

【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1年10月3日(2019.10.3)

【公表番号】特表2016-521993(P2016-521993A)

【公表日】平成28年7月28日(2016.7.28)

【年通号数】公開・登録公報2016-045

【出願番号】特願2016-521449(P2016-521449)

【国際特許分類】

|         |        |           |
|---------|--------|-----------|
| C 1 2 N | 15/09  | (2006.01) |
| C 1 2 N | 15/873 | (2010.01) |
| A 0 1 K | 67/027 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 9/16   | (2006.01) |
| A 6 1 P | 43/00  | (2006.01) |
| A 6 1 K | 48/00  | (2006.01) |
| C 1 2 N | 5/10   | (2006.01) |

【F I】

|         |        |       |
|---------|--------|-------|
| C 1 2 N | 15/00  | A     |
| C 1 2 N | 15/00  | K     |
| A 0 1 K | 67/027 |       |
| C 1 2 N | 9/16   | Z     |
| A 6 1 P | 43/00  | 1 1 1 |
| A 6 1 K | 48/00  |       |
| C 1 2 N | 5/10   |       |

【誤訳訂正書】

【提出日】令和1年8月26日(2019.8.26)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0785

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0785】

リボヌクレアーゼRNアーゼIIIは、II型CRISPR系中のtracrRNAへの結合後にcrRNAのプロセシングおよび成熟に必要であると示されている。しかしながら、5'末端におけるプロセシングは、微生物および真核生物コンテクストの両方において大部分は不明のままである。ネイセリア属種(*Neisseria spp.*)CRISPR RNAプロセシングのプロセシングを調査する近年の報告は、個々のcrRNA単位の転写をドライブするそれぞれのスペーサー配列に先行するダイレクトリピート中に局在する転写プロモーターを同定した。本出願人らは、30ntへのスペーサー配列の伸びがより長いsgRNAをもたらさないことを既に観察している。ノサンプロット分析は、20ntガイド配列を有するsgRNAと依然として同一の長さの転写物を示す。さらに、たとえ低レベルにおいてもtsgRNAの第2の位置からsgRNA単位が完全にプロセシングされ得るという本出願人らの観察は、sgRNAの末端成熟に関与する潜在的なエンドヌクレアーゼの存在を指摘し得る。

RNAシーケンシング分析は、CRISPRアレイのプロモーター近位末端において局在するスペーサーが、より遠位に局在するものよりも多く存在する傾向にあることを示しており、転写プロセシング性が成熟crRNA単位の相対効率の決定における重要なパラメータであり得ることを示唆する。本出願人らの知見と一致して、この試験は、隣接RNAと二次相互作用を形成すると予測されるあるスペーサー配列が不足していることが多い

ことも報告する。したがって、合成 C R I S P R アレイを開発する間、スペーサー配列の考慮の重要性はますます増加していく可能性が高い。

類似した R N A i ライブライアリーよりも大きい再現性および感度を示している、ゲノムワイドノックアウトスクリーンのための C R I S P R - C a s 9 レンチウイルスライブライアリーやを使用する多数の近年の研究が存在している。2つ以上の单一ガイド R N A を单一ベクター上で同時に送達する能力は、レンチウイルススクリーニング法のコンテクストにおいて特に興味深く、それは高スループット欠失およびペアワイズスクリーンの両方を可能とする。一般に使用される s h R N A ライブライアリーのコンテクストにおいて、組み換わるレンチウイルスの傾向は、単一ベクターからの複数のショート R N A の発現をドライブする本発明者らの能力を制限し、複数のユニークプロモーターの利用が要求された。依然として、いかに多くの s g R N A を効率的にタンデムでアレイさせることができるかを把握すべきであるが、このアプローチは、單一プロモーターが少なくとも2つの s g R N A の発現をドライブすることを可能とする。さらに、配列多様性を示すが構造的に類似した s g R N A 足場が活性のままであり得るという知識は、構造的エレメント間の組換えが制限されてきた種々の用途において有用である。

#### 【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞中の目的ゲノム遺伝子座の改変に使用するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、

