

【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29年7月13日(2017.7.13)

【公表番号】特表2015-523856(P2015-523856A)

【公表日】平成27年8月20日(2015.8.20)

【年通号数】公開・登録公報2015-052

【出願番号】特願2015-514015(P2015-514015)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	9/22	(2006.01)
A 0 1 K	67/027	(2006.01)
C 4 0 B	40/06	(2006.01)
C 0 7 K	14/315	(2006.01)
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)
A 6 1 P	31/04	(2006.01)
A 6 1 P	31/12	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	9/22	
A 0 1 K	67/027	
C 4 0 B	40/06	
C 0 7 K	14/315	
A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	48/00	

【誤訳訂正書】

【提出日】平成29年5月31日(2017.5.31)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的DNAを修飾する方法であって、
該標的DNAを複合体と接触させることを含み、
該複合体は、

(a) Cas9ポリペプチド並びに

(b) 単一分子DNA標的化RNAであって、

(i) 該標的DNA内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含むDNA標的化セグメント；および

(ii) 前記Cas9ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖RNA(dsRNA)を形成する、2つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記dsRNAは、tracrRNAおよびCRISPR RNA(crrRNA)の相補的なヌクレオチドを含み、前記2つの相補的な一続きのヌクレオチドは、介在ヌクレオチドによって共有結合的に連結されている、該タンパク質結合セグメントを含み、

前記DNA標的化セグメント、前記crrRNAのヌクレオチド、前記介在ヌクレオチド、前記tracrRNAのヌクレオチドは、この順に5'側から3側に配置されている、
单一分子DNA標的化RNA

を含む複合体であり、

該接触は、インビオのヒト細胞、ではない細胞内で行われ、

該修飾は標的DNAの切断である、

前記標的DNAを修飾する方法。

【請求項2】

前記dsRNAが8塩基対(bp)から30bpの長さを有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

該ハイブリダイズして該タンパク質結合セグメントのdsRNAを形成するヌクレオチド間の相補性が70%よりも大きい、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

該標的DNAが細菌細胞、古細菌細胞、真核単細胞生物、植物細胞、無脊椎動物由來の細胞、または脊椎動物由來の細胞に存在する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

該標的DNAが染色体DNAである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

該单一分子DNA標的化RNAが、1またはそれ以上の修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、Locked核酸もしくはペプチド核酸を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

該单一分子DNA標的化RNAが、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、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、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、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、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの1つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

該単一分子DNA標的化RNAが、

(i) ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、

(ii) Locked核酸(LNA)、並びに

(iii) 2'-Oメトキシメチル、2'-Oメチルおよび2'フルオロから選択される修飾された糖部分、

の1つまたはそれ以上を含む、

請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

該単一分子DNA標的化RNAが、

2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ、2'-Oメチルおよび2'フルオロから選択される、修飾された糖部分の1つまたはそれ以上を含む、

請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

該単一分子DNA標的化RNAが、

5-メチルシトシン、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、アデニンの6-メチル誘導体、グアニンの6-メチル誘導体、アデニンの2-プロピル誘導体、グアニンの2-プロピル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシル、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、偽ウラシル(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、5-ハロ、5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、5-置換ウラシル、5-置換シトシン、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、8-アザグアニン、8-アザアデニン、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、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、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、2-ピリドン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、N-2、N-6もしくはO-6置換プリン、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の1つまたはそれ以上を含む、

請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

該単一分子DNA標的化RNAが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および/または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、

請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

該接触が、

(a) 前記Cas9ポリペプチド又は前記Cas9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および

(b) 前記单一分子DNA標的化RNAまたは前記单一分子DNA標的化RNAをコード

するDNAポリヌクレオチド

を細胞に導入することを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記Cas9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および／または前記单一分子DNA標的化RNAをコードするDNAポリヌクレオチドが、組み換え発現ベクターである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記組み換え発現ベクターが、ウイルスベクターである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

該ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ隨伴ウイルスベクターおよび単純疱疹ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

該組み換え発現ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、ミニサークルベクター、ファージベクターおよびウイルスベクターからなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

さらに、ドナーポリヌクレオチドを細胞に導入することを含む、請求項12から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

該Cas9ポリペプチドのアミノ末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、該Cas9ポリペプチドの細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

