

【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2年4月16日(2020.4.16)

【公開番号】特開2019-162140(P2019-162140A)

【公開日】令和1年9月26日(2019.9.26)

【年通号数】公開・登録公報2019-039

【出願番号】特願2019-99850(P2019-99850)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/09 1 1 0

C 12 N 15/09 Z N A

【手続補正書】

【提出日】令和2年3月9日(2020.3.9)

【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】

二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットであって、

(i) 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ならびに当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチド；および、

(i i) 前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域における配列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチド、ここで、前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域と前記第二のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領域は、DNAとステムとバルジを含み、そして、ここで、当該活性化二重鎖領域はCas9と結合することが可能である；

を含む、セット。

【請求項2】

前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該ターゲティング領域は、DNAとRNAの混合物を含む、請求項1に記載の二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセット。

【請求項3】

当該活性化二重鎖領域は、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1に記載の二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセット。

【請求項4】

当該活性化二重鎖領域は、下方ステム、バルジ、および上方ステムを含む、請求項1に

記載の二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセット。

【請求項 5】

(i) 二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットであって、
(a) デオキシリボ核酸 (D N A) またはリボ核酸 (R N A) を含むターゲティング領域
ならびに当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のクラス 2 C R I S
P R ポリヌクレオチド；および、
(b) 前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域における配
列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチ
ド、ここで、前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域と前
記第二のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリ
ダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領
域は、 D N A とステムとバルジを含み、そして、ここで、当該活性化二重鎖領域は C a s
9 と結合することが可能である；
を含む、セット、および、
(i i) C a s 9
を含む、クラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 6】

当該活性化二重鎖領域は、下方ステム、バルジ、および上方ステムを含む、請求項 5 に
記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 7】

前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該ターゲティング領域は、 D
N A と R N A の混合物を含む、請求項 5 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 8】

当該活性化二重鎖領域は、 D N A と R N A の混合物を含む、請求項 5 に記載のクラス 2
C R I S P R 系。

【請求項 9】

当該活性化二重鎖領域は、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 5 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 10】

ドナーポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 5 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 11】

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) 二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットであって、
(a) デオキシリボ核酸 (D N A) またはリボ核酸 (R N A) を含むターゲティング領域
、ここで当該ターゲティング領域は標的核酸内の標的配列にハイブリダイズするように構
成されている、ならびに当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のクラス
2 C R I S P R ポリヌクレオチド；および、
(b) 前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域における配
列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチ
ド、ここで、前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域と前
記第二のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリ
ダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領
域は、 D N A とステムとバルジを含む；

を含む、セット、および、

(i) Cas 9 であって、ここで Cas 9 は前記二つのクラス 2 CRISPR ポリヌクレオチドの当該活性化二重鎖領域と結合し、前記第一のクラス 2 CRISPR ポリヌクレオチドの当該ターゲティング領域は、当該標的配列とハイブリダイズし、そして当該標的核酸が切断される、前記 Cas 9；
を導入することを含む、前記方法。

【請求項 12】

Cas 9 は、Cas 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 11 に記載の方法。

【請求項 13】

二つのクラス 2 CRISPR ポリヌクレオチドのセットおよび Cas 9 は、細胞内に導入する前に核タンパク質複合体を形成する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

Cas 9 は、核局在シグナル (NLS) を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

二つのクラス 2 CRISPR ポリヌクレオチドのセットおよび Cas 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 11 に記載の方法。

【請求項 16】

活性化二重鎖領域は、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 11 に記載の方法。

【請求項 17】

活性化二重鎖領域は、下方ステム、バルジ、および上方ステムを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 18】

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 11 に記載の方法。

【請求項 19】

ターゲティング領域は、DNA および RNA を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 20】

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 11 に記載の方法。

【請求項 21】

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) 二つのクラス 2 CRISPR ポリヌクレオチドのセットであって、
(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、ここで当該ターゲティング領域は少なくとも一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少なくとも一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ている、ならびに当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のクラス 2 CRISPR ポリヌクレオチド；および、

(b) 前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域における配列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチド、ここで、前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域と前記第二のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領域は、D N A とステムとバルジを含む；

