

【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 6 月 13 日 (2019.6.13)

【公表番号】特表 2018-516556 (P2018-516556A)

【公表日】平成 30 年 6 月 28 日 (2018.6.28)

【年通号数】公開・登録公報 2018-024

【出願番号】特願 2017-559044 (P2017-559044)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/14 (2015.01)

A 6 1 L 27/38 (2006.01)

A 6 1 L 27/50 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 5/10

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 7/00

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 35/14

A 6 1 L 27/38 1 0 0

A 6 1 L 27/50

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 5 月 9 日 (2019.5.9)

【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】

F 1 から F 4、F 1 から F 5 または F 1 から F 6 で表される 4 つ、5 つまたは 6 つのフィンガーを含み、各フィンガーが標的サブサイトを認識する認識ヘリックス領域を含むジंकフィンガータンパク質であって、前記タンパク質は、

(i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F 1 : S T G N L T N (配列番号 7)、

F 2 : T S G S L T R (配列番号 5)、

F 3 : D Q S N L R A (配列番号 2)、及び

F 4 : A Q C C L F H (配列番号 6)、または

(i i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F 1 : D Q S N L R A (配列番号 2) 、
 F 2 : R P Y T L R L (配列番号 3) 、
 F 3 : S R G A L K T (配列番号 8) 、
 F 4 : T S G S L T R (配列番号 5) 、
 F 5 : D Q S N L R A (配列番号 2) 、及び
 F 6 : A Q C C L F H (配列番号 6) 、

(i i i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F 1 : D Q S N L R A (配列番号 2) 、
 F 2 : R N F S L T M (配列番号 9) 、
 F 3 : S N G N L R N (配列番号 10) または S T G N L T N (配列番号 7) または S S
 Y N L A N (配列番号 11) 、
 F 4 : T S G S L T R (配列番号 5) 、
 F 5 : D Q S N L R A (配列番号 2) 、及び
 F 6 : A Q C C L F H (配列番号 6) 、または

(i v) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F 1 : R S D H L T Q (配列番号 13) 、
 F 2 : Q S G H L A R (配列番号 14) 、
 F 3 : Q K G T L G E (配列番号 15) 、
 F 4 : R H R D L S R (配列番号 18) 、及び
 F 5 : R R D N L H S (配列番号 17) 、または

(v) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F 1 : R N D H R T T (配列番号 19) 、
 F 2 : Q K A H L I R (配列番号 20) 、
 F 3 : Q K G T L G E (配列番号 15) 、
 F 4 : R G R D L S R (配列番号 21) または L K R T L K R (配列番号 25) 、及び
 F 5 : R R D N L H S (配列番号 17) 、または

(v i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F 1 : R S D H L T Q (配列番号 13) 、
 F 2 : Q R A H L T R (配列番号 22) 、
 F 3 : Q K G T L G E (配列番号 15) または Q S G T R N H (配列番号 24) 、
 F 4 : H R N T L V R (配列番号 23) 、及び
 F 5 : R R D N L H S (配列番号 17) 、または

(v i i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F 1 : R S D H L T Q (配列番号 13) 、
 F 2 : Q K A H L I R (配列番号 20) 、
 F 3 : Q K G T L G E (配列番号 15) または Q S G T R N H (配列番号 24) 、
 F 4 : R G R D L S R (配列番号 21) 、及び
 F 5 : R R D N L H S (配列番号 17) 、または

(v i i i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F 1 : R S D H L T Q (配列番号 13) 、
 F 2 : Q S G H L A R (配列番号 14) 、
 F 3 : Q S G T R N H (配列番号 24) 、
 F 4 : Q S S D L S R (配列番号 16) 、及び
 F 5 : R R D N L H S (配列番号 17)

からなる群から選択される、前記ジンクフィンガータンパク質。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のジンクフィンガータンパク質及び機能性ドメインを含む、融合タンパク質。

【請求項 3】

前記機能性ドメインは、転写活性化ドメイン、転写抑制ドメイン、または、切断ドメインである、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のジンクフィンガータンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 2 もしくは請求項 3 に記載の融合タンパク質または請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

【請求項 6】

前記細胞は、幹細胞または前駆細胞である、請求項 5 に記載の細胞。

【請求項 7】

前記細胞はヒト細胞である、請求項 6 に記載の細胞。

【請求項 8】

前記細胞のゲノムは融合タンパク質により改変される、請求項 5 ～ 7 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 9】

前記ゲノム改変は、挿入、欠失及びその組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 に記載の細胞。

【請求項 10】

前記ゲノム改変は、BCL11A エンハンサー配列の +58 領域内にある、請求項 8 または 9 に記載の細胞。

【請求項 11】

請求項 5 ～ 10 のいずれかに記載の細胞から作製される、細胞または細胞株。

【請求項 12】

請求項 5 ～ 11 のいずれかに記載の細胞または細胞株に由来する、部分的または完全に分化した細胞。

【請求項 13】

前記細胞は、ゲノム改変を行わない細胞と比較した場合にガンマ及びノまたはベータグロビンの発現増加を示す、請求項 5 ～ 12 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 14】

