもよい。核酸はDNAであってもよい。核酸はRNAであってもよい。核酸は、1つまたはそれ以上の類似体（例えば、変更された骨格、糖または核酸塩基）を含んでもよい。アナログのいくつかの非限定的な例としては、5-プロモウラシル、ペプチド核酸、異種核酸、モルホリノ、ロッド核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コルジセピン、7-デアザ-GTP、フルオロフォア（例えば、糖に結合したローダミンまたはフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン連結ヌクレオチド、蛍光塩基類似体、CpG島、メチル-7-グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チオウリジン、シュードウリジン、ジヒドロウリジン、キューオシン、およびワイオシンが挙げられる。

30

【0132】

本明細書において用いる場合、「核酸サンプル」とは、一般的には生物学的実体由来のサンプルを指してもよい。核酸サンプルは、核酸を含んでもよい。核酸サンプル由来の核酸は、精製されるか、および/または濃縮されてもよい。核酸サンプルは、全体の性質を示し得る。核酸サンプルは、種々の供給源に由来してもよい。核酸サンプルは、1つまたはそれ以上の個体に由来してもよい。1つまたはそれ以上の核酸サンプルは、同じ個体由来であってもよい。1つの非限定的な例は、1つのサンプルが個体の血液由来であって、第二のサンプルが個体の腫瘍生検由来である場合である。核酸サンプルの例としては限定するものではないが、血液、血清、血漿、鼻スワブまたは鼻咽頭洗浄液、唾液、尿、胃液、脊髄液、涙、糞便、粘液、汗、耳垢、オイル、腺分泌物、脳脊髄液、組織、精液、腔液、間質液を挙げることができ、例としては腫瘍組織由来の間質液、眼液、脊髄液、咽頭スワブ、口腔粘膜検体採取、呼気、毛髪、指の爪、皮膚、生検、胎盤液、羊水、臍帯血、強

40

50

調液 (e m p h a t i c f l u i d)、空洞液、痰、膿汁、微生物相、胎便、母乳、口腔サンプル、鼻咽頭洗浄液、他の排泄物、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。核酸サンプルは、組織由来であってもよい。組織サンプルの例としては、限定するものではないが、結合組織、筋組織、神経組織、上皮性組織、軟骨、癌性または腫瘍のサンプル、骨髄、または骨が挙げられる。核酸サンプルは、ヒトまたは動物から提供され得る。核酸サンプルは、哺乳動物、脊椎動物、例えば、マウス、サル、ヒト、家畜、スポーツ動物またはペットから提供されてもよい。核酸サンプルは、生きている対象から収集しても、または死んだ対象から収集してもよい。核酸サンプルは、対象から新鮮に収集してもよいし、または事前処理、貯蔵または輸送のいくつかの形態を受けていてもよい。

【 0 1 3 3 】

核酸サンプルは、標的核酸を含んでもよい。核酸サンプルは、細胞溶解液に由来してもよい。その細胞溶解液は、細胞に由来してもよい。

【 0 1 3 4 】

本明細書において用いる場合、「核酸ターゲティング核酸」とは、別の核酸にハイブリダイズできる核酸を指してもよい。核酸ターゲティング核酸は、RNAであってもよい。核酸ターゲティング核酸は、DNAであってもよい。核酸ターゲティング核酸は、核酸の配列に対して部位特異的に結合するようにプログラミングされてもよい。標的化される核酸または標的核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。核酸ターゲティング核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。標的核酸の一部は、核酸ターゲティング核酸の一部に相補的であり得る。核酸ターゲティング核酸は、ポリヌクレオチド鎖を含んでもよく、「シングルガイド核酸」(すなわち、「シングルガイド核酸ターゲティング核酸」と呼ばれてもよい。核酸ターゲティング核酸は、2つのポリヌクレオチド鎖を含んでもよく、「ダブルガイド核酸」(すなわち、「ダブルガイド核酸ターゲティング核酸」と呼ばれてもよい。別段特定しない場合、「核酸ターゲティング核酸」という用語は、包括的であってもよく、シングルガイド核酸およびダブルガイド核酸の両方を指す。

【 0 1 3 5 】

核酸ターゲティング核酸は、「核酸ターゲティングセグメント」または「核酸ターゲティング配列」とも呼ばれ得るセグメントを含んでもよい。核酸ターゲティング核酸は、「タンパク質結合セグメント」または「タンパク質結合配列」と呼ばれ得るセグメントを含んでもよい。

【 0 1 3 6 】

核酸ターゲティング核酸は、1つまたはそれ以上の改変(例えば、塩基改変、骨格改変)を含み、これによって新規なまたは強化された特徴(例えば、安定性の改善)を有する核酸を提供し得る。核酸ターゲティング核酸は、核酸親和性タグを含んでもよい。ヌクレオチドは、塩基-糖の組み合わせであり得る。ヌクレオチドの塩基部分は、複素環塩基であってもよい。このような複素環塩基のうち2つの最も一般的なクラスは、プリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖部分に共有結合されたリン酸基をさらに含むヌクレオチドであってもよい。ペントフラノシル糖を含むヌクレオチドについて、リン酸基は、糖の2'、3'、または5'ヒドロキシル部分に連結されてもよい。核酸ターゲティング核酸を形成するには、リン酸基は、隣接するヌクレオチドを互いに共有結合して、直鎖のポリマー化合物を形成し得る。次に、直鎖のポリマー化合物のそれぞれの末端は、さらに結合されて、環状の化合物を形成し得る;しかし、直鎖の化合物が一般には適切である。さらに、直鎖の化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有してもよく、従って、完全にまたは部分的に二重鎖の化合物を生じるような方式でフォールディングし得る。核酸ターゲティング核酸内では、リン酸基は共通して、核酸ターゲティング核酸のヌクレオチド間骨格を形成するといってもよい。核酸ターゲティング核酸の連結または骨格は、3'~5'ホスホジエステル結合であってもよい。

【 0 1 3 7 】

核酸ターゲティング核酸は、改変された骨格および/または改変されたヌクレオチド間連結を含んでもよい。改変された骨格としては、骨格中にリン原子を保持するもの、およ

10

20

30

40

50

び骨格中にリン原子を有さないものが挙げられる。

【0138】

適切な改変された核酸ターゲティング核酸骨格（その中にリン原子を含む）としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルホスホネート、例えば、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホラミデートを挙げることができ、例としては、3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、およびボラノホスフェート（正常な3'-5'連結、2'-5'連結の類似体、ならびに逆位の極性を有するもの）が挙げられ、ここで1つまたはそれ以上のヌクレオチド間連結は、3'-3'、5'-5'または2'-2'連結である。逆位の極性を有している適切な核酸ターゲティング核酸は、最も3'側のヌクレオチド間連結で単一の3'-3'連結を含んでもよい（すなわち、核酸塩基が失われているか、またはヒドロキシル基をその位置に有する、単一の逆位ヌクレオシド残基）。種々の塩（例えば、塩化カリウムまたは塩化ナトリウム）、混合塩、および遊離の塩型もまた含まれてもよい。

10

【0139】

核酸ターゲティング核酸は、1つまたはそれ以上のホスホロチオエートおよび/またはヘテロ原子ヌクレオシド間連結、具体的には、 $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ （すなわち、メチレン（メチルイミノ）またはMMI骨格）、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ および $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ （ここで天然のホスホジエステルヌクレオチド間連結は、 $-O-P(=O)(OH)-O-CH_2-$ として示される）を含んでもよい。

20

【0140】

核酸ターゲティング核酸は、モルホリノ骨格構造を含んでもよい。例えば、核酸は、リボース環の位置に6員のモルホリノ環を含んでもよい。これらの実施形態のいくつかでは、ホスホロジアミデートまたは他の非ホスホジエステルヌクレオチド間連結が、ホスホジエステル連結を置き換えてもよい。

30

【0141】

核酸ターゲティング核酸は、短鎖のアルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間連結、混合ヘテロ原子、およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間連結、あるいは1つまたはそれ以上の短鎖ヘテロ原子または複素環ヌクレオチド間連結によって形成されるポリヌクレオチド骨格を含んでもよい。これらとしては、モルホリノ連結を有するもの（ヌクレオチドの糖部分から部分的に形成される）；シロキササン骨格；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルキレン含有骨格；スルファミン酸塩骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホン酸塩およびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混合のN、O、Sおよび CH_2 成分の部分を含んでいるものが挙げられる。

40

【0142】

核酸ターゲティング核酸は、核酸模倣物を含んでもよい。「模倣物」という用語は、ポリヌクレオチドを含むことを意図し得、ここでフラノース環のみ、またはフラノース環およびヌクレオチド間連結の両方が、非フラノース基で置き換えられ、フラノース環のみの置換はまた、糖代用であるということもできる。複素環塩基部分または改変された複素環塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションについて維持され得る。1つのこのような核酸は、ペプチド核酸（PNA）であってもよい。PNAでは、ポリヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、具体的にはアミノエチルグリシン骨格で置換されてもよい。ヌクレオチドは、保持されてもよく、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に対して直

50

接または間接的に結合される。PNA化合物中の骨格は、2つまたはそれ以上の連結されたアミノエチルグリシン単位を含んでもよく、これがPNAをアミド含有骨格に与える。複素環塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に対して直接または間接的に結合され得る。

【0143】

核酸ターゲティング核酸は、連結されたモルホリノ単位（すなわち、モルホリノ核酸）を含んでもよく、モルホリノ環に複素環塩基が結合されている。連結基は、モルホリノ核酸中のモルホリノ単量体単位を連結し得る。非イオン性のモルホリノ塩基のオリゴマーの化合物は、細胞のタンパク質との望ましくない相互作用が少ない場合がある。モルホリノベースのポリヌクレオチドは、核酸ターゲティング核酸の非イオン性模倣物であってもよい。モルホリノの分類内の種々の化合物は、異なる連結基を用いて連結され得る。ポリヌクレオチド模倣物のさらなる分類は、シクロヘキセニル核酸（CeNA）と呼ばれてもよい。核酸分子中に正常に存在するフラノース環は、シクロヘキセニル環で置き換えられ得る。CeNA DMT保護ホスホラミダイト単量体を調製して、ホスホラミダイト化学を用いるオリゴマー化合物合成に用いてもよい。核酸鎖へのCeNAモノマーの組み込みは、DNA/RNAハイブリッドの安定性を増大し得る。CeNAオリゴアデニレートは、天然の複合体と同様の安定性を有する核酸相補体との複合体を形成し得る。さらなる改変は、ロックド核酸（LNA）を含んでもよく、ここで2'-ヒドロキシル基が糖の環の4'炭素原子に連結されて、それによって2'-C, 4'-C-オキシメチレン連結が形成され、これによって二環式の糖部分が形成される。連結は、メチレン（-CH₂-）であって、2'酸素原子および4'炭素原子を架橋する基であって、ここでnが1または2である。LNAおよびLNA類似体は、相補性の核酸との極めて高い二重鎖熱安定性（T_m = +3 ~ +10）、3'-エキソ核酸分解に向かう安定性、および良好な溶解特性を提示し得る。

10

20

【0144】

核酸ターゲティング核酸は、1つまたはそれ以上の置換されている糖部分を含んでもよい。適切なポリヌクレオチドは、OH; F; O-, S-, もしくはN-アルキル; O-, S-, もしくはN-アルケニル; O-, S- もしくはN-アルキニル; またはO-アルキル-O-アルキルから選択される糖置換基を含んでもよく、ここでアルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換されている、または非置換のC₁ ~ C₁₀アルキルまたはC₂ ~ C₁₀アルケニルおよびアルキニルであってもよい。特に適切なものは、O((CH₂)_nO)_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON((CH₂)_nCH₃)₂であり、ここでnおよびmは、1 ~ 約10である。糖置換基は、C₁ ~ C₁₀低級アルキル、置換されている低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されているシリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、核酸ターゲティング核酸の薬物動態学的特性を改善するための基、または核酸ターゲティング核酸の薬力学的特性を改善するための基、および同様の特性を有する他の置換基から選択され得る。適切な改変としては、2'-メトキシエトキシ（2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても公知、すなわち、アルコキシアルコキシ基）を挙げることができる。さらに適切な改変としては、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、（すなわち、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、2'-DMAOEとしても公知）、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ（2'-O-ジメチル-アミノ-エトキシ-エチルまたは2'-DMAEOEとしても公知）、すなわち、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂を挙げることができる。

30

40

【0145】

他の適切な糖置換基としては、メトキシ（-O-CH₃）、アミノプロポキシ（-O

50

CH₂CH₂CH₂NH₂)、アリル (- CH₂ - CH = CH₂)、 - O - アリル (- O - - CH₂ - CH = CH₂) およびフルオロ (F) を挙げることができる。2' - 糖置換基は、アラビノ (上) 位置またはリボ (下) 位置であってもよい。適切な2' - アラビノ改変は、2' - Fである。同様の改変がまた、オリゴマーの化合物上の他の位置で、特に3' 末端ヌクレオシド上の糖の3' 位置、または2' - 5' 連結ヌクレオチド中、および5' 末端ヌクレオチドの5' 位置でも行われる。オリゴマー化合物はまた、ペントフラノシル糖の位置にシクロブチル部分のような糖模倣物を有してもよい。

【 0 1 4 6 】

核酸ターゲティング核酸は、核酸塩基 (単に「塩基」と呼ばれることが多い) の改変または置換を含んでもよい。本明細書において用いる場合、「未改変の」または「天然の」核酸塩基としては、プリン塩基、(例えば、アデニン (A) およびグアニン (G))、およびピリミジン塩基、(例えば、チミン (T)、シトシン (C) およびウラシル (U)) を挙げることができる。改変された核酸塩基としては、他の合成のおよび天然の核酸塩基、例えば、5 - メチルシトシン (5 - me - C)、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2 - アミノアデニン、6 - メチルならびにアデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導体、2 - プロピルならびにアデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび2 - チオシトシン、5 - ハロウラシルおよびシトシン、5 - プロピニル (- C = C - CH₃) ウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6 - アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル (シュードウラシル)、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシルおよび他の8 - 置換のアデニンおよびグアニン、5 - ハロ特に5 - プロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の5 - 置換のウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニンおよび7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノアデニン、8 - アザグアニンおよび8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニンおよび3 - デアザグアニンおよび3 - デアザアデニンを挙げることができる。改変された核酸塩基としては、三環系ピリミジン類、例えば、フェノキサジンシチジン (1H - ピリミド (5 , 4 - b) (1 , 4) ベンゾキサジン - 2 (3H) - オン)、フェノチアジンシチジン (1H - ピリミド (5 , 4 - b) (1 , 4) ベンゾチアジン - 2 (3H) - オン)、G - クランプ、例えば、置換されているフェノキサジンシチジン (例えば、9 - (2 - アミノエトキシ) - H - ピリミド (5 , 4 - (b) (1 , 4) ベンゾキサジン - 2 (3H) - オン)、カルバゾールシチジン (2H - ピリミド (4 , 5 - b) インドール - 2 - オン)、ピリドインドールシチジン (Hピリド (3' , 2' : 4 , 5) ピロロ (2 , 3 - d) ピリミジン - 2 - オン) を挙げることができる。

【 0 1 4 7 】

複素環塩基部分としては、プリンまたはピリミジン塩基が、他の複素環、例えば、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジンおよび2 - ピリドンで置換されるものを挙げることができる。核酸塩基は、ポリヌクレオチド化合物の結合親和性を増大するために有用であり得る。これらとしては、5 - 置換のピリミジン、6 - アザピリミジンおよびN - 2、N - 6およびO - 6置換のプリン、例としては、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンを挙げることができる。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6 ~ 1.2 まで増大し得、かつ適切な塩基置換であり得る (例えば、2' - O - メトキシエチル糖改変と組み合わせた場合)。

【 0 1 4 8 】

核酸ターゲティング核酸の改変は、核酸ターゲティング核酸に対して、1つまたはそれ以上の部分またはコンジュゲート (核酸ターゲティング核酸の活性、細胞分布、または細胞取り込みを増強し得る) に対して化学的に連結する工程を含み得る。これらの部分またはコンジュゲートは、第一級または第二級のヒドロキシル基などの官能基に共有結合したコンジュゲート基を含んでもよい。コンジュゲート基としては、限定するものではないが、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコ

10

20

30

40

50

ール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的特性を増強する基、およびオリゴマーの薬物動態学的特性を増強する基を挙げることができる。コンジュゲート基としては、限定するものではないが、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および色素を挙げることができる。薬力学的特性を向上する基としては、標的核酸の取り込みを改善する基、標的核酸の分解に対する耐性を向上する基、および/または標的核酸との配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基が挙げられる。薬物動態学的特性を向上し得る基としては、核酸の取り込み、分布、代謝または排出を改善する基が挙げられる。コンジュゲート部分としては、限定するものではないが、脂質部分、例えば、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、(例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール)、チオコレステロール、脂肪族鎖(例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基)、リン脂質(例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸、パルミトイル部分、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分を挙げることができる。

10

【0149】

改変としては、「タンパク質形質導入ドメイン(Protein Transduction Domain)」またはPTD(すなわち、細胞貫通性ペプチド(CPP))が挙げられ得る。PTDとは、脂質二重層、ミセル、細胞膜、オルガネラ膜または小胞膜を横切ることができる、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、または有機もしくは無機の化合物を指してもよい。PTDは、小さい極性の分子から大きい高分子および/またはナノ粒子にまでおよんでもよく、かつ分子が膜を横切ること、例えば、細胞外空間から細胞内空間、または細胞質からオルガネラ内へ移動することを容易にし得る、別の分子に結合されてもよい。PTDは、ポリペプチドのアミノ末端に共有結合され得る。PTDは、ポリペプチドのカルボキシル末端に共有結合され得る。PTDは、核酸に共有結合されてもよい。例示的なPTDとしては、限定するものではないが、最小ペプチドタンパク質形質導入ドメイン;ポリアルギニン配列(細胞へ直接侵入するために十分なアルギニンの数(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、または10~50アルギニン)を含む)、VP22ドメイン、ドロソフィリア・アンテナペディア(Drosophila Antennapedia)タンパク質形質導入ドメイン、短縮ヒトカルシトニンペプチド、ポリリジン、およびトランスポート(transport)、アルギニンホモポリマー(3アルギニン残基から50アルギニン残基まで)を挙げることができる。PTDは、活性化可能なCPP(ACPP)であってもよい。ACPPは、マッチングするポリアニオン(例えば、Glu9または「E9」)に対して切断可能なリンカーを介して接続される、ポリカチオン性CPP(例えば、Arg9または「R9」)を含んでもよく、これは、正味の電荷をほぼゼロまで低下し得、それによって細胞への接着および取り込みを阻害する。リンカーの切断の際、ポリアニオンは、遊離され得、局所的にポリアルギニンおよび、そのもともとの接着性をアンマスキングし、それによってACPPを「活性化」して膜を横切らせる。

20

30

40

【0150】

「ヌクレオチド」とは一般的には、塩基-糖-リン酸塩の組み合わせを指してもよい。ヌクレオチドは、合成のヌクレオチドを含んでもよい。ヌクレオチドは合成のヌクレオチド類似体を含んでもよい。ヌクレオチドは、核酸配列の単量体単位であってもよい(例えば、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA))。ヌクレオチドという用語は、リボヌクレオシド三リン酸アデノシン三リン酸(ATP)、ウリジン三リン酸(UTP)、シトシン三リン酸(CTP)、グアノシン三リン酸(GTP)およびデオキシリボヌクレオシド三リン酸、例えば、dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP、またはその誘導体を含み得る。このような誘導体としては、例えば、[S]dATP、7-デアザ-dGTPおよび7-デアザ-dATP、およびヌクレオチド誘導

50

体（それらを含む核酸分子に対してヌクレアーゼ耐性を付与する）を挙げることができる。ヌクレオチドという用語は、本明細書で用いられる場合、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ddNTP）およびそれらの誘導体を指してもよい。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の例示的な例としては、限定するものではないが、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、およびddTTPを挙げることができる。ヌクレオチドは、未標識であってもよいし、または周知の技術によって検出可能に標識されてもよい。標識はまた、量子ドットで行われてもよい。検出可能な標識としては、例えば、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識および酵素標識を挙げることができる。ヌクレオチドの蛍光標識としては、限定するものではないが、フルオレセイン、5 - カルボキシフルオレセイン（FAM）、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン（JOE）、ローダミン、6-カルボキシローダミン（R6G）、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA）、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸（DABCYL）、カスケードブルー（Cascade Blue）、オレゴングリーン、テキサスレッド、シアニンおよび5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸（EDANS）が挙げられ得る。蛍光標識されたヌクレオチドの特定の例としては、[R6G]dUTP、[TAMRA]dUTP、[R110]dCTP、[R6G]dCTP、[TAMRA]dCTP、[JOE]ddATP、[R6G]ddATP、[FAM]ddCTP、[R110]ddCTP、[TAMRA]ddGTP、[ROX]ddTTP、[dR6G]ddATP、[dR110]ddCTP、[dTAMRA]ddGTP、および[dROX]ddTTP（Perkin Elmer、Foster City、Calif.から入手可能）、フルオロリンクデオキシヌクレオチド（FluoroLink Deoxy Nucleotide）、フルオロリンクCy3-dCTP、フルオロリンクCy5-dCTP、フルオロリンクフルオロ（FluoroLink Fluor）X-dCTP、フルオロリンクCy3-dUTP、およびフルオロリンクCy5-dUTP（Amersham、Arlington Heights、Ill.から入手可能）；フルオレセイン-15-dATP、フルオレセイン-12-dUTP、テトラメチル-ローダミン-6-dUTP、IR770-9-dATP、フルオレセイン-12-ddUTP、フルオレセイン-12-UTP、およびフルオレセイン-15-2'-dATP（Boehringer Mannheim、Indianapolis、Ind.から入手可能）；ならびに染色体標識ヌクレオチド（Chromosome Labeled Nucleotides）、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、カスケードブルー-7-UTP、カスケードブルー-7-dUTP、フルオレセイン-12-UTP、フルオレセイン-12-dUTP、オレゴングリーン488-5-dUTP、ローダミングリーン-5-UTP、ローダミングリーン-5-dUTP、テトラメチルローダミン-6-UTP、テトラメチルローダミン-6-dUTP、テキサスレッド-5-UTP、テキサスレッド-5-dUTP、およびテキサスレッド-12-dUTP（Molecular Probes、Eugene、Oregから入手可能）を挙げることができる。ヌクレオチドはまた化学的改変によって標識されても、またはマークされてもよい。化学的に改変された単一のヌクレオチドは、ピオチン-dNTPであってもよい。ピオチン化dNTPのいくつかの非限定的な例としては、ピオチン-dATP（例えば、ピオ-N6-ddATP、ピオチン-14-dATP）、ピオチン-dCTP（例えば、ピオチン-11-dCTP、ピオチン-14-dCTP）、およびピオチン-dUTP（例えば、ピオチン-11-dUTP、ピオチン-16-dUTP、ピオチン-20-dUTP）を挙げることができる。

10

20

30

40

【0151】

本明細書において用いる場合、「P-ドメイン」とは、核酸ターゲティング核酸中のある領域を指してもよい。P-ドメインは、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）、部

50

位特異的ポリペプチド、および/または核酸ターゲティング核酸と相互作用し得る。P - ドメインは、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M)、部位特異的ポリペプチド、および/または核酸ターゲティング核酸と直接または間接的に相互作用し得る。本明細書において用いる場合、「 P A M 相互作用領域」「抗反復隣接領域」および「 P - ドメイン」という用語は交換可能に用いられてもよい。

【 0 1 5 2 】

本明細書において用いる場合、「精製された」とは、組成物のうち少なくとも 5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、または 1 0 0 % を含む分子 (例えば、部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸) を指してもよい。例えば、部位特異的ポリペプチドの 1 0 % を含むが、精製ステップの後は、部位特異的ポリペプチドの 6 0 % を含むサンプルならば、このサンプルは精製されているということが出来る。精製されたサンプルとは、濃縮されたサンプル、または対象とする粒子以外の粒子を除去するための方法を受けたサンプルを指してもよい。

10

【 0 1 5 3 】

本明細書において用いる場合、「再活性化剤」とは一般的には、酵素学的に不活性なポリペプチドを酵素学的に活性なポリペプチドに変化し得る任意の剤を指してもよい。イミダゾールは、再活性化剤であってもよい。リガンド類似体は、再活性化剤であってもよい。

【 0 1 5 4 】

本明細書において用いる場合、「組換え」とは、特定の宿主 (例えば、細胞) に対して外来の供給源に由来する配列、または同じ供給源由来の場合は、そのもとの形態から改変されている配列を指してもよい。細胞中の組換えの核酸としては、特定の細胞に対して内因性であるが、例えば、部位特異的変異生成の使用を通じて改変されている核酸を挙げることができる。この用語は、天然に存在する D N A 配列の天然には存在しない複数のコピーを含んでもよい。従って、この用語は、細胞に対して外来であるかもしくは異種であるか、またはその核酸がもともと見出されない細胞内の位置もしくは形態では細胞に対して相同である、核酸を指してもよい。同様に、ポリペプチドまたはアミノ酸配列の状況で用いる場合、外因性ポリペプチドまたはアミノ酸配列とは、その特定の細胞に対して外来の供給源に由来するか、または同じ供給源由来の場合、そのもとの形態から改変されているポリペプチドもしくはアミノ酸の配列であってもよい。

20

30

【 0 1 5 5 】

本明細書において用いる場合、「部位特異的ポリペプチド」とは、一般的には、ヌクレアーゼ、部位特異的ヌクレアーゼ、エンドリボヌクレアーゼ、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ、アルゴノート (A r g o n a u t)、および核酸結合タンパク質を指してもよい。部位特異的ポリペプチドまたはタンパク質としては、ヌクレアーゼ、例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼ、例えば、P I - T l i I I、H - D r e I、I - D m o I および I - C r e I、I - S c e I、L A G L I D A D G ファミリーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、G I Y - Y I G ファミリーヌクレアーゼ、H i s - C y s ボックスファミリーヌクレアーゼ、V s r 様ヌクレアーゼ、エンドリボヌクレアーゼ、エクソリボヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、およびエクソヌクレアーゼを挙げることができる。部位特異的ポリペプチドとは、I 型、I I 型、I I I 型、および/または U 型の C R I S P R / C a s システムの C a s 遺伝子のメンバーを指してもよい。部位特異的ポリペプチドは、反復関連ミスチリアスプロテイン (R A M P) スーパーファミリー (例えば、C a s 5、C a s 6 サブファミリー) のメンバーを指してもよい。部位特異的ポリペプチドは、アルゴノートタンパク質を指してもよい。

40

【 0 1 5 6 】

部位特異的ポリペプチドとは、ある種のタンパク質であってもよい。部位特異的ポリペプチドとは、ヌクレアーゼを指してもよい。部位特異的ポリペプチドとは、エンドリボヌクレアーゼを指してもよい。部位特異的ポリペプチドは、部位特異的ポリペプチドの任意の改変された (例えば、短縮された、変異された、長くされた) ポリペプチド配列または

50

相同体を指してもよい。部位特異的ポリペプチドは、コドン最適化されてもよい。部位特異的ポリペプチドは、部位特異的ポリペプチドのコドン最適化相同体であってもよい。部位特異的ポリペプチドは、酵素学的に不活性であっても、部分的に活性であっても、構成的に活性であっても、完全に活性であっても、誘導性に活性であっても、および/またはさらに活性であってもよい(例えば、タンパク質またはポリペプチドの野性型相同体よりも)。部位特異的ポリペプチドは、Cas9であってもよい。部位特異的ポリペプチドは、Cas4であってもよい。部位特異的ポリペプチドは、Cas5またはCas5ファミリーのメンバーであってもよい。部位特異的ポリペプチドは、Cas6またはCas6ファミリーのメンバーであってもよい。

【0157】

いくつかの場合には、部位特異的ポリペプチド(例えば、変種、変異した、酵素学的に不活性なおよび/または条件的に酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチド)は、核酸を標的とし得る。部位特異的ポリペプチド(例えば、変種、変異した、酵素学的に不活性なおよび/または条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ)は、RNAを標的とし得る。RNAを標的とし得るエンドリボヌクレアーゼとしては、Cas6およびCas5のような他のCRISPRサブファミリーのメンバーを挙げることができる。

【0158】

本明細書において用いる場合、「特異的、特定の」という用語は、2つの分子の相互作用であって、その分子のうちの一つが、例えば、化学的方法または物理的方法を通じて、第2の分子に特異的に結合する相互作用を指してもよい。例示的な特異的な結合相互作用とは、抗原-抗体結合、アビジン-ビオチン結合、炭水化物およびレクチン、相補的な核酸配列(例えば、ハイブリダイズする)、相補的なペプチド配列、例としては組換え方法によって形成される配列を含む、エフェクターおよび受容体分子、酵素補因子および酵素、酵素阻害剤および酵素などを指してもよい。「非特異的」とは、特異的ではない2つの分子の間の相互作用を指してもよい。

【0159】

本明細書において用いる場合、「固体支持体」とは、一般的には、任意の不溶性または部分的に可溶性の物質を指してもよい。固体支持体とは、試験紙、マルチウェルディッシュなどを指してもよい。固体支持体は、種々の物質(例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然のおよび改変されたセルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、および磁鉄鉱)を含んでもよく、かつアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンチップおよび表面、ニトロセルロースストリップ、ナイロン膜、シート、反応トレイのウェル(例えば、マルチウェルプレート)、プラスチックチューブなどを含む種々の形態で提供されてもよい。固体支持体は、固体であっても、半固体であっても、ビーズであっても、または表面であってもよい。支持体は、溶液中で移動性であっても、または固定されていてもよい。固体支持体は、ポリペプチドを捕捉するために用いられてもよい。固体支持体は捕捉剤を含んでもよい。

【0160】

本明細書において用いる場合、「標的核酸」とは、一般的には、本開示の方法で用いられるべき核酸を指してもよい。標的核酸とは、染色体の配列または染色体外の配列(例えば、エピソーム配列、小円配列、ミトコンドリアの配列、クロロプラスト配列など)を指してもよい。標的核酸はDNAであってもよい。標的核酸はRNAであってもよい。標的核酸は、本明細書においては、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、および/または「標的ポリヌクレオチド」と交換可能に用いられ得る。標的核酸とは、単一のヌクレオチド置換によって核酸サンプル中の任意の他の配列と関連し得ない核酸配列であってもよい。標的核酸とは、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド置換によって、核酸サンプル中で任意の他の配列と関連し得ない核酸配列を指してもよい。いくつかの実施形態では、置換は、標的核酸の5'末端の5、10、15、20、25、3

10

20

30

40

50

0、または35ヌクレオチド内には存在し得ない。いくつかの実施形態では、置換は、標的核酸の3'末端の5、10、15、20、25、30、35ヌクレオチド内には存在し得ない。

【0161】

本明細書において用いる場合、「tracrRNA」とは一般的には、野性型の例示的なtracrRNA配列（例えば、化膿レンサ球菌由来のtracrRNA（配列番号433）、配列番号431～562）に対して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有する核酸を指してもよい。tracrRNAとは、野性型の例示的なtracrRNA配列（例えば、化膿レンサ球菌由来のtracrRNA）に対して多くとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有する核酸を指してもよい。tracrRNAとは、欠失、挿入、または置換、変種、変異、またはキメラのようなヌクレオチド変化を含み得るtracrRNAの改変型を指してもよい。tracrRNAとは、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、野性型の例示的なtracrRNA（例えば、化膿レンサ球菌由来のtracrRNA）配列に対して少なくとも約60%同一であり得る核酸を指してもよい。例えば、tracrRNA配列は、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、野性型の例示的なtracrRNA（例えば、化膿レンサ球菌由来のtracrRNA）配列に対して、少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、または100%同一であり得る。tracrRNAとは、中央-tracrRNAを指してもよい。tracrRNAは、最小tracrRNA配列を指してもよい。

10

20

【0162】

CRISPRシステム

CRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートは、多くの原核生物（例えば、細菌および古細菌）のゲノムで見出されるゲノム遺伝子座であってもよい。CRISPR遺伝子座は、原核生物の外来の侵入物（例えば、ウイルス、ファージ）に対する耐性を提供し得る。この方法では、CRISPRシステムは、外来の侵入物に対する原核生物防御を補助するためのある種の免疫系として機能することが考えられ得る。CRISPR遺伝子座の機能には3つの段階があり得る：この遺伝子座への新しい配列の組み込み、CRISPR RNA（crRNA）の生物発生、および外来の侵入物核酸のサイレンシング。CRISPRシステムには4つの種類があり得る（例えば、I型、II型、III型、U型）。

30

40

【0163】

CRISPR遺伝子座は、「反復、リピート」と呼ばれる多数の短い反復性の配列を含んでもよい。反復は、ヘアピン構造を形成してもよく、および/または反復は、非構造化一本鎖配列であってもよい。反復は、クラスター中に存在してもよい。反復配列は、種の間で高頻度に分岐し得る。反復は、「スペーサー」と呼ばれる固有の介在性配列で規則的に空間を空けられてもよく、それによって反復-スペーサー-反復遺伝子座の構造が生じる。スペーサーは、公知の外来の侵入物配列と同一であってもよいし、または高い相同性を有してもよい。スペーサー-反復単位は、crisprRNA（crRNA）をコードし得る。crRNAは、スペーサー-反復単位の成熟型を指してもよい。crRNAは、標的核酸を標的とすること（例えば、可能性としては、外来核酸に対する監視機構として）に参与し得る「シード」配列を含んでもよい。シード配列は、crRNAの5'末端に位置しても、または3'末端に位置してもよい。

【0164】

CRISPR遺伝子座は、Crispr関連遺伝子（Crispr Associated Genes）（Cas）遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列を含んでもよい

50

。Cas 遺伝子は、crRNA 機能の生物発生および/または干渉段階に關与し得る。Cas 遺伝子は、種と相同体との間の極度の配列（例えば、一次配列）分岐を示し得る。例えば、Cas1 相同体は、相同体の中で10%未満の初代配列同一性を含んでもよい。いくつかのCas 遺伝子は、相同な二次的構造および/または三次的構造を含んでもよい。例えば、極度の配列分岐にかかわらず、CRISPRタンパク質のCas6ファミリーの多くのメンバーは、N末端フェレドキシン様フォールディングを含む。Cas 遺伝子は、それが由来する生物体に応じて命名され得る。例えば、表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）のCas 遺伝子は、Csm-型と呼ばれ、高温性連鎖球菌（*Streptococcus thermophilus*）のCas 遺伝子は、Csn-型と呼ばれ、およびパイロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）のCas 遺伝子は、Cmr-型と呼ばれ得る。

10

【0165】

組み込み

CRISPRシステムの組み込み段階とは、CRISPR 遺伝子座が、外来の侵入物によって感染される際に、新しいスペーサーをcrRNA アレイに組み込む能力を指してもよい。外来の侵入物スペーサーの獲得によって、同じ外来侵入物によるその後の攻撃に対して免疫付与が補助され得る。組み込みは、CRISPR 遺伝子座のリーダー末端で生じ得る。Cas タンパク質（例えば、Cas1 および Cas2）は、新規なスペーサー配列の組み込みに關与し得る。組み込みは、同種のCRISPRシステム（例えば、I型～III型）に關して同様に進行し得る。

20

【0166】

生物発生

成熟 crRNA は、より長い多シストロン性 CRISPR 遺伝子座転写物（すなわち、前 crRNA アレイ）からプロセシングされ得る。プレ-crRNA アレイは、複数の crRNA を含んでもよい。プレ-crRNA アレイ中の反復は、Cas 遺伝子によって認識され得る。Cas 遺伝子は、反復に結合して、反復を切断し得る。作用は、複数の crRNA を遊離し得る。crRNA を、トリミング（例えば、エクソヌクレアーゼによる）などの、成熟型 crRNA を生じるためのさらなる事象に供してもよい。crRNA は、CRISPR 反復配列を全て含んでも、そのうちいくつかを含んでも、または含まなくてもよい。

30

【0167】

干渉

干渉とは、外来侵入物による感染と戦うことを機能的に担う CRISPR システムの中の段階を指してもよい。CRISPR 干渉はまた、RNA 干渉（RNAi（例えば、ここでは標的 RNA が、低分子干渉 RNA（siRNA）によって標的される（例えば、ハイブリダイズされる））と同様の機構に従ってもよく、これによって、標的 RNA の分解および/または不安定化が生じ得る。CRISPR システムは、crRNA および Cas 遺伝子をカップリングすることによって標的核酸の干渉を行い、これによって CRISPR リボヌクレオタンパク質（crRNP）を形成し得る。crRNP の crRNA は、外来の侵入物核酸へ crRNP をガイドし得る（例えば、ハイブリダイゼーションを通じて外来の侵入物核酸を認識することによって）。ハイブリダイズされた標的の外来の侵入物核酸-crRNA 単位を、Cas タンパク質による切断に供してもよい。標的核酸干渉は、標的核酸中にスペーサー隣接モチーフ（PAM）を必要とし得る。

40

【0168】

CRISPR システムの種類

4 種の CRISPR システムが存在し得る：I 型、II 型、III 型、および U 型。2 つ以上の CRISPR 型システムは、生物体で見出され得る。CRISPR システムは、互いに相補的であってもよく、および/または CRISPR 遺伝子座のプロセシングを容易にするために機能的ユニットをトランスに与えてもよい。

【0169】

50

I型CRISPRシステム

I型CRISPRシステムのcrRNA生物発生は、複数のcrRNAを生じ得る、プレ-crRNAアレイにおける反復のエンドリボヌクレアーゼ切断を含んでもよい。I型システムのcrRNAは、crRNAトリミングに供されなくてもよい。crRNAは、カスケードと呼ばれる多重タンパク質複合体によりプレ-crRNAアレイからプロセシングされ得る（抗ウイルス防御のためのCRISPR関連複合体に由来）。カスケードは、タンパク質サブユニット（例えば、CasA-CasE）を含んでもよい。いくつかのサブユニットは、反復関連ミステリアスプロテイン（RAMPS）スーパーファミリー（例えば、Cas5およびCas6ファミリー）のメンバーであってもよい。カスケード-crRNA複合体（すなわち、干渉複合体）は、標的核酸とのcrRNAのハイブリダイゼーションを通じて標的核酸を認識し得る。カスケード干渉複合体は、Cas3ヘリカーゼ/ヌクレアーゼを補充し得、これがトランスで作用して、標的核酸の切断を容易にし得る。Cas3ヌクレアーゼは、標的核酸を切断し得る（例えば、そのHDヌクレアーゼドメインで）。I型CRISPRシステム中の標的核酸は、PAMを含んでもよい。I型CRISPRシステム中の標的核酸はDNAであってもよい。

10

20

30

40

50

【0170】

I型システムはさらに、もともとのそれらの種によって小分割されてもよい。I型システムは、IA型（アエロピュラム・ペルニクス（*Aeropyrum pernix*）またはCASS5）；IB（サーモトガ・ネアポリタナ（*Thermotoga neapolitana*）-ハロアーキュラ・マリスモルツイ（*Halooarculla marismortui*）またはCASS7）；IC（デスルホビブリオ・ブルガリス（*Desulfovibrio vulgaris*）またはCASS1）；ID；IE（大腸菌（*Escherichia coli*）またはCASS2）；およびIF（エルシニア・ペスティス（*Yersinia pestis*）またはCASS3）サブファミリーを含んでもよい。

【0171】

II型CRISPRシステム

II型CRISPRシステム中のcrRNA生物発生は、トランス活性化CRISPR RNA（tracrRNA）を含み得る。tracrRNAは、内因性のRNaseIIIによって改変され得る。複合体のtracrRNAは、プレ-crRNAアレイ中のcrRNA反復に対してハイブリダイズし得る。内因性のRNaseIIIは、プレ-crRNAを切断するために補充され得る。切断されたcrRNAは、エクソリボヌクレアーゼトリミングに供されて、成熟型crRNA（例えば、5'トリミング）を生じ得る。tracrRNAは、crRNAにハイブリダイズされたまま残存し得る。tracrRNAおよびcrRNAは、部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9）と会合し得る。crRNA-tracrRNA-Cas9複合体のcrRNAは、複合体を標的核酸にガイドし得る（標的核酸へcrRNAがハイブリダイズし得る）。標的核酸に対するcrRNAのハイブリダイゼーションは、標的核酸切断に関してCas9を活性化し得る。II型CRISPRシステム中の標的核酸は、PAMを含んでもよい。いくつかの実施形態では、PAMは、標的核酸に対する部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9）の結合を容易にするために必須である。II型システムは、さらにII-A（NmniまたはCASS4）およびII-B（NmniまたはCASS4）に小分割されてもよい。

【0172】

III型CRISPRシステム

III型CRISPRシステム中のcrRNA生物発生は、プレ-crRNAアレイ中の反復のエンドリボヌクレアーゼ切断のステップを含んでもよく、これによって複数のcrRNAが生じ得る。III型CRISPRシステムにおける反復は、非構造化一本鎖領域であってもよい。反復は、エンドリボヌクレアーゼのRAMPSスーパーファミリーのメンバー（例えば、Cas6）によって認識されて切断されてもよい。III型（例えば、III-B型）システムのcrRNAを、crRNAトリミング（例えば、3'トリミン

グ)に供してもよい。I I I型システムは、ポリメラーゼ様タンパク質(例えば、C a s 1 0)を含んでもよい。C a s 1 0は、パームドメインに対して相同なドメインを含んでもよい。

【0173】

I I I型システムは、複数のRAMPスーパーファミリーメンバータンパク質および1つまたはそれ以上のCRISPRポリメラーゼ様タンパク質を含む複合体でプレ-crRNAをプロセシングし得る。I I I型システムは、I I I-AおよびI I I-Bに分割されてもよい。I I I-A型システムの干渉複合体(すなわち、C s m複合体)は、プラスミド核酸を標的とし得る。プラスミド核酸の切断は、複合体中のポリメラーゼ様タンパク質のHDヌクレアーゼドメインで生じ得る。I I I-B型システムの干渉複合体(すなわち、C m r複合体)は、RNAを標的とし得る。

10

【0174】

U型CRISPRシステム

U型CRISPRシステムは、I~I I I型のCRISPRシステムのいずれかの特徴的な遺伝子(例えば、C a s 3、C a s 9、C a s 6、C a s 1、C a s 2)を含まなくてもよい。U型CRISPRのC a s遺伝子の例としては、限定するものではないが、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4を挙げることができる。U型のC a s遺伝子は、I~I I I型のC a s遺伝子とは極めて隔たった相同体であり得る。例えば、C s f 3は、C a s 5ファミリーのメンバーに対して高度に分岐しているが、機能的には類似であり得る。U型システムは、I~I I I型のシステムにおいてトランスで補完的に機能し得る。いくつかの場合には、U型システムは、CRISPRアレイのプロセシングと関連されなくてもよい。U型システムは、別の外来の侵入物防御システムに相当し得る。

20

【0175】

RAMPスーパーファミリー

反復関連ミステリアスプロテイン(RAMPプロテイン)は、-鎖()および-らせん()の[- - - -]モチーフを含む、タンパク質フォールディングによって特徴付けられ得る。RAMPタンパク質は、RNA認識モチーフ(RRM)(これは、フェレドキシンまたはフェレドキシン様フォールディングを含み得る)を含んでもよい。RAMPタンパク質は、N末端RRMを含んでもよい。RAMPタンパク質のC末端ドメインは、変化し得るが、またRRMを含んでもよい。RAMPファミリーのメンバーは、構造化および/または非構造化核酸を認識し得る。RAMPファミリーのメンバーは、一本鎖および/または二本鎖核酸を認識し得る。RAMPタンパク質は、CRISPRのI型およびI I I型のシステムの生物発生および/または干渉段階に参与し得る。RAMPスーパーファミリーのメンバーは、C a s 7、C a s 6、およびC a s 5のファミリーのメンバーを含んでもよい。RAMPスーパーファミリーのメンバーは、エンドリボヌクレアーゼであってもよい。

30

【0176】

RAMPスーパーファミリー中のRRMドメインは、過度に分岐され得る。RRMドメインは、野性型の例示的なRRMドメイン(例えば、C a s 7由来のRRMドメイン)に対して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または100%の配列または構造的な相同性を含んでもよい。RRMドメインは、野性型の例示的なRRMドメイン(例えば、C a s 7由来のRRMドメイン)に対して、多くとも約5%、多くとも約10%、多くとも約15%、多くとも約20%、多くとも約25%、多くとも約30%、多くとも約35%、多くとも約40%、多くとも約45%、多くとも約50%、多くとも約55%、多くとも約60%、多くとも約65%、多くとも約70%、多くとも約75%、多くとも約80%、多くとも約85%、多くとも約90%、多くとも約95%、

40

50

または100%の配列または構造的な相同性を含んでもよい。

【0177】

Cas7ファミリー

Cas7ファミリーのメンバーは、RAMPファミリータンパク質のサブクラスであってもよい。Cas7ファミリーのタンパク質は、I型CRISPRシステムで分類され得る。Cas7ファミリーのメンバーは、いくつかのRAMPファミリーのメンバーにはよく知られているグルシンリッチのループを含まない場合がある。Cas7ファミリーのメンバーは、1つのRRMドメインを含んでもよい。Cas7ファミリーのメンバーとしては、限定するものではないが、Cas7(COG1857)、Cas7(COG3649)、Cas7(CT1975)、Csy3、Csm3、Cmr6、Csm5、Cmr4、Cmr1、Csf2、およびCsc2を挙げることができる。

10

【0178】

Cas6ファミリー

Cas6ファミリーは、RAMPサブファミリーであってもよい。Cas6ファミリーのメンバーは、2つのRNA認識モチーフ(RRM)様ドメインを含んでもよい。Cas6ファミリーのメンバー(例えば、Cas6f)は、N末端RRMドメインおよび別個のC末端ドメインを含んでもよく、これは、RRMドメインに対して弱い配列類似性または構造的な相同性を示し得る。Cas6ファミリーのメンバーは、エンドリボヌクレアーゼ活性に関与し得る触媒性ヒスチジンを含み得る。匹敵するモチーフは、Cas5およびCas7のRAMPファミリーで見出され得る。Cas6ファミリーのメンバーとしては、限定するものではないが、Cas6、Cas6e、Cas6f(例えば、Csy4)を挙げることができる。

20

【0179】

Cas5ファミリー

Cas5ファミリーは、RAMPサブファミリーであってもよい。Cas5ファミリーは、2つのサブグループに分割されてもよい: 2つのRRMドメインを含み得る1つのサブグループ、および1つのRRMドメインを含み得る1つのサブグループ。Cas5ファミリーのメンバーとしては、限定するものではないが、Csm4、Csx10、Cmr3、Cas5、Cas5(BH0337)、Csy2、Csc1、Csf3を挙げることができる。

30

【0180】

Cas 遺伝子

例示的なCRISPR Cas 遺伝子としては、Cas1、Cas2、Cas3'(Cas3-プライム)、Cas3''(Cas3-二重プライム)、Cas4、Cas5、Cas6、Cas6e(以前はCasE、Cse3と呼ばれた)、Cas6f(すなわち、Csy4)、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4を挙げることができる。表1は、CRISPRシステムのタイプによるCRISPR Cas 遺伝子の例示的な分類を示す。

40

【0181】

CRISPR-Cas 遺伝子の命名システムは、Cas 遺伝子が発見されて以来広範に書き換えを受けてきた。本出願の目的に関しては、本明細書で用いられるCas 遺伝子名は、Makarovaら、「CRISPR-Casシステムの発展および分類(Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems)」Nature Reviews Microbiology, 2011 June; 9(6): 467~477. Doi: 10.1038/nrmic

50

r o 2 5 7 7 に概説される命名システムに基づく。

【 0 1 8 2 】

【 表 1 】

表 1: CRISPR 型による CRISPR Cas 遺伝子の例示的な分類

システムのタイプまたはサブタイプ	遺伝子名
I型	<i>cas1, cas2, cas3'</i>
II型	<i>cas1, cas2, cas9</i>
III型	<i>cas1, cas2, cas10</i>
サブタイプI-A	<i>cas3'', cas4, cas5, cas6, cas7, cas8a1, cas8a2, csa5</i>
サブタイプI-B	<i>cas3'', cas4, cas5, cas6, cas7, cas8b</i>
サブタイプI-C	<i>cas4, cas5, cas7, cas8c</i>
サブタイプI-D	<i>cas4, cas6, cas10d, csc1, csc2</i>
サブタイプI-E	<i>cas5, cas6e, cas7, cse1, cse2</i>
サブタイプI-F	<i>cas6f, csy1, csy2, csy3</i>
サブタイプII-A	<i>csn2</i>
サブタイプII-B	<i>cas4</i>
サブタイプIII-A	<i>cas6, csm2, csm3, csm4, csm5, csm6</i>
サブタイプIII-B	<i>cas6, cmr1, cmr3, cmr4, cmr5, cmr6</i>
サブタイプI-U	<i>csb1, csb2, csb3, csx17, csx14, csx10</i>
サブタイプIII-U	<i>csx16, csaX, csx3, csx1</i>
未知	<i>csx15</i>
U型	<i>csf1, csf2, csf3, csf4</i>

10

20

30

【 0 1 8 3 】

部位特異的ポリペプチド

部位特異的ポリペプチドは、標的核酸に結合し得るポリペプチドであってもよい。部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼであってもよい。

【 0 1 8 4 】

部位特異的ポリペプチドは、核酸結合ドメインを含んでもよい。核酸結合ドメインは、核酸に接触する領域を含んでもよい。核酸結合ドメインは、核酸を含んでもよい。核酸結合ドメインは、タンパク質性の物質を含んでもよい。核酸結合ドメインは、核酸およびタンパク質性の物質を含んでもよい。核酸結合ドメインはRNAを含んでもよい。単一の核酸結合ドメインが存在し得る。核酸結合ドメインの例としては、限定するものではないが、らせん・ターン・らせんドメイン、ジンクフィンガードメイン、ロイシンジッパー（bZIP）ドメイン、翼状らせん（winged helix）ドメイン、翼状らせんターンらせん（winged helix turn helix）ドメイン、らせん・ループ・らせん（helix-loop-helix）ドメイン、HMG-boxドメイン、Wor3ドメイン、免疫グロブリンドメイン、B3ドメイン、TALEドメイン、RNA-認識モチーフドメイン、二本鎖RNA結合モチーフドメイン、二本鎖核酸結合ドメイン、一本鎖核酸結合ドメイン、KHドメイン、PUFドメイン、RGGボックスドメイン、DEAD/DEAHボックスドメイン、PAZドメイン、Piwiドメイン、および低温

40

50

ショックドメインを挙げることができる。

【0185】

核酸結合ドメインは、アルゴノートタンパク質のドメインであってもよい。アルゴノートタンパク質は、真核生物のアルゴノートであっても、または原核生物のアルゴノートであってもよい。アルゴノートタンパク質は、RNA、DNA、またはRNAおよびDNAの両方に結合し得る。アルゴノートタンパク質は、RNA、またはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を切断し得る。いくつかの場合には、アルゴノートタンパク質は、DNAに結合して、標的DNAを切断する。

【0186】

いくつかの場合には、2つまたはそれ以上の核酸結合ドメインは、一緒に連結されてもよい。複数の核酸結合ドメインを一緒に連結することは、ポリヌクレオチドターゲティング特異性の増大を提供し得る。2つまたはそれ以上の核酸結合ドメインは、1つまたはそれ以上のリンカーを介して連結され得る。リンカーは、可塑性リンカーであってもよい。リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40またはそれ以上のアミノ酸長を含んでもよい。リンカーは、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のグリシン含量を含んでもよい。リンカーは、多くとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のグリシン含量を含んでもよい。リンカーは、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のセリン含量を含んでもよい。リンカーは、多くとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のセリン含量を含んでもよい。

【0187】

核酸結合ドメインは、核酸配列に結合し得る。核酸結合ドメインは、ハイブリダイゼーションを通じて核酸に結合し得る。核酸結合ドメインは、操作されてもよい（例えば、ゲノム中の配列に対してハイブリダイズするように操作されてもよい）。核酸結合ドメインは、分子クロニング技術（例えば、定方向進化、部位特異的変異、および論理的変異生成）によって操作されてもよい。

【0188】

部位特異的ポリペプチドは、核酸切断ドメインを含んでもよい。核酸切断ドメインは、任意の核酸切断タンパク質由来の核酸切断ドメインであってもよい。核酸切断ドメインは、ヌクレアーゼに由来し得る。適切な核酸切断ドメインとしては、エンドヌクレアーゼの核酸切断ドメイン（例えば、APエンドヌクレアーゼ、RecBCDエンドヌクレアーゼ、T7エンドヌクレアーゼ、T4エンドヌクレアーゼIV、Bal31エンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼI（エンドI）、マイクロコッカスヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼII（エンドVI、エクソIII））、エクソヌクレアーゼ、制限ヌクレアーゼ、エンドリボヌクレアーゼ、エクソリボヌクレアーゼ、RNase（例えば、RNaseI、II、またはIII）が挙げられる。いくつかの場合には、核酸切断ドメインは、FokIエンドヌクレアーゼに由来し得る。部位特異的ポリペプチドは、複数の核酸切断ドメインを含んでもよい。核酸切断ドメインは、一緒に連結されてもよい。2つまたはそれ以上の核酸切断ドメインは、リンカーを介して連結されてもよい。いくつかの実施形態では、リンカーは可塑性のリンカーであってもよい。リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40またはそれ以上のアミノ酸長を含んでもよい。いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、複数の核酸切断ドメインを含

10

20

30

40

50

んでもよい。

【0189】

部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9、アルゴノート）は、2つまたはそれ以上のヌクレアーゼドメインを含んでもよい。Cas9は、HNHもしくはHNH様ヌクレアーゼドメインおよび/またはRuvCもしくはRuvC様ヌクレアーゼドメインを含んでもよい。HNHまたはHNH様ドメインは、McrA様フォールディングを含んでもよい。HNHまたはHNH様ドメインは、2つの逆平行の鎖およびらせんを含んでもよい。HNHまたはHNH様ドメインは、金属結合部位（例えば、二価陽イオン結合部位）を含んでもよい。HNHまたはHNH様ドメインは、標的核酸の1つの鎖（例えば、crRNA標的鎖の相補的な鎖）を切断し得る。HNHまたはHNH様ドメインを含むタンパク質は、エンドヌクレアーゼ、クリシン（clixin）、制限エンドヌクレアーゼ、トランスポーゼース、およびDNAパッケージング因子を含んでもよい。

10

【0190】

RuvCまたはRuvC様ドメインは、RNaseHまたはRNaseH様フォールディングを含んでもよい。RuvC/RNaseHドメインは、RNAおよびDNAの両方に作用することを含む核酸ベースの機能の多様なセットに参与し得る。RNaseHドメインは、複数のらせんに囲まれる5つの鎖を含んでもよい。RuvC/RNaseHまたはRuvC/RNaseH様ドメインは、金属結合部位（例えば、二価陽イオン結合部位）を含んでもよい。RuvC/RNaseHまたはRuvC/RNaseH様ドメインは、標的核酸の1つの鎖（例えば、crRNA標的鎖の非相補的な鎖）を切断し得る。RuvC、RuvC様、またはRNaseH様ドメインを含むタンパク質としては、RNaseH、RuvC、DNAトランスポーゼース、レトロウイルスインテグラーゼ、およびアルゴノートタンパク質）を挙げることができる。

20

【0191】

部位特異的ポリペプチドはエンドリボヌクレアーゼであってもよい。部位特異的ポリペプチドは、酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチドであってもよい。部位特異的ポリペプチドは、条件的に酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチドであってもよい。部位特異的ポリペプチドは、核酸（例えば、ゲノムDNA）中に二本鎖破壊または一本鎖破壊を導入し得る。二本鎖破壊は、細胞の内因性のDNA修復経路（例えば、相同組換えおよび非相同末端結合（non-homologous end joining）（NHEJ）または選択的非相同体末端結合（A-NHEJ））を刺激し得る。NHEJは、相同な鋳型を必要とせずに、切断された標的核酸を修復し得る。これは、標的核酸の欠失を生じ得る。相同組換え（HR）は、相同な鋳型で生じ得る。相同な鋳型は、標的核酸切断部位に隣接する配列に対して相同である配列を含んでもよい。標的核酸が部位特異的ポリペプチドによって切断された後、切断部位は、破壊され得る（例えば、部位は、もとの核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドでの別の回の切断にはアクセス可能ではない場合がある）。

30

【0192】

いくつかの場合には、相同組換えは、外因性のポリヌクレオチド配列を標的核酸切断部位に挿入し得る。外因性のポリヌクレオチド配列は、ドナーポリヌクレオチドと呼ばれてもよい。本開示の方法のいくつかの場合には、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部が、標的核酸切断部位に挿入され得る。ドナーポリヌクレオチドは、外因性のポリヌクレオチド配列であってもよい。ドナーポリヌクレオチドは、標的核酸切断部位で天然に存在しない配列であってもよい。ベクターは、ドナーポリヌクレオチドを含んでもよい。NHEJおよび/またはHRに起因する標的DNAの改変は、例えば、変異、欠失、変更、組み込み、遺伝子補正、遺伝子置換、遺伝子タグ化、導入遺伝子挿入、ヌクレオチド欠失、遺伝子破損、および/または遺伝子変異をもたらし得る。ゲノムDNA中に非天然核酸を組み込む方法は、ゲノム操作と呼ばれてもよい。

40

【0193】

50

いくつかの場合には、部位特異的ポリペプチドは、野性型の例示的な部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9、配列番号 8）に対して多くとも 10%、多くとも 15%、多くとも 20%、多くとも 30%、多くとも 40%、多くとも 50%、多くとも 60%、多くとも 70%、多くとも 75%、多くとも 80%、多くとも 85%、多くとも 90%、多くとも 95%、多くとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0194】

いくつかの場合には、部位特異的ポリペプチドは、野性型の例示的な部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9、配列番号 8）に対して、少なくとも 10%、少なくとも 15%、20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

10

【0195】

いくつかの場合には、部位特異的ポリペプチドは、野性型の例示的な部位特異的ポリペプチドのヌクレアーゼドメイン（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9、配列番号 8）に対して、多くとも 10%、多くとも 15%、多くとも 20%、多くとも 30%、多くとも 40%、多くとも 50%、多くとも 60%、多くとも 70%、多くとも 75%、多くとも 80%、多くとも 85%、多くとも 90%、多くとも 95%、多くとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

20

【0196】

部位特異的ポリペプチドは、10の連続するアミノ酸において、野性型部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9、配列番号 8）に対して少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または 100% の同一性を含み得る。部位特異的ポリペプチドは、10の連続するアミノ酸において、野性型部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9、配列番号 8）に対して多くとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または 100% の同一性を含んでもよい。部位特異的ポリペプチドは、部位特異的ポリペプチドの HNHヌクレアーゼドメイン中の 10の連続するアミノ酸において、野性型部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9、配列番号 8）に対して、少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または 100% の同一性を含み得る。部位特異的ポリペプチドは、部位特異的ポリペプチドの RuvCヌクレアーゼドメイン中の 10の連続するアミノ酸において、野性型部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9、配列番号 8）に対して、少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または 100% の同一性を含み得る。部位特異的ポリペプチドは、部位特異的ポリペプチドの RuvCヌクレアーゼドメイン中の 10の連続するアミノ酸において、野性型部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9、配列番号 8）に対して、多くとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または 100% の同一性を含んでもよい。

30

40

【0197】

いくつかの場合には、部位特異的ポリペプチドは、野性型の例示的な部位特異的ポリペプチドのヌクレアーゼドメイン（例えば、化膿レンサ球菌由来の Cas 9）に対して、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0198】

50

部位特異的ポリペプチドは、野性型の例示的な部位特異的ポリペプチドの改変型を含んでもよい。野性型の例示的な部位特異的ポリペプチドの改変型は、部位特異的ポリペプチドの核酸切断活性を低下するアミノ酸変化（例えば、欠失、挿入、または置換）を含んでもよい。例えば、野性型の例示的な部位特異的ポリペプチドの改変型は、野性型の例示的な部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来のCas9）の核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を有し得る。部位特異的ポリペプチドの改変型は、実質的な核酸切断活性を有さない場合がある。部位特異的ポリペプチドが、実質的な核酸切断活性を有さない改変型である場合、これは、「酵素学的に不活性な」と呼ばれてもよい。

10

【0199】

野性型の例示的な部位特異的ポリペプチドの改変型は、野性型の例示的な部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来のCas9）の核酸切断活性の90%超、80%超、70%超、60%超、50%超、40%超、30%超、20%超、10%超、5%超、または1%超を有してもよい。

【0200】

部位特異的ポリペプチドの改変型は、変異を含んでもよい。部位特異的ポリペプチドの改変型は、標的核酸上に一本鎖の破壊（single stranded break）（SSB）（例えば、標的核酸の糖-リン酸塩骨格のうち的一方のみを切断することによる）を誘導し得るような変異を含んでもよい。変異は、野性型部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿レンサ球菌由来のCas9）の複数の核酸切断ドメインのうちの一つまたはそれ以上で、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満の核酸切断活性を生じ得る。変異は、標的核酸の相補鎖を切断する能力を保持しているが、その標的核酸の非相補鎖を切断する能力が低下している、複数の核酸切断ドメインのうちの一つまたはそれ以上を生じ得る。変異は、標的核酸の非相補鎖を切断する能力を保持しているが、その標的核酸の相補鎖を切断する能力が低下している、複数の核酸切断ドメインのうちの一つまたはそれ以上を生じ得る。例えば、Asp10、His840、Asn854およびAsn856のような、野性型の例示的な化膿レンサ球菌Cas9ポリペプチド中の残基は、複数の核酸切断ドメイン（例えば、ヌクレアーゼドメイン）のうちの一つまたはそれ以上を不活性化するように変異されてもよい。変異されるべき残基は、野性型の例示的な化膿レンサ球菌のCas9ポリペプチド中の残基Asp10、His840、Asn854およびAsn856に相当し得る（例えば、配列および/または構造的アラインメントによって決定される）。変異の非限定的な例としては、D10A、H840A、N854AまたはN856Aを挙げることができる。当業者は、アラニン置換以外の変異が適切であることを認識する。

20

30

【0201】

D10A変異は、H840A、N854A、またはN856A変異のうちの一つまたはそれ以上と組み合わせられて、実質的にDNA切断活性を欠いている部位特異的ポリペプチドを生じ得る。H840A変異は、D10A、N854A、またはN856A変異のうちの一つまたはそれ以上と組み合わせられて、実質的にDNA切断活性を欠いている部位特異的ポリペプチドを生じ得る。N854A変異は、H840A、D10A、またはN856A変異のうちの一つまたはそれ以上と組み合わせられて、実質的にDNA切断活性を欠いている部位特異的ポリペプチドを生じ得る。N856A変異は、H840A、N854A、またはD10A変異のうちの一つまたはそれ以上と組み合わせられて、実質的にDNA切断活性を欠いている部位特異的ポリペプチドを生じ得る。一つの実質的に不活性なヌクレアーゼドメインを含む部位特異的ポリペプチドは、ニックアーゼと呼ばれてもよい。

40

【0202】

本開示の変異は、部位特異的変異によって生成され得る。変異としては、置換、付加、および欠失、またはそれらの任意の組み合わせを挙げることができる。いくつかの場合に

50

は、変異は、変異したアミノ酸をアラニンに変換する。いくつかの場合には、変異は、変異したアミノ酸を別のアミノ酸（例えば、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、またはアルギニン）に変換する。変異は、変異したアミノ酸を非天然のアミノ酸（例えば、セレノメチオニン）に変換し得る。変異は、変異したアミノ酸をアミノ酸模倣物（例えば、リン模倣物（*phosphomimic*））に変換し得る。変異は、保存的変異であってもよい。例えば、変異は、変異したアミノ酸を、変異したアミノ酸のサイズ、形状、電荷、極性、構造および/または回転異性体と似ているアミノ酸に変換し得る（例えば、システイン/セリン変異、リジン/アスパラギン変異、ヒスチジン/フェニルアラニン変異）。

10

【0203】

いくつかの場合には、部位特異的ポリペプチド（例えば、変種、変異した、酵素学的に不活性および/または条件的に酵素学的に不活性な部位特異的ポリペプチド）は、核酸を標的とし得る。部位特異的ポリペプチド（例えば、変種、変異した、酵素学的に不活性および/または条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ）は、RNAを標的とし得る。RNAを標的とし得る部位特異的ポリペプチドとしては、Cas6およびCas5のような他のCRISPRサブファミリーのメンバーを挙げることができる。

【0204】

部位特異的ポリペプチドは、1つまたはそれ以上の非天然配列（例えば、融合）を含んでもよい。

20

【0205】

部位特異的ポリペプチドは、細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のCas9に対して、少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、核酸結合ドメイン、および2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含んでもよい。

【0206】

部位特異的ポリペプチドは、細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、および2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含んでもよい。

30

【0207】

部位特異的ポリペプチドは、細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、および2つの核酸切断ドメインを含んでもよく、ここで核酸切断ドメインのうち一方または両方は、細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のCas9由来のヌクレアーゼドメインに対して、少なくとも50%のアミノ酸同一性を含む。

【0208】

部位特異的ポリペプチドは、細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）、および部位特異的ポリペプチドを非天然配列に連結するリンカーを含んでもよい。

40

【0209】

部位特異的ポリペプチドは、細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）（ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む）を含んでもよい。

【0210】

部位特異的ポリペプチドは、細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、および2つの核酸切断ドメイン

50

(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)(ここでヌクレアーゼドメインのうち1つは、アスパラギン酸10の変異を含み、および/またはヌクレアーゼドメインのうち1つは、ヒスチジン840の変異を含み、ここで変異は、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%まで低下する)を含んでもよい。

【0211】

エンドリボヌクレアーゼ。

いくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは、エンドリボヌクレアーゼであってもよい。

【0212】

いくつかの場合には、エンドリボヌクレアーゼは、野性型参照エンドリボヌクレアーゼに対して、多くとも約20%、多くとも約30%、多くとも約40%、多くとも約50%、多くとも約60%、多くとも約70%、多くとも約75%、多くとも約80%、多くとも約85%、多くとも約90%、多くとも約95%、多くとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性および/または相同性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。エンドリボヌクレアーゼは、野性型参照エンドリボヌクレアーゼ(例えば、緑膿菌由来のCas4)に対して、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性および/または相同性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。参照エンドリボヌクレアーゼは、Cas6ファミリーのメンバー(例えば、Cas4、Cas6)であってもよい。参照エンドリボヌクレアーゼは、Cas5ファミリーのメンバー(例えば、デスルホビブリオ・ブルガリス由来のCas5)であってもよい。参照エンドリボヌクレアーゼは、I型CRISPRファミリーのメンバー(例えば、Cas3)であってもよい。参照エンドリボヌクレアーゼは、II型ファミリーのメンバーであってもよい。参照エンドリボヌクレアーゼは、III型ファミリーのメンバー(例えば、Cas6)であってもよい。参照エンドリボヌクレアーゼは、反復関連ミステリアスプロテイン(RAMP)スーパーファミリーのメンバー(例えば、Cas7)であってもよい。

【0213】

エンドリボヌクレアーゼは、アミノ酸改変(例えば、置換、欠失、付加など)を含んでもよい。エンドリボヌクレアーゼは、1つまたはそれ以上の非天然配列(例えば、融合、親和性タグ)を含んでもよい。アミノ酸改変は、エンドリボヌクレアーゼの活性を実質的に変更しなくてもよい。アミノ酸改変および/または融合を含むエンドリボヌクレアーゼは、野性型エンドリボヌクレアーゼの少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%または100%の活性を保持し得る。

【0214】

改変は、エンドリボヌクレアーゼの酵素活性の変更を生じ得る。改変は、エンドリボヌクレアーゼの90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を生じ得る。いくつかの場合には、改変は、エンドリボヌクレアーゼのヌクレアーゼドメイン中で生じる。このような改変は、野性型エンドリボヌクレアーゼの複数の核酸切断ドメインのうち1つまたはそれ以上における核酸切断能力の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を生じ得る。

【0215】

条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ

いくつかの実施形態では、エンドリボヌクレアーゼは、条件的に酵素学的に不活性であってもよい。条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、配列特異的な方式でポリヌクレオチドに結合し得る。条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ

10

20

30

40

50

は、配列特異的な方式でポリヌクレオチドに結合し得るが、標的ポリリボヌクレオチドは切断できない。

【0216】

いくつかの場合には、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、参照の条件的に酵素学的エンドリボヌクレアーゼ（例えば、緑膿菌由来のCsy4）に対して、最大で約20%まで、最大で約30%まで、最大で約40%まで、最大で約50%まで、最大で約60%まで、最大で約70%まで、最大で約75%まで、最大で約80%まで、最大で約85%まで、最大で約90%まで、最大で約95%まで、最大で約99%まで、または100%のアミノ酸配列同一性および/または相同性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。いくつかの場合には、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、参照の条件的に酵素学的にエンドリボヌクレアーゼ（例えば、緑膿菌由来のCsy4）に対して、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性および/または相同性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

10

【0217】

条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、改変型のエンドリボヌクレアーゼを含んでもよい。改変型のエンドリボヌクレアーゼは、エンドリボヌクレアーゼの核酸切断活性を低下するアミノ酸変化（例えば、欠失、挿入、または置換）を含んでもよい。例えば、改変型の条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、参照（例えば、野生型）の条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ（例えば、緑膿菌由来のCsy4）の核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を有してもよい。改変型の条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、実質的な核酸切断活性を有さない場合がある。条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼが、実質的な核酸切断活性を有さない改変型である場合、これは、「酵素学的に不活性な」と呼んでもよい。

20

【0218】

改変型の条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、核酸切断能力の低下を生じ得る変異を含んでもよい（すなわち、結果として、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼが、核酸切断ドメインのうちの1つまたはそれ以上で酵素学的に不活性であり得る）。変異は、野生型エンドリボヌクレアーゼ（例えば、緑膿菌由来のCsy4）の複数の核酸切断ドメインのうちの1つまたはそれ以上における核酸切断能力の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を生じ得る。変異は、エンドリボヌクレアーゼのヌクレアーゼドメイン中で生じてもよい。変異は、フェレドキシン様フォールディング中で生じてもよい。変異は、保存された芳香族アミノ酸の変異を含んでもよい。変異は、触媒性アミノ酸の変異を含んでもよい。変異は、ヒスチジンの変異を含んでもよい。例えば、変異は、配列および/または構造的アラインメントによって決定して、Csy4（例えば、緑膿菌由来のCsy4）中のH29A変異、またはH29Aに対する任意の対応する残基を含んでもよい。他の残基を変異させて、同じ効果（すなわち、複数のヌクレアーゼドメインのうちの1つまたはそれ以上を不活性化すること）を達成してもよい。

30

40

【0219】

本発明の変異は、部位特異的変異によって生成され得る。変異としては、置換、付加、および欠失、またはそれらの任意の組み合わせを挙げることができる。いくつかの場合には、変異は、変異したアミノ酸をアラニンに変換する。いくつかの場合には、変異は、変異したアミノ酸を別のアミノ酸（例えば、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン

50

、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、またはアルギニン)に変換する。変異は、変異したアミノ酸を非天然のアミノ酸(例えば、セレノメチオニン)に変換し得る。変異は、変異したアミノ酸をアミノ酸模倣物(例えば、リン模倣物)に変換し得る。変異は、保存的変異であってもよい。例えば、変異は、変異したアミノ酸を、その変異したアミノ酸のサイズ、形状、電荷、極性、構造および/または回転異性体と似ているアミノ酸に変換し得る(例えば、システイン/セリン変異、リジン/アスパラギン変異、ヒスチジン/フェニルアラニン変異)。

【0220】

条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、再活性化剤(例えば、イミダゾール)の非存在下で酵素学的に不活性であってもよい。再活性化剤は、ヒスチジン残基を模倣する剤であってもよい(例えば、イミダゾール環を有してもよい)。条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、再活性化剤との接触によって活性化され得る。再活性化剤は、イミダゾールを含んでもよい。例えば、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼと、イミダゾールとを、約100mM~約500mMの濃度で接触させることによって酵素学的に活性化され得る。イミダゾールは、約100mM、約150mM、約200mM、約250mM、約300mM、約350mM、約400mM、約450mM、約500mM、約550mM、または約600mMの濃度であってもよい。イミダゾールの(例えば、約100mM~約500mMの濃度範囲での)存在は、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼを活性化し得、その結果、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、酵素学的に活性になり、例えば、条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、参照の条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ(例えば、H29A変異を含む緑膿菌由来のCsy4)の核酸切断能力の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または95%超を示す。

10

20

【0221】

条件的に酵素学的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、緑膿菌由来のCsy4(ヒスチジン29の変異)に対して少なくとも20%アミノ酸同一性を含んでもよく、ここで変異は、エンドリボヌクレアーゼのヌクレアーゼ活性の少なくとも50%低下を生じ、かつここでヌクレアーゼ活性の少なくとも50%の消失は、エンドリボヌクレアーゼと少なくとも100mMのイミダゾールとのインキュベーションによって修復され得る。

30

40

【0222】

コドン最適化

部位特異的ポリペプチドおよび/またはエンドリボヌクレアーゼをコードしているポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。この種の最適化は、同じタンパク質をコードしたままで、意図する宿主生物体または細胞のコドン優先度を模倣するために外来の(例えば、組換えの)DNAの変異を必要とし得る。従って、コドンは変化されてもよいが、コードされたタンパク質は、未変化のままである。例えば、意図される標的細胞がヒト細胞である場合、ヒトのコドン最適化ポリヌクレオチドCas9は、適切な部位特異的ポリペプチドを生成するために用いられ得る。別の非限定的な例として、意図される宿主細胞がマウス細胞である場合、Cas9をコードするマウスコドン最適化ポリヌクレオチドは、適切な部位特異的ポリペプチドであり得る。部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、対象とする多くの宿主細胞についてコドン最適化され得る。宿主細胞は、任意の生物体由来の細胞(例えば、細菌細胞、古細菌の細胞、単一細胞の真核生物生物体の細胞、植物細胞、藻細胞、例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー、クラミドモナス・レインハルドッティ、ナンノクロロプシス・ガジタナ、クロレラ・ピレノイドーサ、サルガッサム・パテンス、カール・アガードなど、真菌細胞(例えば、酵母細胞)、動物細胞、無脊椎動物(例えば、ショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線虫など)由来の細胞、脊椎動物(例えば、魚、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物)由来の細胞、哺乳動物(例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、ヒトなど

50

)由来の細胞などであってもよい。コドン最適化は必要でない場合もある。いくつかの場合には、コドン最適化が好ましい場合がある。

【0223】

核酸ターゲティング核酸

本開示は、標的核酸内の特異的標的配列に対して、関連したポリペプチド（例えば、部位特異的ポリペプチド）の活性を指向し得る核酸ターゲティング核酸を提供する。核酸ターゲティング核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。核酸ターゲティング核酸はRNAであってもよい。核酸ターゲティング核酸は、シングルガイドの核酸ターゲティング核酸を含んでもよい。例示的なシングルガイド核酸は、図1Aに示される。スペーサー伸長105およびtracrRNA伸長135は、核酸ターゲティング核酸に対する追加の機能（例えば、安定性）に寄与し得るエレメントを含んでもよい。いくつかの実施形態ではスペーサー伸長105およびtracrRNA伸長135は場合による。スペーサー配列110は、標的核酸配列に対してハイブリダイズし得る配列を含んでもよい。スペーサー配列110は、核酸ターゲティング核酸の可変部分であってもよい。スペーサー配列110の配列は、標的核酸配列に対してハイブリダイズするように操作され得る。CRISPR反復115（すなわち、この例示的な実施形態では、最小CRISPR反復と呼ばれる）は、tracrRNA配列125に対してハイブリダイズし得るヌクレオチドを含んでもよい（すなわち、この例示的な実施形態では、最小tracrRNA配列と呼ばれる）。最小CRISPR反復115および最小tracrRNA配列125は、相互作用し得、相互作用する分子は、塩基対の、二本鎖構造を含む。まとめると、最小CRISPR反復115および最小tracrRNA配列125は、部位特異的ポリペプチドに対する結合を容易にし得る。最小CRISPR反復115および最小tracrRNA配列125は、一緒に連結されて、シングルガイドコネクタ-120を通じてヘアピン構造を形成し得る。3'tracrRNA配列130は、プロトスペーサー隣接モチーフ認識配列を含んでもよい。3'tracrRNA配列130は、tracrRNA配列の一部に対して同一であっても、または類似であってもよい。いくつかの実施形態では、3'tracrRNA配列130は、1つまたはそれ以上のヘアピンを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0224】

いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、図1Bに示されるようなシングルガイドの核酸ターゲティング核酸を含んでもよい。核酸ターゲティング核酸は、スペーサー配列140を含んでもよい。スペーサー配列140は、標的核酸配列に対してハイブリダイズ可能な配列を含んでもよい。スペーサー配列140は、核酸ターゲティング核酸の可変部分であってもよい。スペーサー配列140は、第1の二重鎖145の5'側であってもよい。第1の二重鎖145は、最小CRISPR反復146と最小tracrRNA配列147との間にハイブリダイゼーションの領域を含む。第1の二重鎖145は、バルジ150によって中断され得る。バルジ150は、不對のヌクレオチドを含んでもよい。バルジ150は、核酸ターゲティング核酸への部位特異的ポリペプチドの補充を容易にし得る。バルジ150には、第1のステム155が続く場合がある。第1のステム155は、最小CRISPR反復146および最小tracrRNA配列147を連結するリンカー配列を含む。第1の二重鎖145の3'末端の最終の対のヌクレオチドは、第2のリンカー配列160に接続されてもよい。第2のリンカー160は、P-ドメインを含んでもよい。第2のリンカー160は、第1の二重鎖145を中央-tracrRNA165に連結し得る。中央-tracrRNA165は、いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のヘアピン領域を含む。例えば中央-tracrRNA165は、第2のステム170および第3のステム175を含んでもよい。

【0225】

いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、ダブルガイド核酸構造を含んでもよい。図2は、例示的なダブルガイド核酸ターゲティング核酸構造を示す。図1のシングルガイド核酸構造と同様に、ダブルガイド核酸構造は、スペーサー伸長205、スペーサー210、最小CRISPR反復215、最小tracrRNA配列230、3'tr

a c r R N A 配列 2 3 5、および t r a c r R N A 伸長 2 4 0 を含んでもよい。しかし、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸は、シングルガイドコネクタ-1 2 0 を含まなくてもよい。代わりに、最小 C R I S P R 反復配列 2 1 5 は、C R I S P R 反復の一部と類似または同一であり得る、3' C R I S P R 反復配列 2 2 0 を含んでもよい。同様に、最小 t r a c r R N A 配列 2 3 0 は、t r a c r R N A の一部と類似または同一であり得る 5' t r a c r R N A 配列 2 2 5 を含んでもよい。ダブルガイド R N A は、最小 C R I S P R 反復 2 1 5 および最小 t r a c r R N A 配列 2 3 0 を介して一緒にハイブリダイズし得る。

【0226】

いくつかの実施形態では、第1のセグメント(すなわち、核酸ターゲティングセグメント)は、スペーサー伸長(例えば、105/205)およびスペーサー(例えば、110/210)を含んでもよい。核酸ターゲティング核酸は、上述の核酸ターゲティングセグメントを介して標的核酸内の特異的なヌクレオチド配列に対して、結合したポリペプチドをガイドし得る。

