

【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4年12月20日(2022.12.20)

【国際公開番号】WO2020/123753

【公表番号】特表2022-514501(P2022-514501A)

【公表日】令和4年2月14日(2022.2.14)

【年通号数】公開公報(特許)2022-026

【出願番号】特願2021-533523(P2021-533523)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/86(2006.01)

C 1 2 N 15/88(2006.01)

C 1 2 N 15/11(2006.01)

C 1 2 N 7/01(2006.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 K 9/51(2006.01)

A 6 1 K 35/12(2015.01)

A 6 1 K 35/76(2015.01)

A 6 1 K 38/00(2006.01)

C 1 2 N 15/33(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/86 Z

C 1 2 N 15/88 Z Z N A

C 1 2 N 15/11 Z

C 1 2 N 7/01

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 9/51

A 6 1 K 35/12

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 38/00

C 1 2 N 15/33

【手続補正書】

【提出日】令和4年12月12日(2022.12.12)

【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】

以下：

(I) 以下：

(a) プロモータエレメントと、

(b) 外性エフェクターをコード化する核酸配列であって、前記核酸配列が、前記プロモータエレメントに作動可能に連結されており、前記外性エフェクターが、細胞内ポリペプチド又は細胞内核酸である、核酸配列と；

(c) 野生型アネロウイルス(Aneillovirus)の5'UTR保存ドメインに

10

20

30

40

50

対して、少なくとも75%の配列同一性を有する配列とを含む遺伝子エレメント又はその相補体；

( I I ) アネロウイルス ( A n e l l o v i r u s ) O R F 1 核酸によりコード化されるポリペプチド、例えばORF 1分子を含むタンパク質性外層を含む合成粒子において；

前記遺伝子エレメント又は前記その相補体が、前記タンパク質性外層内に閉じ込められており；且つ

前記合成粒子が、前記遺伝子エレメント又は前記その相補体をヒト細胞内に送達することができる、合成粒子。

【請求項2】

アネロウイルス ( A n e l l o v i r u s ) O R F 1 核酸によりコード化される前記ポリペプチドが、ORF 1分子を含み、任意選択で；

( i ) 前記ORF 1分子が、配列番号217のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む；

( i i ) 前記ORF 1分子が、タンパク質分解プロセッシングされたものである；

( i i i ) 前記ORF 1分子が、配列番号54のヌクレオチド612~2612によりコード化される；

( i v ) 前記ORF 1分子が、表16に列挙されるargリッチ領域、ゼリーロールドメイン、超可変ドメイン、N22ドメイン、及び/又はC末端ドメインのアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列のうち1つ若しくは複数を含むアミノ酸配列を含む；且つ/或いは

( v ) 前記ORF 1分子が、配列番号58のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項1に記載の合成粒子。

【請求項3】

前記遺伝子エレメント又は前記その相補体が；

( i ) 配列番号54のヌクレオチド2868~2929の核酸配列、又はそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する核酸配列；並びに/或いは

( i i ) 配列番号54のヌクレオチド323~393の核酸配列、若しくはそれに対して少なくとも90%同一の核酸配列を含む5'UTRドメインを含む、請求項1又は2に記載の合成粒子。

【請求項4】

( i ) 前記合成粒子が、表16に列挙されるORF 2、ORF 2/2、ORF 2/3、ORF 1/1、若しくはORF 1/2のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをさらに含む；且つ/或いは

( i i ) 前記遺伝子エレメント又は前記その相補体が、表16に列挙されるORF 1、ORF 2、ORF 2/2、ORF 2/3、ORF 1/1、若しくはORF 1/2のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコード化する、請求項1~3のいずれか1項に記載の合成粒子。

【請求項5】

( i ) 前記合成粒子が、表16に列挙されるORF 2、ORF 2/2、ORF 2/3、T A I P、ORF 1/1、若しくはORF 1/2のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含まない；且つ/或いは

( i i ) 前記遺伝子エレメント又は前記その相補体が、表16に列挙されるORF 1、ORF 2、ORF 2/2、ORF 2/3、ORF 1/1、若しくはORF 1/2のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコード化しない、請求項1~3のいずれか1項に記載の合成粒子。

【請求項6】

( i ) 前記ORF 1分子が、アミノ酸配列  $Y N P X ^ 2 - D X G X ^ 2 N$  (配列番号829) ( $X ^ n$ は、各々独立して、任意のn個のアミノ酸の連続した配列である)を含む；

