【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6月1日(2017.6.1)

【公開番号】特開2017-51190(P2017-51190A)
【公開日】平成29年3月16日(2017.3.16)
【年通号数】公開・登録公報2017-011
【出願番号】特願2016-193485(P2016-193485)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　9/16　(2006.01)
Ａ０１Ｋ　67/027　(2006.01)
Ａ０１Ｈ　5/00　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　7/01　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　31/12　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/46　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ｃ１２Ｎ　9/16　Ｚ
Ａ０１Ｋ　67/027
Ａ０１Ｈ　5/00　Ａ
Ｃ１２Ｎ　1/15
Ｃ１２Ｎ　1/19
Ｃ１２Ｎ　1/21
Ｃ１２Ｎ　5/10
Ｃ１２Ｎ　7/01
Ａ６１Ｐ　43/00　１０５
Ａ６１Ｐ　31/12
Ａ６１Ｋ　37/54
Ａ６１Ｋ　48/00

【手続補正書】
【提出日】平成29年4月13日(2017.4.13)
【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】
（ａ）配列番号１の野生型Ｉ－ＣｒｅＩメガヌクレアーゼの残基９～１５１と少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、第１認識半部位を有する第１ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットと、
（ｂ）配列番号１の野生型Ｉ－ＣｒｅＩメガヌクレアーゼの残基９～１５１と少なくと

も８５％の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、第２認識半部位を有する第２ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットと、
を含み、
前記第１及び第２ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットは、ポリペプチドリンカにより共有的に結合され、
前記ポリペプチドリンカは１５～５６個の残基を含み、
前記第１ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットは、配列番号１の１４２～１６３位からなる群から選択される位置に対応する残基で前記ポリペプチドリンカと共有的に結合し、
前記第２ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットは、配列番号１の１～９位からなる群から選択される位置に対応する残基で前記ポリペプチドリンカと共有的に結合し、
前記第１及び第２ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットは一緒に機能して、前記第１認識半部位及び前記第２認識半部位のハイブリッドである非パリンドロームＤＮＡ配列を、認識及び切断することができる、組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項２】
前記ポリペプチドリンカは、２３～５６個の残基を含む、請求項１記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項３】
前記ポリペプチドリンカは、２３～５６個の残基を含み、且つ安定な二次構造を有する、請求項１又は２記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項４】
前記ポリペプチドリンカは、少なくとも二つのαヘリックス構造を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項５】
前記ポリペプチドリンカは、１５～４０個の残基を含む、請求項１記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項６】
前記ポリペプチドリンカは、１５～４０個の残基を含み、且つ可撓性リンカである、請求項１又は５記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項７】
前記ポリペプチドリンカは、２５～３１個の残基を含む、請求項１、５又は６記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項８】
前記第１サブユニットは、配列番号１の１５２～１６３位からなる群から選択される位置に対応する残基において、前記ポリペプチドリンカと共有的に結合する、請求項１～７のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項９】
前記第１サブユニットは、配列番号１の１５１～１５３位からなる群から選択される位置に対応する残基において、前記ポリペプチドリンカと共有的に結合する、請求項１～７のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項１０】
前記第２サブユニットは、配列番号１の７～９位からなる群から選択される位置に対応する残基において、前記ポリペプチドリンカと共有的に結合する、請求項７又は８記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項１１】
前記ＬＡＧＬＩＤＡＤＧドメインの少なくとも１つは、Ｙ７５，Ｌ７５，Ｃ７５，Ｙ１３９，Ｃ４６，Ａ４６，Ｈ７５，Ｒ７５，Ｈ４６，Ｋ４６，Ｒ４６，Ｋ７０，Ｅ７０，Ｅ７５，Ｅ４６，Ｄ４６，Ｑ７０，Ｃ７０，Ｌ７０，Ｑ７５，Ｈ１３９，Ｑ４６，Ｇ７０，Ａ７０，Ｓ７０，Ｇ４６，Ｔ４４，Ａ４４，Ｖ４４，Ｉ４４，Ｌ４４，Ｎ４４，Ｄ７０，Ｋ４４，Ｒ４４，Ｈ７０，Ｄ４４，Ｅ４４，Ｃ４４，Ｑ６８，Ｃ２４，Ｅ６８，Ｆ６８，Ｋ２４，Ｒ２４，Ｍ６８，Ｃ６８，Ｌ６８，Ｈ６８，Ｙ６８，Ｋ６８，Ａ２６，Ｑ７７，

