

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和1年5月16日(2019.5.16)

【公表番号】特表2018-513682(P2018-513682A)

【公表日】平成30年5月31日(2018.5.31)

【年通号数】公開・登録公報2018-020

【出願番号】特願2017-552447(P2017-552447)

【国際特許分類】

| | | |
|---------|-------|-----------|
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 37/04 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 7/06 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 7/04 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 31/18 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 35/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 27/02 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/18 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 21/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/36 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/28 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/16 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 7/02 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 29/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 43/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 37/02 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 3/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 1/16 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 13/12 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 19/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 21/04 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 9/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 11/00 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 35/76 | (2015.01) |
| A 6 1 K | 48/00 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 9/14 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 9/127 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 47/68 | (2017.01) |
| A 6 1 K | 38/16 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 47/26 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 1/11 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 5/10 | (2006.01) |

【F I】

| | | |
|---------|-------|---------|
| C 1 2 N | 15/00 | Z N A A |
| A 6 1 P | 37/04 | |
| A 6 1 P | 7/06 | |
| A 6 1 P | 7/04 | |
| A 6 1 P | 31/18 | |
| A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 27/02 | |

| | | |
|---------|-------|-------|
| A 6 1 P | 25/18 | |
| A 6 1 P | 25/00 | |
| A 6 1 P | 21/00 | |
| A 6 1 P | 25/36 | |
| A 6 1 P | 25/28 | |
| A 6 1 P | 25/16 | |
| A 6 1 P | 7/02 | |
| A 6 1 P | 29/00 | |
| A 6 1 P | 43/00 | 1 0 1 |
| A 6 1 P | 37/02 | |
| A 6 1 P | 3/00 | |
| A 6 1 P | 1/16 | |
| A 6 1 P | 13/12 | |
| A 6 1 P | 19/00 | |
| A 6 1 P | 21/04 | |
| A 6 1 P | 9/00 | |
| A 6 1 P | 11/00 | |
| A 6 1 K | 35/76 | |
| A 6 1 P | 43/00 | 1 1 1 |
| A 6 1 K | 48/00 | |
| A 6 1 K | 9/14 | |
| A 6 1 K | 9/127 | |
| A 6 1 K | 47/68 | |
| A 6 1 K | 38/16 | |
| A 6 1 K | 47/26 | |
| C 1 2 N | 1/11 | |
| C 1 2 N | 5/10 | |

【手続補正書】**【提出日】**平成31年4月5日(2019.4.5)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

初代細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導するための方法であって、

(a) 標的核酸に相補的な第1のヌクレオチド配列、およびC R I S P R 関連タンパク質(C a s)ポリペプチドと相互作用する第2のヌクレオチド配列を含む修飾型单一ガイドRNA(s g RNA)であって、前記第1のヌクレオチド配列および/または前記第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの1個または複数が修飾型ヌクレオチドである、修飾型单一ガイドRNA;ならびに

(b) C a s ポリペプチド、C a s ポリペプチドをコードするm RNA、および/またはC a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを初代細胞へ導入するステップ

を含み、

前記修飾型s g RNAが前記C a s ポリペプチドを標的核酸へ導き、

前記修飾型s g RNAが、対応する非修飾型s g RNAと比較して増強した活性で標的核酸の遺伝子調節を誘導する、方法。

【請求項 2】

前記増強した活性が、前記修飾型 s g R N A の増加した安定性および／または前記修飾型 s g R N A の標的核酸に対する増加した特異性を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記標的核酸が標的 D N A または標的 R N A を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記遺伝子調節が前記標的 D N A のゲノム編集を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ゲノム編集が、標的 D N A の相同組換え修復 (H D R) または非相同末端結合 (N H E J) を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

