

【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 1 年 12 月 5 日 (2019.12.5)

【公表番号】特表 2019-509012 (P2019-509012A)

【公表日】平成 31 年 4 月 4 日 (2019.4.4)

【年通号数】公開・登録公報 2019-013

【出願番号】特願 2018-521096 (P2018-521096)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	9/78	(2006.01)
C 1 2 N	9/99	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(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)
C 1 2 N	15/11	(2006.01)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)
A 6 1 P	3/00	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/12	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
A 6 1 P	31/18	(2006.01)
A 6 1 P	31/12	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 K	38/48	(2006.01)
A 6 1 K	47/64	(2017.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	9/78	Z N A
C 1 2 N	9/99	
C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N	9/16	Z
A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/28	

A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	25/00	
A 6 1 K	38/48	
A 6 1 K	47/64	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/63	Z

【手続補正書】

【提出日】令和1年10月23日(2019.10.23)

【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】

(i) C a s 9 ドメイン、(i i) シチジンデアミナーゼドメインおよび(i i i) ウラシルグリコシラーゼ阻害剤(U G I) ドメインを含む、融合蛋白質。

【請求項 2】

C a s 9 ドメインが、配列番号 6 7 4 によって提供されるアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 9 9 . 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の融合蛋白質。

【請求項 3】

C a s 9 ドメインが、配列番号 1 0 ~ 2 6 0 によって提供されるアミノ酸配列のいずれかと少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 9 9 . 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の融合蛋白質。

【請求項 4】

C a s 9 ドメインが、ヌクレオチド二本鎖のヌクレオチド標的鎖を切る C a s 9 ニッカーゼ(n C a s 9) ドメインであり、ヌクレオチド標的鎖が、C a s 9 ニッカーゼドメインの g R N A に結合する鎖である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 5】

C a s 9 ドメインが、配列番号 1 0 によって提供されるアミノ酸配列における D 1 0 A 変異、または配列番号 1 1 ~ 2 6 0 によって提供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 C a s 9 ニッカーゼ(n C a s 9) ドメインである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 6】

C a s 9 ドメインが、配列番号 1 0 によって提供されるアミノ酸配列における N 4 9 7 A、R 6 6 1 A、Q 6 9 5 A、または Q 9 2 6 A 変異の 1 つ以上、または配列番号 1 1 ~ 2 6 0 によって提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける 1 つ以上の対応する変異を含む C a s 9 ニッカーゼ(n C a s 9) ドメインである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の融合蛋白質であって、シチジンデアミナーゼドメインが、

(i) アポリボ蛋白質 B m R N A 編集複合体(A P O B E C) デアミナーゼからのデアミナーゼである；

(i i) 配列番号 2 6 6 ~ 2 8 4、6 0 7 ~ 6 1 0、5 7 2 4 ~ 5 7 3 6、または 5 7 3

8 ~ 5 7 4 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 9 9 . 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む；

(i i i) 配列番号 2 6 6 ~ 2 8 4、6 0 7 ~ 6 1 0、5 7 2 4 ~ 5 7 3 6、または 5 7 3 8 ~ 5 7 4 1 のアミノ酸配列を含む；

(i v) 配列番号 2 8 4 の W 9 0 Y、R 1 2 6 E、および R 1 3 2 E からなる群から選択される 1 つ以上の変異、または別の A P O B E C デアミナーゼにおける 1 つ以上の対応する変異を含むラット A P O B E C 1 (r A P O B E C 1) デアミナーゼである；

(v) 配列番号 5 7 2 4 の W 9 0 Y、Q 1 2 6 E、および R 1 3 2 E からなる群から選択される 1 つ以上の変異、または別の A P O B E C デアミナーゼにおける 1 つ以上の対応する変異を含むヒト A P O B E C 1 (h A P O B E C 1) デアミナーゼである；

