

【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】平成31年3月22日(2019.3.22)

【公表番号】特表2018-506304(P2018-506304A)

【公表日】平成30年3月8日(2018.3.8)

【年通号数】公開・登録公報2018-009

【出願番号】特願2017-560478(P2017-560478)

【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	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	7/01	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2015.01)
A 6 1 K	35/761	(2015.01)
A 6 1 K	35/763	(2015.01)
A 6 1 P	25/14	(2006.01)
A 6 1 K	35/766	(2015.01)
A 6 1 K	31/713	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/08	(2006.01)
A 6 1 P	25/16	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A G
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	7/01	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/763	
A 6 1 P	25/14	
A 6 1 K	35/766	
A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/16	

A 6 1 P 25/28  
A 6 1 P 9/10  
A 6 1 P 35/00  
A 6 1 P 43/00 1 0 5  
A 6 1 K 31/7105

【手続補正書】

【提出日】平成31年2月5日(2019.2.5)

【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】

第1の鎖および第2の鎖を含むRNAiであって、

a) 該第1の鎖および該第2の鎖は、二重鎖を形成し；

b) 該第1の鎖は、少なくとも19塩基のガイド領域を含み、該ガイド領域は、ガイド鎖の塩基1～Nを含むシード領域を含み、ここで、N=7またはN=8であり；および

c) 該第2の鎖は、少なくとも19塩基の非ガイド領域を含み、ここで、

(i) 該非ガイド領域は、二重鎖中のガイド領域の塩基1～(N+2)のいずれか1つまたはそれ以上の反対側に、バルジ配列を含み、場合により、該バルジは、ガイド領域の塩基1または塩基N+2の反対側にある；

(ii) 該非ガイド領域は、二重鎖中のガイド領域の塩基1～(N+1)のいずれか1つまたはそれ以上の反対側に、バルジ配列を含み、場合により、該バルジは、ガイド領域の塩基1または塩基N+1の反対側にある；または

(iii) 該非ガイド領域は、二重鎖中のガイド領域の塩基1～Nのいずれか1つまたはそれ以上の反対側に、バルジ配列を含み、場合により、該バルジは、ガイド領域の塩基1または塩基Nの反対側にある；

前記RNAi。

【請求項2】

請求項1に記載のRNAiであって、ここで：

(a) バルジは、ガイド領域の塩基1の反対側にある；

(b) バルジは、ガイド領域における相補的な塩基が欠失した、二重鎖中の非ガイド鎖の1つまたはそれ以上の塩基によって形成され、該バルジに、ガイド鎖と対合する塩基が隣接する；

(c) バルジは、1～10ヌクレオチドを含み、場合により、該バルジは、1～3ヌクレオチドを含む；および/または

(d) RNAiは、第2のバルジを含み、該第2のバルジは、シード領域の3'に配置されたガイド領域の第1の鎖に配置されている；

前記RNAi。

【請求項3】

RNAiであって、以下の：

(a) 配列5' - U A G A C A A U G A U U C A C A C G G U - 3' (配列番号1) に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含むガイド領域を含む第1の鎖、および、配列5' - A C C G U G U G U C A U U G U C U A A - 3' (配列番号2) に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含む非ガイド領域を含む第2の鎖を含むRNAiであって、該第1の鎖および該第2の鎖は、二重鎖を形成し、該第2の鎖の残基18または残基19におけるA残基は、該非ガイド領域においてバルジを形成し、ここで場合により：

(i) 該ガイド領域は、配列5' - U A G A C A A U G A U U C A C A C G G U - 3'

' (配列番号1)を含む；

(i i )該非ガイド領域は、配列5' - ACCGUGUGUCAUUGUCUAA - 3' (配列番号2)を含む；および／または

(i i i )ガイド領域の残基11および12におけるU残基は、ガイド領域中でバルジを形成する；

(b)配列5' - UCGACAAUGAUUCACACGGU - 3' (配列番号15)に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含むガイド領域を含む第1の鎖、および、配列5' - ACCGUGUGUCAUUGUCGAA - 3' (配列番号16)に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含む非ガイド領域を含む第2の鎖を含むRNAiであって、該第1の鎖および該第2の鎖は、二重鎖を形成し、該第2の鎖の残基18または残基19におけるA残基は、該非ガイド領域においてバルジを形成し、ここで場合により：

