

【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4年9月14日(2022.9.14)

【国際公開番号】WO2020/051561

【公表番号】特表2022-500017(P2022-500017A)

【公表日】令和4年1月4日(2022.1.4)

【出願番号】特願2021-512514(P2021-512514)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 15/867(2006.01)

C 1 2 N 15/861(2006.01)

C 1 2 N 15/864(2006.01)

C 1 2 N 15/869(2006.01)

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 1 2 N 15/55(2006.01)

C 1 2 N 15/57(2006.01)

C 1 2 N 9/78(2006.01)

C 1 2 N 9/48(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/867 Z Z N A

C 1 2 N 15/861 Z

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/869 Z

C 1 2 N 15/62 Z

C 1 2 N 15/55

C 1 2 N 15/57

C 1 2 N 9/78

C 1 2 N 9/48

20

30

【手続補正書】

【提出日】令和4年9月6日(2022.9.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0496

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0496】

本開示は以下の実施形態を含む。

40

[1]

実施形態 1

(a) デアミナーゼとCas9のN末端断片とを含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、および

(b) Cas9のC末端断片をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合

50

される、第2のポリヌクレオチドを含む、組成物。

実施形態 2

(a) Cas9のN末端断片をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、および

(b) Cas9のC末端断片とデアミナーゼとを含む融合タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチドを含む、組成物。

10

実施形態 3

(a) デアミナーゼとCas9のN末端断片とを含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、および

(b) Cas9のC末端断片をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、ここでCas9の前記C末端断片のN末端残基は、Ala、Ser、またはThrを置換したCysであり、Cas9の前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチドを含む、組成物。

20

実施形態 4

(a) Cas9のN末端断片をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、および

30

(b) Cas9のC末端断片とデアミナーゼとを含む融合タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、ここでCas9の前記C末端断片のN末端残基は、Ala、Ser、またはThrを置換したCysであり、Cas9の前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチドを含む、組成物。

実施形態 5

Cas9の前記N末端断片が、配列番号2における番号付けでアミノ酸302、309、312、354、455、459、462、465、471、473、576、588、または589までを含む、実施形態1～4のいずれか一項に記載の組成物。

40

実施形態 6

Cas9の前記C末端断片またはCas9の前記N末端断片が、配列番号2における番号付けでアミノ酸S303、T310、T313、S355、A456、S460、A463、T466、S469、T472、T474、C574、S577、A589、またはS590に対応する残基におけるAla/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含む、実施形態1～4のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 7

単一ガイドRNA (sgRNA) またはそれをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態1または2に記載の組成物。

50

実施形態 8

前記第1および第2のポリヌクレオチドが連結されている、実施形態1～7のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 9

前記第1および第2のポリヌクレオチドが別々に発現される、実施形態1～7のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 10

前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼである、実施形態1～9のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 11

前記デアミナーゼが野生型TadAまたはTadA7.10である、実施形態10に記載の組成物。

実施形態 12

前記デアミナーゼがTadA二量体である、実施形態1～11のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 13

前記TadA二量体が野生型TadAおよびTadA7.10を含む、実施形態12に記載の組成物。

実施形態 14

前記融合タンパク質が核局在化シグナル(NLS)を含む、実施形態1～13のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 15

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片がNLSに連結されている、実施形態1～13のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 16

前記NLSが二部分NLSである、実施形態14または15に記載の組成物。

実施形態 17

Cas9の前記N末端断片と前記融合タンパク質とが連結されて、デアミナーゼおよびSpCas9を含む塩基エディタータンパク質を形成する、実施形態1～16のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 18

Cas9の前記C末端断片と前記融合タンパク質とが連結されて、デアミナーゼおよびSpCas9を含む塩基エディタータンパク質を形成する、実施形態1～16のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 19

前記SpCas9はニッカーゼ活性を有するか、または触媒的に不活性である、実施形態17または18に記載の組成物。

実施形態 20

実施形態1～19のいずれか一項に記載の融合タンパク質およびCas9のN末端断片を含む組成物。

実施形態 21

実施形態1～20のいずれか一項に記載の融合タンパク質およびCas9のC末端断片を含む組成物。

実施形態 22

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片とデアミナーゼとがリンカーによって連結される、実施形態1～21のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態 23

