

【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6年2月13日(2024.2.13)

【公開番号】特開2024-9934(P2024-9934A)

【公開日】令和6年1月23日(2024.1.23)

【年通号数】公開公報(特許)2024-013

【出願番号】特願2023-176087(P2023-176087)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 5/071(2010.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 Q 1/68(2018.01)

C 1 2 N 9/22(2006.01)

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 K 35/12(2015.01)

A 6 1 K 35/545(2015.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 5/071 Z N A

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 9/22

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 35/12

A 6 1 K 35/545

A 6 1 P 43/00 1 1 1

C 1 2 N 15/12

20

30

【手続補正書】

【提出日】令和6年2月2日(2024.2.2)

【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】

40

【請求項1】

細胞のゲノムにおいて、相同組換え修復(HDR)の効率を上昇させるためのインビトロの方法であって、

(a) 細胞に：(i) CRISPRヌクレアーゼ；および(ii)ゲノムに挿入されるべき修飾配列を含む一本鎖ドナー核酸であって、ここで一本鎖ドナー核酸が対称性のホモロジーマ含有し、ヌクレアーゼにより切断されるゲノム内のDNA鎖と相補的であるドナー核酸を、導入すること、および

(b) 細胞を、37 からより低温への温度シフトに供すること、ここでより低温は28

～35 の間である、供すること、

を含み、

50

ヌクレアーゼが、細胞において認識部位でゲノムを切断し、一本鎖ドナー核酸が、上昇したHDR率によって、認識部位でゲノムに組み込まれ、ここでCRISPR切断部位からより遠位にあるヌクレオチドがあまり効率的に組み込まれない、部分配列変換（「部分HDR」）とは対照的に、前記一本鎖ドナー配列にわたって完全な配列変換を生じた遺伝子座（完全HDR）の割合を増加させ、ここで、修飾配列が目的の変異を含み、各対称性のホモロジーアームが目的の変異の両側に位置し、かつ各対称性のホモロジーアームの長さの比が1：1である、方法。

【請求項2】

該より低温が、30 ~ 33 の間である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

細胞を、少なくとも24時間、該より低温で増殖させる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

細胞が、哺乳類細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

細胞が、幹細胞、誘導多能性幹細胞（iPSC）、または初代細胞から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

CRISPRヌクレアーゼが、Casヌクレアーゼ、Cpf1ヌクレアーゼ、C2c1、C2c2またはC2c3から選択されるCRISPRヌクレアーゼである、請求項1に記載の方法。

20

【請求項7】

CRISPRヌクレアーゼが、Cas9ヌクレアーゼである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

CRISPRヌクレアーゼが、sgRNAと共に、DNA形式またはRNA形式のいずれかで、細胞に導入される、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

sgRNAが、合成であり、かつ、化学的に修飾されている、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

Cas9ヌクレアーゼおよびsgRNAをコードするDNAが細胞に導入される、請求項8に記載の方法。

30

【請求項11】

sgRNA/Cas9RNPが細胞に導入される、請求項8に記載の方法。

【請求項12】

sgRNA/Cas9mRNAが細胞に導入される、請求項8に記載の方法。

【請求項13】

相同組換え修復（HDR）率が、少なくとも1.5倍上昇している、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

請求項1に記載の方法により生産された細胞。

40

【請求項15】

請求項14に記載の細胞を含む、医薬組成物。

【請求項16】

目的のたんぱく質を、それを必要とする対象に提供する方法であって：
 (a) 請求項1に記載の方法に従い、目的のたんぱく質をコードする一本鎖ドナー核酸を、細胞に導入すること；および
 (b) 該細胞を非ヒト対象に導入して、目的のたんぱく質を対象において発現させること
 を含む、方法。

50