

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成30年3月22日(2018.3.22)

【公表番号】特表2018-503386(P2018-503386A)

【公表日】平成30年2月8日(2018.2.8)

【年通号数】公開・登録公報2018-005

【出願番号】特願2017-539643(P2017-539643)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 9/16 (2006.01)

C 07 K 2/00 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 N 9/16 Z

C 07 K 2/00

【手続補正書】

【提出日】平成29年12月27日(2017.12.27)

【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】

单一ポリヌクレオチドであって、

デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)を含むターゲッティング領域と；

DNAを含む前記ターゲッティング領域に隣接した活性化領域と；

を含み、

ここで、前記活性化領域は、ステムループ構造を含み、そして、Cpf1と結合することが可能である、

前記单一ポリヌクレオチド。

【請求項2】

ターゲッティング領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】

ターゲッティング領域は、DNAおよびRNAの混合物を含み、活性化領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】

クラス2 C R I S P R系であって、

(i)(a) デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)を含むターゲッティング領域；および、(b) DNAを含む前記ターゲッティング領域に隣接した活性化領域；を含む单一ポリヌクレオチドであって；ここで前記活性化領域はステムループ構造を含み、そして、Cpf1と結合することが可能である；前記单一ポリヌクレオチドと；

(ii) Cpf1と

を実質的に含む、前記クラス2 C R I S P R系。

【請求項5】

前記ターゲッティング領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項4に記載のク

ラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 6】

前記活性化領域は、DNA および RNA の混合物を含む、請求項 4 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 7】

前記ターゲッティング領域は、DNA および RNA の混合物を含み、前記活性化領域は、DNA および RNA の混合物を含む、請求項 4 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 8】

ドナーポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 4 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 9】

単一ポリヌクレオチドであって、
デオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) を含むターゲッティング領域と；
DNA を含む前記ターゲッティング領域に隣接した活性化領域と；
を含み、

ここで、前記活性化領域は、ステムおよびバルジを含みを含み、そして、前記活性化領域は、Cas 9 と結合することが可能である、
前記単一ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

ターゲッティング領域は、DNA および RNA の混合物を含む、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

ターゲッティング領域は、DNA および RNA の混合物を含み、そして活性化領域は、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸アルキル、ホスホン酸 5'-アルキレン、キラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、3'-アミノホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスホフェート、およびボラノホスフェートからなる群から選択される化合物を含む、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

前記活性化領域は、下方ステム、バルジ、上方ステム、ネクサス、およびヘアピンを含む、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

クラス 2 C R I S P R 系であって、
(i) (a) デオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) を含むターゲッティング領域；および、(b) DNA を含む前記ターゲッティング領域に隣接した活性化領域；を含む単一ポリヌクレオチドであって；ここで前記活性化領域はステムおよびバルジを含み、そして、Cas 9 と結合することが可能である；前記単一ポリヌクレオチドと；

(i i) Cas 9 と

を実質的に含む、前記クラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 14】

前記活性化領域は、下方ステム、バルジ、上方ステム、ネクサス、およびヘアピンを含む、請求項 13 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 15】

前記ターゲッティング領域は、DNA および RNA の混合物を含む、請求項 13 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 16】

前記活性化領域は、DNA および RNA の混合物を含む、請求項 13 に記載のクラス 2

C R I S P R 系。

【請求項 17】

前記ターゲティング領域は、DNAおよびRNAの混合物を含み、そして活性化領域は、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸アルキル、ホスホン酸5'-アルキレン、キラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、3'-アミノホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスホフェート、およびボラノホスフェートからなる群から選択される化合物を含む、請求項13に記載のクラス2 C R I S P R 系。

【請求項 18】

ドナーポリヌクレオチドをさらに含む、請求項13に記載のクラス2 C R I S P R 系。

【請求項 19】

標的核酸分子を修飾する方法であって：

標的配列を有する前記標的核酸分子を、

(i) (a) デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)を含み、前記標的配列にハイブリダイズするように構成されるターゲティング領域；および

