

(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2020-503017

(P2020-503017A)

(43) 公表日 令和2年1月30日 (2020.1.30)

| | | |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| (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 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 1 1 | |
| C 1 2 N 15/55 (2006.01) | C 1 2 N 15/55 Z N A | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|--------------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2019-533110 (P2019-533110) | (71) 出願人 | 595104323 |
| (86) (22) 出願日 | 平成29年12月28日 (2017.12.28) | | アイオーニス ファーマシューティカルズ |
| (85) 翻訳文提出日 | 令和1年6月13日 (2019.6.13) | | , インコーポレーテッド |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2017/068642 | | Ionis Pharmaceutica |
| (87) 国際公開番号 | W02018/125964 | | ls, Inc. |
| (87) 国際公開日 | 平成30年7月5日 (2018.7.5) | | アメリカ合衆国カリフォルニア州9201 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/572, 361 | | 0, カールズバッド, ガゼル コート 2 |
| (32) 優先日 | 平成29年10月13日 (2017.10.13) | | 855 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US) | (71) 出願人 | 519215429 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/439, 828 | | ルートヴィヒ・インスティテュート・フォー |
| (32) 優先日 | 平成28年12月28日 (2016.12.28) | | ー・キャンサー・リサーチ |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国ニューヨーク州10017 |
| | | | , ニューヨーク, サード・アベニュー 6 |
| | | | 66 |

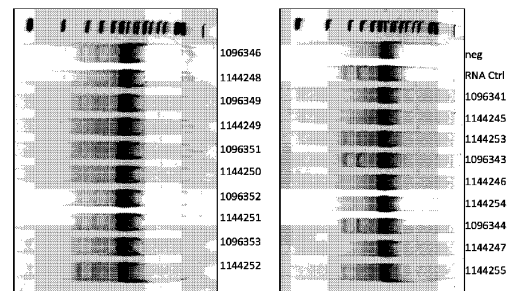
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾CRISPR RNA及びその使用

(57) 【要約】

本開示は、CRISPRに使用するための改変オリゴヌクレオチドを含有する化合物を提供する。ある特定の実施形態において、そのような改変オリゴヌクレオチドによりcrRNAの特性は改善する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

35～45の連結ヌクレオシドからなる修飾crRNAを含む化合物。

【請求項 2】

修飾crRNAを含む化合物であって、前記修飾crRNAのCRISPR認識部分が17～20の連結ヌクレオシドからなる、前記化合物。

【請求項 3】

修飾crRNAを含む化合物であって、前記修飾crRNAの標的認識部分が18～23の連結ヌクレオシドからなる、前記化合物。

【請求項 4】

修飾crRNAを含む化合物であって、前記修飾crRNAが少なくとも1個のリンカーヌクレオシドを含む、前記化合物。

【請求項 5】

5'-安定化修飾crRNAを含む化合物。

【請求項 6】

前記化合物が安定化コンジュゲート基を含む、請求項1～5のいずれかに記載の化合物。

【請求項 7】

前記crRNAが安定化修飾を含有する少なくとも1個のリンカーヌクレオシドを含む、請求項1～5のいずれかに記載の化合物。

【請求項 8】

前記修飾crRNAが5'-安定化である、請求項1～4のいずれかに記載の化合物。

【請求項 9】

前記修飾crRNAが3'-安定化である、請求項1～8のいずれかに記載の化合物。

【請求項 10】

前記修飾crRNAの前記CRISPR認識部分がCpf1ヌクレアーゼに結合する、請求項1～9のいずれかに記載の化合物。

【請求項 11】

前記修飾crRNAの前記標的認識部分が、標的のDNAまたはRNAに対する前記crRNAの親和性を増加させる少なくとも1つの修飾を含む、請求項1～10のいずれかに記載の化合物。

【請求項 12】

前記修飾crRNAの前記CRISPR認識部分が、Cpf1ヌクレアーゼに対する前記crRNAの親和性を増加させる少なくとも1つの修飾を含む、請求項10～11のいずれかに記載の化合物。

【請求項 13】

前記修飾crRNAの少なくとも1つの核酸塩基がチミンである、請求項1～12のいずれかに記載の化合物。

【請求項 14】

前記修飾crRNAの少なくとも1つの核酸塩基が修飾核酸塩基である、請求項1～13のいずれかに記載の化合物。

【請求項 15】

前記修飾核酸塩基が5-メチルシトシンである、請求項14に記載の化合物。

【請求項 16】

前記修飾crRNAが35～42個の連結ヌクレオシドから成る、請求項1～15のいずれかに記載の化合物。

【請求項 17】

前記修飾crRNAが36～40個の連結ヌクレオシドから成る、請求項1～15のいずれかに記載の化合物。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

前記修飾 c r R N A が少なくとも 2 個のリンカーヌクレオシドを含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 1 9】

少なくとも 2 個のリンカーヌクレオシドが前記修飾 c r R N A . の前記 C R I S P R 認識部分に連結される、請求項 1 8 に記載の化合物。

【請求項 2 0】

少なくとも 2 個のリンカーヌクレオシドが前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の 5 ' 末端に連結される、請求項 1 9 に記載の化合物。

【請求項 2 1】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が 1 8 ~ 2 0 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の化合物。

10

【請求項 2 2】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が 1 8 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 2 1 に記載の化合物。

【請求項 2 3】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が 1 9 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 2 1 に記載の化合物。

【請求項 2 4】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が 2 0 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 2 1 に記載の化合物。

20

【請求項 2 5】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 1 8 ~ 2 2 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 6】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 1 8 ~ 2 0 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 7】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 1 8 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 2 6 に記載の化合物。

【請求項 2 8】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 1 9 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 2 6 に記載の化合物。

30

【請求項 2 9】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 2 0 個の連結ヌクレオシドから成る、請求項 2 6 に記載の化合物。

【請求項 3 0】

前記修飾 c r R N A の少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が、修飾ヌクレオシド間結合である、請求項 1 ~ 2 9 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 3 1】

少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 3 0 に記載の化合物。

40

【請求項 3 2】

前記修飾 c r R N A の各ヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、請求項 3 0 または 3 1 に記載の化合物。

【請求項 3 3】

少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が、中性のヌクレオシド間結合である、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 3 4】

少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合がメトキシプロピル基を含む、請求項 3 3 に記載の化合物。

50

【請求項 35】

少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合がホスホノ酢酸を含む、請求項33に記載の化合物。

【請求項 36】

少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合がメチルホスホン酸を含む、請求項33に記載の化合物。

【請求項 37】

前記修飾 c r R N A の各ヌクレオシド間結合がホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項1～31のいずれかに記載の化合物。

10

【請求項 38】

前記修飾 c r R N A の少なくとも2つのヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、請求項30、31、または33～37のいずれかに記載の化合物。

【請求項 39】

前記修飾 c r R N A の少なくとも2つの修飾ヌクレオシド間結合が互いに同じである、請求項38に記載の化合物。

【請求項 40】

前記修飾 c r R N A が、前記修飾 c r R N A の5'末端に1～5個の連続的なホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、請求項1～39のいずれかに記載の化合物。

【請求項 41】

前記修飾 c r R N A が、前記修飾 c r R N A の5'末端に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、請求項40に記載の化合物。

20

【請求項 42】

前記修飾 c r R N A が前記修飾 c r R N A の5'末端に2つの連続的なホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、請求項40に記載の化合物。

【請求項 43】

前記修飾 c r R N A が、修飾ヌクレオシド間結合によって前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分に連結される、少なくとも1個のリンカーヌクレオシドを含む、請求項1～42のいずれかに記載の化合物。

【請求項 44】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分に、少なくとも1個のリンカーヌクレオシドで連結する前記修飾ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項43に記載の化合物。

30

【請求項 45】

前記修飾 c r R N A が2つのリンカーヌクレオシドを含む、請求項44に記載の化合物。

【請求項 46】

前記リンカーヌクレオシドが、修飾ヌクレオシド間結合によって互いに連結される、請求項45に記載の化合物。

【請求項 47】

互いに前記リンカーヌクレオシドを連結する前記修飾ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項46に記載の化合物。

40

【請求項 48】

前記修飾 c r R N A が2つを超えるリンカーヌクレオシドを含む、請求項43～44のいずれかに記載の化合物。

【請求項 49】

前記修飾 c r R N A が前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内に1～6個の修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項1～48のいずれかに記載の化合物。

【請求項 50】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内の前記1～6個の修飾ヌクレオシド間結合が

50

連続的である、請求項 49 に記載の化合物。

【請求項 51】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内の前記 1 ～ 6 個の修飾ヌクレオシド間結合が、未修飾のヌクレオシド間結合と交互に生じる、請求項 49 に記載の化合物。

【請求項 52】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 3' 末端が前記 1 ～ 6 個の修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 49 ～ 51 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 53】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 1 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 50 ～ 52 のいずれかに記載の化合物。

10

【請求項 54】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 2 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 50 ～ 52 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 55】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 3 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 50 ～ 52 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 56】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 4 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 50 ～ 52 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 57】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 5 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 50 ～ 52 のいずれかに記載の化合物。

20

【請求項 58】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 6 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 50 ～ 52 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 59】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内の少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 49 ～ 58 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 60】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内のすべての前記修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 49 ～ 58 のいずれかに記載の化合物。

30

【請求項 61】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が、前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の 3' 末端に直接的または間接的に連結される、請求項 1 ～ 60 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 62】

前記修飾 c r R N A の少なくとも 1 つのヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 1 ～ 61 のいずれかに記載の化合物。

40

【請求項 63】

前記 c r R N A の 5' 末端ヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 に記載の化合物。

【請求項 64】

前記 5' 末端ヌクレオシドが直線状の修飾糖部分を含む、請求項 63 に記載の化合物。

【請求項 65】

前記 5' 末端のヌクレオシドが 2' - 修飾糖部分を含む、請求項 64 に記載の化合物。

【請求項 66】

前記 5' 末端ヌクレオシドが二環糖部分を含む、請求項 63 に記載の化合物。

【請求項 67】

50

前記 5' 末端ヌクレオシドが 2' - O - メチル、2' - MOE、2' - F、cEt、及び LNA の中から選択される修飾糖部分を含む、請求項 63 に記載の化合物。

【請求項 68】

前記 5' 末端ヌクレオシドがリンカーヌクレオシドである、請求項 1 ~ 67 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 69】

前記 CRISPR 認識部分の 5' 末端から 5 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 68 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 70】

前記 CRISPR 認識部分の 5' 末端から 6 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 69 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 71】

前記 CRISPR 認識部分の 5' 末端から 7 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 70 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 72】

前記 CRISPR 認識部分の 5' 末端から 10 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 71 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 73】

前記 CRISPR 認識部分の 5' 末端から 14 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 72 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 74】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 1 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 73 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 75】

少なくとも 1 つの修飾糖部分が 2' - O - メチル、2' - MOE、2' - F、cEt、及び LNA の中から選択される、請求項 69 ~ 74 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 76】

各修飾糖部分が 2' - O - メチル、2' - MOE、2' - F、cEt、及び LNA の中から独立して選択される、請求項 69 ~ 74 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 77】

前記修飾 crRNA の 3' 末端ヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 に記載の化合物。

【請求項 78】

前記 3' 末端ヌクレオシドが直鎖状の修飾糖部分を含む、請求項 77 に記載の化合物。

【請求項 79】

前記 3' 末端のヌクレオシドが 2' - 修飾糖部分を含む、請求項 78 に記載の化合物。

【請求項 80】

前記 3' 末端ヌクレオシドが二環糖部分を含む、請求項 77 に記載の化合物。

【請求項 81】

前記 3' 末端ヌクレオシドが 2' - O - メチル、2' - MOE、2' - F、cEt、及び LNA の中から選択される修飾糖部分を含む、請求項 77 に記載の化合物。

【請求項 82】

前記標的認識部分の 5' 末端から 1 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 81 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 83】

前記標的認識部分の 5' 末端から 8 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 82 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 84】

前記標的認識部分の 5' 末端から 9 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 83 のいずれかに記載の化合物。

10

20

30

40

50

【請求項 85】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 1 ~ 5 個の 3' 末端ヌクレオシドがそれぞれ修飾糖部分を含む、請求項 62 ~ 84 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 86】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 1 ~ 5 個の 3' 末端ヌクレオシドがそれぞれ同一の修飾糖部分を含む、請求項 85 に記載の化合物。

【請求項 87】

前記標的認識部分の 1 ~ 5 個の 3' 末端ヌクレオシドの前記修飾糖部分が、2'-O-メチル、2'-MOE、2'-F、c E t、及び L N A の中からそれぞれ独立して選択される、請求項 84 または 85 に記載の化合物。

10

【請求項 88】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が少なくとも 1 つの未修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 87 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 89】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が少なくとも 1 つの未修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 88 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 90】

前記修飾 c r R N A が未修飾糖部分を含む少なくとも 1 つのリンカーヌクレオシドを含む、請求項 1 ~ 89 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 91】

前記化合物が前記修飾 c r R N A から成る、請求項 1 ~ 90 のいずれかに記載の化合物。

20

【請求項 92】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の核酸塩基配列が、少なくとも標的の D N A または R N A に対して少なくとも 90 % 相補的である、請求項 1 ~ 91 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 93】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の前記核酸塩基配列が、標的の D N A または R N A に対して 100 % 相補的である、請求項 92 に記載の化合物。

【請求項 94】

前記修飾 c r R N A が自己相補的な領域を含む、請求項 1 ~ 93 のいずれかに記載の化合物。

30

【請求項 95】

前記自己相補的な領域が、前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分内にある、請求項 94 に記載の化合物。

【請求項 96】

前記自己相補的な領域がヘアピンを形成することができる、請求項 94 または 95 に記載の化合物。

【請求項 97】

前記自己相補的な領域が、前記自己相補的な領域の安定性を増加させる少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 94 ~ 96 のいずれかに記載の化合物。

40

【請求項 98】

前記自己相補的な領域が、前記自己相補的な領域のハイブリダイゼーション親和性を増加させる少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 94 ~ 97 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 99】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、表 A から選択される配列の少なくとも 12 個の連続的な核酸塩基を含む、請求項 1 ~ 98 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 100】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、表 A から選択

50

される配列または配列の部分から成る、請求項 1 ~ 98 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 101】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、配列 X C X A C X を含み、ここで各 X は独立して U 核酸塩基または T 核酸塩基である、請求項 1 ~ 100 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 102】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、配列 G X A G A X を含み、ここで各 X は独立して U 核酸塩基または T 核酸塩基である、請求項 1 ~ 100 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 103】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、前記配列 X C X A C X 及び前記配列 G X A G A X を含み、ここで各 X は独立して U 核酸塩基または T 核酸塩基である、請求項 1 ~ 100 のいずれかに記載の化合物。

10

【請求項 104】

前記化合物がコンジュゲート基を含む、請求項 1 ~ 90、または 92 ~ 103 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 105】

前記コンジュゲート基が G a l N A c を含む、請求項 104 に記載の化合物。

【請求項 106】

前記コンジュゲート基が親油性である、請求項 104 に記載の化合物。

20

【請求項 107】

前記コンジュゲート基が脂質である、請求項 106 に記載の化合物。

【請求項 108】

請求項 1 ~ 107 のいずれかに記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 109】

細胞を、請求項 1 ~ 108 のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 110】

前記細胞が C p f 1 ヌクレアーゼを発現する、請求項 109 に記載の方法。

30

【請求項 111】

細胞を、請求項 1 ~ 108 のいずれかに記載の化合物または組成物及び C p f 1 ヌクレアーゼをコードするプラスミドと接触させることを含む方法。

【請求項 112】

細胞を、請求項 1 ~ 108 のいずれかに記載の化合物または組成物及び C p f 1 ヌクレアーゼをコードする m R N A と接触させることを含む方法。

【請求項 113】

前記修飾 c r R N A が、トランスフェクション試薬のない状態で前記細胞によって取り込まれる、請求項 109 ~ 112 のいずれかに記載の方法。

【請求項 114】

前記細胞が動物内に存在する、請求項 109 ~ 113 のいずれかに記載の化合物。

40

【請求項 115】

請求項 1 ~ 108 のいずれかに記載の化合物または組成物を、動物に投与することを含む方法。

【請求項 116】

前記投与が、皮下である、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

前記投与が、髄腔内である、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 118】

C p f 1 ヌクレアーゼをコードするプラスミドを投与することを含む、請求項 115 ~ 117 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 1 1 9】

前記動物が C p f 1ヌクレアーゼを発現する、請求項 1 1 5 ~ 1 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記プラスミドが、アデノ随伴ウイルス (A A V) を介して前記動物内の細胞に送達される、請求項 1 1 1 または 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記プラスミドが、レンチウイルスを介して前記動物内の細胞に送達される、請求項 1 1 1 または 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

標的遺伝子が編集される、請求項 1 0 9 ~ 1 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記修飾 c r R N A は、細胞内で前記標的遺伝子が編集された後に前記細胞内で分解される、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記 C p f 1ヌクレアーゼは、前記修飾 c r R N A がいない状態でヌクレアーゼ活性を示さない、請求項 1 1 0 ~ 1 1 2、または 1 1 8 ~ 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記細胞を、前記修飾 c r R N A または C p f 1ヌクレアーゼの前記活性または発現を低下または抑制する第 2 の化合物と接触させることを含む、請求項 1 0 9 ~ 1 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記細胞を、標的遺伝子を編集した後に前記第 2 の化合物と接触させる、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記第 2 の化合物が、前記修飾 c r R N A に相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 2 5 または 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記第 2 の化合物が、C p f 1ヌクレアーゼ遺伝子を標的にする c r R N A を含む、請求項 1 2 5 または 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記第 2 の化合物が、C p f 1転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 2 5 または 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記 C p f 1ヌクレアーゼの発現が抑制される、請求項 1 2 8 または 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記動物がヒトである、請求項 1 1 4 ~ 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 2】

少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集が、未修飾 c r R N A または 4 5 個を超えるヌクレオチドを含む化合物が前記修飾 c r R N A の代わりに使用される場合の前記少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集と比較して低減される、請求項 1 0 9 ~ 1 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記投与が、硝子体内である、請求項 1 1 5 または 1 1 8 ~ 1 3 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記細胞が、植物細胞である、請求項 1 0 9 ~ 1 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記細胞が、T細胞である、請求項 1 0 9 ~ 1 1 4 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 136】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項 1 ~ 107 のいずれかに記載の化合物または請求項 108 に記載の組成物を前記個体に投与することによって前記個体の前記疾患を治療する、前記方法。

【請求項 137】

疾患の治療のための、請求項 1 ~ 107 のいずれかに記載の化合物または請求項 108 に記載の組成物の使用。

【請求項 138】

薬物の調合のための、請求項 1 ~ 107 のいずれかに記載の化合物または請求項 108 に記載の組成物の使用。

10

【請求項 139】

請求項 1 ~ 107 のいずれかに記載の化合物または請求項 108 に記載の組成物を動物に投与し、そしてヒトへの移植のために前記動物から器官を回収する方法。

【請求項 140】

前記 5' 末端ヌクレオシドが c E t 修飾糖部分を含む、請求項 90 ~ 107 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 141】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 3' 末端が 2 つの連続的なホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、請求項 140 に記載の化合物。

【請求項 142】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の各ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートである、請求項 140 ~ 141 のいずれかに記載の化合物。

20

【請求項 143】

前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 2 つの 3' 末端ヌクレオシドが、それぞれ 2' - O - メチル修飾糖部分を含む、請求項 140 ~ 142 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 144】

前記 C R I S P R 認識部分の 5' 末端から 1 番目のヌクレオシドが未修飾糖部分を含む、請求項 140 ~ 143 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 145】

前記修飾 c r R N A が 30 ~ 38 個の未修飾糖部分を含む、請求項 140 ~ 144 のいずれかに記載の化合物。

30

【請求項 146】

前記修飾 c r R N A が 36 個の未修飾糖部分を含む、請求項 145 に記載の化合物。

【請求項 147】

請求項 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物を含む医薬組成物。

【請求項 148】

細胞を、請求項 140 ~ 147 のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 149】

前記細胞が C p f 1 ヌクレアーゼを発現する、請求項 148 に記載の方法。

40

【請求項 150】

細胞を、請求項 140 ~ 147 のいずれかに記載の化合物または組成物及び C p f 1 ヌクレアーゼをコードするプラスミドと接触させることを含む方法。

【請求項 151】

細胞を、請求項 140 ~ 147 のいずれかに記載の化合物または組成物及び C p f 1 ヌクレアーゼをコードする m R N A と接触させることを含む方法。

【請求項 152】

前記修飾 c r R N A が、トランスフェクション試薬のない状態で前記細胞によって取り込まれる、請求項 148 ~ 151 のいずれかに記載の方法。

【請求項 153】

50

前記細胞が動物内に存在する、請求項 1 4 8 ~ 1 5 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5 4】

請求項 1 4 0 ~ 1 4 7 のいずれかに記載の化合物または組成物を動物に投与することを含む方法。

【請求項 1 5 5】

前記投与が、皮下である、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

前記投与が、髄腔内である、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

C p f 1 ヌクレアーゼをコードするプラスミドを投与することを含む、請求項 1 5 4 ~ 1 5 6 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 1 5 8】

前記動物が C p f 1 ヌクレアーゼを発現する、請求項 1 5 4 ~ 1 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記プラスミドが、アデノ随伴ウイルス (A A V) を介して前記動物内の細胞に送達される、請求項 1 5 0 または 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

前記プラスミドが、レンチウイルスを介して前記動物内の細胞に送達される、請求項 1 5 0 または 1 5 7 に記載の方法。 20

【請求項 1 6 1】

標的遺伝子が編集される、請求項 1 4 8 ~ 1 6 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6 2】

前記修飾 c r R N A は、細胞内で前記標的遺伝子が編集された後に前記細胞内で分解される、請求項 1 6 1 に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

前記 C p f 1 ヌクレアーゼが、前記修飾 c r R N A がいない状態でヌクレアーゼ活性を示さない、請求項 1 4 9 ~ 1 5 1 または 1 5 7 ~ 1 6 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記細胞を、前記修飾 c r R N A または C p f 1 ヌクレアーゼの前記活性または発現を低下または抑制する第 2 の化合物と接触させることを含む、請求項 1 4 8 ~ 1 6 3 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 1 6 5】

前記細胞を、標的遺伝子を編集した後に前記第 2 の化合物と接触させる、請求項 1 6 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

前記第 2 の化合物が、前記修飾 c r R N A に相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 6 4 または 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

前記第 2 の化合物が、C p f 1 ヌクレアーゼ遺伝子を標的にする c r R N A を含む、請求項 1 6 4 または 1 6 5 に記載の方法。 40

【請求項 1 6 8】

前記第 2 の化合物が、C p f 1 転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 6 4 または 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

前記 C p f 1 ヌクレアーゼの発現が抑制される、請求項 1 6 7 または 1 6 8 に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

前記動物がヒトである、請求項 1 5 3 ~ 1 6 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 1】

少なくとも1つのオフターゲット遺伝子の編集が、未修飾c r R N Aまたは45個を超えるヌクレオシドを含む化合物が前記修飾c r R N Aの代わりに使用される場合の前記少なくとも1つのオフターゲット遺伝子の編集と比較して低減される、請求項148～170のいずれかに記載の方法。

【請求項172】

前記投与が、硝子体内である、請求項154または157～171のいずれかに記載の方法。

【請求項173】

前記細胞が、植物細胞である、請求項148～152のいずれかに記載の方法。

【請求項174】

前記細胞が、T細胞である、請求項148～153のいずれかに記載の方法。

【請求項175】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項140～146のいずれかに記載の化合物または請求項147に記載の組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【請求項176】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項140～146のいずれかに記載の化合物または請求項147に記載の組成物を前記個体に投与することによって、前記個体の前記疾患を治療することを含む、前記方法。

【請求項177】

疾患を治療するための、請求項140～146のいずれかに記載の化合物または請求項147に記載の組成物の使用。

【請求項178】

薬剤の調合のための、請求項140～146のいずれかに記載の化合物または請求項147に記載の組成物の使用。

【請求項179】

請求項140～146のいずれかに記載の化合物または請求項147に記載の組成物を動物に投与し、そしてヒトへの移植のために前記動物から器官を回収する方法。

【請求項180】

前記修飾c r R N Aの少なくとも1つの修飾ヌクレオシドが2'-デオキシヌクレオシドである、請求項91～107または140～146のいずれかに記載の化合物。

【請求項181】

前記修飾c r R N Aの少なくとも1つの修飾ヌクレオシドが2'-H置換を有する直鎖状の修飾糖部分を含む、請求項91～107または140～146のいずれかに記載の化合物。

【請求項182】

前記修飾c r R N Aの少なくとも1つの修飾ヌクレオシドが、天然のDNAに見いだされるような修飾2'-H(H)糖部分を有する、請求項91～107または140～146のいずれかに記載の化合物。

【請求項183】

前記修飾c r R N Aが40個の連結ヌクレオシドから成る、請求項91～107、140～146または180～182のいずれかに記載の化合物。

【請求項184】

前記修飾c r R N Aが43個の連結ヌクレオシドから成る、請求項91～107、140～146または180～182のいずれかに記載の化合物。

【請求項185】

前記修飾c r R N Aが45個の連結ヌクレオシドから成る、請求項91～107、140～146または180～182のいずれかに記載の化合物。

【請求項186】

前記修飾c r R N Aの前記標的認識部分が、DNMT1核酸に対して少なくとも90%相補的である、請求項91～107、140～146または180～185のいずれかに

10

20

30

40

50

記載の化合物。

【請求項 187】

前記標的認識部分が、DNMT1 核酸に対して 100% 相補的である、請求項 186 に記載の化合物。

【請求項 188】

前記 DNMT1 核酸が、デオキシリボ核酸である、請求項 186 または 187 に記載の化合物。

【請求項 189】

前記 DNMT1 核酸が、ヒトのデオキシリボ核酸である、請求項 188 に記載の化合物。

10

【請求項 190】

前記修飾 crRNA の前記標的認識部分が、LDLR 核酸に対して少なくとも 90% 相補的である、請求項 91 ~ 107、140 ~ 146 または 180 ~ 185 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 191】

前記標的認識部分が、LDLR 核酸に対して 100% 相補的である、請求項 190 に記載の化合物。前記 LDLR 核酸が、デオキシリボ核酸である、請求項 190 または 191 に記載の化合物。

【請求項 192】

前記 LDLR 核酸が、ヒトのデオキシリボ核酸である、請求項 191 に記載の化合物。

20

【請求項 193】

前記修飾 crRNA の 2 つの 3' 末端ヌクレオシドが、独立して選択された修飾糖部分を含む、請求項 91 ~ 107、140 ~ 146 または 180 ~ 192 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 194】

前記修飾 crRNA の 3 つの 3' 末端ヌクレオシドが、独立して選択された修飾糖部分を含む、請求項 91 ~ 107、140 ~ 146 または 180 ~ 192 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 195】

前記修飾 crRNA の 4 つの 3' 末端ヌクレオシドが、独立して選択された修飾糖部分を含む、請求項 91 ~ 107、140 ~ 146 または 180 ~ 192 のいずれかに記載の化合物。

