

【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31年4月11日(2019.4.11)

【公表番号】特表2016-521554(P2016-521554A)

【公表日】平成28年7月25日(2016.7.25)

【年通号数】公開・登録公報2016-044

【出願番号】特願2016-517954(P2016-517954)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)
A 6 1 K	35/12	(2015.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	35/12	

【誤訳訂正書】

【提出日】平成31年3月1日(2019.3.1)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0010

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0010】

一つの態様によると、前記1種類以上のRNAはガイドRNAである。一つの態様によると、前記1種類以上のRNAはtracrRNA-crrRNA融合体である。一つの態様によると、前記ガイドRNAはスペーサー配列とトレーサーメイト配列(tracer mate sequence)を含む。前記ガイドRNAは、その一部がtracrメイト配列にハイブリダイズするtracr配列を含んでもよい。前記ガイドRNAはトレーサーメイト配列とtracr配列を連結(link)してtracrRNA-crrRNA融合体を作製するリンク核酸配列を含んでもよい。前記スペーサー配列は、例えばハイブリダイゼーションにより、標的DNAに結合する。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0080

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0080】

一つの態様によると、転写活性化ドメインをヌクレアーゼ欠損Cas9またはガイドRNAのどちらかに連結することによってヒト細胞においてのRNA誘導性ゲノム制御を可能にする、遺伝子改変されたCas9-gRNAシステムが提供される。本開示の一つの

態様によると、1つ以上の転写制御タンパク質またはドメイン（そのような用語は互換的に使用される）がヌクレアーゼ欠損型 Cas9 または1つ以上のガイド RNA (gRNA) に結びつけられ、あるいはこれ以外のやり方で接続される。それらの転写制御ドメインは標的座位に対応する。したがって、本開示の態様は、転写制御ドメインを Cas9N または gRNA のどちらかに融合し、接続し、または結びつけることによりそのようなドメインを標的座位に局在させるための方法および材料を含む。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0081

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0081】

一つの態様によると、転写活性化可能な Cas9N 融合タンパク質が提供される。一つの態様によると、VP64 活性化ドメイン（ここにその全体が参照により援用される Zhang ら著、Nature Biotechnology誌、第29巻、149～153頁（2011年）を参照のこと）が Cas9N の C 末端に結びつけられ、融合され、接続され、あるいはこれら以外のやり方で連結（tether）される。一つの方法によると、当該 Cas9N タンパク質により標的ゲノム DNA 部位に転写制御ドメインが提供される。一つの方法によると、転写制御ドメインに融合した Cas9N が1つ以上のガイド RNA と共に細胞内に提供される。融合した転写制御ドメインを有する Cas9N が、標的ゲノム DNA に、または標的ゲノム DNA 近傍に結合する。1つ以上のガイド RNA が、標的ゲノム DNA に、または標的ゲノム DNA 近傍に結合する。転写制御ドメインが標的遺伝子の発現を制御する。特定の態様によると、Cas9N - VP64 融合体は、プロモーター近辺の配列を標的とする gRNA と組み合わさった時に、レポーターコンストラクトの転写を活性化し、それによって RNA 誘導性転写を活性化した。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0082

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0082】

一つの態様によると、転写活性化可能な gRNA 融合タンパク質が提供される。一つの態様によると、VP64 活性化ドメインが gRNA に結びつけられ、融合され、接続され、あるいはこれら以外のやり方で連結（tether）される。一つの方法によると、その gRNA によりゲノム DNA 部位を標的とする転写制御ドメインが提供される。一つの方法によると、転写制御ドメインに融合した gRNA が Cas9N タンパク質と共に細胞内に提供される。当該 Cas9N は、標的ゲノム DNA に、または標的ゲノム DNA 近傍に結合する。転写制御タンパク質またはドメインと融合した、1つ以上のガイド RNA が、標的ゲノム DNA に、または標的ゲノム DNA 近傍に結合する。転写制御ドメインが標的遺伝子の発現を制御する。特定の態様によると、Cas9N タンパク質と、転写制御ドメインが融合した gRNA とが、レポーターコンストラクトの転写を活性化し、それによって RNA 誘導性転写を活性化した。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0103

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0103】

標的核酸には、本明細書に記載される共局在複合体が制御またはニックの形成のどちらかにとて有用であり得るあらゆる核酸配列が含まれる。標的核酸には遺伝子が含まれる

。本開示の目的のため、二本鎖DNAなどのDNAは標的核酸を含むことができ、共局在複合体はその共局在複合体が標的核酸に対する所望の作用を有し得るようにその標的核酸で、またはそれに隣接して、またはその近傍でそのDNAに結合するか、あるいはこれら以外のやり方でそのDNAと共に局在することができる。そのような標的核酸には内在性の（または天然の）核酸および外來性の（または外來の）核酸が含まれ得る。当業者は標的核酸を含むDNAに共局在するガイドRNAおよびCas9タンパク質を本開示に基づいて容易に特定またはデザインすることができる。当業者は標的核酸を含むDNAに同様に共局在する転写制御因子タンパク質またはドメインをさらに特定することができる。DNAにはゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNAまたは外來性DNAが含まれる。

