

【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5月13日(2025.5.13)

【国際公開番号】WO2022/236147  
 【公表番号】特表2024-518413(P2024-518413A)  
 【公表日】令和6年5月1日(2024.5.1)  
 【年通号数】公開公報(特許)2024-080  
 【出願番号】特願2023-568340(P2023-568340)  
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 9/22(2006.01)  
 C 1 2 N 15/55(2006.01)  
 C 1 2 N 15/09(2006.01)  
 C 1 2 N 15/11(2006.01)  
 C 1 2 N 5/10(2006.01)  
 C 1 2 N 15/63(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 9/22 Z N A  
 C 1 2 N 15/55  
 C 1 2 N 15/09 1 1 0  
 C 1 2 N 15/11 Z  
 C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 N 15/63 Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和7年5月1日(2025.5.1)

【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

30

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸誘導型ヌクレアーゼを含む組成物であって、前記核酸誘導型ヌクレアーゼがV型CRISPRヌクレアーゼポリペプチドを含み、前記ポリペプチドのN末端もしくはC末端またはそれらの付近に少なくとも1つの核局在シグナル(NLS)を含む、組成物。

【請求項2】

前記ヌクレアーゼが、Va型ヌクレアーゼである、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記V型CRISPRヌクレアーゼポリペプチドが、配列番号1と少なくとも60%の配列同一性を有する、請求項1または2に記載の組成物。

40

【請求項4】

前記V型CRISPRヌクレアーゼポリペプチドが、2つのNLSを含み、そのうちの1つまたはその両方が前記ポリペプチドの前記N末端もしくは前記C末端またはそれらの付近にある、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】

前記V型CRISPRヌクレアーゼポリペプチドが、3つのNLSを含み、その各々が前記ポリペプチドの前記N末端もしくは前記C末端またはそれらの付近にある、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】

50

前記V型CRISPRヌクレアーゼポリペプチドが、4つのNLSを含み、その各々が前記ポリペプチドの前記N末端もしくは前記C末端またはそれらの付近にある、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項7】

前記V型CRISPRヌクレアーゼポリペプチドが、少なくとも5つのNLSを含み、その各々が前記ポリペプチドの前記N末端もしくは前記C末端またはそれらの付近にある、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項8】

前記NLSの少なくとも2つが、前記ポリペプチドの前記N末端またはその付近にある、請求項4～7のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項9】

前記NLSの少なくとも3つが、前記ポリペプチドの前記N末端またはその付近にある、請求項5～7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項10】

前記NLSの少なくとも4つが、前記ポリペプチドの前記N末端またはその付近にある、請求項6～7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項11】

前記5つのNLSが、前記ポリペプチドの前記N末端またはその付近にある、請求項7に記載の組成物。

【請求項12】

配列番号109～112のいずれか1つに少なくとも60%同一の配列を含む、請求項11に記載の組成物。

20

【請求項13】

前記V型CRISPRヌクレアーゼポリペプチドが、少なくとも1～30のNLSを含み、そのそれぞれが、前記ポリペプチドの前記N末端もしくは前記C末端またはそれらの付近にある、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

前記NLSの少なくとも2つが、異なる核局在機構を有する、請求項4～11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項15】

前記NLSの少なくとも3つが、異なる核局在機構を有する、請求項5～7または9～11のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項16】

前記NLSのうち1つ以上が、SV40ウイルスの大型T抗原のNLS、ヌクレオプラスミンからのNLS、ヌクレオプラスミン二部構成NLS、c-myc NLS、hRNPA1 M9 NLS、インポーチンアルファNLSのIBBドメイン、筋腫タンパク質NLS、ヒトp53 NLS由来の配列、マウスc-abl IV NLS由来の配列、インフルエンザウイルスNS1 NLSの配列、肝炎ウイルスデルタ抗原NLSの配列、マウスMx1タンパク質NLSの配列、ヒトポリ(A DP-リボース)ポリメラーゼNLSの配列、ステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイドNLSの配列、及び/またはEGL-13 NLSの配列を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の組成物。

