

【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 3 年 7 月 26 日 (2021.7.26)

【公表番号】特表 2020-524497 (P2020-524497A)

【公表日】令和 2 年 8 月 20 日 (2020.8.20)

【年通号数】公開・登録公報 2020-033

【出願番号】特願 2019-567686 (P2019-567686)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/22 (2006.01)

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (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)

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 38/16 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 9/22 Z N A

C 1 2 N 15/55

C 1 2 N 15/63 Z

C 0 7 K 19/00

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

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 38/16

A 6 1 K 48/00

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 6 月 4 日 (2021.6.4)

【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】

野生型化膿レンサ球菌 (Staphylococcus pyogenes) Cas 9 (SPCas 9) と比較して、以下の位置：D 2 3、D 1 2 5 1、Y 1 2 8、T 6 7、N 4 9 7、R 6 6 1、Q 6 9 5、及び／又は Q 9 2 6 の 1 つ以上にてアミノ酸置換を含む、単離 S P C a s 9 ポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 13 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む単離 S P C a s 9 ポリペプチドであって、配列番号 13 の以下の位置：D 2 3、D 1 2 5 1、Y 1 2 8、T 6 7、N 4 9 7、R 6 6 1、Q 6 9 5、及び／又は Q 9 2 6 の 1 つ以上にてアミノ酸置換を含む、単離 S P C a s 9 ポリペプチド。

【請求項 3】

以下のアミノ酸置換：D 2 3 A、Y 1 2 8 V、T 6 7 L、N 4 9 7 A、D 1 2 5 1 G、R 6 6 1 A、Q 6 9 5 A、及び／又は Q 9 2 6 A の 1 つ以上を含む、請求項 1 又は請求項 2 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D 2 3 A／Y 1 2 8 V／D 1 2 5 1 G／T 6 7 L を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 5】

異種機能ドメインに、場合によってはリンカーが介在して融合する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチドを含む融合タンパク質であって、前記リンカーは、前記融合タンパク質の活性に干渉しない、融合タンパク質。

【請求項 6】

前記異種機能ドメインは：V P 6 4、N F ー カ ッ プ B p 6 5、K r u e p p e l 関連ボックス (K R A B) ドメイン、E R F リ プ レ ッ サ ド メ イ ン (E R D)、m S i n 3 A 相互作用ドメイン (S I D)、ヘテロクロマチンタンパク質 1 (H P 1)、DNA メチルトランスフェラーゼ (D N M T)、T E T タンパク質、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (H A T)、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ (H M T)、又はヒストンデメチラーゼ (H D M)、M S 2、C s y 4、ラムダ N タンパク質、及び F o k I からなる群から選択される、請求項 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチドを含むゲノム編集系。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド、請求項 7 に記載のゲノム編集系、請求項 8 に記載の核酸、及び／又は請求項 9 に記載のベクター、並びに、場合によっては、薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物。

【請求項 11】

細胞を変更する方法であって、前記細胞を、請求項 10 に記載の組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 12】

患者を処置する方法 において用いるための、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 13】

配列番号 13 と少なくとも約 80 % 同一のアミノ酸配列を含み、且つ配列番号 13 の位置 D 2 3、T 6 7、Y 1 2 8、及び D 1 2 5 1 の 1 つ以上にてアミノ酸置換を有するポリペプチド。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のポリペプチド であって、

(a) 前記ポリペプチドは、D 2 3 にてアミノ酸置換を含む；

(b) 前記ポリペプチドは、D 2 3 にてアミノ酸置換を、且つ T 6 7、Y 1 2 8、又は D 1 2 5 1 にて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む；

(c) 前記ポリペプチドは、D 2 3 にてアミノ酸置換を、且つ T 6 7、Y 1 2 8、又は D

1 2 5 1 にて少なくとも 2 つのアミノ酸置換を含む；

(d) 前記ポリペプチドは、T 6 7 にてアミノ酸置換を含む；

(e) 前記ポリペプチドは、T 6 7 にてアミノ酸置換を、且つ D 2 3、Y 1 2 8、又は D 1 2 5 1 にて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む；

