

【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 5 年 3 月 10 日(2023.3.10)

【公開番号】特開 2022-124487(P2022-124487A)

【公開日】令和 4 年 8 月 25 日(2022.8.25)

【年通号数】公開公報(特許)2022-156

【出願番号】特願 2022-58736(P2022-58736)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)

10

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 1 2 N 15/63(2006.01)

C 1 2 N 9/12(2006.01)

C 0 7 K 19/00(2006.01)

C 1 2 N 1/15(2006.01)

C 1 2 N 1/19(2006.01)

C 1 2 N 1/21(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 P 3/00(2006.01)

20

A 6 1 P 17/00(2006.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 P 7/04(2006.01)

A 6 1 P 21/00(2006.01)

A 6 1 P 13/12(2006.01)

A 6 1 P 9/00(2006.01)

A 6 1 P 7/12(2006.01)

A 6 1 P 25/28(2006.01)

A 6 1 P 31/18(2006.01)

A 6 1 P 19/02(2006.01)

30

A 6 1 P 25/02(2006.01)

A 6 1 K 47/59(2017.01)

A 6 1 K 38/47(2006.01)

A 6 1 K 47/62(2017.01)

A 6 1 K 47/55(2017.01)

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 Q 1/48(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

40

C 1 2 N 15/62 Z Z N A

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 9/12

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 3/00

50

A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 7/04
A 6 1 P 21/00
A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 7/12
A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 25/02
A 6 1 K 47/59
A 6 1 K 38/47
A 6 1 K 47/62
A 6 1 K 47/55
C 1 2 N 15/113 Z
C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 N 15/12

10

【手続補正書】

20

【提出日】令和5年2月28日(2023.2.28)

【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】

配列番号9により示されるC a s 9のアミノ酸配列と少なくとも90パーセント同一であるアミノ酸配列を含み、

30

C a s 9蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号9に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基267、294、405、480、543、1219、1224、1256および1362からなる群から選択されるアミノ酸残基において、または配列番号10～262に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応するアミノ酸残基において、少なくとも1つの変異を含み、

C a s 9蛋白質が、古典的P A Mを含まない標的配列に対する増加した活性を示す、組み換えC a s 9蛋白質。

【請求項2】

C a s 9蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号9に示されるアミノ酸配列のX 267 G、X 294 R、X 405 I、X 480 K、X 543 D、X 1219 V、X 1224 K、X 1256 KおよびX 1362 P、または配列番号10～262に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、からなる群から選択される少なくとも1つの変異を含み、Xがいずれかのアミノ酸を表す、請求項1に記載のC a s 9蛋白質。

40

【請求項3】

C a s 9蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号9に示されるアミノ酸配列のS 267 G、K 294 R、F 405 I、E 480 K、E 543 D、E 1219 V、N 1224 K、Q 1256 KおよびL 1362 P、または配列番号10～262に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、からなる群から選択される少なくとも1つの変異を含む、請求項1または2に記載のC a s 9蛋白質。

【請求項4】

50

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の以下の群の変異のいずれか 1 つ：

X 2 9 4 R、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 1 2 1 9 V、X 1 2 5 6 K および X 1 3 6 2 P 変異；

X 2 9 4 R、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 1 2 1 9 V および X 1 2 5 6 K 変異；ならびに X 2 6 7 G、X 2 9 4 R、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 1 2 1 9 V、X 1 2 2 4 K および X 1 2 5 6 K 変異、

または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、を含み、X がいずれかのアミノ酸を表す、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

10

【請求項 5】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の以下の群の変異のいずれか 1 つ：

K 2 9 4 R、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、E 1 2 1 9 V、Q 1 2 5 6 K および L 1 3 6 2 P 変異；

K 2 9 4 R、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、E 1 2 1 9 V および Q 1 2 5 6 K 変異；ならびに S 2 6 7 G、K 2 9 4 R、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、E 1 2 1 9 V、N 1 2 2 4 K および Q 1 2 5 6 K 変異、

または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

20

【請求項 6】

配列番号 9 により示される C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 パーセント同一であるアミノ酸配列を含み、

