

【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4年10月31日(2022.10.31)

【公開番号】特開2022-43042(P2022-43042A)

【公開日】令和4年3月15日(2022.3.15)

【年通号数】公開公報(特許)2022-046

【出願番号】特願2021-188589(P2021-188589)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 9/14(2006.01)

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 1 2 N 15/55(2006.01)

C 1 2 Q 1/6897(2018.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 9/14 1 0 1

C 1 2 N 15/62 Z Z N A

C 1 2 N 15/55

C 1 2 Q 1/6897 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

【手続補正書】

【提出日】令和4年10月21日(2022.10.21)

【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】

点変異を含む標的DNA配列を含むDNA分子を編集する方法であって(ただし、ヒト個体内での実施を除く)、方法が、DNA分子の標的DNA配列と、

(i)ヌクレアーゼ不活性型Cas9(dCas9)ドメインおよびシチジンデアミナーゼドメインを含む融合タンパク質、および

(ii)前記(i)の融合タンパク質の標的を前記DNA分子の標的DNA配列に定めるsgRNAとを接触させることを含み、

ここで前記標的DNA配列が、前記標的DNA配列における標的シトシン(C)の脱アミノ化に有効な量で、および前記脱アミノ化に適した条件下で前記融合タンパク質および前記sgRNAと接触させられる;ならびに

ここで前記標的DNA配列における標的シトシン(C)の脱アミノ化により前記点変異が非変異または野生型のヌクレオチド塩基へ修正される、方法。

【請求項2】

前記標的DNA配列が、チミン シトシン(T C)点変異を含み、前記標的DNA配列における標的シトシン(C)の脱アミノ化により、標的シトシン(C)がチミン(T)へ変換されることで点変異が修正される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記シチジンデアミナーゼドメインが、アポリポタンパク質B mRNA編集複合体(APOBEC)ファミリーのデアミナーゼ、APOBEC1ファミリーのデアミナーゼ、または活性化誘導

10

20

30

40

50

シチジンデアミナーゼ(AID)からなる群から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記シチジンデアミナーゼドメインが、前記Cas9ドメインのN末端に融合している、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記シチジンデアミナーゼドメインが、前記Cas9ドメインのC末端に融合している、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記Cas9ドメインおよび前記シチジンデアミナーゼドメインが、リンカーを介して融合している、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項7】

前記リンカーが、(GGGGS)_n(配列番号91)、(G)_n、(EAAAK)_n(配列番号5)、(GGS)_n、SGSETPGTSESATPES(配列番号93)、もしくは(XP)_nモチーフ、またはこれらのうちのいずれかの組み合わせを含み、nが独立して1～30の整数である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記Cas9ドメインが、配列番号34または配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記Cas9ドメインが、配列番号4の位置10に対応する位置および位置820に対応する位置にて、または配列番号2の位置819に対応する位置にて、アラニン残基の置換を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項10】

前記シチジンデアミナーゼドメインが、配列番号22、配列番号23、または配列番号24から選択されるAPOBEC1シチジンデアミナーゼのアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記標的DNA分子が、疾患または障害に関連する点変異を含む標的DNA配列を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記標的DNA配列における標的シトシン(C)の前記脱アミノ化により、点変異が非変異または野生型のヌクレオチド塩基へ補正されて、疾患または障害に関連しない配列が生じる、請求項11に記載の方法。

30

【請求項13】

前記疾患または障害が、嚢胞性線維症、フェニルケトン尿症、表皮剥離性角化症(EHK)、シャルコー・マリー・トゥース病4J型、神経芽細胞腫(NB)、フォン・ウィルブラン病(vWD)、先天性筋強直症、遺伝性腎アミロイドーシス、拡張型心筋症(DCM)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、神経芽細胞腫、遺伝性リンパ水腫、家族性アルツハイマー病、プリオン病、慢性乳児神経皮膚関節症候群(CINCA)、デスミン関連心筋症(DRM)、または変異PI3KCAタンパク質に関連する腫瘍性疾患である、請求項11または12に記載の方法。

40

【請求項14】

前記標的DNA配列が、
 (i)野生型PI3Kタンパク質と比較してPI3KCAタンパク質においてアミノ酸配列変異が生じるT C点変異を含み、前記方法により変異C塩基が脱アミノ化される；
 (ii)野生型PSEN1タンパク質と比較してPSEN1タンパク質においてアミノ酸配列変異が生じ、前記方法により変異C塩基が脱アミノ化される；
 (iii)野生型₁-抗トリプシンタンパク質と比較して₁-抗トリプシンタンパク質においてアミノ酸配列変異が生じ、前記方法により変異C塩基が脱アミノ化される；
 (iv)野生型vWFタンパク質と比較してvWFタンパク質においてアミノ酸配列変異が生じ

50

前記方法により変異C塩基が脱アミノ化される;または
(v)野生型カスパーゼ-9タンパク質と比較してカスパーゼ-9タンパク質においてアミノ
酸配列変異が生じ、前記方法により変異C塩基が脱アミノ化される、請求項11~13のい
ずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記 1-抗トリプシンタンパク質が、1-抗トリプシン遺伝子におけるT C点変異に
起因するアミノ酸置換を含む;ここで前記点変異が、慢性閉塞性肺疾患(COPD)に関連す
る;およびここで前記接触させることにより、前記1-抗トリプシン遺伝子の点変異シチ
ジン残基が脱アミノ化され、そのため前記T C点変異が修正される、請求項14に記載の
方法。

10

【請求項16】

前記 1-抗トリプシンタンパク質が、1-抗トリプシン遺伝子のコドン55におけるT
C点変異に起因するL55P置換を含む;ここで前記接触させることにより、前記1-抗トリ
プシン遺伝子のコドン55における変異シチジン残基が脱アミノ化され、そのため前記T
C点変異が修正される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記 vWFタンパク質が、vWF遺伝子のコドン509におけるT C点変異に起因するシス
テイン アルギニン置換を含む;ここで前記vWF点変異が、フォン・ウィルブランド病(v
WD)に関連する、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

前記 接触させることにより、前記vWF遺伝子のコドン509における変異シトシン残基
が脱アミノ化され、そのため前記T C点変異が補正される、請求項17に記載の方法。

20

【請求項19】

前記 カスパーゼ-9タンパク質が、カスパーゼ-9遺伝子のコドン197におけるT C点変
異に起因するL197P置換を含む;ここで前記カスパーゼ-9点変異が、神経芽細胞腫に関連
する、請求項14に記載の方法。

【請求項20】

前記 接触させることにより、前記カスパーゼ-9遺伝子のコドン197における変異シト
シン残基が脱アミノ化され、そのため前記T C点変異が修正される、請求項19に記載の
方法。

30

【請求項21】

前記 ヌクレオチド塩基の前記脱アミノ化を検出することを更に含む、請求項1~20の
いずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記 検出することが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

方法が、インビトロまたはエキソビボである、請求項1~22のいずれか一項に記載の方
法。

40