40

【請求項17】

前記NLSのうち1つ以上が、前記SV40ウイルスの大型T抗原のNLS、ヌクレオプラスミンからのNLS、c-myc NLS、またはEGL-13 NLSを含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】

前記NLSのうち2つ以上が、前記SV40ウイルスの大型T抗原のNLSを含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項19】

50

前記 N L S の 1 つまたは複数において、前記 S V 4 0 ウイルスの大型 T 抗原の N L S が、配列番号 5 の配列を含み、前記ヌクレオプラスミンからの N L S が、配列番号 6 の配列を含み、前記 c - m y c N L S が、配列番号 7、配列番号 8 または配列番号 2 1 の配列を含み、および / または前記 E G L - 1 3 N L S が、配列番号 1 0 7 の配列を含む、請求項 1 7 または 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記 V 型 C R I S P R ヌクレアーゼポリペプチドが、精製タグをさらに含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記精製タグが、前記ヌクレアーゼポリペプチドの前記 N 末端またはその付近にある、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記精製タグが、ポリ - h i s タグ、マルトース結合タンパク質 ( m b p )、N 末端グルタチオン S - トランスフェラーゼ ( G S T )、またはカルモジュリン結合ペプチド ( C B P ) を含む、請求項 2 0 または 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記ポリ - h i s タグが、g l y - 6 x H i s タグまたは g l y - 8 x H i s タグを含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記 V 型 C R I S P R ヌクレアーゼポリペプチドが、切断部位をさらに含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記切断部位が、前記ヌクレアーゼポリペプチドの N 末端またはその付近にある、請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記切断部位が、タバコエッチ病ウイルス ( T E V ) 切断部位を含む、請求項 2 4 または 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記切断部位が、配列番号 1 0 8 の配列を含む、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記ポリペプチドの N 末端またはその付近に 5 つの N L S、精製タグ、及び前記切断部位を含み、前記切断部位が、前記精製タグの後にある、請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

配列番号 1 1 1 または 1 1 2 に少なくとも 6 0 % 同一の配列を含む、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

ポリヌクレオチド内の標的ヌクレオチド配列、または g N A をコードするポリヌクレオチドを標的とするスペーサー配列を含むガイド核酸 ( g N A ) をさらに含む、前記 g N A は、前記 V 型 C R I S P R ヌクレアーゼと適合性である、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記標的ヌクレオチドが、前記 V 型 C R I S P R ヌクレアーゼに特異的なプロトスペーサー隣接モチーフ ( P A M ) 配列の 5 0 ヌクレオチド以内にある、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記 P A M が、Y T T N の配列を含み、式中、Y は、T または C であり、かつ N は、A、T、G または C である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記 P A M が、Y T T V または T T T V の配列を含み、式中、V は、A、G または C で

10

20

30

40

50

ある、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記 g N A が、g R N A である、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記 g R N A が、二本鎖 g R N A である、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記組成物が、前記 g R N A を含み、前記 g R N A が、1 つ以上の化学修飾を含む、請求項 3 4 または 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記化学修飾が、2' - O - アルキル、2' - O - メチル、ホスホロチオエート、ホスホ 10 ノアセテート、チオホスホノアセテート、2' - O - メチル - 3' - ホスホロチオエート、2' - O - メチル - 3' - ホスホノアセテート、2' - O - メチル - 3' - チオホスホノアセテート、2' - デオキシ - 3' - ホスホノアセテート、2' - デオキシ - 3' - チオホスホノアセテート、好適な代替物、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記 g R N A 中のグアニン：ウラシルの比が、少なくとも 5 1 : 4 9 である、請求項 3 4 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記 g N A 対 V 型 C R I S P R ヌクレアーゼのモル比が、少なくとも 1 . 1 : 1 である、請求項 3 0 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。 20

【請求項 4 0】

前記 g N A のモル量が、少なくとも 1 0 p m o l 及び / または 3 0 0 p m o l 以下である、請求項 3 0 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

ドナーテンプレートをさらに含む、請求項 3 0 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記ドナーテンプレートが、相同性アームを含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記ドナーテンプレートが、少なくとも 0 . 1 μ g μ L <sup>-1</sup> 及び / または 1 0 μ g μ L <sup>-1</sup> 以下の量で存在する、請求項 4 1 または 4 2 に記載の組成物。 30

