

【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10月19日 (2017.10.19)

【公表番号】特表2016-533760(P2016-533760A)

【公表日】平成28年11月4日 (2016.11.4)

【年通号数】公開・登録公報2016-062

【出願番号】特願2016-540409(P2016-540409)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/115 (2010.01)

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 1 2 N 9/16 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 47/50 (2017.01)

A 6 1 K 47/42 (2017.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A H

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 9/16 Z

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 43/00 1 0 5

【手続補正書】

【提出日】平成29年9月5日 (2017.9.5)

【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】

(i) アプタマーを含む g R N A であって、g R N A が、アプタマーに結合した特異的リガンドの非存在下では標的核酸にハイブリダイズしない、前記 g R N A と；(i i) C a s 9 タンパク質とを含む複合体。

【請求項 2】

アプタマーにリガンドが結合していて、任意に、リガンドが、小分子、代謝産物、ペプチド、または核酸である、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 3】

gRNA：リガンド：Cas9 複合体が標的核酸を結合する、請求項 2 に記載の複合体。

【請求項 4】

アプタマーを含む gRNA であって、アプタマーに結合した特異的リガンドの非存在下では標的核酸にハイブリダイズせず、アプタマーに結合した特異的リガンドの非存在下では Cas9 タンパク質を結合しない、前記 gRNA。

【請求項 5】

アプタマーが、アプタマーに特異的なリガンドにより結合されているとき、gRNA が Cas9 タンパク質を結合する、請求項 4 に記載の gRNA。

【請求項 6】

アプタマーに結合する特異的リガンドの存在下または非存在下で Cas9 タンパク質を結合するが、アプタマーに結合した特異的リガンドの存在下でのみ標的核酸に結合する、請求項 5 に記載の gRNA。

【請求項 7】

リガンドが、小分子、代謝産物、ペプチド、または核酸である、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 8】

アプタマーが RNA アプタマーである、請求項 4 ~ 7 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 9】

RNA アプタマーがリボスイッチに由来し、任意に、リボスイッチが、テオフィリンリボスイッチ、チアミンピロリン酸エステル (TPP) リボスイッチ、アデノシンコバラミン (AdoCbl) リボスイッチ、S - アデノシルメチオニン (SAM) リボスイッチ、SAH リボスイッチ、フラビンモノヌクレオチド (FMN) リボスイッチ、テトラヒドロ葉酸リボスイッチ、リジンリボスイッチ、グリシンリボスイッチ、プリンリボスイッチ、GlmS リボスイッチ、またはプレケオシン 1 (PreQ1) リボスイッチである、請求項 8 に記載の gRNA。

【請求項 10】

アプタマーがテオフィリンリボスイッチに由来し、配列番号 3 を含む、請求項 9 に記載の gRNA。

【請求項 11】

アプタマーが、試験管内進化法 (SELEX) プラットフォームを使用して特異的リガンドを結合するよう操作されている、請求項 4 ~ 10 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 12】

非アプタマー部分が、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 70、少なくとも 80、少なくとも 90、少なくとも 100、少なくとも 110、少なくとも 120、少なくとも 130、少なくとも 140、または少なくとも 150 個のヌクレオチドを含み、アプタマーが、少なくとも 20、少なくとも 30、少なくとも 40、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 70、少なくとも 80、少なくとも 90、少なくとも 100、少なくとも 110、少なくとも 120、少なくとも 130、少なくとも 140、少なくとも 150、少なくとも 175、少なくとも 200、少なくとも 250、または少なくとも 300 個のヌクレオチドを含む、請求項 4 ~ 11 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 13】

(i) 請求項 4 ~ 12 のいずれか一項に記載の gRNA と、(ii) Cas9 タンパク質とを含む複合体。

【請求項 14】

DNA を、(i) DNA の部分を結合する配列を含む請求項 4 ~ 12 のいずれか一項に記載の gRNA と、(ii) gRNA のアプタマーに結合した特異的リガンドと、(iii) Cas9 タンパク質とを含む複合体に、Cas9 タンパク質が DNA を切断する条件

下で接触させることを含む、in vitroの部位特異的DNA切断方法であって、任意に、DNAが細胞中にあり、任意に、細胞が真核細胞である、前記方法。

【請求項15】

細胞において部位特異的DNA切断を誘発するin vitroの方法であって、

(a) DNA標的配列に結合可能な配列を含む、請求項4～12のいずれか一項に記載のgRNAを、細胞に接触させるかまたは細胞内で発現させること；

(b) Cas9タンパク質を、細胞に接触させるかまたは細胞内で発現させること；および

(c) gRNAのアプタマーを結合する特異的リガンドを細胞に接触させ、DNA標的を切断するgRNA：リガンド：Cas9複合体を形成させることを含む、前記方法。

【請求項16】

細胞において部位特異的DNA切断を誘発するin vitroの方法であって、(a) Cas9タンパク質と、DNA標的配列に結合可能な配列を含む、請求項4～12のいずれか一項に記載のgRNAとを含む複合体を、細胞に接触させること、および(b) gRNAのアプタマーを結合する特異的リガンドを細胞に接触させ、DNA標的を切断するgRNA：リガンド：Cas9複合体を形成させることを含む、任意に、工程(a)および(b)を、同時にまたは順次に任意の順番で実行する、前記方法。

