

【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28日(2021.10.28)

【公表番号】特表2020-536580(P2020-536580A)

【公表日】令和2年12月17日(2020.12.17)

【年通号数】公開・登録公報2020-051

【出願番号】特願2020-537300(P2020-537300)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

A 01 K 67/027 (2006.01)

A 01 K 67/02 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/09 100

C 12 N 5/10 Z N A

A 01 K 67/027

A 01 K 67/02

【手続補正書】

【提出日】令和3年9月16日(2021.9.16)

【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】

鳥の卵における雄のヒヨコ胚の致死表現型を誘導可能な様式で誘発するための第1の核酸配列と、前記致死表現型をもたらすための前記第1の核酸配列を前記鳥の細胞のZ染色体に向けるための第2の核酸配列と、を含むDNA編集剤。

【請求項2】

前記第1の核酸配列が、致死性タンパク質の発現を制御するスイッチをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された前記致死性タンパク質をコードし、前記スイッチがインデューサーによって調節される、又は前記第1の核酸配列が、ゲノム編集を行うことができるエンドヌクレアーゼ酵素をコードし、かつ、該エンドヌクレアーゼ酵素の発現を制御するスイッチをコードするヌクレオチド配列と操作可能に連結され、前記スイッチがインデューサーによって調節される、請求項1に記載のDNA編集剤。

【請求項3】

前記致死性タンパク質が、毒素、アポトーシス促進タンパク質、Wntシグナル伝達経路の阻害剤、BMPアンタゴニストおよびFGFアンタゴニストからなる群から選択される、又は前記エンドヌクレアーゼ酵素がジンクフィンガヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)およびカスパーーゼ9からなる群より選ばれるRNA誘導DNAエンドヌクレアーゼ酵素であり、前記第1の核酸配列がエンドヌクレアーゼ酵素をコードする場合には、前記DNA編集剤は鳥の必須遺伝子を標的とする誘導RNAをコードするヌクレオチド配列をさらに含み、該ヌクレオチド配列は、前記スイッチをコードするヌクレオチド配列と操作可能に連結されている、請求項2に記載のDNA編集剤。

【請求項4】

单一分子である、請求項1に記載のDNA編集剤。

**【請求項 5】**

前記第1の核酸配列および前記第2の核酸配列が非同一分子に含まれる、請求項1に記載のDNA編集剤。

**【請求項 6】**

前記第2の核酸配列が、

(i) 前記鳥の前記Z染色体における標的遺伝子座に隣接する5'領域に実質的に相同である左相同性アーム(LHA)ヌクレオチド配列と、

(ii) 前記鳥の前記Z染色体における前記標的遺伝子座に隣接する3'領域に実質的に相同である右相同性アーム(RHA)ヌクレオチド配列と、を含む、請求項1に記載のDNA編集剤。

**【請求項 7】**

前記インデューサーが、熱、超音波、電磁エネルギーおよび化学物質からなる群から選択される、請求項2に記載のDNA編集剤。

**【請求項 8】**

前記スイッチが、(a)前記インデューサーの存在下で結合して活性酵素を形成するスプリットリコンビナーゼ酵素及び(b)誘導性プロモーターの少なくとも1つを含む、請求項2に記載のDNA編集剤。

**【請求項 9】**

前記必須遺伝子がBMP1A、BMP2、BMP4およびFGFR1からなる群から選択される、請求項2に記載のDNA編集剤。

**【請求項 10】**

前記電磁エネルギーが可視光の成分であり、任意に、該可視光の成分が青色光である、請求項7に記載のDNA編集剤。

**【請求項 11】**

前記鳥が、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒルおよびウズラからなる群から選択される、請求項1~10のいずれか一項に記載のDNA編集剤。

**【請求項 12】**

鳥の細胞のZ染色体に安定に組み込まれた外因性ポリヌクレオチドを含む前記鳥の細胞を含む細胞集団であって、前記外因性ポリヌクレオチドは、前記鳥の雄の子孫において致死表現型を誘発するためのものである、細胞集団。

**【請求項 13】**

前記誘発は誘導可能な様式でもたらされる、請求項12に記載の細胞集団。

**【請求項 14】**

前記細胞は始原生殖細胞(PGC)又は配偶子を含み、任意に、前記PGCは生殖腺PGC、血液PGCおよび生殖三日月環PGCからなる群から選択される、請求項12又は13に記載の細胞集団。

