

【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2月16日 (2017.2.16)

【公表番号】特表2016-505256(P2016-505256A)

【公表日】平成28年2月25日 (2016.2.25)

【年通号数】公開・登録公報2016-012

【出願番号】特願2015-547530(P2015-547530)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/22 (2006.01)

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/315 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/22

A 0 1 K 67/027

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 14/315

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 43/00 1 0 5

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月13日 (2017.1.13)

【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】

1 つ以上の原核細胞（複数の場合も有り）において 1 つ以上の突然変異を導入することによって 1 つ以上の原核細胞（複数の場合も有り）を選択する方法であって、

前記方法が、

1 つ以上のベクターを前記原核細胞（複数の場合も有り）中に導入すること；

ここで、前記 1 つ以上のベクターが、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、t r a c r 配列、及び標的ポリヌクレオチドを含むターゲティングされる染色体遺伝子座中への組換えのための編集テンプレートのうちの 1 つ以上の発現をドライブし；

並びに、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、及び t r a c r 配列、並びに編集テンプレートの全てが、前記原核細胞（複数の場合もあり）において産生され；

組換えによって前記編集テンプレートを標的ポリヌクレオチド中に導入すること、

ここで、前記編集テンプレートが、プロトスペーサー隣接モチーフ（P A M）配列又はプロトスペーサー配列を変更し、前記標的ポリヌクレオチドのC R I S P R 酵素開裂を停止させる、前記標的ポリヌクレオチドの前記1つ以上の突然変異を含み；

C R I S P R 複合体を前記標的ポリヌクレオチドに結合させて、前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせること；

ここで、前記C R I S P R 複合体が、（1）前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされる前記ガイド配列、及び（2）t r a c r 配列にハイブリダイズされる前記t r a c r メイト配列と複合体形成している前記C R I S P R 酵素を含み；

ここで、前記C R I S P R 複合体による前記標的ポリヌクレオチドの開裂が、細胞死を誘導し；

それによって、1つ以上の突然変異が導入された1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）が選択されることを可能とすること；

を含む、方法。

**【請求項2】**

1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）において1つの突然変異又は複数の突然変異を導入することによって1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）において1つの突然変異又は複数の突然変異を生成する方法であって、

A .

1つ以上のベクターを前記原核細胞（複数の場合もあり）中に導入すること；

ここで、前記1つ以上のベクターが、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、t r a c r 配列、及び編集テンプレートのうちの1つ以上の発現をドライブレ；

並びに、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、及び t r a c r 配列、並びに編集テンプレートの全てが、前記原核細胞（複数の場合もあり）において産生され；

C R I S P R 複合体を、標的ポリヌクレオチドを含むターゲティングされる染色体遺伝子座に結合させて、前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせること、

それによって、前記突然変異を含む前記編集テンプレートが、前記1つ以上の原核生物（複数の場合もあり）において組換えによって導入され；並びに

ここで、前記C R I S P R 複合体が、（1）前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされる前記ガイド配列、及び（2）t r a c r 配列にハイブリダイズされる前記t r a c r メイト配列と複合体形成している前記C R I S P R 酵素を含み；

それによって、前記突然変異が導入された1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）を生成すること；

を含む方法によって、1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）において突然変異を導入することによって1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）において1つの突然変異を生成すること；

或いは、

B .

1つ以上のベクターを前記原核細胞（複数の場合もあり）中に導入すること；

ここで、前記1つ以上のベクターが、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、t r a c r 配列、及び編集テンプレートのうちの1つ以上の発現をドライブレ；

並びに、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、及び t r a c r 配列、並びに編集テンプレートの全てが、前記原核細胞（複数の場合もあり）において産生され；

C R I S P R 複合体を、標的ポリヌクレオチドを含むターゲティングされる染色体遺伝子座に結合させて、前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせること、

それによって、前記複数の突然変異を含む前記編集テンプレートが、前記1つ以上の原核生物（複数の場合もあり）において組換えによって導入され；並びに

ここで、前記C R I S P R 複合体が、（1）前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされる前記ガイド配列、及び（2）t r a c r 配列にハイブリダイズされる前記t r a c r メイト配列と複合体形成している前記C R I S P R 酵素を含み；

それによって、複数の突然変異が導入された1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）を生成すること；

を含む方法によって、1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）において複数の突然変異を導入することによって1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）において複数の突然変異を生成すること；

或いは、

C .

