

【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23年4月21日(2011.4.21)

【公表番号】特表2010-520757(P2010-520757A)

【公表日】平成22年6月17日(2010.6.17)

【年通号数】公開・登録公報2010-024

【出願番号】特願2009-552911(P2009-552911)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 35/14 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A G

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 35/14 Z

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 31/14

A 6 1 K 48/00

【手続補正書】

【提出日】平成23年3月7日(2011.3.7)

【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】

細胞内で s i R N A 分子を発現する方法であって、

該方法が e x v i v o で標的細胞に組換えレトロウイルスを感染させることを含み、
前記組換えレトロウイルスが、第 1 の R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター領域、第
1 の R N A コード領域、及び第 1 の終結配列を含み、

前記 R N A コード領域の発現によって、標的遺伝子又はゲノム転写物が低下するように調節され、

前記第 1 の R N A コード領域は、配列番号 1 6 を含む s i R N A をコードすることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記 R N A コード領域が配列番号 1 7 から成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 R N A コード領域がヘアピン領域を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標的細胞内の前記 R N A コード領域の発現が、少なくとも約 1 0 日間、該標的細胞の増殖速度を変えない、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記組換えレトロウイルスがさらに、レンチウイルス 5 ' 長末端反復 (L T R) 及び自己不活性化レンチウイルス 3 ' L T R 由来の R 配列及び U 5 配列を含む、請求項 1 ~ 4 のい

ずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 R N A コード領域が、センス領域と、アンチセンス領域と、ループ領域とを有する R N A 分子をコードし、該センス領域は該アンチセンス領域と実質的に相補的である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ループ領域は約 2 ヌクレオチド長 ~ 約 1 5 ヌクレオチド長である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 R N A コード領域が、標的領域と実質的に相補的であり、該標的領域が、1 5 ヌクレオチド長 ~ 3 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 R N A コード領域が、標的領域と実質的に相補的であり、該標的領域が、1 8 ヌクレオチド長 ~ 2 3 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記 5 ' L T R 配列が H I V に由来する、請求項 5 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記自己不活性化 レンチウイルス 3 ' L T R が、エンハンサー配列が欠失した U 3 因子を含む、請求項 5 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記自己不活性化 レンチウイルス 3 ' L T R が修飾 H I V 3 ' L T R である、請求項 5 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記組換えレトロウイルスが偽型である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記組換えレトロウイルスが水泡性口内炎ウイルスエンベローブ糖タンパク質によって偽型となっている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 5 ' L T R 配列がモロニー Maus 白血病ウイルスに由来する、請求項 5 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 5 ' L T R 配列がマウス幹細胞ウイルス (M S C V) に由来する、請求項 5 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記標的細胞がヒト細胞である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記標的細胞が造血細胞である、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記標的細胞が C D 3 4 陽性造血細胞である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記標的 C D 3 4 陽性造血細胞が患者から単離されたものであることを特徴とする、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

感染した C D 3 4 陽性造血細胞が前記患者へ再導入する ためのものであることを特徴とする、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記細胞が培養細胞である、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

パッケージング細胞株にレトロウイルス構築物をトランスフェクトすること、及び前記パッケージング細胞株から組換えレトロウイルスを回収すること、をさらに含む、請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記パッケージング細胞株が H E K 2 9 3 細胞株である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

H I V に感染した患者を治療するための細胞の製造方法であって、該方法が、患者より単離された C D 3 4 陽性標的細胞に、レトロウイルス構築物をトランスフェクトしたパッケージング細胞株から回収された組換えレトロウイルスを感染させることを含む、

前記組換えレトロウイルス構築物が、第 1 の R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター領域、配列番号 17 をコードする第 1 の R N A コード領域、及び第 1 の終結配列を含み、

前記 R N A コード領域の発現によって、C C R 5 が低下するように調節されることを特徴とする細胞の製造方法。

【請求項 27】

前記標的細胞内の前記 R N A コード領域の発現が、少なくとも約 10 日間、該標的細胞の増殖速度を変えない、請求項 26 に記載の細胞の製造方法。

【請求項 28】

前記組換えレトロウイルス構築物がさらに、レンチウイルス 5' 長末端反復 (L T R) 及び自己不活性化レンチウイルス 3' L T R 由来の R 配列及び U 5 配列を含む、請求項 26 または 27 に記載の細胞の製造方法。

