

【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6年1月23日(2024.1.23)

【国際公開番号】WO2021/146591
 【公表番号】特表2023-510590(P2023-510590A)
 【公表日】令和5年3月14日(2023.3.14)
 【年通号数】公開公報(特許)2023-048
 【出願番号】特願2022-543381(P2022-543381)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/864(2006.01)

C 1 2 N 7/01(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 7/01 Z N A

【手続補正書】

【提出日】令和6年1月15日(2024.1.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

20

【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】

原核生物配列を欠く組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を産生する方法であって、ヒト胚細胞株を懸濁状態で培養する工程、

(a)rAAV複製に十分なヘルパータンパク質をコードする核酸配列、(b)AAV rep遺伝子およびAAV cap遺伝子をコードする核酸配列、ならびに(c)少なくとも1つの逆位末端反復(ITR)配列と1つまたは複数の調節エレメントに機能的に連結された異種導入遺伝子とを含む閉鎖末端化された直鎖状二重鎖rAAVベクター核酸を、ヒト胚細胞株にトランスフェクトする工程、

30

トランスフェクトされたヒト細胞株を約40~400時間インキュベートする工程、ならびに

任意で、トランスフェクトされたヒト細胞株を溶解させて、rAAVをコードする核酸配列を精製する工程

を含み、それによって、rAAVを産生する、前記方法。

【請求項2】

前記細胞株の細胞が、懸濁状態でトランスフェクトされる、請求項1記載の方法。

【請求項3】

ヒト胚細胞株が、ヒト胎児腎細胞株由来の、懸濁適合化無血清細胞株である、請求項1記載の方法。

40

【請求項4】

AAV rep遺伝子およびAAV cap遺伝子が異なる血清型由来である、請求項1記載の方法。

【請求項5】

AAV rep遺伝子およびAAV cap遺伝子が同じ血清型由来である、請求項1記載の方法。

【請求項6】

AAV rep遺伝子がAAV2 rep遺伝子であり、AAV cap遺伝子がAAV8 cap遺伝子である、請求項1記載の方法。

50

【請求項 7】

AAV ITR遺伝子およびAAV cap遺伝子が異なる血清型由来である、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

AAV ITR遺伝子およびAAV cap遺伝子が同じ血清型由来である、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

AAV逆位末端反復 (ITR) 配列がアデノ随伴ウイルス2逆位末端反復 (ITR) 配列である、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

AAV ITR配列が、AAV2血清型由来またはAAV1、3a、3b、4、5、6、7、8、9、10、11および13からなる群より選択される血清型由来である、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

AAV ITR配列が合成である、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

1×10^6 個の細胞あたりの(a)、(b)および(c)から下トランスフェクトされた核酸の総量が $2 \mu\text{g}$ 未満であり、任意で、 1×10^6 個の細胞あたりの(a)、(b)および(c)から下トランスフェクトされた核酸の総量が $1 \mu\text{g}$ 未満である、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

(a) : (b) : (c)の比が約0.5 ~ 1.75 : 約0.75 ~ 2.25 : 約0.5 ~ 1.75 (重量 : 重量 : 重量)であり、任意で、(a) : (b) : (c)の比が約1 : 約1 ~ 1.6 : 約1 (重量 : 重量 : 重量)である、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

(a)、(b)および(c)が、(a)、(b)および(c)ならびに安定なカチオン性ポリマーを含むトランスフェクション組成物を用いてトランスフェクトされ、安定なカチオン性ポリマー対(a)、(b)および(c)からの核酸の総量の比が、約1 : 1 ~ 約3 : 1 (重量 / 重量)であり、任意で、安定なカチオン性ポリマー対(a)、(b)および(c)からの核酸の総量の比が、約1.5 : 1である、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

原核生物配列を欠く高力価の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) の集団を産生する方法であって、

