

【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4月26日(2024.4.26)

【公開番号】特開2023-156365(P2023-156365A)

【公開日】令和5年10月24日(2023.10.24)

【年通号数】公開公報(特許)2023-200

【出願番号】特願2023-122299(P2023-122299)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09(2006.01)

10

C 07 K 19/00(2006.01)

C 12 N 9/22(2006.01)

C 12 N 15/62(2006.01)

C 12 N 15/63(2006.01)

C 12 N 15/55(2006.01)

C 12 N 15/86(2006.01)

C 12 N 1/19(2006.01)

C 12 N 1/15(2006.01)

C 12 N 5/10(2006.01)

C 12 N 5/071(2010.01)

20

C 12 N 5/04(2006.01)

【F I】

C 12 N 15/09 110

C 07 K 19/00 Z N A

C 12 N 9/22

C 12 N 15/62 Z

C 12 N 15/63 Z

C 12 N 15/55

C 12 N 15/86 Z

C 12 N 1/19

30

C 12 N 1/15

C 12 N 5/10

C 12 N 5/071

C 12 N 5/04

【手続補正書】

【提出日】令和6年4月16日(2024.4.16)

【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

40

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

融合タンパク質および操作されたガイドRNAを含むシステムであって、融合タンパク質が、ストレプトコッカス・ピオゲネス(Streptococcus pyogenes)Cas9タンパク質；マーカータンパク質；Cas9タンパク質およびマーカータンパク質間に少なくとも1つの第一のリンカー、ここで少なくとも1つの第一のリンカーは配列番号35または配列番号36を含む；および核局在化シグナルである第一の異種ドメイン、を含み；ここで融合タンパク質が、ヌクレアーゼであり二本鎖配列の両鎖を開裂す

50

る、ニッカーゼであり二本鎖配列の一方の鎖を開裂する、またはヌクレアーゼまたはニッカーゼ活性を有しない、システム。

【請求項 2】

操作されたガイド RNA が单一分子である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

操作されたガイド RNA が 2 つの別の分子である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

操作されたガイド RNA 配列が、操作されたガイド RNA 内での塩基対形成促進、操作されたガイド RNA 内での塩基対形成最小化、操作されたガイド RNA の安定性増加、真核生物細胞における操作されたガイド RNA の転写促進またはこれらの組み合わせのために最適化されている、請求項 1 に記載のシステム。

10

【請求項 5】

マーカータンパク質が融合タンパク質の N 末端にある、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 6】

融合タンパク質が任意の第二のリンカーをさらに含み、ここで核局在化シグナル、マーカータンパク質、第一のリンカー、任意の第二のリンカー（存在する場合）、および Cas 9 タンパク質が次の順番（N 末端から C 末端方向）で配置されている、請求項 1 に記載のシステム：

マーカータンパク質 - 第一のリンカー - 核局在化シグナル - Cas 9 タンパク質；

マーカータンパク質 - 核局在化シグナル - 第一のリンカー - Cas 9 タンパク質；

核局在化シグナル - マーカータンパク質 - 第一のリンカー - Cas 9 タンパク質；

マーカータンパク質 - 第一のリンカー - 核局在化シグナル - 第一のリンカー - Cas 9 タンパク質；または

核局在化シグナル - 第二のリンカー - マーカータンパク質 - 第一のリンカー - Cas 9 タンパク質。

20

【請求項 7】

核局在化シグナル、マーカータンパク質、第一のリンカー、および Cas 9 タンパク質が次の順番（N 末端から C 末端方向）で配置されている、請求項 6 に記載のシステム：

マーカータンパク質 - 第一のリンカー - 核局在化シグナル - Cas 9 タンパク質。

【請求項 8】

融合タンパク質が、核局在化シグナルである第一の異種ドメイン以外の少なくとも 1 つのさらなる異種ドメインをさらに含み、少なくとも 1 つのさらなる異種ドメインが細胞透過性ドメイン、クロマチン調節モチーフ、後成的修飾ドメイン、転写制御ドメイン、RNA アプタマー結合ドメインまたはこれらの組み合わせである、請求項 1 に記載のシステム。

30

【請求項 9】

核局在化シグナルである第一の異種ドメインが配列 P A A K R V K L D（配列番号 6）を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 10】

融合タンパク質が配列 P K K K R K V（配列番号 1）を含む 2 つの核局在化シグナルをさらに含む、請求項 9 に記載のシステム。

40

【請求項 11】

マーカータンパク質が、配列番号 19 または 20 を含むアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 12】

マーカータンパク質が、配列番号 19 または 20 からなるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 13】

融合タンパク質が、配列番号 48、49、または 50 と少なくとも 95 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のシステム。

50

**【請求項 14】**

融合タンパク質が、配列番号 48、49、または 50 と少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のシステム。

**【請求項 15】**

融合タンパク質が、配列番号 48、49、または 50 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のシステム。

**【請求項 16】**

請求項 1 に記載のシステムをコードする複数の核酸であって、複数の核酸が融合タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸、および少なくとも 1 つの操作されたガイド RNA をコードする核酸を含む、複数の核酸。

10

**【請求項 17】**

融合タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸が RNA である、請求項 16 に記載の複数の核酸。

**【請求項 18】**

融合タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸が DNA である、請求項 16 に記載の複数の核酸。

**【請求項 19】**

融合タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸が真核生物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 16 に記載の複数の核酸。

20

**【請求項 20】**

真核生物細胞がヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、非哺乳類脊椎動物細胞、無脊椎動物細胞、植物細胞または単細胞真核生物である、請求項 19 に記載の複数の核酸。

**【請求項 21】**

少なくとも 1 つの操作されたガイド RNA をコードする核酸が DNA である、請求項 16 に記載の複数の核酸。

**【請求項 22】**

融合タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸が、インビトロ RNA 合成または細菌細胞におけるタンパク質発現のためにファージプロモーター配列に操作可能に連結され、少なくとも 1 つの操作されたガイド RNA をコードする核酸が、インビトロ RNA 合成のためにファージプロモーター配列に操作可能に連結されている、請求項 16 に記載の複数の核酸。

30

**【請求項 23】**

融合タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸が、真核生物細胞における発現のために真核生物プロモーター配列に操作可能に連結され、少なくとも 1 つの操作されたガイド RNA をコードする核酸が、真核生物細胞における発現のために真核生物プロモーター配列に操作可能に連結されている、請求項 16 に記載の複数の核酸。

**【請求項 24】**

請求項 16 に記載の複数の核酸を含む、少なくとも 1 つのベクター。

**【請求項 25】**

プラスミドベクター、ウイルスベクターまたは自己複製ウイルス RNA レプリコンである、請求項 24 に記載の少なくとも 1 つのベクター。

40

**【請求項 26】**

請求項 1 に規定される少なくとも 1 つのシステムを含む、真核生物細胞。

**【請求項 27】**

ヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、植物細胞、非哺乳類脊椎動物細胞、無脊椎動物細胞または単細胞真核生物である、請求項 26 に記載の真核生物細胞。

**【請求項 28】**

インビオ、エクスピオまたはインビトロである、請求項 26 に記載の真核生物細胞。

**【請求項 29】**

生存真核生物細胞または化学的に固定された真核生物細胞内の染色体同一性および位置

50

を決定する方法であって、請求項1に記載のシステムを生存または化学的に固定された真核生物細胞に導入し、マーカータンパク質からのシグナルを測定することを含む、方法。

**【請求項30】**

真核生物細胞がヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、植物細胞、非哺乳類脊椎動物細胞、無脊椎動物細胞または単細胞真核生物である、請求項29に記載の方法。

10

20

30

40

50