30

【請求項 196】

前記修飾 crRNA の 5 つの 3' 末端ヌクレオシドが、独立して選択された修飾糖部分を含む、請求項 91 ~ 107、140 ~ 146 または 180 ~ 192 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 197】

前記 3' 末端修飾ヌクレオシドの前記修飾糖部分が 2' - H (H)、2' - O - メチル、2' - F、cEt、及び LNA 修飾糖部分の中から選択される、請求項 77 または 193 ~ 196 のいずれかに記載の化合物。

40

【請求項 198】

前記 3' 末端修飾ヌクレオシドの前記修飾糖部分が 2' - H (H)、2' - O - メチル、及び cEt 修飾糖部分の中から選択される、請求項 197 に記載の化合物。

【請求項 199】

前記 3' 末端修飾ヌクレオシドの前記修飾糖部分が 2' - H (H) 及び 2' - O - メチル修飾糖部分の中から選択される、請求項 197 に記載の化合物。

【請求項 200】

前記 3' 末端修飾ヌクレオシドの前記修飾糖部分が cEt 及び LNA 修飾糖部分の中から選択される、請求項 197 に記載の化合物。

【請求項 201】

50

前記標的認識部分の 5' 末端から 1 番目のヌクレオシドが 2' - H (H) または 2' - F 修飾糖部分を含む、請求項 82 ~ 107、140 ~ 146、または 180 ~ 200 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 202】

前記標的認識部分の 5' 末端から 8 番目のヌクレオシドが 2' - H (H) または 2' - F 修飾糖部分を含む、請求項 82 ~ 107、140 ~ 146、または 180 ~ 201 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 203】

前記標的認識部分の 5' 末端から 9 番目のヌクレオシドが 2' - H (H) または 2' - F 修飾糖部分を含む、請求項 82 ~ 107、140 ~ 146、または 180 ~ 202 のいずれかに記載の化合物。

10

【請求項 204】

請求項 91 ~ 107、140 ~ 146、または 180 ~ 203 のいずれかに記載の化合物であって、前記修飾 crRNA が以下の特徴の少なくとも 3 つを含む、前記化合物：

a . 前記修飾 crRNA の前記 CRISPR 認識部分の 5' 末端に連結される 2 つのリンカーヌクレオシド；

b . 独立して 2' - F または 2' - H (H) 修飾糖部分を含有する、前記修飾 crRNA の前記標的認識部分の 5' 末端から 1 番目、8 番目、及び / または 9 番目のヌクレオシド

c . 前記修飾 crRNA の 3' 及び 5' 末端のそれぞれにおける少なくとも 1 つの末端ホスホロチオエートヌクレオシド間結合

20

d . 未修飾糖部分を含む、前記 CRISPR 認識部分の各ヌクレオシド

e . 独立して選択される修飾糖部分を含む、前記修飾 crRNA の 1 ~ 5 個の 3' 末端ヌクレオシド。

【請求項 205】

前記修飾 crRNA が塩である、請求項 1 ~ 107、140 ~ 146、または 180 ~ 204 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 206】

請求項 180 ~ 205 のいずれかに記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 207】

30

前記医薬組成物がリボ核タンパク質複合体を含む、請求項 108、147、または 206 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 208】

前記リボ核タンパク質複合体が、Cpf1ヌクレアーゼ及び前記修飾 crRNA を含有する前記化合物を含む、請求項 207 に記載の医薬組成物。

【請求項 209】

細胞を、請求項 180 ~ 208 のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 210】

細胞を、請求項 180 ~ 207 のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法であって、ここで前記細胞は Cpf1ヌクレアーゼを発現する、前記方法。

40

【請求項 211】

細胞を、請求項 180 ~ 207 のいずれかに記載の化合物または組成物及び Cpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドと接触させることを含む方法。

【請求項 212】

細胞を、請求項 180 ~ 207 のいずれかに記載の化合物または組成物及び Cpf1ヌクレアーゼをコードする mRNA と接触させることを含む方法。

【請求項 213】

前記修飾 crRNA が、トランスフェクション試薬のない状態で前記細胞によって取り込まれる、請求項 209 ~ 212 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 2 1 4】

前記細胞が動物内に存在する、請求項 2 0 9 ~ 2 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 1 5】

請求項 1 8 0 ~ 2 0 8 のいずれかに記載の化合物または組成物を、動物に投与することを含む方法。

【請求項 2 1 6】

前記投与が、皮下である、請求項 2 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 1 7】

前記投与が、髄腔内である、請求項 2 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

C p f 1 ヌクレアーゼをコードするプラスミドを投与することを含む、請求項 2 1 5 ~ 2 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 1 9】

前記動物が C p f 1 ヌクレアーゼを発現する、請求項 2 1 5 ~ 2 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2 0】

前記プラスミドが、アデノ随伴ウイルス (A A V) を介して前記動物内の細胞に送達される、請求項 2 1 1 または 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

前記プラスミドが、レンチウイルスを介して前記動物内の細胞に送達される、請求項 2 1 1 または 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

標的遺伝子が編集される、請求項 2 0 9 ~ 2 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2 3】

前記修飾 c r R N A は、細胞内で前記標的遺伝子が編集された後に前記細胞内で分解される、請求項 2 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

前記 C p f 1 ヌクレアーゼは、前記修飾 c r R N A がいない状態でヌクレアーゼ活性を示さない、請求項 2 1 0 ~ 2 1 2、または 2 1 5 ~ 2 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2 5】

前記細胞を、前記修飾 c r R N A または C p f 1 ヌクレアーゼの前記活性または発現を低下または抑制する第 2 の化合物と接触させることを含む、請求項 2 0 9 ~ 2 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2 6】

前記細胞を、標的遺伝子を編集した後に前記第 2 の化合物と接触させる、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 2 7】

前記第 2 の化合物が、前記修飾 c r R N A に相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 2 5 または 2 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 2 8】

前記第 2 の化合物が、C p f 1 ヌクレアーゼ遺伝子を標的にする c r R N A を含む、請求項 2 2 5 または 2 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

前記第 2 の化合物が、C p f 1 転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 2 5 または 2 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

前記 C p f 1 ヌクレアーゼの発現が抑制される、請求項 2 2 8 または 2 2 9 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

前記動物がヒトである、請求項 2 1 4 ~ 2 3 0 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 3 2】

少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集が、未修飾 c r R N A または 4 5 個を超えるヌクレオシドを含む化合物が前記修飾 c r R N A の代わりに使用される場合の前記少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集と比較して低減される、請求項 2 0 9 ~ 2 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3 3】

前記投与が、硝子体内である、請求項 2 1 5 または 2 1 8 ~ 2 3 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3 4】

前記細胞が、植物細胞である、請求項 2 0 9 ~ 2 1 3 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 2 3 5】

前記細胞が、T 細胞である、請求項 2 0 9 ~ 2 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3 6】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項 1 8 0 ~ 2 0 5 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 0 6 ~ 2 0 8 のいずれかに記載の組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 3 7】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項 1 8 0 ~ 2 0 5 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 0 6 ~ 2 0 8 のいずれかに記載の組成物を前記個体に投与することによって前記個体の前記疾患を治療することを含む、前記方法。

20

【請求項 2 3 8】

疾患を治療するための、請求項 1 8 0 ~ 2 0 5 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 0 6 ~ 2 0 8 のいずれかに記載の組成物の使用。

【請求項 2 3 9】

薬物の調合のための、請求項 1 8 0 ~ 2 0 5 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 0 6 ~ 2 0 8 のいずれかに記載の組成物の使用。

【請求項 2 4 0】

請求項 1 8 0 ~ 2 0 5 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 0 6 ~ 2 0 8 のいずれかに記載の組成物を動物に投与し、そしてヒトへの移植のために前記動物から器官を回収する方法。

30

【請求項 2 4 1】

前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が少なくとも 1 つの未修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6、または 1 8 0 ~ 2 0 5 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 4 2】

前記 C R I S P R 認識部分の少なくとも 1 つの修飾糖部分が直鎖状の修飾糖部分である、請求項 2 4 1 に記載の化合物。

【請求項 2 4 3】

前記 C R I S P R 認識部分の少なくとも 1 つの修飾糖部分が二環糖部分である、請求項 2 4 1 に記載の化合物。

40

【請求項 2 4 4】

前記二環糖部分が c E t または L N A である、請求項 2 4 3 に記載の化合物。

【請求項 2 4 5】

前記二環糖部分が c E t である、請求項 2 4 3 に記載の化合物。

【請求項 2 4 6】

前記 C R I S P R 認識部分の 3' 末端から 2 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 5 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 4 7】

前記 C R I S P R 認識部分の 3' 末端から 3 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 5 のいずれかに記載の化合物。

50

【請求項 248】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 4 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 249】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 5 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 250】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 6 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 251】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 7 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 252】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 8 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 253】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 9 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 254】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 11 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 255】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 12 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 256】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 13 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 257】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 18 番目のヌクレオシドが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 258】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 11 番目及び 12 番目のヌクレオシドが、それぞれ修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 245 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 259】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 1 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 258 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 260】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 10 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 259 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 261】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 14 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 260 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 262】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 15 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 261 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 263】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 16 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 241 ~ 262 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 264】

前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 17 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を

10

20

30

40

50

含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 6 5】

前記 C R I S P R 認識部分の 5' 末端から 1 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 6 6】

前記 C R I S P R 認識部分の 5' 末端から 2 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 5 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 6 7】

前記 C R I S P R 認識部分の 5' 末端から 3 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 6 のいずれかに記載の化合物。

10

【請求項 2 6 8】

前記標的認識部分の 5' 末端から 1 4 番目のヌクレオシドが、修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6、1 8 0 ~ 2 0 5 または 2 4 1 ~ 2 6 7 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 6 9】

前記標的認識部分の 5' 末端から 1 5 番目のヌクレオシドが、修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6、1 8 0 ~ 2 0 5 または 2 4 1 ~ 2 6 8 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 7 0】

前記標的認識部分の 5' 末端から 1 6 番目のヌクレオシドが、修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6、1 8 0 ~ 2 0 5 または 2 4 1 ~ 2 6 9 のいずれかに記載の化合物。

20

【請求項 2 7 1】

前記標的認識部分の 5' 末端から 1 4、1 5、及び / または 1 6 の位置の各修飾糖部分が、直鎖状の修飾糖部分である、請求項 2 6 8 ~ 2 7 0 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 2 7 2】

前記標的認識部分の 5' 末端から 1 4、1 5、及び / または 1 6 の位置の各修飾糖部分が、2' - H (H) 及び 2' - F 修飾糖部分から独立して選択される、請求項 2 7 1 に記載の化合物。

【請求項 2 7 3】

前記標的認識部分の 5' 末端から 1 4、1 5、及び / または 1 6 の位置の各修飾糖部分が、2' - H (H) 修飾糖部分である、請求項 2 7 2 に記載の化合物。

30

【請求項 2 7 4】

請求項 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6、1 8 0 ~ 2 0 5、または 2 4 1 ~ 2 7 3 のいずれかに記載の化合物であって、前記修飾 c r R N A が以下の特徴の少なくとも 3 つを含む、前記化合物

(a) 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の 5' 末端に連結される 2 つのリンカーヌクレオシド

(b) 独立して 2' - F または 2' - H (H) 修飾糖部分を含有する、前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 5' 末端から 1 番目、8 番目、及び / または 9 番目のヌクレオシド

40

(c) 前記修飾 c r R N A の 3' 及び 5' 末端のそれぞれにおける少なくとも 1 つの末端ホスホロチオエートヌクレオシド間結

(d) 修飾糖部分を含む、前記 C R I S P R 認識部分の 3' 末端から 5、6、7、8、11、または 12 の位置の少なくとも 1 つのヌクレオシド

(e) 独立して選択される修飾糖部分を含む、前記修飾 c r R N A の 1 ~ 5 個の 3' 末端ヌクレオシド

【請求項 2 7 5】

前記修飾 c r R N A が特徴 (a)、(c)、及び (e) を含む、請求項 2 7 4 に記載の化合物。

50

【請求項 276】

前記修飾 c r R N A が特徴 (a)、(c)、及び (d) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【請求項 277】

前記修飾 c r R N A が特徴 (a)、(b)、及び (c) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【請求項 278】

前記修飾 c r R N A が特徴 (a)、(b)、(c) 及び (e) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【請求項 279】

前記修飾 c r R N A が特徴 (a)、(c)、(d) 及び (e) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【請求項 280】

前記修飾 c r R N A が特徴 (a)、(b)、(c)、(d)、及び (e) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【請求項 281】

請求項 241 ~ 280 のいずれかに記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 282】

前記医薬組成物が、リボ核タンパク質複合体を含む、請求項 281 に記載の医薬組成物。

【請求項 283】

前記リボ核タンパク質複合体が、C p f 1ヌクレアーゼ及び前記修飾 c r R N A を含有する前記化合物を含む、請求項 282 に記載の医薬組成物。

【請求項 284】

細胞を、請求項 241 ~ 283 のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 285】

細胞を請求項 241 ~ 283 のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させる方法であって、ここで前記細胞は C p f 1ヌクレアーゼを発現する、前記方法。

【請求項 286】

細胞を、請求項 241 ~ 283 のいずれかに記載の化合物または組成物及び C p f 1ヌクレアーゼをコードするプラスミドと接触させることを含む方法。

【請求項 287】

細胞を、請求項 241 ~ 283 のいずれかに記載の化合物または組成物及び C p f 1ヌクレアーゼをコードする m R N A と接触させることを含む方法。

【請求項 288】

前記修飾 c r R N A が、トランスフェクション試薬のない状態で前記細胞によって取り込まれる、請求項 284 ~ 287 のいずれかに記載の方法。

【請求項 289】

前記細胞が動物内に存在する、請求項 284 ~ 288 のいずれかに記載の方法。

【請求項 290】

請求項 241 ~ 283 のいずれかに記載の化合物または組成物を、動物に投与することを含む方法。

【請求項 291】

前記投与が皮下である、請求項 290 に記載の方法。

【請求項 292】

前記投与が髄腔内である、請求項 290 に記載の方法。

【請求項 293】

C p f 1ヌクレアーゼをコードするプラスミドを投与することを含む、請求項 290 ~ 292 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 294】

前記動物が C p f 1ヌクレアーゼを発現する、請求項 290 ~ 292 のいずれかに記載の方法。

【請求項 295】

前記プラスミドがアデノ随伴ウイルス (A A V) を介して前記動物内の細胞に送達される、請求項 286 または 293 に記載の方法。

【請求項 296】

前記プラスミドがレンチウイルスを介して前記動物内の細胞に送達される、請求項 286 または 293 に記載の方法。

【請求項 297】

標的遺伝子が編集される、請求項 284 ~ 296 のいずれかに記載の方法。

【請求項 298】

前記修飾 c r R N A は、細胞内で前記標的遺伝子が編集された後に前記細胞内で分解される、請求項 297 に記載の方法。

【請求項 299】

前記 C p f 1ヌクレアーゼが前記修飾 c r R N A のない状態でヌクレアーゼ活性を示さない、請求項 285 ~ 287、または 293 ~ 298 のいずれかに記載の方法。

【請求項 300】

前記細胞を、前記修飾 c r R N A または C p f 1ヌクレアーゼの前記活性または発現を低下または抑制する第 2 の化合物と接触させることを含む、請求項 284 ~ 299 のいずれかに記載の方法。

【請求項 301】

前記細胞を、標的遺伝子を編集した後に前記第 2 の化合物と接触させる、請求項 300 に記載の方法。

【請求項 302】

前記第 2 の化合物が、前記修飾 c r R N A に相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、請求項 300 または 301 に記載の方法。

【請求項 303】

前記第 2 の化合物が、C p f 1ヌクレアーゼ遺伝子を標的にする c r R N A を含む、請求項 300 または 301 に記載の方法。

【請求項 304】

前記第 2 の化合物が、C p f 1転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項 300 または 301 に記載の方法。

【請求項 305】

前記 C p f 1ヌクレアーゼの発現が抑制される、請求項 303 または 304 に記載の方法。

【請求項 306】

前記動物がヒトである、請求項 289 ~ 305 のいずれかに記載の方法。

【請求項 307】

少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集が、未修飾 c r R N A または 45 個を超えるヌクレオチドを含む化合物が前記修飾 c r R N A の代わりに使用される場合の前記少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集と比較して低減される、請求項 284 ~ 306 のいずれかに記載の方法。

【請求項 308】

前記投与が、硝子体内である、請求項 290 または 293 ~ 297 のいずれかに記載の方法。

【請求項 309】

前記細胞が、植物細胞である、請求項 284 ~ 288 のいずれかに記載の方法。

【請求項 310】

前記細胞が、T細胞である、請求項 284 ~ 289 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1 1】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項 2 4 1 ~ 2 8 0 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 8 1 ~ 2 8 3 のいずれかに記載の組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【請求項 3 1 2】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項 2 4 1 ~ 2 8 0 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 8 1 ~ 2 8 3 のいずれかに記載の組成物を前記個体に投与することによって前記個体の前記疾患を治療することを含む、前記方法。

【請求項 3 1 3】

疾患を治療するための、請求項 2 4 1 ~ 2 8 0 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 8 1 ~ 2 8 3 のいずれかに記載の組成物の使用。 10

【請求項 3 1 4】

薬物の調合のための、請求項 2 4 1 ~ 2 8 0 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 8 1 ~ 2 8 3 のいずれかに記載の組成物の使用。

【請求項 3 1 5】

請求項 2 4 1 ~ 2 8 0 のいずれかに記載の化合物または請求項 2 8 1 ~ 2 8 3 のいずれかに記載の組成物を動物に投与し、そしてヒトへの移植のために前記動物から器官を回収する方法。

【請求項 3 1 6】

リボソームまたは脂質ナノ粒子を含む、請求項 1 0 8、1 4 7、2 0 6、または 2 8 1 のいずれかに記載の医薬組成物。 20

【請求項 3 1 7】

C p f 1ヌクレアーゼをコードする m R N A を含む、請求項 1 0 8、1 4 7、2 0 6、2 8 1、または 3 1 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 3 1 8】

前記修飾 c r R N A 及び C p f 1ヌクレアーゼをコードする前記 m R N A を含む前記化合物が、リボソームまたは脂質ナノ粒子の中に含まれる、請求項 3 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1 9】

前記 C p f 1ヌクレアーゼをコードする前記 m R N A 及び前記修飾 c r R N A を含む前記化合物が、リボソームまたは脂質ナノ粒子の中に含まれる、請求項 2 1 2 ~ 2 1 4、1 5 1 ~ 1 5 3、2 1 2 ~ 2 1 4 または 2 8 7 ~ 2 8 9 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 3 2 0】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項 3 1 6 ~ 3 1 8 のいずれかに記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【請求項 3 2 1】

個体の疾患を治療する方法であって、請求項 3 1 6 ~ 3 1 8 のいずれかに記載の医薬組成物を前記個体に投与することによって前記個体の前記疾患を治療することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】 40

【技術分野】

【0 0 0 1】

配列表

本出願は、配列表とともに電子形式で出願されている。配列表は、2 0 1 7 年 1 2 月 1 5 日に作成された C O R E 0 1 4 1 W O S E Q _ S T 2 5 . t x t という名前のファイルとして提供され、サイズは 9 4 8 K b である。この配列表の電子形式の情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

遺伝子を編集または無効にするための C l u s t e r R e g u l a t o r y I n t 50

erspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) の使用が記載されている。例えば、Jinek et al., Science 337: 816-821 (2012)、Mali et al., Science 339: 823-826 (2013) を参照されたい。

【0003】

発明の概要

種々の CRISPR システムが記載されている。例えば、WO 2013/176772、WO 2015/006747、Qi et al., Cell 152: 1173-1183 (2013)、Gilbert et al., Cell 154: 1-10 (2013)、Jinek et al., Science 337: 816-821 (2012)、Mali et al., Science 339: 823-826 (2013)、Doudna et al., Science 346: 6213 (2014) を参照されたい。また、例えば Zetsche et al., Cell 163: 1-13 (2015) も参照されたい。本発明は CRISPR システムにおいて、crRNA として使用するための修飾オリゴヌクレオチドを提供する。ある特定の実施形態において、このような修飾 crRNA は、未修飾 crRNA と比べて向上した安定性を有する。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、5' 末端及び / または 3' 末端で安定化される。ある特定の実施形態において、このような安定化 crRNA は、エキソヌクレアーゼ消化及び / またはエンドヌクレアーゼ消化に耐性がある。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は未修飾 crRNA と比べて、標的の DNA または RNA に対する改善した親和性を有する。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、未修飾 crRNA と比べて標的の DNA または RNA に対する改善した選択性を有する。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、未修飾 crRNA と比べて改善した細胞取り込みを有する。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は未修飾 crRNA と比べて CRISPR システムの遺伝子編集活性を高める。

【0004】

ある特定の実施形態において、crRNA 修飾により、標的の DNA または RNA に対する親和性が増加して修飾 crRNA を短縮することが可能となると同時に、標的 DNA もしくは RNA にハイブリダイズ及び / または他の CRISPR システム成分と会合するのに十分な親和性を保持することが可能となる。このように、ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、未修飾よりも短い。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、35 ~ 45 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、35 ~ 43 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、35 ~ 42 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、36 ~ 43 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、36 ~ 42 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA は、36 ~ 40 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA の標的認識部分は 15 ~ 23 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA の標的認識部分は 15 ~ 22 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA の標的認識部分は 16 ~ 22 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA の標的認識部分は 17 ~ 22 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA の標的認識部分は 18 ~ 22 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において修飾 crRNA の標的認識部分は 16 ~ 20 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において修飾 crRNA の標的認識部分は 18 ~ 20 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA の CRISPR 修飾 crRNA 認識部分は 17 ~ 20 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、修飾 crRNA の CRISPR 修飾 crRNA 認識部分は 18 ~ 20 個の連結ヌクレオシド長である。ある特定の実施形態において、このようなより短い crRNA は、より長い crRNA よりも改善した取り込み特性及び / または合成の

容易性を有する。ある特定の実施形態において、修飾 *crRNA* はトランスフェクション試薬またはエレクトロポレーションなしで細胞に取り込まれる。ある特定のこのような実施形態において、細胞は、動物の中に存在する。ある特定の実施形態において、動物は *CRISPR* ヌクレアーゼを発現する。ある特定の実施形態において、動物は *CRISPR* ヌクレアーゼを発現する手段で予めまたは同時に処置される。ある特定のこのような実施形態において、このような処置には *CRISPR* ヌクレアーゼを送達するためのベクターの投与が含まれる。ある特定のこのような実施形態において、このようなベクターはウイルスベクター、例えばアデノ随伴ウイルス (*AAV*) である。ある特定のこのような実施形態において、ウイルスベクターは、*AAV* ベクターに適合する細菌由来の *CRISPR* ヌクレアーゼを発現する。ある特定の実施形態において、*CRISPR* ヌクレアーゼは *cpf1* ヌクレアーゼである。

10

【0005】

ある特定の実施形態において、*CRISPR* システムは、標的遺伝子が編集された後に抑制される。ある特定のこのような実施形態において、細胞内の修飾 *crRNA* は、標的遺伝子が編集された後に分解される。ある特定のこのような実施形態において、*CRISPR* ヌクレアーゼは細胞内で発現され続けるが、*CRISPR* ヌクレアーゼがヌクレアーゼ活性を示すには *crRNA* が必要であるため、もはや活性ではない。ある特定のこのような実施形態において、*CRISPR* システムのオフターゲット効果、例えばオフターゲット遺伝子の望まない切断などは、ヌクレアーゼ活性に必要な全ての成分が、例えばウイルスベクターによって無期限に発現され続ける *CRISPR* システムと比べて減少している。ある特定のこのような実施形態において、修飾 *crRNA* の分解は、*crRNA* に相補的なオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによって促進される。ある特定の実施形態において、修飾 *crRNA* の分解は、細胞に存在するヌクレアーゼによって促進される。

20

【0006】

ある特定の実施形態において、*CRISPR* システムは、標的遺伝子が、細胞内の *tracrRNA* の分解を介して編集された後に抑制される。ある特定のこのような実施形態において、*tracrRNA* の分解は、*tracrRNA* に相補的なオリゴヌクレオチドにハイブリダイゼーションすることによって促進される。ある特定の実施形態において、*tracrRNA* の分解は、細胞内に存在するヌクレアーゼによって促進される。

30

【0007】

ある特定の実施形態において、*CRISPR* システムは、標的遺伝子が *CRISPR* ヌクレアーゼの発現抑制を介して編集された後に抑制される。ある特定のこのような実施形態において、ヌクレアーゼ遺伝子は、修飾 *crRNA* によって編集される。ある特定の実施形態において、ヌクレアーゼ転写物は、ヌクレアーゼ転写物に相補的なオリゴヌクレオチドへのヌクレアーゼ転写物のハイブリダイゼーション後に分解される。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】実施例12に記載される修飾 *crRNA* による、*DNMT1* の過剰な遺伝子編集を例証するゲルを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0009】

前述の一般的な説明及び以下の発明を実施するための形態はどちらも例示的かつ説明的なものにすぎず、特許請求される発明を限定するものではないと理解すべきである。本明細書において、単数形の使用は、別途明確に記述されない限り、複数形を含む。本明細書で使用されるとき、「*or* (または)」の使用は、別途記述されない限り、「及び/または (*and/or*)」を意味する。さらに、「*including* (～を含む)」という用語、ならびに「*includes* (～を含む)」及び「*included* (含まれる)」等の他の形態の使用は、限定的なものではない。また、「要素」または「成分」等の用語は、別途明確に記述されない限り、1つのユニットを含む要素及び成分、ならびに2つ

50

以上のサブユニットを含む要素及び成分の両方を包含する。

【0010】

本明細書で使用される節の見出しは、単に構成目的のものであり、記載される主題を限定するものと解釈されるべきではない。特許、特許出願、記事、書籍、及び論文を含むが、これらに限定されない本出願において引用されるすべての文書または文書の一部は、参照によりそれらの全体があらゆる目的のために本明細書に明確に組み込まれる。

【0011】

定義

別途示されない限り、以下の用語は、以下の意味を有する。本明細書で使用する場合、「2'-デオキシヌクレオシド」は、天然のデオキシリボ核酸(DNA)に見いだされるような2'-H(H)フラノシル糖部分を含有するヌクレオシドを意味する。crRNAにおいて、2'-デオキシヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドである。

10

【0012】

本明細書で使用する場合、「2'-置換ヌクレオシド」または「2'-修飾ヌクレオシド」は、2'-置換または2'-修飾糖部分を含有するヌクレオシドを意味する。本明細書で使用する場合、crRNAにおける糖部分に関する「2'-置換」または「2'-修飾」は、未修飾糖部分の2'-OHの代わりに2'-置換基を含有するフラノシル糖部分を意味する。