10

20

30

40

50

( i i ) 前記 O R F 1 分子が、アミノ酸配列  $Y N P X^2-D X G X^2-N$  (配列番号 8 2 9) とフランキングする第 1 鎖及び第 2 鎖をさらに含み、例えば、前記第 1 鎖は、前記アミノ酸配列  $Y N P X^2-D X G X^2-N$  (配列番号 8 2 9) のチロシン ( Y ) 残基を含み、且つ / 又は前記第 2 鎖は、前記アミノ酸配列  $Y N P X^2-D X G X^2-N$  (配列番号 8 2 9) の第 2 アスパラギン ( N ) 残基 ( N から C ) を含む；

( i i i ) 前記 O R F 1 分子が、N 末端から C 末端方向の順で、第 1 鎖、第 2 鎖、第 1 ヘリックス、第 3 鎖、第 4 鎖、第 5 鎖、第 2 ヘリックス、第 6 鎖、第 7 鎖、第 8 鎖、及び第 9 鎖を含む；且つ / 或いは

( i v ) 前記外性エフェクターが、m i R N A を含み、宿主遺伝子の発現を低減する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の合成粒子。

10

#### 【請求項 7】

前記遺伝子エレメント又は前記その相補体が；

( i ) 宿主細胞内でのローリングサークル複製により増幅されて、例えば、少なくとも 8 コピーを産生することができる；

( i i ) 一本鎖である；

( i i i ) 環状である；

( i v ) D N A である；

( v ) マイナス鎖 D N A である；

( v i ) 前記ヒト細胞に進入する前記粒子の 1 0 %、8 %、6 %、4 %、3 %、2 %、1 %、0 . 5 %、0 . 2 %、0 . 1 % 未満の頻度で組み込まれる；

20

( v i i ) 表 3 8 に示すコンセンサス 5 ' U T R 核酸配列の配列を含む；

( v i i i ) 表 3 9 に示すコンセンサス G C リッチ領域の配列を含む；

( i x ) 少なくとも 1 0 0 ヌクレオチド長の配列を含み、これは、少なくとも 7 0 % (例えば、約 7 0 ~ 1 0 0 %、7 5 ~ 9 5 %、8 0 ~ 9 5 %、8 5 ~ 9 5 %、若しくは 8 5 ~ 9 0 % ) の位置の G 又は C から構成される；

( x ) 配列番号 1 2 0 の核酸配列を含む；且つ / 或いは

( x i ) 約 1 . 5 ~ 2 . 0、2 . 0 ~ 2 . 5、2 . 5 ~ 3 . 0、3 . 0 ~ 3 . 5、3 . 1 ~ 3 . 6、3 . 2 ~ 3 . 7、3 . 3 ~ 3 . 8、3 . 4 ~ 3 . 9、3 . 5 ~ 4 . 0、4 . 0 ~ 4 . 5、又は 4 . 5 ~ 5 . 0 k b の長さを有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の合成粒子。

30

#### 【請求項 8】

前記プロモータエレメントが、野生型アネロウイルス ( A n e l l o v i r u s ) に対して外性であるか、又は前記プロモータエレメントが、野生型アネロウイルス ( A n e l l o v i r u s ) に対して内在性である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の合成粒子。

#### 【請求項 9】

( i ) 前記合成粒子が、ヒト細胞、例えば、免疫細胞、肝細胞、又は肺上皮細胞に感染することができる；

( i i ) 前記合成粒子が、実質的に非免疫原性であり、例えば、実施例 4 に記載の方法に従って検出される場合、例えば、検出可能な及び / 又は不要な免疫応答を誘導せず、任意選択で、前記実質的に非免疫原性の粒子が、被験者において、免疫応答が欠損する対照被験者における効力の少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、又は 1 0 0 % である効力を有する；

40

( i i i ) 少なくとも 1 0 0 0 の前記粒子の集団が、少なくとも約 1 0 0 コピー (例えば、少なくとも 1、2、3、4、5、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、又は 1 0 0 0 コピー) の遺伝子エレメント又はその相補体を 1 つ若しくは複数のヒト細胞内に送達することができる；