(b) 前記ターゲティング領域に隣接し、DNAを含む活性化領域であって、ここで前記活性化領域はステムループ構造を含む、前記活性化領域；
を含む単一ポリヌクレオチド；ならびに

(i i) C p f 1であって、ここでC p f 1は単一ポリヌクレオチドの活性化領域と結合し、前記標的核酸分子と前記単一ポリヌクレオチドおよび前記C p f 1との、(A) インビトロ、(B) 非ヒト細胞、または(C) 分離された細胞での接触が起き、そして前記標的核酸分子が切断される、前記C p f 1；
と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 20】

前記標的核酸分子は、DNAを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

前記標的核酸分子は、RNAを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 22】

前記標的核酸分子は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 23】

ターゲティング領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項19に記載の方法。

。

【請求項 24】

活性化領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 25】

ターゲティング領域は、DNAおよびRNAの混合物を含み、活性化領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 26】

標的核酸分子と、単一ポリヌクレオチドおよびC p f 1との接触が、インビトロで起こる、請求項19に記載の方法。

【請求項 27】

標的核酸分子と、単一ポリヌクレオチドおよびC p f 1との接触が、非ヒト細胞内で起こる、請求項19に記載の方法。

【請求項 28】

標的核酸分子と、単一ポリヌクレオチドおよびC p f 1との接触が、分離された細胞内で起こる、請求項19に記載の方法。

【請求項 29】

細胞は、細菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、藻類細胞、真菌細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

ドナーポリヌクレオチドをさらに含む、請求項19に記載の方法。

【請求項31】

標的核酸分子内の少なくとも1つの遺伝子の転写を調節する方法であって：

標的配列を有する前記標的核酸分子を、

(i) (a) デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)を含み、前記標的配列にハイブリダイズするように構成されるターゲティング領域であって、ここで前記標的配列は、前記少なくとも1つの遺伝子のオープンリーディングフレーム配列内または、前記少なくとも1つの遺伝子のプロモーター配列内にある、前記ターゲティング領域；および

(b) 前記ターゲティング領域に隣接し、DNAを含む活性化領域であって、ここで前記活性化領域はステムループ構造を含む、前記活性化領域；を含む単一ポリヌクレオチド；ならびに

(i i) Cpf1であって、ここで、Cpf1はヌクレアーゼ活性を有せず、Cpf1は単一ポリヌクレオチドの活性化領域と結合し、単一ポリヌクレオチドのターゲティング領域は標的配列にハイブリダイズし、前記標的核酸分子と前記単一ポリヌクレオチドおよび前記Cpf1との、(A)インビトロ、(B)非ヒト細胞、または(C)分離された細胞での接触が起き、そして前記標的核酸分子内の少なくとも1つの遺伝子の転写が調節される、前記Cpf1；

と接触させることを含む、前記方法。

【請求項32】

ターゲティング領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

活性化領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項34】

ターゲティング領域は、DNAおよびRNAの混合物を含み、前記活性化領域は、DNAおよびRNAの混合物を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項35】

標的核酸分子と、単一ポリヌクレオチドおよびCpf1との接触が、インビトロで起こる、請求項31に記載の方法。

【請求項36】

標的核酸分子と、単一ポリヌクレオチドおよびCpf1との接触が、非ヒト細胞内で起こる、請求項31に記載の方法。

【請求項37】

標的核酸分子と、単一ポリヌクレオチドおよびCpf1との接触が、分離された細胞内で起こる、請求項31に記載の方法。

【請求項38】

細胞は、細菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、藻類細胞、真菌細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