該Cas9ポリペプチドのカルボキシル末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、該Cas9ポリペプチドの細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

該Cas9ポリペプチドが、RuvCドメインおよび／またはHNHドメインに一つ以上の変異を含む、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

該Cas9ポリペプチドが、対応する野生型Cas9タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

該標的DNAが、非相同末端結合(NHEJ)修復機構により編集される、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

該標的DNAが、相同組換修復(HDR)機構により編集される、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

該標的DNAが、ドナーポリヌクレオチドの配列を、該標的DNA分子の切断された鎖に挿入することにより編集される、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

組成物であって、

(a) Cas9ポリペプチド、または前記Cas9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びに

(b) 单一分子DNA標的化RNA、または前記单一分子DNA標的化RNAをコードするDNAポリヌクレオチドを含み、

該单一分子DNA標的化RNAは、

(i) 標的DNA内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、DNA標的化セグメント、および

(ii) 前記Cas9ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖RNA(dsRNA)を形成する2つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記dsRNAは、tracrRNAおよびCRISPR RNA(crrRNA)の相補的なヌクレオチドを含み、前記2つの相補的な一続きのヌクレオチドは、介在ヌクレオチドによって共有結合的に連結されている、該タンパク質結合セグメントを含み、

前記DNA標的化セグメント、前記crrRNAのヌクレオチド、前記介在ヌクレオチド、前記tracrRNAのヌクレオチドは、この順に5'側から3側に配置されている、單一分子DNA標的化RNAである、

前記組成物。

【請求項26】

前記dsRNAが8塩基対(bp)から30bpの長さを有する、請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

該ハイブリダイズして該タンパク質結合セグメントのdsRNAを形成するヌクレオチド間の相補性が70%よりも大きい、請求項25または26に記載の組成物。

【請求項28】

該標的DNAが細菌細胞、古細菌細胞、真核单細胞生物、植物細胞、無脊椎動物由來の細胞、または脊椎動物由來の細胞に存在する、請求項25～27のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項29】

該標的DNAが染色体DNAである、請求項25～27のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項30】

該Cas9ポリペプチドのアミノ末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、該Cas9ポリペプチドの細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する、請求項25～29のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項31】

該Cas9ポリペプチドのカルボキシル末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、該Cas9ポリペプチドの細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する、請求項25～29のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項32】

該Cas9ポリペプチドと該單一分子DNA標的化RNAは、インビボのヒト細胞、ではない細胞中に存在する、請求項25～31のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項33】

該單一分子DNA標的化RNAが、1またはそれ以上の修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、Locked核酸もしくはペプチド核酸を含む、請求項25～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項34】

該單一分子DNA標的化RNAが、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、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、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、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、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの1つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレ

オシド間連結を含む、請求項 25～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 35】

該単一分子DNA標的化RNAが、

(i) ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、

(ii) Locked 核酸(LNA)、並びに

(iii) 2'-O メトキシメチル、2'-O メチルおよび2' フルオロから選択される修飾された糖部分、

の1つまたはそれ以上を含む、

請求項 25～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 36】

該単一分子DNA標的化RNAが、

2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ、2'-O メチルおよび2' フルオロから選択される、修飾された糖部分の1つまたはそれ以上を含む、

請求項 25～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 37】

該単一分子DNA標的化RNAが、

5-メチルシトシン、5-ヒロド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、アデニンの6-メチル誘導体、グアニンの6-メチル誘導体、アデニンの2-プロピル誘導体、グアニンの2-プロピル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシル、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、偽ウラシル(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、5-ハロ、5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、5-置換ウラシル、5-置換シトシン、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、8-アザグアニン、8-アザアデニン、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、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、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、2-ピリドン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、N-2、N-6もしくはO-6置換プリン、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の1つまたはそれ以上を含む、

請求項 25～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 38】

該単一分子DNA標的化RNAが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および/または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、

請求項 25～37のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

前記 Cas9 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および/または前記单一分子DNA標的化RNAをコードするDNAポリヌクレオチドが、組み換え発現ベクターである、請求項 25～38のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記組み換え発現ベクターが、ウイルスベクターである、請求項3 9に記載の組成物。

【請求項 4 1】

該ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純疱疹ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項4 0に記載の組成物。

