

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成29年1月19日 (2017.1.19)

【公表番号】特表2016-502840(P2016-502840A)

【公表日】平成28年2月1日 (2016.2.1)

【年通号数】公開・登録公報2016-007

【出願番号】特願2015-545838(P2015-545838)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 0 7 K 7/08 (2006.01)

C 0 7 K 14/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 9/16 Z N A Z

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 7/06

C 0 7 K 7/08

C 0 7 K 14/00

【手続補正書】

【提出日】平成28年12月2日 (2016.12.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2つのRNA誘導型ニッカーゼシステムを含む組成物であって、各々のRNA誘導型ニッカーゼシステムが、(i)1つの機能的ヌクレアーゼドメインを有し、二本鎖配列の一本鎖を切断するように修飾されたRNA誘導型エンドヌクレアーゼ、および(ii)二本鎖配列の一本鎖中の標的部位と相補性を有する第一の領域およびRNA誘導型エンドヌクレアーゼと相互作用する第二の領域、を含み、2つのRNA誘導型ニッカーゼシステムの標的部位が二本鎖配列の対向する鎖にあり、2つのRNA誘導型ニッカーゼシステムのRNA誘導型エンドヌクレアーゼが共に、二本鎖配列の対向する鎖を独立に切断することにより、二本鎖の切断を導入できるものである、組成物。

【請求項 2】

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼが、II型のクラスタ化調節的散在型短パリンδροーム反復配列(CRISPR)/CRISPR-関連(Cas)(CRISPR/Cas)システムタンパク質に由来し、II型CRISPR/CasシステムがCas9タンパク質である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

各々のRNA誘導型ニッカーゼシステムのCas9タンパク質が、RuvCまたはHNHドメイン中の変異を含む、請求項2に記載の組成物。

【請求項 4】

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼが、核局在化シグナル、細胞透過性ドメイン、

またはマーカードメインから選択される少なくとも1つの追加のドメインをさらに含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

ガイドRNAが少なくとも部分的に化学的に合成された、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物をコードする複数の核酸。

【請求項7】

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸がmRNAであり、各々のガイドRNAをコードする核酸がDNAである、請求項6に記載の複数の核酸。

【請求項8】

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸がDNAであり、各々のガイドRNAをコードする核酸がDNAである、請求項6に記載の複数の核酸。

【請求項9】

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸が、真核細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項7または8に記載の複数の核酸。

【請求項10】

請求項8または9に記載の複数の核酸を含むベクターであって、各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸が、真核細胞における発現のためにプロモーター調節配列に操作可能に連結されており、各々のガイドRNAをコードする核酸が、真核細胞における発現のためにプロモーター調節配列に操作可能に連結されている、ベクター。

【請求項11】

真核細胞において二本鎖配列を修飾するための方法であって、該方法は、

a) 真核細胞に、2つのRNA誘導型ニッカーゼシステムまたは該システムをコードする核酸、および任意に少なくとも1つのドナーポリヌクレオチド、ここで、各々のRNA誘導型ニッカーゼシステムが：

(i) 1つの機能的ヌクレアーゼドメインを有し、二本鎖配列の一本鎖を切断するように修飾されたRNA誘導型エンドヌクレアーゼ；および

(ii) 二本鎖配列の一本鎖中の標的部位と相補性を有する第一の領域およびRNA誘導型エンドヌクレアーゼと相互作用する第二の領域を含むガイドRNA、ここで、2つのRNA誘導型ニッカーゼシステムの標的部位が二本鎖配列の対向する鎖にある；を導入すること、および

b) 2つのRNA誘導型ニッカーゼシステムのRNA誘導型エンドヌクレアーゼが共に、二本鎖配列の対向する鎖を独立に切断することにより、二本鎖の切断を導入し、DNA修復過程による二本鎖の切断の修復が、二本鎖配列の修飾を導入するように、真核細胞を培養すること、を含む方法。

【請求項12】

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼが、II型のクラスタ化調節的散在型短パリンδροーム反復配列(CRISPR)/CRISPR-関連(Cas)(CRISPR/Cas)システムタンパク質に由来し、II型CRISPR/CasシステムがCas9タンパク質である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

各々のRNA誘導型ニッカーゼシステムのCas9タンパク質が、RuvCまたはHNHドメイン中の変異を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼが、核局在化シグナル、細胞透過性ドメイン、またはマーカードメインから選択される少なくとも1つの追加のドメインをさらに含む、請求項11から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

少なくとも１つのガイドRNAが少なくとも部分的に化学的に合成された、請求項１１から１４のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項１６】**

任意のドナーポリヌクレオチドが、二本鎖配列における標的部位の近位の二本鎖配列と関連する少なくとも一つのヌクレオチド変化を含むドナー配列を含む、請求項１１から１５のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項１７】**

ドナー配列が、二本鎖染色体配列中の標的部位のどちらかの側の配列と実質的に同一の配列を有する配列と隣接しているか、またはRNA誘導型エンドヌクレアーゼによって生じるオーバーハングと適合する短いオーバーハングと隣接している、請求項１６に記載の方法。

**【請求項１８】**

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸がmRNAであり、各々のガイドRNAをコードする配列がDNAである、請求項１１から１７のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項１９】**

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸がDNAであり、各々のガイドRNAをコードする配列がDNAである、請求項１１から１７のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項２０】**

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼおよび各々のガイドRNAをコードする核酸がベクターの一部であり、各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸が、真核細胞における発現のためにプロモーター調節配列に操作可能に連結されており、各々のガイドRNAをコードする核酸が、真核細胞における発現のためにプロモーター調節配列に操作可能に連結されている、請求項１９に記載の方法。

**【請求項２１】**

各々のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸が、真核細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項１１から２０のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項２２】**

真核細胞が、ヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、または植物細胞である、請求項１１から２１のいずれか一項に記載の方法。