

【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8月5日(2021.8.5)

【公表番号】特表2020-528761(P2020-528761A)
 【公表日】令和2年10月1日(2020.10.1)
 【年通号数】公開・登録公報2020-040
 【出願番号】特願2020-520440(P2020-520440)
 【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 5/10 (2006.01)
 A 0 1 H 1/00 (2006.01)
 A 0 1 K 67/027 (2006.01)
 A 6 1 K 38/46 (2006.01)
 A 6 1 K 47/59 (2017.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 1 2 N 9/80 Z N A
 C 1 2 N 5/10
 A 0 1 H 1/00 A
 A 0 1 K 67/027
 A 6 1 K 38/46
 A 6 1 K 47/59
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 K 35/17 Z
 A 6 1 P 37/02

【手続補正書】

【提出日】令和3年6月23日(2021.6.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0101

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0101】

【図57-1】dCas13-RNA編集の設計パラメーターの特徴付けA)野生型Cas13b及び触媒的に不活性なH133A/H1058A Cas13b(dCas13b)を標的とするGlucのノックダウン効率。B)タイリングCluc標的化ガイドで試験した、野生型ADAR2触媒ドメインまたは機能亢進E488Q変異体ADAR2触媒ドメインのいずれかに融合したdCas13bによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。C)CypriidinalルシフェラーゼW85X(配列番号737-745)を標的とする30ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。D)PPIB(配列番号746-753)を標的とする50ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。E)REPAIRv1によるルシフェラーゼ

活性の回復に対するリンカーの選択の影響。F) REPAIR v1 (配列番号754及び755)によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均+/- S.E.M.を表す。

【図57-2】 dCas13-ADAR2 RNA編集の設計パラメーターの特徴付けA) 野生型Cas13b及び触媒的に不活性なH133A/H1058A Cas13b (dCas13b)を標的とするGlucのノックダウン効率。B) タイリングCluc標的化ガイドで試験した、野生型ADAR2触媒ドメインまたは機能亢進E488Q変異体ADAR2触媒ドメインのいずれかに融合したdCas13bによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。C) CypridinalルシフェラーゼW85X (配列番号737-745)を標的とする30ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。D) PPIB (配列番号746-753)を標的とする50ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。E) REPAIR v1によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。F) REPAIR v1 (配列番号754及び755)によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均+/- S.E.M.を表す。

【図57-3】 dCas13-ADAR2 RNA編集の設計パラメーターの特徴付けA) 野生型Cas13b及び触媒的に不活性なH133A/H1058A Cas13b (dCas13b)を標的とするGlucのノックダウン効率。B) タイリングCluc標的化ガイドで試験した、野生型ADAR2触媒ドメインまたは機能亢進E488Q変異体ADAR2触媒ドメインのいずれかに融合したdCas13bによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。C) CypridinalルシフェラーゼW85X (配列番号737-745)を標的とする30ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。D) PPIB (配列番号746-753)を標的とする50ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。E) REPAIR v1によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。F) REPAIR v1 (配列番号754及び755)によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均+/- S.E.M.を表す。

【図57-4】 dCas13-ADAR2 RNA編集の設計パラメーターの特徴付けA) 野生型Cas13b及び触媒的に不活性なH133A/H1058A Cas13b (dCas13b)を標的とするGlucのノックダウン効率。B) タイリングCluc標的化ガイドで試験した、野生型ADAR2触媒ドメインまたは機能亢進E488Q変異体ADAR2触媒ドメインのいずれかに融合したdCas13bによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。C) CypridinalルシフェラーゼW85X (配列番号737-745)を標的とする30ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。D) PPIB (配列番号746-753)を標的とする50ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。E) REPAIR v1によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。F) REPAIR v1 (配列番号754及び755)によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均+/- S.E.M.を表す。

【図57-5】 dCas13-ADAR2 RNA編集の設計パラメーターの特徴付けA) 野生型Cas13b及び触媒的に不活性なH133A/H1058A Cas13b (dCas13b)を標的とするGlucのノックダウン効率。B) タイリングCluc標的化ガイドで試験した、野生型ADAR2触媒ドメインまたは機能亢進E488Q変異体ADAR2触媒ドメインのいずれかに融合したdCas13bによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。C) CypridinalルシフェラーゼW85X (配列番号737-745)を標的とする30ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。D) PPIB (配列番号746-753)を標的とする50ntガイドのA I編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。E) REPAIR v1によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。F) REPAIR v1 (配列番号754及び755)によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影

響。値は平均 + / - S . E . M . を表す。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0201