(v i) 配列番号 2 7 5 の W 2 8 5 Y、R 3 2 0 E、および R 3 2 6 E からなる群から選択される 1 つ以上の変異、または別の A P O B E C デアミナーゼにおける 1 つ以上の対応する変異を含むヒト A P O B E C 3 G (h A P O B E C 3 G) デアミナーゼである；

(v i i) 活性化誘導デアミナーゼ (A I D) である；または

(v i i i) Petromyzon marinus からのシチジンデアミナーゼ 1 (p m C D A 1) である、

前記融合蛋白質。

【請求項 8】

A P O B E C デアミナーゼが、A P O B E C 1 デアミナーゼ、A P O B E C 2 デアミナーゼ、A P O B E C 3 A デアミナーゼ、A P O B E C 3 B デアミナーゼ、A P O B E C 3 C デアミナーゼ、A P O B E C 3 D デアミナーゼ、A P O B E C 3 F デアミナーゼ、A P O B E C 3 G デアミナーゼ、および A P O B E C 3 H デアミナーゼからなる群から選択される、請求項 7 に記載の融合蛋白質。

【請求項 9】

U G I ドメインが、ウラシル D N A グリコシラーゼ (U D G) 活性を阻害することができるドメインを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 10】

U G I ドメインが、配列番号 6 0 0 と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 9 9 . 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の融合蛋白質。

【請求項 11】

U G I ドメインが、配列番号 6 0 0 によって提供されるアミノ酸配列を含む、請求項 9 または 10 に記載の融合蛋白質。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の融合蛋白質であって、構造：

(a) NH_2 - [シチジンデアミナーゼドメイン] - [C a s 9 ドメイン] - [U G I ドメイン] - COOH 、およびここで、「] - [」のそれぞれが任意のリンカーを含む；

(b) NH_2 - [シチジンデアミナーゼドメイン] - [C a s 9 ドメイン] - [U G I ドメイン] - [第 2 の C a s 9 ドメイン] - COOH 、およびここで、「] - [」のそれぞれが任意のリンカーを含む；または

(c) NH_2 - [シチジンデアミナーゼドメイン] - [C a s 9 ドメイン] - [第 2 の C a s 9 ドメイン] - [U G I ドメイン] - COOH 、およびここで、「] - [」のそれぞれが任意のリンカーを含む、

を含む、前記融合蛋白質。

【請求項 13】

(i i) のシチジンデアミナーゼドメインおよび (i) の C a s 9 ドメインが、アミノ酸配列 (G G G S)_n (配列番号 2 6 5)、(G G G G S)_n (配列番号 5)、(G)_n、(E A A A K)_n (配列番号 6)、(G G S)_n、(S G G S)_n (配列番号 4 2 8 8

)、SGSETPGTSESATPES (配列番号7)、または(XP)_nモチーフ、またはその組み合わせを含むリンカーによってリンクされ、nが独立して端を含めて1および30の間の整数であり、および、Xがいずれかのアミノ酸である、請求項1～12のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項14】

核局在配列(NLS)をさらに含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項15】

NLSが、アミノ酸配列PKKKRKV (配列番号741)またはMDSL L MNR R KFLYQFKNVRWAKGRRETYLC (配列番号742)を含む、請求項14に記載の融合蛋白質。

【請求項16】

構造：NH₂ - [シチジンデアミナーゼドメイン] - [nC a s 9ドメイン] - [UGIドメイン] - [NLS] - COOHを含み、およびここで、「」 - 「」のそれぞれが任意のリンカーを含む、請求項15に記載の融合蛋白質。

【請求項17】

UGIドメインおよびNLSが、アミノ酸配列SGGS (配列番号4288)を含むリンカーによってリンクされる、または、C a s 9ドメインおよびUGIドメインが、アミノ酸配列SGGS (配列番号4288)を含むリンカーによってリンクされる、請求項15または16に記載の融合蛋白質。