(i )該ガイド領域は、配列5' - UCGACAAUGAUUCACACGGU - 3' (配列番号15)を含む；

(i i )該非ガイド領域は、配列5' - ACCGUGUGUCAUUGUCGAA - 3' (配列番号16)を含む；および／または

(i i i )ガイド領域の残基11および12におけるU残基は、ガイド領域中でバルジを形成する；または

(c)配列5' - UAGACGAUGAUUCACACGGU - 3' (配列番号17)に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含むガイド領域を含む第1の鎖、および配列5' - ACCGUGUGUCAUUCGUAAA - 3' (配列番号18)に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含む非ガイド領域を含む第2の鎖を含むRNAiであって、該第1の鎖および該第2の鎖は、二重鎖を形成し、該第2の鎖の残基18または残基19におけるA残基は、該非ガイド領域においてバルジを形成し、ここで場合により：

(i )該ガイド領域は、配列5' - UAGACGAUGAUUCACACGGU - 3' (配列番号17)を含む；

(i i )該非ガイド領域は、配列5' - ACCGUGUGUCAUUCGUAAA - 3' (配列番号18)を含む；および／または

(i i i )ガイド領域の残基11および12におけるU残基は、ガイド領域中でバルジを形成する；

を含む、前記RNAi。

#### 【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項に記載のRNAiであって、ここで：

(a)二重鎖は、19～25または19～23塩基対の長さである；

(b)第1および／または第2の鎖は、3'オーバーハング領域、5'オーバーハング領域、または3'および5'オーバーハング領域の両方をさらに含む；および／または

(c)第1の鎖および第2の鎖は、ループ構造を形成することが可能なRNAリンカーによって連結されており、ここで場合により：

(i )該RNAリンカーは、4～50ヌクレオチド、4～20ヌクレオチド、または13ヌクレオチドを含む；

(i i )該ループ構造は、4～20ヌクレオチドを含む；および／または

(i i i )該RNAiは、5'から3'へ、第2の鎖、RNAリンカー、および第1の鎖を含む；または、該RNAiは、5'から3'へ、第1の鎖、RNAリンカー、および第2の鎖を含む；

前記RNAi。

#### 【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載のRNAiであって、ここで：

(a)配列は、オフターゲットの遺伝子サイレンシングを低減するように改善されている；

(b)配列は、1つまたはそれ以上のCpGモチーフを含む；および／または

(c)配列は、シード領域中に1つまたはそれ以上のCpGモチーフを含む；

前記 R N A i。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の R N A i であって、ここで：

該 R N A i は、配列番号 3 のヌクレオチド配列と約 90 % 同一なヌクレオチド配列を含み、場合により、該 R N A i は、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む、前記 R N A i。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の R N A i であって、ここで：

該 R N A i は、低分子阻害性 R N A ( s i R N A )、マイクロ R N A ( m i R N A )、または小ヘアピン R N A ( s h R N A ) である、前記 R N A i。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の R N A i であって、ここで：

該 R N A i は、障害に関連するポリペプチドをコードする R N A を標的化し、ここで場合により：

( a ) 該障害は、C N S 障害である；

( b ) 該障害は、リソソーム蓄積症 ( L S D )、ハンチントン病、てんかん、パーキンソン病、アルツハイマー病、卒中、大脳皮質基底核変性症 ( C B D )、大脳皮質基底核神経節変性症 ( C B G D )、前頭側頭認知症 ( F T D )、多系統萎縮症 ( M S A )、進行性核上麻痺 ( P S P )、または脳のがんである；および / または

( c ) 該障害は、ハンチントン病である；

前記 R N A i。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の R N A i であって、ここで：