組換えドナー修復鋳型を前記初代細胞へ導入するステップをさらに含む、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記組換えドナー修復鋳型が、前記標的 D N A の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、ゲノム編集を受ける前記標的 D N A に対応するヌクレオチド配列の 5' 末端および 3' 末端に位置する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記組換えドナー修復鋳型が、一塩基多型 (S N P) を正すための変異をコードするヌクレオチド配列を含む合成の一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (s s O D N) 鋳型、および標的 D N A の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、変異をコードするヌクレオチド配列の 5' 末端および 3' 末端に位置する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子調節が、エンドヌクレアーゼ欠損 C a s ポリペプチドを用いた、前記標的 D N A または前記標的 R N A の遺伝子発現の阻害または活性化を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記修飾型 s g R N A および前記 C a s ポリペプチドを前記初代細胞へ導入する前に、前記初代細胞が多細胞生物体から単離される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記多細胞生物体が、植物、多細胞原生生物、多細胞真菌、または動物である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記初代細胞が、幹細胞、免疫細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記幹細胞が、造血幹細胞・造血前駆細胞 (H S P C) 、間葉幹細胞、神経幹細胞、臓器幹細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記免疫細胞が、T 細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、末梢血单核細胞 (P B M C) 、末梢血リンパ球 (P B L) 、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記修飾型 s g R N A および前記 C a s ポリペプチドを前記初代細胞へ導入した後に、前記初代細胞またはその子孫が前記多細胞生物体へ戻される、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記初代細胞が初代細胞集団を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも約 30 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも約 40 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも約 50 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも約 60 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記修飾型ヌクレオチドが、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはそれらの組合せにおける修飾を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記リボース基における修飾が、前記リボース基の 2' 位における修飾を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記リボース基の 2' 位における修飾が、2' - O - メチル、2' - フルオロ、2' - デオキシ、2' - O - (2 - メトキシエチル)、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記リン酸基における修飾が、ホスホロチオエート修飾を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記修飾型ヌクレオチドが、2' - O - メチル (M) ヌクレオチド、2' - O - メチル 3' - ホスホロチオエート (MS) ヌクレオチド、2' - O - メチル 3' - チオ P A C E (MSP) ヌクレオチド、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記第 1 のヌクレオチド配列が約 20 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはそれ以上が、修飾型ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記修飾型ヌクレオチドが、前記第 1 のヌクレオチド配列の 5' 末端に、もしくは 5' 末端の近くに、および / または前記第 1 のヌクレオチド配列内の内部の位置に位置する、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 1 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの約 10 % から約 30 % までが修飾型ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 2 のヌクレオチド配列が約 80 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 2 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの少なくとも 2 個、3 個、4 個、5

個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上が、修飾型ヌクレオチドである、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

前記修飾型ヌクレオチドが、前記第2のヌクレオチド配列の3'末端に、もしくは3'末端の近くに、および/または前記第2のヌクレオチド配列内の内部の位置に位置する、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

前記第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの約1%から約10%までが修飾型ヌクレオチドである、請求項1～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】

前記修飾型sgRNAが、前記第1のヌクレオチド配列の5'末端、または5'末端の近くにおける1個、2個、または3個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチド、および前記第2のヌクレオチド配列の3'末端、または3'末端の近くにおける1個、2個、または3個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチドを含む、請求項1～33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

前記修飾型sgRNAが、前記第1のヌクレオチド配列の5'末端における3個の連続した修飾型ヌクレオチド、および前記第2のヌクレオチド配列の3'末端における3個の連続した修飾型ヌクレオチドを含む、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記修飾型sgRNAが化学合成される、請求項1～35のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】

前記修飾型sgRNAが少なくとも2個の異なる修飾型sgRNAを含み、各修飾型sgRNAが、異なる標的核酸へ方向づけられている、請求項1～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】

前記Casポリペプチドが、前記CasポリペプチドをコードするmRNAである、請求項1～37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

前記Casポリペプチドが、Cas9ポリペプチド、そのバリアント、またはその断片である、請求項1～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】

前記初代細胞へ導入するステップが、前記初代細胞をエレクトロポレーションすることを含む、請求項1～39のいずれか1項に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0186

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0186】

前述の発明は、理解を明りょうにするために、例証および例としてかなり詳細に記載されているが、当業者は、ある特定の変化および改変が、添付の特許請求の範囲内で実施され得ることを認識しているだろう。加えて、本明細書に提供された各参考文献は、各参考文献を個々に引用することにより本明細書の一部をなすものとするのと同じ程度でその全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

なお、出願時の特許請求の範囲は、以下のとおりである。

【請求項1】

初代細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導するための方法であって、

(a) 標的核酸に相補的な第1のヌクレオチド配列、およびCRISPR関連タンパク

質 (C a s) ポリペプチドと相互作用する第 2 のヌクレオチド配列を含む修飾型単一ガイド R N A (s g R N A) であって、前記第 1 のヌクレオチド配列および / または前記第 2 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの 1 個または複数が修飾型ヌクレオチドである、修飾型単一ガイド R N A ; ならびに

(b) C a s ポリペプチド、C a s ポリペプチドをコードする m R N A 、および / または C a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを初代細胞へ導入するステップ

を含み、

前記修飾型 s g R N A が前記 C a s ポリペプチドを標的核酸へ導き、

前記修飾型 s g R N A が、対応する非修飾型 s g R N A と比較して増強した活性で標的核酸の遺伝子調節を誘導する、方法。

[請求項 2]

前記増強した活性が、前記修飾型 s g R N A の増加した安定性および / または前記修飾型 s g R N A の標的核酸に対する増加した特異性を含む、請求項 1 に記載の方法。

[請求項 3]

前記標的核酸が標的 D N A または標的 R N A を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

[請求項 4]

