

【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7年7月1日(2025.7.1)

【公開番号】特開2025-29049(P2025-29049A)

【公開日】令和7年3月5日(2025.3.5)

【年通号数】公開公報(特許)2025-040

【出願番号】特願2024-209192(P2024-209192)

【国際特許分類】

C 12 N 15/864 (2006.01)
 C 12 N 15/63 (2006.01)
 C 12 N 1/15 (2006.01)
 C 12 N 1/19 (2006.01)
 C 12 N 1/21 (2006.01)
 C 12 N 5/10 (2006.01)
 C 12 N 7/01 (2006.01)
 C 12 N 15/861 (2006.01)
 C 12 N 15/35 (2006.01)

10

【F I】

C 12 N 15/864 1 0 0 Z
 C 12 N 15/63 Z
 C 12 N 1/15
 C 12 N 1/19
 C 12 N 1/21
 C 12 N 5/10
 C 12 N 7/01
 C 12 N 15/861 Z
 C 12 N 15/35 Z N A
 C 12 N 15/35

20

30

【手続補正書】

【提出日】令和7年6月19日(2025.6.19)

【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】

4つのRepタンパク質、Rep78、Rep68、Rep52、及びRep40をコードするAAV rep遺伝子を有する、修飾アデノ随伴ウイルス(AAV)rep遺伝子と、前記4つのRepタンパク質によって共有される前記rep遺伝子のコード配列に挿入された人工イントロンと、を含む、非自然発生の核酸分子であって、前記人工イントロンが、前記人工イントロンの5'スプライス部位の下流及び分岐部位の上流に挿入された停止カセットを含み、前記停止カセットが、5'から3'の順序で、

40

(a)配列番号7のヌクレオチド配列を有するattP部位と、

(b)スプライスアクセプタと、

(c)ターミネータと、

(d)配列番号8又は配列番号9のヌクレオチド配列を有するattB部位と、を含む、非自然発生の核酸分子。

50

【請求項 2】

前記スプライスアクセプタが、配列番号17のヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 3】

前記ターミネータが、ポリアデニル化シグナルを含む、請求項1又は2に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 4】

前記ターミネータが、配列番号19のヌクレオチド配列を更に含む、請求項3に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 5】

前記停止カセットが、選択可能なマーカーをコードする遺伝子を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子。

10

【請求項 6】

前記人工イントロンが、5'から3'の順序で、配列番号14のヌクレオチド配列、前記停止カセット、及び配列番号15のヌクレオチド配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 7】

前記AAV rep遺伝子が、AAV1～AAV8のうちの1つのrep遺伝子、又はそのハイブリッドを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子。

20

【請求項 8】

前記AAV rep遺伝子が、GenBankアクセッション番号NC_001401.2のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号190～2202を有するヒトAAV2のrep遺伝子を含む、請求項7に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 9】

前記人工イントロンが、GenBankアクセッション番号NC_001401.2のAAV rep遺伝子のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号996～1905のいずれか2つのヌクレオチドの間に挿入されている、請求項8に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 10】

前記人工イントロンが、GenBankアクセッション番号NC_001401.2のAAV rep遺伝子のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号1052、1061、1712、1906、1022、1112、1475、1514、1700、1742、1784、又は1340のすぐ下流に挿入されている、請求項9に記載の非自然発生の核酸分子。

30

【請求項 11】

修飾AAV rep遺伝子を含む、非自然発生の核酸分子であって、前記修飾AAV rep遺伝子が、5'から3'の順序で、

(A)

- (a) 配列番号55のヌクレオチド配列を有するAAV rep遺伝子の5'部分と、
- (b) 人工イントロンであって、5'から3'の順序で、
 - (i) 配列番号14のヌクレオチド配列を有する5'イントロン断片、
 - (ii) 停止カセットであって、5'から3'の順序で、
 - (1) 配列番号7のヌクレオチド配列を有するattP部位、
 - (2) 配列番号17のヌクレオチド配列を有するスプライスアクセプタ、
 - (3) 配列番号18のヌクレオチド配列を有するネオマイシンホストランスフェラーゼ発現カセット、
 - (4) 配列番号19のヌクレオチド配列を有するターミネータ、及び
 - (5) 配列番号8又は配列番号9のヌクレオチド配列を有するattB部位、を含む、停止カセット、並びに
 - (iii) 配列番号15のヌクレオチド配列を有する3'イントロン断片、を含む、人工イントロンと、

40

50

(c) 配列番号 5'6 のヌクレオチド配列を有する AAV r e p 遺伝子の 3' 部分と、
を含むか、または、

(B)