(f) 前記ポリペプチドは、T 6 7 にてアミノ酸置換を、且つ D 2 3、Y 1 2 8、又は D 1 2 5 1 にて少なくとも 2 つの置換を含む；

(g) 前記ポリペプチドは、Y 1 2 8 にてアミノ酸置換を含む；

(h) 前記ポリペプチドは、Y 1 2 8 にてアミノ酸置換を、且つ D 2 3、T 6 7、又は D 1 2 5 1 にて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む；

(i) 前記ポリペプチドは、Y 1 2 8 にてアミノ酸置換を、且つ D 2 3、T 6 7、又は D 1 2 5 1 にて少なくとも 2 つの置換を含む；

(j) 前記ポリペプチドは、D 1 2 5 1 にてアミノ酸置換を含む；

(k) 前記ポリペプチドは、D 1 2 5 1 にて置換を、且つ D 2 3、T 6 7、又は Y 1 2 8 にて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む；

(l) 前記ポリペプチドは、D 1 2 5 1 にてアミノ酸置換を、且つ D 2 3、T 6 7、又は Y 1 2 8 にて少なくとも 2 つの置換を含む；又は、

(m) 前記ポリペプチドは、D 2 3、T 6 7、Y 1 2 8、及び D 1 2 5 1 にてアミノ酸置換を含む、
ポリペプチド。

【請求項 15】

請求項 1 3 又は請求項 1 4 に記載のポリペプチドであって、

前記ポリペプチドが標的二本鎖 DNA (dsDNA) と接触した場合、オフターゲット編集率が、野生型 SPCas9 による標的の観察オフターゲット編集率よりも低く、

任意選択で、前記ポリペプチドによるオフターゲット編集率は、野生型 SPCas9 よりも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、又は 80 % 低く、

前記オフターゲット編集率は、オフターゲット部位でのインデルのレベル（例えば、割合又はパーセンテージ）を評価することによって測定されてよい、
ポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号 1 3 と少なくとも約 80 % 同一のアミノ酸配列を含み、且つ以下のアミノ酸置換：D 2 3 A、T 6 7 L、Y 1 2 8 V、及び D 1 2 5 1 G の 1 つ以上を含むポリペプチド
。

【請求項 17】

請求項 1 6 に記載のポリペプチドであって、

(a) 前記ポリペプチドは、D 2 3 A を含む；

(b) 前記ポリペプチドは、D 2 3 A、並びに T 6 7 L、Y 1 2 8 V、及び D 1 2 5 1 G の少なくとも 1 つを含む；

(c) 前記ポリペプチドは、D 2 3 A、並びに T 6 7 L、Y 1 2 8 V、及び D 1 2 5 1 G の少なくとも 2 つを含む；

(d) 前記ポリペプチドは、T 6 7 L を含む；

(e) 前記ポリペプチドは、T 6 7 L、並びに D 2 3 A、Y 1 2 8 V、及び D 1 2 5 1 G の少なくとも 1 つを含む；

(f) 前記ポリペプチドは、T 6 7 L、並びに D 2 3 A、Y 1 2 8 V、及び D 1 2 5 1 G の少なくとも 2 つを含む；

(g) 前記ポリペプチドは、Y 1 2 8 V を含む；

(h) 前記ポリペプチドは、Y 1 2 8 V、並びに D 2 3 A、T 6 7 L、及び D 1 2 5 1 G の少なくとも 1 つを含む；

(i) 前記ポリペプチドは、Y 1 2 8 V、並びに D 2 3 A、T 6 7 L、及び D 1 2 5 1 G の少なくとも 2 つを含む；

(j) 前記ポリペプチドは、D 1 2 5 1 Gを含む；

(k) 前記ポリペプチドは、D 1 2 5 1 G、並びにD 2 3 A、T 6 7 L、及びY 1 2 8 Vの少なくとも1つを含む；

(l) 前記ポリペプチドは、D 1 2 5 1 G、並びにD 2 3 A、T 6 7 L、及びY 1 2 8 Vの少なくとも2つを含む；又は

(m) 前記ポリペプチドは、D 2 3 A、T 6 7 L、Y 1 2 8 V、及びD 1 2 5 1 Gを含む

、

ポリペプチド。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 又は請求項 1 7 に記載のポリペプチドであって、

