

【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 4 年 1 月 11 日 (2022.1.11)

【公表番号】特表 2020-505934 (P2020-505934A)

【公表日】令和 2 年 2 月 27 日 (2020.2.27)

【年通号数】公開・登録公報 2020-008

【出願番号】特願 2019-542456 (P2019-542456)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/46 (2006.01)

A 6 1 K 9/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/46 (2006.01)

A 6 1 K 35/51 (2015.01)

A 6 1 K 35/14 (2015.01)

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/18 (2015.01)

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/113 Z N A Z

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 5/10

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 38/46

A 6 1 K 9/00

A 6 1 K 47/46

A 6 1 K 35/51

A 6 1 K 35/14 Z

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 35/18 Z

A 6 1 P 7/06

A 6 1 K 31/7105

C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 5/078

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 12 月 6 日 (2021.12.6)

【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】

t r a c r と c r R N A とを含む g R N A 分子であって、前記 c r R N A は、
 a) 配列番号 6 7、配列番号 1、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、
配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 5、配列番号 4
6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 5 0、配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番
号 5 4、配列番号 5 8、配列番号 6 2、配列番号 6 3 又はその断片のいずれか 1 つ；
 b) 配列番号 6 7、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4
 8、配列番号 5 1 若しくはその断片のいずれか 1 つ；
 c) 配列番号 1、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 5 4
 若しくはその断片のいずれか 1 つ
 d) 配列番号 6 7；又は
 e) 配列番号 1 ~ 配列番号 7 2 若しくはその断片のいずれか 1 つ
 を含む標的化ドメインを含む、g R N A 分子。

【請求項 2】

(a) 配列番号 1 9 5 ；
 (b) 配列番号 2 3 1 ；又は
 (c) 1、2、3、4、5、6 又は 7 個のウラシル (U) ヌクレオチドを 3 ' 末端にさら
 に含む上記 (a) 又は (b) のいずれか
 を含み、(a) ~ (c) のいずれかの配列は、前記標的化ドメインの 3 ' 側、任意選択で
 前記標的化ドメインの直ちに 3 ' 側に配置される、請求項 1 に記載の g R N A 分子。

【請求項 3】

(a) 配列番号 1 7 4 ；
 (b) 配列番号 1 7 5 ；又は
 (c) 配列番号 1 7 6
 の配列を含む、請求項 1 に記載の g R N A 分子。

【請求項 4】

(a) 配列番号 1 7 7 を含む c r R N A 及び配列番号 2 2 4 を含む t r a c r ；
 (b) 配列番号 1 7 7 を含む c r R N A 及び配列番号 7 3 を含む t r a c r ；
 (c) 配列番号 1 7 8 を含む c r R N A 及び配列番号 2 2 4 を含む t r a c r ；又は
 (d) 配列番号 1 7 8 を含む c r R N A 及び配列番号 7 3 を含む t r a c r
 を含む、請求項 1 に記載の g R N A 分子。

【請求項 5】

a) 前記 g R N A 分子を含む C R I S P R システムが細胞に導入されると、インデルは
 、前記 g R N A 分子の前記標的化ドメインに相補的な標的配列に又はその近傍に形成され
 ；かつ / 又は
 b) 前記 g R N A 分子を含む C R I S P R システムが細胞に導入されると、配列を含む、
 例えば実質的に全ての前記配列を含む欠失は、H B G 1 プロモーター領域において前記 g
 R N A 標的化ドメインに相補的な配列と、H B G 2 プロモーター領域において前記 g R N
 A 標的化ドメインに相補的な配列との間に形成される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記
 載の g R N A 分子。

【請求項 6】

前記インデルは、5 , 2 5 0 , 0 9 2 ~ 5 , 2 4 9 , 8 3 3、- 鎖 (h g 3 8) 間に配
 置されたヌクレオチドを含まず、任意選択で、前記インデルは、非欠失 H P F H 又は転写
 因子結合部位のヌクレオチドを含まない、請求項 5 に記載の g R N A 分子。

【請求項 7】

前記 g R N A 分子を含む C R I S P R システムが細胞の集団に導入されると、インデル
 は、前記集団の前記細胞の少なくとも約 1 5 % において、前記 g R N A 分子の前記標的化
 ドメインに相補的な標的配列に又はその近傍に形成される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項
 に記載の g R N A 分子。