前記リンカーがペプチドリinkerである、実施形態22に記載の組成物。

実施形態 24

実施形態1～23のいずれか一項に記載の第1および第2のポリヌクレオチドを含むベクター。

実施形態 25

10

20

30

40

50

前記ベクターがプロモーターを含む、実施形態 2 4 記載のベクター。

実施形態 2 6

前記プロモーターは構成的プロモーターである、実施形態 2 5 に記載のベクター。

実施形態 2 7

前記構成的プロモーターはCMVまたはCAGプロモーターである、実施形態 2 6 に記載のベクター。

実施形態 2 8

前記ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択される、実施形態 2 4 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のベクター。

10

実施形態 2 9

前記ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、実施形態 2 8 に記載のベクター。

実施形態 3 0

実施形態 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物または実施形態 2 4 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のベクターを含む、細胞。

実施形態 3 1

前記細胞が哺乳動物細胞である、実施形態 3 0 に記載の細胞。

実施形態 3 2

Ala/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含むCas9ドメインを含む、再構成されたA G塩基エディタータンパク質。

20

実施形態 3 3

前記変異が、SpCas9のアミノ酸S303、T310、T313、S355、A456、S460、A463、T466、S469、T472、T474、C574、S577、A589、またはS590に対応する残基におけるものである、実施形態 3 2 に記載の再構成された塩基エディタータンパク質。

実施形態 3 4

(a) Cas9のN末端断片であって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292~G364の位置で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合されている、N末端断片、および

(b) Cas9のC末端断片であって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292~G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合されている、C末端断片をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

30

実施形態 3 5

(a) Cas9のN末端断片であって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のアミノ酸302、309、312、354、455、459、462、465、471、473、576、588または589で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合されている、N末端断片、および

(b) Cas9のC末端断片であって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のアミノ酸303、310、313、355、456、460、463、466、472、474、577、589または590で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合されている、C末端断片をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

40

実施形態 3 6

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片が核局在シグナル(NLS)に連結されている、実施形態 3 4 または 3 5 に記載の組成物。

実施形態 3 7

Cas9の前記N末端断片およびCas9の前記C末端断片の両方がNLSに連結されている、実施形態 3 6 に記載の組成物。

実施形態 3 8

50

前記NLSが二部分NLSである、実施形態36または37に記載の組成物。

実施形態39

Cas9の前記N末端断片とCas9の前記C末端断片が連結されてSpCas9を形成する、実施形態34～38のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態40

前記SpCas9は、ニッカーゼ活性を有するか、または触媒的に不活性である、実施形態39に記載の組成物。

実施形態41

実施形態34～40のいずれか一項の(a)におけるCas9のN末端断片と(b)におけるCas9のC末端断片とを含む、組成物。

実施形態42

実施形態34～40のいずれか一項に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

実施形態43

前記ベクターがプロモーターを含む、実施形態42に記載のベクター。

実施形態44

前記プロモーターが構成的プロモーターである、実施形態43に記載のベクター。

実施形態45

前記構成的プロモーターがCMVまたはCAGプロモーターである、実施形態44に記載のベクター。

実施形態46

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択される、実施形態42～45のいずれか一項に記載のベクター。

実施形態47

前記ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、実施形態46に記載のベクター。

実施形態48

実施形態34～41のいずれか一項に記載の組成物または実施形態42～47のいずれか一項に記載のベクターを含む、細胞。

実施形態49

前記細胞が哺乳動物細胞である、実施形態48に記載の細胞。

実施形態50

Ala/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含むCas9バリエーションポリペプチド。

実施形態51

アミノ酸303、310、313、355、456、460、463、466、472または474にCys残基を含む、Cas9バリエーションポリペプチド。

実施形態52

細胞を、

(a) デアミナーゼとCas9のN末端断片とを含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インティン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、

(b) Cas9のC末端断片をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インティン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチド、および

(c) 単一ガイドRNA(sgRNA)またはそれをコードするポリヌクレオチドに接触させることを含む、

塩基エディターシステムを細胞に送達するための方法。

実施形態53

10

20

30

40

50

細胞を、

(a) Cas9のN末端断片を含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、

(b) Cas9のC末端断片とデアミナーゼとをコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチド、および

