

【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1月31日(2023.1.31)

【国際公開番号】WO2020/150716

【公表番号】特表2022-517435(P2022-517435A)

【公表日】令和4年3月8日(2022.3.8)

【年通号数】公開公報(特許)2022-041

【出願番号】特願2021-541712(P2021-541712)

【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 1 2 N 15/55(2006.01)

C 1 2 N 15/12(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 15/13(2006.01)

C 1 2 N 15/14(2006.01)

C 1 2 N 7/01(2006.01)

A 6 1 K 35/76(2015.01)

20

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 P 3/12(2006.01)

A 6 1 P 13/12(2006.01)

A 6 1 P 19/08(2006.01)

A 6 1 P 9/00(2006.01)

C 1 2 N 9/16(2006.01)

C 0 7 K 19/00(2006.01)

C 0 7 K 16/00(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/62 Z

30

C 1 2 N 15/55 Z N A

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 15/86 Z

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/14

C 1 2 N 7/01

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00

40

A 6 1 P 3/12

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 19/08

A 6 1 P 9/00

C 1 2 N 9/16 C

C 1 2 N 9/16 Z

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 16/00

【手続補正書】

50

【提出日】令和5年1月20日(2023.1.20)

【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】

病的石灰化または病的骨化の疾患または障害を治療または予防することを必要とする対象において病的石灰化または病的骨化の疾患または障害を治療または予防するための医薬組成物であるか、あるいは

ENPP1タンパク質の欠乏を有する対象を治療するための医薬組成物であって、ENPP1タンパク質またはENPP3タンパク質の触媒ドメインを含む組換えポリペプチドをコードする治療有効量のウイルスベクターを含む、医薬組成物。

【請求項2】

前記疾患もしくは障害または前記ENPP1タンパク質の欠乏が、前記対象におけるNPP1遺伝子の機能欠損型突然変異またはABCC6遺伝子の機能欠損型突然変異と関連する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記ウイルスベクターが組換えENPP1ポリペプチドをコードするか、

前記ウイルスベクターが組換えENPP3ポリペプチドをコードするか、

前記ウイルスベクターが組換えENPP1-Fc融合ポリペプチドまたは組換えENPP1-アルブミン融合ポリペプチドをコードするか、

前記ウイルスベクターが組換えENPP3-Fc融合ポリペプチドまたは組換えENPP3-アルブミン融合ポリペプチドをコードするか、

前記ウイルスベクターがENPP1またはENPP3に融合したシグナルペプチドを含む組換えポリペプチドをコードするか、および/または、

前記ウイルスベクターがENPP1-FcまたはENPP1-アルブミンをコードし、好ましくは、前記シグナルペプチドがアズロシジンシグナルペプチド、NPP2シグナルペプチドまたはNPP7シグナルペプチドである、

請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクターまたは単純ヘルペスベクターまたはアルファウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターであるか

前記ウイルスベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9およびAAV-rh74からなる群から選択される血清型を有するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであるか、あるいは

前記ウイルスベクターが、ENPP1-Fc融合ポリペプチドに融合したアズロシジンシグナルペプチドを含む組換えポリペプチドをコードするアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記ウイルスベクターがENPP1-Fc融合ポリペプチドをコードするAAVベクターであり、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k gまたは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ v g / k gの投薬量で対象に投与されるか、

前記ウイルスベクターがAAVベクターであり、 $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ v g / k gの投薬量で対象に投与されるか、あるいは

前記ウイルスベクターがENPP1-FcをコードするAAVベクターであり、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k gの投薬量で対象に投与され、

好ましくは、ENPP1-Fcポリペプチドをコードする前記AAVベクターの対象への投与が、前記対象において、血漿ピロリン酸(PPi)の用量依存的増加および血漿E

10

20

30

40

50

N P P 1 濃度の用量依存的増加をもたらすものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

E N P P 1 タンパク質または E N P P 3 タンパク質の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、ウイルスベクター。

【請求項 7】

ポリペプチド配列が、E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質の細胞外ドメインを含むか、

前記ポリペプチドが E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質の膜貫通ドメインを含むか、および/または

前記ポリペプチドが E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質のヌクレアーゼドメインを含む、請求項 6 に記載のウイルスベクター。

