

【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 2 区分

【発行日】令和 1 年 12 月 19 日 (2019.12.19)

【公表番号】特表 2018-534114 (P2018-534114A)

【公表日】平成 30 年 11 月 22 日 (2018.11.22)

【年通号数】公開・登録公報 2018-045

【出願番号】特願 2018-545108 (P2018-545108)

【国際特許分類】

A 6 1 L	27/38	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/113	(2010.01)
C 1 2 N	15/85	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/30	(2015.01)
A 6 1 K	35/38	(2015.01)
A 6 1 K	35/36	(2015.01)
A 6 1 K	35/28	(2015.01)
A 6 1 K	35/51	(2015.01)
A 6 1 K	35/545	(2015.01)
A 6 1 L	27/54	(2006.01)
A 6 1 L	27/40	(2006.01)
A 6 1 K	38/18	(2006.01)
A 6 1 K	38/16	(2006.01)

【F I】

A 6 1 L	27/38	1 0 0
C 1 2 N	5/10	Z N A
C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/113	Z
C 1 2 N	15/85	Z
A 6 1 P	27/02	
A 6 1 L	27/38	3 0 0
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/30	
A 6 1 K	35/38	
A 6 1 K	35/36	
A 6 1 K	35/28	
A 6 1 K	35/51	
A 6 1 K	35/545	
A 6 1 L	27/54	
A 6 1 L	27/40	
A 6 1 K	38/18	
A 6 1 K	38/16	

【手続補正書】

【提出日】令和1年11月8日(2019.11.8)

【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】

角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療する必要がある対象における、角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療するための医薬組成物であって、角膜ジストロフィー標的核酸中の核酸突然変異が操作されて修正された幹細胞を含む、医薬組成物。

【請求項2】

前記幹細胞が、1以上の単離された幹細胞である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記幹細胞が、複数の培養された幹細胞である、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記幹細胞が、操作後に培養されたものである、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記幹細胞が、安定した細胞株である、請求項3又は4に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記幹細胞が自己由来であるか、又は相同性ドナー由来である、請求項1～5のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記幹細胞が、対象から得られたものである、請求項1～6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記角膜ジストロフィー標的核酸が、TGF β I 標的核酸である、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記核酸突然変異が、TGF β I ポリペプチド中のアルギニン124、アルギニン555、又はヒスチジン626のアミノ酸置換をコードする、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項10】

前記核酸突然変異が、R124C、R124H、R124L、R555W、R555Q及びH626Pから選択されるアミノ酸置換をコードする、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項11】

前記角膜ジストロフィー標的核酸が、COL4A1、COL4A2、COL4A3、COL4A4、LOX、SPARC、LRRN1、HGF、AKAP13、ZNF469、ATG12P2、GS1-256O22.5、PLEKHA6、APOL4、SLC44A3、SLC6A18、SLC29A3、RANBP3L、KCNMA1、MUC5AC、CROCC、ATHL1、又はPLP1の標的核酸である、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記核酸突然変異が、COL4A1中のQ1334H、COL4A2中のG683A、COL4A2中のP718S、COL4A2中のR517K、COL4A3中のD326Y、COL4A3中のH451R、COL4A4中のV1327M、LOX中のR158Q、AKAP13中のA1046T、AKAP13中のG624V、ZNF469中のG2358R、SLC29A3中のS158F、MUC5AC中のP4493S、CROCC中のP370S、又はそれらの任意の組み合わせから選択されるアミノ酸置換をコードする、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記核酸突然変異が、rs3742207、rs3803230、rs9583500、rs7990383、rs55703767、rs11677877、rs2229813、rs1800449、rs1053411、rs2116780、rs3749350、rs2286194、rs12536657、rs2614668、rs745191、rs12598474、rs10932976、rs5908678、rs35803438、rs132728、rs132729、rs132730、rs859063、rs2893276、rs6687749、rs13189855、rs6876514、rs6876515、rs13361701、rs883764、rs780667、rs780668、rs13166148、rs10941287、rs7907270、rs200922784、rs9435793、rs116300974、又はrs2233696に相当する、請求項11又は12に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記角膜ジストロフィー標的核酸が、TGFI、KRT3、KRT12、GSN又はUBIAD1の標的核酸である、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記核酸突然変異が、

(i) TGFI 標的核酸中のLeu509Arg、Arg666Ser、Gly623Asp、Arg555Gln、Arg124Cys、Val505Asp、Ile522Asn、Leu569Arg、His572Arg、Arg496Trp、Pro501Thr、Arg514Pro、Phe515Leu、Leu518Pro、Leu518Arg、Leu527Arg、Thr538Pro、Thr538Arg、Val539Asp、Phe540del、Phe540Ser、Asn544Ser、Ala546Thr、Ala546Asp、Phe547Ser、Pro551Gln、Leu558Pro、His572del、Gly594Val、Val613del、Val613Gly、Met619Lys、Ala620Asp、Asn622His、Asn622Lys、Asn622Lys、Gly623Arg、Gly623Asp、Val624__Val625del、Val624Met、Val625Asp、His626Arg、His626Pro、Val627SerfsX44、Thr629__Asn630insAsnValPro、Val631Asp、Arg666Ser、Arg555Trp、Arg124Ser、Asp123delins、Arg124His、Arg124Leu、Leu509Pro、Leu103__Ser104del、Val113Ile、Asp123His、Arg124Leu、及び/又はThr125__Glu126del、

