

【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 3 年 4 月 30 日 (2021.4.30)

【公表番号】特表 2020-511991 (P2020-511991A)

【公表日】令和 2 年 4 月 23 日 (2020.4.23)

【年通号数】公開・登録公報 2020-016

【出願番号】特願 2019-553350 (P2019-553350)

【国際特許分類】

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/49 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 7/01 Z N A

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/113 Z

C 1 2 N 15/49

C 1 2 N 15/09 Z

C 1 2 N 15/867 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 3 月 17 日 (2021.3.17)

【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】

レンチウイルスベクターであって、

(a) HIV - 1 株 NL 4 - 3 の 5' 長末端反復 (LTR) と、

(b) プサイ ( ) パッケージングシグナルと、

(c) HIV - 1 株 NL 4 - 3 のセントラルポリプリン配列 c P P T / F L A P エレメントと、

(d) RNA 核外輸送因子と、

(e) HIV - 1 env スプライスアクセプター配列と、

(f) ヒト BCL 1 1 A mRNA にハイブリダイズするアンチセンス配列を含む sh m i R をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された赤血球特異的プロモーターと、

(g) HIV - 1 株 NL 4 - 3 の 3' LTR と、を含む、レンチウイルスベクター。

【請求項 2】

前記 5' LTR が、改変された 5' LTR である、請求項 1 に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 3】

前記改変された 5' LTR が CMV プロモーターを含む、請求項 2 に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 4】

前記 HIV - 1 株 NL 4 - 3 の 3' LTR が自己不活性化 (SIN) LTR である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 5】

前記 RNA 核外輸送因子が、HIV - 1 株 HXB 3 由来の RRE RNA 核外輸送因子である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 6】

前記赤血球特異的プロモーターが、ヒト グロビンプロモーターを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 7】

ヒト グロビン LCR をさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 8】

前記ヒト グロビン LCR が、HS 3 および HS 2 DNAse I 過敏性部位を含む、請求項 7 に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 9】

前記 LCR が、HS 4 DNAse I 過敏性部位を欠く、請求項 7 または請求項 8 に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 10】

a . 前記 HS 4 DNAse I 過敏性部位が、約 638 ヌクレオチドである；および / または

b . 前記 HS 4 DNAse I 過敏性部位が、約 847 ヌクレオチドである、請求項 8 または請求項 9 に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 11】

a . 1 つ以上の変異 ATG 開始コドンを含む gag タンパク質をコードする約 459 ヌクレオチドのポリヌクレオチド；および / または

b . HIV - 1 env スプライスアクセプター配列と前記 shmiR との間に配置された合成ポリ (A) 配列

をさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 12】

a . 前記 cPPT / FLAP エlement は約 381 ヌクレオチドである；

b . 前記 HIV - 1 env スプライスアクセプター配列は約 176 ヌクレオチドである；および / または

c . 前記 shmiR は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に記載の配列を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 13】

前記ベクターが、前記レンチウイルスゲノム RNA の転写と比較して逆配向である、前記赤血球特異的プロモーターと、前記 shmiR をコードする前記ポリヌクレオチドとを含む発現カセットを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 14】

前記ベクターが、配列番号 4 に記載のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクターを含む細胞であって、前記細胞が、造血幹細胞または前駆細胞である、細胞。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクターを含む細胞であって、前記細胞が、CD34<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>、および / または CD34<sup>+</sup>CD38<sup>Lo</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> である、細胞。

【請求項 17】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の複数の細胞を含む細胞集団を含む、組成物。

【請求項 1 8】

対象におけるヘモグロビン異常症を治療する際に使用するための、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記ヘモグロビン異常症が、サラセミア、サラセミアまたは鎌状赤血球症である、請求項 1 8 に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 7】

特定の実施形態において、造血幹細胞集団は、静脈内に投与される。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

H I V - 1 株 N L 4 - 3 の 5 ' 長末端反復 ( L T R ) と、ヒト B C L 1 1 A m R N A にハイブリダイズするアンチセンス配列を含む s h m i R をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された赤血球特異的プロモーターと、H I V - 1 株 N L 4 - 3 の 3 ' L T R と、を含む、レンチウイルスベクター。

(項目 2)

5 ' から 3 ' に向かって、プサイ ( ) パッケージングシグナルと、H I V - 1 株 N L 4 - 3 のセントラルポリプリン配列 ( c P P T ) / F L A P エlementと、RNA 核外輸送因子と、H I V - 1 e n v スプライスアクセプター配列と、をさらに含む、項目 1 に記載のレンチウイルスベクター。

(項目 3)