【0013】

本明細書で使用する場合、修飾オリゴヌクレオチドに関する「3'-安定化」は、少なくとも1つの安定化修飾を含む、または安定化コンジュゲート基に結合される修飾オリゴヌクレオチドを意味し、ここで少なくとも1つの修飾及び/またはコンジュゲート基は、少なくとも1つの安定化修飾を含まないか安定化コンジュゲート基に結合されない対応するオリゴヌクレオチドと比べて、細胞内または動物内の修飾オリゴヌクレオチドの3'末端の安定性を増大させる。ある特定の実施形態において、修飾crRNAは3'-安定化である。ある特定のこのような実施形態において、修飾crRNAの3'末端ヌクレオシドには、安定化修飾が含まれる。ある特定の実施形態において、crRNAの3'末端ヌクレオシド間連結は、安定化修飾を含む。

20

【0014】

本明細書で使用する場合、修飾オリゴヌクレオチドに関する「5'-安定化」は、少なくとも1つの安定化修飾を含む、または安定化コンジュゲート基に結合される修飾オリゴヌクレオチドを意味し、ここで少なくとも1つの修飾及び/またはコンジュゲート基は、少なくとも1つの安定化修飾を含まないか安定化コンジュゲート基に結合されない対応するオリゴヌクレオチドと比べて、細胞内または動物内の修飾オリゴヌクレオチドの5'末端の安定性を増加させる。ある特定の実施形態において、修飾crRNAは5'-安定化である。ある特定のこのような実施形態において、修飾crRNAの5'末端ヌクレオシドには、安定化修飾が含まれる。ある特定のこのような実施形態において、修飾crRNAの5'末端ヌクレオシドは、リンカーヌクレオシドである。

30

【0015】

本明細書で使用されるとき、「二環ヌクレオシド」または「BNA」とは、二環糖部分を含むヌクレオシドを意味する。本明細書で使用する場合、「二環糖」または「二環糖部分」は、2つの環を含有する修飾糖部分を意味し、ここで第2の環は、第1の環における原子の2つを結びつける架橋を介して形成されることにより、二環構造を形成する。ある特定の実施形態において、二環糖部分の第1の環は、フラノシル部分である。ある特定の実施形態において、二環糖部分はフラノシル部分を含まない。

40

【0016】

本明細書で使用する場合、「細胞標的化部分」は、特定の細胞型(複数可)に結合することができるコンジュゲート基またはコンジュゲート基の部分を意味する。

【0017】

本明細書で使用する場合、オリゴヌクレオチドに関して「相補的な」は、2つの核酸塩

50

基配列が反対方向に整列している場合、そのようなオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列またはその1つ以上の領域が、別のオリゴヌクレオチドまたは核酸もしくはその1つ以上の領域の核酸塩基配列と一致することを意味する。核酸塩基一致または相補的な核酸塩基は、本明細書に記載される場合、別に明記されない限り、アデニン（A）及びチミン（T）、アデニン（A）及びウラシル（U）、シトシン（C）及びグアニン（G）、ならびに5-メチルシトシン（^mC）及びグアニン（G）に限定される。相補的なオリゴヌクレオチド及び/または核酸は、各ヌクレオシドで相補的な核酸塩基を持つ必要はない。むしろ、いくつかのミスマッチが許容される。本明細書で使用する場合、オリゴヌクレオチドに関して「完全に相補的な」または「100%相補的な」は、このようなオリゴヌクレオチドが他のオリゴヌクレオチドまたは核酸に対して各ヌクレオシドで相補的であることを意味する。このような実施形態において、ミスマッチは許容されない。

10

【0018】

本明細書で使用する場合、「コンジュゲート基」は親化合物、例えばオリゴヌクレオチドに直接的または間接的に結合する原子団を意味する。

【0019】

本明細書で使用する場合、「コンジュゲートリンカー」は、親化合物、例えばオリゴヌクレオチドにコンジュゲート基を結合させる原子団を意味する。

【0020】

本明細書で使用する場合、オリゴヌクレオチドの文脈において「連続的な」は、互いに直接隣接するヌクレオシド、核酸塩基、糖部分、またはヌクレオシド間結合を指す。例えば、「連続的な核酸塩基」は、互いに直接隣接する核酸塩基を意味する。

20

【0021】

本明細書で使用する場合、「crRNA」または「CRISPR RNA」は、標的認識部分及びCRISPR認識部分を含むオリゴヌクレオチドを意味する。本明細書で使用する場合、「標的認識部分」はDNAまたはRNAの標的に相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの部分の意味する。本明細書で使用する場合、「CRISPR認識部分」はCRISPRヌクレアーゼに結合、CRISPRヌクレアーゼと会合、またはCRISPRヌクレアーゼとの結合もしくは会合に寄与することができるオリゴヌクレオチドの一部、またはCRISPRヌクレアーゼに結合もしくはCRISPRヌクレアーゼと会合する分子である。crRNAのCRISPR認識部分は、crRNAの標的認識部分のDNAまたはRNAの標的に相補的ではない。したがってcrRNAの標的認識部分はCRISPRヌクレアーゼと会合し得るが、crRNAの標的認識及びCRISPR認識部分は重複しない。CRISPRヌクレアーゼは、crRNAと直接的または間接的に会合し、そして標的のDNAまたはRNAを分解するタンパク質である。ある特定の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼはCpf1ヌクレアーゼである。ある特定のこのような実施形態において、crRNAのCRISPR認識部分はCpf1ヌクレアーゼに結合またはCpf1ヌクレアーゼと会合する。ある特定の実施形態において、crRNAのCRISPR認識部分はtracrRNAに結合またはtracrRNAと会合する。ある特定の実施形態において、crRNAには自己相補的な領域が含まれる。ある特定のこのような実施形態において、CRISPR認識部分は、自己相補的な領域と部分的に、または完全に重複する。ある特定の実施形態において、crRNAには1個以上のリンカーヌクレオシドが含まれる。

30

40

【0022】

本明細書で使用する場合、crRNAの文脈において「リンカーヌクレオシド」は、crRNAの標的認識部分及び/またはCRISPR認識部分に連結する1個以上のヌクレオシドを意味する。リンカーヌクレオシドは、crRNAの標的認識部分またはCRISPR認識部分のいずれの部分でもない。ある特定の実施形態において、このようなリンカーヌクレオシドは、crRNAの5'末端、crRNAの3'末端、及び/またはcrRNAの標的認識部分及びCRISPR認識部分の間に位置する。

【0023】

50

本明細書で使用する場合、オリゴヌクレオチドに関して「完全修飾」は、各糖部分が修飾されている修飾オリゴヌクレオチドを意味する。オリゴヌクレオチドに関して「均一に修飾された」とは、各糖部分のそれぞれの少なくとも1つの修飾が同じである完全修飾オリゴヌクレオチドを意味する。例えば、均一に修飾されたオリゴヌクレオチドのヌクレオシドは、それぞれ2'-MOE修飾であるが、異なる核酸塩基を有することができ、そしてヌクレオシド間結合は異なっても良い。

【0024】

本明細書で使用する場合、「遺伝子編集」はCRISPRヌクレアーゼ及び修飾または未修飾のcrRNAを含む複合体によって媒介される任意のプロセスを意味し、これには遺伝子ノックダウン、遺伝子ノックアウト、遺伝子破壊、欠失、挿入、及び遺伝子活性化が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0025】

本明細書で使用する場合、「ハイブリダイゼーション」はオリゴヌクレオチド及び/または核酸に相補的な対形成またはアニーリングを意味する。特定の機構に限定されないが、最も一般的なハイブリダイゼーションの機構には水素結合が含まれ、これは相補的な核酸塩基間のワトソン・クリック型、フーグスティーン型、または逆フーグスティーン型の水素結合であっても良い。

【0026】

本明細書で使用する場合、修飾オリゴヌクレオチドによって媒介される効果に関して「増加する」は、ある特定の修飾を含まない対応するオリゴヌクレオチドの存在下の効果より、ある特定の修飾を含むオリゴヌクレオチドの存在下でその効果がより高まることを意味する。

20

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「ヌクレオシド間結合」は、オリゴヌクレオチドにおいて隣接するヌクレオシド間の共有結合を形成する基を意味する。本明細書で使用する場合、「修飾ヌクレオシド間結合」は、天然のリン酸ヌクレオシド間結合以外の任意のヌクレオシド間結合を意味する。天然の非リン酸結合は、修飾ヌクレオシド間結合として本明細書で称される。「ホスホロチオエート結合」は、リン酸結合のホスホジエステル結合が、非架橋酸素原子の1つを硫黄原子で置換することによって修飾されているヌクレオシド間の結合を意味する。ホスホロチオエート結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。

30

【0028】

本明細書で使用する場合、「直鎖状修飾糖」または「直鎖状修飾糖部分」は、非環式または非架橋修飾を含む修飾糖部分を意味する。このような直鎖状修飾は二環糖修飾とは異なる。

【0029】

本明細書で使用する場合、「連結ヌクレオシド」とは、連続配列で連結（すなわち、連結されたものの間に追加のヌクレオシドが存在しない）及びそれらがヌクレオシド間結合によって連結されているヌクレオシドである。

【0030】

本明細書で使用する場合、「ミスマッチ」は第1及び第2のオリゴマー化合物が整列している場合に、第2のオリゴヌクレオチドまたは標的核酸の対応する核酸塩基と対形成することができない第1のオリゴヌクレオチドの核酸塩基を意味する。

40

【0031】

本明細書で使用する場合、「MOE」は、メトキシエチルを意味する。「2'-MOE」は、フラノシル環の2'位の-OCH₂CH₂OCH₃基を意味する。

【0032】

本明細書で使用する場合、「モチーフ」は、オリゴヌクレオチドにおける、未修飾及び/または修飾の糖部分、核酸塩基及び/またはヌクレオシド間結合を意味する。

【0033】

本明細書で使用する場合、「天然の」は自然に存在していることを意味する。

50

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用する場合、「核酸塩基」は第2の異なる核酸塩基と対形成することができる複素環部分を意味する。本明細書で使用する場合、「核酸塩基配列」は、任意の糖またはヌクレオシド結合修飾と関係のない連続的な核酸塩基の順序を意味する。本明細書で使用する場合、「修飾核酸塩基」は、5つの未修飾核酸塩基として本明細書に定義されるアデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)、ウラシル(U)及びグアニン(G)以外の核酸塩基を意味する。ユニバーサル塩基は、5つの未修飾核酸塩基の任意の1つと対形成できる核酸塩基である。

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用する場合、「ヌクレオシド」は、核酸塩基及び糖部分を含有する化合物を意味する。核酸塩基及び糖部分はそれぞれ、独立して修飾されないか、または修飾される。本明細書で使用する場合、「修飾ヌクレオシド」は、修飾核酸塩基及び/または修飾糖部分を含有するヌクレオシドを意味する。修飾ヌクレオシドには脱塩基ヌクレオシドが含まれる。

10

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用する場合、「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオシド間結合を介して結合した一本鎖の連結ヌクレオシドを意味し、ここで各ヌクレオシド及びヌクレオシド間結合は修飾されてもまたは修飾されなくても良い。別に示されない限り、オリゴヌクレオチドは8~50個の連結ヌクレオシドから成る。本明細書で使用する場合、「修飾オリゴヌクレオチド」は、少なくとも1つのヌクレオシドまたはヌクレオシド間結合が修飾されている、オリゴヌクレオチドを意味する。本明細書で使用する場合、「未修飾オリゴヌクレオチド」は、いずれのヌクレオシド修飾またはヌクレオシド間修飾も含まないオリゴヌクレオチドを意味する。

20

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用されるとき、「薬剂的に許容される担体または希釈剤」とは、動物への投与における使用に好適な任意の物質を意味する。ある特定のそのような担体は、医薬組成物を、例えば、対象による経口摂取のための丸剤、錠剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液、及びトローチ剤として製剤化することを可能にする。

【 0 0 3 8 】

「薬学的に許容される塩」とは、オリゴマー化合物などの化合物の生理学的かつ薬学的に許容される塩、すなわち、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、かつそれに望ましくない毒物学的影響を与えない塩を意味する。

30

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用する場合、「医薬組成物」とは、対象への投与に適した物質の混合物を意味する。例えば、医薬組成物はcrRNA化合物及び滅菌水溶液を含み得る。ある特定の実施形態において、医薬組成物は、ある特定の細胞株での自由取り込みアッセイ(free uptake assay)において活性を示す。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する場合、「リン部分」は、リン原子を含む原子団を意味する。ある特定の実施形態において、リン部分には、モノ-、ジ-、もしくはトリ-リン酸またはホスホロチオエートが含まれる。

40

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用する場合、「プロドラッグ」とは、内因性酵素または他の化学物質及び/または条件の生理学的作用により、体内またはその細胞内で活性形態に変換される不活性形態の治療薬を意味する。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用する場合、オリゴヌクレオチドに関して「自己相補的な」とは、それ自体に対して少なくとも部分的に相補的であるオリゴヌクレオチドを意味する。ある特定の実施形態において、自己相補的なオリゴヌクレオチドは、自己相補的なオリゴヌクレオチ

50

ドの一部がそれ自体に対してハイブリダイズする場合、ヘアピンを形成する。

【0043】

本明細書で使用する場合、「糖部分」は、他の基に核酸塩基を結合させることができる原子団、例えばヌクレオシド間結合、コンジュゲート基、または末端基を意味する。ある特定の実施形態において、糖部分は核酸塩基に結合してヌクレオシドを形成する。本明細書で使用する場合、*crRNA*の文脈における「未修飾糖部分」は、*RNA*で見られるような2'-OH(H)フラノシル部分を意味する。未修飾糖部分は1'、3'、及び4'位のそれぞれに1個の水素、3'位に1個の酸素、5'位に2個の水素を有する。本明細書で使用する場合、「修飾糖部分」または「修飾糖」は、未修飾糖部分に対して任意の置換を含有する糖代替物またはフラノシル部分を意味する。ある特定の実施形態において、修飾糖部分は2'-置換糖部分である。このような修飾糖部分には二環糖及び直鎖状の修飾糖が含まれる。

10

【0044】

本明細書で使用する場合、「糖代替物」は、別の基(例えばヌクレオシド間結合、コンジュゲート基、または末端基)に核酸塩基を連結することができる、フラノシル糖部分以外を有する修飾糖部分を意味する。糖代替物を含む修飾ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチド内の1つ以上の位置に組み込まれ得る。ある特定の実施形態においてこのようなオリゴヌクレオチドは、相補的なオリゴマー化合物または核酸にハイブリダイズすることができる。

【0045】

20

本明細書で使用する場合、「標的核酸」、「標的*RNA*」、「標的*DNA*」、「標的遺伝子」及び「核酸標的」は、*crRNA*の標的認識部分に対して核酸が相補的であることを意味する。ある特定のこのような実施形態において、*crRNA*は、標的核酸に作用するように設計される。「オフターゲット遺伝子」は、*crRNA*が作用するように設計されていない遺伝子である。ある特定の実施形態において、オフターゲット遺伝子の編集は、有害である。

【0046】

本明細書で使用する場合、「末端基」は、オリゴヌクレオチドの末端に共有結合する、化学基または原子団を意味する。

【0047】

30

[*CRISPR*システム及び*CRISPR*システムに使用するためのある特定のオリゴヌクレオチド]

ある特定の*CRISPR RNA*(*crRNA*)

ある特定の実施形態において、本発明は*CRISPR*に使用するための修飾オリゴヌクレオチドを提供する。典型的に、*CRISPR*は標的の*DNA*または*RNA*にハイブリダイズし、標的の*DNA*または*RNA*を分解するヌクレアーゼを直接的または間接的に補充する*CRISPR RNA*(*crRNA*)を使用する。したがって、このようなシステムの*crRNA*は、以下の2つの機能、すなわち(1)標的*DNA*または*RNA*の認識及びハイブリダイゼーション、ならびに(2)*CRISPR*ヌクレアーゼまたは*CRISPR*ヌクレアーゼを補充する分子による認識を有する。典型的に、このようなシステムにおいて*crRNA*には、これらの2つの機能に対応する2つの部分、すなわち標的認識部分及び*CRISPR*認識部分が含まれる。本発明は、*crRNA*として使用され得る修飾オリゴヌクレオチドを提供する。このような修飾オリゴヌクレオチドは、標的認識部分及び/または*CRISPR*認識部分に修飾を有し得る。

40

【0048】

ある特定の実施形態において、*crRNA*の*CRISPR*認識部分は、細菌性生物由来の直接反復配列の一部を含み、*Cpf1*ヌクレアーゼまたは*Cpf1*オーソログを有する。ある特定のこのような実施形態において、*crRNA*の*CRISPR*認識部分は、下表から選択される配列を含む。ある特定の実施形態において、*crRNA*の*CRISPR*認識部分は、下表から選択される配列の16、17、18、19、または20個の核酸塩基

50

を含む。ある特定の実施形態において、*crRNA*の*CRISPR*認識部分は、下表から選択される配列の16、17、18、19、または20個の核酸塩基を含む。

【表1-1】

表A

*crRNA*の*CRISPR*認識部分に使用される直接反復配列

| 生物 | 配列 | 配列番号 |
|--|---------------------------------|------|
| <i>Francisella novicida</i> | UAAUUUCUACUGUUGUAGAU | 3 |
| <i>Lachnospiraceae bacterium MC2017</i> | AGAAUUGCAUGGUUCUCAUGC | 4 |
| <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> | AAAAUUACCUAGUAAUUAGGU | 5 |
| <i>Peregrinibacteria bacterium</i> | GGAUUUCUACUUUUGUAGAU | 6 |
| <i>Parcubacteria bacterium</i> | AAAUUUCUACUUUUGUAGAU | 7 |
| <i>Smithella</i> | GUUUCAAUCCACGCGCCACGCGGGGCGCGAC | 8 |
| <i>Acidaminococcus</i> | UAAUUUCUACUCUUGUAGAU | 9 |
| <i>Lachnospiraceae bacterium MA2020</i> | GAAUUUCUACUAAUUGUAGAU | 10 |
| <i>Candidatus Methanoplasma termitum</i> | GAAUCUCUACUCUUGUAGAU | 11 |
| <i>Eubacterium eligens</i> | UAAUUUCUACUUUUGUAGAU | 12 |
| <i>Moraxella bovoculi</i> | AAAUUUCUACUGUUUGUAGAU | 13 |
| <i>Leptospira inadai</i> | GAAUUUCUACUUUUGUAGAU | 14 |
| <i>Lachnospiraceae bacterium ND2006</i> | UAAUUUCUACUAAUGUGUAGAU | 15 |
| <i>Porphyromonas crevioricanis</i> | UAAUUUCUACUAAUUGUAGAU | 16 |
| <i>Prevotella disiens</i> | UAAUUUCUACUUCGGUAGAU | 17 |
| <i>Porphyromonas macacae</i> | UAAUUUCUACUAAUUGUAGAU | 16 |

10

20

30

40

50

【0049】

ある特定の実施形態において、*crRNA*の標的認識部分は、標的DNAに相補的な核酸塩基配列を含む。ある特定のこのような実施形態において、標的認識部分の全体の核酸塩基配列は、標的DNAに相補的である。ある特定の実施形態において、標的認識部分の核酸塩基配列は、標的DNAに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的である。ある特定の実施形態において、標的DNAは、DNMT1遺伝子である。ある特定の実施形態において、標的DNMT1遺伝子の核酸塩基配列は、本明細書で配列番号66として称される核酸塩基1506424~1569013から切り取られたGENBANK受入番号NT_011295.10である。ある特定の実施形態において、標的DNAは、GRIN2B遺伝子である。ある特定の実施形態において、標的GRIN2B遺伝子の核酸塩基配列は、本明細書で配列番号67として称される核酸塩基13534001~13985000から切り取られたGENBANK受入番号NC_000012.12である。ある特定の実施形態において、標的DNAは、LDLR遺伝子である。ある特定の実施形態において、標的LDLR遺伝子の核酸塩基配列は、本明細書で配列番号68として称される、核酸塩基11086001~11137000から切り取られたGENBANK受入番号NC_000019.10である。ある特定の実施形態において、標的DNAは、補体第5成分(C5)遺伝子である。ある特定の実施形態において、標的C5遺伝子の核酸塩基配列は、本明細書で配列番号69として称される核酸塩基120949001~121078000から切り取られたGENBANK受入番号NC_000009.12である。ある特定の実施形態において、標的DNAは、empty spiracles homolog 1 (EMX1)遺伝子である。ある特定の実施形態において、標的EMX1遺伝子の核酸塩基配列は、本明細書で配列番号70として称される核酸塩基72908001~72940000から切り取られたGENBANK受入番号NC_000002.12である。

【0050】

ある特定の実施形態において、修飾*crRNA*は、標的認識部分、*CRISPR*認識部分、及びリンカーヌクレオシドを含む。リンカーヌクレオシドは、*crRNA*の標的認識部分または*CRISPR*認識部分の一部ではない。ある特定の実施形態において、リンカ

ーヌクレオシドはヌクレアーゼを安定にするために修飾される。ある特定のこのような実施形態において、リンカーヌクレオシドはエキソヌクレアーゼを安定にする。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A はリンカーヌクレオシドを含まない。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は 2 つのリンカーヌクレオシドを含む。

【 0 0 5 1 】

ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は C R I S P R 認識部分、標的認識部分及び、任意選択で 1 つ以上のリンカーヌクレオシドを含む。C R I S P R 認識部分及び標的認識部分ならびに任意選択のリンカーヌクレオシドは、下記に示すように互いに対して任意の配向であって良く、ここで「C R」は C R I S P R 認識部分であり、「T a」は、標的認識部分であり、「L n」はリンカーヌクレオシド（複数可）である。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は以下の形態の 1 つによって表される。

5' - C R - T a - 3'
 5' - L n - C R - T a - 3'
 5' - C R - T a - L n - 3'
 5' - L n - C R - T a - L n - 3'
 5' - C R - L n - T a - 3'
 5' - L n - C R - L n - T a - 3'
 5' - L n - C R - L n - T a - L n - 3'
 5' - T a - C R - 3'
 5' - T a - C R - L n - 3'
 5' - L n - T a - C R - 3'
 5' - L n - T a - C R - L n - 3'
 5' - T a - L n - C R - L n - 3'
 5' - T a - L n - C R - 3'
 5' - L n - T a - L n - C R - L n - 3'

【 0 0 5 2 】

ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A を含有する化合物は、コンジュゲート基を含む。ある特定のこのような実施形態において、コンジュゲート基は修飾 c r R N A の 5' 末端に結合される。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は修飾 c r R N A の 3' 末端に結合される。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は修飾 c r R N A のヌクレオシド内またはヌクレオシド間結合に結合される。

【 0 0 5 3 】

ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は 5' - 安定化及び / または 3' - 安定化である。ある特定のこのような実施形態において、5' - または 3' - 安定化 c r R N A の 5' - または 3' 末端ヌクレオシドは、それぞれ安定化修飾を含む。ある特定の実施形態において、安定化修飾を含有するヌクレオシドは、C R I S P R 認識部分の末端ヌクレオシドである。ある特定の実施形態において、安定化修飾を含有するヌクレオシドは、標的認識部分の末端ヌクレオシドである。ある特定の実施形態において、安定化修飾を含有するヌクレオシドは、リンカーヌクレオシドである。ある特定の実施形態において、5' - または 3' - 安定化 c r R N A は、それぞれ 5' - または 3' 末端の安定化コンジュゲート基に結合される。ある特定のこのような実施形態において、コンジュゲート基は切断可能な部分を含まない。

【 0 0 5 4 】

ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は、修飾オリゴヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は修飾オリゴヌクレオチドから成る。本明細書に記載される修飾オリゴヌクレオチドは、c r R N A としての使用に適している。

【 0 0 5 5 】

ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は以下の特徴の少なくとも 3 つを含む：

a . 修飾 c r R N A の C R I S P R 認識部分の 5' 末端に連結される 2 つのリンカーヌクレオシド；

b. 独立して 2' - F または 2' - H (H) 修飾糖部分を含有する、修飾 c r R N A の標的認識部分の 5' 末端から 1 番目、8 番目、及び / または 9 番目のヌクレオシド ;

c. 修飾 c r R N A の 3' 及び 5' 末端のそれぞれにおける少なくとも 1 つの末端ホスホロチオエートヌクレオシド間結合

d. 未修飾糖部分を含む、C R I S P R 認識部分の各ヌクレオシド

e. 独立して選択される修飾糖部分を含む、修飾 c r R N A の 1 ~ 5 個の 3' 末端ヌクレオシド。

ある特定のこのような実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (b)、(d)、及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (b)、(c)、及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (b)、(c)、及び (d) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (b)、(c)、(d) 及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(c)、及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、及び (d) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、(d) 及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、(c) 及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) を含む。

【0056】

ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は以下の特徴の少なくとも 3 つを含む :

a. 修飾 c r R N A の C R I S P R 認識部分の 5' 末端に連結される 2 つのリンカーヌクレオシド ;

b. 独立して 2' - F または 2' - H (H) 修飾糖部分を含有する、修飾 c r R N A の標的認識部分の 5' 末端から 1 番目、8 番目、及び / または 9 番目のヌクレオシド ;

c. 修飾 c r R N A の 3' 及び 5' 末端のそれぞれにおける少なくとも 1 つの末端ホスホロチオエートヌクレオシド間結合

d. 修飾糖部分を含む、C R I S P R 認識部分の 3' 末端から 5、6、7、8、11、または 12 の位置の少なくとも 1 つのヌクレオシド

e. 独立して選択される修飾糖部分を含む、修飾 c r R N A の 1 ~ 5 個の 3' 末端ヌクレオシド。

ある特定のこのような実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (b)、(d)、及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (b)、(c)、及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (b)、(c)、及び (d) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (b)、(c)、(d) 及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(c)、及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、及び (d) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、(d) 及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、(c) 及び (e) を含む。ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は特徴 (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) を含む。

【0057】

ある特定の実施形態において、修飾 c r R N A は下表に掲載される特徴 (a)、(b)、(c)、(d)、及び (e) の任意の組み合わせを含み、ここで 1 つの選択が (a)、(b)、(c)、(d)、及び (e) のそれぞれに対してなされる。

10

20

30

40

【表 1 - 2】

表B

ある特定の修飾c r RNAの特徴

| (a) リンカーヌクレオシド | (b) 標的認識部分の修飾 | (c) 末端ホスホチオエート (P S) ヌクレオシド間結合 | (d) C R I S P R 認識部分の糖部分 | (e) 3' 末端ヌクレオシドの糖修飾 |
|---|------------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| 2つの修飾リンカーヌクレオシド | 1、8、及び9の位置の2'-H (H) 修飾ヌクレオシド | 各末端の2つのP S結合 | C R I S P R 認識部分の各ヌクレオシドは未修飾糖部分を含む | 2つの3' 末端ヌクレオシドは修飾糖部分を含む |
| 2つの2'-H (H) 修飾リンカーヌクレオシド | 1位または8の位置の2'-H (H) 修飾ヌクレオシド | 3' 末端の2つのP S結合及び3' 末端の6つのP S結合 | N/A (C R I S P R 認識部分の少なくとも1つのヌクレオシドは、修飾糖を含む) | 5つの3' 末端ヌクレオシドは修飾糖部分を含む |
| 2つの2'-O Me 修飾リンカーヌクレオシド | 1及び9の位置の2'-H (H) 修飾ヌクレオシド | N/A (少なくとも1つの末端は非-P S末端結合を有する) | C R I S P R 認識部分の3' 末端から11の位置の二環修飾ヌクレオシド | 2つの3' 末端ヌクレオシドは2'-O Me 修飾糖部分を含む |
| 2つのc E t 修飾リンカーヌクレオシド | 8及び9の位置の2'-H (H) 修飾ヌクレオシド | | C R I S P R 認識部分の3' 末端から12の位置の二環修飾ヌクレオシド | 2つの3' 末端ヌクレオシドはc E t 修飾糖部分を含む |
| 1つの修飾リンカーヌクレオシド及び1つの未修飾リンカーヌクレオシド | 1の位置の2'-H (H) 修飾ヌクレオシド | | C R I S P R 認識部分の3' 末端から11及び12の位置の二環修飾ヌクレオシド | 5つの3' 末端ヌクレオシドは2'-O Me 修飾糖部分を含む |
| 1つの2'-O Me 修飾リンカーヌクレオシド及び1つの未修飾リンカーヌクレオシド | N/A (1、8、または9の位置のいずれかに修飾ヌクレオシドがない) | | | 5つの3' 末端ヌクレオシドは2'-F 修飾糖部分を含む |