前記ポリペプチドが二本鎖DNA (dsDNA) 標的と接触する場合、オフターゲット編集率が、野生型SPCas9による標的の観察オフターゲット編集率よりも低く、

任意選択で、前記ポリペプチドによるオフターゲット編集率は、野生型SPCas9よりも約5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、又は80%低く、

前記オフターゲット編集率は、オフターゲット部位でのインデルのレベル（例えば、割合又はパーセンテージ）を評価することによって測定されてよい、

ポリペプチド。

【請求項 1 9】

請求項 1 3 又は請求項 1 6 に記載のポリペプチド、並びに核局在化配列、細胞膜透過ペプチド配列、及び／又は親和性タグの1つ以上を含む融合タンパク質。

【請求項 2 0】

異種機能ドメインに、場合によってはリンカーが介在して融合する、請求項 1 3 又は請求項 1 6 に記載のポリペプチドを含む融合タンパク質であって、前記リンカーは、前記融合タンパク質の活性に干渉しない、融合タンパク質。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の融合タンパク質であって、

(a) 前記異種機能ドメインは、転写トランス活性化ドメインであり、任意選択で、前記転写トランス活性化ドメインは、VP64又はNFκB p65に由来してよい；

(b) 前記異種機能ドメインは、転写サイレンサ又は転写抑制ドメインであり、任意選択で、前記転写抑制ドメインは、Krueppel関連ボックス (KRAB) ドメイン、ERFリプレッサドメイン (ERD)、又はmSin3A相互作用ドメイン (SID) であってよく、又は前記転写サイレンサは、ヘテロクロマチンタンパク質1 (HP1) であってよい；

(c) 前記異種機能ドメインは、DNAのメチル化状態を修飾する酵素であり、任意選択で、DNAのメチル化状態を修飾する前記酵素は、DNAメチルトランスフェラーゼ (DNMT) 又はTE Tタンパク質であってよく、前記TE Tタンパク質は、TE T I であってよい；

(d) 前記異種機能ドメインは、ヒストンサブユニットを修飾する酵素であり、任意選択で、ヒストンサブユニットを修飾する前記酵素は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT)、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ (HMT)、又はヒストンデメチラーゼであってよい；

(e) 前記異種機能ドメインは、生物学的テザーであり、任意選択で、前記生物学的テザーは、MS2、Csy4、又はラムダNタンパク質であってよい；又は、

(f) 前記異種機能ドメインは、FokIである、融合タンパク質。

【請求項 2 2】

請求項 1 3 ～ 1 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする単離核酸。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の単離核酸を含むベクター。

【請求項 24】

請求項 23 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 25】

細胞の集団を遺伝的に操作する方法であって、

前記細胞内で請求項 13 ～ 18 のいずれか一項に記載のポリペプチド、並びに前記細胞のゲノムの標的核酸上の標的配列と相補的な領域を有するガイド核酸を発現させ、又は前記細胞を前記ポリペプチド及び前記ガイド核酸と接触させることによって、少なくとも複数の前記細胞のゲノムを変更することを含む、方法。

【請求項 26】

二本鎖 DNA (dsDNA) 分子の集団を編集する方法であって、

dsDNA 分子を、請求項 13 ～ 18 のいずれか一項に記載のポリペプチド、並びに前記 dsDNA 分子の標的配列と相補的な領域を有するガイド核酸と接触させることによって、複数の前記 dsDNA 分子を編集することを含む方法。

【請求項 27】

請求項 25 又は 26 に記載の方法であって、

前記ポリペプチドによるオフターゲット編集率は、野生型 SPCas9 による標的配列の観察オフターゲット編集率よりも低く、

任意選択で、前記ポリペプチドによるオフターゲット編集率は、野生型 SPCas9 よりも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、又は 80 % 低く、

前記オフターゲット編集率は、オフターゲット部位でのインデルのレベル（例えば、割合又はパーセンテージ）を評価することによって測定されてよい、方法。

【請求項 28】

請求項 25 ～ 27 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記ポリペプチド及び前記ガイド核酸は、リボ核タンパク質 (RNP) として投与され、任意選択で、前記 RNP は、 $1 \times 10^{-4} \mu\text{M} \sim 1 \mu\text{M}$ RNP の用量にて投与されてよい、方法。