

【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3月25日(2021.3.25)

【公表番号】特表2020-507312(P2020-507312A)

【公表日】令和2年3月12日(2020.3.12)

【年通号数】公開・登録公報2020-010

【出願番号】特願2019-539756(P2019-539756)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 15/64 (2006.01)

C 12 N 15/55 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/09 110

C 12 N 15/64 Z

C 12 N 15/55 Z N A

【手続補正書】

【提出日】令和3年2月8日(2021.2.8)

【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】

組換え核酸分子を調製する方法であって：

A) :

i) 複数の異なるDNA挿入であって、各DNA挿入の側面に、2つのクローニングタグ(c T A G)が位置しており、各c T A Gが：

a) 1つ以上のC R I S P Rランディング部位であって、それぞれ、プロトスペーサ隣接モチーフ(P A M)に作動可能に連結されたプロトスペーサ配列を含み、各c T A Gが前記DNA挿入のそれぞれに人工的に導入された、1つ以上のC R I S P Rランディング部位を含む、複数の異なるDNA挿入と；

i i) 複数のDNA挿入の少なくとも2つにおいて存在する前記c T A Gの少なくとも1つを標的とする1つ以上のC R I S P R複合体であって、各C R I S P R複合体が：

a) C R I S P Rエンドヌクレアーゼ、及び

b) 前記標的とされるc T A Gの1つに前記C R I S P Rエンドヌクレアーゼを動員することができるガイドRNA

を含む、1つ以上のC R I S P R複合体と；

を含む混合物を、

前記複数のDNA挿入の少なくとも2つにおける前記標的とされるc T A Gの消化を可能にして、消化されたDNA末端を生じさせる条件下でインキュベートすることと、

B) 前記DNA挿入と、(A)において生じた、消化されたDNA末端とを、前記消化されたDNA末端の共有結合を可能にし、それにより、組換え核酸分子を生成する条件下でインキュベートすることと；

を含み、前記組換え核酸分子は、前記方法においてライゲーションされる前記DNA挿入のc T A Gを含み、ライゲーションされたDNA挿入のそれぞれの側面に、前記インキュベーション工程前にDNA挿入が有していた同じc T A Gが位置している、方法。

【請求項 2】

前記消化されたDNA末端は、前記消化された末端の共有結合に先立って互いにハイブリダイズすることができる突出配列を有する付着末端である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記CRISPRエンドヌクレアーゼは、Cpf1である、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記消化されたDNA末端は、平滑末端である、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記平滑末端はさらに、ssDNAエキソヌクレアーゼで消化されて、突出配列を有する付着末端が生じ、工程B)はさらに、前記消化された末端の共有結合に先立って前記突出配列にハイブリダイズすることができる架橋DNA配列を加えることを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記CRISPRエンドヌクレアーゼは、Cas9である、請求項1、4、又は5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法はさらに：

i) 工程B)に先立って、前記CRISPR複合体から、前記消化されたcTAG配列を分離する工程、及び/又は

ii) 工程B)に先立って、前記CRISPR複合体を不活化する工程を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記分離工程は、DNA精製工程を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記不活化工程は、前記CRISPR複合体の熱又は化学物質による不活化を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項 10】

前記複数のDNA挿入のそれぞれの前記2つのcTAGは、cTAG対を形成し、前記cTAG対は、前記方法においてライゲーションされる前記DNA挿入の他の全てのcTAG対に対して固有である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