10

【請求項 8】

前記ポリペプチドが配列番号 1 の残基 99 ~ 925 (P r o S e r C y s ~ G l n G l u A s p) を含むか、

前記ポリペプチドが配列番号 7 の残基 31 ~ 875 (L e u L e u V a l ~ T h r T h r I l e) を含むか、

前記ポリペプチドが配列番号 1 の残基 191 ~ 591 (V a l G l u G l u ~ G l y S e r L e u) を含むか、

前記ポリペプチドが配列番号 7 の残基 140 ~ 510 (L e u G l u G l u ~ G l u V a l G l u) を含むか、

20

前記ポリペプチドが配列番号 92 の残基 1 ~ 827 (P r o S e r C y s ~ G l n G l u A s p) を含むか、あるいは

前記ポリペプチドが配列番号 89 の残基 1 ~ 833 (P h e T h r A l a ~ G l n G l u A s p) または配列番号 91 の残基 1 ~ 830 (G l y L e u L y s ~ G l n G l u A s p) を含む、請求項 6 または 7 に記載のウイルスベクター。

【請求項 9】

前記ウイルスベクターが、昆虫ウイルスベクターではないか、および/または、哺乳動物細胞に感染するものである、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチド配列がプロモーター配列をコードし、好ましくは、前記プロモーターが肝臓特異的プロモーターであるか、あるいは、アルブミンプロモーター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (P E P C K) プロモーターおよびアルファ - 1 - アンチトリプシンプロモーターからなる群から選択される肝臓特異的プロモーターであり、好ましくは、前記ポリヌクレオチド配列が、ポリアデニル化シグナルをコードするヌクレオチド配列を含むか；あるいは、前記ポリヌクレオチドが、E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質をコードするヌクレオチド配列に対してアミノ末端にあるシグナルペプチドをコードし、

30

好ましくは、前記シグナルペプチドがアズロシジンシグナルペプチドである、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

40

【請求項 11】

前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであるか、あるいは、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9 および A A V - r h 7 4 からなる群から選択される血清型を有する A A V ベクターである、請求項 6 ~ 10 のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチド配列が、前記 E N P P 1 に融合した前記アズロシジンシグナルペプチドまたは前記 E N P P 3 に融合した前記アズロシジンシグナルペプチドおよび F c ポリペプチドに融合した前記 E N P P 1 または前記 E N P P 3 をコードして、それぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端の順で、アズロシジンシグナルペプチド - E N P P 1 - F c

50

またはアズロシジンシグナルペプチド - E N P P 3 - F c を形成するか、あるいは

前記ポリヌクレオチド配列が、前記 E N P P 1 に融合した前記アズロシジンシグナルペプチドまたは前記 E N P P 3 に融合した前記アズロシジンシグナルペプチドおよびヒト血清アルブミンに融合した前記 E N P P 1 または前記 E N P P 3 をコードして、それぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端の順で、アズロシジンシグナルペプチド - E N P P 1 - アルブミンまたはアズロシジンシグナルペプチド - E N P P 3 - アルブミンを形成する、請求項 6 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項 1 3】

前記ポリペプチドが、(i) E N P P 1 タンパク質または E N P P 3 タンパク質および (i i) 半減期延長ドメインを含む融合タンパク質であり、

10

好ましくは、

前記半減期延長ドメインが、I g G F c ドメインまたはその機能的フラグメントが存在しない場合の前記ポリペプチドの半減期と比較して、哺乳動物において前記ポリペプチドの半減期を延ばすことができる、前記 I g G F c ドメインまたは前記 I g G F c ドメインの機能的フラグメントであるか、

前記半減期延長ドメインが、アルブミンドメインまたはその機能的フラグメントが存在しない場合の前記ポリペプチドの半減期と比較して、哺乳動物において前記ポリペプチドの半減期を延ばすことができる、前記アルブミンドメインまたは前記アルブミンドメインの機能的フラグメントであるか、または

前記半減期延長ドメインが、前記融合タンパク質において、前記 E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質に対してカルボキシ末端にあり、好ましくは、

20

前記 I g G F c ドメインが配列番号 3 4 に示されるアミノ酸配列を含むか、あるいは前記アルブミンドメインが配列番号 3 5 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項 1 4】