【請求項 8】

前記 g R N A 分子を含む C R I S P R システムが細胞に導入されると、

- (a) 胎児ヘモグロビンの発現は、前記細胞又はその子孫において増加し、任意選択で、胎児ヘモグロビンの前記発現は、前記 g R N A 分子が導入されていない細胞の集団又はその子孫の集団における胎児ヘモグロビンの発現のレベルと比較して、少なくとも約 1 5 % 増加し；
- (b) 前記細胞又はその子孫は、1 細胞当たり少なくとも約 6 ピコグラムの胎児ヘモグロビンを産生し；
- (c) オフターゲットインデルは、前記細胞において形成されず；かつ / 又は
- (d) オフターゲットインデルは、前記細胞の集団の細胞の約 5 % 超において検出されない、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の g R N A 分子。

【請求項 9】

前記細胞は、哺乳類細胞、霊長類細胞又はヒト細胞であり、任意選択で、前記細胞は、異常ヘモグロビン症に罹患している患者から得られる、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の g R N A 分子。

【請求項 10】

前記細胞は、

- a) H S P C、任意選択で C D 3 4 + H S P C、任意選択で C D 3 4 + C D 9 0 + H S P C であるか、又は
- b) 前記細胞を投与される患者にとって自己由来又は同種異系由来である、請求項 9 に記載の g R N A 分子。

【請求項 11】

- a) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子及び C a s 9 分子；
- b) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子及び C a s 9 分子をコードする核酸；
- c) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子をコードする核酸及び C a s 9 分子；
- d) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子をコードする核酸及び C a s 9 分子をコードする核酸；又は
- e) 上記 a) ~ d) のいずれかのもの及び鑄型核酸；又は
- f) 上記 a) ~ d) のいずれかのもの及び鑄型核酸をコードする配列を含む核酸を含む組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の第 1 の g R N A 分子を含み、C a s 9 分子をさらに含む組成物であって、前記 C a s 9 分子は、活性又は不活性化膿レンサ球菌 (s . p y o g e n e s) C a s 9 であり、任意選択で、前記 C a s 9 分子は、配列番号 2 0 5 又はそれと少なくとも 9 5 % の配列相同性を有する配列を含む、組成物。

【請求項 13】

前記 C a s 9 分子は、

- (a) 配列番号 2 3 3 ；
- (b) 配列番号 2 3 4 ；
- (c) 配列番号 2 3 5 ；
- (d) 配列番号 2 3 6 ；
- (e) 配列番号 2 3 7 ；
- (f) 配列番号 2 3 8 ；
- (g) 配列番号 2 3 9 ；
- (h) 配列番号 2 4 0 ；
- (i) 配列番号 2 4 1 ；
- (j) 配列番号 2 4 2 ；

(k) 配列番号 2 4 3 ; 又は

(l) 配列番号 2 4 4

を含む、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

a) 前記第 1 の g R N A 分子及び C a s 9 分子は、リボ核タンパク質複合体 (R N P) 中に存在し、かつ / または

b) 前記 g R N A 分子の各々は、本明細書に記載される C a s 9 分子と共に R N P 中にあり、前記 R N P の各々は、約 1 0 μ M 未満、例えば約 3 μ M 未満、例えば約 1 μ M 未満、例えば約 0 . 5 μ M 未満、例えば約 0 . 3 μ M 未満、例えば約 0 . 1 μ M 未満の濃度であり、任意選択で、前記 R N P の前記濃度は、約 2 μ M であるか又は約 1 μ M であり、任意選択で、前記組成物は、細胞、例えば H S P C の集団をさらに含む、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子をコードする核酸配列。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の核酸配列を含むベクターであって、任意選択で、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、プラスミド、ミニサークル、ナノプラスミド及び R N A ベクターからなる群から選択されるベクター。