10

【0227】

いくつかの実施形態では、第2のセグメント(すなわち、タンパク質結合セグメント)は、最小 C R I S P R 反復(例えば、115/215)、最小 t r a c r R N A 配列(例えば、125/230)、3' t r a c r R N A 配列(例えば、130/235)、および/または t r a c r R N A 伸長配列(例えば、135/240)を含んでもよい。核酸ターゲティング核酸のタンパク質結合セグメントは、部位特異的ポリペプチドと相互作用し得る。核酸ターゲティング核酸のタンパク質結合セグメントは、互いにハイブリダイズし得るヌクレオチドの2つのストレッチを含んでもよい。タンパク質結合セグメントのヌクレオチドはハイブリダイズして、二本鎖核酸二重鎖を形成し得る。二本鎖核酸二重鎖は R N A であってもよい。二本鎖核酸二重鎖は D N A であってもよい。

20

【0228】

いくつかの場合には、核酸ターゲティング核酸は、5'~3'の順序で、スペーサー伸長、スペーサー、最小 C R I S P R 反復、シングルガイドコネクタ-、最小 t r a c r R N A、3' t r a c r R N A 配列、および t r a c r R N A 伸長を含んでもよい。いくつかの場合には、核酸ターゲティング核酸は、t r a c r R N A 伸長、3' t r a c r R N A 配列、最小 t r a c r R N A、シングルガイドコネクタ-、最小 C R I S P R 反復、ス

30

【0229】

核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドは、複合体を形成し得る。核酸ターゲティング核酸は、標的核酸の配列にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含むことによって、複合体に対する標的の特異性を提供し得る。言い換えれば、部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸の少なくともタンパク質結合セグメントとのその会合のおかげで核酸配列にガイドされ得る。核酸ターゲティング核酸は、C a s 9 タンパク質の活性を指向し得る。核酸ターゲティング核酸は、酵素学的に不活性な C a s 9 タンパク質の活性を指向し得る。

【0230】

本開示の方法は、遺伝的に改変された細胞を提供し得る。遺伝的に改変された細胞は、外因性の核酸ターゲティング核酸および/または核酸ターゲティング核酸をコードするヌクレオチド配列を含む外因性の核酸を含んでもよい。

40

【0231】

スペーサー伸長配列

スペーサー伸長配列は、安定性を提供し得、および/または核酸ターゲティング核酸の改変のための位置を提供し得る。スペーサー伸長配列は、約1ヌクレオチド~約400ヌクレオチドの長さを有してもよい。スペーサー伸長配列は、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、34

50

0、360、380、40、1000、2000、3000、4000、5000、6000、もしくは7000またはそれ以上のヌクレオチドを超える長さを有してもよい。スペーサー伸長配列は、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000またはそれ以上のヌクレオチド未満の長さを有してもよい。スペーサー伸長配列は、10ヌクレオチド長未満であってもよい。スペーサー伸長配列は、10～30ヌクレオチド長であってもよい。スペーサー伸長配列は、30～70ヌクレオチド長であってもよい。

【0232】

スペーサー伸長配列は、ある部分（例えば、安定性制御配列、エンドリボヌクレアーゼ結合配列、リボザイム）を含んでもよい。部分は、核酸ターゲティングRNAの安定性に影響し得る。部分は、転写ターミネーターセグメント（すなわち、転写終止配列）であってもよい。核酸ターゲティング核酸の一部は、約10ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約10ヌクレオチド（nt）～約20nt、約20nt～約30nt、約30nt～約40nt、約40nt～約50nt、約50nt～約60nt、約60nt～約70nt、約70nt～約80nt、約80nt～約90nt、または約90nt～約100nt、約15ヌクレオチド（nt）～約80nt、約15nt～約50nt、約15nt～約40nt、約15nt～約30ntまたは約15nt～約25ntの総長を有してもよい。この部分は、真核生物細胞中で機能し得るものであってもよい。いくつかの場合には、この部分は、原核生物細胞中で機能し得るものであってもよい。この部分は、真核生物細胞および原核生物細胞の両方の中で機能し得るものであってもよい。

【0233】

適切な部分の非限定的な例としては、以下を挙げることができる：5'キャップ（例えば、7-メチルグアニレートキャップ（m7G））、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質およびタンパク質複合体によって調節された安定性および/または調節された接近性を可能にするため）、dsRNA二重鎖（すなわち、ヘアピン）を形成する配列、RNAを細胞内の位置（例えば、核、ミトコンドリア、クロロプラストなど）に標的とする配列、トラッキングを提供する改変もしくは配列（例えば、蛍光分子に対する直接のコンジュゲーション、蛍光検出を容易にする部分に対するコンジュゲーション、蛍光検出を可能にする配列、など）、タンパク質（例えば、DNAに作用するタンパク質、例としては、転写活性化因子、転写レプレッサー、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなど）に結合部位を提供する改変もしくは配列、増大した、低下したおよび/もしくは制御可能な安定性を提供する改変もしくは配列、またはそれらの任意の組み合わせ。スペーサー伸長配列は、プライマー結合部位、分子指標（例えば、バーコード配列）を含んでもよい。スペーサー伸長配列は、核酸親和性タグを含んでもよい。

【0234】

スペーサー

核酸ターゲティング核酸の核酸ターゲティングセグメントは、標的核酸中の配列に対してハイブリダイズし得るヌクレオチド配列（例えば、スペーサー）を含んでもよい。核酸ターゲティング核酸のスペーサーは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）を介して標的核酸と、配列特異的な方式で相互作用し得る。従って、スペーサーのヌクレオチド配列は、変化し得、かつ核酸ターゲティング核酸および標的核酸が相互作用し得る標的核酸内の位置を決定し得る。

【0235】

スペーサー配列は、スペーサー隣接モチーフ（PAM）の5'側に位置する標的核酸に対してハイブリダイズし得る。異なる生物体は、異なるPAM配列を含んでもよい。例えば、化膿レンサ球菌では、PAMは、配列5'-XRR-3'を含む標的核酸中の配列であってもよく、ここでRは、AまたはGのいずれであってもよく、ここでXは、任意のヌ

10

20

30

40

50

rRNAのシード領域に対して、約50%、60%、70%、80%、90%、または100%を超えて相補的であってもよい。標的核酸は、crRNAのシード領域に対して約50%、60%、70%、80%、90%、または100%未満で相補的であってもよい。

【0239】

核酸ターゲティング核酸のスペーサーセグメントは、標的核酸内の任意の所望の配列に対してハイブリダイズするように改変されてもよい（例えば、遺伝子操作によって）。例えば、スペーサーは、癌、細胞増殖、DNA複製、DNA修復、HLA遺伝子、細胞表面タンパク質、T細胞受容体、免疫グロブリンスーパーファミリー遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、マイクロRNA遺伝子、長非コードRNA遺伝子、転写因子、グロブリン、ウイルスタンパク質、ミトコンドリア遺伝子などに関する標的核酸中の配列にハイブリダイズするように操作され（例えば、設計され、プログラミングされ）てもよい。

10

【0240】

スペーサー配列は、コンピュータプログラム（例えば、機械読み取り可能なコード）を用いて特定され得る。コンピュータプログラムは、予測融点、二次構造形成、および予測アニリング温度、配列同一性、ゲノムコンテクスト、クロマチン接近性、GC%、ゲノム出現の頻度、メチル化状況、SNPの存在などのような変数を用い得る。

【0241】

最小CRISPR反復配列

最小CRISPR反復配列は、参照のCRISPR反復配列（例えば、化膿レンサ球菌由来のcrRNA）と、少なくとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列同一性および/または配列相同性である配列であってもよい。最小CRISPR反復配列は、参照のCRISPR反復配列（例えば、化膿レンサ球菌由来のcrRNA）と、多くとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列同一性および/または配列相同性を有する配列であってもよい。最小CRISPR反復は、最小tracrRNA配列にハイブリダイズし得るヌクレオチドを含んでもよい。最小CRISPR反復および最小tracrRNA配列は、塩基対の二本鎖構造を形成してもよい。まとめると、最小CRISPR反復および最小tracrRNA配列は、部位特異的ポリペプチドに対する結合を容易にし得る。最小CRISPR反復配列の一部は、最小tracrRNA配列に対してハイブリダイズし得る。最小CRISPR反復配列の一部は、最小tracrRNA配列に対して少なくとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%相補的であり得る。最小CRISPR反復配列の一部は、最小tracrRNA配列に対して多くとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%相補的であり得る。

20

30

【0242】

最小CRISPR反復配列は、約6ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの長さを有してもよい。例えば、最小CRISPR反復配列は、約6ヌクレオチド（nt）～約50nt、約6nt～約40nt、約6nt～約30nt、約6nt～約25nt、約6nt～約20nt、約6nt～約15nt、約8nt～約40nt、約8nt～約30nt、約8nt～約25nt、約8nt～約20ntまたは約8nt～約15nt、約15nt～約100nt、約15nt～約80nt、約15nt～約50nt、約15nt～約40nt、約15nt～約30ntまたは約15nt～約25ntの長さを有し得る。いくつかの実施形態では、最小CRISPR反復配列は、およそ12ヌクレオチドの長さを有する。

40

【0243】

最小CRISPR反復配列は、少なくとも6、7または8つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、参照の最小CRISPR反復配列（例えば、化膿レンサ球菌由来の野性型crRNA）に対して少なくとも約60%同一であってもよい。最小CRISPR

50

反復配列は、少なくとも6、7または8つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、参照の最小CRISPR反復配列（例えば、化膿レンサ球菌由来の野性型crRNA）に対して少なくとも約60%同一であってもよい。例えば、最小CRISPR反復配列は、少なくとも6、7または8つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、参照の最小CRISPR反復配列に対して少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一または100%同一であってもよい。

【0244】

最小tracrRNA配列

最小tracrRNA配列は、参照のtracrRNA配列（例えば、化膿レンサ球菌由来の野性型tracrRNA）に対して少なくとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列同一性および/または配列相同性を有する配列であってもよい。最小tracrRNA配列は、参照のtracrRNA配列（例えば、化膿レンサ球菌由来の野性型tracrRNA）に対して多くとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列同一性および/または配列相同性を有する配列であってもよい。最小tracrRNA配列は、最小CRISPR反復配列に対してハイブリダイズし得るヌクレオチドを含んでもよい。最小tracrRNA配列および最小CRISPR反復配列は、塩基対の、二本鎖構造を形成し得る。まとめると、最小tracrRNA配列および最小CRISPR反復は、部位特異的ポリペプチドに対する結合を容易にし得る。最小tracrRNA配列の一部は、最小CRISPR反復配列にハイブリダイズし得る。最小tracrRNA配列の一部は、最小CRISPR反復配列に対して30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%相補的であってもよい。

【0245】

最小tracrRNA配列は、約6ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、最小tracrRNA配列は、約6ヌクレオチド(nt)～約50nt、約6nt～約40nt、約6nt～約30nt、約6nt～約25nt、約6nt～約20nt、約6nt～約15nt、約8nt～約40nt、約8nt～約30nt、約8nt～約25nt、約8nt～約20ntまたは約8nt～約15nt、約15nt～約100nt、約15nt～約80nt、約15nt～約50nt、約15nt～約40nt、約15nt～約30ntまたは約15nt～約25ntの長さを有してもよい。いくつかの実施形態では、最小tracrRNA配列は、およそ14ヌクレオチドの長さを有する。

【0246】

最小tracrRNA配列は、少なくとも6、7または8つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、参照の最小tracrRNA（例えば、野性型、化膿レンサ球菌由来のcrRNA）配列に対して少なくとも約60%同一であってもよい。最小tracrRNA配列は、少なくとも6、7または8つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、参照の最小tracrRNA（例えば、野性型、化膿レンサ球菌由来のtracrRNA）配列に対して少なくとも約60%同一であってもよい。例えば、最小tracrRNA配列は、少なくとも6、7または8つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、参照の最小tracrRNA配列に対して少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一または100%同一であってもよい。

【0247】

最小CRISPR RNAと最小tracrRNAとの間の二重鎖（すなわち、図1Bの第1の二重鎖）は、二重らせんを含んでもよい。二重鎖の第1の鎖の第1の塩基（例え

10

20

30

40

50

ば、図1Bの最小CRISPR反復)は、グアニンであってもよい。二重鎖の第1の鎖の第1の塩基(例えば、図1Bの最小CRISPR反復)はアデニンであってもよい。最小CRISPR RNAと最小tracrRNAとの間の二重鎖(すなわち、図1Bの第1の二重鎖)は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10、または10超のヌクレオチドを含んでもよい。最小CRISPR RNAと最小tracrRNAとの間の二重鎖(すなわち、図1Bの第1の二重鎖)は、多くとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10、または10超のヌクレオチドを含んでもよい。

【0248】

二重鎖は、ミスマッチを含んでもよい。二重鎖は、少なくとも約1、2、3、4、または5またはそれ以上のミスマッチを含んでもよい。二重鎖は、多くとも約1、2、3、4、または5またはそれ以上のミスマッチを含んでもよい。いくつかの場合には、二重鎖は、2つ以下のミスマッチを含んでもよい。

10

【0249】

バルジ

バルジとは、最小CRISPR反復および最小tracrRNA配列からできている二重鎖内のヌクレオチドの不对の領域を指してもよい。バルジは、部位特異的ポリペプチドに対する結合に重要であり得る。バルジは、二重鎖の片側に、不对の5'-XXX Y-3'を含んでもよく、ここでXは、任意のプリンであり、かつYは、反対の鎖の上のヌクレオチドと不安定な対を形成し得るヌクレオチド、および二重鎖の他の側の上の不对のヌクレオチド領域であってもよい。

20

【0250】

例えば、バルジは、バルジの最小CRISPR反復鎖上に不对のプリン(例えば、アデニン)を含んでもよい。いくつかの実施形態では、バルジは、そのバルジの最小tracrRNA配列鎖の不对の5'-AAGY-3'を含んでもよく、ここでYは、最小CRISPR反復鎖上のヌクレオチドと不安定な対を形成し得るヌクレオチドであってもよい。

【0251】

二重鎖の第1の側(例えば、最小CRISPR反復側)の上のバルジは、少なくとも1、2、3、4、もしくは5つ、またはそれ以上の不对のヌクレオチドを含んでもよい。二重鎖の第1の側(例えば、最小CRISPR反復側)の上のバルジは、多くとも1、2、3、4、もしくは5つ、またはそれ以上の不对のヌクレオチドを含んでもよい。二重鎖の第1の側(例えば、最小CRISPR反復側)の上のバルジは、1つの不对のヌクレオチドを含んでもよい。

30

【0252】

二重鎖の第2の側(例えば、二重鎖の最小tracrRNA配列側)の上のバルジは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10、またはそれ以上の不对のヌクレオチドを含んでもよい。二重鎖の第2の側(例えば、二重鎖の最小tracrRNA配列側)の上のバルジは、多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10、またはそれ以上の不对のヌクレオチドを含んでもよい。二重鎖の第2の側(例えば、二重鎖の最小tracrRNA配列側)の上のバルジは、4つの不对のヌクレオチドを含んでもよい。

40

【0253】

二重鎖の各々の鎖の上の異なる数の不对のヌクレオチドの領域は一緒に対になってもよい。例えば、バルジは、第1の鎖由来の5つの不对のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の1つの不对のヌクレオチドを含んでもよい。バルジは、第1の鎖由来の4つの不对のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の1つの不对のヌクレオチドを含んでもよい。バルジは、第1の鎖由来の3つの不对のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の1つの不对のヌクレオチドを含んでもよい。バルジは、第1の鎖由来の2つの不对のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の1つの不对のヌクレオチドを含んでもよい。バルジは、第1の鎖由来の1つの不对のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の2つの不对のヌクレオチドを含んでもよい。バルジは、第1の鎖由来の1つの不对のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の2つの不对のヌクレオチドを含んでもよい。

50

チドを含んでもよい。バルジは、第1の鎖由来の1つの不對のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の3つの不對のヌクレオチドを含んでもよい。バルジは、第1の鎖由来の1つの不對のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の4つの不對のヌクレオチドを含んでもよい。バルジは、第1の鎖由来の1つの不對のヌクレオチドおよび第2の鎖由来の5つの不對のヌクレオチドを含んでもよい。

【0254】

いくつかの場合には、バルジは、少なくとも1つの不安定な対合を含んでもよい。いくつかの場合には、バルジは、多くとも1つの不安定な対合を含んでもよい。バルジ配列は、少なくとも1つのプリンヌクレオチドを含んでもよい。バルジ配列は、少なくとも3つのプリンヌクレオチドを含んでもよい。バルジ配列は、少なくとも5つのプリンヌクレオチドを含んでもよい。バルジ配列は、少なくとも1つのグアニンヌクレオチドを含んでもよい。バルジ配列は、少なくとも1つのアデニンヌクレオチドを含んでもよい。

10

【0255】

P - ドメイン (P - D O M A I N)

P - ドメインは、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) を認識し得る核酸ターゲティング核酸のある領域を指してもよい。P - ドメインは、標的核酸中の P A M にハイブリダイズし得る。従って、P - ドメインは、P A M に相補性である配列を含んでもよい。P - ドメインは、最小 t r a c r R N A 配列に対して 3 ' 側に位置してもよい。P - ドメインは、3 ' t r a c r R N A 配列 (すなわち、中央 - t r a c r R N A 配列) 内に位置してもよい。

20

【0256】

p は、最小 C R I S P R 反復および最小 t r a c r R N A 配列の二重鎖中の最後の対のヌクレオチドの少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、もしくは 20、またはそれ以上のヌクレオチドで開始する。P - ドメインは、最小 C R I S P R 反復および最小 t r a c r R N A 配列の二重鎖中の最後の対のヌクレオチドの多くとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは 10、またはそれ以上のヌクレオチドで開始し得る。

【0257】

P - ドメインは、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、もしくは 20、またはそれ以上の連続のヌクレオチドを含んでもよい。P - ドメインは、多くとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、もしくは 20、またはそれ以上の連続のヌクレオチドを含んでもよい。

30

【0258】

いくつかの場合には、P - ドメインは、C C ジヌクレオチド (すなわち、2つの連続のシトシンヌクレオチド) を含んでもよい。C C ジヌクレオチドは、P A M の G G ジヌクレオチドと相互作用し得、ここで P A M は、5 ' - X G G - 3 ' 配列を含む。

【0259】

P - ドメインは、3 ' t r a c r R N A 配列中に位置するヌクレオチド配列であってもよい (すなわち、中央 - t r a c r R N A 配列) 。P - ドメインは、二重鎖のヌクレオチド (例えば、一緒にハイブリダイズした、ヘアピンのヌクレオチド) を含んでもよい。例えば、P - ドメインは、3 ' t r a c r R N A 配列のヘアピン二重鎖中の G G ジヌクレオチドにハイブリダイズする C C ジヌクレオチドを含んでもよい (すなわち、中央 - t r a c r R N A 配列) 。P - ドメインの活性 (例えば、核酸ターゲティング核酸が標的核酸を標的とする能力) は、P - D O M A I N のハイブリダイゼーション状態によって調節され得る。例えば、P - ドメインがハイブリダイズされる場合、核酸ターゲティング核酸は、その標的を認識しなくてもよい。P - ドメインがハイブリダイズしない場合、核酸ターゲティング核酸は、その標的を認識し得る。

40

【0260】

P - ドメインは、部位特異的ポリペプチド内の P - ドメイン相互作用領域と相互作用し得る。P - ドメインは、部位特異的ポリペプチド中のアルギニンリッチな塩基性パッチと

50

相互作用し得る。P - ドメイン相互作用領域は、P A M 配列と相互作用し得る。P - ドメインは、ステムループを含み得る。P - ドメインはバルジを含んでもよい。

【0261】

3' tracrRNA 配列

3' tracrRNA 配列は、参照の tracrRNA 配列（例えば、化膿レンサ球菌由来の tracrRNA）と、少なくとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列同一性および/または配列相同性を有する配列であってもよい。3' tracrRNA 配列は、参照の tracrRNA 配列（例えば、化膿レンサ球菌由来の tracrRNA）と、多くとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列同一性および/または配列相同性を有する配列であってもよい。

10

【0262】

3' tracrRNA 配列は、約6ヌクレオチド~約100ヌクレオチドの長さを有してもよい。例えば、3' tracrRNA 配列は、約6ヌクレオチド(nt)~約50nt、約6nt~約40nt、約6nt~約30nt、約6nt~約25nt、約6nt~約20nt、約6nt~約15nt、約8nt~約40nt、約8nt~約30nt、約8nt~約25nt、約8nt~約20ntまたは約8nt~約15nt、約15nt~約100nt、約15nt~約80nt、約15nt~約50nt、約15nt~約40nt、約15nt~約30ntまたは約15nt~約25ntの長さを有してもよい。いくつかの実施形態では、3' tracrRNA 配列は、およそ14ヌクレオチドの長さを有する。

20

【0263】

3' tracrRNA 配列は、少なくとも6、7、または8つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、参照の3' tracrRNA 配列（例えば、化膿レンサ球菌由来の野性型3' tracrRNA 配列）に対して少なくとも約60%同一であってもよい。例えば、3' tracrRNA 配列は、少なくとも6、7、または8つの連続するヌクレオチドのストレッチにおいて、参照の3' tracrRNA 配列（例えば、化膿レンサ球菌由来の野性型3' tracrRNA 配列）に対して、少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、または100%同一であってもよい。

30

【0264】

3' tracrRNA 配列は、2つ以上の二重鎖の領域（例えば、ヘアピン、ハイブリダイズした領域）を含んでもよい。3' tracrRNA 配列は、2つの二重鎖の領域を含んでもよい。

【0265】

3' tracrRNA 配列はまた、中央 - tracrRNA と呼ばれてもよい（図1Bを参照のこと）。中央 - tracrRNA 配列は、ステムループ構造を含んでもよい。言い換えれば、中央 - tracrRNA 配列は、図1Bに示されるとおり、第2のまたは第3のステムとは異なるヘアピンを含んでもよい。中央 - tracrRNA のステムループ構造（すなわち、3' tracrRNA）は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15もしくは20、またはそれ以上のヌクレオチドを含んでもよい。中央 - tracrRNA のステムループ構造（すなわち、3' tracrRNA）は、多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、またはそれ以上のヌクレオチドを含んでもよい。ステムループ構造は、機能的な部分を含んでもよい。例えば、ステムループ構造は、アダマー、リボザイム、タンパク質 - 相互作用ヘアピン、CRISPRアレイ、イントロン、およびエクソンを含んでもよい。ステムループ構造は、少なくとも約1、2、3、4、もしくは5つ、またはそれ以上の機能的な部分を含んでもよい。ステムル

40

50

ープ構造は、多くとも約 1、2、3、4、もしくは 5 つ、またはそれ以上の機能的部分を含んでもよい。

【0266】

中央 - t r a c r R N A 配列中のヘアピンは、P - ドメインを含んでもよい。P - ドメインは、そのヘアピン中に二本鎖の領域を含んでもよい。

【0267】

t r a c r R N A 伸長配列

t r a c r R N A 伸長配列は、核酸ターゲティング核酸の改変について安定性を提供するか、および/または位置を提供し得る。t r a c r R N A 伸長配列は、約 1 ヌクレオチド ~ 約 400 ヌクレオチドの長さを有し得る。t r a c r R N A 伸長配列は、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400 またはそれ以上のヌクレオチドを超える長さを有し得る。t r a c r R N A 伸長配列は、約 20 ~ 約 5000、またはそれ以上のヌクレオチドの長さを有してもよい。t r a c r R N A 伸長配列は、1000 を超えるヌクレオチドの長さを有してもよい。t r a c r R N A 伸長配列は、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400 ヌクレオチド未満の長さを有してもよい。t r a c r R N A 伸長配列は、1000 ヌクレオチド未満の長さを有してもよい。t r a c r R N A 伸長配列は、10 ヌクレオチド長未満であってもよい。t r a c r R N A 伸長配列は、10 ~ 30 ヌクレオチド長であってもよい。t r a c r R N A 伸長配列は、30 ~ 70 ヌクレオチド長であってもよい。

10

20

【0268】

t r a c r R N A 伸長配列は、ある部分（例えば、安定性制御配列、リボザイム、エンドリボヌクレアーゼ結合配列）を含んでもよい。部分は、核酸ターゲティング RNA の安定性に影響し得る。部分は、転写終結セグメント（すなわち、転写終止配列）であってもよい。核酸ターゲティング核酸の一部は、約 10 ヌクレオチド ~ 約 100 ヌクレオチド、約 10 ヌクレオチド (n t) ~ 約 20 n t 、約 20 n t ~ 約 30 n t 、約 30 n t ~ 約 40 n t 、約 40 n t ~ 約 50 n t 、約 50 n t ~ 約 60 n t 、約 60 n t ~ 約 70 n t 、約 70 n t ~ 約 80 n t 、約 80 n t ~ 約 90 n t 、または約 90 n t ~ 約 100 n t 、約 15 ヌクレオチド (n t) ~ 約 80 n t 、約 15 n t ~ 約 50 n t 、約 15 n t ~ 約 40 n t 、約 15 n t ~ 約 30 n t または約 15 n t ~ 約 25 n t の総長を有してもよい。この部分は、真核生物細胞中で機能し得るものであってもよい。いくつかの場合には、この部分は、原核生物細胞中で機能し得るものであってもよい。この部分は、真核生物細胞および原核生物細胞の両方の中で機能し得るものであってもよい。

30

【0269】

適切な t r a c r R N A 伸長部分の非限定的な例としては、3' ポリ - アデニル化テール、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質およびタンパク質複合体により調節された安定性および/もしくは調節された接近性を可能にするため）、d s R N A 二重鎖（すなわち、ヘアピン）を形成する配列、R N A を細胞内の位置（例えば、核、ミトコンドリア、クロロプラストなど）に標的とする配列、トラッキング（蛍光分子に対する直接コンジュゲーション、蛍光検出を容易にする部分へのコンジュゲーション、蛍光検出を可能にする配列、など）を提供する改変もしくは配列、タンパク質（例えば、DNA に作用するタンパク質、例としては、転写活性化因子、転写レプレッサー、DNA メチルトランスフェラーゼ、DNA デメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなど）に関する結合部位を提供する改変もしくは配列、安定性の増大、低下および/もしくは制御可能な安定性を提供する改変もしくは配列、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。t r a c r R N A 伸長配列は、プライマー結合部位、分子指標（例えば、バーコード配列）を含んでもよい。本開示のいくつかの実施形態では、t r a c r R N

40

50

A 伸長配列は、1つまたはそれ以上の親和性タグを含んでもよい。

【0270】

シングルガイド核酸

核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸であってもよい。シングルガイド核酸はRNAであってもよい。シングルガイド核酸は、シングルガイドコネクター配列と呼ばれ得る最小CRISPR反復配列と最小tracrRNA配列との間のリンカー（すなわち、図1Aの項目120）を含んでもよい。

【0271】

シングルガイド核酸のシングルガイドコネクターは、約3ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの長さを有してもよい。例えば、リンカーは、約3ヌクレオチド（nt）～約90nt、約3nt～約80nt、約3nt～約70nt、約3nt～約60nt、約3nt～約50nt、約3nt～約40nt、約3nt～約30nt、約3nt～約20ntまたは約3nt～約10ntの長さを有してもよい。例えば、リンカーは、約3nt～約5nt、約5nt～約10nt、約10nt～約15nt、約15nt～約20nt、約20nt～約25nt、約25nt～約30nt、約30nt～約35nt、約35nt～約40nt、約40nt～約50nt、約50nt～約60nt、約60nt～約70nt、約70nt～約80nt、約80nt～約90nt、または約90nt～約100ntの長さを有してもよい。いくつかの実施形態では、シングルガイド核酸のリンカーは、4～40ヌクレオチドである。リンカーは、少なくとも約100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、もしくは7000、またはそれ以上のヌクレオチドの長さを有してもよい。リンカーは、多くとも約100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、もしくは7000、またはそれ以上のヌクレオチドの長さを有してもよい。

10

20

【0272】

リンカー配列は、機能的部分を含んでもよい。例えば、リンカー配列は、アプタマー、リボザイム、タンパク質相互作用性ヘアピン、CRISPRアレイ、イントロン、およびエクソンを含んでもよい。リンカー配列は、少なくとも約1、2、3、4、もしくは5つ、またはそれ以上の機能的部分を含んでもよい。リンカー配列は、多くとも約1、2、3、4、もしくは5つ、またはそれ以上の機能的部分を含んでもよい。

30

【0273】

いくつかの実施形態では、シングルガイドコネクターは、最小CRISPR反復の3'末端を最小tracrRNA配列の5'末端に接続し得る。あるいは、シングルガイドコネクターは、tracrRNA配列の3'末端を、最小CRISPR反復の5'末端に接続し得る。すなわち、シングルガイド核酸は、3'タンパク質結合セグメントに連結された5'DNA結合セグメントを含んでもよい。シングルガイド核酸は、3'DNA結合セグメントに連結された5'タンパク質結合セグメントを含んでもよい。

【0274】

核酸ターゲティング核酸は、10～5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列；12～30ヌクレオチド長のスペーサー配列（ここでスペーサーは、標的核酸に対して少なくとも50%相補的である）；6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、5～30ヌクレオチドを有する最小CRISPR反復；最小tracrRNA配列（6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列は、5～30ヌクレオチドの長さを有する）；リンカー配列（最小CRISPR反復および最小tracrRNAを連結し、かつ3～5000ヌクレオチドの長さを含む）；3'tracrRNA（6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のtrac

40

50

rRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3' tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む)；ならびに/またはtracrRNA伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれてもよい。

【0275】

核酸ターゲティング核酸は、10~5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列；12~30ヌクレオチド長のスペーサー配列(ここでスペーサーは、標的核酸に対して少なくとも50%相補的である)；1)6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復が5~30ヌクレオチドの長さを有する、最小CRISPR反復、2)6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列が5~30ヌクレオチドの長さを有する最小tracrRNA配列、3)パルジ(ここでパルジが、二重鎖の最小CRISPR反復鎖上に少なくとも3つの不对のヌクレオチド、および二重鎖の最小tracrRNA配列鎖上に少なくとも1つの不对のヌクレオチドを含む)を含む二重鎖；リンカー配列(最小CRISPR反復および最小tracrRNAを連結し、かつ3~5000ヌクレオチドの長さを含む)；3'tracrRNA(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、ここで3'tracrRNAが10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む)；P-ドメイン(最小CRISPR反復および最小tracrRNAを含む二重鎖の1~5ヌクレオチド下流で開始し、1~10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ3'tracrRNA領域に位置している)；ならびに/またはtracrRNA伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

10

20

【0276】

ダブルガイド核酸

核酸ターゲティング核酸は、ダブルガイド核酸であってもよい。ダブルガイド核酸はRNAであってもよい。ダブルガイド核酸は、2つの別々の核酸分子(すなわち、ポリヌクレオチド)を含んでもよい。ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の2つの核酸分子の各々は、2つの核酸分子の相補的なヌクレオチドがハイブリダイズして、タンパク質結合セグメントの二重鎖の二重鎖を形成するように互いに対してハイブリダイズし得るヌクレオチドのストレッチを含んでもよい。別段特定しない場合、「核酸ターゲティング核酸」という用語は、包括的であってもよく、単一分子の核酸ターゲティング核酸および二重分子の核酸ターゲティング核酸の両方を指す。

30

【0277】

ダブルガイド核酸ターゲティング核酸は、1)10~5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列；12~30ヌクレオチド長のスペーサー配列(ここでスペーサーは、標的核酸に対して少なくとも50%相補的である)；および最小CRISPR反復(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復は5~30ヌクレオチドの長さを有する)を含む、第1の核酸分子；ならびに2)ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子であって、6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む最小tracrRNA配列であって、かつ、ここで最小tracrRNA配列が、5~30ヌクレオチドの長さを有する)；3'tracrRNA(6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3'tra

40

50

c r R N A が 1 0 ~ 2 0 ヌクレオチド長を含み、かつ二重鎖の領域を含む) ; および / または t r a c r R N A 伸長 (1 0 ~ 5 0 0 0 ヌクレオチド長を含む) を含んでもよい第 2 の核酸分子、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

【 0 2 7 8 】

いくつかの場合には、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸は、1) スペーサー伸長配列 (1 0 ~ 5 0 0 0 ヌクレオチド長を含む) ; 1 2 ~ 3 0 ヌクレオチド長のスペーサー配列 (ここでスペーサーは、標的核酸に対して少なくとも 5 0 % 相補的である) ; 最小 C R I S P R 反復 (6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物 (例えば、化膿レンサ球菌) またはファージ由来の c r R N A に対して少なくとも 6 0 % の同一性を含み、かつ、ここで最小 C R I S P R 反復が 5 ~ 3 0 ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも 3 つの不对のヌクレオチドを有する) を含む第 1 の核酸分子 ; ならびに 2) ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第 2 の核酸分子であって、最小 t r a c r R N A 配列 (6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物 (例えば、化膿レンサ球菌) またはファージ由来の t r a c r R N A に対して少なくとも 6 0 % の同一性を含み、かつ、ここで最小 t r a c r R N A 配列が 5 ~ 3 0 ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも 1 つの不对のヌクレオチドを有し、ここでバルジの 1 つの不对のヌクレオチドが、最小 C R I S P R 反復の 3 つの不对のヌクレオチドと同じバルジに位置する) ; 3 ' t r a c r R N A (6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物 (例えば、化膿レンサ球菌) またはファージ由来の t r a c r R N A に対して少なくとも 6 0 % の同一性を含み、かつ、ここで 3 ' t r a c r R N A が 1 0 ~ 2 0 ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む) ; P - ドメイン (最小 C R I S P R 反復および最小 t r a c r R N A を含む二重鎖の 1 ~ 5 ヌクレオチド下流から開始し、1 ~ 1 0 ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ 3 ' t r a c r R N A 領域に位置する) ; および / または t r a c r R N A 伸長 (1 0 ~ 5 0 0 0 ヌクレオチド長を含む) を含み得る、第 2 核酸分子、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

10

20

【 0 2 7 9 】

核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドの複合体

核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリペプチド (例えば、核酸 - ガイドのヌクレアーゼ、C a s 9) と相互作用し得、これによって複合体を形成し得る。核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリペプチドを標的核酸へガイドし得る。

30

【 0 2 8 0 】

いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、複合体 (例えば、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む) が、部位特異的ポリペプチドの切断部位の外側に結合し得るように操作され得る。この場合、標的核酸は、複合体と相互作用しない場合があり、標的核酸は切り出され得る (例えば、複合体から自由に) 。

【 0 2 8 1 】

いくつかの実施形態では、核酸ターゲティング核酸は、この複合体が、部位特異的ポリペプチドの切断部位の内側に結合し得るように操作され得る。この場合、標的核酸は、複合体と相互作用し得、標的核酸が結合され得る (例えば、複合体に結合して) 。

40

【 0 2 8 2 】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド (ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来の C a s 9 に対して少なくとも 1 5 % のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、および 2 つの核酸切断ドメイン (すなわち、H N H ドメインおよび R u v C ドメイン) を含んでもよい) ; およびダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、1) 1 0 ~ 5 0 0 0 ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列 ; 1 2 ~ 3 0 ヌクレオチド長のスペーサー配列 (ここでスペーサーは、標的核酸に対して少なくとも 5 0 % 相補的である) ; および最小 C R I S P R 反復 (6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物 (例えば、化膿レンサ球菌) またはファージ由来の c r R N A に対して少なくとも 6 0 % の同一性を含み、かつここで最小 C R I S P R 反復が 5 ~ 3 0 ヌクレオチドの

50

長さを有する)を含む第1の核酸分子; ならびに2) ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子であって、これは、最小 *tracrRNA* 配列(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の *tracrRNA* に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小 *tracrRNA* 配列が、5~30ヌクレオチドの長さを有する); 3' *tracrRNA* (6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来の *tracrRNA* に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつここで3' *tracrRNA* が10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む); および/もしくは *tracrRNA* 伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

10

【0283】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来の Cas9 に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、および2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)を含んでもよい); ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、1) 10~5000ヌクレオチド長のスパーサー伸長配列; 12~30ヌクレオチド長のスパーサー配列(ここでスパーサーは、標的核酸に対して少なくとも50%相補的である); 最小CRISPR反復(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の *crRNA* に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつここで最小CRISPR反復が5~30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも3つの不對のヌクレオチドを有する)を含む第1の核酸分子; ならびに2) ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子であって、これは、最小 *tracrRNA* 配列(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の *tracrRNA* に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつここで最小 *tracrRNA* 配列が5~30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも1つの不對のヌクレオチドを有し、ここでバルジの1つの不對のヌクレオチドが、最小CRISPR反復の3つの不對のヌクレオチドと同じバルジ内に位置している); 3' *tracrRNA* (6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の *tracrRNA* に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつここで3' *tracrRNA* が10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む); P-ドメイン(最小CRISPR反復および最小 *tracrRNA* を含む二重鎖の1~5ヌクレオチド下流から開始し、1~10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスパーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ3' *tracrRNA* 領域に位置する); および/または *tracrRNA* 伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

20

30

【0284】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来の Cas9 に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、および2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)を含んでもよい); ならびに、核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、10~5000ヌクレオチド長のスパーサー伸長配列を含み; 12~30ヌクレオチド長のスパーサー配列(ここでスパーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である); 最小CRISPR反復(6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の *crRNA* に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復は、5~30ヌクレオチドの長さを有する); 最小 *tracrRNA* 配列(6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来の *tracrRNA* に対して少なくとも60%の同一性を含み、ここで最小 *tracrRNA* 配列が5~30ヌクレオチドの長さを有する); リンカー配列(最小CRISPR反復および最小 *tracrRNA* を連

40

50

結し、かつ3～5000ヌクレオチドの長さを含む)；3' *tracrRNA* (6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3' *tracrRNA*が10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む)；および/または*tracrRNA*伸長(10～5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれてもよい。

【0285】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、および2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)を含んでもよい)；ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、10～5000ヌクレオチド長のスパー伸長配列を含み；12～30ヌクレオチド長のスパー配列(ここでスパーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である)；1)最小CRISPR反復(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の*crRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復は、5～30ヌクレオチドの長さを有する)、2)最小*tracrRNA*配列(6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含み、ここで最小*tracrRNA*配列が5～30ヌクレオチドの長さを有する)、ならびに3)パルジ(ここでパルジが、二重鎖の最小CRISPR反復鎖上の少なくとも3つの不對のヌクレオチド、および二重鎖の最小*tracrRNA*配列鎖上の少なくとも1つの不對のヌクレオチドを含む)を含む二重鎖；リンカー配列(最小CRISPR反復および最小*tracrRNA*を連結しかつ3～5000ヌクレオチドの長さを含む)；3' *tracrRNA* (6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含み、ここで3' *tracrRNA*が、10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む)；P-ドメイン(最小CRISPR反復および最小*tracrRNA*を含む二重鎖の1～5ヌクレオチド下流から開始し、1～10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスパー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ3' *tracrRNA*領域に位置する)；および/または*tracrRNA* (伸長10～5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせ、を含んでもよい。いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)、およびリンカー(部位特異的ポリペプチドを非天然配列に連結する)を含む)；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは1)第1の核酸分子(10～5000ヌクレオチド長のスパー伸長配列を含む)；12～30ヌクレオチド長のスパー配列(ここでスパーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である)；および最小CRISPR反復(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の*crRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつここで最小CRISPR反復が5～30ヌクレオチドの長さを有する)を含む第1の核酸分子；2)ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含み、これが、最小*tracrRNA*配列(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小*tracrRNA*配列が5～30ヌクレオチドの長さを有する)；3' *tracrRNA* (6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3' *tracrRNA*が10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む)；および/または*tracrRNA*伸長(10～5000

10

20

30

40

50

ヌクレオチド長を含む)を含み得る第2の核酸分子、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

【0286】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチドを含んでもよく、ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)、および非天然配列に対して部位特異的ポリペプチドを連結するリンカー;ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは1)10~5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列;12~30ヌクレオチド長のスペーサー配列(ここでスペーサーは、標的核酸に対して少なくとも50%相補的である);最小CRISPR反復(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む)を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復は、反復5~30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも3つの不對のヌクレオチドを有する、第1の核酸分子;ならびに2)ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含み、これは、最小tracrRNA配列(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列が5~30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも1つの不對のヌクレオチドを有し、ここでバルジの1つの不對のヌクレオチドが最小CRISPR反復の3つの不對のヌクレオチドと同じバルジ内に位置している);3)tracrRNA(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3'tracrRNAが10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む);P-ドメイン(最小CRISPR反復および最小tracrRNAを含む二重鎖の1~5ヌクレオチド下流から開始し、1~10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ3'tracrRNA領域に位置する);および/またはtracrRNA伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

10

20

30

【0287】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)、および非天然配列に対して部位特異的ポリペプチドを連結するリンカーを含む);ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、10~5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列を含み;12~30ヌクレオチド長のスペーサー配列(ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である);最小CRISPR反復(6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含みかつ、ここで最小CRISPR反復は5~30ヌクレオチドの長さを有する);最小tracrRNA配列(6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列が5~30ヌクレオチドの長さを有する);リンカー配列(最小CRISPR反復および最小tracrRNAを連結しかつ3~5000ヌクレオチドの長さを含む);3'tracrRNA(6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3'tracrRNAが10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む);および/またはtracrRNA伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれて

40

50

もよい。

【0288】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチドであって、ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）、および非天然配列に対して部位特異的ポリペプチドを連結するリンカーを含む、部位特異的ポリヌクレオチド；ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、10～5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列を含み；12～30ヌクレオチド長のスペーサー配列（ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である）を含み；1）最小CRISPR反復（6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復が5～30ヌクレオチドの長さを有する）、2）最小tracrRNA配列（6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列が5～30ヌクレオチドの長さを有する）、および3）パルジ（ここでパルジが、二重鎖の最小CRISPR反復鎖上の少なくとも3つの不對のヌクレオチドおよび二重鎖の最小tracrRNA配列鎖上の少なくとも1つの不對のヌクレオチドを含む）を含む二重鎖；リンカー配列（最小CRISPR反復および最小tracrRNAを連結しかつ3～5000ヌクレオチドの長さを含む）；3'tracrRNA（6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、ここで3'tracrRNAが10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む）；P-ドメイン（最小CRISPR反復および最小tracrRNAを含む二重鎖の1～5ヌクレオチド下流から開始し、1～10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ3'tracrRNA領域に位置する）；および/またはtracrRNA伸長（10～5000ヌクレオチド長を含む）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

【0289】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチドであって、ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含み、ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む、部位特異的ポリペプチド；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、1）10～5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列；12～30ヌクレオチド長のスペーサー配列（ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である）；および最小CRISPR反復（6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復が5～30ヌクレオチドの長さを有する）を含む、第1の核酸分子；ならびに2）ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含み、これは、最小tracrRNA配列（6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列が5～30ヌクレオチドの長さを有する）；3'tracrRNA（6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3'tracrRNAが10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む）；および/またはtracrRNA伸長（10～5000ヌクレオチド長を含む）、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

【0290】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチドであって、ここで部位特異的ポリペプチドは化膿レンサ球菌由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性、2 つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）を含み、ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも 50% まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む、部位特異的ポリペプチド；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、1) 10 ~ 5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列；12 ~ 30ヌクレオチド長のスペーサー配列（ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも 50% 相補的である）；最小 CRISPR 反復（6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで最小 CRISPR 反復は 5 ~ 30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも 3 つの不对のヌクレオチドを有する）を含む第一の核酸分子；ならびに 2) ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第 2 の核酸分子を含んでもよく、これは、最小 tracrRNA 配列（6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで最小 tracrRNA 配列は 5 ~ 30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも 1 つの不对のヌクレオチドを有し、ここでバルジの 1 つの不对のヌクレオチドが最小 CRISPR 反復の 3 つの不对のヌクレオチドと同じバルジ内に位置している）；3' tracrRNA（6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで 3' tracrRNA が 10 ~ 20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む）；P-ドメイン（最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA を含む二重鎖の 1 ~ 5ヌクレオチド下流から開始し、1 ~ 10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ 3' tracrRNA 領域に位置する）；および/または tracrRNA 伸長（10 ~ 5000ヌクレオチド長を含む）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0291】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド（ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性を含む）、2 つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）を含んでもよく、ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも 50% まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む）；ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、10 ~ 5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列を含み；12 ~ 30ヌクレオチド長のスペーサー配列（ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも 50% 相補的である）；最小 CRISPR 反復（6、7、または 8 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで最小 CRISPR 反復が 5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する）；最小 tracrRNA 配列（6、7、または 8 つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで最小 tracrRNA 配列が 5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する）；リンカー配列（最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA を連結しかつ 3 ~ 5000ヌクレオチドの長さを含む）；3' tracrRNA（6、7、または 8 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで 3' tracrRNA が 10 ~ 20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む）；および/または tracrRNA 伸長（10 ~ 5000ヌクレオチド長を含む）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれてもよい。

【0292】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド（部位特異的ポリペプチドは

10

20

30

40

50

、化膿レンサ球菌由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性、2 つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）を含み、ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも 50% まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む）；ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、10～5000ヌクレオチド長のスパーサー伸長配列を含み；12～30ヌクレオチド長のスパーサー配列（ここでスパーサーは標的核酸に対して少なくとも 50% 相補的である）；1）最小 CRISPR 反復（6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで最小 CRISPR 反復が 5～30ヌクレオチドの長さを有する）、2）最小 tracrRNA 配列（6 つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで最小 tracrRNA 配列が 5～30ヌクレオチドの長さを有する）、および 3）パルジ（ここでパルジが、二重鎖の最小 CRISPR 反復鎖上の少なくとも 3 つの不对のヌクレオチド、および二重鎖の最小 tracrRNA 配列鎖上の少なくとも 1 つの不对のヌクレオチドを含む）を含む二重鎖；リンカー配列（最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA を連結しかつ 3～5000ヌクレオチドの長さを含む）；3' tracrRNA（6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、ここで 3' tracrRNA が 10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む）；P-ドメイン（最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA を含む二重鎖の 1～5ヌクレオチド下流から開始し、1～10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスパーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ 3' tracrRNA 領域に位置する）；および / または tracrRNA 伸長（10～5000ヌクレオチド長を含む）、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

10

20

【0293】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド（ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性、2 つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）を含み、ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも 50% まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは 1）第 1 の核酸分子（10～5000ヌクレオチド長のスパーサー伸長配列を含む）；12～30ヌクレオチド長のスパーサー配列（ここでスパーサーは標的核酸に対して少なくとも 50% 相補的である）；および最小 CRISPR 反復（6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで最小 CRISPR 反復が 5～30ヌクレオチドの長さを有する）；および 2）ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第 2 の核酸分子を含み、これは最小 tracrRNA 配列（6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含み、かつ、ここで最小 tracrRNA 配列が 5～30ヌクレオチドの長さを有する）；3' tracrRNA（6 つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含みかつ、ここで 3' tracrRNA が 10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む）；および / または tracrRNA 伸長（10～5000ヌクレオチド長を含む）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

30

40

【0294】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド（ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性、2 つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）を含み、こ

50

ここで部位特異的ポリペプチドが、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む) ; ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは1) 第1の核酸分子(10~5000ヌクレオチド長のスパー伸長配列を含む) ; 12~30ヌクレオチド長のスパー配列(ここでスパーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である) ; 最小CRISPR反復(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復は5~30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも3つの不對のヌクレオチドを有する) ; ならびに2) ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含み、これは最小tracrRNA配列(これは、6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列は5~30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも1つの不對のヌクレオチドを有し、ここでバルジの1つの不對のヌクレオチドが最小CRISPR反復の3つの不對のヌクレオチドと同じバルジ内に位置している) ; 3' tracrRNA(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3' tracrRNAが10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む) ; P-ドメイン(最小CRISPR反復および最小tracrRNAを含む二重鎖の1~5ヌクレオチド下流から開始し、1~10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスパー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ3' tracrRNA領域に位置する) ; および/またはtracrRNA伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせ、を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0295】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)を含み、ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む) ; ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは10~5000ヌクレオチド長のスパー伸長配列を含み ; 12~30ヌクレオチド長のスパー配列(ここでスパーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である) ; 最小CRISPR反復(6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復が5~30ヌクレオチドの長さを有する) ; 最小tracrRNA配列(6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列が5~30ヌクレオチドの長さを有する) ; リンカー配列(最小CRISPR反復および最小tracrRNAを連結しかつ3~5000ヌクレオチドの長さを含む) ; 3' tracrRNA(6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3' tracrRNAが10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む) ; および/またはtracrRNA伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれてもよい。

【0296】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)を含み、ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%ま

で低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む) ; ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは10~5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列を含み ; 12~30ヌクレオチド長のスペーサー配列(ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である) ; 1) 最小CRISPR反復(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復が5~30ヌクレオチドの長さを有する)、2) 最小tracrRNA配列(6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列が5~30ヌクレオチドの長さを有する)、および3) バルジ(ここでバルジが、二重鎖の最小CRISPR反復鎖上の少なくとも3つの不对のヌクレオチド、および二重鎖の最小tracrRNA配列鎖上の少なくとも1つの不对のヌクレオチドを含む)二重鎖 ; リンカー配列(最小CRISPR反復および最小tracrRNAを連結しかつ3~5000ヌクレオチドの長さを含む) ; 3' tracrRNA(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、ここで3' tracrRNAが10~20ヌクレオチドの長さを含みかつ二重鎖の領域を含む) ; P-ドメイン(最小CRISPR反復および最小tracrRNAを含む二重鎖の1~5ヌクレオチド下流から開始し、1~10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ3' tracrRNA領域に位置し ; および/またはtracrRNA伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

【0297】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)を含み、ここで部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%まで低下する核酸切断ドメインの一方または両方に変異を含む) ; ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは1) 第1の核酸分子(10~5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列を含む) ; 12~30ヌクレオチド長のスペーサー配列(ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である) ; および最小CRISPR反復(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復が5~30ヌクレオチドの長さを有する)を含む、第1の核酸分子 ; および2) ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含み、これが最小tracrRNA配列(6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列が5~30ヌクレオチドの長さを有する) ; 3' tracrRNA(6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3' tracrRNAが10~20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む) ; および/またはtracrRNA伸長(10~5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

【0298】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド(ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、および2つの核酸切断ドメインを含み、ここで核酸切断ドメインの一方または両方は、化膿レンサ球菌由来のCas9由来のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも50%アミノ酸同一性を含む) ; ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは1) 第1の核酸分子(10~5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列を含む) ;

12～30ヌクレオチド長のスペーサー配列（ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である）；最小CRISPR反復（6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小CRISPR反復は5～30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも3つの不對のヌクレオチドを有する）；ならびに2）ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含み、これが最小tracrRNA配列（6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで最小tracrRNA配列は5～30ヌクレオチドの長さ、およびバルジの少なくとも1つの不對のヌクレオチドを有し、ここでバルジの1つの不對のヌクレオチドが最小CRISPR反復の3つの不對のヌクレオチドと同じバルジ内に位置している）；3）tracrRNA（6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3' tracrRNAが10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む）；P-ドメイン（最小CRISPR反復および最小tracrRNAを含む二重鎖の1～5ヌクレオチド下流から開始し、1～10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ3' tracrRNA領域に位置し；および/またはtracrRNA伸長（10～5000ヌクレオチド長を含む）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0299】

20

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド（ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、および2つの核酸切断ドメインを含み、ここで核酸切断ドメインの一方または両方は、化膿レンサ球菌由来のCas9由来のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも50%アミノ酸同一性を含む）；ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは、10～5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列を含み；12～30ヌクレオチド長のスペーサー配列（ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である）；最小CRISPR反復（6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含みかつ、ここで最小CRISPR反復が5～30ヌクレオチドの長さを有する）；最小tracrRNA配列（6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、化膿レンサ球菌）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含みかつ、ここで最小tracrRNA配列が5～30ヌクレオチドの長さを有する）；リンカー配列（最小CRISPR反復および最小tracrRNAを連結しかつ3～5000ヌクレオチドの長さを含む）；3' tracrRNA（6、7、または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ球菌）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含み、かつ、ここで3' tracrRNAが10～20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む）；および/またはtracrRNA伸長（10～5000ヌクレオチド長を含む）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれてもよい。

30

40

【0300】

いくつかの場合には、複合体は、部位特異的ポリペプチド（ここで部位特異的ポリペプチドは、化膿レンサ球菌由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、および2つの核酸切断ドメインを含み、ここで核酸切断ドメインの一方または両方が化膿レンサ球菌由来のCas9由来のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも50%アミノ酸同一性を含む）；ならびに核酸ターゲティング核酸を含んでもよく、これは10～5000ヌクレオチド長のスペーサー伸長配列を含み；12～30ヌクレオチド長のスペーサー配列（ここでスペーサーは標的核酸に対して少なくとも50%相補的である）；1）最小CRISPR反復（6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、化膿レンサ

50

球菌)またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60%の同一性を含み、かつ、ここで最小 CRISPR 反復が 5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する) 2) 最小 tracrRNA 配列(6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、化膿レンサ球菌)由来の tracrRNA に対して少なくとも 60%の同一性を含みかつ、ここで最小 tracrRNA 配列が 5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する)、および 3) バルジ(ここでバルジが、二重鎖の最小 CRISPR 反復鎖上の少なくとも 3つの不对のヌクレオチドおよび二重鎖の最小 tracrRNA 配列鎖上の少なくとも 1つの不对のヌクレオチドを含む)を含む、二重鎖; リンカー配列(最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA を連結しかつ 3 ~ 5000ヌクレオチドの長さを含む); 3' tracrRNA (6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、化膿レンサ球菌)またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60%の同一性を含み、ここで 3' tracrRNA が 10 ~ 20ヌクレオチドの長さを含み、かつ二重鎖の領域を含む); P-ドメイン(最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA を含む二重鎖の 1 ~ 5ヌクレオチド下流から開始し、1 ~ 10ヌクレオチドを含み、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズし得る配列を含み、ヘアピンを形成し得、かつ 3' tracrRNA 領域に位置する); および/または tracrRNA 伸長(10 ~ 5000ヌクレオチド長を含む)、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

10

【0301】

本開示の任意の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸またはタンパク質性の分子は、組換えられても、精製されても、単離されてもよい。

20

【0302】

核酸ターゲティング核酸および/または部位特異的ポリペプチドをコードする核酸

本開示は、本開示の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸またはタンパク質性の分子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。いくつかの実施形態では、本開示の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸またはタンパク質性の分子をコードする核酸はベクター(例えば、組換え発現ベクター)であってもよい。

30

【0303】

いくつかの実施形態では、組換えの発現ベクターは、ウイルスの構築物(例えば、組換えのアデノ随伴ウイルス構築物)、組換えのアデノウイルスの構築物、組換えのレンチウイルスの構築物、組換えのレトロウイルスの構築物などであってもよい。

40

【0304】

適切な発現ベクターとしては、限定するものではないが、ウイルスのベクター(例えば、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、SV40、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、レトロウイルスのベクター(例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ならびにレトロウイルス、例えば、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳腺腫瘍ウイルス)由来のウイルスのベクター)、植物ベクター(例えば、T-DNAベクター)、などを挙げることができる。以下のベクターが、例えば、真核生物宿主細胞について提供され得る: pXT1、pSG5、pSVK3、pBPV、pMSG、および pSVLSV40 (Pharmacia)

50

。他のベクターを、それらが宿主細胞と適合する限り、用いてもよい。

【0305】

いくつかの場合には、ベクターは、直線化されたベクターであってもよい。直線化されたベクターは、部位特異的ポリペプチドおよび/または核酸ターゲティング核酸を含んでもよい。直線化されたベクターは、環状プラスミドでなくてもよい。直線化されたベクターは、二本鎖破壊を含んでもよい。直線化されたベクターは、蛍光タンパク質（例えば、オレンジ蛍光タンパク質（OFP））をコードする配列を含んでもよい。直線化されたベクターは、抗原（例えば、CD4）をコードする配列を含んでもよい。直線化されたベクターは、核酸ターゲティング核酸の一部をコードするベクターの領域中で直線化され（例えば、切断され）てもよい。例えば直線化されたベクターは、核酸ターゲティング核酸5'の領域から核酸ターゲティング核酸のcrRNA部分まで直線化され（例えば、切断され）てもよい。直線化されたベクターは、核酸ターゲティング核酸3'の領域から核酸ターゲティング核酸のスペーサー伸長配列まで直線化され（例えば、切断され）てもよい。直線化されたベクターは、核酸ターゲティング核酸のcrRNA配列をコードする核酸ターゲティング核酸の領域で直線化され（例えば、切断され）てもよい。いくつかの場合には、直線化されたベクターまたは閉じたスーパーコイルのベクターは、部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9）をコードする配列、部位特異的ポリペプチドをコードする配列の発現を駆動するプロモーター（例えば、CMVプロモーター）、リンカー（例えば、2A）をコードする配列、マーカー（例えば、CD4またはOFP）をコードする配列、核酸ターゲティング核酸の一部をコードする配列、核酸ターゲティング核酸の一部をコードする配列の発現を駆動するプロモーター、および選択マーカー（例えば、アンピシリン）をコードする配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

10

20

【0306】

ベクターは、転写および/または翻訳制御エレメントを含んでもよい。利用される宿主/ベクターシステム次第で、任意の多数の適切な転写および翻訳制御エレメント、例としては、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを、発現ベクター中で用いてもよい。

【0307】

いくつかの実施形態では、本開示の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸またはタンパク質性の分子をコードするヌクレオチド配列は、プロモーターのような制御要素（例えば、転写制御要素）に作動可能に連結され得る。転写制御要素は、真核生物細胞、（例えば、哺乳動物細胞）、原核生物細胞（例えば、細菌または古細菌細胞）中で機能的であり得る。いくつかの実施形態では、本開示の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸またはタンパク質性の分子をコードするヌクレオチド配列は、多重の制御要素に対して作動可能に連結され得る。多重の制御要素に対する作動可能な連結は、本開示の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸またはタンパク質性の分子をコードするヌクレオチド配列の発現を、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかの中で、可能にし得る。

30

40

【0308】

適切な真核生物プロモーター（すなわち、真核生物細胞中で機能的なプロモーター）の非限定的な例としては、サイトメガロウイルス（CMV）最初期、単純ヘルペスウイルス

50

(HSV)チミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来の長末端反復(LTR)、ヒト伸長因子-1プロモーター(EF1)、ハイブリッド構築物(ニワトリ活性化プロモーター(CAG)に融合されたサイトメガロウイルス(CMV)エンハンサーを含む)、マウス幹細胞ウイルスプロモーター(MSCV)、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1遺伝子座プロモーター(PGK)およびマウス金属ロチオネイン-Iを挙げることができる。プロモーターは、真菌プロモーターであってもよい。プロモーターは植物プロモーターであってもよい。植物プロモーターのデータベースは見出すことができる(例えば、PlantProm)。発現ベクターはまた、翻訳開始および転写終止のためのリボソーム結合部位を含んでもよい。発現ベクターはまた、発現を増幅するために適切な配列を含んでもよい。発現ベクターはまた、部位特異的ポリペプチドに融合されており、これによって融合タンパク質を生じる、非天然タグ(例えば、6xHisタグ、ヘマグルチニンタグ、緑色蛍光タンパク質など)をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0309】

いくつかの実施形態では、本開示の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸またはタンパク質性の分子をコードするヌクレオチド配列(単数または複数)は、誘導性プロモーター(例えば、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節性プロモーター、ステロイド調節性プロモーター、金属調節性プロモーター、エストロゲン受容体-調節性プロモーターなど)に対して作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、本開示の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸もしくはタンパク質性の分子をコードするヌクレオチド配列は、構成的プロモーター(例えば、CMVプロモーター、UBCプロモーター)に対して作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、空間的に制限されたプロモーター、および/または時間的に制限されたプロモーター(例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーターなど)に対して作動可能に連結され得る。

【0310】

本開示の核酸ターゲティング核酸、本開示の部位特異的ポリペプチド、本開示の方法の実施形態を行うために必須のエフェクタータンパク質、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または任意の核酸またはタンパク質性の分子をコードするヌクレオチド配列(単数または複数)は、細胞への送達のために生物学的区画の中にまたはその表面上にパッケージングされてもよい。生物学的区画としては、限定するものではないが、ウイルス(レンチウイルス、アデノウイルス)、ナノスフェア、リボソーム、量子ドット、ナノ粒子、ポリエチレングリコール粒子、ヒドロゲル、およびミセルが挙げられる。

【0311】

細胞への本開示の複合体、ポリペプチド、および核酸の導入は、ウイルスのまたはバクテリオファージの感染、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンジアミン(PEI)媒介性トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リボソーム媒介性トランスフェクション、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介性核酸送達などによって生じ得る。

【0312】

トランスジェニック細胞および生物体

本開示は、トランスジェニック細胞および生物体を提供する。遺伝的に改変された宿主細胞および/またはトランスジェニック生物体の核酸が、ゲノム操作について標的され得る。

【0313】

本開示の方法によるトランスジェニック細胞を生成するために用いられ得る例示的な細胞としては、限定するものではないが、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、293-T細胞、褐色細胞腫、神経芽細胞腫線維芽細胞、横紋筋肉腫、後根神経節細胞、NSO細胞、タバコ(Tobacco)BY-2、CV-I(ATCC CCL70)、COS-I(ATCC CRL1650)、COS-7(ATCC CRL1651)、CHO-K1(ATCC CCL61)、3T3(ATCC CCL92)、NIH/3T3(ATCC CRL1658)、HeLa(ATCC CCL2)、C1271(ATCC CRL1616)、BS-C-I(ATCC CCL26)、MRC-5(ATCC CCL171)、L細胞、HEK-293(ATCC CRL1573)およびPC12(ATCC CRL-1721)、HEK293T(ATCC CRL-11268)、RBL(ATCC CRL-1378)、SH-SY5Y(ATCC CRL-2266)、MDCK(ATCC CCL-34)、SJ-RH30(ATCC CRL-2061)、HepG2(ATCC HB-8065)、ND7/23(ECACC92090903)、CHO(ECACC85050302)、Vera(ATCC CCL81)、Caco-2(ATCC HTB37)、K562(ATCC CCL243)、Jurkat(ATCC TIB-152)、Per.Co, Huvec(ATCC ヒト初代PCS100-010、マウスCRL2514、CRL2515、CRL2516)、HuH-7D12(ECACC01042712)、293(ATCC CRL10852)、A549(ATCC CCL185)、IMR-90(ATCC CCL186)、MCF-7(ATC HTB-22)、U-2 OS(ATCC HTB-96)、およびT84(ATCC CCL248)、またはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)(ATCC)から入手可能な任意の細胞、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

10

20

30

【0314】

トランスジェニックであり得る生物体としては、細菌、古細菌、単一細胞真核生物、植物、藻類、真菌(例えば、酵母)、無脊椎動物(例えば、ショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線虫など)、脊椎動物(例えば、魚、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物)、哺乳動物(例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、ヒトなど)などを挙げることができる。

【0315】

トランスジェニック生物体は、遺伝的に改変された細胞を含んでもよい。トランスジェニック生物体および/または遺伝的に改変された細胞は、本開示の核酸ターゲティング核酸、エフェクタータンパク質、および/または部位特異的ポリペプチド、またはそれらの任意の組み合わせをコードするヌクレオチド配列を含む外因性の核酸で遺伝的に改変された生物体および/または細胞を含んでもよい。

40

【0316】

遺伝的に改変された細胞は、外因性の部位特異的ポリペプチドおよび/または外因性の核酸(部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む)を含んでもよい。細胞中の部位特異的ポリペプチドの発現は、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、またはそれ以上の日数がかかる場合がある。部位特異的ポリペプチドを導入された細胞は、細胞が細胞培養物および/または宿主生物体から取り出され得る前に、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の日数、増殖されてもよい。

【0317】

対象

50

本開示は、対象において本開示の方法を実施することを提供する。対象はヒトであることができる。対象は哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウシ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウマ）であることができる。対象は、脊椎動物または無脊椎動物であることができる。対象は、実験動物であることができる。対象は、患者であることができる。対象は疾患に罹っていることができる。対象は、疾患の症状を呈することができる。対象は、疾患の症状を呈さないが、なお疾患を有する可能性がある。対象は、介護者の医療を受けていることができる（例えば、対象は、入院し、医師により治療されている）。対象は、植物または穀物であることができる。

【0318】**キット**

本開示は、本開示の方法を実施するためのキットを提供する。キットは、本開示の核酸ターゲティング核酸、核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド、本開示の部位特異的ポリペプチド、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、エフェクタータンパク質、エフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド、多重化遺伝子ターゲティング剤、多重化遺伝子ターゲティング剤をコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、タンデム融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または本開示の方法の実施態様を実施するために必要な任意の核酸もしくはタンパク質性分子、あるいはそれらの任意の組合せのうちの一つまたはそれ以上を含むことができる。

10

20

【0319】

本開示の核酸ターゲティング核酸、核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド、本開示の部位特異的ポリペプチド、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、エフェクタータンパク質、エフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド、多重化遺伝子ターゲティング剤、多重化遺伝子ターゲティング剤をコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、タンデム融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または本開示の方法の実施態様を実施するために必要な任意の核酸もしくはタンパク質性分子が、上で詳述される。

30

【0320】

キットは、(1)核酸ターゲティング核酸をコードするヌクレオチド配列を含むベクター、および(2)部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターおよび(2)ベクターの再構成および/または希釈のための試薬を含むことができる。

【0321】

キットは、(1)(i)核酸ターゲティング核酸をコードするヌクレオチド配列および(ii)部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターならびに(2)ベクターの再構成および/または希釈のための試薬を含むことができる。

【0322】

キットは、(1)核酸ターゲティング核酸をコードするヌクレオチド配列を含むベクター、(2)部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター、(3)エフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド配列、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または本開示の方法の実施態様を実施するために必要な任意の核酸もしくはタンパク質性分子を含むベクターならびに(4)ベクターの再構成および/または希釈のための試薬を含むことができる。

40

【0323】

キットは、(1)(i)核酸ターゲティング核酸をコードするヌクレオチド配列、(ii)部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター、(2)エフェクタータンパク質をコードするヌクレオチド配列、多重化遺伝子ターゲティング剤、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、レポーターエレメント、対象とする遺

50

伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または本開示の方法の実施態様を実施するために必要な任意の核酸もしくはタンパク質性分子を含むベクターならびに(3)組換え発現ベクターの再構成および/または希釈のための試薬を含むことができる。

【0324】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド(および/またはそれをコードする核酸)、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S.ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列および2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)を含むことができ;ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸(および/またはそれをコードする核酸)であって、1)10~5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列;12~30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり;および6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、*S.ピオゲネス*)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5~30ヌクレオチドの長さを有する、を含む、第1の核酸分子;および2)6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、*S.ピオゲネス*)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5~30ヌクレオチドの長さを有し;6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌(例えば、*S.ピオゲネス*)由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを有し、二重鎖領域を含むことができ;および/または10~5000ヌクレオチドの長さを含む、tracrRNA伸長物、あるいはそれらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

10

20

【0325】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド(および/またはそれをコードする核酸)、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S.ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列および2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)を含むことができ;ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸(および/またはそれをコードする核酸)であって、1)10~5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列;12~30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり;6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、*S.ピオゲネス*)またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5~30ヌクレオチドの長さを有し、バルジの少なくとも3つの不對ヌクレオチドを含む、を含む、第1の核酸分子;および2)6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、*S.ピオゲネス*)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5~30ヌクレオチドの長さおよびバルジの少なくとも1つの不對ヌクレオチドを有し、ここで、バルジの1つの不對ヌクレオチドが、最小のCRISPR反復の3つの不對ヌクレオチドと同じバルジ中に位置し;6つの連続するヌクレオチドにおいて6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物(例えば、*S.ピオゲネス*)またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み;最小のCRISPR反復および最小のtracrRNAを含む二重鎖領域の1~5ヌクレオチド下流から開始し、1~10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3'tracrRNA領域中に位置する、P-ドメイン;および/または10~5000ヌクレオチドの長さを含むtracrRNA伸長物、あるいは、それらの任意の組合せを含むこと

30

40

50

のできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

【0326】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列および2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含むことができ；ならびに10~5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12~30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5~30ヌクレオチドの長さを有し；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、*S. ピオゲネス*）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列であって、ここで、最小のtracrRNA配列は、5~30ヌクレオチドの長さを有し；最小のCRISPR反復と最小のtracrRNAを連結し、3~5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNAであって、ここで、3'tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または10~5000ヌクレオチドの長さを含む、tracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）を含むことができる。

10

20

【0327】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列および2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含むことができ；ならびに核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、10~5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12~30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；二重鎖であって、1)6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5~30ヌクレオチドの長さを有し、2)6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、*S. ピオゲネス*）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5~50ヌクレオチドの長さを有し、および3)バルジ、ここでバルジは、二重鎖の最小のCRISPR反復鎖上の少なくとも3つの不對ヌクレオチドおよび二重鎖の最小のtracrRNA配列鎖上の少なくとも1つの不對ヌクレオチドを含む、を含む、二重鎖；最小のCRISPR反復と最小のtracrRNAを連結し、3~5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；最小のCRISPR反復および最小のtracrRNAを含む二重鎖の1~5ヌクレオチド下流から開始し、1~10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができる、3'tracrRNA領域中に位置する、P-ドメイン；および/または10~5000ヌクレオチドの長さを含む、tracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

30

40

50

【0328】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）および部位特異的ポリペプチドを非天然配列に連結するリンカーを含み；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、1) 10~5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12~30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；および6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、CRISPR反復は5~30ヌクレオチドの長さを有する、を含む、第1の核酸分子；および2) 6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は5~30ヌクレオチドの長さを有し；6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（*S. ピオゲネス*）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3' tracrRNA、ここで、3' tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または10~5000ヌクレオチドの長さを含むtracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

10

20

【0329】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）および部位特異的ペプチドを非天然配列に連結するリンカーを含み；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、1) 10~5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12~30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5~30ヌクレオチドの長さおよびバルジの少なくとも3つの不對ヌクレオチドを有する、を含む、第1の核酸分子；および2) 6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5~30ヌクレオチドの長さおよびバルジの少なくとも1つの不對ヌクレオチドを有し、ここで、バルジの1つの不對ヌクレオチドは、最小のCRISPR反復の3つの不對ヌクレオチドと同じバルジ中に位置し；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3' tracrRNA、ここで、3' tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；最小のCRISPR反復および最小のtracrRNAを含む二重鎖の1~5ヌクレオチド下流から開始し、1~10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3' tracrRNA領域中に位置する、P-ドメイン；および/または10~5000ヌクレオチドの長さを含むtracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

30

40

【0330】

50

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）および部位特異的ペプチドを非天然配列に連結するリンカーを含み；ならびに 10 ~ 5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12 ~ 30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも 50% 相補的であり；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、最小の CRISPR 反復、ここで、最小の CRISPR 反復は、5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有し；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（*S. ピオゲネス*）由来の連続した tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、最小の tracrRNA 配列、ここで、最小の tracrRNA 配列は、5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有し；最小の CRISPR 反復と最小の tracrRNA を連結し、3 ~ 5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、3' tracrRNA、ここで、3' tracrRNA は、10 ~ 20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または 10 ~ 5000ヌクレオチドの長さを含む tracrRNA 伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）を含むことができる。この核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれることができる。

【0331】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）および部位特異的ペプチドを非天然配列に連結するリンカーを含み；ならびに核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、10 ~ 5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12 ~ 30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも 50% 相補的であり；二重鎖であって、1) 6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、最小の CRISPR 反復、ここで、最小の CRISPR 反復は、5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有し；2) 6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、*S. ピオゲネス*）由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、最小の tracrRNA 配列、ここで、最小の tracrRNA 配列は、5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有し、および 3) バルジ、ここで、バルジは、二重鎖の最小の CRISPR 反復鎖上の少なくとも 3つの不對ヌクレオチドおよび二重鎖の最小の tracrRNA 配列鎖上の少なくとも 1つの不對ヌクレオチドを含む、を含む、二重鎖；最小の CRISPR 反復と最小の tracrRNA を連結し、3 ~ 5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、3' tracrRNA、ここで、3' tracrRNA は、10 ~ 20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；最小の CRISPR 反復および最小の tracrRNA を含む二重鎖の 1 ~ 5ヌクレオチド下流から開始し、1 ~ 10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3' tracrRNA 領域中に位置する、P-ドメイン；および/または 10 ~ 5000ヌクレオチドの長さを含む tracrRNA 伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

【0332】

10

20

30

40

50

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性、2 つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも 50% 低減する変異を含み；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、1) 10 ~ 5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12 ~ 30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも 50% 相補的であり；および 6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、最小の CRISPR 反復、ここで、最小の CRISPR 反復は、5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する、を含む、第 1 の核酸分子；および 2) 6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、最小の tracrRNA 配列、ここで、最小の tracrRNA 配列は、5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有し；6 つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、*S. ピオゲネス*）由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、3' tracrRNA、ここで、3' tracrRNA は、10 ~ 20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または 10 ~ 5000ヌクレオチドの長さを含む tracrRNA 伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第 2 の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

【0333】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来の Cas 9 に対して少なくとも 15% のアミノ酸同一性、2 つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよび RuvCドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも 50% 低減する変異を含み；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、1) 10 ~ 5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12 ~ 30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも 50% 相補的であり；6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の crRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、最小の CRISPR 反復、ここで、最小の CRISPR 反復は、5 ~ 30ヌクレオチドの長さおよびバルジの少なくとも 3 つの不對ヌクレオチドを有する、を含む、第 1 の核酸分子；および 2) 6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、最小の tracrRNA 配列、ここで、最小の tracrRNA 配列は、5 ~ 30ヌクレオチドの長さおよびバルジの少なくとも 1 つの不對ヌクレオチドを有し、ここで、バルジの 1 つの不對ヌクレオチドは、最小の CRISPR 反復の 3 つの不對ヌクレオチドと同じバルジ中に位置し；6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来の tracrRNA に対して少なくとも 60% の同一性を含む、3' tracrRNA、ここで、3' tracrRNA は、10 ~ 20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；最小の CRISPR 反復および最小の tracrRNA を含む二重鎖領域の 1 ~ 5ヌクレオチド下流から開始し、1 ~ 10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3' tracrRNA 領域中に位置する、P-ドメイン；および/または 10 ~ 5000ヌクレオチドの長さを含む tracrRNA 伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第 2 の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0334】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%低減する変異を含み；ならびに10～5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12～30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、*S. ピオゲネス*）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；最小のCRISPR反復と最小のtracrRNAを連結し、3～5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10～20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または10～5000ヌクレオチドの長さを含むtracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含み、核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）を含むことができる。この核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれることができる。

10

20

【0335】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%低減する変異を含み；ならびに核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、10～5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12～30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；二重鎖であって、1)6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；2)6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、*S. ピオゲネス*）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5～30ヌクレオチドの長さを有し、および3)バルジ、ここで、バルジは、二重鎖の最小のCRISPR反復鎖上の少なくとも3つの不对ヌクレオチドおよび二重鎖の最小のtracrRNA配列鎖上の少なくとも1つの不对ヌクレオチドを含む、を含む、二重鎖；最小のCRISPR反復と最小のtracrRNAを連結し、3～5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S. ピオゲネス*）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10～20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；最小のCRISPR反復および最小のtracrRNAを含む二重鎖の1～5ヌクレオチド下流から開始し、1～10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3'tracrRNA領域中に位置する、P-ドメイン；および/または10～5000ヌクレオチドの長さを含む、tracr

30

40

50

rRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

【0336】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネス由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%低減する変異を含み；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、1) 10~5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12~30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；および6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5~30ヌクレオチドの長さを含む、を含む、第1の核酸分子；および2) 6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5~30ヌクレオチドの長さを有し；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または10~5000ヌクレオチドの長さを含む、tracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

10

20

【0337】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネス由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%低減する変異を含み；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、1) 10~5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12~30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5~30ヌクレオチドの長さおよびバルジの少なくとも3つの不對ヌクレオチドを有する、を含む、第1の核酸分子；および2) 6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5~30ヌクレオチドの長さおよびバルジの少なくとも1つの不對ヌクレオチドを有し、ここで、バルジの1つの不對ヌクレオチドは、最小のCRISPR反復の3つの不對ヌクレオチドと同じバルジ中に位置し；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10~20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；最小のCRISPR反復および最小のtracrRNAを含む二重鎖領域の1~5ヌクレオチド下流から開始し、1~10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3'tracr

30

40

50

RNA領域中に位置する、P-ドメイン；および/または10～5000ヌクレオチドの長さを含むtracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

【0338】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネス由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%低減する変異を含み；ならびに10～5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12～30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、S.ピオゲネス）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；最小のCRISPR反復と最小のtracrRNAを連結し、3～5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10～20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または10～5000ヌクレオチドの長さを含むtracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）を含むことができる。この核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれることができる。

【0339】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネス由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも50%低減する変異を含み；ならびに核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、10～5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12～30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；二重鎖であって、1)6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のcrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；2)6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、S.ピオゲネス）由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のtracrRNA配列、ここで、最小のtracrRNA配列は、5～30ヌクレオチドの長さを有し、および3)バルジ、ここで、バルジは、二重鎖の最小のCRISPR反復鎖上の少なくとも3つの不對ヌクレオチドおよび二重鎖の最小のtracrRNA配列鎖上の少なくとも1つの不對ヌクレオチドを含む、を含む、二重鎖；最小のCRISPR反復と最小のtracrRNAを連結し、3～5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S.ピオゲネス）またはファージ由来のtracrRNAに対して少なくとも60%の同一性を含む、3'tracrRNA、ここで、3'tracrRNAは、10～20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；最小のCRISPR反復および最小のtra

10

20

30

40

50

c r R N A を含む二重鎖の 1 ~ 5 ヌクレオチド下流から開始し、1 ~ 10 ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3' t r a c r R N A 領域中に位置する、P - ドメイン；および/または 10 ~ 5000 ヌクレオチドの長さを含む t r a c r R N A 伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

【0340】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、S . ピオゲネス由来の C a s 9 に対して少なくとも 15 % のアミノ酸同一性、2 つの核酸切断ドメイン（すなわち、H N H ドメインおよび R u v C ドメイン）を含み、ここで、部位特異的ポリペプチドは、一方または両方の核酸切断ドメイン中に、ヌクレアーゼドメインの切断活性を少なくとも 50 % 低減する変異を含み；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、1) 10 ~ 5000 ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12 ~ 30 ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも 50 % 相補的であり；および 6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S . ピオゲネス）またはファージ由来の c r R N A に対して少なくとも 60 % の同一性を含む、最小の C R I S P R 反復、ここで、最小の C R I S P R 反復は、5 ~ 30 ヌクレオチドの長さを有する、を含む、第 1 の核酸分子；および 2) 6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S . ピオゲネス）またはファージ由来の t r a c r R N A に対して少なくとも 60 % の同一性を含む、最小の t r a c r R N A 配列、ここで、最小の t r a c r R N A 配列は、5 ~ 30 ヌクレオチドの長さを有し；6 つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、S . ピオゲネス）由来の t r a c r R N A に対して少なくとも 60 % の同一性を含む、3' t r a c r R N A、ここで、3' t r a c r R N A は、10 ~ 20 ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または 10 ~ 5000 ヌクレオチドの長さを含む t r a c r R N A 伸長物、あるいは、それらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第 2 の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

【0341】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、S . ピオゲネス由来の C a s 9 に対して少なくとも 15 % のアミノ酸同一性および 2 つの核酸切断ドメインを含み、ここで、核酸切断ドメインの一方または両方は、S . ピオゲネス由来の C a s 9 由来のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも 50 % のアミノ酸同一性を含み；ならびにダブルガイド核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）であって、1) 10 ~ 5000 ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12 ~ 30 ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも 50 % 相補的であり；6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S . ピオゲネス）またはファージ由来の c r R N A に対して少なくとも 60 % の同一性を含む、最小の C R I S P R 反復、ここで、最小の C R I S P R 反復は、5 ~ 30 ヌクレオチドの長さを有し、バルジの少なくとも 3 つの不對ヌクレオチドを含む、を含む、第 1 の核酸分子；および 2) 6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S . ピオゲネス）またはファージ由来の t r a c r R N A に対して少なくとも 60 % の同一性を含む、最小の t r a c r R N A 配列、ここで、最小の t r a c r R N A 配列は、5 ~ 30 ヌクレオチドの長さおよびバルジの少なくとも 1 つの不對ヌクレオチドを有し、ここで、バルジの 1 つの不對ヌクレオチドが、最小の C R I S P R 反復の 3 つの不對ヌクレオチドと同じバルジ中に位置し；6 つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、S . ピオゲネス）またはファージ由来の t r a c r R N A に対して少なくとも 60 % の同一性を含む、3' t r a c r R N A、ここで、3' t r a c r R N A は、10 ~ 20 ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；最小の C R I S P R 反復および最小の t r a c r R N A を含む二重鎖領

