

【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6年1月16日(2024.1.16)

【国際公開番号】WO2021/142342

【公表番号】特表2023-510352(P2023-510352A)

【公表日】令和5年3月13日(2023.3.13)

【年通号数】公開公報(特許)2023-047

【出願番号】特願2022-542340(P2022-542340)

【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 15/55(2006.01)

C 1 2 N 15/63(2006.01)

C 1 2 N 15/86(2006.01)

C 1 2 N 15/864(2006.01)

C 1 2 N 15/867(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

C 1 2 N 15/13(2006.01)

C 1 2 N 15/33(2006.01)

20

C 1 2 N 15/87(2006.01)

C 1 2 N 15/90(2006.01)

C 1 2 N 1/15(2006.01)

C 1 2 N 1/19(2006.01)

C 1 2 N 1/21(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 P 21/02(2006.01)

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 K 9/08(2006.01)

A 6 1 K 9/19(2006.01)

30

A 6 1 P 3/06(2006.01)

A 6 1 P 3/00(2006.01)

A 6 1 P 1/16(2006.01)

A 6 1 P 9/10(2006.01)

A 6 1 P 9/00(2006.01)

A 6 1 P 3/10(2006.01)

A 6 1 P 9/12(2006.01)

A 6 1 P 3/04(2006.01)

A 6 1 P 25/28(2006.01)

A 6 1 P 25/00(2006.01)

40

A 6 1 P 27/02(2006.01)

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 31/713(2006.01)

A 6 1 K 38/16(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/113 Z Z N A

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/55

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 15/86 Z

50

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z  
 C 1 2 N 15/867 Z  
 C 1 2 N 15/12  
 C 1 2 N 15/13  
 C 1 2 N 15/33  
 C 1 2 N 15/87 Z  
 C 1 2 N 15/90 1 0 0 Z  
 C 1 2 N 1/15  
 C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 P 21/02 C  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 K 9/08  
 A 6 1 K 9/19  
 A 6 1 P 3/06  
 A 6 1 P 3/00  
 A 6 1 P 1/16  
 A 6 1 P 9/10  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 3/10  
 A 6 1 P 9/12  
 A 6 1 P 3/04  
 A 6 1 P 25/28  
 A 6 1 P 25/00  
 A 6 1 P 27/02  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 31/713  
 A 6 1 K 38/16

10

20

30

## 【手続補正書】

【提出日】令和6年1月5日(2024.1.5)

## 【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】

C a s Xタンパク質と、ガイドリボ核酸 (g R N A) とを含むシステムであって、ここで  
 前記 g R N A がプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシシ9型 (P C S K 9) 遺伝子  
 標的核酸配列に相補的な標的化配列を含む、システム。

40

【請求項2】

前記 P C S K 9 遺伝子が、

- a . P C S K 9 イントロン、
- b . P C S K 9 エクソン、
- c . P C S K 9 イントロン - エクソン接合部、
- d . P C S K 9 調節要素、および
- e . 遺伝子間領域、からなる群から選択される領域に1つ以上の変異を含む、

ならびにここで、前記変異が、野生型 P C S K 9 遺伝子配列と比較して、1つ以上のヌ

50

クレオチドの挿入、欠失、置換、重複、または逆位である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記変異が、機能獲得型変異であるか、または機能喪失型突然変異である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記 gRNA が、CCAGCGACUAUGUCGUAGUGG (配列番号 32) のステムループ配列、またはそれに対して少なくとも 1、2、3、4、または 5 つのミスマッチを有する配列番号 32 の配列を含む足場を有する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 5】

前記 gRNA の前記標的化配列が、配列番号 247 ~ 303、315 ~ 436、612 ~ 2100、および 2286 ~ 13861 からなる群から選択される配列、またはそれに対して少なくとも約 65%、少なくとも約 75%、少なくとも約 85%、もしくは少なくとも約 95% の同一性を有する配列を含む、請求項 1 に記載のシステム。 10

【請求項 6】

前記 gRNA の前記標的化配列が、配列番号 4555 の配列を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 7】

前記 gRNA が、配列番号 2201 ~ 2285 からなる群から選択される配列、またはそれに対して少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% の配列同一性を有する配列を含む足場を有する、請求項 1 に記載のシステム。 20

【請求項 8】

前記 gRNA が、化学的に改変される、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 9】

前記 CasX タンパク質が、2 つ以上の異なる CasX タンパク質由来のタンパク質ドメインを含むキメラ CasX タンパク質である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 10】

