

【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 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

A 0 1 K 67/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 5/10 Z N A

A 0 1 K 67/027

A 0 1 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ーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) およびカスパーゼ 9 から成る群より選ばれる 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】

単一分子である、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 ( L H A ) ヌクレオチド配列と、

( i i ) 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 ( R H A ) 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 B M P R 1 A 、 B M P 2 、 B M P 4 および F G F R 1 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 ( P G C ) 又は配偶子を含み、任意に、前記 P G C は生殖腺 P G C 、血液 P G C および生殖三日月環 P G C 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 P G C 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、前記投与に続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 P G C 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減らす、交配させること、を含む、方法。