【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12月9日(2021.12.9)

【公表番号】特表2021-503278(P2021-503278A)
【公表日】令和3年2月12日(2021.2.12)
【年通号数】公開・登録公報2021-006
【出願番号】特願2020-524642(P2020-524642)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/113　(2010.01)
Ｃ１２Ｎ　15/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｑ　1/44　(2006.01)
Ｃ１２Ｑ　1/6844　(2018.01)
Ｃ１２Ｑ　1/6851　(2018.01)
Ｃ１２Ｑ　1/686　(2018.01)
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　9/22　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/16　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　35/12　(2015.01)
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/46　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/53　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/542　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/543　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/09　１１０
Ｃ１２Ｎ　15/113　ＺＮＡＺ
Ｃ１２Ｎ　15/10　Ｚ
Ｃ１２Ｑ　1/44
Ｃ１２Ｑ　1/6844　Ｚ
Ｃ１２Ｑ　1/6851　Ｚ
Ｃ１２Ｑ　1/686　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　1/15
Ｃ１２Ｎ　1/19
Ｃ１２Ｎ　5/10
Ｃ１２Ｎ　9/22
Ａ６１Ｋ　38/16
Ａ６１Ｋ　48/00
Ａ６１Ｋ　35/12
Ａ６１Ｐ　43/00　１０５
Ａ６１Ｋ　38/46
Ｇ０１Ｎ　33/53　Ｍ
Ｇ０１Ｎ　33/542　Ａ
Ｇ０１Ｎ　33/543　５４１Ｚ

【手続補正書】

【提出日】令和3年10月29日(2021.10.29)
【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】
（ａ）ＣａｓＺポリペプチド、または前記ＣａｓＺポリペプチドをコードする核酸と、
（ｂ）標的核酸の標的配列に対して相補的なガイド配列及び前記ＣａｓＺポリペプチドに結合することができる領域を含む、ＣａｓＺガイドＲＮＡ、または前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードする核酸と
を含む、非天然型である組成物。
【請求項２】
前記ＣａｓＺポリペプチドがＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ　ＤＮＡ標的化酵素である、請求項1に記載の組成物。
【請求項３】
前記ＣａｓＺポリペプチドの長さが、３５０～９００アミノ酸である、請求項1または2に記載の組成物。
【請求項４】
前記ＣａｓＺポリペプチドが、ＲｕｖＣ－Ｉサブドメイン、ＲｕｖＣ－ＩＩサブドメイン、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩサブドメインを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５】
前記ＣａｓＺポリペプチドが１つの型のヌクレアーゼドメインのみを有し、該ヌクレアーゼドメインがＲｕｖＣヌクレアーゼドメインである、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】
前記ＲｕｖＣヌクレアーゼドメインが、第一のＡｓｐ残基、Ｇｌｕ残基、及び第二のＡｓｐ残基を含む、請求項5に記載の組成物。
【請求項７】
前記ガイドＲＮＡが、真核細胞核酸に対して相補的である、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記ＣａｓＺポリペプチドが、SEQ ID NO: 1～47から選択されるアミノ酸配列と７０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記ＣａｓＺポリペプチドが、SEQ ID NO: 3、8、及び12から選択されるアミノ酸配列と７０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記ＣａｓＺポリペプチドが、SEQ ID NO: 3、8、及び12から選択されるアミノ酸配列と95％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１】
前記ＣａｓＺポリペプチドが、タンパク質の天然型触媒活性を減少させる、１つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記ＣａｓＺポリペプチドが、異種ポリペプチドである異種部分と融合する、請求項1

