

【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7年4月10日(2025.4.10)

【公開番号】特開2024-71489(P2024-71489A)

【公開日】令和6年5月24日(2024.5.24)

【年通号数】公開公報(特許)2024-095

【出願番号】特願2024-46338(P2024-46338)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68(2018.01)

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 4 0 B 40/06(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 4 0 B 40/06

【手続補正書】

【提出日】令和7年4月1日(2025.4.1)

【手続補正1】

20

【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】

タウ凝集の遺伝的修飾因子をスクリーニングする方法であって、

(a) Cas タンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを含む細胞集団を提供することであって、

30

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが蛍光タンパク質であり、前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)対であり、前記細胞が哺乳動物細胞である、提供することと、

(b) 複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを前記細胞集団に導入することと、

(c) ゲノムの編集および拡大を可能にするために前記細胞集団を培養することであって、前記複数の固有のガイドRNAが、前記Cas タンパク質と複合体を形成し、前記Cas タンパク質が、前記複数の遺伝子を切断して遺伝子機能のノックアウトをもたらし、遺伝子修飾された細胞集団を生成する、培養することと、

(d) 前記遺伝子修飾された細胞集団をタウ播種剤と接触させて、播種された細胞集団を生成することと、

40

(e) タウ凝集体の形成を可能にするために前記播種された細胞集団を培養することであって、前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のタウリピートドメインの凝集体が、前記播種された細胞集団の第1のサブセットに形成されて、凝集陽性細胞集団を生成し、前記播種された細胞集団の第2のサブセットには形成されずに、凝集陰性細胞集団を生成する、培養することと、

(f) ステップ(e)で同定された前記凝集陰性細胞集団および/もしくはステップ(d)での前記播種された細胞集団に対して、ステップ(e)で同定された前記凝集陽性細胞集団における前記複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定すること、ならびに/またはステップ(e)で同定された前記凝集陽性細胞集団および/もしくはステップ(

50

d)での前記播種された細胞集団に対して、ステップ(e)で同定された前記凝集陰性細胞集団における前記複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定することと、を含み、

ステップ(d)が、タウリピートドメインが凝集状態で安定して存在する培養されたタウ凝集陽性細胞からの細胞溶解物を含む培地の存在下で、前記遺伝子修飾された細胞集団を培養することを含み、

ステップ(e)における前記凝集陽性細胞集団および前記凝集陰性細胞集団が、フローサイトメトリーによって同定され、

ステップ(e)で同定された前記凝集陽性細胞集団および/もしくはステップ(d)での前記播種された細胞集団に対しての、ステップ(e)で同定された前記凝集陰性細胞集団におけるガイドRNAの濃縮、またはステップ(e)で同定された前記凝集陰性細胞集団および/もしくはステップ(d)での前記播種された細胞集団に対しての、ステップ(e)で同定された前記凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇が、前記ガイドRNAによって標的とされた前記遺伝子がタウ凝集の遺伝的修飾因子であることを示し、前記ガイドRNAによって標的とされた前記遺伝子の破壊が、タウ凝集を防止し、かつ/または

ステップ(e)で同定された前記凝集陰性細胞集団および/もしくはステップ(d)での前記播種された細胞集団に対しての、ステップ(e)で同定された前記凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの濃縮、またはステップ(e)で同定された前記凝集陽性細胞集団および/もしくはステップ(d)での前記播種された細胞集団に対しての、ステップ(e)で同定された前記凝集陰性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇が、前記ガイドRNAによって標的とされた前記遺伝子がタウ凝集の遺伝的修飾因子であることを示し、前記ガイドRNAによって標的とされた前記遺伝子の破壊が、タウ凝集を促進または増強する、方法。

【請求項2】

前記Casタンパク質が、Cas9タンパク質であり、任意に、前記Casタンパク質が、Streptococcus pyogenes Cas9タンパク質であり、任意に、前記Casタンパク質が、配列番号21を含み、任意に、前記Casタンパク質が、配列番号22に示される配列を含むコード配列によってコードされる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記Casタンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、前記細胞集団において安定して発現される、または

前記Casタンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインをコードする核酸が、前記細胞集団においてゲノム的に組み込まれる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

各ガイドRNAが、構成的エクソンを標的とし、任意に、各ガイドRNAが、5'構成的エクソンを標的とする、または

各ガイドRNAが、第1のエクソン、第2のエクソン、または第3のエクソンを標的とする、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

タウ凝集の遺伝的修飾因子をスクリーニングする方法であって、

(a)1つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含むキメラCasタンパク質と、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したアダプタータンパク質を含むキメラアダプタータンパク質と、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインと、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインと、を含む細胞集団を提供することであって、

