

【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5年12月12日(2023.12.12)

【国際公開番号】WO2021/113774
 【公表番号】特表2023-505188(P2023-505188A)
 【公表日】令和5年2月8日(2023.2.8)
 【年通号数】公開公報(特許)2023-025
 【出願番号】特願2022-533341(P2022-533341)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/11(2006.01)
 C 1 2 N 15/63(2006.01)
 C 1 2 N 15/113(2010.01)

【F I】

C 1 2 N 15/11 Z Z N A
 C 1 2 N 15/63 Z
 C 1 2 N 15/113 Z

【手続補正書】

【提出日】令和5年12月4日(2023.12.4)

20

【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】

配列番号1～4または38～41のうちの任意の1つのヌクレオチド配列を含む初期転写配列(I T S)を含む、操作された核酸。

【請求項2】

30

前記I T Sへ作動可能に連結されたプロモーターを含み、
任意に前記プロモーターはバクテリオファージプロモーターであり、及び/又は、前記プロモーターは、配列番号9若しくは18のヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の操作された核酸。

【請求項3】

配列番号10～13または42～45のうちの任意の1つのヌクレオチド配列を含む、請求項1または2に記載の操作された核酸。

【請求項4】

前記I T Sのヌクレオチド配列の下流の関心の配列をさらに含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の操作された核酸。

40

【請求項5】

前記関心の配列の下流の1つまたは複数のターミネーター配列をさらに含み、
任意に、前記ターミネーター配列が、(a) r r n B T 1ターミネーター配列、r r n B T 2ターミネーター配列、T T 7ターミネーター配列、p E T - T 7ターミネーター配列、T 7 Uターミネーター配列、T T 3ターミネーター配列、及び/またはP T Hターミネーター配列、並びに/或いは、(b) 配列番号19～30のうちの任意の1つのヌクレオチド配列を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の操作された核酸。

【請求項6】

前記操作された核酸が二本鎖である、請求項1～5のいずれか1項に記載の操作された核酸。

50

【請求項 7】

前記操作された核酸が環状である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の操作された核酸。

【請求項 8】

二本鎖 RNA (ds RNA) のセンス鎖をコードするヌクレオチド配列の上流の初期転写配列 (ITS) へ作動可能に連結されたプロモーターを含む、第 1 の発現カセット；及び

前記 ds RNA のアンチセンス鎖をコードするヌクレオチド配列の上流の初期転写配列 (ITS) へ作動可能に連結されたプロモーターを含む、第 2 の発現カセット、
を含むコンストラクトであって、

前記 ds RNA の前記センス鎖が、前記 ds RNA の前記アンチセンス鎖へ相補的であり、

任意に、前記初期転写配列が、配列番号 1 ~ 8 または 38 ~ 41 のうちの任意の 1 つのヌクレオチド配列を含む、

前記コンストラクト。

【請求項 9】

前記第 1 の発現カセット及び前記第 2 の発現カセットのいずれかまたは両方が、前記 ds RNA の鎖をコードする前記ヌクレオチド配列の下流のターミネーター配列をさらに含み、

任意に、前記第 1 の発現カセット及び前記第 2 の発現カセットのいずれかまたは両方が、制限エンドヌクレアーゼ認識部位をさらに含む、請求項 8 に記載のコンストラクト。

【請求項 10】

前記初期転写配列が、配列番号 1 ~ 4 または 38 ~ 41 のうちの任意の 1 つのヌクレオチド配列を含む、請求項 8 のコンストラクト。

【請求項 11】

前記第 1 の発現カセット及び前記第 2 の発現カセットが、単一の DNA 分子内に所在し、同じ方向に向けられる、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

【請求項 12】

前記第 1 の発現カセット及び前記第 2 の発現カセットが、単一の DNA 分子内に所在し、反対の方向に向けられる、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

【請求項 13】

前記第 1 の発現カセットの前記センス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列が、前記 ITS 及び前記 ITS のリバース相補物に隣接し、前記第 2 の発現カセットの前記アンチセンス鎖が、前記 ITS 及び前記 ITS のリバース相補物に隣接する、請求項 8 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