【請求項 29】

第 1 の R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター領域、該 R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター領域と作動可能に連結された配列番号 17 をコードする第 1 の R N A コード領域、及び第 1 の終結配列を含む組換えレトロウイルスを標的細胞に *i n v i t r o* で感染させることを含む細胞内で *s i* R N A 分子を発現する方法であって、前記第 1 の R N A コード領域の発現によって、前記標的細胞において C C R 5 が低下するように調節されることを特徴とする方法。

【請求項 30】

配列番号 17 を含む小 R N A 分子。

【請求項 31】

ヒト末梢血単核細胞における *s i* R N A の発現が、少なくとも約 10 日間、該細胞の増殖速度を変えない、請求項 30 に記載の小 R N A 分子。

【請求項 32】

前記 *s i* R N A がヘアピン領域を含む、請求項 30 または 31 に記載の小 R N A 分子。

【請求項 33】

細胞に、第 1 の R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター領域、第 1 の R N A コード領域、及び第 1 の終結配列を含む組換えレンチウイルスを *i n v i t r o* でトランスフェクトすることを含む、細胞の C C R 5 が低下するように調節する方法であって、前記 R N A コード領域が配列番号 17 をコードすることを特徴とする方法。

【請求項 34】

細胞内で *s i* R N A 分子を発現させるための、レトロウイルス構築物であって、該レトロウイルス構築物が

レンチウイルス 5' 長末端反復 (L T R) 由来の R 配列及び U 5 配列を有する核酸；自己不活性化レンチウイルス 3' L T R ；

R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター；および

R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター領域と作動可能に連結された少なくとも 1 つの R N A コード領域；を含み、

該 R N A コード領域が配列番号 17 をコードする、

レトロウイルス構築物。

【請求項 35】

RNAポリメラーゼIIIプロモーター及びRNAコード領域が5'LTRと3'LTR配列との間に位置する、請求項34に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 36】

少なくとも1つの終結配列をさらに含む、請求項34及び35に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 37】

該RNAポリメラーゼIIIプロモーターが誘導性である、請求項34～36のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 38】

該誘導性プロモーターがテトラサイクリンで活性化される、請求項37に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 39】

前記RNAコード領域が、センス領域と、アンチセンス領域と、ループ領域とを有する自己相補的なRNA分子をコードする、請求項34～38のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 40】

前記ループ領域が約2ヌクレオチド長～15ヌクレオチド長である、請求項39に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 41】

前記センス領域及びアンチセンス領域が約15ヌクレオチド長～約30ヌクレオチド長の間である、請求項39または40に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 42】

前記、5'LTR配列がHIV由来である、請求項34～41のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 43】

前記レトロウイルス構築物が、ウッドチャック肝炎ウイルスエンハンサー因子配列を含む、請求項34～42のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 44】

前記ウイルス構築物がtRNAアンバー抑制因子配列を含む、請求項34～43のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 45】

前記自己不活性化3'LTRがエンハンサー配列が欠失したU3因子である、請求項34～44のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 46】

自己不活性化3'LTRは修飾HIV3'LTRである、請求項33～45のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 47】

前記レトロウイルス構築物が偽型である、請求項34～46のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 48】

前記レトロウイルス構築物が、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質によって偽型とされる、請求項47に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 49】

該RNAコード領域が配列番号17をコードする、請求項34～48のいずれか1項に記載のレトロウイルス構築物。

【請求項 50】

HIVに感染した患者を治療するための細胞の製造方法であって、
該方法が、患者から単離されたCD34-陽性標的細胞に、

レトロウイルス構築物をトランスフェクトしたパッケージング細胞株から回収された、組換えレトロウイルスを感染させる工程を含み、

前記組換えレトロウイルス構築物は第一のRNAポリメラーゼIIIプロモーター領域を含み、

配列番号16をコードする第一のRNAコード領域、及び第1の終結配列を含み、

前記RNAコード領域の発現によってCCR5が低下するように調節される、細胞の製造方法。