

【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 (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 DNA (c e DNA) であって、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 個の不对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 I T R 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 D N A (c e D N A) 。

【請求項 2】

I T R 配列が、40 ~ 1000ヌクレオチド長の範囲であり、任意に、I T R 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 k c a l / m o l ~ - 30 k c a l / m o l 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 k c a l / m o l ~ - 25 k c a l / m o l 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 個の不对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、R e p 結合要素 (R B E) であり、任意に、R B E が、配列 5 ' - G C T C G C T C G C T C - 3 ' を含み、

作動性末端分解部位が、配列 5 ' - T T - 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 個の不对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 k c a l / m o l から - 22 k c a l / m o l 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 D N A 。

【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 R N A 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、T A L E N S、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、メガヌクレアーゼ、C a s 9、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 D N A 。

【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 D N A 。

【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 D N A 。

【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 D N A 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 つのアデノ随伴ウイルス (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 個の不對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、切断された交差アーム配列により分断されている；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 18】

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 (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 DNA (c e D N A) を含み、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 個の不對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 I T R 配列は、切断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 19】

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単量体形態および / 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単量体の極性、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 18 に記載の方法。

【請求項 20】

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 18 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】0088

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0088】

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、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 D N A）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（H C C）、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 アンチトリブ

シン欠乏症、自己免疫性肝炎、胆道閉鎖症、肝硬変、肝臓の嚢胞性疾患、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 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、腎盂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ル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、チャージ・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、皮質壊死、