

【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3年5月27日(2021.5.27)

【公表番号】特表2020-517299(P2020-517299A)

【公表日】令和2年6月18日(2020.6.18)

【年通号数】公開・登録公報2020-024

【出願番号】特願2020-507491(P2020-507491)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

C 1 2 N 15/79 (2006.01)

C 1 2 N 15/90 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/11 Z N A Z

C 1 2 N 15/55

C 1 2 N 15/79 Z

C 1 2 N 15/90 1 0 0 Z

【手続補正書】

【提出日】令和3年4月16日(2021.4.16)

【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】

真核細胞の内因性標的DNAの部位特異的改変の方法であって、
意図する改変部位を有する前記内因性標的DNAを、

(i) 前記意図する改変部位において又はその近くにおいて前記内因性標的DNA中に二本鎖切断を導入するように構成された遺伝子編集システム、及び

(ii) ドナーDNA修復鋳型

と接触させる工程を含み、

a. 前記ドナー修復鋳型が、複数の縦列反復配列を含むローリングサークル増幅(RCA)産物DNAであり、

b. 前記複数の縦列反復配列のそれぞれが、ドナー5'隣接配列及びドナー3'隣接配列により隣接された外因性ドナーDNA配列を含み、

c. 前記ドナー5'隣接配列及び前記ドナー3'隣接配列が、前記内因性標的DNA中の前記意図する改変部位の各側の連続的なDNA配列に相同的であり、

d. 前記複数の縦列反復配列のそれぞれがチオエート化ヌクレオチドを含み、

e. ドナーDNA修復鋳型として前記RCA産物が採用される前に、前記RCA産物が処理されて、単一コピーのDNA断片を生成し、

前記方法が、ヒトの生殖系列の遺伝的同一性を改変する工程を含まない、
方法。

【請求項2】

前記真核細胞を前記遺伝子編集システム及び前記ドナーDNA修復鋳型とインキュベートする工程により、前記遺伝子編集システム及び前記ドナーDNA修復鋳型を前記真核細胞中

に導入する工程を更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記遺伝子編集システム及び前記ドナーDNA修復鋳型が、同時に前記真核細胞中に導入される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記遺伝子編集システムが、メガヌクレアーゼ、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)及びクラスター化等間隔短鎖回文リピート(CRISPR)-CRISPR関連システム(Cas)からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記遺伝子編集システムがCRISPR-Cas9システムである、請求項2に記載の方法。

【請求項6】

前記CRISPR-Cas9システムを導入する工程が、
前記真核細胞を1つ又は複数のDNAコンストラクトとインキュベートする工程を含み、前記1つ又は複数のDNAコンストラクトが、
a) crRNA配列及びtracrRNA配列を含むガイドRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された前記真核細胞中で作動可能な第1の調節エレメント、及び
b) Cas9タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された前記真核細胞中で作動可能な第2の調節エレメント
を含み、成分(a)及び成分(b)が同じ又は異なるDNAコンストラクト上に位置する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記CRISPR-Cas9システムを導入する工程が、Cas9タンパク質及びシングルガイドRNA(sgRNA)、又はcrRNAとtracrRNAとの組合せのいずれかを前記真核細胞に導入する工程を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記外因性ドナーDNA配列のサイズが、約10塩基対から約1kbまでの範囲内である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記ドナーDNA修復鋳型が、二本鎖RCA産物DNA、一本鎖RCA産物DNA、又は一本鎖RCA産物DNAと二本鎖RCA産物DNAとの組合せである、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記ドナーDNA修復鋳型が、チオエート化ヌクレオチドを含む一本鎖RCA産物DNAである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記ドナーDNA修復鋳型が、チオエート化ヌクレオチドを含む二本鎖RCA産物DNAである、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

前記ドナーDNA修復鋳型が、前記ドナー5'隣接配列及び前記ドナー3'隣接配列により隣接された前記外因性ドナーDNA配列から本質的になる最小限のDNA配列の複数の反復から本質的になる一本鎖又は二本鎖RCA産物DNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記内因性標的DNAの前記部位特異的改変が、前記二本鎖切断において前記内因性標的DNA中に前記外因性ドナーDNA配列を組み込む工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記二本鎖切断において前記内因性標的DNA中に前記外因性ドナーDNA配列を組み込む工程が、内因性標的DNAの改変のための相同組換え修復を含む、請求項13に記載の方法。