

【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5年4月17日(2023.4.17)

【国際公開番号】WO2020/210507

【公表番号】特表2022-526646(P2022-526646A)

【公表日】令和4年5月25日(2022.5.25)

【年通号数】公開公報(特許)2022-092

【出願番号】特願2021-559793(P2021-559793)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 7/01(2006.01)

C 1 2 N 1/06(2006.01)

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/35(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

C 1 2 N 9/10(2006.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

10

【F I】

C 1 2 N 5/10 Z N A

C 1 2 N 7/01

C 1 2 N 1/06

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/113 Z

C 1 2 N 15/35

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 9/10

C 1 2 Q 1/686 Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和5年4月7日(2023.4.7)

【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】

K C N N 2、R G M A、A T P 5 E P 2、L I N C 0 0 3 1 9、C Y P 3 A 7、A B C A 1 0、N O G、S P A N X N 3、P G A 5、M Y R I Pおよび/またはN A L C N - A S 1から発現される遺伝子産物の発現および/または活性が対応する非改変親細胞と比較して低下した、複数の操作された細胞を含む組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)パッケージングおよび/または産生細胞株。

30

40

【請求項2】

K C N N 2、R G M A、A T P 5 E P 2、L I N C 0 0 3 1 9、C Y P 3 A 7、A B C A 1 0、N O G、S P A N X N 3、P G A 5、M Y R I Pおよび/またはN A L C N - A S 1から発現される遺伝子産物の発現および/または活性が無期限にまたは永続的に低下している、請求項1に記載のr A A Vパッケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項3】

50

前記複数の操作された細胞が、KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIPおよび/またはNALCN-AS1のうちの少なくとも1つに遺伝子破壊または部分的もしくは完全な遺伝子欠失を含む、請求項2に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項4】

前記複数の操作された細胞が、KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIPおよび/またはNALCN-AS1のうちの少なくとも1つに遺伝子破壊を含む、請求項3に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

10

【請求項5】

前記複数の操作された細胞が、KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIPおよびNALCN-AS1から選択される少なくとも2つの遺伝子に遺伝子破壊を含む、請求項3に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項6】

前記複数の操作された細胞が、KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIPおよび/またはNALCN-AS1のうちの少なくとも1つに部分的または完全な遺伝子欠失を含む、請求項3に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

20

【請求項7】

前記複数の操作された細胞が、KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIPおよびNALCN-AS1から選択される少なくとも2つの遺伝子に部分的または完全な遺伝子欠失を含む、請求項3に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項8】

前記発現および/または活性が、クラスター化され規則的に間隔の空いた短い回文構造の繰り返し(CRISPR)ゲノム編集の使用により低下している、請求項1から7のいずれか一項に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項9】

前記CRISPRゲノム編集がガイドRNA(gRNA)対を使用し、各gRNAが、(a)配列番号12~15のヌクレオチド配列から選択される配列を含む、および/または(b)配列番号16~31のヌクレオチド配列のいずれか1つから選択される標的DNA配列を標的とする、請求項8に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

30

【請求項10】

前記gRNA対が、前記複数の細胞におけるKCNN2を標的とするために使用され、配列番号12の配列を含む第1のgRNA分子、および配列番号13の配列を含む第2のgRNA分子を含む、または前記gRNA対が、前記複数の細胞におけるKCNN2を標的とするために使用され、配列番号14の配列を含む第1のgRNA分子、および配列番号15の配列を含む第2のgRNA分子を含む、請求項9に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

40

【請求項11】

各gRNA分子が、その5'および3'末端のいずれかまたは両方の末端の3ヌクレオチドにおける3'ホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む2' O - メチルアナログである、請求項10に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項12】

ヒト細胞株であり、必要に応じて、前記ヒト細胞株がHeLa細胞株またはヒト胎児腎臓(HEK)293細胞株である、請求項1から11のいずれか一項に記載の記載のパッ

50

ケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項 13】

対応する親細胞株と比較して、KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP および NALCN-AS1 のうちの少なくとも1つから発現されるポリペプチドまたはポリリボヌクレオチドの低下した発現および/または活性を示す複数の操作された細胞を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) パッケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項 14】