(a) 配列番号 7'3 のヌクレオチド配列を有する AAV r e p 遺伝子の 5' 部分と、
(b) 人工イントロンであって、5' から 3' の順序で、

(i) 配列番号 1'4 のヌクレオチド配列を有する 5' イントロン断片、

(ii) 停止カセットであって、5' から 3' の順序で、

(1) 配列番号 7 のヌクレオチド配列を有する attP 部位、

(2) 配列番号 1'7 のヌクレオチド配列を有するスプライスアクセプタ、

(3) 配列番号 1'8 のヌクレオチド配列を有するネオマイシンホスホトランスクエ
ラーゼ発現カセット、

(4) 配列番号 1'9 のヌクレオチド配列を有するターミネータ、及び

(5) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する attB 部位、を含
む、停止カセット、並びに

(iii) 配列番号 6'6 のヌクレオチド配列を有する 3' イントロン断片、を含む、
人工イントロンと、

(c) 配列番号 5'6 のヌクレオチド配列を有する AAV r e p 遺伝子の 3' 部分と、
を含む、非自然発生の核酸分子。

【請求項 12】

前記停止カセットが、配列番号 1'6 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1'1 に記載の非
自然発生の核酸分子。

【請求項 13】

3 つのキャプシドタンパク質 VP1、VP2、及び VP3 をコードする AAV cap
遺伝子を更に含む、請求項 1 ~ 1'2 のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 14】

前記 AAV cap 遺伝子が、AAV1 ~ AAV9 及び AAVDJ のうちのいずれか 1
つの cap 遺伝子、又はそのハイブリッドを含む、請求項 1'3 に記載の非自然発生の核酸
分子。

【請求項 15】

前記 AAV cap 遺伝子が、GenBank アクセッション番号 AY530579.
1 のヌクレオチド配列を有するヒト AAV9 の cap 遺伝子を含む、請求項 1'4 に記載の
非自然発生の核酸分子。

【請求項 16】

前記 AAV cap 遺伝子が、ポリアデニル化シグナルを更に含む、請求項 1'3 ~ 1'5
のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 17】

前記 AAV cap 遺伝子の下流の一対の AAV 逆位末端反復配列 (ITR) が隣接す
る導入遺伝子を更に含む、請求項 1'3 ~ 1'6 のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 18】

前記修飾 AAV r e p 遺伝子の上流に第 1 のインシュレータ、及び前記 ITR が隣接す
る前記導入遺伝子の下流に第 2 のインシュレータを更に含み、前記第 1 のインシュレ
ータ及び前記第 2 のインシュレータが、独立して、

(a) 配列番号 2'4 のヌクレオチド配列を有するヒト抗リプレッサ要素 4'0、

(b) 配列番号 2'5 のヌクレオチド配列を有するマウス抗リプレッサ要素 4'0、

(c) GenBank アクセッション番号 AY190749.1 のヌクレオチド配列を
有する抗リプレッサ要素 0'4、

(d) GenBank アクセッション番号 AY190750.1 のヌクレオチド配列を
有する抗リプレッサ要素 0'6、

(e) GenBank アクセッション番号 AY190751.1 のヌクレオチド配列を

10

20

30

40

50

有する抗リプレッサ要素 0 7、

(f) G e n B a n k アクセッション番号 A Y 1 9 0 7 5 2 . 1 のヌクレオチド配列を有する抗リプレッサ要素 1 2、

(g) G e n B a n k アクセッション番号 A Y 1 9 0 7 5 3 . 1 のヌクレオチド配列を有する抗リプレッサ要素 1 3、

(h) G e n B a n k アクセッション番号 A Y 1 9 0 7 5 4 . 1 のヌクレオチド配列を有する抗リプレッサ要素 3 5、

(i) G e n B a n k アクセッション番号 A Y 1 9 0 7 5 5 . 1 のヌクレオチド配列を有する抗リプレッサ要素 3 6、

(j) G e n B a n k アクセッション番号 A Y 1 9 0 7 5 7 . 1 のヌクレオチド配列を有する抗リプレッサ要素 5 2、

(k) G e n B a n k アクセッション番号 A Y 1 9 0 7 5 8 . 1 のヌクレオチド配列を有する抗リプレッサ要素 5 3、及び

(l) 2つ又は3つ以上のコピーにおいて A Y 0 4 0 8 3 5 . 1 のヌクレオチド配列を有するグロビン遺伝子座からのニワトリ H S 4 インシュレータからなる群から選択される、請求項 1 7 に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 19】

前記非自然発生の核酸分子が、前記修飾 A A V r e p 遺伝子の上流に前記第 1 のインシュレータを含み、前記導入遺伝子の上流及び下流にそれぞれ、第 1 のスペーサ配列及び第 2 のスペーサ配列を更に含み、前記第 1 のスペーサ配列及び前記第 2 のスペーサ配列が独立して、

a) 配列番号 6 7 のヌクレオチド配列、及び

b) 配列番号 6 8 のヌクレオチド配列からなる群から選択される、請求項 1 8 に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 20】

