

【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7年4月17日(2025.4.17)

【公開番号】特開2024-164012(P2024-164012A)

【公開日】令和6年11月26日(2024.11.26)

【年通号数】公開公報(特許)2024-221

【出願番号】特願2024-118365(P2024-118365)

【国際特許分類】

C 12 N 9/12(2006.01)

10

C 12 N 15/09(2006.01)

C 12 N 15/54(2006.01)

C 12 N 15/63(2006.01)

C 12 N 1/15(2006.01)

C 12 N 1/19(2006.01)

C 12 N 1/21(2006.01)

C 12 N 5/10(2006.01)

C 12 N 15/62(2006.01)

【F I】

C 12 N 9/12

20

C 12 N 15/09 110

C 12 N 15/54 Z N A

C 12 N 15/63 Z

C 12 N 1/15

C 12 N 1/19

C 12 N 1/21

C 12 N 5/10

C 12 N 15/62 Z

C 12 N 15/54

C 12 N 9/12 Z N A

30

【手続補正書】

【提出日】令和7年4月1日(2025.4.1)

【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) Cas9タンパク質、(ii)シチジンデアミナーゼ、(iii)ウラシルグリコシラーゼ阻害剤(UGI)タンパク質、および(iv)ガイドRNA(gRNA)を含む、複合体。

【請求項2】

複合体が、標的核酸配列中のシチジンを脱アミノ化する、請求項1に記載の複合体。

【請求項3】

Cas9タンパク質が、Cas9ニッカーゼ(nCas9)である、請求項1または2に記載の複合体。

【請求項4】

nCas9は、配列番号10に示されているアミノ酸配列と少なくとも85%、少なく

50

とも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または少なくとも 99.5% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および、

配列番号 10 に示されているアミノ酸配列はさらに、D10A 変異、または、配列番号 11 ~ 260 および配列番号 4273 ~ 4276 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、請求項 3 に記載の複合体。

【請求項 5】

nCas9 が、配列番号 10 によって提供されるアミノ酸配列における N497A、R661A、Q695A、または Q926A 変異の 1 つ以上、または配列番号 11 ~ 260 および 4273 ~ 4276 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 3 または 4 に記載の複合体。10

【請求項 6】

Cas9 タンパク質が、ヌクレアーゼ不活性型 Cas9 (dCas9) である、請求項 1 または 2 に記載の複合体。

【請求項 7】

dCas9 は、配列番号 10 に示されているアミノ酸配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または少なくとも 99.5% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および、

配列番号 10 に示されているアミノ酸配列はさらに、D10A 変異、または、配列番号 11 ~ 260 および配列番号 4273 ~ 4276 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、請求項 6 に記載の複合体。20

【請求項 8】

dCas9 が、配列番号 10 によって提供されるアミノ酸配列における H840A 変異、または配列番号 11 ~ 260 および 4273 ~ 4276 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、請求項 6 または 7 に記載の複合体。

【請求項 9】

dCas9 が、配列番号 10 によって提供されるアミノ酸配列における N497A、R661A、Q695A、または Q926A 変異の 1 つ以上、または配列番号 11 ~ 260 および 4273 ~ 4276 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 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の複合体。30

【請求項 10】

Cas9 タンパク質は、Staphylococcus aureus からの Cas9 タンパク質 (SaCas9)、ヌクレアーゼ不活性型 SaCas9 (dSaCas9)、SaCas9 ニッカーゼ (nSaCas9)、Streptococcus pyogenes からの Cas9 タンパク質 (SpCas9)、ヌクレアーゼ不活性型 SpCas9 (dSpCas9)、および、SpCas9 ニッカーゼ (nSpCas9) からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の複合体。

【請求項 11】

SaCas9 は、配列番号 4273 または 4274 によって提供されるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の複合体。40

【請求項 12】

SaCas9 が、配列番号 4273 によって提供されるアミノ酸配列における E781K、N967K、または R1014H 変異の 1 つ以上、または配列番号 10 ~ 260 および 4274 ~ 4276 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 10 または 11 に記載の複合体。

【請求項 13】

SpCas9 は、配列番号 4276 によって提供されるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の複合体。

【請求項 14】

SpCas9 が、配列番号 4276 によって提供されるアミノ酸配列における D9A 変50

異、または配列番号 10 ~ 260 および 4273 ~ 4276 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、請求項 10 に記載の複合体。

【請求項 15】

Cas9タンパク質は : *Corynebacterium ulcerans*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Spiroplasma syrphidicola*、*Prevotella intermedia*、*Spiroplasma taiwanense*、*Streptococcus iniae*、*Belliella baltica*、*Psychrophlexus torquisi*、*Streptococcus thermophilus*、*Listeria innocua*、*Campylobacter jejuni*、もしくは*Neisseria meningitidis*からのCas9タンパク質である、請求項 1 または 2 に記載の複合体。

【請求項 16】

Cas9タンパク質は*Neisseria meningitidis*からのCas9タンパク質である、請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の複合体であって、シチジンデアミナーゼが、(i) アポリポ蛋白質 B mRNA 編集複合体 (APOBEC) デアミナーゼファミリーからのデアミナーゼである；

(ii) 配列番号 266 ~ 284、607 ~ 610、5724 ~ 5736、および 5738 ~ 5741 のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または少なくとも 99.5% 同一であるアミノ酸配列を含む；