前記発現および/または活性が、ヌクレアーゼ、二本鎖RNA (dsRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、小ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA) または アンチセンスRNAオリゴヌクレオチド (ASO) の使用により低下している、請求項 13 に記載の rAAV パッケージングおよび/または産生細胞株。

10

【請求項 15】

(a) 前記複数の細胞における ATP5EP2 の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 1 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 32 のヌクレオチド配列を含む；

(b) 前記複数の細胞における LINC00319 の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 2 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 33 のヌクレオチド配列を含む；

(c) 前記複数の細胞における CYP3A7 の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 3 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 34 のヌクレオチド配列を含む；

20

(d) 前記複数の細胞における NOG の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 4 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 35 のヌクレオチド配列を含む；

(e) 前記複数の細胞における SPANXN3 の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 5 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 36 のヌクレオチド配列を含む；

(f) 前記複数の細胞における MYRIP の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 6 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 37 のヌクレオチド配列を含む；

30

(g) 前記複数の細胞における KCNN2 の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 7 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 38 のヌクレオチド配列を含む；

(h) 前記複数の細胞における NALCN-AS1 の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 8 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 39 のヌクレオチド配列を含む；

(i) 前記複数の細胞における RGMA の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 9 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 40 のヌクレオチド配列を含む；

40

(j) 前記複数の細胞における PGA5 の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 10 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 41 のヌクレオチド配列を含む；および/または

(k) 前記複数の細胞における ABCA10 の発現および/または活性が siRNA の使用により低下しており、前記 siRNA が、センス鎖に配列番号 11 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 42 のヌクレオチド配列を含む、

請求項 13 に記載の rAAV パッケージングおよび/または産生細胞株。

【請求項 16】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の rAAV パッケージングおよび/または産生細胞株の溶解液または細胞培養上清。

50

【請求項 17】

r A A V の産生に関連する 1 つまたは複数の遺伝子を同定する方法であって、
i . r A A V 力価を増加させる 1 種または複数種の補充物質を細胞株へ添加すること；
i i . 補充および無補充細胞株におけるトランスクリプトームにわたって網羅的遺伝子発現を測定すること；
i i i . 補充細胞株と無補充細胞株の間で差次的に発現される遺伝子のリストを得ること；
；ならびに
i v . r A A V の産生に関連する 1 つまたは複数の遺伝子を同定すること
を含む、方法。

【請求項 18】

前記細胞株に添加される前記 1 種または複数種の補充物質が、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、ベタメタゾン、コルチゾン、プレドニゾン、ブデソニドまたはトリアムシノロンを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

r A A V パッケージングおよび / または産生細胞株を産生して r A A V の産生の増加を促進する方法であって、請求項 17 に記載の方法を使用して同定された 1 つまたは複数の遺伝子の発現をモジュレートすることを含む、方法。

【請求項 20】

前記細胞株が、ヒト細胞株であり、必要に応じて、HeLa 細胞株またはヒト胎児腎臓 (H E K) 2 9 3 細胞株である、請求項 17 から 19 のいずれか一項に記載の方法

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

本開示は、以下を参照することでより完全に理解されるであろう。
 本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

A T P 5 E P 2、L I N C 0 0 3 1 9、C Y P 3 A 7、A B C A 1 0、N O G、R G M A、S P A N X N 3、P G A 5、M Y R I P、K C N N 2 および / または N A L C N - A S 1 の発現が対照親細胞と比較して低下している細胞を含む組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) パッケージングおよび / または産生細胞株。

(項目 2)

K C N N 2、L I N C 0 0 3 1 9、R G M A および S P A N X N 3 の発現が対照親細胞と比較して低下している細胞を含む、項目 1 に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

(項目 3)

前記発現が、ヌクレアーゼ、二本鎖 RNA (d s R N A)、低分子干渉 RNA (s i R N A)、小ヘアピン RNA (s h R N A)、マイクロ RNA (m i R N A) またはアンチセンス RNA オリゴヌクレオチド (A S O) の使用により低下している、項目 1 または 2 に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

(項目 4)

前記発現が、配列番号 1 ~ 11 のいずれか 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む s i R N A の使用により低下している、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

(項目 5)

A T P 5 E P 2 の発現が低下しており、前記 s i R N A が、センス鎖に配列番号 1 のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号 32 のヌクレオチド配列を含む、項目

