

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-524061

(P2023-524061A)

(43)公表日 令和5年6月8日(2023.6.8)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 7
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全181頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-566315(P2022-566315)	(71)出願人	515236259
(86)(22)出願日	令和3年4月30日(2021.4.30)		ザ・ブロード・インスティテュート・インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年12月27日(2022.12.27)		アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02142・ケンブリッジ・メイン・ストリート・415
(86)国際出願番号	PCT/US2021/030298		
(87)国際公開番号	WO2021/222831	(71)出願人	505028576
(87)国際公開日	令和3年11月4日(2021.11.4)		プレジデント アンド フェロウズ オヴハーヴァード カレッジ
(31)優先権主張番号	63/019,221		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02138 ケンブリッジ クインシー・ストリート 17
(32)優先日	令和2年5月1日(2020.5.1)	(71)出願人	596060697
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
(31)優先権主張番号	63/061,517		
(32)優先日	令和2年8月5日(2020.8.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 操作された中枢神経系用組成物

(57)【要約】

中枢神経系細胞を標的とするのに有効な標的化部分を含む組成物及びその製剤が、いくつかの例示的な実施形態に記載される。特定の実施形態において、標的化部分は、n量体モチーフ、Pモチーフ、又は両方から構成される。1つ以上の標的化部分を含有するポリペプチドを生成するように構成されたベクター系も、いくつかの例の実施形態に記載される。カーゴを対象に送達するため、及び／又は中枢神経系疾患、障害、若しくはその系を処置するためなどの、中枢神経系細胞を標的とするのに有効な標的化部分を生成し、本明細書に記載される標的化部分を含有する組成物を使用する方法も、本明細書に記載される。

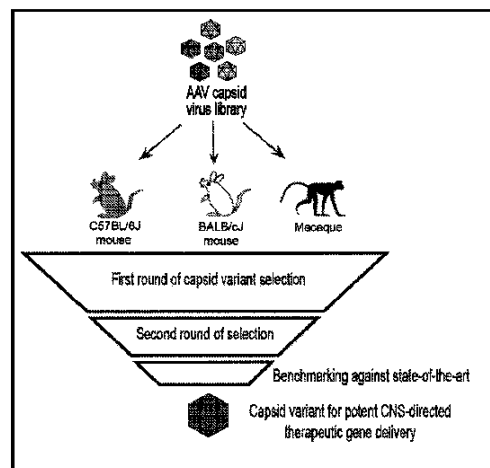


FIG. 6A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物であって、

中枢神経系（CNS）細胞を標的化するのに有効な標的化部分であって、前記標的化部分が、

1つ以上のPモチーフ（ここで、前記少なくとも1つのPモチーフが、アミノ酸配列 $PX_1QGTX_2RX_n$ （配列番号2）を含み、ここで、 X_1 、 X_2 、 X_n がそれぞれ、独立して、いずれかのアミノ酸から選択され、ここで、 n が、0、1、2、3、4、5、6、若しくは7である）、又は

配列番号65～199、200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、313、及び318～329からなる群から選択される1つ以上の n 量体インサート、又は

配列番号65～199、200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、313、及び318～329からなる群から選択される1つ以上の n 量体インサート及び1つ以上のPモチーフを含む、標的化部分、並びに

任意に、カーゴ（ここで、前記カーゴが、前記標的化部分に連結されるか又は他の形で結合される）

を含む、組成物。

【請求項 2】

前記標的化部分が、 n 量体インサート及びPモチーフの両方を含み、ここで、前記Pモチーフが、任意に、前記 n 量体インサートの部分又は全体である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記1つ以上の n 量体インサート、前記Pモチーフのそれぞれ、又は両方が、それぞれ3～15アミノ酸長である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

- a. X_1 が、S、T、若しくはAであり、
- b. X_2 が、L、V、F、若しくはIであり、又は
- c. 両方である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 n 量体インサート及び／又はPモチーフが、配列番号65～199からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 n 量体インサート及び／又はPモチーフが、配列番号200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、及び313からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 n 量体インサート及び／又はPモチーフが、配列番号318～329からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 n 量体インサートの直前に、AQ又はDGがある、請求項1に記載の組成物。

【請求項 9】

(a) 前記 n 量体インサートポリペプチドの直前に、AQがあり、前記 n 量体インサートが、KTVGTVY（配列番号3）、RSVGSVY（配列番号4）、RYLGDA S（配列番号5）、WVLP SGG（配列番号6）、VTVGS IY（配列番号7）、VRGSS I L（配列番号8）、RHHGDAA（配列番号9）、VIQAMKL（配列番号10）、LTYGMAQ（配列番号11）、LRIGLSQ（配列番号12）、GDYS MIV（配列番号13）、VNYSVAL（配列番号14）、RHIADAS（配列番号15）、RYLGDA T（配列番号16）、QRVGF AQ（配列番号17）、QIAH

G Y S T（配列番号 18）、W T L E S G H（配列番号 19）、若しくは G E N S A R W（配列番号 20）であり；又は

（b）前記 n 量体インサートポリペプチドの直前に、D G があり、前記 n 量体インサートが、R E Q Q K L W（配列番号 21）、A S N P G R W（配列番号 22）、W T L E S G H（配列番号 23）、R E Q K K L W（配列番号 24）、E R L L V Q L（配列番号 25）、若しくは R M Q R T L Y（配列番号 26）である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記標的化部分が、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、ポリマー、糖、又はそれらの組合せを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記標的化部分が、ウイルスタンパク質を含む、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記ウイルスタンパク質が、カプシドタンパク質である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 n 量体インサートが、ウイルスカプシドの外部であるように、前記 n 量体インサートは、前記ウイルスタンパク質の 2 つのアミノ酸の間に位置する、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ウイルスタンパク質が、アデノ随伴ウイルス（A A V）タンパク質である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 A A V タンパク質が、A A V カプシドタンパク質である、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の n 量体インサート及び／又は P モチーフがそれぞれ、A A V 9 カプシドポリペプチドにおける 262～269、327～332、382～386、452～460、488～505、527～539、545～558、581～593、704～714、又はそれらの任意の組合せから独立して選択されるアミノ酸間のいずれか 2 つの連続したアミノ酸間、又は 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 r h . 74、A A V r h . 10 カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記 1 つ以上の n 量体インサートの少なくとも 1 つが、A A V 9 カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸 588 及び 589 間、又は 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 r h . 74、A A V r h . 10 カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記 A A V カプシドタンパク質が、対応する野生型 A A V カプシドポリペプチドと比較して、非 C N S 細胞における減少された又はなくされた吸収を有する操作 A A V カプシドタンパク質である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記非 C N S 細胞が、肝細胞である、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記野生型カプシドポリペプチドが、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 r h . 74、又は A A V r h . 10 カプシドポリペプチドである、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記操作 A A V カプシドタンパク質が、非 C N S 細胞における減少された又はなくされた吸収をもたらす 1 つ以上の変異を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

前記 1 つ以上の変異が、前記 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）における

- a. 2 6 7 位に、
- b. 2 6 9 位に、
- c. 5 0 4 位に、
- d. 5 0 5 位に、
- e. 5 9 0 位に、
- f. 又はそれらの任意の組合せに、

又は非 A A V 9 カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する 1 つ以上の位置にある、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

10

前記非 A A V 9 カプシドタンパク質が、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 r h. 7 4、又は A A V r h. 1 0 カプシドポリペプチドである、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）における 2 6 7 位又は非 A A V 9 カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、A への G 又は X の変異であり、ここで、X がアミノ酸である、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）における 2 6 9 位又は非 A A V 9 カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、S 又は X から T への変異であり、ここで、X がアミノ酸である、請求項 2 2 に記載の組成物。

20

【請求項 2 6】

前記 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）における 5 0 4 位又は非 A A V 9 カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、G 又は X から A への変異であり、ここで、X がアミノ酸である、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）における 5 0 5 位又は非 A A V 9 カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、P 又は X から A への変異であり、ここで、X がアミノ酸である、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

30

前記 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）における 5 9 0 位又は非 A A V 9 カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Q 又は X から A への変異であり、ここで、X がアミノ酸である、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記操作 A A V カプシドタンパク質が、野生型 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）の 2 6 7 位、2 6 9 位又は両方における変異を含む操作 A A V 9 カプシドポリペプチドであり、2 6 7 位における前記変異が、G から A への変異であり、2 6 9 位における前記変異が、S から T への変異である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

40

前記操作 A A V カプシドタンパク質が、野生型 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）の 5 9 0 位における変異を含む操作 A A V 9 カプシドポリペプチドであり、5 0 9 位における前記変異が、Q から A への変異である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記操作 A A V カプシドタンパク質が、野生型 A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 1）の 5 0 4 位、5 0 5 位、又は両方における変異を含む操作 A A V 9 カプシドポリペプチドであり、5 0 4 位における前記変異が、G から A への変異であり、5 0 5 位における前記変異が、P から A への変異である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記組成物が、操作ウイルス粒子である、請求項 1 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の組成物。

50

【請求項 33】

前記操作ウイルス粒子が、操作 AAV ウイルス粒子である、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記 AAV ウイルス粒子が、操作 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.74、又は AAVrh.10 ウイルス粒子である、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記任意選択のカーゴが、CNS 疾患又は障害を処置又は予防することが可能である、請求項 1～34 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 36】

ベクターを含むベクター系であって、前記ベクターが：

1つ以上のポリヌクレオチドであって、前記 1つ以上のポリヌクレオチドの少なくとも 1つが、中枢神経系 (CNS) 細胞を標的化するのに有効な標的化部分の全て又は部分をコードし、前記標的化部分が、

少なくとも 1つの P モチーフ (ここで、前記少なくとも 1つの P モチーフが、アミノ酸配列 $PX_1QGT X_2RX_n$ (配列番号 2) を含み、ここで、 X_1 、 X_2 、 X_n がそれぞれ、独立して、いずれかのアミノ酸から選択され、ここで、 n が、0、1、2、3、4、5、6、若しくは 7 である)、又は

配列番号 65～199、200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、及び 313、及び 318～329 からなる群から選択される少なくとも 1つの n 量体インサート、又は

配列番号 65～199、200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、313、及び 318～329 からなる群から選択される少なくとも 1つの n 量体インサート及び少なくとも 1つの P モチーフを含み、

ここで、前記 1つ以上のポリヌクレオチドの少なくとも 1つが、前記少なくとも 1つの n 量体インサート、前記少なくとも 1つの P モチーフ、又は両方をコードする、1つ以上のポリヌクレオチド；並びに

任意に、前記 1つ以上のポリヌクレオチドの 1つ以上に動作可能に連結される調節要素を含む、ベクター系。

20

30

【請求項 37】

前記標的化部分が、 n 量体インサート及び P モチーフの両方を含み、ここで、前記 P モチーフが、任意に、前記 n 量体インサートの部分又は全体である、請求項 36 に記載のベクター系。

【請求項 38】

前記 1つ以上の n 量体インサート、前記 P モチーフのそれぞれ、又は両方が、それぞれ 3～15 アミノ酸長である、請求項 36 に記載のベクター系。

【請求項 39】

- a. X_1 が、S、T、若しくは A であり、
- b. X_2 が、L、V、F、若しくは I であり、又は
- c. 両方である、請求項 36 に記載のベクター系。

40

【請求項 40】

前記 n 量体インサート及び／又は P モチーフが、配列番号 65～199 からなる群から選択される、請求項 36 に記載のベクター系。

【請求項 41】

前記 n 量体インサート及び／又は P モチーフが、配列番号 200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、及び 313 からなる群から選択される、請求項 36 に記載のベクター系。

【請求項 42】

50

前記 n 量体インサート及び／又は P モチーフが、配列番号 3 1 8 ～ 3 2 9 からなる群から選択される、請求項 3 6 に記載のベクター系。

【請求項 4 3】

前記 n 量体インサートの直前に、A Q 又は D G がある、請求項 3 6 に記載のベクター系。

【請求項 4 4】

(a) 前記 n 量体インサートポリペプチドの直前に、A Q があり、前記 n 量体インサートが、K T V G T V Y (配列番号 3)、R S V G S V Y (配列番号 4)、R Y L G D A S (配列番号 5)、W V L P S G G (配列番号 6)、V T V G S I Y (配列番号 7)、V R G S S I L (配列番号 8)、R H H G D A A (配列番号 9)、V I Q A M K L (配列番号 10)、L T Y G M A Q (配列番号 11)、L R I G L S Q (配列番号 12)、G D Y S M I V (配列番号 13)、V N Y S V A L (配列番号 14)、R H I A D A S (配列番号 15)、R Y L G D A T (配列番号 16)、Q R V G F A Q (配列番号 17)、Q I A H G Y S T (配列番号 18)、W T L E S G H (配列番号 19)、若しくは G E N S A R W (配列番号 20) であり；又は

(b) 前記 n 量体インサートポリペプチドの直前に、D G があり、前記 n 量体インサートが、R E Q Q K L W (配列番号 21)、A S N P G R W (配列番号 22)、W T L E S G H (配列番号 23)、R E Q K K L W (配列番号 24)、E R L L V Q L (配列番号 25)、若しくは R M Q R T L Y (配列番号 26) である、請求項 4 3 に記載のベクター系。

【請求項 4 5】

カーゴをさらに含む、請求項 3 6 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項 4 6】

前記カーゴが、カーゴポリヌクレオチドであり、前記標的化部分をコードする前記 1 つ以上のポリヌクレオチドの 1 つ以上に任意に動作可能に連結される、請求項 4 5 に記載のベクター系。

【請求項 4 7】

前記ベクター系が、ウイルス粒子、前記カーゴを含有するウイルス粒子、又は両方を生成することが可能である、請求項 3 6 ～ 4 6 のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項 4 8】

前記ベクター系が、前記標的化部分の 1 つ以上を含むポリペプチドを生成することが可能である、請求項 3 6 ～ 4 7 のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項 4 9】

前記ポリペプチドが、ウイルスポリペプチドである、請求項 4 8 に記載のベクター系。

【請求項 5 0】

前記ウイルスポリペプチドが、カプシドポリペプチドである、請求項 4 9 に記載のベクター系。

【請求項 5 1】

前記カプシドポリペプチドが、アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドポリペプチドである、請求項 5 0 に記載のベクター系。

【請求項 5 2】

前記ウイルス粒子が、A A V ウイルス粒子である、請求項 4 9 ～ 5 1 のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項 5 3】

前記 A A V ウイルス粒子又は A A V カプシドポリペプチドが、操作 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 r h . 7 4、若しくは A A V r h . 1 0 ウイルス粒子又はポリペプチドである、請求項 5 0 又は 5 1 に記載のベクター系。

【請求項 5 4】

前記 n 量体インサートが、前記ウイルス粒子のウイルスカプシドの外部であるように、

前記少なくとも1つのn量体インサートをコードする前記少なくとも1つのポリヌクレオチドが、ウイルスポリペプチドの2つのアミノ酸に対応する2つのコドン間に挿入される、請求項49～51のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項55】

前記少なくとも1つのポリヌクレオチドが、AAV9カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸262～269、327～332、382～386、452～460、488～505、527～539、545～558、581～593、704～714、若しくはそれらの任意の組合せの間のいずれか2つの連続したアミノ酸に対応する2つのコドン間、又はAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh.74、AAVrh.10カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される、請求項53に記載のベクター系。

10

【請求項56】

前記少なくとも1つのポリヌクレオチドが、前記AAV9カプシドポリヌクレオチドにおけるアミノ酸588及び589に対応する前記コドン間、又はAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh.74、AAVrh.10カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される、請求項54に記載のベクター系。

【請求項57】

前記AAVカプシドタンパク質が、対応する野生型AAVカプシドポリペプチドと比較して、非CNS細胞における減少された又はなくされた吸収を有する操作AAVカプシドタンパク質である、請求項51に記載のベクター系。

20

【請求項58】

前記非CNS細胞が、肝細胞である、請求項57に記載のベクター系。

【請求項59】

前記野生型カプシドポリペプチドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.74、又はAAVrh.10カプシドポリペプチドである、請求項57に記載のベクター系。

【請求項60】

前記操作AAVカプシドタンパク質が、非CNS細胞における減少された又はなくされた吸収をもたらす1つ以上の変異を含む、請求項57に記載のベクター系。

30

【請求項61】

前記1つ以上の変異が、前記AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における

- a. 267位に、
- b. 269位に、
- c. 504位に、
- d. 505位に、
- e. 590位に、
- f. 又はそれらの任意の組合せに、

又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する1つ以上の位置にある、請求項60に記載のベクター系。

40

【請求項62】

前記非AAV9カプシドタンパク質が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh.74、又はAAVrh.10カプシドポリペプチドである、請求項61に記載のベクター系。

【請求項63】

前記AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における267位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、AへのG又はX変異であり、ここで、Xがアミノ酸である、請求項61に記載のベクター系。

【請求項64】

前記AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における269位又は非AAV9カプ

50

シドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、S又はXからTへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である、請求項61に記載のベクター系。

【請求項65】

前記AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における504位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、G又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である、請求項61に記載のベクター系。

【請求項66】

前記AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における505位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、P又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である、請求項61に記載のベクター系。

【請求項67】

前記AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における590位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Q又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である、請求項61に記載のベクター系。

【請求項68】

前記操作AAVカプシドタンパク質が、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の267位、269位又は両方における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、267位における前記変異が、GからAへの変異であり、269位における前記変異が、SからTへの変異である、請求項60に記載のベクター系。

【請求項69】

前記操作AAVカプシドタンパク質が、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の590位における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、509位における前記変異が、QからAへの変異である、請求項60に記載のベクター系。

【請求項70】

前記操作AAVカプシドタンパク質が、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の504位、505位、又は両方における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、504位における前記変異が、GからAへの変異であり、505位における前記変異が、PからAへの変異である、請求項60に記載のベクター系。

【請求項71】

前記1つ以上のポリヌクレオチドを含む前記ベクターが、スプライス調節要素を含まない、請求項36～70のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項72】

ウイルスrepタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項36～71のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項73】

前記ウイルスrepタンパク質が、AAVrepタンパク質である、請求項72に記載のベクター系。

【請求項74】

前記ウイルスrepタンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、前記1つ以上のポリヌクレオチドと同じベクター又は異なるベクター上にある、請求項72又は73に記載のベクター系。

【請求項75】

前記ウイルスrepタンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、調節要素に動作可能に連結される、請求項72～74のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項76】

前記ベクター系が、請求項1～35のいずれか一項に記載の組成物又はその部分を生成することが可能である、請求項36～75のいずれか一項に記載のベクター系。

【請求項77】

請求項36～76のいずれか一項に記載のベクター系によってコードされるか、生成されるか、又は両方であるポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 78】

前記ポリペプチドが、ウイルスポリペプチドである、請求項 77 に記載のポリペプチド。

【請求項 79】

前記ウイルスポリペプチドが、AAV ポリペプチドである、請求項 78 に記載のポリペプチド。

【請求項 80】

前記ポリペプチドが、カーゴに連結されるか又は他の形で結合される、請求項 77 ～ 79 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 81】

請求項 77 ～ 80 のいずれか一項に記載のポリペプチドを任意に含む、請求項 36 ～ 76 のいずれか一項に記載のベクター系によって生成される粒子。

【請求項 82】

前記粒子が、ウイルス粒子である、請求項 81 に記載の粒子。

【請求項 83】

前記ウイルス粒子が、アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、レンチウイルス粒子、又はレトロウイルス粒子である、請求項 82 に記載の粒子。

【請求項 84】

前記粒子が、カーゴを含む、請求項 81 ～ 83 のいずれか一項に記載の粒子。

【請求項 85】

前記ウイルス粒子が、中枢神経系 (CNS) 指向性を有する、請求項 81 ～ 84 のいずれか一項に記載の粒子。

【請求項 86】

前記カーゴが、CNS 疾患若しくは障害を予防することができる、請求項 45 ～ 76 のいずれか一項に記載のベクター系、請求項 77 ～ 80 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 81 ～ 85 のいずれか一項に記載の粒子。

【請求項 87】

- a. 請求項 1 ～ 35 のいずれか一項に記載の組成物；
- b. 請求項 36 ～ 76 又は 86 のいずれか一項に記載のベクター系；
- c. 請求項 77 ～ 80 又は 86 のいずれか一項に記載のポリペプチド；
- d. 請求項 81 ～ 86 のいずれか一項に記載の粒子；又は
- e. それらの組合せ

を含む細胞。

【請求項 88】

前記細胞が、原核細胞である、請求項 87 に記載の細胞。

【請求項 89】

前記細胞が、真核細胞である、請求項 87 に記載の細胞。

【請求項 90】

- a. 請求項 1 ～ 35 のいずれか一項に記載の組成物、
- b. 請求項 36 ～ 76 又は 86 のいずれか一項に記載のベクター系；
- c. 請求項 77 ～ 80 又は 86 のいずれか一項に記載のポリペプチド；
- d. 請求項 81 ～ 86 のいずれか一項に記載の粒子；
- e. 請求項 87 ～ 89 のいずれか一項に記載の細胞；又は
- f. それらの組合せ；及び

薬学的に許容される担体

を含む医薬製剤。

【請求項 91】

中枢神経系疾患、障害、又はその症状を処置する方法であって、それを必要とする対象に、

- a. 請求項 1 ～ 35 のいずれか一項に記載の組成物；

- b. 請求項 36～76 又は 86 のいずれか一項に記載のベクター系；
- c. 請求項 77～80 又は 86 のいずれか一項に記載のポリペプチド；
- d. 請求項 81～86 のいずれか一項に記載の粒子；
- e. 請求項 87～89 のいずれか一項に記載の細胞；
- f. 請求項 90 に記載の医薬製剤；又は
- g. それらの組合せ

を投与することを含む方法。

【請求項 92】

前記中枢神経系疾患又は障害が、二次的な筋肉疾患、障害、又はその症状を含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記中枢神経系疾患又は障害が、フリードライヒ運動失調症、ドラベ症候群、脊髄小脳失調症 3 型、ニーマン・ピック病 C 型、ハンチントン病、ポンペ病、筋強直性ジストロフィー 1 型、Glut1 欠損症症候群（De Vivo 症候群）、テイ・サックス病、脊髄性筋萎縮症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ダノン病、レット症候群、アンジェルマン症候群、又はそれらの組合せである、請求項 91 に記載の方法。

【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、2020 年 5 月 1 日に提出された米国仮特許出願第 63 / 019, 221 号、及び 2020 年 8 月 5 日に提出された米国仮特許出願第 63 / 061, 517 号の利益を主張するものである。上記に示される出願の全内容が、参照により本明細書に完全に援用される。

【0002】

電子的な配列表の参照

本出願は、2021 年 4 月 30 日に作成され、144, 000 バイトのサイズを有する、BROD-5125WP.txt という名称の ASCII テキストファイルとして電子的形態で提出された配列表を含む。配列表の内容は、全体が本明細書に援用される。

【0003】

本明細書に開示される主題は、一般に、限定はされないが、組み換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む操作された中枢神経系標的化組成物、並びにシステム、組成物、及びその使用に関する。

【背景技術】

【0004】

組み換え AAV（rAAV）は、遺伝子治療及び遺伝子編集のための最も一般的に使用される送達ビヒクルである。それにもかかわらず、天然カプシド変異体を含有する rAAV は、限られた細胞指向性を有する。実際に、現在使用されている rAAV は、主に、全身送達後に肝臓に感染させる。さらに、天然カプシド変異体を有するこれらの従来の rAAV による他の細胞型、組織、及び器官における従来の rAAV の形質導入効率は限られる。したがって、中枢神経系などの、肝臓以外の細胞、組織、及び器官を侵す疾患のための AAV 媒介性ポリヌクレオチド送達は、典型的に、多量のウイルス（典型的に、約 2×10^{14} vg/kg）の注入を必要とし、これは、肝臓毒性をもたらすことが多い。さらに、従来の rAAV を用いる場合、多量が必要とされるため、成人患者に投与する必要がある十分な量の治療用 rAAV を製造することは非常に難題である。さらに、遺伝子発現及び生理学の相違のため、マウス及び霊長類モデルは、ウイルスカプシドに対して異なって応答する。異なるウイルス粒子の形質導入効率は、異なる種間で変化し、結果として、マウスにおける前臨床試験は、ヒトを含む霊長類における結果を正確に反映しないことが多い。したがって、様々な遺伝性疾患の処置に使用するための改善された rAAV の必要性がある。

10

20

30

40

50

【0005】

本出願におけるいずれの文献の引用又は特定も、このような文献が本発明に対する先行技術として利用可能であることを認めるものではない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

組成物であって、中枢神経系（CNS）細胞を標的とするのに有効な標的化部分であって、標的化部分が、1つ以上のPモチーフ又は（ここで、少なくとも1つのPモチーフが、アミノ酸配列 $PX_1QGTX_2RX_n$ （配列番号2）を含み、ここで、 X_1 、 X_2 、 X_n がそれぞれ、独立して、いずれかのアミノ酸から選択され、ここで、 n が、0、1、2、3、4、5、6、若しくは7である）、又は配列番号65～199、200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、及び313、及び318～329のいずれか1つの群から選択される1つ以上の n 量体インサート、又は配列番号65～199、200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、313、及び318～329の群から選択される1つ以上の n 量体インサート及び1つ以上のPモチーフを含む、標的化部分、並びに任意に、カーゴ（ここで、カーゴが、標的化部分に連結されるか又は他の形で結合される）を含む、組成物が、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。

【0007】

いくつかの例の実施形態において、標的化部分は、 n 量体インサート及びPモチーフの両方を含み、ここで、Pモチーフは、任意に、 n 量体インサートの部分又は全体である。

【0008】

いくつかの例の実施形態において、1つ以上の n 量体インサート、Pモチーフのそれぞれ、又は両方が、それぞれ3～15アミノ酸長である。

【0009】

いくつかの例の実施形態において、

- a. X_1 が、S、T、若しくはAであり、
- b. X_2 が、L、V、F、若しくはIであり、
- c. 又は両方である。

【0010】

いくつかの例の実施形態において、 n 量体インサート及び／又はPモチーフは、表1（例えば、配列番号65～199）にあるとおりである。

【0011】

いくつかの例の実施形態において、 n 量体インサート及び／又はPモチーフが、表2～3（例えば、配列番号200、202、204、206、208、210、212、214（表2）及び／又は300、303、306、308、311、313（表3））のいずれか1つにあるとおりである。

【0012】

いくつかの例の実施形態において、 n 量体インサート及び／又はPモチーフが、表7（例えば、配列番号318～329）にあるとおりである。

【0013】

いくつかの例の実施形態において、 n 量体インサートの直前に、AQ又はDGがある。

【0014】

いくつかの例の実施形態において、

(a) n 量体インサートポリペプチドの直前に、AQがあり、 n 量体インサートは、KT VGT VY（配列番号3）、RSVGS VY（配列番号4）、RYLG D A S（配列番号5）、WVLP S G G（配列番号6）、VT V G S I Y（配列番号7）、VR G S S I L（配列番号8）、RHHG D A A（配列番号9）、VI Q A M K L（配列番号10）、L T Y G M A Q（配列番号11）、L R I G L S Q（配列番号12）、GD Y S M I V（配

10

20

30

40

50

列番号 13)、V N Y S V A L (配列番号 14)、R H I A D A S (配列番号 15)、R Y L G D A T (配列番号 16)、Q R V G F A Q (配列番号 17)、Q I A H G Y S T (配列番号 18)、W T L E S G H (配列番号 19)、若しくは G E N S A R W (配列番号 20)であり;又は

(b) n 量体インサートポリペプチドの直前に、D G があり、n 量体インサートは、R E Q Q K L W (配列番号 21)、A S N P G R W (配列番号 22)、W T L E S G H (配列番号 23)、R E Q K K L W (配列番号 24)、E R L L V Q L (配列番号 25)、若しくは R M Q R T L Y (配列番号 26)である。

【0015】

いくつかの例の実施形態において、標的化部分は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、ポリマー、糖、又はそれらの組合せを含む。

10

【0016】

いくつかの例の実施形態において、標的化部分は、ウイルスタンパク質を含む。

【0017】

いくつかの例の実施形態において、ウイルスタンパク質は、カプシドタンパク質である。

【0018】

いくつかの例の実施形態において、n 量体インサートが、ウイルスカプシドの外部であるように、n 量体インサートは、ウイルスタンパク質の2つのアミノ酸の間に位置する。

【0019】

いくつかの例の実施形態において、ウイルスタンパク質は、アデノ随伴ウイルス (A A V) タンパク質である。

20

【0020】

いくつかの例の実施形態において、A A V タンパク質は、A A V カプシドタンパク質である。

【0021】

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のn 量体インサート及び/又はPモチーフはそれぞれ、A A V 9 カプシドポリペプチドにおける262~269、327~332、382~386、452~460、488~505、527~539、545~558、581~593、704~714、若しくはそれらの任意の組合せから独立して選択されるアミノ酸間のいずれか2つの連続したアミノ酸間、又は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 r h . 74、A A V r h . 10 カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される。

30

【0022】

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のn 量体インサートの少なくとも1つが、A A V 9 カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸588及び589間、又は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 r h . 74、A A V r h . 10 カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される。

【0023】

いくつかの例の実施形態において、A A V カプシドタンパク質は、対応する野生型 A A V カプシドポリペプチドと比較して、非 C N S 細胞における減少された又はなくされた吸収を有する操作 A A V カプシドタンパク質である。

40

【0024】

いくつかの例の実施形態において、非 C N S 細胞は、肝細胞である。

【0025】

いくつかの例の実施形態において、野生型カプシドポリペプチドは、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 r h . 74、又はA A V r h . 10 カプシドポリペプチドである。

【0026】

いくつかの例の実施形態において、操作 A A V カプシドタンパク質は、非 C N S 細胞に

50

おける減少された又はなくされた吸収をもたらす1つ以上の変異を含む。

【0027】

いくつかの例の実施形態において、1つ以上の変異は、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における

a. 267位に、

b. 269位に、

c. 504位に、

d. 505位に、

e. 590位に、

f. 若しくはそれらの任意の組合せに、又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する1つ以上の位置にある。

10

【0028】

いくつかの例の実施形態において、非AAV9カプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh.74、又はAAVrh.10カプシドポリペプチドである。

【0029】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における267位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、AへのG又はX変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

20

【0030】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における269位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、S又はXからTへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0031】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における504位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、G又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0032】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における505位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、P又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

30

【0033】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における590位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Q又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0034】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の267位、269位又は両方における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、267位における変異は、GからAへの変異であり、269位における変異は、SからTへの変異である。

40

【0035】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の590位における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、509位における変異は、QからAへの変異である。

【0036】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の504位、505位、又は両方における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、504位における変異は、GからAへの変異であり、505位における変異は、PからAへの変異である。

【0037】

50

いくつかの例の実施形態において、組成物は、操作ウイルス粒子である。

【0038】

いくつかの例の実施形態において、操作ウイルス粒子は、操作AAVウイルス粒子である。

【0039】

いくつかの例の実施形態において、AAVウイルス粒子は、操作AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.74、又はAAVrh.10ウイルス粒子である。

【0040】

いくつかの例の実施形態において、任意選択のカーゴは、CNS疾患又は障害を処置又は予防することが可能である。 10

【0041】

ベクターを含むベクター系において、ベクターが、1つ以上のポリヌクレオチドであって、1つ以上のポリヌクレオチドの少なくとも1つが、中枢神経系（CNS）細胞を標的化するのに有効な標的化部分の全て又は部分をコードし、ここで、標的化部分が、少なくとも1つのPモチーフ又は（ここで、少なくとも1つのPモチーフが、アミノ酸配列 $PX_1QGTX_2RX_n$ （配列番号2）を含み、ここで、 X_1 、 X_2 、 X_n がそれぞれ、独立して、いずれかのアミノ酸から選択され、ここで、 n が、0、1、2、3、4、5、6、若しくは7である）、又は配列番号65～199、200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、及び313、及び318～329からなる群から選択される少なくとも1つの n 量体インサート、又は配列番号65～199、200、202、204、206、208、210、212、214、300、303、306、308、311、313、及び318～329からなる群から選択される少なくとも1つの n 量体インサート及び少なくとも1つのPモチーフを含み、ここで、1つ以上のポリヌクレオチドの少なくとも1つが、少なくとも1つの n 量体インサート、少なくとも1つのPモチーフ、又は両方をコードする、1つ以上のポリヌクレオチド；並びに任意に、1つ以上のポリヌクレオチドの1つ以上に動作可能に連結される調節要素を含むベクター系が、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。 20

【0042】

いくつかの例の実施形態において、標的化部分は、 n 量体インサート及びPモチーフの両方を含み、ここで、Pモチーフは、任意に、 n 量体インサートの部分又は全体である。 30

【0043】

いくつかの例の実施形態において、1つ以上の n 量体インサート、Pモチーフのそれぞれ、又は両方が、それぞれ3～15アミノ酸長である。

【0044】

いくつかの例の実施形態において、

- a. X_1 が、S、T、若しくはAであり、
- b. X_2 が、L、V、F、若しくはIであり、
- c. 又は両方である。

40

【0045】

いくつかの例の実施形態において、 n 量体インサート及び／又はPモチーフが、表1中のいずれか1つ（例えば、配列番号65～199）である。

【0046】

いくつかの例の実施形態において、 n 量体インサート及び／又はPモチーフが、表2～3のいずれか1つ（例えば、配列番号200、202、204、206、208、210、212、214（表2）及び／又は300、303、306、308、311、313（表3））にあるとおりである。

【0047】

いくつかの例の実施形態において、 n 量体インサート及び／又はPモチーフが、表7（ 50

例えば、配列番号 3 1 8 ~ 3 2 9) にあるとおりである。

【0048】

いくつかの例の実施形態において、n 量体インサートの直前に、A Q 又は D G がある。

【0049】

いくつかの例の実施形態において、

(a) n 量体インサートポリペプチドの直前に、A Q があり、n 量体インサートは、K T V G T V Y (配列番号 3)、R S V G S V Y (配列番号 4)、R Y L G D A S (配列番号 5)、W V L P S G G (配列番号 6)、V T V G S I Y (配列番号 7)、V R G S S I L (配列番号 8)、R H H G D A A (配列番号 9)、V I Q A M K L (配列番号 10)、L T Y G M A Q (配列番号 11)、L R I G L S Q (配列番号 12)、G D Y S M I V (配列番号 13)、V N Y S V A L (配列番号 14)、R H I A D A S (配列番号 15)、R Y L G D A T (配列番号 16)、Q R V G F A Q (配列番号 17)、Q I A H G Y S T (配列番号 18)、W T L E S G H (配列番号 19)、若しくは G E N S A R W (配列番号 20) であり；又は

10

(b) n 量体インサートポリペプチドの直前に、D G があり、n 量体インサートは、R E Q Q K L W (配列番号 21)、A S N P G R W (配列番号 22)、W T L E S G H (配列番号 23)、R E Q K K L W (配列番号 24)、E R L L V Q L (配列番号 25)、若しくは R M Q R T L Y (配列番号 26) である。

【0050】

いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、カーゴをさらに含む。

20

【0051】

いくつかの例の実施形態において、カーゴは、カーゴポリヌクレオチドであり、標的化部分をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドの 1 つ以上に任意に動作可能に連結される。

【0052】

いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、ウイルス粒子、カーゴを含有するウイルス粒子、又は両方を生成することが可能である。

【0053】

いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、標的化部分の 1 つ以上を含むポリペプチドを生成することが可能である。

30

【0054】

いくつかの例の実施形態において、ポリペプチドは、ウイルスポリペプチドである。

【0055】

いくつかの例の実施形態において、ウイルスポリペプチドは、カプシドポリペプチドである。

【0056】

いくつかの例の実施形態において、カプシドポリペプチドは、アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドポリペプチドである。

【0057】

いくつかの例の実施形態において、ウイルス粒子は、A A V ウイルス粒子である。

40

【0058】

いくつかの例の実施形態において、A A V ウイルス粒子又は A A V カプシドポリペプチドは、操作 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 r h . 7 4、若しくは A A V r h . 1 0 ウイルス粒子又はポリペプチドである。

【0059】

いくつかの例の実施形態において、n 量体インサートが、ウイルス粒子のウイルスカプシドの外部であるように、少なくとも 1 つの n 量体インサートをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドは、ウイルスポリペプチドの 2 つのアミノ酸に対応する 2 つのコドン間に挿入される。

50

【0060】

いくつかの例の実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、AAV9カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸262～269、327～332、382～386、452～460、488～505、527～539、545～558、581～593、704～714、若しくはそれらの任意の組合せの間のいずれか2つの連続したアミノ酸に対応する2つのコドン間、又はAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh.74、AAVrh.10カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される。

【0061】

いくつかの例の実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、AAV9カプシドポリヌクレオチドにおけるアミノ酸588及び589に対応するコドン間、又はAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh.74、AAVrh.10カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される。

10

【0062】

いくつかの例の実施形態において、AAVカプシドタンパク質は、対応する野生型AAVカプシドポリペプチドと比較して、非CNS細胞における減少された又はなくされた吸収を有する操作AAVカプシドタンパク質である。

【0063】

いくつかの例の実施形態において、非CNS細胞は、肝細胞である。

20

【0064】

いくつかの例の実施形態において、野生型カプシドポリペプチドは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.74、又はAAVrh.10カプシドポリペプチドである。

【0065】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、非CNS細胞における減少された又はなくされた吸収をもたらす1つ以上の変異を含む。

【0066】

いくつかの例の実施形態において、1つ以上の変異は、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における

30

a. 267位に、

b. 269位に、

c. 504位に、

d. 505位に、

e. 590位に、

f. 若しくはそれらの任意の組合せに、又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する1つ以上の位置にある。

【0067】

いくつかの例の実施形態において、非AAV9カプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh.74、又はAAVrh.10カプシドポリペプチドである。

40

【0068】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における267位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、AへのG又はX変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0069】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における269位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、S又はXからTへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0070】

50

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における504位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、G又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0071】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における505位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、P又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0072】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における590位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Q又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

10

【0073】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の267位、269位又は両方における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、267位における変異は、GからAへの変異であり、269位における変異は、SからTへの変異である。

【0074】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の590位における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、509位における変異は、QからAへの変異である。

20

【0075】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の504位、505位、又は両方における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、504位における変異は、GからAへの変異であり、505位における変異は、PからAへの変異である。

【0076】

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドを含むベクターは、スプライス調節要素を含まない。

【0077】

いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、ウイルスrepタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

30

【0078】

いくつかの例の実施形態において、ウイルスrepタンパク質は、AAVrepタンパク質である。

【0079】

いくつかの例の実施形態において、ウイルスrepタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、1つ以上のポリヌクレオチドと同じベクター又は異なるベクター上にある。

【0080】

いくつかの例の実施形態において、ウイルスrepタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、調節要素に動作可能に連結される。

40

【0081】

いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される組成物又はその部分を生成することが可能である。

【0082】

先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるベクター系によってコードされるか、生成されるか、又は両方であるポリペプチドが、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。

【0083】

いくつかの例の実施形態において、ポリペプチドは、ウイルスポリペプチドである。

50

【0084】

いくつかの例の実施形態において、ウイルスポリペプチドは、AAVポリペプチドである。

【0085】

いくつかの例の実施形態において、ポリペプチドは、カーゴに連結されるか又は他の形で結合される。

【0086】

先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるポリペプチドを任意に含む、先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるベクター系によって生成される粒子が、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。

10

【0087】

いくつかの例の実施形態において、粒子は、ウイルス粒子である。

【0088】

いくつかの例の実施形態において、ウイルス粒子は、アデノ随伴ウイルス(AAV)粒子、レンチウイルス粒子、又はレトロウイルス粒子である。

【0089】

いくつかの例の実施形態において、粒子は、カーゴを含む。

【0090】

いくつかの例の実施形態において、ウイルス粒子は、中枢神経系(CNS)指向性を有する。

20

【0091】

いくつかの例の実施形態において、カーゴが、可能であるか又はCNS疾患若しくは障害を予防する、先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるポリペプチド、又は先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される粒子。

【0092】

a. 先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される組成物；

b. 先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるベクター系；

30

c. 先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるポリペプチド；

d. 先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される粒子；又は

e. それらの組合せを含む細胞が、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。

【0093】

いくつかの例の実施形態において、細胞は、原核細胞である。

【0094】

いくつかの例の実施形態において、細胞は、真核細胞である。

40

【0095】

a. 先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される組成物；

b. 先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるベクター系；

c. 先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるポリペプチド；

d. 先行する段落のいずれか1つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される粒子；

50

e. 先行する段落のいずれか 1 つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される細胞；又は

f. それらの組合せ

及び薬学的に許容される担体を含む医薬製剤が、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。

【0096】

中枢神経系疾患、障害、又はその症状を処置する方法であって、それを必要とする対象に、

a. 先行する段落のいずれか 1 つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される組成物；

b. 先行する段落のいずれか 1 つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるベクター系；

c. 先行する段落のいずれか 1 つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるポリペプチド；

d. 先行する段落のいずれか 1 つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される粒子；

e. 先行する段落のいずれか 1 つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される細胞；

f. 先行する段落のいずれか 1 つ及び／又は本明細書における他の箇所に記載される医薬製剤；又は

g. それらの組合せ

を投与することを含む方法が、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。

【0097】

いくつかの例の実施形態において、中枢神経系疾患又は障害は、二次的な筋肉疾患、障害、又はその症状を含む。

【0098】

いくつかの例の実施形態において、中枢神経系疾患又は障害は、フリードライヒ運動失調症、ドラベ症候群、脊髄小脳失調症 3 型、ニーマン・ピック病 C 型、ハンチントン病、ポンペ病、筋強直性ジストロフィー 1 型、Glut1 欠損症候群（De Vivo 症候群）、テイ・サックス病、脊髄性筋萎縮症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ダノン病、レット症候群、アンジェルマン症候群、又はそれらの組合せである。例の実施形態のこれらの及び他の態様、目的、特徴、及び利点は、例の実施形態の以下の詳細な説明を考慮すると、当業者に明らかになるであろう。

【0099】

本発明の特徴及び利点の理解は、本発明の原理が利用され得る、例示的な実施形態を説明する以下の詳細な説明及び以下の添付の図面を参照することによって得られる。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図 1】図 1 は、導入遺伝子からの mRNA の産生をもたらす、アデノ随伴ウイルス（AAV）形質導入機構を示す。

【0101】

【図 2】図 2 は、AAV 変異体の mRNA ベースの選択が、DNA ベースの選択よりストリンジェントであり得ることを実証し得るグラフを示す。ウイルスライブラリーを、CMV プロモーターの制御下で発現させた。

【0102】

【図 3A－3B】図 3A－3B は、肝臓におけるウイルスライブラリー及びベクターゲノム DNA（図 3A）及び mRNA（図 3B）の間の相関を実証し得るグラフを示す。

【0103】

【図 4A－4F】図 4A－4F は、DNA レベルで存在し、様々な組織内で特定される mRNA レベルで発現されるカプシド変異体を実証し得るグラフを示す。この実験では、ウ

10

20

30

40

50

イラストライブラリーを、CMVプロモーターの制御下で発現させた。

【0104】

【図5A-5C】図5A-5Cは、細胞型特異的プロモーター（x軸上に示される）の制御下での様々な組織におけるカプシドmRNA発現を実証し得るグラフを示す。CMVが、例示的な構成的プロモーターとして含まれていた。CK8は、筋肉特異的プロモーターである。MHCK7は、筋肉特異的プロモーターである。hSynは、神経特異的プロモーターである。細胞型特異的プロモーターからの発現レベルは、各組織における構成的CMVプロモーターからの発現レベルに基づいて正規化された。

【0105】

【図6A-6B】図6A-6Bは、（図6A）種間の組織特異的遺伝子送達のためのカプシド変異体を生成及び選択する方法の実施形態を示す概略図並びに（図6B）上位選択されたカプシドのベンチマークを示す概略図を示す。

10

【0106】

【図7】図7は、AAVカプシド変異体ライブラリーを生成する実施形態、特に、野生型AAV、例えば、AAV9へのランダムn量体（ $n=3\sim15$ アミノ酸）の挿入を示す概略図を示す。

【0107】

【図8】図8は、AAVカプシド変異体ライブラリーを生成する実施形態、特に、変異体AAV粒子生成を示す概略図を示す。各カプシド変異体が、ベクターゲノムとしてそれ自体のコード配列を封入する。

20

【0108】

【図9】図9は、AAVカプシド変異体ライブラリーを生成するためにAAVベクター系において使用され得る代表的なAAVカプシドプラスミドライブラリーベクター（例えば、図8を参照）の概略的なベクターマップを示す。

【0109】

【図10】図10は、異なる構成的及び細胞型特異的哺乳動物プロモーターを含有する構築物によって生成されるウイルス力価（AAV9ベクターゲノム／15cm皿として計算される）を示し得るグラフを示す。

【0110】

【図11A-11P】図11A-11Pは、1回目及び2回目の選択からの上位選択されたカプシドのベンチマークからの結果を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0111】

本明細書における図は、例示のためのものであるに過ぎず、必ずしも縮尺どおりに描かれているわけではない。

【0112】

一般的な定義

特に定義されない限り、本明細書において使用される専門用語及び科学用語は、本開示が関連する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学における一般的な用語及び技術の定義は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989) (Sambrook, Fritsch, and Maniatis); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition (2012) (Green and Sambrook); Current Protocols in Molecular Biology (1987) (F. M. Ausubel et al. eds.); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (1995) (M. J. MacPherson, B. D. Hammes, and G. R. Taylor eds.): Antibodies, A Laboratory Manual (1988) (Harlow and Lane, eds

40

50

.) : Antibodies A Laboratory Manual, 2nd edition 2013 (E. A. Greenfield ed.) ; Animal Cell Culture (1987) (R. I. Freshney, ed.) ; Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones and Bartlet, 2008 (ISBN 0763752223) ; Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0632021829) ; Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 9780471185710) ; Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N. Y. 1994) , March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N. Y. 1992) ; 及び Marten H. Hofker and Jan van Deursen, Transgenic Mouse Methods and Protocols, 2nd edition (2011) に見出され得る。

10

20

【0113】

本明細書において使用される際、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈上特に明記されない限り、単数及び複数の指示対象の両方を含む。

【0114】

「任意選択の」又は「任意に」という用語は、その後に記載される事象、状況又は置換基が、起こっても又は起こらなくてもよく、この記載が、事象又は状況が起こる場合及びそれが起こらない場合を含むことを意味する。

【0115】

端点による数値範囲の記載は、それぞれの範囲内に含まれる全ての数及び分数、並びに記載される端点を含む。

30

【0116】

本明細書において使用される際の「約」又は「およそ」という用語は、パラメータ、量、一時的な持続時間などの測定可能な値に言及するとき、記載される値の及びそれからの変動、例えば、記載される値の及びそれからの $+/-10\%$ 以下、 $+/-5\%$ 以下、 $+/-1\%$ 以下、及び $+/-0.1\%$ 以下の変動を、このような変動が開示される発明において機能するのに適切である限り包含することが意図される。「約」又は「およそ」という修飾語句が指す値が、それ自体でも特定の、及び好ましくは、開示されることが理解されるべきである。

【0117】

本明細書において使用される際、「生体試料」は、全細胞及び／又は生細胞及び／又は細胞残屑を含み得る。生体試料は、「体液」を含み得る（又はそれに由来し得る）。本発明は、体液が、羊水、房水、硝子体液、胆汁、血清、母乳、脳脊髄液、耳垢（cerumen）（耳垢（earwax））、乳糜、糜粥、内リンパ液、外リンパ液、滲出液、糞便、女性精液、胃酸、胃液、リンパ液、粘液（鼻漏及び痰を含む）、心膜液、腹水、胸膜液、膿汁、カタル性分泌物、唾液、皮脂（sebum）（皮脂（skin oil））、精液、喀痰、滑液、汗、涙液、尿、膺分泌物、嘔吐物及びそれらの1つ以上の混合物から選択される実施形態を包含する。生体試料は、細胞培養物、体液、体液からの細胞培養物を含む。体液は、例えば、穿刺、又は他の収集又は試料採取手順によって、哺乳動物生物から得られる。

40

【0118】

50

「対象」、「個体」、及び「患者」という用語は、脊椎動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトを指すために、本明細書において同義的に使用される。哺乳動物としては、限定はされないが、マウス、類人猿、ヒト、家畜、スポーツ用動物、及び愛玩動物が挙げられる。インビボで得られる又はインビトロで培養される生物学的実体の組織、細胞及びそれらの後代も包含される。

【0119】

様々な実施形態は、本明細書において後述される。特定の実施形態が、本明細書に記載されるより広い態様に対する網羅的な説明として又はそのような態様に対する限定として意図されていないことが留意されるべきである。特定の実施形態とともに記載される一態様は、その実施形態に必ずしも限定されるわけではなく、任意の他の実施形態とともに実施され得る。本明細書全体を通して、「一実施形態 (one embodiment)」、「実施形態 (an embodiment)」、「例の実施形態」への言及は、実施形態とともに記載される特定の特徴、構造又は特性が、本発明の少なくとも一実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体を通して様々な箇所における「一実施形態 (one embodiment) において」、「一実施形態 (an embodiment) において」、又は「例の実施形態」という語句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態に言及しているわけではないが、その場合もある。さらに、特定の特徴、構造又は特性が、1つ以上の実施形態において、本開示から当業者に明らかであるように、任意の好適な方法で組み合わせられ得る。さらに、本明細書に記載されるある実施形態は、他の実施形態に含まれるある特徴を含むが他の特徴を含まない一方、異なる実施形態の特徴の組合せが、本発明の範囲内にあることが意図される。例えば、添付の特許請求の範囲において、権利請求される実施形態のいずれかが、任意の組合せで使用され得る。

【0120】

本明細書において引用される全ての刊行物、公開特許文献、及び特許出願は、各個々の刊行物、公開特許文献、又は特許出願が参照により援用されることが具体的に及び個別に示されているのと同程度に、本明細書に参照により援用される。

【0121】

概説

本明細書に開示される実施形態は、カーゴ及び／又は送達ビヒクル若しくはシステムに連結されるか又は他の形で結合され得る中枢神経系 (CNS) 特異的標的化部分を提供する。本明細書に開示される実施形態は、CNS 特異的標的化部分の1つ以上を組み込み得るポリペプチド及び粒子を提供する。ポリペプチド及び／又は粒子は、カーゴに連結されるか、結合されるか、カーゴを封入するか、又は他の形で組み込み得、それによって、カーゴを標的化部分と結合する。本明細書に開示される実施形態は、本明細書にさらに記載されるn量体インサートの1つ以上を含有し得るCNS 特異的標的化部分を提供する。本明細書に開示されるある実施形態は、細胞特異的及び／又は種特異的指向性、例えば、CNS 特異的指向性を、操作AAV粒子に与えるように操作され得る操作アデノ随伴ウイルス (AAV) カプシドを提供する。

【0122】

ある実施形態において、n量体モチーフは、表1～3及び／又は7のいずれか1つにあるとおりであり、及び／又はPモチーフを含有するか又はPモチーフであり、ここで、Pモチーフは、アミノ酸配列 $PX_1QGTX_2RX_n$ (配列番号2) を含有するか又はそれであり、ここで、 X_1 、 X_2 、 X_n がそれぞれ、任意のアミノ酸から選択され、nが、0、1、2、3、4、5、6、又は7である。

【0123】

本明細書に開示される実施形態はまた、修飾された表面構造の変異体、例えば、変異体カプシドタンパク質の多様なライブラリーの生成を体系的に指向することを含み得る操作カプシドを有する組み換えAAV (rAAV) を生成する方法も提供する。操作カプシドを有するrAAVを生成する方法の実施形態はまた、特定の細胞、組織、及び／又は器官タイプを標的とすることが可能なカプシド変異体のストリンジェントな選択も含み得る。

操作カプシドを有する r A A V を生成する方法の実施形態は、少なくとも 2 つ以上の種における効率的な及び／又は均一な形質導入が可能なカプシド変異体のストリンジェントな選択を含み得る。

【0124】

本明細書に開示される実施形態は、本明細書に記載される操作 A A V を生成することが可能なベクター及びそのシステムを提供する。

【0125】

本明細書に開示される実施形態は、本明細書に記載される操作 A A V 粒子を生成することが可能であり得る細胞を提供する。ある実施形態において、細胞は、本明細書に記載される 1 つ以上のベクター又はそのシステムを含む。

【0126】

本明細書に開示される実施形態は、本明細書に記載される操作カプシドを含み得る操作 A A V を提供する。ある実施形態において、操作 A A V は、細胞に送達されるカーゴポリヌクレオチドを含み得る。ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、遺伝子組み換えポリヌクレオチドである。

【0127】

本明細書に開示される実施形態は、操作 A A V ベクター若しくはそのシステム、操作 A A V カプシド、本明細書に記載される操作 A A V カプシドを含む操作 A A V 粒子、及び／又は操作 A A V カプシド、及び／若しくは操作 A A V ベクター若しくはそのシステムを含む本明細書に記載される操作された細胞を含有し得る製剤を提供する。ある実施形態において、製剤は、薬学的に許容される担体も含み得る。本明細書に記載される製剤は、それを必要とする対象又は細胞に送達され得る。

【0128】

本明細書に開示される実施形態は、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、操作 A A V カプシド、操作 A A V 粒子、細胞、又は他の構成要素及びそれらの組合せの 1 つ以上並びに本明細書に記載される医薬製剤のうちの 1 つ以上を含むキットも提供する。実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、操作 A A V カプシド、操作 A A V 粒子細胞、及びそれらの組合せの 1 つ以上は、組合せキットとして示され得る。

【0129】

本明細書に開示される実施形態は、例えば、治療用ポリヌクレオチドを細胞に送達するために、本明細書に記載される細胞特異的指向性を有する操作 A A V を使用する方法を提供する。このように、本明細書に記載される操作 A A V は、それを必要とする対象における疾患を処置及び／又は予防するのに使用され得る。本明細書に開示される実施形態は、操作 A A V カプシド、操作 A A V ウイルス粒子、操作 A A V ベクター又はそのシステム及び／又はその製剤を細胞に送達する方法も提供する。操作 A A V 粒子、操作 A A V カプシド、操作 A A V カプシドベクター又はそのシステム、操作された細胞、及び／又はその製剤を対象に送達することによって、それを必要とする対象を処置する方法も、本明細書において提供される。

【0130】

実施形態の操作 A A V 並びに操作 A A V を作製及び使用する方法のさらなる特徴及び利点が、本明細書にさらに記載される。

【0131】

C N S 特異的標的化部分及び組成物

一般に、C N S 細胞を有効に標的とし得る 1 つ以上の C N S 特異的標的化部分を含有する組成物が、本明細書に記載される。ある実施形態において、1 つ以上の C N S 特異的標的化部分は、C N S 特異的標的化能力を、送達ビヒクル、薬剤、又はそのシステムに提供するように、送達ビヒクル、薬剤、又はそのシステムに組み込まれ得る。例示的な送達ビヒクルとしては、限定はされないが、ウイルス粒子、（例えば、A A V ウイルス粒子）、ミセル、リボソーム、エキソソームなどが挙げられる。C N S 標的化部分が組み込まれ得

10

20

30

40

50

る例示的な送達ビヒクルは、本明細書における他の箇所にさらに詳細に記載される。ある実施形態において、CNS-標的化部分は、カーゴに間接的に又は直接連結され、したがって、CNS特異性を、連結されたカーゴに提供し得る。ある実施形態において、組成物は、CNS細胞（例えば、本明細書に記載されるCNS特異的標的化部分によって与えられる）に特異的であり得、非CNS細胞（限定はされないが、肝細胞を含む）に対する低下した特異性を有し得る。ある実施形態において、CNS標的化部分は、CNS細胞上の1つ以上のAAV受容体と特異的に相互作用するか又は他の形で関連し、それによって、CNS特異性（又は指向性）を提供し得る。CNS特異的標的化部分を生成及び同定する方法は、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

【0132】

CNS特異的標的化部分

CNS細胞を特異的に標的とし、それに結合し、それに関連し、又は他の形でそれと相互作用することが可能な標的化部分が、本明細書に記載される。ある実施形態において、標的化部分は、本明細書に記載されるn量体モチーフであるか又はそれを含み得る。一例の実施形態において、n量体モチーフは、表1～3及び／又は7のいずれか1つにあるとおりである。別の例の実施形態において、n量体モチーフは、Pモチーフであるか又はそれを含む。本明細書において使用される際の「Pモチーフ」という用語は、アミノ酸配列 $PX_1QGTX_2RX_n$ （配列番号2）を含むか又はそれであるn量体モチーフを指し、ここで、 X_1 、 X_2 、 X_n がそれぞれ、任意のアミノ酸から選択され、nが、0、1、2、3、4、5、6、又は7である。n量体モチーフは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。n量体モチーフに関して、「モチーフ」及び「インサート」という用語が、本明細書において同義的に使用されるが理解されるであろう。一般に、n量体モチーフは、短い（例えば、約3～約15、20、又は25）アミノ酸配列であり、ここで、n量体モチーフの各アミノ酸は、任意のアミノ酸から選択され得る。ある実施形態において、n量体モチーフ（Pモチーフを有するか又は有さない）は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25アミノ酸長である。

【0133】

ある実施形態において、n量体インサートは、「RGD」インサート（本明細書において同義的に「RGDモチーフ」とも呼ばれる）を含み得る。「RGD」インサートは、n量体インサート内のアミノ酸RGDの存在を指す。ある実施形態において、RGDは、n量体インサートの最初の3つのアミノ酸である。したがって、ある実施形態において、n量体は、RGD又は $RGDX_n$ の配列を有し得、ここで、nが、3～15アミノ酸であり得、X、存在する各アミノ酸がそれぞれ、その他から独立して選択され得、任意のアミノ酸の群から選択され得る。ある実施形態において、n量体インサートは、RGD（3量体）、 $RGDX_1$ （4量体）、 $RGDX_1X_2$ （5量体）、 $RGDX_1X_2X_3$ （6量体）、 $RGDX_1X_2X_3X_4$ （7量体）、 $RGDX_1X_2X_3X_4X_5$ （8量体）、又は $RGDX_1X_2X_3X_4X_5X_6$ （9量体）、 $RGD_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ （10量体）、 $RGD_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ （11量体）、 $RGDX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ （12量体）、 $RGDX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ （13量体）、 $RGDX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ （14量体）、又は $RGDX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}$ （15量体）であり得、ここで、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} がそれぞれ、独立して選択され得、任意のアミノ酸であり得る。ある実施形態において、 X_1 が、L、T、A、M、V、Q、又はMであり得る。ある実施形態において、 X_2 が、T、M、S、N、L、A、又はIであり得る。ある実施形態において、 X_3 が、T、E、N、O、S、Q、Y、A、又はDであり得る。ある実施形態において、 X_4 が、P、Y、K、L、H、T、又はSであり得る。