を含む、セット、および、

(i i) C a s 9 であって、ここで当該C a s 9 はヌクレアーゼ活性を有さず、ここでC a s 9 は前記二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化二重鎖領域と結合し、前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該ターゲティング領域は、当該標的配列とハイブリダイズし、そして標的核酸分子内の少なくとも一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22】

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21に記載の方法。

【請求項23】

二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットおよびC a s 9 は、細胞内に導入する前に核タンパク質複合体を形成する、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

C a s 9 は、核局在シグナル(N L S)を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項25】

二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットおよびC a s 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21に記載の方法。

【請求項26】

活性化二重鎖領域は、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21に記載の方法。

【請求項27】

活性化二重鎖領域は、下方ステム、バルジ、および上方ステムを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項28】

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21に記載の方法。

【請求項29】

ターゲティング領域は、D N A およびR N A を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項30】

単一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドであって、
デオキシリボ核酸(D N A)を含むターゲッティング領域と；
当該ターゲッティング領域に隣接した、リボ核酸(R N A)を含む活性化領域と；
を含み、

ここで、当該活性化領域は、ステムループ構造を含み、そして、C p f 1 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 3 1】

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 3 0 に記載の単一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチド。

【請求項 3 2】

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 3 0 に記載の単一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチド。

【請求項 3 3】

(i) 単一のポリヌクレオチドであって、

デオキシリボ核酸 (DNA) を含むターゲッティング領域と、当該ターゲッティング領域に隣接した、リボ核酸 (RNA) を含む活性化領域とを含み、

ここで、当該活性化領域は、ステムループ構造を含み、そして、C p f 1 と結合することができる。

前記単一ポリヌクレオチド；および、

(i i) C p f 1

を含む、クラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 3 4】

当該ターゲッティング領域は、DNA と RNA の混合物を含む、請求項 3 3 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 3 5】

ドナーポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 3 3 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 3 6】

当該活性化領域は、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 3 3 に記載のクラス 2 C R I S P R 系。

【請求項 3 7】

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) 単一のポリヌクレオチドであって、

デオキシリボ核酸 (DNA) を含むターゲッティング領域と、当該ターゲッティング領域に隣接した、リボ核酸 (RNA) を含む活性化領域とを含み、

ここで、当該ターゲッティング領域は標的配列にハイブリダイズするように構成され、そして、当該活性化領域はステムループ構造を含む、

前記単一ポリヌクレオチド；および、

(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) 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 3 8】

前記標的核酸分子は、DNAを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記標的核酸分子は、RNAを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 0】

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37に記載の方法。

【請求項 4 1】

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37に記載の方法。

【請求項 4 2】

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、細胞内で起こる、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 3】

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37に記載の方法。

【請求項 4 4】

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 4 5】

ドナーポリヌクレオチドを供給することをさらに含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 6】

Cpf1は、Cpf1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37に記載の方法。

【請求項 4 7】

単一ポリヌクレオチドおよびCpf1は、細胞内に導入する前に複合体を形成する、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 8】

Cpf1は、核局在シグナル(NLS)を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 9】

単一ポリヌクレオチドおよびCpf1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37に記載の方法。

【請求項 5 0】

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37に記載の方法。

【請求項 5 1】

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：

標的配列を有する前記標的核酸分子を、

(i) 単一のポリヌクレオチドであって、

デオキシリボ核酸(DNA)を含むターゲッティング領域と、当該ターゲッティング領域

に隣接した、リボ核酸（RNA）を含む活性化領域とを含み、

ここで、当該ターゲティング領域は少なくとも一つの遺伝子のオープンリーディングフレーム配列内、または少なくとも一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ており、そして、当該活性化領域はステムループ構造を含む、

前記単一ポリヌクレオチド；および、

(i) Cpf1であって、ここで当該Cpf1はヌクレアーゼ活性を有さず、ここでCpf1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前記ターゲティング領域は、前記標的配列とハイブリダイズし、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)細胞、または(C)分離された細胞での接触が起き、そして標的核酸分子内の少なくとも一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52】

前記標的核酸分子は、DNAを含む、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記標的核酸分子は、RNAを含む、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