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0201】

本発明の方法において使用するための適切なリンカーは、当業者によく知られており、こうしたリンカーとしては、限定されないが、直鎖または分岐鎖の炭素リンカー、ヘテロ環式炭素リンカー、またはペプチドリンカーが挙げられる。しかしながら、本明細書で使用される場合、リンカーは、共有結合（炭素-炭素結合または炭素-ヘテロ原子結合）であってもよい。特定の実施形態では、標的化ドメイン及びアデノシンデアミナーゼを、それぞれのタンパク質がその必要機能特性を確実に保持する上で十分な距離をとって隔てるためにリンカーが使用される。好ましいペプチドリンカー配列は、可塑性の広がった立体構造を取り、秩序だった二次構造を取る傾向を示さないものである。特定の実施形態では、リンカーは、単量体、二量体、多量体、またはポリマーであり得る化学的部分であってもよい。好ましくは、リンカーは、アミノ酸を含む。可塑性リンカーにおける典型的なアミノ酸としては、Gly、Asn、及びSerが挙げられる。したがって、特定の実施形態では、リンカーは、Glyアミノ酸、Asnアミノ酸、及びSerアミノ酸のうちの1つ以上が組み合わさったものを含む。他のほぼ中性のアミノ酸（Thr及びAlaなど）もまた、リンカー配列において使用され得る。リンカーの例は、Maratea et al. (1985), Gene 40:39-46、Murphy et al. (1986) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 83:8258-62; 米国特許第4,935,233号; 及び米国特許第4,751,180号に開示されている。例えば、GlySerリンカーであるGGG、GGGS、またはGGGを使用してもよい。適切な長さを得るために、GGGリンカー、GGGリンカー、GGGSリンカー、またはGGGGSリンカーを、3回反復形態（例えば(GGG)₃（配列番号12）、(GGGG)₃）、または5回反復形態、6回反復形態、7回反復形態、9回反復形態、もしくは12回（配列番号13）以上反復する形態として使用してもよい。特定の実施形態では、リンカー、例えば(GGGGS)₃が好ましくは本明細書で用いられる。(GGGGGS)₆(GGGGGS)₉または(GGGGS)₁₂を代替物として使用することも好ましい場合がある。他の好ましい代替物は、(GGGGGS)₁（配列番号14）、(GGGGGS)₂（配列番号15）、(GGGGGS)₄、(GGGGGS)₅、(GGGGGS)₇、(GGGGGS)₈、(GGGGGS)₁₀、または(GGGGS)₁₁である。さらに別の実施形態では、リンカーとしてLEPGEKPYKCECGKSFSGALTRHQRTHTR（配列番号11）が使用される。さらに追加の実施形態では、リンカーは、XTENリンカーである（配列番号919）。本発明はまた、AD機能化組成物を使用して、標的化された脱アミノ化による疾患または疾患を引き起こすバリエーションを治療または予防する方法に関する。例えば、Aの脱アミノ化は、病原性GAまたはCT点変異を含む転写物によって引き起こされる疾患を改善し得る。本発明で治療または予防され得る疾患の例としては、がん、マイヤー・ゴーリン症候群、セッケル症候群4、ジュベール症候群5、レーバー先天性黒内障10; シャルコー・マリー・トゥース病、2型; シャルコー・マリー・トゥース病、2型; アッシャー症候群、2C型; 脊髄小脳性運動失調28; 脊髄小脳性運動失調28; 脊髄小脳性運動失調28; 長QT症候群2; シェーグレン・ラーソン症候群; 遺伝性フルクトース尿症; 遺伝性フルクトース尿症; 神経芽細胞腫; 神経芽細胞腫; カルマン症候群1; カルマン症候群1; カルマン症候群1; 異染性白質ジストロフィーが挙げられる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0284

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0284】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配列番号704に定義されるようなhADAR1-Dの野生型アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、hADAR1-D配列に1つ以上の変異を含み、その結果、hADAR1-Dの編集効率及び/または基質編集優先性が特定の要件に応じて改変される。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】1262

【補正方法】変更

【補正の内容】

【1262】

図96~97に示すように、多数のV351、T375、R455変異体がC U脱アミノ化活性を触媒する能力について試験して、C U活性を有する特定のV351変異体をさらに検証した。図95に示す構築物ガイド対で使用されるガイド配列を以下に示す。