前記 CasX タンパク質が、配列番号 1 の 101 ~ 191 位のアミノ酸またはそれに対して少なくとも 70% の配列同一性を有する配列を含む非標的鎖結合 (NTSB) ドメイン、ならびに配列番号 2 の 648 ~ 812 位および 922 ~ 978 位のアミノ酸またはそれに対して少なくとも 70% の配列同一性を有する配列を含む RuvC DNA 切断ドメインを含む、請求項 1 に記載のシステム。 30

【請求項 11】

前記 CasX タンパク質が、少なくとも 1 つのキメラドメインを含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記 CasX タンパク質が、RuvC 切断ドメインを含み、ここで前記 RuvC 切断ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸 648 ~ 812 の配列と比較して 1 つ以上のアミノ酸改変を有する配列番号 2 のアミノ酸 648 ~ 812 の配列を含む、ならびにここで前記 CasX タンパク質が、配列番号 2 と比較して、改善された標的 DNA の編集、改善された標的 DNA 切断速度、切断能力のあるリボ核タンパク質 (RNP) 複合体の形成の増加、改善されたプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 利用および改善された溶解性からなる群より選択される 1 つ以上の改善された特性を示す、請求項 1 に記載のシステム。 40

【請求項 13】

前記 CasX タンパク質が、配列番号 49 ~ 160、329、441、443、445、447 ~ 460、472、474、476、478、480、482、484、486、488、もしくは 490 の配列、またはそれに対して少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、もしくは少なくとも約 95%、もしくは少なくとも約 95%、もしくは少なくとも約 96%、もしくは 50

は少なくとも約 97%、もしくは少なくとも約 98%、もしくは少なくとも約 99% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 14】

前記 CasX タンパク質が、配列番号 138 の配列またはそれに対して少なくとも約 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 13 に記載のシステム。

【請求項 15】

前記 CasX タンパク質が、1 つ以上の核局在化シグナル (NLS) をさらに含む、およびここで、前記 1 つ以上の NLS が、前記 CasX タンパク質の C 末端で、もしくはその近くで発現されるか、または前記 CasX タンパク質の N 末端で、もしくはその近くで発現される、請求項 14 に記載のシステム。

10

【請求項 16】

前記 CasX タンパク質が、前記 gRNA とともにリボ核タンパク質複合体 (RNP) を形成することができる、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 17】

前記 RNP が、標的核酸に結合することおよび標的核酸を改変することができる、ならびにここで前記改変することが、PCSK9 タンパク質の発現のロックダウンまたはロックアウトを含む、請求項 16 に記載のシステム。

【請求項 18】

前記 CasX タンパク質と前記 gRNA とを含む RNP が、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 の参照 CasX タンパク質と、配列番号 4 ~ 16 のうちのいずれか 1 つの配列を含む gRNA とを含む RNP と比較して、少なくとも 1 つ以上の改善された特性を示す、請求項 17 に記載のシステム。

20

【請求項 19】

前記改善された特性が、前記 CasX タンパク質の改善されたフォールディング、ガイド核酸 (gNA) に対する改善された結合親和性、標的 DNA に対する改善された結合親和性、標的 DNA の編集において ATC、CTC、GTC、または TTC を含む 1 つ以上の PAM 配列のより広範なスペクトルを利用する改善された能力、前記標的 DNA の改善された巻き戻し、増加した編集活性、改善された編集効率、改善された編集特異性、増加したヌクレアーゼ活性、改善された標的核酸配列切断速度、二本鎖切断のための増加した標識鎖負荷、一本鎖ニッキングのための減少した標識鎖負荷、減少したオフターゲット切断、非標的 DNA 鎖の改善された結合、改善されたタンパク質安定性、改善されたタンパク質溶解性、改善されたリボ核タンパク質複合体 (RNP) 形成、切断能力のある RNP の高い割合、改善されたタンパク質 : gNA 複合体 (RNP) 安定性、改善されたタンパク質 : gNA 複合体溶解性、改善されたタンパク質収量、改善されたタンパク質発現、および改善された融合特性からなる群のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 18 に記載のシステム。

30

【請求項 20】

前記 RNP の前記改善された特性が、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 の前記参照 CasX タンパク質と、配列番号 4 ~ 16 のうちのいずれか 1 つの配列を含む前記 gRNA との前記 RNP と比較して、少なくとも約 1.1 ~ 約 100 倍以上改善される、請求項 19 に記載のシステム。