10

20

30

40

【表 1 - 3】

| | | | | |
|--|---|--|--|----------------------------|
| 1つのc E t修飾リンカーヌクレオシド及び1つの未修飾リンカーヌクレオシド | 14、15、及び16の位置の2'-H (H) 修飾ヌクレオシド | | | N/A (3'末端ヌクレオシドは未修飾糖部分を含む) |
| N/A (0または1個のリンカーヌクレオシド) | 14、15、16、ならびに少なくとも1つの1、8、及び9の位置の2'-H (H) 修飾ヌクレオシド | | | |
| | 1、8、及び/または9の位置の2'-F修飾ヌクレオシド | | | |
| | 14、15、及び/または16の位置の2'-F修飾ヌクレオシド | | | |

10

20

【0058】

ある特定の修飾オリゴヌクレオチドは、1つ以上の不斉中心を有するため、エナンチオマー、ジアステレオマー、及び糖のアノマーなどの(R)もしくは(S)のように、またはアミノ酸などの(D)もしくは(L)のように絶対立体化学の観点から定義され得る他の立体異性体配置をもたらす。本明細書で提供される修飾オリゴヌクレオチドには、別様に明記しない限り、これらのラセミ体及び工学的に純粋な形態を含む、全てのこのような可能性のある異性体が含まれる。同様に全てのシス異性体及びトランス異性体ならびに互変異性形態も含まれる。

30

【0059】

ある特定の実施形態において、このような修飾オリゴヌクレオチドには本明細書に記載の修飾糖部分、修飾核酸塩基、修飾ヌクレオシド間結合、モチーフ、及び/または長さの任意の組み合わせが含まれ得る。

【0060】

[修飾crRNAを含む、ある特定の使用方法]

40

ある特定の実施形態において、修飾crRNAを含有する化合物と細胞を接触させることを含む方法は、in vitroでの方法である。ある特定の実施形態において、修飾crRNAを含有する化合物と細胞を接触させることを含む方法は、ex vivoでの方法である。ある特定の実施形態において、修飾crRNAを含有する化合物と細胞を接触させることを含む方法は、in vivoでの方法である。

【0061】

種々のCRISPRヌクレアーゼ変異体には、天然及び遺伝子改変型の両方が、本明細書に記載される方法に使用可能である。このような変異体には、遺伝子活性化など標的核酸切断を必要としない用途に使用される不活性ヌクレアーゼ変異体、及びAAVベクターなどのある特定のベクターでの発現に適切な切断型ヌクレアーゼ変異体が含まれるが、こ

50

れらに限定されない。ある特定のこのような実施形態において、C R I S P Rヌクレアーゼ変異体は、C p f 1ヌクレアーゼ変異体である。

【0062】

ある特定の実施形態において、細胞を、修飾c r R N Aを含有する化合物と接触させることを含む方法には、標的遺伝子を編集した後に、その細胞を第2の化合物と接触させてC R I S P Rシステムを抑制（または遮断）することがさらに含まれる。

【0063】

ある特定の実施形態において、細胞を、修飾c r R N Aを含有する化合物と接触させることを含む遺伝子編集方法は、本発明の修飾c r R N Aの代わりに未修飾c r R N Aを使用する遺伝子編集方法より少ない及び／またはいっそう少ない有害性のオフターゲット効果をもたらす。

10

【0064】

本開示には、以下の番号付けされた実施形態が含まれる。

実施形態1．35～45個の連結ヌクレオシドからなる修飾c r R N Aを含む化合物。

【0065】

実施形態2．修飾c r R N Aを含む化合物であって、前記修飾c r R N AのC R I S P R認識部分が17～20個の連結ヌクレオシドからなる、前記化合物。

【0066】

実施形態3．修飾c r R N Aを含む化合物であって、前記修飾c r R N Aの標的認識部分が18～23個の連結ヌクレオシドからなる、前記化合物。

20

【0067】

実施形態4．修飾c r R N Aを含む化合物であって、前記修飾c r R N Aが少なくとも1個のリンカーヌクレオシドを含む、前記化合物。

【0068】

実施形態5．5' - 安定化修飾c r R N Aを含む化合物。

【0069】

実施形態6．前記化合物が安定化コンジュゲート基を含む、実施形態1～5のいずれかに記載の化合物。

【0070】

実施形態7．前記c r R N Aが安定化修飾を含有する少なくとも1個のリンカーヌクレオシドを含む、実施形態1～5のいずれかに記載の化合物。

30

【0071】

実施形態8．前記修飾c r R N Aが5' - 安定化である、実施形態1～4のいずれかに記載の化合物。

【0072】

実施形態9．前記修飾c r R N Aが3' - 安定化である、実施形態1～8のいずれかに記載の化合物。

【0073】

実施形態10．前記修飾c r R N Aの前記C R I S P R認識部分がC p f 1ヌクレアーゼに結合する、実施形態1～9のいずれかに記載の化合物。

40

【0074】

実施形態11．前記修飾c r R N Aの前記標的認識部分が、標的のD N AまたはR N Aに対する前記c r R N Aの親和性を増加させる少なくとも1つの修飾を含む、実施形態1～10のいずれかに記載の化合物。

【0075】

実施形態12．前記修飾c r R N Aの前記C R I S P R認識部分が、C p f 1ヌクレアーゼに対する前記c r R N Aの親和性を増加させる少なくとも1つの修飾を含む、実施形態10～11のいずれかに記載の化合物。

【0076】

実施形態13．前記修飾c r R N Aの少なくとも1つの核酸塩基がチミンである、実施

50

形態 1 ~ 12 のいずれかに記載の化合物。

【0077】

実施形態 14 . 前記修飾 c r R N A の少なくとも 1 つの核酸塩基が修飾核酸塩基である、実施形態 1 ~ 13 のいずれかに記載の化合物。

【0078】

実施形態 15 . 前記修飾核酸塩基が 5 - メチルシトシンである、実施形態 14 に記載の化合物。

【0079】

実施形態 16 . 前記修飾 c r R N A が 35 ~ 42 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 1 ~ 15 のいずれかに記載の化合物。

【0080】

実施形態 17 . 前記修飾 c r R N A が 36 ~ 40 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 1 ~ 15 のいずれかに記載の化合物。

【0081】

実施形態 18 . 前記修飾 c r R N A が少なくとも 2 個のリンカーヌクレオシドを含む、実施形態 1 ~ 17 のいずれかに記載の化合物。

【0082】

実施形態 19 . 少なくとも 2 個のリンカーヌクレオシドが前記修飾 c r R N A . の前記 C R I S P R 認識部分に連結される、実施形態 18 に記載の化合物。

【0083】

実施形態 20 . 少なくとも 2 個のリンカーヌクレオシドが前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の 5' 末端に連結される、実施形態 19 に記載の化合物。

【0084】

実施形態 21 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が 18 ~ 20 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 1 ~ 20 のいずれかに記載の化合物。

【0085】

実施形態 22 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が 18 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 21 に記載の化合物。

【0086】

実施形態 23 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が 19 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 21 に記載の化合物。

【0087】

実施形態 24 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が 20 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 21 に記載の化合物。

【0088】

実施形態 25 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 18 ~ 22 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 1 ~ 24 のいずれかに記載の化合物。

【0089】

実施形態 26 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 18 ~ 22 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 1 ~ 24 のいずれかに記載の化合物。

【0090】

実施形態 27 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 18 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 26 に記載の化合物。

【0091】

実施形態 28 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 19 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 26 に記載の化合物。

【0092】

実施形態 29 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 20 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 26 に記載の化合物。

【0093】

10

20

30

40

50

実施形態 30 . 前記修飾 c r R N A の少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が、修飾ヌクレオシド間結合である、実施形態 1 ~ 29 のいずれかに記載の化合物。

【 0 0 9 4 】

実施形態 31 . 少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態 30 に記載の化合物。

【 0 0 9 5 】

実施形態 32 . 前記修飾 c r R N A の各ヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、実施形態 30 または 31 に記載の化合物。

【 0 0 9 6 】

実施形態 33 . 少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が、中性のヌクレオシド間結合である、実施形態 30 ~ 32 のいずれかに記載の化合物。

10

【 0 0 9 7 】

実施形態 34 . 少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合がメトキシプロピル基を含む、実施形態 33 に記載の化合物。

【 0 0 9 8 】

実施形態 35 . 少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合がホスホノ酢酸を含む、実施形態 33 に記載の化合物。

【 0 0 9 9 】

実施形態 36 . 少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合がメチルホスホン酸を含む、実施形態 33 に記載の化合物。

20

【 0 1 0 0 】

実施形態 37 . 前記修飾 c r R N A の各ヌクレオシド間結合がホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態 1 ~ 31 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 0 1 】

実施形態 38 . 前記修飾 c r R N A の少なくとも 2 つのヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、実施形態 30、31、または 33 ~ 37 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 0 2 】

実施形態 39 . 前記修飾 c r R N A の少なくとも 2 つの修飾ヌクレオシド間結合が互いに同じである、実施形態 38 に記載の化合物。

30

【 0 1 0 3 】

実施形態 40 . 前記修飾 c r R N A が、前記修飾 c r R N A の 5 ' 末端に 1 ~ 5 個の連続的なホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態 1 ~ 39 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 0 4 】

実施形態 41 . 前記修飾 c r R N A が、前記修飾 c r R N A の 5 ' 末端に 1 個のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態 40 に記載の化合物。

【 0 1 0 5 】

実施形態 42 . 前記修飾 c r R N A が前記修飾 c r R N A の 5 ' 末端に 2 つの連続的なホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態 40 に記載の化合物。

40

【 0 1 0 6 】

実施形態 43 . 前記修飾 c r R N A が、修飾ヌクレオシド間結合によって前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分に連結される、少なくとも 1 個のリンカーヌクレオシドを含む、実施形態 1 ~ 42 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 0 7 】

実施形態 44 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分に、少なくとも 1 個のリンカーヌクレオシドで連結する前記修飾ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態 43 に記載の化合物。

【 0 1 0 8 】

50

実施形態 45 . 前記修飾 c r R N A が 2 個のリンカーヌクレオシドを含む、実施形態 44 に記載の化合物。

【0109】

実施形態 46 . 前記リンカーヌクレオシドが、修飾ヌクレオシド間結合によって互いに連結される、実施形態 45 に記載の化合物。

【0110】

実施形態 47 . 互いに前記リンカーヌクレオシドを連結する前記修飾ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態 46 に記載の化合物。

【0111】

実施形態 48 . 前記修飾 c r R N A が 2 つを超えるリンカーヌクレオシドを含む、実施形態 43 ~ 44 のいずれかに記載の化合物。

10

【0112】

実施形態 49 . 前記修飾 c r R N A が前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内に 1 ~ 6 個の修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態 1 ~ 48 のいずれかに記載の化合物。

【0113】

実施形態 50 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内の前記 1 ~ 6 個の修飾ヌクレオシド間結合が連続的である、実施形態 49 に記載の化合物。

【0114】

実施形態 51 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内の前記 1 ~ 6 個の修飾ヌクレオシド間結合が、未修飾のヌクレオシド間結合と交互に生じる、実施形態 49 に記載の化合物。

20

【0115】

実施形態 52 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 3' 末端が前記 1 ~ 6 個の修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態 49 ~ 51 のいずれかに記載の化合物。

【0116】

実施形態 53 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 1 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態 50 ~ 52 のいずれかに記載の化合物。

【0117】

実施形態 54 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 2 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態 50 ~ 52 のいずれかに記載の化合物。

30

【0118】

実施形態 55 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 3 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態 50 ~ 52 のいずれかに記載の化合物。

【0119】

実施形態 56 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 4 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態 50 ~ 52 のいずれかに記載の化合物。

【0120】

実施形態 57 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 5 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態 50 ~ 52 のいずれかに記載の化合物。

【0121】

実施形態 58 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が 6 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態 50 ~ 52 のいずれかに記載の化合物。

40

【0122】

実施形態 59 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内の少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態 49 ~ 58 のいずれかに記載の化合物。

【0123】

実施形態 60 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分内のすべての前記修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態 49 ~ 58 のいずれかに記載の化合物。

50

【0124】

実施形態61．前記修飾c r R N Aの前記標的認識部分が、前記修飾c r R N Aの前記C R I S P R認識部分の3'末端に直接的または間接的に連結される、実施形態1～60のいずれかに記載の化合物。

【0125】

実施形態62．前記修飾c r R N Aの少なくとも1つのヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態1～61のいずれかに記載の化合物。

【0126】

実施形態63．前記c r R N Aの5'末端ヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態62に記載の化合物。

10

【0127】

実施形態64．前記5'末端ヌクレオシドが直鎖状の修飾糖部分を含む、実施形態63に記載の化合物。

【0128】

実施形態65．前記5'末端のヌクレオシドが2'-修飾糖部分を含む、実施形態64に記載の化合物。

【0129】

実施形態66．前記5'末端ヌクレオシドが二環糖部分を含む、実施形態63に記載の化合物。

【0130】

20

実施形態67．前記5'末端ヌクレオシドが2'-O-メチル、2'-MOE、2'-F、c E t、及びL N Aの中から選択される修飾糖部分を含む、実施形態63に記載の化合物。

【0131】

実施形態68．前記5'末端ヌクレオシドがリンカーヌクレオシドである、実施形態1～67のいずれかに記載の化合物。

【0132】

実施形態69．前記C R I S P R認識部分の5'末端から5番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態62～68のいずれかに記載の化合物。

【0133】

30

実施形態70．前記C R I S P R認識部分の5'末端から6番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態62～69のいずれかに記載の化合物。

【0134】

実施形態71．前記C R I S P R認識部分の5'末端から7番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態62～70のいずれかに記載の化合物。

【0135】

実施形態72．前記C R I S P R認識部分の5'末端から10番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態62～71のいずれかに記載の化合物。

【0136】

実施形態73．前記C R I S P R認識部分の5'末端から14番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態62～72のいずれかに記載の化合物。

40

【0137】

実施形態74．前記C R I S P R認識部分の3'末端から1番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態62～73のいずれかに記載の化合物。

【0138】

実施形態75．少なくとも1つの修飾糖部分が2'-O-メチル、2'-MOE、2'-F、c E t、及びL N Aの中から選択される、実施形態69～74のいずれかに記載の化合物。

【0139】

実施形態76．各修飾糖部分が2'-O-メチル、2'-MOE、2'-F、c E t、

50

及び L N A の中から独立して選択される、実施形態 6 9 ~ 7 4 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 4 0 】

実施形態 7 7 . 前記修飾 c r R N A の 3 ' 末端ヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態 6 2 に記載の化合物。

【 0 1 4 1 】

実施形態 7 8 . 前記 3 ' 末端ヌクレオシドが直鎖状の修飾糖部分を含む、実施形態 7 7 に記載の化合物。

【 0 1 4 2 】

実施形態 7 9 . 前記 3 ' 末端のヌクレオシドが 2 ' - 修飾糖部分を含む、実施形態 7 8 に記載の化合物。

10

【 0 1 4 3 】

実施形態 8 0 . 前記 3 ' 末端ヌクレオシドが二環糖部分を含む、実施形態 7 7 に記載の化合物。

【 0 1 4 4 】

実施形態 8 1 . 前記 3 ' 末端ヌクレオシドが 2 ' - O - メチル、2 ' - M O E、2 ' - F、c E t、及び L N A の中から選択される修飾糖部分を含む、実施形態 7 7 に記載の化合物。

【 0 1 4 5 】

実施形態 8 2 . 前記標的認識部分の 5 ' 末端から 1 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態 6 2 ~ 8 1 のいずれかに記載の化合物。

20

【 0 1 4 6 】

実施形態 8 3 . 前記標的認識部分の 5 ' 末端から 8 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態 6 2 ~ 8 2 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 4 7 】

実施形態 8 4 . 前記標的認識部分の 5 ' 末端から 9 番目のヌクレオシドが修飾糖部分を含む、実施形態 6 2 ~ 8 3 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 4 8 】

実施形態 8 5 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 1 ~ 5 個の 3 ' 末端ヌクレオシドがそれぞれ修飾糖部分を含む、実施形態 6 2 ~ 8 4 のいずれかに記載の化合物。

30

【 0 1 4 9 】

実施形態 8 6 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の 1 ~ 5 個の 3 ' 末端ヌクレオシドがそれぞれ同一の修飾糖部分を含む、実施形態 8 5 に記載の化合物。

【 0 1 5 0 】

実施形態 8 7 . 前記標的認識部分の 1 ~ 5 個の 3 ' 末端ヌクレオシドの前記修飾糖部分が、2 ' - O - メチル、2 ' - M O E、2 ' - F、c E t、及び L N A の中からそれぞれ独立して選択される、実施形態 8 4 または 8 5 に記載の化合物。

【 0 1 5 1 】

実施形態 8 8 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が少なくとも 1 つの未修飾糖部分を含む、実施形態 1 ~ 8 7 のいずれかに記載の化合物。

40

【 0 1 5 2 】

実施形態 8 9 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が少なくとも 1 つの未修飾糖部分を含む、実施形態 1 ~ 8 8 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 5 3 】

実施形態 9 0 . 前記修飾 c r R N A が未修飾糖部分を含む少なくとも 1 つのリンカーヌクレオシドを含む、実施形態 1 ~ 8 9 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 5 4 】

実施形態 9 1 . 前記化合物が、前記修飾 c r R N A から成る、実施形態 1 ~ 9 0 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 5 5 】

50

実施形態 9 2 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の核酸塩基配列が、少なくとも標的の D N A または R N A に対して少なくとも 9 0 % 相補的である、実施形態 1 ~ 9 1 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 5 6 】

実施形態 9 3 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分の前記核酸塩基配列が、標的の D N A または R N A に対して 1 0 0 % 相補的である、実施形態 9 2 に記載の化合物。

【 0 1 5 7 】

実施形態 9 4 . 前記修飾 c r R N A が自己相補的な領域を含む、実施形態 1 ~ 9 3 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 5 8 】

実施形態 9 5 . 前記自己相補的な領域が、前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分内にある、実施形態 9 4 に記載の化合物。

【 0 1 5 9 】

実施形態 9 6 . 前記自己相補的な領域がヘアピンを形成することができる、実施形態 9 4 または 9 5 に記載の化合物。

【 0 1 6 0 】

実施形態 9 7 . 前記自己相補的な領域が、前記自己相補的な領域の安定性を増加させる少なくとも 1 つの修飾を含む、実施形態 9 4 ~ 9 6 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 6 1 】

実施形態 9 8 . 前記自己相補的な領域が、前記自己相補的な領域のハイブリダイゼーション親和性を増加させる少なくとも 1 つの修飾を含む、実施形態 9 4 ~ 9 7 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 6 2 】

実施形態 9 9 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、表 A から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続的な核酸塩基を含む、実施形態 1 ~ 9 8 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 6 3 】

実施形態 1 0 0 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、表 A から選択される配列または配列の部分から成る、実施形態 1 ~ 9 8 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 6 4 】

実施形態 1 0 1 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、配列 X C X A C X を含み、ここで各 X は独立して U 核酸塩基または T 核酸塩基である、実施形態 1 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 6 5 】

実施形態 1 0 2 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、配列 G X A G A X を含み、ここで各 X は独立して U 核酸塩基または T 核酸塩基である、実施形態 1 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 6 6 】

実施形態 1 0 3 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分の前記核酸塩基配列が、前記配列 X C X A C X 及び前記配列 G X A G A X を含み、ここで各 X は独立して U 核酸塩基または T 核酸塩基である、実施形態 1 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 6 7 】

実施形態 1 0 4 . 前記化合物がコンジュゲート基を含む、実施形態 1 ~ 9 0 、または 9 2 ~ 1 0 3 のいずれかに記載の化合物。

【 0 1 6 8 】

実施形態 1 0 5 . 前記コンジュゲート基が G a l N A c を含む、実施形態 1 0 4 に記載の化合物。

【 0 1 6 9 】

実施形態 1 0 6 . 前記コンジュゲート基が親油性である、実施形態 1 0 4 に記載の化合

10

20

30

40

50

物。

【0170】

実施形態107．前記コンジュゲート基が脂質である、実施形態106に記載の化合物。

【0171】

実施形態108．実施形態1～107のいずれかに記載の化合物を含有する、医薬組成物。

【0172】

実施形態109．細胞を、実施形態1～108のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法。

10

【0173】

実施形態110．前記細胞がCpf1ヌクレアーゼを発現する、実施形態109に記載の方法。

【0174】

実施形態111．細胞を、実施形態1～108のいずれかに記載の化合物または組成物及びCpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドと接触させることを含む方法。

【0175】

実施形態112．細胞を、実施形態1～108のいずれかに記載の化合物または組成物及びCpf1ヌクレアーゼをコードするmRNAと接触させることを含む方法。

20

【0176】

実施形態113．前記修飾crRNAが、トランスフェクション試薬のない状態で前記細胞によって取り込まれる、実施形態109～112のいずれかに記載の方法。

【0177】

実施形態114．前記細胞が動物内に存在する、実施形態109～113のいずれかに記載の方法。

【0178】

実施形態115．実施形態1～108のいずれかに記載の化合物または組成物を、動物に投与することを含む方法。

【0179】

実施形態116．前記投与が、皮下である、実施形態115に記載の方法。

30

【0180】

実施形態117．前記投与が、髄腔内である、実施形態115に記載の方法。

【0181】

実施形態118．Cpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドを投与することを含む、実施形態115～117のいずれかに記載の方法。

【0182】

実施形態119．前記動物がCpf1ヌクレアーゼを発現する、実施形態115～117のいずれかに記載の方法。

【0183】

実施形態120．前記プラスミドが、アデノ随伴ウイルス(AAV)を介して前記動物内の細胞に送達される、実施形態111または118に記載の方法。

40

【0184】

実施形態121．前記プラスミドが、レンチウイルスを介して前記動物内の細胞に送達される、実施形態111または118に記載の方法。

【0185】

実施形態122．標的遺伝子が編集される、実施形態109～121のいずれかに記載の方法。

【0186】

実施形態123．前記修飾crRNAは、細胞内で前記標的遺伝子が編集された後に前記細胞内で分解される、実施形態122に記載の方法。

50

【 0 1 8 7 】

実施形態 1 2 4 . 前記 C p f 1 ヌクレアーゼは、前記修飾 c r R N A がいない状態でヌクレアーゼ活性を示さない、実施形態 1 1 0 ~ 1 1 2、または 1 1 8 ~ 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 8 8 】

実施形態 1 2 5 . 前記細胞を、前記修飾 c r R N A または C p f 1 ヌクレアーゼの前記活性または発現を低下または抑制する第 2 の化合物と接触させることを含む、実施形態 1 0 9 ~ 1 2 4 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 8 9 】

実施形態 1 2 6 . 前記細胞を、標的遺伝子を編集した後に前記第 2 の化合物と接触させる、実施形態 1 2 5 に記載の方法。

【 0 1 9 0 】

実施形態 1 2 7 . 前記第 2 の化合物が、前記修飾 c r R N A に相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、実施形態 1 2 5 または 1 2 6 に記載の方法。

【 0 1 9 1 】

実施形態 1 2 8 . 前記第 2 の化合物が、C p f 1 ヌクレアーゼ遺伝子を標的にする c r R N A を含む、実施形態 1 2 5 または 1 2 6 に記載の方法。

【 0 1 9 2 】

実施形態 1 2 9 . 前記第 2 の化合物が、C p f 1 転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、実施形態 1 2 5 または 1 2 6 に記載の方法。

【 0 1 9 3 】

実施形態 1 3 0 . 前記 C p f 1 ヌクレアーゼの発現が抑制される、実施形態 1 2 8 または 1 2 9 に記載の方法。

【 0 1 9 4 】

実施形態 1 3 1 . 前記動物がヒトである、実施形態 1 1 4 ~ 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 5 】

実施形態 1 3 2 . 少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集が、未修飾 c r R N A または 4 5 個を超えるヌクレオチドを含む化合物が前記修飾 c r R N A の代わりに使用される場合の前記少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集と比較して低減される、実施形態 1 0 9 ~ 1 3 1 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 6 】

実施形態 1 3 3 . 前記投与が、硝子体内である、実施形態 1 1 5 または 1 1 8 ~ 1 3 2 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 7 】

実施形態 1 3 4 . 前記細胞が、植物細胞である、実施形態 1 0 9 ~ 1 1 3 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 8 】

実施形態 1 3 5 . 前記細胞が、T 細胞である、実施形態 1 0 9 ~ 1 1 4 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 9 】

実施形態 1 3 6 . 個体の疾患を治療する方法であって、実施形態 1 ~ 1 0 7 のいずれかに記載の化合物または実施形態 1 0 8 に記載の組成物を前記個体に投与することによって前記個体の前記疾患を治療する、前記方法。

【 0 2 0 0 】

実施形態 1 3 7 . 疾患の治療のための、実施形態 1 ~ 1 0 7 のいずれかに記載の化合物または実施形態 1 0 8 に記載の組成物の使用。

【 0 2 0 1 】

実施形態 1 3 8 . 薬物の調合のための、実施形態 1 ~ 1 0 7 のいずれかに記載の化合物または実施形態 1 0 8 に記載の組成物の使用。

10

20

30

40

50

【0202】

実施形態139．実施形態1～107のいずれかに記載の化合物または実施形態108に記載の組成物を動物に投与し、そしてヒトへの移植のために前記動物から器官を回収する方法。

【0203】

実施形態140．前記5'末端ヌクレオシドがcEt修飾糖部分を含む、実施形態90～107のいずれかに記載の化合物。

【0204】

実施形態141．前記修飾crRNAの前記標的認識部分の3'末端が2つの連続的なホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態140に記載の化合物。

10

【0205】

実施形態142．前記修飾crRNAの前記CRISPR認識部分の各ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートである、実施形態140～141のいずれかに記載の化合物。

【0206】

実施形態143．前記修飾crRNAの前記標的認識部分の2つの3'末端ヌクレオシドが、それぞれ2'-O-メチル修飾糖部分を含む、実施形態140～142のいずれかに記載の化合物。