請求項 2 もしくは請求項 3 に記載の融合タンパク質、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 5 ～ 13 のいずれかに記載の細胞を含む、医薬組成物。

【請求項 15】

細胞の内在性 BCL11a エンハンサー配列を改変するための組成物であって、請求項 2 もしくは請求項 3 に記載の融合タンパク質または請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含み、前記内在性 BCL11a エンハンサー配列が改変されるように、前記組成物が前記細胞に投与されることを特徴とする、前記組成物。

【請求項 16】

外来配列が前記細胞にさらに導入され、前記内在性 BCL11a エンハンサー配列に前記外来配列が挿入されるようにすることを特徴とする、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記改変は欠失を含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

対象においてグロビン生成を増加させるための組成物であって、請求項 5 ～ 13 のいずれかに記載の細胞を含み、前記組成物が前記対象に投与されることを特徴とする、前記組成物。

【請求項 19】

前記対象はヒトであり、前記細胞はヒト幹細胞またはヒト前駆細胞である、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記組成物が骨髄移植で投与され、前記細胞は前記対象内で生着し、分化し、かつ成熟することを特徴とする、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記対象は異常ヘモグロビン症に罹患している、請求項 18 ~ 20 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 22】

前記異常ヘモグロビン症はベータサラセミアまたは鎌状赤血球症である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

内在性 BCL11A エンハンサー配列内にゲノム改変を含む遺伝子改変細胞を作製する方法であって、

- a) 細胞と、請求項 2 または請求項 3 に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを接触させ、ここで、前記融合タンパク質は切断ドメインを含み、
- b) 前記ポリヌクレオチドから前記融合タンパク質の発現が導かれる条件に前記細胞を供し、かつ
- c) 遺伝子改変細胞を作製するために十分な発現融合タンパク質を用いて前記内在性 BCL11A エンハンサー配列を改変する、各工程を含む、前記方法。

【請求項 24】

前記細胞を少なくとも 1 つのサイトカインで刺激することをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のタンパク質、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド及び / または請求項 5 ~ 13 のいずれかに記載の細胞を含む、キット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0219

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0219】

開示は、明瞭な理解を目的とした説明及び実施例で一部が提供されてはいるが、本開示の範囲の趣旨および範囲から逸脱することなく多様な変更及び修正を行うことが可能であることは当業者には明らかとなろう。したがって、上述の記載内容及び実施例により限定されると解釈されるべきではない。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

F1 から F4、F1 から F5 または F1 から F6 で表される 4 つ、5 つまたは 6 つのフィンガーを含み、各フィンガーが標的サブサイトを認識する認識ヘリックス領域を含むジंकフィンガータンパク質であって、前記タンパク質は、

(i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F1：STGNLTN (配列番号 7)、

F2：TSGSLTR (配列番号 5)、

F3：DQSNLRA (配列番号 2)、及び

F4：AQCCLFH (配列番号 6)、または

(ii) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：

F1：DQSNLRA (配列番号 2)、

F2：RPYTLRL (配列番号 3)、

F3：SRGALKT (配列番号 8)、

F4：TSGSLTR (配列番号 5)、

F5：DQSNLRA (配列番号 2)、及び

F 6 : A Q C C L F H (配列番号 6)、
(i i i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：
F 1 : D Q S N L R A (配列番号 2)、
F 2 : R N F S L T M (配列番号 9)、
F 3 : S N G N L R N (配列番号 10) または S T G N L T N (配列番号 7) または S S
Y N L A N (配列番号 11)、
F 4 : T S G S L T R (配列番号 5)、
F 5 : D Q S N L R A (配列番号 2)、及び
F 6 : A Q C C L F H (配列番号 6)、または
(i v) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：
F 1 : R S D H L T Q (配列番号 13)、
F 2 : Q S G H L A R (配列番号 14)、
F 3 : Q K G T L G E (配列番号 15)、
F 4 : R H R D L S R (配列番号 18)、及び
F 5 : R R D N L H S (配列番号 17)、または
(v) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：
F 1 : R N D H R T T (配列番号 19)、
F 2 : Q K A H L I R (配列番号 20)、
F 3 : Q K G T L G E (配列番号 15)、
F 4 : R G R D L S R (配列番号 21) または L K R T L K R (配列番号 25)、及び
F 5 : R R D N L H S (配列番号 17)、または
(v i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：
F 1 : R S D H L T Q (配列番号 13)、
F 2 : Q R A H L T R (配列番号 22)、
F 3 : Q K G T L G E (配列番号 15) または Q S G T R N H (配列番号 24)、
F 4 : H R N T L V R (配列番号 23)、及び
F 5 : R R D N L H S (配列番号 17)、または
(v i i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：
F 1 : R S D H L T Q (配列番号 13)、
F 2 : Q K A H L I R (配列番号 20)、
F 3 : Q K G T L G E (配列番号 15) または Q S G T R N H (配列番号 24)、
F 4 : R G R D L S R (配列番号 21)、及び
F 5 : R R D N L H S (配列番号 17)、または
(v i i i) 以下の認識ヘリックス領域を含むタンパク質：
F 1 : R S D H L T Q (配列番号 13)、
F 2 : Q S G H L A R (配列番号 14)、
F 3 : Q S G T R N H (配列番号 24)、
F 4 : Q S S D L S R (配列番号 16)、及び
F 5 : R R D N L H S (配列番号 17)
からなる群から選択される、前記ジンクフィンガータンパク質。

