【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5年6月19日(2023.6.19)

【国際公開番号】WO2020/252378
【公表番号】特表2022-538789(P2022-538789A)
【公表日】令和4年9月6日(2022.9.6)
【年通号数】公開公報(特許)2022-164
【出願番号】特願2021-573843(P2021-573843)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ 15/09(2006.01)
Ｃ１２Ｎ 15/63(2006.01)
Ｃ１２Ｎ 15/867(2006.01)
Ｃ１２Ｎ 15/861(2006.01)
Ｃ１２Ｎ 15/864(2006.01)
Ｃ１２Ｎ 15/869(2006.01)
Ｃ１２Ｎ 9/22(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ 15/09 １１０
Ｃ１２Ｎ 15/63 Ｚ
Ｃ１２Ｎ 15/867 Ｚ
Ｃ１２Ｎ 15/861 Ｚ
Ｃ１２Ｎ 15/864１００Ｚ
Ｃ１２Ｎ 15/869 Ｚ
Ｃ１２Ｎ 9/22 ＺＮＡ

【手続補正書】
【提出日】令和5年6月9日(2023.6.9)
【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】
ＣＬＵＳＴ．１２１１４３、ＣＬＵＳＴ．１９６６８２、又はＣＬＵＳＴ．０８９５３７のエンジニアリングされた天然に存在しないクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）－Ｃａｓシステムであって、
ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むＲＮＡガイド；及び
ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質又は前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質をコードする核酸
を含み、
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、配列番号６０１のアミノ酸配列と、或いは表２、表８、又は表１２に提供されるアミノ酸配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のアミノ酸配列を含み；
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、前記ＲＮＡガイドに結合し、前記スペーサー配列に相補的な前記標的核酸配列を標的化することができる、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム。
【請求項２】

前記システムが、ＣＬＵＳＴ．１２１１４３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムであり、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、表２に提供されるアミノ酸配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のアミノ酸配列を含み、任意選択で、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、ＣＬＵＳＴ．１２１１４３　３３０００１４８３９エフェクタータンパク質である、請求項１に記載のシステム。

【請求項３】

ｉ）前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の認識能を有し、前記標的核酸は、核酸配列５’－ＴＴＧ－３’を含むＰＡＭを含む

ｉｉ）前記ダイレクトリピート配列が、表３に提供されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のヌクレオチド配列を含む；

ｉｉｉ）前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、約２２ヌクレオチド～約４０ヌクレオチドを含む；或いは

ｉｖ）前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、約２６ヌクレオチド～約３５ヌクレオチドを含む、請求項２に記載のシステム。

【請求項４】

前記システムが、ＣＬＵＳＴ．１９６６８２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムであり、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、表８に提供されるアミノ酸配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のアミノ酸配列を含み、任意選択で、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、ＣＬＵＳＴ．１９６６８２　３３０００２５６３８エフェクタータンパク質である、請求項１に記載のシステム。

【請求項５】

ｉ）前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の認識能を有し、前記標的核酸は、核酸配列５’－ＣＧ－３’を含むＰＡＭを含む

ｉｉ）前記ダイレクトリピート配列が、表９に提供されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のヌクレオチド配列を含む；

ｉｉｉ）前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、約１７ヌクレオチド～約４４ヌクレオチドを含む；或いは

ｉｖ）前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、２６～３８ヌクレオチドを含む、請求項４に記載のシステム。

【請求項６】

前記システムが、ＣＬＵＳＴ．０８９５３７のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムであり、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、表１２に提供されるアミノ酸配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のアミノ酸配列を含み、任意選択で、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、ＣＬＵＳＴ．０８９５３７　ＣＡＡＡＣＸ０１０００００６５２エフェクタータンパク質である、請求項１に記載のシステム。

【請求項７】

ｉ）前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の認識能を有し、前記標的核酸は、核酸配列５’－ＴＴＣ－３’を含むＰＡＭを含む