(ii) KRT3 標的核酸中のGlu498Val、Arg503Pro、及び/又はGlu509Lys、

(iii) KRT12 標的核酸中のMet129Thr、Met129Val、Gln130Pro、Leu132Pro、Leu132Val、Leu132His、Asn133Lys、Arg135Gly、Arg135Ile、Arg135Thr、Arg135Ser、Ala137Pro、Leu140Arg、Val143Leu、Val143Leu、Lle391__Leu399dup、Ile426Val、Ile426Ser、Tyr429Asp、Tyr429Cys、Arg430Pro、及び/又はLeu433Arg、

(iv) GSN 標的核酸中のAsp214Tyr、並びに

(v) UBIAD1 標的核酸中のAla97Thr、Gly98Ser、Asn102Ser、Asp112Asn、Asp112Gly、Asp118Gly、Arg119Gly、Leu121Val、Leu121Phe、Val122Glu、Val122Gly、Ser171Pro、Tyr174Cys、Thr175Ile、Gly177Arg、Lys181Arg、Gly186Arg、Leu188His、Asn232Ser、Asn233His、Asp236Glu、及び/又はAsp240Asn、

からなる群から選択されるアミノ酸置換をコードする、請求項 1 4 に記載の 医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記複数の幹細胞が、角膜縁上皮幹細胞、口腔粘膜上皮幹細胞、歯の幹細胞、毛包幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯ライニング幹細胞、又は胚性幹細胞である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の 医薬組成物。

【請求項 1 7】

前記複数の幹細胞が、角膜縁上皮幹細胞である、請求項 1 6 に記載の 医薬組成物。

【請求項 1 8】

前記角膜ジストロフィーが眼レーザー手術後に生じる、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の 医薬組成物。

【請求項 1 9】

前記核酸突然変異が、単離された複数の幹細胞に 1 組の核酸操作試薬を導入することにより操作され、それによって前記核酸操作試薬が 1 以上の複数の幹細胞における核酸突然変異を修正する、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 0】

前記核酸操作試薬を、電気穿孔、トランスフェクション、又はウイルス送達を使用して、前記複数の幹細胞へ導入する、請求項 1 9 に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記 1 組の核酸操作試薬が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、再設計ホーミングヌクレアーゼ、RNA 干渉 (R N A i) 試薬、又はクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) / ヌクレアーゼシステムの試薬を含む、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 2】

前記核酸操作試薬が、複数の幹細胞内で角膜ジストロフィー標的核酸とハイブリダイズするガイド RNA 核酸と、ヌクレアーゼをコードするヌクレアーゼ核酸とを含む、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) / ヌクレアーゼシステムの試薬であり、それにより、前記ガイド RNA が前記標的核酸を標的とし、前記ヌクレアーゼが前記標的核酸を切断する、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 3】

前記ガイド RNA が、検出可能な標識を含む、請求項 2 2 に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記ガイド RNA の検出可能な標識が核酸バーコード又は蛍光バーコード標識である、請求項 2 3 に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記核酸操作試薬が、野生型の角膜ジストロフィー標的核酸又はそのフラグメントを含む修復核酸を更に含み、それによって前記ガイド RNA が前記標的核酸を標的とし、前記ヌクレアーゼが前記標的核酸を切断して、前記標的核酸切断部位を生成し、それによって前記標的核酸切断部位の生成後、前記修復核酸が前記角膜ジストロフィー標的核酸と相同組み換えすることができる、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 6】

前記修復核酸が、検出可能な標識を含む、請求項 2 5 に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 7】

前記修復核酸の検出可能な標識が、核酸バーコード又は蛍光バーコード標識である、請求項 2 6 に記載の 医薬組成物。

【請求項 2 8】

前記 C R I S P R / ヌクレアーゼシステムの試薬は、非相同末端結合 (N H E J) 経路に関与する遺伝子を抑制することにより複数の幹細胞において相同組み換えの頻度を増加させる、1 以上の薬剤を更に含む、請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の 医薬組成物。

【請求項 29】

前記ヌクレアーゼが Cas9ヌクレアーゼである、請求項 22 ~ 28 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

操作されたクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) / CRISPR 関連タンパク質 9 (Cas9) システムが前記幹細胞に導入されており、ここで、前記 CRISPR / Cas9 システムが、Cas9ヌクレアーゼ及びシングルガイド RNA (sgRNA) をコードするヌクレオチド分子を含む少なくとも 1 つのベクターを含み、前記 Cas9ヌクレアーゼ及び前記 sgRNA が共に天然起源ではない、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