【請求項 14】

前記第 1 の発現カセットが、前記センス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列の下流の 1 つまたは複数のターミネーター配列をさらに含み、前記第 2 の発現カセットが、前記アンチセンス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列の下流の 1 つまたは複数のターミネーター配列をさらに含み、

任意に、前記ターミネーター配列が、rrnBT1ターミネーター配列、rrnBT2ターミネーター配列、TT7ターミネーター配列、pET-T7ターミネーター配列、T7Uターミネーター配列、TT3ターミネーター配列、及び/またはPTHターミネーター配列を含み、

任意に、前記ターミネーター配列が、配列番号 19 ~ 30 のうちの任意の 1 つのヌクレオチド配列を含む、
請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

【請求項 15】

選択マーカをさらに含み、

任意前記選択マーカが、前記第 1 の発現カセットと前記第 2 の発現カセットとの間に

10

20

30

40

50

所在するか、及び/又は前記選択マーカーが、抗生物質耐性選択マーカーまたは抗生物質不含有選択マーカーである、

請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

【請求項 1 6】

前記第 1 の発現カセットのプロモーター、前記第 2 の発現カセットのプロモーター、または前記第 1 の発現カセットのプロモーター及び前記第 2 の発現カセットのプロモーターの両方のいずれかが、バクテリオファージ T 7 プロモーターであり、

任意に前記第 1 の発現カセットのプロモーターもしくは前記第 2 の発現カセットのプロモーター、または前記第 1 の発現カセットのプロモーター及び前記第 2 の発現カセットのプロモーターの両方が、配列番号 9 または 1 8 のヌクレオチド配列を含む、

10

請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

【請求項 1 7】

前記コンストラクトが、プラスミド、コスミド、バクテリア人工染色体、酵母人工染色体、天然の染色体、バクテリオファージ、及びウイルスから選択され、

任意に前記コンストラクトが、高コピー数、中間コピー数、または低コピー数のプラスミドであり、

任意に前記プラスミドが、C o l E 1 レプリコンもしくは p U C レプリコン、または C o l E 1、p B R 3 2 2、p U C、R 6 K、p 1 5 a もしくは p S C 1 0 1 レプリコンに由来するレプリコンを含む、

請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

20

【請求項 1 8】

前記 d s R N A が、昆虫、植物、真菌、またはウイルスのゲノム配列を標的化する、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

【請求項 1 9】

(a) 配列番号 1 ~ 4 または 3 8 ~ 4 1 のうちの任意の 1 つのヌクレオチド配列を含む初期転写配列 (I T S) へ作動可能に連結されたプロモーター、二本鎖 R N A (d s R N A) のセンス鎖をコードするヌクレオチド配列、及びターミネーター配列を含む、

第 1 の発現カセット；ならびに

(b) 配列番号 1 ~ 4 または 3 8 ~ 4 1 のうちの任意の 1 つのヌクレオチド配列を含む I T S へ作動可能に連結されたプロモーター、前記 d s R N A のアンチセンス鎖をコードするヌクレオチド配列、及びターミネーター配列を含む、

30

第 2 の発現カセット、

を含むコンストラクトであって、

前記 d s R N A の前記センス鎖は、前記 d s R N A の前記アンチセンス鎖へ相補的であり、

任意に、前記第 1 の発現カセットの前記プロモーター及び前記第 2 の発現カセットの前記プロモーターのいずれかまたは両方が、バクテリオファージ T 7 プロモーターである、

前記コンストラクト。

【請求項 2 0】

前記第 1 の発現カセット及び前記第 2 の発現カセットが、単一の D N A 分子内に所在し、同じ方向に向けられる、請求項 1 9 に記載のコンストラクト。

40

【請求項 2 1】

前記第 1 の発現カセット及び前記第 2 の発現カセットが、単一の D N A 分子内に所在し；任意選択で前記第 1 の発現カセット及び前記第 2 の発現カセットが、反対の方向に向けられる、請求項 1 9 に記載のコンストラクト。

