

【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29年7月27日(2017.7.27)

【公表番号】特表2016-523559(P2016-523559A)

【公表日】平成28年8月12日(2016.8.12)

【年通号数】公開・登録公報2016-048

【出願番号】特願2016-525411(P2016-525411)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/19

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月19日(2017.6.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

ストレプトコッカス・ピオゲネス (*S. pyogenes*) では、Cas9は、タンパク質中の2つの触媒ドメイン、すなわちDNAの相補鎖を切断するHNHドメインおよび非相補鎖を切断するRuvC様ドメインが仲介するプロセスにより、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の3bp上流に平滑末端の二本鎖切断を形成する。その全体が参照により援用されるJinke et al., Science 337, 816-821 (2012)を参照されたい。Cas9タンパク質は、Makarova et al., Nature Reviews, Microbiology, Vol. 9, June 2011, pp. 467-477の補足情報で確認されている以下のものを含む、多数のI I型CRISPRシステム中に存在することが知られている。メタノコッカス・マリパルディス (*Methanococcus maripaludis*) C7株；コリネバクテリウム・ジフテリアエ (*Corynebacterium diphtheriae*)；コリネバクテリウム・エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens*) YS-314株；コリネバクテリウム・グルタニカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032Kitasato株；コリネバクテリウム・グルタニカム ATCC13032Bielefeld株；コリネバクテリウム・グルタニカム R株；コリネバクテリウム・クロッペンステッティイ (*Corynebacterium kroppenstedtii*) DSM44385株；マイコバクテリウム・アブセサス (*Mycobacterium abscessus*) ATCC19977株；ノカルディア・ファルシニカ (*Nocardia farcinica*) IFM10152株；ロドコッカス・エリスロボリス (*Rhodococcus erythropolis*) PR4株；ロドコッカス・オパカス (*Rhodococcus opacus*) B4uid36573株；アシドサーマス・セルロリティカス (*Acidothermus cellulolyticus*) 11B株；アルスロバクター・クロロフェノリカス (*Arthrobacter chlorophenolicus*) A6株；クリベラ・フラビダ (*Kribbella flava*) DSM17836uid43465株；サーモモノスpora・カーバタ (*Thermomonospora curvata*) DSM43183株；ビフィドバクテリウム・デンティウム (*Bifidobacterium dentium*) Bd1株；ビフィドバクテリウム・ロンゴム (*Bifidobacterium longum*) DJO10A株；スラッキア・ヘリオトリニレデューセンス (*Slackia heliotrinireducens*) DSM20476株；パーセフォネラ・マリナ (*Persephonella marina*) EX-H1株；バクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) NCTC9434株；カプノサイトファガ・オクラセア(

