

【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2年4月9日(2020.4.9)

【公表番号】特表2019-506889(P2019-506889A)

【公表日】平成31年3月14日(2019.3.14)

【年通号数】公開・登録公報2019-010

【出願番号】特願2018-546429(P2018-546429)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/11	(2006.01)
C 1 2 N	15/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/87	(2006.01)
C 1 2 Q	1/6806	(2018.01)
C 1 2 Q	1/686	(2018.01)
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2015.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	38/02	(2006.01)
A 6 1 K	38/46	(2006.01)
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/11	Z N A Z
C 1 2 N	15/10	1 1 0 Z
C 1 2 N	15/87	Z
C 1 2 Q	1/6806	Z
C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/68	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	38/02	
A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	31/7105	

【手続補正書】

【提出日】令和2年3月2日(2020.3.2)

【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】

少なくとも2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端配列(ITR)が隣接する異種核酸インサートを含む閉鎖型直鎖状二重鎖DNA(c e DNA)であって、ITR配列

は、互いに非対称であり、各配列は、作動性末端分解部位(t r s)およびローリングサークル複製タンパク質結合要素(R B E)を有し、ここで第1のITR配列は、2つの対向する縦方向対称ステムループを形成する交差アーム配列により分断され、対向する縦方向対称ステムループの各々は、長さが5～15塩基対の範囲のステム部分と、2～5個の不対のデオキシリボヌクレオチドを有するループ部分とを有し、第2のITR配列は、切断された交差アーム配列により分断されている、前記閉鎖型直鎖状二重鎖DNA(c e D N A)。

#### 【請求項2】

ITR配列が、40～1000ヌクレオチド長の範囲であり、任意に、ITR配列が、100～160ヌクレオチド長の範囲であり、

交差アーム配列が、-12 kcal/mol～-30 kcal/molの範囲の生理学的条件下でアンフォールディングのギブス自由エネルギー(G)を有し、任意に、交差アーム配列が、-20 kcal/mol～-25 kcal/molの範囲の生理学的条件下でアンフォールディングのギブス自由エネルギー(G)を有し、

対向する縦方向対称ステムループの各々が、長さが3～15塩基対の範囲のステム部分を有し、任意に、対向する縦方向対称のステムループの各々が、長さが8～10塩基対の範囲のステム部分を有し、

各ループ部分が、2～5個の不対のデオキシリボヌクレオチドを有し、任意に、各ループ部分が、3個のデオキシリボヌクレオチドを有し、さらに任意に、1つのループ部分が3個のデオキシチミジンを有し、もう1つのループ部分が3個のデオキシアデノシンを有し、

ローリングサークル複製タンパク質結合要素が、Rep結合要素(RBE)であり、任意に、RBEが、配列5'-GCTCGCTCGCTC-3'を含み、

作動性末端分解部位が、配列5'-TTT-3'を含み、

作動性末端分解部位の3'末端が、ローリングサークル複製タンパク質結合要素の5'末端から15～25ヌクレオチドであり、

切断された交差アーム配列が、2つの対向する縦方向非対称ステムループを形成し、任意に、対向する縦方向非対称ステムループの1つが、長さが8～10塩基対の範囲のステム部分と2～5個の不対のデオキシリボヌクレオチドを有するループ部分とを有し、さらに任意に、1つの縦方向非対称ステムループが、3個以下のデオキシリボヌクレオチドを有するループ部分を有し、さらに任意に、1つの縦方向非対称ステムループが、8塩基対未満の長さのステム部分と2～5個のデオキシリボヌクレオチドを有するループ部分とを有し、任意に、1つの縦方向非対称ステムループが、3塩基対未満の長さのステム部分を有し、さらに任意に、切断された交差アーム配列が、0 kcal/molから-22 kcal/molを超える範囲の生理学的条件下で、アンフォールディングのギブス自由エネルギー(G)を有する、請求項1に記載のc e DNA。

#### 【請求項3】

異種核酸インサートが、タンパク質または機能性RNAを発現するように操作されており、異種核酸インサートが、遺伝子編集用基質としての無プロモーター構築物であり、任意に、無プロモーター構築物が、TALENs、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、メガヌクレアーゼ、Cas9、および他の遺伝子編集タンパク質のための基質を提供する、請求項1または2に記載のc e DNA。