前記遺伝子調節が前記標的 D N A のゲノム編集を含む、請求項 3 に記載の方法。

[請求項 5]

前記ゲノム編集が、標的 D N A の相同組換え修復 (H D R) または非相同末端結合 (N H E J) を含む、請求項 4 に記載の方法。

[請求項 6]

組換えドナー修復錆型を前記初代細胞へ導入するステップをさらに含む、請求項 4 または 5 に記載の方法。

[請求項 7]

前記組換えドナー修復錆型が、前記標的 D N A の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、ゲノム編集を受ける前記標的 D N A に対応するヌクレオチド配列の 5 ' 末端および 3 ' 末端に位置する、請求項 6 に記載の方法。

[請求項 8]

前記組換えドナー修復錆型が、一塩基多型 (S N P) を正すための変異をコードするヌクレオチド配列を含む合成の一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (s s O D N) 錆型、および標的 D N A の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、変異をコードするヌクレオチド配列の 5 ' 末端および 3 ' 末端に位置する、請求項 6 に記載の方法。

[請求項 9]

前記遺伝子調節が、エンドヌクレアーゼ欠損 C a s ポリペプチドを用いた、前記標的 D N A または前記標的 R N A の遺伝子発現の阻害または活性化を含む、請求項 3 に記載の方法。

[請求項 10]

前記修飾型 s g R N A および前記 C a s ポリペプチドを前記初代細胞へ導入する前に、前記初代細胞が多細胞生物体から単離される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項 11]

前記多細胞生物体が、植物、多細胞原生生物、多細胞真菌、または動物である、請求項 10 に記載の方法。

[請求項 12]

前記初代細胞が、幹細胞、免疫細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項 13]

前記幹細胞が、造血幹細胞・造血前駆細胞（HSPC）、間葉幹細胞、神経幹細胞、臓器幹細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～2に記載の方法。

[請求項1～4]

前記免疫細胞が、T細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、末梢血単核細胞（PBMC）、末梢血リンパ球（PBL）、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～2に記載の方法。

[請求項1～5]

前記修飾型sgRNAおよび前記Casポリペプチドを前記初代細胞へ導入した後に、前記初代細胞またはその子孫が前記多細胞生物体へ戻される、請求項10～14のいずれか1項に記載の方法。

[請求項1～6]

前記初代細胞が初代細胞集団を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項1～7]

前記修飾型sgRNAが、前記初代細胞集団の少なくとも約30%において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項1～6に記載の方法。

[請求項1～8]

前記修飾型sgRNAが、前記初代細胞集団の少なくとも約40%において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項1～6に記載の方法。

[請求項1～9]

前記修飾型sgRNAが、前記初代細胞集団の少なくとも約50%において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項1～6に記載の方法。

[請求項1～20]

前記修飾型sgRNAが、前記初代細胞集団の少なくとも約60%において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項1～6に記載の方法。

[請求項1～21]

前記修飾型ヌクレオチドが、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはそれらの組合せにおける修飾を含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

[請求項1～22]

前記リボース基における修飾が、前記リボース基の2'位における修飾を含む、請求項2～1に記載の方法。

[請求項1～23]

前記リボース基の2'位における修飾が、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-O-(2-メトキシエチル)、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項2～2に記載の方法。

[請求項1～24]

前記リン酸基における修飾が、ホスホロチオエート修飾を含む、請求項2～1に記載の方法。

[請求項1～25]

前記修飾型ヌクレオチドが、2'-O-メチル(M)ヌクレオチド、2'-O-メチル3'-ホスホロチオエート(MS)ヌクレオチド、2'-O-メチル3'-チオPACE(MSP)ヌクレオチド、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

[請求項1～26]

前記第1のヌクレオチド配列が約20ヌクレオチド長である、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

[請求項1～27]

前記第1のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上が、修飾型ヌクレオチドである、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

[請求項1～28]

前記修飾型スクレオチドが、前記第1のスクレオチド配列の5'末端に、もしくは5'末端の近くに、および/または前記第1のスクレオチド配列内の内部の位置に位置する、請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。

[請求項29]

前記第1のスクレオチド配列におけるスクレオチドの約10%から約30%までが修飾型スクレオチドである、請求項1～28のいずれか1項に記載の方法。

[請求項30]

前記第2のスクレオチド配列が約80スクレオチド長である、請求項1～29のいずれか1項に記載の方法。

[請求項31]

前記第2のスクレオチド配列におけるスクレオチドの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上が、修飾型スクレオチドである、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。

[請求項32]

前記修飾型スクレオチドが、前記第2のスクレオチド配列の3'末端に、もしくは3'末端の近くに、および/または前記第2のスクレオチド配列内の内部の位置に位置する、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

[請求項33]

