

【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 7 年 1 月 29 日 (2025.1.29)

【公開番号】特開 2024-102277 (P2024-102277A)

【公開日】令和 6 年 7 月 30 日 (2024.7.30)

【年通号数】公開公報 (特許) 2024-141

【出願番号】特願 2024-76528 (P2024-76528)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/31 (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 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/31

C 1 2 N 1/15 Z N A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 15/31 Z N A

20

【手続補正書】

【提出日】令和 7 年 1 月 17 日 (2025.1.17)

【手続補正 1】

30

【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】

改変レトロソルであって、前記改変レトロソルは：

a) m s r 前配列；

b) マルチコピー一本鎖 RNA (m s RNA) をコードする m s r 遺伝子；

c) マルチコピー一本鎖 DNA (m s DNA) をコードする m s d 遺伝子；

d) 前記 m s r 前配列との配列相補性を有する自己相補性領域を含む m s d 後配列；

e) 逆転写酵素をコードする r e t 遺伝子；

を含み、

前記 m s r 遺伝子および前記 m s d 遺伝子は、トランス構成で提供されるか、または前記 r e t 遺伝子は、前記 m s r 遺伝子または前記 m s d 遺伝子に対してトランス構成にあり、

前記 m s d 遺伝子または前記 m s r 遺伝子は異種配列を含み、

前記異種配列は、相同組換え修復 (H D R) 又はリコンビニアリングによって標的遺伝子座に組み込まれる意図される編集を含むヌクレオチド配列に隣接している、5' 標的配列にハイブリダイズする 5' 相同性アームと、3' 標的配列にハイブリダイズする 3' 相同

40

50

性アームとを含むドナーポリヌクレオチドをコードする、改変レトロソ。

【請求項 2】

前記 r e t 遺伝子は、前記 m s r 遺伝子および前記 m s d 遺伝子に対してトランスである、請求項 1 に記載の改変レトロソ。

【請求項 3】

前記 m s r 遺伝子および前記 m s d 遺伝子は互いに対してシスであり、かつ前記 r e t 遺伝子に対してトランスである、請求項 1 に記載の改変レトロソ。

【請求項 4】

暗号化された停止シグナルが前記 r e t 遺伝子から除去される、請求項 1 に記載の改変レトロソ。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の改変レトロソを含む 1 つ以上のベクターを含むベクターシステム。

【請求項 6】

前記 m s r 遺伝子および前記 m s d 遺伝子は、同じベクターまたは異なるベクターによって提供される、請求項 5 に記載のベクターシステム。

【請求項 7】

前記 r e t 遺伝子は、前記 m s r 遺伝子および前記 m s d 遺伝子とは異なるベクターによって提供される、請求項 5 に記載のベクターシステム。

【請求項 8】

前記同じベクターは、前記 m s r 遺伝子および前記 m s d 遺伝子に作動可能に連結されたプロモータを含む、請求項 6 に記載のベクターシステム。

【請求項 9】

前記 r e t 遺伝子に作動可能に連結された第 2 のプロモータをさらに含む、請求項 8 に記載のベクターシステム。

【請求項 10】

前記 1 つ以上のベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである、請求項 5 に記載のベクターシステム。

【請求項 11】

前記非ウイルスベクターは、プラスミドである、請求項 10 に記載のベクターシステム。

【請求項 12】

R N A 誘導型ヌクレアーゼをコードするベクターをさらに含む、請求項 5 に記載のベクターシステム。

【請求項 13】

前記 R N A 誘導型ヌクレアーゼは、C a s ヌクレアーゼまたは改変された R N A 誘導型 F o k I ヌクレアーゼである、請求項 12 に記載のベクターシステム。

【請求項 14】

前記 C a s ヌクレアーゼは、C a s 9 または C p f 1 である、請求項 13 に記載のベクターシステム。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の改変レトロソまたは請求項 5 に記載のベクターシステムを含む単離された宿主細胞。

【請求項 16】

前記宿主細胞は、原核生物、古細菌または真核生物の宿主細胞である、請求項 15 に記載の宿主細胞。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の改変レトロソ、請求項 5 に記載のベクターシステムまたは請求項 16 に記載の宿主細胞を含むキット。

【請求項 18】

細胞を遺伝的に改変する方法であって、前記方法は：

a ) 細胞に、請求項 1 に記載の改変レトロソをトランスフェクトすること；

10

20

30

40

50

b) 前記細胞にRNA誘導型ヌクレアーゼ及びガイドRNAを導入することであって、前記RNA誘導型ヌクレアーゼは、前記ガイドRNAと複合体を形成し、前記ガイドRNAは、前記複合体をゲノム標的遺伝子座に導き、前記RNA誘導型ヌクレアーゼは、前記ゲノム標的遺伝子座においてゲノムDNAに二本鎖切断を作り出し、および前記改変レトロロンによって生成される前記ドナーポリヌクレオチドは、その5'相同性アームおよび3'相同性アームによって認識される前記ゲノム標的遺伝子座に相同組換え修復(HDR)によって組み込まれて、遺伝的に改変された細胞を産生する、導入すること、を含む方法。

【請求項19】

組換えmsDNAを作製する方法であって、前記方法は：

10

a) 宿主細胞に、請求項1に記載の改変レトロロンまたは請求項5に記載のベクターシステムをトランスフェクトすること；および

b) 前記宿主細胞を好適な条件下で培養することであって、前記msDNAが産生される、培養すること、を含む方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

20

【0079】

一部の実施形態において、組換えレトロロンコンストラクトは、msr遺伝子、msd遺伝子及びret遺伝子間の間隔が非天然である非天然立体配置(non-native configuration)を有する。msr遺伝子及びmsd遺伝子は、内因性のシス構成で提供されるのではなく、むしろトランス構成で離れていることができる。加えて、ret遺伝子は、msr遺伝子又はmsd遺伝子のいずれに対してもトランス構成で提供され得る。一部の実施形態において、ret遺伝子がトランス構成で提供されると逆転写酵素の暗号化された停止シグナル(cryptic stop signal)がなくなり、そのため、改変レトロロンコンストラクトからの一層長い一本鎖DNAの生成が可能となる。

30

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0204

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0204】

本発明者らは、様々なレトロロンエレメントをコードするコンストラクトも作成した。例えば、逆転写酵素をmsr/msd(プライマー-鋳型)と分離して、msr及びmsdを(典型的なシス構成でなく)トランスで逆転写酵素に供給できるようにした(図4A、図4B)。このトランス構成により、逆転写酵素の暗号化された停止シグナルがなくなる。以下に、レトロロン-Eco1 msrのみの領域の配列を配列番号16として示す。

40

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0220

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0220】

実施例3に記載されるとおり、レトロロン-Eco1 msr及びmsdエレメントをコードするトランスコンストラクトの発現により、逆転写酵素の暗号化された停止シグナルがなくなり、より長いssDNAの生成を生じさせることが可能となる(図4C、図4D

50

) 。

10

20

30

40

50