Ｅ７７，Ｋ２６，Ｒ７７，Ｅ２６，Ｓ７７，Ｑ２６，Ｓ２６，Ｅ４２，Ｒ４２，Ｋ２８，Ｃ２８，Ｑ４２，Ｍ６６，Ｋ６６，Ｑ４０，Ｅ４０，Ｒ２８，Ｒ４０，Ｃ４０，Ｉ４０，Ｖ４０，Ｃ７９，Ｉ７９，Ｖ７９，Ｑ２８，Ａ４０，Ａ７９，Ａ２８，Ｈ２８，Ｓ４０，Ｓ２８，Ｅ３８，Ｋ３０，Ｒ３０，Ｋ３８，Ｒ３８，Ｅ３０，Ｉ３８，Ｌ３８，Ｃ３８，Ｈ３８，Ｎ３８，Ｑ３０，Ｆ３３，Ｅ３３，Ｄ３３，Ｈ３３，Ｌ３３，Ｖ３３，Ｉ３３，Ｃ３３，Ｒ３２，Ｒ３３，Ｅ３２，Ｋ３２，Ｌ３２，Ｖ３２，Ａ３２，Ｃ３２，Ｄ３２，Ｉ３２，Ｎ３２，Ｈ３２，Ｑ３２，及びＴ３２からなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。

【請求項１２】

前記ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットはそれぞれ、配列番号７～３０からなる群から選択される認識半部位を有する、請求項１～１１のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。

【請求項１３】

前記ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットの少なくとも１つは、配列番号７～３０からなる群から選択される認識半部位を有し、及び

他の前記ＬＡＧＬＩＤＡＤＧサブユニットは、少なくとも１つの塩基対の修飾により、配列番号７～３０からなる群から選択される認識半部位と異なる認識半部位を有する、

請求項１～１１のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。

【請求項１４】

前記リンカを形成する前記残基の少なくとも５０％は極性非荷電残基である、請求項１～１３のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。

【請求項１５】

真核細胞の染色体中に挿入された目的の外因性配列を含有する、ヒト配偶子、ヒト接合子、ヒト胚盤胞細胞、及びヒト胚性幹細胞を除く遺伝子組換え真核細胞を体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）で製造する方法であって、

（ｉ）メガヌクレアーゼをコードする第１核酸配列と、

（ｉｉ）前記目的の配列を含む第２核酸配列と

を含む一つ以上の核酸を、真核細胞にトランスフェクトすることを含み、

前記メガヌクレアーゼにより前記染色体内に切断部位が作られ、該切断部位で前記目的の配列が前記染色体に挿入され、

前記メガヌクレアーゼは、請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼである、方法。

【請求項１６】

前記第２核酸は、更に、前記切断部位に隣接する配列に相同性のある配列を含み、前記外因性配列は前記切断部位で相同組換えによって挿入される、請求項１５記載の方法。

【請求項１７】

前記第２核酸は、前記切断部位に対し実質的な相同性を欠き、前記外因性配列は非相同的末端結合によって前記染色体に挿入される、請求項１５記載の方法。

【請求項１８】

真核細胞の染色体中に挿入された目的の外因性配列を含有する、ヒト配偶子、ヒト接合子、ヒト胚盤胞細胞、及びヒト胚性幹細胞を除く遺伝子組換え真核細胞を体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）で製造する方法であって、

メガヌクレアーゼタンパク質を真核細胞に導入することと、

前記目的の配列を含む核酸を前記真核細胞にトランスフェクトすることと、を含み、

前記メガヌクレアーゼにより前記染色体内に切断部位を作り、該切断部位で前記目的の配列を前記染色体に挿入し、

前記メガヌクレアーゼは請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼである、

遺伝子組換え真核細胞を製造する方法。

【請求項１９】
前記核酸は、更に、前記切断部位に隣接する配列に相同性のある配列を含み、前記外因性配列を前記切断部位で相同組換えによって挿入する、請求項１８記載の方法。
【請求項２０】
前記核酸は、前記切断部位に対し実質的な相同性を欠き、前記外因性配列を非相同的末端結合によって前記染色体に挿入する、請求項１８記載の方法。
【請求項２１】
真核細胞の染色体中で標的配列を破壊することによって、ヒト配偶子、ヒト接合子、ヒト胚盤胞細胞、及びヒト胚性幹細胞を除く遺伝子組換え真核細胞を体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）で製造する方法であって、
メガヌクレアーゼをコードする核酸を、真核細胞にトランスフェクトすることを含み、
前記メガヌクレアーゼにより前記染色体中に切断部位を作り、該切断部位で前記標的配列を非相同的末端結合によって破壊し、
前記メガヌクレアーゼは請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼである、方法。
【請求項２２】
遺伝子組換え非ヒト生物を製造する方法であって、
（ａ）請求項１５～２１のいずれか１項に記載の方法に従って遺伝子組換え真核細胞を製造することと、
（ｂ）前記遺伝子組換え真核細胞を成長させ、前記遺伝子組換え非ヒト生物を製造することと、
を含む、方法。
【請求項２３】
前記真核細胞が、配偶子、接合子、胚盤胞細胞、胚性幹細胞、及びプロトプラスト細胞からなる群から選択される、請求項２２記載の方法。
【請求項２４】
前記遺伝子組換え非ヒト生物が植物であり、且つ前記遺伝子組換え真核細胞がプロトプラスト細胞である、請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
前記遺伝子組換え非ヒト生物が動物であり、且つ前記遺伝子組換え真核細胞が接合子又は胚性幹細胞である、請求項２３記載の方法。
【請求項２６】
ウィルス性病原体のゲノム中で標的配列を破壊することによって、非ヒト真核生物宿主において前記ウィルス性病原体を処理する方法であって、
メガヌクレアーゼをコードする核酸を、前記非ヒト真核生物宿主の少なくとも一つの感染細胞にトランスフェクトすることを含み、
前記メガヌクレアーゼにより前記ウィルス性ゲノム中に切断部位を作り、該切断部位で非相同的末端結合により前記標的配列を破壊し、
前記メガヌクレアーゼは請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼであり、
前記標的配列の混乱により前記感染の治療を提供する、方法。
【請求項２７】
ウィルス性病原体のゲノム中で標的配列を破壊することによって、非ヒト真核生物宿主において前記ウィルス性病原体を処理する方法であって、
メガヌクレアーゼをコードする第１核酸と、第２核酸とを、前記非ヒト真核生物宿主の少なくとも一つの感染細胞にトランスフェクトすることを含み、
前記メガヌクレアーゼにより前記ウィルス性ゲノム中に切断部位を作り、該切断部位で前記ウィルス性ゲノム及び前記第２核酸の相同組換えにより前記標的配列を破壊し、
前記メガヌクレアーゼは請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼであり、

前記第２核酸は前記切断部位に隣接する配列に相同性のある配列を含み、
前記標的配列の破壊により前記感染の治療を提供する、方法。
【請求項２８】
原核細胞系病原体のゲノム中で標的配列を破壊することによって、非ヒト真核生物宿主において前記原核細胞系病原体を処理する方法であって、
メガヌクレアーゼをコードする核酸を、前記非ヒト真核生物宿主に感染する前記原核細胞系病原体の少なくとも細胞にトランスフェクトすることを含み、
前記メガヌクレアーゼにより前記原核細胞系ゲノム中に切断部位を作り、該切断部位で非相同的末端結合により前記標的配列を破壊し、
前記メガヌクレアーゼは請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼであり、
前記標的配列の破壊により前記感染の治療を提供する、方法。
【請求項２９】
原核細胞系病原体のゲノム中で標的配列を破壊することによって、非ヒト真核生物宿主において前記原核細胞系病原体を処理する方法であって、
メガヌクレアーゼをコードする第１核酸と、第２核酸とを、前記真核生物宿主に感染する前記原核細胞系病原体の少なくとも細胞にトランスフェクトすることを含み、
前記メガヌクレアーゼにより前記原核細胞系ゲノム中に切断部位を作り、該切断部位における前記原核細胞系ゲノム及び前記第２核酸の相同組換えにより前記標的配列を破壊し、
前記メガヌクレアーゼは請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼであり、
前記第２核酸は前記切断部位に隣接する配列に相同性のある配列を含み、
前記標的配列の混乱により前記感染の治療を提供する、方法。
【請求項３０】
遺伝子治療に用いるための、請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。
【請求項３１】
真核生物宿主におけるウィルス性病原体の感染又は真核生物宿主における原核細胞系病原体の感染を治療するために用いるための、請求項１～１４のいずれか１項に記載の組換え単鎖メガヌクレアーゼ。