

【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 14 日 (2020.5.14)

【公表番号】特表 2018-535691 (P2018-535691A)

【公表日】平成 30 年 12 月 6 日 (2018.12.6)

【年通号数】公開・登録公報 2018-047

【出願番号】特願 2018-529170 (P2018-529170)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

A 6 1 K 35/407 (2015.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 1/18 (2006.01)

A 6 1 K 35/545 (2015.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 15/113 Z

A 6 1 K 35/407

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 1/18

A 6 1 K 35/545

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 4 月 6 日 (2020.4.6)

【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 55, 559 ~ 55, 564、55, 566 ~ 55, 569、55, 572 ~ 55, 575、55, 577、55, 578、55, 580 ~ 55, 584、55, 586、55, 587、55, 591、55, 595、55, 599、55, 600、55, 602、55, 605、55, 607、55, 616、55, 620、55, 625、55, 627、55, 628、55, 633、55, 635、55, 639、55, 641、55, 642、55, 645、55, 646、55, 657、55, 658、55, 669、55, 671 ~ 55, 674、55, 677、55, 678、55, 681、55, 685 ~ 55, 692、55, 694 ~ 55, 697、55, 701、55, 704、55, 705、55, 707 ~ 55, 709、55, 716、55, 718、55, 721、55, 722、55, 724、55, 726、55, 727、55, 728、55, 730、55, 732 ~ 55, 737、55, 740、55, 743、55, 744、55, 748、55, 749、55, 751、55, 754、55, 756、55, 762、55, 764、55, 771、55, 776、55, 778、55, 781 ~ 55, 783、60, 476、60, 477、60, 480 ~ 60, 482、60, 485、60

、487、60、490、60、492、60、494～60、499、60、504、60、506、60、511、60、515、60、517、60、519、60、522、60、526～60、529、60、534、60、536、60、539～60、541、60、547、60、549、60、552、60、554、60、555、60、557、60、558、60、561、60、563、60、564、60、566、60、567、60、569～60、572、60、575、60、576、60、578、60、581、60、582、60、583、60、588、60、591、60、592、60、594、60、599、60、601、60、604、60、605、60、607、60、608、60、615、60、618～60、620、60、622、60、628、60、630、60、632、60、633、60、637、60、639、60、640、60、642～60、645、60、647、60、648、60、650、60、657、60、658、60、660、および60、664の核酸配列からなる群から選択されるスパーサー配列を含むガイドリボ核酸 (gRNA)を含む、アルファ1アンチトリプシン欠乏症 (AATD) の患者由来の細胞内のSERPINA1遺伝子を編集するための組成物。

【請求項2】

gRNAが単分子ガイドRNA (sgRNA) である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

gRNAが改変型gRNAである、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

sgRNAが改変型sgRNAである、請求項2に記載の組成物。

【請求項5】

細胞が肝細胞である、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

アルファ1アンチトリプシン欠乏症 (AATD) の患者由来の細胞のSERPINA1遺伝子を編集する方法であって、化膿性連鎖球菌 (S. pyogenes) Cas9エンドヌクレアーゼ、および、配列番号55、559～55、564、55、566～55、569、55、572～55、575、55、577、55、578、55、580～55、584、55、586、55、587、55、591、55、595、55、599、55、600、55、602、55、605、55、607、55、616、55、620、55、625、55、627、55、628、55、633、55、635、55、639、55、641、55、642、55、645、55、646、55、657、55、658、55、669、55、671～55、674、55、677、55、678、55、681、55、685～55、692、55、694～55、697、55、701、55、704、55、705、55、707～55、709、55、716、55、718、55、721、55、722、55、724、55、726、55、727、55、728、55、730、55、732～55、737、55、740、55、743、55、744、55、748、55、749、55、751、55、754、55、756、55、762、55、764、55、771、55、776、55、778、55、781～55、783、60、476、60、477、60、480～60、482、60、485、60、487、60、490、60、492、60、494～60、499、60、504、60、506、60、511、60、515、60、517、60、519、60、522、60、526～60、529、60、534、60、536、60、539～60、541、60、547、60、549、60、552、60、554、60、555、60、557、60、558、60、561、60、563、60、564、60、566、60、567、60、569～60、572、60、575、60、576、60、578、60、581、60、582、60、583、60、588、60、591、60、592、60、594、60、599、60、601、60、604、60、605、60、607、60、608、60、615、60、618～60、620、60、622、60、628、60、630、60、632、60、633

、60,637、60,639、60,640、60,642～60,645、60,647、60,648、60,650、60,657、60,658、60,660、および60,664の核酸配列からなる群から選択されるスパーサー配列を含むガイドリボ核酸（gRNA）を細胞に導入することを含む方法。

【請求項7】

細胞が肝細胞である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

アルファ1アンチトリプシン（AAT）タンパク質活性の回復を、野生型の、または正常なAATのタンパク質活性と比較することをさらに含む、請求項6または7に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

ゲノム編集によりヒト細胞のSERPINA1遺伝子を編集する方法が提供され、本方法は、ヒト細胞に1つ以上のデオキシリボ核酸（DNA）エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断（SSB）または1つ以上の2本鎖切断（DSB）をもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子の内部またはその近傍での1つ以上の変異またはエクソンの永続的な挿入、欠失、修正、またはその発現もしくは機能の調節の少なくとも1つを生じるか、または、SERPINA1遺伝子の発現もしくは機能に影響を与え、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に1つ以上のSSBまたは1つ以上のDSBをもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、アルファ1アンチトリプシン（AAT）タンパク質活性を回復させるステップを含む。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

ゲノム編集によりヒト細胞にSERPINA1遺伝子を挿入する方法もまた提供され、本方法は、ヒト細胞に1つ以上のデオキシリボ核酸（DNA）エンドヌクレアーゼを導入し、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断（SSB）または2本鎖切断（DSB）をもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、アルファ1アンチトリプシン（AAT）タンパク質活性を回復させるステップを含む。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

1つの局面において、ゲノム編集によりヒト細胞のSERPINA1遺伝子を編集する方法であって、該細胞に1つ以上のデオキシリボ核酸（DNA）エンドヌクレアーゼを導入し、該細胞のSERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断（SSB）または2本鎖切断（DSB）をもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子の内部または

その近傍で1つ以上の変異またはエクソンの永続的な欠失、挿入、または修正を生じて、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に1つ以上のSSBまたは1つ以上のDSBをもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、アルファ1アンチトリプシン(AAT)タンパク質活性を回復させることを含む方法が提供される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

iPSCのSERPINA1遺伝子もしくはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍で編集するステップ、または、iPSCのSERPINA1遺伝子のセーフハーバー座位の内部またはその近傍で編集するステップ、または、iPSCのSERPINA1遺伝子の第一エクソンの遺伝子座の内部または近傍で編集するステップは、iPSCに1つ以上のデオキシリボ核酸(DNA)エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断(SSB)または2本鎖切断(DSB)をもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子の内部またはその近傍で1つ以上の変異またはエクソンの永続的な挿入、修正、欠失、またはその発現もしくは機能の調節を生じるか、または、SERPINA1遺伝子の発現もしくは機能に影響を与え、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に1つ以上のSSBまたは1つ以上のDSBをもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子の永続的な挿入を生じて、AATタンパク質活性を回復させることを含む得る。セーフハーバー座位は、AAVS1(PPP1R12C)、ALB、Angptl3、Apoc3、ASGR2、CCR5、FIX(F9)、G6PC、Gys2、HGD、Lp(a)、Pcsk9、Serpina1、TF、およびTTRからなる群から選択することができる。セーフハーバー座位は、AAVS1のエクソン1-2(PPP1R12C)、ALBのエクソン1-2、Angptl3のエクソン1-2、Apoc3のエクソン1-2、ASGR2のエクソン1-2、CCR5のエクソン1-2、FIX(F9)のエクソン1-2、G6PCのエクソン1-2、Gys2のエクソン1-2、HGDのエクソン1-2、Lp(a)のエクソン1-2、Pcsk9のエクソン1-2、Serpina1のエクソン1-2、TFのエクソン1-2、およびTTRのエクソン1-2からなる群から選択することができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

いくつかの態様において、前駆細胞もしくは初代肝細胞のSERPINA1遺伝子の、または、前記細胞もしくは初代肝細胞のSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の、内部またはその近傍で編集すること、あるいは、前駆細胞または初代肝細胞の白血球のセーフハーバー座位の内部またはその近傍で編集するステップは、前駆細胞または初代肝細胞に1つ以上のデオキシリボ核酸(DNA)エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断(SSB)または2本鎖切断(DSB)をもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子の内部またはその近傍で1つ以上の変異またはエクソンの永続的な挿入、修正、欠失、またはその発現もしくは機能の調節を生じるか、または、SERPINA1遺伝子の発現もしくは機能に

影響を与え、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍で編集し、SERPINA1遺伝子の内部またはその近傍での1つ以上の変異の永続的な欠失、挿入、または修正を生じて、アルファ1アンチトリプシン(AAT)タンパク質活性を回復させることを含む。セーフハーバー座位は、AAVS1(PPP1R12C)、ALB、Angptl3、ApoC3、ASGR2、CCR5、FIX(F9)、G6PC、Gys2、HGD、Lp(a)、Pcsk9、Serpina1、TF、およびTTRからなる群から選択することができる。セーフハーバー座位は、AAVS1のエクソン1-2(PPP1R12C)、ALBのエクソン1-2、Angptl3のエクソン1-2、ApoC3のエクソン1-2、ASGR2のエクソン1-2、CCR5のエクソン1-2、FIX(F9)のエクソン1-2、G6PCのエクソン1-2、Gys2のエクソン1-2、HGDのエクソン1-2、Lp(a)のエクソン1-2、Pcsk9のエクソン1-2、Serpina1のエクソン1-2、TFのエクソン1-2、およびTTRのエクソン1-2からなる群から選択することができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

いくつかの態様において、幹細胞のSERPINA1遺伝子または間葉系幹細胞のSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍を編集するステップは、間葉系幹細胞に1つ以上のデオキシリボ核酸(DNA)エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断(SSB)または2本鎖切断(DSB)をもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子の内部またはその近傍での1つ以上の変異またはエクソンの永続的な欠失、挿入、修正、またはその発現もしくは機能の調節を生じるか、または、SERPINA1遺伝子の発現もしくは機能に影響を与え、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に1つ以上のSSBまたは1つ以上のDSBをもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子の内部または近傍に1つ以上の変異を生じて、SERPINA1遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、アルファ1アンチトリプシン(AAT)タンパク質活性を回復させることを含む。セーフハーバー座位は、AAVS1(PPP1R12C)、ALB、Angptl3、ApoC3、ASGR2、CCR5、FIX(F9)、G6PC、Gys2、HGD、Lp(a)、Pcsk9、Serpina1、TF、およびTTRからなる群から選択することができる。セーフハーバー座位は、AAVS1(PPP1R12C)のエクソン1-2、ALBのエクソン1-2、Angptl3のエクソン1-2、ApoC3のエクソン1-2、ASGR2のエクソン1-2、CCR5のエクソン1-2、FIX(F9)のエクソン1-2、G6PCのエクソン1-2、Gys2のエクソン1-2、HGDのエクソン1-2、Lp(a)のエクソン1-2、Pcsk9のエクソン1-2、Serpina1のエクソン1-2、TFのエクソン1-2、およびTTRのエクソン1-2からなる群から選択することができる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

いくつかの態様において、患者の細胞内のSERPINA1遺伝子を編集するステップは、細胞に1つ以上のデオキシリボ核酸(DNA)エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDN

A配列の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断(SSB)または2本鎖切断(DSB)をもたらし、その結果、SERPINA1遺伝子の内部に1つ以上の変異またはエクソンの永続的な欠失、挿入、または修正、または調節を生じ、SERPINA1遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、AATタンパク質活性を回復させることを含む。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

いくつかの態様において、患者の細胞内のSERPINA1遺伝子を編集するステップは、細胞に1つ以上のデオキシリボ核酸(DNA)エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードするDNA配列の内部またはその近傍に1つ以上の2本鎖切断(DSB)をもたらす、あるいは、SERPINA1遺伝子のセーフハーバー座位の内部またはその近傍で編集して、SERPINA1遺伝子の内部またはその近傍での1つ以上のエクソンの永続的な欠失、挿入、修正、またはその発現もしくは機能の修正もしくは調節を生じるか、または、SERPINA1遺伝子の発現もしくは機能に影響を与え、アルファ1アンチトリプシン(AAT)タンパク質活性を回復させることを含む。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0524

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0524】

従って、本開示は、特に、以下の非限定的な発明に関する：第1の方法、方法1において、本開示は、ゲノム編集によりヒト細胞のSERPINA1遺伝子を編集する方法であって、ヒト細胞に1つ以上のデオキシリボ核酸(DNA)エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断(SSB)または2本鎖切断(DSB)をもたらす、その結果、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍での1つ以上の変異もしくはエクソンの、永続的な欠失、挿入、または、その発現もしくは機能の修正もしくは調節を生じるか、または、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の発現もしくは機能に影響を与え、アルファ1アンチトリプシン(AAT)タンパク質活性を回復させるステップを含む方法を提供する。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0530

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0530】

別の方法、方法7において、本開示は、編集ステップが、iPSCに1つ以上のデオキシリボ核酸(DNA)エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍に1つ以上の1本鎖切断(SSB)または2本鎖切断(DSB)をもたらす、その結果、SERPINA1遺伝子またはSERPINA1遺伝子の調節エレメントをコードする他のDNA配列の内部またはその近傍での1つ以上の変異もしくはエクソンの、永続的な欠

失、挿入、または、その発現もしくは機能の修正もしくは調節を生じるか、または、S E R P I N A 1 遺伝子または S E R P I N A 1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の D N A 配列の発現もしくは機能に影響を与え、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に 1 つ以上の S S B または D S B をもたらし、その結果、S E R P I N A 1 遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、ルファ 1 アンチトリプシン (A A T) タンパク質活性を回復させることを含む方法であって、方法 3 ~ 6 のいずれかに記載の方法を提供する。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 3 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 5 3 6】

別の方法、方法 1 3 において、本開示は、編集ステップが、前駆細胞または初代肝細胞に 1 つ以上のデオキシリボ核酸 (D N A) エンドヌクレアーゼを導入し、S E R P I N A 1 遺伝子または S E R P I N A 1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の D N A 配列の内部またはその近傍に 1 つ以上の 1 本鎖切断 (S S B) または 2 本鎖切断 (D S B) をもたらし、その結果、S E R P I N A 1 遺伝子または S E R P I N A 1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の D N A 配列の内部またはその近傍での 1 つ以上の変異もしくはエクソンの永続的な欠失、挿入、修正、または、その発現もしくは機能の調節を生じるか、または、S E R P I N A 1 遺伝子または S E R P I N A 1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の D N A 配列の発現もしくは機能に影響を与え、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に 1 つ以上の S S B または 1 つ以上の D S B をもたらし、その結果、S E R P I N A 1 遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、アルファ 1 アンチトリプシン (A A T) タンパク質活性を回復させることを含む方法であって、方法 1 1 または 1 2 に記載の方法を提供する。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 5 4 2】

別の方法、方法 1 9 において、本開示は、編集ステップが、間葉系幹細胞に 1 つ以上のデオキシリボ核酸 (D N A) エンドヌクレアーゼを導入し、S E R P I N A 1 遺伝子または S E R P I N A 1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の D N A 配列の内部またはその近傍に 1 つ以上の 1 本鎖切断 (S S B) または 2 本鎖切断 (D S B) をもたらし、その結果、S E R P I N A 1 遺伝子または S E R P I N A 1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の D N A 配列の内部またはその近傍での 1 つ以上の変異もしくはエクソンの永続的な欠失、挿入、修正、または、その発現もしくは機能の調節を生じるか、または、S E R P I N A 1 遺伝子または S E R P I N A 1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の D N A 配列の発現もしくは機能に影響を与え、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に 1 つ以上の S S B または 1 つ以上の D S B をもたらし、その結果、S E R P I N A 1 遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、アルファ 1 アンチトリプシン (A A T) タンパク質活性を回復させることを含む方法であって、方法 1 6 ~ 1 8 のいずれかに記載を提供する。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 4 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 5 4 7 】

別の方法、方法 2 4 において、本開示は、編集ステップが、細胞に 1 つ以上のデオキシリボ核酸 (DNA) エンドヌクレアーゼを導入し、SERPINA1 遺伝子または SERPINA1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の DNA 配列の内部またはその近傍に 1 つ以上の 1 本鎖切断 (SSB) または 2 本鎖切断 (DSB) をもたらし、その結果、SERPINA1 遺伝子または SERPINA1 遺伝子の調節エレメントをコードする他の DNA 配列の内部またはその近傍での 1 つ以上の変異もしくはエクソンの永続的な欠失、挿入、または、修正もしくは調節を生じて、あるいは、セーフハーバー座位の内部またはその近傍に 1 つ以上の SSB または 1 つ以上の DSB をもたらし、その結果、SERPINA1 遺伝子またはミニ遺伝子の永続的な挿入を生じて、アルファ 1 アンチトリプシン (AAT) タンパク質活性を回復させることを含む方法であって、方法 2 3 に記載の方法を提供する。