前記 I T R が、配列番号 2 0 のヌクレオチド配列を有し、前記導入遺伝子が、コード配列に作動可能に連結されたプロモータを含み、前記コード配列が、ポリアデニル化シグナルに作動可能に連結されており、前記プロモータが、配列番号 2 1 のヌクレオチド配列を有し、前記ポリアデニル化シグナルが、ヌクレオチド配列の配列番号 2 3 を有する、請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子。

【請求項 21】

非自然発生の核酸分子であって、5'から3'の順序で、

(A) 配列番号 2 4 のヌクレオチド配列を含む、第 1 のインシュレータと、

(B) 修飾 A A V r e p 遺伝子であって、5'から3'の順序で、

(i) 配列番号 5 5 のヌクレオチド配列を含む、A A V r e p 遺伝子の 5'部分、

(i i) 人工イントロンであって、5'から3'の順序で、

(a) 配列番号 1 4 のヌクレオチド配列を含む、5'イントロン断片、

(b) 停止カセットであって、5'から3'の順序で、

(1) 配列番号 7 のヌクレオチド配列を有する a t t P 部位、

(2) 配列番号 1 7 のヌクレオチド配列を含む、スプライスアクセプタ、

(3) 配列番号 1 8 のヌクレオチド配列を含む、選択可能なマーカーをコードする、

(4) 配列番号 1 9 のヌクレオチド配列を含む、ターミネータ、及び

(5) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する a t t B 部位、を含む、停止カセット、並びに

(c) 配列番号 1 5 のヌクレオチド配列を含む、3'イントロン断片、を含む、人工イントロン、並びに

(i i i) 配列番号 5 6 のヌクレオチド配列を含む A A V r e p 遺伝子の 3'部分、を含む、修飾 A A V r e p 遺伝子と、

(C) 配列番号 5 7 のヌクレオチド配列を含む、A A V c a p 遺伝子と、

(D) 一対の A A V I T R が隣接する導入遺伝子であって、前記 A A V I T R が、

10

20

30

40

50

配列番号 2 0 のヌクレオチド配列を有し、前記導入遺伝子が、コード配列に作動可能に連結されたプロモータを含み、前記コード配列が、ポリアデニル化シグナルに作動可能に連結されており、前記プロモータが、配列番号 2 1 のヌクレオチド配列を有し、前記ポリアデニル化シグナルが、ヌクレオチド配列の配列番号 2 3 を有する、導入遺伝子と、
 (E) 配列番号 2 5 のヌクレオチド配列を含む、第 2 のインシュレータと、を含む、非自然発生の核酸分子。

【請求項 2 2】

非自然発生の核酸分子であって、5'から3'の順序で、
 (A) 配列番号 2 4 のヌクレオチド配列を含む、第 1 のインシュレータと、
 (B) 修飾 A A V r e p 遺伝子であって、5'から3'の順序で、
 (i) 配列番号 7 3 のヌクレオチド配列を含む、A A V r e p 遺伝子の 5'部分、
 (i i) 人工イントロンであって、5'から3'の順序で、
 (a) 配列番号 1 4 のヌクレオチド配列を含む、5'イントロン断片、
 (b) 停止カセットであって、5'から3'の順序で、
 (1) 配列番号 7 のヌクレオチド配列を有する a t t P 部位、
 (2) 配列番号 1 7 のヌクレオチド配列を含む、スプライスアクセプタ、
 (3) 配列番号 1 8 のヌクレオチド配列を含む、選択可能なマーカーをコードする遺伝子、
 (4) 配列番号 1 9 のヌクレオチド配列を含む、ターミネータ、及び
 (5) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する a t t B 部位、を含む、停止カセット、並びに
 (c) 配列番号 6 6 のヌクレオチド配列を含む、3'イントロン断片、を含む、人工イントロン、並びに
 (i i i) 配列番号 5 6 のヌクレオチド配列を含む、A A V r e p 遺伝子の 3'部分、を含む、修飾 A A V r e p 遺伝子と、
 (C) A A V c a p 遺伝子と、
 (D) 導入遺伝子であって、
 (1) 一対の A A V I T R であって、前記 A A V I T R が、配列番号 2 0 のヌクレオチド配列を有し、前記導入遺伝子が、コード配列に作動可能に連結されたプロモータを含み、前記コード配列が、ポリアデニル化シグナルに作動可能に連結されており、前記プロモータが、配列番号 2 1 のヌクレオチド配列を有し、前記ポリアデニル化シグナルが、ヌクレオチド配列の配列番号 2 3 を有する、一対の A A V I T R 、及び
 (2) 一対のスペーサ配列であって、前記スペーサ配列が、配列番号 6 7 及び配列番号 6 8 のヌクレオチド配列を有する、一対のスペーサ配列、が隣接する、導入遺伝子と、を含む、非自然発生の核酸分子。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子を含むベクター。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 0 又は 2 2 のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子を含むベクターであって、前記ベクターが、配列番号 7 0 または配列番号 1 2 のヌクレオチド配列を含むプラスミドである、ベクター。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の非自然発生の核酸分子を含む、細胞。

10

20

30

40

50