【請求項 4 2】

該組み換え発現ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、ミニサークルベクター、ファージベクターおよびウイルスベクターからなる群から選択される、請求項3 9に記載の組成物。

【請求項 4 3】

該C a s 9ポリペプチドが、R u v Cドメインおよび／またはH N Hドメインに一つ以上の変異を含む、請求項2 5～4 2のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 4】

該C a s 9ポリペプチドが、対応する野生型C a s 9タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項2 5～4 3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 5】

单一分子DNA標的化RNA、または前記单一分子DNA標的化RNAをコードするDNAポリヌクレオチドであって、該单一分子DNA標的化RNAが

(a) 標的DNA内の標的配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、DNA標的化セグメント、および

(b) C a s 9タンパク質と相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖RNA(dsRNA)を形成する2つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記dsRNAは、t r a c r RNAおよびC R I S P R RNA(crrRNA)の相補的なヌクレオチドを含み、前記2つの相補的な一続きのヌクレオチドは、介在ヌクレオチドによって共有結合的に連結されている、タンパク質結合セグメントを含み、

前記DNA標的化セグメント、前記crrRNAのヌクレオチド、前記介在ヌクレオチド、前記t r a c r RNAのヌクレオチドは、この順に5'側から3側に配置されている、前記单一分子DNA標的化RNA、または前記单一分子DNA標的化RNAをコードするDNAポリヌクレオチド。

【請求項 4 6】

前記dsRNAが8塩基対(bp)から30bpの長さを有する、請求項4 5に記載の单一分子DNA標的化RNA。

【請求項 4 7】

該ハイブリダイズして該タンパク質結合セグメントのdsRNAを形成するヌクレオチド間の相補性が70%よりも大きい、請求項4 5または4 6に記載の单一分子DNA標的化RNA。

【請求項 4 8】

該標的DNAが細菌細胞、古細菌細胞、真核单細胞生物、植物細胞、無脊椎動物由來の細胞、または脊椎動物由來の細胞に存在する、請求項4 5～4 7のいずれか一項に記載の单一分子DNA標的化RNA。

【請求項 4 9】

該標的DNAが染色体DNAである、請求項4 5～4 7のいずれか一項に記載の单一分子DNA標的化RNA。

【請求項 5 0】

該单一分子DNA標的化RNAが、1またはそれ以上の修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、L o c k e d核酸もしくはペプチド核酸を含む、請求項4 5～4 9のいずれか一項に記載の单一分子DNA標的化RNA。

【請求項 5 1】

該單一分子DNA標的化RNAが、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、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、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、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、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの1つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項45～49のいずれか一項に記載の單一分子DNA標的化RNA。

【請求項 5 2】

該單一分子DNA標的化RNAが、

(i) ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、

(ii) Locked核酸(LNA)、並びに

(iii) 2'-Oメトキシメチル、2'-Oメチルおよび2'フルオロから選択される修飾された糖部分、

の1つまたはそれ以上を含む、

請求項45～49のいずれか一項に記載の單一分子DNA標的化RNA。

【請求項 5 3】

該單一分子DNA標的化RNAが、

2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ、2'-Oメチルおよび2'フルオロから選択される、修飾された糖部分の1つまたはそれ以上を含む、

請求項45～49のいずれか一項に記載の單一分子DNA標的化RNA。

【請求項 5 4】

該單一分子DNA標的化RNAが、

5-メチルシトシン、5-ヒロド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、アデニンの6-メチル誘導体、グアニンの6-メチル誘導体、アデニンの2-プロピル誘導体、グアニンの2-プロピル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシル、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、偽ウラシル(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、5-ハロ、5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、5-置換ウラシル、5-置換シトシン、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、8-アザグアニン、8-アザアデニン、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、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、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、2-ピリドン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、N-2、N-6もしくはO-6置換プリン、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の1つまたはそれ以上を含む、

請求項45～49のいずれか一項に記載の單一分子DNA標的化RNA。

【請求項 5 5】

該單一分子DNA標的化RNAが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノ

ン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および／または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている。

請求項 4 5 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の単一分子 D N A 標的化 R N A 。

【請求項 5 6】

一つまたはそれ以上の核酸であって、

(a) 単一分子 D N A 標的化 R N A をコードする、第 1 のヌクレオチド配列を含み、該単一分子 D N A 標的化 R N A は、

(i) 標的 D N A 内の標的配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む D N A 標的化セグメント、および

