

【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12月26日(2022.12.26)

【国際公開番号】WO2020/132059  
 【公表番号】特表2022-516004(P2022-516004A)  
 【公表日】令和4年2月24日(2022.2.24)  
 【年通号数】公開公報(特許)2022-033  
 【出願番号】特願2021-535829(P2021-535829)  
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/864(2006.01)  
 C 1 2 N 5/10(2006.01)  
 C 1 2 N 7/01(2006.01)  
 A 6 1 K 35/76(2015.01)  
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)  
 A 6 1 K 48/00(2006.01)  
 A 6 1 P 43/00(2006.01)  
 C 1 2 N 15/113(2010.01)  
 C 1 2 N 15/33(2006.01)  
 C 1 2 N 15/11(2006.01)  
 C 1 2 N 7/02(2006.01)

20

## 【F I】

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z  
 C 1 2 N 5/10 Z N A  
 C 1 2 N 7/01  
 A 6 1 K 35/76  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 P 43/00  
 C 1 2 N 15/113 1 0 0 Z  
 C 1 2 N 15/33  
 C 1 2 N 15/11 Z  
 C 1 2 N 7/02

30

## 【手続補正書】

【提出日】令和4年12月14日(2022.12.14)

## 【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

40

## 【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

アデノ随伴ウイルス(AAV)を産生するための哺乳動物細胞であって、

a .

i . 第1の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、E2A遺伝子およびE4Orf6遺伝子を含むアデノウイルスヘルパー遺伝子と、

ii . 第2の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、Rep遺伝子およびCap遺伝子を含むAAV遺伝子と、

iii . 第3の抑圧可能なプロモーターの制御下にあるウイルス関連非コードRNA

50

と、

i v . 2つの逆位末端反復 ( I T R ) 配列と、

v . 前記第 1、第 2、および第 3 の抑制解除可能なプロモーターの抑制エレメントと、をコードする核酸分子を含む、哺乳動物細胞。

【請求項 2】

前記哺乳動物細胞が、哺乳動物細胞培養物である、請求項 1 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 3】

前記哺乳動物細胞培養物が、懸濁培養物である、請求項 2 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 4】

前記 E 2 A 遺伝子と前記 E 4 O r f 6 遺伝子との間に内部リボソーム侵入部位 ( I R E S ) エレメントをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。 10

【請求項 5】

R e p 7 8 遺伝子が、前記第 2 の抑制解除可能なプロモーターの制御下であり、R e p 5 2 遺伝子が、第 4 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 6】

R e p 7 8 遺伝子が、前記第 2 の抑制解除可能なプロモーターの制御下であり、R e p 5 2 遺伝子が、人工イントロン内に含まれる第 4 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。 20

【請求項 7】

前記 C a p 遺伝子が、天然プロモーターの制御下にある、請求項 5 または 6 に記載の哺乳動物細胞。 20

【請求項 8】

前記抑制解除可能なプロモーターの各々が、機能的プロモーターおよび 2 つのテトラサイクリンオペレーター配列 ( T e t O <sub>2</sub> ) を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 9】

前記第 1 の抑制解除可能なプロモーターの前記機能的プロモーターが、サイトメガロウイルス ( C M V ) プロモーターである、請求項 8 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 10】

前記抑制エレメントが、構成的プロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。 30

【請求項 11】

前記抑制エレメントが、テトラサイクリン抑制タンパク質である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 12】

前記テトラサイクリン抑制タンパク質をコードする前記核酸とインフレーションの転写抑制ドメインをコードする核酸をさらに含む、請求項 11 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 13】

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。 40

【請求項 14】

前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 15】

前記ヒト細胞が、ヒト胚腎 ( H E K ) 細胞である、請求項 14 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 16】

目的の遺伝子をコードする核酸分子をさらに含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 17】

配列番号 20 のプラスミド *iRepCap6* 配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 18】

哺乳動物細胞中でアデノ随伴ウイルス (AAV) を産生する方法であって、

- a. 前記哺乳動物細胞を、
  - i. 第 1 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、E2A 遺伝子および E4Orf6 遺伝子を含むアデノウイルスヘルパー遺伝子と、
  - ii. 第 2 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、Rep 遺伝子および Cap 遺伝子を含む AAV 遺伝子と、
  - iii. 第 3 の抑圧可能なプロモーターの制御下にあるウイルス関連非コード RNA と、
  - iv. 2 つの逆位末端反復 (ITR) 配列と、
  - v. 前記第 1、第 2、および第 3 の抑制解除可能なプロモーターの抑制エレメントと、
- をコードする単離された核酸分子でトランスフェクトすることと、
- b. 前記哺乳動物細胞を前記抑制エレメントの結合パートナーで処理することと、
- c. 前記第 1、第 2、および第 3 の抑制解除可能なプロモーターを活性化することと、
- d. 前記 AAV を産生することと、
- e. 前記 AAV を回収することと、を含む、方法。