【0134】

いくつかの例の実施形態において、RGDモチーフは、 X_mRGDX_n の式で表され、

ここで、 m が、0～4アミノ酸であり、 n が、0～15アミノ酸であり、 X が、任意のアミノ酸であり、存在する各 X アミノ酸が、独立して、任意のアミノ酸からなる群からのその他から選択される。いくつかの例の実施形態において、RGDモチーフは、式RGDX n で表され、ここで、 n が、4又は5であり、 X が、任意のアミノ酸であり、存在する各 X アミノ酸が、独立して、任意のアミノ酸又は本明細書における他の箇所に記載される任意の特定の組合せからなる群からのその他から選択される。

【0135】

ある実施形態において、RGDインサートを含む n 量体は、CNS特異的標的化部分に含まれ、CNS標的化に加えて標的化部分による筋肉標的化を促進し得る。本開示を考慮して理解されるように、CNS及び筋肉標的化能力を有するこのような標的化部分は、筋細胞の関与又は病理を有するCNS疾患を処置するための組成物及び製剤に使用するのに有利であり得る。ある例示的な実施形態において、及び本明細書にさらに記載されるように、標的化部分は、AAVウイルスカプシドなどのウイルスカプシドであり得る。

10

【0136】

ある実施形態において、 n 量体モチーフは、RGDインサートを含まない。

【0137】

ある実施形態において、 n 量体インサート及び／又はPモチーフの直前に、AQ又はDGがあり、例えば、 n 量体インサート及び／又はPモチーフが別のポリペプチドに挿入される場合などである。ある実施形態において、 n 量体インサートポリペプチドの直前に、AQがあり、 n 量体インサートは、KTVGTVY（配列番号3）、RSVGSVY（配列番号4）、RYLGDA（配列番号5）、WVLPSSG（配列番号6）、VTVGS（配列番号7）、VRGSSIL（配列番号8）、RHHGDA（配列番号9）、VIQAMKL（配列番号10）、LTYGMAQ（配列番号11）、LRIGLSQ（配列番号12）、GDYSMIV（配列番号13）、VNYSVAL（配列番号14）、RHIADAS（配列番号15）、RYLGDA（配列番号16）、QRVGFAG（配列番号17）、QIAHGYST（配列番号18）、WTLESGH（配列番号19）；又はGENSARW（配列番号20）である。ある実施形態において、 n 量体インサートポリペプチドの直前に、DGがあり、 n 量体インサートは、REQQKLW（配列番号21）、ASNPGRW（配列番号22）、WTLESGH（配列番号23）、REQKKLW（配列番号25）、ERLLVQL（配列番号25）；又はRMQRTLY（配列番号26）である。ある実施形態において、CNS特異的 n 量体モチーフは、表1にあるとおりであり得る。

20

30

【0138】

ある実施形態において、CNS特異的 n 量体モチーフは、Pモチーフであり得るか又はそれを含み得る。ある実施形態において、Pモチーフの X_1 が、S、T、又はAである。ある実施形態において、Pモチーフの X_2 が、L、V、F、又はIである。ある実施形態において、Pモチーフの X_n が、0である。ある実施形態において、CNS特異的 n 量体モチーフは、表2～3のいずれかにあるとおりである。

【0139】

ある実施形態において、CNS特異的 n 量体インサート及び／又はPモチーフは、表7中の n 量体インサート及び／又はPモチーフ（配列番号321～329）のいずれか1つである。ある実施形態において、CNS特異的 n 量体インサート及び／又はPモチーフは、配列番号322～324の群から選択される n 量体インサートのいずれか1つ以上である。ある実施形態において、CNS特異的 n 量体インサート及び／又はPモチーフは、配列番号322～325の群から選択される n 量体インサートのいずれか1つ以上である。ある実施形態において、CNS特異的 n 量体インサート及び／又はPモチーフは、配列番号322～327の群から選択される n 量体インサートのいずれか1つ以上である。ある実施形態において、CNS特異的 n 量体インサート及び／又はPモチーフは、配列番号322～324及び329の群から選択される n 量体インサートのいずれか1つ以上である。ある実施形態において、CNS特異的 n 量体インサート及び／又はPモチーフは、配列

40

50

番号 3 2 2 ~ 3 2 4 の群から選択される n 量体インサートのいずれか 1 つ以上である。ある実施形態において、C N S 特異的 n 量体インサート及び／又は P モチーフは、配列番号 3 2 2 ~ 3 2 4 及び 3 2 6 ~ 3 2 7 の群から選択される n 量体インサートのいずれか 1 つ以上である。ある実施形態において、C N S 特異的 n 量体インサート及び／又は P モチーフは、配列番号 3 2 2 ~ 3 2 4 及び 3 2 6 ~ 3 2 8 の群から選択される n 量体インサートのいずれか 1 つ以上である。ある実施形態において、C N S 特異的 n 量体インサート及び／又は P モチーフは、配列番号 3 2 2 ~ 3 2 4 及び 3 2 8 の群から選択される n 量体インサートのいずれか 1 つ以上である。

【0 1 4 0】

ある実施形態において、C N S 特異的 n 量体インサート及び／又は P モチーフは、種特異的である。言い換えると、ある実施形態において、C N S 特異的 n 量体インサート及び／又は P モチーフは、ある種において別の種より良好に C N S 標的化を促進し得る。ある実施形態において、C N S 特異的 n 量体インサートは、霊長類に特異的である。ある実施形態において、C N S 特異的 n 量体インサートは、ヒト及び／又は非ヒト霊長類に特異的である。

【0 1 4 1】

ある実施形態において、C N S 特異的 n 量体インサートは、C N S 内の他のものより、1 つ以上の細胞及び／又は組織型を標的とすることが可能である。ある実施形態において、C N S 特異的インサートは、C N S の 1 つ以上の他の細胞及び／又は組織型より、後根神経節細胞を標的とするのに有効でないか又は効果が低い。

【0 1 4 2】

ある実施形態において、標的化部分は、本明細書に記載される C N S 特異的 n 量体モチーフなどの 2 つ以上の n 量体モチーフを含み得る。ある実施形態において、標的化部分は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上の n 量体モチーフを含み得る。ある実施形態において、標的化部分に含まれる全ての n - モチーフは、同じであり得る。ある実施形態において、2 つ以上の n 量体モチーフが含まれる場合、n 量体モチーフの少なくとも 2 つが、互いに異なる。ある実施形態において、2 つ以上の n 量体モチーフが含まれる場合、全ての n 量体モチーフが、互いに異なる。

【0 1 4 3】

ある実施形態において、標的化部分、例えば、C N S 特異的標的化部分は、カーゴと連結されるか又は他の形でそれと結合し得る。ある実施形態において、本明細書に記載される 1 つ以上の筋肉特異的標的化部分は、カーゴに直接結合される。ある実施形態において、本明細書に記載される 1 つ以上の筋肉特異的標的化部分は、リンカー分子などを介して、カーゴに間接的に連結される。ある実施形態において、本明細書に記載される 1 つ以上の 1 つ以上の筋肉特異的標的化部分は、カーゴに連結され、結合され、それを封入、及び／又は含有するポリペプチド又は他の粒子と結合するように連結される。

【0 1 4 4】

例示的な粒子としては、限定はされないが、ウイルス粒子（例えば、バクテリオファージカプシドを含むウイルスカプシド）、ポリソーム、リボソーム、ナノ粒子、微粒子、エキソソーム、ミセルなどが挙げられる。本明細書において使用される際の「ナノ粒子」という用語は、均一又は不均一な材料のナノスケール堆積物を含む。ナノ粒子は、規則的な又は不規則な形状であり得、複合ナノスケール粒子を形成する複数の共析出された粒子から形成され得る。ナノ粒子は、ほぼ球形の形状であり得、又は複数の共析出されたほぼ球形の粒子から形成された複合形状を有し得る。ナノ粒子の例示的な形状としては、限定はされないが、球形、ロッド、楕円形、円筒形、ディスク形などが挙げられる。ある実施形態において、ナノ粒子は、ほぼ球形の形状を有する。

【0 1 4 5】

本明細書において使用される際、2 つの部分間の記載される相互作用に関して使用される場合の「特異的」という用語は、第 1 及び第 2 の部分の非共有物理的結合を指し、ここで、第 1 及び第 2 の部分間の結合は、結合が起こる環境中に存在するほとんど又は全ての

10

20

30

40

50

他の部分とのいずれかの部分の結合より、少なくとも2倍強く、少なくとも5倍強く、少なくとも10倍強く、少なくとも50倍強く、少なくとも100倍強く、又はより強い。用いられる条件下で、例えば、細胞の内部の又は細胞生存と合致するものなどの生理学的条件下で、平衡解離定数、 K_d が、 $10^{-3} M$ 以下、 $10^{-4} M$ 以下、 $10^{-5} M$ 以下、 $10^{-6} M$ 以下、 $10^{-7} M$ 以下、 $10^{-8} M$ 以下、 $10^{-9} M$ 以下、 $10^{-10} M$ 以下、 $10^{-11} M$ 以下、又は $10^{-12} M$ 以下である場合、2つ以上の実体の結合は、特異的であると考えられ得る。ある実施形態において、特異的結合は、複数のより弱い相互作用（例えば、複数の個々の相互作用によって達成され得、ここで、各個々の相互作用は、 $10^{-3} M$ 超の K_d によって特徴付けられる）。ある実施形態において、「分子認識」と呼ばれ得る特異的結合は、各実体における官能基の相補的な配向に依存する2つの実体間の飽和結合相互作用である。特異的相互作用の例としては、プライマー-ポリヌクレオチド相互作用、アプタマー-アプタマー標的相互作用、抗体-抗原相互作用、アビジン-ビオチン相互作用、リガンド-受容体相互作用、金属-キレート相互作用、相補的な核酸間のハイブリダイゼーションなどが挙げられる。

10

【0146】

ある実施形態において、 n 量体モチーフに加えて、標的化部分は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、ポリマー、糖、又はそれらの組合せを含み得る。

【0147】

ある実施形態において、標的化部分は、限定はされないが、レンチウイルス、アデノウイルス、AAV、バクテリオファージ、レトロウイルスタンパク質を含むカプシドタンパク質などのウイルスタンパク質に組み込まれる。ある実施形態において、 n 量体モチーフがウイルスカプシドの外部である（すなわち、ウイルスカプシドの表面上に示される）ように、 n 量体モチーフは、ウイルスタンパク質の2つのアミノ酸間に位置する。

20

【0148】

ある実施形態において、本明細書に記載される筋肉特異的標的化部分の1つ以上を含有する組成物は、増加した筋細胞能力、筋細胞特異性、低下した免疫原性、又はそれらの任意の組合せを有する。

【0149】

カーゴは、本明細書に記載される筋肉特異的標的化部分に連結されるか又はそれと結合可能である任意の分子を含み得る。カーゴとしては、限定はされないが、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、リボタンパク質、脂質、糖、薬学的に活性な薬剤（例えば、薬物、造影剤及び他の診断薬など）、化学化合物、及びそれらの組合せが挙げられ得る。ある実施形態において、カーゴは、DNA、RNA、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体、アプタマー、リボザイム、重要な腫瘍タンパク質及び遺伝子の翻訳又は転写を阻害するリボザイムのためのガイド配列、ホルモン、免疫調節剤、解熱剤、抗不安薬、抗精神病薬、鎮痛薬、鎮痙薬、抗炎症剤、抗ヒスタミン剤、抗感染薬、放射線増感剤、化学療法薬、放射性化合物、造影剤、及びそれらの組合せである。

30

【0150】

CNS特異的 n 量体モチーフ及び標的化部分は、全体的に又は部分的に、ポリヌクレオチドによってコードされ得る。コードポリヌクレオチドは、CNS特異的 n 量体モチーフ及び／又はPモチーフを含む標的化部分及びその組成物を生成するのに使用され得る1つ以上のベクター（又はベクター系）に含まれ得る。例示的なコードポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、及び組み換え操作技術は、本明細書により詳細に記載され、及び／又は当該技術分野において一般に公知であり、本明細書に記載される標的化部分及びその組成物とともに使用するために適合され得る。

40

【0151】

ある実施形態において、カーゴは、CNS疾患又は障害を処置又は予防することが可能である。例示的なCNS疾患及び障害は、本明細書における他の箇所に記載される。

【0152】

50

カーゴ

CNS細胞を標的とするのに有効な標的化部分は、カーゴに任意に連結され得る。このように、カーゴは、本明細書に記載される組成物に組み込まれるとき、CNS細胞に選択的に送達され得る。代表的なカーゴ分子としては、限定はされないが、核酸、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド／ポリペプチド錯体、小分子、糖、又はそれらの組合せが挙げられ得る。本明細書に記載されるシステム及び方法にしたがって送達され得るカーゴとしては、限定はされないが、治療剤、造影剤、及びモニタリング剤を含む生物学的に活性な薬剤が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。カーゴは、外因性材料又は内因性材料であり得る。ある実施形態において、カーゴは、「対象とする遺伝子」であり得る。

10

【0153】

ポリヌクレオチド

ある実施形態において、カーゴは、カーゴポリヌクレオチドである。本明細書において使用される際、「核酸」、「ヌクレオチド配列」、及び「ポリヌクレオチド」は、本明細書において同義的に使用され得、一連の少なくとも2つの塩基-糖-リン酸組合せを一般に指し得、特に、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、及び一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖又は、より典型的に、二本鎖又は一本鎖及び二本鎖領域の混合物であり得るDNA及びRNAを含むハイブリッド分子を指す。さらに、本明細書において使用される際のポリヌクレオチドは、RNA若しくはDNA又はRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域を指し得る。このような領域における鎖は、同じ分子又は異なる分子に由来し得る。領域は、分子の1つ以上の全てを含み得るが、より典型的には、分子のいくつかの領域のみを含み得る。三重らせん領域の分子の1つは、オリゴヌクレオチドであることが多い。「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、ポリヌクレオチドのこのような化学的に、酵素的に、又は代謝的に修飾された形態、並びに特に、単純型及び複雑型細胞を含む、ウイルス及び細胞に特徴的なDNA及びRNAの化学形態も包含する。例えば、本明細書において使用される際のポリヌクレオチドという用語は、1つ以上の修飾塩基を含有する本明細書に記載されるDNA又はRNAを含み得る。したがって、わずか2つの例を挙げると、イノシンなどの稀な塩基、又はトリチル化塩基などの修飾塩基を含むDNA又はRNAが、この用語が本明細書において使用される際のポリヌクレオチドである。「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」及び「核酸」は、PNA（ペプチド核酸）、ホスホロチオエート、及び天然核酸のリン酸骨格の他の変異体も含む。天然核酸は、リン酸骨格を有し、人工核酸は、他のタイプの骨格を含有し得るが、同じ塩基を含有する。したがって、安定性又は他の理由のために修飾された骨格を有するDNA又はRNAは、その用語が本明細書に含まれる際、「核酸」又は「ポリヌクレオチド」である。本明細書において使用される際、「核酸配列」及び「オリゴヌクレオチド」は、本明細書における他の箇所に定義される核酸及びポリヌクレオチドも包含する。

20

30

【0154】

本明細書において使用される際、「デオキシリボ核酸（DNA）」及び「リボ核酸（RNA）」は、一般に、非修飾RNA若しくはDNA又は修飾RNA若しくはDNAであり得る、任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを指し得る。RNAは、限定はされないが、tRNA（トランスファーRNA）、snRNA（低分子核内RNA）、rRNA（リボソームRNA）、アンチセンスRNA、RNAi（RNA干渉構築物）、siRNA（低分子干渉RNA）、マイクロRNA（miRNA）、又はリボザイム、アプタマー、ガイドRNA（gRNA）、又はコードmRNA（メッセンジャーRNA）を含む、非コードRNAの形態であり得る。

40

【0155】

ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、DNAである。ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、RNAである。ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、RNA及び／又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA又

50

はRNA)である。DNA、cDNA、cRNA、RNA、タンパク質／ペプチドなどの間の関係に関連して本明細書において使用される際、「に対応する」又は「コードする」(本明細書において同義的に使用される)は、これらの異なる分子間の基礎的な生物学的関係を指す。したがって、当業者は、動作可能に「に対応する」により、これらの分子との同様の生物学的関係を有する任意の他の分子の配列を所与として、他の分子の可能な基礎的な及び／又は得られる配列を決定することができることを理解するであろう。例えば、DNA配列から、RNA配列が決定され得、RNA配列から、cDNA配列が決定され得る。

【0156】

対象とする遺伝子

ある実施形態において、本明細書に記載されるシステムは、対象とする遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む。本明細書において使用される際、「対象とする遺伝子」という用語は、特定の目的のために選択され、本発明のシステム又は小胞による送達に望ましい遺伝子を指す。標的細胞又はレシピエント細胞内で発現されるとき、それが、発現され、所望の遺伝子産物を産生し得るか、及び／又は本発明の操作送達小胞中のカーゴとしてパッケージングされ得るように、対象とする遺伝子は、1つ以上の領域中に、ベクター、例えば、発現ベクター(操作送達小胞生成システムベクターの1つ以上を含む)を挿入された。特異的に同定された他のカーゴも、対象とする遺伝子であり得ることが理解されるであろう。例えば、Casエフェクターをコードするポリヌクレオチドが、この文脈において、例えばCasエフェクターを細胞に送達することが望ましい対象とする遺伝子であり得る。

【0157】

一実施形態において、対象とする遺伝子は、疾患の処置のための治療機能を提供する遺伝子をコードする。ある実施形態において、対象とする遺伝子はまた、ワクチン遺伝子(vaccinating gene)、すなわち、ヒト又は動物における免疫応答を生成することが可能な抗原ペプチドをコードする遺伝子であり得る。これは、ウイルス及び細菌感染に特異的なペプチド抗原を含み得るが、必ずしもそれに限定されず、又は腫瘍特異的であり得る。ある実施形態において、対象とする遺伝子は、所望の表現型を与える遺伝子である。本明細書に記載される実施形態が、対象とする遺伝子のパッケージング及び送達のための改良された方法に焦点を合わせているため、特定の対象とする遺伝子は、限定的なものではなく、技術は、レンチウイルス系と用いて送達可能であると当業者によって一般に認識される対象とする任意の遺伝子を送達するのに一般に使用され得る。当業者は、自身が関心のあるいずれかの遺伝子を含む構築物を設計することができる。対象とする公知の遺伝子を含む構築物の設計は、過度の実験を伴わずに行われ得る。当業者は、対象とする遺伝子を日常的に選択する。例えば、GenBank公開データベースは、1982年から存在しており、本発明により権利請求される方法に関連する技術分野の当業者によって日常的に使用される。2019年6月の時点で、GenBankは、213,383,758の報告された配列からの2013,383,758の遺伝子座、329,835,282,370の塩基を含む。ヌクレオチド配列は、補助的な書誌的及び生物学的注釈を伴い、300,000超の生物に由来する。配列情報の多くの他の公知のリポジトリが存在するため、GenBankは、例に過ぎない。

【0158】

ある実施形態において、対象とする遺伝子は、例えば、合成RNA／DNA配列、コドン最適化RNA／DNA配列、組み換えRNA／DNA配列(すなわち、組み換えDNA技術の使用によって調製される)、cDNA配列又は部分的ゲノムDNA配列(それらの組合せを含む)であり得る。好ましくは、これは、センス配向にある。好ましくは、配列は、cDNAであるか、cDNAを含むか、又はcDNAから転写される。対象とする遺伝子は、本明細書において「異種配列」「異種遺伝子」又は「導入遺伝子」とも呼ばれ得る。

【0159】

ある実施形態において、対象とする遺伝子は、いくつかの治療効果を与え得る。「治療剤 (therapeutic agent)」、「治療能力がある薬剤」又は「処置剤 (treatment agent)」という用語は、同義的に使用され、対象に投与するといくつかの有益な効果を与える分子又は化合物を指す。有益な効果は、診断決定を実施可能にすること；疾患、症状、障害、又は病状の改善；疾患、症状、障害、若しくは病態の発症を減少又は予防すること；及び疾患、症状、障害又は病状に全般的に対抗することを含む。

【0160】

好ましくは、治療剤は、治療有効量の有効成分中で投与され得る。「治療有効量」という用語は、研究者、獣医、医師又は他の臨床医によって求められる組織、システム、動物、又はヒトにおける生物学的又は医薬的応答を引き起こし得る、特に、処置される疾患又は病態の局所又は全身症状又は特徴の1つ以上を予防又は軽減し得る量を指す。ある実施形態において、疾患又は病態は、CNS若しくはその細胞の又はそれを侵す疾患又は病態である。CNSの及び／又はそれを侵す例示的な疾患及び障害は、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

【0161】

ある実施形態において、対象とする遺伝子は、標的細胞における改変された発現をもたらし得る。本明細書において使用される際、「改変された発現」という用語は、細胞による記載される遺伝子産物の改変された産生を特に示し得る。本明細書において使用される際、「遺伝子産物」という用語は、遺伝子（例えば、mRNA）から転写されたRNA、又は遺伝子によってコードされた若しくはRNAから翻訳されたポリペプチドを含む。

【0162】

また、本明細書において意図される際の「改変された発現」は、1つ以上の内因性遺伝子産物の活性を調節することを包含し得る。したがって、「改変された発現」、「発現を改変する」、「発現を調節する」、又は「発現を検出する」或いは類似の語は、それぞれ「改変された発現若しくは活性」、「発現若しくは活性を改変する」、「発現若しくは活性を調節する」、又は「発現若しくは活性を検出する」或いは類似の語と同義的に使用され得る。本明細書において使用される際、「調節する」又は「調節すること」は、一般に、好適なインビトロ、細胞、又はインビボアッセイを用いて測定される際、標的又は抗原の活性を低下させるか又は阻害すること、或いは標的又は抗原の活性を増加させることを意味する。特に、「調節する」又は「調節すること」は、本明細書に記載される阻害剤／アンタゴニスト剤又は活性化因子／アゴニスト剤の存在がない以外は同じ条件下における同じアッセイにおける標的又は抗原の活性と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは90%又はそれ以上、好適なインビトロ、細胞又はインビボアッセイ（通常、関与する標的又は抗原に応じて決まる）を用いて測定される際、標的又は抗原の（関連する又は意図される）活性を低下させるか又は阻害すること、或いは標的又は抗原の（関連する又は意図される）生物学的活性を増加させることを意味し得る。

【0163】

当業者に明らかであるように、「調節する」は、調節剤の存在がない以外は同じ条件と比較して、その標的の1つ以上に対する、標的又は抗原の親和性、結合力、特異性及び／又は選択性の変化（増加又は減少のいずれかであり得る）をもたらすことも含み得る。また、これは、任意の好適な方法で、及び／又は標的に応じて、それ自体公知の任意の好適なアッセイを用いて決定され得る。特に、阻害剤／アンタゴニスト又は活性化因子／アゴニストとしての作用は、意図される生物学的又は生理学的活性が、阻害剤／アンタゴニスト剤又は活性化因子／アゴニスト剤の存在がない以外は同じ条件下における同じアッセイにおける生物学的又は生理学的活性と比較して、それぞれ、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは90%又はそれ以上、増加又は減少されるようなものであり得る。調節は、標的若しくは抗原又はそれが関与する機構若しくは経路を活性化すること

も含み得る。

【0164】

干渉RNA

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、1つ以上の干渉RNAをコードし得る。干渉RNAは、遺伝子発現を抑制することが可能なRNA分子である。例のタイプの干渉RNAとしては、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA (miRNA)、及び短鎖ヘアピンRNA (shRNA) が挙げられる。

【0165】

いくつかの例の実施形態において、干渉RNAは、siRNAであり得る。低分子干渉RNA (siRNA) 分子は、干渉RNAによって標的遺伝子発現を阻害することが可能である。siRNAは、化学的に合成され得、又はインビトロ転写によって得られ、又は標的細胞内で、インビボで合成され得る。siRNAは、15～40ヌクレオチド長の二本鎖RNAを含んでいてもよく、1～6ヌクレオチド長の突出領域3'及び／又は5'を含み得る。突出領域の長さは、siRNA分子の全長とは無関係である。siRNAは、標的メッセンジャーの転写後分解又はサイレンシングによって作用し得る。ある場合には、外因性ポリヌクレオチドは、shRNAをコードする。shRNAにおいて、siRNAを形成する逆平行鎖は、ループ又はヘアピン領域によって連結される。

【0166】

干渉RNA (例えば、siRNA) は、対象に移植された後、細胞の長期生存及び機能性を促進するために遺伝子の発現を抑制し得る。いくつかの例では、干渉RNAは、TGFβ経路、例えば、TGFβ、TGFβ受容体、及びSMADタンパク質において遺伝子を抑制する。いくつかの例では、干渉RNAは、コロニー刺激因子1 (CSF1) 経路、例えば、CSF1及びCSF1受容体において遺伝子を抑制する。特定の実施形態において、1つ以上の干渉RNAが、CSF1経路及びTGFβ経路の両方において遺伝子を抑制する。TGFβ経路遺伝子は、ACVR1、ACVR1C、ACVR2A、ACVR2B、ACVRL1、AMH、AMHR2、BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8A、BMP8B、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、CDKN2B、CHRD、COMP、CREBBP、CUL1、DCN、E2F4、E2F5、EP300、FST、GDF5、GDF6、GDF7、ID1、ID2、ID3、ID4、IFNG、INHBA、INHBB、INHBC、INHBE、LEFTY1、LEFTY2、LOC728622、LTBP1、MAPK1、MAPK3、MYC、NODAL、NOG、PITX2、PPP2CA、PPP2CB、PPP2R1A、PPP2R1B、RBL1、RBL2、RBX1、RHOA、ROCK1、ROCK2、RPS6KB1、RPS6KB2、SKP1、SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD5、SMAD6、SMAD7、SMAD9、SMURF1、SMURF2、SP1、TFDP1、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TGFB1R1、TGFB1R2、THBS1、THBS2、THBS3、THBS4、TNF、ZFYVE16、及び／又はZFYVE9のうちの1つ以上を含み得る。

【0167】

ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、RNAi分子、アンチセンス分子、及び／又はRNAi分子、アンチセンス分子をコードする遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、及び／又は遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドである。

【0168】

本明細書において使用される際、「遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチド」は、単独で又は他の遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドとともに、細胞の内因性機構s、分子、タンパク質、酵素、及び／又は他の細胞機構又は外因性分子、薬剤、タンパク質、酵素、及び／又はポリヌクレオチドを用いて、遺伝子発現、RNAレベル、RNA翻訳、RNA転写の全体的若しくは特異的減少又は除去を引き起こし得、野生型又は好適な対照と比較して、非コードRNAのタンパク質発現及び／又は機能の減少又は有効な低下をも

たらし得る任意のオリゴヌクレオチドを指す。これは、「遺伝子ノックダウン」という語句と同義である。遺伝子発現、RNAレベル、RNA翻訳、RNA転写、及び／又はタンパク質発現の低下は、約100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、～1%又はそれ以下の低下の範囲であり得る。「遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチド」としては、限定はされないが、細胞内のRNA干渉(RNAi)経路を刺激するのに使用される任意のアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、任意のオリゴヌクレオチド(一本鎖又は二本鎖)(総称してRNAiオリゴヌクレオチド)、低分子干渉RNA(sRNA)、マイクロRNA、及び短鎖ヘアピンRNA(shRNA)が挙げられる。市販のプログラム及びツールが、当業者に入手可及な遺伝子配列及び他の情報に基づいて、所望の遺伝子のための遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を設計するために利用可能である。

10

【0169】

治療用ポリヌクレオチド

ある実施形態において、カーゴ分子は、治療用ポリヌクレオチドである。治療用ポリヌクレオチドは、レシピエント細胞に送達されるとき、治療効果を提供するものである。ポリヌクレオチドは、毒性ポリヌクレオチド(転写又は翻訳されるとき、細胞の死亡をもたらすポリヌクレオチド)又は溶解性ペプチド若しくはタンパク質をコードするポリヌクレオチドであり得る。実施形態において、カーゴ分子として毒性ポリヌクレオチドを有する送達小胞が、抗菌剤又は抗生物質として作用し得る。これは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。ある実施形態において、カーゴ分子は、産生細胞及び／又は第1の細胞に対して外因性であり得る。ある実施形態において、カーゴ分子は、産生細胞及び／又は第1の細胞に対して内因性であり得る。ある実施形態において、カーゴ分子は、レシピエント細胞及び／又は第2の細胞に対して外因性であり得る。ある実施形態において、カーゴ分子は、レシピエント細胞及び／又は第2の細胞に対して内因性であり得る。

20

30

【0170】

本明細書に記載されるように、カーゴポリヌクレオチドは、真核細胞に対して内因性又は外因性の任意のポリヌクレオチドであり得る。例えば、カーゴポリヌクレオチドは、真核細胞の核内に存在するポリヌクレオチドであり得る。カーゴポリヌクレオチドは、遺伝子産物(例えば、タンパク質)をコードする配列又は非コード配列(例えば、調節ポリヌクレオチド)であり得る。

【0171】

ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、DNA又はRNA(例えば、mRNA)ワクチンである。

【0172】

40

アプタマー

いくつかの例の実施形態において、ポリヌクレオチドは、アプタマーであり得る。特定の実施形態において、1つ以上の薬剤は、アプタマーである。核酸アプタマーは、小分子、タンパク質、核酸、細胞、組織、及び生物などの様々な分子標的に結合するように、何度も反復されるインビトロ選択又はすなわち、SELEX(指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化)によって操作された核酸種である。核酸アプタマーは、古典的なワトソン・クリック塩基対形成以外の相互作用によって、分子に対する特異的な結合親和性を有する。アプタマーは、それらが抗体と同様の分子認識特性を提供する際、生物工学的及び治療的用途において有用である。それらの明確な認識に加えて、アプタマーは、それらが試験管中で完全に操作され得、化学合成によって容易に生成され、望ましい貯蔵特性を有

50

し、治療的用途においてほとんど又は全く免疫原性を引き起こさないため、抗体を上回る利点を提供する。特定の実施形態において、RNAアプタマーは、DNA構築物から発現され得る。他の実施形態において、核酸アプタマーは、別のポリヌクレオチド配列に結合され得る。ポリヌクレオチド配列は、二本鎖DNAポリヌクレオチド配列であり得る。アプタマーは、ポリヌクレオチド配列の1つの鎖に共有結合され得る。アプタマーは、ポリヌクレオチド配列にライゲートされ得る。ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列が、固体担体に結合されるか又は別のポリヌクレオチド配列にライゲートされ得るよう、構成され得る。

【0173】

ファージディスプレイ又はモノクローナル抗体（「mAb」）によって生成されるペプチドのようなアプタマーは、選択された標的に特異的に結合し、例えば、結合によって、標的の活性を調節することが可能であり、アプタマーは、それらの標的の機能する能力をブロックし得る。典型的なアプタマーは、10～15 kDaのサイズ（30～45ヌクレオチド）であり、サブナノモル親和性でその標的に結合し、密接に関連する標的を区別する（例えば、アプタマーは、典型的に、同じ遺伝子ファミリーからの他のタンパク質に結合しない）。構造研究は、アプタマーが、抗体-抗原複合体における親和性及び特異性を駆動する同じタイプの結合相互作用（例えば、水素結合、静電相補性、疎水性接触、立体排除）を使用することが可能であることを示した。

【0174】

アプタマーは、高い特異性及び親和性、生物学的有効性、及び優れた薬物速度論的特性を含む、研究において及び治療薬及び診断薬として使用するためのいくつかの望ましい特性を有する。さらに、それらは、抗体及び他のタンパク質生物製剤を上回る特定の競争的優位性を提供する。アプタマーは、化学的に合成され、研究、診断又は治療的用途のための生産の需要を満たすために必要に応じて容易に規模を調整される。アプタマーは、化学的に堅固である。それらは、熱及び変性剤などの因子への曝露後に活性を取り戻すように本質的に構成され、凍結乾燥粉末として室温で長期間（>1年）にわたって貯蔵され得る。理論によって制約されるものではないが、固体担体又はビーズに結合されたアプタマーは、長期間にわたって貯蔵され得る。

【0175】

ホスホジエステル形態におけるオリゴヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼなどの細胞内及び細胞外酵素によって急速に分解され得る。アプタマーは、改善されたインビボ安定性又は改善された送達特性などの、リガンドにおける改善された特性を与える修飾ヌクレオチドを含み得る。このような修飾の例は、リボース及び／又はホスフェート及び／又は塩基位置における化学置換を含む。修飾ヌクレオチドを含有するS E L E Xに同定された核酸リガンドが、例えば、米国特許第5,660,985号明細書（これは、リボースの2'位、ピリミジンの5位、及びプリン8位で化学修飾されたヌクレオチド誘導体を含有するオリゴヌクレオチドを記載している）、米国特許第5,756,703号明細書（これは、様々な2'修飾ピリミジンを含むオリゴヌクレオチドを記載している）、及び米国特許第5,580,737号明細書（これは、2'-アミノ（2'-NH₂）、2'-フルオロ（2'-F）、及び／又は2'-O-メチル（2'-OMe）置換基で修飾された1つ以上のヌクレオチドを含有する高度に特異的な核酸リガンドを記載している）に記載される。アプタマーの修飾は、環外アミンにおける修飾、4-チオウリジンの置換、5-プロモ又は5-ヨード-ウラシルの置換；骨格修飾、ホスホロチオエート又はアリルホスフェート修飾、メチル化、並びにイソ塩基イソシチジン及びイソグアノシンなどの稀な塩基対形成の組合せも含み得る。修飾は、キャッピングなどの3'及び5'修飾も含み得る。本明細書において使用される際、ホスホロチオエートという用語は、1つ以上の硫黄原子で置換されたホスホジエステル結合における1つ以上の非架橋酸素原子を包含する。さらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾糖基を含み、例えば、ヒドロキシル基の1つ以上は、ハロゲン、脂肪族基で置換され、又はエーテル若しくはアミンとして官能化される。一実施形態において、フラノース残基の2'位は

10

20

30

OM

50

、O-メチル、O-アルキル、O-アリル、S-アルキル、S-アリル、又はハロ基のいずれかで置換される。2'修飾糖の合成の方法は、例えば、Sproat, et al., Nucl. Acid Res. 19:733-738 (1991); Cotten, et al., Nucl. Acid Res. 19:2629-2635 (1991); 及び Hobbs, et al., Biochemistry 12:5138-5145 (1973) に記載される。他の修飾が、当業者に公知である。特定の実施形態において、アプタマーは、全体が参照により本明細書に援用される、国際特許公開番号国際公開第2009012418号パンフレット、“Method for generating aptamers with improved off-rates”に記載される改善されたオフレート有するアプタマーを含む。特定の実施形態において、アプタマーは、アプタマーのライブラリーから選択される。このようなライブラリーとしては、限定はされないが、Rohloff et al., “Nucleic Acid Ligands With Protein-like Side Chains: Modified Aptamers and Their Use as Diagnostic and Therapeutic Agents”, Molecular Therapy Nucleic Acids (2014) 3, e201に記載されるものが挙げられる。アプタマーはまた、市販されている（例えば、SomaLogic, Inc., Boulder, Coloradoを参照）。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載される任意の修飾を含有する任意のアプタマーを用い得る。

10

20

【0176】

いくつかの他の例の実施形態において、ポリヌクレオチドは、リボザイム又は他の酵素的に活性なポリヌクレオチドであり得る。

【0177】

生物学的に活性な薬剤

ある実施形態において、カーゴは、生物学的に活性な薬剤である。生物学的に活性な薬剤は、直接又は間接的に、細胞内で効果を及ぼす任意の分子を含む。生物学的に活性な薬剤は、タンパク質、核酸、小分子、炭水化物、及び脂質であり得る。カーゴが、核酸であるか又は核酸を含む場合、核酸は、DNAベースの担体と別個の実体であり得る。これらの実施形態において、DNAベースの担体は、それ自体でカーゴではない。他の実施形態において、DNAベースの担体は、それ自体で核酸カーゴを含み得る。治療剤としては、限定はされないが、化学療法剤、抗癌剤、抗血管新生薬、腫瘍抑制剤、抗菌剤、酵素補充剤、治療用タンパク質又は核酸をコードする核酸を含む遺伝子発現調節剤及び発現構築物、及びワクチンが挙げられる。治療剤は、ペプチド、タンパク質（酵素、抗体及びペプチド性ホルモンを含む）、細胞骨格のリガンド、核酸、小分子、非ペプチド性ホルモンなどであり得る。核に対する親和性を高めるために、薬剤が、核局在配列にコンジュゲートされ得る。本発明の方法によって送達され得る核酸は、DNA、RNA、トランスポゾンDNA、アンチセンス核酸、dsRNA、siRNA、転写RNA、メッセンジャーRNA、リボソームRNA、低分子核小体RNA、マイクロRNA、リボザイム、プラスミド、発現構築物などを含む、合成及び天然核酸材料を含む。

30

40

【0178】

造影剤としては、強磁性流体ベースのMRI造影剤及びPETスキャン用のガドリニウム剤、フルオレセインイソチオシアネート及び6-TAMARAなどの造影剤が挙げられる。モニタリング剤としては、レポータープローブ、バイオセンサー、緑色蛍光タンパク質などが挙げられる。レポータープローブとしては、発光化合物、例えば、蛍光体、放射性部分、及び蛍光部分、例えば、希土類キレート（例えば、ユウロピウムキレート）、テキサスレッド、ローダミン、フルオレセイン、FITC、fluor-3, 5ヘキサデカノイルフルオレセイン、Cy2、fluor-X、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、ダンシル、フィコエリスリン、フィコシアニン、スペクトルオレンジ、スペクトルグリーン、及び／又は上記のいずれか1つ以上の誘導体が挙げられる。バイオセンサーは、例えば、化学物質の存在又は存在の変化を検出することによって、生理学的変化

50

又はプロセスに関連する情報を検出及び伝達する分子である。バイオセンサーによって得られる情報は、典型的に、変換器を用いて検出されるシグナルを活性化する。変換器は、典型的に、生物学的応答を、電気信号に変換する。バイオセンサーの例としては、認識要素として使用される酵素、抗体、DNA、受容体、及び調節タンパク質が挙げられ、これは、全細胞又は単離細胞のいずれかにおいて使用され、独立して使用され得る（D'Souza, 2001, Biosensors and Bioelectronics 16:337-353）。

【0179】

1つ又は2つ以上の異なるカーゴが、本明細書に記載される送達粒子によって送達され得る。

【0180】

ある実施形態において、カーゴは、本明細書における他の箇所に記載されるように、リンカーによって1つ以上のエンベロープタンパク質に結合され得る。好適なリンカーは、グリシン-セリンリンカーを含み得るが、必ずしもそれに限定されない。ある実施形態において、グリシン-セリンリンカーは、(GGS)₃（配列番号27）である。

【0181】

ある実施形態において、カーゴは、リボヌクレオタンパク質を含む。特定の実施形態において、カーゴは、遺伝的調節剤を含む。

【0182】

本明細書において使用される際、「改変された発現」という用語は、細胞による、記載される遺伝子産物の改変された産生を特に示し得る。本明細書において使用される際、「遺伝子産物」という用語は、遺伝子（例えば、mRNA）から転写されたRNA、又は遺伝子によってコードされるか若しくはRNAから翻訳されたポリペプチドを含む。

【0183】

遺伝子組み換えシステム

ある実施形態において、カーゴは、ポリヌクレオチド修飾システム又はその構成要素である。ある実施形態において、ポリヌクレオチド修飾システムは、遺伝子修飾システムである。ある実施形態において、遺伝子組み換えシステムは、遺伝子調節剤であるか又はそれから構成される。ある実施形態において、遺伝子調節剤は、ポリヌクレオチド修飾システム（例えば、遺伝子編集システム）及び／又はそれをコードするポリヌクレオチドの1つ以上の構成要素を含み得る。

【0184】

ある実施形態において、遺伝子編集システムは、RNAガイドシステム又は他のプログラム可能なヌクレアーゼシステムであり得る。ある実施形態において、遺伝子編集システムは、IsCBシステムである。ある実施形態において、遺伝子編集システムは、CRISPR-Casシステムであり得る。

【0185】

CRISPR-Casシステム

一般に、本明細書及び国際公開第2014/093622号パンフレット（PCT/US2013/074667号明細書）などの文献において使用されるCRISPR-Cas又はCRISPRシステムは、Cas遺伝子をコードする配列、tracr（trans-活性化CRISPR）配列（例えばtracrRNA又は活性な部分tracrRNA）、tracr-メイト配列（「ダイレクトリピート」及び内因性CRISPRシステムに関してtracrRNA処理された部分ダイレクトリピートを包含する）、ガイド配列（内因性CRISPRシステムに関して「スパーサー」とも呼ばれる）、又はその用語が本明細書において使用される際の「RNA」（例えば、Cas9などのCasをガイドするRNA、例えばCRISPR RNA及びトランス活性化（tracr）RNA又はシングルガイドRNA（sgRNA）（キメラRNA））又はCRISPR遺伝子座からの他の配列及び転写産物を含む、CRISPR関連（「Cas」）遺伝子の発現に関与するか又はCRISPR関連（「Cas」）遺伝子の活性を指向する転写産物及び他の要素

10

20

30

40

50

を総称して指す。一般に、CRISPRシステムは、標的配列の部位におけるCRISPR複合体の形成を促進する要素（内因性CRISPRシステムに関してプロトスペーサーとも呼ばれる）によって特徴付けられる。例えば、Shmakov et al. (2015) “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems”, *Molecular Cell*, DOI:dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008を参照されたい。

【0186】

クラス1システム

本明細書において提供される方法、システム、及びツールは、クラス1 CRISPRタンパク質とともに使用するために設計され得る。いくつかの例の実施形態において、クラス1システムは、全体が参照により本明細書に援用されるMakarova et al. “Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants” *Nature Reviews Microbiology*, 18:67-81 (Feb 2020)に記載され、特に、図1、p. 326に記載される、タイプI、タイプII又はタイプIV Casタンパク質であり得る。クラス1システムは、典型的に、多タンパク質エフェクター複合体を使用し、これは、ある実施形態において、補助的なタンパク質、例えば、抗ウイルス防御のためのCRISPR関連複合体と呼ばれる複合体中の1つ以上のタンパク質（Cascade）、1つ以上の適合タンパク質（例えば、Cas1、Cas2、RNAヌクレアーゼ）、及び／又は1つ以上のアクセサリタンパク質（例えば、Cas4、DNAヌクレアーゼ）、CRISPR関連ロスマンフォールド（CARF）ドメイン含有タンパク質、及び／又はRNA転写酵素を含み得る。クラス1システムが、限られた配列類似性を有するが、クラス1システムタンパク質は、1つ以上の反復関連ミステリアスタンパク質（RAMP）ファミリーサブユニット、例えば、Cas5、Cas6、Cas7を含むそれらの類似の構造によって同定され得る。RAMPタンパク質は、1つ以上のRNA認識モチーフドメインを有することによって特徴付けられる。大型のサブユニット（例えばcas8又はcas10）及び小型のサブユニット（例えば、cas11）も、クラス1システムに特有である。例えば、図1及び2を参照されたい。Koonin EV, Makarova KS. 2019 *Origins and evolution of CRISPR-Cas systems*. *Phil. Trans. R. Soc. B* 374:20180087, DOI:10.1098/rstb.2018.0087。一態様において、クラス1システムは、シグネチャータンパク質Cas3によって特徴付けられる。特定のクラス1タンパク質中のCascadeは、プレ-crRNAに結合し、プレ-crRNAを処理するのに直接関与するヌクレアーゼである、さらなるCasタンパク質、例えばCas6又はCas5を動員する複数のCasタンパク質の専用の複合体を含み得る。一態様において、タイプI CRISPRタンパク質は、エフェクターを含み、複合体は、1つ以上のCas5サブユニット及び2つ以上のCas7サブユニットを含む。クラス1サブタイプは、タイプI-A、I-B、I-C、I-U、I-D、I-E、及びI-F、タイプIV-A及びIV-B、並びにタイプII-I-A、II-I-D、II-I-C、及びII-I-Bを含む。クラス1システムは、タイプI-A、I-B、I-E、I-F及びI-U変異体を含むCRISPR-Cas変異体も含み、これは、Tn7様トランスポゾンの大型のファミリー及び同様に分解されたサブタイプI-BシステムをコードするTn7様トランスポゾンのより小さい群によってコードされるサブタイプI-Fの形態を含む、トランスポゾン及びプラスミドによって運ばれる変異体を含み得る。Peters et al., *PNAS* 114(35)(2017); DOI:10.1073/pnas.1709035114; Makarova et al, *the CRISPR Journal*, v. 1, n5、図5も参照されたい。

【0187】

10

20

30

40

50

クラス2システム

本明細書における他の箇所により詳細に記載される組成物、システム、及び方法は、クラス2 CRISPR-Casシステムとともに使用するために設計及び適合され得る。したがって、ある実施形態において、CRISPR-Casシステムは、クラス2 CRISPR-Casシステムである。クラス2システムは、それらが単一の大型のマルチドメインエフェクタータンパク質を有する点でクラス1システムと区別される。いくつかの例の実施形態において、クラス2システムは、タイプII、タイプV、又はタイプVIシステムであり得、これは、参照により本明細書に援用されるMakarova et al. “Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants” Nature Reviews Microbiology, 18: 67-81 (Feb 2020)に記載される。クラス2システムの各タイプは、さらにサブタイプに分けられる。Markova et al. 2020、特に、図2を参照されたい。クラス2、タイプIIシステムは、4つのサブタイプ: II-A、II-B、II-C1、及びII-C2に分けられ得る。クラス2、タイプVシステムは、17のサブタイプ: V-A、V-B1、V-B2、V-C、V-D、V-E、V-F1、V-F1 (V-U3)、V-F2、V-F3、V-G、V-H、V-I、V-K (V-U5)、V-U1、V-U2、及びV-U4に分けられ得る。クラス2、タイプIVシステムは、5つのサブタイプ: VI-A、VI-B1、VI-B2、VI-C、及びVI-Dに分けられ得る。

10

20

30

40

50

【0188】

これらのタイプの顕著な特徴は、それらのエフェクター複合体が、単一の大型のマルチドメインタンパク質からなることである。タイプVシステムは、RuvC様ヌクレアーゼドメイン配列の内部に挿入されるHNHヌクレアーゼとともに、標的DNAの1つの鎖の切断にそれぞれ関与する2つの核ドメインを含むタイプIIエフェクター（例えば、Cas9）と異なる。タイプVシステム（例えば、Cas12）は、両方の鎖を切断するRuvC様ヌクレアーゼドメインのみを含む。タイプVI（Cas13）は、タイプII及びVシステムのエフェクターに関連せず、2つのHEPNドメイン及び標的RNAを含む。Cas13タンパク質はまた、標的認識によって引き起こされる付加的な活性を提示する。いくつかのタイプVシステムはまた、インビトロの文脈において2つの一本鎖DNAとのこの付加的な活性を有することが分かった。

【0189】

ある実施形態において、クラス2システムは、タイプIIシステムである。ある実施形態において、タイプII CRISPR-Casシステムは、II-A CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプII CRISPR-Casシステムは、II-B CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプII CRISPR-Casシステムは、II-C1 CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプII CRISPR-Casシステムは、II-C2 CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプIIシステムは、Cas9システムである。ある実施形態において、タイプIIシステムは、Cas9を含む。

【0190】

ある実施形態において、クラス2システムは、タイプVシステムである。ある実施形態において、タイプV CRISPR-Casシステムは、V-A CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプV CRISPR-Casシステムは、V-B1 CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプV CRISPR-Casシステムは、V-B2 CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプV CRISPR-Casシステムは、V-C CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプV CRISPR-Casシステムは、V-D CRISPR-Casシステムである。ある実施形態において、タイプ

V CRISPR-Cas システムは、V-E CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-F1 CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-F1 (V-U3) CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-F2 CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-F3 CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-G CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-H CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-I CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-K (V-U5) CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-U1 CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-U2 CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、V-U4 CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ V CRISPR-Cas システムは、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas14、及び／又は CasΦ を含む。

10

20

【0191】

ある実施形態において、クラス2システムは、タイプ VI システムである。ある実施形態において、タイプ VI CRISPR-Cas システムは、VI-A CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ VI CRISPR-Cas システムは、VI-B1 CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ VI CRISPR-Cas システムは、VI-B2 CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ VI CRISPR-Cas システムは、VI-C CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ VI CRISPR-Cas システムは、VI-D CRISPR-Cas システムである。ある実施形態において、タイプ VI CRISPR-Cas システムは、Cas13a (C2c2)、Cas13b (Group 29/30)、Cas13c、及び／又は Cas13d を含む。

30

【0192】

ガイド分子

本明細書に記載される CRISPR-Cas 又は Cas ベースのシステムは、ある実施形態において、1つ以上のガイド分子を含み得る。ガイド分子、ガイド配列及びガイドポリヌクレオチドという用語は、Cas を標的ゲノム遺伝子座に誘導することが可能なポリヌクレオチドを指し、国際特許公開番号国際公開第2014/093622号パンフレット (PCT/US2013/074667号明細書) などの上記の引用文献におけるものと同義的に使用される。一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、標的配列に対する CRISPR 複合体の配列特異的結合を指向するために、標的ポリヌクレオチド配列との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。ガイド分子は、ポリヌクレオチドであり得る。

40

【0193】

標的核酸配列に対する核酸標的化複合体の配列特異的結合を指向するガイド配列 (核酸標的化ガイド RNA 内) の能力は、任意の好適なアッセイによって評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含む核酸標的化複合体を形成するのに十分な核酸標的化 CRISPR システムの構成要素は、核酸標的化複合体の構成要素をコードするベクターによるトランスフェクションなどによって、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に提供され得、その後、Surveyor アッセイなどによって標的核酸配列内の優先的な標的化 (

50

例えば、切断)の評価を行う(Quiet al. 2004. BioTechniques. 36(4)702-707)。同様に、標的核酸配列の切断は、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列と異なる対照ガイド配列を含む、標的核酸配列、核酸標的化複合体の構成要素を提供し、試験及び対照ガイド配列反応の間で標的配列における結合又は切断の率を比較することによって、試験管中で評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に想到される。

【0194】

ある実施形態において、ガイド分子は、CRISPR-Cas又はCasベースのシステムに含まれるRNAである。ガイド分子(本明細書において同義的にガイドポリヌクレオチド及びガイド配列とも呼ばれる)は、標的核酸配列とハイブリダイズし、標的核酸配列に対する核酸標的化複合体の配列特異的結合を指向するために、標的核酸配列との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り得る。ある実施形態において、相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて任意にアラインメントされる場合、約又は約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%超、又はそれ以上であり得る。最適なアラインメントは、配列をアラインメントするための任意の好適なアルゴリズムの使用により決定され得、その非限定的な例としては、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler変換に基づくアルゴリズム(例えば、Burrows Wheelerアライナー)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies; www.novocraft.comで入手可能)、ELAND(Illumina, San Diego, CA)、SOAP(soap.genomics.org.cnで入手可能)、及びMaq(maq.sourceforge.netで入手可能)が挙げられる。

【0195】

ガイド配列、ひいては核酸標的化ガイドは、任意の標的核酸配列を標的とするように選択され得る。標的配列は、DNAであり得る。標的配列は、任意のRNA配列であり得る。ある実施形態において、標的配列は、メッセンジャーRNA(mRNA)、プレ-mRNA、リボソームRNA(rRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、低分子核内RNA(snRNA)、低分子核小体RNA(snoRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、非コードRNA(ncRNA)、長鎖非コードRNA(lncRNA)、及び低分子細胞質RNA(scRNA)からなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。ある好ましい実施形態において、標的配列は、mRNA、プレ-mRNA、及びrRNAからなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。ある好ましい実施形態において、標的配列は、ncRNA、及びlncRNAからなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。あるより好ましい実施形態において、標的配列は、mRNA分子又はプレ-mRNA分子内の配列であり得る。

【0196】

ある実施形態において、核酸標的化ガイドは、核酸標的化ガイド内の二次構造の程度を低下させるように選択される。ある実施形態において、核酸標的化ガイドのうち約又は約75%、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%未満、又はそれ以下未満のヌクレオチドが、最適にフォールディングされたときに自己相補的な塩基対形成に参与する。最適なフォールディングは、任意の好適なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定され得る。いくつかのプログラムは、最小ギブズ自由エネルギーを計算することに基づいている。1つのこのようなアルゴリズムの例は、Zuker and Stiegler(Nucleic Acids Res. 9(1981)、133-148)によって記載されるように、mFoldである。別の例のフォールディングアルゴリズムは、重心構造予測アルゴリズムを用いて、Institute for Theoretical Chemistry at the University of Viennaで開発されたオンラインウェブサーバーRNAfold

である（例えば、A. R. Gruber et al., 2008, Cell 106 (1): 23-24; 及び P. A. Carr and G. M. Church, 2009, Nature Biotechnology 27 (12): 1151-62 を参照）。

【0197】

特定の実施形態において、ガイドRNA又はcrRNAは、ダイレクトリピート（DR）配列及びガイド配列又はスペーサー配列を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になり得る。特定の実施形態において、ガイドRNA又はcrRNAは、ガイド配列又はスペーサー配列に融合又は結合されたダイレクトリピート配列を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になり得る。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、ガイド配列又はスペーサー配列の上流（すなわち、5'）に位置し得る。他の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、ガイド配列又はスペーサー配列の下流（すなわち、3'）に位置し得る。

10

【0198】

特定の実施形態において、crRNAは、ステムループ、好ましくは単一のステムループを含む。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、ステムループ、好ましくは単一のステムループを形成する。

【0199】

特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長さは、15～35 nt である。特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長さは、少なくとも15ヌクレオチドである。特定の実施形態において、スペーサー長さは、15～17 nt、例えば、15、16、又は17 nt、17～20 nt、例えば、17、18、19、又は20 nt、20～24 nt、例えば、20、21、22、23、又は24 nt、23～25 nt、例えば、23、24、又は25 nt、24～27 nt、例えば、24、25、26、又は27 nt、27～30 nt、例えば、27、28、29、又は30 nt、30～35 nt、例えば、30、31、32、33、34、又は35 nt、又は35 nt 又はそれ以上である。

20

【0200】

「tracrRNA」配列又は類似の用語は、ハイブリダイズするために、crRNA配列との十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。ある実施形態において、最適にアラインメントされたときに2つのうちの短い方の長さに沿ったtracrRNA配列及びcrRNA配列の間の相補性の程度は、約又は約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%超、又はそれ以上である。ある実施形態において、tracr配列は、約又は約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50超、又はそれ以上のヌクレオチド長である。ある実施形態において、2つの間のハイブリダイゼーションが、ヘアピンなどの二次構造を有する転写産物を産生するように、tracr配列及びcrRNA配列は、単一の転写産物内に含まれる。

30

【0201】

一般に、相補性の程度は、2つの配列の短い方の長さに沿ったsca配列及びtracr配列の最適なアラインメントに関するものである。最適なアラインメントは、任意の最適なアラインメントアルゴリズムによって決定され得、sca配列又はtracr配列のいずれかの中の自己相補性などの二次構造をさらに説明し得る。ある実施形態において、最適にアラインメントされたときに2つのうちの短い方の長さに沿ったtracr配列及びsca配列の間の相補性の程度は、約又は約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%超、又はそれ以上である。

40

【0202】

ある実施形態において、ガイド配列及びその対応する標的配列の間の相補性の程度は、約又は約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、若しくは100%超であり得；ガイド又はRNA又はsgRNAは、約又は約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23

50

、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75超、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得；又はガイド又はRNA又はsgRNAは、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12未満、又はそれ未満のヌクレオチド長であり得；tracrRNAは、30又は50ヌクレオチド長であり得る。ある実施形態において、ガイド配列及びその対応する標的配列の間の相補性の程度は、94.5%又は95%又は95.5%又は96%又は96.5%又は97%又は97.5%又は98%又は98.5%又は99%又は99.5%又は99.9%、又は100%超である。オフターゲットは、配列及びガイドの間の100%又は99.9%又は99.5%又は99%又は99%又は98.5%又は98%又は97.5%又は97%又は96.5%又は96%又は95.5%又は95%又は94.5%又は94%又は93%又は92%又は91%又は90%又は89%又は88%又は87%又は86%又は85%又は84%又は83%又は82%又は81%又は80%未満の相補性であり、オフターゲットが、配列及びガイドの間で100%又は99.9%又は99.5%又は99%又は99%又は98.5%又は98%又は97.5%又は97%又は96.5%又は96%又は95.5%又は95%又は94.5%の相補性であることが有利である。

10

【0203】

ある実施形態において、本発明によれば、ガイドRNA（Casを標的遺伝子座に誘導することが可能である）は、（1）真核細胞内のゲノム標的遺伝子座にハイブリダイズすることが可能なガイド配列；（2）tracr配列；及び（3）tracrメイト配列を含み得る。全ての（1）～（3）は、単一のRNA、すなわち、sgRNA（5'から3'配向で配置される）に存在してもよく、又はtracrRNAは、ガイド及びtracr配列を含むRNAと異なるRNAであり得る。tracrは、tracrメイト配列にハイブリダイズし、CRISPR/Cas複合体を標的配列に指向する。tracrRNAが、ガイド及びtracr配列を含むRNAと異なるRNA上にある場合、各RNAの長さは、それらのそれぞれの天然の長さから短縮されるように最適化され得、それぞれが、独立して、細胞RNaseによって分解から保護するか又は他の形で安定性を高めるように化学修飾され得る。

20

【0204】

ガイド配列に対する多くの修飾が、当該技術分野において公知であり、本発明の文脈の範囲内でさらに考えられる。様々な修飾は、標的配列への結合の特異性を増加させ、及び／又はCasタンパク質の活性を増加させ、及び／又はオフターゲット効果を低下させるために使用され得る。例のガイド配列修飾は、参照により本明細書に援用される国際特許出願番号PCT US2019/045582号明細書、特に、段落[0178]～[0333]に記載される。

30

【0205】

標的配列、PAM、及びPFS

CRISPR複合体の形成に関して、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計された配列を指し、ここで、標的配列及びガイド配列の間のハイブリダイゼーションが、CRISPR複合体の形成を促進する。標的配列は、RNAポリヌクレオチドを含み得る。「標的RNA」という用語は、標的配列であるか又はそれを含むRNAポリヌクレオチドを指す。言い換えると、標的ポリヌクレオチドは、ガイド配列の一部が相補性を有するように設計され、CRISPRエフェクタータンパク質及びガイド分子を含む複合体によって媒介されるエフェクター機能が、それに指向される、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドの一部であり得る。ある実施形態において、標的配列は、細胞の核又は細胞質に位置する。

40

【0206】

ガイド配列は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に特異的に結合し得る。標的ポリヌクレオチドは、DNAであり得る。標的ポリヌクレオチドは、RNAであり得る。標的ポリヌクレオチドは、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10など又はそれ以上）の標的配列を有し得る。標的ポリヌクレオチドは、ベクター上にあり得る

