

【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 15 % 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產生し；
(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、靈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 ~ 10 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 ~ 10 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 ~ 10 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 ~ 10 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 ~ 10 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10 μM未満、例えば約3 μM未満、例えば約1 μM未満、例えば約0.5 μM未満、例えば約0.3 μM未満、例えば約0.1 μM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 μMであるか又は約1 μM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_1～1_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_1～1_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_1～1_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_1～1_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_1～1_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、骨髄、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15%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、非改变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) 前記改变は、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する、請求項 1_7 又は 1_8 に記載の方法。

【請求項 2_0】

請求項 1_7 ~ 1_9 のいずれか一項に記載の方法によって改变された細胞又は請求項 1_7 ~ 1_9 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 2_1】

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 (h g 38) 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 2_2】

請求項 1 ~ 1_0 のいずれか一項に記載の g R N A 分子を含む細胞。

【請求項 2_3】

C a s 9 分子をさらに含む、請求項 2_2 に記載の細胞。

【請求項 2_4】

幹細胞増殖剤と接触している、請求項 2_0 ~ 2_3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 2_5】

前記幹細胞増殖剤は、

- a) (1 r , 4 r) - N ¹ - (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、(1 r , 4 r) - N ¹ - (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 2_4 に記載の細胞。

【請求項 2_6】

a) 動物細胞、例えば哺乳類細胞、靈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) 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) 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 2_0 ~ 2_5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 2_7】

請求項 2_0 ~ 2_6 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 2_0 ~ 2_6 のいずれか一項に記載の細胞である、細胞の集団。

【請求項 2_8】

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2_7に記載の細胞の集団。

【請求項 2_9】

請求項2_0～2_8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 3_0】

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オで培養するステップ；及び
 (c) 請求項1～1_0のいずれか一項に記載のgRNA分子、請求項1～1_0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1_1～1_4のいずれか一項に記載の組成物、請求項1_5に記載の核酸配列又は請求項1_6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 3_1】

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3_0に記載の方法。

【請求項 3_2】

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]チオフェン-3-イル)-9-イソプロピル-9H-ブリン-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-ブリン-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-ブリン-9-イル)プロパン-1-オールとの組み合わせ)

である、請求項3_0又は3_1に記載の方法。

【請求項 3_3】

前記細胞培養培地は、トロンボポエチン(Tpo)、F1t3リガンド(F1t-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、ヒトイントロイキン-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)、F1t3リガンド(F1t-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3_0～3_2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3_4】

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 7 5 0 nM の濃度で含む、請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

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 3 0 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 3 0 ~ 3 5 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 3 7】

請求項 3 6 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 ~ 1 0 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、非変異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 3 8】

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 3 6 又は 3 7 に記載の細胞。

【請求項 3 9】

医薬として使用するための、請求項 2 0 ~ 2 6 もしくは 3 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 2 7 もしくは 2 8 に記載の細胞の集団、又は請求項 1 1 ~ 1 4 もしくは 2 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

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 2 0 ~ 2 6 もしくは 3 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 2 7 もしくは 2 8 に記載の細胞の集団、又は請求項 1 1 ~ 1 4 もしくは 2 9 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 4 1】

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 2 0 ~ 2 6 もしくは 3 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 2 7 もしくは 2 8 に記載の細胞の集団、又は請求項 1 1 ~ 1 4 もしくは 2 9 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 4 2】

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 2 0 ~ 2 8 又は 3 6 ~ 3 8 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 2 0 ~ 2 8 又は 3 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の C D 3 4 + 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検出することによって検出されるとき、投与後の16週間超、20週間超又は24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16週間超、20週間超又は24週間超における参照細胞集団（例えば、CD34+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50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%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。