

【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3部門第2区分

【発行日】令和2年9月3日(2020.9.3)

【公開番号】特開2020-73463(P2020-73463A)

【公開日】令和2年5月14日(2020.5.14)

【年通号数】公開・登録公報2020-019

【出願番号】特願2019-162760(P2019-162760)

【国際特許分類】

A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 K	38/46	(2006.01)
A 6 1 K	38/17	(2006.01)
A 6 1 K	47/62	(2017.01)
A 6 1 K	47/64	(2017.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 K	47/18	(2006.01)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/435	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	9/78	(2006.01)
C 1 2 N	9/10	(2006.01)
C 1 2 N	5/077	(2010.01)
A 6 1 K	47/42	(2017.01)
A 6 1 K	47/34	(2017.01)

【F I】

A 6 1 K	38/00	
A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	47/62	
A 6 1 K	47/64	
A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	47/18	
C 1 2 N	9/16	Z N A Z
C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/435	
C 1 2 Q	1/68	
C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	9/78	
C 1 2 N	9/10	
C 1 2 N	5/077	
A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	47/34	

【手続補正書】

【提出日】令和2年7月21日(2020.7.21)

【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蛋白質およびカチオン性脂質を含む組成物であって、Cas9蛋白質がgRNAと結びつき、Cas9蛋白質が、デアミナーゼに融合されている、前記組成物。

【請求項2】

組成物が、細胞の集団に投与されたときに低い毒性を示す、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

カチオン性脂質が、Lipofectamine(登録商標)2000、Lipofectamine(登録商標)3000、Lipofectamine(登録商標)RNAiMAX、およびLipofectamine(登録商標)LTXからなる群から選択される、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

デアミナーゼが、シチジンデアミナーゼを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

シチジンデアミナーゼが、APOBEC1、AIDおよびACF1/ASEデアミナーゼからなる群から選択される、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

シチジンデアミナーゼが、APOBEC1デアミナーゼである、請求項4または5に記載の組成物。

【請求項7】

シチジンデアミナーゼが、AIDデアミナーゼである、請求項4または5に記載の組成物。

【請求項8】

シチジンデアミナーゼが、ACF1/ASEデアミナーゼである、請求項4または5に記載の組成物。

【請求項9】

デアミナーゼが、アデノシンデアミナーゼを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

アデノシンデアミナーゼが、ADATファミリーデアミナーゼを含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

Cas9蛋白質が、リンカーを介してデアミナーゼに融合されている、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

リンカーが、SGSETPGTSESATPES(配列番号3)、SGSETPGTSESATPEGGSGGS(配列番号4)、SGSETPGTSESATPEGGSGGS(配列番号5)、VPFLLEPDNINGKTC(配列番号6)、GSAGSAAAGSGEF(配列番号7)、SIVAQLSRPDPA(配列番号8)、MKIIEQLPSA(配列番号9)、VRHKLKRVGS(配列番号10)、GHGTGSTGSGSS(配列番号11)、MSRPDPA(配列番号12)、GGSM(配列番号13)、GGS、および(GGS)<sub>n</sub>、ここでnは1～10である、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

デアミナーゼに融合されているCas9蛋白質が、構造：

[NH<sub>2</sub>] - [Cas9] - [デアミナーゼ] - [COOH]、または

[ NH<sub>2</sub>] - [ デアミナーゼ ] - [ Cas9 ] - [ COOH ]

を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

Cas9 蛋白質またはデアミナーゼに融合されている核局在シグナル (NLS) をさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

核局在シグナルが、アミノ酸配列 M A P K K K R K V G I H R G V P (配列番号 47) を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

NLS が、デアミナーゼの C 末端である、請求項 14 または 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

NLS が、Cas9 ドメインの C 末端である、請求項 14 または 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

デアミナーゼに融合されている Cas9 蛋白質が、構造：

[ NH<sub>2</sub>] - [ NLS ] - [ Cas9 ] - [ デアミナーゼ ] - [ COOH ] または

[ NH<sub>2</sub>] - [ NLS ] - [ デアミナーゼ ] - [ Cas9 ] - [ COOH ]

を含む、請求項 14 または 15 に記載の組成物。

【請求項 19】

細胞の少なくとも 60% が、細胞への組成物の投与後に生存可能である、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

細胞の少なくとも 70% が、細胞への組成物の投与後に生存可能である、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

細胞の少なくとも 80% が、細胞への組成物の投与後に生存可能である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

細胞の少なくとも 90% が、細胞への組成物の投与後に生存可能である、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

Cas9 蛋白質が、野生型 Cas9 蛋白質もしくはそのバリアント、Cas9 ニッカーゼもしくはそのバリアント、またはヌクレアーゼ不活性型 Cas9 (dCas9) もしくはそのバリアントを含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

Cas9 蛋白質が、Cas9 ニッカーゼまたはそのバリアントを含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

Cas9 蛋白質が、野生型 Cas9 蛋白質または配列番号 44 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む Cas9 バリアントを含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 26】

Cas9 蛋白質が、配列番号 45 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、かつ野生型 Cas9 のアミノ酸配列と比較して、D10A および / または H840A 置換を含む、ヌクレアーゼ不活性型 Cas9 (dCas9) を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

インビトロで細胞内に Cas9 蛋白質を導入する方法であって、Cas9 蛋白質が細胞内に入るための好適な条件で請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の組成物と細胞とをインビトロで接触させることを含み、それによって細胞内に Cas9 蛋白質を導入する、前記方法。

**【請求項 28】**

デアミナーゼが細胞に透過したことを確認することをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。