50

。標的ポリヌクレオチドは、ゲノムDNAであり得る。標的ポリヌクレオチドは、エピソームであり得る。標的ポリヌクレオチドの他の形態が、本明細書における他の箇所に記載される。

【0207】

標的配列は、DNAであり得る。標的配列は、任意のRNA配列であり得る。ある実施形態において、標的配列は、メッセンジャーRNA (mRNA)、プレ-mRNA、リボソームRNA (rRNA)、トランスファーRNA (tRNA)、マイクロRNA (miRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、低分子核内RNA (snRNA)、低分子核小体RNA (snoRNA)、二本鎖RNA (dsRNA)、非コードRNA (ncRNA)、長鎖非コードRNA (lncRNA)、及び低分子細胞質RNA (scRNA) からなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。ある好ましい実施形態において、標的配列 (本明細書において標的ポリヌクレオチドとも呼ばれる) は、mRNA、プレ-mRNA、及びrRNAからなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。ある好ましい実施形態において、標的配列は、ncRNA、及びlncRNAからなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。あるより好ましい実施形態において、標的配列は、mRNA分子又はプレ-mRNA分子内の配列であり得る。

10

【0208】

PAM及びPFS要素

PAM要素は、Casタンパク質によって認識及び結合され得る配列である。次に、Casタンパク質／エフェクター複合体は、PAM要素に隣接する位置においてdsDNAを巻き戻し得る。RNAを標的とするCasタンパク質及びそれを含むシステムは、PAM配列を必要としないことが理解されるであろう (Marraffini et al., 2010, Nature, 463: 568-571)。その代わりに、多くは、PFSに依存し、これは、本明細書における他の箇所に記載される。特定の実施形態において、標的配列は、PAM (プロトスペーサー隣接モチーフ) 又はPFS (プロトスペーサー隣接配列又は部位)、すなわち、CRISPR複合体によって認識される短鎖配列と結合されるべきである。CRISPR-Casタンパク質の性質に依存して、標的配列は、DNA二本鎖におけるその相補的配列 (本明細書において非標的配列とも呼ばれる) が、PAMの上流又は下流にあるように選択されるべきである。実施形態において、標的配列の相補的配列は、PAMの下流若しくは3'又はPAMの上流若しくは5'である。PAMのため

20

30

【0209】

異なるPAM配列を認識する能力は、システムに含まれるCasポリペプチドに依存する。例えば、Gleditzsch et al., 2019, RNA Biology, 16(4): 504-517を参照されたい。以下の表4 (Gleditzsch et al., 2019からの) は、彼らが認識するいくつかのCasポリペプチド及びPAM配列を示す。

40

【表 1】

表 4- 例の PAM 配列	
Cas タンパク質	PAM 配列
SpCas9	NGG/NRG
SaCas9	NGRRT 又は NGRRN
NmeCas9	NNNNGATT
CjCas9	NNNNRYAC
StCas9	NNAGAAW
Cas12a (Cpf1) (LbCpf1 及び AsCpf1 を含む)	TTTV
Cas12b (C2c1)	TTT、TTA、及び TTC
Cas12c (C2c3)	TA
Cas12d (CasY)	TA
Cas12e (CasX)	5'-TTCN-3'

10

【0210】

好ましい実施形態において、CRISPRエフェクタータンパク質は、3' PAMを認識し得る。特定の実施形態において、CRISPRエフェクタータンパク質は、5' Hである3' PAMを認識し得、ここで、Hが、A、C又はUである。

20

【0211】

さらに、Casタンパク質におけるPAM相互作用 (PI) ドメインの操作は、例えば Klein et al., Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. Nature. 2015 Jul 23; 523 (7561): 481-5. doi: 10.1038/nature14592 において Cas9 について記載されるように、PAM特異性のプログラミングを可能にし、標的部認識忠実度を改善し、CRISPR-Casタンパク質の多用途性を増加させ得る。本明細書においてさらに詳述されるように、当業者は、Cas13タンパク質が、同様に修飾され得ることを理解するであろう。Gao et al., "Engineered Cpf1 Enzymes with Altered PAM Specificities," bioRxiv 091611; doi: http://dx.doi.org/10.1101/091611 (Dec. 4, 2016)。Doenchらは、sgRNAのプールを作成し、これは、一連の6つの内因性マウス及び3つの内因性ヒト遺伝子の全ての可能な標的部並びに抗体染色及びフローサイトメトリーによってそれらの標的遺伝子のヌル対立遺伝子を産生する定量的に評価されるそれらの能力をカバーしている。著者は、PAMの最適化が活性を改善したことを示し、また、sgRNAを設計するためのオンラインツールを提供した。

30

【0212】

PAM配列は、適切な設計ツールを用いてポリヌクレオチドにおいて同定され得、この設計ツールは、オンラインだけでなく市販されている。このような自由に入手可能なツールとしては、限定はされないが、CRISPRFinder及びCRISPRTargetが挙げられる。Mojica et al., 2009. Microbiol. 155 (Pt. 3): 733-740; Atschul et al., 1990. J. Mol. Biol. 215: 403-410; Biswass et al., 2013. RNA Biol. 10: 817-827; 及び Grissa et al., 2007. Nucleic Acid Res. 35: W52-57。PAM同定のための実験的手法は、限定はされないが、プラスミド枯渇アッセイ (Jiang et al., 2013. Nat. Biotechnol. 31: 233-239; Esvelt et al., 2013. Nat. Methods. 10: 1116-1121; Klein et

40

50

al. 2015. Nature. 523: 481–485)、PAM-SCNARと呼ばれるハイスループットインビボモデルによるスクリーニング (Pattanayak et al. 2013. Nat. Biotechnol. 31: 839–843 及び Lee et al. 2016. Mol. Cell. 16: 253)、及びネガティブスクリーニング (Zetsche et al. 2015. Cell. 163: 759–771) を含み得る。

【0213】

上述されるように、RNAを標的とするCRISPR-Casシステムは、典型的に、PAM配列に依存しない。その代わりに、このようなシステムは、典型的に、PAMの代わりにプロトスペーサー隣接部位 (PFS) を認識する。したがって、タイプVI CRISPR-Casシステムは、典型的に、PAMの代わりにプロトスペーサー隣接部位 (PFS) を認識する。PFSは、RNA標的のためのPAMの類似体を表す。タイプVI CRISPR-Casシステムは、Cas13を用いる。レプトトリキア・シャーイイ (Leptotrichia shahii) (LSHCas13a) から同定されたCas13a (C2c2) などの、これまでに分析されたいくつかのCas13タンパク質は、標的RNAの3'末端においてGに対する明確な区別を有する。対応するcrRNA反復部位におけるCの存在は、この位置におけるヌクレオチド対形成が拒絶されることを示し得る。しかしながら、いくつかのCas13タンパク質 (例えば、LwacCas13a 及び PspCas13b) は、PFS選好を有さないようである。例えば、Gleditzsch et al. 2019. RNA Biology. 16 (4): 504–517 を参照されたい。

【0214】

サブタイプBなどのいくつかのタイプVIタンパク質は、D (G、T、A) の5' - 認識及びNAN又はNNAの3' - モチーフ要件を有する。一例は、バージイエラ・ズーヘルカム (Bergeyella zoohelcum) (BzCas13b) において同定されたCas13bタンパク質である。例えば、Gleditzsch et al. 2019. RNA Biology. 16 (4): 504–517 を参照されたい。

【0215】

全体的なタイプVI CRISPR-Casシステムは、DNA (例えば、タイプV及びタイプII) を標的とするものより、基質 (例えば、標的配列) 認識についてより制限的でない規則を有するようである。

【0216】

核標的化及び輸送に関連する配列

ある実施形態において、1つ以上の構成要素 (例えば、細胞を操作するための組成物中のCasタンパク質及び／又はデアミナーゼ) は、核標的化及び輸送に関連する1つ以上の配列を含み得る。このような配列は、細胞内の配列を標的化するために組成物中の1つ以上の構成要素を促進し得る。核に対する、本開示の方法において使用されるCRISPR-Casタンパク質及び／又はヌクレオチドデアミナーゼタンパク質又は触媒ドメインの標的化を改善するために、これらの構成要素の一方又は両方に、1つ以上の核局在配列 (NLS) を提供することが有利であり得る。

【0217】

ある実施形態において、本開示に関して使用されるNLSは、タンパク質に対して異種である。NLSの非限定的な例としては、アミノ酸配列PKKKRKV (配列番号28) 又はPKKKRKVEAS (配列番号29) を有するSV40ウイルス大型T抗原のNLS; 核質からのNLS (例えば、配列KRPAATKKAGQAKKKK (配列番号30) を有する核質双節型 (bipartite) NLS); アミノ酸配列PAAKRVKLD (配列番号31) 又はRQRRNELKRSP (配列番号32) を有するc-myc NLS; 配列NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (配列番号33) を有するhRNPA1 M9 NLS; インポーチン-αからのIBBDドメインの配列RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRK

A K K D E Q I L K R R N V (配列番号 34) ; 筋腫 T タンパク質の配列 V S R K R P R P (配列番号 35) 及び P P K K A R E D (配列番号 36) ; ヒト p 53 の配列 P Q P K K K P L (配列番号 37) ; マウス c - a b l I V の配列 S A L I K K K K K M A P (配列番号 38) ; インフルエンザウイルス N S 1 の配列 D R L R R (配列番号 39) 及び P K Q K K R K (配列番号 40) ; 肝炎ウイルス δ 抗原の配列 R K L K K K I K K L (配列番号 41) ; マウス M x 1 タンパク質の配列 R E K K K F L K R R (配列番号 42) ; ヒトポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼの配列 K R K G D E V D G V D E V A K K K S K K (配列番号 42) ; 及びステロイドホルモン受容体 (ヒト) グルココルチコイドの配列 R K C L Q A G M N L E A R K T K K (配列番号 44) に由来する N L S 配列が挙げられる。一般に、1 つ以上の N L S は、真核細胞の核内に検出可能な量の D N A 標的化 C a s タンパク質を蓄積させるのに十分な強度を有する。一般に、核局在活性の強度は、C R I S P R - C a s タンパク質中の N L S の数、使用される特定の N L S 、又はこれらの因子の組合せから生じ得る。核内の蓄積の検出は、任意の好適な技術によって行われ得る。例えば、検出可能なマーカーは、核酸標的化タンパク質に融合され得、それによって、細胞内の位置が、例えば、核の位置を検出する手段 (例えば、D A P I などの核に特異的な染色) と組み合わせて可視化され得る。細胞核はまた、細胞から単離され得、次に、その含有物が、免疫組織化学的分析、ウェスタンブロット、又は酵素活性アッセイなどの、タンパク質を検出するための任意の好適なプロセスによって分析され得る。核内の蓄積はまた、C R I S P R - C a s タンパク質及びデアミナーゼタンパク質に曝露されず、又は 1 つ以上の N L S を欠く C R I S P R - C a s 及び / 又はデアミナーゼタンパク質にも曝露されていない対照と比較して、標的配列における核酸標的化複合体形成の影響についてのアッセイ (例えば、デアミナーゼ活性についてのアッセイ)、又は D N A 標的化複合体形成及び / 又は D N A 標的化によって影響される変化された遺伝子発現活性についてのアッセイ) などによって、間接的に決定され得る。

10

20

30

40

50

【0218】

C R I S P R - C a s 及び / 又はヌクレオチドデアミナーゼタンパク質は、1 つ以上、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上の異種 N L S を備え得る。ある実施形態において、タンパク質は、アミノ末端又はその近傍に、約又は約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 超、又はそれ以上の N L S 、カルボキシ末端又はその近傍に、約又は約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 超、又はそれ以上の N L S 、或いはこれらの組合せ (例えば、アミノ末端に 0 又は少なくとも 1 つ以上の N L S 及びカルボキシ末端に 0 又は 1 つ以上の N L S) を含む。2 つ以上の N L S が存在する場合、それぞれは、単一の N L S が 2 つ以上のコピー中に存在し得るように他から独立して、及び / 又は 1 つ以上のコピー中に存在する 1 つ以上の他の N L S と組み合わせて選択され得る。ある実施形態において、N L S の最も近いアミノ酸が、N 末端又は C 末端からポリペプチド鎖に沿って約 1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、又はそれ以上のアミノ酸以内にある場合、N L S は、N 末端又は C 末端の近傍であると見なされる。C R I S P R - C a s タンパク質の好ましい実施形態において、N L S は、タンパク質の C 末端に結合される。

【0219】

特定の実施形態において、C R I S P R - C a s タンパク質及びデアミナーゼタンパク質は、別個のタンパク質として細胞に送達されるか又は細胞内で発現される。これらの実施形態において、C R I S P R - C a s 及びデアミナーゼタンパク質のそれぞれは、本明細書に記載される 1 つ以上の N L S を備え得る。特定の実施形態において、C R I S P R - C a s 及びデアミナーゼタンパク質は、融合タンパク質として細胞に送達されるか又は細胞内で発現される。これらの実施形態において、C R I S P R - C a s 及びデアミナーゼタンパク質の一方又は両方は、1 つ以上の N L S を備える。ヌクレオチドデアミナーゼが、上述されるアダプタータンパク質 (M S 2 など) に融合される場合、1 つ以上の N L S が、これがアダプター結合を妨げないことを条件としてアダプタータンパク質上に提供され得る。特定の実施形態において、1 つ以上の N L S 配列はまた、ヌクレオチドデアミ

ナーゼ及びCRISPR-Casタンパク質の間のリンカー配列として機能し得る。

【0220】

特定の実施形態において、本開示のガイドは、アダプタータンパク質のための特異的結合部位（例えば、アダプター）を含み、これは、ヌクレオチドデアミナーゼ又はその触媒ドメインに結合されるか又は融合され得る。このようなガイドが、CRISPR複合体（例えば、ガイド及び標的に結合するCRISPR-Casタンパク質）を形成する場合、アダプタータンパク質は、結合し、アダプタータンパク質に結合されたヌクレオチドデアミナーゼ又はその触媒ドメインは、寄与される機能が有効であるように有利な空間的配向で位置決めされる。

【0221】

当業者は、アダプター＋ヌクレオチドデアミナーゼの結合を可能にするが、アダプター＋ヌクレオチドデアミナーゼの適切な位置決めを可能にしない（例えば、CRISPR複合体の3次元構造内の立体障害に起因する）ガイドに対する修飾は、意図されない修飾であることを理解するであろう。1つ以上の修飾ガイドは、本明細書に記載されるように、テトラループ、ステムループ1、ステムループ2、又はステムループ3において、好ましくは、テトラループ又はステムループ2のいずれかにおいて、ある場合には、テトラループ及びステムループ2の両方において修飾され得る。

【0222】

ある実施形態において、システム中の構成要素（例えば、死Casタンパク質、ヌクレオチドデアミナーゼタンパク質若しくはその触媒ドメイン、又はそれらの組合せ）は、1つ以上の核外搬出シグナル（NES）、1つ以上の核局在シグナル（NLS）、又はそれらの任意の組合せを含み得る。ある場合には、NESは、HIV Rev NESであり得る。いくつかの場合、NESは、MAPK NESであり得る。構成要素がタンパク質である場合、NES又はNLSは、構成要素のC末端にあり得る。或いは、又はそれに加えて、NES又はNLSは、構成要素のN末端にあり得る。いくつかの例では、Casタンパク質及び任意に前記ヌクレオチドデアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、1つ以上の不均一な核外搬出シグナル（NES）又は核局在シグナル（NLS）、好ましくは、HIV Rev NES又はMAPK NES、好ましくは、C末端を含む。

【0223】

Casタンパク質に関連して本明細書に記載されるNLS及びNESが、他のカーゴ、特に、本明細書における遺伝子組み換え剤、及び標的細胞などの細胞のヌクレアーゼ内における又はそれからの転座から利益を得られる他のタンパク質とともに使用され得ることが理解されるであろう。

【0224】

ドナー鑄型

ある実施形態において、細胞を操作するための組成物は、鑄型、例えば、組み換え鑄型を含む。鑄型は、本明細書に記載される別のベクターの構成要素であるか、別個のベクターに含まれるか、又は別個のポリヌクレオチドとして提供され得る。ある実施形態において、組み換え鑄型は、核酸標的化複合体の一部として核酸標的化エフェクタータンパク質によってニック又は切断された標的配列内又はその近傍などで、相同的組み換えにおける鑄型として働くように設計される。

【0225】

一実施形態において、鑄型核酸は、標的位置の配列を改変する。一実施形態において、鑄型核酸は、標的核酸への、修飾された、又は非天然塩基の組み込みをもたらす。

【0226】

鑄型配列は、標的配列による分解に媒介又は触媒される組み換えを生じ得る。一実施形態において、鑄型核酸は、Casタンパク質媒介性切断事象によって切断される標的配列上の部位に対応する配列を含み得る。一実施形態において、鑄型核酸は、第1のCasタンパク質媒介性事象において切断される標的配列における第1の部位、及び第2のCasタンパク質媒介性事象において切断される標的配列における第2の部位の両方に対応する

10

20

30

40

50

配列を含み得る。

【0227】

特定の実施形態において、鋳型核酸は、翻訳された配列のコード配列の改変をもたらす配列、例えば、タンパク質産物における1つのアミノ酸の別のアミノ酸との置換、例えば、変異対立遺伝子を野生型対立遺伝子へと変換すること、野生型対立遺伝子を変異対立遺伝子へと変換すること、及び／又は終止コドンを導入すること、アミノ酸残基の挿入、アミノ酸残基の欠失、又はナンセンス変異をもたらすものを含み得る。特定の実施形態において、鋳型核酸は、非コード配列の改変、例えば、エクソン又は5'若しくは3'非翻訳又は非転写領域の改変をもたらす配列を含み得る。このような改変は、制御要素、例えば、プロモーター、エンハンサーの改変、及びcis作用性又はtrans作用性制御要素の改変を含む。

10

【0228】

標的遺伝子中の標的位置との相同性を有する鋳型核酸が、標的配列の構造を改変するのに使用され得る。鋳型配列は、好ましくない構造、例えば、好ましくない又は変異ヌクレオチドを改変するのに使用され得る。鋳型核酸は、統合されると、陽性対照要素の活性を低下させ；陽性対照要素の活性を増加させ；陰性対照要素の活性を低下させ；陰性対照要素の活性を増加させ；遺伝子の発現を低下させ；遺伝子の発現を増加させ；障害若しくは疾患に対する抵抗性を増加させ；ウイルス侵入に対する抵抗性を増加させ；変異を修正するか、又は遺伝子産物の生物学的特性を付与し、増加させ、除去し、若しくは低下させる好ましくないアミノ酸残基を改変し、例えば、酵素の酵素活性を増加させ、又は別の分子と相互作用する遺伝子産物の能力を増加させる配列を含み得る。

20

【0229】

鋳型核酸は、標的配列の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12又はそれ以上のヌクレオチドの配列の変化をもたらす配列を含み得る。

【0230】

鋳型ポリヌクレオチドは、任意の好適な長さ、例えば、約又は約10、15、20、25、50、75、100、150、200、500、1000超、又はそれ以上のヌクレオチド長のものであり得る。一実施形態において、鋳型核酸は、20+/-10、30+/-10、40+/-10、50+/-10、60+/-10、70+/-10、80+/-10、90+/-10、100+/-10、110+/-10、120+/-10、130+/-10、140+/-10、150+/-10、160+/-10、170+/-10、180+/-10、190+/-10、200+/-10、210+/-10、又は220+/-10ヌクレオチド長であり得る。一実施形態において、鋳型核酸は、30+/-20、40+/-20、50+/-20、60+/-20、70+/-20、80+/-20、90+/-20、100+/-20、110+/-20、120+/-20、130+/-20、140+/-20、150+/-20、160+/-20、170+/-20、180+/-20、190+/-20、200+/-20、210+/-20、又は220+/-20ヌクレオチド長であり得る。一実施形態において、鋳型核酸は、10~1,000、20~900、30~800、40~700、50~600、50~500、50~400、50~300、50~200、又は50~100ヌクレオチド長である。

30

40

【0231】

ある実施形態において、鋳型ポリヌクレオチドは、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。最適にアラインメントされる場合、鋳型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、約又は約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100超又はそれ以上のヌクレオチド）と重複し得る。ある実施形態において、鋳型配列及び標的配列を含むポリヌクレオチドが、最適にアラインメントされる場合、鋳型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、又はそれ以上のヌクレオ

50

チド以内にある。

【0232】

外因性ポリヌクレオチド鑄型は、統合される配列（例えば、変異遺伝子）を含む。統合のための配列は、細胞に対して内因性又は外因性である配列であり得る。統合される配列の例としては、タンパク質又は非コードRNA（例えば、マイクロRNA）をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。したがって、統合のための配列は、適切な1つ又は複数の制御配列に動作可能に結合され得る。或いは、統合される配列は、調節機能を提供し得る。

【0233】

上流又は下流の配列は、約20bp～約2500bp、例えば、約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、又は2500bpを含み得る。ある方法において、例示的な上流又は下流の配列は、約200bp～約2000bp、約600bp～約1000bp、又はより特に、約700bp～約1000を有する。

【0234】

上流又は下流の配列は、約20bp～約2500bp、例えば、約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、又は2500bpを含み得る。ある方法において、例示的な上流又は下流の配列は、約200bp～約2000bp、約600bp～約1000bp、又はより特に、約700bp～約1000を有する。

【0235】

特定の実施形態において、一方又は両方の相同性アームが、特定の配列反復要素を含むことを避けるために短縮され得る。例えば、5'相同性アームが、配列反復要素を避けるために短縮され得る。他の実施形態において、3'相同性アームが、配列反復要素を避けるために短縮され得る。ある実施形態において、5'及び3'相同性アームの両方が、特定の配列反復要素を含むことを避けるために短縮され得る。

【0236】

ある方法において、外因性ポリヌクレオチド鑄型は、マーカーをさらに含み得る。このようなマーカーにより、標的化される統合についてスクリーニングしやすくなり得る。好適なマーカーの例としては、制限部位、蛍光タンパク質、又は選択可能マーカーが挙げられる。本開示の外因性ポリヌクレオチド鑄型は、組み換え技術を用いて構築され得る（例えば、Sambrook et al., 2001 and Ausubel et al., 1996を参照）。

【0237】

特定の実施形態において、変異を修正するための鑄型核酸は、一本鎖オリゴヌクレオチドとしての使用のために設計され得る。一本鎖オリゴヌクレオチドを用いる場合、5'及び3'相同性アームは、最大で約200塩基対（bp）長の範囲、例えば、少なくとも25、50、75、100、125、150、175、又は200bp長であり得る。

【0238】

Suzuki et al. は、CRISPR/Cas9媒介性相同性に依存しない標的化された統合によるインビボゲノム編集を記載している（2016, Nature 540:144-149）。

【0239】

特殊なCasベースのシステム

ある実施形態において、システムは、特殊な機能又は活性を実施することが可能なCas-basedシステムである。例えば、Casタンパク質は、1つ以上の機能的ドメインに融合されるか、動作可能に連結されるか、又は他の形でそれと結合され得る。いくつかの例の実施形態において、Casタンパク質は、触媒的に死亡したCasタンパク質（

「dCas」)であり得るか、及び／又はニッカーゼ活性を有する。ニッカーゼは、二本鎖標的の1つのみの鎖を切断するCasタンパク質である。このような実施形態において、dCas又はニッカーゼは、機能的ドメインを、標的配列に又はそれに近接して送達する配列特異的な標的化機能性を提供する。Casタンパク質に融合されるか、動作可能に連結されるか、又は他の形でそれと結合され得る例の機能的ドメインは、限定はされないが、核局在シグナル(NLS)ドメイン、核外搬出シグナル(NES)ドメイン、翻訳活性化ドメイン、転写活性化ドメイン(例えばVP64、p65、MyoD1、HSF1、RTA、及びSET7/9)、翻訳開始ドメイン、転写抑制ドメイン(例えば、KRABドメイン、NuEドメイン、NcoRドメイン、及びSID4XドメインなどのSIDドメイン)、ヌクレアーゼドメイン(例えば、FokI)、ヒストン修飾ドメイン(例えば、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ)、光誘導性／制御可能ドメイン、化学物質誘導性／制御可能ドメイン、トランスポザーゼドメイン、相同的組み換え機構ドメイン、リコンビナーゼドメイン、インテグラーゼドメイン、及びそれらの組合せであり得るか又はそれを含み得る。触媒的に死亡したCas9又はニッカーゼCas9を生成するための方法(国際公開第2014/204725号パンフレット、Ran et al. Cell. 2013 Sept 12; 154(6): 1380-1389)、Cas12(Liu et al. Nature Communications, 8, 2095(2017)、及びCas13(国際特許公開番号国際公開第2019/005884号パンフレット及び国際公開第2019/060746号パンフレット)は、当該技術分野において公知であり、参照により本明細書に援用される。

10

20

【0240】

ある実施形態において、機能的ドメインは、以下の活性：メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、翻訳活性化活性、翻訳開始活性、翻訳抑制活性、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、ヌクレアーゼ活性、一本鎖RNA切断活性、二本鎖RNA切断活性、一本鎖DNA切断活性、二本鎖DNA切断活性、分子スイッチ活性、化学物質誘導性、光誘導性、及び核酸結合活性のうちの1つ以上を有し得る。ある実施形態において、1つ以上の機能的ドメインは、エピトープタグ又はレポーターを含み得る。エピトープタグの非限定的な例としては、ヒスチジン(His)タグ、V5タグ、FLAGタグ、インフルエンザ赤血球凝集素(HA)タグ、Mycタグ、VSV-Gタグ、及びチオレドキシン(Trx)タグが挙げられる。レポーターの例としては、限定はされないが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(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(GFP)、HcRed、DsRed、シアン色蛍光タンパク質(CFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、及び青色蛍光タンパク質(BFP)を含む自己蛍光タンパク質が挙げられる。

30

40

【0241】

1つ以上の機能的ドメインは、エフェクタータンパク質(例えば、Casタンパク質)の末端に、その近傍に、及び／又はそれに近接して位置決めされ得る。2つ以上の機能的ドメインを有する実施形態において、2つのそれぞれは、エフェクタータンパク質(例えば、Casタンパク質)の末端に又はその近傍に又はそれに近接して位置決めされ得る。機能的ドメインが、エフェクタータンパク質に動作可能に連結されるものなどの、ある実施形態において、1つ以上の機能的ドメインは、エフェクタータンパク質(例えば、Casタンパク質)に好適なリンカー(限定はされないが、GlySerリンカーを含む)を介してテザー又は結合され得る。2つ以上の機能的ドメインがある場合、機能的ドメインは、同じか又は異なり得る。ある実施形態において、全ての機能的ドメインが同じである。ある実施形態において、機能的ドメインの全てが、互いに異なる。ある実施形態において、機能的ドメインの少なくとも2つが、互いに異なる。ある実施形態において、機能的ドメインの少なくとも2つが、互いに同じである。

【0242】

他の好適な機能的ドメインは、例えば、国際特許公開番号国際公開第2019/018

50

423号パンフレットに見出され得る。

【0243】

分割CRISPR-Casシステム

ある実施形態において、CRISPR-Casシステムは、分割CRISPR-Casシステムである。例えば、Zetche et al., 2015. Nat. Biotechnol. 33(2):139-142及び国際特許公開国際公開第2019/018423号パンフレット（その組成物及び技術が、本発明において使用され、及び／又は本発明とともに使用するために適合され得る）を参照されたい。分割CRISPR-Casタンパク質は、本明細書及び本明細書においてさらに詳細に参照により援用される文献に記載される。特定の実施形態において、分割CRISPRタンパク質の各部分が、特定の結合対のメンバーに結合され、互いに結合される場合、特定の結合対のメンバーは、CRISPRタンパク質の部分を近接して維持する。特定の実施形態において、分割CRISPRタンパク質の各部分が、誘導性結合対と結合される。誘導性結合対は、誘導性結合対の両方のメンバーに結合するタンパク質又は小分子によってスイッチを「オン」又は「オフ」することが可能であるものである。ある実施形態において、CRISPRタンパク質は、好ましくは、ドメインをインタクトな状態に保ちながら、ドメイン間を分割し得る。特定の実施形態において、前記Cas分割ドメイン（例えば、Cas9の場合、RuvC及びHNHドメイン）は、前記分割Casドメインが藻類細胞内の標的核酸配列を処理するように、細胞中に同時に又は連続して導入され得る。野生型Casと比較して分割Casの減少したサイズは、本明細書に記載される細胞藻類細胞透過性ペプチドの使用などの、細胞へのシステムの送達の方法を可能にする。

10

20

【0244】

DNA及びRNA塩基編集

ある実施形態において、本明細書における他の箇所に記載される本発明のポリヌクレオチドは、塩基編集システムを用いて修飾され得る。ある実施形態において、Casタンパク質は、ヌクレオチドデアミナーゼに結合又は融合される。したがって、ある実施形態において、Casベースのシステムは、塩基編集システムであり得る。本明細書において使用される際、「塩基編集」は、修飾を作製するためにヌクレオチドを除去することを含まないCRISPR-Casベースの又はCasベースのシステムを介したポリヌクレオチド修飾のプロセスを一般に指す。塩基編集は、従来のCRISPR-Casシステムを用いて作製され得る過剰な望ましくない編集副産物を生成せずに、正確な位置で塩基対を変換し得る。

30

【0245】

いくつかの例の実施形態において、ヌクレオチドデアミナーゼは、限定はされないが、クラス2タイプII及びタイプVシステムなどのDNA結合Casタンパク質と組み合わせて使用されるDNA塩基エディターであり得る。2つの種類のDNA塩基エディターが、一般に公知である：シトシン塩基エディター（CBE）及びアデニン塩基エディター（ABE）。CBEは、C・G塩基対をT・A塩基対へと変換し（Komor et al., 2016. Nature. 533:420-424; Nishida et al., 2016. Science. 353; 及びLi et al., Nat. Biotech. 36:324-327）、ABEは、A・T塩基対をG・C塩基対へと変換する。共同で、CBE及びABEは、全ての4つの可能な転位変異（CからT、AからG、TからC、及びGからA）を媒介し得る。Rees and Liu, 2018. Nat. Rev. Genet. 19(12):770-788、特に、図1b、2a~2c、3a~3f、及び表1。ある実施形態において、塩基編集システムは、CBE及び／又はABEを含む。ある実施形態において、本明細書における他の箇所に記載される本発明のポリヌクレオチドは、塩基編集システムを用いて修飾され得る。Rees and Liu, 2018. Nat. Rev. Genet. 19(12):770-788。塩基エディターはまた、一般に、DNAドナー鋳型を必要とせず、及び／又は相同性指向性修復に依拠する。Komor et al., 2016. Nature. 533:420-424; Nishida

40

50

et al. 2016. Science. 353; 及び Gaudeli et al. 2017. Nature. 551: 464-471。DNAにおける標的遺伝子座への結合時に、システムのガイドRNA及び標的DNA鎖の間の塩基対形成が、「R-ループ」におけるssDNAの小さいセグメントの転位をもたらす。Nishimasu et al. Cell. 156: 935-949。ssDNAバブル内のDNA塩基が、デアミナーゼなどの酵素構成要素によって修飾される。あるシステムにおいて、触媒的に不活性化されたCasタンパク質は、変異体であり得、又は修飾Casは、ニッカーゼ機能性を有し得、非編集DNA鎖中にニックを生成して、鋳型として編集鎖を用いて、非編集鎖を修復するように細胞を誘導し得る。Komor et al. 2016. Nature. 533: 420-424; Nishida et al. 2016. Science. 353; 及び Gaudeli et al. 2017. Nature. 551: 464-471。

10

【0246】

他の例のタイプV塩基編集システムは、国際特許公開番号国際公開第2018/213708号パンフレット、国際公開第2018/213726号パンフレット、及び国際特許出願番号PCT/US2018/067207号明細書、PCT/US2018/067225号明細書、及びPCT/US2018/067307号明細書に記載され、これらはそれぞれ、参照により本明細書に援用される。

【0247】

いくつかの例の実施形態において、塩基編集システムは、RNA塩基編集システムであり得る。DNA塩基エディターと同様に、ヌクレオチド塩基を変換することが可能なヌクレオチドデアミナーゼは、Casタンパク質に融合され得る。しかしながら、これらの実施形態において、Casタンパク質は、RNAに結合することが可能である必要があるであろう。例のRNA結合Casタンパク質としては、限定はされないが、RNA結合Cas9、例えば、フランシセラ・ノビシダ (Francisella novicida) Cas9 (「FnCas9」)、及びクラス2タイプVI Casシステムが挙げられる。ヌクレオチドデアミナーゼは、シチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼ、又はシチジンデアミナーゼ活性を有するように操作されたアデノシンデアミナーゼであり得る。いくつかの例の実施形態において、RNA塩基エディターは、発現されたmRNA中で翻訳後修飾部位を除去又は導入するのに使用され得る。その編集が修飾細胞において永続的であるDNA塩基エディターと対照的に、RNA塩基エディターは、より細かい、一時的な制御が、例えば、特定の免疫応答を調節するのに必要とされ得る編集を提供することができる。例のタイプVI RNA-塩基編集システムは、Cox et al. 2017. Science 358: 1019-1027、国際特許公開番号国際公開第2019/005884号パンフレット、国際公開第2019/005886号パンフレット、及び国際公開第2019/071048号パンフレット、並びに国際特許出願番号PCT/US2018/05179号明細書及びPCT/US2018/067207号明細書に記載され、これらは、参照により本明細書に援用される。RNA塩基編集の目的のために適合され得る例のFnCas9システムは、参照により本明細書に援用される国際特許公開番号国際公開第2016/106236号パンフレットに記載される。

20

30

40

【0248】

CBE及びABEを再構成可能な半部へと分割するための分割インテイン手法の使用を含む、塩基編集システムの送達のための例の方法が、参照により本明細書に援用される Levy et al. Nature Biomedical Engineering doi.org/10.1038/s41441-019-0505-5 (2019) に記載される。

【0249】

プライムエディター

ある実施形態において、本明細書における他の箇所に記載される本発明のポリヌクレオチドは、プライム編集システムを用いて編集され得る。例えば、Anzalone et

50

al. 2019. Nature. 576: 149–157を参照されたい。塩基編集システムのように、プライム編集システムは、二本鎖破断を生成せずにポリヌクレオチドの標的化された修飾が可能であり得、ドナー鋳型を必要としない。さらなるプライム編集システムは、全ての12の可能な組合せ交換が可能であり得る。プライム編集は、「検索及び置換 (search-and-replace)」方法によって動作し得、標的化された挿入、欠失、全ての12の可能な塩基間変換及びそれらの組合せを媒介し得る。一般に、PE1、PE2、及びPE3 (Id.) によって例示されるように、プライム編集システムは、pegRNA上の伸長からの遺伝情報の直接コピーを、標的ポリヌクレオチドへと収容する (facility) ためにRNA-プログラム可能なニッカーゼ及びプライム編集伸長ガイドRNA (pegRNA) と融合されるか又は他の形で連結されるか又は結合された逆転写酵素を含み得る。本発明とともに使用され得る実施形態は、これら及びその変異体を含む。プライム編集は、従来のCRISPR-Casシステムと比較して少ない副産物及びより高い又は同様の効率とともに、従来のCRISPR-Casシステムより低いオフターゲット活性の利点を有し得る。

10

20

30

40

50

【0250】

ある実施形態において、プライム編集ガイド分子は、両方の標的ポリヌクレオチド情報 (例えば、配列) を規定し得、標的ポリヌクレオチドを置き換える新しいポリヌクレオチドカーゴを含有し得る。ガイド分子から標的ポリヌクレオチドへの移動を開始させるために、PEシステムは、3' ヒドロキシル基を露出するために標的部位において標的ポリヌクレオチドをニックし得、これは、直接、標的ポリヌクレオチド中の標的部位へのガイド分子 (例えば、プライム編集ガイド分子又はpegガイド分子) の編集コード伸長領域の逆転写をプライムし得る。例えば、Anzalone et al. 2019. Nature. 576: 149–157、特に、図1b、1c、関連する説明、及び補足説明を参照されたい。

【0251】

ある実施形態において、プライム編集システムは、ニッカーゼ活性、逆転写酵素、及びガイド分子を有するCasポリペプチドから構成され得る。Casポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性を欠き得る。ガイド分子は、標的結合配列並びにプライマー結合配列及び編集されたポリヌクレオチド配列を含有する鋳型を含み得る。ガイド分子、Casポリペプチド、及び／又は逆転写酵素は、一緒に連結されるか又は他の形で互いに結合して、エフェクター複合体を形成し、標的配列を編集し得る。ある実施形態において、Casポリペプチドは、クラス2、タイプV Casポリペプチドである。ある実施形態において、Casポリペプチドは、Cas9ポリペプチドである (例えば、Cas9ニッカーゼである)。ある実施形態において、Casポリペプチドは、逆転写酵素に融合される。ある実施形態において、Casポリペプチドは、逆転写酵素に結合される。

【0252】

ある実施形態において、プライム編集システムは、PE1システム若しくはその変異体、PE2システム若しくはその変異体、又はPE3 (例えば、PE3、PE3b) システムであり得る。例えば、Anzalone et al. 2019. Nature. 576: 149–157、特に、2～3頁、図2a、3a～3f、4a～4b、拡大データ図3a～3b、4を参照されたい。

【0253】

pegガイド分子は、約10～約200又はそれ以上のヌクレオチド長、例えば、10から／又は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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、

102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、
 112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、
 122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、
 132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、
 142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、
 152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、
 162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、
 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、
 182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、
 192、193、194、195、196、197、198、199、若しくは200又は
 はそれ以上のヌクレオチド長であり得る。pegガイド分子の最適化は、Anzalone
 et al. 2019. Nature. 576:149-157、特に、3頁、図2
 a～2b、及び拡大データ図5a～cに記載されるように達成され得る。

【0254】

CRISPR関連トランスポザーゼ（CAST）システム

ある実施形態において、本明細書における他の箇所に記載される本発明のポリヌクレオチドは、CRISPR関連トランスポザーゼ（「CAST」）システムを用いて修飾され得る。CASTシステムは、触媒的に不活性であるか、又は触媒的に活性であるように操作されたCasタンパク質を含み得、RNAガイドDNA転位を触媒するトランスポザーゼ（又はそのサブユニット）をさらに含む。このようなシステムは、宿主細胞修復機構に依拠せずにDNA分子中の標的部位にDNA配列を挿入することが可能である。CASTシステムクラス1又はクラス2 CASTシステムであり得る。例のクラス1システムが、参照により本明細書に援用されるKlompe et al. Nature, doi: 10.1038/s41586-019-1323に記載される。例のクラス2システムが、参照により本明細書に援用される、Strecker et al. Science. 10/1126/science.aax9181（2019）、及びPCT/US2019/066835号明細書に記載される。

【0255】

IscBs

ある実施形態において、本明細書における核酸ガイドヌクレアーゼは、IscBタンパク質であり得る。IscBタンパク質は、本明細書に記載されるXドメイン及びYドメインを含み得る。いくつかの例では、IscBタンパク質は、1つ以上のガイド分子とともに複合体を形成し得る。ある場合には、IscBタンパク質は、足場分子として働き、ガイド配列を含む1つ以上のhRNA分子とともに複合体を形成し得る。いくつかの例では、IscBタンパク質は、CRISPR関連タンパク質であり、例えば、ヌクレアーゼの遺伝子座が、CRISPRアレイに関連している。いくつかの例では、IscBタンパク質は、CRISPRに関連していない。

【0256】

いくつかの例では、IscBタンパク質は、全体が参照により本明細書に援用される、Kapitonov VV et al., ISC, a Novel Group of Bacterial and Archaeal DNA Transposons That Encode Cas9 Homologs, J Bacteriol. 2015 Dec 28; 198(5):797-807. doi: 10.1128/JB.00783-15に記載されるIscBタンパク質のホモログ又はオルソログであり得る。

【0257】

ある実施形態において、IscBsは、1つ以上のドメイン、例えば、Xドメイン（例えば、N末端における）、RuvCドメイン、架橋ヘリックスドメイン、及びYドメイン（例えば、C末端における）の1つ以上を含み得る。いくつかの例では、核酸ガイドヌクレアーゼは、N末端Xドメイン、RuvCドメイン（例えば、RuvC-I、RuvC-II、及びRuvC-IIサブドメインを含む）、架橋ヘリックスドメイン、及びC末

10

20

30

40

50

端 Y ドメインを含む。いくつかの例では、核酸ガイドヌクレアーゼは、N 末端 X ドメイン、RuvC ドメイン（例えば、RuvC-I、RuvC-II、及び RuvC-III サブドメインを含む）、架橋ヘリックスドメイン、HNH ドメイン、及び C 末端 Y ドメインを含む。

【0258】

ある実施形態において、核酸ガイドヌクレアーゼは、小さいサイズを有し得る。例えば、核酸ガイドヌクレアーゼは、50 以下、100 以下、150 以下、200 以下、250 以下、300 以下、350 以下、400 以下、450 以下、500 以下、550 以下、600 以下、650 以下、700 以下、750 以下、800 以下、850 以下、900 以下、950 以下、又は 1000 以下のアミノ酸長であり得る。

10

【0259】

いくつかの例では、IscB タンパク質は、表 5 から選択される IscB タンパク質との少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を共有する。

20

30

40

50

【表 2】

表 5.		
番号	タンパク質	配列
1	IscB (-HNH) EFH81386	MSTDATLIRTPSHAEADATDTLVATPLMPRRVISWPWGPGEQSLMRIPVVDIRGMALMPCTPAKARHL LKSGNARPKRNKLGIFYVQLSYEQEPDNQSLVAGVDPGSKFEGLSVVGTKDVTNLNMEAPDHVKGAVQTR RTMRARRQRKWRPFRFHNRLNMQRIPPSTRSRWEAKARIVAHRLTILPFTDVVVEDVQAVTRKGKGGT WNGSFSPVQVGKEHLYRLLRAMGLTLHLREGWQTKELREQHGLKTKSKSKQSFSHAVDSWVLAASISGA EHPTCTRLWYMPAILHRRQLHRLQASKGGVRKPYGGTRSLGVKRGTLVEHKKYGRCTVGGVDRKNTISL HEYRTNRLTQAAKVETCRVLTWLSWRSWLLRGKRTSSKGGKSHSS (配列番号 45)
2	IscB (+HNH) TAE54104. 1	MQPAKQQNWVFQINGDKQPLDMINPGRCRELQNRGKLASFRRFPYVVIQQQTIENTPQTKEYILKIDPGSQW TGFAICQGNLILFRAELNHRGEAIKFDLVKRAWFRRRRSRNLRYRKKRLNRAKPEGWLAPSIHRHVLTV TWIKRFMYCPIAWIEIEQVRFDQTLANPEIDGVEYQQGELQGYEVREYLLQKWGRKCAVCGTENPVEV EHIQSKSGGSSRIGNLTLACHVCNVKGNLDVRDFL AKSPDILNQV LENSTKPLKD AAVNSTRYA IVKMAKSICENVKSSGARTKMNRVROGLEKTHSLDAACVGESGASIRVLTDRPLITCKGHGSRQSIRVN ASGFPAVNAKTVFTHIAAGDVVRFTIGKDRKKAQAGTYTARVKTPTPKGFEVLIDGAR ISLSTMSNVFVHRSDGYGY EL (配列番号 46)
3	IscB (+HNH) WP_038093640. 1	MAVFVIDKHKRLMPCSEKRARLLERGRAVVRQVPFVIRLKDRTVQHSVQPLRVALDPGSRATGMALV REKNTVDGTGEVYRERIALNLFELVHRGHIREQLDQRRNFRRRRRGANLRYRAPRFDNRPPGWLAPS LQHRVDTMAWVRLCRWAPASAIETVRFDQTLQNPESGVEYQQGALAGCEVREYLLEKWRKCAVY GAENVPLEIEHIVPKSRGGSDRVSNLALACRACNAKGNRDVRAFLADQPERLARILAQAKAPLKDAAVN ATRWALYRALVDTGLPVEAGTGGRTKWNTRLGLPKTHALDALCVGQVDQVRHWRVPVLGIRACGRSYRR TRLTRHCFPRGYLTRNKSAGFQGTGDLIRAVVTGKKAGTYLGRITRASGSFNIQTPMGVVQGIHHRFCT LLQRADGYGYFVQP KPTAALSSP RLKAGVSSAG N (配列番号 47)
4	IscB (+HNH) WP_052490348. 1	MTNVVVIDTNQKPLQPCSAAVARKLLRGKAAMFRYPVAVIILKKEVDSVGKPKIELRIDPGSKYTGF LVDSKDNADFIWGTLEHGAATCKELTKRSAIRSRNRKTRYRKKRFERRKPEGWLAPSLQHRVDTTL TWVKRICKFVPIMSISVEQVKFDLQKLENSDIQIEYQQGTLAGYTLREALLEHWGRKCAVCDENVFLEI EHIYPKSKGGSDKFSNLTACHKCNINKGNSIDEFLSDHHRLEQIKLHQKTKLDAAVNATRKKLVT LQEKTFNLVSDGASTKMTRLSSSLAKRHWIDAGCVNTTLIVILKTLQPLQVCKNGHGNKQFVTMDAYGF PRKSYEPKVRKDWKAGDIIRVTCKDGTMLMGRVKAACKLVYIPFGGKEASFSS ENAKAIHRSDGYRYSFAAID SELLQKMAT (配列番号 48)
5	IscB (+HNH) WP_015325818. 1	MPNKYAFVLDSKGLDPTKSKAWYLIRKGKASLVEEYPLIILKREVPKDQVNSDKLILGIDDGTTKVG FALVQKCQTKNKVLFKAVMEQRQDVSKMEERRGYRRYRSHKRYRPARFDRSSSKRKGRIPPSILQKKQ AILRVVNKLKKYIRIDKIVLEDVSDIRKLTEGRELYNWEYQESNRDENLRKATLYRDDCTCQLCGTTET MLHAHHIMPRDGGADSIYNLITLCKACHKDKVDNNEYQYKQFLAIIIDSKELSDLKSASHVMQGKTWLRD KLSKIAQLEITSGGNTANKRIDYIEKSHSNDICTTGLLPVDNIDDIKEYIYKPLRKKSKAKIKELKCFR QRDLVKYTKRNGETYTYITSLRIKNNKYNSKVCNFSTLKGKIFRGYGRNLTLNRPKGLMIV (配列 番号 49)
6	sp G3ECR1 CAS9_ STRTR	MLFNKCIISINLDFSNEKCMTPYSIGLDIGTNSVGWAVITDNYKVPSSKMKVLGNTSKYIKKNLLGV LLFDSGITAEGRRLKRTARRRYTRRRNRILYLQEIFSTEMATLDDAFFQRLDSDFLVPDDKRD SKYIFGN LVEEKVYHDEFPTIYHLRKYLADSTKADRLVYLALAHMIKYRGHFLIEGEFNSKNNDIQKNFQDFLDY NAIFESDLSLENSKQLEEIVKDKISKLEKKDRILKLPGEKNSGIFSEFLKLI VGNQADFRKCFNLDEKAS LHFSKESYDEDELETLGYIGDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVDNTEAPLSSAMIKRYNEHKEDLAL LKEYIRNLSLKYNEVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYLKNLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTF DNGSIPYQIHLQEMRAILDQKQAFYPFLAKNKERIEKILTFRIPYVYVGLARGNSDFAWSIRKRNEKITPW

10

20

30

40

		NFEDVIDKESSAEAFINRMTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETFNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSKQKKD IVRLYFKDKRKVTDKDIEYLHAIYGYDIELKGIEKFNSSLSTYHDLNLIINDKEFLDSSNEAIIIEI IHTLTIFEDREMIKQRLSKFENIFDKSVLKKLSRRHYTGWGLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLDGGSN RNFMLIHDDALSFKKKIQKAQIGDEDKGNIKEVVKSLPGSPAIIKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESI VVEMARENQYTNQGKSNSQRLKRLKELSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQNGKDMYT GDDLDIDRLSNYDIDHIIPQAFKDNSIDNKVLVSSASNRGKSDDFPSLEVVKRKTFWYQLLKSKLISQR KFDNLTKAERGGLLPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVARLLDEKFNKKDENNRVRTVKIITLSTLVSQF RKDFELYKVREINDFHHAHDAYLNAVIAALLKKYPKLEPEFVYGDYPKYNSFRERKSATEKVYFYSNIMN IFKKSISLADGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLATVRRVLSYPQVNVVKVEEQNHGLDRGPKGLFN ANLSSKPKPNSNENLVGAKEYLDPKKYGGYAGISNSFAVLVKGTIEKGAKKKITNVLEFGQGISILDRINR KDKLNFLEKGYKDIELIIELPKYSLEFSDGSRRLASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFVKLLYHAKR ISNTINENHRKYVENHKKFEELFYIIEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQNSHIDELCSSFIGPTGSE KGLFELTSRGSAADEFELGVKIPRYRDTTPSSLLKDATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGEG (配列番号 50)
7	sp J7RUA5 CAS9_ STAAU	MKRYNIIIGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRSRKRGARRLKRHHRIQRVKLL FDYNLLTDHSELSGINPYEARVGLSQKLSEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEDTGNELSTKEQISRNS KALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFTSDYVKEAKQLLVQKAYHQLDQSFIDTYIDLETRTYE GPGEQSPFGWKDIKEWYMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEFKQII ENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKIDITARKEIENAELLDQIAKIL TIYQSSEDIQEELTNLSELTEQEEIEQISNLKGYTGTHNLSKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVK KVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIIELAKEKNSKDAQKMINEMQKR NRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFYEVDDHIIPRSVSFDNS FNNKVLVKQEENSCKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHIILNAKGKGRISKTKEYLLEERDINRFSVQK DFINRNLVDTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGKHHAEALIAN ADFIKKEWKKLDAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKSHRVDKKNR ELINDTLSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLINKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGEKN PLYKYEETGNYLTKYSKKNPVIKKIKYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLSLKPVRFDVLDNGVY KFTVTKNLDVICKENYEVNSKCYEEAKKLLKISNQAEIFIASFYNNDLKINGELYRVIGVNNDLNRIEV NMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG (配列番号 51)
8	Streptococcus_p yogenes_SF370	KYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTR RKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS TDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFITQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQSKDITYDDDLNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDF YPFLKDNREKIEKILTFRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDK NLPNEKVLPHKHSLLYEFYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKK IECFDSVEISGVEDRFNASLGTYYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKYAHL FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDLSHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQGGQKNSRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLLKDDSIDNK VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIQRQLVETRQ ITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVGTAL IKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGE TGEIVWDKGRDFATVRKVLSPMPQVNVKKEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV

10

20

30

40

		AYSVLVAVKVEKGSKKLSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFLENR KRLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 52)
--	--	---

50

【表 3】

表 5 (続き)		
番号	タンパク質	ドメイン及びアミノ酸位置
1	IscB(-HNH) EFH81386	X ドメイン: 51-97 RuvC-I: 104-118 架橋ヘリックス: 140-160 RuvC-II: 169-212 RuvC-III: 226-278
2	IscB(+HNH) TAE54104.1	X ドメイン: 11-56 RuvC-I: 63-77 架橋ヘリックス: 100-121 RuvC-II: 129-172 HNH: 211-243 RuvC-III: 279-321
3	IscB(+HNH) WP_038093640.1	X ドメイン: 4-50 RuvC-I: 57-71 架橋ヘリックス: 108-129 RuvC-II: 138-181 HNH: 220-252 RuvC-III: 288-330
4	IscB(+HNH) WP_052490348.1	X ドメイン: 7-52 RuvC-I: 59-73 架橋ヘリックス: 100-121 RuvC-II: 129-172 HNH: 211-243 RuvC-III: 279-322
5	IscB(+HNH) WP_015325818.1	X ドメイン: 7-52 RuvC-I: 61-75 架橋ヘリックス: 101-121 RuvC-II: 132-175 HNH: 215-247 RuvC-III: 284-327
6	sp G3ECR1 CAS9_STRTR	RuvC-I: 28-42 架橋ヘリックス: 85-108 Rec: 118-736 RuvC-II: 750-799 HNH: 864-896 RuvC-III: 957-1019 PAM 相互作用 (PI): 1119-1409
7	sp J7RUA5 CAS9_STAAU	RuvC-I: 7-21 架橋ヘリックス: 49-72 Rec: 80-433 RuvC-II: 445-493 HNH: 553-585

10

20

30

40

50

		RuvC-III: 654-709 PAM 相互作用 (PI): 789-1053
8	Streptococcus_pyogenes_SF370	RuvC-I: 4-18 架橋ヘリックス: 61-84 Rec: 94-718 RuvC-II: 725-774 HNH: 833-865 RuvC-III: 926-988 PAM 相互作用 (PI): 1099-1365

10

【0260】

Xドメイン

ある実施形態において、I s c Bタンパク質は、例えば、そのN末端にXドメインを含む。

【0261】

特定の実施形態において、Xドメインは、表5中のXドメインを含む。Xドメインの例は、当該技術分野において記載されるXドメインとの構造的類似性及び／又は配列類似性を有する任意のポリペプチドも含む。いくつかの例では、Xドメインは、表5中のXドメインとの少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも5%、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95%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有し得る。

20

【0262】

いくつかの例では、Xドメインは、10以下、20以下、30以下、40以下、50以下、60以下、70以下、80以下、90以下、又は100以下のアミノ酸長であり得る。例えば、Xドメインは、例えば、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、又は50アミノ酸長を含む、50以下のアミノ酸長であり得る。

30

【0263】

Yドメイン

ある実施形態において、I s c Bタンパク質は、例えば、そのC末端にYドメインを含む。

【0264】

特定の実施形態において、Xドメインは、表5中のYドメインを含む。Yドメインの例は、当該技術分野において記載されるYドメインとの構造的類似性及び／又は配列類似性を有する任意のポリペプチドも含む。いくつかの例では、Yドメインは、表5中のYドメインとの少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも5%、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95%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有し得る。

40

【0265】

R u v Cドメイン

ある実施形態において、I s c Bタンパク質は、少なくとも1つのヌクレアーゼドメインを含む。特定の実施形態において、I s c Bタンパク質は、少なくとも2つのヌクレアーゼドメインを含む。特定の実施形態において、1つ以上のヌクレアーゼドメインは、補因子が存在するときのみ活性化する。特定の実施形態において、補因子は、マグネシウム(Mg)である。2つ以上のヌクレアーゼドメインが存在し、基質が二本鎖ポリヌクレオ

50

チドである実施形態において、ヌクレアーゼドメインはそれぞれ、二本鎖ポリヌクレオチドの異なる鎖を切断する。特定の実施形態において、ヌクレアーゼドメインは、RuvCドメインである。

【0266】

IscBタンパク質は、RuvCドメインを含み得る。RuvCドメインは、複数のサブドメイン、例えば、RuvC-I、RuvC-II及びRuvC-IIIを含み得る。サブドメインは、タンパク質のアミノ酸配列上で介在する配列によって隔てられ得る。

【0267】

特定の実施形態において、RuvCドメインの例は、表5中のものを含む。RuvCドメインの例は、当該技術分野において記載されるRuvCドメインとの構造的類似性及び／又は配列類似性を有する任意のポリペプチドも含む。例えば、RuvCドメインは、Cas9のRuvCとの構造的類似性及び／又は配列類似性を共有し得る。いくつかの例では、RuvCドメインは、表5中のRuvCドメインとの少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも5%、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95%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有し得る。

【0268】

架橋ヘリックス

IscBタンパク質は、架橋ヘリックス(BH)ドメインを含む。架橋ヘリックスドメインは、ヘリックス及びアルギニンリッチポリペプチドを指す。架橋ヘリックスドメインは、核酸ガイドヌクレアーゼ中のアミノ酸ドメインのいずれか1つに隣接して位置し得る。ある実施形態において、架橋ヘリックスドメインは、RuvCドメインに隣接して、例えば、RuvC-I、RuvC-II、又はRuvC-IIIサブドメインに隣接している。一例において、架橋ヘリックスドメインは、RuvC-1及びRuvC2サブドメインの間にある。

【0269】

架橋ヘリックスドメインは、10~100、20~60、30~50、例えば、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46又は47、48、49、又は50アミノ酸長であり得る。架橋ヘリックスの例は、化膿レンサ球菌(S. pyogenes) Cas9の配列のアミノ酸60~93のポリペプチドを含む。

【0270】

特定の実施形態において、BHドメインの例は、表5中のものを含む。BHドメインの例は、当該技術分野において記載されるBHドメインとの構造的類似性及び／又は配列類似性を有する任意のポリペプチドも含む。例えば、BHドメインは、Cas9のBHドメインとの構造的類似性及び／又は配列類似性を共有し得る。いくつかの例では、BHドメインは、表5中のBHドメインとの少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも5%、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95%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有し得る。

【0271】

HNHDドメイン

IscBタンパク質は、HNHDドメインを含む。特定の実施形態において、少なくとも1つのヌクレアーゼドメインは、当該技術分野において記載されるHNHDドメインとのかなりの構造的類似性又は配列類似性を共有する。

【0272】

いくつかの例では、核酸ガイドヌクレアーゼは、HNHDドメイン及びRuvCドメインを含む。RuvCドメインがRuvC-I、RuvC-II、及びRuvC-IIIドメインを含む場合、HNHDドメインは、RuvCドメインのRuvC-II及びRuvC-IIIサブドメインの間に位置し得る。

【0273】

特定の実施形態において、HNHDメインの例は、表5中のものを含む。HNHDメインの例は、当該技術分野において記載されるHNHDメインとの構造的類似性及び／又は配列類似性を有する任意のポリペプチドも含む。例えば、HNHDメインは、Cas9のHNHDメインとの構造的類似性及び／又は配列類似性を共有し得る。いくつかの例では、HNHDメインは、表5中のHNHDメインとの少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも5%、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95%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有し得る。

【0274】

hRNA

10

いくつかの例では、IsCBタンパク質は、1つ以上のhRNA分子とともに複合体を形成することが可能である。hRNA複合体は、ガイド配列及びIsCBポリペプチドと相互作用する足場を含み得る。hRNA分子は、IsCBポリペプチドヌクレアーゼ又はIsCBポリペプチドとともに複合体を形成し、標的配列と結合するように複合体に指向させ得る。いくつかの例の実施形態において、hRNA分子は、足場配列及びスパーサー配列を含む単一の分子である。いくつかの例の実施形態において、スパーサーは、足場配列の5'側にある。いくつかの例の実施形態において、hRNA分子は、足場及びスパーサー位置の間に保存された核酸配列をさらに含み得る。

