

【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6月17日(2025.6.17)

【公開番号】特開2024-153629(P2024-153629A)

【公開日】令和6年10月29日(2024.10.29)

【年通号数】公開公報(特許)2024-202

【出願番号】特願2024-104063(P2024-104063)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

10

C 12 N 15/11 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/09 110

C 12 N 15/11 ZZNA

C 12 N 15/11 Z

【手続補正書】

【提出日】令和7年6月9日(2025.6.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

20

【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】

第1のgRNA分子および第2のgRNA分子をコードする単離ポリヌクレオチドであって、前記第1のgRNA分子および前記第2のgRNA分子は、

(i) 配列番号1のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号2のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(i i) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(i i i) 配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(i v) 配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号18のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(v) 配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(v i) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(v i i) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号18のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(v i i i) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードさ

30

30

40

40

50

れるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(i x) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(x) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(xi) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号18のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；ならびに

(xii) 配列番号41のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号42のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子

からなる群から選択される、単離ポリヌクレオチド。

【請求項2】

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート関連9(Cas9)分子をさらにコードする、請求項1に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項3】

前記Cas9分子は、NNGRRT(配列番号24)またはNNGRRV(配列番号25)のいずれかのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識する、請求項2に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項4】

前記第1のgRNA分子、前記第2のgRNA分子および前記Cas9分子は、ヒトDMD遺伝子のエクソン51に隣接する第1および第2のインtron中で第1および第2の二本鎖切断を形成するように構成されている、請求項3に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項5】

前記第1のgRNA分子、前記第2のgRNA分子および/または前記Cas9分子をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された組織特異的プロモーターを含む、請求項2に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項6】

請求項2に記載の単離ポリヌクレオチドを含む細胞。

【請求項7】

請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドを含む、ジストロフィン遺伝子におけるエクソン51を含むセグメントの欠失用の組成物。

【請求項8】

ジストロフィン遺伝子におけるエクソン51を含むセグメントの欠失用の組成物であつて、

(a) 第1のガイドRNA(gRNA)分子と、NNGRRT(配列番号24)またはNNGRRV(配列番号25)のいずれかのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識する第1のCas9分子とをコードする第1の単離ポリヌクレオチド、および

(b) 第2のgRNA分子と、NNGRRT(配列番号24)またはNNGRRV(配列番号25)のいずれかのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識する第2のCas9分子とをコードする第2の単離ポリヌクレオチドを含み、

前記第1のgRNA分子、前記第2のgRNA分子、前記第1のCas9分子、および前記第2のCas9分子は、ヒトDMD遺伝子のエクソン51に隣接する第1のインtron中に第1の二本鎖切断を、かつ第2のインtron中に第2の二本鎖切断を形成するように構成され、それにより、前記ジストロフィン遺伝子におけるエクソン51を含むセグメントが欠失され、かつ

前記第1のgRNA分子および前記第2のgRNA分子は、

10

20

30

40

50

(i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 2 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(i i) 配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 4 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(i i i) 配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 19 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(i v) 配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 18 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(v) 配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 4 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(v i) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 19 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子：

(viii) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 18 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(viii) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 4 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(i x) 配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 19 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子：

(×) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子：

($\times i$) 配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 18 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；ならびに

(x i i) 配列番号 4 1 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 4 2 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子

からなる群が

請求項 9】

前記第1のgRNA分子および前記第2のgRNA分子は、
(i)配列番号1のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号2のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子。

ゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；
(i) 配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 4 のヌクレオチド配列によりコードされる

ターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；
(i i i) 配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 19 のヌクレオチド配列によりコードさ

れるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；
(iv)配列番号15のスクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメイ

ンを含む第1のgRNA分子、および配列番号18のヌクレオチド配列によりコードされ

10

20

30

10

50

るターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(v) 配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(vi) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(vii) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号18のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(viii) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(ix) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(x) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；ならびに

(xi) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号18のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子

からなる群から選択される、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドを含む、細胞中で変異ジストロフィン遺伝子を修正するための組成物。