ポリペプチドは、ハンチントンであり、ここで場合により：

( a ) 該ハンチントンは、ハンチントン病に関連する突然変異を含む；および / または

( b ) ガイド領域は、配列 5' - U A G A C A A U G A U U C A C A C G G U - 3' (配列番号 1 ) を含み、非ガイド領域は、配列 5' - A C C G U G U G U C A U U G U C U A A - 3' (配列番号 2 ) を含む；または

( c ) ガイド領域は、配列 5' - U C G A C A A U G A U U C A C A C G G U - 3' (配列番号 1 5 ) を含み、非ガイド領域は、配列 5' - A C C G U G U G U C A U U G U C G A A - 3' (配列番号 1 6 ) を含む；または

( d ) ガイド領域は、配列 5' - U A G A C G A U G A U U C A C A C G G U - 3' (配列番号 1 7 ) を含み、非ガイド領域は、配列 5' - A C C G U G U G U C A U C G U C U A A - 3' (配列番号 1 8 ) を含む；

前記 R N A i。

【請求項 10】

R N A i の毒性を低減する方法であって、該 R N A i の非ガイド領域にバルジを導入して、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の R N A i を生成することを含む、前記方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の R N A i をコードする核酸を含む発現コンストラクトであって、場合により、該 R N A i をコードする核酸は、m i R N A 足場を含み、場合により、該 R N A i をコードする核酸は、m i R - 1 5 5 足場を含む、

前記発現コンストラクト。

【請求項 12】

請求項 1 1 に記載の発現コンストラクトであって、R N A i をコードする核酸は、プロモーターに機能するように連結されており、ここで場合により：

( a ) 該プロモーターは、哺乳動物の脳で R N A i を発現させることが可能であり；および / または

( b ) 該プロモーターは、サイトメガロウイルス ( C M V ) 前初期プロモーター、R S V L T R 、M o M L V L T R 、ホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 ( P G K ) プロモーター、シミアンウイルス 4 0 ( S V 4 0 ) プロモーター、C K 6 プロモーター、トランス

チレチンプロモーター( T T R )、 T K プロモーター、 テトラサイクリン応答プロモーター( T R E )、 H B V プロモーター、 h A A T プロモーター、 L S P プロモーター、 キメラ肝臓特異的プロモーター( L S P )、 E 2 F プロモーター、 テロメラーゼ( h T E R T )プロモーター； サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリベータ - アクチン / ウサギ - グロビンプロモーター( C A G )プロモーター、 延長因子 1 - アルファプロモーター( E F 1 - アルファ )プロモーター、 ヒト - グルクロニダーゼプロモーター、 ニワトリ - アクチン( C B A )プロモーター、 レトロウイルス性のラウス肉腫ウイルス( R S V ) L T R プロモーター、 ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 および 1 3 - アクチンプロモーターから選択される、

前記発現コンストラクト。

#### 【請求項 1 3】

請求項 1 1 または 1 2 に記載の発現コンストラクトであって、 ポリアデニル化シグナルをさらに含み、 ここで場合により、 ポリアデニル化シグナルは、 ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル、 S V 4 0 のポリアデニル化シグナル、 または H S V T K p A である、 前記発現コンストラクト。

#### 【請求項 1 4】

請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクトを含むベクターであって、 ここで場合により：

( a ) 該ベクターは、 組換えアデノ随伴ウイルス( r A A V )ベクターである；

( b ) 該ベクターは、 組換えアデノウイルスベクターであり、 ここで場合により、 該組換えアデノウイルスベクターは、 アデノウイルス血清型 2 、 1 、 5 、 6 、 1 9 、 3 、 1 1 、 7 、 1 4 、 1 6 、 2 1 、 1 2 、 1 8 、 3 1 、 8 、 9 、 1 0 、 1 3 、 1 5 、 1 7 、 1 9 、 2 0 、 2 2 、 2 3 、 2 4 ~ 3 0 、 3 7 、 4 0 、 4 1 、 A d H u 2 、 A d H u 3 、 A d H u 4 、 A d H u 2 4 、 A d H u 2 6 、 A d H u 3 4 、 A d H u 3 5 、 A d H u 3 6 、 A d H u 3 7 、 A d H u 4 1 、 A d H u 4 8 、 A d H u 4 9 、 A d H u 5 0 、 A d C 6 、 A d C 7 、 A d C 6 9 、 ウシ A d 3 型、 イヌ A d 2 型、 ヒツジ A d 、 またはブタ A d 3 型から誘導される；