40

【請求項 21】

前記 CasX タンパク質が、触媒的に不活性な CasX (dCasX) タンパク質であり、前記 dCasX と前記 gNA との RNP が、前記 PCSK9 標的核酸に結合する能力を保持する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 22】

前記 dCasX が、残基 :

a . 配列番号 1 の前記 CasX タンパク質に対応する D672、E769、および / もしくは D935、または

b . 配列番号 2 の前記 CasX タンパク質に対応する D659、E756、および /

50

もしくはD 9 2 2、に変異を含む、請求項 2 1に記載のシステム。

【請求項 2 3】

請求項 1 3に記載のC a s Xをコードする配列を含む、核酸。

【請求項 2 4】

請求項 7に記載のg R N Aをコードする配列を含む、核酸。

【請求項 2 5】

a . 請求項 7に記載のg R N A ;

b . 請求項 1 3に記載のC a s Xタンパク質、または

c . 請求項 2 3もしくは2 4に記載の核酸、

を含むベクター。

10

【請求項 2 6】

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、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(A A V)ベクター、単純ヘルペスウイルス(H S V)ベクター、ウイルス様粒子(V L P)、プラスミド、ミニサークル、ナノ粒子、ナノプラスミド、D N Aベクター、およびR N Aベクターからなる群から選択される、請求項 2 5に記載のベクター。

【請求項 2 7】

a . 請求項 1 ~ 2 2のいずれか一項に記載のシステム、

b . 請求項 2 3に記載の核酸

c . 請求項 2 4に記載の核酸、および

1つ以上の薬学的に好適な賦形剤を含む、医薬組成物。

20

【請求項 2 8】

細胞集団におけるP C S K 9 標的核酸配列を改変する方法であって、前記P C S K 9 標的核酸が1つ以上の変異を含み、前記方法が、前記集団細胞に、

a . 請求項 1 ~ 2 2のいずれか一項に記載のシステム、

b . 請求項 2 3もしくは2 4に記載の核酸、または

c . ( a ) ~ ( b )の組み合わせ、を導入することを含み、

前記g R N Aによって標的化される前記細胞の前記P C S K 9 標的核酸配列が、前記C a s Xタンパク質によって改変される、

ならびにここで、前記改変することが、前記細胞集団における前記P C S K 9 遺伝子のノックダウンまたはノックアウトをもたらし、それによって、非機能的P C S K 9 タンパク質の発現が、前記P C S K 9 遺伝子が改変されていない細胞と比較して、少なくとも約1 0 %、少なくとも約2 0 %、少なくとも約3 0 %、少なくとも約4 0 %、少なくとも約5 0 %、少なくとも約6 0 %、少なくとも約7 0 %、少なくとも約8 0 %、または少なくとも約9 0 %減少される、方法。

30

【請求項 2 9】

P C S K 9 関連疾患の治療を必要とする対象におけるP C S K 9 関連疾患を治療する方法における使用のための組成物であって、

a . 請求項 1 ~ 2 2のいずれか一項に記載のシステム、

b . 請求項 2 3もしくは2 4に記載の核酸、または

c . ( a ) ~ ( b )の組み合わせ、

を含む、組成物。

40

【請求項 3 0】

前記P C S K 9 関連疾患が、常染色体優性高コレステロール血症(A D H)、高コレステロール血症、総コレステロールレベルの上昇、高脂質血症、低密度リポタンパク質(L D L)レベルの上昇、L D Lコレステロールレベルの上昇、高密度リポタンパク質レベルの低下、脂肪肝、冠動脈性心疾患、虚血、脳卒中、末梢血管疾患、血栓症、2型糖尿病、高血圧、アテローム性動脈硬化症、肥満、アルツハイマー病、神経変性、加齢性黄斑変性症(A M D)、またはそれらの組み合わせである、請求項 2 9に記載の組成物。

【請求項 3 1】

50

前記対象が、げっ歯類、マウス、ラット、非ヒト霊長類およびヒトからなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

- a. 請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のシステム、
- b. 請求項 2 3 に記載の核酸
- c. 請求項 2 4 に記載の核酸、または
- d. ( a ) ~ ( c ) の組み合わせ、および  
1 つ以上の薬学的に好適な賦形剤を含む、キット。

10

20

30

40

50