

(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2021-528091

(P2021-528091A)

(43) 公表日 令和3年10月21日 (2021. 10. 21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6844 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/6844 Z N A Z	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/34 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/34	4 B O 5 0
C 1 2 N 9/10 (2006. 01)	C 1 2 N 9/10	4 B O 6 3
G O 1 N 33/50 (2006. 01)	G O 1 N 33/50 P	
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 M	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-573010 (P2020-573010)	(71) 出願人	515236259
(86) (22) 出願日	令和1年6月26日 (2019. 6. 26)		ザ・ブロード・インスティテュート・イン コーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和3年2月24日 (2021. 2. 24)		アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02 142・ケンブリッジ・メイン・ストリー ト・415
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/039221	(71) 出願人	596060697
(87) 国際公開番号	W02020/006067		マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
(87) 国際公開日	令和2年1月2日 (2020. 1. 2)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア ヴェニュー・77
(31) 優先権主張番号	62/690, 278		
(32) 優先日	平成30年6月26日 (2018. 6. 26)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/767, 059		
(32) 優先日	平成30年11月14日 (2018. 11. 14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C R I S P Rダブルニッカーゼに基づく増幅の組成物、システム、及び方法

(57) 【要約】

本明細書中開示される実施形態は、RNA標的指向性エフェクターを利用して、堅固なC R I S P Rに基づく核酸増幅の方法及びシステムを提供する。本明細書中開示される実施形態は、二本鎖核酸標的及び一本鎖核酸標的の両方を増幅することができる。さらに、本明細書中開示される実施形態は、様々な検出プラットフォーム、例えば、C R I S P R - S H E R L O C Kなどと組み合わせ、アトモル感度での検出及び診断を達成することができる。そのような実施形態は、例えば、ウイルス検出、細菌株分類、高感度遺伝子型解析、及び疾患関連無細胞DNAの検出をはじめとする、ヒトの健康に関する複数の場面で有用である。

【選択図】図1

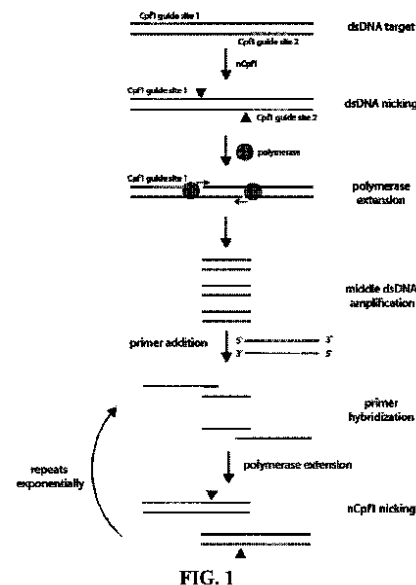


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的二本鎖核酸を増幅及び／または検出する方法であって、以下：

a．前記標的二本鎖核酸を含む試料を、増幅反応混合物と混合すること、前記増幅反応混合物は、以下：

i．増幅 C R I S P R 系、前記増幅 C R I S P R 系は、第一 C R I S P R / C a s 複合体及び第二 C R I S P R / C a s 複合体を含み、前記第一 C R I S P R / C a s 複合体は、第一 C a s 系ニッカーゼと、前記第一 C R I S P R / C a s 複合体を第一標的核酸位置に誘導する第一ガイド分子とを含み、前記第二 C R I S P R / C a s 複合体は、第二 C a s 系ニッカーゼと、前記第二 C R I S P R / C a s 複合体を第二標的核酸位置に誘導する第二ガイド分子とを含む；ならびに

i i．ポリメラーゼ、を含む；

b．前記標的核酸を増幅すること；

c．前記反応混合物に、第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対を加えること、前記第一プライマーは、第一位置と相補的な部分を含み、前記第二プライマーは、第二位置と相補的な部分及び前記第二ガイド分子の結合部分を含む部分を含み；ならびに

d．等温条件下で延長及びニッキングを繰り返すことにより、さらに、前記標的核酸を増幅すること

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記第一ガイド分子は、前記第一 C R I S P R / C a s 複合体を前記標的核酸の第一鎖に誘導し、及び前記第二ガイド分子は、前記第二 C R I S P R / C a s 複合体を前記標的核酸の第二鎖に誘導する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第一標的核酸位置及び前記第二標的核酸位置は、前記標的核酸の第一鎖にあり、それにより、前記第一標的核酸位置と前記第二標的核酸位置の間にある前記標的核酸の前記第一鎖の配列を含む s s D N A を生成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第一 C R I S P R / C a s 複合体及び前記第二 C R I S P R / C a s 複合体を用いて前記標的核酸の前記第一鎖及び前記第二鎖をニッキングし、ならびに前記ポリメラーゼを用いて前記ニッキングされた鎖を置換及び延長し、それにより第一及び第二ニッキング部位間の標的核酸配列を含む二重鎖を生成させることにより前記標的核酸を増幅することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 C a s 系ニッカーゼは、C a s 9 ニッカーゼ、C p f 1 ニッカーゼ、及び C 2 c 1 ニッカーゼからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 C a s 系ニッカーゼは、H N H ドメインに変異を有する C a s 9 ニッカーゼタンパク質である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 C a s 系ニッカーゼは、S p C a s 9 の N 8 6 3 A または S a C a s 9 の N 5 8 0 A に相当する変異を有する C a s 9 ニッカーゼタンパク質である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 C a s 系ニッカーゼは、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s、S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s、S . m u t a n s、S . a g a l a c t i a e、S . e q u i s i m i l i s、S . s a n g u i n i s、S . p n e u m o n i a；C . j e j u n i、C . c o l i；N . s a l s u g i n i s、N . t e r g a r c u s；S . a u r i c u l a r i s、S . c a r n o s u s；N . m e n i n g i t i d e s、N

10

20

30

40

50

. gonorrhoeae; L. monocytogenes、L. ivanovii; C. botulinum、C. difficile、C. tetani、C. sordellii、Francisella tularensis 1、Prevotella albensis、Lachnospiraceae科菌MC2017 1、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacteria属菌GW2011__GWA2__33__10、Parcubacteria属菌GW2011__GWC2__44__17、Smithella種SCADC、Acidaminococcus種BV3L6、Lachnospiraceae科菌MA2020、Candidatus Methanoplasma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi 237 10、Leptospira inadai、Lachnospiraceae科菌ND2006、Porphyromonas crevioricanis 3、Prevotella disiens、及びPorphyromonas macacaeからなる群より選択される細菌種に由来するCas9タンパク質である、請求項3または4に記載の方法。

【請求項9】

前記Cas系ニッカーゼは、Nucドメインに変異を有するCpf1ニッカーゼタンパク質である、請求項2に記載の方法。

【請求項10】

前記Cas系ニッカーゼは、Ascpf1のR1226Aに相当する変異を有するCpf1ニッカーゼタンパク質である、請求項6に記載の方法。 20

【請求項11】

前記Cas系ニッカーゼは、Francisella tularensis、Prevotella albensis、Lachnospiraceae科菌、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacteria属菌、Parcubacteria属菌、Smithella種、Acidaminococcus種、Lachnospiraceae科菌、Candidatus Methanoplasma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi、Leptospira inadai、Porphyromonas crevioricanis、Prevotella disiens 30 及びPorphyromonas macacae、Succinivibrio dextrinosolvens、Prevotella disiens、Flavobacterium branchiophilum、Helcococcus kunzii、Eubacterium種、Microgenomates (Roizmanbacteria)群菌、Flavobacterium種、Prevotella brevis、Moraxella caprae、Bacteroidetes oral、Porphyromonas cansulci、Synergistes jonesii、Prevotella bryantii、Anaerovibrio種、Butyrivibrio fibrisolvens、Candidatus Methanomethylophilus、Butyrivibrio種、Oribacterium種、Pseudobutyrvibrio ruminis、ならびにProteocatella sphenisciからなる群より選択される細菌種に由来するCpf1タンパク質である、請求項6または7に記載の方法。 40

【請求項12】

前記Cas系ニッカーゼは、Nucドメインに変異を有するC2c1ニッカーゼタンパク質である、請求項2に記載の方法。

【請求項13】

前記Cas系ニッカーゼは、AacC2c1のD570A、E848A、またはD977Aに相当する変異を有するC2c1ニッカーゼタンパク質である、請求項9に記載の方法。 50

【請求項 14】

前記 Cas 系ニッカーゼは、*Alicyclobacillus acidoterrestris*、*Alicyclobacillus contaminans*、*Alicyclobacillus macrosporangiidus*、*Bacillus hisashii*、*Candidatus Lindowbacteria*、*Desulfovibrio inopinatus*、*Desulfonatronum thiodismutans*、*Elusimicrobia* 門菌 RIF OXYA12、*Omniitrophica* WOR__2 細菌 RIF C S P H I G H O2、*Opitutaceae* 科菌 TAV5、*Phycisphaerae* 綱菌 ST-NAGAB-D1、*Planctomycetes* 門菌 RBG__13__46__10、*Spirochaetes* 門菌 GWB1__27__13、*Verrucomicrobiaceae* 科菌 UBA2429、*Tuberculosis calidus*、*Bacillus thermoamylovorans*、*Brevibacillus* 種 CF112、*Bacillus* 種 NSP2.1、*Desulfatirhabdium butyrativorans*、*Alicyclobacillus herbarius*、*Citrobacter freundii*、*Brevibacillus agri* (例えば、BAB-2500)、及び *Methylobacterium nodulans* からなる群より選択される細菌種に由来する C2c1 タンパク質である、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第一 Cas 系ニッカーゼと前記第二 Cas 系ニッカーゼは、同一である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記第一 Cas 系ニッカーゼと前記第二 Cas 系ニッカーゼは、異なっている、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記ポリメラーゼは、Bst 2.0 DNAポリメラーゼ、Bst 2.0 WarmStart DNAポリメラーゼ、Bst 3.0 DNAポリメラーゼ、全長Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bsu DNAポリメラーゼ、phi29 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Gstポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、E.coli DNAポリメラーゼIのクレノー断片、KlenTaq、Pol III DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、Gstポリメラーゼ、及びシーケナーゼDNAポリメラーゼからなる群より選択される、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記標的核酸の増幅は、約 50 ~ 59 で行われる、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記標的核酸の増幅は、約 60 ~ 72 で行われる、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記標的核酸の増幅は、約 37 でまたは約 65 で行われる、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記標的核酸の増幅は、一定温度で行われる、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記標的核酸配列は、長さが、約 20 ~ 30、約 30 ~ 40、約 40 ~ 50、または約 50 ~ 100 ヌクレオチドである、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記標的核酸配列は、長さが、約 100 ~ 200、約 100 ~ 500、または約 100

～ 1 0 0 0 ヌクレオチドである、請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記標的核酸配列は、長さが、約 1 0 0 0 ～ 2 0 0 0、約 2 0 0 0 ～ 3 0 0 0、約 3 0 0 0 ～ 4 0 0 0、または約 4 0 0 0 ～ 5 0 0 0 ヌクレオチドである、請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記第一プライマーまたは前記第二プライマーは、RNAポリメラーゼプロモーターを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

さらに、前記増幅された核酸を、ゲル電気泳動、挿入色素検出、PCR、リアルタイムPCR、蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、質量分析、及びCRISPR-SHERLOCKからなる群より選択される方法により検出することを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

前記増幅された核酸は、Cas13に基づくCRISPR-SHERLOCK法により検出される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記標的核酸は、アトモル感度で検出される、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記標的核酸は、フェムトモル感度で検出される、請求項 1 から 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 3 0】

前記標的核酸は、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、プラスミドDNA、及び合成二本鎖DNAからなる群より選択される、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記試料は、生体試料または環境試料である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

生体試料は、血液、血漿、血清、尿、糞便、痰、粘液、リンパ液、滑液、胆汁、腹水、胸水、漿液腫、唾液、脳脊髄液、眼房水もしくは硝子体液、または任意の体分泌、漏出液、滲出液、または関節から得られる液体、あるいは皮膚または粘膜表面のスワブである、請求項 2 8 に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

前記試料は、ヒト患者から得られた血液、血漿、または血清である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記試料は、植物試料である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記試料は、未精製試料である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 3 6】

前記試料は、精製試料である、請求項 1 から 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

標的一本鎖核酸を増幅及び/または検出する方法であって、以下：

(a) 試料中の前記一本鎖核酸を標的二本鎖核酸に変換すること；及び

(b) 請求項 1 に記載の工程を行うこと、

を含む、前記方法。

【請求項 3 8】

標的一本鎖核酸は、RNA分子である、請求項 3 4 に記載の方法。

50

【請求項 39】

RNA 分子は、逆転写及び増幅工程により、前記二本鎖核酸に変換される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 40】

標的一本鎖核酸は、一本鎖ウイルス DNA、ウイルス RNA、メッセンジャー RNA、リボソーム RNA、転移 RNA、マイクロ RNA、低分子干渉 RNA、核内低分子 RNA、合成 RNA、及び合成一本鎖 DNA からなる群より選択される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 41】

試料中の標的二本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのシステムであって、以下：
e) 増幅 CRISPR 系、前記増幅 CRISPR 系は、第一 CRISPR / Cas 複合体及び第二 CRISPR / Cas 複合体を含み、前記第一 CRISPR / Cas 複合体は、第一 Cas 系ニッカースと、前記第一 CRISPR / Cas 複合体を標的核酸の第一鎖に誘導する第一ガイド分子とを含み、及び前記第二 CRISPR / Cas 複合体は、第二 Cas 系ニッカースと、前記第二 CRISPR / Cas 複合体を前記標的核酸の第二鎖に誘導する第二ガイド分子とを含む；

f) ポリメラーゼ；

g) 反応混合物に対する第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対、前記第一プライマーは、前記標的核酸の前記第一鎖と相補的な部分及び前記第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含み、及び前記第二プライマーは、前記標的核酸の前記第二鎖と相補的な部分及び前記第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む；ならびに任意選択で

h) 前記標的核酸を増幅を検出する検出システム、を含む、前記システム。

【請求項 42】

前記 Cas 系ニッカースは、Cas9 ニッカース、Cpf1 ニッカース、及び C2c1 ニッカースからなる群より選択される、請求項 38 に記載のシステム。

【請求項 43】

前記ポリメラーゼは、Bst 2.0 DNA ポリメラーゼ、Bst 2.0 WarmStart DNA ポリメラーゼ、Bst 3.0 DNA ポリメラーゼ、全長 Bst DNA ポリメラーゼ、巨大断片 Bst DNA ポリメラーゼ、巨大断片 Bsu DNA ポリメラーゼ、phi29 DNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ、及びシーケナーゼ DNA ポリメラーゼからなる群より選択される、請求項 38 または 39 に記載のシステム。

【請求項 44】

前記 Cas 系ニッカース及び前記ポリメラーゼは、同一温度で機能する、請求項 38 から 40 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 45】

試料中の標的一本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのシステムであって、以下：

a) 前記標的一本鎖核酸を二本鎖核酸に変換する試薬、

b) 請求項 38 に記載の構成要素、

を含む、前記システム。

【請求項 46】

試料中の標的二本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのキットであって、請求項 38 に記載の構成要素及び取扱説明書のセットを含む、前記キット。

【請求項 47】

さらに、前記試料中の前記二本鎖核酸を精製する試薬を含む、請求項 43 に記載のキット。

【請求項 48】

試料中の標的一本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのキットであって、請求項 43 に記載の構成要素及び取扱説明書のセットを含む、前記キット。

【請求項 49】

さらに前記試料中の一本鎖核酸を精製する試薬を含む、請求項 4 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年11月14日出願の米国仮出願第62/767,059号及び2018年6月26日出願の米国仮出願第62/690,278号の優先権を主張する。上記特定される出願の全内容は、本明細書によりそのまま全体が本明細書中参照として援用される。

10

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する記述

本発明は、認可番号MH100706、MH110049、及びHL141201の下、国立衛生研究所により付与された政府支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0002】

技術分野

本明細書中開示される発明の対象は、概して、CRISPRエフェクター系の使用と関連した、核酸増幅の方法、システム、及び迅速な診断方法に関する。

【背景技術】

【0003】

20

核酸は、生体情報の普遍的符号である。携帯型プラットフォームで、高感度かつ単一塩基特異性を持って核酸を迅速に検出できることは、多くの疾患の診断及びモニタリングに変革をもたらし、価値ある疫学的情報を提供し、一般化可能な科学ツールとして役立つ可能性がある。核酸検出の方法は数多く開発されてきたものの(Du et al., 2017; Green et al., 2014; Kumar et al., 2014; Pardue et al., 2014; Pardue et al., 2016; Urdea et al., 2006)、それらは、感度、特異性、簡潔さ、及び速さの間で不可避のトレードオフを被っている。例えば、qPCRアプローチは、高感度であるものの、高価な上に複雑な装置に依存しており、そのため実験室での高度に訓練されたオペレーターによる利用に限られている。核酸診断が様々な医療用途に適していることがますます明らかであることから、低費用で高特異性かつ高感度を提供する検出技術は、臨床及び基礎研究の場の両方で非常に有用であると思われる。

30

【0004】

多くの核酸増幅アプローチは、様々な検出プラットフォームで利用可能である。その中でも、等温核酸増幅法は、極端な温度循環及び複雑な設備を用いない増幅のために開発されてきた。そのような方法として、核酸配列に基づく増幅法(nucleic-acid sequenced-based amplification、NASBA)、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法(RPA)、ループ介在等温増幅法(LAMP)、鎖置換増幅法(SDA)、ヘリカーゼ依存増幅法(HDA)、またはニック酵素増幅反応(NEAR)が挙げられる。しかしながら、これらの等温増幅アプローチは、依然として、最初の変性工程及び複数のプライマーセットを必要とする可能性がある。そのうえさらに、等温核酸増幅を携帯型プラットフォームと組み合わせた新規アプローチ(Du et al., 2017; Pardue et al., 2016)は、ポイントオブケア(POC)の場で高い検出感度を提供するものの、感度が低いために幾分用途が制限される。

40

【発明の概要】

【0005】

本開示は、概して、ニッカーゼに基づく核酸増幅及び検出の方法に関する。

【0006】

ある特定の例示の実施形態において、本発明は、標的二本鎖核酸を増幅及び/または検出する方法を提供し、本方法は、以下を含む：(a)標的二本鎖核酸を含む試料を、増幅

50

反応混合物と混合すること、増幅反応混合物は、以下：(i) 増幅CRISPR系、増幅CRISPR系は、第一CRISPR/Cas複合体及び第二CRISPR/Cas複合体を含み、第一CRISPR/Cas複合体は、第一Cas系ニッカーゼと、第一CRISPR/Cas複合体を標的核酸の第一位置に誘導する第一ガイド分子とを含み、第二CRISPR/Cas複合体は、第二Cas系ニッカーゼと、第二CRISPR/Cas複合体を標的核酸の第二位置に誘導する第二ガイド分子とを含み；ならびに(ii) ポリメラーゼを含む；(b) 標的核酸を増幅すること；(c) 反応混合物に、第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対を加えること、第一プライマーは、標的核酸の第一位置と相補的な部分及び第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含み、第二プライマーは、標的核酸の第二位置と相補的な部分及び第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む；ならびに(d) 等温条件下で延長及びニッキングを繰り返すことにより、さらに標的核酸を増幅すること。

10

【0007】

複数の実施形態において、第一位置及び第二位置は、標的核酸の同一鎖にある。他の実施形態において、第一位置は、二本鎖標的核酸の第一鎖に、及び第二位置は第二鎖にある。第一位置が標的核酸の第一鎖に、及び第二位置が第二鎖にある応用において、増幅は、第一CRISPR/Cas複合体及び第二CRISPR/Cas複合体を用いて標的核酸の第一鎖及び第二鎖をニッキングすること、及びニッキングされた鎖を、ポリメラーゼを用いて置換及び延長することを含み、それにより、第一ニッキング部位と第二ニッキング部位との間の標的核酸配列を有する二重鎖を生成させることができる。

20

【0008】

ある特定の実施形態において、Cas系ニッカーゼは、Cas9ニッカーゼ、Cpf1ニッカーゼ、及びC2c1ニッカーゼからなる群より選択することができる。

【0009】

ある実施形態において、Cas系ニッカーゼは、HNHドメインに変異を有するCas9ニッカーゼタンパク質である。別の実施形態において、Cas系ニッカーゼは、SpCas9のN863AまたはSaCas9のN580Aに相当する変異を有するCas9ニッカーゼタンパク質である。Cas系ニッカーゼは、*Streptococcus pyogenes*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus thermophilus*、*S. mutans*、*S. agalactiae*、*S. equisimilis*、*S. sanguinis*、*S. pneumoniae*；*C. jejuni*、*C. coli*；*N. salmuginis*、*N. tergarctus*；*S. auricularis*、*S. carnosus*；*N. meningitidis*、*N. gonorrhoeae*；*L. monocytogenes*、*L. ivanovii*；*C. botulinum*、*C. difficile*、*C. tetani*、*C. sordellii*、*Francisella tularensis* 1、*Prevotella albensis*、*Lachnospiraceae*科菌MC2017 1、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Peregrinibacteria*属菌GW2011__GWA2__33__10、*Parcubacteria*属菌GW2011__GWC2__44__17、*Smithella*種SCADC、*Acidaminococcus*種BV3L6、*Lachnospiraceae*科菌MA2020、*Candidatus Methanoplasma termitum*、*Eubacterium eligens*、*Moraxella bovovoculi* 237、*Leptospira inadai*、*Lachnospiraceae*科菌ND2006、*Porphyromonas crevioricanis* 3、*Prevotella disiens*、及び*Porphyromonas macacae*からなる群より選択される細菌種に由来するCas9タンパク質であることが可能である。

30

40

【0010】

ある実施形態において、Cas系ニッカーゼは、Nucドメインに変異を有するCpf

50

1 ニッカーゼタンパク質である。別の実施形態において、Cas系ニッカーゼは、AsCpf1のR1226Aに相当する変異を有するCpf1ニッカーゼタンパク質である。Cas系ニッカーゼは、Francisella tularensis、Prevotella albensis、Lachnospiraceae科菌、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacteria属菌、Parcubacteria属菌、Smithella種、Acidaminococcus種、Lachnospiraceae科菌、Candidatus Methanoplasma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi、Leptospira inadai、Porphyromonas crevioricanis、Prevotella disiens及びPorphyromonas macacae、Succinivibrio dextrinosolvens、Prevotella disiens、Flavobacterium branchiophilum、Helcococcus kunzii、Eubacterium種、Microgenomates (Roizmanbacteria)群菌、Flavobacterium種、Prevotella brevis、Moraxella caprae、Bacteroidetes oral、Porphyromonas cansulci、Synergistes jonesii、Prevotella bryantii、Anaerovibrio種、Butyrivibrio fibrisolvens、Candidatus Methanomethylophilus、Butyrivibrio種、Oribacterium種、Pseudobutyrvibrio ruminis、ならびにProteocatella sphenisciからなる群より選択される細菌種に由来するCpf1タンパク質であることが可能である。

【0011】

ある実施形態において、Cas系ニッカーゼは、Nucドメインに変異を有するC2c1ニッカーゼタンパク質である。別の実施形態において、Cas系ニッカーゼは、AacC2c1のD570A、E848A、またはD977Aに相当する変異を有するC2c1ニッカーゼタンパク質である。Cas系ニッカーゼは、Alicyclobacillus acidoterrestris、Alicyclobacillus contaminans、Alicyclobacillus macrosporangiidus、Bacillus hisashii、Candidatus Lindowbacteria、Desulfovibrio inopinatus、Desulfonatronum thiodismutans、Elusimicrobia門菌RIFOXYA12、Omnitrophica WOR__2細菌RIFCSPHIGHO2、Opitutaceae科菌TAV5、Phycisphaerae綱菌ST-NAGAB-D1、Planctomycetes門菌RBG__13__46__10、Spirochaetes門菌GWB1__27__13、Verrucomicrobiaceae科菌UBA2429、Tuberibacillus calidus、Bacillus thermoamylovorans、Brevibacillus種CF112、Bacillus種NSP2.1、Desulfatirhabdium butyrativorans、Alicyclobacillus herbarius、Citrobacter freundii、Brevibacillus agri(例えば、BAB-2500)、及びMethylobacterium nodulansからなる群より選択される細菌種に由来するC2c1タンパク質であることが可能である。

【0012】

ある実施形態において、第一Cas系ニッカーゼと第二Cas系ニッカーゼは、同一である。別の実施形態において、第一Cas系ニッカーゼと第二Cas系ニッカーゼは、異なっている。

【0013】

DNAポリメラーゼは、5'→3'エキソヌクラーゼ活性を欠いたポリメラーゼの群

10

20

30

40

50

から選択される場合があり、これらのポリメラーゼは、さらに、任意選択で3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠いている場合がある。適切なDNAポリメラーゼの例として、E. coli DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠失クレノー断片(New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.))、エキソヌクレアーゼ欠失T7 DNAポリメラーゼ(シーケナーゼ; USB, (Cleveland, Ohio))、E. coli DNAポリメラーゼIのクレノー断片(New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.))、Bst DNAポリメラーゼの巨大断片(New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.))、KlenTaq DNAポリメラーゼ(AB Peptides, (St Louis, Mo.))、T5 DNAポリメラーゼ(米国特許第5,716,819号)、及びPol III DNAポリメラーゼ(米国特許第6,555,349号)が挙げられる。鎖置換活性を保持するDNAポリメラーゼ、例えば、E. coli DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠失クレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ巨大断片、及びシーケナーゼは、ヘリカーゼ依存増幅に好適である。T7ポリメラーゼは、誤り率が 3.5×10^{-5} という高度に忠実なポリメラーゼであり、この誤り率はTaqポリメラーゼより著しく低い(Keohavong and Thilly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9253-9257 (1989))。しかしながら、T7ポリメラーゼは、耐熱性がなく、したがって、昇温サイクルを必要とする増幅システムで使用するのに最適なものではない。等温で行うことが可能であるHDAでは、T7シーケナーゼは、DNAの増幅に好適なポリメラーゼの1種である。

10

20

【0014】

特定の実施形態において、ポリメラーゼは、Bst 2.0 DNAポリメラーゼ、Bst 2.0 WarmStart DNAポリメラーゼ、Bst 3.0 DNAポリメラーゼ、全長Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bsu DNAポリメラーゼ、phi29 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、及びシーケナーゼDNAポリメラーゼからなる群より選択される場合がある。

【0015】

ある特定の実施形態において、ポリメラーゼは、Bst 2.0 DNAポリメラーゼ、Bst 2.0 WarmStart DNAポリメラーゼ、Bst 3.0 DNAポリメラーゼ、全長Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bsu DNAポリメラーゼ、phi29 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Gstポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼIのクレノー断片、KlenTaq、Pol III DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、及びシーケナーゼDNAポリメラーゼからなる群より選択される。標的核酸の増幅は、約50 ~ 59、約60 ~ 72、または約37で行うことができる。ある特定の実施形態において、標的核酸の増幅は、一定温度で行われる。ある特定の実施形態において、標的核酸の増幅は、ある範囲内の温度で行われる。

30

40

【0016】

ある特定の実施形態において、標的核酸配列は、長さが、約20 ~ 30、約30 ~ 40、約40 ~ 50、または約50 ~ 100ヌクレオチドであることが可能である。ある特定の実施形態において、標的核酸配列は、長さが、約100 ~ 200、約100 ~ 500、または約100 ~ 1000ヌクレオチドであることが可能である。他の実施形態において、標的核酸配列は、長さが、約1000 ~ 2000、約2000 ~ 3000、約3000 ~ 4000、または約4000 ~ 5000ヌクレオチドであることが可能である。

【0017】

さらなる実施形態において、第一プライマーまたは第二プライマーは、さらに、RNAポリメラーゼプロモーターを含む。

【0018】

50

ある特定の実施形態において、本方法は、さらに、増幅された核酸を、ゲル電気泳動、挿入色素検出、PCR、リアルタイムPCR、蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、質量分析、ラテラルフローアッセイ、比色アッセイ(HRP、ALP、金ナノ粒子に基づくアッセイ)、及びCRISPR-SHERLOCKからなる群より選択される方法により検出することを含む。CRISPR-SHERLOCK法は、Cas13に基づくCRISPR-SHERLOCK法が可能である。標的核酸は、アトモル感度、またはフェムトモル感度で検出することができる。

【0019】

ある特定の実施形態において、標的核酸は、DNAまたはRNAが可能である。DNAは、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、プラスミドDNA、循環無細胞DNA、環境DNA、及び合成二本鎖DNAからなる群より選択することができる。ある特定の実施形態において、標的核酸は、二本鎖核酸または一本鎖核酸が可能である。標的核酸が一本鎖である場合、そのような一本鎖核酸として、一本鎖ウイルスDNA、ウイルスRNA、メッセンジャーRNA、リボソームRNA、転移RNA、マイクロRNA、低分子干渉RNA、核内低分子RNA、合成RNA、または合成一本鎖DNAをあげることができるが、必ずしもこれらに限定されない。

10

【0020】

ある実施形態において、試料は、生体試料または環境試料である。生体試料は、血液、血漿、血清、尿、糞便、痰、粘液、リンパ液、滑液、胆汁、腹水、胸水、漿液腫、唾液、脳脊髄液、眼房水もしくは硝子体液、または任意の体分泌、漏出液、滲出液、または関節から得られる液体、あるいは皮膚または粘膜表面のスワブである。ある特定の実施形態において、試料は、ヒト患者から得られた血液、血漿、または血清である。別の実施形態において、試料は、植物試料である。さらなる実施形態において、試料は、未精製試料または精製試料が可能である。

20

【0021】

別の態様において、本開示は、標的一本鎖核酸を増幅及び/または検出する方法を提供し、本方法は、以下を含む：(a)試料中の一本鎖核酸を標的二本鎖核酸に変換すること；及び(b)先に記載された方法の工程を行うこと。標的一本鎖核酸は、RNA分子が可能である。RNA分子は、逆転写及び増幅工程により、二本鎖核酸へと変換することができる。標的一本鎖核酸は、一本鎖ウイルスDNA、ウイルスRNA、メッセンジャーRNA、リボソームRNA、転移RNA、マイクロRNA、低分子干渉RNA、核内低分子RNA、合成RNA、長鎖非翻訳RNA、プレマイクロRNA、dsRNA、及び合成一本鎖DNAからなる群より選択することができる。

30

【0022】

別の態様において、本開示は、試料中の標的二本鎖核酸を増幅及び/または検出するシステムを提供し、本システムは、以下を含む：(a)増幅CRISPR系、増幅CRISPR系は、第一CRISPR/Cas複合体及び第二CRISPR/Cas複合体を含み、第一CRISPR/Cas複合体は、第一Cas系ニッカーゼと、第一CRISPR/Cas複合体を標的核酸の第一鎖に誘導する第一ガイド分子とを含み、第二CRISPR/Cas複合体は、第二Cas系ニッカーゼと、第二CRISPR/Cas複合体を標的核酸の第二鎖に誘導する第二ガイド分子とを含む；(b)ポリメラーゼ；(c)反応混合物に対する第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対、第一プライマーは、標的核酸の第一鎖と相補的な部分及び第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含み、第二プライマーは、標的核酸の第二鎖と相補的な部分及び第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む；ならびに任意選択で、(d)標的核酸の増幅を検出する検出システム。Cas系ニッカーゼは、Cas9ニッカーゼ、Cpf1ニッカーゼ、C2c1ニッカーゼ、Cas13aニッカーゼ、Cas13bニッカーゼ、Cas13cニッカーゼ、及びCas13dニッカーゼからなる群より選択することができる。ポリメラーゼは、Bst 2.0 DNAポリメラーゼ、Bst 2.0 WarmStart DNAポリメラーゼ、Bst 3.0 DNAポリメラーゼ、全長Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bst

40

50

DNAポリメラーゼ、巨大断片Bsu DNAポリメラーゼ、phi29 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Gstポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、E.coli DNAポリメラーゼIのクレノー断片、KlenTaq、Pol III DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、及びシーケナーゼDNAポリメラーゼからなる群より選択することができる。ある特定の実施形態において、Cas系ニッカーゼとポリメラーゼは、同一温度で機能する。ある特定の実施形態において、Cas系ニッカーゼとポリメラーゼは、異なる温度で機能する。

【0023】

鎖置換活性を保持するDNAポリメラーゼ、例えば、E.coli DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠失クレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ巨大断片、及びシーケナーゼは、ヘリカーゼ依存増幅に好適である。T7ポリメラーゼは、誤り率が 3.5×10^{-5} という高度に忠実なポリメラーゼであり、この誤り率はTaqポリメラーゼより著しく低いので、等温で行われる場合には使用可能である。(Keohavong and Thilly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9253-9257 (1989))。

10

【0024】

さらに別の態様において、本開示は、試料中の標的一本鎖核酸を増幅及び/または検出するシステムを提供し、本システムは、以下を含む：(a)標的一本鎖核酸を二本鎖核酸に変換する試薬；及び(b)標的二本鎖核酸を増幅及び/または検出する上記のシステムの構成要素。

20

【0025】

別の態様において、本開示は、試料中の標的二本鎖核酸を増幅及び/または検出するためのキットを提供し、本キットは、標的二本鎖核酸を増幅及び/または検出する上記のシステムの構成要素、及び使用説明書のセットを含む。本キットは、さらに、試料中の二本鎖核酸を精製する試薬も含むことができる。

【0026】

別の態様において、本開示は、試料中の標的一本鎖核酸を増幅及び/または検出するためのキットを提供し、本キットは、標的一本鎖核酸を増幅及び/または検出する上記のシステムの構成要素、及び使用説明書のセットを含む。本キットは、さらに、試料中の一本鎖核酸を精製する試薬も含むことができる。

30

【0027】

例示の実施形態のこれら及び他の態様、目的、特長、及び利点は、図解される例示の実施形態についての以下の詳細な説明を考慮することで当業者に明らかとなるだろう。

【0028】

本発明の原理が利用されている場合がある例示の実施形態について説明する以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することにより、本発明の特長及び利点が理解されるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】ある特定の例示の実施形態に従うプログラム可能なニッカーゼに基づく増幅の概略図である。