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 6 2 における変異、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、を含み、

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 4 0 9、4 8 0、5 4 3、6 9 4、および 1 2 1 9 からなる群から選択されるアミノ酸残基における少なくとも 1 つの変異、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、をさらに含み、

30

C a s 9 蛋白質が、古典的 P A M を含まない標的配列に対する増加した活性を示す、組み換え C a s 9 蛋白質。

【請求項 7】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の X 2 6 2 T 変異、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異を含み、

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の X 4 0 9 I、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 6 9 4 I、および X 1 2 1 9 V からなる群から選択される少なくとも 1 つの変異、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異をさらに含み、X がいずれかのアミノ酸を表す、請求項 6 に記載の C a s 9 蛋白質。

40

【請求項 8】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の A 2 6 2 T 変異、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異を含み、

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の S 4 0 9 I、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、M 6 9 4 I、および E 1 2 1 9 V からなる群から選択される少なくとも 1 つの変異、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異をさらに含む、請求項 6 または 7 に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 9】

50

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の以下の群の変異のいずれか 1 つ：

X 2 6 2 T および X 1 2 1 9 V 変異；

X 2 6 2 T、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、および X 1 2 1 9 V 変異；

X 2 6 2 T、X 4 0 9 I、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 6 9 4 I、および X 1 2 1 9 V 変異；ならびに

X 2 6 2 T、X 4 0 5 I、X 4 0 9 I、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 6 9 4 I および X 1 2 1 9 V 変異、または、

配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異、

を含み、X がいずれかのアミノ酸を表す、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

10

【請求項 1 0】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の以下の群の変異のいずれか 1 つ：

A 2 6 2 T および E 1 2 1 9 V 変異；

A 2 6 2 T、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、および E 1 2 1 9 V 変異；

A 2 6 2 T、S 4 0 9 I、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、M 6 9 4 I、および E 1 2 1 9 V 変異；ならびに

A 2 6 2 T、F 4 0 5 I、S 4 0 9 I、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、M 6 9 4 I および E 1 2 1 9 V 変異、または、

20

配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異、

を含む、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 1 1】

C a s 9 蛋白質が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の D 1 0 A および / または H 8 4 0 A 変異、または、配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異、を含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 1 2】

C a s 9 蛋白質が、配列番号 9 に示される *Streptococcus pyogenes* の C a s 9 蛋白質と比較して、3' 末端に古典的 P A M (5' - N G G - 3') を含まない標的配列に対する増加した活性を示す、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

30

【請求項 1 3】

C a s 9 蛋白質が、古典的 P A M 配列 (5' - N G G - 3') と直接隣接していない 3' 末端を有する標的配列に対する活性を示し、同じ標的配列に対する、配列番号 9 に示される *Streptococcus pyogenes* の C a s 9 蛋白質の活性と比較し、少なくとも 5 倍増加している、請求項 1 2 に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 1 4】

標的配列の 3' 末端が、A G C、G A G、T T T、G T G、C A A、C A C、G A T、T A A、A C G、C G A、C G T、A A A、A A C、A A G、A A T、C A G、C A T、G A A、G A C、T A C、T A G、T A T、A C A、A C C、A C T、C C A、C C C、C C G、C C T、G C A、G C C、G C G、G C T、T C A、T C C、T C G、T C T、A G A、A G T、C G C、G G A、G G C、G G T、T G A、T G C、T G T、A T A、A T C、A T G、A T T、C T A、C T C、C T G、C T T、G T A、G T C、G T T、T T A、T T C、または T T G 配列と直接隣接している、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

40

【請求項 1 5】

標的配列の 3' 末端が、A G C、G A G、T T T、G T G、C A A、C A C、G A T、T A A、A C G、C G A、または C G T 配列と直接隣接している、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 1 6】

C a s 9 蛋白質またはその断片がエフェクタードメインと融合し、それにより融合蛋白

50

質を形成する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の Cas9 蛋白質またはその断片を含む融合蛋白質。

