【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2年1月30日(2020.1.30)

【公表番号】特表2019-500885(P2019-500885A)
【公表日】平成31年1月17日(2019.1.17)
【年通号数】公開・登録公報2019-002
【出願番号】特願2018-535834(P2018-535834)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/64　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/078　(2010.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/0735　(2010.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/074　(2010.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/0783　(2010.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/0781　(2010.01)
Ｃ１２Ｎ　15/861　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　 1/20　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　35/76　(2015.01)
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/10
Ｃ１２Ｎ　15/12
Ｃ１２Ｎ　15/64
Ｃ１２Ｎ　 5/10
Ｃ１２Ｎ　 5/078
Ｃ１２Ｎ　 5/0735
Ｃ１２Ｎ　 5/074
Ｃ１２Ｎ　 5/0783
Ｃ１２Ｎ　 5/0781
Ｃ１２Ｎ　15/861
Ｃ１２Ｎ　 1/20　Ｅ
Ａ６１Ｋ　35/76
Ａ６１Ｋ　48/00
Ａ６１Ｋ　45/00

【手続補正書】
【提出日】令和1年12月11日(2019.12.11)
【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】
ドナー核酸鎖から、核酸配列を取り込む（retrieving）方法であって、
（ａ）第１の核酸鎖（first nucleic acid strand）を含む核酸ベクターを用意するこ

とであり、第１の鎖が、
ｉ．鎖間の相同組換え（homologous recombination）のための、ドナー鎖（donor strand）の第１のヌクレオチド配列（first nucleotide sequence）（ＮＳ１）と相同な、第１の相同アーム（homology arm）（ＨＡ１）と；
ｉｉ．鎖間の相同組換えのための、ドナー鎖の第２のヌクレオチド配列（ＮＳ２）と相同な、第２の相同アーム（ＨＡ２）と；
ｉｉｉ．ＨＡ１の３’末端を、ＨＡ２の５’末端へと接続する、介在ヌクレオチド配列（intervening nucleotide sequence）とを含み、
ＨＡ１が、第１の鎖内のＨＡ２に対して５’側にあり；ＮＳ１が、ドナー鎖内のＮＳ２の３’側にあり、ドナー鎖が、ＮＳ１とＮＳ２との間に、取込み配列（retrieval sequence）（ＲＳ）を含むことと；
（ｂ）第１の鎖を、ドナー鎖と組み合わせることと；
（ｃ）ＨＡ１の５’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の５’側にフランキングする（flanking）第１の鎖の第１の切断部位（first cut site）（ＣＳ１）の、ヌクレアーゼによる切断；および／またはＨＡ２の３’末端における第１の鎖、もしくは前記末端の３’側にフランキングする第１の鎖の第２の切断部位（ＣＳ２）の、ヌクレアーゼによる切断することと；
工程（ｂ）および（ｃ）を、任意の順序において、または同時に実行することと；
（ｄ）切断された第１の鎖の、ドナー鎖との相同組換えを実行し、これにより、第１の鎖のギャップ修復が、ＲＳを、ＨＡ１とＨＡ２との間に取り込んだベクターを作製することと；および
（ｅ）適宜、ベクターまたはそのＲＳ配列を単離またはシーケンシングすることと
を含む方法。
【請求項２】
工程（ｄ）の生成物（product）が、環状ベクターである、請求項１に記載の方法。
を含む方法。
【請求項３】
工程（ｂ）～（ｄ）を、宿主細胞内で実施し、所望に応じ、ベクターが、工程（ａ）において、環状であってもよく、環状ベクターを、工程（ｂ）における細胞へと導入する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
ベクターが、ＢＡＣ、ＹＡＣ、ＰＡＣ、コスミド、またはプラスミドである、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項５】
それぞれの切断部位モチーフを使用して、工程（ｃ）の前記各切断を方向付け、前記各モチーフを、相同組換えにより破壊する、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項６】
ドナー鎖が、細胞の染色体またはエピソームの鎖である、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項７】
ＲＳが、少なくとも１０ｋｂの長さである、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項８】
ヌクレアーゼによる切断が、Ｃａｓによる切断、メガヌクレアーゼによる切断、亜鉛フィンガータンパク質媒介型切断、またはＴＡＬＥＮ媒介型切断である、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項９】
前記切断がＣａｓヌクレアーゼによる切断であり、工程（ａ）において、ベクターが、
Ａ．ＣＳ１を含む、第１のプロトスペーサー配列（first protospacer sequence）（ＰＳ１）と；
Ｂ．ＰＳ１の３’末端と隣接する第１のＰＡＭ（Ｐ１）と；