【請求項 1 7】

細胞を前記細胞内の標的配列で又はその近傍で改変する方法であって、前記細胞を、

a) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子及び C a s 9 分子 ;

b) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子及び C a s 9 分子をコードする核酸 ;

c) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子をコードする核酸及び C a s 9 分子 ;

d) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子をコードする核酸及び C a s 9 分子をコードする核酸 ;

e) 上記 a) ~ d) のいずれか及び鑄型核酸 ;

f) 上記 a) ~ d) のいずれか、及び鑄型核酸をコードする配列を含む核酸 ;

g) 請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の組成物 ; 又は

h) 請求項 1 6 に記載のベクター
と接触させるステップを含む方法。

【請求項 1 8】

a) 前記細胞は、動物細胞であり、任意選択で、前記細胞は、異常ヘモグロビン症に罹患している患者から得られるものであり ;

b) 前記細胞は、H S P C、任意選択で C D 3 4 + H S P C、任意選択で C D 3 4 + C D 9 0 + H S P C であり ;

c) 前記細胞は、C D 3 4 + 細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物中に配置されるものであり ;

d) 前記細胞 (例えば、細胞の集団) は、骨髓、末梢血 (例えば、動員末梢血) 又は臍帯血から単離されるものであり、かつ / 又は

e) 前記細胞は、前記細胞を投与される患者にとって自己由来又は同種異系由来である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

(a) 細胞の集団の少なくとも約 1 5 % が改変されている細胞の集団をもたらし ;

(b) 前記改変は、赤血球系統の分化細胞への分化能を有する細胞をもたらし、前記分化細胞は、胎児ヘモグロビンのレベルの増加を呈し ;

(c) 前記改変は、分化細胞の集団への分化能を有する細胞の集団をもたらし、前記分化

細胞の集団は、非改変細胞の集団と比較してF細胞の割合が増加しており；かつ／又は（d）前記改変は、分化細胞、例えば赤血球系統の細胞への分化能を有する細胞をもたらす、前記分化細胞は、1細胞当たり少なくとも約6ピコグラムの胎児ヘモグロビンを産生する、請求項17又は18に記載の方法。

【請求項20】

請求項17～19のいずれか一項に記載の方法によって改変された細胞又は請求項17～19のいずれか一項に記載の方法によって得ることが可能な細胞。

【請求項21】

表7-2に記載されるインデルを含む細胞であって、任意選択で、5, 250, 092～5, 249, 833、-鎖(hg38)間に配置されたヌクレオチドの欠失を含まない細胞。

【請求項22】

請求項1～10のいずれか一項に記載のgRNA分子を含む細胞。

【請求項23】

Cas9分子をさらに含む、請求項22に記載の細胞。

【請求項24】

幹細胞増殖剤と接触している、請求項20～23のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項25】

前記幹細胞増殖剤は、

- a) (1r, 4r) - N¹ - (2 - ベンジル - 7 - (2 - メチル - 2 H - テトラゾール - 5 - イル) - 9 H - ピリミド [4, 5 - b] インドール - 4 - イル) シクロヘキサン - 1, 4 - ジアミン；
 - b) メチル 4 - (3 - ピペリジン - 1 - イルプロピルアミノ) - 9 H - ピリミド [4, 5 - b] インドール - 7 - カルボキシレート；
 - c) 4 - (2 - (2 - (ベンゾ [b] チオフェン - 3 - イル) - 9 - イソプロピル - 9 H - プリン - 6 - イルアミノ) エチル) フェノール；
 - d) (S) - 2 - (6 - (2 - (1 H - インドール - 3 - イル) エチルアミノ) - 2 - (5 - フルオロピリジン - 3 - イル) - 9 H - プリン - 9 - イル) プロパン - 1 - オール；
- 又は
- e) これらの組み合わせ（例えば、(1r, 4r) - N¹ - (2 - ベンジル - 7 - (2 - メチル - 2 H - テトラゾール - 5 - イル) - 9 H - ピリミド [4, 5 - b] インドール - 4 - イル) シクロヘキサン - 1, 4 - ジアミンと、(S) - 2 - (6 - (2 - (1 H - インドール - 3 - イル) エチルアミノ) - 2 - (5 - フルオロピリジン - 3 - イル) - 9 H - プリン - 9 - イル) プロパン - 1 - オール) との組み合わせ）