10

20

30

40

50

域の1～5ヌクレオチド下流から開始し、1～10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3' *tracrRNA* 領域中に位置する、P-ドメイン；および/または10～5000ヌクレオチドの長さを含む *tracrRNA* 伸長物、あるいは、それらの任意の組合せを含むことのできる、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸の第2の核酸分子を含む、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

【0342】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S.ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性および2つの核酸切断ドメインを含み、ここで、核酸切断ドメインの一方または両方は、*S.ピオゲネス*由来のCas9由来のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも50%のアミノ酸同一性を含み；ならびに10～5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12～30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S.ピオゲネス*）またはファージ由来の*crRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、*S.ピオゲネス*）由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含む、最小の*tracrRNA*配列、ここで、最小の*tracrRNA*配列は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；最小のCRISPR反復と最小の*tracrRNA*を連結し、3～5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6、7または8つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S.ピオゲネス*）またはファージ由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含む、3' *tracrRNA*、ここで、3' *tracrRNA*は、10～20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領域を含み；および/または10～5000ヌクレオチドの長さを含む *tracrRNA* 伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）を含むことができる。この核酸ターゲティング核酸は、シングルガイド核酸ターゲティング核酸と呼ばれることができる。

【0343】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチド（および/またはそれをコードする核酸）、ここで、部位特異的ポリペプチドは、*S.ピオゲネス*由来のCas9に対して少なくとも15%のアミノ酸同一性および2つの核酸切断ドメインを含み、ここで、核酸切断ドメインの一方または両方は、*S.ピオゲネス*由来のCas9由来のヌクレアーゼドメインに対して少なくとも50%のアミノ酸同一性を含み；ならびに10～5000ヌクレオチドの長さのスペーサー伸長配列；12～30ヌクレオチドの長さのスペーサー配列、ここで、スペーサーは、ターゲット核酸に対して少なくとも50%相補的であり；二重鎖であって、1) 6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S.ピオゲネス*）またはファージ由来の*crRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含む、最小のCRISPR反復、ここで、最小のCRISPR反復は、5～30ヌクレオチドの長さを有し；2) 6つの連続するヌクレオチドにおいて細菌（例えば、*S.ピオゲネス*）由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含む、最小の*tracrRNA*配列、ここで、最小の*tracrRNA*配列は、5～30ヌクレオチドの長さを有し、および3) バルジ、ここで、バルジは、二重鎖の最小のCRISPR反復鎖上の少なくとも3つの不對ヌクレオチドおよび二重鎖の最小の*tracrRNA*配列鎖上の少なくとも1つの不對ヌクレオチドを含む、を含む、二重鎖；最小のCRISPR反復と最小の*tracrRNA*を連結し、3～5000ヌクレオチドの長さを含む、リンカー配列；6つの連続するヌクレオチドにおいて原核生物（例えば、*S.ピオゲネス*）またはファージ由来の*tracrRNA*に対して少なくとも60%の同一性を含む、3' *tracrRNA*、ここで、3' *tracrRNA*は、10～20ヌクレオチドの長さを含み、二重鎖領

10

20

30

40

50

域を含み；最小のCRISPR反復および最小のtracrRNAを含む二重鎖の1～5ヌクレオチド下流から開始し、1～10ヌクレオチドを含み、ターゲット核酸中のプロトSpacer隣接モチーフにハイブリダイズすることのできる配列を含み、ヘアピンを形成することができ、3' tracrRNA領域中に位置する、P-ドメイン；および/または10～5000ヌクレオチドの長さを含むtracrRNA伸長部、あるいはそれらの任意の組合せを含む、核酸ターゲティング核酸（および/またはそれをコードする核酸）を含むことができる。

【0344】

任意の上記キットのいくつかの実施態様において、キットは、シングルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。任意の上記キットのいくつかの実施態様において、キットは、ダブルガイド核酸ターゲティング核酸を含むことができる。任意の上記キットのいくつかの実施態様において、キットは、2つまたはそれ以上のダブルガイドまたはシングルガイド核酸ターゲティング核酸ができる。いくつかの実施態様において、ベクターは、核酸ターゲティング核酸をコードし得る。

10

【0345】

任意の上記キットのいくつかの実施態様において、キットは、所望の遺伝子改変を行うために、ドナーポリヌクレオチドまたはドナーポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含むことができる。キットの構成要素は、別個の容器中にあることができるか；または単一の容器中に併合されることができる。

20

【0346】

上記キットは、1つまたはそれ以上の追加の試薬をさらに含み、ここで、そのような追加の試薬は、バッファー、キットのポリペプチドまたはポリヌクレオチド物品を細胞中に導入するためのバッファー、洗浄バッファー、対照試薬、対照ベクター、対照RNAポリヌクレオチド、DNAからのポリペプチドのインビトロでの産生のための試薬、配列決定のためのアダプターなどから選択されることができる。バッファーは、安定化バッファー、再構成バッファーまたは希釈バッファーであることができる。

【0347】

いくつかの場合において、キットは、植物および/または真菌に特異的な1つまたはそれ以上の追加の試薬を含むことができる。植物および/または真菌のための1つまたはそれ以上の追加の試薬は、例えば、土壌、栄養素、植物、種子、孢子、アグロバクテリウム (Agrobacterium)、T-DNAベクターおよびpBINARベクターを含むことができる。

30

【0348】

上記構成要素に加えて、キットは、方法を実行するためにキットの構成要素を使用するための指示をさらに含むことができる。方法の実行のための指示は、一般に、好適な記録媒体に記録される。例えば、指示は、紙またはプラスチックなどの基材上に印刷され得る。指示は、包装挿入物としてキットの中に、キットの容器もしくはその構成要素のラベル中に（すなわち、包装または分包に伴って）存在し得る。指示は、好適なコンピュータ読み取り可能な記憶媒体、例えば、CD-ROM、ディスク、フラッシュドライブなどに存在する電子記憶データファイルとして存在することができる。いくつかの場合において、実際の指示は、キット中に存在しないが、遠隔供給源から指示を得るための手段が（例えば、インターネットを介して）提供されることができる。この実施態様の例は、指示が見られることができおよび/またはそこから指示がダウンロードされることができるウェブアドレスを含むキットである。指示と同様に、指示を入手するためのこの手段は、好適な基材に記録可能である。

40

【0349】

いくつかの実施態様において、キットは、線状化されたベクターを含むことができる。線状化されたベクターは、部位特異的ポリペプチドおよび/または核酸ターゲティング核酸を含む、線状化された（例えば環状でない）プラスミドを含むことができる。線状化されたベクターは、10mM Tris-HCl、pH 8.0および1mM EDTA、p

50

H 8 . 0 を含むバッファー中に貯蔵されることができる。キットは、約 2 0 マイクロリッターの線状化された C R I S P Rヌクレアーゼベクターを含むことができる。いくつかの実施態様において、キットは、1 つまたはそれ以上の環状ベクターを含むことができる。

【 0 3 5 0 】

いくつかの実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドアニーリングバッファーを含むことができる。オリゴヌクレオチドアニーリングバッファーは、DNA オリゴを一緒にしてアニーリングして、核酸ターゲティング核酸をコードする二本鎖 DNA を作り出すために使用されるバッファーであることができる。オリゴヌクレオチドアニーリングバッファーは、使用濃度よりも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 倍またはそれ以上濃縮されることができる。オリゴヌクレオチドアニーリングバッファーは、使用時の濃度よりも 1 0 倍濃縮されることができる。オリゴヌクレオチドアニーリングバッファーは、1 0 0 m M T r i s - H C l、p H 8 . 0、1 0 m M E D T A、p H 8 . 0 および 1 M N a C l を含むことができる。キットは、2 5 0 マイクロリッターのオリゴヌクレオチドアニーリングバッファーを含むことができる。

10

【 0 3 5 1 】

キットは、D N A s e を含まない水を含むことができる。キットは、R N A s e を含まない水を含むことができる。キットは、少なくとも 1 . 5 ミリリッターの R N A s e を含まないおよび / または D N A s e を含まない水を含むことができる。

【 0 3 5 2 】

キットは、ライゲーションバッファーを含むことができる。ライゲーションバッファーは、線状化された C R I S P Rヌクレアーゼベクターにオリゴヌクレオチドを連結するために使用されることができる。ライゲーションバッファーは、使用濃度よりも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 倍またはそれ以上濃縮されることができる。ライゲーションバッファーは、使用時の濃度よりも 5 倍濃縮されることができる。5 倍ライゲーションバッファーは、2 5 0 m M T r i s - H C l、p H 7 . 6、5 0 m M M g C l ₂、5 m M A T P、5 m M D T T および 2 5 % (w / v) ポリエチレングリコール - 8 0 0 0 を含むことができる。キットは、約 8 0 マイクロリッターのライゲーションバッファーを含むことができる。

20

【 0 3 5 3 】

キットは、DNA リガーゼを含むことができる。DNA リガーゼは、線状化された C R I S P Rヌクレアーゼベクターにオリゴヌクレオチドを連結するために使用されることができる。DNA リガーゼは、1 0 m M T r i s - H C l、p H 7 . 5、5 0 m M K C l、1 m M D T T および 5 0 % (w / v) グリセロールを含むことができる。キットは、2 0 マイクロリッターの DNA リガーゼを含むことができる。

30

【 0 3 5 4 】

キットは、配列決定プライマーを含むことができる。配列決定プライマーは、一旦オリゴヌクレオチドが線状化されたベクター中に連結されているベクターを配列決定するために使用されることができる。配列決定プライマーは、T r i s - E D T A バッファー p H 8 . 0 で希釈されることができる。キットは、2 0 マイクロリッターの配列決定プライマーを含むことができる。

40

【 0 3 5 5 】

キットは、対照オリゴヌクレオチドを含むことができる。対照オリゴヌクレオチドは、線状化されたベクター中に連結されるオリゴヌクレオチドであるが、核酸ターゲティング核酸をコードしない、オリゴヌクレオチドであることができる。対照オリゴヌクレオチドは、1 倍濃度のオリゴヌクレオチドアニーリングバッファーで希釈されることができる。キットは、1 0 マイクロリッターの対照オリゴヌクレオチドを含むことができる。

【 0 3 5 6 】

いくつかの場合において、キットは、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む線状化されたベクター、オリゴヌクレオチドアニーリングバッファー、DNA s e / R N A s e を含まないバッファー、ライゲーションバッファー、リガーゼ酵素、

50

配列決定プライマーおよび対照オリゴヌクレオチドまたはそれらの任意の組合せを含むことができる。

【0357】

医薬組成物

本明細書に記載された本開示の核酸ターゲティング核酸、核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド、本開示の部位特異的ポリペプチド、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、エフェクタータンパク質、エフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド、多重化遺伝子ターゲティング剤、多重化遺伝子ターゲティング剤をコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド、タンデム融合タンパク質、タンデム融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、レポーターエレメント、対象とする遺伝子エレメント、分割システムの構成要素および/または本開示の方法の実施態様を実施するために必要な任意の核酸もしくはタンパク質性分子のような分子が、医薬組成物に製剤化されることができる。

10

【0358】

医薬組成物は、本明細書に記載の任意の分子と、担体、安定化剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤および/または賦形剤のような他の化学成分の組合せを含むことができる。医薬組成物は生物への分子の投与を容易化することができる。医薬組成物は、例えば、静脈内、皮下、筋内、経口、直腸内、エアロゾル、腸管外、点眼、肺内、経皮、腔内、耳内、鼻腔内および局所投与を含む、多様な形態および経路により、医薬組成物としての治療的有効量で投与されることができる。

20

【0359】

医薬組成物は、例えば、場合により、デポまたは持続放出製剤で、器官中への分子の直接的な注入を介して、局所的または全身的な方法で投与されることができる。医薬組成物は、速放性製剤 (rapid release formulation) の形態で、持続放出性製剤の形態で、または中間型放出性製剤 (intermediate release formulation) の形態で提供されることができる。速放性形態は、即時放出を提供することができる。持続放出性製剤は、制御放出または持続性遅延放出を提供することができる。

【0360】

経口投与のために、医薬組成物は、分子と薬学的に許容される担体または賦形剤を併合することによって容易に製剤化されることができる。そのような担体は、対象による経口摂取のための錠剤、散剤、ピル、ドラジェ、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、エリキシル、スラリー、懸濁液などを製剤するために使用されることができる。

30

【0361】

経口使用のための医薬製剤は、1つまたはそれ以上の固体賦形剤を1つまたはそれ以上の本明細書に記載の分子と混合し、場合により、得られた混合物を粉碎し、所望により、好適な佐剤を添加した後に顆粒の混合物を加工処理して、錠剤またはドラジェコアを得ることによって、得られることができる。コアは、好適なコーティングとともに提供されることができる。この目的のために、濃縮糖液が使用されることができ、これは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコールおよび/または二酸化チタン、ラッカー溶液のような賦形剤、ならびに好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有することができる。染料または顔料が、例えば、活性化化合物用量の様々な組合せの同定のためまたは特徴づけるために、錠剤またはドラジェコーティングに添加されることができる。

40

【0362】

経口で使用可能な医薬製剤は、ゼラチン製のプッシュフィットカプセル (push-fit capsule) 並びにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールのような可塑剤でできた軟質密封カプセルを含むことができる。いくつかの実施態様において、カプセルは、医薬品、ウシゼラチンおよび植物性ゼラチンの1つまたはそれ以上を含む硬質ゼラチンカプセルを含む。ゼラチンは、アルカリ処理されることができる。プッシュフィ

50

ットカプセルは、ラクトースのような充填剤、デンプンのような結合剤および/またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤および安定化剤との混合物として活性成分を含むことができる。軟質カプセル中で、分子は、脂肪油、液体パラフィンまたは液体ポリエチレングリコールのような好適な液体中に溶解または懸濁されることができる。安定化剤が添加されることができる。経口投与のためのすべての製剤は、そのような投与に好適な用量で提供される。

【0363】

頬側または舌下投与のために、組成物は錠剤、ロゼンジまたはゲルであることができる。

【0364】

腸管外注射剤は、ポラス注射または持続的輸注のために製剤化されることができる。医薬組成物は、油性または水性ビヒクル中の滅菌懸濁液、溶液またはエマルジョンとして、腸管外注射に好適な形態であることができ、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤のような調合剤を含有することができる。腸管外投与のための医薬製剤は、水溶性形態の活性化合物の水溶液を含むことができる。

10

【0365】

分子の懸濁液は、油性注射用懸濁液として調製されることができる。好適な親油性溶媒またはビヒクルは、ゴマ油のような脂肪油またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステルまたはリポソームを含む。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランのような懸濁液の粘度を増加させる物質を含有することができる。懸濁液は、分子の溶解度を増大させて、高濃縮溶液の調製を可能とする好適な安定化剤または作用物質も含有することができる。或いは、活性成分は、使用前に、好適なビヒクル、例えば、滅菌パイロジェンフリー水による構成のための粉末形態であることができる。

20

【0366】

活性化合物は、局所に投与されることができ、溶液、懸濁液、ローション、ゲル、ペースト、薬用スティック、バーム、クリームおよび軟膏のような多様な局所投与可能な組成物に製剤化されることができる。そのような医薬組成物は、可溶化剤、安定化剤、浸透圧増進剤、バッファーおよび防腐剤を含むことができる。

【0367】

分子の経皮投与に好適な製剤は、経皮送達デバイスおよび経皮送達パッチを使用することができ、ポリマーまたは接着剤中に溶解および/または分散された、親油性エマルジョンまたは緩衝化水溶液であることができる。そのようなパッチは、分子の持続的な、パルス状のまたはオンデマンドの送達のために構築されることができる。経皮送達は、イオン導入パッチなどにより達成されることができる。さらに、経皮パッチは、制御された送達を提供することができる。吸収速度は、律速膜を使用することによりまたは化合物をポリマーマトリックスもしくはゲル内に捕捉することによって遅くされることができる。逆に、吸収を増加させるために吸収促進剤が使用されることができる。吸収促進剤または担体は、皮膚を通る移行を支援するために、吸収性の薬学的に許容される溶媒を含むことができる。例えば、経皮デバイスは、裏打ち部材、化合物および担体を入れたりザーバー、長時間にわたって制御された所定の速度で対象の皮膚に化合物を送達するための律速障壁および皮膚にデバイスを固定するための接着剤を含む包帯の形態であることができる。

30

40

【0368】

吸入による投与のために、分子は、エアロゾル、ミストまたは散剤の形態であることができる。好適な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の好適な気体の使用により、医薬組成物は、加圧パックまたはネプライザーからエアロゾルスプレー表現の形態で送達されることができる。加圧エアロゾルの場合、単位用量は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定されることができる。例えば、吸入器または注入器における使用のためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物の粉末混合物およ

50

びラクトースまたはデンプンのような好適な粉末基剤を含有して製剤化されることができる。

【0369】

分子は、浣腸剤、直腸ゲル、直腸フォーム、直腸エアロゾル、坐剤、ゼリー坐剤またココアバターまたは他のグリセリド並びにポリビニルピロリドンおよびPEGのような合成ポリマーのような従来の坐剤基材を含有する、停留浣腸剤のような直腸用組成物に製剤化されることもできる。組成物の坐剤形態において、脂肪酸グリセリドまたはココアバターの混合物のような低融点ワックスが使用されることができる。

【0370】

本開示の方法の実行において、本明細書に記載の化合物の治療的有効量が、処置される疾患または状態を有する対象に医薬組成物中で投与されることができる。治療的有効量は、疾患の重症度、対象の年齢および相対的な健康、使用される化合物の有効性および他の因子に依存して大きく変化する。化合物は、単独でまたは1つまたは複数の治療剤と組み合わせることで混合物の構成要素として使用されることができる。

10

【0371】

医薬組成物は、賦形剤および佐剤を含み、医薬として使用可能な製剤への分子の加工処理を容易化する、1つまたはそれ以上の生理学的に許容可能な担体を用いて製剤化されることができる。製剤は、選択された投与経路に依存して改変されることができる。本明細書に記載の分子を含む医薬組成物は、例えば、混合、溶解、顆粒化、ドラジェ作製、水簸、乳化、封入、捕捉または圧縮方法によって製造されることができる。

20

【0372】

医薬組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤および遊離塩基もしくは薬学的に許容される塩形態としての本明細書に記載の分子を含むことができる。本明細書に記載の方法および医薬組成物は、(多形としても知られる)結晶形態および同じタイプの活性を有するこれらの化合物の活性代謝物の使用を含む。

【0373】

本明細書に記載の化合物を含む組成物の調製方法は、分子を1つまたはそれ以上の不活性な薬学的に許容される賦形剤または担体とともに製剤化して、固体、半固体または液体組成物を形成する工程を含むことができる。固体組成物は、例えば、散剤、錠剤、分散性顆粒剤、カプセル、カシェ剤および坐剤を含むことができる。液体組成物は、例えば、その中に化合物が溶解している溶液、化合物を含むエマルジョンまたは本明細書に開示された化合物を含むリポソーム、ミセルもしくはナノ粒子を含有する溶液を含むことができる。半固体組成物は、例えば、ゲル、懸濁液およびクリームを含むことができる。組成物は、溶液もしくは懸濁液であるか、使用前には、液体中の溶液もしくは懸濁液に好適な固形であるか、またはエマルジョンあることができる。これらの組成物は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝化剤のような、微量の無毒性の補助剤および他の薬学的に許容される添加剤も含有することができる。

30

【0374】

剤形の非限定例としては、飼料、食品、ペレット、ロゼンジ、液体、エリキシル、エアロゾル、吸入剤、スプレー、散剤、錠剤、ピル、カプセル、ゲル、ジェルタブ、ナノ懸濁液、ナノ粒子、マイクロゲル、坐剤トローチ、水性または油性懸濁液、軟膏、パッチ、ローション、歯磨き剤、エマルジョン、クリーム、滴剤、分散性散剤もしくは顆粒剤、硬質もしくは軟質ゲルカプセル中のエマルジョン、シロップ、フィトシューティカル(phytoceutical)および栄養補助食品(neutraceutical)またはそれらの任意の組合せが挙げられ得る。

40

【0375】

薬学的に許容される賦形剤の非限定例としては、顆粒化剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、甘味料、流動促進剤、固結防止剤(anti-adherent)、帯電防止剤、界面活性剤、抗酸化剤、ゴム、被覆剤、着色剤、香味料、被覆剤、可塑剤、防腐剤、懸濁剤、乳化剤、植物セルロース性材料および球状化剤(spheronization agent)

50

t) またはそれらの任意の組合せが挙げられ得る。

【0376】

組成物は、例えば、即時放出型または制御放出製剤であることができる。即時放出製剤は、分子が迅速に作用することを可能とするために製剤化されることができる。即時放出製剤の非限定例としては、容易に溶解する製剤が挙げられ得る。制御放出製剤は、薬物放出速度および薬物放出プロファイルが生理学および時間治療学的要求にマッチするように適合させられているか、或いはプログラムされた速度で薬物の放出を達成するように製剤化されている医薬製剤であることができる。制御放出製剤の非限定例としては、顆粒剤、遅延放出顆粒剤、(例えば、合成または天然起源の)ハイドロゲル、他のゲル化剤(例えば、ゲル形成性食物繊維)、マトリックススペースの製剤(例えば、全体に分散した少なくとも1つの活性成分を含むポリマー材料を含む製剤)、マトリックス内の顆粒、ポリマー混合物、顆粒塊などが挙げられ得る。

10

【0377】

制御放出製剤は、遅延放出型であることができる。遅延放出型は、分子の作用を長時間遅らせるために製剤化されることができる。遅延放出型は、1つまたはそれ以上の分子の有効量の放出を、例えば、約4時間、約8時間、約12時間、約16時間または約24時間遅らせるために製剤化されることができる。

【0378】

制御放出製剤は、持続放出型であることができる。持続放出型は、例えば、分子の作用を長時間にわたって維持するために製剤化されることができる。持続放出型は、本明細書に記載の任意の分子の(例えば、生理学的に有効な血液プロファイルを提供する)有効量を、約4時間、約8時間、約12時間、約16時間または約24時間にわたって提供するために製剤化されることができる。

20

【0379】

投与方法および処置方法

本明細書に記載の分子を含有する医薬組成物は、予防的および/または治療的処置のために投与されることができる。治療適用において、組成物は、既に疾患または状態に罹っている対象に、疾患または状態の症状を治癒させるかもしくは少なくとも部分的に停止させるために、または状態を治癒させ、癒し、改善もしくは寛解させるために十分な量で投与されることができる。この用途のために有効な量は、疾患または状態の重症度および経過、先の治療、対象の健康状態、体重および薬物に対する反応ならびに処置する医師の判断に基づいて変化しうる。

30

【0380】

複数の治療剤が任意の順番でまたは同時に投与されることができる。同時の場合、複数の治療剤は、単一の、統合されたまたは複数の形態で、例えば、複数の別個のピルとして提供されることができる。分子は、一緒にまたは別個に、単一の包装にまたは複数の包装に詰められることができる。1つまたはすべての治療剤は、複数用量で与えられることができる。同時でない場合、複数用量の間のタイミングは、約1ヶ月も変化しうる。

【0381】

本明細書に記載の分子は、疾患または状態の発生の前、その間または後に投与されることができる。化合物を含有する組成物の投与のタイミングは変化することができる。例えば、医薬組成物は、予防薬として使用されることができ、疾患または状態の発生を防止するために、状態または疾患の傾向を有する対象に持続的に投与されることができる。分子および医薬組成物は、症状の発症の間または発症後にできるだけ早く対象に投与されることができる。分子の投与は、症状の発症の最初の48時間以内、症状の発症の最初の24時間以内、症状の発症の最初の6時間以内、または症状の発症の最初の3時間以内に開始されることができる。初回投与は、本明細書に記載の任意の製剤を用いて、本明細書に記載の任意の経路によるなどの実用的な任意の経路を介することができる。分子は、疾患または状態の発症が検出または疑われた後、実行可能であればできるだけ早く、疾患の治療に必要な長さの時間、例えば、約1ヶ月から約3か月まで投与されることができる。処置の

40

50

長さは、各対象について変化し得る。

【0382】

分子は、生体コンパートメントに詰められることができる。分子を含む生体コンパートメントは、対象に投与されることができる。生体コンパートメントは、ウイルス（レンチウイルス、アデノウイルス）、ナノスフィア、リボソーム、量子ドット、ナノ粒子、マイクロ粒子、ナノカプセル、ベシクル、ポリエチレングリコール粒子、ハイドロゲルおよびミセルを含むことができるが、これらに限定されない。

【0383】

例えば、生体コンパートメントはリボソームを含むことができる。リボソームは、それぞれが反対向きの両親媒性脂質分子を含有する2つの単層を含むことのできる脂質二重層を1つまたはそれ以上含む自己集合構造であることができる。両親媒性脂質は、1つまたは2つまたはそれ以上の非極性（疎水性）アシルまたはアルキル鎖に共有結合した極性（親水性）先頭基を含むことができる。疎水性のアシル鎖と周囲の水性媒体との間のエネルギー的に好ましくない接触が、極性先頭基が二重層表面に向き、アシル鎖が二重層内部に向くように両親媒性脂質分子がそれら自身を配置するように誘導し、アシル鎖を水性環境との接触から効果的に保護する。

10

【0384】

リボソーム中で使用される好ましい両親媒性化合物の例としては、ホスグリセリドおよびスフィンゴリピドが挙げられ、その代表例としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンノシトール、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジリノレオイルホスファチジルコリンおよび卵スフィンゴミエリン、またはそれらの任意の組合せが挙げられる。

20

【0385】

生体コンパートメントは、ナノ粒子を含むことができる。ナノ粒子は、約40ナノメートルから約1.5マイクロメートルまで、約50ナノメートルから約1.2マイクロメートルまで、約60ナノメートルから約1マイクロメートルまで、約70ナノメートルから約800ナノメートルまで、約80ナノメートルから約600ナノメートルまで、約90ナノメートルから約400ナノメートルまで、約100ナノメートルから約200ナノメートルまでの直径を含むことができる。

30

【0386】

いくつかの場合において、ナノ粒子のサイズが増大するにつれて放出速度は遅くなるかまたは延長されることができ、ナノ粒子のサイズが減少するにつれて放出速度は増大することができる。

【0387】

ナノ粒子中のアルブミンの量は、約5%から約85%アルブミン（v/v）まで、約10%から約80%まで、約15%から約80%まで、約20%から約70%アルブミン（v/v）まで、約25%から約60%まで、約30%から約50%まで、約35%から約40%までにわたることができる。医薬組成物は、30、40、50、60、70もしくは80%以下またはそれ以上のナノ粒子を含むことができる。いくつかの場合において、本開示の核酸分子は、ナノ粒子の表面に結合することができる。

40

【0388】

生体コンパートメントは、ウイルスを含むことができる。ウイルスは、本開示の医薬組成物のための送達系であることができる。代表的なウイルスは、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスもしくはI型はII型、パルボウイルス、細網内皮症ウイルスおよびアデノ関連ウイルス（AAV）を含むことができる。本開示の医薬組成物は、ウイルスを用いて細胞に送達されることができる。ウイルスは、インビ

50

ボ、エキスピボまたはインビトロで、細胞に感染し、形質導入することができる。エキスピボよびインビトロ送達において、形質導入された細胞が、治療を必要とする対象に投与されることができる。

【0389】

医薬組成物は、ウイルス送達系中にパッケージングされることができる。例えば、組成物は、HSV-1ヘルパーウイルスを含まないパッケージング系によってピリオン中にパッケージングされることができる。

【0390】

ウイルス送達系（例えば、本開示の医薬組成物を含むウイルス）は、直接注入、定位的注入、脳室内に、ミニポンプ輸注系により、対流、カテーテル、静脈内、腸管外、腹腔内および/または皮下注入によって、必要とする対象の細胞、組織または器官に投与されることができる。いくつかの場合において、細胞は、インビトロまたはエキスピボで、ウイルス送達系により、形質導入されることができる。形質導入細胞は、疾患を有する対象に投与されることができる。例えば、医薬組成物を含むウイルス送達系によって幹細胞が形質導入されることができ、該肝細胞が疾患を処置するために患者に移植されることができる。いくつかの場合において、対象に与えられる形質導入細胞の用量は、単一用量中、約 1×10^5 細胞/kg、約 5×10^5 細胞/kg、約 1×10^6 細胞/kg、約 2×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg、約 6×10^6 細胞/kg、約 7×10^6 細胞/kg、約 8×10^6 細胞/kg、約 9×10^6 細胞/kg、約 1×10^7 細胞/kg、約 5×10^7 細胞/kg、約 1×10^8 細胞/kg またはそれ以上であることができる。

10

20

【0391】

生体コンパートメント中の医薬組成物は、関節炎のような炎症性疾患、骨癌、乳癌、皮膚癌、前立腺癌、肝臓癌、肺癌、咽頭癌および腎臓癌のような癌、細菌感染症を処置するため、神経損傷、肺、肝臓および腎臓疾患、目の処置、脊髄損傷、心臓疾患、動脈疾患を処置するために使用されることができる。

【0392】

細胞中への生体コンパートメントの導入は、ウイルスまたはバクテリオファージ感染、形質移入、コンジュゲーション、原形質融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンジイミン（PEI）媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、微粒子銃技術、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介核酸送達などにより起こることができる。

30

【0393】

用量

本明細書に記載の医薬組成物は、正確な用量の単回投与に好適な単位剤形であることができる。単位剤形において、製剤は適切な量の1つまたはそれ以上の化合物を含有する単位用量に分割されることができる。単位用量は、個別の量の製剤を含有する包装の形態であることができる。非限定例としては、包装された錠剤またはカプセルおよびバイアルまたはアンプル入りの散剤が挙げられ得る。水性懸濁液組成物は、再度密封できない単回投与容器に包装されることができる。再度密封できる多数回投与容器は、例えば、防腐剤とともに使用されることができる。腸管外注射のための製剤は、単位剤形、例えば、アンプル中または防腐剤とともに多数回投与容器中提示されることができる。

40

【0394】

本明細書に記載の分子は、約1mgから約2000mgまで；約5mgから約1000mgまで、約10mgから又は約25mgから500mgまで、約50mgから約250mgまで、約100mgから約200mgまで、約1mgから約50mgまで、約50mgから約100mgまで、約100mgから約150mgまで、約150mgから約200mgまで、約200mgから約250mgまで、約250mgから約300mgまで、約300mgから約350mgまで、約350mgから約400mgまで、約400mg

50

から約450mgまで、約450mgから約500mgまで、約500mgから約550mgまで、約550mgから約600mgまで、約600mgから約650mgまで、約650mgから約700mgまで、約700mgから約750mgまで、約750mgから約800mgまで、約800mgから約850mgまで、約850mgから約900mgまで、約900mgから約950mgまで、または約950mgから約1000mgまでの範囲内の組成物中に存在することができる。

【0395】

本明細書中に記載の分子は、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、約25mg、約30mg、約35mg、約40mg、約45mg、約50mg、約55mg、約60mg、約65mg、約70mg、約75mg、約80mg、約85mg、約90mg、約95mg、約100mg、約125mg、約150mg、約175mg、約200mg、約250mg、約300mg、約350mg、約400mg、約450mg、約500mg、約550mg、約600mg、約650mg、約700mg、約750mg、約800mg、約850mg、約900mg、約950mg、約1000mg、約1050mg、約1100mg、約1150mg、約1200mg、約1250mg、約1300mg、約1350mg、約1400mg、約1450mg、約1500mg、約1550mg、約1600mg、約1650mg、約1700mg、約1750mg、約1800mg、約1850mg、約1900mg、約1950mgまたは約2000mgの量で組成物中に存在することができる。

10

【0396】

本明細書に記載の分子（例えば、部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸および/または部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の複合体）は、少なくとも0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、10単位またはそれ以上の活性/mg分子を提供する組成物中に存在することができる。いくつかの実施態様において、対象に送達される分子の活性の総単位数は、少なくとも25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000、160,000、170,000、180,000、190,000、200,000、210,000、220,000、230,000または250,000単位またはそれ以上である。いくつかの実施態様において、対象に送達される分子の活性の総単位数は、最大で25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000、160,000、170,000、180,000、190,000、200,000、210,000、220,000、230,000または250,000単位またはそれ以上である。

20

30

【0397】

いくつかの実施態様において、少なくとも約10,000単位の活性が対象に送達され、体重50kgあたりに基準化される。いくつかの実施態様において、少なくとも約10,000、15,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000、160,000、170,000、180,000、190,000、200,000、210,000、220,000、230,000または250,000単位またはそれ以上の分子の活性が対象に送達され、体重50kgあたりに基準化される。いくつかの実施態様において、治療的有効量は、少なくとも 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 1.1×10^7 、 1.2×10^7 、 1.5×10^7 、 1.6×10^7 、 1.7×10^7 、 1.8×10^7 、 1.9×10^7 、 2×10^7 、 2.1×10^7 または 3×10^7 単位またはそれ以上の分子の活性である。いくつかの実施態様において、治

40

50

療的有効量は、最大で 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 1.1×10^7 、 1.2×10^7 、 1.5×10^7 、 1.6×10^7 、 1.7×10^7 、 1.8×10^7 、 1.9×10^7 、 2×10^7 、 2.1×10^7 または 3×10^7 単位またはそれ以上の分子の活性である。

【0398】

いくつかの実施態様において、治療的有効量は、少なくとも約 10,000、15,000、20,000、22,000、24,000、25,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、125,000、150,000、200,000 または 500,000 単位 / kg 体重である。いくつかの実施態様において、治療的有効量は、最大で約 10,000、15,000、20,000、22,000、24,000、25,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、125,000、150,000、200,000 または 500,000 単位 / kg 体重である。

10

【0399】

いくつかの実施態様において、対象に送達される分子の活性は、少なくとも 10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,000、27,000、28,000、30,000、32,000、34,000、35,000、36,000、37,000、40,000、45,000 または 50,000 U / mg 分子またはそれ以上である。いくつかの実施態様において、対象に送達される分子の活性は、最大で 10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,000、27,000、28,000、30,000、32,000、34,000、35,000、36,000、37,000、40,000、45,000 または 50,000 U / mg 分子またはそれ以上である。

20

【0400】

薬力学および薬物動態測定

薬力学および薬物動態データは、様々な実験技術によって得られることができる。特別な組成物を説明する適切な薬力学および薬物動態プロファイルの構成要素は、ヒト対象における薬物代謝の変動によって変化することができる。薬力学および薬物動態プロファイルは、一群の対象の平均パラメータの決定に基づくことができる。該対照群は、代表的な平均を決定するのに好適な任意の合理的な数の対象、例えば、5人の対象、10人の対象、15人の対象、20人の対象、25人の対象、30人の対象、35人またはそれ以上の対象を含む。平均は、測定した各パラメータのすべての対象の測定値の平均を計算することによって決定されることができる。用量は、本明細書に記載の所望のまたは有効な血液プロファイルのような所望の薬力学または薬物動態プロファイルを達成するために調節されることができる。

30

【0401】

薬力学パラメータは、分子を説明するのに好適な任意のパラメータであることができる。例えば、 C_{max} は、約 25 ng / mL 未満でない；約 50 ng / mL 未満でない；約 75 ng / mL 未満でない；約 100 ng / mL 未満でない；約 200 ng / mL 未満でない；約 300 ng / mL 未満でない；約 400 ng / mL 未満でない；約 500 ng / mL 未満でない；約 600 ng / mL 未満でない；約 700 ng / mL 未満でない；約 800 ng / mL 未満でない；約 900 ng / mL 未満でない；約 1000 ng / mL 未満でない；約 1250 ng / mL 未満でない；約 1500 ng / mL 未満でない；約 1750 ng / mL 未満でない；約 2000 ng / mL 未満でない；または本明細書に記載の分子の薬力学プロファイルを説明するのに適切な任意の他の C_{max} であることができる。

40

【0402】

50

本明細書に記載の分子の T_{max} は、例えば、約 0.5 時間超でない、約 1 時間超でない、約 1.5 時間超でない、約 2 時間超でない、約 2.5 時間超でない、約 3 時間超でない、約 3.5 時間超でない、約 4 時間超でない、約 4.5 時間超でない、約 5 時間超でない、または本明細書に記載の分子の薬力学プロファイルを説明するのに適切な任意の他の T_{max} であることができる。

【0403】

本明細書に記載の分子の $AUC_{(0-inf)}$ は、例えば、約 50 ng / 時間 / mL 未満でない、約 100 ng / 時間 / mL 未満でない、約 150 ng / 時間 / mL 未満でない、約 200 ng / 時間 / mL 未満でない、約 250 ng / 時間 / mL 未満でない、約 300 ng / 時間 / mL 未満でない、約 350 ng / 時間 / mL 未満でない、約 400 ng / 時間 / mL 未満でない、約 450 ng / 時間 / mL 未満でない、約 500 ng / 時間 / mL 未満でない、約 600 ng / 時間 / mL 未満でない、約 700 ng / 時間 / mL 未満でない、約 800 ng / 時間 / mL 未満でない、約 900 ng / 時間 / mL 未満でない、約 1000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 1250 ng / 時間 / mL 未満でない、約 1500 ng / 時間 / mL 未満でない、約 1750 ng / 時間 / mL 未満でない、約 2000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 2500 ng / 時間 / mL 未満でない、約 3000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 3500 ng / 時間 / mL 未満でない、約 4000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 5000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 6000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 7000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 8000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 9000 ng / 時間 / mL 未満でない、約 10,000 ng / 時間 / mL 未満でない、または本明細書に記載の分子の薬力学プロファイルを説明するのに適切な任意の他の $AUC_{(0-inf)}$ であることができる。

10

20

【0404】

投与の約 1 時間後の本明細書に記載の分子の血漿濃度は、例えば、約 25 ng / mL 未満でない、約 50 ng / mL 未満でない、約 75 ng / mL 未満でない、約 100 ng / mL 未満でない、約 150 ng / mL 未満でない、約 200 ng / mL 未満でない、約 300 ng / mL 未満でない、約 400 ng / mL 未満でない、約 500 ng / mL 未満でない、約 600 ng / mL 未満でない、約 700 ng / mL 未満でない、約 800 ng / mL 未満でない、約 900 ng / mL 未満でない、約 1000 ng / mL 未満でない、約 1200 ng / mL 未満でない、または本明細書に記載の分子の任意の他の血漿濃度であることができる。

30

【0405】

薬物動態パラメータは、本開示の医薬組成物を説明するのに好適な任意のパラメータであることができる。例えば、薬物動態プロファイルは、例えば、約 2 時間、約 4 時間、約 8 時間、約 12 時間または約 24 時間後の炎症に関連した因子の減少を示すことができる。

【0406】

薬学的に許容される塩

本開示は、本明細書に記載の任意の分子の薬学的に許容される塩の使用を提供する。薬学的に許容される塩は、例えば、酸付加塩および塩基付加塩を含むことができる。化合物に付加されて酸付加塩を形成する酸は、有機酸または無機酸であることができる。化合物に付加されて塩基付加塩を形成する塩基は、有機塩基または無機塩基であることができる。いくつかの実施態様において、薬学的に許容される塩は、金属塩である。いくつかの実施態様において、薬学的に許容される塩は、アンモニウム塩である。

40

【0407】

金属塩は、本発明の化合物への無機塩基の付加から生じることができる。無機塩基は、水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩またはリン酸塩などの、塩基性対イオンと対になった金属カチオンから成る。金属は、アルカリ金属、アルカリ土類金属、遷移金属または典型金属であることができる。いくつかの実施態様において、金属は、リチウム、ナトリウム、カリウム、セシウム、セリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、カルシウム、ストロンチウム

50

、コバルト、チタン、アルミニウム、銅、カドミウムまたは亜鉛である。

【0408】

いくつかの実施態様において、金属塩は、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、セシウム塩、セリウム塩、マグネシウム塩、マンガン塩、鉄塩、カルシウム塩、ストロンチウム塩、コバルト塩、チタン塩、アルミニウム塩、銅塩、カドミウム塩、亜鉛塩またはそれらの任意の組合せである。

【0409】

アンモニウム塩は、本発明の化合物へのアンモニアまたは有機アミンの付加から生じることができる。いくつかの実施態様において、有機アミンは、トリエチルアミン、ジイソプロピルアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、モルホリン、N-メチルモルホリン、ペペリジン、N-メチルペペリジン、N-エチルペペリジン、ジベンジルアミン、ピペラジン、ピリジン、ピラゾール、ピピラゾール (pipyrrole)、イミダゾール、ピラジンまたはピピラジン (pipyrazine) またはそれらの任意の組合せである。

10

【0410】

いくつかの実施態様において、アンモニウム塩は、トリエチルアミン塩、ジイソプロピルアミン塩、エタノールアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、モルホリン塩、N-メチルモルホリン塩、ペペリジン塩、N-メチルペペリジン塩、N-エチルペペリジン塩、ジベンジルアミン塩、ピペラジン塩、ピリジン塩、ピラゾール塩、ピピラゾール塩、イミダゾール塩、ピラジン塩またはピピラジン塩またはそれらの任意の組合せである。

20

【0411】

酸付加塩は、本開示の分子への酸の付加から生じることができる。いくつかの実施態様において、酸は無機質である。いくつかの実施態様において、酸は有機質である。いくつかの実施態様において、酸は、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、亜硝酸、硫酸、亜硫酸、リン酸、イソニコチン酸、乳酸、サリチル酸、酒石酸、アスコルビン酸、ゲンチシン酸、グルコン酸、グルカロン酸、サッカリン酸、ギ酸、安息香酸、グルタミン酸、パントテン酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、フマル酸、コハク酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、クエン酸、シュウ酸またはマレイン酸またはそれらの任意の組合せである。

30

【0412】

いくつかの実施態様において、塩は、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酒石酸塩、アスコルビン酸塩、ゲンチシン酸塩、グルコン酸塩、グルカロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、パントテン酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩またはマレイン酸塩またはそれらの任意の組合せである。

【0413】

操作された部位特異的ポリペプチド
総括

40

本開示は、部位特異的ポリペプチド (例えば、Cas 9、Csy 4、Cas 5、Cas 6、Argonaut など) および / または関連酵素を改変するための方法、組成物、系および / またはキットを記載する。改変は、部位特異的ポリペプチドに対する任意の共有結合または非共有結合による改変を含み得る。いくつかの場合において、これは、部位特異的ポリペプチドの1つまたはそれ以上の領域への化学改変を含み得る。いくつかの場合において、改変は、部位特異的ポリペプチドの保存的または非保存的アミノ酸置換を含み得る。いくつかの場合において、改変は、天然の部位特異的ポリペプチド中に見出されないアミノ酸、ペプチドまたはドメインによる、部位特異的ポリペプチドの任意の部分の付加、欠失または置換を含み得る。いくつかの場合において、1つまたはそれ以上の非天然

50

のドメインが、部位特異的ポリペプチド中で付加、欠失または置換され得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、融合タンパク質として存在し得る。

【0414】

いくつかの場合において、本開示は、所望の酵素特異性および/または活性を有する所望の標的核酸配列を認識するための部位特異的ポリペプチドの操作を提供する。部位特異的ポリペプチドに対する改変は、タンパク質工学によって実施されることができる。タンパク質工学は、部位特異的ポリペプチド全体の機能状態または内在性の細胞遺伝子座の実際の標的核酸配列を改変するために使用可能な、そのような操作された部位特異的ポリペプチドに機能ドメインを融合させることを含むことができる。本開示の部位特異的ポリペプチドは、内在性遺伝子の転写の活性化および抑制の両方を通じて、内在性遺伝子の発現を調節するために使用されることができる。

10

【0415】

部位特異的ポリペプチド融合物は、内在性の染色体配列を改変するために、他の調節または機能ドメイン、例えば、ヌクレアーゼ、トランスポゼースまたはメチラーゼ、に連結されることもできる。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、本明細書に記載の少なくとも1つまたはそれ以上の調節ドメインに連結され得る。調節または機能ドメインの非限定例としては、K R A BおよびV P 1 6のような転写因子リプレッサーまたはアクチベータードメイン、コリプレッサーおよびコアクチベータードメイン、D N Aメチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼならびにエンドヌクレアーゼF o k I由来の切断ドメインのようなD N A切断ドメインが挙げられる。

20

【0416】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドの1つまたはそれ以上の特異的ドメイン、領域または構造要素は、一緒に改変されることができる。部位特異的ポリペプチドの改変は起こり得るが、プロトスペーサー隣接モチーフ(P A M)および/または核酸ターゲティング核酸に結合もしくは認識する領域のような部位特異的ポリペプチドの要素に限定されない。そのような結合または認識要素は、保存された架橋性ヘリックス、強塩基性領域、N末端領域、C末端領域、R u v Cモチーフ(例えば、R u v Cおよび/またはR u v C様ヌクレアーゼドメイン)ならびにH N Hおよび/またはH N H様ドメインのような1つまたはそれ以上のヌクレアーゼドメインを含み得る。改変は、部位特異的ポリペプチド内のさらなるドメイン、構造要素、配列またはアミノ酸に対しても行われ得る。

30

【0417】

部位特異的ポリペプチドの1つまたはそれ以上の領域に対する改変は、部位特異的ポリペプチドの様々な性質を変更するために実施されうる。いくつかの場合において、改変は、一定の核酸標的配列に関する結合認識を変更し得る。これは、一定の配列に対する結合親和性および/または特異性を増大させることあるいは一定の標的核酸配列/認識要素を優先的にターゲティングすることを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの場合において、改変は、天然のヌクレアーゼ機能を変更するために使用され得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドに対する改変は、P A M特異性、t r a c r R N A特異性、c r R N A特異性または核酸ターゲティング核酸のようなさらなる核酸エレメントに対する特異性を変更し得る。

40

【0418】

本明細書には、部位特異的ポリペプチド(例えば、C a s 9)とゲノム編集(例えば、遺伝子の切断;例えば、切断とそれに続く外来配列の挿入(物理的挿入または相同組換え修復を介する挿入)および/または切断とそれに続くN H E Jによる遺伝子の変更;1つまたはそれ以上の遺伝子の部分的または完全な不活性化;内在性遺伝子の機能状態の変更、調節エレメントの挿入によるアレルの生成;など)のために操作された1つまたはそれ以上のドメインもしくは領域の融合タンパク質および生殖細胞系に運び入れられるゲノムの変更を含む、組成物および方法が記載される。例えば、標的細胞中の1つまたはそれ以上の遺伝子を編集(すなわち、変更)するためのこれらの組成物(すなわち、試薬)を作

50

成および使用する方法も開示される。したがって、本明細書に記載の方法および組成物は、ターゲティングされる遺伝子の変更（例えば、ノックイン）および/または1つまたはそれ以上の遺伝子の（部分的または完全な）ノックアウトのため、および/または任意の標的アレルの配列の無作為化変異のための高効率の方法を提供し、したがって、ヒト疾患の動物モデルの作成を可能とする。当業者は、用語「ゲノム操作」または「ゲノム編集」が本明細書中の方法を記述するためにしばしば使用されるが、本明細書に記載の方法および組成物は、細胞のゲノムにおいて厳密に言及されない可能性のある任意の標的核酸を変更するためにも使用されることができると理解する（例えば、合成核酸、プラスミド、ベクター、ウイルス核酸、組換え核酸などに対して使用可能である）。

【0419】

本明細書に記載の方法および組成物は、新規治療適用（例えば、遺伝疾患、癌、真菌、原虫、細菌およびウイルス感染症、虚血、血管病、関節炎、免疫不全などの予防および/または治療）、新規診断法（例えば、状態の予知および/または診断）並びに研究ツール（例えば、キット、機能的ゲノミクスアッセイならびに研究および薬物スクリーニングのための操作された細胞系および動物モデルを作成すること）ならびに増大した疾患抵抗性を含むがそれに限定されない、変更された表現型を有する植物を開発するためならびに果実の熟成特性、糖および油脂組成、収量および色の変更を提供するための手段を提供することを可能とする。本明細書に記載の方法および組成物は、新規なエビジェネティック研究を可能とする。

【0420】

タンパク質の改変および操作
アミノ酸変更

本明細書に記載のとおり、部位特異的ポリペプチドは改変されることができ、改変は、部位特異的ポリペプチドのアミノ酸に対する改変を含むことができる。改変は、一次アミノ酸配列および/または二次、三次および四次アミノ酸構造を変更することができる。いくつかの場合において、本発明の部位特異的ポリペプチドのいくつかのアミノ酸配列が、該タンパク質の構造または機能に対する顕著な影響なしに変化させられることができる。変更がいくつかの領域（例えば、該タンパク質の重要でない領域）において起こる場合、変異の種類は全く重要でない可能性がある。いくつかの場合において、置換の位置によって、変異は結果としての変種の生物学的性質に対して大きな効果を有さない可能性がある。例えば、Cas9変種の性質および機能は、野生型Cas9と同じ種類であることができる。いくつかの場合において、変異は、部位特異的ポリペプチドの構造および/または機能に決定的に影響を及ぼすことができる。

【0421】

部位特異的ポリペプチドを改変する位置（例えば、Cas9変種）は、配列および/または構造アラインメントを用いて決定されることができ、配列アラインメントは、ポリペプチドの類似および/または非類似の領域（例えば、保存された、保存されない、疎水性、親水性など）を同定することができる。いくつかの場合において、他の配列に類似する、対象とする配列中の領域が改変に好適である。いくつかの場合において、他の配列に非類似の、対象とする配列中の領域が改変に好適である。例えば、配列アラインメントが、データベース探索、ペアワイズアラインメント、多重配列アラインメント、ゲノム解析、モチーフ探索、ベンチマーキングおよび/またはBLAST、CS-BLAST、HHPRD、psi-BLAST、LALIGN、PyMOLおよびSEQALIGNのようなプログラムによって実行されることができ、構造アラインメントは、DALI、PHYRE、Chimera、COOT、OおよびPyMOLのようなプログラムによって実行されることができ、アラインメントは、データベース探索、ペアワイズアラインメント、多重配列アラインメント、ゲノム解析、モチーフ探索、ベンチマーキングまたはそれらの任意の組合せによって実行されることができ、

【0422】

部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸および/または標的核酸に対する

結合特異性を増大させるために改変されることができる。部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸の特定の領域（例えば、スパーサー伸長部、スパーサー、最小のCRISPR反復（CRISPR repeat）、最小のtracrRNA配列、3' tracrRNA配列、tracrRNA伸長部）および/または標的核酸への結合を増大させるために改変されることができる。

【0423】

いくつかの場合において、改変は、保存的改変を含むことができる。保存的アミノ酸変化は、それらの側鎖（例えば、システイン/セリン）において関連するアミノ酸のファミリーのうちの1つの置換を含むことができる。

【0424】

いくつかの場合において、本明細書に開示されたCas9タンパク質におけるアミノ酸変化は、非保存的アミノ酸変化（すなわち、非類似の荷電または非荷電アミノ酸の置換）である。非保存的アミノ酸変化は、それらの側鎖において関連しなくてもよいアミノ酸のファミリーのうちの1つの置換または部位特異的ポリペプチドの生理活性を変更する置換を含むことができる。

【0425】

アミノ酸の変異は、標的核酸への結合の選択性も変化させることができる。変異は、変異した部位特異的ポリペプチドと標的核酸の間の結合の解離定数（ K_d ）における変化を含み得る変化をもたらし得る。変異した部位特異的ポリペプチドと標的核酸の間の結合の K_d の変化は、非変異部位特異的ポリペプチドと標的核酸の間の結合の K_d よりも1000倍超、500倍超、100倍超、50倍超、25倍超、10倍超、5倍超、4倍超、3倍超、2倍超高いかまたは低くてもよい。変異した部位特異的ポリペプチドと標的核酸の間の結合の K_d の変化は、非変異部位特異的ポリペプチドと標的核酸の間の結合の K_d よりも1000倍未満、500倍未満、100倍未満、50倍未満、25倍未満、10倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満、2倍未満高いかまたは低くてもよい。

【0426】

変異は、変異した部位特異的ポリペプチドとPAMモチーフの間の結合の K_d における変化を含み得る変化をもたらし得る。変異した部位特異的ポリペプチドとPAMモチーフの間の結合の K_d における変化は、非変異部位特異的ポリペプチドとPAMモチーフの間の結合の K_d よりも1000倍超、500倍超、100倍超、50倍超、25倍超、10倍超、5倍超、4倍超、3倍超、2倍超高いかまたは低くてもよい。変異した部位特異的ポリペプチドとPAMモチーフの間の結合の K_d の変化は、非変異部位特異的ポリペプチドとPAMモチーフの間の結合の K_d よりも1000倍未満、500倍未満、100倍未満、50倍未満、25倍未満、10倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満、2倍未満高いかまたは低くてもよい。

【0427】

変異は、変異した部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の間の結合の K_d における変化を含み得る変化をもたらし得る。変異した部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の間の結合の K_d における変化は、非変異部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の間の結合の K_d よりも1000倍超、500倍超、100倍超、50倍超、25倍超、10倍超、5倍超、4倍超、3倍超、2倍超高いかまたは低くてもよい。変異した部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の間の結合の K_d における変化は、非変異部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の間の結合の K_d よりも1000倍未満、500倍未満、100倍未満、50倍未満、25倍未満、10倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満、2倍未満高いかまたは低くてもよい。

【0428】

部位特異的ポリペプチドの変異は、部位特異的ポリペプチドの酵素作用の反応速度論を変化させることもできる。変異は、変異した部位特異的ポリペプチドの K_m における変化を含み得る変化をもたらし得る。変異した部位特異的ポリペプチドの K_m における変化は、非変異部位特異的ポリペプチドの K_m よりも1000倍超、500倍超、100倍超、

10

20

30

40

50

50倍超、25倍超、10倍超、5倍超、4倍超、3倍超、2倍超高いかまたは低くてもよい。変異した部位特異的ポリペプチドの K_m における変化は、非変異部位特異的ポリペプチドの K_m よりも1000倍未満、500倍未満、100倍未満、50倍未満、25倍未満、10倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満、2倍未満高いかまたは低くてもよい。

【0429】

部位特異的ポリペプチドの変異は、部位特異的ポリペプチドのターンオーバーにおける変化を含み得る変化をもたらし得る。変異した部位特異的ポリペプチドのターンオーバーにおける変化は、非変異部位特異的ポリペプチドのターンオーバーよりも1000倍超、500倍超、100倍超、50倍超、25倍超、10倍超、5倍超、4倍超、3倍超、2倍超高いかまたは低くてもよい。変異した部位特異的ポリペプチドのターンオーバーにおける変化は、非変異部位特異的ポリペプチドのターンオーバーよりも1000倍未満、500倍未満、100倍未満、50倍未満、25倍未満、10倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満、2倍未満高いかまたは低くてもよい。

10

【0430】

変異は、部位特異的ポリペプチドの酵素作用の G における変化を含み得る変化をもたらし得る。変異した部位特異的ポリペプチドの G における変化は、非変異部位特異的ポリペプチドの G よりも1000倍超、500倍超、100倍超、50倍超、25倍超、10倍超、5倍超、4倍超、3倍超、2倍超高いかまたは低くてもよい。変異した部位特異的ポリペプチドのターンオーバーにおける変化は、非変異部位特異的ポリペプチドの

20

【0431】

変異は、部位特異的ポリペプチドの酵素作用の V_{max} における変化を含み得る変化をもたらし得る。変異した部位特異的ポリペプチドの V_{max} における変化は、非変異部位特異的ポリペプチドの V_{max} よりも1000倍超、500倍超、100倍超、50倍超、25倍超、10倍超、5倍超、4倍超、3倍超、2倍超高いかまたは低くてもよい。変異した部位特異的ポリペプチドのターンオーバーにおける変化は、非変異部位特異的ポリペプチドの V_{max} よりも1000倍未満、500倍未満、100倍未満、50倍未満、25倍未満、10倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満、2倍未満高いかまたは低くてもよい。

30

【0432】

変異は、部位特異的ポリペプチドの任意の反応速度パラメータにおける変化を含み得る変化をもたらし得る。変異は、部位特異的ポリペプチドの任意の熱力学的パラメータにおける変化を含み得る変化をもたらし得る。変異は、部位特異的ポリペプチドの表面電荷、埋没した表面積および/または折りたたみ速度論および/または部位特異的ポリペプチドの酵素作用における変化を含み得る変化をもたらし得る。

【0433】

機能に必須の本発明の部位特異的ポリペプチド中のアミノ酸は、部位特異的変異誘発、アラニン-スキャニング変異誘発、タンパク質構造解析、核磁気共鳴、光親和性標識および電子断層撮影、ハイスループットスクリーニング、ELISA、生化学アッセイ、結合アッセイ、切断アッセイ(例えば、サーベイヤーアッセイ)、レポーターアッセイなどの方法により同定されることができる。

40

【0434】

他のアミノ酸変更は、グリコシル化形態のアミノ酸、他の分子との凝集性コンジュゲートおよび関連しない化学部分(例えば、ペグ化分子)との共有結合によるコンジュゲートも含み得る。共有結合性の変異体は、アミノ酸鎖中またはN末端またはC末端残基において見出される基に官能基を連結することによって調製されることができる。いくつかの場合において、変異した部位特異的ポリペプチドは、対立遺伝子変異型および変異種も含み得る。

50

【0435】

Cas9タンパク質の機能活性に影響しない領域のトランケーションが操作され得る。Cas9タンパク質の機能活性に影響する領域のトランケーションが操作され得る。トランケーションは、5個未満、10個未満、15個未満、20個未満、25個未満、30個未満、35個未満、40個未満、45個未満、50個未満、60個未満、70個未満、80個未満、90個未満、100個またはそれ以上よりも少ないアミノ酸のトランケーションを含み得る。トランケーションは、5個超、10個超、15個超、20個超、25個超、30個超、35個超、40個超、45個超、50個超、60個超、70個超、80個超、90個超、100個超またはそれ以上よりも多いアミノ酸のトランケーションを含み得る。トランケーションは、部位特異的ポリペプチドの約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%のトランケーションを含み得る。

10

【0436】

Cas9タンパク質の機能活性に影響しない領域の欠失が改変され得る。Cas9タンパク質の機能活性に影響する領域の欠失が操作され得る。欠失は、5個未満、10個未満、15個未満、20個未満、25個未満、30個未満、35個未満、40個未満、45個未満、50個未満、60個未満、70個未満、80個未満、90個未満、100個またはそれ以上よりも少ないアミノ酸の欠失を含み得る。欠失は、5個超、10個超、15個超、20個超、25個超、30個超、35個超、40個超、45個超、50個超、60個超、70個超、80個超、90個超、100個超またはそれ以上よりも多いアミノ酸の欠失を含み得る。欠失は、部位特異的ポリペプチドの約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の欠失を含み得る。欠失は、N末端、C末端またはポリペプチド鎖中の任意の領域において起こることができる。

20

【0437】

スクリーニング

本開示は、部位特異的ポリペプチドを操作するための方法を提供する。スクリーニングは、部位特異的ポリペプチドを操作するために使用されることができる。例えば、スクリーニングは、部位特異的ポリペプチドの領域中の変異の効果をスクリーニングするために設定されることができる。例えば、スクリーニングは、RNA構造（例えば、核酸ターゲティング核酸構造）への親和性またはプロセシング能力（例えば、標的核酸の切断）に対する強塩基性パッチの改変をテストするために設定されることができる。代表的なスクリーニング方法は、細胞ソーティング法、mRNAディスプレイ、ファージディスプレイおよび定方向進化を含むが、これらに限定されない。

30

【0438】

融合物

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、非天然配列（non-native sequence）（すなわち、該ポリペプチドが、対立遺伝子またはそれが由来する配列から変化した改変を有する）（例えば、該ポリペプチドは融合物と呼ばれることができる）を含むように改変される。非天然配列は、1つまたはそれ以上の追加のタンパク質、タンパク質ドメイン、サブドメインまたはポリペプチドを含むこともできる。例えば、Cas9は、転写因子ドメイン、ヌクレアーゼドメイン、核酸ポリメライジングドメインを含むがこれらに限定されない、任意の好適な追加の非天然核酸結合タンパク質（nucleic acid-binding protein）および/またはドメインと融合され得る。非天然配列は、Cas9および/またはCas9ホモログの配列を含むことができる。

40

【0439】

非天然配列は、融合タンパク質に新しい機能を付与することができる。これらの機能は、例えばDNA切断、DNAメチル化、DNA損傷、DNA修復、標的DNAに関連した

50

標的ポリペプチド（例えば、ヒストン、DNA結合タンパク質）の改変を含むことができ、例えば、ヒストンのメチル化、ヒストンのアセチル化、ヒストンのユビキチン化などをもち、融合タンパク質により付与される他の機能は、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、脱アミノ活性、ジスルフィド活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスボーズ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性またはグリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性、リモデリング活性、プロテアーゼ活性、オキシドレダクターゼ活性、トランスフェラーゼ活性、ヒドロラーゼ活性、リアーゼ活性、イソメラーゼ活性、シンターゼ活性、シンセターゼ活性および脱ミリスチル化活性またはそれらの任意の組合せを含むことができる。

10

【0440】

ブリッジヘリックスに対する改変

いくつかの場合において、（PAM特異性を変更するなどのために）Cas9のブリッジヘリックス領域が改変され得る。いくつかの場合において、ブリッジヘリックスは、S.ピオゲネスのCas9タンパク質中に同定されるブリッジヘリックス（残基551～566）と同一性を共有する。いくつかの場合において、ブリッジヘリックスは、S.ピオゲネスCas9ブリッジヘリックスの残基551～556と、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の同一性を共有し得る。いくつかの場合において、ブリッジヘリックスは、S.ピオゲネスCas9ブリッジヘリックスの残基551～556と、最大で5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の同一性を共有し得る。

20

【0441】

いくつかの場合において、ブリッジヘリックスに対する改変は、本明細書に記載の個々のアミノ酸改変を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの場合において、ブリッジヘリックスに対する改変は、個々のアミノ酸または（ドメイン、構造モチーフ、タンパク質などの）他のタンパク質要素のようなポリペプチドの挿入、欠失または置換を含み得るが、これらに限定されない。

30

【0442】

改変は、ブリッジヘリックスの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、ブリッジヘリックスの最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、ブリッジヘリックスの少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%も含み得る。改変は、ブリッジヘリックスの最大で5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%も含み得る。

40

【0443】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのブリッジヘリックス配列に対する改変は、アルファヘリックス、ベータストランド、ベータシート、310-ヘリックス、pi-ヘリックス、ポリプロリンIモチーフ、ポリプロリンIIモチーフ、ポリプロリンIIIモチーフ、ベータターン、アルファ-ターン-アルファまたはヘリックスのよじれ

50

またはヒンジを含むがこれらに限定されない、特別のポリペプチド構造モチーフを含み得る。例えば、部位特異的ポリペプチドのブリッジヘリックスに対する置換は、1つまたはそれ以上のプロリンアミノ酸残基による置換または付加を含み得る。プロリン残基の挿入は、PAMに対するブリッジヘリックスの結合特異性を変更し得る、ブリッジヘリックス中のねじれを導入し得る。別の例において、置換または付加は、1つまたはそれ以上のグリシンアミノ酸残基を含み得る。グリシン残基の挿入または置換は、ブリッジヘリックスのフレキシビリティの増大またはPAMに対するブリッジヘリックスの結合特異性も変更し得る「ヒンジ」を導入し得る。結合特異性の変更は、Cas9タンパク質の酵素活性に影響する可能性があるかまたはない。

【0444】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのブリッジヘリックス配列に対する改変は、ブリッジヘリックスの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の欠失を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのブリッジヘリックス配列に対する改変は、ブリッジヘリックスの最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の欠失を含み得る。

【0445】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのブリッジヘリックス配列に対する改変は、相同な部位特異的ブリッジヘリックスの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのブリッジヘリックス配列に対する改変は、相同な部位特異的ブリッジヘリックスの最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。

【0446】

例えば、非天然のCas9ブリッジヘリックスは、任意の好適な生物に由来し得る。いくつかの場合において、Cas9タンパク質およびブリッジヘリックスは、古細菌、細菌、原生生物（例えば、E.コリ（*E. coli*）、S.ピオゲネス、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、P.フリオス（*P. furiosus*）など）を含むが、これらに限定されない原核生物に由来し得る。

【0447】

例えば、S.ピオゲネスCas9酵素のブリッジヘリックスは、異なる種からの別のCas9酵素由来のブリッジヘリックスまたはその断片により置換または挿入され得る。

【0448】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネスからのCas9に対する少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）および改変されたブリッジヘリックスを含む。

【0449】

強塩基性パッチに対する改変

PAM結合および特異性は、Cas9タンパク質内のさらなる領域によっても影響される。いくつかの場合において、PAM結合部位に隣接する塩基性アミノ酸残基を含む強塩基性パッチまたは領域は、PAM特異性を変更するためにも改変され得る。いくつかの場合において、強塩基性パッチまたは領域は、N末端領域内に含有されるS.ピオゲネスのCas9において同定される強塩基性パッチまたはS.ピオゲネスCas9のアミノ酸残基1~270との相同性を共有し得る。いくつかの場合において、強塩基性パッチは、

10

20

30

40

50

S . ピオゲネス C a s 9 の強塩基性パッチと、少なくとも 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % または 100 % の相同性を共有し得る。いくつかの場合において、強塩基性パッチは、S . ピオゲネス C a s 9 の強塩基性パッチと、最大で 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % または 100 % の相同性を共有し得る。

【0450】

いくつかの場合において、強塩基性パッチに対する改変は、本明細書に記載の個々のアミノ酸改変を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの場合において、強塩基性パッチに対する改変は、個々のアミノ酸または(ドメイン、構造モチーフ、タンパク質などの)他のタンパク質要素のようなポリペプチドの挿入、欠失または置換を含み得るが、これらに限定されない。

10

【0451】

改変は、強塩基性パッチの少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 またはそれ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、強塩基性パッチの最大で 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 またはそれ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、強塩基性パッチの少なくとも 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % または 100 % も含み得る。改変は、強塩基性パッチの最大で 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % または 100 % も含み得る。

20

【0452】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドの強塩基性パッチ配列に対する改変は、アルファヘリックス、ベータストランド、ベータシート、310-ヘリックス、 π -ヘリックス、ポリプロリンエモチーフ、ポリプロリンエエモチーフ、ポリプロリンエエエモチーフ、ベータターン、アルファ-ターン-アルファまたはヘリックスのねじれもしくはヒンジを含むがこれらに限定されない、特別のポリペプチド構造モチーフを含み得る。

30

【0453】

部位特異的ポリペプチドの強塩基性パッチに対する置換は、1つまたはそれ以上の酸性アミノ酸残基による置換または付加を含み得る。酸性残基の挿入は、部位特異的ポリペプチドのこの領域の全体的塩基性電荷を低減することができ、PAMに対する強塩基性パッチの結合特異性を変更し得る。別の例において、置換または付加は、1つまたはそれ以上の塩基性アミノ酸残基を含み得る。塩基性残基の挿入または置換は、荷電領域または該ポリペプチドと核酸の間の相互作用のイオン強度を増大することができ、PAMに対する強塩基性パッチの結合特異性も変更し得る。結合特異性の変更は、部位特異的ポリペプチドの酵素活性に影響する可能性があるかまたはない。

40

【0454】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドの強塩基性パッチ配列に対する改変は、強塩基性パッチの少なくとも 1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % または 100 % の欠失を含み得る。いくつか

50

の場合において、部位特異的ポリペプチドの強塩基性パッチ配列に対する改変は、強塩基性パッチの最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の欠失を含み得る。

【0455】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドの強塩基性パッチ配列に対する改変は、相同なCas9強塩基性パッチの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドの強塩基性パッチ配列に対する改変は、相同なCas9強塩基性パッチの最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。

10

【0456】

相同なCas9強塩基性パッチ配列は、任意の好適な生物に由来し得る。いくつかの場合において、Cas9タンパク質は、古細菌、細菌、原生生物（例えば、E.コリ、S.ピオゲネス、S.サーモフィルス、P.フリオスなど）を含む原核生物に由来し得る。例えば、S.ピオゲネスCas9酵素の強塩基性パッチは、別の種のCas9由来の強塩基性パッチまたはその断片により置換または挿入され得る。

20

【0457】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネスからのCas9に対する少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）および改変された強塩基性パッチを含む。

【0458】

HNHドメインに対する改変

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチド中のHNHドメインは、PAM特異性を変更するために改変され得る。いくつかの場合において、HNHドメインは、S.ピオゲネスのCas9タンパク質のC末端ドメインにおいて同定されるHNHドメイン（残基860~1100）との相同性を共有し得る。いくつかの場合において、HNHドメインは、S.ピオゲネスCas9のHNHドメインの残基551~556と、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の相同性を共有し得る。いくつかの場合において、HNHドメインは、S.ピオゲネスCas9のHNHドメインの残基860~1100と、最大で5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の相同性を共有し得る。

30

【0459】

いくつかの場合において、HNHドメインに対する改変は、本明細書に記載の個々のアミノ酸改変を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの場合において、HNHドメインに対する改変は、個々のアミノ酸または（ドメイン、構造モチーフ、タンパク質などの）他のタンパク質要素のようなポリペプチドの挿入、欠失または置換を含み得るが、これらに限定されない。

40

【0460】

改変は、HNHドメインの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、HNHドメインの最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または

50

それ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、HNHドメインの少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%も含み得る。改変は、HNHドメインの最大で5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%も含み得る。

【0461】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのHNHドメイン配列に対する改変は、アルファヘリックス、ベータストランド、ベータシート、310-ヘリックス、pi-ヘリックス、ポリプロリンIモチーフ、ポリプロリンIIモチーフ、ポリプロリンIIIモチーフ、ベータターン、アルファ-ターン-アルファまたはヘリックスのねじれもしくはヒンジを含むがこれらに限定されない、特別のポリペプチド構造モチーフを含み得る。

10

【0462】

部位特異的ポリペプチドのHNHドメインに対する置換は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基による置換または付加を含み得る。いくつかの場合において、HNHドメインは、他の好適な核酸結合ドメインと置換または融合され得る。核酸結合ドメインは、RNAを含むことができる。単一の核酸結合ドメインが存在することができる。核酸結合ドメインの例としては、ヘリックス-ターン-ヘリックスドメイン、ジンクフィンガードメイン、ロイシンジッパー(bZIP)ドメイン、翼状ヘリックスドメイン、翼状ヘリクスターンヘリックスドメイン、ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン、HMG-ボックスドメイン、Wor3ドメイン、イムノグロブリンドメイン、B3ドメイン、TALEドメイン、ジンクフィンガードメイン、RNA認識モチーフドメイン、二本鎖RNA結合モチーフドメイン、二本鎖核酸結合ドメイン、一本鎖核酸結合ドメイン、KHドメイン、PUFドメイン、RGGボックスドメイン、DEAD/DEAHボックスドメイン、PAZドメイン、Piwiドメインおよび低温ショックドメイン、RNAseHドメイン、HNHドメイン、RuvC様ドメイン、RAMPドメイン、Cas5ドメイン、Cas6ドメインが挙げられることができるが、これらに限定されない。

20

【0463】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのHNHドメイン配列に対する改変は、HNHドメインの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の欠失を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのHNHドメイン配列に対する改変は、HNHドメインの最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の欠失を含み得る。

30

【0464】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのHNHドメイン配列に対する改変は、相同なCas9HNHドメインの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのHNHドメイン配列に対する改変は、相同なCas9HNHドメインの最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。

40

【0465】

相同なCas9HNHドメインは、任意の好適な生物に由来し得る。いくつかの場合に

50

において、Cas9タンパク質は、古細菌、細菌、原生生物（例えば、E. コリ、S. ピオゲネス、S. サーモフィルス、P. フリオスなど）を含む原核生物に由来し得る。例えば、S. ピオゲネスCas9酵素のHNHドメインは、別の種のCas9酵素由来のHNHドメインまたはその断片により置換または挿入され得る。いくつかの場合において、少なくとも1つの相同なCas9HNHドメインがHNHドメイン中に挿入され得る。いくつかの場合において、該少なくとも1つの相同なCas9HNHドメインは、少なくとも2つのHNHドメインを含むHNHドメインアレイを形成し得る。いくつかの場合において、HNHドメインアレイは、少なくとも1つのCas9HNHドメインおよび少なくとも1つの第2のHNHドメインを含むことができる。

【0466】

いくつかの場合において、HNHまたはHNH様ドメインに対する改変は、Cas9のHNHドメインに直列した（例えば、隣接した）同じまたは類似のHNHまたはNH様ドメインの挿入を含むことができる。HNHまたはHNH様ドメインは、Cas9中のHNHドメインのN末端および/またはC末端に挿入されることができる。Cas9における1つまたはそれ以上のHNHまたはHNH様ドメインの挿入は、標的核酸における特異性を拡張することにおいて有用であることができる。Cas9における1つまたはそれ以上のHNHまたはHNH様ドメインの挿入は、標的核酸における特異性を2倍にすることにおいて有用であることができる。例えば、1つまたはそれ以上のHNHまたはHNH様ドメインの挿入は、より長い標的核酸を認識し、異なるRNA-DNAハイブリッドを認識し、および/またはより結合親和性の高い標的核酸を認識するようにCas9を設計することができる。

【0467】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、S. ピオゲネスからのCas9に対する少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）および改変されたHNHドメインを含む。

【0468】

RuvCまたはRuvC様ドメインに対する改変

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチド中のRuvCまたはRuvC様ドメインは、PAM特異性を変更するために改変され得る。いくつかの場合において、RuvCまたはRuvC様ドメインは、S. ピオゲネスのCas9タンパク質において同定されるRuvCまたはRuvC様ドメイン（残基1~270）との相同性を共有し得る。いくつかの場合において、RuvCまたはRuvC様ドメインは、S. ピオゲネスCas9のRuvCまたはRuvC様ドメインの残基551~556と、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の相同性を共有し得る。いくつかの場合において、RuvCまたはRuvC様ドメインは、S. ピオゲネスCas9のRuvCまたはRuvC様ドメインの残基1~270と、最大で5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の相同性を共有し得る。

【0469】

いくつかの場合において、RuvCまたはRuvC様ドメインに対する改変は、本明細書に記載の個々のアミノ酸改変を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの場合において、RuvCまたはRuvC様ドメインに対する改変は、個々のアミノ酸または（ドメイン、構造モチーフ、タンパク質などの）他のタンパク質要素のようなポリペプチドの挿入、欠失または置換を含み得るが、これらに限定されない。

【0470】

改変は、RuvCまたはRuvC様ドメインの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または

10

20

30

40

50

それ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、R u v CまたはR u v C様ドメインの最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、R u v CまたはR u v C様ドメインの少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%も含み得る。改変は、R u v CまたはR u v C様ドメインの最大で5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%も含み得る。

【0471】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのR u v CまたはR u v C様ドメイン配列に対する改変は、アルファヘリックス、ベータストランド、ベータシート、310-ヘリックス、 π -ヘリックス、ポリプロリンIモチーフ、ポリプロリンIIモチーフ、ポリプロリンIIIモチーフ、ベータターン、アルファ-ターン-アルファまたはヘリックスのねじれもしくはヒンジを含むがこれらに限定されない、特別のポリペプチド構造モチーフを含み得る。

【0472】

部位特異的ポリペプチドのR u v CまたはR u v C様ドメインに対する置換は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基による置換または付加を含み得る。いくつかの場合において、R u v CまたはR u v C様ドメインは、他の好適な核酸結合ドメインと置換または融合され得る。核酸結合ドメインは、RNAを含むことができる。単一の核酸結合ドメインが存在することができる。核酸結合ドメインの例としては、ヘリックス-ターン-ヘリックスドメイン、ジンクフィンガードメイン、ロイシンジッパー(bZIP)ドメイン、翼状ヘリックスドメイン、翼状ヘリクスターンヘリックスドメイン、ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン、HMG-ボックスドメイン、Wor3ドメイン、イムノグロブリンドメイン、B3ドメイン、TALドメイン、ジンクフィンガードメイン、RNA認識モチーフドメイン、二本鎖RNA結合モチーフドメイン、二本鎖核酸結合ドメイン、一本鎖核酸結合ドメイン、KHドメイン、PUFドメイン、RGGボックスドメイン、DEAD/DEAHボックスドメイン、PAZドメイン、Piwiドメイン、低温ショックドメイン、RNAseHドメイン、HNHドメイン、R u v C様ドメイン、RAMPドメイン、Cas5ドメインおよびCas6ドメインが挙げられることができるが、これらに限定されない。

【0473】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのR u v CまたはR u v C様ドメイン配列に対する改変は、R u v CまたはR u v C様ドメインの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の欠失を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのR u v CまたはR u v C様ドメイン配列に対する改変は、R u v CまたはR u v C様ドメインの最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の欠失を含み得る。

【0474】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのR u v CまたはR u v C様ドメイン配列に対する改変は、相同なCas9 R u v CまたはR u v C様ドメインの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのR u v CまたはR u v C様ドメイン配列に対する改変は、相同なCas9 R u v CまたはR u v C様ドメインの最大で1%、5%、10%、15%、20%

10

20

30

40

50

、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。

【0475】

相同なCas9RuvCまたはRuvC様ドメインは、任意の好適な生物に由来し得る。いくつかの場合において、Cas9タンパク質は、古細菌、細菌、原生生物（例えば、E.コリ、S.ピオゲネス、S.サーモフィルス、P.フリオススなど）を含む原核生物に由来し得る。例えば、S.ピオゲネスCas9酵素のRuvCまたはRuvC様ドメインは、別の種からのもののような、別のCas9酵素由来のRuvCまたはRuvC様ドメインまたはその断片により置換または挿入され得る。

10

【0476】

いくつかの場合において、RuvCまたはRuvC様ドメインに対する改変は、Cas9のRuvCまたはRuvC様ドメインに直列した（例えば、隣接した）同じまたは類似のRuvCまたはRuvC様ドメインの挿入を含むことができる。RuvCまたはRuvC様ドメインは、Cas9中のRuvCまたはRuvC様ドメインのN末端および/またはC末端に挿入されることができる。Cas9における1つまたはそれ以上のRuvCまたはRuvC様ドメインの挿入は、標的核酸における特異性を拡張することにおいて有用であることができる。Cas9における1つまたはそれ以上のRuvCまたはRuvC様ドメインの挿入は、標的核酸における特異性を2倍にすることにおいて有用であることができる。例えば、1つまたはそれ以上のRuvCまたはRuvC様ドメインの挿入は、より長い標的核酸を認識し、異なるRNA-DNAハイブリッドを認識し、および/またはより結合親和性の高い標的核酸を認識するようにCas9を設計することができる。

20

【0477】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネスからのCas9に対する少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）および改変されたRuvCドメインを含む。

【0478】

RNAポリメラーゼ相同領域を含有するCas9ドメインに対する改変

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、RNAポリメラーゼとの相同性を共有しうる。両タンパク質は、結合の触媒および核酸の操作に関与する類似の機能的に相同なドメインを共有し得る。例えば、RNAポリメラーゼは、RNA-DNA二本鎖の結合に関与するポリペプチド配列の領域を含むことができる。いくつかの場合において、これらの領域は、二本鎖の融解を支援しうる。

