

【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6月6日(2024.6.6)

【公開番号】特開2023-169897(P2023-169897A)  
 【公開日】令和5年11月30日(2023.11.30)  
 【年通号数】公開公報(特許)2023-225  
 【出願番号】特願2023-155533(P2023-155533)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)

10

C 1 2 N 15/55(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 15/82(2006.01)

C 1 2 N 9/16(2006.01)

C 1 2 N 15/31(2006.01)

A 0 1 H 5/00(2018.01)

A 0 1 H 5/10(2018.01)

C 1 2 N 5/04(2006.01)

C 1 2 N 15/11(2006.01)

C 0 7 K 14/195(2006.01)

20

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/55 Z N A

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/82 1 5 4 Z

C 1 2 N 9/16 Z

C 1 2 N 15/31

A 0 1 H 5/00 Z

A 0 1 H 5/10

C 1 2 N 5/04

30

C 1 2 N 15/11 Z

C 0 7 K 14/195

【手続補正書】

【提出日】令和6年5月16日(2024.5.16)

【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】

40

【特許請求の範囲】

【請求項1】

動物細胞、真菌細胞、又は原核細胞のゲノムにおける標的部位でヌクレオチド配列を修飾する方法であって、前記細胞に

(i) ガイドRNA(gRNA)、又はgRNAをコードするDNAポリヌクレオチドであって、ここで、gRNAは、(a) 標的部位でヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第1のセグメント；及び(b) Cms1ポリペプチドと相互作用する第2のセグメントを含む、ガイドRNA(gRNA)、又はgRNAをコードするDNAポリヌクレオチド；ならびに

(ii) Cms1ポリペプチド又はCms1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

50

ドであって、ここで、C m s 1 ポリペプチドは、配列番号 1 0、1 1、2 0 ~ 2 3、3 0 ~ 6 9、1 5 4 ~ 1 5 6、及び 2 2 2 ~ 2 5 4 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、エンドヌクレアーゼ活性を有するアミノ酸配列を有する、C m s 1 ポリペプチド又は C m s 1 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む上記方法。

【請求項 2】

C m s 1 ポリペプチドが発現され、標的部位でヌクレオチド配列を切断して修飾ヌクレオチド配列を生成する条件下で細胞を培養し；及び前記修飾ヌクレオチド配列を含む細胞を選択することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記修飾ヌクレオチド配列が、細胞のゲノムへの異種 D N A の挿入、細胞のゲノムからのヌクレオチド配列の欠失、又は細胞のゲノムにおける少なくとも 1 つのヌクレオチドの突然変異を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記修飾されたヌクレオチド配列が、形質転換細胞に抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードするポリヌクレオチドの挿入を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞のゲノムが核ゲノム又はミトコンドリアゲノムである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6】

C m s 1 ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 g R N A が D N A 標的化 R N A である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞が動物細胞であり、動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

ポリヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記ポリヌクレオチド配列が、( i ) 配列番号 1 6 ~ 1 9、2 4 ~ 2 7、7 0 ~ 1 4 6、1 7 4 ~ 1 7 6、2 1 2 ~ 2 1 5、及び 2 5 5 ~ 2 8 7 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有し、エンドヌクレアーゼ活性を有する C m s 1 ポリペプチドをコードするか；又は ( i i ) 配列番号 1 0、1 1、2 0 ~ 2 3、3 0 ~ 6 9、1 5 4 ~ 1 5 6、及び 2 2 2 ~ 2 5 4 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む C m s 1 ポリペプチドをコードし、エンドヌクレアーゼ活性を有し、ここで、ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列に対して異種であり、動物細胞、真菌細胞、又は原核細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結されている上記核酸分子。

30

【請求項 1 0】

前記プロモーターが動物細胞において活性であり、動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項 9 に記載の核酸分子。

40

【請求項 1 1】

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 1 6 ~ 1 9、2 4 ~ 2 7、7 0 ~ 1 4 6、1 7 4 ~ 1 7 6、2 1 2 ~ 2 1 5、及び 2 5 5 ~ 2 8 7 のいずれか 1 つとして示されるか、又は前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 1 0、1 1、2 0 ~ 2 3、3 0 ~ 6 9、1 5 4 ~ 1 5 6、及び 2 2 2 ~ 2 5 4 のいずれか 1 つとして示されるアミノ酸配列を含む C m s 1 ポリペプチドをコードする、請求項 9 又は 1 0 に記載の核酸分子。

【請求項 1 2】

前記 C m s 1 ポリペプチドが、ヌクレアーゼ活性を低減又は排除するために変異されて

50

いる、請求項 9 又は 10 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記変異 C m s 1 ポリペプチドが、同一性が最大になるように整列させた場合、S m C m s 1 (配列番号 10) の 701 位若しくは 922 位、又は S u l f C m s 1 (配列番号 11) の 848 位及び 1213 位に対応する位置に変異を含む、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 14】

C m s 1 ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、細胞における発現するためにコドン最適化されている、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 15】