(c) 単一ガイドRNA (sgRNA) またはそれをコードするポリヌクレオチドに接触させることを含む、

塩基エディターシステムを細胞に送達するための方法。

実施形態 5 4

細胞を、

(a) デアミナーゼとCas9のN末端断片とを含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、

(b) Cas9のC末端断片をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記C末端断片のN末端残基は、Ala、Ser、またはThrを置換したCysであり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチド、および

(c) 単一ガイドRNA (sgRNA) またはそれをコードするポリヌクレオチドに接触させることを含む、

塩基エディターシステムを細胞に送達するための方法。

実施形態 5 5

細胞を、

(a) Cas9のN末端断片を含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、

(b) Cas9のC末端断片とデアミナーゼとをコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記C末端断片のN末端残基は、Ala、Ser、またはThrを置換したCysであり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチド、および

(c) 単一ガイドRNA (sgRNA) またはそれをコードするポリヌクレオチドに接触させることを含む、

塩基エディターシステムを細胞に送達するための方法。

実施形態 5 6

前記sgRNAは標的ポリヌクレオチドに対して相補的である、実施形態 5 2～5 5のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5 7

前記標的ポリヌクレオチドが生物のゲノム中に存在する、実施形態 5 6 記載の方法。

実施形態 5 8

10

20

30

40

50

前記生物が動物、植物、または細菌である、実施形態 5 7 に記載の方法。

実施形態 5 9

前記第1のポリヌクレオチド、前記第2のポリヌクレオチド、および/または前記をコードするポリヌクレオチドが、ベクターを介して前記細胞に接触される、実施形態 5 2 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 0

前記ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択される、実施形態 5 9 に記載の方法。

実施形態 6 1

前記ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、実施形態 6 0 に記載の方法。

実施形態 6 2

Cas9の前記C末端断片またはCas9の前記N末端断片が、配列番号2における番号付けでアミノ酸S303、T310、T313、S355、A456、S460、A463、T466、S469、T472、T474、C574、S577、A589、またはS590に対応する残基においてAla/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含む、実施形態 5 2 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 3

前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼである、実施形態 5 2 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 4

前記デアミナーゼがTadAまたはそのバリエーションである、実施形態 6 3 に記載の方法。

実施形態 6 5

前記デアミナーゼが野生型TadAまたはTad7.10である、実施形態 6 4 に記載の方法。

実施形態 6 6

前記デアミナーゼがTadA二量体である、実施形態 5 2 ~ 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 7

前記TadA二量体が野生型TadAおよびTadA7.10を含む、実施形態 6 6 に記載の方法。

実施形態 6 8

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片がNLSを含む、実施形態 5 2 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 9

Cas9の前記N末端断片およびCas9の前記C末端断片の両方がNLSを含む、実施形態 6 8 に記載の方法。

実施形態 7 0

前記NLSが二部分NLSである、実施形態 6 8 または 6 9 に記載の方法。

実施形態 7 1

Cas9の前記N末端断片とCas9の前記C末端断片が連結されてSpCas9を形成する、実施形態 5 2 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 7 2

前記SpCas9は、ニッカース活性を有するか、または触媒的に不活性である、実施形態 7 1 に記載の方法。

実施形態 7 3

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質はデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292~G364の位置で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態 7 4

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質はデアミ

10

20

30

40

50

ナーゼとCas9のN末端断片とを含み、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のF445～K483の位置で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態 7 5

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質はデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のE565～T637の位置で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態 7 6

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質は、デアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、ここで、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態 7 7

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質は、デアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、ここで、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のF445～K483の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態 7 8

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質は、デアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、ここで、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態 7 9

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質は、デアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、ここで、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片のN末端残基はAla、Ser、またはThrを置換したCysであり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態 8 0

Cas9の前記C末端断片またはCas9の前記N末端断片が、Ala/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含む、実施形態 7 3～7 9のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 8 1

前記変異が、配列番号2における番号付けでアミノ酸S303、T310、T313、S355、A456、S460、A463、T466、S469、T472、T474、C574、S577、A589、またはS590に対応する残基におけるものである、実施形態 8 0に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 8 2

前記デアミナーゼはアデノシンデアミナーゼである、実施形態 7 3～8 1のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 8 3

