

【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3年1月21日(2021.1.21)

【公表番号】特表2020-500541(P2020-500541A)

【公表日】令和2年1月16日(2020.1.16)

【年通号数】公開・登録公報2020-002

【出願番号】特願2019-530778(P2019-530778)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/55	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/864	(2006.01)
A 0 1 K	67/027	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/55	Z N A
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
A 0 1 K	67/027	
C 1 2 N	15/09	1 1 0
G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年12月3日(2020.12.3)

【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】

Cas9ポリペプチドをコードする配列、第1のゲノム標的配列を標的とする第1のガイドRNA(gRNA)をコードする配列、および第2のゲノム標的配列を標的とする第2のgRNAをコードする配列を含む組成物であって、第1および第2のゲノム標的配列が各々、マウスジストロフィン遺伝子のエクソンを囲むインtron配列を含む、組成物。

【請求項2】

前記エクソンがマウスジストロフィン遺伝子のエクソン50を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

Cas9ポリペプチドをコードする配列が、黄色ブドウ球菌(S. aureus) Cas9ポリペプチドをコードする配列から単離されているか、またはそれに由来する、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

Cas9ポリペプチドをコードする配列が、第1のベクターに含まれ、且つ第1のgRNAをコ

ドする配列または第2のgRNAをコードする配列のうちの少なくとも1つが、第2のベクターに含まれる、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

Cas9ポリペプチドをコードする配列、第1のgRNAをコードする配列、および第2のgRNAをコードする配列が、1つのベクターに含まれる、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

Cas9ポリペプチドをコードする配列の発現を駆動するプロモーターをさらに含み、該プロモーターがCK8プロモーター、任意でCK8eプロモーターを含む、請求項4または5に記載の組成物。

【請求項7】

同一ではない、第1のgRNAをコードする配列の発現を駆動するプロモーターおよび第2のgRNAをコードする配列の発現を駆動するプロモーターをさらに含む、請求項4～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

第1のgRNAをコードする配列の発現を駆動するプロモーターおよび第2のgRNAをコードする配列の発現を駆動するプロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーター、および7SKプロモーターから選択される、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

Cas9ポリペプチドをコードする配列が、ヒト細胞またはマウス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1～8のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

1つまたは複数のベクターが、非ウイルスベクターであり、任意で該非ウイルスベクターがプラスミドであり、且つ任意で該非ウイルスベクターがリポソームまたはナノ粒子に結合している、請求項4～9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項11】

1つまたは複数のベクターが、ウイルスベクターであり、任意で該ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項4～9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

AAVベクターが、複製欠損型もしくは条件付き複製欠損型である、且つ／またはAAVベクターが、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはそれらの任意の組み合わせのうちのAAVベクターから単離されたか、もしくはそれに由来する配列を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

薬学的担体をさらに含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物を含む、細胞。

【請求項15】

請求項14に記載の細胞を含む、組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 2】

[本発明1001]

Cas9ポリペプチドをコードする配列、第1のゲノム標的配列を標的とする第1のガイドRNA（gRNA）をコードする配列、および第2のゲノム標的配列を標的とする第2のgRNAをコードする配列を含む組成物であって、第1および第2のゲノム標的配列が各々、マウスジスト

ロフィン遺伝子のエクソンを囲むインtron配列を含む、組成物。

[本発明1002]

前記エクソンがマウスジストロフィン遺伝子のエクソン50を含む、本発明1001の組成物。

[本発明1003]

Cas9ポリペプチドをコードする配列が、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) Cas9ポリペプチドをコードする配列から単離されているか、またはそれに由来する、本発明1001または1002の組成物。

[本発明1004]

Cas9ポリペプチドをコードする配列、第1のgRNAをコードする配列、または第2のgRNAをコードする配列のうちの少なくとも1つが、RNA配列を含む、本発明1001～1003のいずれかの組成物。

[本発明1005]

前記RNA配列がmRNA配列を含む、本発明1004の組成物。

[本発明1006]

前記RNA配列が、少なくとも1個の化学的に修飾されたヌクレオチドを含む、本発明1004または1005の組成物。

[本発明1007]

Cas9ポリペプチドをコードする配列、第1のgRNAをコードする配列、または第2のgRNAをコードする配列のうちの少なくとも1つが、DNA配列を含む、本発明1001～1003のいずれかの組成物。