【請求項 4 4】

アニオン性ポリマーをさらに含む、請求項 3 0 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記アニオン性ポリマーが、ポリグルタミン酸 ( P G A ) を含む、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記アニオン性ポリマーが、少なくとも 2 0 μ g μ L <sup>-1</sup> 、及び / または 1 0 0 0 μ g μ L <sup>-1</sup> 以下の濃度で存在する、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

請求項 1 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む細胞。 40

【請求項 4 8】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 4 7 に記載の細胞。

【請求項 4 9】

前記細胞が、免疫細胞または幹細胞である、請求項 4 8 に記載の細胞。

【請求項 5 0】

前記細胞が、T 細胞または人工多能性幹細胞 ( i P S C ) である、請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 5 1】

( i ) 請求項 3 0 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることと、( i i ) 50

前記ヌクレアーゼ及び前記ガイド核酸に、標的ゲノム領域を修飾させることができるようにすることと、を含む、標的ポリヌクレオチドを修飾するための方法。

【請求項 5 2】

前記組成物が、請求項 4 1 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の組成物である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記標的ポリヌクレオチドが、細胞内のゲノムまたはゲノムの一部である、請求項 5 1 または 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 5 3 に記載の方法。

10

【請求項 5 5】

前記細胞が、免疫細胞または幹細胞である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記細胞が、T細胞またはiPSCである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記ドナーテンプレートが、前記標的ポリヌクレオチド中の前記標的ヌクレオチド配列の 5 0 ヌクレオチド内の P A M における変異を含む、請求項 5 2 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記組成物が、請求項 5 2 に記載の組成物であり、前記ドナーテンプレートが、前記細胞によって発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 5 3 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5 9】

前記細胞によって発現される前記ポリペプチドがキメラ抗原受容体 ( C A R ) またはその一部を含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記細胞が、ヒト T 細胞またはヒト iPSC である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

V 型 C R I S P R ヌクレアーゼポリペプチドを含む核酸誘導型ヌクレアーゼを含むポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記ポリヌクレオチドが、配列番号 2 2 に対して 7 5 % 未満の配列同一性を有する組成物。

30

【請求項 6 2】

前記ヌクレアーゼポリペプチドが、少なくとも 1、2、3、4、または 5 の N L S を含み、前記 N L S の各々が、前記ヌクレアーゼポリペプチドの N 末端もしくは C 末端またはそれらの付近である、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 3】

前記 N L S のうちの 1 つ以上が、S V 4 0 ウイルスの大型 T 抗原の N L S、ヌクレオプラスミンからの N L S、ヌクレオプラスミン二部構成 N L S、c - m y c N L S、h R N P A 1 M 9 N L S、インポーチンアルファ N L S の I B B ドメイン、筋腫 T タンパク質 N L S、ヒト p 5 3 N L S 由来の配列、マウス c - a b 1 I V N L S 由来の配列、インフルエンザウイルス N S 1 N L S の配列、肝炎ウイルスデルタ抗原 N L S の配列、マウス M x 1 タンパク質 N L S の配列、ヒトポリ ( A D P - リボース ) ポリメラーゼ N L S の配列、ステロイドホルモン受容体 ( ヒト ) グルココルチコイド N L S の配列、及び / または E G L - 1 3 N L S の配列を含む、請求項 6 2 に記載の組成物。

40

【請求項 6 4】

前記 N L S のうちの 1 つ以上が、前記 S V 4 0 ウイルスの大型 T 抗原の N L S、ヌクレオプラスミンからの N L S、c - m y c N L S、および / または E G L - 1 3 N L S を含む、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

前記 N L S の 1 つ又は複数において、前記 S V 4 0 ウイルスの大型 T 抗原の N L S が、

50

配列番号 5 の配列を含み、前記ヌクレオプラスミンからの N L S が、配列番号 6 の配列を含み、前記 c - m y c N L S が、配列番号 7、配列番号 8 または配列番号 2 1 の配列を含み、および / または前記 E G L - 1 3 N L S が、配列番号 1 0 7 の配列を含む、請求項 6 4 に記載の組成物。

【請求項 6 6】

前記 N L S の 1 つ又は複数が、前記ポリペプチドの前記 N 末端またはその付近にある、請求項 6 2 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 7】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、精製タグをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 6 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 6 8】

前記精製タグが、前記ヌクレアーゼポリペプチドの N 末端またはその付近にある、請求項 6 7 に記載の組成物。

【請求項 6 9】

前記精製タグが、ポリ - h i s タグ、短いエピトープタグ、マルトース結合タンパク質 ( m b p )、N 末端グルタチオン S - トランスフェラーゼ ( G S T )、またはカルモジュリン結合ペプチド ( C B P )を含む、請求項 6 7 または 6 8 に記載の組成物。

【請求項 7 0】

前記 ポリ - h i s タグが、g l y - 6 x H i s タグまたはg l y - 8 x H i s タグを含む、請求項 6 9 に記載の組成物。

20

【請求項 7 1】

前記 V 型 C R I S P R ヌクレアーゼポリペプチドが、切断部位を含む、請求項 6 1 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 2】

前記切断部位が、前記ヌクレアーゼポリペプチドの N 末端またはその付近にある、請求項 7 1 に記載の組成物。

【請求項 7 3】

前記切断部位が、タバコエッチ病ウイルス ( T E V )切断部位を含む、請求項 7 1 または 7 2 に記載の組成物。

【請求項 7 4】

30

前記切断部位が、配列番号 1 0 8 の配列を含む、請求項 7 3 に記載の組成物。

【請求項 7 5】

前記ポリペプチドの N 末端またはその付近に 5 つの N L S、精製タグ、及び前記切断部位を含み、前記切断部位が、前記精製タグの後にある、請求項 7 4 に記載の組成物。

【請求項 7 6】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 0 9 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つと少なくとも 6 0 % 同一である配列を含むポリペプチドをコードする、請求項 6 1 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 7】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、配列番号 1 1 3 と少なくとも 5 0 % 同一の配列を含む、請求項 6 1 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 7 8】

g N Aまたはその一部をコードする第 2 のポリヌクレオチドをさらに含み、前記 g N A は、ポリヌクレオチド内の標的ヌクレオチド配列、または前記 g N A をコードするポリヌクレオチド内の標的ヌクレオチド配列を標的とするスペーサー配列を含み、ここで、前記 g N A は、前記 V 型 C R I S P R ヌクレアーゼと適合性がある、請求項 6 1 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 9】

前記第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドが同じである、請求項 7 8 に記載の組成物。

50

## 【請求項 80】

ドナーテンプレートを含む第3のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項61～79のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項 81】

V型CRISPRヌクレアーゼポリペプチドを含む核酸誘導型ヌクレアーゼを含むポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドを含むベクターであって、前記ポリヌクレオチドが配列番号22に対して75%未満の配列同一性を有する、ベクター。

## 【請求項 82】

請求項61～80のいずれか1項に記載の組成物または請求項81に記載のベクターを含む、細胞。

10

## 【請求項 83】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項82に記載の細胞。

## 【請求項 84】

前記細胞が、免疫細胞または幹細胞である、請求項83に記載の細胞。

## 【請求項 85】

前記細胞が、T細胞またはiPSCである、請求項84に記載の細胞。

## 【請求項 86】

請求項61～80のいずれか1項に記載の組成物または請求項81に記載のベクターを細胞内に挿入することを含む、ゲノム編集方法。

## 【請求項 87】

前記組成物を前記細胞に挿入することが、エレクトロポレーションを含む、請求項86に記載のゲノム編集方法。

20

## 【請求項 88】

(i) 請求項61～77のいずれか1項に記載の組成物を細胞内に挿入することと、(ii) 前記組成物によってコードされた前記V型CRISPRヌクレアーゼと適合するgNAを前記細胞内に挿入することと、を含むゲノム編集方法。

## 【請求項 89】

ステップ(i)及び(ii)が、エレクトロポレーションを含む、請求項88に記載のゲノム編集方法。

30

40

50