改変された 5 ' L T R と、H I V - 1 の 3 ' S I N L T R と、をさらに含む、項目 1 または項目 2 に記載のレンチウイルスベクター。

(項目 4)

改変された 5 ' L T R であって、前記改変された 5 ' L T R のプロモーターが C M V プロモーターで置換されている、改変された 5 ' L T R と、H I V - 1 の 3 ' S I N L T R と、をさらに含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目 5)

レンチウイルスベクターであって、  
 ( a ) H I V - 1 の 5 ' L T R と、  
 ( b ) プサイ ( ) パッケージングシグナルと、  
 ( c ) レンチウイルス c P P T / F L A P エlementと、  
 ( d ) R N A 核外輸送因子と、  
 ( e ) H I V - 1 e n v スプライスアクセプター配列と、  
 ( f ) ヒト B C L 1 1 A m R N A にハイブリダイズするアンチセンス配列をコードする s h m i R に作動可能に連結された赤血球特異的プロモーターと、  
 ( g ) H I V - 1 の 3 ' L T R と、を含む、レンチウイルスベクター。

(項目 6)

改変された 5 ' L T R であって、前記改変された 5 ' L T R のプロモーターが C M V プロモーターで置換されている、改変された 5 ' L T R と、H I V - 1 の 3 ' S I N L T R と、をさらに含む、項目 5 に記載のレンチウイルスベクター。

(項目 7)

H I V - 1 株 H X B 3 由来の R R E R N A 核外輸送因子をさらに含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目 8)

前記赤血球特異的プロモーターが、 グロビンプロモーターを含む、項目１～７のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目９)

前記赤血球特異的プロモーターが、ヒト グロビンプロモーターを含む、項目１～８のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１０)

グロビンＬＣＲをさらに含む、項目１～９のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１１)

ヒト グロビンＬＣＲをさらに含む、項目１～１０のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１２)

自己不活性化（ＳＩＮ）レンチウイルスベクターであって、

(a) 改変されたＨＩＶ－１株ＮＬ４－３の５’ＬＴＲであって、前記改変された５’ＬＴＲのプロモーターがＣＭＶプロモーターで置換されている、改変されたＨＩＶ－１株ＮＬ４－３の５’ＬＴＲと、

(b) プサイ（ ）パッケージングシグナルと、

(c) ＨＩＶ－１株ＮＬ４－３のｃＰＰＴ／ＦＬＡＰエレメントと、

(d) ＨＩＶ－１株ＨＸＢ３のＲＲＥ RNA核外輸送因子と、

(e) ＨＩＶ－１株ＮＬ４－３ envスプライスアクセプター配列と、

(f) ヒトＢＣＬ１１Ａ mRNAにハイブリダイズするアンチセンス配列をコードするshmiRに作動可能に連結された グロビンプロモーターと、

(g) グロビンＬＣＲと、

(g) ＨＩＶ－１株ＮＬ４－３の３’ＳＩＮ LTRと、を含む、自己不活性化（ＳＩＮ）レンチウイルスベクター。

(項目１３)

ＨＳ３およびＨＳ２ DNAse I過敏性部位を含むヒト グロビンＬＣＲをさらに含む、項目１～１２のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１４)

ＨＳ３およびＨＳ２ DNAse I過敏性部位を含むヒト グロビンＬＣＲをさらに含むが、ＨＳ４ DNAse I過敏性部位を欠く、項目１～１３のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１５)

gagタンパク質をコードする約４５９ヌクレオチドのポリヌクレオチドをさらに含む、項目１～１４のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１６)

１つ以上の変異ＡＴＧ配列を含む前記gagタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、項目１～１５のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１７)

約１７６ヌクレオチドのＨＩＶ－１ envスプライスアクセプター配列をさらに含む、項目１～１６のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１８)

約３８１ヌクレオチドのｃＰＰＴ／ＦＬＡＰエレメントをさらに含む、項目１～１７のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目１９)

約６３８ヌクレオチドのＨＳ２ DNAse I過敏性部位をさらに含む、項目１～１８のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

(項目２０)

約８４７ヌクレオチドのＨＳ３ DNAse I過敏性部位をさらに含む、項目１～１９のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 2 1 )

H I V - 1 e n v スプライスアクセプター配列と前記 s h m i R との間に配置された合成ポリ ( A ) 配列をさらに含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 2 2 )

前記 s h m i R が、配列番号 1 に記載の配列をコードする、項目 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 2 3 )

前記 s h m i R が、配列番号 2 に記載のガイド鎖配列を含む、項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 2 4 )

前記 s h m i R が、配列番号 3 に記載の標的配列にハイブリダイズするガイド鎖配列を含む、項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 2 5 )