		ガイド 配列 (配列番号 774-781)	ガイド seq + G (配列番号 782-789)	組み換え (配列番号 790-797)	トップの順序 (配列番号 798- 805)	ボトムの 順序 (配列番号 806-813)
G l u c A	5 0	ttcatcttgggc gtgcActtgatg tgggacaggcag atcagacagccc ct	Gttcatcttggg cgtgcActtgat gtgggacaggca gatcagacagcc cct	aggggctgtctg atctgcctgtcc cacatcaagtgc acgcccgaagatg aac	caccGttcatctt gggcgtgcActtg atgtgggacaggc agatcagacagcc cct	caacaggggctgtct gatctgcctgtccca catcaagtgcacgcc caagatgaac
G l u c C	5 0	ttcatcttgggc gtgcCcttgatg tgggacaggcag atcagacagccc ct	Gttcatcttggg cgtgcCcttgat gtgggacaggca gatcagacagcc cct	aggggctgtctg atctgcctgtcc cacatcaagggc acgcccgaagatg aac	caccGttcatctt gggcgtgcCcttg atgtgggacaggc agatcagacagcc cct	caacaggggctgtct gatctgcctgtccca catcaagggcacgcc caagatgaac
G l u c T	5 0	ttcatcttgggc gtgcTcttgatg tgggacaggcag atcagacagccc ct	Gttcatcttggg cgtgcTcttgat gtgggacaggca gatcagacagcc cct	aggggctgtctg atctgcctgtcc cacatcaagagc acgcccgaagatg aac	caccGttcatctt gggcgtgcTcttg atgtgggacaggc agatcagacagcc cct	caacaggggctgtct gatctgcctgtccca catcaagagcacgcc caagatgaac
G l u c G	5 0	ttcatcttgggc gtgcGcttgatg tgggacaggcag atcagacagccc ct	Gttcatcttggg cgtgcGcttgat gtgggacaggca gatcagacagcc cct	aggggctgtctg atctgcctgtcc cacatcaagcgc acgcccgaagatg aac	caccGttcatctt gggcgtgcGcttg atgtgggacaggc agatcagacagcc cct	caacaggggctgtct gatctgcctgtccca catcaagcgcacgcc caagatgaac
G l u c A	3 0	gcActtgatgtg ggacaggcagat cagaca	GgcActtgatgt gggacaggcaga tcagaca	tgtctgatctgc ctgtcccacatc aagtgcc	caccGgcActtga tgtgggacaggca gatcagaca	caactgtctgatctg cctgtcccacatcaa gtgcc
G l u c C	3 0	gcCcttgatgtg ggacaggcagat cagaca	GgcCcttgatgt gggacaggcaga tcagaca	tgtctgatctgc ctgtcccacatc aagggcc	caccGgcCcttga tgtgggacaggca gatcagaca	caactgtctgatctg cctgtcccacatcaa gggcc
G l u c T	3 0	gcTcttgatgtg ggacaggcagat cagaca	GgcTcttgatgt gggacaggcaga tcagaca	tgtctgatctgc ctgtcccacatc aagagcc	caccGgcTcttga tgtgggacaggca gatcagaca	caactgtctgatctg cctgtcccacatcaa gagcc

G						
l						
u		gcGcttgatgtg	GgcGcttgatgt	tgtctgatctgc	caccGgcGcttga	caactgtctgatctg
c	3	ggacaggcagat	gggacaggcaga	ctgtcccacate	tgtgggacaggca	cctgtcccacatcaa
G	0	cagaca	tcagaca	aagcgcc	gatcagaca	gcgcc

PC0 715	caccGttcatcttgggcgtgcActtgatgtgggacaggcaga tcagacagcccct (配列番号 814)	pAB0212 50bp A フリップ F v2 を標的するガイド
PC0 716	caccGttcatcttgggcgtgcCcttgatgtgggacaggcaga tcagacagcccct (配列番号 815)	pAB0212 50bp C フリップ F v2 を標的するガイド
PC0 717	caccGttcatcttgggcgtgcTcttgatgtgggacaggcaga tcagacagcccct (配列番号 816)	pAB0212 50bp T フリップ F v2 を標的するガイド
PC0 718	caccGttcatcttgggcgtgcGcttgatgtgggacaggcaga tcagacagcccct (配列番号 817)	pAB0212 50bp G フリップ F v2 を標的するガイド
PC0 719	caccGgcActtgatgtgggacaggcagatcagaca(配列番 号 818)	pAB0212 30bp A フリップ F v2 を標的するガイド
PC0 720	caccGgcCcttgatgtgggacaggcagatcagaca(配列番 号 819)	pAB0212 30bp C フリップ F v2 を標的するガイド
PC0 721	caccGgcTcttgatgtgggacaggcagatcagaca(配列番 号 820)	pAB0212 30bp T フリップ F v2 を標的するガイド
PC0 722	caccGgcGcttgatgtgggacaggcagatcagaca(配列番 号 821)	pAB0212 30bp G フリップ F v2 を標的するガイド
PC0 723	Caacaggggctgtctgatctgectgtcccacatcaagtgcac gcccagaatgaac (配列番号 822)	pAB0212 50bp A フリップ R v2 を標的するガイド
PC0 724	Caacaggggctgtctgatctgectgtcccacatcaagggcac gcccagaatgaac (配列番号 823)	pAB0212 50bp C フリップ R v2 を標的するガイド
PC0 725	Caacaggggctgtctgatctgectgtcccacatcaagagcac gcccagaatgaac (配列番号 824)	pAB0212 50bp T フリップ R v2 を標的するガイド
PC0 726	Caacaggggctgtctgatctgectgtcccacatcaagcgcac gcccagaatgaac (配列番号 825)	pAB0212 50bp G フリップ R v2 を標的するガイド
PC0 727	Caactgtctgatctgectgtcccacatcaagtgcc (配列 番号 826)	pAB0212 30bp A フリップ R v2 を標的するガイド
PC0 728	Caactgtctgatctgectgtcccacatcaagggcc (配列 番号 827)	pAB0212 30bp C フリップ R v2 を標的するガイド
PC0 729	Caactgtctgatctgectgtcccacatcaagagccc (配列 番号 828)	pAB0212 30bp T フリップ R v2 を標的するガイド
PC0 730	caactgtctgatctgectgtcccacatcaagcgccc(配列番 号 829)	pAB0212 30bp G フリップ R v2 を標的するガイド