【0207】

実施形態144．前記CRISPR認識部分の5'末端から1番目のヌクレオシドが未修飾糖部分を含む、実施形態140～143のいずれかに記載の化合物。

20

【0208】

実施形態145．前記修飾crRNAが30～38個の未修飾糖部分を含む、実施形態140～144のいずれかに記載の化合物。

【0209】

実施形態146．前記修飾crRNAが36個の未修飾糖部分を含む、実施形態145に記載の化合物。

【0210】

実施形態147．実施形態140～146のいずれかに記載の化合物を含む医薬組成物。

30

【0211】

実施形態148．細胞を、実施形態140～147のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法。

【0212】

実施形態149．前記細胞がCpf1ヌクレアーゼを発現する、実施形態148に記載の方法。

【0213】

実施形態150．細胞を、実施形態140～147のいずれかに記載の化合物または組成物及びCpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドと接触させることを含む方法。

【0214】

実施形態151．細胞を、実施形態140～147のいずれかに記載の化合物または組成物及びCpf1ヌクレアーゼをコードするmRNAと接触させることを含む方法。

40

【0215】

実施形態152．前記修飾crRNAが、トランスフェクション試薬のない状態で前記細胞によって取り込まれる、実施形態148～151のいずれかに記載の方法。

【0216】

実施形態153．前記細胞が動物内に存在する、実施形態148～152のいずれかに記載の方法。

【0217】

実施形態154．実施形態140～147のいずれかに記載の化合物または組成物を動

50

物に投与することを含む方法。

【0218】

実施形態155．前記投与が、皮下である、実施形態154に記載の方法。

【0219】

実施形態156．前記投与が、髄腔内である、実施形態154に記載の方法。

【0220】

実施形態157．Cpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドを投与することを含む、実施形態154～156のいずれかに記載の方法。

【0221】

実施形態158．前記動物がCpf1ヌクレアーゼを発現する、実施形態154～156のいずれかに記載の方法。 10

【0222】

実施形態159．前記プラスミドが、アデノ随伴ウイルス(AAV)を介して前記動物内の細胞に送達される、実施形態150または157に記載の方法。

【0223】

実施形態160．前記プラスミドが、レンチウイルスを介して前記動物内の細胞に送達される、実施形態150または157に記載の方法。

【0224】

実施形態161．標的遺伝子が編集される、実施形態148～160のいずれかに記載の方法。 20

【0225】

実施形態162．前記修飾crRNAは、細胞内で前記標的遺伝子が編集された後に前記細胞内で分解される、実施形態161に記載の方法。

【0226】

実施形態163．前記Cpf1ヌクレアーゼが、前記修飾crRNAがない状態でヌクレアーゼ活性を示さない、実施形態149～151または157～162のいずれかに記載の方法。

【0227】

実施形態164．前記細胞を、前記修飾crRNAまたはCpf1ヌクレアーゼの前記活性または発現を低下または抑制する第2の化合物と接触させることを含む、実施形態148～163のいずれかに記載の方法。 30

【0228】

実施形態165．前記細胞を、標的遺伝子を編集した後に前記第2の化合物と接触させる、実施形態164に記載の方法。

【0229】

実施形態166．前記第2の化合物が、前記修飾crRNAに相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、実施形態164または165に記載の方法。

【0230】

実施形態167．前記第2の化合物が、Cpf1ヌクレアーゼ遺伝子を標的にするcrRNAを含む、実施形態164または165に記載の方法。 40

【0231】

実施形態168．前記第2の化合物が、Cpf1転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、実施形態164または165に記載の方法。

【0232】

実施形態169．前記Cpf1ヌクレアーゼの発現が抑制される、実施形態167または168に記載の方法。

【0233】

実施形態170．前記動物がヒトである、実施形態153～169のいずれかに記載の方法。

【0234】

実施形態 171 . 少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集が、未修飾 c r R N A または 45 個を超えるヌクレオシドを含む化合物が前記修飾 c r R N A の代わりに使用される場合の前記少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集と比較して低減される、実施形態 148 ~ 170 のいずれかに記載の方法。

【0235】

実施形態 172 . 前記投与が、硝子体内である、実施形態 154 または 157 ~ 171 のいずれかに記載の方法。

【0236】

実施形態 173 . 前記細胞が、植物細胞である、実施形態 148 ~ 152 のいずれかに記載の方法。

10

【0237】

実施形態 174 . 前記細胞が、T細胞である、実施形態 148 ~ 153 のいずれかに記載の方法。

【0238】

実施形態 175 . 個体の疾患を治療する方法であって、実施形態 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物または実施形態 147 に記載の組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【0239】

実施形態 176 . 個体の疾患を治療する方法であって、実施形態 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物または実施形態 147 に記載の組成物を前記個体に投与することによって、前記個体の前記疾患を治療することを含む、前記方法。

20

【0240】

実施形態 177 . 疾患を治療するための実施形態 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物または実施形態 147 に記載の組成物の使用。

【0241】

実施形態 178 . 薬剤の調合のための、実施形態 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物または実施形態 147 に記載の組成物の使用。

【0242】

実施形態 179 . 実施形態 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物または実施形態 147 に記載の組成物を動物に投与し、そしてヒトへの移植のために前記動物から器官を回収する方法。

30

【0243】

実施形態 180 . 前記修飾 c r R N A の少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドが 2' - デオキシヌクレオシドである、実施形態 91 ~ 107 または 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物。

【0244】

実施形態 181 . 前記修飾 c r R N A の少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドが 2' - H 置換を有する直鎖状の修飾糖部分を含む、実施形態 91 ~ 107 または 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物。

【0245】

実施形態 182 . 前記修飾 c r R N A の少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドが、天然の DNA に見いだされるような修飾 2' - H (H) 糖部分を有する、実施形態 91 ~ 107 または 140 ~ 146 のいずれかに記載の化合物。

40

【0246】

実施形態 183 . 前記修飾 c r R N A が 40 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 91 ~ 107、140 ~ 146 または 180 ~ 182 のいずれかに記載の化合物。

【0247】

実施形態 184 . 前記修飾 c r R N A が 43 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 91 ~ 107、140 ~ 146 または 180 ~ 182 のいずれかに記載の化合物。

【0248】

50

実施形態 185 . 前記修飾 c r R N A が 4 5 個の連結ヌクレオシドから成る、実施形態 9 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6 または 1 8 0 ~ 1 8 2 のいずれかに記載の化合物。

【 0 2 4 9 】

実施形態 186 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が、D N M T 1 核酸に対して少なくとも 9 0 % 相補的である、実施形態 9 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6 または 1 8 0 ~ 1 8 5 のいずれかに記載の化合物。

【 0 2 5 0 】

実施形態 187 . 前記標的認識部分が、D N M T 1 核酸に対して 1 0 0 % 相補的である、実施形態 186 に記載の化合物。

【 0 2 5 1 】

実施形態 188 . 前記 D N M T 1 核酸が、デオキシリボ核酸である、実施形態 186 または 187 に記載の化合物。

【 0 2 5 2 】

実施形態 189 . 前記 D N M T 1 核酸が、ヒトのデオキシリボ核酸である、実施形態 188 に記載の化合物。

【 0 2 5 3 】

実施形態 190 . 前記修飾 c r R N A の前記標的認識部分が、L D L R 核酸に対して少なくとも 9 0 % 相補的である、実施形態 9 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6 または 1 8 0 ~ 1 8 5 のいずれかに記載の化合物。

【 0 2 5 4 】

実施形態 191 . 前記標的認識部分が、L D L R 核酸に対して 1 0 0 % 相補的である、実施形態 190 に記載の化合物。前記 L D L R 核酸が、デオキシリボ核酸である、実施形態 190 または 191 に記載の化合物。

【 0 2 5 5 】

実施形態 192 . 前記 L D L R 核酸が、ヒトのデオキシリボ核酸である、実施形態 191 に記載の化合物。

【 0 2 5 6 】

実施形態 193 . 前記修飾 c r R N A の 2 つの 3 ' 末端ヌクレオシドが、独立して選択された修飾糖部分を含む、実施形態 9 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6 または 1 8 0 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の化合物。

【 0 2 5 7 】

実施形態 194 前記修飾 c r R N A の 3 つの 3 ' 末端ヌクレオシドが、独立して選択された修飾糖部分を含む、実施形態 9 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6 または 1 8 0 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の化合物。

【 0 2 5 8 】

実施形態 195 . 前記修飾 c r R N A の 4 つの 3 ' 末端ヌクレオシドが、独立して選択された修飾糖部分を含む、実施形態 9 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6 または 1 8 0 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の化合物。

【 0 2 5 9 】

実施形態 196 . 前記修飾 c r R N A の 5 つの 3 ' 末端ヌクレオシドが、独立して選択された修飾糖部分を含む、実施形態 9 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6 または 1 8 0 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の化合物。

【 0 2 6 0 】

実施形態 197 . 前記 3 ' 末端修飾ヌクレオシドの前記修飾糖部分が 2 ' - H (H)、2 ' - O - メチル、2 ' - F、c E t、及び L N A 修飾糖部分の中から選択される、実施形態 77 または 193 ~ 196 のいずれかに記載の化合物。

【 0 2 6 1 】

実施形態 198 . 前記 3 ' 末端修飾ヌクレオシドの前記修飾糖部分が 2 ' - H (H)、2 ' - O - メチル、及び c E t 修飾糖部分の中から選択される、実施形態 197 に記載の化合物。

10

20

30

40

50

【0262】

実施形態199．前記3'末端修飾ヌクレオシドの前記修飾糖部分が2'-H(H)及び2'-O-メチル修飾糖部分の中から選択される、実施形態197に記載の化合物。

【0263】

実施形態200．前記3'末端修飾ヌクレオシドの前記修飾糖部分がcEt及びLNA修飾糖部分の中から選択される、実施形態197に記載の化合物。

【0264】

実施形態201．前記標的認識部分の5'末端から1番目のヌクレオシドが2'-H(H)または2'-F修飾糖部分を含む、実施形態82~107、140~146、または180~200のいずれかに記載の化合物。

10

【0265】

実施形態202．前記標的認識部分の5'末端から8番目のヌクレオシドが2'-H(H)または2'-F修飾糖部分を含む、実施形態82~107、140~146、または180~201のいずれかに記載の化合物。

【0266】

実施形態203．前記標的認識部分の5'末端から9番目のヌクレオシドが2'-H(H)または2'-F修飾糖部分を含む、実施形態82~107、140~146、または180~202のいずれかに記載の化合物。

【0267】

実施形態204．実施形態91~107、140~146、または180~203のいずれかに記載の化合物であって、前記修飾crRNAが以下の特徴の少なくとも3つを含む、前記化合物：

20

a．前記修飾crRNAの前記CRISPR認識部分の5'末端に連結される2つのリンカーヌクレオシド；

b．独立して2'-Fまたは2'-H(H)修飾糖部分を含む、前記修飾crRNAの前記標的認識部分の5'末端から1番目、8番目、及び/または9番目のヌクレオシド；

c．前記修飾crRNAの3'及び5'末端のそれぞれにおける少なくとも1つの末端ホスホロチオエートヌクレオシド間結合

d．未修飾糖部分を含む、前記CRISPR認識部分の各ヌクレオシド

30

e．独立して選択される修飾糖部分を含む、前記修飾crRNAの1~5個の3'末端ヌクレオシド。

【0268】

実施形態205．前記修飾crRNAが塩である、実施形態1~107、140~146、または180~204のいずれかに記載の化合物。

【0269】

実施形態206．実施形態180~205のいずれかに記載の化合物を含む、医薬組成物。

【0270】

実施形態207．前記医薬組成物がリボ核タンパク質複合体を含む、実施形態108、147、または206のいずれかに記載の医薬組成物。

40

【0271】

実施形態208．前記リボ核タンパク質複合体が、Cpf1ヌクレアーゼ及び前記修飾crRNAを含む前記化合物を含む、実施形態207に記載の医薬組成物。

【0272】

実施形態209．細胞を、実施形態180~208のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法。

【0273】

実施形態210．細胞を、実施形態180~207のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法であって、ここで前記細胞はCpf1ヌクレアーゼを発

50

現する、前記方法。

【0274】

実施形態211．細胞を、実施形態180～207のいずれかに記載の化合物または組成物及びCpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドと接触させることを含む方法。

【0275】

実施形態212．細胞を、実施形態180～207のいずれかに記載の化合物または組成物及びCpf1ヌクレアーゼをコードするmRNAと接触させることを含む方法。

【0276】

実施形態213．前記修飾crRNAが、トランスフェクション試薬のない状態で前記細胞によって取り込まれる、実施形態209～212のいずれかに記載の方法。

【0277】

実施形態214．前記細胞が動物内に存在する、実施形態209～213のいずれかに記載の方法。

【0278】

実施形態215．実施形態180～208のいずれかに記載の化合物または組成物を、動物に投与することを含む方法。

【0279】

実施形態216．前記投与が、皮下である、実施形態215に記載の方法。

【0280】

実施形態217．前記投与が、髄腔内である、実施形態215に記載の方法。

【0281】

実施形態218．Cpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドを投与することを含む、実施形態215～217のいずれかに記載の方法。

【0282】

実施形態219．前記動物がCpf1ヌクレアーゼを発現する、実施形態215～217のいずれかに記載の方法。

【0283】

実施形態220．前記プラスミドが、アデノ随伴ウイルス(AAV)を介して前記動物内の細胞に送達される、実施形態211または218に記載の方法。

【0284】

実施形態221．前記プラスミドが、レンチウイルスを介して前記動物内の細胞に送達される、実施形態211または218に記載の方法。

【0285】

実施形態222．標的遺伝子が編集される、実施形態209～221のいずれかに記載の方法。

【0286】

実施形態223．前記修飾crRNAは、細胞内で前記標的遺伝子が編集された後に前記細胞内で分解される、実施形態222に記載の方法。

【0287】

実施形態224．前記Cpf1ヌクレアーゼは、前記修飾crRNAがない状態でヌクレアーゼ活性を示さない、実施形態210～212、または215～223のいずれかに記載の方法。

【0288】

実施形態225．前記細胞を、前記修飾crRNAまたはCpf1ヌクレアーゼの前記活性または発現を低下または抑制する第2の化合物と接触させることを含む、実施形態209～224のいずれかに記載の方法。

【0289】

実施形態226．前記細胞を、標的遺伝子を編集した後に前記第2の化合物と接触させる、実施形態225に記載の方法。

【0290】

10

20

30

40

50

実施形態 227 . 前記第 2 の化合物が、前記修飾 c r R N A に相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、実施形態 225 または 226 に記載の方法。

【0291】

実施形態 228 . 前記第 2 の化合物が、C p f 1 ヌクレアーゼ遺伝子を標的にする c r R N A を含む、実施形態 225 または 226 に記載の方法。

【0292】

実施形態 229 . 前記第 2 の化合物が、C p f 1 転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、実施形態 225 または 226 に記載の方法。

【0293】

実施形態 230 . 前記 C p f 1 ヌクレアーゼの発現が抑制される、実施形態 228 または 229 に記載の方法。

10

【0294】

実施形態 231 . 前記動物がヒトである、実施形態 214 ~ 230 のいずれかに記載の方法。

【0295】

実施形態 232 . 少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集が、未修飾 c r R N A または 45 個を超えるヌクレオシドを含む化合物が前記修飾 c r R N A の代わりに使用される場合の前記少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集と比較して低減される、実施形態 209 ~ 231 のいずれかに記載の方法。

【0296】

20

実施形態 233 . 前記投与が、硝子体内である、実施形態 215 または 218 ~ 232 のいずれかに記載の方法。

【0297】

実施形態 234 . 前記細胞が、植物細胞である、実施形態 209 ~ 213 のいずれかに記載の方法。

【0298】

実施形態 235 . 前記細胞が、T 細胞である、実施形態 209 ~ 214 のいずれかに記載の方法。

【0299】

実施形態 236 . 個体の疾患を治療する方法であって、実施形態 180 ~ 205 のいずれかに記載の化合物または実施形態 206 ~ 208 のいずれかに記載の組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

30

【0300】

実施形態 237 . 個体の疾患を治療する方法であって、実施形態 180 ~ 205 のいずれかに記載の化合物または実施形態 206 ~ 208 のいずれかに記載の組成物を前記個体に投与することによって前記個体の前記疾患を治療することを含む、前記方法。

【0301】

実施形態 238 . 疾患を治療するための、実施形態 180 ~ 205 のいずれかに記載の化合物または実施形態 206 ~ 208 のいずれかに記載の組成物の使用。

【0302】

40

実施形態 239 . 薬物の調合のための、実施形態 180 ~ 205 のいずれかに記載の化合物または実施形態 206 ~ 208 のいずれかに記載の組成物の使用。

【0303】

実施形態 240 . 実施形態 180 ~ 205 のいずれかに記載の化合物または実施形態 206 ~ 208 のいずれかに記載の組成物を動物に投与し、そしてヒトへの移植のために前記動物から器官を回収する方法。

【0304】

実施形態 241 . 前記修飾 c r R N A の前記 C R I S P R 認識部分が少なくとも 1 つの未修飾糖部分を含む、実施形態 1 ~ 107、140 ~ 146、または 180 ~ 205 のいずれかに記載の化合物。

50

【0305】

実施形態242．前記CRISPR認識部分の少なくとも1つの修飾糖部分が直鎖状の修飾糖部分である、実施形態241に記載の化合物。

【0306】

実施形態243．前記CRISPR認識部分の少なくとも1つの修飾糖部分が二環糖部分である、実施形態241に記載の化合物。

【0307】

実施形態244．前記二環糖部分がcEtまたはLNAである、実施形態243に記載の化合物。

【0308】

実施形態245．前記二環糖部分がcEtである、実施形態243に記載の化合物。

【0309】

実施形態246．前記CRISPR認識部分の3'末端から2番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0310】

実施形態247．前記CRISPR認識部分の3'末端から3番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0311】

実施形態248．前記CRISPR認識部分の3'末端から4番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0312】

実施形態249．前記CRISPR認識部分の3'末端から5番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0313】

実施形態250．前記CRISPR認識部分の3'末端から6番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0314】

実施形態251．前記CRISPR認識部分の3'末端から7番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0315】

実施形態252．前記CRISPR認識部分の3'末端から8番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0316】

実施形態253．前記CRISPR認識部分の3'末端から9番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0317】

実施形態254．前記CRISPR認識部分の3'末端から11番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0318】

実施形態255．前記CRISPR認識部分の3'末端から12番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0319】

実施形態256．前記CRISPR認識部分の3'末端から13番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0320】

実施形態257．前記CRISPR認識部分の3'-末端から18番目のヌクレオシドが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項241～245のいずれかに記載の化合物。

【0321】

実施形態258．前記CRISPR認識部分の3'末端から11番目及び12番目のヌ

10

20

30

40

50

クレオシドが、それぞれ修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 5 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 2 2】

実施形態 2 5 9 . 前記 C R I S P R 認識部分の 3 ' 末端から 1 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 5 8 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 2 3】

実施形態 2 6 0 . 前記 C R I S P R 認識部分の 3 ' 末端から 1 0 番目のヌクレオシドが未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 5 9 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 2 4】

実施形態 2 6 1 . 前記 C R I S P R 認識部分の 3 ' 末端から 1 4 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 0 のいずれかに記載の化合物。 10

【0 3 2 5】

実施形態 2 6 2 . 前記 C R I S P R 認識部分の 3 ' 末端から 1 5 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 1 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 2 6】

実施形態 2 6 3 . 前記 C R I S P R 認識部分の 3 ' 末端から 1 6 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 2 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 2 7】

実施形態 2 6 4 . 前記 C R I S P R 認識部分の 3 ' 末端から 1 7 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 3 のいずれかに記載の化合物。 20

【0 3 2 8】

実施形態 2 6 5 . 前記 C R I S P R 認識部分の 5 ' 末端から 1 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 4 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 2 9】

実施形態 2 6 6 . 前記 C R I S P R 認識部分の 5 ' 末端から 2 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 5 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 3 0】

実施形態 2 6 7 . 前記 C R I S P R 認識部分の 5 ' 末端から 3 番目のヌクレオシドが、未修飾糖部分を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 6 6 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 3 1】

実施形態 2 6 8 . 前記標的認識部分の 5 ' 末端から 1 4 番目のヌクレオシドが、修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6、1 8 0 ~ 2 0 5 または 2 4 1 ~ 2 6 7 のいずれかに記載の化合物。 30

【0 3 3 2】

実施形態 2 6 9 . 前記標的認識部分の 5 ' 末端から 1 5 番目のヌクレオシドが、修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6、1 8 0 ~ 2 0 5 または 2 4 1 ~ 2 6 8 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 3 3】

実施形態 2 7 0 . 前記標的認識部分の 5 ' 末端から 1 6 番目のヌクレオシドが、修飾糖部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 7、1 4 0 ~ 1 4 6、1 8 0 ~ 2 0 5 または 2 4 1 ~ 2 6 9 のいずれかに記載の化合物。 40

【0 3 3 4】

実施形態 2 7 1 . 前記標的認識部分の 5 ' 末端から 1 4、1 5、及び / または 1 6 の位置の各修飾糖部分が、直鎖状の修飾糖部分である、請求項 2 6 8 ~ 2 7 0 のいずれかに記載の化合物。

【0 3 3 5】

実施形態 2 7 2 . 前記標的認識部分の 5 ' 末端から 1 4、1 5、及び / または 1 6 の位置の各修飾糖部分が、2 ' - H (H) 及び 2 ' - F 修飾糖部分から独立して選択される、請求項 2 7 1 に記載の化合物。

【0 3 3 6】

実施形態 273 . 前記標的認識部分の 5' 末端から 14、15、及び / または 16 の位置の各修飾糖部分が、2'-H(H) 修飾糖部分である、請求項 272 に記載の化合物。

【0337】

実施形態 274 . 請求項 1 ~ 107、140 ~ 146、180 ~ 205、または 241 ~ 273 のいずれかに記載の化合物であって、前記修飾 crRNA が以下の特徴の少なくとも 3 つを含む、前記化合物：

(a) 前記修飾 crRNA の前記 CRISPR 認識部分の 5' 末端に連結される 2 つのリンカーヌクレオシド；

(b) 独立して 2'-F または 2'-H(H) 修飾糖部分を含有する、前記修飾 crRNA の前記標的認識部分の 5' 末端から 1 番目、8 番目、及び / または 9 番目のヌクレオシド；

(c) 前記修飾 crRNA の 3' 及び 5' 末端のそれぞれにおける少なくとも 1 つの末端ホスホロチオエートヌクレオシド間結合

(d) 修飾糖部分を含む、前記 CRISPR 認識部分の 3' 末端から 5、6、7、8、11、または 12 の位置の少なくとも 1 つのヌクレオシド

(e) 独立して選択される修飾糖部分を含む、前記修飾 crRNA の 1 ~ 5 個の 3' 末端ヌクレオシド。

【0338】

実施形態 275 . 前記修飾 crRNA が特徴 (a)、(c)、及び (e) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【0339】

実施形態 276 . 前記修飾 crRNA が特徴 (a)、(c)、及び (d) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【0340】

実施形態 277 . 前記修飾 crRNA が特徴 (a)、(b)、及び (c) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【0341】

実施形態 278 . 前記修飾 crRNA が特徴 (a)、(b)、(c) 及び (e) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【0342】

実施形態 279 . 前記修飾 crRNA が特徴 (a)、(c)、(d) 及び (e) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【0343】

実施形態 280 . 前記修飾 crRNA が特徴 (a)、(b)、(c)、(d)、及び (e) を含む、請求項 274 に記載の化合物。

【0344】

実施形態 281 . 請求項 241 ~ 280 のいずれかに記載の化合物を含む、医薬組成物。

【0345】

実施形態 282 . 前記医薬組成物が、リボ核タンパク質複合体を含む、請求項 281 に記載の医薬組成物。

【0346】

実施形態 283 . 前記リボ核タンパク質複合体が、Cpf1ヌクレアーゼ及び前記修飾 crRNA を含有する前記化合物を含む、請求項 282 に記載の医薬組成物。

【0347】

実施形態 284 . 細胞を、請求項 241 ~ 283 のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させることを含む方法。

【0348】

実施形態 285 . 細胞を請求項 241 ~ 283 のいずれかに記載の化合物または組成物と接触させる方法であって、ここで前記細胞は Cpf1ヌクレアーゼを発現する、前記方

10

20

30

40

50

法。

【0349】

実施形態286．細胞を、請求項241～283のいずれかに記載の化合物または組成物及びCpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドと接触させることを含む方法。

【0350】

実施形態287．細胞を、請求項241～283のいずれかに記載の化合物または組成物及びCpf1ヌクレアーゼをコードするmRNAと接触させることを含む方法。

【0351】

実施形態288．前記修飾crRNAが、トランスフェクション試薬のない状態で前記細胞によって取り込まれる、請求項284～287のいずれかに記載の方法。

10

【0352】

実施形態289．前記細胞が動物内に存在する、請求項284～288のいずれかに記載の方法。

【0353】

実施形態290．請求項241～283のいずれかに記載の化合物または組成物を、動物に投与することを含む方法。

【0354】

実施形態291．前記投与が、皮下である、請求項290に記載の方法。

【0355】

実施形態292．前記投与が、髄腔内である、請求項290に記載の方法。

20

【0356】

実施形態293．Cpf1ヌクレアーゼをコードするプラスミドを投与することを含む、請求項290～292のいずれかに記載の方法。

【0357】

実施形態294．前記動物がCpf1ヌクレアーゼを発現する、請求項290～292のいずれかに記載の方法。

【0358】

実施形態295．前記プラスミドが、アデノ随伴ウイルス(AAV)を介して前記動物内の細胞に送達される、請求項286または293に記載の方法。

【0359】

実施形態296．前記プラスミドが、レンチウイルスを介して前記動物内の細胞に送達される、請求項286または293に記載の方法。

30

【0360】

実施形態297．標的遺伝子が編集される、請求項284～296のいずれかに記載の方法。

【0361】

実施形態298．前記修飾crRNAは、細胞内で前記標的遺伝子が編集された後に前記細胞内で分解される、請求項297に記載の方法。

【0362】

実施形態299．前記Cpf1ヌクレアーゼが前記修飾crRNAのない状態でヌクレアーゼ活性を示さない、請求項285～287、または293～298のいずれかに記載の方法。

40

【0363】

実施形態300．前記細胞を、前記修飾crRNAまたはCpf1ヌクレアーゼの前記活性または発現を低下または抑制する第2の化合物と接触させることを含む、請求項284～299のいずれかに記載の方法。

【0364】

実施形態301．前記細胞を、標的遺伝子を編集した後に前記第2の化合物と接触させる、請求項300に記載の方法。

【0365】

50

実施形態 302 . 前記第 2 の化合物が、前記修飾 c r R N A に相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、請求項 300 または 301 に記載の方法。

【0366】

実施形態 303 . 前記第 2 の化合物が、C p f 1 ヌクレアーゼ遺伝子を標的にする c r R N A を含む、請求項 300 または 301 に記載の方法。