10

20

30

40

50

4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目6)

LINC00319の発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号2のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号33のヌクレオチド配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目7)

CYP3A7の発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号3のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号34のヌクレオチド配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目8)

NOGの発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号4のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号35のヌクレオチド配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目9)

SPANXN3の発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号5のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号36のヌクレオチド配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目10)

MYRIPの発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号6のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号37のヌクレオチド配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目11)

KCNN2の発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号7のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号38のヌクレオチド配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目12)

NALCN-AS1の発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号8のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号39のヌクレオチド配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目13)

RGMAの発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号9のヌクレオチド配列、およびアンチセンス鎖に配列番号40のヌクレオチド配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目14)

PGA5の発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号10の配列、およびアンチセンス鎖に配列番号41の配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目15)

ABCA10の発現が低下しており、前記siRNAが、センス鎖に配列番号11の配列、およびアンチセンス鎖に配列番号42の配列を含む、項目4に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目16)

前記ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、メガヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、またはクラスター化され規則的に間隔の空いた短い回文構造の繰り返し(CRISPR)関連タンパク質からなる群から選択される、項目3に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目17)

前記発現がCRISPRゲノム編集の使用により低下している、項目1から16のいずれか一項に記載のパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目18)

10

20

30

40

50

前記発現がガイドRNA対の使用により低下しており、各ガイドRNAが、
(a) 配列番号 1 2 ~ 1 5 のヌクレオチド配列から選択される配列を含む、および / また
は

(b) 配列番号 1 6 ~ 3 1 のヌクレオチド配列のいずれか 1 つから選択される標的 DNA
配列を標的とする、

項目 1 7 に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

(項目 1 9)

前記 g RNA 対が、K C N N 2 を標的とするために使用され、配列番号 1 2 の配列を含
む第 1 の g RNA 分子、および配列番号 1 3 の配列を含む第 2 の g RNA 分子を含む、項
目 1 8 に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

10

(項目 2 0)

前記 g RNA 対が、K C N N 2 を標的とするために使用され、配列番号 1 4 の配列を含
む第 1 の g RNA 分子、および配列番号 1 5 の配列を含む第 2 の g RNA 分子を含む、項
目 1 8 に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

(項目 2 1)

各 g RNA 分子が、その 5 ' および 3 ' 末端のいずれかまたは両方の末端の 3 ヌクレオチ
ドにおける 3 ' ホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む 2 ' O - メチルアナログであ
る、項目 1 9 または 2 0 に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

(項目 2 2)

前記遺伝子発現が対照親細胞と比較して除去されている、項目 1 から 2 1 のいずれか一
項に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

20

(項目 2 3)

ヒト細胞株である、項目 1 から 2 2 のいずれか一項に記載のパッケージングおよび / ま
たは産生細胞株。

(項目 2 4)

前記ヒト細胞株が H e L a 細胞株またはヒト胎児腎臓 (H E K) 2 9 3 細胞株である、
項目 2 3 に記載のパッケージングおよび / または産生細胞株。

(項目 2 5)

r A A V パッケージング細胞株である、項目 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の細胞株。

(項目 2 6)

r A A V 産生細胞株である、項目 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の細胞株。

30

(項目 2 7)

r A A V の力価が、前記対照親細胞を含む細胞株から産生される r A A V の力価と比較
して約 1 . 5 ~ 約 7 倍増加している、項目 2 6 に記載の細胞株。

(項目 2 8)

項目 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の細胞株の溶解液。

(項目 2 9)

項目 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の細胞株からの細胞培養上清。

(項目 3 0)

産生細胞株を生成する方法であって、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ベクター
を項目 2 5 に記載のパッケージング細胞株の細胞に送達することを含む、方法。

40

(項目 3 1)

r A A V を産生する方法であって、項目 3 0 に記載の方法によって生成された産生細胞
株の細胞にヘルパーウイルスを感染させることを含む、方法。

(項目 3 2)

r A A V を産生する方法であって、項目 2 6 に記載の産生細胞株の細胞にヘルパーウ
イルスを感染させることを含む、方法。

(項目 3 3)

前記 r A A V が前記産生細胞株から収集される、項目 3 1 または 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