(i i) C a s 9 ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖 R N A (d s R N A) を形成する 2 つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記 d s R N A は、 t r a c r R N A および C R I S P R R N A (c r R N A) の相補的なヌクレオチドを含み、前記 2 つの相補的な一続きのヌクレオチドは、介在ヌクレオチドによって共有結合的に連結されている、該タンパク質結合セグメントを含み、

前記 D N A 標的化セグメント、前記 c r R N A のヌクレオチド、前記介在ヌクレオチド、前記 t r a c r R N A のヌクレオチドは、この順に 5' 側から 3' 側に配置されている、単一分子 D N A 標的化 R N A であり、

前記 单一分子 D N A 標的化 R N A をコードする第 1 のヌクレオチド配列は、プロモーターに作動可能に連結しており、並びに、

(b) C a s 9 ポリペプチドをコードする、第 2 のヌクレオチド配列であって、前記 C a s 9 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、プロモーターに作動可能に連結している、第 2 のヌクレオチド配列、を含んでもよい、

前記一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 5 7】

前記核酸は一つまたはそれ以上の組み換え発現ベクターである、請求項 5 6 に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 5 8】

前記一つまたはそれ以上の組み換え発現ベクターが、一つまたはそれ以上のウイルスベクターである、請求項 5 7 に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 5 9】

該ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純疱疹ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 5 8 に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 0】

該組み換え発現ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、ミニサークルベクター、ファージベクターおよびウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 5 7 に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 1】

該第 2 のヌクレオチド配列が、該 C a s 9 ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に共有結合的に連結された、タンパク質形質導入ドメインをコードし、ここで、前記タンパク質形質導入ドメインは、該 C a s 9 ポリペプチドの細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する、請求項 5 6 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 2】

前記 d s R N A が 8 塩基対 (b p) から 3 0 b p の長さを有する、請求項 5 6 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 3】

該ハイブリダイズして該タンパク質結合セグメントの d s R N A を形成するヌクレオチド間の相補性が 70 %よりも大きい、請求項 5 6 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 4】

該標的 D N A が細菌細胞、古細菌細胞、真核単細胞生物、植物細胞、無脊椎動物由來の細胞、または脊椎動物由來の細胞に存在する、請求項 5 6 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 5】

該標的 D N A が染色体 D N A である、請求項 5 6 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 6】

該 C a s 9 ポリペプチドが、R u v C ドメインおよび / または H N H ドメインに一つ以上の変異を含む、請求項 5 6 ~ 6 5 のいずれか一項に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 7】

該 C a s 9 ポリペプチドが、対応する野生型 C a s 9 タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項 5 6 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の一つまたはそれ以上の核酸。

【請求項 6 8】

キットであって、
(a) C a s 9 ポリペプチドまたは前記 C a s 9 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、並びに

(b) 单一分子 D N A 標的化 R N A 、または前記单一分子 D N A 標的化 R N A をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含み、

該单一分子 D N A 標的化 R N A は、

(i) 標的 D N A 内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む D N A 標的化セグメント、および

(i i) 前記 C a s 9 ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖 R N A (d s R N A) を形成する 2 つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、該 d s R N A は、 t r a c r R N A および C R I S P R R N A (c r R N A) の相補的なヌクレオチドを含み、前記 2 つの相補的な一続きのヌクレオチドは、介在ヌクレオチドによって共有結合的に連結されている、該タンパク質結合セグメントを含み、

前記 D N A 標的化セグメント、前記 c r R N A のヌクレオチド、前記介在ヌクレオチド、前記 t r a c r R N A のヌクレオチドはこの順に 5 ' 側から 3 側に配置されている、单一分子 D N A 標的化 R N A であり、

(a) および (b) は单一のまたは別々の容器中に存在する、

前記キット。

【請求項 6 9】

該標的 D N A が細菌細胞、古細菌細胞、真核単細胞生物、植物細胞、無脊椎動物由來の細胞、または脊椎動物由來の細胞に存在する、請求項 6 8 に記載のキット。

【請求項 7 0】

該標的 D N A が染色体 D N A である、請求項 6 8 に記載のキット。

【請求項 7 1】

前記 C a s 9 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む前記核酸、および / または前記单一分子 D N A 標的化 R N A をコードするヌクレオチド配列を含む前記核酸が、組み換え発現ベクターである、請求項 6 8 ~ 7 0 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7 2】

