

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-505159

(P2021-505159A)

(43) 公表日 令和3年2月18日 (2021.2.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z N A Z	4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 C 0 8 6
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 242 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-531057 (P2020-531057)
 (86) (22) 出願日 平成30年12月6日 (2018.12.6)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年6月23日 (2020.6.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/064242
 (87) 国際公開番号 W02019/113310
 (87) 国際公開日 令和1年6月13日 (2019.6.13)
 (31) 優先権主張番号 62/595,328
 (32) 優先日 平成29年12月6日 (2017.12.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/607,069
 (32) 優先日 平成29年12月18日 (2017.12.18)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 520068043
 ジェネレーション バイオ カンパニー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 142, ケンブリッジ, ビニー スト
 リート 301, 4ティールエイチ フロ
 ア
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾型閉端DNA (CEDNA) を使用する遺伝子編集

(57) 【要約】

本出願は、遺伝子編集のための直鎖状で連続的な構造を有するcednaベクターについて説明する。cednaベクターは、2つのITR配列が隣接する発現カセットを含み、発現カセットは、遺伝子編集分子をコードする。一部のcednaベクターは、調節スイッチを含むシス調節エレメントをさらに含む。cednaベクターを使用する信頼できる遺伝子編集のための方法および細胞株が、本明細書でさらに提供される。

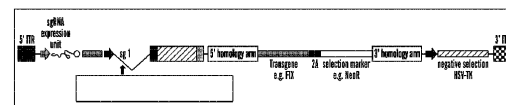


FIG. 8

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非ウイルス性カプシド不含閉端 DNA (c e DNA) ベクターであって、
隣接する逆位末端反復 (I T R) 間に少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列を含み、
少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、少なくとも 1 つの遺伝子編集分子をコードする、c e DNA ベクター。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼ、ガイド RNA (g RNA)、ガイド DNA (g DNA)、およびアクチベーター RNA から選択される、請求項 1 に記載の c e DNA ベクター。

10

【請求項 3】

少なくとも 1 つの遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼである、請求項 2 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 4】

前記ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、請求項 3 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 5】

前記配列特異的ヌクレアーゼが、核酸誘導型ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、メガヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、または m e g a T A L から選択される、請求項 4 に記載の c e DNA ベクター。

20

【請求項 6】

前記配列特異的ヌクレアーゼが、一塩基エディター、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、および DNA 誘導型ヌクレアーゼから選択される核酸誘導型ヌクレアーゼである、請求項 5 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの遺伝子編集分子が、g RNA または g DNA である、請求項 2 または請求項 6 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの遺伝子編集分子が、アクチベーター RNA である、請求項 2、6、または 7 に記載の c e DNA ベクター。

30

【請求項 9】

前記核酸誘導型ヌクレアーゼが、C R I S P R ヌクレアーゼである、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の c e DNA。

【請求項 10】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼが、C a s ヌクレアーゼである、請求項 9 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 11】

前記 C a s ヌクレアーゼが、C a s 9、ニックング C a s 9 (n C a s 9)、および不活性化 C a s (d C a s) から選択される、請求項 10 に記載の c e DNA ベクター。

40

【請求項 12】

前記 n C a s 9 が、C a s の H N H または R u V c ドメインに突然変異を含む、請求項 11 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 13】

前記 C a s ヌクレアーゼが、標的遺伝子のプロモーター領域を標的とする g RNA と複合体を形成する不活性化 C a s ヌクレアーゼ (d C a s) である、請求項 11 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 14】

K R A B エフェクタードメインをさらに含む、請求項 13 に記載の c e DNA ベクター。

50

【請求項 15】

前記 d C a s が、プロモーター領域に向けられ得る異種転写活性化ドメインに融合される、請求項 13 または請求項 14 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 16】

前記 d C a s 融合が、標的遺伝子の発現を上方調節するために追加のトランス活性化ドメインを動員するガイド R N A によって前記標的遺伝子のプロモーター領域に向けられる、請求項 15 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 17】

前記 d C a s が、S . p y o g e n e s d C a s 9 である、請求項 13 ～ 16 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

10

【請求項 18】

前記ガイド R N A 配列が、標的遺伝子のプロモーターを標的とし、C R I S P R が、前記標的遺伝子をサイレンシングする (C R I S P R i 系)、請求項 7 ～ 17 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 19】

前記ガイド R N A 配列が、標的遺伝子の転写開始部位を標的とし、前記標的遺伝子を活性化する (C R I S P R a 系)、請求項 7 ～ 17 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 20】

前記少なくとも 1 つの遺伝子編集分子が、第 1 のガイド R N A および第 2 のガイド R N A を含む、請求項 6 ～ 19 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

20

【請求項 21】

前記 g R N A が、スプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的とする、請求項 7 ～ 20 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 22】

前記スプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的とすることが、非相同末端結合 (N H E J) および欠陥遺伝子の訂正をもたらす、請求項 21 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 23】

前記ベクターが、1 つのガイド R N A 配列の複数のコピーをコードする、請求項 7 ～ 22 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

30

【請求項 24】

第 1 の異種ヌクレオチド配列が、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 1 の調節配列を含む、請求項 1 ～ 23 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 25】

前記第 1 の調節配列が、プロモーターを含む、請求項 24 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 26】

前記プロモーターが、C A G 、 P o l I I I 、 U 6 、または H 1 である、請求項 25 に記載の c e D N A ベクター。

40

【請求項 27】

前記第 1 の調節配列が、モジュレーターを含む、請求項 24 ～ 26 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 28】

前記モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、請求項 27 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 29】

前記第 1 の異種ヌクレオチド配列が、前記ヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列の上流にイントロン配列を含み、前記イントロン配列が、ヌクレアーゼ切断部位を含

50

む、請求項 24～28 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 30】

第 2 の異種ヌクレオチド配列が、ガイド R N A をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 2 の調節配列を含む、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 31】

前記第 2 の調節配列が、プロモーターを含む、請求項 30 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 32】

前記プロモーターが、C A G、P o l I I I、U 6、または H 1 である、請求項 31 に記載の c e D N A ベクター。 10

【請求項 33】

前記第 2 の調節配列が、モジュレーターを含む、請求項 30～32 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 34】

前記モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、請求項 33 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 35】

第 3 の異種ヌクレオチド配列が、アクチベーター R N A をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 3 の調節配列を含む、請求項 1～34 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。 20

【請求項 36】

前記第 3 の調節配列が、プロモーターを含む、請求項 35 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 37】

前記プロモーターが、C A G、P o l I I I、U 6、または H 1 である、請求項 36 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 38】

前記第 3 の調節配列が、モジュレーターを含む、請求項 35～37 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。 30

【請求項 39】

前記モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、請求項 38 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 40】

前記 c e D N A ベクターが、標的核酸配列に対する 5' 相溶性アームおよび 3' 相溶性アームを含む、請求項 1～39 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 41】

前記 5' 相溶性アームおよび前記 3' 相溶性アームが各々、約 250～2000 b p である、請求項 40 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 42】

前記 5' 相溶性アームおよび／または前記 3' 相溶性アームが、I T R の近位にある、請求項 40 または請求項 41 に記載の c e D N A ベクター。 40

【請求項 43】

少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、前記 5' 相溶性アームと前記 3' 相溶性アームとの間にある、請求項 40～42 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 44】

前記 5' 相溶性アームと前記 3' 相溶性アームとの間にある前記少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、標的遺伝子を含む、請求項 43 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 45】

遺伝子編集分子をコードする前記 c e D N A ベクター少なくとも 1 つの異種ヌクレオチ 50

ド配列が、前記 5' 相同性アームと前記 3' 相同性アームとの間にはない、請求項 40～44 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 46】

遺伝子編集分子をコードする前記異種ヌクレオチド配列のいずれも、前記 5' 相同性アームと前記 3' 相同性アームとの間にはない、請求項 45 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 47】

前記 5' 相同性アームの上流に第 1 のエンドヌクレアーゼ制限部位を含み、かつ／または前記 3' 相同性アームの下流に第 2 のエンドヌクレアーゼ制限部位を含む、請求項 40～46 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 48】

前記第 1 のエンドヌクレアーゼ制限部位および前記第 2 のエンドヌクレアーゼ制限部位が、同じ制限エンドヌクレアーゼ部位である、請求項 47 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 49】

少なくとも 1 つのエンドヌクレアーゼ制限部位が、同じく前記 c e D N A ベクター上にコードされるエンドヌクレアーゼによって切断される、請求項 47 または請求項 48 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 50】

1 つ以上のポリ A 部位をさらに含む、請求項 40～49 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 51】

導入遺伝子調節エレメント、ならびに下流にありかつ前記 3' 相同性アームに近接する、および／または上流にありかつ前記 5' 相同性アームに近接するポリ A 部位のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 40～50 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 52】

上流にありかつ前記 3' 相同性アームに近接する 2 A および選択マーカー部位を含む、請求項 40～51 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 53】

前記 5' 相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の上流のヌクレオチド配列と相同である、請求項 40～52 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 54】

前記 3' 相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の下流のヌクレオチド配列と相同である、請求項 40～53 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 55】

相同組み換えのエンハンサーをコードする異種ヌクレオチド配列を含む、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 56】

相同組み換えの前記エンハンサーが、SV40 後期ポリ A シグナル上流エンハンサー配列、サイトメガロウイルス初期エンハンサーエレメント、RSV エンハンサー、および CMV エンハンサーから選択される、請求項 55 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 57】

少なくとも 1 つの I T R が、機能性末端分解部位および R e p 結合部位を含む、請求項 1～56 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 58】

前記隣接する I T R が、対称または非対称である、請求項 1～57 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 59】

前記隣接する I T R が、非対称であり、前記 I T R のうちの少なくとも 1 つが、野生型 A A V I T R 配列から、前記 I T R の全体的な 3 次元コンフォメーションに影響を与える欠失、付加、または置換によって変更されている、請求項 58 に記載の c e D N A ベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 60】

少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、cDNAである、請求項1～59のいずれか一項に記載のcDNAベクター。

【請求項 61】

前記隣接するITRのうちの1つ以上が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびAAV12から選択されるAAV血清型に由来する、請求項1～60に記載のcDNAベクター。

【請求項 62】

前記ITRのうちの1つ以上が、合成のものである、請求項1～61のいずれか一項に記載のcDNAベクター。 10

【請求項 63】

前記ITRのうちの1つ以上が、野生型ITRではない、請求項1～62のいずれか一項に記載のcDNAベクター。

【請求項 64】

前記ITRのうちの1つ以上両方が、A、A'、B、B'、C、C'、D、およびD'から選択されるITR領域のうちの少なくとも1つにおける欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている、請求項1～63のいずれか一項に記載のcDNAベクター。

【請求項 65】

前記欠失、挿入、および／または置換が、通常はA、A'、B、B'、C、またはC'領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、請求項64に記載のcDNAベクター。 20

【請求項 66】

前記ITRが、対称である、請求項1～58または56～65のいずれか一項に記載のcDNAベクター。

【請求項 67】

前記ITRが、野生型である、請求項1～58、60、61、および66のいずれか一項に記載のcDNAベクター。

【請求項 68】

両方のITRが、前記ITRが互いに対して反転されたときに全体的な3次元対称性をもたらすように変更されている、請求項1～66のいずれか一項に記載のcDNAベクター。 30

【請求項 69】

前記変更が、A、A'、B、B'、C、C'、D、およびD'から選択される前記ITR領域における欠失、挿入、および／または置換である、請求項68に記載のcDNAベクター。

【請求項 70】

ゲノム編集のための方法であって、

細胞を遺伝子編集系と接触させることを含み、前記遺伝子編集系の1つ以上の構成成分が、前記細胞を、隣接する逆位末端反復（ITR）の間に少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列を含む非ウイルス性カプシド不含閉端DNA（cDNA）ベクターと接触させることによって前記細胞に送達され、少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、少なくとも1つの遺伝子編集分子をコードする、方法。 40

【請求項 71】

少なくとも1つの遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼ、ガイドRNA（gRNA）、ガイドDNA（gDNA）、およびアクチベーターRNAから選択される、請求項70に記載の方法。

【請求項 72】

少なくとも1つの遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼである、請求項71に記載の方法。 50

【請求項 73】

前記ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記配列特異的ヌクレアーゼが、核酸誘導型ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、メガヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、または me g a T A L から選択される、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

前記配列特異的ヌクレアーゼが、一塩基エディター、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、および DNA 誘導型ヌクレアーゼから選択される核酸誘導型ヌクレアーゼである、請求項 73 に記載の方法。

10

【請求項 76】

少なくとも 1 つの遺伝子編集分子が、gRNA または gDNA である、請求項 70 または 75 に記載の方法。

【請求項 77】

少なくとも 1 つの遺伝子編集分子が、アクチベーター RNA である、請求項 70、75、または 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記核酸誘導型ヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼである、方法 74～77 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

前記 CRISPRヌクレアーゼが、Casヌクレアーゼである、請求項 78 に記載の方法。

20

【請求項 80】

前記 Casヌクレアーゼが、Cas9、ニックング Cas9 (nC as 9)、および不活性化 Cas (dCas) から選択される、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

前記 nCas9 が、Cas の HNH または RuVc ドメインに突然変異を含む、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記 Casヌクレアーゼが、標的遺伝子のプロモーター領域を標的とする gRNA と複合体を形成する不活性化 Casヌクレアーゼ (dCas) である、請求項 80 に記載の方法。

30

【請求項 83】

KRABエフェクタードメインをさらに含む、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

前記 dCas が、プロモーター領域に向けられ得る異種転写活性化ドメインに融合される、請求項 82 または 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記 dCas 融合が、標的遺伝子の発現を上方調節するために追加のトランス活性化ドメインを動員するガイド RNA によって前記標的遺伝子のプロモーター領域に向けられる、請求項 84 に記載の方法。

40

【請求項 86】

前記 dCas が、S. pyogenes dCas9 である、請求項 82～85 のいずれかに記載の方法。

【請求項 87】

前記ガイド RNA 配列が、標的遺伝子のプロモーターを標的とし、CRISPR が、前記標的遺伝子をサイレンシングする (CRISPRi 系)、請求項 78～86 のいずれかに記載の方法。

【請求項 88】

前記ガイド RNA 配列が、標的遺伝子の転写開始部位を標的とし、前記標的遺伝子を活

50

性化する (C R I S P R a 系)、請求項 78～86 のいずれかに記載の方法。

【請求項 89】

前記少なくとも 1 つの遺伝子編集分子が、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA を含む、請求項 76～88 のいずれかに記載の方法。

【請求項 90】

前記 gRNA が、スプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的とする、請求項 76～89 のいずれかに記載の方法。

【請求項 91】

前記スプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的とすることが、非相同末端結合 (NHEJ) および欠陥遺伝子の訂正をもたらす、請求項 22 に記載の方法。

10

【請求項 92】

前記ベクターが、1 つのガイド RNA 配列の複数のコピーをコードする、請求項 76～91 に記載の方法。

【請求項 93】

第 1 の異種ヌクレオチド配列が、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 1 の調節配列を含む、請求項 70～92 のいずれかに記載の方法。

【請求項 94】

前記第 1 の調節配列が、プロモーターを含む、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

前記プロモーターが、CAG、Pol III、U6、または H1 である、請求項 94 に記載の方法。

20

【請求項 96】

前記第 1 の調節配列が、モジュレーターを含む、請求項 93～95 のいずれかに記載の方法。

【請求項 97】

前記モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

前記第 1 の異種ヌクレオチド配列が、前記ヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列の上流にイントロン配列を含み、前記イントロン配列が、ヌクレアーゼ切断部位を含む、請求項 93～97 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 99】

第 2 の異種ヌクレオチド配列が、ガイド RNA をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 2 の調節配列を含む、請求項 70～98 のいずれかに記載の方法。

【請求項 100】

前記第 2 の調節配列が、プロモーターを含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記プロモーターが、CAG、Pol III、U6、または H1 である、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記第 2 の調節配列が、モジュレーターを含む、請求項 99～101 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 103】

前記モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

第 3 の異種ヌクレオチド配列が、アクチベーター RNA をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 3 の調節配列を含む、請求項 70～103 のいずれかに記載の方法。

【請求項 105】

50

前記第3の調節配列が、プロモーターを含む、請求項104に記載の方法。

【請求項106】

前記プロモーターが、CAG、Poly I I I、U6、またはH1である、請求項105に記載の方法。

【請求項107】

前記第3の調節配列が、モジュレーターを含む、請求項104～106のいずれかに記載の方法。

【請求項108】

前記モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、請求項107に記載の方法。

【請求項109】

前記ceDNAベクターが、標的核酸配列に対する5'相同性アームおよび3'相同性アームを含む、請求項70～108のいずれかに記載の方法。

【請求項110】

前記5'相同性アームおよび前記3'相同性アームが各々、約250～2000bpである、請求項109に記載の方法。

【請求項111】

前記5'相同性アームおよび／または前記3'相同性アームが、ITRの近位にある、請求項109または110に記載の方法。

【請求項112】

少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、前記5'相同性アームと前記3'相同性アームとの間にある、請求項109～111のいずれかに記載の方法。

【請求項113】

前記5'相同性アームと前記3'相同性アームとの間にある前記少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、標的遺伝子を含む、請求項112に記載の方法。

【請求項114】

遺伝子編集分子をコードする前記ceDNAベクター少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、前記5'相同性アームと前記3'相同性アームとの間にはない、請求項109～113に記載の方法。

【請求項115】

遺伝子編集分子をコードする前記異種ヌクレオチド配列のいずれも、前記5'相同性アームと前記3'相同性アームとの間にはない、請求項114に記載の方法。

【請求項116】

前記5'相同性アームの上流の第1のエンドヌクレアーゼ制限部位および／または前記3'相同性アームの下流の第2のエンドヌクレアーゼ制限部位を含む、請求項109～115に記載の方法。

【請求項117】

前記第1のエンドヌクレアーゼ制限部位および前記第2のエンドヌクレアーゼ制限部位が、同じ制限エンドヌクレアーゼ部位である、請求項116に記載の方法。

【請求項118】

少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ制限部位が、同じく前記ceDNAベクター上にコードされるエンドヌクレアーゼによって切断される、請求項116または117に記載の方法。

【請求項119】

1つ以上のポリA部位をさらに含む、請求項109～118のいずれかに記載の方法。

【請求項120】

導入遺伝子調節エレメント、および下流にありかつ前記3'相同性アームに近接する、および／または上流にありかつ前記5'相同性アームに近接するポリA部位のうちの少なくとも1つを含む、請求項109～119のいずれかに記載の方法。

【請求項121】

10

20

30

40

50

上流にありかつ前記 3' 相同性アームに近接する 2 A および選択マーカー部位を含む、請求項 109～120 のいずれかに記載の方法。

【請求項 122】

前記 5' 相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の上流のヌクレオチド配列と相同である、請求項 109～121 のいずれかに記載の方法。

【請求項 123】

前記 3' 相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の下流のヌクレオチド配列と相同である、請求項 109～122 のいずれかに記載の方法。

【請求項 124】

相同組み換えのエンハンサーをコードする異種ヌクレオチド配列を含む、請求項 109～123 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 125】

相同組み換えの前記エンハンサーが、SV40 後期ポリ A シグナル上流エンハンサー配列、サイトメガロウイルス初期エンハンサーエレメント、RSV エンハンサー、および CMV エンハンサーから選択される、請求項 124 に記載の方法。

【請求項 126】

少なくとも 1 つの ITR が、機能性末端分解部位および Rep 結合部位を含む、請求項 70～125 のいずれかに記載の方法。

【請求項 127】

前記隣接する ITR が、対称または非対称である、請求項 70～126 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 128】

前記隣接する ITR が、非対称であり、前記 ITR のうちの少なくとも 1 つが、野生型 AA V ITR 配列から、前記 ITR の全体的な 3 次元コンフォメーションに影響を与える欠失、付加、または置換によって変更されている、請求項 127 に記載の方法。

【請求項 129】

少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、cDNA である、請求項 70～128 のいずれかに記載の方法。

【請求項 130】

前記隣接する ITR のうちの 1 つ以上が、AA V 1、AA V 2、AA V 3、AA V 4、AA V 5、AA V 6、AA V 7、AA V 8、AA V 9、AA V 10、AA V 11、および AA V 12 から選択される AA V 血清型に由来する、請求項 70～129 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 131】

前記 ITR のうちの 1 つ以上が、合成のものである、請求項 70～130 のいずれかに記載の方法。

【請求項 132】

前記 ITR のうちの 1 つ以上が、野生型 ITR ではない、請求項 70～131 のいずれかに記載の方法。

【請求項 133】

前記 ITR のうちの 1 つ以上両方が、A、A'、B、B'、C、C'、D、および D' から選択される ITR 領域のうちの少なくとも 1 つにおける欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている、請求項 70～132 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 134】

前記欠失、挿入、および／または置換が、通常は A、A'、B、B'、C、または C' 領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、請求項 133 に記載の方法。

【請求項 135】

前記 ITR が、対称である、請求項 70～127 または 129～134 のいずれかに記載の方法。 50

【請求項 136】

前記 I T R が、野生型である、請求項 70～127 または 129～130 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 137】

両方の I T R が、前記 I T R が互いに対して反転されたときに全体的な 3 次元対称性をもたらすように変更されている、請求項 70～136 のいずれかに記載の方法。

【請求項 138】

前記変更が、A、A'、B、B'、C、C'、D、および D' から選択される前記 I T R 領域における欠失、挿入、および／または置換である、請求項 137 に記載の方法。

【請求項 139】

接触される前記細胞が、真核細胞である、請求項 70～138 のいずれかに記載の方法。

【請求項 140】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼが、前記真核細胞における発現のためにコドン最適化される、請求項 84～139 のいずれかに記載の方法。

【請求項 141】

前記 C a s タンパク質が、前記真核細胞での発現のためにコドン最適化される、請求項 84～140 のいずれかに記載の方法。

【請求項 142】

標的遺伝子を編集するのに適した条件下、かつそのために十分な時間にわたって、請求項 1～69 のいずれか一項に記載の有効量の非ウイルス性カプシド不含閉端 D N A (c e D N A ベクター) を細胞に投与することを含む、ゲノム編集の方法。

【請求項 143】

前記標的遺伝子が、1 つ以上のガイド R N A 配列を使用して標的化され、相同性指向修復 (H D R) ドナーテンプレートの存在下で H D R により編集される遺伝子である、請求項 113～142 のいずれかに記載の方法。

【請求項 144】

前記標的遺伝子が、1 つのガイド R N A 配列を使用して標的化され、前記標的遺伝子が、非相同末端結合 (N H E J) によって編集される、請求項 142 または 143 に記載の方法。

【請求項 145】

前記方法が、疾患に関連する一塩基多型 (S N P) を訂正するためにインビボで実施される、請求項 70～144 のいずれかに記載の方法。

【請求項 146】

前記疾患が、鎌状赤血球貧血、遺伝性ヘモクロマトーシス、または癌遺伝性失明を含む、請求項 145 に記載の方法。

【請求項 147】

少なくとも 2 つの異なる C a s タンパク質が、前記 c e D N A ベクターに存在し、前記 C a s タンパク質のうちの 1 つが、触媒的に不活性 (C a s - i) であり、前記 C a s - I に関連する前記ガイド R N A が、前記標的細胞の前記プロモーターを標的とし、前記 C a s - I をコードする前記 D N A が、誘導性プロモーターの制御下にあるため、所望の時点で前記標的遺伝子の前記発現を止めることができる、請求項 70～146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 148】

細胞を C R I S P R / C a s 遺伝子編集系と接触させることを含む、細胞の標的遺伝子における単一ヌクレオチド塩基対を編集するための方法であって、前記 C R I S P R / C a s 遺伝子編集系の 1 つ以上の構成成分が、前記細胞を非ウイルス性カプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクター組成物と接触させることによって前記細胞に送達され、

前記 c e D N A ベクターから発現された前記 C a s タンパク質が、触媒的に不活性であり、塩基編集部分に融合されており、

10

20

30

40

50

前記方法が、前記標的遺伝子の発現を調整するのに十分な条件下、かつそのために十分な時間にわたって実施される、方法。

【請求項 149】

前記 c e D N A ベクターが、請求項 1 ～ 69 のいずれかに記載の c e D N A ベクターである、請求項 148 に記載の方法。

【請求項 150】

前記塩基編集部分が、一本鎖特異的シチジンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤、または t R N A アデノシンデアミナーゼを含む、請求項 148 に記載の方法。

【請求項 151】

前記触媒的に不活性な C a s タンパク質が、d C a s 9 である、請求項 148 に記載の方法。

10

【請求項 152】

前記細胞が、T 細胞または C D 3 4 ⁺ である、請求項 70 ～ 151 のいずれかに記載の方法。

【請求項 153】

前記標的遺伝子が、プログラム死タンパク質 (P D 1)、細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (C T L A 4)、または腫瘍壊死因子 α (T N F - α) をコードする、請求項 70 ～ 152 のいずれかに記載の方法。

【請求項 154】

産生された細胞を、それを必要とする対象に投与することをさらに含む、請求項 70 ～ 153 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 155】

治療を必要とする前記対象が、遺伝性疾患、ウイルス感染、細菌感染、癌、または自己免疫疾患を有する、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 156】

細胞における 2 つ以上の標的遺伝子の発現を調整する方法であって、

(i v) 隣接する末端反復 (T R) 配列、および 2 つ以上の標的遺伝子に相補的な少なくとも 2 つのガイド R N A をコードする核酸配列を含むベクターを含む第 1 の組成物であって、前記ベクターが、非ウイルス性カプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクターである、第 1 の組成物と、

30

(v) 隣接する末端反復 (T R) 配列、および各々がガイド R N A と関連し、2 つ以上の標的遺伝子に結合する少なくとも 2 つの触媒的に不活性な D N A エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含むベクターを含む第 2 の組成物であって、前記ベクターが、非ウイルス性カプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクターである、第 2 の組成物と、

(v i) 隣接する末端反復 (T R) 配列、および少なくとも 2 つの転写調節因子タンパク質またはドメインをコードする核酸配列を含むベクターを含む第 3 の組成物であって、前記ベクターが、非ウイルス性カプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクターである、第 3 の組成物と、を前記細胞に導入することを含み、

前記少なくとも 2 つのガイド R N A、前記少なくとも 2 つの触媒的に不活性な R N A 誘導型エンドヌクレアーゼ、および少なくとも 2 つの転写調節因子タンパク質またはドメインが、前記細胞で発現され、

40

ガイド R N A、触媒的に不活性な R N A 誘導型エンドヌクレアーゼ、転写調節因子タンパク質またはドメイン、および標的遺伝子の間で 2 つ以上の共局在複合体が形成され、

前記転写調節因子タンパク質またはドメインが、少なくとも 2 つの標的遺伝子の発現を調節する、方法。

【請求項 157】

前記第 1 の組成物の前記 c e D N A ベクターが、請求項 1 ～ 69 のいずれかに記載の c e D N A ベクターであり、前記第 2 の組成物の前記 c e D N A ベクターが、請求項 1 ～ 69 のいずれかに記載の c e D N A ベクターであり、前記第 3 の組成物が、請求項 1 ～ 69 のいずれかに記載の c e D N A ベクターである、請求項 156 に記載の方法。

50

【請求項 158】

核酸配列をゲノムセーフハーバー遺伝子に挿入するための方法であって、細胞を (i) 遺伝子編集系、および (ii) ゲノムセーフハーバー遺伝子に対する相同性を有し、関心対象のタンパク質をコードする核酸配列を含む相同性指向修復テンプレートと接触させることを含み、

前記遺伝子編集系の 1 つ以上の構成成分が、前記細胞を非ウイルス性カプシド不含閉端 DNA (ceDNA) ベクター組成物と接触させることによって前記細胞に送達され、前記 ceDNA 核酸ベクター組成物が、隣接する逆位末端反復 (ITR) 間に少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列を含み、少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、少なくとも 1 つの遺伝子編集分子をコードし、

前記方法が、関心対象のタンパク質をコードする前記核酸配列を前記ゲノムセーフハーバー遺伝子に挿入するのに十分な条件下、かつそのために十分な時間にわたって実施される、方法。

【請求項 159】

前記 ceDNA ベクターが、請求項 1～69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターである、請求項 158 に記載の方法。

【請求項 160】

前記ゲノムセーフハーバー遺伝子が、高発現レベルでタンパク質を発現することが知られている少なくとも 1 つのコード配列に近い活性イントロンを含む、請求項 158 に記載の方法。

【請求項 161】

前記ゲノムセーフハーバー遺伝子が、アルブミン遺伝子、CCR5 遺伝子、AAVS1 遺伝子座のうちのいずれか 1 つの中または近くの部位を含む、請求項 158 に記載の方法。

【請求項 162】

前記関心対象のタンパク質が、受容体、毒素、ホルモン、酵素、または細胞表面タンパク質である、請求項 158～161 のいずれかに記載の方法。

【請求項 163】

前記関心対象のタンパク質が、分泌タンパク質である、請求項 162 に記載の方法。

【請求項 164】

前記関心対象のタンパク質が、第 VII 因子 (FVII) または第 IX 因子 (FIX) を含む、請求項 163 に記載の方法。

【請求項 165】

前記方法が、血友病 A または血友病 B の治療のためにインビボで実施される、請求項 164 に記載の方法。

【請求項 166】

宿主細胞内の染色体上の所定の挿入部位にドナー配列を挿入する方法であって、前記宿主細胞に請求項 1～69 に記載の ceDNA ベクターを導入することを含み、前記ドナー配列が、相同組み換えによって前記挿入部位において、または隣接して前記染色体に挿入される、方法。

【請求項 167】

動物の染色体上の所定の挿入部位に挿入されたドナー配列を含む遺伝子操作された動物を生成する方法であって、a) 請求項 167 に記載の染色体上の前記所定の挿入部位に挿入された前記ドナー配列を有する細胞を生成することと、b) a) によって生成された前記細胞を担体動物に導入して、前記遺伝子操作された動物を産生する、方法。

【請求項 168】

前記細胞が、接合体または多能性幹細胞である、請求項 167 に記載の方法。

【請求項 169】

請求項 168 に記載の方法によって生成された遺伝子操作された動物。

【請求項 170】

前記動物が、非ヒト動物である、請求項 169 に記載の遺伝子操作された動物。

【請求項 171】

細胞内の染色体上の挿入部位にドナー配列を挿入するためのキットであって、

a)

2 つの AAV 逆位末端反復 (ITR)、ならびに

5' 相溶性アーム、ドナー配列、および 3' 相溶性アームを含む第 1 のヌクレオチド配列であって、前記ドナー配列が、遺伝子編集機能を有する、第 1 のヌクレオチド配列、を含む、第 1 の非ウイルス性カプシド不含閉端 DNA (ceDNA) ベクターと、

(b)

少なくとも 1 つの AAV ITR、および

少なくとも 1 つの遺伝子編集分子をコードするヌクレオチド配列、を含む、第 2 の ceDNA ベクターと、を含み、

前記第 1 の ceDNA ベクターでは、前記 5' 相溶性アームが、前記染色体上の遺伝子編集分子の切断部位の上流の配列と相同であり、前記 3' 相溶性アームが、前記染色体上の前記遺伝子編集分子切断部位の下流の配列と相同であり、前記 5' 相溶性アームまたは前記 3' 相溶性アームが、前記 ITR の近位にある、キット。

【請求項 172】

前記遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼである、請求項 171 に記載の方法。

【請求項 173】

前記ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、請求項 172 に記載の方法。

【請求項 174】

前記第 1 の ceDNA ベクターが、請求項 1、40～56、57～69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターである、請求項 171～173 のいずれかに記載の方法。

【請求項 175】

前記第 2 の ceDNA ベクターが、請求項 1～39 または請求項 57～69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターである、請求項 171～173 のいずれかに記載の方法。

【請求項 176】

宿主細胞の染色体上の所定の挿入部位にドナー配列を挿入する方法であって、

a) 少なくとも 1 つの逆位末端反復 (ITR) を有する第 1 の非ウイルス性カプシド不含閉端 DNA (ceDNA) ベクターを前記宿主細胞に導入することであって、前記 ceDNA ベクターが、5' 相溶性アーム、ドナー配列、および 3' 相溶性アームを含む第 1 の直鎖状核酸を含む、導入することと、

b) 隣接する逆位末端反復 (ITR) の間に少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列を含む第 2 の ceDNA ベクターを前記宿主細胞に導入することであって、少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、前記挿入部位において、または隣接して前記染色体を切断する少なくとも 1 つの遺伝子編集分子をコードし、前記ドナー配列が、相同組み換えによって前記挿入部位において、または隣接して前記染色体に挿入される、導入することと、を含む、方法。

【請求項 177】

前記遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼである、請求項 176 に記載の方法。

【請求項 178】

前記ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 179】

前記第 1 の ceDNA ベクターが、請求項 1、40～56、57～69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターである、請求項 176～178 のいずれかに記載の方法。

【請求項 180】

前記第 2 の ceDNA ベクターが、請求項 1～39 または請求項 57～69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターである、請求項 176～179 のいずれかに記載の方法。

【請求項 181】

前記第 2 の ceDNA ベクターが、前記挿入部位を認識するガイド配列をコードする第

10

20

30

40

50

3 のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 179 または 180 に記載の方法。

【請求項 182】

請求項 1～69 のいずれかに記載の c e D N A ベクターを含む、細胞。

【請求項 183】

請求項 1～69 のいずれかに記載のベクターおよび脂質を含む、組成物。

【請求項 184】

前記脂質が、脂質ナノ粒子 (L N P) である、請求項 184 に記載の組成物。

【請求項 185】

請求項 183 もしくは 184 に記載の組成物、または請求項 182 に記載の細胞を含む、キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) の下、2017 年 12 月 6 日に提出された米国仮特許出願第 62/595,328 号および 2017 年 12 月 18 日に提出された仮特許出願第 62/607,069 号の利益を主張し、各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2018 年 12 月 6 日に作成された前述の A S C I I コピーは、080170-090470 W O P T _ S L . t x t という名前が付けられ、サイズは 198,924 バイトである。

【0003】

本発明は、遺伝子編集機能を有する単離されたポリヌクレオチドを含む、遺伝子療法の分野に関する。本開示はまた、ポリヌクレオチドを含む核酸構築物、プロモーター、ベクター、および宿主細胞、ならびに外因性 D N A 配列を標的細胞、組織、器官、または生物に送達する方法に関する。例えば、本開示は、遺伝子編集非ウイルス性 D N A ベクターを提供する。

30

【背景技術】

【0004】

遺伝子療法は、遺伝子発現プロファイルにおける異常によって引き起こされる遺伝子突然変異または後天性疾患のいずれかを罹患している患者の臨床転帰を改善することを目的とする。遺伝子療法は、欠陥遺伝子、または障害、疾患、悪性腫瘍等をもたらし得る異常調節もしくは発現、例えば過小発現もしくは過剰発現から生じる医学的状態の治療または予防を含む。例えば、欠陥遺伝子によって引き起こされる疾患または障害は、患者の体内で遺伝物質の治療的発現をもたらす、患者への訂正遺伝物質の送達によって治療、予防、または改善され得る。欠陥遺伝子によって引き起こされる疾患または障害は、欠陥遺伝子を変更またはサイレンシングすること、例えば、欠陥遺伝子の全部もしくは一部を除去すること、および／または欠陥遺伝子の特定の部分を患者に対する訂正遺伝物質で編集して、患者の体内で遺伝物質の治療的発現をもたらすことによって治療、予防、または改善され得る。

40

【0005】

遺伝子療法の基礎は、転写カセットに活性遺伝子産物（導入遺伝子と称される場合がある）を供給することであり、例えば、正の機能獲得効果、負の機能喪失効果、または例えば腫瘍溶解効果などの別の結果をもたらし得る。遺伝子療法を使用して、他の要因によって引き起こされる疾患または悪性腫瘍を治療することもできる。ヒト単一遺伝子障害は、

50

標的細胞への正常遺伝子の送達および発現によって治療され得る。患者の標的細胞中の補正遺伝子の送達および発現は、操作されたウイルスおよびウイルス遺伝子送達ベクターの使用を含む、多くの方法を介して実行され得る。使用可能な多くのウイルス由来ベクター（例えば、組み換えレトロウイルス、組み換えレンチウイルス、組み換えアデノウイルス等）の中で、組み換えアデノ関連ウイルス（rAAV）は、遺伝子療法において多用途ベクターとして人気を集めている。

【0006】

アデノ関連ウイルス（AAV）は、パルボウイルス科に属し、より具体的にはディペンドパルボウイルス属を構成する。AAVゲノムは、およそ4.7キロベース（kb）を含み、非構造的Rep（複製）および構造的Cap（カプシド）タンパク質をコードする2つの主要なオープンリーディングフレーム（ORF）からなる直鎖状一本鎖DNA分子で構成されている。アセンブリー活性化タンパク質（AAP）をコードするキャップ遺伝子内の第2のORFが特定された。AAVコード領域に隣接するDNAは、およそ145ヌクレオチド長の2つのシス作用性逆位末端反復（ITR）配列であり、DNA複製のプライマーとして機能するエネルギー的に安定したヘアピン構造に折り畳まれ得る中断パリンδροーム配列を有する。DNA複製におけるそれらの役割に加えて、ITR配列は、細胞ゲノム中のウイルスDNA組み込み、宿主ゲノムまたはプラスミドからのレスキュー、および成熟ビリオン中のウイルス核酸のカプシド化に関与することが示された（Muzyczka, (1992) Curr. Top. Micro. Immunol. 158:97-129）。

【0007】

AAV由来のベクター（すなわち、組み換えAAV（rAAV）またはAAVベクター）は、（i）それらが筋細胞およびニューロンを含む多種多様な非分裂および分裂細胞型に感染する（形質導入する）ことができるため、（ii）それらがウイルス構造遺伝子を欠いていることによって、ウイルス感染に対する宿主細胞反応、例えばインターフェロン媒介性反応を減少させるため、（iii）野生型ウイルスが、ヒトにおいて非病理的であるとみなされるため、（iv）宿主細胞ゲノム中に組み込むことができる野生型AAVと対照的に、複製欠損AAVベクターは、rep遺伝子を欠き、一般にエピソームとして持続し、したがって挿入変異または遺伝毒性の危険性を制限するため、ならびに（v）他のベクター系と比較して、AAVベクターは、一般に比較的不良な免疫原であるとみなされるため、著しい免疫反応を誘起せず（iiを参照）、したがって治療導入遺伝子のベクターDNAおよび潜在的に長期発現の持続を得るため、遺伝物質を送達するために魅力的である。AAVベクターはまた、高力価で産生および製剤化され、動脈内、静脈内、または腹腔内注入を介して送達され得、齧歯類（Goyenvallée et al., 2004、Fougerousse et al., 2007、Koppanati et al., 2010、Wang et al., 2009）およびイヌにおける単回注入による重要な筋領域へのベクター分布および遺伝子導入を可能にする。脊髄性筋萎縮症1型を治療するための臨床研究では、AAVベクターを、脳を標的とし、明らかな臨床改善をもたらすことを意図して、全身的に送達した。

【0008】

しかしながら、AAV粒子を遺伝子送達ベクターとして使用することには、いくつかの重大な欠陥が存在する。rAAVに関連する1つの重大な欠点は、約4.5kbの異種DNAの制限されたウイルスパッケージング能力である（Dong et al., 1996、Athanasopoulos et al., 2004、Lai et al., 2010）。結果として、AAVベクターの使用は、150,000Da未満のタンパク質コード能力に制限されている。第2の欠点は、集団における野生型AAV感染の流行の結果として、rAAV遺伝子療法の候補を、患者からベクターを排除する中和抗体の存在についてスクリーニングする必要があることである。第3の欠点は、初回治療から排除されなかった患者への再投与を予防するカプシド免疫原性に関する。患者における免疫系は、「ブースター」ショットとして有効に作用するベクターに反応して、将来の治療を妨げ

る高力価抗 A A V 抗体を生成する免疫系を刺激し得る。いくつかの最近の報告は、高用量状況における免疫原性との関係を示している。一本鎖 A A V D N A が異種遺伝子発現前に二本鎖 D N A に変換されなければならないことを考えると、別の顕著な欠点は、A A V 媒介性遺伝子発現の始まりが比較的遅いことである。二本鎖 D N A ベクターを構築することによって、この問題を回避することが試みられているが、この戦略は、A A V ベクターに組み込まれ得る導入遺伝子発現カセットのサイズをさらに制限する (M c C a r t y , 2 0 0 8、V a r e n i k a e t a l . , 2 0 0 9、F o u s t e t a l . , 2 0 0 9)。

【0009】

追加として、カプシドを有する従来の A A V ビリオンは、A A V ゲノム、r e p 遺伝子、および c a p 遺伝子を含む 1 つまたは複数のプラスミドを導入することによって産生される (G r i m m e t a l . , 1 9 9 8)。トランスにおけるこれらのヘルパープラスミドの導入時に、A A V ゲノムは、宿主ゲノムから「レスキュー」され (すなわち、放出された後に増幅され)、さらにカプシド化されて (ウイルスカプシド)、生物学的に活性な A A V ベクターを産生する。しかしながらそのようなカプシド化 A A V ウイルスベクターは、ある特定の細胞および組織型を非効率的に形質導入することがわかった。カプシドはまた、免疫反応を誘導する。

【0010】

したがって、遺伝子療法のためのアデノ関連ウイルス (A A V) ベクターの使用は、(患者免疫反応に起因する) 患者への単回投与、関連 A A V カプシドの最小ウイルスパッケージング能力 (約 4 . 5 k b) に起因する A A V ベクター中の送達に好適な導入遺伝子遺伝物質の制限された範囲、ならびに遅い A A V 媒介性遺伝子発現に起因して制限される。r A A V 臨床遺伝子療法のための適用は、同系マウスモデルにおける、または他のモデル種における用量反応によって予測されない患者間の変動性によってさらに妨げられる。

【0011】

A A V を利用してドナーテンプレートを送達するものなどの現在の遺伝子編集アプローチには問題があり、いくつかの制限がある。第 1 に、ドナーテンプレートのサイズ、および例えば、相同性指向修復 (H D R) を誘導するための相同性アームは、A A V 粒子内のパッケージング要件によって制約される。第 2 に、A A V 投与によって誘導された免疫原性は、再投与を妨げるため、遺伝子編集プロセスは 1 回しか実行することができない。最後に、A A V に対するベースライン免疫により、かなりの割合の患者が潜在的な遺伝子編集療法を受けることができなくなる。本発明者らは、ヌクレアーゼ (複数可)、プロモーター (複数可) ガイド R N A (C a s 9 がヌクレアーゼである場合)、「訂正された遺伝子」ドナーテンプレート (複数可) (例えば、相同性指向組み換え (H D R) 修復テンプレート)、および相同性領域の別個の送達などの様々な構成成分に関連する現在の遺伝子編集アプローチの他の制限を観察した。構成成分を単一の送達粒子にパッケージ化することができず、複数の粒子を使用すると免疫原性の問題が発生する可能性があるため、現在の構成成分の現送達にも問題がある。遺伝子編集では、すべての構成成分が編集対象の単一細胞内に存在する必要があるため、送達された構成成分のすべてを取得できない細胞が多いことにより、遺伝子編集の効率は低くなる。

組み換えカプシド不含 A A V ベクターは、発現可能な導入遺伝子、ならびに R e p 結合部位および末端分解部位を含む 2 つの野生型 A A V 逆位末端反復配列 (I T R) によって隣接されるプロモーター領域を含む、単離された直鎖状核酸分子として取得され得る。これらの組み換え A A V ベクターは、A A V カプシドタンパク質をコードする配列を欠いており、2 つの野生型 I T R パリンドローム配列を通して共有結合された一方または両方の末端を有する一本鎖、二本鎖、または二重鎖であり得る (例えば、W O 2 0 1 2 / 1 2 3 4 3 0、米国特許第 9, 5 9 8, 7 0 3 号)。それらは、導入遺伝子能力がはるかに高く、導入遺伝子発現の始まりが速く、患者の免疫系が D N A 分子を一掃されるべきウイルスとして認識するという点で、A A V 媒介性遺伝子療法の多くを回避する。しかしながら、導入遺伝子の定常発現は、すべての例において望ましくない場合があり、A A V 正準野生

10

20

30

40

50

型 I T R は、c e D N A 機能のために最適化されない場合がある。

新しい標的配列ごとに新しいタンパク質の設計を必要としない方法で、ヌクレアーゼ活性（または他のタンパク質活性）を標的 D N A 内の異なる位置に正確に標的化できるようにする技術が、当該分野で必要である。さらに、最小のオフターゲット効果で遺伝子発現を制御する方法が当該技術分野で必要であり、産生および／または発現特性が改善された制御可能な組み換え D N A ベクターの重要な満たされていないニーズが残っている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際公開第2012/123430号

【特許文献2】米国特許第9,598,703号明細書

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】M u z y c z k a, (1992) C u r r. T o p. M i c r o. I m m u n o l. 158:97-129

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

本明細書に記載される発明は、遺伝子編集のための共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含 D N A ベクターである（本明細書では「閉端 D N A ベクター」または「c e D N A ベクター」と称される）。本明細書に記載される c e D N A ベクターは、共有結合性閉端（直鎖状、連続、および非カプシド化構造）を有する相補的 D N A の連続鎖から形成されるカプシド不含直鎖状二重鎖 D N A 分子であり、5' 逆位末端反復（I T R）配列および 3' I T R 配列を含み、5' I T R および 3' I T R は、互いに対して同じ対称の 3 次元構成（すなわち、対称もしくは実質的に対称）を有し得るか、または代替として 5' I T R および 3' I T R は、互いに対して異なる 3 次元構成（すなわち、非対称 I T R）を有し得る。さらに、I T R は、同じまたは異なる血清型に由来し得る。いくつかの実施形態では、遺伝子編集のための c e D N A ベクターは、それらの構造が幾何学的空間で同じ形状であるか、または 3 D 空間で同じ A、C - C' および B - B' ループを有するように、対称の 3 次元空間構成を有する I T R 配列を含み得る（すなわち、それらは同じであるか、または互いに対して鏡像である）。そのような実施形態では、対称の I T R 対、または実質的に対称の I T R 対は、両方が同じ方法で修飾型 I T R（例えば、m o d - I T R）であり得、両方が野生型 I T R である必要はない。m o d - I T R 対は、野生型 I T R からの 1 つ以上の修飾を有し、互いに逆相補（逆位）である同じ配列を有し得る。代替実施形態では、修飾型 I T R 対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型 I T R 対は、異なる配列を有し得るが、対応するまたは同じ対称の 3 次元形状を有し得る。いくつかの実施形態では、一方の I T R は、1 つの A A V 血清型に由来し得、他方の I T R は、異なる A A V 血清型に由来し得る。

【0015】

したがって、本明細書に記載される技術のいくつかの態様は、(i) 少なくとも 1 つの W T I T R および少なくとも 1 つの修飾された A A V 逆位末端反復（I T R）（例えば、非対称の修飾型 I T R）、(i i) m o d - I T R 対が互いに対して異なる 3 次元空間構成を有する、2 つの修飾型 I T R（例えば、非対称の修飾型 I T R）、または (i i i) 各 W T - I T R が同じ 3 次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称の W T - W T I T R 対、または (i v) 各 m o d - I T R が同じ 3 次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称の修飾型 I T R 対のうちのいずれかから選択される I T R 配列を含む、遺伝子編集のための c e D N A ベクターに関する。本明細書に開示される c e D N A ベクターは、真核細胞中で産生され得、したがって昆虫細胞中の原核 D N A 修飾および細菌内毒素汚染を欠き得る。

【0016】

より具体的には、本発明の実施形態は、宿主細胞において遺伝子編集分子である導入遺伝子を発現し（例えば、導入遺伝子は、ZFN、TALEN、Casなどのヌクレアーゼ；1つ以上のガイドRNA；CRISPR；リボ核タンパク質（RNP）；またはそれらの任意の組み合わせである）、効率的なゲノム編集をもたらすことができる遺伝子編集ceDNAベクターを含む方法および組成物に基づく。本明細書に記載されるceDNAベクターは、サイズに制限されないため、例えば、単一のベクター（例えば、CRISPR/Cas遺伝子編集系（例えば、Cas9もしくは修飾型Cas9酵素、ガイドRNA、および／または相同性指向修復テンプレート）、あるいはTALENまたはジンクフィンガー系に必須のすべての構成成分の発現を許可する。しかしながら、そのような構成成分のうちの1つまたは2つが、単一のceDNAベクター上でコードされる一方で、残りの構成成分（複数可）は、別個のceDNAベクターまたは従来のプラスミド上で発現され得る。

【0017】

本明細書に記載される技術は、導入遺伝子または異種核酸に隣接する2つのAAV逆位末端反復配列（ITR）を含むceDNAベクターに関し、異種核酸は、遺伝子編集核酸配列である。本明細書で提供されるすべての態様では、遺伝子編集核酸配列は、配列特異的ヌクレアーゼ、1つ以上のガイドRNA、CRISPR/Cas、リボ核タンパク質（RNP）、またはCRISPRiもしくはCRISPRa系のための非活性化CAS、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される遺伝子編集分子をコードする。

【0018】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、（1）シス調節エレメント、プロモーター、および少なくとも1つの導入遺伝子（例えば、遺伝子編集分子）を含む発現カセット；（2）少なくとも1つの導入遺伝子（例えば、遺伝子編集分子）に操作可能に連結されたプロモーター；ならびに（3）当該発現カセットに隣接する2つの自己相補的配列、例えば、本明細書で定義される非対称または対称または実質的に対称のITRを含み、ceDNAベクターは、カプシドタンパク質と関連していない。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、AAVゲノム中に見出される2つの自己相補的配列を含み、少なくとも1つのITRは、操作的Rep結合エレメント（RBE）（本明細書では「RBS」と称される場合もある）およびAAVの末端分解部位（trs）またはRBEの機能性異形、および導入遺伝子に操作可能に連結された1つ以上のシス調節エレメントを含む。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、導入遺伝子（例えば、遺伝子編集分子）の発現を調節するための追加の構成成分、例えば、本明細書において「調節スイッチ」と題するセクションに記載されている、導入遺伝子の発現を制御および調節するための調節スイッチを含み、例えば、ceDNAベクターを含む細胞の制御された細胞死を可能にするキルスイッチである調節スイッチを含み得る。

【0019】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子編集のためのceDNAベクターを、所望の核酸配列のノックインに使用することができる。特に、本明細書に記載される方法および組成物を使用して、新しい核酸配列を導入する、ゲノム配列の突然変異を訂正する、または宿主細胞の標的遺伝子配列に突然変異を導入することができる。そのような方法は、「DNAノックイン系」と呼ぶことができる。

【0020】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される遺伝子編集ceDNAベクターは、例えば、標的遺伝子に対する標的化の特異性を高めるために、相同性アームを含む。相同性指向修復（HDR）は、相同組み換えのプロセスであり、DNAテンプレートを使用して、関心対象のドナー配列の挿入の二本鎖切断（DSB）の正確な修復に必要な相同性を提供する。例えば、非限定的な一例では、遺伝子編集のためのceDNAベクターは、特定の遺伝子または標的統合部位に対する5'および3'相同性アームを含み得る。いくつかの実施形態では、特定の制限部位は、5'相同性アームに対する5'、3'相同性アームに対する3'、または両方で操作することができる。ceDNAベクターが、操作された

制限部位（複数可）に特異的な1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで切断されると、結果として得られるカセットは、5'相同性アームドナー配列-3'相同性アームを含み、所望のゲノム遺伝子座とより容易に組み換えられ得る。いくつかの実施形態では、標的とされ、3'相同性アームの5'末端が相同である場所の5'およびその近く、ならびに／または5'相同性アームの3'末端が相同である場所の3'およびその近くに位置するゲノムDNA配列において、sgRNA標的配列がある（例えば、図17および18Aを参照）。この切断されたカセットは、限定されないが、以下：調節領域、ヌクレアーゼ、および追加のドナー配列のうちの1つ以上などの他のエレメントをさらに含むことが当業者によって理解されるであろう。ある特定の態様では、ceDNAベクター自体が、制限エンドヌクレアーゼをコードすることができ、それによりceDNAベクターが核に送達されると、制限エンドヌクレアーゼが発現され、ベクターを切断することができる。ある特定の態様では、制限エンドヌクレアーゼは、別個に送達される第2のceDNAベクター上でコードされる。ある特定の態様では、制限エンドヌクレアーゼは、非ceDNAベースの送達手段によって核に導入される。ある特定の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼは、ceDNAベクターが核に送達された後に導入される。ある特定の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼおよびceDNAベクターは、同時に核に輸送される。ある特定の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼは、ceDNAベクターの導入時に既に存在している。

10

【0021】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術は、複数の遺伝子編集ceDNAが対象に送達されるのを可能にする。本明細書で論じられるように、一実施形態では、ceDNAは、特定の標的遺伝子または遺伝子座を標的とするドナー配列に隣接する相同性アームを有することができ、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるゲノムDNAの切断を標的とするための1つ以上のガイドRNA（例えば、sgRNA）も含むことができ、別のceDNAは、実際の遺伝子編集ステップについて本明細書に記載されるように、ヌクレアーゼ酵素およびアクチベーターRNAを含むことができる。

20

【0022】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、配列特異的ヌクレアーゼは、TALヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、メガヌクレアーゼ、megaTAL、またはRNA誘導型エンドヌクレアーゼ（例えば、CAS9、cpf1、dCAS9、nCAS9）を含む。

30

【0023】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、遺伝子編集核酸配列は、相同性指向修復テンプレートである。

【0024】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、相同性指向修復テンプレートは、5'相同性アーム、ドナー配列、および3'相同性アームを含む。

【0025】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、組成物は、エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列をさらに含み、エンドヌクレアーゼは、標的遺伝子のDNA上の特定のエンドヌクレアーゼ部位またはceDNAベクター上の標的部位で切断またはニックングする。

40

【0026】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、5'相同性アームは、染色体上のDNAエンドヌクレアーゼ切断またはニックング部位の上流のヌクレオチド配列と相同である。

【0027】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、3'相同性アームは、DNAエンドヌクレアーゼ切断またはニックング部位の下流のヌクレオチド

50

配列と相同である。

【0028】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、相同性アームは各々、約250～2000bpである。

【0029】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、DNAエンドヌクレアーゼは、TALヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、またはRNA誘導型エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9またはCpf1）を含む。

【0030】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、Cas酵素を含む。 10

【0031】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、Cas酵素は、Cas9である。

【0032】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、Cas酵素は、ニックングCas9（nCas9）である。

【0033】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、nCas9は、CasのHNHまたはRuvCドメイン（例えば、D10A）に突然変異を含む。 20

【0034】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、Cas酵素は、標的遺伝子のプロモーター領域を標的とするgRNAと複合体を形成する非活性化Casヌクレアーゼ（dCas）である。

【0035】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、組成物は、KRABエフェクタードメインをさらに含む。

【0036】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、dCasは、プロモーター領域に向けることができる異種転写活性化ドメインに融合される。 30

【0037】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、dCas融合は、標的遺伝子の発現を上方調節する追加のトランス活性化ドメインを動員するガイドRNAによって標的遺伝子のプロモーター領域に向けられる。

【0038】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、dCasは、S. pyogenes dCas9である。

【0039】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ガイドRNA配列は、標的遺伝子のプロモーターの近接を標的とし、CRISPRは、標的遺伝子をサイレンシングする（CRISPRi系）。本明細書で使用される場合、「標的遺伝子のプロモーターの近接」という語句は、物理的に標的遺伝子のプロモーター配列上の、隣接する、または近くの領域を指し、触媒的に不活性なDNAエンドヌクレアーゼは、標的遺伝子の発現を阻害するように機能することができる。いくつかの実施形態では、「プロモーターへの近接」は、プロモーター配列自体内、プロモーター配列（いずれかの末端）に直接隣接する、またはプロモーター配列の終端から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド以上の配列を指す。 40

【0040】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ガイドR 50

N A 配列は、標的遺伝子の転写開始部位を標的とし、標的遺伝子を活性化または調節する (C R I S P R a 系)。本明細書で使用される場合、「標的遺伝子の転写開始部位」という用語は、物理的に標的遺伝子の転写開始配列 (「A T G」、開始メチオニン) 上の、隣接する、または近くの領域を指し、触媒的に不活性な D N A エンドヌクレアーゼは、R N A ポリメラーゼなどの転写機構を動員して、標的遺伝子の発現を、例えば少なくとも 1 0 % 増加させるように機能し得る。いくつかの実施形態では、ガイド R N A は、「A T G」転写開始部位を含む配列を含み得る。他の実施形態では、ガイド R N A は、転写開始部位のすぐ上流の配列を含み得る。追加の実施形態では、ガイド R N A は、距離がそれほど大きくないため、動員された翻訳機序が標的遺伝子の発現を強化するように機能しないことを条件として、転写開始部位の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0 ヌクレオチド以上上流の配列を含むことができる。

10

【0041】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ガイド R N A 配列は、標的遺伝子のプロモーターの近接を標的とし、標的遺伝子 (C R I S P R a 系) を活性化または調節して、例えば、標的遺伝子の発現を増加させる。

【0042】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、組成物は、R N A 誘導型 D N A エンドヌクレアーゼのための少なくとも 1 つのガイド R N A (g R N A) をコードする核酸をさらに含む。

20

【0043】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ガイド R N A (g R N A) は、欠陥遺伝子のスプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的として、非相同末端結合 (N H E J) および機能性タンパク質の発現のための欠陥遺伝子の訂正を行う。本明細書で使用される「スプライスアクセプター」という用語は、エクソンと接合するイントロンの 3' 末端の核酸配列を指す。スプライスアクセプターのコンセンサス配列には、N T N (T C) (T C) (T C) T T T (T C) (T C) (T C) (T C) (T C) N C A G g (配列番号 5 5 8) が含まれるが、これに限定されない。イントロン配列は大文字で、エクソン配列は小文字フォントで表される。本明細書で使用される「スプライスドナー」という用語は、エクソンと接合するイントロンの 5' 末端の核酸配列を指す。スプライスドナー配列のコンセンサス配列には、n a g g t (a g) a G T (配列番号 5 5 9) が含まれるが、これに限定されない。イントロン配列は大文字で、エクソン配列は小文字フォントで表される。これらの配列は、ウイルスから霊長類のゲノムに保存されているものを表す。

30

【0044】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ベクターは、1 つのガイド R N A 配列の複数のコピーをコードする。

【0045】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、組成物は、遺伝子編集配列をコードする核酸配列に操作可能に連結された調節配列をさらに含む。

40

【0046】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、調節配列は、エンハンサーおよび／またはプロモーターを含む。ある特定の実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。

【0047】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、プロモーターは、D N A エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列に操作可能に連結され、D N A エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列は、エンドヌクレアーゼ配列の上流にイントロン配列をさらに含み、イントロンは、ヌクレアーゼ切断部位を含む。

【0048】

50

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ポリ A 部位は、上流であり、5' 相同性アームに近接している。

【0049】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ドナー配列は、5' 相同性アームまたは 3' 相同性アームに対して外来である。

【0050】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、5' 相同性アームまたは 3' 相同性アームは、本明細書で定義される少なくとも 1 つの ITR の近位にある。

【0051】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、cDNA である。

【0052】

別の実施形態では、編集は、DNA ではなく RNA に向けられる。例えば、Prevotella spp. 細菌からの Cas13 などの Cas13 を使用する。この酵素は、RNA を訂正する別の分子と組み合わせられる。例えば、ADAR2 タンパク質は、個々の RNA をアデノシンからイノシンに変更する。例えば、Science, Cox, D. B. T. et al. 25 Oct 2017 "RNA editing with CRISPR-Cas13 を参照されたい。本明細書に記載される遺伝子編集系をコードする ceDNA ベクター（複数可）を使用する RNA 編集および／または追跡は、当該技術分野、例えば、Abudayyeh et al. Science 353:1-9 (2016)、O'Connell et al. Nature 516:263-266 (2014)、Nelles et al. Cell 165:488-496 (2016)（各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）において既知の方法で実施することができる。

【0053】

本明細書で提供される別の態様は、細胞を遺伝子編集系と接触させることを含むゲノム編集のための方法に関し、遺伝子編集系の 1 つ以上の構成成分は、細胞を本明細書に開示されるような ceDNA ベクターを含む組成物と接触させることによって細胞に送達され、ceDNA 核酸ベクター組成物は、隣接する逆位末端反復 (ITR) 配列 (ITR 配列が、本明細書で定義されるように互いに対して非対称、対称、または実質的に対称である)、および少なくとも 1 つの遺伝子編集核酸配列を含む。

【0054】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、遺伝子編集系は、TALEN 系、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ (ZFN) 系、CRISPR/CAS 系、CRISPRi 系、CRISPRa 系、およびメガヌクレアーゼ系からなる群から選択される。

【0055】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子編集核酸配列は、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、ガイド RNA、ガイド DNA、ZFN、TALEN、Cas、CRISPR/Cas 分子もしくはそのオルソログ、リボ核タンパク質 (RNP)、または CRISPRi もしくは CRISPRa 系のための非活性化 CAS からなる群から選択される遺伝子編集分子をコードする。

【0056】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、単一の ceDNA ベクターは、遺伝子編集系のすべての構成成分を含む。

【0057】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、Cas タンパク質は、真核細胞での発現のためにコドン最適化される。

【0058】

また別の態様では、標的遺伝子を編集するのに適した条件下、かつそのために十分な時間にわたって、本明細書に記載される有効量の c e D N A 組成物を細胞に投与することを含むゲノム編集の方法が本明細書で提供される。

【0059】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、標的遺伝子は、1つ以上のガイドRNA配列を使用して標的化され、相同性指向修復（HDR）ドナーテンプレートの存在下ではHDRによって編集される。

【0060】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、標的遺伝子は、1つのガイドRNA配列を使用して標的化され、標的遺伝子は、非相同末端結合（NHEJ）によって編集される。一実施形態では、ガイドRNAは、スプライスドナーまたはアクセプターを標的化して、エクソンスキッピングおよび機能性タンパク質、例えばジストロフィンタンパク質の発現を促進する。

【0061】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、この方法をインビボで実施して、疾患に関連する一塩基多型（SNP）、または欠失もしくは挿入を訂正する。

【0062】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用する遺伝子編集に適した疾患は、本明細書における「遺伝子編集 c e D N A で治療される例示的な疾患」および「遺伝子編集のための追加の疾患」と題するセクションで論じられる。治療される例示的な疾患は、例えば、限定されないが、デュシェン型筋ジストロフィー（DMD 遺伝子）、トランスサイレチンアミロイドーシス（ATTR）（正しい mutant TR 遺伝子）、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症（OTC 欠損症）、血友病、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、遺伝性ヘモクロマトーシス、癌、または遺伝性失明であり、訂正される遺伝子には、エリスロポエチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD1）、グロビン、レプチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、サイトカイン、嚢胞性線維症膜コンダクタンス調節因子（CFTR）、またはペプチド成長因子等が含まれるが、これらに限定されない。

【0063】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、少なくとも2つの異なる Cas タンパク質が、c e D N A ベクターに存在し、Cas タンパク質のうちの1つが、触媒的に不活性（Cas-i）であり、Cas-i に関連するガイドRNAが、標的細胞のプロモーターを標的とし、Cas-i をコードするDNAが、誘導性プロモーターの制御下にあるため、所望の時点で標的遺伝子の発現を止めることができる。本明細書で使用される場合、「触媒的に不活性」という用語は、活性状態から不活性状態に変化し、それによりその活性を妨げる触媒部位を有する分子（例えば、酵素またはキナーゼ）を指す。分子は、例えば、変性、阻害結合、触媒部位への突然変異、または二次プロセッシング（例えば、リン酸化もしくは他の翻訳後修飾）により、触媒的に不活性にされ得る。例えば、触媒的に不活性または非活性化された Cas9（dCas9）は、エンドヌクレアーゼ活性を持たず、例えば、Cas9 をコードする遺伝子の2つの触媒残基 D10A および H840A に点突然変異を導入することによって生成され得る。一実施形態では、分子の触媒的に不活性な状態は、その触媒的に活性な状態と比較して0.1%未満の触媒活性を有する分子を指し、標準的な実験室方法によって識別可能な任意の活性を有する分子をさらに包含する。

【0064】

また別の態様では、細胞の標的遺伝子内の単一ヌクレオチド塩基対を編集するための方法であって、細胞をCRISPR/Cas 遺伝子編集系と接触させることを含む方法が本明細書に提供され、CRISPR/Cas 遺伝子編集系の1つ以上の構成成分は、細胞を

閉端DNA (ceDNA) 核酸ベクター組成物と接触させることによって細胞に送達され、ceDNA 核酸ベクター組成物は、隣接する末端反復 (TR) 配列、および標的遺伝子または当該標的遺伝子の調節配列を標的とするための少なくとも1つの遺伝子編集核酸配列を含む直鎖状閉端二重鎖DNAであり、ベクターから発現されるCasタンパク質は、触媒的に不活性であり、塩基編集部分に融合され、当該方法は、標的遺伝子の発現を調整するのに十分な条件下、かつそのために十分な時間にわたって実施される。

【0065】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、塩基編集部分は、一本鎖特異的シチジンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤、またはtRNAアデノシンデアミナーゼを含む。

10

【0066】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ベクターから発現される触媒的に不活性なCasタンパク質は、dCas9である。

【0067】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、接触される細胞は、T細胞またはCD34⁺細胞である。

【0068】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、標的遺伝子は、プログラム死タンパク質 (PD1)、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA4)、または腫瘍壊死因子 α (TNF- α) をコードする。

20

【0069】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、本明細書に記載される方法によって産生された細胞 (例えば、T細胞またはCD34⁺細胞) を、それを必要とする対象に投与することをさらに含む。

【0070】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、治療を必要とする対象は、ウイルス感染、細菌感染、癌、または自己免疫疾患を有する。

【0071】

本明細書で提供される別の態様は、細胞内の2つ以上の標的遺伝子の発現を調整する方法に関し、(i) 隣接するITR配列 (このITR配列は、本明細書で定義されるように互いに対して非対称、対称、または実質的に対称である) および2つ以上の標的遺伝子に相補的な少なくとも2つのガイドRNAをコードする核酸配列を含むceDNAベクター (このベクターは、直鎖状閉端二重鎖DNAである) を含む組成物と、(ii) 隣接するITR配列 (このITR配列は、本明細書で定義されるように互いに対して非対称、対称、または実質的に対称である) および各々がガイドRNAに関連し、2つ以上の標的遺伝子に結合する少なくとも2つの触媒的に不活性なDNAエンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含むceDNAベクター (このベクターは、直鎖状閉端二重鎖DNAである) を含む第2の組成物と、(iii) 隣接するITR配列 (このITR配列は、本明細書で定義されるように互いに対して非対称、対称、または実質的に対称である) および少なくとも2つの転写調節因子タンパク質またはドメインをコードする核酸配列 (このベクターは、直鎖状閉端二重鎖DNAである) を含むceDNAベクターを含む第3の組成物とを細胞に導入することを含み、少なくとも2つのガイドRNA、少なくとも2つの触媒的に不活性なRNA誘導型エンドヌクレアーゼ、および少なくとも2つの転写調節因子タンパク質またはドメインは、細胞内で発現され、2つ以上の共局在複合体は、ガイドRNA、触媒的に不活性なRNA誘導型エンドヌクレアーゼ、転写調節因子タンパク質またはドメイン、および標的遺伝子の間で形成され、転写調節因子タンパク質またはドメインは、少なくとも2つの標的遺伝子の発現を調節する。

30

40

【0072】

一態様では、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含DNAベクターは、好ましくは直鎖状二重鎖分子であり、2つの逆位末端反復配列 (ITR) (例えば、AAV

50

I T R) の間に操作可能に位置付けられた異種核酸をコードするベクターポリヌクレオチドから取得可能であり、I T Rのうちの少なくとも1つは、末端分解部位および複製タンパク質結合部位(R P S) (時として複製的タンパク質結合部位と称される)、例えば、R e p結合部位を含む。5' I T Rおよび3' I T Rは、互いに対して対称または実質的に対称(5' および3' I T Rは、同じ3次元空間構成(すなわち、対称m o d-I T R対または対称もしくは実質的に対称のW T-I T R対)を有する)、あるいは5' I T Rおよび3' I T Rが互いに対して互いに対して異なる3次元構成(すなわち、非対称I T R)を有するように互いに対して非対称であり得る(例えば、W T-I T Rおよびm o d-I T Rまたはm o d-I T R対。これらの用語は本明細書で定義されたとおりである。

10

【0073】

いくつかの実施形態では、2つの自己相補的配列は、任意の既知のバルボウイルス、例えばA A V (例えば、A A V 1~A A V 1 2)などのディペンドウイルスからのI T R配列であり得る。ヘアピン二次構造形成を可能にする可変パリンドローム配列に加えて、5'-G C G C G C T C G C T C G C T C-3' (配列番号531)などのR e p結合部位(R B S)および末端分解部位(t r s)を保持する修飾型A A V 2 I T R配列を含むが、これらに限定されない任意のA A V血清型を使用することができる。いくつかの実施形態では、I T Rは、ヘアピン二次構造形成を可能にする可変パリンドローム配列に加えて、5'-G C G C G C T C G C T C G C T C-3' (配列番号531)などの機能性R e p結合部位(R B S)および末端分解部位(T R S)を保持する合成I T R配列である。

いくつかの実施例では、I T R配列は、R B S、t r sの配列、ならびに野生型A A V 2 I T Rの対応する配列からの1つのI T Rヘアピン二次構造の末端ループ部分を形成するR e p結合エレメントの構造および位置を保持する。

20

【0074】

いくつかの実施形態では、非対称I T R対を含むc e D N Aベクターは、本明細書の表4 Aもしくは4 Bのいずれか1つ以上、または参照によりその全体が本明細書に組み込まれるP C T出願P C T/U S 1 8/4 9 9 9 6の表2、3、4、5、6、7、8、9、および1 0 A~1 0 Bのうちの1つ以上に示されるI T R配列またはI T R部分配列の修飾のいずれかに対応するI T Rの修飾を有するI T Rを含み得る。例示的な例として、本開示は、非対称I T Rを含む遺伝子編集のための閉端D N Aベクターを提供し、c e D N Aベクターは、導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターを含み、c e D N Aはカプシドタンパク質を欠き、(a)そのヘアピン二次構成(好ましくは、これらの参照配列と比較して、この構成での任意のA A AもしくはT T T末端ループの欠失を除外する)において配列番号2と同数の分子内に二重化した塩基対を有する突然変異型右側A A V 2 I T Rまたは配列番号51と同数の分子内に二重化した塩基対を有する突然変異型左側A A V 2 I T Rをコードするc e D N A-プラスミド(例えば、実施例1~2および/もしくは図1 A~Bを参照)から産生され、(b)実施例1における未変性ゲルおよび変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるc e D N Aの同定のためのアッセイを使用して、c e D N Aとして同定される。非対称I T Rを含むc e D N Aベクターのそのような5' および3' 修飾型I T R配列の例は、本明細書の表4 Aもしくは4 B、または参照によりその全体が本明細書に組み込まれるP C T出願第P C T/U S 1 8/4 9 9 9 6号の表2、3、4、5、6、7、8、9、および1 0 A~1 0 Bのうちの1つ以上に提供されている。

30

40

【0075】

あるいは、いくつかの実施形態では、対称修飾型I T Rを含むc e D N Aベクターで使用するための例示的な修飾型I T R配列、すなわち、修飾型5' I T Rおよび修飾型3' I T Rを含むc e D N A (修飾型5' I T Rおよび修飾型3' I T Rは、互いに対して対称または実質的に対称である)は、I T Rの対(修飾型5' I T Rおよび対称修飾型3' I T R)を示す表5に示すとおりである。いくつかの実施形態では、対称I T R対は、表2に示されるW T-W T I T R対である。

50

【0076】

本明細書に記載される技術はさらに、遺伝子編集のための c e D N A ベクターに関し、c e D N A ベクターは、異種核酸発現カセットを含み、例えば、4 0 0 0 ヌクレオチド超、5 0 0 0 ヌクレオチド、1 0, 0 0 0 ヌクレオチド、もしくは 2 0, 0 0 0 ヌクレオチド、もしくは 3 0, 0 0 0 ヌクレオチド、もしくは 4 0, 0 0 0 ヌクレオチド、もしくは 5 0, 0 0 0 ヌクレオチド、または約 4 0 0 0 ~ 1 0, 0 0 0 ヌクレオチド、もしくは 1 0, 0 0 0 ~ 5 0, 0 0 0 ヌクレオチドの間の任意の範囲、または 5 0, 0 0 0 ヌクレオチド超を含み得る。c e D N A ベクターは、カプシド化 A A V ベクターのサイズ制限を有さず、したがって、大サイズの発現カセットの送達を導入遺伝子の効率的な発現をもたらすようにすることができる。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、原核細胞特異的メチル化を欠いている。

10

【0077】

発現カセットはまた、内部リボソームエンタリー部位 (I R E S) および／または 2 A エレメントを含み得る。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、m i r 調節エレメント、転写後調節エレメント、組織および細胞型特異的プロモーター、ならびにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、I T R は、導入遺伝子のプロモーターとして作用し得る。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成分を含む。例えば、追加の調節構成成分は、本明細書に開示される調節スイッチであり得、c e D N A 感染細胞、ならびに必要に応じて他の誘導性および／または抑制性エレメントを殺傷し得るキルスイッチを含むが、これに限定されない。

20

【0078】

本明細書に記載される技術はさらに、c e D N A ベクターを使用した遺伝子編集の新規方法を提供する。c e D N A ベクターは、A A V カプシドの非存在下で、宿主細胞中に取り込まれるとともに、核中に輸送される能力を有する。さらに、本明細書に記載される c e D N A ベクターは、カプシドを欠いているため、カプシド含有ベクターに反応して生じ得る免疫反応を回避する。

【0079】

本発明の態様は、本明細書に記載されるような遺伝子編集に有用な c e D N A ベクターを産生する方法に関する。他の実施形態では、本明細書に提供される方法によって産生される c e D N A ベクターに関する。一実施形態では、カプシド不含非ウイルス性 D N A ベクター (c e D N A ベクター) は、最初の 5 ' 逆位末端反復 (例えば、A A V I T R)、異種核酸配列、および 3 ' I T R (例えば、A A V I T R) をこの順序で含むポリヌクレオチド発現構築物テンプレートを含むプラスミド (本明細書では「c e D N A - プラスミド」と呼ばれる) から得られ、5 ' I T R および 3 ' I T R は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称または対称 (例えば、W T - I T R または修飾型対称 I T R) であり得る。

30

【0080】

本明細書に開示される c e D N A ベクターは、本開示を読むことにより、熟練者に既知のいくつかの手段によって取得可能である。例えば、本発明の c e D N A ベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド発現構築物テンプレートは、c e D N A - プラスミド (例えば、表 8 もしくは図 7 B を参照)、c e D N A - バクミド、および／または c e D N A - バキュロウイルスであり得る。一実施形態では、c e D N A - プラスミドは、I T R の間に操作可能に位置付けられた制限クロニング部位 (例えば、配列番号 7) を含み、例えば、導入遺伝子、例えばレポーター遺伝子および／または治療的遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットを挿入することができる。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、対称または非対称 I T R (修飾型または W T I T R) を含むポリヌクレオチドテンプレート (例えば、c e D N A - プラスミド、c e D N A - バクミド、c e D N A - バキュロウイルス) から産生される。

40

【0081】

50

許容宿主細胞中、例えば、Repの存在下では、少なくとも2つのITRを有するポリヌクレオチドテンプレートが複製して、ceDNAベクターを産生する。ceDNAベクター産生は、第1の、Repタンパク質を介したテンプレート骨格（例えば、ceDNAープラスミド、ceDNAーバクミド、ceDNAーバキュロウイルスゲノム等）からのテンプレートの切除（「レスキュー」）、および第2の、切除したceDNAベクターのRep媒介型複製の2つのステップを経る。様々なAAV血清型のRepタンパク質およびRep結合部位は、当業者に周知である。当業者は、少なくとも1つの機能的ITRに基づいて、核酸配列に結合し、複製する血清型からRepタンパク質を選択することを理解する。例えば、複製可能ITRがAAV血清型2に由来する場合、対応するRepは、その血清型と共働するAAV血清型に由来し、例えばAAV2 ITRはAAV2またはAAV4 Repと共働するが、AAV5 Repとは共働しない。複製時に、共有結合性閉端ceDNAベクターは、許容細胞中で蓄積し続け、ceDNAベクターは、好ましくは標準複製条件下、Repタンパク質の存在下では、長期間にわたって十分に安定して、例えば、少なくとも1 pg／細胞、好ましくは少なくとも2 pg／細胞、好ましくは少なくとも3 pg／細胞、より好ましくは少なくとも4 pg／細胞、さらにより好ましくは少なくとも5 pg／細胞の量で蓄積する。

【0082】

したがって、本発明の一態様は、a) ポリヌクレオチド発現構築物テンプレート（例えば、ceDNAープラスミド、ceDNAーバクミド、および／またはceDNAーバキュロウイルス）を内包する宿主細胞（例えば、昆虫細胞）の集団をインキュベートするステップであって、Repタンパク質の存在下では、宿主細胞内のceDNAベクターの産生を誘導するために効果的な条件下、かつそのために十分な時間にわたってウイルスカプシドコード配列を欠いており、宿主細胞が、ウイルスカプシドコード配列を含まない、インキュベートするステップと、b) ceDNAベクターを宿主細胞から採取し、単離するステップと、を含む、遺伝子編集のためのceDNAベクターを産生するプロセスに関する。Repタンパク質の存在は、修飾型ITRを有するベクターポリヌクレオチドの複製を誘導して、宿主細胞中でceDNAベクターを産生する。しかしながら、ウイルス粒子（例えば、AAVビリオン）は発現されない。したがって、ビリオン強制サイズ制限はない。

【0083】

宿主細胞から単離された遺伝子編集に有用なceDNAベクターの存在は、宿主細胞から単離されたDNAを、ceDNAベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、および消化されたDNA材料を変性ゲルおよび非変性ゲル上で分析して、直鎖状で非連続的なDNAと比較して特徴的な直鎖状で連続的なDNAのバンドの存在を確認することによって確認され得る。

【0084】

また別の態様では、核酸配列をゲノムセーフハーバー遺伝子に挿入するための方法が本明細書に提供され、この方法は、細胞を(i) 遺伝子編集系および(ii) ゲノムセーフハーバー遺伝子に対する相同性を有し、関心対象のタンパク質をコードする核酸配列を含む相同性指向修復テンプレートと接触させることを含み、遺伝子編集系の1つ以上の構成成分は、細胞を本明細書に開示されるceDNAベクター組成物と接触させることによって細胞に送達され、ceDNAベクター組成物は、隣接するITR配列を含む直鎖状の閉端二重鎖DNAであり、ITR配列は、本明細書で定義されるように互いに対して非対称、対称、または実質的に対称であり、少なくとも1つの遺伝子編集核酸配列は、ゲノムセーフハーバー遺伝子に相補的な領域を有し、この方法は、関心対象のタンパク質をコードする核酸配列をゲノムセーフハーバー遺伝子に挿入するのに十分な条件下、かつそのために十分な時間にわたって実施される。

【0085】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ゲノムセーフハーバー遺伝子は、高発現レベルでタンパク質を発現することが知られている少なく

とも1つのコード配列に近い活性イントロンを含む。

【0086】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ゲノムセーフハーバー遺伝子は、アルブミン遺伝子の中または近くの部位を含む。

【0087】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ゲノムセーフハーバー遺伝子は、AAVS1遺伝子座である。

【0088】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、関心対象のタンパク質は、受容体、毒素、ホルモン、酵素、または細胞表面タンパク質である。この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、関心対象のタンパク質は、受容体である。この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、関心対象のタンパク質は、プロテアーゼである。

【0089】

この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、標的化される例示的な非限定的遺伝子、または関心対象のタンパク質は、第VII因子(FVII)または第IX因子(FIX)であり得る。この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、方法は、血友病Aまたは血友病Bの治療のためにインビボで実施される。本明細書に開示されるような遺伝子編集cDNAベクターの使用は、本明細書における「遺伝子編集cDNAで治療される例示的な疾患」および「遺伝子編集のための追加の疾患」と題するセクションで論じられる。治療される例示的な疾患は、例えば、限定されないが、デュシェン型筋ジストロフィー(DMD遺伝子)、トランスサイレチンアミロイドーシス(ATTR)(正しいmutTR遺伝子)、オルニントランスカルバミラーゼ欠損症(OTC欠損症)、血友病、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、遺伝性ヘモクロマトーシス、癌、または遺伝性失明であり、訂正される遺伝子には、エリスロポエチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)、グロビン、レプチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、サイトカイン、嚢胞性線維症膜コンダクタンス調節因子(CFTR)、またはペプチド成長因子等が含まれるが、これらに限定されない。

【0090】

いくつかの実施形態では、本出願は、以下のパラグラフのうちのいずれかに定義され得る。

1. 非ウイルス性カプシド不含閉端DNA(cDNA)ベクターであって、隣接する逆位末端配列(ITR)間に少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列を含み、少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、少なくとも1つの遺伝子編集分子をコードする、cDNAベクター。

2. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼ、ガイドRNA(gRNA)、ガイドDNA(gDNA)、およびアクチベーターRNAから選択される、パラグラフ1に記載のcDNAベクター。

3. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼである、パラグラフ2に記載のcDNAベクター。

4. ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、パラグラフ3に記載のcDNAベクター。

5. 配列特異的ヌクレアーゼが、核酸誘導型ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、メガヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、またはmegaTALEから選択される、パラグラフ4に記載のcDNAベクター。

6. 配列特異的ヌクレアーゼが、一塩基エディター、RNA誘導型ヌクレアーゼ、およびDNA誘導型ヌクレアーゼから選択される核酸誘導型ヌクレアーゼである、パラグラフ5に記載のcDNAベクター。

7. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、gRNAまたはgDNAである、パラグラフ2またはパラグラフ6に記載のceDNAベクター。
8. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、アクチベーターRNAである、パラグラフ2、6、または7に記載のceDNAベクター。
9. 核酸誘導型ヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼである、パラグラフ6～8のいずれか1つに記載のceDNA。
10. CRISPRヌクレアーゼが、Casヌクレアーゼである、パラグラフ9に記載のceDNAベクター。
11. Casヌクレアーゼが、Cas9、ニッキングCas9 (nCas9)、および不活性化Cas (dCas) から選択される、パラグラフ10に記載のceDNAベクター 10
12. nCas9が、CasのHNHまたはRuvCドメインに突然変異を含む、パラグラフ11に記載のceDNAベクター。
13. Casヌクレアーゼが、標的遺伝子のプロモーター領域を標的とするgRNAと複合体を形成する不活性化Casヌクレアーゼ (dCas) である、パラグラフ11に記載のceDNAベクター。
14. KRABエフェクタードメインをさらに含む、パラグラフ13に記載のceDNAベクター。
15. dCasが、プロモーター領域に向けられ得る異種転写活性化ドメインに融合される、パラグラフ13またはパラグラフ14に記載のceDNAベクター。 20
16. dCas融合が、標的遺伝子の発現を上方調節するために追加のトランス活性化ドメインを動員するガイドRNAによって標的遺伝子のプロモーター領域に向けられる、パラグラフ15に記載のceDNAベクター。
17. dCasが、S. pyogenes dCas9である、パラグラフ13～16のいずれか1つに記載のceDNAベクター。
18. ガイドRNA配列が、標的遺伝子のプロモーターを標的とし、CRISPRが、標的遺伝子をサイレンシングする (CRISPRi系)、パラグラフ7～17のいずれか1つに記載のceDNAベクター。
19. ガイドRNA配列が、標的遺伝子の転写開始部位を標的とし、標的遺伝子を活性化 (CRISPRa系)、パラグラフ7～17のいずれか1つに記載のceDNAベクター。 30
20. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAを含む、パラグラフ6～19のいずれか1つに記載のceDNAベクター。
21. gRNAが、スプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的とする、パラグラフ7～20のいずれか1つに記載のceDNAベクター。
22. スプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的とすることが、非相同末端結合 (NH E J) および欠陥遺伝子の訂正をもたらす、パラグラフ21に記載のceDNAベクター。
23. ベクターが、1つのガイドRNA配列の複数のコピーをコードする、パラグラフ7～22のいずれか1つに記載のceDNAベクター。 40
24. 第1の異種ヌクレオチド配列が、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第1の調節配列を含む、パラグラフ1～23のいずれか1つに記載のceDNAベクター。
25. 第1の調節配列が、プロモーターを含む、パラグラフ24に記載のceDNAベクター。
26. プロモーターが、CAG、Pol III、U6、またはH1である、パラグラフ25に記載のceDNAベクター。
27. 第1の調節配列が、モジュレーターを含む、パラグラフ24～26のいずれか1つに記載のceDNAベクター。
28. モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、パラグラフ 50

27に記載のc e D N Aベクター。

29. 第1の異種ヌクレオチド配列が、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の上流にイントロン配列を含み、イントロン配列が、ヌクレアーゼ切断部位を含む、パラグラフ24～28のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

30. 第2の異種ヌクレオチド配列が、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第2の調節配列を含む、パラグラフ1～29のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

31. 第2の調節配列が、プロモーターを含む、パラグラフ30に記載のc e D N Aベクター。

32. プロモーターが、C A G、P o l I I I、U 6、またはH 1である、パラグラフ31に記載のc e D N Aベクター。

33. 第2の調節配列が、モジュレーターを含む、パラグラフ30～32のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

34. モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、パラグラフ33に記載のc e D N Aベクター。

35. 第3の異種ヌクレオチド配列が、アクチベーターRNAをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第3の調節配列を含む、パラグラフ1～34のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

36. 第3の調節配列が、プロモーターを含む、パラグラフ35に記載のc e D N Aベクター。

37. プロモーターが、C A G、P o l I I I、U 6、またはH 1である、パラグラフ36に記載のc e D N Aベクター。

38. 第3の調節配列が、モジュレーターを含む、パラグラフ35～37のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

39. モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、パラグラフ38に記載のc e D N Aベクター。

40. c e D N Aベクターが、標的核酸配列に対する5'相同性アームおよび3'相同性アームを含む、パラグラフ1～39のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

41. 5'相同性アームおよび3'相同性アームが各々、約250～2000bpである、パラグラフ40に記載のc e D N Aベクター。

42. 5'相同性アームおよび／または3'相同性アームが、I T Rの近位にある、パラグラフ40またはパラグラフ41に記載のc e D N Aベクター。

43. 少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、5'相同性アームと3'相同性アームとの間にある、パラグラフ40～42のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

44. 5'相同性アームと3'相同性アームとの間にある少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、標的遺伝子を含む、パラグラフ43に記載のc e D N Aベクター。

45. 遺伝子編集分子をコードするc e D N Aベクター少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、5'相同性アームと3'相同性アームとの間にはない、パラグラフ40～44のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

46. 遺伝子編集分子をコードする異種ヌクレオチド配列のいずれも、5'相同性アームと3'相同性アームとの間にはない、パラグラフ45に記載のc e D N Aベクター。

47. 5'相同性アームの上流の第1のエンドヌクレアーゼ制限部位および／または3'相同性アームの下流の第2のエンドヌクレアーゼ制限部位を含む、パラグラフ40～46のいずれか1つに記載のc e D N Aベクター。

48. 第1のエンドヌクレアーゼ制限部位および第2のエンドヌクレアーゼ制限部位が、同じ制限エンドヌクレアーゼ部位である、パラグラフ47に記載のc e D N Aベクター。

49. 少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ制限部位が、同じくc e D N Aベクター上にコードされるエンドヌクレアーゼによって切断される、パラグラフ47またはパラグラフ48に記載のc e D N Aベクター。

50. 1つ以上のポリA部位をさらに含む、パラグラフ40～49のいずれか1つに記載

10

20

30

40

50

の c e D N A ベクター。

51. 導入遺伝子調節エレメント、および下流にありかつ 3' 相溶性アームに近接する、および／または上流にありかつ 5' 相溶性アームに近接するポリ A 部位のうちの少なくとも 1 つを含む、パラグラフ 40～50 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

52. 上流にありかつ 3' 相溶性アームに近接する 2 A および選択マーカー部位を含む、パラグラフ 40～51 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

53. 5' 相溶性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の上流のヌクレオチド配列と相同である、パラグラフ 40～52 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

54. 3' 相溶性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の下流のヌクレオチド配列と相同である、パラグラフ 40～53 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

55. 相同組み換えのエンハンサーをコードする異種ヌクレオチド配列を含む、パラグラフ 1～54 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

56. 相同組み換えのエンハンサーが、SV40 後期ポリ A シグナル上流エンハンサー配列、サイトメガロウイルス初期エンハンサーエレメント、RSV エンハンサー、および CMV エンハンサーから選択される、パラグラフ 55 に記載の c e D N A ベクター。

57. 少なくとも 1 つの I T R が、機能性末端分解部位および R e p 結合部位を含む、パラグラフ 1～56 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

58. 隣接する I T R が、対称または非対称である、パラグラフ 1～57 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

59. 隣接する I T R が、非対称であり、I T R のうちの少なくとも 1 つが、野生型 A A V I T R 配列から、I T R の全体的な 3 次元コンフォメーションに影響を与える欠失、付加、または置換によって変更されている、パラグラフ 58 に記載の c e D N A ベクター。

60. 少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、c D N A である、パラグラフ 1～59 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

61. 隣接する I T R のうちの 1 つ以上が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、および A A V 12 から選択される A A V 血清型に由来する、パラグラフ 1～60 に記載の c e D N A ベクター。

62. I T R のうちの 1 つ以上が、合成のものである、パラグラフ 1～61 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

63. I T R のうちの 1 つ以上が、野生型 I T R ではない、パラグラフ 1～62 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

64. I T R のうちの 1 つ以上または両方が、A、A'、B、B'、C、C'、D、および D' から選択される I T R 領域のうちの少なくとも 1 つにおける欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている、パラグラフ 1～63 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

65. 欠失、挿入、および／または置換が、通常は A、A'、B、B'、C、または C' 領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、パラグラフ 64 に記載の c e D N A ベクター。

66. I T R が、対称である、パラグラフ 1～58 または 56～65 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

67. I T R が、野生型である、パラグラフ 1～58、60、61、および 66 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

68. 両方の I T R が、I T R が互いに対して反転されたときに全体的な 3 次元対称性をもたらすように変更されている、パラグラフ 1～66 のいずれか 1 つに記載の c e D N A ベクター。

69. 変更が、A、A'、B、B'、C、C'、D、および D' から選択される I T R 領域における欠失、挿入、および／または置換である、パラグラフ 68 に記載の c e D N A ベクター。

10

20

30

40

50

70. ゲノム編集のための方法であって、

細胞を遺伝子編集系と接触させることを含み、遺伝子編集系の1つ以上の構成成分が、細胞を、隣接する逆位末端反復 (ITR) の間に少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列を含む非ウイルス性カプシド不含閉端DNA (ceDNA) ベクターと接触させることによって細胞に送達され、少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、少なくとも1つの遺伝子編集分子をコードする、方法。

71. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼ、ガイドRNA (gRNA)、ガイドDNA (gDNA)、およびアクチベーターRNAから選択される、パラグラフ70に記載の方法。

72. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼである、パラグラフ71に記載の方法。

73. ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、パラグラフ72に記載の方法。

74. 配列特異的ヌクレアーゼが、核酸誘導型ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、メガヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、またはme ga TALから選択される、パラグラフ73に記載の方法。

75. 配列特異的ヌクレアーゼが、一塩基エディター、RNA誘導型ヌクレアーゼ、およびDNA誘導型ヌクレアーゼから選択される核酸誘導型ヌクレアーゼである、パラグラフ73に記載の方法。

76. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、gRNAまたはgDNAである、パラグラフ70または75に記載の方法。

77. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、アクチベーターRNAである、パラグラフ70、75、または76に記載の方法。

78. 核酸誘導型ヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼである、方法74～77のいずれか1つに記載の方法。

