

【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1年11月7日(2019.11.7)

【公開番号】特開2019-76097(P2019-76097A)

【公開日】令和1年5月23日(2019.5.23)

【年通号数】公開・登録公報2019-019

【出願番号】特願2018-230081(P2018-230081)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

C 12 N 15/55 (2006.01)

C 12 N 9/16 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/09 110

C 12 N 5/10 Z N A

C 12 N 15/55

C 12 N 9/16 Z

【手続補正書】

【提出日】令和1年9月27日(2019.9.27)

【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】

ガイドRNAを真核細胞にトランスフェクトすること、および  
前記ガイドRNAと相互作用するCas9タンパク質をコードする核酸を前記真核細胞  
にトランスフェクトすること  
を含み、

前記ガイドRNAが前記真核細胞のゲノム上の標的核酸に結合し、  
前記ガイドRNAが、スペーサーと前記スペーサーと連結された足場を含み、ここで、  
前記スペーサーは前記標的核酸に相補的であり、

前記足場が以下の核酸

G U U U U A G A G C U A G A A A U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U  
C C G U U A U C A A C U U G A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C (配列  
番号: 45)

を含む、真核細胞をインビトロ又はエクスピボで改変する方法。

【請求項2】

前記Cas9タンパク質がCas9酵素であり、前記標的核酸が切斷される、請求項1  
に記載の方法。

【請求項3】

前記ガイドRNAが、前記ガイドRNAをコードする第一の核酸を前記真核細胞に導入  
することにより前記真核細胞にトランスフェクトされ、

前記Cas9タンパク質をコードする核酸が、前記Cas9タンパク質をコードする第  
二の核酸を前記真核細胞に導入することにより前記真核細胞にトランスフェクトされ、

前記真核細胞が、前記ガイドRNA及び前記Cas9タンパク質を生成する、請求項1  
に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記第一の核酸が、ウイルス的送達法を用いて前記真核細胞に導入される、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記第一の核酸が、アデノ随伴ウイルスを用いて前記真核細胞に導入される、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記 Cas 9 タンパク質が、Cas 9 酵素、Cas 9 ニッカーゼ、ヌクレアーゼ欠損 Cas 9、改変 Cas 9、または Cas 9 のホモログである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記真核細胞が、酵母細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記真核細胞がヒト細胞である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

異なる標的核酸に相補的なスペーサーを有する複数のガイド RNA が、前記真核細胞にトランスフェクトされ、

前記複数のガイド RNA が、前記異なる標的核酸に結合し、

前記 Cas 9 タンパク質が、前記複数のガイド RNA と相互作用する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 Cas 9 タンパク質が、ヒトコドン最適化されている、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 Cas 9 タンパク質が、核局在化シグナルを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

遺伝子座中の複数の標的核酸に相補的な複数のガイド RNA が、前記真核細胞にトランスフェクトされ、

前記複数のガイド RNA が、前記複数の標的核酸に結合し、

前記 Cas 9 タンパク質が、前記複数の標的核酸を切断する Cas 9 酵素であり、

その間に位置する核酸が前記遺伝子座から欠失される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記 Cas 9 タンパク質が、前記標的核酸を切断する Cas 9 酵素であり、

前記真核細胞に付与されたドナー核酸が前記標的核酸に挿入される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記 Cas 9 タンパク質が、ヌクレアーゼ欠損であり、転写活性化ドメインまたは転写抑制ドメインを含み、

標的遺伝子の発現が調節される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記 Cas 9 タンパク質が、ヌクレアーゼ欠損であり、蛍光タンパク質を含み、

前記蛍光タンパク質が可視化される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記 Cas 9 タンパク質が、ヌクレアーゼ欠損であり、タンパク質結合有機フルオロフォア、核酸結合有機フルオロフォア、量子ドット、分子ビーコン、エコープローブ、または多価リガンド結合タンパク質ドメインを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記配列番号 45 で表される核酸配列の 3' 末端にさらに UUUU が連結している、請求項 1 に記載の方法。

**【手続補正 2】****【補正対象書類名】明細書**

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2019076097000001.app