

【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30年7月19日(2018.7.19)

【公表番号】特表2017-505145(P2017-505145A)
 【公表日】平成29年2月16日(2017.2.16)
 【年通号数】公開・登録公報2017-007
 【出願番号】特願2016-568490(P2016-568490)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 4 0 B 40/08 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 4 0 B 40/08

C 1 2 N 1/21

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月4日(2018.6.4)

【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】

ゲノム編集を有する細胞のライブラリーを生成する方法であって、該方法は、
 (a) 細胞を合成されたオリゴヌクレオチドのライブラリーと接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドが

(i) 核酸の標的領域および該標的領域に対する配列変異と相同である領域、

(ii) プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)変異、

(iii) バーコード、および

(iv) 該標的領域を標的化するガイドRNA(gRNA)の標的領域特異的標的化部分を少なくともコードする核酸

を含む、ステップ；

(b) 該標的領域に対する配列の変化、PAM変異、および該バーコードを含む細胞について濃縮するステップ；ならびに

(c) 該細胞のライブラリーの1つまたは複数の細胞の該バーコードを配列決定して、それによって、該ライブラリーの細胞内の該配列の変化を同定するステップ

を含む、方法。

【請求項2】

前記細胞のライブラリーが、少なくとも1つの目的の遺伝子におけるゲノム編集を有する細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞のライブラリーが、少なくとも1つの目的の非コード領域におけるゲノム編集を有する細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記濃縮するステップが、前記ガイドRNAに適合可能なヌクレアーゼを使用することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

(i) 細胞中の核酸の標的領域の部分に相補的な領域を含む、ガイドRNA (gRNA) の部分を少なくともコードする核酸、および

(i i) 合成された編集カセットのライブラリーであって、各編集カセットが、(a) 該細胞中の核酸の標的領域と相同である領域、(b) 該標的領域に対する少なくとも1つのヌクレオチドの変異、および(c) 第1のプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 変異を含む、合成された編集カセットのライブラリー

を含む組成物であって、該合成された編集カセットのライブラリーが、該核酸の該標的領域に対して異なる変異を有する少なくとも2つの該編集カセットを含む、組成物。

【請求項6】

gRNAをコードする前記核酸が、(b) Cas9エンドヌクレアーゼと相互作用する、またはCas9エンドヌクレアーゼを動員する領域をさらに含む、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記標的領域が非コード領域内にある、請求項5または請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

前記標的領域が前記細胞内の目的の遺伝子内にある、請求項5～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

前記少なくとも1つのヌクレオチドの変異が、前記目的の遺伝子の少なくとも1つのコドン内にある、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

前記PAM変異が、前記目的の遺伝子のリーディングフレームの外側にある、請求項8または請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記目的の遺伝子が原核生物遺伝子である、請求項8～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

前記目的の遺伝子が真核生物遺伝子である、請求項8～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

少なくとも1つのコドンの前記変異が、前記PAM変異の100ヌクレオチド内にある、請求項9～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、アレイベースの合成によって合成される、請求項5～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項15】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、並行合成によって合成される、請求項5～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項16】

前記gRNAが、単一キメラgRNAを含む、請求項5～15のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項17】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、少なくとも27,000個の異なる合成されたオリゴヌクレオチドを含む、請求項5～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項18】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、約 10^4 ～ 10^6 個の異なる合成されたカセットを含む、請求項5～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項19】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、少なくとも 10^4 個の異なる合成されたカセットを含む、請求項5～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、少なくとも 10^5 個の異なる合成されたカセットを含む、請求項 5 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、少なくとも 10^6 個の異なる合成されたカセットを含む、請求項 5 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、縮重プライマーを使用して生成される、請求項 5 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、合理的に設計される、請求項 5 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

(i) 合成された編集カセットのライブラリーであって、各編集カセットが、(a) 該細胞中の核酸の複数の標的領域の 1 つと相同である領域、(b) 該標的領域に対する少なくとも 1 つのヌクレオチドの変異、および (c) 第 1 のプロトSpacer 隣接モチーフ (PAM) 変異を含む、合成された編集カセットのライブラリー、および
(ii) 各々がガイド RNA (gRNA) をコードする複数の核酸であって、各ガイド RNA が、少なくとも 1 つの該複数の標的領域の部分に相補的である領域を含み、該核酸の該複数の標的領域の各々の相補体を含む少なくとも 1 つの gRNA が存在する、複数の核酸を含む組成物であって、該合成された編集カセットのライブラリーが、該複数の核酸の各 gRNA の該標的領域に対して異なる変異を有する少なくとも 2 つの該編集カセットを含む、組成物。

【請求項 25】

gRNA をコードする前記核酸が、(b) Cas9 エンドヌクレアーゼと相互作用する、または Cas9 エンドヌクレアーゼを動員する領域をさらに含む、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記複数の標的領域の少なくとも 1 つが非コード領域内にある、請求項 24 または請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記複数の標的領域の少なくとも 1 つが前記細胞内の目的の遺伝子内にある、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 28】

前記少なくとも 1 つのヌクレオチドの変異が、前記目的の遺伝子の少なくとも 1 つのコドン内にある、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記 PAM 変異が、前記目的の遺伝子のリーディングフレームの外側にある、請求項 27 または請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記目的の遺伝子が原核生物遺伝子である、請求項 27 ~ 29 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 31】

前記目的の遺伝子が真核生物遺伝子である、請求項 27 ~ 29 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

少なくとも 1 つのコドンの前記変異が、前記 PAM 変異の 100 ヌクレオチド内にある、請求項 28 ~ 31 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 33】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、アレイベースの合成によって合成される、請求項 2 4 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、並行合成によって合成される、請求項 2 4 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記複数の核酸によってコードされる少なくとも 1 つの g R N A が、単一キメラ g R N A を含む、請求項 2 4 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、少なくとも 2 7 , 0 0 0 個の異なる合成されたオリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、約 $1 0^4$ ~ $1 0^6$ 個の異なる合成されたカセットを含む、請求項 2 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、少なくとも $1 0^4$ 個の異なる合成されたカセットを含む、請求項 2 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、少なくとも $1 0^5$ 個の異なる合成されたカセットを含む、請求項 2 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、少なくとも $1 0^6$ 個の異なる合成されたカセットを含む、請求項 2 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、縮重プライマーを使用して生成される、請求項 2 4 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記合成された編集カセットのライブラリーが、合理的に設計される、請求項 2 4 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の組成物。