Capnocytophaga ochracea) D S M 7 2 7 1 株 ; フラボバクテリウム・サイクロフィルム (*Flavobacterium psychrophilum*) J I P 0 2 8 6 株 ; アッカーマンシア・ムシニフィラ (*Akkermansia muciniphila*) A T C C B A A 8 3 5 株 ; ロゼイフレクサス・キャステンホルツィイ (*Roseiflexus castenholzii*) D S M 1 3 9 4 1 株 ; ロゼイフレクサス (*Roseiflexus*) R S 1 株 ; シネコシスティス (*Synechocystis*) P C C 6 8 0 3 株 ; エルシミクロビウム・ミヌトウム (*Elusimicrobium minutum*) P e i 1 9 1 株 ; 未培養細菌 T e r m i t e g r o u p 1 p h y l o t y p e R s D 1 7 ; フィブロバクター・サクシノゲネス (*Fibrobacter succinogenes*) S 8 5 株 ; バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) A T C C 1 0 9 8 7 株 ; リステリア・イノキュア (*Listeria innocua*) ; ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) ; ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) G G 株 ; ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) U C C 1 1 8 株 ; ストレプトコッカス・アガラクティアエ (*Streptococcus agalactiae*) A 9 0 9 株 ; ストレプトコッカス・アガラクティアエ (N E M 3 1 6 株) ; (*Streptococcus agalactiae* 2 6 0 3 株) ; ストレプトコッカス・ディスガテクティアエ亜種エクイシミリス (*Streptococcus dysgalactiae equisimilis*) G G S 1 2 4 株 ; ストレプトコッカス・エクイ亜種ズーエピデミカス (*Streptococcus equi zooepidemicus*) M G C S 1 0 5 6 5 株 ; (*Streptococcus gallolyticus*) U C N 3 4 u i d 4 6 0 6 1 株 ; ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordoni Challis subst*) C H 1 株 ; ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) N 2 0 2 5 u i d 4 6 3 5 3 株 ; ストレプトコッカス・ミュータンス ; ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) M 1 G A S 株 ; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 5 0 0 5 ; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 2 0 9 6 株 ; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 9 4 2 9 株 ; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 6 1 8 0 株 ; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 3 1 5 株 ; ストレプトコッカス・ピオゲネス S S I - 1 ; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 1 0 7 5 0 株 ; ストレプトコッカス・ピオゲネス N Z 1 3 1 株 ; ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) C N R Z 1 0 6 6 株 ; ストレプトコッカス・サーモフィラス L M D - 9 株 ; ストレプトコッカス・サーモフィラス L M G 1 8 3 1 1 株 ; クロストリジウム・ボツリヌム (*Clostridium botulinum*) A 3 L o c h M a r e e 株 ; クロストリジウム・ボツリヌム B E k l u n d 1 7 B 株 ; クロストリジウム・ボツリヌム B a 4 6 5 7 株 ; クロストリジウム・ボツリヌム F L a n g e l a n d 株 ; クロストリジウム・セルロリティカム (*Clostridium cellulolyticum*) H 1 0 株 ; フィネゴルディア・マグナ (*Finegoldia magna*) A T C C 2 9 3 2 8 株 ; ユウバクテリウム・レクターレ (*Eubacterium rectale*) A T C C 3 3 6 5 6 株 ; マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) ; マイコプラズマ・モービレ (*Mycoplasma mobile*) 1 6 3 K 株 ; マイコプラズマ・ペネトランス (*Mycoplasma penetrans*) ; マイコプラズマ・シノビアエ (*Mycoplasma synoviae*) 5 3 株 ; ストレプトバチルス・モニリフォルミス (*Streptobacillus moniliformis*) D S M 1 2 1 1 2 株 ; ブラジリゾビウム (*Bradyrhizobium*) B T A i 1 株 ; ニトロバクター・ハンブルゲンシス (*Nitrobacter hamburgensis*) X 1 4 株 ; ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*) B i s B 1 8 株 ; ロドシュードモナス・パルストリス B i s B 5 株 ; パルビバクラム・ラバメンティボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*) D S - 1 株 ; ディノロセオバクター・シバエ (*Dinoroseobacter shibae*) D F L 1 2 株 ; グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) P a 1 5 F A P E R J 株 ; グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス P a 1 5 J G I 株 ; アゾスピリルム (*Azospirillum*) B 5 1 0 u i d 4 6 0 8 5 株 ; ロドスピリラム・ルブラム (*Rhodospirillum rubrum*) A T C C 1 1 1 7 0 株 ; ディアフォロバクター (*Diaiphorobacter*) T P S Y u i d 2 9 9 7 5 株 ; フェルミネフォロバクター・エイセニアエ (*Verminephrobacter eiseniae*) E F 0 1 - 2 株 ; ナイセリア・メニンジティディス (*Neisseria meningitidis*) 0 5 3 4 4 2 株 ; ナイセリア・メニンジティディス a l p