( c ) 該ベクターは、 組換えレンチウイルスベクターであり、 ここで場合により 該組換えレンチウイルスベクターは、 水疱性口内炎ウイルス( V S V )、 リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス( L C M V )、 口スリバーウイルス( R R V )、 エボラウイルス、 マールブルグウイルス、 モコラウイルス、 狂犬病ウイルス、 R D 1 1 4 、 またはそれらのバリエントで偽型化したレンチウイルスから誘導される； または

( d ) 該ベクターは、 r H S V ベクターであり、 ここで場合により、 該 r H S V ベクターは、 r H S V - 1 または r H S V - 2 から誘導される；

前記ベクター。

#### 【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載のベクターであって、 該ベクターは、 r A A V ベクターであり、 そして、 発現コンストラクトに、 1 つまたはそれ以上の A A V の逆方向末端反復( I T R )配列が隣接し、 ここで場合により：

( a ) 該発現コンストラクトに、 2 つの A A V の I T R が隣接する； および / または

( b ) 該 A A V の I T R 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 r h 8 、 A A V r h 8 R 、 A A V 9 、 A A V 1 0 、 A A V r h 1 0 、 A A V 1 1 、 A A V 1 2 、 A A V 2 R 4 7 1 A 、 A A V D J 、 ヤギ A A V 、 ウシ A A V 、 またはマウス A A V 血清型の I T R であり、 ここで場合により、 該 A A V の I T R は、 A A V 2 の I T R である；

前記ベクター。

#### 【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載のベクターであって、 r A A V ベクターは、 5 ' から 3 ' へ、 A A V 2 の I T R 、 プロモーター、 R N A i をコードする核酸、 ポリアデニル化シグナル、 および A A V 2 の I T R を含み、 ここで場合により：

- (a) 該プロモーターは、CBAプロモーターである；
- (b) 該ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルである；および／または
- (c) 該rAAVベクターは、5'から3'へ、AAV2のITR、CBAプロモーター、RNAiをコードする核酸、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル、およびAAV2のITRを含む；

前記ベクター。

【請求項17】

請求項15または16に記載のベクターであって、該ベクターは、スタッファー核酸をさらに含み、ここで場合により：

- (a) 該スタッファー核酸は、プロモーターとRNAiをコードする核酸との間に配置されている；および／または

(b) 該スタッファー核酸は、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする核酸、ヒトアルファ-1-アンチトリプシン(AAT)スタッファー配列、またはC16P1第16染色体P1クローン(ヒトC16)のスタッファー配列を含み、ここで場合により、該スタッファー核酸は、配列番号13のヌクレオチド1692からヌクレオチド2720の核酸配列を含む；

前記ベクター。

【請求項18】

請求項15～17のいずれか1項に記載のベクターであって、該ベクターは、自己相補的なrAAVベクターであり、ここで場合により、該ベクターは、RNAiをコードする第1の核酸配列およびRNAiの相補物をコードする第2の核酸配列を含み、該第1の核酸配列は、その長さのほとんどまたは全てにわたり、第2の核酸配列と鎖内の塩基対を形成することができ；そして、ここで場合により、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、突然変異したAAVのITRによって連結されており、該突然変異したAAVのITRは、D領域の欠失を含み、そして末端分解配列の突然変異を含む；

前記ベクター。

【請求項19】

請求項14～18のいずれか1項に記載のベクターを含む細胞であって、ここで場合により、該細胞は、中枢神経系(CNS)細胞である、前記細胞。

【請求項20】

請求項14に記載のベクターを含むウイルス粒子であって、ここで：

- (a) 該ウイルス粒子は、rAAVベクターをキャプシド化するAAV粒子である；
- (b) 該ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスペクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子であって、ここで場合により、該アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、もしくはブタAd3型由来のキャプシド、またはアデノウイルス血清型5のキャプシドのバリエントを含む；