【0367】

実施形態 304 . 前記第 2 の化合物が、C p f 1 転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項 300 または 301 に記載の方法。

【0368】

実施形態 305 . 前記 C p f 1 ヌクレアーゼの発現が抑制される、請求項 303 または 304 に記載の方法。

10

【0369】

実施形態 306 . 前記動物がヒトである、請求項 289 ~ 305 のいずれかに記載の方法。

【0370】

実施形態 307 . 少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集が、未修飾 c r R N A または 45 個を超えるヌクレオシドを含む化合物が前記修飾 c r R N A の代わりに使用される場合の、前記少なくとも 1 つのオフターゲット遺伝子の編集と比較して低減される、請求項 284 ~ 306 のいずれかに記載の方法。

【0371】

20

実施形態 308 . 前記投与が、硝子体内である、請求項 290 または 293 ~ 297 のいずれかに記載の方法。

【0372】

実施形態 309 . 前記細胞が、植物細胞である、請求項 284 ~ 288 のいずれかに記載の方法。

【0373】

実施形態 310 . 前記細胞が、T 細胞である、請求項 284 ~ 289 のいずれかに記載の方法。

【0374】

実施形態 311 . 個体の疾患を治療する方法であって、請求項 241 ~ 280 のいずれかに記載の化合物または請求項 281 ~ 283 のいずれかに記載の組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

30

【0375】

実施形態 312 . 個体の疾患を治療する方法であって、請求項 241 ~ 280 のいずれかに記載の化合物または請求項 281 ~ 283 のいずれかに記載の組成物を前記個体に投与することによって前記個体の前記疾患を治療することを含む、前記方法。

【0376】

実施形態 313 . 疾患を治療するための、請求項 241 ~ 280 のいずれかに記載の化合物または請求項 281 ~ 283 のいずれかに記載の組成物の使用。

【0377】

40

実施形態 314 . 薬物の調合のための、請求項 241 ~ 280 のいずれかに記載の化合物または請求項 281 ~ 283 のいずれかに記載の組成物の使用。

【0378】

実施形態 315 . 請求項 241 ~ 280 のいずれかに記載の化合物または請求項 281 ~ 283 のいずれかに記載の組成物を動物に投与し、そしてヒトへの移植のために前記動物から器官を回収する方法。

【0379】

実施形態 316 . リボソームまたは脂質ナノ粒子を含む、実施形態 108、147、206、または 281 のいずれかに記載の医薬組成物。

【0380】

50

実施形態 317. Cp f 1ヌクレアーゼをコードする mRNA を含む、実施形態 108、147、206、281、または 316 のいずれかに記載の医薬組成物

【0381】

実施形態 318. 前記修飾 cr RNA 及び Cp f 1ヌクレアーゼをコードする前記 mRNA を含む前記化合物が、リボソームまたは脂質ナノ粒子の中に含まれる、実施形態 317 に記載の医薬組成物

【0382】

実施形態 319. 前記 Cp f 1ヌクレアーゼをコードする前記 mRNA 及び前記修飾 cr RNA を含む前記化合物が、リボソームまたは脂質ナノ粒子の中に含まれる、実施形態 212 ~ 214、151 ~ 153、212 ~ 214 または 287 ~ 289 のいずれかに記載の方法

10

【0383】

実施形態 320. 個体の疾患を治療する方法であって、実施形態 316 ~ 318 のいずれかに記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法

【0384】

実施形態 321. 個体の疾患を治療する方法であって、実施形態 316 ~ 318 のいずれかに記載の医薬組成物を前記個体に投与することによって前記個体の前記疾患を治療することを含む、前記方法

【0385】

A. ある特定の修飾ヌクレオシド

20

本発明のある特定の化合物には修飾ヌクレオシドが組み込まれる。別段の定めがない限り、以下の修飾ヌクレオシドは cr RNA として使用するための修飾オリゴヌクレオチドに、このように組み込まれるのに適しているが、限定されない。ある特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドを含む。そのような修飾ヌクレオシドには、修飾糖部分もしくは修飾核酸塩基または修飾糖部分及び修飾核酸塩基の両方が含まれる。

【0386】

1. ある特定の糖部分

ある特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチド、例えば修飾 cr RNA には、修飾糖部分を含有する 1 つ以上の修飾ヌクレオシドが含まれる。1 つ以上の糖修飾ヌクレオシドを含有する、そのような修飾オリゴヌクレオチドは、そのような糖修飾ヌクレオシドを欠いているオリゴヌクレオチドと比べて、増強したヌクレアーゼ安定性または標的核酸との増大した結合親和性などの所望の特性を有し得る。ある特定の実施形態において、修飾糖部分は直鎖状の修飾糖部分である。ある特定の実施形態において、修飾糖部分は二環または三環糖部分である。ある特定の実施形態において、修飾糖部分は、糖代替物である。そのような糖代替物は、1 つ以上の置換をそれらの対応する置換糖部分に有し得る。

30

【0387】

ある特定の実施形態において、修飾糖部分は、2' 及び / または 5' 位に置換基を含むが、これらに限定されない 1 つ以上の非環式置換基を有するフラノシル環を含む直鎖状修飾糖部分である。修飾 cr RNA に使用するための直鎖状修飾糖部分に適した 2' - 置換基には、2' - H、2' - F、2' - OCH₃ (「OMe」または「O - メチル」)、及び 2' - O(CH₂)₂OCH₃ (「MOE」) が含まれるが、これらに限定されない。そのような直鎖状修飾糖部分の 2' - 置換基は、未修飾糖部分に存在する 2' - OH 基に取って代わる。ある特定の実施形態において、2' - 置換基は、ハロ、アリル、アミノ、アジド、SH、CN、OCN、CF₃、OCF₃、O - C₁ ~ C₁₀ アルコキシ、O - C₁ ~ C₁₀ 置換アルコキシ、O - C₁ ~ C₁₀ アルキル、O - C₁ ~ C₁₀ 置換アルキル、S - アルキル、N(R_m) - アルキル、O - アルケニル、S - アルケニル、N(R_m) - アルケニル、O - アルケニル、S - アルケニル、N(R_m) - アルケニル、O - アルキレニル (alkylenyl) - O - アルキル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O - アルカリル、O - アラルキル、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂ON(R_m)

40

50

) (R_n) または OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n) の中から選択され、式中各 R_m 及び R_n は、独立して H、アミノ保護基、または未置換 C₁ ~ C₁₀ アルキルである。ある特定の実施形態のこれらの 2' - 置換基は、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ (NO₂)、チオール、チオアルコキシ、チオアルキル、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルの中から独立して選択される 1 つ以上の置換基でさらに置換され得る。直鎖状の修飾糖部分に対して適切な 5' - 置換基の例には、5' - メチル (R または S)、5' - ビニル、及び 5' - メトキシが含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、直鎖状の修飾糖部分は、2 つ以上の非架橋糖置換、例えば 2' - F - 5' - メチル糖部分を含む (例えばさらなる 2' , 5' - ビス置換糖部分及びヌクレオシドについて、国際公開特許第 2008 / 101157 号を参照されたい)。

10

【0388】

ある特定の実施形態において、2' - 置換ヌクレオシドまたは 2' - 直鎖状糖部分は H、F、NH₂、N₃、OCF₃、OCH₃、O(CH₂)₃NH₂、CH₂CH=CH₂、OCH₂CH=CH₂、OCH₂CH₂OCH₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n)、O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂、及び N-置換アセトアミド (OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n)) から選択される直鎖状 2' - 置換基を含有する糖部分を含み、式中各 R_m 及び R_n は、独立して H、アミノ保護基、または C₁ ~ C₁₀ アルキルである。

20

【0389】

ある特定の実施形態において、2' - 置換ヌクレオシドまたは 2' - 直鎖状修飾ヌクレオシドは H、F、OCF₃、OCH₃、OCH₂CH₂OCH₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂、O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂、及び OCH₂C(=O)-N(H)CH₃ (「NMA」) から選択される直鎖状 2' - 置換基を含有する糖部分を含む。

【0390】

ある特定の実施形態において、2' - 置換ヌクレオシドまたは 2' - 直鎖状修飾ヌクレオシドは H、F、OCH₃、及び OCH₂CH₂OCH₃ から選択される直鎖状 2' - 置換基を含有する糖部分を含む。

30

【0391】

直鎖状修飾糖部分などの修飾糖部分を含むヌクレオシドは、そのヌクレオシドの糖部分における置換 (複数可) の位置 (複数可) により参照される。例えば、2' - 置換または 2 - 修飾糖部分を含有するヌクレオシドは、2' - 置換ヌクレオシドまたは 2 - 修飾ヌクレオシドのように称される。

【0392】

ある特定の修飾糖部分は、第 2 の環を形成して二環糖部分をもたらす架橋糖置換基を含む。ある特定のそのような実施形態において、二環糖部分は、4' フラノース環原子と 2' フラノース環原子との間に橋を含む。そのような 4' と 2' を架橋する糖置換には、4' - CH₂ - 2'、4' - (CH₂)₂ - 2'、4' - (CH₂)₃ - 2'、4' - CH₂ - O - 2' (「LNA」)、4' - CH₂ - S - 2'、4' - (CH₂)₂ - O - 2' (「ENA」)、4' - CH(CH₃) - O - 2' (S 配置の場合に「拘束エチル」または「cEt」と称される)、4' - CH₂ - O - CH₂ - 2'、4' - CH₂ - N(R) - 2'、4' - CH(CH₂OCH₃) - O - 2' (「拘束 MOE」または「cMOE」) 及びその類似体 (例えば、米国特許第 7,399,845 号を参照)、4' - C(CH₃)(CH₃) - O - 2' 及びその類似体 (例えば、WO2009/006478 を参照)、4' - CH₂ - N(OCH₃) - 2' 及びその類似体 (例えば、WO2008/150729 を参照)、4' - CH₂ - O - N(CH₃) - 2' (例えば、US2004/0171570 を参照)、4' - CH₂ - C(H)(CH₃) - 2' (例えば、Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118 - 134 を参照)、4' - CH₂ - C(=CH₂) - 2' 及びその類似体 (公開 PCT 国

40

50

際出願 WO 2008 / 154401 を参照)、 $4' - C(R_a R_b) - N(R) - O - 2'$ 、 $4' - C(R_a R_b) - O - N(R) - 2'$ 、 $4' - CH_2 - O - N(R) - 2'$ 、及び $4' - CH_2 - N(R) - O - 2'$ (式中各 R、 R_a 、及び R_b は、独立して H、保護基、または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルである (例えば、米国特許第 7,427,672 号を参照)) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0393】

ある特定の実施形態において、このような $4'$ と $2'$ の架橋は $- [C(R_a)(R_b)]_n -$ 、 $- [C(R_a)(R_b)]_n - O -$ 、 $- C(R_a) = C(R_b) -$ 、 $- C(R_a) = N -$ 、 $- C(=NR_a) -$ 、 $- C(=O) -$ 、 $- C(=S) -$ 、 $- O -$ 、 $- Si(R_a)_2 -$ 、 $- S(=O)_x -$ 、及び $- N(R_a) -$ から独立して選択される 1 ~ 4 個の結合基を独立して含み、

式中、

x は、0、1、または 2 であり、

n は、1、2、3、または 4 であり、

各 R_a 及び R_b は、独立して H、保護基、ヒドロキシル、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、置換 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、複素環基、置換複素環基、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、 $C_5 \sim C_7$ 脂環基、置換 $C_5 \sim C_7$ 脂環基、ハロゲン、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、アシル ($C(=O) - H$)、置換アシル、 CN 、スルホニル ($S(=O)_2 - J_1$)、またはスルホニル ($S(=O) - J_1$)、ならびに

各 J_1 及び J_2 は、独立して H、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、置換 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、アシル ($C(=O) - H$)、置換アシル、複素環基、置換複素環基、 $C_1 \sim C_{12}$ アミノアルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アミノアルキル、または保護基である。

【0394】

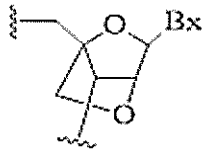
さらなる二糖部分には、例えば、Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443、Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740、Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456、Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630、Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638、Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222、Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039、Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2001, 123, 8362-8379、Elayadi et al., Curr. Opin. Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561、Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7、Orum et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243、米国特許第 7,053,207 号、同第 6,268,490 号、同第 6,770,748 号、同第 6,794,499 号、同第 7,034,133 号、同第 6,525,191 号、同第 6,670,461 号、及び同第 7,399,845 号、WO 2004 / 106356、WO 1994 / 14226、WO 2005 / 021570、及び WO 2007 / 134181、米国特許公開番号 US 2004 / 0171570、US 2007 / 0287831、及び US 2008 / 0039618、米国特許出願シリアル番号第 12 / 129,154 号、同第 60 / 989,574 号、同第 61 / 026,995 号、同第 61 / 026,998 号、同第 61 / 056,564 号、同第 61 / 086,231 号、同第 61 / 097,787 号、及び同第 61 / 099,844 号、ならびに PCT 国際出願番号 P

CT/US2008/064591、PCT/US2008/066154、及びPCT/US2008/068922が当分野で知られる。

【0395】

ある特定の実施形態において、二環糖部分及びそのような二環糖部分を組み込むヌクレオシドは、異性体配置によってさらに定義される。例えば、LNAヌクレオシド（上記の）は、 β -L配置または β -D配置であっても良い。

【化1】



LNA (β -D 配置)

架橋 = 4'-CH₂-O-2'



α -L-LNA (α -L 配置)

架橋 = 4'-CH₂-O-2'

10

β -L-メチレンオキシ (4' - CH₂ - O - 2') または β -L-LNA 二環ヌクレオシドはオリゴヌクレオチドに組み込まれている (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365 - 6372)。本明細書では、二環ヌクレオシドの一般的な描写に両方の異性体配置が含まれる。特定の二環ヌクレオシド（例えばLNAまたはcEt）の位置が本明細書の例示的な実施形態で特定される場合、別様に明記されない限り、それらは β -D配置である。

20

【0396】

ある特定の実施形態において、修飾糖部分は1つ以上の非架橋糖置換及び1つ以上の架橋糖置換（例えば5'-置換及び4'-2'架橋糖）を含む。（例えばLNAヌクレオシドがさらに例えば、5'-メチルまたは5'-ビニル基で置換されるWO2007/134181を参照、及び例えば米国特許第7,547,684号、同第7,750,131号、同第8,030,467号、同第8,268,980号、同第7,666,854号及び同第8,088,746号を参照）。

【0397】

ある特定の実施形態において、修飾糖部分は、糖代替物である。ある特定のこのような実施形態において、糖部分の酸素原子は、例えば硫黄、炭素または窒素原子で置換される。ある特定のこのような実施形態において、このような修飾糖部分は、上記のように架橋及び/または非架橋置換も含む。例えば、ある特定の糖代替物には、4'-硫黄原子ならびに2'位（例えばUS2005/0130923を参照）及び/または5'位に置換が含まれる。

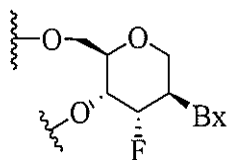
30

【0398】

ある特定の実施形態において、糖代替物は5原子以外を有する環を含む。例えば、ある特定の実施形態において、糖代替物は6員のテトラヒドロピラン（「THP」）を含む。このようなテトラヒドロピランは、さらに修飾または置換され得る。このような修飾テトラヒドロピランを含有するヌクレオシドには、限定されないが、ヘキシトール核酸（「HNA」）、アニトール核酸（「ANA」）、マニトール核酸（「MNA」）(Leumann, C.J. Bioorg. & Med. Chem. 2002, 10, 841 - 854)、フルオロHNA:

40

【化 2】

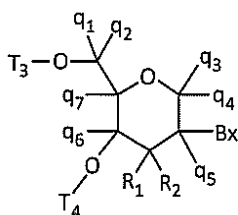


F-HNA

(「F-HNA」、F-HNAはF-THPまたは3'-フルオロテトラヒドロピランとしても称され、例えば米国特許第8,088,904号、同第8,440,803号、及び同第8,796,437号を参照されたい)、及びさらに修飾された以下の式を有するTHP化合物を含有するヌクレオシドが含まれ、

10

【化 3】



20

式中、上記の修飾THPヌクレオシドのそれぞれについて、独立してBxは核酸塩基部分であり、

T₃及びT₄は、それぞれ独立して、修飾THPヌクレオシドをオリゴヌクレオチドの残部に結合するヌクレオシド間結合基であり、またはT₃及びT₄の一方は、修飾THPヌクレオシドをオリゴヌクレオチドの残部に結合するヌクレオシド間結合基であり、ならびにT₃及びT₄の他方は、H、ヒドロキシル保護基、結合コンジュゲート基、または5'もしくは3'末端基であり、

q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇はそれぞれ、独立してH、C₁～C₆アルキル、置換C₁～C₆アルキル、C₂～C₆アルケニル、置換C₂～C₆アルケニル、C₂～C₆アルキニル、または置換C₂～C₆アルキニルであり、及び

30

R₁及びR₂は水素、ハロゲン、置換または非置換のアルコキシ、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、OC(=X)J₁、OC(=X)NJ₁J₂、NJ₃C(=X)NJ₁J₂、及びCNの中から独立して選択され、式中XはO、SまたはNJ₁、ならびにJ₁、J₂、及びJ₃は、独立してHまたはC₁～C₆アルキルである。

【0399】

ある特定の実施形態において、修飾THPヌクレオシドが提供され、ここでq₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇はそれぞれHである。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのq₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇はそれぞれH以外である。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのq₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇はメチルである。ある特定の実施形態において、修飾THPヌクレオシドが提供され、ここでR₁及びR₂の1つはFである。ある特定の実施形態において、R₁はFであり、かつR₂はHであり、ある特定の実施形態において、R₁はメトキシであり、かつR₂はHであり、ならびにある特定の実施形態において、R₁はメトキシエトキシであり、かつR₂はHである。

40

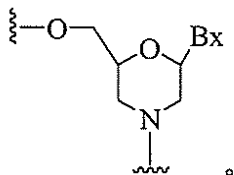
【0400】

ある特定の実施形態において、糖代替物は5を超える原子及び2つ以上のヘテロ原子を有する環を含む。例えば、モルホリノ糖部分を含有するヌクレオシド及びオリゴヌクレオチドにおけるそれらの使用が報告されている(例えば、Braasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510ならびに米国特許第5

50

、698、685号、同第5、166、315号、同第5、185、444号、及び同第5、034、506号を参照)。本明細書で使用する場合、用語「モルホリノ」は以下の構造を有する糖代替物を意味する。

【化4】



10

特定の実施形態において、例えば、上記モルホリノ構造の様々な置換基を付加するか変更することによって、モルホリノが修飾されていてもよい。このような糖代替物は、本明細書において「修飾モルホリノ」と称される。

【0401】

ある特定の実施形態において、糖代替物是非環式部分を含む。そのような非環式糖代替物を含むヌクレオシド及びオリゴヌクレオチドの例には、ペプチド核酸(「PNA」)、非環式ブチル核酸(例えばKumar et al., Org. Biomol. Chem., 2013, 11, 5853-5865を参照)、及びWO2011/133876に記載されるヌクレオシド及びオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0402】

多くの他の二環糖及び三環糖ならびに糖代替物の環構造が当技術分野で知られており、これらは修飾ヌクレオシドに使用することができる(例えばLeumann, J. C. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854を参照)。

【0403】

2. ある特定の修飾核酸塩基

ある特定の実施形態において、修飾crRNAなどの修飾オリゴヌクレオチドは、未修飾核酸塩基を含む1つ以上のヌクレオシドを含む。ある特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、修飾核酸塩基を含む1つ以上のヌクレオシドを含む。ある特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは脱塩基ヌクレオシドと称される核酸塩基を含まない、1つ以上の核酸塩基を含む。

30

【0404】

ある特定の実施形態において、修飾核酸塩基は5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、アルキルまたはアルキニル置換ピリミジン、アルキル置換プリン、ならびにN-2、N-6及びO-6置換プリンから選択される。ある特定の実施形態において、修飾核酸塩基は2-アミノプロピルアデニン、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-N-メチルグアニン、6-N-メチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-プロピニル(-C≡C-CH₃)ウラシル、5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-リボシルウラシル(プソイドウラシル(pseudouracil))、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、8-アザ及び他の8-置換プリン、5-ハロ、とりわけ5-プロモ、5-トリフルオロメチル、5-ハロウラシル、及び5-ハロシトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン、3-デアザアデニン、6-N-ベンゾイルアデニン、2-N-イソブチリルグアニン、4-N-ベンゾイルシトシン、4-N-ベンゾイルウラシル、5-メチル4-N-ベンゾイルシトシン、5-メチル4-N-ベンゾイルウラシル、ユニバーサル塩基、疎水性塩基、無差別な塩基(promiscuous base)、サイズ拡張塩基(size-expanded base)

40

50

）、及びフッ素化塩基から選択される。さらに修飾核酸塩基には、三環ピリミジン、例えば 1, 3 - ジアザフェノキサジン - 2 - オン、1, 3 - ジアザフェノチアジン - 2 - オン及び 9 - (2 - アミノエトキシ) - 1, 3 - ジアザフェノキサジン - 2 - オン (G - クランプ) が含まれる。修飾核酸塩基にはまた、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環、例えば 7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジン及び 2 - ピリドンで置換されたものも含まれ得る。さらに核酸塩基には米国特許第 3, 687, 808 号に開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Kroschwitz, J. I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858 - 859、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613、Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273 - 288 に開示されるもの、ならびに Antisense Drug Technology, Crooke S. T., Ed., CRC Press, 2008, 163 - 166 及び 442 - 443 の Chapter 6 及び 15 で開示されるものが含まれる。

10

【0405】

上記の修飾核酸塩基ならびに他の修飾核酸塩基のある特定の調製を教示する代表的な米国特許には、US 2003/0158403、U. S. 3, 687, 808、4, 845, 205、5, 130, 302、5, 134, 066、5, 175, 273、5, 367, 066、5, 432, 272、5, 434, 257、5, 457, 187、5, 459, 255、5, 484, 908、5, 502, 177、5, 525, 711、5, 552, 540、5, 587, 469、5, 594, 121、5, 596, 091、5, 614, 617、5, 645, 985、5, 681, 941、5, 750, 692、5, 763, 588、5, 830, 653 及び 6, 005, 096 が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0406】

B. ある特定の修飾ヌクレオシド間結合

ある特定の実施形態において、修飾 crRNA などの修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオシドは任意のヌクレオシド間結合を用いて共に結合され得る。ヌクレオシド間結合基の 2 つの主な分類は、リン原子の存在または不在によって定義される。代表的なリンを含有するヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル結合 (「P = O」) (未修飾または天然の結合とも称される)、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホロアミダート、及びホスホロチオエート (「P = S」)、及びホスホロジチオエート (「HS - P = S」) を含むリン酸が含まれるが、これらに限定されない。代表的な非リン酸を含有するヌクレオシド間結合基には、メチレンメチルイミノ (-CH₂ - N(CH₃) - O - CH₂ -)、チオジエステル (-O - C(=O) - S -)、チオノカルバメート (-O - C(=O) (NH) - S -)、シロキサン (-O - SiH₂ - O -)、及び N, N' - ジメチルヒドラジン (-CH₂ - N(CH₃) - N(CH₃) -) が含まれるが、これらに限定されない。天然のリン酸結合と比較して、修飾ヌクレオシド間結合は、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を変える (通常は増加させる) ために使用され得る。ある特定の実施形態において、キラル原子を有するヌクレオシド間結合は、ラセミ混合物として、または別個の鏡像異性体として調製され得る。代表的なキラルなヌクレオシド間結合には、アルキルホスホネート及びホスホロチオエートが含まれるが、これらに限定されない。リン含有及び非リン含有ヌクレオシド間結合の調製方法は、当業者に周知である。

30

40

【0407】

中性のヌクレオシド間結合には、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、MMI (3' - CH₂ - N(CH₃) - O - 5')、アミド - 3 (3' - CH₂ - C(=O) - N(H) - 5')、アミド - 4 (3' - CH₂ - N(H) - C(=O) - 5')、ホルムア

50

セタール (3' - O - CH₂ - O - 5')、メトキシプロピル、及びチオホルムアセタール (3' - S - CH₂ - O - 5') が含まれるが限定されない。さらに中性なヌクレオシド間結合には、シロキサン (ジアルキルシロキサン)、カルボン酸エステル、カルボキサミド、スルフィド、スルホン酸エステル及びアミド (例えば、Carbohydrate Modifications in Antisense Research、Y. S. Sanghvi and P. D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580、Chapters 3 and 4、40 - 65 を参照) を含む、非イオン性結合が含まれる。さらに中性のヌクレオシド間結合には、入り混じった N、O、S 及び CH₂ 成分部分を含有する非イオン性結合が含まれる。

【0408】

10

C. ある特定のコンジュゲート基及び末端基

ある特定の実施形態において、crRNA として使用するためのオリゴヌクレオチドには、コンジュゲート基及び/または末端基がさらに含まれる。ある特定の実施形態において、crRNA として使用するためのオリゴヌクレオチドを含有する化合物には、コンジュゲート基または末端基がさらに含まれる。ある特定のこのような実施形態において、オリゴヌクレオチドは1つ以上のコンジュゲート基に共有結合する。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は薬力学的特性、薬物動態学的特性、安定特性、結合特性、吸収特性、細胞分布特性、細胞取り込み特性、電荷特性及びクリアランス特性を含むが、これらに限定されない、結合オリゴヌクレオチドの1つ以上の特性を修飾する。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は、結合オリゴヌクレオチドに新たな特性、例えばオリゴヌクレオチドの検出を可能にする蛍光色素基またはレポーター基を付与する。コンジュゲート基及び/または末端基は、上記の任意の修飾またはモチーフを有するオリゴヌクレオチドに付加しても良い。

20

【0409】

コンジュゲート基には、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、糖、ビタミン部分、ポリエチレングリコール、チオエーテル、ポリエーテル、コレステロール、チオコレステロール、コール酸部分、葉酸、脂質、リン脂質、ピオチン、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、アダマンタン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、蛍光色素、及び色素が含まれるが、これらに限定されない。前述したある特定のコンジュゲート基は、例えば、コレステロール部分 (Lettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553 - 6556)、コリン酸 (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053 - 1060)、チオエーテル、例えばヘキシル - S - トリチルチオール (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306 - 309、Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765 - 2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533 - 538)、脂肪族鎖、例えばド - デカン - ジオール) またはウンデシル残基 (Saison - Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111 - 1118、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327 - 330、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49 - 54)、リン脂質、例えばジ - ヘキサデシル - rac - グリセロールまたはトリエチル - アンモニウム 1, 2 - ジ - O - ヘキサデシル - rac - グリセロ - 3 - H - ホスホネート (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651 - 3654、Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777 - 3783)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969 - 973)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651 - 3654)、パルミチ

30

40

50

ル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、オクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)、トコフェロール基 (Nishina et al., Molecular Therapy Nucleic Acids, 2015, 4, e220; doi:10.1038/mtna.2014.72 及び Nishina et al., Molecular Therapy, 2008, 16, 734-740)、または GalNAc クラスター (例えば WO2014/179620) である。