各cTAG対における前記cTAGの少なくとも1つが、異なるcTAG対における少なくとも1つの他のcTAGと同じである、請求項1～5に記載の方法。

【請求項 12】

DNA配列編集方法であって、前記方法は：

a)

i) CRISPRマルチクローン部位を含むCRISPR DNAコンストラクトであって、前記マルチクローン部位が、少なくとも2つの異なるクローニングタグ(cTAG)であって、前記DNA挿入のそれぞれに人工的にCRISPR DNAコンストラクトに導入されている、少なくとも2つの異なるクローニングタグ、を含み、各cTAGが：

a) 1つ以上のCRISPRランディング部位であって、それぞれ、プロトスペーサ隣接モチーフ(PAM)に作動可能に連結されたプロトスペーサ配列を含み；前記CRISPRランディング部位の少なくとも1つが、前記CRISPR DNAコンストラクト内で固有である、1つ以上のCRISPRランディング部位を含む、CRISPR DNAコンストラクトと；

ii) 置換DNA挿入であって、前記置換DNA挿入は、第1及び第2の挿入cTAGが側面に位置しており；

a) 前記第1の挿入cTAGは、前記CRISPR DNAコンストラクトの前記互いに異なるcTAGの1つの前記CRISPRランディング部位を含み、そして前記第

2 の挿入 c T A G は、前記 C R I S P R DNA コンストラクトの別の異なる c T A G の前記 C R I S P R ランディング部位を含む、置換 DNA 挿入と；

i i i) 前記第 1 及び第 2 の挿入 c T A G をそれぞれ標的とする第 1 及び第 2 の C R I S P R 複合体であって、各 C R I S P R 複合体が：

a) C R I S P R エンドヌクレアーゼ、及び

b) 前記標的とされる挿入 c T A G の 1 つに前記 C R I S P R エンドヌクレアーゼを動員することができるガイド RNA ;
を含む、第 1 及び第 2 の C R I S P R 複合体、
を用意すること、

ここで、(i) 及び (i i) で規定される C R I S P R DNA コンストラクトと置換 DNA 挿入がそれぞれ、(i i i) で規定される第 1 及び第 2 の C R I S P R 複合体と、單一の反応又は別個の反応でインキュベートされ；前記第 1 及び第 2 の C R I S P R 複合体は、前記第 1 及び第 2 の挿入 c T A G 、並びにそれらの対応する互いに異なる c T A G を切断して、消化された DNA 末端を生じさせる：そして

b) 前記置換 DNA 挿入、及び工程 (A) において生じた DNA 末端が消化された C R I S P R DNA コンストラクトを、前記消化された DNA 末端の共有結合を可能にし、それにより編集された C R I S P R DNA コンストラクトを生成する条件下でインキュベートすることと；を含み、

ここで、編集された C R I S P R DNA コンストラクトは、前記方法によって共有結合される置換 DNA 挿入の c T A G 配列を含み、共有結合した置換 DNA 挿入の側面には、工程 (A) のインキュベーションの前に置換 DNA が有していた同じ不ランディング c T A G が尚も位置している、DNA 配列編集方法。

【請求項 1 3】

工程 (B) の前記インキュベーションは、リガーゼを含む、請求項 1 2 に記載の DNA 配列編集方法。

【請求項 1 4】

前記方法はさらに：

i) 工程 (B) に先立って、前記切断された第 1 及び第 2 の挿入 c T A G 、並びにそれらの対応する互いに異なる c T A G を前記 C R I S P R 複合体から分離する工程、及び／又は

i i) 工程 (B) に先立って前記 C R I S P R 複合体を不活化する工程を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記分離工程は、DNA 精製工程を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記不活化工程は、前記 C R I S P R 複合体の熱又は化学物質による不活化を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記消化された DNA 末端は、前記消化された末端の共有結合に先立って互いにハイブリダイズすることができる突出配列を有する付着末端である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 C R I S P R エンドヌクレアーゼは、C p f 1 である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記消化された DNA 末端は、平滑末端である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記平滑末端はさらに、s s DNA エキソヌクレアーゼで消化されて、突出配列を有する付着末端が生じ、工程 B) はさらに、前記消化された末端の共有結合に先立って前記突出配列にハイブリダイズすることができる架橋 DNA 配列を加えることを含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 C R I S P R エンドヌクレアーゼは、C a s 9 である、請求項1 2、1 9、又は2 0のいずれか一項に記載の方法。