10

20

30

40

50

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターが蛍光タンパク質であり、前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターが、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) 対であり、前記細胞が哺乳動物細胞である、提供することと、

(b) 複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイド RNA を含むライブラリを前記細胞集団に導入することと、

(c) 転写活性化および拡大を可能にするために前記細胞集団を培養することであって、前記複数の固有のガイド RNA が、前記キメラ Cas タンパク質および前記キメラアダプタータンパク質と複合体を形成し、前記複合体が、前記複数の遺伝子の転写を活性化して遺伝子発現の増加をもたらす、遺伝子修飾された細胞集団を生成する、培養することと

(d) 前記遺伝子修飾された細胞集団をタウ播種剤と接触させて、播種された細胞集団を生成することと、

(e) タウ凝集体の形成を可能にするために前記播種された細胞集団を培養することであって、前記第 1 のタウリピートドメインおよび前記第 2 のタウリピートドメインの凝集体が、前記播種された細胞集団の第 1 のサブセットに形成されて、凝集陽性細胞集団を生成し、前記播種された細胞集団の第 2 のサブセットには形成されずに、凝集陰性細胞集団を生成する、培養することと、

(f) ステップ (e) で同定された前記凝集陰性細胞集団および/もしくはステップ (d) での前記播種された細胞集団に対して、ステップ (e) で同定された前記凝集陽性細胞集団における前記複数の固有のガイド RNA の各々の存在量を決定すること、ならびに/またはステップ (e) で同定された前記凝集陽性細胞集団および/もしくはステップ (d) での前記播種された細胞集団に対して、ステップ (e) で同定された前記凝集陰性細胞集団における前記複数の固有のガイド RNA の各々の存在量を決定することと、を含み

ステップ (d) が、タウリピートドメインが凝集状態で安定して存在する培養されたタウ凝集陽性細胞からの細胞溶解物を含む培地の存在下で、前記遺伝子修飾された細胞集団を培養することを含み、

ステップ (e) での前記凝集陽性細胞集団および前記凝集陰性細胞集団が、フローサイトメトリーによって同定され、

ステップ (e) で同定された前記凝集陽性細胞集団および/もしくはステップ (d) での前記播種された細胞集団に対しての、ステップ (e) で同定された前記凝集陰性細胞集団におけるガイド RNA の濃縮、またはステップ (e) で同定された前記凝集陰性細胞集団および/もしくはステップ (d) での前記播種された細胞集団に対しての、ステップ (e) で同定された前記凝集陽性細胞集団におけるガイド RNA の枯渇が、前記ガイド RNA によって標的とされた前記遺伝子がタウ凝集の遺伝的修飾因子であることを示し、前記ガイド RNA によって標的とされた前記遺伝子の転写活性化が、タウ凝集を防止し、かつ/または

ステップ (e) で同定された前記凝集陰性細胞集団および/もしくはステップ (d) での前記播種された細胞集団に対しての、ステップ (e) で同定された前記凝集陽性細胞集団におけるガイド RNA の濃縮、またはステップ (e) で同定された前記凝集陽性細胞集団および/もしくはステップ (d) での前記播種された細胞集団に対しての、ステップ (e) で同定された前記凝集陰性細胞集団におけるガイド RNA の枯渇が、前記ガイド RNA によって標的とされた前記遺伝子がタウ凝集の遺伝的修飾因子であることを示し、前記ガイド RNA によって標的とされた前記遺伝子の転写活性化が、タウ凝集を促進または増強する、方法。

【請求項 6】

前記 Cas タンパク質が、Cas9 タンパク質であり、任意に、前記 Cas タンパク質が、Streptococcus pyogenes Cas9 タンパク質であり、

前記キメラ Cas タンパク質が、VP64 転写活性化ドメインに融合した前記ヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質を含み、任意に、前記キメラ Cas タンパク質が、N 末端が

10

20

30

40

50

ら C 末端に、前記ヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質、核局在化シグナル、および前記 VP 6 4 転写活性化ドメインを含み、任意に、前記キメラ Cas タンパク質が、配列番号 3 6 を含み、任意に、前記キメラ Cas タンパク質が、配列番号 3 8 に示される配列を含むコード配列によってコードされ、