【0275】

本明細書において使用される際、異種hRNA分子は、IsCBポリペプチドヌクレアーゼと同じ種に由来しないhRNA分子であり、又はIsCBポリペプチドヌクレアーゼ、例えば、IsCBタンパク質と同じ種に由来しない分子の一部、例えば、スパーサーを含む。例えば、種Aに由来するIsCBポリペプチドヌクレアーゼの異種hRNA分子は、種A、又は人工ポリヌクレオチドと異なる種に由来するポリヌクレオチドを含む。

20

【0276】

TALEヌクレアーゼ

ある実施形態において、TALEヌクレアーゼ又はTALEヌクレアーゼシステムは、ポリヌクレオチドを修飾するのに使用され得る。ある実施形態において、本明細書において提供される方法は、改善された効率及び拡大された特異性を有する核酸配列の標的化を可能にするそれらの組織構造の一部としてTALEモノマー又はTALEモノマー又はハーフモノマーを含む単離された、非天然、組み換え又は操作DNA結合タンパク質を使用する。

30

【0277】

天然TALE又は「野生型TALE」は、多くの種のプロテオバクテリアによって分泌される核酸結合タンパク質である。TALEポリペプチドは、主に、33、34又は35アミノ酸長であり、主にアミノ酸の12及び13位において互いに異なる高度に保存されたモノマーポリペプチドのタンデムリピートから構成される核酸結合ドメインを含有する。有利な実施形態において、核酸は、DNAである。本明細書において使用される際、「ポリペプチドモノマー」、「TALEモノマー」又は「モノマー」という用語は、TALE核酸結合ドメイン内の高度に保存された反復ポリペプチド配列を指すために使用され、「リピート可変二残基」又は「RVD」という用語は、ポリペプチドモノマーの12及び13位における高度可変アミノ酸を指すために使用される。本開示全体を通して提供される際、RVDのアミノ酸残基は、アミノ酸についてIUPAC一文字コードを用いて示される。DNA結合ドメイン内に含まれるTALEモノマーの一般的表現は、 $X_{1 \sim 11} - (X_{12} X_{13}) - X_{14 \sim 33}$ 又は 34 又は 35 であり、ここで、下付き文字は、アミノ酸位置を示し、Xが、任意のアミノ酸を表す。 $X_{12} X_{13}$ が、RVDを示す。いくつかのポリペプチドモノマーにおいて、13位における可変アミノ酸は、欠失しているか又は存在せず、このようなモノマーにおいて、RVDは、単一のアミノ酸からなる。このような場合、RVDは、或いは X^* として表され得、ここで、Xが、 X_{12} を表し、(*)は、 X_{13} が存在しないことを示す。DNA結合ドメインは、TALEモノマーのいくつか

40

50

の反復を含み、これは、 $(X_{11} \sim 11 - (X_{12} X_{13}) - X_{14} \sim 33$ 又は 34 又は $35)$ $_z$ として表され得、ここで、有利な実施形態において、 z が、少なくとも $5 \sim 40$ である。さらなる有利な実施形態において、 z が、少なくとも $10 \sim 26$ である。

【0278】

T A L E モノマーは、その R V D におけるアミノ酸の同一性によって決定されるヌクレオチド結合親和性を有し得る。例えば、N I の R V D を有するポリペプチドモノマーは、アデニン (A) に優先的に結合し得、N G の R V D を有するモノマーは、チミン (T) に優先的に結合し得、H D の R V D を有するモノマーは、シトシン (C) に優先的に結合し得、N N の R V D を有するモノマーは、アデニン (A) 及びグアニン (G) の両方に優先的に結合し得る。ある実施形態において、I G の R V D を有するモノマーは、T に優先的に結合し得る。したがって、T A L E の核酸結合ドメインにおけるポリペプチドモノマー反復の数及び順序が、その核酸標的特異性を決定する。ある実施形態において、N S の R V D を有するモノマーは、全ての4つの塩基対を認識し得、A、T、G 又は C に結合し得る。T A L E の構造及び機能は、例えば、Moscou et al., Science 326:1501 (2009); Boch et al., Science 326:1509-1512 (2009); 及び Zhang et al., Nature Biotechnology 29:149-153 (2011) にさらに記載される。

【0279】

本発明の方法において使用されるポリペプチドは、特異的核酸配列を標的とするように設計されるポリペプチドモノマー反復を含有する核酸又は DNA 結合領域を有する単離された、非天然、組み換え又は操作核酸結合タンパク質であり得る。

【0280】

本明細書に記載されるように、H N 又は N H の R V D を有するポリペプチドモノマーは、グアニンに優先的に結合し、それによって、標的核酸配列を含有するグアニンに対して高い結合特異性を有する T A L E ポリペプチドの生成を可能にする。ある実施形態において、R V D R N、N N、N K、S N、N H、K N、H N、N Q、H H、R G、K H、R H 及び S S を有するポリペプチドモノマーは、グアニンに優先的に結合し得る。ある実施形態において、R V D R N、N K、N Q、H H、K H、R H、S S 及び S N を有するポリペプチドモノマーは、グアニンに優先的に結合し得、したがって、標的核酸配列を含有するグアニンに対する高い結合特異性を有する T A L E ポリペプチドの生成を可能にし得る。ある実施形態において、R V D H H、K H、N H、N K、N Q、R H、R N、及び S S を有するポリペプチドモノマーは、グアニンに優先的に結合し得、それによって、標的核酸配列を含有するグアニンに対する高い結合特異性を有する T A L E ポリペプチドの生成を可能にする。ある実施形態において、グアニンに対する高い結合特異性を有する R V D は、R N、N H R H 及び K H である。さらに、N V の R V D を有するポリペプチドモノマーは、アデニン及びグアニンに優先的に結合し得る。ある実施形態において、H*、H A、K A、N*、N A、N C、N S、R A、及び S* の R V D を有するモノマーは、同等の親和性でアデニン、グアニン、シトシン、及びチミンに結合する。

【0281】

核酸又は DNA 結合ドメインの1つ以上のポリペプチドモノマーの所定の N 末端から C 末端の順序が、本発明のポリペプチドが結合することになる対応する所定の標的核酸配列を決定する。本明細書に記載されるように、モノマー及び少なくとも1つ以上の半モノマーは、ゲノム遺伝子座又は対象とする遺伝子「を標的とするように特異的に順序付けられる (specifically ordered)」。植物ゲノムにおいて、天然 T A L E 結合部位は、常に、チミン (T) から開始し、これは、T A L E ポリペプチドの非反復 N 末端内の潜在性シグナル (cryptic signal) によって規定され得；ある場合には、この領域は、リピート 0 と呼ばれ得る。動物ゲノムにおいて、T A L E 結合部位は、必ずしも、チミン (T) から開始する必要はなく、本発明のポリペプチドは、T、A、G 又は C から開始する DNA 配列を標的とし得る。T A L E モノマーのタンデムリピートは、常に、反復完全長 T A L E モノマーの最初の 20 アミノ酸のみと同一性を共有し

得る半分長のリピート又は配列のストレッチで終端し、この半リピートは、半モノマーと呼ばれ得る。したがって、標的化される核酸又はDNAの長さは、完全モノマーの数プラス2と等しいということになる。

【0282】

Zhang et al., Nature Biotechnology 29:149-153 (2011)に記載されるように、TALEポリペプチド結合効率は、操作TALE DNA結合領域の位置N末端又はC末端において操作TALEへの天然TALEのDNA結合領域の直接N末端又はC末端にある「キャッピング領域」からのアミノ酸配列を含むことによって増加され得る。したがって、特定の実施形態において、本明細書に記載されるTALEポリペプチドは、N末端キャッピング領域及び／又はC末端キャッピング領域をさらに含む。

10

【0283】

N末端キャッピング領域の例示的なアミノ酸配列は、以下である：

M D P I R S R T P S P A R E L L S G P Q P D G V Q P T A D R G V S P P A
G G P L D G L P A R R T M S R T R L P S P P A P S P A F S A D S F S D L
L R Q F D P S L F N T S L F D S L P P F G A H H T E A A T G E W D E V
Q S G L R A A D A P P P T M R V A V T A A R P P R A K P A P R R R A A
Q P S D A S P A A Q V D L R T L G Y S Q Q Q Q E K I K P K V R S T V A
Q H H E A L V G H G F T H A H I V A L S Q H P A A L G T V A V K Y Q D
M I A A L P E A T H E A I V G V G K Q W S G A R A L E A L L T V A G E L
R G P P L Q L D T G Q L L K I A K R G G V T A V E A V H A W R N A L T
G A P L N (配列番号53)

20

【0284】

C末端キャッピング領域の例示的なアミノ酸配列は、以下である：

R P A L E S I V A Q L S R P D P A L A A L T N D H L V A L A C L G G R P
A L D A V K K G L P H A P A L I K R T N R R I P E R T S H R V A D H A Q
V V R V L G F F Q C H S H P A Q A F D D A M T Q F G M S R H G L L Q L
F R R V G V T E L E A R S G T L P P A S Q R W D R I L Q A S G M K R A
K P S P T S T Q T P D Q A S L H A F A D S L E R D L D A P S P M H E G
D Q T R A S (配列番号54)

30

【0285】

本明細書において使用される際、N末端キャッピング領域の所定の「N末端」から「C末端」配向、反復TALEモノマー及びC末端キャッピング領域を含むDNA結合ドメイン、本発明のd-TALE又はポリペプチドにおける異なるドメインの組織化のための構造的基盤を提供する。

【0286】

全体的なN末端及び／又はC末端キャッピング領域は、DNA結合領域の結合活性を必ずしも高めるわけではない。したがって、特定の実施形態において、N末端及び／又はC末端キャッピング領域のフラグメントは、本明細書に記載されるTALEポリペプチドに含まれる。

40

【0287】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるTALEポリペプチドは、N末端キャッピング領域の少なくとも10、20、30、40、50、54、60、70、80、87、90、94、100、102、110、117、120、130、140、147、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260又は270のアミノ酸を含むN末端キャッピング領域フラグメントを含有する。特定の実施形態において、N末端キャッピング領域フラグメントアミノ酸は、N末端キャッピング領域のC末端(DNA結合領域近位端)のものである。Zhang et al., Nature Biotechnology 29:149-153 (2011)に記載されるように、C末端240アミノ酸を含むN末端キャッピング領域フラグメン

50

トは、完全長キャッピング領域と等しい結合活性を高める一方、C末端147アミノ酸を含むフラグメントは、完全長キャッピング領域の有効性の80%超を保持し、C末端117アミノ酸を含むフラグメントは、完全長キャッピング領域の活性の50%超を保持する。

【0288】

ある実施形態において、本明細書に記載されるT A L Eポリペプチドは、C末端キャッピング領域の少なくとも6、10、20、30、37、40、50、60、68、70、80、90、100、110、120、127、130、140、150、155、160、170、180のアミノ酸を含むC末端キャッピング領域フラグメントを含有する。特定の実施形態において、C末端キャッピング領域フラグメントアミノ酸は、C末端キャッピング領域のN末端（DNA結合領域近位端）のものである。Zhang et al., Nature Biotechnology 29:149-153 (2011)に記載されるように、C末端68アミノ酸を含むC末端キャッピング領域フラグメントは、完全長キャッピング領域と等しい結合活性を高める一方、C末端20アミノ酸を含むフラグメントは、完全長キャッピング領域の有効性の50%超を保持する。

10

【0289】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるT A L Eポリペプチドのキャッピング領域は、本明細書において提供されるキャッピング領域配列に対して同一の配列を有する必要はない。したがって、ある実施形態において、本明細書に記載されるT A L Eポリペプチドのキャッピング領域は、本明細書において提供されるキャッピング領域アミノ酸配列に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるか又は同一性を共有する配列を有する。配列同一性は、配列相関性に関連する。相関性比較は、目測で、又はより通常は、容易に利用可能な配列比較プログラムを用いて行われ得る。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間のパーセント(%)相関性を計算し得、また、2つ以上のアミノ酸又は核酸配列によって共有される配列同一性を計算し得る。ある好ましい実施形態において、本明細書に記載されるT A L Eポリペプチドのキャッピング領域は、本明細書において提供されるキャッピング領域アミノ酸配列に対して少なくとも95%同一であるか又は同一性を共有する配列を有する。

20

【0290】

配列相関性は、限定はされないが、B L A S T又はF A S T Aを含む、当該技術分野において公知のいくつかのコンピュータプログラムのいずれかによって生成され得る。G C G W i s c o n s i n B e s t f i tパッケージのようなアラインメントを行うための好適なコンピュータプログラムも使用され得る。ソフトウェアが、最適アラインメントで生成されたら、%相関性、好ましくは、%の配列同一性を計算することが可能である。ソフトウェアは、典型的に、配列比較の一環としてこれを行い、数値結果を生成する。

30

【0291】

ある実施形態において、本明細書に記載される、本発明のT A L Eポリペプチドは、1つ以上のエフェクタードメインに結合された核酸結合ドメインを含む。「エフェクタードメイン」又は「調節及び機能的ドメイン」という用語は、核酸結合ドメインによって認識される核酸配列への結合以外の活性を有するポリペプチド配列を指す。核酸結合ドメインを、1つ以上のエフェクタードメインと組み合わせることによって、本発明のポリペプチドは、エフェクタードメインによって媒介される1つ以上の機能又は活性を、核酸結合ドメインが特異的に結合する特定の標的DNA配列に標的化するのに使用され得る。

40

【0292】

本明細書に記載されるT A L Eポリペプチドのある実施形態において、エフェクタードメインによって媒介される活性は、生物学的活性である。例えば、ある実施形態において、エフェクタードメインは、m S i n相互作用ドメイン(S I D)などの転写阻害剤(すなわち、リプレッサドメイン)である。S I D 4 Xドメイン又はクルッペル関連ボックス(K R A B)又はK R A Bドメインのフラグメント。ある実施形態において、エフェク

50

タードメインは、転写のエンハンサー（すなわち、活性化ドメイン）、例えば、VP16、VP64又はp65活性化ドメインである。ある実施形態において、核酸結合は、例えば、限定はされないが、トランスポザーゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、レゾルバーゼ、インベルターゼ、プロテアーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、ヌクレアーゼ、転写抑制因子、転写活性化因子、転写因子動員、タンパク質核局在化シグナル又は細胞取り込みシグナルを含むエフェクタードメインと結合される。

【0293】

ある実施形態において、エフェクタードメインは、限定はされないが、トランスポザーゼ活性、インテグラーゼ活性、リコンビナーゼ活性、レゾルバーゼ活性、インベルターゼ活性、プロテアーゼ活性、DNAメチルトランスフェラーゼ活性、DNAデメチラーゼ活性、ヒストンアセチラーゼ活性、ヒストンデアセチラーゼ活性、ヌクレアーゼ活性、核局在化シグナル伝達活性、転写抑制因子活性、転写活性化因子活性、転写因子動員活性、又は細胞取り込みシグナル伝達活性を含む、活性を示すタンパク質ドメインである。本発明の他の好ましい実施形態は、本明細書に記載される活性の任意の組合せを含み得る。

10

【0294】

本発明に関して使用するためのゲノム編集のための他の好ましいツールは、亜鉛フィンガーシステム及びTALEシステムを含む。1つのタイプのプログラム可能なDNA結合ドメインは、ゲノム中の新たなDNA結合部位を標的とするZFモジュールのアレイを含む人工亜鉛フィンガー（ZF）技術によって提供される。ZFアレイ中の各フィンガーモジュールは、3つのDNA塩基を標的とする。個々の亜鉛フィンガードメインのカスタマイズされたアレイが、ZFタンパク質（ZFP）へと組み立てられる。

20

【0295】

亜鉛フィンガーヌクレアーゼ

亜鉛フィンガータンパク質は、機能的ドメインを含み得る。第1の合成亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、ZFタンパク質が、タイプIIS制限酵素FokIの触媒ドメインに融合することによって発達された（Kim, Y. G. et al., 1994, Chimeric restriction endonuclease, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 883-887; Kim, Y. G. et al., 1996, Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 1156-1160）。増加した切断特異性は、それぞれ、短いスペーサーによって隔てられる異なるヌクレオチド配列を標的とする対合されたZFNヘテロ二量体の使用によって低下したオフターゲット活性により得られる。（Doyon, Y. et al., 2011, Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. Nat. Methods 8, 74-79）。ZFPはまた、転写活性化因子及びリプレッサーとして設計され得、多種多様な生物における多くの遺伝子を標的とするのに使用されている。ZFNを用いたゲノム編集の例示的な方法は、例えば、米国特許第6,534,261号明細書、同第6,607,882号明細書、同第6,746,838号明細書、同第6,794,136、6,824,978号明細書、同第6,866,997号明細書、同第6,933,113号明細書、同第6,979,539号明細書、同第7,013,219号明細書、同第7,030,215号明細書、同第7,220,719号明細書、同第7,241,573号明細書、同第7,241,574号明細書、同第7,585,849号明細書、同第7,595,376号明細書、同第6,903,185号明細書、及び同第6,479,626号明細書において見出され、これらは全て、参照により具体的に援用される。

30

40

【0296】

メガヌクレアーゼ

50

ある実施形態において、メガヌクレアーゼ又はそのシステムは、ポリヌクレオチドを修飾するのに使用され得る。大きい認識部位（12～40塩基対の二本鎖DNA配列）によって特徴付けられるエンドデオキシリボヌクレアーゼであるメガヌクレアーゼ。メガヌクレアーゼを使用するための例示的な方法は、米国特許第8,163,514号明細書、同第8,133,697号明細書、同第8,021,867号明細書、同第8,119,361号明細書、同第8,119,381号明細書、同第8,124,369号明細書、及び同第8,129,134号明細書において見出され、これらは、参照により本明細書に具体的に援用される。

【0297】

RNAi

10

特定の実施形態において、遺伝子組み換え剤は、RNAi（例えば、shRNA）である。本明細書において使用される際、RNAi分子、例えば、siRNA又はmiRNAの活性に関して「遺伝子サイレンシング」又は「遺伝子サイレンシングされた」は、miRNA又はRNA干渉分子の存在なしで、細胞内で見られるmRNAレベルの少なくとも約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、約100%の、標的遺伝子についての細胞内のmRNAレベルの減少を指す。好ましい一実施形態において、mRNAレベルは、少なくとも約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、約100%だけ減少される。

【0298】

本明細書において使用される際、「RNAi」という用語は、限定はされないが、siRNAi、shRNAi、内因性マイクロRNA及び人工マイクロRNAを含む、任意のタイプの干渉RNAを指す。例えば、それは、RNAの下流のプロセシングの機構にかかわらず、siRNAとして予め同定された配列を含む（すなわち、siRNAは、mRNAの切断をもたらすインビボプロセシングの特定の方法を有すると考えられるが、このような配列は、本明細書に記載される隣接配列に関してベクターに組み込まれ得る）。「RNAi」という用語は、両方の遺伝子サイレンシングRNAi分子、及びさらに遺伝子の発現を活性化するRNAiエフェクター分子を含み得る。

20

【0299】

本明細書において使用される際、「siRNA」は、二本鎖RNAを形成する核酸を指し、二本鎖RNAは、siRNAが、標的遺伝子と同じ細胞内に存在するか又は発現されるとき、遺伝子又は標的遺伝子の発現を低下させるか又は阻害する能力を有する。二本鎖RNA siRNAは、相補鎖によって形成され得る。一実施形態において、siRNAは、二本鎖siRNAを形成し得る核酸を指す。siRNAの配列は、完全長標的遺伝子、又はその部分配列に対応し得る。典型的に、siRNAは、少なくとも約15～50ヌクレオチド長である（例えば、二本鎖siRNAの各相補的配列は、約15～50ヌクレオチド長であり、二本鎖siRNAは、約15～50塩基対長、好ましくは、約19～30塩基ヌクレオチド、好ましくは、約20～25ヌクレオチド長、例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチド長である）。

30

【0300】

本明細書において使用される際、「shRNA」又は「短鎖ヘアピンRNA」（ステムループとも呼ばれる）は、siRNAの一種である。一実施形態において、これらのshRNAは、短い、例えば、約19～約25ヌクレオチド、アンチセンス鎖、続いて、約5～約9ヌクレオチドのヌクレオチドループ、及び類似のセンス鎖から構成される。或いは、センス鎖が、ヌクレオチドループ構造に先行し得、アンチセンス鎖が、後に続き得る。

40

【0301】

「マイクロRNA」又は「miRNA」という用語は、本明細書において同義的に使用され、内因性RNAであり、これらのいくつかは、転写後レベルでタンパク質コード遺伝子の発現を調節することが知られている。内因性マイクロRNAは、mRNAの生産的利用を調節することが可能なゲノム中に天然に存在する低分子RNAである。人工マイクロRNAという用語は、mRNAの生産的利用を調節することが可能な、内因性マイクロR

50

NA以外の任意のタイプのRNA配列を含む。マイクロRNA配列は、Lim, et al., Genes & Development, 17, p. 991-1008 (2003)、Lim et al Science 299, 1540 (2003)、Lee and Ambros Science, 294, 862 (2001)、Lau et al., Science 294, 858-861 (2001)、Lagos-Quintana et al, Current Biology, 12, 735-739 (2002)、Lagos Quintana et al, Science 294, 853-857 (2001)、及びLagos-Quintana et al, RNA, 9, 175-179 (2003)などの刊行物において記載されており、これらは、参照により本明細書に援用される。複数のマイクロRNAはまた、前駆体分子に組み込まれ得る。さらに、miRNA様ステムループは、miRNA及び又はRNAi経路を介して内因性遺伝子の発現を調節するために人工miRNA及び低分子干渉RNA (siRNA)を送達するためのビヒクルとして細胞内で発現され得る。

10

【0302】

本明細書において使用される際、「二本鎖RNA」又は「dsRNA」は、2つの鎖から構成されるRNA分子を指す。二本鎖分子は、それ自体で折り返して、二本鎖構造を形成する単一のRNA分子から構成されるものを含む。例えば、プレ-miRNAと呼ばれる、一本鎖miRNAが由来する前駆分子のステムループ構造 (Bartel et al. 2004. Cell 116: 281-297) は、dsRNA分子を含む。

20

【0303】

ポリペプチド

いくつかの例の実施形態において、カーゴ分子は、1つ以上のポリペプチドであり得る。ポリペプチドは、完全長タンパク質又は機能的フラグメント又はその機能的ドメイン、すなわち、完全長タンパク質の所望の機能性を維持するフラグメント又はドメインであり得る。この節において使用される際、「タンパク質」は、完全長タンパク質及び機能的フラグメント及びそのドメインを指すことが意図される。幅広いポリペプチドが、限定はされないが、分泌タンパク質、免疫調節タンパク質、抗線維化タンパク質、組織再生及び／又は移植生存機能を促進するタンパク質、ホルモン、抗菌性タンパク質、抗線維化ポリペプチド、及び抗体を含む、本明細書に記載される操作送達小胞を用いて送達され得る。1つ以上のポリペプチドはまた、上記の例のクラスのポリペプチドの組合せも含み得る。本明細書に記載されるポリペプチドのいずれかはまた、対応するコードポリヌクレオチドの送達によって本明細書に記載される操作送達小胞及びシステムを介して送達され得ることが理解されるであろう。

30

【0304】

分泌タンパク質

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のポリペプチドは、1つ以上の分泌タンパク質を含み得る。分泌は、細胞から能動的に輸送されたタンパク質、例えば、内分泌であるか又は外分泌であるかにかかわらず、細胞によって分泌されるタンパク質である。分泌経路は、酵母から哺乳動物へと保存されることが示され、従来及び非在来型タンパク質分泌経路の両方が、植物において実証されている。Chung et al., “An Overview of Protein Secretion in Plant Cells”, MIMB, 1662:19-32, September 1, 2017。したがって、1つ以上のポリヌクレオチドが挿入され得る分泌タンパク質の同定は、特定の細胞及び用途のために同定され得る。実施形態において、当業者は、短い疎水性N末端配列からなるシグナルペプチドの存在に基づいて分泌タンパク質を同定することができる。

40

【0305】

実施形態において、タンパク質は、分泌経路によって分泌される。実施形態において、タンパク質は、消化管内に酵素を含む、外分泌タンパク質又はペプチドである。実施形態において、タンパク質は、内分泌タンパク質又はペプチド、例えば、血流中に放出されるインスリン及び他のホルモンである。他の実施形態において、タンパク質は、分泌される

50

シグナル伝達分子、例えば、傍分泌、自己分泌、内分泌又は神経内分泌を介して細胞の間又は細胞内のシグナル伝達に關与する。実施形態において、分泌タンパク質は、サイトカイン、キナーゼ、ホルモン及び標的細胞の表面で受容体に結合する増殖因子の群から選択される。

【0306】

記載されるように、分泌タンパク質は、ホルモン、酵素、毒素、及び抗菌ペプチドを含む。分泌タンパク質の例としては、セリンプロテアーゼ（例えば、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ及びプラスミノゲン活性化因子）、アミラーゼ、リパーゼ、ヌクレアーゼ（例えばデオキシリボヌクレアーゼ及びリボヌクレアーゼ）、ペプチダーゼ酵素阻害剤、例えば、セルピン（例えば、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン及びプラスミノゲン活性化因子阻害剤）、細胞付着タンパク質、例えば、コラーゲン、フィブロネクチン及びラミニン、ホルモン及び増殖因子、例えば、インスリン、成長ホルモン、プロラクチン血小板由来増殖因子、上皮成長因子、線維芽細胞増殖因子、インターロイキン、インターフェロン、アポリポタンパク質、及び担体タンパク質、例えば、トランスフェリン及びアルブミンが挙げられる。いくつかの例では、分泌タンパク質は、インスリン又はそのフラグメントである。一例において、分泌タンパク質は、インスリン又はそのフラグメントの前駆体である。いくつかの例において、分泌タンパク質は、c-ペプチドである。好ましい実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドが、c-ペプチドの真ん中に挿入される。ある態様において、分泌タンパク質は、GLP-1、グルカゴン、ベータトロフィン、膵アミラーゼ、膵リパーゼ、カルボキシペプチダーゼ、セクレチン、CCK、PPAR（例えばPPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- δ 又はその前駆体（例えばプレタンパク質又はプレプロタンパク質）である。態様において、分泌タンパク質は、フィブロネクチン、凝固因子タンパク質（例えば第VII、VIIII、IX因子など）、 $\alpha 2$ -マクログロブリン、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン、抗トロンピンIII、タンパク質S、タンパク質C、プラスミノゲン、 $\alpha 2$ -アンチプラスミン、補体成分（例えば補体成分C1-9）、アルブミン、セルロプラスミン、トランスコルチン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、IGF結合タンパク質、レチノール結合タンパク質、トランスフェリン、ビタミンD結合タンパク質、トランスサイレチン、IGF-1、トロンボポエチン、ヘプシジン、アンジオテンシノーゲン、又はその前駆体タンパク質である。態様において、分泌タンパク質は、ペプシノーゲン、胃リパーゼ、スクラーゼ、ガストリン、ラクターゼ、マルターゼ、ペプチダーゼ、又はその前駆体である。態様において、分泌タンパク質は、レニン、エリスロポエチン、アンジオテンシン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、アミリン、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、カルシトニン、グレリン、成長ホルモン（GH）、レプチン、メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）、オキシトシン、プロラクチン、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、サイトロロピン放出ホルモン（TRH）、バソプレシン、血管作動性腸管ペプチド、又はその前駆体である。

【0307】

免疫調節ポリペプチド

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のポリペプチドは、1つ以上の免疫調節タンパク質を含み得る。特定の実施形態において、本発明は、免疫状態を調節することを提供。免疫状態は、T細胞機能又は機能障害を調節することによって調節され得る。特定の実施形態において、免疫状態は、本明細書における他の箇所に記載されるように、IL-10及び／又は他のサイトカインの発現及び分泌によって調節される。特定の実施形態において、T細胞は、近接する他の免疫細胞など、全体的な免疫状態に影響を与え得る。

【0308】

ポリヌクレオチドは、免疫抑制タンパク質を含む1つ以上の免疫調節タンパク質をコードし得る。「免疫抑制」という用語は、生物における免疫応答が、減少又は低下されたことを意味する。免疫抑制タンパク質は、免疫系又は処置される対象の応答の程度を抑制し、減少させ、又は隠し得る。例えば、免疫抑制タンパク質は、サイトカイン産生を抑制し

、自己抗原発現を下方制御若しくは抑制し、又はMHC抗原を隠し得る。本明細書において使用される際、「免疫応答」という用語は、刺激に対する、B細胞、T細胞（CD4＋又はCD8＋）、制御性T細胞、抗原提示細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、NK細胞、好塩基球、好酸球、又は好中球などの、免疫系の細胞による応答を指す。ある実施形態において、応答は、特定の抗原に対して特異的であり（「抗原特異的応答」）、それらの抗原特異的受容体を介したCD4 T細胞、CD8 T細胞、又はB細胞による応答を指す。ある実施形態において、免疫応答は、CD4＋応答又はCD8＋応答などのT細胞応答である。これらの細胞によるこのような応答は、例えば、細胞毒性、増殖、サイトカイン又はケモカイン産生、輸送、又は食作用を含み得、応答を生じる免疫細胞の性質に依存し得る。ある場合には、免疫抑制タンパク質は、多面的な機能を発揮し得る。ある場合には、免疫調節タンパク質は、エフェクターT細胞（Treg / Tef f）バランスに対して適切な制御性T細胞を維持し得る。例えば、免疫調節タンパク質は、Tregを増殖及び／又は活性化し得、Tef fの作用をブロックし、それによって、包括的な免疫抑制なしで免疫調節を提供する。免疫抑制に関連する標的遺伝子は、例えば、PD1、Tim3、Lag3、TIGIT、CTLA-4、及びそれらの組合せなどのチェックポイント阻害剤を含む。

10

【0309】

本明細書全体を通して使用される際の「免疫細胞」という用語は、一般に、免疫応答において役割を果たす造血幹細胞に由来する任意の細胞を包含する。この用語は、自然免疫又は適応免疫系の両方の免疫細胞を包含することが意図される。本明細書において言及される免疫細胞は、分化の任意の段階における白血球（例えば、幹細胞、前駆細胞、成熟細胞）又は任意の活性化状態であり得る。免疫細胞は、リンパ球（ナチュラルキラー細胞など、T細胞（例えば、胸腺細胞、Th又はTc；Th1、Th2、Th17、Thαβ、CD4＋、CD8＋、エフェクターTh、メモリーTh、調節Th、CD4＋／CD8＋胸腺細胞、CD4－／CD8－胸腺細胞、γδ T細胞などを含む）又はB細胞（例えば、プロ-B細胞、初期のプロ-B細胞、後期のプロ-B細胞、プレ-B細胞、大型のプレ-B細胞、小型のプレ-B細胞、未熟又は成熟B細胞、任意のアイソタイプの抗体を産生する、T1 B細胞、T2、B細胞、ナイーブB細胞、GC B細胞、形質芽球、メモリーB細胞、血漿細胞、濾胞性B細胞、辺縁帯B細胞、B-1細胞、B-2細胞、調節B細胞などを含む）、例えば、単球（例えば、古典的な、非古典的な、又は中間単球を含む）、（セグメント化された又はバンドされた）好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、組織球、ミクログリア、様々なサブタイプを含む、成熟、分化、又は活性化段階、例えば造血幹細胞、骨髄性前駆細胞、リンパ系前駆細胞、骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球、後骨髄球、単芽球、前単球、リンパ芽球、前リンパ球、小リンパ球、マクロファージ（例えば、クッパー細胞、星細胞マクロファージ、M1又はM2マクロファージを含む）、（骨髄性又はリンパ系）樹状細胞（例えば、ランゲルハンス細胞、従来のは又は骨髄性樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、mDC-1、mDC-2、Mo-DC、HP-DC、ベール細胞を含む）、顆粒球、多形核細胞、抗原提示細胞（APC）などを含む。

20

30

【0310】

T細胞応答は、より具体的に、T細胞が直接若しくは間接的に媒介する又は他の形で対象における免疫応答に寄与する免疫応答を指す。T細胞媒介性応答は、細胞媒介性効果、サイトカイン媒介性効果、及びさらにはB細胞が、例えば、T細胞によって分泌されるサイトカインによって刺激される場合、B細胞に関連する効果に関連し得る。一例を用いて、ただし、限定はされないが、MHCクラスI制限細胞傷害性Tリンパ球（CTL）のエフェクター機能は、サイトカイン及び／又は細胞溶解能力、例えば、T細胞受容体（天然TCR又は遺伝子組み換えTCR、例えば、キメラ抗原受容体、CAR）によって認識される抗原ペプチドを提示する標的細胞の溶解、サイトカイン、好ましくは、IFN γ、TNF α及び／又は1つ以上の免疫刺激サイトカイン、例えば、IL-2の分泌、及び／又は細胞毒性エフェクター分子、例えば、グランザイム、パーフォリン又はグラニュリンの抗原ペプチド誘導性分泌を含み得る。一例を用いて、ただし、限定はされないが、

40

50

MHCクラスII制限Tヘルパー（Th）細胞については、エフェクター機能は、サイトカイン、好ましくは、IFN γ 、TNF α 、IL-4、IL5、IL-10、及び／又はIL-2の抗原ペプチド誘導性分泌であり得る。例として、ただし、限定はされないが、T調節（Treg）細胞について、エフェクター機能は、サイトカイン、好ましくは、IL-10、IL-35、及び／又はTGF- β の抗原ペプチド誘導性分泌であり得る。B細胞応答は、より具体的には、B細胞が、直接又は間接的に、対象における免疫応答を媒介するか又は他の形でそれに寄与する免疫応答を指す。B細胞のエフェクター機能は、特に、B細胞による抗原特異的抗体の産生及び分泌（例えば、抗原の複数のエピトープに対するポリクローナルB細胞応答（抗原特異的抗体応答））、抗原提示、及び／又はサイトカイン分泌を含み得る。

10

【0311】

持続性の免疫活性化の際、例えば、無制御の腫瘍増殖又は慢性感染症の際、免疫細胞、特に、CD8+又はCD4+T細胞の垂集団は、それらのサイトカイン及び／又は細胞溶解能力に関連して異なる程度に損なわれる。このような免疫細胞、特に、CD8+又はCD4+T細胞は、一般的に「機能障害」又は「機能的に枯渇した（functionally exhausted）」又は「枯渇した（exhausted）」と称される。本明細書において使用される際、「機能障害」又は「機能的枯渇」という用語は、細胞が、正常な入力シグナルに応答してその通常の機能又は活性を行わない場合の細胞の状態を指し、活性化受容体又はサイトカインを介した刺激などの刺激に対する免疫細胞の屈折性（refractivity）を含む。このような機能又は活性としては、限定はされないが、増殖（例えば、IFN- γ などのサイトカインに応答した）又は細胞分裂、細胞周期への参入、サイトカイン産生、細胞毒性、移動及び輸送、食作用活性、又はそれらの任意の組合せが挙げられる。正常な入力シグナルは、限定はされないが、受容体（例えば、T細胞受容体、B細胞受容体、共刺激受容体）を介した刺激を含み得る。非応答免疫細胞は、同じタイプの対応する対照免疫細胞と比べて、細胞毒性活性、サイトカイン産生、増殖、輸送、食作用活性、又はそれらの任意の組合せの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或いは100%の減少を有し得る。本明細書に記載される態様のある特定の実施形態において、機能障害である細胞は、CD8+細胞表面マーカーを発現するCD8+T細胞である。このようなCD8+細胞は、通常、細胞殺滅酵素を増殖させ、生成し、例えば、それらは、細胞毒素パーフォリン、グランザイム、及びグラニュリシンを放出し得る。しかしながら、枯渇した／機能障害T細胞は、TCR刺激に対して十分に応答せず、不十分なエフェクター機能、阻害性受容体の持続した発現及び機能的エフェクター又はメモリーT細胞のものと異なる転写状態を示す。したがって、T細胞の機能障害／枯渇は、感染症及び腫瘍の最適な制御を妨げる。枯渇した／機能障害免疫細胞、例えば、CD8+T細胞などのT細胞は、機能的免疫細胞と比較して、減少した量のIFN- γ 、TNF- α 及び／又は1つ以上の免疫刺激サイトカイン、例えば、IL-2を生成し得る。枯渇した／機能障害免疫細胞、例えば、CD8+T細胞などのT細胞は、機能的免疫細胞と比較して、（増加した量の）1つ以上の免疫抑制転写因子又はサイトカイン、例えば、IL-10及び／又はFoxp3をさらに生成し得、それによって、局所免疫抑制をもたらす。機能障害CD8+T細胞は、疾患管理に対する保護及び弊害の両方であり得る。本明細書において使用される際、「機能障害免疫状態」は、対象における全体的な抑制免疫状態又は対象の微小環境（例えば、腫瘍微小環境）を指す。例えば、増加したIL-10産生は、免疫細胞の集団における他の免疫細胞の抑制をもたらす。

20

30

40

【0312】

CD8+T細胞機能は、それらのサイトカインプロファイルに関連する。複数のサイトカイン（多機能性CD8+T細胞）を同時に生成する能力を有するエフェクターCD8+T細胞が、制御される慢性ウイルス感染を有する患者並びに免疫療法に応答する癌患者における防御免疫に関連することが報告されている（Spranger et al., 2014, J. Immunother. Cancer, vol. 2, 3）。持続性抗原の存

50

在下で、CD8+T細胞は、時間とともに完全に細胞溶解活性を喪失したことが分かった（Moskophidis et al., 1993, Nature, vol. 362, 758-761）。その後、機能障害T細胞が、階層的順序でIL-2、TNFα及びIFNγを異なって生成し得ることが分かった（Wherry et al., 2003, J. Virol., vol. 77, 4911-4927）。分離機能障害及び活性化CD8+細胞状態も、記載されている（例えば、Singer, et al. (2016). A Distinct Gene Module for Dysfunction Uncoupled from Activation in Tumor-Infiltrating T Cells. Cell 166, 1500-1511 e1509; 国際公開第2017/075478号パンフレット; 及び国際公開第2018/049025号パンフレットを参照）。

10

【0313】

本発明は、T細胞バランスを調節するための組成物及び方法を提供する。本発明は、T細胞バランスを調節するT細胞調節剤を提供する。例えば、ある実施形態において、本発明は、T細胞調節剤、並びにT細胞型のレベル及び／又はT細胞型間のバランス、例えば、Th17及び他のT細胞型、例えば、Th1様細胞のレベル及び／又はその間のバランスを調節し、影響を与え、又は他の形で影響するようにこれらのT細胞調節剤を使用する方法を提供する。例えば、ある実施形態において、本発明は、T細胞調節剤、並びにTh17活性及び炎症可能性のレベル及び／又はその間のバランスを調節し、影響を与え、又は他の形で影響するようにこれらのT細胞調節剤を使用する方法を提供する。本明細書において使用される際、「Th17細胞」及び／又は「Th17表現型」などの用語及びその全ての文法的変化形は、インターロイキン17A（IL-17A）、インターロイキン17F（IL-17F）、及びインターロイキン17A／Fヘテロ二量体（IL17-AF）からなる群から選択される1つ以上のサイトカインを発現する分化したTヘルパー細胞を指す。本明細書において使用される際、「Th1細胞」及び／又は「Th1表現型」などの用語及びその全ての文法的変化形は、インターフェロンγ（IFNγ）を発現する分化したTヘルパー細胞を指す。本明細書において使用される際、「Th2細胞」及び／又は「Th2表現型」などの用語及びその全ての文法的変化形は、インターロイキン4（IL-4）、インターロイキン5（IL-5）及びインターロイキン13（IL-13）からなる群から選択される1つ以上のサイトカインを発現する分化したTヘルパー細胞を指す。本明細書において使用される際、「Treg細胞」及び／又は「Treg表現型」などの用語及びその全ての文法的変化形は、Foxp3を発現する分化したT細胞を指す。

20

30

【0314】

いくつかの例では、免疫調節タンパク質は、免疫抑制サイトカインであり得る。一般に、サイトカインは、低分子タンパク質であり、インターロイキン、リンホカイン及び細胞シグナル分子、例えば、腫瘍壊死因子及びインターフェロンを含み、これらは、炎症、造血、及び感染に対する応答を調節する。免疫抑制サイトカインの例としては、インターロイキン10（IL-10）、TGF-β、IL-Rα、IL-18Ra、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35、IL-36、IL-37、PGE2、SCF、G-CSF、CSF-1R、M-CSF、GM-CSF、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IFN-λ、bFGF、CCL2、CXCL1、CXCL8、CXCL12、CX3CL1、CXCR4、TNF-α及びVEGFが挙げられる。免疫抑制タンパク質の例は、FOXP3、AHR、TRP53、IKZF3、IRF4、IRF1、及びSMAD3をさらに含み得る。一例において、免疫抑制タンパク質は、IL-10である。一例において、免疫抑制タンパク質は、IL-6である。一例において、免疫抑制タンパク質は、

40

50

IL-2である。

【0315】

抗線維化タンパク質

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のポリペプチドは、抗線維化タンパク質を含み得る。抗線維化タンパク質の例としては、細胞外基質構成要素、フィブロネクチン、プロテオグリカン、コラーゲン、エラスチン、TGIF、及びSMAD7の産生を減少させるか又は阻害する任意のタンパク質が挙げられる。実施形態において、抗線維化タンパク質は、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR）であり、又は1つ以上のPPARを含み得る。ある実施形態において、タンパク質は、PPAR α であり、PPAR γ は、二重PPAR α/γ である。Derosa et al., “The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice” January 18, 2017 J. Cell. Phys. 223:1 153-161.

10

【0316】

組織再生及び／又は移植生存機能を促進するタンパク質

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のポリペプチドは、組織再生及び／又は移植生存機能を促進するタンパク質を含み得る。ある場合には、このようなタンパク質は、膵臓 β 細胞再生のための遺伝子の発現を誘導及び／又は上方制御し得る。ある場合には、移植生存及び機能を促進するタンパク質は、膵臓 β 細胞再生のための遺伝子の産物を含む。このような遺伝子は、膵島細胞新生を刺激するタンパク質又はこのようなタンパク質に由来するペプチドである膵島促進（proislet）ペプチドを含み得る。膵臓 β 細胞再生のための遺伝子の例としては、Reg1、Reg2、Reg3、Reg4、ヒト膵島促進ペプチド、副甲状腺ホルモン関連ペプチド（1-36）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）、エクステンジン（extendin）-4、プロラクチン、Hgf、Igf-1、Gip-1、アディプシン、レジスチン、レプチン、IL-6、IL-10、Pdx1、Ptf1a、Mafa、Pax6、Pax4、Nkx6.1、Nkx2.2、PDGF、ビグリニン（vglycin）、胎盤性ラクトゲン（ソマトマンモトロピン、例えば、CSH1、CHS2）、そのアイソフォーム、そのホモログ、及びそのオルソログが挙げられる。特定の実施形態において、膵臓 β 細胞再生を促進するタンパク質は、サイトカイン、マイオカイン、及び／又はアディポカインである。

20

30

【0317】

ホルモン

特定の実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、1つ以上のホルモンを含み得る。「ホルモン」という用語は、管を有する腺器官によって一般に分泌されるポリペプチドホルモンを指す。ホルモンは、天然源又は組み換え細胞培養物及び天然配列ホルモンの生物学的に活性な同等物（合成により産生された低分子実体並びにその薬学的に許容される誘導体及び塩を含む）に由来するタンパク質を含む。ホルモンに含まれるのは、例えば、成長ホルモン、例えば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン（prorelaxin）；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体形成ホルモン（LH）などの糖タンパク質ホルモン；プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド、インヒビン；アクチビン；ミューラー管抑制因子；及びトロンプオエチン、成長ホルモン（GH）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、デヒドロエピアンドロステロン（DHEA）、コルチゾール、エピネフリン、甲状腺ホルモン、エストロゲン、プロゲステロン、胎盤性ラクトゲン（ソマトマンモトロピン、例えばCSH1、CHS2）、テストステロンである。及び神経内分泌ホルモンである。いくつかの例において、ホルモンは、膵臓、例えば、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチド及びグレリンから選択される。いくつかの例では、ホルモンは、インスリンである。

40

50

【0318】

本明細書におけるホルモンは、増殖因子、例えば、線維芽細胞成長因子（FGF）ファミリー、骨形態形成タンパク質（BMP）ファミリー、血小板由来成長因子（PDGF）ファミリー、形質転換成長因子β（TGFβ）ファミリー、神経成長因子（NGF）ファミリー、上皮成長因子（EGF）ファミリー、インスリン関連成長因子（IGF）ファミリー、肝細胞増殖因子（HGF）ファミリー、造血成長因子（HemGF）、血小板由来内皮細胞成長因子（PD-ECGF）、アングリオポエチン、血管内皮成長因子（VEGF）ファミリー、及び糖質コルチコイドも含み得る。特定の実施形態において、ホルモンは、インスリン又はインクレチン、例えば、エキセナチド、GLP-1である。

【0319】

神経ホルモン

実施形態において、分泌されるペプチドは、神経ホルモン、神経内分泌細胞によって生成及び放出されるホルモンである。例の神経ホルモンとしては、サイトロロピン放出ホルモン、コルチコトロピン放出ホルモン、ヒスタミン、成長ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン、ゴナドトロピン放出ホルモン、セロトニン、ドーパミン、ニューロテンシン、オキシトシン、バソプレシン、エピネフリン、及びノルエピネフリンが挙げられる。

【0320】

抗菌性タンパク質

ある実施形態において、1つ以上のポリペプチドは、1つ以上の抗菌性タンパク質を含み得る。細胞が哺乳動物細胞である実施形態において、ヒト宿主防御抗菌ペプチド及びタンパク質（AMP）は、侵入する微生物病原体を防ぐ際に重大な役割を果たす。特定の実施形態において、抗菌性は、例えば、α-デフェンシンHD-6、HNp-1及びβ-デフェンシンhBD-3、リゾチーム、カテリシジンLL-37、C型レクチンRegIIIαである。例えば、参照により本明細書に援用される、Wang, "Human Antimicrobial Peptide and Proteins" Pharma, May 2014, 7(5): 545-594を参照されたい。

【0321】

抗線維化タンパク質

いくつかの例の実施形態において、1つ以上のポリペプチドは、1つ以上の抗線維化ポリペプチドを含み得る。抗線維化ポリペプチドは、分泌されるポリペプチドであり得る。ある実施形態において、抗線維化ポリペプチドは、本明細書における他の箇所に記載される1つ以上の他のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドと共発現される。抗線維化剤は、分泌され、それと共発現され得る内因性タンパク質及び／又は外因性タンパク質の線維化及び／又は凝集を阻害するように作用し得る。ある実施形態において、抗線維化剤は、P4（VITYF（配列番号55））、P5（VVVVV（配列番号56））、KR7（KPWWPRR（配列番号57））、NK9（NIVNVSLVK（配列番号58））、iAb5p（Leu-Pro-Phe-Phe-Asp（配列番号59））、KLVF（配列番号60）及びその誘導体、インドリシジン、カルノシン、Wang et al. 2014. ACS Chem Neurosci. 5: 972-981に記載されるヘキサペプチド、Hopping et al. 2014. Elife 3: e01681に記載される交互のD-アミノ酸及びL-アミノ酸を有するαシートペプチド、D-（PGKL VYA（配列番号61））、RI-OR2-TAT、シクロ（17、21）-（Lys17、Asp21）A₁（1-28）、SEN304、SEN1576、D3、R8-Aβ（25-35）、ヒトγD-クリスタリン（HGD）、ポリ-リジン、ヘパリン、ポリ-Asp、ポリ-Gl、ポリ-L-リジン、ポリ-L-グルタミン酸、LVEALYL（配列番号62）、RGFFYT（配列番号63）、米国特許第8,754,034号明細書に記載されるか又はそれに記載される方法によって設計／生成されるペプチド、及びそれらの組合せである。態様において、抗線維化剤は、D-ペプチドである。態様において、抗線維化剤は、L-ペプチドである。態様において、抗線維化剤は、レトロインベルソ修飾ペプチドである。レトロインベルソ修飾ペプチドは、それらのD-同等物とL

10

20

30

40

50

ーアミノ酸を置換し、元のペプチドを模倣するように配列を反転することによってペプチドから誘導され、これは、それらが、側鎖及び3D構造の同じ空間的位置決めを保持するためである。態様において、レトロインベルソ修飾ペプチドは、天然又は合成Aβペプチドから誘導される。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、線維化抵抗性タンパク質をコードする。ある実施形態において、線維化抵抗性タンパク質は、修飾インスリンであり、例えば、米国特許第8,343,914号明細書を参照されたい。

【0322】

抗体

特定の実施形態において、1つ以上のポリペプチドは、1つ以上の抗体を含み得る。「抗体」という用語は、本明細書における「免疫グロブリン」という用語と同義的に使用され、インタクトな抗体、抗体のフラグメント、例えば、Fab、F(ab')₂フラグメント、並びにそれらの定常及び／又は可変領域のいずれかにおいて変異された（例えば、キメラ、部分的ヒト化、又は完全ヒト化抗体を生成する変異、並びに所望の形質を有する抗体を生成する変異、例えば、強化された結合及び／又は減少したFcR結合）インタクトな抗体及びフラグメントを含む。「フラグメント」という用語は、インタクトな又は完全な抗体又は抗体鎖より少ないアミノ酸残基を含む抗体又は抗体鎖の一部又は部分を指す。フラグメントは、インタクトな又は完全な抗体又は抗体鎖の化学又は酵素処理によって得られる。フラグメントはまた、組み換え手段によって得られる。例示的なフラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fd、dAb、H₂H及びscFv及び／又はFvフラグメントを含む。

【0323】

本明細書において使用される際、約50%未満の非抗体タンパク質（本明細書において「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を有する抗体タンパク質、又は化学的前駆体の調製は、「実質的に含まない（substantially free）」と見なされる。40%、30%、20%、10%及びより好ましくは、5%（乾燥重量基準で）の非抗体タンパク質、又は化学的前駆体は、実質的に含まないと見なされる。抗体タンパク質又はその生物学的に活性な部分が、組み換えにより生成される場合、それはまた、好ましくは、培養培地を実質的に含まず、すなわち、培養培地は、約30%未満、好ましくは、約20%未満、より好ましくは、約10%未満、最も好ましくは、約5%未満の体積又は質量のタンパク質調製物を表す。

【0324】

「抗原結合フラグメント」という用語は、抗原に結合し、又は抗原結合（すなわち、特異的結合）を巡ってインタクトな抗体（すなわち、それらが由来するインタクトな抗体）と競合する免疫グロブリン又は抗体のポリペプチドフラグメントを指す。したがって、これらの抗体又はそのフラグメントは、抗体又はフラグメントが標的分子に特異的に結合することを条件として、本発明の範囲内に含まれる。

【0325】

「抗体」という用語は、任意の供給源（例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、並びにげっ歯類、ウサギ目の動物、ヤギ、ウシ亜科の動物、ウマ科の動物、ヒツジなど）から得られる任意のIgクラス又は任意のIgサブクラス（例えば、IgGのIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4サブクラス）を包含することが意図される。

【0326】

本明細書において使用される際の「Igクラス」又は「免疫グロブリンクラス」という用語は、ヒト及び高等哺乳動物において同定された免疫グロブリンの5つのクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEを指す。「Igサブクラス」という用語は、ヒト及び高等哺乳動物において同定されたIgMの2つのサブクラス（H及びL）、IgAの3つのサブクラス（IgA1、IgA2、及び分泌IgA）、並びにIgGの4つのサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4）を指す。抗体は、モノマー又はポリマー形態で存在し得；例えば、IgM抗体は、五量体形態で存在し、IgA抗体は、モノマー、二量体、又は多量体形態で存在する。

【0327】

「IgGサブクラス」という用語は、免疫グロブリン、V1～V4のそれぞれの重鎖によってヒト及び高等哺乳動物において同定された免疫グロブリンクラスIgGの4つのサブクラス—IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を指す。「一本鎖免疫グロブリン」又は「一本鎖抗体」（本明細書において同義的に使用される）という用語は、重及び軽鎖からなる2ポリペプチド鎖構造を有するタンパク質を指し、前記鎖は、例えば、抗原に特異的に結合する能力を有する鎖間ペプチドリンカーによって安定される。「ドメイン」という用語は、例えば、βブリーツシート及び／又は鎖間ジスルフィド結合によって安定されたペプチドループを含む（例えば、3～4つのペプチドループを含む）重又は軽鎖ポリペプチドの球状領域を指す。ドメインはさらに、「定常」ドメインの場合、様々なクラスのメンバーのドメイン内の配列変化の相対的欠如、又は「可変」ドメインの場合、様々なクラスメンバーのドメイン内の実質的な変化に基づいて、本明細書において「定常」又は「可変」と称される。抗体又はポリペプチド「ドメイン」は、当該技術分野において抗体又はポリペプチド「領域」と同義的に称されることが多い。抗体軽鎖の「定常」ドメインは、「軽鎖定常領域」、「軽鎖定常ドメイン」、「CL」領域又は「CL」ドメインと同義的に称される。抗体重鎖の「定常」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「CH」領域又は「CH」ドメイン）と同義的に称される。抗体軽鎖の「可変」ドメインは、「軽鎖可変領域」、「軽鎖可変ドメイン」、「VL」領域又は「VL」ドメイン）と同義的に称される。抗体重鎖の「可変」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「VH」領域又は「VH」ドメイン）と同義的に称される。

10

20

【0328】

「領域」という用語はまた、抗体鎖又は抗体鎖ドメインの一部又は部分（例えば、本明細書において定義される、重若しくは軽鎖の一部若しくは部分又は定常若しくは可変ドメインの一部若しくは部分）、並びに前記鎖又はドメインのより個別の一部又は部分を指し得る。例えば、軽及び重鎖又は軽及び重鎖可変ドメインは、本明細書において定義されるように、「フレームワーク領域」又は「FR」の間に組み込まれた「相補性決定領域」又は「CDR」を含む。

【0329】

「立体構造」という用語は、タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体、抗体鎖、そのドメイン又は領域）の三次構造を指す。例えば、「軽（又は重）鎖立体構造」という語句は、軽（又は重）鎖可変領域の三次構造を指し、「抗体立体構造」又は「抗体フラグメント立体構造」という語句は、抗体又はそのフラグメントの三次構造を指す。

30

【0330】

「抗体様タンパク質足場」又は「操作タンパク質足場」という用語は、典型的に、組合せ工学（combinatorial engineering）（ファージディスプレイ又は他の分子選択技術と組み合わせた部位特異的ランダム変異誘発など）によって得られるタンパク性非免疫グロブリン特異的結合剤を広く包含する。通常、このような足場は、堅固な及び低分子の可溶性モノマータンパク質（Kunitz阻害剤又はリポカリンなど）又は細胞表面受容体の安定的にフォールディングされた膜外ドメイン（プロテインA、フィブロネクチン又はアンキリン反復など）に由来する。

40

【0331】

このような足場は、Binz et al. ((Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. Nat Biotechnol 2005, 23:1257-1268)、Gebauer and Skerra (Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol. 2009, 13:245-55)、Gill and Damle (Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds. Curr Opin Biotechnol 2006, 17:653-65

50

8)、Skerra (Engineered protein scaffolds for molecular recognition. J Mol Recognit 2000, 13:167-187)、及びSkerra (Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. Curr Opin Biotechnol 2007, 18:295-304)において広く概説されており、限定はされないが、ブドウ球菌 (staphylococcal) プロテインAのZドメイン、その α -ヘリックスの2つの上に界面を提供する58残基の3ヘリックスバンドルに基づくアフィボディ (Nygren, Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. FEBS J 2008, 275:2668-2676) ; 異なるプロテアーゼ特異性のために操作された、典型的にヒト由来の小さい (約58残基) 及び堅固なジスルフィド架橋セリンプロテアーゼ阻害剤 (例えば、LACI-D1) に基づく操作Kunitzドメイン (Nixon and Wood, Engineered protein inhibitors of proteases. Curr Opin Drug Discov Dev 2006, 9:261-268) ; 2~3つの露出したループを有するが、中心のジスルフィド架橋を欠くIg様 β -サンドイッチフォールド (94残基) を採用するヒトフィブロネクチンIIIの第10の細胞外ドメイン (10Fn3) に基づくモノボディ又はアドネクチン (Koide and Koide, Monobodies: antibody mimics based on the scaffold of the fibronectin type III domain. Methods Mol Biol 2007, 352:95-109) ; リポカリンに由来するアンチカリン、ヒト、昆虫、及び多くの他の生物中に豊富にある、開口端における4つの構造的に可変のループによって小さいリガンドのための結合部位を天然に形成する8つの鎖の β -バレルタンパク質 (約180残基) の多様なファミリー (Skerra, Alternative binding proteins: Anticalins-harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. FEBS J 2008, 275:2677-2683) ; DARPin s、典型的に3つの反復 β -ターンから生じる硬い界面を提供する設計されたアンキリン反復ドメイン (166残基) (Stump et al., DARPin s: a new generation of protein therapeutics. Drug Discov Today 2008, 13:695-701) ; アビマー (多量体化LDLR-Aモジュール) (Silverman et al., Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. Nat Biotechnol 2005, 23:1556-1561) ; 及びシステインリッチノッチンペプチド (Kolmar, Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins. FEBS J 2008, 275:2684-2690) を含む。

【0332】

抗体の「特異的結合」は、抗体が、特定の抗原又はエピトープに対してかなりの親和性を示し、一般に、交差反応性をあまり示さないことを意味する。「かなりの」結合は、少なくとも25 μ Mの親和性での結合を含む。1 $\times$ 10⁷ M⁻¹超の親和性 (又は1 μ M以下の解離係数若しくは1 nm以下の解離係数) を有する抗体は、典型的に、対応してより高い特異性で結合する。本明細書に記載されるものの中間の値も、本発明の範囲内にあることが意図され、本発明の抗体は、例えば、100 nM以下、75 nM以下、50 nM以下、25 nM以下、例えば10 nM以下、5 nM以下、1 nM以下、又は実施形態におい

10

20

30

40

50

て、500 pM以下、100 pM以下、50 pM以下又は25 pM以下の親和性の範囲で結合する。「交差反応性をあまり示さない」抗体は、その標的以外の実体（例えば、異なるエピトープ又は異なる分子）にあまり結合しないものであり。例えば、標的分子に特異的に結合する抗体は、標的分子にかなり結合するが、非標的分子又はペプチドとあまり反応しないであろう。特定のエピトープに特異的な抗体は、例えば、同じタンパク質又はペプチドにおける離れたエピトープとあまり交差反応しないであろう。特異的結合は、このような結合を決定するための当該技術分野で認識されている任意の手段にしたがって決定され得る。好ましくは、特異的結合は、スキャッチャード解析及び／又は競合的結合アッセイにしたがって決定される。

【0333】

本明細書において使用される際、「親和性」という用語は、抗原決定基を有する単一の抗原結合部位の結合の強度を指す。親和性は、抗体結合部位及び抗原決定基の間の立体化学適合の近さ、それらの間の接触領域のサイズ、荷電及び疎水性基の分布などに依存する。抗体親和性は、平衡透析又は動力学的B I A C O R E（商標）方法によって測定される。解離定数、 K_d 、及び結合定数、 K_a は、親和性の定量的尺度である。

