

【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 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 5/10 Z N A

C 1 2 N 15/55

C 1 2 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、スパーサーと前記スパーサーと連結された足場を含み、ここで、  
前記スパ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

GUUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU  
CCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGC (配列  
番号：45)

を含む、真核細胞をインビトロ又はエキ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、前記標的核酸が切断される、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 Cas9 タンパク質が、Cas9 酵素、Cas9 ニッカーゼ、ヌクレアーゼ欠損 Cas9、改変 Cas9、または Cas9 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パ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 Cas9 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 Cas9 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 Cas9 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 Cas9 タンパク質が、前記複数の標的核酸を切断する Cas9 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 Cas9 タンパク質が、前記標的核酸を切断する Cas9 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 Cas9 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 Cas9 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 Cas9 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