

【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3年11月11日(2021.11.11)

【公表番号】特表2020-537516(P2020-537516A)

【公表日】令和2年12月24日(2020.12.24)

【年通号数】公開・登録公報2020-052

【出願番号】特願2020-519386(P2020-519386)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/80 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

A 6 1 K 35/12 (2015.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

C 1 2 N 9/22 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/115 (2010.01)

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/861 (2006.01)

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 5/0781 (2010.01)

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 9/80 Z N A Z

C 1 2 N 15/63 Z

A 6 1 K 35/12

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 3/00

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 15/55

C 1 2 N 9/22

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/115 Z

C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/861 Z

C 1 2 N 15/867 Z

C 1 2 N 15/113 Z

C 1 2 N 5/0781

C 1 2 N 5/0783

【手続補正書】

【提出日】令和3年10月1日(2021.10.1)

【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】

部位特異的塩基編集のための操作された組成物であって、

（a）標的化ドメインと、

（b）アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインと、を含み、前記アデノシンデアミナーゼが、活性をシチジンデアミナーゼに変換するように修飾される、組成物。

【請求項２】

前記アデノシンデアミナーゼが、E 3 9 6、C 4 5 1、V 3 5 1、R 4 5 5、T 3 7 5、K 3 7 6、S 4 8 6、Q 4 8 8、R 5 1 0、K 5 9 4、R 3 4 8、G 5 9 3、S 3 9 7、H 4 4 3、L 4 4 4、Y 4 4 5、F 4 4 2、E 4 3 8、T 4 4 8、A 3 5 3、V 3 5 5、T 3 3 9、P 5 3 9、V 5 2 5、及びI 5 2 0から選択される１つ以上の位置で変異されるか、

前記アデノシンデアミナーゼが、E 4 8 8、V 3 5 1、S 4 8 6、T 3 7 5、S 3 7 0、P 4 6 2、及びN 5 9 7から選択される１つ以上の位置で変異されるか、または

前記アデノシンデアミナーゼが、E 4 8 8 Q、V 3 5 1 G、S 4 8 6 A、T 3 7 5 S、S 3 7 0 C、P 4 6 2 A、及びN 5 9 7 Iから選択される１つ以上の変異を含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、ヒト、頭足類、または*Drosophila*アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインであるか、または前記標的化ドメインに共有結合または非共有結合で連結される、請求項１又は２に記載の組成物。

【請求項４】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、h A D A R 2－Dアミノ酸配列のグルタミン酸488、または相同A D A Rタンパク質における対応する位置における変異を含むように修飾されている、請求項１から３の何れか一項に記載の組成物。

【請求項５】

位置488または相同A D A Rタンパク質における対応する位置の前記グルタミン酸残基が、グルタミン残基によって置き換えられるか（E 4 8 8 Q）、または前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、変異E 4 8 8 Qを含む変異されたh A D A R 2 dまたは変異E 1 0 0 8 Qを含む変異されたh A D A R 1 dである、請求項４に記載の組成物。

【請求項６】

前記標的化ドメインが、触媒的に不活性なC a s 1 3タンパク質、または前記触媒的に不活性なC a s 1 3タンパク質をコードするヌクレオチド配列である、請求項１～５のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項７】

前記触媒的に不活性なC a s 1 3タンパク質が、触媒的に不活性なC a s 1 3 a、触媒的に不活性なC a s 1 3 b、または触媒的に不活性なC a s 1 3 cであるか、または表１、２、３、または４のいずれかに列挙される細菌種からなる群から選択される細菌種に由来するC a s 1 3ヌクレアーゼから得られる、請求項６に記載の組成物。

【請求項８】

直接反復配列に連結されるガイド配列を含むガイド分子、または前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項 9】

目的の標的座位におけるアデニンを修飾するのに適した、操作された非天然型のシステムであって、請求項 6 に記載の組成物と、

(c) 直接反復配列に連結されるガイド配列を含むガイド分子、または前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列

とを含み、

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記 Cas 13 タンパク質もしくは前記ガイド分子に共有結合または非共有結合で連結されるか、または送達後にそれらに連結するように適合されており、

前記ガイド配列が、アデニンを含む標的 RNA 配列とハイブリダイズして RNA 二本鎖を形成することができ、前記ガイド配列が、前記アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成された前記 RNA 二本鎖において A-C ミスマッチをもたらす、システム。

【請求項 10】

目的の標的 RNA 配列におけるアデニンを修飾する方法であって、前記標的 RNA に、請求項 9 に記載のシステムを送達することを含み、

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記 RNA 二本鎖において前記アデニンを脱アミノする、方法：ただし、ヒトを処置する方法は除く。

