

【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 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 0 7 K 2/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/16 Z

C 0 7 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】

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、

前記単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 CRISPR 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; 前記単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 CRISPR 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) を含むターゲティング領域と

；

DNA を含む前記ターゲ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、Cas9 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) を含むターゲティング領域；および、(b) DNA を含む前記ターゲ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、Cas9 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

；

(ii) Cas9 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、およびボラノホスホ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) Cpfl であって、ここで、Cpfl はヌクレアーゼ活性を有せず、Cpfl 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 Cpfl 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 Cpfl ；

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 Cpfl 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 Cpfl 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 Cpfl 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

(ii) Cas9 であって、ここで Cas9 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 Cas9；を導入することを含む、前記方法。

【請求項 40】

Cas9 は、Cas9 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 Cas9 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】

Cas9 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 Cas9 は、リボフェクション、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、リボソーム、免疫リボソーム、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 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、リボフェクション、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、リボソーム、免疫リボソーム、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。