～11のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３】
前記ＣａｓＺポリペプチドが核局在シグナル（ＮＬＳ）とコンジュゲートする、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４】
ＦＲＥＴ対またはクエンチャー／蛍光体対である蛍光発光色素対を含む一本鎖検出ＤＮＡを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５】
前記ガイド配列及びＣａｓＺポリペプチドに結合する前記領域が、互いに異種である、請求項1～14のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６】
マグネシウムイオンである二価金属イオンを含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７】
前記ガイド配列の長さが、16～23連結ヌクレオチドである、請求項1～16のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８】
標的核酸を、請求項1～17のいずれか一項に記載の組成物を含む操作された及び／または非天然型の複合体と接触させる方法。
【請求項１９】
前記標的核酸の修飾、前記標的核酸からの転写の調節、または標的核酸に関連するポリペプチドの修飾をもたらす、請求項18に記載の方法。
【請求項２０】
前記標的核酸が、切断されることによって修飾される、請求項19に記載の方法。
【請求項２１】
前記標的核酸が、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、ＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、及び染色体外ＤＮＡから選択される、請求項18～20のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記接触が、インビトロにおいて細胞の外部、インビトロにおいて細胞の内部、またはエクスビボで起きる、請求項18～21のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記接触が、
（ａ）前記ＣａｓＺポリペプチド、または前記ＣａｓＺポリペプチドをコードする核酸、及び
（ｂ）前記ＣａｓＺガイドＲＮＡ、または前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードする核酸
のうちの少なくとも1つを標的細胞に導入すること
を含む、請求項18～21のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記ＣａｓＺポリペプチドをコードする前記核酸が、前記標的細胞における発現のためにコドン最適化された非天然型配列である、請求項23に記載の方法。
【請求項２５】
前記標的細胞が、真核細胞である、請求項23または24に記載の方法。
【請求項２６】
前記真核細胞が、植物細胞、真菌細胞、単細胞真核生物、哺乳動物細胞、爬虫類細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、魚類細胞、寄生虫細胞、節足動物細胞、無脊椎動物の細胞、脊椎動物の細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞からなる群から選択される、請求項25に記載の方法。
【請求項２７】
前記接触が、ＤＮＡドナー鋳型を前記標的細胞に導入することを含む、請求項23～26の

いずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記標的核酸をＣａｓＺトランス活性化非コードＲＮＡ（ｔｒａｎｃＲＮＡ）と接触させることを含む、請求項23～27のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
遺伝子修飾された真核細胞であって、
（ａ）ＣａｓＺポリペプチド、または前記ＣａｓＺポリペプチドをコードする核酸、及び
（ｂ）標的核酸の標的配列に対して相補的なガイド配列を含みかつ前記ＣａｓＺポリペプチドに結合することができる領域を含む、ＣａｓＺガイドＲＮＡ、または前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードする核酸
を含む、前記真核細胞。
【請求項３０】
（ａ）前記ＣａｓＺポリペプチドをコードする前記核酸が、
（ｉ）前記ＣａｓＺポリペプチドをコードしかつ（ｉｉ）異種プロモーターと動作可能に連結しているヌクレオチド配列
を含むこと、
（ｂ）前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードする前記核酸が、
（ｉ）前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードしかつ（ｉｉ）異種プロモーターと動作可能に連結しているヌクレオチド配列
を含むこと、及び
（ｃ）前記ＣａｓＺ　ｔｒａｎｃＲＮＡをコードする前記核酸が、
（ｉ）前記ＣａｓＺ　ｔｒａｎｃＲＮＡをコードしかつ（ｉｉ）異種プロモーターと動作可能に連結しているヌクレオチド配列
を含むこと
のうちの少なくとも1つを特徴とする、請求項1～17及び29のいずれか一項に記載の組成物または真核細胞。
【請求項３１】
患者の治療処置の方法における使用のための、請求項1～17及び29～30のいずれか一項に記載の組成物または真核細胞。
【請求項３２】
（i）前記ＣａｓＺポリペプチドをコードする前記核酸、前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードする前記核酸、及び前記ＣａｓＺ　ｔｒａｎｃＲＮＡをコードする前記核酸のうちの少なくとも1つが、組み換え発現ベクターである、
（ii）前記ＣａｓＺガイドＲＮＡが、修飾核酸塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間結合、修飾糖部分、ロックド核酸、ペプチド核酸、及びデオキシリボヌクレオチドのうちの1つ以上を含む、かつ／または
（iii）前記ＣａｓＺポリペプチドが、対応する野生型ＣａｓＺタンパク質と比較して減少したヌクレアーゼ活性を有するバリアントＣａｓＺポリペプチドである、
請求項1～17及び29～31のいずれか一項に記載の組成物または真核細胞。
【請求項３３】
前記ＣａｓＺポリペプチドが、異種部分とコンジュゲートする、請求項1～17及び29～32のいずれか一項に記載の組成物または真核細胞。
【請求項３４】
前記異種部分が、異種ポリペプチドである、請求項33に記載の組成物または真核細胞。
【請求項３５】
前記異種ポリペプチドが、（ｉ）ＤＮＡ修飾活性を有し、（ｉｉ）転写を増加もしくは減少させる能力を示し、及び／または（ｉｉｉ）ＤＮＡに関連するポリペプチドを修飾する酵素活性を有する、請求項34に記載の組成物または真核細胞。
【請求項３６】

