

【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 5 月 28 日 (2020.5.28)

【公表番号】特表 2019-500899 (P2019-500899A)

【公表日】平成 31 年 1 月 17 日 (2019.1.17)

【年通号数】公開・登録公報 2019-002

【出願番号】特願 2018-545579 (P2018-545579)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 P	21/04	(2006.01)
A 6 1 P	25/14	(2006.01)
A 6 1 P	21/02	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/12	(2006.01)
A 6 1 P	31/04	(2006.01)
A 6 1 P	37/04	(2006.01)
A 6 1 P	31/18	(2006.01)
A 6 1 P	31/22	(2006.01)
A 6 1 P	1/16	(2006.01)
A 6 1 P	31/16	(2006.01)
A 6 1 P	31/14	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/761	(2015.01)
A 6 1 K	35/763	(2015.01)
A 6 1 K	35/12	(2015.01)
A 6 1 K	38/46	(2006.01)
A 6 1 K	47/59	(2017.01)
A 6 1 K	47/64	(2017.01)
A 6 1 K	47/55	(2017.01)
A 6 1 K	38/02	(2006.01)
A 6 1 P	31/20	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2015.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/861	(2006.01)
C 1 2 N	15/864	(2006.01)
C 1 2 N	15/867	(2006.01)
C 1 2 N	15/86	(2006.01)
C 1 2 N	15/11	(2006.01)
C 1 2 N	15/54	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 0 7 K	14/47	(2006.01)
C 0 7 K	14/195	(2006.01)
C 1 2 N	9/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/09	1 1 0
A 6 1 P	21/04	Z N A
A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	35/00	

A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	31/22	
A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	31/16	
A 6 1 P	31/14	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	47/59	
A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	47/55	
A 6 1 K	38/02	
A 6 1 P	31/20	
A 6 1 K	35/76	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/861	Z
C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N	15/54	
C 1 2 N	15/62	Z
C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	14/195	
C 1 2 N	9/10	

## 【手続補正書】

【提出日】令和1年11月21日(2019.11.21)

## 【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】

以下：

(a)ヌクレアーゼ不活性RNA-標的化Cas9(RCas9)ポリペプチド、ここで当該ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドは：

(1)対応する野生型(WT)Cas9ポリペプチドと比較して、HNHヌクレアーゼドメインの全部又は一部、RuvCヌクレアーゼドメインの1つ以上の全部又は一部、Cas9ポリペプチドDNAse活性部位の全部又は一部、Cas9ポリペプチド活性部位を含む -メタルフォールドの全部又は一部、又はそれらの組合せを欠き；

(2)DNase、DNA開裂、ニッカーゼ活性を欠き；かつ

(3)送達ベクター中にRCas9コードヌクレオチドをパッケージすることを可能とする対応する野生型(WT)Cas9ポリペプチドと比較してポリペプチドのサイズが小さい；及び

(b) 以下：

(1) その5'末端に、標的RNA配列にハイブリダイズまたは結合するRNA配列、ここで当該標的RNA配列は反復配列を有し、ここで当該標的RNA配列とハイブリダイズまたは結合するRNA配列は当該反復配列とハイブリダイズまたは結合し、そして当該反復配列は、CUG、CCUG、CAG、GGGGCC又はそれらの任意の組合せである；及び

(2) 3'末端に、以下：

(i) 前記ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドと結合又は連結するRNA配列；又は

(ii) 当該sgRNAの5'RNA配列をヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドに共有結合または非共有結合させるリンカー；

を含む、組換えまたは合成によるシングルガイドRNA (sgRNA)；

を含み、当該ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドと結合又は連結するRNA配列が、RCas9が由来する古細菌又は細菌の野生型ガイドRNAを含み、又は由来し；そして任意で、当該核タンパク質複合体はPAMmerオリゴヌクレオチドを含まない、操作された核タンパク質複合体。

【請求項2】

前記ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチド又は前記sgRNAのヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドと結合出来る又は関連するRNA配列が、以下：

*Haloferax mediterranei*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Francisella tularensis* subsp. *novicida*、*Pasteurella multocida*、*Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejuni*、*Streptococcus thermophilus* LMD-9 CRISPR 3、*Campylobacter lari* CF89-12、*Mycoplasma gallisepticum* str. F、*Nitratifractor salinus* str. DSM 16511、*Parvibaculum lavamentivorans*、*Roseburia intestinalis*、*Neisseria cinerea*、*Gluconacetobacter diazotrophicus*、*Azospirillum B510*、*Sphaerochaeta globus* str. Buddy、*Flavobacterium columnare*、*Fluviicola taffensis*、*Bacteroides coprophilus*、*Mycoplasma mobile*、*Lactobacillus farciminius*、*Streptococcus pasteurianus*、*Lactobacillus johnsonii*、*Staphylococcus pseudintermedius*、*Filifactor alocis*、*Treponema denticola*、*Legionella pneumophila* str. Paris、*Sutterella wadsworthensis*、*Corynebacter diphtheriae*、*Streptococcus aureus*及び*Francisella novicida*；

からなる群から選択されるものから単離され又は由来する古細菌又は細菌Cas9ポリペプチドから単離され又は由来する配列を含む、請求項1に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項3】

前記sgRNAの5'末端が約15～25ヌクレオチド長で、前記ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドと結合出来る又は関連するRNA配列のRNA配列が85～100ヌクレオチド長である、請求項1または2のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項4】

前記ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドが、1つ以上のエフェクタポリペプチド、ターゲティング剤、酵素、検出可能部分、RNA改変ポリペプチド又はそれらの組合せと共有結合又は非共有結合している、請求項1～3のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項5】

前記RNA改変ポリペプチドが、スプライシング因子またはRNAスプライシングドメイン、RBFOX2ドメイン含有タンパク質、RNAのスプライシングに影響を与えることが知られているタンパク質、RNA開裂ドメイン、又はPTNドメイン含有タンパク質を含む、請求項4に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項6】

前記RNA開裂ドメインがエンドヌクレアーゼを含有する、請求項5に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項7】

前記シングルガイドRNA (sgRNA) のヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドと結合出来る

る又は関連するRNAが二次RNA構造を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項 8】

前記シングルガイドRNA (sgRNA) が、転写終止配列を除去する1つ以上の点変異を含み、又はそのシングルガイドRNAを分解に対して安定化させる変化、または5'末端の追加ヌクレオチドまたは追加化学的部分を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項 9】

前記前記シングルガイドRNA (sgRNA) が、前記標的RNAの少なくとも一部と相補的である配列を含んでいて、その部分が、その標的RNAの少なくとも約5~20%である、請求項 1 ~ 8 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項 10】

前記ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドが、1つ以上の核局在化シグナル、1つ以上のリンカーペプチド、1つ以上のXTENペプチド、又はSV40核局在化シグナルと共有結合又は非共有結合されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項 11】

前記ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドが、エフェクタポリペプチド、ターゲティング剤、酵素、検出可能な薬剤または部分のいずれかと連結しており、そのCas9ポリペプチドが組み換えまたは合成によるポリペプチドである、請求項 1 ~ 10 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか1項に規定された、ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド、及びシングルガイドRNA (sgRNA) をコードする第二のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記第一のポリヌクレオチド及び第二のポリヌクレオチドが互いに操作可能に連結している、請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

単一のベクターが、シングルガイドRNA (sgRNA) 及びヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチドをコードする核酸を含む、又は担持する、請求項 1 ~ 11 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項 15】

単一のベクターが、前記操作された核タンパク質複合体又はその1つ以上の成分をコードする核酸を含有又は担持し；又は単一のベクターが、前記操作された核タンパク質複合体の各成分を含有又は担持する、請求項 1 ~ 11 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項 16】

前記ヌクレアーゼ不活性RCas9ポリペプチド、前記sgRNA、前記エフェクタポリペプチドのうちの1つ以上、またはこれらの組み合わせの発現を制御する調節可能なプロモータまたは構成的プロモータを更に含む、請求項 4 ~ 11、14 及び 15 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複合体、又は請求項 12 もしくは 13 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 17】

前記ベクターが、アデノウイルスベクター、AAVベクター、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、又は合成ベクターを含有し、又は由来する、請求項 15 又は 16 のいずれかに記載の操作された核タンパク質複合体。

【請求項 18】

以下：

(a) 請求項 1 ~ 11、及び 14 ~ 17 のいずれか1項に記載の操作された核タンパク質複

合体；または

(b) 請求項 1 2 もしくは 1 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド；  
を含む、細胞。

【請求項 1 9】

ポリヌクレオチドの編集に用いられる、又は哺乳類又はヒト対象の、疾患または病気または感染症の症状の、治療、予防、緩和又は軽減に用いられる、請求項請求項 1 ~ 1 1、及び 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の操作された核タンパク質複合体、請求項 1 2 もしくは 1 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、又は請求項 1 8 に記載の細胞であって、当該核タンパク質複合体が細胞内の RNA を改変することにより、ポリヌクレオチドを編集し、又は疾患または病気または感染症の症状を治療、予防、緩和又は軽減する、操作された核タンパク質複合体、ポリヌクレオチド、又は細胞。

【請求項 2 0】

前記疾患または病気が、CTG、CCTG、CAG、GGGGCC と、これらの任意の組み合わせからなるグループから選択された反復配列によって起こり、当該疾患または病気が RNA マイクロサテライト反復伸長によって起こる、請求項 1 8 または 1 9 のいずれかに記載の操作された核タンパク質複合体、ポリヌクレオチド、又は細胞。

【請求項 2 1】

前記組成物が、経口、肺、腹腔内 (ip)、静脈内 (iv)、筋肉内 (im)、皮下 (sc)、経皮、口腔内、鼻腔内、舌下、眼内、直腸、膣からなる群から選択される経路によって投与される、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の操作された核タンパク質複合体、ポリヌクレオチド、又は細胞。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 1 1 または 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の操作された核タンパク質複合体を発現させる方法であって、請求項 1 2 または 1 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを、細胞の中に、その細胞が前記核タンパク質複合体を発現する条件下で導入することを含む方法。

【請求項 2 3】

以下：

(a) 請求項 1 ~ 1 1 または 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の改変された核タンパク質複合体；または  
(b) 請求項 1 2 または 1 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド；  
を含有する医薬組成物であって、経腸送達用または非経口送達用に製剤化されるか、静脈内 (iv) 送達用に製剤化される、医薬組成物。

【請求項 2 4】

以下：

(a) 請求項 1 ~ 1 1 または 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の改変された核タンパク質複合体；または  
(b) 請求項 1 2 または 1 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド；  
の 1 つ以上を備えるキット。