前記アダプタータンパク質が、MS 2 コートタンパク質であり、前記キメラアダプタータンパク質中の前記 1 つ以上の転写活性化ドメインが、p 6 5 転写活性化ドメインおよび HS F 1 転写活性化ドメインを含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、N 末端から C 末端に、前記 MS 2 コートタンパク質、核局在化シグナル、前記 p 6 5 転写活性化ドメイン、および前記 HS F 1 転写活性化ドメインを含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号 3 7 を含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号 3 9 に示される配列を含むコード配列によってコードされる、
請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記キメラ Cas タンパク質、前記キメラアダプタータンパク質、前記第 1 のレポーターに連結された前記第 1 のタウリピートドメイン、および前記第 2 のレポーターに連結された前記第 2 のタウリピートドメインが、前記細胞集団において安定して発現される、または

前記キメラ Cas タンパク質、前記キメラアダプタータンパク質、前記第 1 のレポーターに連結された前記第 1 のタウリピートドメイン、および前記第 2 のレポーターに連結された前記第 2 のタウリピートドメインをコードする核酸が、前記細胞集団においてゲノム的に組み込まれる、請求項 5 または 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

各ガイド RNA が、転写開始部位の 2 0 0 b p 上流内のガイド RNA 標的配列を標的とし、

各ガイド RNA が、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる 1 つ以上のアダプター結合エレメントを含み、任意に、各ガイド RNA が、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる 2 つのアダプター結合エレメントを含み、任意に、第 1 のアダプター結合エレメントが、前記 1 つ以上のガイド RNA の各々の第 1 のループ内にあり、第 2 のアダプター結合エレメントが、前記 1 つ以上のガイド RNA の各々の第 2 のループ内にあり、任意に、前記アダプター結合エレメントが、配列番号 3 3 に示される配列を含み、

30

任意に、1 つ以上のガイド RNA の各々が、トランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 部分に融合した CRISPR RNA (crRNA) 部分を含む単一のガイド RNA であり、前記第 1 のループが、配列番号 1 7 の残基 1 3 ~ 1 6 に対応するテトラループであり、前記第 2 のループが、配列番号 1 7 の残基 5 3 ~ 5 6 に対応するステムループ 2 である、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

(I) ステップ (c) が約 3 日 ~ 約 1 3 日であり、任意に、ステップ (c) が約 7 日 ~ 約 1 0 日である、約 7 日である、もしくは約 1 0 日である、かつ / または

(I I) 前記培地中の前記細胞溶解物が、約 1 ~ 約 5 μ g / m L の濃度である、かつ / もしくは

40

前記細胞溶解物を含む前記培地が、リポフェクタミンまたは別のトランスフェクション試薬をさらに含み、任意に、前記細胞溶解物を含む前記培地が、約 1 . 5 ~ 約 4 μ L / m L の濃度でリポフェクタミンを含む、かつ / または

(I I I) ステップ (e) が約 1 日 ~ 約 3 日であり、任意に、ステップ (e) が約 2 日である、かつ / または

(I V) 存在量が次世代シーケンシングによって決定される、
請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記複数の固有のガイド RNA の合計集団に対する前記ガイド RNA の存在量が、ステ

50

ップ（e）での前記凝集陽性細胞集団および/もしくはステップ（d）での播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団において少なくとも1.5倍高い場合、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団においてガイドRNAが濃縮されているとみなされ、前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記ガイドRNAの存在量が、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団および/もしくはステップ（d）での播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団において少なくとも1.5倍低い場合、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団においてガイドRNAが枯渇しているるとみなされる、または

前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記ガイドRNAの存在量が、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団および/もしくはステップ（d）での播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団において少なくとも1.5倍高い場合、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団においてガイドRNAが濃縮されているとみなされ、前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記ガイドRNAの存在量が、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団および/もしくはステップ（d）での播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団において少なくとも1.5倍低い場合、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団においてガイドRNAが枯渇しているるとみなされる、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

ステップ（f）が、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団、ステップ（c）の第1の時点での前記培養された細胞集団、およびステップ（d）の第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団における前記複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定すること、ならびに/またはステップ（f）が、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団、ステップ（c）の第1の時点での前記培養された細胞集団、およびステップ（d）の第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団における前記複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定することを含み、

任意に、ステップ（c）の前記第1の時点が、前記細胞集団を培養する第1の継代であり、

任意に、ステップ（c）の前記第1の時点が、約3日の培養の後であり、ステップ（c）の前記第2の時点が、約7日の培養または約10日の培養の後である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

（I）遺伝子は、

（1）前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記遺伝子を標的とするガイドRNAの存在量が、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団、ステップ（c）の前記第1の時点での前記培養された細胞集団、およびステップ（d）の前記第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団において少なくとも1.5倍高い場合、ならびに/もしくは