【請求項 11】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記死んだ Cas 13 タンパク質の N 末端または C 末端に融合される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、リンカーによって前記死んだ Cas 13 タンパク質に融合される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記リンカーが、(GGGGS)₃₋₁₁、GSG₅もしくはLEPGEKPYKCPEC GKSFSSQSGALTRHQRTHTRであるか、または前記リンカーがXTENリンカーである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、アダプタータンパク質に連結され、前記ガイド分子または前記死んだ Cas 13 タンパク質が、前記アダプタータンパク質に結合することができるアダプター配列を含む、請求項 10 から 13 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記アダプター配列が、MS2、PP7、Q β 、F2、GA、fr、JP501、M12、R17、BZ13、JP34、JP500、KU1、M11、MX1、TW18、VK、SP、FI、ID2、NL95、TW19、AP205、 ϕ Cb5、 ϕ Cb8r、 ϕ Cb12r、 ϕ Cb23r、7s、及びPRR1から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記死んだ Cas 13 タンパク質の内部ループに挿入される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 Cas 13 タンパク質が、Cas 13a タンパク質であり、前記 Cas 13a が、2つのHEPNドメインにおいて、特に、Leptotrichia wadeiに由来するCas 13a タンパク質の位置R474及びR1046またはCas 13a オーソログのそれらに対応するアミノ酸位置で1つ以上の変異を含むか、

前記 Cas 13 タンパク質が、Cas 13b タンパク質であり、前記 Cas 13b が、Bergeyella zoohelcum ATCC 43767に由来するCas 13b タンパク質の位置R116、H121、R1177、もしくはH1182のうちの1

つ以上、またはC a s 1 3 b オーソログのそれらに対応するアミノ酸位置において変異を含むか、または

前記C a s 1 3 タンパク質が、C a s 1 3 b タンパク質であり、前記C a s 1 3 b が、B e r g e y e l l a z o o h e l c u m A T C C 4 3 7 6 7 に由来するC a s 1 3 b タンパク質のR 1 1 6 A、H 1 2 1 A、R 1 1 7 7 A、またはH 1 1 8 2 Aのうちの1つ以上、もしくはC a s 1 3 b オーソログのそれらに対応するアミノ酸位置において変異を含む、

請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記ガイド配列が、前記標的配列と前記RNA二本鎖を形成することができる約20～約53nt、約25～約53nt、約29～約53nt、または約40～約50ntの長さを有する、請求項10～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記非対合Cと前記ガイド配列の5'末端との間の距離が、20～30ヌクレオチドであるか、

前記ガイド配列が、前記標的RNA配列における異なるアデノシン部位に対応する2つ以上のミスマッチを含むか、または2つのガイド分子が使用され、各々が、前記標的RNA配列における異なるアデノシン部位に対応するミスマッチを含むか、

前記C a s 1 3 タンパク質及び任意選択で前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、1つ以上の異種核局在化シグナル（複数可）（NLS）を含むか、または

前記方法が、前記目的の標的配列を決定することと、前記標的配列に存在する前記アデニンを最も効率的に脱アミノする前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを選択することと、を含む、

請求項10～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記目的の標的RNA配列が、細胞内にある、請求項10～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記細胞が、真核細胞、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、植物細胞、動物、植物、インビトロにおけるRNAポリヌクレオチドに含まれる、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記成分（a）、（b）、及び（c）が、リボ核タンパク質複合体または1つ以上のポリヌクレオチド分子として前記細胞に送達される、請求項10～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記1つ以上のポリヌクレオチド分子が、成分（a）及び／または（c）をコードする1つ以上のmRNA分子を含むか

1つ以上のベクター内に含まれるか、または

前記C a s 1 3 タンパク質、前記ガイド分子、及び前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを発現するように動作可能に構成された1つ以上の調節エレメントを含み、任意選択で、前記1つ以上の調節エレメントが誘導性プロモーターを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記1つ以上のポリヌクレオチド分子または前記リボ核タンパク質複合体が、粒子、小胞、または1つ以上のウイルスベクターを介して送達される、請求項22又は23に記載の方法。