40

【0030】

【図2】ニッカーゼ酵素増幅反応の最適化を実証するゲル電気泳動像である。赤色矢印は、標的増幅バンドを示す。

【0031】

【図3A】Nt.A1w1制限酵素を20nMの標的とともに用いたニッカーゼに基づく直線増幅を示すグラフである。

【図3B】T7ミスマッチ化Cpf1を20nMの標的とともに用いたニッカーゼに基づく直線増幅を示すグラフである。

【図3C】マッチするCpf1を20nMの標的とともに用いたニッカーゼに基づく直線

50

増幅を示すグラフである。

【図 3 D】N t . A 1 w 1 制限酵素を 2 0 f M の標的とともに用いたニッカーゼに基づく直線増幅を示すグラフである。

【図 3 E】T 7 ミスマッチ化 C p f 1 を 2 0 f M の標的とともに用いたニッカーゼに基づく直線増幅を示すグラフである。

【図 3 F】マッチする C p f 1 を 2 0 f M の標的とともに用いたニッカーゼに基づく直線増幅を示すグラフである。

【 0 0 3 2 】

【図 4 A】N t . A 1 w 1 増幅及び S Y T O 挿入色素を用いた検出を示すグラフである。

【図 4 B】T 7 ミスマッチ化 C p f 1 増幅及び S Y T O 挿入色素を用いた検出を示すグラフである。

【図 4 C】マッチする C p f 1 増幅及び S Y T O 挿入色素を用いた検出を示すグラフである。

【図 4 D】N t . A 1 w 1 増幅及びゲルに基づく読み出しを用いた検出を示すグラフである。

【図 4 E】T 7 ミスマッチ化 C p f 1 増幅及びゲルに基づく読み出しを用いた検出を示すグラフである。

【図 4 F】マッチする C p f 1 増幅及びゲルに基づく読み出しを用いた検出を示すグラフである。

【図 4 G】N t . A 1 w 1 増幅及び C R I S P R - S H E R L O C K を用いた検出を示すグラフである。

【図 4 H】T 7 ミスマッチ化 C p f 1 増幅及び C R I S P R - S H E R L O C K を用いた検出を示すグラフである。

【図 4 I】マッチする C p f 1 増幅及び C R I S P R - S H E R L O C K を用いた検出を示すグラフである。

【 0 0 3 3 】

【図 5】ニッカーゼに基づく増幅を S Y T O または C R I S P R - S H E R L O C K 検出のいずれかと組み合わせた結果を、標的あり / 標的なしの比でプロットして示すグラフである。

【 0 0 3 4 】

【図 6 A】N E A R 増幅単独で標的濃度を変化させた結果を示すグラフである。

【図 6 B】N E A R 増幅を C R I S P R - S H E R L O C K 検出と組み合わせて標的濃度を変化させた結果を示すグラフである。

【 0 0 3 5 】

【図 7 A】N E A R 増幅を、6 0 で、B s t 2 . 0 w a r m s t a r t ポリメラーゼを用いて行った結果を示すゲル電気泳動像である。

【図 7 B】図 1 1 9 A の定量化を示すグラフである。

【図 7 C】N E A R を C R I S P R - S H E R L O C K と組み合わせて、6 0 で、B s t 2 . 0 w a r m s t a r t ポリメラーゼを用いて行った結果を示すグラフである。

【 0 0 3 6 】

【図 8 A】N E A R 増幅を 3 7 で、シーケナーゼ 2 . 0 を用いて行ったときの 1 6 分の時点での結果を示すグラフである。

【図 8 B】N E A R 増幅を 3 7 で、シーケナーゼ 2 . 0 を用いて行ったときの終点での結果を示すグラフである。

【 0 0 3 7 】

【図 9】C R I S P R - N E A R と S H E R L O C K 検出の組み合わせの概略である。

【 0 0 3 8 】

本明細書中の図面は、例示のみを目的し、必ずしも縮尺どおりには描かれていない。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

一般的な定義

特に定義されない限り、本明細書中使用される技術用語及び科学用語は、本開示が関係する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学の一般的な用語と技術の定義は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989) (Sambrook, Fritsch, and Maniatis); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition (2012) (Green and Sambrook); Current Protocols in Molecular Biology (1987) (F.M. Ausubel et al. eds.); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (1995) (M.J. MacPherson, B.D. Hames, and G.R. Taylor eds.): Antibodies, A Laboratory Manual (1988) (Harlow and Lane, eds.): Antibodies A Laboratory Manual, 2nd edition 2013 (E.A. Greenfield ed.); Animal Cell Culture (1987) (R.I. Freshney, ed.); Benjamin Lewin, Genes IX, 出版元 Jones and Bartlet, 2008 (ISBN 0763752223); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, 出版元 Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 出版元 VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 9780471185710); Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992); 及び Marten H. Hofker and Jan van Deursen, Transgenic Mouse Methods and Protocols, 2nd edition (2011) で見ることができる。

【0040】

本明細書中使用される場合、単数形「a (不定冠詞)」、「an (不定冠詞)」、及び「the (定冠詞)」は、文脈がそうではないと明確に指示しない限り、単数及び複数の指示対象の両方を含む。

【0041】

「任意選択の」または「任意選択で」という用語は、その後に記載される事象、状況、または置き換えが発生する場合と発生しない場合があること、ならびにその記載にはその事象または状況が発生する場合及び発生しない場合が含まれることを意味する。

【0042】

端点による数値範囲の列挙は、列挙された端点と同様に、それぞれの範囲内に含まれる全ての数及び分数を含む。

【0043】

「約」または「およそ」という用語は、本明細書中使用される場合、パラメーター、量、時間的持続期間などの測定可能な値を示す場合、その指定される値を基準にしたその値からの変動、例えば、指定される値を基準にしてその値から + / - 10 % 以下、+ / - 5

10

20

30

40

50

%以下、+/-1%以下、及び+/-0.1%以下の変動を包含することを意味するが、ただし、そのような変動は、開示される本発明で生じるのに適切である場合に限る。当然のことながら、修飾語「約」または「およそ」が指す値は、それ自体も具体的であり、かつ好ましくは開示されている。

【0044】

本明細書中使用される場合、「生体試料」は、全細胞及び/または生細胞及び/または細胞片を含有する場合がある。生体試料は、「体液」を含有する（またはそれに由来する）場合がある。本発明は、体液が、羊水、房水、硝子体液、胆汁、血清、母乳、脳脊髄液、耳垢（イヤークラックス）、乳糜、粥状液、内リンパ、外リンパ、滲出液、糞便、女性射出液、胃酸、胃液、リンパ、粘液（鼻漏及び痰を含む）、心膜液、腹水、胸水、膿、粘膜分泌物、唾液、皮脂（皮膚（skin oil））、精液、痰、滑液、汗、涙、尿、腔分泌物、吐瀉物、及びそれらの1種または複数の混合物から選択される実施形態を包含する。生体試料には、細胞培養物、体液、体液からの細胞培養物が含まれる。体液は、哺乳類生物から、例えば、穿刺により、または他の収集もしくは試料採取手技により、得ることができる。

10

【0045】

「対象」、「個体」、及び「患者」という用語は、本明細書中同義で使用され、脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトを示す。哺乳類として、マウス、サル、ヒト、家畜動物、スポーツ用動物、及びペットが挙げられるが、これらに限定されない。in vivoで得られたまたはin vitroで培養された生物学的実体の組織、細胞、及びそれらの子孫も、包含される。

20

【0046】

「C2c2」は、現在「Cas13a」と称されており、これらの用語は、特に記載がない限り、本明細書中同義で使用される。「グループ29」、「グループ30」、及びCas13bという用語は、本明細書中同義で使用される。「Cpf1」及び「Cas12a」という用語は、本明細書中同義で使用される。「C2c1」及び「Cas12b」という用語は、本明細書中同義で使用される。

【0047】

様々な実施形態について、本明細書中以下に記載する。なお、特定の実施形態は、網羅的な説明であること、または本明細書で考察するよりも広範な態様に対する制限であることを意図しない。特定の実施形態に関連して記載される1つの態様は、必ずしもその実施形態に限定されるものではなく、他の任意の実施形態（複数可）で実施され得る。本明細書全体を通じて「1つの実施形態」、「ある実施形態」、「例示の実施形態」への言及は、その実施形態に関連して記載される特定の長、構造、または特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれていることを意味する。したがって、本明細書全体を通じて様々な箇所で「1つの実施形態において」、「ある実施形態において」、「例示の実施形態」という語句が出現する場合、必ずしも全てが同一の実施形態を示しているわけではないが、そうである場合もあり得る。さらに、その特定の長、構造、または特性は、1つまたは複数の実施形態において、本開示から当業者に明らかであると思われるとおり、任意の適切な様式で組み合わせることができる。さらに、本明細書中記載されるある実施形態は、ある長を含むが他の実施形態に含まれる他の長を含まないものの、異なる実施形態の長の組み合わせは、本発明の範囲内にあることを意味する。例えば、添付の特許請求の範囲において、特許請求される実施形態のどれであっても、任意の組み合わせで使用可能である。

30

40

【0048】

本明細書中引用される全ての刊行物、公開特許文書、及び特許出願は、個々の刊行物、公開特許文書、または特許出願が参照により援用されると具体的かつ個別に示されるのと同じ程度に、本明細書により参照として援用される。

【0049】

概要

50

本明細書中開示される実施形態は、等温条件下、C R I S P R - C a s 系ニック酵素を利用した、標的核酸の増幅法を提供する。

【 0 0 5 0 】

別の態様において、本明細書中開示される実施形態は、試料中の標的二本鎖及び一本鎖核酸を増幅及び／または検出するシステムに関する。ある特定の実施形態において、本システムは、増幅C R I S P R系、ポリメラーゼ、プライマー対、及び任意選択で、標的核酸の増幅を検出する検出システムを含む。ある特定の例示の実施形態において、本システムは、さらに、標的一本鎖核酸を二本鎖核酸に変換する試薬を含むことができる。

【 0 0 5 1 】

さらに別の態様において、本明細書中開示される実施形態は、試料中の標的二本鎖または一本鎖核酸を増幅及び／または検出するキットに関する。ある特定の例示の実施形態において、本キットは、試料中の二本鎖または一本鎖核酸を精製する試薬、及び取扱説明書のセットを含むことができる。

10

【 0 0 5 2 】

増幅システム

試料中の標的二本鎖核酸を増幅するシステムが提供される。本システムは、増幅C R I S P R系、ポリメラーゼ、及びプライマー対を含む。複数の実施形態において、本システムは、任意選択で、検出システムを含むことができ、これにより標的核酸の検出が可能になる。

【 0 0 5 3 】

増幅C R I S P R系は、第一C R I S P R / C a s 複合体及び第二C R I S P R / C a s 複合体を含む。各C R I S P R / C a s 複合体は、C a s 系ニッカーゼと、標的分子に優先的に結合する、標的分子に特異的である、例えば、標的分子との結合に十分な相補性を有することでC R I S P R / C a s 複合体を標的核酸に誘導するガイド分子とを含む。増幅システムは、以下、ポリメラーゼ；反応混合物に対する第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対、第一プライマーは、第一標的位置と相補的な部分及び第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含み、第二プライマーは、第二標的核酸位置と相補的な部分及び第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む；ならびに任意選択で、標的核酸の増幅を検出する検出システムを含む。第一位置及び第二位置は、同一鎖にあることが可能であり、その場合、C a s 系ニッカーゼは、同一鎖をニッキングすると思われ、または第一位置及び第二位置は、2本の異なる鎖にあることが可能である。

20

30

【 0 0 5 4 】

C R I S P R 系

本明細書中提供されるC R I S P R系は、第一C R I S P R / C a s 複合体及び第二C R I S P R / C a s 複合体を含む。第一C R I S P R / C a s 複合体は、第一C a s 系ニッカーゼと、第一C R I S P R / C a s 複合体を標的核酸の第一位置に誘導する第一ガイド分子とを含み、第二C R I S P R / C a s 複合体は、第二C a s 系ニッカーゼと、第二C R I S P R / C a s 複合体を標的核酸の第二位置に誘導する第二ガイド分子とを含む。

【 0 0 5 5 】

1つの態様において、第一C R I S P R / C a s 複合体は、第一C a s 系ニッカーゼと、第一C R I S P R / C a s 複合体を標的核酸の第一鎖に誘導する第一ガイド分子とを含み、第二C R I S P R / C a s 複合体は、第二C a s 系ニッカーゼと、第二C R I S P R / C a s 複合体を標的核酸の第二鎖に誘導する第二ガイド分子とを含む。ある態様において、第一C R I S P R / C a s 複合体は、第一C a s 系ニッカーゼと、第一C R I S P R / C a s 複合体を標的核酸の第一鎖の第一位置に誘導する第一ガイド分子とを含み、第二C R I S P R / C a s 複合体は、第二C a s 系ニッカーゼと、第二C R I S P R / C a s 複合体を標的核酸の第一鎖の第二位置に誘導する第二ガイド分子とを含む。

40

【 0 0 5 6 】

一般に、C R I S P R - C a s またはC R I S P R系とは、本明細書中使用される場合、及びW O 2 0 1 4 / 0 9 3 6 2 2 (P C T / U S 2 0 1 3 / 0 7 4 6 6 7) などの前述

50

の文書で使用されているとおり、C R I S P R 関連 (「C a s」) 遺伝子の活性の発現または活性の誘導に關与する転写物及び他の配列要素を総称的に示し、これに含まれるものとして、C a s 遺伝子をコードする配列、t r a c r (トランス活性化C R I S P R) 配列 (例えば、t r a c r R N A または活性部分 t r a c r R N A)、t r a c r - m a t e 配列 (内因性C R I S P R 系の文脈において「直列反復」及び t r a c r R N A で処理された部分的な直列反復を含む)、ガイド配列 (内因性C R I S P R 系の文脈において「スパーサー」とも称する)、または本明細書で使用されるとおりの「R N A (複数可)」という用語 (例えば、C a s 9 などのC a s をガイドするR N A (複数可)、例えばC R I S P R R N A 及びトランス活性化 (t r a c r) R N A またはシングルガイドR N A (s g R N A) (キメラR N A))、またはC R I S P R 遺伝子座からの他の配列及び転写物が挙げられる。一般に、C R I S P R 系は、標的配列の部位でC R I S P R 複合体の形成を促進する配列要素 (内因性C R I S P R 系の文脈においてプロトスパーサーとも称する) を特徴とする。C R I S P R タンパク質がC p f 1 タンパク質である場合、t r a c r R N A は、必要ではない。

【0057】

本明細書中使用される場合、「C a s」という用語は、概して、C R I S P R / C a s 系または複合体の (修飾) エフェクタータンパク質を示し、C a s としては、特に制限なく、(修飾) C a s 9、(修飾) C a s 12 (例えば、C a s 12 a「C p f 1」、C a s 12 b「C 2 c 1」、C a s 12 c「C 2 c 3」)、(修飾) C a s 13 (例えば、C a s 13 a「C 2 c 2」、C a s 13 b「グループ29/30」、C a s 13 c、C a s 13 d) が可能である。「C a s」という用語は、本明細書中、特に明記されない限り、例えば、C a s 9 に具体的に限定される記述などでない限り、「C R I S P R」タンパク質、「C R I S P R / C a s タンパク質」、「C R I S P R エフェクター」、「C R I S P R / C a s エフェクター」、「C R I S P R 酵素」、「C R I S P R / C a s 酵素」などの用語と同義で使用される場合がある。当然のことながら、「C R I S P R タンパク質」という用語は、C R I S P R タンパク質が、野生型C R I S P R タンパク質に比べて、改変されている、例えば、酵素活性が上昇または低下 (またはなくなつて) いるなどに関係なく、「C R I S P R 酵素」と同義で使用される場合がある。同様に、本明細書中使用される場合、ある特定の実施形態において、適切でありかつ当業者に明らかである場合には、「ヌクレアーゼ」という用語は、特に明記されない限り、例えば、未修飾ヌクレアーゼに具体的に限定される記述などでない限り、修飾ヌクレアーゼを示す場合があり、その場合、触媒活性は、改変されている、例えば、ヌクレアーゼ活性が上昇または低下している、あるいはヌクレアーゼ活性をまったく持たず、ニッカーゼ活性についても同様であり、本明細書中いずれかの箇所で定義されるとおりのそれ以外の修飾ヌクレアーゼについても同様である。

【0058】

本発明によるある特定の実施形態において、C R I S P R - C a s タンパク質は、好ましくは、相当する野生型酵素を基準として、変異型C R I S P R - C a s タンパク質が標的配列を含む標的遺伝子座のD N A 鎖の一方または両方を切断する能力を欠くようにして変異している。

【0059】

ある特定の実施形態において、C R I S P R - C a s タンパク質は、一本のD N A 鎖のみを切断する変異型C R I S P R - C a s タンパク質、すなわちニッカーゼである。ある特定の実施形態において、ニッカーゼは、非標的配列、すなわち標的配列の反対D N A 鎖上にあり、P A M 配列の3'である配列内で切断する。

【0060】

本発明は、2種以上のニッカーゼの使用法、詳細には、二重またはダブルニッカーゼアプローチを企図する。この結果、標的D N A は、2種のC a s ニッカーゼと結合する。また、例えば、D N A の一方の鎖 (例えば、コード鎖) にはC a s ニッカーゼ、及び非コードまたは反対D N A 鎖、あるいは第二のD N A 標的位置にはオルソログ、というように異

10

20

30

40

50

なるオルソログが使用可能であることも想定している。オルソログとして、C a s 9 ニッカーゼ、例えば、S a C a s 9 ニッカーゼまたはS p C a s 9 ニッカーゼなどが可能であるが、これらに限定されない。異なるP A Mを必要とし、さらに異なるガイド必要条件も有する可能性がある2種の異なるオルソログを使用することは、利用者に大幅な制御をもたらすので、有利となる可能性がある。

【0061】

C R I S P R - C a s タンパク質

C R I S P R エフェクタータンパク質をコードする核酸分子は、有利なことに、コドン最適化C R I S P R エフェクタータンパク質である。コドン最適化配列の例は、この場合、真核生物、例えば、ヒト（すなわちヒトでの発現に最適化されている）、または本明細書中検討されるとおりの別の真核生物、動物、または哺乳類での発現に最適化された配列である；例えば、W O 2014/093622 (P C T / U S 2013/074667) のS a C a s 9 ヒトコドン最適化配列を参照。これが好適であるものの、当然のことながら、他の例も可能であり、ヒト以外の宿主へのコドン最適化、または特定の生物へのコドン最適化は既知である。実施形態によっては、C R I S P R エフェクタータンパク質をコードする酵素コード配列は、特定の細胞、例えば、真核生物細胞での発現にコドン最適化されている。真核生物細胞は、特定生物、例えば、植物または哺乳類のものである、またはそれに由来する場合があります、特定生物として、ヒト、あるいは本明細書中検討されるとおりの非ヒト真核生物または動物または哺乳類、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜、あるいは非ヒト哺乳類または霊長類が挙げられるが、これらに限定されない。実施形態によっては、ヒトの生殖系列遺伝的同一性の修飾プロセス及び/または動物の遺伝的同一性の修飾プロセスで、そのようなプロセスを受けるヒトまたは動物に、及びそのようなプロセスから生じる動物も同様に、実質的な医薬的利益を全くもたさずに苦痛を引き起こす可能性があるプロセスは、除外される場合がある。一般に、コドン最適化は、天然の配列の少なくとも1つのコドン（例えば、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50またはそれ以上のコドン）を、その天然のアミノ酸配列を維持したままで、その宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に用いられるコドンで置き換えることにより、目的の宿主細胞における発現を高めるために核酸配列を修飾するプロセスを示す。様々な種が、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用頻度の違い）は、メッセンジャーRNA (mRNA) の翻訳効率と相関することが多く、これは、同じく、とりわけ、翻訳されるコドンの特性及び特定のトランスファーRNA (tRNA) 分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞内の選択されたtRNAの優位性は、一般的に、ペプチド合成で最も頻繁に使用されるコドンを反映している。したがって、コドン最適化に基づいて、所定の生物における最適な遺伝子発現のために遺伝子を調整することが可能である。コドン使用表は、例えばkazusa.or.jp/codon/にある「Codon Usage Database」で容易に入手可能であり、これらの表は、多数の方法で適合可能である。Nakamura, Y., et al., 'Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000', Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)を参照。特定の宿主細胞で発現させるために特定の配列をコドン最適化するコンピュータアルゴリズムも利用可能であり、例えばGene Forge (Aptagen; Jacobus, PA) なども利用可能である。実施形態によっては、C a s をコードする配列中の1つまたは複数のコドン（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50以上、または全てのコドン）は、特定のアミノ酸で最も頻繁に使用されるコドンに対応する。

【0062】

ある特定の実施形態において、本明細書中記載される方法は、C a s 遺伝子導入細胞を提供することを含む場合があります、C a s 遺伝子導入細胞では、1つまたは複数のガイドRNAをコードする1つまたは複数の核酸が、提供または導入されて、細胞中で、1つまた

10

20

30

40

50

は複数の目的の遺伝子のプロモーターを含む調節エレメントと作動可能に連結される。本明細書中使用される場合、「Cas 遺伝子導入細胞」という用語は、細胞中、Cas 遺伝子がゲノムレベルで組み込まれている真核生物細胞などの細胞を示す。細胞の性質、型、または起源は、本発明により特に制限されることはない。同じく、Cas 導入遺伝子を細胞に導入するやり方は、変更可能であり、当該分野で既知であるとおりの任意の方法が可能である。ある特定の実施形態において、Cas 遺伝子導入細胞は、単離した細胞に、Cas 導入遺伝子を導入することにより得られる。ある特定の実施形態において、Cas 遺伝子導入細胞は、Cas 遺伝子導入生物から細胞を単離することにより得られる。例として、特に制限なく、本明細書中示すとおりのCas 遺伝子導入細胞は、Cas 遺伝子導入真核生物、例えば、Cas ノックイン真核生物に由来する場合がある。参照として、WO 2014/093622 (PCT/US13/74667) が挙げられ、これは本明細書中参照として援用される。Sangamo Biosciences, Inc. に譲渡された米国特許公開番号第20120017290号及び同第20110265198号の方法は、Rosa 遺伝子座を標的とすることに関するものであるが、これらを、本発明のCRISPR-Cas系を利用するように改変することができる。Celllectis に譲渡された米国特許公開番号第20130236946号の方法は、Rosa 遺伝子座を標的とすることに関するものであるが、これも、本発明のCRISPR-Cas系を利用するように改変することができる。さらなる例として、参照として、Platt et al. (Cell; 159(2): 440-455 (2014)) が挙げられ、これはCas9 ノックインマウスについて記載するものであり、本明細書中参照として援用される。Cas 導入遺伝子は、さらに、Lox-Stop-ポリA-Lox (LSL) カセットを含むことができ、それにより、Cas 発現をCreリコンビナーゼにより誘導可能にすることができる。あるいは、Cas 遺伝子導入細胞は、単離された細胞にCas 導入遺伝子を導入することにより、得られる場合がある。導入遺伝子の送達系は、当該分野で周知である。例として、Cas 導入遺伝子は、例えば、真核生物細胞に、ベクター（例えば、AAV、アデノウイルス、レンチウイルス）及び/または粒子及び/またはナノ粒子送達を用いて送達される場合があり、これについても、本明細書中いずれかの箇所で記載される。

【0063】

当業者には当然のことながら、本明細書中示されるとおりの細胞、例えばCas 遺伝子導入細胞は、組み込まれたCas 遺伝子を有するのとは別にさらなるゲノム改変を含む、またはCas を標的遺伝子座に誘導することができるRNAと複合体形成するときのCas の配列特異的作用から生じる変異を含む場合がある。

【0064】

ある特定の態様において、本発明は、例えば、細胞に、Cas 及び/またはCas を標的遺伝子座に誘導することができるRNA（すなわちガイドRNA）を送達または導入するベクター、それだけでなくこうした構成要素を伝播する（例えば、原核細胞において）ことができるベクターが関与する。本明細書中使用される場合、「ベクター」とは、ある実体を1つの環境から別の環境へと移すことを可能にするまたは促進する道具である。これは、挿入されたセグメントの複製をもたらすように、別のDNAセグメントを挿入することが可能なレプリコン、例えば、プラスミド、ファージ、またはコスミドなどである。一般に、ベクターは、適切な調節エレメントが付随する場合に複製を行うことができる。一般に、「ベクター」という用語は、自身がそれまで結合していた核酸を輸送することができる核酸分子を示す。ベクターとして、一本鎖、二本鎖、または部分二本鎖である核酸分子；1つまたは複数の遊離末端を有する、遊離末端を有さない（例えば、環状）核酸分子；DNA、RNA、またはその両方を有する核酸分子；及び、当該分野で既知である他の種類のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターの1つの種類は、「プラスミド」であり、これは、環状二本鎖DNAループを示し、その中に、追加のDNAセグメントを、例えば標準的な分子クローニング技法により、挿入することができる。ベクターの別の種類は、ウイルスベクターであり、この場合、まとめあげてウイル

10

20

30

40

50

ス（例えばレトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス（AAV））にするために、ウイルス由来のDNAまたはRNA配列が、ベクターに存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞にトランスフェクションするためにウイルスが保有するポリヌクレオチドも含む。ある種のベクターは、それらが導入された宿主細胞中で自律増殖することができる（例えば、複製の細菌起源を有する細菌ベクター、及びエピソード哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入に際して、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと合わせて複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが作動性に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書中、「発現ベクター」と称する。組換えDNA技法で利用される一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態をしている場合が多い。

10

【0065】

組換え発現ベクターは、宿主細胞で本発明の核酸が発現するのに適切な形でその核酸を含むことができ、このことは、組換え発現ベクターが、1つまたは複数の調節エレメントを含むことを意味し、調節エレメントは、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択することができる、発現させようとする核酸配列と作動性に連結されている。組換え発現ベクター内で、「作動性に連結されている」とは、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現（例えば、*in vitro*転写/翻訳システムにおいて、または宿主細胞に導入される場合は宿主細胞において）を可能にする様式で調節エレメント（複数可）に連結されていることを意味するものとする。組換え及びクローニング法に関して、以下が参照される：米国特許出願第10/815,730号、US 2004-0171156 A1として2004年9月2日公開、この内容は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される。すなわち、本明細書中開示される実施形態は、CRISPRエフェクター系を含む遺伝子導入細胞も含む場合がある。ある特定の例示の実施形態において、遺伝子導入細胞は、個別の離散した塊として機能する場合がある。言い換えると、マスキング構築物を含む試料が、例えば、適切な送達小胞で、細胞に送達される場合があり、標的が送達小胞中に存在する場合、CRISPRエフェクターは活性化されて、検出可能なシグナルが生成する。

20

【0066】

ベクター（複数可）は、調節エレメント（複数可）、例えば、プロモーター（複数可）を含むことができる。ベクター（複数可）は、複数及び/または単一のCasコード配列を含むことができるが、可能性として、少なくとも3または8または16または32または48または50のガイドRNA（複数可）（例えば、sgRNA）コード配列、例えば、1~2、1~3、1~4、1~5、3~6、3~7、3~8、3~9、3~10、3~8、3~16、3~30、3~32、3~48、3~50のRNA（複数可）（例えば、sgRNA）も含むことができる。単一ベクター中、有利なことに、上限約16のRNA（複数可）が存在する場合には各RNA（例えば、sgRNA）についてプロモーターが存在することができる；単一ベクターが16を超えるRNA（複数可）を提供する場合、1つまたは複数のプロモーター（複数可）が、複数のRNA（複数可）の発現を駆動することができる、例えば、32のRNA（複数可）が存在する場合には、各プロモーターは、2つのRNA（複数可）の発現を駆動することができる、48のRNA（複数可）が存在する場合には、各プロモーターは、3つのRNA（複数可）の発現を駆動することができる。簡単な算術的及び十分に確立されたクローニングプロトコルならびに本開示での教示により、当業者なら、RNA（複数可）に応じて、AAVなどの適切な例示ベクター、及びU6プロモーターなどの適切なプロモーターに関して本発明を容易に実行できる。例えば、AAVの組み入れ限度は、約4.7 kbである。単一U6-gRNA（+クローニング用制限部位）の長さは、361 bpである。したがって、当業者なら、単一ベクターに約12~16、例えば、13のU6-gRNAカセットを容易に合わせることができる。これは、任意の適切な手段、例えば、TALEアセンブリ（genome-engineering.org/tales-effectors/）に利用されるゴールデンゲート戦略など

30

40

50

により組み立てることができる。当業者なら、U6-gRNAの数を約1.5倍に増加させる、例えば、12~16、例えば、13から、約18~24、例えば、約19のU6-gRNAへと増加させるタンデムガイド戦略も利用できる。したがって、当業者なら、単一ベクター、例えば、AAVベクター中のプロモーター-RNA、例えば、U6-gRNAを約18~24、例えば、約19にすることが容易に可能である。ベクター中のプロモーター及びRNAの数を増加させるさらなる手段は、単一プロモーター（例えば、U6）を使用して、切断可能な配列により分離されたRNAのアレイを発現させることである。また、ベクター中のプロモーター-RNAの数を増加させるなおさらなる手段は、切断可能な配列により分離されたプロモーター-RNAのアレイを、コード配列または遺伝子のイントロンにおいて発現させることである。この場合、ポリメラーゼIIプロモーターを使用するのが有利であり、ポリメラーゼIIプロモーターは、組織特異的様式で、発現を増加させることができ、長鎖RNAの転写を行うことができる。（例えば、nar.oxfordjournals.org/content/34/7/e53.short及びnature.com/mt/journal/v16/n9/abs/mt2008144a.htmlを参照）。有利な実施形態において、AAVは、上限約50遺伝子を目的として、U6タンデムgRNAを組み入れることができる。したがって、当該分野の知識及び本開示の教示から、当業者なら、どのような過度の実験も行わずに、特に本明細書中検討されるRNAまたはガイドの数に応じて、1つまたは複数のプロモーターの制御下でまたはプロモーターと作動性にもしくは機能性に連結させて複数のRNAまたはガイドを発現するベクター（複数可）、例えば、単一ベクターを、容易に作製及び使用することができる。

10

20

【0067】

ガイドRNA（複数可）コード配列及び/またはCasコード配列は、調節エレメント（複数可）と機能性または作動性に連結させることができ、したがって、調節エレメント（複数可）が、発現を駆動する。プロモーター（複数可）は、構成的プロモーター（複数可）及び/または条件的プロモーター（複数可）及び/または誘導型プロモーター（複数可）及び/または組織特異的プロモーター（複数可）が可能である。プロモーターは、RNAポリメラーゼ、pol I、pol II、pol III、T7、U6、H1、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター、及びEF1 α プロモーターからなる群より選択することができる。有利なプロモーターは、プロモーターはU6である。

30

40

【0068】

CRISPR-Casタンパク質は、さらに修飾されている場合がある。本明細書中使用される場合、CRISPR-Casタンパク質に関して「修飾された」という用語は、概して、派生元となる野生型Casタンパク質と比較して、1つまたは複数の修飾または変異（点変異、ランケーション、挿入、削除、キメラ、融合タンパク質などを含む）を有するCRISPR-Casタンパク質を示す。由来するは、由来する酵素が、高度の配列相同性を有するという意味において、野生型酵素に多大に基づいているが、当該分野で既知のある種の方法でまたは本明細書中記載されるとおりに変異している（修飾されている）ことを意味する。

【0069】

CRISPR-Casタンパク質の追加修飾は、機能の改変をもたらす場合もそうでない場合もある。例として、特にCRISPR-Casタンパク質に関して、機能の改変をもたらさない修飾として、例えば、発現のための特定宿主へのコドン最適化、または特定マーカー（例えば、可視化用）を持つヌクレアーゼの提供が挙げられる。機能の改変をもたらす可能性がある修飾は、変異、ならびにキメラヌクレアーゼ（例えば、異なるオルソログまたはホモログ由来のドメインを含む）または融合タンパク質も含む場合があり、変異として、点変異、挿入、削除、ランケーション（開裂ヌクレアーゼを含む）などが挙

50

げられる。融合タンパク質として、特に制限なく、例えば、異種ドメインまたは機能性ドメイン（例えば、局在化シグナル、触媒ドメインなど）との融合物を挙げることができる。ある特定の実施形態において、多種多様な修飾を組み合わせる場合がある（例えば、触媒的に不活性であり、例えばDNAメチル化もしくは別の核酸修飾を誘導するためにさらに機能性ドメインと融合されている変異型ヌクレアーゼ、例えば、特に制限なく、切断（例えば、異なるヌクレアーゼ（ドメイン）によるもの）、変異、削除、挿入、置換、連結、消化、切断、または組換えが挙げられる）。本明細書中使用される場合、「機能の改変」として、特に制限なく、特異性の改変（例えば、標的認識の改変、特異性の上昇（例えば、「向上した」Casタンパク質）または低下、あるいはPAM認識の改変）、活性の改変（例えば、触媒活性の上昇または低下、触媒不活性なヌクレアーゼまたはニックアーゼを含む）、及び/または安定性の改変（例えば、不安定化ドメインを持つ融合物）が挙げられる。適切な異種ドメインとして、特に制限なく、ヌクレアーゼ、リガーゼ、修復タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、（ウイルス）インテグラーゼ、リコンビナーゼ、トランスポザーゼ、アルゴノート、シチジンデアミナーゼ、レトロン（retrotron）、グループIIイントロン、ホスファターゼ、ホスホリラーゼ、スルフィラーゼ（sulfurylase）、キナーゼ、ポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼなどが挙げられる。こうした修飾の全ての例は、当該分野で既知である。当然のことながら、本明細書中称するとおりの「修飾」ヌクレアーゼ、特に「修飾」Casまたは「修飾」CRISPR-Cas系または複合体は、好ましくは、ポリ核酸と相互作用するまたはそれと結合する能力を依然として有する（例えば、ガイド分子との複合体形成において）。そのような修飾Casタンパク質は、本明細書中記載されるとおりのデアミナーゼタンパク質またはその活性ドメインと組み合わせることができる。