50

r A A Vの前記産生が対照親細胞株と比較して増強される、項目31から33のいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

r A A Vの産生に関連する1つまたは複数の遺伝子を同定する方法であって、

i . r A A V力価を増加させる1種または複数種の補充物質を細胞株へ添加すること；

i i . 補充および無補充細胞株におけるトランスクリプトームにわたって網羅的遺伝子発現を測定すること；

i i i . 補充細胞株と無補充細胞株の間で差次的に発現される遺伝子のリストを得ること；ならびに

i v . r A A Vの産生に関連する1つまたは複数の遺伝子を同定することを含む、方法。

10

(項目36)

前記細胞株に添加される前記1種または複数種の補充物質が、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、ベタメタゾン、コルチゾン、プレドニゾン、ブデソニドまたはトリアムシノロンを含む、項目35に記載の方法。

(項目37)

r A A Vパッケージングおよび/または産生細胞株を産生してr A A Vの産生の増加を促進する方法であって、項目35に記載の方法を使用して同定された1つまたは複数の遺伝子の発現をモジュレートすることを含む、方法。

(項目38)

前記細胞株がr A A Vパッケージング細胞株である、項目35から37のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目39)

前記細胞株がr A A V産生細胞株である、項目35から37のいずれか一項に記載の方法。

(項目40)

前記r A A V産生細胞株が、r A A V力価を、対応する1つまたは複数の遺伝子の発現のモジュレーションを行わないr A A V産生細胞株によって産生されるr A A V力価よりも少なくとも1.5倍大きく増加する、項目39に記載の方法。

(項目41)

前記発現をモジュレートすることが1つまたは複数の遺伝子の発現を低下させることを含む、項目37から40のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目42)

前記発現をモジュレートすることが1つまたは複数の遺伝子の発現を除去することを含む、項目37から40のいずれか一項に記載の方法。

(項目43)

前記細胞株がヒト細胞株である、項目30から42のいずれか一項に記載の方法。

(項目44)

前記ヒト細胞株がHeLa細胞株またはヒト胎児腎臓(HEK)293細胞株である、項目43に記載の方法。

40

(項目45)

A T P 5 E P 2、L I N C 0 0 3 1 9、C Y P 3 A 7、A B C A 1 0、N O G、R G M A、S P A N X N 3、P G A 5、M Y R I P、K C N N 2および/またはN A L C N - A S 1から発現される遺伝子産物の発現および/または活性を対応する非改変親細胞と比較して低下させるように操作された細胞を含む組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)パッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目46)

A T P 5 E P 2、L I N C 0 0 3 1 9、C Y P 3 A 7、A B C A 1 0、N O G、R G M A、S P A N X N 3、P G A 5、M Y R I P、K C N N 2および/またはN A L C N - A S 1から発現される遺伝子産物の発現および/または活性が無期限にまたは永続的に低下

50

している、項目45に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目47)

ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGM
A、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2および/またはNALCN-AS1
のうちの少なくとも1つに遺伝子破壊または部分的もしくは完全な遺伝子欠失を含む
ように操作されている、項目46に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目48)

ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGM
A、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2および/またはNALCN-AS1
のうちの少なくとも1つに遺伝子破壊を含むように操作されている、項目47に記載
のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

10

(項目49)

ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGM
A、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2およびNALCN-AS1から
選択される少なくとも2つの遺伝子に遺伝子破壊を含むように操作された、項目47に記
載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目50)

ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGM
A、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2および/またはNALCN-AS1
のうちの少なくとも1つに部分的または完全な遺伝子欠失を含むように操作された、
項目47に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

20

(項目51)

ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGM
A、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2およびNALCN-AS1から
選択される少なくとも2つの遺伝子に部分的または完全な遺伝子欠失を含むように操作さ
れた、項目47に記載のrAAVパッケージングおよび/または産生細胞株。

(項目52)

対応する親細胞株と比較して、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、
ABCA10、NOG、RGM A、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2
およびNALCN-AS1のうちの少なくとも1つから発現されるポリペプチドまたはポリ
リボヌクレオチドの低下した発現および/または活性を示す組換えアデノ随伴ウイルス
(rAAV)パッケージングおよび/または産生細胞株。

30

40

50