前記赤血球特異的プロモーターと、前記 s h m i R をコードする前記ポリヌクレオチドを含む発現カセットが、前記レンチウイルスゲノム R N A の転写と比較して逆配向である、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 2 6 )

配列番号 4 に記載のポリヌクレオチド配列を含む、レンチウイルス導入ベクター。

( 項目 2 7 )

項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクターを含む、細胞。

( 項目 2 8 )

H I V - 1 の g a g および p o l をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドと、 V S V - G と、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクターと、を含む、細胞。

( 項目 2 9 )

項目 2 8 に記載の細胞から産生された、レンチウイルスベクター粒子。

( 項目 3 0 )

項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクターで形質導入された、細胞。

( 項目 3 1 )

前記細胞が、ポロキサマー 2 8 8、ポロキサマー 3 3 5、ポロキサマー 3 3 8、およびポロキサマー 4 0 7 からなる群から選択される有効量のポロキサマー、ならびに P G E<sub>2</sub> 受容体アゴニストの存在下で形質導入される、項目 3 0 に記載の細胞。

( 項目 3 2 )

項目 2 9 に記載のレンチウイルスベクター粒子で形質導入された、細胞。

( 項目 3 3 )

前記細胞が、ポロキサマー 2 8 8、ポロキサマー 3 3 5、ポロキサマー 3 3 8、およびポロキサマー 4 0 7 からなる群から選択される有効量のポロキサマー、ならびに P G E<sub>2</sub> 受容体アゴニストの存在下で形質導入される、項目 3 2 に記載の細胞。

( 項目 3 4 )

前記細胞が、造血幹細胞または造血前駆細胞である、項目 3 0 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 3 5 )

前記細胞が、造血幹細胞または前駆細胞である、項目 3 0 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 3 6 )

前記細胞が、C D 3 4 + である、項目 3 0 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 3 7 )

前記細胞が、C D 1 3 3 + である、項目 3 0 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 38)

前記細胞が、 $CD34^+CD38^L^0CD90^+CD45RA^-$ である、項目30～37のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 39)

前記細胞が、ヘモグロビン異常症に関連する1つ以上の変異 グロビン対立遺伝子を含む、項目30～38のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 40)

前記細胞が、 $E/0$ 、 $C/0$ 、 $0/0$ 、 $E/E$ 、 $C/+$ 、 $E/+$ 、 $0/+$ 、 $+/+$ 、 $C/C$ 、 $E/S$ 、 $0/S$ 、 $C/S$ 、 $+ / S$  および  $S / S$  からなる群から選択される1つ以上の変異 グロビン対立遺伝子を含む、項目30～39のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 41)

前記細胞が、 $E/0$ 、 $C/0$ 、 $0/0$ 、 $C/C$ 、 $E/E$ 、 $E/+$ 、 $C/E$ 、 $C/+$ 、 $0/+$ 、および  $+ / +$  からなる群から選択される1つ以上の変異 グロビン対立遺伝子を含む、項目30～39のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 42)

前記細胞が、 $E/S$ 、 $0/S$ 、 $C/S$ 、 $+ / S$  および  $S / S$  からなる群から選択される1つ以上の変異 グロビン対立遺伝子を含む、項目30～39のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 43)

項目30～42のいずれか一項に記載の複数の細胞を含む、細胞集団。

(項目 44)

項目30～42のいずれか一項に記載の複数の細胞を含む細胞集団を含む、組成物。

(項目 45)

薬学的に許容される担体と、項目30～42のいずれか一項に記載の複数の細胞を含む細胞集団と、を含む、薬学的組成物。

(項目 46)

造血細胞集団を形質導入する方法であって、項目1～26のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター、ポロキサマー、および  $PG E_2$  受容体アゴニストの存在下で、培地中で細胞を培養することを含む、方法。

(項目 47)

前記ポロキサマーが、ポロキサマー288、ポロキサマー335、ポロキサマー338、およびポロキサマー407からなる群から選択される、項目46に記載の方法。

(項目 48)