1つ以上のベクターを前記原核細胞（複数の場合もあり）中に導入すること；

ここで、前記1つ以上のベクターが、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、t r a c r 配列、及び編集テンプレートのうちの1つ以上の発現をドライブし；

並びに、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、及びt r a c r 配列、並びに編集テンプレートの全てが、前記原核細胞（複数の場合もあり）において産生され；

C R I S P R 複合体を、標的ポリヌクレオチドを含むターゲティングされる染色体遺伝子座に結合させて、前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせること、

それによって、第1の突然変異を含む前記編集テンプレートが、前記1つ以上の原核生物（複数の場合もあり）において組換えによって導入され；並びに

ここで、前記C R I S P R 複合体が、（1）前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされる前記ガイド配列、及び（2）t r a c r 配列にハイブリダイズされる前記t r a c r メイト配列と複合体形成している前記C R I S P R 酵素を含み；

それによって、前記第1の突然変異が導入された1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）を生成すること；

1つ以上のベクターを、前記第1の突然変異を有する前記原核細胞（複数の場合もあり）中に導入すること；

ここで、前記1つ以上のベクターが、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、t r a c r 配列、及び編集テンプレートのうちの1つ以上の発現をドライブし；

並びに、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、及びt r a c r 配列、並びに編集テンプレートの全てが、前記原核細胞（複数の場合もあり）において産生され；

C R I S P R 複合体を、標的ポリヌクレオチドを含むターゲティングされる染色体遺伝子座に結合させて、前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせること、

それによって、第2の突然変異を含む前記編集テンプレートが、前記1つ以上の原核生物（複数の場合もあり）において組換えによって導入され；並びに

ここで、前記C R I S P R 複合体が、（1）前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされる前記ガイド配列、及び（2）t r a c r 配列にハイブリダイズされる前記t r a c r メイト配列と複合体形成している前記C R I S P R 酵素を含み；

それによって、前記第1の突然変異及び前記第2の突然変異が導入された1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）を生成すること；

を含む方法によって、1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）において複数の突然変異を導入することによって1つ以上の原核細胞（複数の場合もあり）において複数の突然変異を生成すること；

を含む、方法。

【請求項 3】

前記 C R I S P R 酵素が、I I 型 C R I S P R 系酵素である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 C R I S P R 酵素が、C a s 9 である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 C a s 9 が、化膿連鎖球菌 (S. pyogenes) C a s 9 である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 C R I S P R 酵素が、前記原核生物 (複数の場合も有り) に対して内因性ではない、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記原核生物 (複数の場合も有り) が、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 又は大腸菌 (E. coli) である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 つ以上のベクターが、プラスミドである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 9】

リコンビニアリングによって突然変異 (複数の場合も有り) を導入すること、及び前記突然変異 (複数の場合も有り) を有する原核生物 (複数の場合も有り) を選択することを含む、突然変異 (複数の場合も有り) を原核生物中に導入するための方法であって、

1 つ以上のベクターを前記原核細胞 (複数の場合も有り) 中に導入すること；

ここで、前記 1 つ以上のベクターが、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、t r a c r 配列、及び標的ポリヌクレオチドを含むターゲティングされる染色体遺伝子座中への組換えのための編集オリゴヌクレオチドのうちの 1 つ以上の発現をドライブし；

並びに、C R I S P R 酵素、t r a c r メイト配列に結合しているガイド配列、t r a c r 配列、及び編集テンプレートの全てが、前記原核細胞 (複数の場合も有り) において産生され；

前記突然変異 (複数の場合も有り) を含む前記編集オリゴヌクレオチドを、リコンビニアリングによって標的ポリヌクレオチド中に導入すること、

ここで、前記編集テンプレートが、プロト Spacer 隣接モチーフ (P A M) 配列又はプロト Spacer 配列を変更し、前記標的ポリヌクレオチドの C R I S P R 酵素開裂を停止させる、前記標的ポリヌクレオチドの前記突然変異 (複数の場合も有り) を含み；

C R I S P R 複合体を前記標的ポリヌクレオチドに結合させて、前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせること、

ここで、前記標的配列が、リコンビニアリング由来の前記突然変異 (複数の場合も有り) を有しない原核生物 (複数の場合も有り) 中に存在し；並びに

ここで、前記 C R I S P R 複合体が、( 1 ) 前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされる前記ガイド配列、及び ( 2 ) t r a c r 配列にハイブリダイズされる前記 t r a c r メイト配列と複合体形成している前記 C R I S P R 酵素を含み；

ここで、前記標的ポリヌクレオチドとの前記 C R I S P R 複合体の結合が、前記突然変異 (複数の場合も有り) を有しない前記原核生物 (複数の場合も有り) においてターゲティングされる部位における C R I S P R 酵素指向開裂をもたらす、細胞死を誘導する；  
による、方法。

【請求項 10】

前記 C R I S P R 酵素が、I I 型 C R I S P R 系酵素である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 C R I S P R 酵素が、C a s 9 である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 C a s 9 が、化膿連鎖球菌 (S. pyogenes) C a s 9 である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 C R I S P R 酵素が、前記原核生物 (複数の場合もあり) に対して内因性ではない、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記原核生物 (複数の場合もあり) が、大腸菌 (E. coli) である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記突然変異 (複数の場合もあり) が、前記標的ポリヌクレオチドの前記 P A M 配列を変更する、請求項 1 又は 9 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記突然変異 (複数の場合もあり) が、前記標的ポリヌクレオチドの前記プロトスペーサー配列を変更する、請求項 1 又は 9 に記載の方法。