10

20

【0070】

ある特定の実施形態において、CRISPR-Casタンパク質は、活性及び/または特異性の向上をもたらす1つまたは複数の修飾を含む場合があり、そのような修飾として、例えば、標的指向化または非標的指向化鎖を安定化させる残基の変異が挙げられる（例えば、eCas9; ‘‘Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity’’, Slaymaker et al. (2016), Science, 351(6268): 84-88、本明細書によりそのまま全体が参照として援用される）。ある特定の実施形態において、改変CRISPRタンパク質の活性の改変または修飾は、標的指向性効率の上昇または標的外結合の減少を含む。ある特定の実施形態において、改変CRISPRタンパク質の活性の改変は、切断活性の修飾を含む。ある特定の実施形態において、活性の改変は、標的ポリヌクレオチド遺伝子座に対する切断活性の上昇を含む。ある特定の実施形態において、活性の改変は、標的ポリヌクレオチド遺伝子座に対する切断活性の低下を含む。ある特定の実施形態において、活性の改変は、標的外ポリヌクレオチド遺伝子座に対する切断活性の低下を含む。ある特定の実施形態において、修飾ヌクレアーゼの活性の改変または修飾は、ヘリカーゼ動態の改変を含む。ある特定の実施形態において、修飾ヌクレアーゼは、タンパク質と、RNAを含む核酸分子（Casタンパク質の場合）、または標的ポリヌクレオチド遺伝子座の鎖、または標的外ポリヌクレオチド遺伝子座の鎖との会合を改変する修飾を含む。本発明の態様において、改変CRISPRタンパク質は、CRISPR複合体の形成を改変する修飾を含む。ある特定の実施形態において、活性の改変は、標的外ポリヌクレオチド遺伝子座に対する切断活性の上昇を含む。したがって、ある特定の実施形態において、標的外ポリヌクレオチド遺伝子座と比較した場合に標的ポリヌクレオチド遺伝子座に対する特異性の上昇が存在する。他の実施形態において、標的外ポリヌクレオチド遺伝子座と比較した場合に標的ポリヌクレオチド遺伝子座に対する特異性の低下が存在する。ある特定の実施形態において、変異は、標的外効果（例えば、切断もしくは結合特性、活性、または動態）の低下をもたらす。例えば、Casタンパク質の場合において、例えば、標的とガイドRNAとの間のミスマッチ許容度の低下をもたらす。他の変異は、標的外効果（例えば、切断もしくは結合特性、活性、または動態）の上

30

40

50

昇をもたらす場合がある。他の変異は、標的中効果（例えば、切断もしくは結合特性、活性、または動態）の上昇または低下を招く場合がある。ある特定の実施形態において、変異は、ヘリカーゼ活性の改変（例えば、上昇または低下）、機能性ヌクレアーゼ複合体（例えば、CRISPR-Cas複合体）の会合または形成の改変をもたらす。ある特定の実施形態において、変異は、PAM認識の改変をもたらす、すなわち、非修飾Casタンパク質と比較して、異なるPAMが（追加でまたは代替で）認識される場合がある（例えば、‘ ‘ Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities ’ ’, Klein et al. (2015), Nature, 523 (7561): 481 - 485を参照、これはそのまま全体が本明細書中参照として援用される）。特に好適な変異は、特異性を向上させる目的で、正荷電残基及び/または（進化上）保存残基、例えば、保存された正荷電残基を含む。ある特定の実施形態において、そのような残基は、変異により、アラニンなど無電荷残基になる場合がある。

10

20

30

40

50

【0071】

Cas9系ニッカーゼ

ある特定の実施形態において、CRISPRニッカーゼは、Cas9系ニッカーゼである。Cas9遺伝子は、複数の多様な細菌ゲノムにおいて見られ、典型的には、同じ遺伝子座でcas1、cas2、及びcas4遺伝子ならびにCRISPRカセットとともに見られる。そのうえさらに、Cas9タンパク質は、トランスポゾンORF-Bとホモログの関係にある容易に同定可能なC末端領域を有し、また、活性RuvC様ヌクレアーゼ、アルギニンリッチ領域を有する。

【0072】

特定の実施形態において、ニッカーゼは、Streptococcus属、Campylobacter属、Nitratifractor属、Staphylococcus属、Parvibaculum属、Roseburia属、Neisseria属、Glucanacetobacter属、Azospirillum属、Sphaerochaeta属、Lactobacillus属、Eubacterium属、またはCorynebacter属を含む属の生物に由来するCas9ニッカーゼである。

【0073】

特定の実施形態において、ニッカーゼは、Carnobacterium属、Rhodobacter属、Listeria属、Paludibacter属、Clostridium属、Lachnospiraceae科、Clostridiaridium属、Leptotrichia属、Francisella属、Legionella属、Alicyclobacillus属、Methanomethylophilus属、Porphyromonas属、Prevotella属、Bacteroidetes門、Helcococcus属、Leptospira属、Desulfovibrio属、Desulfonatronum属、Opitutaceae科、Tuberibacillus属、Bacillus属、Brevibacillus属、Methylobacterium属、またはAcidaminococcus属を含む属の生物に由来するCas9ニッカーゼである。

【0074】

さらに特定の実施形態において、Cas9ニッカーゼは、S. mutans、S. agalactiae、S. equisimilis、S. sanguinis、S. pneumoniae; C. jejuni、C. coli; N. salmuginis、N. tergarctus; S. auricularis、S. carnosus; N. meningitidis、N. gonorrhoeae; L. monocytogenes、L. ivanovii; C. botulinum、C. difficile、C. tetani、C. sordelliiから選択される生物に由来する。特定の実施形態において、ニッカーゼは、Streptococcus pyogenes、Staphylococcus aureus、またはStrept

ococcus thermophilus の Cas 9 の生物に由来する Cas 9 ニッカ
ーゼである。

【0075】

ニッカーゼは、第一エフェクタータンパク質（例えば、Cas 9）オルソログに由来する第一断片及び第二エフェクター（例えば、Cas 9）タンパク質オルソログに由来する第二断片を有するキメラタンパク質を含む場合があり、第一エフェクタータンパク質オルソログと第二エフェクタータンパク質オルソログは異なっている。第一及び第二エフェクタータンパク質（例えば、Cas 9）オルソログの少なくとも一方は、Streptococcus 属、Campylobacter 属、Nitratifractor 属、Staphylococcus 属、Parvibaculum 属、Roseburia 属、Neisseria 属、Gluconacetobacter 属、Azospirillum 属、Sphaerochaeta 属、Lactobacillus 属、Eubacterium 属、Corynebacter 属、Carnobacterium 属、Rhodobacter 属、Listeria 属、Paludibacter 属、Clostridium 属、Lachnospiraceae 科、Clostridiaridium 属、Leptotrichia 属、Francisella 属、Legionella 属、Alicyclobacillus 属、Methanomethyophilus 属、Porphyromonas 属、Prevotella 属、Bacteroidetes 門、Helcococcus 属、Leptospira 属、Desulfovibrio 属、Desulfonatronum 属、Opitutaceae 科、Tuberibacillus 属、Bacillus 属、Brevibacillus 属、Methylobacterium 属、または Acidaminococcus 属に含まれる生物に由来するエフェクタータンパク質（例えば、Cas 9）を含む場合がある。例えば、キメラエフェクタータンパク質は、第一断片及び第二断片を含み、第一断片及び第二断片のそれぞれは、Streptococcus 属、Campylobacter 属、Nitratifractor 属、Staphylococcus 属、Parvibaculum 属、Roseburia 属、Neisseria 属、Gluconacetobacter 属、Azospirillum 属、Sphaerochaeta 属、Lactobacillus 属、Eubacterium 属、Corynebacter 属、Carnobacterium 属、Rhodobacter 属、Listeria 属、Paludibacter 属、Clostridium 属、Lachnospiraceae 科、Clostridiaridium 属、Leptotrichia 属、Francisella 属、Legionella 属、Alicyclobacillus 属、Methanomethyophilus 属、Porphyromonas 属、Prevotella 属、Bacteroidetes 門、Helcococcus 属、Leptospira 属、Desulfovibrio 属、Desulfonatronum 属、Opitutaceae 科、Tuberibacillus 属、Bacillus 属、Brevibacillus 属、Methylobacterium 属、または Acidaminococcus 属に含まれる生物の Cas 9 から選択され、ただし、第一断片及び第二断片は、同じ細菌に由来しない。例えば、キメラエフェクタータンパク質は、第一断片及び第二断片を含み、第一断片及び第二断片のそれぞれは、S. mutans、S. agalactiae、S. equisimilis、S. sanguinis、S. pneumoniae; C. jejuni、C. coli; N. salmuginis、N. tergarctus; S. auricularis、S. carnosus; N. meningitides、N. gonorrhoeae; L. monocytogenes、L. ivanovii; C. botulinum、C. difficile、C. tetani、C. sordellii; Francisella tularensis 1、Prevotella albensis、Lachnospiraceae 科 菌 MC2017 1、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacteria 属 菌 GW2011__GWA2__33__10、Parc

10

20

30

40

50

ubacteria 属菌 GW2011__GWC2__44__17、Smithella 種 SCADC、Acidaminococcus 種 BV3L6、Lachnospiraceae 科菌 MA2020、Candidatus Methanoplasma termittum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi 237、Leptospira inadai、Lachnospiraceae 科菌 ND2006、Porphyromonas crevioricanis 3、Prevotella disiens、及び Porphyromonas macacae の Cas9 から選択され、ただし、第一断片及び第二断片は、同じ細菌に由来しない。

【0076】

10

より好適な実施形態において、Cas9 ニッカーゼは、Streptococcus pyogenes、Staphylococcus aureus、または Streptococcus thermophilus の Cas9 から選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態において、Cas9p は、Francisella tularensis 1、Prevotella albensis、Lachnospiraceae 科菌 MC2017 1、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacteria 属菌 GW2011__GWA2__33__10、Parcubacteria 属菌 GW2011__GWC2__44__17、Smithella 種 SCADC、Acidaminococcus 種 BV3L6、Lachnospiraceae 科菌 MA2020、Candidatus Methanoplasma termittum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi 237、Leptospira inadai、Lachnospiraceae 科菌 ND2006、Porphyromonas crevioricanis 3、Prevotella disiens、及び Porphyromonas macacae から選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態において、Cas9p は、Acidaminococcus 種 BV3L6、Lachnospiraceae 科菌 MA2020 から選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、Francisella tularensis 1 の亜種に由来し、亜種として、Francisella tularensis subsp. Novicida が挙げられるが、これに限定されない。

20

30

【0077】

特定の実施形態において、本明細書中称されたとおりの Cas9 のホモログまたはオルソログは、Cas9 と少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、例えば、少なくとも 95% の配列同一性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりの Cas9 のホモログまたはオルソログは、野生型 Cas9 と少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、例えば、少なくとも 95% の配列同一性を有する。Cas9 が 1 つまたは複数の変異を有する（変異型である）場合、本明細書中称されたとおりの当該 Cas9 のホモログまたはオルソログは、変異型 Cas9 と少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、例えば、少なくとも 95% の配列同一性を有する。

40

【0078】

ある実施形態において、Cas9 ニッカーゼは、Streptococcus 種または Staphylococcus 種を含む属の生物のオルソログである場合があるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、Cas9 タンパク質は、Streptococcus pyogenes、Staphylococcus aureus、または Streptococcus thermophilus の Cas9 を含む種の生物のオルソログである場合があるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本明細書中称されたとおりの Cas9p のホモログまたはオルソログは、本明細書中開示される Cas9 配列の 1 つまたは複数と少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、

50

さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりのCas9のホモログまたはオルソログは、野生型SpCas9、SaCas9、またはStCas9と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0079】

特定の実施形態において、本発明のCas9ニッカーゼは、SpCas9、SaCas9、またはStCas9と少なくとも60%、より詳細には少なくとも70%、例えば少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりのCas9タンパク質は、野生型SpCas9、SaCas9、またはStCas9と少なくとも60%、例えば少なくとも70%、より詳細には少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。当業者ならわかるだろうが、これには、Cas9タンパク質の切断型が含まれ、それにより配列同一性は、切断型の長さにわたり決定される。

10

【0080】

修飾Cas9タンパク質

特定の実施形態において、本明細書中定義されたとおりの改変Cas9タンパク質、例えばCas9を利用することが目的となるが、ただしこのタンパク質は、RNAを含む核酸分子と複合体形成して、CRISPR複合体を形成し、ただし、CRISPR複合体において、核酸分子が1つまたは複数の標的ポリヌクレオチド遺伝子座を標的とする場合、タンパク質は、非修飾Cas9タンパク質と比較して少なくとも1つの修飾を有し、及び修飾タンパク質を含むCRISPR複合体は、非修飾Cas9タンパク質を含む複合体と比較した場合に活性が変化している。当然のことながら、本明細書中CRISPR「タンパク質」と示す場合、Cas9タンパク質は、好ましくは、修飾CRISPR-Cas9タンパク質である（例えば、酵素活性が上昇または低下している（あるいはない）、例えば、限定するものではないが、Cas9が挙げられる）。「CRISPRタンパク質」という用語は、「CRISPR-Cas9タンパク質」と同義で 사용할ことができ、野生型CRISPRタンパク質に比べて、CRISPRタンパク質が改変されているかどうか、例えば酵素活性が上昇または低下している（あるいはない）などとは無関係である。

20

30

【0081】

Cas9一次構造内で、不定形領域の小さな区間が複数予想されている。不定形領域は、溶媒と接触し、異なるCas9オルソログの間で保存されていないが、これらは、断片して小タンパク質配列を挿入するのに好適な側部である。また、これらの側部は、Cas9オルソログ間でキメラタンパク質を生成するのに利用することができる。

【0082】

上記の知識に基づくと、酵素の不活性化を招く、または二本鎖ヌクレアーゼ活性をニッカーゼ活性に修飾する変異体を生成することができる。代替実施形態において、この知識を用いて、標的外効果の低下した酵素が開発される（本明細書中いずれかの箇所で記載される）。

40

【0083】

特異性を、特に標的外効果の低下により向上させる、適切なCas9酵素修飾は、例えば、PCT/US2016/038034に記載されており、これはそのまま全体が本明細書中参照として援用される。特定の実施形態において、標的外切断の減少は、鎖分離を不安定化させることにより、より詳細には、DNA相互作用領域の正電荷を減少させる変異をCas9酵素に導入することにより、確実になる（本明細書中記載されたとおりであり、Cas9に関してSlaymaker et al., 2016 (Science, 1; 351 (6268): 84-8にさらに例示される）。さらなる実施形態において、標的外切断の減少は、標的鎖とガイドRNA配列の間の相互作用に影響を及ぼす変異

50

を Cas 9 酵素に導入する、より詳細には、標的特異的活性は保持するが標的外活性は低下させるようなやり方で Cas 9 と標的 DNA 鎖のリン酸骨格との間の相互作用を破壊することにより、確実にする (Cas 9 に関して Kleinstiver et al., 2016, Nature, 28; 529 (7587): 490-5 に記載されるとおり)。特定の実施形態において、標的外活性は、野生型 Cas 9 に比べて、標的鎖及び非標的鎖両方との相互作用が修飾されている、修飾型 Cas 9 という手段により低下する。

【0084】

標的外活性に対する標的的中の活性及び/または特異性を上昇または低下させる、すなわち標的外結合に対する標的的中の結合及び/または特異性を上昇または低下させるために様々な組み合わせで利用可能な方法及び変異を用いて、他の効果を促進するためになされた変異または修飾を、補填するまたは向上させることができる。他の効果を促進するためになされたそのような変異または修飾として、Cas 9 エフェクタータンパク質に対する変異または修飾、及び/またはガイド RNA になされた変異または修飾が挙げられる。

10

【0085】

Cas 9 特異性を改善するために用いられる同様な戦略を用いて (Slaymaker et al., 2015 'Rationally engineered Cas 9 nucleases with improved specificity')、標的外 DNA 鎖を安定化する残基を変異させることにより、Cas 9 の特異性をさらに改善することができる。これは、直線構造配列比較を用いて、1) Cas 9 のどのドメインが DNA のどの鎖と結合するか、及び 2) それらのドメイン中のどの残基が DNA と接触するか、を予測することにより、結晶構造がなくても達成することができる。

20

【0086】

しかしながら、このアプローチは、既知のタンパク質を持つ Cas 9 の保存性が良くないために制限される場合がある。したがって、全ての可能性のある DNA 相互作用アミノ酸 (リシン、ヒスチジン、及びアルギニン) の機能を探索することが望ましい場合がある。

【0087】

触媒活性な Cas 9 タンパク質は、平滑断端を生成し、そのため、切断部位は、典型的には、標的配列にある。より詳細には、平滑断端は、典型的には、PAM の 2 ~ 3 ヌクレオチド上流にある。特定の実施形態において、非標的鎖の断端は、PAM の 3 ヌクレオチド上流 (すなわち PAM の上流の 3 番目と 4 番目のヌクレオチドの間) にあり、標的鎖 (すなわちガイド配列とハイブリダイズする鎖) の断端は、相補鎖の同じ位置に生じる (これは、3' 鎖上で PAM の補体の 3 ヌクレオチド上流、または PAM の補体の上流の 3 番及び 4 番ヌクレオチドの間である)。

30

【0088】

ある特定の実施形態において、Cas 9 タンパク質の 1 つまたは複数の触媒ドメイン (例えば、Cas 9 タンパク質の RuvC I、RuvC II、及び RuvC III、または HNH ドメイン) が変異して、標的配列の 1 つの DNA 鎖のみを切断する変異型 Cas タンパク質が生成する。

【0089】

追加のガイドランスとして、特に制限なく、例えば、S. pyogenes 由来の Cas 9 の RuvC I 触媒ドメインにおいてアスパラギン酸からアラニンへの置換 (D10A) を行うと、Cas 9 は、鎖を両方とも切断するヌクラーゼからニッカーゼ (一本の鎖を切断する) へと変換される。Cas 9 をニッカーゼにする変異の他の例として、特に制限なく、H840A、N854A、及び N863A が挙げられる。追加のガイドランスとして、酵素が SpCas9 ではない場合、変異は、SpCas9 の 10、762、840、854、863、及び/または 986 位に相当する残基のいずれかまたは全てで行うことが可能である (このことは、例えば、標準の配列比較ツールにより確認可能である)。詳細には、以下の変異のいずれかまたは全てが、SpCas9 において好適であり: D10A、E762A、H840A、N854A、N863A、及び/または D986A; な

40

50

らびに交換アミノ酸のいずれかについての保存的置換も想定されている。

【0090】

第一の好適な実施形態において、CRISPR-Casタンパク質は、触媒不活性なHNHドメインを有するSpCas9ニッカーゼである（例えば、N863A変異を持つSpCas9ニッカーゼ）。第二の好適な実施形態において、CRISPR-Casタンパク質は、触媒不活性なHNHドメインを有するSaCas9である（例えば、N580A変異を持つSaCas9ニッカーゼ）。第三の好適な実施形態において、CRISPR-Casタンパク質は、HNHドメインが部分的または完全に除去されたSpCas9ニッカーゼである。第四の好適な実施形態において、CRISPR-Casタンパク質は、HNHドメインが部分的または完全に除去されたSaCas9である。

10

【0091】

上記のCas9酵素のあるものにおいて、酵素は、1つまたは複数の残基の変異により修飾されており、そのような残基として、FnCas9タンパク質または任意の相当するオルソログに従って、D917、E1006、E1028、D1227、D1255A、及びN1257位が挙げられるが、これらに限定されない。ある態様において、本発明は、本明細書中検討される組成物を提供し、組成物中、Cas9酵素は、FnCas9タンパク質またはCas9オルソログの相当する位置に従って、D917A、E1006A、E1028A、D1227A、D1255A、及びN1257Aからなる群より選択される1つまたは複数の変異を有する不活性化酵素である。ある態様において、本発明は、本明細書中検討される組成物を提供し、組成物中、CRISPR-Casタンパク質は、FnCas9タンパク質またはCas9オルソログの相当する位置に従って、D917、またはE1006とD917、またはD917とD1255を有する。

20

【0092】

ある特定の実施形態において、Cas9の修飾または変異は、RuvC I、RuvC II、RuvC III、またはHNHドメインでの変異を含む。ある特定の実施形態において、修飾または変異は、SpCas9のアミノ酸位置番号を参照して、12、13、63、415、610、775、779、780、810、832、848、855、861、862、866、961、968、974、976、982、983、1000、1003、1014、1047、1060、1107、1108、1109、1114、1129、1240、1289、1296、1297、1300、1311、及び1325位；好ましくは855位；810、1003、及び1060位；または848、1003位の1つまたは複数でのアミノ酸置換を含む。ある特定の実施形態において、63、415、775、779、780、810、832、848、855、861、862、866、961、968、974、976、982、983、1000、1003、1014、1047、1060、1107、1108、1109、1114、1129、1240、1289、1296、1297、1300、1311、または1325位；好ましくは855位；810、1003、及び1060位；848、1003、及び1060位；あるいは497、661、695、及び926位での修飾または変異は、アラニン置換を含む。ある特定の実施形態において、修飾は、K855A；K810A、K1003A、及びR1060A；またはK848A、K1003A（SpCas9を参照して）、及びR1060Aを含む。ある特定の実施形態において、ある特定の実施形態において、修飾は、N497A、R661A、Q695A、及びQ926A（SpCas9を参照して）を含む。

30

40

【0093】

さらなる例として、Cas9の2つ以上の触媒ドメイン（RuvC I、RuvC II、及びRuvC III、またはHNHドメイン）を変異させて、全てのDNA切断活性を実質的に失った変異型Cas9を生成させる場合がある。実施形態によっては、D10A変異を、H840A、N854A、またはN863A変異のうちの1つまたは複数と組み合わせて、全てのDNA切断活性を実質的に失った変異型Cas9を生成させる。実施形態によっては、変異型酵素のDNA切断活性が、その非変異型を基準として約25%

50

、10%、5%、1%、0.1%、0.01%未満、またはそれより低い場合に、CRISPR酵素は、全てのDNA切断活性を実質的に失っていると見なされる。酵素がSpCas9ではない場合、変異は、SpCas9の10、762、840、854、863、及び/または986位に相当するいずれかまたは全てで行うことが可能である（このことは、例えば、標準の配列比較ツールにより確認可能である）。詳細には、以下の変異のいずれかまたは全てが、SpCas9において好適であり：D10A、E762A、H840A、N854A、N863A、及び/またはD986A；ならびに交換アミノ酸のいずれかについての保存的置換も想定されている。他のCas9での相当する位置における同じ変異（またはそれら変異の保存的置換）も好適である。特に好適であるのは、SpCas9におけるD10及びH840である。しかしながら、他のCas9において、SpCas9のD10及びH840に相当する残基も好適である。

10

【0094】

ある特定の実施形態において、2種の異なるキメラgRNAを、Cas9ニッカーゼとともに使用することができ、これらは一緒になって、単一キメラgRNAを用いるのと同様な効率で標的部位の切断を導入することができる。この様式では標的外効果を低下させることができる。なぜならCas9ニッカーゼは、野生型Cas9のような二本鎖切断を導入する能力を持たないからである。そのような二重ニックング法は、例えば、PCT公開番号第WO2014093622号及び第WO2014204725号に記載されており、これらは本明細書中参照として援用される。

20

【0095】

Cas12タンパク質

ある特定の例示の実施形態において、組成物、システム、及びアッセイは、複数のCas12オルソログあるいは1種または複数のオルソログを1種または複数のCas9オルソログと組み合わせて含む場合がある。ある特定の例示の実施形態において、Cas12オルソログは、Cpf1オルソログ、C2c1オルソログ、またはC2c3オルソログである。

【0096】

Cpf1オルソログ

本発明は、サブタイプV-Aで示されるCpf1遺伝子座に由来する、野生型Cpf1エフェクタータンパク質の変異型に基づくニッカーゼの使用を包含する。本明細書中、そのようなエフェクタータンパク質は、「Cpf1p」、例えば、Cpf1タンパク質とも称する（及びそのようなエフェクタータンパク質またはCpf1タンパク質またはCpf1遺伝子座に由来するタンパク質も「CRISPR酵素」と呼ぶ）。現在、サブタイプV-A遺伝子座は、cas1、cas2、cpf1で示される明確な遺伝子、及びCRISPRアレイを包含する。Cpf1（CRISPR関連タンパク質Cpf1、サブタイプPREFRAN）は、Cas9の相当するドメインとホモログであるRuvC様ヌクレアーゼドメインを、Cas9の特徴的なアルギニンリッチクラスターのカウンターパートと合わせて有する巨大タンパク質（約1300のアミノ酸）である。しかしながら、Cpf1には、全てのCas9タンパク質に存在するHNHヌクレアーゼドメインが欠けており、RuvC様ドメインは、Cas9とは対照的にCpf1配列中で連続している。Cas9では、このドメインには、HNHドメインを含む長い挿入が含まれている。したがって、特定の実施形態において、CRISPR-Cas酵素は、RuvC様ヌクレアーゼドメインのみを含む。

30

40

【0097】

「オルソログ（orthologue）」（本明細書中「オルソログ（ortholog）」とも称する）及び「ホモログ（homologue）」（本明細書中「ホモログ（homolog）」とも称する）という用語は、当該分野で周知である。追加のガイダンスとして、本明細書中使用される場合、タンパク質の「ホモログ」とは、ホモログの関係にあるタンパク質と同じまたは同様の機能を発揮する、同じ種のタンパク質である。ホモログタンパク質は、可能性としてはあり得るが、構造的に関連する必要はなく、またはそ

50

の構造的な関連性は部分的なものにすぎない。本明細書中使用される場合、タンパク質の「オルソログ」とは、オルソログの関係にあるタンパク質と同じまたは同様の機能を発揮する、異なる種のタンパク質である。オルソログタンパク質は、可能性としてはあり得るが、構造的に関連する必要はなく、またはその構造的な関連性は部分的なものにすぎない。ホモログ及びオルソログは、相同性モデリングによって同定可能である。(例えば、Greer, Science vol. 228 (1985) 1055、及びBlundell et al. Eur J Biochem vol 172 (1988) 513)、または「structural BLAST」(Dey F, Cliff Zhang Q, Petrey D, Honig B. Toward a 'structural BLAST': using structural relationships to infer function. Protein Sci. 2013 Apr; 22(4): 359-66. doi: 10.1002/pro.2225.を参照)。CRISPR-Cas 遺伝子座の分野における応用については、Shmakov et al. (2015)も参照。ホモログタンパク質は、可能性としてはあり得るが、構造的に関連する必要はなく、またはその構造的な関連性は部分的なものにすぎない。

【0098】

Cpf1 遺伝子は、複数の多様な細菌ゲノムにおいて見られ、典型的には、同じ遺伝子座でcas1、cas2、及びcas4 遺伝子ならびにCRISPRカセットとともに見られる(例えば、Francisella cf. novicida Fx1のFNFX1__1431-FNFX1__1428)。すなわち、この推定新規CRISPR-Cas系のレイアウトは、II-B型のものと同様であるように見受けられる。そのうえさらに、Cpf1タンパク質は、Cas9と同様に、トランスポゾンORF-Bとホモログの関係にある容易に同定可能なC末端領域を有し、また、活性RuvC様ヌクレアーゼ、アルギニンリッチ領域、及びZnフィンガー(Cas9には存在しない)を有する。しかしながら、Cas9とは異なり、Cpf1は、CRISPR-Casとは脈絡のない複数のゲノム中にも存在し、その相対的に高いORF-B類似性は、これが、トランスポゾン構成要素である可能性を示唆する。仮にこれが本物のCRISPR-Cas系であり、Cpf1がCas9の機能的類似体であるとしたら、これは、新型のCRISPR-Cas、いわゆるV型であるという可能性が示唆された(Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. Makarova KS, Koonin EV. Methods Mol Biol. 2015; 1311: 47-75を参照)。しかしながら、本明細書中記載される場合、Cpf1は、C2c1pと区別するためにサブタイプV-Aにあるとして表される。C2c1pは、同一のドメイン構造を有さず、したがってサブタイプV-Bにあるとして表される。

【0099】

特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、Streptococcus属、Campylobacter属、Nitratifractor属、Staphylococcus属、Parvibaculum属、Roseburia属、Neisseria属、Gluconacetobacter属、Azospirillum属、Sphaerochaeta属、Lactobacillus属、Eubacterium属、Corynebacter属、Carnobacterium属、Rhodobacter属、Listeria属、Paludibacter属、Clostridium属、Lachnospiraceae科、Clostridiaridium属、Leptotrichia属、Francisella属、Legionella属、Alicyclobacillus属、Methanomethylophilus属、Porphyromonas属、Prevotella属、Bacteroidetes門、Helcococcus属、Leptospira属、Desulfovibrio属、Desulfonatronum属、Opitutaceae科、Tuberibacillus属、Bacillus属、Brevibacillus属、Methylobacteriu

m属、または*Acidaminococcus*属を含む属の生物に由来するCpf1エフェクタータンパク質である。

【0100】

さらなる特定の実施形態において、Cpf1エフェクタータンパク質は、*S. mutans*、*S. agalactiae*、*S. equisimilis*、*S. sanguinis*、*S. pneumoniae*；*C. jejuni*、*C. coli*；*N. salmuginis*、*N. tergarctus*；*S. auricularis*、*S. carnosus*；*N. meningitidis*、*N. gonorrhoeae*；*L. monocytogenes*、*L. ivanovii*；*C. botulinum*、*C. difficile*、*C. tetani*、*C. sordellii*から選択される生物に由来する。

10

【0101】

ニッカーゼは、第一エフェクタータンパク質（例えば、Cpf1）オルソログに由来する第一断片及び第二エフェクター（例えば、Cpf1）タンパク質オルソログに由来する第二断片を含むキメラタンパク質の場合があり、ただし、第一及び第二エフェクタータンパク質オルソログは、異なっている。第一及び第二エフェクタータンパク質（例えば、Cpf1）オルソログの少なくとも一方は、*Streptococcus*属、*Campylobacter*属、*Nitratifractor*属、*Staphylococcus*属、*Parvibaculum*属、*Roseburia*属、*Neisseria*属、*Gluconacetobacter*属、*Azospirillum*属、*Sphaerochaeta*属、*Lactobacillus*属、*Eubacterium*属、*Corynebacter*属、*Carnobacterium*属、*Rhodobacter*属、*Listeria*属、*Paludibacter*属、*Clostridium*属、*Lachnospiraceae*科、*Clostridiaridium*属、*Leptotrichia*属、*Francisella*属、*Legionella*属、*Alicyclobacillus*属、*Methanomethyophilus*属、*Porphyromonas*属、*Prevotella*属、*Bacteroidetes*門、*Helcococcus*属、*Leptospira*属、*Desulfovibrio*属、*Desulfonatronum*属、*Opitutaceae*科、*Tuberibacillus*属、*Bacillus*属、*Brevibacillus*属、*Methylobacterium*属、または*Acidaminococcus*属に含まれる生物に由来するエフェクタータンパク質（例えば、Cpf1）を含む可能性がある。例えば、キメラエフェクタータンパク質は、第一断片及び第二断片を含み、第一断片及び第二断片のそれぞれは、*Streptococcus*属、*Campylobacter*属、*Nitratifractor*属、*Staphylococcus*属、*Parvibaculum*属、*Roseburia*属、*Neisseria*属、*Gluconacetobacter*属、*Azospirillum*属、*Sphaerochaeta*属、*Lactobacillus*属、*Eubacterium*属、*Corynebacter*属、*Carnobacterium*属、*Rhodobacter*属、*Listeria*属、*Paludibacter*属、*Clostridium*属、*Lachnospiraceae*科、*Clostridiaridium*属、*Leptotrichia*属、*Francisella*属、*Legionella*属、*Alicyclobacillus*属、*Methanomethyophilus*属、*Porphyromonas*属、*Prevotella*属、*Bacteroidetes*門、*Helcococcus*属、*Leptospira*属、*Desulfovibrio*属、*Desulfonatronum*属、*Opitutaceae*科、*Tuberibacillus*属、*Bacillus*属、*Brevibacillus*属、*Methylobacterium*属、または*Acidaminococcus*属に含まれる生物のCpf1から選択され、ただし、第一及び第二断片は、同一細菌に由来しない。例えば、キメラエフェクタータンパク質は、第一断片及び第二断片を含み、第一断片及び第二断片のそれぞれは、*S. mutans*、*S. agalactiae*、*S. equisimilis*、*S.*

20

30

40

50

. *sanguinis*, *S. pneumonia*; *C. jejuni*, *C. coli*; *N. salmuginis*, *N. tergarctus*; *S. auricularis*, *S. carnosus*; *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*; *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*; *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. tetani*, *C. sordellii*; *Francisella tularensis* 1, *Prevotella albensis*, *Lachnospiraceae* 科菌 MC2017_1, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacter* 属菌 GW2011_GWA2_33_10, *Parcubacteria* 属菌 GW2011_GWC2_44_17, *Smithella* 種 SCADC, *Acidaminococcus* 種 BV3L6, *Lachnospiraceae* 科菌 MA2020, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi* 237, *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae* 科菌 ND2006, *Porphyromonas crevioricanis* 3, *Prevotella disiens*, 及び *Porphyromonas macacae* の Cpf1 から選択され、ただし、第一及び第二断片は、同一細菌に由来しない。

【0102】

より好適な実施形態において、Cpf1p ニッカーゼは、*Francisella tularensis* 1, *Prevotella albensis*, *Lachnospiraceae* 科菌 MC2017_1, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacter* 属菌 GW2011_GWA2_33_10, *Parcubacteria* 属菌 GW2011_GWC2_44_17, *Smithella* 種 SCADC, *Acidaminococcus* 種 BV3L6, *Lachnospiraceae* 科菌 MA2020, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi* 237, *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae* 科菌 ND2006, *Porphyromonas crevioricanis* 3, *Prevotella disiens*, 及び *Porphyromonas macacae* から選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態において、Cpf1p は、*Acidaminococcus* 種 BV3L6, *Lachnospiraceae* 科菌 MA2020 から選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、*Francisella tularensis* 1 の亜種に由来し、そのような亜種として、*Francisella tularensis* subsp. *Novicida* が挙げられるが、これに限定されない。

