

【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 10 月 3 日(2024.10.3)

【公開番号】特開 2024-23239(P2024-23239A)
【公開日】令和 6 年 2 月 21 日(2024.2.21)
【年通号数】公開公報(特許)2024-033
【出願番号】特願 2023-189768(P2023-189768)
【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)
C 1 2 N 1/15(2006.01)
C 1 2 N 1/21(2006.01)
C 1 2 N 5/10(2006.01)
C 1 2 N 1/19(2006.01)
C 1 2 N 9/22(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0
C 1 2 N 1/15 Z N A
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 9/22

20

【手続補正書】
【提出日】令和 6 年 9 月 24 日(2024.9.24)
【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】

30

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核細胞の目的のゲノム遺伝子座の改変に使用するためのエンジニアされた C R I S P R - C a s 系であって、

C a s 9 タンパク質または C a s 9 タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、前記 C a s 9 は R u v C または H N H ドメインに突然変異を含み、かつニッカーゼであり、前記 C a s 9 は核局在化シグナル(N L S)に融合している、C a s 9 タンパク質または C a s 9 タンパク質をコードするポリヌクレオチド；

目的のゲノム遺伝子座において第 1 の標的配列とハイブリダイズするようにエンジニアされた第 1 の C R I S P R - C a s 系キメラ R N A であって、前記第 1 のキメラ R N A は、C a s 9 タンパク質と第 1 の C R I S P R 複合体を形成し、真核細胞の核内の第 1 の標的配列への第 1 の C R I S P R 複合体の配列特異的結合を指向することができ、それによって、C a s 9 タンパク質が目的のゲノム遺伝子座の第 1 の D N A 鎖を切断して第 1 のニックを生成できる第 1 の C R I S P R - C a s 系キメラ R N A ；および

40

目的のゲノム遺伝子座において第 2 の標的配列とハイブリダイズするようにエンジニアされた第 2 の C R I S P R - C a s 系キメラ R N A であって、前記第 2 のキメラ R N A は、C a s 9 タンパク質と第 2 の C R I S P R 複合体を形成し、真核細胞の核内の第 2 の標的配列への第 2 の C R I S P R 複合体の配列特異的結合を指向することができ、それによって、C a s 9 タンパク質が目的のゲノム遺伝子座の第 2 の D N A 鎖を切断して第 2 のニックを生成できる、第 2 の C R I S P R - C a s 系キメラ R N A ；

50

を含み、

ここで、第1のニックは、第2のニックの1～200ヌクレオチド5'に位置する、エンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項2】

前記Cas9タンパク質が少なくとも2つのNLSに融合している、請求項1に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項3】

前記Cas9タンパク質がS. pyogenes Cas9である、請求項1または2に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項4】

前記Cas9タンパク質がS. aureus Cas9である、請求項1または2に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項5】

前記Cas9タンパク質が、S. pyogenes Cas9のD10A、E762A又はD986Aに対応するRuvCドメイン中の突然変異を含む、請求項1から4の何れか一項に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項6】

前記Cas9タンパク質が、S. pyogenes Cas9のD10Aに対応する突然変異を含む、請求項5に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項7】

前記Cas9タンパク質が、S. pyogenes Cas9のH840A、N854A、又はN863Aに対応するHNHドメイン中の突然変異を含む、請求項1から4の何れか一項に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項8】

前記Cas9タンパク質が、S. pyogenes Cas9のH840Aに対応する突然変異を含む、請求項7に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項9】

前記Cas9タンパク質が、異種タンパク質ドメインに融合している、請求項1から8の何れか一項に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項10】

前記異種タンパク質ドメインが、メチラーゼ、デメチラーゼ、転写活性化因子、転写抑制因子、リコンビナーゼ、トランスボザーゼ、ヒストンリモデラー、DNAメチルトランスフェラーゼ、またはクリプトクロムである、請求項9に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項11】

第1のニックが、第2のニックの1～100ヌクレオチド5'に位置する、請求項1から10の何れか一項に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項12】

第1のニックが、第2のニックの1～50ヌクレオチド5'に位置する、請求項1から10の何れか一項に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項13】

第1のニックが、第2のニックの26～50ヌクレオチド5'に位置する、請求項1から10の何れか一項に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項14】

第1のニックが、第2のニックの34～50ヌクレオチド5'に位置する、請求項1から10の何れか一項に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

【請求項15】

前記エンジニアされたCRISPR-Cas系が、前記Cas9タンパク質をコードするウイルスベクターを含む、請求項1から14の何れか一項に記載のエンジニアされたCRISPR-Cas系。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記エンジニアされた C R I S P R - C a s 系が、前記 C a s 9 タンパク質をコードする m R N A を含む、請求項 1 から 14 の何れか一項に記載のエンジニアされた C R I S P R - C a s 系。

【請求項 17】

第 1 または第 2 の標的配列の少なくとも 5 ヌクレオチドと重複する鋳型ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 から 16 の何れか一項に記載のエンジニアされた C R I S P R - C a s 系。

【請求項 18】

目的のゲノム遺伝子座が遺伝子産物をコードしている、請求項 1 から 17 の何れか一項 10
に記載のエンジニアされた C R I S P R - C a s 系。

【請求項 19】

真核細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 1 から 18 の何れか一項に記載のエンジニア
された C R I S P R - C a s 系。

20

30

40

50