10

【請求項 19】

前記哺乳動物細胞が、哺乳動物細胞培養物である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記哺乳動物細胞培養物が、懸濁培養物である、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記 E2A 遺伝子と前記 E4Orf6 遺伝子との間に内部リボソーム侵入部位 (IRES) エレメントをさらに含む、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

Rep78 遺伝子が、前記第 2 の抑制解除可能なプロモーターの制御下であり、Rep52 遺伝子が、第 4 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、請求項 18 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

Rep78 遺伝子が、前記第 2 の抑制解除可能なプロモーターの制御下であり、Rep52 遺伝子が、人工イントロン内に含まれる第 4 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、請求項 18 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記第 4 の抑制解除可能なプロモーターが、前記抑制解除可能なプロモーターの前記活性化後および前記 AAV の前記産生前に除去される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記 Cap 遺伝子が、天然プロモーターの制御下にある、請求項 22 または 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記抑制解除可能なプロモーターの各々が、機能的プロモーターおよび 2 つのテトラサイクリンオペレーター配列 (TetO<sub>2</sub>) を含む、請求項 18 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 27】

前記第 1 の抑制解除可能なプロモーターの前記機能的プロモーターが、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記抑制エレメントが、構成的プロモーターの制御下にある、請求項 18 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記抑制エレメントが、テトラサイクリン抑制タンパク質である、請求項 18 ~ 28 の

50

いずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記核酸が、前記テトラサイクリン抑制タンパク質をコードする前記核酸とインフレーションの転写抑制ドメインをコードする核酸をさらに含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記処理が、ドキシサイクリンで処理することを含む、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項 18 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 33】

前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、請求項 18 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記ヒト細胞が、ヒト胚腎 (HEK) 細胞である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記 AAV が、目的の遺伝子をコードする核酸分子を含む、請求項 18 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記 AAV が、治療目的の遺伝子を含む、請求項 35 に記載の方法。

20

【請求項 37】

アデノ随伴ウイルス (AAV) を産生する方法であって、

a. TetR および / または TetR - KRAB をコードする 1 つ以上の核酸を安定的に発現する哺乳動物細胞を、

i. 第 1 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、E2A 遺伝子、E4Orf 遺伝子、およびウイルス関連非コード RNA を含むアデノウイルスヘルパー遺伝子をコードする第 1 の核酸と、

ii. 第 2 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、Rep 遺伝子および Cap 遺伝子を含む AAV 遺伝子をコードする第 2 の核酸と、

iii. 任意選択で、第 3 の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、目的の遺伝子をコードする第 3 の核酸と、でトランスフェクトすることと、

30

b. 前記哺乳動物細胞を前記 TetR の結合パートナーで処理することと、

c. 前記第 1、第 2、および第 3 の抑制解除可能なプロモーターを活性化することと、

d. 前記 AAV を産生することと、

e. 前記 AAV を回収することと、を含む、方法。

【請求項 38】

前記哺乳動物細胞が、哺乳動物細胞培養物である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項 37 または 38 に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、請求項 37 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記ヒト細胞が、ヒト胚腎 (HEK) 細胞である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記哺乳動物細胞培養物が、懸濁培養物である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 43】

前記 E2A 遺伝子と E4Orf6 遺伝子との間に内部リボソーム侵入部位 (IRES) エlement をさらに含む、請求項 37 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 44】

前記抑制解除可能なプロモーターの各々が、機能的プロモーターおよび2つのテトラサイクリンオペレーター配列 (TetO<sub>2</sub>) を含む、請求項 37 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 45】

前記第1の抑制解除可能なプロモーターの前記機能的プロモーターが、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターである、請求項 44 に記載の方法。

## 【請求項 46】

前記 TetR および / または TetR - KRAB が、構成的プロモーターの制御下にある、請求項 37 ~ 45 のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 47】

前記 TetR - KRAB をコードする前記核酸が、前記 TetR とインフレームで融合された KRAB を含む、請求項 46 に記載の方法。

## 【請求項 48】

前記処理が、ドキシサイクリンで処理することを含む、請求項 37 ~ 47 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 49】

前記第1、第2、および第3の核酸の各々が、トランスポゾン特異的逆位末端反復 (ITR) に隣接する、請求項 37 ~ 48 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 50】

前記哺乳動物細胞が、十分な量の TetR および / または TetR - KRAB を発現する、請求項 37 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 51】

前記 AAV が、治療目的の遺伝子を含む、請求項 37 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 52】

前記哺乳動物細胞が、前記 TetR および / または TetR - KRAB 抑制因子配列に隣接するニワトリ過敏性部位 - 4 (cHS4) をコードする1つ以上の核酸の安定した発現をさらに含む、請求項 37 ~ 51 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 53】

前記哺乳動物細胞が、選択遺伝子をさらに含む、請求項 37 ~ 52 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 54】