【0103】

実施形態によっては、Cpf1p ニッカーゼは、*Eubacterium* 属の生物に由来する。実施形態によっては、CRISPR ニッカーゼは、*Eubacterium rectale* の細菌種の生物に由来する。実施形態によっては、野生型 Cpf1 エフェクタータンパク質のアミノ酸配列は、NCBI 参照配列 WP_055225123.1、NCBI 参照配列 WP_055237260.1、NCBI 参照配列 WP_055272206.1、または GenBank ID OLA16049.1 に相当する。実施形態によっては、Cpf1 エフェクタータンパク質は、NCBI 参照配列 WP_055225123.1、NCBI 参照配列 WP_055237260.1、NCBI 参照配列 WP_055272206.1、または GenBank ID OLA16049.1 と、少なくとも 60%、より詳細には少なくとも 70%、例えば少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、例えば少なくとも 95% の配列相同性または配列同一性を有する。当業者ならわかるだろうが、これには、Cpf1 タンパク質の切断型が含まれ、それにより配列同一性は、切断型の長さにわたり決定される。実施形態によっては、Cpf1 エフェクターは、TTTN または CTTN という PAM

配列を認識する。

【0104】

特定の実施形態において、本明細書中称されたとおりのC p f 1のホモログまたはオルソログは、C p f 1と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりのC p f 1のホモログまたはオルソログは、野生型C p f 1と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。C p f 1が1つまたは複数の変異を有する(変異型である)場合、本明細書中称されたとおりの当該C p f 1のホモログまたはオルソログは、変異型C p f 1と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。

10

【0105】

ある実施形態において、C p f 1タンパク質は、ある属の生物のオルソログである場合があり、そのような属の生物として、Acidaminococcus種、Lachnospiraceae科菌、またはMoraxella bovoculiが挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、V型Casタンパク質は、ある種の生物のオルソログである場合があり、そのような種の生物として、Acidaminococcus種BV3L6、Lachnospiraceae科菌ND2006(LbCpf1)、またはMoraxella bovoculi 237が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、本明細書中称されたとおりのC p f 1のホモログまたはオルソログは、本明細書中開示されるC p f 1配列のうち1つまたは複数と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりのC p f 1のホモログまたはオルソログは、野生型FnCpf1、AsCpf1、またはLbCpf1と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。

20

【0106】

特定の実施形態において、本発明のC p f 1タンパク質は、FnCpf1、AsCpf1、またはLbCpf1と少なくとも60%、より詳細には少なくとも70%、例えば少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりのC p f 1タンパク質は、野生型AsCpf1またはLbCpf1と少なくとも60%、例えば少なくとも70%、より詳細には少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列同一性を有する。特定の実施形態において、本発明のC p f 1タンパク質は、FnCpf1との配列同一性が60%未満である。当業者ならわかるだろうが、これには、C p f 1タンパク質の切断型が含まれ、それにより配列同一性は、切断型の長さにより決定される。

30

40

【0107】

実施形態によっては、C p f 1ニッカーゼは、Nucドメインに変異を有する。実施形態によっては、C p f 1ニッカーゼは、標的DNA鎖とガイド分子の間のヘテロ二本鎖の形成により行き場を失った標的外DNA鎖を、目的の標的遺伝子座において、ニッキングすることができる。実施形態によっては、C p f 1ニッカーゼはAsCpf1のR1226Aに相当する変異を有する。

【0108】

追加のガイダンスとして、特に制限なく、Acidaminococcus種由来のC p f 1のNucドメインにおいてアルギニンからアラニンへの置換(R1226A)を行うと、C p f 1は、鎖を両方とも切断するヌクレアーゼからニッカーゼ(一本の鎖を切断

50

する)へと変換される。当業者には当然のことながら、酵素がA s C p f 1ではない場合、変異は、相当する位置の残基で行うことができる。特定の実施形態において、C p f 1はF n C p f 1であり、変異は、R 1 2 1 8位のアルギニンで行われる。特定の実施形態において、C p f 1はL b C p f 1であり、変異はR 1 1 3 8位のアルギニンで行われる。特定の実施形態において、C p f 1はM b C p f 1であり、変異はR 1 2 9 3位のアルギニンで行われる。

【0109】

C 2 c 1オルソログ

本発明は、サブタイプV - Bで示されるC 2 c 1遺伝子座に由来するC 2 c 1系ニッカーゼの使用を包含する。本明細書中、そのようなエフェクタータンパク質は、「C 2 c 1 p」、例えば、C 2 c 1タンパク質とも称する(及びそのようなエフェクタータンパク質またはC 2 c 1タンパク質またはC 2 c 1遺伝子座に由来するタンパク質も「C R I S P R酵素」と称する)。現在、サブタイプV - B遺伝子座は、c a s 1 - C a s 4融合物、c a s 2、C 2 c 1と示される別個の遺伝子、及びC R I S P Rアレイを包含する。C 2 c 1(C R I S P R関連タンパク質C 2 c 1)は、C a s 9の相当するドメインとホモログの関係にあるR u v C様ヌクレアーゼドメインをC a s 9の特徴的なアルギニンリッチクラスターのカウンターパートと合わせて有する巨大タンパク質(約1 1 0 0 ~ 1 3 0 0のアミノ酸)である。しかしながら、C 2 c 1には、全てのC a s 9タンパク質に存在するH N Hヌクレアーゼドメインが欠けており、R u v C様ドメインは、C a s 9とは対照的にC 2 c 1配列中で連続している。C a s 9では、このドメインには、H N Hドメインを含む長い挿入が含まれている。したがって、特定の実施形態において、C R I S P R - C a s酵素は、R u v C様ヌクレアーゼドメインのみを含む。

【0110】

C 2 c 1(C a s 1 2 bとしても知られる)タンパク質は、R N Aに誘導されるヌクレアーゼである。これによる切断は、ガイド配列及び直列反復を含むガイドR N Aを動員するt r a c r R N Aに依存しており、ガイド配列は、標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズして、D N A / R N Aヘテロ二本鎖を形成する。現在の研究に基づく、C 2 c 1ヌクレアーゼ活性も、P A M配列の認識を必要とし、これに依存する。C 2 c 1のP A M配列はTリッチ配列である。実施形態によっては、P A M配列は、5' T T N 3'または5' A T T N 3'であり、配列中、Nは、任意のヌクレオチドである。特定の実施形態において、P A M配列は、5' T T C 3'である。特定の実施形態において、P A Mは、P l a s m o d i u m f a l c i p a r u mの配列中にある。

【0111】

C 2 c 1は、標的遺伝子座においてねじれ型切断を作り、5'オーバーハング、すなわち「粘着末端」が、標的配列のP A M遠位側にできる。実施形態によっては、5'オーバーハングは、7 n tである。L e w i s a n d K e , M o l C e l l . 2 0 1 7 F e b 2 ; 6 5 (3) : 3 7 7 - 3 7 9を参照。

【0112】

C 2 c 1遺伝子は、複数の多様な細菌ゲノムにおいて見られ、典型的には、同じ遺伝子座でc a s 1、c a s 2、及びc a s 4遺伝子ならびにC R I S P Rカセットとともに見られる。すなわち、この推定新規C R I S P R - C a s系のレイアウトは、I I - B型のものと同様であるように見受けられる。そのうえさらに、C 2 c 1タンパク質は、C a s 9と同様に、活性R u v C様ヌクレアーゼ、アルギニンリッチ領域、及びZ nフィンガー(C a s 9には存在しない)を有する。

【0113】

特定の実施形態において、C R I S P Rニッカーゼは、A l i c y c l o b a c i l l u s属、D e s u l f o v i b r i o属、D e s u l f o n a t r o n u m属、O p i t u t a c e a e科、T u b e r i b a c i l l u s属、B a c i l l u s属、B r e v i b a c i l l u s属、C a n d i d a t u s、D e s u l f a t i r h a b d i u m属、C i t r o b a c t e r属、E l u s i m i c r o b i a門、M e t h y l o b a c t e

rium属、Omni trophica門、Phycisphaerae綱、Planctomycetes門、Spirochaete属、及びVerrucomicrobiaceae科を含む属の生物に由来するC2c1ニッカーゼである。

【0114】

さらなる特定の実施形態において、C2c1ニッカーゼは、Alicyclobacillus acidoterrestris (例えば、ATCC 49025)、Alicyclobacillus contaminans (例えば、DSM 17975)、Alicyclobacillus macrosporangius (例えば、DSM 17980)、Bacillus hisashii株C4、Candidatus Lindowbacteria細菌RIFCSFLOWO2、Desulfovibrio inopinatus (例えば、DSM 10711)、Desulfonatronum thiodismutans (例えば、MLF-1株)、Elusimicrobia門菌RIFOXYA12、Omni trophica WOR__2細菌RIFCSPHIGHO2、Opitutaceae科菌TAV5、Phycisphaerae綱菌ST-NAGAB-D1、Planctomycetes門菌RBG__13__46__10、Spirochaetes門菌GWB1__27__13、Verrucomicrobiaceae科菌UBA2429、Tuberibacillus calidus (例えば、DSM 17572)、Bacillus thermoamylovorans (例えば、B4166株)、Brevibacillus種CF112、Bacillus種NSP2.1、Desulfatirhabdium butyrativorans (例えば、DSM 18734)、Alicyclobacillus herbarius (例えば、DSM 13609)、Citrobacter freundii (例えば、ATCC 8090)、Brevibacillus agri (例えば、BAB-2500)、Methylobacterium nodulans (例えば、ORS 2060)から選択される種に由来するものである。

【0115】

ニッカーゼは、第一エフェクタータンパク質 (例えば、C2c1) オルソログに由来する第一断片及び第二エフェクター (例えば、C2c1) タンパク質オルソログに由来する第二断片を含むキメラエフェクタータンパク質を含む場合があり、ただし、第一及び第二エフェクタータンパク質オルソログは、異なっている。第一及び第二エフェクタータンパク質 (例えば、C2c1) オルソログの少なくとも一方は、Alicyclobacillus属、Desulfovibrio属、Desulfonatronum属、Opitutaceae科、Tuberibacillus属、Bacillus属、Brevibacillus属、Candidatus、Desulfatirhabdium属、Elusimicrobia門、Citrobacter属、Methylobacterium属、Omni trophica門、Phycisphaerae綱、Planctomycetes門、Spirochaete属、及びVerrucomicrobiaceae科に含まれる生物に由来するエフェクタータンパク質 (例えば、C2c1) を含む可能性がある。例えば、キメラエフェクタータンパク質は、第一断片及び第二断片を含み、第一断片及び第二断片のそれぞれは、Alicyclobacillus属、Desulfovibrio属、Desulfonatronum属、Opitutaceae科、Tuberibacillus属、Bacillus属、Brevibacillus属、Candidatus、Desulfatirhabdium属、Elusimicrobia門、Citrobacter属、Methylobacterium属、Omni trophica門、Phycisphaerae綱、Planctomycetes門、Spirochaete属、及びVerrucomicrobiaceae科に含まれる生物のC2c1から選択され、ただし、第一断片及び第二断片は、同一細菌に由来しない。例えば、キメラエフェクタータンパク質は、第一断片及び第二断片を含み、第一断片及び第二断片のそれぞれは、Alicyclobacillus acidoterrestris (例えば、ATCC 49025)、Alicyclobacil

lus contaminans (例えば、DSM 17975)、Alicyclobacillus macrosporangiidus (例えばDSM 17980)、Bacillus hisashii株C4、Candidatus Lindowbacteria細菌RIFCSPLOWO2、Desulfovibrio inopinatus (例えば、DSM 10711)、Desulfonatronum thiodismutans (例えば、MLF-1株)、Elusimicrobia門菌RIF OXYA12、Omnitrophica WOR__2細菌RIFCSPHIGHO2、Opitutaceae科菌TAV5、Phycisphaerae綱菌ST-NAGAB-D1、Planctomycetes門菌RBG__13__46__10、Spirochaetes門菌GWB1__27__13、Verrucomicrobiaceae科菌UBA2429、Tuberibacillus calidus (例えば、DSM 17572)、Bacillus thermoamylovorans (例えば、B4166株)、Brevibacillus種CF112、Bacillus種NSP2.1、Desulfatirhabdium butyrativorans (例えば、DSM 18734)、Alicyclobacillus herbarius (例えば、DSM 13609)、Citrobacter freundii (例えば、ATCC 8090)、Brevibacillus agri (例えば、BAB-2500)、Methylobacterium nodulans (例えば、ORS 2060)のC2c1から選択され、ただし、第一断片及び第二断片は、同一細菌に由来しない。

10

20

【0116】

より好適な実施形態において、C2c1pニッカーゼは、Alicyclobacillus acidoterrestriis (例えば、ATCC 49025)、Alicyclobacillus contaminans (例えば、DSM 17975)、Alicyclobacillus macrosporangiidus (例えばDSM 17980)、Bacillus hisashii株C4、Candidatus Lindowbacteria細菌RIFCSPLOWO2、Desulfovibrio inopinatus (例えば、DSM 10711)、Desulfonatronum thiodismutans (例えば、MLF-1株)、Elusimicrobia門菌RIF OXYA12、Omnitrophica WOR__2細菌RIFCSPHIGHO2、Opitutaceae科菌TAV5、Phycisphaerae綱菌ST-NAGAB-D1、Planctomycetes門菌RBG__13__46__10、Spirochaetes門菌GWB1__27__13、Verrucomicrobiaceae科菌UBA2429、Tuberibacillus calidus (例えば、DSM 17572)、Bacillus thermoamylovorans (例えば、B4166株)、Brevibacillus種CF112、Bacillus種NSP2.1、Desulfatirhabdium butyrativorans (例えば、DSM 18734)、Alicyclobacillus herbarius (例えば、DSM 13609)、Citrobacter freundii (例えば、ATCC 8090)、Brevibacillus agri (例えば、BAB-2500)、Methylobacterium nodulans (例えば、ORS 2060)から選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態において、C2c1pは、Alicyclobacillus acidoterrestriis (例えば、ATCC 49025)、Alicyclobacillus contaminans (例えば、DSM 17975)から選択される細菌種に由来する。

30

40

【0117】

特定の実施形態において、本明細書中称されたとおりのC2c1のホモログまたはオルソログは、C2c1と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりのC2c1のホモログまたはオルソログは、野生型C2c1と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%

50

、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。C2c1が1つまたは複数の変異を有する(変異型である)場合、本明細書中称されたとおりの当該C2c1のホモログまたはオルソログは、変異型C2c1と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0118】

ある実施形態において、C2c1タンパク質は、ある属の生物のオルソログである場合があり、そのような属として、Alicyclobacillus属、Desulfovibrio属、Desulfonatronum属、Opitutaceae科、Tuberibacillus属、Bacillus属、Brevibacillus属、Candidatus、Desulfatirhabdium属、Elusimicrobia門、Citrobacter属、Methylobacterium属、Omnitrophica門、Phycisphaerae綱、Planctomycetes門、Spirochaete属、及びVerrucomicrobiaceae科が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、V型Casタンパク質は、ある種の生物のオルソログである場合があり、そのような種として、Alicyclobacillus acidoterrestris(例えば、ATCC 49025)、Alicyclobacillus contaminans(例えば、DSM 17975)、Alicyclobacillus macrosporangiidus(例えば、DSM 17980)、Bacillus hisashii株C4、Candidatus Lindowbacteria細菌RIFCSPLWO2、Desulfovibrio inopinatus(例えば、DSM 10711)、Desulfonatronum thiodismutans(例えば、MLF-1株)、Elusimicrobia門菌RIFOXYA12、Omnitrophica WOR__2細菌RIFCSPIGHO2、Opitutaceae科菌TAV5、Phycisphaerae綱菌ST-NAGAB-D1、Planctomycetes門菌RBG__13__46__10、Spirochaetes門菌GWB1__27__13、Verrucomicrobiaceae科菌UBA2429、Tuberibacillus calidus(例えば、DSM 17572)、Bacillus thermoamylovorans(例えば、B4166株)、Brevibacillus種CF112、Bacillus種NSP2.1、Desulfatirhabdium butyrativorans(例えば、DSM 18734)、Alicyclobacillus herbarius(例えば、DSM 13609)、Citrobacter freundii(例えば、ATCC 8090)、Brevibacillus agri(例えば、BAB-2500)、Methylobacterium nodulans(例えば、ORS 2060)が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本明細書中称されたとおりのC2c1のホモログまたはオルソログは、本明細書中開示されるC2c1配列の1つまたは複数と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりのC2c1のホモログまたはオルソログは、野生型AacC2c1またはBthC2c1と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0119】

特定の実施形態において、本発明のC2c1ニッカーゼは、AacC2c1またはBthC2c1と少なくとも60%、より詳細には少なくとも70%、例えば少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列同一性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中称されたとおりのC2c1タンパク質は、野生型AacC2c1と少なくとも60%、例えば少なくとも70%、より詳細には少なくとも80%、より好ましくは少なくとも

10

20

30

40

50

85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列同一性を有する。特定の実施形態において、本発明のC2c1タンパク質は、AacC2c1との配列同一性が60%未満である。当業者ならわかるだろうが、これには、C2c1タンパク質の切断型が含まれ、それにより配列同一性は、切断型の長さにわたり決定される。

【0120】

ある特定の実施形態において、C2c1ニッカーゼは、*in vitro*系中または細胞中で、一過性にまたは安定して、提供されるまたは発現し、非特異的に細胞核酸を切断することを標的とするまたはそれを引き起こすようにされている場合がある。1つの実施形態において、C2c1は、ssDNA、例えば、ウイルスssDNAをロックダウンするように操作されている。別の実施形態において、C2c1は、RNAをロックダウンするように操作されている。このシステムは、ロックダウンが、細胞中または*in vitro*系中に存在する標的DNAに依存する、あるいはその系または細胞に標的核酸が加えられることにより引き起こされるように、考案することができる。

10

【0121】

ある特定の例示の実施形態において、C2c1タンパク質は、RuvCドメインに変異を有する触媒不活性C2c1である。実施形態によっては、触媒不活性C2c1タンパク質は、*Allicyclobacillus acidoterrestris*のC2c1のアミノ酸位置D570、E848、またはD977に相当する変異を有する。実施形態によっては、触媒不活性C2c1タンパク質は、*Allicyclobacillus acidoterrestris*のC2c1のD570A、E848A、またはD977Aに相当する変異を有する。

20

【0122】

ある特定の実施形態において、Cas系ニッカーゼは、Nucドメインに変異を有するC2c1ニッカーゼである。実施形態によっては、C2c1ニッカーゼは、*Allicyclobacillus acidoterrestris*のC2c1のアミノ酸位置R911、R1000、またはR1015に相当する変異を有する。実施形態によっては、C2c1ニッカーゼは、*Allicyclobacillus acidoterrestris*のC2c1のR911A、R1000A、またはR1015Aに相当する変異を有する。当業者には当然のことながら、酵素が上記のCRISPR-Cas酵素ではない場合、変異は、相当する位置の残基で行うことができる。

30

【0123】

変異は、隣接する残基、例えば、ヌクレアーゼ活性に関与する上記に示されるものの近くのアミノ酸で行うことができる。実施形態によっては、RuvCドメインのみが不活性化され、他の実施形態において、別の推定ヌクレアーゼドメインが不活性化され、この場合、エフェクタータンパク質複合体は、ニッカーゼとして機能し、1つのDNA鎖のみを切断する。実施形態によっては、2種のCRISPR-Casバリエーション（それぞれ異なるニッカーゼ）を用いて特異性を高め、2種のニッカーゼバリエーションは、標的でDNAを切断するのに用いられる（1つのDNA鎖のみが切断され続いて修復される標的外修飾は最小限に抑えつつまたは除外しながら、どちらのニッカーゼもDNA鎖を切断する）。

40

【0124】

ある特定の実施形態において、C2c1エフェクタータンパク質は、2つのC2c1エフェクタータンパク質分子を含むホモ二量体として、目的の標的遺伝子座に関連した配列またはその遺伝子座で配列を切断する。好適な実施形態において、ホモ二量体は、それぞれ個別のRuvCドメインに異なる変異を有する2つのC2c1エフェクタータンパク質分子を含む場合がある。

【0125】

ガイド配列

本明細書中使用される場合、「ガイド配列」、「crRNA」、「ガイドRNA」、または「単一ガイドRNA」、または「gRNA」、または「ガイド分子」という用語は、標的核酸配列とハイブリダイズし、ガイド配列及びCRISPRエフェクタータンパク質

50

を含むRNA標的指向性複合体の標的核酸配列に対する配列特異的結合を指示するのに十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを示す。いくつかの例示の実施形態において、相補性の程度は、適切な整列アルゴリズムを使用して最適に配列比較される場合、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%以上である。最適な配列比較は、配列の整列に適した任意のアルゴリズムを使用して決定される場合があり、その限定ではなく例として、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler変換に基づくアルゴリズム（例えば、Burrows Wheeler Aligner）、ClustalW、ClustalX、BLAT、Novoalign（Novocraft Technologies; www.novocraft.comで入手可能）、ELAND（Illumina, San Diego, CA）、SOAP（soap.genomics.org.cnで入手可能）、及びMaq（maq.sourceforge.netで入手可能）が挙げられる。核酸標的指向性複合体の標的核酸配列への配列特異的結合を指示するガイド配列（核酸標的指向性ガイドRNA内）の能力は、任意の適切なアッセイにより評価可能である。例えば、試験されるガイド配列を含む核酸標的指向性複合体を形成するのに十分な核酸標的指向性CRISPR系の構成要素は、核酸標的指向性複合体の構成要素をコードするベクターを用いるトランスフェクションなどにより、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に提供することができ、続いて、本明細書に記載されるとおりのSurveyorアッセイなどにより、標的核酸配列内の優先的標的指向性（例えば、切断）を評価することができる。同様に、標的核酸配列の切断は、試験管内で、標的核酸配列と、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含む核酸標的指向性複合体の構成要素とを提供すること、ならびに試験ガイド配列反応と対照ガイド配列反応の間で、標的配列での結合または切断速度を比較することにより評価可能である。他のアッセイも可能であり、当業者に思い浮かぶであろう。任意の標的核酸配列を標的とするように、ガイド配列、したがって核酸標的指向性ガイドを選択することができる。標的配列はDNAである場合がある。標的配列は、任意のRNA配列が可能である。実施形態によっては、標的配列は、メッセンジャーRNA（mRNA）、プレmRNA、リボソームRNA（rRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、低分子核小体RNA（snoRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、非コードRNA（ncRNA）、長非コードRNA（lncRNA）、及び低分子細胞質RNA（scRNA）からなる群より選択されるRNA分子内の配列である場合がある。いくつかの好適な実施形態において、標的配列は、mRNA、プレmRNA、及びrRNAからなる群より選択されるRNA分子内の配列である場合がある。いくつかの好適な実施形態において、標的配列は、ncRNA及びlncRNAからなる群より選択されるRNA分子内の配列である場合がある。いくつかのより好ましい実施形態において、標的配列は、mRNA分子またはプレmRNA分子内の配列である場合がある。

【0126】

実施形態によっては、核酸標的指向性ガイドは、核酸標的指向性ガイド内の二次構造の程度を低下するように選択される。実施形態によっては、核酸標的指向性ガイドのヌクレオチドのうち、最適にフォールディングされたときの自己相補的な塩基対形成に關与するヌクレオチドの割合は、約75%以下、約50%以下、約40%以下、約30%以下、約25%以下、約20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、約1%以下、またはそれ未満の%である。最適なフォールディングは、任意の適切なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定可能である。いくつかのプログラムは、最小ギブズ自由エネルギーの計算に基づくものである。そのようなアルゴリズムの1つの例は、mFoldであり、mFoldは、Zuker and Stiegler（Nucleic Acids Res. 9（1981），133-148）によって説明されている。フォールディングアルゴリズムの別の例は、重心構造予測アルゴリズムを使用す

るオンラインウェブサーバーRNAfoldであり、これは、Institute for Theoretical Chemistry at the University of Viennaで開発されたものである（例えば、A. R. Gruber et al., 2008, Cell 106(1): 23-24; 及びPA Car and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27(12): 1151-62を参照）。

【0127】

ある特定の実施形態において、ガイドRNAまたはcrRNAは、直列反復（DR）配列とガイド配列またはスペーサー配列とを含む、本質的にそれらからなる、あるいはそれらからなる場合がある。ある特定の実施形態において、ガイドRNAまたはcrRNAは、ガイド配列またはスペーサー配列に融合または連結された直列反復配列を含む、本質的にそれらからなる、あるいはそれらからなる場合がある。ある特定の実施形態において、直列反復配列は、ガイド配列またはスペーサー配列の上流（すなわち5'）に位置する場合がある。他の実施形態では、直列反復配列は、ガイド配列またはスペーサー配列の下流（すなわち、3'）に位置する場合がある。

10

【0128】

ある特定の実施形態において、crRNAは、ステムループ、好ましくは単一のステムループを含む。ある特定の実施形態において、直列反復配列は、ステムループ、好ましくは単一のステムループを形成する。

20

【0129】

ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、15～35ntである。ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、少なくとも15ヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、スペーサー長は、15～17nt、例えば15、16、または17nt、17～20nt、例えば17、18、19、または20nt、20～24nt、例えば20、21、22、23、または24nt、23～25nt、例えば23、24、または25nt、24～27nt、例えば24、25、26、または27nt、27～30nt、例えば27、28、29、または30nt、30～35nt、例えば30、31、32、33、34、または35nt、または35nt以上である。

【0130】

一般に、CRISPR-Cas、CRISPR-Cas9、またはCRISPR系とは、WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667) などの前述の文書で使用されているとおりのものであり、CRISPR関連（「Cas」）遺伝子の活性の発現または活性の誘導に関与する転写物及び他の配列要素を総称的に示し、これに含まれるものとして、Cas遺伝子をコードする配列、特にCRISPR-Cas9の場合はCas9遺伝子、tracr（トランス活性化CRISPR）配列（例えば、tracrRNAまたは活性部分tracrRNA）をコードする配列、tracr-mate配列（内因性CRISPR系の文脈において「直列反復」及びtracrRNAで処理された部分的な直列反復を含む）、ガイド配列（内因性CRISPR系の文脈において「スペーサー」とも称する）、または本明細書で使用されるとおりの「RNA（複数可）」という用語（例えば、Cas9をガイドするRNA（複数可）、例えばCRISPRRNA及びトランス活性化（tracr）RNAまたはシングルガイドRNA（sgRNA）（キメラRNA））、またはCRISPR遺伝子座からの他の配列及び転写物が挙げられる。一般に、CRISPR系は、標的配列の部位でCRISPR複合体の形成を促進する配列要素（内因性CRISPR系の文脈においてプロトスペーサーとも称する）を特徴とする。CRISPR複合体の形成の文脈において、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計された配列を示し、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションが、CRISPR複合体の形成を促進する。ガイド配列の中の、標的配列に対する相補性が切断活性に重要であるセクションは、本明細書中シード配列と呼ばれる。標的配列は、DNAまたはRNAポリヌクレオチドなどの任意のポリヌクレオチドを含むことができ

30

40

50

る。実施形態によっては、標的配列は、細胞の核または細胞質に位置し、細胞内に存在するミトコンドリア、オルガネラ、小胞、リボソーム、もしくは粒子の中にあるまたはそれに由来する核酸を含む場合がある。実施形態によっては、特に非核用途の場合、NLSは好ましくない。実施形態によっては、CRISPR系は、1つまたは複数の核輸出シグナル(NES)を含む。実施形態によっては、CRISPR系は、1つまたは複数のNLS及び1つまたは複数のNESを含む。実施形態によっては、以下の基準のいずれかまたは全てを満たす反復モチーフを検索することにより、*in silico*で直列反復を同定することができる：1．II型CRISPR遺伝子座に隣接するゲノム配列の2 Kbのウィンドウで見られる；2．20～50 bpの範囲；及び3．20～50 bpの間隔。実施形態によっては、これらの基準のうちの2つ、例えば1と2、2と3、または1と3が用いられる場合がある。いくつかの実施形態では、3つ全ての基準が用いられる場合がある。

10

【0131】

本発明の実施形態において、ガイド配列及びガイドRNA、すなわちCasを標的ゲノム遺伝子座にガイドすることができるRNAという用語は、WO 2014/09362 (PCT/US2013/074667)などの前述の引用文献のように同義で使用される。一般に、ガイド配列とは、標的配列とハイブリダイズし、標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指示するのに十分な、標的ポリヌクレオチド配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。実施形態によっては、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、適切な整列アルゴリズムを使用して最適に配列比較された場合、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、またはそれ以上である。最適な配列比較は、配列の整列に適した任意のアルゴリズムを使用して決定可能であり、そのようなアルゴリズムの限定ではなく例として、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler Transformに基づくアルゴリズム(例えば、Burrows Wheeler Aligner)、ClustalW、ClustalX、BLAT、Novoalign (Novocraft Technologies、www.novocraft.comで入手可能)、ELAND (Illumina、San Diego、CA)、SOAP (soap.genomics.org.cnで入手可能)、及びMaq (maq.sourceforge.netで入手可能)が挙げられる。実施形態によっては、ガイド配列は、約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、またはそれ以上のヌクレオチド長である。実施形態によっては、ガイド配列は、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチド長未満である。好ましくは、ガイド配列は、10～30ヌクレオチド長である。CRISPR複合体の標的配列への配列特異的結合を指示するガイド配列の能力は、任意の適切なアッセイにより評価可能である。例えば、試験されるガイド配列を含む、CRISPR複合体を形成するのに十分なCRISPR系の構成要素を、CRISPR配列の構成要素をコードするベクターによるトランスフェクションなどにより、対応する標的配列を有する宿主細胞に提供することができ、続いて、本明細書に記載されるとおりのSurveyorアッセイなどにより、標的配列内の優先的切断を評価することができる。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、試験管中で、標的配列と、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むCRISPR複合体の構成要素とを提供すること、ならびに試験ガイド配列反応と対照ガイド配列反応の間で、標的配列での結合または切断速度を比較することによって、評価することができる。他のアッセイも可能であり、当業者に思い浮かぶであろう。

20

30

40

【0132】

CRISPR-Cas系のいくつかの実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%以上、または約100%であることが可能であり；ガイドま

50

たはRNAまたはsgRNAは、約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、またはそれ以上のヌクレオチド長であることが可能であり；あるいは、ガイドまたはRNAまたはsgRNAは、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12、またはそれ未満のヌクレオチド長であることが可能であり；有利には、tracrRNAは、30または50ヌクレオチド長である。しかしながら、本発明のある態様は、標的外相互作用を低減すること、例えば、低い相補性を有する標的配列とのガイドの相互作用を低減することを目的とする。実際、そのような例では、本発明は、80%超～約95%の相補性、例えば83%～84%または88～89%または94～95%の相補性を有する標的配列と標的外配列をCRISPR-Cas系が識別する（例えば、18ヌクレオチドを有する標的と、1、2または3つのミスマッチを有する18ヌクレオチドの標的外のものを識別する）ことができるようになる変異を含むことが示されている。したがって、本発明の文脈において、ガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性の程度は、94.5%または95%または95.5%または96%または96.5%または97%または97.5%または98%または98.5%または99%または99.5%または99.9%超、または100%である。標的外では、配列とガイドとの間の相補性が100%または99.9%または99.5%または99%または99%または98.5%または98%または97.5%または97%または96.5%または96%または95.5%または95%または94.5%または94%または93%または92%または91%または90%または89%または88%または87%または86%または85%または84%または83%または82%または81%または80%未満であり、標的外では配列とガイドとの間で100%または99.9%または99.5%または99%または99%または98.5%または98%または97.5%または97%または96.5%または96%または95.5%または95%または94.5%の相補性であることが有利である。

10

20

【0133】

ガイド修飾

ある特定の実施形態において、本発明のガイドは、非天然の核酸、及び/または非天然のヌクレオチド、及び/またはヌクレオチドアナログ、及び/または化学修飾を含む。非天然の核酸として、例えば、天然のヌクレオチドと非天然のヌクレオチドの混合物が挙げられる。非天然のヌクレオチド及び/またはヌクレオチドアナログは、リボース部分、リン酸部分、及び/または塩基部分で修飾されている場合がある。本発明のある実施形態において、ガイド核酸は、リボヌクレオチド及び非リボヌクレオチドを含む。そのような実施形態の1つにおいて、ガイドは、1つまたは複数のリボヌクレオチド及び1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチドを含む。本発明のある実施形態において、ガイドは、1つまたは複数の非天然のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ、例えば、ホスホロチオアート結合を有するヌクレオチド、ボラノリン酸連結を有するヌクレオチド、リボース環の2'炭素と4'炭素との間にメチレン架橋を有するロックド核酸(LNA)ヌクレオチド、または架橋型核酸(BNA)を含む。修飾ヌクレオチドの他の例として、2'-O-メチルアナログ、2'-デオキシアナログ、2'-チオウリジンアナログ、N6-メチルアデノシンアナログ、または2'-フルオロアナログが挙げられる。修飾塩基のさらなる例として、2'-アミノプリン、5'-プロモ-ウリジン、シュードウリジン(Ψ)、N¹-メチルシュードウリジン($me^1\Psi$)、5'-メトキシウリジン($5moU$)、イノシン、7'-メチルグアノシンが挙げられるが、これらに限定されない。ガイドRNAの化学修飾の例として、限定するものではないが、2'-O-メチル(M)、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオアート(MS)、ホスホロチオアート(PS)、S-拘束エチル(cEt)、または2'-O-メチル3'-チオPACET(MSP)を1つまたは複数の末端ヌクレオチドに組み込むことが挙げられる。そのように化学修飾されたガイドは、非修飾ガイドと比較した場合に安定性の向上及び活性の増大を含む可能性があるが、標的外と比較しての標的的中特異性は予測不可能である(Hendel, 2015, Nat Bio