非ヒト生物、分離された細胞、またはインビトロでの標的核酸分子を修飾する方法であって、前記方法は：

細胞に、

(i) (a) 前記標的核酸内の標的配列にハイブリダイズするように構成されるターゲティング領域、および

(b) 前記ターゲティング領域に隣接し、デオキシリボ核酸(DNA)を含む活性化領域であって、ここで前記活性化領域はシステムおよびバルジを含む、前記活性化領域；を含む単一ポリヌクレオチド；ならびに

(i) C_{as}9であって、ここでC_{as}9は単一ポリヌクレオチドの活性化領域と結合し、前記単一ポリヌクレオチドの活性化領域は、前記標的配列とハイブリダイズし、そして前記標的核酸分子が切断される、前記C_{as}9；
を導入することを含む、前記方法。

【請求項40】

C_{as}9は、C_{as}9のコーディング配列を含む発現ベクターによりコードされる、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

単一ポリヌクレオチドおよびC_{as}9は、細胞内に導入する前に複合体を形成する、請求項39に記載の方法。

【請求項42】

C_{as}9は、核局在シグナル(NLS)を含む、請求項39に記載の方法。

【請求項43】

単一ポリヌクレオチドおよびC_{as}9は、リポフェクション、エレクトロポーレーション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリストイック、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、脂質：核酸コンジュゲート、またはそれらの組み合わせにより細胞内に導入される、請求項39に記載の方法。

【請求項44】

活性化領域は、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸アルキル、ホスホン酸5'-アルキレン、キラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、3'-アミノホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスホフェート、およびボラノホスフェートからなる群から選択される化合物を含む、請求項39に記載の方法。

【請求項45】

活性化領域は、下方システム、バルジ、上方システム、ネクサス、およびヘアピンを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項46】

細胞は、細菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、藻類細胞、真菌細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項47】

ターゲティング領域は、リボ核酸(RNA)を含む、請求項39に記載の方法。

【請求項48】

ドナーポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程をさらに含む、請求項39に記載の方法。

【請求項49】

非ヒト生物、分離された細胞、またはインビトロでの標的核酸分子内の少なくとも1つの遺伝子の転写を調節する方法であって、前記方法は：

細胞に、

(i) (a) 前記少なくとも1つの遺伝子のオープンリーディングフレーム内の標的配列、または前記少なくとも1つの遺伝子のプロモーター配列内の標的配列にハイブリダイズするように構成されるターゲティング領域、および

(b) 前記ターゲティング領域に隣接し、デオキシリボ核酸(DNA)を含む活性化領域であって、ここで前記活性化領域はシステムおよびバルジを含む、前記活性化領域；を含む単一ポリヌクレオチド；ならびに

(i i) C a s 9 であって、ここで C a s 9 は単一ポリヌクレオチドの活性化領域と結合し、前記単一ポリヌクレオチドの活性化領域は、前記標的配列とハイブリダイズし、そして前記標的核酸分子内の少なくとも 1 つの遺伝子の転写が調節される、前記 C a s 9 ; を導入することを含む、前記方法。

【請求項 5 0】

C a s 9 は、C a s 9 のコーディング配列を含む発現ベクターによりコードされる、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

単一ポリヌクレオチドおよび C a s 9 は、細胞内に導入する前に複合体を形成する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

C a s 9 は、核局在シグナル (N L S) を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 3】

単一ポリヌクレオチドおよび C a s 9 は、リポフェクション、エレクトロボーレーション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリストイック、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、脂質：核酸コンジュゲート、またはそれらの組み合わせにより細胞内に導入される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 4】

活性化領域は、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸アルキル、ホスホン酸 5 ' - アルキレン、キラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、3 ' - アミノホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスホフェート、およびボラノホスフェートからなる群から選択される化合物を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 5】

活性化領域は、下方ステム、バルジ、上方ステム、ネクサス、およびヘアピンを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 6】

細胞は、細菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、藻類細胞、真菌細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 7】

ターゲティング領域は、リボ核酸 (R N A) を含む、請求項 4 9 に記載の方法。