前記  $PG E_2$  受容体アゴニストが、15d-PGJ<sub>2</sub>、12-PGJ<sub>2</sub>、2-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸(HHT)、トロンボキササンA<sub>2</sub>、トロンボキササンB<sub>2</sub>、イロprost、トレprostチニル、トラボprost、カルボprostトロメタミン、タフルprost、ラタノprost、ピマトprost、ウノprostノイソprostビル、クロprostテノール、エストロファン、スーパーファン、ミソprostオール、ブタprost、リノール酸、13(s)-HODE、LY171883、ミード酸、エイコサトリエン酸、エボキシエイコサトリエン酸、ONO-259、Cay1039、 $PG E_2$  受容体アゴニスト、16,16-ジメチル  $PG E_2$ 、19(R)-ヒドロキシ  $PG E_2$ 、16,16-ジメチル  $PG E_2$  p-(p-アセトアミドベンズアミド)フェニルエステル、11-デオキシ-16,16-ジメチル  $PG E_2$ 、9-デオキシ-9-メチレン-16,16-ジメチル  $PG E_2$ 、9-デオキシ-9-メチレン  $PG E_2$ 、スルprost、 $PG E_2$  セリノールアミド、 $PG E_2$  メチルエステル、16-フェニルテトラノール  $PG E_2$ 、15(S)-15-メチル  $PG E_2$ 、および15(R)-15-メチル  $PG E_2$  からなる群から選択される、項目46または項目47に記載の方法。

(項目 49)

前記  $\text{PGE}_2$  受容体アゴニストが、 $\text{PGE}_2$  または  $16, 16$ -ジメチル  $\text{PGE}_2$  である、項目 46 ~ 48 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 50)

前記レンチウイルスベクターが、約 10 ~ 約 30 の MOI または約 10 ~ 約 25 の MOI で存在する、項目 46 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 51)

前記レンチウイルスベクターが、約 10 ~ 約 20 の MOI で存在する、項目 46 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 52)

前記レンチウイルスベクターが、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、または約 30 の MOI で存在する、項目 46 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 53)

項目 43 に記載の細胞集団、項目 44 に記載の組成物、または項目 45 に記載の薬学的組成物の有効量を、対象に投与することを含む、前記対象におけるヘモグロビン異常症を治療する方法。

(項目 54)

対象におけるヘモグロビン異常症の少なくとも 1 つの症状を寛解させる方法であって、項目 43 に記載の細胞集団、項目 44 に記載の組成物、または項目 45 に記載の薬学的組成物の有効量を、前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 55)

前記対象の前記 グロビン対立遺伝子が、 $\frac{E}{0}$ 、 $\frac{C}{0}$ 、 $\frac{0}{0}$ 、 $\frac{E}{0}$ 、 $\frac{C}{+}$ 、 $\frac{E}{+}$ 、 $\frac{0}{+}$ 、 $\frac{+}{+}$ 、 $\frac{C}{C}$ 、 $\frac{E}{S}$ 、 $\frac{0}{S}$ 、 $\frac{C}{S}$ 、 $\frac{+}{S}$  または  $\frac{S}{S}$  である、項目 54 に記載の方法。

(項目 56)

対象におけるサラセミアを治療する方法であって、項目 43 に記載の細胞集団、項目 44 に記載の組成物、または項目 45 に記載の薬学的組成物の有効量を、前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 57)

前記サラセミアが、サラセミアである、項目 56 に記載の方法。

(項目 58)

前記サラセミアが、サラセミアである、項目 56 に記載の方法。

(項目 59)

前記対象の前記 グロビン対立遺伝子が、 $\frac{E}{0}$ 、 $\frac{C}{0}$ 、 $\frac{0}{0}$ 、 $\frac{C}{C}$ 、 $\frac{E}{E}$ 、 $\frac{E}{+}$ 、 $\frac{C}{E}$ 、 $\frac{C}{+}$ 、 $\frac{0}{+}$ 、または  $\frac{+}{+}$  である、項目 56 に記載の方法。

(項目 60)

対象における鎌状赤血球症を治療する方法であって、項目 43 に記載の細胞集団、項目 44 に記載の組成物、または項目 45 に記載の薬学的組成物の有効量を、前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 61)

前記対象の前記 グロビン対立遺伝子は、 $\frac{E}{S}$ 、 $\frac{0}{S}$ 、 $\frac{C}{S}$ 、 $\frac{+}{S}$  または  $\frac{S}{S}$  である、項目 60 に記載の方法。

(項目 62)

対象におけるサラセミアを治療する方法であって、有効量の項目 43 に記載の細胞集団、項目 44 に記載の組成物、または項目 45 に記載の薬学的組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 63)

前記対象の前記 グロビン対立遺伝子が、 $\frac{E}{0}$ 、 $\frac{C}{0}$ 、 $\frac{0}{0}$ 、 $\frac{C}{C}$

/ C、 E / E、 E / +、 C / E、 C / +、 0 / +、または + / + である、項目 6 2 に記載の方法。

( 項目 6 4 )

前記造血幹細胞集団が、静脈内経路、髄内経路、または骨内経路で投与される、項目 5 3 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 5 )

前記造血幹細胞集団が、静脈内に投与される、項目 5 3 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の方法。