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51に記載の方法。

【請求項55】

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51に記載の方法。

【請求項56】

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、細胞内で起こる、請求項51に記載の方法。

【請求項57】

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51に記載の方法。

【請求項58】

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51に記載の方法。

【請求項59】

Cpf1は、Cpf1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51に記載の方法。

【請求項60】

単一ポリヌクレオチドおよびCpf1は、細胞内に導入する前に複合体を形成する、請求項51に記載の方法。

【請求項61】

Cpf1は、核局在シグナル(NLS)を含む、請求項51に記載の方法。

【請求項62】

単一ポリヌクレオチドおよびCpf1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、バイオリストラクチャ、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51に記載の方法。

【請求項63】

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51に記載の方法。

【請求項64】

(i) ターゲティング領域および当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のポリヌクレオチド；および、

(ii) 前記第一のポリヌクレオチドの当該活性化領域における配列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のポリヌクレオチド、ここで、前記第一のポリヌクレオチドの当該活性化領域と前記第二のポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領域は、DNAとシステムとバルジを含み、そして、ここで、当該活性化二重鎖領域は、Cas9、低減されたヌクレアーゼ活性を有するCas9、ニッカーゼ活性を有するCas9、ヌクレアーゼ活性を有さないCas9、およびCas9ドメインを含む融合タンパク質からなる群から選択される部位特異的ポリペプチドと結合することが可能であり、ここで、当該Cas9ドメインは、前記活性化二重鎖領域と結合することが可能であり、そして、ここで、前記融合タンパク質はCas9以外のポリペプチドに由来するドメインさらに含む；を含む、細胞。

【請求項65】

Cas9、低減されたヌクレアーゼ活性を有するCas9、ニッカーゼ活性を有するCas9、ヌクレアーゼ活性を有さないCas9、およびCas9ドメインを含む融合タンパク質からなる群から選択される部位特異的ポリペプチド、ここで、当該Cas9ドメインは、前記活性化二重鎖領域と結合することが可能であり、そして、ここで、前記融合タンパク質はCas9以外のポリペプチドに由来するドメインさらに含む、をさらに含む、請求項64に記載の細胞。

【請求項66】

前記部位特異的ポリペプチドは、前記部位特異的ポリペプチド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64に記載の細胞。

【請求項67】

前記部位特異的ポリペプチドは、前記細胞により構成的に発現される、請求項64に記載の細胞。

【請求項68】

前記部位特異的ポリペプチドは、核局在シグナル(NLS)を含む、請求項64に記載の細胞。

【請求項69】

前記部位特異的ポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性を有さないCas9である、請求項64に記載の細胞。

【請求項70】

前記部位特異的ポリペプチドは、低減されたヌクレアーゼ活性を有するCas9である、請求項64に記載の細胞。

【請求項71】

前記部位特異的ポリペプチドは、Cas9ドメインを含む融合タンパク質であり、ここで前記Cas9ドメインは前記活性化二重鎖領域と結合することが可能であり、そして、ここで、前記融合タンパク質は、Cas9以外のポリペプチドに由来するドメインをさらに含み、そしてそれは前記部位特異的ポリペプチドに対し、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、DNA修復活性、DNA損傷活性、脱アミノ活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、グリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ

活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性および脱ミリストイル化活性からなる群から選択される、さらなる活性を付与する、請求項64に記載の細胞。

【請求項72】

第一および第二のポリヌクレオチドは、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64に記載の細胞。

【請求項73】

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64に記載の細胞。

【請求項74】

活性化二重鎖領域は、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64に記載の細胞。

【請求項75】

ドナーポリヌクレオチドをさらに含む、請求項64に記載の細胞。

【請求項76】

二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットであって、
(i) 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ならびに当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチド；および、

(ii) 前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域における配列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチド、ここで、前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域と前記第二のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領域は、ステム構造を含み、そして、ここで、当該活性化二重鎖領域はCpf1と結合することが可能である、

を含む、セット。

【請求項77】

前記第一のクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該ターゲティング領域は、DNAとRNAの混合物を含む、請求項76に記載の二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセット。

【請求項78】

当該活性化二重鎖領域は、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76に記載の二つのクラス2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセット。