【請求項 17】

Cas9 蛋白質およびエフェクタードメインが、リンカーを介して融合する、請求項 16 に記載の融合蛋白質。

【請求項 18】

リンカーが、(GGGGS)_n (配列番号 5)、(G)_n、(EAAAK)_n (配列番号 6)、(GGS)_n、SGSETPGTSESATPES (配列番号 7) または (XP)_n モチーフ、またはこれらのいずれかの組合せを含み、n が独立に 1 ~ 30 の整数である、請求項 17 に記載の融合蛋白質。

10

【請求項 19】

エフェクタードメインが、ヌクレアーゼドメイン、ニッカーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、デアミナーゼドメイン、メチルトランスフェラーゼドメイン、メチラーゼドメイン、アセチラーゼドメイン、アセチルトランスフェラーゼドメイン、転写アクチベータードメインまたは転写リプレッサードメインを含む、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 20】

エフェクタードメインが、ヌクレアーゼドメインである、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 21】

ヌクレアーゼドメインが、FokI DNA 切断ドメインである、請求項 20 に記載の融合蛋白質。

20

【請求項 22】

エフェクタードメインが、核酸編集ドメインである、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 23】

核酸編集ドメインが、デアミナーゼドメインである、請求項 22 に記載の融合蛋白質。

【請求項 24】

デアミナーゼドメインが、シチジンデアミナーゼである、請求項 23 に記載の融合蛋白質。

30

【請求項 25】

デアミナーゼドメインが、アポリボ蛋白質 B メッセンジャー RNA 編集複合体 (APOBEC) ファミリーのデアミナーゼを含む、請求項 24 に記載の融合蛋白質。

【請求項 26】

デアミナーゼドメインが、APOBEC1 デアミナーゼ、APOBEC2 デアミナーゼ、APOBEC3 デアミナーゼ、APOBEC3A デアミナーゼ、APOBEC3D デアミナーゼ、APOBEC3E デアミナーゼ、APOBEC3F デアミナーゼ、APOBEC3G デアミナーゼ、APOBEC3H デアミナーゼ、または APOBEC4 デアミナーゼを含む、請求項 25 に記載の融合蛋白質。

【請求項 27】

デアミナーゼドメインが、アデノシンデアミナーゼである、請求項 23 に記載の融合蛋白質。

40

【請求項 28】

第 2 の Cas9 蛋白質に融合した請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の Cas9 蛋白質を含む、融合蛋白質。

【請求項 29】

請求項 20 または 21 に記載の融合蛋白質の二量体。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の Cas9 蛋白質または請求項 16 ~ 28 のいずれか一項に記載の融合蛋白質と、当該 Cas9 蛋白質または当該 Cas9 融合蛋白質と結

50

合するガイドRNAと、を含む複合体。

【請求項31】

DNA分子に：

(a) 請求項1～15のいずれか一項に記載のCas9蛋白質、請求項16～28のいずれか一項に記載の融合蛋白質、または請求項29に記載の二量体と、約15～100ヌクレオチド長であり、標的配列と相補的な少なくとも10の連続するヌクレオチドを含む、ガイドRNAと、を接触させること、または、

(b) 請求項30に記載の複合体を接触することを含む方法。

【請求項32】

請求項1～15のいずれか一項に記載のCas9蛋白質または請求項16～28のいずれか一項に記載の融合蛋白質をコードする、ポリヌクレオチド。 10

【請求項33】

請求項32に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項34】

請求項32に記載のポリヌクレオチドおよびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む、ベクター。

【請求項35】

請求項1～15のいずれか一項に記載のCas9蛋白質、請求項16～28のいずれか一項に記載の融合蛋白質、請求項29に記載の二量体、請求項30に記載の複合体、請求項32に記載のポリヌクレオチド、または請求項33または34に記載のベクターを含む、細胞。 20

【請求項36】

医薬としての使用のための、請求項1～15のいずれか一項に記載のCas9蛋白質、請求項16～28のいずれか一項に記載の融合蛋白質、請求項29に記載の二量体、請求項30に記載の複合体、請求項32に記載のポリヌクレオチド、請求項33または34に記載のベクター、請求項35に記載の細胞。

30

40

50