(i)(a)rAAV複製に十分なヘルパータンパク質をコードする核酸配列、(b)rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸配列、ならびに(c)少なくとも1つのITRと1つまたは複数の調節エレメントに機能的に連結された異種導入遺伝子とを含む閉鎖末端化された直鎖状二重鎖rAAVベクター核酸を、哺乳動物細胞株にトランスフェクトする工程であって、 1×10^6 個の細胞あたりの(a)、(b)および(c)から下トランスフェクトされた核酸の総量が $1 \mu\text{g}$ 未満である、工程、

(ii)トランスフェクトされた細胞を少なくとも24時間培養する工程、

(iii)トランスフェクトされた細胞を収集して、産生されたrAAVベクター粒子を精製する工程

を含み、rAAVの力価が、少なくとも 9.3×10^{13} 個のベクターゲノム / 3.0×10^9 個の生きたトランスフェクト細胞である、前記方法。

【請求項 16】

(a) : (b) : (c)の比が約0.5 ~ 1.75 : 約0.75 ~ 2.25 : 約0.5 ~ 1.75 (重量 : 重量 : 重量)であり、任意で、(a) : (b) : (c)の比が約1 : 約1 ~ 1.6 : 約1 (重量 : 重量 : 重量)である、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

(a)、(b)および(c)が、(a)、(b)および(c)ならびに安定なカチオン性ポリマーを含むトランスフェクション組成物を用いてトランスフェクトされ、安定なカチオン性ポリマー対(a)、(b)および(c)からの核酸の総量の比が、約1 : 1 ~ 約3 : 1 (重量 / 重量)であり、任意で、安定なカチオン性ポリマー対(a)、(b)および(c)からの核酸の総量の比が、

約1.5 : 1である、請求項15記載の方法。

【請求項18】

原核生物配列を欠く精製された組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)の集団を産生する方法であって、

i. 培養培地中に懸濁された哺乳動物細胞株に、トランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、トランスフェクション組成物が、(a)rAAV複製に十分なヘルパータンパク質をコードする核酸配列、(b)rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸配列、ならびに(c)少なくとも1つのITRと1つまたは複数の調節エレメントに機能的に連結された異種導入遺伝子とを含む閉鎖末端化された直鎖状二重鎖rAAVベクター核酸、ならびに(d)安定なカチオン性ポリマーを含み、安定なカチオン性ポリマー 対 (a)、

10

ii. トランスフェクトされた細胞株を少なくとも24時間培養する工程、

iii. 工程(ii)のトランスフェクトされた細胞株を収集する工程、

iv. rAAVを精製する工程

を含み、精製されたウイルスが、 2×10^4 vg/TCID50未満の粒子対感染性比(a particle to infectivity ratio)を有する、前記方法。

【請求項19】

哺乳動物細胞株が懸濁細胞株であり、細胞が懸濁状態でトランスフェクトされる、請求項18記載の方法。

20

【請求項20】

哺乳動物細胞株がヒト胎児腎細胞株由来である、請求項18記載の方法。

【請求項21】

ヒト胚細胞株が、ヒト胎児腎細胞株由来の、懸濁適合化無血清細胞株である、請求項18~20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

安定なカチオン性ポリマー 対 (a)、(b)および(c)からの核酸成分の総量の比が約1.75 : 1 ~ 約2.75 : 1であり、任意で、安定なカチオン性ポリマー 対 (a)、(b)および(c)からの核酸成分の総量の比が約2 : 1である、請求項18記載の方法。

30

【請求項23】

安定なカチオン性ポリマーが、完全加水分解直鎖ポリエチレンジミン(PEI)を含む、請求項18~22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

請求項1、15または18のいずれか1項記載の方法により産生される、原核生物DNAを欠くrAAVビリオンの集団。

【請求項25】

プロテオメラーゼ標的配列を含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)。

【請求項26】

プロテオメラーゼ標的配列が、少なくとも10塩基対長の二本鎖回文配列を含む、請求項25記載のrAAV。

40

【請求項27】

導入遺伝子をさらに含む、請求項25記載のrAAV。