79. CRISPRヌクレアーゼが、Casヌクレアーゼである、パラグラフ78に記載の方法。

80. Casヌクレアーゼが、Cas9、ニックングCas9 (nCas9)、および不活性化Cas (dCas) から選択される、パラグラフ79に記載の方法。

81. nCas9が、CasのHNHまたはRuvCドメインに突然変異を含む、パラグラフ80に記載の方法。

82. Casヌクレアーゼが、標的遺伝子のプロモーター領域を標的とするgRNAと複合体を形成する不活性化Casヌクレアーゼ (dCas) である、パラグラフ80に記載の方法。

83. KRABエフェクタードメインをさらに含む、パラグラフ82に記載の方法。

84. dCasが、プロモーター領域に向けられ得る異種転写活性化ドメインに融合される、パラグラフ82または83に記載の方法。

85. dCas融合が、標的遺伝子の発現を上方調節するために追加のトランス活性化ドメインを動員するガイドRNAによって標的遺伝子のプロモーター領域に向けられる、パラグラフ84に記載の方法。

86. dCasが、S. pyogenes dCas9である、パラグラフ82～85のいずれかに記載の方法。

87. ガイドRNA配列が、標的遺伝子のプロモーターを標的とし、CRISPRが、標的遺伝子をサイレンシングする (CRISPRi系)、パラグラフ78～86のいずれかに記載の方法。

88. ガイドRNA配列が、標的遺伝子の転写開始部位を標的とし、標的遺伝子を活性化 (CRISPRa系)、パラグラフ78～86のいずれかに記載の方法。

89. 少なくとも1つの遺伝子編集分子が、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAを含む、パラグラフ76～88のいずれかに記載の方法。

90. gRNAが、スプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的とする、パラグラフ76～89のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

- 9 1. スプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的とすることが、非相同末端結合 (N H E J) および欠陥遺伝子の訂正をもたらす、パラグラフ 2 2 に記載の方法。
- 9 2. ベクターが、1 つのガイド R N A 配列の複数のコピーをコードする、パラグラフ 7 6 ~ 9 1 に記載の方法。
- 9 3. 第 1 の異種ヌクレオチド配列が、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 1 の調節配列を含む、パラグラフ 7 0 ~ 9 2 のいずれかに記載の方法。
- 9 4. 第 1 の調節配列が、プロモーターを含む、パラグラフ 9 3 に記載の方法。
- 9 5. プロモーターが、C A G、P o l I I I、U 6、または H 1 である、パラグラフ 9 4 に記載の方法。 10
- 9 6. 第 1 の調節配列が、モジュレーターを含む、パラグラフ 9 3 ~ 9 5 のいずれかに記載の方法。
- 9 7. モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、パラグラフ 9 6 に記載の方法。
- 9 8. 第 1 の異種ヌクレオチド配列が、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の上流にイントロン配列を含み、イントロン配列が、ヌクレアーゼ切断部位を含む、パラグラフ 9 3 ~ 9 7 のいずれかに記載の方法。
- 9 9. 第 2 の異種ヌクレオチド配列が、ガイド R N A をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 2 の調節配列を含む、パラグラフ 7 0 ~ 9 8 のいずれかに記載の方法。 20
- 1 0 0. 第 2 の調節配列が、プロモーターを含む、パラグラフ 9 9 に記載の方法。
- 1 0 1. プロモーターが、C A G、P o l I I I、U 6、または H 1 である、パラグラフ 1 0 0 に記載の方法。
- 1 0 2. 第 2 の調節配列が、モジュレーターを含む、パラグラフ 9 9 ~ 1 0 1 のいずれかに記載の方法。
- 1 0 3. モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、パラグラフ 1 0 2 に記載の方法。
- 1 0 4. 第 3 の異種ヌクレオチド配列が、アクチベーター R N A をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された第 3 の調節配列を含む、パラグラフ 7 0 ~ 1 0 3 のいずれかに記載の方法。 30
- 1 0 5. 第 3 の調節配列が、プロモーターを含む、パラグラフ 1 0 4 に記載の方法。
- 1 0 6. プロモーターが、C A G、P o l I I I、U 6、または H 1 である、パラグラフ 1 0 5 に記載の方法。
- 1 0 7. 第 3 の調節配列が、モジュレーターを含む、パラグラフ 1 0 4 ~ 1 0 6 のいずれかに記載の方法。
- 1 0 8. モジュレーターが、エンハンサーおよびリプレッサーから選択される、パラグラフ 1 0 7 に記載の方法。
- 1 0 9. c e D N A ベクターが、標的核酸配列に対する 5 ' 相同性アームおよび 3 ' 相同性アームを含む、パラグラフ 7 0 ~ 1 0 8 のいずれかに記載の方法。 40
- 1 1 0. 5 ' 相同性アームおよび 3 ' 相同性アームが各々、約 2 5 0 ~ 2 0 0 0 b p である、パラグラフ 1 0 9 に記載の方法。
- 1 1 1. 5 ' 相同性アームおよび / または 3 ' 相同性アームが、I T R の近位にある、パラグラフ 1 0 9 または 1 1 0 に記載の方法。
- 1 1 2. 少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、5 ' 相同性アームと 3 ' 相同性アームとの間にある、パラグラフ 1 0 9 ~ 1 1 1 のいずれかに記載の方法。
- 1 1 3. 5 ' 相同性アームと 3 ' 相同性アームとの間にある少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、標的遺伝子を含む、パラグラフ 1 1 2 に記載の方法。
- 1 1 4. 遺伝子編集分子をコードする c e D N A ベクター少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、5 ' 相同性アームと 3 ' 相同性アームとの間にはない、パラグラフ 1 0 9 ~ 50

1 1 3 に記載の方法。

1 1 5. 遺伝子編集分子をコードする異種ヌクレオチド配列のいずれも、5' 相同性アームと3' 相同性アームとの間にはない、パラグラフ 1 1 4 に記載の方法。

1 1 6. 5' 相同性アームの上流の第1のエンドヌクレアーゼ制限部位および／または3' 相同性アームの下流の第2のエンドヌクレアーゼ制限部位を含む、パラグラフ 1 0 9 ~ 1 1 5 に記載の方法。

1 1 7. 第1のエンドヌクレアーゼ制限部位および第2のエンドヌクレアーゼ制限部位が、同じ制限エンドヌクレアーゼ部位である、パラグラフ 1 1 6 に記載の方法。

1 1 8. 少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ制限部位が、同じく c e D N A ベクター上にコードされるエンドヌクレアーゼによって切断される、パラグラフ 1 1 6 または 1 1 7 に記載の方法。

1 1 9. 1 つ以上のポリ A 部位をさらに含む、パラグラフ 1 0 9 ~ 1 1 8 のいずれかに記載の方法。

1 2 0. 導入遺伝子調節エレメント、および下流にありかつ3' 相同性アームに近接する、および／または上流にありかつ5' 相同性アームに近接するポリ A 部位のうちの少なくとも1つを含む、パラグラフ 1 0 9 ~ 1 1 9 のいずれかに記載の方法。

1 2 1. 上流にありかつ3' 相同性アームに近接する2 A および選択マーカー部位を含む、パラグラフ 1 0 9 ~ 1 2 0 のいずれかに記載の方法。

1 2 2. 5' 相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の上流のヌクレオチド配列と相同である、パラグラフ 1 0 9 ~ 1 2 1 のいずれかに記載の方法。

1 2 3. 3' 相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の下流のヌクレオチド配列と相同である、パラグラフ 1 0 9 ~ 1 2 2 のいずれかに記載の方法。

1 2 4. 相同組み換えのエンハンサーをコードする異種ヌクレオチド配列を含む、パラグラフ 1 0 9 ~ 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

1 2 5. 相同組み換えのエンハンサーが、S V 4 0 後期ポリ A シグナル上流エンハンサー配列、サイトメガロウイルス初期エンハンサーエレメント、R S V エンハンサー、および C M V エンハンサーから選択される、パラグラフ 1 2 4 に記載の方法。

1 2 6. 少なくとも1つの I T R が、機能性末端分解部位および R e p 結合部位を含む、パラグラフ 7 0 ~ 1 2 5 のいずれかに記載の方法。

1 2 7. 隣接する I T R が、対称または非対称である、パラグラフ 7 0 ~ 1 2 6 のいずれかに記載の方法。

1 2 8. 隣接する I T R が、非対称であり、I T R のうちの少なくとも1つが、野生型 A A V I T R 配列から、I T R の全体的な3次元コンフォメーションに影響を与える欠失、付加、または置換によって変更されている、パラグラフ 1 2 7 に記載の方法。

1 2 9. 少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、c D N A である、パラグラフ 7 0 ~ 1 2 8 のいずれかに記載の方法。

1 3 0. 隣接する I T R のうちの1つ以上が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、および A A V 1 2 から選択される A A V 血清型に由来する、パラグラフ 7 0 ~ 1 2 9 のいずれかに記載の方法。

1 3 1. I T R のうちの1つ以上が、合成のものである、パラグラフ 7 0 ~ 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

1 3 2. I T R のうちの1つ以上が、野生型 I T R ではない、パラグラフ 7 0 ~ 1 3 1 のいずれかに記載の方法。

1 3 3. I T R のうちの1つ以上両方が、A、A'、B、B'、C、C'、D、および D' から選択される I T R 領域のうちの少なくとも1つにおける欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている、パラグラフ 7 0 ~ 1 3 2 のいずれかに記載の方法。

1 3 4. 欠失、挿入、および／または置換が、通常はA、A'、B、B'、C、または C' 領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、パラグラフ 1 3 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

135. ITRが、対称である、パラグラフ70～127または129～134のいずれかに記載の方法。

136. ITRが、野生型である、パラグラフ70～127または129～130のいずれか1つに記載の方法。

137. 両方のITRが、ITRが互いに対して反転されたときに全体的な3次元対称性をもたらすように変更されている、パラグラフ70～136のいずれかに記載の方法。

138. 変更が、A、A'、B、B'、C、C'、D、およびD'から選択されるITR領域における欠失、挿入、および／または置換である、パラグラフ137に記載の方法。

139. 接触される細胞が、真核細胞である、パラグラフ70～138のいずれかに記載の方法。

140. CRISPRヌクレアーゼが、真核細胞における発現のためにコドン最適化される、パラグラフ84～139のいずれかに記載の方法。

141. Casタンパク質が、真核細胞での発現のためにコドン最適化される、パラグラフ84～140のいずれかに記載の方法。

142. 標的遺伝子を編集するのに適した条件下、かつそのために十分な時間にわたって、パラグラフ1～69のいずれか1つに記載の有効量の非ウイルス性カプシド不含閉端DNA (ceDNAベクター) を細胞に投与することを含む、ゲノム編集の方法。

143. 標的遺伝子が、1つ以上のガイドRNA配列を使用して遺伝子標的化され、相同性修復(HDR)ドナーテンプレートの存在下でHDRにより編集される遺伝子である、パラグラフ113～142のいずれかに記載の方法。

144. 標的遺伝子が、1つのガイドRNA配列を使用して標的化され、標的遺伝子が、非相同末端結合(NHEJ)によって編集される、パラグラフ142または143に記載の方法。

145. 方法が、疾患に関連する一塩基多型(SNP)を訂正するためにインビボで実施される、パラグラフ70～144のいずれかに記載の方法。

146. 疾患が、鎌状赤血球貧血、遺伝性ヘモクロマトーシス、または癌遺伝性失明を含む、パラグラフ145に記載の方法。

147. 少なくとも2つの異なるCasタンパク質が、ceDNAベクターに存在し、Casタンパク質のうちの1つが、触媒的に不活性(Cas-i)であり、Cas-iに関連するガイドRNAが、標的細胞のプロモーターを標的とし、Cas-iをコードするDNAが、誘導性プロモーターの制御下にあるため、所望の時点で標的遺伝子の発現を止めることができる、パラグラフ70～146のいずれかに記載の方法。

148. 細胞をCRISPR/Cas遺伝子編集系と接触させることを含む、細胞の標的遺伝子における単一ヌクレオチド塩基対を編集するための方法であって、CRISPR/Cas遺伝子編集系の1つ以上の構成成分が、細胞を非ウイルス性カプシド不含閉端DNA (ceDNA) ベクター組成物と接触させることによって細胞に送達され、

ceDNAベクターから発現されたCasタンパク質が、触媒的に不活性であり、塩基編集部分に融合されており、

方法が、標的遺伝子の発現を調整するのに十分な条件下、かつそのために十分な時間にわたって実施される、方法。

149. ceDNAベクターが、パラグラフ1～69のいずれかに記載のceDNAベクターである、パラグラフ148に記載の方法。

150. 塩基編集部分が、一本鎖特異的シチジンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤、またはtRNAアデノシンデアミナーゼを含む、パラグラフ148に記載の方法。

151. 触媒的に不活性なCasタンパク質が、dCas9である、パラグラフ148に記載の方法。

152. 細胞が、T細胞またはCD34⁺である、パラグラフ70～151のいずれかに記載の方法。

153. 標的遺伝子が、プログラム死タンパク質(PD1)、細胞傷害性Tリンパ球関連

10

20

30

40

50

抗原 4 (CTLA 4)、または腫瘍壊死因子 α (TNF- α) をコードする、パラグラフ 70~152 のいずれかに記載の方法。

154. 産生された細胞を、それを必要とする対象に投与することをさらに含む、パラグラフ 70~153 のいずれかに記載の方法。

155. 治療を必要とする対象が、遺伝性疾患、ウイルス感染、細菌感染、癌、または自己免疫疾患を有する、パラグラフ 154 に記載の方法。

156. 細胞における 2 つ以上の標的遺伝子の発現を調整する方法であって、

(i) 隣接する末端反復 (TR) 配列、および 2 つ以上の標的遺伝子に相補的な少なくとも 2 つのガイド RNA をコードする核酸配列を含むベクターを含む第 1 の組成物であって、ベクターが、非ウイルス性カプシド不含閉端 DNA (ceDNA) ベクターである、第 1 の組成物と、

(ii) 隣接する末端反復 (TR) 配列、および各々がガイド RNA と関連し、2 つ以上の標的遺伝子に結合する少なくとも 2 つの触媒的に不活性な DNA エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含むベクターを含む第 2 の組成物であって、ベクターが、非ウイルス性カプシド不含閉端 DNA (ceDNA) ベクターである、第 2 の組成物と、

(iii) 隣接する末端反復 (TR) 配列、および少なくとも 2 つの転写調節因子タンパク質またはドメインをコードする核酸配列を含むベクターを含む第 3 の組成物であって、ベクターが、非ウイルス性カプシド不含閉端 DNA (ceDNA) ベクターである、第 3 の組成物と、を細胞に導入することを含み、

少なくとも 2 つのガイド RNA、少なくとも 2 つの触媒的に不活性な RNA 誘導型エンドヌクレアーゼ、および少なくとも 2 つの転写調節因子タンパク質またはドメインが、細胞で発現され、

ガイド RNA、触媒的に不活性な RNA 誘導型エンドヌクレアーゼ、転写調節因子タンパク質またはドメイン、および標的遺伝子の間で 2 つ以上の共局在複合体が形成され、

転写調節因子タンパク質またはドメインが、少なくとも 2 つの標的遺伝子の発現を調節する、方法。

157. 第 1 の組成物の ceDNA ベクターが、パラグラフ 1~69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターであり、第 2 の組成物の ceDNA ベクターが、パラグラフ 1~69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターであり、第 3 の組成物が、パラグラフ 1~69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターである、パラグラフ 156 に記載の方法。

158. 核酸配列をゲノムセーフハーバー遺伝子に挿入するための方法であって、細胞を (i) 遺伝子編集系、および (ii) ゲノムセーフハーバー遺伝子に対する相同性を有し、関心対象のタンパク質をコードする核酸配列を含む相同性指向修復テンプレートと接触させることを含み、

遺伝子編集系の 1 つ以上の構成成分が、細胞を非ウイルス性カプシド不含閉端 DNA (ceDNA) ベクター組成物と接触させることによって細胞に送達され、ceDNA 核酸ベクター組成物が、隣接する逆位末端反復 (ITR) 間に少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列を含み、少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列が、少なくとも 1 つの遺伝子編集分子をコードし、

当該方法が、関心対象のタンパク質をコードする核酸配列をゲノムセーフハーバー遺伝子に挿入するのに十分な条件下、かつそのために十分な時間にわたって実施される、方法。

159. ceDNA ベクターが、パラグラフ 1~69 のいずれかに記載の ceDNA ベクターである、パラグラフ 158 に記載の方法。

160. ゲノムセーフハーバー遺伝子が、高発現レベルでタンパク質を発現することが知られている少なくとも 1 つのコード配列に近い活性イントロンを含む、パラグラフ 158 に記載の方法。

161. ゲノムセーフハーバー遺伝子が、アルブミン遺伝子、CCR5 遺伝子、AAVS1 遺伝子座のうちのいずれか 1 つの中または近くの部位を含む、パラグラフ 158 に記載の方法。

10

20

30

40

50

162. 関心対象のタンパク質が、受容体、毒素、ホルモン、酵素、または細胞表面タンパク質である、パラグラフ158～161のいずれかに記載の方法。

163. 関心対象のタンパク質が、分泌タンパク質である、パラグラフ162に記載の方法。

164. 関心対象のタンパク質が、第VII因子(FVII)または第IX因子(FIX)を含む、パラグラフ163に記載の方法。

165. 方法が、血友病Aまたは血友病Bの治療のためにインビボで実施される、パラグラフ164に記載の方法。

166. 宿主細胞内の染色体上の所定の挿入部位にドナー配列を挿入する方法であって、宿主細胞にパラグラフ1～69に記載のc e DNAベクターを導入することを含み、ドナー配列が、相同組み換えによって挿入部位において、または隣接して染色体に挿入される、方法。

167. 動物の染色体上の所定の挿入部位に挿入されたドナー配列を含む遺伝子操作された動物を生成する方法であって、a)パラグラフ167に記載の染色体上の所定の挿入部位に挿入されたドナー配列を有する細胞を生成することと、b) a)によって生成された細胞を担体動物に導入して、遺伝子操作された動物を産生することと、を含む、方法。

168. 細胞が、接合体または多能性幹細胞である、パラグラフ167に記載の方法。

169. パラグラフ168に記載の方法によって生成された遺伝子操作された動物。

170. 動物が、非ヒト動物である、パラグラフ169に記載の遺伝子操作された動物。

171. 細胞内の染色体上の挿入部位にドナー配列を挿入するためのキットであって、2つのAAV逆位末端反復(ITR)、ならびに

5' 相同性アーム、ドナー配列、および3' 相同性アームを含む第1のヌクレオチド配列であって、ドナー配列が、遺伝子編集機能を有する、第1のヌクレオチド配列を含む、第1の非ウイルス性カプシド不含閉端DNA(c e DNA)ベクターと、

(a)

少なくとも1つのAAV ITR、および

少なくとも1つの遺伝子編集分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のc e DNAベクターと、を含み、

第1のc e DNAベクターでは、5' 相同性アームが、染色体上の遺伝子編集分子の切断部位の上流の配列と相同であり、3' 相同性アームが、染色体上の遺伝子編集分子切断部位の下流の配列と相同であり、5' 相同性アームまたは3' 相同性アームが、ITRの近位にある、キット。

172. 遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼである、パラグラフ171に記載の方法。

173. ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、パラグラフ172に記載の方法。

174. 第1のc e DNAベクターが、パラグラフ1、40～56、57～69のいずれかに記載のc e DNAベクターである、パラグラフ171～173のいずれかに記載の方法。

175. 第2のc e DNAベクターが、パラグラフ1～39またはパラグラフ57～69のいずれかに記載のc e DNAベクターである、パラグラフ171～173のいずれかに記載の方法。

176. 宿主細胞の染色体上の所定の挿入部位にドナー配列を挿入する方法であって、

a) 少なくとも1つの逆位末端反復(ITR)を有する第1の非ウイルス性カプシド不含閉端DNA(c e DNA)ベクターを宿主細胞に導入することであって、c e DNAベクターが、5' 相同性アーム、ドナー配列、および3' 相同性アームを含む第1の直鎖状核酸を含む、導入することと、

b) 隣接する逆位末端反復(ITR)の間に少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列を含む第2のc e DNAベクターを宿主細胞に導入することであって、少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列が、挿入部位において、または隣接して染色体を切断する少なくとも1つの遺伝子編集分子をコードし、ドナー配列が、相同組み換えによって挿入部位におい

10

20

30

40

50

て、または隣接して染色体に挿入される、導入することと、を含む、方法。

177. 遺伝子編集分子が、ヌクレアーゼである、パラグラフ176に記載の方法。

178. ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、パラグラフ177に記載の方法。

179. 第1のc e D N Aベクターが、パラグラフ1、40～56、57～69のいずれかに記載のc e D N Aベクターである、パラグラフ176～178のいずれかに記載の方法。

180. 第2のc e D N Aベクターが、パラグラフ1～39またはパラグラフ57～69のいずれかに記載のc e D N Aベクターである、パラグラフ176～179のいずれかに記載の方法。

181. 第2のc e D N Aベクターが、挿入部位を認識するガイド配列をコードする第3のヌクレオチド配列をさらに含む、パラグラフ179または180に記載の方法。

182. パラグラフ1～69のいずれかに記載のc e D N Aベクターを含む、細胞。

183. パラグラフ1～69のいずれかに記載のベクターおよび脂質を含む、組成物。

184. 脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)である、パラグラフ184に記載の組成物。

185. パラグラフ183もしくは184の組成物またはパラグラフ182の細胞を含む、キット。

【0091】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術の一態様は、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含D N Aベクター(c e D N Aベクター)に関し、c e D N Aベクターは、非対称逆位末端反復配列(非対称I T R)の間に操作可能に位置付けられた少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列を含み、非対称I T Rのうちの少なくとも1つは、機能性末端分解部位およびR e p結合部位を含み、任意に異種核酸配列は、導入遺伝子をコードし、ベクターは、ウイルスカプシド中に存在しない。

【0092】

本発明のこれらおよび他の態様は、下記でさらに詳述される。

【0093】

上記に簡単に要約され、以下により詳細に論じられる本開示の実施形態は、添付の図面に描かれた本開示の例示的な実施形態を参照することによって理解することができる。しかしながら、添付の図面は、本開示の典型的な実施形態のみを示し、したがって、本開示は他の等しく有効な実施形態を認めることができるため、範囲を限定するものと見なされるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1A】遺伝子編集のための非対称I T Rを含む、c e D N Aベクターの例示的な構造を示す。この実施形態では、例示的なc e D N Aベクターは、C A Gプロモーター、W P R E、およびB G H p Aを含有する発現カセットを含む。ルシフェラーゼ導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム(O R F)は、C A GプロモーターとW P R Eとの間のクローニング部位(R 3 / R 4)に挿入される。発現カセットは、2つの逆位末端反復(I T R)－発現カセットの上流(5'端)の野生型A A V 2 I T Rおよび下流(3'端)の修飾型I T Rによって隣接され、したがって、発現カセットに隣接する2つのI T Rは、互いに対して非対称である。

【図1B】C A Gプロモーター、W P R E、およびB G H p Aを含む発現カセットを用いた遺伝子編集のための非対称I T Rを含む、c e D N Aベクターの例示的な構造を示す。ルシフェラーゼ導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム(O R F)は、C A GプロモーターとW P R Eとの間のクローニング部位に挿入される。発現カセットは、2つの逆位末端反復(I T R)－発現カセットの上流(5'端)の修飾型I T Rおよび下流(3'端)の野生型I T Rによって隣接される。

【図1C】エンハンサー／プロモーターを含む発現カセット、遺伝子編集分子である導入遺伝子の挿入のためのオープンリーディングフレーム(O R F)、または遺伝子編集核酸

10

20

30

40

50

配列、転写後エレメント (WPRE)、およびポリAシグナルを備えた、非対称 ITR を含む、遺伝子編集のための c e DNA ベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム (ORF) は、遺伝子編集分子である導入遺伝子、CAG プロモーターと WPRE との間のクローニング部位への遺伝子編集核酸配列の挿入を可能にする。発現カセットは、互いに対して非対称である 2 つの逆位末端反復 (ITR)、発現カセットの上流 (5' 端) の修飾型 ITR および下流 (3' 端) の修飾型 ITR によって隣接され、5' ITR および 3' ITR の両方は、修飾型 ITR であるが、異なる修飾を有する (すなわち、同じ修飾を有しない)。

【図 1 D】CAG プロモーター、WPRE、および BGHpA を含む発現カセットを備えた、本明細書で定義される対称の修飾型 ITR または実質的に対称の修飾型 ITR を含む、遺伝子編集のための c e DNA ベクターの例示的な構造を示す。ルシフェラーゼ導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) は、CAG プロモーターと WPRE との間のクローニング部位に挿入される。発現カセットは、5' 修飾型 ITR および 3' 修飾型 ITR が対称または実質的に対称である、2 つの修飾型逆位末端反復 (ITR) に隣接している。

10

【図 1 E】エンハンサー／プロモーターを含む発現カセット、遺伝子編集分子である導入遺伝子の挿入のためのオープンリーディングフレーム (ORF)、または遺伝子編集核酸配列、転写後エレメント (WPRE)、およびポリAシグナルを備えた、本明細書で定義される対称の修飾型 ITR または実質的に対称の修飾型 ITR を含む、遺伝子編集のための c e DNA ベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム (ORF) は、遺伝子編集分子である導入遺伝子、CAG プロモーターと WPRE との間のクローニング部位への遺伝子編集核酸配列の挿入を可能にする。発現カセットは、5' 修飾型 ITR および 3' 修飾型 ITR が対称または実質的に対称である、2 つの修飾型逆位末端反復 (ITR) に隣接している。

20

【図 1 F】CAG プロモーター、WPRE、および BGHpA を含む発現カセットを備えた、本明細書で定義される対称の WT-ITR または実質的に対称の WT-ITR を含む、遺伝子編集のための c e DNA ベクターの例示的な構造を示す。ルシフェラーゼ導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) は、CAG プロモーターと WPRE との間のクローニング部位に挿入される。発現カセットは、5' WT-ITR および 3' WT-ITR が対称または実質的に対称である、2 つの野生型逆位末端反復 (WT-ITR) に隣接している。

30

【図 1 G】エンハンサー／プロモーターを含む発現カセット、遺伝子編集分子である導入遺伝子の挿入のためのオープンリーディングフレーム (ORF)、または遺伝子編集核酸配列、転写後エレメント (WPRE)、およびポリAシグナルを備えた、本明細書で定義される対称の修飾型 ITR または実質的に対称の修飾型 ITR を含む、遺伝子編集のための c e DNA ベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム (ORF) は、遺伝子編集分子である導入遺伝子、CAG プロモーターと WPRE との間のクローニング部位への遺伝子編集核酸配列の挿入を可能にする。発現カセットは、5' WT-ITR および 3' WT-ITR が対称または実質的に対称である、2 つの野生型逆位末端反復 (WT-ITR) に隣接している。

40

【図 2 A】A-A' アーム、B-B' アーム、C-C' アーム、2 つの Rep 結合部位 (RBE および RBE') の特定を有する AAV2 (配列番号 538) の野生型左 ITR の T 形ステムループ構造を提供し、末端分解部位 (trs) も示す。RBE は、Rep78 または Rep68 のいずれかと相互作用すると考えられる一連の 4 つの二重四量体を含む。さらに、RBE' はまた、構築物中の野生型 ITR または変位型 ITR 上で集成した Rep 複合体と相互作用すると考えられる。D および D' 領域は、転写因子結合部位および他の保存構造を含む。

【図 2 B】A-A' アーム、B-B' アーム、C-C' アーム、2 つの Rep 結合部位 (RBE および RBE')、および末端分解部位 (trs) の特定を有する AAV2 の野生型左 ITR の T 形ステムループ構造を含む、野生型 ITR (配列番号 539) 中の提案さ

50

れたRep触媒ニッキングおよび結紮活性を示し、またいくつかの転写因子結合部位を含むDおよびD'領域、および他の保存構造も示す。

【図3A】野生型左AAV2 ITR（配列番号540）のA-A'アームおよびC-C'およびB-B'アームのRBE含有部分の一次構造（ポリヌクレオチド配列）（左）および二次構造（右）を提供する。

【図3B】左ITRの例示的な突然変異型ITR（修飾型ITRとも称される）配列を示す。例示的な突然変異型左ITR（ITR-1、左）（配列番号113）のA-A'アーム、Cアーム、およびB-B'アームのRBE部分の一次構造（左）および予測される二次構造（右）が示される。

【図3C】野生型右AAV2 ITR（配列番号541）のA-A'ループ、ならびにB-B'およびC-C'アームのRBE含有部分の一次構造（左）および二次構造（右）を示す。

【図3D】例示的な右修飾型ITRを示す。例示的な突然変異型左ITR（ITR-1、右）（配列番号114）のA-A'アーム、ならびにB-B'およびCアームのRBE含有部分の一次構造（左）および予測される二次構造（右）が示される。左および右のITR（例えば、AAV2 ITRまたは他のウイルス血清型または合成ITR）の任意の組み合わせを、本明細書で教示されるように使用することができる。図3A～3Dポリヌクレオチド配列の各々は、本明細書に記載されるようにceDNAを産生するために使用されるプラスミドまたはバクミド／バキュロウイルスゲノム中で使用される配列を指す。プラスミドまたはバクミド／バキュロウイルスゲノム中のceDNAベクター構成および予測されたGibb自由エネルギー値から推定される対応するceDNA二次構造もまた、図3A～3Dの各々に含まれる。

【図4A】図4Bの概略図に記載されるプロセスにおけるceDNAの産生に有用である、バキュロウイルス感染した昆虫細胞（BIBC）を作製するための上流プロセスを示す概略図である。

【図4B】ceDNA産生の例示的な方法の概略図である。

【図4C】ceDNAベクター産生を確認するための生化学方法およびプロセスを示す。

【図4D】（図4Dおよび図4E）図4BのceDNA産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取されたDNA中のceDNAの存在を特定するためのプロセスを説明する概略図である。（図4E）非連続的な構造を有するDNAを示す。ceDNAは、ceDNAベクター上に単一認識部位を有する制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件および変性条件の両方において、異なるサイズ（1 kbおよび2 kb）を有する2つのDNA断片を生成し得る。図4Eはまた、直鎖状で連続的な構造を有するceDNAを示す。ceDNAベクターは、制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、変性条件ではなく中性条件において1 kbおよび2 kbとして移動する2つのDNA断片を生成することができ、鎖は接続されたままであり、2 kbおよび4 kbとして移動する単鎖を産生する。図4Dは、左が未切断であるか、または制限エンドヌクレアーゼで消化された後、未変性ゲルまたは変性ゲルのいずれかで電気泳動に共される例示的なceDNAの概略的予想バンドを示す。左端の概略図は、未変性ゲルであり、その二重鎖および未切断形態で、ceDNAが少なくとも単量体および二量体状態で存在し、より速く移動する小さい単量体および単量体のサイズの2倍である、より遅く移動する二量体として見えることを示唆する、多重バンドを示す。左から二番目の概略図は、ceDNAが制限エンドヌクレアーゼで切断されたとき、元のバンドが消え、分裂後に残存する予想断片サイズに対応する、より速く移動する（例えば、より小さい）バンドが出現することを示す。変性条件下、元の二重鎖DNAは単鎖であり、相補鎖が共有結合されるため、未変性ゲル上で観察されるものより2倍大きい種として移動する。したがって、右から二番目の概略図において、消化されたceDNAは、未変性ゲル上で観察されるものと同様のバンディング分布を示すが、バンドは、未変性ゲル対応物のサイズの2倍の断片として移動する。右端の概略図は、変性条件下の未切断のceDNAが、単鎖開環として移動し、したがって観察されたバンドは、環が開いていない未変性条件下で観察されるもののサイズの2倍であるこ

とを示す。この図において、「k b」を使用して、文脈に応じて、ヌクレオチド鎖の長さ（例えば、変性状態で観察される単鎖分子の場合）または塩基対の数（例えば、未変性状態で観察される二本鎖分子の場合）に基づくヌクレオチド分子の相対サイズを示す。

【図 4 E】（図 4 D および 図 4 E）図 4 B の c e D N A 産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取された D N A 中の c e D N A の存在を特定するためのプロセスを説明する概略図である。（図 4 E）非連続的な構造を有する D N A を示す。c e D N A は、c e D N A ベクター上に単一認識部位を有する制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件および変性条件の両方において、異なるサイズ（1 k b および 2 k b）を有する 2 つの D N A 断片を生成し得る。図 4 E はまた、直鎖状で連続的な構造を有する c e D N A を示す。c e D N A ベクターは、制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、変性条件ではなく中性条件において 1 k b および 2 k b として移動する 2 つの D N A 断片を生成することができ、鎖は接続されたままであり、2 k b および 4 k b として移動する単鎖を産生する。図 4 D は、左が未切断であるか、または制限エンドヌクレアーゼで消化された後、未変性ゲルまたは変性ゲルのいずれかで電気泳動に共される例示的な c e D N A の概略的予想バンドを示す。左端の概略図は、未変性ゲルであり、その二重鎖および未切断形態で、c e D N A が少なくとも単量体および二量体状態で存在し、より速く移動する小さい単量体および単量体のサイズの 2 倍である、より遅く移動する二量体として見えることを示唆する、多重バンドを示す。左から二番目の概略図は、c e D N A が制限エンドヌクレアーゼで切断されたとき、元のバンドが消え、分裂後に残存する予想断片サイズに対応する、より速く移動する（例えば、より小さい）バンドが出現することを示す。変性条件下、元の二重鎖 D N A は単鎖であり、相補鎖が共有結合されるため、未変性ゲル上で観察されるものより 2 倍大きい種として移動する。したがって、右から二番目の概略図において、消化された c e D N A は、未変性ゲル上で観察されるものと同様のバンディング分布を示すが、バンドは、未変性ゲル対応物のサイズの 2 倍の断片として移動する。右端の概略図は、変性条件下の未切断の c e D N A が、単鎖開環として移動し、したがって観察されたバンドは、環が開いていない未変性条件下で観察されるもののサイズの 2 倍であることを示す。この図において、「k b」を使用して、文脈に応じて、ヌクレオチド鎖の長さ（例えば、変性状態で観察される単鎖分子の場合）または塩基対の数（例えば、未変性状態で観察される二本鎖分子の場合）に基づくヌクレオチド分子の相対サイズを示す。

【図 5】エンドヌクレアーゼでの消化を有する（+）または有しない（-）c e D N A ベクターの変性ゲル流動例の例示的な図である（c e D N A 構築物 1 および 2 の場合 E c o R I、c e D N A 構築物 3 および 4 の場合 B a m H I、c e D N A 構築物 5 および 6 の場合 S p e I、ならびに c e D N A ベクター 7 および 8 の場合 X h o I）。アスタリスクで強調されたバンドのサイズを判定し、図の下に示した。

【図 6 A】R e p タンパク質 R e p 5 2 および R e p 7 8 の核酸配列を含む p F B D L S R プラスミド中の例示的な R e p ー バクミドである。この例示的な R e p ー バクミドは、I E 1 プロモーター断片（配列番号 6 6）、K o z a k 配列を含む R e p 7 8 ヌクレオチド配列（配列番号 6 7）、R e p 5 2 のポリヘドロンプロモーター配列（配列番号 6 8）、および K o z a k 配列（g c c g c c a c c）で始まる R e p 5 8 ヌクレオチド配列（配列番号 6 9）を含む。

【図 6 B】w t ー L I T R、C A G プロモーター、ルシフェラーゼ導入遺伝子、W P R E およびポリアデニル化配列、ならびに m o d ー R I T R を有する、例示的な c e D N A ー プラスミド 1 の概略図である。

【図 7 A - 1】表 4 A に列挙される例示的な修飾型右 I T R の A - A ' アーム、ならびに修飾型 B - B ' アームおよび／または修飾型 C - C ' アームの R B E 含有部分の予測された構造を示す。

【図 7 A - 2】同上。

【図 7 A - 3】同上。

【図 7 A - 4】同上。

【図 7 A - 5】同上。

10

20

30

40

50

【図 7 A - 6】同上。

【図 7 A - 7】同上。

【図 7 B - 1】表 4 B に列挙される例示的な修飾型左 I T R の A - A ' アーム、ならびに修飾型 C - C ' アームおよび／または修飾型 B - B ' アームの R B E 含有部分の予測された構造を示す。示される構造は、予測された最低自由エネルギー構造である。カラーコード：赤色＝確率 99 % 超、橙色＝確率 99 % ～ 95 %、ベージュ色＝確率 95 ～ 90 %、濃緑色 90 % ～ 80 %、明緑色＝80 % ～ 70 %、明青色＝70 % ～ 60 %、濃青色 60 % ～ 50 %、およびピンク色＝50 % 未満。

【図 7 B - 2】同上。

【図 7 B - 3】同上。

【図 7 B - 4】同上。

【図 7 B - 5】同上。

【図 7 B - 6】同上。

【図 7 B - 7】同上。

【図 7 B - 8】同上。

【図 8】本開示による c e D N A ベクターの概略図である。

【図 9】図 20 とは異なる、本開示による c e D N A ベクターの概略図である。

【図 10 A - D】本開示による c e D N A ベクターの概略図を描く。

【図 10 E - F】本開示による c e D N A ベクターの概略図を描く。

【図 11】本開示による c e D N A ベクターの概略図である。E n h : エンハンサー、P r o = プロモーター、i n t r o n = スプライスドナーおよびアクセプター配列を持つ合成または天然に存在するイントロン、N L S = 核局在化シグナルヌクレアーゼ = C a s 9、Z F N、T a l e n、または他のエンドヌクレアーゼ配列の O R F。塗りつぶされた矢印は、s g R N A 配列を表し（単一のガイド R N A 標的配列（例えば、4）は、選出され、実験的に検証された自由に利用できるソフトウェア／アルゴリズムを使用して選択される）、白抜きの矢印は、代替 s g R N A 配列を表す。

【図 12】本開示による c e D N A ベクターの概略図である。

【図 13】本開示による c e D N A ベクターの概略図である。

【図 14】s g R N A を発現させるための発現カセットの概略図である。

【図 15】図 20 および 21 とは異なる、本開示による c e D N A ベクターの概略図である。

【図 16】本開示による c e D N A ベクターの概略図である。c e D N A ベクターのうちの 3 つは、5 ' および 3 ' 相同性アームと、アルブミンへの挿入に適したプロモーターレス導入遺伝子で構成されている。また、プロモーター駆動の導入遺伝子、例えば、任意のセーフハーバー部位に挿入され得るレポーター遺伝子を含む、5 ' および 3 ' 相同性アームを有する c e D N A も描かれる。挿入が重大な悪影響を引き起こさない標的領域。所与のゲノム（例えば、ヒトゲノム）におけるゲノムセーフハーバー部位は、当該技術分野において既知であり、例えば、P a p a p e t r o u , E R & S c h a m b a c h , A . M o l e c u l a r T h e r a p y 24 (4) : 678 - 684 (2016) または S a d e l a i n e t a l . N a t u r e R e v i e w s C a n c e r 12 : 51 - 58 (2012) に記載されており、各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【図 17 - 1】アルブミンマウス遺伝子座の標的中心および F I X をコードするドナーテンプレートの概略図および配列である。図 17 は、配列番号 835 を開示する。

【図 17 - 2】アルブミンマウス遺伝子座の標的中心および F I X をコードするドナーテンプレートの概略図および配列である。図 17 は、配列番号 835 を開示する。

【図 18 A】（図 18 A および図 18 B）アルブミンマウス遺伝子座相同性アームの標的中心、および例示的なガイド R N A 位置（図 18 A）、およびガイド R N A S（図 18 B）の概略図および配列である。図 18 A および 18 B は、出現順に、それぞれ配列番号 835 ～ 841 を開示する。

10

20

30

40

50

【図18B】(図18Aおよび図18B)アルブミンマウス遺伝子座相同性アームの標的中心、および例示的なガイドRNA位置(図18A)、およびガイドRNAS(図18B)の概略図および配列である。図18Aおよび18Bは、出現順に、それぞれ配列番号835~841を開示する。

【図19】(i)発現ベクターの細胞送達、(ii)gRNAの設計、(iii)細胞培養法および最適化、(iv)Cas9 RNPアセンブリー、(v)相同性指向修復テンプレートを含むceDNAベクター、ならびに(vi)良好な遺伝子編集の検出を含む、本明細書に記載される方法および組成物で有用な遺伝子編集実験プロトコルの例示的なワークフロー方法の概略図が、本明細書に提供される。

【発明を実施するための形態】

【0095】

I. 定義

本明細書で別途定義されない限り、本出願に関して使用される科学的および技術的用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、および試薬等に限定されず、そのようなものとして変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、単に特許請求の範囲によって定義される、本発明の範囲を限定することを意図しない。免疫学および分子生物学における一般的な用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3)、Robert S. Porter et al. (eds.), Fields Virology, 6th Edition, published by Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2013)、Knipe, D. M. and Howley, P. M. (ed.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908)、およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)、Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006、Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305)、Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055)、Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (2012) (ISBN 1936113414)、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X)、Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542)、Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), Joh

10

20

30

40

50

n Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005、および Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strober, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)に見出すことができ、これらの内容はすべて、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0096】

本明細書で使用される場合、「異種ヌクレオチド配列」および「導入遺伝子」は、交換可能に使用され、本明細書で開示される cDNA ベクターに組み込まれ、それによって送達および発現され得る、関心対象の（カプシドポリペプチドをコードする核酸以外の）核酸を指す。

【0097】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」および「転写カセット」という用語は、交換可能に使用され、導入遺伝子の転写を配向するのに十分な1つ以上のプロモーターまたは他の調節配列に操作可能に連結された導入遺伝子を含むが、カプシドをコードする配列、他のベクター配列、または逆位末端反復領域を含まない核酸の直鎖状ストレッチを指す。発現カセットは、追加として、1つ以上のシス作用性配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、またはリプレッサー）、1つ以上のイントロン、および1つ以上の転写後調節エレメントを含んでもよい。

20

【0098】

本明細書で交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。したがって、この用語には、一本鎖、二本鎖、または多重らせん DNA もしくは RNA、ゲノム DNA、cDNA、DNA-RNA ハイブリッド、あるいはプリンおよびピリミジン塩基または他の天然、化学的もしくは生化学的修飾、非天然、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。「オリゴヌクレオチド」は、一般に、一本鎖または二本鎖 DNA の約5～約100ヌクレオチドのポリヌクレオチドを指す。しかしながら、この開示の目的のために、オリゴヌクレオチドの長さに上限はない。オリゴヌクレオチドは、「オリゴマー」または「オリゴ」としても知られており、遺伝子から単離するか、または当技術分野で知られている方法によって化学的に合成することができる。「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、記載されている実施形態に適用可能であるように、一本鎖（センスまたはアンチセンスなど）および二本鎖ポリヌクレオチドを含むと理解されるべきである。

30

【0099】

本明細書で使用される「核酸構築物」という用語は、天然に存在する遺伝子から単離されるか、またはそうでなければ天然に存在しないような方法で核酸のセグメントを含むように修飾されるか、または合成のものである、一本鎖または二本鎖の核酸分子を指す。核酸構築物という用語は、核酸構築物が本開示のコード配列の発現に必要な制御配列を含む場合、「発現カセット」という用語と同義である。「発現カセット」は、プロモーターに操作可能に連結された DNA コード配列を含む。

40

【0100】

「ハイブリダイズ可能」または「相補的」または「実質的に相補的」とは、核酸（例えば、RNA）が、非共有結合する、すなわち、ワトソン・クリック塩基対および／または G/U 塩基対を形成する、温度および溶液イオン強度の適切なインビトロおよび／またはインビボ条件下で配列特異的、逆平行方法で別の核酸に「アニール」または「ハイブリダイズ」する（すなわち、核酸は、相補的核酸に特異的に結合する）のを可能にするヌクレ

50

オチドの配列を含むことを意味する。当該技術分野で知られているように、標準的なワトソン・クリック塩基対合には、チミジン（T）とのアデニン（A）対合、ウラシル（U）とのアデニン（A）対合、およびシトシン（C）とのグアニン（G）対合が含まれる。さらに、2つのRNA分子（例えば、dsRNA）間のハイブリダイゼーションのために、グアニン（G）塩基がウラシル（U）と対合することも当該技術分野で知られている。例えば、G/U塩基対合は、mRNA中のコドンとのtRNAアンチコドン塩基対合の状況で、遺伝暗号の縮重（すなわち、冗長性）を部分的に担っている。この開示の文脈において、対象のDNA標的化RNA分子のタンパク質結合セグメント（dsRNA二重鎖）のグアニン（G）は、ウラシル（U）に相補的であると見なされ、逆もまた同様である。したがって、対象のDNA標的RNA分子のタンパク質結合セグメント（dsRNA二重鎖）の所与のヌクレオチド位置でG/U塩基対を作製できる場合、その位置は、非相補的であると見なされないが、代わりに相補的であると見なされる。

10

【0101】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、コードおよび非コードアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸、および修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。

【0102】

特定のRNAまたはタンパク質遺伝子産物を「コードする」DNA配列は、特定のRNAおよび／またはタンパク質に転写されるDNA核酸配列である。DNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されるRNA（mRNA）をコードし得るか、またはDNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されないRNA（例えば、tRNA、rRNA、またはDNA標的RNA、「非コード」RNAまたは「ncRNA」とも呼ばれる）をコードし得る。

20

【0103】

本明細書で使用される場合、「遺伝子編集分子」という用語は、タンパク質またはタンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上を指し、タンパク質は、トランスポザゼ、ヌクレアーゼ、インテグラーゼ、ガイドRNA（gRNA）、ガイドDNA、リボ核タンパク質（RNP）、またはアクチベーターRNAを含む群から選択される。ヌクレアーゼ遺伝子編集分子は、ヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であり、非限定的な例には、CRISPRタンパク質（Cas）、CRISPR関連タンパク質9（Cas9）；IIS型制限酵素；転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）；およびジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、メガヌクレアーゼ、操作された部位特異的ヌクレアーゼ、またはCRISPRiもしくはCRISPRa系のための非活性化CASが含まれる。遺伝子編集分子はまた、DNA結合ドメインおよびヌクレアーゼを含み得る。ある特定の実施形態では、遺伝子編集分子は、DNA結合ドメインおよびヌクレアーゼを含む。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、ガイドRNAを含む。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、TALENのDNA結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子編集分子は、1つ以上の転移因子を含む。ある特定の実施形態では、1つ以上の転移因子は、環状DNAを含む。ある特定の実施形態では、1つ以上の転移因子は、プラスミドベクターまたは小環状DNAベクターを含む。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、ジンクフィンガーヌクレアーゼのDNA結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子編集分子は、1つ以上の転移因子を含む。ある特定の実施形態では、1つ以上の転移因子は、直鎖状DNAを含む。トランスポゾンコードする直鎖状組み換えおよび非天然に存在するDNA配列は、インビトロで産生され得る。本開示の直鎖状組み換えおよび非天然に存在するDNA配列は、環状DNAの制限消化の産物であり得る。ある特定の実施形態では、環状DNAは、プラスミドベクターまたは小環状DNAベクターである。本開示の直鎖状組み換えおよび非天然に存在するDNA配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の産物であり得る。本開示の直鎖状組み換えおよび非天然に存在するDNA配列は、二本鎖doggyb

30

40

50

one（商標）DNA配列であり得る。本開示のDoggybone（商標）DNA配列は、抗原発現カセット、コンプリシン抗原、プロモーター、ポリAテール、およびテロメア末端のみをコードする酵素プロセスによって産生され得る。

【0104】

本明細書で使用される場合、「遺伝子編集機能」という用語は、機能の喪失または獲得を伴う、ゲノムの特定の部位でのDNAの挿入、欠失、または置換を指す。特定の部位でのDNAの挿入、欠失、または置換は、例えば、相同性指向修復（HDR）または非同末端結合（NHEJ）、または単一塩基の変更編集によって実現され得る。いくつかの実施形態では、ドナーテンプレートが、例えば、HDRのために使用され、それによりドナーテンプレート内の所望の配列が、相同組み換え事象によってゲノムに挿入される。一実施形態では、「ドナーテンプレート」または「修復テンプレート」は、宿主ゲノムに導入される核酸配列に所望の突然変異または挿入を含むドナー配列のいずれかの側に隣接する2つの相同性アーム（例えば、5'相同性アームおよび3'相同性アーム）を含む。5'および3'相同性アームは、エンドヌクレアーゼ媒介切断の部位における標的遺伝子のゲノム配列と実質的に相同である。3'相同性アームは、一般に、エンドヌクレアーゼが切断する（例えば、二本鎖DNA切断）、またはいくつかの実施形態ではDNAをニックングするプロトSpacer隣接モチーフ（PAM）部位のすぐ下流にある。

10

【0105】

本明細書で使用される場合、「遺伝子編集系」という用語は、細胞内でゲノム編集を行うのに必要な最小限の構成成分を指す。例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはTALEN系は、標的遺伝子の配列に相補的な核酸に融合したエンドヌクレアーゼの発現のみを必要とする場合があるが、CRISPR/Cas遺伝子編集系の場合、最小構成成分は、CasエンドヌクレアーゼおよびガイドRNAを必要とする場合がある。遺伝子編集系は、必要に応じて単一のceDNAベクターまたは複数のベクター上でコードされ得る。当業者は、遺伝子編集系に必要な構成成分（複数可）を容易に理解するであろう。

20

【0106】

本明細書で使用される場合、「塩基編集部分」という用語は、配列内の単一ヌクレオチド、例えば、シトシン/グアニンヌクレオチド対「G/C」をアデニンおよびチミン「T」/ウリジン「U」ヌクレオチド対（A/T、U）に（例えば、Shevidi et al. Dev Dyn 31（2017）PMID：28857338、Kyoungmi et al. Nature Biotechnology 35：435-437（2017）を参照、各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）またはアデニン/チミン「A/T」ヌクレオチド対からグアニン/シトシン「G/C」ヌクレオチド対に（例えば、Gaudelli et al. Nature（2017），in press doi：10.1038/nature24644を参照、この内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）変更することができる酵素または酵素系を指す。

30

【0107】

本明細書で使用される場合、「ゲノムセーフハーバー遺伝子」または「セーフハーバー遺伝子」という用語は、内因性遺伝子活性に重大な悪影響を及ぼすことなく、または癌を促進することなく、配列が予測可能な方法で統合および機能し得る（例えば、関心対象のタンパク質を発現する）ように、核酸配列を挿入することができる遺伝子または遺伝子座を指す。いくつかの実施形態では、セーフハーバー遺伝子はまた、挿入された核酸配列が非セーフハーバー部位よりも効率的かつ高レベルで発現され得る遺伝子座または遺伝子である。

40

【0108】

本明細書で使用される場合、「遺伝子送達」という用語は、外来DNAが遺伝子療法の適用のために宿主細胞に導入されるプロセスを意味する。

【0109】

本明細書で使用される場合、「CRISPR」という用語は、クラスター化された規則

50

的に間隔を空けた短いパリンδροーム反復を表し、これは、CRISPR-Cas9ゲノム編集技術の基礎を形成する細菌防御系の特徴である。

【0110】

本明細書で使用される場合、「ジンクフィンガー」という用語は、折り目を安定させるために、1つ以上の垂鉛イオンの配位によって特徴付けられる小さなタンパク質構造モチーフを意味する。

【0111】

本明細書で使用される場合、「相同組み換え」という用語は、ヌクレオチド配列がDNAの2つの類似または同一の分子間で交換される一種の遺伝子組み換えを意味する。相同組み換えはまた、DNA配列の新しい組み合わせを産生する。DNAのこれらの新しい組み合わせは、遺伝的変異を表す。相同組み換えは、ウイルスの異なる株と種との間で遺伝物質を交換するために、水平遺伝子導入にも使用される。

【0112】

本明細書で使用される場合、「末端反復」または「TR」という用語は、少なくとも1つの最小限必要な複製起源、および回文ヘアピン構造を含む領域を含む、任意のウイルス末端配列または合成配列を含む。Rep結合配列（「RBS」）（RBE（Rep結合エレメント）とも称される）および末端分解部位（「TRS」）は、一緒に「最小限必要な複製起源」を構成し、したがって、TRは、少なくとも1つのRBSおよび少なくとも1つのTRSを含む。ポリヌクレオチド配列の所与のストレッチ内で互いの逆相補鎖であるTRは、典型的に、各々「逆位末端反復」または「ITR」と称される。ウイルスの文脈において、ITRは、複製、ウイルスパッケージング、統合、およびプロウイルスレスキューを媒介する。本明細書で本発明において予想外に見出されたように、全長にわたって逆相補鎖でないTRは、依然としてITRの従来の機能を行うことができ、したがって、ITRという用語は、本明細書において、ceDNAベクターの複製を媒介することができるceDNAゲノムまたはceDNAベクター中のTRを指すように使用される。複合ceDNAベクター構成中、2つより多くのITRまたは非対称ITR対が存在し得ることは、当業者によって理解されるであろう。ITRは、AAV ITRもしくは非AAV ITRであり得るか、またはAAV ITRもしくは非AAV ITRに由来し得る。

例えば、ITRは、パルボウイルスおよびディペンドウイルス（例えば、イヌパルボウイルス、ウシパルボウイルス、マウスパルボウイルス、ブタパルボウイルス、ヒトパルボウイルスB-19）を包含するパルボウイルス科に由来し得るか、またはSV40複製の起源として役立つSV40ヘアピンは、切断、置換、欠失、挿入、および／もしくは付加によってさらに修飾され得る、ITRとして使用され得る。Parvoviridaeファミリーウイルスは、脊椎動物に感染するParvovirinaeおよび無脊椎動物に感染するDensovirinaeの2つのサブファミリーで構成されている。ディペンドパルボウイルスは、ヒト、霊長類、ウシ、イヌ、ウマ、ヒツジ種を含むが、これらに限定されない脊椎動物宿主における複製が可能である、アデノ関連ウイルス（AAV）のウイルスファミリーを含む。本明細書では便宜上、ceDNAベクター中の発現カセットに対して5'（その上流）に位置するITRは、「5' ITR」または「左ITR」と称され、ceDNAベクター中の発現カセットに対して3'（その下流）に位置するITRは、「3' ITR」または「右ITR」と称される。

【0113】

「野生型ITR」または「WT-ITR」は、例えば、Rep結合活性およびRepニッキング能力を保持する、AAVまたは他のディペンドウイルスにおける天然に存在するITR配列の配列を指す。任意のAAV血清型からのWT-ITRのヌクレオチド配列は、遺伝コードまたはドリフトの縮退のために、天然に存在する正準配列とわずかに異なる場合があり、したがって本明細書における使用のために包含されるWT-ITR配列は、産生プロセス中に発生する天然に存在する変化（例えば、複製エラー）の結果としてWT-ITR配列を含む。

【0114】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「実質的に対称のWT-ITR」または「実質的に対称のWT-ITR対」という用語は、両方がそれらの全長にわたって逆相補配列を有する野生型ITRである単一のc e DNAゲノムまたはc e DNAベクター内のWT-ITRの対を指す。例えば、変化が配列の特性および全体的な3次元構造に影響を及ぼさない限り、天然に存在する正準配列から逸脱する1つ以上のヌクレオチドを有する場合でも、ITRが野生型の配列であると思なすことができる。いくつかの態様では、逸脱するヌクレオチドは、保存的配列変化を表す。非限定的な一例として、配列は、正準配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性（例えば、デフォルト設定でBLASTを使用して測定される）を有し、またそれらの3次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、他のWT-ITRに対して対称の3次元空間構成を有する。実質的に対称のWT-ITRは、3次元空間で同じA、C-C'、B-B'ループを有する。実質的に対称のWT-ITRは、適切なRepタンパク質と対合する操作可能なRep結合部位(RBEまたはRBE')および末端分解部位(trs)を有することを決定することによって、WTとして機能的に確認することができる。任意に、許容条件下での導入遺伝子発現を含む他の機能を試験することができる。

10

【0115】

本明細書で使用される場合、「修飾型ITR」または「mod-ITR」または「突然変異体ITR」の語句は、本明細書で交換可能に使用され、同じ血清型からのWT-ITRと比較して、少なくとも1つ以上のヌクレオチドに突然変異を有するITRを指す。突然変異は、同じ血清型のWT-ITRの3次元空間構成と比較して、ITRのA、C、C'、B、B'領域のうちの1つ以上の変化をもたらし得、3次元空間構成（すなわち、幾何学的空間におけるその3次元構造）の変化をもたらし得る。

20

【0116】

本明細書で使用される場合、「非対称ITR対」とも呼ばれる「非対称ITR」という用語は、全長にわたって逆相補鎖ではない単一のc e DNAゲノムまたはc e DNAベクター内のITRの対を指す。非限定的な一例として、非対称ITR対は、それらの3次元構造が、幾何学的空間において異なる形状であるように、それらの同族ITRに対して対称の3次元空間構成を有しない。言い換えると、非対称のITR対は、全体的な幾何学的構造が異なり、すなわち、3次元空間でのそれらのA、C-C'、およびB-B'ループの構成が異なる（例えば、同族ITRと比較して、1つのITRは、短いC-C'アームおよび/または短いB-B'ループを有し得る）。2つのITR間の配列の相違は、1つ以上のヌクレオチド付加、欠失、切断、または点突然変異に起因し得る。一実施形態では、非対称ITR対の一方のITRは、野生型AAV ITR配列であり得、他方のITRは、本明細書で定義される修飾型ITR（例えば、非野生型または合成ITR配列）であり得る。別の実施形態では、非対称ITR対のどちらのITRも野生型AAV配列ではなく、2つのITRは、幾何学的空間において異なる形状（すなわち、異なる全体的な幾何学的構造）を有する修飾型ITRである。いくつかの実施形態では、非対称ITR対の一方のmod-ITRは、短いC-C'アームを有することができ、他のITRは、それらが同族の非対称mod-ITRと比較して、異なる3次元空間構成を有するように異なる修飾（例えば、単一アーム、または短いB-B'アーム等）を有し得る。

30

40

【0117】

本明細書で使用される場合、「対称ITR」という用語は、野生型ディペンドウイルスITR配列に対して突然変異または修飾され、それらの全長にわたって逆相補鎖である単一のc e DNAゲノムまたはc e DNAベクター内の一対のITRを指す。どちらのITRも野生型ITR AAV2配列ではなく（すなわち、それらは修飾型ITRであり、突然変異体ITRとも呼ばれる）、ヌクレオチドの付加、欠失、置換、切断、または点突然変異により、野生型ITRとは配列が異なり得る。本明細書では便宜上、c e DNAベクター中の発現カセットに対して5'（その上流）に位置するITRは、「5' ITR」または「左ITR」と称され、c e DNAベクター中の発現カセットに対して3'（その下流）に位置するITRは、「3' ITR」または「右ITR」と称される。

50

【0118】

本明細書で使用される場合、「実質的に対称の修飾型 I T R」または「実質的に対称の m o d - I T R 対」という用語は、両方がそれらの全長にわたって逆相補配列を有する単一の c e D N A ゲノムまたは c e D N A ベクター内の修飾型 I T R の対を指す。例えば、修飾型 I T R は、変化が特性および全体的な形状に影響を及ぼさない限り、逆相補配列から逸脱するいくつかのヌクレオチド配列がある場合でも、実質的に対称と見なすことができる。非限定的な一例として、配列は、正準配列に対して少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性（デフォルト設定で B L A S T を使用して測定される）を有し、またそれらの 3 次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、それらの同族の修飾型 I T R に対して対称の 3 次元空間構成を有する。言い換えると、実質的に対称の修飾型 I T R 対は、3 次元空間に構成された同じ A、C - C'、および B - B' ループを有する。いくつかの実施形態では、m o d - I T R 対からの I T R は、異なる逆相補鎖ヌクレオチド配列を有し得るが、依然として同じ対称の 3 次元空間構成を有し得る。すなわち、両方の I T R は、同じ全体的な 3 次元形状をもたらす突然変異を有する。例えば、m o d - I T R 対の 1 つの I T R（例えば、5' I T R）は、1 つの血清型に由来し得、他方の I T R（例えば、3' I T R）は、異なる血清型に由来し得るが、両方が同じ対応する突然変異を有し得（例えば、5' I T R が C 領域に欠失を有する場合、異なる血清型の同族の修飾型 3' I T R は、C' 領域の対応する位置に欠失を有する）、それにより修飾型 I T R 対が同じ対称の 3 次元空間構成を有する。そのような実施形態では、修飾型 I T R 対の各 I T R は、A A V 2 および A A V 6 の組み合わせなどの異なる血清型（例えば、A A V 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、および 12）に由来し得、1 つの I T R の修飾は、異なる血清型の同族の I T R の対応する位置に反映される。一実施形態では、実質的に対称の修飾型 I T R 対は、I T R 間のヌクレオチド配列の相違が特性または全体的な形状に影響を与えず、それらが 3 次元空間で実質的に同じ形状を有する限り、一対の修飾型 I T R（m o d - I T R）を指す。非限定的な例として、m o d - I T R は、B L A S T（B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l）またはデフォルト設定の B L A S T N などの当該技術分野において周知の標準的な手段によって決定される、正準 m o d - I T R に対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有し、またそれらの 3 次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、対称の 3 次元空間構成を有する。実質的に対称の m o d - I T R 対は、3 次元空間で同じ A、C - C' および B - B' ループを有する。例えば、実質的に対称の m o d - I T R 対の修飾型 I T R が C - C' アームの欠失を有する場合、同族の m o d - I T R は、C - C' ループの対応する欠失を有し、またその同族の m o d - I T R の幾何学的空間に同じ形状の残りの A および B - B' ループの同様の 3 次元構造を有する。

【0119】

「隣接する」という用語は、別の核酸配列に対するある核酸配列の相対位置を指す。一般に、配列 A B C では、B の両側に A および C が隣接している。配置 A x B x C についても同様である。したがって、隣接する配列は、隣接される配列の前または後に続くが、隣接される配列と連続している、またはすぐ隣である必要はない。一実施形態では、隣接するという用語は、直鎖状二重鎖 c e D N A ベクターの各末端における末端反復を指す。

【0120】

本明細書で使用される場合、「c e D N A ゲノム」という用語は、少なくとも 1 つの逆位末端反復領域をさらに組み込む発現カセットを指す。c e D N A ゲノムは、1 つ以上のスペーサー領域をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、c e D N A ゲノムは、D N A の分子間二重鎖ポリヌクレオチドとして、プラスミドまたはウイルスゲノムに組み込まれる。

【0121】

本明細書で使用される場合、「c e D N A スペーサー領域」という用語は、c e D N A ベクターまたは c e D N A ゲノム中の機能的エレメントを分離する介在配列を指す。いく

つかの実施形態では、c e D N A スペーサー領域は、最適機能性のための所望の処理で 2 つの機能的エレメントを保持する。いくつかの実施形態では、c e D N A スペーサー領域は、例えば、プラスミドまたはバキュロウイルス内の c e D N A ゲノムの遺伝的安定性を提供する、または増大させる。いくつかの実施形態では、c e D N A スペーサー領域は、クローニング部位等に便利な位置を提供することによって、c e D N A ゲノムの容易な遺伝子操作を促進する。例えば、ある特定の態様では、いくつかの制限エンドヌクレアーゼ部位を含有するオリゴヌクレオチド「ポリリンカー」、または既知のタンパク質（例えば、転写因子）結合部位を有しないように設計された非オープンリーディングフレーム配列を c e D N A ゲノム中に位置付けて、シス作用性因子を分離することができ、例えば、末端分解部位と、上流転写調節エレメントとの間に 6 m e r、1 2 m e r、1 8 m e r、2 4 m e r、4 8 m e r、8 6 m e r、1 7 6 m e r 等を挿入する。同様に、スペーサーを、ポリアデニル化シグナル配列と 3' 末端分解部位との間に組み込むことができる。

【0122】

本明細書で使用される場合、「R e p 結合部位」、「R e p 結合エレメント」、「R B E」、および「R B S」は、交換可能に使用され、R e p タンパク質（例えば、A A V R e p 7 8 または A A V R e p 6 8）の結合部位を指し、R e p タンパク質による結合時に、R e p タンパク質が、R B S を組み込む配列上でその部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を実行できるようにする。R B S 配列およびその逆相補鎖は、一緒に単一 R B S を形成する。R B S 配列は、当該技術分野において既知であり、例えば、A A V 2 において特定された R B S 配列である 5' - G C G C G C T C G C T C G C T C - 3'（配列番号 5 3 1）を含む。任意の既知の R B S 配列は、他の既知の A A V R B S 配列および他の天然に既知のまたは合成 R B S 配列を含む、本発明の実施形態において使用され得る。理論に束縛されるものではないが、R e p タンパク質のヌクレアーゼドメインは、二重鎖ヌクレオチド配列 G C T C に結合し、したがって 2 つの既知の A A V R e p タンパク質は、二重鎖オリゴヌクレオチド、5' - (G C G C) (G C T C) (G C T C) (G C T C) - 3'（配列番号 5 3 1）に直接結合し、安定に集成すると考えられる。加えて、可溶性凝集配座異性体（すなわち、不定数の相互関連 R e p タンパク質）は解離し、R e p 結合部位を含有するオリゴヌクレオチドに結合する。各 R e p タンパク質は、各鎖上の窒素塩基およびホスホジエステル骨格の両方と相互作用する。窒素塩基との相互作用は、配列特異性を提供するが、ホスホジエステル骨格との相互作用は、非配列特異性または低配列特異性であり、タンパク質-D N A 複合体を安定させる。

【0123】

本明細書で使用される場合、「末端分解部位」および「T R S」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、R e p が、細胞 D N A ポリメラーゼ、例えば D N A p o l δ または D N A p o l ε を介して D N A 伸長の基質として役立つ 3' O H を生成する 5' チミジンとのチロシン-ホスホジエステル結合を形成する領域を指す。代替として、R e p-チミジン複合体は、配位ライゲーション反応に関与し得る。いくつかの実施形態では、T R S は、最小限で非塩基対チミジンを包含する。いくつかの実施形態では、T R S のニッキング効率は、R B S からの同じ分子内のその距離によって少なくとも部分的に制御され得る。受容体基質が相補的 I T R であるとき、得られる産生物は、分子間二重鎖である。T R S 配列は、当該技術分野において既知であり、例えば、A A V 2 において特定されたヘキサヌクレオチド配列である 5' - G G T T G A - 3'（配列番号 4 5）を含む。他の既知の A A V T R S 配列、A G T T（配列番号 4 6）、G G T T G G（配列番号 4 7）、A G T T G G（配列番号 4 8）、A G T T G A（配列番号 4 9）などの他の天然に既知のまたは合成 T R S 配列、および R R T T R R（配列番号 5 0）などの他のモチーフを含む、任意の既知の T R S 配列を、本発明の実施形態において使用することができる。

【0124】

本明細書で使用される場合、「c e D N A-プラスミド」という用語は、分子間二重鎖として c e D N A ゲノムを含むプラスミドを指す。

【0125】

本明細書で使用される場合、「ceDNA-バクミド」という用語は、E. coliにおいてプラスミドとして伝播することができる分子間二重鎖としてceDNAゲノムを含み、それによりバキュロウイルスのシャトルベクターとして操作し得る、感染性バキュロウイルスゲノムを指す。

【0126】

本明細書で使用される場合、「ceDNA-バキュロウイルス」という用語は、バキュロウイルスゲノム内の分子間二重鎖としてceDNAゲノムを含むバキュロウイルスを指す。

【0127】

本明細書で使用される場合、「ceDNA-バキュロウイルス感染昆虫細胞」および「ceDNA-BIIC」という用語は、交換可能に使用され、ceDNA-バキュロウイルスに感染した無脊椎動物宿主細胞（限定されないが、昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）を含む）を指す。

【0128】

本明細書で使用される場合、「閉端DNAベクター」、「ceDNAベクター」、および「ceDNA」は、交換可能に使用され、少なくとも1つの共有結合性閉端を有する非ウイルスカプシド不含DNAベクター（すなわち、分子間二重鎖）を指す。いくつかの実施形態では、ceDNAは、2つの共有結合性閉端を含む。

【0129】

本明細書で定義されるように、「レポーター」は、検出可能な読み出しを提供するために使用することができるタンパク質を指す。レポーターは、一般に、蛍光、色、または発光などの測定可能なシグナルを産生する。レポータータンパク質コード配列は、細胞または生物中の存在が容易に観察されるタンパク質をコードする。例えば、蛍光タンパク質は、特定波長の光で励起されたときに細胞を蛍光させ、ルシフェラーゼは、細胞に光を生成する反応を触媒させ、β-ガラクトシダーゼなどの酵素は、基質を着色産生物に変換する。実験または診断目的のために有用な例示的なレポーターポリペプチドとしては、β-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ（LacZ）、アルカリンホスファターゼ（AP）、チミジンキナーゼ（TK）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、および他の蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ルシフェラーゼ、なら

【0130】

本明細書で使用される場合、「エフェクタータンパク質」という用語は、例えば、レポーターポリペプチドとして、あるいはより適切には、細胞を殺傷するポリペプチド、例えば毒素、または選択された薬剤もしくはその欠失で細胞を殺傷しやすくする薬剤として、検出可能な読み出しを提供するポリペプチドを指す。エフェクタータンパク質は、宿主細胞のDNAおよび／またはRNAを直接標的または損傷する任意のタンパク質またはペプチドを含む。例えば、エフェクタータンパク質としては、宿主細胞DNA配列を標的とする制限エンドヌクレアーゼ（ゲノム因子であるか染色体外因子であるかにかかわらず）、細胞生存に必要なポリペプチドを標的とするプロテアーゼ、DNAギラーゼ阻害剤、およびリボヌクレアーゼ型毒素が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成生物的回路によって制御されるエフェクタータンパク質の発現は、別の合成生物的回路における因子として関与し得、それによって生物的回路系の反応性の範囲および複雑性を拡張する。

【0131】

転写調節因子は、関心対象の遺伝子の転写を活性化または抑制する、転写アクチベーターおよびリプレッサーを指す。プロモーターは、特定の遺伝子の転写を開始する核酸の領域である。転写アクチベーターは、典型的に、転写プロモーターの近くに結合し、RNAポリメラーゼを動員して転写を直接開始する。リプレッサーは、転写プロモーターに結合し、RNAポリメラーゼによる転写開始を立体的に妨害する。他の転写調節因子は、それ

らが結合する場所、ならびに細胞条件および環境条件に応じて、アクチベーターまたはリプレッサーのいずれかとして役立ち得る。転写調節因子クラスの特例としては、ホメオドメインタンパク質、亜鉛フィンガータンパク質、翼状らせん（フォークヘッド）タンパク質、およびロイシンジッパータンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0132】

本明細書で使用される場合、「リプレッサータンパク質」または「誘導因子タンパク質」は、調節配列エレメントに結合するタンパク質であり、調節配列エレメントに操作可能に連結した配列の転写をそれぞれ抑制または活性化する。本明細書に記載される好ましいリプレッサーおよび誘導因子タンパク質は、少なくとも1つの入力剤または環境入力の実在または非存在に敏感である。本明細書に記載される好ましいタンパク質は、例えば、分離可能なDNA結合および入力剤結合、または反応性エレメントもしくはドメインを含む形態のモジュールである。

10

【0133】

本明細書で使用される場合、「担体」としては、任意かつすべての溶媒、分散媒質、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁液、コロイド等が挙げられる。薬学的活性物質に対するそのような媒質および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。補充的活性成分を組成物に組み込むこともできる。「薬学的に許容される」という語句は、宿主に投与されたときに、毒性反応、アレルギー性反応、または同様の不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。

20

【0134】

本明細書で使用される場合、「入力剤反応性ドメイン」は、条件または入力剤に結合するか、またはそうでなければ連結DNA結合融合ドメインをその条件もしくは入力の実在に対して反応性にするように、条件または入力剤に反応する転写因子のドメインである。一実施形態では、条件または入力の実在は、入力剤反応性ドメインまたはそれが融合するタンパク質の立体構造変化をもたらす、それが転写因子の転写調節活性を修飾する。

【0135】

「インビボ」という用語は、多細胞動物などの生物中または生物内で起こるアッセイまたはプロセスを指す。本明細書に記載される態様のうちのいくつかでは、方法または使用は、細菌などの単細胞生物が使用されるときに「インビボで」起こると言われ得る。「エクスビボ」という用語は、多細胞動物または植物、例えば、とりわけ外植片、培養細胞（一次細胞および細胞株を含む）、形質転換細胞株、および抽出組織または細胞（血液細胞を含む）の体外に無傷膜を有する生細胞を使用して実行される方法および使用を指す。「インビトロ」という用語は、細胞抽出物などの無傷膜を有する細胞の実在を必要としないアッセイおよび方法を指し、非細胞系、例えば細胞抽出物などの細胞または細胞系を含まない媒質にプログラム可能な合成生物的回路を導入することを指し得る。

30

【0136】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、タンパク質またはRNAをコードする異種標的遺伝子であり得る、核酸配列の転写を駆動することによって、別の核酸配列の発現を調節する任意の核酸配列を指す。プロモーターは、構成的、誘導性、抑制性、組織特異性、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。プロモーターは、核酸配列の残りの転写の開始および速度が制御される、核酸配列の制御領域である。プロモーターはまた、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節タンパク質および分子が結合し得る、遺伝子エレメントを含有し得る。本明細書に記載される態様のいくつかの実施形態では、プロモーターは、プロモーター自体の発現を調節する転写因子の発現を駆動することができる。プロモーター配列内では、転写開始部位、ならびにRNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメインが見出されるであろう。真核生物プロモーターは、必ずしもそうではないが、多くの場合、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含有する。誘導性プロモーターを含む様々なプロモーターを使用して、本明細書に開示されるcDNAベクター中の導入遺伝子の発現を駆動することができる。プロモ

40

50

ーター配列は、その 3' 末端で転写開始部位によって結合され、バックグラウンドより上で検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基または要素を含むように上流（5' 配向）に伸びる。

【0137】

本明細書で使用される場合、「エンハンサー」という用語は、1つ以上のタンパク質（例えば、活性因子タンパク質または転写因子）に結合して、核酸配列の転写活性化を増加させるシス作用性調節配列（例えば、50～1,500塩基対）を指す。エンハンサーは、それらが調節する遺伝子開始部位の上流または遺伝子開始部位の下流で最大1,000,000塩基対に位置付けられ得る。エンハンサーは、非関連遺伝子のイントロン領域内またはエクソン領域内に位置付けられ得る。

10

【0138】

プロモーターは、それが調節する核酸配列の発現を駆動する、または転写を駆動することができる。「操作可能に連結された」、「操作可能に位置付けられた」、「作動可能に連結された」、「制御下」、および「転写制御下」という語句は、プロモーターが、核酸配列に関して正しい機能的な位置および／または配向にあり、その配列の転写開始および／または発現を制御するように調節することを示す。本明細書で使用される場合、「逆位プロモーター」は、核酸配列が逆配向にあるプロモーターを指し、それによりコード鎖であったものは、今は非コード鎖であり、逆も同様である。逆位プロモーター配列を様々な実施形態で使用して、スイッチの状態を調節する。加えて、様々な実施形態では、プロモーターをエンハンサーと併せて使用することができる。

20

【0139】

プロモーターは、所与の遺伝子または配列のコードセグメントおよび／またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって取得され得る、遺伝子または配列と天然に関連するものであり得る。そのようなプロモーターは、「内因性」と呼ばれ得る。同様に、いくつかの実施形態では、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列と天然に関連するものであり得る。

【0140】

いくつかの実施形態では、コード核酸セグメントは、「組み換えプロモーター」または「異種プロモーター」の制御下で位置付けられ、これらの両方が、その自然環境において操作可能に連結されたコードされた核酸配列と通常は関連しないプロモーターを指す。組み換えまたは異種エンハンサーは、その自然環境において所与の核酸配列と通常は関連しないエンハンサーを指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、任意の他の原核、ウイルス性、または真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在」しない合成プロモーターまたはエンハンサーを含み得、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および／または当該技術分野において既知である遺伝子操作の方法を通じて発現を変更する突然変異を含み得る。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成的に産生することに加えて、プロモーター配列は、本明細書に開示される合成生物的回路およびモジュールに関して、PCRを含む組み換えクローニングおよび／または核酸増幅技術を使用して産生され得る（例えば、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照、各々が参照により本明細書に組み込まれる）。さらに、ミトコンドリア、クロロプラスト等の非核性細胞小器官内の配列の転写および／または発現を配向する制御配列が同様に用いられ得ることが企図される。

30

40

【0141】

本明細書に記載される場合、「誘導性プロモーター」は、誘導因子または誘導剤の存在下、それによって影響されるとき、またはそれによって接触されるときに、転写活性を開始または強化することによって特徴付けられるものである。本明細書に定義される場合、「誘導因子」または「誘導剤」は、内因性であり得るか、または誘導性プロモーターからの転写活性を誘導することにおいて活性であるような方法で投与される、通常は外因性の化合物またはタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、誘導因子または誘導剤、

50

すなわち、化学物質、化合物、またはタンパク質は、それ自体が核酸配列の転写または発現の結果であり得（すなわち、誘導因子は、別の構成成分またはモジュールによって発現される誘導因子タンパク質であり得る）、それ自体が誘導性プロモーターの制御下であり得る。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、リプレッサーなどのある特定の薬剤の非存在下で誘導される。誘導性プロモーターの例としては、テトラサイクリン、メタロチオニン、エクジソン、哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、およびマウス乳腺腫瘍ウイルス長末端反復（MMTV-LTR））、ならびに他のステロイド反応性プロモーター、ラパマイシン反応性プロモーター等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0142】

本明細書で交換可能に使用される「DNA調節配列」、「制御エレメント」、および「調節エレメント」という用語は、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナル等の転写および翻訳制御配列を指し、これらは非コード配列（例えば、DNA標的化RNA）またはコード配列（例えば、部位特異的修飾ポリペプチドもしくはCas9/Csn1ポリペプチド）の転写を提供および／もしくは調節し、かつ／またはコードされたポリペプチドの翻訳を調節する。

【0143】

「操作可能に連結された」とは、そのように記載された構成成分が、それらが意図された方法で機能することを許可する関係にある並列を指す。例えば、プロモーターがその転写または発現に影響を与える場合、プロモーターは、コード配列に操作可能に連結されている。「発現カセット」は、ceDNAベクターにおける導入遺伝子の転写を指示するのに十分なプロモーターまたは他の調節配列に操作可能に連結されている外因性DNA配列を含む。好適なプロモーターには、例えば、組織特異的プロモーターが含まれる。プロモーターは、AAV起源でもあり得る。

【0144】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、本発明によるceDNAベクターでの予防的治療を含む治療が提供される、ヒトまたは動物を指す。通常、動物は、限定されないが、霊長類、齧歯類、飼育動物、または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルが挙げられるが、これらに限定されない。齧歯類としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、およびハムスターが挙げられる。飼育動物および狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えば、飼いネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、トリ種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、および魚、例えば、トラウト、ナマズ、およびサケが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される態様のある特定の実施形態では、対象は、哺乳類、例えば、霊長類またはヒトである。対象は、男性または女性であり得る。追加として、対象は、幼児または子供であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、新生児または胎児対象であり得、例えば、対象は、子宮内に存在する。好ましくは、対象は、哺乳類である。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、疾患および障害の動物モデルを代表する対象として有利に使用され得る。追加として、本明細書に記載される方法および組成物は、飼育動物および／またはペットに使用され得る。ヒト対象は、任意の年齢、性別、人種、または民族グループ、例えば、コーカサス人（白人）、アジア人、アフリカ人、黒人、アフリカ系アメリカ人、アフリカ系ヨーロッパ人、スペイン人、中東人等であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、臨床設定において患者または他の対象であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、既に治療を受けている。いくつかの実施形態では、対象は、胚、胎児、新生児、幼児、子供、青年、または成人である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト胎児、ヒト新生児、ヒト幼児、ヒト子供、ヒト青年、またはヒト成人である。いくつかの実施形態では、対象は、動物胚、または非ヒト胚もしくは非ヒト霊長類胚である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト胚である。

10

20

30

40

50

【0145】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本開示の核酸構築物またはcDNA発現ベクターによる形質転換、トランスフェクション、形質導入などを受けやすい任意の細胞型を含む。非限定的な例として、宿主細胞は、単離された初代細胞、多能性幹細胞、CD34⁺細胞)、人工多能性幹細胞、またはいくつかの不死化細胞株(例えば、HepG2細胞)のいずれかであり得る。あるいは、宿主細胞は、組織、器官、または生物における原位置またはインビボの細胞であり得る。

【0146】

「外因性」という用語は、その天然源以外の細胞中に存在する物質を指す。本明細書で使用される「外因性」という用語は、通常見られず、核酸またはポリペプチドをそのような細胞または生物に導入することが望まれる、人の手が関与するプロセスによって細胞または生物などの生物系に導入された核酸(例えば、ポリペプチドをコードする核酸)またはポリペプチドを指し得る。あるいは、「外因性」とは、それが比較的少量で見られ、細胞または生物における核酸またはポリペプチドの量を増加させること、例えば、異所性発現またはレベルをもたらしことが望まれる、人の手が関与するプロセスによって細胞または生物などの生物系に導入された核酸またはポリペプチドを指し得る。これとは対照的に、「内因性」という用語は、生物系または細胞に対して天然である物質を指す。

【0147】

「配列同一性」という用語は、2つのヌクレオチド配列間の関連性を指す。本開示の目的のために、2つのデオキシリボヌクレオチド配列間の配列同一性の程度は、EMBOSSパッケージのNeedleプログラム(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, 上記)、好ましくはバージョン3.0.0以降において実装されるように、Needleman-Wunschアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970, 上記)を使用して決定される。使用される任意のパラメーターは、ギャップオープンペナルティ10、ギャップ拡張ペナルティ0.5、およびEDNAFULL(NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン)置換マトリックスである。「最長同一性」とラベル付けされたNeedleの出力(-nobriefオプションを使用して取得される)は、同一性パーセントとして使用され、次のように計算される: (同一のデオキシリボヌクレオチド×100)/アラインメントの長さ-アラインメントにおけるギャップの総数)。アラインメントの長さは、好ましくは少なくとも10ヌクレオチド、好ましくは少なくとも25ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも100ヌクレオチドである。

【0148】

本明細書で使用される「相同性」または「相同」という用語は、必要に応じて配列を整列させ、ギャップを導入して最大の配列同一性パーセントを達成した後、標的染色体上の対応する配列のヌクレオチド残基と同一である相同性アームのヌクレオチド残基のパーセンテージとして定義される。ヌクレオチド配列相同性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Clustal W2、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当該技術の範囲内である様々な方法で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメーターを決定することができる。いくつかの実施形態では、例えば修復テンプレートの相同性アームの核酸配列(例えば、DNA配列)は、配列が、宿主細胞の対応する未変性または未編集の核酸配列(例えば、ゲノム配列)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%以上同一である場合、「相同」と見なされる。

10

20

30

40

50

【0149】

本明細書で使用される場合、「相同性アーム」は、相同組み換えを通じてドナー配列をゲノムに標的化するのに適したポリヌクレオチドを指す。典型的には、2つの相同性アームがドナー配列に隣接し、各相同性アームは、組み込みの遺伝子座の上流および下流のゲノム配列を含む。

【0150】

本明細書で使用される場合、「ドナー配列」は、宿主細胞ゲノムに挿入されるか、または宿主細胞ゲノムの修復テンプレートとして使用されるポリヌクレオチドを指す。ドナー配列は、遺伝子編集に行われることが望まれる修飾を含み得る。組み込まれる配列は、標的配列での相同性指向修復を介して標的核酸分子に導入することができ、それによって元の標的配列からドナー配列に含まれる配列への標的配列の変更を引き起こす。したがって、ドナー配列に含まれる配列は、標的配列と比較して、挿入、欠失、インデル、点突然変異、突然変異の修復等であり得る。ドナー配列は、例えば、一本鎖DNA分子、二本鎖DNA分子、DNA/RNAハイブリッド分子、およびDNA/modRNA（修飾型RNA）ハイブリッド分子であり得る。一実施形態では、ドナー配列は、相同性アームに対して外来である。編集は、RNA編集およびDNA編集であり得る。ドナー配列は、所望の遺伝子編集の性質に応じて、宿主細胞ゲノムに対して内因性または外因性であり得る。

【0151】

本明細書で使用される「異種」という用語は、それぞれ天然の核酸またはタンパク質には見られないヌクレオチドまたはポリペプチド配列を意味する。例えば、キメラCas9/Csn1タンパク質において、天然に存在する細菌Cas9/Csn1ポリペプチド（またはその変異体）のRNA結合ドメインは、異種ポリペプチド配列（すなわち、Cas9/Csn1以外のタンパク質からのポリペプチド配列または別の生物のポリペプチド配列）に融合されてもよい。異種ポリペプチド配列は、キメラCas9/Csn1タンパク質によっても示される活性（例えば、酵素活性）を示し得る（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性等）。異種核酸配列は、天然に存在する核酸配列（またはその変異体）に（例えば、遺伝子操作によって）連結されて、キメラポリペプチドをコードするキメラヌクレオチド配列を生成し得る。別の例として、融合変異体Cas9部位特異的ポリペプチドにおいて、変異体Cas9部位特異的ポリペプチドは、融合変異体Cas9部位特異的ポリペプチドによっても示される活性を示す異種ポリペプチド（すなわち、Cas9以外のポリペプチド）に融合されてもよい。異種核酸配列は、変異体Cas9部位特異的ポリペプチドに（例えば、遺伝子操作によって）連結されて、融合変異体Cas9部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を生成し得る。

【0152】

「ベクター」または「発現ベクター」は、細胞において結合されたセグメントの複製をもたらすために別のDNAセグメント、すなわち「挿入」が結合され得る、プラスミド、バクミド、ファージ、ウイルス、ビリオン、またはコスミドなどのレプリコンである。ベクターは、宿主細胞への送達のために、または異なる宿主細胞間の移動のために設計された核酸構築物であり得る。本明細書で使用される場合、ベクターは、起源および/または最終形態でウイルス性または非ウイルス性であり得るが、本開示の目的のために、「ベクター」は、その用語が本明細書で使用されるとき、一般にceDNAベクターを指す。「ベクター」という用語は、適切な制御エレメントと関連する場合に複製することができ、遺伝子配列を細胞に移すことができる任意の遺伝的エレメントを包含する。いくつかの実施形態では、ベクターは、発現ベクターまたは組み換えベクターであり得る。

【0153】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からのRNAまたはポリペプチドの発現を指示するベクターを指す。発現される配列は、必ずしもそうではないが、細胞にとって異種であることが多い。発現ベクターは、追加のエレメントを含むことができ、例えば、発現ベクターは、2つの複製

系を有することができるため、それを2つの生物、例えば発現の場合はヒト細胞、ならびにクローニングおよび増幅の場合は原核生物宿主で維持することができる。「発現」という用語は、RNAおよびタンパク質、また必要に応じて、例えば、転写、転写処理、翻訳およびタンパク質の折りたたみ、修飾および処理を含むがこれらに限定されない分泌タンパク質の産生に参与する細胞プロセスを指す。「発現産物」には、遺伝子から転写されたRNA、および遺伝子から転写されたmRNAの翻訳によって得られたポリペプチドが含まれる。「遺伝子」という用語は、適切な調節配列に操作可能に連結された場合に、インビトロまたはインビボでRNAに転写される核酸配列(DNA)を意味する。遺伝子には、コード領域の前後の領域、例えば、5'未翻訳(5'UTR)または「リーダー」配列および3'UTRまたは「トレーラー」配列、ならびに個々のコードセグメント(エクソン)間の介在配列(イントロン)が含まれる場合と含まれない場合がある。 10

【0154】

「組み換えベクター」とは、異種核酸配列を含むベクター、またはインビボで発現することができる「導入遺伝子」を意味する。本明細書に記載されるベクターは、いくつかの実施形態では、他の好適な組成物および治療法と組み合わせることができることを理解されたい。いくつかの実施形態では、ベクターは、エピソームである。好適なエピソームベクターの使用は、対象における関心対象のヌクレオチドを高コピー数の染色体外DNAに維持し、それによって染色体組み込みの潜在的な影響を排除する手段を提供する。

【0155】

本明細書で使用される「訂正」、「ゲノム編集」、および「復元」という用語は、完全長機能または部分完全長機能性タンパク質の発現が得られるように、切断されたタンパク質をコードするか、またはタンパク質を全くコードしない突然変異体遺伝子を変化させることを指す。変異体遺伝子の訂正または復元は、突然変異を有する遺伝子の領域を置き換えること、または突然変異体遺伝子全体を、相同性指向修復(HDR)などの修復機序を用いて、突然変異を持たない遺伝子のコピーで置き換えることを含み得る。突然変異体遺伝子の訂正または復元はまた、遺伝子に二本鎖切断を生成して非相同末端結合(NHEJ)を使用して修復することにより、未成熟終止コドン、異常スプライスアクセプター部位、または異常スプライスドナー部位を引き起こすフレームシフト突然変異を修復することを含み得る。NHEJは、修復中に少なくとも1つの塩基対を付加または削除する可能性があり、これが適切なリーディングフレームを復元し、未成熟終止コドンを排除し得る。 20 30

突然変異体遺伝子の訂正または回復はまた、異常なスプライスアクセプター部位またはスプライスドナー配列の破壊を含み得る。突然変異体遺伝子の訂正または復元はまた、2つのヌクレアーゼ標的的部位間のDNAを除去し、NHEJによってDNA切断を修復することによって適切なリーディングフレームを復元するために、同じDNAストランド上の2つのヌクレアーゼの同時作用によって非必須遺伝子セグメントを削除することを含み得る。

【0156】

本明細書で使用される「遺伝性疾患」という語句は、ゲノムの1つ以上の異常、特に出生時から存在する状態によって部分的または完全に、直接的または間接的に引き起こされる疾患を指す。異常は、突然変異、挿入、または欠失であり得る。異常は、遺伝子のコード配列またはその調節配列に影響を与える可能性がある。遺伝性疾患は、DMD、血友病、嚢胞性線維症、ハンチントン舞蹈病、家族性高コレステロール血症(LDL受容体欠損)、肝芽腫、ウィルソン病、先天性肝ポルフィリン症、肝代謝の遺伝性疾患、レッシュ・ナイハン症候群、鎌状赤血球貧血、サラセミア、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、網膜色素変性症、毛細血管拡張性運動失調症、ブルーム症候群、網膜芽細胞腫、およびテイ・サックス病であり得るが、これらに限定されない。 40

【0157】

本明細書で使用される「非相同末端結合(NHEJ)経路」という語句は、相同テンプレートを必要とせずに切断末端を直接ライゲーションすることによってDNAの二本鎖切断を修復する経路を指す。NHEJによるDNA末端のテンプレートに依存しない再ライ 50

ゲーションは、DNAブレイクポイントにランダムなマイクロ挿入およびマイクロ欠失（インデル）を導入する確率的でエラーが発生しやすい修復プロセスである。この方法を使用して、標的遺伝子配列のリーディングフレームを意図的に破壊、削除、または変更することができる。NHEJは典型的に、修復を誘導するためにマイクロホモロジーと呼ばれる短い相同DNA配列を使用する。これらのマイクロホモロジーは、二本鎖切断の終わりにある一本鎖オーバーハングに存在することが多い。オーバーハングが完全に互換性がある場合、NHEJは通常、切断を正確に修復するが、ヌクレオチドの損失につながる不正確な修復が発生する可能性もあるが、オーバーハングが互換性がない場合にははるかにより一般的である。本明細書で使用される「ヌクレアーゼ媒介NHEJ」は、cas9または他のヌクレアーゼなどのヌクレアーゼが二本鎖DNAを切断した後に開始されるNHEJを指す。CRISPR/CAS系では、NHEJは、単一ガイドRNA配列を使用することによって標的化され得る。

10

【0158】

本明細書で交換可能に使用される「相同性指向修復」または「HDR」という語句は、DNAの相同片が核に存在する場合に二本鎖DNA損傷を修復する細胞の機序を指す。HDRは、修復を誘導するためにドナーDNAテンプレートをし、遺伝子全体の標的化された付加を含む、ゲノムへの特定の配列変化を作成するために使用される場合がある。CRISPR/Cas9ベースの系など、部位特異的ヌクレアーゼとともにドナーテンプレートが提供されている場合、細胞機構は、相同組み換えによって切断を修復し、これはDNA切断の存在下で数桁強化される。相同DNA片が存在しない場合、代わりに非相同末端結合を行うことができる。CRISPR/CAS系では、1つのガイドRNA、またはは2つの異なるガイドRNAsをHDRに使用することができる。