【0334】

本明細書において使用される際、「モノクローナル抗体」という用語は、構造及び抗原特異性が均一な抗体生成細胞（例えば、Bリンパ球又はB細胞）のクローン集団に由来する抗体を指す。「ポリクローナル抗体」という用語は、それらの及びエピトープ特異性が不均一であるが、共通の抗原を認識する、抗体生成細胞の異なるクローン集団に由来する複数の抗体を指す。モノクローナル及びポリクローナル抗体は、本明細書に記載されるように、粗製の調製物として体液中に存在してもよく、又は精製され得る。

【0335】

抗体（又は「抗体部分」）の「結合部分」という用語は、標的分子に特異的に結合する能力を保持する、1つ以上の完全なドメイン、例えば、一对の完全なドメイン、並びに抗体のフラグメントを含む。抗体の結合機能が、完全長抗体のフラグメントによって行われ得ることが示されている。結合フラグメントは、組み換えDNA技術、又はインタクトな免疫グロブリンの酵素的若しくは化学的切断によって生成される。結合フラグメントは、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 $Fabc$ 、 Fd 、 dAb 、 Fv 、一本鎖、一本鎖抗体、例えば、 $scFv$ 、及び単一のドメイン抗体を含む。

【0336】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分は、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基で置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体において見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに改善するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的に2つの、可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、超可変領域の全て又は実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のものに対応する。ヒト化抗体はまた、任意に、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的に、ヒト免疫グロブリンのものを含むであろう。

【0337】

本発明の定義によって包含される抗体又はエピトープー結合タンパク質の部分の例としては、(i) V_L 、 C_L 、 V_H 及び C_{H1} ドメインを有する Fab フラグメント；(ii) C_{H1} ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を有する Fab フラグメントである Fab' フラグメント；(iii) V_H 及び C_{H1} ドメインを有する Fd フラグメント；(iv) V_H 及び C_{H1} ドメイン及び C_{H2} ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を有する Fd' フラグメント；(v) 抗体の単一のアームの V_L 及び V_H ドメインを

10

20

30

40

50

有するFvフラグメント；(v i) 抗原に結合するV_Hドメイン又はV_LドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al., 341 Nature 544 (1989))；(v i i) 機能的骨格において示される単離されたCDR領域又は単離されたCDR領域；(v i i i) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって結合された2つのFab'フラグメントを含む2価フラグメントであるF(ab')₂フラグメント；(i x) 一本鎖抗体分子(例えば、一本鎖Fv；scFv)(Bird et al., 242 Science 423 (1988))；及びHuston et al., 85 PNAS 5879 (1988))；(x) 同じポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む2つの抗原結合部位を有する「二重特異性抗体」(例えば、欧州特許第404,097号明細書；国際公開第93/11161号パンフレット；Hollinger et al., 90 PNAS 6444 (1993)を参照)；(x i) 相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に、一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデムFdセグメント(V_H-C_H1-V_H-C_H1)を含む「線状抗体」(Zapata et al., Protein Eng. 8 (10) : 1057-62 (1995))；及び米国特許第5,641,870号明細書)が挙げられる。

10

【0338】

本明細書において使用される際、「ブロック」抗体又は抗体「アンタゴニスト」は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低下させるものである。特定の実施形態において、本明細書に記載されるブロック抗体又はアンタゴニスト抗体又はその部分は、抗原の生物学的活性を完全に阻害する。

20

【0339】

抗体は、認識されるポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストとして働き得る。例えば、本発明は、部分的に又は完全に受容体／リガンド相互作用を妨げる抗体を含む。本発明は、受容体特異的抗体及びリガンド特異的抗体の両方を特徴とする。本発明はまた、リガンド結合を防止しないが、受容体活性化を防止する受容体特異的抗体を特徴とする。受容体活性化(すなわち、シグナル伝達)は、本明細書に記載されるか又は他の形で当該技術分野において公知である技術によって決定され得る。例えば、受容体活性化は、免疫沈降、続いてウエスタンブロット分析によって、受容体又はその下流の基質の1つのリン酸化(例えば、チロシン又はセリン／トレオニン)を検出することによって決定され得る。特定の実施形態において、抗体の非存在下における活性の少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、又は少なくとも50%だけ、リガンド活性又は受容体活性を阻害する抗体が提供される。

30

【0340】

本発明はまた、リガンド及び受容体活性化の両方を防止する受容体特異的抗体並びに受容体-リガンド複合体を認識する抗体を特徴とする。同様に、本発明によって包含されるのは、リガンドに結合し、受容体へのリガンドの結合を防止する中和抗体、並びにリガンドに結合し、それによって、受容体活性化を防止するが、リガンドが受容体に結合するのを防止しない抗体である。本発明にさらに含まれるのは、受容体を活性化する抗体である。これらの抗体は、受容体作用薬として働き得、すなわち、例えば、受容体の二量体化を誘導することによって、リガンド媒介性受容体活性化の生物学的活性の全て又はサブセットのいずれかを増強又は活性化し得る。抗体は、本明細書に開示されるペプチドの特異的な生物学的活性を含む生物学的活性のためのアゴニスト、アンタゴニスト又は逆作動薬として規定され得る。抗体アゴニスト及びアンタゴニストは、当該技術分野において公知の方法を用いて作製され得る。例えば、PCT公開国際公開第96/40281号パンフレット；米国特許第5,811,097号明細書；Deng et al., Blood 92 (6) : 1981-1988 (1998)；Chen et al., Cancer Res. 58 (16) : 3668-3678 (1998)；Harrop et al., J. Immunol. 161 (4) : 1786-1794 (1998)；Zhu et al., Cancer Res. 58 (15) : 3209-3214 (1998)；Yo

40

50

on et al., J. Immunol. 160 (7) : 3170-3179 (1998) ; Prat et al., J. Cell. Sci. III (Pt 2) : 237-247 (1998) ; Pitard et al., J. Immunol. Methods 205 (2) : 177-190 (1997) ; Liautard et al., Cytokine 9 (4) : 233-241 (1997) ; Carlson et al., J. Biol. Chem. 272 (17) : 11295-11301 (1997) ; Taryman et al., Neuron 14 (4) : 755-762 (1995) ; Muller et al., Structure 6 (9) : 1153-1167 (1998) ; Bartunek et al., Cytokine 8 (1) : 14-20 (1996) を参照されたい。

10

【0341】

本発明について定義される抗体は、すなわち、共有結合が、抗体が抗イディオタイプ応答を生成するのを防止しないように、抗体への任意のタイプの分子の共有結合によって修飾された誘導体を含む。例えば、限定としてではないが、抗体誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への結合などによって修飾された抗体を含む。多くの化学修飾のいずれかが、限定はされないが、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む公知の技術によって行われ得る。さらに、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含有し得る。

20

【0342】

プロテアーゼ切断部位

上記で例示されるように、1つ以上のカーゴポリペプチドは、1つ以上のプロテアーゼ切断部位、すなわち、プロテアーゼによって認識及び切断され得るアミノ酸配列を含み得る。プロテアーゼ切断部位は、所望の遺伝子産物（例えば、他のタンパク質の任意のタグ又は部分を有さないインタクトな遺伝子産物）を生成するために使用され得る。プロテアーゼ切断部位は、タンパク質の一端又は両端であり得る。本明細書において使用され得るプロテアーゼ切断部位の例としては、エンテロキナーゼ切断部位、トロンビン切断部位、第Xa因子切断部位、ヒトライノウイルス3Cプロテアーゼ切断部位、タバコエッチウイルス（TEV）プロテアーゼ切断部位、ジペプチジルアミノペプチダーゼ切断部位及び低分子ユビキチン様修飾因子（SUMO）／ユビキチン様タンパク質-1（ULP-1）プロテアーゼ切断部位を含む。いくつかの例において、プロテアーゼ切断部位は、Lys-Argを含む。

30

【0343】

小分子

ある実施形態において、カーゴ分子は、小分子である。ペプチドを小分子剤に連結するための技術及び方法は、当該技術分野において一般に公知であり、CNS細胞を標的とするのに有効な標的化部分を、小分子カーゴに連結するために、本明細書において適用され得る。小分子としては、限定はされないが、ホルモン、免疫調節剤、解熱剤、抗不安薬、抗精神病薬、鎮痛薬、鎮痙薬、抗炎症剤、抗ヒスタミン剤、抗感染薬、放射線増感剤、化学療法薬が挙げられる。

40

【0344】

好適なホルモン限定はされないが、アミノ酸から誘導されるホルモン（例えば、メラトニン及びチロキシン）、低分子ペプチドホルモン及びタンパク質ホルモン（例えば、サイロトロピン放出ホルモン、バソプレシン、インスリン、成長ホルモン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、及び甲状腺刺激ホルモン）、エイコサノイド（例えば、アラキドン酸、リボキシン、及びプロスタグランジン）、及びステロイドホルモン（例えば、エストラジオール、テストステロン、テトラヒドロテストステロンコルチゾール）が挙げられる。好適な免疫調節剤としては、限定はされないが、プレドニゾン、アザチオプリン、6-MP、シクロスポリン、タクロリムス、メトトレキサート、インターロイキン（例えば、IL-2、IL-7、及びIL-12）、サイトカイン（例えば、インターフェロン（例

50

例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN-K、IFN- ω 、及びIFN- γ ）、顆粒球コロニー刺激因子、及びイミキモド）、ケモカイン（例えば、CCL3、CCL26及びCXCL7）、シトシンリン酸グアノシン、オリゴデオキシヌクレオチド、グルカン、抗体、及びアプタマー）が挙げられる。

【0345】

好適な解熱剤としては、限定はされないが、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びニメスリド）、アスピリン及び関連サリチレート（例えば、サリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム、及びサリチル酸ナトリウム）、パラセタモール／アセトアミノフェン、メタミゾール、ナブメトン、フェナゾン、及びキニーネが挙げられる。

10

【0346】

好適な抗不安薬としては、限定はされないが、ベンゾジアゼピン（例えば、アルプラゾラム、プロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロナゼパム、クロラゼパート、ジアゼパム、フルラゼパム、ロラゼパム、オキサゼパム、テマゼパム、トリアゾラム、及びトフィソパム）、セロトニン性抗うつ薬（例えば選択的セロトニン再取り込み阻害剤、三環系抗うつ薬、及びモノアミンオキシダーゼ阻害剤）、メビカル、アホバゾール、セラंक（selank）、プロマンタン、エモキシピン、アザピロン、バルビツール酸系薬、ヒドロキシジン、プレガバリン、バリドール、及び β 遮断薬が挙げられる。

【0347】

好適な抗精神病薬としては、限定はされないが、ベンペリドール、ブロムペリドール（bromoperidol）、ドロペリドール、ハロペリドール、モペロン、ピパンペロン（pipaperone）、チミペロン、フルスピリレン、ペンフルリドール、ピモジド、アセプロマジン、クロルプロマジン、シアメマジン、ジキシラジン（dizyrazine）、フルフェナジン、レボメプロマジン、メソリダジン、ペラジン、ペリシアジン、ペルフェナジン、ピボチアジン、プロクロルペラジン、プロマジン、プロメタジン、プロチペンジル、チオプロペラジン、チオリダジン、トリフルオペラジン、トリフルプロマジン、クロルプロチキセン、クロベンチキソール、フルベンチキソール、チオチキセン、ズクロベンチキソール、クロチアピン、ロキサピン、プロチペンジル、カルピプラミン、クロカプラミン、モリンドン、モサプラミン、スルピリド、ベラリプリド、アミスルプリド、アモキサピン、アリピプラゾール、アセナピン、クロザピン、プロナンセリン、イロペリドン、ルラシドン、メルペロン、ネモナプリド、オランザピン、パリペリドン、ペロスピロン、クエチアピン、レモキシプリド、リスペリドン、セルチンドール、トリミプラミン、ジブラシドン、ゾテピン、アルストニイ（alstonie）、ビフェプルノックス（befeprunox）、ビットベルチン、ブレクスピプラゾール、カンナビジオール、カリブラジン、ピマバンセリン、ボマグルメタッドメチオニル、バビカセリン、キサノメリン、及びジクロナピンが挙げられる。

20

30

【0348】

好適な鎮痛薬としては、限定はされないが、パラセタモール／アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬（例えばイブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びニメスリド）、COX-2阻害剤（例えばロフェコキシブ、セレコキシブ、及びエトリコキシブ）、オピオイド（例えばモルヒネ、コデイン、オキシコドン、ヒドロコドン、ジヒドロモルヒネ、ペチジン、ブプレノルフィン）、トラマドール、ノルエピネフリン、フルピルチン（flupiretine）、ネホパム、オルフェナドリン、プレガバリン、ガバペンチン、シクロベンザプリン、スコボラミン、メタドン、ケトベミドン、ピリトラミド、及びアスピリン及び関連サリチレート（例えば、サリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム、及びサリチル酸ナトリウム）が挙げられる。

40

【0349】

好適な鎮痙薬としては、限定はされないが、メベベリン、パパベリン（papaverine）、シクロベンザプリン、カリソプロドール、オルフェナドリン、チザニジン、メタキサロン、メトカルバモール（methocarbamol）、クロルゾキサゾン、バ

50

クロフェン、ダントロレン、バクロフェン、チザニジン、及びダントロレンが挙げられる。好適な抗炎症剤としては、限定はされないが、プレドニゾン、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びニメスリド）、COX-2阻害剤（例えば、ロフェコキシブ、セレコキシブ、及びエトリコキシブ）、及び免疫選択的抗炎症誘導体（例えば、顎下腺ペプチド-T及びその誘導体）が挙げられる。

【0350】

好適な抗ヒスタミン剤としては、限定はされないが、H₁-受容体拮抗薬（例えば、アクリバステイン、アゼラスチン、ピラスチン、ブロムフェニラミン、ブクリジン、プロモジフェンヒドラミン、カルビノキサミン、セチリジン、クロルプロマジン、シクリジン、クロルフェニラミン、クレマスチン、シプロヘプタジン、デスロラタジン、デクスブロムフェニラミン（dexbromapheniramine）、デキスクロルフェニルアミン、ジメンヒドリナート、ジメチンデン、ジフェニルヒドラミン、ドキシラミン、エバステイン（ebastine）、エンブラミン、フェキソフェナジン、ヒドロキシジン、レボセチリジン（levocetirizine）、ロラタジン、メクロジン、ミルタザピン、オロパタジン、オルフェナドリン、フェニндаミン、フェニラミン、フェニルトロキサミン、プロメタジン、ピリラミン、クエチアピン、ルパタジン、トリペレナミン、及びトリプロリジン）、H₂-受容体拮抗薬（例えば、シメチジン、ファモチジン、ラフチジン、ニザチジン、ラニチジン（ranitidine）、及びロキサチジン）、トリトクアリン、カテキン、クロモグリケート、ネドクロミル、及びp₂-アドレナリン作動薬が挙げられる。

【0351】

好適な抗感染薬としては、限定はされないが、抗アメーバ薬（例えば、ニタゾキサニド、パロモマイシン、メトロニダゾール、チニダゾール、クロロキン、ミルテホシン、アムホテリシンb、及びヨードキノール）、アミノグリコシド（例えば、パロモマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、カナマイシン、及びネオマイシン）、駆虫薬（例えば、ピランテル、メベンダゾール、イベルメクチン、プラジカンテル、アルベンダゾール（albendazole）、チアベンダゾール、オキサムニキン）、抗真菌剤（例えば、アゾール系抗真菌剤（例えば、イトラコナゾール、フルコナゾール、ボサコナゾール、ケトコナゾール、クロトリマゾール、ミコナゾール、及びポリコナゾール）、エキノキャンディン系（例えば、キャスポファンギン、アニデュラファンギン、及びミカファンギン）、グリセオフルビン、テルビナフィン、フルシトシン、及びポリエン系（例えば、ナイスタチン、及びアムホテリシンb）、抗マラリア剤（例えば、ピリメタミン／スルファドキシム、アルテムエーテル／ルメファントリン、アトバコン／プログアニル（proguanil）、キニーネ、ヒドロキシクロロキン、メフロキン、クロロキン、ドキシサイクリン、ピリメタミン、及びハロファントリン）、抗結核剤（例えば、アミノサリチレート（例えば、アミノサリチル酸）、イソニアジド／リファンピン、イソニアジド／ピラジナミド／リファンピン、ベダキリン、イソニアジド、エタンブトール、リファンピン、リファブチン、リファペンチン、カプレオマイシン、及びサイクロセリン）、抗ウイルス薬（例えば、アマンタジン、リマンタジン、アバカビル／ラミブジン、エムトリシタビン／テノホビル、コビシスタット／エルビテグラビル／エムトリシタビン／テノホビル、エファビレンツ／エムトリシタビン／テノホビル、アバカビル／ラミブジン／ジドブジン、ラミブジン／ジドブジン、エムトリシタビン／テノホビル、エムトリシタビン／ロピナビル（opinavir）／リトナビル／テノホビル、インターフェロンα-2v／リバビリン、ペグインターフェロンα-2b、マラビロク、ラルテグラビル、ドルテグラビル、エンフビルチド、ホスカルネット、ホミビルセン、オセルタミビル、ザナミビル、ネビラピン、エファビレンツ、エトラビリン、リルピビリン、デラビルジン（delavirdine）、ネビラピン、エンテカビル、ラミブジン、阿德ホビル、ソホスブビル、ジダノシン、テノホビル、アバシブル（avacivir）、ジドブジン、スタブジン、エムトリシタビン、ザルシタビン（xalcitabine）、テルビブジン、シメプレビル、ボセプレビル、テラプレビル、ロピナビル／リトナビル、ホスアンプレナビル（fos

10

20

30

40

50

amprenvir)、ダルナビル(dranavir)、リトナビル、チプラナビル、アタザナビル、ネルフィナビル、アンブレナビル、インジナビル、サキナビル(saquinavir)、リバビリン、バラシクロビル(valcyclovir)、アシクロビル、ファムシクロビル、ガンシクロビル、及びバルガンシクロビル)、カルバペネム(例えば、ドリベネム、メロベネム、エルタベネム、及びシラスタチン/イミベネム)、セファロsporin(例えば、セファドロキシル、セフラジン、セファゾリン、セファレキシン、セフェピム、セフトロリン(ceftriaxone)、ロラカルベフ、セフォテタン、セフロキシム、セフプロジル、ロラカルベフ、セフォキシチン、セファクロル、セフチブテン、セフトリアキソン、セフォタキシム、セフポドキシム、セフジニル、セフィキシム、セフジトレン、セフチゾキシム(cefprozime)、及びセフトジジム)、糖ペプチド抗生物質(例えば、バンコマイシン、ダルババンシン、オリタババンシン、及びテラバンシン(telavancin))、グリシルサイクリン系(例えば、チゲサイクリン)、抗らい菌薬(例えば、クロファジミン及びサリドマイド)、リンコマイシン及びその誘導体(例えば、クリンダマイシン及びリンコマイシン)、マクロライド及びその誘導体(例えば、テリスロマイシン、フィダキソマイシン、エリスロマイシン(erythromycin)、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、及びトロレアンドマイシン)、リネゾリド、スルファメトキサゾール/トリメトプリム、リファキシミン、クロラムフェニコール、ホスホマイシン、メトロニダゾール、アズトレオナム、バシトラシン、ペニシリン系(アモキシシリン、アンピシリン、バカンピシリン、カルベニシリン、ピペラシリン、チカルシリン、アモキシシリン/クラブラネート、アンピシリン/スルバクタム、ピペラシリン/タゾバクタム、クラブラネート/チカルシリン、ペニシリン、プロカインペニシリン、オキサシリン(oxacillin)、ジクロキサシリン、及びナフシリン)、キノロン系(例えば、ロメフロキサシン、ノルフフロキサシン、オフロキサシン、ガチフロキサシン(gatifloxacin)、モキシフロキサシン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、ゲミフロキサシン、モキシフロキサシン、シノキサシン、ナリジクス酸、エノキサシン、グレパフロキサシン、ガチフロキサシン、トロバフロキサシン、及びスパルフロキサシン)、スルホンアミド系(例えば、スルファメトキサゾール/トリメトプリム、スルファサラジン、及びスルフィソキサゾール(sulfisoxazole))、テトラサイクリン(例えば、ドキシサイクリン、デメクロサイクリン、ミノサイクリン、ドキシサイクリン/サリチル酸、ドキシサイクリン/ ω -3多価不飽和脂肪酸、及びテトラサイクリン)、及び尿路感染症薬(例えば、ニトロフラントイン、メテナミン、ホスホマイシン、シノキサシン、ナリジクス酸、トリメトプリム、及びメチレンブルー)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0352】

好適な化学療法薬としては、限定はされないが、パクリタキセル、ブレンツキシマブ、ペドチン、ドキシソルピシン、5-FU(フルオロウラシル)、エベロリムス、ペメトレキセド、メルファラン、パミドロネート、アナストロゾール、エキセメスタン、ネララビン、オフアツマブ、ベバシズマブ、ベリノスタット、トシツモマブ、カルムスチン、ブレオマイシン、ボスチニブ、ブスルファン、アレムツズマブ、イリノテカン、バンデタニブ、ビカルタミド、ロムスチン、ダウノルビシン、クロファラビン、カボザンチニブ、ダクチノマイシン、ラムシルマブ、シタラビン、シトキサン、シクロホスファミド、デシタビン、デキサメタゾン、ドセタキセル、ヒドロキシウレア、デカルバジン、ロイプロリド、エピルビシン、オキサリプラチン、アスパラギナーゼ、エストラムスチン、セツキシマブ、ビスモデギブ、黒脚病菌(Erwinia chrysanthemi)由来アスパラギナーゼ、アミホスチン、エトポシド、フルタミド、トレミフェン、フルベストラント、レトロゾール、デガレリクス、プラトレキサート、メトトレキサート、フロクスウリジン、オビヌツズマブ、ゲムシタビン、アフアチニブ、メシル酸イマチニブ、カルムスチン、エリブリン、トラスツズマブ、アルトレタミン、トポテカン、ポナチニブ、イダルビシン、イホスファミド、イブルチニブ、アキシチニブ、インターフェロン α -2a、ゲフィチニブ、ロミデプシン、イクサベピロン、ルキソリチニブ、カバジタキセル、a do-トラ

スツズマブエムタンシン、カーフィルゾミブ、クロラムブシル、サルグラモスチム、クラドリピン、ミトタン、ピンクリスチン、プロカルバジン、メゲストロール、トラメチニブ、メスナ、塩化ストロンチウム-89、メクロレタミン、マイトマイシン、ブスルファン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ビノレルピン、フィルグラスチム、ペグフィルグラスチム、ソラフェニブ、ニルタミド、ベントスタチン、タモキシフェン、ミトキサントロン、ペガスパルガーゼ、デニロイキンディフチトクス、アリトレチノイン、カルボプラチン、パーツズマブ、シスプラチン、ボマリドミド、プレドニゾン、アルデスロイキン、メルカプトブリン、ゾレドロン酸、レナリドミド、リツキシマブ、オクトレオチド (octreotide)、ダサチニブ、レゴラフェニブ、ヒストレリン、スニチニブ、シルツキシマブ、オマセタキシン、チオグアニン (チオグアニン)、ダブラフェニブ、エルロチニブ、ベキサロテン、テモゾロミド、チオテパ、サリドマイド、BCG、テムシロリムス、ベンダムスチン塩酸塩、トリプトレリン、三酸化ヒ素、ラパチニブ、バルルピシン、パニツムマブ、ビンブラスチン、ボルテゾミブ、トレチノイン、アザシチジン、パゾパニブ、テニポシド、ロイコボリン、クリゾチニブ、カペシタビン、エンザルタミド、イピリウムマブ、ゴセレリン、ボリノスタット、イデラリシブ、セリチニブ、アビラテロン、エポチロン、タフルボシド、アザチオプリン、ドキシフルリジン、ビンデシン、及び all-trans レチノイン酸が挙げられる。

10

【0353】

操作ウイルスカプシド及びコードポリヌクレオチド

細胞特異的指向性を、操作ウイルスタンパク質を含有する操作ウイルス粒子 (AAV 粒子) に与えるように操作され得る、操作ウイルスタンパク質、(例えば、カプシドタンパク質)、例えば、アデノ随伴ウイルス (AAV) ウイルスタンパク質 (例えば、カプシドタンパク質) の例示的な実施形態が、本明細書に記載される。操作ウイルスタンパク質 (例えば、カプシド) は、操作ウイルス粒子に含まれ得、細胞特異的指向性、例えば、CNS 特異的指向性、低下した免疫原性、又は両方を、操作ウイルス (例えば、AAV) 粒子に与えることができる。本明細書における他の箇所に記載されるように、粒子は、カーゴを含み得る。このように、粒子は、カーゴのための細胞特異的送達ビヒクルであり得る。本明細書に記載される操作ウイルスカプシドは、本明細書に記載される1つ以上の操作ウイルスカプシドタンパク質を含み得る。操作ウイルスカプシドタンパク質は、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、又はAAVであり得る。操作カプシドは、ウイルスカプシドタンパク質の1つ以上を含有し得る。操作ウイルス粒子操作ウイルスカプシドタンパク質の1つ以上を含み得、したがって、操作ウイルスカプシドを含有する。本明細書における他の箇所に記載される1つ以上のn量体モチーフを含有するか又はそれから構成される1つ以上のCNS特異的標的化部分を含有する操作ウイルスカプシドタンパク質、カプシド、及び/又はウイルス粒子。ある実施形態において、操作ウイルスカプシドタンパク質、ウイルスカプシド、及び/又はウイルス粒子は、それに含まれる1つ以上のn量体モチーフによってそれに与えられるCNS特異的指向性を有し得る。

20

30

【0354】

CNS特異的n量体モチーフ及び標的化部分は、ポリヌクレオチドによって全体的に又は部分的にコードされ得る。操作ウイルスカプシド及び/又はウイルスカプシドタンパク質は、1つ以上の操作ウイルスカプシドポリヌクレオチドによってコードされ得る。ある実施形態において、操作ウイルスカプシドポリヌクレオチドは、操作AAVカプシドポリヌクレオチド、操作レンチウイルスカプシドポリヌクレオチド、操作レトロウイルスカプシドポリヌクレオチド、又は操作アデノウイルスカプシドポリヌクレオチドである。ある実施形態において、操作ウイルスカプシドポリヌクレオチド (例えば、操作AAVカプシドポリヌクレオチド、操作レンチウイルスカプシドポリヌクレオチド、操作レトロウイルスカプシドポリヌクレオチド、又は操作アデノウイルスカプシドポリヌクレオチド) は、3'ポリアデニル化シグナルを含み得る。ポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナルであり得る。

40

【0355】

50

操作 A A V カプシドは、野生型 A A V カプシドの変異体であり得る。ある実施形態において、野生型 A A V カプシドは、V P 1、V P 2、V P 3 カプシドタンパク質又はそれらの組合せから構成され得る。言い換えると、操作 A A V カプシドは、野生型 V P 1、野生型 V P 2、及び／又は野生型 V P 3 カプシドタンパク質の 1 つ以上の変異体を含み得る。ある実施形態において、参照野生型 A A V カプシドの血清型は、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 - 8、A A V - 9 又はそれらの任意の組合せであり得る。ある実施形態において、野生型 A A V カプシドの血清型は、A A V - 9 であり得る。操作 A A V カプシドは、参照野生型 A A V カプシドのものと異なる指向性を有し得る。

【0356】

操作 A A V カプシドは、1 ~ 60 個の操作カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作 A A V カプシドは、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、又は 60 個の操作カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作 A A V カプシドは、0 ~ 59 個の野生型 A A V カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作 A A V カプシドは、0、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、又は 59 個の野生型 A A V カプシドタンパク質を含有し得る。

【0357】

ある実施形態において、操作 A A V カプシドタンパク質は、n 量体アミノ酸インサート（本明細書において同義的に「n 量体モチーフ」又は「n 量体インサート」とも呼ばれる）を有し得、ここで、n が、少なくとも 3 つのアミノ酸であり得る。ある実施形態において、n が、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は 15 個のアミノ酸であり得る。ある実施形態において、操作 A A V カプシドは、6 量体又は 7 量体アミノ酸インサートを有し得る。ある実施形態において、n 量体アミノ酸インサートは、野生型ウイルスタンパク質（V P）（又はカプシドタンパク質）中の 2 つのアミノ酸の間に挿入され得る。ある実施形態において、n 量体インサートは、A A V カプシドタンパク質中の可変アミノ酸領域における 2 つのアミノ酸の間に挿入され得る。各野生型 A A V ウイルスタンパク質のコアは、自律性パロウイルスカプシド中に保存される 8 本の β -バレルモチーフ（ β B ~ β I）及び α -ヘリックス（ α A）を含有する（例えば、D i M a t t i a e t a l . 2012 . J . V i r o l . 86 (12) : 6947-6958 を参照）。構造的変換領域（V R）は、群になってカプシド表面における局所変化を生成する β -鎖を連結する表面ループに存在する。A A V は、12 の可変領域（超可変領域とも呼ばれる）を有する（例えば、W e i t z m a n a n d L i n d e n . 2011 . “ A d e n o - A s s o c i a t e d V i r u s B i o l o g y . ” I n S n y d e r , R . O . , M o u l l i e r , P . (e d s .) T o t o w a , N J : H u m a n a P r e s s を参照）。ある実施形態において、1 つ以上の n 量体インサートは、野生型 A A V カプシドタンパク質中の 12 の可変領域の 1 つ以上における 2 つのアミノ酸の間に挿入され得る。ある実施形態において、1 つ以上の n 量体インサートはそれぞれ、V R - I、V R - I I、V R - I I I、V R - I V、V R - V、V R - V I、V R - V I I、V R - I I I、V R - I X、V R - X、V R - X I、V R - X I I、又はそれらの組合せにおける 2 つのアミノ酸の間に挿入され得る。ある実施形態において、n 量体は、カプシドタンパク質の V R - I I I における 2 つのアミノ酸の間に挿入され得る。ある実施形態において、操作カプシドは、A A V 9 ウイルスタンパク質のアミノ酸 262 ~ 269 の間のいずれか 2 つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸 327 ~ 332 の間のいずれか 2 つの連続

したアミノ酸の間、アミノ酸 382～386 の間のいずれか 2 つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸 452～460 の間のいずれか 2 つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸 488～505 の間のいずれか 2 つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸 545～558 の間のいずれか 2 つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸 581～593 の間のいずれか 2 つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸 704～714 の間のいずれか 2 つの連続したアミノ酸の間に挿入された n 量体を有し得る。ある実施形態において、操作カプシドは、AAV9 ウイルスタンパク質のアミノ酸 588～589 の間に挿入された n 量体を有し得る。ある実施形態において、操作カプシドは、AAV9 ウイルスタンパク質のアミノ酸 588～589 の間に挿入された 7 量体インサートを有し得る。配列番号 1 は、上述される挿入部位を少なくとも参照するための参照 AAV9 カプシド配列である。n 量体が、他の血清型の AAV ウイルスタンパク質における類似の位置に挿入され得ることが理解されるであろう。ある実施形態において、上述されるように、n 量体は、AAV ウイルスタンパク質内のいずれか 2 つの連続したアミノ酸の間に挿入され得、ある実施形態において、挿入は、可変領域においてなされる。

10

20

30

40

50

【0358】

配列番号 1 AAV9 カプシド（野生型）参照配列：

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGP
GNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFG
GNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAK
KRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGS LT MASGGGAPVADNNEGADGVGSSS
GNWHCDSQWLGD RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP
WGYFDFNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIAN
NLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLT LNDGSQAVGRSS
FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKT
INGSGQNQQT LKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTT VTQNNNSEFAWPGA
SSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITN
EEEIKTTNPVATESYGGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGP
IWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQY
STGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRY
LTRNL

【0359】

ある実施形態において、AAV カプシドは、P モチーフを含有する 1 つ以上の n 量体モチーフを有する 1 つ以上の標的化部分を含有する。P モチーフは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。ある実施形態において、AAV カプシドは、それぞれ A Q が直前にある 1 つ以上の n 量体モチーフを有する 1 つ以上の標的化部分を含有し、ここで、n 量体インサートは、K T V G T V Y（配列番号 3）、R S V G S V Y（配列番号 4）、R Y L G D A S（配列番号 5）、W V L P S G G（配列番号 6）、V T V G S I Y（配列番号 7）、V R G S S I L（配列番号 8）、R H H G D A A（配列番号 9）、V I Q A M K L（配列番号 10）、L T Y G M A Q（配列番号 11）、L R I G L S Q（配列番号 12）、G D Y S M I V（配列番号 13）、V N Y S V A L（配列番号 14）、R H I A D A S（配列番号 15）、R Y L G D A T（配列番号 16）、Q R V G F A Q（配列番号 17）、Q I A H G Y S T（配列番号 18）、W T L E S G H（配列番号 19）；又は G E N S A R W（配列番号 20）である。ある実施形態において、AAV カプシドは、それぞれ D G が直前にある 1 つ以上の n 量体モチーフを有する 1 つ以上の標的化部分を含有し得、ここで、n 量体インサートは、R E Q Q K L W（配列番号 21）、A S N P G R W（配列番号 22）、W T L E S G H（配列番号 23）、R E Q K K L W（配列番号 24）、E R L L V Q L（配列番号 25）；又は R M Q R T L Y（配列番号 26）である。ある実施形態において、CNS 特異的 AAV カプシドなどの AAV カプシド中の n 量体は、表 1～3 に記載されるいずれか 1 つ以上であり得る。ある実施形態において、AAV カプシド中の n 量体の挿入は、細胞、組織、器官特異的な操作 AAV カプシドをもたらし得る。あ

る実施形態において、操作ウイルスタンパク質、操作ウイルスカプシドタンパク質、操作ウイルスカプシド、及び／又は操作ウイルス粒子は、骨組織及び／又は細胞、肺組織及び／又は細胞、肝臓組織及び／又は細胞、膀胱組織及び／又は細胞、腎臓組織及び／又は細胞、心臓組織及び／又は細胞、骨格筋組織及び／又は細胞、平滑筋及び／又は細胞、神経組織及び／又は細胞、腸組織及び／又は細胞、膵臓組織及び／又は細胞、副腎組織及び／又は細胞、脳組織及び／又は細胞、腱組織又は細胞、皮膚組織及び／又は細胞、脾臓組織及び／又は細胞、眼組織及び／又は細胞、血液細胞、滑液細胞、免疫細胞（特定のタイプの免疫細胞に対する特異性を含む）、及びそれらの組合せに対して特異性を有し得る。

【0360】

ある実施形態において、操作ウイルスタンパク質、操作ウイルスカプシドタンパク質、操作ウイルスカプシド、及び／又は操作ウイルス粒子は、CNS細胞及び／又は組織に対する特異性を有し得る。

10

【0361】

ある実施形態において、CNS AAVカプシドは、RGDインサートを含有する。ある実施形態において、CNS AAVカプシドは、RGDインサートを含有しない。RGDモチーフは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

【0362】

ある実施形態において、n量体インサートは、「Pモチーフ」（本明細書において同義的に「Pインサート」とも呼ばれる）を含む。本明細書において使用される際、「Pモチーフ」という用語は、モチーフ PX_1QGTX_2R （配列番号64又は2）を指し得、ここで、 X_1 及び X_2 がそれぞれ、任意のアミノ酸から選択され得る。ある実施形態において、 X_1 が、S、T、又はAである。ある実施形態において、 X_2 が、L、V、F、又はIである。ある実施形態において、 X_1 が、S、T、又はAであり、 X_2 が、L、V、F、又はIである。例示的な、非限定的なPモチーフは、少なくとも、例えば表3に示される。P-インサートは、本明細書における他の箇所にさらに記載される。

20

【0363】

ある実施形態において、表1、2、又は3のいずれか1つ以上に記載され得る1つ以上のn量体インサートは、CNS特異的操作カプシドに含まれ得る。

【0364】

表1及び実施例に示されるように、n量体インサート（7量体インサートなど）は、2つの連続したアミノ酸の間のAAVベクター中に挿入され得る、ここで、n量体インサートの直前にあるAAVベクター中のアミノ酸は、DG又はAQであり得る。DG及びAQは、この用語が本明細書において使用される際、n量体インサートの一部と見なされないことが理解されるであろう。言い換えると、n量体インサートの第1のアミノ酸は、表1に示される配列のそれぞれにおける第3のアミノ酸である。それぞれの場合、これらの2つのアミノ酸は、AQ又はDGのいずれかである。各n量体インサートは、両方の立体配置で試験された（例えば、AAVのアミノ酸587及び588としてAQ及びDGを有する）。表1は、CNS形質導入効率を有する例示的な変異体を表す。本明細書における実施例においてさらに説明されるように、これらの操作AAV変異体は、マウスの複数の株からの細胞を形質導入することができた。これは、少なくともある場合には、マウスのいくつかの株のみを形質導入し得る他のAAVと対照的である。ある実施形態において、AAVのアミノ酸587及び588又はそれと類似のアミノ酸は、DGである。ある実施形態において、AAVのアミノ酸587及び588又はそれと類似のアミノ酸は、AQである。

30

40

【0365】

ある実施形態において、AAVのアミノ酸587及び588又はそれと類似のアミノ酸は、AQであり、7量体アミノ酸インサートが後に続く。ある実施形態において、AAVのアミノ酸587及び588又はそれと類似のアミノ酸は、AQであり、7量体アミノ酸インサートが後に続き、ここで、7量体インサートは、KTVGTVY（配列番号3）、RSVGSVY（配列番号4）、RYLGDA S（配列番号5）、WVLP SGG（配列

50

番号 6)、V T V G S I Y (配列番号 7)、V R G S S I L (配列番号 8)、R H H G D A A (配列番号 9)、V I Q A M K L (配列番号 10)、L T Y G M A Q (配列番号 11)、L R I G L S Q (配列番号 12)、G D Y S M I V (配列番号 13)、V N Y S V A L (配列番号 14)、R H I A D A S (配列番号 15)、R Y L G D A T (配列番号 16)、Q R V G F A Q (配列番号 17)、Q I A H G Y S T (配列番号 18)、W T L E S G H (配列番号 19) ; 又は G E N S A R W (配列番号 20) である。

【0366】

ある実施形態において、A A V のアミノ酸 5 8 7 及び 5 8 8 又はそれと類似のアミノ酸は、D G であり、7 量体アミノ酸インサートが後に続く。ある実施形態において、A A V のアミノ酸 5 8 7 及び 5 8 8 又はそれと類似のアミノ酸は、D G であり、7 量体アミノ酸インサートが後に続き、ここで、7 量体インサートは、R E Q Q K L Y (配列番号 64)、A S N P G R W (配列番号 22)、W T L E S G H (配列番号 23、R E Q K K L W (配列番号 24)、E R L L V Q L (配列番号 25) ; 又は R M Q R T L Y (配列番号 26) である。

10

【0367】

ある実施形態において、A A V カプシドは、C N S 特異的であり得る。ある実施形態において、操作 A A V カプシドの C N S 特異性は、操作 A A V カプシドに組み込まれる C N S 特異的 n 量体インサートによって与えられる。理論によって制約されることを意図するものではないが、操作 A A V カプシドを含有する操作 A A V の相互作用が、内皮及び／又は C N S 細胞の表面における細胞表面受容体及び／又は他の分子との増加又は改善された相互作用 (例えば、増加した親和性) を有するように、n 量体インサートが、前記操作 A A V カプシドのドメイン又は領域に又はその中に 3 D 構造を与えるものと考えられる。ある実施形態において、細胞表面受容体は、A A V 受容体 (A A V R) である。ある実施形態において、細胞表面受容体は、C N S 細胞特異的 A A V 受容体である。ある実施形態において、C N S 特異的カプシドを含有する C N S 特異的操作 A A V は、本明細書に記載される筋肉特異的操作 A A V カプシドを含有しない他の細胞型及び／又は他の A A V と比較して、C N S 細胞内における増加した形質導入率、効率、量、又はそれらの組合せを有し得る。

20

30

40

50

【表 4】

表 1. 例示的な CNS n 量体インサート		
頭文字「AQ」又は「DG」は、標的化部分又は組成物における「 n 量体インサート」の直前の標的化部分における 2 つのアミノ酸(例えば、AA 588 及び 589 間に配置された n 量体インサートを有する AAV9 の AA 587 及び 588)に対応する。	CNS 形質導入効率スコア	配列番号
AQRSVGSVY	46000	65
AQKTVGTVY	45980	66
AQRYLG DAS	40592	67
DGREQK KLW	39151	68
AQWVLP SGG	37597	69
AQVTVGSIY	32968	70
AQVRGSSIL	32330	71
AQRHHGDAA	32171	72
AQVIQAMKL	32127	73
AQLTYGMAQ	31956	74
AQLRIGLSQ	31710	75
AQGDYSMIV	31497	76
AQVNYSVAL	31271	77
AQRYSGDAS	31198	78
AQRYSGDSV	29860	79
AQRHIADAS	29554	80
AQRYLG DAT	29527	81
AQQRVGFAQ	29454	82
AQIAHGYST	28216	83
AQWTLES GH	27471	84
AQGENSARW	27287	85
DGASNPGRW	24583	86
AQLAVGQKW	24445	87
AQVKLGYSQ	23912	88
AQEAGSARW	23888	89
AQLNYSVSL	21972	90
AQWAISDGY	21970	91
AQRGPGLSQ	21738	92
DGWTLES GH	20534	93
AQRYVGESS	19635	94
DGREQK KLW	17695	95
AQFTLTTPK	15607	96
DGERLLVQL	15513	97
AQEDLLRLR	14920	98

10

20

30

40

50

AQPIIEHAV	12837	99
DGRMQRTLY	12453	100
DGWAISDGY	10828	101
AQRYISDSA	10788	102
AQWSTSSGF	10614	103
AQWSLGSGH	10498	104
AQWSQSSGY	10258	105
DGVRGSSIL	9714	106
AQIMLGYST	9404	107
DGKLADSV	9356	108
AQASNPGRW	9173	109
AQHVENWHI	8680	110
AQVAGSSIL	8645	111
DGRQQQKLW	8393	112
DGTVNNDRF	8028	113
DGMSANERT	8000	114
AQATVAGQF	7885	115
DGRDQQKLW	7761	116
AQGKSPGVW	7685	117
DGGASNGGT	7674	118
AQSLVTSST	6782	119
AQLLYGYSS	6779	120
DGVTELTKF	6655	121
AQALVQNGV	6638	122
AQVLESNPR	6572	123
AQPASHEVL	6460	124
AQAGVQNAL	6452	125
DGKEISVSV	6420	126
AQGLNERVA	6410	127
DGQVAQQGA	6393	128
DGGVAGTNT	6386	129
DGASAQ GAL	6382	130
AQAGVSSQT	6357	131
AQKNRRHSV	6312	132
AQKVDSAQL	6311	133
AQYTLSQGW	6310	134
DGQSVDRSK	6293	135
AQASASSPR	6266	136
DGRYVGESS	6252	137
DGLGHNAGV	6239	138
AQPNERINV	6142	139
AQVMSGTSH	6122	140
DGVLVSPGP	6000	141
DGVGISSGV	6000	142

10

20

30

40

50

DGSGETLRI	5977	143
DGSTEGAAL	5954	144
AQTSLSQDR	5943	145
AQSANPVVT	5937	146
DGVLASNGP	5898	147
AQAHLDNAP	5893	148
DGVVQVTGR	5875	149
DGFAVRLSS	5855	150
DGLVRDTKT	5811	151
DSGGESLSR	5804	152
AQTNEQAQR	5796	153
DGTLANSQR	5746	154
AQLLADKSV	5680	155
DGSQEQRAR	5679	156
AQVNGNTTY	5655	157
AQALAEAGA	5624	158
DGSREGGNV	5580	159
AQMGDSVTI	5574	160
DGLGGSSMG	5565	161
AQGVRTDNI	5562	162
DGSGSTDKL	5556	163
AQASQNSTV	5493	164
AQGGTSSGH	5462	165
AQAADSSVR	5404	166
AQAANSSVR	5387	167
AQWADSKDQ	5374	168
AQPTQGTVR	5353	169
AQGSTDFTK	5344	170
AQVDHGGVV	5342	171
AQGEQQKGW	5322	172
DGIANLAAS	5311	173
DGAGGVRDR	5299	174
DGSGSGGGL	5252	175
DGTLANSER	5237	176
AQKGASVTL	5236	177
AQSNVALTG	5235	178
DGVNYSVAL	5206	179
AQGLNEHGA	5193	180
DGKNPGVYT	5173	181
DGQREAARI	5173	182
AQGLVDSSR	5168	183
DGNGSEGDR	5157	184
DGNVGVVQL	5144	185
AQVTDGVR	5109	186

10

20

30

40

50

AQVIASNEH	5109	187
AQMSVGQSW	5098	188
DGHSLQTSA	5096	189
AQQDGYGTR	5093	190
AQLSNGQGP	5071	191
AQPVTDSKM	5068	192
AQNGTAADR	5057	193
AQIIVDNGS	5024	194
AQEADNHGR	5023	195
AQAADSSGR	4995	196
AQVVDSNNL	4986	197
DGSGANLSY	4985	198
DGKAHDGEV	4978	199

10

20

30

40

50

【表 5】

表 2. 例示的な CNS n 量体インサート及び/又は P モチーフ				
ランク	N 量体インサート	配列番号	コード配列	配列番号
1	PSQGLR	200	CCTTCTCAGGGGACGCTTCGG	201
2	TDALTTK	202	ACTGATGCGCTTACGACTAAG	203
3	PTQGTVR	204	CCCACACAAGGCACAGTCCGT	205
4	PTQGLR	206	CCTACTCAGGGGACGCTTCGG	207
5	PTQGTVR	208	CCTACTCAGGGGACGGTTCGG	209
6	STIPTMK	210	AGTACTATTCTACTATGAAG	211
7	TDAGDGK	212	ACAGACGCGGGGACGGCAA	213
8	YQRTESL	214	TATCAGAGGACGGAGTCTCTG	215
9	RVDPSGL	216	AGAGTCGACCCAGTGGACTA	217
10	SLVTSST	218	TCGCTTGTTACTTCTAGTACG	219
11	LLAGADR	220	TTGCTTGCTGGTGCTGATCGT	221
12	STDRESR	222	TCCACGGACCGTGAAAGCCGA	223
13	NGYTEGR	224	AATGGGTATACGGAGGGGCGT	225
14	PTQGTFR	226	CCGACACAAGGAACATTGAGG	227
15	MTGISIV	228	ATGACAGGCATCTCTATCGTA	229
16	DGRAELR	230	GATGGGCGGGCGGAGTTGCGT	231
17	AADSSAR	232	GCCGCTGACTCATCGGCCGT	233
18	PTQGTIR	234	CCTACTCAGGGGACGATTCGG	235
19	LSRGEEK	236	CTTTCGAGGGGTGAGGAGAAG	237
20	AIVSIAQ	238	GCGATTGTGTCGATTGCTCAG	239
21	LTSGLAA	240	TTGACGTCTGGTTTGGCGGCG	241
22	PTQGTFR	242	CCTACTCAGGGGACGTTTCGG	243
23	TLAISGR	244	ACTTTGGCGATTCTGGGCGG	245
24	VHSQDVS	246	GTCCACAGTCAAGACGTTTCC	247
25	FQVEQVK	248	TTTCAGGTTGAGCAGGTTAAG	249
26	NRELALG	250	AACCGCGAACTCGCACTCGGG	251
27	SIGDLGK	252	AGTATCGGTGACCTAGGTAAA	253
28	TVGHDNK	254	ACCGTAGGACACGACAACAAA	255
29	HSKGFY	256	CACAGTAAAGGTTTCGACTAC	257
30	HTQGLR	258	CATACTCAGGGGACGCTTCGG	259
31	PAQGLR	260	CCGGCGCAAGGAACACTACGA	261
32	AGGGDPR	262	GCTGGTGGAGGTGACCCCGA	263
33	LGKADPV	264	TTGGGAAAAGCTGACCCAGTA	265
34	ALNEHVA	266	GCTCTGAATGAGCATGTGGCG	267
35	GSGGVS	268	GGTTCGGGTGGTGTAGTGTG	269
36	PSQGLR	270	CCGTCCAAGGAACACTCAGG	271
37	TGGRDQY	272	ACTGGTGGTCGGGATCAGTAT	273
38	YLVTTEN	274	TATTTGGTTACTACTGAGAAT	275
39	LSRDVAV	276	TTGTCGAGGGATGTGGCGGTT	277

10

20

30

40

50

40	RIVDSVP	278	AGGATTGTGGATAGTGTTC	279
41	KGYDTPM	280	AAAGGCTACGACACACCCATG	281
42	TSREEQW	282	ACTTCTCGTGAGGAGCAGTGG	283
43	RASADV	284	AGGGCGAGTGC	285
44	NLGAALS	286	AACCTTGGGGCTGCCCTATCG	287
45	SVTDIKH	288	TCGGTGACGGACATAAACAC	289
46	FQDTIGV	290	TTTCAGGATACGATTGGGGTG	291
47	PNERLAV	292	CCTAACGAACGATTGGCAGTC	293
48	HTIAASM	294	CACACCATAGCCGCAAGTATG	295
49	NSDLMGR	296	AACAGTGACCTAATGGGCCGA	297
50	AGVSASL	298	GCGGGTGTCTGCGTCGTTG	299

10

【表 6】

表 3. 例示的な P モチーフ			
n 量体モチーフ	配列番号	コード配列	配列番号
PSQGTLR	300	CCTTCTCAGGGGACGCTTCGG;	301
		CCGTCCCAAGGAACACTCAGG	302
PTQGTVR	303	CCCACACAAGGCACAGTCCGT;	304
		CCTACTCAGGGGACGGTTCGG	305
PTQGTLR	306	CCTACTCAGGGGACGCTTCGG	307
PTQGTFR	308	CCGACACAAGGAACATTCAGG;	309
		CCTACTCAGGGGACGTTTCGG	310
PTQGTIR	311	CCTACTCAGGGGACGATTTCGG	312
PAQGTLR	313	CCGGCGCAAGGAACACTACGA	314

20

30

【0368】

限定はされないが、本明細書に記載される操作 AAV カプシドを含む、本明細書に記載される操作された標的化部分、ウイルスタンパク質（例えば、カプシドタンパク質）、及び他のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがまた、本明細書に記載される。ある実施形態において、操作 AAV カプシドコードポリヌクレオチドは、本明細書における他の箇所に記載される操作 AAV 粒子を生成するのに使用され得る AAV ベクター系中の AAV ゲノムドナーであるように構成されたポリヌクレオチドに含まれ得る。

40

【0369】

ある実施形態において、AAV カプシド又は他のウイルスカプシド又は組成物は、CNS 特異的であり得る。ある実施形態において、操作 AAV 又は他のウイルスカプシド又は他の組成物の CNS 特異性は、本明細書に記載される操作 AAV 又は他のウイルスカプシド又は他の組成物に組み込まれる 1 つ以上の CNS 特異的 n 量体モチーフによって与えられる。理論によって制約されることを意図するものではないが、本明細書に記載される操作 AAV カプシド又は他のウイルスカプシド又は他の組成物を含有するウイルス粒子又は他の組成物の相互作用が、CNS 細胞の表面における細胞表面受容体及び／又は他の分子との増加又は改善された相互作用（例えば、増加した親和性）を有するように、n 量体モ

50

チーフが、操作 A A V カプシド又は他のウイルスカプシド又は他の組成物ドメイン又は領域に又はその中に 3 D 構造を与えるものと考えられる。ある実施形態において、細胞表面受容体は、A A V 受容体 (A A V R) である。ある実施形態において、細胞表面受容体は、C N S 細胞特異的 A A V 受容体である。ある実施形態において、細胞表面受容体又は他の分子は、C N S 細胞の表面において選択的に発現される細胞表面受容体又は他の分子である。

【0370】

ある実施形態において、操作ウイルス (例えば、A A V) カプシドコードポリヌクレオチドは、ポリアデニル化テールに動作可能に連結され得る。ある実施形態において、ポリアデニル化テールは、S V 4 0 ポリアデニル化テールであり得る。ある実施形態において、ウイルス (例えば、A A V) カプシドコードポリヌクレオチドは、プロモーターに動作可能に連結され得る。ある実施形態において、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり得る。ある実施形態において、組織特異的プロモーターは、筋肉 (例えば、心臓、骨格、及び／又は平滑筋)、神経及び指示細胞 (例えば、星状膠細胞、グリア細胞、シュワン細胞など)、脂肪、脾臓、肝臓、腎臓、免疫細胞、髄液細胞、滑液細胞、皮膚細胞、軟骨、腱、結合組織、骨、膵臓、副腎、血液細胞、骨髄細胞、胎盤、内皮細胞、及びそれらの組合せに対して特異的である。ある実施形態において、プロモーターは、構成的プロモーターであり得る。好適な組織特異的プロモーター及び構成的プロモーターは、本明細書における他の箇所に記載され、当該技術分野において一般に公知であり、市販品として入手可能である。

【0371】

好適な神経組織／細胞特異的プロモーターとしては、限定はされないが、G F A P プロモーター (星状膠細胞)、S Y N 1 プロモーター (神経)、及び N S E / R U 5 ' (成熟神経) が挙げられる。

【0372】

他の好適な C N S 特異的プロモーターは、限定はされないが、神経活性ペプチドコレシストキニン (C C K) (例えば、Chhatwani et al. Gene Therapy volume 14, pages 575-583 (2007) を参照)、脳特異的 DNA Mini プロモーター (de Leeuw et al. Mol. Therapy. 1 (5): 2014. doi: 10.1038/mtm.2013.5 にあるように脳又は汎神経系発現について同定されるもののいずれかなど)、ミエリン塩基性プロモーター (M B P) (例えば、von Jonquieres, G., Mersmann, N., Klugmann, C. B., Harasta, A. E., Lutz, B., Teahan, O., et al. (2013). Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain. PLoS One 8 (6), e65646. doi: 10.1371/journal.pone.0065646 を参照)、星状膠細胞における発現のためのグリア線維性酸性タンパク質 (G F A P) (例えば、Smith-Arica, J. R., Morelli, A. E., Larregina, A. T., Smith, J., Lowenstein, P. R., Castro, M. G. (2000). Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression. Mol. Ther. 2 (6), 579-587. doi: 10.1006/mthe.2000.0215 及び Lee, Y., Messing, A., Su, M., Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. Glia 56 (5), 481-493. doi: 10.1002/glia.20622 を参照)、ヒトミエリン関連糖タンパク質プロモーター (完全長

又は切断型) (例えば、von Jonquieres, G., Frohlich, D., Klugmann, C. B., Wen, X., Harasta, A. E., Ramkumar, R., et al. (2016). Recombinant human myelin-associated glycoprotein promoter drives selective AAV-mediated transgene expression in oligodendrocytes. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 13. doi:10.3389/fnmol.2016.00013を参照)、F4/80プロモーター (例えば、Rosario, A. M., Cruz, P. E., Ceballos-Diaz, C., Strickland, M. R., Siemienski, Z., Pardo, M., et al. (2016). Microglia-specific targeting by novel capsid-modified AAV6 vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 3, 16026. doi:10.1038/mtm.2016.26を参照)、リン酸活性化グルタミンナーゼ (PAG) 又は小胞型グルタミン酸トランスポーター (vGLUT) プロモーター (約90%のグルタミン酸作動性神経特異的発現の場合) (例えば、Rasmussen, M., Kong, L., Zhang, G. R., Liu, M., Wang, X., Szabo, G., et al. (2007). Glutamatergic or GABAergic neuron-specific, long-term expression in neocortical neurons from helper virus-free HSV-1 vectors containing the phosphate-activated glutaminase, vesicular glutamate transporter-1, or glutamic acid decarboxylase promoter. *Brain Res.* 1144, 19-32. doi:10.1016/j.brainres.2007.01.125を参照)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) プロモーター (約90%のGABA作動性神経特異的発現の場合) (例えば、Rasmussen, M., Kong, L., Zhang, G. R., Liu, M., Wang, X., Szabo, G., et al. (2007). Glutamatergic or GABAergic neuron-specific, long-term expression in neocortical neurons from helper virus-free HSV-1 vectors containing the phosphate-activated glutaminase, vesicular glutamate transporter-1, or glutamic acid decarboxylase promoter. *Brain Res.* 1144, 19-32. doi:10.1016/j.brainres.2007.01.125を参照)、MeCP2プロモーター (例えば、Gray et al. *Hum Gene Ther.* 2011 Sep; 22 (9): 1143-53. doi:10.1089/hum.2010.245を参照)、及び網膜芽細胞腫遺伝子プロモーター (例えば、Jiang et al., *J. Biol. Chem.* 2001. 276, 593-600を参照) を含み得る。

【0373】

好適な構成的プロモーターとしては、限定はされないが、CMV、RSV、SV40、EF1 α 、CAG、及び β -アクチンが挙げられる。

【0374】

低下した非CNS細胞特異性を有するAAV

ある実施形態において、n量体インサート及び／又はPモチーフは、1つ以上の非CNS細胞型に対する低下した特異性 (又は検出不可能な、測定不可能な、又は臨床的に関連しない相互作用) を有するAAVタンパク質 (例えば、AAVカプシドタンパク質) 中に挿入される。例示的な非CNS細胞型としては、限定はされないが、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、筋肉 (骨格及び心臓)、骨、免疫、胃、腸、眼、皮膚細胞などが挙げられる。

ある実施形態において、非CNS細胞は、肝細胞である。

【0375】

いくつかの例の実施形態において、AAVカプシドタンパク質は、対応する野生型AAVカプシドポリペプチドと比較して、非CNS細胞における減少された又はなくされた吸収を有する操作AAVカプシドタンパク質である。

【0376】

いくつかの例の実施形態において、非CNS細胞は、肝細胞である。

【0377】

いくつかの例の実施形態において、野生型カプシドポリペプチドは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.74、又はAAVrh.10カプシドポリペプチドである。

10

【0378】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、非CNS細胞における減少された又はなくされた吸収をもたらす1つ以上の変異を含む。

【0379】

いくつかの例の実施形態において、1つ以上の変異は、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における

a. 267位に、

b. 269位に、

c. 504位に、

d. 505位に、

e. 590位に、

f. 又はそれらの任意の組合せに、

20

又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する1つ以上の位置にある。

【0380】

いくつかの例の実施形態において、非AAV9カプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh.74、又はAAVrh.10カプシドポリペプチドである。

【0381】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における267位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、AへのG又はX変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

30

【0382】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における269位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、S又はXからTへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0383】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における504位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、G又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

40

【0384】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における505位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、P又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0385】

いくつかの例の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）における590位又は非AAV9カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Q又はXからAへの変異であり、ここで、Xがアミノ酸である。