である、請求項24に記載の細胞。

【請求項26】

a) 動物細胞、例えば哺乳類細胞、霊長類細胞又はヒト細胞であり、例えばヒト細胞であり；任意選択で、異常ヘモグロビン症、例えば鎌状赤血球病又はサラセミア、例えば - サラセミアに罹患している患者から得られる細胞であり；

b) HSPC、任意選択でCD34 + HSPC、任意選択でCD34 + CD90 + HSPCであり；

c) 骨髄、末梢血（例えば、動員末梢血）又は臍帯血から単離された細胞（例えば、細胞の集団）であり、かつ／または

d) 細胞を投与される患者にとって自己由来又は同種異系由来である細胞である、請求項20～25のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項27】

請求項20～26のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞の集団であって、前記集団の前記細胞の少なくとも約50%は、請求項20～26のいずれか一項に記載の細胞である、細胞の集団。

【請求項28】

分化細胞の集団への分化能を有し、前記分化細胞の集団は、同じタイプの修飾されていない細胞の集団と比較してF細胞の割合が増加している、請求項27に記載の細胞の集団。

【請求項29】

請求項20～28のいずれか一項に記載の細胞又は細胞の集団及び薬学的に許容可能な媒体を含む組成物。

【請求項30】

細胞を調製する方法であって、

- (a) 細胞を提供するステップ；
- (b) 幹細胞増殖剤を含む細胞培養培地中において前記細胞をエキソビボで培養するステップ；及び
- (c) 請求項1～10のいずれか一項に記載のgRNA分子、請求項1～10のいずれか一項に記載のgRNA分子をコードする核酸分子、請求項11～14のいずれか一項に記載の組成物、請求項15に記載の核酸配列又は請求項16に記載のベクターを前記細胞に導入するステップを含む方法。

【請求項31】

ステップ(c)の前記導入後、前記細胞は、分化細胞への分化能を有し、前記分化細胞は、例えば、ステップ(c)に供されていない同じ細胞と比較して増加した胎児ヘモグロビンを産生する、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記幹細胞増殖剤は、

- a) (1r, 4r) - N1 - (2 - ベンジル - 7 - (2 - メチル - 2H - テトラゾール - 5 - イル) - 9H - ピリミド[4, 5 - b] インドール - 4 - イル) シクロヘキサン - 1, 4 - ジアミン；
 - b) メチル4 - (3 - ピペリジン - 1 - イルプロピルアミノ) - 9H - ピリミド[4, 5 - b] インドール - 7 - カルボキシレート；
 - c) 4 - (2 - (2 - (ベンゾ[b]チオフエン - 3 - イル) - 9 - イソプロピル - 9H - プリン - 6 - イルアミノ)エチル)フェノール；
 - d) (S) - 2 - (6 - (2 - (1H - インドール - 3 - イル)エチルアミノ) - 2 - (5 - フルオロピリジン - 3 - イル) - 9H - プリン - 9 - イル)プロパン - 1 - オール；
- 又は
- e) これらの組み合わせ(例えば、(1r, 4r) - N1 - (2 - ベンジル - 7 - (2 - メチル - 2H - テトラゾール - 5 - イル) - 9H - ピリミド[4, 5 - b] インドール - 4 - イル)シクロヘキサン - 1, 4 - ジアミンと、(S) - 2 - (6 - (2 - (1H - インドール - 3 - イル)エチルアミノ) - 2 - (5 - フルオロピリジン - 3 - イル) - 9H - プリン - 9 - イル)プロパン - 1 - オールとの組み合わせ)
- である、請求項30又は31に記載の方法。

【請求項33】

前記細胞培養培地は、トロンボポエチン(Tpo)、Flt3リガンド(Flt-3L)及びヒト幹細胞因子(SCF)を含み、任意選択で、前記細胞培養培地は、ヒトインターロイキン-6(IL-6)をさらに含み；任意選択で、前記細胞培養培地は、トロンボポエチン(Tpo)、Flt3リガンド(Flt-3L)、ヒト幹細胞因子(SCF)及び存在する場合にはヒトIL-6をそれぞれ約10ng/mL～約1000ng/mLの範囲の濃度、任意選択でそれぞれ約50ng/mLの濃度、例えば50ng/mLの濃度で含む、請求項30～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

前記細胞培養培地は、幹細胞増殖剤を約1nM～約1mMの範囲の濃度、任意選択で約1μM～約100nMの範囲の濃度、任意選択で約500nM～約750nMの範囲の濃度、任意選択で約500nMの濃度、例えば500nMの濃度又は約750nMの濃度、