30

【0479】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、核酸に関する酵素の結合特異性に影響する一定の領域も含み得る。いくつかの場合において、これらの領域は、RNAポリメラーゼにおいて見出されるドメインまたは領域との配列または機能的相同性のいずれかを共有し得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのN末端の塩基性領域は、tracrRNAおよびcrRNAまたは一本鎖RNA（sgRNA）に結合し得る。S.ピオゲネスにおいて、これは、残基50~100の領域に相当する。

40

【0480】

一般に、本開示は、この領域または隣接領域に対する任意の好適な改変を提供する。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチド中のtracrRNA/crRNA結合領域（例えば、核酸ターゲティング核酸結合領域）は、核酸に関する特異性を変更するために改変され得る。いくつかの場合において、tracrRNA/crRNA結合領域は、S.ピオゲネスのCas9タンパク質において同定されるtracrRNA/crRNA結合領域（残基50~100）との相同性を共有し得る。いくつかの場合において、tracrRNA/crRNA結合領域は、S.ピオゲネスCas9のtracrRNA/crRNA結合領域の残基50~100と、少なくとも5%、10%、15%、20%、

50

25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の相同性を共有し得る。いくつかの場合において、tracrRNA/crRNA結合領域は、S.ピオゲネスCas9のtracrRNA/crRNA結合領域の残基50~100と、最大で5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の相同性を共有し得る。

【0481】

いくつかの場合において、tracrRNA/crRNA結合領域に対する改変は、本明細書に記載の個々のアミノ酸改変を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの場合において、tracrRNA/crRNA結合領域に対する改変は、個々のアミノ酸または(ドメイン、構造モチーフ、タンパク質などの)他のタンパク質要素のようなポリペプチドの挿入、欠失または置換を含み得るが、これらに限定されない。

10

【0482】

改変は、tracrRNA/crRNA結合領域の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、tracrRNA/crRNA結合領域の最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸に対する改変を含み得る。改変は、tracrRNA/crRNA結合領域の少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%も含み得る。改変は、tracrRNA/crRNA結合領域の最大で5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%も含み得る。

20

【0483】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのtracrRNA/crRNA結合領域配列に対する改変は、アルファヘリックス、ベータストランド、ベータシート、310-ヘリックス、pi-ヘリックス、ポリプロリンIモチーフ、ポリプロリンIIモチーフ、ポリプロリンIIIモチーフ、ベータターン、アルファ-ターン-アルファまたはヘリックスのねじれもしくはヒンジを含むがこれらに限定されない、特別のポリペプチド構造モチーフを含み得る。

30

【0484】

例えば、部位特異的ポリペプチドのtracrRNA/crRNA結合領域に対する置換は、1つまたはそれ以上のタンパク質またはその断片による置換または付加を含み得る。例えば、tracrRNA/crRNA結合領域は、任意の知られたRNA結合性タイプI、タイプIIまたはタイプIIICRISPRシステムのメンバーからのRNA結合ドメインにより置換され得る。tracrRNA/crRNA結合領域は、RAMPスーパーファミリーの任意の知られたRNA結合メンバーからのRNA結合ドメインにより置換され得る。tracrRNA/crRNA結合領域は、Cas7、Cas6、Cas5ファミリーの任意の知られたRNA結合メンバーからのRNA結合ドメインにより置換され得る。一例において、tracrRNAの必要条件は、DNA認識のためのヘアピンの下流に位置するスペーサー配列を有する5'ヘアピン配列の必要条件で置き換えられ得る。

40

【0485】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドのtracrRNA/crRNA結合領域配列に対する改変は、tracrRNA/crRNA結合領域の少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、9

50

9%または100%の欠失を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドの *tracrRNA/crRNA* 結合領域配列に対する改変は、*tracrRNA/crRNA* 結合領域の最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の欠失を含み得る。

【0486】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドの *tracrRNA/crRNA* 結合領域配列に対する改変は、相同な *Cas9 tracrRNA/crRNA* 結合領域の少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドの *tracrRNA/crRNA* 結合領域配列に対する改変は、相同な *Cas9 tracrRNA/crRNA* 結合領域の最大で1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の付加または置換を含み得る。

10

【0487】

相同な部位特異的ポリペプチドの *tracrRNA/crRNA* 結合領域は、任意の好適な生物に由来し得る。いくつかの場合において、*tracrRNA/crRNA* 結合領域は、古細菌、細菌、原生生物（例えば、*E. コリ*、*S. ピオゲネス*、*S. サーモフィルス*、*P. フリオス*など）を含むが、これらに限定されない原核生物に由来し得る。例えば、*S. ピオゲネス* *Cas9* の *tracrRNA/crRNA* 結合領域は、別の種由来のもののような、別の *Cas9* 由来の *tracrRNA/crRNA* 結合領域またはその断片により置換または挿入され得る。

20

【0488】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、*S. ピオゲネス* からの *Cas9* に対する少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン（すなわち、*HNH*ドメインおよび *RuvC*ドメイン）および改変されたポリメラーゼ様ドメインを含む。

【0489】

PAM特異性を変更するための改変

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、プロトスペーサー隣接モチーフ (*protospacer adjacent motif*) (PAM) を認識することができる。PAMは、部位特異的ポリペプチドにより認識される標的核酸中の任意の配列であることができ、核酸ターゲティング核酸のスペーサーによってターゲティングされる標的核酸配列の3'に隣接する。例えば、PAMは、5'-NGG-3'または5'-NGGNG-3'、5'-NNA A A W-3'、5'-NNNNGATT-3'、5'-GNNNCNNA-3'、5'-NNNACA-3'を含むことができ、ここで、Nは任意のヌクレオチドであり、Nは、スペーサー配列によってターゲティングされる標的核酸配列の3'に隣接する。

30

40

【0490】

部位特異的ポリペプチドは、PAM特異性を変更するために改変されることができる。例えば、部位特異的ポリペプチドは、改変前には該ポリペプチドが第1のプロトスペーサー隣接モチーフをターゲティングし、改変後には該部位特異的ポリペプチドが第2のプロトスペーサー隣接モチーフをターゲティングするように、改変されることができる。いくつかの場合において、変更されたPAM特異性は、結合特異性の変化（例えば、増大した結合、減少した結合）および/または結合定数の変化（例えば、増大した *K_d*、減少した *K_d*）を含むことができる。

【0491】

部位特異的ポリペプチドは、該部位特異的ポリペプチドが、野生型部位特異的ポリペプ

50

チドが認識するタイプとは異なる新しいタイプのPAMを認識することができるように、
 変更されることができる。例えば、5'-NGG-3' PAMを認識する部位特異的ポリ
 ペプチドは、5'-NGGNG-3' PAM、5'-NNAAA AW-3'、5'-NN
 NNGATT-3'、5'-GNNNCNNA-3'または5'-NNNACA-3'を
 認識することができるように変更されることができる。

【0492】

部位特異的ポリペプチドの任意の領域（例えば、ブリッジヘリックス、HNHおよび/
 またはHNH様ドメイン、RuvCおよび/またはRuvC様ドメイン、塩基性パッチ）
 が、本開示の方法によってPAM特異性を変更するために操作されることができる。

【0493】

野生型部位特異的ポリペプチド（例えば、S.ピオゲネスからのCas9、配列番号8
 ）の残基445~507、446~497、1096~1225、1105~1138に
 相当する領域は、PAM認識を変更するために、操作されることができる。これらの領域
 の操作は、変異を導入すること、他のCas9オルソログからの対応する領域で置換する
 こと、欠失、挿入などを含むことができる。残基718~757、22~49、65~9
 5、445~507、446~497、1096~1225、1105~1138に相当
 する領域は、核酸ターゲティング核酸の認識を変更するために操作されることができる
 。残基445~507および1105~1138に相当する領域は、P-ドメイン認識を
 変更するために操作されることができる。

【0494】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネスからのCas9
 に対する少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイ
 ン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）および変更を含み、ここで、改
 変の導入前には、該部位特異的ポリペプチドは、第1のPAMに結合するのに適合して
 おり、変更の導入後には、該部位特異的ポリペプチドは、異なるPAMに結合する
 のに適合している。

【0495】

核酸ターゲティング核酸特異性を変更するための変更

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸を認識
 することができる。部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸特異性を変更
 するために変更されることができる。例えば、部位特異的ポリペプチドは、変更前には、該
 ポリペプチドが第1の核酸ターゲティング核酸をターゲティングし、変更後には、部位特
 異的ポリペプチドが第2の核酸ターゲティング核酸をターゲティングするように変更され
 ることができる。いくつかの場合において、変更された核酸ターゲティング核酸特異性は
 、結合特異性の変化（例えば、増大した結合、減少した結合）および/または結合定数の
 変化（例えば、Kdを増加させる、Kdを減少させる）を含むことができる。

【0496】

部位特異的ポリペプチドは、該部位特異的ポリペプチドが、野生型部位特異的ポリペ
 プチドが認識するタイプとは異なる新しいタイプの核酸ターゲティング核酸を認識するこ
 とができるように、変更されることができる。部位特異的ポリペプチドの任意の領域（例
 えば、ブリッジヘリックス、HNHおよび/またはHNH様ドメイン、RuvCおよび/
 またはRuvC様ドメイン、塩基性パッチ）が、本開示の方法によってPAM特異性を変更
 するために操作されることができる。

【0497】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネスからのCas9
 に対する少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイ
 ン（すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン）および変更を含み、ここで、改
 変の導入前には、部位特異的ポリペプチドは、第1の核酸ターゲティング核酸に結合する
 のに適合しており、変更の導入後には、部位特異的ポリペプチドは、異なる核酸ター
 ゲティング核酸に結合するのに適合している。

10

20

30

40

50

【0498】

ハイブリダイゼーション必要条件を変更するための改変
挿入

部位特異的ポリペプチドは、標的核酸への結合特異性を増大させるために改変されることが出来る。配列が部位特異的ポリペプチド中に挿入され得る。いくつかの場合において、HNHおよび/またはHNH様ドメインが部位特異的ポリペプチド中に挿入され得る。非天然配列(例えば、HNHおよび/またはHNH様ドメイン)は、任意の種に起源を有し得る。挿入は、部位特異的ポリペプチド中の任意の位置において起こり得る。挿入は、部位特異的ポリペプチドの天然のHNHおよび/またはHNH様ドメインに直列に(例えば、隣接して)起こり得る。挿入されたHNHおよび/またはHNH様ドメインは、変異を含み得る。挿入されたHNHおよび/またはHNH様ドメインは、該ドメインのヌクレアーゼ活性を低減する変異を含み得る。いくつかの場合において、RuvCおよび/またはRuvC様ドメインが、部位特異的ポリペプチド中に挿入され得る。挿入は、部位特異的ポリペプチド中に任意の位置において起こり得る。挿入は、部位特異的ポリペプチドの天然のRuvCおよび/またはRuvC様ドメインに直列に(例えば、隣接して)起こり得る。挿入されたRuvCおよび/またはRuvC様ドメインは、変異を含み得る。挿入されたRuvCおよび/またはRuvC様ドメインは、該ドメインのヌクレアーゼ活性を低減する変異を含み得る。

10

【0499】

部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸への結合特異性を増大させるために改変されることが出来る。配列が部位特異的ポリペプチド中に挿入され得る。HNHおよび/またはHNH様ドメインが部位特異的ポリペプチド中に挿入され得る。非天然配列(例えば、HNHおよび/またはHNH様ドメイン)は、任意の種に起源を有し得る。挿入は、部位特異的ポリペプチド中の任意の位置において起こり得る。挿入は、部位特異的ポリペプチドの天然のHNHおよび/またはHNH様ドメインに直列に(例えば、隣接して)起こり得る。挿入されたHNHおよび/またはHNH様ドメインは、変異を含み得る。挿入されたHNHおよび/またはHNH様ドメインは、該ドメインのヌクレアーゼ活性を低減する変異を含み得る。RuvCおよび/またはRuvC様ドメインが、部位特異的ポリペプチド中に挿入され得る。挿入は、部位特異的ポリペプチド中に任意の位置において起こり得る。挿入は、部位特異的ポリペプチドの天然のRuvCおよび/またはRuvC様ドメインに直列に(例えば、隣接して)起こり得る。挿入されたRuvCおよび/またはRuvC様ドメインは、変異を含み得る。挿入されたRuvCおよび/またはRuvC様ドメインは、該ドメインのヌクレアーゼ活性を低減する変異を含み得る。

20

30

【0500】

部位特異的ポリペプチドはRNA-DNAハイブリッド(例えば、RNaseドメイン、ジンクフィンガードメイン)に結合することのできるポリペプチドドメインを含むように操作されることが出来る。例えば、部位特異的ポリペプチドは、RNaseHドメインを含むように操作されることが出来る。挿入されたRNaseHドメインは、変異を含み得る。挿入されたRNaseHドメインは、該ドメインのヌクレアーゼ活性を低減する変異を含み得る。

40

【0501】

部位特異的ポリペプチドは、二本鎖DNA(例えば、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを含むドメイン、ロイシンジッパーモチーフを含むドメイン、ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフを含むドメイン、ジンクフィンガードメインを含むドメイン)に結合することのできるポリペプチドドメインを含むように操作されることが出来る。たとえば、部位特異的ポリペプチドは、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを含むように操作されることが出来る。ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフの非限定例としては、dnaB、TetR、MuB、P2R、CysB、BirA、バクテリオファージラムダリプレッサー、Engrailed、Myb、LuxR、MarR、ETS、ZNF10a、Kox-1からのものが挙げられる。ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフ

50

は、2重らせん、3重らせん、4重らせん、翼状ヘリックス-ターン-ヘリックスまたは他の改変されたヘリックス-ループ-ヘリックスであることができる。挿入されたドメインは、変異を含み得る。挿入されたドメインは、該ドメインのヌクレアーゼ活性を低減する変異を含み得る。

【0502】

補償変異 (compensatory mutation)

部位特異的ポリペプチドは、変異したおよび/または操作された核酸ターゲティング核酸に優先的に結合し得るように、変異を含むおよび/または操作されることができる。部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の対のそのような変異は、補償変異と呼ばれることができる。例えば、部位特異的ポリペプチドは、そのヌクレアーゼドメイン(例えば、HNHおよび/またはHNH様、RuvCおよび/またはRuvC様)が、核酸結合ドメイン(例えば、Cys4、Cas5、Cas6核酸結合ドメイン)により置換されるように操作されることができる。部位特異的ポリペプチドは、核酸結合ドメイン(例えば、Cys4、Cas5、Cas6核酸結合ドメイン)が部位特異的ポリペプチド中に挿入されるように、操作されることができる。得られた部位特異的ポリペプチドは、核酸結合ドメイン結合部位(例えば、Cys4、Cas5、Cas6核酸結合ドメイン)を含むように変異および/または操作された核酸ターゲティング核酸に結合することができる。核酸ターゲティング核酸は、最小のtracrRNA配列中に核酸結合ドメイン結合部位を含むように変異および/または操作されることができる。核酸ターゲティング核酸は、3'tracrRNA配列中の核酸結合ドメイン結合部位を含むように変異および/または操作されることができる。核酸ターゲティング核酸は、tracrRNA伸長部中の核酸結合ドメイン結合部位を含むように変異および/または操作されることができる。

10

20

【0503】

いくつかの場合において、部位特異的ポリペプチドは、S.ピオゲネスからのCas9に対する少なくとも15%のアミノ酸同一性を含むアミノ酸配列、2つの核酸切断ドメイン(すなわち、HNHドメインおよびRuvCドメイン)および該部位特異的ポリペプチドが操作された核酸ターゲティング核酸に結合できるが、未改変の核酸ターゲティング核酸には結合できない、補償変異を含む。

【0504】

粘着末端および平滑末端を作成する方法

いくつかの場合において、1つまたはそれ以上のニッカーゼ(すなわち、1つの実質的に不活性なヌクレアーゼドメインを含む部位特異的ポリペプチド)が、標的核酸中にターゲティングされた二本鎖切断を作成するために使用されることができる。1つまたはそれ以上のニッカーゼのそれぞれは、二本鎖標的核酸うちの1つの鎖をターゲティングすることができる。いくつかの場合において、2つのニッカーゼが、ターゲティングされた二本鎖切断を作成するために使用されることができる。

30

【0505】

2つのニッカーゼは、標的核酸を切断して、(標的核酸の切断部位が各鎖上の同じ位置にある)平滑末端切断を作成されることができる。2つのニッカーゼは、いくつかの一本鎖ヌクレオチドが残るように各鎖内の異なる位置で標的核酸を切断し、それによって粘着末端を作成されることができる。

40

【0506】

ニッカーゼ活性を有する2つの改変された部位特異的ポリペプチドによる標的核酸の切断は、標的核酸を切断し、外来的に提供されるドナーポリヌクレオチドの非存在下で細胞が配列を修復するのを可能とすることによって、標的核酸からの核酸材料の欠失または挿入をもたらすために使用され得る。いくつかの場合において、本開示の方法は、遺伝子をノックアウトするために使用されることができる。核酸ターゲティング核酸およびニッカーゼ活性を有する2つの改変された部位特異的ポリペプチドが、標的核酸に対する相同性を有するセグメントを少なくとも含むドナーポリヌクレオチド配列とともに細胞に同時投与される場合、新たな核酸材料が該部位に挿入/複製され得る。そのような方法は、(例

50

例えば、タンパク質をコードする核酸、s i R N A、m i R N Aなどを「ノックイン」するために)核酸材料を標的核酸に付加(すなわち、挿入または置換)するため、タグ(例えば、6 x H i s、蛍光たんぱく質(例えば、緑色蛍光たんぱく質;黄色蛍光たんぱく質など)、ヘマグルチニン(H A)、F L A Gなど)を付加するため、遺伝子に調節配列(例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、内部リボソーム進入配列(I R E S)、2 Aペプチド、開始コドン、停止コドン、スプライスシグナル、局在化シグナルなど)を付加するため、核酸配列を改変する(例えば、変異を導入する)ためなどに使用され得る。

【0507】

図32は、ニッカーゼにより平滑末端を作成するための方法を示す。標的核酸二本鎖3210は、複数のPAM配列3215(枠で囲んだ)を含むことができ、ここで、1つのPAMが標的核酸3210の一方の鎖上にあり、1つのPAMは標的核酸3210の他方の鎖上にある。ニッカーゼとの複合体(ニッカーゼは示されない)の一部としての核酸ターゲティング核酸3205は、標的核酸3210の各鎖上のPAM3215に隣接するスパーサー配列にハイブリダイズすることができる。ニッカーゼは、標的核酸3210の一方の鎖を切断することができる。切断は、三角により示される。PAMが適切な間隔にあれば、ニッカーゼは各鎖の実質的に同じ場所で標的核酸を切断することができ、それによって平滑末端が生じる。PAM配列は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40または50またはそれ以上のヌクレオチドで隔てられ得る。PAM配列は、最大で約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40または50またはそれ以上のヌクレオチドで隔てられ得る。いくつかの場合において、PAMは、6ヌクレオチドで隔てられ得る(すなわち、各PAMの間に6ヌクレオチドがある)。いくつかの場合において、核酸ターゲティング核酸は、PAMの5'の約3ヌクレオチドを切断する。

【0508】

いくつかの実施態様において、粘着末端を作成するために、2つまたはそれ以上のニッカーゼが使用されることができる。図33は、標的核酸のオーバーラップ領域をターゲティングする2つのニッカーゼが、どのように粘着末端を生じる二本鎖のずれた裂け目をもたらすことができるかを図解する。標的核酸二本鎖3310は、複数のPAM配列3315(枠で囲んだ)を含むことができる。ニッカーゼとの複合体(ニッカーゼは示されない)の一部としての核酸ターゲティング核酸3305は、標的核酸3310の各鎖上のPAM3315に隣接するスパーサー配列にハイブリダイズすることができる。ニッカーゼは、標的核酸3310の一方の鎖を切断することができる。切断は、三角により示される。PAMが適切な間隔にあれば、ニッカーゼはずれた位置で標的核酸を切断することができ、それによって粘着末端が生じる。PAM配列は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10またはそれ以上のヌクレオチドで隔てられ得る。PAM配列は、最大で約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10またはそれ以上のヌクレオチドで隔てられ得る。PAM配列の距離は、作成された粘着末端の長さに関連することができる。例えば、PAMが互いに遠いほど、粘着末端は長くなる。

【0509】

2つまたはそれ以上のニッカーゼを使用して粘着末端を作成するための方法は、(反対の鎖上であるが)相互に実質的に隣接したPAM配列を含むことができる。いくつかの場合において、PAM配列は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10またはそれ以上のヌクレオチドで隔てられ得る。いくつかの場合において、PAM配列は、最大で約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10またはそれ以上のヌクレオチドで隔てられ得る。いくつかの場合において、PAM配列は1つのヌクレオチドで隔てられる。いくつかの場合において、PAM配列は、ヌクレオチドなしで隔てられる。

【0510】

標的核酸の濃縮および配列決定のための方法
総括

10

20

30

40

50

配列決定は、変異および/または他の配列変種（例えば、多型）を同定することによって疾患を診断するために有用であることができる。本開示の方法は、増幅方法を使用することなく、標的核酸配列を濃縮するための方法、キットおよび組成物を提供する。標的核酸は、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の使用によって濃縮されることができる。

【0511】

図3は、本開示の方法の代表的な実施態様を示す。部位特異的ポリペプチド305は、核酸ターゲティング核酸310を結合し、それによって、複合体306を形成することができる。核酸ターゲティング核酸310は、核酸親和性タグ（*affinity tag*）311を含むことができる。部位特異的ポリペプチド305は、ヌクレアーゼドメインを含むことができる。部位特異的ポリペプチド305は、酵素的に活性であることができる。部位特異的ポリペプチド305は、親和性タグ315を含むことができる。核酸ターゲティング核酸310は、標的核酸320にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施態様において、複数の複合体306が、標的核酸320内の複数の位置にハイブリダイズすることができる。切断工程325において、部位特異的ポリペプチド305のヌクレアーゼドメインが、標的核酸320を切断または切り取る330。切り出された標的核酸340は、精製工程335において精製されることができる。アダプター345が切り出された標的核酸に連結されることができる。アダプターは、切り出された標的核酸の配列決定を容易化することができる。

10

【0512】

図4は、本開示の方法の代表的な実施態様を示す。部位特異的ポリペプチド405は、核酸ターゲティング核酸410と相互作用し、それによって、複合体406を形成することができる。部位特異的ポリペプチド405は、ヌクレアーゼドメインを含むことができる。いくつかの実施態様において、部位特異的ポリペプチド405のヌクレアーゼドメインは、酵素的に不活性であることができる。部位特異的ポリペプチド405は、親和性タグ415を含むことができる。核酸ターゲティング核酸410は、標的核酸420にハイブリダイズすることができる。核酸ターゲティング核酸410は、核酸親和性タグ411を含むことができる。核酸ターゲティング核酸の親和性タグ411は、ヘアピン構造を含むことができる。複数の複合体406が、標的核酸420内の複数の位置にハイブリダイズすることができる。断片化工程225において、標的核酸420は、（本明細書中で「標的核酸」とも呼ばれる）標的核酸断片445に断片化されることができる。部位特異的ポリペプチド405は、部位特異的ポリペプチド405の親和性タグ415に結合することができる捕捉剤440によって精製されることができる。断片化された標的核酸445は、精製工程450において複合体406から溶離されることができる。同工程において、または場合により異なる工程において、アダプター455は、標的核酸に連結されることができる。アダプターは、標的核酸の配列決定を容易化することができる。

20

30

【0513】

核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドの複合体

核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9などの核酸誘導ヌクレアーゼ）と相互作用し、それによって、複合体を形成することができる。核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリペプチドを標的核酸に誘導することができる。

40

【0514】

いくつかの実施態様において、核酸ターゲティング核酸は、（例えば、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む）複合体が部位特異的ポリペプチドの切断部位の外側に結合できるように、操作されることができる。この場合、標的核酸は、複合体と相互作用することができず、標的核酸は（例えば、複合体から遊離して）切り出されることができる。

【0515】

いくつかの実施態様において、核酸ターゲティング核酸は、複合体が部位特異的ポリペプチドの切断部位の内側に結合できるように、操作されることができる。この

50

場合、標的核酸は、複合体と相互作用することができ、標的核酸は（例えば、複合体に結合されて）結合されることができる。

【0516】

核酸ターゲティング核酸は、（例えば、部位特異的ポリペプチドおよび/または核酸ターゲティング核酸を含む）複合体が核酸サンプル内の複数の位置にハイブリダイズできるように、操作されることができる。

【0517】

複数の複合体が核酸サンプルに接触させられることができる。複数の複合体は、同じ配列にハイブリダイズするように操作された核酸ターゲティング核酸を含むことができる。複数の複合体は、異なる配列にハイブリダイズするように操作された核酸ターゲティング核酸を含むことができる。

10

【0518】

配列は、標的核酸内の異なる位置にあることができる。位置は、同じ、または同様の標的核酸配列を含むことができる。位置は、異なる標的核酸配列を含むことができる。位置は、互いに定義された距離にあることができる。位置は、10キロ塩基（Kb）未満離れている、8 Kb未満離れている、6 Kb未満離れている、4 Kb未満離れている、2 Kb未満離れている、1 Kb未満離れている、900ヌクレオチド未満離れている、800ヌクレオチド未満離れている、700ヌクレオチド未満離れている、600ヌクレオチド未満離れている、500ヌクレオチド未満離れている、400ヌクレオチド未満離れている、300ヌクレオチド未満離れている、200ヌクレオチド未満離れている、100ヌクレオチド未満離れていることができる。

20

【0519】

複合体は、標的核酸を切断することができ、10キロ塩基（Kb）未満の長さ、8 Kb未満の長さ、6 Kb未満の長さ、4 Kb未満の長さ、2 Kb未満の長さ、1 Kb未満の長さ、900ヌクレオチド未満の長さ、800ヌクレオチド未満の長さ、700ヌクレオチド未満の長さ、600ヌクレオチド未満の長さ、500ヌクレオチド未満の長さ、400ヌクレオチド未満の長さ、300ヌクレオチド未満の長さ、200ヌクレオチド未満の長さ、100ヌクレオチド未満の長さの切り出された標的核酸を生じることができる。

【0520】

複合体は、10キロ塩基（Kb）未満の長さ、8 Kb未満の長さ、6 Kb未満の長さ、4 Kb未満の長さ、2 Kb未満の長さ、1 Kb未満の長さ、900ヌクレオチド未満の長さ、800ヌクレオチド未満の長さ、700ヌクレオチド未満の長さ、600ヌクレオチド未満の長さ、500ヌクレオチド未満の長さ、400ヌクレオチド未満の長さ、300ヌクレオチド未満の長さ、200ヌクレオチド未満の長さ、100ヌクレオチド未満の長さであることができる断片化された標的核酸に結合することができる。

30

【0521】

部位特異的ポリペプチドのオフターゲットの結合部位を検出するための方法

総括

本開示は、部位特異的ポリペプチドのオフターゲットの結合部位を決定するための方法、組成物、系および/またはキットを記載する。本開示のいくつかの実施態様において、部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸を含み、それによって複合体を形成することができる。複合体は、標的核酸と接触させられることができる。標的核酸は、複合体の親和性タグに結合することができる捕捉剤により捕捉されることができる。標的核酸の同一性は、配列決定によって決定されることができる。配列決定（例えば、Illumina、Ion Torrentなどのハイスループット配列決定）は、特別な結合部位が読み取られる回数を計数することによって、部位特異的ポリペプチドおよび/または複合体のオフターゲットの結合部位の頻度を同定することができる。本開示の方法、組成物、系および/またはキットは、より正確かつ特異的にターゲティングされた部位特異的ポリペプチドの開発を容易化することができる。

40

【0522】

50

図5は、本開示の方法の代表的な実施態様を示す。部位特異的ポリペプチド505は、親和性タグ510を含むことができる。部位特異的ポリペプチドは、核酸結合ドメイン515を含むことができる。核酸結合ドメイン515は、核酸であることができる。いくつかの実施態様において、核酸結合ドメイン515および部位特異的ポリペプチド505は、複合体531を形成することができる。複合体531は、標的核酸530と接触させられることができる(525)。好ましい実施態様において、標的核酸530は、DNA(例えばゲノムDNAまたはgDNA)である。複合体は、捕捉剤540によってアフィニティー精製される(535)。捕捉剤540は、部位特異的ポリペプチド505からの親和性タグ510に結合することができる。捕捉剤540は、第2の親和性タグ545を含むことができる。捕捉剤540は、固体支持体555に結合することによってアフィニティー精製される(550)。いくつかの実施態様において、固体支持体555は、捕捉剤の親和性タグ545に結合することのできるアフィニティー試薬でコーティングされたビーズである。場合により、固体支持体555は、精製を容易化するために、部位特異的ポリペプチド505の親和性タグ510に結合することができる。いくつかの実施態様において、1回またはそれ以上の精製が行われることができる。各回は、固体支持体555を部位特異的ポリペプチド510および/または捕捉剤545の親和性タグと接触させることを含むことができる。アフィニティー精製された複合体が、標的核酸530から溶離される(560)ことができる。続いて、標的核酸はさらなる加工処理のために調製される(565)ことができる。加工処理は、下流の分析方法、例えば、配列決定を含むことができる。

10

20

【0523】

図6は、本開示の方法の代表的な実施態様を示す。部位特異的ポリペプチド605は、親和性タグ610を含むことができる。部位特異的ポリペプチド605は、核酸結合ドメイン615を含むことができる。核酸結合ドメイン615は、核酸であることができる。いくつかの実施態様において、核酸結合ドメイン615は、親和性タグ620を含むことができる。いくつかの実施態様において、核酸結合ドメイン615および部位特異的ポリペプチド605は、複合体631を形成することができる。複合体631は、標的核酸630と接触させられることができる(625)。好ましい実施態様において、標的核酸630はDNAである。複合体631は、捕捉剤640によってアフィニティー精製される(635)ことができる。捕捉剤640は、条件的に、酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドであることができる。捕捉剤640は、条件的に、Csy4の酵素的に不活性な変種であることができる。捕捉剤640は、親和性タグ620に結合することができる。捕捉剤640は、親和性タグ645を含むことができる。捕捉剤640は、固体支持体655に結合することによって、アフィニティー精製される(650)ことができる。いくつかの実施態様において、固体支持体は、捕捉剤640の親和性タグ645に結合することのできるアフィニティー試薬でコーティングされたビーズである。場合により、固体支持体655は、精製を容易化するために、部位特異的ポリペプチド605の親和性タグ610に結合することができる。いくつかの実施態様において、2回の精製が行われることができ、各回は、固体支持体655を部位特異的ポリペプチド610および/または捕捉剤640の親和性タグと接触させることを含むことができる。親和性タグ620の切断は、標的核酸630の固体支持体655からの溶離(660)を容易化することができる。続いて、標的核酸630は、配列決定のような、さらなる下流の分析方法のために調製される(665)ことができる。

30

40

【0524】

方法

本開示は、ヌクレアーゼの免疫沈降および配列決定(NIP-Seq)のための方法を提供する。いくつかの実施態様において、方法は、a)核酸サンプルを、酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチド、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体と接触させる工程を含むことができる。複合体は、標的核酸にハイブリダイズすることができる。複合体は、捕捉剤によって捕捉される(670)ことができ、複合体に結合した標

50

的核酸は、配列決定されることができる。いくつかの実施態様において、方法は、オフターゲットの結合部位の同一性を決定する工程をさらに含むことができる。方法は、本明細書に記載の、部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施されることができる。

【0525】

方法は、細胞の外側で実施されることができる。例えば、サンプルは、精製されたゲノムDNA、細胞ライセート、均質化された組織、血漿などを含むことができる。方法は、細胞中で実施されることができる。

【0526】

部位特異的ポリペプチド-標的核酸複合体は、複合体を形成するために、固定化されるかまたは架橋されることができる。細胞は、溶解される前に架橋されることができる。固定化されたまたは架橋した細胞は、細胞中のタンパク質-DNA複合体を安定化することができる。好適な固定化剤および架橋剤は、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、エタノールに基づく固定化剤、メタノールに基づく固定化剤、アセトン、酢酸、四酸化オスミウム、重クロム酸カリウム、クロム酸、過マンガン酸カリウム、水銀製剤、ピクリン酸塩、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、ビス[スルホスクシニミジル]スベレート(BS3)、3,3'-ジチオビス[スルホスクシニミジルプロピオネート](DTSSP)、エチレングリコールビス[スルホスクシジミジルスクシネート(スルホ-EGS)、ジスクシニミジルグルタレート(DSG)、ジチオビス[スクシニミジルプロピオネート](DSP)、ジスクシニミジルスベレート(DSS)、エチレングリコールビス[スクシニミジルスクシネート](EGS)のようなアミン反応性NHS-エステル架橋剤、NHS-ジアジリン、NHS-LC-ジアジリン、NHS-SS-ジアジリン、スルホ-NHS-ジアジリン、スルホ-NHS-LC-ジアジリンおよびスルホ-NHS-SS-ジアジリンのようなNHS-エステル/ジアジリン架橋剤を含むことができる。

【0527】

核酸(例えば、ゲノムDNA)は、アフィニティー精製の前にDNAを断片化するために処理されることができる。断片化は、物理的、機械的または酵素的方法によって実施されることができる。物理的断片化は、標的ポリヌクレオチドを熱または紫外(UV)光に曝露することを含む。機械的破壊は、標的ポリヌクレオチドを所望の範囲の断片に機械的にせん断するために使用され得る。機械的せん断は、標的ポリヌクレオチドの繰り返しのピペッティング、超音波処理および噴霧化を含む、本分野で知られた多くの方法によって達成され得る。標的ポリヌクレオチドは、酵素的方法によっても断片化され得る。いくつかの場合において、制限酵素の使用などの酵素を使用して酵素消化が実施され得る。制限酵素は、標的ポリヌクレオチドの特異的または非特異的断片化を実施するために使用され得る。方法は、一般にI型酵素、II型酵素および/またはIII型酵素と記述される1つまたはそれ以上の型の制限酵素を使用し得る。II型およびIII型酵素は、一般に市販され、本分野で周知である。II型およびIII型酵素は、二本鎖ポリヌクレオチド配列内のヌクレオチドの特定の配列(「認識配列」または「認識部位」)を認識する。これらの配列の結合および認識に際して、II型およびIII型酵素は、ポリヌクレオチド配列を切断する。いくつかの場合において、切断は、「粘着末端」と呼ばれるオーバーハングした一本鎖DNAの部分を有するポリヌクレオチド断片を生じる。他の場合において、切断は、オーバーハングを有する断片を生じず、「平滑末端」を作り出す。方法は、粘着末端または平滑末端のいずれかを作成する制限酵素の使用を含み得る。核酸の断片は、増幅技術(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、長距離ポリメラーゼ連鎖反応、線形(linear)ポリメラーゼ連鎖反応など)を介しても作成されることができる。

【0528】

断片化されると、部位特異的ポリペプチドを含む複合体は、固体支持体とのインキュベーションにより精製されることができる。例えば、部位特異的ポリペプチドがビオチンタグを含む場合、固体支持体は、ビオチンタグに結合するためにアビジンまたはストレプト

10

20

30

40

50

アビジンによりコーティングされることができる。

【0529】

いくつかの実施態様において、断片化されると、部位特異的ポリペプチド、標的核酸および/または核酸ターゲティング核酸を含む複合体は、捕捉剤とのインキュベーションによって精製される。捕捉剤は、部位特異的ポリペプチドに融合された親和性タグに結合することのできる任意の作用物質を意味することができる。代表的な捕捉剤は、ビオチン、ストレプトアビジンおよび抗体を含むことができる。例えば、部位特異的ポリペプチドに融合された親和性タグがFLAGタグである場合、捕捉剤は抗FLAGタグ抗体である。いくつかの実施態様において、捕捉剤は、親和性タグ（例えば、ビオチン、ストレプトアビジン）を含むことができる。

10

【0530】

いくつかの場合において、捕捉剤は、酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼである。例えば、捕捉剤は、酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチド、酵素的に不活性なCsy4、Cas5またはCas6であることができる。

【0531】

捕捉剤は、固体支持体によって精製されることができる。例えば捕捉剤がビオチンタグを含む場合、ビオチン化された捕捉剤を結合するために、ビーズがアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされることができる。

【0532】

方法のいくつかの実施態様において、2回またはそれ以上の精製が実施されることができる。少なくとも1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回またはそれ以上の精製が実施されることができる。最大で1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回またはそれ以上の精製が実施されることができる。初回の精製は、捕捉剤の親和性タグに結合することのできる固体支持体による精製を含むことができ、2回目の精製は、部位特異的ポリペプチドの親和性タグに結合することのできる固体支持体による精製を含むことができる。初回の精製は、部位特異的ポリペプチドの親和性タグに結合することのできる固体支持体による精製を含むことができ、2回目の精製は、捕捉剤の親和性タグに結合することのできる固体支持体による精製を含むことができる。方法は、該方法を2回以上実施することによって、部位特異的ポリペプチドの結合特異性を最適化するために使用されることができる。

20

30

【0533】

捕捉された複合体は、部位特異的ポリペプチドおよび標的核酸を含むことができる。標的核酸は、高塩濃度洗浄（high salt washing）、エタノール沈殿、沸騰およびゲル精製のような方法によって部位特異的ポリヌクレオチド複合体から溶離されることができる。

【0534】

溶離されたDNAは、配列決定解析（例えば、せん断、アダプターの連結）のために調製されることができる。配列決定解析のための調製は、溶離された標的核酸の配列決定ライブラリーの作成を含むことができる。配列決定解析は、部位特異的ポリペプチドのオフターゲットの結合部位の同一性および頻度を決定することができる。配列決定は、好ましくは、ハイスループットな連続的方法を使用して並行して多くの配列が読み取られる、本質的に並行したやり方で、多くの（典型的に、何千から何十億の）核酸配列を決定する方法を使用して実施されることもできる。そのような方法は、（例えば、454 Life Sciences, Inc., Branford, Conn.により市販される）ピロシーケンシング；（例えば、SOLID（商標）技術、Life Technology, Inc., Carlsbad, Calif.において市販される）連結による配列決定；（Illumina, Inc., San Diego, Calif.によるTruSeq（商標）およびHiSeq（商標）技術、Helicos Biosciences Corporation, Cambridge, Mass.によるHeliscope（商標）ならびにPacific Biosciences of

40

50

California, Inc., Menlo Park, Calif.による PacBio RSにおいて市販されるような) 改変されたヌクレオチドを使用する合成による配列決定、イオン検出技術による配列決定 (Ion Torrent, Inc., South San Francisco, Calif.)、DNA ナノボールの配列決定 (Complete Genomics, Inc., Mountain View, Calif.); (例えば、Oxford Nanopore Technologies, LTD, Oxford, UKにより開発された) ナノポアに基づく配列決定技術および他の知られた高並列化配列決定法を含むが、これらに限定されない。

【0535】

いくつかの実施態様において、方法は、データを収集する工程およびデータを保存する工程をさらに含む。データは、機械により読み取り可能であることができ、コンピュータサーバーに保存および/または収集可能である (例えば、図31および実施例27)。

10

【0536】

核酸中の配列変種を検出するための方法

総括

いくつかの実施態様において、本開示の方法は、核酸中の配列変種を検出することを提供する。該方法は、本明細書に記載の部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施されることができる。図7に示されるように、核酸サンプル705は核酸タグ710と連結されることができる720。核酸タグは、シングルガイド (single guide) RNAであることができる。核酸タグは、crRNAを含むことができる。核酸タグは、検出可能な標識715を含むことができる。核酸タグ710に連結された核酸サンプル705は、全体として、タグ付き試験サンプル721と呼ばれることができる。タグ付き試験サンプル721は、固定化されたオリゴヌクレオチド735を含むアレイ740に接触させられることができる725。固定化されたオリゴヌクレオチド735は、核酸ライブラリー (nucleic acid library) と呼ばれることができる。オリゴヌクレオチド735は、二本鎖DNAであることができる。オリゴヌクレオチド735は、検出可能な標識730を含むことができる。タグ付き試験サンプル721の個々の構成要素は、ハイブリダイゼーションを容易化するための十分な相補性をそれらが共有するオリゴヌクレオチド735にハイブリダイズすることができる745。ハイブリダイゼーションの量は、2つの検出可能な標識715および730の強度を比較することによって定量化されることができる。例えば、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドは、2つの検出可能な標識を表示することができる。ハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドは、1つの検出可能な標識730を表示することができる。ハイブリダイズしたサンプルは、部位特異的ポリペプチド750と接触させられることができる。部位特異的ポリペプチドは、タグ付き試験サンプル721の構成要素とハイブリダイズした、アレイ740中のオリゴヌクレオチド735を切断することができる755。部位特異的ポリペプチドによる切断は、タグ付き試験サンプル721のハイブリダイズした構成要素が除去されることを可能とすることができる。部位特異的ポリペプチド750による切断後、ハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドの検出可能な標識760のみが、アレイ上に残る。残った検出可能な標識760は定量化されることができる。残った検出可能な標識760の定量化は、核酸サンプル705中にどの配列が表されたかおよびどれが表されなかったかに関係付けられることができる。残った検出可能な標識760を表示しないオリゴヌクレオチドは、核酸サンプル705中に表された配列に対応する。残った検出可能な標識760を表示するオリゴヌクレオチドは、核酸サンプル705中に表されなかった配列に対応する。

20

30

40

【0537】

いくつかの実施態様において、核酸サンプル805は、核酸タグ810と連結されることができる820。核酸タグは、シングルガイドRNAであることができる。核酸タグは、crRNAを含むことができる。核酸タグは、検出可能な標識815を含むことができ

50

る。核酸タグに連結された核酸サンプルは、全体として、タグ付き試験サンプル 8 2 1 と呼ばれることができる。タグ付き試験サンプル 8 2 1 は、固定化されたオリゴヌクレオチド 8 3 5 を含むアレイ 8 4 0 に接触させられることができる 8 2 5。固定化されたオリゴヌクレオチドは、核酸ライブラリーと呼ばれることができる。オリゴヌクレオチド 8 3 5 は、二本鎖 DNA であることができる。タグ付き試験サンプル 8 2 1 の個々の構成要素は、ハイブリダイゼーションを容易化するための十分な相補性をそれらが共有するオリゴヌクレオチド 8 3 5 にハイブリダイズすることができる 8 4 5。ハイブリダイズしたサンプルは、部位特異的ポリペプチド 8 5 0 と接触させられることができる。部位特異的ポリペプチドは、タグ付き試験サンプル 8 2 1 の構成要素とハイブリダイズした、アレイ 8 4 0 中のオリゴヌクレオチド 8 3 5 を切断することができる 8 5 5。部位特異的ポリペプチド 8 5 0 による切断は、タグ付き試験サンプル 8 2 1 のハイブリダイズした構成要素が除去されることを可能とすることができる。部位特異的ポリペプチド 8 5 0 による切断は、固定化されたオリゴヌクレオチドの一部が切断され、アレイ 8 6 0 から分離されることを可能とすることができる。分離された切断オリゴヌクレオチド 8 6 0 は、配列決定のために適切なアダプター 8 7 0 に連結されることのできる 8 6 5。切断されたオリゴヌクレオチド 8 6 0 の配列決定は、核酸サンプル 8 0 5 中に表される配列を決定することができる。

【 0 5 3 8 】

いくつかの実施態様において、市販のハイスループット配列決定プラットフォームを使用して、核酸ライブラリーが配列決定解析のために作成されることのできる。該ライブラリーは、1つまたはそれ以上の配列決定タグ 9 3 0 および標的配列 9 4 5 を含むことのできる核酸を含むことができる。標的配列 9 4 5 は、核酸サンプル 9 0 5 中に表され得る配列であることができる。標的配列 9 4 5 は、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列を含むことができる。場合により、核酸ライブラリー中の核酸は、1つまたはそれ以上の同定用ポリヌクレオチド配列 (*identifying polynucleotide sequences*) 9 3 5、および1つまたはそれ以上の伸長配列 9 4 0 を含むことができる。この実施態様において、核酸サンプル 9 0 5 が、核酸タグ 9 1 0 と連結されることのできる 9 2 0。核酸タグはシングルガイド RNA であることができる。核酸タグは、*crRNA* を含むことができる。場合により、核酸タグは、親和性タグ 9 1 5 を含むことができる。核酸タグに連結された核酸サンプルは、全体として、タグ付き試験サンプル 9 2 1 と呼ばれることができる。タグ付き試験サンプル 9 2 1 は、核酸ライブラリーに接触させられることのできる 9 2 5。タグ付き試験サンプル 9 2 1 は、核酸ライブラリー中の核酸にハイブリダイズし、複合体 9 4 6 を形成することができる。ハイブリダイズしたタグ付き試験サンプルおよび核酸ライブラリーは、部位特異的ポリペプチド 9 5 0 と接触させられることができる。部位特異的ポリペプチド 9 5 0 は、ハイブリダイズした核酸ライブラリーの構成要素を切断することができる。切断された核酸ライブラリーの構成要素 9 6 5 は、未切断の構成要素から分離されることのできる。未切断の構成要素は、配列決定解析に供されることのできる。配列決定解析は、どの配列が核酸サンプル 9 0 5 中で表されたかを決定することができる。例えば、未切断の構成要素の配列は、核酸サンプル 9 0 5 中で表されなかった配列に相当することができる。これらの配列は、核酸ライブラリー中の既知の配列から除去されることのできる。結果として生じる配列は、核酸ライブラリーの切断された構成要素 9 6 5 の配列であることができ、核酸サンプル 9 0 5 中で表された配列に相当することができる。

【 0 5 3 9 】

部位特異的ポリペプチド 9 5 0 は、親和性タグ 9 5 5 を含むことができる。場合により、部位特異的ポリペプチド 9 5 0 は、部位特異的ポリペプチドの酵素的に不活性な変種であることができる。いくつかの実施態様において、酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、ハイブリダイズした核酸ライブラリー (例えば、複合体 9 4 6) と接触させられることができる。部位特異的ポリペプチドは、ハイブリダイズした核酸ライブラリーの構成要素を結合することができるが、切断することはできない。部位特異的ポリペプチドは、親和性タグ 9 5 5 に結合することのできる捕捉剤 9 7 5 によってアフィニティー精製さ

10

20

30

40

50

ることができる970。場合により、複合体946は、親和性タグ915に結合することができる捕捉剤によってアフィニティー精製されることができる。アフィニティー精製された核酸ライブラリーの構成要素は、配列決定解析に供されることができる。この実施態様において、配列決定された核酸ライブラリーの構成要素は、核酸サンプル905中で表される配列に対応することができる。

【0540】

配列決定

配列変種を検出するための方法は、変種を配列決定することを含むことができる。配列決定は、好ましくは、ハイスループットな連続的方法を使用して、並行して多くの配列が読み取られる、本質的に並行したやり方で、多くの（典型的に、何千から何十億の）核酸配列を決定する方法を使用して実施されることができる。そのような方法は、（例えば、454 Life Sciences, Inc., Brandford, Conn.により市販される）ピロシーケンシング；（例えば、SOLiD（商標）技術、Life Technology, Inc., Carlsbad, Calif.において市販される）連結による配列決定；（Illumina, Inc., San Diego, Calif.によるTruSeq（商標）およびHiSeq（商標）技術、Helicos Biosciences Corporation, Cambridge, Mass.によるHeliscope（商標）およびPacific Biosciences of California, Inc. Menlo Park, Calif.によるPacBio RSにおいて市販されるような）改変されたヌクレオチドを使用する合成による配列決定、イオン検出技術による配列決定（Ion Torrent, Inc., South San Francisco, Calif.）；DNAナノボールの配列決定（Complete Genomics, Inc., Mountain View, Calif.）；（例えば、Oxford Nanopore Technologies, LTD, Oxford, UKにより開発された）ナノポアに基づく配列決定技術、（例えば、Molecular DynamicsによるMegaBACEにおいて市販されるような）キャピラリー配列決定、電子的配列決定（electronic sequencing）、（例えば、Pacific Biosciences, Menlo Park Calif.によるSMRT（商標）技術において市販されるような）単一分子配列決定（single molecule sequencing）、液滴マイクロ流体配列決定、（Affymetrix, Santa Clara, Calif.により市販されるような）ハイブリダイゼーションによる配列決定、バイサルフェイトシーケンシング（bisulfate sequencing）および他の知られた高並列化配列決定法を含むが、これらに限定されない。

【0541】

リアルタイムPCR

配列変種を検出するための方法は、リアルタイムPCRを使用して変種を検出することを含むことができる。配列決定は、サンプル中に存在する増幅可能な核酸の量を検出することのできるリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（定量的PCR（QPCR）とも呼ばれる、RT-PCR）によって実施されることができる。QPCRは、ポリメラーゼ連鎖反応に基づく技術であり、標的核酸を増幅し、同時に定量化するために使用されることができる。QPCRは、標的核酸サンプル中の特定の配列の検出および定量化の両方を可能とすることができる。手順は、ポリメラーゼ連鎖反応の一般的原理に従うことができ、増幅された標的核酸が各増幅サイクルの後でリアルタイムに反応中に蓄積するため、増幅された標的核酸が定量化されうる、という追加の特徴を有する。定量化の2つの方法は、（1）二本鎖標的核酸にインターカレートする蛍光色素の使用および（2）相補的標的核酸とハイブリダイズしたときに蛍光を発する改変DNAオリゴヌクレオチドプローブ、であることができる。第一の方法において、標的核酸結合色素は、PCRにおけるすべての二本鎖（ds）核酸に結合し、色素の蛍光を生じることができる。PCRの間の核酸産物の増加は、したがって、蛍光強度の増大をもたらすことができ、各サイクルにおいて測定され

10

20

30

40

50

ることができ、こうして、核酸濃度が定量化されることを可能とする。反応は、蛍光 (ds) 核酸色素の添加により、標準的な PCR 反応と同様に準備されることができる。反応は、サーモサイクラーにおいて行われることができ、各サイクルの後に、検出器によって、蛍光のレベルが測定されることができ；色素は、(ds) 核酸 (すなわち、PCR 産物) に結合した時にのみ、蛍光を発することができる。標準希釈液を参照して、PCR における (ds) 核酸濃度が決定されることができ。得られた値は、それに関連した絶対単位を有することができない。測定された DNA / RNA サンプルの標準希釈液に対する比較は、標準液に対するサンプルの比率または割合を与えることができ、異なる組織または実験条件の間の相対的比較を可能とする。定量化における精度を確実にするために、標的遺伝子の発現は、安定して発現される遺伝子に対して正規化されることができ。これは、サンプル間の核酸の量または質における可能性のある相違の補正を可能とすることができる。第2の方法は、プローブ配列を含有する核酸のみを定量化するために、配列特異的な RNA または DNA に基づくプローブの使用することができ；したがって、レポータープローブの使用は、特異性を増大させることができ、何等かの非特異的核酸増幅の存在下でさえ、定量化を可能とすることができる。これは、すべての遺伝子が同様の効率で増幅されるという条件で、多重化 (すなわち、異なる色の標識を伴う特異的プローブを使用することによって、同じ反応で数種の遺伝子をアッセイすること) を可能とすることができる。この方法は、プローブの一方の末端に蛍光レポーター (例えば、6 - カルボキシフルオレセイン) を、反対の末端に蛍光のクエンチャー (例えば、6 - カルボキシ - テトラメチルローダミン) を有する核酸に基づくプローブによって実施されることができ。クエンチャーにレポーターがごく接近していることは、その蛍光の検出を妨げ得る。ポリメラーゼ (例えば、Taq ポリメラーゼ) の 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性によるプローブの分解は、レポーター - クエンチャーの近接性を解決することができ、したがって、蛍光のクエンチングされない発光を可能とすることができ、これが検出されることができ。各 PCR サイクルにおいてレポータープローブによりターゲティングされる産物の増加は、プローブの分解およびレポーターの放出による蛍光の比例した増加をもたらすことができる。

10

20

【0542】

反応は、標準的な PCR 反応と同様に準備されることができ、レポータープローブが添加されることができ。反応が開始すると、PCR のアニーリング段階の間、プローブとプライマーの両方が標的核酸にアニールすることができ。新しい DNA 鎖の多量体化は、プライマーから開始されることができ、ポリメラーゼがプローブに到達すると、その 5' - 3' エキソヌクレアーゼがプローブを分解し、クエンチャーから蛍光レポーターを物理的に分離して蛍光の増加をもたらす。リアルタイム PCR サーモサイクラーにおいて蛍光が検出され、測定されることができ、蛍光の幾何学的増加は産物の指数関数的増加に対応することができ、各反応における閾値サイクルを決定するために使用される。反応の指数関数相の間に存在する DNA の相対濃度は、対数スケールにおいて、サイクル数に対して蛍光をプロットすることによって決定されることができ (したがって、指数関数的増量は、直線を与えることができる)。バックグラウンドより高い蛍光の検出のための閾値が決定されることができ。サンプルからの蛍光が閾値を超えるサイクルは、サイクル閾値、Ct と呼ばれることができる。DNA の量が指数相の間はサイクルごとに2倍になることができるため、DNA の相対量が計算されることができ (例えば、別のものよりも Ct が3サイクル早いサンプルは、 $2^3 = 8$ 倍多いテンプレートを有する)。核酸 (例えば、RNA または DNA) の量は、既知量の核酸の連続的希釈液 (例えば、未希釈、1 : 4、1 : 16、1 : 64) のリアルタイム PCR により作られた標準曲線に対して結果を比較することによって決定されることができ。QPCR 反応は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) よりも有利な二元フルオロフォアアプローチを含むことができる (例えば、2つのオリゴヌクレオチドプローブがアンプリコンにアニールすることができ、LIGHTCYCLEFR ハイブリダイゼーションプローブ)。オリゴヌクレオチドは、効率的なエネルギー移動に適合した距離に分離されたフルオロフォアと、頭尾方向にハイブリ

30

40

50

ダイズするように設計されることができる。伸長産物に組み込まれたか、核酸に結合した時にシグナルを放射するように構造化された標識オリゴヌクレオチドの他の例としては：SCORPIONSプローブ、Sunrise（またはAMPLIFLOUR）プライマー、およびLUXプライマーおよびMOLECULAR BEACONSプローブが挙げられる。QPCR反応は、蛍光Taqman方法論およびリアルタイムで蛍光を測定することのできる装置（例えば、ABI Prism 7700 Sequence Detector）を使用することができる。Taqman反応は、2つの異なる蛍光色素で標識されたハイブリダイゼーションプローブを使用することができる。一方の色素は、レポーター色素（6-カルボキシフルオレセイン）であることができ、他方は、クエンチング色素（6-カルボキシ-テトラメチルローダミン）であることができる。プローブが未変化であるとき、蛍光エネルギー移動が起こり、レポーター色素の蛍光発光がクエンチング色素により吸収されることができる。PCRサイクルの伸長相の間、蛍光ハイブリダイゼーションプローブが、DNAポリメラーゼの5'-3'核酸分解活性によって切断されることができる。プローブが切断されると、レポーター色素発光はもはや効率的にクエンチング色素に移動することはできず、レポーター色素蛍光発光スペクトルの増大をもたらす。リアルタイム法または一点検出法（single point detection method）を含む任意の核酸定量法が、サンプル中の核酸の量を定量化するために使用されることができる。検出は、数種の異なる方法論（例えば、染色、標識プローブによるハイブリダイゼーション；ピオチン化プライマーの取り込みとそれに続くアビジン-酵素コンジュゲート検出；dCTPまたはdATPのような32P標識デオキシヌクレオチド三リン酸の増幅されたセグメントへの取り込み）により実施されることができる。定量化は、増幅工程を含むことができるかまたは含むことができない。定量は、実験的であることはできない。

【0543】

マイクロアレイ

配列変種を検出するための方法は、マイクロアレイを使用して変種を配列決定および/または検出することを含むことができる。マイクロアレイは、核酸サンプル中の複数の遺伝子の発現レベルを決定するために使用されることができる。マイクロアレイは、核酸サンプル中の複数の配列の配列同一性を決定するために使用されることができる。

【0544】

マイクロアレイは、基板を含むことができる。基板は、ガラスおよび改変または官能化ガラス、（アクリル系、ポリスチレンおよびスチレンと他の材料のコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、テフロン（登録商標）などを含む）プラスチック、多糖、ナイロンまたはニトロセルロース、樹脂、シリカまたはシリコンおよび改変シリコンを含むシリカに基づく材料、炭素、金属、無機ガラスおよびプラスチックを含むことができるが、これらに限定されない。

【0545】

マイクロアレイは、複数のポリヌクレオチドプローブを含むことができる。マイクロアレイは、約1、10、100、1000、5000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、110000、120000またはそれ以上のプローブを含むことができる。

【0546】

プローブは、長さが少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140ヌクレオチドまたはそれ以上であることができる。

【0547】

いくつかの実施態様において、プローブは、遺伝子および/または種の特定の組に関する配列情報を含むことができる。プローブは、宿主タンパク質をコードする核酸配列に相補的であることができる。プローブは、非コーディング核酸配列に相補的であることができる。プローブは、DNA配列に相補的であることができる。プローブは、RNA配列に

相補的であることができる。

【0548】

プローブは、マイクロアレイ上に固定化されることができる。固体基板上へのポリヌクレオチドの固定化は、固体基板上へのポリヌクレオチドの直接合成（例えば、光リソグラフィ合成）によりまたは固体基板の所定の領域上への先に合成されたポリヌクレオチドの固定化（スポットティング）により達成されることができる。ポリヌクレオチドは、固体基板の表面を求核性官能基（例えば、アミノ基）により活性化すること、優れた脱離基によって活性化された生体分子（例えば、ポリヌクレオチド）を表面が活性化された固体基板にカップリングすることおよび未反応の反応物質を除去することによってマイクロアレイ基板上に固定化されることができる。プローブは、固体基板へ共有結合またはイオン結合によってさらにコンジュゲーションされたビーズに固定化されることができる。プローブは、低い伝導率および低い融点を有する特定の膜、すなわち金膜を使用して基板上に固定化されることができる。印加された電磁放射線は、入射部位において膜を融解することができ、切断されることができる。膜は、コロイド状の分散体と接触させられ、融解に際して、反応部位で対流を生じさせ、それによって、特異的に融解した部位への分散体中の不溶性粒子の接着をもたらすことができる。

10

【0549】

マイクロアレイは、素性の不明な核酸サンプルを参照サンプルと比較することによって、素性の不明な核酸を含む核酸サンプル（例えば、試験サンプル）を分析することができる。核酸サンプルは、DNA（例えば、単離されたDNA、ゲノムDNA、染色体外DNA）から調製されることができる。核酸サンプルは、RNAから調製されることができる。RNAは、遺伝子特異的なプライマーまたはユニバーサルプライマーによってDNAに逆転写されることができる。逆転写されたDNA（例えば、cDNA）は、RNAを加水分解するためにRnaseまたは塩基（例えば、NaOH）で処理されることができる。cDNAは、N-ヒドロキシスクシニミド化学または同様のラベリングケミストリーによって色素（例えば、Cy3、Cy5）で標識されることができる。好適な蛍光色素は、多様な市販の色素およびAlexa、Fluorescein、Rhodamine、FAM、TAMRA、Joe、ROX、Texas Red、BODIPY、FITC、Oregon Green、Lissamineなどと表示される色素誘導体を含むことができる。参照サンプルは、試験サンプルとは異なる色素で標識化されることができる。

20

30

【0550】

試験サンプルおよび参照サンプルは、同時に複数のスポットに接触させるために、マイクロアレイに塗布されることができる。試験サンプルおよび参照サンプルは、核酸サンプル中の核酸がマイクロアレイ上の相補的プローブに結合することを可能とするハイブリダイズ条件下でマイクロアレイに塗布されることができる。マイクロアレイ中の結合した分子によって、結合した反応物質分子の洗浄工程への曝露を含む多様な反応工程が実施されることができる。チップ上に固定化された核酸サンプルを特徴づけするために、反応の進行または結果が、マイクロアレイ中の各スポット（例えば、プローブ）においてモニターされることができる。マイクロアレイ分析は、通常、数分から数時間にわたる可能性のあるインキュベーション期間を必要とし得る。インキュベーション期間の持続時間は、アッセイに依存することができ、反応物質の種類、混合の程度、サンプル体積、標的のコピー数およびアレイの密度などの多様な因子によって決定されることができる。インキュベーション期間の間、核酸サンプル中の核酸は、マイクロアレイプローブに密着していることができる。

40

【0551】

検出は、GSI Lumonics (Bellerica, MA)により提供されるScanArray 3000のような、レーザー励起および光電子増幅管検出を備えた共焦点走査型装置を使用して実施されることができる。方法を実行するために、Axon Instruments (Foster City, CA)、Genetic Microsystems (Santa Clara, CA)、Molecular Dy

50

namics (Sunnyvale, CA) および Virtek (Woburn, MA) により提供されるような共焦点および非共焦点蛍光検出システムが使用されることができる。代替の検出システムは、気体、ダイオードおよび固体レーザーを使用する走査システム並びにキセノンおよびハロゲンランプのような多様な他の種類の光源を使用する走査システムを含むことができる。光増幅管に加えて、検出器は、電荷結合素子 (CCD) および相補型金属酸化物シリコン (CMOS) チップを使用するカメラを含むことができる。

【0552】

試験サンプルおよび参照サンプルからの2つの色素の強度の比が、各プローブに関して比較されることができる。所与のマイクロアレイスポットから検出されたシグナルの強度は、所与のスポット (例えば、スポットがプローブを含む) におけるプローブへのサンプル中の核酸のハイブリダイゼーションの程度に直接比例することができる。ハイブリダイズしたマイクロアレイの蛍光強度の分析は、スポットセグメンテーション、背景判定 (および可能性のある背景除去)、パッドスポットの除去、それに続く、任意の残ったノイズを補正するための正規化の方法を含むことができる。正規化技術は、すべてのスポットまたはハウスキーピング遺伝子のようなスポットのサブセットにおける全体的正規化、より良いベースラインマッチを得るためのプレログシフト、あるいは2つ (またはそれ以上) のチャンネルハイブリダイゼーションの場合には、 $M = 0$ に中心を合わせた M 対 A プロットを与えるのを助けるおよび / または分布が最小となる対角線に中心を合わせたログ (Red) 対ログ (Green) プロットを与えるのを助けるベストフィットを見出すことを含むことができる。 M 対 A プロットは、 R 対 I プロットとも呼ばれることができ、ここで、 R は、 $R = \log_2 (\text{Red} / \text{Green})$ のような比であり、 I は、 $I = \log V_{\text{Red}} * \text{Green}$ のような強度である。スケールング、シフティング、ベストフィットから散布図までは、マイクロアレイデータセットを正規化するためおよびその後の分析のためのより良い足がかりを与えるために利用される技術であることができる。これらの正規化法のほとんどは、その背景に、(「試験内のほとんどの遺伝子はあまり変化しない」などの) 基礎となる同じ仮説を有することができる。

【0553】

タグ付けした核酸および使用方法

総括

本開示は、本明細書に記載したようなタグ付けした核酸ターゲティング核酸のためのキット、方法および組成物を提供する。図10は、開示の核酸ターゲティング核酸1005の実施形態例を示す。核酸ターゲティング核酸は、1つまたはそれ以上の非天然配列 (例えば、タグ) 1010 / 1015を含むことができる。核酸ターゲティング核酸は、核酸ターゲティング核酸の3'末端、5'末端のいずれかまたは3'および5'末端の両方に非天然配列1010 / 1015を含むことができる。

【0554】

場合によって、核酸ターゲティング核酸は本明細書に記載したような核酸ターゲティング核酸であってもよく、核酸ターゲティング核酸の3'末端、5'末端のいずれかまたは3'および5'末端の両方などに1つまたはそれ以上の非天然配列を含む。

【0555】

場合によって、核酸ターゲティング核酸は、本明細書に記載し、図11に示したようなダブルガイド核酸ターゲティング核酸である。ダブルガイド核酸ターゲティング核酸は、2つの核酸分子1105 / 1110を含むことができる。ダブルガイド核酸ターゲティング核酸は、複数の非天然配列1115 / 1120 / 1125 / 1130を含むことができる。非天然配列は核酸ターゲティング核酸の各分子の3'末端、5'末端または3'および5'末端の両方に位置することができる。例えば、非天然配列は第1の核酸分子1105の3'末端、5'末端または3'および5'末端の両方に位置することができる。非天然配列は第2の分子1110の3'末端、5'末端または3'および5'末端の両方に位置することができる。核酸ターゲティング核酸は、図11において列挙した構成のいずれ

かにおいて1つまたはそれ以上の非天然配列を含むことができる。

【0556】

本開示は、タグ付けした核酸ターゲティング核酸の使用を提供する。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。場合によって、複数のタグ付けした核酸ターゲティング核酸を複数の標的核酸と接触させることができる。図12は、タグ付けした核酸ターゲティング核酸の使用法例を示す。タグ付けした核酸ターゲティング核酸は、標的核酸1205とハイブリダイズすることができるスペーサー1210を含むことができる。核酸ターゲティング核酸は、非天然配列（例えば、タグ）1220を含むことができる。非天然配列1220は、RNA結合タンパク質結合配列であることができる。場合によって、非天然配列1220は、CRISPR RNA結合タンパク質結合配列であることができる。非天然配列1220にはRNA結合タンパク質1215が結合することができる。RNA結合タンパク質1215は、非天然配列1225を含むことができる（例えば、融合体、すなわち、RNA結合タンパク質1215は融合ポリペプチドであってもよい）。非天然配列（例えば、融合体）1225は、標的核酸および/または外来性核酸の転写を変更することができる。非天然配列（例えば、融合体）1225は、分割システムの第1の部分を含むことができる。

10

【0557】

いくつかの実施形態では、第2の核酸ターゲティング核酸は、第2の標的核酸1245にハイブリダイズすることができる第2のスペーサー1240を含み、第2の非天然配列（例えば、タグ）1250を含むことができる。第2の非天然配列（例えば、タグ）1250は、RNA結合タンパク質結合配列であることができる。第2の非天然配列（例えば、タグ）1250は、CRISPR RNA結合タンパク質結合配列であることができる。第2の非天然配列1250にはRNA結合タンパク質1235が結合することができる。RNA結合タンパク質は、非天然配列1230を含むことができる（例えば、融合体、すなわち、RNA結合タンパク質1235は融合体であってもよい）。非天然配列1230（例えば、融合体）は、分割システムの第2の部分であることができる。

20

【0558】

場合によって、分割システム1225の第1の部分および分割システム1230の第2の部分は空間的に接近することができ、したがって分割システム1225の第1の部分および分割システム1230の第2の部分は相互作用して1255、活性のある分割システム1260を形成する。活性のある分割システム1260とは、第1の部分および第2の部分が分割システム全体を形成する分割されていないシステムを意味することができる。分割システムの活性化は、2つの標的核酸1205/1245が空間的に接近したことを示すことができる。

30

【0559】

方法

本開示は、標的核酸を、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体と接触させ、1つまたはそれ以上のエフェクタータンパク質を導入するための方法であって、1つまたはそれ以上のエフェクタータンパク質が非天然配列を含み、改変された核酸ターゲティング核酸に結合することができる方法を提供する。エフェクタータンパク質とは、機能的効果を備えた任意のタンパク質を意味することができる。例えば、エフェクタータンパク質は酵素活性、リモデリング生体分子（例えば、フォールディングシャペロン）を含んでいてもよく、足場タンパク質であってもよく、および/または低分子または代謝物に結合していてもよい。エフェクタータンパク質は、標的核酸を改変（例えば、切断、酵素的に改変、転写によって改変）することができる。開示の方法は、バイオセンサーのような開示の組成物の使用を提供する。例えば、複合体（例えば、改変された核酸ターゲティング核酸、部位特異的ポリペプチドおよび/またはエフェクタータンパク質を含む）は、遺伝子移動事象をモニターして、配列が3次元空間的に接近するときを検知

40

50

し、転写を条件的に変更するために使用することができる。

【0560】

遺伝子移動事象

本開示は、遺伝子移動事象の発生を決定するための方法を提供する。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。遺伝子移動事象は、例えば、転座、組換え、組込み、遺伝子転移、遺伝子水平導入事象、形質転換、形質導入、接合、遺伝子変換事象、重複、転座、反転、欠失、置換、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

【0561】

遺伝子移動事象は、遺伝子間の組換えを含むことができる。組換えは、有害な遺伝子生成物を導くおそれがある（例えば、乳癌の原因となり得るBCR - ABL組換え）。組換えは、例えば、相同組換え、非相同組換え（例えば、非相同末端結合）およびV(D)J組換えを含むことができる。組換えは、染色体交差を意味することができる。組換えは、減数分裂の分裂前期I（例えば、対合）中に起こり得る。組換えは、DNAの核酸鎖の2本鎖切断、その後のDNA鎖の交換を触媒することができるリコンビナーゼによるホリディジャンクションの形成を含むことができる。

【0562】

遺伝子移動事象は疾患の原因となり得る。例えば、慢性骨髄性白血病は遺伝子移動事象から生じ得る。染色体9と22の間の転座は、融合体BCR - A b l 1遺伝子を生じ、1染色体の伸長（例えば、9）および別の染色体の短縮（例えば、22、すなわち、フィラデルフィア染色体）を引き起こすおそれがある。BCR - A b l 1転座は、受容体（例えば、インターロイキン - 3受容体）と相互作用して細胞分裂を促進することができるBCR - A b l融合タンパク質の生成をまねき、慢性骨髄性白血病（CML）を引き起こすおそれがある。遺伝子移動事象のその他の非限定的例には、BRD3 - NUT、BRD4 - NUT、K I A A 1 5 4 9 - B R A F、F I G / G O P C - R O S 1、E T V 6 - N T R K 3、B C A S 4 - B C A S 3、T B L 1 X R 1 - R G S 1 7、O D Z 4 - N R G 1、M A L A T 1 - T F E B、A P S C R 1 - T F E 3、P R C C - T F E 3、C L T C - T F E 3、N O N O - T F E 3、S F P Q - T F E 3、E T V 6 - N R T K 3、E M L 4 - A L K、E W S R 1 - A T F 1、M N 1 - E T V 6、C T N N B 1 - P L A G 1、L I F R - P L A G 1、T C E A 1 - P L A G 1、F G F r 1 - P L A G 1、C H C H D 7 - P L A G 1、H M G A 2 - F H I T、H M G A - N F I B、C R T C 1 - M A M L 2、C R C T 3 - M A M L 2、E W S R 1 - P O U F 5 F 1、T M P R S S 1 - E R G、T M P R S S 2 - E T V 4、T M P R S S 2 - E T V 5、H N R N P A 2 B 1 - E T V 1、H E R V - K - E T V 1、C 1 5 O R F 2 1 - E T V 1、S L C 4 5 A 3 - E T V 1、S L C 4 5 A 3 - E T V 5、S L C 4 5 A 3 - E L K 4、K L K 2 - E T V 4、C A N T 1 - E T V 4、R E T - P T C 1 / C C D C 6、R E T - P T C 2 / P R K A R 1 A、R E T - P T C 3、4 / N C O A 4、R E T - P T C 5 / G O L G A 5、R E T - P T C 6 / T R I M 2 4、R E T - P T C 7 / T R I M 3 3、R E T - P T C 8 / K T N 1、R E T - P T C 9 / R F G 9、R E T - P T C M 1、T F G - N T R K 1、T P M 3 - N R T K 1、T P R - N R T K 1、R E T - D 1 0 S 1 7 0、E L K S - R E T、H O O K S 3 - R E T、R F P - R E T、A K A P 9 - B R A F、およびPAX8 - P P A R Gが含まれる。

【0563】

遺伝子移動事象が原因となり得る疾患には、シャルコーマリートゥース病1A型（CMT1A）、若年性ネフロン癆（NPH）、X連鎖性魚鱗癬、家族性成長ホルモン欠乏症1A型、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）、 - サラセミア、血友病A、ハンター症候群（すなわち、ムコ多糖症II）、エメリドレフュス型筋ジストロフィー、ヘモグロビンレポア、ステロイド21 - ヒドロキシラーゼ欠乏症、糖質コルチコイド抑制性高アルドステロン症（GSH）、色覚異常（例えば、2色型色覚）、常染色体劣性脊髄性筋萎縮症（SMA）、癌、T細胞性急性リンパ性白血病（T-ALL）、悪性上皮細胞癌（

10

20

30

40

50

aggressive midline carcinoma)、星状細胞腫、分泌性乳癌、乳癌、腎臓癌、中胚葉性腎腫、肺腺癌、黒色腫、髄膜腫、多形性腺腫、粘液性類表皮癌、前立腺癌、甲状腺癌および急性前骨髄球性白血病を含むことができる。

【0564】

開示の方法は、標的核酸が2つの複合体と接触することができる遺伝子移動事象の発生の決定であって、各複合体が部位特異的ポリペプチドおよび改変された核酸ターゲティング核酸を含み、2つ以上のエフェクタータンパク質を導入することができ、2つ以上のエフェクタータンパク質が改変された核酸ターゲティング核酸に結合することができ、2つ以上のエフェクタータンパク質のうちの1つが分割システムの第1の部分である非天然配列を含み、2つ以上のエフェクタータンパク質のうちの1つが分割システムの第2の部分である非天然配列を含む遺伝子移動事象の発生の決定を提供する。分割システムとは、それぞれ蛍光性ではないが、複合体を形成したとき機能的(すなわち、蛍光を発する)蛍光タンパク質複合体を生じる2つ以上のタンパク質断片から構成されるタンパク質複合体を意味することができる。分割システム(例えば、分割蛍光タンパク質)の個々のタンパク質断片は、「相補的断片(complementing fragments)」または「相補的断片(complementary fragments)」と称することができる。自発的に機能的蛍光タンパク質複合体に組み込まれることができる相補的断片は、自己相補的な、自己組織化した、または自発的に関連する相補的断片として知られている。例えば、分割システムはGFPを含むことができる。GFP分割システムにおいて、相補的断片はGFPの3次元構造から得られ、11個の外側の逆平行ベータ鎖および1個の内側のアルファ鎖を含む。第1の断片は、GFP分子の11個のベータ鎖の1つ(例えば、GFP S11)を含むことができ、第2の断片は残りの鎖(例えば、GFP S1~10)を含むことができる。

10

20

【0565】

遺伝子移動事象の前に、1つの複合体の標的となり得る標的核酸配列は、別の配列の標的となり得る標的核酸配列から離れていてもよい。2つの標的核酸配列の間の距離は、少なくとも約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10Kbまたはそれ以上を含むことができる。2つの標的核酸配列の間の距離は、多くても約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10Kbまたはそれ以上を含むことができる。2つの標的核酸配列は、異なる染色体に位置していてもよい。2つの標的核酸配列は、同じ染色体に位置していてもよい。

30

【0566】

遺伝子移動事象の前に、分割システムの部分を構成するエフェクタータンパク質は、互いに相互作用することができなくてもよい(例えば、分割システムは不活性であってもよい)。遺伝子移動事象の後に、1つの複合体の標的となり得る標的核酸配列はその他の複合体の標的となり得る標的核酸配列に極めて近くに位置することができる。遺伝子移動事象の後に、分割システムの部分を構成するエフェクタータンパク質は、互いに相互作用して、それによって分割システムを活性化することができる。

【0567】

活性化した分割システムは、遺伝子移動事象の発生を示すことができる。例えば、活性化した分割システムが蛍光タンパク質分割システムである場合、遺伝子移動事象の前に、サンプル中で蛍光を検出することはできない。場合によって、不活性の分割システムの蛍光レベル(例えば、バックグラウンドレベル)は、分割システムを含まない対照試料(例えば、細胞)と比較して0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5倍またはそれ以上少ない蛍光であってもよい。場合によって、不活性の分割システムの蛍光レベル(例えば、バックグラウンドレベル)は、分割システムを含まない対照試料(例えば、細胞)よりも0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5倍またはそれ以上多い蛍光であってもよい。

40

【0568】

遺伝子移動事象の後に、2つの分割部分は合体して活性のある蛍光タンパク質を形成す

50

ることができ、試料中で蛍光を検出することができる。活性のある分割システムは、蛍光の少なくとも約 0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍またはそれ以上の増加を引き起こすことができる。活性のある分割システムは、蛍光の多くても約 0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍またはそれ以上の増加を引き起こすことができる。

【0569】

遺伝子移動の検出は、対象（例えば、患者）の遺伝子型同定に使用することができる。遺伝子型は疾患の指標となり得る。遺伝子移動事象の検出は、対照の診断に使用することができる。本明細書に記載した方法から得られた遺伝子診断情報は、対照に連絡することができる。本明細書に記載した方法から得られた遺伝子診断情報は、対象専用の処置計画を立てるために使用することができる。例えば、本開示の方法から得られたデータが、患者が特定の処置計画に対して抵抗性にする遺伝子型を有することを示す場合、対象のために新たな処置計画を立てることができる。

10

【0570】

転写の変更

開示の方法は、核酸の転写の変更を提供することができる。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。この方法は、標的核酸を2つの複合体と接触させることであって、各複合体が部位特異的ポリペプチドおよび改変された核酸ターゲティング核酸を含むこと、ならびに2つ以上のエフェクタータンパク質を導入することであって、2つ以上のエフェクタータンパク質が改変された核酸ターゲティング核酸に結合することができ、2つ以上のエフェクタータンパク質のうちの1つが分割転写因子システムの第1の部分である非天然配列を含み、2つ以上のエフェクタータンパク質のうちの1つが分割転写因子システムの第2の部分である非天然配列を含み、分割システムの第1の部分と第2の部分の相互作用が核酸の転写を変更する転写因子を形成することを提供する。

20

【0571】

転写因子は、核酸および/または標的核酸の転写レベルを変更することができる。変更した転写は、転写レベルの増加および/または転写レベルの減少を含むことができる。転写因子は、転写レベルを変更していない転写レベルよりも2倍、3倍、5倍、10倍、50倍、100倍、1000倍またはそれ以上、高くまたは低く変更することができる。転写因子は、転写レベルを変更していない転写レベルよりも2倍、3倍、5倍、10倍、50倍、100倍、1000倍またはそれ以下、高くまたは低く変更することができる。

30

【0572】

転写因子は、標的核酸および/または外来性核酸の転写を変更することができる。標的核酸は、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体が接触する核酸であってもよい。外来性核酸は、ドナーポリヌクレオチド、プラスミドおよび/または標的核酸を含むことができる。

【0573】

外来性核酸は、アポトーシスに関与する遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。アポトーシスに関与する適切な遺伝子には、腫瘍壊死因子 (TNF)、TNF-R1、TNF-R2、TNF受容体関連死ドメイン (TRADD)、Fas受容体およびFasリガンド、カスパーゼ（例えば、カスパーゼ3、カスパーゼ8、カスパーゼ10）、APAF-1、FADDおよびアポトーシス誘導因子 (AIF) を含めることができる。外来性核酸には、細胞溶解を生じる遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含めることができる。適切な遺伝子には、アデノウイルス死タンパク質 (Adenovirus death protein) (ADP)、ディフェンシン、c-FLIPから得られた膜透過性溶解性ペプチド、プロカスパーゼ、細胞貫通ペプチド、例えば、HIV TATを含めることができる。外来性核酸には、細胞部位（例えば、MHCクラスペプチド）に免疫細胞の動員を引き起こすことができる抗原をコードするポリヌクレオチドを含める

40

50

ことができる。外来性核酸には、ゲノム内に何回も生じ、大規模なゲノム断片化および細胞死を引き起こす配列（例えば、マイクロサテライト、縦列反復）を標的とする核酸ターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチドを含めることができる。