（ａ）前記ＣａｓＺポリペプチドをコードする前記核酸が、
（ｉ）前記ＣａｓＺポリペプチドをコードしかつ（ｉｉ）異種プロモーターと動作可能に連結しているヌクレオチド配列
を含むこと、
（ｂ）前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードする前記核酸が、
（ｉ）前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードしかつ（ｉｉ）異種プロモーターと動作可能に連結しているヌクレオチド配列
を含むこと、及び
（ｃ）前記ＣａｓＺ　ｔｒａｎｃＲＮＡをコードする前記核酸が、
（ｉ）前記ＣａｓＺ　ｔｒａｎｃＲＮＡをコードしかつ（ｉｉ）異種プロモーターと動作可能に連結しているヌクレオチド配列
を含むこと
のうちの少なくとも1つを特徴とする、請求項18～28のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
（i）前記ＣａｓＺポリペプチドをコードする前記核酸、前記ＣａｓＺガイドＲＮＡをコードする前記核酸、及び前記ＣａｓＺ　ｔｒａｎｃＲＮＡをコードする前記核酸のうちの少なくとも1つが、組み換え発現ベクターである、
（ii）前記ＣａｓＺガイドＲＮＡが、修飾核酸塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間結合、修飾糖部分、ロックド核酸、ペプチド核酸、及びデオキシリボヌクレオチドのうちの1つ以上を含む、かつ／または
（iii）前記ＣａｓＺポリペプチドが、対応する野生型ＣａｓＺタンパク質と比較して減少したヌクレアーゼ活性を有するバリアントＣａｓＺポリペプチドである、
請求項18～28及び36のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記ＣａｓＺポリペプチドが、異種部分とコンジュゲートする、請求項18～28及び36～37のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記異種部分が、異種ポリペプチドである、請求項38に記載の方法。
【請求項４０】
前記異種ポリペプチドが、（ｉ）ＤＮＡ修飾活性を有し、（ｉｉ）転写を増加もしくは減少させる能力を示し、及び／または（ｉｉｉ）ＤＮＡに関連するポリペプチドを修飾する酵素活性を有する、請求項39に記載の方法。
【請求項４１】
試料中の標的ＤＮＡを検出する方法であって、
（ａ）前記試料を、
（ｉ）請求項1～17のいずれか一項に記載の組成物、及び
（ｉｉ）一本鎖であり、かつ前記ガイドＲＮＡの前記ガイド配列とハイブリダイズしない、検出ＤＮＡ
と接触させることと、
（ｂ）前記ＣａｓＺポリペプチドによる前記一本鎖検出ＤＮＡの切断によって生成された検出可能なシグナルを測定し、それにより、前記標的ＤＮＡを検出することと
を含む、前記方法。
【請求項４２】
前記標的ＤＮＡが、一本鎖である、請求項41に記載の方法。
【請求項４３】
前記標的ＤＮＡが、二本鎖である、請求項41に記載の方法。
【請求項４４】
前記標的ＤＮＡが、ウイルスＤＮＡであり、かつパポバウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、及びパルボウイルスから選択されるウイルスに由来する、請求項41～43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４５】
前記試料が、細胞または細胞溶解物からのＤＮＡ分子を含む、請求項41～44のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記接触が、インビトロまたはエクスビボにある細胞の内部で行われる、請求項41～45のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記細胞が、真核細胞である、請求項46に記載の方法。
【請求項４８】
前記標的ＤＮＡが、10ａＭ程度の低さの濃度で検出され得る、請求項41～47のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記試料中に存在する前記標的ＤＮＡの量を決定することを含み、
前記量を決定することが、
前記検出可能なシグナルを測定して試験測定値を生成することと、
参照試料または細胞によって生成される検出可能なシグナルを測定して、参照測定値を生成することと、
前記試験測定値を前記参照測定値と比較して、前記試料中に存在する標的ＤＮＡの量を決定することと
を含む、請求項41～48のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
検出可能なシグナルの測定が、金ナノ粒子ベースの検出、蛍光偏光、コロイド相転移／分散、電気化学検出、及び半導体ベースの感知のうちの1つ以上を含む、請求項41～49のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記試料中の核酸を増幅することを含む、請求項41～50のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記増幅が、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）を含む等温増幅を含む、請求項51に記載の方法。
【請求項５３】
前記増幅が、ステップ（ａ）の前記接触の前に、またはステップ（ａ）の前記接触と同時に開始する、請求項41～52のいずれか一項に記載の方法。