

【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24年2月2日 (2012.2.2)

【公表番号】特表2011-505809(P2011-505809A)

【公表日】平成23年3月3日 (2011.3.3)

【年通号数】公開・登録公報2011-009

【出願番号】特願2010-537144(P2010-537144)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 9/16 Z N A A

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/00

【手続補正書】

【提出日】平成23年12月6日 (2011.12.6)

【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】

配列番号：1 の I - C r e I メガヌクレアーゼの 2 ～ 1 5 3 残基に少なくとも 8 5 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4 及び配列番号：5 からなる群から選択される I - C r e I メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に対して特異性を有し、

前記認識配列半部位が、ヒトゲノムの D N a s e I 高感受性領域の中で発見され、配列番号：5 9、4 6、7 1、8 1、6 2、3 7 ～ 4 5、4 7 ～ 5 8、6 0 ～ 6 1、6 3 ～ 7 0、7 2 ～ 8 0、及び 8 2 ～ 8 7 からなる群から選択されることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 2】

X 1 3 . 2 A、X 1 3 . 2 B、X 4 . 2 A # 1、X 4 . 2 A # 2、X 4 . 2 B # 1、X 4 . 2 B # 2、X 1 9 . 1 A、X 1 9 . 1 B、X 2 0 . 3 A、X 2 0 . 3 B、X 1 6 . 1 A # 1、X 1 6 . 1 A # 2、X 1 6 . 1 B、X 4 . 3、X 2 1 . 1、X 1 . 1 A、X 1 . 1 B、X 1 . 2 A、X 1 . 2 B、X 1 . 3 A、X 1 . 3 B、X 1 . 4 A、X 1 . 4 B、X 2 . 1 A、X 2 . 1 B、X 3 . 1 A、X 3 . 1 B、X 4 . 1 A、X 4 . 1 B、X 5 . 1 A、X 5 . 1 B、X 7 . 1 A、X 7 . 1 B、X 7 . 2 A、X 7 . 2 B、X 9 . 1 A、X 9 . 1 B、X 9 . 2 A、X 9 . 2 B、X 9 . 3 A、X 9 . 3 B、X 1 0 . 1 A、X 1 0 . 1 B、X 1 2 . 1 A、X 1 2 . 1 B、X 1 2 . 2 A、X 1 2 . 2 B、X 1 2 . 3 A、X 1 2 .

3 B、X 1 2 . 4 A、X 1 2 . 4 B、X 1 3 . 1 A、X 1 3 . 1 B、X 1 4 . 1 A、X 1 4 . 1 B、X 1 5 . 1 A、X 1 5 . 1 B、X 1 6 . 2 A、X 1 6 . 2 B、X 1 6 . 3 A、X 1 6 . 3 B、X 1 7 . 1 A、X 1 7 . 1 B、X 1 7 . 2 A、X 1 7 . 2 B、X 1 7 . 3 A、X 1 7 . 3 B、X 1 7 . 4 A、X 1 7 . 4 B、X 1 7 . 5 A、X 1 7 . 5 B、X 1 8 . 1 A、X 1 8 . 1 B、X 1 9 . 2 A、X 1 9 . 2 B、X 1 9 . 3 A、X 1 9 . 3 B、X 1 9 . 4 A、X 1 9 . 4 B、X 1 9 . 5 A、X 1 9 . 5 B、X 1 9 . 6 A、X 1 9 . 6 B、X 1 9 . 7 A、X 1 9 . 7 B、X 1 9 . 8 A、X 1 9 . 8 B、X 2 0 . 1 A、X 2 0 . 1 B、X 2 0 . 2 A、X 2 0 . 2 B、X 2 0 . 4 A、X 2 0 . 4 B、X 2 2 . 1 A、X 2 2 . 1 B、X 2 2 . 2 A、X 2 2 . 2 B、X 2 2 . 3 A、X 2 2 . 3 B、X 2 2 . 4 A、X 2 2 . 4 B、X X . 1 A、及び X X . 1 B からなる群から選択されるメガヌクレアーゼ単量体で表されるアミノ酸改変を含むことを特徴とする、  
請求項 1 に記載の組み換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 3】