30

40

50

technol. 33(9):985-9, doi:10.1038/nbt.3290、2015年6月29日オンライン公開; Ragdarm et al., 0215, PNAS, E7110-E7111; Allerson et al., J. Med. Chem. 2005, 48:901-904; Bramsen et al., Front. Genet., 2012, 3:154; Deng et al., PNAS, 2015, 112:11870-11875; Sharma et al., MedChemComm., 2014, 5:1454-1471; Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33(9): 985-989; Li et al., Nature Biomedical Engineering, 2017, 1, 0066 DOI:10.1038/s41551-017-0066を参照)。実施形態によっては、ガイドRNAの5'末端及び/または3'末端は、さまざまな機能性部分によって修飾され、そのような機能性部分として、蛍光色素、ポリエチレングリコール、コレステロール、タンパク質、または検出タグが挙げられる。(Kelly et al., 2016, J. Biotech. 233:74-83を参照のこと)。ある特定の実施形態において、ガイドは、標的DNAに結合する領域にリボヌクレオチドを含み、Cas9、Cpf1、またはC2c1に結合する領域に1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチド及び/またはヌクレオチドアナログを含む。本発明のある実施形態において、デオキシリボヌクレオチド及び/またはヌクレオチドアナログは、改変ガイド構造、例えば、限定するものではないが、5'及び/または3'末端、ステムループ領域、及びシード領域などに組み込まれる。ある特定の実施形態において、こうした修飾は、ステムループ領域の5'ハンドルには存在しない。ガイドのステムループ領域の5'ハンドルを化学修飾するとガイドの機能が消失する場合がある(Li, et al., Nature Biomedical Engineering, 2017, 1:0066を参照)。ある特定の実施形態において、ガイドのヌクレオチドのうちの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、または75のヌクレオチドが化学的に修飾される。実施形態によっては、ガイドの3'末端または5'末端いずれかに位置する3~5つのヌクレオチドが化学修飾される。実施形態によっては、シード領域にごく軽微な修飾、例えば2'-F修飾などが導入される。実施形態によっては、ガイドの3'末端に2'-F修飾が導入される。ある特定の実施形態において、ガイドの5'末端及び/または3'末端に位置する3~5ヌクレオチドが、2'-O-メチル(M)、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオアート(MS)、S-拘束エチル(cEt)、または2'-O-メチル-3'-チオPACE(MSP)で化学的に修飾される。そのような修飾によってゲノム編集効率が向上する可能性がある(Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33(9):985-989を参照)。ある特定の実施形態において、遺伝子破壊のレベルを向上させるために、ガイドのホスホジエステル結合の全てがホスホロチオアート(PS)で置き換えられる。ある特定の実施形態において、ガイドの5'末端及び/または3'末端に位置する5ヌクレオチド超が、2'-O-Me、2'-F、またはS-拘束エチル(cEt)で化学的に修飾される。そのように化学修飾されたガイドでは、介在する遺伝子破壊のレベルが向上する可能性がある(Ragdarm et al., 0215, PNAS, E7110-E7111を参照)。本発明のある実施形態において、ガイドは、その3'末端及び/または5'末端に化学部分を含むように修飾される。そのような部分として、アミン、アジド、アルキン、チオ、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)、またはローダミンが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、化学部分は、リンカー、例えばアルキル鎖などによってガイドに結合される。ある特定の実施形態において、修飾ガイドの化学部分は、ガイドを別の分子、例えば、DNA、RNA、タンパク質、またはナノ粒子などに付加するために使用することができる。そのように化学修飾されたガイドは、CRISPR系によって一般に編集された細胞の同定ま

たは富化に使用することができる (Lee et al., eLife, 2017, 6:e25312, DOI:10.7554を参照)。

【0134】

ある特定の実施形態において、本明細書中提供されるとおりのCRISPR系は、ガイド配列を含むcrRNAまたは類似ポリヌクレオチドを利用することができ、ポリヌクレオチドは、RNA、DNA、またはRNAとDNAの混合物であり、及び/またはポリヌクレオチドは、1つまたは複数のヌクレオチドアナログを含む。配列は、任意の構造を含むことができ、そのような構造として、天然crRNAの構造、例えば、バルジ、ヘアピン、またはステムループ構造が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、ガイド配列を含むポリヌクレオチドは、第二のポリヌクレオチド配列と二本鎖を形成し、第二のポリヌクレオチド配列は、RNA配列またはDNA配列であることが可能である。

10

【0135】

ある特定の実施形態において、化学修飾されたガイドRNAが使用される。ガイドRNAの化学修飾の例として、限定するものではないが、1つまたは複数の末端ヌクレオチドへの2'-O-メチル(M)、2'-O-メチル3'ホスホロチオアート(MS)、または2'-O-メチル3'チオPACE(MSP)の組み込みが挙げられる。そのように化学修飾されたガイドRNAは、非修飾RNAと比較した場合に安定性の向上及び活性の増大を含む可能性があるが、標的外と比較しての標的中の特異性は予測不可能である(Hendel, 2015, Nat Biotechnol. 33(9):985-9, doi:10.1038/nbt.3290, 2015年6月29日にオンライン公開、を参照)。化学修飾されたガイドRNAは、さらに、限定するものではないが、ホスホロチオアート結合を有するRNA、及びリボース環の2'炭素と4'炭素との間にメチレン架橋を有するロックド核酸(LNA)ヌクレオチドを含む。

20

【0136】

実施形態によっては、ガイド配列は、長さが約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75ヌクレオチドある、またはそれより長い。実施形態によっては、ガイド配列は、長さが、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチドある、またはそれより短い。好ましくは、ガイド配列は、10~30ヌクレオチド長である。CRISPR複合体が標的配列に対して配列特異的に結合するように指示するガイド配列の能力は、任意の適切なアッセイにより評価可能である。例えば、CRISPR複合体を形成するのに十分なCRISPR系の構成要素は、試験されるガイド配列も含めて、例えばCRISPR配列の構成要素をコードするベクターを用いるトランスフェクションにより、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に提供することができ、続いてSurveyorアッセイなどにより、標的配列内の優先的切断を評価することができる。同様に、標的RNAの切断は、試験管内で、標的配列と、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むCRISPR複合体の構成要素とを提供すること、ならびに試験ガイド配列反応と対照ガイド配列反応の間で、標的配列での結合または切断速度を比較することにより評価可能である。他のアッセイも可能であり、当業者に思い浮かぶであろう。

30

40

【0137】

実施形態によっては、ガイドに対する修飾は、化学修飾、挿入、削除、または分割である。実施形態によっては、化学修飾として、2'-O-メチル(M)アナログ、2'-デオキシアナログ、2'-チオウリジンアナログ、N6-メチルアデノシンアナログ、2'-フルオロアナログ、2'-アミノプリン、5'-プロモ-ウリジン、シュードウリジン(Ψ)、N¹-メチルシュードウリジン(me¹ Ψ)、5'-メトキシウリジン(5moU)、イノシン、7'-メチルグアノシン、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオアート(MS)、S-拘束エチル(cEt)、ホスホロチオアート(PS)、または2'-O-メチル-3'-チオPACE(MSP)を組み込むことが挙げられるが、これらに限定されない。

50

実施形態によっては、ガイドは、1つまたは複数のホスホロチオアート修飾を含む。ある特定の実施形態において、ガイドのヌクレオチドのうちの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、または25個が化学修飾される。ある特定の実施形態において、シード領域の1つまたは複数のヌクレオチドが化学修飾される。ある特定の実施形態において、3'末端の1つまたは複数のヌクレオチドが化学修飾される。ある特定の実施形態において、5'ハンドルのヌクレオチドはいずれも、化学修飾されない。実施形態によっては、シード領域における化学修飾は、軽微な修飾、例えば、2'-フルオロアナログの組み込みなどである。特定の実施形態において、シード領域のヌクレオチドの1つが、2'-フルオロアナログで置き換えられる。実施形態によっては、3'末端の5または10個のヌクレオチドが化学修飾される。Cpf1 CrRNAの3'末端をそのように化学修飾することで、遺伝子切断効率が改善される(Li, et al., Nature Biomedical Engineering, 2017, 1:0066を参照)。特定の実施形態において、3'末端の5つのヌクレオチドが、2'-フルオロアナログで置き換えられる。特定の実施形態において、3'末端の10個のヌクレオチドが、2'-フルオロアナログで置き換えられる。特定の実施形態において、3'末端の5つのヌクレオチドが、2'-O-メチル(M)アナログで置き換えられる。

10

【0138】

実施形態によっては、ガイドの5'ハンドルのループが修飾される。実施形態によっては、ガイドの5'ハンドルのループは、削除、挿入、分割、または化学修飾を有するように修飾される。ある特定の実施形態において、ループは、3つ、4つ、または5つのヌクレオチドを有する。ある特定の実施形態において、ループは、UCUU、UUUU、UAUU、またはUGUUという配列を含む。

20

【0139】

ガイド配列、従って核酸標的指向性ガイドRNAは、任意の標的核酸配列を標的とするように選択可能である。CRISPR複合体の形成の文脈において、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計されている配列を示し、標的配列とガイド配列の間でのハイブリダイゼーションが、CRISPR複合体の形成を促進する。標的配列は、RNAポリヌクレオチドを含む場合がある。「標的RNA」という用語は、標的配列であるまたは標的配列を含むRNAポリヌクレオチドを示す。言い換えると、標的RNAは、gRNA、すなわちガイド配列の一部が相補性を有するように設計されており、CRISPRエフェクタータンパク質及びgRNAを含む複合体が介在するエフェクター機能がそれに向けられている、RNAポリヌクレオチドまたはRNAポリヌクレオチドの一部の場合がある。実施形態によっては、標的配列は、細胞の核または細胞質に存在する。標的配列はDNAである場合がある。標的配列は、任意のRNA配列である場合がある。実施形態によっては、標的配列は、メッセンジャーRNA(mRNA)、プレmRNA、リボソームRNA(rRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、低分子核小体RNA(snoRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、非コードRNA(ncRNA)、長非コードRNA(lncRNA)、及び低分子細胞質RNA(scRNA)からなる群より選択されるRNA分子内の配列である場合がある。いくつかの好適な実施形態において、標的配列は、mRNA、プレmRNA、及びrRNAからなる群より選択されるRNA分子内の配列である場合がある。いくつかの好適な実施形態において、標的配列は、ncRNA及びlncRNAからなる群より選択されるRNA分子内の配列である場合がある。いくつかのより好適な実施形態において、標的配列は、mRNA分子またはプレmRNA分子内の配列である場合がある。

30

40

【0140】

ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、28ヌクレオチド未満である。ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、少なくとも18

50

ヌクレオチドあり、かつ28ヌクレオチド未満である。ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、19~28ヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、19~25ヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、20ヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、23ヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長は、25ヌクレオチドである。

【0141】

ある特定の実施形態において、切断効率の調節は、スペーサー/標的側にあるミスマッチの位置も含めて、スペーサー配列と標的配列の間にミスマッチを導入すること、例えば1つまたは複数のミスマッチ、例えば1つまたは2つのミスマッチを導入することにより活用可能である。例えば、より中心近く(すなわち、3'または5'ではない)にダブルミスマッチがあるほど、切断効率が受ける影響は大きくなる。したがって、スペーサー側でミスマッチ位置を選択することにより、切断効率を調節することができる。例として、標的の切断が100%未満であることが望ましい場合(例えば、細胞集団において)、スペーサーと標的配列の間の1つまたは複数、例えば、好ましくは2つのミスマッチを、スペーサー配列に導入することができる。ミスマッチ位置がスペーサー側でより中心寄りであると、切断パーセンテージはより低くなる。

10

【0142】

ある特定の例示の実施形態において、切断効率は、単一ヌクレオチドで異なる2つ以上の標的、例えば、単一ヌクレオチド多型(SNP)、多様性、または(点)変異を識別することができる単一ガイドを設計することにより活用される場合がある。CRISPRエフェクターは、SNP(または他の単一ヌクレオチド多様性)に対する感度を低下させていながらも、継続してある一定レベルの効率でSNP標的を切断する場合がある。すなわち、2つの標的、または1組の標的に関して、標的のうちの1つに対して相補的であるヌクレオチド配列を持つようにガイドRNAを設計する、すなわち標的的中SNPを設計することができる。ガイドRNAは、さらに、合成ミスマッチを有するように設計される。本明細書中使用される場合、「合成ミスマッチ」は、天然のSNPの上流または下流、例えば、最大で5ヌクレオチド上流または下流、例えば、4、3、2、または1ヌクレオチド上流または下流、好ましくは最大で3ヌクレオチド上流または下流、より好ましくは最大で2ヌクレオチド上流または下流、特に好ましくは1ヌクレオチド上流または下流(すなわちSNPに隣接して)に導入される非天然のミスマッチを示す。CRISPRエフェクターが標的的中SNPに結合するとき、1つのミスマッチのみが合成ミスマッチとの間に形成されることになり、CRISPRエフェクターは引き続き活性化されて検出可能なシグナルが生成することになる。ガイドRNAが標的外SNPとハイブリダイズするとき、2つのミスマッチ、SNPによるミスマッチ及び合成ミスマッチによるミスマッチが形成されることになり、検出可能なシグナルが生成しない。すなわち、本明細書中開示されるシステムは、集団内のSNPを識別するように設計することができる。例えば、本システムを使用して、単一SNPで異なる病原性株を識別する、またはある特定の疾患特異的SNPを検出することができ、そのようなSNPとして、疾患関連SNP、例えば特に限定されないが、がん関連SNPなどが挙げられるが、これに限定されない。

20

30

40

【0143】

ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、SNPがスペーサー配列の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、または30位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、SNPがスペーサー配列の1、2、3、4、5、6、7、8、または9位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、SNPがスペーサー配列の2、3、4、5、6、または7位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、SNPがスペーサー配列の3、4、5、または6位(5'末端から開始して)に位

50

置するように設計される。ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、SNPがスパーサー配列の3位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。

【0144】

ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、ミスマッチ(例えば、合成ミスマッチ、すなわちSNPを除く追加ミスマッチ)がスパーサー配列の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、または30位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、ミスマッチがスパーサー配列の1、2、3、4、5、6、7、8、または9位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、ミスマッチがスパーサー配列の4、5、6、または7位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、ミスマッチがスパーサー配列の5位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。

10

【0145】

ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、ミスマッチがSNPの2ヌクレオチド上流に位置する(すなわち1つのヌクレオチドを間に挟む)ように設計される。

【0146】

ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、ミスマッチがSNPの2ヌクレオチド下流に位置する(すなわち1つのヌクレオチドを間に挟む)ように設計される。

20

【0147】

ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、ミスマッチがスパーサー配列の5位(5'末端から開始して)に位置し、SNPがスパーサー配列の3位(5'末端から開始して)に位置するように設計される。

【0148】

本明細書中記載される実施形態は、本明細書中考察されたとおりの真核細胞に(in vitroで、すなわち単離された真核細胞に)1つまたは複数のヌクレオチド修飾を誘導することを包含し、細胞に本明細書中考察されたとおりのベクターを送達することを含む。変異(複数可)は、ガイド(複数可)RNA(複数可)を介した細胞(複数可)の各標的配列での1つまたは複数のヌクレオチドの導入、削除、または置換を含むことができる。変異は、ガイド(複数可)RNA(複数可)を介した当該細胞(複数可)の各標的配列での1~75ヌクレオチドの導入、削除、または置換を含むことができる。変異は、ガイド(複数可)RNA(複数可)を介した当該細胞(複数可)の各標的配列における1、5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、または75ヌクレオチドの導入、削除、または置換を含むことができる。変異は、ガイド(複数可)RNA(複数可)を介した、当該細胞(複数可)の各標的配列における5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、または75ヌクレオチドの導入、削除、または置換を含むことができる。変異は、ガイド(複数可)RNA(複数可)を介した当該細胞(複数可)の各標的配列の10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、または75ヌクレオチドの導入、削除、または置換を含むことができる。変異は、ガイド(複数可)RNA(複数可)を介した当該細胞(複数可)の各標的配列での20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、または75ヌクレオチドの導入、削除、または置換を含むことができる。変異は、ガイド(複数可)RNA(複数可)を介した当該細胞(複数可)の各標的配列での40、45、50、75、100、200、300、400、または500ヌクレオチドの導入、削除、または置換を含むことができる。

30

40

【0149】

典型的には、内因性CRISPR系の文脈において、CRISPR複合体の形成(標的

50

配列とハイブリダイズし、1つまたは複数のC a sタンパク質と複合体を形成したガイド配列を含む)は、標的配列において、またはその付近(例えば、そこから1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれ以上の塩基対内)での切断をもたらすが、例えば二次構造に依存する場合があります、特にRNA標的の場合などでそうである。

【0150】

増幅試薬

ある特定の例示の実施形態において、本明細書中開示されるシステムは、増幅試薬を含む場合がある。核酸の増幅に有用な種々の構成要素または試薬は、本明細書中記載される。例えば、本明細書中記載されるとおりの増幅試薬として、トリス緩衝剤などの緩衝剤を挙げることができる。トリス緩衝剤は、所望の用途または使用に適切な任意の濃度で使用可能であり、濃度として、例えば、1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、25 mM、50 mM、75 mM、1 Mなどが挙げられるが、これらに限定されない。当業者なら、本発明で使用するのに適切な、トリスなどの緩衝剤の濃度を決定することができるだろう。

【0151】

塩、例えば、塩化マグネシウム(MgCl₂)、塩化カリウム(KCl)、または塩化ナトリウム(NaCl)が、核酸断片の増幅を改善する目的で、PCRなどの増幅反応に含まれている場合がある。塩濃度は特定の反応及び応用に依存することになるものの、実施形態によっては、特定の塩濃度で、特定の大きさの核酸断片が最適に産生される場合がある。生成物が大きくなると、所望の結果をもたらす目的で、必要とされる塩濃度も変化する可能性があり、典型的には低くなるが、生成物がより小さい場合の増幅は、塩濃度が高い方がより良い結果をもたらす可能性がある。当業者には当然のことながら、塩の存在及び/または濃度は、塩濃度の変更に合わせて、生物学的または化学反応のストリンジェンシーを変更する場合があります、したがって、本発明の方法に最適であり本明細書中記載されるとおりの条件を提供する任意の塩を使用することができる。

【0152】

生物学的または化学反応の他の成分として、細胞中の材料を分析するために細胞を破壊して開くまたは溶解させる目的で、細胞溶解成分を挙げることができる。細胞溶解成分として、界面活性剤、上記のとおり塩、例えば、NaCl、KCl、硫酸アンモニウム[(NH₄)₂SO₄]、または他のものを挙げることができるが、これらに限定されない。本発明に適切である可能性がある界面活性剤として、Triton X-100、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、CHAPS(3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート)、エチルトリメチルアンモニウム=プロミド、ノニルフェノキシポリエトキシエタノール(NP-40)が挙げられる。界面活性剤の濃度は、特定の用途に依存する場合があります、場合によっては、反応に対して特異的である場合がある。増幅反応は、本明細書中詳細に記載されるとおり、任意の濃度で使われるdNTP及び核酸プライマーを含む場合がある。

【0153】

増幅反応は、本発明に適切な任意の濃度で使われるdNTP及び核酸プライマーを含む場合があり、例えば、その濃度として、100 nM、150 nM、200 nM、250 nM、300 nM、350 nM、400 nM、450 nM、500 nM、550 nM、600 nM、650 nM、700 nM、750 nM、800 nM、850 nM、900 nM、950 nM、1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM、450 mM、500 mMなどが挙げられるが、これらに限定されない。同様に、本発明に従って有用なポリメラーゼは、当該分野で既知であり本発明にとって有用であれば、特定のポリメラーゼでも一般的なポリメラーゼでもどれでもよく、その

ようなポリメラーゼとして、Taqポリメラーゼ、Q5ポリメラーゼなどが挙げられる。

【0154】

実施形態によっては、本明細書中記載されるとおりの増幅試薬は、ホットスタート増幅で使用するのに適切である場合がある。ホットスタート増幅は、実施形態によっては、アダプター分子またはオリゴの二量体化を削減または排除するのに、あるいはその他の望ましくない増幅産物またはアーチファクトを防いで所望の産物の最適な増幅を得るのに、有益である場合がある。本明細書中記載される増幅で使用する多くの成分は、ホットスタート増幅でも使用することができる。実施形態によっては、ホットスタート増幅で使用するのに適切な試薬または成分が、適宜、1種または複数の組成成分の代わりに使用される場合がある。例えば、特定の温度ではあるポリメラーゼが、他の反応条件では他の試薬が、そこで所望の活性を示すものが使用される場合がある。実施形態によっては、ホットスタート増幅用に設計されたまたは最適化された試薬が使用される場合があり、例えば、ポリメラーゼは、遺伝子転位後に、または特定温度に到達後に、活性化される場合がある。そのようなポリメラーゼは、抗体に基づくまたはアプタマーに基づく場合がある。本明細書中記載されるポリメラーゼは、当該分野で既知である。そのような試薬の例として、ホットスタートポリメラーゼ、ホットスタートdNTP、及びフォトケージド(photo-caged)dNTPを挙げることができるが、これらに限定されない。そうした試薬は、当該分野で既知であり利用可能である。当業者なら、個別の試薬にとって適切なように最適温度を決定することができる。

10

20

【0155】

ポリメラーゼ

本明細書中のシステム及び方法は、標的配列の増幅にポリメラーゼを利用する。本発明に従って有用なポリメラーゼは、当該分野で既知であり、本発明に有用であれば、どのような特異的または汎用ポリメラーゼでも可能であり、そのようなポリメラーゼとして、Taqポリメラーゼ、Q5ポリメラーゼなどが挙げられる。複数の実施形態において、増幅を利用して、ニックングされたDNA片をサイクル反応中でニックング及び拡張することができ、このサイクルがニックング部位間の標的を指数関数的に増幅させることができる。複数の実施形態において、ポリメラーゼは、Bst 2.0 DNAポリメラーゼ、Bst 2.0 WarmStart DNAポリメラーゼ、Bst 3.0 DNAポリメラーゼ、全長Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bst DNAポリメラーゼ、巨大断片Bsu DNAポリメラーゼ、phi29 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Gstポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、E.coli DNAポリメラーゼIのクレノー断片、KlenTaq、Pol III DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、Gstポリメラーゼ、及びシーケナーゼDNAポリメラーゼから選択することができる。

30

40

【0156】

増幅は、等温であること及び温度に合わせて選択することが可能である。1つの実施形態において、増幅は、37 で迅速に進行する。他の実施形態において、等温増幅の温度は、異なる温度で作動可能なポリメラーゼ（例えばBsu、Bst、Phi29、クレノー断片など）の選択により、選択される場合がある。ニックーゼに基づく増幅は、ある範囲内の温度またはある一定温度で行うことができる。ある特定の実施形態において、ニックーゼに基づく増幅は、約50 ~ 59、約60 ~ 72、または約37で行うことができる。Cas系ニックーゼ及びポリメラーゼは、同一温度下で、または異なる温度下で、機能することができる。

【0157】

等温反応は、一般に、極度の温度変化サイクルを伴わず行われる、すなわち約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20より上がる温度変動を伴わず、あるいは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または2

50

0 より下がる温度変動を伴わず行われる反応を示す。ある特定の実施形態において、等温反応は、ポリメラーゼにとって作動可能な温度範囲で行われる。

【0158】

実施形態によっては、本明細書中記載されるとおりの増幅試薬は、ホットスタート増幅で使用するのに適切である場合がある。ホットスタート増幅は、実施形態によっては、アダプター分子またはオリゴの二量体化を削減または排除するのに、あるいはその他の望ましくない増幅産物またはアーチファクトを防いで所望の産物の最適な増幅を得るのに、有益である場合がある。増幅で使用する本明細書中記載される多くの成分は、ホットスタート増幅でも使用することができる。実施形態によっては、ホットスタート増幅で使用するのに適切な試薬または成分が、適宜、1種または複数の組成成分の代わりに使用される場合がある。例えば、特定の温度ではあるポリメラーゼが、他の反応条件では他の試薬が、そこで所望の活性を示すものが使用される場合がある。実施形態によっては、ホットスタート増幅用に設計されたまたは最適化された試薬が使用される場合があり、例えば、ポリメラーゼは、遺伝子転位後に、または特定温度に到達後に、活性化される場合がある。そのようなポリメラーゼは、抗体に基づくまたはアプタマーに基づく場合がある。本明細書中記載されるポリメラーゼは、当該分野で既知である。そのような試薬の例として、ホットスタートポリメラーゼ、ホットスタートdNTP、及びフォトケージド(photo-caged)dNTPを挙げることができるが、これらに限定されない。そうした試薬は、当該分野で既知であり利用可能である。当業者なら、個別の試薬にとって適切なように最適温度を決定することができる。

10

20

【0159】

プライマー対

プライマー対は、本明細書中提供されるシステム及び方法の実施形態で使用される。プライマー対は、第一プライマー及び第二プライマーを含む。第一プライマーは、標的核酸の第一位置と相補的な部分を含み、及び第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含む。第二プライマーは、標的核酸の第二位置と相補的な部分を含み、及び第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む。

【0160】

ある態様において、第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対が、反応混合物に提供され、第一プライマーは、標的核酸の第一鎖と相補的な部分及び第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含み、第二プライマーは、標的核酸の第二鎖と相補的な部分及び第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む。

30

【0161】

ある態様において、第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対が、反応混合物に提供され、第一プライマーは、標的核酸の1つの鎖の第一位置と相補的な部分及び第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含み、第二プライマーは、標的核酸の当該鎖の第二位置と相補的な部分及び第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む。

【0162】

特定の実施形態において、増幅反応混合物は、さらに、標的核酸鎖とハイブリダイズすることができるプライマーを含む場合がある。「ハイブリダイゼーション」という用語は、オリゴヌクレオチドプライマーが一本鎖核酸テンプレート鎖の一方にあるその相補配列に対してのみ特異的に結合する条件下で、オリゴヌクレオチドプライマーがテンプレートのある領域に結合し、テンプレートの他の領域には結合しないことを示す。ハイブリダイゼーションの特異性は、オリゴヌクレオチドプライマーの長さ、ハイブリダイゼーション反応が行われる温度、イオン強度、及びpHにより影響を受ける場合がある。「プライマー」という用語は、標的核酸の一本鎖領域に結合して標的核酸鎖のポリメラーゼ依存性複製を促進することができる一本鎖核酸を示す。「相補的な」または「補体(複数可)」である核酸(複数可)とは、標準のワトソン・クリック、フーグスティーン、または逆フーグスティーン結合相補性則に従って塩基対形成することができるものである。

40

【0163】

50

ある特定の実施形態において、反応には、延長された鎖とのハイブリダイゼーション、続いてポリメラーゼによるプライマーのさらなる延長により、2つのdsDNA片を生成させることができるプライマーが含まれ、第一のdsDNAは、第一鎖CRISPRガイド部位または第一及び第二鎖CRISPRガイド部位の両方を含み、第二dsDNAは、第二鎖CRISPRガイド部位または第一及び第二鎖CRISPRガイド部位の両方を含む。これらのdsDNA片は、サイクル反応中で継続してニッキング及び延長が行われ、このサイクルによりニッキング部位間の標的領域が指数関数的に増幅される。

【0164】

本アプローチは、固定された配列優先性を持つニッキング酵素を用いる（例えば、ニッキング酵素増幅反応、すなわちNEARにおいて）これまでのニッキング等温増幅技法に勝る利点を提供する。これまでのニッキング等温増幅技法は、ニッキング基質を標的の末端に付加するプライマーがアニーリング及び延長を行えるように元来のdsDNA標的を変性する必要がある。ガイドRNAを介してニッキング部位をプログラムすることが可能なCRISPRニッカーゼを用いる本発明の方法は、変性工程を必要としないことを意味し、これにより、全反応を真に等温にすることが可能となる。反応が簡素化されるのは、ニッキング基質を付加するプライマーが、反応の後段で使用されるプライマーとは異なることが理由であるが、このことは、NEARがプライマーセットを2つ（すなわち4つのプライマー）を必要とするのに対して、Cpf1ニッキング増幅などのCRISPRニッキングがプライマーセットを1つ（すなわち2つのプライマー）しか必要としないことを意味する。このことは、CRISPRニッキング増幅を、さらにより簡素かつ簡便にして、変性及びそれに続く等温への冷却を行うための複雑な指示なしで操作できるようにして、より簡素で、より迅速な増幅法を提供する。

【0165】

プライマーは、プロモーター配列を含むことができる。ある特定の実施形態において、プロモーター配列とは、任意選択の検出工程で使用可能な配列である。複数の実施形態において、プライマーは、SHERLOCK検出法で使用可能なT7プロモーター配列を含む。さらに下流のシステム及び方法で使用するために、他のプロモーター配列を、当業者は選択することができる。

【0166】

核酸は、重合工程に供することができる。DNAポリメラーゼは、増幅しようとする核酸がDNAである場合に選択される。当初の標的がRNAである場合、最初に逆転写酵素を使用してRNA標的をcDNA分子にコピーすることができ、それからcDNAをさらに増幅する。

【0167】

増幅反応は、本発明に適切な任意の濃度で使用されるdNTP及び核酸プライマーを含む場合があり、濃度として例えば、100nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM、500nM、550nM、600nM、650nM、700nM、750nM、800nM、850nM、900nM、950nM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、150mM、200mM、250mM、300mM、350mM、400mM、450mM、500mM、などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0168】

標的核酸

CRISPR複合体の形成の文脈において、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計されている配列を示し、標的配列とガイド配列の間でのハイブリダイゼーションは、CRISPR複合体の形成を促進する。標的配列は、DNAまたはRNAポリヌクレオチドを含む場合がある。「標的DNAまたはRNA」という用語は、標的配列であるもしくは標的配列を含むDNAまたはRNAポリヌクレオチドを示す。言い換えると、標的DNAまたはRNAは、gRNA、すなわちガイド配列の一部が相補性を有するよ

うに設計されており、C R I S P Rエフェクタータンパク質及びg R N Aを含む複合体が介在するエフェクター機能がそれに向けられている、D N AまたはR N AポリヌクレオチドあるいはD N AまたはR N Aポリヌクレオチドの一部の場合がある。実施形態によっては、標的配列は、細胞の核または細胞質に存在する。

【0169】

ニッカーゼに基づく増幅は、様々な長さの標的核酸配列を増幅するのに使用可能である。例えば、標的核酸配列は、約10～20、約20～30、約30～40、約40～50、約50～100、約100～200、約100～200、約100～1000、約1000～2000、約2000～3000、約3000～4000、または約4000～5000ヌクレオチドの長さが可能である。標的核酸は、D N A、例えば、ゲノムD N A、ミトコンドリアD N A、ウイルスD N A、プラスミドD N A、循環無細胞D N A、環境D N A、または合成二本鎖D N Aであることが可能である。標的核酸は、一本鎖核酸、例えば、R N A分子であることが可能である。一本鎖核酸は、ニッカーゼに基づく増幅の前に、二本鎖核酸に変換することができる。例えば、R N A分子は、増幅の前に、逆転写により二本鎖D N Aに変換することができる。一本鎖核酸は、一本鎖ウイルスD N A、ウイルスR N A、メッセンジャーR N A、リボソームR N A、転移R N A、マイクロR N A、低分子干渉R N A、核内低分子R N A、合成R N A、長鎖非翻訳R N A、プレマイクロR N A、d s R N A、及び合成一本鎖D N Aからなる群より選択することができる。

10

【0170】

試料

20

本明細書に記載されるとおり、本発明で使用する試料は、生体試料または環境試料、例えば、食品試料（新鮮な果物または野菜、肉）、飲料試料、紙面、布面、金属面、木面、プラスチック面、土壌試料、新鮮な水試料、排水試料、生理食塩水試料、大気または他のガスと接触した試料、あるいはそれらの組み合わせである場合がある。例えば、任意の材料製の家庭／商業／産業的表面として、限定するものではないが、金属、木材、プラスチック、ゴムなどが挙げられるが、これらを拭き取り、汚染物質について検査する場合がある。土壌試料は、環境保護目的及び／またはヒト、動物、もしくは植物の病害検査の両方のため、病原菌または寄生虫、あるいは他の微生物の存在について検査する場合がある。水試料、例えば、新鮮な水試料、排水試料、生理食塩水試料は、例えば、C r y p t o s p o r i d i u m p a r v u m、G i a r d i a l a m b l i a、または他の微生物汚染の存在を検出して、清浄度及び安全性、及び／または可搬性を評価することができる。さらなる実施形態において、生体試料は、試料源から得られる場合があり、試料源として、組織試料、唾液、血液、血漿、血清、糞便、尿、痰、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、腹水、胸水、漿液腫、膿、あるいは皮膚または粘膜表面のスワブが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、環境試料または生体試料は、未精製試料である場合があり、及び／または1種または複数の標的分子が、本方法の増幅前に試料から精製されて増幅されていない場合がある。微生物の同定は、多数の応用にとって有用及び／または必要である場合があり、したがって、当業者が適切だと見なす任意の試料源由来の任意の種類の試料が、本発明に従って使用される場合がある。

30

【0171】

40

実施形態によっては、生体試料として、血液、血漿、血清、尿、糞便、痰、粘液、リンパ液、滑液、胆汁、腹水、胸水、漿液腫、唾液、脳脊髄液、眼房水もしくは硝子体液、または任意の体分泌、漏出液、滲出液、または関節から得られる液体、あるいは皮膚または粘膜表面のスワブを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0172】

特定の実施形態において、試料は、ヒト患者から得られる血液、血漿、または血清である場合がある。

【0173】

実施形態によっては、試料は、植物試料である場合がある。実施形態によっては、試料は、未精製試料である場合がある。実施形態によっては、試料は、精製試料である場合がある。

50

ある。

【0174】

検出

本明細書中記載されるシステムは、さらに、検出システムを含む場合がある。ニッカーゼに基づく増幅は、増幅された核酸産物を検出するために様々な検出法と組み合わせることができる。例えば、検出システム及び方法は、ゲル電気泳動、挿入色素検出、PCR、リアルタイムPCR、蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、質量分析、ラテラルフローアッセイ、比色アッセイ(HRP、ALP、金、ナノ粒子系アッセイ)、及びCRISPR-SHERLOCKを含むことができる。増幅と検出を組み合わせることで、アトモル感度またはフェムトモル感度を達成することができる。ある特定の実施形態において、本発明の方法またはシステムを用いたDNAの検出は、検出前に、(増幅された)DNAをRNAに転写することを必要とする。

10

【0175】

本発明の検出方法は、様々な組み合わせで核酸増幅及び検出手順を含むことができることが、明らかとなるだろう。検出対象となる核酸は、任意の天然または合成核酸が可能であり、DNA及びRNAが挙げられるが、これらに限定されず、これらは、任意の適切な方法により増幅されて、検出可能な中間産物をもたらす場合がある。中間産物の検出は、任意の適切な方法により行うことができ、そのような方法として、検出可能なシグナル部分を直接または付帯活性により生成するCRISPRタンパク質の結合及び活性化が挙げられるが、これに限定されない。