h a 1 4 株 ; ナイセリア・メニンジティディス Z 2 4 9 1 株 ; デスルホビブリオ・サレキシゲンス (*Desulfovibrio salexigens*) D S M 2 6 3 8 株 ; キャンピロバクター・ジェジュニ亜種ドイレイ (*Campylobacter jejuni doylei*) 2 6 9 9 7 株 ; キャンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 8 1 1 1 6 株 ; キャンピロバクター・ジェジュニ ; キャンピロバクター・ラリ (*Campylobacter lari*) R M 2 1 0 0 株 ; ヘリコバクター・ヘパティカス (*Helicobacter hepaticus*) ; ウオリネラ・サクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*) ; トルモナス・アウエンシス (*Tolumonas auensis*) D S M 9 1 8 7 株 ; シュードアルテロモナス・アトランティカ (*Pseudoalteromonas atlantica*) T 6 c 株 ; シューワネラ・ペアレアナ (*Shewanella pealeana*) A T C C 7 0 0 3 4 5 株 ; レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) P a r i s 株 ; アクチノバチルス・サクシノゲネス (*Actinobacillus succinogenes*) 1 3 0 Z 株 ; パスツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*) ; フランシセラ・ツラレンシス亜種ノビシダ (*Francisella tularensis novicida*) U 1 1 2 株 ; フランシセラ・ツラレンシス亜種ハラークティカ (*Francisella tularensis holarktica*) ; フランシセラ・ツラレンシス (*Francisella tularensis*) F S C 1 9 8 株 ; フランシセラ・ツラレンシス ; フランシセラ・ツラレンシス W Y 9 6 - 3 4 1 8 株 ; およびトレポネーマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) A T C C 3 5 4 0 5 株。したがって、本開示の態様は、I I 型 C R I S P R システム中に存在する C a s 9 タンパク質に関する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 2】

実施例 I

酵母における C R I S P R - C a s 9 を用いた多重遺伝子編集の一般的プロセス

ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) の C R I S P R 免疫系由来の C a s 9 を用いて、相同組換えを促進し、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において形質転換 D N A を組み換えない細胞に対して選択する。C a s 9 を用いた R N A 誘導型 D N A 切断の一般的な方法を図 1 に示す。C a s 9 、ガイド R N A 、および標的 D N A の間で共局在複合体が形成される。C a s 9 により標的 D N A 中に二本鎖切断が生じる。次に、相同組換えによりドナー D N A が D N A に挿入される。ドナー D N A には、切断部位の両側に隣接配列、および C a s 9 切断部位を除去する配列が含まれる。その結果、ドナー D N A が、ゲノム D N A であってもよい D N A 中に組み込まれる。

【手続補正3】

【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】

標的 D N A に相補的な R N A と共に局在複合体を形成、且つ前記標的 D N A を部位特異的に切断する酵素を発現する細胞において前記標的 D N A に複数の変化を生じさせる方法であって、

(a) 標的 D N A に相補的であり且つ前記酵素を前記標的 D N A にガイドする、1種類または複数種類の R N A をコードする第 1 の外来核酸を前記細胞に導入すること、ここで、前記 1 種類または複数種類の R N A および前記酵素が、前記標的 D N A への共局在複合体の構成要素である、

1 種類または複数種類のドナー核酸配列をコードする第 2 の外来核酸を前記細胞に導入

すること、ここで、前記 1 種類または複数種類の RNA および前記 1 種類または複数種類のドナー核酸の配列が発現し、前記 1 種類または複数種類の RNA および前記酵素が前記標的 DNA に共局在し、前記酵素により前記標的 DNA が切断され、前記ドナー核酸が前記標的 DNA に挿入されて前記細胞中に変化した DNA が生成する、および、

ステップ (a) を複数回繰り返して前記細胞において前記 DNA に複数の変化を生じさせることを含む、方法。

【請求項 2】

前記酵素が、RNA 誘導型 DNA 結合タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記酵素が Cas 9 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞が真核細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞が、酵母細胞、植物細胞、または動物細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 RNA が、10 ~ 500 ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 RNA が、20 ~ 100 ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 種類または複数種類の RNA が、ガイド RNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 種類または複数種類の RNA が、t r a c r RNA - c r RNA 融合体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 標的 DNA が、ゲノム DNA 、ミトコンドリア DNA 、ウイルス DNA 、または外来性 DNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 1 種類または複数種類のドナー核酸配列が、組換えにより挿入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 種類または複数種類のドナー核酸配列が、相同組換えにより挿入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 1 種類または複数種類の RNA および前記 1 種類または複数種類のドナー核酸配列が、1 種類または複数種類のプラスミド上に存在する、請求項 1 に記載の方法。