I . タンデムガイド R N A またはタンデムガイド R N A をコードするポリヌクレオチドであって、前記タンデムガイド R N A は、

( a ) 第1の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第1の標的配列に対する第1の C R I S P R 複合体の配列特異的結合を指向し得る第1のガイド配列、

( b ) 第1の t r a c r 配列にハイブリダイズし得る第1の t r a c r メイト配列、

( c ) 第1の t r a c r 配列、

( d ) 第2の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第2の標的配列に対する第2の C R I S P R 複合体の配列特異的結合を指向し得る第2のガイド配列、

( e ) 第2の t r a c r 配列にハイブリダイズし得る第2の t r a c r メイト配列、および

( f ) 第2の t r a c r 配列

を含み、( a )、( b )、( c )、( d )、( e )および( f )は 5' から 3' 配向で配置されており、かつ( c )および( d )はヌクレオチドリンクマーにより結合している、タンデムガイド R N A またはタンデムガイド R N A をコードするポリヌクレオチド、および

I I . 少なくとも1つ以上の核局在化配列( N L S )を含む C a s 9 、または前記 C a s 9 をコードするポリヌクレオチド

を含む、組成物。

【請求項 2】

前記ゲノム遺伝子座の前記改変がインデルおよび / または微小欠失の誘導を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記微小欠失が前記第1および第2の標的配列間の配列の欠失を含む、請求項2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記ヌクレオチドリンクマーが少なくとも5ヌクレオチドを含む、請求項1から3の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 5】**

前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも 10 ヌクレオチドを含む、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも 20 ヌクレオチドを含む、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記ヌクレオチドリンカーが 8 または 12 ヌクレオチドを有する、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記第 1 もしくは第 2 のガイド配列、前記第 1 もしくは第 2 の tracr 配列および / または前記第 1 もしくは第 2 の tracr メイト配列が改変される、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記改変が、最適化された第 1 もしくは第 2 の tracr 配列ならびに / または最適化された第 1 もしくは第 2 のガイド配列、ならびに / または第 1 もしくは第 2 の tracr 配列および / または第 1 もしくは第 2 の tracr メイト配列それぞれの同時折り畳み構造、ならびに / または第 1 もしくは第 2 の tracr 配列の二次構造の安定化ならびに / または短縮された塩基対形成の領域を有する第 1 もしくは第 2 の tracr 配列を含む、請求項 8 に記載の組成物。

**【請求項 10】**

前記 Cas9 をコードするポリヌクレオチドが RNA である、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 11】**

前記 Cas9 をコードするポリヌクレオチドが RNA であり、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達される、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記第 1 および第 2 の tracr メイト配列が 100 % の同一性を共有する、請求項 1 から 11 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 13】**

前記第 1 および第 2 の tracr 配列が 100 % の同一性を共有する、請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 14】**

前記 Cas9 がヌクレアーゼまたはニッカーゼである、請求項 1 から 13 の何れか一項に記載の組成物。

**【請求項 15】**

前記 Cas9 が SpCas9 または SaCas9 である、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 16】**

1 つ以上のベクターを含むベクター系を含む、細胞中の目的ゲノム遺伝子座の改変に使用するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、前記 1 つ以上のベクターを含むベクター系は、

I . タンデムガイド RNA をコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合している第 1 の調節エレメントであって、前記タンデムガイド RNA は、

( a ) 第 1 の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第 1 の標的配列に対する第 1 の CRISPR 複合体の配列特異的結合を指向し得る第 1 のガイド配列、

( b ) 第 1 の tracr 配列にハイブリダイズし得る第 1 の tracr メイト配列、

( c ) 第 1 の tracr 配列、

( d ) 第 2 の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第 2 の標的配列に対する第 2 の CRISPR 複合体の配列特異的結合を指向し得る第 2 のガイド配列、

(e) 第2の|配列
|  |
にハイブリダイズし得る第2の|メイト配列
、および

(f) 第2の|配列
|  |

を含み、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)は5'から3'配向で配置されており、かつ(c)および(d)はヌクレオチドリンクーにより結合している、第1の調節エレメント、および

I I . C a s 9 をコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合している第2の調節エレメントであって、前記C a s 9 は1つ以上のN L S を含む、第2の調節エレメントを含み、成分I およびI I は前記系の同じまたは異なるベクター上に局在している、組成物。