[本発明1008]

第1のベクターが、Cas9ポリペプチドをコードする配列を含み、第2のベクターが、第1のgRNAをコードする配列または第2のgRNAをコードする配列のうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1007のいずれかの組成物。

[本発明1009]

第1のベクターまたはCas9ポリペプチドをコードする配列が、第1のポリA配列をさらに含む、本発明1008の組成物。

[本発明1010]

第2のベクターまたは第1のgRNAをコードする配列または第2のgRNAをコードする配列が、第2のポリA配列をコードする、本発明1008の組成物。

[本発明1011]

第1のベクターまたはCas9ポリペプチドをコードする配列が、第1のプロモーター配列をさらに含む、本発明1008の組成物。

[本発明1012]

第2のベクターまたは第1のgRNAをコードする配列または第2のgRNAをコードする配列が、第2のプロモーター配列を含む、本発明1008の組成物。

[本発明1013]

第1のプロモーター配列と第2のプロモーター配列とが同一である、本発明1011または1012の組成物。

[本発明1014]

第1のプロモーター配列と第2のプロモーター配列とが同一ではない、本発明1011または1012の組成物。

[本発明1015]

第1のプロモーター配列または第2のプロモーター配列が、CK8プロモーター配列を含む、本発明1011～1014のいずれかの組成物。

[本発明1016]

第1のプロモーター配列または第2のプロモーター配列が、CK8eプロモーター配列を含む、本発明1011～1014のいずれかの組成物。

[本発明1017]

第1のプロモーター配列または第2のプロモーター配列が、構成的プロモーターを含む、本発明1011～1014のいずれかの組成物。

[本発明1018]

第1のプロモーター配列または第2のプロモーター配列が、誘導性プロモーターを含む、本発明1011～1014のいずれかの組成物。

[本発明1019]

1つのベクターが、Cas9ポリペプチドをコードする配列、第1のgRNAをコードする配列、および第2のgRNAをコードする配列を含む、本発明1001～1007のいずれかの組成物。

[本発明1020]

前記ベクターがポリA配列をさらに含む、本発明1019の組成物。

[本発明1021]

前記ベクターがプロモーター配列をさらに含む、本発明1020または1021の組成物。

[本発明1022]

前記プロモーター配列が構成的プロモーターを含む、本発明1021の組成物。

[本発明1023]

前記プロモーター配列が誘導性プロモーターを含む、本発明1021の組成物。

[本発明1024]

前記プロモーター配列がCK8プロモーター配列を含む、本発明1021の組成物。

[本発明1025]

前記プロモーター配列がCK8eプロモーター配列を含む、本発明1021の組成物。

[本発明1026]

哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化された配列を含む、本発明1001～1025のいずれかの組成物。

[本発明1027]

ヒト細胞またはマウス細胞における発現のためにコドン最適化された配列を含む、本発明1001～1016のいずれかの組成物。

[本発明1028]

Cas9ポリペプチドをコードする配列が、ヒト細胞またはマウス細胞における発現のためにコドン最適化されている、本発明1027の組成物。

[本発明1029]

第1のベクターおよび第2のベクターのうちの少なくとも1つが、非ウイルスベクターである、本発明1008～1018のいずれかの組成物。

[本発明1030]

非ウイルスベクターがプラスミドである、本発明1029の組成物。

[本発明1031]

リポソームまたはナノ粒子が前記非ウイルスベクターを含む、本発明1029または1030の組成物。

[本発明1032]

第1のベクターおよび第2のベクターのうちの少なくとも1つが、ウイルスベクターである、本発明1008～1018のいずれかの組成物。

[本発明1033]

前記ベクターがウイルスベクターである、本発明1019～1028のいずれかの組成物。

[本発明1034]

ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、本発明1032または1033の組成物。

[本発明1035]

AAVベクターが複製欠損型または条件付き複製欠損型である、本発明1034の組成物。

[本発明1036]

AAVベクターが組換えAAVベクターである、本発明1034または1035の組成物。

[本発明1037]

AAVベクターが、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、またはそれらの任意の組み合わせのうちのAAVベクターから単離されたか、またはそれに由来する配列を含む、本発明1034～1036のいずれかの組成物。

[本発明1038]