( v i ) 前記細胞内ポリペプチド又は細胞内核酸が、以下：

I D H 1 阻害剤；

50

- I D H 2 阻 害 剤 ；  
  E G F R 阻 害 剤 ；  
  L R P 5 阻 害 剤 ；  
  D K K 2 阻 害 剤 ；  
  D P P - 4 阻 害 剤 ；  
  K R A S 阻 害 剤 ；  
  好 中 球 エ ラ ス タ ー ゼ 阻 害 剤 ；  
  F G F R 3 ア ク チ ベ ー タ 、 若 し く は  
  H T T ア ク チ ベ ー タ  
を 含 む ； 且 つ / 或 い は 10  
  ( v ) 前 記 外 性 エ フ ェ ク タ ー が 、 以 下 ；  
  ( i ) ナ ノ - ル シ フ ェ ラ ー ゼ 以 外 の 細 胞 内 ポ リ ペ プ チ ド 、 又 は  
  ( i i ) n - m y c 相 互 作 用 タ ン パ ク 質 に 対 す る m i R - 1 2 4 、 m i R - 5 1 8 、  
m i R - 6 2 5 、 m i R N A 以 外 の 細 胞 内 核 酸 ( 例 え ば 、 m i R N A 若 し く は s i R N A  
) 、 又 は 野 生 型 ア ネ ロ ウ イ ル ス ( A n e l l o v i r u s ) 、 例 え ば 、 本 明 細 書 に 記 載 の  
よ う に 、 例 え ば 、 T T V - t t h 8 ア ネ ロ ウ イ ル ス ( A n e l l o v i r u s ) の 前 記 内  
在 性 m i R N A を 含 む 、 請 求 項 1 ~ 8 の い ず れ か 1 項 に 記 載 の 合 成 粒 子 。
- 【 請 求 項 1 0 】**  
  以 下 ； 20  
  ( i ) 以 下 ；  
  ( a ) プ ロ モ ー タ エ レ メ ン ト と 、  
  ( b ) 外 性 エ フ ェ ク タ ー を コ ー ド 化 す る 核 酸 配 列 で あ っ て 、 前 記 核 酸 配 列 が 、 前 記 プ ロ  
モ ー タ エ レ メ ン ト に 作 動 可 能 に 連 結 さ れ て お り 、 前 記 外 性 エ フ ェ ク タ ー が 、 以 下 ；  
  I D H 1 阻 害 剤 ；  
  I D H 2 阻 害 剤 ；  
  E G F R 阻 害 剤 ；  
  L R P 5 阻 害 剤 ；  
  D K K 2 阻 害 剤 ；  
  D P P - 4 阻 害 剤 ；  
  K R A S 阻 害 剤 ； 30  
  好 中 球 エ ラ ス タ ー ゼ 阻 害 剤 ；  
  F G F R 3 ア ク チ ベ ー タ 、 若 し く は  
  H T T ア ク チ ベ ー タ  
か ら 選 択 さ れ る 細 胞 内 治 療 薬 ポ リ ペ プ チ ド 若 し く は 細 胞 内 治 療 薬 核 酸 で あ る 、 核 酸 配 列 と  
；  
  ( c ) 野 生 型 ア ネ ロ ウ イ ル ス ( A n e l l o v i r u s ) の 5 ' U T R 保 存 ド メ イン に  
対 し て 、 少 な く と も 7 5 % の 配 列 同 一 性 を 有 す る 配 列 と 、  
を 含 む 遺 伝 子 エ レ メ ン ト 又 は そ の 相 補 体 ； 並 び に  
  ( i i ) ア ネ ロ ウ イ ル ス ( A n e l l o v i r u s ) O R F 1 核 酸 に よ り コ ー ド 化 さ れ  
る ポ リ ペ プ チ ド 、 例 え ば 、 O R F 1 分 子 を 含 む タ ン パ ク 質 性 外 層 40  
を 含 む 合 成 粒 子 に お い て ；  
  前 記 遺 伝 子 エ レ メ ン ト 又 は 前 記 そ の 相 補 体 が 、 前 記 タ ン パ ク 質 性 外 層 内 に 閉 じ 込 め ら れ  
て お り ； 且 つ  
  前 記 合 成 粒 子 が 、 前 記 遺 伝 子 エ レ メ ン ト 又 は 前 記 そ の 相 補 体 を ヒ ト 細 胞 内 に 送 達 す る こ  
と が で き る 、 合 成 粒 子 。
- 【 請 求 項 1 1 】**  
  前 記 遺 伝 子 エ レ メ ン ト 又 は 前 記 そ の 相 補 体 が 、 配 列 番 号 5 4 の 又 ク レ オ チ ド 3 2 3 ~ 3  
9 3 の 核 酸 配 列 、 若 し く は そ れ に 対 し て 少 な く と も 8 5 % 同 一 の 核 酸 配 列 を 含 む 5 ' U T  
R ド メ イン を 含 む 、 請 求 項 1 0 に 記 載 の 合 成 粒 子 。
- 【 請 求 項 1 2 】** 50

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の合成粒子、及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 13】

(i) 前記医薬組成物が、少なくとも  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、又は  $10^{-9}$  の合成粒子を含む；且つ/或いは

(ii) 前記医薬組成物が、予め定めた比の粒子：感染性単位（例えば、 $< 300 : 1$ 、 $< 200 : 1$ 、 $< 100 : 1$ 、若しくは  $< 50 : 1$ ）を有する、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