#### 【請求項17】

前記ゲノム遺伝子座の前記改変がインデルおよび/または微小欠失の誘導を含む、請求項16に記載の組成物。

#### 【請求項18】

前記微小欠失が前記第1および第2の標的配列間の配列の欠失を含む、請求項17に記載の組成物。

#### 【請求項19】

前記ヌクレオチドリンクーが少なくとも5ヌクレオチドを含む、請求項16から18の何れか一項に記載の組成物。

#### 【請求項20】

前記ヌクレオチドリンクーが少なくとも10ヌクレオチドを含む、請求項16から18の何れか一項に記載の組成物。

#### 【請求項21】

前記ヌクレオチドリンクーが少なくとも20ヌクレオチドを含む、請求項16から18の何れか一項に記載の組成物。

#### 【請求項22】

前記ヌクレオチドリンクーが8または12ヌクレオチドを有する、請求項16から18の何れか一項に記載の組成物。

#### 【請求項23】

前記第1もしくは第2のガイド配列、前記第1もしくは第2の|配列
|  |
および/または前記第1もしくは第2の|メイト配列
が改変される、請求項16から22の何れか一項に記載の組成物。

#### 【請求項24】

前記改変が、最適化された第1もしくは第2の|配列
|  |
ならびに/または最適化された第1もしくは第2のガイド配列、ならびに/または第1もしくは第2の|メイト配列
および/または第1もしくは第2の|メイト配列
それぞれの同時折り畳み構造、ならびに/または第1もしくは第2の|配列
の二次構造の安定化ならびに/または短縮された塩基対形成の領域を有する第1もしくは第2の|配列
を含む、請求項23に記載の組成物。

#### 【請求項25】

前記1つ以上のベクターがウイルスベクターである、請求項16から24の何れか一項に記載の組成物。

#### 【請求項26】

前記1つ以上のベクターがAAVベクターである、請求項16から24の何れか一項に記載の組成物。

#### 【請求項27】

前記第1および第2の|メイト配列
|  |
が100%の同一性を共有する、請求項16から26の何れか一項に記載の組成物。

#### 【請求項28】

前記第1および第2の|配列
|  |
が100%の同一性を共有する、請求項16から

27の何れか一項に記載の組成物。

【請求項29】

前記Cass9がヌクレアーゼまたはニッカーゼである、請求項16から28の何れか一項に記載の組成物。

【請求項30】

前記1つ以上のベクターがSpCas9またはSaCas9である、請求項29に記載の組成物。

【請求項31】

細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のDNA二重鎖の逆鎖上の第1および第2の標的配列の改変に使用するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、

I. タンデムガイドRNAまたはタンデムガイドRNAをコードするポリヌクレオチドであって、前記タンデムガイドRNAは、

(a) 前記第1の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第1の標的配列に対する第1のCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し得る第1のガイド配列、

(b) 第1のtracr配列にハイブリダイズし得る第1のtracrメイト配列、

(c) 第1のtracr配列、

(d) 前記第2の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第2の標的配列に対する第2のCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し得る第2のガイド配列、

(e) 第2のtracr配列にハイブリダイズし得る第2のtracrメイト配列、および

(f) 第2のtracr配列

を含み、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)は5'から3'配向で配置されており、かつ(c)および(d)はヌクレオチドリンクーにより結合している、タンデムガイドRNAまたはタンデムガイドRNAをコードするポリヌクレオチド、および

II. ニッカーゼであり且つ1つ以上のNLSを含むCass9、又は前記Cass9をコードするポリヌクレオチドを含み、

前記第1のガイド配列が前記第1の標的配列近傍で前記Cass9により前記DNA二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し得るものであり、かつ前記第2のガイド配列が前記第2の標的配列近傍で前記Cass9により前記DNA二重鎖の他方の鎖の開裂を指向し得るものであり、それにより二本鎖切断が誘導される、組成物。

【請求項32】

前記第1の標的配列近傍で前記DNA二重鎖の一方の鎖の開裂を指向する前記第1のガイド配列および前記第2の標的配列近傍で前記DNA二重鎖の他方の鎖の開裂を指向する前記第2のガイド配列が5'オーバーハングをもたらす、請求項31に記載の組成物。