ｉｉ）前記ダイレクトリピート配列が、表１３に提供されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８

％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のヌクレオチド配列を含む；
ｉｉｉ）前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、約２０ヌクレオチド～約４０ヌクレオチドを含む；或いは
ｉｖ）前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、２５～３７ヌクレオチドを含む、請求項６に記載のシステム。
【請求項８】
ａ）前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が：
ｉ）少なくとも１つ（例えば、１つ、２つ、又は３つ）のＲｕｖＣドメイン；
ｉｉ）分割されたＲｕｖＣドメイン；又は
ｉｉｉ）触媒残基（例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸）
を含む；
ｂ）前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、前記標的核酸を切断する；
ｃ）前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、ペプチドタグ、蛍光タンパク質、塩基編集ドメイン、ＤＮＡメチル化ドメイン、ヒストン残基修飾ドメイン、局在化因子、転写修飾因子、光ゲート制御因子、化学誘導性因子、又はクロマチン可視化因子を更に含む；
ｄ）前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質をコードする前記核酸が、
ｉ）細胞での発現にコドン最適化される；
ｉｉ）プロモーターに作動可能に連結されている；又は
ｉｉｉ）ベクター内にあり、任意選択で、前記ベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ファージベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、又は単純ヘルペスベクターを含む；或いは
ｅ）前記標的核酸が：
ｉ）ＤＮＡである；又は
ｉｉ）ＰＡＭを含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項９】
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質及びＲＮＡガイドによる前記標的核酸のターゲティングにより、前記標的核酸に修飾が生じ、前記標的核酸の前記修飾が：
ｉ）二本鎖切断イベントである；
ｉｉ）一本鎖切断イベントである；
ｉｉｉ）挿入イベントを生じる；又は
ｉｖ）欠失イベントを生じる、請求項８に記載のシステム。
【請求項１０】
ドナー鋳型核酸を更に含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１１】
ｉ）前記ＲＮＡガイドが、ｔｒａｃｒＲＮＡを含む；又は
ｉｉ）前記システムがｔｒａｃｒＲＮＡを更に含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１２】
前記システムが、ナノ粒子、リポソーム、エキソソーム、微小胞、又は遺伝子銃を含む送達組成物中に存在する、請求項１～１１のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１３】
細胞内（例えば、真核細胞又は原核細胞）にある、請求項１～１１のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１４】
請求項１～１３のいずれか一項に記載のシステムを含む組成物であって、前記組成物は、前記システムを細胞内の標的核酸に結合させる方法における使用のための組成物であり、前記方法は、
（ａ）前記システムを提供すること；及び
（ｂ）前記システムを前記細胞に送達すること

を含み、前記細胞が前記標的核酸を含み、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が前記ＲＮＡガイドに結合し、前記スペーサー配列が前記標的核酸に結合する、組成物。
【請求項１５】
請求項１～１３のいずれか一項に記載のシステムを含む組成物であって、前記組成物は、標的核酸の編集方法における使用のための組成物であり、前記方法は、前記システムを前記標的核酸に接触させることを含む、組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１９】
他の実施形態
本発明はその詳細な説明を伴い説明されているが、前述の説明は例示であり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定する意図はないことが理解されるべきである。他の態様、利点、及び変形例が、以下の特許請求の範囲内にある。
特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：
（項目１）
ＣＬＵＳＴ．１２１１４３、ＣＬＵＳＴ．１９６６８２、又はＣＬＵＳＴ．０８９５３７のエンジニアリングされた天然に存在しないクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）－Ｃａｓシステムであって、
ダイレクトリピート配列と標的核酸へのハイブリダイゼーション能を有するスペーサー配列とを含むＲＮＡガイド；及び
ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質又は前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質をコードする核酸
を含み、
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、表２、表８、又は表１２に提供されるアミノ酸配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のアミノ酸配列を含み；
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、前記ＲＮＡガイドに結合し、前記スペーサー配列に相補的な前記標的核酸配列を標的化することができる、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム。
（項目２）
前記システムが、ＣＬＵＳＴ．１２１１４３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムであり、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、表２に提供されるアミノ酸配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む、項目１に記載のシステム。
（項目３）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、ＣＬＵＳＴ．１２１１４３　３３０００１４８３９エフェクタータンパク質である、項目２に記載のシステム。
（項目４）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の認識能を有し、前記標的核酸は、核酸配列５’－ＴＴＧ－３’を含むＰＡＭを含む、項目２又は３に記載のシステム。
（項目５）
前記ダイレクトリピート配列が、表３に提供されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のヌクレオチド配列を含む、項目２～４のいずれか一項に記載のシステム。

（項目６）
前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、約２２ヌクレオチド～約４０ヌクレオチドを含む、項目２～５のいずれか一項に記載のシステム。
（項目７）
前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、約２６ヌクレオチド～約３５ヌクレオチドを含む、項目２～６のいずれか一項に記載のシステム。
（項目８）
前記システムが、ＣＬＵＳＴ．１９６６８２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムであり、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、表８に提供されるアミノ酸配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む、項目１に記載のシステム。
（項目９）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、ＣＬＵＳＴ．１９６６８２　３３０００２５６３８エフェクタータンパク質である、項目８に記載のシステム。
（項目１０）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の認識能を有し、前記標的核酸は、核酸配列５’－ＣＧ－３’を含むＰＡＭを含む、項目８又は９に記載のシステム。
（項目１１）
前記ダイレクトリピート配列が、表９に提供されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のヌクレオチド配列を含む、項目８～１０のいずれか一項に記載のシステム。
（項目１２）
前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、約１７ヌクレオチド～約４４ヌクレオチドを含む、項目８～１１のいずれか一項に記載のシステム。
（項目１３）
前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、２６～３８ヌクレオチドを含む、項目８～１２のいずれか一項に記載のシステム。
（項目１４）
前記システムが、ＣＬＵＳＴ．０８９５３７のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムであり、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、表１２に提供されるアミノ酸配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む、項目１に記載のシステム。
（項目１５）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、ＣＬＵＳＴ．０８９５３７　ＣＡＡＡＣＸ０１０００００６５２エフェクタータンパク質である、項目１４に記載のシステム。
（項目１６）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の認識能を有し、前記標的核酸は、核酸配列５’－ＴＴＣ－３’を含むＰＡＭを含む、項目１４又は１５に記載のシステム。
（項目１７）
前記ダイレクトリピート配列が、表１３に提供されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％（例えば、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一のヌクレオチド配列を含む、項目１４～１６のいずれか一項に記載のシステム。