以下：

(i) 請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の合成粒子の前記遺伝子エレメント又は前記その相補体の配列を含む第 1 核酸（例えば、二本鎖又は一本鎖環状 DNA）、及び

(ii) 例えば、表 16 に列挙される ORF 1、ORF 2、ORF 2 / 2、ORF 2 / 3、ORF 1 / 1、若しくは ORF 1 / 2 から選択されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列の 1 つ若しくは複数をコード化する第 2 核酸配列

を含む、反応混合物。

【請求項 15】

(i) 前記第 1 核酸及び第 2 核酸が、同じ核酸分子中にある；

(ii) 前記第 1 核酸及び第 2 核酸が、異なる核酸分子であり、任意選択で、前記第 2 核酸配列が、ヘルパー細胞又はヘルパーウイルスに含まれる；

(iii) 前記第 1 核酸及び第 2 核酸が、異なる核酸分子であり、且つ、前記第 2 核酸が、二本鎖環状 DNA として提供される；又は

(iv) 前記第 1 核酸及び第 2 核酸が、異なる核酸分子であり、且つ、前記第 1 及び第 2 核酸が、二本鎖環状 DNA として提供される、請求項 14 に記載の反応混合物。

【請求項 16】

合成粒子を作製する方法であって、前記方法が、以下：

a) 以下：

(i) 請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の合成粒子の遺伝子エレメント又はその相補体の前記核酸配列を含む第 1 核酸分子と、

(ii) 例えば、表 16 のいずれかに列挙される、ORF 1、ORF 2、ORF 2 / 2、ORF 2 / 3、ORF 1 / 1、若しくは ORF 1 / 2 から選択されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列の 1 つ若しくは複数をコード化する第 2 核酸分子と、

を含む宿主細胞を用意するステップ；及び

b) 前記合成粒子を作製するのに好適な条件下で前記宿主細胞をインキュベートするステップを含み、

それによって前記合成粒子を作製する方法。

【請求項 17】

(i) 前記方法が、ステップ (a) の前に、前記第 1 核酸分子及び/又は前記第 2 核酸分子を前記宿主細胞に導入するステップをさらに含み、任意選択で、前記第 2 核酸分子が、前記第 1 核酸分子の前に、それと同時に、又はその後前記宿主細胞に導入される；

(ii) 前記第 2 核酸分子が、前記宿主細胞のゲノム中に組み込まれる；

(iii) 前記第 2 核酸分子が、ヘルパー（例えば、ヘルパープラスミド又はヘルパーウイルスのゲノム）である；且つ/或いは

(iv) 前記第 2 核酸分子が、アミノ酸配列  $[W/F]X^7HX^3CX^1CX^5H$ （配列番号 949）（ $X^n$  は、任意の  $n$  個のアミノ酸の連続した配列である）を含む ORF 2 分子をコード化する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

合成粒子調製物を製造する方法であって、前記方法が、以下：

10

20

30

40

50

a) 請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の複数の合成粒子、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物、又は請求項 3 6 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の反応混合物を用意するステップ；

b) 任意選択で、以下：本明細書に記載の混入物、光学密度測定値（例えば、OD 2 6 0）、粒子数（例えば、HPLCにより）、感染力（例えば、粒子：感染単位比）のうち 1 つ又は複数について前記複数を評価するステップ；並びに

c) 例えば、(b) のパラメータの 1 つ又は複数が、指定閾値を満たす場合、例えば、被験者への投与に好適な医薬組成物として、前記複数の合成粒子を製剤化するステップを含む、方法。

【請求項 1 9】

以下：

(i) 請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の合成粒子の遺伝子エレメント又はその相補体の前記核酸配列を含む第 1 核酸分子、及び

(i i) 任意選択で、表 1 6 のいずれかに列挙される ORF 1、ORF 2、ORF 2 / 2、ORF 2 / 3、ORF 1 / 1、若しくは ORF 1 / 2 から選択されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列の 1 つ若しくは複数をコード化する第 2 核酸分子；

を含む宿主細胞。

【請求項 2 0】

外性エフェクター（例えば、治療用外性エフェクター）を哺乳動物細胞に送達するエクスピボの方法において、前記方法が、以下：

(a) 請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の合成粒子を用意するステップ；及び

(b) 哺乳動物細胞を前記合成粒子と接触させるステップ

を含み；

ここで、前記合成粒子は、前記遺伝子エレメント又は前記その相補体を前記哺乳動物細胞に送達することができ；

任意選択で、前記遺伝子エレメント又は前記その相補体を宿主細胞中の前記タンパク質性外層内に閉じ込めるのに好適な条件下で、前記遺伝子エレメント又は前記その相補体を前記宿主細胞に導入することにより、前記合成粒子が生産され；