【0574】

標的核酸の改変

本開示は、開示の核酸ターゲティング核酸を使用して標的核酸を改変するための方法を提供する。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。例えば、標的核酸は、部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸および1つまたはそれ以上のエフェクタータンパク質を含む複合体と接触させることができ、1つまたはそれ以上のエフェクタータンパク質は非天然配列を含み、改変された核酸ターゲティング核酸に結合することができる。非天然配列は酵素活性を与えることができ、および/またはエフェクタータンパク質の転写活性は標的核酸を改変することができる。例えば、エフェクタータンパク質がメチルトランスフェラーゼに対応する非天然配列を含むならば、メチルトランスフェラーゼは標的核酸をメチル化することができる。標的核酸の改変は、標的核酸の5'または3'末端のいずれかからヌクレオチドが少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100個またはそれ以上離れたところに起こすことができる。標的核酸の改変は、標的核酸の5'または3'末端のいずれかからヌクレオチドが多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100個以上離れたところに起こすことができる。改変は、標的核酸を含まない別個の核酸（例えば、別の染色体）に起こすことができる。

10

20

【0575】

改変例には、メチル化、脱メチル化、アセチル化、脱アセチル化、ユビキチン化、脱ユビキチン化、脱アミノ化、アルキル化、脱プリン化、酸化、ピリミジン二量体形成、遺伝子転移、組換え、鎖伸長、連結、グリコシル化を含めることができる。リン酸化、脱リン酸化、アデニル化、脱アデニル化、SUMO化、脱SUMO化、リボシル化、脱リボシル化、ミリストイル化、リモデリング、切断、酸化還元、水和・加水分解および異性化。

【0576】

遺伝子型の決定および処置

本開示は、開示の核酸ターゲティング核酸を使用して疾患を処置するための方法を提供する。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。例えば、本明細書に記載した分割システムを使用して、（例えば、遺伝子移動事象において、染色体構造において、または線状核酸において）空間的に接近した2つ以上の標的核酸の存在は、（例えば、対象の）遺伝子型の指標となり得る。遺伝子型は、核酸の特定の配列、ヌクレオチド多型（すなわち、一塩基遺伝子多型または多塩基遺伝子多型のいずれか）、対立遺伝子変種または核酸の配列の任意のその他の指標の有無を意味することができる。遺伝子型は、患者が疾患を罹患しているかどうか、および/または疾患に罹患しやすいかどうかを示すことができる。

30

40

【0577】

遺伝子型の決定には、例えば、対象が変異配列（例えば、変異を含む核酸配列）を含むかどうかを決定することを含めることができる。場合によって、分割システムの第1の部分を含むために本明細書に記載したような適切な成分を含む第1の核酸ターゲティング核酸は、予測された変異配列の近くの領域を標的とするように設計することができる。場合によって、分割システムの第2の部分を含むために本明細書に記載したような適切な成分を含む第2の核酸ターゲティング核酸は、予測された変異配列を含む領域を標的とするように設計することができる。変異配列が存在するならば、第2の核酸ターゲティング核酸はその配列に結合することができ、分割システムの2つの部分は相互作用することができる。相互作用は、変異配列の存在を指示することができる信号を生成することができる。

50

【0578】

遺伝子型はバイオマーカーによって同定することができる。バイオマーカーは任意の生理学的プロセスを指示することができる。バイオマーカーは、処置（例えば、薬剤処置）の効能の指標として役立つことができる。バイオマーカーは、核酸、ポリペプチド、分析物、溶質、低分子、イオン、元素、核酸および/またはポリペプチドの改変、ならびに/または分解生成物であってもよい。バイオマーカーは、核酸および/またはポリペプチドの相対的発現レベルを意味することができる。

【0579】

対象専用の処置計画は、開示の方法を使用した対象の遺伝子型の測定から策定することができる。例えば、特定の療法に反応しないことが知られているある種の遺伝子型を対象が含む場合、対象は異なる療法で処置することができる。遺伝子型の決定は、臨床試験のために対象を選択するか、または選択しないことを可能にすることができる。

10

【0580】

遺伝子型の決定は、介護者から対象に（例えば、医師から患者に、または遺伝子型分析の実施者から顧客に）連絡することができる。連絡は、対面で（例えば、診療所において）、電話で、書面でまたは電子的に行うことができる。連絡はさらに、対象の遺伝子型から決定された対象専用の処置計画を対象に通知することができる。

【0581】

方法は対象に2回以上（例えば、反復して）実施することができる。例えば、対象の遺伝子型を測定し、処置行程を対象に指示し、対象の遺伝子型を再度測定することができる。2つの遺伝子型を比較して、処置行程の有効性を測定することができる。処置計画は、遺伝子型の比較に基づいて変更することができる。

20

【0582】

3次元空間における配列の位置

場合によって、本開示は、細胞の3次元空間において配列の位置を測定するための方法を提供する。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。クロマチンおよび核酸の3次元構造の測定は、遺伝子の転写活性化および/または抑制などの遺伝子調節を理解するために重要であろう。場合によって、この方法は、標的核酸と2つの複合体を接触させることを含み、各複合体はそのコグネイト標的核酸に結合する。この複合体は、本開示の部位特異的ポリペプチドおよび核酸標的核酸を含むことができる。2つ以上のエフェクタータンパク質を導入することができる。2つ以上のエフェクタータンパク質はそれぞれ複合体に結合する。エフェクタータンパク質は、前述の分割システムに類似していてもよく、各エフェクタータンパク質は全ポリペプチドの不活性断片を含んでいてもよい。エフェクタータンパク質が空間的に離れている場合、エフェクタータンパク質は不活性である（例えば、信号が検出されない）。エフェクタータンパク質が相互作用するために空間的に十分に近いと、検出可能な活性化ポリペプチドを形成することができる。

30

【0583】

エフェクタータンパク質は、分割親和性タグシステムの一部であってもよい。分割親和性タグシステムにおいて、システムの2つの不活性ポリペプチド断片は、親和性タグの2つの不活性断片に対応することができる。2つの断片が一緒に結合すると、完全な親和性タグが回復し、したがって親和性タグは結合剤によって検出することができる。結合剤は、親和性タグに結合し精製することができる分子を意味することができる。結合剤の例には、抗体、抗体結合ビーズおよび低分子結合ビーズを含めることができる。

40

【0584】

開示の複合体およびポリペプチドの導入は、ウイルスまたはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（PEI）媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェ

50

クション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介核酸輸送などによって行うことができる。

【0585】

細胞は、複合体と共に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日またはそれ以上培養することができる。細胞は、複合体と共に多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日またはそれ以上培養することができる。適切な期間の後（例えば、複合体を標的核酸に結合させるための期間）、細胞を溶解することができる。

【0586】

細胞は溶解する前に架橋結合させることができる。固定または架橋結合した細胞は、細胞内でタンパク質-DNA複合体を安定化することができる。適切な固定剤および架橋結合剤には、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、エタノールに基づく固定剤、メタノールに基づく固定剤、アセトン、酢酸、四酸化オスミウム、重クロム酸カリウム、クロム酸、過マンガン酸カリウム、水銀剤、ピクリン酸塩、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、アミン反応性NHS-エステル架橋結合剤、例えばビス[スルホスクシンイミジル]スベレート(BS3)、3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオネート](DTSSP)、エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシネート(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジルグルタレート(DSG)、ジチオビス[スクシンイミジルプロピオネート](DSP)、ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシネート](EGS)、NHS-エステル/ジアジリン架橋結合剤、例えば、NHS-ジアジリン、NHS-LC-ジアジリン、NHS-SS-ジアジリン、スルホ-NHS-ジアジリン、スルホ-NHS-LC-ジアジリンおよびスルホ-NHS-SS-ジアジリンを含めることができる。

【0587】

溶解した細胞は、親和性タグへの結合を目的とする結合剤（例えば、抗体）と接触させることができる。接触は試験管内で行うことができる。接触はクロマトグラフィー装置（例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラム）内で行うことができる。結合剤との接触は少なくとも1分、5分、10分、15分、20分、25分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、15時間、20時間、25時間、30時間、35時間、40時間、45時間またはそれ以上行うことができる。結合剤との接触は多くても1分、5分、10分、15分、20分、25分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、15時間、20時間、25時間、30時間、35時間、40時間、45時間またはそれ以上行うことができる。場合によって、結合剤との接触は細胞溶解前に行う。

【0588】

複合体は結合剤によって精製することができる。精製した複合体に核酸精製技術を実施し、複合体から標的核酸を分離することができる。核酸精製技術にはスピンカラム分離、沈殿および電気泳動を含めることができる。

【0589】

核酸（例えば、標的核酸を含む核酸）に配列決定法を実施することができる。核酸は、1つまたはそれ以上のアダプターを連結することによって配列分析用に調製することができる。配列決定した核酸を分析して、遺伝子多型を同定し、疾患を診断し、疾患の処置行程を決定し、および/またはゲノムの3次元構造を決定することができる。

【0590】

リンカーを含むタグ付けした核酸ターゲティング核酸

本開示は、タグ付けした核酸ターゲティング核酸の組成物ならびに作製方法および使用方法を提供する。図13Aは、タグ付けしていない核酸ターゲティング核酸の例を示す。タグ付けしていない核酸ターゲティング核酸は、プロトスペーサー(PS)、最小CRISPR反復(MCR)、シングルガイドコネクター(SGC)、最小tracrRNA配列(MtS)、3'tracrRNA配列(3TS)およびtracrRNA伸長(TE)を含むことができる。リンカーを含むタグ付けした核酸ターゲティング核酸は、本明細

10

20

30

40

50

書で記載したような核酸ターゲティング核酸のいずれかを意味することができ、核酸標的核酸の5'末端、3'末端のいずれかまたは5'および3'末端の両方にリンカーを含む。

【0591】

核酸ターゲティング核酸は、図13Bで示したような非天然配列を含むことができる。非天然配列は、タグと称することができる。タグは、核酸ターゲティング核酸の5'末端、3'末端のいずれかまたは5'および3'末端の両方に融合させることができる。非天然配列は、RNA結合タンパク質のための結合配列を含むことができる。RNA結合タンパク質はCsy4であってもよい。非天然配列は核酸ターゲティング核酸のプロトスペーサー配列に融合することができる。

10

【0592】

非天然融合体は、リンカーによって核酸ターゲティング核酸から分離することができる。図14は、核酸ターゲティング核酸のプロトスペーサーから非天然配列（例えば、Csy4ヘアピン）を分離するリンカーの例（例えば、Tagリンカー）を示す。リンカー配列は、標的核酸と相補的であってもよい。リンカー配列は、標的核酸と少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のミスマッチを含むことができる。リンカー配列は、標的核酸と多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のミスマッチを含むことができる。場合によって、リンカーと標的核酸との間のミスマッチが少なければ少ないほど、Cas9：核酸ターゲティング核酸複合体の切断効率が良好である。

20

【0593】

リンカー配列の長さはヌクレオチドが少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60個またはそれ以上であってもよい。リンカー配列の長さはヌクレオチド長が多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60個またはそれ以上であってもよい。

【0594】

多重化遺伝子ターゲティング剤 総括

本開示は、多重化ゲノム操作のための方法、組成物、システムおよび/またはキットについて記載する。本開示のいくつかの実施形態では、部位特異的ポリペプチドは核酸ターゲティング核酸を含み、それによって複合体を形成することができる。複合体は標的核酸と接触させることができる。標的核酸は複合体によって切断および/または改変することができる。本開示の方法、組成物、システムおよび/またはキットは、多数の標的核酸を迅速に、効率よく、および/または同時に改変するために有用であり得る。この方法は、本明細書で記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。

30

【0595】

図15は、本開示の方法の実施形態例を示す。核酸（例えば、核酸ターゲティング核酸）1505は、非天然配列（例えば、部分、エンドリボヌクレアーゼ結合配列、リボザイム）1510に融合させて、それによって核酸モジュール1512を形成することができる。核酸モジュール1512（例えば、非天然配列に融合した核酸を含む）を直列に結合させて、それによって多重化遺伝子ターゲティング剤（例えば、ポリモジュール、例えば、配列）1511を形成することができる。多重化遺伝子ターゲティング剤1511はRNAを含むことができる。多重化遺伝子ターゲティング剤は、1つまたはそれ以上のエンドリボヌクレアーゼ1520と接触させることができる1515。エンドリボヌクレアーゼは、非天然配列1510に結合することができる。結合したエンドリボヌクレアーゼは、多重化遺伝子ターゲティング剤1511の核酸モジュール1512を非天然配列151

40

50

0によって限定された指定の位置で切断することができる。切断1525は、個々の核酸モジュール1512を処理（例えば、遊離）することができる。いくつかの実施形態では、処理された核酸モジュール1512は、非天然配列1510の全部、一部を含んでいてもよく、または全く含まなくてもよい。処理された核酸モジュール1512には部位特異的ポリペプチド1530が結合し、それによって複合体1531を形成することができる。複合体1531は、標的核酸1540を標的とすることができる1535。標的核酸1540は複合体1531によって切断および/または改変することができる。

【0596】

多重化遺伝子ターゲティング剤

多重化遺伝子ターゲティング剤は、多数の標的核酸を同時に、および/または化学量論的
10
量的で改変するのに使用することができる。多重化遺伝子ターゲティング剤は、直列に並んだ本明細書に記載したような任意の核酸ターゲティング核酸であってもよい。多重化遺伝子ターゲティング剤は、1つまたはそれ以上の核酸モジュールを含む連続的な核酸分子を意味することができる。核酸モジュールは、核酸および非天然配列（例えば、部分、エンドリボヌクレアーゼ結合配列、リボザイム）を含むことができる。核酸は、ノンコーディングRNA、例えば、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、長鎖ノンコーディングRNA（lncRNAまたはlinRNA）、内在性siRNA（エンド-siRNA）、piwi相互作用RNA（piRNA）、トランス作用性低分子干渉RNA（tasiRNA）、リピート関連低分子干渉RNA（rasiRNA）、核小体低分子RNA（snRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、トランス
20
ファーRNA（tRNA）およびリボソームRNA（rRNA）またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。核酸は、コーディングRNA（例えば、mRNA）であってもよい。核酸は、いかなる種類のRNAであってもよい。いくつかの実施形態では、核酸は、核酸ターゲティング核酸であってもよい。

【0597】

非天然配列は、核酸モジュールの3'末端に位置することができる。非天然配列は、核酸モジュールの5'末端に位置することができる。非天然配列は、核酸モジュールの3'末端および5'末端の両方に位置することができる。非天然配列は、エンドリボヌクレアーゼに結合することができる配列（例えば、エンドリボヌクレアーゼ結合配列）を含むことができる。非天然配列は、エンドリボヌクレアーゼによって配列特異的に認識される配列
30
であることができる（例えば、RNアーゼT1は不对G塩基を切断し、RNアーゼT2はAsの3'末端を切断し、RNアーゼU2は不对A塩基の3'末端を切断する）。非天然配列は、エンドリボヌクレアーゼによって構造的に認識される配列であることができる（例えば、ヘアピン構造、1本鎖-2本鎖接合部、例えば、ドロージャはヘアピン内の1本鎖-2本鎖接合部を認識する）。非天然配列は、CRISPRシステムエンドリボヌクレアーゼ（例えば、Csy4、Cas5、および/またはCas6タンパク質）に結合することができる配列を含むことができる。非天然配列は、以下の配列の1つと少なくとも、または多くても約40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%のヌクレオチド配列同一性および/または配列類似性を有するヌクレオチド配列を含むことができる：
40

5' - GUUCACUGCCGUUAUAGGCAGCUAAGAAA - 3' ;

5' - GUUGCAAGGGAUUGAGCCCGUAAGGGGAUUGCGAC - 3' ;

5' - GUUGCAAACCUCGUUAGCCUCGUAGAGGAUUGAAAC - 3' ;

5' - GGAUCGAUAACCCACCCCGAAGAAAAGGGGACGAGAAC - 3' ;

5' - GUCGUCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC - 3' ;

5' - GAUAUA AACCUAAAUUACCCUCGAGAGGGGACGGAAAC - 40

10

20

30

40

50

3' ;
 5' - C C C C A G U C A C C U C G G G A G G G G A C G G A A A C - 3' ;
 5' - G U U C C A A U U A A U C U U A A A C C C U A U U A G G G A U U G A A A C
 - 3' 。
 5' - G U U G C A A G G G A U U G A G C C C C G U A A G G G G A U U G C G A C -
 3' ;
 5' - G U U G C A A A C C U C G U U A G C C U C G U A G A G G A U U G A A A C -
 3' ;
 5' - G G A U C G A U A C C C A C C C C G A A G A A A A G G G G A C G A G A A C
 - 3' ;
 5' - G U C G U C A G A C C C A A A A C C C C G A G A G G G G A C G G A A A C -
 3' ;
 5' - G A U A U A A A C C U A A U U A C C U C G A G A G G G G A C G G A A A C -
 3' ;
 5' - C C C C A G U C A C C U C G G G A G G G G A C G G A A A C - 3' ;
 5' - G U U C C A A U U A A U C U U A A A C C C U A U U A G G G A U U G A A A C
 - 3' ,
 5' - G U C G C C C C C C A C G C G G G G G C G U G G A U U G A A A C - 3' ;
 5' - C C A G C C G C C U U C G G G C G G C U G U G U G U U G A A A C - 3' ;
 5' - G U C G C A C U C U A C A U G A G U G C G U G G A U U G A A A U - 3' ;
 5' - U G U C G C A C C U U A U A U A G G U G C G U G G A U U G A A A U - 3' ;
 および
 5' - G U C G C G C C C C G C A U G G G G C G C G U G G A U U G A A A - 3' 。

10

20

30

40

50

【0598】

いくつかの実施形態では、非天然配列はエンドリボヌクレアーゼ結合配列を含み、核酸モジュールには同じエンドリボヌクレアーゼが結合することができる。核酸モジュールは、同じエンドリボヌクレアーゼ結合配列を含んでいなくてもよい。核酸モジュールは、異なるエンドリボヌクレアーゼ結合配列を含んでいてもよい。異なるエンドリボヌクレアーゼ結合配列には、同じエンドリボヌクレアーゼが結合することができる。いくつかの実施形態では、核酸モジュールは、異なるエンドリボヌクレアーゼが結合することができる。

【0599】

部分はリボザイムを含むことができる。リボザイムは自己切断して、それによって多重化遺伝子ターゲティング剤の各モジュールを遊離することができる。適切なリボザイムには、ペプチジルトランスフェラーゼ23S rRNA、RNAアーゼP、グループIイントロン、グループIIイントロン、GIR1枝分かれリボザイム、Leadzyme、ヘアピンリボザイム、ハンマーヘッドリボザイム、HDVリボザイム、CPEB3リボザイム、VSRリボザイム、glmSリボザイム、CoTCリボザイム、合成リボザイムを含めることができる。

【0600】

多重化遺伝子ターゲティング剤の核酸モジュールの核酸は同一であってもよい。核酸モジュールは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50個またはそれ以上のヌクレオチドが異なってもよい。例えば、異なる核酸モジュールは、核酸モジュールのスペーサー領域が異なっていて、それによって核酸モジュールは異なる標的核酸を標的とすることができる。場合によって、異なる核酸モジュールは、核酸モジュールのスペーサー領域が異なっても、同じ標的核酸を標的とすることができる。核酸モジュールは、同じ標的核酸を標的とすることができる。核酸モジュールは、1つまたはそれ以上の標的核酸を標的とすることができる。

【0601】

核酸モジュールは、核酸モジュールの適切な翻訳または増幅を可能にすることができる調節配列を含むことができる。例えば、核酸モジュールは、プロモーター、TATAボッ

クス、エンハンサー配列、転写終結因子、リボソーム結合部位、3'非翻訳領域、5'非翻訳領域、5'キャップ配列、3'ポリアデニル化配列、RNA安定性因子などを含むことができる。

【0602】

方法

本開示は、多重化遺伝子ターゲティング剤を使用することによって多数の標的核酸を同時に改変するための方法を提供する。部位特異的ポリペプチド、エンドリボヌクレアーゼおよび多重化遺伝子ターゲティング剤を宿主細胞に導入することができる。開示のベクター（例えば、多重化遺伝子ターゲティング剤、エンドリボヌクレアーゼおよび/または部位特異的ポリペプチドを含む）を宿主細胞に導入することができる。場合によって、2つ以上のエンドリボヌクレアーゼおよび/または多重化遺伝子ターゲティング剤を細胞に導入することができる。多重化遺伝子ターゲティング剤が様々な種類の部分を含み、その部分が様々なエンドリボヌクレアーゼ結合配列である場合、多重化遺伝子ターゲティング剤における結合配列の種類に対応する1つまたはそれ以上のエンドリボヌクレアーゼを細胞に導入することができる。

10

【0603】

導入は、ウイルスまたはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合、プロトプラスト融合体、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンジイミン(PEI)-媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介核酸輸送などの核酸を細胞に導入するための任意の手段によって行うことができる。ベクターは、宿主細胞内で一過性に発現することができる。ベクターは、宿主細胞内で安定して発現させることができる（例えば、宿主細胞のゲノムに安定して組み込むことによって）。

20

【0604】

部分がエンドリボヌクレアーゼ結合配列を含む場合、エンドリボヌクレアーゼは発現して、多重化遺伝子ターゲティング剤のエンドリボヌクレアーゼ結合部位に結合することができる。エンドリボヌクレアーゼは、多重化遺伝子ターゲティング剤を個々の核酸モジュールに切断することができる。

【0605】

部分がリボザイムを含む場合、エンドリボヌクレアーゼは宿主細胞内で発現するために必要でなくてもよい。リボザイムは自己切断して、それによって多重化遺伝子ターゲティング剤の個々の核酸モジュールへの切断を引き起こすことができる。

30

【0606】

個々の（例えば、切断した）核酸モジュールは、部分（例えば、エンドリボヌクレアーゼ結合配列）の全部、一部を含んでもよく、または全く含まなくてもよい。例えば、遊離した（例えば、処理した）核酸モジュールは、核酸モジュールの5'および/または3'末端の除去を引き起こすことができるエキソヌクレアーゼトリミングおよび/または分解を受けることができる。このような場合、エキソヌクレアーゼトリミングおよび/または分解は、部分（例えば、エンドリボヌクレアーゼ結合配列）の全部、一部の除去を引き起こしてもよく、または全く引き起こさなくてもよい。

40

【0607】

遊離した（例えば、処理した）核酸モジュールは、部位特異的ポリペプチドに結合し、それによって複合体を形成することができる。この複合体は、配列特異的な方法で標的核酸とハイブリダイズすることができる核酸ターゲティング核酸によって標的核酸にガイドすることができる。一旦ハイブリダイズすると、複合体の部位特異的ポリペプチドは標的核酸を改変する（例えば、標的核酸を切断する）ことができる。場合によって、この改変には、標的核酸への2本鎖分断の導入が含まれる。場合によって、この改変には、標的核酸への1本鎖分断の導入が含まれる。

【0608】

50

いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のドナーポリヌクレオチドおよび/またはこれをコードするベクターを細胞に導入することができる。1つまたはそれ以上のドナーポリヌクレオチドは、改変された(例えば、切断された)標的核酸に組み込まれ、それによって挿入を引き起こすことができる。同じドナーポリヌクレオチドを標的核酸の多数の切断部位に組み込むことができる。1つまたはそれ以上のポリヌクレオチドを標的核酸の1つまたはそれ以上の切断部位に組み込むことができる。これは、多重ゲノム操作と称することができる。場合によって、ドナーポリヌクレオチドおよび/またはこれをコードするベクターを細胞に導入しなくてもよい。これらの場合、改変された標的核酸は欠失を含むことができる。

【0609】

核酸の化学量論的輸送

総括

本開示は、核酸を細胞および/または細胞内の限定された部位に化学量論的に輸送するための組成物、方法およびキットを提供する。化学量論的輸送は複合体によって媒介することができる。図16は、複数の核酸を細胞および/または細胞内の位置に化学量論的に輸送するための複合体の例を示す。複合体は、複数の核酸1605を含むことができる。各核酸は、核酸結合タンパク質結合部位1610を含むことができる。核酸結合タンパク質結合部位1610は全て同じ配列、異なる配列であってもよく、または一部が同じ配列であってもよく、一部が異なる配列であってもよい。いくつかの実施形態では、核酸結合タンパク質結合部位はCas6、Cas5またはCsy4ファミリーメンバーに結合することができる。複合体は、直列型融合ポリペプチド1630を含むことができる。直列型融合ポリペプチドは、直列に一緒に融合した核酸結合タンパク質1625を含むことができる。核酸結合タンパク質は、リンカー1620によって分離することができる。核酸結合タンパク質1625は同じタンパク質であってもよく、異なるタンパク質であってもよく、または一部が同じタンパク質であってもよく、一部が異なるタンパク質であってもよい。核酸結合タンパク質1625は、Csy4タンパク質であってもよい。核酸結合タンパク質1625は、核酸1605の核酸結合タンパク質結合部位1610に結合することができる。直列型融合ポリペプチド1630は、非天然配列1615を含むことができる。場合によって、非天然配列は細胞内(例えば、核)に局在する配列である。いくつかの実施形態では、核酸1605は非天然配列(例えば、細胞内(例えば、核)に局在する配列)をコードすることができる。複合体は、細胞内に導入することができ1635、1つまたはそれ以上の核酸105はポリペプチド1640に翻訳することができる。翻訳されたポリペプチド1640は、核酸1605の核酸結合タンパク質結合部位1610に結合し、切断することができる。切断1645は、核酸ターゲティング核酸であることができる核酸1650を遊離することができる。遊離した核酸1650は、翻訳したポリペプチド1645(例えば、部位特異的ポリペプチド)に結合し、それによって単位を形成することができる。翻訳したポリペプチド1645は、核内移行シグナルを含むことができる。単位は核に転座することができ、単位は遊離した核酸1650のスペーサーとハイブリダイズすることができる標的核酸にガイドすることができる。単位は、標的核酸にハイブリダイズすることができる。単位の部位特異的ポリペプチドは、標的核酸を切断することができる。標的核酸の切断は、ゲノム操作と称することができる。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。

【0610】

いくつかの実施形態では、多数の核酸ターゲティング核酸は、細胞および/または細胞内の位置に化学量論的に輸送することができる。図17は、複数の核酸を化学量論的に輸送するための複合体の例を示す。複合体は、複数の核酸1705を含むことができる。各核酸は、複数の核酸結合タンパク質結合部位1710/1711を含むことができる。核酸結合タンパク質結合部位1710/1711は全て同じ配列、異なる配列であってもよ

10

20

30

40

50

く、または一部が同じ配列であってもよく、また一部が異なる配列であってもよい。いくつかの実施形態では、核酸結合タンパク質結合部位 1710 / 1711 は Cas 6、Cas 5 または Csy 4 ファミリーメンバーに結合することができる。複合体は、直列型融合ポリペプチド 1730 を含むことができる。直列型融合ポリペプチドは、直列に一緒に融合した核酸結合タンパク質 1725 を含むことができる。核酸結合タンパク質は、リンカー 1720 によって分離することができる。核酸結合タンパク質 1725 は同じタンパク質であってもよく、異なるタンパク質であってもよく、または一部が同じタンパク質であってもよく、一部が異なるタンパク質であってもよい。RNA 結合タンパク質 1725 は、Csy 4、Cas 5 および Cas 6 ポリペプチドの組み合わせであってもよい。核酸結合タンパク質 1725 は、核酸 1705 の核酸結合タンパク質結合部位 1710 に結合することができる。直列型融合ポリペプチド 1730 は、非天然配列 1715 を含むことができる。場合によって、非天然配列は細胞内（例えば、核）に局在する配列である。いくつかの実施形態では、核酸 1705 は非天然配列（例えば、細胞内（例えば、核）に局在する配列）をコードすることができる。複合体は、細胞内に導入することができる。1735、1 つまたはそれ以上の核酸はポリペプチド 1740 / 1750 に翻訳することができる。翻訳されたポリペプチド 1740 は、核酸 1705 の核酸結合タンパク質結合部位 1711 に結合し、切断することができる。切断 1745 は、核酸ターゲティング核酸および / またはドナーポリヌクレオチドであることができる核酸 1755 を遊離することができる。遊離した核酸 1755 は、翻訳したポリペプチド 1750（例えば、部位特異的ポリペプチド）に結合し、それによって単位を形成することができる。場合によって、翻訳したポリペプチド 1750 は、核内移行シグナルを含む。単位は核に転座することができ、単位は遊離した RNA 1755 のスペーサーとハイブリダイズすることができる。標的核酸にガイドすることができる。単位は、標的核酸にハイブリダイズすることができる。単位の部位特異的ポリペプチドは、標的核酸を切断することができる。

【0611】

方法

本開示は、核酸を細胞に化学量論的に輸送するための方法を提供する（例えば、化学量論的に輸送できる核酸）。この方法は、直列型融合ポリペプチドを複数の化学量論的に輸送できる核酸に結合し、それによって複合体を形成することを含むことができる。複合体は、化学量論的量の核酸を含むことができる（例えば、複合体は複数の核酸を指定した比および / または量で含むことができる）。1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上の核酸を化学量論的に輸送することができる。場合によって、3 個の化学量論的に輸送できる核酸を化学量論的に輸送することができる。場合によって、4 個の化学量論的に輸送できる核酸を化学量論的に輸送することができる。

【0612】

化学量論的に輸送できる核酸は、ポリペプチドまたはノンコーディング RNA をコードすることができる。ポリペプチドは、CRISPR システムポリペプチド（例えば、部位特異的ポリペプチド、エンドリボヌクレアーゼ）であってもよい。化学量論的に輸送できる核酸は、2 つ以上のポリペプチドをコードすることができる。化学量論的に輸送できる核酸は、複数の化学量論的に輸送できる核酸（例えば、配列で）含むことができる。化学量論的に輸送できる核酸は、ノンコーディング RNA をコードすることができる。ノンコーディング RNA の例には、マイクロ RNA (miRNA)、低分子干渉 RNA (siRNA)、長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA または lincRNA)、内在性 siRNA (エンド-siRNA)、piwi 相互作用 RNA (piRNA)、トランス作用性低分子干渉 RNA (tasiRNA)、リピート関連低分子干渉 RNA (rasiRNA)、核小体低分子 RNA (snRNA)、核内低分子 RNA (snRNA)、トランスファー RNA (tRNA) およびリボソーム RNA (rRNA) を含めることができる。化学量論的に輸送できる核酸は、RNA であってもよい。

【0613】

化学量論的に輸送できる核酸は、非天然配列をコードすることができる。場合によって

、化学量論的に輸送できる核酸は非天然配列をコードし、したがって、ポリペプチドがポリペプチドをコードする化学量論的に輸送できる核酸から翻訳されるとき、ポリペプチドは非天然配列に融合する（例えば、それによって融合体タンパク質を生成する）。非天然配列は、ペプチド親和性タグであってもよい。非天然配列（例えば、ペプチド親和性タグ）は、ポリペプチドのN末端、ポリペプチドのC末端、またはポリペプチド内の任意の位置（例えば、表面から到達できるループ）に位置することができる。いくつかの実施形態では、非天然配列は核内移行シグナル（NLS）である。NLSは、モノパーティットまたはバイパーティット配列であってもよい。NLSは、核移行機構（例えば、インポーチン）によって認識され得る。NLSは、小さいペプチド（例えば、SV40ラージT抗原のPKKKRKV）であってもよい。NLSは、ポリペプチドドメイン（例えば、hnRNPA1の酸性M9ドメイン）であってもよい。

10

【0614】

非天然配列は、核酸親和性タグ（例えば、核酸局在シグナル）であってもよい。例えば、化学量論的に輸送できる核酸をコードするDNA（例えば、ドナーポリヌクレオチド）は、DNAを核に局在させることができる核酸局在シグナルを含むことができる。このような核酸局在シグナルは、例えば、ペプチド-核酸（PNA）配列を含むことができる。

【0615】

化学量論的に輸送できる核酸は、核酸の適切な翻訳または増幅を可能にできる調節配列を含むことができる。例えば、核酸は、プロモーター、TATAボックス、エンハンサー配列、転写終結因子、DNA安定化因子、リボソーム結合部位、3'非翻訳領域、5'非翻訳領域、5'キャップ配列、3'ポリアデニル化配列、RNA安定性因子などを含むことができる。

20

【0616】

核酸は、核酸結合タンパク質結合部位を含むことができる。核酸結合タンパク質結合部位には、核酸結合タンパク質が結合することができる。核酸結合タンパク質結合部位は、CRISPRポリペプチド（例えば、部位特異的ポリペプチド、エンドリボヌクラーゼ）が結合することができる。核酸結合タンパク質結合部位には、Cas5またはCas6ファミリーポリペプチドが結合することができる。核酸結合タンパク質結合部位には、Csy4、Cas5またはCas6ポリペプチドが結合することができる。核酸結合タンパク質結合部位のいくつかの例には、例えば、RNA結合タンパク質が結合することができる配列、例えば、MS2結合配列、U1A結合配列、boxB配列、eIF4A配列、ヘアピン、RNA認識モチーフ（RRM）ドメイン（例えば、U1A）が結合することができる配列、2本鎖RNA結合ドメイン（dsRBD）例えば、（シュタウフェン）が結合することができる配列、PAZドメイン（例えば、PAZ、アルゴノート）が結合することができる配列、PIWIドメイン（例えば、PIWI、MILI、MIWI、アルゴノート）が結合することができる配列などが含めることができる。核酸結合タンパク質結合部位のいくつかの例には、例えば、DNA結合タンパク質、例えば、亜鉛フィンガー、ヘリックス-ターン-ヘリックスドメイン、亜鉛フィンガードメイン、ロイシンジッパー（bZIP）ドメイン、ウイングドヘリックスドメイン、ウイングドヘリクスターンヘリックスドメイン、ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン、HMG-ボックスドメイン、Wor3ドメイン、イムノグロブリンドメイン、B3ドメイン、TALEドメインなどが結合する配列を含めることができる。

30

40

【0617】

核酸は、1つまたはそれ以上の核酸結合タンパク質結合部位を含むことができる。核酸は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の核酸結合タンパク質結合部位を含むことができる。1つまたはそれ以上の核酸結合タンパク質結合部位は同じであってもよい。1つまたはそれ以上の核酸結合タンパク質結合部位は異なってもよい。例えば、核酸はCsy4結合部位およびMS2結合部位を含むことができる。1つまたはそれ以上の核酸結合タンパク質結合部位は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、1

50

30、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離することができる。いくつかの実施形態では、3'のほとんどの核酸結合タンパク質結合部位には、本開示の直列型融合ポリペプチドが結合することができる。

【0618】

直列型融合ポリペプチド

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、複数の核酸の直列型融合ポリペプチドへの結合を提供する。直列型融合ポリペプチドは、1つのポリペプチド鎖と一緒に融合した複数の核酸結合タンパク質を含むことができる。直列型融合ポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の核酸結合タンパク質を含むことができる。直列型融合ポリペプチドの核酸結合タンパク質は、本開示の核酸の核酸結合タンパク質結合部位に結合することができる。核酸結合タンパク質の例には、MS2、U1A、box B配列結合タンパク質（例えば、亜鉛フィンガー）、eIF4A、シュタウフェン、PAZ、アルゴノート、PIWI、MILI、MIWI、亜鉛フィンガー、ヘリックス-ターン-ヘリックスドメイン、亜鉛フィンガードメイン、ロイシンジッパー（bZIP）ドメイン、ウイングドヘリックスドメイン、ウイングドヘリクスターンヘリックスドメイン、ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン、HMG-ボックスドメイン、Wor3ドメイン、イムノグロブリンドメイン、B3ドメイン、TALEドメインなどを含めることができる。いくつかの実施形態では、核酸結合タンパク質はRNA結合タンパク質である。RNA結合タンパク質は、CRISPRシステムの構成要素であってもよい。いくつかの実施形態では、RNA結合タンパク質は、Cas5またはCas6ファミリーのタンパク質の構成要素であってもよい。いくつかの実施形態では、RNA結合タンパク質は、Csy4、Cas5、Cas6またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。いくつかの実施形態では、核酸結合タンパク質はDNA結合タンパク質（例えば、亜鉛フィンガー）である。

10

20

【0619】

場合によって、核酸結合タンパク質はリンカーによって分離される。リンカーは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100個またはそれ以上のアミノ酸を含んでもよい。

【0620】

直列型融合ポリペプチドは、非天然配列（例えば、ペプチド親和性タグ）を含むことができる。非天然配列は、直列型融合ポリペプチドを細胞内の位置（例えば、核）に向かわせることができる核内移行シグナル（NLS）を含むことができる。

30

【0621】

直列型融合ポリペプチドの各核酸結合タンパク質は、それ自身の非天然配列を含むことができる。各核酸結合タンパク質の非天然配列は同じであってもよい。各核酸結合タンパク質の非天然配列は異なってもよい。直列型融合ポリペプチドの核酸結合タンパク質のいくつかの非天然配列は同じであってもよく、直列型融合ポリペプチドの核酸結合タンパク質のいくつかの非天然配列は異なってもよい。

【0622】

場合によって、本開示の方法は、本開示の直列型融合ポリペプチドおよび複数の核酸を含む複合体の形成を提供することができる。複合体の形成は、本開示の核酸内のコグネイト核酸結合タンパク質結合配列に結合する直列型融合ポリペプチドの核酸結合タンパク質を含むことができる。例えば、Csy4結合部位を含む化学量論的に輸送できる核酸は、直列型融合タンパク質におけるCsy4タンパク質サブユニットに結合することができる。複合体は、細胞の外側で形成することができる（例えば、インピトロにおいて）。複合体は、細胞内で形成することができる（例えば、インピボにおいて）。複合体がインピトロにおいて形成する場合、例えば、トランスフェクション、形質転換、ウイルス形質導入、エレクトロポレーション、注射などによって細胞に導入することができる。

40

【0623】

50

本開示の方法は、インピボ、インピトロおよびエキソピボの両方における多数の核酸の治療的輸送を提供する。輸送した核酸は、疾患を処置するために使用することができる。例えば、輸送した核酸は、遺伝子治療で使用することができる、および/または細胞のゲノムに組み込むことによって治療成績をもたらすことができる。治療成績とは、タンパク質、核酸または疾患に関連した任意の生体分子、例えば、分解生成物、低分子および/またはイオンのレベルの増加または減少を意味することができる。例えば、治療成績は、炎症遺伝子のレベルの増加、または疾患に関連する経路におけるタンパク質レベルの減少を含むことができる。治療成績とは、生理学的効果を意味することができる。生理学的効果には、形態学的変化、代謝変化および/または細胞における構造変化を含めることができる。治療成績とは、タンパク質および/または核酸の改変、例えば、グリコシル化、アセチル化、メチル化、脱メチル化、脱プリン化、ユビキチン化などの変化を意味することができる。

10

【0624】

治療成績は、細胞の遺伝子構造の変化、細胞内の対象とする生体分子のレベルおよび/または細胞における生理学的変化によって測定することができる。測定は、分光測定法、スペクトル測定法、配列決定、ELISA、顕微鏡検査および/またはX線結晶学などの分子生物学的技術を使用して行うことができる。測定は、マウス、ラット、イヌおよび霊長類などの動物モデルを使用して行うことができる。例えば、本開示の遺伝的に改変された細胞をマウスに導入して、例えば、転移および/または分化させる能力などの生物学的および生理学的変化を評価することができる。

20

【0625】

血液疾患のためのスパーサー

本開示は、造血幹細胞(HSC)の遺伝子操作のための組成物、方法およびキットを提供する。

【0626】

組成物

HSCは、部位特異的ポリペプチド(例えば、Cas9)を含むことができる。

【0627】

HSCは、核酸ターゲティング核酸を含むことができる。本開示の核酸ターゲティング核酸は、遺伝子疾患に關与する遺伝子を標的とすることができる。表1に障害に關与する遺伝子の例を挙げる。表1に挙げた遺伝子は、核酸ターゲティング核酸の標的となることができる遺伝子であることができる。本開示の核酸ターゲティング核酸は、表1に挙げた遺伝子を標的とすることができるスパーサーを含むことができる。

30

【0628】

表2は、本開示の核酸ターゲティング核酸のスパーサーの例を示す。表2の各スパーサーは、核酸ターゲティング核酸に挿入することができるスパーサーであることができる。スパーサーの例と共に、疾患の名称およびスパーサーの標的となる疾患に關与する遺伝子を示す。

【0629】

【表 2】

表2. 血液疾患のスペーサー

遺伝子	スペーサー	疾患
アリアルスルファターゼ A	AGGGTTTATTTCTTACGCT	異染性白質ジストロフィー
ウィスコット-アルドリッチ 症候群タンパク質	CCGAGGTCCCTAGTCCGGAA	ウィスコット-アルドリッチ 症候群
ATP 結合カセット D1	CGGAGGTGGGCGGAGCCTCC	副腎白質ジストロフィー
C-C ケモカイン受容体 5 型	AGCTTTCTCGTCTGGGTATT	ヒト免疫不全ウイルス
ヘモグロビンベータサブ ユニット	GAAAATAAATGTTTTTATT	ベータ-サラセミア
インターロイキン-2 受容体 サブユニットガンマ	ACAGAACTTTATTTCTCAT	X-連鎖重症複合免疫不全症
シスチノシン	CTTTGGGAGGCCGAGGCGGG	MLSDシスチン症
リボソームタンパク質 S19	TTTTAGAAACAGTATGAGAT	ダイヤモンド-ブラックファン 貧血
ファンconi貧血相補群 B	ATGCACAAAATAAACAGCAG	ファンconi貧血
シュワックマン-ボディアン- ダイヤモンド症候群遺伝子	GAGTTAGTTCACATCTACAG	シュワックマン-ボディアン- ダイヤモンド症候群

10

20

【0630】

方法

30

本開示は、核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドをHSCに導入する方法を提供する。いくつかの実施形態では、HSCは導入前に患者から抽出する。抽出したHSCは精製することができる（例えば、アフェレーシスによって）。部位特異的ポリペプチドおよび/または核酸ターゲティング核酸は、精製したHSCに導入することができる。部位特異的ポリペプチドおよび/または核酸ターゲティング核酸は、精製していないHSCに導入することができる。導入はインビトロにおいて（例えば、患者の外部で、取り出した細胞で）HSC内に行うことができる。場合によって、導入はインビボにおいて（例えば、患者の内部で、取り出していない細胞で）HSC内に行うことができる。

【0631】

本開示の部位特異的ポリペプチドおよび/または核酸ターゲティング核酸の導入は、例えば、ウイルス形質導入、トランスフェクション、エレクトロポレーション、光学的トランスフェクションおよび/または化学的トランスフェクションによって行うことができる。

40

【0632】

一旦HSCに導入されると、本開示の核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドは複合体を形成することができる。複合体は核酸ターゲティング核酸によって標的核酸（例えば、表3に挙げた遺伝子）にガイドすることができる。核酸ターゲティング核酸は、標的核酸とハイブリダイズすることができる。部位特異的ポリペプチドは、標的核酸を改変することができる（例えば、標的核酸を切断することによって）。

【0633】

50

場合によって、改変された標的核酸は欠失を含む。場合によって、改変された標的核酸はドナーポリヌクレオチドの挿入を含む。ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピーまたはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部を標的核酸に挿入することができる。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。

【0634】

【表3】

表3. 疾患に関する遺伝子のリスト

疾患名	遺伝子
異染性白質ジストロフィー(MLD)	アリアルスルファターゼA
ウィスコット-アルドリッチ症候群(WAS)	ウィスコット-アルドリッチ症候群タンパク質
ウィスコット-アルドリッチ症候群(WAS)	Leukosialin
好中球減少症	ウィスコット-アルドリッチ症候群タンパク質
副腎白質ジストロフィ	ATP結合カセットD1
ヒト免疫不全ウイルス(HIV)	C-Cケモカイン受容体5型
ベータ-サラセミア	ヘモグロビンサブユニットベータ
鎌状赤血球貧血	ヘモグロビンサブユニットベータ
X-連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)	インターロイキン-2受容体サブユニットガンマ
マルチシステムリソソーム蓄積シスチン症	シスチノシン
ダイヤモンド-ブラックファン貧血	リボソームタンパク質S19
ファンconi貧血	ファンconi貧血相補群A、BおよびC
シュワックマン-ボディアン-ダイヤモンド症候群	SBDS遺伝子
ゴーシェ病	グルコセレブロシダーゼ
血友病A	抗血友病因子または第VIII因子
血友病B	クリスマス因子、セリンプロテアーゼ、第IX因子
アデノシンデアミナーゼ欠損症(ADA-SCID)	アデノシンデアミナーゼ
GM1ガングリオシド	ベータ-ガングリオシド
糖原病II型、ポンペ病、酸性マルターゼ欠損症	酸性アルファ-グルコシダーゼ
ニーマン-ピック病、SMPD1-関連(A型およびB型)	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1 または酸性スフィンゴミエリナーゼ
クラッペ病、グロボイド細胞白質ジストロフィー、ガラクトシルセラミド脂質代謝異常	ガラクトシルセラミダーゼまたはガラクトセレブロシダーゼ
多発硬化症(MS)	ヒト白血球抗原DR-15、DQ-6、DRB1

10

20

30

【0635】

計算法

本開示は、核酸ターゲティング核酸のためのスペーサーを同定するための計算法を提供する。計算法は、プロトスペーサー隣接モチーフのためのゲノムの核酸配列の走査を含むことができる。プロトスペーサー隣接モチーフを見いだすと、プログラムはプロトスペーサー隣接モチーフの上流のヌクレオチド10~30個を自動的に計数することができる。プロトスペーサー隣接モチーフの上流のヌクレオチド10~30個は、推定上のスペーサー配列となり得る。言い換えると、ゲノムにおいてプロトスペーサー隣接モチーフの上流のヌクレオチド10~30個は標的核酸に対応することができ、標的核酸に相補的な配列はスペーサーと称することができる。

40

【0636】

このプログラムは、配列が核酸ターゲティング核酸においてスペーサーとしてどの程度

50

効果的であるかを確認するために、推定スペーサー配列の全配列反復を試験することができる。例えば、このプログラムは、推定スペーサー配列の各反復を取り上げ、配列についてインシリコ2次構造予測を実施することができる。2次構造予測は、推定スペーサー配列を核酸ターゲティング核酸主鎖（例えば、スペーサーを含まない核酸ターゲティング核酸）に付加することを含むことができる。2次構造予測は、核酸ターゲティング核酸主鎖において合体した推定スペーサー配列の2次構造予測分析を実施することができる。2次構造予測分析は、例えば、どのヌクレオチドが2本鎖、ヘアピンを形成することができ、どのヌクレオチドが構造不定で、および/またはどのヌクレオチドが不对であり得るかを予測することを含むことができる。

【0637】

計算化学法は、2次構造予測分析を行った各推定スペーサー配列について折りたたみ試験を実行することを含むことができる。折りたたみ試験は、推定スペーサー配列を含む核酸ターゲティング核酸のインシリコ折りたたみを含むことができる。核酸ターゲティング核酸および推定スペーサー配列は、折りたたみ試験を合格することができるか、または不合格であってもよい。

【0638】

折りたたみ試験を合格するために、主鎖核酸ターゲティング核酸の2次構造は保存されていることが必要であり、スペーサーにおける5、4、3、2または1個未満のヌクレオチドがスペーサーの外のヌクレオチドとハイブリダイズしていてもよく、スペーサー内のその他の2次構造はスペーサー内に含有される。

【0639】

切れ目のないレポーター選択

総括

本開示は、細胞を遺伝的に改変し、レポーターエレメントの切れ目のない組込み、検出および切除によってこのように遺伝的に改変された細胞を選択するための方法、組成物、システムおよびキットについて記載する。本開示のいくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは、細胞ゲノムに導入する核酸（本明細書では対象とする遺伝子エレメントと呼ぶ）ならびにレポーターエレメント（例えば、GFP）をコードする核酸配列、部位特異的ポリペプチドおよび2つの核酸ターゲティング核酸を含むことができる。部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸のいずれかおよび/または3つ全てを誘導性プロモーターによって制御することができる。部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸は、核酸ターゲティング核酸がゲノム内の標的核酸にハイブリダイズすることによって細胞ゲノムの1部位を標的とすることができる複合体を形成することができる。複合体の部位特異的ポリペプチドは、標的核酸を切断することができる。ドナーポリヌクレオチドは切断された標的核酸に挿入することができる。ドナーポリヌクレオチドの存在下で標的部位に2本鎖分断（または1本鎖分断）を導入した後で、受容体細胞の集団は、対象とする遺伝子エレメントの存在の代理としてレポーター分子の存在をスクリーニングすることができる。レポーター分子含有細胞を単離した後で、レポーターエレメントは部位特異的ポリペプチドおよび/または核酸ターゲティング核酸発現を誘導することによって切除することができる。核酸ターゲティング核酸は、レポーターエレメントの5'および3'末端を標的とすることができ、レポーターエレメントの切除を引き起こすことができる。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。

【0640】

図18は、本開示の方法の実施形態例を示す。核酸は、複数の遺伝子エレメント1805/1810を含むことができる。遺伝子エレメント1805および1810は、例えば、遺伝子、ノンコーディング核酸、イントロン、エキソン、DNAおよび/またはRNAであってもよい。遺伝子エレメント1805および1810は、同じ遺伝子の一部であることができる。遺伝子エレメントの間に、遺伝子操作に適した標的核酸1806があつて

10

20

30

40

50

もよい。本開示の部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸は、標的核酸 1806 を標的とすることができる 1815 複合体を形成することができる。複合体の部位特異的ポリペプチドは、標的核酸 1806 を切断 1820 することができる。ドナーポリヌクレオチドは切断された標的核酸 1806 に挿入 1825 することができる。ドナーポリヌクレオチドは、対象とする遺伝子エレメント 1830 を含むことができる。対象とする遺伝子エレメント 1830 は遺伝子であってもよい。ドナーポリヌクレオチドはまた、レポーターエレメント 1835 を含むことができる。ドナーポリヌクレオチドはまた、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列および 1 つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸を含むことができる。場合によって、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび 1 つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸は、2 つの核酸ターゲティング核酸をコードする。部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列および核酸ターゲティング核酸は、作動可能に誘導性プロモーターに結合することができる。ドナーポリヌクレオチドの標的核酸 1806 への挿入は、レポーターエレメント 1835 の発現を引き起こすことができる。レポーターエレメント 1835 は、ドナーポリヌクレオチドを含む細胞を選択する手段として使用することができる。

10

20

30

40

50

【0641】

図 19 は、標的核酸からレポーターエレメント 1915 を除去するための実施形態例を示す。標的核酸は、複数の遺伝子エレメント 1905 / 1920 を含むことができる。レポーターエレメント 1915 は、対象とする遺伝子エレメント 1910 に融合させることができる。部位特異的ポリペプチドおよび 1 つまたはそれ以上の核酸ターゲティング核酸の生成を引き起こすことができるレポーター遺伝子 1915 の発現を誘導することができる。部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸と複合体を形成することができる。この複合体は、複合体の核酸ターゲティング核酸によってレポーターエレメント 1915 にガイドすることができる。2 つの核酸ターゲティング核酸の 1 つは、レポーターエレメント 1915 の 5' 末端を標的とすることができる 1925。2 つの核酸ターゲティング核酸の 1 つは、レポーターエレメント 1915 の 3' 末端を標的とすることができる 1930。レポーターエレメント 1915 の標的末端は、複合体の部位特異的ポリペプチドによって切断され、それによってレポーターエレメント 1915 を切除 1935 することができる。標的核酸は、ドナーポリヌクレオチドの対象とする遺伝子エレメント 1910 部分を含むことができる。核酸ターゲティング核酸は、ドナーポリヌクレオチドが（対象とする遺伝子エレメントを含んで）切除されるように設計することができる。

【0642】

方法

本発明の開示は、レポーターエレメントおよびレポーターエレメントの切除を使用した細胞の選択方法を提供する。部位特異的ポリペプチド、エンドリボヌクラーゼ、核酸ターゲティング核酸、ドナーポリヌクレオチドおよび / または核酸ターゲティング核酸は、細胞に導入することができる。ドナーポリヌクレオチドは、1 つまたはそれ以上の対象とする遺伝子エレメントを含むことができる。ドナーポリヌクレオチドは、1 つまたはそれ以上のレポーターエレメントを含むことができる。ドナーポリヌクレオチドは、対象とする 1 つまたはそれ以上の遺伝子エレメントおよび 1 つまたはそれ以上のレポーターエレメントを含む。2 つ以上の部位特異的ポリペプチド、エンドリボヌクラーゼ、ドナーポリヌクレオチドおよび / または核酸ターゲティング核酸は、細胞に導入することができる。場合によって、細胞は既に部位特異的ポリペプチドおよび / または核酸ターゲティング核酸を発現している。場合によって、部位特異的ポリペプチドおよび / または核酸ターゲティング核酸はプラスミドにコードされる。場合によって、部位特異的ポリペプチドおよび / または核酸ターゲティング核酸は 2 つ以上のプラスミドにコードされる。場合によって、2 つ以上の部位特異的ポリペプチドまたは部位特異的ポリペプチドをコードする核酸を細胞に導入する。場合によって、細胞は細胞溶解物である。

【0643】

導入は、ウイルスまたはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合、プロ

トプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリエチレンジイミン（PEI）媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介核酸輸送などの核酸を細胞に導入するための任意の手段によって行うことができる。ベクターは、宿主細胞内で一過性に発現することができる。ベクターは、宿主細胞内で安定して発現することができる（例えば、宿主細胞のゲノムに安定して組み込まれることによって）。

【0644】

核酸ターゲティング核酸は、特定の標的配列および/または特定の配列に相同な任意の配列によって特徴づけられる核酸に結合することができる。標的配列は、遺伝子の一部または全部、その他の核酸実体の中でも遺伝子の5'末端、遺伝子の3'末端、調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー）、擬遺伝子、ノンコーディングDNA、マイクロサテライト、イントロン、エキソン、染色体DNA、ミトコンドリアDNA、センスDNA、アンチセンスDNA、核様体DNA、葉緑体DNAまたはRNAであることができる。

【0645】

部位特異的ポリペプチドは、核酸ターゲティング核酸が結合した標的核酸を切断することができる。部位特異的ポリペプチドは、標的核酸を切断しなくてもよい。場合によって、エンドリボヌクレアーゼは標的核酸を切断する。エンドリボヌクレアーゼは、ベクターによってコードされていてもよい。エンドリボヌクレアーゼはドナーポリヌクレオチドによってコードされていてもよい。エンドリボヌクレアーゼは、細胞内に存在していてもよい。エンドリボヌクレアーゼおよび/または部位特異的ポリペプチドの発現は、条件的プロモーターによって誘導することができる。ドナーポリヌクレオチドは、切断された部位の標的核酸に組み込むことができる。

【0646】

切除

本明細書で開示した方法はさらに、レポーターエレメントの全部、一部の切除を含んでもよく、または全く含まなくてもよい。レポーターエレメントの第1の核酸ターゲティング核酸は、レポーターエレメントの5'末端を標的とすることができる。レポーターエレメントの第2の核酸ターゲティング核酸は、レポーターエレメントの3'末端を標的とすることができる。核酸ターゲティング核酸は、レポーターエレメントの5'および3'末端両方を標的とすることができる。核酸ターゲティング核酸は、レポーターエレメントおよび/またはドナーポリヌクレオチドの2つの配列を標的とすることができる。2つの標的配列は、少なくとも約70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%同一であることができる。2つの標的配列は、多くても約70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%同一であることができる。レポーターエレメントの核酸ターゲティング核酸が発現すると、それらは部位特異的ポリペプチドと複合体を形成し、レポーターエレメントの5'および3'末端の相補的領域にハイブリダイズすることによってレポーターエレメントの5'および3'末端を標的とすることができる。複合体とレポーターエレメントのハイブリダイゼーションは、レポーターエレメントの全部、一部の切断を引き起こすことができるか、または全く引き起こすことができない。切断した核酸は、例えば、非相同末端結合によって再結合することができる。再結合した核酸は、欠失または挿入を導入しなくてもよい。再結合した核酸は、欠失または挿入を導入してもよい。切断した核酸は、例えば、相同組換えによって再結合することができる。相同組換えは、標的核酸部位が実質的に同一のとき、切断した核酸を再結合するために使用することができる。

【0647】

スクリーニング

本明細書で開示した方法はさらに、選択した細胞からレポーターエレメントを切除すること、それによって第2の細胞を形成すること、および第2の細胞をスクリーニングすることを含むことができる。スクリーニングには、レポーターエレメントの全部または一部の欠如のスクリーニングを含めることができる。スクリーニングには、レポーターエレメントによってコードされた蛍光タンパク質を発現する細胞を、蛍光タンパク質を発現しない細胞から分離する蛍光標示式細胞分取 (FACS) を含めることができる。細胞は、レポーターエレメントもしくは遺伝子エレメントによってコードされたタンパク質に結合する蛍光タンパク質、蛍光プローブまたは蛍光色素を結合した抗体と接触させ、その後FACSによって選択することができる。蛍光色素には、限定はしないが、カスケードブルー、パシフィックブルー、パシフィックオレンジ、ルシファーイエロー、NBD、R-フィコエリトリン (PE)、PE-Cy5 結合体、PE-Cy7 結合体、Red 613、PerCP、TruRed、FluorX、フルオレセイン、BODIPY-FL、TRITC、テキサスレッド、アロフィコシアニン、APC-Cy7 結合体 (PharRed)、様々なアレクサフルオロ色素、Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、様々なダイライト、Y66H、Y66F、EBFP、EBFP2、アズライト、GFPUV、T-サファイア、TagBFP、セルリアン、mCFP、ECFP、Cypet、Y66W、dケイマ-レッド、mケイマ-レッド、TagCFP、AmCyan1、mTFP1、S65A、ミドリイシ-シアン、GFP、TurboGFP、TagGFP、TagGFP2、AcGFP1、S65L、エメラルド、S65T、S65C、EGFP、アザミ-グリーン、ザグリーン1、ドロンパ-グリーン、TagYFP、EYFP、トパーズ、ヴィーナス、mシチリン (mCitirine)、YPet、TurboYFP、PhiYFP、PhiYFPm、ザイエロー1、mバナナ、クサビラ-オレンジ、mオレンジ、mOrane2、mKO、TurboRFP、tdTomato、DsRed-Express2、TagRFP、DsRedモノマー、DsRed2、mストロベリー、TurboFP602、AsRed2、mRFP1、J-Red、mCherry、HcRed1、mKate2、Katushka、mKate、TurboFP635、mPlum、mラズベリー、mネプチューン (mNeptune)、E2-クリムゾンを含めることができる。

10

20

30

40

50

【0648】

細胞は、レポーターエレメントまたは遺伝子エレメントによってコードされるペプチド親和性タグに結合する抗体と接触させて、その後この抗体を認識する免疫磁気ビーズによって選択することができる。スクリーニングは、レポーターエレメントまたは遺伝子エレメントがb-ガラクトシダーゼをコードする場合は、X-galを添加することによって細胞を染色することを含むことができる。スクリーニングは、手動の選別 (例えば、細胞懸濁液の希釈) および顕微鏡 (例えば、蛍光顕微鏡) を含むことができる。スクリーニングはハイコンテックススクリーニングを含むことができる。

【0649】

レポーターエレメントは、薬剤耐性遺伝子をコードし、それによって、レポーターエレメントを発現しない細胞を殺滅する薬剤を添加することによってレポーターエレメントを含有する細胞の選択を可能にすることができる。このような薬剤には、限定はしないが、エリスロマイシン、クリンダマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、キヌプリスチン-ダルホプリスチンの組み合わせ、エンロフロキサシン、バンコマイシン、オキサシリン、ペニシリン、スルホンアミドスルfoisキサゾール、トリメトプリム、メチオニンスルホキシミン、メトトレキセート、ピューロマイシン、プラストサイジン、ヒスチジノール、ハイグロマイシン、ゼオシン、プレオマイシンおよびネオマイシンを含めることができる。

【0650】

ライブラリー

本発明の開示は、ドナーポリヌクレオチドを含む発現ベクターのライブラリーを提供する。いくつかの実施形態では、このライブラリーは、対象とする遺伝子エレメントは異なる

るが、同じレポーターエレメントをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含むことができる。いくつかの実施形態では、このライブラリーは異なる対象とする異なる遺伝子エレメントおよび異なるレポーターエレメントをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含むことができる。レポーターエレメントは、核酸ターゲティング配列 (crRNA および tracrRNA) が異なってもよい。レポーターエレメントは、レポーター遺伝子 (例えば、蛍光タンパク質をコードする遺伝子) が異なってもよい。本開示は、遺伝的に改変された複数の細胞を生成するためのライブラリーの使用方法を提供する。本開示は、ハイスループット遺伝子スクリーニングのためのライブラリーの使用方法を提供する。これらのライブラリーは、遺伝子機能を推測するために多数の個々の遺伝子の分析を可能にすることができる。ライブラリーは約 10 個の構成要素から約 10^{12} 個の構成要素を含むことができ、例えば、ライブラリーは約 10 個の構成要素から約 10^2 個の構成要素、約 10^2 個の構成要素から約 10^3 個の構成要素、約 10^3 個の構成要素から約 10^5 個の構成要素、約 10^5 個の構成要素から約 10^7 個の構成要素、約 10^7 個の構成要素から約 10^9 個の構成要素、または約 10^9 個の構成要素から約 10^{12} 個の構成要素を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0651】

細胞の改変 (トランスフェクション / 感染)

開示の方法は、ドナーポリヌクレオチドを含む細胞の選択を提供する。いくつかの実施形態では、方法には、標的核酸と接触させること、または細胞 (若しくは細胞の集団) に本開示の核酸ターゲティング核酸、部位特異的ポリペプチドおよび / またはドナーポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列を含む 1 つまたはそれ以上の核酸を導入することが関与することができる。核酸の細胞への導入方法は、ウイルスまたはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合、プロトプラスト融合体、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン (PEI) 媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介核酸輸送などを含むことができる。いくつかの実施形態では、標的核酸の接触または細胞 (もしくは細胞の集団) への 1 つまたはそれ以上の核酸の導入は、ウイルス感染を含んでいなくてもよい。いくつかの実施形態では、標的核酸の接触または細胞 (もしくは細胞の集団) への 1 つまたはそれ以上の核酸の導入は、バクテリオファージ感染を含んでいなくてもよい。いくつかの実施形態では、標的核酸の接触または細胞 (もしくは細胞の集団) への 1 つまたはそれ以上の核酸の導入は、トランスフェクションを含んでいなくてもよい。

【0652】

操作された核酸ターゲティング核酸

操作された P - ドメイン

核酸ターゲティング核酸は操作されていてもよい (例えば、改変を含む)。操作された核酸ターゲティング核酸とは、本明細書に記載したような操作された核酸ターゲティング核酸のいずれかを意味することができる。例えば、操作された核酸ターゲティング核酸は、最小 CRISPR 反復、最小 tracrRNA および 3' tracrRNA を含むことができる。核酸ターゲティング核酸の P - ドメインは、部位特異的ポリペプチドの領域と相互作用することができる。P - ドメインは、部位特異的ポリペプチドの複数の領域と相互作用することができる。P - ドメインは、部位特異的ポリペプチドの複数の領域と相互作用ことができ、少なくとも 1 個の領域はプロトスペーサー隣接モチーフの PAM と相互作用する。これらの領域の例には、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) の Cas9 のアミノ酸 1096 ~ 1225 および 1105 ~ 1138 を含めることができる。

【0653】

改変は、P - ドメインに導入することができる。P - ドメインは、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 または 30 個またはそれ以上の隣接ヌクレオチドを含むことができる。P - ドメインは、多くても約 1、2、3、4、5

、6、7、8、9、10、15、20、25または30個またはそれ以上の隣接ヌクレオチドを含むことができる。P-ドメインは、最小CRISPR反復および最小tracrRNA配列を含む2本鎖における最後のヌクレオチド対の3'の1個のヌクレオチドから開始することができる。P-ドメインは、最小CRISPR反復および最小tracrRNA配列を含む2本鎖における最後のヌクレオチド対の少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25個または30個またはそれ以上のヌクレオチド3'から開始することができる。P-ドメインは、最小CRISPR反復および最小tracrRNA配列を含む2本鎖における最後のヌクレオチド対の多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25個または30個またはそれ以上のヌクレオチド3'から開始することができる。

10

【0654】

操作されたP-ドメインは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の変異を含むことができる。操作されたP-ドメインは、多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の変異を含むことができる。変異は、互いに隣接（例えば、連続）していてもよい。変異は、互いに分離していてもよい。変異は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離していてもよい。変異は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離していてもよい。核酸ターゲティング核酸への変異は、核酸ターゲティング核酸におけるヌクレオチドの挿入、欠失および置換を含むことができる。

20

【0655】

場合によって、操作された核酸ターゲティング核酸は、野生型核酸ターゲティング核酸に対して多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30%またはそれ以上のヌクレオチド同一性および/または類似性を含む。場合によって、操作された核酸ターゲティング核酸は、野生型核酸ターゲティング核酸に対して少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30%またはそれ以上のヌクレオチド同一性および/または類似性を含む。

30

【0656】

場合によって、操作された核酸ターゲティング核酸のCRISPR核酸部分は、野生型CRISPR核酸に対して多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30%またはそれ以上のヌクレオチド同一性および/または類似性を含む。場合によって、操作された核酸ターゲティング核酸のCRISPR核酸部分は、野生型CRISPR核酸に対して少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30%またはそれ以上のヌクレオチド同一性および/または類似性を含む。

40

【0657】

操作された核酸ターゲティング核酸のtracrRNA核酸部分は、野生型tracrRNA核酸に対して多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30%またはそれ以上のヌクレオチド同一性および/または類似性を含むことができる。操作された核酸ターゲティング核酸のtracrRNA核酸部分は、野生型tracrRNA核酸に対して少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30%またはそれ以上のヌクレオチド同一性および/または類似性を含むことができる。

50

【0658】

P - ドメインにおける改変は、操作された核酸ターゲティング核酸が標的核酸における新規PAM配列にハイブリダイズするように新たに構成されていてもよい。P - ドメインへの改変は、標的核酸におけるPAMと相補的にすることができる。P - ドメインの改変は、標的核酸におけるPAMと逆向き相補性を含むことができる。新規PAMは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドを含むことができる。新規PAMは、多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドを含むことができる。Pドメインの改変は、P - ドメイン結合および部位特異的ポリペプチドのPAM結合領域の改変と共に起こすことができる。これらの改変は代償的であってもよく、改変されたP - ドメインは改変された部位特異的ポリペプチドに結合するように特異的に改変され、改変によって部位特異的ポリペプチドはより高い特異性で操作されたP - ドメインに結合することが可能である。

10

【0659】

操作されたP - ドメインは、新規PAMに結合するように操作することができる（例えば、操作されたP - ドメインは新規PAMにハイブリダイズすることができる）。新規PAM（例えば、異なるPAM）は、2峰性であってもよい（すなわち、2峰性PAMは、PAMの2つの別々の領域を含むことができる）。2峰性PAMの2つの別々の領域は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離していてもよい。2峰性PAMの2つの別々の領域は、多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離していてもよい。

20

【0660】

操作されたP - ドメインは、新規PAM（例えば、異なるPAM）に結合するように操作されていてもよく、この新規PAMは3峰性である。3峰性PAMは、PAM配列の3つの別々の領域を含むことができる（例えば、核酸ターゲティング核酸が標的核酸を標的とするのに使用することができる3つの別々の領域）。3峰性PAMの3つの別々の領域は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離していてもよい。3峰性PAMの3つの別々の領域は、多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離していてもよい。

30

【0661】

操作された核酸ターゲティング核酸は少なくとも2個のヘアピンを含むことができる。第1のヘアピンは、最小CRISPR反復と最小tracrRNA配列の間に2本鎖を含むことができる。第2のヘアピンは、第1のヘアピンの下流にあることができる。第2のヘアピンは、第1の2本鎖の最後のヌクレオチド対の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドの下流から開始することができる。第2のヘアピンは、第1の2本鎖の最後のヌクレオチド対の多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドの下流から開始することができる。第2のヘアピンは、操作されたP - ドメインを含むことができる。

【0662】

第2のヘアピンの操作されたP - ドメインは、2本鎖ヘアピンの片側に位置することができる。第2のヘアピンの操作されたP - ドメインは、2本鎖ヘアピンの両側に位置することができる。第2のヘアピンの操作されたP - ドメインは、第2のヘアピンのヌクレオチドの少なくとも約1、2、3、4、5、10または20%を含むことができる。第2のヘアピンの操作されたP - ドメインは、第2のヘアピンのヌクレオチドの多くても約1、2、3、4、5、10または20%を含むことができる。

40

【0663】

第2のヘアピンは、tracrRNA（例えば、核酸ターゲティング核酸のmid-tracrRNAまたは3'tracrRNA）を含むことができる。第2のヘアピンは、tracrRNAと少なくとも約1、5、10、15、20、25、30、35、40、

50

45 または 50% またはそれ以上の同一性を含むことができる。第2のヘアピンは、tracrRNA と多くても約 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45 または 50% またはそれ以上の同一性を含むことができる。

【0664】

操作された P - ドメインを含む第2のヘアピンは、2本鎖を解く（例えば、融解する、ほどく）ように構成されていてもよい。第2のヘアピンは、標的核酸と接触したとき、2本鎖を解くことができる。第2のヘアピンは、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフと接触したとき、2本鎖を解くことができる。

【0665】

場合によって、操作された P - ドメインは、核酸ターゲティング核酸（例えば、操作された P - ドメインを含む同じ核酸ターゲティング核酸）における領域にハイブリダイズするように構成されていてもよく、操作された P - ドメインは、標的核酸にハイブリダイズするように構成されていてもよい。言い換えると、操作された P - ドメインは切り替え可能な配列を含むことができ、場合によって、P - ドメインは核酸ターゲティング核酸にハイブリダイズし、それによってヘアピンを形成し、場合によって、P - ドメインに標的核酸内の PAM がハイブリダイズする。

10

【0666】

変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸（例えば、野生型核酸ターゲティング核酸）よりも低い解離定数で PAM に結合するように操作することができる。変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸よりも少なくとも約 10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550 または 600% またはそれ以上低い、または高い解離定数で PAM に結合するように操作することができる。

20

【0667】

変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸よりも多くても約 10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550 または 600% またはそれ以上低い、または高い解離定数で PAM に結合するように操作することができる。変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸よりも少なくとも約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍または 50 倍またはそれ以上低い、または高い解離定数で PAM に結合するように操作することができる。変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸よりも多くても約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍または 50 倍またはそれ以上低い、または高い解離定数で PAM に結合するように操作することができる。

30

【0668】

変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸（例えば、野生型核酸ターゲティング核酸）よりも高い特異性で PAM に結合するように操作することができる。より高い特異性とは、オフターゲット結合（例えば、核酸ターゲティング核酸の間違った PAM または PAM 関連配列への結合）の低下を意味することができる。例えば、変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸よりも少なくとも約 10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550 または 600% またはそれ以上非特異的結合を低下させるように操作することができる。変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸よりも多くても約 10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550 または 600% またはそれ以上非特異的結合を低下させるよ

40

50

うに操作することができる。変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸よりも少なくとも約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍または 50 倍またはそれ以上非特異的結合を低下させるように操作することができる。変更された P - ドメインを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、変更された P - ドメインを含まない核酸ターゲティング核酸よりも多くても約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍または 50 倍またはそれ以上非特異的結合を低下させるように操作することができる。

【0669】

操作されたバルジ

操作された核酸ターゲティング核酸は、変更を核酸ターゲティング核酸のバルジ領域に導入することができるように操作することができる。バルジは、不对ヌクレオチドを含む特徴的な核酸部分である。バルジは、バルジを含む 2 本鎖のそれぞれの鎖に不对ヌクレオチドを含むことができる。言い換えると、バルジは、2 本鎖の最小 CRISPR 反復鎖に不对ヌクレオチドを、2 本鎖の最小 tracrRNA 配列鎖にも不对ヌクレオチドを含むことができる。

10

【0670】

バルジは、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個またはそれ以上の不对ヌクレオチドを核酸ターゲティング核酸の 2 本鎖の第 1 の鎖（すなわち、最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA 配列を含む 2 本鎖の最小 CRISPR 反復鎖）に含むことができる。バルジは、多くても約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個またはそれ以上の不对ヌクレオチドを核酸ターゲティング核酸の 2 本鎖の第 1 の鎖（すなわち、最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA 配列を含む 2 本鎖の最小 CRISPR 反復鎖）に含むことができる。バルジは、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個またはそれ以上の不对ヌクレオチドを核酸ターゲティング核酸の 2 本鎖の第 2 の鎖（すなわち、最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA 配列を含む 2 本鎖の最小 tracrRNA 配列鎖）に含むことができる。バルジは、多くても約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 は 10 個またはそれ以上の不对ヌクレオチドを核酸ターゲティング核酸の 2 本鎖の第 2 の鎖（すなわち、最小 CRISPR 反復および最小 tracrRNA 配列を含む 2 本鎖の最小 tracrRNA 配列鎖）に含むことができる。バルジは、最小 CRISPR RNA 配列に 1 個の不对ヌクレオチドを、最小 tracrRNA 配列鎖に 3 個の不对ヌクレオチドを含むことができる。

20

30

【0671】

不对ヌクレオチドに隣接したヌクレオチドは、ゆらぎ塩基対相互作用を形成するヌクレオチドであることができる。ゆらぎ塩基対相互作用には、グアニン - ウラシル、ヒポキサンチン - ウラシル、ヒポキサンチン - アデニンおよびヒポキサンチン - シトシンを含めることができる。不对ヌクレオチドに隣接した少なくとも 1、2、3、4 または 5 個またはそれ以上のヌクレオチドは揺らぎ対を形成することができる。不对ヌクレオチドに隣接した多くても 1、2、3、4 または 5 個またはそれ以上のヌクレオチドは揺らぎ対を形成することができる。

40

【0672】

操作されたバルジは、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個またはそれ以上の変異を含むことができる。操作されたバルジは、多くても約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個またはそれ以上の変異を含むことができる。変異は、互いに隣接（例えば、連続）していてもよい。変異は、互いに分離していてもよい。変異は、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離していてもよい。変異は、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個またはそれ以上のヌクレオチドによって分離していてもよい。核酸ターゲティング核酸への変異には、核酸ターゲティング核酸におけるヌクレオチドの挿入、欠失および置換を含めることができる。

50

【0673】

操作された核酸ターゲティング核酸のバルジは、野生型核酸ターゲティング核酸に対して多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30%またはそれ以上のヌクレオチド同一性および/または類似性を含むことができる。操作された核酸ターゲティング核酸のバルジは、野生型核酸ターゲティング核酸に対して少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30%またはそれ以上のヌクレオチド同一性および/または類似性を含むことができる。

10

【0674】

バルジの1本の鎖は変異していてもよいが、もう1本の鎖は変異していない。言い換えると、場合によって、最小CRISPR RNA鎖のバルジの配列は、野生型核酸ターゲティング核酸と同じであり、最小tracrRNA配列のバルジの配列は変異している。言い換えると、最小CRISPR RNA鎖のバルジの配列は変異しており、最小tracrRNA配列のバルジの配列は野生型核酸ターゲティング核酸と同じである。

【0675】

バルジにおける改変は、操作された核酸ターゲティング核酸が新規部位特異的ポリペプチドに結合するように新たに構成されていてもよい。新規部位特異的ポリペプチドは、野生型部位特異的ポリペプチドに対して多くても約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50%またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を含むことができる。新規部位特異的ポリペプチドは、野生型部位特異的ポリペプチドに対して多くても約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50%またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を含むことができる。新規部位特異的ポリペプチドは、Cas9の相同体であってもよい。新規部位特異的ポリペプチドは、Cas9の相同分子種であってもよい。新規部位特異的ポリペプチドは、2つの異なる部位特異的ポリペプチドのキメラであってもよい。新規部位特異的ポリペプチドは、本明細書で開示したような変異を含んでいてもよい。

20

【0676】

改変されたバルジを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、改変されたバルジを含まない核酸ターゲティング核酸（例えば、野生型核酸ターゲティング核酸）よりも低いまたは高い解離定数で部位特異的ポリペプチドに結合するように操作することができる。改変されたバルジを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、改変されたバルジを含まない核酸ターゲティング核酸よりも少なくとも約10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550または600%またはそれ以上低い、または高い解離定数で部位特異的ポリペプチドに結合するように操作することができる。改変されたバルジを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、改変されたバルジを含まない核酸ターゲティング核酸よりも多くても約10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550または600%またはそれ以上低い、または高い解離定数で部位特異的ポリペプチドに結合するように操作することができる。改変されたバルジを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、改変されたバルジを含まない核酸ターゲティング核酸よりも少なくとも約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍または50倍またはそれ以上低い、または高い解離定数で部位特異的ポリペプチドに結合するように操作することができる。改変されたバルジを含む操作された核酸ターゲティング核酸は、改変されたバルジを含まない核酸ターゲティング核酸よりも多くても約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍または50倍またはそれ以上低い、または高い解離定数で部位特異的ポリペプチドに結合するように操作することができる。

30

40

【0677】

方法

50

本開示は、核酸ターゲティング核酸の操作方法を提供する。この方法は、核酸ターゲティング核酸の改変を含むことができる。この改変は、核酸ターゲティング核酸におけるヌクレオチドの挿入、欠失、置換および変異を含むことができる。この改変には、核酸ターゲティング核酸が野生型核酸ターゲティング核酸よりも新規プロトスペーサー隣接モチーフおよび/または新規部位特異的ポリペプチドに結合するように核酸ターゲティング核酸を改変することを含めることができる。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。

【0678】

操作された核酸ターゲティング核酸は、標的核酸を切断するために使用することができる。操作された核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリペプチドを有する細胞に導入し、それによって複合体を形成することができる。複合体は標的核酸にハイブリダイズすることができ、この標的核酸はプロトスペーサー隣接モチーフを含む。複合体の部位特異的ポリペプチドは、標的核酸を切断することができる。

10

【0679】

化膿性連鎖球菌SF370のpre-CRISPR核酸およびtracr核酸配列の核酸配列の相補的部分を図20に示す。

【0680】

図21は、最小CRISPR反復および最小tracrRNA配列および3'tracrRNA配列の一部を含む2本鎖（例えば、ヘアピン）の構造例を示す。2本鎖はバルジ領域を含む。

20

【0681】

表4は、開示の1個のガイド核酸ターゲティング核酸を合成するために使用したDNA鋳型の配列を含む。

【0682】

【表4】

表4. 開示のガイド核酸のDNA鋳型

2本鎖変種第1群

TEMP3-FL	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT ATGCTGTTTTGGAAACAAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA TCAACTTGAAAAAGTGCCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v2	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGAAAAAGAGC TAGAAATAGCAAGTTTTTTTTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v3	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGATATAGAGCT AGAAATAGCAAGTTATATTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCAC CGAGTCGGTGCTTTTTTTT	10
SGR-v4	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGGA TGAAATCCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v5	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGAAAATGAGG ATGAAAATCCAAGTATTTTTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v6	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGATTATGAGGA TGAAATCCAAGTATAATTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCAC CGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v7	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTAATTGAGGA TGAAATCCAAGTATAATTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCAC CGAGTCGGTGCTTTTTTTT	20
SGR-v8	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGAAAATCAAG TGATGAAAATCGAGATTTTTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v9	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGAAAATGAAG GATGAAAATCCAGTATTTTTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v10	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGATTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v11	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTCTCAGAGCT AGAAATAGCAAGTTGAGATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	30
SGR-v12	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTCCCAGAGC TAGAAATAGCAAGTTGGGATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCC ACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v13	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGACTC AGAAATCAGAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	

2本鎖変種第2群

SGR-v14	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCTCTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCACC GAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v15	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGG AAACTCTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCACCGAGTC GGTGCTTTTTTTT	40