【請求項17】

Cas9タンパク質とgRNAとを含む複合体であって、gRNAが(i)標的核酸の領域とハイブリダイズする領域と；(ii)領域(i)の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域と；(iii)転写物(mRNA)の領域とハイブリダイズする領域とを含む、前記複合体。

【請求項18】

(i)標的核酸の領域とハイブリダイズする領域と；(ii)領域(i)の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域と；(iii)転写物(mRNA)の領域とハイブリダイズする領域とを含むgRNA。

【請求項19】

領域(i)、領域(ii)、および領域(iii)の各配列が、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、または少なくとも25個のヌクレオチドを含む、請求項18に記載のgRNA。

【請求項20】

ステムが領域(ii)の配列の一部または全部とハイブリダイズした領域(i)の配列を含み、ループが領域(iii)の配列の一部または全部から形成されるステム・ループ構造を形成する、請求項18または19に記載のgRNAであって、任意に、領域(ii)および領域(iii)の両方が、領域(i)に対して5'または3'側のいずれかにあり、任意に、領域(iii)の配列とハイブリダイズする転写物の非存在下でステム・ループ構造が形成され、任意に、転写物が領域(iii)の配列を結合することにより、領域(ii)の配列が領域(i)の配列とハイブリダイズしないように、ステム・ループ構造がアンフォールドされるか、またはステム・ループ構造の形成が阻止され、任意に、gRNAがCas9タンパク質を結合し、領域(iii)の配列が転写物を結合すると領域(i)の配列が標的核酸とハイブリダイズする、前記gRNA。

【請求項21】

Cas9タンパク質と、請求項18～20のいずれか一項に記載のgRNAとを含む複合体。

【請求項22】

DNAを請求項17に記載の複合体と接触させることを含む、in vitroの部位特異的DNA切断方法であって、任意に、DNAが細胞中にあり、任意に、細胞が真核細胞である、前記方法。

【請求項23】

(i)標的核酸の領域とハイブリダイズする領域と；(ii)領域(i)の配列と部分

的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域と；(i i i) 標的核酸の他の領域とハイブリダイズする領域とを含む g R N A。

【請求項 2 4】

領域 (i) および領域 (i i) の各配列が、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、または少なくとも 25 個のヌクレオチドを含み、領域 (i i i) の配列が、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 40、少なくとも 50、少なくとも 75、または少なくとも 100 個のヌクレオチドを含む、請求項 2 3 に記載の g R N A であって、任意に、ステムが領域 (i i) の配列の一部または全部とハイブリダイズした領域 (i) の配列を含み、ループが領域 (i i i) の配列の一部または全部から形成されるステム・ループ構造を形成する g R N A であって、任意に、領域 (i i) および領域 (i i i) の両方が、領域 (i) に対して 5' または 3' 側のいずれかにあり、任意に、(i i i) 中の配列と相補し結合する標的核酸の領域の非存在下でステム・ループ構造が形成され、任意に、標的核酸の領域が領域 (i i i) の配列へハイブリダイゼーションすることにより、領域 (i i) の配列が領域 (i) の配列とハイブリダイズしないように、ステム・ループ構造がアンフォールドされるか、またはステム・ループ構造の形成が阻止され、および任意に、g R N A が C a s 9 タンパク質を結合し、(i i i) 中の配列が標的核酸を結合すると (i) 中の配列が標的核酸を結合する、前記 g R N A。

【請求項 2 5】

請求項 2 3 または 2 4 に記載の g R N A と、C a s 9 タンパク質とを含む複合体であって、任意に標的核酸を含み、任意に、複合体の形成により、標的核酸が切断される、前記複合体。

【請求項 2 6】

請求項 4 ~ 1 2、1 8 ~ 2 0、2 3 および 2 4 のいずれか一項に記載の g R N A をコードする単離したポリヌクレオチド。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載のポリヌクレオチドおよび任意に C a s 9 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 2 8】

請求項 4 ~ 1 2、1 8 ~ 2 0、2 3 および 2 4 のいずれか一項に記載の g R N A をコードするポリヌクレオチドおよび任意に C a s 9 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現用ベクター。