前記デアミナーゼはTadAまたはそのバリエーションである、実施形態 8 2に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 8 4

前記デアミナーゼは野生型TadAまたはTad7.10である、実施形態 8 3に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 8 5

10

20

30

40

50

前記融合タンパク質は、互いに連結された2つのデアミナーゼを含む、実施形態73～84のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態86

前記融合タンパク質が野生型TadAおよびTadA7.10の両方を含む、実施形態85に記載のポリヌクレオチド。

実施形態87

前記融合タンパク質がNLSを含む、実施形態73～86のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態88

前記NLSは二部分NLSである、実施形態87に記載のポリヌクレオチド。

実施形態89

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片がSpCas9のアミノ酸配列を含む、実施形態73～88のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態90

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片が、ヌクレアーゼ活性の低減に関連する1つ以上のアミノ酸置換を含む、実施形態73～89のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態91

アミノ酸302、309、312、354、455、459、462、465、471、または473までが、分割されたインティン-Nに融合されたものを含む、Cas9タンパク質のN末端断片。

実施形態92

Cas9タンパク質のC末端タンパク質断片であって、前記C末端断片のN末端アミノ酸は、アミノ酸303、310、313、355、456、460、463、466、472または474におけるCys置換であり、かつ分割インティン-Cに融合されている、C末端タンパク質断片。

実施形態93

A G塩基エディター融合タンパク質の断片をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質は1つ以上のデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、前記N末端断片は分割インティン-Nに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態94

A G塩基エディター融合タンパク質の断片をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質は1つ以上のデアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、前記C末端断片は分割インティン-Cに融合される、ポリヌクレオチド。

実施形態95

A G塩基エディター融合タンパク質のタンパク質断片であって、前記融合タンパク質は1つ以上のデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、前記N末端断片は分割インティン-Nに融合されている、タンパク質断片。

実施形態96

A G塩基エディター融合タンパク質のタンパク質断片であって、前記融合タンパク質は1つ以上のデアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、前記C末端断片は分割インティン-Cに融合されている、タンパク質断片。

実施形態97

1つ以上のデアミナーゼとCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質の断片をそれぞれがコードする第1および第2のポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記第1のポリヌクレオチドは、Cas9のN末端断片が分割インティン-Nに融合されたものをコードし、前記第2のポリヌクレオチドは、Cas9のC末端断片が分割インティン-Cに融合されたものをコードする、組成物。

実施形態98

1つ以上のデアミナーゼとSpCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質のN末端断片およびC末端断片を含む組成物であって、前記N末端断片は、SpCas9の断片が分割インティン-Nに融合されたものを含み、前記C末端断片は、SpCas9の残部が分割イン

10

20

30

40

50

テイン-Cに融合されたものを含む、組成物。

実施形態 9 9

細胞に塩基エディターシステムを送達するための方法であって、1つ以上のデアミナーゼとCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質の断片をそれぞれコードする第1および第2のポリヌクレオチドに細胞を接触させることを含み、ここで、前記第1のポリヌクレオチドは、Cas9のN末端断片が分割インティン-Nに融合されたものをコードし、前記第2のポリヌクレオチドは、Cas9のC末端断片が分割インティン-Cに融合されたものをコードし、前記第1または第2のポリヌクレオチドのどちらかが、単一ガイドRNAをコードする、方法。

実施形態 1 0 0

細胞に塩基エディターシステムを送達するための方法であって、1つまたは複数のデアミナーゼとSpCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質のN末端断片およびC末端断片、ならびにガイドRNAに細胞を接触させることを含み、ここで、前記N末端断片は、SpCas9の断片が分割インティン-Nに融合されたものを含み、前記C末端断片は、SpCas9の残部が分割インティン-Cに融合されたものを含む、方法。

実施形態 1 0 1

1つまたは複数のデアミナーゼとCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質の断片をそれぞれコードする第1および第2のポリヌクレオチドに細胞を接触させる工程であって、ここで、前記第1のポリヌクレオチドは、Cas9のN末端断片が分割インティン-Nに融合されたものをコードし、前記第2のポリヌクレオチドは、Cas9のC末端断片が分割インティン-Cに融合されたものをコードし、前記第1または第2のポリヌクレオチドのどちらかが単一ガイドRNAをコードする、工程と、