これによって、前記治療用外性エフェクターを前記哺乳動物細胞に送達する、方法。

【請求項 2 1】

被験者の疾患又は障害の治療に使用するための組成物又は医薬組成物であって、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の合成粒子を含む組成物又は請求項 1 2 若しくは 1 3 に記載の医薬組成物であり、任意選択で、前記疾患又は障害が、癌である、組成物又は医薬組成物。

【請求項 2 2】

被験者の疾患又は障害の治療のための薬剤の製造における請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の合成粒子又は請求項 1 2 若しくは 1 3 に記載の医薬組成物の使用であって、任意選択で、前記疾患又は障害が癌である、使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】1 3 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【1 3 2 5】

ORF 1 の N 2 2 ドメイン中の Y N P X<sup>2</sup> D X G X<sup>2</sup> N モチーフ（配列番号 8 2 9）の二次構造も、それを取り囲む保存二次構造を有する。5 ~ 6 A A 鎖で開始して、これは、モチーフの 1 位のチロシン（Y）後に切断し、モチーフのほとんどは、8 ~ 9 A A ランダムコイルとして末端アスパラギン（N）まで配列し、その地点で、7 ~ 8 A A の別の鎖が開始する。例示的なアネロウイルス（Anellovirus）ORF 1 N 2 2 M

10

20

30

40

50

モチーフ配列のアラインメントを図 48 に示す。このモチーフ中のチロシンは鎖を切断し、第 2 鎖が、モチーフの末端アスパラギンで開始する。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

以下：

(I) 以下：

(a) プロモータエレメントと、

(b) 外性エフェクターをコード化する核酸配列であって、前記核酸配列が、前記プロモータエレメントに作動可能に連結されており、前記外性エフェクターが、IDH1 阻害剤である、核酸配列と；

(c) 以下：

配列番号 54 のヌクレオチド 323 ~ 393 の核酸配列、若しくはそれに対して少なくとも 90% 同一の核酸配列を含む 5' UTR ドメインと、を含む遺伝子エレメント；

(II) アネロウイルス (Anellovirus) ORF1 核酸によりコード化されるポリペプチド、例えば ORF1 分子を含むタンパク質性外層

を含む合成アネロソームにおいて；

前記遺伝子エレメントが、前記タンパク質性外層内に閉じ込められており；且つ

前記合成アネロソームが、前記遺伝子エレメントをヒト細胞内に送達することができる、合成アネロソーム。

(項目 2)

前記 ORF1 分子が、配列番号 217 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の合成アネロソーム。

(項目 3)

前記 ORF1 分子が、配列番号 54 のヌクレオチド 612 ~ 2612 によりコード化される、項目 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 4)

前記遺伝子エレメントが、配列番号 54 のヌクレオチド 2868 ~ 2929 の核酸配列、又はそれに対して少なくとも 85% の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 5)

前記 ORF1 分子が、表 16 に列挙される arg リッチ領域、ゼリーロールドメイン、超可変ドメイン、N22 ドメイン、及び / 又は C 末端ドメインのアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列のうち 1 つ若しくは複数を含むアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 6)

前記 ORF1 分子が、配列番号 58 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 85% の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 7)

表 16 に列挙される ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1、若しくは ORF1/2 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをさらに含む、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 8)

前記遺伝子エレメントが、表 16 に列挙される ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1、若しくは ORF1/2 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列をコード化する、項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 9)

10

20

30

40

50

前記合成アネロソームが、表 1 6 に列挙される O R F 2、O R F 2 / 2、O R F 2 / 3、T A I P、O R F 1 / 1、若しくは O R F 1 / 2 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 8 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含まない、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 0)

前記遺伝子エレメントが、表 1 6 に列挙される O R F 1、O R F 2、O R F 2 / 2、O R F 2 / 3、O R F 1 / 1、若しくは O R F 1 / 2 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 8 5 % の同一性を有するアミノ酸配列をコード化しない、項目 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 1)

前記 O R F 1 分子が、アミノ酸配列 Y N P X<sup>2</sup>-D X G X<sup>2</sup>-N (配列番号 8 2 9) (X<sup>n</sup> は、各々独立して、任意の n 個のアミノ酸の連続した配列である) を含む、項目 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 2)

前記 O R F 1 分子が、アミノ酸配列 Y N P X<sup>2</sup>-D X G X<sup>2</sup>-N (配列番号 8 2 9) とフランキングする第 1 鎖及び第 2 鎖をさらに含み、例えば、前記第 1 鎖は、前記アミノ酸配列 Y N P X<sup>2</sup>-D X G X<sup>2</sup>-N (配列番号 8 2 9) のチロシン (Y) 残基を含み、且つ / 又は前記第 2 鎖は、前記アミノ酸配列 Y N P X<sup>2</sup>-D X G X<sup>2</sup>-N (配列番号 8 2 9) の第 2 アスパラギン (N) 残基 (N から C) を含む、項目 1 1 に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 3)