【表 5】

	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAAAT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT TTTT	
SGR-v16		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATATTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v17		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATATTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAACAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v18		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGACGATAGAA CGGAAACGTTGGACATCGTTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGCTTTTTTT	10
SGR-v19		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGACGATGAGA CGGAAACGTC AAGTATCGTTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v20		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAAGACT AGAAATAGTGGACTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v21		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATCGTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v22		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTGGTAGAGC TAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGCTTTTTTT	20
SGR-v23		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTCGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v24		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGTG AGAAATAGCAAGTTCACATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v25		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTACACTAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v26		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAACAGAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	30
SGR-v27		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAACTGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG CACCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v28		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v29		
Tracr変種群		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATGGAAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v30		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATTTTCGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	40
SGR-v31		
	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGCGAAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTT	
SGR-v32		

【表 6】

SGR-v33	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTTACCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v34	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTGGCTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v35	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGAATTCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v36	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAAGTACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	10
SGR-v37	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCATGATGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v38-M MO	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGAATGATACATCACAAAAAAGGCTTTATGC CGTAACTACTACTTATTTTTCAAATAAGTAGTTTTTTTTT	
SGR-v39-ST 2	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTT ATGGCAGGGTGTTTTTCGTTATTTTTTTT	
SGR-v40-CJ	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGAGTTTGCGGGACTCTGCGGGGTACAAATCC CCTAAAACCGCTTTTTTTT	20
SGR-v41-N M	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTG CCCCTTAAAGCTTCTGCTTTAAGGGGCATTTTTTTT	
Csy4-タグ群		
SGR-v42	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTATACTGCCGTATA GGCAGAGATTTTTTTT	
SGR-v43	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTATACTGCCGTATA GGCAGAGAAATGGACTCGGAATACTGCCGTATAGGCAGAGATTTTTTTT	30
SGR-v44	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT ATCACTGCCGTATAGGCAGTGATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT	
SGR-v45	AGTAATAATACGACTCACTATAGGGGGCCACTAGGGACAGGATGTTTTAGAGCT ATCACTGCCGTATAGGCAGTGATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTAATGGACTCGATACTGCCGTATAG GCAGAGATTTTTTTT	

【0685】

表 2 は、表 1 の DNA 鋳型の RNA 配列を示す。

【0686】

【表7】

表2. 開示の1個のガイド核酸ターゲティング核酸のRNA配列

Caribou

P/N 1個のガイド核酸ターゲティング核酸配列

2本鎖変種
第1群

TEMP3-FL	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGGAAACA AAACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	10
SGR-v2	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGAAAAAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUUUU UUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v3	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGAUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUUA UUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v4	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGGAUGAAAAUCCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	20
SGR-v5	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGAAAAUGAGGAUGAAAAUCCAAGUAUUU UUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v6	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGAUUAGAGGAUGAAAAUCCAAGUAUAA UUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v7	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGAAUUGAGGAUGAAAAUCCAAGUAAUU AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	30
SGR-v8	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGAAAAUCAAGUGAUGAAAAUCGAGAUUU UUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v9	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGAAAAUGAAGGAUGAAAAUCCAGUAUUU UUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	40
SGR-v10	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGAUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA UUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	

【0687】

【表 8】

SGR-v11	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUCUCAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUGAGA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU UUUUU	
SGR-v12	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUCCCAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUGGGA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU UUUUU	
SGR-v13	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUUAGACUCAGAAAUCAGAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	10
2 本鎖変種		
第 2 群		
SGR-v14	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUUAGAGCUAGAAAUAGCUCUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU UUUU	
SGR-v15	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUUAGAGGAAACUCUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	20
SGR-v16	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUUAGAAAUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	
SGR-v17	GGGGCCACUAGGGACAGGAUAUUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v18	GGGGCCACUAGGGACAGGAUAUUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA ACAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	30
SGR-v19	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGACGAUAGAACGGAAACGUUGGACAUCGU UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU UUUUU	
SGR-v20	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGACGAUGAGACGGAAACGUCAAGUAUCGU UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU UUUUU	
SGR-v21	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUUAGACUAGAAAUAGUGGACUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	40

【 0 6 8 8 】

【表 9】

SGR-v22	GGGGCCACUAGGGACAGGAUCGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v23	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUGGUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v24	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUGCGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	10
SGR-v25	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGUGAGAAAUAGCAAGUUCAC AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v26	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUACAC UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU UUUUU	20
SGR-v27	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAC AGAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v28	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAACUGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUUUU	
SGR-v29	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU UUU	30
Tracr 変種 群		
SGR-v30	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUGGAACUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v31	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUUUCGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	40
SGR-v32	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGCGAAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	

【表 1 0】

SGR-v33	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUUCACCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v34	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUGGCUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v35	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGAAUUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	10
SGR-v36	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAAGUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	
SGR-v37	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAUGAUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUUUUU	20
SGR-v38-M MO	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGAAUGAUACAUCACAAAAAAGGCUUUAUGCCGUAACUACUACU UAUUUUCAAAAUAAGUAGUUUUUUU	
SGR-v39-ST 2	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUUCAUGCCGAAUCAACACCCUGUCAUUUUUAGGCAGGGUGU UUUCGUUAUUUUUUU	
SGR-v40-CJ	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGAGUUUGCGGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCUAAAACCGCUU UUUUU	30
SGR-v41-N M	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCCGUCUGAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAAGCUU CUGCUUUAAGGGGCAUUUUUU	
Csy4-タグ 群		
SGR-v42	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUAUACUGCCGUAUAGGCAGAGAUUUU UU	40
SGR-v43	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUAUACUGCCGUAUAGGCAGAGAAAUG GACUCGGAAUACUGCCGUAUAGGCAGAGAUUUUUU	

【 0 6 9 0】

【表 1 1】

SGR-v44	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUUAGAGCUAUCACUGCCGUAUAGGCA GUGAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU
SGR-v45	GGGGCCACUAGGGACAGGAUGUUUUUAGAGCUAUCACUGCCGUAUAGGCA GUGAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUAAUGGACUCGAUACUGCCGUAUAGGCAGAGAU UUUUU

10

【0691】

表5は、さらなる核酸ターゲティング核酸変種の活性および目的を示す。+は活性を意味し、-は不活性を意味する。これらの変種の実験データを図37に示す。

【0692】

【表 1 2】

表5. 核酸ターゲティング核酸変種およびその活性

名称	dCB ###	活性	目的	Spacer	sg主鎖
SGR-v80		-	リンカーの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAACTCGGCTAGTCC GTTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGCT
SGR-v81		-	リンカーの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAACTCTGGCTAGTCC GTTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGCT
SGR-v82		-	リンカーの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAACTCTCTGGCTAGT CCGTTATCAACTTGAAAAAGTG GCACCGAGTCGGTGCT
SGR-v83		++	対照	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v84		++	最小sgRNA	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGGAAACAAGTTAAA ATAAGGCTAGTCCGTTATCAACT TGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCT
SGR-v85		++	最小sgRNA	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGACAAGTTAAAATA AGGCTAGTCCGTTATCAACTTG AAAAAGTGGCACCGAGTCGGT GCT
SGR-v86		++	最小sgRNA	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGGAGAACTTTAAAT AAGGCTAGTCCGTTATCAACTT GAAAAAGTGGCACCGAGTCGG TGCT
SGR-v87		-	最小sgRNA	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTATCGAAATCTAAAATAAG GCTAGTCCGTTATCAACTTGAA AAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT
SGR-v88		-	最小sgRNA	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTACTTCGGTAAAATAAGGC TAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCT
SGR-v89		++	最小sgRNA	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGATACTTAAAATAAGGC TAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCT
SGR-v90		-	最小sgRNA	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTATGAACTAAAATAAGG CTAGTCCGTTATCAACTTGAAA AAGTGGCACCGAGTCGGTGCT
SGR-v91		-	最小sgRNA	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTCTTCGGAATAAGGCTAG TCCGTTATCAACTTGAAAAAGT GGCACCGAGTCGGTGCT

10

20

30

40

【表 1 3】

名称	dCB ###	活性	目的	スパーサー	sg主鎖
SGR-v92		++	バルジの角度を変化させる	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGGCTAGAAATAGCAAG TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v93		++	バルジの角度を変化させる	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATC AACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCT
SGR-v94		++	バルジの角度を変化させる	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTACTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCA ACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCT
SGR-v95		-	バルジの角度を変化させる	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAG TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v96		-	バルジの角度を変化させる	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATC AACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCT
SGR-v97		++	バルジの角度を変化させる	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATC AACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCT
SGR-v98		-	バルジの角度を変化させる	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCA ACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCT
SGR-v99		-	対照	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v124	dCB154	-	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTAAAATAACCCTAGTCCGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v125	dCB155	+/-	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTAAAATAACCCTAGTGGGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v126	dCB156	+	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTAAAATAAGGCTAGTGGGTT ATCAACTTGAAAAAGTGGCACC GAGTCGGTGCT
SGR-v46	dCB157	++	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTAAAATAAGGCTAGTAAGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT

10

20

30

40

【表 1 4】

名称	dCB ###	活性	目的	スペーサー	sg主鎖
SGR-v47	dCB158	++	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTTTGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v48	dCB159	++	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGACTAGTTCGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v49	dCB160	-	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGGAAACT AGCCTTCTCAA
SGR-v50	dCB161	-	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGGAAACT AGCCCTCAATA
SGR-v51	dCB162	+/-	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTA GAAAATGCC
SGR-v52	dCB163	+	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTA GAAATACGG
SGR-v53	dCB164	+	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTA GAAATACTTAT
SGR-v54	dCB165	+	ネクサス/ アピン変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA TTATTAGGGGGTTA
SGR-v55	dCB166	-	ネクサス ランケーシ ョン	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGG
SGR-v56	dCB167	-	ネクサス ランケーシ ョン	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAG
SGR-v57	dCB168	+/-	ネクサス ランケーシ ョン	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCG
SGR-v58	dCB169	+/-	ネクサス ランケーシ ョン	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA T
SGR-v100		+/-	ネクサス テムの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGGCTAGTCCCG TTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCT
SGR-v101		++	ネクサス テムの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGGGCTAGTCCC CGTTATCAACTTGAAAAAGTGG CACCGAGTCGGTGCT

10

20

30

40

【表 15】

名称	dCB###	活性	目的	シーサー	sg主鎖
SGR-v102		+	ネクサス テムの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGGGGCTAGTCC CCCGTTATCAACTTGAAAAAGT GGCACCAGTCGGTGCT
SGR-v103		++	ネクサス テムの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAAACTAGTTTGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v104		++	ネクサス テムの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGACTAGTTCCG TTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCT
SGR-v105		++	対照	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v106		+/-	ネクサス テムの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCTGTT ATCAACTTGAAAAAGTGGCACC GAGTCGGTGCT
SGR-v107		++	ネクサス テムの長さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAAGCTAGTCTGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v108		-	ネクサスル ープの大き さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGTCTAGTCCCG TTATCAACTTGAAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCT
SGR-v109		+	ネクサスル ープの大き さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGTACTAGTCGC CGTTATCAACTTGAAAAAGTGG CACCGAGTCGGTGCT
SGR-v110		-	ネクサスル ープの大き さ	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGTATCTAGTGCG CCGTTATCAACTTGAAAAAGTG GCACCGAGTCGGTGCT
SGR-v111		++	対照	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCT
SGR-v112		-	Tracrハイブ リッド- LRH	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATCAAACAAGCTTCA GCTGAGTTTCAATTTCTGGCCCA TGTTGGGCACATACATATGCCAC CGAG
SGR-v113		++	Tracrハイブ リッド- SM159	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAAGGCAGTGATTTTT AATCCAGTCCGTACACAACCTTG AAAAAGTGCGCACCGATTCCGTT GCTTTTTT

10

20

30

40

【表 16】

名称	dCB ###	活性	目的	スパーサー	sg主鎖
SGR-v114		++	Tracrハイブリッド-ST3	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTAAAATAAGGCTTAGACCGT ACTCAACTTGAAAAGGTGGCAC CGATTCGGTGTTCCTTTT
SGR-v115		++	Tracrハイブリッド-LBU	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTAAAATCAAAGCGCTTTGCG CGGAGTTTCAACTTTT
SGR-v120		-	主要な変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GAGAATCTCCTAGAAATAGCTC TTATTCTTAAGGGATCACCGAAT ACAACCTGAAAAAGTGGCACC GAGTCGGTGCT
SGR-v121		++	主要な変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	GACGATGAGACGGAAACGTCA AGTATCGTTAAGGGATCACCGA ATACAACCTGAAAAAGTGGCAC CGAGTCGGTGCT
SGR-v122		-	主要な変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	AACGATGAGACGGAAACGTCA AGTATCGTCAAGGGATCACCCA ATACAACCTGAAAAAGTGGCAC CGAGTCGGTGCT
SGR-v123		-	主要な変種	GGGGCCAC TAGGGACA GGAT	AACGGTGAGGTGGAAACACCA AGTACCGTCAAGGTAGCACCCG ACAAGTC

10

20

【0697】

核酸ターゲティング核酸を使用するタグ付き細胞株の生成方法

本開示の方法は、細胞をドナーポリヌクレオチドでタグ付けすることによって、このドナーポリヌクレオチドは分裂および/または分化することができ、このドナーポリヌクレオチドは細胞分裂中に娘細胞それぞれに伝達することができることを提供する。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。

30

【0698】

タグ付けした細胞は、細胞をドナーポリヌクレオチドならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体と接触させることによって生成することができる。ドナーポリヌクレオチドは切断された標的核酸に挿入され、それによってタグ付けした細胞を生成することができる。タグ付けした細胞は細胞系などにおいて増殖させるか、または細胞の増殖集団を生成するために増殖させることができる。

40

【0699】

ドナーポリヌクレオチドは、2本鎖分断の両側に配列に相同な末端を含む相同組換えのためのドナーカセットを使用することによって切断部位に導入することができる。ドナーポリヌクレオチドは、2つの末端の間に他の配列を含むことができる。他の配列は核酸配列であってもよい。他の配列は遺伝子をコードしていてもよい。他の配列はノンコーディング核酸エレメントをコードしていてもよい。

【0700】

ドナーポリヌクレオチド（例えば、2つの相同末端の間にあるドナーポリヌクレオチドの他の配列）はマーカーを含んでもよい。マーカーは、視覚化マーカー（例えば、GFPなどの蛍光マーカー）を含むことができる。マーカーは、ランダムポリヌクレオチド配列（例えば、ランダムヘキサマー配列）を含むことができる。マーカーはバーコードで

50

あってもよい。

【0701】

NHEJは、各切断部位に特有の配列特性を導入することができる。修復機構は、挿入（例えば、ドナーポリヌクレオチドの挿入）、欠失または変異の切断部位への導入を引き起こすことができる。2本鎖分断を修復するためにNHEJを受けた細胞は、修復が起こった後、特有の配列を含むことができる（例えば、特有の配列は2本鎖分断に挿入される）。2つ以上の部位が細胞内で切断される場合、修復によって各部位にドナーポリヌクレオチドが導入され、それによってその細胞に配列多様性を付加することができる。修復部位は、細胞分裂中保持され、変更された細胞の後代全てに受け継がれることが可能な特有のバードコード配列を細胞にもたすことができる。ドナーポリヌクレオチドは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の部位に挿入することができる（例えば、切断された標的核酸）。ドナーポリヌクレオチドは、多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の部位に挿入することができる（例えば、切断された標的核酸）。

10

【0702】

相同組換え（HR）は、細胞および/または細胞集団（例えば、ヒト細胞、ほ乳類細胞、酵母、真菌、原生動物、古細菌）にバーコード配列を導入するために使用することができる。ドナープラスミドのライブラリー（例えば、ドナーポリヌクレオチドを含む）は、ドナーカセット内のランダム配列を用いて作製することができる。このライブラリーは、オリゴヌクレオチド、1本の2本鎖DNA断片、プラスミドおよび/またはミニサークルから形成することができる。

20

【0703】

ドナーポリヌクレオチド配列は、細胞系列を追跡する目的のために個々の細胞のゲノムに導入することができる。細胞機能に有害な影響を及ぼす可能性を最小限に抑えるために、遺伝子および調節エレメントから離れたゲノムのサイレントまたは「セーフハーバー」領域において改変するように、部位を選択することができる。機能を果たす遺伝子エレメント内の部位はまた、細胞の運命を追跡するために使用することができる。

【0704】

例えば、ドナーポリヌクレオチドは、幹細胞および/または幹細胞集団に導入することができる。本開示の方法は、動物モデルにおける細胞系列の発達を追跡するために使用することができる。例えば、造血における細胞の運命の発達および/または分化は、本開示の方法を使用して追跡することができる。本開示の方法は、細胞操作に基づく治療的療法のために使用することができる。例えば、細胞は、治療用タンパク質をコードするドナーポリヌクレオチドでタグ付けすることができる。この細胞を増殖させることができる。増殖した細胞は、対象に導入することができる。別の例として、分化した細胞を対象から除去することができる。分化した細胞は、1つは細胞が分化したときに発現し、1つは細胞が脱分化したときに発現する2つのマーカーでタグ付けすることができる。マーカーの同定は、分化事象の決定において有用であり得る。別の例として、分化した細胞を対象から獲得することができる。分化した細胞は、多能性細胞に脱分化させることができる。多能性細胞は、治療用タンパク質をコードするドナーポリヌクレオチドでタグ付けすることができる。細胞は、治療用タンパク質を発現する間に新たな細胞型に再分化させ、それによって患者専用の治療用細胞を生成することができる。タグ付けした細胞は分裂および分化することができ、ゲノムの改変は、細胞分裂中に各娘細胞に伝達することができる。

30

40

【0705】

場合によって、2種類の細胞を2種類の異なるドナーポリヌクレオチドマーカーでタグ付けすることができる。この2種類の細胞を一緒にすることができる。一緒にした混合物は同時にアッセイすることができる。ドナーポリヌクレオチドは2種類の細胞を区別するために使用することができるので、ドナーポリヌクレオチドは2種類の細胞の多重化分析を可能にすることができる。

【0706】

50

細胞集団は、2本鎖分断を導入し、または細胞特性を生成するために選択することができる。細胞は精製するか、または選択することができる。例えば、造血幹細胞(CD45陽性)の集団は、FACSまたは磁気ビーズ精製によって選択することができる。骨髄は、エキソソームにおいてヌクレアーゼで処理することができる。細胞は、特定の指向性を備えたウイルスを使用することによってインビボにおいて標的とすることができる。細胞は、特定の受容体を有する細胞を標的とするために操作されたウイルスを使用することによって選択することができる。

【0707】

タグ付けした細胞は、集団レベルまたは単一細胞レベルのいずれかでハイスループット配列決定によって分析することができる。集団レベルでは、細胞の収集物を溶解することができる。ゲノムDNAを抽出することができる。PCRプライマーは、ヌクレアーゼによって改変されたゲノム領域を増幅するために設計することができる。配列は、ハイブリダイゼーションによって濃縮することができる。配列ライブラリーは、ゲノムDNAから調製し、濃縮することができる。対象とする領域を濃縮して、配列ライブラリーを調製することができる。配列ライブラリーは、核酸配列決定技術で使用するために適切な配列タグを含むプライマーを使用して、濃縮中に同時に調製することができる。2本鎖分断が転写可能な領域内に形成される場合、RNAを使用して配列ライブラリーを調製することができる。

10

【0708】

一旦核酸配列データを獲得したら、配列を分析してクローン構造を決定することができる。これは、共通配列を一緒に集め、これらの配列を計数することによって実施することができる。

20

【0709】

細胞は、フローサイトメトリーまたはアフィニティー精製方法を使用して細胞表面マーカーに基づく選別方法によって予備選択してもよい。細胞表面マーカーは、細胞状態を明確にするために使用することができ、細胞状態とクローン構造を比較することによって改変された細胞集団の運命を測定することができる。

【0710】

単一細胞レベルでは、細胞は単離してもよい。PCR生成物は、個々の細胞それぞれから生成することができる。これは、マイクロウェルアレイ、マイクロ流体装置および/またはエマルジョンにおいて実現することができる。細胞当たり2つ以上のゲノム改変を行う場合、PCR生成物は、親細胞に対する関連性を確認するために物理的に、または化学的に一緒に結合することができる。

30

【0711】

ゲノム編集事象の定量方法

Cas9などのRNA依存性ヌクレアーゼのために、核酸認識機能とヌクレアーゼ活性を関連づけることができる。場合によって、核酸認識機能とヌクレアーゼ活性を関連づけてなくてもよい。ヌクレアーゼ部位は、ヌクレアーゼによって認識される特定の配列内に位置していてもよい。

【0712】

非相同性末端結合は、2本鎖分断の部位に複数の塩基の挿入を引き起こすことができる不完全な修復プロセスであってもよい。NHEJは、切断部位への挿入、欠失および/または変異の導入を引き起こすことができる。NHEJは、元の配列を著しく破壊することができる。修復機構の結果としての元の配列の破壊は、ゲノム編集アプローチの有効性を評価するために使用することができる。

40

【0713】

相同組換えは、類似した、または同一の核酸分子の間でヌクレオチド配列を交換することによって、標的核酸分断のより完全な修復を可能にすることができる。2本鎖分断の両側の配列に相同な末端および2つの末端の間に他の配列を含むドナーカセット(例えば、ドナーポリヌクレオチド)を使用することによって、他の配列を標的核酸の切断部位に導

50

入することができる。

【0714】

本開示は、2本鎖分断活性およびCas9などの核酸依存性ヌクレアーゼによって導入されたNHEJ媒介挿入/欠失を評価するアプローチについて記載する。この方法は、最初のヌクレアーゼ認識および核酸切断活性中にCas9によって認識される標的核酸内の部位が、NHEJプロセス中に挿入または欠失が導入されることによって破壊され得るという事実を利用する。

【0715】

場合によって、この方法は、標的核酸(例えば、ゲノム)における対象とする部位を標的とする核酸ターゲティング核酸の設計を提供する。核酸ターゲティング核酸をコードする核酸鋳型は、核酸ターゲティング核酸のインビトロ合成を可能にするために、核酸ターゲティング核酸の5'末端にプロモーター配列を付加するように設計することができる。

10

【0716】

プライマーは、切断部位に隣接した場所に設計することができる。切断部位(および/または切断部位周辺の核酸領域)は(例えば、ゲノム核酸から)増幅して、それによって生成物(例えば、増幅したPCR生成物)を生成することができる。生成物(例えば、増幅したPCR生成物)は、塩基の長さが少なくとも約100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200またはそれ以上であってもよい。生成物(例えば、増幅したPCR生成物)は、塩基の長さが多くても約100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200またはそれ以上であってもよい。生成物(例えば、増幅したPCR生成物)の塩基対の長さは約200~600であってもよい。

20

【0717】

生成物は精製することができる。生成物は、RNA依存性ヌクレアーゼ(例えば、Cas9)および核酸ターゲティング核酸とインキュベートすることができる。NHEJによって改変されていないゲノム核酸から増幅された分子は、Cas9によって認識され、切断され得る正確な配列を含むことができる。NHEJによって改変されたゲノム核酸から増幅された分子は、Cas9によって認識および/または切断され得る部位を含まなくてもよい。

【0718】

消化した生成物は、次にゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、ハイスループット配列決定および/または定量的PCR(例えば、qPCR)などの方法によって分析することができる。ゲル電気泳動の場合、ゲルを画像処理することができる。一旦ゲルが画像処理されたら、NHEJによって改変された細胞の割合は消化した生成物に対応するバンドの強度を測定し、消化していない生成物に対応するバンドの強度と比較することによって推定することができる。

30

【0719】

ドナーポリヌクレオチドを2本鎖分断に挿入するために2本鎖分断に輸送するための方法

本開示は、ドナーポリヌクレオチドの2本鎖分断部位への挿入(例えば、相同組換え)を促進するために、ドナーポリヌクレオチドを部位特異的標的核酸分断に極めて接近させる方法について記載する。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。

40

【0720】

場合によって、本開示の方法は2本鎖分断を生成するヌクレアーゼ(例えば、Cas9)にドナーポリヌクレオチドを結合させることによって、ドナーポリヌクレオチドを標的核酸内の2本鎖分断部位に極めて接近させることを提供する。

【0721】

部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸およびドナーポリヌクレオチドを含

50

む複合体を標的核酸に輸送することができる。図30は、ドナーポリヌクレオチドを標的核酸内の2本鎖分断部位に接近させる方法例を例示している。例えば、核酸ターゲティング核酸は、3'にハイブリダイズする伸長配列を含むことができ、これは *tracrRNA* 伸長配列（核酸ターゲティング核酸に付着した細い点線で示した）の一部となることができる。3'にハイブリダイズする伸長配列は、非天然配列であってもよい。図30Aは、核酸ターゲティング核酸の3'末端の *tracrRNA* 伸長配列がドナーポリヌクレオチドの末端（例えば、3'末端）にハイブリダイズできる配列を含むことができることを例示している（ドナーポリヌクレオチドは太い破線で示す）。3'のハイブリダイズする伸長配列の長さは、ヌクレオチドが少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上であってもよい。3'のハイブリダイズする伸長配列の長さは、ヌクレオチドが多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上であってもよい。3'のハイブリダイズする配列は、ドナーポリヌクレオチドの少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする配列は、ドナーポリヌクレオチドの多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする配列は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のミスマッチを有するドナーポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする配列は、多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のミスマッチを有するドナーポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。

【0722】

3'のハイブリダイズする伸長は、ドナーポリヌクレオチドの3'末端にハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする伸長は、ドナーポリヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の3'のほとんどのヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする伸長は、ドナーポリヌクレオチドの多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の3'のほとんどのヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。

【0723】

図30Bに示したように、核酸ターゲティング核酸の3'末端の *tracrRNA* 伸長は、ドナーDNAの5'末端にハイブリダイズすることができる配列を含むことができる。3'のハイブリダイズする伸長は、ドナーポリヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の5'のほとんどのヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする伸長は、ドナーポリヌクレオチドの多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の5'のほとんどのヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。

【0724】

図30Cに示したように、核酸ターゲティング核酸の3'末端の *tracrRNA* 伸長は、ドナーポリヌクレオチドの3'末端と5'末端の間の領域にハイブリダイズすることができる配列を含むことができる。3'のハイブリダイズする伸長は、ドナーポリヌクレオチドの3'末端と5'末端の間の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする伸長は、ドナーポリヌクレオチドの3'末端と5'末端の間の多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。

【0725】

図30Dに示したように、核酸ターゲティング核酸の3'末端の *tracrRNA* 伸長は、ドナーポリヌクレオチドの完全長に沿ってハイブリダイズすることができる配列を含むことができる。核酸ターゲティング核酸は、ドナーポリヌクレオチドの少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90または100%に沿ってハイブリダイズす

10

20

30

40

50

ることができる。核酸ターゲティング核酸は、ドナーポリヌクレオチドの多くても約20、30、40、50、60、70、80、90または100%に沿ってハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする伸長配列は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のミスマッチを有するドナーポリヌクレオチドの完全長に沿ってハイブリダイズすることができる。3'のハイブリダイズする伸長配列は、多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上のミスマッチを有するドナーポリヌクレオチドの完全長に沿ってハイブリダイズすることができる。

【0726】

図30Eに示したように、核酸ターゲティング核酸の3'末端のtracr核酸伸長(例えば、3'のハイブリダイズする伸長)は、鋳型として使用できる配列を含むことができ、例えば、逆転写酵素によって変換されてハイブリッド核酸を生成することができる(例えば、得られた核酸は、RNA-DNAハイブリッドであり、新たに転写された核酸はDNAであってもよい)。逆転写酵素の例には、SuperScript、ThermoScript、HIV逆転写酵素、MMLV逆転写酵素が含まれる。逆転写酵素は、3'のハイブリダイズする伸長鋳型からドナーポリヌクレオチド配列を伸長することができる。

10

【0727】

核酸ターゲティング核酸の3'末端のtracr核酸伸長は、RNA結合タンパク質(RBP)に結合することができる核酸配列を組み込むことができる。RNA結合タンパク質は図30Fに示したようにDNA結合タンパク質(DBP)に融合することができる。DNA結合タンパク質は、ドナーポリヌクレオチドに結合することができる。

20

【0728】

ドナーポリヌクレオチドを2本鎖分断に極めて接近させるために使用した配列は、核酸ターゲティング核酸の5'末端(例えば、スパーサー伸長)に付加することができる。ドナーポリヌクレオチドを2本鎖分断の極めて接近させるために使用した配列は、核酸ターゲティング核酸の5'末端および3'末端の両方に付加することができる。

【0729】

本開示の方法で使用したヌクレアーゼ(例えば、Cas9)は、ヌクレアーゼが標的核酸に1本鎖分断を導入することができるニッカーゼ活性を含むことができる。ヌクレアーゼとニッカーゼ活性の対は、互いに極めて接近した領域を標的とすることができる。第1のヌクレアーゼは、第1のドナーポリヌクレオチドと相互作用することができる第1の核酸ターゲティング核酸に結合することができる。第2のヌクレアーゼは、第2のドナーポリヌクレオチドと相互作用することができる第2の核酸ターゲティング核酸に結合することができる。第1および第2のドナーポリヌクレオチドは、2本鎖ドナーポリヌクレオチドを形成するために互いにハイブリダイズするように設計することができる。2つの別々のドナーポリヌクレオチドをヌクレアーゼ部位にもたすことができる。

30

【0730】

いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは1本鎖であってもよい。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは2本鎖であってもよい。いくつかの実施形態では、ドナーDNAはミニサークルであってもよい。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドはプラスミドであってもよい。いくつかの実施形態では、プラスミドは高次コイルであってもよい。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドはメチル化されていてもよい。いくつかの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドはメチル化されていなくてもよい。ドナーポリヌクレオチドは改変を含んでいてもよい。改変には、限定はしないが、ピオチン化、化学結合および合成ヌクレオチドを含む本明細書に記載したものを含めることができる。

40

【0731】

部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含むベクターをクローニングし発現する方法

50

本開示は、操作された核酸ターゲティング核酸をベクター（例えば、直線化したベクター）にクローニングする方法を提供する。この方法は、本明細書に記載したような部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸ならびに部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸の複合体のいずれかを使用して実施することができる。

【0732】

使用者（例えば、科学者）は、1本鎖DNAオリゴヌクレオチドを設計することができる。1本鎖DNAオリゴヌクレオチドは、一緒にハイブリダイズすると標的核酸を標的とするスペーサー配列をコードすることができる。1本鎖DNAオリゴヌクレオチドの長さは、ヌクレオチドが少なくとも約5、10、15、20、25、30個またはそれ以上であってよい。1本鎖DNAオリゴヌクレオチドの長さは、ヌクレオチドが多くても約5、10、15、20、25、30個またはそれ以上であってよい。1本鎖DNAオリゴヌクレオチドの長さは、ヌクレオチド19～20個であってよい。

10

【0733】

1本鎖DNAオリゴヌクレオチドは、標的核酸（例えば、プロトスペーサー隣接モチーフの3'または5'末端などのプロトスペーサー隣接モチーフに隣接した配列）にハイブリダイズするように設計することができる。DNAオリゴヌクレオチドは、標的核酸配列のセンスまたはアンチセンス鎖に対応する配列をコードすることができる。

【0734】

1本鎖オリゴヌクレオチドは、標的核酸にハイブリダイズすることができ、および/または相補的である第1の部分を含むことができる。1本鎖オリゴヌクレオチドは、別の1本鎖オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、および/または相補的である第1の部分を含むことができる。1本鎖オリゴヌクレオチドは、直線化したベクター内の配列にハイブリダイズすることができる第2の部分を含むことができる。言い換えると1対の1本鎖オリゴヌクレオチドは、互いにハイブリダイズする第1の部分および1本鎖オーバーハングを含む第2の部分を含むことができ、このオーバーハングは直線化したベクターにおける付着末端にハイブリダイズすることができる。場合によって、オーバーハングは5'-GTTTT-3'を含む。場合によって、オーバーハングは5'-CGGTG-3'を含む。

20

【0735】

1本鎖DNAヌクレオチドは、一緒にアニーリングして2本鎖オリゴヌクレオチドを生成することができる。1本鎖DNAヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドアニーリング緩衝液（例えば、トリス-HCl、EDTAおよびNaClを含む）中で一緒にアニーリングすることができる。2本鎖オリゴヌクレオチドは、作用濃度（例えば、直線化したプラスミドへの連結に適した濃度）に希釈することができる。希釈した2本鎖オリゴヌクレオチドは、直線化したベクターに連結することができる。連結は、ライゲーション緩衝液（例えば、トリス-HCl、MgCl₂、ATPを含む）中でリガーゼ（例えば、T4DNAリガーゼ）によって実施することができる。2本鎖オリゴヌクレオチドは、直線化したベクターの核酸ターゲティング核酸をコードする配列内の領域に連結することができる。言い換えると、直線化したベクターは核酸ターゲティング核酸をコードする領域内の一点において直線化していてもよく、直線化によって2本鎖オリゴヌクレオチドの付着末端に相補的な付着末端が生成する。2本鎖オリゴヌクレオチドをベクターに連結すると、2本鎖オリゴヌクレオチド配列に対応するスペーサー配列を含む操作された核酸ターゲティング核酸をコードする配列を生成することができる。

30

40

【0736】

連結したベクターは、化学的にコンピテントな細胞（例えば、DH5-アルファ、Top10）を形質転換し、正確に連結したベクターの発現を（例えば、抗体スクリーニングによって）選択することができる。選択した形質転換体は、配列決定によって挿入の存在を分析することができる。配列決定は、ベクターの一部にハイブリダイズすることができる配列決定プライマーを使用して実施することができる。

【0737】

50

正確に連結したベクターは（例えば、大規模なDNA調製、maxiprep）によって調製し、精製することができる。部位特異的ポリペプチド、2本鎖DNAオリゴヌクレオチドを含む核酸ターゲティング核酸を含むベクターは、選択した細胞系（例えば、ほ乳類細胞系）に導入（例えば、遺伝子導入）することができる。

【0738】

本明細書では本発明の好ましい実施形態について示し述べたが、このような実施形態が例としてのみ示されていることは当業者には明らかであろう。当業者であれば、本発明を逸脱することのない数多くの変種、変化および置換に気づくであろう。本明細書に記載した本発明の実施形態の様々な代替法が本発明の実施で使用できることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本発明の範囲を定義するものであり、これらの特許請求の範囲内の方法および構造物ならびにそれらの同等物が特許請求の範囲の対象となるものとする。

10

【実施例】

【0739】

〔実施例1〕

変更されたPAM特異性のための部位特異的ポリペプチドの改変

いくつかの実施形態において、本開示はPAM特異性を変更するために改変される改変部位特異的ポリペプチドを提供する。改変部位特異的ポリペプチドをコードする核酸は、トランスフェクションによって細胞に導入される。改変部位特異的ポリペプチドは、挿入されたHNHまたはRuvCヌクレアーゼドメインを含む。改変部位特異的ポリペプチドは、改変された高塩基性断片を含む。標的核酸とハイブリダイズすることができるスペーサーを含む核酸ターゲティング核酸も、トランスフェクションによって細胞に導入される。改変部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸は、複合体を形成する。複合体は、核酸ターゲティング核酸によって標的核酸へ導かれる。一度、核酸ターゲティング核酸とハイブリダイズされると、標的核酸は部位特異的ポリペプチドのヌクレアーゼドメインによって切断される。いくつかの実施形態において、改変部位特異的ポリペプチドは、より低いKdで標的核酸と結合する。

20

【0740】

いくつかの実施形態において、ドナーポリヌクレオチドも、細胞に導入される。いくつかの例では、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部は、切断された標的核酸に挿入される。

30

【0741】

〔実施例2〕

変更された標的核酸特異性のための部位特異的ポリペプチドの改変

いくつかの実施形態において、本開示は標的核酸特異性を変更するために改変される改変部位特異的ポリペプチドを提供する。改変部位特異的ポリペプチドは、細胞に導入される。改変部位特異的ポリペプチドは、高塩基性断片および/またはHNH様ドメインの改変を含む。標的核酸とハイブリダイズすることができるスペーサーを含む核酸ターゲティング核酸も、細胞に導入される。改変部位特異的ポリペプチドと核酸ターゲティング核酸は、複合体を形成する。複合体は、核酸ターゲティング核酸によって標的核酸へ導かれる。一度、核酸ターゲティング核酸とハイブリダイズされると、標的核酸は部位特異的ポリペプチドによって切断される。いくつかの実施形態において、改変部位特異的ポリペプチドは、より低いKdで標的核酸と結合する。

40

【0742】

いくつかの実施形態において、ドナーポリヌクレオチドも、細胞に導入される。いくつかの例では、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部は、切断された標的核酸に挿入される。

【0743】

〔実施例3〕

50

部位特異的ポリペプチドの組換え発現

改変部位特異的ポリペプチドをコードし、宿主生物で改変部位特異的ポリペプチドの発現を可能にするように、組換えDNA配列を組み立てることができる。組換えDNA配列はプロモーター配列を含み、さらに精製のための親和性タグまたはエピトプタグを含んでもよい。非限定的な実施例では、プラスミドは改変部位特異的ポリペプチドの発現のための組換えDNA配列を含む。

【0744】

組換えタンパク質の産生。

部位特異的改変ポリペプチドをコードしているプラスミドは、細菌細胞（例えば、大腸菌（*E. coli*））へ導入される。ポリペプチドは細菌細胞内で発現されて、次いで、クロマトグラフ法を用いて細胞溶解物から精製される。改変部位特異的ポリペプチドの活性は、改変ポリペプチドの特異性、PAM配列、部位特異的ポリペプチドの特異性プロフィールおよびポリペプチドの核酸選択（例えば、DNAもしくはRNA、または改変核酸。）の特異性を定量するために設計された検定方法を用いて測定される。

10

【0745】

ソフトウェアは、改変部位特異的ポリペプチドを用いて切断することができる部位を選択するように設計されている。ガイドRNA配列は、部位特異的ポリペプチドの活性を管理するように設計されている。一度設計されたならば、部位特異的ポリペプチドを使用して核酸を切断する。

20

【0746】

改変部位特異的ポリペプチドの細胞への導入

改変ペプチドは核酸部位を標的とするために細胞に導入される。ヌクレアーゼ活性を保持するポリペプチドを使って、一本鎖または二本鎖DNAの切れ目を標的DNAに導入する。DNA結合活性を持つがDNA切断活性は持たないポリペプチドを使って二本鎖DNAを細胞に結合させる。このことは、転写の活性化または抑制をもたらすのに用いることができる。

【0747】

〔実施例4〕

CAS9配列内での改変部位の選択

先に述べたように、Cas9オーソログを含むタイプII CRISPRシステムは、それらのCRISPR-Cas座位の分析に基づいて3つのグループ（タイプII-A、タイプII-BおよびタイプII-C）に分類できる。これらのグループ内のCas9オーソログは、概して、より短い（Cas9/Csn1-タイプ）およびより長い（Cas9/Csx12-タイプ）配列を含む2つの分岐によって定義することができる。これらのより大きいグループに加えて、Cas9に類似したトポロジではあるが保存配列要素間の挿入の長さおよび配列の有意差を伴って配置されるHNHおよびRuvCドメインを含むホモログの2つの追加のファミリーが存在しうる。二次構造予測と配列アラインメントを使って、改変のためのポリペプチドの領域を定める。二次構造要素の間に、または、高い配列保存の領域の間に分類される領域は、挿入または欠失の候補として選択される。既知構造のドメインと類似性がある領域は、配列を挿入または欠失させるための特異的な領域を同定するために分析される。

30

40

【0748】

図35は、少数の多様なCas9オーソログのための、CDD配列アラインメントTIGR0185を表す。下方に「X」と記したアミノ酸は、類似していると考えられる。下方に「Y」と記したアミノ酸は、高度に保存されるか、または全配列で同一であると考えられることができる。「X」または「Y」のないアミノ酸残基は、保存されていない。このアラインメントは、より長いCas9オーソログのC-末端領域（アミノ酸残基1100~1350とほぼ一致する）を含まない。図35に記載された配列を表6に記載する。

【0749】

【表 17】

表6. 図35に記載された配列。

Genbank	登録番号	種
gi	22533915	B群溶血性連鎖球菌(<i>Streptococcus agalactiae</i>)2603V/R
gi	34483507	ウォリネラ・スクシノゲネス(<i>Wolinella succinogenes</i>)
gi	12721472	パストレラ・ムルトシダ(<i>Pasteurella multocida</i>)、ムルトシダ(<i>multocida</i>) 亜種、Pm70系統
gi	24377777	ミュータンス菌(<i>Streptococcus mutans</i>)UA15
gi	13622193	化膿連鎖球菌(<i>Streptococcus pyogenes</i>)M1GAS
gi	41815893	トレポネーマ・デンティコラ(<i>Treponema denticola</i>)ATCC35405
gi	218767588	髄膜炎菌(<i>Neisseria meningitidis</i>)Z2491
gi	157150687	ストレプトコッカス・ゴルドニ(<i>Streptococcus gordonii</i>)Challis系統、CH1 亜系統
gi	294660600	マイコプラズマ・ガリセプティクム(<i>Mycoplasma gallisepticum</i>)R系統(低)
gi	218563121	カンピロバクター・ジェジュニ(<i>Campylobacter jejuni</i>)、ジェジュニ (<i>jejuni</i>)亜種、NCTC11168=ATCC700819
gi	370792169	リステリア・イノキュア(<i>Listeria innocua</i>)ATCC33091

10

【0750】

新しい機能性ドメインの位置、代替配列の挿入または、Cas9活性を改変する領域サイズの欠失または減少のための領域は、表7でハイライトされる領域を含むことができるが、これに限定されるものではない。数字は、化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)M1GAS由来のCas9配列に基づくアミノ酸配列番号を表す。

20

【0751】

【表 18】

表7. Cas9を改変する典型的な位置

gi 13622193	化膿連鎖球菌(<i>Streptococcus pyogenes</i>) M1 GAS		
挿入/欠失部位	開始	終止	長さ
1	22	42	20
2	97	134	37
3	170	312	142
4	350	400	50
5	426	444	18
6	455	492	37
7	528	541	13
8	578	589	11
9	600	612	12
10	628	634	6
11	654	658	4
12	684	692	8
13	710	727	17
14	753	756	3
15	792	794	2
16	801	804	3
17	826	834	8
18	873	881	8
19	893	915	22
20	939	952	13
21	971	974	3
22	1005	1029	24
23	1096	1225	129
24	1105	1138	33

30

40

50

【0752】

一度、ある領域が新しいポリペプチド配列をタンパク質に挿入するか、またはタンパク質の領域を欠失させる可能性のある位置であると同定されたならば、タンパク質をコードするDNA配列は変更を取り入れるために変更される。

【0753】

〔実施例5〕

部位特異的ポリペプチド結合性標的核酸の配列濃縮

本開示は、部位特異的ポリペプチドを用いた、増幅のない配列濃縮の方法を提供する。

【0754】

いくつかの実施形態において、方法は、a) 標的核酸を、核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドを含む複合体と接触させる工程と、b) 標的核酸を切断する工程と、c) 標的核酸を精製する工程と、d) 濃縮される標的核酸の配列決定する工程とを含む。

10

【0755】

いくつかの実施形態において、部位特異的ポリペプチドは酵素的に不活性である。酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドの使用は、標的核酸が部位特異的ポリペプチド複合体に結合するのを容易にする。いくつかの実施形態において、部位特異的ポリペプチドは、酵素的に活性である。

【0756】

いくつかの実施形態において、配列濃縮は、細胞外（例えば、無細胞試料）で実行される。例えば、試料は精製されたゲノムDNAを含む。いくつかの実施形態において、配列濃縮は、細胞試料（例えば、細胞、細胞溶解物）で実行される。

20

【0757】

いくつかの例では、部位特異的ポリペプチド-標的核酸複合体は、固定されるか、複合体を形成するために架橋される。方法が細胞上で実行されているならば、細胞は溶解される。溶解条件は、無傷のタンパク質-DNA複合体を維持するために選択される。

【0758】

核酸試料は、親和性精製の前に標的核酸を断片化するために処理される。断片化は、物理的、機械的、または酵素的方法によって実行することができる。物理的な断片化は、標的ポリヌクレオチドを熱、または、紫外(UV)光にさらすことを含む。機械的な破壊を使って、標的ポリヌクレオチドを、所望の範囲の断片に機械的に剪断する。機械的剪断は、標的ポリヌクレオチドの反復的なピペット操作、音波処理および噴霧を含むいくつかの方法によって達成される。標的核酸も、酵素的な方法を用いて断片化される。場合によっては、酵素消化は制限酵素などの酵素を使って実行される。制限酵素を使って、標的ポリヌクレオチドの特異的または非特異的断片化を行う。方法は、一般に、タイプI酵素、タイプII酵素および/またはタイプIII酵素と言われる1つまたはそれ以上の種類の制限酵素を使用する。タイプIIおよびタイプIII酵素は、二本鎖ポリヌクレオチド配列内の、ヌクレオチドの特異的な配列を認識する(「認識配列」または「認識部位」)。これらの配列を結合および認識すると同時に、タイプIIおよびタイプIII酵素は、ポリヌクレオチド配列を切断する。場合によっては、切断の結果、一本鎖核酸が一部突出した、「付着末端」と呼ばれるポリヌクレオチド断片になる。その他の場合、切断の結果、突出した断片にならずに「平滑末端」を生じる。方法は、付着末端または平滑末端を生成する制限酵素の使用を含んでもよい。

30

40

【0759】

断片化されると、部位特異的ポリペプチドを含む複合体は、固体担体とインキュベートすることによって精製される。例えば、部位特異的ポリペプチドがビオチンタグを含むならば、固体担体はビオチンタグと結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0760】

代替的な実施形態において、断片化されると、部位特異的ポリペプチド、標的核酸およ

50

び/または核酸ターゲティング核酸を含む複合体は捕捉剤とインキュベートすることによって精製される。捕捉剤は、部位特異的ポリペプチドと融合する親和性タグと結合する。捕捉剤は、抗体を含む。例えば、部位特異的ポリペプチドと融合する親和性タグがFLAGタグであるならば、捕捉剤は抗-FLAG-タグ抗体になる。

【0761】

いくつかの実施形態において、捕捉剤は、固体担体で精製される。例えば、捕捉剤がビオチンタグを含むならば、固体担体はビオチン化された捕捉剤を結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0762】

いくつかの実施形態において、核酸ターゲティング核酸は、親和性タグを含む。親和性タグは、エンドリボヌクレアーゼと結合可能な配列を含む。いくつかの例では、親和性タグは、条件つきで酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼと結合可能な配列を含む。条件つきで酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、親和性タグを結合するが、切断しない。

10

【0763】

いくつかの実施形態において、エンドリボヌクレアーゼおよび/または条件つきで酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、親和性タグを含む。

【0764】

条件つきで酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、固体担体で精製される。固体担体は、条件つきで酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼの親和性タグと結合する。例えば、条件つきで酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼがビオチンタグを含むならば、固体担体はビオチン化された捕捉剤を結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

20

【0765】

いくつかの実施形態において、条件つきで酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼは、様々な不溶性担体のいずれかの上に固定される。

【0766】

方法のいくつかの実施形態において、2ラウンドの精製が実行される。いくつかの例では、第1ラウンドは捕捉剤の親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含み、第2ラウンドは部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含む。いくつかの例では、第1ラウンドは部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含み、第2ラウンドは捕捉剤の親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含む。

30

【0767】

いくつかの実施形態において、本開示の方法が、多重の配列濃縮のために使われる。本実施形態において、複数の核酸ターゲティング核酸は、核酸試料と接触可能であり、各々の核酸ターゲティング核酸は、核酸試料中で異なる標的核酸(例えば、ゲノムの配列)を標的とするように操作されている。

【0768】

捕捉された複合体は、標的核酸を含む。標的核酸は、高塩濃度洗浄、エタノール沈殿、煮沸、ゲル精製などを含む標準的な方法によって、部位特異的ポリペプチド複合体から溶出される。

40

【0769】

溶出されたDNAは、1つまたはそれ以上のアダプターのライゲーションによって、配列解析のために調製される。

【0770】

本明細書に記載されるように、配列ライブラリーは配列決定される。配列決定されたライブラリーは、多型性を同定するため、疾患を診断するため、疾患の治療方針を決定するため、および/または、抗体ライブラリーを生成するために分析される。

【0771】

50

〔実施例 6〕

部位特異的ポリペプチドを含む複合体非結合性標的核酸の配列濃縮

いくつかの実施形態において、配列濃縮は、酵素的に活性な部位特異的ポリペプチドで実行される。いくつかの例では、部位特異的ポリペプチドは、酵素的に活性である。この例では、標的核酸は部位特異的ポリペプチドに結合されず、切除される。

【0772】

標的核酸は同定され、核酸ターゲティング核酸は標的核酸の側面に位置する配列に部位特異的ポリペプチドを向けるように設計される。部位特異的ポリペプチドが標的核酸の両端でDNAを切断するような、設計された核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドを含む複合体と共に試料をインキュベートする。標的核酸の切断と同時に、標的核酸は元の核酸から切断される。切断された標的核酸は精製される（例えば、ゲル電気泳動、ビーズもしくは他のカルボン酸塩誘導体化ビーズからのサイズ選択溶出によって、または、適切な濃度の塩およびPEGを用いて、より大きいもしくはより小さなDNAを優先して沈殿させることによって）。

10

【0773】

いくつかの実施形態において、配列濃縮は、細胞外（例えば、無細胞試料）で実行される。例えば、試料は精製されたゲノムDNAを含む。いくつかの実施形態において、配列濃縮は、細胞試料（例えば、細胞、細胞溶解物）で実行される。

【0774】

方法が細胞上で実行されているならば、細胞は溶解される。溶解条件は、無傷のタンパク質-DNA複合体を維持するために選択される。

20

【0775】

いくつかの実施形態において、配列決定される標的核酸は、核酸ターゲティング核酸および/または部位特異的ポリペプチドに結合されない。本実施形態では、部位特異的ポリペプチドおよび/または核酸ターゲティングと結合した核酸は精製される。部位特異的ポリペプチドの精製は、本明細書で前に記載したように進行する。手短に言うと、部位特異的ポリペプチドを含む複合体は、固体担体とインキュベートすることによって精製される。例えば、部位特異的ポリペプチドがビオチンタグを含むならば、固体担体はビオチンタグと結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0776】

代替的な実施形態において、断片化されると、部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸、および非標的核酸を含む複合体は捕捉剤とインキュベートすることによって精製される。捕捉剤は、部位特異的ポリペプチドと融合する親和性タグと結合する。捕捉剤は、抗体を含む。例えば、部位特異的ポリペプチドと融合する親和性タグがFLAGタグであるならば、捕捉剤は抗-FLAG-タグ抗体になる。

30

【0777】

捕捉剤は、固体担体で精製される。例えば、捕捉剤がビオチンタグを含むならば、固体担体はビオチン化された捕捉剤を結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0778】

いくつかの実施形態において、本開示の方法が、多重の配列濃縮のために使われる。本実施形態において、複数の核酸ターゲティング核酸は、細胞へ導入可能であり、各々の核酸ターゲティング核酸は、異なる標的核酸（例えば、ゲノムの配列）を標的とするように操作されている。

40

【0779】

捕捉された複合体は、標的核酸を含まない。

【0780】

標的核酸は、部位特異的ポリペプチドを含む複合体に結合しない核酸を含む。標的核酸は、標準的な核酸精製法（例えば、市販のPCR精製キット、アガロースゲル）によって回収することができる。

50

【0781】

回収した標的核酸は、本明細書に記載されたように、1つまたはそれ以上のアダプターのライゲーションによって、配列分析（例えば、ディープシーケンス）用に調製される。

【0782】

配列決定された標的核酸は、多型性を同定するため、疾患を診断するため、疾患の治療方針を決定するため、および/または、抗体ライブラリーを生成するために分析される。

【0783】

〔実施例7〕

配列決定

溶出された標的核酸は、配列解析のために調製される。配列解析のための調製は、溶出された標的核酸の配列ライブラリーの生成を含む。配列解析は、部位特異的ポリペプチドのオフ標的結合部位の同一性および頻度を決定する。

【0784】

配列決定は、本質的に平行した方法で多くの（一般的に数千から数十億）核酸配列を決定する方法を用いて実行され、多くの配列は、高スループット連続的方法を用いて平行して好ましく読み出される。このような方法は、パイロシーケンス法（例えば、454 Life Sciences, Inc., Branford, Conn.によって商品化されたように）；ライゲーションによる配列決定（例えば、SOLiD（商標）技術、Life Technology, Inc., Carlsbad, Calif.に商品化されたように）；改変ヌクレオチドを用いた合成による配列決定（Illumina, Inc., San Diego, Calif.によるTruSeq（商標）およびHiSeq（商標）技術、Helicos Biosciences Corporation, Cambridge, Mass.によるHeliscope（商標）、およびPacific Biosciences of California, Inc., Menlo Park, Calif.によるPacBio RSなどに商品化されたように）、イオン検出技術による配列決定（Ion Torrent, Inc., South San Francisco, Calif.）；DNAナノボールの配列決定（Complete Genomics, Inc., Mountain View, Calif.）；ナノ細孔ベースの配列決定技術（例えば、Oxford Nanopore Technologies, LTD, Oxford, UKによって開発されたように）、キャピラリー配列決定（例えば、Molecular DynamicsによってMegaBACEに商品化されたように）、電子配列決定、単一分子配列決定（例えばPacific Biosciences, Menlo Park, Calif.によるSMRT（商標）技術に商品化されたように）、液滴マイクロ流体配列決定（droplet microfluidic sequencing）、ハイブリダイゼーションによる配列決定（例えば、Affymetrix, Santa Clara, Calif.によって商品化されたように）、重硫酸塩配列決定およびその他の既知の高度に並行化された配列決定法を含むことができるが、限定されるものではない。

【0785】

いくつかの実施形態において、配列決定はマイクロアレイ分析によって実行される。

【0786】

〔実施例8〕

抗体ライブラリーの生成

本明細書で開示された方法を使用して、タンパク質ライブラリー（例えば、抗体ライブラリー）を生成する。タンパク質ライブラリーは、発現ライブラリーを調製するために有用であり、それは治療、試薬および/または診断法で使用するためのスクリーニングタンパク質（例えば抗体）のために使用される。タンパク質ライブラリーは、追加の抗体の合成および/またはクローニングのためにも有用である。

【0787】

タンパク質ライブラリーは、免疫グロブリンをコードする標的核酸配列とハイブリダイズするために核酸ターゲティング核酸を操作することによって生成される。部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体は、本明細書に記載された方法を用いて精製される。いくつかの実施形態において、核酸ターゲティング核酸とハイブリダイズしている核酸は標的核酸であり、本明細書に記載された方法を用いて溶出され、配列決定される。いくつかの実施形態において、核酸ターゲティング核酸とハイブリダイズしている核酸は、標的核酸ではない。標的核酸は、複数の複合体（例えば、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体）の切断部位の間で切除される核酸である。切除された標的核酸は、本明細書に記載された方法を用いて精製され、配列決定される。

10

【0788】

〔実施例9〕

遺伝子型決定

本明細書で開示された方法を使用して、ヒト白血球抗原（HLA）タイピングを実行する。HLA遺伝子は、ヒトで最も多型の遺伝子のいくつかである。これらの領域の遺伝子型を理解することは、組織および臓器移植のための優れた適合性を得る上で重要である。

【0789】

HLAタイピングを実行するために、核酸ターゲティング核酸は、HLA遺伝子における標的核酸配列とハイブリダイズするように操作されている。部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体は、本明細書に記載された方法を用いて精製される。いくつかの実施形態において、核酸ターゲティング核酸とハイブリダイズしている核酸は標的核酸であり、本明細書に記載された方法を用いて溶出され、配列決定される。いくつかの実施形態において、核酸ターゲティング核酸とハイブリダイズしている核酸は、標的核酸ではない。標的核酸は、複数の複合体（例えば、部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸を含む複合体）の切断部位の間で切除される核酸である。切除された標的核酸は、本明細書に記載された方法を用いて精製され、配列決定される。

20

【0790】

〔実施例10〕

部位特異的ポリペプチドの免疫沈降反応

本開示は、ヌクレアーゼ免疫沈降反応および配列決定（NIP-Seq）方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、a）核酸試料を酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドと接触させ、そこで、酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドは標的核酸と結合し、それによって複合体を形成すること、b）捕捉剤で複合体を捕捉すること、および、c）標的核酸の配列決定をすることを含む。いくつかの実施形態において、方法は、d）オフ標的結合部位の同一性を決定することをさらに含む。

30

【0791】

いくつかの実施形態において、本開示の方法は、細胞外で実行される。例えば、試料は精製されたゲノムDNAを含む。

【0792】

部位特異的ポリペプチド-標的核酸複合体は、固定されるか、複合体を形成するために架橋される。

40

【0793】

核酸（例えば、ゲノムDNA）は、親和性精製の前にDNAを断片化するために処理される。断片化は、物理的、機械的、または酵素的の方法によって実行することができる。物理的な断片化は、標的ポリヌクレオチドを熱、または、紫外（UV）光にさらすことを含むことができる。機械的な破壊を使って、標的ポリヌクレオチドを、所望の範囲の断片に機械的に剪断してもよい。機械的剪断は、標的ポリヌクレオチドの反復的なピペット操作、音波処理および噴霧を含む当技術分野で知られているいくつかの方法によって達成してもよい。標的ポリヌクレオチドも、酵素的な方法を用いて断片化されてもよい。場合によっては、酵素消化は制限酵素などの酵素を使って実行されてもよい。制限酵素を使って、

50

標的ポリヌクレオチドの特異的または非特異的断片化を行ってもよい。方法は、一般に、タイプ I 酵素、タイプ II 酵素および/またはタイプ III 酵素と言われる 1 つまたはそれ以上の種類の制限酵素を使用してもよい。タイプ II およびタイプ III 酵素は、通常、市販され、当技術分野で既知である。タイプ II およびタイプ III 酵素は、二本鎖ポリヌクレオチド配列内の、ヌクレオチドの特異的な配列を認識する（「認識配列」または「認識部位」）。これらの配列を結合および認識すると同時に、タイプ II およびタイプ III 酵素は、ポリヌクレオチド配列を切断する。場合によっては、切断の結果、一本鎖核酸が一部突出した、「付着末端」と呼ばれるポリヌクレオチド断片になる。その他の場合、切断の結果、突出した断片にならずに「平滑末端」を生じる。方法は、付着末端または平滑末端を生成する制限酵素の使用を含んでもよい。

10

【0794】

断片化されると、部位特異的ポリペプチドを含む複合体は、固体担体とインキュベートすることによって精製される。例えば、部位特異的ポリペプチドがビオチンタグを含むならば、固体担体はビオチンタグと結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0795】

代替的な実施形態において、断片化されると、部位特異的ポリペプチド、標的核酸および/または核酸ターゲティング核酸を含む複合体は捕捉剤とインキュベートすることによって精製される。捕捉剤は、部位特異的ポリペプチドと融合する親和性タグと結合する。捕捉剤は、抗体を含む。例えば、部位特異的ポリペプチドと融合する親和性タグが FLAG タグであるならば、捕捉剤は抗-FLAG-タグ抗体になる。

20

【0796】

捕捉剤は、固体担体で精製される。例えば、捕捉剤がビオチンタグを含むならば、ビーズはビオチン化された捕捉剤を結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0797】

方法のいくつかの実施形態において、2ラウンドまたはそれ以上の精製が実行される。第1ラウンドは捕捉剤の親和性タグと結合可能な固体担体を用いた精製を含み、第2ラウンドは部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合可能な固体担体を用いた精製を含む。第1ラウンドは部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含み、第2ラウンドは捕捉剤の親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含む。

30

【0798】

いくつかの実施形態において、2回以上方法を実行することによって、方法を使って部位特異的ポリペプチドの結合特異性を最適化する。

【0799】

捕捉された複合体は、部位特異的ポリペプチドおよび標的核酸を含む。標的核酸は、高塩濃度洗浄、エタノール沈殿、煮沸、ゲル精製、などを含む標準的な方法によって、部位特異的ポリペプチド複合体から溶出される。

【0800】

溶出されたDNAは、標準的な方法を用いて、配列解析のために調製される。配列ライブラリーは配列決定され、配列およびヌクレアーゼ結合部位の頻度を同定するために分析される。

40

【0801】

いくつかの実施形態において、方法は何回も実行される。いくつかの実施形態において、方法はデータの収集およびデータの保存をさらに含む。データを収集し、コンピュータサーバに保存することができる。

【0802】

〔実施例11〕

生体内における部位特異的ポリペプチドの免疫沈降反応

いくつかの実施形態において、方法は、a) 酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチド

50

を細胞内に導入する工程であって、酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドは標的核酸と結合し、それによって複合体を形成する工程と、b) 捕捉剤で複合体を捕捉する工程と、c) 標的核酸の配列決定をする工程とを含む。いくつかの実施形態において、方法は、d) オフ標的結合部位の同一性を決定する工程をさらに含む。

【0803】

いくつかの例では、部位特異的ポリペプチドは、親和性タグを含む。親和性タグを含むポリペプチドは、本明細書に記載された。

【0804】

細胞は固定されるか、または架橋される。固定されたおよび/または架橋された細胞は、溶解される。溶解条件は、無傷のタンパク質-DNA複合体を維持するために選択される。溶解物は、親和性精製の前にDNAを断片化するために処理される。適切な断片化技術は、本明細書に記載されている。

10

【0805】

断片化されると、部位特異的ポリペプチド、標的核酸および/または核酸ターゲティング核酸を含む複合体は、固体担体とインキュベートすることによって溶解物から精製される。例えば、部位特異的ポリペプチドがビオチンタグを含むならば、固体担体はビオチンタグと結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0806】

代替的な実施形態において、断片化されると、部位特異的ポリペプチドを含む複合体は捕捉剤とインキュベートすることによって溶解物から精製される。捕捉剤は、部位特異的ポリペプチドに融合する親和性タグと結合する。捕捉剤は、抗体を含む。例えば、部位特異的ポリペプチドに融合する親和性タグがFLAGタグであるならば、捕捉剤はFLAG-タグ抗体になる。

20

【0807】

いくつかの実施形態において、捕捉剤は、親和性タグを含む。捕捉剤は、固体担体で精製される。固体担体は、捕捉剤の親和性タグと結合する。例えば、捕捉剤がビオチンタグを含むならば、ビーズはビオチン化された捕捉剤を結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0808】

方法のいくつかの実施形態において、2ラウンドの精製が実行される。いくつかの例では、第1ラウンドは捕捉剤の親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含み、第2ラウンドは部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含む。いくつかの例では、第1ラウンドは部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含み、第2ラウンドは捕捉剤の親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含む。

30

【0809】

いくつかの実施形態において、2回以上方法を実行することによって、方法を使って部位特異的ポリペプチドの結合特異性を最適化する。

【0810】

捕捉された複合体は、部位特異的ポリペプチドおよび標的核酸を含む。標的核酸は、高塩濃度洗浄、エタノール沈殿、煮沸、ゲル精製、などを含む標準的な方法によって、部位特異的ポリペプチド複合体から溶出される。

40

【0811】

溶出されたDNAは、配列解析のために調製される。配列ライブラリーは、溶出された標的核酸から作製される。配列ライブラリーは配列決定され、配列およびヌクレアーゼ結合部位の頻度を同定するために分析される。

【0812】

〔実施例12〕

酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ捕捉剤を用いた免疫沈降反応

ヌクレアーゼのオフ標的結合部位の同一性を決定する方法は、a) 核酸試料を酵素的に

50

不活性な部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸と接触させる工程であって、酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸は標的核酸と結合し、それによって複合体を形成する工程と、b) 捕捉剤で複合体を捕捉する工程であって、捕捉剤は条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドを含む、工程と、c) 標的核酸の配列決定をする工程と、およびd) オフ標的結合部位の同一性を決定する工程とを含む。この方法は、無細胞核酸試料、および/または細胞に由来する核酸試料で実行されるように設計されている。

【0813】

部位特異的ポリペプチド - 標的核酸複合体は、固定されるか、複合体を形成するために架橋される。

10

【0814】

核酸試料が細胞に由来するならば、固定されたおよび/または架橋された複合体は溶解される。溶解条件は、無傷のタンパク質 - DNA複合体を維持するために選択することができる。溶解物は、親和性精製の前にDNAを断片化するために処理される。核酸試料が無細胞試料に由来するならば、無細胞核酸はDNAを断片化するために処理される。適切な断片化技術は、本明細書に記載されている。

【0815】

いくつかの実施形態において、核酸ターゲティング核酸は、親和性タグを含む。親和性タグは、条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドと結合可能な配列を含む。いくつかの例では、親和性タグは、条件つきで酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼと結合可能な配列を含む。いくつかの例では、親和性タグは、条件つきで酵素的に不活性なCsy4タンパク質と結合可能な配列を含む。条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、親和性タグを結合するが、切断しない。親和性タグは、核酸配列5' - GUUCACUGCCGUAUAGGCAGCUAAGAAA - 3' を含む。親和性タグは、標準的な組換え法を用いて核酸に導入される。

20

【0816】

断片化されると、部位特異的ポリペプチド、標的核酸および/または核酸ターゲティング核酸を含む複合体は、条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチド(例えば、変種Csy4)とインキュベートすることによって精製される。

【0817】

いくつかの実施形態において、条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、親和性タグを含む。

30

【0818】

条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、固体担体で精製される。固体担体は、条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合する。例えば、条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドがビオチンタグを含むならば、ビーズはビオチン化された捕捉剤を結合するためにアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。

【0819】

いくつかの実施形態において、酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、様々な不溶性担体のいずれかの上に固定される。

40

【0820】

方法のいくつかの実施形態において、2ラウンドの精製が実行される。いくつかの例では、第1ラウンドは条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチド(例えば、変種Csy4)の親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含み、第2ラウンドは部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含む。いくつかの例では、第1ラウンドは部位特異的ポリペプチドの親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含み、第2ラウンドは条件つきで酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチド(例えば、変種Csy4)の親和性タグと結合する固体担体を用いた精製を含む。

【0821】

50

いくつかの実施形態において、2回以上方法を実行することによって、方法を使って部位特異的ポリペプチドの結合特異性を最適化する。

【0822】

捕捉された複合体は、部位特異的ポリペプチドおよび標的核酸を含む。標的核酸は、高塩濃度洗浄、エタノール沈殿、煮沸、ゲル精製、などを含む標準的な方法によって、部位特異的ポリペプチド複合体から溶出される。

【0823】

溶出されたDNAは、配列解析のために調製される。配列ライブラリーは配列決定され、配列およびヌクレオチド結合部位の頻度を同定するために分析される。

【0824】

〔実施例13〕

配列決定

溶出された標的核酸は、配列解析のために調製される。配列解析のための調製は、溶出された標的核酸の配列ライブラリーの生成を含む。配列解析は、部位特異的ポリペプチドのオフ標的結合部位の同一性および頻度を決定する。

【0825】

配列決定も、本質的に平行した方法で多くの（一般的に数千から数十億）核酸配列を決定する方法を用いて実行され、多くの配列は、高スループット連続的方法を用いて平行して好ましく読み出される。このような方法は、パイロシーケンス法（例えば、454 Life Sciences, Inc., Branford, Conn.によって商品化されたように）；ライゲーションによる配列決定（例えば、SOLiD（商標）技術、Life Technology, Inc., Carlsbad, Calif.に商品化されたように）；改変ヌクレオチドを用いた合成による配列決定（Illumina, Inc., San Diego, Calif.によるTruSeq（商標）およびHiSeq（商標）技術、Helicos Biosciences Corporation, Cambridge, Mass.によるHeliscope（商標）、およびPacific Biosciences of California, Inc., Menlo Park, Calif.によるPacBio RSなどに商品化されたように）、イオン検出技術による配列決定（Ion Torrent, Inc., South San Francisco, Calif.）；DNAナノボールの配列決定（Complete Genomics, Inc., Mountain View, Calif.）；ナノ細孔ベースの配列決定技術（例えば、Oxford Nanopore Technologies, LTD, Oxford, UKによって開発されたように）、およびその他の既知の高度に並行化された配列決定法を含むことができるが、限定されるものではない。

【0826】

〔実施例14〕

エフェクタータンパク質による標的核酸の改変

部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸および/またはエフェクタータンパク質を含むベクターは、細胞に導入される。一度細胞内に、ベクターにコードされる要素を含む複合体が形成される。核酸ターゲティング核酸は、Csy4タンパク質結合配列で改変される。エフェクタータンパク質、Csy4は、改変核酸ターゲティング核酸と結合する。Csy4は、標的核酸を改変する非天然配列（例えば、融合）を含む。非天然配列は、標的核酸の転写を改変する配列である。非天然配列は、転写因子である。転写因子は、標的核酸の転写レベルを上昇させる。場合によっては、非天然配列は、メチラーゼである。メチラーゼは、結果として標的核酸のメチル化を増加させる。場合によっては、非天然配列は、デメチラーゼである。デメチラーゼは、結果として標的核酸のメチル化を減少させる。場合によっては、非天然配列は、Rad51動員ペプチド（recruiting peptide）である。Rad51動員ペプチドは、標的部位で相同組換えのレベルを上昇させる。場合によっては、非天然配列は、BCRA-2動員ペプチドである。BCRA-2動員ペプチドは、標的部位で相同組換えのレベルを上昇させる。

10

20

30

40

50

【0827】

〔実施例15〕

遺伝子移動事象のためのバイオセンサーとしての部位特異的ポリペプチドの使用

部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸および/またはエフェクタータンパク質を含むベクターは、細胞に導入される。部位特異的ポリペプチドおよびエフェクタータンパク質は、細胞局在配列（例えば核局在化シグナル）に融合される。一度細胞内に、ベクターにコードされる要素を含む複合体が形成される。いくつかの例では、2つのベクターが、細胞に導入される。ベクターは、分割された緑色蛍光タンパク質（GFP）の第1の不活性化部分を含み、第1の核酸ターゲティング核酸と結合する第1のエフェクタータンパク質（Csy4）、および分割されたGFPの第2の不活性化部分を含み、第2の核酸ターゲティング核酸と結合する第2のエフェクタータンパク質（Csy4、Cas5またはCas6）をコードする。第1の核酸ターゲティング核酸は、第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質が結合可能な、第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質結合配列で改変される。第2の核酸ターゲティング核酸は、第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質が結合可能な第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質結合配列で改変される。いくつかの実施形態において、第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質は第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質結合配列と相互作用し、第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質は第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質結合配列と相互作用する。第1および第2の核酸ターゲティング核酸が、ごく接近した2つの配列と結合するように部位特異的ポリペプチドを導く時、第1のエフェクタータンパク質および第2のエフェクタータンパク質は、分割されたGFPの第1の不活性化部分を分割されたGFPの第2の不活性化部分と接触させて、活性なGFPを生成する。例えば、1つの核酸ターゲティング核酸が、Bcr遺伝子領域またはその近くに複合体を導くように、および、例えば、別の核酸ターゲティング核酸が、Ab1遺伝子領域またはその近くに複合体を導くように、複合体の核酸ターゲティング核酸は設計される。転位事象が起こらなかったならば、Bcr遺伝子は22番染色体上にあり、Ab1遺伝子は9番染色体上にあり、分割されたGFPシステムの2つの不活性化部分が相互作用することができないように、標的核酸配列は十分に遠く離れているので、シグナルは生成しない。転位事象が起こったならば、遺伝子が共に近くなるように、Bcr遺伝子およびAb1遺伝子は転位する。この例では、分割されたGFPシステムの2つの不活性化部分が活性なGFPを形成するために一体となるように、標的核酸配列は共に十分に接近している。GFPシグナルは、蛍光光度計によって検出可能である。シグナルは、遺伝子移動事象に由来する特定の遺伝子型を示す。

10

20

30

【0828】

〔実施例16〕

遺伝子変異のためのバイオセンサーとしての部位特異的ポリペプチドの使用

実施例2に記載されたシステムを使用して、細胞内の特異的な変異の存在を検出することもできる。この実施例では、第1の核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリヌクレオチドを変異部位の近くに位置する天然の配列に導くために選択される。第2の核酸ターゲティング核酸は、変異配列（例えば、DNA配列決定によって同定された変異配列）を認識するために選択される。部位のPAM配列のすぐ5'側の最初の12個の核酸内に、変異配列が生じるように、核酸ターゲティング核酸は選択される。この例では、分割されたGFPシステムの2つの不活性化部分が活性なGFPを形成するために一体となるように、標的核酸配列は共に十分に接近している。GFPシグナルは、蛍光光度計によって検出可能である。シグナルは、特定の遺伝子型を示す。

40

【0829】

〔実施例17〕

遺伝子移動事象を含む疾患治療（therapeutic for diseases）としての部位特異的ポリペプチドの使用

部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸および/またはエフェクタータンバ

50

ク質を含むベクター、操作可能なように第1のプロモーターにリンクした細胞溶解誘導性ペプチド（例えばアデノウイルス死タンパク質）を含む核酸もまた、細胞に導入される。一度細胞内に、ベクターにコードされる要素を含む複合体が形成される。いくつかの例では、2つのベクターが、細胞に導入される。ベクターは、第1の核酸ターゲティング核酸と結合し、第1のプロモーターと結合する第1の転写因子の活性化因子ドメインを含む第1のエフェクタータンパク質（第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質配列を含む）、および第2の核酸ターゲティング核酸と結合し、第1の転写因子のDNA結合ドメインを含む第2のエフェクタータンパク質（第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質配列を含む）をコードする。第1の核酸ターゲティング核酸は、第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質が結合可能な、第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質結合配列で改変される。第2の核酸ターゲティング核酸は、第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質が結合可能な第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質結合配列で改変される。いくつかの実施形態において、第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質は第1のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質結合配列と優先的に相互作用し、第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質は第2のCsy4、Cas5またはCas6タンパク質結合配列と優先的に相互作用する。罹患細胞が遺伝子移動事象を含むゲノムを含むならば、第1および第2の核酸ターゲティング核酸が、ごく接近した2つの配列と結合するように部位特異的ポリペプチドを導く時、第1のエフェクタータンパク質および第2のエフェクタータンパク質は、活性化因子ドメインおよび第1の転写因子のDNA結合ドメインを接近させる。第1の転写因子のDNA結合ドメインは、操作可能なように細胞溶解誘導性ペプチドにリンクした第1のプロモーターと結合可能であり、近位の活性化因子ドメインは、細胞溶解誘導性ペプチドをコードするRNAの転写を誘発する。遺伝子移動事象を含まない非罹患細胞において、DNA結合ドメインおよび第1の転写因子の活性化因子ドメインは接近させられず、細胞溶解誘導性ペプチドの転写は行われない。

【0830】

例えば、1つの核酸ターゲティング核酸が、Bcr遺伝子領域またはその近くに複合体を導くように、および、例えば、別の核酸ターゲティング核酸が、Ab1遺伝子領域またはその近くに複合体を導くように、複合体の核酸ターゲティング核酸は設計される。非罹患細胞において、転位事象は起こらず、Bcr遺伝子は2番染色体上にあり、Ab1遺伝子は9番染色体上にあり、転写因子システムの2つの不活性な部分が相互作用することができず、細胞溶解誘導ペプチドの転写が誘導されないように、標的核酸配列は十分に遠く離れている。転位事象が起きた罹患細胞において、遺伝子が共に近くなるように、Bcr遺伝子およびAb1遺伝子は転位する。この例では、転写因子システムの2つの不活性な部分が細胞死誘導ペプチドの転写を誘導するために一体となるように、標的核酸配列は共に十分に接近している。細胞溶解は、遺伝子移動事象に由来する特定の遺伝子型に依存している。

【0831】

〔実施例18〕

遺伝子変異を含む疾患治療としての部位特異的ポリペプチドの使用

実施例4に記載されたシステムを使用して、細胞内の特異的な変異の存在を検出することもできる。この実施例では、第1の核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリヌクレオチドを変異部位の近くに位置する天然の配列に導くために選択される。第2の核酸ターゲティング核酸は、変異配列（例えば、DNA配列決定によって同定された変異配列）を認識するために選択される。部位のPAM配列のすぐ5'側の最初の12個の核酸内に、変異配列が生じるように、核酸ターゲティング核酸は選択される。この例では、転写因子の2つの不活性な部分が細胞溶解誘導ペプチドの転写を可能にするために一体となるように、標的核酸配列は共に十分に接近している。

【0832】

〔実施例19〕

10

20

30

40

50

遺伝子移動事象または遺伝子変異を含む患部組織を攻撃するための免疫系の動員。

実施例 4 および / または 5 に記載されたシステムを使用して、結果として細胞表面上の抗原を表示する分割された転写因子システムによる転写を導くこともできる。いくつかの例では、抗原は MHC クラス II 分子によって示されるペプチドである。いくつかの例では、抗原は、免疫エフェクター細胞を部位に動員する細胞表面タンパク質である。

【 0 8 3 3 】

〔実施例 2 0〕

核酸の 3 次元位置の検出

部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸および / またはエフェクタータンパク質を含むベクターは細胞に導入される。一度細胞内に、ベクターにコードされる要素を含む複合体が形成される。2つのベクターが、細胞に導入される。1つのベクターは、分割された親和性タグシステムの第 1 の不活性な部分を含むエフェクタータンパク質 (C s y 4) をコードする。第 2 のベクターは、分割された親和性タグの第 2 の不活性な部分を含むエフェクタータンパク質 (C s y 4 、 C a s 5 または C a s 6) をコードする。複合体の核酸ターゲティング核酸は、C s y 4 、 C a s 5 または C a s 6 タンパク質結合配列で改変される。エフェクタータンパク質は、改変核酸ターゲティング核酸と結合する。核酸ターゲティング核酸は、複合体を 3 次元核酸構造 (例えば、クロマチン) 中の関心領域へ導くように設計されている。標的配列が空間的に共に近くないならば、分割された親和性タグの 2 つの不活性な部分は相互作用することができない。標的配列が空間的に共に近いならば、分割された親和性タグの 2 つの不活性な部分は、親和性タグ全体を形成するために一体とすることができる。

10

20

【 0 8 3 4 】

細胞は溶解され、細胞溶解は親和性タグと結合する抗体と共にインキュベートされる。抗体は精製され、それによって、親和性タグおよび複合体が結合している核酸を精製する。精製された核酸は、高塩濃度洗浄を用いて複合体から解離される。解離され精製された核酸は配列解析用に調製され、配列決定される。配列決定の結果は、3次元空間で共に近いクロマチン領域と一致する。配列決定の結果を用いて、遺伝子発現をさらに理解し、疾患を治療することができる。

【 0 8 3 5 】

〔実施例 2 1〕

多重ゲノム工学

核酸ターゲティング核酸およびエンドリボヌクレアーゼ結合配列を含む核酸モジュールを含む多重化遺伝子標的剤を含むベクターは、細胞に導入される。いくつかの実施形態において、細胞は部位特異的ポリペプチドおよびエンドリボヌクレアーゼをすでに含む。いくつかの例では、細胞は、部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターおよびエンドリボヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターと接触する。いくつかの例では、細胞は、部位特異的ポリペプチドおよびエンドリボヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターと接触する。いくつかの実施形態において、ベクターは 1 つまたはそれ以上のエンドリボヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、多重化遺伝子標的剤、部位特異的ポリペプチドおよび 1 つまたはそれ以上のエンドリボヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む。配列は RNA に転写される。1 つまたはそれ以上のエンドリボヌクレアーゼは、多重化遺伝子標的剤の 1 つまたはそれ以上のエンドリボヌクレアーゼ結合配列へ結合する。1 つまたはそれ以上のエンドリボヌクレアーゼは、多重化遺伝子標的剤の 1 つまたはそれ以上のエンドリボヌクレアーゼ結合配列を切断し、このように、個々の核酸モジュールを解放する。いくつかの実施形態において、核酸モジュールは、エンドリボヌクレアーゼ結合配列の、すべて、いくつかを含むか、または何も含まない。