前記組み換え発現ベクターが、ウイルスベクターである、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 3】

該ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウ

イルスペクター、アデノ随伴ウイルスペクターおよび単純疱疹ウイルスペクターからなる群から選択される、請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 7 4】

該組み換え発現ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、ミニサークルベクター、ファージベクターおよびウイルスペクターからなる群から選択される、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 5】

タンパク質形質導入ドメインが、該 Cas 9 ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に共有結合的に連結されており、ここで、前記タンパク質形質導入ドメインは、該 Cas 9 ポリペプチドの細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する、請求項 6 8 ~ 7 4 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7 6】

該單一分子 DNA 標的化 RNA が、1 またはそれ以上の修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、Locked 核酸もしくはペプチド核酸を含む、請求項 6 8 ~ 7 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7 7】

該單一分子 DNA 標的化 RNA が、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、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、3' - アルキレンホスホネート、5' - アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、3' - アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、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、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの 1 つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項 6 8 ~ 7 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7 8】

該單一分子 DNA 標的化 RNA が、
(i) ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、

(i i) Locked 核酸 (LNA) 、並びに

(i i i) 2' O メトキシメチル、2' O メチルおよび 2' フルオロから選択される修飾された糖部分、

の 1 つまたはそれ以上を含む、

請求項 6 8 ~ 7 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7 9】

該單一分子 DNA 標的化 RNA が、
2' - O - (2 - メトキシエチル) 、 2' - ジメチルアミノオキシエトキシ、 2' - ジメチルアミノエトキシエトキシ、 2' O メチルおよび 2' フルオロから選択される、修飾された糖部分の 1 つまたはそれ以上を含む、

請求項 6 8 ~ 7 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8 0】

該單一分子 DNA 標的化 RNA が、
5 - メチルシトシン、5 - ヒロド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、アデニンの 6 - メチル誘導体、グアニンの 6 - メチル誘導体、アデニンの 2 - プロピル誘導体、グアニンの 2 - プロピル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン、2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル、5 - ハロシトシン、5 - プロピニルウラシル、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、偽ウラシル (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、5 - ハロ、5 - ブロモ、5 - トリフルオロメチル、5 - 置換ウラシル、5 - 置換シトシン、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、8 - アザグアニン、8 - ア

ザアデニン、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、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、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、2 - ピリドン、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、N - 2、N - 6 もしくはO - 6 置換プリン、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の1つまたはそれ以上を含む、

請求項68～75のいずれか一項に記載のキット。

【請求項81】

該単一分子DNA標的化RNAが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシリアルアミノ - カルボニル - オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および / または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、

請求項68～80のいずれか一項に記載のキット。

【請求項82】

該Cas9ポリペプチドが、RuvCドメインおよび / またはHNHドメインに一つ以上の変異を含む、請求項68～81のいずれか一項に記載のキット。

【請求項83】

該Cas9ポリペプチドが、対応する野生型Cas9タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項68～82のいずれか一項に記載のキット。

【請求項84】

患者の治療的な処置方法において用いるための、請求項25～44のいずれか一項に記載の組成物、請求項45～55のいずれか一項に記載の単一分子DNA標的化RNA、請求項56～67のいずれか一項に記載の一つまたはそれ以上の核酸、または請求項68～83のいずれか一項に記載のキット。

【請求項85】

遺伝子改变された真核生物細胞であって、

1つまたはそれ以上の

(a) 単一分子DNA標的化RNAであって、

(i) 標的DNA内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含むDNA標的化セグメント、および

(ii) 前記Cas9ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、ハイブリダイズして二本鎖RNA(dsRNA)を形成する2つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、該dsRNAは、tracrRNAおよびCRISPR RNA(cRNA)の相補的なヌクレオチドを含み、前記2つの相補的な一続きのヌクレオチドは、介在ヌクレオチドによって共有結合的に連結されている、前記タンパク質結合セグメントを含み、

前記DNA標的化セグメント、前記cRNAのヌクレオチド、前記介在ヌクレオチド、前記tracrRNAのヌクレオチドは、この順に5'側から3側に配置されている、前記単一分子DNA標的化RNA、並びに、