前記第2のスクレオチド配列におけるスクレオチドの約1%から約10%までが修飾型スクレオチドである、請求項1～32のいずれか1項に記載の方法。

[請求項34]

前記修飾型sgRNAが、前記第1のスクレオチド配列の5'末端、または5'末端の近くにおける1個、2個、または3個の連続した、または非連続の修飾型スクレオチド、および前記第2のスクレオチド配列の3'末端、または3'末端の近くにおける1個、2個、または3個の連続した、または非連続の修飾型スクレオチドを含む、請求項1～33のいずれか1項に記載の方法。

[請求項35]

前記修飾型sgRNAが、前記第1のスクレオチド配列の5'末端における3個の連続した修飾型スクレオチド、および前記第2のスクレオチド配列の3'末端における3個の連続した修飾型スクレオチドを含む、請求項34に記載の方法。

[請求項36]

前記修飾型sgRNAが化学合成される、請求項1～35のいずれか1項に記載の方法。

[請求項37]

前記修飾型sgRNAが少なくとも2個の異なる修飾型sgRNAを含み、各修飾型sgRNAが、異なる標的核酸へ方向づけられている、請求項1～36のいずれか1項に記載の方法。

[請求項38]

前記Casポリペプチドが、前記CasポリペプチドをコードするmRNAである、請求項1～37のいずれか1項に記載の方法。

[請求項39]

前記Casポリペプチドが、Cas9ポリペプチド、そのバリエント、またはその断片である、請求項1～38のいずれか1項に記載の方法。

[請求項40]

前記初代細胞へ導入するステップが、前記初代細胞をエレクトロポレーションすることを含む、請求項1～39のいずれか1項に記載の方法。

[請求項41]

対象において遺伝的疾患を予防または処置するための方法であって、前記遺伝的疾患に関連した標的遺伝子における変異を正すのに十分な量で修飾型単一ガイドRNA(sgRNA)を前記対象に投与するステップであって、前記修飾型sgRN

Aが、前記標的遺伝子に相補的な第1のヌクレオチド配列、およびC R I S P R 関連タンパク質(C a s)ポリペプチドと相互作用する第2のヌクレオチド配列を含み、かつ前記第1のヌクレオチド配列および/または前記第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの1個または複数が修飾型ヌクレオチドである、ステップを含む、方法。

[請求項42]

前記遺伝的疾患が、X連鎖重症複合免疫不全症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、血友病、腫瘍症、癌、H I V感染症、加齢黄斑変性、統合失調症、トリヌクレオチドリピート障害、脆弱X症候群、ブリオン関連障害、筋萎縮性側索硬化症、薬物依存、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソン病、囊胞性線維症、血液凝固性疾患または障害、炎症、免疫関連疾患または障害、代謝性疾患、肝臓疾患および障害、腎臓疾患および障害、筋肉/骨格疾患および障害、神経学的および神経細胞の疾患および障害、心血管疾患および障害、肺疾患および障害、ならびに眼疾患および障害からなる群から選択される、請求項41に記載の方法。

[請求項43]

C a s ポリペプチド、C a s ポリペプチドをコードするm R N A、および/またはC a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを対象に投与するステップをさらに含む、請求項41または42に記載の方法。

[請求項44]

前記C a s ポリペプチドが、C a s 9 ポリペプチド、そのバリエント、またはその断片である、請求項43に記載の方法。

[請求項45]

組換えドナー修復錆型を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項41~44のいずれか1項に記載の方法。

[請求項46]

前記修飾型s g R N Aの投与が、対応する非修飾型s g R N Aの投与と比較して、前記標的遺伝子において前記変異を正す前記C a s ポリペプチドの効果を増強する、請求項41~45のいずれか1項に記載の方法。

[請求項47]

前記修飾型s g R N A、C a s ポリペプチド、および/または組換えドナー修復錆型が、薬学的に許容される担体と共に前記対象に投与される、請求項45または46に記載の方法。

[請求項48]

前記修飾型s g R N A、C a s ポリペプチド、および/または組換えドナー修復錆型が、ナノ粒子、リポソーム、ミセル、ビロソーム、核酸複合体、およびそれらの組合せからなる群から選択される送達系によって前記対象へ投与される、請求項45~47のいずれか1項に記載の方法。

[請求項49]

前記核酸複合体が、前記C a s ポリペプチドと複合体化した前記修飾型s g R N Aを含む、請求項48に記載の方法。

[請求項50]

前記修飾型s g R N A、C a s ポリペプチド、および/または組換えドナー修復錆型が、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、皮下、細動脈内、脳室内、頭蓋内、病巣内、髄腔内、局所的、経粘膜、鼻腔内、およびそれらの組合せからなる群から選択される送達経路によって対象へ投与される、請求項45~49のいずれか1項に記載の方法。