前記コードされたタンパク質および単一ガイドRNAを細胞中で発現させる工程とを含む、細胞中の標的ポリヌクレオチドを編集するための方法。

[他の実施形態]

上述の説明から、種々の用途および条件に適用するために、本明細書に記載する本発明に変形および修正を加えることができることが明らかであろう。そのような実施形態もまた、特許請求の範囲内である。

【 手続補正 2 】

【 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 】

(a) デアミナーゼとCas9のN末端断片とを含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インティン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、および

(b) Cas9のC末端断片をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は分割インティン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチドを含むか；または

(a) Cas9のN末端断片をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インティン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、および

(b) Cas9のC末端断片とデアミナーゼとを含む融合タンパク質をコードする第2のポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチドを含むか；または

(a) デアミナーゼとCas9のN末端断片とを含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、および

(b) Cas9のC末端断片をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、ここでCas9の前記C末端断片のN末端残基は、Ala、Ser、またはThrを置換したCysであり、Cas9の前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチドを含む、組成物。

10

【請求項2】

(a) Cas9のN末端断片をコードする第1のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で終結する連続配列であり、ここで、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合される、第1のポリヌクレオチド、および

20

(b) Cas9のC末端断片とデアミナーゼとを含む融合タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドであって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、ここでCas9の前記C末端断片のN末端残基は、Ala、Ser、またはThrを置換したCysであり、Cas9の前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合される、第2のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項3】

Cas9の前記N末端断片が、配列番号2における番号付けでアミノ酸302、309、312、354、455、459、462、465、471、473、576、588、または589までを含み；および/または

30

Cas9の前記C末端断片またはCas9の前記N末端断片が、配列番号2における番号付けでアミノ酸S303、T310、T313、S355、A456、S460、A463、T466、S469、T472、T474、C574、S577、A589、またはS590に対応する残基におけるAla/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含む、

請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

単一ガイドRNA (sgRNA) またはそれをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項5】

前記第1および第2のポリヌクレオチドが連結されているか、または別々に発現される、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼであって、前記デアミナーゼが野生型TadAまたはTadA7.10であるか；前記デアミナーゼがTadA二量体であるか；または前記デアミナーゼが野生型TadAおよびTadA7.10を含むTadA二量体である、

請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

50

前記融合タンパク質が核局在化シグナル（NLS）を含み、
Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片がNLSに連結されているか；または
前記NLSが二部分NLSである、

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記SpCas9はニッカーゼ活性を有するか、または触媒的に不活性である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の融合タンパク質とCas9のN末端断片またはC末端断片とを含む組成物。

10

【請求項 10】

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片とデアミナーゼとがリンカーによって連結され、前記リンカーは任意でペプチドリinkerである、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の第1および第2のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 12】

前記ベクターがプロモーターを含み；

前記ベクターが構成的プロモーターであるプロモーターを含み；

20

前記ベクターがCMVまたはCAGプロモーターである構成的プロモーターを含み；および
／または

前記ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択される、

請求項 11 記載のベクター。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物または請求項 11 もしくは 12 に記載のベクターを含む細胞であって、任意で前記細胞は哺乳動物細胞である、細胞。

【請求項 14】

30

Ala/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含むCas9ドメインを含む、再構成されたA G塩基エディタータンパク質。

【請求項 15】

前記変異が、SpCas9のアミノ酸S303、T310、T313、S355、A456、S460、A463、T466、S469、T472、T474、C574、S577、A589、またはS590に対応する残基におけるものである、請求項 14 に記載の再構成された塩基エディタータンパク質。

【請求項 16】

(a) Cas9のN末端断片であって、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のアミノ酸302、309、312、354、455、459、462、465、471、473、576、588または589で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合されている、N末端断片、および

40

(b) Cas9のC末端断片であって、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のアミノ酸303、310、313、355、456、460、463、466、472、474、577、589または590で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合されている、C末端断片をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 17】