【0410】

ある特定の実施形態において、コンジュゲート基には、有効な製剤原料、例えばアスピリン、ワーファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン (fen-bufen)、ケトプロフェン、(S)-(+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5 - トリヨード安息香酸、フィンゴリモド、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジジン、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメタシン (indomethacin)、パルビツレート、セファロスポリン、サルファ薬、糖尿病治療薬、抗菌薬、または抗生物質が含まれる。

【0411】

コンジュゲート基は、crRNA オリゴヌクレオチドなどの親化合物に直接的に、または任意選択でコンジュゲートリンカーを介して結合する。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基はオリゴヌクレオチドに直接結合する。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基はコンジュゲートリンカーを介してオリゴヌクレオチドに間接的に結合する。ある特定の実施形態において、コンジュゲートリンカーは、ヒドロカルビル鎖、またはエチレングリコールもしくはアミノ酸単位などの繰り返し単位のオリゴマーなどの鎖構造を含む。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は切断可能な部分を含む。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は切断可能な部分を介してオリゴヌクレオチドに結合する。ある特定の実施形態において、コンジュゲートリンカーは切断可能な部分を含む。ある特定のこのような実施形態において、コンジュゲートリンカーは切断可能な部分を介してオリゴヌクレオチドに結合する。

【0412】

ある特定の実施形態において、コンジュゲートリンカーは、アルキル、アミノ、オキソ、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル、及びヒドロキシルアミノから選択される1つ以上の基を含む。ある特定のこのような実施形態において、コンジュゲートリンカーは、アルキル、アミノ、オキソ、アミド及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定の実施形態において、コンジュゲートリンカーは、アルキル及びアミド基から選択される基を含む。ある特定の実施形態において、コンジュゲートリンカーは、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定の実施形態において、コンジュゲートリンカーは、少なくとも1つのリン部分を含む。ある特定の実施形態において、コンジュゲートリンカーは、少なくとも1つのリン酸基を含む。ある特定の実施形態において、コンジュゲートリンカーは、少なくとも1つの中性結合基を含む。

【0413】

ある特定の実施形態において、上記のコンジュゲートリンカーを含有するコンジュゲートリンカーは、二官能性の結合部分、例えば本明細書で提供される crRNA オリゴヌクレオチドなど、親化合物への結合コンジュゲート基として有用であることが当分野で知られているものである。一般に、二官能性結合部分には少なくとも2つの官能基が含まれる。官能基のうち1つは、親化合物の特定の部位に結合するために選択され、他方はコンジュゲート基に結合するために選択される。二官能性結合部分に使用される官能基の例には、求核性基と反応するための求電子基及び求電子基と反応するための求核性基が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、二官能性結合部分にはアミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、アルキル、アルケニル、及びアルキニルから選

10

20

30

40

50

択される 1 つ以上の基が含まれる。

【0414】

コンジュゲートリンカーの例には、ピロリジン、8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタノ酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (SMCC) 及び 6 - アミノヘキサン酸 (AHEX または AHA) が含まれるが、これらに限定されない。他のコンジュゲートリンカーには、限定されないが、置換もしくは未置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、置換もしくは未置換の $C_2 \sim C_{10}$ アルケニルまたは置換もしくは未置換の $C_2 \sim C_{10}$ アルキニルが含まれ、ここで好ましい置換基の非限定的な一覧には、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルが含まれる。

10

【0415】

ある特定の実施形態において、切断可能な部分は、切断可能な結合である。ある特定の実施形態において、切断可能な部分は、切断可能な結合を含む。ある特定の実施形態において、切断可能な部分は、少なくとも 1 つの切断可能な結合を含有する原子団である。ある特定の実施形態において、切断可能な部分は、1 個、2 個、3 個、4 個、または 4 個以上の切断可能な結合を有する原子団を含む。ある特定の実施形態において、切断可能な部分は、リソソームなどの細胞内部または細胞内区画で選択的に切断される。ある特定の実施形態において、切断可能部分はヌクレアーゼなどの内因性酵素によって選択的に切断される。

20

【0416】

ある特定の実施形態において、切断可能な結合は、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、一方または両方のホスホジエステル結合、リン酸エステル結合、カルバメート結合、またはジスルフィド結合の中から選択される。ある特定の実施形態において、切断可能な結合は、一方または両方のホスホジエステルのエステルである。ある特定の実施形態において、切断可能な部分は、リン酸またはホスホジエステルを含む。ある特定の実施形態において、切断可能な部分はオリゴヌクレオチドとコンジュゲートリンカーまたはコンジュゲート基の間のリン酸結合である。

【0417】

コンジュゲート基はオリゴヌクレオチドの末端及び / または任意の内側の部位の一方または両方に結合し得る。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオシドの 2' 位に結合する。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの一方または両方の末端に結合するコンジュゲート基は、末端基である。ある特定のこのような実施形態において、コンジュゲート基または末端基は、オリゴヌクレオチドの 3' 及び / または 5' 末端に結合する。ある特定のこのような実施形態において、コンジュゲート基 (または末端基) は、オリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合する。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基はオリゴヌクレオチドの 3' 末端付近に結合する。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基 (または末端基) はオリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合する。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基はオリゴヌクレオチドの 5' 末端付近に結合する。

30

40

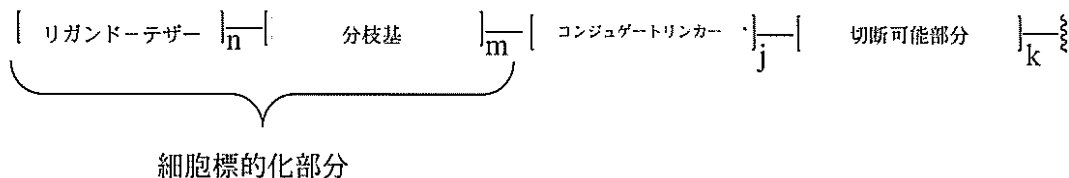
【0418】

末端基の例にはコンジュゲート基、キャッピング基、リン酸部分、保護基、修飾または未修飾のヌクレオシド、及び独立して修飾または未修飾である 2 つ以上のヌクレオシドが含まれるが、これらに限定されない。

【0419】

ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は細胞標的化部分である。ある特定の実施形態において、コンジュゲート基、任意選択のコンジュゲートリンカー、及び任意選択の切断可能部分は、以下の一般式を有し：

【化 5】



式中、 n は 1 ~ 約 3 であり、 n が 1 の場合 m は 0、 n が 2 以上の場合 m は 1、 j は 1 または 0、及び k は 1 または 0 である。

【0420】

ある特定の実施形態において、 n は 1、 j は 1 及び k は 0 である。ある特定の実施形態において、 n は 1、 j は 0 及び k は 1 である。ある特定の実施形態において、 n は 1、 j は 1 及び k は 1 である。ある特定の実施形態において、 n は 2、 j は 1、及び k は 0 である。ある特定の実施形態において、 n は 2、 j は 0、及び k は 1 である。ある特定の実施形態において、 n は 2、 j は 1、及び k は 1 である。ある特定の実施形態において、 n は 3、 j は 1、及び k は 0 である。ある特定の実施形態において、 n は 3、 j は 0、及び k は 1 である。ある特定の実施形態において、 n は 3、 j は 1、及び k は 1 である。

【0421】

ある特定の実施形態において、コンジュゲート基は少なくとも 1 つのテザーリガンドを有する細胞標的化部分を含む。ある特定の実施形態において、細胞標的化部分は、分枝基に共有結合する 2 つのテザーリガンドを含む。ある特定の実施形態において、細胞標的化部分は分枝基に共有結合する 3 つのテザーリガンドを含む。

【0422】

ある特定の実施形態において、細胞標的化部分は、アルキル、アミノ、オキソ、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル、及びヒドロキシアミノ基から選択される 1 つ以上の基を含有する分枝基を含む。ある特定の実施形態において、分枝基はアルキル、アミノ、オキソ、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル及びヒドロキシアルアミノ基から選択される基を含有する分枝の脂肪族基を含む。ある特定のこのような実施形態において、分枝の脂肪族基はアルキル、アミノ、オキソ、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定のこのような実施形態において、分枝の脂肪族基は、アルキル、アミノ、及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定のこのような実施形態において、分枝の脂肪族基は、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定の実施形態において、分枝基は、単環式または多環式環系を含む。

【0423】

ある特定の実施形態において、細胞標的化部分の各テザーは、任意の組み合わせで、アルキル、置換アルキル、エーテル、チオエーテル、ジスルフィド、アミノ、オキソ、アミド、ホスホジエステル及びポリエチレングリコール基から選択される 1 個以上の基を含む。ある特定の実施形態において、各テザーは、任意の組み合わせで、アルキル、エーテル、チオエーテル、ジスルフィド、アミノ、オキソ、アミド、及びポリエチレングリコールから選択される 1 個以上の基を含む直線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、任意の組み合わせで、アルキル、ホスホジエステル、エーテル、アミノ、オキソ及びアミドから選択される 1 個以上の基を含む直線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、任意の組み合わせで、アルキル、エーテル、アミノ、オキソ、及びアミドから選択される 1 個以上の基を含む直線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、任意の組み合わせで、アルキル、アミノ、及びオキソから選択される 1 個以上の基を含む直線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、任意の組み合わせで、アルキル及びオキソから選択される 1 個以上の基を含む直線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、任意の組み合わせで、アルキル及びホスホジエステルから選択される 1 個以上の基を含む直線状脂肪族基である。

ある。ある特定の実施形態において、各テザーは、少なくとも1個のリン結合基または中性結合基を含む。ある特定の実施形態において、各テザーは、約6～約20原子長の鎖を含む。ある特定の実施形態において、各テザーは、約10～約18原子長の鎖を含む。ある特定の実施形態において、各テザーは約10原子の鎖長を含む。

【0424】

ある特定の実施形態において、細胞標的化部分の各リガンドは、標的細胞上の少なくとも1つの受容体型に親和性を有する。ある特定の実施形態において、各リガンドは哺乳動物の肝臓細胞の表面上の少なくとも1つの受容体型に親和性を有する。ある特定の実施形態において、各リガンドは、肝臓のアシアロ糖タンパク質受容体(ASGP-R)に親和性を有する。ある特定の実施形態において、各リガンドは、糖である。ある特定の実施形態において、各リガンドはガラクトース、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、マンノース、グルコース、グルコサミン及びフコースから独立して選択される。ある特定の実施形態において、各リガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)である。ある特定の実施形態において、細胞標的化部分は、3つのGalNAcリガンドを含む。ある特定の実施形態において、細胞標的化部分は、2つのGalNAcリガンドを含む。ある特定の実施形態において、細胞標的化部分は、1つのGalNAcリガンドを含む。

【0425】

ある特定の医薬組成物

ある特定の実施形態において、本発明は1つ以上のcrRNAを含有する医薬組成物を提供する。ある特定の実施形態において、そのような医薬組成物はtracrRNAを含む。ある特定の実施形態において、医薬組成物にはCRISPRヌクレアーゼを発現する手段が含まれる。ある特定の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼを発現する手段は、プラスミドまたはウイルスベクターである。ある特定のこのような実施形態において、医薬組成物には適切な薬学的に許容される希釈剤または担体が含まれる。ある特定の実施形態において医薬組成物には修飾crRNAが含まれる。ある特定のこのような実施形態において、修飾crRNAはリボ核タンパク質の粒子または複合体(RNP)である。ある特定のこのような実施形態において、RNPにはヌクレアーゼも含まれる。ある特定のこのような実施形態において、ヌクレアーゼはCpf1ヌクレアーゼである。ある特定の実施形態において医薬組成物にはリボソームまたは脂質ナノ粒子が含まれる。ある特定のこのような実施形態において、リボソームまたは脂質ナノ粒子には修飾crRNAが含まれる。ある特定のこのような実施形態において、リボソームまたは脂質ナノ粒子にはCpf1ヌクレアーゼをコードするmRNAが含まれる。ある特定の実施形態において、医薬組成物は、滅菌生理食塩溶液及び1個以上のアンチセンス化合物を含む。ある特定の実施形態において、そのような医薬組成物は、滅菌生理食塩溶液及び1個以上のアンチセンス化合物からなる。ある特定の実施形態において、滅菌生理食塩水は、医薬品グレードの生理食塩水である。ある特定の実施形態において、医薬組成物は、1個以上のアンチセンス化合物及び滅菌水を含む。ある特定の実施形態において、医薬組成物は、1個のアンチセンス化合物及び滅菌水からなる。ある特定の実施形態において、滅菌水は医薬品グレードの水である。ある特定の実施形態において、医薬組成物は、1個以上のアンチセンス化合物及びリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含む。ある特定の実施形態において、医薬組成物は、1個以上のアンチセンス化合物及び滅菌PBSからなる。ある特定の実施形態において、滅菌PBSは医薬品グレードのPBSである。

【0426】

[参照による非限定的な開示及び組み込み]

明細書に記載されるある特定の化合物、組成物、及び方法が特定の実施形態に従って具体的に記載されているが、以下の実施例は、本明細書に記載される化合物を例証する役割のみを果たし、それを限定するようには意図されていない。本出願に列挙される参考文献、GenBank受入番号等の各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0427】

10

20

30

40

50

本出願に添付される配列表が必要に応じて各配列を「RNA」または「DNA」のいずれか一方と特定するが、実際には、それらの配列は、任意の組み合わせの化学修飾で修飾され得る。当業者であれば、修飾オリゴヌクレオチドを説明するための「RNA」または「DNA」のそのような指定が、ある特定の事例において、任意であることを容易に認識する。例えば、2'-OH糖部分及びチミン塩基を含むヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドは、修飾糖を有するDNA（DNAの天然2'-Hに対して2'-OH）または修飾塩基を有するRNA（RNAの天然ウラシルに対して、チミン（メチル化ウラシル））と記載され得る。

【0428】

したがって、配列表中のものを含むが、これらに限定されない本明細書に提供される核酸配列は、修飾核酸塩基を有するそのような核酸を含むが、これらに限定されない天然または修飾RNA及び/またはDNAの任意の組み合わせを含有する核酸を包含するよう意図される。さらなる例として限定するものではないが、核酸塩基配列「ATCGATCG」を有するオリゴマー化合物は、修飾または未修飾に関わらず、配列「AUCGAUCG」を有するようなRNA塩基を含有するそのような化合物、及び「AUCGATCG」など一部のDNA塩基と一部のRNA塩基を有するもの、及び「AT^mCGAUCG」など他の修飾塩基または天然の塩基を有するオリゴマー化合物を含有するが、これらに限定されないそのような核酸塩基配列を有する任意のオリゴマー化合物を包含し、ここで^mCは、5位にメチル基を含有するシトシン塩基を示す。

【実施例】

【0429】

実施例

以下の実施例は、本発明のある特定の実施形態を例示し、限定するものではない。さらに、特定の実施形態が提供される場合、本発明者らは、それらの特定の実施形態の一般的適用を企図している。例えば、特定のモチーフを有するオリゴヌクレオチドの開示は、そのモチーフまたは同様のモチーフを有するさらなるオリゴヌクレオチドへの合理的な支持を提供する。同様に、例えば、特定の高親和性修飾が特定の位置に出現する場合、同一の位置での他の高親和性修飾は、別途示されない限り、好適であると見なされる。

【0430】

実施例1：切断crRNAの遺伝子編集作用

DNA（シトシン5）-メチルトランスフェラーゼ1（DNMT1）に相補的である標的認識部分を含む切断crRNAを設計かつ合成して、DNMT1の遺伝子編集におけるその作用を試験した。HEK293T細胞はCpf1をコードするプラスミド及び下表に列挙されるcrRNAをコードする2本鎖gblock（IDT, Coralville, Iowa）でトランスフェクションした。48時間後、ゲノムDNAを細胞から単離し、製造業者の指示に従ってSURVEYORアッセイ（Integrated DNA Technologies）を使用した。DNMT1遺伝子のcrRNA標的部位を増幅させるために使用されたPCRプライマーは、順方向：5'-CTGGGACTCAGGC GGGTCAAC-3'（配列番号1）及び逆方向：5'-CCTCACACAACAGCTTCAATGTCAGC-3'（配列番号2）であった。CellI切断後、DNAをゲルで泳動した。DNMT1の遺伝子編集は、DNMT1内の非相同末端結合（NHEJ）の程度を測定することにより評価した。ゲルのバンドの定量化は、Image Jソフトウェアを用いて行い、NHEJ発生率は以下の式を用いて算出した。NHEJ（%）= $100 \times (1 - (\text{標的遺伝子の画分切り取り})^{0.5})$ 、式中の標的遺伝子の画分切り取りは、切り取った標的遺伝子の断片（複数可）を、切り取った遺伝子断片（複数可）とインタクトな遺伝子断片（複数可）の全ての蛍光シグナルで割ることによって決定される。各切断型crRNAに対するNHEJ発生率は、陽性対照である完全長crRNA002のNHEJ発生率に対して標準化され、そしてその標準化した値を遺伝子破壊率と称した。下表に示す結果は、複数の切断型crRNAが標的遺伝子を編集したことを示す。項目「n.d.」は、ゲルに検出可能な切断バンドがないためにデータがないことを示す。

【表 1 - 4】

表 1

DNMT 1 を標的化する c r R N A

| 名称 | | 配列 (5' →3') | 長さ | 標準化した遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|-------------|---------|--|----|-----------------|------|
| 002 | 1090808 | UAAUUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGU</u> <u>CUGUUACUC</u> | 43 | 100 | 18 |
| 005 | 1091140 | UUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUCUGU</u> <u>UACUC</u> | 39 | n. d. | 19 |
| 006 | 1091141 | UAAUUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGU</u> <u>CUGUUA</u> | 40 | 102 | 20 |
| 007 | 1091142 | UUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUCUGU</u> | 34 | n. d. | 21 |
| 008 | 1090812 | UAAUUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGU</u> <u>CUGU</u> | 38 | 90 | 22 |
| 009 | 1091143 | UUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUCUGU</u> <u>UA</u> | 36 | n. d. | 23 |
| 010 | 1090813 | AAUUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUC</u> <u>UGU</u> | 37 | 84 | 24 |
| 1034 621 | 1034621 | AUUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUCU</u> <u>GU</u> | 36 | 60 | 25 |
| 012 | 1090814 | UUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUCUG</u> <u>U</u> | 35 | 17 | 26 |
| 013 | 1090809 | AAUUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUC</u> <u>UGUUACUC</u> | 42 | 99 | 27 |
| 014 | 1090810 | AUUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUCU</u> <u>GUUACUC</u> | 41 | 65 | 28 |
| 015 | 1090811 | UUUCUACUCUUGUAGAU <u>CUGAUGGUCCAUGUCUG</u> <u>UUACUC</u> | 40 | 20 | 29 |

10

20

30

40

上表における全てのヌクレオシドは、2' - ヒドロキシ糖部分を含む未修飾リボヌクレオシドであり、そして上表における全てのヌクレオシド間結合は、リン酸ヌクレオシド間結合である。各 c r R N A の下線部分は、標的認識部分であり、下線の無い部分は各 c r R N A の C R I S P R 認識部分である。表 1 において、c r R N A の C R I S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。

【0431】

実施例 2 : 修飾 c r R N A の遺伝子編集作用

D N M T 1 に相補的である標的認識部分を含有する修飾 c r R N A を設計かつ合成し、D N M T 1 の遺伝子編集におけるこれらの作用を試験した。H E K 2 9 3 T 細胞は、L i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0 を用いて C p f 1 をコードしているプラスミドでトランスフェクションした (L i f e T e c h n o l o g i e s , C a r l s b a d , C A) 。翌朝、細胞を L i p o f e c t a m i n e R N A i m a x (L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いて、下表に掲載される修飾 c r R N A でトランスフェクションした。24 時間後、ゲノム D N A を細胞から単離し、そして D N M T 1 の遺伝子編集の程度を決定するために、実施例 1 に記載されるように解析した。各修飾 c r R N A についての N H E J 発生率は、実施例 1 でも試験された c r R N A 1 0 3 4 6 2 1 について観察された N H E J 発生率に対して標準化した。標準化した値は、遺伝子破壊率と称した。下表に示す結果は、複数の修飾 c r R N A が標的遺伝子を編集したことを示す。「n. d.」の項目は、ゲル中に検出可能な切断バンドがないためにデータがないことを示す。

【表 2】

表 2

DNMT 1 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | (標準化した) 遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|---|----|--------------------|------|
| 1034621 | <u>A_{ro}U_{ro}U_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}A_{ro}C_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}A_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}</u> | 36 | 100 | 25 |
| 1038257 | <u>A_{rs}U_{rs}U_{rs}U_{rs}C_{rs}U_{rs}A_{rs}C_{rs}U_{rs}C_{rs}U_{rs}G_{rs}U_{rs}A_{rs}G_{rs}A_{rs}U_{rs}C_{rs}U_{rs}G_{rs}A_{rs}U_{rs}G_{rs}G_{rs}U_{rs}C_{rs}C_{rs}A_{rs}U_{rs}G_{rs}U_{rs}C_{rs}U_{rs}G_{rs}U_{rs}</u> | 36 | n. d. | 25 |
| 1038259 | <u>A_{mo}U_{ro}U_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}A_{ro}C_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}A_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}</u> | 36 | n. d. | 25 |
| 1038260 | <u>A_{ro}U_{ro}U_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}A_{ro}C_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}A_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}</u> | 36 | 108 | 25 |
| 1038261 | <u>A_{mo}U_{ro}U_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}A_{ro}C_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}A_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}</u> | 36 | n. d. | 25 |

10

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各 c r RNA の下線部分は、標的認識部分であり、下線のない部分は c r RNA の C R I S P R 認識部分である。上表において、c r RNA の C R I S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。

20

【0432】

実施例 3：修飾 c r RNA の遺伝子編集作用

D N M T 1 に相補的である標的認識部分を含有する修飾 c r RNA を設計かつ合成し、D N M T 1 の遺伝子編集におけるこれらの作用を試験した。修飾 c r RNA を除く、実施例 2 に記載されるようにトランスフェクションされた H E K 2 9 3 T 細胞を下表に掲載する。ゲノム DNA は、実施例 1 に記載されるように単離され、そして解析された。各修飾 c r RNA についての N H E J 発生率は、実施例 1 及び 2 でも試験された c r RNA 1 0 3 4 6 2 1 について観察された N H E J 発生率に対して標準化した。標準化した値は、遺伝子破壊率と称した。下表に示される結果は、修飾 c r RNA が標的遺伝子を編集したことを示す。下表のほぼ全ての修飾 c r RNA が未修飾の対照より高い効率で標的遺伝子を編集した (c r RNA 1 0 3 4 6 2 1)。

30

【表 3】

表 3

DNMT 1 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | (標準化した) 遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|--|----|--------------------|------|
| 1034621 | <u>AroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAroGuroAroUroCuro</u> <u>UroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUroGuroUro</u> | 36 | 100 | 25 |
| 1038268 | <u>AroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAroGuroAroUroCuro</u> <u>UroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUroGuroUro</u> | 36 | 141 | 25 |
| 1038269 | <u>AroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAroGuroAroUroCuro</u> <u>UroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUroGuroUro</u> | 36 | 148 | 25 |
| 1038270 | <u>AroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAroGuroAroUroCuro</u> <u>UroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUroGuroUro</u> | 36 | 109 | 25 |
| 1038271 | <u>AroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAroGuroAroUroCuro</u> <u>UroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUroGuroUro</u> | 36 | 141 | 25 |
| 1038272 | <u>UroAroAroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAroGuroAro</u> <u>UroCuroUroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUroGuroUro</u> | 38 | 152 | 22 |
| 1038273 | <u>UroAroAroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAroGuroAro</u> <u>UroCuroUroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUroGuroUro</u> | 38 | 88 | 22 |
| 1038274 | <u>UroAroAroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAroGuroAro</u> <u>UroCuroUroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUroGuroUro</u> | 38 | 109 | 22 |
| 1038275 | <u>CuroUroUroAroAroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAro</u> <u>GuroAroUroCuroUroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUro</u> <u>GuroUro</u> | 40 | 169 | 30 |
| 1038276 | <u>CuroUroUroAroAroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAro</u> <u>GuroAroUroCuroUroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUro</u> <u>GuroUro</u> | 40 | 144 | 30 |
| 990509 | <u>CuroUroUroAroAroUroUroUroCuroUroAroCuroUroCuroUroUroGuroUroAro</u> <u>GuroAroUroCuroUroGuroAroUroGuroGuroUroCuroCuroAroUroGuroUroCuroUro</u> <u>GuroUro</u> | 40 | 165 | 30 |

10

20

30

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各 c r RNA の下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各 c r RNA の C R I S P R 認識部分である。上表において、c r RNA の C R I S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。修飾 c r RNA の 1038273、1038274、1038276 及び 990509 は 5'-安定化である。c r RNA 1038273 及び 1038274 の C R I S P R 認識部分には 1 つ以上の 5'-安定化修飾が含まれる。c r RNA 1038276 及び 990509 のリンカーヌクレオシドには、1 つ以上の 5'-安定化修飾が含まれる。

40

【0433】

実施例 4：修飾 c r RNA の遺伝子編集作用

D N M T 1 に相補的である標的認識部分を含有する修飾 c r RNA を設計かつ合成し、D N M T 1 の遺伝子編集におけるこれらの作用を試験した。修飾 c r RNA を除く、実施例 2 に記載されるようにトランスフェクションされた H E K 2 9 3 T 細胞を下表に掲載する。ゲノム DNA は、実施例 1 に記載されるように単離され、そして解析された。各修飾 c r RNA についての N H E J 発生率は、本実験で試験されたこれらの中で最も高い活性を有した c r RNA 1038299 について観察された N H E J 発生率に対して標準化した。標準化した値は、遺伝子破壊率と称した。下表に示す結果は、複数の修飾 c r RNA

50

が標的遺伝子を編集したことを示す。

【表 4】

表 4

DNMT 1 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | (標準化した) 遺伝子 破壊率 (%) | 配列 番号 |
|---------|--|----|------------------------------|----------|
| 1038292 | C _{ms} U _{ms} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 39 | 30 |
| 1038293 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{rs} U _{rs} G _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} C _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | n. d. | 30 |
| 1038294 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} C _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | n. d. | 30 |
| 1038295 | C _{ms} U _{ms} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} C _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | n. d. | 30 |
| 1038296 | C _{ms} U _{ms} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{rs} U _{rs} G _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} C _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | n. d. | 30 |
| 1038297 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 80 | 30 |
| 1038298 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} | 40 | 86 | 30 |
| 1038299 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{rs} C _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{ro} C _{rs} U _{ro} G _{rs} U _{ro} | 40 | 100 | 30 |
| 1038300 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 49 | 30 |
| 1038301 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 44 | 30 |
| 1038302 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 58 | 30 |
| 1038303 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 52 | 30 |
| 1038304 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 37 | 30 |
| 1038305 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | n. d. | 30 |

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字の「f」は、2'-F修飾を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各 c r RNA の下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各 c r RNA の C R I S P R 認識部分である。上表において、c r RNA の C R I S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。上表の修飾 c r RNA は 5'-安定化であり、そしてリンカーヌクレオシドには 5'-安定化修飾が含まれる。