【請求項33】

前記5'オーバーハングが高々200ヌクレオチドである、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

前記5'オーバーハングが高々100ヌクレオチドである、請求項32に記載の組成物。

【請求項35】

前記5'オーバーハングが高々50ヌクレオチドである、請求項32に記載の組成物。

【請求項36】

前記5'オーバーハングが少なくとも26ヌクレオチドである、請求項32に記載の組成物。

【請求項37】

前記5'オーバーハングが少なくとも30ヌクレオチドである、請求項32に記載の組成物。

【請求項38】

前記5'オーバーハングが34~50ヌクレオチドである、請求項32に記載の組成物

。

【請求項 3 9】

前記 Cas 9 をコードするポリヌクレオチドが RNA である、請求項 3 1 から 3 8 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記第 1 および第 2 の tracr メイト配列が 100 % の同一性を共有する、請求項 3 1 から 3 9 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記第 1 および第 2 の tracr 配列が 100 % の同一性を共有する、請求項 3 1 から 4 0 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記 Cas 9 が SaCas 9 である、請求項 3 1 から 4 1 の何れか一項に記載の組成物。

。

【請求項 4 3】

前記 Cas 9 が SpCas 9 である、請求項 3 1 から 4 1 の何れか一項に記載の組成物。

。

【請求項 4 4】

前記 Cas 9 が触媒ドメイン中の 1 つ以上の突然変異を含む、請求項 3 1 から 4 1 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記 Cas 9 が SpCas 9 であり、D10A、E762A、H840A、N854A、N863A および D986A からなる群から選択される 1 つ以上の突然変異を含む、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記 SpCas 9 が前記 D10A 突然変異を含む、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

前記第 1 もしくは第 2 のガイド配列、前記第 1 もしくは第 2 の tracr 配列、および / または前記第 1 もしくは第 2 の tracr メイト配列が、最適化された第 1 もしくは第 2 の tracr 配列ならびに / または最適化された第 1 もしくは第 2 のガイド配列、ならびに / または第 1 もしくは第 2 の tracr 配列および / または第 1 もしくは第 2 の tracr メイト配列それぞれの同時折り畳み構造、ならびに / または第 1 もしくは第 2 の tracr 配列の二次構造の安定化、ならびに / または短縮された塩基対形成の領域を有する第 1 もしくは第 2 の tracr 配列により改変される、請求項 3 1 から 4 6 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 4 8】

1 つ以上のベクターを含むベクター系を含む、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中の DNA 二重鎖の逆鎖上の第 1 および第 2 の標的配列の改変に使用するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、前記 1 つ以上のベクターを含むベクター系は、

I . タンデムガイド RNA をコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合している第 1 の調節エレメントであって、前記タンデムガイド RNA は、

( a ) 前記第 1 の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第 1 の標的配列に対する第 1 の CRISPR 複合体の配列特異的結合を指向し得る第 1 のガイド配列、

( b ) 第 1 の tracr 配列にハイブリダイズし得る第 1 の tracr メイト配列、

( c ) 第 1 の tracr 配列、

( d ) 前記第 2 の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第 2 の標的配列に対する第 2 の CRISPR 複合体の配列特異的結合を指向し得る第 2 のガイド配列、

( e ) 第 2 の tracr 配列にハイブリダイズし得る第 2 の tracr メイト配列、および

( f ) 第 2 の tracr 配列

を含み、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)は5'から3'配向で配置されており、かつ(c)および(d)はヌクレオチドリンクーにより結合している、第1の調節エレメント、および

I I . C a s 9 をコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合している第2の調節エレメントであって、C a s 9 はニッカーゼであり且つ1つ以上のN L S を含む、第2の調節エレメント

を含み、

成分IおよびIIは前記系の同じまたは異なるベクター上に局在しており、

前記第1のガイド配列が前記第1の標的配列近傍で前記C a s 9 により前記D N A二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し得るものであり、かつ前記第2のガイド配列が前記第2の標的配列近傍で前記C a s 9 により前記D N A二重鎖の他方の鎖の開裂を指向し得るものであり、それにより二本鎖切断が誘導される、組成物。