(項目 2)

項目 1 に記載のジンクフィンガータンパク質及び機能性ドメインを含む、融合タンパク質。

(項目 3)

前記機能性ドメインは、転写活性化ドメイン、転写抑制ドメイン、または、切断ドメインである、項目 2 に記載の融合タンパク質。

(項目 4)

項目 1 ～ 3 のいずれかに記載のジンクフィンガータンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(項目 5)

項目 2 もしくは項目 3 に記載の融合タンパク質または項目 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

(項目 6)

前記細胞は、幹細胞または前駆細胞である、項目 5 に記載の細胞。

(項目 7)

前記細胞はヒト細胞である、項目 6 に記載の細胞。

(項目 8)

前記細胞のゲノムは融合タンパク質により改変される、項目 5 ～ 7 のいずれかに記載の細胞。

(項目 9)

前記ゲノム改変は、挿入、欠失及びその組み合わせからなる群から選択される、項目 8 に記載の細胞。

(項目 1 0)

前記ゲノム改変は、B C L 1 1 A エンハンサー配列の + 5 8 領域内にある、項目 8 または 9 に記載の細胞。

(項目 1 1)

項目 5 ～ 1 0 のいずれかに記載の細胞から作製される、細胞または細胞株。

(項目 1 2)

項目 5 ～ 1 1 のいずれかに記載の細胞または細胞株に由来する、部分的または完全に分化した細胞。

(項目 1 3)

前記細胞は、ゲノム改変を行わない細胞と比較した場合にガンマ及びノまたはベータグロビンの発現増加を示す、項目 5 ～ 1 2 のいずれかに記載の細胞。

(項目 1 4)

項目 2 もしくは項目 3 に記載の融合タンパク質、項目 4 に記載のポリヌクレオチド、または項目 5 ～ 1 3 のいずれかに記載の細胞を含む、医薬組成物。

(項目 1 5)

細胞の内在性 B C L 1 1 a エンハンサー配列を改変する方法であって、前記内在性 B C L 1 1 a エンハンサー配列が改変されるように、項目 2 もしくは項目 3 に記載の融合タンパク質または項目 4 に記載のポリヌクレオチドを、前記細胞に投与することを含む、前記方法。

(項目 1 6)

前記細胞に外来配列を導入し、前記内在性 B C L 1 1 a エンハンサー配列に前記外来配列が挿入されるようにすることをさらに含む、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記改変は欠失を含む、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 8)

対象においてグロビン生成を増加させる方法であって、前記対象に項目 5 ～ 1 3 のいずれかに記載の細胞を投与することを含む、前記方法。

(項目 1 9)

前記対象はヒトであり、前記細胞はヒト幹細胞またはヒト前駆細胞である、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記細胞を骨髓移植で投与し、前記細胞は前記対象内で生着し、分化し、かつ成熟する、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記対象は異常ヘモグロビン症に罹患している、項目 1 8 ～ 2 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 2)

前記異常ヘモグロビン症はベータサラセミアまたは鎌状赤血球症である、項目 2 1 に記

載の方法。

(項目 2 3)

内在性 B C L 1 1 A エンハンサー配列内にゲノム改変を含む遺伝子改変細胞を作製する方法であって、

a) 細胞と、項目 2 または項目 3 に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを接触させ、ここで、前記融合タンパク質は切断ドメインを含み、

b) 前記ポリヌクレオチドから前記融合タンパク質の発現が導かれる条件に前記細胞を供し、かつ

c) 遺伝子改変細胞を作製するために十分な発現融合タンパク質を用いて前記内在性 B C L 1 1 A エンハンサー配列を改変する、各工程を含む、前記方法。

(項目 2 4)

前記細胞を少なくとも 1 つのサイトカインで刺激することをさらに含む、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

項目 1 ~ 3 のいずれかに記載のタンパク質、項目 4 に記載のポリヌクレオチド及び / または項目 5 ~ 1 3 のいずれかに記載の細胞を含む、キット。