前記 O R F 1 分子が、N 末端から C 末端方向の順で、第 1 鎖、第 2 鎖、第 1 ヘリックス、第 3 鎖、第 4 鎖、第 5 鎖、第 2 ヘリックス、第 6 鎖、第 7 鎖、第 8 鎖、及び第 9 鎖を含む、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 4)

前記遺伝子エレメントが、宿主細胞内でのローリングサークル複製により増幅されて、例えば、少なくとも 8 コピーを産生することができる、項目 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 5)

前記遺伝子エレメントが、一本鎖である、項目 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 6)

前記遺伝子エレメントが、環状である、項目 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 7)

前記遺伝子エレメントが、DNA である、項目 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 8)

前記遺伝子エレメントが、マイナス鎖 DNA である、項目 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 1 9)

前記遺伝子エレメントが、前記ヒト細胞に進入する前記アネロソームの 1 0 %、8 %、6 %、4 %、3 %、2 %、1 %、0 . 5 %、0 . 2 %、0 . 1 % 未満の頻度で組み込まれる、項目 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 2 0)

前記遺伝子エレメントが、表 1 6 - 1 に示すコンセンサス 5 ' U T R 核酸配列の配列を含む、項目 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 2 1)

前記遺伝子エレメントが、表 1 6 - 2 に示すコンセンサス G C リッチ領域の配列を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソーム。

(項目 2 2)

10

20

30

40

50

前記遺伝子エレメントが、少なくとも100ヌクレオチド長の配列を含み、これは、少なくとも70%（例えば、約70～100%、75～95%、80～95%、85～95%、若しくは85～90%）の位置のG又はCから構成される、項目1～21のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目23）

前記遺伝子エレメントが、配列番号120の核酸配列を含む、項目1～22のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目24）

前記プロモータエレメントが、野生型アネロウイルス（Anellovirus）に対して外性である、項目1～23のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目25）

前記プロモータエレメントが、野生型アネロウイルス（Anellovirus）に対して内在性である、項目1～24のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目26）

前記外性エフェクターが、miRNAを含み、宿主遺伝子の発現を低減する、項目1～25のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目27）

前記遺伝子エレメントが、約1.5～2.0、2.0～2.5、2.5～3.0、3.0～3.5、3.1～3.6、3.2～3.7、3.3～3.8、3.4～3.9、3.5～4.0、4.0～4.5、又は4.5～5.0 kbの長さを有する、項目1～26のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目28）

前記合成アネロソームが、ヒト細胞、例えば、免疫細胞、肝細胞、又は肺上皮細胞に感染することができる、項目1～27のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目29）

実質的に非免疫原性であり、例えば、実施例4に記載の方法に従って検出される場合、例えば、検出可能な及び/又は不要な免疫応答を誘導しない、項目1～28のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目30）

前記実質的に非免疫原性のアネロソームが、被験者において、免疫応答が欠損する対照被験者における効力の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%である効力を有する、項目29に記載の合成アネロソーム。

（項目31）

少なくとも1000の前記アネロソームの集団が、少なくとも約100コピー（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、又は1000コピー）の遺伝子エレメントを1つ若しくは複数のヒト細胞内に送達することができる、項目1～30のいずれか1項に記載の合成アネロソーム。

（項目32）

以下：

（i）以下：

（a）プロモータエレメントと、

（b）外性エフェクターをコード化する核酸配列であって、前記核酸配列が、前記プロモータエレメントに作動可能に連結されており、前記外性エフェクターが、以下：

IDH1阻害剤；

IDH2阻害剤；

EGFR阻害剤；

LRP5阻害剤；

DKK2阻害剤；

10

20

30

40

50

D P P - 4 阻 害 剤 ;

K R A S 阻 害 剤 ;

好 中 球 エ ラ ス タ ー ゼ 阻 害 剤 ;

F G F R 3 ア ク チ ベ ー タ、 若 し く は

H T T ア ク チ ベ ー タ

か ら 選 択 さ れ る 細 胞 内 治 療 薬 で あ る、 核 酸 配 列 と ;

( c ) 以 下 ;

配 列 番 号 5 4 の ヌ ク レ オ チ ド 3 2 3 ~ 3 9 3 の 核 酸 配 列、 若 し く は そ れ に 対 し て 少 な く

と も 8 5 % 同 一 の 核 酸 配 列 を 含 む 5 ' U T R ド メ イ ン と、

を 含 む 遺 伝 子 エ レ メ ン ト ; 並 び に

( i i ) O R F 1 核 酸 に よ り コ ー ド 化 さ れ る ポ リ ペ プ チ ド、 例 え ば、 O R F 1 分 子 を 含

む タ ン パ ク 質 性 外 層

を 含 む 合 成 ア ネ ロ ソ ー ム に お い て ;