【請求項49】

前記第1の標的配列近傍で前記D N A二重鎖の一方の鎖の開裂を指向する前記第1のガイド配列および前記第2の標的配列近傍で前記D N A二重鎖の他方の鎖の開裂を指向する前記第2のガイド配列が5'オーバーハングをもたらす、請求項48に記載の組成物。

【請求項50】

前記5'オーバーハングが高々200ヌクレオチドである、請求項49に記載の組成物。

【請求項51】

前記5'オーバーハングが高々100ヌクレオチドである、請求項49に記載の組成物。

【請求項52】

前記5'オーバーハングが高々50ヌクレオチドである、請求項49に記載の組成物。

【請求項53】

前記5'オーバーハングが少なくとも26ヌクレオチドである、請求項49に記載の組成物。

【請求項54】

前記5'オーバーハングが少なくとも30ヌクレオチドである、請求項49に記載の組成物。

【請求項55】

前記5'オーバーハングが34~50ヌクレオチドである、請求項49に記載の組成物。

【請求項56】

前記1つ以上のベクターがウイルスベクターである、請求項48から55の何れか一項に記載の組成物。

【請求項57】

前記第1および第2のt r a c r メイト配列が100%の同一性を共有する、請求項48から56の何れか一項に記載の組成物。

【請求項58】

前記第1および第2のt r a c r 配列が100%の同一性を共有する、請求項48から57の何れか一項に記載の組成物。

【請求項59】

前記C a s 9 がS a C a s 9 である、請求項48から58の何れか一項に記載の組成物。

【請求項60】

前記C a s 9 がS p C a s 9 である、請求項48から58の何れか一項に記載の組成物。

【請求項61】

前記C a s 9 が触媒ドメイン中の1つ以上の突然変異を含む、請求項48から58の何

れか一項に記載の組成物。

【請求項 6 2】

前記 Cas 9 が S p Cas 9 であり、D 1 0 A、E 7 6 2 A、H 8 4 0 A、N 8 5 4 A、N 8 6 3 A および D 9 8 6 A からなる群から選択される 1 つ以上の突然変異を含む、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 3】

前記 S p Cas 9 が前記 D 1 0 A 突然変異を含む、請求項 6 2 に記載の組成物。

【請求項 6 4】

前記ウイルスベクターが A A V ベクターである、請求項 5 6 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも 5 ヌクレオチドを含む、請求項 3 1 から 6 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 6 6】

前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも 1 0 ヌクレオチドを含む、請求項 3 1 から 6 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 6 7】

前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも 2 0 ヌクレオチドを含む、請求項 3 1 から 6 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 6 8】

前記ヌクレオチドリンカーが 8 ヌクレオチドを有する、請求項 3 1 から 6 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 6 9】

請求項 3 1 から 6 8 の何れか一項に記載の組成物において、

- 前記二本鎖切断によって生じる前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを含む二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド ( d s O D N ) であって、前記 d s O D N が前記目的の遺伝子座にインテグレートされ得る、 d s O D N ; または

- 一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド ( s s O D N ) であって、前記 s s O D N が前記二本鎖切断の相同性組換え修復のテンプレートとして働き得る、 s s O D N をさらに含む組成物。

【請求項 7 0】

( a ) 第 1 の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第 1 の標的配列に対する第 1 の C R I S P R 複合体の配列特異的結合を指向し得る第 1 のガイド配列、

( b ) 第 1 の t r a c r 配列にハイブリダイズし得る第 1 の t r a c r メイト配列、

( c ) 第 1 の t r a c r 配列、

( d ) 第 2 の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第 2 の標的配列に対する第 2 の C R I S P R 複合体の配列特異的結合を指向し得る第 2 のガイド配列、

( e ) 第 2 の t r a c r 配列にハイブリダイズし得る第 2 の t r a c r メイト配列、および

( f ) 第 2 の t r a c r 配列

を含み、( a )、( b )、( c )、( d )、( e ) および ( f ) は 5 ' から 3 ' 配向で配置されており、かつ ( c ) および ( d ) は ヌクレオチドリンカーにより結合している、タンデムガイド R N A 。

【請求項 7 1】

請求項 7 0 に記載のタンデムガイド R N A をコードするポリヌクレオチド。