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片が核局在シグナル（NLS）に連結されているか、または

Cas9の前記N末端断片およびCas9の前記C末端断片の両方がNLSに連結されており、任

50

意で前記NLSは二部分NLSである、

請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

Cas9の前記N末端断片とCas9の前記C末端断片が連結されてSpCas9を形成し、任意で前記SpCas9は、ニッカーゼ活性を有するか、または触媒的に不活性である、請求項 1 6 または 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物または請求項 1 9 に記載のベクターを含む細胞であって、任意で前記細胞は哺乳動物細胞である、細胞。

【請求項 2 1】

アミノ酸303、310、313、355、456、460、463、466、472または474にCys残基を含む、Cas9パリアントポリペプチド。

【請求項 2 2】

細胞を、
請求項 1 または 2 に記載の第1および第2のポリヌクレオチドと；単一ガイドRNA (sgRNA) またはそれをコードするポリヌクレオチド
に接触させることを含む、

塩基エディターシステムを細胞に送達するためのインビトロまたはエクスピボの方法。

【請求項 2 3】

前記細胞が動物、植物、または細菌細胞である、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記第1のポリヌクレオチド、前記第2のポリヌクレオチド、および/または前記sgRNAをコードするポリヌクレオチドが、前記細胞に接触される1つ以上のベクターに含有される、請求項 2 2 または 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択され；

Cas9の前記C末端断片またはCas9の前記N末端断片が、配列番号2における番号付けでアミノ酸S303、T310、T313、S355、A456、S460、A463、T466、S469、T472、T474、C574、S577、A589、またはS590に対応する残基においてAla/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含み；

前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼであり；

前記デアミナーゼがTadAまたはそのパリアントであるアデノシンデアミナーゼであり；

前記デアミナーゼが野生型TadAまたはTadA7.10であるアデノシンデアミナーゼであり；

前記デアミナーゼがTadA二量体であり；

前記デアミナーゼが野生型TadAおよびTadA7.10を含むTadA二量体であり；

Cas9の前記N末端断片および/またはCas9の前記C末端断片がNLSを含み、NLSは任意で二部分NLSであり；

および/または

Cas9の前記N末端断片とCas9の前記C末端断片が連結されてSpCas9を形成し、SpCas9は任意でニッカーゼ活性を有するか、または触媒的に不活性である；

請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、

(i) 前記融合タンパク質はデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のA292~G3

10

20

30

40

50

64の位置で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合されるか、または

(i i) 前記融合タンパク質はデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のF445～K483の位置で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合されるか、または

(i i i) 前記融合タンパク質はデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、Cas9の前記N末端断片は、Cas9のN末端で始まり、配列番号2における番号付けでCas9のE565～T637の位置で終結する連続配列であり、Cas9の前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合されるか、または

(i v) 前記融合タンパク質は、デアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、ここで、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合されるか、または

(v) 前記融合タンパク質は、デアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、ここで、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のF445～K483の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合されるか、または

(v i) 前記融合タンパク質は、デアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、ここで、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合されるか、または

(v i i) 前記融合タンパク質は、デアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、ここで、Cas9の前記C末端断片は、配列番号2における番号付けでCas9のA292～G364、F445～K483、またはE565～T637の位置で始まりCas9のC末端で終結する連続配列であり、Cas9の前記C末端断片のN末端残基はAla、Ser、またはThrを置換したCysであり、Cas9の前記C末端断片は、分割インテイン-Cに融合される、

ポリヌクレオチド。

【請求項 27】

Cas9の前記C末端断片またはCas9の前記N末端断片が、Ala/Cys、Ser/Cys、またはThr/Cys変異を含み；

前記変異が、配列番号2における番号付けでアミノ酸S303、T310、T313、S355、A456、S460、A463、T466、S469、T472、T474、C574、S577、A589、またはS590に対応する残基におけるものであり；

前記デアミナーゼはアデノシンデアミナーゼであり；

前記デアミナーゼはTadAまたはそのバリエーションであるアデノシンデアミナーゼであり；

前記デアミナーゼは野生型TadAまたはTad7.10であるアデノシンデアミナーゼであり；

前記融合タンパク質は、互いに連結された2つのデアミナーゼを含み；

前記融合タンパク質が野生型TadAおよびTadA7.10の両方を含み；

前記融合タンパク質がNLSを含み、任意で前記NLSは二部分NLSであり；

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片がSpCas9のアミノ酸配列を含み；および/または

Cas9の前記N末端断片またはCas9の前記C末端断片が、ヌクレアーゼ活性の低減に関連する1つ以上のアミノ酸置換を含む；

請求項 26 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 28】

アミノ酸302、309、312、354、455、459、462、465、471、または473までが、分割インテイン-Nに融合されたものを含む、請求項 1 または 2 に記載のCas9タンパク質のN末端断片。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