【請求項79】

当該活性化二重鎖領域は、DNAとRNAの混合物を含む、請求項76に記載の二つのクラス2 CRISPRポリヌクレオチドのセット。

【請求項80】

(i) 二つのクラス2 CRISPRポリヌクレオチドのセットであって、
(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ならびに当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のクラス2 CRISPRポリヌクレオチド；および、
(b) 前記第一のクラス2 CRISPRポリヌクレオチドの当該活性化領域における配列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のクラス2 CRISPRポリヌクレオチド、ここで、前記第一のクラス2 CRISPRポリヌクレオチドの当該活性化領域と前記第二のクラス2 CRISPRポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領域は、ステム構造を含み、そして、ここで、当該活性化二重鎖領域はCpf1と結合することが可能である；

を含む、セット、および、

(i) Cpf1

を含む、クラス2 CRISPR系。

【請求項81】

前記第一のクラス2 CRISPRポリヌクレオチドの当該ターゲティング領域は、DNAとRNAの混合物を含む、請求項80に記載のクラス2 CRISPR系。

【請求項82】

当該活性化二重鎖領域は、DNAとRNAの混合物を含む、請求項80に記載のクラス2 CRISPR系。

【請求項83】

当該活性化二重鎖領域は、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80に記載のクラス2 CRISPR系。

【請求項84】

ドナーポリヌクレオチドをさらに含む、請求項80に記載のクラス2 CRISPR系。

【請求項85】

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) 二つのクラス2 CRISPRポリヌクレオチドのセットであって、
(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、ここで当該ターゲティング領域は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ている、ならびに当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のクラス2 CRISPRポリヌクレオチド；および、
(b) 前記第一のクラス2 CRISPRポリヌクレオチドの当該活性化領域における配列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のクラス2 CRISPRポリヌクレオチド、ここで、前記第一のクラス2 CRISPRポリヌクレオチドの当該活性化領域と前記第二のクラス2 CRISPRポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領域は、ステム構造を含む；
を含む、セット、および、

(i) Cp f 1 であって、ここで Cp f 1 は前記二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化二重鎖領域と結合し、前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該ターゲティング領域は、当該標的配列とハイブリダイズし、そして当該標的核酸が切断される、前記 Cp f 1；
を導入することを含む、前記方法。

【請求項 8 6】

Cp f 1 は、Cp f 1 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 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットおよびCp f 1 は、細胞内に導入する前に核タンパク質複合体を形成する、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 8】

Cp f 1 は、核局在シグナル (NLS) を含む、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 9】

二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットおよびCp f 1 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 8 5 に記載の方法。

【請求項 9 0】

活性化二重鎖領域は、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 8 5 に記載の方法。

【請求項 9 1】

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 8 5 に記載の方法。

【請求項 9 2】

ターゲティング領域は、DNA および RNA を含む、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 9 3】

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 8 5 に記載の方法。

【請求項 9 4】

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) 二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットであって、
(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、ここで当該ターゲティング領域は少なくとも一つの遺伝子のオーブンリーディングフレーム内の標的配列または少なくとも一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ている、ならびに当該ターゲティング領域に隣接した活性化領域を含む第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチド；および、
(b) 前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域における配列と相補的な配列を含む活性化領域を含む第二のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチド、ここで、前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域と前記第二のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化領域は、互いにハイブリ

ダイズして活性化二重鎖領域を形成することが可能であり、ここで、当該活性化二重鎖領域は、システム構造を含む；

を含む、セット、および、

(i) C p f 1 であって、ここで当該 C p f 1 はヌクレアーゼ活性を有さず、ここで C p f 1 は前記二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該活性化二重鎖領域と結合し、前記第一のクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドの当該ターゲティング領域は、当該標的配列とハイブリダイズし、そして標的核酸分子内の少なくとも一つの遺伝子の転写が調節される、前記 C p f 1 ；

を導入することを含む、前記方法。

【請求項 9 5】

C p f 1 は、C p f 1 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 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットおよび C p f 1 は、細胞内に導入する前に核タンパク質複合体を形成する、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 7】

C p f 1 は、核局在シグナル (N L S) を含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 8】

二つのクラス 2 C R I S P R ポリヌクレオチドのセットおよび C p f 1 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 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 9】

活性化二重鎖領域は、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 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

ターゲティング領域は、DNA および RNA を含む、請求項 9 4 に記載の方法。