【請求項11】

細胞中で変異ジストロフィン遺伝子を修正するための組成物であって、

(a) 第1のガイドRNA(gRNA)分子と、NNNGRRT(配列番号24)またはNNNGRRV(配列番号25)のいずれかのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識する第1のCas9分子とをコードする第1の単離ポリヌクレオチド、および

(b) 第2のgRNA分子と、NNNGRRT(配列番号24)またはNNNGRRV(配列番号25)のいずれかのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識する第2のCas9分子とをコードする第2の単離ポリヌクレオチドを含み、

前記第1のgRNA分子、前記第2のgRNA分子、前記第1のCas9分子、および前記第2のCas9分子は、ヒトDMD遺伝子のエクソン51に隣接する第1のイントロン中に第1の二本鎖切断を、かつ第2のイントロン中に第2の二本鎖切断を形成するように構成され、それにより、前記ジストロフィン遺伝子においてエクソン51を含むセグメントが欠失され、かつ

前記第1のgRNA分子および前記第2のgRNA分子は、

(i) 配列番号1のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号2のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(ii) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(iii) 配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

10

20

30

40

50

れるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(viii) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(ix) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(x) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；ならびに

(xi) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号18のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子

からなる群から選択される、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドを含む、変異ジストロフィン遺伝子を有する、必要とする対象を処置するための組成物。

【請求項14】

変異ジストロフィン遺伝子を有する、必要とする対象を処置するための組成物であって、

(a) 第1のガイドRNA(gRNA)分子と、NNNGRRT(配列番号24)またはNNNGRRV(配列番号25)のいずれかのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識する第1のCas9分子とをコードする第1の単離ポリヌクレオチド、および

(b) 第2のgRNA分子と、NNNGRRT(配列番号24)またはNNNGRRV(配列番号25)のいずれかのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識する第2のCas9分子とをコードする第2の単離ポリヌクレオチドを含み、

前記第1のgRNA分子、前記第2のgRNA分子、前記第1のCas9分子、および前記第2のCas9分子は、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51に隣接する第1のイントロン中に第1の二本鎖切断を、かつ第2のイントロン中に第2の二本鎖切断を形成するように構成され、それにより、ジストロフィン遺伝子においてエクソン51を含むセグメントが欠失され、かつ

前記第1のgRNA分子および前記第2のgRNA分子は、

(i) 配列番号1のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号2のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(ii) 配列番号11のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(iii) 配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(iv) 配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号18のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(v) 配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号4のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(vi) 配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第1のgRNA分子、および配列番号19のヌクレオチド配列によりコードされ

10

20

30

40

50

るターゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

(viii) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 18 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(viii) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 4 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(i x) 配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 19 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子：

(x) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の *gRNA* 分子、および配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の *gRNA* 分子：

($\times i$) 配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 18 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子：ならびに

(x i i) 配列番号 41 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 42 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子

からなる群から選択される。組成物

【請求項 15】

前記第 1 の gRNA 分子および前記第 2 の gRNA 分子は

(i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の mRNA 分子、および配列番号 2 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の mRNA 分子；

(i i) 配列番号 1 1 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の g R N A 分子、および配列番号 4 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の g R N A 分子：

(i i i) 配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の g R N A 分子、および配列番号 19 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の g R N A 分子；

(i v) 配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 18 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(v) 配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 4 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子；

(v) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 19 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の gRNA 分子

(viii) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 18 のヌクレオチド配列によりコードさ

(v i i i) 配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 4 のヌクレオチド配列によりコードさ

(i x) 配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の gRNA 分子、および配列番号 19 のヌクレオチド配列によりコードされ

—ゲティングドメインを含む第2のgRNA分子；

10

20

30

40

を含む第 1 の g R N A 分子、および配列番号 1 5 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の g R N A 分子；ならびに

(x i) 配列番号 1 1 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 1 の g R N A 分子、および配列番号 1 8 のヌクレオチド配列によりコードされるターゲティングドメインを含む第 2 の g R N A 分子
からなる群から選択される、請求項 1 4 に記載の組成物。

10

20

30

40

50