(iii) 配列番号 266 ~ 284、607 ~ 610、5724 ~ 5736、および 5738 ~ 5741 のアミノ酸配列のいずれかを含む；

(iv) 配列番号 284 の W90Y、R126E、および R132E からなる群から選択される 1 つ以上の変異、または別の APOBEC 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 APOBEC1 (rAPOBEC1) デアミナーゼである；

(v) 配列番号 5724 の W90Y、Q126E、および R132E からなる群から選択される 1 つ以上の変異、または別の APOBEC 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 APOBEC1 (hAPOBEC1) デアミナーゼである；

(vi) 配列番号 275 の W285Y、R320E、および R326E からなる群から選択される 1 つ以上の変異、または別の APOBEC 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 APOBEC3G (hAPOBEC3G) デアミナーゼである；

(vii) 活性化誘導デアミナーゼ (AID) である；または

(viii) *Petromyzon marinus* からのシチジンデアミナーゼ 1 (pmCDA1) である、前記複合体。

【請求項 18】

シチジンデアミナーゼが、ヒトからのシチジンデアミナーゼである、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 19】

シチジンデアミナーゼが、ラットからのシチジンデアミナーゼである、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 20】

APOBEC ファミリーからのデアミナーゼが、APOBEC1 デアミナーゼ、APOBEC2 デアミナーゼ、APOBEC3A デアミナーゼ、APOBEC3B デアミナーゼ、APOBEC3C デアミナーゼ、APOBEC3D デアミナーゼ、APOBEC3F デアミナーゼ、APOBEC3G デアミナーゼ、および APOBEC3H デアミナーゼからなる群から選択される、請求項 17 に記載の複合体。

【請求項 21】

APOBEC ファミリーからのデアミナーゼが、APOBEC3G デアミナーゼである、請求項 17 または 20 に記載の複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

U G I タンパク質が、配列番号 3 2 2 ~ 3 2 4 および 6 0 0 のいずれか 1 つと少なくとも 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 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 3】

U G I タンパク質が、配列番号 3 2 2 ~ 3 2 4 および 6 0 0 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 4】

g R N A が、標的核酸配列に対して相補的である少なくとも 1 0 個の一続きのヌクレオチドの配列を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の複合体。 10

【請求項 2 5】

g R N A が、1 5 ~ 1 0 0 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 6】

標的核酸配列が D N A 配列である、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 7】

標的核酸配列が真核生物のゲノム中にある、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 8】

真核生物が哺乳動物である、請求項 2 7 に記載の複合体。 20

【請求項 2 9】

哺乳動物がヒトである、請求項 2 8 に記載の複合体。

【請求項 3 0】

標的核酸配列が、疾患または異常に関連する配列を含み、シチジンの脱アミノ化が、疾患または異常に関連していない配列をもたらす、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の複合体の、核酸編集のための使用であって、前記使用は、標的核酸配列におけるシチジンの脱アミノ化をもたらす、前記使用。 30

【請求項 3 2】

標的核酸配列は、疾患または異常に関連する点変異を含み、脱アミノ化が、点変異を修正する、請求項 3 1 に記載の複合体の使用。

【請求項 3 3】

標的核酸配列が、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核酸配列をもたらす、請求項 3 2 に記載の複合体の使用。

【請求項 3 4】

疾患または異常に関連する標的核酸配列が、タンパク質をコードし、脱アミノ化が、疾患または異常に関連する標的核酸配列にストップコドンを導入し、コードされるタンパク質の短縮をもたらす、請求項 3 1 に記載の複合体の使用。 40

【請求項 3 5】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の複合体と、標的核酸配列とを接触させることを含む、方法であって、ここで接触させるステップが、インビトロ、エクスピボまたは非ヒト動物のインビボで行われる、前記方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の複合体と、核酸分子とを接触させることを含む、核酸分子を編集するための方法であって、ここで接触させるステップが、インビトロ、エクスピボまたは非ヒト動物のインビボで行われる、前記方法。

【請求項 3 7】

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、標的核酸塩基対を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

標的核酸塩基対が、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核酸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、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

疾患または異常が、囊胞性線維症、フェニルケトン尿症、表皮剥離性角質増殖症(EHK)、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30、32~34および38のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項40】

二本鎖DNA配列を請求項1~28のいずれか一項に記載の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、二本鎖DNA配列が、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り、ここで接触させるステップが、インビトロ、エクスピボまたは非ヒト動物のインビボで行われる、前記方法。

20

【請求項41】

請求項1~25のいずれか一項に記載の複合体の2以上の構成要素をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項42】

請求項41に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項43】

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さらに含む、請求項42に記載のベクター。

30

【請求項44】

請求項1~30のいずれか一項に記載の複合体、請求項41に記載のポリヌクレオチド、または請求項42もしくは43に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項45】

請求項1~30のいずれか一項に記載の複合体、請求項41に記載のポリヌクレオチド、または請求項42もしくは43に記載のベクターの、医薬の製造における使用。

【請求項46】

請求項1~30のいずれか一項に記載の複合体、請求項41に記載のポリヌクレオチド、請求項42もしくは43に記載のベクター、または、請求項44に記載の細胞を含む、核酸編集のためのキット。

40