（2）前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記遺伝子を標的とするガイドRNAの存在量が、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団、およびステップ（d）の前記第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団において少なくとも1.5倍高い場合、ならびに/もしくは

（3）前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記遺伝子を標的とするガイドRNAの存在量が、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団、ステップ（c）の前記第1の時点での前記培養された細胞集団、およびステップ（d）の前記第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陽性細胞集団において少なくとも1.5倍低い場合、ならびに/もしくは

（4）前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記遺伝子を標的とするガイドRNAの存在量が、ステップ（e）での前記凝集陰性細胞集団、およびステップ（d）の前記第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ（e）での前記凝集陽

10

20

30

40

50

性細胞集団において少なくとも1.5倍低い場合、タウ凝集の遺伝的修飾因子とみなされ、前記遺伝子の破壊または転写活性化がタウ凝集を防止する、または

(I I) 遺伝子は、

(1) 前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記遺伝子を標的とするガイドRNAの存在量が、ステップ(e)での前記凝集陰性細胞集団、ステップ(c)の前記第1の時点での前記培養された細胞集団、およびステップ(d)の前記第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ(e)での前記凝集陽性細胞集団において少なくとも1.5倍高い場合、ならびに/もしくは

(2) 前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記遺伝子を標的とするガイドRNAの存在量が、ステップ(e)での前記凝集陰性細胞集団、およびステップ(d)の前記第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ(e)での前記凝集陽性細胞集団において少なくとも1.5倍高い場合、ならびに/もしくは

(3) 前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記遺伝子を標的とするガイドRNAの存在量が、ステップ(e)での前記凝集陽性細胞集団、ステップ(c)の前記第1の時点での前記培養された細胞集団、およびステップ(d)の前記第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ(e)での前記凝集陰性細胞集団において少なくとも1.5倍低い場合、ならびに/もしくは

(4) 前記複数の固有のガイドRNAの合計集団に対する前記遺伝子を標的とするガイドRNAの存在量が、ステップ(e)での前記凝集陽性細胞集団、およびステップ(d)の前記第2の時点での前記播種された細胞集団に対して、ステップ(e)での前記凝集陰性細胞集団において少なくとも1.5倍低い場合、タウ凝集の遺伝的修飾因子とみなされ、前記遺伝子の破壊または転写活性化がタウ凝集を促進または増強する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

(I) タウ凝集の遺伝的修飾因子としての遺伝子であって、前記遺伝子の破壊または転写活性化がタウ凝集を防止する遺伝子を同定するために、ステップ(f)で以下のステップ:

(1) ステップ(e)で生成された前記凝集陰性細胞集団に、前記複数の固有のガイドRNAのうちどれが存在するかを同定すること、

(2) 式 $n C n' * (x - n') C (m - n) / x C m$ を使用して、ステップ(f)(1)で同定された前記ガイドRNAが存在するランダム確率を計算することであって、

式中、xが、ステップ(b)で前記細胞集団に導入された様々な固有のガイドRNAであり、

mが、ステップ(f)(1)で同定された様々な固有のガイドRNAであり、

nが、前記遺伝子を標的とするステップ(b)で前記細胞集団に導入された様々な固有のガイドRNAであり、

n'が、前記遺伝子を標的とする、ステップ(f)(1)で同定された様々な固有のガイドRNAである、計算すること、

(3) ステップ(f)(1)で同定された前記ガイドRNAの平均濃縮スコアを計算することであって、

ガイドRNAの前記濃縮スコアが、ステップ(e)で生成された前記凝集陰性細胞集団における前記ガイドRNAの相対存在量を、ステップ(e)で生成された前記凝集陽性細胞集団またはステップ(d)での前記播種された細胞集団における前記ガイドRNAの相対存在量で割ったものであり、

相対存在量が、前記ガイドRNAの読み取りカウントを、前記複数の固有のガイドRNAの合計集団の読み取りカウントで割ったものである、計算すること、および

(4) 前記遺伝子を標的とするガイドRNAが、存在する前記ランダム確率を大幅に下回り、濃縮スコアの閾値を上回っている場合に前記遺伝子を選択することが、施される、または

