

【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2年2月27日(2020.2.27)

【公表番号】特表2018-537963(P2018-537963A)

【公表日】平成30年12月27日(2018.12.27)

【年通号数】公開・登録公報2018-050

【出願番号】特願2018-521045(P2018-521045)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)
C 1 2 N	15/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/55	(2006.01)
C 1 2 N	15/31	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 0 7 K	14/315	(2006.01)
C 1 2 N	15/52	(2006.01)
C 1 2 N	9/10	(2006.01)
C 1 2 N	9/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/11	(2006.01)
C 0 7 K	7/06	(2006.01)
C 0 7 K	7/08	(2006.01)
C 0 7 K	5/083	(2006.01)
A 0 1 K	67/027	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(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	9/14	(2006.01)
C 0 7 K	14/035	(2006.01)
C 0 7 K	14/05	(2006.01)
C 0 7 K	14/46	(2006.01)
C 1 2 N	15/54	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/38	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/02	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/12	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/18	(2006.01)
A 6 1 P	19/02	(2006.01)
A 6 1 P	21/00	(2006.01)
A 6 1 P	21/02	(2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 P 7/04 (2006.01)
A 6 1 K 38/50 (2006.01)
A 6 1 K 47/65 (2017.01)
A 6 1 K 47/54 (2017.01)
A 6 1 K 38/45 (2006.01)
A 6 1 K 38/43 (2006.01)
A 6 1 K 47/26 (2006.01)
C 4 0 B 10/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 1 2 N 9/16 Z
 C 1 2 N 15/10 2 0 0 Z
 C 1 2 N 15/55
 C 1 2 N 15/31
 C 0 7 K 19/00
 C 1 2 N 15/62 Z
 C 0 7 K 14/315
 C 1 2 N 15/52 Z
 C 1 2 N 9/10
 C 1 2 N 9/00
 C 1 2 N 9/16 A
 C 1 2 N 15/11 Z
 C 0 7 K 7/06
 C 0 7 K 7/08
 C 0 7 K 5/083
 A 0 1 K 67/027
 C 1 2 N 15/63 Z
 C 1 2 M 1/00 A
 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 9/14
 C 0 7 K 14/035
 C 0 7 K 14/05
 C 0 7 K 14/46
 C 1 2 N 15/54
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/38
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 13/02
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 19/02

A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	7/04	
A 6 1 K	38/50	
A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	38/45	
A 6 1 K	38/43	
A 6 1 K	47/26	
C 4 0 B	10/00	

【手続補正書】**【提出日】** 令和2年1月10日 (2020.1.10)**【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】**

配列番号 9 ~ 2 6 2 のいずれか 1 つにより示される C a s 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 パーセント同一であるアミノ酸配列を含み、

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 6 2、2 6 7、2 9 4、4 0 5、4 0 9、4 8 0、5 4 3、6 9 4、1 2 1 9、1 2 2 4、1 2 5 6 および 1 3 6 2 からなる群から選択されるアミノ酸残基において、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応するアミノ酸残基において、少なくとも 1 つ の変異を含み、

C a s 9 蛋白質が、古典的 P A M を含まない標的配列に対する増加した活性を示す、組み換え C a s 9 蛋白質。

【請求項 2】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の X 2 6 2 T、X 2 6 7 G、X 2 9 4 R、X 4 0 5 I、X 4 0 9 I、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 6 9 4 I、X 1 2 1 9 V、X 1 2 2 4 K、X 1 2 5 6 K および X 1 3 6 2 P、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、からなる群から選択される少なくとも 1 つ の変異を含み、X がいずれかのアミノ酸を表す、請求項 1 に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 3】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の A 2 6 2 T、S 2 6 7 G、K 2 9 4 R、F 4 0 5 I、S 4 0 9 I、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、M 6 9 4 I、E 1 2 1 9 V、N 1 2 2 4 K、Q 1 2 5 6 K および L 1 3 6 2 P、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、からなる群から選択される少なくとも 1 つ の変異を含む、請求項 1 または 2 に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 4】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の X 1 2 1 9 V 変異、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、を含み、X がいずれかのアミノ酸を表す、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 5】