例えば 750 nM の濃度で含む、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

ステップ (a) で提供される前記細胞の集団は、CD34+細胞に関して富化される、請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

請求項 30 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法によって得ることが可能な細胞。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の細胞であって、

(a) 前記細胞の集団の細胞の少なくとも約 40% は、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の gRNA 分子の前記標的化ドメインに相補的なゲノム DNA 配列に又はその近傍にインデルを含み；

(b) 前記細胞は、赤血球系統の分化細胞への分化能を有し、前記分化細胞は、胎児ヘモグロビンのレベルの増加を呈し；

(c) 前記細胞の集団は、分化細胞の集団への分化能を有し、前記分化細胞の集団は、非改変細胞の集団と比較して F 細胞の割合が増加しており；

(d) 前記細胞は、分化細胞への分化能を有し、前記分化細胞は、1 細胞当たり少なくとも約 6 ピコグラムの胎児ヘモグロビンを産生し；

(e) オフターゲットインデルは、前記細胞において形成されず；

(f) オフターゲットインデルは、前記細胞の集団の細胞の約 5% 超において検出されず；かつ/又は

(g) 前記細胞又はその子孫は、移植後の 16 週間超において、それを移植される患者で検出可能である、

細胞。

【請求項 38】

a) 異常ヘモグロビン症、例えば鎌状赤血球病又はサラセミア、例えば - サラセミアに罹患している患者から得られる細胞であり；

b) HSPC、任意選択で CD34+HSPC、任意選択で CD34+CD90+HSPC であり；

c) 骨髄、末梢血（例えば、動員末梢血）又は臍帯血から単離された細胞（例えば、細胞の集団）であり；かつ/又は

d) 細胞を投与される患者にとって自己由来又は同種異系由来である細胞である、

請求項 36 又は 37 に記載の細胞。

【請求項 39】

医薬として使用するための、請求項 20 ~ 26 もしくは 36 ~ 38 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 27 もしくは 28 に記載の細胞の集団、又は請求項 11 ~ 14 もしくは 29 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

患者における異常ヘモグロビン症、例えば - サラセミア又は鎌状赤血球病を治療するための医薬組成物であって、請求項 20 ~ 26 もしくは 36 ~ 38 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 27 もしくは 28 に記載の細胞の集団、又は請求項 11 ~ 14 もしくは 29 のいずれか一項に記載の組成物を含む、医薬組成物。

【請求項 41】

患者の胎児ヘモグロビン発現を増加させるための医薬組成物であって、請求項 20 ~ 26 もしくは 36 ~ 38 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 27 もしくは 28 に記載の細胞の集団、又は請求項 11 ~ 14 もしくは 29 のいずれか一項に記載の組成物を含む、医薬組成物。

【請求項 42】

ヒト患者の体重 1 kg 当たり少なくとも約 2 e 6 個の、請求項 20 ~ 28 又は 36 ~ 38 のいずれか一項に記載の細胞、例えばヒト患者の体重 1 kg 当たり少なくとも約 2 e 6 個の、請求項 20 ~ 28 又は 36 ~ 38 のいずれか一項に記載の CD34+細胞を含む、

請求項 4 0 又は 4 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 3】

前記細胞若しくは細胞の集団又はその子孫は、任意選択で、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の g R N A 分子の前記標的化ドメインに相補的なゲノム D N A 配列に又はその近傍にインデルを検出することによって検出されるとき、投与後の 1 6 週間超、2 0 週間超又は 2 4 週間超において、前記患者、例えばヒト患者で検出可能であり、任意選択で、前記インデルは、表 7 - 2 に挙げられるインデルから選択され；任意選択で、投与後の 1 6 週間超、2 0 週間超又は 2 4 週間超における参照細胞集団（例えば、C D 3 4 + 細胞）での前記インデルの検出のレベルは、投与の直前の前記細胞の集団における前記インデルの検出のレベルと比較して 5 0 % 以下、4 0 % 以下、3 0 % 以下、2 0 % 以下、1 0 % 以下、5 % 以下又は 1 % 以下で低下する、請求項 4 0 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。