**【請求項 15】**

請求項12~14のいずれか1項に記載の細胞集団を含むキメラ鳥。

**【請求項 16】**

キメラ鳥を生成する方法であって、請求項22に記載の細胞集団をレシピエント鳥胚に、前記細胞集団の前記PGCの少なくとも1つが前記レシピエント鳥胚の生殖腺に定着することを可能にするのに十分な条件下で投与し、これによってキメラ鳥を生成することを含み、前記方法は、任意に、前記投与に統いて前記キメラ鳥をインキュベートして孵化させることをさらに含み、任意に、前記キメラ鳥を性的成熟まで飼育することをさらに含み、前記キメラ鳥はドナーPGCに由来する配偶子を産生する、請求項12~14のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記投与がi n - o v o注射によるものである、請求項16に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記細胞集団が、前記レシピエント鳥と同じ鳥類種又は異なる鳥類種に由来する、請求

項16又は17に記載の方法。

【請求項19】

前記レシピエント胚がEyal-Giladi & Kochavステージ分類システムによるおよそステージIXとHamburger & Hamiltonステージ分類システムによるおよそステージ30との間にあるときに、前記細胞集団が投与される、請求項16～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記レシピエント胚がHamburger & Hamiltonステージ分類システムによるステージ14後にあるときに、前記細胞集団が投与される、請求項19記載の方法。

【請求項21】

請求項16～20のいずれか一項に記載の方法に従って生成されるキメラ鳥。

【請求項22】

請求項16～20のいずれか1項に記載のキメラ鳥の配偶子を使用して生成されるトランスジェニックトリ。

【請求項23】

鳥の受精卵から孵化する雄のヒヨコの数を減らす方法であって、外因性ポリヌクレオチドが前記鳥のZ染色体に安定して組み込まれ、前記外因性ポリヌクレオチドは前記鳥の雄の子孫において致死表現型を誘導可能な様式で誘発するためのものであり、

前記方法は、前記致死表現型を誘発するインデューサーに前記卵をさらし、これによって鳥の前記受精卵から孵化する雄のヒヨコの数を減らすことを含む、方法。

【請求項24】

DNA編集システムであって、

(i) リコンビナーゼ認識部位に操作可能に連結された鳥の卵において致死表現型を誘発するための第1の核酸配列と、前記致死表現型をもたらすための前記第1の核酸配列を前記鳥の細胞のZ染色体に向けるための配列と、を含む第1の薬剤と、

(ii) リコンビナーゼ酵素をコードする第2の核酸配列と、前記第2の核酸配列を前記鳥の細胞のZ染色体に向けるための配列と、を含む第2の薬剤と、を含む、DNA編集システム。

【請求項25】

前記第1の核酸配列が、致死性タンパク質またはゲノム編集を実行できるエンドヌクレアーゼ酵素をコードする、請求項24に記載のDNA編集システム。

【請求項26】

前記第1の核酸配列または前記第2の核酸配列をX染色体に向けるための前記配列が、

(i) 前記鳥の前記Z染色体における標的遺伝子座に隣接する5'領域に実質的に相同である左相同性アーム(LHA)ヌクレオチド配列と、

(ii) 前記鳥の前記Z染色体における前記標的遺伝子座に隣接する3'領域に実質的に相同である右相同性アーム(RHA)ヌクレオチド配列と、を含む、請求項24又は25に記載のDNA編集システム。

【請求項27】

鳥の受精卵から孵化する雄のヒヨコの数を減らす方法であって、

雌鳥を雄鳥と交配させることであって、リコンビナーゼ認識部位に操作可能に連結された第1の外因性ポリヌクレオチドは、前記雄鳥のZ染色体に安定的に組み込まれ、前記外因性ポリヌクレオチドは、鳥の卵の致死表現型を誘発するためのものであり、リコンビナーゼ酵素をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドは、前記雌鳥のZ染色体に安定して組み込まれているか、または、

リコンビナーゼ認識部位に操作可能に連結された前記第1の外因性ポリヌクレオチドは、前記雌鳥のZ染色体に安定的に組み込まれ、前記外因性ポリヌクレオチドは、鳥の卵の致死表現型を誘発するためのものであり、リコンビナーゼ酵素をコードする第2の外因性ポリヌクレオチドは前記雄鳥のZ染色体に安定的に組み込まれていて、

これによって、鳥の受精卵から孵化する雄のヒヨコの数を減らす、交配させること、を含む、方法。