X 1 2 1 9 V 変異が、E 1 2 1 9 V 変異である、請求項 4 に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 6】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の以下の群の変異のいずれか 1 つ：

X 4 8 0 K、X 5 4 3 D および X 1 2 1 9 V 変異；

X 2 6 2 T、X 4 0 9 I、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 6 9 4 I および X 1 2 1 9 V 変異；

X 2 9 4 R、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 1 2 1 9 V、X 1 2 5 6 K および X 1 3 6 2 P 変異；

X 2 9 4 R、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 1 2 1 9 V および X 1 2 5 6 K 変異；

X 2 6 7 G、X 2 9 4 R、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 1 2 1 9 V、X 1 2 2 4 K および X 1 2 5 6 K 変異；ならびに

X 2 6 2 T、X 4 0 5 I、X 4 0 9 I、X 4 8 0 K、X 5 4 3 D、X 6 9 4 I および X 1 2 1 9 V 変異、

または配列番号 1 0 ～ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、を含み、X がいずれかのアミノ酸を表す、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 7】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の以下の群の変異のいずれか 1 つ：

E 4 8 0 K、E 5 4 3 D および E 1 2 1 9 V 変異；

A 2 6 2 T、S 4 0 9 I、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、M 6 9 4 I および E 1 2 1 9 V 変異；

K 2 9 4 R、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、E 1 2 1 9 V、Q 1 2 5 6 K および L 1 3 6 2 P 変異；

K 2 9 4 R、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、E 1 2 1 9 V および Q 1 2 5 6 K 変異；

S 2 6 7 G、K 2 9 4 R、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、E 1 2 1 9 V、N 1 2 2 4 K および Q 1 2 5 6 K 変異；ならびに

A 2 6 2 T、F 4 0 5 I、S 4 0 9 I、E 4 8 0 K、E 5 4 3 D、M 6 9 4 I および E 1 2 1 9 V 変異、

または配列番号 1 0 ～ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 8】

C a s 9 蛋白質が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の D I O A および / または H 8 4 0 A 変異、または配列番号 1 0 ～ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異、を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 9】

C a s 9 蛋白質が、配列番号 9 に示される Streptococcus pyogenes の C a s 9 と比較して、3' 末端に古典的 P A M (5' - N G G - 3') を含まない標的配列に対する増加した活性を示す、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 10】

C a s 9 蛋白質が、R u v C および H N H ドメインを含む、請求項 9 に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 11】

C a s 9 蛋白質が、古典的 P A M 配列 (5' - N G G - 3') と直接隣接していない 3' 末端を有する標的配列に対する活性を示し、同じ標的配列に対する、配列番号 9 に示される Streptococcus pyogenes の Cas 9 の活性と比較し、少なくとも 5 倍増加している、請求項 9 または 11 に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 12】

標的配列の 3' 末端が、A G C、G A G、T T T、G T G、C A A、C A C、G A T、

T A A、A C G、C G A、A G G、C G T、A A A、A A C、A A G、A A T、C A G、C A T、G A A、G A C、T A C、T A G、T A T、A C A、A C C、A C T、C C A、C C C、C C G、C C T、G C A、G C C、G C G、G C T、T C A、T C C、T C G、T C T、A G A、A G T、C G C、G G A、G G C、G G T、T G A、T G C、T G T、A T A、A T C、A T G、A T T、C T A、C T C、C T G、C T T、G T A、G T C、G T T、T T A、T T C、または T T G 配列と直接隣接している、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質。

【請求項 13】

配列番号 9 ~ 262 のいずれか 1 つにより示される C a s 9 のアミノ酸配列と少なくとも 90 パーセント同一であるアミノ酸配列を含み、

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 122、137、182、660 および 1329 からなる群から選択されるアミノ酸残基、または配列番号 10 ~ 262 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応するアミノ酸残基において、少なくとも 1 つの変異を含み、