(b) Cas9ポリペプチドおよび / またはCas9ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、

前記遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項86】

前記dsRNAが8塩基対(bp)から30bpの長さを有する、請求項85に記載の

遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項 8 7】

該ハイブリダイズして該タンパク質結合セグメントの d s R N Aを形成するヌクレオチド間の相補性が 70 %よりも大きい、請求項 8 5 または 8 6 に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項 8 8】

該標的 D N A が前記真核生物細胞の染色体 D N Aである、請求項 8 5 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項 8 9】

タンパク質形質導入ドメインが、該 C a s 9 ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に共有結合的に連結されており、ここで、前記タンパク質形質導入ドメインは、該 C a s 9 ポリペプチドの細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する、請求項 8 5 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項 9 0】

該単一分子 D N A 標的化 R N A が、1 またはそれ以上の修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、L o c k e d 核酸もしくはペプチド核酸を含む、請求項 8 5 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項 9 1】

該単一分子 D N A 標的化 R N A が、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、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、3' - アルキレンホスホネート、5' - アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、3' - アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、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、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの1つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項 8 5 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項 9 2】

該単一分子 D N A 標的化 R N A が、

(i) ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、

(i i) L o c k e d 核酸 (L N A) 、並びに

(i i i) 2' O メトキシメチル、2' O メチルおよび2' フルオロから選択される修飾された糖部分、

の1つまたはそれ以上を含む、

請求項 8 5 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項 9 3】

該単一分子 D N A 標的化 R N A が、

2' - O - (2 - メトキシエチル) 、2' - ジメチルアミノオキシエトキシ、2' - ジメチルアミノエトキシエトキシ、2' O メチルおよび2' フルオロから選択される、修飾された糖部分の1つまたはそれ以上を含む、

請求項 8 5 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項 9 4】

該単一分子 D N A 標的化 R N A が、

5 - メチルシトシン、5 - ヒロド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、アデニンの6 - メチル誘導体、グアニンの6 - メチル誘導体、アデニンの2 - プロピル誘導体、グアニンの2 - プロピル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン、2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル、5 - ハロシトシン、5 - プロピニルウラシル、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、偽ウラシル (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、5 - ハロ、5 - ブロモ、5 - トリフルオロメチル、5 - 置換ウラシル、5 - 置換シトシン、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、8 - アザグアニン、8 - アザアデニン、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、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、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、2 - ピリドン、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、N - 2、N - 6 もしくはO - 6 置換プリン、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の1つまたはそれ以上を含む。

請求項85～89のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項95】

該単一分子DNA標的化RNAが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシリアミノ - カルボニル - オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および/または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、

請求項85～94のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項96】

該Cas9ポリペプチドが、RuvCドメインおよび/またはHNHドメインに一つ以上の変異を含む、請求項85～95のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項97】

該Cas9ポリペプチドが、対応する野生型Cas9タンパク質に比して、低いヌクレオーゼ活性を有する、請求項85～96のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【請求項98】

前記遺伝子改变された真核生物細胞が、インビボのヒト細胞ではない、請求項85～97のいずれか一項に記載の遺伝子改变された真核生物細胞。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0139

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0139】

内部にリン原子を含有する適切な修飾されたオリゴヌクレオチド骨格としては、例えば、通常の3' - 5' 連結を有する、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、メチルおよび他のアルキルのホスホン酸エステル、例えば、3' - アルキレンホスホネート、5' - アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミダート、例えば、3' - アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、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、セレノホスフェートおよびボラノホスフェート、これらの2' - 5' 連結類似体、並びに一つまたは複数のヌクレオチド間連結が3' から3'、5' から5' または2' から2' 連結である逆の極性を有するものが挙げられる。

逆の極性を有する適切なオリゴヌクレオチドは、3'末端ヌクレオチド間連結における单一の3'から3'の連結、すなわち、单一の逆のヌクレオシド残基を含み、当該ヌクレオシド残基は脱塩基性（核酸塩基が失われているか、その位置にヒドロキシリル基を有する）であってもよい。種々の塩（例えば、カリウムまたはナトリウム等）、混合塩および遊離酸形態も含まれる。