【請求項 2 2】

前記第 1 の発現カセットが、前記センス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列の下流の前記 I T S のリバース相補物を含み、前記第 2 の発現カセットが、前記 d s R N A 産物の前記アンチセンス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列の下流の前記 I T S のリバース相補物を含む、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のコンストラクト。

50

【請求項 23】

前記第1の発現カセットが、前記センス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列の下流の1つまたは複数のターミネーター配列をさらに含み、前記第2の発現カセットが、前記アンチセンス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列の下流の1つまたは複数のターミネーター配列をさらに含む、請求項19～22のいずれか1項に記載のコンストラクト。

【請求項 24】

前記第1の発現カセットが前記ITSのリバース相補物の下流にある、及び/または前記第2の発現カセットが前記ITSのリバース相補物の下流にある、請求項19～23のいずれか1項に記載のコンストラクト。

【請求項 25】

前記ターミネーター配列が、rrnBT1ターミネーター配列、rrnBT2ターミネーター配列、TT7ターミネーター配列、pET-T7ターミネーター配列、T7Uターミネーター配列、TT3ターミネーター配列、及び/またはPTHターミネーター配列を含み、

任意に、前記ターミネーター配列が、配列番号19～30のうちの任意の1つのヌクレオチド配列を含む、

請求項19～24のいずれか1項に記載のコンストラクト。

【請求項 26】

前記センス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列及び/または前記アンチセンス鎖をコードする前記ヌクレオチド配列の下流で、任意選択で前記ITSの前記リバース相補物のいずれかの下流で、及び/または前記ターミネーター配列のいずれかの下流で、制限エンドヌクレアーゼ認識部位をさらに含む、請求項19～25のいずれか1項に記載のコンストラクト。

【請求項 27】

選択マーカをさらに含み、

任意に、前記選択マーカが、前記第1の発現カセットと前記第2の発現カセットとの間に所在するか、及び/又は、前記選択マーカが、抗生物質耐性選択マーカまたは抗生物質不含有選択マーカである、

請求項19～26のいずれか1項に記載のコンストラクト。

【請求項 28】

前記第1の発現カセットの前記プロモーター及び前記第2の発現カセットの前記プロモーターのいずれかまたは両方が、配列番号9または18のヌクレオチド配列を含む、請求項19～27のいずれか1項に記載のコンストラクト。

【請求項 29】

前記コンストラクトが、プラスミド、コスミド、バクテリア人工染色体、酵母人工染色体、天然の染色体、バクテリオファージ、及びウイルスから選択され、

任意に、前記コンストラクトが、高コピー数、中間コピー数、または低コピー数のプラスミドであり、並びに/或いは、前記プラスミドが、ColE1レプリコンもしくはpUCレプリコン、またはColE1、pBR322、pUC、R6K、p15aもしくはpSC101レプリコンに由来するレプリコンを含む、

請求項19～28のいずれか1項に記載のコンストラクト。

【請求項 30】

前記dsRNAが、昆虫、植物、真菌、またはウイルスのゲノム配列を標的化する、請求項19～29のいずれか1項に記載のコンストラクト。

【請求項 31】

請求項1～7のいずれか1項に記載の操作された核酸または請求項8～30のいずれか1項に記載のコンストラクト及びポリメラーゼを転写反応において組み合わせること、ならびにRNA転写物を産生することを含む、方法。

【請求項 32】

関心の産物をコードするヌクレオチド配列の上流の初期転写配列(ITS)へ作動可能

10

20

30

40

50

に連結されたプロモーター、ならびに任意選択で続いてITS - RC及び/または制限エンドヌクレアーゼ部位及び/または2つのタンデムなターミネーター配列を含む発現カセットであって、前記ITSが、配列番号1～8または38～41のうちの任意の1つのヌクレオチド配列を含む、前記発現カセット。

【請求項33】

配列番号1～4または38～41のうちの任意の1つのヌクレオチド配列を含む、操作された核酸；及び

ポリメラーゼ

を含み、

任意に、ヌクレオシド三リン酸及び/またはヌクレオシドリン酸をさらに含む、キット。

10

20

30

40

50