組み換え C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、天然に存在する C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列と同一でない、組み換え C a s 9 蛋白質。

【請求項 14】

C a s 9 蛋白質またはその断片がエフェクタードメインと融合し、それにより融合蛋白質を形成する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質を含む融合蛋白質。

【請求項 15】

C a s 9 蛋白質およびエフェクタードメインが、リンカーを介して融合する、請求項 14 に記載の融合蛋白質。

【請求項 16】

エフェクタードメインが、核酸編集ドメインである、請求項 14 または 15 に記載の融合蛋白質。

【請求項 17】

核酸編集ドメインが、デアミナーゼドメインである請求項 16 に記載の融合蛋白質。

【請求項 18】

デアミナーゼドメインが、シトシンデアミナーゼまたはシチジンデアミナーゼである、請求項 17 に記載の融合蛋白質。

【請求項 19】

デアミナーゼドメインが、アポリボ蛋白質 B m R N A 編集複合体 (A P O B E C) フ
ァミリーのデアミナーゼを含む、請求項 18 に記載の融合蛋白質。

【請求項 20】

リンカーが、(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 S E T P G T S E S A T P E S (配列番号 7) または (X P)_n モチーフ、またはこれらのいずれかの組合せを含み、n が独立に 1 ~ 30 の整数である、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 21】

エフェクタードメインが、ヌクレアーゼドメイン、ニッカーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、デアミナーゼドメイン、メチルトランスフェラーゼドメイン、メチラーゼドメイン、アセチラーゼドメイン、アセチルトランスフェラーゼドメイン、転写アクチベータードメインまたは転写リプレッサードメインを含む、請求項 14 ~ 20 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 22】

エフェクタードメインが、ヌクレアーゼドメインである、請求項 14 ~ 21 のいずれか
一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 23】

ヌクレアーゼドメインが、F o k I D N A 切断ドメインである、請求項 22 に記載の

融合蛋白質。

【請求項 2 4】

請求項 1 4 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の融合蛋白質の二量体。

【請求項 2 5】

第 2 の C a s 9 蛋白質に融合した請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質を含む、融合蛋白質。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質または請求項 1 4 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の融合蛋白質と、当該 C a s 9 蛋白質または当該 C a s 9 融合蛋白質と結合するガイド RNA と、を含む複合体。

【請求項 2 7】

DNA 分子に：

(a) 請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質または請求項 1 4 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の融合蛋白質と、約 1 5 ~ 1 0 0 ヌクレオチド長であり、標的配列と相補的な少なくとも 1 0 の連続するヌクレオチドを含む、ガイド RNA と、を接触させること、または、

(b) 請求項 2 6 に記載の複合体を接触することを含む方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質または請求項 1 4 ~ 2 3 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 2 9】

請求項 2 8 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 3 0】

請求項 2 8 に記載のポリヌクレオチドおよびガイド RNA をコードするヌクレオチド配列を含む、ベクター。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の C a s 9 蛋白質、請求項 1 4 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の融合蛋白質、請求項 2 6 に記載の複合体、または請求項 2 8 に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

【請求項 3 2】

C a s 9 蛋白質のアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 6 2、2 6 7、2 9 4、4 0 5、4 0 9、4 8 0、5 4 3、6 9 4、1 2 1 9、1 2 2 4、1 2 5 6 および 1 3 6 2 からなる群から選択されるアミノ酸残基において、または配列番号 1 0 ~ 2 6 2 に示されるアミノ酸配列のいずれかの対応するアミノ酸残基において、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つの変異を含み、

C a s 9 蛋白質が、古典的 P A M を含まない標的配列に対する増加した活性を示す、請求項 1 に記載の組み換え C a s 9 蛋白質。

【請求項 3 3】

医薬としての使用のための、請求項 1 4 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の融合蛋白質。

【請求項 3 4】

医薬としての使用のための、請求項 2 6 に記載の複合体。