前 記 遺 伝 子 エ レ メ ン ト が、 前 記 タ ン パ ク 質 性 外 層 内 に 閉 じ 込 め ら れ て お り ; 且 つ

前 記 合 成 ア ネ ロ ソ ー ム が、 前 記 遺 伝 子 エ レ メ ン ト を ヒ ト 細 胞 内 に 送 達 す る こ と が で き る

、 合 成 ア ネ ロ ソ ー ム。

( 項 目 3 3 )

項 目 1 ~ 3 2 の い ず れ か 1 項 に 記 載 の 合 成 ア ネ ロ ソ ー ム、 及 び 薬 学 的 に 許 容 さ れ る 担 体

又 は 賦 形 剤 を 含 む、 医 薬 組 成 物。

( 項 目 3 4 )

少 な く と も 1 0 <sup>3</sup>、 1 0 <sup>4</sup>、 1 0 <sup>5</sup>、 1 0 <sup>6</sup>、 1 0 <sup>7</sup>、 1 0 <sup>8</sup>、 又 は 1 0 <sup>9</sup> の 合 成 ア ネ

ロ ソ ー ム を 含 む、 項 目 3 3 に 記 載 の 医 薬 組 成 物。

( 項 目 3 5 )

前 記 医 薬 組 成 物 が、 予 め 定 め た 比 の 粒 子 : 感 染 性 単 位 ( 例 え ば、 < 3 0 0 : 1、 < 2 0

0 : 1、 < 1 0 0 : 1、 若 し く は < 5 0 : 1 ) を 有 す る、 項 目 3 3 又 は 3 4 に 記 載 の 医 薬

組 成 物。

( 項 目 3 6 )

以 下 :

( i ) 項 目 1 ~ 3 5 の い ず れ か 1 項 に 記 載 の 合 成 ア ネ ロ ソ ー ム の 前 記 遺 伝 子 エ レ メ ン ト

の 配 列 を 含 む 第 1 核 酸 ( 例 え ば、 二 本 鎖 又 は 一 本 鎖 環 状 D N A )、 及 び

( i i ) 例 え ば、 表 1 6 に 列 挙 さ れ る O R F 1、 O R F 2、 O R F 2 / 2、 O R F 2 /

3、 O R F 1 / 1、 若 し く は O R F 1 / 2 か ら 選 択 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列、 又 は そ れ に 対 し

て 少 な く と も 8 5 % の 配 列 同 一 性 を 有 す る ア ミ ノ 酸 配 列 の 1 つ 若 し く は 複 数 を コ ー ド 化 す

る 第 2 核 酸 配 列

を 含 む、 反 応 混 合 物。

( 項 目 3 7 )

前 記 第 1 核 酸 及 び 第 2 核 酸 が、 同 じ 核 酸 分 子 中 に あ る、 項 目 3 6 に 記 載 の 反 応 混 合 物。

( 項 目 3 8 )

前 記 第 1 核 酸 及 び 第 2 核 酸 が、 異 な る 核 酸 分 子 で あ る、 項 目 3 6 に 記 載 の 反 応 混 合 物。

( 項 目 3 9 )

前 記 第 1 核 酸 及 び 第 2 核 酸 が、 異 な る 核 酸 分 子 で あ り、 且 つ、 前 記 第 2 核 酸 が、 二 本 鎖

環 状 D N A と し て 提 供 さ れ る、 項 目 3 6 に 記 載 の 反 応 混 合 物。

( 項 目 4 0 )

前 記 第 1 核 酸 及 び 第 2 核 酸 が、 異 な る 核 酸 分 子 で あ り、 且 つ、 前 記 第 1 及 び 第 2 核 酸 が

、 二 本 鎖 環 状 D N A と し て 提 供 さ れ る、 項 目 3 6 に 記 載 の 反 応 混 合 物。

( 項 目 4 1 )

前 記 第 2 核 酸 配 列 が、 ヘル パ ー 細 胞 又 は ヘル パ ー ウ イ ル ス に 含 ま れ る、 項 目 3 8 に 記 載

の 反 応 混 合 物。

( 項 目 4 2 )

合 成 ア ネ ロ ソ ー ム を 作 製 す る 方 法 で あ っ て、 前 記 方 法 が、 以 下 :

10

20

30

40

50

a) 以下:

(i) 項目 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソームの遺伝子エレメントの前記核酸配列を含む第 1 核酸分子と、

(ii) 例えば、表 1 6 のいずれかに列挙される、ORF 1、ORF 2、ORF 2 / 2、ORF 2 / 3、ORF 1 / 1、若しくは ORF 1 / 2 から選択されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 85 % の配列同一性を有するアミノ酸配列の 1 つ若しくは複数をコード化する第 2 核酸分子と、

を含む宿主細胞を用意するステップ; 及び

b) 前記合成アネロソームを作製するのに好適な条件下で前記宿主細胞をインキュベートするステップを含み、

それによって前記合成アネロソームを作製する方法。

(項目 4 3)

ステップ (a) の前に、前記第 1 核酸分子及び / 又は前記第 2 核酸分子を前記宿主細胞に導入するステップをさらに含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記第 2 核酸分子が、前記第 1 核酸分子の前に、それと同時に、又はその後前記宿主細胞に導入される、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記第 2 核酸分子が、前記宿主細胞のゲノム中に組み込まれる、項目 4 2 又は 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記第 2 核酸分子が、ヘルパー (例えば、ヘルパープラスミド又はヘルパーウイルスのゲノム) である、項目 4 2 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 7)

第 2 核酸分子が、アミノ酸配列 [W / F] X<sup>n</sup> H X<sup>3</sup> C X<sup>1</sup> C X<sup>5</sup> H (配列番号 9 4 9) (X<sup>n</sup> は、任意の n 個のアミノ酸の連続した配列である) を含む ORF 2 分子をコード化する、項目 4 2 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 8)

合成アネロソーム調製物を製造する方法であって、前記方法が、以下:

a) 項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の複数の合成アネロソーム、項目 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物、又は項目 3 6 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の反応混合物を用意するステップ;

b) 任意選択で、以下: 本明細書に記載の混入物、光学密度測定値 (例えば、OD 2 6 0)、粒子数 (例えば、HPLC により)、感染力 (例えば、粒子: 感染単位比) のうち 1 つ又は複数について前記複数を評価するステップ; 並びに

c) 例えば、(b) のパラメータの 1 つ又は複数が、指定閾値を満たす場合、例えば、被験者への投与に好適な医薬組成物として、前記複数の合成アネロソームを製剤化するステップ

を含む、方法。

(項目 4 9)

以下:

(i) 項目 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソームの遺伝子エレメントの前記核酸配列を含む第 1 核酸分子、及び

(ii) 任意選択で、表 1 6 のいずれかに列挙される ORF 1、ORF 2、ORF 2 / 2、ORF 2 / 3、ORF 1 / 1、若しくは ORF 1 / 2 から選択されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 85 % の配列同一性を有するアミノ酸配列の 1 つ若しくは複数をコード化する第 2 核酸分子;

を含む宿主細胞。

(項目 5 0)

外性エフェクター (例えば、治療用外性エフェクター) を哺乳動物細胞に送達する方法

10

20

30

40

50

において、以下：

( a ) 項目 1 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の合成アネロソームを用意するステップ；及び  
( b ) 哺乳動物細胞を前記合成アネロソームと接触させるステップ  
を含み；

ここで、前記合成アネロソームは、前記遺伝子エレメントを前記哺乳動物細胞に送達する  
ことができ；

任意選択で、前記遺伝子エレメントを宿主細胞中の前記タンパク質性外層内に閉じ込め  
るのに好適な条件下で、前記遺伝子エレメントを前記宿主細胞に導入することにより、前  
記合成アネロソームが生産され；

これによって、前記治療用外性エフェクターを前記哺乳動物細胞に送達する、方法。

( 項目 5 1 )

前記遺伝子エレメントの宿主細胞への送達を目的とする、項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項  
に記載の合成アネロソーム又は項目 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の使用

( 項目 5 2 )

被験者の疾患又は障害の治療を目的とする、項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の合成  
アネロソーム又は項目 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の使用。

( 項目 5 3 )

前記疾患又は障害が、癌である、項目 5 2 に記載の使用。

( 項目 5 4 )

被験者の疾患又は障害の治療に使用するための、項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の  
合成アネロソーム又は項目 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

( 項目 5 5 )

被験者の疾患又は障害を治療する方法であって、前記方法が、項目 1 ~ 3 2 のいずれか  
1 項に記載の合成アネロソーム又は項目 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を  
前記被験者に投与するステップを含み、ここで、前記疾患又は障害が、癌である、方法。

( 項目 5 6 )

被験者の疾患又は障害の治療のための薬剤の製造における項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項  
に記載の合成アネロソーム又は項目 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の使用  
であって、任意選択で、前記疾患又は障害が癌である、使用。

10

20

30

40

50