薬学的担体をさらに含む、本発明1001～1037のいずれかの組成物。

[本発明1039]

本発明1001～1038のいずれかの組成物を含む、細胞。

[本発明1040]

マウス細胞である、本発明1039の細胞。

[本発明1041]

卵母細胞である、本発明1039または1040の細胞。

[本発明1042]

本発明1039～1041のいずれかの細胞を含む、組成物。

[本発明1043]

本発明1039～1041のいずれかの細胞を含む、遺伝子操作されたマウス。

[本発明1044]

本発明1039～1041のいずれかの細胞をマウスと接触させる工程を含む、遺伝子操作されたマウスを作製する方法。

[本発明1045]

マウスの細胞を、本発明1001～1038のいずれかの組成物と接触させる工程を含む、遺伝子操作されたマウスを作製する方法。

[本発明1046]

本発明1044または1045の方法によって生成される、遺伝子操作されたマウス。

[本発明1047]

マウスのゲノムが、ジストロフィン遺伝子のエクソン50の欠失を含み、結果としてジストロフィン遺伝子のエクソン51においてアウトオブフレームシフトおよび中途終止コドンをもたらす、遺伝子操作されたマウス。

[本発明1048]

ジストロフィン遺伝子のエクソン79の下流にそれとインフレームで位置しかつジストロフィン3'-UTRの上流に位置するレポーター遺伝子であって、エクソン79がエクソン49とインフレームで翻訳される時に発現されるレポーター遺伝子をさらに含む、本発明1047の遺伝子操作されたマウス。

[本発明1049]

レポーター遺伝子がルシフェラーゼである、本発明1048の遺伝子操作されたマウス。

[本発明1050]

レポーター遺伝子の上流にありそれとインフレームである、かつエクソン79の下流にありそれとインフレームである、プロテアーゼコード配列をさらに含む、本発明1047～1049のいずれかの遺伝子操作されたマウス。

[本発明1051]

プロテアーゼが自己触媒性である、本発明1050の遺伝子操作されたマウス。

[本発明1052]

プロテアーゼが2Aプロテアーゼである、本発明1050または1051の遺伝子操作されたマウス。

[本発明1053]

欠失についてヘテロ接合性である、本発明1047～1052のいずれかの遺伝子操作されたマウス。

[本発明1054]

欠失についてホモ接合性である、本発明1047～1052のいずれかの遺伝子操作されたマウス。

[本発明1055]

野生型マウスと比較して増大したクレアチンキナーゼレベルを呈する、本発明1047～1054のいずれかの遺伝子操作されたマウス。

[本発明1056]

心臓または骨格筋において検出可能なジストロフィンタンパク質を呈さない、本発明1047～1055のいずれかの遺伝子操作されたマウス。

[本発明1057]

(a) 受精した卵母細胞を、CRISPR/Cas9エレメントと、ジストロフィン遺伝子のエクソン50に隣接する配列を標的とする2種類のシングルガイドRNA (sgRNA) とに接触させ、それによって改変卵母細胞を作製する工程であって、CRISPR/Cas9によるエクソン50の欠失が、ジストロフィン遺伝子のエクソン51においてアウトオブフレームシフトおよび中途終止コドンを結果としてもたらす、工程；

(b) 該改変卵母細胞をレシピエント雌に移入する工程を含む、本発明1047～1056のいずれかの遺伝子操作されたマウスを作製する方法。

[本発明1058]

ジストロフィン遺伝子のエクソン79の下流にそれとインフレームで位置しかつジストロフィン3'-UTRの上流に位置するレポーター遺伝子であって、エクソン79がエクソン49とインフレームで翻訳される時に発現されるレポーター遺伝子を有するジストロフィン遺伝子を卵母細胞が含む、本発明1057の方法。

[本発明1059]

レポーター遺伝子がルシフェラーゼである、本発明1058の方法。

[本発明1060]

レポーター遺伝子の上流にありそれとインフレームである、かつエクソン79の下流にありそれとインフレームである、プロテアーゼコード配列をさらに含む、本発明1057～1059のいずれかの方法。

[本発明1061]

プロテアーゼが自己触媒性である、本発明1060の方法。

[本発明1062]

プロテアーゼが2Aプロテアーゼである、本発明1060または1061の方法。

[本発明1063]

