

【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】

C a s 9 蛋白質およびカチオン性脂質を含む組成物であって、C a s 9 蛋白質が g R N A と結びつき、C a s 9 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、A P O B E C 1、A I D および A C F 1 / A S E 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、A P O B E C 1 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、A I D 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、A C F 1 / A S E 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、A D A T 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】

C a s 9 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、S G S E T P G T S E S A T P E S（配列番号 3）、S G S E T P G T S E S A（配列番号 4）、S G S E T P G T S E S A T P E G G S G G S（配列番号 5）、V P F L L E P D N I N G K T C（配列番号 6）、G S A G S A A G S G E F（配列番号 7）、S I V A Q L S R P D P A（配列番号 8）、M K I I E Q L P S A（配列番号 9）、V R H K L K R V G S（配列番号 10）、G H G T G S T G S G S S（配列番号 11）、M S R P D P A（配列番号 12）、G G S M（配列番号 13）、G G S、および（G G S）_n、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 C a s 9 蛋白質が、構造：

[N H ₂] - [C a s 9] - [デアミナーゼ] - [C O O H]、または

[NH₂] - [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 MAPKKKRKVGIHRGVP (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：

[NH₂] - [NLS] - [Cas9] - [デアミナーゼ] - [COOH] または
[NH₂] - [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エーション、Cas9 ニッカーゼもしくはそのバリエーション、またはヌクレアーゼ不活性型 Cas9 (dCas9) もしくはそのバリエーションを含む、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エーションを含む、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 バリエーションを含む、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。