【0386】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9

50

カプシドタンパク質（配列番号1）の267位、269位又は両方における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、267位における変異は、GからAへの変異であり、269位における変異は、SからTへの変異である。

【0387】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の590位における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、509位における変異は、QからAへの変異である。

【0388】

いくつかの例の実施形態において、操作AAVカプシドタンパク質は、野生型AAV9カプシドタンパク質（配列番号1）の504位、505位、又は両方における変異を含む操作AAV9カプシドポリペプチドであり、504位における変異は、GからAへの変異であり、505位における変異は、PからAへの変異である。

【0389】

ある実施形態において、n量体モチーフ及び／又はPモチーフが挿入され得るAAVカプシドタンパク質は、国際特許出願公開国際公開第2019／217911号パンフレットの配列番号4又は配列番号5に対して80-100（例えば、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、から／又は100）パーセント同一であり得、この文献は、本明細書に全体が表されているかのように参照により援用される。これらの配列も、それぞれ配列番号330及び331として本明細書に組み込まれる。低下した肝臓特異性を有するこれらのAAV9カプシドタンパク質の変異体を考慮する場合、その残基267及び／又は269は、関連する変異又は同等物を含まなければならないことが理解されるであろう。

【0390】

ある実施形態において、n量体モチーフ及び／又はPモチーフが挿入され得るAAVカプシドタンパク質は、非CNS細胞、特に、肝細胞に対して低下した特異性を有するAdachi et al., (Nat. Comm. 2014. 5:3075, DOI:10.1038/ncomms4075)に記載されるもののいずれかに対して80~100（例えば、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、から／又は100）パーセント同一であり得る。Adachi et al., (Nat. Comm. 2014. 5:3075, DOI:10.1038/ncomms4075)は、全体が表されているかのように参照により本明細書に援用される。

【0391】

ある実施形態において、修飾AAVは、野生型AAV又は対照と比較して、非CNS細胞に対する特異性の約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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100パーセント又は倍の低下を有し得る。ある実施形態において、修飾AAVはまた、1つ以上の非CNS細胞における測定可能な若しくは検出可能な取り込み及び／又は発現を有さないことがある。

【0392】

操作AAVカプシドを生成する方法

操作AAVカプシドを生成する方法も、本明細書において提供される。操作AAVカプシド変異体は、野生型AAVカプシドの変異体であり得る。図6A~8は、本明細書に記載される操作AAVカプシドを生成することが可能な方法の様々な実施形態を示し得る。一般に、AAVカプシドライブラリーは、適切なAAV産生細胞株において、上述される

操作 A A V カプシドポリヌクレオチドをそれぞれ含有する操作カプシドベクターを発現させることによって生成され得る。例えば、図 8 を参照されたい。図 8 は、A A V 粒子産生のヘルパー依存的な方法を示すことが理解されるであろうが、これは、ヘルパーを含まない方法によっても行われ得ることが理解されるであろう。これは、もう 1 つの所望の細胞特異的操作 A A V カプシド変異体を含有し得る A A V カプシドライブラリーを生成し得る。図 6 に示されるように、A A V カプシドライブラリーは、1 回目の m R N A ベースの選択のために様々な非ヒト動物に投与され得る。図 1 に示されるように、A A V 及び関連ベクターによる形質導入プロセスは、細胞を形質導入したウイルスのゲノムを反映している m R N A 分子の産生をもたらし得る。少なくとも本明細書における実施例において示されるように、ウイルス D N A の存在を測定することによって細胞内のウイルス粒子の存在を単に検出することと対照的に、m R N A ベースの選択は、生成された機能的産物に基づくため、細胞を機能的に形質導入することが可能なウイルス粒子を決定するためにより特異的及び有効であり得る。

10

【0393】

1 回目の投与の後、次に、所望のカプシド変異体を有する 1 つ以上の操作 A A V ウイルス粒子が、フィルター処理された A A V カプシドライブラリーを形成するのに使用され得る。望ましい A A V ウイルス粒子は、カプシド変異体の m R N A 発現を測定し、どの変異体が、所望されない細胞型と比較して所望の細胞型において高度に発現されるかを決定することによって同定され得る。所望の細胞、組織、及び／又は器官型において高度に発現されるものは、所望の A A V カプシド変異体粒子である。ある実施形態において、A A V カプシド変異体コードポリヌクレオチドは、所望の細胞、組織、又は器官において選択的活性を有する組織特異的プロモーターの制御下にある。

20

【0394】

次に、1 回目から同定された操作 A A V カプシド変異体粒子は、様々な非ヒト動物に投与され得る。ある実施形態において、2 回目の選択及び同定において使用される動物は、1 回目の選択及び同定において使用される動物と同じでない。1 回目と同様に、投与の後、所望の細胞、組織、及び／又は器官型において上位で発現する変異体は、細胞内のウイルス m R N A 発現を測定することによって同定され得る。次に、2 回目の後に同定された上位の変異体が、任意にバーコード化され、任意にプールされ得る。ある実施形態において、特に、上位の変異体の最終用途がヒト内である場合、次に、2 回目からの上位の変異体が、非ヒト霊長類に投与されて、上位の細胞特異的変異体を同定し得る。各回の投与は、全身性であり得る。

30

【0395】

ある実施形態において、A A V カプシド変異体を生成する方法は、(a) 細胞内で操作 A A V カプシドポリヌクレオチドを含有する本明細書に記載されるベクター系を発現させて、操作 A A V ウイルス粒子カプシド変異体を生成する工程；(b) 工程 (a) において生成された操作 A A V ウイルス粒子カプシド変異体を収集する工程；(c) 操作 A A V ウイルス粒子カプシド変異体を、1 つ以上の第 1 の対象に投与する工程であって、操作 A A V ウイルス粒子カプシド変異体が、細胞内で操作 A A V カプシド変異体ベクター又はそのシステムを発現させ、細胞によって生成された操作 A A V ウイルス粒子カプシド変異体を収集することによって生成される、工程；及び (d) 1 つ以上の第 1 の対象における 1 つ以上の特定の細胞又は特定の細胞型によって有意に高いレベルで生成される 1 つ以上の操作 A A V カプシド変異体を同定する工程を含み得る。これに関して、「有意に高い」は、15 c m の皿当たり、約 2×10^{11} ～ 約 6×10^{12} 個のベクターゲノムの範囲であり得る力価を指し得る。

40

【0396】

本方法は、(e) 工程 (d) において同定されたいくつか又は全ての操作 A A V ウイルス粒子カプシド変異体を、1 つ以上の第 2 の対象に投与する工程；及び (f) 1 つ以上の第 2 の対象における 1 つ以上の特定の細胞又は特定の細胞型において有意に高いレベルで生成される 1 つ以上の操作 A A V ウイルス粒子カプシド変異体を同定する工程をさらに含

50

み得る。工程（a）における細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。ある実施形態において、工程（c）、工程（e）、又は両方における投与は、全身性である。ある実施形態において、1つ以上の第1の対象、1つ以上の第2の対象、又は両方は、非ヒト哺乳動物である。ある実施形態において、1つ以上の第1の対象、1つ以上の第2の対象、又は両方はそれぞれ、独立して、野生型非ヒト哺乳動物、ヒト化非ヒト哺乳動物、疾患特異的非ヒト哺乳動物モデル、及び非ヒト霊長類からなる群から選択される。

【0397】

操作ベクター及びベクターシステム

本明細書に記載される操作ポリヌクレオチド、（例えば、AAVカプシドポリヌクレオチド）の1つ以上を含有し得るベクター及びベクター系も、本明細書において提供される。これに関して使用される際、操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドは、本明細書における他の箇所に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドをコードすることが可能な本明細書に記載されるポリヌクレオチド及び／又は本明細書における他の箇所に記載される1つ以上の操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドタンパク質をコードすることが可能なポリヌクレオチドのいずれか1つ以上を指す。さらに、ベクターが、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドを含む場合、ベクターはまた、それ自体で特に示されないが、操作ベクター又はそのシステムと呼ばれ、操作ベクター又はそのシステムであると思なされ得る。実施形態において、ベクターは、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドの1つ以上の要素をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含有し得る。ベクターは、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドの1つ以上の構成要素を発現し得る細菌、真菌、酵母、植物細胞、動物細胞、及びトランスジェニック動物を生成するのに有用であり得る。本明細書に記載されるポリヌクレオチド配列の1つ以上を含有するベクターは、本開示の範囲内である。本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシド及びそのシステムの一部であるポリヌクレオチドの1つ以上が、ベクター又はベクター系に含まれ得る。

【0398】

ある実施形態において、ベクターは、3'ポリアデニル化シグナルを有する操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドを含み得る。ある実施形態において、3'ポリアデニル化は、SV40ポリアデニル化シグナルである。ある実施形態において、ベクターは、スプライス調節要素を有さない。ある実施形態において、ベクターは、1つ以上の最小スプライス調節要素を含む。ある実施形態において、ベクターは、修飾スプライス調節要素をさらに含み得、ここで、修飾は、スプライス調節要素を不活性化する。ある実施形態において、修飾スプライス調節要素は、repタンパク質ポリヌクレオチド及び操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドタンパク質変異体ポリヌクレオチドの間のスプライシングを誘導するのに十分なポリヌクレオチド配列である。ある実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、スプライシングを誘導するのに十分であり得、スプライスアクセプター又はスプライスドナーである。ある実施形態において、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドは、本明細書における他の箇所に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドである。

【0399】

ベクター及び／又はベクター系は、例えば、産生細胞などの細胞内で操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドの1つ以上を発現させて、本明細書における他の箇所に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドを含有する操作ウイルス（例えば、AAV）粒子を生成するのに使用され得る。本明細書に記載されるベクター及びベクター系のための他の使用も、本開示の範囲内である。一般に、本明細書全体を通して、この用語は、1つの環境から別の環境への実体の移動を可能にするか又は容易にするツールである。当業者によって理解されるいくつかの状況において、「ベクター」は、それが結合される別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す専門用語であり得る。ベクターは、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどのレプリコンであり得、それに、挿入

されたセグメントの複製をもたらすように別のDNAセグメントが挿入され得る。一般に、ベクターは、適切な制御要素に結合されるとき、複製が可能である。

【0400】

ベクターとしては、限定はされないが、一本鎖、二本鎖、又は部分的に二本鎖である核酸分子；1つ以上の自由端を含むか、自由端を含まない（例えば、環状）核酸分子；DNA、RNA、又は両方を含む核酸分子；及び当該技術分野において公知のポリヌクレオチドの他の種が挙げられる。他のタイプのベクターは、「プラスミド」であり、これは、標準的な分子クローニング技術などによってさらなるDNAセグメントが挿入された環状二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、ここで、ウイルス由来のDNA又はRNA配列が、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス（AAV））にパッケージングするためにベクター中に存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためにウイルスによって運ばれるポリヌクレオチドも含む。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自己複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）が、宿主細胞中への導入時に宿主細胞のゲノムに統合され、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが動作可能に結合される遺伝子の発現を指向することが可能である。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。組み換えDNA技術において有用な一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。

【0401】

組み換え発現ベクターは、宿主細胞内の核酸の発現に好適な形態の本発明の核酸（例えば、ポリヌクレオチド）から構成され得、これは、組み換え発現ベクターが、発現される核酸配列に動作可能に結合される、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択され得る1つ以上の調節要素を含むことを意味する。組み換え発現ベクターにおいて、「動作可能に結合される（operably linked）」及び「動作可能に結合される（operatively linked）」は、本明細書において同義的に使用され、本明細書における他の箇所にさらに定義される。ベクターに関して、「動作可能に結合される」という用語は、対象とするヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロ転写／翻訳システム内又はベクターが宿主細胞中に導入されるとき、宿主細胞内で）ヌクレオチド配列の発現を可能にするように調節要素に結合されることを意味することが意図される。有利なベクターは、アデノ随伴ウイルスを含み、このようなベクターのタイプはまた、所望の細胞特異的指向性を有する操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドを含有する操作ウイルス（例えば、AAV）ベクターなど、特定のタイプの細胞を標的とするために選択され得る。ベクター及びベクター系のこれらの及び他の実施形態は、本明細書における他の箇所に記載される。

【0402】

ある実施形態において、ベクターは、2シストロン性ベクターであり得る。ある実施形態において、2シストロン性ベクターは、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の要素に使用され得る。ある実施形態において、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの要素の発現は、好適な構成的又は組織特異的プロモーターによって駆動され得る。操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの要素がRNAである場合、その発現は、U6プロモーターなどのPol IIIプロモーターによって駆動され得る。ある実施形態において、2つが組み合わされる。

【0403】

細胞ベースのベクター増幅及び発現

ベクターは、好適な宿主細胞内の本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステム（例えば、核酸転写産物、タンパク質、酵素、及びそれらの組合せ）などの1つ以上の要素の発現のために設計され得る。

ある実施形態において、好適な宿主細胞は、原核細胞である。好適な宿主細胞としては、限定はされないが、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞が挙げられる。ベクターは、ウイルススペース又は非ウイルススペースであり得る。ある実施形態において、好適な宿主細胞は、真核細胞である。ある実施形態において、好適な宿主細胞は、好適な細菌細胞である。好適な細菌細胞としては、限定はされないが、大腸菌 (*Escherichia coli*) 種の細菌からの細菌細胞が挙げられる。大腸菌 (*E. coli*) の多くの好適な株が、ベクターの発現のために当該技術分野において公知である。これらとしては、限定はされないが、Pir1、Stbl2、Stbl3、Stbl4、TOP10、XL1 Blue、及びXL10 Goldが挙げられる。ある実施形態において、宿主細胞は、好適な昆虫細胞である。好適な昆虫細胞としては、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) からのものが挙げられる。ツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*) 細胞の好適な株としては、限定はされないが、Sf9及びSf21が挙げられる。ある実施形態において、宿主細胞は、好適な酵母細胞である。ある実施形態において、酵母細胞は、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来し得る。ある実施形態において、宿主細胞は、好適な哺乳動物細胞である。多くのタイプの哺乳類細胞が、ベクターを発現するために発達された。好適な哺乳類細胞としては、限定はされないが、HEK293、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、マウス骨髄腫細胞、HeLa、U2OS、A549、HT1080、CAD、P19、NIH 3T3、L929、N2a、MCF-7、Y79、SO-Rb50、HepG2、DIKX-X11、J558L、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、及びニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) が挙げられる。好適な宿主細胞は、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) においてさらに説明される。

10

20

30

40

50

【0404】

ある実施形態において、ベクターは、酵母発現ベクターであり得る。酵母サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における発現のためのベクターの例としては、pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6:229-234)、pMFa (Kuijan and Herskowitz, 1982. Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., 1987. Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、及びpicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.) が挙げられる。本明細書において使用される際、「酵母発現ベクター」は、RNA及び／又はポリペプチドをコードする1つ以上の配列を含有する核酸を指し、核酸の発現を制御する任意の所望の要素、並びに酵母細胞の内部の発現ベクターの複製及び維持を可能にする任意の要素をさらに含有し得る。多くの好適な酵母発現ベクター及びその特徴は、当該技術分野において公知であり；例えば、様々なベクター及び技術は、Yeast Protocols, 2nd edition, Xiao, W., ed. (Humana Press, New York, 2007) 及び Buckholz, R. G. 及び Gleeson, M. A. (1991) Biotechnology (NY) 9(11):1067-72に示される。酵母ベクターは、限定はされないが、動原体 (CEN) 配列、自己複製配列 (ARS)、プロモーター、例えば、対象とする配列又は遺伝子に動作可能に結合されるRNAポリメラーゼIIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIIターミネーターなどのターミネーター、複製起点、及びマーカー遺伝子 (例えば、栄養要求性、抗生物質、又は他の選択可能マーカー) を含有し得る。酵母において使用するための発現ベクターの例は、プラスミド、酵母人工染色体、2 μ プラスミド、酵母組み込み型プラスミド、酵母複製プラスミド、シャトルベクター、及びエピソームプラスミドを含み得る。

【0405】

ある実施形態において、ベクターは、バキュロウイルスベクター又は発現ベクターであ

り、昆虫細胞内でのポリヌクレオチド及び／又はタンパク質の発現に好適であり得る。培養された昆虫細胞（例えば、SF9細胞）内でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ（Smith, et al., 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165）及びpVLシリーズ（Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39）が挙げられる。rAAV（組み換えアデノ随伴ウイルス）ベクターは、好ましくは、昆虫細胞、例えば、ツマジロクサヨトウ（*Spodoptera frugiperda*）SF9昆虫細胞内で生成され、無血清懸濁液培養物中で増殖される。無血清昆虫細胞は、商業的供給業者、例えば、Sigma Aldrich（EX-CELL 405）から購入され得る。

10

【0406】

ある実施形態において、ベクターは、哺乳動物発現ベクターである。ある実施形態において、哺乳動物発現ベクターは、哺乳動物細胞内で1つ以上のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドを発現することが可能である。哺乳動物発現ベクターの例としては、限定はされないが、pCDM8（Seed, 1987. Nature 329: 840）及びpMT2PC（Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187-195）が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、哺乳動物細胞内で1つ以上のポリヌクレオチド及び／又はタンパク質の発現を制御することが可能な1つ以上の好適な調節要素を含み得る。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、サルウイルス40、及び本明細書に開示され、当該技術分野

20

において公知である他のものに由来する。好適な調節要素についてのさらなる詳細は、本明細書における他の箇所に記載される。

【0407】

原核細胞及び真核細胞の両方のための他の好適な発現ベクター及びベクター系については、例えば、Chapters 16 and 17 of Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989を参照されたい。

【0408】

ある実施形態において、組み換え哺乳動物発現ベクターは、優先的に特定の細胞型（例えば、組織特異的調節要素は、核酸を発現させるのに使用される）の核酸の発現を指向することが可能である。組織特異的調節要素は、当該技術分野において公知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1: 268-277）、リンパ系特異的プロモーター（Calame and Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235-275）、T細胞受容体の特定のプロモーター（Wimoto and Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733）及び免疫グロブリン（Baneiji, et al., 1983. Cell 33: 729-740；Queen and Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748）、神経特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター；Byrne and Ruddie, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916）、及び乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第4, 873, 316号明細書及び欧州特許出願公開第264, 166号明細書）が挙げられる。発生調節プロモーター、例えば、マウスhoxプロモーター（Kessel and Gruss, 1990. Science 249: 374-379）及びα-フェトプロテインプロモーター（Campes and Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546）も包含される。これらの原核生物及び真核生物ベクターに関連して、米国特許第6, 7

30

40

50

50, 059号明細書が言及され、その内容は、全体が参照により本明細書に援用される。他の実施形態は、ウイルスベクターを用いることができ、これに関して、米国特許出願第13/092, 085号明細書が言及され、その内容は、全体が参照により本明細書に援用される。組織特異的調節要素は、当該技術分野において公知であり、これに関して、米国特許第7, 776, 321号明細書が言及され、その内容は、全体が参照により本明細書に援用される。ある実施形態において、調節要素は、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の要素の発現を駆動するように、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の要素に動作可能に結合され得る。

【0409】

ベクターは、原核生物又は原核細胞内で導入及び増殖され得る。ある実施形態において、原核生物は、真核細胞中に導入されるベクターのコピーを増幅するため、又は真核細胞中に導入されるベクターの産生における中間ベクターとして使用される（例えば、ウイルスベクターパッケージングシステムの一部としてプラスミドを増幅する）。ある実施形態において、原核生物は、例えば、宿主細胞又は宿主生物への送達のために1つ以上のタンパク質の供給源を提供するために、ベクターのコピーを増幅し、1つ以上の核酸を発現するのに使用される。

【0410】

ある実施形態において、ベクターは、融合ベクター又は融合発現ベクターであり得る。ある実施形態において、融合ベクターは、いくつかのアミノ酸を、それにコードされるタンパク質に、例えば、組み換えタンパク質のアミノ末端、カルボキシ末端、又は両方に付加する。このような融合ベクターは、(i) 組み換えタンパク質の発現を増加させるため；(ii) 組み換えタンパク質の可溶性を高めるため；及び(iii) 親和性精製におけるリガンドとして働くことによって組み換えタンパク質の精製を補助するためなどの、1つ以上の目的を果たすことができる。ある実施形態において、原核生物におけるポリヌクレオチド（非コードポリヌクレオチドなど）及びタンパク質の発現は、融合又は非融合ポリヌクレオチド及び／又はタンパク質のいずれかの発現を指向する構成的又は誘導性プロモーターを含有するベクターを用いて、大腸菌（*Escherichia coli*）中で行われ得る。ある実施形態において、融合発現ベクターは、タンパク質分解切断部位を含み得、これは、融合ベクター骨格又は他の融合部分及び組み換えポリヌクレオチド又はタンパク質の接合部に導入されて、融合ポリヌクレオチド又はタンパク質の精製の後に、融合ベクター骨格又は他の融合部分からの組み換えポリヌクレオチド又はタンパク質の分離を可能にし得る。このような酵素、及びそれらの同種認識配列は、第Xa因子、トロンビン及びエンテロキナーゼを含む。例の融合発現ベクターとしては、pGEX（Pharmacia Biotech Inc；Smith and Johnson, 1988 . Gene 67: 31-40）、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、又はプロテインAのそれぞれを、標的組み換えタンパク質に融合するpMAL（New England Biolabs, Beverly, Mass.）及びpRIT5（Pharmacia, Piscataway, N. J.）が挙げられる。好適な誘導性非融合大腸菌（*E. coli*）発現ベクターの例としては、pTrc（Amrann et al., (1988) Gene 69: 301-315）及びpET 11d（Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89）が挙げられる。

【0411】

ある実施形態において、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の要素の発現を駆動する1つ以上のベクターは、本明細書に記載される操作送達システムの要素の発現が、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシ

10

20

30

40

50

システム（限定はされないが、本明細書における他の箇所により詳細に記載される操作遺伝子導入剤粒子を含む）の形成を指向するように、宿主細胞中に導入される。例えば、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドシステムの異なる要素がそれぞれ、別個のベクターにおける別個の調節要素に動作可能に結合され得る。本明細書に記載される操作送達システムの異なる要素のRNAが、動物又は哺乳動物又はその細胞に送達されて、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドシステムの1つ以上の要素を組み込むか又は本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドシステムの1つ以上の要素を組み込むか及び／又は発現する1つ以上の細胞を含有する本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドシステムの異なる要素を構成的に又は誘導的に又は調整的に発現する動物又は哺乳動物又はその細胞を生成し得る。

10

【0412】

ある実施形態において、同じか又は異なる調節要素から発現される要素の2つ以上が、第1のベクターに含まれないシステムの任意の構成要素を提供する1つ以上のさらなるベクターとともに、単一のベクター中で組み合わせられ得る。単一のベクター中で組み合わせられる操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドシステムポリヌクレオチドは、任意の好適な配向で配置され得、例えば、1つの要素が、第2の要素に対して5'側（「上流」）又は第2の要素に対して3'側（「下流」）に位置する。1つの要素のコード配列は、第2の要素のコード配列の同じ又は反対側の鎖に位置し、同じ又は反対方向に配向され得る。ある実施形態において、単一のプロモーターは、1つ以上のイントロン配列（例えば、異なるイントロンにおいてそれぞれ、少なくとも1つのイントロンにおいて2つ以上、又は単一のイントロンにおいて全て）内に埋め込まれた、1つ以上の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドタンパク質をコードする転写産物の発現を駆動する。ある実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドポリヌクレオチドは、同じプロモーターに動作可能に結合され、同じプロモーターから発現され得る。

20

【0413】

ベクターの特徴

ベクターは、ベクター、送達されるポリヌクレオチド、それから生成されるウイルス粒子、又はそれから発現されるポリペプチドに、1つ以上の機能性を与え得るさらなる特徴を含み得る。このような特徴としては、限定はされないが、調節要素、選択可能マーカー、分子識別子（例えば、分子バーコード）、安定化要素などが挙げられる。発現ベクター及び含まれるさらなる特徴の設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望の発現のレベルなどの要因に依存し得ることが、当業者によって理解されるであろう。

30

【0414】

調節要素

実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチド及び／又はそのベクター（本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドポリヌクレオチドなど）は、ポリヌクレオチドに動作可能に結合され得る1つ以上の調節要素を含み得る。「調節要素」という用語は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（IRES）、及び他の発現制御要素（例えば、転写終結シグナル、例えば、ポリアデニル化シグナル及びポリ-U配列）を含むことが意図される。このような調節要素は、例えば、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載される。調節要素は、多くのタイプの宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を指向するもの、及び特定の宿主細胞のみにおけるヌクレオチド配列（例えば、組織特異的調節配列）の発現を指向するものを含む。組織特異的プロモーターは、主に、対象とする所望の組織、例えば、筋肉、神経、骨、皮膚、血液、特定の器官（例えば、肝臓、脾臓）、又は特定の細胞型（例え

40

50

ば、リンパ球)における発現を指向し得る。調節要素はまた、時間依存的に、例えば、細胞周期依存的又は発生段階依存的に発現を指向することもあり、これはまた、組織又は細胞型特異的であっても又はなくともよい。ある実施形態において、ベクターは、1つ以上の *p o l I I I* プロモーター (例えば、1、2、3、4、5、又はそれ以上の *p o l I I I* プロモーター)、1つ以上の *p o l I I* プロモーター (例えば、1、2、3、4、5、又はそれ以上の *p o l I I* プロモーター)、1つ以上の *p o l I* プロモーター (例えば、1、2、3、4、5、又はそれ以上の *p o l I* プロモーター)、又はそれらの組合せを含む。*p o l I I I* プロモーター例としては、限定はされないが、U6及びH1プロモーターが挙げられる。*p o l I I* プロモーターの例としては、限定はされないが、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス (RSV) LTRプロモーター (任意に、RSVエンハンサーとともに)、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (任意に、CMVエンハンサーとともに) (例えば、Boshart et al, Cell, 41: 521-530 (1985) を参照)、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β -アクトチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ (PGK) プロモーター、及びEF1 α プロモーターが挙げられる。エンハンサー要素、例えば、WPRE; CMVエンハンサー; HTLV-IのLTRにおけるR-U5'セグメント (Mol. Cell. Biol., Vol. 8 (1), p. 466-472, 1988); SV40エンハンサー; 並びにウサギ β -グロブリンのエクソン2及び3間のイントロン配列 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78 (3), p. 1527-31, 1981) も、「調節要素」という用語によって包含される。

10

20

【0415】

ある実施形態において、調節配列は、米国特許第7,776,321号明細書、米国特許出願公開第2011/0027239号明細書、及びPCT公開国際公開第2011/028929号パンフレットに記載される調節配列であり得、その内容は、全体が参照により本明細書に援用される。ある実施形態において、ベクターは、最小プロモーターを含むし得る。ある実施形態において、最小プロモーターは、Mecp2プロモーター、tRNAプロモーター、又はU6である。さらなる実施形態において、最小プロモーターは、組織特異的である。ある実施形態において、ベクターポリヌクレオチド、最小プロモーター及びポリヌクレオチド配列の長さは、4.4Kb未満である。

【0416】

ポリヌクレオチドを発現するために、ベクターは、1つ以上の転写及び／又は翻訳開始調節配列、例えば、遺伝子の転写及び／又は細胞内のコードされるタンパク質の翻訳を指向するプロモーターを含み得る。ある実施形態において、構成的プロモーターが、用いられ得る。哺乳類細胞のための好適な構成的プロモーターは、当該技術分野において一般に公知であり、限定はされないが、SV40、CAG、CMV、EF-1 α 、 β -アクトチン、RSV、及びPGKを含む。細菌細胞、酵母細胞、及び真菌細胞のための好適な構成的プロモーターは、当該技術分野において一般に公知であり、例えば、細菌発現のためのT-7プロモーター及び酵母における発現のためのアルコールデヒドロゲナーゼプロモーターである。

30

【0417】

ある実施形態において、調節要素は、調節プロモーターであり得る。「調節プロモーター」は、構成的ではないが、時間的及び／又は空間的に調節された方式で遺伝子発現を指向するプロモーターを指し、組織特異的、組織選好的及び誘導性プロモーターを含む。ある実施形態において、調節プロモーターは、本明細書における他の箇所に上述される組織特異的プロモーターである。調節プロモーターは、調整プロモーター及び誘導性プロモーターを含む。ある実施形態において、調整プロモーターは、特定の細胞型で、特定の環境条件下で、及び／又は特定の発生段階中に、ポリヌクレオチドの発現を指向するのに用いられ得る。好適な組織特異的プロモーターは、限定はされないが、CNS組織及び細胞特異的プロモーターを含み得る。

40

【0418】

50

好適な神経組織／細胞特異的プロモーターとしては、限定はされないが、GFAPプロモーター（星状膠細胞）、SYN1プロモーター（神経）、及びNSE／RU5'（成熟神経）が挙げられる。

【0419】

他の好適なCNS特異的プロモーターは、限定はされないが、神経活性ペプチドは、コレシストキニン（CCK）（例えば、Chhatwani et al. *Gene Therapy* volume 14, pages 575–583 (2007)を参照）、脳特異的DNA Miniプロモーター（de Leeuw et al. *Mol. Therapy*. 1 (5): 2014. doi:10.1038/mtm.2013.5にあるように脳又は汎神経系発現について同定されるもののいずれかなど）、ミエリン塩基性プロモーター（MBP）（例えば、von Jonquieres, G., Mersmann, N., Klugmann, C. B., Harasta, A. E., Lutz, B., Teahan, O., et al. (2013). *Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain*. *PLoS One* 8 (6), e65646. doi:10.1371/journal.pone.0065646を参照）、星状膠細胞における発現のためのグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）（例えば、Smith-Arica, J. R., Morelli, A. E., Larregina, A. T., Smith, J., Lowenstein, P. R., Castro, M. G. (2000). *Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression*. *Mol. Ther.* 2 (6), 579–587. doi:10.1006/mthe.2000.0215及びLee, Y., Messing, A., Su, M., Brenner, M. (2008). *GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression*. *Glia* 56 (5), 481–493. doi:10.1002/glia.20622を参照）、ヒトミエリン関連糖タンパク質プロモーター（完全長又は切断型）（例えば、von Jonquieres, G., Frohlich, D., Klugmann, C. B., Wen, X., Harasta, A. E., Ramkumar, R., et al. (2016). *Recombinant human myelin-associated glycoprotein promoter drives selective AAV-mediated transgene expression in oligodendrocytes*. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 13. doi:10.3389/fnmol.2016.00013を参照）、F4／80プロモーター（例えば、Rosario, A. M., Cruz, P. E., Ceballos-Diaz, C., Strickland, M. R., Siemieniowski, Z., Pardo, M., et al. (2016). *Microglia-specific targeting by novel capsid-modified AAV6 vectors*. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 3, 16026. doi:10.1038/mtm.2016.26を参照）、リン酸活性化グルタミンナーゼ（PAG）又は小胞型グルタミン酸トランスポーター（vGLUT）プロモーター（約90%のグルタミン酸作動性神経特異的発現の場合）（例えば、Rasmussen, M., Kong, L., Zhang, G. R., Liu, M., Wang, X., Szabo, G., et al. (2007). *Glutamate- or GABAergic neuron-specific, long-term expression in neocortical neurons from helper virus-free HSV-1 vectors containing the phosphate-activated glutamin*

10

20

30

40

50

ase, vesicular glutamate transporter-1, or glutamic acid decarboxylase promoter. Brain Res. 1144, 19-32. doi:10.1016/j.brainres.2007.01.125を参照)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) プロモーター (約90%のGABA作動性神経特異的発現の場合) (例えば、Rasmussen, M., Kong, L., Zhang, G. R., Liu, M., Wang, X., Szabo, G., et al. (2007). Glutamatergic or GABAergic neuron-specific, long-term expression in neocortical neurons from helper virus-free HSV-1 vectors containing the phosphate-activated glutaminase, vesicular glutamate transporter-1, or glutamic acid decarboxylase promoter. Brain Res. 1144, 19-32. doi:10.1016/j.brainres.2007.01.125を参照)、MeCP2プロモーター (例えば、Gray et al. Hum Gene Ther. 2011 Sep; 22 (9): 1143-53. doi:10.1089/hum.2010.245を参照)、及び網膜芽細胞腫遺伝子プロモーター (例えば、Jiang et al., J. Biol. Chem. 2001. 276, 593-600を参照) を含み得る。

【0420】

他の組織及び／又は細胞特異的プロモーターは、本明細書における他の箇所に記載され、当該技術分野において一般に公知であり得、本開示の範囲内である。

【0421】

誘導性／調整プロモーターは、正の誘導性／調整プロモーター (例えば、活性化された活性化因子との適切な相互作用によりポリヌクレオチドの転写を活性化するプロモーター、又は誘導剤 (化合物、環境条件、又は他の刺激) 又は負の／調整誘導性プロモーター (例えば、プロモーターのリプレッサー条件が除去されるまで抑制される (例えば、リプレッサーによって結合される) プロモーターであり得る (例えば誘導剤は、リプレッサーによるプロモーターの放出又はプロモーター環境からの化学的リプレッサーの除去を刺激するプロモーターに結合されたリプレッサーに結合する)。誘導剤は、化合物、環境条件、又は他の刺激であり得る。したがって、誘導性／調整プロモーターは、化学的、生物学的、又は他の分子剤、温度、光、及び／又はpHなどの任意の好適な刺激に応答し得る。好適な誘導性／調整プロモーターとしては、限定はされないが、Tet-On、Tet-Off、Lacプロモーター、pBad、AlcA、LexA、Hsp70プロモーター、Hsp90プロモーター、pDawn、XVE/OlexA、GVG、及びpOp/LhGRが挙げられる。

【0422】

植物細胞における発現が所望される場合、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドシステムの構成要素は、典型的に、植物プロモーター、すなわち、植物細胞内で動作可能なプロモーターの制御下に置かれる。異なるタイプのプロモーターの使用が考えられる。ある実施形態において、植物における操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドシステムベクターの包含は、AAVベクター産生の目的のためであり得る。

【0423】

構成的植物プロモーターは、植物の全て又はほぼ全ての発生段階の間の植物組織 (「構成的発現」と呼ばれる) の全て又はほぼ全てにおいてそれが制御するオープンリーディングフレーム (ORF) を発現することが可能なプロモーターである。構成的プロモーターの1つの非限定的な例は、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターである。異なるプロモーターは、様々な組織又は細胞型、又は異なる発生段階において、又は異なる環境条件に応答して、遺伝子の発現を指向し得る。特定の実施形態において、操作された

標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステム構成要素の1つ以上が、構成的プロモーターの制御下で発現され、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター問題選好プロモーターが、特定の植物組織、例えば葉若しくは根における血管細胞又は種子の特定の細胞における特定の細胞型において強化された発現を標的とするのに用いられ得る。操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムにおいて使用するための特定のプロモーターの例は、Kawamata et al., (1997) Plant Cell Physiol 38:792-803; Yamamoto et al., (1997) Plant J 12:255-65; Hire et al., (1992) Plant Mol Biol 20:207-18; Kuster et al., (1995) Plant Mol Biol 29:759-72; 及び Capana et al., (1994) Plant Mol Biol 25:681-91に見出される。

10

【0424】

誘導性であり、遺伝子編集又は遺伝子発現の時空制御を可能にし得るプロモーターの例は、エネルギーの形態を使用し得る。エネルギーの形態は、限定はされないが音響エネルギー、電磁放射線、化学エネルギー及び／又は熱エネルギーを含み得る。誘導性システムの例としては、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Tet-On又はTet-Off）、小分子2ハイブリッド転写活性化システム（FKBP、ABAなど）、又は光誘導性システム（フィトクロム、LOVドメイン、又はクリプトクロム）、例えば、配列特異的に転写活性の変化を指向する光誘導性転写エフェクター（LITE）が挙げられる。光誘導性システムの構成要素は、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステム、光応答性シトクロムヘテロ二量体（例えば、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来）、及び転写活性化／抑制ドメインの1つ以上の要素を含み得る。ある実施形態において、ベクターは、PCT公開国際公開第2014/018423号パンフレット及び米国特許出願公開第2015/0291966号明細書、同第2017/0166903号明細書、同第2019/0203212号明細書において示される誘導性DNA結合タンパク質の1つ以上を含み得、これらの文献は、例えば、誘導性DNA結合タンパク質及び使用方法の実施形態を記載し、本発明とともに使用するために適合され得る。

20

【0425】

ある実施形態において、一過性又は誘導性発現は、例えば、化学物質調節型プロモーターを含むことによって達成され得、すなわち、ここで、外因性化学物質の適用が、遺伝子発現を誘導する。遺伝子発現の調節はまた、化学物質抑制性プロモーターを含むことによって得られ、ここで、化学物質の適用が、遺伝子発現を抑制する。化学物質誘導性プロモーターとしては、限定はされないが、ベンゼンスルホンアミド除草剤毒性緩和剤によって活性化されるトウモロコシln2-2プロモーター（De Veylder et al., (1997) Plant Cell Physiol 38:568-77）、発芽前除草剤として使用される疎水性求電子化合物によって活性化されるトウモロコシGSTプロモーター（GST-ll-27、国際公開第93/01294号パンフレット）、及びサリチル酸によって活性化されるタバコPR-1aプロモーター（Ono et al., (2004) Biosci Biotechnol Biochem 68:803-7）が挙げられる。テトラサイクリン誘導性及びテトラサイクリン抑制性プロモーターなどの抗生物質によって調節されるプロモーター（Gatz et al., (1991) Mol Gen Genet 227:229-37; 米国特許第5,814,618号明細書及び同第5,789,156号明細書）も、本明細書において使用され得る。

30

40

【0426】

ある実施形態において、ベクター又はそのシステムは、特性の細胞構成要素又は細胞小器官への／中で操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドを転座及び／又は発現することが可能な1つ以上の要素を含み得る

50

。このような細胞小器官としては、限定はされないが、核、リボソーム、小胞体、ゴルジ体、葉緑体、ミトコンドリア、液胞、リソソーム、細胞骨格、細胞膜、細胞壁、ペルオキシソーム、中心小体などが挙げられる。

【0427】

選択可能マーカー及びタグ

操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドの1つ以上は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドであり得る、選択可能マーカー若しくはタグをコードするか又はそれらであるポリヌクレオチドを含むように動作可能に結合され、融合され、又は他の形で修飾され得る。ある実施形態において、選択可能マーカーポリペプチドが、翻訳されるとき、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリペプチドのN-及びC-末端の間、又は操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリペプチドのN-及び/又はC末端における2つのアミノ酸の間に挿入されるように、ポリペプチド選択可能マーカーをコードするポリペプチドは、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムポリヌクレオチドに組み込まれ得る。ある実施形態において、選択可能マーカー又はタグは、ポリヌクレオチドバーコード又は固有分子識別子（UMI）である。

10

【0428】

このような選択可能マーカー又はタグをコードするポリヌクレオチドが、選択可能マーカー又はタグの発現を可能にするために適切な方法で本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の構成要素をコードするポリヌクレオチドに組み込まれ得ることが理解されるであろう。このような技術及び方法は、本明細書における他の箇所に記載され、本開示を考慮して当業者によって即座に理解されるであろう。多くのこのような選択可能マーカー及びタグは、当該技術分野において一般に公知であり、本開示の範囲内であることが意図される。

20

【0429】

好適な選択可能マーカー及びタグとしては、限定はされないが、親和性タグ、例えば、キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、ポリ（His）タグ；可溶化タグ、例えば、チオレドキシン（TRX）及びポリ（NANP）、MBP、及びGST；クロマトグラフィータグ、例えば、ポリアニオン系アミノ酸からなるもの、例えば、FLAG-タグ；エピトープタグ、例えば、V5-タグ、Myc-タグ、HA-タグ及びNE-タグ；特定の酵素的修飾（ビオチンリガーゼによるビオチン化など）又は化学修飾（蛍光イメージングのためのFLASH-EDT2との反応など）を可能にし得るタンパク質タグ、制限酵素又は他の酵素切断部位を含有するDNA及び/又はRNAセグメント；スペクチノマイシン、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、Basta、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（NEO）、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（HPT）などの抗生物質を含む本体は毒性の化合物に対する抵抗性を提供する産物をコードするDNAセグメント；レシピエント細胞において本来は欠失している産物をコードするDNA及び/又はRNAセグメント（例えば、tRN遺伝子、栄養要求性マーカー）；容易に同定され得る産物をコードするDNA及び/又はRNAセグメント（例えば、β-ガラクトシダーゼ、GUSなどの表現型マーカー；緑色蛍光タンパク質（GFP）、シアン色（CFP）、黄色（YFP）、赤色（RFP）などの蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、及び細胞表面タンパク質）；PCRのための1つ以上の新しいプライマー部位を生成し得るポリヌクレオチド（例えば、前に並置されていない2つのDNA配列の並列）、制限エンドヌクレアーゼ又は他のDNA修飾酵素、化学物質などによって作用されていない又は作用されたDNA配列；エピトープタグ（例えば、GFP、FLAG-及びHis-タグ）、及び、分子バーコード又は固有分子識別子（UMI）を作製するDNA配列、その同定を可能にする特定の修飾（例えば、メチル化）に必要なDNA配列が挙げられる。他の好適なマーカーは、当業者によって理解されるであろう。

30

40

50

【0430】

選択可能マーカー及びタグは、好適なリンカー、例えば、GS又はGG程度から最大で(GGGGG)₃(配列番号315)又は(GGGGS)₃(配列番号316)のグリシン又はグリシンセリンリンカーを介して、本明細書に記載される操作AAVカプシドシステムの1つ以上の構成要素に動作可能に結合され得る。他の好適なリンカーが、本明細書における他の箇所に記載される。

【0431】

ベクター又はベクター系は、1つ以上の標的化部分をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含み得る。ある実施形態において、標的化部分は、コードポリヌクレオチドは、ウイルス粒子が特定の細胞、組織、器官などに標的化され得るように生成されたウイルス粒子内及び／又はウイルス粒子上でそれらが発現されるように、ウイルスベクター系などのベクター又はベクター系に含まれ得る。ある実施形態において、標的化部分は、コードポリヌクレオチドは、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス(例えば、AAV)カプシドポリヌクレオチド及び／又はそれから発現される産物が、標的化部分を含み、特定の細胞、組織、器官などに標的化され得るように、ベクター又はベクター系に含まれ得る。非ウイルス担体などのある実施形態において、標的化部分は、担体(例えば、ポリマー、脂質、無機分子など)に結合され得、担体及び任意の結合又は会合される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス(例えば、AAV)カプシドポリヌクレオチドを、特定の細胞、組織、器官などに標的化することが可能であり得る。

【0432】

無細胞ベクター及びポリヌクレオチド発現

ある実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス(例えば、AAV)カプシドシステムの1つ以上の特徴をコードするポリヌクレオチドは、無細胞インビトロシステムにおいてベクター又は好適なポリヌクレオチドから発現され得る。言い換えると、ポリヌクレオチドは、インビトロで、転写され、任意に翻訳され得る。インビトロ転写／翻訳システム及び適切なベクターは、当該技術分野において一般に公知であり、市販されている。一般に、インビトロ転写及びインビトロ翻訳システムは、細胞環境の外部で、RNA及びタンパク質合成のそれぞれのプロセスを再現する。インビトロ転写のためのベクター及び好適なポリヌクレオチドは、T7、SP6、T3、ポリヌクレオチド又はベクターを転写するために適切なポリメラーゼによって認識され、作用され得るプロモーター調節配列を含み得る。

【0433】

インビトロ翻訳は、独立しているか(例えば、精製されたポリリボヌクレオチドの翻訳)又は転写に結合／連結され得る。ある実施形態において、無細胞(又はインビトロ)翻訳システムは、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽、及び／又は大腸菌(E. coli)からの抽出物を含み得る。抽出物は、外因性RNAの翻訳に必要な様々な高分子構成要素(例えば、70S又は80Sリボソーム、tRNA、アミノアシル-tRNA、シنتターゼ、開始、伸長因子、終結因子など)を含み得る。他の構成要素は、限定はされないが、アミノ酸、エネルギー供給源(ATP、GTP)、エネルギー再生システム(クレアチンホスフェート及びクレアチンホスホキナーゼ(真核細胞システム))(細菌システムのためのホスホエノールビルビン酸及びビルビン酸キナーゼ)、及び他の補因子(Mg²⁺、K⁺など)を含め、翻訳反応に含まれるか又は翻訳反応中に加えられ得る。上述されるように、インビトロ翻訳は、RNA又はDNA出発材料に基づき得る。いくつかの翻訳システムは、出発材料(例えば、網状赤血球溶解物及びコムギ胚芽抽出物)としてRNA鋳型を用い得る。いくつかの翻訳システムは、出発材料(例えば、大腸菌(E. coli)ベースのシステム)としてDNA鋳型を用い得る。これらのシステムにおいて、転写及び翻訳が、連結され、DNAが、まず、RNAへと転写され、これが、その後、翻訳される。好適な標準的な及び結合された無細胞翻訳システムが、当該技術分野において一般に公知であり、市販されている。

【0434】

ベクターポリヌクレオチドのコドン最適化

本明細書における他の箇所に記載されるように、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の実施形態をコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。ある実施形態において、任意に、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの実施形態をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドに加えて、本明細書に記載されるベクター（「ベクターポリヌクレオチド」）に含まれる1つ以上のポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。一般に、コドン最適化は、天然配列の少なくとも1つのコドン（例えば、約又は約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50超、若しくはそれ以上のコドン）を、天然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高頻度で又は最も高頻度で使用するコドンで置換することによって、対象とする宿主細胞内の強化された発現のために核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸の特定のコドンに対して特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用の差）は、多くの場合、メッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳の効率と相関し、これは、ひいては、特に、翻訳されるコドンの特性及び特定のトランスファーRNA（tRNA）分子の利用可能性に依存するものと考えられる。細胞内の選択されたtRNAの優位性は、一般に、ペプチド合成において最も高頻度で使用するコドンの反映である。したがって、遺伝子は、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調整され得る。コドン使用表は、例えば、www.kazusa.or.jp/codon/で入手可能な「コドン使用データベース」で容易に入手可能であり、これらの表は、いくつかの方法で適合され得る。Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000) を参照されたい。特定の宿主細胞内での発現のために特定の配列を最適化するコドンのコンピュータアルゴリズムも入手可能であり、例えば、Gene Forge (Aptagen; Jacobus, PA) も入手可能である。ある実施形態において、DNA/RNA 標的化カスタンパク質をコードする配列における1つ以上のコドン（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、若しくはそれ以上、又は全てのコドン）は、特定のアミノ酸のための最も高頻度で使用するコドンに対応する。酵母におけるコドン使用に関して、http://www.yeastgenome.org/community/codon_usage.shtmlで利用可能なオンライン酵母ゲノムデータベース、又はCodon selection in yeast, Bennetzen and Hall, J Biol Chem. 1982 Mar 25; 257 (6): 3026-31が参照される。藻類を含む植物におけるコドン使用に関して、Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria, Campbell and Gowri, Plant Physiol. 1990 Jan; 92 (1): 1-11.; 並びにCodon usage in plant genes, Murray et al, Nucleic Acids Res. 1989 Jan 25; 17 (2): 477-98; 又はSelection on the codon bias of chloroplast and cyanelle genes in different plant and algal lineages, Morton BR, J Mol Evol. 1998 Apr; 46 (4): 449-59が参照される。

【0435】

ベクターポリヌクレオチドは、特定の細胞型、組織型、器官型、及び／又は対象型における発現のためにコドン最適化され得る。ある実施形態において、コドン最適化配列は、本明細書における他の箇所に記載されるように、真核生物、例えば、ヒト（すなわち、ヒト又はヒト細胞内での発現のために最適化される）において、又は別の真核生物、例えば、別の動物（例えば、哺乳動物又は鳥類）のための発現のために最適化される配列である

。このようなコドン最適化配列は、本明細書における説明を考慮して当業者の技能の範囲内である。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、特定の細胞型のためにコドン最適化される。このような細胞型は、限定はされないが、CNS上皮細胞（限定はされないが、脳室の内側を覆う細胞を含む）、神経細胞（神経、脳細胞、脊柱細胞、神経支持細胞（例えば、星状膠細胞、グリア細胞、シュワン細胞など）、CNSの結合組織細胞（脂肪及び髄膜などのCNSの他の軟組織充填細胞）、幹細胞及び他の前駆細胞、CNS免疫細胞、胚細胞、及びそれらの組合せを含み得る。このようなコドン最適化配列は、本明細書における説明を考慮して当業者の技能の範囲内である。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、特定の組織型のためにコドン最適化される。このような組織型は、限定はされないが、CNS組織及び／又はその細胞を含み得る。このようなコドン最適化配列は、本明細書における説明を考慮して当業者の技能の範囲内である。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、特定の器官のためにコドン最適化される。このような器官としては、限定はされないが、脳が挙げられる。このようなコドン最適化配列は、本明細書における説明を考慮して当業者の技能の範囲内である。

10

【0436】

ある実施形態において、ベクターポリヌクレオチドは、原核細胞又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、植物或いは、限定はされないが、ヒト、又は本明細書に記載される非ヒト真核生物若しくは動物又は哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜、又は非ヒト哺乳動物又は霊長類を含む哺乳動物などの特定の生物のものであるか又はそれに由来し得る。

20

【0437】

非ウイルスベクター及び担体

ある実施形態において、ベクターは、非ウイルスベクター又は担体である。ある実施形態において、非ウイルスベクターは、ウイルスベクターと比較して、低下した毒性及び／又は免疫原性及び／又は増加して、バイオセーフティーの利点を有し得る。専門用語「非ウイルスベクター及び担体」は、これに関して本明細書において使用される際、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドに結合し、組み込み、連結し、及び／又は他の形でそれと相互作用することが可能であり得、ポリヌクレオチドを細胞に輸送し、及び／又はポリヌクレオチドを発現することが可能であり得るウイルス又はウイルスゲノムの1つ以上の構成要素（非ウイルスベクターによって送達及び／又は発現される任意のヌクレオチドを除く）に基づかない分子及び／又は組成物を指す。これが、送達されるウイルスベースのポリヌクレオチドの包含を除外しないことが理解されるであろう。例えば、送達されるgRNAが、ウイルス構成要素に対して指向され、それが、本来非ウイルスベクター又は担体に挿入又は他の形で連結される場合、これは、前記ベクターを「ウイルスベクター」にしないであろう。非ウイルスベクター及び担体は、裸のポリヌクレオチド、化学物質ベースの担体、ポリヌクレオチド（非ウイルス）ベースのベクター、及び粒子ベースの担体を含む。非ウイルスベクター及び担体に関して使用される際の「ベクター」という用語が、ポリヌクレオチドベクターを指し、これらに関して使用される際の「担体」が、送達されるポリヌクレオチド、例えば、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドに結合されるか又は他の形でそれと相互作用する非核酸又はポリヌクレオチド分子又は組成物を指すことが理解されるであろう。

30

40

【0438】

裸のポリヌクレオチド

ある実施形態において、本明細書における他の箇所に記載される1つ以上の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドに含まれ得る。本明細書において使用される際の専門用語「裸のポリヌクレオチド」は、多くの場合、環境因子及び／又は分解からそれを保護するのを助け得る別の分子（例えば、タンパク質、脂質、及び／又は他の分子）と結合されないポリヌクレオチドを指す。本明細書において使用される際、と結合される（associate

50

d with) は、限定はされないが、に結合される (linked to)、に付着される (adhered to)、に吸着される (adsorbed to)、に包まれる (enclosed in)、に若しくはその中に包まれる (enclosed in or within)、と混合される (mixed with) などを含む。本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドポリヌクレオチドの1つ以上を含む裸のポリヌクレオチドは、宿主細胞に直接送達され、任意にそこで発現され得る。裸のポリヌクレオチドは、任意の好適な2次元及び3次元構造を有し得る。非限定的な例として、裸のポリヌクレオチドは、一本鎖分子、二本鎖分子、環状分子 (例えば、プラスミド及び人工染色体)、一本鎖である部分及び二本鎖である部分を含む分子 (例えば、リボザイム) などであり得る。ある実施形態において、裸のポリヌクレオチドは、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドポリヌクレオチドのみを含有する。ある実施形態において、裸のポリヌクレオチドは、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドポリヌクレオチドに加えて、他の核酸及び／又はポリヌクレオチドを含有し得る。裸のポリヌクレオチドは、トランスポゾンシステムの1つ以上の要素を含み得る。トランスポゾン及びそのシステムは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

10

【0439】

非ウイルスポリヌクレオチドベクター

ある実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドポリヌクレオチドの1つ以上が、非ウイルスポリヌクレオチドベクターに含まれ得る。好適な非ウイルスポリヌクレオチドベクターとしては、限定はされないが、トランスポゾンベクター及びベクター系、プラスミド、細菌人工染色体、酵母人工染色体、AR (抗生物質抵抗性) フリープラスミド及びミニプラスミド、共有結合性閉環状ベクター (例えば、ミニサークル、ミニベクター、ミニノット)、直鎖状共有結合性閉鎖型ベクター (「ダンベル形状」、MIDGE (最小限の免疫学的に定義された (minimalistic immunologically defined) 遺伝子発現) ベクター、MILV (マイクロ直鎖状ベクター) ベクター、ミニストリング (Ministring)、ミニイントロンプラスミド、PSKシステム (分離後殺滅 (post-segregationally killing) システム)、ORT (オペレーターリプレッサー滴定) プラスミド、などが挙げられる。例えば、Hardee et al. 2017. Genes. 8 (2) : 65を参照されたい。

20

30

【0440】

ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、調整複製起点を有し得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、ORTプラスミドであり得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、最小限の免疫学的に定義された遺伝子発現を有し得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、1つ以上の分離後殺滅システム遺伝子を有し得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、ARフリーである。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、ミニベクターである。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、核局在シグナルを含む。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、1つ以上のCpGモチーフを含み得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、1つ以上の足場／基質結合領域 (S/MAR) を含み得る。例えば、その技術及びベクターが、本発明において使用するために適合され得る、Mirkovitch et al. 1984. Cell. 39 : 223-232、Wong et al. 2015. Adv. Genet. 89 : 113-152を参照されたい。S/MARは、核基質へのDNAループ塩基結合によって染色体の空間的構成において役割を果たすATリッチ配列である。S/MARは、プロモーター、エンハンサー、及びDNA複製起点などの調節要素の近くに見られることが多い。1つ以上のS/MARの包含は、娘細胞内のエピソームとして非ウイルスポ

40

50

リヌクレオチドベクターを維持する細胞周期につき一度 (once-per-cell-cycle) の複製を促進し得る。実施形態において、S/MAR配列は、非ウイルスポリヌクレオチドベクターに含まれる活発に転写されたポリヌクレオチド (例えば、本発明の1つ以上の操作AAVカプシドポリヌクレオチド) の下流に位置する。ある実施形態において、S/MARは、 β -インターフェロン遺伝子クラスターからのS/MARであり得る。例えば、その技術及びベクターが、本発明において使用するために適合され得る、Verghese et al. 2014. Nucleic Acid Res. 42: e53; Xu et al. 2016. Sci. China Life Sci. 59: 1024-1033; Jin et al. 2016. 8: 702-711; Koira la et al. 2014. Adv. Exp. Med. Biol. 801: 703-709; 及びNehlsen et al. 2006. Gene Ther. Mol. Biol. 10: 233-244を参照されたい。

10

【0441】

ある実施形態において、非ウイルスベクターは、トランスポゾンベクター又はそのシステムである。本明細書において使用される際、「トランスポゾン」(転位性要素とも呼ばれる)は、ゲノムにおける位置を別の位置に移動することが可能なポリヌクレオチド配列を指す。いくつかのクラスのトランスポゾンがある。トランスポゾンは、レトロトランスポゾン及びDNAトランスポゾンを含む。レトロトランスポゾンは、ポリヌクレオチドを、新たなゲノム又はポリヌクレオチドに転置するために、移動される(又は転置される)ポリヌクレオチドの転写を必要とする。DNAトランスポゾンは、ポリヌクレオチドを、新たなゲノム又はポリヌクレオチドに転置するために、移動される(又は転置される)ポリヌクレオチドの逆転写を必要としないものである。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、レトロトランスポゾンベクターであり得る。ある実施形態において、レトロトランスポゾンベクターは、長い末端反復を含む。ある実施形態において、レトロトランスポゾンベクターは、長い末端反復を含まない。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、DNAトランスポゾンベクターであり得る。DNAトランスポゾンベクターは、トランスポザーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含み得る。ある実施形態において、トランスポゾンベクターは、非自律性トランスポゾンベクターとして構成され、これは、転位が、それ自体で自然に起こらないことを意味する。これらの実施形態のいくつかにおいて、トランスポゾンベクターは、転位に必要なタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチド配列を欠く。ある実施形態において、非自律性トランスポゾンベクターは、1つ以上のAc要素を欠く。

20

30

【0442】

ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドトランスポゾンベクター系は、5'及び3'末端においてトランスポゾン末端逆方向反復(TIR)によって隣接される本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス(例えば、AAV)カプシドポリヌクレオチドを含有する第1のポリヌクレオチドベクター、並びにトランスポザーゼの発現を駆動するためにプロモーターに連結されたトランスポザーゼをコードすることが可能なポリヌクレオチドを含む第2のポリヌクレオチドベクターを含み得る。両方が同じ細胞内で発現される場合、トランスポザーゼは、第2のベクターから発現され得、第1のベクターにおけるTIR(例えば、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス(例えば、AAV)カプシドポリヌクレオチド)の間に材料を転置し、それを、宿主細胞のゲノムにおける1つ以上の位置に統合し得る。ある実施形態において、トランスポゾンベクター又はそのシステムは、遺伝子トラップとして構成され得る。ある実施形態において、TIRは、強いスプライスアクセプター部位、続いて、レポーター及び/又は他の遺伝子(例えば、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス(例えば、AAV)カプシドポリヌクレオチドの1つ以上)及び強いポリAテールに隣接するように構成され得る。転位が、このベクター又はそのシステムを使用しながら起こる場合、トランスポゾンは、遺伝子のイントロンに挿入され得、挿入されたレポーター又は他の遺伝子は、ミスプライシングプロセスを誘発し得、結果として、それは、捕捉された遺伝子を不活性

40

50

化する。

【0443】

任意の好適なトランスポゾンシステムが、使用され得る。好適なトランスポゾン及びそのシステムは、限定はされないが、Sleeping Beautyトランスポゾンシステム(Tc1/marinerスーパーファミリー) (例えば、Ivics et al. 1997. Cell. 91 (4) : 501-510を参照)、piggyBac (piggyBacスーパーファミリー) (例えば、Li et al. 2013 110 (25) : E2279-E2287及びYusa et al. 2011. PNAS. 108 (4) : 1531-1536)、Tol2 (スーパーファミリーhATを参照)、Frog Prince (Tc1/marinerスーパーファミリー) (例えば、Miskey et al. 2003 Nucleic Acid Res. 31 (23) : 6873-6881を参照) 及びその変異体を含み得る。