30

40

【 0 8 3 6 】

解放された核酸モジュールは、部位特異的ポリペプチドと結合し、それによって複合体

50

を形成する。複合体は、1つまたはそれ以上の標的核酸に標的とされる。1つまたはそれ以上の核酸モジュールは、1つまたはそれ以上の標的核酸とハイブリダイズする。1つまたはそれ以上の部位特異的ポリペプチドは、核酸モジュールによって定義される切断部位で1つまたはそれ以上の標的核酸を切断し、このように、結果として1つまたはそれ以上の改変標的核酸になる。

【0837】

いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上のドナーポリヌクレオチドおよび/または同じものをコードするベクターは、細胞に導入される。1つまたはそれ以上のドナーポリヌクレオチドは1つまたはそれ以上の切断された標的核酸に組み入れられ、それによって結果として1つまたはそれ以上の改変標的核酸(例えば、付加)になる。いくつかの例では、同一のドナーポリヌクレオチドは、複数の切断部位に組み入れられる。いくつかの例では、1つまたはそれ以上のドナーポリヌクレオチドは、複数の切断部位に組み入れられる。いくつかの例では、ドナーポリヌクレオチドおよび/または同じものをコードするベクターは、細胞に導入されない。これらの場合に、改変標的核酸は、欠失を含むことができる。

10

【0838】

〔実施例22〕

RNAの細胞への化学量論的送達方法

いくつかの実施形態において、本開示は、核酸の細胞核への化学量論的送達方法を提供する。いくつかの実施形態において、3つの化学量論的に送達可能な核酸が用いられる：Cas9をコードするもの、核酸ターゲティング核酸をコードするもの、およびCsy4をコードするものである。3つの核酸の各々は、Csy4結合部位を含む。

20

【0839】

いくつかの実施形態において、方法はタンDEM融合ポリペプチドを提供する。融合ポリペプチドは、3つのCsy4ポリペプチドを含む。3つのCsy4ポリペプチドは、リンカーによって分離される。3つのCsy4ポリペプチドは、3つの核酸分子の各々の上でCsy4結合部位と結合し、それによって複合体を形成する。

【0840】

いくつかの実施形態において、複合体は細胞外で形成され、細胞に導入される。複合体は、3つの化学量論的に送達可能な核酸と融合タンパク質とを混合し、タンDEM融合ポリペプチドと3つのCsy4結合部位との間で結合を可能にする反応を生じさせることによって形成される。複合体は、インジェクション、エレクトロポレーション、トランスフェクション、形質転換、ウイルス導入、などによって導入される。細胞内で、複合体の核酸のいくつかは翻訳される。いくつかの実施形態において、結果として生じる翻訳産物は、Csy4およびNLS-Cas9である(例えば、NLSを含むCas9。NLSは、N末端である必要はない場合がある)。Csy4は、核酸ターゲティング核酸をコードする核酸上でCsy4結合部位を切断し、それによって核酸ターゲティング核酸をタンDEM融合ポリペプチドから解放する。NLS-Cas9は解放された核酸ターゲティング核酸を結合し、それによってユニットを形成する。このユニットは、核へ移行する。核内で、ユニットは核酸ターゲティング核酸のスペーサーとハイブリダイズする標的核酸へ導かれる。ユニットのCas9は、標的核酸を切断する。Cas9による標的核酸の切断は、ゲノム工学と呼ばれる。

30

40

【0841】

いくつかの実施形態において、複合体は細胞内で形成される。3つの化学量論的に送達可能な核酸をコードするベクターは、細胞に導入される。3つの化学量論的に送達可能な核酸の各々のうちの1つをコードする3つの異なるベクターは、細胞に導入される。2つのベクターが細胞に導入され、2つのベクターのうちの1つは2つの化学量論的に送達可能な核酸をコードし、2つのベクターのうちの1つは、1つの化学量論的に送達可能な核酸をコードする。ベクターのどれでも、タンDEM融合ポリペプチドをコードすることができる。

50

【0842】

細胞内で、RNAまたはポリペプチドをコードするベクターの核酸は、RNAに転写される。3つの核酸およびタンDEM融合ポリペプチドを含む複合体が形成され、それによってCsy4結合タンパク質の各々は、3つの核酸の各々の上のCsy4結合部位へ結合する。複合体の核酸は、翻訳される。いくつかの実施形態において、結果として生じる翻訳産物は、Csy4とNLS-Cas9である（例えば、NLSを含むCas9。NLSは、N末端である必要はない場合がある）。Csy4は、核酸ターゲティング核酸をコードする核酸上でCsy4結合部位を切断し、それによって核酸ターゲティング核酸をタンDEM融合ポリペプチドから解放する。NLS-Cas9は解放された核酸ターゲティング核酸を結合し、それによってユニットを形成する。このユニットは、核へ移行する。核内で、ユニットは核酸ターゲティング核酸のスペーサーとハイブリダイズする標的核酸へ導かれる。ユニットのCas9は、標的核酸を切断する。

10

【0843】

〔実施例23〕

複数の核酸ターゲティング核酸の細胞への化学量論的送達方法

いくつかの実施形態において、本開示は、複数の核酸の細胞への化学量論的送達方法を提供し、複数の核酸のいくつかは、核酸ターゲティング核酸である。いくつかの実施形態において、複数の核酸は、4つの核酸を含む：Cas9をコードするもの、核酸ターゲティング核酸をコードするものが2つ、およびCsy4をコードするものである。

20

【0844】

核酸は、2つ以上の核酸結合タンパク質結合部位を含む。いくつかの例では、第1の核酸結合タンパク質結合部位（例えば、より5'部位）は、Csy4結合部位を含む。いくつかの例では、第2の核酸結合タンパク質結合部位（例えば、より3'部位）は、異なる核酸結合タンパク質結合部位（例えば、MS2結合部位）を含む。いくつかの例では、第2の核酸結合タンパク質結合部位は、化学量論的に送達可能な核酸の各々とは異なる。例えば、第2の核酸結合タンパク質結合部位は、CRISPRポリペプチド（例えば、Cas5、Cas6）のうちの1つを結合する部位である可能性がある。いくつかの例では、Cas9をコードする核酸も、核局在化シグナル（NLS）を含む。

【0845】

いくつかの実施形態において、タンDEM融合ポリペプチドは、3つの核酸結合タンパク質を含む。3つの核酸結合タンパク質は、Csy4、Cas5、Cas6である。タンDEM融合ポリペプチドは、核局在化シグナルを含む。タンDEM融合ポリペプチドは、複数の核酸結合タンパク質のコピーを含む（例えば、Csy4を2コピー、Cas5を1コピー、Cas6を1コピー）。

30

【0846】

いくつかの実施形態において、タンDEM融合タンパク質および4つの核酸を含む複合体は、細胞外で形成される。複合体は、4つの核酸とタンDEM融合タンパク質とを混合し、タンDEM融合ポリペプチドと4つの核酸結合タンパク質結合部位との間で結合を可能にする反応を生じさせることによって形成される。複合体は、細胞に導入される。導入は、形質転換、トランスフェクション、ウイルス導入、マイクロインジェクションもしくはエレクトロポレーション、または、細胞膜を横断して生体分子を導入することができるいかなる技術のいずれかによって生じる。複合体は、細胞内で形成される（例えば、核酸およびタンDEM融合タンパク質をコードする核酸配列を含むベクターの導入後）。

40

【0847】

細胞内で、Csy4およびCas9をコードする核酸は翻訳され、結果としてCsy4およびNLS-Cas9を生じる（例えば、NLSを含むCas9。NLSは、N末端である必要はない場合がある）。Csy4は、核酸ターゲティング核酸をコードする核酸上でCsy4結合部位を切断し、それによってそれらをタンDEM融合ポリペプチドから解放する。

【0848】

50

NLS-Cas9は解放された核酸ターゲティング核酸を結合し、それによって複数のユニットを形成する。これらのユニットは、核へ移行する。核内で、ユニットは、ユニットの核酸ターゲティング核酸のスペーサーとハイブリダイズする標的核酸へ導かれる。ユニットのCas9は、標的核酸を切断する。

【0849】

〔実施例24〕

RNAおよびドナーポリヌクレオチドの化学量論的送達方法

本開示は、ゲノム工学で使用可能なRNA成分の化学量論的送達方法を提供する。方法は、ゲノム工学の部位に挿入可能なドナーポリヌクレオチドの送達を含むこともできる。

【0850】

本開示は、複数のRNAおよびドナーポリヌクレオチドの細胞への化学量論的送達方法を提供する。いくつかの実施形態において、複数のRNAは、3つのRNAおよび1つのDNAを含む。いくつかの例では、3つのRNAは以下の通りである：Cas9をコードするもの、Csy4をコードするもの、および核酸ターゲティング核酸をコードするものである。DNAは、ドナーポリヌクレオチドをコードするDNAである。

【0851】

いくつかの例では、RNAは複数の核酸結合タンパク質結合部位（例えば、2つの核酸結合タンパク質結合部位）を含む。第1の核酸結合タンパク質結合部位（例えば、より5'部位）は、Csy4結合部位を含む。第2の核酸結合タンパク質結合部位（例えば、より3'部位）は、異なる核酸結合タンパク質結合部位を含む。本開示の核酸の各々における第2の核酸結合タンパク質結合部位は異なる。例えば、第2の核酸結合タンパク質結合部位は、CRISPRポリペプチド（例えば、Cas5、Cas6）および/またはDNA結合タンパク質（例えば、ジンクフィンガータンパク質）を結合する。方法の核酸も、核局在化シグナル（例えば、Cas9をコードするRNAおよびドナーポリヌクレオチドをコードするDNA）をコードする配列を含む。

【0852】

いくつかの実施形態において、タンデム融合ポリペプチドは、4つの核酸結合タンパク質（例えば、RNA結合タンパク質およびDNA結合タンパク質）を含む。いくつかの例では、3つの核酸結合タンパク質はCsy4、Cas5、Cas6であり、第4の核酸結合タンパク質はDNA結合タンパク質（例えば、ジンクフィンガータンパク質）である。いくつかの例では、タンデム融合ポリペプチドは、核局在化シグナルを含む。

【0853】

いくつかの実施形態において、タンデム融合タンパク質および核酸（例えば、3つのRNAおよび1つのDNA）を含む複合体は、細胞外で形成される。複合体は、核酸（例えば、3つのRNAおよび1つのDNA）とタンデム融合タンパク質とを混合し、タンデム融合ポリペプチドと4つのRNA結合タンパク質結合部位との間で結合を可能にする反応を生じさせることによって形成される。複合体を、細胞に導入することができる。複合体は、細胞内で形成される（例えば、核酸およびタンデム融合タンパク質をコードする核酸配列を含むベクターの導入後）。

【0854】

細胞内で、Csy4およびCas9をコードするRNAは翻訳され、結果としてCsy4およびNLS-Cas9を生じる（例えば、NLSを含むCas9。ここに記載するように、NLSは、N末端である必要はない場合がある）。Csy4は、核酸ターゲティング核酸およびDNAをコードするRNA上でCsy4結合部位を切断し、それによってそれらをタンデム融合ポリペプチドから解放する。いくつかの例では、解放されたドナーポリヌクレオチドは、その核局在化シグナルによって核へ移行する。

【0855】

NLS-Cas9は解放された核酸ターゲティング核酸を結合し、それによってユニットを形成する。ユニットは、核へ移行する。核内で、ユニットは、ユニットの核酸ターゲティング核酸のスペーサーとハイブリダイズする標的核酸へ導かれる。ユニットのCas

10

20

30

40

50

9 は、標的核酸を切断する。ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部は、切断された標的核酸に挿入されることができる。

【0856】

〔実施例25〕

遺伝的に改変した細胞の継ぎ目のない選抜

複数の細胞は、Cas9と相同なポリペプチド、核酸ターゲティング核酸およびドナーポリヌクレオチドをコードする配列を含むベクターと接触させられる。場合によっては、Cas9と相同なポリペプチド、核酸ターゲティング核酸およびドナーポリヌクレオチドをコードする配列の1つまたはそれ以上は、異なるベクター上に配置される。細胞は、ベクターでトランスフェクションされる。いくつかの例では、細胞はベクターを運ぶウイルスに感染される。いくつかの例では、細胞はCas9に相同なタンパク質をすでに含み、ベクターはこのポリペプチドをコードしない。いくつかの例では、細胞はCRISPRシステム（例えば、Casタンパク質、crRNAおよびtracrRNA）をすでに含み、ベクターはドナーポリヌクレオチドをコードするだけである。ドナーポリヌクレオチドは、関心の遺伝要素およびレポーター要素をコードする配列を含む。レポーター要素は、核酸ターゲティング核酸配列、Cas9と相同なタンパク質、および蛍光タンパク質を含む。核酸ターゲティング核酸は、Cas9を標的核酸（例えば宿主細胞ゲノムの部位）へ導き、結果として標的核酸の二本鎖DNAに亀裂を入れ、ドナーポリヌクレオチドを挿入する。ドナーポリヌクレオチドの挿入は、レポーターのスクリーニングによって検査される。場合によっては、スクリーニングは蛍光活性化細胞分類を含む。スクリーニングは、複数の選抜方法を含む。Cas9および/または核酸ターゲティング核酸は、誘導性プロモーターによって制御される。レポーターシグナルを含む細胞集団を選抜した後に、レポーター要素は、誘導性プロモーターを活性化することによって除去され、このことは核酸ターゲティング核酸およびドナーポリヌクレオチドの部位特異的ポリペプチドを転写する。転写された核酸ターゲティング核酸および転写された部位特異的ポリペプチドは、複合体を形成することができる。ある複合体は、ドナーポリヌクレオチドのレポーター要素の3'末端を標的とすることができる。ある複合体は、ドナーポリヌクレオチドのレポーター要素の5'末端を標的とすることができる。レポーター要素の3'および5'末端は、切断可能である。切断された標的核酸は細胞メカニズムで再結合されることが可能であり、それによって、結果として、ドナーポリヌクレオチドの挿入前と同一の核酸配列をコードするインフレーム核酸配列になる。このように、レポーター要素は継ぎ目なく挿入されて、細胞から除去される。

【0857】

〔実施例26〕

操作された核酸ターゲティング核酸を用いたCas9の切断方法

試薬

temp3標的DNA配列を含むpCB002プラスミドは、DNA 1μgにつき、AscI 1Uで消化してベクターを線状にした。反応混合物を80℃で20分間インキュベートすることによって反応を停止した。次いでQiagen PCRクリーンアップキットを用いて反応物を精製した。

【0858】

シングルガイド核酸は、T7 High Yield RNA Synthesis Kit（カタログ番号E2040S）を用いて、300ヌクレオチドを超えるRNAの場合に製造業者によって推奨される試薬の半分の量を用いて生成した。通常、20μL反応で200~350ngの間のテンプレートをを用い、16時間インキュベートした。試料をDNaseで処理し、Thermo GeneJet RNA精製キット（カタログ番号K0732）を用いて精製し、20μLに溶出した。典型的な収量は、1.4~2μg/μLの範囲であった。

【0859】

10

20

30

40

50

切断検定のセットアップの初めに、すべての sgRNA を 3500 nM の濃度に希釈し、80 で 15 分間、熱ショックを与えた。試料を加熱素子から除去し、室温に平衡化させた。シングルガイド核酸ターゲティング核酸の 4 μL アリコート、アガロースゲル上に流して RNA 完全性を確かめることができる。

【0860】

2 ~ 2.5 mg/mL の Cas9 のアリコートをフリーザーから取り出し、可及的速やかに解凍し、次いで 1 倍切断緩衝液で希釈して適切なストック濃度にした。

【0861】

切断検定

マスターミックスの水、5 倍切断緩衝液 (100 mM HEPES、500 mM KCl、25 mM MgCl₂、5 mM DTT および 25% グリセリン、pH 7.4)、および 250 nM までの Cas9 を薄肉の PCR 試験管に等分した。sgRNA を、250 nM の最終濃度で適切な試験管に添加した。

10

【0862】

反応を 37 で 10 分間インキュベートし、10 nM の線状プラスミドを添加し、反応物 (最終的な反応体積は 20 μL) を 37 で 1 時間インキュベートした。反応を 60 で 20 分間加熱することによって反応を停止した。アリコート 10 μL を 6 倍 DNA ローディングダイ 2 μL と混合し、SYBR safe で染色した 1.5% アガロースゲル上で、電気泳動によって分析した。約 2800 bp および約 1300 bp 断片が出現することは、Cas9 が媒介して切断されたことを示した。実験の結果を、図 6、10 および 11 に示す。図 5 に示した、設計されたすべての合成ガイド RNA 配列は、SGRv8 を除いて、sgRNA 切断を支持し、全ての補完的な領域は逆転した。これらの結果は、sgRNA の異なる領域が操作に従うことが可能であり、まだ機能を保持することを示す。

20

【0863】

操作された核酸ターゲティング核酸は、上述の検定でテストされた。図 22A および 22B は、ターゲティングおよび切断活性をテストするために用いられるシングルガイド核酸ターゲティング核酸骨格変種における二本鎖変種の初期設定の設計を示す。

【0864】

図 23A および 23B は、二本鎖におけるより小さな改変の二本鎖変種の第 2 セットを例示する。V28 は、相補的な領域の 3' 側に 2 塩基の挿入を含む；V29 は、相補的な領域の 3' 側に 3 塩基の欠失を含む。

30

【0865】

図 24A および 24B は、核酸ターゲティング核酸 (すなわち、最小限の tracrRNA 配列および 3' tracrRNA 配列) の tracrRNA 部分に変異を含む tracr 変種を例示する。V38 ~ V41 は、マイコプラズマ・モバイル (M. mobile) 163K (V38)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (S. thermophilus) LMD-9 (V39)、カンピロバクター・ジェジュニ (C. jejuni) (V40)、および髄膜炎菌 (N. meningitidis) 由来の相補的領域 / 二本鎖と tracr 核酸配列の 3' 末端との間での融合を含む。

40

【0866】

図 25A および 25B は、核酸ターゲティング核酸への Csy4 結合を可能にする改変を含む変種を表す。追加のヘアピン配列は、緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) PA14 の CRISPR 反復に由来する。

【0867】

図 26A ~ C は、Cas9 切断に関する核酸ターゲティング核酸変種の活性を示している、試験管内切断検定のデータを示す。変種 SGRv8 は、標的核酸切断 (図 26B レーン 9) を支持することができなかった。

【0868】

図 27 および図 28 は、図 23 ~ 25 の中に図示される変種をテストする、Cas9 切断検定の 2 回の独立した反復を表す。

50

【 0 8 6 9 】

追加の操作された核酸ターゲティング核酸は、表 2 にリストされたように作製され、同じ検定によってテストされた。検定の結果は図 3 7 に示され、表 2 の活性欄にリストされる。

【 0 8 7 0 】

これらの実験結果は、標的核酸切断を達成する場合に膨らみおよび P ドメイン領域が重要であることを示す。変種 4 2 ~ 4 5 の機能性は、核酸ターゲティング核酸への C s y 4 結合配列の付加が標的核酸切断を阻害しないことを示す。

【 0 8 7 1 】

〔実施例 2 7〕

配列解析システム

図 3 0 は、本開示の方法を実装するために構成されたシステムを示す。システムは、本明細書に記載される方法を実装するためにプログラムされたコンピュータサーバ（「サーバ」）を含むことができる。図 3 0 は、利用者が、例えば、ヌクレアーゼを標的とした濃縮核酸、配列決定された標的核酸、本開示の方法に関するデータ、疾患の診断、患者の遺伝子型、患者に特異的な治療の決定、またはその任意の組合せの配列決定の結果を検出し、分析し、伝達することができるように適用されたシステム 3 0 0 0 を表す。システム 3 0 0 0 は、本明細書に記載される典型的な方法を実装するようにプログラムされた中央コンピュータサーバ 3 0 0 1 を含む。サーバ 3 0 0 1 は、シングルコアプロセッサ、マルチコアプロセッサ、または並列処理のための複数個のプロセッサであり得る中央処理装置（CPU、また、「プロセッサ」）3 0 0 5 を含む。サーバ 3 0 0 1 も、メモリ 3 0 1 0（例えばランダムアクセスメモリ、読出し専用メモリ、フラッシュメモリ）；電子記憶装置 3 0 1 5（例えばハードディスク）；1 つまたはそれ以上の他のシステムと通信するための通信用インターフェース 3 0 2 0（例えばネットワークアダプタ）；および、キャッシュ、他のメモリ、データ記憶および / または電子表示アダプターを含んでもよい周辺デバイス 3 0 2 5 を含む。メモリ 3 0 1 0、記憶装置 3 0 1 5、インターフェース 3 0 2 0 および周辺デバイス 3 0 2 5 は、マザーボードのような通信バス（実線）で、プロセッサ 3 0 0 5 と通信する。記憶装置 3 0 1 5 は、データを保存するためのデータ記憶装置であり得る。サーバ 3 0 0 1 は、通信用インターフェース 3 0 2 0 を用いてコンピュータネットワーク（「ネットワーク」）3 0 3 0 に作動可能に接続される。ネットワーク 3 0 3 0 は、インターネット、イントラネットおよび / またはエクストラネット、イントラネットおよび / またはインターネット、テレコミュニケーションまたはデータネットワークと通信するエクストラネットであり得る。ネットワーク 3 0 3 0 は、場合によっては、サーバ 3 0 0 1 を用いて、ピアツーピアネットワークを実装することができ、それはサーバ 3 0 0 1 に接続したデバイスがクライアントまたはサーバとして動くのを可能にしてもよい。顕微鏡およびマイクロマニピュレーターは、周辺デバイス 3 0 2 5 または遠隔コンピュータシステム 3 0 4 0 であり得る。

【 0 8 7 2 】

記憶装置 3 0 1 5 は、例えば配列決定の結果、標的結合部位、個人的な遺伝子のデータ、遺伝子型、イメージ、イメージおよび / または配列決定の結果のデータ解析、または、本開示と関連したデータの任意の態様のファイルを保存することができる。

【 0 8 7 3 】

サーバは、ネットワーク 3 0 3 0 によって 1 つまたはそれ以上の遠隔コンピュータシステムと通信することができる。1 つまたはそれ以上の遠隔コンピュータシステムは、例えば、パーソナルコンピュータ、ラップトップ、タブレット、電話、スマートフォン、または個人情報機器であってもよい。

【 0 8 7 4 】

いくつかの状況では、システム 3 0 0 0 はシングルサーバ 3 0 0 1 を含む。他の状況では、システムは、イントラネット、エクストラネットおよび / またはインターネットで互いに通信する複数のサーバを含む。

10

20

30

40

50

【0875】

サーバ3001は、配列決定の結果、標的結合部位、個人的な遺伝子のデータ、および/または潜在的関連のその他の情報を保存するために適用されることができる。そのような情報を、記憶装置3015またはサーバ3001に保存することができ、そのようなデータを、ネットワークを通じて送信することができる。

【0876】

本明細書に記載された方法は、例えばメモリ3010または電子記憶装置3015上などのサーバ3001の電子記憶場所に保存される機械（またはコンピュータプロセッサ）実行コード（またはソフトウェア）として実装可能である。使用中に、コードはプロセッサ3005によって実行されることができる。場合によっては、コードは記憶装置3015から検索されることができ、プロセッサ3005による手早いアクセスのためにメモリ3010に保存されることができる。いくつかの状況では、電子記憶装置3015を除外することができ、機械実行可能命令がメモリ3010に保存される。あるいは、コードを第2のコンピュータシステム3040上で実行することができる。

【0877】

本明細書により提供されるシステムおよび方法の態様、例えばサーバ3001は、プログラミングに具体化されることができる。技術のさまざまな態様は、一般的に、機械（またはプロセッサ）実行コードおよび/または一種の機械可読媒体で送られる、または具体化される関連データの形の「生成物」または「製品」とみなしてもよい。機械実行可能コードを、電子記憶装置、同様のメモリ（例えば、読み出し専用メモリ、ランダムアクセスメモリ、フラッシュメモリ）またはハードディスクに保存することができる。「記憶」タイプ媒体は、コンピュータ、プロセッサなどの具体的なメモリのいずれかもしくはすべて、または、さまざまな半導体メモリ、テープドライブ、ディスクドライブなどの、その関連モジュールを含むことができ、いつでも一時的ではない保存をソフトウェアプログラミングに提供してもよい。ソフトウェアのすべてまたは部分は、インターネットまたはさまざまな他のテレコミュニケーションネットワークを通して時々やりとりされてもよい。そのような通信は、例えば、1台のコンピュータまたはプロセッサから他へ、例えば、管理サーバまたはホストコンピュータからアプリケーションサーバのコンピュータプラットフォームへ、ソフトウェアの装填を可能にするかもしれない。したがって、ソフトウェアエレメントを担ってもよい別のタイプの媒体は、例えばローカルデバイス間の物理的インターフェースを横断して、有線で光学的な地上通信線ネットワークを介して、さまざまなエアリンク（air-links）で使用される光学的、電氣的、電磁氣的な波を含む。そのような波を運ぶ物理的要素、例えば有線または無線リンク、光リンクなども、ソフトウェアを載せる媒体と考えてもよい。本明細書で用いられるように、非一時的な、具体的な「記憶」媒体に制限されない限り、コンピュータまたは機械「読み込み可能な媒体」などの用語は、実行のために命令をプロセッサに提供することに関与するいかなる媒体をも指す。

【0878】

したがって、コンピュータ実行可能コードのような、機械可読媒体は、具体的な記憶媒体、搬送波媒体または物理的伝送媒体を含むが、これに限定されない多くの形式をとってもよい。不揮発性記憶媒体は、例えば、いかなるコンピュータのいかなる記憶デバイスなどの、光学または磁気ディスクを含むことができ、上述のものはシステムを実装するのに用いられてもよい。具体的な伝送媒体は、以下を含むことができる：同軸ケーブル、銅線、および光ファイバ（コンピュータシステム内のバスを構成するワイヤを含む）。搬送波伝送媒体は、電氣的もしくは電磁氣的シグナルまたは、無線周波数（RF）および赤外線（IR）データ通信の間に発生するような音波もしくは光波の形式をとってもよい。コンピュータで読取り可能な媒体の一般的な形式は、したがって、例えば、以下を含む：フロッピー（登録商標）ディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、その他の磁気媒体、CD-ROM、DVD、DVD-ROM、その他の光学的媒体、パンチカード、紙テープ、穴のパターンによるその他の物理的記憶媒体、RAM、ROM、P

10

20

30

40

50

ROMおよびEPROM、FLASH-EPROM、その他のメモリチップまたはカートリッジ、搬送波輸送データまたは命令、ケーブル、または前述の搬送波を輸送しているリンク、またはコンピュータがプログラミングコードおよび/またはデータを読み込む可能性のあるその他の媒体。コンピュータで読取り可能な媒体のこれらの形式の多くは、実行のために1つまたはそれ以上の命令の1つまたはそれ以上の配列をプロセッサへ運ぶことに関係している可能性がある。

【0879】

〔実施例28〕

部位特異的ポリペプチドを用いた配列に基づく配列決定

核酸試料は、シングルガイドRNAおよび検出可能なラベルを含む核酸タグと結合する。同時に、核酸タグが結合した核酸試料は、タグ付き測定用試料と呼ばれる。タグ付き測定用試料は、固定化オリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイに接触される。固定化オリゴヌクレオチドは、二本鎖核酸ライブラリーである。オリゴヌクレオチドは、検出可能なラベル（例えば、蛍光ラベル）を含む。タグ付き測定用試料の個々の部材は、それらがハイブリダイゼーションを容易にするのに十分な相補性を共有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションの量は、試料ライブラリーおよび固定化オリゴヌクレオチドから2つの検出可能なラベルの強度を比較することによって定量化されることができる。例えば、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドは、2つの検出可能なラベル（試料ライブラリーおよびオリゴヌクレオチドから）を示すことができる。ハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドは、1つの検出可能なラベル（オリゴヌクレオチドから）を示すことができる。ハイブリダイズしたプローブは、Cas9と接触する。Cas9は、タグ付き測定用試料の部材とハイブリダイズしたマイクロアレイで、オリゴヌクレオチドを切断する。部位特異的ポリペプチドによる切断は、タグ付き測定用試料のハイブリダイズされた部材が除去されることを可能にする。部位特異的ポリペプチドによる切断の後、ハイブリダイズしないオリゴヌクレオチド検出可能なラベルのみが、マイクロアレイ上に残る。残された検出可能なラベルを定量化する。残された検出可能なラベルの定量化は、どの配列が核酸試料において示されたか、およびどれがそうではなかったか（例えば、位置マッピングによって）に相関している。残された検出可能なラベルを示さないオリゴヌクレオチドは、核酸試料において示された配列と一致する。残りの検出可能なラベルを示すオリゴヌクレオチドは、核酸試料において示されなかった配列と一致する。

【0880】

〔実施例29〕

タグ付き核酸ターゲティング核酸を用いた標的核酸の切断

本実施例は、核酸ターゲティング核酸の5'末端の上でCsy4結合配列を含む核酸ターゲティング核酸で、標的核酸を切断した結果を記載する。直鎖状二本鎖DNA配列の単一部位を標的とするガイドRNAの有りまたは無しで、Cas9をインキュベートした。1時間後に、切断産物をアガロースゲル上で分離し、視覚化した。図13Dは、タグ付き核酸ターゲティング核酸を介したCas9切断（レーン3）が、タグなし核酸ターゲティング核酸を介したCas9切断（レーン1）より効率的でなかったことを示す。1時間後、標的の約100%は、タグなし核酸ターゲティング核酸に導かれたCas9によって切断され、ごくわずかな標的だけが、タグ付き核酸ターゲティング核酸に導かれたCas9によって同時に切断された。これらの実験は、非天然配列の位置を使ってCas9：核酸ターゲティング核酸複合体の切断の切断効率を調整できることを示す。例えば、図27および図29は、活性を保持する核酸ターゲティング核酸内のさまざまな位置へのCsy4結合配列の付加の機能性を表す。

【0881】

〔実施例30〕

血液疾患におけるゲノム工学遺伝子

図XX中に記載されたスパーサー配列を含む核酸ターゲティング核酸は、部位特異的ポリペプチドと共に細胞に導入され、それによって複合体が形成される。複合体は、核酸タ

10

20

30

40

50

ーゲティング核酸のスペーサー配列に相当する相補性を持つ血液疾患に関する遺伝子を標的とする。核酸ターゲット核酸が標的核酸とハイブリダイズされると、部位特異的ポリペプチドは標的核酸を切断する。切断された標的核酸は、ドナーポリヌクレオチドと共に操作されることができる。

【0882】

〔実施例31〕

標的核酸切断および改変を定量するためのプロトコール

本プロトコールを用いて、標的核酸が切断されたかどうか、または、標的核酸が、例えば挿入または欠失で改変されたかどうか定量することができる。25 μ L 反応、gDNA からの500~600 nt 生成物において、標的部位を囲むプライマーが、PCR増幅に使われる。プライマーは、切断部位の両側に少なくとも100 ntを含む。切断検定から結果として生じる生成物は、約100 ntを超える。

10

【0883】

増幅が純粋かどうか確認するために、約5 μ LのPCR産物、をアガロースゲル上で泳動する。残りのPCR産物についての、融解およびアニーリングのプロトコールは、以下の通りである：

- ・ 95 10分
- ・ 95 ~ 85 (- 2.0 / 秒)
- ・ 85 1分
- ・ 85 ~ 75 (- 0.3 / 秒)
- ・ 75 1分
- ・ 75 ~ 65 (- 0.3 / 秒)
- ・ 65 1分
- ・ 65 ~ 55 (- 0.3 / 秒)
- ・ 55 1分
- ・ 55 ~ 45 (- 0.3 / 秒)
- ・ 45 1分
- ・ 45 ~ 35 (- 0.3 / 秒)
- ・ 35 1分
- ・ 35 ~ 25 (- 0.3 / 秒)
- ・ 25 1分
- ・ 4 保持

20

30

【0884】

T7E1マスターミックスの水、NEB2緩衝液、およびT7E1酵素を調製する。各反応を乗じて、余分を追加する。表8は、T7E1マスターミックスの構成要素を示す。

【0885】

【表19】

表8. T7E1マスターミックスの反応構成要素

	1回の反応
水	7.5 μ L
NEB2緩衝液	2 μ L
T7E1酵素	0.5 μ L
PCR産物	10 μ L
総体積	20 μ L

40

【0886】

200 μ L ストリップキャップ試験管中の、各々の反応に、次の試薬を添加する：T7E1マスターミックス(10 μ L)およびPCR試料(10 μ L)。反応を、37 で25分間インキュベートする。

50

【0887】

ローディングバッファーを試料に加え、すべての試料を3%のゲル上で120V、20分間泳動する。より分離が必要ならば、ゲルをもっと長く泳動してもよい。画像化して、ゲル画像を保存する。

【0888】

標的核酸の切断量を定量するために、画像を定量化する。

【0889】

〔実施例31〕

核酸ターゲティング核酸変種の細胞検定

本実施例は、実施例26で定量した試験管内の機能性が、生体内の機能性と適合するかどうかを確認するために、図22、24および25、ならびに実施例26に示される核酸ターゲティング核酸変種が、細胞に基づく検定でテストされたことを示す。HEK293細胞を、10cmのシャーレで60~70%の集密まで生育させた。細胞をトリプシン処理によって切り離し、血球計数器を用いて計数し、次いでトランスフェクションするために、各ウエルに 7×10^4 細胞のアリコートに分けた。各ウエルについて、哺乳動物のコードンを最適化したCas9を発現しているpCB045プラスミド250ngを、最終体積が50 μ LのDMEM中にガイドRNA 30ngおよびcopGFP DNA 40ngおよびリポフェクタミン2000 0.5 μ Lと混合した。DNAおよび脂質は、トランスフェクションの前に15分間インキュベートした。トランスフェクションはプレティング時に、脂質を加えることによって行った： 7×10^4 細胞を含む450 μ L DMEM + 10%ウシ胎仔血清へDNAを混合。トランスフェクション/細胞混合物を、ラットテールコラーゲンIでコートされた96穴組織培養プレートに添加した。細胞は、37で、5%CO₂を含むインキュベーターで40時間インキュベートした。

【0890】

各ウエルから培地を除去し、製造業者の使用説明書に従ってQuickextract溶液(Epicentre)を用いて細胞を溶解した。Quickextract溶解から集められたDNAを、1:10に希釈し、実施例30に記載したようにT7E1検定のためのPCR反応のテンプレートとして用いた。

【0891】

図36は、v8およびv9以外の全変種が標的核酸を切断することができたことを示す。図23Bに示されるように、核酸ターゲティング核酸変種v8は試験管内の検定においてもかなり不活性であった。核酸ターゲティング核酸変種v9は、図23Bに示される試験管内の検定で、非常にわずかに活性であった。

【0892】

〔実施例32〕

タグ付き細胞を用いた細胞運命の決定

本実施例は、細胞系統から発達している細胞を追う方法を記載する。造血幹細胞(例えば、血球芽細胞)は、部位特異的ポリペプチド、核酸ターゲティング核酸およびドナーポリヌクレオチドと接触する。部位特異的ポリペプチドおよび核酸ターゲティング核酸は、複合体を形成し、切断のために造血ゲノムの領域を標的とする。一度切断されたならば、ドナーポリヌクレオチドは造血細胞のゲノム中の切断部位に挿入される。造血幹細胞は、通常の分化プロセスによって分化するよう誘導される。分化の異なるステージで、分化した造血細胞を含む試料は、ドナーポリヌクレオチドが存在するために分析可能である。このように、細胞の分化過程を追跡することができる。

【0893】

〔実施例33〕

核酸ターゲティング核酸をコードする二本鎖オリゴヌクレオチドを線状化ベクターヘクローニングする

本実施例は、核酸ターゲティング核酸(例えば、スパーサー)の一部をコードする二本鎖オリゴヌクレオチドを生成し、それを線状化ベクターに挿入する方法を記載する。線状

10

20

30

40

50

化ベクターまたは閉鎖スーパーコイルベクターは、部位特異的ポリペプチド（例えば、Cas9）をコードする配列、部位特異的ポリペプチド（例えば、CMVプロモーター）をコードする配列の発現を駆動するプロモーター、リンカー（例えば、2A）をコードする配列、マーカー（例えば、CD4またはOFP）をコードする配列、核酸ターゲティング核酸の一部をコードする配列、核酸ターゲティング核酸の一部をコードする配列の発現を駆動するプロモーターおよび選択可能なマーカー（例えば、アンピシリン）をコードする配列、またはその任意の組合せを含む。

【0894】

等量の2つの一本鎖オリゴヌクレオチドは、一緒にアニールされる（例えば、50マイクロモル）。2つの一本鎖オリゴヌクレオチドは、一緒にハイブリダイズすることができる。2つの一本鎖オリゴヌクレオチドのうち少なくとも1つは、標的核酸（例えば、標的のプロトスペーサー隣接モチーフに隣接した10～30のヌクレオチド領域）と相補的である。2つの一本鎖ヌクレオチドのうち少なくとも1つは、配列5'-GTTT-3'を含む3'突出配列を含む。2つの一本鎖オリゴヌクレオチドのうち少なくとも1つは、配列5'-CGGTG-3'を含む3'突出配列を含む。いくつかの例では、2つの一本鎖オリゴヌクレオチドのうち1つは、5'-GTTT-3'突出を含み、2つの一本鎖オリゴヌクレオチドのもう一方は5'-CGGTG-3'を含む。アニリングは、少なくとも10mM Tris HCl pH 8.0、1mM EDTA、pH 8.0および100mM NaClを含むアニリング緩衝液中で行う。アニリングは、オリゴヌクレオチド混合物を95℃で3～5分間加熱し、オリゴヌクレオチド混合物を熱源から取り除き、混合物を5～10分間室温まで冷却させることによって行う。二本鎖オリゴヌクレオチド混合物は、穏やかに遠心分離する。アニリングの後、混合物を4℃または-20℃で保存してもよい。混合物、今では二本鎖オリゴヌクレオチドを、500ナノモルおよび5ナノモルの2つの原液を調製するために希釈する。原液は、オリゴヌクレオチド混合物を水で希釈することによって調製する。

【0895】

二本鎖オリゴヌクレオチド（dsオリゴヌクレオチド）を、線状化ベクターに結合する。線状化ベクターは、部位特異的ポリペプチドをコードする配列（例えば、Cas9）、マーカータンパク質（例えば、オレンジ蛍光タンパク質）、および/または核酸ターゲティング核酸をコードする配列を含み、生成する付着末端がdsオリゴヌクレオチドの突出端に適合するように、線状化ベクターは核酸ターゲティング核酸をコードする配列の領域で線状化される。ライゲーション反応は、1倍ライゲーション緩衝液（例えば、50mM Tris-HCl pH 7.6、5mM MgCl₂、1mM ATP、1mM DTT、および/または5% PEG 8000）、30ナノグラムの線状化ベクター、5nM dsオリゴヌクレオチド、およびDNAリガーゼ（例えば、4マイクロリットルの5倍ライゲーション緩衝液、15ナノグラム/マイクロリットルの線状化ベクターを2マイクロリットル、5ナノモルのdsオリゴヌクレオチドを2マイクロリットル、11マイクロリットルの水、1マイクロリットルのT4DNAリガーゼ）を含むことができる。反応を混合する。反応は、10分～2時間、室温でインキュベートする。反応を氷上に置き、コンピテント細胞に変換させる。

【0896】

コンピテント細胞への形質転換は、化学的にコンピテントなTOP10大腸菌（E. coli）細胞へのトランスフォーミングを含む。コンピテント細胞を、氷上で解凍する。反応混合物の3マイクロリットルを、コンピテント細胞に添加し、穏やかに混合する。細胞を10～30分間、氷上でインキュベートする。細胞に42℃で30秒間、熱ショックを与える。細胞を2分間、氷へ移す。250マイクロリットルの培地（SOCまたはLB）を、細胞に添加する。細胞を200rpmで1時間、37℃で振盪する。細胞を、次いで100マイクログラム/ミリリットルのアンピシリンを含む寒天平板に広げ、37℃で一晩保存する。

【0897】

10

20

30

40

50

形質転換体を分析する。例えば、形質転換体は、ベクターに結合された ds オリゴヌクレオチドの同一性を判定し、および/またはライゲーションが偽陽性でないことを確認するために分析される。形質転換体を分析するために、コロニーをつまみ、37 で 100 マイクログラム/ミリリットルのアンピシリンを含む LB 培地で一晚培養する。部位特異的ポリペプチドおよび ds オリゴヌクレオチドを含むプラスミドを単離する（例えば、ミニプレップキットによって）。配列決定反応は、単離したプラスミドで実行する。配列決定反応は、ds オリゴヌクレオチドを配列決定するように設計されている配列決定プライマーを利用する（例えば、配列決定プライマーは、ds オリゴヌクレオチドをコードする配列のすぐ上流にある U6 プロモーターと結合する U6 配列決定プライマーである）。

【0898】

一度所望の ds オリゴヌクレオチドの挿入が確認されたならば、プラスミドを -20、または、-80 のグリセリンストックで保存することができる。グリセリンストックを作製するために、所望のプラスミドを含む元のコロニーを、100 マイクログラム/ミリリットルのアンピシリンを含む寒天平板上にストリークし、37 で一晚インキュベートする。シングルコロニーを単離し、100 マイクログラム/ミリリットルのアンピシリンを含む LB で、培養が定常期になるまで生育させる。培養物をグリセリンと混合し、液体窒素で急速冷凍する（例えば、0.85 mL の培養物を、0.15 mL のグリセリンと混合する）。

【0899】

所望の ds オリゴヌクレオチドを含む精製されたプラスミドを、トランスフェクションによって細胞系統（例えば、哺乳動物の細胞系統、HeLa）に挿入する。プラスミドをトランスフェクションさせるために、プラスミドを、例えば、マキシプレップキットを用いて高濃度に精製する。プラスミドを、脂質ベースの緩衝液（例えば、リポフェクタミン 2000）で 70% の集密度で塗布した細胞にトランスフェクションする。3 マイクログラムのベクターを細胞にトランスフェクションする。

【0900】

〔実施例 34〕

操作された核酸ターゲティング核酸のナノ粒子送達

操作された核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドをコードする核酸をカプセルに入れたナノ粒子を調製する。ナノ粒子を、90% エタノール 10 mL 中に、DOPE : Chol : DSPE-PEG : C₁₆mPEG-セラミドを 18 : 60 : 20 : 1 : 1 のモル比で混合することによって調製する（総脂質 30 μmol）。核酸を、20 mM トリス緩衝液（pH 7.4 ~ 7.6）10 mL に溶解する。37 まで加熱後、2 つの溶液を複式シリンジポンプを通して混合し、その後、混合溶液を 20 mM トリス緩衝液（300 mM NaCl、pH 7.4 ~ 7.6）20 mL で希釈する。混合物を 37 で 30 分間インキュベートし、10 mM PBS 緩衝液（138 mM NaCl、2.7 mM KCl、pH 7.4）で透析する。透析によって混合物からエタノールを除去した後、安定粒子が得られる。ナノ粒子液剤を、3,000 rpm、4 の温度で遠心分離することによって濃縮する。濃縮懸濁液を所与の時間以後に回収し、0.22 μm シリンジフィルター（Millex-GV、Millipore、USA）でろ過することによって滅菌する。操作された核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドをコードする核酸を含むナノ粒子の均一な懸濁液が得られる。

【0901】

ナノ粒子を細胞に接触させる。ナノ粒子が細胞に入る。細胞内で、ナノ粒子は操作された核酸ターゲティング核酸および部位特異的ポリペプチドをコードする核酸を解放する。核酸は転写および/または翻訳されて部位特異的ポリペプチドタンパク質と結合する操作された核酸ターゲティング核酸を生産し、それによって複合体が形成される。複合体は、操作された核酸ターゲティング核酸とハイブリダイズする標的核酸を標的とする。複合体は標的核酸を切断する。

【0902】

10

20

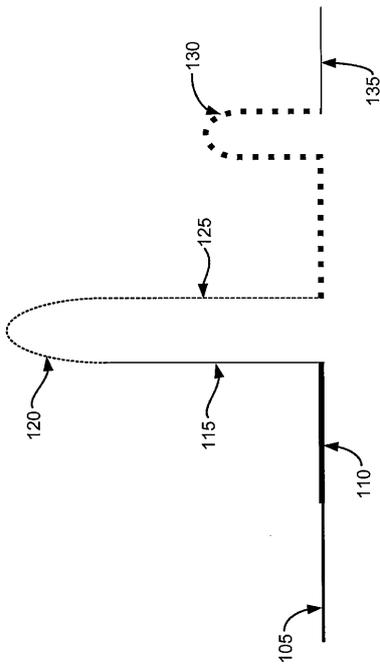
30

40

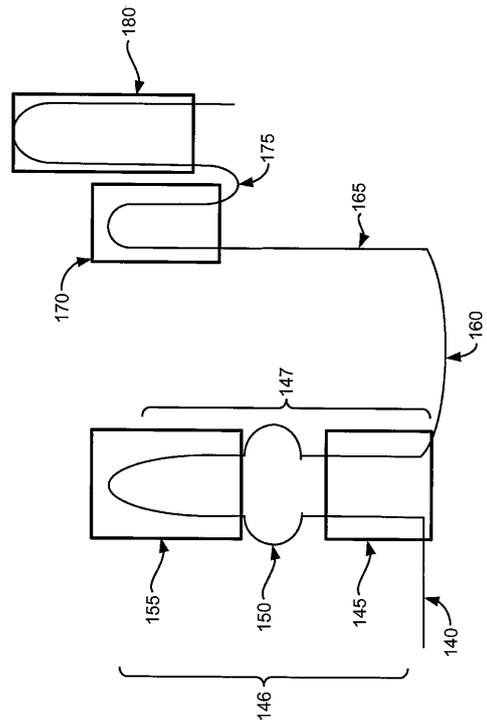
50

いくつかの例では、ナノ粒子はドナーポリヌクレオチドをコードする核酸をさらに含む。標的核酸が部位特異的ポリペプチドによって切断される時、ドナーポリヌクレオチドは切断された標的核酸の部位に挿入される。

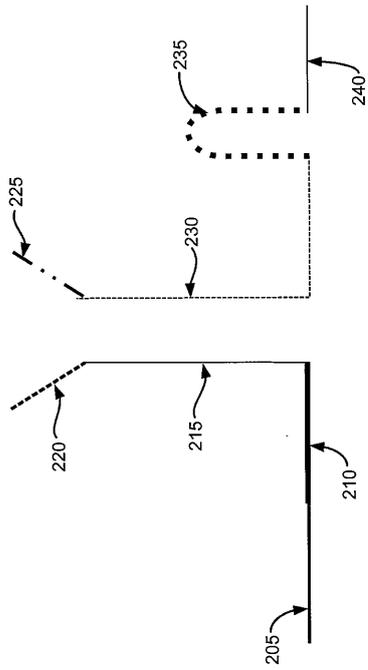
【図 1 A】



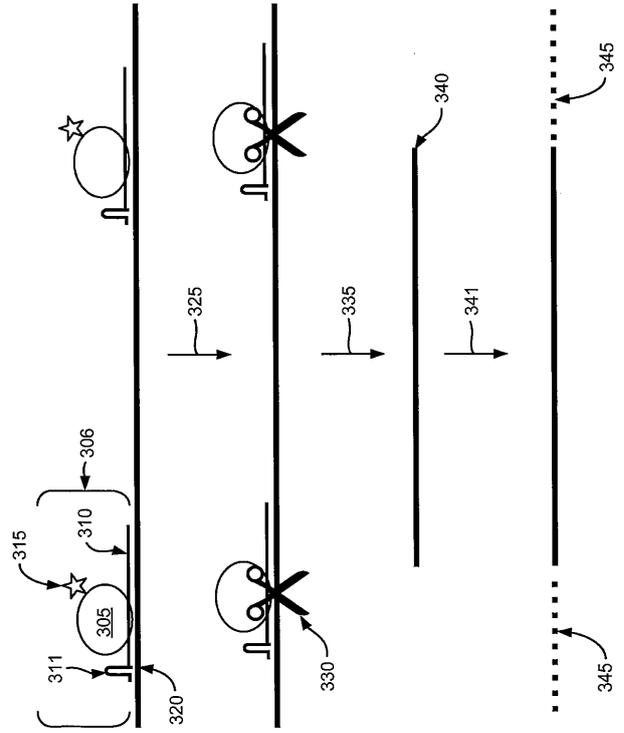
【図 1 B】



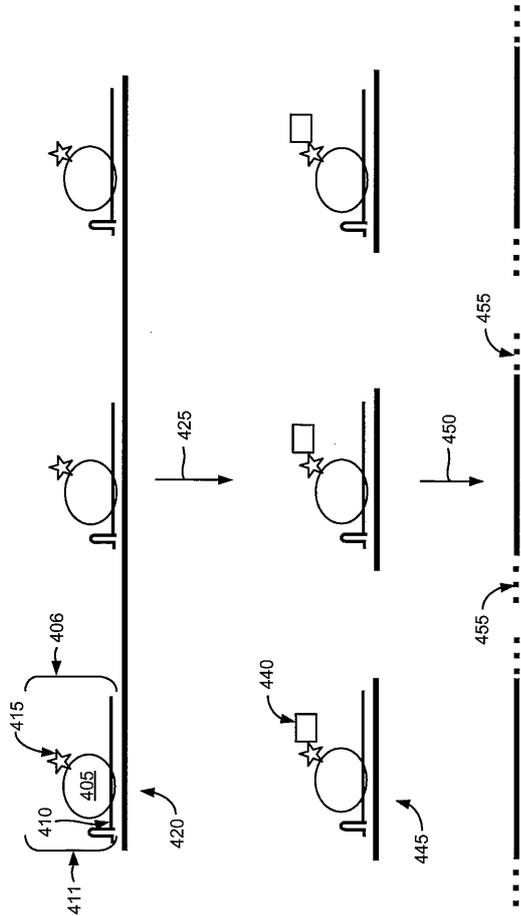
【 図 2 】



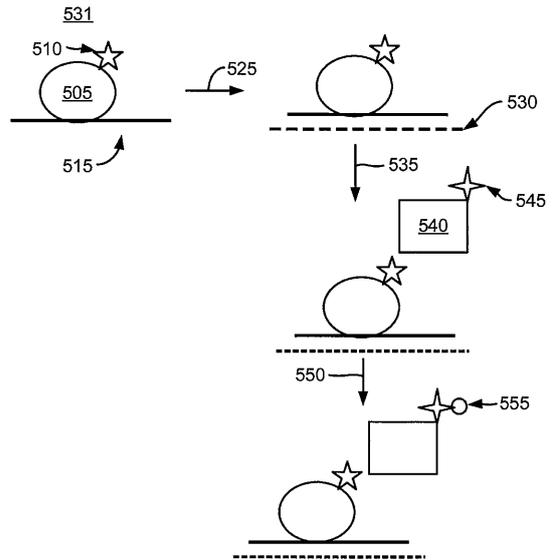
【 図 3 】



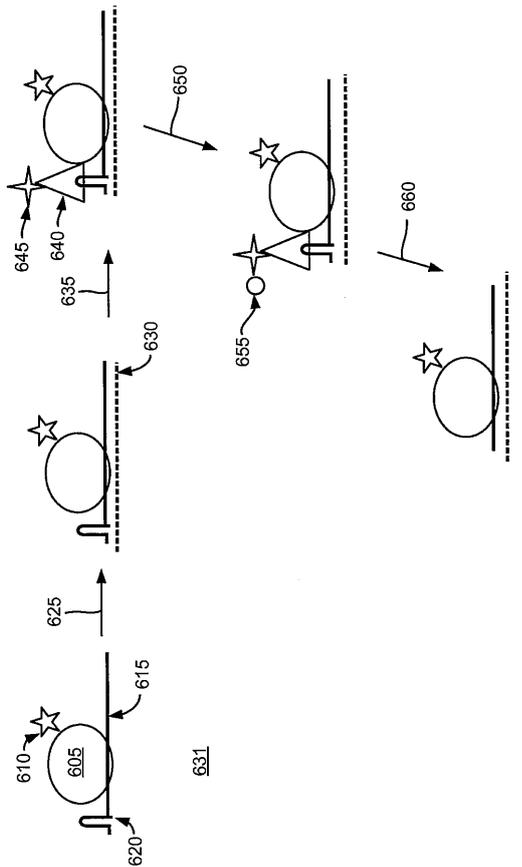
【 図 4 】



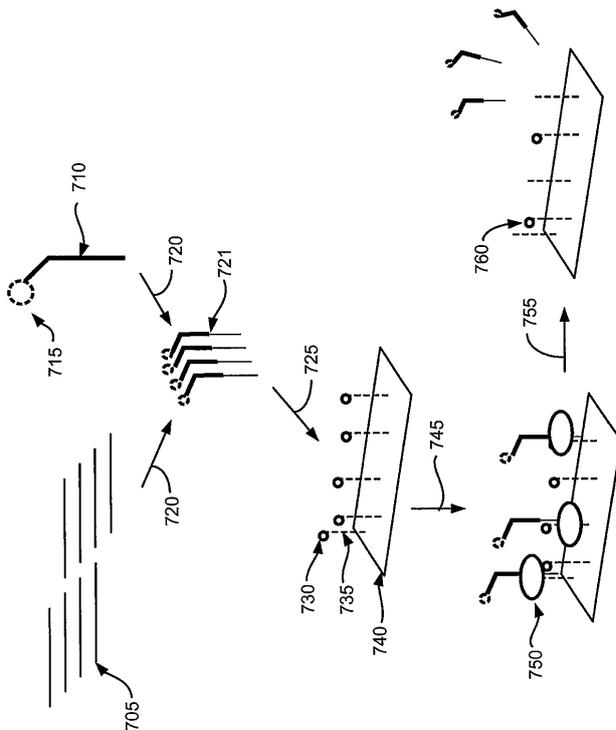
【 図 5 】



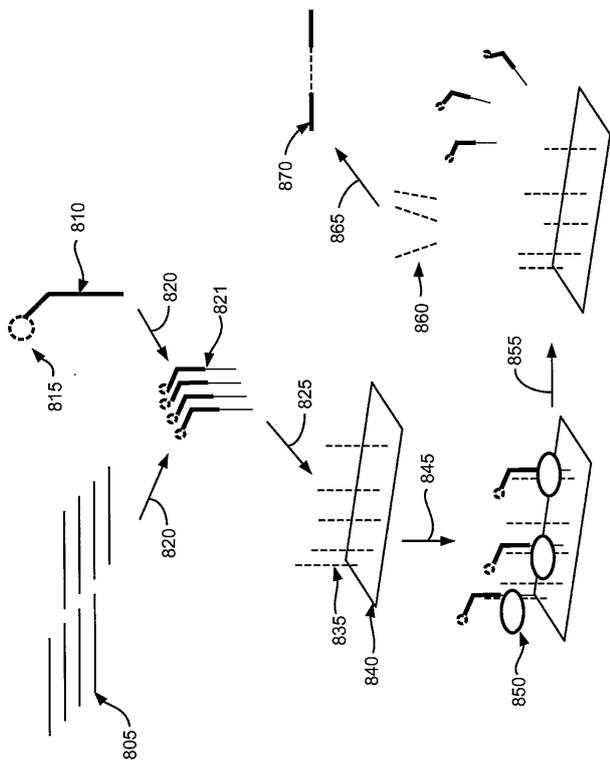
【 図 6 】



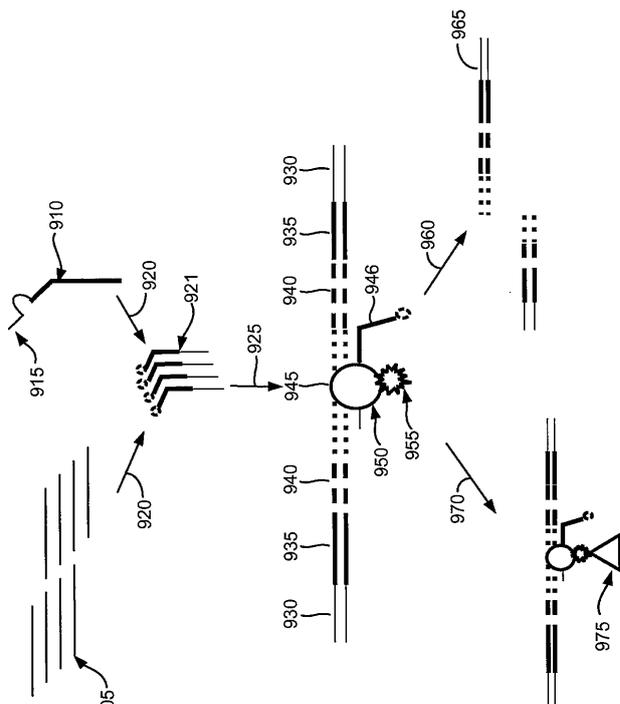
【 図 7 】



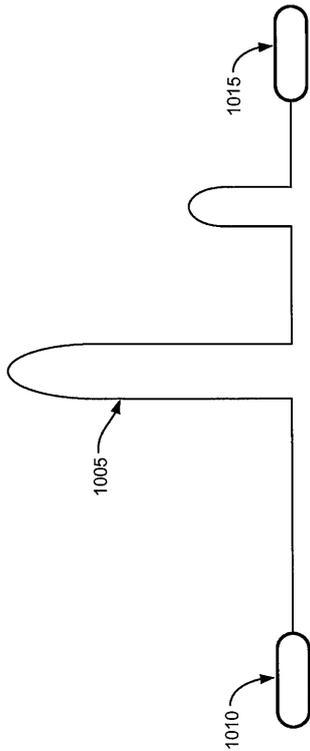
【 図 8 】



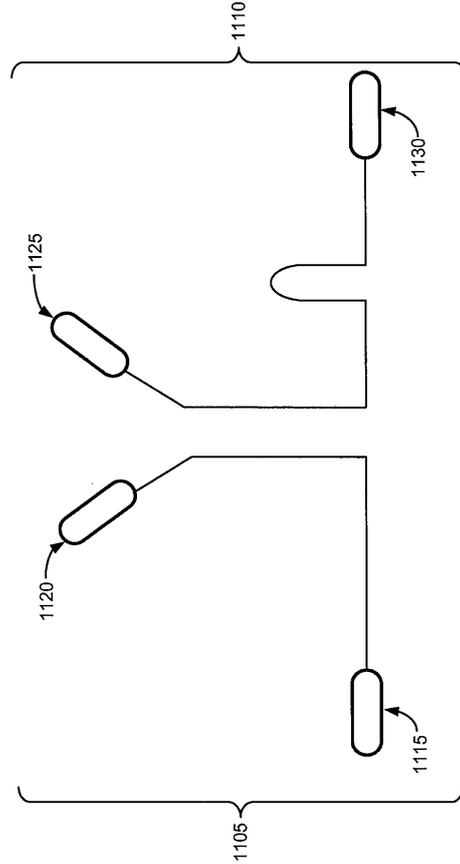
【 図 9 】



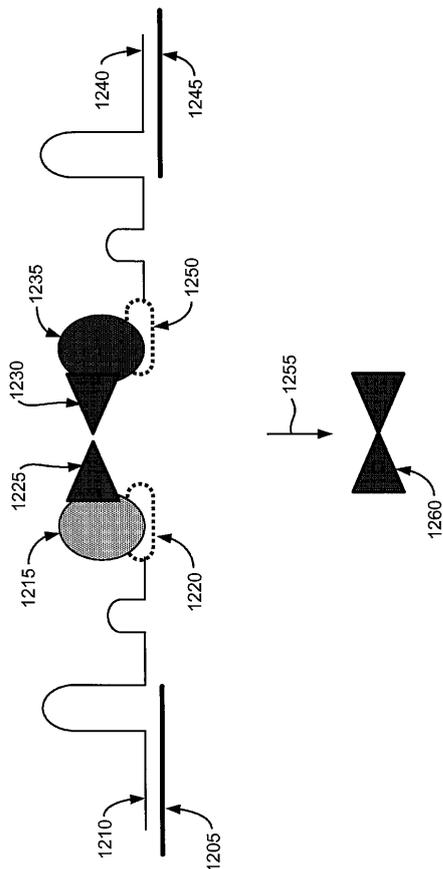
【図 10】



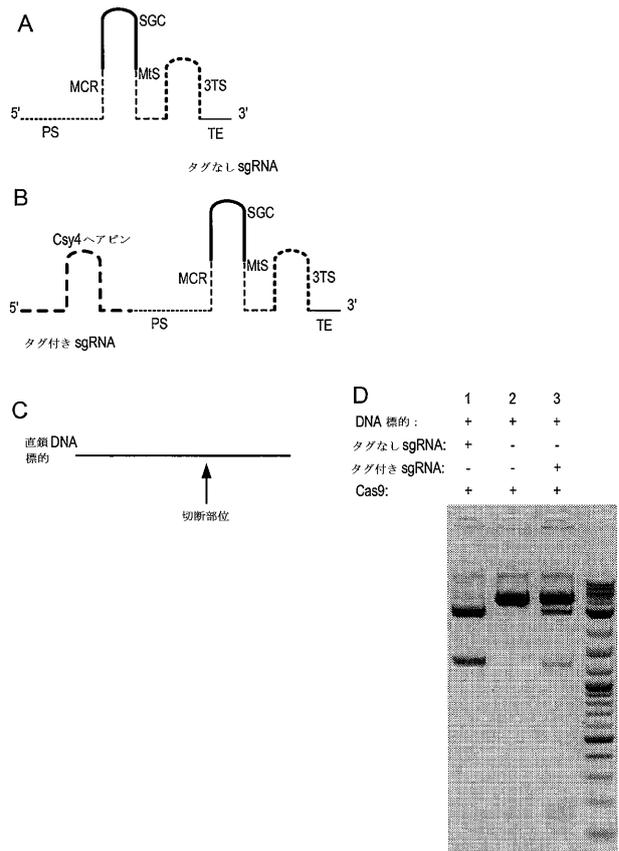
【図 11】



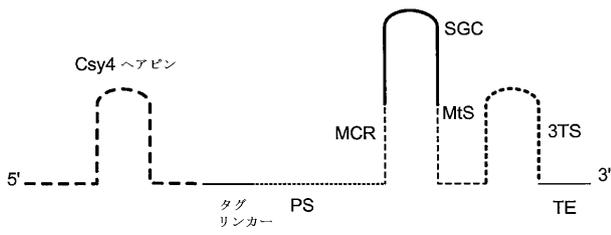
【図 12】



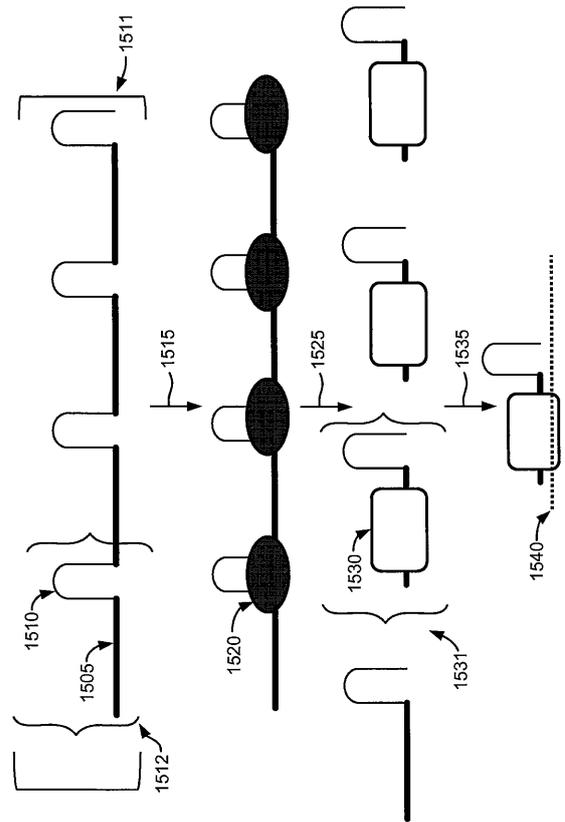
【図 13】



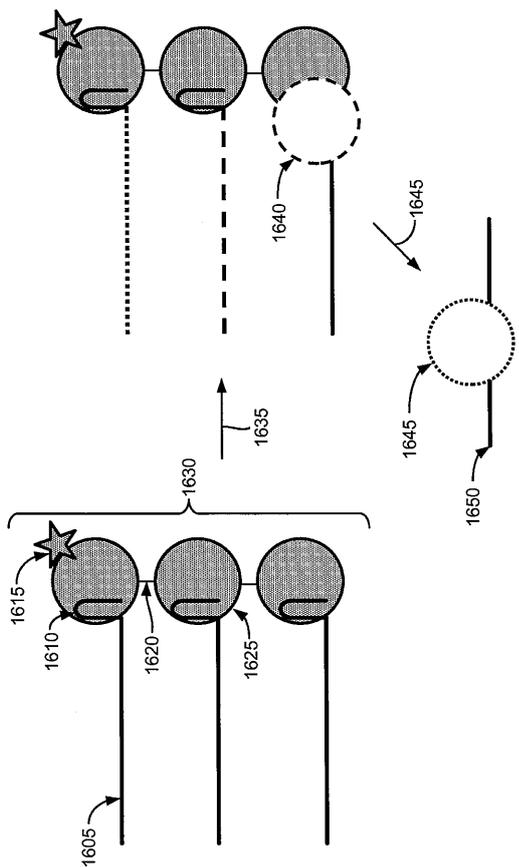
【 図 1 4 】



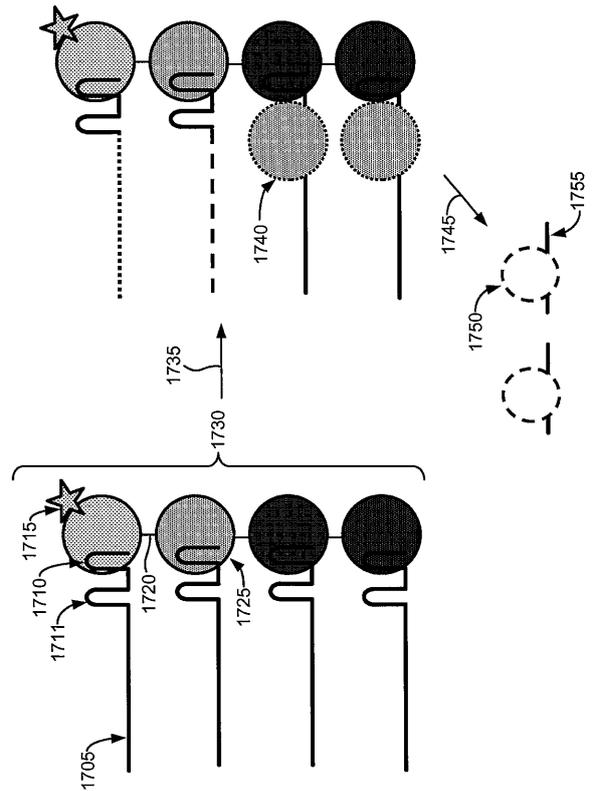
【 図 1 5 】



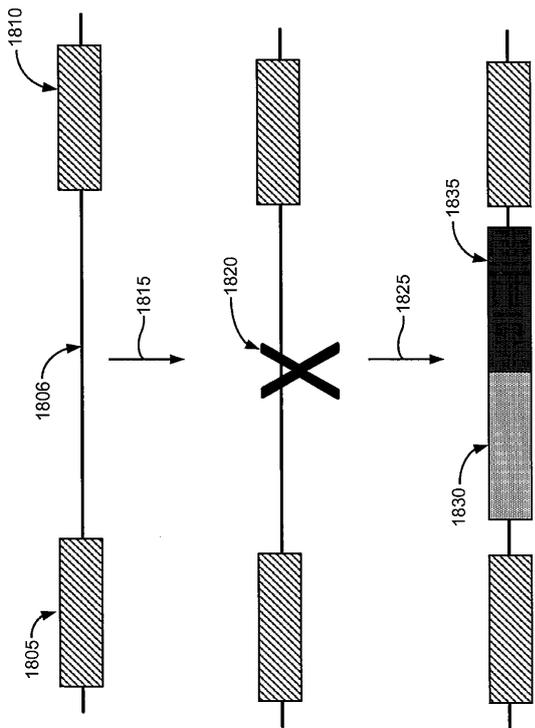
【 図 1 6 】



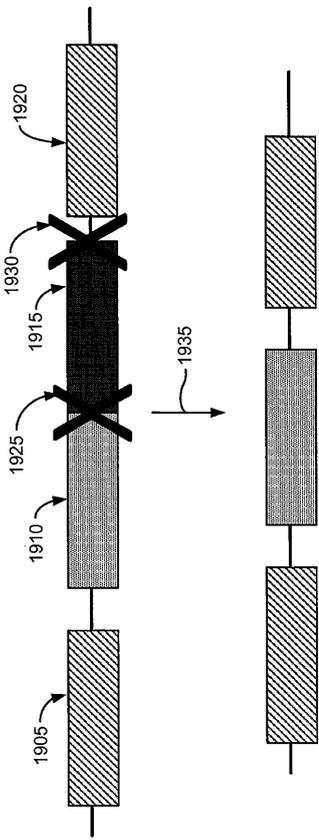
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 図 2 0 】

5'-GUUUUAG-AGCUAUGCUGUUUUGAAUGGCCAAAAC-3' - crRNA 反複配列
 |||||
 3'-UAAAAUUUGAACGUAUCGACAAAACUUUACCAAGGUUUU-5' - tracrRNA 配列

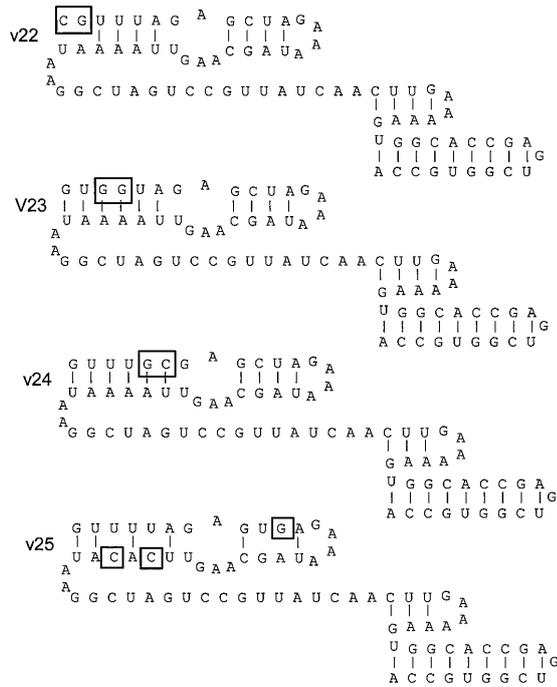
【 図 2 1 】

```

G U U U A G A G C U A G A
| | | | | | | | | | | |
U A A A U U G A C G A U A
A
A G G C U A G U C C G

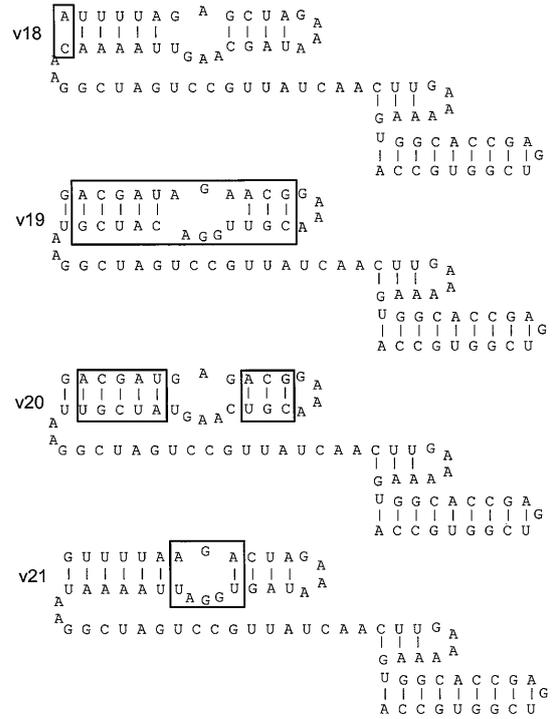
```


【 図 2 4 - 2 】

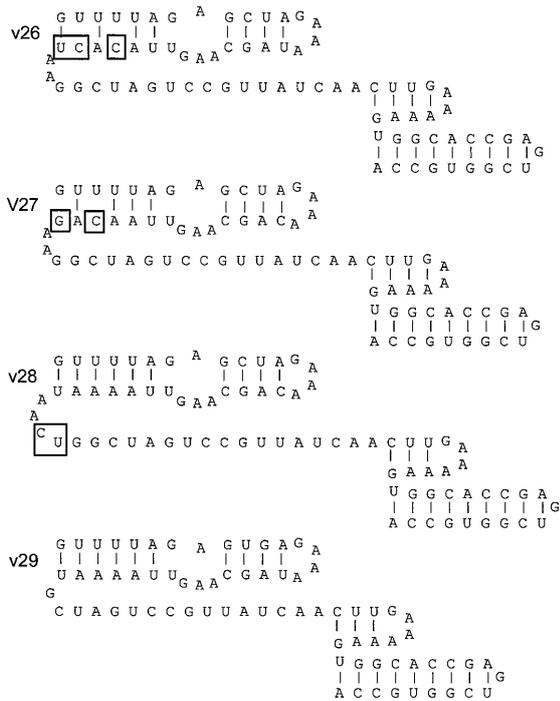


(続き)

【 図 2 5 】



【 図 2 5 B 】

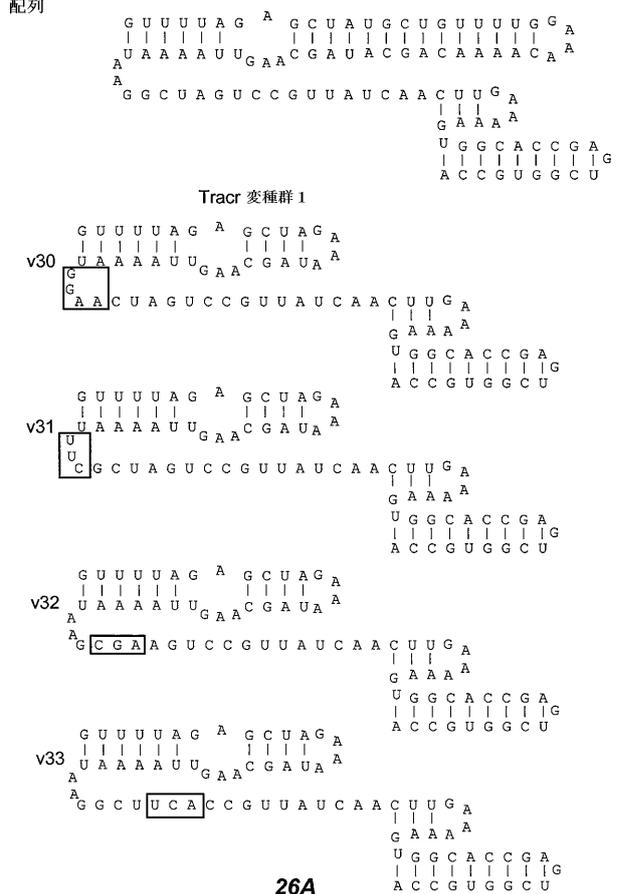


(続き)

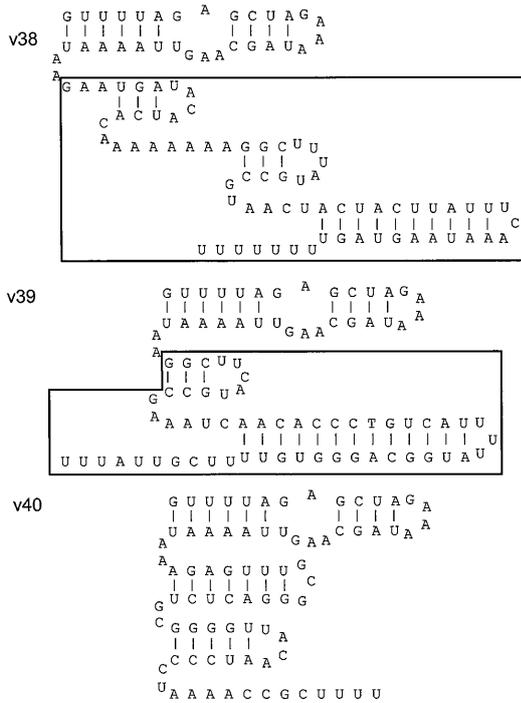
【 図 2 6 A - 1 】

FL-TRACR-CRRNA

配列

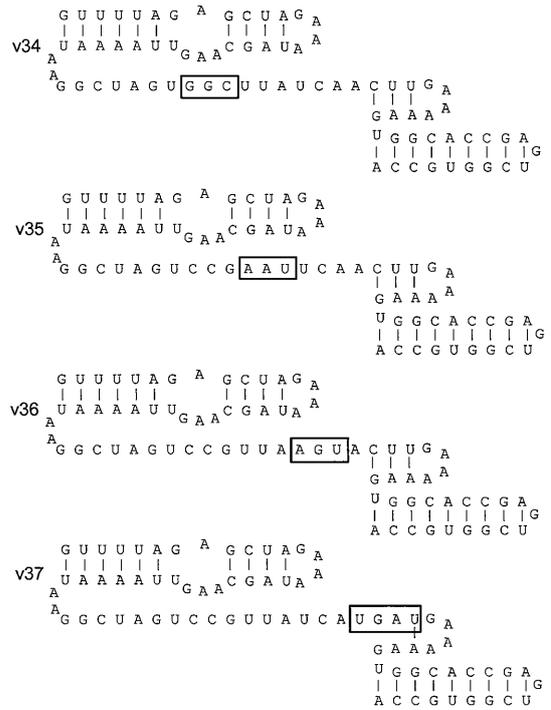


【 図 2 6 A - 2 】



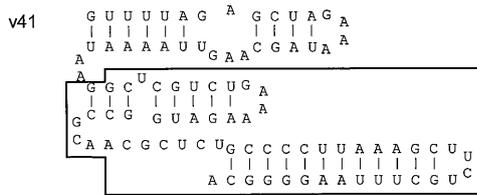
26A (続き)