#### 【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0106

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0106】

疾患および有害な健康状態は特定のタンパク質の発現の異常な喪失を特徴とするものである。そのような疾患または有害な健康状態は特定のタンパク質の上方制御によって治療され得る。以上より、疾患または有害な健康状態を治療する方法であって、本明細書に記載される共局在複合体が標的核酸を含むDNAに会合その他のやり方で結合し、共局在複合体の転写活性化因子が標的核酸の発現を上方制御する前記方法を提供する。例えば、褐色脂肪分化および代謝取込みの増加を促進するPRDM16と他の遺伝子の上方制御を用いてメタボリックシンドロームまたは肥満を治療することができる。抗炎症性遺伝子の活性化は自己免疫疾患および心血管疾患において有用である。腫瘍抑制遺伝子の活性化は癌の治療に有用である。当業者は本開示に基づいてそのような疾患および有害な健康状態を容易に特定する。

#### 【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的核酸を含むDNAに相補的である1種類以上のガイドRNAをコードする第1外來核酸を細胞に導入すること、

前記DNAに結合し且つ前記1種類以上のガイドRNAによってガイドされるヌクレアーゼ欠損(nuclease-null)Cas9タンパク質をコードする第2外來核酸を前記細胞に導入すること、

転写制御因子タンパク質またはドメインをコードする第3外來核酸を前記細胞に導入することを含み、

前記1種類以上のガイドRNA、前記ヌクレアーゼ欠損Cas9タンパク質および前記転写制御因子タンパク質またはドメインが発現し、前記1種類以上のガイドRNA、前記ヌクレアーゼ欠損Cas9タンパク質および前記転写制御因子タンパク質またはドメインが前記DNAに共局在し、前記転写制御因子タンパク質またはドメインが前記標的核酸の発現を制御し、

前記1種類以上のガイドRNAをコードする前記第1外來核酸が連結(tether)配列をさらにコードし、前記転写制御因子タンパク質またはドメインをコードする前記第3外來核酸が前記転写制御因子タンパク質またはドメインに融合した連結配列結合ドメインをさらにコードする、

細胞において標的核酸の発現を制御する方法(ただし、該方法が人体内で行われる場合

を除く)。

【請求項 2】

ヌクレアーゼ欠損 Cas9 タンパク質をコードする前記第 2 外来核酸が、前記ヌクレアーゼ欠損 Cas9 タンパク質に融合した前記転写制御因子タンパク質またはドメインをさらにコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記連結配列が RNA 結合ドメインの標的であり、

前記連結配列結合ドメインが RNA 結合ドメインである、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】

前記転写制御因子タンパク質またはドメインが転写活性化因子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記転写制御因子タンパク質またはドメインが前記標的核酸の発現を上方制御する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記転写制御因子タンパク質またはドメインが、疾患または有害な健康状態を治療するために前記標的核酸の発現を上方制御する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記標的核酸が疾患または有害な健康状態と関連する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 1 種類以上のガイド 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 11】

前記 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 12】

前記連結配列が 2 コピーの MS2 バクテリオファージ・コートプロテイン結合性 RNA ステムループを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記連結配列結合ドメインが MS2 バクテリオファージ・コートプロテインである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記連結配列がアプタマーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

標的核酸を含む DNA に相補的である 1 種類以上のガイド RNA をコードする第 1 外来核酸、

ヌクレアーゼ欠損 Cas9 タンパク質をコードする第 2 外来核酸、および

転写制御因子タンパク質またはドメインをコードする第 3 外来核酸を含み、

前記 1 種類以上のガイド RNA 、前記ヌクレアーゼ欠損 Cas9 タンパク質、および前記転写制御因子タンパク質またはドメインが、前記標的核酸に対する共局在複合体の構成要素であり、

前記 1 種類以上のガイド RNA をコードする前記第 1 外来核酸が連結 (tether) 配列をさらにコードし、前記転写制御因子タンパク質またはドメインをコードする前記第 3 外来核酸が前記転写制御因子タンパク質またはドメインに融合した連結配列結合ドメインをさらにコードする、細胞。

【請求項 16】

前記ヌクレアーゼ欠損 C a s 9 タンパク質をコードする前記第 2 外来核酸が、前記ヌクレアーゼ欠損 C a s 9 タンパク質に融合した前記転写制御因子タンパク質またはドメインをさらにコードする、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 1 7】

前記連結配列が R N A 結合ドメインの標的であり、

前記連結配列結合ドメインが R N A 結合ドメインである、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 1 8】

前記細胞が真核細胞である、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 1 9】

前記転写制御因子タンパク質またはドメインが転写活性化因子である、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 2 0】

前記転写制御因子タンパク質またはドメインが、疾患または有害な健康状態を治療するために前記標的核酸の発現を上方制御する、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 2 1】

前記 1 種類以上のガイド R N Aが t r a c r R N A c r R N A 融合体である、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 2 2】

前記 D N A がゲノム D N A、ミトコンドリア D N A、ウイルス D N A、または外来性 D N A である、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 2 3】

前記連結配列が 2 コピーの M S 2 バクテリオファージ・コートプロテイン結合性 R N A ステムループを含む、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 2 4】

前記連結配列結合ドメインが M S 2 バクテリオファージ・コートプロテインである、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 2 5】

前記連結配列がアプタマーである、請求項 1 5 に記載の細胞。