20

【0159】

本明細書で交換可能に使用される「反復可変残基」または「RVD」という語句は、33～35アミノ酸を含む、TALE DNA結合ドメインのDNA認識モチーフ（「RVDモジュール」としても知られる）内の隣接するアミノ酸残基の対を指す。RVDは、RVDモジュールのヌクレオチド特異性を決定する。RVDモジュールを組み合わせて、RVDアレイを産生することができる。本明細書で使用される「RVDアレイ長」は、TALENによって認識されるTALEN標的領域、すなわち結合領域内のヌクレオチド配列の長さに対応するRVDモジュールの数を指す。

30

【0160】

本明細書で使用される「部位特異的ヌクレアーゼ」または「配列特異的ヌクレアーゼ」という用語は、DNA配列を特異的に認識および切断することができる酵素を指す。部位特異的ヌクレアーゼを操作することができる。操作された部位特異的ヌクレアーゼの例には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ならびに様々な天然および非天然のCas酵素を使用するCRISPR/Casベースの系が含まれる。

【0161】

本明細書で使用される場合、「含む（comprising）」または「含む（comprises）」という用語は、方法または組成物に必須であるが、必須であるか否かにかかわらず、不特定要素の包含に対して開かれている、その組成物、方法、およびそれぞれの構成成分（複数可）に関して使用される。

40

【0162】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という用語は、所与の実施形態に必要な要素を指す。この用語は、その実施形態の基本的かつ新規または機能的な特徴（複数可）に物質的に影響を及ぼさない要素の存在を許容する。「含む」の使用は、限定ではなく包含を示す。

【0163】

「からなる」という用語は、実施形態の説明において列挙されてない任意の要素を除いて、本明細書に記載される組成物、方法、およびそれらそれぞれの構成成分を指す。

50

【0164】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という用語は、所与の実施形態に必要な要素を指す。この用語は、本発明の実施形態の基本的かつ新規または機能的な特徴（複数可）に物質的に影響を及ぼさない追加の要素の存在を許容する。

【0165】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が別途明らかに示さない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「方法」に対する言及は、本明細書に記載される、および／または本開示等を読むことにより当業者に明らかとなるであろうタイプの1つ以上の方法、および／またはステップを含む。同様に、「または」という語は、文脈が別途明らかに示されない限り、「および」を含むことが意図される。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料を、本開示の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料は、下記で説明される。省略形「例えば（e. g.）」は、ラテン語の *exempli gratia* に由来し、本明細書では非限定例を示すように使用される。したがって、省略形「例えば（e. g.）」は、「例えば（for example）」と同義である。

10

【0166】

作動例または別途示される場合を除いて、本明細書で使用される成分または反応条件の量を表すすべての数は、すべての場合において「約」という用語によって修飾されるものとして理解されたい。パーセンテージに関連して使用される「約」という用語は、±1%を意味する場合がある。本発明は、以下の実施例によってさらに詳細に説明されるが、本発明の範囲は、それに限定されてはならない。

20

【0167】

本明細書に開示される本発明の代替要素または実施形態のグループ化は、限定として解釈されるべきではない。各グループのメンバーは、個別に、またはグループの他のメンバーまたは本明細書で見られる他の要素との任意の組み合わせで参照および主張することができる。グループの1つ以上のメンバーは、利便性および／または特許性の理由から、グループに含める、またはグループから削除することができる。そのような任意の包含または削除が発生した場合、本明細書では、明細書が修正されたグループを含むと見なされ、したがって添付の特許請求の範囲で使用されているすべてのマーカッシュグループの記述を満たす。

30

【0168】

いずれかの態様のいくつかの実施形態では、本明細書に記載される開示は、人間のクローン化プロセス、人間の生殖細胞系列の遺伝的同一性を修正するプロセス、産業もしくは商業目的でのヒト胚の使用、または人もしくは動物にいかなる実質的な医学的利益ももたらすことなく苦しみを引き起こす可能性が高い動物、およびそのようなプロセスから生じる動物の遺伝的同一性を修正するためのプロセスに関係しない。

【0169】

本明細書では、本発明の様々な態様の説明内で他の用語が定義されている。

【0170】

文献参照、発行済み特許、公開済みの特許出願、および係属中の特許出願を含む、本出願を通して引用されるすべての特許および他の出版物は、例えば、本明細書に記載される技術に関連して使用され得るそのような刊行物に記載される方法論を説明および開示する目的で、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。これらの出版物は、本出願の出願日より前のそれらの開示のためにのみ提供されている。この点に関するいかなるものも、発明者が先行発明のおかげで、またはいかなる他の理由のためにもそのような開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。日付に関するすべての記述またはこれらの文書の内容に関する表現は、出願人が入手できる情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確さに関するいかなる承認も構成するものではない。

40

50

【0171】

本開示の実施形態の説明は、網羅的であること、または本開示を開示された正確な形態に限定することを意図したものではない。本開示の特定の実施形態および実施例が、例示の目的で本明細書で説明されているが、当業者が認識するように、本開示の範囲内で様々な同等の修正が可能である。例えば、方法のステップまたは機能は、所与の順序で提示されるが、代替の実施形態は、異なる順序で機能を実施してもよく、または機能は実質的に同時に実施されてもよい。本明細書で提供される開示の教示は、必要に応じて他の手順または方法に適用することができる。本明細書に記載される様々な実施形態は、さらなる実施形態を提供するために組み合わせることができる。本開示の態様は、必要に応じて、上記の参考文献および出願の構成、機能、および概念を用いて本開示のさらなる実施形態を提供するように修正することができる。さらに、生物学的機能の同等性の考慮により、種類または量の生物学的または化学的作用に影響を与えることなく、タンパク質構造にいくつかの変更を加えることができる。詳細な説明に照らして、これらの変更および他の変更を本開示に加えることができる。そのような修正はすべて、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

10

【0172】

前述の実施形態のいずれかの特定の要素は、他の実施形態の要素と組み合わせるか、または置き換えることができる。さらに、本開示のある特定の実施形態に関連する利点が、これらの実施形態の文脈で説明されたが、他の実施形態もそのような利点を示し得、すべての実施形態が本開示の範囲内にあるために必ずしもそのような利点を示す必要はない。

20

【0173】

本明細書に記載される技術は、以下の実施例によってさらに説明されており、決してこれらをさらに限定するものと解釈されるべきではない。

【0174】

本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、および試薬等に限定されず、そのようなものとして変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、単に特許請求の範囲によって定義される、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0175】

I I. 遺伝子編集のための c e DNA ベクター

30

本発明の実施形態は、宿主細胞において遺伝子編集分子である導入遺伝子を発現し（例えば、導入遺伝子は、ZFN、TALEN、Casなどのヌクレアーゼである、1つ以上のガイドRNA、CRISPR、リボ核タンパク質（RNP）、またはそれらの任意の組み合わせである）、より効率的なゲノム編集をもたらすことができる閉端直鎖二重化（c e DNA）ベクターを含む方法および組成物に基づく。本明細書に記載される c e DNA ベクターは、サイズに制限されないため、例えば、単一ベクターからの遺伝子編集系（例えば、CRISPR/Cas 遺伝子編集系（例えば、Cas9 もしくは修飾型 Cas9 酵素、ガイドRNA、および／または相同性指向修復テンプレート）、またはTALEN もしくはジンクフィンガー系に必須のすべての構成成分の発現を許可する。しかしながら、そのような構成成分のうちの1つまたは2つのみが、単一ベクター上でコードされる一方で、残りの構成成分（複数可）は、別個の c e DNA ベクターまたは例えば従来のプラスミド上で発現され得ることも企図される。

40

【0176】

本明細書の一態様は、例えば、細胞染色体上の特定の標的部位に高効率で1つ以上の外因性ドナー配列を導入するための、DNAノックイン法（複数可）のための新規の c e DNA ベクターに関する。遺伝子編集のための1つ以上の c e DNA ベクターの使用に加えて、c e DNA ベクターは、(i) 少なくとも1つのWT ITR および少なくとも1つの修飾型AAV逆位末端反復（ITR）（例えば、非対称の修飾型ITR）、(i i) m o d - ITR 対が互いに対して異なる3次元空間構成を有する、2つの修飾型ITR（例えば、非対称の修飾型ITR）、または(i i i) 各WT - ITR が同じ3次元空間構成

50

を有する、対称もしくは実質的に対称のWT-ITR対、または(iv)各mod-ITRが同じ3次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称の修飾型ITR対のうちのいずれかから選択されるITR配列を含み、本明細書に開示される方法および組成物は、限定されないが、リボソームナノ粒子送達系などの送達系をさらに含み得る。使用のために包含される非限定的な例示的リボソームナノ粒子系が、本明細書に開示されている。いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集のためのceDNAおよびイオン化脂質を含む脂質ナノ粒子を提供する。例えば、プロセスにより得られた遺伝子編集ceDNAを用いて作製および負荷される脂質ナノ粒子製剤は、2018年9月7日に提出された国際出願第PCT/US2018/050042号に開示されており、本明細書に組み込まれる。

10

【0177】

本明細書では、共有結合性閉端を有する新規の非ウイルス性カプシド不含ceDNA分子(ceDNA)が提供される。これらの非ウイルス性カプシド不含ceDNA分子は、2つの異なる逆位末端反復(ITR)配列の間に位置付けられた異種遺伝子(導入遺伝子)を含有する発現構築物(例えば、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バキュロウイルス、または統合型細胞株)からの許容宿主細胞中で産生され得、ITRは、互いに関して異なる。いくつかの実施形態では、ITRのうちの1つは、野生型ITR配列(例えば、AAV-ITR)と比較した欠失、挿入、および/または置換によって修飾され、ITRのうちの少なくとも1つは、機能性末端分解部位(trs)およびRep結合部位を含む。ceDNAベクターは、好ましくは、発現カセットなどの分子の少なくとも一部分にわたって二重鎖、例えば、自己相補的である(例えば、ceDNAは、二本鎖環状分子ではない)。ceDNAベクターは、共有結合性閉端を有し、したがって、例えば、1時間以上37℃でエキソヌクレアーゼ消化(例えば、エキソヌクレアーゼIまたはエキソヌクレアーゼIII)に対して耐性である。

20

【0178】

本明細書に開示される遺伝子編集のためのceDNAベクターは、ウイルスカプシド内の限定空間によって課されるパッケージング制約を有しない。ceDNAベクターは、封入されたAAVゲノムとは対照的な原核細胞的に産生されたプラスミドDNAベクターに対する可変の真核細胞的に産生された代替物を表す。これは、制御エレメント、例えば、本明細書に開示される調節スイッチ、大きな導入遺伝子、複数の導入遺伝子等の挿入を許可する。

30

【0179】

一態様では、遺伝子編集のためのceDNAベクターは、5'~3'配向に、第1のアデノ関連ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)、目的のヌクレオチド配列(例えば、本明細書に記載される発現カセット)、および第2のAAV-ITRを含む。いくつかの実施形態では、第1のITR(5'ITR)および第2のITR(3'ITR)は、互いに対して非対称であり、すなわち、それらは、互いに異なる3次元空間構成を有する。例示的な実施形態として、第1のITRは、野生型ITRであり得、第2のITRは、突然変異型または修飾型ITRであり得るか、またはその逆であり、第1のITRは、突然変異型または修飾型ITRであり得、第2のITRは、野生型ITRであり得る。別の実施形態では、第1のITRおよび第2のITRは、両方とも修飾されているが、異なる配列であるか、または異なる修飾を有するか、または同一の修飾型ITRではなく、異なる3次元空間構成を有する。言い換えると、非対称ITRを用いた遺伝子編集のためのceDNAベクターは、WT-ITRに対する1つのITRのいかなる変更も他のITRに反映されないITRを有するか、あるいは非対称ITRが修飾された非対称ITR対を有する場合は、互いに対して異なる配列および異なる3次元形状を有し得る。ceDNAベクター中の、ceDNA-プラスミドを生成するために使用するための例示的な非対称ITRは、「非対称ITR」と題するセクションで後述されている。

40

【0180】

別の態様では、遺伝子編集のためのceDNAベクターは、5'~3'配向に、第1の

50

アデノ関連ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、関心対象のヌクレオチド配列 (例えば、本明細書に記載される発現カセット)、および第2のAAV ITRを含み、第1のITR (5' ITR) および第2のITR (3' ITR) は、互いに対して対称または実質的に対称であり、すなわち、遺伝子編集 c e DNA ベクターは、対称の3次元空間構成を有する ITR 配列を含み得、それによりそれらの構造は、幾何学的空間で同じ形状であるか、または3次元空間で同じA、C-C'、B-B' ループを有する。そのような実施形態では、対称の ITR 対、または実質的に対称の ITR 対は、野生型 ITR ではない修飾型 ITR (例えば、mod-ITR) であり得る。mod-ITR 対は、野生型 ITR からの1つ以上の修飾を有し、互いに逆相補 (逆位) である同じ配列を有し得る。代替実施形態では、修飾型 ITR 対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型 ITR 対は、異なる配列を有し得るが、対応するまたは同じ対称の3次元形状を有し得る。いくつかの実施形態では、対称の ITR、または実質的に対称の ITR は、本明細書に記載されるように野生型 (WT-ITR) であり得る。すなわち、両方の ITR が野生型配列を有するが、必ずしも同じAAV血清型のWT-ITRである必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、一方のWT-ITRは、1つのAAV血清型に由来し得、他方のWT-ITRは、異なるAAV血清型に由来し得る。そのような実施形態では、WT-ITR 対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称的な3次元空間構成を維持しながら、1つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。

10

【0181】

20

対称の ITR または実質的に対称の ITR については、以下の「対称 ITR 対」と題するセクションで論じられる。

【0182】

本明細書に提供される野生型または突然変異型または他の方法で修飾された ITR 配列は、c e DNA ベクターの産生のために発現構築物 (例えば、c e DNA プラスミド、c e DNA バクミド、c e DNA バキュロウイルス) に含まれるDNA配列を表す。したがって、c e DNA プラスミドまたは他の発現構築物から産生された c e DNA ベクター中に実際に含有される ITR 配列は、産生プロセス中に起こる天然に存在する変化 (例えば、複製エラー) の結果として、本明細書に提供される ITR 配列に対して同一であっても同一でなくてもよい。

30

【0183】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集分子である導入遺伝子を有する発現カセット、または遺伝子編集核酸配列を含む本明細書に記載される c e DNA ベクターは、導入遺伝子の発現を可能にするかまたは制御する1つ以上の調節配列 (複数可) に操作可能に連結され得る。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、第1の ITR 配列および第2の ITR 配列を含み、関心対象のヌクレオチド配列は、第1および第2の ITR 配列によって隣接され、第1および第2の ITR 配列は、互いに対して非対称であるか、または互いに対して対称である。

【0184】

これらの態様の各々における一実施形態では、発現カセットは、2つの ITR 間に位置し、導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター、転写後調節エレメント、ならびにポリアデニル化および終結シグナルのうちの1つ以上をこの順に含む。一実施形態では、プロモーターは、調節可能-誘導可能または抑制可能である。プロモーターは、導入遺伝子の転写を促進する任意の配列であり得る。一実施形態では、プロモーターは、CAG プロモーター (例えば、配列番号03) またはその変形である。転写後調節エレメントは、導入遺伝子の発現を調整する配列であり、非限定的な例として、遺伝子編集分子である導入遺伝子の発現を強化する三次構造を作成する任意の配列、または遺伝子編集核酸配列である。

40

【0185】

一実施形態では、転写後調節エレメントは、WPRE (例えば、配列番号08) を含む

50

。一実施形態では、ポリアデニル化および終結シグナルは、BGHポリA（例えば、配列番号09）を含む。当該技術分野において既知の任意のシス調節エレメント、またはその組み合わせ、例えば、SV40後期ポリAシグナル上流エンハンサー配列（USE）または他の転写後処理エレメント（限定されないが、単純ヘルペスウイルスまたはB型肝炎ウイルス（HBV）のチミジンキナーゼ遺伝子を含む）が追加として使用され得る。一実施形態では、5'～3'配向の発現カセット長は、AAVビリオン中でカプシド化されることが知られている最大長を超える。一実施形態では、長さは、4.6 kb超、または5 kb超、または6 kb超、または7 kb超である。様々な発現カセットが、本明細書に例示される。

【0186】

発現カセットは、4000ヌクレオチド超、5000ヌクレオチド、10,000ヌクレオチド、もしくは20,000ヌクレオチド、もしくは30,000ヌクレオチド、もしくは40,000ヌクレオチド、または50,000ヌクレオチド、または約4000～10,000ヌクレオチド、もしくは10,000～50,000ヌクレオチドの間の任意の範囲、または50,000ヌクレオチド超を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、遺伝子編集分子である導入遺伝子、または500～50,000ヌクレオチド長の範囲の遺伝子編集核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、遺伝子編集分子である導入遺伝子、または500～75,000ヌクレオチド長の範囲の遺伝子編集核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、遺伝子編集分子である導入遺伝子を含み得るか、または遺伝子編集核酸配列は、500～10,000ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、発現カセットは、遺伝子編集分子である導入遺伝子を含み得るか、または遺伝子編集核酸配列は、1000～10,000ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、発現カセットは、遺伝子編集分子である導入遺伝子を含み得るか、または遺伝子編集核酸配列は、500～5,000ヌクレオチド長の範囲である。ceDNAベクターは、カプシド化されたAAVベクターのサイズ制限を有しないため、大型の発現カセットの送達を可能にして、遺伝子編集分子である効率的な導入遺伝子、または遺伝子編集核酸配列を提供する。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、原核細胞特異的メチル化を欠いている。

【0187】

発現カセットはまた、内部リボソームエンタリー部位（IRES）および／または2Aエレメントを含み得る。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、mir調節エレメント、転写後調節エレメント、組織および細胞型特異的プロモーター、ならびにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ITRは、導入遺伝子のプロモーターとして作用し得る。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成分、例えば、本明細書において「調節スイッチ」と題するセクションに記載されている、導入遺伝子の発現を制御および調節するための調節スイッチを含み、所望される場合、ceDNAベクターを含む細胞の制御された細胞死を可能にするキルスイッチである調節スイッチを含み得る。

【0188】

図1A～1Eは、非限定の例示的なceDNAベクター、またはceDNAプラスミドの対応する配列の概略図を示す。ceDNAベクターは、カプシド不含であり、第1のITR、発現可能な導入遺伝子カセットおよび第2のITRをこの順にコードするプラスミドから取得され、第1および／または第2のITR配列のうちの少なくとも1つは、対応する野生型AAV2 ITR配列に関して突然変異される。カセットは、好ましくは、エンハンサー／プロモーター、ORFレポーター（導入遺伝子）、転写後調節エレメント（例えば、WPRE）、ならびにポリアデニル化および終結シグナル（例えば、BGHポリA）のうちの1つ以上をこの順序で含む。

【0189】

発現カセットは、遺伝子編集分子である任意の導入遺伝子、または遺伝子編集核酸配列

10

20

30

40

50

を含み得る。遺伝子編集 c e D N A ベクターは、ポリペプチドをコードする核酸、または非コード核酸（例えば、R N A i、m i R 等）、ならびに対象のゲノム中のウイルス配列、例えば、H I V ウイルス配列等を含む外因性遺伝子およびヌクレオチド配列を含むがこれらに限定されない、対象における任意の関心対象の遺伝子を編集する。好ましくは、本明細書に開示される遺伝子編集 c e D N A ベクターは、治療目的（例えば、医療、診断、もしくは獣医学的使用）または免疫原性ポリペプチドに使用される。ある特定の実施形態では、遺伝子編集 c e D N A ベクターは、1 つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、s i R N A、R N A i s、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、抗体、抗原結合断片、またはそれらの任意の組み合わせを含む、対象における任意の関心対象の遺伝子を編集することができる。

10

【0190】

c e D N A 発現カセットは、例えば、レシピエント対象において存在しない、不活性、もしくは不十分な活性であるタンパク質をコードする発現可能な外因性配列（例えば、オープンリーディングフレーム）、または所望の生物学的もしくは治療的效果を有するタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。ドナー配列などの外因性配列は、欠陥遺伝子または転写産物の発現を訂正するように機能することができる遺伝子産物をコードすることができる。発現カセットはまた、訂正 D N A 鎖をコードし、ポリペプチド、センスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、または R N A（コードもしくは非コード；例えば、s i R N A、s h R N A、マイクロ R N A、およびそれらのアンチセンス対応物（例えば、a n t a g o m i R））をコードし得る。発現カセットは、実験または診断の目的で使用されるレポータータンパク質をコードする外因性配列、例えば β-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ（L a c Z）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（G F P）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（C A T）、ルシフェラーゼ、および当該技術分野において周知の他のものを含み得る。

20

【0191】

原則として、発現カセットは、突然変異のために減少もしくは欠如しているタンパク質、ポリペプチド、もしくは R N A をコードする、または過剰発現が本開示の範囲内であると見なされる場合に治療効果をもたらす任意の遺伝子を含み得る。c e D N A ベクターは、ヌクレアーゼによって提供される二本鎖切断（またはニック）の後に挿入される訂正 D N A 鎖として使用されるテンプレートまたはドナーヌクレオチド配列を含み得る。c e D N A ベクターは、誘導型 R N A ヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはジンクフィンガーヌクレアーゼによって提供される二本鎖切断（またはニック）の後に挿入される訂正 D N A 鎖として使用されるテンプレートヌクレオチド配列を含み得る。好ましくは、挿入されていない細菌 D N A は存在せず、好ましくは、本明細書に提供される c e D N A 組成物中に細菌 D N A は存在しない。いくつかの例では、タンパク質は、ニックなしでコドンを変えることができる。

30

【0192】

本明細書に記載される c e D N A ベクターの発現カセット、発現構築物、またはドナー配列で提供される配列は、宿主細胞についてコドン最適化することができる。本明細書で使用される場合、「最適化されたコドン」または「コドン最適化」という用語は、関心対象の脊椎動物、例えばマウスまたはヒトの細胞中の発現強化のために、少なくとも 1 つ、2 つ以上、または相当数の未変性配列（例えば、原核細胞配列）のコドンを、その脊椎動物の遺伝子中でより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定の偏向を呈する。典型的には、コドン最適化は、元の翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を変更しない。最適化されたコドンは、例えば、A p t a g e n の G e n e F o r g e（登録商標）コドン最適化およびカスタム遺伝子合成プラットフォーム（A p t a g e n, I n c., 2190 F o x M i l l R d. S u i t e 300, H e r n d o n, V a. 20171）または別の公開データベースを使用して決定することができる。

40

50

【0193】

多くの生物は、特定のコドンを使用して、成長するペプチド鎖における特定のアミノ酸の挿入をコードする偏向を示す。生物間のコドン使用頻度の違いであるコドン優先またはコドン偏向は、遺伝暗号の縮退によってもたらされ、多くの生物の間で十分に文書化されている。コドン偏向は、メッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳効率と相関関係があることが多く、特に翻訳されるコドンの特性および特定のトランスファーRNA（tRNA）分子の可用性に依存すると考えられている。細胞内の選択されたtRNAの優勢は、一般にペプチド合成で最も頻繁に使用されるコドンの反映である。したがって、コドン最適化に基づいて、所与の生物における最適な遺伝子発現のために遺伝子を調整することができる。

10

【0194】

多種多様な動物、植物、および微生物種で利用可能な多数の遺伝子配列を考えると、コドン使用頻度の相対頻度を計算することが可能である（Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)）。

【0195】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集遺伝子（例えば、ドナー配列）またはガイドRNAは、治療遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、抗体、または抗体断片、またはその抗原結合断片、例えば、中和抗体または抗体断片等を標的とする。

20

【0196】

特に、遺伝子編集遺伝子（例えば、ドナー配列）またはガイドRNAは、例えば、疾患、機能不全、傷害、および／または障害の1つ以上の症状の治療、予防、および／または改善における使用のための、タンパク質（複数可）、ポリペプチド（複数可）、ペプチド（複数可）、酵素（複数可）、抗体、抗原結合断片、ならびにその変異体および／または活性断片を含むが、これらに限定されない1種以上の治療剤（複数可）を標的とする。ガイドRNAで標的化するための例示的な遺伝子は、本明細書において、「治療の方法」と題するセクションに記載されている。

30

【0197】

プラスミド系発現ベクターとは異なるceDNAベクターの多くの構造特徴が存在する。ceDNAベクターは、以下の特徴：元の（すなわち、挿入されていない）細菌DNAの欠失、原核細胞複製起源の欠失、自蔵である（すなわち、Rep結合および末端分解部位（RBSおよびTRS）を含む2つのITR以外のいかなる配列も、ITR間の外因性配列も必要としない）、真核起源（すなわち、それらは真核細胞中で産生される）のヘアピンを形成するITR配列の存在、ならびに細菌型DNAメチル化、または実際に哺乳動物宿主によって異常であるとみなされる任意の他のメチル化の非存在のうちの1つ以上を有し得る。一般に、本ベクターは、いかなる原核細胞DNAも含有しないことが好ましいが、いくつかの原核細胞DNAが、外因性配列として、非限定例としてプロモーターまたはエンハンサー領域に挿入されてもよいことが企図される。ceDNAベクターをプラスミド発現ベクターと区別する別の重要な特徴は、ceDNAベクターが、閉端を有する一本鎖直鎖状DNAであるが、プラスミドは、常に二本鎖DNAである。

40

【0198】

本明細書に提供される方法によって産生された遺伝子編集のためのceDNAベクターは、好ましくは、制限酵素消化アッセイによって判定して、非連続的な構造ではなく直鎖状で連続的な構造を有する（図4D）。直鎖状で連続的な構造は、細胞エンドヌクレアーゼによる攻撃に対してより安定であると同時に、組み換えられて突然変異誘発を引き起こす可能性が低いと考えられる。したがって、直鎖状で連続的な構造の遺伝子編集ceDNAベクターは、好ましい実施形態である。連続的な直鎖状の一本鎖分子内二重鎖ceDNA

50

Aベクターは、AAVカプシドタンパク質をコードする配列なしに、終端に共有結合している可能性がある。これらの遺伝子編集c e DNAベクターは、細菌起源の環状二重鎖核酸分子であるプラスミド（本明細書に記載されるc e DNAプラスミドを含む）とは構造的に異なる。プラスミドの相補鎖は、変性に続いて分離されて2つの核酸分子を生成することができるが、反対に、c e DNAベクターは、相補鎖を有するが、単一DNA分子であり、したがって変性された場合でも単一分子のままである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるc e DNAベクターは、プラスミドとは異なり、原核細胞タイプのDNA塩基メチル化なしに生成され得る。したがって、c e DNAベクターおよびc e DNA-プラスミドは、構造（特に、直鎖状対環状）およびこれらの異なる対象物（下記を参照）を生成および精製するために使用される方法の両方に関して、またc e DNA-プラスミドの場合は原核細胞タイプおよびc e DNAベクターの場合は真核細胞タイプのものである、それらのDNAメチル化に関して異なる。

10

【0199】

プラスミド系発現ベクターを超える遺伝子編集のための本明細書に記載されるc e DNAベクターを使用するいくつかの利点があり、そのような利点としては、次のことが挙げられるが、これらに限定されない。1) プラスミドは、細菌DNA配列を含有し、原核細胞特異的メチル化、例えば、6-メチルアデノシンおよび5-メチルシトシンメチル化に供されるが、カプシド不含AAVベクター配列は、真核細胞起源であり、原核細胞特異的メチル化を受けず、結果として、カプシド不含AAVベクターは、プラスミドと比較して炎症および免疫反応を誘導する可能性が低い。2) プラスミドは、産生プロセス中に耐性遺伝子の存在を必要とするが、c e DNAベクターは必要としない。3) 環状プラスミドは、細胞への導入時に核に送達されず、細胞ヌクレアーゼによる分解をバイパスするために過負荷を必要とするが、c e DNAベクターは、ヌクレアーゼに対する耐性を付与するウイルスシスエレメント、すなわちITRを含有し、核に対して標的化され、送達されるように設計され得る。ITR機能に不可欠な最小定義エレメントは、Rep結合部位(RBS、AAV2の場合5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号531））および末端分解部位(TRS、AAV2の場合5'-AGTTGG-3'（配列番号48））に加えて、ヘアピン形成を可能にする可変パルンドローム配列であると仮定する。4) c e DNAベクターは、報告によれば受容体のToll様ファミリーのメンバーに結合し、T細胞媒介性免疫反応を誘起する原核細胞由来のプラスミドにおいてしばしば見出されるCpGジヌクレオチドの過剰提示を有しない。対照的に、本明細書に開示されるカプシド不含AAVベクターでの形質導入は、様々な送達試薬を使用し、従来のAAVビリオンで形質導入することが困難である細胞および組織型を効率的に標的とし得る。

20

30

【0200】

III. 所望の核酸配列のノックイン

本明細書に記載される遺伝子編集c e DNAベクター、方法、および組成物を使用して、新しい核酸配列を導入する、ゲノム配列の突然変異を訂正する、または宿主細胞の標的遺伝子配列に突然変異を導入することができる。そのような方法は、「DNAノックイン系」と呼ぶことができる。DNAノックイン系は、本明細書に記載されているように、ドナー配列を任意の所望の標的部位に高効率で挿入できるため、例えば、外因性の非コード配列（配列タグまたは調節エレメントなど）をゲノムに付加することによって、外因性遺伝子を発現するトランスジェニック動物の作成、疾患の細胞培養モデルの調製、スクリーニングアッセイ系の調製、操作された組織構築物の遺伝子発現の修飾、ゲノム遺伝子座の修飾（例えば、突然変異）、および遺伝子編集などの多くの用途に実行可能にする。本明細書で提供される方法を使用して生成された細胞および動物は、例えば、細胞療法として、疾患モデルとして、研究ツールとして、および様々な目的に有用なヒト化動物として、様々な用途を見出すことができる。

40

【0201】

本開示のDNAノックイン系はまた、大きなドナー配列（<5 kb）を使用する遺伝子編集技法がゲノムの任意の所望の標的部位に挿入されることを可能にし、したがって現在

50

の技法よりも大きな遺伝子の遺伝子編集を提供する。いくつかの実施形態では、大きな相同性アーム、例えば50塩基対～2,000塩基対が含まれ、優れた効率（高いオンターゲット）および優れた特異性（低いオフターゲット）を備えた遺伝子編集、いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼを使用しないHDRを提供する。

【0202】

本開示のDNAノックイン系はまた、遺伝子編集のためのドナー配列の投与に関していくつかの利点を提供する。第1に、本開示の送達粒子内で本明細書に記載されるようなceDNAベクターを投与することは、ベースライン免疫によって排除されず、したがって、特定の障害を有する任意かつ潜在的にすべての患者に投与され得る。第2に、本開示の粒子を投与することは、ウイルスベクターベースの送達系に対して典型的に引き起こされるような送達される治療に対する適応免疫応答を生み出さないため、臨床効果のために必要に応じて実施形態を再投与することができる。インビボ送達などの、本開示による1つ以上のceDNAベクターの投与は、反復可能であり、頑強である。

10

【0203】

ある特定の実施形態では、本開示のceDNAベクターによる遺伝子編集は、治療された患者からの適切なバイオマーカーでモニターして遺伝子訂正の効率を評価することができ、適切なレベルの遺伝子編集が達成されるまで治療用製品の反復投与を行うことができる。

【0204】

別の態様では、本開示に従って、本明細書に記載される遺伝子ノックイン系を、ceDNAベクターとともに使用することによって、遺伝子修飾された動物を生成する方法が提供される。これらの方法については、以下でさらに説明される。

20

【0205】

ある特定の実施形態では、本開示は、真核細胞または原核細胞などの宿主細胞の染色体上の所定の挿入部位にドナー配列を挿入するためにceDNAベクターを使用する方法に関する。

【0206】

IV. 遺伝子編集系構成成分一般

RNA誘導型ヌクレアーゼを含むものなどのさらなる実施形態では、遺伝子編集に必要な構成成分は、ヌクレアーゼ、ガイドRNA（Cas9などが利用される場合）、ドナー配列、および本開示の単一のceDNAベクター内に含まれる1つ以上の相同性アームを含み得る。そのような実施形態は、遺伝子編集構成成分を送達するために別個のまたは様々な粒子を必要とするアプローチと比較して、遺伝子編集の効率を高める。

30

【0207】

さらなる実施形態では、ヌクレアーゼは、遺伝子編集後に不活性化／減少され得、そうでなければ、細胞内の付加されたヌクレアーゼの存続とともに生じるはずのオフターゲット編集を減少または排除する。

【0208】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載される方法のうちのいずれか1つで使用するための1つ以上のceDNAベクターを含むキットに関する。

40

【0209】

本明細書に記載される方法および組成物はまた、例えば、Oakes et al. Nat. Biotechnol. 34:646-651 (2016)（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている、細胞スイッチを含む遺伝子編集系を提供する。

【0210】

本明細書に記載される方法および組成物が、当該技術分野で知られている方法を使用してハイスループット方式で実施できることも本明細書で特に企図される（例えば、Shalem et al. Nat. Rev. Genet. 16:299-311 (2015)、Shalem et al. Science 343:84-88 (2014)を参照

50

。各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)。

【0211】

V. ITRs

本明細書に開示されているように、ceDNAベクターは、2つの逆位末端反復(ITR)配列の間に位置付けられた遺伝子編集核酸配列を含み、これらの用語は、本明細書に定義されるように、ITR配列は、非対称ITR対または対称もしくは実質的に対称のITR対であり得る。本明細書に開示される遺伝子編集のためのceDNAベクターは、(i)少なくとも1つのWT ITRおよび少なくとも1つの修飾型AAV逆位末端反復(ITR)(例えば、非対称の修飾型ITR)、(ii)mod-ITR対が互いに対して異なる3次元空間構成を有する、2つの修飾型ITR(例えば、非対称の修飾型ITR)、または(iii)各WT-ITRが同じ3次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称のWT-WT ITR対、または(iv)各mod-ITRが同じ3次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称の修飾型ITR対のうちのいずれかから選択されるITR配列を含み得、本開示の方法は、限定されないが、リボソームナノ粒子送達系などの送達系をさらに含み得る。

【0212】

A. 対称ITR対

いくつかの実施形態では、ITR配列は、2つのサブファミリー：脊椎動物に感染するParvovirinaeおよび昆虫に感染するDensovirinaeを含む、Parvoviridaeファミリーのウイルスに由来し得る。パルボウイルス亜科(パルボウイルスと称される)は、ディペンドウイルス族を含み、そのメンバーは、ほとんどの条件下で、増殖性感染のためにアデノウイルスまたはヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスとの共感染を必要とする。ディペンドウイルス族は、通常はヒト(例えば、血清型2、3A、3B、5、および6)または霊長類(例えば、血清型1および4)に感染するアデノ関連ウイルス(AAV)、ならびに他の温血動物に感染する関連ウイルス(例えば、ウシ、イヌ、ウマ、およびヒツジアデノ関連ウイルス)を含む。パルボウイルスおよびParvoviridaeファミリーの他のメンバーは、Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69 in FIELDS VIROLOGY (3d Ed. 1996)に一般に記載されている。

【0213】

ITRは、明細書において例証されており、本明細書における例は、AAV2-WT-ITRであるが、当業者であれば、上述のように、任意の既知のパルボウイルス、例えば、ディペンドウイルス、例えばAAV(例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ、およびAAV-DJ8ゲノムからのITRを使用できることを認識する。例えば、NCBI:NC002077;NC001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC006260;NC006261)、キメラITR、または任意の合成AAVからのITR。いくつかの実施形態では、AAVは、温血動物、例えば、鳥類(AAAV)、ウシ(BAAV)、イヌ、ウマ、およびヒツジアデノ関連ウイルスに感染し得る。いくつかの実施形態では、ITRは、B19パルボウイルス(GenBank受託番号NC000883)、マウスからの微小ウイルス(MVM)(GenBank受託番号NC001510)、ガチョウパルボウイルス(GenBank受託番号NC001701)、ヘビパルボウイルス1(GenBank受託番号NC006148)に由来する。いくつかの実施形態では、本明細書で論じられるように、5'-WT-ITRは、1つの血清型に由来し、3'-WT-ITRは、異なる血清型に由来し得る。

【0214】

熟練者であれば、ITR配列が、二本鎖ホリデージャンクションの一般構造を有し、典型的には、T形またはY形ヘアピン構造であり(例えば、図2Aおよび図3Aを参照)、

各WT-I TRが、より大きなパリンドロームアーム(A-A')に埋め込まれた2つのパリンドロームアームまたはループ(B-B'およびC-C')、ならびに一本鎖D配列によって形成される(これらのパリンドローム配列の順序は、I TRのフリップまたはフロップ配向を定義する)ことを知っている。例えば、異なるAAV血清型(AAV1~AAV6)からのI TRの構造分析および配列比較を参照されたい。Grimm et al., J. Virology, 2006; 80(1); 426-439、Yan et al., J. Virology, 2005; 364-379、Duan et al., Virology 1999; 261; 8-14に記載されている。当業者は、本明細書に提供される例示的なAAV2 I TR配列に基づいて、ceDNAベクターまたはceDNAプラスミドで使用するための任意のAAV血清型からWT-I TR配列を容易に決定することができる。例えば、Grimm et al., J. Virology, 2006; 80(1); 426-439に記載される異なるAAV血清型(AAV1~AAV6、ならびにトリAAV(AAAV)およびウシAAV(BAAV))からのI TRの配列比較を参照されたい。これは、他の血清型からの左I TRに対するAAV2の左I TRの同一性%を示す: AAV-1(84%)、AAV-3(86%)、AAV-4(79%)、AAV-5(58%)、AAV-6(左I TR)(100%)、およびAAV-6(右I TR)(82%)。

【0215】

本明細書で論じられるように、いくつかの実施形態では、遺伝子編集のためのceDNAベクターは、対称I TR配列(例えば、対称I TR対)を含むことができ、5' I TRおよび3' I TRは、互いに対して同じ対称の3次元構成を有することができる(すなわち、対称または実質的に対称)。すなわち、遺伝子編集のためのceDNAベクターは、それらの構造が幾何学的空間で同じ形状であるか、または3次元空間で同じA、C-C'およびB-B'ループを有するように、対称の3次元空間構成を有するI TR配列を含み得る(すなわち、それらは同じであるか、または互いに対して鏡像である)。そのような実施形態では、対称のI TR対、または実質的に対称のI TR対は、野生型I TRではない修飾型I TR(例えば、mod-I TR)であり得る。mod-I TR対は、野生型I TRからの1つ以上の修飾を有し、互いに逆相補(逆位)である同じ配列を有し得る。代替実施形態では、修飾型I TR対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型I TR対は、異なる配列を有し得るが、対応するまたは同じ対称の3次元形状を有し得る。

【0216】

(i) 野生型I TR

いくつかの実施形態では、対称のI TR、または実質的に対称のI TRは、本明細書に記載されるように野生型(WT-I TR)である。すなわち、両方のI TRが野生型配列を有するが、必ずしも同じAAV血清型のWT-I TRである必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、一方のWT-I TRは、1つのAAV血清型に由来し得、他方のWT-I TRは、異なるAAV血清型に由来し得る。そのような実施形態では、WT-I TR対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称的な3次元空間構成を維持しながら、1つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。

【0217】

したがって、本明細書で開示されるように、遺伝子編集のためのceDNAベクターは、2つの隣接する野生型逆位末端反復(WT-I TR)配列の間に位置する遺伝子編集配列を含み、互いに逆相補(逆位)であるか、または代替として互いに実質的に対称である。すなわち、WT-I TR対は、対称の3次元空間構成を有する。いくつかの実施形態では、野生型I TR配列(例えば、AAV WT-I TR)は、機能性Rep結合部位(RBS、例えば、AAV2の場合5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'、配列番号531)および機能性末端分解部位(TRS、例えば5'-AGTT-3'、配列番号46)を含む。

【0218】

一態様では、遺伝子編集のための c e D N A ベクターは、2つの W T 逆位末端反復配列 (W T - I T R) (例えば、A A V W T - I T R) の間に操作可能に位置付けられた異種核酸をコードするベクターポリヌクレオチドから取得可能である。すなわち、両方の I T R が野生型配列を有するが、必ずしも同じ A A V 血清型の W T - I T R である必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、一方の W T - I T R は、1つの A A V 血清型に由来し得、他方の W T - I T R は、異なる A A V 血清型に由来し得る。そのような実施形態では、W T - I T R 対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称の 3 次元空間構成を維持しながら、1つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。いくつかの実施形態では、5' W T - I T R は、1つの A A V 血清型に由来し、3' W T - I T R は、同じまたは異なる A A V 血清型に由来する。いくつかの実施形態では、5' W T - I T R および 3' W T - I T R は、互いの鏡像であり、すなわち、それらは対称である。いくつかの実施形態では、5' W T - I T R および 3' W T - I T R は、同じ A A V 血清型に由来する。

10

【0219】

W T I T R は周知である。一実施形態では、2つの I T R は、同じ A A V 2 血清型に由来する。ある特定の実施形態では、他の血清型からの W T を使用することができる。相同であるいくつかの血清型、例えば、A A V 2、A A V 4、A A V 6、A A V 8 がある。一実施形態では、密接に相同な I T R (例えば、類似のループ構造を有する I T R) を使用することができる。別の実施形態では、より多様な A A V W T I T R、例えば A A V 2 および A A V 5 を使用することができ、さらに別の実施形態では、実質的に W T である I T R を使用することができる、すなわち、それは W T の基本ループ構造を有するが、特性を変更しないかまたは影響しないいくつかの保存的ヌクレオチド変化を有する。同じウイルス血清型に由来する W T - I T R を使用する場合、1つ以上の調節配列をさらに使用することができる。ある特定の実施形態では、調節配列は、c e D N A の活性の調整を可能にする調節スイッチである。

20

【0220】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術の一態様は、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含 D N A ベクター (c e D N A ベクター) に関し、c e D N A ベクターは、2つの野生型逆位末端反復配列 (W T - I T R) の間に操作可能に位置付けられた少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列を含み、W T - I T R は、同じ血清型、異なる血清型に由来し得るか、または互いに対して実質的に対称であり得る (すなわち、それらの構造が幾何学的空間で同じ形状であるように対称の 3 次元空間構成を有するか、または 3 次元空間で同じ A、C - C'、および B - B' ループを有する)。いくつかの実施形態では、対称 W T - I T R は、機能性末端分解部位および R e p 結合部位を含む。いくつかの実施形態では、異種核酸配列は、導入遺伝子をコードし、ベクターは、ウイルスカプシドにはない。

30

【0221】

いくつかの実施形態では、W T - I T R は同じであるが、互いの逆相補鎖である。例えば、5' I T R の配列 A A C G は、対応する部位の 3' I T R の C G T T (すなわち、逆相補鎖) であり得る。一実施例では、5' W T - I T R センス鎖は、A T C G A T C G の配列を含み、対応する 3' W T - I T R センス鎖は、C G A T C G A T (すなわち、A T C G A T C G の逆相補鎖) を含む。いくつかの実施形態では、W T - I T R c e D N A は、末端分解部位および複製タンパク質結合部位 (R P S) (複製タンパク質結合部位と呼ばれることもある)、例えば R e p 結合部位をさらに含む。

40

【0222】

W T - I T R を含む c e D N A ベクターで使用するための例示的な W T - I T R 配列は、W T - I T R の対 (5' W T - I T R および 3' W T - I T R) を示す本明細書の表 2 に示されている。

【0223】

50

例示的な実施例として、本開示は、調節スイッチの有無にかかわらず、導入遺伝子（例えば、遺伝子編集配列）に操作可能に連結されたプロモーターを含む閉端DNAベクターを提供し、ceDNAはカプシドタンパク質を欠き、（a）WT-ITRをコードするceDNA-プラスミド（例えば、図1F~1Gを参照）から産生され、各WT-ITRは、そのヘアピン二次構成で同じ数の分子内二重化塩基対を有し（好ましくはこれらの参照配列と比較して、この構成のいかなるAAAまたはTTT末端ループの欠失も除外する）、および（b）実施例1の未変性ゲルおよび変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるceDNAの同定のためのアッセイを使用してceDNAとして同定される。

【0224】

いくつかの実施形態では、隣接するWT-ITRは、互いに実質的に対称である。この実施形態では、WT-ITRが同一の逆相補鎖ではないように、5' WT-ITRは、AAVの1つの血清型に由来し、3' WT-ITRは、AAVの異なる血清型に由来し得る。例えば、5' WT-ITRは、AAV2に由来し得、3' WT-ITRは、異なる血清型（例えば、AAV1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）に由来し得る。いくつかの実施形態では、WT-ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、ヘビパルボウイルス（例えば、ロイヤルパイソンパルボウイルス）、ウシパルボウイルス、ヤギパルボウイルス、トリパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ウマパルボウイルス、エビパルボウイルス、ブタパルボウイルス、または昆虫AAVのうちのいずれかから選択される2つの異なるパルボウイルスから選択され得る。いくつかの実施形態では、WT-ITRのそのような組み合わせは、AAV2およびAAV6からのWT-ITRの組み合わせである。一実施形態では、実質的に対称のWT-ITRは、一方が他方のITRに対して反転されたときに、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%~97%~98%~99%~99.5%、およびその間のすべてのポイントであり、同じ対称の3次元空間構成を有する。いくつかの実施形態では、WT-ITR対は、それらが対称の3次元空間構成を有する、例えば、A-C-C'、B-B'、およびDアームの同じ3次元構成を有するため、実質的に対称である。一実施形態では、実質的に対称のWT-ITR対は、他方に対して反転され、互いに少なくとも95%同一、少なくとも96%~97%~98%~99%~99.5%、およびその間のすべてのポイントであり、一方のWT-ITRは、5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号531）のRep結合部位（RBS）および末端分解部位（trs）を保持する。いくつかの実施形態では、実質的に対称のWT-ITR対は、互いに対して反転され、互いに少なくとも95%同一、少なくとも96%~97%~98%~99%~99.5%、およびその間のすべてのポイントであり、一方のWT-ITRは、ヘアピン二次構造形成を可能にする可変パルンドローム配列に加えて、5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号531）のRep結合部位（RBS）および末端分解部位（trs）を保持する。相同性は、BLAST（ベーシックローカルアライメント検索ツール）、デフォルト設定のBLASTNなど、当該技術分野で周知の標準的な手段によって決定することができる。

【0225】

いくつかの実施形態では、ITRの構造エレメントは、ITRと大きなRepタンパク質（例えば、Rep78またはRep68）との機能的相互作用に参与する任意の構造エレメントであり得る。ある特定の実施形態では、構造エレメントは、ITRと大きなRepタンパク質との相互作用に対する選択性を提供する。すなわち、少なくとも部分的に、どのRepタンパク質がITRと機能的に相互作用するかを判定する。他の実施形態では、構造エレメントは、Repタンパク質がITRに結合されたとき、大きなRepタンパク質と物理的に相互作用する。各構造エレメントは、例えば、ITRの二次構造、ITRのヌクレオチド配列、2つ以上のエレメント間の空間、または上記のうちのいずれかの組み合わせであり得る。一実施形態では、構造エレメントは、AおよびA'アーム、BおよびB'アーム、CおよびC'アーム、Dアーム、Rep結合部位（RBE）およびRBE

’（すなわち、相補的 R B E 配列）、ならびに末端分解部位（t r s）からなる群から選択される。

【0226】

単なる例として、表1は、WT-I TRの例示的な組み合わせを示す。

【0227】

表1：同じ血清型もしくは異なる血清型、または異なるパロウイルスからのWT-I TRの例示的な組み合わせ。示されている順序は、I TR位置を示すものではなく、例えば、「AAV1、AAV2」は、c e D N Aが5’位置にWT-AAV1 I TRおよび3’位置にWT-AAV2 I TR、またはその逆、5’位置にWT-AAV2 I TRおよび3’位置にWT-AAV1 I TRを含み得ることを明示する。略語：AAV血清型1（AAV1）、AAV血清型2（AAV2）、AAV血清型3（AAV3）、AAV血清型4（AAV4）、AAV血清型5（AAV5）、AAV血清型6（AAV6）、AAV血清型7（AAV7）、AAV血清型8（AAV8）、AAV血清型9（AAV9）、AAV血清型10（AAV10）、AAV血清型11（AAV11）、またはAAV血清型12（AAV12）；AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ、およびAAV-DJ8ゲノム（例えば、NCBI：NC002077；NC001401；NC001729；NC001829；NC006152；NC006260；NC006261）、温血動物のI TR（トリAAV（AAAV）、ウシAAV（BAAV）、イヌ、ウマ、およびヒツジAAV）、B19パルボウイルスからのI TR（GenBank受託番号：NC000883）、マウスからの微小ウイルス（MVM）（GenBank受託番号NC001510）；ガチョウ：ガチョウパルボウイルス（GenBank受託番号：NC001701）；ヘビ：ヘビパルボウイルス1（GenBank受託番号NC006148）。

【表1-1】

表1				
AAV1、AAV1	AAV2、AAV2	AAV3、AAV3	AAV4、AAV4	AAV5、AAV5
AAV1、AAV2	AAV2、AAV3	AAV3、AAV4	AAV4、AAV5	AAV5、AAV6
AAV1、AAV3	AAV2、AAV4	AAV3、AAV5	AAV4、AAV6	AAV5、AAV7
AAV1、AAV4	AAV2、AAV5	AAV3、AAV6	AAV4、AAV7	AAV5、AAV8
AAV1、AAV5	AAV2、AAV6	AAV3、AAV7	AAV4、AAV8	AAV5、AAV9
AAV1、AAV6	AAV2、AAV7	AAV3、AAV8	AAV4、AAV9	AAV5、AAV10
AAV1、AAV7	AAV2、AAV8	AAV3、AAV9	AAV4、AAV10	AAV5、AAV11
AAV1、AAV8	AAV2、AAV9	AAV3、AAV10	AAV4、AAV11	AAV5、AAV12
AAV1、AAV9	AAV2、AAV10	AAV3、AAV11	AAV4、AAV12	AAV5、 AAVRH8
AAV1、AAV10	AAV2、AAV11	AAV3、AAV12	AAV4、AAVRH8	AAV5、 AAVRH10
AAV1、AAV11	AAV2、AAV12	AAV3、AAVRH8	AAV4、AAVRH10	AAV5、AAV13
AAV1、AAV12	AAV2、AAVRH8	AAV3、AAVRH10	AAV4、AAV13	AAV5、AAVDJ
AAV1、AAVRH8	AAV2、 AAVRH10	AAV3、AAV13	AAV4、AAVDJ	AAV5、AAVDJ8
AAV1、 AAVRH10	AAV2、AAV13	AAV3、AAVDJ	AAV4、AAVDJ8	AAV5、トリ

【表 1 - 2】

AAV1、AAV13	AAV2、AAVDJ	AAV3、AAVDJ8	AAV4、トリ	AAV5、ウシ
AAV1、AAVDJ	AAV2、AAVDJ8	AAV3、トリ	AAV4、ウシ	AAV5、イヌ
AAV1、AAVDJ8	AAV2、トリ	AAV3、ウシ	AAV4、イヌ	AAV5、ウマ
AAV1、トリ	AAV2、ウシ	AAV3、イヌ	AAV4、ウマ	AAV5、ヤギ
AAV1、ウシ	AAV2、イヌ	AAV3、ウマ	AAV4、ヤギ	AAV5、エビ
AAV1、イヌ	AAV2、ウマ	AAV3、ヤギ	AAV4、エビ	AAV5、ブタ
AAV1、ウマ	AAV2、ヤギ	AAV3、エビ	AAV4、ブタ	AAV5、昆虫
AAV1、ヤギ	AAV2、エビ	AAV3、ブタ	AAV4、昆虫	AAV5、ヒツジ
AAV1、エビ	AAV2、ブタ	AAV3、昆虫	AAV4、ヒツジ	AAV5、B19
AAV1、ブタ	AAV2、昆虫	AAV3、ヒツジ	AAV4、B19	AAV5、MVM
AAV1、昆虫	AAV2、ヒツジ	AAV3、B19	AAV4、MVM	AAV5、ガチョウ
AAV1、ヒツジ	AAV2、B19	AAV3、MVM	AAV4、ガチョウ	AAV5、ヘビ
AAV1、B19	AAV2、MVM	AAV3、ガチョウ	AAV4、ヘビ	
AAV1、MVM	AAV2、ガチョウ	AAV3、ヘビ		
AAV1、ガチョウ	AAV2、ヘビ			
AAV1、ヘビ				
AAV6、AAV6	AAV7、AAV7	AAV8、AAV8	AAV9、AAV9	AAV10、AAV10
AAV6、AAV7	AAV7、AAV8	AAV8、AAV9	AAV9、AAV10	AAV10、AAV11
AAV6、AAV8	AAV7、AAV9	AAV8、AAV10	AAV9、AAV11	AAV10、AAV12
AAV6、AAV9	AAV7、AAV10	AAV8、AAV11	AAV9、AAV12	AAV10、AAVRH8
AAV6、AAV10	AAV7、AAV11	AAV8、AAV12	AAV9、AAVRH8	AAV10、AAVRH10
AAV6、AAV11	AAV7、AAV12	AAV8、AAVRH8	AAV9、AAVRH10	AAV10、AAV13
AAV6、AAV12	AAV7、AAVRH8	AAV8、AAVRH10	AAV9、AAV13	AAV10、AAVDJ
AAV6、AAVRH8	AAV7、AAVRH10	AAV8、AAV13	AAV9、AAVDJ	AAV10、AAVDJ8
AAV6、AAVRH10	AAV7、AAV13	AAV8、AAVDJ	AAV9、AAVDJ8	AAV10、トリ
AAV6、AAV13	AAV7、AAVDJ	AAV8、AAVDJ8	AAV9、トリ	AAV10、ウシ
AAV6、AAVDJ	AAV7、AAVDJ8	AAV8、トリ	AAV9、ウシ	AAV10、イヌ
AAV6、AAVDJ8	AAV7、トリ	AAV8、ウシ	AAV9、イヌ	AAV10、ウマ
AAV6、トリ	AAV7、ウシ	AAV8、イヌ	AAV9、ウマ	AAV10、ヤギ
AAV6、ウシ	AAV7、イヌ	AAV8、ウマ	AAV9、ヤギ	AAV10、エビ
AAV6、イヌ	AAV7、ウマ	AAV8、ヤギ	AAV9、エビ	AAV10、ブタ
AAV6、ウマ	AAV7、ヤギ	AAV8、エビ	AAV9、ブタ	AAV10、昆虫
AAV6、ヤギ	AAV7、エビ	AAV8、ブタ	AAV9、昆虫	AAV10、ヒツジ
AAV6、エビ	AAV7、ブタ	AAV8、昆虫	AAV9、ヒツジ	AAV10、B19

10

20

30

40

【表 1 - 3】

AAV6、ブタ	AAV7、昆虫	AAV8、ヒツジ	AAV9、B19	AAV10、MVM
AAV6、昆虫	AAV7、ヒツジ	AAV8、B19	AAV9、MVM	AAV10、ガチョウ
AAV6、ヒツジ	AAV7、B19	AAV8、MVM	AAV9、ガチョウ	AAV10、ヘビ
AAV6、B19	AAV7、MVM	AAV8、ガチョウ	AAV9、ヘビ	
AAV6、MVM	AAV7、ガチョウ	AAV8、ヘビ		
AAV6、ガチョウ	AAV7、ヘビ			
AAV6、ヘビ				
AAV11、AAV11	AAV12、AAV12	AAVRH8、AAVRH8	AAVRH10、AAVRH10	AAV13、AAV13
AAV11、AAV12	AAV12、AAVRH8	AAVRH8、AAVRH10	AAVRH10、AAV13	AAV13、AAVDJ
AAV11、AAVRH8	AAV12、AAVRH10	AAVRH8、AAV13	AAVRH10、AAVDJ	AAV13、AAVDJ8
AAV11、AAVRH10	AAV12、AAV13	AAVRH8、AAVDJ	AAVRH10、AAVDJ8	AAV13、トリ
AAV11、AAV13	AAV12、AAVDJ	AAVRH8、AAVDJ8	AAVRH10、トリ	AAV13、ウシ
AAV11、AAVDJ	AAV12、AAVDJ8	AAVRH8、トリ	AAVRH10、ウシ	AAV13、イヌ
AAV11、AAVDJ8	AAV12、トリ	AAVRH8、ウシ	AAVRH10、イヌ	AAV13、ウマ
AAV11、トリ	AAV12、ウシ	AAVRH8、イヌ	AAVRH10、ウマ	AAV13、ヤギ
AAV11、ウシ	AAV12、イヌ	AAVRH8、ウマ	AAVRH10、ヤギ	AAV13、エビ
AAV11、イヌ	AAV12、ウマ	AAVRH8、ヤギ	AAVRH10、エビ	AAV13、ブタ
AAV11、ウマ	AAV12、ヤギ	AAVRH8、エビ	AAVRH10、ブタ	AAV13、昆虫
AAV11、ヤギ	AAV12、エビ	AAVRH8、ブタ	AAVRH10、昆虫	AAV13、ヒツジ
AAV11、エビ	AAV12、ブタ	AAVRH8、昆虫	AAVRH10、ヒツジ	AAV13、B19
AAV11、ブタ	AAV12、昆虫	AAVRH8、ヒツジ	AAVRH10、B19	AAV13、MVM
AAV11、昆虫	AAV12、ヒツジ	AAVRH8、B19	AAVRH10、MVM	AAV13、ガチョウ
AAV11、ヒツジ	AAV12、B19	AAVRH8、MVM	AAVRH10、ガチョウ	AAV13、ヘビ
AAV11、B19	AAV12、MVM	AAVRH8、ガチョウ	AAVRH10、ヘビ	
AAV11、MVM	AAV12、ガチョウ	AAVRH8、ヘビ		
AAV11、ガチョウ	AAV12、ヘビ			

10

20

30

40

【表 1 - 4】

AAV11、ヘビ				
AAVDJ、AAVDJ	AAVDJ8、 AVVDJ8	トリ、トリ	ウシ、ウシ	イヌ、イヌ
AAVDJ、 AAVDJ8	AAVDJ8、トリ	トリ、ウシ	ウシ、イヌ	イヌ、ウマ
AAVDJ、トリ	AAVDJ8、ウシ	トリ、イヌ	ウシ、ブタ	イヌ、ヤギ
AAVDJ、ウシ	AAVDJ8、イヌ	トリ、ウマ	ウシ、ヤギ	イヌ、エビ
AAVDJ、イヌ	AAVDJ8、ウマ	トリ、ヤギ	ウシ、エビ	イヌ、ブタ
AAVDJ、ウマ	AAVDJ8、ヤギ	トリ、エビ	ウマ、ブタ	イヌ、昆虫
AAVDJ、ヤギ	AAVDJ8、エビ	トリ、ブタ	ウシ、昆虫	イヌ、ヒツジ
AAVDJ、エビ	AAVDJ8、ブタ	トリ、昆虫	ウシ、ヒツジ	イヌ、B19
AAVDJ、ブタ	AAVDJ8、昆虫	トリ、ヒツジ	ウシ、B19	イヌ、MVM
AAVDJ、昆虫	AAVDJ8、ヒツジ	トリ、B19	ウシ、MVM	イヌ、ガチョウ
AAVDJ、ヒツジ	AAVDJ8、B19	トリ、MVM	ウシ、ガチョウ	イヌ、ヘビ
AAVDJ、B19	AAVDJ8、MVM	トリ、ガチョウ	ウシ、ヘビ	
AAVDJ、MVM	AAVDJ8、ガチョ ウ	トリ、ヘビ		
AAVDJ、ガチョ ウ	AAVDJ8、ヘビ			
AAVDJ、ヘビ				
ウマ、ウマ	ヤギ、ヤギ	エビ、エビ	ブタ、ブタ	昆虫、昆虫
ウマ、ヤギ	ヤギ、エビ	エビ、ブタ	ブタ、昆虫	昆虫、ヒツジ
ウマ、エビ	ヤギ、ブタ	エビ、昆虫	ブタ、ヒツジ	昆虫、B19
ウマ、ブタ	ヤギ、昆虫	エビ、ヒツジ	ブタ、B19	昆虫、MVM
ウマ、昆虫	ヤギ、ヒツジ	エビ、B19	ブタ、MVM	昆虫、ガチョウ
ウマ、ヒツジ	ヤギ、B19	エビ、MVM	ブタ、ガチョウ	昆虫、ヘビ
ウマ、B19	ヤギ、MVM	エビ、ガチョウ	ブタ、ヘビ	
ブタ、MVM	ヤギ、ガチョウ	エビ、ヘビ		
ウマ、ガチョウ	ヤギ、ヘビ			
ウマ、ヘビ				
ヒツジ、ヒツジ	B19、B19	MVM、MVM	ガチョウ、ガチ ョウ	ヘビ、ヘビ
ヒツジ、B19	B19、MVM	MVM、ガチョウ	ガチョウ、ヘビ	
ヒツジ、MVM	B19、ガチョウ	MVM、ヘビ		
ヒツジ、ガチ ョウ	B19、ヘビ			
ヒツジ、ヘビ				

【 0 2 2 8】

単なる例として、表 2 は、いくつかの異なる A A V 血清型からの例示的な W T - I T R の配列を示す。

表 2

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

AAV 血 清型	5' WT-ITR (左)	3' WT-ITR (右)
AAV 1	5' - TTGCCCCTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAAAGG TCCGCAGACGGCAGAGGTCTCCTCTGCC GGCCCCACCGAGCGAGCGACGCGCGCA GAGAGGGAGTGGGCAACTCCATCACTA GGGTAA-3' (配列番号 5 6 0)	5' - TTACCCTAGTGATGGAGTTGCCCACTCCC TCTCTGCGCGCGTCTGCTCGGTGGG GCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCGTCTGC GGACCTTTGGTCCGCAGGCCCCACCGAG CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGG CAA-3' (配列番号 5 6 5) (Kay et al., J Virol, 2006, 4 26-439、図 1A から)
AAV 2	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCT CACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGG GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT TCCT (配列番号 5 1)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGAC GCCCCGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G (配列番号 1)
AAV 3	5' - TTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGCT CGCTCGGTGGGGCCTGGCGACCAAAGG TCGCCAGACGGACGTGGGTTTCCACGTC CGGCCCCACCGAGCGAGCGAGTGCGCA TAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GAGGTAT-3' (配列番号 5 6 1)	5' - ATACCTCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC CCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCGGTGG GGCCGGACGTGGAAACCCACGTCCGTCT GGCGACCTTTGGTCGCCAGGCCCCACCG AGCGAGCGAGTGCGCATAGAGGGAGTG GCCAA-3' (配列番号 5 6 6) (Kay et al., J Virol, 2006, 4 26-439、図 1A から)
AAV 4	5' - TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGCT CACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAGG TCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCCGGCA GGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGCGCAT AGAGGGAGTGGCCAACT-3' (配列番 号 5 6 2)	5' - AGTTGGCCACATTAGCTATGCGCGCTCG CTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAG GTCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCCGGC AGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGCGCA TAGAGGGAGTGGCCAA-3' (配列番号 5 6 7)
AAV 5	5' - TCCCCCTGTCGCGTTCGCTCGCTCGCT GGCTCGTTTGGGGGGGCGACGGCCAGA GGGCCGTCTGTCGAGCTCTTTGAGCT	5' - CTTACAAAACCCCTTGCTTGAGAGTGT GGCACTCTCCCCCTGTCGCGTTCGCTCG CTC

10

20

30

40

【表 2 - 2】

	GCCACCCCCCAAACGAGCCAGCGAGC GAGCGAACGCGACAGGGGGGAGAGTGC CACACTCTCAAGCAAGGGGGTTTTGTAA G-3' (配列番号 5 6 3)	GCTGGCTCGTTTGGGGGGGTGGCAGCTC AAAGAGCTGCCAGACGACGGCCCTCTGG CCGTCGCCCCCCCCAAACGAGCCAGCGAG CGAGCGAACGCGACAGGGGGGA-3' (配列番号 5 6 8)
AAV6	5' - TTGCCCCACTCCCTCTAATGCGCGCTCGC TCGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAAAG GTCCGCAGACGGCAGAGGTCTCTCTGCG CGGCCCCACCGAGCGAGCGAGCGCGCA TAGAGGGAGTGGGCAACTCCATCACTA GGGGTAT-3' (配列番号 5 6 4)	5' - ATACCCCTAGTGATGGAGTTGCCCCACTC CCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCGGTGG GGCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCGTCTG CGGACCTTTGGTCCGCAGGCCCCACCGA GCGAGCGAGCGCGCATTAGAGGGAGTG GGCAA (配列番号 5 6 9) (Kay et al., J Virol, 2006, 4 26-439, 図 1A から)

10

【0229】

20

いくつかの実施形態では、WT-ITR 配列のヌクレオチド配列は、（例えば、1、2、3、4 もしくは 5 個以上のヌクレオチドまたはその中の任意の範囲を修飾することにより）修飾され得、それにより修飾は、相補的ヌクレオチドの置換、例えば、C の場合は G、およびその逆、A の場合は T、およびその逆である。

【0230】

本発明のある特定の実施形態では、ceDNA ベクターは、配列番号 550～557 のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列からなる WT-ITR を有しない。

【0231】

本発明の代替実施形態では、ceDNA ベクターが、配列番号 550～557 のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列を含む WT-ITR を有する場合、隣接する ITR も WT であり、ceDNA は、例えば、本明細書および PCT/US18/49996 に開示されているように、調節スイッチを含む（例えば、PCT/US18/49996 の表 11 を参照）。いくつかの実施形態では、ceDNA ベクターは、本明細書に開示されるような調節スイッチ、および配列番号 550～557 からなる群のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する選択された WT-ITR を含む。

30

【0232】

本明細書に記載される ceDNA ベクターは、操作可能な RBE、trs、および RBE' 部分を保持する WT-ITR 構造を含み得る。例示の目的で野生型 ITR を使用する図 2A および図 2B は、ceDNA ベクターの野生型 ITR 構造部分内の trs 部位の操作のための 1 つの可能な機序を示す。いくつかの実施形態では、ceDNA ベクターは、Rep-結合部位（RBS、AAV2 の場合 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号 531））および末端分解部位（TRS、5'-AGTT（配列番号 46））を含む 1 つ以上の機能性 WT-ITR ポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの WT-ITR は、機能的である。ceDNA ベクターが互いに実質的に対称である 2 つの WT-ITR を含む代替実施形態では、少なくとも 1 つの WT-ITR が機能的であり、少なくとも 1 つの WT-ITR が非機能的である。

40

【0233】

B. 非対称 ITR 対または対称 ITR 対を含む ceDNA ベクターの一般的な修飾型 ITR (mod-ITR)

本明細書で論じられるように、ceDNA ベクターは、対称 ITR 対または非対称 ITR

50

R対を含み得る。どちらの場合も、I T Rは修飾型I T Rであり得、その違いは、第1の場合（すなわち、対称mod-I T R）では、mod-I T Rは、同じ3次元空間構成を有する（すなわち、同じA-A'、C-C'、およびB-B'アーム構成を有する）が、第2の場合（すなわち、非対称mod-I T R）では、mod-I T Rは、異なる3次元空間構成を有する（すなわち、A-A'、C-C'、およびB-B'アームの異なる構成を有する）ことである。

【0234】

いくつかの実施形態では、修飾型I T Rは、野生型I T R配列（例えば、AAV I T R）と比較して、欠失、挿入、および／または置換によって修飾されるI T Rである。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターのI T Rのうちの少なくとも1つは、機能性Rep結合部位（RBS；例えば、AAV2の場合は5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'、配列番号531）および機能性末端分解部位（TRS；例えば、5'-AGTT-3'、配列番号46）を含む。一実施形態では、I T Rのうちの少なくとも1つは、非機能性I T Rである。一実施形態では、異なるまたは修飾型I T Rは各々、異なる血清型からの野生型I T Rではない。

【0235】

I T Rの特定の変更および突然変異が本明細書において詳細に説明されているが、I T Rの文脈では、「変更型」または「突然変異型」または「修飾型」とは、ヌクレオチドが野生型、参照、または元のI T R配列に対して挿入、欠失、および／または置換されたことを示す。変更型または突然変異型I T Rは、操作されたI T Rであり得る。本明細書で使用される場合、「操作された」とは、人の手によって操作された態様を指す。例えば、ポリペプチドは、ポリペプチドの少なくとも1つの態様、例えば、その配列が、人の手によって操作され、それが天然に存在するときの態様とは異なるとき、「操作された」とみなされる。

【0236】

いくつかの実施形態では、mod-I T Rは、合成のものであり得る。一実施形態では、合成I T Rは、2つ以上のAAV血清型からのI T R配列に基づいている。別の実施形態では、合成I T Rは、AAV系配列を含まない。さらに別の実施形態では、合成I T Rは、上記のI T R構造を保存するが、わずかなAAV源配列を有するか、または全く有しない。いくつかの態様では、合成I T Rは、野生型Repまたは特定血清型のRepと選択的に相互作用し得るか、または場合によっては、野生型Repによって認識されず、突然変異型Repによってのみ認識される。

【0237】

熟練者であれば、既知の手段によって他の血清型における対応する配列を判定することができる。例えば、A、A'、B、B'、C、C'、またはD領域中に変化が存在するかどうかを判定し、別の血清型における対応する領域を判定する。BLAST（登録商標）（Basic Local Alignment Search Tool）または他の相同性アラインメントプログラムをデフォルト状態で使用して、対応する配列を判定することができる。本発明は、異なるAAV血清型の組み合わせからmod-I T Rを含む集団および複数のceDNAベクターをさらに提供する。すなわち、1つのmod-I T Rは、1つのAAV血清型に由来し得、他のmod-I T Rは、異なる血清型に由来し得る。理論に束縛されるものではないが、一実施形態では、1つのI T Rは、AAV2 I T R配列に由来し得るか、またはそれに基づき得、ceDNAベクターの他のI T Rは、AAV血清型1（AAV1）、AAV血清型4（AAV4）、AAV血清型5（AAV5）、AAV血清型6（AAV6）、AAV血清型7（AAV7）、AAV血清型8（AAV8）、AAV血清型9（AAV9）、AAV血清型10（AAV10）、AAV血清型11（AAV11）、またはAAV血清型12（AAV12）の任意の1つ以上のI T R配列に由来し得るか、またはそれに基づき得る。

【0238】

任意のバルボウイルスI T Rを、I T Rとして、または塩基I T Rとして修飾に使用す

ることができる。好ましくは、パルボウイルスは、ディペンドウイルスである。より好ましくは、AAVである。選択される血清型は、その血清型の組織向性に基づき得る。AAV2は、広い組織向性を有し、AAV1は、ニューロンおよび骨格筋を選好的に標的し、AAV5は、ニューロン、網膜色素上皮、および光受容体を標的とする。AAV6は、骨格筋および肺を選好的に標的とする。AAV8は、肝臓、骨格筋、心臓、および脾臓組織を選好的に標的とする。AAV9は、肝臓、骨格、および肺組織を選好的に標的とする。一実施形態では、修飾型ITRは、AAV2 ITRに基づいている。

【0239】

より具体的には、構造エレメントが特定の大きなRepタンパク質と機能的に相互作用する能力は、構造エレメントを修飾することによって変更され得る。例えば、構造エレメントのヌクレオチド配列は、ITRの野生型配列と比較して修飾され得る。一実施形態では、ITRの構造エレメント（例えば、Aアーム、A'アーム、Bアーム、B'アーム、Cアーム、C'アーム、Dアーム、RBE、RBE'、およびtrs）を除去し、異なるパルボウイルスからの野生型構造エレメントと置き換えることができる。例えば、置換構造は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、ヘビパルボウイルス（例えば、ロイヤルパイソンパルボウイルス）、ウシパルボウイルス、ヤギパルボウイルス、トリパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ウマパルボウイルス、エビパルボウイルス、ブタパルボウイルス、または昆虫AAVからのものであり得る。例えば、ITRは、AAV2 ITRであり得、AもしくはA'アームまたはRBEは、AAV5からの構造エレメントと置き換えることができる。別の実施例では、ITRは、AAV5 ITRであり得、CまたはC'アーム、RBE、およびtrsは、AAV2からの構造エレメントと置き換えることができる。別の実施例では、AAV ITRは、AAV5 ITRであり得、BおよびB'アームは、AAV2 ITR BおよびB'アームで置き換えられる。

【0240】

単なる例として、表3は、修飾型ITRの領域中の少なくとも1つのヌクレオチドの例示的な修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を示し、Xは、対応する野生型ITRに対するそのセクションにおける少なくとも1つの核酸の修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を示す。いくつかの実施形態では、Cおよび／またはC'および／またはBおよび／またはB'の領域のうちのいずれかにおける少なくとも1つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）は、少なくとも1つの末端ループに3つの連続Tヌクレオチド（すなわち、TTT）を保持する。例えば、修飾が、単一アームITR（例えば、単一C-C'アーム、もしくは単一B-B'アーム）、または修飾型C-B'アームもしくはC'-Bアーム、または少なくとも1つの切断されたアーム（例えば、切断されたC-C'アームおよび／もしくは切断されたB-B'アーム）を有する2つのアームITRのうちのいずれかをもたらず場合、少なくとも単一アーム、または2つのアームITRのアーム（1つのアームは切断され得る）のうちの少なくとも1つは、少なくとも1つの末端ループに3つの連続Tヌクレオチド（すなわち、TTT）を保持する。いくつかの実施形態では、切断されたC-C'アームおよび／または切断されたB-B'アームは、末端ループに3つの連続Tヌクレオチド（すなわち、TTT）を有する。

【0241】

表3：ITRの異なるB-B'およびC-C'領域またはアームに対する少なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）の例示的な組み合わせ（Xは、ヌクレオチド修飾、例えば、領域中の少なくとも1つのヌクレオチドの付加、欠失、または置換を示す）。

【表 3】

B領域	B' 領域	C領域	C' 領域
X			
	X		
X	X		
		X	
			X
		X	X
X		X	
X			X
	X	X	
	X		X
X	X	X	
X	X		X
X		X	X
	X	X	X
X	X	X	X

10

20

【0242】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される非対称 I T R 対または対称 m o d - I T R 対を含む遺伝子編集 c e D N A ベクターで使用するための m o d - I T R は、表 3 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A ' と C との間、C と C ' との間、C ' と B との間、B と B ' との間、および B ' と A との間から選択される領域のうちのいずれか 1 つ以上における少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、C もしくは C ' または B もしくは B ' 領域中の少なくとも 1 つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）は、依然としてステムループの末端ループを保存する。いくつかの実施形態では、C と C ' との間および／または B と B ' との間の少なくとも 1 つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）は、少なくとも 1 つの末端ループに 3 つの連続 T ヌクレオチド（すなわち、T T T）を保持する。代替実施形態では、C と C ' との間および／または B と B ' との間の少なくとも 1 つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）は、少なくとも 1 つの末端ループに 3 つの連続 A ヌクレオチド（すなわち、A A A）を保持する。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 I T R は、表 3 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A ' 、A、および／または D から選択される領域のうちのいずれか 1 つ以上における少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 I T R は、表 3 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A 領域における少なくとも 1 つの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）も含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 I T R は、表 3 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A ' 領域における少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 I T R は、表 3 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A および／または A ' 領域における少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 I T R は、表 3 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、ま

30

40

50

たD領域における少なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を含み得る。

【0243】

一実施形態では、構造エレメントのヌクレオチド配列を修飾して（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20以上のヌクレオチド、またはその中の任意の範囲）、修飾型構造エレメントを産生することができる。一実施形態では、ITRに対する特定の修飾が本明細書に例示される（例えば、配列番号2、52、63、64、99～100、469～499、または本明細書の図7A～7Bに示される（例えば、97～98、101～103、105～108、111～112、117～134、545～54）。いくつかの実施形態では、ITRは、（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20以上のヌクレオチド、またはその中の任意の範囲を修飾することによって）修飾され得る。他の実施形態では、ITRは、配列番号469～499もしくは545～547の修飾型ITRのうちの1つ、または配列番号97～98、101～103、105～108、111～112、117～134、545～547の、または参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT/US18/49996の表2～9（すなわち、配列番号110～112、115～190、200～468）に示されているA-A'アームおよびC-C'およびB-B'アームのRBE含有セクションと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれ以上の配列同一性を有し得る。

【0244】

いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、例えば、特定アームの全部、例えば、A-A'アームの全部もしくは一部、またはB-B'アームの全部もしくは一部、またはC-C'アームの全部もしくは一部の除去または欠失、あるいはステム（例えば、単一アーム）をキャップする最終ループが依然として存在する限り、ループのステムを形成する1、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上の塩基対の除去（例えば、図7AのITR-21を参照）を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、B-B'アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上の塩基対の除去を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、C-C'アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上の塩基対の除去を含み得る（例えば、図3BのITR-1または図7AのITR-45を参照）。いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、C-C'アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上の塩基対の除去、およびB-B'アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上の塩基対の除去を含み得る。塩基対の除去の任意の組み合わせが想起され、例えば、C-C'アームにおける6つの塩基対、およびB-B'アームにおける2つの塩基対が除去され得る。例示的な実施例として、図3Bは、修飾型ITRが、少なくとも1つのアーム（例えば、C-C'）が切断される2つのアームを含むように、C部分およびC'部分の各々から欠失された少なくとも7つの塩基対、C領域とC'領域との間のループ中のヌクレオチドの置換、ならびにB領域およびB'領域の各々からの少なくとも1つの塩基対の欠失を有する例示的な修飾型ITRを示す。いくつかの実施形態では、修飾型ITRはまた、B領域およびB'領域の各々からの少なくとも1つの塩基対の欠失を含み、それによりB-B'アームもWT ITRに対して切断される。

【0245】

いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、全長野生型ITR配列に対して1～50（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50）ヌクレオチド欠失を有し得る。いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、全長野生型ITR配列に対して1～30

ヌクレオチド欠失を有し得る。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、全長野生型 I T R 配列に対して 2 ～ 2 0 ヌクレオチド欠失を有す。

【0246】

いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、DNA 複製（例えば、Rep タンパク質による R B E への結合、もしくは末端分解部位でのニッキング）に干渉しないように、A または A' 領域の R B E 含有部分にいかなるヌクレオチド欠失も含まない。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のために包含される修飾型 I T R は、本明細書に記載される B、B'、C、および／または C 領域に 1 つ以上の欠失を有する。

【0247】

いくつかの実施形態では、対称 I T R 対または非対称 I T R 対を含む遺伝子編集 c e D N A ベクターは、本明細書に開示されるような調節スイッチおよび配列番号 550 ～ 557 からなる群のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する選択された少なくとも 1 つの修飾型 I T R を含む。

【0248】

別の実施形態では、構造エレメントの構造は、修飾され得る。例えば、構造エレメントは、ステムの高さおよび／またはループ内のヌクレオチドの数の変化。例えば、ステムの高さは、約 2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9 ヌクレオチド以上、またはその中の任意の範囲であり得る。一実施形態では、ステムの高さは約 5 ヌクレオチド～約 9 ヌクレオチドであり得、Rep と機能的に相互作用し得る。別の実施形態では、ステムの高さは、約 7 ヌクレオチドであり得、Rep と機能的に相互作用し得る。別の例では、ループは 3、4、5、6、7、8、9、もしくは 10 ヌクレオチド以上、またはその中の任意の範囲を有し得る。

【0249】

別の実施形態では、R B E または伸長 R B E 内の G A G Y 結合部位または G A G Y 関連結合部位の数は、増加または減少され得る。一実施例では、R B E または伸長 R B E は、1、2、3、4、5、もしくは 6 以上の G A G Y 結合部位、またはその中の任意の範囲を含み得る。各 G A G Y 結合部位は、独立して、配列が Rep タンパク質に結合するのに十分である限り、正確な G A G Y 配列または G A G Y と同様の配列であり得る。

【0250】

別の実施形態では、2 つのエレメント（限定されないが、R B E およびヘアピンなど）の間の空間を変更して（例えば、増加または減少）、大きな Rep タンパク質との機能的相互作用を変更することができる。例えば、空間は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくは 21 ヌクレオチド以上、またはその中の任意の範囲であり得る。

【0251】

本明細書に記載される c e D N A ベクターは、本明細書に開示される野生型 A A V 2 I T R 構造に関して修飾される I T R 構造を含み得るが、依然として操作可能な R B E、t r s、および R B E' 部分を保持する。図 2 A および図 2 B は、c e D N A ベクターの野生型 I T R 構造内の t r s 部位の操作のための 1 つの可能な機序を示す。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、Rep-結合部位（R B S、A A V 2 の場合 5'-G C G C G C T C G C T C G C T C-3'（配列番号 531））および末端分解部位（T R S、5'-A G T T（配列番号 46））を含む 1 つ以上の機能的 I T R ポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの I T R（野生型または修飾型 I T R）は、機能的である。c e D N A ベクターが、互いに異なるか、または非対称である 2 つの修飾型 I T R を含む代替実施形態では、少なくとも 1 つの修飾型 I T R は、機能的であり、少なくとも 1 つの修飾型 I T R は、非機能的である。

【0252】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、本明細書に提供されるように、配列番号 500 ～ 529 からなる、または本質的にそれからなる任意の配列から選択される修飾型 I T R を有しない。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、配列番号 50

0～529から選択される任意の配列から選択される I T R を有しない。

【0253】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターの修飾型 I T R（例えば、左または右 I T R）は、ループアーム、切断アーム、またはスパーサー内に修飾を有する。ループアーム、切断アーム、またはスパーサー内に修飾を有する I T R の例示的な配列は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる P C T 出願 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 の表 2（すなわち、配列番号 1 3 5～1 9 0、2 0 0～2 3 3）；表 3（例えば、配列番号 2 3 4～2 6 3）；表 4（例えば、配列番号 2 6 4～2 9 3）；表 5（例えば、本明細書の配列番号 2 9 4～3 1 8）；表 6（例えば、配列番号 3 1 9～4 6 8）；および表 7～9（例えば、配列番号 1 0 1～1 1 0、1 1 1～1 1 2、1 1 5～1 3 4）または表 1 0 A もしくは 1 0 B（例えば、配列番号 9、1 0 0、4 6 9～4 8 3、4 8 4～4 9 9）に列挙されている。

【0254】

いくつかの実施形態では、非対称 I T R 対または対称 m o d - I T R 対を含む c e D N A ベクターにおける使用のための修飾型 I T R は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる P C T 出願 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 の表 2、3、4、5、6、7、8、9、および 1 0 A～1 0 B に示されるもののうちのいずれか、またはそれらの組み合わせから選択される。

【0255】

上記のクラスの各々に非対称 I T R 対または対称 m o d - I T R 対を含む c e D N A ベクターで使用するための追加の例示的な修飾型 I T R を表 4 A および 4 B に示す。表 4 A の右修飾型 I T R の予測される二次構造は、図 7 A に示され、表 4 B の左修飾型 I T R の予測される二次構造は、図 7 B に示される。

【0256】

表 4 A および表 4 B は、例示的な右および左修飾型 I T R を示す。

【0257】

表 4 A：例示的な修飾型右 I T R これらの例示的な修飾型右 I T R は、R B E である G C G C G C T C G C T C G C T C - 3'（配列番号 5 3 1）、スパーサーである A C T G A G G C（配列番号 5 3 2）、スパーサー補体 G C C T C A G T（配列番号 5 3 5）、および R B E'（すなわち、R B E に対する補体）である G A G C G A G C G A G C G C G C（配列番号 5 3 6）を含み得る。

【表 4 A - 1】

表 4 A : 例示的な右修飾型 I T R		
I T R 構 築物	配列	配列番 号
I T R - 1 8 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCA CGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	4 6 9
I T R - 1 9 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGA CGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	4 7 0
I T R - 2 0 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G	4 7 1
I T R - 2 1 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCTTT GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG	4 7 2
I T R - 2 2 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACAAAGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCC CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG	4 7 3

10

20

30

【表 4 A - 2】

I TR- 2 3 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGAAAATCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCG GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT GCCTGCAGG	4 7 4
I TR- 2 4 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGAAACGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGG CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG	4 7 5
I TR- 2 5 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCAAAGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG	4 7 6
I TR- 2 6 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGTTTCC CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG	4 7 7
I TR- 2 7 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGTTTCCG GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT GCCTGCAGG	4 7 8
I TR- 2 8 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGTTTCGGG CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG	4 7 9
I TR- 2 9 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTTGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG	4 8 0
I TR- 3 0 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTTGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGC AGG	4 8 1

10

20

30

40

【表 4 A - 3】

I T R - 3 1 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTGCGCCCGACGCTTTGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G	4 8 2
I T R - 3 2 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTGCGCCCGACGTTTCGGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	4 8 3
I T R - 4 9 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTGCGCCCGACGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	9 9
I T R - 5 0 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTGCGCCCGACGCCCGGGCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCA GG	1 0 0

10

20

【 0 2 5 8】

表 4 B：例示的な修飾型左 I T R これらの例示的な修飾型左 I T R は、R B E である G C G C G C T C G C T C G C T C - 3' (配列番号 5 3 1)、スペーサーである A C T G A G G C (配列番号 5 3 2)、スペーサー補体 G C C T C A G T (配列番号 5 3 5)、および R B E 補体 (R B E') である G A G C G A G C G A G C G C G C (配列番号 5 3 6) を含み得る。

【表 4 B - 1】

30

表 1 4 B：例示的な修飾型左 I T R		
I T R - 3 3 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGAAACCCGGGCGTGCGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTCCT	4 8 4
I T R - 3 4 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC CAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	4 8 5
I T R - 3 5 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC CAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	4 8 6
I T R - 3 6 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG	4 8 7

40

50

【表 4 B - 2】

	GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	
I TR-3 7左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCAAAGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC CT	4 8 8
I TR-3 8左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGGCAAAGCCCCGGGGCGTCGGGGCGA CTTTGTGCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG GGTTCCT	4 8 9
I TR-3 9左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGGCAAAGCCCCGGGGCGTCGGGGCGA TTTTCGCCCCGGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCT	4 9 0
I TR-4 0左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGGCAAAGCCCCGGGGCGTCGGGGCGT TTCGCCCCGGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTT CCT	4 9 1
I TR-4 1左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGGCAAAGCCCCGGGGCGTCGGGGCTT TGCCCCGGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC T	4 9 2
I TR-4 2左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGAAACCCGGGGCGTCGGGGCGACC TTTGGTCGCCCCGGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG GGTTCCT	4 9 3
I TR-4 3左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGAAACCGGGCGTCGGGGCGACCTT TGGTCGCCCCGGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCT	4 9 4
I TR-4 4左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGAAACGGGGCGTCGGGGCGACCTTTG GTCGCCCCGGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTT	4 9 5

10

20

30

40

【表 4 B - 3】

	CCT	
I TR-4 5左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCAAAGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCC T	496
I TR-4 6左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCAAAGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCG CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT	497
I TR-4 7左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCAAAGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT	498
I TR-4 8左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGAAACGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT	499

10

20

【0259】

一実施形態では、遺伝子編集 c e DNA ベクターは、2つの対称的な m o d - I T R を含む。すなわち、両方の I T R は、同じ配列を有するが、互いの逆相補鎖（逆位）である。いくつかの実施形態では、対称 m o d - I T R 対は、同じ A A V 血清型からの野生型 I T R 配列と比較して、欠失、挿入、または置換の少なくとも1つまたは任意の組み合わせを含む。対称 I T R の付加、欠失、または置換は同じであるが、互いの逆相補鎖である。例えば、5' I T R の C 領域への3ヌクレオチドの挿入は、3' I T R の C' 領域の対応するセクションへの3つの逆相補ヌクレオチドの挿入に反映される。単に説明の目的のみ、付加が5' I T R の A A C G である場合、付加は、対応する部位における3' I T R の C G T T である。例えば、5' I T R センス鎖が

30

【化1】

ATCGATCG

であり、GとAとの間に

【化2】

AACG

40

の付加を伴い、配列

【化3】

ATCGAACGATCG

をもたらす場合。対応する3' I T R センス鎖は、

【化4】

CGATCGAT (ATCGATCGの逆相補鎖)

50

であり、TとCとの間に

【化5】

CGTT

(すなわち、AACGの逆相補鎖)の付加を伴い、配列

【化6】

CGATCGTTCGAT (ATCGAACGATCGの逆相補鎖)

をもたらす。

【0260】

代替実施形態では、修飾型ITR対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型ITR対は、異なる配列を有し得るが、対応するまたは同じ対称の3次元形状を有し得る。例えば、1つの修飾型ITRは、1つの血清型に由来し得、他の修飾型ITRは、異なる血清型に由来し得るが、それらは同じ領域において同じ突然変異(例えば、ヌクレオチド挿入、欠失、または置換)を有する。言い換えると、単なる説明の目的で、5' mod-ITRは、AAV2に由来し得、C領域に欠失を有し、3' mod-ITRは、AAV5に由来し得、C'領域に対応する欠失を有する。5' mod-ITRおよび3' mod-ITRが同じまたは対称の3次元空間構成を有することを条件として、それらは本明細書における修飾型ITR対としての使用に包含される。

【0261】

いくつかの実施形態では、実質的に対称のmod-ITR対は、3次元空間で同じA、C-C'およびB-B'ループを有する。例えば、実質的に対称のmod-ITR対の修飾型ITRがC-C'アームの欠失を有する場合、同族のmod-ITRは、C-C'ループの対応する欠失を有し、またその同族のmod-ITRの幾何学的空間に同じ形状の残りのAおよびB-B'ループの同様の3次元構造を有する。単なる例として、実質的に対称のITRは、それらの構造が幾何学的空間において同じ形状であるように、対称空間構成を有し得る。これは、例えば、G-C対が、例えばC-G対に、もしくはその逆に修飾されたとき、またはA-T対がT-A対に、もしくはその逆に修飾されたときに起こり得る。したがって、

【化7】

ATCGAACGATCG

(配列番号570)としての修飾型5' ITR、および

【化8】

CGATCGTTCGAT

(配列番号571)としての修飾型3' ITR(すなわち、

【化9】

ATCGAACGATCG

の逆相補(配列番号570))の上記の例示的な実施例を使用し、例えば、5' ITRが

【化10】

ATCGAACCATCG

の配列(配列番号572)を有していた場合(付加部のGは、Cに修飾される)、これらの修飾型ITRは、依然として対称であり、実質的に対称の3' ITRは、付加部のTを対応するAに修飾することなく、

【化11】

CGATCGTTCGAT

10

20

30

40

50

の配列（配列番号 571）を有する。いくつかの実施形態では、修飾型 ITR 対が対称立体化学を有するため、そのような修飾型 ITR は、実質的に対称である。

【0262】

表 5 は、例示的な対称修飾型 ITR 対（すなわち、左修飾型 ITR および対称右修飾型 ITR）を示す。配列の太字（赤）部分は、図 31A～46B にも示されている部分的な ITR 配列（すなわち、A-A'、C-C' および B-B' ループの配列）を識別する。これらの例示的な修飾型 ITR は、RBE である GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号 531）、スペーサーである ACTGAGGC（配列番号 532）、スペーサー補体 GCCTCAGT（配列番号 535）、および RBE'（すなわち、RBE に対する補体）である GAGCGAGCGAGCGCGC（配列番号 536）を含み得る。

【表 5-1】

表 5：例示的な対称修飾型 ITR 対			
左修飾型 ITR (修飾型 5' ITR)		対称右修飾型 ITR (修飾型 3' ITR)	
配列番号 484 (ITR-33 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCCGGGAAA CCCGGGCGTGCGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGG CCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 469 (ITR-18、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CGCACGCCCCGGGTTTCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGC AGCTGCCTGCAGG

10

20

【表 5 - 2】

配列番号 4 8 5 (I T R - 3 4 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGTCGGGCGAC CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGT GGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTC CT	配列番号 9 5 (I T R - 5 1、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC AGCTGCCTGCA GG
配列番号 4 8 6 (I T R - 3 5 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAA AGCCCCGGGCGTCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGT GGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTC CT	配列番号 4 7 0 (I T R - 1 9、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGACGCCCCGGGCTTTGCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC AGCTGCCTGCA GG
配列番号 4 8 7 (I T R - 3 6 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCGTC GGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAG AGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA GGGGTTCCT	配列番号 4 7 1 (I T R - 2 0、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCCGGGCGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGC AGCT GCCTGCAGG
配列番号 4 8 8 (I T R - 3 7 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCAAAGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGG AGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGG TTCCT	配列番号 4 7 2 (I T R - 2 1、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CTTTGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGC AGCTGCCTGCAG G
配列番号 4 8 9 (I T R - 3 8 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAA AGCCCCGGGCGTCGGGCGACTTTGT CGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号 4 7 3 (I T R - 2 2 右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACAAAGTCGCCCCG ACGCCCCGGGCTTTGCCCGGG CGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGC AGCTGCCTGCAGG