(a) C m s 1 ポリペプチドであって、ここで、前記 C m s 1 ポリペプチドは、配列番号 10、11、20 ~ 23、30 ~ 69、154 ~ 156、及び 222 ~ 254 のいずれか 1 つと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、エンドヌクレアーゼ活性を有するか、又は前記 C m s 1 ポリペプチドは、配列番号 16 ~ 19、24 ~ 27、70 ~ 146、174 ~ 176、212 ~ 215、及び 255 ~ 287 のいずれか 1 つと少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列によってコードされ、エンドヌクレアーゼ活性を有する C m s 1 ポリペプチド；あるいは

(b) ポリヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、ここで、前記ポリヌクレオチド配列は、

(i) 配列番号 16 ~ 19、24 ~ 27、70 ~ 146、174 ~ 176、212 ~ 215、及び 255 ~ 287 のいずれか 1 つと少なくとも 90% の同一性を有し、エンドヌクレアーゼを有する C m s 1 ポリペプチドをコードするか；又は

(ii) 配列番号 10、11、20 ~ 23、30 ~ 69、154 ~ 156、及び 222 ~ 254 のいずれか 1 つと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む C m s 1 ポリペプチドをコードし、エンドヌクレアーゼ活性を有するポリヌクレオチド配列を含む核酸分子

を含む動物細胞、真菌細胞、又は原核細胞。

【請求項 16】

(a) の前記 C m s 1 ポリペプチドが、配列番号 10、11、20 ~ 23、30 ~ 69、154 ~ 156、及び 222 ~ 254 のいずれか 1 つとして示されるアミノ酸配列を含むか、又は (a) の前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 16 ~ 19、24 ~ 27、70 ~ 146、174 ~ 176、212 ~ 215、及び 255 ~ 287 のいずれか 1 つとして示される、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 17】

(b) の前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 16 ~ 19、24 ~ 27、70 ~ 146、174 ~ 176、212 ~ 215、及び 255 ~ 287 のいずれか 1 つとして記載されるか、又は (b) の前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 10、11、20 ~ 23、30 ~ 69、154 ~ 156、及び 222 ~ 254 のいずれか 1 つとして示されるアミノ酸配列を含む C m s 1 ポリペプチドをコードする、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 18】

前記 C m s 1 ポリペプチドが、ヌクレアーゼ活性を低減又は排除するために変異されている、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 19】

前記変異 C m s 1 ポリペプチドが、同一性が最大になるように整列させた場合、S m C m s 1 (配列番号 10) の 701 位若しくは 922 位、又は S u l f C m s 1 (配列番号 11) の 848 位及び 1213 位に対応する位置に変異を含む、請求項 18 に記載の細胞。

【請求項 20】

(i) C m s 1 ポリペプチドであって、ここで、前記 C m s 1 ポリペプチドは、配列番号 10、11、20 ~ 23、30 ~ 69、154 ~ 156、及び 222 ~ 254 のいずれ

10

20

30

40

50

か1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、エンドヌクレアーゼ活性を有するか、又は前記Cms1ポリペプチドは、配列番号16~19、24~27、70~146、174~176、212~215、及び255~287のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列によってコードされ、エンドヌクレアーゼ活性を有するCms1ポリペプチド；あるいは

(ii) 異種ポリペプチド

を含む融合タンパク質を含む動物細胞、真菌細胞、又は原核細胞。

【請求項21】

異種ポリペプチドが、切断ドメイン、後成的修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、及び転写リプレッサードメインからなる群から選択されるエフェクタードメインを含む、請求項20に記載の細胞。

10

【請求項22】

融合タンパク質が、核局在化シグナル、色素体シグナルペプチド、ミトコンドリアシグナルペプチド、複数の細胞内位置へのタンパク質輸送が可能なシグナルペプチド、細胞透過ドメイン、又はマーカードメインをさらに含む、請求項20又は21に記載の細胞。

【請求項23】

(i) Cms1ポリペプチドであって、ここで、Cms1ポリペプチドは、

(a) ガイドRNA (gRNA) と相互作用するRNA結合部分；及び

(b) 部位特異的酵素活性を示す活性部分

を含み、ここで、前記Cms1ポリペプチドは、配列番号10、11、20~23、30~69、154~156、及び222~254のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、エンドヌクレアーゼ活性を有するCms1ポリペプチド；ならびに

20

(ii) gRNAであって、ここで、gRNAは、

(a) プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 部位の3'近くにある、動物細胞、真菌細胞、又は原核細胞のゲノムにおける標的配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第1のセグメント、及び

(b) 前記Cms1ポリペプチドと相互作用する第2のセグメント

を含むgRNA

を含むリボ核タンパク質複合体。

30

【請求項24】

Cms1ポリペプチドが、配列番号10、11、20~23、30~69、154~156、及び222~254のいずれか1つとして示されるアミノ酸配列を含む、請求項23に記載のリボ核タンパク質複合体。

【請求項25】

gRNAがDNA標的化RNAである、請求項23又は24に記載のリボ核タンパク質複合体。

40

50