#### 【請求項4】

核酸が、500～50,000ヌクレオチド長の範囲である、請求項1～3のいずれか一項に記載のc e DNA。

#### 【請求項5】

ベクター内に含有される、請求項1～4のいずれか一項に記載のc e DNA。

#### 【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項に記載の複数のc e DNAを含む、組成物。

#### 【請求項7】

複数のc e D N Aが、エンド・ツー・エンドで連結されている、請求項6に記載の組成物。

【請求項 8】

請求項1～5のいずれか一項に記載のc e D N Aおよび薬学的に許容し得る担体を含む、組成物。

【請求項 9】

請求項1～5のいずれか一項に記載のc e D N Aを含む、宿主細胞であって、任意に、宿主細胞がさらに、c e D N Aのローリングサークル複製タンパク質結合要素に選択的に結合するローリングサークル複製タンパク質を含む、前記宿主細胞。

【請求項 10】

請求項1～5のいずれか一項に記載のc e D N Aを含む、異種核酸を細胞に送達するための医薬組成物。

【請求項 11】

異種核酸を対象に送達するための医薬組成物であって、組成物が、請求項1～5のいずれか一項に記載のc e D N Aを含み、ここで、c e D N Aの送達が、免疫応答をもたらさない、前記組成物。

【請求項 12】

免疫応答が体液性応答または細胞性応答である、請求項11に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項9に記載の宿主細胞を含む、異種核酸を対象に送達するための医薬組成物であって、任意に、宿主細胞が血液細胞である、前記組成物。

【請求項 14】

c e D N Aをインビトロで生成する方法であって、方法が、

(i) 許容細胞に、2つのアデノ隨伴ウイルス(A A V)逆位末端配列(I T R)が隣接する異種核酸インサートを含む閉鎖型直鎖状二重鎖D N A(c e D N A)をインビトロで導入すること、I T R配列は、互いに非対称であり、各配列は、作動性末端分解部位(t r s)およびローリングサークル複製タンパク質結合要素(R B E)を有し、ここで第1のI T R配列は、2つの対向する縦方向対称のステムループを形成する交差アーム配列により分断され、対向する縦方向対称ステムループの各々は、長さが5～15塩基対の範囲のステム部分と、2～5個の不対デオキシリボヌクレオチドを有するループ部分とを有し、第2のI T R配列は、切斷された交差アーム配列により分断されている；および

(ii) 許容細胞を、許容細胞中のローリングサークル複製タンパク質が核酸の複数コピーの生成を開始する条件下で、インビトロで維持すること、ここで許容細胞は、核酸の複製可能コピーをウイルス粒子にパッケージング可能なウイルスカプシドタンパク質を発現しない、

を含む、前記方法。

【請求項 15】

許容細胞が哺乳動物細胞ではないか、または、許容細胞が、昆虫細胞株、酵母細胞株、または細菌細胞株である、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

ローリングサークル複製タンパク質が、ヘルパーウイルスベクターによりコードされ、任意にここで、ヘルパーウイルスベクターが、Autograph californica核多角体病ウイルス(A c M N P V)ベクターまたはバキュロウイルス発現ベクター(B E V)である、請求項14または15に記載の方法。

【請求項 17】

核酸をインビトロで調製する方法であって、方法が、

(i) 許容細胞に、請求項1～5のいずれか一項に記載のc e D N Aをインビトロで導入すること、ここで許容細胞は、ローリングサークル複製タンパク質を発現するが、核酸の複製可能コピーをウイルス粒子にパッケージング可能なウイルスカプシドタンパク質を発現しない；および、

( i i ) 許容細胞を、許容細胞中のローリングサークル複製タンパク質が核酸を複製する条件下で、インビトロで維持すること、  
を含む、前記方法。

【請求項 1 8】

核酸を分析する方法であって、方法が、

i ) 許容細胞から単離された核酸複製生成物を含む、核酸調製物を得ること、ここで許容細胞は、2つのアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端配列（ITR）が隣接する異種核酸インサートを含む閉鎖型直鎖状二重鎖DNA（c e DNA）を含み、ITR配列は、互いに非対称であり、各配列は、作動性末端分解部位（trs）およびローリングサークル複製タンパク質結合要素（RBE）を有し、ここで第1のITR配列は、2つの対向する縦方向対称のステムループを形成する交差アーム配列により分断され、対向する縦方向対称ステムループの各々は、長さが5～15塩基対の範囲のステム部分と、2～5個の不対のデオキシリボヌクレオチドを有するループ部分とを有し、ここで第2のITR配列は、切斷された交差アーム配列により分断され、ここで許容細胞は、ローリングサークル複製タンパク質を発現するが、核酸の複製可能コピーをウイルス粒子にパッケージング可能なウイルスカプシドタンパク質を発現せず、およびここで、ローリングサークル複製タンパク質は、核酸のローリングサークル複製タンパク質結合要素に結合し、核酸を複製して核酸複製生成物を生成する；および、