20

【0176】

特定の実施形態において、増幅された核酸は、CRISPR Cas13に基づくシステムにより検出される場合がある。特定の実施形態において、増幅された核酸は、CRISPR Cas12に基づくシステムにより検出される場合がある(Chen et al., Science 360:436-439 (2018)及びGootenberg et al., Science 360:439-444 (2018)を参照)。特定の実施形態において、増幅された核酸は、CRISPR Cas13に基づくシステムとCRISPR Cas12に基づくシステムの併用により検出される場合がある。

【0177】

単一ヌクレオチドバリエーションを含む核酸の検出、rRNA配列に基づく検出、薬剤耐性についてのスクリーニング、微生物増殖のモニタリング、遺伝的摂動、及び環境試料のスクリーニングは、例えば、2018年10月22日出願のWO/2019/07105の[0183]-[0327]に記載されるとおりのものが可能であり、この出願は本明細書中参照として援用される。以下も参照される:WO 2017/219027、WO 2018/107129、US20180298445、US 2018-0274017、US 2018-0305773、WO 2018/170340、2018年3月15日出願の米国出願第15/922,837号、名称「Devices for CRISPR Effector System Based Diagnostics」、2018年9月7日出願のPCT/US18/50091、名称「Multi-Effector CRISPR Based Diagnostic Systems」、2018年12月20日出願のPCT/US18/66940、名称「CRISPR Effector System Based Multiplex Diagnostics」、2018年10月4日出願のPCT/US18/054472、名称「CRISPR Effector System Based Diagnostic」、2018年10月3日出願の米国仮出願第62/740,728号、名称「CRISPR Effector System Based Diagnostics for Hemorrhagic Fever Detection」、2018年6月26日出願の米国仮出願第62/690,278号及び2018年11月14日出願の米国仮出願第62/767,059号、ともに名称「CRISPR Double Nickase Based Amplification, Compositions, Systems an

30

40

50

d Methods」、2018年6月26日出願の米国仮出願第62/690,160号及び2018年11月14日出願の米国仮出願第62,767,077号、ともに名称「CRISPR/CAS and Transposase Based Amplification Compositions, Systems, And Methods」、2018年6月26日出願の米国仮出願第62/690,257号及び2018年11月14日出願の米国仮出願第62/767,052号、ともに名称「CRISPR Effector System Based Amplification Methods, Systems, And Diagnostics」、2018年11月14日出願の米国仮出願第62/767,076号、名称「Multiplexing Highly Evolving Viral Variants With SHERLOCK」、及び2018年11月14日出願の米国仮出願第62/767,070号、名称「Droplet SHERLOCK」。さらに以下が参照される：WO 2017/127807、WO 2017/184786、WO 2017/184768、WO 2017/189308、WO 2018/035388、WO 2018/170333、WO 2018/191388、WO 2018/213708、WO 2019/005866、2018年12月21日出願のPCT/US18/67328、名称「Novel CRISPR Enzymes and Systems」、2018年12月21日出願のPCT/US18/67225、名称「Novel CRISPR Enzymes and Systems」、及び2018年12月21日出願のPCT/US18/67307、名称「Novel CRISPR Enzymes and Systems」、2018年7月31日出願のUS62/712,809、名称「Novel CRISPR Enzymes and Systems」、2018年10月10日出願のU.S. 62/744,080、名称「Novel Cas12b Enzymes and Systems」、及び2018年10月26日出願のU.S. 62/751,196、名称「Novel Cas12b Enzymes and Systems」、2018年8月7日出願のU.S. 715,640、名称「Novel CRISPR Enzymes and Systems」、WO 2016/205711、U.S. 9,790,490、WO 2016/205749、WO 2016/205764、WO 2017/070605、WO 2017/106657、及びWO 2016/149661、WO 2018/035387、WO 2018/194963、Cox DBT, et al., RNA editing with CRISPR-Cas13, Science. 2017 Nov 24;358(6366):1019-1027;Gootenberg JS, et al., Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6., Science. 2018 Apr 27;360(6387):439-444;Gootenberg JS, et al., Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2., Science. 2017 Apr 28;356(6336):438-442;Abudayyeh OO, et al., RNA targeting with CRISPR-Cas13, Nature. 2017 Oct 12;550(7675):280-284;Smargon AA, et al., Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. Mol Cell. 2017 Feb 16;65(4):618-630.e7;Abudayyeh OO, et al., C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector, Science. 2016 Aug 5;353(6299):aaf5573;Yang L, et al., Engineering a

nd optimising deaminase fusions for genome editing. Nat Commun. 2016 Nov 2; 7:13330, Myrvhold et al., Field deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13, Science 2018 360, 444-448; Shmakov et al., 'Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems,' Nat Rev Microbiol. 2017 15(3):169-182、これらのそれぞれが、そのまま全体が本明細書中参照として援用される。

【0178】

いくつかの具体的な実施形態において、堅固なCRISPRに基づく検出を提供するためにRNA標的指向性エフェクターを利用することができる。本明細書中開示される実施形態は、同等の感度レベルでDNA及びRNAの両方を検出することができ、開示されるHDA法及びシステムと併用して使用することができる。容易に参照できるように、本明細書中開示される実施形態は、SHERLOCK(特異的高感度酵素レポーターによるロック解除、Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing)と称する場合もある。これは、実施形態によっては、本明細書中開示されるHDA法に続いて行われ、中温性及び好熱性等温条件下であることを含む。

【0179】

実施形態によっては、核酸標的指向性検出システムの1つまたは複数の配列要素は、内因性CRISPR RNA標的指向性系を含む特定生物に由来する。ある特定の例示の実施形態において、エフェクタータンパク質CRISPR RNA標的指向性検出システムは、少なくとも1つのHEPNドメインを含み、HEPNドメインとして、本明細書中記載されるHEPNドメイン、当該分野で既知であるHEPNドメイン、及びコンセンサス配列モチーフとの比較によりHEPNドメインであると認められるドメインが挙げられるが、これらに限定されない。そのようなドメインのいくつかは、本明細書中提供される。限定ではない1つの例において、コンセンサス配列は、本明細書中提供されるC2c2またはCas13bオルソログの配列に由来することができる。ある特定の例示の実施形態において、エフェクタータンパク質は、単一HEPNドメインを含む。ある特定の他の例示の実施形態において、エフェクタータンパク質は、2つのHEPNドメインを含む。

【0180】

1つの例示の実施形態において、エフェクタータンパク質は、RxxxxHモチーフ配列を含むHEPNドメインを1つまたは複数含む。RxxxxHモチーフ配列は、特に制限なく、本明細書中記載されるHEPNドメインまたは当該分野で既知であるHEPNドメインに由来するものが可能である。RxxxxHモチーフ配列は、さらに、2つ以上のHEPNドメインの一部分を組み合わせることにより作製されたモチーフ配列を含む。上記のとおり、コンセンサス配列は、PCT/US2017/038154、名称「Novel Type VI CRISPR Orthologs and Systems」の、例えば、256-264ページ及び285-336ページ、米国仮特許出願第62/432,240号、名称「Novel CRISPR Enzymes and Systems」、2017年3月15日出願の米国仮特許出願第62/471,710号、名称「Novel Type VI CRISPR Orthologs and Systems」、及び2017年4月12日出願の米国仮特許出願第62/484,786号、名称「Novel Type VI CRISPR Orthologs and Systems」に開示されるオルソログの配列に由来することが可能である。

【0181】

本発明の実施形態において、HEPNドメインは、配列R{N/H/K}X1X2X3H(配列番号1)を含むRxxxxHモチーフを少なくとも1つ含む。本発明の実施形態において、HEPNドメインは、配列R{N/H}X1X2X3H(配列番号2)を含む

R x x x x Hモチーフを含む。本発明の実施形態において、H E P Nドメインは、配列 R { N / K } X 1 X 2 X 3 H (配列番号 3) を含む。ある特定の実施形態において、X 1 は、R、S、D、E、Q、N、G、Y、またはHである。ある特定の実施形態において、X 2 は、I、S、T、V、またはLである。ある特定の実施形態において、X 3 は、L、F、N、Y、V、I、S、D、E、またはAである。

【 0 1 8 2 】

本発明に従って使用される追加のエフェクターは、c a s 1 遺伝子に対するそれらの近さによって特定可能であり、例えば、特に限定するものではないが、c a s 1 遺伝子の始まる前 2 0 K b から c a s 1 遺伝子の終わりより 2 0 k b までの領域内にある。ある特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、少なくとも 1 つの H E P N ドメイン及び少なくとも 5 0 0 のアミノ酸を含み、ただし、C 2 c 2 エフェクタータンパク質は、原核生物ゲノム中に天然に存在するものであり、C a s 遺伝子または C R I S P R アレイから 2 0 k b 上流または下流の範囲内にある。C a s タンパク質の限定ではなく例として、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 6、C a s 7、C a s 8、C a s 9 (C s n 1 及び C s x 1 2 としても知られる)、C a s 1 0、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1、C s e 2、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4、それらのホモログ、またはそれらの修飾型が挙げられる。ある特定の実施形態において、C 2 c 2 エフェクタータンパク質は、原核生物ゲノム中に天然に存在するものであり、C a s 1 遺伝子から 2 0 k b 上流または下流の範囲内にある。「オルソログ (o r t h o l o g u e) 」 (本明細書中「オルソログ (o r t h o l o g) 」とも称する) 及び「ホモログ (h o m o l o g u e) 」 (本明細書中「ホモログ (h o m o l o g) 」とも称する) という用語は、当該分野で周知である。追加のガイドダンスとして、本明細書中使用される場合、タンパク質の「ホモログ」とは、ホモログの関係にあるタンパク質と同じまたは同様の機能を発揮する、同じ種のタンパク質である。ホモログタンパク質は、可能性としてはあり得るが、構造的に関連する必要はなく、またはその構造的な関連性は部分的なものにすぎない。本明細書中使用される場合、タンパク質の「オルソログ」とは、オルソログの関係にあるタンパク質と同じまたは同様の機能を発揮する、異なる種のタンパク質である。オルソログタンパク質は、可能性としてはあり得るが、構造的に関連する必要はなく、またはその構造的な関連性は部分的なものにすぎない。

【 0 1 8 3 】

特定の実施形態において、V I 型 R N A 標的指向性 C a s 酵素は、C 2 c 2 である。他の例示の実施形態において、V I 型 R N A 標的指向性 C a s 酵素は、C a s 1 3 b である。特定の実施形態において、本明細書中示されるとおりの C 2 c 2 などの V I 型タンパク質のホモログまたはオルソログは、C 2 c 2 などの V I 型タンパク質と (例えば、L e p t o t r i c h i a s h a h i i の C 2 c 2、L a c h n o s p i r a c e a e 科菌 M A 2 0 2 0 の C 2 c 2、L a c h n o s p i r a c e a e 科菌 N K 4 A 1 7 9 の C 2 c 2、C l o s t r i d i u m a m i n o p h i l u m (D S M 1 0 7 1 0) の C 2 c 2、C a r n o b a c t e r i u m g a l l i n a r u m (D S M 4 8 4 7) の C 2 c 2、P a l u d i b a c t e r p r o p i o n i c i g e n e s (W B 4) の C 2 c 2、L i s t e r i a w e i h e n s t e p h a n e n s i s (F S L R 9 - 0 3 1 7) の C 2 c 2、L i s t e r i a c e a e 科菌 (F S L M 6 - 0 6 3 5) の C 2 c 2、L i s t e r i a n e w y o r k e n s i s (F S L M 6 - 0 6 3 5) の C 2 c 2、L e p t o t r i c h i a w a d e i (F 0 2 7 9) の C 2 c 2、R h o d o b a c t e r c a p s u l a t u s (S B 1 0 0 3) の C 2 c 2、R h o d o b a c t e r c a p s u l a t u s (R 1 2 1) の C 2 c 2、R h o d o b a c t e r c a p s u l a t u s (D E 4 4 2) の C 2 c 2、L e p t o t r i c h i a w a d e i (L w 2)

のC2c2、または*Listeria seeligeri*のC2c2のいずれかの野生型配列に基づいて)、少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態において、本明細書中示されるとおりのC2c2などのVI型タンパク質のホモログまたはオルソログは、野生型C2c2と(例えば、*Leptotrichia shahii*のC2c2、*Lachnospiraceae*科菌MA2020のC2c2、*Lachnospiraceae*科菌NK4A179のC2c2、*Clostridium aminophilum*(DSM 10710)のC2c2、*Carnobacterium gallinarum*(DSM 4847)のC2c2、*Paludibacter propionicipigenes*(WB4)のC2c2、*Listeria weihenstephanensis*(FSL R9-0317)のC2c2、*Listeriaceae*科菌(FSL M6-0635)のC2c2、*Listeria newyorkensis*(FSL M6-0635)のC2c2、*Leptotrichia wadei*(F0279)のC2c2、*Rhodobacter capsulatus*(SB 1003)のC2c2、*Rhodobacter capsulatus*(DE442)のC2c2、*Leptotrichia wadei*(Lw2)のC2c2、または*Listeria seeligeri*のC2c2のいずれかの野生型配列に基づいて)、少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0184】

ある特定の他の例示の実施形態において、CRISPR系エフェクタータンパク質は、C2c2ヌクレアーゼである。C2c2の活性は、2つのHEPNドメインの存在に依存する場合がある。これらは、RNAを切断するRNA分解酵素ドメイン、すなわちヌクレアーゼ(詳細にはエンドヌクレアーゼ)であることが示されている。C2c2のHEPNは、DNAを、または潜在的にDNA及び/またはRNAを標的とする可能性もある。C2c2のHEPNドメインが、それらの野生型において、RNAに結合してそれを切断する能力を少なくとも持つことを踏まえると、C2c2エフェクタータンパク質がRNA分解酵素機能を有することは好ましい。C2c2 CRISPR系に関しては、2016年6月17日出願の米国仮出願第62/351,662号、及び2016年8月17日出願の米国仮出願第62/376,377号を参照。同じく、2016年6月17日出願の米国仮出願第62/351,803号を参照。同じく、ブロード研究所番号第10035.PA4号及び代理人整理番号第47627.03.2133号を有する2016年12月8日出願の米国仮出願、名称「Novel Crispr Enzymes and Systems」を参照。さらに、East-Seletsky et al., 'Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection', *Nature* doi:10/1038/nature19802及びAbudayyeh et al., 'C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA targeting CRISPR effector', *bioRxiv* doi:10.1101/054742を参照。

【0185】

CRISPR系におけるRNA分解酵素機能は既知であり、例えば、mRNA標的指向性が、ある特定のIII型CRISPR-Cas系について報告されており(Hale et al., 2014, *Genes Dev*, vol. 28, 2432-2443; Hale et al., 2009, *Cell*, vol. 139, 9

10

20

30

40

50

45 - 956; Peng et al., 2015, Nucleic acids research, vol. 43, 406 - 417)、これは著しい利点を提供する。Staphylococcus epidermisのIII-A型系では、標的にわたる転写は、標的DNA及びその転写物の切断をもたらし、これは、Cas10-Csmリボ核タンパク質エフェクタータンパク質複合体内の独立活性部位が仲介する(Samai et al., 2015, Cell, vol. 151, 1164 - 1174を参照)。本エフェクタータンパク質を介してRNAを標的とするCRISPR-Casシステム、組成物、または方法が、こうして提供される。

【0186】

ある実施形態において、Casタンパク質は、ある属の生物のC2c2オルソログである場合があり、そのような属として、Leptotrichia属、Listeria属、Corynebacter属、Sutterella属、Legionella属、Treponema属、Filifactor属、Eubacterium属、Streptococcus属、Lactobacillus属、Mycoplasma属、Bacteroides属、Flavivibrio属、Flavobacterium属、Sphaerochaeta属、Azospirillum属、Gluconacetobacter属、Neisseria属、Roseburia属、Parvibaculum属、Staphylococcus属、Nitratifractor属、Mycoplasma属、Campylobacter属、及びLachnospira属が挙げられるが、これらに限定されない。そのような属の生物種は、本明細書中別途検討されたい。10 20

【0187】

ある特定の例示の実施形態において、本発明のC2c2エフェクタータンパク質として、特に制限なく、以下の21種のオルソログ種が挙げられる(複数のCRISPR遺伝子座を含む: Leptotrichia shahii、Leptotrichia wadei (Lw2)、Listeria seeligeri、Lachnospiraceae属菌MA2020、Lachnospiraceae属菌NK4A179、[Clostridium] aminophilum DSM 10710、Carnobacterium gallinarum DSM 4847、Carnobacterium gallinarum DSM 4847 (第二CRISPR遺伝子座)、Paludibacter propionici genes WB4、Listeria weihenstephanensis FSL R9-0317、Listeriaceae属菌FSL M6-0635、Leptotrichia wadei F0279、Rhodobacter capsulatus SB 1003、Rhodobacter capsulatus DE442、Leptotrichia buccalis C-1013-b、Herbinix hemicellulosilytica、[Eubacterium] rectale、Eubacteriaceae属菌CHKCI004、Blautia種Marseille-P2398、及びLeptotrichia種口腔分類群879株F0557。さらに12種の限定ではなく例として、以下がある: Lachnospiraceae属菌NK4A144、Chloroflexus aggregans、Demequina aurantiaca、Thalassospira種TSL5-1、Pseudobutyrvibrio種OR37、Butyrvibrio種YAB3001、Blautia種Marseille-P2398、Leptotrichia種Marseille-P3007、Bacteroides ihuae、Porphyromonadaceae属菌KH3CP3RA、Listeria riparia、及びInsolitispirillum peregrinum。30 40

【0188】

CRISPR-Casシステム酵素のオルソログを同定する方法によっては、関心対象のゲノム中のtracr配列の同定が関与する場合がある。tracr配列の同定は、以 50

下の工程が関係する場合がある：データベースから直列反復または *tracr* *mate* 配列を検索して、CRISPR 酵素を含む CRISPR 領域を同定する。センス方向及びアンチセンス方向の両方で CRISPR 酵素に隣接する CRISPR 領域においてホモログ配列を検索する。転写ターミネーター及び二次構造を探す。直列反復または *tracr* *mate* 配列ではないが、直列反復または *tracr* *mate* 配列と 50% 超の同一性を有する任意の配列を、潜在的 *tracr* 配列として同定する。潜在的 *tracr* 配列を用いて、それと会合する転写ターミネーター配列を分析する。

【0189】

当然のことながら、本明細書に記載される機能のどれでも、他のオルソログから CRISPR 酵素に操作して導入することができ、そのようなものとして、複数のオルソログ由来の断片を有するキメラ酵素が挙げられる。そのようなオルソログの例は、本明細書中いずれかの箇所に記載される。したがって、キメラ酵素は、ある生物の CRISPR 酵素オルソログの断片を有する場合があります、そのような生物として、*Leptotrichia* 属、*Listeria* 属、*Corynebacter* 属、*Sutterella* 属、*Legionella* 属、*Treponema* 属、*Filifactor* 属、*Eubacterium* 属、*Streptococcus* 属、*Lactobacillus* 属、*Mycoplasma* 属、*Bacteroides* 属、*Flavivibrio* 属、*Flavobacterium* 属、*Sphaerochaeta* 属、*Azospirillum* 属、*Glucacetobacter* 属、*Neisseria* 属、*Roseburia* 属、*Parvibaculum* 属、*Staphylococcus* 属、*Nitratifactor* 属、*Mycoplasma* 属、及び *Campylobacter* 属が挙げられるが、これらに限定されない。キメラ酵素は、第一断片及び第二断片を有することができ、これらの断片は、本明細書中言及される属または本明細書中言及される種の生物の CRISPR 酵素オルソログのものであることが可能であり；有利なことに、断片は、異なる種の CRISPR 酵素オルソログに由来する。

【0190】

複数の実施形態において、本明細書中示されるとおりの C2c2 タンパク質は、C2c2 の機能性バリエーションまたはそのホモログもしくはオルソログも包含する。タンパク質の「機能性バリエーション」は、本明細書中使用される場合、そのタンパク質の活性を少なくとも部分的に保持する、そのタンパク質のバリエーションを示す。機能性バリエーションとして、多形などを含む変異体（これは、挿入、削除、または置換変異体の場合がある）を挙げることができる。同じく機能性バリエーションとして挙げられるのは、そのようなタンパク質と、別のもの、通常は無関係の、核酸、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドとの融合産物である。機能性バリエーションは、天然に生じる場合もあれば、人造物である場合もある。有利な実施形態には、改変されたまたは非天然の VI 型 RNA 標的指向性エフェクタータンパク質が関与可能である。

【0191】

ある実施形態において、C2c2 またはそのオルソログもしくはホモログをコードする核酸分子（複数可）は、真核細胞での発現に関してコドン最適化されている場合がある。真核生物は、本明細書中検討されるとおりのものが可能である。核酸分子（複数可）は、改変されたまたは非天然のものであることが可能である。

【0192】

ある実施形態において、C2c2 またはそのオルソログもしくはホモログは、1 つまたは複数の変異を有する場合があります（したがって、それをコードする核酸分子（複数可）も変異（複数可）を有する場合があります）。変異は、人為的に導入された変異である場合があります、そのような変異として触媒ドメインにおける 1 つまたは複数の変異を挙げることができるが、これらに限定されない。Cas9 酵素に関して触媒ドメインの例として、RuvC I、RuvC II、RuvC III、及び HNH ドメインを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0193】

10

20

30

40

50

ある実施形態において、C2c2またはそのオルソログもしくはホモログは、1つまたは複数の変異を有する場合がある。変異は、人為的に導入された変異である場合があり、そのような変異として触媒ドメインにおける1つまたは複数の変異を挙げることができるが、これらに限定されない。Cas酵素に関して触媒ドメインの例として、HEPNドメインを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0194】

ある実施形態において、C2c2またはそのオルソログもしくはホモログは、機能性ドメインと融合するまたはこれに作動的に連結する一般的核酸結合タンパク質として使用される場合がある。機能性ドメインの例として、翻訳イニシエーター、翻訳アクチベーター、翻訳リプレッサー、ヌクレアーゼ、特にリボヌクレアーゼ、スプライソソーム、ビーズ、光誘導型/制御型ドメイン、または化学光誘導型/制御型ドメインを挙げることができるが、これらに限定されない。

10

【0195】

ある特定の例示の実施形態において、C2c2エフェクタータンパク質は、以下からなる群より選択される生物に由来する場合がある；*Leptotrichia*属、*Listeria*属、*Corynebacter*属、*Sutterella*属、*Legionella*属、*Treponema*属、*Filifactor*属、*Eubacterium*属、*Streptococcus*属、*Lactobacillus*属、*Mycoplasma*属、*Bacteroides*属、*Flavivibrio*属、*Flavobacterium*属、*Sphaerochaeta*属、*Azospirillum*属、*Gluconacetobacter*属、*Neisseria*属、*Roseburia*属、*Parvibaculum*属、*Staphylococcus*属、*Nitratifractor*属、*Mycoplasma*属、及び*Campylobacter*属。

20

【0196】

ある特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、*Listeria*種のC2c2p、好ましくは*Listeria seeligeri*のC2c2p、より好ましくは*Listeria seeligeri*血清型1/2b株SLCC3954のC2c2pである場合があり、crRNA配列は、長さが44~47ヌクレオチドであり、5'の29nt直列反復(DR)及び15nt~18ntのスペーサーを持つ場合がある。

30

【0197】

ある特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、*Leptotrichia*種のC2c2p、好ましくは*Leptotrichia shahii*のC2c2p、より好ましくは*Leptotrichia shahii* DSM 19757のC2c2pである場合があり、crRNA配列は、長さが42~58ヌクレオチドである場合があり、5'に少なくとも24ntの直列反復、例えば5'に24~28ntの直列反復(DR)を持ち、及び少なくとも14ntのスペーサー、例えば14nt~28ntのスペーサー、または少なくとも18ntのスペーサー、例えば、19、20、21、22、またはそれ以上のnt、例えば、18~28、19~28、20~28、21~28、または22~28ntのスペーサーを持つ場合がある。

40

【0198】

ある特定の例示の実施形態において、エフェクタータンパク質は、*Leptotrichia*種、*Leptotrichia wadei* F0279、または*Listeria*種、好ましくは*Listeria newyorkensis* FSL M6-0635のものである場合がある。

【0199】

ある特定の例示の実施形態において、本発明のC2c2エフェクタータンパク質として、特に制限なく、以下の21種のオルソログ種が挙げられる(複数のCRISPR遺伝子座を含む：*Leptotrichia shahii*、*Leptotrichia wadei* (Lw2)、*Listeria seeligeri*、*Lachnospiraceae*属菌MA2020、*Lachnospiraceae*属菌NK4A179、[C1

50

ostridium] aminophilum DSM 10710、Carnobacterium gallinarum DSM 4847、Carnobacterium gallinarum DSM 4847 (第二CRISPR遺伝子座)、Paludibacter propionici genes WB4、Listeria weihenstephanensis FSL R9-0317、Listeriaceae属菌FSL M6-0635、Leptotrichia wadei F0279、Rhodobacter capsulatus SB 1003、Rhodobacter capsulatus R121、Rhodobacter capsulatus DE442、Leptotrichia buccalis C-1013-b、Herbinix hemicellulosilytica、[Eubacterium] rectale、Eubacteriaceae属菌CHKCI004、Blautia種Marseille-P2398、及びLeptotrichia種口腔分類群879株F0557。さらに12種の限定ではなく例として、以下がある：Lachnospiraceae属菌NK4A144、Chloroflexus aggregans、Demequina aurantiaca、Thalassospira種TSL5-1、Pseudobutyrvibrio種OR37、Butyrvibrio種YAB3001、Blautia種Marseille-P2398、Leptotrichia種Marseille-P3007、Bacteroides ihuae、Porphyromonadaceae属菌KH3CP3RA、Listeria riparia、及びInsolitispirillum peregrinum。

【0200】

ある特定の実施形態において、本発明によるC2c2タンパク質は、オルソログのうちの1種であるかそれに由来し、または本出願中記載されるとおりのオルソログ2種以上からなるキメラタンパク質であり、あるいはオルソログのうちの1種の変異体またはバリエーション(またはキメラ変異体もしくはバリエーション)であり、そのようなC2c2タンパク質として、本明細書中いずれかの箇所で定義されるとおりの失活C2c2、スプリットC2c2、不安定化C2c2、などが挙げられ、これらは、異種/機能性ドメインと融合している場合もしていない場合もある。

【0201】

ある特定の例示の実施形態において、RNA標的指向性エフェクタータンパク質は、VI-B型エフェクタータンパク質、例えばCas13b及びグループ29またはグループ30タンパク質などである。ある特定の例示の実施形態において、RNA標的指向性エフェクタータンパク質は、1つまたは複数のHEPNドメインを含む。ある特定の例示の実施形態において、RNA標的指向性エフェクタータンパク質は、C末端HEPNドメイン、N末端HEPNドメイン、またはその両方を含む。本発明の文脈において使用可能なVI-B型エフェクタータンパク質の例に関して、以下が参照される：2016年10月21日出願の米国出願第15/331,792号、名称「Novel CRISPR Enzymes and Systems」、2016年10月21日出願の国際特許出願第PCT/US2016/058302号、名称「Novel CRISPR Enzymes and Systems」、及びSmargon et al., 'Cas13b is a Type VI-B CRISPR-associated RNA-Guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28' Mol. Cell, 65, 1-13 (2017); dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.023、及び2017年3月15日出願の米国仮出願番号未定の名称「Novel Cas13b Orthologues CRISPR Enzymes and System」。1つの好適な実施形態において、Cas13タンパク質は、LwaCas13である。

【0202】

マスキング構築物

10

20

30

40

50

本明細書中使用される場合、「マスキング構築物」は、本明細書中記載される活性化C R I S P R系エフェクタータンパク質により切断される、またはいずれにしろ不活性化される可能性がある分子を示す。「マスキング構築物」という用語は、別の方法では、「検出構築物」とも称する場合がある。ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、RNA系マスキング構築物である。RNA系マスキング構築物は、C R I S P Rエフェクタータンパク質により切断可能なRNA配列要素を含む。RNA配列要素の切断は、作用剤を放出、または構造変化をもたらし、これにより検出可能なシグナルが生成される。RNA配列要素を使用してどのように検出可能なシグナルの生成を防ぐまたはマスクすることができるかを実証する構築物の例を、以下に記載するが、本発明の実施形態は、その変異形態を含む。切断の前、またはマスキング構築物が「活性」状態にある場合、マスキング構築物は、陽性の検出可能なシグナルの生成または検出を遮断する。当然のことながら、ある特定の例示の実施形態において、活性RNAマスキング構築物の存在下、最小限のバックグラウンドシグナルが生成する場合がある。陽性の検出可能なシグナルは、光学的方法、蛍光法、化学発光法、電気化学的方法、または当該分野で既知である他の検出法を用いて検出可能な任意のシグナルが可能である。「陽性の検出可能なシグナル」という用語は、マスキング構築物の存在下で検出可能である可能性がある他の検出可能なシグナルと区別するために使用される。例えば、ある特定の実施形態において、第一のシグナルは、マスキング剤が存在する場合に検出される可能性があり（すなわち、陰性の検出可能なシグナル）、このシグナルは、次いで、活性化C R I S P Rエフェクタータンパク質による標的分子の検出及びマスキング剤の切断または不活性化に際して、第二のシグナルへと変換される（例えば陽性の検出可能なシグナル）。

10

20

【0203】

ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、遺伝子産物の生成を抑制する場合がある。遺伝子産物は、試料に添加されるレポーター構築物によりコードされる場合がある。マスキング構築物は、RNA干渉経路に関与する干渉RNA、例えば、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）または低分子干渉RNA（siRNA）などである場合がある。マスキング構築物は、マイクロRNA（miRNA）も含む場合がある。存在する間、マスキング構築物は、遺伝子産物の発現を抑制する。遺伝子産物は、蛍光タンパク質あるいは標識化プローブ、アプタマー、または抗体により別途検出可能となる他のRNA転写物もしくはタンパク質の場合があり、これらはマスキング構築物が存在すると検出可能とならない。エフェクタータンパク質の活性化の際、マスキング構築物は切断され、いずれにしろサイレンシングされて、遺伝子産物が陽性の検出可能なシグナルとして発現し検出されるようになる。

30

【0204】

ある特定の例示の実施形態において、検出可能な陽性シグナルの発生に必要な1種または複数の試薬がマスキング構築物から放出された結果、検出可能な陽性シグナルが発生するように、マスキング構築物は、検出可能な陽性シグナルの発生に必要な1種または複数の試薬を隔離している場合がある。1種または複数の試薬は、組み合わせさせて、比色シグナル、化学発光シグナル、蛍光シグナル、または任意の他の検出可能なシグナルを生成する場合があり、また、そのような目的に適切であることが既知の任意の試薬を含む場合がある。ある特定の例示の実施形態において、1種または複数の試薬は、1種または複数の試薬に結合したRNAアプタマーにより隔離されている。1種または複数の試薬は、標的分子が検出されてRNAアプタマーが分解されるのに合わせてエフェクタータンパク質が活性化されたときに、放出される。

40

【0205】

本発明の他の実施形態において、RNA系マスキング構築物は、検出可能な陽性シグナルの生成を抑制するか、またはRNA系マスキング構築物は、検出可能な陽性シグナルをマスクすることにより、もしくは代わりに検出可能な陰性シグナルを生成させることにより、検出可能な陽性シグナルの生成を抑制するか、またはRNA系マスキング構築物は、レポーター型構築物によりコードされる遺伝子産物の生成を抑制するサイレンシングRNA

50

Aを含み、この遺伝子産物が、発現したときに検出可能な陽性シグナルを生成する。

【0206】

さらなる実施形態において、RNA系マスキング構築物は、陰性の検出可能なシグナルを生成させるリボザイムであり、陽性の検出可能なシグナルは、リボザイムが不活性化されたときに生成される、またはリボザイムは、基質を第一の色に変化させ、基質は、リボザイムが不活性化されたときに第二の色に変化する。

【0207】

他の実施形態において、RNA系マスキング構築物は、RNAアプタマーであり、またはアプタマーは酵素を隔離しており、この酵素が、アプタマーからの放出に際して基質に作用することにより検出可能なシグナルを生成し、またはアプタマーは1対の作用剤を隔離しており、この作用剤がアプタマーから放出されたときに、一緒になって検出可能なシグナルを生成する。

10

【0208】

別の実施形態において、RNA系マスキング構築物は、RNAオリゴヌクレオチドを含み、これに対して、検出可能な試薬及びマスキング構成要素が付加されている。別の実施形態において、検出可能な試薬は、フルオロフォアであり、マスキング構成要素は、クエンチャー分子、すなわち標的RNA分子(such as)を増幅する試薬である。

【0209】

ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、別個の離散した体積で固相基質に固定されており(以下でさらに定義される)、単一試薬を隔離している場合がある。例えば、試薬は、色素を含むビーズである場合がある。固定された試薬により隔離されている場合、別個のビーズは、検出可能なシグナルを生成できないほど拡散しているが、マスキング構築物からの放出に際して、例えば、凝集または溶液濃度の単純上昇により、検出可能なシグナルを生成できる。ある特定の例示の実施形態において、固定されたマスキング剤は、標的分子の検出に際して活性化エフェクタータンパク質により切断される可能性があるRNA系アプタマーである。

20

【0210】

ある特定の他の例示の実施形態において、マスキング構築物は、溶液中の固定された試薬に結合し、それにより溶液中に遊離している分離した標識化結合パートナーと試薬が結合する能力を遮断する。したがって、試料の洗浄工程を行う際、標的分子の不在下では標識化結合パートナーを試料から洗い落とすことが可能である。しかしながら、エフェクタータンパク質が活性化した場合、マスキング構築物の試薬に結合する能力に干渉するのに十分な程度にマスキング構築物が切断されて、それにより、標識化結合パートナーが、固定された試薬に結合可能になる。したがって、標識化結合パートナーは、洗浄工程後も残存し、試料中の標的分子の存在を示す。ある特定の態様において、固定された試薬に結合するマスキング構築物は、RNAアプタマーである。固定された試薬は、タンパク質である場合があり、標識化結合パートナーは、標識化抗体である場合がある。あるいは、固定された試薬は、ストレプトアビジンである場合があり、標識化結合パートナーは、標識化ビオチンである場合がある。上記の実施形態で使用される結合パートナーの標識は、当該分野で既知である任意の検出可能な標識が可能である。また、他の既知の結合パートナーが、本明細書に記載される全体的な設計に従って使用される場合がある。