【請求項25】

前記粒子が、脂質、糖、金属またはタンパク質を含むか、

前記粒子が、脂質ナノ粒子を含むか

前記小胞が、エクソソームまたはリボソームを含むか、または
前記1つ以上のウイルスベクターが、アデノウイルス、1つ以上のレンチウイルス、または1つ以上のアデノ関連ウイルスのうちの1つ以上を含む、
請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記方法が、1つ以上の標的RNA配列の操作によって細胞、細胞株または生物を修飾する、請求項10～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記目的の標的RNAにおける前記アデニンの前記脱アミノが、病原性G→AまたはC→T点変異を含有する転写産物によって引き起こされる疾患を治療する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記疾患が、Meier-Gorlin症候群、Seckel症候群4、Joubert症候群5、Leber先天性黒内障10、2型Charcot-Marie-Tooth病、2型Charcot-Marie-Tooth病、2C型Usher症候群、脊髄小脳失調症28、脊髄小脳失調症28、脊髄小脳失調症28、QT延長症候群2、Sjogren-Larsson症候群、遺伝性果糖尿症、遺伝性果糖尿症、神経芽細胞腫、神経芽細胞腫、Kallmann症候群1、Kallmann症候群1、Kallmann症候群1、異染色性白質ジストロフィー、Rettsyndrome症候群、筋萎縮性側索硬化症10型、Lifraumeni症候群、または表5に列挙される疾患、または中途終結疾患から選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記修飾が、生物の妊孕性に影響するか、
前記修飾が、前記標的RNA配列のスプライシングに影響するか、
前記修飾が、アミノ酸変化を導入し、がん細胞における新たな抗原の発現を引き起こす転写産物における変異を導入するか、
前記標的RNAが、マイクロRNA内に含まれるか、
前記目的の標的RNAにおける前記アデニンの前記脱アミノが、遺伝子の機能の獲得または機能の欠失を引き起こすか、または
前記目的の標的RNAにおける前記アデニンの前記脱アミノが、がん細胞によって発現される遺伝子の機能の獲得または機能の欠失を引き起こす、
請求項26から28の何れか一項に記載の方法。

【請求項30】

請求項10から29の何れか一項に記載の方法から得られる修飾された細胞、または前記修飾された細胞の後代であって、前記細胞が、前記方法を受けていない対応する細胞と比較して、前記目的の標的RNAにおける前記アデニンに代わるヒポキサンチンまたはグアニンを含む、修飾された細胞または後代。

【請求項31】

請求項30に記載の修飾された細胞を含む、非ヒト動物または植物。

【請求項32】

請求項30に記載の修飾された細胞を含み、前記修飾された細胞の存在が、患者における疾患を治療する、細胞治療剤。

【請求項33】

請求項1に記載の(a)および(b)をコードする配列を含む1以上のポリヌクレオチドを含む、目的の標的座位におけるアデニンを修飾するのに適した、操作された非天然型のベクターシステム。

【請求項34】

a) 前記ガイド配列を含む前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される第1の調節エレメントと、

b) 前記触媒的に不活性なCas13タンパク質をコードするヌクレオチド配列に動作

可能に連結される第2の調節エレメントと、

c) 前記第1または第2の調節エレメントの制御下にあるか、または第3の調節エレメントに動作可能に連結されるアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列と、を含む1つ以上のベクターを含み、

アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列が第3の調節エレメントに動作可能に連結される場合、前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、発現後に前記ガイド分子または前記 Cas 13 タンパク質に連結するように適合され、

成分(a)、(b)、及び(c)は、前記システムの同じまたは異なるベクター上に位置する、請求項33に記載の操作された非天然型のベクターシステム。

【請求項35】

請求項33又は34に記載のシステムを含む、インビトロもしくはエキスビボ宿主細胞もしくはその後代、または細胞株もしくはその後代。

【請求項36】

前記細胞が、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞、または植物細胞、治療用T細胞、または抗体産生B細胞である、請求項35に記載の宿主細胞もしくはその後代または細胞株、またはその後代。

【請求項37】

前記シトシンが、グアノシンに5'隣接しないか、

前記アデノシンデアミナーゼが、ADAR、任意選択でhuADAR、任意選択で(hu)ADAR1または(hu)ADAR2であるか、

前記 Cas 13、好ましくは Cas 13bが、切断され、好ましくはC末端切断され、好ましくは、前記 Cas 13が、対応する野生型 Cas 13の切断された機能的バリエーションであるか、

前記アデノシンデアミナーゼが、RNA特異的アデノシンデアミナーゼであるか、または、

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記ADARの1つ以上の変異、好ましくは本明細書に記載の変異、例えば、図43A~43D、44、45、46A~46B、47A~47Bのいずれかに提供される変異、またはADARホモログまたはオーソログにおける対応する変異を含むように修飾されている、

請求項10から29の何れか一項に記載の方法。