【請求項 2 9】

請求項 4 ~ 1 2、1 8 ~ 2 0、2 3 および 2 4 のいずれか一項に記載の g R N A および任意に C a s 9 タンパク質を発現する遺伝子構築物を含む細胞。

【請求項 3 0】

D N A を請求項 1 ~ 3、1 3、1 7、2 1 および 2 5 のいずれか一項に記載の複合体に接触させることを含む、in vitro の部位特異的 D N A 切断方法であって、任意に、D N A が細胞中にあり、任意に、細胞が真核細胞である、前記方法。

【請求項 3 1】

D N A を、C a s 9 と x D N A をセンスする g R N A とを含む複合体と接触させることを含む in vitro の部位特異的 D N A 切断方法であって、複合体の D N A への結合により D N A が切断され、任意に、D N A が細胞中にあり、任意に、細胞が真核細胞である、前記方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 4】

本明細書で使用される「ヌクレアーゼ」という用語は、核酸分子中のヌクレオチド残基を連結するリン酸ジエステル結合を切断することが可能な、例えばタンパク質または小分子などの薬剤を意味する。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼは、例えば核酸分子を結合し、核酸分子内のヌクレオチド残基を連結するリン酸ジエステル結合を切断可能な酵素などのタンパク質である。ヌクレアーゼは、ポリヌクレオチド鎖内のリン酸ジエステル結合を切断するエンドヌクレアーゼ、あるいはポリヌクレオチド鎖の末端リン酸ジエステル結合を切断するエキソヌクレアーゼであってもよい。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼは、本明細書では「認識配列」、「ヌクレアーゼ標的部位」、または「標的部位」とも呼ばれる特異的なヌクレオチド配列内の特異的なリン酸ジエステル結合を連結および/または切断する部位特異的なヌクレアーゼである。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼは、標的部位に相補する配列を有するRNA（例、ガイドRNA、「gRNA」）と複合体を形成する（例えばそれと結合する）ことでヌクレアーゼの配列特異性を提供するRNA誘導型（すなわち、RNAプログラム可能）ヌクレアーゼである。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼは、一本鎖標的部位を認識する。他の実施態様では、ヌクレアーゼは、例えば二本鎖DNA標的部位などの二本鎖標的部位を認識する。例えば多くの天然に存在するDNA制限ヌクレアーゼなどの多くの天然に存在するヌクレアーゼ標的部位は、当業者には公知である。多くのケースでは、EcoRI、HindIII、またはBamHIなどのDNAヌクレアーゼは、長さが4～10個の塩基対のパリンドロームである二本鎖DNA標的部位を認識し、標的部位内の特異的な位置で二本のDNA鎖の各鎖を切断する。いくつかのエンドヌクレアーゼは、二本鎖核酸標的部位を対称的に、すなわち本明細書では平滑末端とも呼ぶ末端が塩基対をなすヌクレオチドからなるように両鎖を同じ位置で切断する。他のエンドヌクレアーゼは、二本鎖核酸標的部位を非対称的に、すなわち末端が対をなさないヌクレオチドからなるように両鎖を異なる位置で切断する。二本鎖DNA分子の末端の不對のヌクレオチドは、不對のヌクレオチドがそれぞれのDNA鎖の5'または3'末端を形成するかにより、例えば「5'突出」または「3'突出」のように「突出」とも呼ばれる。末端が不對のヌクレオチドである二本鎖DNA分子の末端は、相補的不對ヌクレオチドを含む他の二本鎖DNA分子末端に「粘着」可能なので、粘着末端とも呼ばれる。ヌクレアーゼタンパク質は、通常タンパク質と核酸基質との相互作用を仲介し、更にいくつかのケースでは、特異的に標的部位に結合する「結合ドメイン」と、核酸主鎖内のリン酸ジエステル結合の切断を触媒する「切断ドメイン」とを含む。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼタンパク質は、単量体の形態で核酸分子を結合・切断可能であるが、他の実施態様では、ヌクレアーゼタンパク質は、標的核酸分子を切断するために二量体化または多量体化する必要がある。天然に存在するヌクレアーゼの結合ドメインおよび切断ドメインと、融合して特異的な標的部位に結合するヌクレアーゼを作成可能なモジュールの結合ドメインおよび切断ドメインは、当業者には公知である。例えば、RNAプログラム可能ヌクレアーゼ（例、Cas9）の結合ドメイン、すなわち不活性DNA切断ドメインを有するCas9タンパク質を、所望の標的部位を特異的に結合する結合ドメイン（例、gRNAに結合して標的部位への結合を指示する）として使用し、例えばFokIの切断ドメインなどの切断ドメインと融合または接合し標的部位を切断するよう操作されたヌクレアーゼを作成することが可能である。