10

20

30

40

【表 5 - 3】

配列番号 4 9 0 (I T R - 3 9 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAA AGCCCGGGCGTCGGGCGATTTTCG CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACCTC CATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 4 7 4 (I T R - 2 3、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGAAAATCGCCCGAC GCCCGGGCTTTGCCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGC AGCTGCCTGCAGG
配列番号 4 9 1 (I T R - 4 0 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAA AGCCCGGGCGTCGGGCGTTTTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GC AGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCA TCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 4 7 5 (I T R - 2 4、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGAAACGCCCGACGC CCGGGCTTTGCCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GC AGCTGCCTGCAGG
配列番号 4 9 2 (I T R - 4 1 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAA AGCCCGGGCGTCGGGCTTTGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATC ACTAGGGGTTTCCT	配列番号 4 7 6 (I T R - 2 5 右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCAAAGCCCGACGCC GGGCTTTGCCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGCTGCCTGCAGG
配列番号 4 9 3 (I T R - 4 2 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCGGGAAA CCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 4 7 7 (I T R - 2 6 右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCCGGGTTTCCCGGG CGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGC AGCTGCCTGCAGG
配列番号 4 9 4 (I T R - 4 3 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCGGAAAC CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCG CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACCTC CATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 4 7 8 (I T R - 2 7 右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCCGGTTCGGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGC AGCTGCCTGCAGG

10

20

30

40

【表 5 - 4】

配列番号 4 9 5 (I T R - 4 4 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCGAAACG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCA TCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 4 7 9 (I T R - 2 8 右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCCTTTGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGCTGCCTGCAGG
配列番号 4 9 6 (I T R - 4 5 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGG CGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC ACTAGGGGTTTCCT	配列番号 4 8 0 (I T R - 2 9、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCTTTGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGCTGCCTGCAGG
配列番号 4 9 7 (I T R - 4 6 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGCG TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC TAGGGGTTTCCT	配列番号 4 8 1 (I T R - 3 0、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCTTTGGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG
配列番号 4 9 8 (I T R - 4 7、 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCAAAGCGTC GGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG AGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GGGGTTTCCT	配列番号 4 8 2 (I T R - 3 1、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCTTTGGGCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGCT GCCTGCAGG
配列番号 4 9 9 (I T R - 4 8、 左)	CCTGCAGGCAGCT GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGAAACGTCGG GCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG GGTTTCCT	配列番号 4 8 3 (I T R - 3 2 右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGTTTGGGCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG

10

20

30

40

【 0 2 6 3 】

いくつかの実施形態では、非対称 I T R 対を含む遺伝子編集のための c e D N A ベクターは、本明細書の表 4 A ~ 4 B のいずれか 1 つ以上に示される I T R 配列もしくは I T R 部分配列、あるいは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる 2 0 1 8 年 9 月 7 日に提出された P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 の図 7 A もしくは 7 B に示されているか、または表 2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは 1 0 A ~ 1 0 B に開示されている配列における修飾のうちのいずれかに対応する修飾を有する I T R を含み得る。

50

【0264】

VI. 例示的な遺伝子編集 c e D N A ベクター

上記のように、本開示は、上記のような非対称の I T R 対、対称の I T R 対、または実質的に対称の I T R 対のうちのいずれか 1 つを含む組み換え c e D N A 発現ベクター（例えば、ドナーベクター（プロモーターに操作可能に連結されてもされなくてもよい）および遺伝子編集分子をコードする c e D N A ベクター）に関する。ある特定の実施形態では、本開示は、隣接する I T R 配列および遺伝子編集能力を有する組み換え c e D N A ベクターに関し、I T R 配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、または実質的に対称であり、c e D N A は、隣接する I T R の間に位置する関心対象のヌクレオチド配列（例えば、遺伝子編集配列の発現カセット、またはガイド RNA）をさらに含み、当該核酸分子は、ウイルスカプシドタンパク質コード配列を欠いている。

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、ヌクレアーゼ、1 つ以上の相同性アーム、ガイド RNA、アクチベーター RNA、および制御エレメントのうちの少なくとも 1 つを包含する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、5' 相同性アーム、ドナー配列、および 3' 相同性アームを含む。本開示による好適な c e D N A ベクターは、以下の実施例に従って取得することができる。ある特定の実施形態では、本開示は、遺伝子編集系の少なくとも 2 つの構成成分、例えば、C A S および少なくとも 1 つの g R N A、または 2 つの Z N F 等を含む、組み換え c e D N A 発現ベクターに関する。したがって、いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、遺伝子編集系の複数の構成成分を含む。

【0265】

組み換え c e D N A 発現ベクターは、少なくとも 1 つの I T R が変更されている場合、本明細書に記載されるヌクレオチド配列（複数可）を含む組み換え DNA 手順に都合よく供することができる任意の c e D N A ベクターであってよい。本開示の c e D N A ベクターは、c e D N A ベクターが導入される宿主細胞と適合性がある。ある特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、直鎖状であってもよい。ある特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、染色体外実体として存在し得る。ある特定の実施形態では、本開示の c e D N A ベクターは、宿主細胞のゲノムへのドナー配列の組み込みを可能にするエレメント（複数可）を含み得る。本明細書で使用される場合、「ドナー配列」および「導入遺伝子」および「異種ヌクレオチド配列」は同義である。

【0266】

ここで図 1 A ~ 1 G を参照すると、本開示の c e D N A ベクターを作製するのに有用な 2 つの非限定的プラスミドの機能的構成成分の概略図が示されている。図 1 A、1 B、1 D、1 F は、遺伝子編集のための c e D N A ベクターの構築物または対応する c e D N A プラスミドの配列を示す。c e D N A ベクターは、カプシドを含まず、第 1 の I T R、発現可能な導入遺伝子カセット、および第 2 の I T R をこの順序でコードするプラスミドから取得することができ、第 1 および第 2 の I T R 配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、または実質的に対称である。c e D N A ベクターは、カプシドを含まず、第 1 の I T R、発現可能な導入遺伝子（タンパク質もしくは核酸）またはドナーカセット（例えば、HDR ドナー）、および第 2 の I T R をこの順序でコードするプラスミドから取得することができ、第 1 および第 2 の I T R 配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、または実質的に対称である。いくつかの実施形態では、発現可能な導入遺伝子カセットは、必要に応じて、エンハンサー／プロモーター、1 つ以上の相同性アーム、ドナー配列、転写後調節エレメント（例えば、W P R E、例えば、配列番号 8））、ならびにポリアデニル化および終結シグナル（例えば、B G H ポリ A、例えば、配列番号 7）を含む。

【0267】

図 5 は、実施例に記載される方法を使用して、複数の c e D N A プラスミド構築物から c e D N A の産生を確認するゲルである。c e D N A は、上記の図 4 A に関して、および実施例で論じられるように、ゲル中の特徴的なバンドパターンによって確認される。

【0268】

ここで図8を参照すると、第1および第2のITRを含む、本開示による非限定的な例示的ceDNAベクターが示され、ITR配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、または実質的に対称であり、第1のヌクレオチド配列は、5'相同性アーム、ドナー配列、および3'相同性アームを含み、ドナー配列は、遺伝子編集機能を有する。いくつかの実施形態では、上記のTR（例えば、ITR）は、関心対象の遺伝子編集分子（例えば、ヌクレアーゼ（例えば、配列特異的ヌクレアーゼ）、1つ以上のガイドRNA、Casもしくは他のリボ核タンパク質（RNP）、またはそれらの任意の組み合わせをコードする核酸配列の隣接する末端に含まれる。本開示の核酸構築物の非限定的な例には、配列番号1または配列番号51のヌクレオチド配列を有するAAV2の野生型機能的ITR、およびさらに配列番号2または配列番号52のヌクレオチド配列に対して少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するAAV2の変更されたITRを含む、核酸構築物が含まれる。追加のITRは、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれるWO2017/152149およびPCT出願第PCT/US18/49996号に記載されている。

【0269】

図8を参照すると、ceDNAは、示されるような第1のヌクレオチド配列の上流に第2のヌクレオチド配列を含み得る。本明細書に記載されるceDNAベクターのうちのいずれかのある特定の実施形態では、ceDNAベクターは、ドナー配列を含む第1のヌクレオチド配列の5'または3'のような第2のヌクレオチド配列、および任意に相同性アームをさらに含み得る。いくつかの実施形態では、図8を参照すると、ceDNAベクターは、ガイド配列および／またはアクチベーターRNA配列をコードする1つ以上のヌクレオチドに操作可能に連結された第2のプロモーターを含む第3のヌクレオチド配列を含み得る。ある特定の実施形態では、プロモーターは、Pol III（U6（配列番号18）またはH1（配列番号19））である。

【0270】

別の実施形態では、ceDNAベクターは、ねじれ解放およびより効率的なホモロイ指向修復（HDR）のために、ヌクレアーゼ、および各ceDNA ITRに向けられるか、または相同性ドメイン領域の外側に向けられる1つ以上のガイドRNAをコードする。ヌクレアーゼは、突然変異体ヌクレアーゼである必要はなく、例えば、ドナーHDRテンプレートは、そのような切断によってceDNAから解放されてもよい。

【0271】

いくつかの実施形態では、非限定的な一実施例では、遺伝子編集のためのceDNAベクターは、特定の遺伝子に対する5'および3'相同性アーム、または本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼに特異的な制限部位を5'相同性アームおよび3'相同性アームのいずれかの末端に有する標的統合部位を含み得る。ceDNAベクターが、制限部位（複数可）に特異的な1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで切断されると、結果として得られるカセットは、5'相同性アームドナー配列-3'相同性アームを含み、所望のゲノム遺伝子座とより容易に組み換えられ得る。ある特定の態様では、ceDNAベクター自体が、制限エンドヌクレアーゼをコードすることができ、それによりceDNAベクターが核に送達されると、制限エンドヌクレアーゼが発現され、ベクターを切断することができる。ある特定の態様では、制限エンドヌクレアーゼは、別個に送達される第2のceDNAベクター上でコードされる。ある特定の態様では、制限エンドヌクレアーゼは、非ceDNAベースの送達手段によって核に導入される。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術は、複数の遺伝子編集ceDNAが対象に送達されるのを可能にする。本明細書で論じられるように、一実施形態では、ceDNAは、特定の標的遺伝子または遺伝子座を標的とするドナー配列に隣接する相同性アームを有することができ

、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるゲノムDNAの切断を標的とするための1つ以上のガイドRNA（例えば、sgRNA）も含むことができ、別のcDNAは、実際の遺伝子編集ステップについて本明細書に記載されるように、ヌクレアーゼ酵素およびアクチベーターRNAを含むことができる。

【0272】

A. DNAエンドヌクレアーゼ

本開示のcDNAベクターは、配列特異的ヌクレアーゼなどのヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含み得る。配列特異的または部位特異的ヌクレアーゼを使用して、標的ゲノム遺伝子座に部位特異的二本鎖切断またはニックを導入することができる。このヌクレオチド切断、例えば、DNAまたはRNA切断は、天然の修復機構、例えば、DNA修復機構を刺激し、2つの可能な修復経路のうちの1つにつながる。ドナーテンプレートがない場合、DNAの小さな挿入または欠失につながるエラーが発生しやすい修復経路である非同源末端結合（NHEJ）によって切断が修復される（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Suzuki et al. Nature 540: 144-149 (2016)を参照）。この方法を使用して、標的化遺伝子配列のリーディングフレームを意図的に破壊、削除、または変更することができる。しかしながら、ヌクレアーゼに加えてドナーテンプレートが提供されている場合、細胞機構は相同組み換え（HDR）によって切断を修復し、これはDNA切断の存在下で、またはNHEJを介したドナーテンプレートの挿入によって数桁強化される。

【0273】

この方法を使用して、標的部位のDNA配列に特定の変化を導入することができる。本明細書で使用する「部位特異的ヌクレアーゼ」という用語は、特定のDNA配列を特異的に認識して切断することができる酵素を指す。部位特異的ヌクレアーゼを操作することができる。操作された部位特異的ヌクレアーゼの例には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、ならびにCRISPR/Cas9酵素および操作された誘導体が含まれる。当業者によって理解されるように、遺伝子編集が完了すると、エンドヌクレアーゼは一般にそれ以上必要とされないため、遺伝子編集に必要なエンドヌクレアーゼを一時的に発現させることができる。そのような一時的な発現は、オフターゲット効果と免疫原性の可能性を低下させることができる。一時的な発現は、当該技術分野で知られている任意の手段によって達成することができ、本明細書に記載される調節スイッチを使用して都合よく行うことができる。

【0274】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、cDNAである。配列特異的ヌクレアーゼの非限定的な例には、RNA誘導型ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはメガヌクレアーゼが含まれる。好適なRNA誘導型ヌクレアーゼの非限定的な例には、本明細書に記載されるCRISPR酵素が含まれる。

【0275】

本明細書に記載されるヌクレアーゼは、偏向され得、例えば、配列特異的ヌクレアーゼを設計するように操作され得る（例えば、米国特許第8,021,867号を参照）。ヌクレアーゼは、例えば、Certo, MT et al. Nature Methods (2012) 9: 073-075、米国特許第8,304,222号、同第8,021,867号、同第8,119,381号、同第8,124,369号、同第8,129,134号、同第8,133,697号、同第8,143,015号、同第8,143,016号、同第8,148,098号、または同第8,163,514号（各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている方法を使用して設計することができる。あるいは、市販の技術、例えばPrecision BioSciences' Directed Nuclease Editor（商標）ゲノム編集技術を使用して、部位特異的な切断特性を持つヌクレアーゼを取得することができる。

【0276】

ある特定の実施形態では、例えば、相同性指向修復テンプレートを含むプロモーターレス c e D N A 構築物を使用する場合、ガイド R N A および／もしくは C a s 酵素、または任意の他のヌクレアーゼは、例えば i) ガイド R N A をコードする核酸、i i) または所望のヌクレアーゼ、例えば、C a s 酵素、もしくは他のヌクレアーゼをコードする m R N A を投与することによって、i i i) または C a s 酵素およびガイド R N A を含むリボヌクレオチドタンパク質 (R N P) 複合体を投与するか、または i v) 例えば、ベクター、例えば、ウイルス、プラスミド、または別の c e D N A ベクターによる組み換えヌクレアーゼタンパク質の送達によってトランスで送達される。ある特定の態様では、トランスで送達される分子は、同時投与され得るか、または第 1 の c e D N A ベクターに連続的に投与され得る 1 つ以上の追加の c e D N A ベクターによって送達される。

10

【0277】

したがって、一実施形態では、c e D N A ベクターは、誘導性プロモーターによって転写調節されるエンドヌクレアーゼ (例えば、C a s 9) を含むことができる。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、相同性アームおよび任意にガイド R N A (s g R N A) も含み得るドナー配列を含む c e D N A とともに対象に投与することができる、別個の c e D N A ベクター上にある。別の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載されるオールインワンの c e D N A ベクター上にあり得る。

【0278】

いくつかの実施形態では、c e D N A は、プロモーターの制御下で本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼをコードする。誘導性プロモーターの非限定的な例には、化学的に調節されたプロモーター (例えば、アルコール、テトラサイクリン、ステロイド、金属、および病因関連タンパク質 (例えば、サリチル酸、エチレン、およびベンゾチアジアゾール) の存在または非存在によって転写活性を調節する)、ならびに物理的に調節されるプロモーター (例えば、光の存在または非存在および低温または高温によって転写活性を調節する) が含まれる。誘導性プロモーターの調整により、c e D N A ベクターの遺伝子編集活性をオフまたはオンにすることを可能にする。誘導可能な C a s 9 プロモーターは、例えば C a o J . , e t a l . N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h . 4 4 (1 9) 2 0 1 6、および L i u K I , e t a l . N a t u r e C h e m i c a l B i o l . 1 2 : 9 0 - 9 8 7 (2 0 1 6) (それら全体が本明細書に組み込まれる) においてさらに検討されている。

20

30

【0279】

一実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターは、第 1 のエンドヌクレアーゼ (例えば、C a s 9) の活性を一時的に標的とし、阻害する第 2 のエンドヌクレアーゼをさらに含む。他のエンドヌクレアーゼの活性を標的とし、阻害するエンドヌクレアーゼは、当業者によって決定され得る。別の実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターは、「抗 C R I S P R 遺伝子」 (例えば、L . m o n o c y t o g e n e s A r c 1 1 a) の一時的発現をさらに含む。本明細書で使用される場合、「抗 C R I S P R 遺伝子」は、一般的に使用される S . p y o g e n e C a s 9 を阻害することが示されている遺伝子を指す。別の実施形態では、第 1 のエンドヌクレアーゼ活性または抗 C R I S P R 遺伝子の活性を標的とし、阻害する第 2 のエンドヌクレアーゼは、所望の遺伝子編集が完了した後に投与される第 2 の c e D N A ベクターに含まれる。あるいは、第 2 のエンドヌクレアーゼは、関心対象の遺伝子、例えば、本明細書に記載されるような c e D N A ベクターによって転写的に強化された遺伝子を標的とし、阻害する。

40

【0280】

本明細書に記載されるように、c e D N A ベクターまたはその組成物は、標的遺伝子を活性化する転写アクチベーターをコードするヌクレオチド配列を含み得る。例えば、転写アクチベーターを操作することができる。例えば、操作された転写アクチベーターは、C R I S P R / C a s 9 ベースの系、ジンクフィンガー融合タンパク質、または T A L E 融合タンパク質であり得る。上記のように、C R I S P R / C a s 9 ベースの系を使用して、R N A による標的遺伝子の転写を活性化することができる。C R I S P R / C a s 9 ベ

50

ースの系は、上記のように、第2のポリペプチドドメインが、転写活性化活性またはヒストン修飾活性を有する融合タンパク質を含み得る。例えば、第2のポリペプチドドメインは、VP64またはp300を含み得る。あるいは、転写アクチベーターは、ジンクフィンガー融合タンパク質であり得る。ジンクフィンガーを標的とするDNA結合ドメインは、上記のように、転写活性化活性またはヒストン修飾活性を有するドメインと組み合わせることができる。例えば、ドメインは、VP64またはp300を含み得る。TALE融合タンパク質を使用して、標的遺伝子の転写を活性化することができる。TALE融合タンパク質は、TALE DNA結合ドメインおよび転写活性化活性またはヒストン修飾活性を有するドメインを含み得る。例えば、ドメインは、VP64またはp300を含み得る。

10

【0281】

転写レベルで遺伝子発現を調整する別の方法は、本明細書に記載されるように、修飾型DNAエンドヌクレアーゼを使用して後成的修飾を標的とすることによる。後成的レベルでの遺伝子発現の調整には、CRISPRaまたはCRISPRiを使用して達成される活性化／阻害よりも高い速度で娘細胞に受け継がれるという利点がある。一実施形態では、p300アセチルトランスフェラーゼの触媒ドメインに融合されたdCas9を、本明細書に記載される方法および組成物とともに使用して、ゲノムの所望の領域に後成的修飾（例えば、ヒストン修飾を増加させる）を行うことができる。後成的修飾は、Tet1デメチラーゼ触媒ドメインへのTALENの融合などの修飾型TALEN構築物（Maeder et al. Nature Biotechnology 31(12):1137-42(2013)を参照）またはLSD1ヒストンデメチラーゼに融合されたTALEエフェクター（Mendenhall et al. Nature Biotechnology 31(12):1133-6(2013)）を使用して実現することもできる。

20

【0282】

(i) 修飾型DNAエンドヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ死Cas9、およびその使用ウイルスベクターとは異なり、本明細書に記載されるceDNAベクターは、細胞に送達され得る核酸配列、エフェクター配列、調節配列等のサイズまたは数を制限するカプシドを有しない。したがって、本明細書に記載されるceDNAベクターは、ヌクレアーゼ死DNAエンドヌクレアーゼ、ニックアーゼ、または所望のベクターの産生および／もしくは細胞へのベクターの送達の強化のための修飾された機能（例えば、固有のPAM結合配列）を有する他のDNAエンドヌクレアーゼをコードする核酸を含み得る。そのようなceDNAベクターはまた、プロモーター配列および必要に応じて他の調節配列またはエフェクター配列を含み得る。サイズの制約がないため、当業者は、例えば、機能が修飾された所望のヌクレアーゼの発現、および任意に、少なくとも1つのガイドRNAが同じベクター上の核酸配列からのものであり得、同じまたは異なるプロモーターの制御下にあり得ることを容易に理解するであろう。また本明細書では、例えば、多重遺伝子発現調整（本明細書の「多重遺伝子発現調整」のセクションを参照）のために、同じまたは異なるプロモーターの制御下で、少なくとも2つの異なる修飾エンドヌクレアーゼが同じベクターにコードされ得ることも企図されている。したがって、当業者は、必要に応じて、例えば、1つ以上の誘導性プロモーターによる少なくとも2つの異なる修飾エンドヌクレアーゼの一時的に調節された発現を含む、少なくとも2つの異なるCas9エンドヌクレアーゼ（例えば、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、またはそれ以上）の所望の機能を組み合わせることができる。

30

40

【0283】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物とともに使用するためのDNAエンドヌクレアーゼは、DNAエンドヌクレアーゼが、例えば、ガイドRNA配列によって決定されるゲノムの標的部位でDNA結合活性を保持するが、切断活性を保持しない（例えば、ヌクレアーゼ死Cas9（dCas9））ように修飾され得るか、ま

50

たは非修飾型DNAエンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9ニッカーゼ）と比較して、切断活性が（例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%）低減している。いくつかの実施形態では、修飾型DNAエンドヌクレアーゼは、標的遺伝子の発現を阻害するために本明細書で使用される。例えば、修飾型DNAエンドヌクレアーゼは、DNA結合活性を保持しているため、RNAポリメラーゼの結合を防止する、および／またはRNAポリメラーゼを置き換えることができ、これが次に標的遺伝子の転写を防止する。したがって、所望の遺伝子からの遺伝子産物（例えば、mRNA、タンパク質）の発現が防止される。

【0284】

例えば、「不活性化されたCas9（dCas9）」、「ヌクレアーゼ死Cas9」、または他の方法で不活性化された形態のCas9は、特定の遺伝子への結合を指示するガイドRNAとともに導入され得る。そのような結合は、必要に応じて、標的遺伝子の発現の阻害を低減することができる。いくつかの実施形態では、そのような遺伝子発現阻害を逆転させる能力を有することが望まれる場合がある。これは、例えば、死Cas9タンパク質に異なるガイドRNAを提供して、ゲノム部位へのCas9の結合を弱めることによって達成することができる。そのような逆転は、死Cas9結合の安定性を低下させるように設計された少なくとも2つまたは一連のガイドRNAが連続して投与される反復様式で起こり得る。例えば、連続する各ガイドRNAは、前の反復でガイドRNAによって産生された死Cas9結合の不安定性／安定性の程度から不安定性を増加させる可能性がある。したがって、いくつかの実施形態では、関心対象の遺伝子が機能的タンパク質形態で発現されないように、ゲノム配列を切断することなく、ガイドRNAとともに標的遺伝子配列に向けられたdCas9を使用して「所望の遺伝子を変性化」することができる。代替実施形態では、ガイドRNAは、dCas9結合の安定性が低減されるが、排除されないように設計され得る。すなわち、RNAポリメラーゼの置換は完全ではなく、それにより所望の遺伝子の「遺伝子発現の低下」が可能になる。

【0285】

ある特定の実施形態では、ハイブリッドリコンビナーゼは、標的DNAに組み込み部位を作成するための本開示のceDNAベクターでの使用に好適であり得る。例えば、Cys2-His2ジンクフィンガーまたはTALエフェクターDNA結合ドメインに融合されたセリンリコンビナーゼのリゾルバーゼ／インベルターゼファミリーに由来する活性化触媒ドメインに基づくハイブリッドリコンビナーゼは、哺乳類細胞の標的特異性を改善し、優れた部位特異的組み込み率を実現できる試薬のクラスである。本開示によるceDNAベクターのヌクレオチドによってコードされる好適なハイブリッドリコンビナーゼは、Gaj et al., Enhancing the Specificity of Recombinase-Mediated Genome Engineering through Dimer Interface Redesign, Journal of the American Chemical Society, March 10, 2014（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含む。

【0286】

(ii) ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼおよびTALEN

ZFNおよびTALENベースの制限エンドヌクレアーゼテクノロジーは、ジンクフィンガーおよび転写アクチベーター様エフェクター（TALE）などの特定のDNA配列認識ペプチド（複数可）に連結された非特異的DNA切断酵素を利用する。典型的には、DNA認識部位および切断部位が互いに離れているエンドヌクレアーゼを選択し、その切断部分を分離して、配列認識ペプチドに連結することにより、所望の配列に対して非常に高い特異性を有するエンドヌクレアーゼが得られる。そのような特性を有する例示的な制限酵素は、FokIである。さらに、FokIには、ヌクレアーゼ活性を得るのに二量体化が必要であるという利点があり、これは、各ヌクレアーゼパートナーが固有のDNA配列

10

20

30

40

50

を認識するため、特異性が劇的に高まることを意味する。この効果を強化するために、ヘテロ二量体としてのみ機能することができ、触媒活性を高める F o k I ヌクレアーゼが設計された。ヘテロ二量体機能ヌクレアーゼは、不要なホモ二量体活性の可能性を回避し、したがって二本鎖切断の特異性を高める。

【0287】

Z F N および T A L E N の両方のヌクレアーゼ部分は、同様の特性を有し、これらの操作されたヌクレアーゼの相違は、D N A 認識ペプチドにある。Z F N は、C y s 2 - H i s 2 ジンクフィンガーおよび T A L E 上の T A L E N に依存している。これらの D N A 認識ペプチドドメインの両方が、それらのタンパク質に組み合わせて天然に見られるという特徴を有する。C y s 2 - H i s 2 ジンクフィンガーは、典型的に、3 b p 離れた反復において発生し、転写因子などの様々な核酸相互作用タンパク質の多様な組み合わせで見られる。一方、T A L E は、アミノ酸と認識されたヌクレオチド対との間に 1 対 1 の認識比を持つ反復で見られる。ジンクフィンガーおよび T A L E の両方が反復パターンで発生するため、異なる組み合わせを試して、多様な配列特異性を作成することができる。部位特異的ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼを作製するためのアプローチには、特に、例えばモジュラーアセンブリー（必要な配列をカバーするためにトリプレット配列と相関するジンクフィンガーが連続して接続されている）、O P E N（ペプチドドメイン対トリプレットヌクレオチドの低ストリンジェンシー選択、続いて細菌系におけるペプチドの組み合わせ対最終標的の高ストリンジェンシーの選択）、およびジンクフィンガーライブラリーの細菌ワンハイブリッドスクリーニングが含まれる。本明細書に記載される方法および組成物とともに使用するための Z F N は、例えば S a n g a m o B i o s c i e n c e s（商標）（R i c h m o n d, C A）から商業的に入手することができる。

【0288】

本明細書で交換可能に使用される「転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ」または「T A L E N」という用語は、エンドヌクレアーゼ F o k I などのヌクレアーゼの触媒ドメインの操作された融合タンパク質、およびカスタム D N A 配列に標的化され得る設計された T A L E D N A 結合ドメインを指す。「T A L E N モノマー」は、触媒ヌクレアーゼドメインおよび設計された T A L E D N A 結合ドメインを有する操作された融合タンパク質を指す。2 つの T A L E N モノマーは、T A L E N 標的領域を標的とし、切断するように設計され得る。

【0289】

本明細書で使用される「転写アクチベーター様エフェクター」または「T A L E」という用語は、特定の D N A 配列を認識し、それに結合するタンパク質構造を指す。「T A L E D N A 結合ドメイン」は、各々が D N A の単一塩基対を特異的に認識する、R V D モジュールとしても知られるタンデム 3 3 ~ 3 5 アミノ酸反復のアレイを含む、D N A 結合ドメインを指す。R V D モジュールは、定義された配列を認識する配列を組み立てるために、任意の順序で配置され得る。T A L E D N A 結合ドメインの結合特異性は、R V D アレイとそれに続く 2 0 個のアミノ酸の単一の切断された反復によって決定される。T A L E D N A 結合ドメインは 1 2 ~ 2 7 個の R V D モジュールを有し得、各々が R V D を含み、D N A の単一塩基対を認識する。4 つの可能な D N A ヌクレオチド（A、T、C、および G）の各々を認識する特定の R V D が識別されている。T A L E D N A 結合ドメインはモジュール式であるため、4 つの異なる D N A ヌクレオチドを認識する反復を一括に連結して、任意の特定の D N A 配列を認識することができる。これらの標的化 D N A 結合ドメインを触媒ドメインと組み合わせて、人工転写因子、メチルトランスフェラーゼ、インテグラーゼ、ヌクレアーゼ、およびリコンビナーゼを含む機能的酵素を作成することができる。

【0290】

T A L E N は、ヌクレアーゼ、および T A L E N 標的領域内の標的配列または遺伝子に結合する T A L E D N A 結合ドメインを含み得る。「T A L E N 標的領域」は、2 つの T A L E N の結合領域および結合領域の間に生じるスペーサー領域を含む。2 つの T A L

ENは、TAL EN標的領域内の異なる結合領域に結合し、その後、TAL EN標的領域が切断される。TAL ENの例は、参照によりその全体が組み込まれる国際特許出願第WO 2013/163628号に記載されている。

【0291】

本明細書で交換可能に使用される「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」または「ZFN」という用語は、完全に集成したときにDNAを切断できる少なくとも1つのヌクレアーゼまたはヌクレアーゼの一部に効果的に連結された少なくとも1つのジンクフィンガーDNA結合ドメインを含む、キメラタンパク質分子を指す。本明細書で使用される「ジンクフィンガー」は、DNA配列を認識し、それに結合するタンパク質構造を指す。ジンクフィンガードメインは、ヒトプロテオームで最も一般的なDNA結合モチーフである。単一ジンクフィンガーは、およそ30アミノ酸を含み、ドメインは、典型的に塩基対ごとに単一アミノ酸側鎖の相互作用を介してDNAの3つの連続した塩基対を結合することによって機能する。

10

【0292】

ある特定の実施形態では、本開示によるceDNAベクターは、哺乳類細胞などの細胞に標的化修飾を導入するのに適したジンクフィンガーリコンビナーゼ(ZFR)またはキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。標的化ヌクレアーゼおよび従来のSSR系とは異なり、ZFRの特異性は、モジュラー部位特異的DNA認識および配列依存的触媒作用の協同産物である。多様な標的能力を備えたZFRは、プラグ・アンド・プレイ方式で生成され得る。強化された触媒ドメインを含むZFRは、改善された標的特異性および効率を実証し、低毒性で治療遺伝子のヒトゲノムへの部位特異的送達を可能にする。Creリコンビナーゼ二量体界面の突然変異誘発もまた、組み換え特異性を向上させる。

20

【0293】

実施形態では、本開示によるceDNAベクターは、Porro et al., Promoterless gene targeting without nucleases rescues lethality of a Crigler-Najjar syndrome mouse model, EMBO Molecular Medicine, July 27, 2017 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるものなどのヌクレアーゼ不含HDR系での使用に好適である。そのような実施形態では、インビボ遺伝子標的アプローチは、ヌクレアーゼを使用せずに、ドナー配列の挿入に基づくceDNA適用に適している。いくつかの実施形態では、ドナー配列は、プロモーターレスであってもよい。

30

【0294】

TAL ENおよびZFNは、DNA編集(例えば、ゲノムDNA編集)のためのceDNAベクターの使用について例示されているが、Maeder, et al. "Genome-editing technologies for gene and cell therapy." Molecular Therapy 24.3 (2016): 430-446 and Gammage PA, et al. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-ized. Trends Genet. 2018; 34(2): 101-110に記載されるように、mtZFNおよびmitoTAL EN機能の使用、またはミトコンドリアDNA(mtDNA)の編集のためのceDNAベクターの使用のためのミトコンドリアに適合したCRISPR/Cas9プラットフォームもまた本明細書に包含される。

40

【0295】

(iii) 核酸誘導型エンドヌクレアーゼ

異なるタイプの核酸誘導型エンドヌクレアーゼを本発明の組成物および方法で使用して、ceDNA媒介遺伝子編集を促進することができる。本発明の組成物および方法に適した例示的で非限定的なタイプの核酸誘導型エンドヌクレアーゼは、RNA誘導型エンドヌ

50

クレアーゼ、DNA誘導型エンドヌクレアーゼ、および一塩基エディターを含む。

【0296】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、RNA誘導型エンドヌクレアーゼであり得る。本明細書で使用される場合、「RNA誘導型エンドヌクレアーゼ」という用語は、RNA分子が選択された配列に結合して、選択された標的DNA配列にエンドヌクレアーゼ活性を指示するように、選択された標的DNA配列に相補的な領域を含むRNA分子と複合体を形成するエンドヌクレアーゼを指す。

【0297】

一実施形態では、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、本明細書で論じられるように、CRISPR酵素である。いくつかの実施形態では、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、ニッカーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、標的配列内および／または標的配列の相補体内などの標的配列の位置で一方または両方の鎖の切断を指示する。いくつかの実施形態では、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、標的配列の最初または最後のヌクレオチドから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500、またはそれ以上の塩基対内の一方または両方の鎖の切断を指示する。他の実施形態では、ニッカーゼ活性は、例えば、HDRテンプレートが標的遺伝子のゲノム配列とのHDR相互作用に曝されるように、配列制約を緩めるために、ceDNAベクター自体の1つ以上の配列に向けられる。

【0298】

ある特定の実施形態では、ニッカーゼが、所望の核酸配列上の少なくとも1部位、少なくとも2部位、少なくとも3部位、少なくとも4部位、少なくとも5部位、少なくとも6部位、少なくとも7部位、少なくとも8部位、少なくとも9部位、少なくとも10部位以上（例えば、ceDNAベクターの1つ以上の領域）で切断することが企図される。別の実施形態では、ニッカーゼは、トランスニッキングを介して1つおよび／または2つの部位で切断することが企図される。トランスニッキングは、HDRによるゲノム編集を強化することができ、これは、忠実度が高く、エラーが少ないため、不要なオフターゲット効果を低減する。

【0299】

いくつかの実施形態では、発現構築物またはベクターは、対応する野生型酵素に関して突然変異したRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードし、それにより突然変異型エンドヌクレアーゼは、標的配列を含む標的ポリヌクレオチドの1つの鎖を切断する能力を欠く。

【0300】

いくつかの実施形態では、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列は、真核細胞などの特定の細胞における発現のためにコドン最適化される。真核細胞は、哺乳動物などの特定の生物に由来し得る。哺乳動物の非限定的な例には、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長類が含まれ得る。一般に、コドン最適化とは、未変性配列の少なくとも1つのコドン（例えば、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、またはそれ以上のコドン）を、未変性のアミノ酸配列を維持しながらその宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、関心対象の宿主細胞での発現を強化するために核酸配列を修飾するプロセスを指す。

【0301】

いくつかの実施形態では、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、1つ以上の異種タンパク質ドメイン（例えば、エンドヌクレアーゼに加えて、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のドメイン）を含む融合タンパク質の一部である。RNA誘導型エンドヌクレアーゼ融合タンパク質は、任意の追加のタンパク質配列、および任意の2つのドメイン間のリンカー配列を任意に含み得る。RNA誘導型エンドヌクレアーゼに融合され得るタンパク質ドメインの例には、限定されないが、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、精製タグ、蛍光タンパク質、および以下の活性：メチラーゼ活性、デメ

チラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、RNA切断活性、および核酸結合活性のうちの1つ以上を有するタンパク質ドメインが含まれる。エピトープタグの非限定的な例には、ヒスチジン (His) タグ、V5 タグ、FLAG タグ、インフルエンザ血球凝集素 (HA) タグ、Myc タグ、VSV-G タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、キチン結合タンパク質 (CBP)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、ポリ (NANP)、タンデム親和性精製 (TAP) タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、nus、Softag 1、Sogtag 3、Strept、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、SI、T7、ビオチンカルボキシル担体タンパク質 (BCCP)、カルモジュリン、およびチオレドキシン (Trx) タグが含まれる。レポーター遺伝子の例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、エメラルド、Azami Green、モノマーAzami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質蛍光タンパク質 (CFP)、黄色蛍光タンパク質 (例えば、YFP、EYFP、シトリン、Venus YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、シアン蛍光タンパク質 (例えば、ECFP、セルリアン、CyPet AmCyan1、緑石-シアン)、赤色蛍光タンパク質 (例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred)、橙色蛍光タンパク質 (例えば、mOrange、mKO、Kusabira-Orange、モノマーKusabira-Orange、mTangerine、tdTomato)、および青色蛍光タンパク質 (BFP) を含む自家蛍光タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、DNA分子に結合するか、または他の細胞分子に結合するタンパク質またはタンパク質の断片をコードする遺伝子配列に融合することができ、マルトース結合タンパク質 (MBP)、S タグ、Lex A DNA結合ドメイン (DBD) 融合、GAL4 DNA結合ドメイン融合、および単純ヘルペスウイルス (HSV) BP16タンパク質融合を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、タグ付けされたエンドヌクレアーゼを使用して、標的配列の位置を同定する。

10

20

30

【0302】

本明細書では、少なくとも2つ (例えば、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも15、もしくはそれ以上) の異なるCas酵素が投与されるか、または実質的に同時に細胞と接触している。二本鎖切断誘導Cas酵素、Casニッカーゼ、触媒的に不活性なCas酵素 (例えば、dCas9)、修飾型Cas酵素、切断型Cas9等の任意の組み合わせは、本明細書に記載される方法および組成物と組み合わせて使用することが企図される。

40

【0303】

いくつかの実施形態では、核酸誘導型エンドヌクレアーゼは、DNA誘導型エンドヌクレアーゼである。例えば、Varshney and Burgess Genome Biol. 17:187 (2016) を参照されたい。一実施形態では、DNA修復および/または複製に関与する酵素は、エンドヌクレアーゼに融合されて、DNA誘導型ヌクレアーゼを形成し得る。非限定的な一例は、フラップエンドヌクレアーゼ1 (FEN1) とFokIエンドヌクレアーゼとの融合である (Xu et al., Genome Biol. 17:186 (2016))。別の実施形態では、天然に存在するDNA誘導型ヌクレアーゼを使用することができる。そのような天然に存在するヌクレアーゼの非限定的な例は、アルゴノートタンパク質ファミリーからの原核生物エンドヌクレアーゼである

50

(Kropacheva et al., FEBS Open Bio. 8 (S1) : P 01-074 (2018)。いくつかの実施形態では、核酸誘導型エンドヌクレアーゼは、「一塩基エディター」であり、これは、DNA 標的モジュールおよび単一タイプのヌクレオチド塩基を修飾できる触媒ドメインで構成されるキメラタンパク質である (Rusk, N, Nature Methods 15:763 (2018)、Eid et al., Biochem J. 475 (11) : 1955-64 (2018))。そのような一塩基エディターは、DNA 塩基の編集を行うために標的 DNA に二本鎖切断を生成しないため、挿入および欠失 (例えば、インデル) の生成が制限され、したがって、編集プロセスの忠実度を向上させる。異なる種類の一塩基エディターが知られている。例えば、シチジンデアミナーゼ (シトシンからウラシルへの変換を触媒する酵素) は、APOBEC 10
-dCas9 などのヌクレアーゼに連結され得る。APOBEC は、シチジンデアミナーゼの機能に寄与し、dCas9 によって誘導されて、特定のシチジンをウラシルに脱アミノ化する。結果として生じる U-G ミスマッチは、修復機序を介して解決され、U-A 塩基対を形成し、C から T への点突然変異に翻訳される (Komor et al., Nature 533:420-424 (2016)、Shimatani et al., Nat. Biotechnol. 35:441-443 (2017))。アデニンデアミナーゼベースの DNA 一塩基エディターが設計された。それらは、アデノシンを脱アミノ化してイノシンを形成し、これはシチジンと塩基対合し、グアニンに訂正され、それにより A-T 対が G-C 対に変換され得る。そのようなエディターの例には、TadA、ABE5. 3、ABE7. 8、ABE7. 9、および ABE7. 10 が含まれる (Gaudelli et al., Nature 551:464-471 (2017))。 20

【0304】

(iv) CRISPR/CAS 系

当該技術分野で知られているように、CRISPR-CAS9 系は、生物の遺伝的配列を変更することができるタンパク質およびリボ核酸 (「RNA」) の組み合わせを含む、核酸誘導型ヌクレアーゼベースの系の特定のセットである。CRISPR-CAS9 系は、微生物、真菌、植物、および動物などの多くの生物のゲノムに含まれる特定のデオキシリボ核酸 (「DNA」) を修飾する強力なツールとして発達し続ける。例えば、ヒト疾患のマウスモデルをすばやく発達させて、個々の遺伝子をより速く研究し、細胞内の複数の遺伝子を一度に容易に変えてそれらの相互作用を研究することができる。当業者は、タイプ I、タイプ II、およびタイプ III などのいくつかの既知の CRISPR 系から選択することができる。タイプ II CRISPR-CAS 系は、3 つの構成成分：(1) 「ガイド配列」または「標的因子-RNA」と呼ばれる crDNA 分子、(2) 「tracrRNA」または「アクチベーター-RNA」、および (3) Cas9 と呼ばれるタンパク質を含む、周知の機序を有する。 30

【0305】

DNA 分子を変更するために、系内で次のようないくつかの相互作用が発生する：(1) ガイド配列が、特定の塩基対合によって関心対象の特定の DNA 配列 (「標的 DNA」) に結合する、(2) ガイド配列が、別の配列で特定の塩基対合によってアクチベーター RNA に結合する、(3) アクチベーター RNA が、Cas タンパク質 (例えば、Cas 9 タンパク質) と相互作用し、次いでヌクレアーゼとして機能して、特定の部位で標的 DNA を切断する。本開示による ceDNA ベクターに従って使用するための適切な系は、Van Nierop, et al. Stimulation of homology-directed gene targeting at an endogenous human locus by a nicking endonuclease, Nucleic Acid Research, August 2009 および Ran et al., Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity においてさらに記載されている。 40

【0306】

本開示による c e D N A ベクターは、ガイド配列、t r a c r R N A、または C a s (例えば、C a s 9)などのこれらの系の1つ以上の構成成分をコードするヌクレオチドを含むように設計することができる。ある特定の実施形態では、単一プロモーターが、ガイド配列および t r a c r R N A の発現を駆動し、別個のプロモーターが C a s (例えば、C a s 9)の発現を駆動する。当業者は、ある特定の C a s ヌクレアーゼが、標的核酸配列に隣接するプロトSpacer隣接モチーフ (P A M) の存在を必要とすることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、P A M は、標的配列の 3' 末端の 1、2、3、または 4 ヌクレオチドに隣接するかまたはその中にあり得る。P A M の長さおよび配列は、特定の C a s タンパク質に依存し得る。例示的な P A M 配列には、N G G、N G G N G、N G、N A A A A N、N N A A A A A W、N N N N A C A、G N N N C N N A、T T N、および N N N N G A T T (N は任意のヌクレオチドとして定義され、W は A または T のいずれかとして定義される) が含まれる。いくつかの実施形態では、P A M 配列は、例えば、R N A を編集するとき、ガイド R N A 上にあり得る。

【0307】

いくつかの実施形態では、C a s および C a s 9 を含む R N A 誘導型ヌクレアーゼは、C R I S P R - C a s 9 系を使用してゲノム操作のための1つ以上の構成成分を提供するように設計された c e D N A ベクターでの使用に適している。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第 2014/0170753 号を参照されたい。C R I S P R - C a s 9 は、哺乳類細胞における非相同末端結合 (N H E J) または相同性指向修復 (H D R) を介した C a s 9 媒介ゲノム編集、および下流機能研究のための修飾型細胞株の生成のためのツールのセットを提供する。オフターゲットの切断を最小限に抑えるために、C R I S P R - C a s 9 系には、対合したガイド R N A を有する C a s 9 ニッカーゼ突然変異体を使用するダブルニッキング戦略が含まれる場合がある。この系は、当該技術分野で知られており、例えば、R a n e t a l . , G e n o m e e n g i n e e r i n g u s i n g t h e C R I S P R - C a s 9 s y s t e m , N a t u r e P r o t o c o l s , 24 O c t o b e r 2013 および Z h a n g , e t a l . , E f f i c i e n t p r e c i s e k n o c k i n w i t h a d o u b l e c u t H D R d o n o r a f t e r C R I S P R / C a s 9 - m e d i a t e d d o u b l e - s t r a n d e d D N A c l e a v a g e , G e n o m e B i o l o g y , 2017 に記載されている (両方の参考文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる)。

【0308】

ある特定の実施形態では、c e D N A 系は、ヌクレアーゼと、c e D N A 配列に向けられるガイド R N A とを含む。例えば、n C A S 9 D 10 A などのニッキング C A S を使用して、遺伝子編集の効率を高めることができる。ガイド R N A は、c e D N A の n C A S ニッキングを指示し、それによってより効率的な遺伝子修復および/または発現のために、c e D N A のねじれ拘束を解放する。ニッキングヌクレアーゼを使用すると、配列および構造の完全性を維持しながらねじれ拘束が緩和され、ニッキングされた D N A が核内に残ることができる。ガイド R N A は、同じ D N A 鎖または相補鎖に向けることができる。ガイド R N A は、例えば、I T R S、または配列進行プロモーター、または相同性ドメイン等に向けられ得る。

【0309】

一実施形態では、R N A 誘導型エンドヌクレアーゼは、C a s タンパク質などの C R I S P R 酵素である。C a s タンパク質の非限定的な例には、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 5 e (C a s D)、C a s 6、C a s 6 e、C a s 6 f、C a s 7、C a s 8、C a s 8 a 1、C a s 8 a 2、C a s 8 b、C a s 8 c、C a s 9 (C s n 1 および C s x 1 2 としても知られる)、C a s 10、C a s 10 d、C a s 13、C a s 13 a、C a s 13 c、C a s F、C a s H、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1、C s e 2、C s e 3、C s e 4、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m

r 3、Cmr 4、Cmr 5、Cmr 6、Csb 1、Csb 2、Csb 3、Csx 17、Csx 14、Csx 10、Csx 11、Csx 16、CsaX、Csz 1、Csx 3、Csx 1、Csx 15、Csf 1、Csf 2、Csf 3、Csf 4、Cul 966、Cpf 1、C2c 1、C2c 3、それらの相同体、またはそれらの修正版が含まれる。一実施形態では、Cas タンパク質は、Cas 9 である。別の実施形態では、Cas タンパク質は、ヌクレアーゼ死 Cas 9 (dCas 9) または Cas 9 ニッカーゼである。一実施形態では、Cas タンパク質は、ニッキング Cas 酵素 (nCAs) である。

【0310】

典型的には、RNA 誘導型エンドヌクレアーゼは、Cas 9 によって開始される二本鎖切断などの DNA 切断活性を含む。いくつかの実施形態では、RNA 誘導型エンドヌクレアーゼは、Cs 9、例えば、*S. pyogenes* または *S. pneumoniae* 由来の Cas 9 である。Cas 9 の他の非限定的な細菌源には、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus pasteurianus*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus sp.*、*Nocardia* *dassonvillei*、*Streptomyces pristinaespiralis*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptosporangium roseum*、*Streptosporangium roseum*、*Staphylococcus aureus*、*Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Bacillus pseudomycooides*、*Bacillus selenitireducens*、*Exiguobacterium sibiricum*、*Francisella novicida*、*Wolinella succinogenes*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus salivarius*、*Listeria innocua*、*Lactobacillus gasserii*、*Microscilla marina*、*Burkholderiales bacterium*、*Polaromonas naphthalenivorans*、*Polaromonas sp.*、*Crocospaera watsonii*、*Cyanothecace sp.*、*Microcystis aeruginosa*、*Synechococcus sp.*、*Acetohalobium arabaticum*、*Ammonifex degensii*、*Caldicelulosiruptor beccarii*、*Candidatus Desulforudis*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Finegoldia magna*、*Fibrobacter succinogene*、*Natranaerobius thermophilus*、*Pelotomaculum thermopropionicum*、*Acidithiobacillus caldus*、*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Allochromatium vinosum*、*Marinobacter sp.*、*Nitrosococcus halophilus*、*Nitrosococcus watsoni*、*Pseudoalteromonas haloplanktis*、*Ktedonobacter racemifer*、*Methanohalobium evestigatum*、*Anabaena variabilis*、*Nodularia spumigena*、*Nostoc sp.*、*Arthrospira maxima*、*Arthrospira platensis*、*Arthrospira sp.*、*Lyngbya sp.*、*Microcoleus chthonoplastes*、*Oscillatoria sp.*、*Petroglossa mobilis*、*Thermosiphon africanus*、*Sutterella wadsworthensis*、*Gamma proteobacterium*、*Neisseria cinerea*、*Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejuni*、*Campylobacter lari*、*Parvibaculum lavamentivorans*、*Cornebacterium diphtheria*、*Pasteurella*

a multocida, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardioopsis dassonvillei*, または *Acarychloris marina* が含まれる。

【0311】

一実施形態では、Cas9 ニッカーゼは、nCasp9 D10A を含む。例えば、*S. pyogenes* からの Cas9 の RuvC I 触媒ドメインにおけるアスパラギン酸からアラニンへの置換 (D10A) は、Cas9 を両方の鎖を切断するヌクレアーゼからニッカーゼ (一本鎖を切断する) に変換する。Cas9 をニッカーゼにする突然変異の他の例には、H840A、N854A、および N863A が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、Cas9 ニッカーゼは、DNA 標的のセンス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ標的とするガイド配列 (複数可)、例えば 2 つのガイド配列と組み合わせて使用することができる。この組み合わせにより、両方の鎖をニックングし、非相同末端結合 (NHEJ) 修復を誘導するために使用することができる。

10

【0312】

いくつかの実施形態では、RNA 誘導型エンドヌクレアーゼは、Cas13 である。触媒的に不活性な Cas13 (dCas13) を使用して、例えば、Cox, Det al. RNA editing with CRISPR-Cas13 Science (2017) DOI: 10.1126/science.aag0180 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されているように、mRNA 配列を編集することができる。

20

【0313】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼをコードする本明細書に記載されるような cDNA ベクターは、Cas9 (例えば、配列番号 829)、または配列番号 829 (Cas9) に対して少なくとも 60%、より好ましくは少なくとも 65%、より好ましくは少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは少なくとも 95% の配列同一性を有するか、もしくは配列番号 829 からなるヌクレアーゼのアミノ酸もしくは機能的断片である。ある特定の実施形態では、Cas9 は、触媒ドメインに 1 つ以上の突然変異を含み、Cas9 を、米国特許公開第 2017/0191078-A9 号 (参照によりその全体が組み込まれる) に記載されているものなどの単一 DNA 鎖を切断するニッカーゼにする。

30

【0314】

いくつかの実施形態では、本開示の cDNA ベクターは、遺伝子標的およびゲノム編集機能を有する RNA プログラムされた Cas9 に基づく系および方法での使用に適している。例えば、本開示の cDNA ベクターは、遺伝子標的および遺伝子編集のためのクラスター化された規則的に間隔を空けられた短いパリンδροーム反復または CRISPR 関連 (Cas) 系での使用に適している。CRISPR Cas9 系は、当該技術分野において知られており、例えば、2013 年 3 月に提出された米国特許出願第 13/842,859 号、および米国特許第 8,697,359 号、同第 8,771,945 号、同第 8,795,965 号、同第 8,865,406 号、同第 8,871,445 号に記載されている (すべては参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)。

40

【0315】

本明細書ではまた、Cas9、Cas9 ニッカーゼ、または不活性化 Cas9 (dCas9、もしくはヌクレアーゼ死 Cas9 もしくは「触媒的に不活性」とも呼ばれる) も、FokI との融合タンパク質として調製され、それにより遺伝子編集または遺伝子発現調節が、FokI ヘテロ二量体の形成時に発生する。

【0316】

さらに、dCas9 を使用して、標的遺伝子配列の上流の調節配列のレベルで、所望の遺伝子の発現を活性化 (CRISPRa) または阻害 (CRISPRi) することができる。CRISPRa および CRISPRi は、例えば、dCas9 をエフェクター領域 (

50

例えば、dCas9／エフェクター融合）と融合し、dCas9／エフェクター融合タンパク質が所望の遺伝子または標的遺伝子（例えば、プロモーター領域内）の上流の配列に結合するように指示するガイドRNAを供給することによって実施され得る。dCas9にはヌクレアーゼ活性がないため、プロモーター領域の標的部位に結合したままであり、dCas9／エフェクター融合タンパク質のエフェクター部分は、転写アクチベーターまたはリプレッサーをプロモーター部位に動員することができる。したがって、必要に応じて、標的遺伝子の遺伝子発現を活性化または低減することができる。文献における以前の研究は、dCas9と共発現した複数のガイドRNAの使用は、所望の遺伝子の発現を増加させる可能性があることを示している（例えば、Maeder et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes Nat Methods 10(10):977-979(2013)を参照）。いくつかの実施形態では、所望の遺伝子の誘導性抑制を可能にすることが望ましい。これは、例えば、転写開始部位の上流のプロモーター領域においてガイドRNA結合部位を使用することによって達成され得る（例えば、Gao et al. Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible dCas9 regulators. Nature Methods(2016)を参照）。いくつかの実施形態では、DNAエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼ死バージョン（例えば、dCas9）を使用して、例えば、dCas9／エフェクター融合タンパク質のエフェクタードメイン（例えば、小分子または少なくとも1つのガイドRNA）と相互作用する薬剤の導入によって、所望の遺伝子の発現を誘導的に活性化または増加させることができる。他の実施形態では、遺伝子発現を外因性シグナルを使用して調整できるように、dCas9を化学的または光誘導性ドメインに融合することも本明細書で企図される。一実施形態では、標的遺伝子の発現の阻害は、KRABリプレッサードメインに融合されたdCas9を使用して実施され、これは、哺乳類系における遺伝子発現の阻害の改善に有益であり得、オフターゲット効果がほとんどない。あるいは、遺伝子の転写ベースの活性化は、RNAポリメラーゼのオメガサブユニットに融合されたdCas9、または転写アクチベーターVP64もしくはp65を使用して実施され得る。

【0317】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物、例えば、ceDNAベクターは、CRISPRi（CRISPR干渉）および／もしくはCRISPRia（CRISPR活性化）系を含み、かつ／またはそれを用いて宿主細胞に送達することができる。CRISPRiおよびCRISPRa系は、二本鎖切断（DSB）を生成することができない不活性化されたRNA誘導型エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9）で構成されている。これにより、エンドヌクレアーゼは、ガイドRNAと組み合わせ、ゲノム内の標的配列に特異的に結合し、RNAにより指向された可逆的転写制御を提供することができる。一実施形態では、ceDNAベクターは、ヌクレアーゼおよび／またはガイドRNAをコードする核酸を含むが、相同性指向修復テンプレートまたは対応する相同性アームを含まない。

【0318】

CRISPRiのいくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、KRABエフェクタードメインを含み得る。KRABエフェクタードメインの有無にかかわらず、不活性化されたヌクレアーゼのゲノム配列への結合は、例えば、転写の開始または進行を阻止する、および／または転写機構または転写因子の結合を干渉する可能性がある。

【0319】

CRISPRaでは、不活性化されたエンドヌクレアーゼを1つ以上の転写活性化ドメインと融合させることができ、それによってエンドヌクレアーゼにより標的とされる部位またはその近くの転写を増加させる。いくつかの実施形態では、CRISPRaは、さらなる転写活性化ドメインを動員するgRNAをさらに含むことができる。CRISPRiおよびCRISPRaのsgRNA設計は、当該技術分野において知られている（例えば

、Horlbeck et al. *eLife*. 5, e19760 (2016)、Gilbert et al., *Cell*. 159, 647–661 (2014)、および Zalatan et al., *Cell*. 160, 339–350 (2015) を参照。各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。CRISPRi および CRISPRa 互換性の sgRNA は、所与の標的に対して商業的に入手することもできる (例えば、Dharmacon; Lafayette, CO を参照)。CRISPRi および CRISPRa の詳細は、例えば Qi et al., *Cell*. 152, 1173–1183 (2013)、Gilbert et al., *Cell*. 154, 442–451 (2013)、Cheng et al., *Cell Res.* 23, 1163–1171 (2013)、Tanenbaum et al. *Cell*. 159, 635–646 (2014)、Koner mann et al., *Nature*. 517, 583–588 (2015)、Chavez et al., *Nat. Methods*. 12, 326–328 (2015)、Liu et al., *Science*. 355 (2017)、および Goyal et al., *Nucleic Acids Res.* (2016) において見ることができ、各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0320】

したがって、本明細書に記載されるいくつかの実施形態では、非活性化エンドヌクレアーゼ、例えば RNA 誘導型エンドヌクレアーゼおよび／または Cas9 を含む ceDNA ベクターであり、非活性化エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ活性を欠くが、例えば、1 つ以上のガイド RNA および／または sgRNA と組み合わせ、部位特異的な方法で DNA に結合する能力を保持する。いくつかの実施形態では、ベクターは、1 つ以上の tracrRNA、ガイド RNA、または sgRNA をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、非活性化エンドヌクレアーゼは、転写活性化ドメインをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、本開示の ceDNA ベクターは、すべて当該技術分野において周知である、CRISPRi もしくは CRISPRa dCAS 系、nCAs、または Cas13 系などの非活性化ヌクレアーゼ系にも有用である。

【0321】

本明細書に記載されるベクターを dCas9 と組み合わせ使用して、生きている細胞のゲノム遺伝子座を可視化することができることも本明細書で企図されている (例えば、Ma et al. *Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells* PNAS 112 (10): 3002–3007 (2015) を参照)。CRISPR を介したゲノムおよびその核内の組織の可視化は、4-Dヌクレームとも呼ばれる。一実施形態では、dCas9 は、蛍光タグを含むように修飾される。複数の遺伝子座は、例えば、各々が異なる蛍光標識に融合されたオルソログを使用して、異なる色で標識され得る。この手法を拡張して、例えば、Alu 配列に結合するガイド RNA を使用してガイド RNA で指定された反復の場所のマッピングを支援することによって、ゲノム構造を研究することができる (例えば、McCauffrey et al. *Nucleic Acids Res* 44 (2): e11 (2016) を参照)。したがって、いくつかの実施形態では、臨床的に重要な遺伝子座のマッピングは、例えば、とりわけ、ハンチントン病の識別および／または診断のために、本明細書で企図される。遺伝子編集系をコードする ceDNA ベクター (複数可) を用いてゲノム可視化または遺伝的スクリーニングを実施する方法は、当該技術分野で知られており、かつ／または例えば、Chen et al. *Cell* 155: 1479–1491 (2013)、Singh et al. *Nat Commun* 7: 1–8 (2016)、Korkmaz et al. *Nat Biotechnol* 34: 1–10 (2016)、Hart et al. *Cell* 163: 1515–1526 (2015) (各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0322】

いくつかの実施形態では、例えば、特定の疾患に関連する一塩基多型を修飾するなど、

ゲノム内の単一塩基を編集することが望ましい場合がある（例えば、Komor, A C et al. Nature 533: 420-424 (2016)、Nishida, K et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Science (2016)を参照）。単一ヌクレオチド塩基編集は、標的遺伝子座を切断しない、触媒的に不活性なエンドヌクレアーゼ（例えば、ヌクレアーゼ死 Cas 9）につながれた塩基変換酵素を利用する。塩基編集酵素による塩基変換後、系は、反対側の編集されていない鎖にニックを作り、それは細胞自身の DNA 修復機序によって修復される。これにより、元のヌクレオチドの置換をもたらし、これが「ミスマッチヌクレオチド」になり、したがって単一ヌクレオチド塩基対の変換が完了する。内因性酵素、例えば、シチジンデアミナーゼは、G/Cヌクレオチド対から A/Tヌクレオチド対への変換を行うために利用可能であるが、A/Tヌクレオチド対から G/Cヌクレオチド対への逆変換を触媒するための内因性酵素はない。通常、RNAにのみ作用してアデニンをイノシンに変換するアデニンデアミナーゼ（例えば、TadA）は、細菌系で進化的に選択され、DNAに作用してアデノシンをイノシンに変換するアデニンデアミナーゼ突然変異体を同定した（例えば、Gaudelli et al Nature (2017), in press doi:10.1038/nature 24644、その内容は参照によりその全体が組み込まれる）。

10

【0323】

いくつかの実施形態では、ニックアーゼ機能を有する dCas 9 または修飾型 Cas 9 は、塩基編集機能を有する酵素（例えば、シチジンデアミナーゼ APOBEC1 または突然変異体 TadA）に融合され得る。ゲノム DNA からウラシルを除去する内因性の塩基除去修復系の阻害剤を含めることにより、塩基編集効率をさらに向上させることができる。Gaudelli et al. (2017) programmable base editing of A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage, Nature Published online 25 October 2017（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

20

【0324】

本明細書では、所望のエンドヌクレアーゼが、ユビキチン鎖またはポリユビキチン鎖の付加によって修飾されることも企図される。いくつかの実施形態では、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質 (UBL) であり得る。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例には、小さなユビキチン様修飾因子 (SUMO)、ユビキチン交差反応性タンパク質 (URP、インターフェロン刺激遺伝子 15 (ISG-15) としても知られる)、ユビキチン関連修飾因子-1 (URM1)、神経前駆細胞で発現した発達的に下方調節されたタンパク質-8 (NEDD8、S. cerevisiae では Rub1 と呼ばれる)、ヒト白血球抗原 F 関連 (FAT10)、オートファジー-8 (ATG8)、および-12 (ATG12)、Fau ユビキチン様タンパク質 (FUB1)、膜アンカー型 UBL (MUB)、ユビキチン折りたたみ修飾因子 1 (UFM1)、およびユビキチン様タンパク質-5 (UBL5) が含まれる。

30

40

【0325】

CeDNA ベクターまたはその組成物は、例えば、Fu et al. Nat Biotechnol 32: 279-284 (2013)、Ran et al. Cell 154: 1380-1389 (2013)、Mali et al. Nat Biotechnol 31: 833-838 (2013)、Guillinger et al. Nat Biotechnol 32: 577-582 (2014)、Slaymaker et al. Science 351: 84-88 (2015)、Klenstieve et al. Nature 523: 481-485 (2015)、Bolukbasi et al. Nat Methods 12: 1-9 (2015)、Gilbert et al. Cell 154: 442-451 (2012)、Anders et

50

al. Mol Cell 61:895-902 (2016)、Wright et al. Proc Natl Acad Sci USA 112:2984-2989 (2015)、Truong et al. Nucleic Acids Res 43:6450-6458 (2015) (各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)に記載される修飾型DNAエンドヌクレアーゼをコードすることができる。

【0326】

(v) MegaTALS

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼは、megaTALであり得る。MegaTALは、転写アクチベーター様(TAL)エフェクタードメインおよびメガヌクレアーゼドメインを含む操作された融合タンパク質である。MegaTALは、TALの標的特異性操作の容易さを保持しながら、オフターゲット効果および全体的な酵素サイズを低減し、活性を増加させる。MegaTALの構築および使用については、例えばBoissel et al. 2014 Nucleic Acids Research 42(4):2591-601およびBoissel 2015 Methods Mol Biol 1239:171-196 (各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)により詳細に記載される。megaTALを介した遺伝子ノックアウトおよび遺伝子編集のプロトコルは、当該技術分野において知られており、例えば、Sather et al. Science Translational Medicine 2015 7(307):ral56 and Boissel et al. 2014 Nucleic Acids Research 42(4):2591-601 (各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照されたい。MegaTALは、本明細書に記載されている方法および組成物のいずれかの代替エンドヌクレアーゼとして使用され得る。

【0327】

(vi) 遺伝子発現および複合系の多重調整

必要に応じて、複数のガイドRNAを同じceDNAベクターから発現させることができるため、本明細書に記載されるceDNAベクターのサイズ制限がないことは、多重化編集、CRISPRa、またはCRISPRiで特に有用である。CRISPRは堅牢な系であり、複数のガイドRNAを付加しても、遺伝子編集、CRISPRa、CRISPRi、またはCRISPRを介した核酸の標識の効率は実質的に変わらない。他に記載されているように、複数のガイドRNAは、単一のプロモーター(例えば、ポリシストロニック転写産物)の制御下、または複数のプロモーター(例えば、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6等、最大1:1の比率の限界のガイドRNA:プロモーター配列)の制御下にあり得る。

【0328】

多重CRISPR/Cas9ベースの系は、sgRNA設計の簡潔性および低コストを利用しており、CRISPR/Cas9技術を使用したハイスループットゲノム研究の進歩を活用するのに役立ち得る。例えば、本明細書に記載されているceDNAベクターは、困難な細胞株でCas9および多数の単一ガイドRNA(sgRNA)を発現させるのに役立つ。多重CRISPR/Cas9ベースの系は、上記のCRISPR/Cas9ベースの系と同じ方法で使用することができる。多重CRISPR/Cas9は、Cong, L et al. Science 819(2013)、Wang et al. Cell 153:910-918(2013)、Ma et al. Nat Biotechnol 34:528-530(2016) (各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように実施され得る。

【0329】

記載されている転写活性化およびヌクレアーゼ機能に加えて、この系は、ゲノムアーキテクチャーの照合および内因性遺伝子調節の経路を含む、様々な目的で後成的な修飾を制御する他の新規Cas9ベースのエフェクターを表現するのに役立つ。内因性遺伝子調節は、複数の酵素間の微妙なバランスであるため、異なる機能を持つCas9系を多重化す

ることで、異なる調節シグナル間の複雑な相互作用を調べることができる。本明細書に記載されるベクターは、アプタマー修飾型 gRNA および直交 Cas9 と互換性があり、単一の gRNA セットを使用して独立した遺伝子操作を行うことができる。

【0330】

多重 CRISPR/Cas9 ベースの系を使用して、細胞内の少なくとも 1 つの内因性遺伝子を活性化することができる。この方法は、細胞を修飾型レンチウイルスベクターと接触させることを含む。内因性遺伝子は、一時的に活性化されるか、または安定して活性化され得る。内因性遺伝子は、一時的に抑制されるか、安定して抑制され得る。融合タンパク質は、sgRNA と同様のレベルで発現され得る。融合タンパク質は、sgRNA と比較して、異なるレベルで発現され得る。細胞は、初代ヒト細胞であり得る。

10

【0331】

多重 CRISPR/Cas9 ベースの系は、細胞内の多重遺伝子編集の方法で使用され得る。この方法は、細胞を ceDNA ベクターと接触させることを含む。多重遺伝子編集は、突然変異体遺伝子の訂正または導入遺伝子の挿入を含み得る。突然変異体遺伝子の訂正には、突然変異体遺伝子の欠失、再配置、または置換が含まれ得る。突然変異体遺伝子の訂正には、ヌクレアーゼを介した非相同末端結合または相同性指向修復が含まれ得る。多重遺伝子編集は、少なくとも 1 つの遺伝子を削除または訂正することを含むことができ、遺伝子は、内因性正常遺伝子または突然変異体遺伝子である。

【0332】

多重遺伝子編集は、少なくとも 2 つの遺伝子を削除または訂正することを含み得る。例えば、少なくとも 2 遺伝子、少なくとも 3 遺伝子、少なくとも 4 遺伝子、少なくとも 5 遺伝子、少なくとも 6 遺伝子、少なくとも 7 遺伝子、少なくとも 8 遺伝子、少なくとも 9 遺伝子、または少なくとも 10 遺伝子は、削除または訂正され得る。

20

【0333】

多重 CRISPR/Cas9 ベースの系は、細胞における遺伝子発現の多重調整の方法で使用され得る。この方法は、細胞を修飾型レンチウイルスベクターと接触させることを含む。この方法は、少なくとも 1 つの遺伝子の遺伝子発現レベルを調整することを含み得る。少なくとも 1 つの標的遺伝子の遺伝子発現レベルは、少なくとも 1 つの標的遺伝子の正常な遺伝子発現レベルと比較して、少なくとも 1 つの標的遺伝子の遺伝子発現レベルが増加または減少すると調整される。遺伝子発現レベルは、RNA またはタンパク質レベルであり得る。

30

【0334】

いくつかの実施形態では、複数の遺伝子の発現が、複数の直交 Cas を複数のガイド RNA とともに導入することによって調整されることもまた、本明細書において企図される（例えば、遺伝子発現または「直交 dCas9 系」の多重調整）。例えば、異なる Cas タンパク質または Cas9 タンパク質。当業者は、複数のガイド RNA が、オフターゲット効果または RNA の互いの相互作用を最小化するように設計されるべきであることを理解するであろう。直交 dCas9 系は、ある特定の所望の遺伝子の同時活性化と他の所望の遺伝子の抑制を可能にする。例えば、*S. pyogenes*、*N. meningitidis*、*S. thermophilus*、および *T. denticola* などの細菌種の組み合わせに由来する複数の直交 Cas タンパク質（例えば、Cas9 タンパク質）は、例えば、Esvelt, K et al. *Nature Methods* 10 (11) : 1116–1121 (2013)（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように組み合わせで使用され得る。いくつかの実施形態では、複数のガイド RNA をコードする複数の核酸配列が同じベクター上に存在する。さらに、各 dCas9 は、別個の誘導性系と対合することができ、これにより、所望の遺伝子の活性化および／または抑制の独立した制御が可能になり得る。さらに、この誘導性直交 dCas9 系は、一時的に遺伝子発現の調節を可能にすることもできる（例えば、Gao et al. *Nature Methods* Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible d

40

50

Cas9 regulators (2016) を参照)。

【0335】

B. 相同性指向修復テンプレート

いくつかの実施形態では、相同性指向組み換えテンプレートまたは「修復」テンプレートはまた、例えば、ドナー配列および／またはドナー配列の一部として、ceDNAベクター中に提供される。本明細書では、相同性指向修復テンプレートを使用して、遺伝子配列を修復するか、または例えば治療用タンパク質を製造するために新しい配列を挿入できることが企図される。いくつかの実施形態では、修復テンプレートは、本明細書に記載されるヌクレアーゼ、例えば、CRISPR複合体の一部としてのCRISPR酵素、またはZFNもしくはTALEなどのRNA誘導型エンドヌクレアーゼによってニッキングまたは切断された標的配列内またはその近くの相同組み換えにおけるテンプレートとして機能するように設計される。テンプレートポリヌクレオチドは、約10、15、20、25、50、75、100、150、200、500、1000、またはそれ以上のヌクレオチド長など、任意の好適な長さであり得る。いくつかの実施形態では、テンプレートポリヌクレオチドは、宿主細胞ゲノム内の標的配列を含むポリヌクレオチドの一部に相補的である。最適に整列された場合、テンプレートポリヌクレオチドは、標的配列の1つ以上のヌクレオチド（例えば、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上のヌクレオチド）と重複し得る。いくつかの実施形態では、テンプレート配列および標的配列を含むポリヌクレオチドが最適に整列される場合、テンプレートポリヌクレオチドの最も近いヌクレオチドは、標的配列から約1、5、10、15、20、25、50、75、100、200、300、400、500、1000、5000、10000、またはそれ以上のヌクレオチド以内にある。一実施形態では、修復テンプレートの相同性アームは、指向性である（すなわち、同一ではなく、したがって特定の配向で配列に結合する）。いくつかの実施形態では、細胞内の単一遺伝子、または細胞内の2つの異なる遺伝子を修復するために、2つ以上のHDRテンプレートが提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのテンプレートの複数のコピーが細胞に提供される。

【0336】

いくつかの実施形態では、テンプレート配列は、内因性標的遺伝子配列の一部と実質的に同一であり得るが、少なくとも1つのヌクレオチド変化を含む。いくつかの実施形態では、切断された標的核酸分子の修復は、例えば、(i) 標的遺伝子から発現されるRNAにおける1つ以上のヌクレオチド変化、(ii) 標的遺伝子の発現レベルの変更、(iii) 遺伝子ノックダウン、(iv) 遺伝子ノックアウト、(v) 遺伝子機能の回復、または(vi) 遺伝子ノックアウトおよび遺伝子の同時挿入をもたらし得る。当業者によって容易に理解されるように、テンプレートによる切断された標的核酸分子の修復は、標的遺伝子のエクソン配列、イントロン配列、調節配列、転写制御配列、翻訳制御配列、スプライシング部位、または非コード配列の変化をもたらし得る。他の実施形態では、テンプレート配列は、遺伝子ノックインをもたらし得る外因性配列を含み得る。外因性配列の統合は、遺伝子ノックアウトをもたらし得る。

【0337】

ある特定の実施形態では、ドナー配列は、5' 相同性アームおよび／または3' 相同性アームなどの1つ以上の統合要素も含むカプシド不含ceDNAベクター内にある。ある特定のそのような実施形態では、最低でも、ceDNAは、5'～3'に、5' HDRアーム、ドナー配列、3' HDRアーム、および少なくとも1つのITRを含み、少なくとも1つのITRは、5' HDRアームの上流または3' HDRアームの下流にある。ある特定の実施形態では、ドナー配列（例えば、限定されないが、第IX因子または第VII因子（または例えば、任意の他の関心対象の治療用タンパク質）など）は、宿主細胞の染色体に挿入されるヌクレオチド配列である。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、本来宿主細胞に存在しないか、または宿主細胞にとって外来性であり得る。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、所定の標的部位以外の部位に存在する内因性配列である。あ

る特定の実施形態では、ドナー配列は、所定の標的部位の配列と同様の内因性配列である（例えば、既存の誤った配列を置き換える）。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、宿主細胞にとって内因性であるが、所定の標的部位以外の部位に存在する配列である。いくつかの実施形態では、ドナー配列は、コード配列または非コード配列である。いくつかの実施形態では、ドナー配列は、遺伝子の突然変異体遺伝子座である。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、染色体に挿入される外因性遺伝子、標的部位で内因性配列を置き換える修飾型配列、調節エレメント、タグまたはレポータータンパク質および／もしくはRNAをコードするコード配列であり得る。いくつかの実施形態では、ドナー配列は、融合タンパク質の発現のために標的遺伝子のコード配列にインフレームで挿入されてもよい。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、ORF全体（コード／ドナー配列）ではなく、所望の標的を置き換えることを意味するDNAの訂正部分のみである。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、ドナー配列が天然に存在する配列と同様に調節されるように、内因性プロモーターの後ろにインフレームで挿入される。

10

【0338】

ある特定の実施形態では、ドナー配列は、コード配列を駆動するために、上記のようにプロモーターをその中に任意に含んでもよい。そのような実施形態は、発現を容易にするためにドナー配列内にポリAテールをさらに含み得る。

【0339】

ある特定の実施形態では、ドナー配列は、所定のサイズであり得るか、または当業者によってサイズ決定され得る。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、少なくともまたは約10塩基対、15塩基対、20塩基対、25塩基対、50塩基対、60塩基対、75塩基対、100塩基対、少なくとも150塩基対、200塩基対、300塩基対、500塩基対、800塩基対、1000塩基対、1,500塩基対、2,000塩基対、2500塩基対、3000塩基対、4000塩基対、4500塩基対、5,000塩基対の長さ、または約1塩基対～約10塩基対、または約10塩基対～約50塩基対、または約50塩基対～約100塩基対、または約100塩基対～約500塩基対、または約500塩基対～約5,000塩基対の長さのいずれかであり得る。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、ゲノム中の単一の突然変異型ヌクレオチドを修復するために1塩基対のみを含む。

20

【0340】

本開示による使用のための好適なドナー配列（複数可）の非限定的な例には、本明細書に記載される疾患関連分子のうちの1つに対して少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する1つ以上の疾患関連配列に対応するプロモーターレスコード配列を含む。一実施形態では、コード配列は、配列番号825または配列番号825からなるドナー配列に対して少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する。配列が置換されるのではなく付加される場合などの、ある特定の実施形態では、プロモーターを提供することができる。

30

40

【0341】

宿主細胞ゲノムへのドナー配列の統合のために、ceDNAベクターは、ドナー配列をコードするポリヌクレオチド配列、またはその中に示される5'および3'相同性アームなどの相同組み換えによるゲノムへの統合のためのベクターの任意の他のエレメントに依存し得る（例えば、図8を参照）。例えば、ceDNAベクターは、染色体（複数可）における正確な位置（複数可）での宿主細胞のゲノムへの相同組み換えによる統合を指示するために、5'および3'相同性アームをコードするヌクレオチドを含み得る。正確な位置での統合の可能性を高めるために、5'および3'相同性アームは、50～5,000塩基対、または100～5,000塩基対、または500～5,000塩基対などの十分

50

な数の核酸を含むことができ、これらは相同組み換えの確率を高めるために、対応する標的配列に対して高度の配列同一性または相同性を有する。5'および3'相同性アームは、宿主細胞のゲノム中の標的配列と相同である任意の配列であり得る。さらに、5'および3'相同性アームは、非コードまたはコードヌクレオチド配列であり得る。ある特定の実施形態では、5'相同性アームと染色体上の対応する配列との間の相同性は、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%のいずれかである。ある特定の実施形態では、3'相同性アームと染色体上の対応する配列との間の相同性は、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%のいずれかである。ある特定の実施形態では、5'および/または3'相同性アームは、染色体上の統合またはDNA切断部位のすぐ上流および/または下流の配列に相同であり得る。あるいは、5'および/または3'相同性アームは、統合もしくはDNA切断部位から離れている、例えば統合もしくはDNA切断部位から少なくとも1、2、5、10、15、20、25、30、50、100、200、300、400、もしくは500bp離れているか、またはDNA切断部位と部分的にもしくは完全に重複している配列に相同であり得る。ある特定の実施形態では、ヌクレオチド配列の3'相同性アームは、変更型ITRの近位にある。

10

【0342】

ある特定の実施形態では、ドナー配列の統合の効率は、統合の前に、ceDNAベクターからドナー配列を含むカセットを抽出することによって改善される。非限定的な一例では、特定の制限部位は、5'相同性アームに対する5'、3'相同性アームに対する3'、または両方で操作することができる。そのような制限部位が両方の相同性アームに関して存在する場合、制限部位は、2つの相同性アーム間で同じであっても異なってもよい。ceDNAベクターが、操作された制限部位（複数可）に特異的な1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで切断されると、結果として得られるカセットは、5'相同性アームドナー配列-3'相同性アームを含み、所望のゲノム遺伝子座とより容易に組み換えられ得る。この切断されたカセットは、限定されないが、以下：調節領域、ヌクレアーゼ、および追加のドナー配列のうちの1つ以上などの他のエレメントをさらに含み得ることが当業者によって理解されるであろう。ある特定の態様では、ceDNAベクター自体が、制限エンドヌクレアーゼをコードすることができ、それによりceDNAベクターが核に送達されると、制限エンドヌクレアーゼが発現され、ベクターを切断することができる。ある特定の態様では、制限エンドヌクレアーゼは、別個に送達される第2のceDNAベクター上でコードされる。ある特定の態様では、制限エンドヌクレアーゼは、非ceDNAベースの送達手段によって核に導入される。ある特定の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼは、ceDNAベクターが核に送達された後に導入される。ある特定の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼおよびceDNAベクターは、同時に核に輸送される。ある特定の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼは、ceDNAベクターの導入時に既に存在している。

20

30

【0343】

ある特定の実施形態では、ドナー配列は、5'相同性アームまたは3'相同性アームに対して外来である。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、5'相同性アームおよび3'相同性アームを含む配列の間に内因的に見られない。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、5'相同性アームまたは3'相同性アームを含む未変性配列に対して内因性ではない。ある特定の実施形態では、5'相同性アームは、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の上流のヌクレオチド配列に相同である。ある特定の実施形態では、3'相同性アームは、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の下流のヌクレオチド配列に相同である。ある特定の実施形態では、5'相同性アームまたは3'相同性アームは、少なくとも1つの変異型ITRの近位にある。ある特定の実施形態では、5'相同性アームまたは3'相同性アームは、約250~2000bpである。

40

【0344】

本開示による使用のための、特に肝細胞または組織の遺伝子編集における使用のための

50

好適な 5' 相同性アームの非限定的な例には、配列番号 823 もしくは配列番号 826 内の好適なセグメントに対して少なくとも 60%、より好ましくは少なくとも 65%、より好ましくは少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは少なくとも 95% の配列同一性を有する 5' アルブミン相同性アーム、または配列番号 823 内の好適なセグメントもしくは配列番号 826 内の好適なセグメントからなる 5' 相同性アームが含まれる。そのようなセグメントは、それぞれの配列のすべてであり得る。

【0345】

本開示による使用のための、好適な 3' 相同性アームの非限定的な例には、配列番号 824 もしくは配列番号 14827 内の好適なセグメントに対して少なくとも 60%、より好ましくは少なくとも 65%、より好ましくは少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは少なくとも 95% の配列同一性を有する 3' アルブミン相同性アーム、または配列番号 824 もしくは配列番号 827 内の好適なセグメントからなる 3' 相同性アームが含まれる。そのようなセグメントは、それぞれの配列のすべてであり得る。

【0346】

一実施形態では、本明細書に記載されるように、ドナー配列に隣接する 5' および 3' 相同性アームを含む遺伝子編集 c e D N A ベクターは、C a s ニッカーゼ (n C a s、例えば C a s 9 ニッカーゼ) をコードする別のベクター (例えば、追加の c e D N A ベクター、レンチウイルスベクター、ウイルスベクター、またはプラスミド) と併せて投与され得る。本明細書では、そのような n C a s 酵素は、本明細書に記載される c e D N A ベクターとの相同性を含むガイド R N A と併せて使用され、例えば、物理的に拘束された配列を解放するため、またはねじれ解放を提供するために使用され得ることが企図される。物理的に拘束された配列を解放すると、例えば、c e D N A ベクター内の相同性指向修復 (H D R) テンプレート相同性アーム (複数可) がゲノム配列との相互作用に曝されるように、c e D N A ベクターを「ほどく」ことができる。さらに、本明細書では、必要に応じて、そのような系を使用して、c e D N A ベクターを不活性化できることが企図される。c e D N A ベクターにおいて二本鎖切断を誘導する C a s 酵素が、そのような c e D N A ベクターのより強力なディアクチベーターであることは、当業者によって理解されるであろう。一実施形態では、ガイド R N A は、ヌクレアーゼをコードする配列またはドナー配列もしくはテンプレートなどの、c e D N A ベクターに挿入された配列に対する相同性を含む。別の実施形態では、ガイド R N A は、逆位末端反復 (I T R) または c e D N A ベクターの相同性/挿入エレメントに対する相同性を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターは、5' および 3' 末端の各々に I T R を含み、したがって、I T R と相同性を有するガイド R N A は、1 つ以上の I T R のニッキングを実質的に等しく産生する。いくつかの実施形態では、ガイド R N A は、(例えば、c e D N A ベクターのほどきを支援するために) c e D N A ベクターおよびドナー配列またはテンプレートの一部と相同性を有する。また、本明細書では、ニッキングされると、c e D N A ベクターが核内に保持されなくなる可能性がある、c e D N A ベクター上のある特定の部位が存在することも企図される。当業者は、そのような配列を容易に同定することができる、したがって、そのような配列領域へのガイド R N A の操作を回避することができる。あるいは、必要に応じて、または所望される場合、核の局在化に参与する配列をニッキングするガイド R N A を使用して、ヌクレアーゼの外側の領域に c e D N A ベクターの細胞内局在を修正することを、c e D N A ベクターを非活性化する方法として使用することができる。

【0347】

ある特定の実施形態では、他の統合戦略および構成成分は、本開示の c e D N A ベクターによる使用に適している。例えば、図 1 A ~ 1 G または図 8 または図 9 には示されてい

10

20

30

40

50

ないが、一実施形態では、本開示による c e D N A ベクターは、ゲノム r D N A への相同組み換えが可能であるリボソーム D N A (r D N A) 配列が隣接する発現カセットを含み得る。同様の戦略は、例えば、L i s o w s k i , e t a l . , R i b o s o m a l D N A I n t e g r a t i n g r A A V - r D N A V e c t o r s A l l o w f o r S t a b l e T r a n s g e n e E x p r e s s i o n , T h e A m e r i c a n S o c i e t y o f G e n e a n d C e l l T h e r a p y , 1 8 S e p t e m b e r 2 0 1 2 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) で実施されており、ここでは r A A V - r D N A ベクターが示された。ある特定の実施形態では、c e D N A - r D N A ベクターの送達は、増加した頻度でゲノム r D N A 遺伝子座に統合することができ、統合は r D N A 遺伝子座に特異的である。さらに、ヒト第 I X 因子 (h F I X) またはヒト第 V I I I 因子発現カセットを含む c e D N A - r D N A ベクターは、血清 h F I X またはヒト第 V I I I 因子の治療レベルを高める。r D N A 遺伝子座への統合は比較的安全であるため、c e D N A - r D N A ベクターは、分裂細胞への長期的な遺伝子導入を必要とする治療のための c e D N A の使用を拡大する。

10

【0348】

一実施形態では、プロモーターレス c e D N A ベクターは、相同性修復テンプレート (例えば、2 つの隣接する相同性アームを有する修復配列) の送達のために企図されるが、ヌクレアーゼまたはガイド R N A をコードする核酸配列を含まない。

【0349】

本明細書に記載される方法および組成物は、例えば、R o u e t e t a l . P r o c N a t l A c a d S c i 9 1 : 6 0 6 4 - 6 0 6 8 (1 9 9 4) 、C h u e t a l . N a t B i o t e c h n o l 3 3 : 5 4 3 - 5 4 8 (2 0 1 5) 、R i c h a r d s o n e t a l . N a t B i o t e c h n o l 3 3 : 3 3 9 - 3 4 4 (2 0 1 6) 、K o m o r e t a l . N a t u r e 5 3 3 : 4 2 0 - 4 2 4 (2 0 1 6) (各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる) に記載されるように、相同性組み換えを含む方法で使用され得る。

20

【0350】

本明細書に記載される方法および組成物は、例えば、R o u e t e t a l . P r o c N a t l A c a d S c i 9 1 : 6 0 6 4 - 6 0 6 8 (1 9 9 4) 、C h u e t a l . N a t B i o t e c h n o l 3 3 : 5 4 3 - 5 4 8 (2 0 1 5) 、R i c h a r d s o n e t a l . N a t B i o t e c h n o l 3 3 : 3 3 9 - 3 4 4 (2 0 1 6) 、K o m o r e t a l . N a t u r e 5 3 3 : 4 2 0 - 4 2 4 (2 0 1 6) (各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる) に記載されるように、相同性組み換えを含む方法で使用され得る。

30

【0351】

C. ガイド R N A (g R N A)

一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、選択されたゲノム標的配列への R N A 誘導型エンドヌクレアーゼ複合体の配列特異的標的化を指向するために標的ポリヌクレオチド配列と十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態では、ガイド R N A が結合し、例えば、C a s タンパク質が、リボ核タンパク質 (R N P) 、例えば、C R I S P R / C a s 複合体を形成することができる。

40

【0352】

いくつかの実施形態では、ガイド R N A (g R N A) 配列は、ガイド配列と R N A 誘導型エンドヌクレアーゼとの会合を可能にする c r R N A および / または t r a c r R N A 配列に融合された、g R N A 配列をゲノム内の所望の部位に指向する標的配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、最適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適に整列された場合、少なくとも 5 0 % 、6 0 % 、7 5 % 、8 0 % 、8 5 % 、9 0 % 、9 5 % 、9 7 . 5 % 、9 9 % 、またはそれ以上である。最適なアラインメントは、S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズム、N e e d l e m a n - W u n s c h アルゴリズム、B u r r o w s - W h e e l e r 変換に基

50

づくアルゴリズム（例えば、Burrows Wheeler Aligner）、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign（Novocraft Technologies）、ELAND（Illumina, San Diego, Calif.）、SOAP、およびMaqに基づくアルゴリズムなどの、配列を整列させるための任意の好適なアルゴリズムを使用して決定することができる。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、またはそれ以上のヌクレオチド長である。本明細書では、ガイドRNAの標的配列および標的核酸分子上の標的配列が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のミスマッチを含み得ることが企図される。いくつかの実施形態では、ガイドRNA配列は、パリンδροーム配列を含み、例えば、自己標的配列は、パリンδροームを含む。ガイドRNAの標的配列は、典型的に、19～21塩基対の長さであり、ガイドRNA全体（標的配列＋ヘアピン）をCas9などのCasに結合するヘアピンの直前にある。パリンδροーム配列が、ガイドRNAの自己標的配列として用いられる場合、逆位反復エレメントは、例えば、9、10、11、12、またはそれ以上のヌクレオチド長であり得る。ガイドRNAの標的配列が、最も頻繁に19～21bpである場合、9または10ヌクレオチドのパリンδροーム逆位反復エレメントは、望ましい長さの標的配列を提供する。次いで、Cas9－ガイドRNAヘアピン複合体は、任意のヌクレオチド配列（DNAまたはRNA）、例えば19～21塩基対配列と一致し、その後「PAM」配列、例えばNGGもしくはNGA、または他のPAMが続くDNA配列を認識して切断することができる。

【0353】

RNA誘導型エンドヌクレアーゼ複合体の、標的配列への配列特異的結合を指示するガイド配列の能力は、任意の好適なアッセイによって評価することができる。例えば、RNA誘導型エンドヌクレアーゼ複合体を形成するのに十分なRNA誘導型エンドヌクレアーゼ系の構成成分は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼ配列の構成成分をコードするベクターでのトランスフェクションなどによって、対応する標的配列を有する宿主細胞に提供することができ、続いて、Surveyorアッセイ（Transgenomic（商標）、New Haven, CT）などによって標的配列内の優先的切断を評価する。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、試験されるガイド配列および試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含む、標的配列、RNA誘導型エンドヌクレアーゼ複合体の構成成分を提供し、試験ガイド配列の反応と対照ガイド配列の反応と間で、標的配列での結合または切断率を比較することによって、試験管内で評価することができる。当業者は、他のアッセイを使用して、gRNA配列を試験することもできることを理解するであろう。

【0354】

ガイド配列を選択して、任意の標的配列を標的とすることができる。いくつかの実施形態では、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。いくつかの実施形態では、標的配列は、本明細書に記載されるように、自己クロニングプラスミド中の第1のガイドRNAをコードする配列である。典型的には、ゲノム中の標的配列は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼの結合のためのプロトスペーサー隣接（PAM）配列を含む。当業者は、エンドヌクレアーゼと標的配列との適切な会合を可能にするために、PAM配列およびRNA誘導型エンドヌクレアーゼが同じ（細菌）種から選択されるべきであることを理解するであろう。例えば、CAS9のPAM配列は、cpF1のPAM配列とは異なる。設計は、適切なPAM配列に基づいている。ガイドRNAの分解を防ぐために、ガイドRNAの配列にはPAM配列を含めてはならない。いくつかの実施形態では、ガイドRNAにおける標的配列の長さは、12ヌクレオチドである。他の実施形態では、ガイドRNAにおける標的配列の長さは、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、または40ヌクレオチドである。ガイドRNAは、標的化DNA配列のいずれかの鎖に相補的であり得る。いくつかの実施

形態では、挿入または欠失を含むようにゲノムを修飾する場合、gRNAは、タンパク質コード領域のN末端により近く標的化され得る。

【0355】

当業者は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼによる標的化された切断の目的のために、ゲノムにおいて固有の標的配列が、ゲノムにおいて1回より多く生じる標的配列よりも好ましいことを理解するであろう。Bioinformaticsソフトウェアを使用して、ガイドRNAのオフターゲット効果を予測し、最小化することができる（例えば、特に Naito et al. "CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites" Bioinformatics (2014) 10, epub、Heigwer, F., et al. "E-CRISP: fast CRISPR target site identification" Nat. Methods 11, 122-123 (2014)、Bae et al. "Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases" Bioinformatics 30(10):1473-1475 (2014)、Aach et al. "CasFinder: Flexible algorithm for identifying specific Cas9 targets in genomes" BioRxiv (2014)を参照）。

【0356】

S. pyogenes Cas9の場合、ゲノム内の固有の標的配列は、MMMMMM MNNNNNNNNNNNNNXGG（配列番号590）という形式のCas9標的部位を含み得、NNNNNNNNNNNNNNNNNNXGG（配列番号591）（NはA、G、T、またはCであり、Xは任意のヌクレオチドであり得る）は、ゲノム内で1回だけ発生する。ゲノム内の固有の標的配列は、MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNXGG（配列番号592）の形式のS. pyogenes Cas9標的部位を含み得、NNNNNNNNNNNNXGG（配列番号593）（NはA、G、T、またはCであり、Xは任意のヌクレオチドであり得る）は、ゲノム内で1回だけ発生する。S. thermophilus