アデノ随伴ウイルス (AAV) を産生するための方法であって、

a. 哺乳動物細胞を、

TetR および / または TetR - KRAB 抑制因子をコードする核酸と、

前記 TetR および / または TetR - KRAB 抑制因子に隣接するニワトリ過敏性部位 - 4 (cHS4) 配列と、

選択遺伝子と、で安定的にトランスフェクトすることと、

b. 前記安定的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞を、

i. 第1の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、E2A 遺伝子、E4Orf 遺伝子、およびウイルス関連非コードRNAを含むアデノウイルスヘルパー遺伝子をコードする第1の核酸と、

40

ii. 第2の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある、Rep 遺伝子およびCap 遺伝子を含む AAV 遺伝子をコードする第2の核酸と、

iii. 任意選択で、第3の抑制解除可能なプロモーターの制御下にある目的の遺伝子をコードする第3の核酸と、でトランスフェクトすることと、

c. 前記安定にトランスフェクトされた哺乳動物細胞を前記 TetR の結合パートナーで処理することと、

d. 前記第1、第2、および第3の抑制解除可能なプロモーターを活性化することと、

50

- e . 前記 A A V を産生することと、
- f . 前記 A A V を回収することと、を含む、方法。

## 【請求項 5 5】

前記安定的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞が十分な量の T e t R を産生する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 5 6】

前記 K R A B 抑制ドメインが、前記 T e t R とインフレームで融合されている、請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 5 7】

a . 抑制解除可能 p 5 プロモーター；  
 b . R e p 7 8 遺伝子コード領域内に位置するサイレンシングされた p 1 9 プロモーターを含む、R e p 7 8 遺伝子；  
 c . C a p 遺伝子；  
 d . p 5 プロモーター；  
 e . 抑制解除可能 p 1 9 プロモーター；  
 f . R e p 5 2 遺伝子；および  
 h . 抗生物質耐性遺伝子  
 を、作動可能な順序でコードするプラスミドを含む、単離された核酸分子。

10

## 【請求項 5 8】

前記 C a p 遺伝子が、A N C 8 0、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、A A V 1 0、および A A V 1 1 からなる群より選択される A A V 血清型由来の C a p 遺伝子である、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

20

## 【請求項 5 9】

前記 C a p 遺伝子が、A N C 8 0 C a p 遺伝子である、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 6 0】

前記抑制解除可能 p 5 プロモーターが、機能的 p 5 プロモーターおよび 2 つのテトラサイクリンオペレーター配列 ( T e t O<sub>2</sub> ) を含む、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

30

## 【請求項 6 1】

前記抑制解除可能 p 5 プロモーターが配列番号 5 に記載の配列を含む、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 6 2】

前記抑制解除可能 p 1 9 プロモーターが、機能的 p 1 9 プロモーターおよび 2 つのテトラサイクリンオペレーター配列 ( T e t O<sub>2</sub> ) を含む、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 6 3】

前記抑制解除可能 p 1 9 プロモーターが配列番号 7 に記載の配列を含む、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

40

## 【請求項 6 4】

前記サイレンシングされた p 1 9 プロモーターが、p 1 9 プロモーターの S P 1、T A T A - 1、および T A T A - 2 部位における変異を含む、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 6 5】

前記抗生物質耐性遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子である、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 6 6】

作動不能な抗生物質耐性遺伝子をさらに含む、請求項 5 7 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 6 7】

50

- a. 機能的 p 5 プロモーターおよび 2 つのテトラサイクリンオペレーター配列 ( T e t O<sub>2</sub> ) を含む、抑制解除可能 p 5 プロモーター；
- b. R e p 7 8 遺伝子コード領域内に位置するサイレンシングされた p 1 9 プロモーターを含む、R e p 7 8 遺伝子；
- c. 非コード DNA ；
- d. p 5 プロモーター；
- e. 機能的 p 1 9 プロモーターおよび 2 つのテトラサイクリンオペレーター配列 ( T e t O<sub>2</sub> ) を含む、抑制解除可能 p 1 9 プロモーター；
- f. R e p 5 2 遺伝子；および
- h. 抗生物質耐性遺伝子

10

を、作動可能な順序でコードするプラスミドを含む、単離された核酸分子。

【請求項 6 8】

前記抑制解除可能 p 5 プロモーターが配列番号 5 に記載の配列を含む、請求項 6 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 6 9】

前記抑制解除可能 p 1 9 プロモーターが配列番号 7 に記載の配列を含む、請求項 6 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 7 0】

前記サイレンシングされた p 1 9 プロモーターが、p 1 9 プロモーターの S P 1、T A T A - 1、および T A T A - 2 部位における変異を含む、請求項 6 7 に記載の単離された核酸分子。

20

【請求項 7 1】

前記抗生物質耐性遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子である、請求項 6 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 7 2】

作動不能な抗生物質耐性遺伝子をさらに含む、請求項 6 7 に記載の単離された核酸分子。

30

40

50