

【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 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/64 (2006.01)

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/64 Z

C 1 2 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 10 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、前記マルチクロン部位が、少なくとも 2 つの異なるクロニングタグ (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 D N A 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 D N A 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 D N A コンストラクトと置換 D N A 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、単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 D N A 末端を生じさせる；そして

b) 前記置換 D N A 挿入、及び工程 (A) において生じた D N A 末端が消化された C R I S P R D N A コンストラクトを、前記消化された D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 挿入の c T A G 配列を含み、共有結合した置換 D N A 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 D N A が有していた同じ不ランキング c T A G が尚も位置している、D N A 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 D N A 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、D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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。