前記ポリヌクレオチドがリンカー配列をコードし、

好ましくは、前記リンカー配列が配列番号 5 7 ~ 8 8 および 9 4 からなる群から選択されるか、および / または

前記リンカー配列が、前記融合タンパク質の前記 E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質と前記半減期延長ドメインを接続し、

30

好ましくは、

前記ポリペプチドが配列番号 8 9、9 1、9 2 および 9 3 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項 1 5】

組換えウイルスベクターを産生するための方法であって、

i . E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞または細胞の集団を提供するステップであって、前記細胞が、組換えウイルスベクターへの前記ポリヌクレオチドのパッケージングおよび / またはアセンブリーに必須なウイルスタンパク質を発現するステップ ; ならびに

i i . 前記ポリヌクレオチドを含む前記組換えウイルスベクターのパッケージングの前記アセンブリーに適切な条件下で、前記細胞または細胞の集団を維持するステップを含む、方法。

40

【請求項 1 6】

前記細胞が哺乳動物細胞であり、好ましくはげっ歯類細胞またはヒト細胞である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記ウイルスベクターが請求項 6 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のベクターである、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記細胞もしくは細胞の集団から、または前記細胞もしくは細胞の集団が維持されてい

50

た培地から前記組換えウイルスベクターを精製することをさらに含む、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法から精製された組換えウイルスベクター。

【請求項 20】

請求項 6 ~ 14 のいずれか一項に記載のウイルスベクターまたは請求項 19 に記載の組換えウイルスベクターおよび医薬的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項 21】

哺乳類、好ましくはヒトの疾患の進行を予防するかまたは低減させるための医薬組成物であって、好ましくは、前記疾患が、X連鎖性低リン酸血症(XLH)、慢性腎臓疾患(CKD)、ミネラル骨障害(MBD)、血管石灰化、軟組織の病的石灰化、軟組織の病的骨化、PXE、乳児の全身性動脈石灰化(GACI)および後縦靭帯骨化症(PLL)からなる群から選択される、請求項 20 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 22】

病的石灰化または病的骨化の疾患または障害を治療または予防することを必要とする対象において病的石灰化または病的骨化の疾患または障害を治療または予防するための、あるいは、ENPP1タンパク質の欠乏を有する対象を治療するための、請求項 6 ~ 14 のいずれか一項に記載のウイルスベクターまたは請求項 19 に記載の組換えウイルスベクターを含む医薬組成物。

【請求項 23】

前記疾患もしくは障害または前記ENPP1タンパク質の欠乏が、前記対象におけるENPP1遺伝子の機能欠損型突然変異またはABCC6遺伝子の機能欠損型突然変異と関連する、請求項 22 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 24】

前記ウイルスベクターまたは医薬組成物が、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / 対象または哺乳動物のkgの投薬量で投与されるか、

前記ウイルスベクターまたは医薬組成物が、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ v g / 対象または哺乳動物のkgの投薬量で投与されるか、

前記ウイルスベクターまたは医薬組成物が、 $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ v g / 対象または哺乳動物のkgの投薬量で投与されるか、あるいは

30

前記ウイルスベクターまたは医薬組成物が、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / 対象または哺乳動物のkgの投薬量で投与され、

好ましくは、前記ウイルスベクターまたは医薬組成物の前記対象または哺乳動物への投与が、前記対象または哺乳動物において、血漿ピロリン酸(PPi)および/または血漿ENPP1もしくはENPP3濃度を高めるものである、請求項 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記血漿ピロリン酸(PPi)および/または血漿ENPP1もしくはENPP3濃度は、前記対象または哺乳動物から得られた生物試料において、以下のパラメーター：(i)ピロリン酸の濃度、(ii)ENPP1またはENPP3の発現レベル、および(iii)ENPP1またはENPP3の酵素活性のうちの一つまたは複数を検出または測定することによって示され、前記検出または測定が、前記ウイルスベクターまたは医薬組成物を投与する前に行われるか、前記ウイルスベクターまたは医薬組成物の投与と同時またはほぼ同時に行われるか、あるいは、前記ウイルスベクターまたは医薬組成物の投与の後に行われる、請求項 24 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 26】

エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ-1(ENPP1)に、またはエクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ-3(ENPP3)に融合したアズロシジンシグナルペプチドを含む前駆ポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドであって、哺乳動物細胞における前記ポリヌクレオチドの発現の際に

50

、前記前駆ポリペプチドがタンパク分解的に切断されて、軟組織の異所性石灰化を低減させる活性がある可溶性ENPP1または可溶性ENPP3を生成する、組換えポリヌクレオチド。

【請求項27】

さらにベクターまたはプラスミドを含み、好ましくは、前記ベクターまたは前記プラスミドが前記コードされるポリペプチドを発現することができる、請求項26に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項28】

前記ベクターがウイルスベクターであり、好ましくはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、請求項26または27に記載の組換えポリヌクレオチド。

10

【請求項29】

前記ポリヌクレオチドが、前記ENPP1に融合した前記アズロシジニンシグナルペプチドまたは前記ENPP3に融合した前記アズロシジニンシグナルペプチドおよびFcポリペプチドに融合した前記ENPP1または前記ENPP3をコードして、それぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端の順で、アズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-Fcまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-Fcを形成するか、あるいは、

前記ポリヌクレオチドが、前記ENPP1に融合した前記アズロシジニンシグナルペプチドまたは前記ENPP3に融合した前記アズロシジニンシグナルペプチドおよびヒト血清アルブミンに融合した前記ENPP1または前記ENPP3をコードして、それぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端の順で、アズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-アルブミンまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-アルブミンを形成する、請求項26～28のいずれか一項に記載の組換えポリヌクレオチド。

20

【請求項30】

ENPP1またはENPP3のN末端に融合したシグナルペプチドをコードする核酸配列を含み、それを発現することができる、ウイルスベクター。

【請求項31】

さらにプロモーターを含み、好ましくは、前記プロモーターが肝臓特異的プロモーターであるか、前記プロモーターがアルブミンプロモーター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)プロモーターおよびアルファ-1-アンチトリプシンプロモーターからなる群から選択される肝臓特異的プロモーターである、請求項30に記載のウイルスベクター。

30

【請求項32】

さらにポリアデニル化シグナルをコードする配列を含み、好ましくは、前記シグナルペプチドがアズロシジニンシグナルペプチドである、請求項30または31に記載のウイルスベクター。

【請求項33】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであるか、あるいはAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9およびAAV-rh74からなる群から選択される血清型を有するAAVベクターである、請求項30～32のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

40

【請求項34】

前記ポリヌクレオチドが、前記ENPP1に融合した前記アズロシジニンシグナルペプチドまたは前記ENPP3に融合した前記アズロシジニンシグナルペプチドおよびFcポリペプチドに融合した前記ENPP1または前記ENPP3をコードして、それぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端の順で、アズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-Fcまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-Fcを形成するか、あるいは

前記ポリヌクレオチドが、前記ENPP1に融合した前記アズロシジニンシグナルペプチドまたは前記ENPP3に融合した前記アズロシジニンシグナルペプチドおよびヒト血清アルブミンに融合した前記ENPP1または前記ENPP3をコードして、それぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端の順で、アズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-アルブ

50

ミンまたはアズロシジンシグナルペプチド - E N P P 3 - アルブミンを形成する、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項 35】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載のウイルスベクターおよび生理学的に適合する担体を含む、医薬組成物。

【請求項 36】

X連鎖性低リン酸血症（X L H）、慢性腎臓疾患（C K D）、ミネラル骨障害（M B D）、血管石灰化、軟組織の病的石灰化、軟組織の病的骨化、乳児の全身性動脈石灰化（G A C I）および後縦靭帯骨化症（O P L L）からなる群から選択されるヒトの疾患を予防するか、またはその進行を低減するための、請求項 35 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 37】

請求項 26 ~ 29 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

【請求項 38】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載の組換えウイルスベクターを得る方法であって

i . 請求項 26 ~ 29 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞を提供するステップ、

i i . ウイルスのアセンブリーに適切な条件下で前記細胞を維持するステップ、および

i i i . 前記細胞によって産生された前記ウイルスベクターを精製するステップ

を含む、方法。

20

【請求項 39】

E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質を哺乳動物に提供するための、請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載のウイルスベクターの使用。

30

40

50