【 図 2 6 B - 1 】



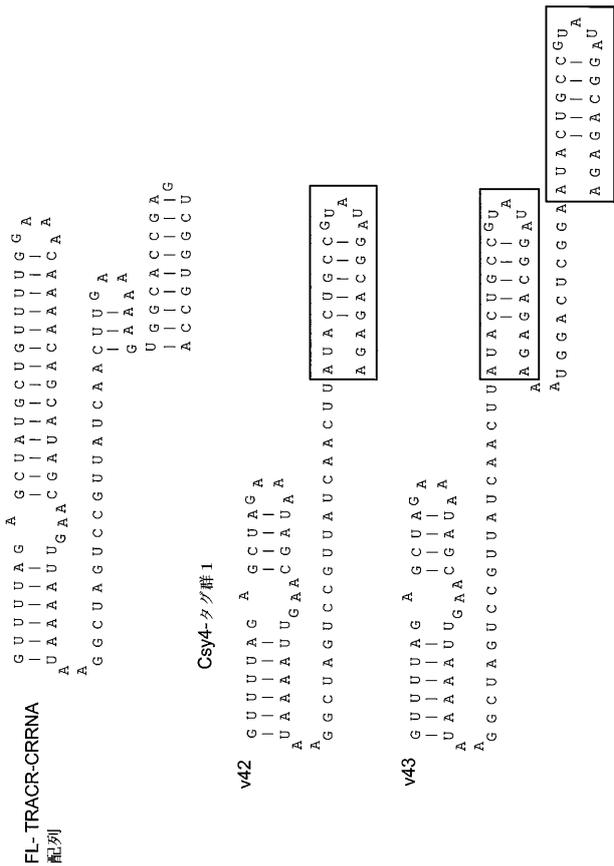
26B

【 図 2 6 B - 2 】

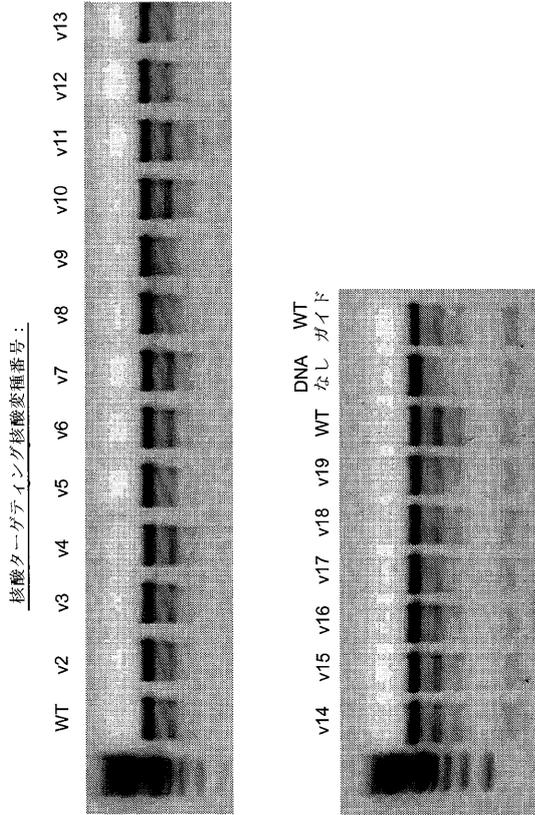


26B (続き)

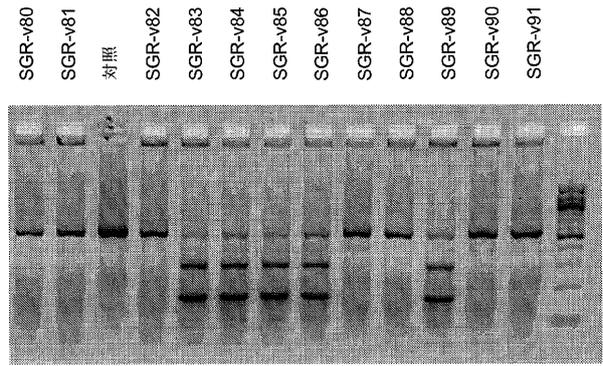
【 図 2 7 A 】



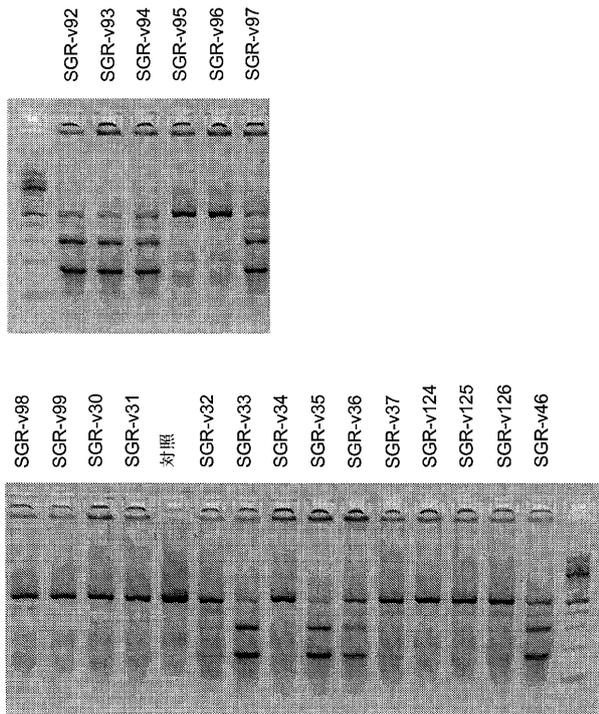
【 図 3 6 】



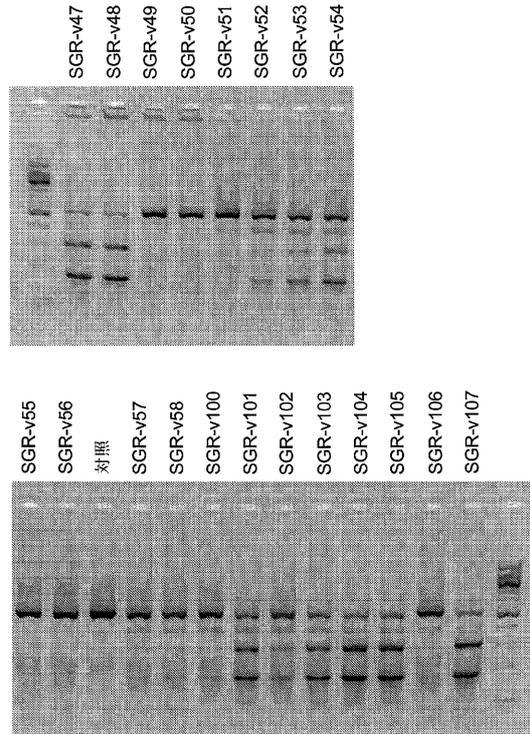
【 図 3 7 A 】



【 図 3 7 B 】

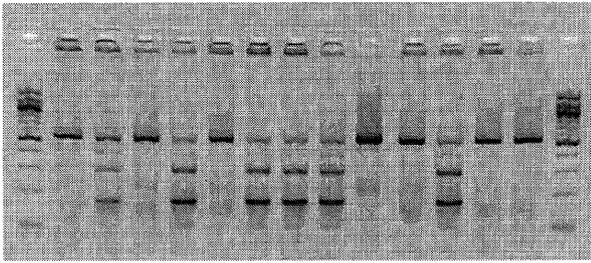


【 図 3 7 C 】



【 図 3 7 D 】

SGR-v108
 SGR-v109
 SGR-v110
 SGR-v111
 SGR-v112
 SGR-v113
 SGR-v114
 SGR-v115
 対照
 SGR-v120
 SGR-v121
 SGR-v122
 SGR-v123



【 図 3 9 】

His29Ala
 1 mdhYldirL pQefppaql msvlfqkIaq alvaaggdri gvsfpdldec rslrgerlri
 61 hasaddlral larpwlegr dhlqfgepav vphtpyrvg svvqksnpe klrrrlmrth
 121 dlseearkr ipdtvarald lprvtlrsqs tgqhriflir hqplqataee ggftcyglsk
 181 ggvfpwf

His29Ala/Ser50Cys
 1 mdhYldirL pQefppaql msvlfqkIaq alvaaggdri gvsfpdldec rslrgerlri
 61 hasaddlral larpwlegr dhlqfgepav vphtpyrvg svvqksnpe klrrrlmrth
 121 dlseearkr ipdtvarald lprvtlrsqs tgqhriflir hqplqataee ggftcyglsk
 181 ggvfpwf

【 図 3 8 】

Csy4 配列
 >gi|1107101871| 参照 | ZP 01365789.1 | 菌株カンバク菌 PaerPA 01002916 [緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) PACS2]
 MDHYLDIRLPDPPEPPAQLMSVLFQKHLQALVAAGGDRIGVSPDLDESRRLGERLRHASADDLRALLRPWLGLRDLRDLQFGEPAVVPHTPYRQVS
 RVQVKSNEPRLRRLMRHRELSSEARKRIPDVARALDLPVTLRSQSTGQHRIFLIRHGLQAVTAEGGFTCYGLSKGGVFWF

>gi|125423433| 参照 | ZP 04928756.1 | 菌株カンバク菌 PACG 01340 [緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) C3719]
 MDHYLDIRLPDPPEPPAQLMSVLFQKHLQALVAAGGDRIGVSPDLDESRRLGERLRHASADDLRAL
 LARPWLGLRDLRDLQFGEPAVVPHTPYRQVSRVQVKSNEPRLRRLMRHRELSSEARKRIPDVARALD
 LFFVTLRSQSTGQHRIFLIRHGLQAVTAEGGFTCYGLSKGGVFWF

>gi|1254240857| 参照 | ZP 04934179.1 | 菌株カンバク菌 PA2G 01531 [緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) 2192]
 MDHYLDIRLPDPPEPPAQLMSVLFQKHLQALVAAGGDRIGVSPDLDESRRLGERLRHASADDLRAL
 LARPWLGLRDLRDLQFGEPAVVPHTPYRQVSRVQVKSNEPRLRRLMRHRELSSEARKRIPDVARALD
 LFFVTLRSQSTGQHRIFLIRHGLQAVTAEGGFTCYGLSKGGVFWF

【 図 4 0 】

Csy4 配列
 <213> 緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa)
 Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Leu Arg Pro Asp Pro Glu Phe Pro
 Pro Ala Gln Leu Met Ser Val Leu Phe Gly Lys Leu His Gln Ala Leu
 Val Ala Gln Gly Gly Asp Arg Ile Gly val Ser Phe Pro Asp Leu Asp
 Glu Ser Arg Ser Arg Leu Gly Glu Arg Leu Arg Ile His Ala Ser Ala
 Asp Asp Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Pro Trp Leu Glu Gly Leu Arg
 Asp His Leu Gln Phe Gly Glu Pro Ala Val Val Pro His Pro Thr Pro
 Tyr Arg Gln Val Ser Arg Val Gln Val Lys Ser Asn Pro Glu Arg Leu
 Arg Arg Arg Leu Met Arg Arg His Asp Leu Ser Glu Glu Ala Arg
 Lys Arg Ile Pro Asp Thr val Ala Arg Ala Leu Asp Leu Pro Phe Val
 Thr Leu Arg Ser Gln Ser Thr Gly Gln His Phe Arg Leu Phe Ile Arg
 His Gly Pro Leu Gln val Thr Ala Glu Glu Gly Gly Phe Thr Cys Tyr
 Gly Leu Ser Lys Gly Gly Phe Val Pro Trp Phe

<213> 緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa)
 Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Leu Arg Pro Asp Pro Glu Phe Pro
 Pro Ala Gln Leu Met Ser Val Leu Phe Gly Lys Leu His Gln Ala Leu
 Val Ala Gln Gly Gly Asp Arg Ile Gly val Ser Phe Pro Asp Leu Asp
 Glu Ser Arg Ser Arg Leu Gly Glu Arg Leu Arg Ile His Ala Ser Ala
 Asp Asp Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Pro Trp Leu Glu Gly Leu Arg
 Asp His Leu Gln Phe Gly Glu Pro Ala Val Val Pro His Pro Thr Pro
 Tyr Arg Gln Val Ser Arg Val Gln Ala Lys Ser Asn Pro Glu Arg Leu
 Arg Arg Arg Leu Met Arg Arg His Asp Leu Ser Glu Glu Ala Arg
 Lys Arg Ile Pro Asp Thr Val Ala Arg Ala Leu Asp Leu Pro Phe Val
 Thr Leu Arg Ser Gln Ser Thr Gly Gln His Phe Arg Leu Phe Ile Arg
 His Gly Pro Leu Gln Ala Thr Ala Glu Glu Gly Gly Phe Thr Cys Tyr
 Gly Leu Ser Lys Gly Gly Phe val Pro Trp Phe

<213> 緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa)
 Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Leu Arg Pro Asp Pro Glu Phe Pro
 Pro Ala Gln Leu Met Ser Val Leu Phe Gly Lys Leu His Gln Ala Leu
 Val Ala Gln Gly Gly Asp Arg Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Leu Asp
 Glu Ser Arg Ser Arg Leu Gly Glu Arg Leu Arg Ile His Ala Ser Ala
 Asp Asp Leu His Ala Leu Leu Ala Arg Pro Trp Leu Glu Gly Leu Arg
 Asp His Leu Gln Phe Gly Glu Ala Ala Val Val Pro His Pro Thr Pro
 Tyr Arg Gln Val Ser Arg Val Gln Ala Lys Ser Asn Pro Glu Arg Leu
 Arg Arg Arg Leu Met Arg Arg His Asp Leu Ser Glu Glu Ala Arg
 Lys Arg Ile Pro Asp Thr Val Ala Arg Ala Leu Asp Leu Pro Phe Val
 Thr Leu Arg Ser Gln Ser Thr Gly Gln His Phe Arg Leu Phe Ile Arg
 His Gly Pro Leu Gln Ala Thr Ala Glu Glu Gly Gly Phe Thr Cys Tyr
 Gly Leu Ser Lys Gly Gly Phe val Pro Trp Phe

【 図 4 1 A 】

Cas6 配列

サーモナス・サーモフィルス(Thermus thermophilus) HB8

Met Val Leu Ala Ala Leu Val Leu Val Leu Glu Gly Leu Pro
Glu Pro Leu Gly Leu Arg Gly Phe Phe Tyr Gly Leu Leu Arg Glu Val
Ala Pro Glu Val His Asp Gln Gly Glu Asn Pro Phe Ala Leu Gly Phe
Gly Gly Arg Glu Gly Ala Ala Trp Ala Arg Val Ser Leu Leu Val Glu
Gly Leu Tyr Ala Arg Leu Ala Pro Arg Leu Tyr Ala Leu Glu Gly Glu
Glu Val Arg Leu Gly Pro Pro Phe Arg Val Arg Ala Val Leu Gln Glu
Gly His Pro Trp Ala Gly Val Ser Thr Tyr Pro Arg Leu Phe Gln Gly
Pro Pro Ser Arg Asp Leu Ala Leu Arg Phe Ala Ser Pro Thr Phe Phe
Arg Arg Lys Gly Val His Tyr Pro Val Pro Glu Pro Arg Leu Val Leu
Glu Ser Leu Leu Arg Arg Leu Glu Ala Phe Gly Pro Leu Lys Ala Pro
Glu Gly Val Arg Glu Ala Leu Leu Glu Arg Thr Thr Val Arg Ser Leu
Glu Gly Arg Thr Leu Pro Ala Arg Thr Glu Val Asp Thr Ala Gly Phe
Val Gly Arg Val Val Tyr His Leu Pro Arg Ala Thr Glu Glu Ala
Leu Trp Leu Ser Ala Leu Gly Arg Phe Ala Phe Tyr Ser Gly Val Gly
Ala Lys Thr Ser Leu Gly Tyr Gly Arg Ala Arg Ala Glu Ser Ala

サーモナス・サーモフィルス(Thermus thermophilus) HB8

Met Pro Gln Ala Val Val Leu Glu Leu Val Gly Glu Lys Pro Pro Leu
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala His Gly Leu Phe Phe Ala Leu Leu Ser Arg
Val Ser Pro Glu Leu Ala Gln Lys Leu His Glu Ala Pro Arg Lys Pro
Phe Thr Leu Ala Pro Leu Pro Arg Ala Gly Pro Glu Gly Ala Thr Leu
Lys Gly Thr Leu Arg Leu Arg Leu Thr Thr Leu Asp Asp Gly Leu Phe
Ala Pro Phe Leu Arg Ala Leu Leu Glu Ala Ala Pro Asp Gly Leu Pro
Leu Gly Asp Ser Ser Tyr Arg Leu Ala Arg Val Leu Ala Thr Arg Glu
Gly His Pro Leu Ala Gly Ala Thr Ser Trp Glu Glu Leu Lys Glu Ala
Pro Lys Arg Glu Lys Ala Thr Phe Arg Phe Thr Pro Thr Val Phe
Ala Thr Ser Lys Pro Gly Gly Arg Thr Arg Tyr Thr Pro Leu Pro Asp
Pro Arg Leu Ile Ala Gly Ser Leu Leu Asp Lys Trp Gln Ala His Ser
Pro Phe Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Phe
Glu Leu Asp Leu Glu Val Ala Gly Phe Arg Asn Leu Arg Phe His Arg
Val Gln Ala Gly Lys Phe Phe Pro Gly Phe Thr Gly Glu Ala Thr
Leu Arg Leu Trp Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln Glu Ala Leu Gly Arg
Leu His Ala Leu Ala Phe Phe Ser Gly Val Gly Ala Lys Thr Pro Tyr
Gly Met Gly Leu Ala Val Pro Leu

【 図 4 1 C 】

Cas6 配列

ストレプトコッカス・サーモフィルス(Streptococcus thermophilus) LMG 18311

Met Lys Lys Leu Val Phe Thr Phe Lys Arg Ile Asp His Pro Ala Gln
Asp Leu Ala Val Lys Phe His Gly Phe Leu Met Glu Gln Leu Asp Ser
Asp Tyr Val Asp Tyr Leu His Gln Gln Gln Thr Asn Pro Tyr Ala Thr
Lys Val Ile Gln Gly Lys Glu Asn Thr Gln Trp Val Val His Leu Leu
Thr Asp Asp Ile Glu Asp Lys Val Phe Met Thr Leu Leu Gln Ile Lys
Glu Val Ser Leu Asn Asp Leu Pro Lys Leu Ser Val Glu Lys Val Glu
Ile Gln Glu Leu Gly Ala Asp Lys Leu Leu Glu Ile Phe Asn Ser Glu
Glu Asn Gln Thr Tyr Phe Ser Ile Ile Phe Glu Thr Pro Thr Gly Phe
Lys Ser Gln Gly Ser Tyr Val Ile Phe Pro Ser Met Arg Leu Ile Phe
Gln Ser Leu Met Gln Lys Tyr Gly Arg Leu Val Glu Asn Gln Pro Glu
Ile Glu Glu Asp Thr Leu Asp Tyr Leu Ser Glu His Ser Thr Ile Thr
Asn Tyr Arg Leu Glu Thr Ser Tyr Phe Arg Val His Arg Gln Arg Ile
Pro Ala Phe Arg Gly Lys Leu Thr Phe Lys Val Gln Gly Ala Gln Thr
Leu Lys Ala Tyr Val Lys Met Leu Leu Thr Phe Gly Glu Tyr Ser Gly
Leu Gly Met Lys Thr Ser Leu Gly Met Gly Gly Ile Lys Leu Glu Glu
Arg Lys Asp

ストレプトコッカス・サンギス(Streptococcus sanguinis) SK36

Met Lys Lys Ile Arg Leu His Leu Ser Lys Val Ser Leu Lys Asp Asp
Asp Leu Val Cys Lys Leu Gln Gly Phe Leu Met Glu Lys Leu Ser Asp
Asp Phe Ala Ser Phe Leu His Gln Gln Glu Thr Asn Pro Tyr Ser Met
Asn Leu Arg Ser Glu Arg Glu Glu Ser Ile Trp Thr Val Asn Leu Leu
Ser Glu Glu Ala Glu Gln Gln Ile Leu Pro Gln Leu Leu Ser Leu Glu
Met Ile Lys Leu Glu Thr Tyr Ser Glu Glu Ile Leu Val Lys Asn Ile
Glu Ile Gln Ser Leu Ser Gln Ser Leu Leu Phe Glu Val Phe Gln Gly
Asp Glu Ala Ser His Ser Ile Ser Leu Asn Phe Tyr Thr Pro Thr Thr
Phe Lys Arg Gln Gly Gln Phe Val Leu Phe Pro Asp Thr Arg Leu Ile
Phe Gln Ser Leu Met Gln Lys Tyr Ser Arg Leu Val Glu Gly Lys Ala
Glu Ile Glu Glu Thr Thr Leu Glu Phe Leu Ala Glu His Ser Gln Ile
Ser Ser Tyr Arg Leu Lys Ser His Tyr Phe Pro Ile His Gly Arg Lys
Tyr Pro Ala Phe Glu Gly Arg Val Thr Ile Arg Ile Gln Gly Ala Ser
Thr Leu Lys Ala Tyr Ala Gln Met Leu Leu Arg Phe Gly Glu Tyr Ser
Gly Val Gly Ala Lys Cys Ser Leu Gly Met Gly Gly Met Arg Ile Glu
Glu Arg Lys Thr

【 図 4 1 B 】

Cas6 配列

表皮ブドウ球菌(Staphylococcus epidermidis) RP62A

Met Ile Asn Lys Ile Thr Val Glu Leu Asp Leu Pro Glu Ser Ile Arg
Phe Gln Tyr Leu Gly Ser Val Leu His Gly Val Leu Met Asp Tyr Leu
Ser Asp Asp Ile Ala Asp Gln Leu His His Glu Phe Ala Tyr Ser Pro
Leu Lys Gln Arg Ile Tyr His Lys Asn Lys Lys Ile Ile Trp Glu Ile
Val Cys Met Ser Asp Asn Leu Phe Lys Glu Val Val Lys Leu Phe Ser
Ser Lys Asn Ser Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Gln Thr Asn Ile Asp Ile
Gln Ser Phe Gln Ile Glu Lys Ile Asn Val Gln Asn Met Met Asn Gln
Leu Leu Gln Val Glu Asp Leu Ser Arg Tyr Val Arg Leu Asn Ile Gln
Thr Pro Met Ser Phe Lys Tyr Gln Asn Ser Tyr Met Ile Phe Pro Asp
Val Lys Arg Phe Phe Arg Ser Ile Met Ile Gln Phe Asp Ala Phe Phe
Glu Glu Tyr Arg Met Tyr Asp Lys Glu Thr Leu Asn Phe Leu Glu Lys
Asn Val Asn Ile Val Asp Tyr Lys Leu Lys Ser Thr Arg Phe Asn Leu
Glu Lys Val Lys Ile Pro Ser Phe Thr Gly Glu Ile Val Phe Lys Ile
Lys Gly Pro Leu Pro Phe Leu Gln Leu Thr His Phe Leu Leu Lys Phe
Gly Glu Phe Ser Gly Ser Gly Ile Lys Thr Ser Leu Gly Met Gly Lys
Tyr Ser Ile Ile

結核菌(Mycobacterium tuberculosis) H37Rv

Met Ala Ala Arg Arg Gly Gly Ile Arg Arg Thr Asp Leu Leu Arg Arg
Ser Gly Gln Pro Arg Gly Arg His Arg Ala Ser Ala Ala Glu Ser Gly
Leu Thr Trp Ile Ser Pro Thr Leu Ile Leu Val Gly Phe Ser His Arg
Gly Asp Arg Arg Met Thr Glu His Leu Ser Arg Leu Thr Leu Thr Leu
Glu Val Asp Ala Pro Leu Glu Arg Ala Arg Val Ala Thr Leu Gly Pro
His Leu His Gly Val Leu Met Glu Ser Ile Pro Ala Asp Tyr Val Gln
Thr Leu His Thr Val Pro Val Asn Pro Tyr Ser Gln Tyr Ala Leu Ala
Arg Ser Thr Thr Ser Leu Glu Trp Lys Ile Ser Thr Leu Thr Asn Glu
Ala Arg Gln Gln Ile Val Gly Pro Ile Asn Asp Ala Ala Phe Ala Gly
Phe Arg Leu Arg Ala Ser Gly Ile Ala Thr Gln Val Thr Ser Arg Ser
Leu Glu Gln Asn Pro Leu Ser Gln Phe Ala Arg Ile Phe Tyr Ala Arg
Pro Glu Thr Arg Lys Phe Arg Val Gly Phe Thr Pro Thr Ala Phe
Lys Gln Ser Gly Glu Tyr Val Phe Trp Pro Asp Pro Arg Leu Val Phe
Gln Ser Leu Ala Gln Lys Tyr Gly Ala Ile Val Asp Gly Glu Glu Pro
Asp Pro Gly Leu Ile Ala Glu Phe Gly Gln Ser Val Arg Leu Ser Ala
Phe Arg Val Ala Ser Ala Pro Phe Ala Val Gly Ala Ala Arg Val Pro
Gly Phe Thr Gly Ser Ala Thr Phe Thr Val Arg Gly Val Asp Thr Phe
Ala Ser Tyr Ile Ala Ala Leu Leu Trp Phe Gly Glu Phe Ser Gly Cys
Gly Ile Lys Ala Ser Met Gly Met Gly Ala Ile Arg Val Gln Pro Leu
Ala Pro Arg Glu Lys Cys Val Pro Lys Pro

【 図 4 1 D 】

Cas6 配列

マイクロシステイス・アエルギノサ(Microcystis aeruginosa) NIES-843

Met Pro Tyr Ser Leu Val Leu Asn Leu Thr Pro Arg Ser Pro Ile Tyr
Pro Asn Phe Leu Thr Gly Arg His Leu His Ala Leu Phe Leu Thr Leu
Val Ser Ser Val Asp Gln Glu Leu Gly Lys Ile Leu His Thr Ala Glu
Ala Asp Lys Ala Phe Thr Leu Ser Pro Leu Gln Met Gln Ser Gly Gly
Lys Thr Ile Asn Ser Pro Gln Trp Arg Tyr Glu Arg Pro Ile Ala Pro
Glu Thr Pro Cys Trp Trp Arg Ile Ser Leu Leu Asp Asp Arg Leu Phe
Gly Lys Leu Thr Pro Leu Trp Leu Asn Leu Asn Pro Lys His Pro Trp
His Leu Gly Ser Ala Asp Leu Val Ile Thr Ser Val Leu Ala Thr Pro
Gln Ser Val Gln Pro Trp Ala Asn Ser Cys Thr Tyr Gln Tyr Leu Tyr
Glu Asn Ala Ser Glu Thr Asn Arg Glu Phe Asp Phe Leu Phe Ala Thr
Pro Val Thr Phe Arg Gln Gly Lys Phe Asp Ser Ala Leu Pro Thr Arg
Glu Leu Val Phe Asn Ser Leu Leu Asn Arg Trp Asn Arg Tyr Ser Ala
Ile Pro Phe Asp Ser Ile Val Leu Glu Ser Ile Phe Pro Ser Phe Phe
Asp Ile Gln Thr Lys Leu Ala Asp Glu Ala Tyr Lys Asn Gln Ser Phe
Gly Cys Val Gly Glu Ile His Tyr Arg Leu Leu Lys Glu Val Glu Pro
Ala Lys Ile Lys Ala Ile Asn Val Leu Ala Asp Phe Ala Leu Tyr Ala
Gly Val Gly Arg Lys Thr Thr Met Gly Met Gly Met Thr Arg Arg Ile
Ala Lys Glu Lys Arg

マイオサーマス・シルバヌス(Meiothermus silvanus) DSM 9946

Met Met Leu Ala Ala Leu Val Leu Pro Leu Glu Gly Gln Ala Arg Pro
Asp Pro Asp Gly Trp Arg Gly Leu Val Tyr Gly Leu Leu Lys Glu Ile
Asp Pro Glu Leu His Thr Ala Gln His Asn Pro Phe Ser Leu Gly Leu
Gly Gly Ala Glu Gly Gln Trp Trp Val Arg Ile Ala Leu Leu Glu Glu
Gly Leu Tyr Ala Arg Leu Ser Pro His Leu Phe Gly Leu Val Gln Gln
Ser Val Lys Leu Lys Glu Pro Phe Arg Val Arg Ala Val Leu Gln Glu
Glu His Pro Trp Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Pro Arg Leu Phe Gln Gly
Gln Ala Ser Pro Ser Leu Gly Leu Gln Phe Ala Ser Pro Thr Phe Phe
Arg Arg Lys Gly Asn Ser Tyr Pro Leu Pro Glu Pro Lys Leu Val Phe
Asp Ser Leu Thr Gln Arg Trp Asn Ala Phe Ala Pro Val Lys Val Pro
Pro Glu Met Ala Glu Thr Trp Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Leu Gln
Gly His Thr Gln Ala Ile Arg Pro Asn Pro Asp Gly Arg Gly Val Gly
Phe Val Gly Arg Val Val Tyr His Leu Pro Ala Ala Lys Pro Thr Glu
Ala Gln Trp Met Gln Ala Leu Gly Arg Phe Ala Phe Tyr Ala Gly Val
Gly Ala Lys Thr Ser Leu Gly Phe Gly Arg Val Arg Gly Phe Asp Pro
Ile Leu Lys Glu Glu Ser Ala Asn Gly Arg Leu Asp Ala Glu Asp Ser
Ser Ser Leu Ala Thr Pro Gln Asp Pro Gly Ala

【 図 4 1 E 】

Cas6 配列

メイオサーマス・シルバヌス (Meiothermus silvanus) DSM 9946

Met Met Leu Ala Ala Leu Val Leu Pro Leu Glu Gly Gln Ala Arg Pro
Asp Pro Asp Gly Trp Arg Gly Leu Val Tyr Gly Leu Leu Lys Glu Ile
Asp Pro Glu Leu His Thr Ala Gln His Asn Pro Phe Ser Leu Gly Leu
Gly Gly Ala Glu Gly Gln Trp Trp Val Arg Ile Ala Leu Leu Glu Glu
Gly Leu Tyr Ala Arg Leu Ser Pro His Leu Phe Gly Leu Val Gly Gln
Ser Val Lys Leu Lys Glu Pro Phe Arg Val Arg Ala Val Leu Gln Glu
Glu His Pro Trp Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Pro Arg Leu Phe Gln Gly
Gln Ala Ser Pro Ser Leu Gly Leu Gln Phe Ala Ser Pro Thr Phe Phe
Arg Arg Lys Gly Asn Ser Tyr Pro Leu Pro Glu Pro Lys Leu Val Phe
Asp Ser Leu Thr Gln Arg Trp Asn Ala Phe Ala Pro Val Lys Val Pro
Pro Glu Met Ala Glu Thr Trp Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Leu Gln
Gly His Thr Gln Ala Ile Arg Pro Asn Pro Asp Glu Arg Gly Val Gly
Phe Val Gly Arg Val Val Tyr His Leu Pro Ala Ala Lys Pro Thr Glu
Ala Gln Trp Met Gln Ala Leu Gly Arg Phe Ala Phe Tyr Ala Gly Val
Gly Ala Lys Thr Ser Leu Gly Phe Gly Arg Val Arg Phe Asp Pro
Ile Leu Lys Glu Glu Ser Ala Asn Gly Arg Leu Asp Ala Glu Asp Ser
Ser Ser Leu Ala Thr Pro Gln Asp Pro Gly Ala

メイオサーマス・ルバー (Meiothermus ruber) DSM 1279

Met Ile Leu Ala Ala Leu Ile Leu Pro Leu Glu Gly Pro Thr Arg Pro
Asp Pro Asp Gly Trp Arg Gly Leu Val Tyr Gly Leu Leu Lys Glu Ile
Asp Pro Glu Leu His Ala Ala Gln His Asn Pro Phe Ser Leu Gly Leu
Gly Gly Ala Leu Gly Gln Trp Trp Val Arg Ile Ala Phe Leu Glu Glu
Gly Leu Tyr Ala Arg Leu Ser Pro His Leu Phe Gly Leu Ala Gly Gln
Thr Val Arg Leu Lys Glu Ala Phe Gln Val Arg Ala Val Leu Gln Glu
Ala His Pro Trp Ala Gly Val Ser Thr Tyr Pro Lys Leu Phe Gln Gly
Gln Ala Thr Ala Ser Leu Gly Leu Gln Phe Ala Ser Pro Thr Phe Phe
Arg Arg Lys Gly His Ser Tyr Pro Leu Pro Glu Pro Arg Leu Val Phe
Glu Ser Leu Thr Gln Arg Trp Asn Ala Phe Ala Pro Val Lys Val Pro
Gln Glu Val Gln Glu Ala Trp Glu Arg Leu Leu Val Gly Gln Phe Gln
Gly Arg Thr His His Ile Ala Pro Asn Gln Asp Glu Arg Gly Val Gly
Phe Val Gly Arg Val Val Tyr Tyr Leu Pro Lys Ala Ser Pro Thr Glu
Ala Gln Trp Leu Gln Ala Leu Gly Arg Phe Ala Phe Tyr Ala Gly Val
Gly Ala Lys Thr Ser Leu Gly Phe Gly Arg Val Arg Met Phe Asp Pro
Leu Gln Gln Glu Arg Arg Pro Asp Glu Ser Glu Gln Gly Ala Leu Thr
Gly Thr Val Gly Gly Val

【 図 4 1 F 】

Cas6 配列

サーマス・サーモフィルス (Thermus thermophilus) HB8

Met Val Leu Ala Ala Leu Val Leu Val Leu Glu Gly Glu Gly Leu Pro
Glu Pro Leu Gly Leu Arg Gly Phe Phe Tyr Gly Leu Leu Arg Glu Val
Ala Pro Glu Val His Asp Gln Gly Glu Asn Pro Phe Ala Leu Gly Phe
Gly Gly Arg Glu Gly Ala Ala Trp Ala Arg Val Ser Leu Leu Val Glu
Gly Leu Tyr Ala Arg Leu Ala Pro Arg Leu Tyr Ala Leu Glu Gly Glu
Glu Val Arg Leu Gly Pro Phe Arg Val Arg Ala Val Leu Gln Glu
Gly His Pro Trp Ala Gly Val Ser Thr Tyr Pro Arg Leu Phe Gln Gly
Pro Pro Ser Arg Asp Leu Ala Leu Arg Phe Ala Ser Pro Thr Phe Phe
Arg Arg Lys Gly Val His Tyr Pro Val Pro Glu Pro Arg Leu Val Leu
Glu Ser Leu Leu Arg Arg Leu Glu Ala Phe Gly Pro Leu Lys Ala Pro
Glu Gly Val Arg Glu Ala Leu Leu Glu Arg Thr Thr Val Arg Ser Leu
Glu Gly Arg Thr Leu Pro Ala Arg Thr Glu Val Asp Thr Ala Gly Phe
Val Gly Arg Val Val Tyr His Leu Pro Arg Ala Thr Glu Glu Ala
Leu Trp Leu Ser Ala Leu Gly Arg Phe Ala Phe Tyr Ser Gly Val Gly
Ala Lys Thr Ser Leu Gly Tyr Gly Arg Ala Arg Ala Glu Ser Ala

サーマス・サーモフィルス (Thermus thermophilus) JL-18

Met Val Leu Ala Ala Leu Val Leu Val Leu Glu Gly Glu Gly Leu Pro
Glu Pro Leu Gly Leu Arg Gly Phe Phe Tyr Gly Leu Leu Arg Glu Val
Ala Pro Glu Val His Asp Gln Gly Glu Asn Pro Phe Ala Leu Gly Phe
Gly Gly Arg Glu Gly Ala Ser Trp Ala Arg Val Ser Leu Leu Arg Glu
Glu Leu Tyr Ala Arg Leu Ala Pro Arg Leu Tyr Ala Leu Glu Gly Glu
Glu Val Arg Leu Gly Pro Phe Arg Val Arg Ala Val Leu Gln Glu
Gly His Pro Trp Ala Gly Val Ser Thr Tyr Pro Arg Leu Phe Gln Gly
Pro Pro Ser Arg Asp Leu Ala Leu Arg Phe Ala Ser Pro Thr Phe Phe
Arg Arg Lys Gly Val His Tyr Pro Val Pro Glu Pro Arg Leu Val Leu
Glu Ser Leu Leu Arg Arg Leu Glu Ala Phe Gly Pro Leu Lys Ala Pro
Glu Gly Val Arg Glu Ala Leu Leu Glu Arg Thr Thr Val Arg Ser Leu
Glu Gly Arg Thr Leu Pro Ala Arg Thr Glu Val Asp Thr Ala Gly Phe
Val Gly Arg Val Val Tyr His Leu Pro Arg Ala Thr Glu Glu Ala
Leu Trp Leu Ser Ala Leu Gly Arg Phe Ala Phe Tyr Ser Gly Val Gly
Ala Lys Thr Ser Leu Gly Tyr Gly Arg Ala Arg Ala Glu Ser Pro

【 図 4 1 G 】

Cas6 配列

サーマス (Thermus) CCB US3 UF1 種

Met Leu Ala Ala Leu Val Leu Thr Leu Glu Gly Glu Ala Pro Pro Glu
Pro Arg Gly Leu Arg Gly Phe Phe Tyr Gly Leu Leu Gln Glu Val Ala
Pro Glu Val His Asp Gln Gly Glu Asn Pro Phe Ala Leu Gly Phe Gly
Gly Lys Glu Gly Ala Tyr Trp Ala Arg Phe Ser Leu Leu Gln Glu Gly
Leu Tyr Ala Arg Leu Ala Pro Arg Leu Phe Ala Leu Glu Gly Lys Glu
Val Arg Leu Gly Leu Pro Phe Arg Val Arg Gly Val Leu Gln Glu Gly
His Pro Trp Ala Gly Val Ser Thr Tyr Ala Arg Leu Phe Gln Gly Glu
Ala Leu Pro Asp Leu Pro Leu Arg Phe Ala Ser Pro Thr Phe Phe Arg
Arg Lys Gly Val His Tyr Pro Leu Pro Glu Pro Arg Leu Val Val Glu
Ser Leu Leu Arg Arg Leu Glu Ala Phe Gly Pro Leu Lys Ala Pro Glu
Gly Val Arg Glu Ala Leu Leu Glu Arg Thr Thr Val Arg Trp Phe Glu
Gly Lys Thr Leu Lys Ala Glu Thr Glu Val Glu Ala Val Gly Phe Val
Gly Lys Val Val Tyr His Leu Pro Arg Ala Thr Glu Glu Ala Arg
Trp Leu Gln Ala Leu Gly Arg Phe Ala Phe Tyr Ser Gly Val Gly Ala
Lys Thr Gly Leu Gly Tyr Gly Arg Ala Arg Val Gly

サーマス・アクアティクス (Thermus aquaticus) Y51MC23

Met Val Leu Val Ala Leu Val Leu Val Leu Glu Gly Glu Gly Pro Pro
Glu Pro Leu Gly Leu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Leu Leu Lys Glu Ala
Phe Pro Glu Leu His Asp Gln Gly Glu Asn Pro Phe Ala Leu Gly Phe
Gly Leu Arg Gly Gly Glu Pro Trp Ala Arg Val Ser Leu Leu Arg Glu
Asp Leu Tyr Gly Arg Leu Ser Pro Ala Leu Phe Gly Leu Glu Gly Arg
Glu Val Arg Leu Gly Arg Leu Phe Arg Val Arg Ala Val Leu Gln Glu
Gly His Pro Trp Ala Gly Leu Thr Thr Tyr Ala Arg Leu Phe Gln Gly
Pro His Ser Pro Asn Leu Pro Leu Arg Phe Tyr Ser Pro Thr Phe Phe
Arg Arg Lys Gly Val Gln Tyr Pro Leu Pro Glu Pro Arg Leu Val Leu
Glu Ser Leu Leu Arg Arg Leu Glu Ala Phe Gly Pro Leu Lys Ala Pro
Gln Glu Val Arg Glu Ala Leu Leu Glu Arg Thr Thr Val Arg Phe Leu
Glu Gly Arg Thr Gln Met Ala Arg Thr Glu Val Asp Thr Val Gly Phe
Val Gly Lys Val Val Tyr His Leu Pro Lys Ala Thr Glu Glu Ala
Leu Trp Leu Ser Ala Leu Gly Arg Tyr Ala Phe Phe Ser Gly Val Gly
Ala Lys Thr Ser Leu Gly Tyr Gly Leu Ala Arg Ala Phe Thr Gln Val
Gly Pro Gln Asp Ala Glu Thr

【 図 4 1 H 】

Cas6 配列

マリニサーマス・ハイドロサーマリス (Marinithermus hydrothermalis) DSM 14884

Met Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Pro Leu Glu Gly Pro Asp Arg Pro
Gln Pro Leu His Ala Arg Gly Trp Val Tyr Arg Leu Leu Arg Glu Ala
Ala Pro Glu Ile His Asp Ala Glu Gly Pro Lys Pro Phe Thr Val Gly
Val Gly Gly Arg Pro Asn Ala Val Trp Val Arg Leu Thr Cys Leu Ala
Glu Glu Val Tyr Ala Ala Leu Ser Pro Arg Leu Trp Ser Gln Val Gly
Leu Glu Val Arg Leu Gly Glu Asp Thr Tyr Arg Ile Lys Ala Val Leu
Gln Ala Glu His Pro Trp Ala Gly Leu Ala Thr Trp Pro Arg Leu Phe
Gln Gly Glu Ala Gly Pro Asp Leu Gly Leu Glu Phe Ala Ser Pro Thr
Phe Phe Arg Arg Gln Gly Ala Asn Tyr Pro Leu Pro Glu Pro Arg Leu
Val Leu Gly Ser Leu Ile Glu Arg Trp Asn Ala His Ala Pro Thr Pro
Val Pro Pro Glu Val Ala Glu Arg Leu Val Glu Ala Thr Thr Leu Arg
Tyr Leu Lys Gly His Thr Val Ser Ala Val Gly His Asp Arg Thr Val
Gly Phe Arg Gly Arg Val Thr Tyr His Leu Pro Arg Ala Ser Thr Glu
Glu Ala Arg Trp Leu Ala Ala Leu Gly Arg Phe Ala Phe Phe Ser Gly
Val Gly Ala Lys Thr Thr Leu Gly Phe Gly Gln Val Arg Pro Tyr Pro
Leu Leu Ala Pro Ser Ala Ala Pro Pro Gly Pro

サーマス・サーモフィルス (Thermus thermophilus) HB8

Met Pro Gln Ala Val Val Leu Glu Leu Val Gly Glu Lys Pro Pro Leu
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala His Gly Leu Phe Phe Ala Leu Leu Ser Arg
Val Ser Pro Glu Leu Ala Gln Lys Leu His Glu Ala Pro Arg Lys Pro
Phe Thr Leu Ala Pro Leu Pro Arg Ala Gly Pro Glu Gly Ala Thr Leu
Lys Gly Thr Leu Arg Leu Arg Leu Thr Thr Leu Asp Asp Gly Leu Phe
Ala Pro Phe Leu Arg Ala Leu Leu Glu Ala Ala Pro Asp Gly Leu Pro
Leu Gly Asp Ser Ser Tyr Arg Leu Ala Arg Val Leu Ala Thr Arg Glu
Gly His Pro Leu Ala Gly Ala Thr Ser Trp Glu Glu Leu Lys Glu Ala
Pro Lys Arg Glu Lys Ala Thr Phe Arg Phe Leu Thr Pro Thr Val Phe
Ala Thr Ser Lys Pro Gly Gly Arg Thr Arg Tyr Thr Pro Leu Pro Asp
Pro Arg Leu Ile Ala Gly Ser Leu Leu Asp Lys Trp Gln Ala His Ser
Pro Phe Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Phe
Glu Leu Asp Leu Glu Val Ala Gly Phe Arg Asn Leu Arg Phe His Arg
Val Gln Ala Gly Lys Gly Phe Phe Pro Gly Phe Thr Gly Glu Ala Thr
Leu Arg Leu Trp Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln Glu Ala Leu Gly Arg
Leu His Ala Leu Ala Phe Phe Ser Gly Val Gly Ala Lys Thr Pro Tyr
Gly Met Gly Leu Ala Val Pro Leu

【 図 4 1 I 】

Cas6 配列

サーマス・サーモフィルス (Thermus thermophilus) HB27

Met Pro Gln Ala Val Val Leu Glu Leu Val Gly Glu Lys Pro Pro Leu
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala His Gly Leu Phe Phe Ala Leu Leu Ser Arg
Val Ser Pro Glu Leu Ala Gln Lys Leu His Glu Ala Pro Arg Lys Pro
Phe Thr Leu Ala Pro Leu Pro Arg Ala Gly Pro Glu Gly Ala Thr Leu
Lys Gly Thr Leu Arg Leu Arg Leu Thr Thr Leu Asp Asp Gly Leu Phe
Ala Pro Phe Leu Arg Ala Leu Leu Glu Ala Ala Pro Asp Gly Leu Pro
Leu Gly Asp Ser Ser Tyr Arg Leu Ala Arg Val Leu Ala Thr Arg Glu
Gly His Pro Leu Ala Gly Ala Thr Ser Trp Glu Glu Leu Lys Glu Ala
Pro Lys Arg Glu Lys Val Thr Phe Arg Phe Leu Thr Pro Thr Val Phe
Ala Thr Ser Lys Pro Gly Gly Arg Thr Arg Tyr Thr Pro Leu Pro Asp
Pro Arg Leu Ile Ala Gly Ser Leu Leu Asp Lys Trp Gln Ala His Ser
Pro Phe Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Glu Ala Ala Leu Arg Gly Leu Phe
Glu Leu Asp Leu Glu Val Ala Gly Phe Arg Asn Leu Arg Phe His Arg
Val Gln Ala Gly Lys Gly Phe Phe Pro Gly Phe Thr Gly Glu Met Thr
Leu Arg Leu Trp Ser Gln Ser Leu Glu Ala Arg Glu Ala Leu Gly Arg
Leu His Ala Leu Ala Phe Phe Ser Gly Val Gly Ala Lys Thr Pro Tyr
Gly Met Gly Leu Ala Val Pro Leu

サーマス・サーモフィルス (Thermus thermophilus) SG0.5JP17-16

Met Pro Gln Ala Val Val Leu Glu Leu Val Gly Glu Lys Pro Pro Leu
Tyr Pro Gly Arg Tyr Ala His Gly Leu Phe Phe Ala Leu Leu Ser Arg
Val Ser Pro Glu Leu Ala Gln Lys Leu His Glu Ala Pro Arg Lys Pro
Phe Thr Leu Ala Pro Leu Pro Arg Val Gly Pro Glu Gly Ala Thr Leu
Lys Gly Ile Leu Arg Leu Arg Leu Thr Ala Leu Asp Asp Gly Leu Phe
Ala Pro Phe Leu Arg Ala Leu Leu Glu Ala Ala Pro Asp Gly Leu Pro
Leu Gly Asp Ser Ser Tyr Arg Leu Ala Arg Val Leu Ala Thr Arg Glu
Gly His Pro Leu Ala Gly Ala Thr Ser Trp Glu Glu Leu Lys Glu Ala
Pro Lys Arg Glu Lys Ala Thr Phe Arg Phe Leu Thr Pro Thr Val Phe
Ala Thr Ser Lys Pro Gly Gly Arg Thr Arg Tyr Thr Pro Leu Pro Asp
Pro Arg Leu Ile Ala Gly Ser Leu Leu Asp Lys Trp Gln Ala His Ser
Pro Phe Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Phe
Glu Leu Asp Leu Glu Val Ala Gly Phe Arg Asn Leu Arg Phe His Arg
Val Gln Ala Gly Lys Gly Phe Phe Pro Gly Phe Thr Gly Glu Ala Thr
Leu Arg Leu Trp Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln Glu Ala Leu Gly Arg
Leu His Ala Leu Ala Phe Phe Ser Gly Val Gly Ala Lys Thr Pro Tyr
Gly Met Gly Leu Ala Val Pro Leu

【 図 4 1 J 】

Cas6 配列

サーマス・サーモフィルス (Thermus thermophilus) JL-18

Met Pro Gln Ala Val Val Leu Glu Leu Val Gly Glu Glu Ser Pro Leu
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala His Gly Leu Phe Phe Ala Leu Leu Ser Arg
Val Ser Pro Glu Leu Ala Gln Lys Leu His Glu Ala Pro Arg Lys Pro
Phe Thr Leu Ala Pro Leu Pro Arg Val Gly Ser Glu Gly Ala Thr Leu
Lys Gly Ile Leu Arg Leu Arg Leu Thr Ile Leu Asp Asp Gly Leu Phe
Ala Pro Phe Leu Arg Ala Leu Leu Glu Ala Ala Pro Asp Gly Leu Pro
Leu Gly Asp Ser Ser Tyr Arg Leu Ala Arg Val Leu Ala Thr Arg Glu
Gly His Pro Leu Ala Gly Ala Thr Ser Trp Glu Glu Leu Lys Glu Ala
Pro Lys Arg Glu Lys Ala Thr Phe Arg Phe Leu Thr Pro Thr Val Phe
Ala Thr Ser Lys Pro Gly Gly Arg Thr Arg Tyr Thr Pro Leu Pro Asp
Pro Arg Leu Ile Ala Gly Ser Leu Leu Asp Lys Trp Gln Ala His Ser
Pro Phe Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Phe
Glu Leu Asp Leu Glu Val Ala Gly Phe Ala Asn Leu Arg Phe His Arg
Val Gln Ala Gly Lys Ser Phe Phe Pro Gly Phe Thr Gly Glu Met Thr
Leu Arg Leu Trp Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln Gly Ala Leu Gly Arg
Leu His Ala Leu Ala Phe Phe Ser Gly Val Gly Ala Lys Thr Pro Tyr
Gly Met Gly Leu Ala Val Pro Leu

【 図 4 2 A 】

Cas5 配列

デスルホビブリオ・ブルガリス (Desulfovibrio vulgaris)
ヒルデンボロー (Hildenborough) 系統

Met Thr His Gly Ala Val Lys Thr Tyr Gly Ile Arg Leu Arg Val Trp
Gly Asp Tyr Ala Cys Phe Thr Arg Pro Glu Met Lys Val Glu Arg Val
Ser Tyr Asp Val Met Pro Pro Ser Ala Ala Arg Gly Ile Leu Glu Ala
Ile His Trp Lys Pro Ala Ile Arg Trp Ile Val Asp Arg Ile His Val
Leu Arg Pro Ile Val Phe Asp Asn Val Arg Arg Asn Glu Val Ser Ser
Lys Ile Pro Lys Pro Asn Pro Ala Thr Ala Met Arg Asp Arg Lys Pro
Leu Tyr Phe Leu Val Asp Asp Gly Ser Asn Arg Gln Gln Arg Ala Ala
Thr Leu Leu Arg Asn Val Asp Tyr Val Ile Glu Ala His Phe Glu Leu
Thr Asp Lys Ala Gly Ala Glu Asp Asn Ala Gly Lys His Leu Asp Ile
Phe Arg Arg Arg Ala Arg Ala Gly Gln Ser Phe Gln Gln Pro Cys Leu
Gly Cys Arg Glu Phe Pro Ala Ser Phe Glu Leu Leu Glu Gly Asp Val
Pro Leu Ser Cys Tyr Ala Gly Glu Lys Arg Asp Leu Gly Tyr Met Leu
Leu Asp Ile Asp Phe Glu Arg Asp Met Thr Pro Leu Phe Phe Lys Ala
Val Met Glu Asp Gly Val Ile Thr Pro Pro Ser Arg Thr Ser Pro Glu
Val Arg Ala

ナイセリア・ムコサ (Neisseria mucosa ATCC) 25996

Met Asn Gln Ile Arg Leu His Val Trp Gly Asp Tyr Ala Cys Phe Thr
Arg Pro Glu Met Lys Val Glu Arg Val Ser Tyr Asp Val Ile Thr Pro
Ser Ala Ala Arg Gly Ile Leu Ala Ala Val His Trp Lys Pro Ala Ile
Arg Trp Val Ile Asp Arg Ile Tyr Val Leu Lys Pro Ile Arg Phe Glu
Ser Val Arg Arg Asn Glu Leu Gly Gly Lys Ile Ser Ala Gly Lys Val
Ser Gly Ala Met Lys Arg Lys Ser Val Ala Asp Leu Tyr Thr Leu Ile
Glu Asp Asp Arg Gln Gln Arg Ala Ala Thr Val Leu Lys Asp Val Ala
Tyr Val Ile Glu Ala His Ala Val Leu Thr Ala Lys Ala Gly Ala Asp
Gly Thr Val Thr Lys His Ile Glu Met Phe Lys Arg Arg Ala Lys Lys
Gly Gln Cys Phe Gln Pro Cys Leu Gly Val Arg Glu Phe Pro Ala
Asp Phe Ala Leu Ile Asp Glu Gly Leu Pro Leu Pro Pro Ser Ala Leu
Ser Glu Ser Glu Ala Asn Arg Asp Leu Gly Trp Met Leu His Asp Ile
Asp Phe Asp His Gly Asn Thr Pro His Phe Phe Arg Ala Gln Met Lys
Asp Gly Val Ile Asp Val Pro Pro Phe Tyr Ala Glu Glu Val Lys Ala

【 図 4 2 B 】

Cas5 配列

バチルス・ハロデュランス (Bacillus halodurans) C-125

Met Arg Asn Glu Val Gln Phe Glu Leu Phe Gly Asp Tyr Ala Leu Phe
Thr Asp Pro Leu Thr Lys Ile Gly Gly Glu Lys Leu Ser Tyr Ser Val
Pro Thr Tyr Gln Ala Leu Lys Gly Ile Ala Lys Ser Ile Tyr Trp Lys
Pro Thr Ile Val Phe Val Ile Asp Glu Leu Arg Val Met Lys Pro Ile
Gln Met Glu Ser Lys Gly Val Arg Pro Ile Glu Tyr Gly Gly Gly Asn
Thr Leu Ala His Tyr Thr Tyr Leu Lys Asp Val His Tyr Gln Val Lys
Ala His Phe Glu Phe Asn Leu His Arg Pro Asp Leu Ala Phe Asp Arg
Asn Glu Gly Lys His Tyr Ser Ile Leu Gln Arg Ser Leu Lys Ala Gly
Gly Arg Arg Asp Ile Phe Leu Gly Ala Arg Glu Cys Gln Gly Tyr Val
Ala Pro Cys Glu Phe Gly Ser Gly Asp Gly Phe Tyr Asp Gly Gln Gly
Lys Tyr His Leu Gly Thr Met Val His Gly Phe Asn Tyr Pro Asp Glu
Thr Gly Gln His Gln Leu Asp Val Arg Leu Trp Ser Ala Val Met Glu
Asn Gly Tyr Ile Gln Phe Pro Arg Pro Glu Asp Cys Pro Ile Val Arg
Pro Val Lys Glu Met Glu Pro Lys Ile Phe Asn Pro Asp Asn Val Gln
Ser Ala Glu Gln Leu Leu His Asp Leu Gly Gly Glu

セレウス菌 (Bacillus cereus) F65185

Met Lys Lys Glu Glu Glu Ser Leu Arg Asn Ser Ile Glu Phe Glu Val
Phe Gly Asp Tyr Ala Leu Phe Thr Asp Pro Leu Met Lys Met Gly Gly
Glu Lys Leu Thr Tyr Gln Val Pro Thr Tyr Gln Ala Ile Lys Gly Ile
Val Glu Ser Ile Tyr Trp Lys Pro Thr Leu Leu Met Ile Val Asp Lys
Ile Arg Ile Met Asn Ala Ile Lys Met Glu Ser Lys Gly Ile Arg Pro
Ile Glu Tyr Gly Gly Asn Thr Leu Ala Asn Tyr Thr Tyr Leu Lys
Asn Val Arg Tyr Gln Val Gln Ala His Phe Ile Phe Asn Pro His Arg
Pro Asp Leu Ala Phe Asp Arg Asn Glu Tyr Lys His His Asn Ile Leu
Lys Arg Ser Leu Lys Val Gly Gly Arg Arg Asp Ile Phe Leu Gly Thr
Arg Glu Cys Gln Gly Tyr Val Glu Pro Cys Val Phe Gly Glu Gly Glu
Gly Phe Tyr Asp Asn Tyr Gly Gly Asp Ile His Leu Gly Thr Met Val
His Gly Leu Asn Tyr Pro Asp Glu Thr Gly Arg Asn Lys Glu Glu Val
Arg Leu Trp Asn Pro Val Met Arg Asp Gly Ile Ile Gln Phe Ile Arg
Pro Glu Glu Cys Thr Lys Ile Arg Lys Ile Ser Lys Met Glu Pro Lys
Ile Phe Asp Ser Ser Asn Val Glu Ser Val Asp Lys Leu Ile Lys Gln
Leu Glu Glu Gly Gly Glu

【 図 4 2 C 】

Cas5 配列

セレンオモナス・ノキシア(Selenomonas noxia) ATCC 43541

```

Met Arg Asn Ser Ile Glu Phe Gln Val Tyr Gly Arg Met Ala Leu Phe
Thr Asp Pro Ile Thr Lys Ile Gly Gly Glu Lys Ala Ser Tyr Ser Val
Pro Thr Tyr Gln Ala Leu Lys Gly Ile Thr Glu Ser Ile Tyr Trp Lys
Pro Thr Ile Ile Trp Phe Ile Asp Glu Val Arg Val Met Lys Arg Ile
Thr Thr Gln Val Arg Gly Val Lys Pro Leu Lys Tyr Gly Asp Ser Gly
Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Lys Tyr Leu Ser Asp Val Cys Tyr Gln Val
Arg Ala His Phe Glu Phe Asn Met His Arg Glu Glu Leu Lys Glu Asp
Arg Asp Glu His Lys His His Asn Ile Ala Lys Arg Met Val Glu Arg
Gly Gly Arg Arg Asp Ile Phe Leu Gly Thr Arg Glu Cys Gln Gly Tyr
Val Glu Pro Val Lys Tyr Gly Val Gly Lys Gly Tyr Tyr Asp Asn Val
Asp Glu Leu Pro Leu Gly Ile Met Leu His Gly Phe Asn Tyr Pro Asp
Glu Thr Gly Glu Asp Lys Leu Gln Val Arg Phe Trp Lys Pro Thr Met
Lys Lys Gly Ile Ile His Phe Arg Arg Pro Glu Lys Cys Glu Met Val
Arg Asp Ile Arg Glu Val Arg Thr Lys Gln Phe Asp Ala Asp Asn Val
Phe Phe Ala Glu Glu Glu Glu Lys Gln Leu Glu Gly Gly His Leu

```

【 配列表 】

2016519652000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年1月15日(2016.1.15)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 8 6 4

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 8 6 4 】

図 2 5 は、二本鎖におけるより小さな改変の二本鎖変種の第 2 セットを例示する。V 2 8 は、相補的な領域の 3' 側に 2 塩基の挿入を含む；V 2 9 は、相補的な領域の 3' 側に 3 塩基の欠失を含む。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 8 6 5

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 8 6 5 】

図 2 6 A および 2 6 B は、核酸ターゲティング核酸（すなわち、最小限の *tracrRNA* 配列および 3' *tracrRNA* 配列）の *tracrRNA* 部分に変異を含む *tracrRNA* 変種を例示する。V 3 8 ~ V 4 1 は、マイコプラズマ・モバイル（*M. mobile*）1 6 3 K（V 3 8）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（*S. thermophilus*）LMD - 9（V 3 9）、カンピロバクター・ジェジュニ（*C. jejuni*）（V 4 0）、および髄膜炎菌（*N. meningitidis*）由来の相補的領域 / 二本鎖

と t r a c r 核酸配列の 3' 末端との間での融合を含む。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0866

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0866】

図 27A および 27B は、核酸ターゲティング核酸への C s y 4 結合を可能にする改変を含む変種を表す。追加のヘアピン配列は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PA14 の CRISPR 反復に由来する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0867

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0867】

図 23A ~ C は、C a s 9 切断に関する核酸ターゲティング核酸変種の活性を示している、試験管内切断検定のデータを示す。変種 S G R v 8 は、標的核酸切断 (図 23B レーン 9) を支持することができなかった。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0868

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0868】

図 28 および図 29 は、図 24 ~ 27 の中に図示される変種をテストする、C a s 9 切断検定の 2 回の独立した反復を表す。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0869

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0869】

追加の操作された核酸ターゲティング核酸は、表 2 にリストされたように作製され、同じ検定によってテストされた。検定の結果は図 37 に示され、表 5 の活性欄にリストされる。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変された C a s 9 タンパク質を含む組成物であって、

ここで改変された C a s 9 タンパク質は、C a s 9 ブリッジヘリックス領域；C a s 9 N 末端領域内の C a s 9 強塩基性パッチ；C a s 9 H N H ドメイン領域；C a s 9 R u v 9 ドメイン領域；C a s 9 P - ドメイン認識領域；付与された酵素活性；ドメインの挿入、欠失または置換；構造モチーフの挿入、欠失または置換；融合；およびそれらの組み合わせ、からなる群から選択される野生型 C a s 9 タンパク質の領域の改変を含む、上記組成物。

【請求項 2】

野生型 Cas9 タンパク質が、ストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes) Cas9 タンパク質である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 1 ~ 270 に対応する野生型 Cas9 タンパク質の領域にある、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 50 ~ 100 に対応する領域にある、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 65 ~ 95 に対応する領域にある、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 22 ~ 49 に対応する領域にある、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 7】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 551 ~ 556 に対応する領域にある、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 8】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 445 ~ 507 に対応する領域にある、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 9】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 860 ~ 1100 に対応する領域にある、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 10】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 1096 ~ 1225 に対応する領域にある、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 11】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 1105 ~ 1138 に対応する領域にある、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

改変が、ストレプトコッカス・ピオゲネス Cas9 のアミノ酸 718 ~ 757 に対応する領域にある、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 13】

改変が、挿入されたヌクレアーゼドメインまたは挿入された RNA 結合ドメインである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 14】

挿入された RNA 結合ドメインは Csy4 である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の改変された Cas9 タンパク質をコードする核酸配列を含むベクター。

【請求項 16】

操作された CRISPR RNA (crRNA)、操作されたトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) またはそれらの組み合わせを含む、操作された核酸ターゲティング核酸であって、

ここで、(i) 操作された核酸ターゲティング核酸は、Cas9 タンパク質と会合して、標的 DNA に結合することができる核酸ターゲティング核酸 - Cas9 複合体を形成することができる、そして (ii) 操作された crRNA、操作された tracrRNA、またはそれらの組み合わせは、対応する野生型 crRNA、tracrRNA またはその両方と比較して変換されており；そして

操作された核酸ターゲティング核酸は、以下： *tracr3'* ハイブリダイズ伸長配列、スパーサー伸長配列、 *tracr* 伸長配列、 変更されたバルジ領域、 変更された P - ドメイン、 *Csy4* タンパク質が Kd 約 $50 pM$ で結合する *Csy4* 結合配列、 *Cas5* タンパク質が結合する *Cas5* 結合配列、 *Cas6* タンパク質が結合する *Cas6* 結合配列、 ネクサス / ヘアピン変異体、 機能的部分を含む変更されたステムループ構造、 またはそれらの組み合わせ、 の少なくとも 1 つを含む、
上記操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 17】

操作された核酸ターゲティング核酸はダブルガイド核酸構造である、 請求項 16 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 18】

操作された核酸ターゲティング核酸はシングルガイド核酸構造である、 請求項 16 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 19】

ネクサス / ヘアピン変異体は、 対応する野生型 *tracrRNA* と比べて、 変更されたネクサスステムの長さまたは変更されたネクサスループの大きさを含む、 請求項 16 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 20】

P - ドメインは、 *crRNA* と *tracrRNA* との間に形成された二重鎖の最後の対のヌクレオチドの 2、 3、 4 または 5 ヌクレオチド下流で開始し、 そして P - ドメインは 2、 3、 4 または 5 個の隣接したヌクレオチド含む、 請求項 16 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 21】

変更された P - ドメインは、 操作された核酸ターゲティング核酸が、 対応する野生型 *tracrRNA* と比べて異なったプロトスパー隣接モチーフにハイブリダイズすることを可能にする 1 つまたはそれ以上の変異を含む、 請求項 20 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 22】

Csy4 結合配列は、 図 27A または図 27B に示された *Csy4* - タグの一つである、 請求項 16 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 23】

tracr 伸長配列がさらに機能的部分を含む、 請求項 16 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 24】

スパーサー伸長配列がさらに機能的部分を含む、 請求項 16 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 25】

操作された核酸ターゲティング核酸が DNA を含む、 請求項 16 に記載の操作された核酸ターゲティング核酸。

【請求項 26】

請求項 16 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の操作された核酸ターゲティング核酸をコードする核酸配列を含むベクター。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の変更された *Cas9* タンパク質組成物、 および請求項 16 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の操作された核酸ターゲティング核酸、 を含む組成物。

【請求項 28】

2 つの複合体が互いに近接しているかどうかを検出するための方法であって、 以下の：
第 1 の標的核酸を第 1 の複合体と接触させる工程であって、 ここで第 1 の複合体は、 第 1 の部位特異的ポリペプチド、 第 1 の標的核酸に相補的な第 1 の核酸配列を含む第 1 の改

変された核酸ターゲティング核酸、および第1のエフェクタータンパク質を含み、ここで第1のエフェクタータンパク質は、第1の改変された核酸ターゲティング核酸に結合するように適合されており、そしてここで第1のエフェクタータンパク質は、分割システムの第1の部分を含む第1の非天然配列を含む、上記工程；

第2の標的核酸を第2の複合体と接触させる工程であって、ここで第2の複合体は、第2の部位特異的ポリペプチド、第2の標的核酸に相補的な第2の核酸配列を含む第2の改変された核酸ターゲティング核酸、および第2のエフェクタータンパク質を含み、ここで第2のエフェクタータンパク質は、第2の改変された核酸ターゲティング核酸に結合するように適合されており、そしてここで第2のエフェクタータンパク質は、分割システムの第2の部分を含む第2の非天然配列を含む、上記工程；および

第1の部分と第2の部分との間の相互作用を検出する工程であって、ここで検出は第1の複合体と第2の複合体が互いに近接していることを示す、上記工程；を含む、上記方法。

【請求項29】

分割システムは2つまたはそれ以上のタンパク質を含み、ここでタンパク質フラグメントは個々には活性化されておらず、そしてタンパク質フラグメント間に形成される複合体は活性がある、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

検出の工程は遺伝子移動事象の発生を決定する工程を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

標的DNA配列に関連するオフ標的結合部位を同定するための方法であって、以下の：標的DNA配列を含むDNAフラグメントの混合物を、crRNAおよびtracrRNAを含む核酸ターゲティング核酸との複合体において、酵素的に不活性なCas9タンパク質と接触させる工程であって、ここで(i)Cas9タンパク質が親和性タグを含むか、核酸ターゲティング核酸が親和性タグを含むか、またはそれらの組み合わせであり、そして(ii)核酸ターゲティング核酸との複合体においてCas9が標的配列に結合する、上記工程；

核酸ターゲティング核酸との複合体においてCas9タンパク質および結合したDNAフラグメントを、親和性タグに結合する捕捉剤を用いて分離する工程；

核酸ターゲティング核酸との複合体においてCas9が結合したDNAフラグメントを精製する工程；

核酸ターゲティング核酸との複合体においてCas9が結合したDNAフラグメントの配列決定をする工程；および

標的DNA結合配列を含まない核酸ターゲティング核酸との複合体においてCas9が結合したDNAフラグメントの配列から、オフ標的結合部位を同定する工程；

を含む、上記方法。

【請求項32】

第一の鎖と第二の鎖を有する標的部位を含む二重鎖DNA中に粘着末端または平滑末端を生成させるための方法であって、以下の：

二重鎖DNAを、crRNAおよびtracrRNAを含む第一の核酸ターゲティング核酸との複合体において、Cas9ニッカゼと接触させる工程であって、ここで第一の核酸ターゲティング核酸との複合体において、Cas9ニッカゼは標的部位の第一の鎖を切断し、第一の鎖の切断部位を生成する、上記工程；および

二重鎖DNAを、crRNAおよびtracrRNAを含む第二の核酸ターゲティング核酸との複合体において、Cas9ニッカゼと接触させる工程であって、ここで第二の核酸ターゲティング核酸との複合体において、Cas9ニッカゼは標的部位の第二の鎖を切断し、第二の鎖の切断部位を生成する、上記工程；

を含み、

ここで、(i)第一の鎖の切断部位と第二の鎖の切断部位は標的部位の同じ位置にあって平滑末端を生成するか、または(ii)第一の鎖の切断部位と第二の鎖の切断部位は標

的部位の異なる位置にあって粘着末端を生成する、
上記方法。

【請求項 33】

標的核酸濃縮のための方法であって、以下の：

標的核酸を含む核酸の混合物を、*crRNA* および *tracrRNA* を含む核酸ターゲティング核酸との複合体において、酵素的に不活性な *Cas9* タンパク質と接触させる工程であって、ここで (i) *Cas9* タンパク質、核酸ターゲティング核酸、またはそれらの組み合わせはさらに親和性タグを含み、そして (ii) 核酸ターゲティング核酸との複合体において *Cas9* は標的配列に結合する、上記工程；および

核酸ターゲティング核酸との複合体において *Cas9* タンパク質と結合した標的核酸を、親和性タグに結合する捕捉剤を用いて分離し、標的核酸濃縮をもたらす工程；を含む、上記方法。

【請求項 34】

多重化遺伝子ターゲティング剤であって、以下の：

複数の核酸ターゲティング核酸であって、各核酸ターゲティング核酸はシングルガイド RNA (*sgRNA*) を含み、*sgRNA* は *crRNA* および *tracrRNA* を含み、ここで *sgRNA* は *Cas9* タンパク質と会合して *sgRNA-Cas9* 複合体を形成することができる、上記複数の核酸ターゲティング核酸；および

複数の非天然配列であって、各非天然配列は、ある部分、エンドリボヌクレアーゼ結合配列、またはリボザイムを含む、上記複数の非天然配列；を含む、

ここで、核酸モジュールが、非天然配列に隣接する核酸ターゲティング核酸を含み、そして複数の核酸モジュールがタンデムに配置されている、上記多重化遺伝子ターゲティング剤。

【請求項 35】

各非天然配列がエンドヌクレアーゼ結合配列を含み、そしてエンドヌクレアーゼ結合配列が、*Csy4* タンパク質結合部位、*Cas5* タンパク質結合部位、および *Cas6* タンパク質結合部位、からなる群から選択される、請求項 34 に記載の多重化遺伝子ターゲティング剤。

【請求項 36】

化学量論的送達複合体であって、以下の：

複数の核酸結合タンパク質を含む操作されたタンデム融合ポリペプチドであって、ここで各核酸結合タンパク質は、核酸結合タンパク質が結合できるコグネイト核酸結合タンパク質結合部位を含む核酸と結合することができる、上記操作されたタンデム融合ポリペプチド、

を含む、上記化学量論的送達複合体。

【請求項 37】

各核酸結合タンパク質が RNA 結合タンパク質または DNA 結合タンパク質である、請求項 36 に記載の化学量論的送達複合体。

【請求項 38】

核酸結合タンパク質がコグネイト核酸結合タンパク質結合部位を含む核酸に結合する、請求項 36 に記載の化学量論的送達複合体。

【請求項 39】

細胞のゲノム DNA を改変するための方法であって、ここでゲノム DNA は標的核酸を含み、該方法は以下の：

ドナーポリヌクレオチドをゲノム DNA の標的核酸中に挿入する工程であって、ここで、(i) *crRNA* および *tracrRNA* を含む第一の核酸ターゲティング核酸との複合体において *Cas9* タンパク質が標的核酸を切断し、(ii) ドナーポリヌクレオチドが切断された標的核酸中に挿入され、そして (iii) ドナーポリヌクレオチドが対象とする遺伝子エレメントとレポーターエレメントを含み、ここでレポーターエレメントは 5

’ 標的部位と 3 ’ 標的部位に隣接している、上記工程；
レポーターエレメントを発現している細胞を選択する工程；
レポーターエレメントを切り取る工程であって、ここで (i) crRNA および tra crRNA を含む第二の核酸ターゲティング核酸との複合体において Cas9 タンパク質が 5 ’ 標的部位を切断して第一の末端を生成し、そして crRNA および tra crRNA を含む第三の核酸ターゲティング核酸との複合体において Cas9 タンパク質が 3 ’ 標的部位を切断して第二の末端を生成し、そして (i i) 第一の末端と第二の末端を再結合する、上記工程；
を含む、上記方法。

【請求項 40】

細胞集団の細胞系列の発達を追跡するための方法であって、以下の：
細胞のゲノム DNA と、標的部位を切断して第一の末端と第二の末端を生成する、crRNA および tra crRNA を含む核酸ターゲティング核酸との複合体において Cas9 タンパク質とを接触させることにより、細胞集団の細胞中の、標的部位を含む、ゲノム DNA に、タグ付けする工程であって、ここで細胞修復機構が第一の末端と第二の末端とを再結合し、多数の細胞中に多数の特徴的な配列を生成する、上記工程；
特徴的な配列を含む細胞集団を増殖させる工程；
各特徴的な配列と関連している細胞を同定するために、集団の細胞を分析する工程；および
細胞集団中の細胞の細胞系統を決定するために、特徴的な配列を用いる工程；
を含む、上記方法。

【請求項 41】

方法が、さらに、ゲノム DNA と、(i) 核酸ターゲティング核酸との複合体において Cas9 タンパク質および (i i) ドナーポリヌクレオチドとを接触させる工程を含む、請求項 40 に記載の細胞集団の細胞系列の発達を追跡するための方法。

【請求項 42】

細胞集団中のゲノム DNA のゲノム編集事象を定量するための方法であって、ここでゲノム DNA は標的核酸を含み、該方法が以下の：
集団中の細胞のゲノム DNA と、crRNA および tra crRNA を含む核酸ターゲティング核酸との複合体において Cas9 タンパク質とを接触させる工程であって、ここで (i) 核酸ターゲティング核酸との複合体において Cas9 タンパク質が標的部位を切断して第一の末端および第二の末端を生成でき、(i i) 核酸ターゲティング核酸との複合体において Cas9 タンパク質が標的部位を切断したとき、細胞の修復機構が第一の末端と第二の末端を再結合し標的部位を破壊し、そして (i i i) 該接触工程が標的部位を有するゲノム DNA を含む多数の細胞と標的部位が破壊されたゲノム DNA を含む多数の細胞を産生する、上記工程；
細胞集団からゲノム DNA を分離する工程；
標的部位に隣接するプライマーを用いて、分離したゲノム DNA によりポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行い、増幅 PCR 産物を産生する工程；
増幅 PCR 産物と、核酸ターゲティング核酸との複合体において Cas9 タンパク質とを接触させる工程；および
増幅 PCR 産物中に標的部位を含むゲノム DNA から由来する増幅 PCR 産物の量と、標的部位が破壊されたゲノム DNA から由来する増幅 PCR 産物の量とを比較することにより、ゲノム編集事象を定量する工程、
を含む、上記方法。

【請求項 43】

定量化がゲル電気泳動を用いて行われる、ゲノム DNA のゲノム編集事象を定量するための請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

組成物であって、以下の：

操作された *crRNA* および *tracrRNA* を含む核酸ターゲティング核酸であって、ここで、(i) 操作された核酸ターゲティング核酸は *Cas9* タンパク質と会合して、*crRNA* - *tracrRNA* - *Cas9* 複合体を生成することができ、(ii) *tracrRNA* は 3' 末端を含み、(iii) *tracrRNA* は、3' 末端にさらにハイブリダイズする配列を含み、そして (iv) ハイブリダイズする配列が、ドナーポリヌクレオチドにハイブリダイズできる核酸配列を含む、上記核酸ターゲティング核酸、を含む、上記組成物。

【請求項 45】

Cas9 タンパク質をさらに含む、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 46】

ドナーポリヌクレオチドを標的部位における二重鎖破壊に送達するための方法であって、以下の：

標的部位を含む DNA 配列を、*crRNA* および *tracrRNA* を含む操作された核酸ターゲティング核酸に接触させる工程であって、ここで (i) 操作された核酸ターゲティング核酸は *Cas9* タンパク質との複合体と会合して *crRNA* - *tracrRNA* - *Cas9* 複合体を生成し、(ii) *tracrRNA* は 3' 末端を含み、(iii) *tracrRNA* は、3' 末端にさらにハイブリダイズする配列を含み、(iv) ハイブリダイズする配列が、ドナーポリヌクレオチドにハイブリダイズできる核酸配列を含み、そして (v) *crRNA* - *tracrRNA* - *Cas9* 複合体は標的部位を含む DNA 配列に結合し、そして標的部位を切断して二重鎖破壊を生成し、*crRNA* - *tracrRNA* - *Cas9* 複合体の結合は、ドナーポリヌクレオチドを標的部位における二重鎖破壊に送達する、上記工程、を含む、上記方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/023828
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2014.01) USPC - 435/6.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12N 9/22, 15/113, 15/907; C12Q 1/68; G01N 30/53 (2014.01) USPC - 435/6.1, 19, 197, 199, 320.1; 536/23.1, 23.2, 23.4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12N 9/22, 15/113, 15/907; C12Q 1/6809, 1/6813, 1/6818 (2014.02) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	JINEK et al., "Bacterial Immunity A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive," Science, Vol. 337, Pgs. 816-820. 12 August 2012 (12.08.2012) entire document	16, 18 ----- 21-26
X	HAURWITZ, R. E., "The CRISPR endoribonuclease Csy4 utilizes unusual sequence and structure-specific mechanisms to recognize and process crRNAs" Electronic Thesis and Dissertations UC Berkley, Pgs. 1-108. Spring 2012. entire document URL: <http://escholarship.org/uc/item/0rh5940p>	17
X	GASIUNAS et al., "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria," PNAS, Vol. 109, No. 39. 04 September 2012 (04.09.2012) entire document	19
X - Y	WO 2011/143124 A2 (HAURWITZ et al) 17 November 2011 (17.11.2011) entire document	20 ----- 21-26
P, X	US 2014/0068797 A1 (DOUDNA et al) 06 March 2014 (06.03.2014) entire document	1-26
P, X	WO 2014/018423 A2 (ZHANG et al) 30 January 2014 (30.01.2014) entire document	1-26
P, Y	WO 2013142578 A1 (SIKSNYS et al) 26 September 2013 (26.09.2013) entire document	1-26
A	US 2010/0055728 A1 (YANG et al) 04 March 2010 (04.03.2010) entire document	1-26
A	US 8,361,725 B2 (RUSSELL et al) 29 January 2013 (29.01.2013) entire document	1-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 23 May 2014		Date of mailing of the international search report 16 JUN 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/023828

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
G 0 1 N	33/566 (2006.01)	G 0 1 N	33/566	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M

- (31)優先権主張番号 61/818,386
(32)優先日 平成25年5月1日(2013.5.1)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/781,598
(32)優先日 平成25年3月14日(2013.3.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/818,382
(32)優先日 平成25年5月1日(2013.5.1)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/900,311
(32)優先日 平成25年11月5日(2013.11.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/907,777
(32)優先日 平成25年11月22日(2013.11.22)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/822,002
(32)優先日 平成25年5月10日(2013.5.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/832,690
(32)優先日 平成25年6月7日(2013.6.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/845,714
(32)優先日 平成25年7月12日(2013.7.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/858,767
(32)優先日 平成25年7月26日(2013.7.26)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/859,661
(32)優先日 平成25年7月29日(2013.7.29)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/865,743
(32)優先日 平成25年8月14日(2013.8.14)
(33)優先権主張国 米国(US)

- (31)優先権主張番号 61/883,804
 (32)優先日 平成25年9月27日(2013.9.27)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/899,712
 (32)優先日 平成25年11月4日(2013.11.4)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/902,723
 (32)優先日 平成25年11月11日(2013.11.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/906,335
 (32)優先日 平成25年11月19日(2013.11.19)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, LT, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. FLASH

- (72)発明者 レイチェル・イー・ハウアウィッツ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 7 0 8 . ケンジントン . ペロイトアベニュー 4 8 2
 (72)発明者 ジェニファー・エー・ドウドゥナ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 7 0 5 . パークリー . ヴィチェンテロード 1 6 4
 (72)発明者 ジェームズ・エム・バーガー
 アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 2 1 0 . ボルチモア . ケンドールロード 3 0 1
 (72)発明者 マシュー・メリル・カーター
 アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 0 6 0 . ノースグランビー . イーストウッドドライブ 8
 (72)発明者 ポール・ドノヒュー
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 7 0 9 . パークリー . スプルーーストリート 1 4 0 4

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 DA02 FA02 FA10 GA11 GA13 HA14
 4B063 QA13 QA17 QQ42 QQ52 QR08 QR14 QR32 QR48 QS16 QS25
 QS34
 4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA02 CA04 CA53 MA52 MA55 MA63
 MA66 NA14 ZA012 ZA332 ZA362 ZA452 ZA592 ZA752 ZA812 ZA962
 ZB112 ZB262 ZB352
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA54 CA11 EA50