CRISPR1 Cas9の場合、ゲノム内の固有の標的配列は、MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNXXAGAAW（配列番号594）という形式のCas9標的部位を含み得、NNNNNNNNNNNNNNNNNNXXAGAAW（配列番号595）（NはA、G、T、またはCであり、Xは任意のヌクレオチドであり得る）は、ゲノム内で1回だけ発生する。ゲノム内の固有の標的配列は、MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNXXAGAAW（配列番号596）という形式のS. thermophilus CRISPR1 Cas9標的部位を含めることができ、NNNNNNNNNNNNNNNNNNXXAGAAW（配列番号597）（NはA、G、T、またはCであり、Xは任意のヌクレオチドであり得、WはAまたはTである）は、ゲノム内で1回だけ発生する。S. pyogenes Cas9の場合、ゲノム内の固有の標的配列は、MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNNXGGXG（配列番号598）という形式のCas9標的部位を含み得、NNNNNNNNNNNNNNNNNNXXGGXG（配列番号599）（NはA、G、T、またはCであり、Xは任意のヌクレオチドであり得る）は、ゲノム内で1回だけ発生する。ゲノム内の固有の標的配列は、MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNNXGGXG（配列番号600）の形式のS. pyogenes Cas9標的部位を含み得、NNNNNNNNNNNNNNNNNNXXGGXG（配列番号601）（NはA、G、T、またはCであり、Xは任意のヌクレオチドであり得る）は、ゲノム内で1回だけ発生する。これらの配列の各々において、「M」は、A、G、T、またはCであり得、配列を固有であると同定する際に考慮される必要はない。

【0357】

一般に、「crRNA/tracrRNA融合配列」は、その用語が本明細書で使用さ

g t c a t t t t a t g g c a g g g t g t t t t c g t t a t t t a a T T T T T T (配列番号603)、(i i i) N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N g t t t t t g t a c t c t c a G A A A t g c a g a a g c t a c a a a g a t a a g g c t t c a t g c c g a a a t c a a c a c c c t g t c a t t t t a t g g c a g g g t g t T T T T T T (配列番号604)、(i v) N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N g t t t t a g a g c t a G A A A t a g c a a g t t a a a a t a a g g c t a g t c c g t t a t c a a c t t g a a a a a g t g g c a c c g a g t c g g t g c T T T T T T (配列番号605)、(v) N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N g t t t t a g a g c t a G A A A T A G c a a g t t a a a a t a a g g c t a g t c c g t t a t c a a c t t g a a a a a g t T T T T T T T T (配列番号606)、および(v i) N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N g t t t t a g a g c t a g A A A T A G c a a g t t a a a a t a a g g c t a g t c c g t t a t c a T T T T T T T T T (配列番号607)。いくつかの実施形態では、配列(i) ~ (i i i) は、S. t h e r m o p h i l u s C R I S P R 1からのC a s 9と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、配列(i v) ~ (v i) は、S. p y o g e n e s由来のC a s 9と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、t r a c r R N A配列は、c r R N A配列を含む転写産物とは別個の転写産物である。

【0358】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、2つのRNA分子を含むことができ、本明細書では「デュアルガイドRNA」または「d g RNA」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、d g RNAは、c r RNAを含む第1のRNA分子、およびt r a c r RNAを含む第2のRNA分子を含み得る。第1および第2のRNA分子は、c r RNA上のフラグポールとt r a c r RNAとの間の塩基対合を介してRNA二重鎖を形成し得る。d g RNAを使用する場合、フラグポールの長さに上限を設ける必要はない。

【0359】

他の実施形態では、ガイドRNAは、単一のRNA分子を含むことができ、本明細書では「単一ガイドRNA」または「s g RNA」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、s g RNAは、t r a c r RNAに共有結合されたc r RNAを含み得る。いくつかの実施形態では、c r RNAおよびt r a c r RNAは、リンカーを介して共有結合され得る。いくつかの実施形態では、s g RNAは、c r RNA上のフラグポールとt r a c r RNAとの間の塩基対合を介してステムループ構造を含み得る。いくつかの実施形態では、単一ガイドRNAは、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、またはそれ以上のヌクレオチド長（例えば、75~120、75~110、75~100、75~90、75~80、80~120、80~110、80~100、80~90、85~120、85~110、85~100、85~90、90~120、90~110、90~100、100~120、100~120ヌクレオチド長）である。いくつかの実施形態では、c e DNAベクターまたはその組成物は、少なくとも1つのg RNAをコードする核酸を含む。例えば、第2のポリヌクレオチド配列は、少なくとも1つのg RNA、少なくとも2つのg RNA、少なくとも3つのg RNA、少なくとも4つのg RNA、少なくとも5つのg RNA、少なくとも6つのg RNA、少なくとも7つのg RNA、少なくとも8つのg RNA、少なくとも9つのg RNA、少なくとも10のg RNA、少なくとも11のg RNA、少なくとも12のg RNA、少なくとも13のg RNA、少なくとも14のg RNA、少なくとも15のg RNA、少なくとも16のg RNA、少なくとも17のg RNA、少なくとも18のg RNA、少なくとも19のg RNA、少なくとも20のg RNA、少なくとも25のg RNA、少なくとも30のg RNA、少なくとも35のg RNA、少なくとも40のg RNA、少なくとも45のg RNA、または少なくとも50のg RNAをコードし得る。第2のポリヌクレオチド配列は、1つのg RNA~50のg RNA、1つのg RNA~45のg RNA、1つのg RNA~40のg RNA、1つのg RNA~35のg RNAの間、1つのg RNA~30のg RNA、1つのg RNA~2

5の異なるgRNA、1つのgRNA～20のgRNA、1つのgRNA～16のgRNA、1つのgRNA～8つの異なるgRNA、4つの異なるgRNA～50の異なるgRNA、4つの異なるgRNA～45の異なるgRNA、4つの異なるgRNA～40の異なるgRNA、4つの異なるgRNA～35の異なるgRNA、4つの異なるgRNA～30の異なるgRNA、4つの異なるgRNA～25の異なるgRNA、4つの異なるgRNA～20の異なるgRNA、4つの異なるgRNA～16の異なるgRNA、4つの異なるgRNA～8つの異なるgRNA～50の異なるgRNA、8つの異なるgRNA～45の異なるgRNA、8つの異なるgRNA～40の異なるgRNA、8つの異なるgRNA～35の異なるgRNA、8つの異なるgRNA～30の異なるgRNA、8つの異なるgRNA～25の異なるgRNA、8つの異なるgRNA～20の異なるgRNA、8つの異なるgRNA～16の異なるgRNA、16の異なるgRNA～50の異なるgRNA、16の異なるgRNA～45の異なるgRNA、16の異なるgRNA～40の異なるgRNA、16の異なるgRNA～35の異なるgRNA、16の異なるgRNA～30の異なるgRNA、16の異なるgRNA～25の異なるgRNA、または16の異なるgRNA～20の異なるgRNAをコードし得る。異なるgRNAをコードするポリヌクレオチド配列の各々は、プロモーターに操作可能に連結され得る。異なるgRNAに操作可能に連結されているプロモーターは、同じプロモーターであり得る。異なるgRNAに操作可能に連結されているプロモーターは、異なるプロモーターであり得る。プロモーターは、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、抑制性プロモーター、または調節可能なプロモーターであり得る。

【0360】

いくつかの実験では、ガイドRNAは、ノックインもしくはノックアウト欠失、または欠陥遺伝子の訂正に成功した既知のZFN配列標的領域を標的とする。既知のZFN標的領域に結合する複数のsgRNA配列が設計されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第2015/0056705号の表1～2に記載されており、例えば、ヒトβグロビン、ヒト、BCL11A、ヒトKLF1、ヒトCCR5、ヒトCXCR4、PPP1R12C、マウスおよびヒトHPRT、ヒトアルブミン、ヒト第IX因子、ヒト第VII因子、ヒトLRRK2、ヒトHtt、ヒトRH、CFTR、TRAC、TRBC、ヒトPD1、ヒトCTLA-4、HLA c11、HLA A2、HLA A3、HLA B、HLA C、HLA c1. I I DBp2. DRA、Tap1および2、Tapasin、DMD、RFX5等)のgRNA配列を含む。

【0361】

修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、ガイドRNAまたはmRNAに存在することができる。ガイドRNAまたはDNAエンドヌクレアーゼ(例えば、RNA誘導型ヌクレアーゼ)をコードするmRNAは、1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含み得る。そのようなmRNAは、「修飾型」と呼ばれ、正準A、G、C、およびU残基の代わりにまたはそれに加えて使用される1つ以上の非天然および/または天然に存在する構成成分または構成の存在を説明する。いくつかの実施形態では、修飾型RNAは、ここでは「修飾型」と呼ばれる非正準ヌクレオシドまたはヌクレオチドを用いて合成される。修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、(i)変更、例えば、ホスホジエステル骨格連結における非連結リン酸酸素の一方もしくは両方および/または連結リン酸酸素のうちの1つ以上の置換(例示的な骨格修飾)；(ii)リボース糖の成分、例えばリボース糖上の2'ヒドロキシルの変更、例えば置換(例示的な糖修飾)；(iii)リン酸部分の「デホスホ」リンカーによる大量置換(例示的な糖修飾)；(iv)非正準核酸塩基によるものを含む、天然に存在する核酸塩基の修飾または置換(例示的な塩基修飾)；(v)リボースーリン酸骨格の置換または修飾(例示的な骨格修飾)；(vi)オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分、キャップ、もしくはリンカーの結合(そのような3'または5'キャップ修飾は、糖および/または骨格の修飾を含み得る)；(vii)糖の修飾または置換(例示的な糖修飾)のうちの1つ以上を含み得る。未修飾の核

酸は、例えば、細胞ヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。例えば、ヌクレアーゼは、核酸のホスホジエステル結合を加水分解することができる。したがって、一態様では、本明細書に記載されるガイドRNAは、例えば、ヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるmRNAは、例えば、ヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むことができる。一実施形態では、修飾は、2'-O-メチルヌクレオチドを含む。他の実施形態では、修飾は、ホスホロチオエート（PS）結合を含む。

【0362】

修飾型リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレン酸、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、ホスホン酸水素、ホスホロアミデート、ホスホン酸アルキルまたはアリールおよびホスホトリエステルが含まれる。非修飾型リン酸基のリン原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの1つを上記の原子または原子群のうちの1つで置き換えることにより、リン原子をキラルにすることができる。不斉リン原子は、「R」構成（ここではRp）または「S」構成（ここではSp）のいずれかを有し得る。骨格はまた、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）を窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）で置換することによって修飾することもできる。置換は、いずれかの連結酸素で、または両方の連結酸素で起こり得る。リン酸基は、ある特定の骨格修飾において、非リン含有コネクタで置き換えることができる。いくつかの実施形態では、電荷リン酸基は、中性部分で置き換えることができる。リン酸基を置き換えることができる部分の例には、限定することなく、例えば、ホスホン酸メチル、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、炭酸塩、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリッカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノが含まれ得る。

【0363】

修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、糖基に対する、すなわち糖修飾での1つ以上の修飾を含むことができる。例えば、2'-ヒドロキシル基（OH）は、修飾することができ、例えば、いくつかの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で置き換えることができる。いくつかの実施形態では、2'-アルコキシドイオンを形成するために、もはやヒドロキシルを脱プロトン化することができないため、2'-ヒドロキシル基への修飾は、核酸の安定性を高めることができる。2'-ヒドロキシル基修飾の例には、アルコキシまたはアリールオキシ（OR、ここで「R」は、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）；ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ が含まれ得、式中、Rは、例えば、Hまたは任意に置換されたアルキルであり得、nは、0~20（例えば、0~4、0~8、0~10、0~16、1~4、1~8、1~10、1~16、1~20、2~4、2~8、2~10、2~16、2~20、4~8、4~10、4~16、4~20）の整数であり得る。いくつかの実施形態では、2'-ヒドロキシル基修飾は、2'-O-Meであり得る。いくつかの実施形態では、2'-ヒドロキシル基修飾は、2'-ヒドロキシル基をフッ化物で置き換える2'-フルオロ修飾であり得る。いくつかの実施形態では、2'-ヒドロキシル基修飾は、2'-ヒドロキシルが、例えばC1-6アルキレンまたはC1-6ヘテロアルキレン架橋によって、同じリボース糖の4'-炭素に接続され得る「ロックされた」核酸（LNA）を含むことができ、例示的な架橋は、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋を含み得る。O-アミノ（アミノは、例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る）およびアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_n$ -アミノ（アミノは、例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ

、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る)を含み得る。いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基修飾は、リボース環がC2'-C3'結合を欠く「ロックされていない」核酸(UNA)を含み得る。いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基(MOE)、(OCH₂CH₂OCH₃、例えば、PEG誘導体)を含み得る。

【0364】

「デオキシ」2'修飾という用語は、水素(すなわち、例えば、部分的にdsRNAのオーバーハング部分にあるデオキシリボース糖)；ハロ(例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード)；アミノ(アミノは、例えば、-NH₂、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る)；NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-アミノ(アミノは、例えば、本明細書に記載されているとおりであり得る)、-NHC(O)R(Rは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖であり得る)、シアノ；メルカプト；アルキルーチオールアルキル；チオアルコキシ；ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル、およびアルキニルを含み得、これらは、例えば、本明細書に記載されるアミノで任意に置換されてもよい。糖修飾は、リボース中の対応する炭素の立体化学的構成とは逆の立体化学的構成を有する1つ以上の炭素を含むこともできる糖基を含み得る。したがって、修飾核酸は、糖として、例えばアラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖を含み得る。これらの無塩基糖は、構成糖原子のうちの1つ以上でさらに修飾することもできる。修飾核酸はまた、L型である1つ以上の糖、例えばL-ヌクレオシドを含み得る。

【0365】

修飾核酸に組み込むことができる、本明細書に記載される修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例には、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、およびウラシル(U)が含まれるが、これらに限定されない。これらの核酸塩基を修飾または完全に置換して、修飾核酸に組み込むことができる修飾残基を提供することができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、プリン、ピリミジン、プリン類似体、またはピリミジン類似体から独立して選択することができる。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、例えば、塩基の天然に存在する誘導体および合成誘導体を含み得る。

【0366】

デュアルガイドRNAを用いる実施形態では、crRNAおよびtracrRNAの各々が修飾を含み得る。そのような修飾は、crRNAおよび/またはtracrRNAの一端または両端にあってもよい。sgRNAを含むある特定の実施形態では、sgRNAの一端もしくは両端にある1つ以上の残基を化学修飾することができるか、またはsgRNA全体を化学修飾することができる。ある特定の実施形態は、5'末端修飾を含む。ある特定の実施形態は、3'末端修飾を含む。ある特定の実施形態では、ガイドRNA分子の一本鎖オーバーハング中の1つ以上またはすべてのヌクレオチドは、デオキシヌクレオチドである。修飾型mRNAは、5'末端および/または3'末端修飾を含むことができる。

【0367】

D. 調節エレメント

本明細書で定義される非対称ITR対または対称ITR対を含む遺伝子編集のためのceDNAベクターは、シス調節エレメントの特定の組み合わせをさらに含む発現構築物から産生することができる。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、mir調節エレメント、転写後調節エレメント、組織および細胞型特異的プロモーター、ならびにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ITRは、導入遺伝子のプロモーターとして作用し得る。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成

分、例えば、本明細書に記載される調節スイッチを含み、導入遺伝子、または c e D N A ベクターを含む細胞を殺傷し得るキルスウィッチの発現を調節する。本発明で使用され得る調節スイッチを含む調節エレメントは、P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）においてより完全に論じられている。

【0368】

実施形態では、第2のヌクレオチド配列は、調節配列、およびヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、遺伝子調節配列は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されている。ある特定の実施形態では、調節配列は、宿主細胞におけるヌクレアーゼの発現を制御するのに適している。ある特定の実施形態では、調節配列は、本開示のヌクレアーゼ（複数可）をコードするヌクレオチド配列などのプロモーター配列に操作可能に連結された遺伝子の転写を指示することができる、好適なプロモーター配列を含む。ある特定の実施形態では、第2のヌクレオチド配列は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の5'末端に連結されたイントロン配列を含む。ある特定の実施形態では、エンハンサー配列がプロモーターの上流に提供されて、プロモーターの効力を増大させる。ある特定の実施形態では、調節配列は、エンハンサーおよびプロモーターを含み、第2のヌクレオチド配列は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の上流のイントロン配列を含み、イントロンは、1つ以上のヌクレアーゼ切断部位（複数可）を含み、プロモーターは、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されている。

【0369】

c e D N A ベクターは、W H P 転写後調節エレメント（W P R E）（例えば、配列番号8）およびB G H ポリA（配列番号9）などのシス調節エレメントの特定の組み合わせをさらに含む発現構築物から産生され得る。発現構築物における使用のための好適な発現カセットは、ウイルスカプシドによって課されるパッケージング制約によって制限されない。

【0370】

(i). プロモーター：

当業者は、本発明の遺伝子編集 c e D N A ベクターで使用されるプロモーターが、それらが促進する特定の配列に対して適切に調整されるべきであることを理解するであろう。例えば、ガイドRNAは、その機能が、未変性DNA上の特定の標的配列と二重鎖を形成して組み換え事象を発生させるため、プロモーターをまったく必要としない場合がある。対照的に、c e D N A ベクターによってコードされるヌクレアーゼは、プロモーターから恩恵を受けるため、ベクターから効率的に、かつ任意に調節可能な方法で発現させることができる。

【0371】

本発明の発現カセットは、全体発現レベルとともに細胞特異性に影響を及ぼし得るプロモーターを含む。導入遺伝子発現の場合、それらは、非常に活発なウイルス由来の最初期プロモーターを含み得る。発現カセットは、導入遺伝子発現を特定の細胞型に制限し、無秩序な異所性発現から生じる毒性効果および免疫反応を低減するために組織特異的真核細胞プロモーターを含有し得る。好ましい実施形態では、発現カセットは、C A G プロモーター（配列番号3）などの合成調節エレメントを含有し得る。C A G プロモーターは、(i) サイトメガロウイルス（CMV）早期エンハンサーエレメント、(i i) プロモーター、ニワトリβ-アクチン遺伝子の第1のエクソンおよび第1のイントロン、ならびに(i i i) ウサギβ-グロブリン遺伝子のスプライスアクセプターを含む。代替として、発現カセットは、α-1-抗トリプシン（A A T）プロモーター（配列番号4もしくは配列番号74）、肝臓特異的（L P 1）プロモーター（配列番号5もしくは配列番号16）、またはヒト伸長因子-1α（E F 1 α）プロモーター（例えば、配列番号6もしくは配列番号15）を含有し得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、1つ以上の構成的プロモーター、例えば、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（R S V）L T R プロモーター（任意にR S Vエンハンサーを有する）、またはサイトメガロウイルス（CMV）最初

期プロモーター（任意にCMVエンハンサーを有する、例えば、配列番号22）を含む。代替として、誘導性プロモーター、導入遺伝子の未変性プロモーター、組織特異的プロモーター、または当該技術分野において既知の様々なプロモーターを使用することができる。

【0372】

上記のものを含む好適なプロモーターは、ウイルスに由来し得るため、ウイルスプロモーターと称され得るか、またはそれらは、原核生物または真核生物を含む任意の生物に由来し得る。好適なプロモーターを使用して、任意のRNAポリメラーゼ（例えば、pol I、pol II、pol III）によって発現を駆動することができる。例示的なプロモーターとしては、SV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス長末端配列（LTR）プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（Ad MLP）；単純ヘルペスウイルス（HSV）プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、例えばCMV最初期プロモーター領域（CMV IE）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、ヒトU6小核プロモーター（U6、例えば、配列番号18（Miyagishi et al., Nature Biotechnology 20, 497-500 (2002)）、強化U6プロモーター（例えば、Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep. 1; 31(17)）、ヒトH1プロモーター（H1）（例えば、配列番号19）、CAGプロモーター、ヒト α 1-抗チプシン（HAAT）プロモーター（例えば、配列番号21）等が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、これらのプロモーターは、それらの下流イントロ含有端で変更され、1つ以上のヌクレアーゼ切断部位を含む。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ切断部位（複数可）を含有するDNAは、プロモーターDNAに対して外来である。

【0373】

一実施形態では、使用されるプロモーターは、治療タンパク質をコードする遺伝子の未変性プロモーターである。治療タンパク質をコードするそれぞれの遺伝子のプロモーターおよび他の調節配列は既知であり、特徴付けられている。使用されるプロモーター領域は、1つ以上の追加の調節配列（例えば、未変性）、例えば、エンハンサー（例えば、配列番号22および配列番号23）をさらに含み得る。

【0374】

本発明に従う使用のための好適なプロモーターの非限定例としては、例えば、CAGプロモーター（配列番号3）、HAATプロモーター（配列番号21）、ヒトEF1- α プロモーター（配列番号6）、またはEF1 α プロモーター（配列番号15）、IE2プロモーター（例えば、配列番号20）、およびラットEF1- α プロモーター（配列番号24）の断片が挙げられる。

【0375】

(ii) ポリアデニル化配列：

ポリアデニル化配列をコードする配列は、ceDNAベクターから発現されたmRNAを安定化するため、および核輸送および翻訳を助けるために、ceDNAベクター中に含まれ得る。一実施形態では、ceDNAベクターは、ポリアデニル化配列を含まない。他の実施形態では、ベクターは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、またはそれ以上のアデニンジヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、約43ヌクレオチド、約40～50ヌクレオチド、約40～55ヌクレオチド、約45～50ヌクレオチド、約35～50ヌクレオチド、またはその間の任意の範囲を含む。

【0376】

発現カセットは、当該技術分野において既知のポリアデニル化配列またはその変形、例えば、ウシBGHpA（例えば、配列番号74）もしくはウイルスSV40pA（例えば、配列番号10）から単離された天然に存在する配列、または合成配列（例えば、配列番

号27)を含み得る。いくつかの発現カセットはまた、SV40後期ポリAシグナル上流エンハンサー(USE)配列を含み得る。いくつかの実施形態では、USEは、SV40pAまたは異種ポリAシグナルと組み合わせて使用され得る。

【0377】

発現カセットはまた、導入遺伝子の発現を増加させるために、転写後エレメントを含み得る。いくつかの実施形態では、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)転写後調節エレメント(WPRE)(例えば、配列番号8)を使用して、導入遺伝子の発現を増加させる。他の転写後処理エレメント、例えば、単純ヘルペスウイルスまたはB型肝炎ウイルス(HBV)のチミジンキナーゼ遺伝子からの転写後エレメントを使用することができる。分泌配列は、導入遺伝子、例えば、VH-02およびVK-A26配列、例えば、配列番号25および配列番号26に連結され得る。

10

【0378】

(iii). 核局在化配列

いくつかの実施形態では、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードするベクターは、1つ以上の核局在化配列(NLS)、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のNLSを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のNLSは、アミノ末端またはその近く、カルボキシ末端またはその近く、またはこれらの組み合わせ(例えば、アミノ末端における1つ以上のNLSおよび/またはカルボキシ末端における1つ以上のNLS)に位置する。複数のNLSが存在する場合、各々を他のNLSから独立して選択することができ、それにより、単一のNLSが複数のコピーに、および/または1つ以上のコピーに存在する1つ以上の他のNLSと組み合わせて存在する。NLSの非限定的な例を表6に示す。

20

【0379】

表6: 核局在化シグナル

【表6-1】

ソース	配列	配列番号
SV40ウイルスの大きなT抗原	PKKKRKV (CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTG によってコードされる、配列番号574)	573
ヌクレオプラスミン	KRPAATKKAGQAKKKK	575
c-myc	PAAKRVKLD	576
	RQRRNELKRSP	577

30

【表 6 - 2】

hRNPA1 M9	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYF AKPRNQGGY	578
インポーチン- α からのIBBドメイン	RMRI ZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRK AKKDEQILKRRNV	579
筋腫Tタンパク質	VSRKRPRP	580
	PPKKARED	581
ヒトp53	PQPKKKPL	582
マウスc-a b l I V	SALIKKKKKMAP	583
インフルエンザウイルスNS1	DRLRR	584
	PKQKKRK	585
肝炎ウイルス δ 抗原	RKLKKKIKKL	586
マウスMx1タンパク質	REKKKF LKRR	587
ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ	KRKGDEV DGVDEVAKKKSKK	588
ステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイド	RKCLQAGMNLEARKTKK	589

10

20

30

【0380】

E. 遺伝子編集系の追加の構成成分

本開示のc e DNAベクターは、遺伝子編集のための他の構成成分をコードするヌクレオチドを含み得る。例えば、特定の遺伝子標的事象を選択するには、保護s hRNAをマイクロRNAに埋め込み、アルブミン遺伝子座などの高活性遺伝子座に部位特異的に統合するように設計された組み換えc e DNAベクターに挿入することができる。そのような実施形態は、Nygaard et al., A universal system to select gene-modified hepatocytes in vivo, Gene Therapy, June 8, 2016に記載されているような任意の遺伝的背景における遺伝子修飾肝細胞のインビボ選択および拡大のための系を提供し得る。本開示のc e DNAベクターは、形質転換、トランスフェクト、形質導入などされた細胞の選択を可能にする1つ以上の選択可能なマーカーを含み得る。選択可能なマーカーは、その産生物が殺生物剤またはウイルス耐性、重金属に対する耐性、栄養要求性に対する原栄養性、NeoR等を提供する遺伝子である。ある特定の実施形態では、正の選択マーカーが、NeoRなどのドナー配列に組み込まれる。負の選択マーカーは、ドナー配列の下流に組み込むことができ、例えば、負の選択マーカーをコードする核酸配列HSV-tkを、ドナー配列の下流の核酸構築物に組み込むことができる。図8を参照すると、導入遺伝子は、任意に、0.05~6kbの伸長相同性アームが隣接するウイルス2Aペプチド切断部位(2A)を介して選択マーカー(NeoR)に融合される。ある特定の実施形態では、HSV TK)などの負の選択マーカーおよび成功した正しい部位の使用を

40

50

制御および選択することを可能にする発現ユニットは、任意に、相同性アームの外側に位置付けられ得る。

【0381】

実施形態では、本開示の c e D N A ベクターは、5' 相同性アームの上流かつ近位にポリアダニル化部位を含み得る。

【0382】

図9を参照すると、本開示による c e D N A ベクターが、c e D N A 特異的 I T R を含めて示されている。c e D N A ベクターは、P o l I I I プロモーター駆動型（U6およびH1など）の s g R N A 発現ユニットを、転写方向に関して任意の配向で含む。「二重突然変異体ニッカーゼ」の s g R N A 標的配列は、任意に、突然変異体 I T R に近い3' 相同性アームの下流のねじれを解放するために提供される。そのような実施形態は、アニーリングを増加させ、H D R の頻度を助長する。

【0383】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターに含まれるヌクレアーゼは、遺伝子編集後に不活化／減少させることができる。例えば、本明細書の実施例6（図8、9、および13も参照）を参照されたい。

【0384】

F. 調節スイッチ

分子調節スイッチは、シグナルに反応して、状態の測定可能な変化を生成するものである。そのような調節スイッチを、本明細書に記載される c e D N A ベクターと有用に組み合わせて、c e D N A ベクターの出力を制御することができる。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、導入遺伝子の発現を微調整するのに役立つ調節スイッチを含む。例えば、c e D N A ベクターの生物学的封じ込め機能として役立ち得る。いくつかの実施形態では、スイッチは、c e D N A ベクターにおける関心対象の遺伝子の、制御可能かつ調節可能な発現を開始または停止（すなわち、シャットダウン）するように設計された「オン／オフ」スイッチである。いくつかの実施形態では、スイッチは、一旦スイッチが起動されると、c e D N A ベクターを含む細胞がプログラム細胞死を受けるよう指示することができる「キルスイッチ」を含み得る。遺伝子編集 c e D N A で使用して、遺伝子編集分子（例えば、導入遺伝子、例えば、エンドヌクレアーゼ、ガイドRNA、g D N A、RNAアクチベーター、またはドナー配列をコードする）の発現を調節するために包含される例示的な調節スイッチについては、P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）においてより完全に論じられている。

【0385】

(i) バイナリ調節スイッチ

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、導入遺伝子の発現を制御可能に調整するのに役立ち得る調節スイッチを含む。例えば、c e D N A ベクターの I T R の間に位置する発現カセットは、追加として、関心対象の遺伝子に操作可能に連結された調節領域、例えば、プロモーター、シスエレメント、リプレッサー、エンハンサー等を含み得、この調節領域は、1つ以上の共因子または外因性薬剤によって調節される。単なる例として、調節領域は、小分子スイッチまたは誘導性もしくは抑制性プロモーターによって調節され得る。誘導性プロモーターの非限定例は、ホルモン誘導性または金属誘導性プロモーターである。他の例示的な誘導性プロモーター／エンハンサーエレメントとしては、R U 4 8 6 誘導性プロモーター、エクジソン誘導性プロモーター、ラパマイシン誘導性プロモーター、およびメタロチオネインプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0386】

(i i) 小分子調節スイッチ

様々な当該技術分野において既知の小分子系調節スイッチは、当該技術分野において既知であり、本明細書に開示される c e D N A ベクターと組み合わせて、調節スイッチによって制御される c e D N A ベクターを形成することができる。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、直交リガンド／核受容体対、例えば、レチノイド受容体変異形／L G 3

10

20

30

40

50

35およびGRQCIMFI (Taylor, et al. BMC Biotechnology 10 (2010): 15に開示されているものなどの、操作可能に連結された導入遺伝子の発現を制御する人工プロモーターとともに) ; 操作されたステロイド受容体、例えば、プロゲステロンに結合することはできないが、RU486 (ミフェプリストン) には結合するC末端切断を有する修飾型プロゲステロン受容体 (米国特許第5, 364, 791号) ; Drosophilaからのエクジソン受容体およびそれらのエクジステロイドリガンド (Saez, et al., PNAS, 97 (26) (2000), 14512-14517)、またはSando R 3rd; Nat Methods. 2013, 10 (11): 1085-8に開示される抗生物質トリメトプリム (TMP) によって制御されるスイッチのうちのいずれか1つまたは組み合わせから選択され得る。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターによって発現される導入遺伝子を制御するための調節スイッチは、米国特許第8, 771, 679号および同第6, 339, 070号に開示されているものなどのプロドラッグ活性化スイッチである。

10

【0387】

(iii) 「パスコード」調節スイッチ

いくつかの実施形態では、調節スイッチは、「パスコードスイッチ」または「パスコード回路」であり得る。パスコードスイッチは、特定の条件が起こったときに、ceDNAベクターからの導入遺伝子の発現の制御の微調整を可能にする。すなわち、導入遺伝子の発現および/または抑制が起こるためには、条件の組み合わせが存在する必要がある。例えば、導入遺伝子の発現が起こるためには、少なくとも条件AおよびBが起こらなければならない。パスコード調節スイッチは、任意の数の条件であり得、例えば、導入遺伝子の発現が起こるためには、少なくとも2、または少なくとも3、または少なくとも4、または少なくとも5、または少なくとも6、または少なくとも7、またはそれ以上の条件が存在する。いくつかの実施形態では、少なくとも2つの条件 (例えば、A、B条件) が起こる必要があり、いくつかの実施形態では、少なくとも3つの条件が起こる必要がある (例えば、A、B、およびCまたはA、B、およびD)。単なる例として、パスコード「ABC」調節スイッチを有するceDNAからの遺伝子発現が起こるためには、条件A、B、およびCが存在しなければならない。条件A、B、およびCは、以下のとおりであり得る。条件Aは、病態または疾患の存在であり、条件Bは、ホルモン反応であり、条件Cは、導入遺伝子の発現に対する反応である。例えば、導入遺伝子が欠陥EPO遺伝子を編集する場合、条件Aは、慢性腎疾患 (CKD) の存在であり、条件Bは、対象が腎臓中に低酸素状態を有する場合に起こり、条件Cは、腎臓中のエリスロポエチン産生細胞 (EPC) 動員が不全であるか、または代替としてHIF-2活性化が不全である。一旦酸素レベルが増加するか、または所望のEPOレベルに達すると、導入遺伝子は、3つの条件が起こるまで再度オフになり、オンに戻る。

20

30

【0388】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターにおける使用のために包含されるパスコード調節スイッチまたは「パスコード回路」は、生物学的封じ込め条件を定義するために使用される環境シグナルの範囲および複雑性を拡張するために、ハイブリッド転写因子 (TF) を含む。既定条件の存在下で細胞死をトリガーするデッドマンスイッチとは対照的に、「パスコード回路」は、特定の「パスコード」の存在下での細胞生存または導入遺伝子発現を可能にし、所定の環境条件またはパスコードが存在する場合にのみ導入遺伝子発現および/または細胞生存を可能にするように容易に再プログラムされ得る。

40

【0389】

本明細書に開示される調節スイッチ、例えば、小分子スイッチ、核酸系スイッチ、小分子-核酸ハイブリッドスイッチ、転写後導入遺伝子調節スイッチ、翻訳後調節放射線制御スイッチ、低酸素媒介性スイッチ、および本明細書に開示される当業者に既知の他の調節スイッチのうちのいずれかおよびすべての組み合わせを、本明細書に開示されるパスコード調節スイッチにおいて使用することができる。使用のために包含される調節スイッチはまた、レビュー論文Kis et al., J R Soc Interface. 12

50

：20141000（2015）において考察され、K i s の表1に要約されている。いくつかの実施形態では、パスコード系における使用のための調節スイッチは、表11のスイッチのうちのいずれか、またはそれらの組み合わせから選択され得る。

【0390】

（i v）．導入遺伝子発現を制御するための核酸系調節スイッチ

いくつかの実施形態では、c e D N A によって発現された導入遺伝子を制御するための調節スイッチは、核酸系制御機序に基づく。例示的な核酸制御機序は、当該技術分野において既知であり、使用が想定される。例えば、そのような機序としては、リボスイッチ、例えば、U S 2 0 0 9 / 0 3 0 5 2 5 3、U S 2 0 0 8 / 0 2 6 9 2 5 8、U S 2 0 1 7 / 0 2 0 4 4 7 7、W O 2 0 1 8 / 0 2 6 7 6 2 A 1、米国特許第9, 222, 093号、および欧州特許出願第E P 2 8 8 0 7 1号に開示されるもの、またV i l l a J K e t a l . , M i c r o b i o l S p e c t r . 2 0 1 8 M a y ; 6 (3) によるレビューに開示されるものなどが挙げられる。W O 2 0 1 8 / 0 7 5 4 8 6 および W O 2 0 1 7 / 1 4 7 5 8 5 に開示されるものなどの、代謝物反応性転写バイオセンサーもまた含まれる。使用が想定される他の当該技術分野において既知の機序としては、s i R N A またはR N A i 分子（例えば、m i R、s h R N A）による導入遺伝子のサイレンシングが挙げられる。例えば、c e D N A ベクターは、c e D N A ベクターによって発現される導入遺伝子に対して相補的であるR N A i 分子をコードする調節スイッチを含み得る。導入遺伝子は、c e D N A ベクターによって発現されたとしてもそのようなR N A i が発現される場合、相補的R N A i 分子によってサイレンシングされ、導入遺伝子がc e D N A ベクターによって発現されたときにR N A i が発現されない場合、導入遺伝子は、R N A i によってサイレンシングされない。

【0391】

いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、U S 2 0 0 2 / 0 0 2 2 0 1 8 に開示されている組織特異的自己不活化調節スイッチであり、これにより調節スイッチは、そうでなければ導入遺伝子発現が不利益となり得る部位において、導入遺伝子発現を意図的にスイッチオフする。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、U S 2 0 1 4 / 0 1 2 7 1 6 2 および米国特許第8, 324, 436号に開示されるリコンビナーゼ可逆的遺伝子発現系である。

【0392】

（v）．転写後および翻訳後調節スイッチ。

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターによって発現された関心対象の導入遺伝子または遺伝子を制御するための調節スイッチは、転写後修飾系である。例えば、そのような調節スイッチは、U S 2 0 1 8 / 0 1 1 9 1 5 6、G B 2 0 1 1 / 0 7 7 6 8、W O 2 0 0 1 / 0 6 4 9 5 6 A 3、欧州特許第2707487号、およびB e i l s t e i n e t a l . , A C S S y n t h . B i o l . , 2 0 1 5 , 4 (5) , p p 5 2 6 - 5 3 4、Z h o n g e t a l . , E l i f e . 2 0 1 6 N o v 2 ; 5 . p i i : e 1 8 8 5 8 に開示されているように、テトラサイクリンまたはテオフィリンに感受性であるアプタザイムリボスイッチであり得る。いくつかの実施形態では、当業者であれば、導入遺伝子、およびリガンド感受性（オフスイッチ）アプタマーを含有し、その最終結果がリガンド感受性オンスイッチである、阻害性s i R N A の両方をコードすることができる。と想定される。

【0393】

（v i）．他の例示的な調節スイッチ

任意の既知の調節スイッチをc e D N A ベクター中で使用して、環境変化によってトリガーされるものを含む、c e D N A ベクターによって発現された導入遺伝子の遺伝子発現を制御することができる。追加の例としては、S u z u k i e t a l . , S c i e n t i f i c R e p o r t s 8 ; 1 0 0 5 1 (2 0 1 8) のB O C方法、遺伝子コード拡張および非生理的アミノ酸、放射線制御型または超音波制御型オン／オフスイッチが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、S c o t t S e t a l . , G e n e

Ther. 2000 Jul; 7 (13) : 1121-5、米国特許第5, 612, 318号、同第5, 571, 797号、同第5, 770, 581号、同第5, 817, 636号、およびWO1999/025385A1を参照)。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、米国特許第7, 840, 263号、US2007/0190028A1に開示されている、埋め込み可能な系によって制御され、遺伝子発現は、ceDNAベクター中の導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターを活性化する電磁エネルギーを含む、1つ以上のエネルギー形態によって制御される。

【0394】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターにおける使用が想定される調節スイッチは、低酸素媒介性またはストレス活性化スイッチ、例えば、WO1999/060142A2、米国特許第5, 834, 306号、同第6, 218, 179号、同第6, 709, 858号、US2015/0322410、Greco et al., (2004) Targeted Cancer Therapies 9, S368に開示されるものなど、ならびにFROG、TOAD、およびNRSEエレメント、および条件的に誘導可能なサイレンスエレメント（例えば、米国特許第9, 394, 526号に開示される、低酸素反応エレメント（HRE）、炎症反応エレメント（IRE）、および剪断応力活性化エレメント（SSAE）を含む）である。そのような実施形態は、虚血後、または虚血性組織および／もしくは腫瘍において、ceDNAベクターからの導入遺伝子の発現をオンにするために有用である。

【0395】

(iv). キルスイッチ

本発明の他の実施形態は、キルスイッチを含むceDNAベクターに関する。本明細書に開示されるキルスイッチは、ceDNAベクターを含む細胞が殺滅されるか、または導入されたceDNAベクターを対象の系から永久に除去する手段としてプログラム細胞死を受けようにすることができる。本発明のceDNAベクターにおけるキルスイッチの使用が、通常は、対象が許容可能に喪失し得る限定数の細胞、またはアポトーシスが望ましい細胞型（例えば、癌細胞）へのceDNAベクターの標的と結びつけられることは、当業者によって理解されるであろう。すべての態様では、本明細書に開示される「キルスイッチ」は、入力生存シグナルまたは他の指定条件の非存在下でceDNAベクターを含む細胞の急速かつロバストな細胞殺滅をもたらすように設計される。言い換えれば、本明細書においてceDNAベクターによりコードされるキルスイッチは、ceDNAベクターを含む細胞の細胞生存を、特定の入力シグナルによって定義される環境に制限し得る。そのようなキルスイッチは、対象からceDNAベクターを除去すること、またはコードされた導入遺伝子を発現しないことを保証することが望ましいときに、生物学的封じ込め機能として役立つ。

【0396】

VII. ceDNAベクターの産生の詳細な方法

A. 一般的な産生

本明細書で定義される非対称ITR対または対称ITR対を含む遺伝子編集のためのceDNAベクターのある特定の産生方法は、2018年9月7日に提出されたPCT/US18/49996のセクションIVに記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されるように、ceDNAベクターは、例えば、a) ポリヌクレオチド発現構築物テンプレート（例えば、ceDNAープラスミド、ceDNAーバクミド、および／またはceDNAーバキュロウイルス）を内包する宿主細胞（例えば、昆虫細胞）の集団をインキュベートするステップであって、Repタンパク質の存在下では、宿主細胞内のceDNAベクターの産生を誘導するために効果的な条件下、かつそのために十分な時間にわたってウイルスカプシドコード配列を欠いており、宿主細胞が、ウイルスカプシドコード配列を含まない、インキュベートするステップと、b) ceDNAベクターを宿主細胞から採取し、単離するステップと、を含むプロセスによって取得され得る。Repタンパク質の存在は、修飾型ITRを有するベクターポリヌクレ

オチドの複製を誘導して、宿主細胞中で c e D N A ベクターを産生する。しかしながら、ウイルス粒子（例えば、A A V ビリオン）は発現されない。したがって、A A V または他のウイルス系ベクターにおいて天然に課されるものなどのサイズ制限はない。

【0397】

宿主細胞から単離された c e D N A ベクターの存在は、宿主細胞から単離された D N A を c e D N A ベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、および消化された D N A 材料を非変性ゲル上で分析して、直鎖状で非連続的な D N A と比較して特徴的な直鎖状で連続的な D N A のバンドの存在を確認することによって確認され得る。

【0398】

さらに別の態様では、本発明は、例えば、L e e , L . e t a l . (2 0 1 3) P l o s O n e 8 (8) : e 6 9 8 7 9 に記載されるように、非ウイルス D N A ベクターの産生において、D N A ベクターポリヌクレオチド発現テンプレート（c e D N A テンプレート）をそれら自体のゲノムに安定して組み込んでいる宿主細胞株の使用を提供する。好ましくは、R e p は、約 3 の M O I で宿主細胞に付加される。宿主細胞株が哺乳類細胞株、例えば、H E K 2 9 3 細胞である場合、細胞株は、安定して組み込まれたポリヌクレオチドベクターテンプレートを有し得、ヘルペスウイルスなどの第 2 のベクターを使用して、R e p タンパク質を細胞に導入することができ、R e p およびヘルパーウイルスの存在下での c e D N A の切除および増幅を可能にする。

【0399】

一実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターを作製するために使用される宿主細胞は、昆虫細胞であり、バキュロウイルスは、R e p タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、例えば図 4 A ~ 4 C および実施例 1 に記載される、c e D N A の非ウイルス性 D N A ベクターポリヌクレオチド発現構築物テンプレートとを両方送達するために使用される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、R e p タンパク質を発現するために操作される。

【0400】

次いで、c e D N A ベクターは、宿主細胞から採取され、単離される。本明細書に記載される c e D N A ベクターを細胞から採取するための時間は、c e D N A ベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存性、細胞形態論、細胞増殖等を考慮して選択され得る。一実施形態では、細胞は、十分な条件下で増殖し、c e D N A ベクターを産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の対部分がバキュロウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取される。D N A - ベクターは、Q i a g e n E n d o - F r e e プラスミドキットなどのプラスミド精製キットを使用して単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、D N A - ベクターに対して適合され得る。一般に、任意の核酸精製方法が採用され得る。

【0401】

D N A ベクターは、D N A の精製のための当業者に既知の任意の手段によって精製され得る。一実施形態では、c e D N A ベクターは、D N A 分子として精製される。別の実施形態では、c e D N A ベクターは、エキソソームまたは微粒子として精製される。

【0402】

c e D N A ベクターの存在は、細胞から単離されたベクター D N A を D N A ベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、ならびにゲル電気泳動を使用し、消化された D N A 材料および未消化の D N A 材料の両方を分析して、直鎖状で非連続的な D N A と比較して特徴的な直鎖状で連続的な D N A の存在を確認することによって確認され得る。図 4 C および F I G . 4 D は、本明細書におけるプロセスによって産生された閉端 c e D N A ベクターの存在を特定するための一実施形態を示す。

【0403】

B. c e D N A プラスミド

c e D N A - プラスミドは、c e D N A ベクターの後期産生に使用されるプラスミドで

ある。いくつかの実施形態では、c e D N A－プラスミドは、転写方向の操作可能に連結された構成成分として、少なくとも（１）5' I T R配列、（２）シス調節エレメントを含有する発現カセット、例えば、プロモーター、誘導性プロモーター、調節スイッチ、エンハンサー等、および（３）修飾型3' I T R配列（3' I T R配列は、5' I T R配列に対して非対称である）を提供する既知の技法を使用して構築され得る。いくつかの実施形態では、I T Rによって隣接された発現カセットは、外因性配列を導入するためのクローニング部位を含む。発現カセットは、A A Vゲノムのr e pおよびc a pコード領域を置き換える。

【0404】

一態様では、c e D N Aベクターは、本明細書では、第1のアデノ関連ウイルス（A A V）逆位末端反復（I T R）、導入遺伝子を含む発現カセット、および突然変異型または修飾型A A V I T Rをこの順序でコードする「c e D N A－プラスミド」と参照されるプラスミドから取得され、当該c e D N A－プラスミドは、A A Vカプシドタンパク質コード配列を欠いている。代替実施形態では、c e D N A－プラスミドは、第1の（または5'）修飾型または突然変異型A A V I T R、導入遺伝子を含む発現カセット、および第2の（または3'）修飾型A A V I T Rをこの順序でコードし、当該c e D N A－プラスミドは、A A Vカプシドタンパク質コード配列を欠いており、5'および3' I T Rは、互いに対して対称である。代替実施形態では、c e D N A－プラスミドは、第1の（または5'）修飾型または突然変異型A A V I T R、導入遺伝子を含む発現カセット、および第2の（または3'）突然変異型または修飾型A A V I T Rをこの順序でコードし、当該c e D N A－プラスミドは、A A Vカプシドタンパク質コード配列を欠いており、5'および3'修飾型I T Rは、同じ修飾を有する（すなわち、それらは互いに対して逆相補または対称である）。

【0405】

さらなる実施形態では、c e D N A－プラスミド系は、ウイルスカプシドタンパク質コード配列を欠いている（すなわち、A A Vカプシド遺伝子だけでなく、他のウイルスのカプシド遺伝子も欠いている）。追加として、特定の実施形態では、c e D N A－プラスミドはまた、A A V R e pタンパク質コード配列を欠いている。したがって、好ましい実施形態では、c e D N A－プラスミドは、機能的A A V c a pおよびA A V r e p遺伝子（A A V 2の場合G G－3'）に加えて、ヘアピン形成を可能にする可変パルンドローム配列を欠いている。

【0406】

本発明のc e D N A－プラスミドは、当該技術分野において周知の任意のA A V血清型のゲノムの天然ヌクレオチド配列を使用して生成され得る。一実施形態では、c e D N A－プラスミド骨格は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 5、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V r h 8、A A V r h 10、A A V－D J、およびA A V－D J 8ゲノムに由来する。例えば、N C B I：N C 0 0 2 0 7 7、N C 0 0 1 4 0 1、N C 0 0 1 7 2 9、N C 0 0 1 8 2 9、N C 0 0 6 1 5 2、N C 0 0 6 2 6 0、N C 0 0 6 2 6 1、S p r i n g e rによって維持されるU R Lで入手可能なK o t i n and S m i t h, T h e S p r i n g e r I n d e x of V i r u s e s (wwwウェブアドレス：o e s y s . s p r i n g e r . d e / v i r u s e s / d a t a b a s e / m k c h a p t e r . a s p ? v i r I D = 4 2 . 0 4)（注記－U R Lまたはデータベースに対する参照は、本出願の有効な出願日現在のU R Lまたはデータベースの内容を指す）。特定の実施形態では、c e D N A－プラスミド骨格は、A A V 2ゲノムに由来する。別の特定の実施形態では、c e D N A－プラスミド骨格は、これらのA A Vゲノムのうちの1つに由来する5'および3' I T Rに含まれるように遺伝子操作された合成骨格である。

【0407】

c e D N A－プラスミドは、c e D N Aベクター産生細胞株の確立における使用のための選択可能または選択マーカーを任意に含み得る。一実施形態では、選択マーカーは、3

10

20

30

40

50

’ I T R 配列の下流（すなわち、3’）に挿入され得る。別の実施形態では、選択マーカ－は、5’ I T R 配列の上流（すなわち、5’）に挿入され得る。適切な選択マーカ－は、例えば、薬物耐性を付与するものを含む。選択マーカ－は、例えば、ブラスチシジン S 耐性遺伝子、カナマイシン、ゲネチシン等であり得る。好ましい実施形態では、薬物選択マーカ－は、ブラスチシジン S 耐性遺伝子である。

【0408】

例示的な c e D N A（例えば、r A A V 0）は、r A A V プラスミドから産生される。r A A V ベクターの産生のための方法は、（a）宿主細胞に上記のような r A A V プラスミドを提供することであって、宿主細胞およびプラスミドの両方が、カプシドタンパク質コード遺伝子を描いている、提供することと、（b）c e D N A ゲノムの産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することと、（c）細胞を採取し、当該細胞から産生された A A V ゲノムを単離することと、を含み得る。

10

【0409】

C. c e D N A プラスミドから c e D N A ベクターを作製する例示的な方法

カプシド不含 c e D N A ベクターを作製するための方法、特にインビボ実験に十分なベクターを提供するために十分に高い収率を有する方法もまた、本明細書に提供される。

【0410】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの産生方法は、（1）発現カセットおよび2つの対称 I T R 配列を含む核酸構築物を宿主細胞（例えば、S f 9 細胞）中に導入するステップと、（2）任意に、例えば、プラスミド上に存在する選択マーカ－を使用することによってクローン細胞株を確立するステップと、（3）R e p コード遺伝子を（当該遺伝子を担持するバキュロウイルスでのトランスフェクションまたは感染のいずれかによって）前述の昆虫細胞中に導入するステップと、（4）細胞を採取し、c e D N A ベクターを精製するステップと、を含む。c e D N A ベクターの産生のために上記の発現カセットおよび2つの I T R 配列を含む核酸構築物は、c e D N A プラスミド、または下記のように c e D N A プラスミドで生成されたバクミドもしくはバキュロウイルスの形態であり得る。核酸構築物は、トランスフェクション、ウイルス形質導入、安定した組み込み、または当該技術分野において既知の他の方法によって宿主細胞中に導入され得る。

20

【0411】

D. 細胞株：

c e D N A ベクターの産生において使用される宿主細胞株は、S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a（S f 9、S f 2 1 など）もしくは T r i c h o p l u s i a n i 細胞に由来する昆虫細胞株、または他の無脊椎動物、脊椎動物、もしくは哺乳類細胞を含む他の真核細胞株を含み得る。熟練者に既知の他の細胞株、例えば、H E K 2 9 3、H u h - 7、H e L a、H e p G 2、H e p l A、9 1 1、C H O、C O S、M e W o、N I H 3 T 3、A 5 4 9、H T 1 1 8 0、単球、ならびに成熟および未成熟樹状細胞を使用することもできる。宿主細胞株は、高収率の c e D N A ベクター産生のために、c e D N A プラスミドの安定した発現のためにトランスフェクトされ得る。

30

【0412】

C e D N A プラスミドは、当該技術分野において既知の試薬（例えば、リボソーム、リン酸カルシウム）または物理的手段（例えば、電気穿孔）を使用し、一時的なトランスフェクションによって S f 9 細胞中に導入され得る。代替として、c e D N A プラスミドをそれらのゲノム中に安定して組み込んでいる安定した S f 9 細胞株が確立され得る。そのような安定した細胞株は、選択マーカ－を上記の c e D N A プラスミド中に組み込むことによって確立され得る。細胞株をトランスフェクトするために使用される c e D N A プラスミドが、抗生物質などの選択マーカ－を含む場合、c e D N A プラスミドでトランスフェクトされ、c e D N A プラスミド D N A をそれらのゲノム中に組み込んでいる細胞は、細胞増殖培地への抗生物質の添加によって選択され得る。次いで、細胞の耐性クローンは、単一細胞希釈またはコロニー移動技法によって単離され、伝播され得る。

40

【0413】

50

E. c e D N A ベクターを単離し、精製する

遺伝子編集のために c e D N A ベクターを入手し、単離するためのプロセスの例は、図 4 A ~ 4 E および下記の特典の実施例に記載されている。本明細書に開示される c e D N A ベクターは、A A V R e p タンパク質（複数可）を発現するプロデューサー細胞から取得され、c e D N A プラスミド、c e D N A バクミド、または c e D N A バキュロウイルスでさらに形質転換され得る。c e D N A ベクターの産生に有用なプラスミドとしては、図 6 A（R e p B I I C 産生に有用な）、図 6 B（c e D N A ベクターを取得するために使用されるプラスミド）に示されるプラスミドが挙げられる。

【0414】

一態様では、ポリヌクレオチドは、プラスミド（R e p プラスミド）、バクミド（R e p バクミド）、またはバキュロウイルス（R e p バキュロウイルス）中のプロデューサー細胞に送達された A A V R e p タンパク質（R e p 7 8 もしくは 6 8）をコードする。R e p プラスミド、R e p バクミド、および R e p バキュロウイルスは、上記の方法によって生成され得る。

【0415】

例示的な c e D N A ベクターである、c e D N A ベクターを産生するための方法は、本明細書に記載されている。本発明の c e D N A ベクターを生成するために使用される発現構築物は、プラスミド（例えば、c e D N A プラスミド）、バクミド（例えば、c e D N A バクミド）、および／またはバキュロウイルス（例えば、c e D N A バキュロウイルス）であり得る。単なる例として、c e D N A ベクターは、c e D N A バキュロウイルスおよび R e p バキュロウイルスに共感染した細胞から生成され得る。R e p バキュロウイルスから産生された R e p タンパク質は、c e D N A バキュロウイルスを複製して、c e D N A ベクターを生成する。代替として、c e D N A ベクターは、R e p プラスミド、R e p バクミド、または R e p バキュロウイルス中で送達される A A V R e p タンパク質（R e p 7 8 / 5 2）をコードする配列を含む構築物で安定してトランスフェクトされた細胞から生成され得る。c e D N A バキュロウイルスは、細胞に一時的にトランスフェクトされ、R e p タンパク質によって複製され、c e D N A ベクターを産生し得る。

【0416】

バクミド（例えば、c e D N A バクミド）は、S f 9、S f 2 1、T n i（T r i c h o p l u s i a n i）細胞、H i g h F i v e 細胞などの許容昆虫細胞中にトランスフェクトされ得、対称 I T R および発現カセットを含む配列を含む組み換えバキュロウイルスである、c e D N A バキュロウイルスを生成し得る。c e D N A バキュロウイルスを昆虫細胞中に再度感染させて、次世代の組み換えバキュロウイルスを取得することができる。任意に、このステップを一回または複数回繰り返して、より多い量の組み換えバキュロウイルスを産生することができる。

【0417】

本明細書に記載される c e D N A ベクターを細胞から採取するための時間は、c e D N A ベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存性、細胞形態論、細胞増殖等を考慮して選択され得る。通常、細胞は、c e D N A ベクター（例えば、c e D N A ベクター）を産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の対部分がウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取され得る。c e D N A ベクターは、Q i a g e n E N D O - F R E E P L A S M I D（登録商標）キットなどのプラスミド精製キットを使用して、S f 9 細胞から単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、c e D N A ベクターに対して適合され得る。一般に、任意の当該技術分野において既知の核酸精製方法、ならびに市販の D N A 抽出キットが採用され得る。

【0418】

代替として、細胞ペレットをアルカリ溶解プロセスに供し、得られた溶解物を遠心分離し、クロマトグラフィー分離を実施することによって、精製が実装され得る。1 つの非限

10

20

30

40

50

定例として、このプロセスは、核酸を保持するイオン交換カラム（例えば、SARTOB IND Q（登録商標））上に上澄を負荷し、次いで溶出し（例えば、1.2M NaCl 溶液で）、ゲル濾過カラム（例えば、6 高速流GE）上でさらなるクロマトグラフィー精製を実施することによって実施され得る。次いで、カプシド不含AAVベクターは、例えば、沈殿によって回収される。

【0419】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターはまた、エキソソームまたは微粒子の形態で精製され得る。多くの細胞型が、膜微小胞の脱落を介して、可溶性タンパク質だけでなく、複合タンパク質／核酸カーゴも放出することは、当該技術分野において既知である（Cocucci et al, 2009、EP10306226.1）。そのような小胞は、微小胞（微粒子とも称される）およびエキソソーム（ナノ小胞とも称される）を含み、それらの両方が、タンパク質およびRNAをカーゴとして含む。微小胞は、形質膜の直接出芽から生成され、エキソソームは、多小胞エンドソームと形質膜との融合時に細胞外環境に放出される。したがって、ceDNAベクターを含有する微小胞および／またはエキソソームは、ceDNAプラスミド、またはceDNAプラスミドで生成されたバクミドもしくはバキュロウイルスで形質導入された細胞から単離され得る。

【0420】

微小胞は、培養培地を20,000xgでの濾過または超遠心分離、および100,000xgでのエキソソームにかけることによって単離され得る。超遠心分離の最適な期間は、実験的に決定することができ、小胞が単離される特定の細胞型に依存する。好ましくは、培養培地は、最初に低速遠心分離（例えば、2000xgで5～20分間）によって一掃され、例えば、AMICON（登録商標）スピナラム（Millipore, Watford, UK）を使用し、スピナ濃度に供される。微小胞およびエキソソームは、微小胞およびエキソソーム上に存在する特定の表面抗原を認識する特定の抗体を使用することによって、FACSまたはMACSを介してさらに精製され得る。他の微小胞およびエキソソーム精製方法としては、免疫沈殿、親和性クロマトグラフィー、濾過、および特定の抗体またはアプタマーでコーティングされた磁気ビーズが挙げられるが、これらに限定されない。精製時に、小胞を、例えば、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。ceDNA含有小胞を送達するために微小胞またはエキソソームを使用する1つの利点は、これらの小胞が、それぞれの細胞型上の特定の受容体によって認識されるそれらの膜タンパク質上に含めることによって、様々な細胞型に標的化され得ることである。（EP10306226も参照）

【0421】

本明細書における本発明の別の態様は、ceDNA構築物をそれら自体のゲノム中に安定して組み込んでいる宿主細胞株からceDNAベクターを精製する方法に関する。一実施形態では、ceDNAベクターは、DNA分子として精製される。別の実施形態では、ceDNAベクターは、エキソソームまたは微粒子として精製される。

【0422】

PCT/US18/49996の図5は、実施例に記載される方法を使用して、複数のceDNAプラスミド構築物からceDNAの産生を確認するゲルを示す。ceDNAは、実施例の図4Dに関して考察されるように、ゲル中の特徴的なバンドパターンによって確認される。

【0423】

VIII. 薬学的組成物

別の態様では、薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は、本明細書に開示される遺伝子編集のためのceDNAベクター、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む。

【0424】

本明細書に開示される遺伝子編集DNAベクターは、対象の細胞、組織、または器官へのインビボ送達のために対象に投与するのに好適な薬学的組成物に組み込まれ得る。典型

的に、薬学的組成物は、本明細書に開示される c e D N A ベクターおよび薬学的に許容される担体を含む。例えば、本明細書に記載される c e D N A ベクターは、治療的投与（例えば、非経口投与）の所望の経路に好適な薬学的組成物に組み込まれ得る。高圧静脈内または動脈内注射を介した受動組織形質導入、ならびに細胞内注入、例えば、核内微量注入もしくは細胞質内注入もまた企図される。治療目的のための薬学的組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高 c e D N A ベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌注射液は、必要に応じて、上記に列挙した成分の 1 つまたは組み合わせとともに、適切なバッファーに必要な量の c e D N A ベクター化合物を組み込んだ後、c e D N A ベクターを含む濾過滅菌によって調製することができ、核酸中の導入遺伝子をレシピエントの細胞に送達するように製剤化して、その中の導入遺伝子またはドナー配列の治療的発現をもたらし得る。この組成物はまた、薬学的に許容される担体を含み得る。

10

【0425】

c e D N A ベクターを含む薬学的に活性な組成物は、細胞、例えば、対象の細胞に、様々な目的のための導入遺伝子またはドナー配列を送達するように製剤化され得る。

【0426】

治療目的のための薬学的組成物は、典型的に、無菌であり、製造および貯蔵の条件下で安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高 c e D N A ベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌の注入可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量の c e D N A ベクター化合物を、上記で列挙した成分のうちの 1 つまたは組み合わせに組み込み、濾過滅菌することによって調製され得る。

20

【0427】

本明細書に開示される c e D N A ベクターは、局所、全身、羊膜内、くも膜下腔内、頭蓋内、動脈内、静脈内、リンパ内、腹腔内、皮下、気管、組織内（例えば、筋肉内、心臓内）、肝内、腎臓内、脳内）、くも膜下腔内、膀胱内、結膜（例えば、眼窩外、眼窩内、眼窩後、網膜内、網膜下、脈絡膜、脈絡膜下、間質内、房内、および硝子体内）、蝸牛内、ならびに粘膜（例えば、経口、直腸、経鼻）投与に適した薬学的組成物に組み込むことができる。高圧静脈内または動脈内注射を介した受動組織形質導入、ならびに細胞内注入、例えば、核内微量注入もしくは細胞質内注入もまた企図される。

30

【0428】

治療目的のための薬学的組成物は、典型的に、無菌であり、製造および貯蔵の条件下で安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高 c e D N A ベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌の注入可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量の c e D N A ベクター化合物を、上記で列挙した成分のうちの 1 つまたは組み合わせに組み込み、濾過滅菌することによって調製され得る。

【0429】

いくつかの態様では、本明細書で提供される方法は、本明細書に開示される遺伝子編集のための 1 つ以上の c e D N A ベクターを宿主細胞に送達することを含む。本明細書ではまた、そのような方法によって産生される細胞、およびそのような細胞を含むかまたはそのような細胞から産生される生物（動物、植物、または真菌など）も提供される。核酸の送達方法には、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸複合体、裸の D N A、および D N A での薬剤強化取り込みが含まれ得る。リポフェクションは、例えば、米国特許第 5, 0 4 9, 3 8 6 号、同第 4, 9 4 6, 7 8 7 号、および同第 4, 8 9 7, 3 5 5 号に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Transfectam（商標）およびLipofectin（商標））。送達は、細胞（例えば、インビトロもしくはエクスピボ投与）または標的組織（例えば、インビボ投与）に対するものであり得る。

40

50

【0430】

核酸を細胞に送達するための様々な技法および方法が、当該技術分野において既知である。例えば、ceDNAなどの核酸は、脂質ナノ粒子(LNP)、リポドイド、リボソーム、脂質ナノ粒子、リポプレックス、またはコアシェルナノ粒子中に製剤化され得る。典型的に、LNPは、核酸(例えば、ceDNA)分子、1つ以上のイオン化またはカチオン性脂質(もしくはそれらの塩)、1つ以上の非イオン性または中性脂質(例えば、リン脂質)、凝集を防ぐ分子(例えば、PEGもしくはPEG-脂質複合体)、および任意にステロール(例えば、コレステロール)で構成される。

【0431】

ceDNAなどの核酸を細胞に送達するための別の方法は、細胞によって内在化されるリガンドと核酸を複合することによるものである。例えば、リガンドは、細胞表面上の受容体に結合し、エンドサイトーシスを介して内在化され得る。リガンドは、核酸中のヌクレオチドに共有結合され得る。核酸を細胞中に送達するための例示的な複合体は、例えば、WO2015/006740、WO2014/025805、WO2012/037254、WO2009/082606、WO2009/073809、WO2009/018332、WO2006/112872、WO2004/090108、WO2004/091515、およびWO2017/177326に記載されている。

【0432】

ceDNAなどの核酸はまた、トランスフェクションによって細胞に送達され得る。有用なトランスフェクション方法としては、脂質媒介性トランスフェクション、カチオン性ポリマー媒介性トランスフェクション、またはリン酸カルシウム沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。トランスフェクション試薬は、当該技術分野において周知であり、TurboFectトランスフェクション試薬(Thermo Fisher Scientific)、Pro-Ject試薬(Thermo Fisher Scientific)、TRANSPASS(商標)タンパク質トランスフェクション試薬(New England Biolabs)、CHARIOT(商標)タンパク質送達試薬(Active Motif)、PROTEOJUICE(商標)タンパク質トランスフェクション試薬(EMD Millipore)、293フェクチン、LIPOFECTAMINE(商標)2000、LIPOFECTAMINE(商標)3000(Thermo Fisher Scientific)、LIPOFECTAMINE(商標)(Thermo Fisher Scientific)、LIPOFECTIN(商標)(Thermo Fisher Scientific)、DMRIE-C、CELLFECTIN(商標)(Thermo Fisher Scientific)、OLIGOFECTAMINE(商標)(Thermo Fisher Scientific)、LIPOFECTACE(商標)、FUGENE(商標)(Roche, Basel, Switzerland)、FUGENE(商標)HD(Roche)、TRANSFECTAM(商標)(Transfectam, Promega, Madison, Wis.)、TFX-10(商標)(Promega)、TFX-20(商標)(Promega)、TFX-50(商標)(Promega)、TRANSFECTIN(商標)(BioRad, Hercules, Calif.)、SILENTFECT(商標)(BioRad)、Effectene(商標)(Qiagen, Valencia, Calif.)、DC-chol(Avanti Polar Lipids)、GENEPORTER(商標)(Gene Therapy Systems, San Diego, Calif.)、DHARMAFECT 1(商標)(Dharmacon, Lafayette, Colo.)、DHARMAFECT 2(商標)(Dharmacon)、DHARMAFECT 3(商標)(Dharmacon)、DHARMAFECT 4(商標)(Dharmacon)、ESCORT(商標)III(Sigma, St. Louis, Mo.)、およびESCORT(商標)IV(Sigma Chemical Co.)が挙げられるが、これらに限定されない。ceDNAなどの核酸もまた、当業者に既知のマイクロフルイディクス方法を介して細胞に送達され得る。

10

20

30

40

50

【0433】

インビボまたはエクスビボでの核酸の非ウイルス性送達の方法としては、電気穿孔、リポフェクション（米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、ならびにTransfectam（商標）およびLipofectin（商標）などの市販試薬）、マイクロインジェクション、微粒子銃、ビロソーム、リボソーム（例えば、Crystal, Science 270:404-410 (1995)、Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995)、Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994)、Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994)、Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995)、Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992)、米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,774,085号、同第4,837,028号、および同第4,946,787号）、イムノリボソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸複合体、裸のDNA、ならびにDNAの薬剤により強化された取り込みが挙げられる。例えば、Sonitron 2000システム（Rich-Mar）を使用するソノポレーションもまた、核酸の送達のために使用され得る。

10

【0434】

本明細書に記載されるceDNAベクターはまた、インビボでの細胞の形質導入のために生物に直接投与され得る。投与は、分子を血液または組織細胞と最終的に接触させるために通常使用される経路のうちのいずれかによるものであり、注入、注射、局所適用、および電気穿孔が挙げられるが、これらに限定されない。そのような核酸を投与する好適な方法は、当業者によって使用可能かつ周知であり、特定の組成物を投与するために2つ以上の経路が使用され得るが、特定の経路は、多くの場合、別の経路よりも即時であり、効果的な反応をもたらし得る。

20

【0435】

核酸ベクターの導入のための方法

本明細書に開示されるceDNAベクターは、例えば米国特許第5,928,638号に記載される方法によって、例えば造血幹細胞中に送達され得る。

30

【0436】

本発明によるceDNAベクターは、対象中の細胞または標的器官への送達のためにリボソームに付加され得る。リボソームは、少なくとも1つの脂質二層を有する小胞である。リボソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療剤送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物または活性製剤成分（API）を送達する。そのような送達のためのリボソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。

【0437】

いくつかの態様では、本開示は、免疫原性／抗原性を低減し、化合物（複数可）に対する親水性および疎水性を提供し、投与頻度を低減することができる、ポリエチレングリコール（PEG）官能基を有する1つ以上の化合物（いわゆる「PEG化化合物」）を含む、リボソーム製剤を提供する。または、リボソーム製剤は、単にポリエチレングリコール（PEG）ポリマーを追加の構成成分として含む。そのような態様では、PEGまたはPEG官能基の分子量は、62Da～約5,000Daであり得る。

40

【0438】

いくつかの態様では、本開示は、延長放出または制御放出プロファイルを有するAPIを、数時間～数週間の期間にわたって送達するリボソーム製剤を提供する。いくつかの関連態様では、リボソーム製剤は、脂質二層によって結合される水性チャンバを含み得る。他の関連態様では、リボソーム製剤は、数時間～数週間の期間にわたってAPIを放出す

50

る、高温で物理的移行を経る構成成分を有する A P I を封入する。

【0439】

いくつかの態様では、リボソーム製剤は、スフィンゴミエリンおよび本明細書に開示される1つ以上の脂質を含む。いくつかの態様では、リボソーム製剤は、O p t i s o m e を含む。

【0440】

いくつかの態様では、本開示は、N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000）-1，2-ジステアロイル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、（ジステアロイル-s n-グリセロール-ホスホエタノールアミン）、M P E G（メトキシポリエチレングリコール）複合脂質、H S P C（水素化ダイズホスファチジルコリン）；P E G（ポリエチレングリコール）；D S P E（ジステアロイル-s n-グリセロール-ホスホエタノールアミン）；D S P C（ジステアロイルホスファチジルコリン）；D O P C（ジオレオイルホスファチジルコリン）；D P P G（ジパルミトイルホスファチジルグリセロール）；E P C（卵ホスファチジルコリン）；D O P S（ジオレオイルホスファチジルセリン）；P O P C（パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン）；S M（スフィンゴミエリン）；M P E G（メトキシポリエチレングリコール）；D M P C（ジミリストイルホスファチジルコリン）；D M P G（ジミリストイルホスファチジルグリセロール）；D S P G（ジステアロイルホスファチジルグリセロール）；D E P C（ジェルコイルホスファチジルコリン）；D O P E（ジオレオイル-s n-グリセロール-ホスホエタノールアミン）、硫酸コレステリル（C S）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（D P P G）、D O P C（ジオレオイル-s n-グリセロール-ホスファチジルコリン）、またはそれらの任意の組み合わせから選択される1つ以上の脂質を含むリボソーム製剤を提供する。

【0441】

いくつかの態様では、本開示は、リン脂質、コレステロール、およびP E G化脂質を56：38：5のモル比で含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リボソーム製剤の全体脂質含有量は、2～16mg/mLである。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびP E G化脂質を含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびP E G化脂質を、それぞれ3：0.015：2のモル比で含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基、エタノールアミン官能基、およびP E G化脂質を含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基およびコレステロールを含有する脂質を含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、P E G化脂質は、P E G-2000-D S P Eである。いくつかの態様では、本開示は、D P P G、ダイズP C、M P E G-D S P E脂質複合体、およびコレステロールを含むリボソーム製剤を提供する。

【0442】

いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する1つ以上の脂質、およびエタノールアミン官能基を含有する1つ以上の脂質を含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、1つ以上のホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびステロール、例えば、コレステロールを含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リボソーム製剤は、D O P C/D E P C、およびD O P Eを含む。

【0443】

いくつかの態様では、本開示は、1種以上の薬学的賦形剤、例えば、スクロースおよび/またはグリシンをさらに含むリボソーム製剤を提供する。

【0444】

いくつかの態様では、本開示は、単一ラメラ構造または多重ラメラ構造のいずれかであるリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子および/また

10

20

30

40

50

は発泡系粒子を含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、一般的なナノ粒子に対する相対サイズでより大きく、約150～250nmのサイズであるリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リボソーム製剤は、凍結乾燥粉末である。

【0445】

いくつかの態様では、本開示は、リボソームの外側に単離されたceDNAを有する混合物に弱塩基を付加することにより、本明細書に開示または記載されるceDNAベクターで作製され、負荷されたリボソーム製剤を提供する。この付加は、リボソームの外側のpHをおよそ7.3に増加させ、APIをリボソーム中に駆動する。いくつかの態様では、本開示は、リボソームの内側で酸性であるpHを有するリボソーム製剤を提供する。そのような場合、リボソームの内側は、pH4～6.9、より好ましくはpH6.5であり得る。他の態様では、本開示は、リボソーム内薬物安定化技術を使用することにより作製されたリボソーム製剤を提供する。そのような場合、ポリマーまたは非ポリマー高電荷アニオンおよびリボソーム内捕捉剤、例えばポリリン酸塩またはオクタ硫酸スクロースが利用される。

10

【0446】

他の態様では、本開示は、リン脂質、レシチン、ホスファチジルコリン、およびホスファチジルエタノールアミンを含むリボソーム製剤を提供する。

【0447】

例えば、リボソーム、ナノカプセル、微粒子、微小球、脂質粒子、小胞等の送達試薬は、好適な宿主細胞中への本開示の組成物の導入のために使用され得る。特に核酸は、送達のために製剤化され得るか、または脂質粒子、リボソーム、小胞、ナノ粒子、金粒子等に封入され得る。そのような製剤は、本明細書に開示される核酸の薬学的に許容される製剤の導入のために好ましい場合がある。

20

【0448】

当該技術分野において既知の様々な送達方法またはそれらの修正を使用して、ceDNAベクターをインビトロまたはインビボで送達することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、機械的、電氣的、超音波、流体力学的、またはレーザー系エネルギーによって細胞膜に一時的な貫通を作製することによって送達され、それにより標的化細胞へのDNA進入が促進される。例えば、ceDNAベクターは、サイズ制限されたチャンネルを通して細胞を圧搾することによるか、または当該技術分野において既知の他の手段によって細胞膜を一時的に崩壊させることにより送達され得る。場合によっては、ceDNAベクターは単独で、裸のDNAとして皮膚、甲状腺、心筋、骨格筋、または肝臓細胞中に直接注入される。

30

【0449】

場合によっては、ceDNAベクターは、遺伝子銃によって送達される。カプシド不含AAVベクターでコーティングされた金またはタングステン球状粒子(1～3μm径)は、加圧ガスによって高速に加速され、標的組織細胞中に貫通することができる。

【0450】

本明細書では、ceDNAベクターおよび薬学的に許容される担体を含む組成物が具体的に企図されている。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、脂質送達系、例えば、本明細書に記載されるリボソームで製剤化される。いくつかの実施形態では、そのような組成物は、熟練した開業医によって望まれる任意の経路によって投与される。組成物は、経口、非経口、舌下、経皮、直腸、経粘膜、局所、吸入を介した、口腔内投与を介した、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、髄腔内、および関節内、またはそれらの組み合わせを含む異なる経路によって対象に投与され得る。獣医学的使用のために、組成物は、通常の獣医学的慣習に従って適切に許容される製剤として投与され得る。獣医師は、特定の動物に最も適切な投与計画および投与経路を容易に決定することができる。組成物は、従来のシリンジ、無針注射デバイス、「マイクロプロジェクトイルボンバードメントガン」、または電気穿孔(「EP」)、「流体力学的方法」、または超音波などの他の物理的方法によって投与することができる。

40

50

【0451】

組成物は、本明細書に記載されるように、インビボ電気穿孔、リボソーム媒介、またはナノ粒子促進を伴うおよび伴わない、DNA注射（DNAワクチン接種とも呼ばれる）を含むいくつかの技術によって対象に送達され得る。

【0452】

いくつかの実施形態では、電気穿孔を使用して、ceDNAベクターを送達する。電気穿孔は、組織への電極対の挿入によって細胞膜標的細胞組織の一時的な不安定化を引き起こし、それにより不安定化した膜の周囲媒質中のDNA分子は、細胞の細胞質および核質中に貫通することができる。電気穿孔は、皮膚、肺、および筋肉などの多くの組織型にインビボで使用されている。

10

【0453】

場合によっては、ceDNAベクターは、内臓および肢全体の骨格筋への、任意の水溶性化合物および粒子の直接細胞内送達のための単純かつ非常に効率的な方法である流体力学的注入によって送達される。

【0454】

場合によっては、ceDNAベクターは、膜中にナノスコピック孔を作製することにより、超音波によって送達され、内臓または腫瘍の細胞へのDNA粒子の細胞内送達を促進するため、プラスミドDNAのサイズおよび濃度は、この系の効率性において大きな役割を果たす。場合によっては、ceDNAベクターは、磁場を使用することによってマグネットフェクションにより送達され、核酸を含有する粒子を標的細胞中に濃縮する。

20

【0455】

場合によっては、化学送達系は、例えば、カチオン性リボソーム／ミセルまたはカチオン性ポリマーに俗するポリカチオン性ナノマー粒子による負電荷核酸の圧縮を含むナノマー複合体を使用することによって使用され得る。送達方法に使用されるカチオン性脂質としては、一価カチオン性脂質、多価カチオン性脂質、グアニジン含有化合物、コレステロール誘導体化合物、カチオン性ポリマー（例えば、ポリ（エチレンイミン）、ポリーLーリジン、プロタミン、他のカチオン性ポリマー）、および脂質－ポリマーハイブリッドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0456】

A. エキソソーム：

30

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、エキソソームにパッケージ化されることによって送達される。エキソソームは、多胞体と形質膜との融合に続いて、細胞外環境中に放出されるエンドサイトーシス起源の小膜小胞である。それらの表面は、ドナー細胞の細胞膜からの脂質二層からなり、それらは、エキソソームを産生したs細胞からのサイトゾルを含有し、表面上の親細胞からの膜タンパク質を呈する。エキソソームは、上皮細胞、BおよびTリンパ球、マスト細胞（MC）、ならびに樹状細胞（DC）を含む様々な細胞型によって産生される。いくつかの実施形態では、10nm～1μm、20nm～500nm、30nm～250nm、50nm～100nmの直径を有するエキソソームが、使用のために想定される。エキソソームは、それらのドナー細胞を使用するか、または特定の核酸をそれらに導入するかのいずれかによって、標的細胞への送達のために単離され得る。当該技術分野において既知の様々なアプローチを使用して、本発明のカプシド不含AAVベクターを含有するエキソソームを産生することができる。

40

【0457】

B. 微粒子／ナノ粒子：

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、脂質ナノ粒子によって送達される。一般に、脂質ナノ粒子は、例えば、Tam et al. (2013). *Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery*. *Pharmaceutical* 5 (3) : 498–507によって開示されるように、イオン化アミノ脂質（例えば、ヘプタトリアコンター6、

50

9, 28, 31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート、DLin-MC3-DMA、ホスファチジルコリン(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン、DSPC)、コレステロール、およびコート脂質(ポリエチレングリコール-ジミリスツールグリセロール、PEG-DMG)を含む。

【0458】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約10~約1000nmの間の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、300nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約10~約300nmの間の直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、200nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約25~約200nmの間の直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子調製物(例えば、複数の脂質ナノ粒子を含む組成物)は、サイズ分布を有し、平均サイズ(例えば、直径)は、約70nm~約200nmであり、より典型的に、平均サイズは、約100nm以下である。

10

【0459】

当該技術分野において既知の様々な脂質ナノ粒子を使用して、本明細書に開示されるceDNAベクターを送達することができる。例えば、脂質ナノ粒子を使用する様々な送達方法は、米国特許第9,404,127号、同第9,006,417号、および同第9,518,272号に記載される。

【0460】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、金ナノ粒子によって送達される。一般に、核酸は、例えば、Ding et al. (2014). Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. Mol. Ther. 22(6); 1075-1083によって記載されるように、金ナノ粒子に共有結合され得るか、または金ナノ粒子に非共有結合され得る(例えば、電荷-電荷相互作用によって結合される)。いくつかの実施形態では、金ナノ粒子-核酸複合体は、例えば、米国特許第6,812,334号に記載されている方法を使用して産生される。

20

【0461】

C. 複合体

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、複合される(例えば、細胞取り込みを増加させる薬剤に共有結合される)。「細胞取り込みを増加させる薬剤」は、脂質膜を通した核酸の輸送を促進する分子である。例えば、核酸は、親油性化合物(例えば、コレステロール、トコフェロール等)、細胞貫通ペプチド(CPP)(例えば、ペネトラチン、TAT、Syn1B等)、およびポリアミン(例えば、スperlミン)に複合され得る。細胞取り込みを増加させる薬剤のさらなる例は、例えば、Winkler (2013). Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. Ther. Deliv. 4(7); 791-809に開示されている。

30

【0462】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、ポリマー(例えば、ポリマー分子)または葉酸塩分子(例えば、葉酸分子)に複合される。一般に、ポリマーに複合された核酸の送達は、例えば、WO2000/34343およびWO2008/022309に記載されているように、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、例えば、米国特許第8,987,377号によって記載されているように、ポリ(アミド)ポリマーに複合される。いくつかの実施形態では、本開示によって記載される核酸は、米国特許第8,507,455号に記載されているように、葉酸分子に複合される。

40

【0463】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、例えば、米国特許第8,450,467号に記載されているように、炭水化物に複合される。

50

【0464】

D. ナノカプセル

代替として、本明細書に開示される c e D N A ベクターのナノカプセル製剤が使用され得る。ナノカプセルは、一般に、安定かつ再生可能な方法で物質を捕捉することができる。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を避けるために、そのような微細粒子（およそ $0.1\ \mu\text{m}$ のサイズ）は、ポリマーを使用して、インビボで分解され得るように設計されるべきである。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子が、使用のために企図される。

【0465】

E. リポソーム

本発明による c e D N A ベクターは、対象中の細胞または標的器官への送達のためにリポソームに付加され得る。リポソームは、少なくとも 1 つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療剤送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物または活性製剤成分（A P I）を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。

【0466】

リポソームの形成および使用は、一般に、当業者に既知である。改善された血清安定性および循環半減期を有するリポソームが開発された（米国特許第 5, 741, 516 号）。さらに、潜在的な薬物担体としてのリポソームおよびリポソーム様調製物の様々な方法が記載されている（米国特許第 5, 567, 434 号、同第 5, 552, 157 号、同第 5, 565, 213 号、同第 5, 738, 868 号、および同第 5, 795, 587 号）。

【0467】

リポソームは、通常は他の手順によるトランスフェクションに対して耐性があるいくつかの細胞型とともに良好に使用されている。加えて、リポソームは、ウイルスベースの送達系に典型的な D N A 長さの制約を含まない。リポソームは、遺伝子、薬物、放射線療法剤、ウイルス、転写因子、アロステリックエフェクターを、様々な培養細胞株および動物に導入するために効果的に使用されている。加えて、リポソーム媒介性薬物送達の有効性を調べるいくつかの良好な臨床試験が完了している。

【0468】

リポソームは、水性媒質中に分散されるリン脂質から形成され、同時に多重ラメラ同心円二層小胞（多重ラメラ小胞（M L V）とも呼ばれる）を形成する。M L V は、一般に、 $25\ \text{nm} \sim 4\ \mu\text{m}$ の直径を有する。M L V の音波処理は、コアに水溶液を含有する、 $200 \sim 500\ \text{Å}$ の範囲の直径を有する小さい単一ラメラ小胞（S U V）の形成をもたらす。

【0469】

いくつかの実施形態では、リポソームは、カチオン性脂質を含む。「カチオン性脂質」という用語は、極性ドメインおよび非極性ドメインの両方を有し、生理的 p H またはその付近で正に電荷されることができ、核酸などのポリアニオンに結合し、細胞への核酸の送達を促進する脂質および合成脂質を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、飽和および不飽和アルキル、およびアミンの脂環式エーテルおよびエステル、またはそれらの誘導体を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、直鎖、分岐鎖アルキル、アルケニル基、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、1 ～ 約 25 個の炭素原子（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 個の炭素原子を含有する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、25 個より多くの炭素原子を含有する。いくつかの実施形態では、直鎖または分岐鎖アルキルまたはアルケン基は、6 個以上の炭素原子を有する。カチオン性脂質はま

10

20

30

40

50

た、いくつかの実施形態では、1つ以上の脂環式基を含み得る。脂環式基の非限定例としては、コレステロールおよび他のステロイド基が挙げられる。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、1つ以上の対イオンで調製される。対イオン（アニオン）の例としては、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 F^- 、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、硫酸塩、亜硝酸塩、および硝酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【0470】

いくつかの態様では、本開示は、免疫原性／抗原性を低減し、化合物（複数可）に対する親水性および疎水性を提供し、投与頻度を低減することができる、ポリエチレングリコール（PEG）官能基を有する1つ以上の化合物（いわゆる「PEG化化合物」）を含む、リポソーム製剤を提供する。または、リポソーム製剤は、単にポリエチレングリコール（PEG）ポリマーを追加の構成成分として含む。そのような態様では、PEGまたはPEG官能基の分子量は、62 Da～約5,000 Daであり得る。

10

【0471】

いくつかの態様では、本開示は、延長放出または制御放出プロファイルを有するAPIを、数時間～数週間の期間にわたって送達するリポソーム製剤を提供する。いくつかの関連態様では、リポソーム製剤は、脂質二層によって結合される水性チャンバを含み得る。他の関連態様では、リポソーム製剤は、数時間～数週間の期間にわたってAPIを放出する、高温で物理的移行を経る構成成分を有するAPIを封入する。

【0472】

いくつかの態様では、リポソーム製剤は、スフィンゴミエリンおよび本明細書に開示される1つ以上の脂質を含む。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、Optosomeを含む。

20

【0473】

いくつかの態様では、本開示は、N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール2000）-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、（ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン）、MPEG（メトキシポリエチレングリコール）複合脂質、HSPC（水素化ダイズホスファチジルコリン）；PEG（ポリエチレングリコール）；DSPC（ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン）；DSPC（ジステアロイルホスファチジルコリン）；DOPC（ジオレオイルホスファチジルコリン）；DPPG（ジパルミトイルホスファチジルグリセロール）；EPC（卵ホスファチジルコリン）；DOPS（ジオレオイルホスファチジルセリン）；POPC（パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン）；SM（スフィンゴミエリン）；MPEG（メトキシポリエチレングリコール）；DMPC（ジミリスチルホスファチジルコリン）；DMPG（ジミリスチルホスファチジルグリセロール）；DSPG（ジステアロイルホスファチジルグリセロール）；DEPC（ジェルクオイルホスファチジルコリン）；DOPE（ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン）、硫酸コレステリル（CS）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、DOPC（ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン）、またはそれらの任意の組み合わせから選択される1つ以上の脂質を含むリポソーム製剤を提供する。

30

40

【0474】

いくつかの態様では、本開示は、リン脂質、コレステロール、およびPEG化脂質を56：38：5のモル比で含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤の全体脂質含有量は、2～16 mg/mLである。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびPEG化脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびPEG化脂質を、それぞれ3：0.015：2のモル比で含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基、エタノールアミン官能基、およびPEG化脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では

50

、本開示は、ホスファチジルコリン官能基およびコレステロールを含有する脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、PEG化脂質は、PEG-2000-DSPEである。いくつかの態様では、本開示は、DPPG、ダイズPC、MPEG-DSPE脂質複合体、およびコレステロールを含むリポソーム製剤を提供する。

【0475】

いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する1つ以上の脂質、およびエタノールアミン官能基を含有する1つ以上の脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、1つ以上のホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびステロール、例えば、コレステロールを含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、DOPC/DEPC、およびDOPEを含む。

10

【0476】

いくつかの態様では、本開示は、1種以上の薬学的賦形剤、例えば、スクロースおよび/またはグリシンをさらに含むリポソーム製剤を提供する。

【0477】

いくつかの態様では、本開示は、単一ラメラ構造または多重ラメラ構造のいずれかであるリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子および/または発泡系粒子を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、一般的なナノ粒子に対する相対サイズでより大きく、約150~250nmのサイズであるリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、凍結乾燥粉末である。

20

【0478】

いくつかの態様では、本開示は、リポソームの外側に単離されたceDNAを有する混合物に弱塩基を付加することにより、本明細書に開示または記載されるceDNAベクターで作製され、負荷されたリポソーム製剤を提供する。この付加は、リポソームの外側のpHをおよそ7.3に増加させ、APIをリポソーム中に駆動する。いくつかの態様では、本開示は、リポソームの内側で酸性であるpHを有するリポソーム製剤を提供する。そのような場合、リポソームの内側は、pH4~6.9、より好ましくはpH6.5であり得る。他の態様では、本開示は、リポソーム内薬物安定化技術を使用することにより作製されたリポソーム製剤を提供する。そのような場合、ポリマーまたは非ポリマー高電荷アニオンおよびリポソーム内捕捉剤、例えばポリリン酸塩またはオクタ硫酸スクロースが利用される。

30

【0479】

他の態様では、本開示は、リン脂質、レシチン、ホスファチジルコリン、およびホスファチジルエタノールアミンを含むリポソーム製剤を提供する。

【0480】

カチオン性脂質の非限定例としては、ポリエチレンジアミン、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer、リポフェクチン(DOTMAおよびDOPEの組み合わせ)、リポフェクターゼ、LIPOFECTAMINE(商標)(例えば、LIPOFECTAMINE(商標)2000)、DOPE、Cytosfectin(Gilead Sciences, Foster City, Calif.)、およびEufectin(JB L, San Luis Obispo, Calif.)が挙げられる。例示的なカチオン性リポソームは、N-[1-(2,3-ジオレオロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、N-[1-(2,3-ジオレオロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチル硫酸塩(DOTAP)、3β-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)、2,3-ジオレイロキシ-N-[2(スベルミンカルボキシアミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロ酢酸塩(DOSPA)、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウム臭化物、およびジメチルジオクタデシルアンモニウム臭化物(DDAB)から作製され得る。核酸(例えば、CELID)はまた、例えばポリ(L-リジン)またはアビジンと複合

40

50

され得、脂質は、この混合物、例えばステリルポリ（Lーリジン）に含まれ得るか、または含まれない場合がある。

【0481】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、米国特許第 8, 158, 601 号に記載されるカチオン性脂質、または米国特許第 8, 034, 376 号に記載される脂質を使用して送達される。

【0482】

F. 例示的なリポソームおよび脂質ナノ粒子（L N P）組成物

本発明による c e D N A ベクターは、遺伝子編集を必要とする、例えばドナー配列を必要とする細胞への送達のためにリポソームに付加することができる。リポソームは、少なくとも 1 つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療剤送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物または活性製剤成分（A P I）を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。

【0483】

いくつかの態様では、本開示は、免疫原性／抗原性を低減し、化合物（複数可）に対する親水性および疎水性を提供し、投与頻度を低減することができる、ポリエチレングリコール（P E G）官能基を有する 1 つ以上の化合物（いわゆる「P E G 化合物」）を含む、リポソーム製剤を提供する。または、リポソーム製剤は、単にポリエチレングリコール（P E G）ポリマーを追加の構成成分として含む。そのような態様では、P E G または P E G 官能基の分子量は、62 D a ～ 約 5, 000 D a であり得る。

【0484】

いくつかの態様では、本開示は、延長放出または制御放出プロファイルを有する A P I を、数時間～数週間の期間にわたって送達するリポソーム製剤を提供する。いくつかの関連態様では、リポソーム製剤は、脂質二層によって結合される水性チャンバを含み得る。他の関連態様では、リポソーム製剤は、数時間～数週間の期間にわたって A P I を放出する、高温で物理的移行を経る構成成分を有する A P I を封入する。

【0485】

いくつかの態様では、リポソーム製剤は、スフィンゴミエリンおよび本明細書に開示される 1 つ以上の脂質を含む。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、O p t i s o m e を含む。

【0486】

いくつかの態様では、本開示は、Nー（カルボニルーメトキシポリエチレングリコール 2000）ー1, 2ージステアロイルー s nーグリセロールー3ーホスホエタノールアミンナトリウム塩、（ジステアロイルー s nーグリセロールーホスホエタノールアミン）、M P E G（メトキシポリエチレングリコール）複合脂質、H S P C（水素化ダイズホスファチジルコリン）；P E G（ポリエチレングリコール）；D S P E（ジステアロイルー s nーグリセロールーホスホエタノールアミン）；D S P C（ジステアロイルホスファチジルコリン）；D O P C（ジオレオイルホスファチジルコリン）；D P P G（ジパルミトイルホスファチジルグリセロール）；E P C（卵ホスファチジルコリン）；D O P S（ジオレオイルホスファチジルセリン）；P O P C（パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン）；S M（スフィンゴミエリン）；M P E G（メトキシポリエチレングリコール）；D M P C（ジミリストイルホスファチジルコリン）；D M P G（ジミリストイルホスファチジルグリセロール）；D S P G（ジステアロイルホスファチジルグリセロール）；D E P C（ジェルコイルホスファチジルコリン）；D O P E（ジオレオイルー s nーグリセロールーホスホエタノールアミン）、硫酸コレステリル（C S）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（D P P G）、D O P C（ジオレオイルー s nーグリセロールーホスファチジルコリン）、またはそれらの任意の組み合わせから選択される 1 つ以上の脂質を含むリポソーム製剤を提供する。