i i ) 1つ以上の複製生成物の、生理化学的特性を決定すること、  
を含む、前記方法。

【請求項 1 9】

生理化学的特性が、

1つまたはそれぞれの自己相補的配列のヌクレオチド配列、

1つ以上の複製生成物の多量体化の程度、

核酸調製物中の複製生成物の单量体形態および／または多量体形態の化学量論、

1つ以上の複製生成物の、制限エンドヌクレアーゼによる消化に対する感受性、

複製生成物の、二量体形態における单量体の極性、ここで極性が、head-to-head、head-to-tail、またはtail-to-tailの極性である、あるいは、

1つ以上の複製生成物または複製生成物の断片の分子量である、請求項1 8に記載の方法。

【請求項 2 0】

分子量が、電気泳動移動度に基づいて決定される、

分子量が、質量分析に基づいて決定される、

分子量が、1つ以上の複製生成物の断片のものであり、ここで分子量を決定する前に、断片が、ポリメラーゼによるプライマー伸長を含む反応によって増幅される、あるいは、

プライマー伸長を含む反応が、ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項1 8に記載の方法。

。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 8 8】

いくつかの態様において、本明細書に記載の核酸（例えば、c e DNA）は、肝臓組織を標的とすることができる。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載の核酸（例えば、c e DNA）は、肝疾患の処置に有用であり得る。本明細書で使用される「肝疾患」は、肝臓の疾患または状態である。肝疾患は遺伝的起源のものであり得、体細胞突然変異によって遺伝するかまたは獲得される。肝疾患は肝臓のがんであり得、これには、限定はされないが、肝細胞癌（HCC）、線維層状肝癌、胆管癌、血管肉腫および肝芽細胞腫を含む。肝疾患のさらなる非限定的例には、アラジール症候群、1アンチトリプ

シン欠乏症、自己免疫性肝炎、胆道閉鎖症、肝硬変、肝臓の囊胞性疾患、脂肪肝疾患、ガラクトース血症、胆石症、ギルバート症候群、ヘモクロマトーシス、妊娠中の肝疾患、新生児肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、ポルフィリン症、ライ症候群、サルコイドーシス、毒性肝炎、1型糖原病、チロシン血症、A、B、C型ウイルス性肝炎、ウィルソン病および住血吸虫症を含む。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

いくつかの態様において、本明細書に記載の核酸（例えば、c e D N A）は、腎臓組織を標的とすることができます。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載の核酸（例えば、c e D N A）は、腎疾患の処置に有用であり得る。本明細書で使用される「腎疾患」は、腎臓の疾患または状態である。腎疾患は遺伝的起源のものであり得、体細胞突然変異によって遺伝するかまたは獲得される。腎疾患は腎臓のがんであり得、これには、限定はされないが、腎細胞がん、明細胞がん、乳頭状がん1型、乳頭状がん2型、色素嫌性がん、膨大細胞がん、集合管がん、腎孟およびウィルムス腫瘍の転移性細胞がんを含む。腎疾患のさらなる非限定的例としては、以下を含む：Abderhalden-Kaufmann-Lignac症候群（腎障害シスチン症）、急性腎不全／急性腎障害、急性巣状細菌性腎炎、急性リン酸腎症、急性細尿管壊死、アデニンホスホリボシリトランスフェラーゼ欠損症、アデノウイルス腎炎、アルポート症候群、アミロイドーシス、血管筋脂肪腫、鎮痛薬性腎症、アンジオテンシン抗体および巣状分節性糸球体硬化症、抗リン脂質抗体症候群、抗T N F -療法関連糸球体腎炎、A P O L 1突然変異、見かけの鉱質コルチコイド過剰症候群、アリストロキア酸腎症、バルカン風土病腎症、バーター症候群、ビート尿、サラセミア腎疾患、胆汁円柱腎症、B K ポリオーマ、C 1 q 腎症、心腎症候群、C F H R 5腎症、コレステロール塞栓症、チャーグ・ストラウス症候群、乳び尿、糸球体虚脱症、C M V 関連糸球体虚脱症、先天性ネフローゼ症候群、腎錐体症候群（Mainzer-Saldino症候群またはSaldino-Mainzer病）、造影剤腎症、硫酸銅中毒、皮質壞死、