Cas9タンパク質のC末端タンパク質断片であって、前記C末端断片のN末端アミノ酸は、アミノ酸303、310、313、355、456、460、463、466、472または474におけるCys置換であり、かつ分割インテイン-Cに融合されている、C末端タンパク質断片。

【請求項30】

A G塩基エディター融合タンパク質の断片をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質は1つ以上の請求項1または2に記載のデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合されるかまたは分割インテイン-Cに融合される、ポリヌクレオチド。

【請求項31】

A G塩基エディター融合タンパク質の断片をコードするポリヌクレオチドであって、前記融合タンパク質は1つ以上の請求項1または2に記載のデアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合される、ポリヌクレオチド。

【請求項32】

A G塩基エディター融合タンパク質のタンパク質断片であって、前記融合タンパク質は1つ以上の請求項1または2に記載のデアミナーゼとCas9のN末端断片とを含み、前記N末端断片は分割インテイン-Nに融合されている、タンパク質断片。

【請求項33】

A G塩基エディター融合タンパク質のタンパク質断片であって、前記融合タンパク質は1つ以上の請求項1または2に記載のデアミナーゼとCas9のC末端断片とを含み、前記C末端断片は分割インテイン-Cに融合されている、タンパク質断片。

【請求項34】

1つ以上のデアミナーゼとCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質の断片をそれぞれがコードする第1および第2のポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記第1のポリヌクレオチドは、Cas9のN末端断片が分割インテイン-Nに融合されたものをコードし、前記第2のポリヌクレオチドは、Cas9のC末端断片が分割インテイン-Cに融合されたものをコードする、組成物。

【請求項35】

1つ以上のデアミナーゼとSpCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質のN末端断片およびC末端断片を含む組成物であって、前記N末端断片は、SpCas9の断片が分割インテイン-Nに融合されたものを含み、前記C末端断片は、SpCas9の残部が分割インテイン-Cに融合されたものを含む、組成物。

【請求項36】

細胞に塩基エディターシステムを送達するためのインビトロまたはエクスピボの方法であって、1つ以上のデアミナーゼとCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質の断片をそれぞれコードする第1および第2のポリヌクレオチドに細胞を接触させることを含み、ここで、前記第1のポリヌクレオチドは、Cas9のN末端断片が分割インテイン-Nに融合されたものをコードし、前記第2のポリヌクレオチドは、Cas9のC末端断片が分割インテイン-Cに融合されたものをコードし、前記第1または第2のポリヌクレオチドのどちらかが、単一ガイドRNAをコードする、方法。

【請求項37】

細胞に塩基エディターシステムを送達するためのインビトロまたはエクスピボの方法であって、1つまたは複数のデアミナーゼとSpCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質のN末端断片およびC末端断片、ならびにガイドRNAに細胞を接触させることを含み、ここで、前記N末端断片は、SpCas9の断片が分割インテイン-Nに融合されたものを含み、前記C末端断片は、SpCas9の残部が分割インテイン-Cに融合されたものを含む、方法。

【請求項38】

1つまたは複数のデアミナーゼとCas9とを含むA G塩基エディター融合タンパク質の断片をそれぞれコードする第1および第2のポリヌクレオチドに細胞を接触させる工程であって、ここで、前記第1のポリヌクレオチドは、Cas9のN末端断片が分割インテイン-

Nに融合されたものをコードし、前記第2のポリヌクレオチドは、Cas9のC末端断片が分割インテイン-Cに融合されたものをコードし、前記第1または第2のポリヌクレオチドのどちらかが単一ガイドRNAをコードする、工程と、

前記コードされたタンパク質および単一ガイドRNAを細胞中で発現させる工程とを含む、細胞中の標的ポリヌクレオチドを編集するためのインビトロまたはエキスピボの方法。

10

20

30

40

50