Ｃ．ＨＡ１と
を含み（５’～３’方向に）；
ＰＳ１のシード配列（seed sequence）（Ｓ１）が、ＣＳ１を、Ｐ１へと接続し、
ＨＡ１が、Ｓ１およびＰ１を含んでもよく；かつ／または
工程（ａ）において、ベクターが、
Ｄ．ＨＡ２と；
Ｅ．ＣＳ２を含む、第２のプロトスペーサー配列（ＰＳ２）と；
Ｆ．ＰＳ２の３’末端と隣接する第２のＰＡＭ（Ｐ２）と
を含み（５’～３’方向に）；
ＰＳ２のシード配列（Ｓ２）が、ＣＳ２を、Ｐ２へと接続し、
ＰＳ２の残余が、ＨＡ２の３’末端にあってもよい、
任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項１０】
工程（ｃ）において、同じガイドＲＮＡ（guide RNA）（ｇＲＮＡ１）を使用して、Ｃａｓによる、ＣＳ１およびＣＳ２の切断をガイドする、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項１１】
工程（ｄ）の前に、または工程（ｄ）中に、ドナー鎖を、ＮＳ２の５’末端において、もしくは前記末端の５’側にフランキングして切断し；かつ／またはＮＳ１の３’末端において、もしくは前記末端の３’側にフランキングして切断する、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項１２】
生成物ベクターの前記ＲＳの全部または一部を、さらなる核酸鎖へと挿入することをさらに含む、所望により、前記さらなる鎖（further strand）との相同組換えにおいて、ＨＡ１および／またはＨＡ２を使用して、ＲＳ配列を、さらなる鎖へと挿入されてもよい、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項１３】
さらなる鎖が、細胞に含まれ、工程（ｄ）のベクター生成物を、前記相同組換えの前に、細胞へと挿入する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記さらなる鎖が、胚性幹細胞または免疫細胞に含まれ；所望により幹細胞生成物を、組織または非ヒト生物へと発生させることを含んでもよい、請求項１２または１３に記載の方法。
【請求項１５】
さらなる鎖の突然変異を、ＲＳの、さらなる鎖への前記挿入により除去し；さらなる鎖生成物または前記生成物中のＲＳを、単離またはシーケンシングすることを含んでもよい、インビトロまたはインビボ（in vivo）における遺伝子治療のための、請求項１２から１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
標的細胞が、前記さらなる鎖を含み、さらなる鎖が、前記遺伝子の突然変異を含み、
（ｉ）第２のヒト細胞を得、請求項１から１１のいずれか一項に記載の方法を、第２の細胞内部において実行することであり、工程（ｄ）の生成物ベクター内のＲＳが、前記遺伝子欠損を含むことと；
（ｉｉ）遺伝子操作を使用して、欠損を補正し、これにより、補正されたＲＳ配列を含む生成物ベクターを作製することと；
（ｉｉｉ）補正されたＲＳ配列を、補正されていない標的細胞へと挿入することであり、補正されたＲＳ配列が、補正されていないＲＳ配列を補充するかまたは置きかえ、これにより、補正された標的細胞を作製することと；および
（ｉｖ）適宜、補正された細胞を培養するか、または組織を、補正された細胞もしくはその後代から発生させることと