【請求項18】

配列番号591～594、611、612、615、657、658、5737、5743、5745、および5746のいずれか1つによって提供されるアミノ酸配列を含む、請求項1～17のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項19】

d C a s 9ドメインが、Staphylococcus aureus (S a C a s 9)を含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項20】

S a C a s 9が、配列番号4273によって提供されるアミノ酸配列を含む、請求項19に記載の融合蛋白質。

【請求項21】

S a C a s 9ドメインが、配列番号4273のE781K、N967K、またはR1014H変異の1つ以上、または配列番号11～260によって提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける1つ以上の対応する変異を含む、請求項19に記載の融合蛋白質。

【請求項22】

核酸分子を請求項1～21のいずれか一項に記載の融合蛋白質およびガイドRNAと接触させることを含む、核酸を編集するための方法であって、ガイドRNAが、生物のゲノム中の標的配列に対して相補的である少なくとも10個の一続きのヌクレオチドの配列を含み、および、標的塩基対を含み、ここで接触させるステップが、インビトロまたはエクスピボで行われる、前記方法。

【請求項23】

(i) 標的塩基対が、疾患または異常に関連するTからCへの点変異を含み、およびここで、変異体C塩基の脱アミノ化が、疾患または異常に関連しない配列をもたらす、

(ii) 接触させるステップが、塩基編集によって20%未満のindel形成をもたらす、および/または

(iii) 接触させるステップが、塩基編集によって少なくとも2:1の意図される産物対意図されない産物をもたらす、

請求項22に記載の方法。

【請求項24】

疾患または異常が、嚢胞性線維症、フェニルケトン尿症、表皮剥離性角質増殖症(EH

K)、シャルコー・マリー・トゥース病4J型、神経芽腫(NB)、フォン・ヴィレブランド病(vWD)、先天性ミオトニー、遺伝性腎アミロイドーシス、拡張型心筋症(DCM)、遺伝性リンパ浮腫、家族性アルツハイマー病、HIV、プリオン病、慢性乳児神経皮膚関節症候群(CINCA)、デスミン関連ミオパチー(DRM)、変異体PI3KCA蛋白質、変異体CTNNB1蛋白質、変異体HRAS蛋白質、または変異体p53蛋白質に関連する新生物疾患である、請求項22または23に記載の方法。

【請求項25】

請求項1~21のいずれか一項に記載の融合蛋白質、および融合蛋白質のCas9ドメインに結合したガイドRNA(gRNA)を含む、複合体。

【請求項26】

ガイドRNAが、15~100ヌクレオチドの長さであり、および標的配列に対して相補的である少なくとも10個の一続きのヌクレオチドの配列を含む、請求項25に記載の複合体。

【請求項27】

標的配列がDNA配列である、請求項25または26に記載の複合体。

【請求項28】

標的配列が原核生物のゲノム中にある、または真核生物のゲノム中にある、例えば哺乳動物のゲノム中にある、および/またはここで哺乳動物がヒトである、請求項27に記載の複合体。

【請求項29】

請求項1~21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。

【請求項30】

請求項29に記載のポリヌクレオチドおよび融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドの発現を駆動する異種プロモーターを含む、ベクター。

【請求項31】

請求項1~21のいずれか一項に記載の融合蛋白質、または請求項25~28のいずれか一項に記載の複合体、または請求項30に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項32】

医薬としての使用のための、請求項1~21のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項33】

二本鎖DNA配列の標的領域を核酸塩基編集因子およびガイド核酸を含む複合体と接触させることを含む、二本鎖DNA配列の核酸塩基対を編集するための方法であって、標的領域が標的核酸塩基対を含み、当該標的核酸塩基対の第1の核酸塩基が第2の核酸塩基に変換され、およびさらに、第1の核酸塩基に対して相補的な第3の核酸塩基が第2の核酸塩基に対して相補的な第4の核酸塩基によって置き換わる、前記方法。

