

【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】令和 2 年 7 月 9 日 (2020.7.9)

【公表番号】特表 2019-517268 (P2019-517268A)
 【公表日】令和 1 年 6 月 24 日 (2019.6.24)
 【年通号数】公開・登録公報 2019-024
 【出願番号】特願 2018-564259 (P2018-564259)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/113 (2010.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 4 0 B 10/00 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)
 C 1 2 Q 1/6834 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/113 Z N A Z
 C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 4 0 B 10/00
 C 1 2 M 1/00 A
 C 1 2 Q 1/6837 Z
 C 1 2 Q 1/6834 Z

【手続補正書】
 【提出日】令和 2 年 6 月 1 日 (2020.6.1)
 【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】

(a) (i) P A M 部位に隣接する標的配列を含む標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるガイド配列、(i i) ステム配列を含む c r R N A セグメントと、

(b) 前記ステム配列に部分的または完全に相補的であるヌクレオチド配列を含む t r a c r R N A セグメントと

を含む合成ガイド R N A であって、

前記ガイド配列が、 $20 - N$ ヌクレオチドからなり、 N が、 -10 から 6 の間の整数であり、

前記ガイド配列が、前記ガイド配列の $4 - N$ 、 $5 - N$ 、 $7 - N$ 、 $9 - N$ 、 $10 - N$ 、 $11 - N$ 、 $14 - N$ または $16 - N$ の位置に位置する少なくとも 1 つの修飾を含む、合成ガイド R N A。

【請求項 2】

単一ガイド R N A (s g R N A) である、請求項 1 に記載の合成ガイド R N A。

【請求項 3】

P A M 部位に隣接する標的配列を含む標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるガイド配列を含む合成 c r R N A であって、前記ガイド配列が、 $20 - N$ ヌクレオチドからなり、 N が、 -10 から 6 の間の整数であり、前記ガイド配列が、前記ガイド配列の $4 - N$ 、 $5 - N$ 、 $7 - N$ 、 $9 - N$ 、 $10 - N$ 、 $11 - N$ 、 $14 - N$ または $16 - N$ の位置に位置する少なくとも 1 つの修飾を含む、合成 c r R N A。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド配列の位置 5 - N もしくは 11 - N、またはそれらの組合せに位置する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の合成ガイド RNA または crRNA。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの修飾が、ホスホノカルボン酸ヌクレオチド間連結、チオホスホノカルボン酸ヌクレオチド間連結、修飾された塩基、および C 3' - エンド糖バッカー構成を付与する 2' 修飾、またはそれらの組合せから選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の合成ガイド RNA または crRNA。

【請求項 6】

前記 2' 修飾が、2' - O - メチル、2' - フルオロ、および 2' - O - (2 - メトキシエチル) から選択される、請求項 5 に記載の合成ガイド RNA または crRNA。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの修飾が、2' - デオキシ - 3' - ホスホノ酢酸 (DP)、2' - O - デオキシ - 3' - チオホスホノ酢酸 (DSP)、2' - O - メチル - 3' - ホスホノ酢酸 (MP) および 2' - O - メチル - 3' - チオホスホノ酢酸 (MSP) から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の合成ガイド RNA または crRNA。

【請求項 8】

前記ガイド RNA または crRNA の 5' 末端、3' 末端または両末端に 1 つまたは複数の修飾をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の合成ガイド RNA または crRNA。

【請求項 9】

前記標的ポリヌクレオチドが、HBB 遺伝子、IL2RG 遺伝子、または VEGFA 遺伝子内に位置する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の合成ガイド RNA または crRNA。

【請求項 10】

CRISPR 機能の特異性を増強する方法であって、

標的ポリヌクレオチドを選択するステップと；

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの合成ガイド RNA を用意するステップと；

Cas タンパク質と前記合成ガイド RNA とを含む gRNA : Cas タンパク質複合体を形成するステップと；

前記 gRNA の前記標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーション、および CRISPR 機能の遂行をもたらすための条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを前記 gRNA : Cas タンパク質複合体と接触させるステップと

を含み、

前記 Cas タンパク質が、タンパク質として、または前記 Cas タンパク質をコードするポリヌクレオチドとして用意される、方法。

【請求項 11】

前記ポリヌクレオチド標的の前記 gRNA : Cas タンパク質複合体との前記接触が、細胞内で実施され、前記複合体の前記形成が、細胞外または内で実施される、請求項 10 に記載の方法。