マウスが、欠失についてヘテロ接合性である、本発明1057～1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

前記マウスが、欠失についてホモ接合性である、本発明1057～1062のいずれかの方法。

[本発明1065]

マウスが、野生型マウスと比較して増大したクレアチンキナーゼレベルを呈する、本発明1057～1064のいずれかの方法。

[本発明1066]

マウスが、心臓または骨格筋において検出可能なジストロフィンタンパク質を呈さない、本発明1057～1065のいずれかの方法。

[本発明1067]

本発明1046～1056のいずれかの遺伝子操作されたマウスから取得された、単離された細胞。

[本発明1068]

ジストロフィン遺伝子のエクソン79の下流にそれとインフレームで位置しかつジストロフィン3'-UTRの上流に位置するレポーター遺伝子であって、エクソン79がエクソン49とインフレームで翻訳される時に発現されるレポーター遺伝子をさらに含み、特に該レポーターがルシフェラーゼである、本発明1067の細胞。

[本発明1069]

レポーター遺伝子の上流にありそれとインフレームである、かつエクソン79の下流にありそれとインフレームである、プロテアーゼコード配列をさらに含む、本発明1066～1068のいずれかの細胞。

[本発明1070]

プロテアーゼが自己触媒性である、本発明1069の細胞。

[本発明1071]

プロテアーゼが2Aプロテアーゼである、本発明1069または1070の細胞、本発明1025の細胞。

[本発明1072]

欠失についてヘテロ接合性である、本発明1069～1071のいずれかの細胞。

[本発明1073]

欠失についてホモ接合性である、本発明1067～1071のいずれかの細胞。

[本発明1074]

(a) 受精した卵母細胞を、CRISPR/Cas9エレメントと、ジストロフィン遺伝子のエクソン50に隣接する配列を標的とする2種類のシングルガイドRNA (sgRNA) と接触させ、それによって改変卵母細胞を作製する工程であって、CRISPR/Cas9によるエクソン50の欠失が、ジストロフィン遺伝子のエクソン51においてアウトオブフレームシフトおよび中途終止コドンを結果としてもたらす、工程；

(b) 該改変卵母細胞をレシピエント雌に移入する工程を含む方法によって作製される、遺伝子操作されたマウス。

[本発明1075]

DMDエクソンスキッピング活性についての候補物質をスクリーニングする方法であって、

(a) 本発明1043、1046、1047、または1074のいずれかのマウスを候補物質と接触させる工程；ならびに

(b) ジストロフィン遺伝子のエクソン79のインフレームの転写および／または翻訳を評価する工程を含み、

エクソン79のインフレームの転写および／または翻訳の存在が、候補物質がエクソンスキッピング活性を呈することを示す、該方法。

[本発明1076]

(a) 受精した卵母細胞を、CRISPR/Cpf1エレメントと、ジストロフィン遺伝子のエクソン50に隣接する配列を標的とする2種類のシングルガイドRNA (sgRNA) とに接触させ、それによって改変卵母細胞を作製する工程であって、CRISPR/Cpf1によるエクソン50の欠失が、ジストロフィン遺伝子のエクソン51においてアウトオブフレームシフトおよび中途終止コドンを結果としてもたらす、工程；

(b) 該改変卵母細胞をレシピエント雌に移入する工程を含む、本発明1047～1056のいずれかの遺伝子操作されたマウスを作製する方法。

[本発明1077]

(a) 受精した卵母細胞を、CRISPR/Cpf1エレメントと、ジストロフィン遺伝子のエクソン50に隣接する配列を標的とする2種類のシングルガイドRNA (sgRNA) とに接触させ、それによって改変卵母細胞を作製する工程であって、CRISPR/Cpf1によるエクソン50の欠失が、ジストロフィン遺伝子のエクソン51においてアウトオブフレームシフトおよび中途終止コドンを結果としてもたらす、工程；

(b) 該改変卵母細胞をレシピエント雌に移入する工程を含む方法によって作製された、遺伝子操作されたマウス。

本開示の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本開示の精神および範囲内の様々な変更および改変がこの詳細な説明から当業者に明らかになるので、詳細な説明および具体例は、本開示の具体的な態様を示しながらも、例証の目的で与えられているにすぎないものと理解されるべきである。