【請求項34】

接触させるステップが、二本鎖DNA配列における20%未満のindel形成をもたらす、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

20%、19%、18%、16%、14%、12%、10%、8%、6%、4%、2%、または1%未満のindel形成をもたらす、請求項33または34に記載の方法。

【請求項36】

意図される編集された核酸塩基対を生成する効率が、少なくとも5%であり、および/または、効率が、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%である、請求項33~35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

標的ヌクレオチドにおける意図される産物対意図されない産物の比が、少なくとも2:1、5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、または200:1である、請求項33~36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

意図される点変異対indel形成の比が、1 : 1、10 : 1、50 : 1、100 : 1、500 : 1、または1000 : 1超である、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

接触させるステップが、当該標的領域の1つの鎖だけを切ることをもたらし、および、切られた鎖が、ガイド核酸にハイブリダイゼーションする、請求項33～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

切られた単一鎖が、第1の核酸塩基を含む鎖の反対である、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

当該第1の核酸塩基がシトシンである、および/または、第2の核酸塩基がウラシルである、請求項39または40に記載の方法。

【請求項 42】

核酸塩基編集因子がUGI活性を含む、および/または、核酸塩基編集因子がニッカーゼ活性を含む、請求項33～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

意図される編集された核酸塩基対が、PAM部位の上流である、および/または、意図される編集された核酸塩基対が、PAM部位の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド上流である、請求項33～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

意図される編集された核酸塩基対が、PAM部位の下流である、および/または、意図される編集された核酸塩基対が、PAM部位の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド下流である、請求項33～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

古典的PAM部位を要求しない、請求項33～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

標的領域が標的ウインドウを含み、さらにここで標的ウインドウが標的核酸塩基対を含む、請求項33～45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

標的ウインドウが、1～10個のヌクレオチド、例えば、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、または1個のヌクレオチドの長さを含む、請求項46に記載の方法。

【請求項 48】

核酸塩基編集因子が、請求項1～21のいずれか一項に記載の融合蛋白質を含む、請求項33～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

(a) 請求項1～21のいずれか一項に記載の融合蛋白質および(b)二本鎖DNA分子中の標的核酸塩基対に対して(a)の融合蛋白質をターゲティングするガイドRNAの、DNAを編集するためのキットの製造における使用であって、DNAを編集することが、当該標的核酸塩基対の第1の核酸塩基の第2の核酸塩基への変換に好適な条件下、DNA分子を(a)および(b)と接触させることを含む、前記使用。

【請求項 50】

接触させるステップが、標的領域において二本鎖DNAの分離を誘導する、請求項49に記載の使用。

【請求項 51】

(a) 請求項1～21のいずれか一項に記載の融合蛋白質および(b)二本鎖DNA分子中の標的核酸塩基対に対して(a)の融合蛋白質をターゲティングするガイドRNAの、医薬の製造における使用。

【請求項 5 2】

接触させるステップがインビトロまたはエキスピボで行われる、請求項 4 9 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5 3】

二本鎖 DNA 配列の核酸塩基対を編集するための方法であって、

(a) 二本鎖 DNA 配列の標的領域を核酸誘導型デアミナーゼと接触させること、ここで標的領域が標的核酸塩基対を含む；および

(b) 標的領域をウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (U G I) と接触させること；
ここで、当該標的核酸塩基対の第 1 の核酸塩基が第 2 の核酸塩基に変換される、
を含む、前記方法。

【請求項 5 4】

核酸誘導型デアミナーゼが、核酸誘導型シチジンデアミナーゼである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

塩基除去修復の阻害剤にカップリングされた、核酸誘導型デアミナーゼ。

【請求項 5 6】

ミスマッチ修復の開始因子をさらに含む、請求項 5 5 に記載の核酸誘導型デアミナーゼ。

【請求項 5 7】

ニッカーゼを含む、請求項 5 6 に記載の核酸誘導型デアミナーゼ。