(I I) タウ凝集の遺伝的修飾因子としての遺伝子であって、前記遺伝子の破壊または

転写活性化がタウ凝集を促進または増強する遺伝子を同定するために、ステップ (f) で以下のステップ：

- (1) ステップ (e) で生成された前記凝集陽性細胞集団に、前記複数の固有のガイドRNAのうちどれが存在するかを同定すること、
- (2) 式 $n C n' * (x - n') C (m - n) / x C m$ を使用して、ステップ (f) (1) で同定された前記ガイドRNAが存在するランダム確率を計算することであって、式中、 x が、ステップ (b) で前記細胞集団に導入された様々な固有のガイドRNAであり、 m が、ステップ (f) (1) で同定された様々な固有のガイドRNAであり、 n が、前記遺伝子を標的とするステップ (b) で前記細胞集団に導入された様々な固有のガイドRNAであり、 n' が、前記遺伝子を標的とする、ステップ (f) (1) で同定された様々な固有のガイドRNAである、計算すること、
- (3) ステップ (f) (1) で同定された前記ガイドRNAの平均濃縮スコアを計算することであって、ガイドRNAの前記濃縮スコアが、ステップ (e) で生成された前記凝集陽性細胞集団における前記ガイドRNAの相対存在量を、ステップ (e) で生成された前記凝集陰性細胞集団またはステップ (d) での前記播種された細胞集団における前記ガイドRNAの相対存在量で割ったものであり、相対存在量が、前記ガイドRNAの読み取りカウントを、前記複数の固有のガイドRNAの合計集団の読み取りカウントで割ったものである、計算すること、および
- (4) 前記遺伝子を標的とするガイドRNAが、存在する前記ランダム確率を大幅に下回り、濃縮スコアの閾値を上回っている場合に前記遺伝子を選択することが、施される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

- 前記第 1 のタウリピートドメインおよび / または前記第 2 のタウリピートドメインが、ヒトタウリピートドメインである、かつ / または
- 前記第 1 のタウリピートドメインおよび / または前記第 2 のタウリピートドメインが、凝集促進変異を含み、任意に、前記第 1 のタウリピートドメインおよび / または前記第 2 のタウリピートドメインが、タウ P 3 0 1 S 変異を含む、かつ / または
- 前記第 1 のタウリピートドメインおよび / または前記第 2 のタウリピートドメインが、タウ 4 リピートドメインを含む、かつ / または
- 前記第 1 のタウリピートドメインおよび / または前記第 2 のタウリピートドメインが、配列番号 1 1 を含む、かつ / または
- 前記第 1 のタウリピートドメインおよび前記第 2 のタウリピートドメインが、同じである、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

- (I) 前記第 1 のタウリピートドメインおよび前記第 2 のタウリピートドメインが、同じであり、各々が、タウ P 3 0 1 S 変異を含むタウ 4 リピートドメインを含む、かつ / または
- (I I) 前記第 1 のレポーターが、シアン蛍光タンパク質 (C F P) であり、前記第 2 のレポーターが、黄色蛍光タンパク質 (Y F P) である、かつ / または
- (I I I) 前記細胞が、ヒト細胞であり、任意に、前記細胞が、H E K 2 9 3 T 細胞である、
- 請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

- (I) 前記複数の固有のガイドRNAが、前記細胞の大部分が前記固有のガイドRNAのうち 1 つのみを受け取るように選択された濃度で導入される、かつ / または
- (I I) 前記複数の固有のガイドRNAが、1 0 0 以上の遺伝子、1 0 0 0 以上の遺伝子、または 1 0 0 0 0 以上の遺伝子を標的とする、もしくは

前記ライブラリが、ゲノムワイドライブラリである、
請求項 1 ~ 1.5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

(I) 複数の標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化され、

任意に、少なくとも 3 つの標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化され、

任意に、約 3 ~ 約 6 個の標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される、かつ / または

(II) 前記複数の固有のガイド RNA が、ウイルス形質導入によって前記細胞集団に導入され、 10

任意に、前記複数の固有のガイド RNA の各々が、別個のウイルスベクター内にあり、

任意に、前記複数の固有のガイド RNA が、レンチウイルス形質導入によって前記細胞集団に導入され、

任意に、前記細胞集団が、約 0.3 未満の感染多重度で感染する、

請求項 1 ~ 1.6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

(I) ステップ (b) において前記複数の固有のガイド RNA が導入される前記細胞集団が、固有のガイド RNA あたり約 300 個を超える細胞を含む、かつ / または

(II) 前記複数の固有のガイド RNA が、選択マーカーと共に前記細胞集団に導入され、ステップ (b) が、前記選択マーカーを含む細胞を選択することをさらに含み、 20

任意に、前記選択マーカーが、薬物に対する耐性を付与し、任意に、前記選択マーカーが、ピューロマイシンまたはゼオシンに対する耐性を付与し、

任意に、前記選択マーカーが、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン - N - アセチルトランスフェラーゼ、およびブラストサイジン S デアミナーゼから選択される、請求項 1 ~ 1.7のいずれか一項に記載の方法。

30

40

50