10

【0444】

化学的担体

ある実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドポリヌクレオチドは、化学的担体に連結され得る。ポリヌクレオチドの送達に好適であり得る化学的担体は、大きく、以下のクラス: (i) 無機粒子、(ii) 脂質ベース、(iii) ポリマーベース、及び(iv) ペプチドベースに分類され得る。それらは、(1) ポリヌクレオチドと縮合複合体を形成し得るもの (本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えばAAV) カプシドポリヌクレオチドなど)、(2) 特定の細胞を標的化することが可能であるもの、(3) 宿主細胞の核又は細胞質へのポリヌクレオチドの送達を増加させることが可能であるもの (本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えばAAV) カプシドポリヌクレオチドなど)、(4) 宿主細胞の細胞質におけるDNA/RNAから分解することが可能であるもの、及び(5) 持続又は制御放出が可能であるものに分類され得る。いずれか1つの所与の化学的担体が、複数のカテゴリーからの特徴を含み得ることが理解されるであろう。本明細書において使用される際の「粒子」という用語は、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドシステム構成要素の送達のための任意の好適なサイズの粒子を指す。好適なサイズは、マクロ、マイクロ、及びナノサイズの粒子を含む。

20

30

【0445】

ある実施形態において、非ウイルス担体は、無機粒子であり得る。ある実施形態において、無機粒子は、ナノ粒子であり得る。無機粒子は、可変のサイズ、形状、及び/又は多孔性によって構成及び最適化され得る。ある実施形態において、無機粒子は、網内系システムから流出するように最適化される。ある実施形態において、無機粒子は、封入された分子を分解から保護するように最適化され得る。これに関して非ウイルス担体として使用され得る好適な無機粒子は、限定はされないが、リン酸カルシウム、シリカ、金属 (例えば、金、白金、銀、パラジウム、ロジウム、オスミウム、イリジウム、ルテニウム、水銀、銅、レニウム、チタン、ニオブ、タンタル、及びそれらの組合せ)、磁性化合物、粒子、及び材料、(例えば、超磁性酸化鉄及び磁鉄鉱)、量子ドット、フラーレン (例えば、炭素ナノ粒子、ナノチューブ、ナノストリングなど)、及びそれらの組合せを含み得る。他の好適な無機非ウイルス担体は、本明細書における他の箇所に記載される。

40

【0446】

ある実施形態において、非ウイルス担体は、脂質ベースであり得る。好適な脂質ベースの担体も、本明細書においてより詳細に記載される。ある実施形態において、脂質ベースの担体は、送達されるポリヌクレオチド (例えば、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドポリヌクレオチドなど) における負電荷と結合するか又は他の形で相互作用することが可能なカチオン性脂質又は両親媒性脂質を含む。ある実施形態において、化学的非ウイルス担体システムは、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス (例えば、AAV) カプシドポリヌクレオチド) など

50

のポリヌクレオチド及び脂質（カチオン性脂質など）を含み得る。これらは、当該技術分野においてリポプレックスとも呼ばれる。リポプレックスの他の実施形態は、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、非ウイルス脂質ベースの担体は、脂質ナノエマルジョンであり得る。脂質ナノエマルジョンは、別の安定化乳化剤中の非混和性液体の分散体によって形成され得、送達されるポリヌクレオチド（例えば、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチド）を含有し得る脂質、水、及び界面活性剤から構成される約200nmの粒子を有し得る。ある実施形態において、脂質ベースの非ウイルス担体は、固体脂質粒子又はナノ粒子であり得る。

【0447】

ある実施形態において、非ウイルス担体は、ペプチドベースであり得る。ある実施形態において、ペプチドベースの非ウイルス担体は、1つ以上のカチオン性アミノ酸を含み得る。ある実施形態において、35～40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99又は100%のアミノ酸が、カチオン性である。ある実施形態において、ペプチド担体は、他のタイプの担体（例えば、これらの担体を官能化するためのポリマーベースの担体及び脂質ベースの担体）とともに使用され得る。ある実施形態において、官能化は、宿主細胞を標的とすることである。ポリマーベースの非ウイルス担体に含まれ得る好適なポリマーは、限定はされないが、ポリエチレンイミン（PEI）、キトサン、ポリ（DL-ラクチド）（PLA）、ポリ（DL-ラクチド-co-グリコシド）（PLGA）、デンドリマー（例えば、その技術及び組成物が、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドとともに使用するために適合され得る米国特許出願公開第2017/0079916号明細書を参照）、ポリメタクリレート、及びそれらの組合せを含み得る。

【0448】

ある実施形態において、非ウイルス担体は、外部刺激、例えば、pH、温度、オスモル濃度、特定の分子又は組成物（例えば、カルシウム、NaClなど）の濃度、圧力などに応答して非ウイルス担体に会合又は結合された操作送達システムポリヌクレオチドを放出するように構成され得る。ある実施形態において、非ウイルス担体は、本明細書に記載される操作AAVカプシドポリヌクレオチド及び環境的誘発剤応答要素、及び任意に誘発剤の1つ以上を含むように構成された粒子であり得る。ある実施形態において、粒子は、ポリメタクリレート及びポリアクリレートの群から選択され得るポリマーを含み得る。ある実施形態において、非ウイルス粒子は、その技術及び組成物が、本発明において使用するために適合され得る、米国特許出願公開第20150232883号明細書及び同第20050123596号明細書に記載される組成物微粒子の1つ以上の実施形態を含み得る。

【0449】

ある実施形態において、非ウイルス担体は、ポリマーベースの担体であり得る。ある実施形態において、ポリマーは、それが、送達される負荷電ポリヌクレオチド（本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドなど）と電荷依存的に相互作用し得るように、カチオン性又は主にカチオン性である。ポリマーベースのシステムは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

【0450】

ウイルスベクター

ある実施形態において、ベクターは、ウイルスベクターである。専門用語「ウイルスベクター」は、これに関して本明細書において使用される際、ポリヌクレオチド、例えば、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドを、ウイルス粒子へと発現及びパッケージングし、単独で又は1つ以上の他のウイルスベクター（ウイルスベクター系などにおけるように）とともに使用されるとき、前記ウイルス粒子を生成することが可能なウイルスの1つ以上の要素からの又はそれに基づく1つ以上の要素を含有するポリヌクレオチドベースのベクターを指す。ウイルス

ベクター及びそのシステムは、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の構成要素の送達及び／又は発現のためのウイルス粒子を生成するのに使用され得る。ウイルスベクターは、複数のベクターを含むウイルスベクター系の一部であり得る。ある実施形態において、複数のウイルスベクターを組み込むシステムは、これらのシステムの安全性を高め得る。好適なウイルスベクターは、アデノウイルスベースのベクター、アデノ随伴ベクター、ヘルパー依存性アデノウイルス（HdAd）ベクター、ハイブリッドアデノウイルスベクターなどを含み得る。ウイルスベクター及びそれから生成されるウイルス粒子の他の実施形態は、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、ウイルスベクターは、これらのシステムの改善された安全性のために複製能力のないウイルス粒子を生成するように構成される。

10

【0451】

アデノウイルスベクター、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター、及びハイブリッドアデノウイルスベクター

ある実施形態において、ベクターは、アデノウイルスベクターであり得る。ある実施形態において、アデノウイルスベクターは、ベクター又はそのシステムを用いて生成されたウイルス粒子が、血清型2、5、又は9であり得るような要素を含み得る。ある実施形態において、アデノウイルス粒子を介して送達されるポリヌクレオチドは、最大で約8 kbであり得る。したがって、ある実施形態において、アデノウイルスベクターは、約0.001 kb～約8 kbのサイズの範囲であり得る、送達されるDNAポリヌクレオチドを含み得る。アデノウイルスベクターは、いくつかの状況において上首尾に使用されている（例えば、Teramoto et al., 2000, Lancet, 355:1911-1912; Lai et al., 2002, DNA Cell Biol., 21:895-913; Flotte et al., 1996, Hum. Gene Ther., 7:1145-1159; 及びKay et al., 2000, Nat. Genet., 24:257-261を参照。操作AAVカプシドは、前記操作AAVカプシドを含有するアデノウイルス粒子を生成するために、アデノウイルスベクターに含まれ得る。

20

【0452】

ある実施形態において、ベクターは、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター又はそのシステムであり得る。これらは、当該技術分野において「ガットレス（gutless）」又は「ガッテド（guttled）」ベクターとも呼ばれ、アデノウイルスベクターの修飾世代である（例えば、Thrasher et al., 2006, Nature, 443:E5-E7を参照）。ヘルパー依存性アデノウイルスベクター系の実施形態において、1つのベクター（ヘルパー）が、複製に必要な全てのウイルス遺伝子を含有し得るが、パッケージングドメインにおける条件遺伝子欠陥を含有する。システムの第2のベクターは、ウイルスゲノムの末端、1つ以上の操作AAVカプシドポリヌクレオチド、及び天然のパッケージング認識シグナルのみを含有し得、これは、細胞からの選択的なパッケージングされた放出を可能にし得る（例えば、Cideciyan et al., 2009, N Engl J Med, 361:725-727を参照）。ヘルパー依存性アデノウイルスベクター系が、いくつかの状況において遺伝子送達に成功している（例えば、Simionelli et al., 2010, J Am Soc Gene Ther., 18:643-650; Cideciyan et al., 2009, N Engl J Med, 361:725-727; Crane et al., 2012, Gene Ther., 19(4):443-452; Alba et al., 2005, Gene Ther., 12:18-S27; Croyle et al., 2005, Gene Ther., 12:579-587; Amalfitano et al., 1998, J. Virol., 72:926-933; 及びMorrall et al., 1999, PNAS, 96:12816-12821を参照）。これらの刊行物に記載される技術及びベクターは、本明細書に記載される操作AAVカプシドポリヌクレオチドの包含及び送達のために適合され得る。ある実施形態において、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター又はそのシステムが

30

40

50

ら生成されたウイルス粒子を介して送達されるポリヌクレオチドは、最大で約38kbであり得る。したがって、ある実施形態において、アデノウイルスベクターは、約0.001kb～約37kbのサイズの範囲であり得る、送達されるDNAポリヌクレオチドを含み得る（例えば、Rosewell et al., 2011, J. Gene Ther. Suppl. 5:001を参照）。

【0453】

ある実施形態において、ベクターは、ハイブリッドアデノウイルスベクター又はそのシステムである。ハイブリッドアデノウイルスベクターは、遺伝子欠失アデノウイルスベクターの高い形質導入効率並びにアデノ随伴、レトロウイルス、レンチウイルス、及びトランスポゾンベースの遺伝子導入の長期ゲノム組み込み可能性から構成される。ある実施形態において、このようなハイブリッドベクター系は、安定した形質導入及び限られた組み込み部位をもたらし得る。例えば、Balague et al., 2000, Blood, 95:820-828; Morral et al., 1998, Hum. Gene Ther., 9:2709-2716; Kubo and Mitani, 2003, J. Virol., 77(5):2964-2971; Zhang et al., 2013, PLoS One, 8(10):e76771; 及びCooney et al., 2015, Mol. Ther., 23(4):667-674を参照されたい。これらの文献に記載されるその技術及びベクターが、本発明の操作AAVカプシドシステムにおいて使用するために修飾及び適合され得る。ある実施形態において、ハイブリッドアデノウイルスベクターは、レトロウイルス及び／又はアデノ随伴ウイルスの1つ以上の特徴を含み得る。ある実施形態において、ハイブリッドアデノウイルスベクターは、スプマレトロウイルス又は泡沫状ウイルス（FV）の1つ以上の特徴を含み得る。例えば、Ehrhardt et al., 2007, Mol. Ther., 15:146-156及びLiu et al., 2007, Mol. Ther., 15:1834-1841を参照されたい。これらの文献に記載されるその技術及びベクターが、本発明の操作AAVカプシドシステムにおいて使用するために修飾及び適合され得る。ハイブリッドアデノウイルスベクター又はそのシステムにおいてFVからの1つ以上の特徴を使用する利点は、広範囲の細胞を感染させるそれから生成されたウイルス粒子の能力、他のレトロウイルスとして大きなパッケージング容量、及び静止（非分裂）細胞内で持続する能力を含み得る。例えば、Ehrhardt et al., 2007, Mol. Ther., 15:146-156及びShuji et al., 2011, Mol. Ther., 19:76-82も参照されたい。これらの文献に記載されるその技術及びベクターが、本発明の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムにおいて使用するために修飾及び適合され得る。

【0454】

アデノ随伴ベクター

一実施形態において、操作ベクター又はそのシステムは、アデノ随伴ベクター（AAV）であり得る。例えば、West et al., Virology 160:38-47 (1987); 米国特許第4,797,368号明細書; 国際公開第93/24641号パンフレット; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); 及びMuzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)を参照されたい。それらの特徴のいくつかがアデノウイルスベクターと同様であるが、AAVは、それらの複製及び／又は病原性のいくらかの欠損を有し、したがって、アデノウイルスベクターより安全であり得る。ある実施形態において、AAVは、観察可能な副作用を伴わずに、ヒト細胞の19番染色体における特定の部位に統合し得る。ある実施形態において、AAVベクター、そのシステム、及び／又はAAV粒子の容量は、最大で約4.7kbであり得る。AAVベクター又はそのシステムは、本明細書に記載される1つ以上の操作カプシドポリヌクレオチドを含み得る。

【0455】

AAVベクター又はそのシステムは、1つ以上の調節分子を含み得る。ある実施形態に

において、調節分子は、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなどであり得、これらは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。ある実施形態において、AAVベクター又はそのシステムは、1つ以上の調節タンパク質をコードし得る1つ以上のポリヌクレオチドを含み得る。ある実施形態において、1つ以上の調節タンパク質は、Rep78、Rep68、Rep52、Rep40、その変異体、及びそれらの組合せから選択され得る。ある実施形態において、プロモーターは、上述されるように組織特異的プロモーターであり得る。ある実施形態において、組織特異的プロモーターは、本明細書に記載される操作カプシドAAVカプシドポリヌクレオチドの発現を駆動し得る。

【0456】

AAVベクター又はそのシステムは、1つ以上のカプシドタンパク質、例えば、本明細書における他の箇所に記載される操作AAVカプシドタンパク質をコードし得る1つ以上のポリヌクレオチドを含み得る。操作カプシドタンパク質は、AAVウイルス粒子のタンパク質シェル（操作カプシド）に組み立てることが可能であり得る。操作カプシドは、細胞特異的、組織特異的及び／又は器官特異的指向性を有し得る。

【0457】

ある実施形態において、AAVベクター又はそのシステムは、1つ以上のアデノウイルスヘルパー因子又は1つ以上のアデノウイルスヘルパー因子をコードし得るポリヌクレオチドを含み得る。このようなアデノウイルスヘルパー因子は、限定はされないが、E1A、E1B、E2A、E4ORF6、及びVA RNAを含み得る。ある実施形態において、生成宿主細胞株は、アデノウイルスヘルパー因子の1つ以上を発現する。

【0458】

AAVベクター又はそのシステムは、特定の血清型を有するAAV粒子を生成するように構成され得る。ある実施形態において、血清型は、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-8、AAV-9又はそれらの任意の組合せであり得る。ある実施形態において、AAVは、AAV1、AAV-2、AAV-5、AAV-9又はそれらの任意の組合せであり得る。標的とされる細胞に関してAAVのAAVを選択することができ；例えば、脳及び／又は神経細胞を標的化するためにAAV血清型1、2、5、9又はハイブリッドカプシドAAV-1、AAV-2、AAV-5、AAV-9又はそれらの任意の組合せを選択することができ；心臓組織を標的化するためにAAV-4を選択することができ；肝臓への送達のためにAAV-8を選択することができる。したがって、ある実施形態において、脳及び／又は神経細胞を標的化することが可能なAAV粒子を生成することが可能なAAVベクター又はそのシステムは、血清型1、2、5又はハイブリッドカプシドAAV-1、AAV-2、AAV-5又はそれらの任意の組合せを有するAAV粒子を生成するように構成され得る。ある実施形態において、心臓組織を標的化することが可能なAAV粒子を生成することが可能なAAVベクター又はそのシステムは、AAV-4血清型を有するAAV粒子を生成するように構成され得る。ある実施形態において、肝臓を標的化することが可能なAAV粒子を生成することが可能なAAVベクター又はそのシステムは、AAV-8血清型を有するAAVを生成するように構成され得る。Srivastava, 2017, Curr. Opin. Virol. 21: 75-80も参照されたい。

【0459】

異なる血清型が、あるレベルの細胞、組織、及び／又は器官特異性を提供し得る一方、各血清型は依然として多栄養性であり、したがって、血清型が形質導入する際に効率が低い組織を標的とするために当該血清型を使用する場合、組織毒性をもたらし得ることが理解されるであろう。したがって、特定の血清型のAAVを選択することによって、いくらかの組織標的化能力を達成することに加えて、AAV血清型の指向性が、本明細書に記載される操作AAVカプシドによって修飾され得ることが理解されるであろう。本明細書における他の箇所に記載されるように、任意の血清型の野生型AAVの変異体は、本明細書に記載される方法によって生成され、特定の細胞特異的指向性を有することが決定され得、これは、参照野生型AAV血清型のものと同じか又は異なり得る。ある実施形態におい

10

20

30

40

50

て、野生型血清型の細胞、組織、及び／又は特異性は、強化され得る（例えば、血清型がそれに対して既にバイアスされた特定の細胞型に対してより選択的又は特異的にされた）。例えば、野生型 AAV-9 は、ヒトにおける筋肉及び脳に対してバイアスされる（例えば、Srivastava, 2017, Curr. Opin. Virol. 21: 75-80 を参照）。本明細書に記載される野生型 AAV-9 の操作 AAV カプシド及び／又はカプシドタンパク質変異体を含むことによって、例えば、筋肉（又は他の非 CNS 組織又は細胞）に対するバイアスが、低下されるか又はなくされ得、及び／又は CNS 組織又は細胞特異性が、筋肉（又は他の非 CNS 組織又は細胞）特異性が、比較して低下されるようであるように増加し、したがって、野生型 AAV-9 と比較して、CNS 組織又は細胞に対する特異性を強化する。上述されるように、野生型 AAV 血清型の操作カプシド及び／又はカプシドタンパク質変異体の包含は、野生型参照 AAV 血清型と異なる指向性を有し得る。例えば、AAV-9 の操作 AAV カプシド及び／又はカプシドタンパク質変異体は、ヒトにおける筋肉又は脳以外の組織に対する特異性を有し得る。

10

【0460】

ある実施形態において、AAV ベクターは、ハイブリッド AAV ベクター又はそのシステムである。ハイブリッド AAV は、少なくとも 1 つの異なる血清型に由来するカプシドへとパッケージングされる 1 つの血清型からの要素を有するゲノムを含む AAV である。例えば、生成されるのが rAAV2/5 である場合、及び生成方法が、上述されるヘルパーフリーの一過性トランスフェクション方法に基づいている場合、第 1 のプラスミド及び第 3 のプラスミド（アデノヘルパープラスミド）が、rAAV2 生成について記載されるのと同じであろう。しかしながら、第 2 のプラスミド、pRepCap は、異なるであろう。pRep2/Cap5 と呼ばれるこのプラスミドにおいて、Rep 遺伝子が、依然として AAV2 に由来する一方、Cap 遺伝子は、AAV5 に由来する。生成スキームは、AAV2 生成のための上記の手法と同じである。得られた rAAV は、rAAV2/5 と呼ばれ、ここで、ゲノムが、組み換え AAV2 に基づいている一方、カプシドは、AAV5 に基づいている。この AAV2/5 ハイブリッドウイルスによって示される細胞又は組織指向性が、AAV5 のものと同じであるべきであると考えられる。野生型ハイブリッド AAV 粒子が、上述される非ハイブリッド野生型血清型と同じ特異性問題を抱えていることが理解されるであろう。

20

【0461】

野生型ベースのハイブリッド AAV システムによって達成される利点は、操作 AAV カプシドにより達成され得る増加したカスタマイズ可能な細胞特異性と組み合わせられ得、これは、本明細書における他の箇所に記載される操作 AAV カプシドを含み得るハイブリッド AAV を生成することによって組み合わせられ得る。ハイブリッド AAV が、操作 AAV カプシドがその変異体である参照野生型血清型と異なる血清型からの要素を有するゲノムを含有する操作 AAV カプシドを含有し得ることが理解されるであろう。例えば、AAV-2 血清型からの構成要素（例えば、rep 要素）を含有するゲノムをパッケージングするのに使用される AAV-9 血清型の変異体である操作 AAV カプシドを含むハイブリッド AAV が生成され得る。上述される野生型ベースのハイブリッド AAV と同様に、得られる AAV 粒子の指向性は、操作 AAV カプシドのものになる。

30

40

【0462】

これらの細胞についての特定の野生型 AAV 血清型の表が、表 6 として以下に再現される Grimm, D. et al, J. Virol. 82: 5887-5911 (2008) に見出され得る。さらなる指向性の詳細は、上述されるように、Srivastava, 2017, Curr. Opin. Virol. 21: 75-80 に見出され得る。

50

【表 7】

表 6								
細胞株	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9
Huh-7	13	100	2.5	0.0	0.1	10	0.7	0.0
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1
HeLa	3	100	2.0	0.1	6.7	1	0.2	0.1
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND
Hep1A	20	100	0.2	1.0	0.1	1	0.2	0.0
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1.0
COS	33	100	33	3.3	5.0	14	2.0	0.5
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1.0	0.2
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1
単球	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND
未成熟 DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND
成熟 DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND

【0463】

ある実施形態において、AAVベクター又はそのシステムは、AAVrh.74又はAAVrh.10である。

【0464】

ある実施形態において、AAVベクター又はそのシステムは、レトロウイルスベクターに関連して記載されるものと同様に、「ガットレス」ベクターとして構成される。ある実施形態において、「ガットレス」AAVベクター又はそのシステムは、対象とする異種配列（例えば、操作AAVカプシドポリヌクレオチド）と関連してゲノム増幅及びパッケージングに関与するcis作用性ウイルスDNA要素を有し得る。

【0465】

ベクター構築

本明細書に記載されるベクターは、任意の好適なプロセス又は技術を用いて構築され得る。ある実施形態において、1つ以上の好適な組み換え及び／又はクローニング方法又は技術が、本明細書に記載されるベクターに使用され得る。好適な組み換え及び／又はクローニング技術及び／又は方法は、限定はされないが、米国特許出願公開第2004-0171156 A1号明細書に記載されるものを含み得る。他の好適な方法及び技術が、本明細書における他の箇所に記載される。

【0466】

組み換えAAVベクターの構築が、米国特許第5,173,414号明細書；Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985)；Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984)；Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984)；及びSamulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989)を含むいくつかの刊行物に記載される。技術及び／又は方法のいずれかが、本明細書に記載されるAAV又は他のベクターを構築するために、使用及び／又は適合され得る。AAVベクターは、本明細書における他の箇所に記載される。

【0467】

ある実施形態において、ベクターは、1つ以上の挿入部位、例えば、制限エンドヌクレアーゼ認識配列（「クローニング部位」とも呼ばれる）を有し得る。ある実施形態において、1つ以上の挿入部位（例えば、約又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10超、若しくはそれ以上の挿入部位）は、1つ以上のベクターの1つ以上の配列要素の上流及び／又は下流に位置する。

【0468】

本明細書に記載される操作AAVカプシドシステムの1つ以上の要素の発現のための送達ビヒクル、ベクター、粒子、ナノ粒子、製剤及びその構成要素は、国際公開第2014/093622号パンフレット（PCT/US2013/074667号明細書）などの上記の文献において使用され、本明細書においてより詳細に説明される。

10

【0469】

ウイルスベクターからのウイルス粒子生成

AAV粒子生成

本明細書に記載されるものなどのAAVベクター及びそのシステムからAAV粒子を生成するための2つの主な手法があり、これは、アデノウイルスヘルパー因子がどのように提供されるかに依存する（ヘルパー対ヘルパーフリー）。ある実施形態において、AAVベクター及びそのシステムからAAV粒子を生成する方法は、得られるAAV粒子（例えば、操作AAVカプシドポリヌクレオチド）によってパッケージング及び送達されるポリヌクレオチドを含有するAAVベクターとともにAAV複製及びカプシドコードポリヌクレオチドを安定的に有する細胞株中にアデノウイルス感染症を含め得る。ある実施形態において、AAVベクター及びそのシステムからAAV粒子を生成する方法は、「ヘルパーフリー」方法であり得、これは、3つのベクター（例えば、プラスミドベクター）：（1）2つのITRの間に対象とするポリヌクレオチド（例えば、操作AAVカプシドポリヌクレオチド）を含有するAAVベクター；（2）AAV Rep-Capコードポリヌクレオチドを有するベクター；及び（ヘルパーポリヌクレオチドによる適切な生成細胞株の共トランスフェクションを含む。当業者は、ヘルパー及びヘルパーフリーの両方である様々な方法及びその変形並びに各システムの異なる利点を理解するであろう。

20

【0470】

本明細書に記載される操作AAVベクター及びそのシステムは、これらの方法のいずれかによって生成され得る。

30

【0471】

ベクター及びウイルス粒子送達

本明細書に記載されるベクター（非ウイルス担体を含む）は、宿主細胞中に導入され、それによって、本明細書に記載される核酸（例えば、操作AAVカプシドシステム転写産物、タンパク質、酵素、その変異形態、その融合タンパク質など）によってコードされる融合タンパク質又はペプチド、及びウイルス粒子（ウイルスベクター及びそのシステムなどに由来する）を含む、転写産物、タンパク質、又はペプチドを生成し得る。

【0472】

1つ以上の操作AAVカプシドポリヌクレオチドは、上述されるように、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス又は他のプラスミド又はウイルスベクタータイプを用いて、特に、例えば、米国特許第8,454,972号明細書（製剤、アデノウイルスのための用量）、同第8,404,658号明細書（製剤、AAVのための用量）及び同第5,846,946号明細書（製剤、DNAプラスミドのための用量）並びに臨床試験及びレンチウイルス、AAV及びアデノウイルスを含む臨床試験に関連する刊行物からの製剤及び用量を用いて送達され得る。例えば、AAVについて、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第8,454,972号明細書及びAAVを含む臨床試験にあるとおりであり得る。アデノウイルスについて、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第8,404,658号明細書及びアデノウイルスを含む臨床試験にあるとおりであり得る。

40

【0473】

50

プラスミド送達のために、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第5,846,946号明細書及びプラスミドを含む臨床試験にあるとおりであり得る。ある実施形態において、用量は、平均70kgの個体（例えば、成人男性）に基づき、推定され得、異なる重量及び種の患者、対象、哺乳動物のために調整され得る。投与の頻度は、患者又は対象の年齢、性別、全体的な健康、他の条件及び対処される特定の病態又は症状を含む通常の要因に応じて、医療業務又は獣医学診療実践者（例えば、医師、獣医）の技能の範囲内である。ウイルスベクターは、対象とする組織又は細胞に注入又は他の形で送達され得る。

【0474】

インビボ送達に関して、AAVは、低い毒性（これは、免疫応答を活性化し得る細胞粒子の超遠心分離を必要としない精製方法に起因し得る）、及びそれが宿主ゲノムに統合しないため、挿入変異誘発を生じる低い可能性などのいくつかの理由のため他のウイルスベクターより有利である。

【0475】

本明細書に記載されるベクター及びウイルス粒子は、インビトロ、インビボ、及び又はエキスピボで宿主細胞中に送達され得る。送達は、限定はされないが、物理的方法、化学的方法、及び生物学的方法を含む任意の好適な方法によって行われ得る。物理的送達方法は、ベクターの細胞内送達を容易にするために細胞の膜障壁に対抗する物理的な力を用いる方法である。好適な物理的方法としては、限定はされないが、針（例えば、注射）、弾道導入（ballistic）ポリヌクレオチド（例えば、粒子衝撃、マイクロプロジェクトイル遺伝子導入、及び遺伝子銃）、エレクトロポレーション、ソノポレーション、フォトポレーション、マグネトフェクション、ハイドロポレーション、及び機械的マッサージが挙げられる。化学的方法は、細胞膜透過性又は細胞中へのベクターの進入を容易にする他の特性の変化を引き起こす化学物質を用いる方法である。例えば、細胞膜の透過性の変化を引き起こし得る環境pHが変化され得る。生物学的方法は、宿主細胞の生物学的過程又は細胞中へのベクターの輸送（担体を用いた又は用いない）を容易にする生物学的特性に依拠し、それを利用するものである。例えば、ベクター及び／又はその担体は、細胞におけるエンドサイトーシス又は同様のプロセスを刺激して、細胞中へのベクターの取り込みを容易にし得る。

【0476】

粒子を介した細胞への操作AAVカプシドシステム構成要素（例えば、操作AAVカプシド及び／又はカプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチド）の送達。本明細書において使用される際の「粒子」という用語は、本明細書に記載される操作AAVカプシドシステム構成要素の送達のための任意の好適なサイズの粒子を指す。好適なサイズは、マイクロ、マイクロ、及びナノサイズの粒子を含む。ある実施形態において、操作AAVカプシドシステム構成要素（例えば、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、及びそれらの組合せ）のいずれかが、本明細書に記載される1つ以上の粒子又はその構成要に結合され、連結され、それと統合され、他の形で会合され得る。次に、本明細書に記載される粒子は、適切な経路及び／又は技術によって、細胞又は生物に投与され得る。ある実施形態において、粒子送達は、ポリヌクレオチド又はベクター構成要素の送達のために選択され、そのような送達に有利であり得る。実施形態において、粒子送達はまた、本明細書における他の箇所に記載される他の層カプシドシステム分子及び製剤に有利であり得ることが理解されるであろう。

【0477】

操作ウイルスカプシドを含む操作ウイルス粒子

本明細書における他の箇所により詳細に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドを含有し得る操作ウイルス粒子（本明細書及び本明細書における他の箇所において「操作ウイルス粒子」とも呼ばれる）も、本明細書に記載される。操作AAVカプシドを有するウイルス粒子は、本明細書において操作AAV粒子と呼ばれる。操作ウイルス（例えば、AAV）粒子が、上述される少なくとも1つの操作AAVカプシドタンパク質を含有するアデノウイルスベースの粒子、ヘルパーアデノウイルスベースの粒子、AAVベ-

スの粒子、又はハイブリッドアデノウイルスペースの粒子であり得ることが理解されるであろう。操作 A A V カプシドは、本明細書における他の箇所に記載されるように 1 つ以上の操作 A A V カプシドタンパク質を含有するものである。ある実施形態において、操作 A A V 粒子は、本明細書に記載される 1 ～ 60 個の操作 A A V カプシドタンパク質を含み得る。ある実施形態において、操作 A A V 粒子は、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、又は 60 個の操作カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作 A A V 粒子は、0 ～ 59 個の野生型 A A V カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作 A A V 粒子は、0、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、又は 59 個の野生型 A A V カプシドタンパク質を含有し得る。したがって、操作 A A V 粒子は、上述されるように 1 つ以上の n 量体インサートを含み得る。

10

【0478】

操作 A A V 粒子は、1 つ以上のカーゴポリヌクレオチドを含み得る。カーゴポリヌクレオチドは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。ウイルス及び非ウイルスベクターから操作 A A V 粒子を作製する方法が、本明細書における他の箇所に記載される。操作ウイルス粒子を含有する製剤が、本明細書における他の箇所に記載される。

20

【0479】

操作ウイルス（例えば、A A V）カプシドポリヌクレオチド、他のウイルス（例えば、A A V）ポリヌクレオチド、及び／又はベクターポリヌクレオチドは、1 つ以上のカーゴポリヌクレオチドを含有し得る。カーゴポリヌクレオチドは、1 つ以上のポリペプチドをコードし得る。例示的なカーゴは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。カーゴポリペプチドが記載される場合、そのコードポリヌクレオチドが、これに関して記載されるカーゴポリヌクレオチドであり得ることが理解されるであろう。ある実施形態において、1 つ以上のカーゴポリヌクレオチドは、操作ウイルス（例えば、A A V）カプシドポリヌクレオチドに動作可能に結合され得、本発明のウイルス（例えば、A A V）システムの操作ウイルス（例えば、A A V）ゲノムの一部であり得る。カーゴポリヌクレオチドは、操作ウイルス（例えば、A A V）粒子にパッケージングされ得、これは、例えば、細胞に送達され得る。ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、それが送達される細胞のポリヌクレオチド（例えば、遺伝子又は転写産物）を修飾することが可能であり得る。本明細書において使用される際、「遺伝子」は、染色体上の特定の位置を占有し、生物における特性又は特質のための遺伝的指令を含む DNA の配列に対応する遺伝的単位を指し得る。遺伝子という用語は、ゲノムの翻訳及び／又は非翻訳領域を指し得る。「遺伝子」は、ポリペプチドへと翻訳され、又は限定はされないが、tRNA、siRNA、piRNA、miRNA、長鎖非コード RNA 及び shRNA を含む触媒 RNA 分子であり得る RNA 転写産物へと転写される DNA の特定の配列を指し得る。ポリヌクレオチド、遺伝子、転写産物などの修飾は、限定はされないが、遺伝子編集並びに従来の組み換え遺伝子改変技術（例えば、全体的又は部分的な遺伝子挿入、欠失、及び変異誘発（例えば、挿入及び欠失変異誘発）技術を含む全ての遺伝子組み換え技術を含む。

30

40

【0480】

前記操作ウイルスカプシドを発現する操作された細胞及び生物

本明細書における他の箇所により詳細に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、A A V）カプシドポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、及び／又はベクター系の 1 つ以上を含み得る操作された細胞が、本明細書に記載される。ある実施形態において、操作ウイルス（例えば、A A V）カプシドポリヌクレオチドの 1

50

つ以上が、操作された細胞において発現され得る。ある実施形態において、操作された細胞は、本明細書における他の箇所に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドタンパク質及び／又は操作ウイルス（例えば、AAV）カプシド粒子を生成することが可能であり得る。本明細書に記載される1つ以上の操作された細胞を含み得る改変又は操作された生物も、本明細書に記載される。操作された細胞は、本明細書における他の箇所に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドに依存して又はそれとは独立してカーゴ分子（例えば、カーゴポリヌクレオチド）を発現するように操作され得る。

【0481】

多種多様な動物、植物、藻類、真菌、酵母など及び動物、植物、藻類、真菌、酵母細胞又は組織システムが、本明細書における他の箇所に記載される様々な形質転換方法を用いて、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の核酸構築物を発現するように操作され得る。これは、例えば、生成の目的、操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシド設計及び／又は生成、及び／又はモデル生物のために、操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシド粒子を生成し得る生物を生成し得る。ある実施形態において、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の構成要素をコードするポリヌクレオチドは、植物、動物、藻類、真菌、及び／又は酵母又は組織システムの1つ以上の細胞に安定的に又は一過性に組み込まれ得る。ある実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムポリヌクレオチドの1つ以上が、植物、動物、藻類、真菌、及び／又は酵母又は組織システムの1つ以上の細胞中にゲノム的に組み込まれる。改変された生物及びシステムのさらなる実施形態が、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムの1つ以上の構成要素が、植物、動物、藻類、真菌、酵母、又は組織システムの1つ以上の細胞において発現される。

【0482】

操作された細胞

本明細書における他の箇所に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステムポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、及び／又はベクター系の1つ以上を含み得る操作された細胞の様々な実施形態が、本明細書に記載される。ある実施形態において、細胞は、操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチドの1つ以上を発現し得、本明細書により詳細に記載される、1つ以上の操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシド粒子を生成し得る。このような細胞は、本明細書において「生成細胞」とも呼ばれる。これらの操作された細胞は、それらが、細胞が本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシド粒子又は他の粒子を生成することを可能にする、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチド、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドベクター又は他のベクターの1つ以上を含まない限り、修飾細胞が必ずしも生成細胞でない（すなわち、それらは、操作ウイルス（例えば、AAV）粒子を作製しない）ことから本明細書における他の箇所に記載される「修飾細胞」と異なることが理解されるであろう。修飾細胞は、操作ウイルス（例えば、AAV）カプシド粒子のレシピエント細胞であり得、ある実施形態において、レシピエント細胞に送達される操作ウイルス（例えば、AAV）カプシド粒子及び／又はカーゴポリヌクレオチドによって修飾され得る。修飾細胞は、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。修飾という用語は、レシピエント細胞であることに依存しない細胞の修飾に関連して使用され得る。例えば、単離された細胞は、操作された標的化部分

、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシド分子を受容する前に修飾され得る。

【0483】

一実施形態において、本発明は、記載される実施形態のいずれかにしたがって、本明細書に記載される操作送達システムの1つ以上の構成要素を含有する真核生物宿主細胞を含む非ヒト真核生物；例えば、多細胞真核生物を提供する。他の実施形態において、本発明は、記載される実施形態のいずれかにしたがって、本明細書に記載される操作送達システムの1つ以上の構成要素を含有する真核生物宿主細胞を含む真核生物；好ましくは、多細胞真核生物を提供する。ある実施形態において、生物は、ウイルス（例えば、AAV）の宿主である。

【0484】

特定の実施形態において、得られる植物、藻類、真菌、酵母など、細胞又は部分は、細胞の全て又は部分のゲノムに組み込まれる外因性DNA配列を含むトランスジェニック植物である。

【0485】

操作された細胞は、原核細胞であり得る。原核細胞は、細菌細胞であり得る。原核細胞は、古細菌細胞であり得る。細菌細胞は、任意の好適な細菌細胞であり得る。好適な細菌細胞は、エシェリキア属 (*Escherichia*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、ロドバクター属 (*Rodhobacter*)、シネココッカス属 (*Synechococcus*)、シネコシステイス属 (*Synechocystis*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、シュードアルテロモナス属 (*Pseudoaltermonas*)、ステノトロホモナス属 (*Stenotrophomonas*)、及びストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) からの物であり得る。好適な細菌細胞としては、限定はされないが、大腸菌 (*Escherichia coli*) 細胞、カウロバクター・クレセンタス (*Caulobacter crescentus*) 細胞、ロドバクター・スフェロイデス (*Rodhobacter sphaeroides*) 細胞、シュードアルテロモナス・ハロプランクティス (*Pseudoaltermonas haloplanktis*) 細胞が挙げられる。細菌の好適な株としては、限定はされないが、BL21 (DE3)、DL21 (DE3) - pLysS、BL21 Star-pLysS、BL21-SI、BL21-AI、Tuner、Tuner pLysS、Origami、Origami B pLysS、Rosetta、Rosetta pLysS、Rosetta-gami-pLysS、BL21 コドンPlus、AD494、BL2trxB、HMS174、NovaBlue (DE3)、BLR、C41 (DE3)、C43 (DE3)、Lemo21 (DE3)、Shuffle T7、Arctic Express 及び Arctic Express (DE3) が挙げられる。

【0486】

操作された細胞は、真核細胞であり得る。真核細胞は、植物或いは、限定はされないが、ヒト、又は本明細書に記載される非ヒト真核生物又は動物又は哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜、又は非ヒト哺乳動物若しくは霊長類を含む哺乳動物などの特定の生物のものであるか又はそれに由来し得る。ある実施形態において、操作された細胞は、細胞株であり得る。細胞株の例としては、限定はされないが、C8161、CRF-CEM、MOLT、mIMCD-3、NHDF、HeLa-S3、Huh1、Huh4、Huh7、HUVEC、HASMC、HEKn、HEKa、MiaPaCell、Panc1、PC-3、TF1、CTLL-2、C1R、Rat6、CV1、RPTe、A10、T24、J82、A375、ARH-77、Calu1、SW480、SW620、SKOV3、SK-UT、CaCo2、P388D1、SEM-K2、WEHI-231、HB56、TIB55、ジャーカット、J45.01、LRMB、Bcl-1、BC-3、IC21、DLD2、Raw264.7、NRK、NRK-52E、MRC5、MEF、Hep G2、HeLa B、HeLa T4、COS、COS-1、COS

- 6、COS-M6A、BS-C-1サル腎臓上皮、BALB/3T3マウス胚性線維芽細胞、3T3 Swiss、3T3-L1、132-d5ヒト胎児線維芽細胞；10.1マウス線維芽細胞、293-T、3T3、721、9L、A2780、A2780ADR、A2780cis、A172、A20、A253、A431、A-549、ALC、B16、B35、BCP-1細胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR293、BxPC3、C3H-10T1/2、C6/36、Cal-27、CHO、CHO-7、CHO-IR、CHO-K1、CHO-K2、CHO-T、CHO Dhfr-/-、COR-L23、COR-L23/CPR、COR-L23/5010、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CML T1、CMT、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、HEK-293、HeLa、Hepa1c1c7、HL-60、HMEC、HT-29、ジャーカット、JY細胞、K562細胞、Ku812、KCL22、KG1、KYO1、LNCap、Ma-Mel 1-48、MC-38、MCF-7、MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCK II、MDCK II、MOR/0.2R、MONO-MAC 6、MTD-1A、MyEnd、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NALM-1、NW-145、OPCN / OPCT細胞株、Peer、PNT-1A / PNT 2、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、Saos-2細胞、Sf-9、SkBr3、T2、T-47D、T84、THP1細胞株、U373、U87、U937、VCaP、Vero細胞、WM39、WT-49、X63、YAC-1、YAR、及びそれらのトランスジェニック種が挙げられる。細胞株は、当業者に公知の様々な供給源（例えば、米国培養細胞系統保存機関（American Type Culture Collection）（ATCC）（Manassas, Va.）を参照）から入手可能である。

10

20

30

【0487】

ある実施形態において、操作された細胞は、筋細胞（例えば、心筋、骨格筋、及び／又は平滑筋）、骨細胞、血液細胞、免疫細胞（限定はされないが、B細胞、マクロファージ、T細胞、CAR-T細胞などを含む）、腎臓細胞、膀胱細胞、肺細胞、心臓細胞、肝細胞、脳細胞、神経、皮膚細胞、胃細胞、神経支持細胞、腸細胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞又は他の前駆細胞、副腎細胞、軟骨細胞、及びそれらの組合せである。

【0488】

ある実施形態において、操作された細胞は、真菌細胞であり得る。本明細書において使用される際、「真菌細胞」は、真菌界内の任意のタイプの真核細胞を指す。真菌界内の門は、子囊菌門（Ascomycota）、担子菌門（Basidiomycota）、コウマクノウキン門（Blastocladiomycota）、ツボカビ門（Chytridiomycota）、グロムス門（Glomeromycota）、微孢子虫門（Microsporidia）、及びネオカリマスティクス菌門（Neocallimastigomycota）を含む。真菌細胞は、酵母、カビ、及び糸状真菌を含み得る。ある実施形態において、真菌細胞は、酵母細胞である。

40

【0489】

本明細書において使用される際、「酵母細胞」という用語は、子囊菌門（Ascomycota）及び担子菌門（Basidiomycota）内の任意の真菌細胞を指す。酵母細胞は、出芽酵母細胞、分裂酵母細胞、及びカビ細胞を含み得る。これらの生物に限定はされないが、研究室及び工業環境で使用される多くのタイプの酵母は、子囊菌門（Ascomycota）の一部である。ある実施形態において、酵母細胞は、S. セレビシエ（*S. cerevisiae*）、クルイペロマイセス・マルシアヌス（*Kluyveromyces marxianus*）、又はイサチエンキア・オリエンタリス（*Issatchenkia orientalis*）細胞である。他の酵母細胞は、限定はされないが、カンジダ属（*Candida* spp.）（例えば、カンジダ・アルビカンス（*C.*

50

andida albicans))、ヤロウシア属 (*Yarrowia* spp.) (例えば、ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*))、ピキア属 (*Pichia* spp.) (例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*))、クлуйベロマイセス属 (*Kluyveromyces* spp.) (例えば、クлуйベロマイセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) 及び クлуйベロマイセス・マルシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*))、ニューロスポラ属 (*Neurospora* spp.) (例えば、アカパンカビ (*Neurospora crassa*))、フザリウム属 (*Fusarium* spp.) (例えば、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*))、及びイサチェンキア属 (*Issatchenkia* spp.) (例えば、イサチェンキア・オリエンタリス (*Issatchenkia orientalis*))、別名ピキア・クドリャブゼビ (*Pichia kudriavzevii*) 及びカンジダ・アシドサーモフィルム (*Candida acidothermophilum*)) を含み得る。ある実施形態において、真菌細胞は、糸状真菌細胞である。本明細書において使用される際、「糸状真菌細胞」という用語は、糸状体、すなわち、菌糸又は菌糸体に生長する任意のタイプの真菌細胞を指す。糸状真菌細胞の例は、限定はされないがアスペルギルス属 (*Aspergillus* spp.) (例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*))、トリコデルマ属 (*Trichoderma* spp.) (例えば、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*))、リゾプス属 (*Rhizopus* spp.) (例えば、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*))、及びモルティエレラ属 (*Mortierella* spp.) (例えば、モルティエレラ・イサベリナ (*Mortierella isabellina*)) を含み得る。

10

20

30

40

50

【0490】

ある実施形態において、真菌細胞は、工業用菌株である。本明細書において使用される際、「工業用菌株」は、工業プロセス、例えば、商業的又は工業的規模での製品の生産に使用されるか又はそれから単離される真菌細胞の任意の菌株を指す。工業用菌株は、工業プロセスに典型的に使用される真菌種を指し得、又はそれは、非工業目的 (例えば、実験研究) にも使用され得る真菌種の分離株を指し得る。工業プロセスの例は、発酵 (例えば、食品又は飲料製品の製造)、蒸留、バイオ燃料生産、化合物の生産、及びポリペプチドの生産を含み得る。工業用菌株の例は、限定はされないが、JAY 270 及び ATCC 4124 を含み得る。

【0491】

ある実施形態において、真菌細胞は、倍数体細胞である。本明細書において使用される際、「倍数体」細胞は、ゲノムが2つ以上のコピーで存在する任意の細胞を指し得る。倍数体細胞は、天然に倍数体状態で見られるタイプの細胞を指し得、又はそれは、倍数体状態で存在するように誘導された細胞 (例えば、減数分裂、細胞質分裂、又はDNA複製の特異的調節、改変、不活性化、活性化、又は修飾によって) を指し得る。倍数体細胞は、ゲノム全体が倍数体である細胞を指し得、又はそれは、対象とする特定のゲノム遺伝子座が倍数体である細胞を指し得る。

【0492】

ある実施形態において、真菌細胞は、二倍体細胞である。本明細書において使用される際、「二倍体」細胞は、ゲノムが2つのコピーで存在する任意の細胞を指し得る。二倍体細胞は、天然に二倍体状態で見られるタイプの細胞を指し得、又はそれは、二倍体状態で存在するように誘導された細胞 (例えば、減数分裂、細胞質分裂、又はDNA複製の特異的調節、改変、不活性化、活性化、又は修飾によって) を指し得る。例えば、*S. cerevisiae* 株 S228C は、単数体又は二倍体状態で維持される。二倍体細胞は、ゲノム全体が二倍体である細胞を指し得、又はそれは、対象とする特定のゲノム遺伝子座が二倍体である細胞を指し得る。ある実施形態において、真菌細胞は、単数体細胞である。本明細書において使用される際、「単数体」細胞は、ゲノムが1つ

のコピーで存在する任意の細胞を指し得る。単数体細胞は、天然に単数体状態で見られるタイプの細胞を指し得、又はそれは、単数体状態で存在するように誘導された細胞（例えば、減数分裂、細胞質分裂、又はDNA複製の特異的調節、改変、不活性化、活性化、又は修飾によって）を指し得る。例えば、S.セレビスエ（*S. cerevisiae*）株 S228Cは、単数体又は二倍体状態で維持され得る。単数体細胞は、ゲノム全体が単数体である細胞を指し得、又はそれは、対象とする特定のゲノム遺伝子座が単数体である細胞を指し得る。

【0493】

ある実施形態において、操作された細胞は、対象から得られる細胞である。ある実施形態において、対象は、健康又は非疾患対象である。ある実施形態において、対象は、操作された標的化部分、ポリペプチド、ベクター、ウイルス（例えば、AAV）カプシド粒子が生成されるとき、それが、所望の生理学的及び／又は生物学的特性に関連し得る1つ以上のカーゴポリヌクレオチドをパッケージングすることができ、及び／又は所望の生理学的及び／又は生物学的特性を調節することが可能であるような所望の生理学的及び／又は生物学的特性を有する対象である。したがって、生成された操作ウイルス（例えば、AAV）又は他の粒子のカーゴポリヌクレオチドは、所望の特性をレシピエント細胞に移すことが可能であり得る。ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、操作された細胞が所望の生理学的及び／又は生物学的特性を有するように、操作された細胞のポリヌクレオチドを修飾することが可能である。

【0494】

ある実施形態において、本明細書に記載される1つ以上のベクターでトランスフェクトされた細胞が、1つ以上のベクター由来配列を含む新しい細胞株を確立するのに使用される。

【0495】

操作された細胞は、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチド、ベクター、及び／又は粒子を生成するのに使用され得る。ある実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドポリヌクレオチド、ベクター、及び／又は粒子は、生成され、収集され、及び／又はそれを必要とする対象に送達される。ある実施形態において、操作された細胞は、対象に送達される。操作された細胞のための他の使用が、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、操作された細胞は、本明細書における他の箇所に記載される製剤及び／又はキットに含まれ得る。

【0496】

操作された細胞は、後で使用するために短期間又は長期間貯蔵され得る。好適な貯蔵方法は、当該技術分野において一般に公知である。さらに、後で使用するために貯蔵された細胞を元の状態に戻す方法（貯蔵後の操作された細胞における解凍、再構成、及び他の形で代謝を刺激することなど）も、当該技術分野において一般に公知である。

【0497】

製剤

操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシドシステム、操作された細胞、操作ウイルス（例えば、AAV）粒子、及び／又はそれらの組合せの構成要素は、対象又は細胞に送達され得る製剤に含まれ得る。ある実施形態において、製剤は、医薬製剤である。本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上が、それを必要とする対象又は細胞に、単独で又は医薬製剤中などで有効成分として提供され得る。したがって、ある量の、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、又はそれらの組合せの1つ以上を含有する医薬製剤も、本明細書に記載される。ある実施形態において、医薬製剤は、有効量の本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上を含有し得る。本明細書に記載される医薬製剤は、それを必要とする対象又は細胞に投与され得る。

【0498】

ある実施形態において、医薬製剤に含まれる本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、ウイルス粒子、ナノ粒子、他の送達粒子、及びそれらの組合せの1つ以上の量は、それを必要とする対象の体重又は医薬製剤が投与され得る特定の患者集団の平均体重に基づいて、約 1 pg/kg ～約 10 mg/kg の範囲であり得る。医薬製剤中の本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上の量は、約 1 pg ～約 10 g 、約 10 nL ～約 10 mL の範囲であり得る。医薬製剤が1つ以上の細胞を含有する実施形態において、量は、約1個の細胞～ 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 個又はそれ以上の細胞の範囲であり得る。医薬製剤が1つ以上の細胞を含有する実施形態において、量は、 nL 、 μL 、 mL 、又は L 当たり、約1個の細胞～ 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 個又はそれ以上の細胞の範囲であり得る。

10

【0499】

実施形態において、操作AAVカプシド粒子が、製剤に含まれ、製剤は、1個～ 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、 1×10^{18} 、 1×10^{19} 、又は 1×10^{20} 個の形質導入単位(TU)/ mL の操作AAVカプシド粒子を含有し得る。ある実施形態において、製剤は、 $0.1\sim 100\text{ mL}$ の体積であり得、1個～ 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、 1×10^{18} 、 1×10^{19} 、又は 1×10^{20} 個の形質導入単位(TU)/ mL の操作AAVカプシド粒子を含有し得る。

20

【0500】

薬学的に許容される担体及び補助成分及び薬剤

実施形態において、ある量の、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、ウイルス粒子、ナノ粒子、他の送達粒子、及びそれらの組合せの1つ以上を含有する医薬製剤は、薬学的に許容される担体をさらに含み得る。好適な薬学的に許容される担体としては、限定はされないが、活性な組成物と有害に反応しない、水、塩溶液、アルコール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、炭水化物、例えばラクトース、アミロース又はデンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、及びポリビニルピロリドンが挙げられる。

30

【0501】

医薬製剤は、滅菌され、必要に応じて、補助剤、例えば、活性組成物と有害に反応しない、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝液、着色剤、香味料及び／又は芳香物質などと混合され得る。

【0502】

ある量の、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、操作ウイルス(例えばAAV)カプシド、ウイルス(例えばAAV)又は他の粒子、ナノ粒子、他の送達粒子、及びそれらの組合せの1つ以上に加えて、医薬製剤は、限定はされないが、ポリヌクレオチド、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体、アプタマー、リボザイム、ホルモン、免疫調節剤、解熱剤、抗不安薬、抗精神病薬、鎮痛薬、鎮痙薬、抗炎症剤、抗ヒスタミン剤、抗感染薬、化学療法薬、及びそれらの組合せを含む有効量の補助活性薬剤も含み得る。

40

【0503】

好適なホルモンとしては、限定はされないが、アミノ酸から誘導されるホルモン(例えば、メラトニン及びチロキシン)、低分子ペプチドホルモン及びタンパク質ホルモン(例

50

例えば、サイトロロピン放出ホルモン、バソプレシン、インスリン、成長ホルモン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、及び甲状腺刺激ホルモン）、エイコサノイド（例えば、アラキドン酸、リボキシン、及びプロスタグランジン）、及びステロイドホルモン（例えば、エストラジオール、テストステロン、テトラヒドロテストステロンコルチゾール）が挙げられる。好適な免疫調節剤としては、限定はされないが、プレドニゾン、アザチオプリン、6-MP、シクロスポリン、タクロリムス、メトトレキサート、インターロイキン（例えば、IL-2、IL-7、及びIL-12）、サイトカイン（例えば、インターフェロン（例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN-K、IFN- ω 、及びIFN- γ ）、顆粒球コロニー刺激因子、及びイミキモド）、ケモカイン（例えば、CCL3、CCL26及びCXCL7）、シトシンリン酸グアノシン、オリゴデオキシヌクレオチド、グルカン、抗体、及びアプタマーが挙げられる。

10

【0504】

好適な解熱剤としては、限定はされないが、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びニメスリド）、アスピリン及び関連サリチレート（例えば、サリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム、及びサリチル酸ナトリウム）、パラセタモール／アセトアミノフェン、メタミゾール、ナブメトン、フェナゾン、及びキニーネが挙げられる。

【0505】

好適な抗不安薬としては、限定はされないが、ベンゾジアゼピン（例えば、アルプラゾラム、プロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロナゼパム、クロラゼパート、ジアゼパム、フルラゼパム、ロラゼパム、オキサゼパム、テマゼパム、トリアゾラム、及びトフィソパム）、セロトニン性抗うつ薬（例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害剤、三環系抗うつ薬、及びモノアミンオキシダーゼ阻害剤）、メピカル、アホバゾール、セラנק、プロマンタン、エモキシピン、アザピロン、バルビツール酸系薬、ヒドロキシジン、プレガバリン、バリドール、及び β 遮断薬が挙げられる。

20

【0506】

好適な抗精神病薬としては、限定はされないが、ベンペリドール、ブロムペリドール、ドロペリドール、ハロペリドール、モペロン、ピパンペロン、チミペロン、フルスピリレン、ペンフルリドール、ピモジド、アセプロマジン、クロルプロマジン、シアメマジン、ジキシラジン、フルフェナジン、レボメプロマジン、メソリダジン、ペラジン、ペリシアジン、ペルフェナジン、ピボチアジン、プロクロルペラジン、プロマジン、プロメタジン、プロチペンジル、チオプロペラジン、チオリダジン、トリフルオペラジン、トリフルプロマジン、クロルプロチキセン、クロペンチキソール、フルペンチキソール、チオチキセン、ズクロペンチキソール、クロチアピン、ロキサピン、プロチペンジル、カルピプラミン、クロカプラミン、モリンドン、モサプラミン、スルピリド、ベラリプリド、アミスプリド、アモキサピン、アリピプラゾール、アセナピン、クロザピン、プロナンセリン、イロペリドン、ルラシドン、メルペロン、ネモナプリド、オランザピン、パリペリドン、ペロスピロン、クエチアピン、レモキシプリド、リスペリドン、セルチンドール、トリミプラミン、ジブラシドン、ゾテピン、アルストニイ、ピフェプルノックス、ビットペルチン、ブレクスピプラゾール、カンナビジオール、カリプラジン、ピマバンセリン、ポマグルメタッドメチオニル、バビカセリン、キサノメリン、及びジクロナピンが挙げられる。

30

40

【0507】

好適な鎮痛薬としては、限定はされないが、パラセタモール／アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びニメスリド）、COX-2阻害剤（例えば、ロフェコキシブ、セレコキシブ、及びエトリコキシブ）、オピオイド（例えば、モルヒネ、コデイン、オキシコドン、ヒドロコドン、ジヒドロモルヒネ、ペチジン、ブプレノルフィン）、トラマドール、ノルエピネフリン、フルビルチン、ネホパム、オルフェナドリン、プレガバリン、ガバペンチン、シクロベンザプリン、スコボラミン、メタドン、ケトベミドン、ピリトラミド、及びアスピリン及び関連サリチレート（例えば、サリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム、及びサリチル

50

酸ナトリウム)が挙げられる。

【0508】

好適な鎮痙薬としては、限定はされないが、メベベリン、パパベリン、シクロベンザプリン、カリソプロドール、オルフェナドリン、チザニジン、メタキサロン、メトカルバモール、クロルゾキサゾン、バクロフェン、ダントロレン、バクロフェン、チザニジン、及びダントロレンが挙げられる。好適な抗炎症剤としては、限定はされないが、プレドニゾン、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びニメスリド）、COX-2阻害剤（例えば、ロフェコキシブ、セレコキシブ、及びエトリコキシブ）、及び免疫選択的抗炎症誘導体（例えば、顎下腺及びペプチド-T及びその誘導体）が挙げられる。

10

【0509】

好適な抗ヒスタミン剤としては、限定はされないが、H₁-受容体拮抗薬（例えばアクリバスチン、アゼラスチン、ピラスチン、ブロムフェニラミン、ブクリジン、プロモジフェンヒドラミン、カルビノキサミン、セチリジン、クロルプロマジン、シクリジン、クロルフェニラミン、クレマスチン、シプロヘブタジン、デスロラタジン、デクスブロムフェニラミン、デスクロルフェニルアミン、ジメンヒドリナート、ジメチンデン、ジフェニルヒドラミン、ドキシラミン、エバスチン、エンブラミン、フェキソフェナジン、ヒドロキシジン、レボセチリジン、ロラタジン、メクロジン、ミルタザピン、オロパタジン、オルフェナドリン、フェニндаミン、フェニラミン、フェニルトロキサミン、プロメタジン、ピラミン、クエチアピン、ルパタジン、トリペレナミン、及びトリプロリジン）、H₂-受容体拮抗薬（例えば、シメチジン、ファモチジン、ラフチジン、ニザチジン、ラニチジン、及びロキサチジン）、トリトクアリン、カテキン、クロモグリケート、ネドクロミル、及びp₂-アドレナリン作動薬が挙げられる。