10

20

30

40

50

【0487】

いくつかの態様では、本開示は、リン脂質、コレステロール、およびPEG化脂質を56：38：5のモル比で含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤の全体脂質含有量は、2～16mg/mLである。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびPEG化脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびPEG化脂質を、それぞれ3：0.015：2のモル比で含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基、エタノールアミン官能基、およびPEG化脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基およびコレステロールを含有する脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、PEG化脂質は、PEG-2000-DSPCである。いくつかの態様では、本開示は、DPPG、ダイズPC、MPEG-DSPE脂質複合体、およびコレステロールを含むリポソーム製剤を提供する。

10

【0488】

いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する1つ以上の脂質、およびエタノールアミン官能基を含有する1つ以上の脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、1つ以上のホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、およびステロール、例えば、コレステロールを含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、DOPC/DEPC、およびDOPEを含む。

20

【0489】

いくつかの態様では、本開示は、1種以上の薬学的賦形剤、例えば、スクロースおよび/またはグリシンをさらに含むリポソーム製剤を提供する。

【0490】

いくつかの態様では、本開示は、本開示は、単一ラメラ構造または多ラメラ構造のいずれかであるリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子および/または発泡系粒子を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、一般的なナノ粒子に対する相対サイズでより大きく、約150～250nmのサイズであるリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、凍結乾燥粉末である。

30

【0491】

いくつかの態様では、本開示は、リポソームの外側に単離されたceDNAを有する混合物に弱塩基を付加することにより、本明細書に開示または記載されるceDNAベクターで作製され、負荷されたリポソーム製剤を提供する。この付加は、リポソームの外側のpHをおよそ7.3に増加させ、APIをリポソーム中に駆動する。いくつかの態様では、本開示は、リポソームの内側で酸性であるpHを有するリポソーム製剤を提供する。そのような場合、リポソームの内側は、pH4～6.9、より好ましくはpH6.5であり得る。他の態様では、本開示は、リポソーム内薬物安定化技術を使用することにより作製されたリポソーム製剤を提供する。そのような場合、ポリマーまたは非ポリマー高電荷アニオンおよびリポソーム内捕捉剤、例えばポリリン酸塩またはオクタ硫酸スクロースが利用される。

40

【0492】

他の態様では、本開示は、リン脂質、レシチン、ホスファチジルコリン、およびホスファチジルエタノールアミンを含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの実施形態では、リポソーム製剤は、以下の表7に記載されている製剤である。

表7：例示的なリポソーム製剤

【表 7 - 1】

組成	p H	組成	p H
MPEG-DSPE (3. 1 9 m g / m L) HSPC (9. 5 8 m g / m L) コレステロール (3. 1 9 m g	6. 5	DSPC (2 8. 1 6 m g / m L) コレステロール (6. 7 2 m g / m L)	4. 9 ~ 6. 0

【表 7 - 2】

／mL)			
DOPC (5.7 mg/mL) コレステロール (4.4 mg/mL) トリオレイン (1.2 mg/mL) DPPG (1.0 mg/mL)	5.5～ 8.5	卵ホスファチジルコリン：コレステロール (55：45モル比) [炭酸ナトリウム緩衝液中の凍結乾燥物から再構成]	7.8
DOPS：POPC (3：7モル比) 1 g 総脂質／バイアル [凍結乾燥物0.9% NaClから再構成]	4.5～ 7.0	スフィンゴミエリン (2.37 mg/mL、73.5 mg/31 mL) コレステロール (0.95 mg/mL、29.5 mg/31 mL) [リン酸ナトリウム溶液中の凍結乾燥物から再構成]	7.2～ 7.6
DSPC (6.81 mg/mL) コレステロール (2.22 mg/mL) MPEG-2000-DSPE (0.12 mg/mL)	6.8～ 7.6	DMPC (3.4 mg/mL) DMPG (1.5 mg/mL) 7：3モル比	5.0～ 7.0
HSPC (17.75 mg/mL、 213 mg/12 mL) コレステロール (4.33 mg/mL、 52 mg/12 mL) DSPG (7.0 mg/mL、 84 mg/12 mL) [滅菌水中の凍結乾燥物から再構成]	5.0～ 6.0	コレステリル硫酸ナトリウム (2.64 mg/mL) [滅菌水中の凍結乾燥物から再構成]	
DMPCおよびEPG (1：8モル比) [滅菌水中の凍結乾燥物から再構成]		DOPC (4.2 mg/mL) コレステロール (3.3 mg/mL) DPPG (0.9 mg/mL) トリカプリリン (0.3 mg/mL) トリオレイン (0.1 mg/mL)	5.0～ 8.0
コレステロール (4.7 mg/mL)	5.8～ 7.4	DOPC：DOPE (75：25モル比)	

10

20

30

40

【表 7-3】

DPPG (0.9 mg/mL)			
トリカプリリン (2.0 mg/mL)			
DEPC (8.2 mg/mL)			

【0493】

いくつかの態様では、本開示は、c e DNA およびイオン化脂質を含む脂質ナノ粒子を提供する。例えば、プロセスにより得られた c e DNA を用いて作製および負荷される脂質ナノ粒子製剤は、2018年9月7日に提出された国際出願 PCT/US 2018/050042 に開示されており、本明細書に組み込まれる。これは、イオン化脂質をプロトン化し、粒子の c e DNA/脂質会合および核形成に好ましいエネルギー論を提供する、低 pH でのエタノール脂質と水性 c e DNA との高エネルギー混合によって達成され得る。粒子は、水性希釈および有機溶媒の除去によってさらに安定化され得る。粒子は、所望のレベルに濃縮され得る。

10

【0494】

一般に、脂質粒子は、約 10 : 1 ~ 30 : 1 の全脂質対 c e DNA (質量または重量) 比で調製される。いくつかの実施形態では、脂質対 c e DNA 比 (質量/質量比、w/w 比) は、約 1 : 1 ~ 約 25 : 1、約 10 : 1 ~ 約 14 : 1、約 3 : 1 ~ 約 15 : 1、約 4 : 1 ~ 約 10 : 1、約 5 : 1 ~ 約 9 : 1、または約 6 : 1 ~ 約 9 : 1 の範囲内であり得る。脂質および c e DNA の量を調整して、所望の N/P 比、例えば 3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれ以上の N/P 比を提供し得る。一般に、脂質粒子製剤の全体脂質含有量は、約 5 mg/mL ~ 約 30 mg/mL の範囲であり得る。

20

【0495】

イオン化脂質は、典型的に、核酸カーゴ、例えば c e DNA を低 pH で凝縮させるため、および膜会合および膜融合性を駆動するために用いられる。一般に、イオン化脂質は、正に電荷される、または例えば pH 6.5 以下の酸性条件下でプロトン化される少なくとも 1 つのアミノ基を含む脂質である。イオン化脂質はまた、本明細書ではカチオン性脂質と称される。

30

【0496】

例示的なイオン化可脂質は、PCT 特許公開第 WO 2015/095340 号、同第 WO 2015/199952 号、同第 WO 2018/011633 号、同第 WO 2017/049245 号、同第 WO 2015/061467 号、同第 WO 2012/040184 号、同第 WO 2012/000104 号、同第 WO 2015/074085 号、同第 WO 2016/081029 号、同第 WO 2017/004143 号、同第 WO 2017/075531 号、同第 WO 2017/117528 号、同第 WO 2011/022460 号、同第 WO 2013/148541 号、同第 WO 2013/116126 号、同第 WO 2011/153120 号、同第 WO 2012/044638 号、同第 WO 2012/054365 号、同第 WO 2011/090965 号、同第 WO 2013/016058 号、同第 WO 2012/162210 号、同第 WO 2008/042973 号、同第 WO 2010/129709 号、同第 WO 2010/144740 号、同第 WO 2012/099755 号、同第 WO 2013/049328 号、同第 WO 2013/086322 号、同第 WO 2013/086373 号、同第 WO 2011/071860 号、同第 WO 2009/132131 号、同第 WO 2010/048536 号、同第 WO 2010/088537 号、同第 WO 2010/054401 号、同第 WO 2010/054406 号、同第 WO 2010/054405 号、同第 WO 2010/054384 号、同第 WO 2012/016184 号、同第 WO 2009/086558 号、同第 WO 2010/042877 号、同第 WO 2011/000106 号、同第 WO 2011/000107 号、同第 WO 2005/120152 号、同第 WO 2011/141705 号、同第 WO 2013/

40

50

126803号、同第WO2006/007712号、同第WO2011/038160号、同第WO2005/121348号、同第WO2011/066651号、同第WO2009/127060号、同第WO2011/141704号、同第WO2006/069782号、同第WO2012/031043号、同第WO2013/006825号、同第WO2013/033563号、同第WO2013/089151号、同第WO2017/099823号、同第WO2015/095346号、および同第WO2013/086354号、ならびに米国特許公開第US2016/0311759号、同第US2015/0376115号、同第US2016/0151284号、同第US2017/0210697号、同第US2015/0140070号、同第US2013/0178541号、同第US2013/0303587号、同第US2015/0141678号、同第US2015/0239926号、同第US2016/0376224号、同第US2017/0119904号、同第US2012/0149894号、同第US2015/0057373号、同第US2013/0090372号、同第US2013/0274523号、同第US2013/0274504号、同第US2013/0274504号、同第US2009/0023673号、同第US2012/0128760号、同第US2010/0324120号、同第US2014/0200257号、同第US2015/0203446号、同第US2018/0005363号、同第US2014/0308304号、同第US2013/0338210号、同第US2012/0101148号、同第US2012/0027796号、同第US2012/0058144号、同第US2013/0323269号、同第US2011/0117125号、同第US2011/0256175号、同第US2012/0202871号、同第US2011/0076335号、同第US2006/0083780号、同第US2013/0123338号、同第US2015/0064242号、同第US2006/0051405号、同第US2013/0065939号、同第US2006/0008910号、同第US2003/0022649号、同第US2010/0130588号、同第US2013/0116307号、同第US2010/0062967号、同第US2013/0202684号、同第US2014/0141070号、同第US2014/0255472号、同第US2014/0039032号、同第US2018/0028664号、同第US2016/0317458号、同第US2013/0195920号に記載されており、これらすべての内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）

10

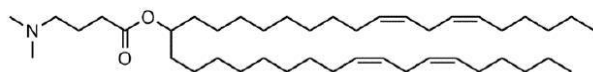
20

30

【0497】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、以下の構造を有するMC3（6Z，9Z，28Z，31Z）-ヘプタトリアコンター6，9，28，31-テトラエン-19-イル-4-（ジメチルアミノ）ブタン酸（DLin-MC3-DMAまたはMC3）である：

【化12】



DLin-M-C3-DMA ("MC3")

40

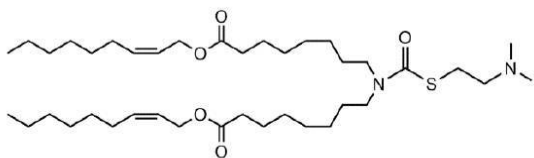
【0498】

脂質DLin-MC3-DMAは、Jayaraman et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. (2012), 51(34):8529-8533に記載されており、この内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0499】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、以下の構造を有する脂質ATX-002である

【化 1 3】



ATX-002

。

【0 5 0 0】

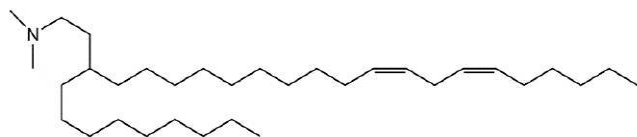
脂質 A T X - 0 0 2 は、W O 2 0 1 5 / 0 7 4 0 8 5（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

10

【0 5 0 1】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、以下の構造を有する（1 3 Z，1 6 Z）- N，N-ジメチル-3-ノニルドコサ-1 3，1 6-ジエン-1-アミン（化合物 3 2）である

【化 1 4】



32

20

。

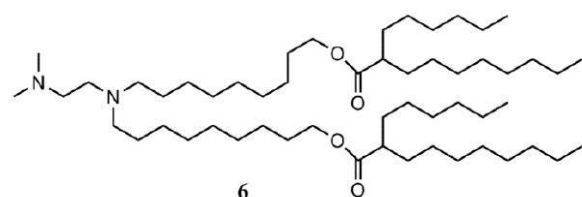
【0 5 0 2】

化合物 3 2 は、W O 2 0 1 2 / 0 4 0 1 8 4（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0 5 0 3】

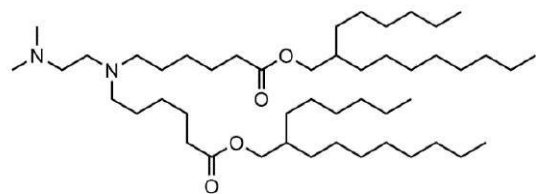
いくつかの実施形態では、イオン化可脂質は、以下の構造を有する化合物 6 または化合物 2 2 である。

【化 1 5】



6

30



22

40

【0 5 0 4】

化合物 6 および 2 2 は、W O 2 0 1 5 / 1 9 9 9 5 2（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0 5 0 5】

無制限に、イオン化脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の 2 0 ~ 9 0 %（m o l）を構成し得る。例えば、イオン化脂質モル含有量は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質

50

の20～70% (mol)、30～60% (mol)、または40～50% (mol)であり得る。いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の約50mol%～約90mol%を含む。

【0506】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、非カチオン性脂質をさらに含み得る。非イオン性脂質としては、両親媒性脂質、中性脂質、およびアニオン性脂質が挙げられる。したがって、非カチオン性脂質は、中性の非電荷、双性イオン性、またはアニオン性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、典型的に、膜融合性を強化するために用いられる。

【0507】

例示的な非カチオン性脂質としては、ジステアロイル-*sn*-グリセロールホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(*N*-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミン (DSPE)、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン (16-O-モノメチルPEなど)、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン (16-O-ジメチルPEなど)、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、水素化ダイズホスファチジルコリン (HSPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジオレオイルホスファチジルセリン (DOPS)、スフィンゴミエリン (SM)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、ジェルコイルホスファチジルコリン (DEPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール (POPG)、ジェライドイル-ホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リソホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン (ESM)、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジカシド、セレブロシド、ジセチルホスフェート、リソホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。他のジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミンリン脂質もまた使用され得ることが理解される。これらの脂質中のアシル基は、好ましくは、C₁₀～C₂₄炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、またはオレオイルである。

【0508】

脂質ナノ粒子中での使用に好適な非カチオン性脂質の他の例としては、例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、パルミチン酸アセチル、リシノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリル系ポリマー、トリエタノールアミン-硫酸ラウリル、アルキル-アリアルサルフェートポリエチルオキシ化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチル臭化アンモニウム、セラミド、スフィンゴミエリン等の非垂リン脂質が挙げられる。

【0509】

いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、リン脂質である。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE、およびSMから選択される。いくつかの好ましい実施形態では、非カチオン性脂質は、DPS Cである。

10

20

30

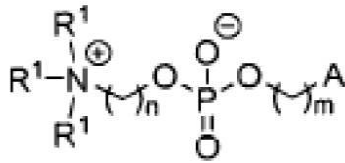
40

50

【0510】

例示的な非カチオン性脂質は、PCT公開第WO2017/099823号および米国特許公開第US2018/0028664号に記載されており、これら両方の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施例では、非カチオン性脂質は、オレイン酸、またはUS2018/0028664（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に定義されている、式（I）

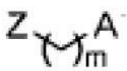
【化16】



10

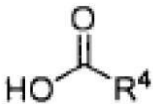
、式（I I）

【化17】



、または式（I V）

【化18】



20

の化合物である。

【0511】

非カチオン性脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の0～30%（mol）を構成し得る。例えば、非カチオン性脂質含有量は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の5～20%（mol）または10～15%（mol）である。様々な実施形態では、イオン化脂質対中性脂質のモル比は、約2：1～約8：1の範囲である。

【0512】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、リン脂質を全く含まない。

30

【0513】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、膜統合性を提供するために、ステロールなどの構成成分をさらに含み得る。

【0514】

脂質ナノ粒子中で使用され得る1つの例示的なステロールは、コレステロールおよびその誘導体である。コレステロール誘導体の非限定例としては、5α-コレスタノール、5β-コプロスタノール、コレステリル-（2'-ヒドロキシ）-エチルエーテル、コレステリル-（4'-ヒドロキシ）-ブチルエーテル、および6-ケトコレスタノールなどの極性類似体、5α-コレスタン、コレステノン、5α-コレスタノン、5β-コレスタノン、およびデカン酸コレステリルなどの非極性類似体、ならびにそれらの混合物が挙げられる。いくつかの実施形態では、コレステロール誘導体は、コレステリル-（4'-ヒドロキシ）-ブチルエーテルなどの極性類似体である。

40

【0515】

例示的なコレステロール誘導体は、PCT公開第WO2009/127060号および米国特許公開第US2010/0130588に記載されており、これら両方の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0516】

ステロールなどの膜統合性を提供する構成成分は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の0～50%（mol）を構成し得る。いくつかの実施形態では、そのような構成成分は、

50

脂質ナノ粒子の全脂質含有量の20～50%（mol）、30～40%（mol）である。

【0517】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（PEG）または複合脂質分子をさらに含み得る。一般に、これらを使用して、脂質ナノ粒子の凝集を阻害し、かつ／または立体安定化を提供する。例示的な複合脂質としては、PEG-脂質複合体、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質複合体、ポリアミド-脂質複合体（ATTA-脂質複合体など）、カチオン性-ポリマー脂質（CPL）複合体、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、複合脂質分子は、PEG-脂質複合体、例えば、（メトキシポリエチレングリコール）-複合脂質である。

10

【0518】

例示的なPEG-脂質複合体としては、PEG-ジアシルグリセロール（DAG）（1-（モノメトキシ-ポリエチレングリコール）-2,3-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG））、PEG-ジアシルオキシプロピル（DAA）、PEG-リン脂質、PEG-セラミド（Cer）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）、PEGコハク酸ジアシルグリセロール（PEG-S-DAG）（4-O-（2',3'-ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル-1-O-（w-メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（PEG-S-DMG））、PEGジアルコキシプロピルカルバム、N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール2000）-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。追加の例示的なPEG-脂質複合体は、例えば、US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224、およびUS2017/0119904に記載されており、それらすべての内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

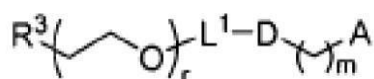
20

【0519】

いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、US2018/0028664（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に定義されている、式（III）

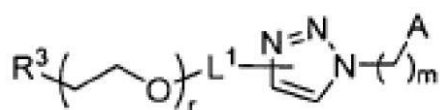
30

【化19】



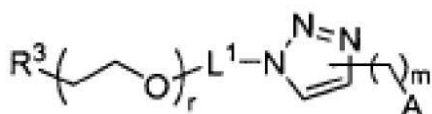
、式（III-a-1）

【化20】



、式（III-a-2）

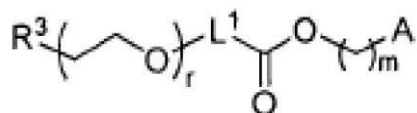
【化21】



、式（III-b-1）

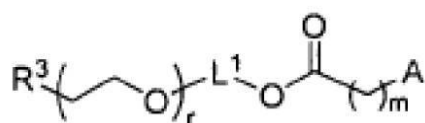
40

【化 2 2】



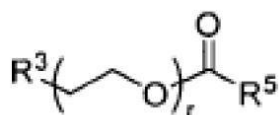
、式 (I I I - b - 2)

【化 2 3】



、または式 (V)

【化 2 4】

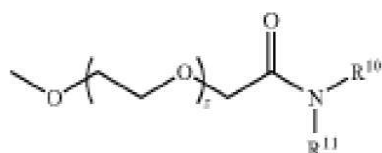


の化合物である。

【 0 5 2 0】

いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、US 2015/0376115 または US 2016/0376224 (それら両方の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる) に定義されている、式 (I I)

【化 2 5】



のである。

【 0 5 2 1】

PEG-DAA 複合体は、例えば、PEG-ジラウリルオキシプロピル、PEG-ジミリスチルオキシプロピル、PEG-ジパルミチルオキシプロピル、またはPEG-ジステアリルオキシプロピルであり得る。PEG-脂質は、PEG-DMG、PEG-ジラウリルグリセロール、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステリルグリセロール、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、PEG-ジステリルグリカミド、PEG-コレステロール (1-[8'-(コレスト-5-エン-3[β]-オキシ)カルボキシアミド-3', 6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[ω]-メチル-ポリ(エチレングリコール)、PEG-DMB (3, 4-ジテトラデコキシルベンジル-[ω]-メチル-ポリ(エチレングリコール)エーテル)、および1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]のうちの1つ以上であり得る。いくつかの実施例では、PEG-脂質は、PEG-DMG、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]、

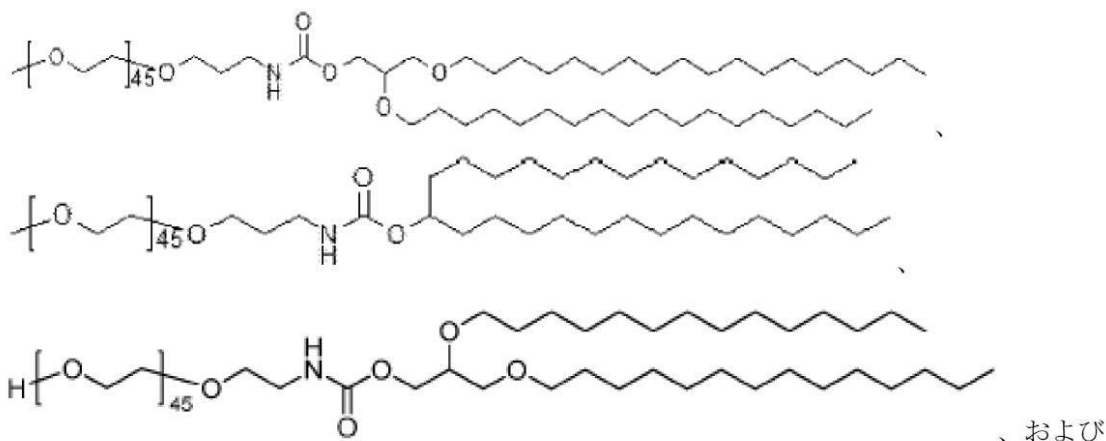
10

20

30

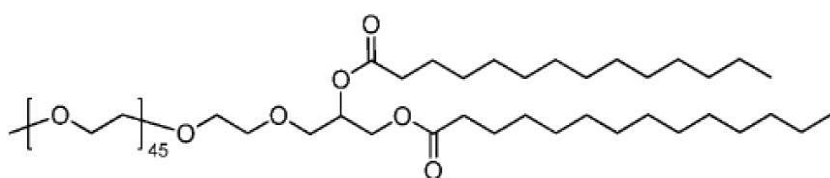
40

【化 2 6】



10

【化 2 7】



20

からなる群から選択され得る。

【0 5 2 2】

P E G 以外の分子と複合した脂質は、P E G - 脂質の代わりに使用することもできる。例えば、ポリオキサゾリン（P O Z）- 脂質複合体、ポリアミド-脂質複合体（A T T A - 脂質複合体など）、およびカチオン性-ポリマー脂質（C P L）複合体を、P E G - 脂質の代わりに、またはそれに加えて使用することができる。

【0 5 2 3】

例示的な複合脂質、すなわち、P E G - 脂質、（P O Z）- 脂質複合体、A T T A - 脂質複合体、およびカチオン性ポリマー-脂質は、P C T 特許出願公開第 W O 1 9 9 6 / 0 1 0 3 9 2 号、同第 W O 1 9 9 8 / 0 5 1 2 7 8 号、同第 W O 2 0 0 2 / 0 8 7 5 4 1 号、同第 W O 2 0 0 5 / 0 2 6 3 7 2 号、同第 W O 2 0 0 8 / 1 4 7 4 3 8 号、同第 W O 2 0 0 9 / 0 8 6 5 5 8 号、同第 W O 2 0 1 2 / 0 0 0 1 0 4 号、同第 W O 2 0 1 7 / 1 1 7 5 2 8 号、同第 W O 2 0 1 7 / 0 9 9 8 2 3 号、同第 W O 2 0 1 5 / 1 9 9 9 5 2 号、同第 W O 2 0 1 7 / 0 0 4 1 4 3 号、同第 W O 2 0 1 5 / 0 9 5 3 4 6 号、同第 W O 2 0 1 2 / 0 0 0 1 0 4 号、同第 W O 2 0 1 2 / 0 0 0 1 0 4 号、および同第 W O 2 0 1 0 / 0 0 6 2 8 2 号、米国特許出願公開第 U S 2 0 0 3 / 0 0 7 7 8 2 9 号、同第 U S 2 0 0 5 / 0 1 7 5 6 8 2 号、同第 U S 2 0 0 8 / 0 0 2 0 0 5 8 号、同第 U S 2 0 1 1 / 0 1 1 7 1 2 5 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 3 0 3 5 8 7 号、同第 U S 2 0 1 8 / 0 0 2 8 6 6 4 号、同第 U S 2 0 1 5 / 0 3 7 6 1 1 5 号、同第 U S 2 0 1 6 / 0 3 7 6 2 2 4 号、同第 U S 2 0 1 6 / 0 3 1 7 4 5 8 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 3 0 3 5 8 7 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 3 0 3 5 8 7 号、および同第 U S 2 0 1 1 0 1 2 3 4 5 3 号、ならびに米国特許第 U S 5, 8 8 5, 6 1 3 号、同第 U S 6, 2 8 7, 5 9 1 号、同第 U S 6, 3 2 0, 0 1 7 号、および同第 U S 6, 5 8 6, 5 5 9 号に記載されており、これらすべての内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0 5 2 4】

P E G または複合脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の 0 ~ 2 0 %（m o l）を構成し得る。いくつかの実施形態では、P E G または複合脂質含有量は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の 0 . 5 ~ 1 0 % または 2 ~ 5 %（m o l）である。

【0 5 2 5】

イオン化脂質、非カチオン性脂質、ステロール、および P E G / 複合脂質のモル比は、必要に応じて変化し得る。例えば、脂質粒子は、組成物のモルまたは全重量で 3 0 ~ 7 0

50

%のイオン化脂質、組成物のモルまたは全重量で0～60%のコレステロール、組成物のモルまたは全重量で0～30%の非カチオン性脂質、および組成物のモルまたは全重量で1～10%の複合脂質を含み得る。好ましくは、組成物は、組成物のモルまたは全重量で30～40%のイオン化脂質、組成物のモルまたは全重量で40～50%のコレステロール、および組成物のモルまたは全重量で10～20%の非カチオン性脂質を含む。いくつかの他の実施形態では、組成物は、組成物のモルまたは全重量で50～75%のイオン化脂質、組成物のモルまたは全重量で20～40%のコレステロール、および組成物のモルまたは全重量で5～10%の非カチオン性脂質、および組成物のモルまたは全重量で1～10%の複合脂質である。組成物は、組成物のモルまたは全重量で60～70%のイオン化脂質、組成物のモルまたは全重量で25～35%のコレステロール、および組成物のモルまたは全重量で5～10%の非カチオン性脂質を含有してもよい。組成物はまた、組成物のモルまたは全重量で最大90%のイオン化脂質、および組成物のモルまたは全重量で2～15%の非カチオン性脂質を含有してもよい。製剤はまた、例えば、組成物のモルもしくは全重量で8～30%のイオン化脂質、組成物のモルもしくは全重量で5～30%の非カチオン性脂質、および組成物のモルもしくは全重量で0～20%のコレステロール；組成物のモルもしくは全重量で4～25%のイオン化脂質、組成物のモルもしくは全重量で4～25%の非カチオン性脂質、組成物のモルもしくは全重量で2～25%のコレステロール、組成物のモルもしくは全重量で10～35%の複合脂質、および組成物のモルもしくは全重量で5%のコレステロール；または組成物のモルもしくは全重量で2～30%のイオン化脂質、組成物のモルもしくは全重量で2～30%の非カチオン性脂質、組成物のモルもしくは全重量で1～15%のコレステロール、組成物のモルもしくは全重量で2～35%の複合脂質、および組成物のモルもしくは全重量で1～20%のコレステロール；またはさらには組成物のモルもしくは全重量で最大90%のイオン化脂質、および組成物のモルもしくは全重量で2～10%の非カチオン性脂質；またはさらには組成物のモルもしくは全重量で100%のカチオン性脂質を含む、脂質ナノ粒子であってもよい。いくつかの実施形態では、脂質粒子製剤は、イオン化脂質、リン脂質、コレステロール、およびPEG化脂質を50：10：38.5：1.5のモル比で含む。いくつかの他の実施形態では、脂質粒子製剤は、イオン化脂質、コレステロール、およびPEG化脂質を60：38.5：1.5のモル比で含む。

【0526】

いくつかの実施形態では、脂質粒子は、イオン化脂質、非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、ステロール（例えば、コレステロール）、およびPEG化脂質を含み、脂質のモル比は、イオン化脂質の場合、20～70モルパーセントの範囲であり（目標40～60）、非カチオン性脂質のモルパーセントは、0～30の範囲であり（目標0～15）、ステロールのモルパーセントは、20～70の範囲であり（目標30～50）、PEG化脂質のモルパーセントは、1～6の範囲である（目標2～5）。

【0527】

ceDNAを含む脂質ナノ粒子（LNP）は、2018年9月7日に提出された国際出願第PCT/US2018/050042号に開示されており、これはその全体が本明細書に組み込まれ、本明細書に開示される方法および組成物における使用が想定される。

【0528】

脂質ナノ粒子の粒径は、Malvern Zetasizer Nano ZS（Malvern, UK）を使用する準弾性光散乱によって判定され得、およそ50～150nmの直系、およそ55～95nmの直径、またはおよそ70～90nmの直径である。

【0529】

製剤化されたカチオン性脂質のpKaは、核酸の送達のためのLNPの有効性と相関し得る（Jayaraman et al, Angewandte Chemie, International Edition（2012）, 51（34）, 8529–8533、Semple et al, Nature Biotechnology 28, 172–176（2010）を参照。それら両方は、参照によりそれら全体が本明細書に組

10

20

30

40

50

み込まれる)。pKaの好ましい範囲は、約5～約7である。各カチオン性脂質のpKaは、2-(p-トリイジノ)-6-ナフタレンスルホン酸(TNS)の蛍光に基づくアッセイを使用し、脂質ナノ粒子中で判定される。0.4mM全脂質の濃度でのPBS中のカチオン性脂質/DSPC/コレステロール/PEG-脂質(50/10/38.5/1.5mol%)からなる脂質ナノ粒子は、本明細書および他に記載されるインラインプロセスを使用して調製され得る。TNSは、蒸留水中の100μMストック溶液として調製され得る。小胞は、10mMのHEPES、10mMのMES、10mMの酢酸アンモニウム、130mMのNaClを含有する2mLの緩衝溶液中の24μM脂質に希釈され得、pHは、2.5～11の範囲である。TNS溶液のアリコートを追加して、1μMの最終濃度にするのができ、続いて渦流混合発光強度を、321nmの励起波長および445nmの発振波長を使用し、SLM Aminco Series 2発光分光光度計において室温で測定する。S字状最良適合分析は、蛍光データに適用することができ、pKaは、半最適蛍光強度を生じるpHとして測定される。

10

【0530】

相対活性は、尾静脈注入を介した投与の4時間後に肝臓内のルシフェラーゼ発現を測定することによって判定され得る。0.3および1.0mg ceDNA/kgの用量で活性を比較し、投与の4時間後に測定された肝臓1gあたりのルシフェラーゼngとして表される。

【0531】

無制限に、本発明の脂質ナノ粒子は、カプシド不含非ウイルス性DNAベクターを関心対象の標的部位(例えば、細胞、組織、器官等)を送達するように使用され得る脂質製剤を含む。一般に、脂質ナノ粒子は、カプシド不含非ウイルス性DNAベクターおよびイオン化脂質またはその塩を含む。

20

【0532】

いくつかの実施形態では、脂質粒子は、イオン化脂質/非カチオン性脂質/ステロール/複合脂質を、50:10:38.5:1.5のモル比で含む。

【0533】

他の態様では、本開示は、リン脂質、レシチン、ホスファチジルコリン、およびホスファチジルエタノールアミンを含む脂質ナノ粒子製剤を提供する。

【0534】

いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の化合物もまた含まれ得る。それらの化合物は、別々に投与され得るか、または追加の化合物は、本発明の脂質ナノ粒子中に含まれ得る。言い換えれば、脂質ナノ粒子は、ceDNAに加えて他の化合物、または少なくとも第1のものとは異なる第2のceDNAを含有し得る。無制限に、他の追加の化合物は、小さいまたは大きい有機または無機分子、単糖類、二糖類、三糖類、オリゴ糖類、多糖類、ペプチド、タンパク質、ペプチド類似体およびそれらの誘導体、ペプチド模倣体、核酸、核酸類似体および誘導体、生体物質から作製される抽出物、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。

30

【0535】

いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の化合物は、治療剤であり得る。治療剤は、治療目的に好適な任意のクラスから選択され得る。言い換えれば、治療剤は、治療目的に好適な任意のクラスから選択され得る。言い換えれば、治療剤は、所望の治療目的および生物作用に従って選択され得る。例えば、LNP内のceDNAが、癌を治療するために有用である場合、追加の化合物は、抗癌剤(例えば、化学療法剤、標的癌療法(小分子、抗体、または抗体-薬物複合体を含むが、これらに限定されない))であり得る。別の実施例では、ceDNAを含有するLNPが、感染症を治療するために有用である場合、追加の化合物は、抗菌剤(例えば、抗生物質または抗ウイルス化合物)であり得る。さらに別の実施例では、ceDNAを含有するLNPが、免疫疾患または障害を治療するために有用である場合、追加の化合物は、免疫反応を調節する化合物(例えば、免疫抑制剤、免疫刺激性化合物、または1つ以上の特定の免疫経路を調節する化合物)であり得る。いくつ

40

50

かの実施形態では、異なるタンパク質または異なる化合物（治療剤など）をコードする c e D N A などの、異なる化合物を含有する異なる脂質ナノ粒子の異なるカクテルを、本発明の組成物および方法で使用するすることができる。

【0536】

いくつかの実施形態では、追加の化合物は、免疫調節剤である。例えば、追加の化合物は、免疫抑制剤である。いくつかの実施形態では、追加の化合物は、免疫刺激性である。

【0537】

本明細書では、脂質ナノ粒子および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む薬学的組成物もまた提供される。

【0538】

いくつかの態様では、本開示は、1種以上の薬学的賦形剤をさらに含む脂質ナノ粒子製剤を提供する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、スクロース、トリス、トレハロース、および／またはグリシンをさらに含む。

【0539】

一般に、本発明の脂質ナノ粒子は、意図した治療効果を提供するように選択された平均直径を有する。したがって、いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、約 30 nm～約 150 nm、より典型的には約 50 nm～約 150 nm、より典型的には約 60 nm～約 130 nm、より典型的には約 70 nm～約 110 nm、最も典型的には約 85 nm～約 105 nm、好ましくは約 100 nm の平均直径を有する。いくつかの態様では、本開示は、一般的なナノ粒子に対する相対サイズでより大きく、約 150～250 nm のサイズである脂質粒子を提供する。脂質ナノ粒子粒径は、例えば、Malvern Zetasizer ZS (Malvern, UK) システムを使用して準弾性光散乱によって判定され得る。

【0540】

脂質粒子の意図した使用に応じて、構成成分の割合は変化し得、特定の製剤の送達効率は、例えば、エンドソーム放出パラメーター (ERP) アッセイを使用して測定され得る。

【0541】

c e D N A は、粒子の脂質部分と複合され得るか、または脂質ナノ粒子の脂質位置に封入され得る。いくつかの実施形態では、c e D N A は、脂質ナノ粒子の脂質位置に完全に封入され得、それによって例えば水溶液中のヌクレアーゼによる分解からそれを保護する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中の c e D N A は、37℃で少なくとも約 20、30、45、または 60 分間のヌクレアーゼへの脂質ナノ粒子の曝露後に実質的に分解されない。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中の c e D N A は、37℃で少なくとも約 30、45、もしくは 60 分、または少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、もしくは 36 時間の血清中の粒子のインキュベーション後に実質的に分解されない。

【0542】

ある特定の実施形態では、脂質ナノ粒子は、対象、例えばヒトなどの哺乳動物に対して実質的に非毒性である。

【0543】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子製剤は、凍結乾燥粉末である。

【0544】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、少なくとも 1 つの脂質二層を有する固体コア粒子である。他の実施形態では、脂質ナノ粒子は、非二層構造、すなわち非ラメラ（すなわち、非二層）形態を有する。無制限に、非二層形態としては、例えば、3次元管、棒、立方対称性等を挙げることができる。脂質粒子の非ラメラ形態（すなわち、非二層構造）は、当業者に既知であり、当業者によって使用される分析技法を使用して判定され得る。そのような技法としては、低温透過型電子顕微鏡（「Cryo-TEM」）、示差走査熱量計（「DSC」）、X線回折等が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、脂

10

20

30

40

50

質ナノ粒子の形態（ラメラ対非ラメラ）は、容易に評価され、US 2010/0130588（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される Cryo-TEM 分析を使用して容易に評価され、特性化され得る。

【0545】

いくつかのさらなる実施形態では、非ラメラ形態を有する脂質ナノ粒子は、高電子密度である。

【0546】

いくつかの態様では、本開示は、単一ラメラ構造または多ラメラ構造のいずれかである脂質ナノ粒子を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子および／または発泡系粒子を含む脂質ナノ粒子を提供する。

【0547】

脂質構成成分の組成物および濃度を制御することによって、脂質複合体が脂質粒子外で交換する速度、順に脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を制御することができる。さらに、例えば、pH、温度、またはイオン強度を含む他の変数を使用して、脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を変化および／または制御することができる。脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を制御するために使用され得る他の方法は、本開示に基づいて当業者に明らかとなるであろう。脂質複合体の組成物および濃度を制御することによって、脂質粒径を制御することも明らかとなるであろう。

【0548】

製剤化されたカチオン性脂質の pK_a は、核酸の送達のための LNP の有効性と相関し得る（Jayaraman et al, Angewandte Chemie, International Edition (2012), 51(34), 8529-8533、Semple et al, Nature Biotechnology 28, 172-176 (2010) を参照。それら両方は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）。 pK_a の好ましい範囲は、約 5 ～ 約 7 である。カチオン性脂質の pK_a は、2-（p-トリイジノ）-6-ナフタレンスルホン酸（TNS）の蛍光に基づくアッセイを使用し、脂質ナノ粒子中で判定され得る。

【0549】

脂質粒子中の ceDNA の封入は、核酸と会合したときに蛍光を強化した色素を使用する、膜不透過性蛍光色素排除アッセイ、例えば Oligreen（登録商標）アッセイまたは PicoGreen（登録商標）アッセイを実施することによって判定され得る。一般に、封入は、脂質粒子製剤に色素を添加し、得られた蛍光を測定し、それを少量の非イオン性界面活性剤の添加時に観察される蛍光と比較することによって判定される。脂質二層の界面活性剤媒介性崩壊は、封入された ceDNA を放出し、それが膜不透過性色素と相互作用できるようにする。ceDNA の封入は、 $E = (I_0 - I) / I_0$ として計算することができ、 I および I_0 は、界面活性剤の添加前および添加後の蛍光強度を指す。

【0550】

IX. ceDNA ベクターを送達する方法

いくつかの実施形態では、ceDNA ベクターは、様々な好適な方法によってインビトロまたはインビボで標的細胞に送達され得る。ceDNA ベクターは、単独で適用または注入され得る。ceDNA ベクターは、トランスフェクション試薬または他の物理的手段の助けなしに細胞に送達され得る。代替として、ceDNA ベクターは、細胞への DNA の進入を促進する任意の当該技術分野において既知のトランスフェクション試薬または他の当該技術分野において既知の物理的手段、例えば、リボソーム、アルコール、高ポリリジン化合物、高アルギニン化合物、リン酸カルシウム、微小胞、マイクロインジェクション、電気穿孔等を使用して送達され得る。

【0551】

対照的に、本明細書に開示されるカプシド不含 AAV ベクターでの形質導入は、様々な送達試薬を使用し、従来の AAV ビリオンで形質導入することが困難である細胞および組織型を効率的に標的とし得る。

【0552】

別の実施形態では、c e D N A ベクターは、C N S（例えば、脳または眼）に投与される。c e D N A ベクターは、脊髄、脳幹（延髄、脳橋）、中脳（視床下部、視床、視床上部、脳下垂体、黒質、松果体）、小脳、終脳（線条体、後頭葉、側頭葉、頭頂葉、および前頭葉、皮質、基底核、海馬、および扁桃体を含む大脳）、辺縁系、新皮質、線条体、大脳、ならびに下丘中に導入されてもよい。c e D N A ベクターはまた、網膜、角膜、および／または視神経などの眼の異なる領域に投与されてもよい。c e D N A ベクターは、脳脊髄液中に（例えば、腰椎穿刺によって）送達されてもよい。c e D N A ベクターは、さらに、血液脳関門が攪乱された状況（例えば、脳腫瘍または脳梗塞）において、C N S に血管内投与されてもよい。

10

【0553】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、当該技術分野において既知の任意の経路によってC N S の所望の領域（複数可）に投与され得、髄腔内、眼内、脳内、脳室内、静脈内（例えば、マンニトールなどの糖の存在下）、鼻腔内、耳内、眼内（例えば、硝子体内、網膜下、前房）、および眼周囲（例えば、テノン下領域）送達、ならびに運動ニューロンへの逆行性送達を伴う筋肉内送達を含むが、これらに限定されない。

【0554】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、C N S 中の所望の領域または区画への直接注入（例えば、定位的注入）によって、液体製剤中で投与される。他の実施形態では、c e D N A ベクターは、所望の領域への局所適用によって、またはエアロゾル製剤の鼻腔内投与によって提供され得る。眼への投与は、液滴の局所適用によって行われてもよい。さらなる代替例として、c e D N A ベクターは、固体の徐放性製剤として投与され得る（例えば、米国特許第7, 201, 898号を参照）。さらに追加の実施形態では、c e D N A ベクターを、逆行性輸送に使用して、運動ニューロンが関与する疾患および障害（例えば、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、脊髄性筋萎縮症（S M A）等）を治療、改善、および／または予防することができる。例えば、c e D N A ベクターは、筋組織に送達され、そこからニューロン中に移動し得る。

20

【0555】

X. c e D N A ベクターの追加の使用

本明細書に提供される組成物およびc e D N A ベクターを使用して、様々な目的のために標的遺伝子を編集することができる。いくつかの実施形態では、得られる導入遺伝子は、研究目的のため、例えば、導入遺伝子を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成するため、例えば、導入遺伝子産生物の機能を研究するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的R N A をコードする。別の実施例では、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを作成するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的R N A をコードする。いくつかの実施形態では、得られる導入遺伝子は、哺乳類対象における疾患状態または障害の治療、予防、または改善に有用である、1つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。得られる導入遺伝子は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、または機能不全に関連した疾患を治療するのに十分な量で対象に導入され得る（例えば、発現され得る）。いくつかの実施形態では、得られる導入遺伝子は、発現の増加、遺伝子産物の活性、または遺伝子の不適切な上方調節（得られる導入遺伝子が、その発現を抑制する、または他の方法でその発現を低減させる）に関連した疾患を治療するのに十分な量で対象において発現され得る。さらに他の実施形態では、得られる導入遺伝子は、未変性遺伝子の欠陥コピーを置換または補足する。導入遺伝子は、それ自体が転写される遺伝子のオープンリーディングフレームでなくともよいことが当業者によって理解されるであろう。代わりに、それは標的遺伝子のプロモーター領域またはリプレッサー領域であり得、c e D N A 遺伝子編集ベクターは、関心対象の遺伝子の発現をそのように調整する結果でそのような領域を修飾し得る。

30

40

【0556】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを作成するために使用され

50

ることが意図されるタンパク質または機能的RNAをコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、哺乳類対象における疾患状態の治療または予防に有用である、1つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。導入遺伝子またはドナー配列は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、または機能不全に関連した疾患を治療するのに十分な量で患者に導入され得る（例えば、発現され得る）。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、遺伝子編集分子（例えば、ヌクレアーゼ）である。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、CRISPR関連ヌクレアーゼ（Casヌクレアーゼ）である。

【0557】

XI. 使用方法

本明細書に開示される遺伝子編集のためのceDNAベクターはまた、関心対象のヌクレオチド配列（例えば、遺伝子編集分子、例えば、ヌクレアーゼまたはガイド配列）を標的細胞（例えば、宿主細胞）に送達するための方法で使用され得る。この方法は、特に関心対象の標的遺伝子を、それを必要とする対象の細胞に送達するため、および関心対象の標的遺伝子を編集するための方法であり得る。本発明は、遺伝子編集機構の治療効果が生じるように、遺伝子編集分子、例えば、対象の細胞内のceDNAベクターにおいてコードされるヌクレアーゼまたはガイド配列のインビボ発現を可能にする。これらの結果は、ceDNAベクター送達のインビボおよびインビトロ両方の形態で見られる。

【0558】

加えて、本発明は、当該関心対象の核酸を含む本発明のceDNAベクターの多回投与を含む、それを必要とする対象の細胞中の遺伝子編集分子の送達のための方法を提供する。本発明のceDNAベクターは、カプシド形成されたウイルスベクターに対して典型的に観察されるような免疫応答を誘導しないため、そのような複数回投与戦略は、ceDNAベースの系においてより大きな成功を収めるであろう。

【0559】

ceDNAベクター核酸（複数可）は、所望の組織の細胞をトランスフェクトし、過度の有害作用なしに、十分なレベルの遺伝子導入および発現をもたらすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路としては、静脈内（例えば、リボソーム製剤）、選択された器官への直接送達（例えば、肝臓への門脈内送達）、筋肉内、および他の投与経路が挙げられるが、これらに限定されない。所望される場合、投与経路を組み合わせることができる。

【0560】

ceDNA送達は、遺伝子編集構成成分をコードするすべてのヌクレオチドのceDNAベクター送達に限定されない。例えば、本明細書に記載されるceDNAベクターは、遺伝子編集構成成分の一部を提供するために提供される他の送達系とともに使用されてもよい。本開示に従ってceDNAベクターと組み合わせることができる系の1つの非限定的な例には、治療または遺伝子編集を必要とする宿主細胞にCas9を別々に送達する系が含まれる。ある特定の実施形態では、Cas9は、Lee et al., Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleotide protein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair, Nature Biomedical Engineering, 2017（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどのナノ粒子に送達され得るが、ドナー配列などの他の構成成分は、ceDNAによって提供される。

【0561】

本発明はまた、治療有効量のceDNAベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、それを必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞または組織）に導入することを含む、対象における疾患を治療する方法を提供する。ceDNAベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実装されるceDNAベクターは、疾患を治療するために有用な関心対象のヌクレオチド配列を含む。特に、ceDNAベクターは、対象に導入されたときに、外因性DNA配列によってコードされる所望

のポリペプチド、タンパク質、またはオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに操作可能に結合された所望の外因性DNA配列を含み得る。ceDNAベクターは、上記および本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【0562】

本明細書に提供される組成物およびベクターを使用して、様々な目的のために導入遺伝子を送達することができる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、研究目的のため、例えば、導入遺伝子を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成するため、例えば、導入遺伝子産生物の機能を研究するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的RNAをコードする。別の実施例では、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを作成するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的RNAをコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、哺乳類対象における疾患状態の治療または予防に有用である、1つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。導入遺伝子は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、または機能不全に関連した疾患を治療するのに十分な量で患者に導入され得る（例えば、発現され得る）。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、遺伝子編集分子（例えば、ヌクレアーゼ）である。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、CRISPR関連ヌクレアーゼ（Casヌクレアーゼ）である。

【0563】

原則として、発現カセットは、突然変異によって減少もしくは欠如しているタンパク質またはポリペプチドをコードする、または過剰発現が本発明の範囲内であると考えられるときに、治療効果をもたらす任意の遺伝子を標的とする核酸またはヌクレアーゼを含み得る。ceDNAベクターは、メガヌクレアーゼまたはジンクフィンガーヌクレアーゼによって提供される二本鎖切断の後に挿入される訂正DNA鎖として使用される、テンプレートヌクレオチド配列を含む。ceDNAベクターは、メガヌクレアーゼまたはジンクフィンガーヌクレアーゼによって提供される二本鎖切断の後に挿入される訂正DNA鎖として使用される、テンプレートヌクレオチド配列を含み得る。好ましくは、挿入されていない細菌DNAは存在せず、好ましくは、本明細書に提供されるceDNA組成物中に細菌DNAは存在しない。

【0564】

遺伝子編集のためのceDNAベクター送達は、1種のceDNAベクターに限定されない。そのようなものとして、別の態様では、異なるドナー配列および／または遺伝子編集配列を含む複数のceDNAベクターは、標的細胞、組織、器官、または対象に同時にまたは順次を送達され得る。したがって、この戦略では、複数の遺伝子の遺伝子編集を同時に行うことができる。遺伝子編集機能の異なる部分を、同時にまたは異なる時間に投与することができ、別々に調節することができる別々のceDNAベクターに分離することも可能である。送達はまた、複数回、および重要なことに、ウイルスカプシドの非存在に起因する抗カプシド宿主免疫反応の欠失を仮定して、後に増加または減少する用量で臨床状況において遺伝子療法のために実施され得る。カプシドが存在しないため、抗カプシド反応は起こらないと予想される。

【0565】

本発明はまた、治療有効量の遺伝子編集のためのceDNAベクターを、任意に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞または組織）に導入することを含む、対象における疾患を治療する方法を提供する。ceDNAベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実装されるceDNAベクターは、疾患を治療するために有用な関心対象のヌクレオチド配列を含む。特に、ceDNAベクターは、対象に導入されたときに、外因性DNA配列によってコードされる所望のポリペプチド、タンパク質、またはオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに操作可能に結合された所望の外因性DNA配列を含み得る。ceDNAベクターは、上記および本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路

を介して投与され得る。

【0566】

X I I . 治療の方法

本明細書に記載される技術はまた、開示される c e D N A ベクターを作製するための方法、ならびにそれを様々な方法（例えば、原位置外、インビトロおよびインビボ適用、方法論、診断手順、ならびに／または遺伝子療法レジメン）で使用方法を実証する。

【0567】

治療有効量の遺伝子編集 c e D N A ベクターを、任意に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（例えば、筋細胞もしくは組織、または他の罹患した細胞型）に導入することを含む、対象における疾患または障害を治療する方法が、本明細書に提供される。c e D N A ベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実装される c e D N A ベクターは、疾患を治療するために有用な関心対象のヌクレオチド配列を含む。特に、c e D N A ベクターは、対象に導入されたときに、外因性 D N A 配列によってコードされる所望のポリペプチド、タンパク質、またはオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに操作可能に結合された所望の外因性 D N A 配列を含み得る。c e D N A ベクターは、上記および本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【0568】

本発明の c e D N A ベクターのうちの 1 つ以上を、1 種以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、または賦形剤と一緒に含む、c e D N A ベクター組成物および製剤が、本明細書に開示される。そのような組成物は、疾患、傷害、障害、外傷、または機能不全の 1 つ以上の症状を診断、予防、治療、または改善するための、1 つ以上の診断的または治療的キットに含まれ得る。一態様では、疾患、傷害、障害、外傷、または機能不全は、ヒト疾患、傷害、障害、外傷、または機能不全である。

【0569】

本明細書に記載される技術の別の態様は、診断的または治療的に有効な量の c e D N A ベクターを、それを必要とする対象に提供するための方法を提供し、この方法は、本明細書に開示されるある量の c e D N A ベクターを、それを必要とする対象の細胞、組織、または器官に、c e D N A ベクターからの導入遺伝子の発現を可能にするのに有効な時間にわたって提供し、それによって診断的または治療的に有効な量の c e D N A ベクターによって発現されるタンパク質、ペプチド、核酸を対象に提供することを含む。さらなる態様では、対象は、ヒトである。

【0570】

本明細書に記載される技術の別の態様は、対象における疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、または外傷のうちの少なくとも 1 つ以上の症状を診断、予防、治療、または改善するための方法を提供する。全体的かつ一般的な意味において、この方法は、少なくとも開示される c e D N A ベクターのうちの 1 つ以上を、それを必要とする対象に、対象の疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、または外傷の 1 つ以上の症状を診断、予防、治療、または改善するための量および時間にわたって投与するステップを含む。さらなる態様では、対象は、ヒトである。

【0571】

別の態様は、疾患または疾患状態の 1 つ以上の症状を治療または低減するためのツールとしての、c e D N A ベクターの使用である。欠陥遺伝子が知られているいくつかの遺伝疾患が存在し、典型的に、通常は一般に劣性的に遺伝される酵素の欠乏状態と、調節または構造タンパク質に関与し得るが、典型的には常に優性的に遺伝されとは限らない不均衡状態との 2 つのクラスに分類される。欠乏状態の疾患の場合、c e D N A ベクターを使用し、導入遺伝子を送達して、置換療法のために正常な遺伝子を罹患した組織に運び入れるとともに、いくつかの実施形態では、アンチセンス突然変異を使用して、疾患の動物モデルを創り出すことができる。不均衡疾患状態の場合、c e D N A ベクターを使用して、モデルシステムにおいて病態を創り出すことができ、次いでこれを使用して、その病態に

対処する試みに使用することができる。したがって、本明細書に開示される c e D N A ベクターおよび方法は、遺伝子疾患の治療を可能にする。本明細書で使用される場合、病態は、疾患を引き起こす、またはそれをより重篤にする欠乏または不均衡を部分的または全体的に修繕することによって治療される。

【0572】

A. 宿主細胞：

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、対象の宿主細胞に導入遺伝子を送達する。いくつかの実施形態では、対象の宿主細胞は、ヒト宿主細胞であり、例えば、血液細胞、幹細胞、造血細胞、C D 3 4 ⁺細胞、肝細胞、癌細胞、血管細胞、筋細胞、膵臓細胞、神経細胞、眼もしくは網膜細胞、上皮もしくは内皮細胞、樹状細胞、線維芽細胞、または哺乳類起源の任意の他の細胞（無制限に、肝（すなわち、肝臓）細胞、肺細胞、心臓細胞、膵臓細胞、腸細胞、横隔膜細胞、腎（すなわち、腎臓）細胞、ニューロン細胞、血液細胞、骨髄細胞、もしくは遺伝子療法が企図される対象の任意の1つ以上の選択された組織を含む）が挙げられる。一態様では、対象宿主細胞は、ヒト宿主細胞である。

【0573】

本開示はまた、本明細書に記載されるような c e D N A ベクターを含む、上記のような組み換え宿主細胞に関する。したがって、当業者には明らかであるように、目的に応じて複数の宿主細胞を使用することができる。ドナー配列を含む構築物または c e D N A ベクターを宿主細胞に導入して、ドナー配列が、前述のように染色体組み込み体として維持されるようにする。宿主細胞という用語は、複製中に生じる突然変異のために親細胞と同一ではない親細胞の任意の子孫を包含する。宿主細胞の選択は、ドナー配列およびその供給源に大きく依存する。宿主細胞はまた、哺乳類、昆虫、植物、または真菌細胞などの真核生物であってもよい。一実施形態では、宿主細胞は、ヒト細胞（例えば、初代細胞、幹細胞、または不死化細胞株）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、欠陥遺伝子の訂正のために、または遺伝子の発現を切除するために遺伝子編集される。例えば、C R I S P R / C A S を使用して、N H E J または H D R 修復、ならびに他の遺伝子編集系、例えば Z F N または T A L E によって、1つ以上の g R N A でゲノムを編集することができる。宿主細胞は、任意の細胞型、例えば、体細胞または幹細胞、人工多能性幹細胞、または血液細胞、例えば、T細胞もしくはB細胞、または骨髄細胞であり得る。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、同種細胞である。例えば、T細胞ゲノム操作は、癌免疫療法、H I V 療法（例えば、C X C R 4 および C C R 5 などの受容体ノックアウト）などの疾患調整、および免疫不全療法に有用である。B細胞上のM H C 受容体は、免疫療法の標的となり得る。ゲノム編集された骨髄幹細胞、例えば、C D 3 4 ⁺細胞、または人工多能性幹細胞を、治療用タンパク質の発現のために患者に移植して戻すことができる。

【0574】

B. 遺伝子編集 c e D N A で治療される例示的な疾患

c e D N A 遺伝子編集ベクターはまた、ドナーDNAがない場合に欠陥遺伝子を訂正するためにも有用であり、例えば、C R I S P R / C A S c e D N A 系では、スプライスアクセプターまたはスプライスドナーを標的とする単一のガイドRNAは、欠陥遺伝子のフレームシフト突然変異を訂正することができ、機能性タンパク質の発現をもたらす。非限定的な例として、機能的なジストロフィンの発現のために、単一のガイドRNA N H E J を使用してエクソンスキッピングにより、および複数のガイドRNAを使用することにより、デュシェン型筋ジストロフィーのD M D 遺伝子を訂正した。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、U S 2 0 1 6 / 0 2 0 1 0 8 9 を参照されたい。

【0575】

c e D N A 遺伝子編集ベクターはまた、遺伝子発現の除去にも有用である。例えば、一実施形態では、c e D N A ベクターを使用して、例えば、フレームシフト突然変異を引き起こすことによって、ナンセンスインデル（例えば、非コード塩基対の挿入または欠失）に標的遺伝子のノックダウンを誘導することができる。非限定的な例として、C X C R 4 および C C R 5、H I V 受容体の発現は、C A S 9 R N P および1つ以上のガイドRNA

Aを使用して、NHEJまたはHDR経路のいずれかを誘導することによって、初代ヒトT細胞で良好に除去された。Schumann et al. (2015) Generation of knock in primary human cells using Cas9 ribonucleoproteins, PNAS 112(33): 10437-10442 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照されたい。この系は、単一のガイドRNAおよびRNP (例えば、CAS9)のみを必要とする。CeDNAベクターを使用して、発現を除去するためにPD-1遺伝子座を標的とすることもできる。PD-1は、悪性腫瘍で起こる慢性的に活性なT細胞に免疫チェックポイント細胞表面受容体を発現する。上記のSchumann et al.を参照されたい。

10

【0576】

いくつかの実施形態では、ceDNA遺伝子編集ベクターは、罹患した遺伝子を標的とするベクターを使用することによって、欠陥遺伝子を訂正するために使用される。一実施形態では、本明細書に記載されるceDNAベクターを使用して、DNAの所望の領域を切除し、フレームシフト突然変異を訂正する、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを治療する、またはレーバー先天性黒内障の治療においてLCA10の突然変異型イントロンを除去することができる。ceDNAベクターを使用した遺伝子編集による治療の影響を受けやすい疾患または障害の非限定的な例は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第2014/0170753号のそれらの遺伝子およびそれらの関連遺伝子とともに表A～Cに示されている。代替実施形態では、ceDNAベクターは、セーフハーバー遺伝子、例えば不活性イントロンにおける治療用タンパク質またはレポータータンパク質の発現のための発現カセットの挿入に使用される。ある特定の実施形態では、プロモーターレスカセットが、セーフハーバー遺伝子に挿入される。そのような実施形態では、プロモーターレスカセットは、セーフハーバー遺伝子調節エレメント (プロモーター、エンハンサー、およびシグナル伝達ペプチド)を利用することができ、セーフハーバー遺伝子座での挿入の非限定的な例は、Blood (2015) 126(15): 1777-1784 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているアルブミン遺伝子座への挿入である。アルブミンへの挿入は、血液への導入遺伝子の分泌を可能にするという利点を有する (例えば、実施例22を参照)。さらに、ゲノムセーフハーバー部位は、当該技術分野において既知であり、例えば、Papapetrou, ER&S Schambach, A. Molecular Therapy 24(4): 678-684 (2016) またはSadellain et al. Nature Reviews Cancer 12: 51-58 (2012) (各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている技法を使用して決定され得る。アデノ関連ウイルス(AAV)ゲノムのセーフハーバー部位 (例えば、AAVS1セーフハーバー部位)は、本明細書に記載される方法および組成物とともに使用され得る (例えば、Oceguera-Yanez et al. Methods 101: 43-55 (2016) またはTiyaboonchai, A et al. Stem Cell Res 12(3): 630-7 (2014)を参照。各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)。例えば、AAVS1ゲノムセーフハーバー部位は、胚性幹細胞 (例えば、ヒト胚性幹細胞) または人工多能性幹細胞 (iPS細胞)における造血特異的導入遺伝子発現および遺伝子サイレンシングの目的のために、本明細書に記載されるceDNAベクターおよび組成物とともに使用することができる。さらに、染色体19上のAAVS1セーフハーバー部位に挿入するための、合成または市販の相同性指向修復ドナーテンプレートを、本明細書に記載されるようなceDNAベクターまたは組成物とともに使用することが本明細書において企図される。例えば、相同性指向修復テンプレート、およびガイドRNAは、例えば、System Biosciences (Palo Alto, CA)から商業的に購入し、ceDNAベクターにクローニングすることができる。

20

30

40

【0577】

50

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、遺伝子をノックアウトまたは編集するために、例えば、養子細胞移入および／またはC A R-T治療の改善のためにT細胞を操作するために使用される（例えば、実施例24を参照）。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、本明細書に記載されるような遺伝子編集ベクターであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書の他の箇所に記載されるように、c e D N A ベクターは、エンドヌクレアーゼ、テンプレート核酸配列、またはエンドヌクレアーゼおよびテンプレート核酸の組み合わせを含むことができる。T細胞の治療に関連するノックアウトおよび遺伝子編集の非限定的な例は、P N A S (2 0 1 5) 1 1 2 (3 3) : 1 0 4 3 7 - 1 0 4 4 2 に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0578】

遺伝子編集c e D N A ベクターまたはその組成物は、任意の遺伝性疾患の治療に使用され得る。非限定的な例として、c e D N A ベクターまたはその組成物は、トランスサイレチンアミロイドーシス（A T T R）、突然変異体タンパク質が神経、心臓、胃腸系等でミスフォールドして凝集する奇病の治療に使用することができる。本明細書に記載される遺伝子編集系を使用して、突然変異体疾患遺伝子（m u t T T R）の欠失によって疾患を治療できることが本明細書で企図される。遺伝性疾患のそのような治療は、疾患の進行を止めることができ、確立された疾患の後退または疾患の少なくとも1つの症状の少なくとも10%の軽減を可能にし得る。

【0579】

別の実施形態では、c e D N A ベクターまたはその組成物は、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症（O T C 欠損症）、高アンモニア血症、または新生児もしくは幼児のアンモニアを解毒する能力を損なう他の尿素サイクル障害の治療に使用することができる。先天性代謝のすべての疾患と同様に、野生型対照と比較した酵素活性の部分的回復でさえ（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%）、O T C 欠乏症を有する対象の少なくとも1つの症状O T C の低減および／または生活の質の改善に十分であり得る。一実施形態では、O T C をコードする核酸は、インビボタンパク質置換のためにアルブミン内因性プロモーターの後ろに挿入され得る。

【0580】

別の実施形態では、c e D N A ベクターまたはその組成物を、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ酵素をコードする核酸配列を送達することによるフェニルケトン尿症（P K U）の治療において使用して、P K U 患者に毒性であり得る食事性フェニルアラニンの蓄積を低減することができる。先天性代謝のすべての疾患と同様に、野生型対照と比較した酵素活性の部分的回復でさえ（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%）、P K U を有する対象のP K U の少なくとも1つの症状の低減および／または生活の質の改善に十分であり得る。一実施形態では、フェニルアラニンヒドロキシラーゼをコードする核酸を、インビボタンパク質置換のためにアルブミン内因性プロモーターの後ろに挿入することができる。

【0581】

別の実施形態では、c e D N A ベクターまたはその組成物は、酵素をコードする核酸配列を送達して、G S D を有する対象における異常なグリコーゲン合成または分解を訂正することによる、グリコーゲン蓄積症（G S D）の治療に使用され得る。本明細書に記載される遺伝子編集方法を使用して訂正され得る酵素の非限定的な例には、グリコーゲンシンターゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、酸- α グルコシダーゼ、グリコーゲン分岐酵素、グリコーゲン分岐酵素、筋肉グリコーゲンホスホリラーゼ、肝臓グリコーゲンホスホリラーゼ、筋肉ホスホフルクトキナーゼが含まれる、ホスホリラーゼキナーゼ、グルコース輸送体-2（G L U T - 2）、アルドラーゼA、 β -エノラーゼ、ホスホグルコムターゼ-1（P G M - 1）、およびグリコゲニン-1が含まれる。先天性代謝のすべての疾患

10

20

30

40

50

と同様に、野生型対照と比較した酵素活性の部分的回復でさえ（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%）、GSDを有する対象のGSDの少なくとも1つの症状の低減および／または生活の質の改善に十分であり得る。一実施形態では、異常なグリコーゲン貯蔵を訂正するために酵素をコードする核酸を、インビボタンパク質置換のためにアルブミン内因性プロモーターの後ろに挿入することができる。

【0582】

本明細書に記載されるceDNAベクターはまた、レーバー先天性黒内障(LCA)、ポリQリピートを含むポリグルタミン病、および α -1アンチトリプシン欠乏症(A1AT)のインビボ修復での使用も企図されている。LCAは、失明を引き起こす稀な先天性眼疾患であり、以下の遺伝子：GUCY2D、RPE65、SPATA7、AIPL1、LCA5、RPGRIP1、CRX、CRB1、NMNAT1、CEP290、IMPDH1、RD3、RDH12、LRAT、TULP1、KCNJ13、GDF6、および／またはPRPH2のうちのいずれか1つにおける突然変異によって引き起こされ得る。本明細書では、本明細書に記載される遺伝子編集方法および組成物が、LCAの症状の原因である遺伝子（複数可）のエラーを訂正するために、LCAに関連する1つ以上の遺伝子の送達に適合され得ることが企図される。ポリグルタミン病には、歯列核淡蒼球ルイ体萎縮症、ハンチントン病、脊髄および球根筋萎縮症、ならびに脊髄小脳失調1型、2型、3型（マシャド・ジョセフ病としても知られている）、6型、7型、および17型が含まれるが、これらに限定されない。本明細書では、ceDNAベクターを使用する遺伝子編集方法を使用して、ポリグルタミン病に関連するものなどのトリヌクレオチドリピート伸長（例えば、ポリQリピート）をもたらすDNA突然変異を修復できることが特に企図される。A1AT欠乏症は、 α -1アンチトリプシンの産生不良を引き起こす遺伝性疾患であり、血液および肺での酵素活性の低下を招き、次にそれが罹患した対象の肺気腫または慢性閉塞性肺疾患につながり得る。本明細書では、本明細書に概説されるようなceDNAベクターまたはその組成物を使用したA1AT欠損症の修復が本明細書で具体的に企図される。本明細書では、LCA、ポリグルタミン疾患、またはA1AT欠乏症の治療のための所望のタンパク質をコードする核酸を、インビボタンパク質置換のためにアルブミン内因性プロモーターの後ろに挿入できることが企図される。

【0583】

さらなる実施形態では、本明細書に記載されるceDNAベクターを含む組成物を使用して、とりわけウイルス配列、病原体配列、染色体配列、転座接合部（例えば、癌に関連する転座）、非コードRNA遺伝子またはRNA配列、疾患関連遺伝子配列の遺伝子を編集することができる。

【0584】

本明細書に開示される遺伝子編集ceDNAベクターを使用して、関心対象の任意の核酸または標的遺伝子を編集することができる。標的核酸および標的遺伝子には、ポリペプチドをコードする核酸、または非コード核酸（例えば、RNAi、miRs等）、好ましくは治療剤（例えば、医療、診断、もしくは獣医用途用）、または免疫原性ポリペプチド（例えば、ワクチン用）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子編集ceDNAベクターによって標的とされる標的核酸または標的遺伝子は、1つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、siRNA、RNAis、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、抗体、抗原結合断片、またはそれらの任意の組み合わせをコードする。

【0585】

特に、本明細書に開示されるceDNAベクターによる遺伝子編集のための遺伝子標的は、例えば、限定されないが、疾患、機能不全、傷害、および／または障害の1つ以上の症状の治療、予防、および／または改善における使用のための、タンパク質（複数可）、ポリペプチド（複数可）、ペプチド（複数可）、酵素（複数可）、抗体、抗原結合断片、

ならびにその変異型、および／または活性断片をコードし得る。一態様では、疾患、機能不全、外傷、傷害、および／または障害は、ヒト疾患、機能不全、外傷、傷害、および／または障害である。

【0586】

本明細書に記載されるように、本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用する遺伝子編集のための遺伝子標的は、タンパク質もしくはペプチド、または治療核酸配列をコードすることができ、または治療剤としては、1 種以上のアゴニスト、アンタゴニスト、抗アポトーシス因子、阻害剤、受容体、サイトカイン、細胞毒、エリスロポエチン剤、糖タンパク質、増殖因子、増殖因子受容体、ホルモン、ホルモン受容体、インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン受容体、神経増殖因子、向神経活性ペプチド、向神経活性ペプチド受容体、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害剤、タンパク質デカルボキシラーゼ、タンパク質キナーゼ、タンパク質キナーゼ阻害剤、酵素、受容体結合タンパク質、輸送タンパク質もしくはその 1 種以上の阻害剤、セロトニン受容体、またはその 1 種以上の取り込み阻害剤、セルピン、セルピン受容体、腫瘍抑制剤、診断的分子、化学療法剤、細胞毒、あるいはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0587】

C. 遺伝子編集のための追加の疾患：

一般に、上記の説明に従って本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用して任意の導入遺伝子を送達して、遺伝子発現に関する任意の障害に関連する症状を治療、予防、または改善することができる。例示的な病態としては、嚢胞性線維症（および他の肺の疾患）、血友病 A、血友病 B、サラセミア、貧血症および他の血液障害、A I D S、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、癲癇および他の神経障害、癌、糖尿病、筋ジストロフィー（例えば、デュシェンヌ型、ベッカー型）、ハーラー病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、代謝障害、網膜変性疾患（および他の眼の疾患）、ミトコンドリオパチー（例えば、レーベル遺伝性視神経症（L H O N）、リー症候群、および亜急性硬化性脳炎）、ミオパチー（例えば、顔面肩甲上腕型ミオパチー（F S H D）および心筋症）、固形臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓）の疾患等が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、代謝障害（例えば、オミチントランスカルバミラーゼ欠損症）を有する個体の治療において有利に使用され得る。

【0588】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターを使用して、遺伝子または遺伝子産生物中の突然変異によって引き起こされる疾患または障害を治療、改善、および／または予防することができる。c e D N A ベクターで治療され得る例示的な疾患または障害としては、代謝疾患または障害（例えば、ファブリー病、ゴーシェ病、フェニルケトン尿症（P K U）、グリコーゲン蓄積疾患）；尿素サイクル疾患または障害（例えば、オルニチントランスカルバミラーゼ（O T C）欠損症）；リソソーム蓄積疾患または障害（例えば、異染性白質ジストロフィー（M L D）、ムコ多糖症 I I 型（M P S I I）、ハンター症候群）；肝疾患または障害（例えば、進行性家族性肝内胆汁うっ滞（P F I C）；血液疾患または障害（例えば、血友病（A および B）、サラセミア、および貧血症）；癌および腫瘍、ならびに遺伝子疾患または障害（例えば、嚢胞性線維症）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0589】

なおもさらなる態様として、本明細書に開示される c e D N A ベクターを用いて、導入遺伝子（例えば、本明細書に記載される、ホルモンまたは増殖因子をコードする導入遺伝子）の発現レベルを調節することが望ましい状況において、異種ヌクレオチド配列を送達することができる。

【0590】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターを使用して、疾患または障害をもたらす遺伝子産生物の異常なレベルおよび／または機能（例

えば、タンパク質中の非存在または欠損)を訂正することができる。c e D N A ベクターは、機能的タンパク質を産生し、かつ／またはタンパク質のレベルを修正して、タンパク質中の非存在もしくは欠損によって引き起こされる特定の疾患もしくは障害から生じる症状を緩和もしくは低減するか、または利益を付与することができる。例えば、O T C 欠損症の治療は、機能的O T C 酵素を産生することによって達成され得る。血友病AおよびBの治療は、第V I I I 因子、第I X 因子、および第X 因子のレベルを修正することによって達成され得る。P K U の治療は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ酵素のレベルを修正することによって達成され得る。ファブリー病またはゴーシェ病の治療は、それぞれ機能的 α ガラクトシダーゼまたは β グルコセレブロシダーゼを産生することによって達成され得る。M L D またはM P S I I の治療は、それぞれ機能的アリールスルファターゼA またはイズロネートー2ースルファターゼを産生することによって達成され得る。嚢胞性線維症の治療は、機能的嚢胞性線維症の膜貫通コンダクタンス調節剤を産生することによって達成され得る。グリコーゲン蓄積疾患の治療は、機能的G 6 P a s e 酵素機能を回復することによって達成され得る。P F I C の治療は、機能的A T P 8 B 1、A B C B 1 1、A B C B 4、またはT J P 2 遺伝子を産生することによって達成され得る。

10

【0591】

代替実施形態では、本明細書に開示されるc e D N A ベクターを使用して、アンチセンス核酸をインビトロまたはインビボで細胞に提供することができる。例えば、導入遺伝子が、R N A i 分子である場合、標的細胞中のアンチセンス核酸またはR N A i の発現は、細胞による特定のタンパク質の発現を減少させる。したがって、R N A i 分子またはアンチセンス核酸である導入遺伝子を投与して、それを必要とする対象における特定のタンパク質の発現を減少させることができる。アンチセンス核酸をインビトロで細胞に投与して、細胞生理学を調節する、例えば、細胞または組織培養系を最適化することもできる。

20

【0592】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターによってコードされる例示的な導入遺伝子としては、X、リソソーム酵素(例えば、タイ・サックス病に関連するヘキササミニダーゼA、またはハンター症候群／M P S I I に関連するイズロネートスルファターゼ)、エリスロポエチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、スーパーオキシドジスムターゼ、グロビン、レプチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、ならびにサイトカイン(例えば、インターフェロン、 β -インターフェロン、インターフェロン γ 、インターロイキン-2、インターロイキン-4、インターロイキン12、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシン等)、ペプチド増殖因子およびホルモン(例えば、ソマトトロピン、インスリン、インスリン様増殖因子1および2、血小板由来増殖因子(P D G F)、上皮増殖因子(E G F)、線維芽細胞増殖因子(F G F)、神経増殖因子(N G F)、神経栄養因子-3および4、脳由来神経栄養因子(B D N F)、グリア由来増殖因子(G D N F)、形質転換増殖因子- α および- β 等)、受容体(例えば、腫瘍壊死因子受容体)が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例示的な実施形態では、導入遺伝子は、1つ以上の所望の標的に特異的なモノクローナル抗体をコードする。いくつかの例示的な実施形態では、2つ以上の導入遺伝子が、c e D N A ベクターによってコードされる。いくつかの例示的な実施形態では、導入遺伝子は、関心対象の2つの異なるポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、本明細書に定義されるように、全長抗体または抗体断片を含む、抗体をコードする。いくつかの実施形態では、抗体は、本明細書に定義されるように、抗原結合ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列である。他の例示的な導入遺伝子配列は、自殺遺伝子産生物(チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクロームP 450、デオキシシチジンキナーゼ、および腫瘍壊死因子)、癌治療において使用される薬物に対する耐性を付与するタンパク質、および腫瘍抑制因子遺伝子産生物をコードする。

30

40

【0593】

代表的な実施形態では、c e D N A ベクターによって発現される導入遺伝子は、筋ジス

50

トロフィーの治療を必要とする対象における治療のために使用され得る。この方法は、治療、改善、または予防に有効な量の、本明細書に記載される c e D N A ベクターを投与することを含み、c e D N A ベクターは、異種核酸をコードするジストロフィン、ミニジストロフィン、マイクロジストロフィン、ミオスタチンプロペプチド、フォリスタチン、アクチビン I I 型可溶性受容体、I G F-1、抗炎症性ポリペプチド、例えば、I κ B 優性突然変異体、サルコスパン、ウトロフィン、マイクロジストロフィン、ラミニン-α 2、α-サルコグリカン、β-サルコグリカン、γ-サルコグリカン、δ-サルコグリカン、I G F-1、ミオスタチンもしくはミオスタチンポリペプチドに対する抗体もしくは抗体断片、および／またはミオスタチンに対する R N A i を含む。特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、本明細書の別の場所に記載されるように、骨格筋、横隔膜筋、および／または心筋に投与され得る。

【0594】

いくつかの実施形態では、通常は血液中で循環するポリペプチド（例えば、酵素）もしくは機能的 R N A（例えば、R N a i、m i c r o R N A、アンチセンス R N A）の産生のため、あるいは障害（例えば、代謝障害、例えば糖尿病（例えば、インスリン）、血友病（例えば、V I I I）、ムコ多糖障害（例えば、スライ症候群、ハーラー症候群、シャイエ症候群、ハーラー・シャイエ症候群、ハンター症候群、サンフィリポ症候群 A、B、C、D、モルキオ症候群、マロトー・ラミー症候群等）またはリソソーム蓄積症（ゴーシェ病 [グルコセレブロシダーゼ]、ポンペ病 [リソソーム酸 α-グルコシダーゼ] もしくはファブリー病 [α-ガラクトシダーゼ A]）またはグリコーゲン蓄積疾患（ポンペ病 [リソソーム酸 α-グルコシダーゼ]）を治療、改善、および／または予防するための他の組織への全身送達のため、c e D N A ベクターを使用して、導入遺伝子を骨格筋、心筋、または横隔膜筋に送達することができる。代謝障害を治療、改善、および／または予防するための他の好適なタンパク質は、上に記載される。

【0595】

他の実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用して、代謝障害の治療、改善、および／または予防を必要とする対象においてそれを行う方法において、導入遺伝子を送達することができる。例示的な代謝障害およびポリペプチドをコードする導入遺伝子が、本明細書に記載される。任意に、ポリペプチドが分泌される（例えば、その未変性状態の分泌ポリペプチドであるポリペプチド、または例えば、当該技術分野において既知のような分泌シグナル配列との操作可能な会合によって分泌されるように操作されたポリペプチド）。

【0596】

本発明の別の態様は、先天性心疾患または P A D の治療、改善、および／または予防を必要とする対象においてそれを行う方法に関し、その方法は、本明細書に記載される c e D N A ベクターを哺乳類対象に投与することを含み、c e D N A ベクターが、例えば、筋形質小胞体 C a²⁺-A T P a s e（S E R C A 2 a）、血管新生因子、ホスファターゼ阻害剤 I（I-1）、ホスホランバンなどの R N A i；ホスホランバン阻害剤または優性陰性分子、例えばホスホランバン S 1 6 E、ホスホランバン遺伝子を調節する亜鉛フィンガータンパク質、β 2-アドレナリン受容体、β 2-アドレナリン受容体キナーゼ（B A R K）、P I 3 キナーゼ、カルサルシン、β-アドレナリン受容体キナーゼ阻害剤（β A R K c t）、タンパク質ホスファターゼ 1 の阻害剤 1、S 1 0 0 A 1、パルバルブミン、アデニルリシクラーゼ 6 型、G-タンパク質連結受容体キナーゼ 2 型ノックダウンに影響を及ぼす分子、例えば、切断された構成的活性型の β A R K c t、P i m-1、P G C-1 α、S O D-1、S O D-2、E C-S O D、カリクレイン、H I F、チモシン-β 4、m i r-1、m i r-1 3 3、m i r-2 0 6、および／または m i r-2 0 8 をコードする導入遺伝子を含む。

【0597】

本明細書に開示される c e D N A ベクターを、任意の好適な手段によって、任意に、c e D N A ベクターを含む呼吸域粒子のエアロゾル懸濁液を投与することによって、対象の

肺に投与することができ、これを対象が吸入する。呼吸域粒子は、液体または固体であり得る。c e D N A ベクターを含む液体粒子のエアロゾルは、当業者に既知であるように、圧力駆動型エアロゾル噴霧器または超音波噴霧器を用いるなど、任意の好適な手段によって産生され得る。例えば、米国特許第 4, 5 0 1, 7 2 9 号を参照されたい。c e D N A ベクターを含む固体粒子のエアロゾルは、薬学分野において既知の技法によって、任意の固体粒子薬剤エアロゾル生成器を用いて同様に産生され得る。

【0598】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、C N S（例えば、脳、眼）の組織に投与され得る。特定の実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、遺伝子障害、神経変性障害、精神障害、および腫瘍を含む C N S の疾患を治療、改善、または予防するために投与され得る。C N S の例示的な疾患としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナバン病、リー病、レフサム病、トゥーレット症候群、原発性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、進行性筋萎縮、ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ビンズワナー病、脊椎または頭部傷害に起因する外傷、タイ・サック病、リーシュ・ナイアン病、癲癇、脳梗塞、気分障害（例えば、抑うつ、双極性感情障害、持続性感情障害、二次気分障害）を含む精神障害、統合失調症、薬物依存（例えば、アルコール依存および他の薬物依存）、ノイローゼ（例えば、不安症、強迫性障害、身体表現性障害、解離性障害、悲痛、産後うつ病）、精神病（例えば、幻覚および妄想）、認知症、偏執病、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛障害、摂食または体重障害（例えば、肥満、悪液質、拒食症、および過食症）、ならびに C N S の癌および腫瘍（例えば、下垂体腫瘍）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0599】

本発明の c e D N A ベクターを治療、改善、または予防され得る眼障害としては、網膜、後視床路、および／または視神経に關与する眼科障害（例えば、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、および他の網膜変性疾患、ブドウ膜炎、加齢性黄斑変性、緑内障）が挙げられる。多くの眼科疾患および障害は、（1）血管新生、（2）炎症、および（3）変性の3種類の適応症の1つ以上に関連している。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターを用いて、抗血管新生因子、抗炎症性因子、細胞変性を遅らせる、細胞節約を促進する、または細胞増殖を促進する因子、およびそれらの組み合わせを送達することができる。糖尿病性網膜症は、例えば、血管新生によって特徴付けられる。糖尿病性網膜症は、眼内（例えば、硝子体内）または眼周囲（例えば、テノン嚢下領域内）のいずれかで1つ以上の抗血管新生因子を送達することによって治療され得る。1つ以上の神経栄養因子を、眼内（例えば、硝子体内）または眼周囲のいずれかに共送達することもできる。本発明の c e D N A ベクターを治療、改善、または予防され得る追加の眼疾患としては、地図状萎縮、血管性または「滲出型」黄斑変性、スタルガルト病、レーバー先天黒内障（L C A）、アッシャー症候群、弾性線維性偽性黄色腫（P X E）、X連鎖性網膜色素変性（X L R P）、X連鎖性網膜分離症（X L R S）、全脈絡膜萎縮、レーバー遺伝性視神経萎縮症（L H O N）、色盲、錐体杆体変性、フックス角膜内皮変性症、糖尿病黄斑浮腫、ならびに眼の癌および腫瘍が挙げられる。

【0600】

いくつかの実施形態では、炎症性眼疾患または障害（例えば、ブドウ膜炎）は、本発明の c e D N A ベクターによって治療、改善、または予防され得る。1つ以上の抗炎症性因子は、本明細書に開示される c e D N A ベクターの眼内（例えば、硝子体または前眼房）投与によって発現され得る。他の実施形態では、網膜変性（例えば、網膜色素変性）によって特徴付けられる眼疾患または障害は、本発明の c e D N A ベクターによって治療、改善、または予防され得る。1つ以上の神経栄養因子をコードする本明細書に開示される c e D N A ベクターの眼内（例えば、硝子体）投与を使用して、そのような網膜変性に基づく疾患を治療することができる。いくつかの実施形態では、血管新生および網膜変性（例えば、加齢性黄斑変性）の両方に關与する疾患または障害は、本発明の c e D N A ベクターで治療され得る。加齢性黄斑変性は、眼内に1つ以上の神経栄養因子および／または眼

内もしくは眼周囲（例えば、テノン嚢下領域内）に1つ以上の抗血管新生因子をコードする本明細書に開示される c e D N A ベクターを投与することによって治療され得る。緑内障は、増加した眼圧および網膜神経節細胞の喪失を特徴とする。緑内障の治療は、本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用して興奮毒性損傷から細胞を保護する1種以上の神経保護剤の投与を含む。したがって、そのような薬剤としては、N-メチル-D-アスパラギン酸塩（NMDA）アンタゴニスト、サイトカイン、および神経栄養因子は、本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用して、眼内、任意に硝子体内に送達され得る。

【0601】

他の実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用して、発作を治療する、例えば、発作の徴候、発生率、または重症度を低減することができる。発作の治療的処置の有効性は動作的（例えば、揺動、眼もしくは口のチック）および／または電子記録的手段（ほとんどの発作は、顕著な電子記録的異常を有する）によって評価され得る。したがって、本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用して、経時的に複数の発作によってマークされる癲癇を治療することもできる。代表的な一実施形態では、脳下垂体腫瘍を治療するために、本明細書に開示される c e D N A ベクターを使用して、ソマトスタチン（またはその活性断片）が脳に投与される。この実施形態に従い、ソマトスタチン（またはその活性断片）をコードする本明細書に開示される c e D N A ベクターは、脳下垂体への微小注入によって投与される。同様に、そのような治療を使用して、末端肥大症（脳下垂体からの異常な成長ホルモン分泌）を治療することができる。ソマトスタチンの核酸（例えば、GenBank 受託番号 J00306）およびアミノ酸（例えば、GenBank 受託番号 P01166、処理された活性ペプチドソマトスタチン-28 およびソマトスタチン-14 を含有する）配列は、当該技術分野において既知のとおりである。特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、米国特許第 7, 071, 172 号に記載される分泌シグナルを含む導入遺伝子をコードすることができる。

【0602】

本発明の別の態様は、インビボでの対象への全身送達のためのアンチセンス RNA、RNAi、または他の機能的 RNA（例えば、リボザイム）を産生するための、本明細書に記載される c e D N A ベクターの使用に関する。したがって、いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、アンチセンス核酸、リボザイム（例えば、米国特許第 5, 877, 022 号に記載される）、スプライソソーム媒介性トランススプライシングに影響を及ぼす RNA（Puttaraju et al., (1999) Nature Biotech. 17: 246、米国特許第 6, 013, 487 号、米国特許第 6, 083, 702 号を参照）、遺伝子サイレンシングを媒介する干渉 RNA（RNAi）（Sharp et al., (2000) Science 287: 2431 を参照）または他の非翻訳 RNA、例えば「ガイド」RNA（Gorman et al., (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 4929、Yuan らへの米国特許第 5, 869, 248 号）等をコードする導入遺伝子を含み得る。

【0603】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターはまた、レポーターポリペプチド（例えば、緑色蛍光タンパク質またはアルカリホスファターゼなどの酵素）をコードする導入遺伝子をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、実験または診断の目的で有用なレポータータンパク質をコードする導入遺伝子は、β-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ（LacZ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ルシフェラーゼ、および当該技術分野において周知の他のもののうちのいずれかから選択される。いくつかの態様では、レポーターポリペプチドをコードする導入遺伝子を含む c e D N A ベクターを、診断目的のために、またはそれらが投与される対象における c e D N A ベクターの活性のマーカーとして使用することができる。

【0604】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、宿主染色体と相同性を共有し、宿主染色体上の遺伝子座と組み替える、導入遺伝子または異種ヌクレオチド配列を含み得る。このアプローチを利用して、宿主細胞中の遺伝子欠陥を訂正することができる。

【0605】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、対象における免疫原性ポリペプチドを発現するため、例えば、ワクチン接種のために使用され得る導入遺伝子を含み得る。導入遺伝子は、当該技術分野において既知の関心対象の任意の免疫原をコードし得、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、g a g タンパク質、腫瘍抗原、癌抗原、細菌抗原、ウイルス抗原等からの免疫原が挙げられるが、これらに限定されない。

【0606】

D. 遺伝子編集 c e D N A ベクターを使用した良好な遺伝子編集の試験

当該技術分野で周知のアッセイを使用して、インビトロおよびインビボの両方のモデルにおける c e D N A による遺伝子編集の効率を試験することができる。c e D N A による所望の導入遺伝子のノックインまたはノックアウトは、所望の導入遺伝子の m R N A およびタンパク質レベルを測定することによって（例えば、逆転写 P C R、ウェスタンブロット分析、および酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A））当業者により評価され得る。c e D N A による核酸変更（例えば、点突然変異、D N A 領域の欠失）は、ゲノム標的 D N A のディープシーケンシングによって評価することができる。一実施形態では、c e D N A は、例えば、蛍光顕微鏡法または発光プレートリーダーによりレポータータンパク質の発現を調べることによって、所望の導入遺伝子の発現を評価するために使用できるレポータータンパク質を含む。インビボ適用の場合、タンパク質機能アッセイを使用して、所与の遺伝子および／または遺伝子産物の機能を試験して、遺伝子編集が成功したかどうかを判断することができる。例えば、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子遺伝子（C F T R）の点突然変異は、アニオン（例えば、C l⁻）をアニオンチャネルを介して移動させる能力を阻害し、c e D N A の遺伝子編集能力によって訂正され得ることが想定される。c e D N A の投与後、当業者は、アニオンがアニオンチャネルを通して移動する能力を評価して、C F T R の点突然変異が訂正されたかどうかを決定することができる。当業者は、インビトロまたはインビボでタンパク質の機能性を測定するための最良の試験を決定することができるであろう。

【0607】

本明細書では、細胞または対象における遺伝子編集の効果は、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも10か月、少なくとも12か月、少なくとも18か月、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも20年にわたって継続し得るか、または永続的であり得ることが企図される。

【0608】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセット、発現構築物、または c e D N A ベクター中の導入遺伝子は、宿主細胞に対して最適化されたコドンであり得る。本明細書で使用される場合、「最適化されたコドン」または「コドン最適化」という用語は、関心対象の脊椎動物、例えばマウスまたはヒト（例えば、ヒト化）の細胞中の発現強化のために、少なくとも1つ、2つ以上、または相当数の未変性配列（例えば、原核細胞配列）のコドンを、その脊椎動物の遺伝子中でより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定の偏向を呈する。典型的には、コドン最適化は、元の翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を変更しない。最適化されたコドンは、例えば、A p t a g e n の G e n e F o r g e（登録商標）コドン最適化およびカスタム遺伝子合成プラットフォーム（A p t a g e n, I n c.）または別の公的に入手可能なデータベースを使用して判定され得る。

【0609】

X I I I . 投与

特定の実施形態では、2回以上の投与（例えば、2、3、4回またはそれ以上の投与）を用いて、様々な間隔の期間にわたって（例えば、毎日、毎週、毎月、毎年等）、所望のレベルの遺伝子発現を達成することができる。

【0610】

本明細書に開示される c e D N A ベクターの例示的な投与形態としては、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入（例えば、エアロゾルを介した）、頬側（例えば、舌下）、腔、髄腔内、眼内、経皮、内皮内、子宮内（または卵内）、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、筋肉内〔骨格、横隔膜、および／または心筋への投与を含む〕、胸膜内、脳内、および動脈内）、局所（例えば、気道表面を含む皮膚および粘膜表面への、ならびに経皮投与）、リンパ内等、ならびに直接組織または器官注入（例えば、肝臓、眼、骨格筋、心筋、横隔膜、筋肉、もしくは脳への）が挙げられる。

10

【0611】

c e D N A ベクターの投与は、脳、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、気道上皮、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、皮膚、および眼からなる群から選択される部位を含むが、これらに限定されない、対象の任意の部位に対して行われ得る。c e D N A ベクターの投与はまた、腫瘍（例えば、腫瘍またはリンパ節内またはその付近）に対するものであり得る。任意の所与の症例における最も好適な経路は、治療、改善、および／または予防される病態の性質および重症度、ならびに使用されている特定の c e D N A ベクターの性質に依存する。追加として、c e D N A は、単一のベクターまたは複数の c e D N A ベクター（例えば、c e D N A カクテル）中に複数の導入遺伝子を投与できるようにする。