(c) 該ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスペクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子であって、ここで場合により、該レンチウイルス粒子は、レンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウィルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114またはそれらのバリエントで偽型化したキャプシドを含む；または

(d) 該ウイルス粒子は、組換えHSVベクターをキャプシド化するHSV粒子であって、ここで場合により、該HSV粒子は、rHSV-1粒子またはrHSV-2粒子であ

る；

前記ウイルス粒子。

【請求項 2 1】

請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む組換え A A V ( r A A V ) 粒子であって、ここで場合により、該 A A V 粒子は、 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 r h 8 、 A A V r h 8 R 、 A A V 9 、 A A V 1 0 、 A A V r h 1 0 、 A A V 1 1 、 A A V 1 2 、 A A V 2 R 4 7 1 A 、 A A V 2 / 2 - 7 m 8 、 A A V D J 、 A A V 2 N 5 8 7 A 、 A A V 2 E 5 4 8 A 、 A A V 2 N 7 0 8 A 、 A A V V 7 0 8 K 、 ヤギ A A V 、 A A V 1 / A A V 2 キメラ、ウシ A A V 、またはマウス A A V キャプシド r A A V 2 / H B o V 1 血清型キャプシドを含む、

前記 r A A V 粒子。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の r A A V 粒子であって、ここで：

( a ) I T R および該 r A A V 粒子のキャプシドは、同じ A A V 血清型から誘導される；または

( b ) I T R および該 r A A V 粒子のキャプシドは、異なる A A V 血清型から誘導され、ここで場合により、該 I T R は、 A A V 2 から誘導され、該 r A A V 粒子のキャプシドは、 A A V 1 から誘導される；

前記 r A A V 粒子。

【請求項 2 3】

請求項 2 0 に記載のウイルス粒子または請求項 2 1 もしくは 2 2 に記載の r A A V 粒子を含む組成物であって、ここで場合により、該組成物は、医薬的に許容される担体をさらに含む、前記組成物。

【請求項 2 4】

疾患を有する哺乳動物のポリペプチドの発言を阻害または低減するための、または哺乳動物の細胞におけるポリペプチドの蓄積を阻害するための、

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の R N A i ；請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクト；請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のベクター；請求項 2 0 に記載のウイルス粒子；請求項 2 1 または 2 2 に記載の r A A V 粒子；または請求項 2 3 に記載の組成物であって、

ここで、該 R N A i はポリペプチドをコードする R N A を標的化し、ここで場合により、該哺乳動物はヒトである、

前記 R N A i 、発現コンストラクト、ベクター、ウイルス粒子、 r A A V 粒子、または組成物。

【請求項 2 5】

哺乳動物におけるハンチントン病を処置するための、または哺乳動物における h t t の発現を阻害するための、または哺乳動物における h t t の蓄積を阻害するための、

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の R N A i ；請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクト；請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のベクター；請求項 2 0 に記載のウイルス粒子；請求項 2 1 または 2 2 に記載の r A A V 粒子；または請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の R N A i ；請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクト；請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のベクター；請求項 2 0 に記載のウイルス粒子；請求項 2 1 または 2 2 に記載の r A A V 粒子；または請求項 2 3 に記載の組成物を含む、

哺乳動物における R N A 干渉を誘導するための、疾患を有する哺乳動物のポリペプチドの発言を阻害または低減するための、哺乳動物の細胞におけるポリペプチドの蓄積を阻害するための、哺乳動物におけるハンチントン病を処置するための、または哺乳動物におけ

る h t t の発現を阻害するための、または哺乳動物における h t t の蓄積を阻害するための、キットであって、

ここで場合により：

( a ) 該哺乳動物はヒトである；および／または

( b ) 該哺乳動物はハンチントン病を有している、  
前記キット。