Y 7 5、L 7 5、H 7 5、E 7 0、C 7 0、C 7 5、R 7 5、E 7 5、L 7 0、Y 1 3 9、H 4 6、E 4 6、G 4 6、C 4 6、K 4 6、D 4 6、Q 7 5、A 4 6、R 4 6、H 1 3 9、Q 4 6、C 4 4、V 4 4、I 4 4、L 4 4、M 6 8、Y 6 8、C 2 4、F 6 8、C 6 8、K 2 4、L 6 8、R 2 4、A 2 6、E 7 7、R 7 7、S 7 7、S 2 6、Q 7 7、K 2 6、E 2 6、E 4 2、R 4 2、C 2 8、M 6 6、Q 4 2、K 6 6、Q 4 0、E 4 0、R 4 0、C 4 0、A 4 0、R 2 8、I 4 0、A 7 9、S 2 8、V 4 0、A 2 8、C 7 9、H 2 8、I 7 9、V 7 9、Q 2 8、E 3 8、K 3 8、I 3 8、C 3 8、H 3 8、K 3 0、R 3 8、L 3 8、N 3 8、R 3 0、E 3 0、Q 3 0、F 3 3、E 3 3、L 3 3、R 3 2、R 3 3、D 3 3、H 3 3、V 3 3、I 3 3、C 3 3、E 3 2、L 3 2、D 3 2、K 3 2、V 3 2、I 3 2、N 3 2、A 3 2、H 3 2、C 3 2、Q 3 2、及び T 3 2 からなる群から選択される少なくとも 1 つの改変を含むことを特徴とする、  
請求項 1 又は 2 に記載の組み換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 4】

真核細胞の染色体に挿入された外因性配列を有する遺伝子改変された真核細胞を作製する方法であって、該方法は、

(i) メガヌクレアーゼをコードする第 1 の核酸配列、及び

(ii) 該外因性配列を有する第 2 の核酸配列

を含有する一つ又は複数の核酸で真核細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、該外因性配列が該切断部位で染色体に挿入され、

該メガヌクレアーゼが請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであり、

該真核細胞がヒト胚性幹細胞（ES 細胞）ではないことを特徴とする方法。

【請求項 5】

真核細胞の染色体に挿入された外因性配列を有する遺伝子改変された真核細胞を作製する方法であって、該方法は、

真核細胞にメガヌクレアーゼタンパク質を導入し、

該真核細胞を、外因性配列を有する核酸でトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、外因性配列が該切断部位で染色体に挿入され、

該メガヌクレアーゼが請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであり、

該真核細胞がヒト胚性幹細胞（ES 細胞）ではないことを特徴とする方法。

【請求項 6】

真核細胞の染色体の標的配列を破壊することにより遺伝子改変された真核細胞を作製する方法であって、該方法は、

メガヌクレアーゼをコードする核酸で真核細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、該標的配列が該切断部位での非相同的末端結合により破壊され、

該メガヌクレアーゼが請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであり、

該真核細胞がヒト胚性幹細胞（ES細胞）ではないことを特徴とする方法。

【請求項 7】

遺伝子改変された非ヒト生物を作製する方法であって、該方法は、

請求項 4 ~ 6 のいずれか一つに記載の方法に従って遺伝子改変された真核細胞を作製し、

該遺伝子改変された真核細胞を成長させて遺伝子改変された生物を作製することを含むことを特徴とする遺伝子改変された非ヒト生物を作製する方法。

【請求項 8】

前記真核細胞が、配偶子、接合子、胚盤胞細胞、胚性幹細胞（ES細胞）及びプロトプラスト細胞からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

薬剤として使用される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の組み換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 10】

薬剤として使用される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の組み換えメガヌクレアーゼをコードする単離された核酸。

【請求項 11】

前記核酸が該切断部位に隣接する配列に相同である配列を更に有し、前記外因性配列が相同的組換えにより切断部位に挿入されること、または

前記核酸が該切断部位に対して実質的な相同性を有せず、前記外因性配列が非相同的末端結合により染色体に挿入されることを特徴とする、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 9 又は 10 に記載のような薬剤であって、

前記薬剤が、染色体の切断部分に挿入される外因性配列と、前記切断部分に隣接する配列と相同である前記外因性配列に隣接する配列とを含む単離された核酸をさらに含有し、前記切断部分が前記組み換えメガヌクレアーゼによって切断される、薬剤。