（項目１８）
前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、約２０ヌクレオチド～約４０ヌクレオチドを含む、項目１４～１７のいずれか一項に記載のシステム。
（項目１９）
前記ＲＮＡガイドの前記スペーサー配列が、２５～３７ヌクレオチドを含む、項目１４～１８のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２０）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、少なくとも１つ（例えば、１つ、２つ、又は３つ）のＲｕｖＣドメインを含む、項目１～１９のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２１）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、分割されたＲｕｖＣドメインを含む、項目１～２０のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２２）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、触媒残基（例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸）を含む、項目１～２１のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２３）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、前記標的核酸を切断する、項目１～２２のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２４）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、ペプチドタグ、蛍光タンパク質、塩基編集ドメイン、ＤＮＡメチル化ドメイン、ヒストン残基修飾ドメイン、局在化因子、転写修飾因子、光ゲート制御因子、化学誘導性因子、又はクロマチン可視化因子を更に含む、項目１～２３のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２５）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質をコードする前記核酸が、細胞での発現にコドン最適化される、項目１～２４のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２６）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質をコードする前記核酸が、プロモーターに作動可能に連結されている、項目１～２５のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２７）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質をコードする前記核酸が、ベクター内にある、項目１～２６のいずれか一項に記載のシステム。
（項目２８）
前記ベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ファージベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、又は単純ヘルペスベクターを含む、項目２７に記載のシステム。
（項目２９）
前記標的核酸がＤＮＡである、項目１～２８のいずれか一項に記載のシステム。
（項目３０）
前記標的核酸が、ＰＡＭを含む、項目１～２９のいずれか一項に記載のシステム。
（項目３１）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が、非特異的ヌクレアーゼ活性を有する、項目１～３０のいずれか一項に記載のシステム。
（項目３２）
前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質及びＲＮＡガイドによる前記標的核酸のターゲティングにより、前記標的核酸に修飾が生じる、項目１～３１のいずれか一項に記載のシステム。
（項目３３）
前記標的核酸の前記修飾が、二本鎖切断イベントである、項目３２に記載のシステム。
（項目３４）

前記標的核酸の前記修飾が、一本鎖切断イベントである、項目３２に記載のシステム。
（項目３５）
前記標的核酸の前記修飾により、挿入イベントが生じる、項目３２に記載のシステム。
（項目３６）
前記標的核酸の前記修飾により、欠失イベントが生じる、項目３２に記載のシステム。
（項目３７）
前記修飾により細胞毒性又は細胞死が生じる、項目３２～３６のいずれか一項に記載のシステム。
（項目３８）
ドナー鋳型核酸を更に含む、項目１～３７のいずれか一項に記載のシステム。
（項目３９）
前記ドナー鋳型核酸がＤＮＡである、項目３８に記載のシステム。
（項目４０）
前記ドナー鋳型核酸がＲＮＡである、項目３８に記載のシステム。
（項目４１）
前記ＲＮＡガイドが、ｔｒａｃｒＲＮＡ、モジュレーターＲＮＡ、又はその両方を含む、項目１～４０のいずれか一項に記載のシステム。
（項目４２）
前記システムがｔｒａｃｒＲＮＡを更に含む、項目１～４１のいずれか一項に記載のシステム。
（項目４３）
前記システムがモジュレーターＲＮＡを更に含む、項目１～４２のいずれか一項に記載のシステム。
（項目４４）
前記システムが、ナノ粒子、リポソーム、エキソソーム、微小胞、又は遺伝子銃を含む送達組成物中に存在する、項目１～４３のいずれか一項に記載のシステム。
（項目４５）
細胞内にある、項目１～４３のいずれか一項に記載のシステム。
（項目４６）
前記細胞が真核細胞である、項目４５に記載のシステム。
（項目４７）
前記細胞が原核細胞である、項目４５に記載のシステム。
（項目４８）
項目１～４７のいずれか一項に記載のシステムを、細胞内の標的核酸に結合させる方法であって、
（ａ）前記システムを提供すること；及び
（ｂ）前記システムを前記細胞に送達すること
を含み、前記細胞が前記標的核酸を含み、前記ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質が前記ＲＮＡガイドに結合し、前記スペーサー配列が前記標的核酸に結合する、方法。
（項目４９）
標的核酸の編集方法であって、項目１～４７のいずれか一項に記載のシステムを前記標的核酸に接触させることを含む、方法。