

【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3部門第2区分

【発行日】令和5年2月13日(2023.2.13)

【公開番号】特開2023-2559(P2023-2559A)

【公開日】令和5年1月10日(2023.1.10)

【年通号数】公開公報(特許)2023-004

【出願番号】特願2022-154905(P2022-154905)

【国際特許分類】

A 0 1 N 63/60(2020.01)

A 0 1 P 7/04(2006.01)

C 1 2 N 15/63(2006.01)

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 15/11(2006.01)

10

【F I】

A 0 1 N 63/60

A 0 1 P 7/04 Z N A

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/11 Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和5年2月3日(2023.2.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0309

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0309】

一部の例では、本明細書に記載される目的のポリペプチドをコードする修飾RNAは、1つ以上の末端修飾、例えば、5'キャップ構造及び/又はポリAテール(例えば、100~200ヌクレオチド長)を有する(配列番号154)。5'キャップ構造は、CapO、Cap1、ARCA、イノシン、N1-メチル-グアノシン、2'フルオロ-グアノシン、7-デアザ-グアノシン、8-オキソ-グアノシン、2-アミノ-グアノシン、LNA-グアノシン、及び2-アジド-グアノシンからなる群から選択され得る。一部のケースでは、修飾RNAは、少なくとも1つのコザック(Kozak)配列を含む5'UTRと、3'UTRとを含有する。こうした修飾は、公知であり、例えば、国際公開第2012/135805号パンフレット及び同第2013/052523号パンフレットに記載される。更なる末端修飾は、例えば、国際公開第2014/164253号パンフレット及び同第2016/011306号パンフレット、国際公開第2012/045075号パンフレット、及び同第2014/093924号パンフレットに記載されている。

30

40

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0336

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0336】

典型的なCRISPR/Cas系では、一本鎖若しくは二本鎖DNA配列を標的とする配列特異的、ノンコーディング「ガイドRNA」により、エンドヌクレアーゼは、標的ヌクレオチド配列(例えば、配列編集しようとするゲノム内の部位)に向けられる。3つの

50

クラス(I~III)のCRISPR系が同定されている。クラスII CRISPR系は、単一のCasエンドヌクレアーゼ(複数のCasタンパク質ではなく)を使用する。1つのクラスII CRISPR系は、Cas9などのII型Casエンドヌクレアーゼ、CRISPR RNA(「crRNA」)、及びトランス-活性化型crRNA(「tracrRNA」)を含む。crRNAは、「ガイドRNA」、即ち、典型的には、標的DNA配列に対応する約20ヌクレオチドRNA配列を含有する。crRNAはまた、tracrRNAに結合する領域を含んで、RNaseIIIにより切断される部分的二本鎖構造を形成し、crRNA/tracrRNAハイブリッドをもたらす。RNAは、Casタンパク質を指令して、スペーサ配列に応じて、特定のDNA/RNA配列を抑制するガイドの役割を果たす。例えば、Horvath et al., Science 327:167-170, 2010; Makarova et al., Biology Direct 1:7, 2006; Pennisi, Science 341:833-836, 2013を参照されたい。標的DNA配列は、一般に、所与のCasエンドヌクレアーゼに対して特異的な「プロトスペーサ隣接モチーフ」(「PAM」)に隣接していなければならないが; PAM配列は、所与のゲノム全体を通して出現する。種々の原核生物種から同定されたCRISPRエンドヌクレアーゼは、ユニークなPAM配列要件を有し; PAM配列の例として、5'-NGG(化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*))、5'-NNAGAA(ストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*) CRISPR1)、5'-NGGNG(ストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*) CRISPR3)、及び5'-NNNGATT(髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*))が挙げられる。いくつかのエンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9エンドヌクレアーゼは、グリッチP(の5'側)AM部位、例えば、5'-NGGと結合して、PAM部位から3ヌクレオチド上流の位置で標的DNAの平滑末端切断を実施する。別のクラスII CRISPR系は、V型エンドヌクレアーゼCpf1を含み、これは、Cas9より小さく; 例として、AsCpf1(アシダミノコッカス属種(*Acidaminococcus* sp.)由来)及びLbCpf1(ラクノスピラ科種(*Lachnospiraceae* sp.)由来)が挙げられる。Cpf1結合CRISPRアレイは、tracrRNAの要件なしに成熟型crRNAにプロセッシングされ; 言い換えれば、Cpf1系は、標的DNA配列を切断するために、Cpf1ヌクレアーゼ及びcrRNAだけを必要とする。Cpf1エンドヌクレアーゼは、トリッチPAM部位、例えば、5'-TTNと結合している。Cpf1はまた、5'-CTA PAMモチーフを認識する。Cpf1は、4'-若しくは5'-ヌクレオチド5'オーバーハングを含むオフセット又はスタッガード二本鎖切断を導入することによりDNAを切断し、例えば、コーディング鎖のPAM部位(の3'側)から18ヌクレオチド下流及び相補鎖のPAM部位から23ヌクレオチド下流に位置する5'-ヌクレオチドオフセット又はスタッガード切断で標的DNAを切断し、こうしたオフセット切断から生じる5'-ヌクレオチドオーバーハングは、相同組換えによるDNA挿入によって、平滑末端切断DNAでの挿入によるものよりも正確なゲノム編集を可能にする。例えば、Zetsche et al., Cell 163:759-771, 2015を参照にされたい。

【**手続補正3**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0384

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【0384】

## 【表 104】

表10: 細胞透過性ペプチド(CPP)の例

ペプチド	由来	配列
<u>タンパク質由来</u>		
ペネトラチン	アンテナペディア	RQIKIWFQNRRMKWKK (配列番号82)
Tat ペプチド	Tat	GRKKRRQRRRPPQ (配列番号83)
pVEC	カドヘリン	LLIILRRRIRKQAHASK (配列番号84)
<u>キメラ</u>		
トランスポーター	ガラニン/マストバラン	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (配列番号85)
MPG	HIV-gp41/SV40 T 抗原	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKY (配列番号86)
Pep-1	HIV 逆転写酵素/ SV40 T 抗原	KETWWETWWTEWSQPKKRKY (配列番号87)
<u>合成</u>		
ポリアルギニン	Tat ペプチドベース	(R) <sub>n</sub> ; 6 < n < 12 (配列番号155)
MAP	デノボ	KLALKLALKALKALKLA (配列番号88)
R <sub>6</sub> W <sub>3</sub>	ペネトラチンベース	RRWWRRWRR (配列番号89)

10

20

30

40

50

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0477

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0477】

PCR分析のために、25 μLの反応物中に、100 ~ 150 ngをゲノムDNA増幅に使用する。Bcr1センス抗センス挿入断片の内部169 bp断片を増幅するために、プライマーフォワード5' - a a a c t g c t g c a t g g c t t t c t - 3' (配列番号90) 及びリバース5' - a c a g g c c t t t c a g g c t t t t a - 3' (配列番号91) を設計する。Perkin Elmerサーモサイクラーを用いて、PCR反応を30サイクル実施する。反応温度は、変性95 (2分)、アニーリング56 (30秒)、及び伸長72 (30秒)である。25 μLの反応容積は、以下: 1 × PCRバッファー、0.25 mMのdNTP、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 μMのプライマー及び2.5 uのTaqを含む。1%アガロース/SYBRグリーンゲル中での電気泳動により、増幅産物を分析する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0496

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0496】

PCR分析のために、25 μLの反応物中に、100～150 ngをゲノムDNA増幅に使用する。ColA遺伝子挿入断片の内部165 bp断片を増幅するために、プライマーフォワード5'-caacgatacggcgatgtatg-3(配列番号95)及びリバーズ5'-ttaatttccacctgctgtt-3(配列番号96)を設計する。Perkin Elmerサーモサイクラーを用いて、PCR反応を30サイクル実施する。反応温度は、変性95(2分)、アニーリング56(30秒)、及び伸長72(30秒)である。25 μLの反応容積は、以下：1×PCRバッファー、0.25 mMのdNTP、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 μMのプライマー及び2.5 uのTaqを含む。1%アガロース/SYBRグリーンゲル中での電気泳動により、増幅産物を分析する。

10

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0516

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0516】

葉内のdsRNA検出のためのノーザンブロット分析：

dsRNA摂取を検出するために、0日目に、LDH、Bcr1-dsRNA又はBcr1-dsRNA-LDHのいずれかで、タバコ(Nicotiana glauca)植物(3つのレプリケート)に噴霧する。試験した複合体の比は、1:1、1:2、又は1:3のdsRNA-LDH比である。温室条件(自然光と共に平均温度25)下、10 cm幅のポット内のUQ23土壌で植物を栽培する。噴霧時にマスキングテープを用いて、これらの植物の先端を覆う。噴霧から20日後に発生した新しい葉を採集する。TRIzol抽出により全RNAを抽出し、小分子RNAを濃縮させる(Mitter et al., Ann. Phytopathological Soc. 16:936-944, 2003)。各処理の小分子RNA(20 μg)を15%(wt/vol)変性尿素ポリアクリルアミドゲル(PAGE)上で泳動させる。3'末端がDIGで標識されたZR小分子RNAラダー(Zymo Research)をマーカとして使用する。Hybond-N膜(Roche)上でのトランスブロット-SDセミドライ転移ユニット(trans-blot SD semi-dry transfer unit)(Bio-Rad)によりブロットを転移させる。DIG標識Bcr1 24 ntプローブ(5'-atgctgaccatgcatctgagcatt(配列番号156))、専用のバッファーセット(Roche)を用い、製造者の推奨事項に従ってブロットを処理する。ハイブリダイゼーション後、CSPD化学発光アルカリホスファターゼ基質を用いて、フィルターを検出する。NIH Image 1.6ソフトウェアを用いて、定量分析を実施する。

20

30

## 【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0518

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0518】

治療計画：

バクテリオサイト標的遺伝子Bcr1:gaaatgcagctgc(配列番号157)に対する相補的アンチセンスPNA構築物

## 【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0522

【補正方法】変更

【補正の内容】

40

50

## 【 0 5 2 2 】

治療計画：

ジベンジルシクロオクチン ( D B C O ) 修飾を有する P N A 及びアジド修飾を有する C y 3 色素： C y 3 - g a a t g c a g c t g c ( 配列番号 1 5 8 )

## 【 手 続 補 正 9 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 5 8 2

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 5 8 2 】

B C R - 4 P N A 合 成

B C R - 4 - C P P を P N A b i o に よ り 合 成 し、配列は、 Y G R K K R R Q R R R - C G T A C A A T A A T C T C A T G G ; 配列番号 1 0 6 及 び 1 0 5 である。 C P P ( T a t ) の配列は、 Y G R K K R R Q R R R ; 配列番号 1 0 6 である。 P N A を、 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 ( T F A ) で 補 充 し た 8 0 % アセトニトリル及 び 2 0 % 水 に 溶 解 さ せ た。一旦溶解したら、 P N A を アリコートに等分し [ アリコート当たり 3 2 . 1 μ g / 5 n m o l ]、空 気 乾 燥 し た 後、 - 2 0 で 保 存 し た。 P N A の 希 釈 標 準 溶 液 を 水 中 5 0 u M で 調 製 し た。

## 【 手 続 補 正 1 0 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 6 1 4

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 6 1 4 】

各 種 遺 伝 子 ( G l n T 1、U b x、b A S、及 び C a c t ) の d s R N A 発 現 配 列 を、G i b s o n ア セ ン プ リ を 介 し て ベ ク タ ー に 導 入 す る こ と が で き る。最 初 に、プ ラ ス ミ ド 内 の 隣 接 領 域 と マ ッ チ す る オ ー バ ー ハ ン グ を 含 む セ ン ス 及 び ア ン チ セ ン ス ア ン プ リ コ ン を、P C R で 適 切 な プ ラ イ マ ー を 用 い て 作 製 す る。具 体 的 に は、セ ン ス 鎖 の 左 オ ー バ ー ハ ン グ は、p C a M V 3 5 S に 対 す る 相 同 性 の 領 域 ( 約 3 0 b p ) を 有 し、ア ン チ セ ン ス 鎖 の 右 オ ー バ ー ハ ン グ は、3 5 S タ ー ミ ネ ー タ 領 域 に 対 す る 相 同 性 の 領 域 ( 約 3 0 b p ) を 有 す る。セ ン ス 鎖 の 右 オ ー バ ー ハ ン グ と ア ン チ セ ン ス 鎖 の 左 オ ー バ ー ハ ン グ は、小 さ な ヘ ア ピ ン 領 域 ( a c a c g t ) の 含 有 に よ り、互 い の 重 複 部 分 を 有 す る こ と に な る。ア ン プ リ コ ン を 作 製 す る た め の プ ラ イ マ ー 配 列 を 表 1 3 に 示 す。

## 【 手 続 補 正 1 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 追 加

【 補 正 の 内 容 】

## 【 配 列 表 】

2023002559000001.xml

10

20

30

40

50