を含む、インビトロの標的ヒト細胞において、遺伝子の突然変異を補正するための、請求項１２から１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
標的細胞内の、補正されていないＲＳ配列の、補正されたＲＳ配列にフランキングするＨＡ１および／またはＨＡ２による相同組換えを使用し、これにより、補正されていないＲＳ配列を置きかえ；補正されていないＲＳ配列と、補正されたＲＳ配列とが、補正された突然変異だけにより異なってもよい、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
工程（ｉｉｉ）において、補正された閉環状生成物ベクターを、標的細胞または後代へと挿入し；補正されたＲＳが、少なくとも１０ｋｂの長さであってもよい、請求項１６または１７に記載の方法。
【請求項１９】
細胞が、同じヒト対象の細胞であり、同じ細胞型であってもよい、請求項１６から１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）を作製するための、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項２１】
工程（ｂ）および／または（ｄ）において、ベクターが、閉環状ベクター（closed circular vector）である、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項２２】
工程（ｂ）において、ベクターが、スーパーコイル状である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
ＨＡ１とＨＡ２との間の配列を、第１の鎖から欠失させ、かつ／またはＮＳ１とＮＳ２との間の配列を、ドナー鎖から欠失させる、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項２４】
ＲＳを、ドナー鎖から欠失させる、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記切断が、Ｃａｓヌクレアーゼによる切断（cutting by a Cas nuclease）であり、ＨＡ１の５’末端におけるプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ、または前記末端の５’側にフランキングするプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せを、工程（ｄ）により破壊し、これにより、ＰＳ１を、第１の鎖内で、非機能的とする、および／またはＨＡ２の３’末端におけるプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せ、または前記末端の３’側にフランキングするプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せを、工程（ｄ）により破壊し、これにより、ＰＳ２を、第１の鎖内で、非機能的とする、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項２６】
ドナー配列を、第１の鎖へと挿入し、かつ／または配列を、第１の鎖から欠失させて、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたは新たなマーカー配列を形成する、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項２７】
工程（ｄ）の後、新たな組合せのプロトスペーサーのＣａｓによる切断、および所望により、その後に、さらなる配列の第１の鎖への挿入を含む、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
ドナー配列を、ドナー鎖から欠失させて、新たなプロトスペーサー／ＰＡＭの組合せまたは新たなマーカー配列を形成する、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項２９】
工程（ｄ）の後のドナー鎖において、新たな組合せのプロトスペーサーのＣａｓによる切断、および所望により、その後に、さらなる配列の、ドナー鎖への挿入またはドナー鎖からの欠失を含む、請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】
欠失が生じた、修飾ドナー鎖またはドナー核酸配列の領域を単離またはコピーすることを含む、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項３１】
工程（ｄ）において、ＲＳを、第１の鎖へと挿入し、挿入された配列が、修飾された第１の鎖からの発現について機能的であり、適宜、方法が、挿入された配列の発現産物を検出または単離することを含む、任意の先行する請求項に記載の方法または生成物。
【請求項３２】
工程（ｂ）～（ｄ）を、宿主細胞内で実施し、ＲＳを、ドナー鎖から欠失させ、（ｉ）欠失が、宿主細胞に対して致死性である、または（ｉｉ）方法が、細胞の生存能、増殖（growthまたはproliferation）を下方調節する、または（ｉｉｉ）方法が、細胞の生存能、増殖を上方調節する、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項３３】
細菌細胞または古細菌細胞、所望により、大腸菌（E. coli）細胞において実行する、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項３４】
原核細胞の集団において実行されて、前記細胞を死滅させ、細胞が、同じ種または株のものである、任意の先行する請求項に記載の方法。
【請求項３５】
工程（ｂ）～（ｄ）を、宿主細胞内で実施し、ヌクレアーゼがＣａｓであり、工程（ｃ）において、Ｃａｓによる切断が、第１の鎖内のプロトスペーサー配列内にあり、プロトスペーサーが、シード配列を含み、シード配列が、細胞ゲノムにおいて、希少であるか、または見出されないヌクレオチド配列を含む、任意の先行する請求項に記載の方法または生成物。
【請求項３６】
ヒトにおける遺伝子欠損を処置するための、請求項１６から１９のいずれか一項に記載の、補正細胞、補正ベクター、または補正ＲＳ配列。
【請求項３７】
対象における疾患または状態を処置または防止する、ヒト対象または動物対象への投与のための、請求項１から３５のいずれか一項に記載の方法により得ることが可能な、ベクター生成物、核酸鎖生成物、細胞生成物、またはＲＳ生成物。
【請求項３８】
取込み配列（retrieved sequence）（ＲＳ）のコレクションを含む複数のベクターを作製するための方法であって、前記コレクションは互いに異なる第１のＲＳ配列および第２のＲＳ配列を含み、前記方法は請求項１から３５のいずれか一項に記載の方法を実施し、各ベクターを得ることを含む、方法。
【請求項３９】
ベクターは、細胞試料から取り込まれたゲノム断片のコレクションを含む、ＢＡＣベクターまたはＹＡＣベクターである、請求項３８に記載の方法。