【0434】

実施例 5：修飾 c r RNA の遺伝子編集作用

DNMT 1 に相補的である標的認識部分を含有する修飾 c r RNA を設計かつ合成し、DNMT 1 の遺伝子編集におけるこれらの作用を試験した。修飾 c r RNA を除く、実施例 2 に記載されるようにトランスフェクションされた HEK 293 T 細胞を下表に掲載する。ゲノム DNA は、実施例 1 に記載されるように単離され、そして解析された。各修飾 c r RNA についての NHE J 発生率は、実施例 1 ~ 3 でも試験された c r RNA 103

4621について観察されたNHEJ発生率に対して標準化した。標準化した値は、遺伝子破壊率と称した。項目「n.d.」は、ゲルに検出可能な切断バンドがないため、データがないことを示す。下表に示す結果は、複数の修飾crRNAが標的遺伝子を編集したことを示し、そして多くの場合、これらは未修飾crRNA1034621よりも、より効果的である。結果はまた、標的認識部分において核酸塩基の変化に耐容性を示す、ある特定の位置（例えば、Kleinstiver et al. in Nature Biotechnology, 34, 869 (2016)を参照）が、修飾糖にも耐容性を示すことを示した。

【表5】

表5

DNMT1を標的化するcrRNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | (標準化した) 遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|---|----|--------------------|------|
| 1034621 | A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 36 | 100 | 25 |
| 991458 | C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 40 | 77 | 30 |
| 991461 | C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 40 | 124 | 31 |
| 991462 | C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 40 | 168 | 31 |
| 991775 | ^m C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 40 | 147 | 30 |
| 991776 | ^m C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 40 | 159 | 31 |
| 991777 | C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 40 | 138 | 31 |
| 991783 | ^m C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ ^m C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 40 | 176 | 30 |
| 991784 | ^m C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ ^m C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ ^m C ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ | 40 | n. d. | 32 |

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。「C」に隣接する上付き文字「m」は、5'-メチルシトシンを示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字の「f」は、2'-F修飾を示す。下付き文字「k」は、cEt修飾を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各crRNAの下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各crRNAのCRISPR認識部分である。上表において、修飾crRNAのCRISPR認識部分はCpf1を認識する。crRNA1034621以外の、上表の修飾crRNAは5'-安定化であり、そしてリンカーヌクレオシドには5'-安定化修飾が含まれる。

【0435】

実施例6：修飾crRNAの遺伝子編集作用

DNMT1に相補的である標的認識部分を含有する修飾crRNAを設計かつ合成し、DNMT1の遺伝子編集におけるこれらの作用を試験した。修飾crRNAを除く、実施例2に記載されるようにトランスフェクションされたHEK293T細胞を下表に掲載する。ゲノムDNAは、実施例1に記載されるように単離され、そして解析された。各修飾crRNAについてのNHEJ発生率は、crRNA989549について観察されたN

10

20

30

40

50

H E J 発生率に対して標準化した。標準化した値は、遺伝子破壊率と称した。下表に示される結果は、修飾 c r R N A が標的遺伝子を編集したことを示す。

【表 6】

表 6

DNMT 1 を標的化する c r R N A

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | (標準化した) 遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|--|----|--------------------|------|
| 989549 | C _{ro} U _{ro} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} | 40 | 100 | 30 |
| 1038293 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{rs} U _{rs} G _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} C _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 26 | 30 |
| 1038294 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} C _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 38 | 30 |
| 1086669 | C _{rs} U _{rs} U _{rs} A _{rs} A _{rs} U _{rs} U _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} A _{rs} C _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} A _{rs} G _{rs} A _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} G _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} C _{rs} A _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} | 40 | 26 | 30 |
| 1086670 | C _{ms} U _{rs} U _{rs} A _{rs} A _{rs} U _{rs} U _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} A _{rs} C _{rs} U _{rs} C _{rs} U _{rs} U _{rs} G _{rs} U _{rs} A _{rs} G _{rs} A _{rs} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _{ms} | 40 | 68 | 30 |
| 1086671 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{rs} U _{ro} C _{rs} C _{ro} A _{rs} U _{ro} G _{rs} U _{ro} C _{rs} U _{ro} G _{ms} U _{ms} | 40 | 77 | 30 |

10

20

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各 c r R N A の下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各 c r R N A の C R I S P R 認識部分である。上表において、c r R N A の C R I S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。上表の修飾 c r R N A は 5'-安定化であり、そしてリンカーヌクレオシドには 5'-安定化修飾が含まれる。

【0436】

実施例 7：修飾 c r R N A の遺伝子編集作用

30

下記及び実施例 4、5、及び 6 に記載される修飾 c r R N A は、c r R N A 989549 と比較した DNMT 1 の遺伝子編集におけるこれらの作用について試験した。HEK 293 T 細胞を実施例 2 に記載されるように、下表に掲載される、3 μ L の 100 μ M c r R N A でトランスフェクションした。ゲノム DNA は、実施例 1 に記載されるように単離され、そして解析された。各修飾 c r R N A についての N H E J 発生率は、c r R N A 989549 について観察された N H E J 発生率に対して標準化した。標準化した値は、遺伝子破壊率と称した。下表に示す結果は、複数の修飾 c r R N A が標的遺伝子を編集したことを示す。

DNMT 1 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 配列番号 |
|---------|---|----|------|
| 1120133 | C _m S U _r U _r A _r A _r U _r U _r U _r C _r U _r A _r C _r U _r C _r U _r U _r G _r U _r A _r G _r A _r r _o U _r C _r U _r G _r A _r U _r G _r G _r U _r C _r C _r T _r A _r U _r G _r U _r f _o C _r f _o U _r S G _m S U _m | 40 | 30 |
| 1120139 | C _m S U _r U _r A _r A _r U _r U _r U _r C _r U _r A _r C _r U _r C _r U _r U _r G _r U _r A _r G _r A _r r _o U _r C _r U _r U _r G _r A _r U _r U _r G _r G _r S U _r C _r S C _r U _r A _r S U _r G _r S U _r f _o C _r S U _r S G _m S U _m | 40 | 30 |
| 1120140 | C _m S U _r U _r A _r A _r U _r U _r U _r C _r U _r A _r C _r U _r C _r U _r U _r G _r U _r A _r G _r A _r r _o U _r C _r U _r T _r G _r A _r U _r U _r G _r G _r S U _m C _m S C _r U _r A _r S U _r G _r S U _r f _o C _r S U _r S G _m S U _m | 40 | 30 |
| 1120141 | C _m S U _r U _r A _r A _r U _r U _r U _r C _r U _r A _r C _r U _r C _r U _r U _r G _r U _r A _r G _r A _r r _o U _r C _r f _o U _r G _r A _r U _r U _r G _r G _r S U _r C _r S C _r U _r A _r S U _r G _r S U _r f _o C _r S U _r S G _m S U _m | 40 | 30 |

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。下付き文字の「f」は、2'-F修飾を示す。各crRNAの下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各crRNAのCRISPR認識部分である。上表において、crRNAのCRISPR認識部分は、Cpf1を認識する。上表の修飾crRNAは5'-安定化であり、そしてリンカーヌクレオシドには5'-安定化修飾が含まれる。

遺伝子破壊率

| 名称 | (標準化した) 遺伝子破壊率 (%) |
|---------|--------------------|
| 989549 | 100 |
| 1038297 | 110 |
| 1038298 | 160 |
| 1038299 | 140 |
| 1120133 | 60 |
| 1120139 | 50 |
| 991461 | 90 |
| 991462 | 90 |
| 991777 | 80 |
| 991775 | 80 |
| 991776 | 90 |
| 991783 | 130 |
| 991784 | 10 |

【表 8 b】

表 8 b

遺伝子破壊

| 名称 | (標準化した) 遺伝子破壊率 (%) |
|---------|-----------------------|
| 989549 | 100 |
| 1120140 | 10 |
| 1120141 | 70 |

10

【 0 4 3 7 】

実施例 8：修飾 c r R N A の遺伝子編集作用

D N M T 1 に相補的である標的認識部分を含有する修飾 c r R N A を設計かつ合成し、D N M T 1 の遺伝子編集におけるこれらの作用を試験した。H E K 2 9 3 T 細胞を実施例 2 に記載されるように、下表に掲載される、3 μ L の 1 0 0 μ M c r R N A でトランスフェクションした。ゲノム D N A は、実施例 1 に記載されるように単離され、そして解析された。表 9 の各修飾 c r R N A についての N H E J 発生率は、修飾 c r R N A 1 0 9 0 6 2 6 について観察された N H E J 発生率に対して標準化した。標準化した値は、遺伝子破壊率と称した。表 1 0 の各修飾 c r R N A の N H E J 発生率は標準化されておらず、観察された遺伝子破壊の絶対的率が掲載されている。下表に示す結果は、複数の修飾 c r R N A が標的遺伝子を編集したことを示す。

20

DNMT 1 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 標準化した遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|--|----|-----------------|------|
| 1038306 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroUroCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 43 | 120 | 33 |
| 1038307 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroUroCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 43 | 143 | 33 |
| 1038308 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 43 | 135 | 34 |
| 1038309 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroUroCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 43 | 169 | 33 |
| 1038335 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 43 | 198 | 34 |
| 1038310 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroUroCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 43 | 181 | 33 |
| 1038311 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 43 | 181 | 34 |
| 1038312 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 43 | 184 | 34 |
| 1090623 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTd</u> | 42 | 105 | 35 |
| 1090624 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCd</u> | 41 | 120 | 36 |
| 1090625 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAd</u> | 40 | 105 | 37 |
| 1090626 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTd</u> | 39 | 100 | 38 |
| 1090627 | <u>UroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroGroAroUroGroGroTdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTd</u> | 38 | 11 | 39 |
| 1038313 | <u>CdoTdoUroAroAroUroUroUroCroUroAroCroUroCroUroUroGroUroAroGroAroUroCdoUroCdoUroGroAroUroGroGroUroCdoCdoCdoAroUroGroUroCdoUroGroUroTdoAdoCdoTdoCd</u> | 45 | 161 | 40 |

【表 10】

表 10

DNMT1 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 絶対的遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|--|----|---------------|------|
| 1038313 | C _{do} T _{do} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} r _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} T _{do} A _{do} C _{do} T _{do} C _d | 45 | 21 | 40 |
| 1090628 | U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} r _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} T _{do} G _{do} T _{do} T _{do} A _{do} C _{do} T _{do} C _d | 43 | n. d. | 41 |
| 1090629 | U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} r _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{do} A _{do} T _{do} G _{do} T _{do} C _{do} T _{do} G _{do} T _{do} T _{do} A _{do} C _{do} T _{do} C _d | 43 | n. d. | 42 |
| 1090630 | U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} r _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{do} T _{do} C _{do} C _{do} A _{do} T _{do} G _{do} T _{do} C _{do} T _{do} G _{do} T _{do} T _{do} A _{do} C _{do} T _{do} C _d | 43 | n. d. | 43 |
| 1090631 | U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} r _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{do} G _{do} T _{do} C _{do} C _{do} A _{do} T _{do} G _{do} T _{do} C _{do} T _{do} G _{do} T _{do} T _{do} A _{do} C _{do} T _{do} C _d | 43 | n. d. | 43 |
| 1090632 | U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} T _{do} G _{do} d _{do} A _{do} T _{do} G _{do} G _{do} T _{do} C _{do} C _{do} A _{do} T _{do} G _{do} T _{do} C _{do} T _{do} G _{do} T _{do} T _{do} A _{do} C _{do} T _{do} C _d | 43 | n. d. | 44 |
| 1090633 | T _{do} A _{do} A _{do} T _{do} T _{do} T _{do} ^o C _{do} T _{do} A _{do} ^o C _{do} T _{do} ^o C _{do} T _{do} G _{do} T _{do} A _{do} G _{do} A _{do} T _{do} ^o C _{do} T _{do} d _{do} G _{do} A _{do} T _{do} G _{do} G _{do} T _{do} ^o C _{do} ^o C _{do} A _{do} T _{do} G _{do} T _{do} ^o C _{do} T _{do} G _{do} T _{do} T _{do} A _{do} ^o C _{do} T _{do} ^o C _d | 43 | n. d. | 45 |

10

20

上記の表の下付き文字「r」は、未修飾の 2' - ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「d」は、修飾された 2' - デオキシ糖部分を示す。下付き文字「o」は、リン酸ヌクレオシド間結合を示す。上付き文字「m」に続く「C」は、5 - メチルシトシンを示す。各 c r RNA の下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各 c r RNA の C R I S P R 認識部分である。c r RNA の C R I S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。

【0438】

実施例 9：修飾 c r RNA の遺伝子編集作用

低密度リボタンパク質受容体に相補的である標的認識部分を含有する修飾 c r RNA を、設計かつ合成して L D L R の遺伝子編集に対するこれらの作用を試験した。H E K 2 9 3 T 細胞を実施例 2 に記載されるように、下表に掲載される、3 μ L の 1 0 0 μ M c r RNA でトランスフェクションした。L D L R 遺伝子の c r RNA 標的部位を増幅させるために使用された P C R プライマーが順方向：5' - G G A G A C C C A A A T A C A A C A A A T C - 3' (配列番号 56) 及び逆方向：5' - C T A G A C T C C G T C T C A A A G A A G - 3' (配列番号 57) であったことを除いて、実施例 1 に記載されるようにゲノム DNA を単離して解析した。各修飾 c r RNA についての N H E J 発生率は、c r RNA 1 0 9 1 1 5 2 について観察された N H E J 発生率に対して標準化した。標準化した値は、遺伝子破壊率と称した。下表に示される結果は、修飾 c r RNA が標的遺伝子を編集したことを示す。

30

【表 1 1 a】

表 1 1 a

LDLRを標的化するc r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 標準化した遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|---|----|-----------------|------|
| 1091152 | C _{ro} U _{ro} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} G _{ro} | 40 | 100 | 46 |
| 1091153 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{do} A _{do} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{rs} G _{ms} G _m | 40 | n. d. | 46 |
| 1091154 | U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} T _{do} C _{do} G _{do} T _{do} G _d | 43 | 120 | 47 |
| 1091155 | U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{do} A _{do} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} T _{do} C _{do} G _{do} T _{do} G _d | 43 | 100 | 47 |
| 1091156 | U _{ms} A _{rs} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} G _{rs} U _{ms} G _m | 43 | 120 | 48 |
| 1091157 | U _{ms} A _{rs} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{do} A _{do} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} G _{rs} U _{ms} G _m | 43 | 110 | 48 |
| 1091158 | C _{do} T _{do} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} T _{do} C _{do} G _d oT _{do} G _d | 45 | 120 | 49 |
| 1091159 | C _{do} T _{do} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{do} A _{do} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} T _{do} C _{do} G _d oT _{do} G _d | 45 | 100 | 49 |
| 1091160 | C _{ms} U _{ms} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} G _r sU _{ms} G _m | 45 | 110 | 50 |
| 1091161 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{do} A _{do} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} G _r sU _{ms} G _m | 45 | 120 | 50 |

【表 1 1 b】

表 1 1 b

LDLRを標的化するc r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 標準化した遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|--|----|-----------------|------|
| 1091152 | C _{ro} U _{ro} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} G _{ro} | 40 | 100 | 51 |
| 1120137 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{rs} C _{ro} A _{rs} G _{ro} C _{rs} A _{rs} G _{ms} G _m | 40 | 10 | 51 |
| 1120138 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} G _r A _{ro} U _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{rs} C _{ro} A _{rs} G _{ro} C _{rs} A _{rs} G _{ms} G _m | 40 | 60 | 51 |

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「d」は、修飾された2'-デオキシ糖部分を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各c r RNAの下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各c r RNAのCRISPR認識部分である。上表において、c r RNAのCRISPR

10

20

30

40

50

S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。

【0439】

実施例10：修飾c r R N A の遺伝子編集作用

L D L R に相補的である標的認識部分を含有する修飾c r R N A を設計かつ合成し、実施例9に記載されるようにL D L R の遺伝子編集に対するこれらの作用を試験した。各c r R N A のN H E J 発生率は標準化しなかった。下表の値は、絶対的な遺伝子破壊率である。この結果は、修飾c r R N A が標的遺伝子を編集したことを示す。

【表12】

表12

L D L R を標的化するc r R N A

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 絶対的遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|--|----|---------------|------|
| 1091152 | C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ | 40 | 26 | 51 |
| 1091153 | C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ d ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ d ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ | 40 | 4 | 51 |
| 1091162 | C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ | 40 | 18 | 51 |
| 1091164 | C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ U ₁₀ G ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ U ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ C ₁₀ U ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ C ₁₀ A ₁₀ G ₁₀ G ₁₀ | 40 | 18 | 51 |

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「d」は、修飾された2'-デオキシ糖部分を示す。下付き文字の「f」は、2'-F修飾を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各c r R N A の下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各c r R N A のC R I S P R 認識部分である。上表において、c r R N A のC R I S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。

【0440】

実施例11：c r R N A の遺伝子編集作用

種々の標的に相補的な標的認識部分を含有するc r R N A を設計かつ合成して、遺伝子編集に対するそれらの作用を試験した。H E K 2 9 3 T 細胞を実施例2に記載されるように、下表に掲載される、3 μ L の100 μ M c r R N A でトランスフェクションした。ゲノムDNAは、c r R N A 標的部位を増幅するために使用されたP C R プライマーが、第5成分遺伝子(C5、表13)については順方向：5'-C A T G G G G T A A C C C A G C A A A C - 3' (配列番号58)及び逆方向：5'-G G A A A T A A G T G A T G G G G C A G G - 3' (配列番号：59)、Empty Spiracles Homeobox 1 遺伝子(EMX1、表14)については順方向：5'-C C A T C C C C T T C T G T G A A T G T - 3' (配列番号60)及び逆方向：5'-G G A G A T T G G A G A C A C G G A G A - 3' (配列番号61)、イオンチャネル型グルタミン酸受容体のNMDAサブユニット2B型遺伝子(GRIN2b、表5)については順方向：5'-G C A T A C T C G C A T G G C T A C C T - 3' (配列番号62)及び逆方向：5'-C T C C C T G C A G C C C C T T T T T A - 3' (配列番号63)、トランスサイレチン遺伝子(TTR、表16)については順方向：5'-C A G A A T C A G C A G G T T T G C A G - 3' (配列番号64)及び逆方向：5'-C A A A C C T A A T G C A C C A A A G C - 3' (挿入番号65)のうちの1つであったことを除いて、実施例1に記載されるように単離かつ解析した。各c r R N A のN H E J 発生率は標準化しなかった。下表の値は、絶対的遺伝子破壊率である。下表に示す結果は、多くのc r R N A が対応する標的遺伝子を編集したこと、そして異なる標的間でいくらか変動性があることを示す。

【表 1 3】

表 1 3

C 5 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 絶対的遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|--|----|---------------|------|
| 1091478 | C _{ro} U _{ro} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} | 40 | <5 | 52 |

【表 1 4】

表 1 4

E M X 1 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 絶対的遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|---|----|---------------|------|
| 1091480 | C _{ro} U _{ro} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} oU _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} C _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} C _{ro} C _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} | 40 | 16 | 53 |

【表 1 5】

表 1 5

G R I N 2 b を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 絶対的遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|---|----|---------------|------|
| 1091484 | C _{ro} U _{ro} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} oU _{ro} G _{ro} U _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} A _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} | 40 | 19 | 54 |

【表 1 6】

表 1 6

T T R を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 絶対的遺伝子破壊率 (%) | 配列番号 |
|---------|---|----|---------------|------|
| 1091482 | C _{ro} U _{ro} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} oU _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} G _{ro} G _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} C _{ro} C _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} | 40 | n. d. | 55 |

表 1 2 の説明文は、表 1 3 ~ 1 6 にも適用される。

【 0 4 4 1】

実施例 1 2 : 修飾 c r RNA の遺伝子編集作用

D N M T 1 に相補的である標的認識部分を含む修飾 c r RNA を設計かつ合成し、未修飾 c r RNA 9 8 9 5 4 9 と比べた D N M T 1 の遺伝子編集におけるその作用を試験した (表 6 参照)。H E K 2 9 3 T 細胞を実施例 2 に記載されるように、下表に掲載される、3 μ L の 1 0 0 μ M の修飾 c r RNA、c r RNA 9 8 9 5 4 9 (「RNA コントロール」) または c r RNA 無し (「ネガティブコントロール」) でトランスフェクションした。N H E J 発生率を定量化しなかったことを除いて、実施例 1 に記載されるようにゲノム D N A を単離かつ分析した。図 1 に示される、結果として生じた D N A ゲルは、C R I S P R 認識部分において少なくとも 1 つの修飾糖部分を含有する複数の修飾 c r RNA が、標的遺伝子を編集したことを示す。

10

20

30

40

【表 17】

表 17

DNMT1 を標的化する c r RNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 配列番号 |
|---------|---|----|------|
| 1096341 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} ^m C _{ko} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}</u> <u>G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 30 |
| 1096343 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ko} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 30 |
| 1096344 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} ^m C _{ko} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 30 |
| 1096346 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} ^m C _{ko} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 30 |
| 1096349 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 30 |
| 1096351 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ko} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 30 |
| 1096352 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ko} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 30 |
| 1096353 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ko} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 30 |
| 1144245 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ko} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} T _{ko} C _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 71 |
| 1144246 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} T _{ko} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} T _{ko} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 72 |
| 1144247 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} T _{ko} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ko} C _{ro} U _{ro} T _{ko} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 73 |
| 1144248 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} T _{ko} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 74 |
| 1144249 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} T _{ko} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 75 |
| 1144250 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} T _{ko} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 71 |
| 1144251 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} T _{ko} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 76 |
| 1144252 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} T _{ko} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 77 |
| 1144253 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} T _{ko} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 78 |
| 1144254 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} T _{ko} C _{ro} U _{ro} <u>G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 79 |
| 1144255 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} T _{ko} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>G_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}C_{ro}A_{ro}U_{ro}G_{ro}U_{ro}C_{ro}U_{rs}G_{ms}U_m</u> | 40 | 80 |

10

20

30

40

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2'-ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「k」は、cEt修飾を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各c r RNAの下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各c r RNAのCRISPR認識部分である。上表において、c r RNAのCRISPR認識部分は、Cpf1を認識する。

【0442】

50

実施例 13 : 修飾 c r R N A の遺伝子編集作用

D N M T 1 に相補的な標的認識部分を含む修飾 c r R N A を設計して D N M T 1 の遺伝子編集におけるそれらの作用を試験した。H E K 2 9 3 T 細胞を実施例 2 に記載されるようにトランスフェクションした。ゲノム D N A を実施例 1 に記載されるように単離して分析した。

【表 18】

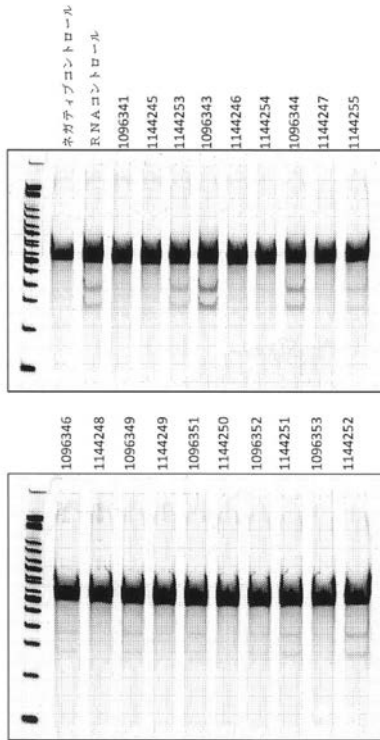
表 18

DNMT1 を標的化する crRNA

| 名称 | 配列 (5' → 3') | 長さ | 配 列 番 号 |
|---------|--|----|------------|
| 1186843 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ko} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} <u>C_{ro}U_{ro}</u> G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _m | 40 | 30 |
| 1186844 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ko} [#] C _{ko} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _m | 40 | 30 |
| 1186845 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ko} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _m | 40 | 30 |
| 1186846 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ko} [#] C _{ko} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _m | 40 | 30 |
| 1186847 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ko} [#] C _{ko} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} C _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{rs} G _{ms} U _m | 40 | 30 |
| 1186848 | C _{ms} U _{rs} U _{ro} A _{ro} A _{ro} U _{ro} U _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} A _{ro} C _{ro} U _{ro} C _{ro} U _{ro} U _{ro} G _{ro} U _{ro} A _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} C _{do} U _{ro} G _{ro} A _{ro} U _{ro} G _{ro} G _{ro} T _{do} C _{do} C _{ro} A _{rs} U _{ro} G _{ro} T _{do} C _{do} T _{do} G _{ms} U _m | 40 | 81 |

下付き文字「m」は、2' - O - メチル修飾を示す。下付き文字「r」は、未修飾の、2' - ヒドロキシ糖部分を示す。下付き文字「d」は、修飾された2' - デオキシ糖部分を示す。下付き文字「k」は、c E t 修飾を示す。下付き文字の「f」は、2' - F 修飾を示す。下付き文字「o」はリン酸ヌクレオシド間結合を示し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。各 c r R N A の下線部分は、標的認識部分であり、太字のヌクレオシドはリンカーヌクレオシドである。太字でもなく下線もない部分は、各 c r R N A の C R I S P R 認識部分である。上表において、c r R N A の C R I S P R 認識部分は、C p f 1 を認識する。

【図 1】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/68642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/11; C12P 19/34; C07H 21/02 (2018.01)
CPC - C12N 15/11; C07H 21/02; C12P19/34

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|--------------------------|
| X | US 2016/0289675 A1 (AGILENT TECHNOLOGIES, INC.) 6 October 2016; paragraphs [0022], [0025], [0042], [0048], [0057], [0063], [0171], [0173], [0254], [0293], [0294], [0393] | 1-5, 6/1-5, 7/1-5, 8/1-4 |
| A | US 2015/0376587 A1 (CARIBOU BIOSCIENCES, INC.) 31 December 2015 | 1-5, 6/1-5, 7/1-5, 8/1-4 |
| A | US 2016/0024524 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 28 January 2016 | 1-5, 6/1-5, 7/1-5, 8/1-4 |

☐ 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

29 March 2018 (29.03.2018)

Date of mailing of the international search report

19 APR 2018

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/68642

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 9-321
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

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 15/864 (2006.01) C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

(31)優先権主張番号 62/491,818

(32)優先日 平成29年4月28日(2017.4.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(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

(74)代理人 100140109
弁理士 小野 新次郎

(74)代理人 100118902
弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208
弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100120112
弁理士 中西 基晴

(74)代理人 100128750
弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 ラダー, メグダッド
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル コート 2 8 5 5

(72)発明者 ブラカシュ, タジャ・ピー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル コート 2 8 5 5

(72)発明者 スウェイジ, エリック・イー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル コート 2 8 5 5

(72)発明者 ベネット, シー・フランク
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル コート 2 8 5 5

(72)発明者 マクマホン, モイラ・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル コート 2 8 5 5

Fターム(参考) 4C084 AA13 MA66
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZC41