【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10月14日(2021.10.14)

【公表番号】特表2020-534812(P2020-534812A)
【公表日】令和2年12月3日(2020.12.3)
【年通号数】公開・登録公報2020-049
【出願番号】特願2020-513724(P2020-513724)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/195　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/31　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/315　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/55　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　9/16　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/38　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/13　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/85　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/65　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/67　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/62　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/57　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/09　１００
Ｃ１２Ｎ　15/09　１１０
Ｃ０７Ｋ　14/195　ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　15/31
Ｃ０７Ｋ　14/315
Ｃ１２Ｎ　15/55
Ｃ１２Ｎ　9/16　Ａ
Ｃ１２Ｎ　15/38
Ｃ１２Ｎ　15/13
Ｃ１２Ｎ　15/63　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/85　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/65　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/67　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/62　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/57
Ｃ０７Ｋ　19/00

【手続補正書】
【提出日】令和3年9月3日(2021.9.3)
【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】
細胞内に存在する内因性核酸分子を改変する方法であって、ドナーＤＮＡ分子を細胞に導入することを含み、
前記ドナーＤＮＡ分子は、前記内因性核酸分子が位置する前記細胞内の位置に前記ドナーＤＮＡ分子を局在させることができる１つ以上の細胞内標的化部分に作動可能に連結する、方法。
【請求項２】
前記内因性核酸分子が位置する前記細胞内の位置が、核、ミトコンドリア、または葉緑体の中である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記１つ以上の細胞内標的部分が核局在化シグナルである、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記ドナーＤＮＡ分子が、約２５～約８，０００ヌクレオチド長である、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記ドナーＤＮＡ分子が一本鎖である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記ドナーＤＮＡ分子が、１つ以上の末端の５０ヌクレオチド内に１つ以上のヌクレアーゼ耐性基を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記ヌクレアーゼ耐性基が、ホスホロチオエート基、アミン基、２’－Ｏ－メチルヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－フルオロヌクレオチド、２’－デオキシヌクレオチド、５－Ｃ－メチルヌクレオチド、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ドナーＤＮＡが、二本鎖または部分的に二本鎖である、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記ドナーＤＮＡ分子が、ポジティブ選択マーカーおよびネガティブ選択マーカーを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記ネガティブ選択マーカーが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼをコードする核酸である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ドナーＤＮＡ分子が、前記細胞内に存在する標的遺伝子座との配列相補性の２つの領域を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記選択マーカーが、前記ドナーＤＮＡ分子の前記配列相補性の２つの領域の間に位置する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記細胞が、以下のうちの１つ以上と接触する、請求項１に記載の方法：
（１）１つ以上の核酸切断エンティティ、
（２）核酸切断エンティティの１つ以上の成分をコードする１つ以上の核酸分子、
（３）１つ以上のＤＮＡ結合調節増強剤、
（４）ＤＮＡ結合調節増強剤の１つ以上の成分をコードする１つ以上の核酸分子、または
（５）１つ以上の非相同末端接合（ＮＨＥＪ）阻害剤。
【請求項１４】
前記１つ以上の非相同末端接合（ＮＨＥＪ）阻害剤がＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼ阻害剤である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】

前記１つ以上の核酸切断エンティティのうちの１つ以上が、以下からなる群から選択される、請求項１３に記載の方法：
（１）ジンクフィンガーヌクレアーゼ、
（２）ＴＡＬエフェクターヌクレアーゼ、および
（３）ＣＲＩＳＰＲ複合体。
【請求項１６】
前記１つ以上のＤＮＡ結合調節増強剤のうちの１つ以上が、以下からなる群から選択される、請求項１３に記載の方法：
（１）ジンクフィンガータンパク質、
（２）ＴＡＬＥタンパク質、および
（３）ＣＲＩＳＰＲ複合体。
【請求項１７】
前記ＴＡＬＥタンパク質が異種ヌクレアーゼドメインを有しない、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記ＣＲＩＳＰＲ複合体がｄＣａｓ９タンパク質を含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
前記１つ以上のＤＮＡ結合調節増強剤のうちの１つ以上が、標的遺伝子座の５０ヌクレオチド内で結合するように設計される、請求項１３に記載の方法。
【請求項２０】
図４６のアミノ酸アミノ酸８１１～８３０を含むＴＡＬＥタンパク質であって、８１５～８１６位および８２４～８２５位のアミノ酸が、Ｇｌｙ－ＳｅｒまたはＧｌｙ－Ｇｌｙであり得る、ＴＡＬＥタンパク質。
【請求項２１】
図４６のアミノ酸アミノ酸８１０～１０２９を含み、１０２２～１０２３位のアミノ酸がＧｌｙ－ＳｅｒまたはＧｌｙ－Ｇｌｙであり得る、請求項２０に記載のＴＡＬＥタンパク質。
【請求項２２】
図４６のアミノ酸アミノ酸７５２～１０２１を含む、請求項２０に記載のＴＡＬＥタンパク質。
【請求項２３】
図４７のアミノ酸アミノ酸２０～２７、３０～１０７、および１１１～１６５を含み、２８～２９位のアミノ酸がＧｌｙ－ＳｅｒまたはＧｌｙ－Ｇｌｙであり、１０８～１１０位のアミノ酸がＡｒｇ－Ｇｌｙ－ＡｌａまたはＧｌｎ－Ｔｒｐ－Ｓｅｒである、ＴＡＬＥタンパク質。
【請求項２４】
図４７のアミノ酸アミノ酸８２１～８２６および８２９～８４０を含み、８２７～８２８位のアミノ酸がＧｌｙ－ＳｅｒまたはＧｌｙ－Ｇｌｙである、ＴＡＬＥタンパク質。
【請求項２５】
図４７に対応するアミノ酸を含む、請求項２４に記載のＴＡＬＥタンパク質。
【請求項２６】
４～２５の反復単位を含む反復領域を含む、請求項２４に記載のＴＡＬＥタンパク質。
【請求項２７】
細胞内で細胞内核酸を操作するための方法であって、請求項２３に記載のＴＡＬＥタンパク質または請求項２３に記載のＴＡＬＥタンパク質をコードする核酸を前記細胞に導入することを含む、方法。
【請求項２８】
ドナー核酸分子を前記細胞に導入することをさらに含み、前記ドナー核酸分子が、前記標的遺伝子座の５０ヌクレオチド内に位置する核酸との配列相同性の１つ以上の領域を有する、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】
２つ以上の双節型核局在化シグナルを含むＣａｓ９タンパク質。
【請求項３０】
前記２つ以上の双節型核局在化シグナルが、１つ以上の末端の２０アミノ酸内に位置する、請求項２９に記載のＣａｓ９タンパク質。
【請求項３１】
前記２つ以上の双節型核局在化シグナルが、前記タンパク質のＮ末端およびＣ末端の２０アミノ酸内に個々に位置する、請求項２９に記載のＣａｓ９タンパク質。
【請求項３２】
前記２つ以上の双節型核局在化シグナルが、異なるアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のＣａｓ９タンパク質。
【請求項３３】
１つ以上の単節型核局在化シグナルをさらに含む、請求項２９に記載のＣａｓ９タンパク質。
【請求項３４】
親和性標識をさらに含む、請求項２９に記載のＣａｓ９タンパク質。
【請求項３５】
細胞内で細胞内核酸を操作する方法であって、請求項２９に記載のＣａｓ９タンパク質または請求項２９に記載のＣａｓ９タンパク質をコードする核酸を前記細胞に導入することを含み、前記Ｃａｓ９タンパク質が前記細胞内の標的遺伝子座に結合するように設計される、方法。
【請求項３６】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体として前記細胞に導入される、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
ドナー核酸分子を前記細胞に導入することをさらに含み、前記ドナー核酸分子が、前記標的遺伝子座の５０ヌクレオチド内に位置する核酸との配列相同性の１つ以上の領域を有する、請求項３５に記載の方法。
【請求項３８】
細胞集団内の切断部位における細胞内核酸分子の相同組換えのための方法であって、
（ａ）前記切断部位で前記細胞内核酸分子に二本鎖破断を生じさせて、切断された核酸分子を生成することと、
（ｂ）前記切断された核酸分子をドナー核酸分子と接触させることであって、前記ドナー核酸分子が、前記切断部位の各側の１００塩基対内に位置する核酸と相同性の少なくとも１０ヌクレオチドまたは塩基対を有する、接触させることと、を含み、
前記細胞集団内の前記細胞の少なくとも９５％が、前記切断部位で前記ドナー核酸分子との相同性指向修復を受ける、方法。
【請求項３９】
前記ドナー核酸分子が、相同性指向修復後に前記細胞内核酸分子に存在するプロモーターに作動可能に連結した選択マーカーまたはレポーター遺伝子を含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記ドナー核酸分子は、前記ドナー核酸分子前記ドナー核酸分子が前記細胞集団の細胞の核に局在化することを可能にする１つ以上の核局在化シグナルに連結する、請求項３８に記載の方法。
【請求項４１】
前記細胞集団が、以下のうちの１つ以上と接触する、請求項３８に記載の方法：
（１）１つ以上の核酸切断エンティティ、
（２）核酸切断エンティティの１つ以上の成分をコードする１つ以上の核酸分子、
（３）１つ以上のＤＮＡ結合調節増強剤、

（４）ＤＮＡ結合調節増強剤の１つ以上の成分をコードする１つ以上の核酸分子、または

（５）１つ以上の非相同末端接合（ＮＨＥＪ）阻害剤。

【請求項４２】

前記ドナー核酸分子が一本鎖である、請求項３８に記載の方法。

【請求項４３】

前記ドナーＤＮＡ分子が、１つ以上の核局在化シグナルに作動可能に連結する、請求項３８に記載の方法。

【請求項４４】

前記細胞集団が、前記１つ以上の核酸切断エンティティまたは１つ以上の核酸切断エンティティをコードする１つ以上の核酸分子と接触し、続いて前記細胞集団が１つ以上のドナー核酸分子と接触する、請求項３８に記載の方法。

【請求項４５】

前記細胞集団が１つ以上の核酸切断エンティティまたは１つ以上の核酸切断エンティティをコードする１つ以上の核酸分子と接触した５～６０分後に、前記細胞集団が１つ以上のドナー核酸分子と接触する、請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】

初期核酸分子における相同組換えのための方法であって、

（ａ）前記初期核酸分子に二本鎖破断を生じさせて、切断された核酸分子を生成することと、

（ｂ）前記切断された核酸分子をドナー核酸分子と接触させることと、を含み、

前記初期核酸分子がプロモーターおよび遺伝子を含み、

前記ドナー核酸分子が、（ｉ）長さが１２ｂｐ～２５０ｂｐの５’および３’末端の一致した末端、（ｉｉ）プロモーターを持たない選択マーカー、（ｉｉｉ）レポーター遺伝子、（ｉｖ）前記プロモーターを持たない選択マーカーと前記レポーター遺伝子または前記プロモーターを持たない選択マーカーのいずれかの側のｌｏｘＰのいずれも連結する自己切断ペプチド、ならびに（ｉｖ）任意選択で、前記プロモーターを持たない選択マーカーと前記レポーター遺伝子との間のリンカーを含む、方法。

【請求項４７】

前記核酸分子の前記二本鎖破断が、（ｉ）前記切断された核酸分子のＮ末端標識化のための前記ＡＴＧ開始コドンから２５０ｂｐ以下であるか、または（ｉｉ）前記切断された核酸分子のＣ末端標識化のための前記停止コドンから２５０ｂｐ以下である、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】

前記二本鎖切断が１つ以上の核酸切断エンティティによって誘導される、請求項４６に記載の方法。

【請求項４９】

前記少なくとも１つの核酸切断エンティティが、１つ以上のジンクフィンガータンパク質、１つ以上の転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、１つ以上のＣＲＩＳＰＲ複合体、１つ以上のアルゴノート－核酸複合体、または１つ以上のマクロヌクレアーゼを含むヌクレアーゼを含む、請求項４８に記載の方法。

【請求項５０】

前記少なくとも１つの核酸切断エンティティが、発現ベクター、プラスミド、リボ核タンパク質複合体（ＲＮＣ）、またはｍＲＮＡを使用して投与される、請求項４８に記載の方法。

【請求項５１】

前記プロモーターを持たない選択マーカーが、タンパク質、抗生物質耐性選択マーカー、細胞表面マーカー、細胞表面タンパク質、代謝産物、またはそれらの活性断片を含む、請求項４６に記載の方法。

【請求項５２】

前記自己切断ペプチドが自己切断２Ａペプチドである、請求項４６に記載の方法。
【請求項５３】
前記一致した末端が、一本鎖ＤＮＡまたは二本鎖ＤＮＡを含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項５４】
前記ドナー核酸分子の５’および３’末端の前記一致した末端が、１２ｂｐ～２００ｂｐ、１２ｂｐ～１５０ｂｐ、１２ｂｐ～１００ｂｐ、１２ｂｐ～５０ｂｐ、または１２ｂｐ～４０ｂｐの長さを有する、請求項４６に記載の方法。
【請求項５５】
前記ドナー核酸分子が、相同性指向修復（ＨＤＲ）によって、前記切断された核酸分子に組み込まれる、請求項４６に記載の方法。
【請求項５６】
５’末端、３’末端、または５’および３’末端で前記ドナー核酸分子を修飾することをさらに含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項５７】
前記ドナー核酸分子が５’および３’末端で修飾される、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記ドナー核酸分子が、１つ以上の末端の１つ以上の鎖中で１つ以上のヌクレアーゼ耐性基により修飾される、請求項５６に記載の方法。
【請求項５９】
前記１つ以上のヌクレアーゼ耐性基が、１つ以上のホスホロチオエート基、１つ以上のアミン基、２’－Ｏ－メチルヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－フルオロヌクレオチド、２’－デオキシヌクレオチド、５－Ｃ－メチルヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含む、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記ドナー核酸分子を１つ以上の非相同末端接合（ＮＨＥＪ）阻害剤で処理することをさらに含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項６１】
請求項４６に記載の方法によって作製される核酸分子。
【請求項６２】
組換え抗体発現カセットであって、
（ｉ）長さ２５０ｂｐ以下である、前記カセットの５’および３’末端にある一致した末端、
（ｉｉ）プロモーターを持たない選択マーカー、
（ｉｉｉ）レポーター遺伝子、
（ｉｖ）前記プロモーターを持たない選択マーカーと前記レポーター遺伝子とを連結する自己切断ペプチド、および
（ｖ）任意選択で、前記プロモーターを持たない選択マーカーと前記レポーター遺伝子との間のリンカー、を含み、
前記プロモーターを持たない選択マーカーが、切断された核酸分子のＮ末端標識化のために前記レポーター遺伝子の５’末端で、または切断された核酸分子のＣ末端標識化のために前記レポーター遺伝子の３’末端で連結する、組換え抗体発現カセット。
【請求項６３】
細胞内の標的遺伝子座での調節タンパク質または調節複合体の活性を高める方法であって、
（１）前記標的遺伝子座をコードする核酸を含む細胞に、
（ｉ）調節部位を含む前記標的遺伝子座の第１のモジュレーター結合配列に結合することができる、第１の調節タンパク質または第１の調節複合体、および
（ｉｉ）前記標的遺伝子座の第１のエンハンサー結合配列に結合することができる第１のＤＮＡ結合調節増強剤、を導入することと、

（２）前記第１のＤＮＡ結合調節増強剤を前記第１のエンハンサー結合配列に結合させ、それにより細胞内の標的遺伝子座で前記第１の調節タンパク質または前記第１の調節複合体の活性を高めることと、を含む、方法。
【請求項６４】
前記第１のＤＮＡ結合調節増強剤の導入に、前記第１のＤＮＡ結合調節増強剤をコードするベクターの導入が含まれる、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記第１のＤＮＡ結合調節増強剤の導入に、前記第１のＤＮＡ結合調節増強剤をコードするｍＲＮＡの導入が含まれる、請求項６３に記載の方法。
【請求項６６】
前記第１のＤＮＡ結合調節増強剤が第１の転写活性化因子様（ＴＡＬ）エフェクターである、請求項６３に記載の方法。
【請求項６７】
（１）前記細胞に第２のＤＮＡ結合調節増強剤を導入することと、
（２）前記第２のＤＮＡ結合調節増強剤が前記標的遺伝子座の第２のエンハンサー結合配列に結合することを可能にすることと、をさらに含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項６８】
前記第１のエンハンサー結合配列および前記第２のエンハンサー結合配列が、互いの１８０塩基対以内に位置する、請求項６４に記載の方法。
【請求項６９】
前記第１のエンハンサー結合配列および前記第２のエンハンサー結合配列が、前記モジュレーター結合配列の反対側に位置する、請求項６４に記載の方法。
【請求項７０】
前記第１の調節タンパク質がＤＮＡ結合ヌクレアーゼ融合タンパク質である、請求項６３に記載の方法。
【請求項７１】
前記ＤＮＡ結合ヌクレアーゼ融合タンパク質がＴＡＬＥ－ＦｏｋＩ融合タンパク質である、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
前記第１の調節複合体が、ヌクレアーゼ活性を有するＣＲＩＳＰＲ／ｇＲＮＡ複合体である、請求項６３に記載の方法。
【請求項７３】
前記第１の調節複合体が、ヌクレアーゼ活性を有するＣａｓ９／ｇＲＮＡ複合体である、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記調節部位を含む前記標的遺伝子座の第２のモジュレーター結合配列に結合することができる、第２の調節タンパク質または第2の調節複合体を、前記細胞に導入することをさらに含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項７５】
前記第１の調節タンパク質がＤＮＡ結合ヌクレアーゼ融合タンパク質である、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
前記ＤＮＡ結合ヌクレアーゼ融合タンパク質がＴＡＬＥ－ＦｏｋＩ融合タンパク質である、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記第２の調節複合体が、ヌクレアーゼ活性を有するＣＲＩＳＰＲ／ｇＲＮＡ複合体である、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記第２の調節複合体が、ヌクレアーゼ活性を有するＣａｓ９／ｇＲＮＡ複合体である、請求項７７に記載の方法。