30

40

【0211】

ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、リボザイムを含む場合がある。リボザイムは、触媒特性を有するRNA分子である。リボザイムは、天然及び改変型どちらにしても、本明細書中開示されるエフェクタータンパク質の標的となる可能性があるRNAを含む、またはそれからなる。リボザイムは、陰性の検出可能なシグナルを生成させるまたは陽性の対照シグナルの生成を防ぐいずれかの反応を触媒するように、選択されるまたは操作される場合がある。活性化エフェクタータンパク質によるリボザイムの不活性化に合わせて、陰性の対照シグナルを生成するまたは陽性の検出可能なシグナルの発生を防ぐ反応は除外され、それにより、陽性の検出可能なシグナルが生成されるようにな

50

る。1つの例示の実施形態において、リボザイムは、溶液に第一色として呈色を引き起こす比色反応を触媒する場合がある。リボザイムが不活性化されたとき、溶液は、第二色に変色し、この第二色が検出可能な陽性シグナルである。リボザイムを使用してどのように比色反応を触媒させることができるかの例は、Zhao et al., 'Signal amplification of glucosamine-6-phosphate based on ribozyme glms', 'Biosens Bioelectron.', 2014; 16: 337-42に記載されており、本明細書中開示される実施形態の文脈においてそのような系がどのように修飾されて機能し得るかの例も提供される。あるいは、リボザイムは、存在する場合、例えば、RNA転写物などの切断産物を生成することができる。したがって、陽性の検出可能なシグナルの検出は、リボザイムが存在しない場合にのみ生成する非切断RNA転写物の検出を含む場合がある。

10

【0212】

ある特定の例示の実施形態において、1種または複数の試薬は、検出可能なシグナル、例えば、比色シグナル、化学発光シグナル、または蛍光シグナルなどの生成を促進することができるタンパク質、例えば、酵素などであり、1つまたは複数のRNAアプタマーがこのタンパク質に結合することによりこのタンパク質が検出可能なシグナルを生成することができないようにして、このタンパク質は阻害または隔離されている。本明細書中開示されるエフェクタータンパク質の活性化に際して、RNAアプタマーは、検出可能なシグナルを生成するタンパク質の能力をもはや阻害できない程度まで切断または分解される。ある特定の例示の実施形態において、アプタマーは、トロンピン阻害因子アプタマーである。ある特定の例示の実施形態において、トロンピン阻害因子アプタマーは、配列GGGAACAAAGCUGAAGUACUUACCC（配列番号4）を有する。このアプタマーが切断されたとき、トロンピンは活性化されることになり、ペプチド比色または蛍光基質を切断することになる。ある特定の例示の実施形態において、比色基質は、トロンピンのペプチド基質と共役結合したパラ-ニトロアニリド（pNA）である。トロンピンによる切断に際して、pNAは放出されて、黄色を呈色し、容易に視認できるようになる。ある特定の例示の実施形態において、蛍光基質は、7-アミノ-4-メチルクマリリンという青色フルオロフォアであり、蛍光検出器を用いて検出可能である。阻害アプタマーは、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ベータ-ガラクトシダーゼ、または仔ウシアルカリホスファターゼ（CAP）に対しても使用される場合があり、上記に説明される一般原則に含まれる。

20

30

【0213】

ある特定の例示の実施形態において、RNA分解酵素活性は、酵素阻害アプタマーの切断を介して比色検出される。RNA分解酵素活性を比色シグナルに変換する様式の1つとして可能性があるのは、RNAアプタマーの切断を、比色アウトプットを生成することができる酵素の再活性化と結びつけることである。RNA切断が存在しない場合、インタクトアプタマーは、酵素標的に結合してその活性を阻害することになる。この読み出しシステムの利点は、酵素がさらなる増幅工程を提供することである：いったん付帯活性（例えばCas13a付帯活性）を介してアプタマーから遊離すると、比色酵素は、比色産物を生成し続けることになり、シグナルの増倍を招く。

40

【0214】

ある特定の例示の実施形態において、比色読み出しを伴って酵素を阻害する既存アプタマーが使用される。比色読み出しを伴うアプタマー/酵素対は複数存在し、例えば、トロンピン、タンパク質C、好中球エラスターゼ、及びサブチリシンなどがある。これらのプロテアーゼは、pNAに基づく比色基質を有し、市販されている。ある特定の例示の実施形態において、一般的な比色酵素を標的とする新規アプタマーが使用される。一般的で堅固な酵素、例えば、ベータ-ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、または仔ウシ小腸アルカリホスファターゼなどを、SELEXなどの選択戦略により設計された改変アプタマーの標的とすることが可能である。そのような戦略は、ナノモル結合効率を持つアプタマーの迅速な選択を可能にし、比色読み出し用のさらなる酵素/アプタマー対の開発に使用可

50

能である。

【0215】

ある特定の実施形態において、RNA分解酵素活性は、RNAテザー阻害剤の切断を介して、比色検出される。一般的な比色酵素の多くは、競合する可逆的阻害剤を有する：例えば、ベータ-ガラクトシダーゼは、ガラクトースにより阻害される可能性がある。こうした阻害剤の多くは、弱いものであるが、それらの効果は、局所濃度の上昇により増大する可能性がある。阻害剤の局所濃度をRNA分解酵素活性と結びつけることにより、比色酵素と阻害剤の対を操作して、RNA分解酵素センサーにすることができる。小分子阻害剤に基づく比色RNA分解酵素センサーには、3つの構成要素が関与する：比色酵素、阻害剤、ならびに阻害剤及び酵素の両方と共有結合した架橋RNAであり、これにより阻害剤を酵素に繋ぎとめる。未切断の配置では、酵素は、小分子の局所濃度が高いことにより阻害されている；RNAが切断されたとき（例えば、Cas13aの付帯切断により）、阻害剤は放出されることになり、比色酵素は活性化されることになる。

10

【0216】

ある特定の実施形態において、RNA分解酵素活性は、G四本鎖の形成及び/または活性化を介して比色検出される。DNAのG四本鎖は、ヘム（鉄（III）-プロトポルフィリンIX）と複合体形成して、ペルオキシダーゼ活性を持つDNAザイムを形成することができる。ペルオキシダーゼ基質（例えばABTS：（2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ジアンモニウム塩））が補給されると、G四本鎖ヘム複合体は、過酸化水素の存在下、基質の酸化を引き起こし、そしてこれが溶液に緑色を呈色させる。G四本鎖形成DNA配列の例は、：GGGTAGGGCGGGTTGGGA（配列番号5）である。RNA配列をこのDNAアプタマーとハイブリダイズさせることにより、G四本鎖構造の形成は制限されることになる。RNA分解酵素の付帯活性化（例えばC2c2複合体付帯活性化）に際して、RNAの付着は切断されていき、G四本鎖が形成されるようになり、ヘムが結合するようになる。この戦略は、発色が酵素反応的である、すなわちRNA分解酵素活性化を超えてさらに増幅が存在することを意味することから、特に魅力的である。

20

【0217】

ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、別個の離散した体積で固相基質に固定されており（以下でさらに定義される）、単一試薬を隔離している場合がある。例えば、試薬は、色素を含むビーズである場合がある。固定された試薬により隔離されている場合、別個のビーズは、検出可能なシグナルを生成できないほど拡散しているが、マスキング構築物からの放出に際して、例えば、凝集または溶液濃度の単純上昇により、検出可能なシグナルを生成できる。ある特定の例示の実施形態において、固定されたマスキング剤は、標的分子の検出に際して活性化エフェクタータンパク質により切断される可能性があるRNA系アプタマーである。

30

【0218】

1つの例示の実施形態において、マスキング構築物は、検出剤が溶液中で凝集しているか分散しているかに応じて呈色を変化させる検出剤を含む。例えば、ある特定のナノ粒子、例えばコロイド金などは、それらが凝集物から分散した粒子へと動くにつれて視認できる紫色から赤色への色シフトを起こす。したがって、ある特定の例示実施形態において、そのような検出剤は、1つまたは複数の架橋分子により凝集物に固定されている場合がある。架橋分子の少なくとも一部分は、RNAを含む。本明細書中開示されるエフェクタータンパク質の活性化に際して、架橋分子のRNA部分が切断されて、検出剤を分散させ、それに対応する呈色変化がもたらされる。ある特定の例示の実施形態において、架橋分子は、RNA分子である。ある特定の例示の実施形態において、検出剤は、コロイド金属である。コロイド金属材料として、水不溶性金属粒子、または液体に分散した金属化合物、ヒドロゾル、または金属ゾルをあげることができる。コロイド金属は、周期表のIA、IB、IIB、及びIIIB族の金属、ならびに遷移金属、特にVII族のものから選択される場合がある。好適な金属として、金、銀、アルミニウム、ルテニウム、亜鉛、鉄、

40

50

ニッケル、及びカルシウムが挙げられる。他の適切な金属として、以下のものが挙げられ、それらの取り得る様々な酸化状態の全てを含む：リチウム、ナトリウム、マグネシウム、カリウム、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、コバルト、銅、ガリウム、ストロンチウム、ニオブ、モリブデン、パラジウム、インジウム、スズ、タンゲステン、レニウム、白金、及びガドリニウム。金属は、好ましくは、適切な金属化合物に由来するイオン形で提供され、例えば、 Al^{3+} 、 Ru^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、及び Ca^{2+} イオンなどである。

【0219】

RNA 架橋が活性化 CRISPR エフェクターにより切断されると、上述の色シフトが観察される。ある特定の例示の実施形態において、粒子はコロイド金属である。ある特定の他の例示の実施形態において、コロイド金属は、コロイド金である。ある特定の例示の実施形態において、コロイド状ナノ粒子は、15 nm の金ナノ粒子 (AuNP) である。コロイド金ナノ粒子の独特の表面特性のため、溶液中に完全に分散しているときは、最大吸光度は 520 nm で観察され、肉眼では赤色に呈色して見える。AuNP が凝集すると、それらは、最大吸光度の赤方偏移を呈し、色がより暗くなり、最終的に暗紫色凝集物として溶液から沈殿する。ある特定の例示の実施形態において、ナノ粒子は、ナノ粒子の表面から延びる DNA リンカーを有するように修飾される。個別の粒子は、RNA の各末端で DNA リンカーの少なくとも一部とハイブリダイズする一本鎖 RNA (ssRNA) 架橋により互いに連結される。こうして、ナノ粒子は、連結された粒子と凝集物のウェブを形成することになり、暗色の沈殿として出現する。本明細書中開示される CRISPR エフェクターの活性化に際して、ssRNA 架橋は切断されることになり、AU の NPS が連結されていた網目から放出されて視認できる赤色を生成する。DNA リンカー及び RNA 架橋配列の例を、以下にまとめる。DNA リンカーの末端にあるチオールリンカーは、AuNP との表面結合に使用される場合がある。他の結合形式も使用される場合がある。ある特定の例示の実施形態において、2 つの AuNP 集団が生成する場合があり、各 DNA リンカーにつき 1 つである。これは、ssRNA が適切な方向で適切に架橋するのを促進する助けとなる。ある特定の例示の実施形態において、第一の DNA リンカーは、3' 末端で結合しているが、第二の DNA リンカーは、5' 末端で結合している。

【表 1】

表 1.

C2c2 比色 DNA 1	TTATAACTATTCCTAAAAA/3チオ MC3-D/ (配列番号 20)
C2c2 比色 DNA 2	/5チオMC6-D/AAAAAAAAAACTCCCCTAA TAACAAT (配列番号 21)
C2c2 比色 架橋	GGGUAGGAAUAGUUAUAAUUUCCCUUCC CAUUGUUAUUAGGGAG (配列番号 22)

【0220】

ある特定の他の例示の実施形態において、マスキング構築物は、検出可能な標識を結合させた RNA オリゴヌクレオチド及びその検出可能な標識のマスキング剤を含む。そのような検出可能な標識 / マスキング剤対の例としては、フルオロフォアとフルオロフォアの消光剤がある。フルオロフォアの消光は、フルオロフォアと別のフルオロフォアまたは非蛍光分子との間で非蛍光複合体が形成された結果生じることが可能である。この機構は、基底状態複合体形成、静的消光、または接触消光として知られる。したがって、RNA オリゴヌクレオチドは、フルオロフォアと消光剤が接触して消光が生じるのに十分なほど近接しているように設計される。フルオロフォア及びそれらの同族の消光剤は、当該分野で

既知であり、当業者はこの目的で選択することができる。本発明の文脈において特定のフルオロフォア / 消光剤対が重要であるのではなく、フルオロフォア / 消光剤対の選択は、フルオロフォアのマスキングを確実にするにすぎない。本明細書中開示されるエフェクタータンパク質の活性化に際して、RNAオリゴヌクレオチドは切断され、それによりフルオロフォアと消光剤の間の接触消光効果を維持するのに必要な近さが断たれる。したがって、フルオロフォアの検出は、試料中に標的分子が存在することを確定するのに使用される場合がある。

【0221】

ある特定の他の例示の実施形態において、マスキング構築物は、1つまたは複数の金属ナノ粒子、例えば金ナノ粒子を結合させた1つまたは複数のRNAオリゴヌクレオチドを含む場合がある。実施形態によっては、マスキング構築物は、複数のRNAオリゴヌクレオチドにより架橋された複数の金属ナノ粒子を含み、それらは閉じたループを形成している。1つの実施形態において、マスキング構築物は、3つのRNAオリゴヌクレオチドにより架橋された3つの金ナノ粒子を含み、それらは閉じたループを形成している。実施形態によっては、CRISPRエフェクタータンパク質によるRNAオリゴヌクレオチドの切断は、金属ナノ粒子による検出可能なシグナルの生成を招く。

10

【0222】

ある特定の他の例示の実施形態において、マスキング構築物は、1つまたは複数の量子ドットを結合させた1つまたは複数のRNAオリゴヌクレオチドを含む場合がある。実施形態によっては、CRISPRエフェクタータンパク質によるRNAオリゴヌクレオチドの切断は、量子ドットによる検出可能なシグナルの生成を招く。

20

【0223】

1つの例示の実施形態において、マスキング構築物は、量子ドットを含む場合がある。量子ドットは、表面に複数のリンカー分子が結合されている場合がある。リンカー分子の少なくとも一部は、RNAを含む。リンカー分子は、一端で量子ドットに結合されており、及び量子ドットの消光が生じるのに十分な近さに消光剤が維持されるように、その長さに沿ってまたはリンカーの末端で1つまたは複数の消光剤に結合されている。リンカーは分岐している場合がある。上記のとおり、量子ドット / 消光剤対が重要であるのではなく、量子ドット / 消光剤対の選択は、フルオロフォアのマスキングを確実にするにすぎない。量子ドット及びそれらの同族 / 消光剤は、当該分野で既知であり、当業者はこの目的で選択することができる。本明細書中開示されるエフェクタータンパク質の活性化に際して、リンカー分子のRNA部分は切断され、それにより量子ドットと1つまたは複数の消光剤の間の消光効果を維持するのに必要な近さが排除される。ある特定の例示の実施形態において、量子ドットは、複合したストレプトアビジンである。RNAは、ピオチンリンカーを介して結合されており、配列 / 5 B i o s g / U C U C G U A C G U U C / 3 I A b R Q S p / (配列番号9) または / 5 B i o s g / U C U C G U A C G U U C U C U C G U A C G U U C / 3 I A b R Q S p / (配列番号10) を持つ消光分子を利用している。式中、/ 5 B i o s g / は、ピオチンタグであり、/ 3 I A b R Q S p / は、I o w a b l a c k 消光剤である。切断に際して、本明細書中開示される活性化エフェクターにより、量子ドットは、視認できる蛍光を発するようになる。

30

40

【0224】

同様な様式で、検出可能な陽性シグナルを生成させるのに蛍光エネルギー移動 (FRET) を使用する場合がある。FRETは、無放射プロセスであり、このプロセスにより、エネルギー励起したフルオロフォア (すなわち「ドナーフルオロフォア」) からのフォトンが、別の分子 (すなわち「アクセプター」) の電子のエネルギー状態を、励起一重項状態のより高い振動レベルへと引き上げる。ドナーフルオロフォアは、そのフルオロフォアに特徴的な蛍光を発することなく基底状態に戻る。アクセプターは、別のフルオロフォアまたは非蛍光分子であることが可能である。アクセプターがフルオロフォアである場合、移動したエネルギーは、そのフルオロフォアに特徴的な蛍光として発せられる。アクセプターが非蛍光分子である場合、吸収されたエネルギーは、熱として失われる。したがって

50

、本明細書中開示される実施形態の文脈において、フルオロフォア / 消光剤対は、オリゴヌクレオチド分子に結合させたドナーフルオロフォア / アクセプター対に置き換えられる。インタクトであるとき、マスキング構築物は、アクセプターから発せられる蛍光または熱により検出されるとおりの第一シグナル（陰性の検出可能なシグナル）を生成する。本明細書中開示されるエフェクタータンパク質の活性化に際して、RNAオリゴヌクレオチドは切断され、ドナーフルオロフォアの蛍光がそこで検出される（陽性の検出可能なシグナル）ようにFRETが破壊される。

【0225】

ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、挿入色素の使用を含み、この色素は、長いRNAが切断されて短いヌクレオチドになるのに反応して、その吸光度を変化させる。そのような色素は複数存在する。例えば、ピロニン-Yは、RNAと複合体形成し、572nmに光吸収を有する複合体を形成する。RNAの切断により、光吸収が消失し、呈色が変わる。メチレンブルーを同様な様式で使用する場合があります、これは、RNA切断に際して688nmでの光吸収を変化させる。したがって、ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、本明細書中開示されるエフェクタータンパク質によるRNAの切断に際して光吸収を変化させるRNAと挿入色素の複合体を含む。

【0226】

ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、HCR反応のイニシエーターを含む場合がある。例えば、Dirks and Pierce, PNAS 101, 15275-15728 (2004)を参照。HCR反応は、2つのヘアピン種の位置エネルギーを利用する。ヘアピンのうち一方の対応する領域と相補的な部分を有する一本鎖イニシエーターが、それまで安定だった混合物に放出されると、そのイニシエーターは、一方の種のヘアピンを開口する。このプロセスは、次いで、一本鎖領域を露出させ、これが他方の種のヘアピンを開口させる。このプロセスは、次いで、最初のイニシエーターと同一の一本鎖領域を露出させる。結果として生じる連鎖反応は、ニック二重らせんの形成を招く場合があり、らせんはヘアピンの供給が枯渇するまで成長する。得られる生成物の検出は、ゲル上でまたは比色で行われる場合がある。比色検出法の例として、例えば、Lu et al., 'Ultra-sensitive colorimetric assay system based on the hybridization chain reaction-triggered enzyme cascade amplification ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(1):167-175, Wang et al., 'An enzyme-free colorimetric assay using hybridization chain reaction amplification and split aptamers' Analyst 2015, 150, 7657-7662、及びSong et al., 'Non covalent fluorescent labeling of hairpin DNA probe coupled with hybridization chain reaction for sensitive DNA detection.' Applied Spectroscopy, 70(4): 686-694 (2016)に開示されるものが挙げられる。

【0227】

ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、HCRイニシエーター配列、及びイニシエーターがHCR反応を開始することを防ぐ切断可能な構造配列要素、例えばループまたはヘアピンなどを含む場合がある。活性化CRISPRエフェクタータンパク質により構造配列要素が切断されると、次いで、イニシエーターが放出されて、HCR反応を引き起こし、反応の検出は、試料中に1種または複数の標的が存在することを示す。ある特定の例示の実施形態において、マスキング構築物は、RNAループを持つヘアピンを含む。活性化CRISPRエフェクタータンパク質がRNAループを切断すると、イニシエーターが放出されてHCR反応を引き起こすことができる。

10

20

30

40

50

【0228】

特定の実施形態において、標的核酸は、アトモル感度で検出される場合がある。特定の実施形態において、標的核酸は、フェムトモル感度で検出される場合がある。いくつかの具体的な実施形態において、本方法は、約2時間未満、約90分間未満、約60分間未満、約30分間未満、または約15分間未満行われる。いくつかの好適な実施形態において、増幅及び検出は、2 f Mの検出を約2時間未満で行うワンポット方法で行うことが可能である。

【0229】

増幅及び検出用キット

同じく本明細書中提供されるのは、試料中の標的二本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのキットである。そのようなキットは、本明細書中記載されるとおりの増幅C R I S P R系を含む場合があるが、必ずしもこれに限定されない。

10

【0230】

実施形態によっては、キットは、試料中の二本鎖核酸を精製するための試薬を含む場合がある。

【0231】

実施形態によっては、キットは、試料中の標的一本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのキットである場合があり、試料中の一本鎖核酸を精製するための試薬を含む場合がある。キットは、使用説明書のセットも含む場合がある。

20

【0232】

キットは、さらに、検出システムを、好適な実施形態において、C R I S P R検出システムを含む場合がある。検出システムは、例えば、2016年12月9日出願の米国出願第62/432,553号、2017年2月8日出願の同62/456,645号、2017年3月15日出願の同62/471,930号、2017年4月12日出願の同62/484,869号、2017年10月4日出願の同62/568,268号に記載されるとおりのものが可能であり、これらは全てそのまま全体が参照として援用される。同じく、2017年12月8日出願のP C T / U S 2 0 1 7 / 0 6 5 4 7 7、名称C R I S P R E f f e c t o r S y s t e m B a s e d D i a g n o s t i c sに記載されるとおりのもの、特に[0142] - [0289]の検出用C R I S P R系の構成要素について記載されるとおりのものが可能であり、この出願は本明細書中参照として援用される。

30

【0233】

方法

増幅及び／または検出の方法が提供され、これらの方法は、本明細書中開示されるとおりのシステムと合わせて利用することができる。

【0234】

本発明の実施形態において、ニッカーゼに基づく増幅が含まれる場合がある。ニック酵素は、C R I S P Rタンパク質の場合がある。したがって、d s D N Aへのニックの導入は、プログラム可能かつ配列特異的であることが可能である。図1は、本発明の実施形態を示し、この実施形態は、d s D N A標的の対向しあう鎖を標的とするように設計された2つのガイドを用いて開始される。本発明に従って、ニッカーゼは、C p f 1、C 2 c 1、C a s 9、あるいはD N A二重鎖の単一鎖を切断するもしくは切断するように改変された任意のオルソログまたはC R I S P Rタンパク質が可能である。次いで、ニックングされた鎖は、ポリメラーゼにより延長することができる。ある実施形態において、ニック位置は、ポリメラーゼによる鎖延長が、ニック部位間の標的二重鎖D N Aの中心部分に向かうように選択される。ある特定の実施形態において、延長された鎖とハイブリダイズし、続いてポリメラーゼがプライマーをさらに延長させて、2つのd s D N A片を生成することができるプライマーが、反応に含まれる：第一のd s D N Aは、第一鎖C R I S P Rガイド部位または第一及び第二鎖C R I S P Rガイド部位の両方を含み、第二d s D N Aは、第二鎖C R I S P Rガイド部位または第一及び第二鎖C R I S P Rガイド部位の両方を

40

50

含む。これらの d s D N A 片は、サイクル反応中で継続してニッキング及び延長が行われ、このサイクルによりニッキング部位間の標的領域が指数関数的に増幅される。

【 0 2 3 5 】

ある特定の実施形態において、増幅は、C R I S P R - ニッカーゼに基づく増幅、すなわちプログラム可能な C R I S P R ニッキング増幅である。増幅は、以下を含む場合がある：(a) 標的二本鎖核酸を含む試料を、増幅反応混合物と混合すること、増幅反応混合物は、以下を含む：(i) 増幅 C R I S P R 系、増幅 C R I S P R 系は、第一 C R I S P R / C a s 複合体及び第二 C R I S P R / C a s 複合体を含み、第一 C R I S P R / C a s 複合体は、第一 C a s 系ニッカーゼと、第一 C R I S P R / C a s 複合体を標的核酸の第一鎖に誘導する第一ガイド分子とを含み、第二 C R I S P R / C a s 複合体は、第二 C a s 系ニッカーゼと、第二 C R I S P R / C a s 複合体を標的核酸の第二鎖に誘導する第二ガイド分子とを含む；ならびに(i i) ポリメラーゼ；(b) 第一 C R I S P R / C a s 複合体及び第二 C R I S P R / C a s 複合体を用いて標的核酸の第一鎖及び第二鎖をニッキングし、置換し、及びニッキングされた鎖をポリメラーゼを用いて延長し、それにより第一及び第二ニッキング部位間の標的核酸配列を含む二重鎖を生成させることにより標的核酸を増幅すること；(c) 反応混合物に、第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対を加えること、第一プライマーは、標的核酸の第一鎖と相補的な部分及び第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含み、第二プライマーは、標的核酸の第二鎖と相補的な部分及び第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む、ならびに(d) 等温条件下で延長及びニッキングを繰り返すことにより、さらに標的核酸を増幅すること。第一 C a s 系ニッカーゼと第二 C a s 系ニッカーゼは、同じであることも、異なっていることも可能である。

10

20

【 0 2 3 6 】

核酸の増幅は、特定の温度サイクル機械または設備を用いて行われる場合があり、単一反応またはバルクで行われる場合があり、例えば、任意の所望数の反応が同時に行われる場合がある。実施形態によっては、増幅は、マイクロ流体装置またはロボット装置を用いて行われる場合があり、あるいは所望の増幅を達成するために温度を手動で変化させて行われる場合がある。実施形態によっては、特定の応用または材料にとって最適な反応条件を得るために最適化が行われる場合がある。当業者なら、十分な増幅を得るために反応条件を最適化することは当然であり、最適化できる。

30

【 0 2 3 7 】

実施形態によっては、標的核酸の増幅は、約 3 7 ~ 6 5 で行われる。実施形態によっては、標的核酸の増幅は、約 5 0 ~ 5 9 で行われる。実施形態によっては、標的核酸の増幅は、約 6 0 ~ 7 2 で行われる。実施形態によっては、標的核酸の増幅は、約 3 7 で行われる。実施形態によっては、標的核酸の増幅は室温で行われる。

【 0 2 3 8 】

さらなる実施形態を、以下の番号を振った段落で開示する：

1 . 標的二本鎖核酸を増幅及び / または検出する方法であって、以下：

a . 前記標的二本鎖核酸を含む試料を、増幅反応混合物と混合すること、前記増幅反応混合物は、以下：

40

i . 増幅 C R I S P R 系、前記増幅 C R I S P R 系は、第一 C R I S P R / C a s 複合体及び第二 C R I S P R / C a s 複合体を含み、前記第一 C R I S P R / C a s 複合体は、第一 C a s 系ニッカーゼと、前記第一 C R I S P R / C a s 複合体を第一標的核酸位置に誘導する第一ガイド分子とを含み、前記第二 C R I S P R / C a s 複合体は、第二 C a s 系ニッカーゼと、前記第二 C R I S P R / C a s 複合体を第二標的核酸位置に誘導する第二ガイド分子とを含む；ならびに

i i . ポリメラーゼ、を含む；

b . 前記標的核酸を増幅すること；

c . 前記反応混合物に、第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対を加えること、前記第一プライマーは、第一位置と相補的な部分を含み、前記第二プライマーは

50

、第二位置と相補的な部分及び前記第二ガイド分子の結合部分を含む部分を含み；ならびに

d．等温条件下で延長及びニッキングを繰り返すことにより、さらに、前記標的核酸を増幅することを含む、前記方法。

2．前記第一ガイド分子は、前記第一C R I S P R / C a s 複合体を前記標的核酸の第一鎖に誘導し、及び前記第二ガイド分子は、前記第二C R I S P R / C a s 複合体を前記標的核酸の第二鎖に誘導する、段落1に記載の方法。

3．前記第一標的核酸位置及び前記第二標的核酸位置は、前記標的核酸の第一鎖にあり、それにより前記第一標的核酸位置と前記第二標的核酸位置の間にある前記標的核酸の前記第一鎖の配列を含むs s D N Aを生成する、段落1に記載の方法。

4．前記第一C R I S P R / C a s 複合体及び前記第二C R I S P R / C a s 複合体を用いて前記標的核酸の前記第一鎖及び前記第二鎖をニッキングし、ならびに前記ポリメラーゼを用いて前記ニッキングされた鎖を置換及び延長し、それにより第一及び第二ニッキング部位間の標的核酸配列を含む二重鎖を生成させることにより前記標的核酸を増幅することを含む、段落2に記載の方法。

5．前記C a s 系ニッカーゼは、C a s 9 ニッカーゼ、C p f 1 ニッカーゼ、及びC 2 c 1 ニッカーゼからなる群より選択される、段落1に記載の方法。

6．前記C a s 系ニッカーゼは、H N H ドメインに変異を有するC a s 9 ニッカーゼタンパク質である、段落2に記載の方法。

7．前記C a s 系ニッカーゼは、S p C a s 9 のN 8 6 3 A またはS a C a s 9 のN 5 8 0 A に相当する変異を有するC a s 9 ニッカーゼタンパク質である、段落2に記載の方法。

8．前記C a s 系ニッカーゼは、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s、S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s、S . m u t a n s、S . a g a l a c t i a e、S . e q u i s i m i l i s、S . s a n g u i n i s、S . p n e u m o n i a ; C . j e j u n i、C . c o l i ; N . s a l s u g i n i s、N . t e r g a r c u s ; S . a u r i c u l a r i s、S . c a r n o s u s ; N . m e n i n g i t i d e s、N . g o n o r r h o e a e ; L . m o n o c y t o g e n e s、L . i v a n o v i i ; C . b o t u l i n u m、C . d i f f i c i l e、C . t e t a n i、C . s o r d e l l i i、F r a n c i s e l l a t u l a r e n s i s 1、P r e v o t e l l a a l b e n s i s、L a c h n o s p i r a c e a e 科菌M C 2 0 1 7 1、B u t y r i v i b r i o p r o t e o c l a s t i c u s、P e r e g r i n i b a c t e r i a 属菌G W 2 0 1 1 _ G W A 2 _ 3 3 _ 1 0、P a r c u b a c t e r i a 属菌G W 2 0 1 1 _ G W C 2 _ 4 4 _ 1 7、S m i t h e l l a 種S C A D C、A c i d a m i n o c o c c u s 種B V 3 L 6、L a c h n o s p i r a c e a e 科菌M A 2 0 2 0、C a n d i d a t u s M e t h a n o p l a s m a t e r m i t u m、E u b a c t e r i u m e l i g e n s、M o r a x e l l a b o v o c u l i 2 3 7、L e p t o s p i r a i n a d a i、L a c h n o s p i r a c e a e 科菌N D 2 0 0 6、P o r p h y r o m o n a s c r e v i o r i c a n i s 3、P r e v o t e l l a d i s i e n s、及びP o r p h y r o m o n a s m a c a c a e からなる群より選択される細菌種に由来するC a s 9 タンパク質である、段落3または4に記載の方法。

9．前記C a s 系ニッカーゼは、N u c ドメインに変異を有するC p f 1 ニッカーゼタンパク質である、段落2に記載の方法。

10．前記C a s 系ニッカーゼは、A s C p f 1 のR 1 2 2 6 A に相当する変異を有するC p f 1 ニッカーゼタンパク質である、段落6に記載の方法。

11．前記C a s 系ニッカーゼは、F r a n c i s e l l a t u l a r e n s i s、P r e v o t e l l a a l b e n s i s、L a c h n o s p i r a c e a e 科菌、B u

10

20

30

40

50

tyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacteri-
eria 属菌、Parcubacteria 属菌、Smithella 種、Acidam-
inococcus 種、Lachnospiraceae 科菌、Candidatus
Methanoplasma termitum、Eubacterium elige-
ns、Moraxella bovoculi、Leptospira inadai、
Porphyromonas crevioricanis、Prevotella d-
isiens 及び Porphyromonas macacae、Succinivib-
rio dextrinosolvens、Prevotella disiens、F-
lavobacterium branchiophilum、Helcococcus
kunzii、Eubacterium 種、Microgenomates (Ro-
zmanbacteria) 群菌、Flavobacterium 種、Prevotel-
la brevis、Moraxella caprae、Bacteroidetes
oral、Porphyromonas cansulci、Synergistes
jonesii、Prevotella bryantii、Anaerovibri-
o 種、Butyrivibrio fibrisolvens、Candidatus
Methanomethylophilus、Butyrivibrio 種、Oribac-
terium 種、Pseudobutyrivibrio ruminis、ならびに
Proteocatella sphenisci からなる群より選択される細菌種に由
来する Cpf1 タンパク質である、段落 6 または 7 に記載の方法。 10

12. 前記 Cas 系ニッカーゼは、Nuc ドメインに変異を有する C2c1 ニッカーゼ
タンパク質である、段落 2 に記載の方法。 20

13. 前記 Cas 系ニッカーゼは、AacC2c1 の D570A、E848A、または
D977A に相当する変異を有する C2c1 ニッカーゼタンパク質である、段落 9 に記載
の方法。

14. 前記 Cas 系ニッカーゼは、Alicyclobacillus acidot-
errestriis、Alicyclobacillus contaminans、A-
licyclobacillus macrosporangiidus、Bacill-
us hisashii、Candidatus Lindowbacteria、De-
sulfovibrio inopinatus、Desulfonatronum t-
hiodismutans、Elusimicrobia 門菌 RIFOXYA12、Om-
nitrophica WOR__2 細菌 RIFCSPHIGO2、Opitutace-
ae 科菌 TAV5、Phycisphaerae 綱菌 ST-NAGAB-D1、Plan-
ctomycetes 門菌 RBG__13__46__10、Spirochaetes 門菌 G-
WB1__27__13、Verrucomicrobiaceae 科菌 UBA2429、T-
uberibacillus calidus、Bacillus thermoamy-
lovorans、Brevibacillus 種 CF112、Bacillus 種 NS-
P2.1、Desulfatirhabdium butyrativorans、Al-
icyclobacillus herbarius、Citrobacter fre-
undii、Brevibacillus agri (例えば、BAB-2500)、及
び Methylobacterium nodulans からなる群より選択される細菌 40
種に由来する C2c1 タンパク質である、段落 9 または 10 に記載の方法。