20

【0612】

本明細書に開示される c e D N A ベクターの、本発明に従う骨格筋への投与としては、肢（例えば、上腕、下腕、上肢、および／または下肢）、腰、首、頭（例えば、舌）、咽頭、腹部、骨盤／会陰、および／または指の骨格筋への投与が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示される c e D N A ベクターは、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内、四肢灌流（任意に、脚および／もしくは腕の単離された四肢灌流、例えば、A r r u d a e t a l . , (2 0 0 5) B l o o d 1 0 5 : 3 4 5 8 - 3 4 6 4 を参照）ならびに／または直接筋肉内注入によって骨格筋に送達され得る。特定の実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、対象（例えば、DMDなどの筋ジストロフィーを有する対象）に、四肢灌流、任意に単離された四肢灌流（例えば、静脈内または動脈内投与による）によって投与される。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、「流体力学的技法」を用いることなく投与され得る。

30

【0613】

本明細書に開示される c e D N A ベクターの、心筋への投与としては、左心房、右心房、左心室、右心室、および／または中隔への投与が挙げられる。本明細書に記載される c e D N A ベクターは、静脈内投与、大動脈内投与などの動脈内投与、直接心臓注入（例えば、左心房、右心房、左心室、右心室への）、および／または冠動脈灌流によって心筋に送達され得る。横隔膜筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、および／または腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。平滑筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、および／または腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。一実施形態では、投与は、平滑筋内、その付近、および／またはその上に存在する内皮細胞に対して行われ得る。

40

【0614】

いくつかの実施形態では、本発明による c e D N A ベクターは、骨格筋、横隔膜筋、および／または心筋に投与される（例えば、筋ジストロフィーまたは心疾患（例えば、P A D もしくはうっ血性心不全）を治療、改善、および／または予防するため）。

【0615】

A. エクスビボ治療

いくつかの実施形態では、細胞を対象から除去し、c e D N A ベクターをその中に導入した後、細胞を対象に戻す。エクスビボでの治療のために対象から細胞を除去し、続いて

50

対象に戻す方法は、当該技術分野において既知である（例えば、米国特許第 5, 399, 346 号を参照、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。代替として、c e D N A ベクターは、別の対象からの細胞中に、培養細胞中に、または任意の他の好適な源からの細胞中に導入され、これらの細胞は、それを必要とする対象に投与される。

【0616】

c e D N A ベクターで形質導入された細胞は、好ましくは薬学的担体と組み合わせて、「治療有効量」で対象に投与される。当業者であれば、いくらかの利益が対象にもたらされる限り、治療効果が完全または治癒的である必要はないことを理解するであろう。

【0617】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、望ましくはインビトロ、エクスピボ、またはインビボで細胞中で産生される任意のポリペプチドである、導入遺伝子（時には異種ヌクレオチド配列と呼ばれる）をコードすることができる。例えば、本明細書で論じられる治療方法における c e D N A ベクターの使用とは対照的に、いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、例えば、抗原またはワクチンの産生のために、培養した細胞、およびそれから単離された発現遺伝子産物中に導入されてもよい。

【0618】

c e D N A ベクターは、獣医用途および医療用途の両方に使用することができる。上記のエクスピボ遺伝子送達方法に好適な対象としては、鳥類（例えば、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、七面鳥、およびキジ）および哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ネコ、イヌ、およびウサギ類）が挙げられ、哺乳動物が好ましい。ヒト対象が最も好ましい。ヒト対象は、新生児、幼児、少年、および成人を含む。

【0619】

本明細書に記載される技術の一態様は、導入遺伝子を細胞に送達する方法に関する。典型的には、インビトロ方法の場合、c e D N A ベクターは、本明細書に開示される方法ならびに当該技術分野において既知の他の方法を使用して導入され得る。本明細書に開示される c e D N A ベクターは、好ましくは生物学的有効量で細胞に投与される。c e D N A ベクターがインビボで細胞に（例えば、対象に）投与される場合、c e D N A ベクターの生物学的有効量は、標的細胞における導入遺伝子の形質導入および発現をもたらすのに十分な量である。

【0620】

B. 用量範囲

インビボおよび／またはインビトロアッセイを任意に用いて、使用のための最適投与量範囲を特定するのを助けることができる。製剤に用いられる正確な用量はまた、投与経路および病態の重症度に依存し、当業者の判断および各対象の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から推定され得る。

【0621】

c e D N A ベクターは、所望の組織の細胞をトランスフェクトし、過度の副作用なしに十分なレベルの遺伝子導入および発現をもたらすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路としては、「投与」セクションで上述されるもの、例えば選択された器官への直接送達（例えば、肝臓への門脈内送達）、経口、吸入（鼻腔内および気管内送達を含む）、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、および他の非経口投与経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与経路は、所望の場合、組み合わせることができる。

【0622】

特定の「治療効果」を達成するために必要な c e D N A ベクターの量の用量は、核酸投与の経路、治療効果を達成するために必要な遺伝子または R N A 発現のレベル、治療される特定の疾患または障害、および遺伝子（複数可）、R N A 産物（複数可）、または得られる発現タンパク質（複数可）の安定性を含むが、これらに限定されないいくつかの因子

10

20

30

40

50

に基づいて変化する。当業者は、前述の因子ならびに当該技術分野において周知の他の因子に基づいて、特定疾患または障害を有する患者を治療するための c e D N A ベクター用量範囲を容易に判定することができる。

【0623】

最適な治療反応を提供するように、投与量レジームを調整することができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、繰り返し投与することができ、例えば、いくつかの用量が毎日投与され得るか、または治療状況の急迫によって示されるように、用量を比例的に低減することができる。当業者は、オリゴヌクレオチドが細胞に投与されるか、または対象に投与されるかにかかわらず、対象オリゴヌクレオチドの投与の適切な用量およびスケジュールを容易に判定することができる。

10

【0624】

「治療有効量」は、臨床治験を通じて判定され得る比較的広い範囲内に含まれ、特定の用途に依存する（神経細胞は、極少量を必要とするが、全身注入は、多量を必要とする）。例えば、ヒト対象の骨格筋または心筋への直接インビボ注入の場合、治療有効量は、およそ約 $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{g}$ の c e D N A ベクターとなる。c e D N A ベクターを送達するためにエキソソームまたは微粒子が使用される場合、治療有効量は、経験的に判定され得るが、 $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{g}$ のベクターを送達することが予想される。さらに、治療上有効な量とは、疾患の1つ以上の症状の低減をもたらすが、オフターゲット遺伝子の遺伝子編集には至らない、標的遺伝子の編集に影響を与えるのに十分な量の遺伝子編集分子を発現する c e D N A ベクターの量である。

20

【0625】

薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の配合は、様々な治療レジメンにおいて本明細書に記載される特定の組成物を使用するための好適な投与および治療レジメンの開発と同様に、当業者に周知である。

【0626】

インビトロトランスフェクションの場合、細胞（ 1×10^6 細胞）に送達される c e D N A ベクターの有効量は、およそ $0.1 \sim 100 \mu\text{g}$ の c e D N A ベクター、好ましくは $1 \sim 20 \mu\text{g}$ 、より好ましくは $1 \sim 15 \mu\text{g}$ または $8 \sim 10 \mu\text{g}$ となる。より大きな c e D N A ベクターは、より多い用量を必要とする。エキソソームまたは微粒子が使用される場合、有効なインビトロ用量は、経験的に判定されるが、一般に同量の c e D N A ベクターを送達することが意図される。

30

【0627】

治療は、単一用量または複数用量の投与を必要とし得る。いくつかの実施形態では、複数の用量を対象に投与することができ、c e D N A ベクターは、ウイルスカプシドの非存在に起因して、抗カプシド宿主免疫反応を誘起する誘起しないため、実際に、必要に応じて複数の用量を投与することができる。そのようなものとして、当業者は、適切な用量数を判定することができる。投与される用量数は、例えば、およそ $1 \sim 100$ 、好ましくは $2 \sim 20$ 用量であり得る。

【0628】

任意の特定の理論に束縛されるものではないが、本開示によって記載される c e D N A ベクターの投与によって誘起される典型的な抗ウイルス免疫反応の欠失（すなわち、カプシド構成成分の非存在）は、複数の場合に c e D N A ベクターを宿主に投与できるようになる。いくつかの実施形態では、異種核酸が対象に送達される場合の数は、 $2 \sim 10$ 回の範囲内（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回）である。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、10回より多く対象に送達される。

40

【0629】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、1 暦日（例えば、24 時間）あたり1回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、2、3、4、5、6、または7 暦日あたり1回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、1 週間（例えば、7 暦日）あたり1回だけ対象

50

に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、2 週間に 1 回（例えば、2 暦週期間に 1 回）だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、1 暦月あたり 1 回（例えば、3 0 暦日に 1 回）だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、6 暦月あたり 1 回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、暦年（例えば、3 6 5 日または閏年では 3 6 6 日）あたり 1 回だけ対象に投与される。

【0 6 3 0】

C. 単位剤形

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、単位剤形で便宜的に提示され得る。単位剤形は、典型的に、薬学的組成物の 1 つ以上の投与経路に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、吸入による投与に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、蒸発器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、噴霧器による投与に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、エアロゾル化器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、経口投与のため、頬側投与のため、または舌下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、静脈内、筋肉内、または皮下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、髄腔内または脳室内投与のために適合される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、局所投与のために製剤化される。単一剤形を産生するために担体材料と複合され得る活性成分の量は、一般に、治療効果をもたらす化合物の量となる。

【0 6 3 1】

X I V. 様々な適用

本明細書に提供される組成物および c e D N A ベクターを使用して、上記のような様々な目的のために遺伝子編集分子を送達することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集分子は、研究目的のために、例えば、1 つ以上の突然変異または訂正された遺伝子配列を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成するため、例えば、標的遺伝子の機能を研究するために編集される、標的遺伝子、例えばタンパク質または機能的 R N A を標的とする。別の実施例では、遺伝子編集分子を使用して、タンパク質または機能的 R N A をコードする標的遺伝子を遺伝子編集して、疾患の動物モデルを作成する。

【0 6 3 2】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集分子の標的遺伝子は、哺乳類対象における疾患状態の治療、改善、または予防に有用である、1 つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。遺伝子編集分子は、c e D N A ベクターを介して、異常な遺伝子配列に関連する疾患を治療するのに十分な量で患者に転送（例えば、発現）され得、これは標的遺伝子の発現の低減、発現の欠如、または機能不全のうちのいずれか 1 つ以上をもたらし得る。

【0 6 3 3】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、診断およびスクリーニング方法における使用のために想定され、遺伝子編集分子は、細胞培養系または代替としてトランスジェニック動物モデルにおいて一時的または安定して発現される。

【0 6 3 4】

本明細書に記載される技術の別の態様は、哺乳類細胞の集団を形質導入する方法を提供する。全体的かつ一般的な意味において、この方法は、少なくとも有効量の本明細書に開示される c e D N A のうちの 1 つ以上を含む組成物を、その集団の 1 つ以上の細胞に導入するステップを含む。

【0 6 3 5】

追加として、本発明は、1 つ以上の追加の成分で配合されるか、またはそれらの使用のために 1 つ以上の指示で調製された、開示される c e D N A ベクターまたは c e D N A 組成物の 1 つ以上を含む、組成物、ならびに治療および／または診断キットを提供する。

【0 6 3 6】

本明細書に開示される c e D N A ベクターが投与される細胞は、任意のタイプのもので

10

20

30

40

50

あり得、神経細胞（末梢および中枢神経系の細胞、特に脳細胞を含む）、肺細胞、腎細胞、上皮細胞（例えば、胃および呼吸器上皮細胞）、筋細胞、樹状細胞、脾細胞（島細胞を含む）、肝細胞、心筋細胞、骨細胞（例えば、骨髄幹細胞）、造血幹細胞、脾臓細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、前立腺細胞、生殖細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。代替として、細胞は、任意の前駆細胞であり得る。さらなる代替として、細胞は、幹細胞（例えば、神経幹細胞、肝幹細胞）であり得る。なおもさらなる代替として、細胞は、癌または腫瘍細胞であり得る。さらに、細胞は、上に示されるように、任意の種の起源に由来し得る。

【0637】

いくつかの実施形態では、本出願は、以下のパラグラフのうちのいずれかに定義され得る。

1. (i) 少なくとも1つの変更されたAAV逆位末端反復(ITR)；(ii) 5' 相同性アーム、ドナー配列、および3' 相同性アームを含む第1のヌクレオチド配列を含み、少なくともドナー配列が、遺伝子編集機能を有する、ceDNAベクター。

2. 第1のヌクレオチド配列が、第1のヌクレオチド配列の上流に第2のヌクレオチド配列をさらに含み、第2のヌクレオチド配列が、遺伝子調節配列、およびヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含み、遺伝子調節配列が、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されている、パラグラフ1に記載のceDNAベクター。

3. ヌクレアーゼが、配列特異的ヌクレアーゼである、パラグラフ1または2に記載のceDNAベクター。

4. 配列特異的ヌクレアーゼが、RNA誘導型ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、または転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)である、パラグラフ1～3のいずれかに記載のceDNAベクター。

5. RNA誘導型ヌクレアーゼが、CasまたはCas9である、パラグラフ1～4のいずれかに記載のceDNAベクター。

6. 調節配列が、エンハンサーおよびプロモーターを含み、第2の核酸配列が、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の上流のイントロン配列を含み、イントロンが、ヌクレアーゼ切断部位を含み、プロモーターが、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されている、パラグラフ1～5のいずれかに記載のceDNAベクター。

7. ガイド配列および／またはアクチベーターRNA配列をコードするヌクレオチド配列を含む第3のヌクレオチド配列をさらに含む、パラグラフ1～6のいずれかに記載のceDNAベクター。

8. 第3のヌクレオチド配列が、ガイド配列および／またはアクチベーターRNA配列をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されたプロモーターをさらに含む、パラグラフ1～7のいずれかに記載のceDNAベクター。

9. ポリA部位が、上流にあり、当該相同性アームに近接している、パラグラフ1～8のいずれかに記載のceDNAベクター。

10. ドナー配列が、5' 相同性アームまたは3' 相同性アームに対して外来である、パラグラフ1～9のいずれかに記載のceDNAベクター。

11. 5' 相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の上流のヌクレオチド配列と相同である、パラグラフ1～10のいずれかに記載のceDNAベクター。

12. 3' 相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の下流のヌクレオチド配列と相同である、パラグラフ1～11のいずれかに記載のceDNAベクター。

13. 5' 相同性アームまたは3' 相同性アームが、少なくとも1つの変更されたITRの近位にある、パラグラフ1～12のいずれかに記載のceDNAベクター。

14. 5' 相同性アームおよび3' 相同性アームが、約250～2000bpである、パラグラフ1～13のいずれかに記載のceDNAベクター。

15. ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列が、cDNAである、パラグラフ1～14のいずれかに記載のceDNAベクター。

16. プロモーターが、CAGプロモーターである、パラグラフ1～15のいずれかに記載のceDNAベクター。

17. プロモーターが、Pol III、U6、またはH1である、パラグラフ1～17のいずれかに記載のceDNAベクター。

18. 宿主細胞の染色体上の所定の挿入部位にドナー配列を挿入する方法であって、少なくとも1つの変更されたITRを有するceDNAベクターを宿主細胞に導入することを含み、ceDNAベクターが、5'相同性アーム、ドナー配列、および3'相同性アームを含むヌクレオチド配列を含み、ドナー配列が、相同組み換えにより、挿入部位でまたは挿入部位に隣接して染色体に挿入される、方法。

19. 挿入部位を認識するガイドRNA(gRNA)をコードするヌクレオチド配列を細胞に導入することをさらに含む、パラグラフ18に記載の方法。

20. 挿入部位でまたは挿入部位に隣接して染色体を切断する配列特異的ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を細胞に導入することをさらに含む、パラグラフ18または19に記載の方法。

21. 配列特異的ヌクレアーゼが、RNA誘導型ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、または転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)である、パラグラフ18～20のいずれかに記載の方法。

22. RNA誘導型ヌクレアーゼが、CasまたはCas9である、パラグラフ18～21のいずれかに記載の方法。

23. 導入するステップが、カプシドを含まない、パラグラフ18～22のいずれかに記載の方法。

24. 5'相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の上流の配列と相同である、パラグラフ18～23のいずれかに記載の方法。

25. 3'相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の下流の配列と相同である、パラグラフ18～24のいずれかに記載の方法。

26. 5'相同性アームまたは3'相同性アームが、変更型ITRの近位にある、パラグラフ18に記載の方法。

27. 5'相同性アームおよび3'相同性アームが、少なくとも約50～2000塩基対である、パラグラフ18～26のいずれかに記載の方法。

28. ヌクレオチド配列が、5'相同性アームの上流の5'隣接配列および3'相同性アームの下流の3'隣接配列をさらに含む、パラグラフ18～27のいずれかに記載の方法。

29. 動物の染色体上の所定の挿入部位に挿入されたドナー配列を含む遺伝子操作された動物を生成する方法であって、a)パラグラフ18に記載の染色体上の所定の挿入部位に挿入されたドナー配列を有する細胞を生成することと、b) a)によって生成された細胞を担体動物に導入して、遺伝子操作された動物を産生する、方法。

30. 細胞が、接合体または多能性幹細胞である、パラグラフ29に記載の方法。

31. パラグラフ29または30に記載の方法によって生成された遺伝子操作された動物。

32. 細胞内の染色体上の挿入部位にドナー配列を挿入するためのキットであって、(i)少なくとも1つの変更されたAAV逆位末端反復(ITR)、および(ii)5'相同性アーム、ドナー配列、および3'相同性アームを含む第1のヌクレオチド配列であって、ドナー配列が、遺伝子編集機能を有する、第1のヌクレオチドを含む、第1のceDNAベクターと、(b)(i)少なくとも1つの変更されたAAV逆位末端反復(ITR)、および(ii)ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む、第2のceDNAベクターと、を含み、5'相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の上流の配列に相同であり、3'相同性アームが、染色体上のヌクレアーゼ切断部位の下流の配列に相同であり、5'相同性アームまたは3'相同性アームが、変更されたITRの近位にある、キット。

33. 宿主細胞の染色体上の所定の挿入部位にドナー配列を挿入する方法であって、(a

）少なくとも1つの変更された I T R を有する第 1 の c e D N A ベクターを宿主細胞に導入することであって、c e D N A ベクターが、5' 相同性アーム、ドナー配列、および 3' 相同性アームを含む第 1 の直鎖状核酸を含む、導入することと、(b) 少なくとも1つの変更された I T R を有する第 2 の c e D N A ベクターを宿主細胞に導入することであって、第 2 の c e D N A ベクターが、挿入部位でまたは挿入部位に隣接して染色体を切断する配列特異的ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の直鎖状核酸を含む、導入することと、を含み、ドナー配列が、相同組み換えにより、挿入部位でまたは挿入部位に隣接して染色体に挿入される、方法。

34. 第 2 の c e D N A ベクターが、挿入部位を認識するガイド配列をコードする第 3 のヌクレオチド配列をさらに含む、パラグラフ 18～33 のいずれかに記載の方法。

35. 導入遺伝子強化エレメント、および下流にありかつ 3' 相同性アームに近接するポリ A c i t e のうちの少なくとも1つをさらに含む、パラグラフ 1～17 のいずれかに記載の c e D N A ベクター。

36. 変更された I T R に近接する代替ヌクレアーゼ標的配列をさらに含む、パラグラフ 1～17 または 35 のいずれかに記載の c e D N A ベクター。

37. 上流にありかつ 3' 相同性アームに近接する 2 A および選択マーカー部位をさらに含む、パラグラフ 1～17 または 35～36 のいずれかに記載の c e D N A ベクター。

38. 隣接する末端反復 (T R)、および少なくとも1つの遺伝子編集核酸配列を含み、ベクターが、直鎖状閉端二重鎖 D N A である、c e D N A 核酸ベクター組成物。

39. 末端反復が、逆位 T R (I T R) である、パラグラフ 38 に記載の組成物。

40. 末端反復のうちの少なくとも1つが修飾されている、パラグラフ 38 または 39 に記載の組成物。

41. ベクターが、核酸変性条件下の一本鎖環状 D N A である、パラグラフ 38～40 のいずれかに記載の組成物。

42. 遺伝子編集核酸配列が、配列特異的ヌクレアーゼ、1つ以上のガイド R N A、C R I S P R / C a s、リボ核タンパク質 (R N P)、または C R I S P R i もしくは C R I S P R a 系のための非活性化 C A S、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される遺伝子編集分子をコードする、パラグラフ 38～41 のいずれかに記載の組成物。

43. 配列特異的ヌクレアーゼが、T A L ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、メガヌクレアーゼ、m e g a T A L、または R N A 誘導型エンドヌクレアーゼ (例えば、C A S 9、c p f 1、d C A S 9、n C A S 9) を含む、パラグラフ 38～42 のいずれかに記載の組成物。

44. 少なくとも2つの修飾型 I T R をさらに含む、パラグラフ 38～43 のいずれかに記載の組成物。

45. 関心対象の核酸をさらに含む、パラグラフ 38～44 のいずれかに記載の組成物。

46. 遺伝子編集核酸配列が、相同性指向修復テンプレートである、パラグラフ 38～45 のいずれかに記載の組成物。

47. 相同性指向修復テンプレートが、5' 相同性アーム、ドナー配列、および 3' 相同性アームを含む、パラグラフ 38～46 のいずれかに記載の組成物。

48. エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列をさらに含み、エンドヌクレアーゼが、標的遺伝子の D N A 上の特定のエンドヌクレアーゼ部位または c e D N A ベクター上の標的部位で切断またはニックングする、パラグラフ 38～47 のいずれかに記載の組成物。

49. 5' 相同性アームが、染色体上の D N A ヌクレアーゼ部位の上流のヌクレオチド配列と相同である、パラグラフ 38～48 のいずれかに記載の組成物。

50. 3' 相同性アームが、D N A エンドヌクレアーゼ部位の下流のヌクレオチド配列と相同である、パラグラフ 38～49 のいずれかに記載の組成物。

51. 相同性アームが、各々約 250～2000 b p である、パラグラフ 38～40 のいずれかに記載の組成物。

52. D N A エンドヌクレアーゼが、T A L ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアー

10

20

30

40

50

ゼ (ZFN)、またはRNA誘導型エンドヌクレアーゼ (例えば、Cas 9 もしくは Cpf1) を含む、パラグラフ 38 ~ 52 のいずれかに記載の組成物。

53. RNA誘導型エンドヌクレアーゼが、Cas 酵素を含む、パラグラフ 38 ~ 52 のいずれかに記載の組成物。

54. Cas 酵素が、Cas 9 である、パラグラフ 38 ~ 53 のいずれかに記載の組成物。

55. Cas 酵素が、ニッキング Cas 9 (nCas 9) である、パラグラフ 38 ~ 53 のいずれかに記載の組成物。

56. nCas 9 が、Cas の HNH または RuvC ドメインに突然変異を含む、パラグラフ 38 ~ 55 のいずれかに記載の組成物。

57. Cas 酵素が、標的遺伝子のプロモーター領域を標的とする gRNA と複合体を形成する不活性化 Cas ヌクレアーゼ (dCas) である、パラグラフ 38 ~ 53 のいずれかに記載の組成物。

58. KRAB エフェクター ドメインをさらに含む、パラグラフ 38 ~ 57 のいずれかに記載の組成物。

59. dCas が、プロモーター領域に向けられ得る異種転写活性化ドメインに融合される、パラグラフ 38 ~ 57 のいずれかに記載の組成物。

60. dCas 融合が、標的遺伝子の発現を上方調節するために追加のトランス活性化ドメインを動員するガイド RNA によって標的遺伝子のプロモーター領域に向けられる、パラグラフ 38 ~ 59 のいずれかに記載の組成物。

61. dCas が、S. pyogenes dCas 9 である、パラグラフ 38 ~ 57 のいずれかに記載の組成物。

62. ガイド RNA 配列が、標的遺伝子のプロモーターの近位を標的とし、CRISPR が、標的遺伝子をサイレンシングする (CRISPRi 系)、パラグラフ 38 ~ 61 のいずれかに記載の組成物。

63. ガイド RNA 配列が、標的遺伝子の転写開始部位を標的とし、標的遺伝子を活性化 (CRISPRa 系)、パラグラフ 38 ~ 61 のいずれかに記載の組成物。

64. RNA誘導型 DNA エンドヌクレアーゼのための少なくとも 1 つのガイド RNA (gRNA) をコードする核酸をさらに含む、パラグラフ 38 ~ 63 のいずれかに記載の組成物。

65. ガイド RNA (sgRNA) が、欠陥遺伝子のスプライスアクセプターまたはスプライスドナー部位を標的として、非相同末端結合 (NHEJ) および欠陥遺伝子の訂正をもたらす、パラグラフ 38 ~ 64 のいずれかに記載の組成物。

66. ベクターが、1 つのガイド RNA 配列の複数のコピーをコードする、パラグラフ 38 ~ 65 のいずれかに記載の組成物。

67. ヌクレアーゼをコードする核酸配列に操作可能に連結された調節配列をさらに含む、パラグラフ 38 ~ 66 のいずれかに記載の組成物。

68. 調節配列が、エンハンサーおよび／またはプロモーターを含む、パラグラフ 38 ~ 67 のいずれかに記載の組成物。

69. プロモーターが、DNA エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列に操作可能に連結され、DNA エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列が、エンドヌクレアーゼ配列の上流にイントロン配列をさらに含み、イントロンが、ヌクレアーゼ切断部位を含む、パラグラフ 38 ~ 68 のいずれかに記載の組成物。

70. ポリ A 部位が、上流にありかつ 5' 相同性アームに近接している、パラグラフ 38 ~ 69 のいずれかに記載の組成物。

71. ドナー配列が、5' 相同性アームまたは 3' 相同性アームに対して外来である、パラグラフ 47 *** のいずれかに記載の組成物。

72. 5' 相同性アームまたは 3' 相同性アームが、少なくとも 1 つの修飾型 ITR の近位にある、パラグラフ 47 に記載の組成物。

73. ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列が、cDNA である、パラグラフ 48

10

20

30

40

50

に記載の組成物。

74. プロモーターが、CAGプロモーターである、パラグラフ68に記載の組成物。

75. プロモーターが、Pol III、U6、またはH1である、パラグラフ68に記載の組成物。

76. パラグラフ38～75のいずれかに記載のベクターを含む、細胞。

77. パラグラフ38～75のいずれかに記載のベクターおよび脂質を含む、組成物。

78. パラグラフ38～75のいずれかに記載のベクター、またはパラグラフ76に記載の細胞を含む、キット。

79. 細胞を遺伝子編集系と接触させることを含む、ゲノム編集のための方法であって、遺伝子編集系の1つ以上の構成成分が、細胞を閉端DNA (ceDNA) 核酸ベクター組成物と接触させることによって細胞に送達され、ceDNA核酸ベクター組成物が、隣接する末端反復 (TR) 配列と、任意に、少なくとも1つの標的遺伝子に相補的な領域を有する少なくとも1つの遺伝子編集核酸配列を含む、直線状閉端二重鎖DNAである、方法。

80. 末端反復が、逆位TR (ITR) である、パラグラフ79に記載の方法。

81. ITRが、修飾型ITRである、パラグラフ79または80に記載の方法。

82. 遺伝子編集系が、TALEN系、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ (ZFN) 系、CRISPR/CAS系、およびメガヌクレアーゼ系からなる群から選択される、パラグラフ79～81のいずれかに記載の方法。

83. 少なくとも1つの遺伝子編集核酸配列が、RNA誘導型ヌクレアーゼ、ガイドRNA、TALEN、およびジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ (ZFN) からなる群から選択される遺伝子編集分子をコードする、パラグラフ79～82のいずれかに記載の方法。

84. 単一ceDNAベクターが、遺伝子編集系のすべての構成成分を含む、パラグラフ79～83のいずれかに記載の方法。

85. 細胞を接触させるステップが、遺伝子編集系と組み合わせてトランスフェクション試薬または脂質試薬を投与することをさらに含む、パラグラフ79～84のいずれかに記載の方法。

86. 遺伝子編集系が、トランスフェクション試薬またはリボソーム試薬をさらに含む、パラグラフ79～85のいずれかに記載の方法。

87. ceDNA核酸ベクター組成物が、パラグラフ1～77のいずれか1つである、パラグラフ79～86のいずれかに記載の方法。

88. 標的遺伝子の発現が変更されている、パラグラフ79～87のいずれかに記載の方法。

89. 接触される細胞が、真核細胞である、パラグラフ79～88のいずれかに記載の方法。

90. Casタンパク質が、真核細胞における発現のためにコドン最適化される、パラグラフ79～88のいずれかに記載の方法。

91. 標的遺伝子を編集するのに適した条件下、かつそのために十分な時間にわたって、パラグラフ1～77のいずれか1つに記載の有効量のceDNA組成物を細胞に投与することを含む、ゲノム編集の方法。

92. 標的遺伝子が、1つ以上のガイドRNA配列を使用して標的化され、相同性修復 (HDR) ドナーテンプレートの存在下でHDRにより編集される遺伝子である、パラグラフ79～91のいずれかに記載の方法。

93. 標的遺伝子が、1つのガイドRNA配列を使用して標的化され、標的遺伝子が、非同相末端結合 (NHEJ) によって編集される、パラグラフ79～91のいずれかに記載の方法。

94. 方法が、疾患に関連する一塩基多型 (SNP) を訂正するためにインビボで行われる、パラグラフ79～93のいずれか1つに記載の方法。

95. 疾患が、鎌状赤血球貧血、遺伝性ヘモクロマトーシス、または癌遺伝性失明を含む

10

20

30

40

50

、パラグラフ 94 に記載の方法。

96. 少なくとも 2 つの異なる Cas タンパク質が、ceDNA ベクターに存在し、Cas タンパク質のうちの 1 つが、触媒的に不活性 (Cas-i) であり、Cas-I に関連するガイド RNA が、標的細胞のプロモーターを標的とし、Cas-I をコードする DNA が、誘導性プロモーターの制御下にあるため、所望の時点で標的遺伝子の発現を止めることができる、パラグラフ 91 に記載の方法。

97. 細胞の標的遺伝子における単一ヌクレオチド塩基対を編集するための方法であって、当該方法が、細胞を CRISPR/Cas 遺伝子編集系と接触させることを含み、CRISPR/Cas 遺伝子編集系の 1 つ以上の構成成分が、細胞を閉端 DNA (ceDNA) 核酸ベクター組成物と接触させることによって細胞に送達され、ceDNA 核酸ベクター組成物が、隣接する末端反復 (TR) 配列、および少なくとも 1 つの標的遺伝子またはその標的遺伝子の調節配列に相補的な領域を有する少なくとも 1 つの遺伝子編集核酸配列を含む、直鎖状閉端二重鎖 DNA であり、

ベクターから発現された Cas タンパク質が、触媒的に不活性であり、塩基編集部分に融合されており、

方法が、標的遺伝子の発現を調整するのに十分な条件下、かつそのために十分な時間にわたって実施される、方法。

98. 末端反復が、逆位 TR (ITR) である、パラグラフ 79 ~ 97 のいずれかに記載の方法。

99. 隣接する末端反復の少なくとも 1 つが、修飾された末端反復である、パラグラフ 79 ~ 98 のいずれかに記載の方法。

100. 塩基編集部分が、一本鎖特異的シチジンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤、または tRNA アデノシンデアミナーゼを含む、パラグラフ 79 ~ 99 のいずれかに記載の方法。

101. ベクターから発現される触媒的に不活性な Cas タンパク質が、dCas9 である、パラグラフ 79 ~ 100 のいずれかに記載の方法。

102. ceDNA ベクターが、パラグラフ 1 ~ 77 のいずれかに記載の構造を有し、接触される細胞が、T 細胞または CD34⁺ である、パラグラフ 79 ~ 101 のいずれかに記載の方法。

103. 標的遺伝子が、プログラム死タンパク質 (PD1)、細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (CTLA4)、または腫瘍壊死因子 α (TNF- α) をコードする、パラグラフ 79 ~ 102 のいずれかに記載の方法。

104. パラグラフ 102 により産生された細胞を、それを必要とする対象に投与することをさらに含む、パラグラフ 79 ~ 103 のいずれかに記載の方法。

105. 治療を必要とする対象が、遺伝性疾患、ウイルス感染、細菌感染、癌、または自己免疫疾患を有する、パラグラフ 104 に記載の方法。

106. 細胞における 2 つ以上の標的遺伝子の発現を調整する方法であって、

(i) 隣接する末端反復 (TR) 配列、および 2 つ以上の標的遺伝子に相補的な少なくとも 2 つのガイド RNA をコードする核酸配列を含むベクターを含む組成物であって、ベクターが、直鎖状閉端二重鎖 DNA である、組成物と、

(ii) 隣接する末端反復 (TR) 配列、および各々がガイド RNA と関連し、2 つ以上の標的遺伝子に結合する少なくとも 2 つの触媒的に不活性な DNA エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含むベクターを含む第 2 の組成物であって、ベクターが、直鎖状閉端二重鎖 DNA ベクターである、第 2 の組成物と、

(iii) 隣接する末端反復 (TR) 配列、および少なくとも 2 つの転写調節因子タンパク質またはドメインをコードする核酸配列を含むベクターを含む第 3 の組成物であって、ベクターが、直鎖状閉端二重鎖 DNA ベクターである、第 3 の組成物と、を細胞に導入することを含み、

少なくとも 2 つのガイド RNA、少なくとも 2 つの触媒的に不活性な RNA 誘導型エンドヌクレアーゼ、および少なくとも 2 つの転写調節因子タンパク質またはドメインが、細

10

20

30

40

50

胞で発現され、

ガイドRNA、触媒的に不活性なRNA誘導型エンドヌクレアーゼ、転写調節因子タンパク質またはドメイン、および標的遺伝子の間で2つ以上の共局在複合体が形成され、

転写調節因子タンパク質またはドメインが、少なくとも2つの標的遺伝子の発現を調節する、方法。

107. 末端反復が、逆位TR (ITR) である、パラグラフ106に記載の方法。

108. 隣接するTR配列のうちの少なくとも1つが、修飾型TRである、パラグラフ106または107に記載の方法。

109. 核酸配列をゲノムセーフハーバー遺伝子に挿入するための方法であって、細胞を (i) 遺伝子編集系、および (ii) ゲノムセーフハーバー遺伝子に対する相同性を有し、関心対象のタンパク質をコードする核酸配列を含む相同性指向修復テンプレートと接触させることを含み、

遺伝子編集系の1つ以上の構成成分が、細胞を閉端DNA (ceDNA) 核酸ベクター組成物と接触させることによって細胞に送達され、ceDNA核酸ベクター組成物が、隣接する末端反復 (TR) 配列と、少なくとも1つの遺伝子編集核酸配列を含む、直線状閉端二重鎖DNAであり、

方法が、関心対象のタンパク質をコードする核酸配列をゲノムセーフハーバー遺伝子に挿入するのに十分な条件下、かつそのために十分な時間にわたって実施される、方法。

110. 末端反復が、逆位TR (ITR) である、パラグラフ109に記載の方法。

111. 隣接するTR配列の少なくとも1つが、修飾型TRである、パラグラフ109または110に記載の方法。

112. ゲノムセーフハーバー遺伝子が、高発現レベルでタンパク質を発現することが知られている少なくとも1つのコード配列に近い活性イントロンを含む、パラグラフ109～111のいずれかに記載の方法。

113. ceDNAベクターが、パラグラフ1～77のいずれか1つのような構造を含む、パラグラフ109～112のいずれかに記載の方法。

114. ゲノムセーフハーバー遺伝子が、アルブミン遺伝子の中または近くの部位を含む、パラグラフ109～113のいずれかに記載の方法。

115. 関心対象のタンパク質が、受容体、毒素、ホルモン、酵素、または細胞表面タンパク質である、パラグラフ109～114のいずれかに記載の方法。

116. 関心対象のタンパク質が、分泌タンパク質である、パラグラフ109～115のいずれかに記載の方法。

117. 関心対象のタンパク質が、第VII因子 (FVII) または第IX因子 (FIX) を含む、パラグラフ109～116のいずれかに記載の方法。

118. 方法が、血友病Aまたは血友病Bの治療のためにインビボで実施される、パラグラフ109～117のいずれかに記載の方法。

【実施例】

【0638】

以下の実施例は、限定ではない例証によって提供される。本明細書に記載される野生型または修飾型ITRのうちのいずれかからceDNAベクターを構築できること、および以下の例示的な方法を使用して、そのようなceDNAベクターの活性を構築し、評価できることを当業者は理解するであろう。これらの方法は、ある特定のceDNAベクターを用いて例示されているが、それらは、説明に沿って任意のceDNAベクターに適用可能である。

【0639】

実施例1：ceDNAベクターを構築する

ポリヌクレオチド構築物テンプレートをを使用したceDNAベクターの産生は、PCT/US18/49996の実施例1に記載されている。例えば、本発明のceDNAベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バクミド、および/またはceDNA-バキュロウイルスであ

り得る。理論に限定されるものではないが、許容宿主細胞中、例えば、Repの存在下、2つの対称ITR（ITRのうちの少なくとも1つが、野生型ITR配列に対して修飾されている）および発現構築物を有するポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ceDNAベクターを産生するように複合する。ceDNAベクター産生は、第1の、テンプレート骨格（例えば、ceDNAープラスミド、ceDNAーバクミド、ceDNAーバキュロウイルスゲノム等）からのテンプレートの切除（レスキュー）、および第2の、切除したceDNAベクターのRep媒介型複製の2つのステップを経る。

【0640】

ceDNAベクターを産生するための例示的な方法は、本明細書に記載されるceDNAープラスミドに由来する。図1Aおよび1Bを参照すると、各ceDNAープラスミドのポリヌクレオチド構築物テンプレートは、左修飾型ITRおよび右修飾型ITRの両方を含み、ITR配列の間には、(i)エンハンサー／プロモーター、(ii)導入遺伝子のクローニング部位、(iii)転写後応答エレメント（例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)）、(iv)ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモン遺伝子(BGHpA)から）を有する。固有の制限エンドヌクレアーゼ認識部位(R1～R6)（図1Aおよび図1Bに示される）もまた、各構成成分の間に導入して、構築物中の特定部位への新たな遺伝子構成成分の導入を促進した。R3(PmeI)GTTTAAAC（配列番号7）およびR4(PacI)TTAAATTA（配列番号542）酵素部位は、導入遺伝子のオープンリーディングフレームを導入するために、クローニング部位の中に設計される。これらの配列を、Thermo Fisher Scientificから取得したpFastBac HT Bプラスミドにクローニングした。

【0641】

手短に言えば、遺伝子編集のための一連のceDNAベクターは、図4A～4Cに示されるプロセスを使用して、ceDNAープラスミド構築物から得られた。表8は、本明細書で使用するための遺伝子編集ceDNAベクターを生成するための例示的な構築物を示し、遺伝子編集分子に操作可能に連結されたプロモーターのいずれかの末端に複製タンパク質部位(RPS)（例えば、Rep結合部位）などの配列も含み得る。表8の番号は、各構成成分の配列に対応する、本文書中の配列番号を指す。表8のプラスミドは、導入遺伝子と右側ITRとの間の3'未翻訳領域において、配列番号8を含むWPRE、続いて配列番号9を含むBGHpAにより構築された。

【0642】

表8：例示的な遺伝子編集ceDNAベクターの生成のための非対称ITR対または対称mod-ITR対を含む例示的な構築物。

【表 8 - 1】

プラスミド	5' 修飾型 I T R	導入遺伝子	3' 修飾型 I T R (5' I T R に対して 対称)
構築物 - 1	配列番号 5 1	遺伝子編集分子	配列番号 2
構築物 - 2	配列番号 5 2	遺伝子編集分子	配列番号 1
構築物 - 3	配列番号 5 1	遺伝子編集分子	配列番号 2
構築物 - 4	配列番号 5 2	遺伝子編集分子	配列番号 1
構築物 - 5	配列番号 5 1	遺伝子編集分子	配列番号 2
構築物 - 6	配列番号 5 2	遺伝子編集分子	配列番号 1
構築物 - 7	配列番号 5 1	遺伝子編集分子	配列番号 2
構築物 - 8	配列番号 5 2	遺伝子編集分子	配列番号 1
構築物 1 1	(配列番号 6 3)	遺伝子編集分子	(配列番号 1)
構築物 1 2	(配列番号 5 1)	遺伝子編集分子	(配列番号 6 4)
構築物 1 3	(配列番号 6 3)	遺伝子編集分子	(配列番号 1)
構築物 1 4	(配列番号 5 1)	遺伝子編集分子	(配列番号 6 4)

10

20

【表 8 - 2】

プラスミド	5' 修飾型 I T R	導入遺伝子	3' 修飾型 I T R (5' I T R に対して 対称)
構築物-15	配列番号 484 (I T R-33 左)	遺伝子編集分子	配列番号 469 (I T R-18、右)
構築物-16	配列番号 485 (I T R-34 左)	遺伝子編集分子	配列番号 95 (I T R-51、右)
構築物-17	配列番号 486 (I T R-35 左)	遺伝子編集分子	配列番号 470 (I T R-19、右)
構築物-18	配列番号 487 (I T R-36 左)	遺伝子編集分子	配列番号 471 (I T R-20、右)
構築物-19	配列番号 488 (I T R-37 左)	遺伝子編集分子	配列番号 472 (I T R-21、右)
構築物-20	配列番号 489 (I T R-38 左)	遺伝子編集分子	配列番号 473 (I T R-22 右)
構築物-21	配列番号 490 (I T R-39 左)	遺伝子編集分子	配列番号 474 (I T R-23、右)
構築物-22	配列番号 491 (I T R-40 左)	遺伝子編集分子	配列番号 475 (I T R-24、右)
構築物-23	配列番号 492 (I T R-41 左)	遺伝子編集分子	配列番号 476 (I T R-25 右)
構築物-24	配列番号 493 (I T R-42 左)	遺伝子編集分子	配列番号 477 (I T R-26 右)
構築物-25	配列番号 494 (I T R-43 左)	遺伝子編集分子	配列番号 478 (I T R-27 右)
構築物-26	配列番号 495 (I T R-44 左)	遺伝子編集分子	配列番号 479 (I T R-28 右)
構築物-27	配列番号 496 (I T R-45 左)	遺伝子編集分子	配列番号 480 (I T R-29、右)
構築物-28	配列番号 497 (I T R-46 左)	遺伝子編集分子	配列番号 481 (I T R-30、右)
構築物-29	配列番号 498 (I T R-47、左)	遺伝子編集分子	配列番号 482 (I T R-31、右)
構築物-30	配列番号 499 (I T R-48、左)	遺伝子編集分子	配列番号 483 (I T R-32 右)
構成物-31	配列番号 51 (WT-I T R)	遺伝子編集分子	配列番号 1 (WT-I T R)

【0643】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集 c e D N A ベクターを作製するための構築物は、本明細書に記載される調節スイッチ、例えば、誘導性プロモーターである、プロモーターを含む。

10

20

30

40

50

【0644】

c e D N A - バクミドの産生：

図4Aを参照して、DH10Bacコンピテント細胞(MAX EFFICIENCY (登録商標) DH10Bac (商標) コンピテント細胞、Thermo Fisher)を、製造元の指示によるプロトコルに従って、試験プラスミドまたは制御プラスミドのいずれかで形質転換した。DH10Bac細胞中のプラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組み換えを誘導して、組み換えc e D N A - バクミドを生成した。バクミドおよびトランスポサゼプラスミドの形質転換体および維持のために選択する抗生物質とともに、X-galおよびIPTGを含有する細菌寒天平板上のE. coli中の青白スクリーニングに基づいて(Φ80dlacZΔM15マーカーは、バクミドベクターからのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のα-相補性を提供する)正の選択をスクリーニングすることによって、組み換えバクミドを選択した。β-ガラクトシダーゼ指標遺伝子を妨害する転位によって引き起こされる白色コロニーを採取し、10mLの培地中で培養した。

10

【0645】

組み換えc e D N A - バクミドをE. coliから単離し、FugeneHDを使用してSf9またはSf21昆虫細胞中にトランスフェクトして、感染性バキュロウイルスを産生した。付着したSf9またはSf21昆虫細胞を、25℃のT25フラスコ中の50mLの培地で培養した。4日後、培養培地(P0ウイルスを含有する)を細胞から取り除き、0.45μmフィルターで濾過し、感染性バキュロウイルス粒子を細胞または細胞残屑から分離した。

20

【0646】

任意に、第1世代のバキュロウイルス(P0)を、ナイーブSf9またはSf21昆虫細胞を感染させることによって50~500mLの培地中で増幅させた。オービタルシェーカー培養器内の懸濁液培養物中の細胞を、130rpm、25℃で維持し、細胞が(14~15nmのナイーブ直径から)18~19nmの直径に到達するまで、細胞直径および生存性、ならびに約4.0E+6細胞/mLの密度を監視した。感染3日後~8日後の間に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離後に収集し、細胞および残屑を除去した後、0.45μmフィルターで濾過した。

【0647】

試験構築物を含むc e D N A - バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性または力価を判定した。具体的には、2.5E+6細胞/mLの4×20mL Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、25~27℃でインキュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存性の変化によって4~5日間にわたって毎日判定した。

30

【0648】

図4Aを参照すると、例えば、図7Aによる「Rep-プラスミド」は、Rep78(配列番号13)またはRep68(配列番号12)およびRep52(配列番号14)またはRep40(配列番号11)の両方を含むpFASTBAC(商標)二重発現ベクター(ThermoFisher)において産生された。

40

【0649】

Rep-プラスミドを、製造元によって提供されるプロトコルに従って、DH10Bacコンピテント細胞(MAX EFFICIENCY (登録商標) DH10Bac (商標) コンピテント細胞(Thermo Fisher)中に形質転換した。DH10Bac細胞中のRep-プラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組み換えを誘導して、組み換えバクミド(「Rep-バクミド」)を生成した。X-galおよびIPTGを含有する細菌寒天平板上のE. coli中の青白スクリーニング(Φ80dlacZΔM15マーカーは、バクミドベクターからのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のα-相補性を提供する)を含む正の選択によって、組み換えバクミドを選択した。単離された白色

50

コロニーを採取し、10 mLの選択培地（LBブロス中のカナマイシン、ゲンタマイシン、テトラシクリン）中に播種した。組み換えバクミド（Rep-バクミド）をE. coliから単離し、Rep-バクミドをSf9またはSf21昆虫細胞中にトランスフェクトして、感染性バキュロウイルスを産生した。

【0650】

Sf9またはSf21昆虫細胞を、50 mLの培地中で4日間培養し、感染性組み換えバキュロウイルス（「Rep-バキュロウイルス」）を、培養物から単離した。任意に、第1世代のRep-バキュロウイルス（P0）を、ナイーブSf9またはSf21昆虫細胞を感染させることによって増幅させ、50～500 mLの培地中で培養した。感染3日後～8日後の間に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離によって細胞を分離するか、または濾過もしくは別の分画プロセスのいずれかによって収集した。Rep-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性を判定した。具体的には、 2.5×10^6 細胞/mLの 4×20 mL Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、インキュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存性の変化によって4～5日間にわたって毎日判定した。

【0651】

ceDNAベクター生成および特徴付け

図4Bを参照して、次に、（1）ceDNA-バクミドを含有する試料またはceDNA-バキュロウイルス、および（2）上記のRep-バキュロウイルスのいずれかを含有するSf9昆虫細胞培養培地を、Sf9細胞（ 2.5×10^6 細胞/mL、20 mL）の新鮮な培養物に、それぞれ1:1000および1:10,000の比で添加した。次いで、細胞を25℃、130 rpmで培養した。同時感染の4～5日後に、細胞の直径および生存率が検出される。細胞直径が18～20 nmに到達し、生存性が約70～80%であったとき、細胞培養物を遠心分離し、培地を取り除き、細胞ペレットを収集した。最初に、細胞ペレットを、適量の水性培地（水または緩衝液のいずれか）に再懸濁する。ceDNAベクターを単離し、Qiagen MIDIPLUS（商標）精製プロトコル（Qiagen、カラムあたり0.2 mgの処理された細胞ペレット質量）を使用して、細胞から精製した。

【0652】

Sf9昆虫細胞から産生および精製されるceDNAベクターの収率は、最初に、260 nmでのUV吸光度に基づいて判定した。

【0653】

ceDNAベクターは、図4Dに例示されるような未変性条件または変性条件下で、アガロースゲル電気泳動によって特定することによって評価することができ、（a）制限エンドヌクレアーゼ切断およびゲル電気泳動分析後の、未変性ゲルに対して変性ゲル上で2倍のサイズで移行する特徴的なバンドの存在、ならびに（b）未切断材料の変性ゲル上の単量体および二量体（2x）バンドの存在は、ceDNAベクターの存在に特有である。

【0654】

単離されたceDNAベクターの構造を、共感染Sf9細胞から得られたDNA（本明細書に記載される）を、制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、a）ceDNAベクター内の単一切断部位のみの存在、およびb）0.8%変性アガロースゲル（>800 bp）上で分画したときに明らかに見えるほど十分に大きい、得られる断片についてさらに分析した。図4Dおよび4Eに示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状DNAベクターおよび直鎖状で連続的な構造を有するceDNAベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別することができ、例えば、非連続的な構造を有するDNAベクターは、1 kbおよび2 kb断片を産生することが期待されるが、連続的な構造を有する非カプシド化ベクターは、2 kbおよび4 kb断片を産生することが期待される。

【0655】

したがって、定義によって必要とされるように、単離されたceDNAベクターが共有

結合性閉端であることを定性的に実証するために、試料を、特定のDNAベクター配列の文脈において、単一制限部位を有すると特定された制限エンドヌクレアーゼで消化させ、好ましくは、等しくないサイズ（例えば、1000bpおよび2000bp）の2つの切断産物をもたらす。変性ゲル（2つの相補的DNA鎖を分離する）上の消化および電気泳動に続いて、直鎖状の非共有結合的に閉じたDNAは、2つのDNA鎖が連結され、展開されて2倍の長さであるとき（但し、一本鎖である）、1000bpおよび2000bpのサイズで溶解するが、共有結合的に閉じたDNA（すなわち、ceDNAベクター）は、2倍サイズ（2000bpおよび4000bp）で溶解するであろう。さらに、DNAベクターの単量体、二量体、およびn量体形態の消化は、多量体DNAベクターの末端間連結に起因して、同じサイズの断片としてすべて溶解する（図4Dを参照）。 10

【0656】

本明細書で使用される場合、「未変性ゲルおよび変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるDNAベクターの特定のためのアッセイ」という語句は、制限エンドヌクレアーゼ消化に続いて、消化産物の電気泳動的評価を実施することによって、ceDNAの閉端性を評価するためのアッセイを指す。1つのそのような例示的アッセイを以下に示すが、当業者であれば、この実施例に関する当該技術分野において既知の多くの変形が可能であることを理解するであろう。およそ1/3×および2/3×のDNAベクター長の産生物を生成するであろう関心対象のceDNAベクターに対する単一切断酵素であるように、制限エンドヌクレアーゼが選択される。これは、未変性ゲルおよび変性ゲルの両方でバンドを溶解する。変性前に、試料から緩衝液を取り除くことが重要である。Qiagen 20
PCRクリーンアップキットまたは脱塩「スピンカラム」、例えば、GE HEALTH CARE ILLUSTRATE（商標）MICROSPIN（商標）G-25カラムは、エンドヌクレアーゼ消化のための当該技術分野において既知のいくつかのオプションである。アッセイは、例えば、i) DNAを適切な制限エンドヌクレアーゼ（複数可）で消化すること、2) 例えば、Qiagen PCRクリーンアップキットに適用し、蒸留水で溶出すること、iii) 10×変性溶液（10×=0.5M NaOH、10mM EDTA）を添加し、10×色素を添加し、緩衝せず、10×変性溶液を、1mM EDTA および200mM NaOHで以前にインキュベートされた0.8~1.0%ゲル上で4×に添加することによって調製されたDNAラダーと一緒に分析して、NaOH濃度が、 30
ゲルおよびゲルボックス中で均一であり、1×変性溶液（50mM NaOH、1mM EDTA）の存在下でゲルを流動させることを保証することを含む。当業者であれば、サイズおよび所望のタイミングの結果に基づいて、電気泳動を実行するために使用する電圧を理解するであろう。電気泳動後に、ゲルを排出し、1×TBEまたはTAE中で中和し、蒸留水または1×SYBR Goldを含む1×TBE/TAEに移す。次いで、例えば、Thermo FisherのSYBR（登録商標）Gold核酸ゲル染料（DMSO中10,000X濃縮物）および落射蛍光灯（青色）またはUV（312nm）を用いてバンドを可視化することができる。

【0657】

生成されたceDNAベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。1つの例示的な非限定的方法として、試料の全体UV吸光度に対するceDNA-プラスミドの寄与は、ceDNAベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。例えば、UV吸光度に基づいて、4μgのceDNAベクターをゲル上に負荷し、ceDNAベクター蛍光強度が、1μgであることが知られている2kbバンドに相当する場合、1μgのceDNAベクターが存在し、ceDNAベクターは、全UV吸光材料の25%である。次いで、ゲル上のバンド強度を、バンドが表す計算されたインプットに対してプロットする。例えば、全ceDNAベクターが8kbであり、切除された比較バンドが2kbである場合、バンド強度は、全インプットの25%としてプロットされ、この場合、1.0μgのインプットに対して0.25μgとなる。ceDNAベクター-プラスミド滴定を使用して、標準曲線をプロットする場合、回帰直線等式を使用して、ceDNAベクターバンドの量を計算し、次いで、これを使用して、ceD 40
50

NAベクターにより表される全インプットのパーセント、または純度パーセントを判定することができる。

【0658】

実施例2：ceDNAベクターは、ルシフェラーゼ導入遺伝子をインビトロで発現する構築物は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子をコードするオープンリーディングフレームを、ceDNAプラスミド構築物：ルシフェラーゼコード配列を含む構築物-15〜30（表8の上記を参照）のクローニング部位に導入することによって生成された。HEK293細胞を培養し、FUGENE（登録商標）（Promega Corp.）をトランスフェクション剤として使用し、100ng、200ng、または400ngのプラスミド構築物1〜31でトランスフェクトした。各プラスミドからのルシフェラーゼの発現は、各細胞培養におけるルシフェラーゼ活性に基づいて決定され、ルシフェラーゼ活性がプラスミドからの遺伝子発現に起因することを確認した。

10

【0659】

実施例3：ceDNAベクターからのルシフェラーゼ導入遺伝子のインビボタンパク質発現

構築物から産生されるceDNAベクターからの導入遺伝子のインビボタンパク質発現は、マウスにおいて評価され得る。例えば、ceDNAプラスミド構築物1〜31から取得されたceDNAベクター（表8に記載される）を試験し、外因性ホタルルシフェラーゼceDNAのリボソームを含まないceDNA構築物の流体力学的注入後のマウスモデルにおける持続した耐性のあるルシフェラーゼ導入遺伝子発現、再投与（28日目）、および耐性（42日目まで）を実証した。異なる実験では、選択されたceDNAベクターのルシフェラーゼ発現は、インビボで評価され、ceDNAベクターは、ルシフェラーゼ導入遺伝子を含み、5' ITRおよび3' ITRは、表2、表4A、表4B、もしくは表5のうちのいずれかにリストされている任意のITR対、または図7A〜7Bに示されている修飾型ITR対のうちのいずれかから選択される。以下の例示的な方法は、ceDNAベクターからのインビボタンパク質発現を評価するために使用されてきた。

20

【0660】

インビボルシフェラーゼ発現：5〜7週齢の雄CD-1 IGSマウス（Charles River Laboratories）に、0日目の尾静脈への静脈内流体力学的投与を介して1.2mL量のルシフェラーゼを発現する0.35mg/kgのceDNAベクターを投与する。3、4、7、14、21、28、31、35、および42日目に、ルシフェラーゼ発現をIVIS撮像によって評価する。手短に言えば、マウスに150mg/kgのルシフェリン基質を腹腔内的に注入した後、全身発光をIVIS（登録商標）撮像を介して評価する。

30

【0661】

IVIS撮像を、3日目、4日目、7日目、14日目、21日目、28日目、31日目、35日目、および42日目に実施し、収集した器官を42日目の屠殺後にエクスピボで撮像する。

【0662】

研究の経過中、動物を計量し、健康全般および幸福について毎日監視する。屠殺後、終端心臓穿刺によって各動物から血液を収集し、および2つの部分に分割し、1）血漿および2）血清に処理し、血漿は急速冷凍し、血清は肝臓酵素パネルに使用した後に急速冷凍する。追加として、肝臓、脾臓、腎臓、および鼠径リンパ節（LN）を収集し、IVISによってエクスピボで撮像する。

40

【0663】

ルシフェラーゼ発現を、MAXDISCOVERY（登録商標）ルシフェラーゼELISAアッセイ（BIOO Scientific/PerkinElmer）、肝臓試料のルシフェラーゼのためのqPCR、肝臓試料の組織病理学、および／または血清肝臓酵素パネル（VetScanVS2、Abaxis Preventative Care Profile Plus）によって、肝臓において評価する。

50

【0664】

実施例4：修飾型 I T R スクリーニング

A. 非対称および対称 I T R 対を含む c e D N A ベクターの修飾型 I T R スクリーニング。

m o d - I T R 構造と c e D N A 形成との関係の分析は、参照により全体が本明細書に組み込まれる P C T 出願第 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 号に記載されているように実施することができる。本明細書の図 7 A ~ 7 B ならびに表 4 A および 4 B に示される一連の m o d - I T R は、c e D N A 形成および c e D N A コード化導入遺伝子を発現する能力に対する特定の構造変化の影響を問い合わせるために構築された。ヒト細胞培養物中の突然変異体構築、c e D N A 形成のアッセイ、および c e D N A 導入遺伝子発現の評価を、以下でさらに詳細に説明する。予想されるとおり、3つの負の対照（培地のみ、模擬トランスフェクション欠失ドナー D N A、および R e p 含有バキュロウイルス細胞の非存在下で処理された試料）は、著しいルシフェラーゼ発現を示さなかった。突然変異体試料の各々においてロバストルシフェラーゼ発現が観察され、各試料について、c e D N A をコードした導入遺伝子が、良好にトランスフェクトされ、突然変異にかかわらず発現されたことを示す。したがって、突然変異体試料は、非対称の m o d - I T R 対を含む c e D N A を正しく形成するように思われた。M o d - I T R は、本発明の組成物および方法で使用するができ、以下の例示的な方法を使用して活性についてスクリーニングすることができる。

【0665】

上記の実施例 1 に記載され、図 4 B に記載されるように、対称 I T R 対を有する c e D N A ベクターが生成され、構築された。対称 m o d - I T R および対称 W T - I T R の関係の分析は、P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている方法に従って評価した。I T R 配列への突然変異は、左右両方の I T R 領域で対称的に作成された。表 5 に開示されているように、ライブラリーには、16 個の右側二重突然変異体（例えば、対称 m o d - I T R 対）が含まれていた。

【0666】

実施例5：遺伝子編集 c e D N A ベクターの生成

例示の目的で、例示的な遺伝子編集 c e D N A ベクターは、第 V I I I 因子を編集するための c e D N A ベクターの生成に関して記載されており、以下に記載されている。しかしながら、本明細書に記載される方法および構築物において有用な遺伝子編集 c e D N A ベクターを生成する方法を説明するために、この実施例では第 V I I I 因子が例示されているが、当業者は、上述の使用のように、遺伝子編集が望まれる任意の遺伝子を使用できることを承知している。編集のための例示的な遺伝子は、本明細書において、例えば、「遺伝子編集 c e D N A で治療される例示的な疾患」および「遺伝子編集のための追加の疾患」と題するセクションに記載されている。

【0667】

第 V I I I 因子遺伝子編集 c e D N A の生成：関心対象の導入遺伝子を含むオープンリーディングフレーム（例えば、1つの非限定的な例として、第 V I I I 因子）を c e D N A ベクターに挿入し、オープンリーディングフレームに隣接するゲノム D N A 配列の大きな（各々 2 K b までの）相動性アームによって隣接されて、導入遺伝子の欠陥のある未変性コピーに関連する疾患または障害を有する患者（第 V I I I 因子の場合、血友病 A に罹患した患者）の内因性導入遺伝子座内の H D R を促進する。部位特異的ヌクレアーゼオープンリーディングフレームは、任意に、s g R N A などの任意の必要な補助構成成分とともに、未変性の導入遺伝子座（例えば、第 V I I I 因子遺伝子座）またはその近くの部位に特異的であり、組み換えを増加させるために効果的なヌクレアーゼとともにベクターに含まれている。c e D N A ベクターはまた、ヌクレアーゼが、c e D N A ベクターからのヌクレアーゼの発現を無効にする c e D N A ベクター自体の部位にさらに特異的であるように操作することもできる。そのようなさらなる特異性は、c e D N A ベクターによって発現されるさらなる g R N A によって提供される。c e D N A は、例えば、本明細書に記

載されるように脂質ナノ粒子（LNP）で送達されてもよい。

【0668】

c e DNA-導入遺伝子構築物は、ヌクレアーゼ（例えば、Cas9、TALE、MegaTAles、またはZFN）、および必要に応じて遺伝子編集プロセスにDNA特異性を提供するガイドRNAを含むようにさらに操作され得る。したがって、この「オールインワン」c e DNA構造は、コアc e DNA骨格エレメントに加えて、次のエレメント：導入遺伝子コード配列（例えば、第VII因子をコードする導入遺伝子）、2つのゲノム相同性領域（例えば、内因性第VII因子遺伝子座に特異的なHR）、ヌクレアーゼコード領域およびヌクレアーゼの発現を駆動するためのプロモーター、ならびにCRISPR系が利用されている場合、ガイドRNA（例えば、Cas9の場合）を有する。c e DNAベクターが、導入遺伝子とともにsgRNAおよびCas9発現カセットをシスに有し、sgRNAおよびCas9が、相同性アームの外側にあり、したがって細胞ゲノムに組み込まれないように、c e DNAベクターを操作することができる。遺伝子編集事象の後、HDR後の直鎖状c e DNAは、DNA末端を露出しているため分解され、したがってこの構築物からの発現を低減する。

10

【0669】

第VII因子構築物を有する例示的なc e DNAベクターは、DNA配列をヌクレアーゼ配列（またはそのプロモーター）に組み込み、それ自体の不活性化を誘導するようにさらに修飾することができる。例えば、Cas9タンパク質が産生されると、それは遺伝子編集（すなわち、所望の効果）を誘導するだけでなく、c e DNAに結合してc e DNA内で二本鎖DNA切断を誘導し、Cas9の下方調節／排除を確実にする（持続的なCas9によって誘導されるオフターゲットDNA切断の可能性を低減する）。

20

【0670】

第VII因子をコードする遺伝子編集c e DNAベクターは、アルブミン遺伝子座または他のゲノム遺伝子座（挿入された第VII因子の発現を促進する強力なプロモーターの近く）に対するゲノム相同性アームを用いて生成され得る。実施例5に列挙された様々な実験は、この枠組みで繰り返される。

【0671】

図10Aは、本開示による試験ベクター発現ユニットを示し、c e DNA設計に組み込まれる5'および3'相同性アームが隣接している。この実施形態では、c e DNAは、アルブミンゲノム遺伝子座にハイブリダイズし、したがって内因性アルブミンプロモーター下でFIXの発現を駆動する5'および3'相同性アームが隣接する第IX因子（FIX）オープンリーディングフレームで設計される。対照は、5'相同性アームのみの発現単位であり、1つは、3'相同性アームのみを含む（それぞれ図10Bおよび10C）。プロモーター、WPREエレメント、pAを含むレポーター遺伝子の発現ユニット、例えば、GFPを使用して、実験的に発現を確認することができる（図10D）。

30

【0672】

ヌクレアーゼ発現ユニットを含むc e DNAベクターは、Cas9 mRNA、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、突然変異型「ニッカーゼ」エンドヌクレアーゼ、クラスII CRISPR/CAS系（CPF1）（図10E）などのトランスで送達され得る。本明細書に記載されるLNPは、送達オプションとして使用され得る。ヌクレアーゼ発現ユニットの核への輸送は、5'または3'酵素ペプチド配列（例えば、Cas9、ZFN、TALEN等のヌクレアーゼ発現ユニット）に融合した核局在化シグナル（NLS）を使用することによって増加または改善され得る。c e DNAによって発現されるヌクレアーゼに応じて、所望の部位で二本鎖切断（DSB）を誘導するために、1つ以上の単一誘導型RNAをトランスで送達することもできる。例えば、sgRNA発現ベクターまたは化学合成された合成sgRNAとして。（sg＝単一ガイドRNA標的配列）（図10F）。sgRNAベクターは、c e DNAベクターまたは他の発現ベクターであり得る。単一ガイドRNA配列は、自由に利用できるソフトウェア／アルゴリズムを使用して選択され、検証され得

40

50

る。4つの潜在的な候補配列が選択され、検証される。(tools.genome-engineering.orgなどの公開リソースを使用して、好適な単一ガイドRNA配列を選択することができる。)

【0673】

例示的な5'および3'相同性アーム：5'および/または3'相同性アームは、図8、9、および10A~10Fに示されるようなceDNA構築物での使用のために、約350bpの長さであり得る。例えば、5'相同性アームは、50~2000bpの範囲であり得る。同様に、3'相同性アームは、約2000bpの長さであり得、50~2000bpの範囲であり得る。当業者は、Zhang, Jian-Ping, et al. "Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage." *Genome biology* 18.1 (2017): 35. and Wang, Yuanming, et al. "Systematic evaluation of CRISPR-Cas systems reveals design principles for genome editing in human cells." *Genome biology* 19.1 (2018): 62に記載されるように、5'および/または3'相同性アームの長さおよび/または組み換え頻度を修正することができる。本明細書で図16に示すように、FIXまたはFVIIは、任意のプロモーターレスのオープンリーディングフレーム(ORF)で置換することができる。WPREおよびBGHpAなどのポリアデニル化シグナルを含むがこれらに限定されない追加のエレメントを、遺伝子編集ceDNA構築物に付加することができる。例えば、挿入される遺伝子(例えば、例示的な遺伝子としてのFIXまたはFVII)の発現は、内因性かつ非常に強力なアルブミンプロモーターによって駆動される。WPREなどの転写強化エレメントが、ORFの3'に付加される。ポリアデニル化シグナル(例えば、BGHpA)も付加され得る。本明細書に開示されるように、ceDNA構築物の容量は大きいので、ITR間のDNA断片の長さを15kb以上にすることができる。したがって、大きなORFを備えたceDNAベクター系が使用に含まれる。また、強力なプロモーター単位を有する他の発現単位を使用することができる。他のセーフハーバー遺伝子座を標的とする相同性アームを持つceDNAベクターを使用することができる。例えば、アルブミン遺伝子座を標的とする代わりに、限定されないが、CCR5またはAAVセーフハーバーS1(AAVS1)遺伝子座などの他のセーフハーバー遺伝子座を標的とする相同性アームを有する。これにより、標的細胞または組織にいかなる影響も与えることなく、遺伝子編集分子または標的遺伝子をイントロン部位に挿入することができる。図11に示すように、合成プロモーターユニット、例えばceDNAベクターに記載されているCAGプロモーターのイントロンにsgRNA配列を導入することにより、ヌクレアーゼ活性の自己不活性化機能の滴定のために発現構築物を作製することができる。不活性化の程度は、sgRNA配列もしくは組み合わせの数、および/または突然変異型(最適化されていない)sgRNA標的配列によって調節される。(Zhang et al, NatPro, 2013 Regulation of Cas9 activity by using de-optimized sgRNA recognition target sequence.) 図11では、sgRNAは、単独または複数(例えば4)であり、いくつかの実施形態では、異なる黒または白で表される複数の固有の標的配列からなり得る。

【0674】

図12は、1つ以上のsgRNAの発現を駆動するために、ceDNAベクターが様々なPol IIIプロモーターユニット配置を含み得る例を示す。この例では、複数の最適なプロモーターがITRの間に配置されている。転写方向は、順方向または逆方向であり得る。sgRNAは、複合および/または複製され得る。図14は、ceDNAがU6プロモーターを利用するなど、複数のsgRNA(sg1、sg2、sg3、またはsg4)を発現し得る別の例を示す。

10

20

30

40

50

【0675】

したがって、本明細書で使用するための遺伝子編集のための c e D N A ベクターは、これらの修飾のうちのいずれか 1 つ以上を含み得る。

【0676】

実施例 6：マスター O R F を備えたオールインワン遺伝子編集 c e D N A ベクター

図 15 に示されるような特徴を含む遺伝子編集 c e D N A ベクターを作製することができる。ラベル付けされていない含まれている機能は、ヌクレアーゼ発現ユニット（ハッシュされたヌクレアーゼエレメントを含む）、および図示された s g R N A 標的配列を有するプロモーターの下流のイントロンである。機能には、c e D N A 特異的 I T R ；転写方向に関して任意の配向を有する P o l I I I プロモーター駆動（U 6 または H 1）s g R N A 発現ユニット；最適化解除の有無にかかわらず、s g R N A 標的配列を含み得る合成プロモーター駆動型ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9、二重突然変異型ニッカーゼ、T a l e n、または他の突然変異体）発現ユニット（実験では、示されている以外の場所にある）；0.05～6 k b のストレッチ相同性アームが隣接するウイルス 2 A ペプチド切断部位（2 A）を介して選択マーカー（例えば、N e o R）に融合する可能性のある導入遺伝子（例えば、F I X）が含まれる。（2 A 系に関する：C h a n e t a l, C o m p a r i s o n o f I R E S a n d F 2 A - B a s e d L o c u s - S p e c i f i c M u l t i c i s t r o n i c E x p r e s s i o n i n S t a b l e M o u s e L i n e s H S V - T K s u i c i d e, P L O S 2 0 1 1 H S V - T K s u i c i d e g e n e s y s t e m, F e s n a k e t a l, E n g i n e e r e d T C e l l s : T h e P r o m i s e a n d C h a l l e n g e s o f C a n c e r I m m u n o t h e r a p y, N a t R e v C a n 2 0 1 6.）

【0677】

好適であれば、相同性アームの外側に位置付けられた、良好な正しい部位の使用のために制御し、選択できるようにする、負の選択マーカー（例えば、H S V T K）および発現ユニットが想定される。本明細書に開示される他の調節エレメントまたは調節スイッチもまた、負の選択マーカー遺伝子の代わりに、またはそれに対して補足的に含まれる。

【0678】

H D R エレメントの挿入のための相同性アームを含む例示的な c e D N A ベクターを図 13 に示す。そのような c e D N A ベクターでは、ランダムな統合がある場合、負の選択可能マーカーを持つベクター全体がゲノムに統合される。そのような誤ってトランスフェクトされた細胞は、H S V T K 負の選択可能マーカーのための G V C などの、適切な薬物で殺すことができる。あるいは、マークされた負の選択可能は、本明細書に記載される調節スイッチ、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる P C T / U S 18 / 49996 の表 11 に開示されるキルスイッチ遺伝子または任意の遺伝子で置き換えることができる。

【0679】

この実施例と同様の別の例示的な c e D N A ベクターが図 9 に示されているが、負の選択マーカーを「二重突然変異体ニッカーゼ」の s g R N A 標的配列で置き換えている（下向きの実線矢印で示されている）。一本鎖 D N A カット（ニッキング）の導入は、突然変異体 I T R に近い 3' 相同性アームの下流のねじれを解放し、アニーリングを増加させ、したがって H D R 頻度を増加させるのを助け得る。そのような c e D N A ベクターでは、負のマーカーは、「二重突然変異体ニッカーゼ」の s g R N A 標的配列で使用する。

【0680】

この実施例で論じられる c e D N A ベクターは、説明のみを目的としており、熟練者は、異なる標的遺伝子を挿入するように修飾することができ、例えば、F I X を使用する代わりに第 X I I I 因子を使用し、第 X I I I 因子を使用する場合は、F I X を使用する。同様に、当業者は、遺伝子編集が望まれる任意の標的遺伝子を使用できることを知っている。

10

20

30

40

50

【0681】

実施例7：疾患の治療のための遺伝子編集c e DNAベクターの生成。

例示の目的で、実施例7は、異なる疾患を治療するための例示的な遺伝子編集c e DNAベクターを生成することを説明する。しかしながら、嚢胞性線維症、肝臓障害、全身性障害、CNS障害、および筋障害の遺伝子がこの実施例で例示され、本明細書に記載される方法および構築物において有用な遺伝子編集c e DNAベクターを生成する方法を例示しているが、当業者は、上述の使用のように、遺伝子編集が望まれるあらゆる疾患を治療するために標的遺伝子を修飾できることを承知している。本明細書に記載されるように遺伝子編集がc e DNA編集ベクターで疾患を治療するための望ましい戦略である例示的な疾患または遺伝性障害は、「遺伝子編集c e DNAで治療される例示的な疾患」および「遺伝子編集のための追加の疾患」と題するセクションで論じられている。

10

【0682】

一実施例では、2～4などの複数のヌクレアーゼ切断部位を有するsgRNAを含むc e DNAベクターを生成することができ、ヌクレアーゼの上流イントロンおよび5' 相同性アームの一方または両方に入れられる。これらは、別個または共有のsgRNAによって駆動される特異性を有し得る。これらの特徴のすべてを有する例示的な「オールインワン」c e DNAベクターを図15に示す。

【0683】

c e DNAベクターを置換または提供する例示的な導入遺伝子は、肝臓障害（例えば、OTC、GSD1a、Crigler-Najjar、PKU等）または全身障害（例えば、MPSII、MLD、MPSIIIA、Gaucher、Fabry、Pompe等）を含む、他の遺伝性障害のための別個の導入遺伝子で遺伝子編集を誘導するように構成され得る。

20

【0684】

遺伝性障害または疾患を治療するための遺伝子編集c e DNAベクターの例は、c e DNAベクターを修飾して、例えば嚢胞性線維症（CF）などの肺で遺伝子編集を誘導できるという点で、実施例6で論じたものと同様であり得る。そのようなc e DNAベクターは、CFで突然変異する遺伝子であるCFTRをコードするために作成される。CFTRは、AAV内に含めることができない大きな遺伝子である。したがって、c e DNAベクターは、独特の解決策を提供し、いくつかの実施形態では、肺上皮の遺伝子編集を誘導するために、対象に静脈内投与および／または噴霧製剤として投与することができる。上記のように、c e DNA遺伝子編集ベクターは、CFTRが内因性CFTR遺伝子座に挿入されるように構成されている。そのような例では、c e DNAベクターは、ヌクレアーゼおよびガイドRNAを含むだけでなく、大きな相同性アームを利用して遺伝子編集の効率および忠実度を高めることもできる。

30

【0685】

CNS障害の遺伝子編集のための遺伝子編集c e DNAベクターの例は、実施例6で論じられるものと同様であり、c e DNAは、神経変性障害（例えば、家族型のアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病）、リソソーム蓄積症（例えば、MPSII、MLD、MPSIIIA、Canavan、Batten等）、または神経発達障害（例えば、SMA レット症候群等）を含む障害について、CNSで遺伝子編集を誘導するように修飾されている。

40

【0686】

筋肉の遺伝性障害または疾患を治療するための遺伝子編集c e DNAベクターの例は、c e DNAベクターを修飾して、限定されないが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、筋膜肩甲上腕筋ジストロフィー等を含む障害について、筋肉における遺伝子編集を誘導することができるという点で、実施例6で論じたものと同様であり得る。

【0687】

実施例6～7で論じられ、例示された遺伝子編集c e DNA（すなわち、c e DNAベクターを置換または提供する導入遺伝子）を、欠陥のある導入遺伝子の動物モデルの標的

50

細胞に送達して、遺伝子編集の有効性を評価し、より効果的な遺伝子産物を産生する細胞を提供することもできる。

【0688】

実施例8：c e D N A は、メガヌクレアーゼが標的二本鎖切断（D S B）を実施する遺伝子編集での使用に適している。

遺伝子編集 c e D N A ベクターは、メガヌクレアーゼによって提供される二本鎖切断の後に挿入される訂正 D N A 鎖として、テンプレートヌクレオチド配列を含み得る。例示の目的で、例示的な遺伝子編集 c e D N A ベクターは、A p o A - I 遺伝子を編集および訂正するための c e D N A ベクターの生成に関して記載されており、以下に記載される。しかしながら、本明細書に記載される方法および構築物において有用な遺伝子編集 c e D N A ベクターを生成する方法を説明するために、この実施例では A p o A - I 遺伝子の訂正が例示されているが、当業者は、上述のように、c e D N A ベクターを使用して、遺伝子編集が所望される任意の他の遺伝子の配列を訂正できることを承知している。編集のための例示的な遺伝子は、本明細書において、例えば、「遺伝子編集 c e D N A で治療される例示的な疾患」および「遺伝子編集のための追加の疾患」と題するセクションに記載されている。

【0689】

インビボでの突然変異型ヒト A p o A I 遺伝子のメガヌクレアーゼにより誘導される訂正

血流中のメガヌクレアーゼ発現カセットおよび c e D N A の混合物を直接注入することによって、インビボでの哺乳類の二本鎖切断（D S B）により誘導される遺伝子変換が使用される。インビボでのマウスにおけるヒト A p o A - I 導入遺伝子の修復に基づく系が提供される。アポリポタンパク質 A - I（A P O A - I）は、高密度リポタンパク質（H D L）の主要なタンパク質成分であり、H D L 代謝に重要な役割を果たす。高密度リポタンパク質は、コレステロール逆輸送の主要なメディエーターとして主要な心臓保護の役割を有する。A p o A - I 遺伝子は、肝臓で発現され、タンパク質は、血中に分泌される。さらに、ヒトにおける A p o A - I 欠乏症は、早期の冠状動脈性心疾患につながる。総合すると、これらの基準により、A p o A - I 遺伝子は、c e D N A を含むメガヌクレアーゼにより誘導された遺伝子訂正の研究に適した候補になる。

【0690】

導入遺伝子：ヒト A p o A - I 遺伝子をコードするゲノム配列は、導入遺伝子の構築に使用される。A p o A - I 遺伝子の発現は、肝臓での導入遺伝子発現を促進するのに十分であることが示されている独自の最小プロモーター（328bp）によって駆動される（Walsh et al., J. Biol. Chem., 1989, 264, 6488-6494）。簡単に言えば、ヒト A p o A - I 遺伝子は、ヒト肝臓ゲノム D N A（Clontech）での P C R によって取得され、プラスミド p U C 19 においてクローニングされる。2つの終止コドンを含む I - S c e I 部位は、エクソン4などの好適なエクソンの先頭に P C R によって挿入される（U S 2012/0288943 A9の図17）。突然変異型遺伝子（I - S c e I - h A p o A - I）は、未変性のヒト A P O A - I（野生型 A P O A - I では80残基対267アミノ酸）の切断型をコードするように作製されている。すべての構築物は、配列決定され、ヒト A p o A - I 遺伝子配列に対してチェックされる。

【0691】

トランスジェニックマウスの生成：突然変異型ヒト A p o A - I 遺伝子を担持する E c o R I / X b a I ゲノム D N A 断片は、トランスジェニック初代の生成に使用される。マイクロインジェクションは、マウス a p o a - I 遺伝子のノックアウト雄（W T K O マウス）（The Jackson Laboratory、#002055）および B 6 S J L F 1 雌（Janvier）の繁殖からの受精卵母細胞に行われる。トランスジェニック初代マウス（F0）は、尾から抽出されたゲノム D N A の P C R およびサザンブロット分析によって識別される。次いで、内因性マウス a p o a - I 遺伝子のノックア

ウト遺伝的バックグラウンドで I - S c e I - h A p o A - I トランスジェニック系統を誘導するために、F0をWT KOマウスと交配させる。合計7つの独立したトランスジェニック系統を研究する。導入遺伝子統合の分子特性は、サザンブロット実験によって行われる。

【0692】

各トランスジェニック系統における導入遺伝子発現の分析は、肝臓から抽出された全RNA (T r i z o l R e a g e n t、I n v i t r o g e n) のRT-PCRによって行われる。マウス転写産物との交差反応を回避するために、ヒトトランスジェニック I - S c e I - h A p o A - I cDNAに特異的なプライマーが使用される。アクチンプライマーは、内部対照として使用される。

10

【0693】

インビボでの流体力学に基づく形質導入 インビボでのトランスジェニックマウス肝細胞の形質導入は、流体力学的尾静脈注射によって行われる。10~20gの動物に、10秒未満で、PBS中の体重の1/10の量の環状プラスミドDNAを注射する。CMVプロモーターの制御下にある I - S c e I をコードする20または50マイクログラムの c e DNAの混合物。

【0694】

遺伝子訂正の分析： I - S c e I 発現カセットおよび c e DNA修復マトリックスの注入後のマウスの導入遺伝子の訂正は、ランダムヘキサマーを使用して逆転写された全肝RNAに対するネストされたPCRによって分析される。訂正されていないものではなく、訂正された遺伝子を検出するために、修復された遺伝子の特異的に増幅したプライマーセットを使用する。特異性は、前方が修復マトリックスの外側に位置している I - S c e I 部位にまたがる逆オリゴヌクレオチドを使用して達成される。アクチンプライマーを内部対照として使用した。

20

【0695】

結果：

これらの実験では、 I - S c e I - h a p o A - I 導入遺伝子の1つまたはいくつかのコピーを担持する様々なトランスジェニック系統が使用される。マウスには、 I - S c e I 発現ベクターおよび c e DNAの混合物、または I - S c e I 発現カセットおよび c e DNAの両方を担持するベクターを注入する。突然変異型ヒト A p o A - I 遺伝子の修復は、訂正されたヒト A p o A - I 遺伝子とのみ対合するように特別に設計されたプライマーを使用して、全肝RNAのRT-PCRによって監視される。PCR断片は、 I - S c e I を発現するカセットおよび c e DNA修復マトリックスが注入されたトランスジェニックマウスで特に可視化される。遺伝子訂正は、導入遺伝子の1つまたは複数のコピーを含む、試験したすべてのトランスジェニック系統で検出可能である。

30

【0696】

メガヌクレアーゼにより誘導される遺伝子変換を使用して、インビボゲノム手術を実施できること、およびメガヌクレアーゼをそのような適用のための薬物として使用できることが示されている。 c e DNAベクターは、メガヌクレアーゼによって提供される二本鎖切断の後に挿入される訂正DNA鎖として使用される、テンプレートヌクレオチド配列を含む。

40

【0697】

実施例9：初代ヒト肝細胞のインビトロAAV形質導入

細胞培養皿 (48ウェル、C M 1 0 4 8、L i f e t e c h) は、プレコートで購入され得るか、またはプレート (3 5 4 8、V W R) を、1ウェルあたり150mLで10mLの肝細胞基本培地 (C C - 3 1 9 9、L o n z a) 中の250mLのB D M a t r i g e l (B D B i o s c i e n c e s) の混合物でコーティングすることができる。プレートを37℃で1時間インキュベートする。18mLのI n V i t r o G R O C P培地 (B i o r e c l a m a t i o n I V T) および400mLのT o r p e d o抗生物質ミックス (C e l s i s I n v i t r o T e c h n o l o g i e s) を組み合わせる

50

ことによって、解凍／プレーティング培地を調製する。プレートを調製したら、プレート可能なヒト肝細胞（ロット# A K B、カタログ# F 0 0 9 9 5 - P）を液体窒素蒸気相から 37 ° 水浴に直接移す。細胞が完全に解凍されるまで、バイアルを穏やかに攪拌する。細胞を、5 mL のあらかじめ温められた解凍／プレーティング培地を含む 50 mL の円錐チューブに直接移す。細胞を完全に移すために、バイアルを 1 mL の解凍／プレーティング培地で洗浄する。チューブを穏やかに回転させることによって、細胞を再懸濁する。少量のアリコート（20 mL）を取り出して、トリパンブルー溶液 1 : 5（25 - 900 - C 1、C e l l g r o）を使用することによって細胞数を測定し、細胞生存率を決定する。次いで、細胞を 75 g で 5 分間遠心分離する。上澄を完全にデカントし、細胞を 1.3 × 10⁶ 細胞/mL で再懸濁する。マトリゲル混合物をウェルから吸引し、細胞を 48 ウェル皿に 1 ウェルあたり 2.3 × 10⁵ 細胞で播種する。次いで、細胞を 5 % CO₂ インキュベーター内で 37 °C でインキュベートする。形質導入時に、細胞は、維持のために肝細胞培養培地（HCM）に切り替えられる（肝細胞基本培地、CC - 3199、Lonza；HCM、CC - 4182、SingleQuots）。本明細書に記載される c e D N A ベクターおよび m A l b Z F N メッセンジャー RNA（mRNA）[あるいは実験では、各々 Z F N メッセンジャーと同じ部位に標的される C a s 9 mRNA および m A l b g R N A もしくは T A L E N もしくは M N で置き換えるか、または実験では、c e D N A 上の発現エレメントを統合する] は、リポフェクタミン RNA i M A X（商標）（L i f e t e c h）（または本明細書に開示されている他の適切な試薬）でトランスフェクトされる。24 時間後、培地を新鮮な HCM で交換し、これは、初代肝細胞培養の健康を最大にするために毎日行われる。E L I S A による h F I X 検出が必要な実験では、h F I X が上澄に蓄積するように、培地を数日間交換しない場合がある。

10

20

【0698】

実施例 10：Z F N 系を使用したインビボ血友病治療のための c e D N A ベクター

ジンクフィンガーヌクレアーゼベースの遺伝子編集系を含む c e D N A ベクターも構築することができる。例示の目的で、例示的な遺伝子編集 c e D N A ベクターは、ヌクレアーゼ導入遺伝子としてジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）をコードする c e D N A ベクターの生成に関して記載されており、以下に記載される。しかしながら、本明細書に記載される方法および構築物において有用なヌクレアーゼをコードする遺伝子編集 c e D N A を生成する方法を説明するために、この実施例では Z F N が例示されているが、当業者は、上述の使用のように、本明細書に記載される任意のヌクレアーゼ、例えば、限定されないが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、T A L エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、メガヌクレアーゼ、および C R I S P R / C a s 9 - 酵素、および操作された部位特異的誘導体ヌクレアーゼを使用できることを承知している。c e D N A ベクターによってコードされる例示的なヌクレアーゼは、本明細書、例えば、「DNA エンドヌクレアーゼ」と題するセクションおよびその中のサブセクションに記載されている。

30

【0699】

前述の実施例に記載された方法を利用して、c e D N A ベクターに導入遺伝子として含まれるヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）であり得る。非限定的な一例として、Sharma et al.（Blood 126:1777-1784（2015））によって記載されたアルブミン遺伝子座への治療用導入遺伝子の Z F N 媒標的は、本発明の c e D N A ベクターを使用してもたらされ得る。そのような c e D N A ベクターは、その遺伝子座を標的とする c e D N A コード化 Z F N の活性を介して、標的対象のアルブミン遺伝子座におけるヒト第 V I I I 因子および／または第 I X 因子の統合を可能にする。本明細書に記載される送達方法のうちのいずれかを使用して、c e D N A ベクターを患者に投与することができる。血友病 A および B のマウスモデルにおける治療レベルでの、例えばヒト第 V I I I 因子および第 I X 因子（h F V I I I および h F I X）の長期発現は、この方法を使用して達成される。

40

【0700】

実施例 11：Z F N 系を使用したインビボでの嚢胞性線維症治療のための c e D N A ベク

50

ター

実施例 10 の実験に対する類似のアプローチを適用して、例えば嚢胞性線維症 (CF) を有する対象において、肺での遺伝子編集を誘導する。この実験では、野生型 CFTR (CF で突然変異している遺伝子) をコードするために、ceDNA が作成される。CFTR は AA V 内に含めることができない大きな遺伝子である。ceDNA は、AA V よりも大幅に大きい核酸インサートに対応するため、CFTR の治療に独自の解決策を提供する。ZFN CFTR 特異的遺伝子編集系をコードする ceDNA ベクターは、肺上皮の遺伝子編集を誘導するために、静脈内または噴霧製剤として投与され得る。上記のように、実験では、CFTR は、その遺伝子座を標的としたコードされた ZFN の活性と、ヌクレアーゼおよびガイド RNA のパッケージ化とを通じて内因性 CFTR 遺伝子座に挿入され、大きな相同性アームを利用することで、遺伝子編集の効率および忠実度を高めることができる。

10

【0701】

実施例 12 : インビボでのデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療のための ceDNA ベクター

実施例 10 および 11 の実験への類似のアプローチを適用して、ジストロフィン遺伝子の突然変異を訂正することによって、筋肉組織、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおける ZFN 媒介遺伝子編集を誘導する。

【0702】

あるいは、ジストロフィン遺伝子のエクソン 51 スプライスアクセプターに隣接する少なくとも 2 つのニックおよび／または DSB を作成するエンドヌクレアーゼ (例えば、ZNF または TALE S) をコードするために、ceDNA ベクターが作成される。これらのニックおよび／または切断の修復は、エクソン 51 の欠失をもたらす。エクソン 51 の欠失は、ジストロフィン転写産物からエクソン 51 の除外をもたらし、それによってある特定の DMD を引き起こす突然変異、例えばエクソン 48 ~ 50 の欠失を訂正する。本明細書に記載される ceDNA ベクターの大きなペイロード容量は、2 つのエンドヌクレアーゼ (例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ousterhout et al. Molecular Therapy 2015 doi:10.1038/mt.2014.234 に記載されるような 2 つの ZFN) または RNA 誘導型エンドヌクレアーゼおよび複数の sgRNA が、単一ベクターで筋細胞に送達され、効率を高めることができるようにする。ceDNA ベクターを静脈内または筋内に投与して、筋組織の遺伝子編集を誘導することができる。

20

30

【0703】

さらに、1 つのみのガイド RNA 標的配列 (例えば、1 つまたは複数のコピー数)、および／または CRISPR/Cas ヌクレアーゼを (シスまたはトランスで) 発現する ceDNA 遺伝子編集ベクターを使用して、DMD 遺伝子の個々のスプライスドナーまたはスプライスアクセプターを標的とすることができる。これが、エクソンスキッピング (例えば、エクソン 51 スキッピング) および遺伝子の訂正を引き起こし、機能性タンパク質を発現させる、NHEJ をもたらす。DMD 遺伝子を標的とする複数のガイド RNA は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる US 2016/0201089 に見られ、例えば、その中の実施例 5 ~ 11 を参照されたい。ジストロフィン発現の訂正は、DMD 筋芽細胞株で試験することができる。

40

【0704】

実施例 13 : ゲノムセーフハーバー遺伝子からの長期治療的発現のための ceDNA 遺伝子編集ベクター。

相同性ドメインを含む ceDNA 遺伝子編集ベクターを使用して、治療用導入遺伝子の挿入および発現のために、ゲノムセーフハーバー遺伝子を標的とすることができる。ceDNA ベクターは、実施例 1 に従って作製される。任意のセーフハーバー遺伝子座を標的とすることができ、そのようなセーフハーバーは、例えば、既知の不活性イントロンであるか、あるいはタンパク質を高発現レベルで発現することが知られているコード配列に近

50

い活性イントロンである。セーフハーバー遺伝子への挿入は、挿入がない場合と比較して、著しい悪影響を及ぼさない。例えば、血清アルブミンは、肝細胞におけるその高い発現レベルと存在のために、関心対象の典型的な標的である。アルブミンの最初のエクソンが最終タンパク質産物から切断される分泌ペプチドをコードするため、スプライスアクセプター部位および導入遺伝子を持つプロモーターレスカセットの、アルブミンのイントロン配列への統合は、多くの異なるタンパク質の発現および分泌をサポートする。少なくとも1つのc e D N Aベクターは、イントロン1を標的とするジンクフィンガー対をコードする。例示的なジンクフィンガー対は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、B l o o d (2 0 1 5) 1 2 6 (1 5) : 1 7 7 7 - 1 7 8 4 (例えば、補足の図6のA-BおよびC-Dの対)に完全に記載されている。さらに、c e D N Aベクターには制限がないため、c e D N Aベクターは、同じまたは異なるc e D N Aベクター上にドナーD N Aを提供するように操作されている。

10

【0705】

例示の目的で、例示的な遺伝子編集c e D N Aベクターは、アルブミンセーフハーバーを標的とする相同性アーム（相同性ドメインとも呼ばれる）を含むc e D N Aベクターの生成に関して記載されており、以下に記載されている。しかしながら、本明細書に記載される方法および構築物において有用な導入遺伝子（またはドナーD N A）の標的挿入のための相同性アームを持つ遺伝子編集c e D N Aを生成する方法を示すために、この実施例では、アルブミンアルブミンのイントロン1への導入遺伝子（またはドナーD N A）の標的挿入のための相同性アームを持つ遺伝子編集c e D N Aが例示されているが、当業者は、上述の使用のように、セーフハーバー遺伝子または遺伝子座を含むがこれに限定されない任意の遺伝子に対して相同性アームを使用できること、例えば、C C R 5またはA A V -セーフハーバーS 1遺伝子座が標的とされ得ることを承知している。