前記 sgRNA が、(i) RNA (crRNA) 配列を標的とする CRISPR と、(ii) トランス活性化 crRNA (tracrRNA) 配列とを含み、前記 crRNA 配列及び tracrRNA 配列が共に天然起源ではない、請求項 30 に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

前記 tracrRNA が、配列番号 2 又は配列番号 6 のヌクレオチド配列と少なくとも 85 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

前記 Cas9ヌクレアーゼは、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、又はそれらの変異体に由来する、請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 34】

前記 Cas9ヌクレアーゼが、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 85 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 35】

Cas9ヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド分子が、配列番号 3 又は配列番号 7 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 85 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

前記 sgRNA 及び Cas9ヌクレアーゼが同じベクター上に含まれる、請求項 30 ~ 35 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 37】

角膜ジストロフィーの治療を必要とする対象における角膜ジストロフィーの治療のためのキットであって、

角膜ジストロフィー標的核酸とハイブリダイズするガイド RNA 核酸と、ヌクレアーゼをコードするヌクレアーゼ核酸とを備える、キット。

【請求項 38】

野生型の角膜ジストロフィー標的核酸又はそのフラグメントを含む修復核酸を更に備える、請求項 37 に記載のキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

幾つかの場合、1 以上の細胞取り込み試薬はトランスフェクション試薬である。トランスフェクション試薬として、例えば、ポリマー系 (例えば DEAE デキストラン) トランスフェクション試薬、及びカチオンリポソーム媒介トランスフェクション試薬が挙げられる。また、電気穿孔方法を使用して、核酸操作試薬の取り込みを促進してもよい。外部電場を印加することによって、細胞において膜電位差の変更が誘導され、正味の膜電位差の

値（印加の合計、及び静止電位差）が閾値より大きい場合、一時的な浸透構造がメンブレンに生成され、電気穿孔が達成される。例えば、Gehl et al., Acta Physiol. Scand., 177: 437-447 (2003) を参照されたい。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

操作されたCRISPR/Cas9システムを、当該技術分野で知られ、本明細書に記載される任意の好適な方法を使用して、細胞に導入することができる。或る実施の形態では、導入は、培養中の幹細胞又は宿主生物に幹細胞に操作されたCRISPR/Cas9システムを投与することを含んでもよい。上で考察されるように、操作されたCRISPR/Cas9システムを導入する例示的な方法として、限定されないが、トランスフェクション、電気穿孔、及びウイルスに基づく方法が挙げられる。幾つかの場合では、1以上の細胞取り込み試薬は、トランスフェクション試薬である。トランスフェクション試薬として、例えば、ポリマー系（例えばDEAEデキストラン）トランスフェクション試薬、及びカチオンリポソーム媒介トランスフェクション試薬が挙げられる。また、電気穿孔法を使用して、核酸操作試薬の取り込みを促進してもよい。外部電場を印加することによって、細胞において膜電位差の変更が誘導され、正味の膜電位差の値が（印加の合計、及び静止電位差）閾値より大きい場合、一時的な浸透構造がメンブレンに生成され、電気穿孔が達成される。例えば、Gehl et al., Acta Physiol. Scand., 177: 437-447 (2003) を参照されたい。また、操作されたCRISPR/Cas9システム、ウイルス形質導入により細胞に送達されてもよい。好適なウイルス送達システムとして、限定されないが、アデノ関連ウイルス(AAV)、レトロウイルス、及びレンチウイルスの送達システムが挙げられる。かかるウイルス送達システムは、細胞がトランスフェクションに抵抗性である場合に有用である。ウイルス媒介送達システムを使用する方法は、核酸操作試薬をコードするウイルスベクターを作製する工程、及びウイルス粒子中に該ベクターをパッケージングする工程を更に含んでもよい。核酸試薬送達の他の方法として、限定されないが、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ピロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、又は脂質：核酸複合体、ネイキッドDNA、人工ビリオン、及び薬剤により増強された取り込みが挙げられる。また、全ての目的、特に、試薬送達システムに関する全ての教示に対して、それらの全体が引用することにより本明細書の一部をなす、Neiwoehner et al., Nucleic Acids Res., 42: 1341-1353 (2014)、並びに米国特許第5,049,386号、米国特許第4,946,787号、及び米国特許第4,897,355号を参照されたい。或る実施の形態では、導入は、DNAプラスミド、RNA（例えば本明細書に記載されるベクターの転写物）、ネイキッド核酸、及びリポソーム等の送達ビヒクルと複合体化した核酸を含む非ウイルスベクター送達システムによって行われる。送達は、細胞（例えばin vitro又はex vivoでの投与）に対してでもよく、又は標的組織（例えばin vivoでの投与）に対してもよい。