15. 前記第一 Cas 系ニッカーゼと前記第二 Cas 系ニッカーゼは、同一である、先
行する段落のいずれか 1 つに記載の方法。

16. 前記第一 Cas 系ニッカーゼと前記第二 Cas 系ニッカーゼは、異なっている、
段落 1 から 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

17. 前記ポリメラーゼは、Bst 2.0 DNA ポリメラーゼ、Bst 2.0
WarmStart DNA ポリメラーゼ、Bst 3.0 DNA ポリメラーゼ、全長
Bst DNA ポリメラーゼ、巨大断片 Bst DNA ポリメラーゼ、巨大断片 Bsu
DNA ポリメラーゼ、phi29 DNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ、G-
st ポリメラーゼ、Taq ポリメラーゼ、E.coli DNA ポリメラーゼ I のクレノ 50

ー断片、K l e n T a q、P o l I I I DNAポリメラーゼ、T 5 DNAポリメラーゼ、G s t ポリメラーゼ、及びシーケナーゼDNAポリメラーゼからなる群より選択される、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。

18．前記標的核酸の増幅は、約50～59で行われる、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。

19．前記標的核酸の増幅は、約60～72で行われる、段落1から14のいずれか1つに記載の方法。

20．前記標的核酸の増幅は、約37でまたは約65で行われる、段落1から14のいずれか1つに記載の方法。

21．前記標的核酸の増幅は、一定温度で行われる、段落1から14のいずれか1つに記載の方法。 10

22．前記標的核酸配列は、長さが、約20～30、約30～40、約40～50、または約50～100ヌクレオチドである、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。

23．前記標的核酸配列は、長さが、約100～200、約100～500、または約100～1000ヌクレオチドである、段落1から18のいずれか1つに記載の方法。

24．前記標的核酸配列は、長さが、約1000～2000、約2000～3000、約3000～4000、または約4000～5000ヌクレオチドである、段落1から18のいずれか1つに記載の方法。

25．前記第一プライマーまたは前記第二プライマーは、RNAポリメラーゼプロモーターを含む、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。 20

26．さらに、前記増幅された核酸を、ゲル電気泳動、挿入色素検出、PCR、リアルタイムPCR、蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、質量分析、及びCRISPR-SHERLOCKからなる群より選択される方法により検出することを含む、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。

27．前記増幅された核酸は、C a s 1 3に基づくCRISPR-SHERLOCK法により検出される、段落23に記載の方法。

28．前記標的核酸は、アトモル感度で検出される、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。

29．前記標的核酸は、フェムトモル感度で検出される、段落1から24のいずれか1つに記載の方法。 30

30．前記標的核酸は、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、プラスミドDNA、及び合成二本鎖DNAからなる群より選択される、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。

31．前記試料は、生体試料または環境試料である、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。

32．前記生体試料は、血液、血漿、血清、尿、糞便、痰、粘液、リンパ液、滑液、胆汁、腹水、胸水、漿液腫、唾液、脳脊髄液、眼房水もしくは硝子体液、または任意の体分泌、漏出液、滲出液、または関節から得られる液体、あるいは皮膚または粘膜表面のスワブである、段落28に記載の方法。

33．前記試料は、ヒト患者から得られた血液、血漿、または血清である、段落29に記載の方法。 40

34．前記試料は、植物試料である、段落28に記載の方法。

35．前記試料は、未精製試料である、先行する段落のいずれか1つに記載の方法。

36．前記試料は、精製試料である、段落1から31のいずれか1つに記載の方法。

37．標的一本鎖核酸を増幅及び/または検出する方法であって、以下：

(a) 試料中の前記一本鎖核酸を標的二本鎖核酸に変換すること；及び

(b) 段落1に記載の工程を行うこと、

を含む、前記方法。

38．前記標的一本鎖核酸は、RNA分子である、段落34に記載の方法。

39．前記RNA分子は、逆転写及び増幅工程により、前記二本鎖核酸に変換される、 50

段落 35 に記載の方法。

40．前記標的一本鎖核酸は、一本鎖ウイルス DNA、ウイルス RNA、メッセンジャー RNA、リボソーム RNA、転移 RNA、マイクロ RNA、低分子干渉 RNA、核内低分子 RNA、合成 RNA、及び合成一本鎖 DNA からなる群より選択される、段落 34 に記載の方法。

41．試料中の標的二本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのシステムであって、以下：

a) 増幅 CRISPR 系、前記増幅 CRISPR 系は、第一 CRISPR / Cas 複合体及び第二 CRISPR / Cas 複合体を含み、前記第一 CRISPR / Cas 複合体は、第一 Cas 系ニッカーゼと、前記第一 CRISPR / Cas 複合体を標的核酸の第一鎖に誘導する第一ガイド分子とを含み、及び前記第二 CRISPR / Cas 複合体は、第二 Cas 系ニッカーゼと、前記第二 CRISPR / Cas 複合体を前記標的核酸の第二鎖に誘導する第二ガイド分子とを含む；

b) ポリメラーゼ；

c) 反応混合物に対する第一プライマー及び第二プライマーを含むプライマー対、前記第一プライマーは、前記標的核酸の前記第一鎖と相補的な部分及び前記第一ガイド分子の結合部位を含む部分を含み、及び前記第二プライマーは、前記標的核酸の前記第二鎖と相補的な部分及び前記第二ガイド分子の結合部位を含む部分を含む；ならびに任意選択で

d) 前記標的核酸の増幅を検出する検出システム、を含む、前記システム。

42．前記 Cas 系ニッカーゼは、Cas 9 ニッカーゼ、Cpf1 ニッカーゼ、及び C2c1 ニッカーゼからなる群より選択される、段落 38 に記載のシステム。

43．前記ポリメラーゼは、Bst 2.0 DNA ポリメラーゼ、Bst 2.0 WarmStart DNA ポリメラーゼ、Bst 3.0 DNA ポリメラーゼ、全長 Bst DNA ポリメラーゼ、巨大断片 Bst DNA ポリメラーゼ、巨大断片 Bsu DNA ポリメラーゼ、phi 29 DNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ、及びシーケナーゼ DNA ポリメラーゼからなる群より選択される、段落 38 または 39 に記載のシステム。

44．前記 Cas 系ニッカーゼ及び前記ポリメラーゼは、同一温度で機能する、段落 38 から 40 のいずれか 1 つに記載のシステム。

45．試料中の標的一本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのシステムであって、以下：

a) 前記標的一本鎖核酸を二本鎖核酸に変換する試薬、

b) 段落 38 に記載の構成要素、

を含む、前記システム。

46．試料中の標的二本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのキットであって、段落 38 に記載の構成要素及び取扱説明書のセットを含む、前記キット。

47．さらに、前記試料中の前記二本鎖核酸を精製する試薬を含む、段落 43 に記載のキット。

48．試料中の標的一本鎖核酸を増幅及び／または検出するためのキットであって、段落 43 に記載の構成要素及び取扱説明書のセットを含む、前記キット。

49．さらに前記試料中の一本鎖核酸を精製する試薬を含む、段落 4 に記載のキット。

【0239】

以下の実施例で本発明をさらに説明するが、実施例は、特許請求の範囲で記載される本発明の範囲を制限しない。

【実施例】

【0240】

作業実施例

実施例 1：CRISPR - ニッカーゼに基づく増幅 (CRISPR - NEAR) 及び NEAR SHERLOCK 検出

10

20

30

40

50

この実施例では、CRISPR-Cas 酵素を用いたニッカーゼに基づく増幅 (CRISPR-NEAR と称する) を、CRISPR SHERLOCK 検出法と併用して、試験した。図 1 に、CRISPR-Cas 酵素を用いたニッカーゼに基づく増幅の概略図を示す。

【0241】

CRISPR-NEAR は、DNA インプットまたは RNA インプットいずれでも行うことができる。増幅プライマーに T7 プロモーター配列を組み込むことにより、CRISPR-NEAR は、下流にある SHERLOCK 検出法とも適合する。図 9 に、SHERLOCK 検出法と組み合わせた CRISPR-NEAR の概略図を示す。CRISPR-NEAR を使用することの重要な利点の 1 つは、それが、RPA 増幅よりもはるかに迅速となり得ることである。この方法は、非常に簡単な緩衝剤を使用し、これにより、SHERLOCK 検出の全ての工程を 1 つの反応に簡単にまとめることが可能になる。それに対して、RPA 増幅は、非常に粘性の高い緩衝剤を使用し、他の試薬とともに使用することが難しい。

10

【0242】

図 2 は、ニッカーゼ酵素増幅反応の最適化を実証するゲル電気泳動像である。この結果は、NEAR 増幅が、ニッカーゼ酵素及びポリメラーゼの両方に依存することを示す。プライマーがないと、直線増幅のみが生じる。プライマー及び他の PCR 添加剤 (例えば、gp32 SSB またはトレハロースなど) は、増幅を増大させ、非特異的産物形成を調節する可能性がある。

20

【0243】

図 3 A ~ 図 3 F は、ニッカーゼに基づく直線増幅が、最適なニッカーゼ濃度に依存することを実証する一連の実験を示す。これらの実験において、追加のプライマーは、反応に含まれていなかったため、ニッキングに基づく直線増幅のみが生じている。これらの実験で使用されたニッカーゼは、Nt.A1w1 (陽性対照として使用)、T7 ミスマッチ化 nAscpf1、またはマッチする nAscpf1 のいずれかであった。ガイド濃度は、5 μ M インプットで一定に保ち、一方でニッカーゼ濃度を、減量設定した。nAscpf1 は、二本鎖 DNA をニッキングすることができ、二本鎖 DNA は、鎖置換ポリメラーゼにより増幅される。これらのデータは、nAscpf1 増幅に最適な濃度が 500 nM であり、試験した最高濃度 (1 μ M) ではないことを示す。

30

【0244】

インプットとして増幅された NEAR 反応を用いて、連続実験を行なった。実験では、核酸標的は、増幅され、そして SYTO 挿入色素 (図 4 A ~ 図 4 C)、ゲル系読み出し (図 4 D ~ 図 4 F)、または Cas13 に基づく SHERLOCK 検出 (図 4 G ~ 図 4 I) のいずれかを用いて検出される。これらの結果は、NEAR を用いた増幅が、多くの非特異的産物を作り出し、従って、SYTO またはゲル系読み出しとは適合しないことを示唆する。しかしながら、CRISPR SHERLOCK に基づく検出は、この問題を回避することができ、目的の産物の特異的検出を可能にする。SYTO または CRISPR SHERLOCK に基づく検出 (Cas13 または Cpf1 検出いずれかを使用) を用いたデータを、さらに、標的あり / 標的なしの比としてプロットした (図 5)。グラフは、標的部位に対してプログラミングされた LwCas13a 及び Cpf1 ガイド複合体が、非特異的増幅に対して特異的増幅を識別することができるのに対して、SYTO 挿入色素検出は、標準条件下で識別不可であることを示す。

40

【0245】

図 6 A 及び図 6 B は、NEAR 単独対 NEAR と SHERLOCK 検出の併用のデータを示す 2 つのグラフである。これらのグラフから複数の結論を導くことができる。第一に、LwCas13a SHERLOCK は、T7 増幅及び強力な付帯 RNA 分解酵素活性を通じてさらに低い検出限度を可能にする。第二に、Nt.A1w1 NEAR を Cas13 検出と併用することで、2 aM という検出限度が達成可能であり、一方で、nAscpf1-NEAR を Cas13 検出と併用することで、2 fM という検出限度が達成可能

50

である。最後に、A s C p f 1 検出は、どのN E A R 反応と組み合わせても、2 0 f M 未満で信頼できるシグナルを与えるのに十分なほどの感度ではない。

【 0 2 4 6 】

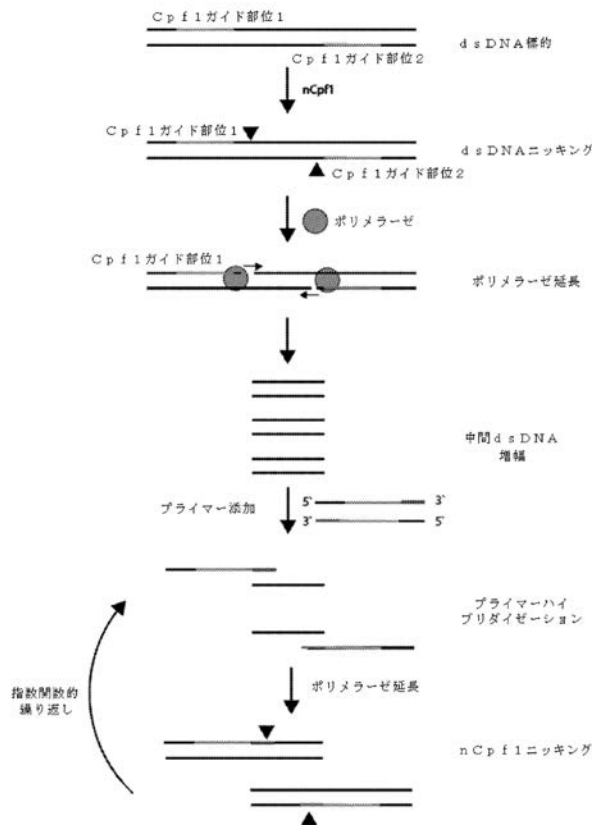
N E A R S H E R L O C K は、使用されるポリメラーゼに応じて、異なる温度で行うことができる。図 7 A ~ 図 7 C は、N E A R が、B s t 2 . 0 w a r m s t a r t ポリメラーゼを用いて 6 0 で実行可能であることを実証する。図 8 A ~ 図 8 B は、N E A R が、シーケナーゼ 2 . 0 ポリメラーゼを用いて 3 7 でも実行可能であることを実証する。

【 0 2 4 7 】

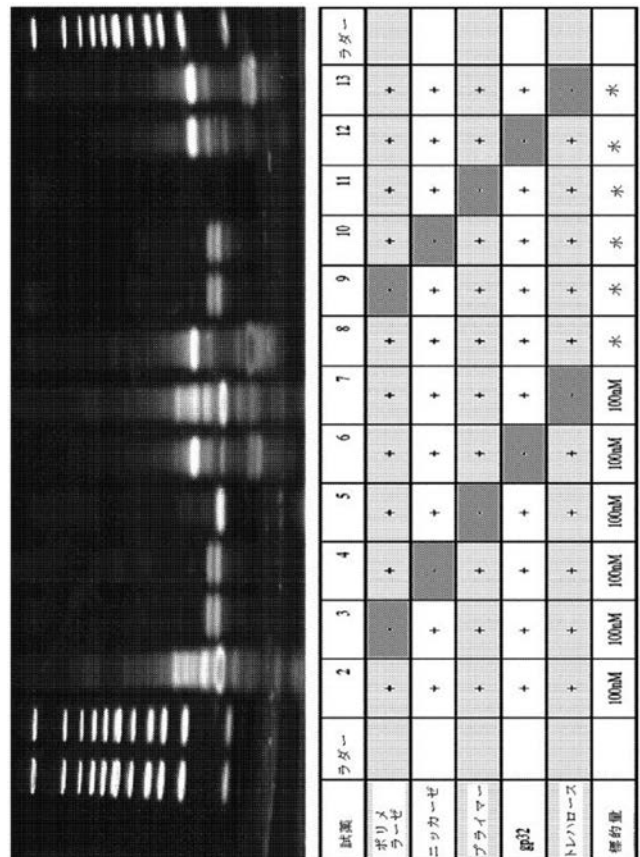
記載される本発明の方法、医薬組成物、及びキットの様々な修飾及び改変が、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、当業者に明らかとなるだろう。本発明を特定の実施形態に関連して説明してきたものの、当然のことながら、さらなる修飾が可能であり、特許請求されるとおりの本発明は、そのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではない。実際、本発明を実行するために説明された様式の様々な修飾で当業者に明らかであるものは、本発明の範囲内にあることが意図される。本出願は、概して、本発明の原理に従い、本発明が属する技術分野内で既知の慣行に含まれる本開示からの逸脱を含む、本発明の任意の改変、使用、または応用を包含することを意図し、このことは、本明細書中明記される前の必須の特長にも適用され得る。

10

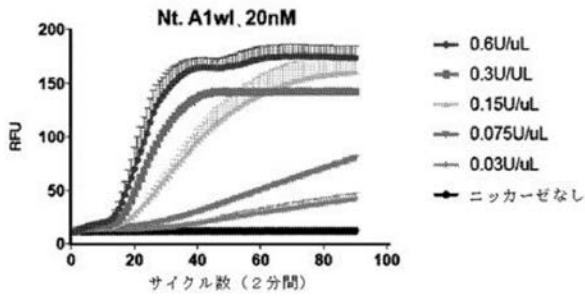
【 図 1 】



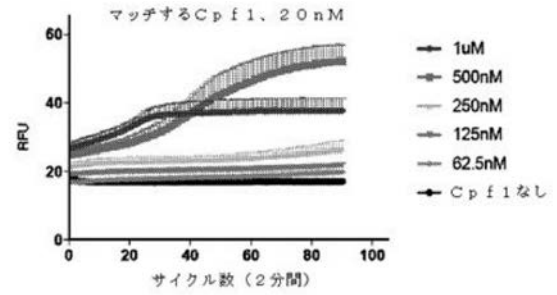
【 図 2 】



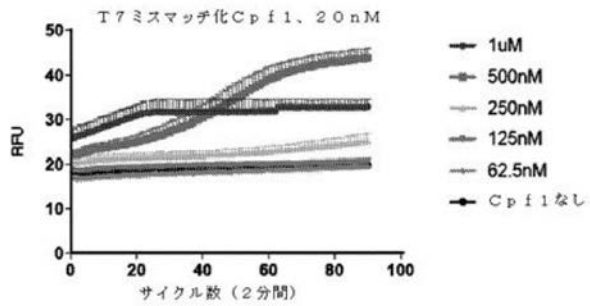
【図 3 A】



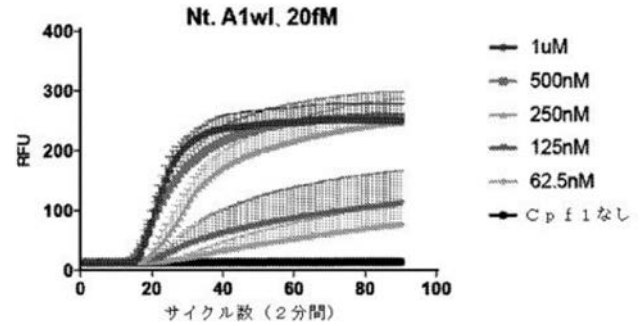
【図 3 C】



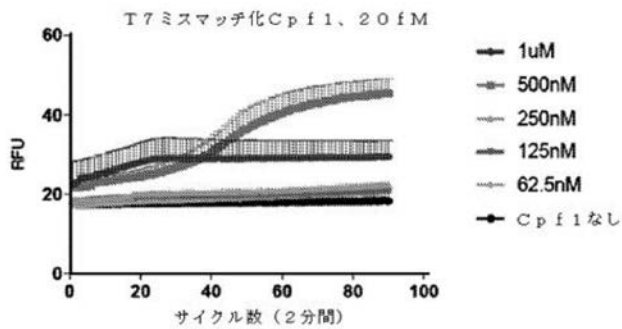
【図 3 B】



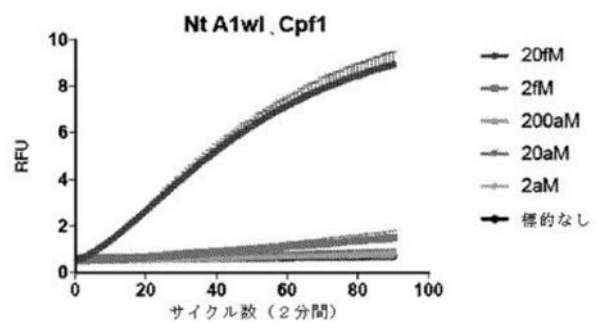
【図 3 D】



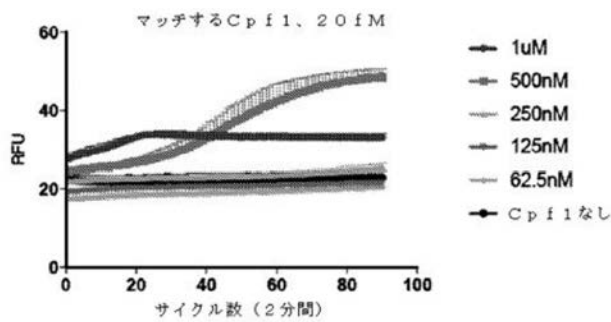
【図 3 E】



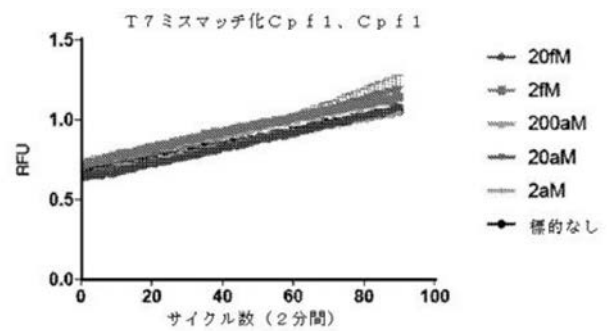
【図 4 A】



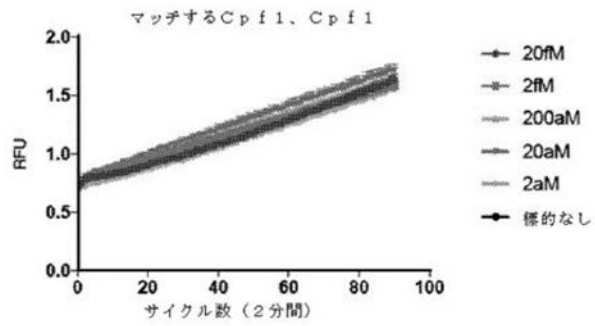
【図 3 F】



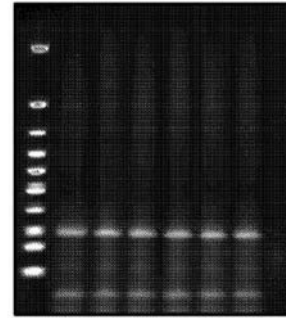
【図 4 B】



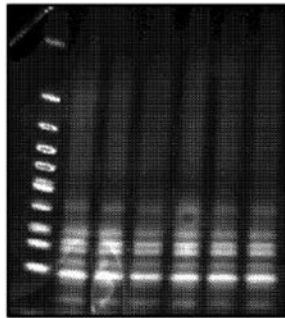
【図 4 C】



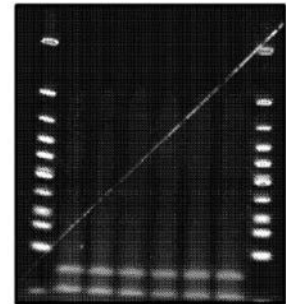
【図 4 E】



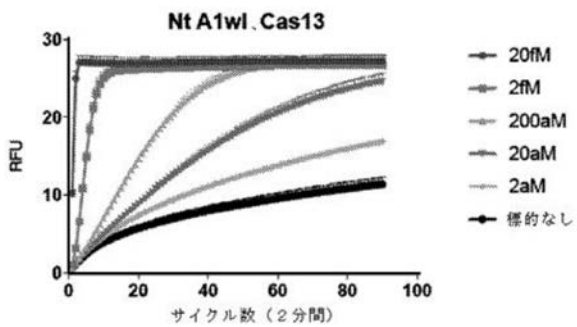
【図 4 D】



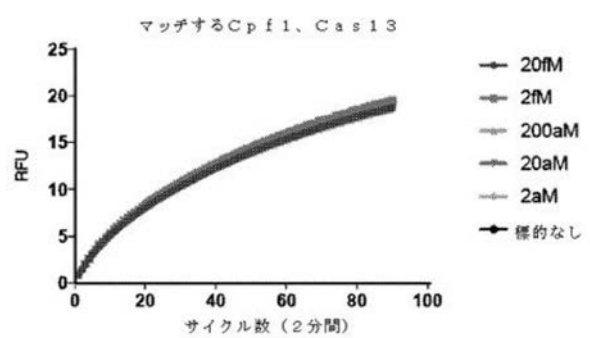
【図 4 F】



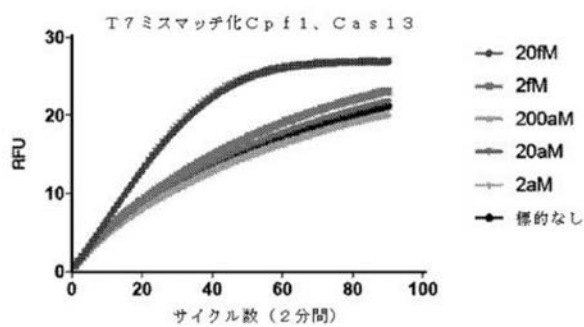
【図 4 G】



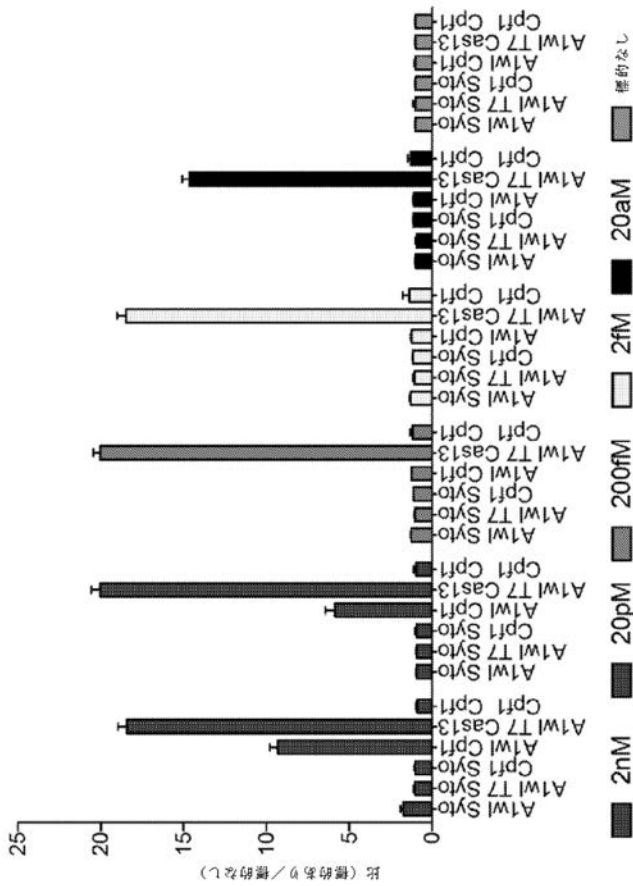
【図 4 I】



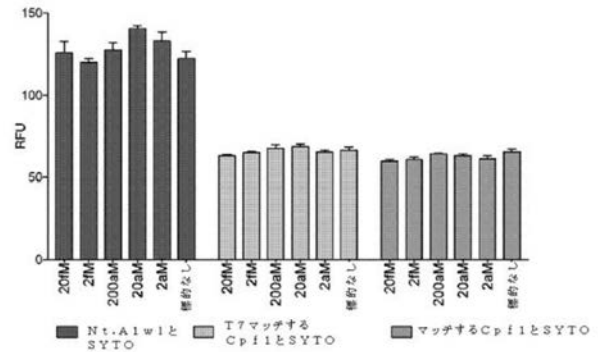
【図 4 H】



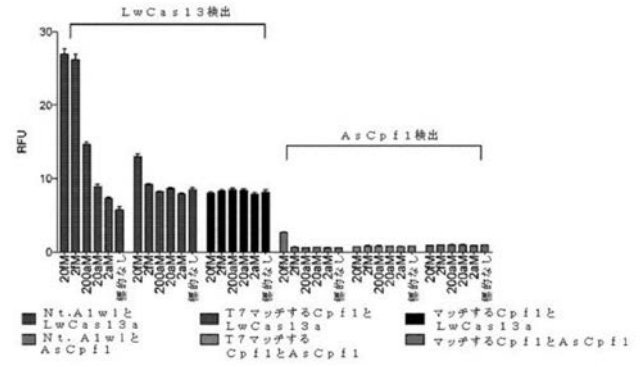
【図 5】



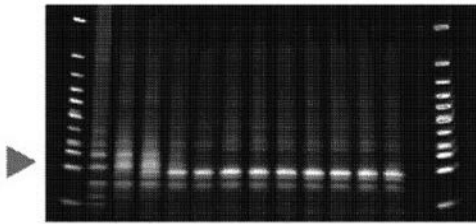
【図 6 A】



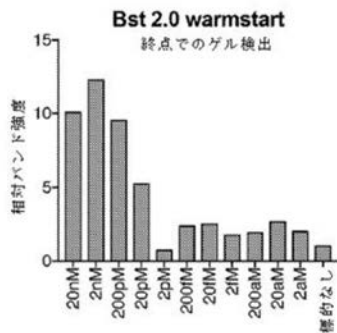
【図 6 B】



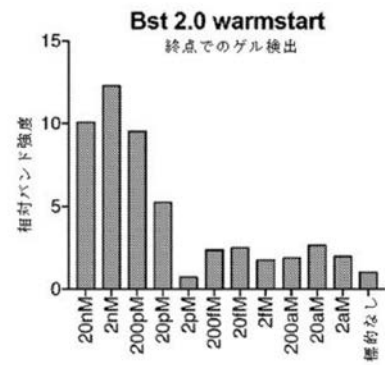
【図 7 A】



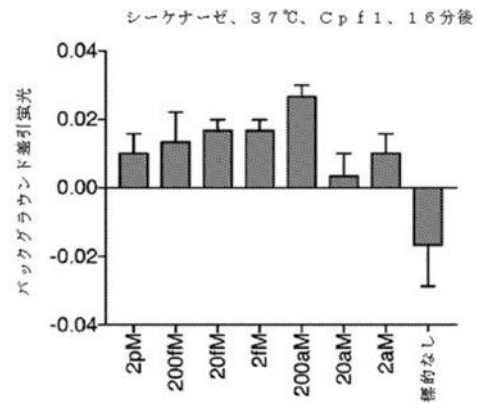
【図 7 B】



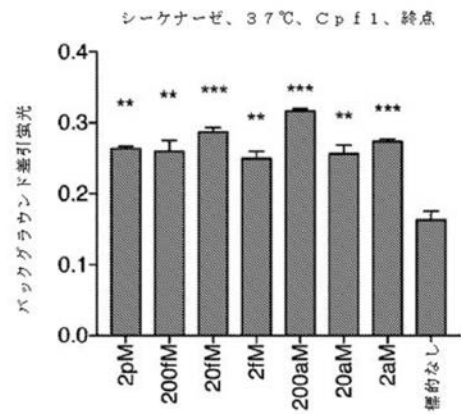
【図 7 C】



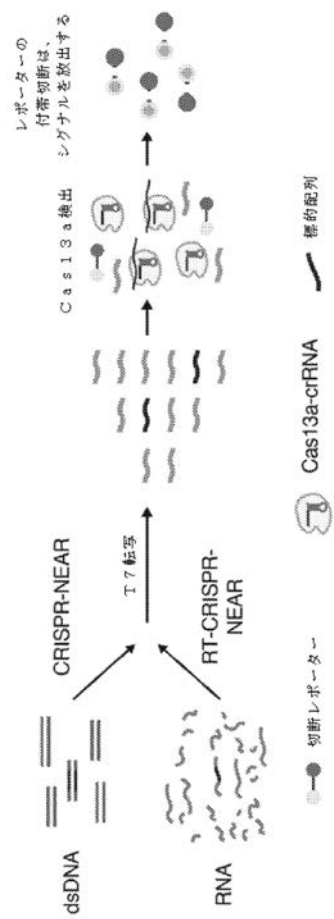
【図 8 A】



【 図 8 B 】



【 図 9 】



【 配 列 表 】

2021528091000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/039221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 C12Q1/6844 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JONATHAN S. GOOTENBERG ET AL: "Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2", SCIENCE, NIH AUTHOR MANUSCRIPT, vol. 356, no. 6336, 28 April 2017 (2017-04-28), pages 438-442, XP055481345, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aam9321 the whole document ----- -/--	1-49
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 October 2019		Date of mailing of the international search report 19/11/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL- 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Young, Craig

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/039221

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JONATHAN S. GOOTENBERG ET AL: "Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6", SCIENCE, NIH AUTHOR MANUSCRIPT, vol. 360, no. 6387, 15 February 2018 (2018-02-15), pages 439-444, XP055538780, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aag0179 the whole document -----	1-49
Y	Qiao Wang ET AL: "Abstract", bioRxiv, 19 December 2017 (2017-12-19), XP055629213, DOI: 10.1101/236588 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/biorxi v/early/2017/12/19/236588.full-text.pdf the whole document -----	1-49
T	KELLNER MAX J ET AL: "SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases", NATURE PROTOCOLS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 14, no. 10, 23 September 2019 (2019-09-23), pages 2986-3012, XP036888708, ISSN: 1754-2189, DOI: 10.1038/S41596-019-0210-2 [retrieved on 2019-09-23] the whole document -----	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09 1 1 0
C 1 2 N	9/22	(2006.01)	C 1 2 N	9/22

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

(71)出願人 505028576
 プレジデント アンド フェロウズ オヴ ハーヴァード カレッジ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 8 ケンブリッジ クインシー・ストリート 1
 7

(74)代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス

(72)発明者 チャン フェン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ メイン ストリート 4 1 5

(72)発明者 ケルナー マックス
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ メイン ストリート 4 1 5

(72)発明者 グーテンバーグ ジョナサン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 8 ケンブリッジ クインシー ストリート 1
 7

(72)発明者 アブデイエー オマール
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー
 ー 7 7

F ターム(参考) 2G045 AA28 CA25 CA26 CB03 CB04 CB07 CB08 CB09 CB20 CB30
 DA12 DA13 DA14 FB01 FB02
 4B050 CC07 DD02 LL03
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ42 QR08 QR14 QR32 QR35 QR62 QS25
 QS28