20

【0706】

図16は、ドナーD N Aを標的アルブミンイントロン配列に組み込むためのいくつかのプロモーターレス構築物を描く概略図を示し、そのような構築物は、ヌクレアーゼと同じまたは異なるベクター上にある。一実施形態では、プロモーターレスc e D N A構築物は、末端反復（例えば、I T R）が隣接する挿入／修復配列を含み、ヌクレアーゼ／ガイドR N Aは、別個の構築物（例えば、第2のc e D N Aベクター、ヌクレアーゼをコードするm R N A、組み換えヌクレアーゼ、R N P複合体等）を使用して提供される。プロモーターのない（プロモーターレス）任意の導入遺伝子、例えば、F V I I Iまたは第I X因子、またはG F P、またはG F Pおよびn e oをコードするc e D N Aは、アルブミン遺伝子座に対するゲノム相同性アームを用いて作製される（実施例4を参照）。いくつかの実験では、Z F Nの代わりに、C a s 9またはc p f 1ヌクレアーゼが、c e D N Aベクターに組み込まれ、ガイドR N Aが、Z F N領域を標的とするように設計される。いくつかの実験では、同じc e D N Aをさらに操作してガイドR N Aを発現させ（例えば、図14、15、および16を参照）、C A Sまたはc p f 1酵素が使用される場合、同じもしくは異なるc e D N A上、またはプラスミド上のいずれかでC R I S P Rが提供され得る。ガイドR N Aは、標的配列を整列させ、使用されるC A S酵素（例えば、s a C A S 9、またはs p C A S 9、またはc p f 1等）に関連するP A Mモチーフを識別することによって、例えば、S h a r m a e t a l . B l o o d (2 0 1 5) 1 2 6 (1 5) : 1 7 7 7 - 1 7 8 4におけるZ F N標的配列（例えば、補足図6のA-BおよびC-Dの対）に結合するように操作されている。ガイドR N Aのためのアルブミンにおける1つのc e D N A標的中心を図17に示す。類似の部位が、ヒトアルブミンに使用される。

30

40

【0707】

例示の導入遺伝子（例えば、分泌タンパク質、例えば第I X因子）を発現するためのアルブミン遺伝子への例示の挿入のためのc e D N A s 遺伝子編集系は、ヒト標的遺伝子に向けられたガイドR N Aを使用するときに初代ヒト肝細胞（例えば、T h e r m o S c i e n t i f i cからのヒト肝細胞）でインビトロで試験し、マウスモデルではインビボで試験する。例えば、上記のS h a r m a e t a l . に記載されるように、マウス肝

50

臓は、第 I X 因子 mRNA レベルの測定および発色アッセイおよび抗原を使用した第 I X 因子活性の測定のために、c e D N A 系の全身投与後に分離される。第 I X 因子を組み込んだ系では、mRNA レベル、タンパク質活性アッセイ、ウエスタンブロットの技術的に既知であり、かつ市販の試験は、任意の所望の導入遺伝子のノックインの評価、およびインビトロヒト初代細胞およびインビボマウスモデルの両方における訂正を試験するために好適である。アルブミン遺伝子座への挿入は、例えば、血液への分泌タンパク質の分泌を可能にする。導入遺伝子の血漿中濃度が評価される。ヒト第 V I I I 因子および第 I X 因子の分泌は、血友病の動物モデルでインビボで試験される。本明細書に記載される c e D N A を使用して、任意の分泌されたタンパク質をアルブミンに「ノックイン」できることは、当業者には理解されるであろう。非限定的な例には、 α -ガラクトシダーゼ、イブラネート-2-スルファターゼ、ベーターグルコシダーゼ、 α -L-イブロンダーゼ等が含まれ、適切な動物モデルで試験することができる。一実施形態では、ノックインは、G a l 1 1 などの誘導性プロモーターの制御下にある。

10

【0708】

本明細書ではさらに、c e D N A ベクターのねじれ拘束が、c e D N A ベクター自体を標的とするガイドRNAと組み合わせてn C a s 9 ニッカースを介して解放されることが企図される。そのようなねじれ拘束の解放により、c e D N A ベクター上に見られるH D R テンプレートの1つ以上の相同性アームの能力が向上し得る。加えて、本明細書ではさらに、I T R を標的とするガイドRNAを、染色体のガイドRNAと組み合わせてC a s 9 とともに使用できることが企図される。c e D N A ベクターのI T R (または相同性)領域ならびに染色体上の標的部位の両方を標的とする単一ガイドRNAを設計することができる。c e D N A ベクター内の切断部位は、D N A ベクターの片端または両端に位置し得る。

20

【0709】

実施例14：c e D N A ベクターで使用するための例示的な標的遺伝子およびs g R N A

例示の目的で、例示的な遺伝子編集c e D N A ベクターは、編集のためのZ N F スクレアーゼのs g D N A を含むc e D N A ベクターの生成に関して記載されており、以下に記載されている。しかしながら、遺伝子を編集するためのZ N F スクレアーゼのs g R N A 配列は、本実施例において例示され、本明細書に記載される方法および構築物において有用な遺伝子編集c e D N A ベクターを生成する方法を説明するが、本明細書の「D N A エンドヌクレアーゼ」と題するセクションおよびその中のサブセクションにおいて論じられるように、当業者は、上述の使用のように、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Z F N)、T A L エフェクターヌクレアーゼ(T A L E N)、メガヌクレアーゼ、およびC R I S P R / C a s 9 および操作された部位特異的ヌクレアーゼのs g R N A を含む、本書に記載されている任意のヌクレアーゼのs g R N A を使用できることを承知している。

30

【0710】

非限定的な例示的標的遺伝子およびZ F N の標的配列対、ならびにZ N F 標的配列に基づくg R N A 配列は、表9に見られる。c e D N A ベクターは、標的遺伝子の訂正および/または調整のためにこれらの配列を標的とするZ N F を発現するように操作されている。c e D N A ベクターは、例えば、任意のC R I S P R / C a s 9 系を使用して標的遺伝子を訂正するために、そのような例示的なg R N A を発現するように操作されている。したがって、ある特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、表9または表10から選択される遺伝子を標的とする。ある特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、表9から選択されるガイドRNAを含む。ある特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、以下の表9から選択される標的配列を標的とするZ F N をコードする遺伝子を含む。

40

【0711】

表9：Z F N 標的配列を標的とするs g R N A

【表 9 - 1】

標的遺伝子	ZFN の標的配列	配列 番号	sgRNA をコードする配列	配列 番号
ヒト β グロビン	GGGCAGTAACGGCAGACT TCTCCTCAGG	608	GTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG	756
"	TGGGGCAAGGTGAACGTG GATGAAGTTG	609	GTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG	756
"	AGAGTCAGGTGCACCATG GTGTCTGTTT	610	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757

【表 9 - 2】

"	GTGGAGAAGTCTGCCGTT ACTGCCCTGT	611	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
"	ACAGGAGTCAGGTGCACC ATGGTGTCTG	612	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
"	GAGAAGTCTGCCGTTACT GCCCTGTGGG	613	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
"	TAACGGCAGACTTCTCCA CAGGAGTCAG	614	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
"	GCCCTGTGGGGCAAGGTG AACGTGGATG	615	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
"	GGGCAGTAACGGCAGACT TCTCCTCAGG	608	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
"	TGGGGCAAGGTGAACGTG GATGAAGTTG	609	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
"	CACAGGGCAGTAACGGCA GACTTCTCCT	616	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
"	GGCAAGGTGAACGTGGAT GAAGTTGGTG	617	GTAACGGCAGACTTCaCCTCAGG	757
ヒト BCL11A	ATCCCATGGAGAGGTGGC TGGAAGGAC	618	GCAATATGAATCCCATGGAGAGG	758
"	ATATTGCAGACAATAACC CCTTTAACCT	619	GCAATATGAATCCCATGGAGAGG	758
"	CATCCAGGCGTGGGGAT TAGAGCTCCA	620	GCATATTCTGCACTCATCCAGG	759
"	GTGCAGAATATGCCCCGC AGGGTATTTG	621	GCATATTCTGCACTCATCCAGG	759
ヒト KLF1	GGGAAGGGGCCAGGGC GGTCAGTGTGC	622	GGGCCCCTTCCCGGACACACAGG	760
"	ACACACAGGATGACTTCC TCAAGGTGGG	623	GGGCCCCTTCCCGGACACACAGG	760
"	CGCCACCGGGCTCCGGGC CCGAGAAGTT	624	GCAGGTCTGGGGCGCGCCACCGG	761
"	CCCCAGACCTGCGCTCTG GCGCCAGCG	625	GCAGGTCTGGGGCGCGCCACCGG	761
"	GGCTCGGGGGCCGGGGCT GGAGCCAGGG	626	GGCCCCGAGCCCAAGGCGCTGG	762
"	AAGGCGCTGGCGCTGCAA CCGGTGTACC	627	GGCCCCGAGCCCAAGGCGCTGG	762
"	TTGCAGCGCCAGCGCCTT	628	GCGCTGCAACCGGTGTACCCGGG	763

10

20

30

40

【表 9 - 3】

	GGGCTCGGGG			
"	CGGTGTACCCGGGGCCCG GCGCCGGCTC	629	GCGCTGCAACCGGTGTACCCGGG	763
ヒト γ 調節	TTGCATTGAGATAGTGTG GGGAAGGGGC	630	GCATTGAGATAGTGTGGGGAAGG	764
"	ATCTGTCTGAAACGGTCC CTGGCTAAAC	631	GCATTGAGATAGTGTGGGGAAGG	764
"	TTTGCATTGAGATAGTGT GGGGAAGGGG	632	GCATTGAGATAGTGTGGGGAAGG	764
"	CTGTCTGAAACGGTCCCT GGCTAAACTC	633	GCATTGAGATAGTGTGGGGAAGG	764
"	TATTTGCATTGAGATAGT GTGGGGAAGG	634	GCATTGAGATAGTGTGGGGAAGG	764
"	CTGTCTGAAACGGTCCCT GGCTAAACTC	633	GCATTGAGATAGTGTGGGGAAGG	764
	CTTGACAAGGCAAAC	635	GCTATTGGTCAAGGCAAGGCTGG	765
	GTCAAGGCAAGGCTG	636	GCTATTGGTCAAGGCAAGGCTGG	765
ヒト CCR5	GATGAGGATGAC	637	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	GATGAGGATGAC	637	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	GATGAGGATGAC	637	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	GATGAGGATGAC	637	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	GATGAGGATGAC	637	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	GATGAGGATGAC	637	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	GATGAGGATGAC	637	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	AAACTGCAAAAG	638	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	AAACTGCAAAAG	638	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	AAACTGCAAAAG	638	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	AAACTGCAAAAG	638	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	AAACTGCAAAAG	638	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	AAACTGCAAAAG	638	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	AAACTGCAAAAG	638	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	AAACTGCAAAAG	638	GTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGG	766
"	GACAAGCAGCGG	639	GGTCCTGCCGCTGCTTGTCATGG	767
"	CATCTGCTACTCG	640	GGTCCTGCCGCTGCTTGTCATGG	767
ヒト CXCR4	ATGACTTGTGGGTGGTTG TGTTCCAGTT	641	GCTTCTACCCCAATGACTTGTGG	768
"	GGGTAGAAGCGGTCACAG ATATATCTGT	642	GCTTCTACCCCAATGACTTGTGG	768
"	AGTCAGAGGCCAAGGAA GCTGTTGGCTG	643	GCCTCTGACTGTTGGTGGCGTGG	769

10

20

30

40

【表 9 - 4】

"	TTGGTGGCGTGGACGATG GCCAGGTAGC	644	GCCTCTGACTGTTGGTGGCGTGG	769
"	CAGTTGATGCCGTGGCAA ACTGGTACTT	645	GCCGTGGCAAACCTGGTACTTTGG	770
"	CCAGAAGGGAAGCGTGAT GACAAAGAGG	646	GCCGTGGCAAACCTGGTACTTTGG	770
PPP1R12C	ACTAGGGACAGGATTG	647	GGGGCCACTAGGGACAGGATTGG	771
"	CCCCACTGTGGGGTGG	648	GGGGCCACTAGGGACAGGATTGG	771
PPP1R12C	ACTAGGGACAGGATTG	647	GTCACCAATCCTGTCCCTAGTGG	772
"	CCCCACTGTGGGGTGG	648	GTCACCAATCCTGTCCCTAGTGG	772
PPP1R12C	ACTAGGGACAGGATTG	647	GTGGCCCCACTGTGGGGTGGAGG	773
"	CCCCACTGTGGGGTGG	648	GTGGCCCCACTGTGGGGTGGAGG	773
マウスおよび ヒト HPRT	ACCCGCAGTCCCAGCGTC GTGGTGAGCC	649	GTCGGCATGACGGGACCGGTCGG	774
"	GCATGACGGGACCGGTCG GCTCGCGGCA	650	GTCGGCATGACGGGACCGGTCGG	774
"	TGATGAAGGAGATGGGA GGCCATCACAT	651	GATGTGATGAAGGAGATGGGAGG	775
"	ATCTCGAGCAAGACGTTT AGTCCTACAG	652	GATGTGATGAAGGAGATGGGAGG	775
"	AAGCACTGAATAGAAATA GTGATAGATC	653	GTGCTTTGATGTAATCCAGCAGG	776
"	ATGTAATCCAGCAGGTCA GCAAAGAATT	654	GTGCTTTGATGTAATCCAGCAGG	776
"	GGCCGGCGCGCGGGCTGA CTGCTCAGGA	655	GTCGCCATAACGGAGCCGGCCGG	777
"	GCTCCGTTATGGCGACCC GCAGCCCTGG	656	GTCGCCATAACGGAGCCGGCCGG	777
"	TGCAAAAGGTAGGAAAA GGACCAACCAG	657	GTATTGCAAAAGGTAGGAAAAGG	778
"	ACCCAGATACAAACAATG GATAGAAAAC	658	GTATTGCAAAAGGTAGGAAAAGG	778
"	CTGGGATGAACTCTGGGC AGAATTCACA	659	GCATATCTGGGATGAACTCTGGG	779
"	ATGCAGTCTAAGAATACA GACAGATCAG	660	GCATATCTGGGATGAACTCTGGG	779
"	TGCACAGGGGCTGAAGTT GTCCACAGG	661	GCCTCCTGGCCATGTGCACAGGG	780
"	TGGCCAGGAGGCTGGTTG	662	GCCTCCTGGCCATGTGCACAGGG	780

10

20

30

40

【表 9 - 5】

	CAAACATTTT			
"	TTGAATGTGATTTGAAAG GTAATTTAGT	663	GAAGCTGATGATTTAAGCTTTGG	781
"	AAGCTGATGATTTAAGCT TTGGCGGTTT	664	GAAGCTGATGATTTAAGCTTTGG	781
"	GTGGGGTAATTGATCCAT GTATGCCATT	665	GATCAATTACCCACCTGGGTGG	782
"	GGGTGGCCAAAGGAACTG CGCGAACCTC	666	GATCAATTACCCACCTGGGTGG	782
"	ATCAACTGGAGTTGGACT GTAATACCAG	667	GATGTCTTTACAGAGACAAGAGG	783
"	CTTTACAGAGACAAGAGG AATAAAGGAA	668	GATGTCTTTACAGAGACAAGAGG	783
ヒトアルブミ ン	CCTATCCATTGCACTATG CTTTATTAA	669	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	CCTATCCATTGCACTATG CTTTATTAA	669	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	CCTATCCATTGCACTATG CTTTATTAA	669	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	CCTATCCATTGCACTATG CTTTATTAA	669	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	CCTATCCATTGCACTATG CTTTATTAA	669	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	TTTGGGATAGTTATGAAT TCAATCTCA	670	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	TTTGGGATAGTTATGAAT TCAATCTCA	670	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	TTTGGGATAGTTATGAAT TCAATCTCA	670	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	TTTGGGATAGTTATGAAT TCAATCTCA	670	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	CCTGTGCTGTTGATCTCAT AAATAGAAC	671	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	CCTGTGCTGTTGATCTCAT AAATAGAAC	671	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	TTGTGGTTTTTAAATAAA GCATAGTGCA	672	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784

10

20

30

40

【表 9 - 6】

"	TTGTGGTTTTTAAATAAA GCATAGTGCA	672	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	ACCAAGAAGACAGACTA AAATGAAAATA	673	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
"	CTGTTGATAGACACTAAA AGAGTATTAG	674	GATCAACAGCACAGGTTTTGTGG	784
ヒト第 IX 因子	TGACACAGTACCTGGCAC CATAGTTGTA	675	GTCAGGGTACTAGGGGTATGGGG	785
"	GTACTAGGGGTATGGGGA TAAACCAGAC	676	GTCAGGGTACTAGGGGTATGGGG	785
ヒト LRRK2	GCAAAGATTGCTGACTAC GGCATTGCTC	677	GTCAGCAATCTTTGCAATGATGG	786
"	TGATGGCAGCATTGGGAT ACAGTGTGAA	678	GTCAGCAATCTTTGCAATGATGG	786
"	GCAAAGATTGCTGACTAC AGCATTGCTC	679	GTCAGCAATCTTTGCAATGATGG	786
ヒト Htt	GGGGCGATGCTGGGGACG GGGACATTAG	680		
"	ACGCTGCGCCGGCGGAGG CGGGGCCGCG	681	GTCTGGGACGCAAGGCGCCGTGG	787
"	AAGGCGCCGTGGGGGCTG CCGGGACGGG	682	GTCTGGGACGCAAGGCGCCGTGG	787
"	AGTCCCCGGAGGCCTCGG GCCGACTCGC	683	GGAGGCCTCGGGCCGACTCGCGG	788
"	GCGCTCAGCAGGTGGTGA CCTTGTTGGAC	684	GCCGGTGATATGGGCTTCCTGGG	789
"	ATGGTGGGAGAGACTGTG AGGCGGCAGC	685	GAGACTGTGAGGCGGCAGCTGGG	790
"	ATGGCGCTCAGCAGGTGG TGACCTTGTG	686	GAGACTGTGAGGCGGCAGCTGGG	790
"	TGGGAGAGACTGTGAGGC GGCAGCTGGG	687	GAGACTGTGAGGCGGCAGCTGGG	790
ヒト RHO	GCCAGGTAGTACTGTGGG TACTCGAAGG	688	GGCTCAGCCAGGTAGTACTGTGG	791
"	GAGCCATGGCAGTTCTCC ATGCTGGCCG	689	GGCTCAGCCAGGTAGTACTGTGG	791
"	CAGTGGGTTCTTGCCGCA GCAGATGGTG	690	GAACCCACTGGGTGACGATGAGG	792
"	GTGACGATGAGGCCTCTG	691	GAACCCACTGGGTGACGATGAGG	792

10

20

30

40

【表 9 - 7】

	CTACCGTGTC			
"	GGGGAGACAGGGCAAGG CTGGCAGAGAG	692	GCCCTGTCTCCCCATGTCCAGG	793
"	ATGTCCAGGCTGCTGCCT CGGTCCCAT	693	GCCCTGTCTCCCCATGTCCAGG	793
CFTR	ATTAGAAGTGAAGTCTGG AAATAAAACC	694	GGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGG	794
"	AGTGATTATGGGAGAACT GGATGTTACAGTCAGTC CACACGTC	695	GGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGG	794
"	CATCATAGGAAACACCAA AGATGATATT	696	GAGGGTAAAATTAAGCACAGTGG	795
"	ATATAGATACAGAAGCGT CATCAAAGCA	697	GAGGGTAAAATTAAGCACAGTGG	795
"	GCTTTGATGACGCTTCTGT ATCTATATT	698	GAGGGTAAAATTAAGCACAGTGG	795
"	CCAACTAGAAGAGGTAAG AAACTATGTG	699	GAGGGTAAAATTAAGCACAGTGG	795
"	CCTATGATGAATATAGAT ACAGAAGCGT	700	GAGGGTAAAATTAAGCACAGTGG	795
"	ACACCAATGATATTTTCTT TAATGGTGC	701	GAGGGTAAAATTAAGCACAGTGG	795
TRAC	CTATGGACTTCAAGAGCA ACAGTGCTGT	702	GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG	796
"	CTCATGTCTAGCACAGTT TTGTCTGTGA	703	GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG	796
"	GTGCTGTGGCCTGGAGCA ACAAATCTGA	704	GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG	796
"	TTGCTCTTGAAGTCCATA GACCTCATGT	705	GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG	796
"	GCTGTGGCCTGGAGCAAC AAATCTGACT	706	GACACCTTCTTCCCAGCCCAGG	797
"	CTGTTGCTCTTGAAGTCC ATAGACCTCA	707	GACACCTTCTTCCCAGCCCAGG	797
"	CTGTGGCCTGGAGCAACA AATCTGACTT	708	GACACCTTCTTCCCAGCCCAGG	797
"	CTGACTTTGCATGTGCAA ACGCCTTCAA	709	GACACCTTCTTCCCAGCCCAGG	797
"	TTGTTGCTCCAGGCCACA	710	GACACCTTCTTCCCAGCCCAGG	797

10

20

30

40

【表 9 - 8】

	GCACTGTTGC			
"	TGAAAGTGGCCGGGTTTA ATCTGCTCAT	711	GACACCTTCTTCCCCAGCCCAGG	797
"	AGGAGGATTCGGAACCCA ATCACTGACA	712	GATTAAACCCGGCCACTTTCAGG	798
"	GAGGAGGATTCGGAACCC AATCACTGAC	713	GATTAAACCCGGCCACTTTCAGG	798
"	TGAAAGTGGCCGGGTTTA ATCTGCTCAT	711	GATTAAACCCGGCCACTTTCAGG	798
TRBC	CCGTAGAACTGGACTTGA CAGCGGAAGT	714	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
"	TCTCGGAGAATGACGAGT GGACCCAGGA	715	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
"	TCTCGGAGAATGACGAGT GGACCCAGGA	715	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
"	TCTCGGAGAATGACGAGT GGACCCAGGA	715	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
"	TCTCGGAGAATGACGAGT GGACCCAGGA	715	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
"	CCGTAGAACTGGACTTGA CAGCGGAAGT	714	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
"	CCGTAGAACTGGACTTGA CAGCGGAAGT	714	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
"	CCGTAGAACTGGACTTGA CAGCGGAAGT	714	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
"	CCGTAGAACTGGACTTGA CAGCGGAAGT	714	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	799
ヒ ト PD1	CCAGGGCGCCTGTGGGAT CTGCATGCCT	716	GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGG	800
"	CAGTCGTCTGGGCGGTGC TACAACTGGG	717	GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGG	800
"	GAACACAGGCACGGCTGA GGGGTCCTCC	718	GTCCACAGAGAACACAGGCACGG	801
"	CTGTGGACTATGGGGAGC TGGATTTCCTCA	719	GTCCACAGAGAACACAGGCACGG	801
"	CAGTCGTCTGGGCGGTGC T	720	GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGG	800
ヒ ト CTLA- 4	ACAGTGCTTCGGCAGGCT GACAGCCAGG	721	GCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGG	802

10

20

30

40

【表 9 - 9】

"	ACCCGGACCTCAGTGGCT TTGCCTGGAG	722	GCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGG	802
"	ACTACCTGGGCATAGGCA ACGGAACCCA	723	GTACCCACCGCCATACTACCTGG	803
"	TGGCGGTGGGTACATGAG CTCCACCTTG	724	GTACCCACCGCCATACTACCTGG	803
HLA CII : HLA A2	GTATGGCTGCGACGTGGG GTCGGACGGG	725	GCTGCGACGTGGGGTCGGACGGG	804
"	TTATCTGGATGGTGTGAG AACCTGGCCC	726	GCAGCCATACATTATCTGGATGG	805
"	TCCTCTGGACGGTGTGAG AACCTGGCCC	727	GCAGCCATACATCCTCTGGACGG	806
HLA A3	ATGGAGCCGCGGGCGCCG TGGATAGAGC	728	GTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGG	807
"	CTGGCTCGCGGCGTCGCT GTCGAACCGC	729	GAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGG	808
HLA B	TCCAGGAGCTCAGGTCCT CGTTCAGGGC	730	GGACCTGAGCTCCTGGACCGCGG	809
"	CGGCGGACACCGCGGCTC AGATCACCCA	731	GGACCTGAGCTCCTGGACCGCGG	809
"	AGGTGGATGCCCAGGACG AGCTTTGAGG	732	GATGCCCAGGACGAGCTTTGAGG	810
"	AGGGAGCAGAAGCAGCG CAGCAGCGCCA	733	GCGCTGCTTCTGCTCCCTGGAGG	811
"	CTGGAGGTGGATGCCCAG GACGAGCTTT	734	GCGCTGCTTCTGCTCCCTGGAGG	811
"	GAGCAGAAGCAGCGCAG CAGCGCCACCT	735	GCGCTGCTTCTGCTCCCTGGAGG	811
HLA C	CCTCAGTTTCATGGGGAT TCAAGGGAAC	736	GGGGATTCAAGGGAACACCCTGG	812
"	CCTAGGAGGTCATGGGCA TTTGCCATGC	737	GCAAATGCCCATGACCTCCTAGG	813
"	TCGCGGCGTCGCTGTCGA ACCGCACGAA	738	GAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGG	808
"	CCAAGAGGGGAGCCGCG GGAGCCGTGGG	739	GGCGCCCGCGGCTCCCCTCTTGG	814
HLA cI. II : DBP2	GAAATAAGGCATACTGGT ATTACTAATG	740	GTTACATCTCCCCCGGGCCTGG	815
"	GAGGAGAGCAGGCCGATT	741	GTTACATCTCCCCCGGGCCTGG	815

10

20

30

40

【表 9 - 1 0】

	ACCTGACCCA			
DRA	TCTCCCAGGGTGGTTCAG TGGCAGAATT	742	GGAGAATGCGGGGGAAAGAGAGG	816
"	GCGGGGGAAAGAGAGGA GGAGAGAAGGA	743	GGAGAATGCGGGGGAAAGAGAGG	816
TAP1	AGAAGGCTGTGGGCTCCT CAGAGAAAAT	744	GCCCACAGCCTTCTGTACTCTGG	817
"	ACTCTGGGGTAGATGGAG AGCAGTACCT	745	GCCCACAGCCTTCTGTACTCTGG	817
TAP2	TTGCGGATCCGGGAGCAG CTTTTCTCCT	746	GTTGATTCGAGACATGGTGTAGG	818
"	TTGATTCGAGACATGGTG TAGGTGAAGC	747	GTTGATTCGAGACATGGTGTAGG	818
タパシン	CCACAGCCAGAGCCTCAG CAGGAGCCTG	748	GCTCTGGCTGTGGTCGCAAGAGG	819
"	CGCAAGAGGCTGGAGAG GCTGAGGACTG	749	GCTCTGGCTGTGGTCGCAAGAGG	819
"	CTGGATGGGGCTTGGCTG ATGGTCAGCA	750	GCAGAACTGCCCCGCGGGCCCTGG	820
"	GCCCGCGGGCAGTTCTGC GCGGGGGTCA	751	GCAGAACTGCCCCGCGGGCCCTGG	820
CIITA	GCTCCCAGGCAGCGGGCG GGAGGCTGGA	752	GCTGCCTGGGAGCCCTACTCGGG	821
"	CTACTCGGGCCATCGGCG GCTGCCTCGG	753	GCTGCCTGGGAGCCCTACTCGGG	821
RFX5	TTGATGTCAGGGAAGATC TCTCTGATGA	754	GCCTTCGAGCTTTGATGTCAGGG	822
"	GCTCGAAGGCTTGGTGGC CGGGGCCAGT	755	GCCTTCGAGCTTTGATGTCAGGG	822

10

20

30

【 0 7 1 2】

表 1 0 : 標的とするための例示的な遺伝子 (例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる U S 2 0 1 5 / 0 0 5 6 7 0 5 を参照)

40

【表 1 0 - 1】

遺伝子名	遺伝子座	代表的な受託 (cDNA) 参照配列
HBB	chr11 : 5246696 - 5248301	(NM_000518)
BCL11A	chr2 : 60684329 - 60780633	(NM_022893)
KLF1	chr19 : 12995237 - 12998017	(NM_006563)
HBG1	chr11 : 5269502 - 5271087	(NM_000559)
CCR5	chr3 : 46411633 - 46417697	(NM_000579)

【表 10 - 2】

CXCR4	chr2 : 136871919-136873813	(NM_001008540)
PPP1R12C	chr19 : 55602281-55628968	(NM_017607)
HPRT	chrX : 133594175-133634698	(NM_000194)
マウス HPRT	chrX : 52988078-53021660	(NM_013556)
	(アセンブリーGRCm38/ mm10)	
ALB	chr4 : 74269972-74287129	(NM_000477)
第 VIII 因子	chrX : 154064064-154250998	(NM_000132. 3)
第 IX 因子	chrX : 138612895-138645617	(NM_000133)
LRRK2	chr12 : 40618813-40763086	(NM_198578)
Htt	chr4 : 3076237-3245687	(NM_002111)
RHO	chr3 : 129247482-129254187	(NM_000539)
CFTR	chr7 : 117120017-117308718	(NM_000492)
TCRA	chr6 : 42883727-42893575	(NM_001243168)
TCRB	chr7 : 142197572-142198055	L36092. 2
PD-1	chr2 : 242792033-242795132	(NM_005018)
CTLA-4	chr2 : 204732511-204738683	(NM_001037631)
HLA-A	chr6 : 29910247-29912868	(NM_002116)
HLA-B	chr6 : 31236526-31239913	NM_005514. 6
HLA-C	chr6 : 31236526-31239125	(NM_001243042)
HLA-DPA	chr6 : 33032346-33048555	(NM_033554. 3)
HLA-DQ	chr6 : 32605183-32611429	(NM_002122)
HLA-DRA	chr6__ssto__hap7 : 3754283-	(NM_019111)
	3759493	
LMP7	chr6__dbb__hap3 : 4089872-	(X66401)
	4093057	
タバシン	chr6 : 33271410-33282164	(NM_172208)
RFX5	chr1 : 151313116-151319769	(NM_001025603)
CIITA	chr16 : 10971055-11002744	(NM_000246)
TAP1	chr6 : 32812986-32821748	(NM_000593)
TAP2	chr6 : 32793187-32806547	(NM_000544)
TAPBP	chr6 : 33267472-33282164	
DMD	chrX : 31137345-33229673	(NM_004006)
RFX5	chr1 : 151313116-151319769	(NM_000449)
B. napus FAD3	PCT 公報を参照	JN992612
	WO2014/039684	
B. napus FAD2	PCT 公報を参照	JN992609
	WO2014/039692	
ダイズ FAD2	US2014/0090116 を参照	

10

20

30

40

【表 10-3】

トウモロコシ ZP15	米国特許第 8, 329, 986 号を参 照	GBWI-61522 (MaizeCyc)
B-ケトアシル ACP	米国特許第 8, 592, 645 号を参 照	
シンターゼ II (KASII)		
トマト MDH	US2013/0326725 を参照	AY725474
B. napus EPSPS	米国特許第 8, 399, 218 号を参 照	
パラログ C+D		
パラログ D	米国特許第 8, 399, 218 号を参 照	
パラログ A+B	米国特許第 8, 399, 218 号を参 照	
PPP1R12C (AAVS1)	chr19 : 55602840-55624858	(NM_017607)
GR	5 : 142646254-142783254	(NM_000176)
IL2RG	chrX : 70327254-70331481	(NM_000206)
SFTPB	chr2 : 85884440-85895374	(NM_198843)

10

20

【0713】

実施例 15 : T 細胞を操作するための c e D N A 遺伝子編集ベクター

本明細書に開示されるように、本明細書に記載される c e D N A 遺伝子編集ベクターを使用して、任意の細胞のゲノム、例えば、T 細胞における遺伝子を編集、修復、および／またはノックアウトすることができる。例示の目的で、例示的な遺伝子編集 c e D N A ベクターは、T 細胞における C X C R 4、C C R 5、P D-1 遺伝子のうちのいずれかを編集するための c e D N A ベクターの生成に関して記載されており、以下に記載される。しかしながら、本明細書に記載される方法および構築物において有用な遺伝子編集ベクター c e D N A を生成する方法を説明するために、本実施例では C X C R 4、C C R 5、または P D-1 遺伝子を標的とすることが例示されるが、当業者は、上述の使用のように、例えば、本明細書における「遺伝子編集 c e D N A で治療される例示的な疾患」および「遺伝子編集のための追加の疾患」と題するセクションに記載されるように、遺伝子編集が望ましい任意の遺伝子を使用できることを承知している。さらに、この例示的な実施例では、T 細胞のゲノムが修飾されているが、当業者は、エキソビボまたはインビボで任意の細胞、例えば本明細書において「宿主細胞」と題するセクション X I I . A に記載されている任意の細胞を修飾できることを承知している。また、この例示的な実施例では、ゲノム D N A が修飾されるように示されているが、熟練者が c e D N A ベクターを修飾して、ミトコンドリア D N A (m t D N A) を修飾する、例えば、Maeder, et al. "Genome-editing technologies for gene and cell therapy." Molecular Therapy 24.3 (2016) : 430-446 and Gammage PA, et al. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-ized. Trends Genet. 2018 ; 34 (2) : 101-110 に記載されているように、m t Z F N および m i t o T A L E N 機能、またはミトコンドリア適合型 C R I S P R / C a s 9 プラットフォームを

30

40

50

コードできることも想定される。

【0714】

治療に関連する任意の遺伝子（例えば、C X C R 4、またはC C R 5、H I V侵入の補助受容体）が標的とされ得、切除、編集、修復、または置換され得る（C X C R 4の場合、例えば、H I V侵入を防止するため）。さらなる非限定的な例では、T細胞消耗のメディエーターであるP D - 1を切除することができる。標的遺伝子の切除は、テンプレート核酸配列、例えばドナーH D Rテンプレートの有無にかかわらず実施される。H D Rテンプレートがない場合の単一ガイドR N A（s g R N A）および対応するヌクレアーゼの使用は、非相同末端結合（N H E J）をもたらす。

【0715】

任意の治療関連遺伝子座を標的とすることができ、そのような標的遺伝子座は、例えば、T細胞枯渇の既知の調節因子、ウイルス補助受容体等である。c e D N A遺伝子編集ベクターは、R N A誘導型エンドヌクレアーゼ、例えば、「D N Aエンドヌクレアーゼ」と題するセクションおよびその中のサブセクションにおいて本明細書に記載されるC R I S P R / C a s 9、およびジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、T A L エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、メガヌクレアーゼ、および操作された部位特異的誘導ヌクレアーゼを含む他のエンドヌクレアーゼを含む、本明細書に記載される任意のエンドヌクレアーゼを含み得る。例示的な好適なエンドヌクレアーゼと、C X C R 4およびP D - 1のH D Rのテンプレート核酸は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、S c h u m a n n e t a l . , P N A S (2 0 1 5) 1 1 2 (3 3) : 1 0 4 3 7 - 1 0 4 4 2 に完全に記載されている（例えば、S c h u m a n n e t a l . , における図1〜4を参照）。

【0716】

さらに、c e D N Aにはサイズ制限がないため、c e D N Aベクターは、同じc e D N Aベクター上にドナーD N Aおよび／または遺伝子編集分子を提供するように操作することができる。あるいは、ドナーD N Aおよび／または遺伝子編集分子は、1つ以上の異なるc e D N Aベクター上に提供することができる。

【0717】

標的遺伝子座の切除、例えば、プロモーターの破壊または未成熟終止コドンの挿入またはミスセンス突然変異に適したテンプレート核酸をコードするc e D N Aは、標的遺伝子座へのゲノム相同性アームを用いて作製される（例えば、実施例10を参照）。そのようなものとして、修飾された細胞では、遺伝子は切断されるか、または遺伝子サイレンシングされる。いくつかの実験では、C a s 9またはc p f 1ヌクレアーゼが、同じまたは異なるc e D N Aベクターに組み込まれる。いくつかの実験では、c e D N Aは、ガイドR N Aを発現するようにさらに操作され（例えば、図12、15、16を参照）、C a sまたはc p f 1酵素が使用される場合、同じもしくは異なるc e D N A上で、またはプラスミドによって、またはm R N Aによって、または組み換えタンパク質によって提供され得る。ガイドR N Aは、標的配列を整列させ、使用されるC A S酵素（例えば、s a C a s 9、またはs p C A S 9、またはc p f 1等）に関連するP A Mモチーフを同定することによって、例えば、P N A S (2 0 1 5) 1 1 2 (3 3) : 1 0 4 3 7 - 1 0 4 4 2 における標的配列に結合するように操作されている。

【0718】

いくつかの実験では、ガイドR N Aは、他の既知の配列領域を標的とする。既知の標的領域に結合する複数のs g R N A配列が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第2015/0056705号の表1〜2に記載されており、例えば、ヒトβグロビン、ヒト、B C L I I A、ヒトK L F 1、ヒトC C R 5、ヒトC X C R 4、P P P 1 R 1 2 C、マウスおよびヒトH P R T、ヒトアルブミン、ヒト第I X因子、ヒト第V I I I因子、ヒトL R R K 2、ヒトH t t、ヒトR H、C F T R、T R A C、T R B C、ヒトP D 1、ヒトC T L A - 4、H L A c 1 1、H L A A 2、H L A A 3、H L A B、H L A C、H L A c 1 . I I D B p 2 . D R A、T a p 1および2、T a p

10

20

30

40

50

a s i n、D M D、R F X 5 等) の g R N A 配列が含まれる。

【0719】

c e D N A ベクターは、エキスピボで T 細胞に送達されるが、全身送達も本明細書で企図される。いくつかの実験では、C a s 9 または c p f 1 スクレアーゼの代わりに、ジungkフィンガーヌクレアーゼ、T A L E N S、または m e g a T A L が同じまたは異なる c e D N A ベクターに組み込まれる。

【0720】

実施例 16：ウィスコット・アルドリッチ症候群 (W A S) を治療するためのエキスピボ遺伝子編集

A A V を使用したエキスピボ遺伝子編集は、A A V が相同性修復テンプレートまたは D N A ドナーテンプレートの唯一のソースであるため、困難である。A A V ベクターは、カプシド化 D N A を含み、これは送達され得る相同性アームのサイズを制限する。さらに、A A V に関連する複雑性および高いコストにより、エキスピボ遺伝子編集に関してその有用性が制限される。さらに、培養中の細胞に十分な相同性指向修復を誘導するには、非常に高い力価の A A V ベクターが必要である。

【0721】

本明細書に記載される C e D N A ベクターは、D N A ドナーテンプレートの A A V ベクター媒介送達に関連する問題の多くを克服することができる。例えば、c e D N A ベクターは、従来の A A V ベクターで使用される相同性アームよりも長い相同性アームを有するドナーテンプレートの使用を可能にし、これはより高いオンターゲット効果およびより低いオフターゲット効果を伴って、より効率的な遺伝子編集を可能にする利点をもたらす。

【0722】

例示の目的で、例示的な遺伝子編集 c e D N A ベクターは、W A S 遺伝子 C D 3 4 + 幹細胞をエキスピボで編集するための c e D N A ベクターの生成に関して記載されており、以下に記載される。しかしながら、本明細書に記載される方法および構築物において有用な遺伝子編集 c e D N A ベクターを生成する方法を説明するために、この実施例では W A S 遺伝子の標的が例示されているが、当業者は、上述の使用のように、遺伝子編集が望まれる任意の遺伝子を使用できることを承知している。編集のための例示的な遺伝子は、本明細書において、例えば、「遺伝子編集 c e D N A で治療される例示的な疾患」および「遺伝子編集のための追加の疾患」と題するセクションに記載されている。さらに、この例示的な実施例では造血 C D 3 4 + 細胞のゲノムが修飾されているが、体細胞、培養細胞、ならびに幹細胞および／または多能性細胞を含む任意の細胞、例えば、「宿主細胞」と題する本明細書のセクション X I I . A . に記載される任意の細胞が、エキスピボまたはインスピボで修飾され得る。

【0723】

エキスピボ実験を、ヒト C D 3 4 + 造血幹細胞を使用して実施して、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (W A S) 遺伝子のオープンリーディングフレーム (O R F) をコードする c e D N A ベクターが培養で遺伝子編集を行う能力を試験する。5 つの異なる治療アームを含む例示的な実験は、本明細書において以下に概説される。

【0724】

最初に、c e D N A ベクターを使用して、現在 A A V ベクターを使用して送達され、W A S O R F (ミニ遺伝子、エクソンのみ) および相同性領域をコードする構築物を送達する。遺伝子編集結果の効率は、A A V を使用して達成された効率 (30 ~ 40 %) と比較され、c e D N A ベクターベースの送達が同じミニ遺伝子の A A V を介した送達の効率を満たし得るか、または超え得るかを決定する。

【0725】

次に、c e D N A ベクターを使用して、イントロン 1 を保持した W A S ミニ遺伝子 (エクソンのみ) を送達する。イントロン 1 は、W A S タンパク質の発現に重要であることがわかっているが、イントロン 1 は、A A V ベクターのサイズ制限を超えている。したがって、W A S ミニ遺伝子 + イントロン 1 の送達が成功すると、c e D N A ベクターが

、遺伝子編集、W A S ミニ遺伝子+イントロン-1 の標的送達、およびW A S タンパク質の良好な発現についてA A Vベクターより優れていることが示される。

【0726】

次に、W A S O R F ミニ遺伝子またはW A S ミニ遺伝子+イントロン-1 を含むc e D N Aベクターは、より長い相同性アームで設計され、そのような相同性アームの長さの増加が、遺伝子編集のオンターゲット効率またはオフターゲット忠実度に影響を及ぼすかどうかを評価する。

【0727】

次に、W A S O R F ミニ遺伝子またはW A S ミニ遺伝子+イントロン-1 を含むC e D N Aベクターは、c e D N AにC a s 9切断部位を含むように設計されており、C a s 9部位の存在が、c e D N Aベクターのねじれ張力を解放することによって、ドナーテンプレートとして機能するようにc e D N Aの効率を高めるかどうかを決定する。最後に、c e D N A-G F P / c e D N A-L U Cなどのレポーター構築物をコードするc e D N Aベクターは、エクスピボ細胞におけるc e D N Aベクターの電気穿孔の効率を最適化および／または最大化するように設計され得る。

【0728】

実施例17：培養細胞における遺伝子編集のための例示的なワークフロー方法（複数可）
別の実施例では、図19に描かれる方法を本明細書において使用して、培養細胞における遺伝子編集を実施する。例えば、本発明のc e D N Aベクターのうちのいずれかは、本出願および実施例に記載されている方法により、肝細胞培養物などの培養細胞に送達することができる。次いで、N H E J経路（c e D N AベクターがH D Rテンプレートを含まない場合）を使用して、またはH D R経路（c e D N AベクターがH D Rテンプレートを含む場合）を介して、遺伝子編集をもたらすのに十分な時間および条件下でインキュベートされる。遺伝子編集が成功したかどうかを判断するには、ドナーテンプレートタンパク質、例えば、第IX因子（F I X）の発現について、またはゲノム標的D N Aのディープシーケンシングによって細胞をアッセイして、ドナーテンプレートの良好な組み込みが起こったかどうかを判断することができる。この実施例に関するさらなる考慮事項が以下に概説される。

【0729】

ガイドR N Aの設計：当該技術分野で知られている任意の方法を使用して、本発明のc e D N Aベクターに組み込むための標的遺伝子編集部位と相同性を有するカスタムガイドR N A（g R N A）を設計および／または合成することができる。本明細書では、カスタムg R N Aは、複数のベンダー、例えば、T h e r m o F i s h e rを通じて設計および合成され得ることが本明細書で特に企図されている。

【0730】

初代細胞培養：いくつかの実施形態では、肝細胞などの肝臓細胞の遺伝子編集部位を標的とすることが望ましい場合がある。これは、例えば、アルブミン遺伝子内の遺伝子編集部位を利用することによって達成できる。当業者は、肝臓細胞を含む初代細胞の良好な単離および増殖は困難であり得、解凍およびプレーティング手順、プレートのコーティング、M a t r i g e l（商標）、および／または増殖培地（例えば、肝細胞基本培地）の最適化を必要とし得ることを理解するであろう。一実施形態では、肝臓細胞を培養するための方法は、当該技術分野で既知の方法、例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるS h a r m a B l o o d（2017）（上記）に由来する。初代肝臓細胞の増殖条件は、例えば、T h e r m o F i s h e rからの試薬、解凍培地、プレーティング培地、インキュベーション培地、およびマトリックス試薬（G e l T r e x（商標）、M a t r i g e l（商標））などを使用して最適化され得る。

【0731】

H D Rテンプレートc e D N A：非限定的な実施例では、H D Rテンプレートを含むc e D N Aベクターは、図19に示されるように設計される。例えば、c e D N Aベクターは、所望の長さを有する5'相同性アームおよび所望の長さの3'相同性アームを含み得

る。非特異的効果を排除するために、本明細書では、c e D N A 対照が、(i) 5 ' 相同性アームのみ (ドナーテンプレート配列の有無にかかわらず)、または (i i) 3 ' 相同性アームのみ (ドナーテンプレート配列の有無にかかわらず) は、H D R テンプレート全体 (例えば、5 ' 相同性アーム、ドナーテンプレート配列、および 3 ' 相同性アーム) を含む c e D N A ベクターと実質的に同様のプロトコルで 사용할 ことができる。これらの対照により、当業者は、相同性アームによって単独でもたらされ得る非特異的効果またはオフターゲット効果がある場合、それを識別することができる。

【0732】

実施例 18 : 対象におけるインビボでの遺伝子編集のための例示的なワークフロー方法 (複数可)

実施例 17 に記載される方法および c e D N A 構築物は、多細胞生物、例えば、動物または人間において遺伝子編集を行うように適合させることができる。c e D N A ベクターは、任意の便利な方法で生物 (例えば、マウス) の胚性幹細胞に送達することができる。いくつかの実施例では、生物は、非ヒト生物である。生物は、疾患の動物モデルを生成するための齧歯類または動物 (例えば、非ヒト霊長類) であり得る。得られた細胞をスクリーニングして、適切に組み換えられた導入遺伝子の存在を確認する。陽性細胞を野生型生物 (例えば、マウスおよび非ヒト齧歯類) に移植し、得られた子孫を導入遺伝子の存在についてスクリーニングすることができる。標的とされる突然変異は、生物 (例えば、マウス) の任意の系統における関心対象の遺伝子において作製され得るため、子孫の戻し交配は、所望の遺伝的バックグラウンドでトランスジェニック子孫を得るために必要ない。

【0733】

例示の目的で、この実施例は、細胞を編集して動物モデルを生成するための c e D N A ベクターの生成に関して、例示的な遺伝子編集 c e D N A ベクターの使用について考察する。しかしながら、本明細書に記載される遺伝子編集ベクター c e D N A を使用する方法を説明するために、この実施例では動物 (例えば、マウス) の修飾が例示されているが、当業者は、上述の使用のように、遺伝子編集が望まれる任意の生物または対象の細胞上の c e D N A ベクターを使用できることを承知している。遺伝子編集の例示的な対象は、本明細書の「対象」の定義で論じられている。

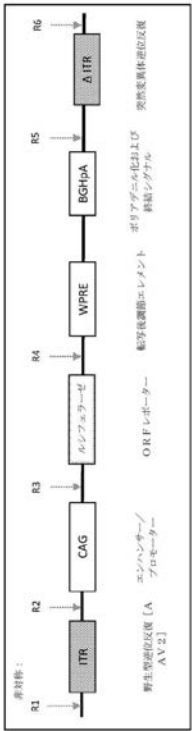
【0734】

参考文献

特許および特許出願を含むがこれらに限定されない、本明細書および本明細書の実施例で引用されるすべての刊行物および参考文献は、あたかも個々の刊行物または参考文献が、完全に記載されるように参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、それら全体が参照により組み込まれる。この出願が優先権を主張する任意の特許出願もまた、刊行物および参考文献について上述した方法で、参照により本明細書に組み込まれる。

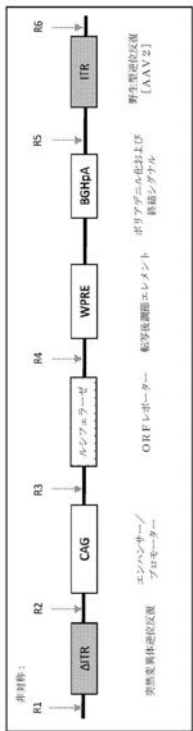
【図 1 A】

【図 1 A】



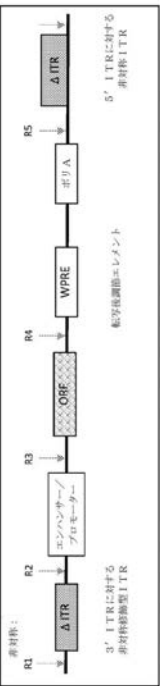
【図 1 B】

【図 1 B】



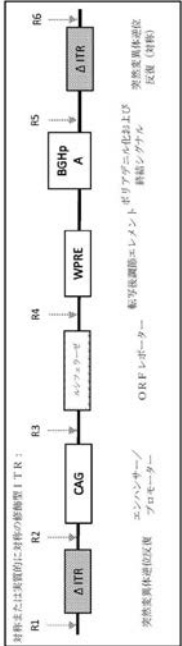
【図 1 C】

【図 1 C】



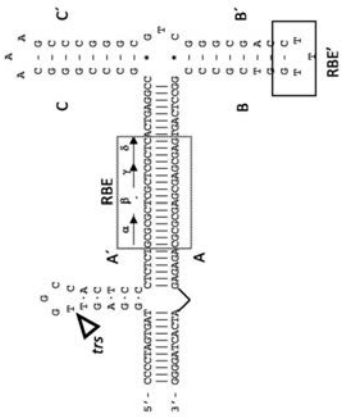
【図 1 D】

【図 1 D】



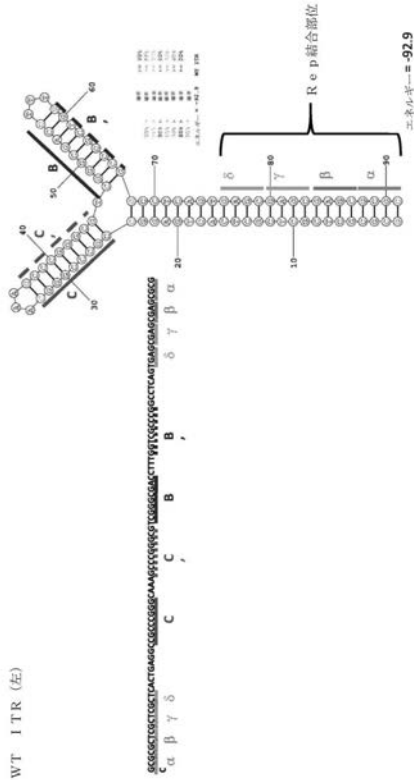
【図 2 B】

【図 2 B】



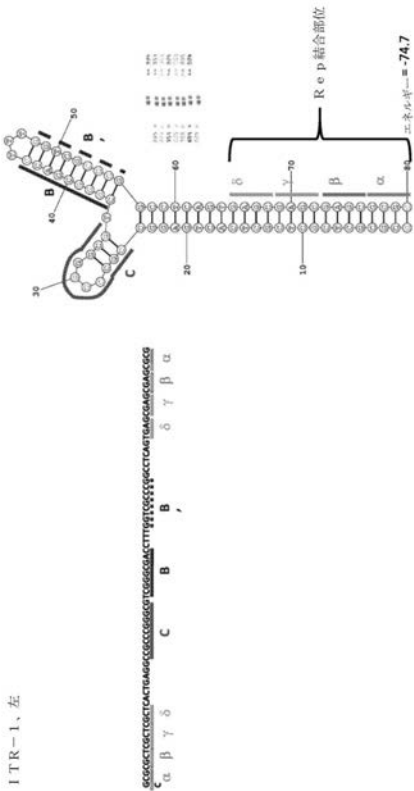
【図 3 A】

【図 3 A】



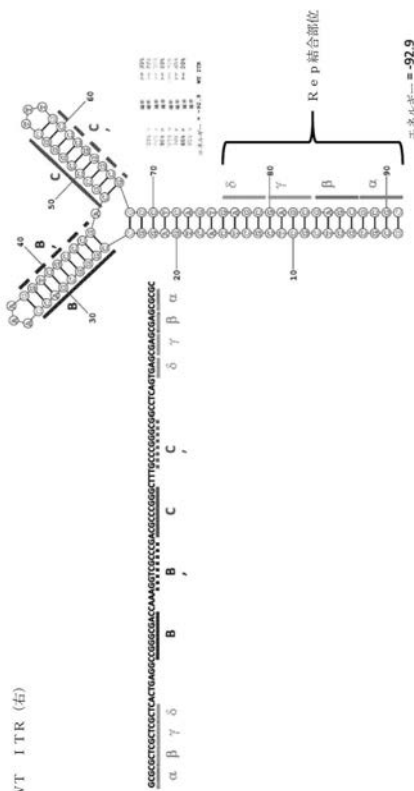
【図 3 B】

【図 3 B】



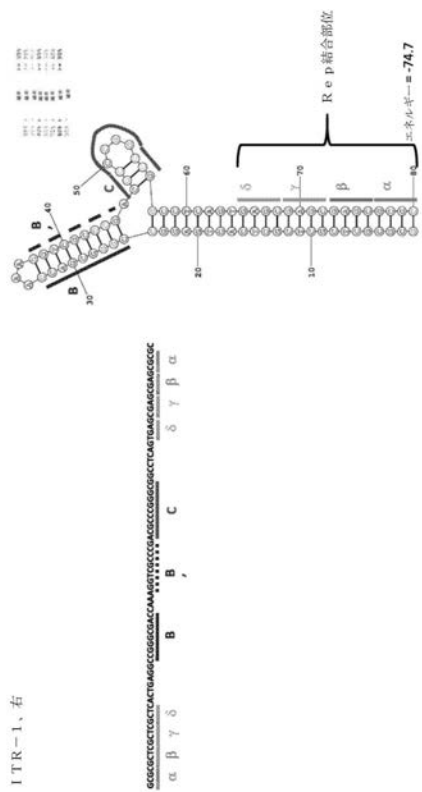
【図 3 C】

【図 3 C】



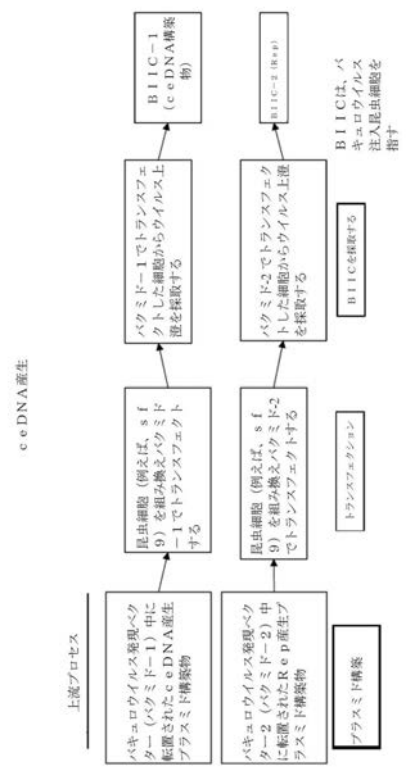
【図 3 D】

【図 3 D】



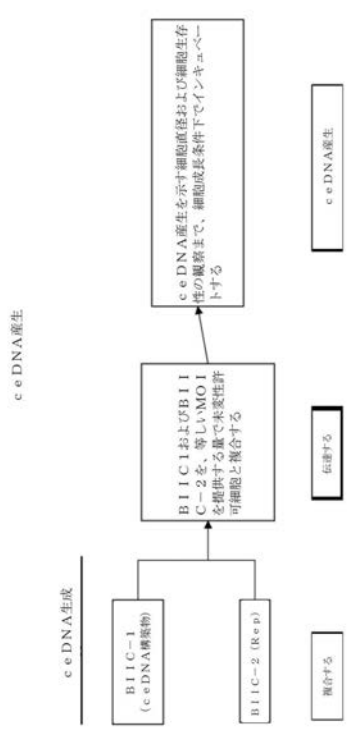
【図 4 A】

【図 4 A】



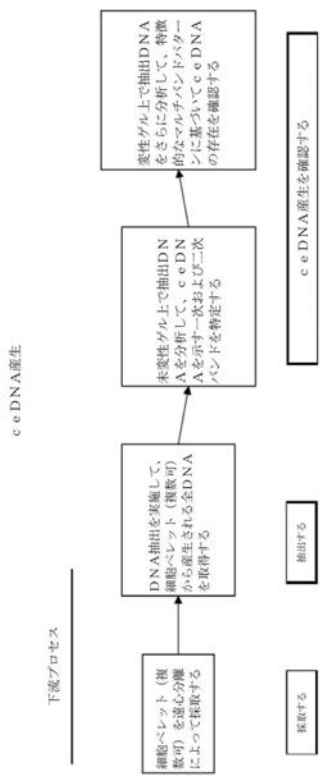
【図 4 B】

【図 4 B】



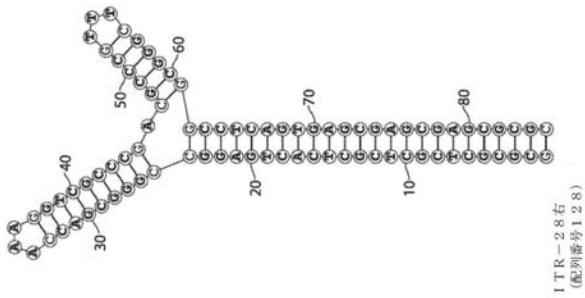
【図 4 C】

【図 4 C】



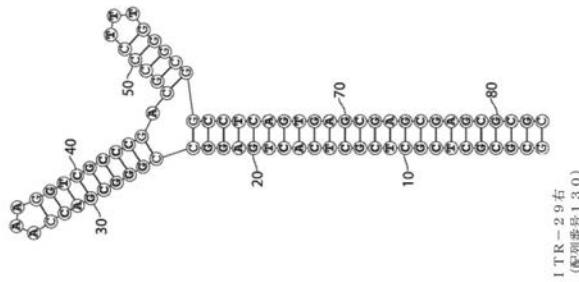
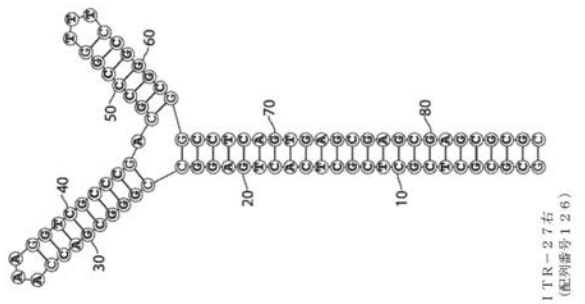
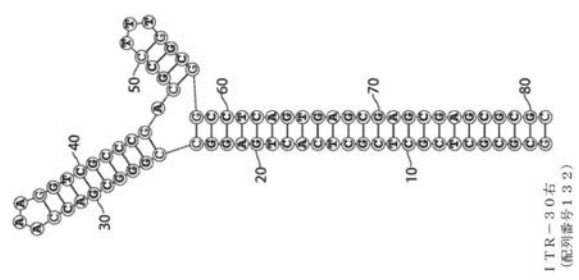
【図 7 A - 4】

【図 7 A - 4】



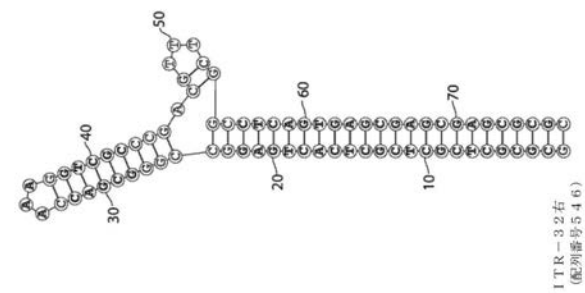
【図 7 A - 5】

【図 7 A - 5】



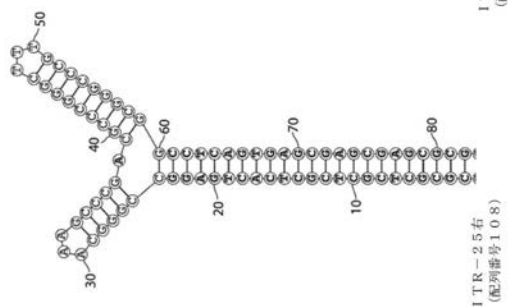
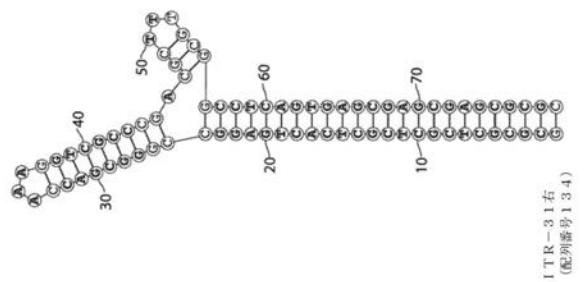
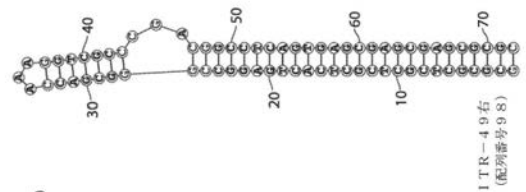
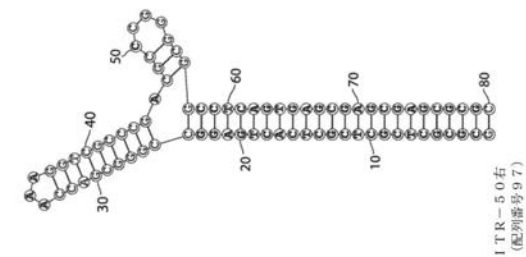
【図 7 A - 6】

【図 7 A - 6】



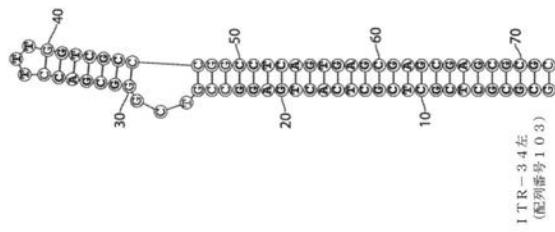
【図 7 A - 7】

【図 7 A - 7】



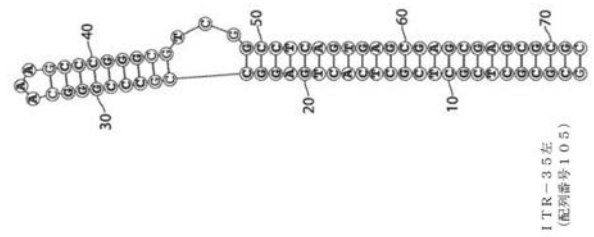
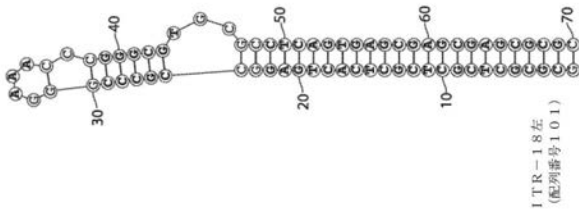
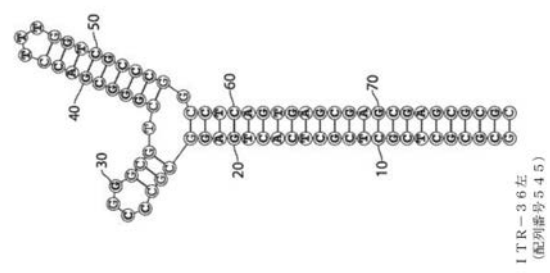
【図 7 B - 1】

【図 7 B - 1】



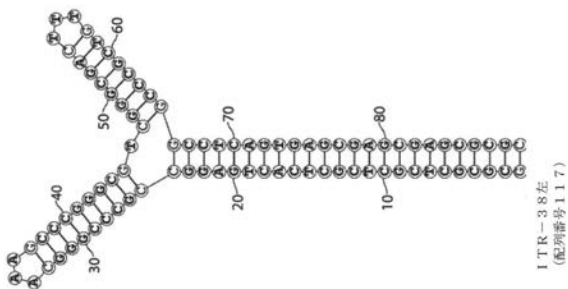
【図 7 B - 2】

【図 7 B - 2】



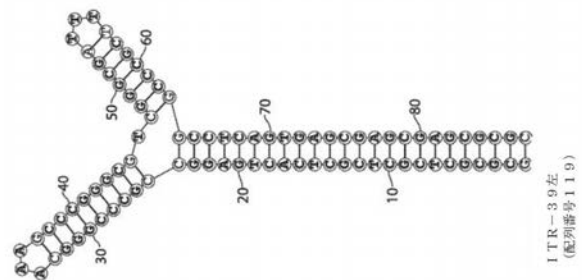
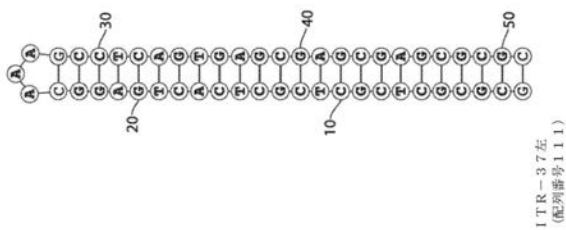
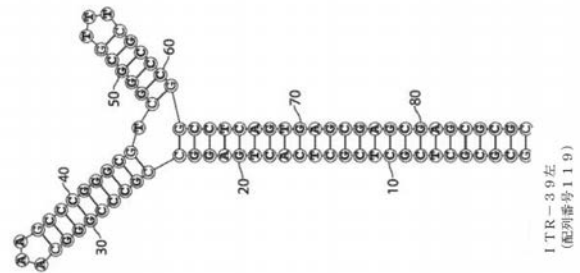
【図 7 B - 3】

【図 7 B - 3】



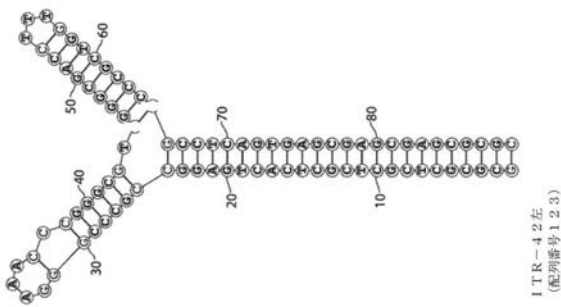
【図 7 B - 4】

【図 7 B - 4】



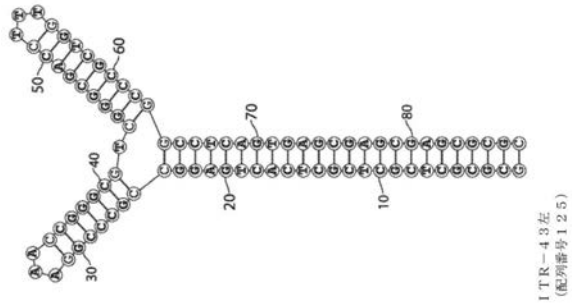
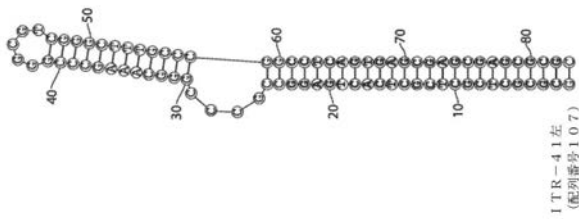
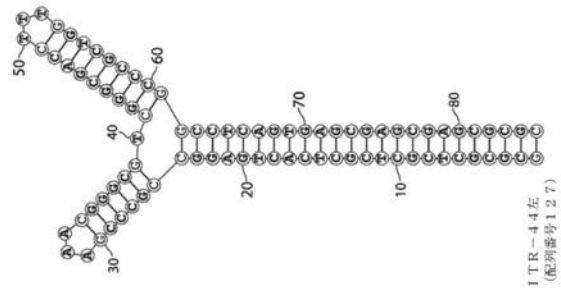
【図 7 B - 5】

【図 7 B - 5】



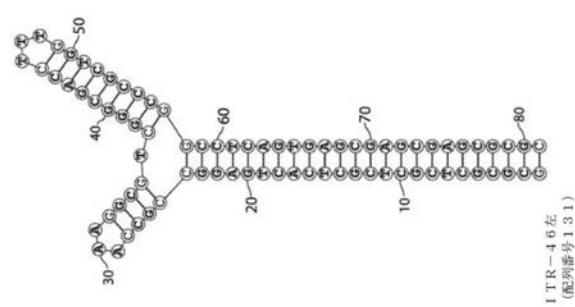
【図 7 B - 6】

【図 7 B - 6】



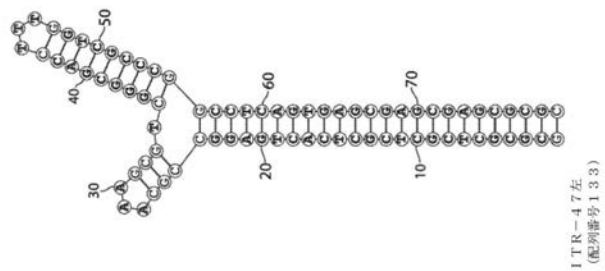
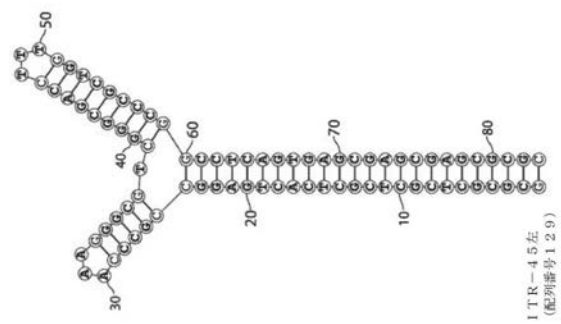
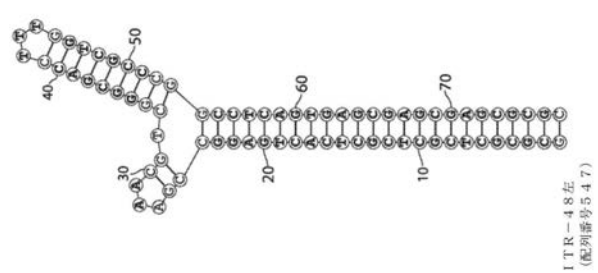
【図 7 B - 7】

【図 7 B - 7】



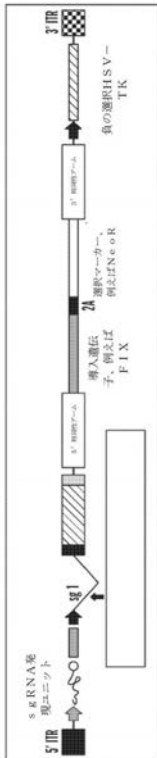
【図 7 B - 8】

【図 7 B - 8】



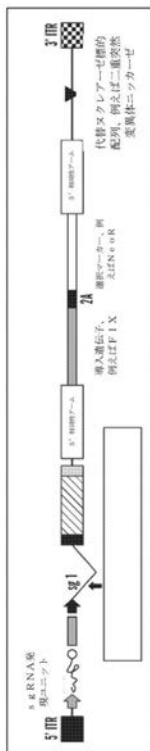
【 図 8 】

【圖8】



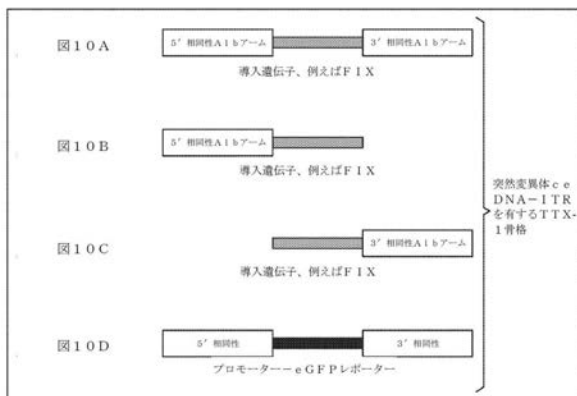
【図 9】

【圖9】



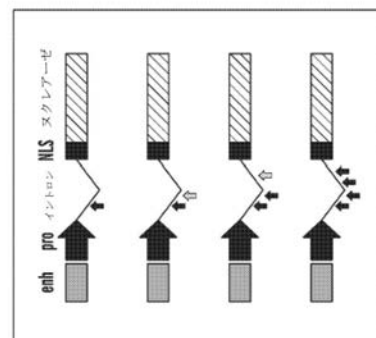
【 図 1 0 A - D 】

【図 10A-D】



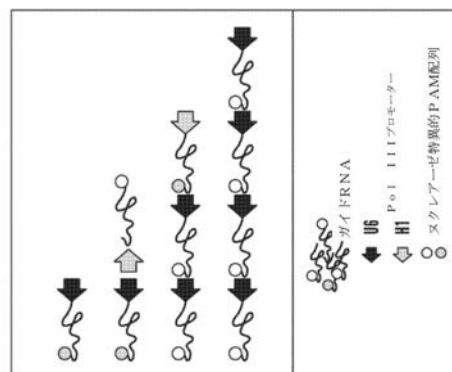
【图 1 1】

【圖 1 1】



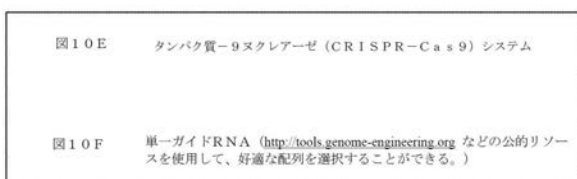
【图 1 2】

【圖 1 2】



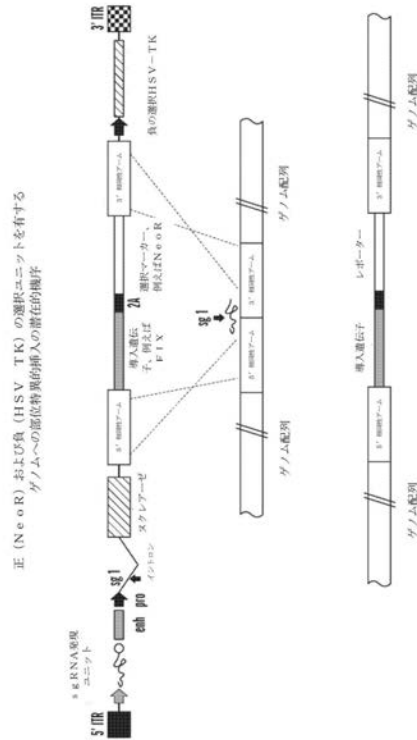
【図 10 E - F】

【図 10E-F】



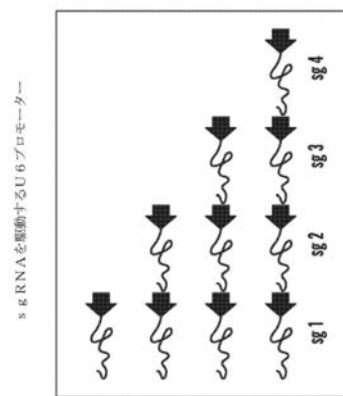
【 図 1 3 】

【圖 1 3】



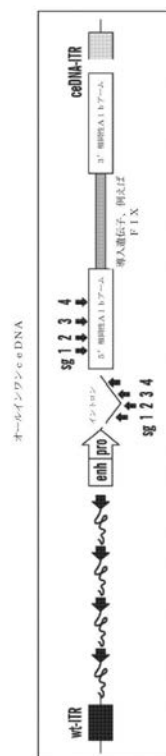
【図 14】

【图 1-4】



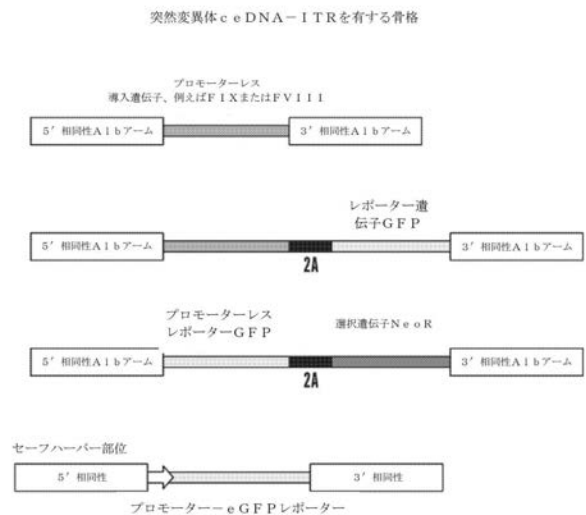
【图 1 5】

【图 15】



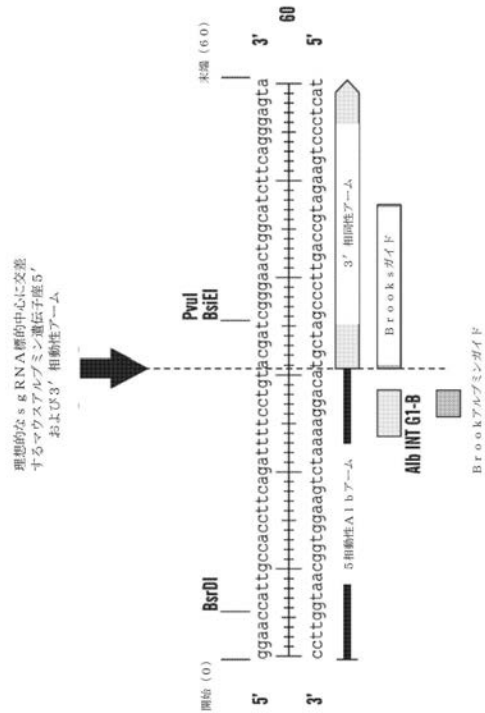
【图 16】

【图 16】



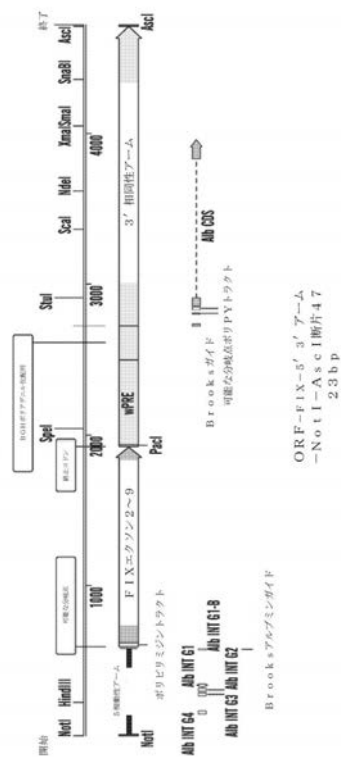
【図 17-1】

【図 17】



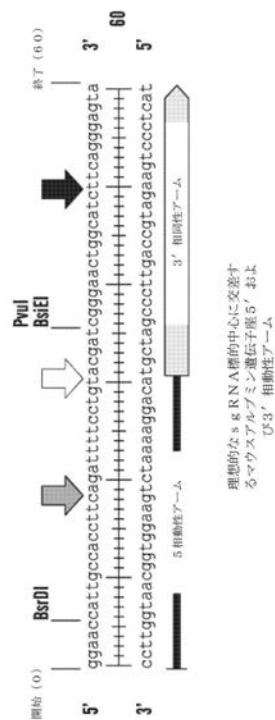
【図 17-2】

【図 17-2】



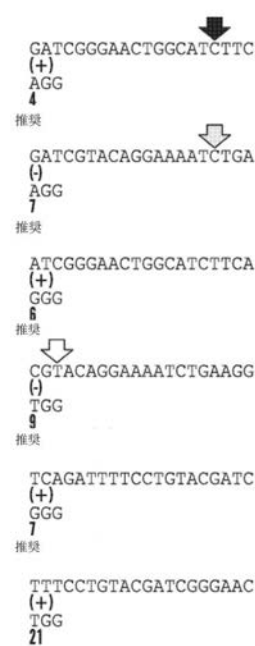
【図 18A】

【図 18A】



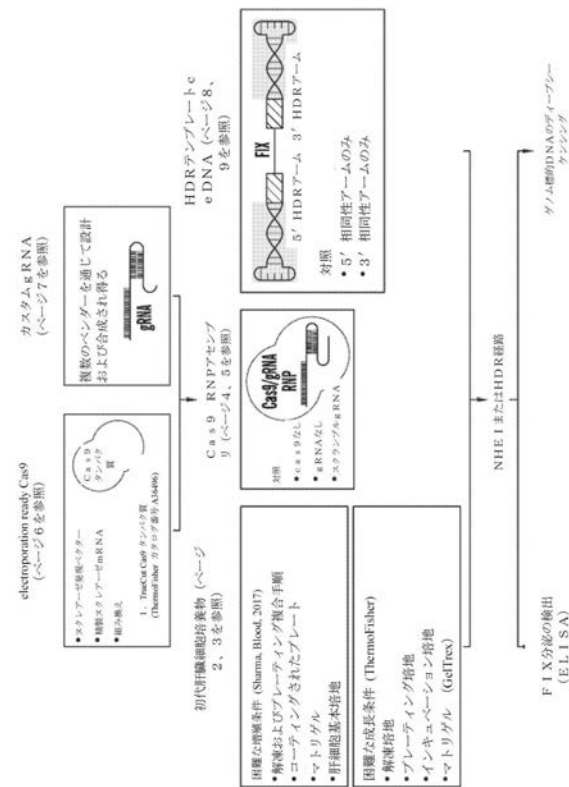
【図 18B】

【図 18B】



【図 19】

【図 19】



【配列表】

2021505159000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/64242

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12N 5/10, 9/22, 15/09, 15/63, 15/64, 15/66, 15/90, 15/113 (2019.01) CPC - C12N 5/10, 9/22, 15/09, 15/63, 15/64, 15/66, 15/90, 15/102, 15/111, 15/113, 15/907, 15/8257; A61K 48/005, 67/0275 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2017/152149 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 08 September 2017; page 2, line 2; page 5, lines 5-7; page 11, line 20; page 40, lines 25-26, 29-30; page 42, lines 6, 18-19; page 50, line 5; page 51, lines 17-18; page 53, line 18; page 65 line 26-27</td> <td>1-5, 70-74, 176-178 6, 75, 158, 160-161, 171-173</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2016/0369258 A1 (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 22 December 2016; paragraphs [0012], [0022]</td> <td>6, 75, 171-173</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2014/0335063 A1 (SANGAMO BIO SCIENCES, INC.) 13 November 2014; paragraphs [0025], [0043], [0080], [0119]</td> <td>158, 160-161</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015/089462 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al.) 18 June 2015; entire document</td> <td>1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016/154596 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 29 September 2016; entire document</td> <td>1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178</td> </tr> <tr> <td>E, X</td> <td>US 2019/0032083 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 31 January 2019; entire document</td> <td>1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2017/152149 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 08 September 2017; page 2, line 2; page 5, lines 5-7; page 11, line 20; page 40, lines 25-26, 29-30; page 42, lines 6, 18-19; page 50, line 5; page 51, lines 17-18; page 53, line 18; page 65 line 26-27	1-5, 70-74, 176-178 6, 75, 158, 160-161, 171-173	Y	US 2016/0369258 A1 (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 22 December 2016; paragraphs [0012], [0022]	6, 75, 171-173	Y	US 2014/0335063 A1 (SANGAMO BIO SCIENCES, INC.) 13 November 2014; paragraphs [0025], [0043], [0080], [0119]	158, 160-161	A	WO 2015/089462 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al.) 18 June 2015; entire document	1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178	A	WO 2016/154596 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 29 September 2016; entire document	1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178	E, X	US 2019/0032083 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 31 January 2019; entire document	1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	WO 2017/152149 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 08 September 2017; page 2, line 2; page 5, lines 5-7; page 11, line 20; page 40, lines 25-26, 29-30; page 42, lines 6, 18-19; page 50, line 5; page 51, lines 17-18; page 53, line 18; page 65 line 26-27	1-5, 70-74, 176-178 6, 75, 158, 160-161, 171-173																					
Y	US 2016/0369258 A1 (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 22 December 2016; paragraphs [0012], [0022]	6, 75, 171-173																					
Y	US 2014/0335063 A1 (SANGAMO BIO SCIENCES, INC.) 13 November 2014; paragraphs [0025], [0043], [0080], [0119]	158, 160-161																					
A	WO 2015/089462 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al.) 18 June 2015; entire document	1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178																					
A	WO 2016/154596 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 29 September 2016; entire document	1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178																					
E, X	US 2019/0032083 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 31 January 2019; entire document	1-6, 70-75, 158, 160-161, 171-173, 176-178																					
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 19 February 2019 (19.02.2019)		Date of mailing of the international search report 10 APR 2019																					
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/64242

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 8-69, 77-147, 149-155, 157-159, 162-170, 174-175, 179-185
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-7, 70-76, 148, 156, 158, 160, 161, 171-173, 178-178, and a single-base editor nucleic acid-guided nuclease (gene editing molecule) are directed toward a non-viral capsid-free close-ended DNA (cdDNA) vector, and methods and a kit associated therewith.

---Continued on Supplemental Page---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1, 2-6 (each in-part), 70, 71-75 (each in-part), 158, 160, 161, 171-173, and 176-178; a single-base editor nucleic acid-guided nuclease (gene editing molecule)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/64242

-***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking.-***-

The vector, methods and kit will be searched to the extent they encompass a single-base editor nucleic acid-guided nuclease (first exemplary gene editing molecule). Applicant is invited to elect additional gene editing molecule(s), with, where applicable, associated method(s) and/or kit(s), to be searched. Additional gene editing molecule(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims x1, 2-6 (each in-part), 70, 71-75 (each in-part), 158, 160, 161, 171-173, and 176-178 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a single-base editor nucleic acid-guided nuclease (gene editing molecule). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected gene editing molecule(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an RNA-guided nuclease (gene editing molecule).

No technical features are shared between the gene editing molecules of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a non-viral capsid-free close-ended DNA (ceDNA) vector comprising: at least one heterologous nucleotide sequence between flanking inverted terminal repeats (ITRs), wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule; and a method for genome editing comprising: contacting a cell with a gene editing system, wherein one or more components of the gene editing system are delivered to the cell by contacting the cell with a non-viral capsid-free close ended DNA (ceDNA) vector comprising at least one heterologous nucleotide sequence between flanking inverted terminal repeats (ITRs), wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule; a method for inserting a nucleic acid sequence into a genomic safe harbor gene, the method comprising: contacting a cell with (i) a gene editing system and (ii) a homology directed repair template having homology to a genomic safe harbor gene and comprising a nucleic acid sequence encoding a protein of interest, wherein one or more components of the gene editing system are delivered to the cell by contacting the cell with a non-viral capsid-free close-ended DNA (ceDNA) vector composition, wherein the ceDNA nucleic acid vector composition comprises at least one heterologous nucleotide sequence between flanking inverted terminal repeats (ITRs), wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule, and wherein the method is performed under conditions and for a time sufficient to insert the nucleic acid sequence encoding the protein of interest into the genomic safe harbor gene; these shared technical features are previously disclosed by WO 2017/152149 A1 to University of Massachusetts (hereinafter "Massachusetts") in view of US 2014/0335063 A1 to Sangamo BioSciences, Inc. et al. (hereinafter "Sangamo").

Massachusetts discloses: a non-viral capsid-free close-ended DNA (ceDNA) vector (a non-viral capsid-free close-ended DNA (ceDNA) vector; page 1, line 28 - page 2, line 7) comprising: at least one heterologous nucleotide sequence (comprising: at least one heterologous nucleotide sequence; page 1, line 28 - page 2, line 7) between flanking inverted terminal repeats (ITRs) (between flanking interrupted self-complementary sequences [inverted terminal repeats (ITRs)]; page 1, line 28 - page 2, line 7; page 14, lines 1-8; page 19, lines 24-25), wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule (wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule; page 40, line 25 - page 41, line 5).

Massachusetts does not disclose: a method for genome editing comprising: contacting a cell with a gene editing system, wherein one or more components of the gene editing system are delivered to the cell by contacting the cell with a non-viral capsid-free close ended DNA (ceDNA) vector comprising at least one heterologous nucleotide sequence between flanking inverted terminal repeats (ITRs), wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule; a method for inserting a nucleic acid sequence into a genomic safe harbor gene, the method comprising: contacting a cell with (i) a gene editing system and (ii) a homology directed repair template having homology to a genomic safe harbor gene and comprising a nucleic acid sequence encoding a protein of interest, wherein one or more components of the gene editing system are delivered to the cell by contacting the cell with a non-viral capsid-free close-ended DNA (ceDNA) vector composition, wherein the ceDNA nucleic acid vector composition comprises at least one heterologous nucleotide sequence between flanking inverted terminal repeats (ITRs), wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule, and wherein the method is performed under conditions and for a time sufficient to insert the nucleic acid sequence encoding the protein of interest into the genomic safe harbor gene.

Sangamo discloses a method for genome editing (a method for genome editing; paragraphs [0007], [0163]) comprising: contacting a cell with a gene editing system (comprising: contacting a cell with a gene editing system; paragraphs [0007], [0163]), wherein one or more components of the gene editing system are delivered to the cell by contacting the cell with a vector (wherein one or more components of the gene editing system are delivered to the cell by contacting the cell with a vector; paragraphs [0143], [0163]) comprising at least one heterologous nucleotide sequence (comprising at least one heterologous nucleotide sequence; paragraph [0143]), wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule (wherein at least one heterologous nucleotide sequence encodes at least one gene editing molecule; paragraph [0143]); and a method for inserting a nucleic acid sequence into a genomic safe harbor gene (a method for inserting a nucleic acid sequence into a target locus, including a genomic safe harbor gene; paragraphs [0007], [0012], [0080]), the method comprising: contacting a cell with (i) a gene editing system (the method comprising: contacting a cell with (i) a gene editing system) and (ii) a homology directed repair template (and a transgene with flanking homology regions (a homology directed repair template); paragraphs [0007], [0044]) having homology to a genomic safe harbor gene (having homology to a genomic safe harbor gene; paragraphs [0007], [0012], [0080]) and comprising a nucleic acid sequence encoding a protein of interest (comprising a nucleic acid sequence encoding a heterologous polypeptide (protein of interest); paragraph [0007]), wherein one or more components of the gene editing system are delivered to the cell by contacting the cell with a vector composition (wherein one or more components of the gene editing system are delivered to the cell by contacting the cell with a vector composition; paragraphs [0007], [0143], [0163]), wherein the nucleic acid vector composition comprises at least one heterologous nucleotide sequence encoding at least one gene editing molecule (wherein the nucleic acid vector composition comprises at least one heterologous nucleotide sequence encoding at least one gene editing molecule; paragraphs [0007], [0143], [0163]), and wherein the method is performed under conditions and for a time sufficient to insert the nucleic acid sequence encoding the protein of interest into the genomic safe harbor gene (wherein the method is performed under conditions and for a time sufficient to insert the nucleic acid sequence encoding the protein of interest into the genomic safe harbor gene; paragraph [0164]).

-***-Continued Within the Next Supplemental Box.-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/64242

-***Continued from Previous Supplemental Box.***-

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Massachusetts to have provided methods of genome editing and integration of a heterologous repair sequence into a safe harbor locus, as disclosed by Sangamo, in order to provide a better means of editing the genome of the cells and integrating one or more desired heterologous proteins of interest into a host without the complexities associated with viral vector reproduction in the host, which could potentially lead to off-target effects of the integration of additionally produced, unwanted, vectors, in the host cells.

Since none of the special technical features of the Groups 1+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Massachusetts and Sangamo references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/0789 (2010.01)	C 1 2 N 5/0789	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 コーティン, ロバート エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301, 4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 カー, ダグラス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301, 4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 サマヨア, フィリップ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301, 4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 アルカン, オザン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301, 4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 シモンズ, マシュー ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301, 4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

Fターム(参考) 4B029 AA23 BB11 CC01 FA13 GA08 GB06

4B065 AA90X AA93X AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA23 CA31 CA44
CA46
4C084 AA13 NA14 ZA331 ZA511 ZA531 ZA551 ZB081 ZB212 ZB261 ZB331
ZB351
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA51 ZA53
ZA55 ZB08 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA12 NA14 ZA33 ZA51 ZA53 ZA55
ZB08 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35