20

【0510】

好適な抗感染薬としては、限定はされないが、抗アメーバ薬（例えば、ニタゾキサニド、パロモマイシン、メトロニダゾール、チニダゾール、クロロキン、ミルテホシン、アムホテリシンb、及びヨードキノール）、アミノグリコシド（例えば、パロモマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、カナマイシン、及びネオマイシン）、駆虫薬（例えば、ピランテル、メベンダゾール、イベルメクチン、プラジカンテル、アルベンダゾール、チアベンダゾール、オキサニルニキン）、抗真菌剤（例えば、アゾール系抗真菌剤（例えばイトラコナゾール、フルコナゾール、パルコナゾール、ケトコナゾール、クロトリマゾール、ミコナゾール、及びボリコナゾール）、エキノキャンディン系（例えばキャスポファンギン、アニデュラファンギン、及びミカファンギン）、グリセオフルビン、テルビナフィン、フルシトシン、及びポリエン系（例えば、ナイスタチン、及びアムホテリシンb）、抗マラリア剤（例えば、ピリメタミン／スルファドキシム、アルテムエーテル／ルメファントリン、アトバコン／プログアニル、キニーネ、ヒドロキシクロロキン、メフロキン、クロロキン、ドキシサイクリン、ピリメタミン、及びハロファントリン）、抗結核剤（例えば、アミノサリチレート（例えば、アミノサリチル酸）、イソニアジド／リファンピン、イソニアジド／ピラジナミド／リファンピン、ベダキリン、イソニアジド、エタンブトール、リファンピン、リファブチン、リファペンチン、カプレオマイシン、及びサイクロセリン）、抗ウイルス薬（例えば、アマンタジン、リマンタジン、アバカビル／ラミブジン、エムトリシタビン／テノホビル、コビシスタット／エルビテグラビル／エムトリシタビン／テノホビル、エファビレンツ／エムトリシタビン／テノホビル、アバカビル／ラミブジン／ジドブジン、ラミブジン／ジドブジン、エムトリシタビン／テノホビル、エムトリシタビン／ロピナビル／リトナビル／テノホビル、インターフェロンα-2v／リバビリン、ペグインターフェロンα-2b、マラビロク、ラルテグラビル、ドルテグラビル、エンフルビルチド、ホスカルネット、ホミビルセン、オセルタミビル、ザナミビル、ネビラピン、エファビレンツ、エトラビリン、リルピビリン、デラビルジン、ネビラピン、エンテカビル、ラミブジン、アデホビル、ソホスブビル、ジダノシン、テノホビル、アバカビル、ジドブジン、スタブジン、エムトリシタビン、ザルシタビン、テルビブ

30

40

50

ジン、シメプレビル、ボセプレビル、テラプレビル、ロピナビル／リトナビル、ボセプレビル、ダルナビル、リトナビル、チプラナビル、アタザナビル、ネルフィナビル、アンプレナビル、インジナビル、サキナビル、リバビリン、バラシクロビル、アシクロビル、ファミシクロビル、ガンシクロビル、及びバルガンシクロビル）、カルバペネム（例えば、ドリペネム、メロペネム、エルタペネム、及びシラスタチン／イミペネム）、セファロsporin（例えば、セファドロキシル、セフラジン、セファゾリン、セファレキシン、セフェピム、セファゾリン（*cefazolin*）、ロラカルベフ、セフォテタン、セフロキシム、セフプロジル、ロラカルベフ、セフォキシチン、セファクロル、セフチブテン、セフトリアキソン、セフォタキシム、セフポドキシム、セフジニル、セフィキシム、セフジトレン、セフチゾキシム、及びセフトアジジム）、糖ペプチド抗生物質（例えばバンコマイシン、ダルババンシン、オリタバシン、及びテラバンシン）、グリシルサイクリン系（例えば、チゲサイクリン）、抗らい菌薬（例えば、クロファジミン及びサリドマイド）、リンコマイシン及びその誘導体（例えば、クリンダマイシン及びリンコマイシン）、マクロライド及びその誘導体（例えば、テリスロマイシン、フィダキソマイシン、エリスロマイシン、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、及びトロレアンドマイシン）、リネゾリド、スルファメトキサゾール／トリメトプリム、リファキシミン、クロラムフェニコール、ホスホマイシン、メトロニダゾール、アズトレオナム、バシトラシン、ペニシリン（アモキシシリン、アンピシリン、バカンピシリン、カルベニシリン、ピペラシリン、チカルシリン、アモキシシリン／クラブラネート、アンピシリン／スルバクタム、ピペラシリン／タゾバクタム、クラブラネート／チカルシリン、ペニシリン、プロカインペニシリン、オキサシリン、ジクロキサシリン、及びナフシリン）、キノロン系（例えば、ロメフロキサシン、ノルフフロキサシン、オフフロキサシン、ガチフロキサシン、モキシフロキサシン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、ゲミフロキサシン、モキシフロキサシン、シノキサシン、ナリジクス酸、エノキサシン、グレパフロキサシン、ガチフロキサシン、トロバフロキサシン、及びスパルフフロキサシン）、スルホンアミド系（例えば、スルファメトキサゾール／トリメトプリム、スルファサラジン、及びスルフィソキサゾール）、テトラサイクリン（例えば、ドキシサイクリン、デメクロサイクリン、ミノサイクリン、ドキシサイクリン／サリチル酸、ドキシサイクリン／ ω -3多価不飽和脂肪酸、及びテトラサイクリン）、及び尿路感染症薬（例えば、ニトロフラントイン、メテナミン、ホスホマイシン、シノキサシン、ナリジクス酸、トリメトプリム、及びメチレンブルー）が挙げられる。

10

20

30

【0511】

好適な化学療法薬としては、限定はされないが、パクリタキセル、ブレンツキシマブベドチン、ドキシソルピシン、5-FU（フルオロウラシル）、エベロリムス、ペメトレキセド、メルファラン、パミドロネート、アナストロゾール、エキセメスタン、ネララビン、オフアツマブ、ベバシズマブ、ベリノスタット、トシツモマブ、カルムスチン、ブレオマイシン、ポストニブ、ブスルファン、アレムツズマブ、イリノテカン、バンデタニブ、ビカルタミド、ロムスチン、ダウノルピシン、クロファラビン、カボザンチニブ、ダクチノマイシン、ラムシルマブ、シタラビン、シトキサシン、シクロホスファミド、デシタビン、デキサメタゾン、ドセタキセル、ヒドロキシウレア、デカルバジン、ロイプロリド、エ

ピルピシン、オキサリプラチン、アスパラギナーゼ、エストラムスチン、セツキシマブ、ビスモデギブ、黒脚病菌（*Erwinia chrysanthemi*）由来アスパラギナーゼ、アミホスチン、エトポシド、フルタミド、トレミフェン、フルベストラント、レトロゾール、デガレリクス、プララトレキサート、メトトレキサート、フロクスウリジン、オビヌツズマブ、ゲムシタビン、アフアチニブ、メシル酸イマチニブ、カルムスチン、エリブリン、トラスツズマブ、アルトレタミン、トポテカン、ポナチニブ、イダルピシン、イホスファミド、イブルチニブ、アキシチニブ、インターフェロン α -2a、ゲフィチニブ、ロミデプシン、イクサベピロン、ルキソリチニブ、カバジタキセル、adオートラスツズマブエムタンシン、カーフィルゾミブ、クロラムブシル、サルグラモスチム、クラドリビン、ミトタン、ピンクリスチン、プロカルバジン、メゲストロール、トラメチニブ

40

50

、メスナ、塩化ストロンチウム-89、メクロレタミン、マイトマイシン、ブスルファン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ビノレルビン、フィルグラスチム、ペグフィルグラスチム、ソラフェニブ、ニルタミド、ペントスタチン、タモキシフェン、ミトキサントロン、ペガスパルガーゼ、デニロイキンディフチトクス、アリトレチノイン、カルボプラチン、パーツズマブ、シスプラチン、ボマリドミド、プレドニゾン、アルデスロイキン、メルカプトプリン、ゾレドロン酸、レナリドミド、リツキシマブ、オクトレオチド、ダサチニブ、レゴラフェニブ、ヒストレリン、スニチニブ、シルツキシマブ、オマセタキシン、チオグアニン（チオグアニン）、ダブラフェニブ、エルロチニブ、ベキサロテン、テモゾロミド、チオテパ、サリドマイド、BCG、テムシロリムス、ベンダムスチン塩酸塩、トリプトレリン、三酸化ヒ素、ラパチニブ、バルルビシン、パニツムマブ、ビンブラスチン、ボルテゾミブ、トレチノイン、アザシチジン、パゾパニブ、テニポシド、ロイコボリン、クリゾチニブ、カペシタビン、エンザルタミド、イピリムマブ、ゴセレリン、ポリノスタット、イデラリシブ、セリチニブ、アビラテロン、エポチロン、タフルポシド、アザチオプリン、ドキシフルリジン、ビンデシン、及びall-transレチノイン酸が挙げられる。

10

【0512】

本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、組成物、ベクター、細胞、ウイルス粒子、ナノ粒子、他の送達粒子、及びそれらの組合せの1つ以上に加えて、医薬製剤に含まれる補助活性薬剤がある実施形態において、補助活性薬剤の有効量などの量は、補助活性薬剤に応じて変化する。ある実施形態において、補助活性薬剤の量は、0.001マイクログラム～約1ミリグラムの範囲である。他の実施形態において、補助活性薬剤の量は、約0.01IU～約1000IUの範囲である。さらなる実施形態において、補助活性薬剤の量は、0.001mL～約1mLの範囲である。さらに他の実施形態において、補助活性薬剤の量は、全医薬製剤の約1%w/w～約50%w/wの範囲である。さらなる実施形態において、補助活性薬剤の量は、全医薬製剤の約1%v/v～約50%v/vの範囲である。さらに他の実施形態において、補助活性薬剤の量は、全医薬製剤の約1%w/v～約50%w/vの範囲である。

20

【0513】

剤形

ある実施形態において、本明細書に記載される医薬製剤は、剤形であり得る。剤形は、任意の適切な経路による投与のために適合され得る。適切な経路としては、限定はされないが、経口（口腔又は舌下を含む）、直腸、硬膜外、頭蓋内、眼内、吸入、鼻腔内、局所（口腔、舌下、又は経皮を含む）、膈内、尿道内、非経口、頭蓋内、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、皮内、骨内、心臓内、関節内、空洞内、くも膜下腔内、硝子体内、脳内、歯肉、歯肉縁下、脳室内、及び皮内が挙げられる。このような製剤は、当該技術分野において公知の任意の方法によって調製され得る。

30

【0514】

経口投与に適合された剤形は、個別の投薬量単位、例えば、水性又は非水性液体中の、カプセル、ペレット又は錠剤、粉末又は顆粒、溶液、又は懸濁液；食用のフォーム又はホイップ、又は水中油型液体エマルジョン又は油中水型液体エマルジョンであり得る。ある実施形態において、経口投与に適合された医薬製剤は、医薬製剤を香味付けし、保存し、着色し、又は分散を助ける1つ以上の薬剤も含む。経口投与用に調製された剤形はまた、フォーム、スプレー、又は液体溶液として送達され得る液体溶液の形態であり得る。ある実施形態において、経口剤形は、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上を含有する標的化エフェクター融合タンパク質及び／又はその複合体又は組成物の治療有効量又はその適切な分割量を含有する医薬製剤約1ng～1000gを含有し得る。経口剤形は、それを必要とする対象に投与され得る。

40

【0515】

必要に応じて、本明細書に記載される剤形は、マイクロカプセル化され得る。

50

【0516】

剤形はまた、任意の成分の放出を延長又は持続させるように調製され得る。ある実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上は、放出が遅延される成分であり得る。他の実施形態において、任意に含まれる補助成分の放出が遅延される。成分の放出を遅延させるための好適な方法としては、限定はされないが、ポリマー、ワックス、ゲルなどの材料に成分をコーティングするか又は埋め込むことが挙げられる。遅延放出剤形は、“Pharmaceutical dosage form tablets”, eds. Liberman et al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989)、
“Remington – The science and practice of pharmacy”, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000、及び“Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems”, 6th Edition, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995)などの標準的な参考文献に記載されるように調製され得る。これらの参考文献は、錠剤及びカプセル及び遅延放出剤形の錠剤及びペレット、カプセル、及び顆粒を調製するための賦形剤、材料、設備、及び方法に関する情報を提供する。遅延放出は、約1時間～約3か月又はそれ以上の範囲であり得る。

10

【0517】

好適なコーティング材料の例としては、限定はされないが、セルロースポリマー、例えば、酢酸フタル酸セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及び酢酸コハク酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース；ポリフタル酸酢酸ビニル、アクリル酸ポリマー及びコポリマー、及び商品名EUDRAGIT（登録商標）（Roth Pharma, Westerstadt, Germany）で市販されているメタクリル樹脂、ゼイン、シェラック、及び多糖が挙げられる。

20

【0518】

コーティングは、所望の放出プロファイルを生じさせるため、水不溶性／水溶性非ポリマー賦形剤を用いて又は用いずに、異なる比率の水溶性ポリマー、水不溶性ポリマー、及び／又はpH依存性ポリマーで形成され得る。コーティングは、限定はされないが、錠剤（被覆ビーズを伴うか又は伴わずに圧縮された）、カプセル（被覆されたビーズを伴うか又は伴わずに）、ビーズ、粒子組成物、限定はされないが、懸濁液形態又は振りかける剤形として製剤化された「そのままの成分」を含む剤形（マトリックス又は単純）において行われる。

30

【0519】

局所投与に適合された剤形は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、粉末、溶液、ペースト、ゲル、スプレー、エアロゾル、又は油として製剤化され得る。眼又は他の外部組織、例えば口又は皮膚の処置のためのある実施形態において、医薬製剤は、局所軟膏又はクリームとして適用される。軟膏として製剤化される場合、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上は、パラフィン系又は水混和性軟膏基剤とともに製剤化され得る。ある実施形態において、有効成分は、水中油型クリーム基剤又は油中水型基剤を含むクリームとして製剤化され得る。口内の局所投与に適合された剤形は、ロゼンジ、トローチ、及び洗口液を含む。

40

【0520】

鼻内又は吸入投与に適合された剤形は、エアロゾル、溶液、懸濁液滴、ゲル、又は乾燥粉末を含む。ある実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上は、微粉化によって得られる又は得ることができる低粒径化形態で、吸入に適合された剤形に含まれる。ある実施形態において、低粒径化された（例えば、微粉化された）化合物又はその塩若しくは溶媒和物の粒

50

径は、当該技術分野において公知の適切な方法によって測定される際、約 0.5 ～ 約 10 ミクロンの D50 値によって定義される。吸入による投与に適合された剤形は、粒子ダスト又はミストも含む。担体又は賦形剤が、鼻腔内スプレー又は点鼻薬として投与するための液体である好適な剤形は、有効成分（例えば、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの 1 つ以上及び／又は補助活性薬剤）の水性又は油性溶液／懸濁液を含み、これは、様々なタイプの定量式加圧エアロゾル、ネブライザー、又は吸入器によって生成され得る。

【0521】

ある実施形態において、剤形は、吸入による投与に好適なエアロゾル製剤であり得る。これらの実施形態のいくつかにおいて、エアロゾル製剤は、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの 1 つ以上の溶液又は微細懸濁液及び薬学的に許容される水性又は非水性溶媒を含有し得る。エアロゾル製剤は、密閉容器中に滅菌形態で、単回用量又は複数回用量の分量で提供され得る。これらの実施形態のいくつかでは、密閉容器は、定量弁を備えた単回用量又は複数回用量の鼻内又はエアロゾルディスペンサー（例えば、定量式吸入器）であり、これは、容器の内容物が排出された後に廃棄することが意図される。

【0522】

エアロゾル剤形が、エアロゾルディスペンサーに含まれる場合、ディスペンサーは、圧縮空気、二酸化炭素、又は限定はされないが、ヒドロフルオロカーボンを含む有機噴射剤などの、圧力下にある好適な噴射剤を含む。他の実施形態におけるエアロゾル製剤剤形は、ポンプ式アトマイザーに含まれる。加圧エアロゾル製剤は、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの 1 つ以上の溶液又は懸濁液も含有し得る。さらなる実施形態において、エアロゾル製剤は、例えば、製剤の安定性及び／又は味及び／又は微粒子質量特性（量及び／又はプロファイル）を改善するために組み込まれた共溶媒及び／又は調整剤も含有し得る。エアロゾル製剤の投与は、1 日 1 回又は 1 日数回、例えば 1 日 2、3、4、又は 8 回であり得、ここで、1 回に 1、2、又は 3 用量が送達される。

【0523】

吸入投与に好適な及び／又は適合された、いくつかの剤形では、医薬製剤は、乾燥粉末吸入可能製剤である。本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの 1 つ以上、補助有効成分、及び／又はその薬学的に許容される塩に加えて、このような剤形は、ラクトース、グルコース、トレハロース、マンニトール、及び／又はデンプンなどの粉末基剤を含有し得る。これらの実施形態のいくつかにおいて、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの 1 つ以上は、低粒径化された形態である。さらなる実施形態において、性能調整剤、例えば、L-ロイシン又は別のアミノ酸、セロピオースオクタアセテート、及び／又はステアリン酸の金属塩、例えば、ステアリン酸マグネシウム又はステアリン酸カルシウム。

【0524】

ある実施形態において、エアロゾル剤形は、エアロゾルのそれぞれの定量用量が、所定の量の有効成分、例えば、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの 1 つ以上の 1 つ以上を含有するように構成され得る。

【0525】

腔内投与に適合された剤形は、ベッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム、又はスプレー製剤として提供され得る。直腸投与に適合された剤形は、坐薬又は浣腸を含む。

【0526】

非経口投与に適合された及び／又は任意のタイプの注射（例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、骨内、硬膜外、心臓内、関節内、空洞内、歯肉、歯肉縁下、くも膜下腔内、硝子体内、脳内、及び脳室内）に適合された剤形は、水性及び／又は非水性滅菌注

10

20

30

40

50

射溶液を含むことができ、これは、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、組成物を対象の血液と等張にする溶質、及び水性及び非水性滅菌懸濁液（懸濁化剤及び増粘剤を含み得る）を含む。非経口投与に適合された剤形は、限定はされないが、密閉アンプル又はバイアルを含む単回単位用量又は複数回単位用量容器中で提供され得る。用量は、凍結乾燥され、投与前に滅菌担体に再懸濁されて用量を再構成し得る。即時調合注射溶液及び懸濁液が、ある実施形態において、滅菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製され得る。

【0527】

眼内投与に適合された剤形は、任意に注射に適合され得、任意に酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、組成物を眼又はそれに含まれる若しくは対象の眼の周りにある体液と等張性にする溶質を含む水性及び／又は非水性滅菌溶液、並びに懸濁化剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性滅菌懸濁液を含み得る。

10

【0528】

ある実施形態では、剤形は、単位用量当たり所定の量の本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上を含む。ある実施形態において、したがって、このような単位用量の所定の量は、1日1回又は2回以上投与され得る。このような医薬製剤は、当該技術分野において周知の方法のいずれかによって調製され得る。

【0529】

キット

ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、又は本明細書に記載される他の構成要素及びそれらの組合せの1つ以上及び本明細書に記載される医薬製剤の1つ以上を含むキットも、本明細書に記載される。実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上は、組合せキットとして提供され得る。本明細書において使用される際、「組合せキット」又は「パーツのキット」という用語は、化合物、又は製剤、並びにそれに含まれる要素の組合せ又は単一の要素、例えば有効成分の包装、スクリーニング、試験、販売、流通、送達、及び／又は投与に使用され得るさらなる構成要素を指す。このようなさらなる構成要素は、限定はされないが、パッケージング、シリンジ、プリスターパッケージ、ボトルなどを含む。組合せキットは、構成要素（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの1つ以上の1つ以上）又はその製剤の1つ以上を含む、単一の製剤（例えば、液体、凍結乾燥粉末など）、又は別個の製剤中で提供され得る。別個の構成要素又は製剤は、キット内の単一のパッケージ又は別個のパッケージに含まれ得る。キットは、有形的表現媒体に取扱説明書も含み、取扱説明書は、それに含まれる構成要素及び／又は製剤の内容に関する情報及び／又は指示、それに含まれる構成要素及び／又は製剤の内容に関する安全情報、それに含まれる構成要素及び／又は製剤の量、投与量、用法指示、スクリーニング方法、構成要素設計勧告及び／又は情報、推奨される治療計画に関する情報を含み得る。本明細書において使用される際、「有形的表現媒体」は、物理的に有形又は触れられる媒体を指し、単なる抽象的思考又は記録されていない話し言葉ではない。「有形的表現媒体」としては、限定はされないが、セルロース又はプラスチック材料上の言葉、又は好適なコンピュータ可読メモリ形態で保存されたデータが挙げられる。データは、フラッシュメモリドライブ若しくはCD-ROMなどのユニットデバイス又は例えば、ウェブインターフェースを介してユーザによってアクセス可能なサーバに保存され得る。

20

30

40

【0530】

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載される構成要素の1つ以上を含むキットを提供する。ある実施形態において、キットは、ベクター系及びキットを使用するための取扱説明書を含む。ある実施形態において、ベクター系は、本明細書における他の箇所に記載される1つ以上の操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）送達システムポリヌクレオチドに動作可能に結合される調節要素、及び、任意に、調節要素に任意に動作可能に結合され得るカーゴ分子を含む。1つ以上の操作された標的化

50

部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）送達システムポリヌクレオチドは、キット内にカーゴ分子を含有する実施形態において本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）送達システムによって送達可能なカーゴ分子と同じ又は異なるベクターに含まれ得る。

【0531】

ある実施形態において、キットは、ベクター系及びキットを使用するための取扱説明書を含む。ある実施形態において、ベクター系は、（a）ダイレトリピート配列及びダイレトリピート配列の上流又は下流（いずれか適用可能な方）に1つ以上のガイド配列を挿入するための1つ以上の挿入部位に動作可能に結合される第1の調節要素であって、発現されるとき、ガイド配列が、真核細胞内の標的配列へのCas9-CRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、Cas9-CRISPR複合体が、標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体を形成するCas9酵素を含む、第1の調節要素；及び／又は（b）核局在配列を含む前記Cas9酵素をコードする酵素-コード配列に動作可能に結合される第2の調節要素を含む。適用可能である場合、tracr配列も提供され得る。ある実施形態において、キットは、システムの同じ又は異なるベクターに位置する構成要素（a）及び（b）を含む。ある実施形態において、構成要素（a）は、第1の調節要素に動作可能に結合される2つ以上のガイド配列をさらに含み、発現されるとき、2つ以上のガイド配列のそれぞれが、真核細胞内の異なる標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する。ある実施形態において、Cas9酵素は、真核細胞の核内に検出可能な量の前記CRISPR酵素の蓄積を駆動するのに十分な強度の1つ以上の核局在配列を含む。ある実施形態において、CRISPR酵素は、タイプV又はVI CRISPRシステム酵素である。ある実施形態において、CRISPR酵素は、Cas9酵素である。ある実施形態において、Cas9酵素は、野兔病菌（*Francisella tularensis*）1、野兔病菌亜種ノビシダ（*Francisella tularensis* subsp. *novicida*）、プレボテラ・アルペンシス（*Prevotella albensis*）、ラクノスピラセ・バクテリウム（*Lachnospiraceae bacterium*）MC2017_1、ブチリビブリオ・プロテオクラステカス（*Butyrivibrio proteoclasticus*）、ペレグリニ・バクテリウム（*Peregrinibacteria bacterium*）GW2011_GWA2_33_10、パルクバクテリア・バクテリウム（*Parcubacteria bacterium*）GW2011_GWC2_44_17、スミセラ属（*Smithella* sp.）SCADC、アシダミノコッカス属（*Acidaminococcus* sp.）BV3L6、ラクノスピラセ・バクテリウム（*Lachnospiraceae bacterium*）MA2020、カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム（*Candidatus Methanoplasma termitum*）、ユウバクテリウム・エリゲンス（*Eubacterium eligens*）、モラクセラ・ボボクリ（*Moraxella bovoculi*）237、レプトスピラ・イナダイ（*Leptospira inadai*）、ラクノスピラセ・バクテリウム（*Lachnospiraceae bacterium*）ND2006、ポルフィロモナス・クレビオリカニス（*Porphyromonas crevioricanis*）3、プレボテラ・ディシエンス（*Prevotella disiens*）、又はポルフィロモナス・マカカエ（*Porphyromonas macacae*）Cas9（例えば、少なくとも1つのDDを有するか又はそれと結合されるように修飾された）に由来し、Cas9の変化又は変異をさらに含み得、キメラCas9であり得る。ある実施形態において、DD-CRISPR酵素は、真核細胞内での発現のためにコドン最適化される。ある実施形態において、DD-CRISPR酵素は、標的配列の位置で1つ又は2つの鎖の切断を指向する。ある実施形態において、DD-CRISPR酵素は、DNA鎖切断活性を欠くか又は実質的に欠く（例えば、野生型酵素又はヌクレアーゼ活性を減少させる変異又は変化を有さない酵素と比較して5%以下のヌクレアーゼ活性）。ある実施形態において、第1の調節要素は、ポリメラーゼIIIプロモーターである。ある実施形態において、第2

10

20

30

40

50

の調節要素は、ポリメラーゼⅠⅠプロモーターである。ある実施形態において、ガイド配列は、少なくとも16、17、18、19、20、25ヌクレオチド、又は16～30、又は16～25、又は16～20ヌクレオチド長である。

【0532】

使用の方法

一般的な説明

本明細書に記載されるCNS特異的標的化部分（例えば、操作された標的化部分システムポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、操作された細胞、操作ウイルス（例えば、AAV）カプシド、及びウイルス及び他の粒子）を含有する組成物は、一般に、1つ以上のカーゴポリヌクレオチドをレシピエント細胞へとパッケージング及び／又は送達するのに使用され得る。ある実施形態において、送達は、標的化部分の特異性に基づいて細胞特異的に行われる。ある実施形態において、細胞特異性は、上述される標的化部分に含まれるn量体モチーフを介して与えられる。ある実施形態において、送達は、操作ウイルス（例えば、AAV）カプシドの指向性に基づいて細胞特異的に行われる。ある実施形態において、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシド、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子、その組成物、及び／又は細胞は、対象又は細胞、組織、及び／又は器官に投与され、レシピエント細胞へのカーゴポリヌクレオチドの移動及び／又は統合を促進し得る。他の実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシド、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子及び／又はその組成物を生成することが可能な操作された細胞は、操作された標的化部分システム分子（例えば、ポリヌクレオチド、ベクター、及びベクター系など）から生成され得る。ある実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシド、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子及び／又はその組成物は、対象又は細胞、組織、及び／又は器官に送達され得る。対象に送達される場合、それらの操作送達システム分子は、対象の細胞をインビボ又はエクスピボで形質転換して、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）カプシド、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子及び／又はその組成物を作製することが可能であり得る操作された細胞を生成し得、これは、操作された細胞から放出され、カーゴ分子を、インビボでレシピエント細胞に送達し、レシピエント細胞を得た対象への再導入のために個人化された操作ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）粒子、及び／又は他の粒子を生成し得る。ある実施形態において、操作された細胞は、対象に送達され得、ここで、それは、それらが次にカーゴ（例えば、カーゴポリヌクレオチド）をレシピエント細胞に送達し得るように、生成された操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）粒子、及び／又は他の粒子を放出し得る。これらの一般的なプロセスは、対象における疾患若しくはその症状を処置及び／又は予防し、モデル細胞を生成し、修飾生物を生成し、細胞選択及びスクリーニングアッセイを提供するために、生物学的生産において、及び他の様々な用途において、様々な方法で使用され得る。

【0533】

ある実施形態において、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）粒子、及び／又は他の粒子、ポリヌクレオチド、ベクター、及びそのシステムは、CNS特異性などの所望の細胞特異性を有する変異体のために利用され得る操作AAVカプシド変異体ライブラリーを生成するのに使用され得る。様々な実施例によって裏付けられる、本明細書において提供される説明は、所望の細胞特異性を踏まえる者が、本明細書に記載される本発明を用いて、CNS特異性などの所望の細胞特異性を有するカプシドを得ることができるであろうことを実証することができる。

【0534】

本発明は、結果又はデータの伝達がある研究プログラムの一環として使用され得る。コンピュータシステム（又はデジタルデバイス）は、結果を受信、送信、表示及び／又は保存し、データ及び／又は結果を分析し、及び／又は結果及び／又はデータ及び／又は分析のレポートを生成するのに使用され得る。コンピュータシステムは、媒体（例えば、ソフ

トウェア）及び／又はネットワークポートから（例えば、インターネットから）命令を読み取ることができる論理的装置として理解され得、これは、任意に、固定媒体を有するサーバに接続され得る。コンピュータシステムは、CPU、ディスクドライブ、キーボード及び／又はマウスなどの入力デバイス、及びディスプレイ（例えば、モニター）の1つ以上を含み得る。命令又はレポートの送信などのデータ通信は、通信媒体を介して、ローカル又はリモート位置でサーバへと行われ得る。通信媒体は、データを送信及び／又は受信する任意の手段を含み得る。例えば、通信媒体は、ネットワーク接続、無線接続、又はインターネット接続であり得る。このような接続は、ワールド・ワイド・ウェブにわたって通信を提供し得る。本発明に関連するデータが、受信機による受信及び／又は閲覧のためにこのようなネットワーク又は接続（又は限定はされないが、プリントアウトなどの郵送の物理的レポートを含む、情報を伝達するための任意の他の好適な手段）にわたって送信され得ると考えられる。受信機は、限定はされないが、個々の、又は電子システム（例えば、1つ以上のコンピュータ、及び／又は1つ以上のサーバ）であり得る。ある実施形態において、コンピュータシステムは、1つ以上のプロセッサを含む。プロセッサは、1つ以上のコントローラ、計算ユニット、及び／又はコンピュータシステムの他のユニットと結合されるか、又は必要に応じてファームウェアに組み込まれ得る。ソフトウェアにおいて実装される場合、ルーティンが、RAM、ROM、フラッシュメモリ、磁気ディスク、レーザディスク、又は他の好適な記憶媒体などの任意のコンピュータ可読メモリに記憶され得る。同様に、このソフトウェアは、例えば、通信チャネル、例えば、電話線、インターネット、無線接続などにわたって、又は輸送可能媒体、例えば、コンピュータ可読ディスク、フラッシュドライブなどを介した方法を含む任意の公知の送達方法によって、コンピュータデバイスに送達され得る。様々な工程が、ハードウェア、ファームウェア、ソフトウェア、又はハードウェア、ファームウェア、及び／若しくはソフトウェアの任意の組合せにおいて実装され得る様々なブロック、操作、ツール、モジュール、及び技術として実装され得る。ハードウェアにおいて実装される場合、ブロック、操作、技術などのいくつか又は全てが、例えば、カスタム集積回路（IC）、特定用途向け集積回路（ASIC）、フィールドプログラム可能な論理アレイ（FPGA）、プログラム可能な論理アレイ（PLA）などにおいて実装され得る。クライアント・サーバ、リレーショナルデータベースアーキテクチャが、本発明の実施形態において使用され得る。クライアント・サーバアーキテクチャは、ネットワーク上の各コンピュータ又はプロセスが、クライアント又はサーバのいずれかであるネットワークアーキテクチャである。サーバコンピュータは、典型的に、ディスクドライブ（ファイルサーバ）、プリンター（印刷サーバ）、又はネットワークトラフィック（ネットワークサーバ）を管理するための専用の高性能のコンピュータである。クライアントコンピュータとしては、PC（パーソナルコンピュータ）又はユーザがアプリケーションを実行するワークステーション、並びに本明細書に開示される例の出力デバイスが挙げられる。クライアントコンピュータは、ファイル、デバイス、及びさらに処理能力などのリソースをサーバコンピュータに依拠する。本発明のある実施形態において、サーバコンピュータは、データベース機能の全てを扱う。クライアントコンピュータは、全てのフロントエンドデータ管理を扱うソフトウェアを有し得、ユーザからのデータ入力を受信することもできる。コンピュータ実行可能コードを含む機械可読媒体は、限定はされないが、有形記憶媒体、搬送波媒体又は物理的伝送媒体を含む多くの形態を取り得る。不揮発性記憶媒体は、例えば、光又は磁気ディスク、例えば、任意のコンピュータなどにおける記憶デバイスのいずれかを含み、例えば、図面に示されるデータベースなどを実装するのに使用され得る。揮発性記憶媒体は、このようなコンピュータプラットフォームのメインメモリなどのダイナミックメモリを含む。有形送信媒体は、コンピュータシステム内のバスを含む配線を含む銅線及び光ファイバーの同軸ケーブルを含む。担体波送信媒体は、電気若しくは電磁気信号、又は無線周波数（RF）及び赤外線（IR）データ通信の間に生成されるものなどの音波若しくは光波の形式を取り得る。したがって、コンピュータ可読媒体の共通の形式は、例えば：フロッピーディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、任意の他の磁気媒体、CD-ROM、DVD

10

20

30

40

50

又はDVD-ROM、任意の他の光媒体、パンチカード、紙テープ、穴のパターンを備えた任意の他の物理的記憶媒体、RAM、ROM、PROM及びEPROM、FLASH-EPROM、任意の他のメモリチップ若しくはカートリッジ、データ又は指示を運ぶ搬送波、このような搬送波を輸送するケーブル若しくはリンク、又はコンピュータがプログラミングコード及び／又はデータを読み取り得る任意の他の媒体を含む。これらの形態のコンピュータ可読媒体の多くは、プロセッサに実行のための1つ以上の指示の1つ以上の配列を運ぶことに関与し得る。したがって、本発明は、本明細書に記載される任意の方法を実施し、それからのデータ及び／又は結果及び／又はその分析を保存及び／又は送信すること、並びに中間体を含む、本明細書に記載される任意の方法を実施することからの生成物を包含する。

10

【0535】

治療薬

ある実施形態において、本明細書に記載される操作送達システム、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）粒子、及び／又は他の粒子、ポリヌクレオチド、ベクター、そのシステム、操作された細胞、及び／又はその製剤の1つ以上の分子が、1つ以上の疾患の治療としてそれを必要とする対象に送達され得る。ある実施形態において、処置される疾患は、遺伝性又は後成的疾患である。ある実施形態において、処置される疾患は、遺伝性又は後成的疾患でない。ある実施形態において、本明細書に記載される操作送達システム、操作された標的化部分、ポリペプチド、ウイルス（例えば、AAV）粒子、及び／又は他の粒子、ポリヌクレオチド、ベクター、及びそのシステム、操作された細胞、及び／又はその製剤の1つ以上の分子が、疾患の処置又は予防として（又は処置若しくは予防の一環として）それを必要とする対象に送達され得る。操作された細胞及び／又は操作の送達によって処置及び／又は予防される特定の疾患が、操作AAVカプシド粒子にパッケージングされるカーゴ分子に依存し得ることが理解されるであろう。

20

【0536】

一般に、本明細書に記載される組成物は、CNS疾患、障害、又はその症状を処置するための治療法において使用され得る。CNS疾患又は障害が、その病理が中枢神経系の1つ以上の細胞型に関与するか又は影響を与える任意の疾患又は障害を指すことが理解されるであろう。ある実施形態において、CNS疾患又は障害は、その主な病理がCNSの1つ以上の細胞型に関与するものである。ある実施形態において、筋細胞又は末梢神経系細胞などの、CNSの外部の1つ以上の他の細胞型が、CNS疾患の病理に関与する。ある実施形態において、CNS疾患又は障害は、1つ以上の遺伝的異常によって引き起こされ得る。ある実施形態において、CNS疾患又は障害は、遺伝的異常によって引き起こされない。疾患の非遺伝的原因としては、感染症、癌、身体的外傷及び当業者によって理解される他の原因が挙げられる。疾患を処置するための遺伝子組み換え手法が、遺伝性疾患及び非遺伝性疾患の両方を処置及び／又は予防するのに適用され得ることも理解されるであろう。例えば、非遺伝性疾患の場合、遺伝子治療手法が、非遺伝性疾患の原因（例えば、癌又は感染性微生物）を修正するのに使用され得、原因がもはや疾患を引き起こさないようにする（例えば、癌細胞又は感染性微生物を除去するか又は非機能性にするによって）。

30

40

【0537】

例示的なCNS疾患及び障害としては、限定はされないが、フリードライヒ運動失調症、ドラベ症候群、脊髄小脳失調症3型、ニーマン・ピック病C型、ハンチントン病、ポンペ病、筋強直性ジストロフィー1型、Glut1欠損症症候群（De Vivo症候群）、テイ・サックス病、脊髄性筋萎縮症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ダノン病、レット症候群、アンジェルマン症候群、又はそれらの組合せが挙げられる。他のものが、本明細書における他の箇所に記載され、及び／又は本明細書において提供される説明を考慮して当業者によって理解されるであろう）。

【0538】

処置され得る遺伝性疾患は、本明細書における他の箇所により詳細に記載される（例え

50

ば、以下の遺伝子組み換えによる療法についての説明を参照）。他の疾患は、限定はされないが、以下のもの：癌（膠芽細胞腫又は他の脳又はCNS癌など）、アシネトバクター（*Acubetivacter*）感染症、放線菌症、アフリカ睡眠病、AIDS／HIV、アメーバ症、アナプラズマ症、住血線虫症、アニサキス症、炭疽病、アルカノバクテリアウム・ヘモリティカム（*Acranobacterium haemolyticum*）感染症、アルゼンチン出血熱、回虫症、アスペルギルス症、アストロウイルス感染症、バベシア症、細菌性髄膜炎、細菌性肺炎、細菌性膣炎、バクテロイデス（*Bacteroides*）感染症、バランチジウム症、バルトネラ症、バイリサスカリス感染症、BKウイルス感染症、黒色砂毛、プラストシスチス症、プラストミセス症、ボリビア出血熱、ボツリヌス症、ブラジル出血熱、ブルセラ症、腺ペスト、バークホルデリア（*Burkholderia*）感染症、ブルーリ潰瘍、カリシウイルス感染症、カンピロバクター感染症、カンジダ症、毛頭虫症、カリオン病、ネコ引っ掻き病、蜂巣炎、シャーガス病、軟性下疳、水痘、チクングニア熱、クラミジア、クラミジア肺炎菌（*Chlamydia pneumoniae*）、コレラ、黒色分芽菌症、ツボカビ症、肝吸虫症、クロストリジウム・ディフィシレ（*Clostridium difficile*）大腸炎、コクシジオイデス症、コロラドダニ熱、ライノウイルス／コロナウイルス感染症（風邪）、クロイツフェルト・ヤコブ病、クリミアコンゴ出血熱、クリプトコッカス症、クリプトスポリジウム症、皮膚幼虫移行症（CLM）、サイクロスポーラ症、嚢虫症、サイトメガロウイルス感染症、デング熱、デスマデスムス（*Desmodemus*）感染症、二核アメーバ症、ジフテリア、裂頭条虫症、メジナ虫症、エボラ出血熱、エキノコックス症、エーリキア症、蟻虫症、エンテロコッカス（*Enterococcus*）感染症、エンテロウイルス感染症、流行性発疹チフス、伝染性紅斑、突発性発疹、肝蛭、肥大吸虫症、致死性家族性不眠症、フィラリア症、ウエルシュ菌（*Clostridium perfringens*）感染症、フソバクテリアウム（*Fusobacterium*）感染症、ガス壊疽（クロストリジウム性筋壊死）、ジオトリクム症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、ジアルジア症、鼻疽、顎口虫症、淋病、鼠径肉芽腫、A群連鎖球菌（*Group A streptococcal*）感染症、B群連鎖球菌（*Group B streptococcal*）感染症、インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）感染症、手足口病、ハンタウイルス肺症候群、ハートランドウイルス病、ピロリ菌（*Helicobacter pylori*）感染症、腎症候性出血熱、ヘンドラウイルス感染症、肝炎（A、B、C、D、E型の全ての群）、単純ヘルペス、ヒストプラズマ症、鉤虫感染症、ヒトボカウイルス感染症、ヒトエーリキア症、ヒト顆粒球アナプラズマ症、ヒトメタニューモウイルス感染症、ヒト単球性エーリキア症、ヒトパピローマウイルス、膜様条虫症、エプスタイン・バーン感染症、単核球症、インフルエンザ、イソスポラ症、川崎病、キングラ・キング（*Kingella kingae*）感染症、クールー病、ラッサ熱、レジオネラ症（レジオネラ症及びポンティアック熱）、リーシュマニア症、ハンセン病、レプトスピラ症、リステリア症、ライム病、リンパ管フィラリア症、リンパ球性脈絡髄膜炎、マラリア、マールブルグ出血熱、麻疹、中東呼吸器症候群、類鼻疽、髄膜炎、髄膜炎菌性疾患、メタゴニムス症、微孢子虫症、伝染性軟属腫、サル痘、ムンプス、ネズミ発疹チフス、マイコプラズマ肺炎、マイコプラズマ・ジェニタリウム（*Mycoplasma genitalium*）感染症、菌腫、ハエ蛆症、結膜炎、ニパウイルス感染症、ノロウイルス、変異体クロイツフェルト・ヤコブ病、ノカルジア症、オンコセルカ症、オピストルキス症、パラコクシジオイデス症、肺吸虫症、パストツレラ症、アタマジラミ（*Pediculosis capitis*）、コロモジラミ（*Pediculosis corporis*）、ケジラミ（*Pediculosis pubis*）、骨盤内炎症性疾患、百日咳、ペスト、肺炎球菌感染症、ニューモシスチス肺炎、肺炎、ポリオウイルス感染症、プレボテラ感染症、原発性アメーバ性髄膜脳炎、進行性多巣性白質脳症、オウム病、Q熱、狂犬病、回帰熱、呼吸器合胞体ウイルス感染症、ライノウイルス感染症、リケッチア感染症、リケッチア痘、リフトバレー熱、ロッキー山紅斑熱、ロタウイルス感染症、風疹、サルモネラ症、SARS、疥癬、猩紅熱、住血吸虫症、敗血症、細菌性赤痢、带状疱疹

10

20

30

40

50

疹、天然痘、スポロトリウム症、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）感染症（*MRSA*を含む）、糞線虫症、亜急性硬化性全脳炎、梅毒、条虫症、破傷風、白癬菌属（*Trichophyton*）種感染症、トキソカラ症、トキソプラズマ症、トラコーマ、旋毛虫病、鞭虫症、結核、野兔病、腸チフス熱、発疹チフス熱、ウレアプラズマ・ウレアリティカム（*Ureaplasma urealyticum*）感染症、溪谷熱、ベネズエラウマ脳炎、ベネズエラ出血熱、ビブリオ属（*Vibrio*）種感染症、ウイルス肺炎、ウエストナイル熱、白色砂毛、エルシニア偽結核、エルシニア症、黄熱病、ジアスポラ症（*Zea spora*）、ジカ熱、接合菌症及びそれらの組合せのいずれかを含み得る。

【0539】

本発明の実施形態を用いて処置され得る他の疾患及び障害としては、限定はされないが、内分泌疾患（例えば、1型及び2型糖尿病、妊娠糖尿病、低血糖症、グルカゴノーマ、甲状腺腫、甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、甲状腺炎、甲状腺癌、甲状腺ホルモン不応症、副甲状腺障害、骨粗鬆症、変形性骨炎、くる病、骨軟化症、下垂体機能低下症、下垂体部腫瘍など）、感染性及び非感染性起源の皮膚疾患、感染性又は非感染性起源の眼疾患、感染性又は非感染性起源の消化器疾患、感染性又は非感染性起源の心血管疾患、感染性又は非感染性起源の脳及び神経疾患、感染性又は非感染性起源の神経系疾患、感染性又は非感染性起源の筋疾患、感染性又は非感染性起源の骨疾患、感染性又は非感染性起源の生殖器系疾患、感染性又は非感染性起源の腎臓系疾患、感染性又は非感染性起源の血液疾患、感染性又は非感染性起源のリンパ系疾患、感染性又は非感染性起源の免疫系疾患、感染性又は非感染性起源の精神疾患などが挙げられる。

【0540】

ある実施形態において、処置される疾患は、CNS又はCNS関連疾患又は障害、例えば、遺伝性CNS疾患又は障害である。このようなCNS又はCNS関連疾患（遺伝性CNS疾患又は障害を含む）は、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

【0541】

他の疾患及び障害が、当業者によって理解されるであろう。

【0542】

養子細胞療法

一般的に言えば、養子細胞移入は、対象への細胞（自己細胞、同種異系細胞、及び／又は異種細胞）の移入を含む。細胞は、対象への送達の前に修飾及び／又は他の形で操作されても又はされなくてもよい。操作は、1つ以上の遺伝子組み換え剤による遺伝子組み換えを含み得る。例示的な遺伝子組み換え剤及びシステムは、本明細書における他の箇所により詳細に記載され、当業者によって理解されるであろう。このような遺伝子又は他の修飾組成物又はシステムは、CNS特異的標的化部分を含有する本明細書に記載される組成物の1つ以上によって養子療法のために修飾される細胞に送達され得る。

【0543】

ある実施形態において、本明細書に記載される操作された細胞は、養子細胞移入治療に含まれ得る。ある実施形態において、本明細書に記載される操作された細胞は、それを必要とする対象に送達され得る。ある実施形態において、細胞は、対象から単離され、それが操作された細胞を生成するために本明細書に記載される操作AAVカプシド粒子を生成することが可能であるようにインビトロで操作され、自己移植により対象に戻されるか又は同種異系若しくは異種移植により異なる対象に送達される。単離、操作、及び／又は送達される細胞は、真核細胞であり得る。単離、操作、及び／又は送達される細胞は、幹細胞であり得る。単離、操作、及び／又は送達される細胞は、分化した細胞であり得る。単離、操作、及び／又は送達される細胞は、免疫細胞、血液細胞、内分泌細胞、脳細胞、神経系細胞、血管細胞、筋細胞、軟組織細胞、神経細胞、グリア細胞、星状膠細胞、シュワン細胞、ミクログリア細胞、又は他の神経支持細胞、又はそれらの組合せであり得る。他の特定の細胞型が、当業者によって即座に理解されるであろう。

【0544】

ある実施形態において、単離された細胞は、本明細書における他の箇所に記載されるよ

うに操作された細胞になるように操作され得る（例えば、本明細書における他の箇所に記載される1つ以上の操作送達システム分子又はベクターを含有し、及び／又は発現する）。このような操作された細胞を作製する方法は、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

【0545】

本発明にしたがう細胞又は細胞の集団の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、注入、埋め込み、又は移植によるなどの任意の好都合な方法で行われ得る。細胞又は細胞の集団は、患者に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に（*intranodally*）、髄内に、筋肉内に、静脈内若しくはリンパ管内注入によって、又は腹腔内に投与され得る。一実施形態において、本発明の細胞組成物は、好ましくは、静脈注射によって投与される。

10

【0546】

細胞又は細胞の集団の投与は、 kg 体重当たり $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞（それらの範囲内の細胞数の全ての整数値を含む）の投与であるか又はそれを含み得る。ある実施形態において、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞/ kg が、送達される。養子細胞療法における投与は、例えばシクロホスファミドによるリンパ球の枯渇化を途中で伴うか又は伴わずに、例えば $10^6 \sim 10^9$ 個の細胞/ kg の投与を含み得る。細胞又は細胞の集団は、1回以上の投与で投与され得る。別の実施形態において、有効量の細胞が、単回投与として投与される。別の実施形態において、有効量の細胞が、所定の期間にわたって2回以上の投与として投与される。投与のタイミングは、担当医師の判断の範囲内であり、患者の臨床症状に依存する。細胞又は細胞の集団は、血液バンク又はドナーなどの任意の供給源から入手され得る。個々のニーズは変化するが、特定の疾患又は病態のための所与の細胞型の有効量の最適な範囲の決定は、当業者の技能の範囲内である。有効量は、治療又は予防効果を提供する量を意味する。投与される投与量は、レシピエントの年齢、健康及び体重、もしあれば併用療法の種類、処置の頻度及び所望の効果の性質に依存するであろう。

20

【0547】

別の実施形態において、それらの細胞を含む有効量の細胞又は組成物が、非経口的に投与される。投与は、静脈内投与であり得る。投与は、組織内での注射によって直接行われ得る。ある実施形態において、組織は、腫瘍であり得る。

【0548】

有害反応を防ぐために、操作された細胞は、細胞を特定のシグナルへの曝露に対して脆弱にする導入遺伝子の形態のトランスジェニック安全スイッチを備え得る。例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（TK）遺伝子は、例えば Greco, et al., *Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene*, *Front. Pharmacol.* 2015; 6: 95 に記載されるものと同様の操作された細胞への導入によって、このように使用され得る。このような細胞において、ガンシクロビル又はアシクロビルなどのヌクレオシドプロドラッグの投与は、細胞死を引き起こす。別の安全スイッチ構築物は、例えば2つの非機能的 *icasp9* 分子と一緒にして活性酵素を形成する小分子ジメライザー（*dimerizer*）の投与によって誘発される誘導性カスパーゼ9を含む。細胞増殖制御を実施するための多種多様な別の手法が、記載されている（米国特許出願公開第20130071414号明細書；PCT特許公開国際公開第2011146862号パンフレット；PCT特許公開国際公開第2014011987号パンフレット；PCT特許公開国際公開第2013040371号パンフレット；Zhou et al., *BLOOD*, 2014, 123/25: 3895-3905；Di Stasi et al., *The New England Journal of Medicine* 2011; 365: 1673-1683；Sadelain M, *The New England Journal of Medicine* 2011; 365: 1735-173；Ramos et al., *Stem Cells* 28 (6): 1107-15 (2010) を参照）。

30

40

【0549】

50

単離された細胞を修飾して、所望の特性を有する操作された細胞を得る方法が、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、本方法は、限定はされないが、細胞を修飾するためにCRISPR-Casシステムを用いるゲノム編集を含むゲノム修飾を含み得る。これは、本明細書における他の箇所に記載される操作AAVカプシドシステム分子の導入に加えて行われ得る。

【0550】

同種異系細胞は、宿主免疫系によって迅速に拒絶される。未照射血液産物中に存在する同種異系白血球が、5～6日以下持続することが実証されている（Bonni, Murski et al., 2008 Blood 112(12):4746-54）。したがって、同種異系細胞の拒絶を防ぐために、宿主の免疫系は、通常、ある程度抑制される必要がある。しかしながら、養子細胞移入の場合、免疫抑制剤の使用はまた、本明細書に記載される操作された細胞などの導入された治療用細胞に有害な影響を及ぼす。したがって、これらの条件で養子免疫療法を有効に使用するために、導入される細胞は、免疫抑制療法に耐性である必要があるであろう。したがって、特定の実施形態において、本発明は、好ましくは、免疫抑制剤に対する標的をコードする少なくとも1つの遺伝子を不活性化することによって、操作された細胞を修飾して、それらを免疫抑制剤に対して耐性にする工程をさらに含む。免疫抑制剤は、いくつかの作用機序の1つによって免疫機能を抑制する薬剤である。免疫抑制剤は、限定はされないが、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン-2受容体 α -鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼの阻害剤、ジヒドロ葉酸レダクターゼの阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤であり得る。本発明は、操作された細胞内の免疫抑制剤の標的を不活性化することによって、養子細胞療法のために操作された細胞に免疫抑制抵抗性を与えることを可能にする。非限定的な例として、免疫抑制剤の標的は、CD52、グルココルチコイド受容体（GR）、FKBPファミリー遺伝子メンバー及びシクロフィリンファミリー遺伝子メンバーなどの免疫抑制剤に対する受容体であり得る。

【0551】

免疫チェックポイントは、免疫反応を減速又は停止し、免疫細胞の無制御な活性から過剰な組織損傷を防止する阻害経路である。特定の実施形態において、標的とされる免疫チェックポイントは、プログラム細胞死-1（PD-1又はCD279）遺伝子（PDCD1）である。他の実施形態において、標的とされる免疫チェックポイントは、細胞毒性Tリンパ球関連抗原（CTLA-4）である。さらなる実施形態において、標的とされる免疫チェックポイントは、CD28及びCTLA4 Igスーパーファミリーの別のメンバー、例えば、BTLA、LAG3、ICOS、PDL1又はKIRである。他のさらなる実施形態において、標的とされる免疫チェックポイントは、TNFRスーパーファミリーのメンバー、例えば、CD40、OX40、CD137、GITR、CD27又はTIM-3である。

【0552】

さらなる免疫チェックポイントは、Src相同性2ドメイン含有タンパク質チロシンホスファターゼ1（SHP-1）（Watson HA, et al., SHP-1: the next checkpoint target for cancer immunotherapy? Biochem Soc Trans. 2016 Apr 15; 44(2):356-62）を含む。SHP-1は、広く発現される阻害性タンパク質チロシンホスファターゼ（PTP）である。T細胞において、それは、抗原依存性活性化及び増殖の負の調節因子である。それは、細胞質タンパク質であり、したがって、抗体媒介性治療法に適していないが、活性化及び増殖におけるその役割により、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞などの養子移入手法における遺伝子操作の魅力的な標的になっている。免疫チェックポイントは、Ig及びITIMドメイン（TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9）及びVISTAを有するT細胞免疫受容体も含み得る（Le Mercier I, et al., (2015) Beyond CTLA-4及びPD-1, the generation Z of negative checkpoint

regulators. Front. Immunol. 6:418)。

【0553】

国際公開第2014172606号パンフレットは、枯渇したCD8+T細胞の増殖及び／又は活性を増加させ、CD8+T細胞枯渇を減少させる（例えば、機能的に枯渇した又は非応答CD8+免疫細胞減少させる）ための、MT1及び／又はMT1阻害剤の使用に関連する。特定の実施形態において、メタロチオネインが、養子移入されたT細胞における遺伝子編集によって標的とされる。

【0554】

特定の実施形態において、遺伝子編集の標的は、免疫チェックポイントタンパク質の発現に関与する少なくとも1つの標的化遺伝子座であり得る。このような標的は、限定はされないが、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、ICOS (CD278)、PDL1、KIR、LAG3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244 (2B4)、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFRBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、VISTA、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、MT1、MT2、CD40、OX40、CD137、GITR、CD27、SHP-1又はTIM-3を含み得る。ある実施形態において、PD-1又はCTLA-4遺伝子の発現に関与する遺伝子座が標的とされる。ある実施形態において、限定はされないが、PD-1及びTIGITなどの遺伝子の組合せが標的とされる。

【0555】

ある実施形態において、少なくとも2つの遺伝子が編集される。遺伝子の対は、限定はされないが、PD1及びTCR α 、PD1及びTCR β 、CTLA-4及びTCR α 、CTLA-4及びTCR β 、LAG3及びTCR α 、LAG3及びTCR β 、Tim3及びTCR α 、Tim3及びTCR β 、BTLA及びTCR α 、BTLA及びTCR β 、BY55及びTCR α 、BY55及びTCR β 、TIGIT及びTCR α 、TIGIT及びTCR β 、B7H5及びTCR α 、B7H5及びTCR β 、LAIR1及びTCR α 、LAIR1及びTCR β 、SIGLEC10及びTCR α 、SIGLEC10及びTCR β 、2B4及びTCR α 、2B4及びTCR β を含み得る。

【0556】

操作された細胞（操作T細胞など（例えば、単離された細胞は、T細胞である）の遺伝子組み換え又は他の修飾の前又は後のいずれかにかかわらず、操作された細胞は、例えば、米国特許第6,352,694号明細書；同第6,534,055号明細書；同第6,905,680号明細書；同第5,858,358号明細書；同第6,887,466号明細書；同第6,905,681号明細書；同第7,144,575号明細書；同第7,232,566号明細書；同第7,175,843号明細書；同第5,883,223号明細書；同第6,905,874号明細書；同第6,797,514号明細書；同第6,867,041号明細書；及び同第7,572,631号明細書に記載されるような方法を一般に用いて活性化及び増殖され得る。操作された細胞は、インビトロ又はインビボで増殖され得る。

【0557】

ある実施形態において、本方法は、本明細書における他の箇所に記載される好適な遺伝子組み換え方法によってエクスピボで操作された細胞を編集して（例えば、CRISPR-Cas又はIsCbsystemによる遺伝子編集）、潜在的なアロ反応性TCR又は他の受容体を除去して、同種異系の養子移入を可能にすることを含む。ある実施形態において、T細胞は、CRISPR-Casシステム又は他の好適なゲノム修飾技術によってエクスピボで編集されて、TCR（例えば、 $\alpha\beta$ TCR）又は他の関連受容体をコード

する内因性遺伝子をノックアウト又はノックダウンして、移植片対宿主病（GVHD）を防ぐ。ある実施形態において、操作された細胞がT細胞である場合、操作された細胞は、CRISPR又は他の適切な遺伝子組み換え方法によってエキスピボで編集されて、TRAC遺伝子座を変異させる。ある実施形態において、T細胞は、TRACの第1のエクソンを標的とする1つ以上のガイド配列を用いて、CRISPR-Casシステムによってエキスピボで編集される。Liu et al., Cell Research 27: 154-157 (2017)を参照されたい。ある実施形態において、TRACの第1のエクソンは、別の適切な遺伝子組み換え方法を用いて修飾される。ある実施形態において、本方法は、CRISPR又は他の適切な方法を使用して、CAR又はTCRをコードする外因性遺伝子をTRAC遺伝子座にノックインすると同時に、内因性TCRをノックアウトすることを含む（例えば、CAR cDNAの後の自己切断P2Aペプチドをコードするドナー配列を有する）。Eyquem et al., Nature 543: 113-117 (2017)を参照されたい。ある実施形態において、外因性遺伝子は、内因性TCRプロモーターの下流に動作可能に挿入されるプロモーターレスCARコード又はTCRコード配列を含む。

10

【0558】

ある実施形態において、本方法は、CRISPR-Casシステムによって操作された細胞、例えば、操作T細胞をエキスピボで編集して、HLA-Iタンパク質をコードする内因性遺伝子をノックアウト又はノックダウンして、編集された細胞、例えば操作T細胞の免疫原性を最小限に抑えることを含む。ある実施形態において、操作T細胞は、CRISPR-Casシステムによってエキスピボで編集されて、β-2ミクログロブリン（B2M）遺伝子座を変異させ得る。ある実施形態において、操作された細胞、例えば、操作T細胞は、B2Mの第1のエクソンを標的とする1つ以上のガイド配列を用いて、CRISPR-Casシステムによってエキスピボで編集される。B2Mの第1のエクソンはまた、別の適切な修飾方法を用いて修飾され得る。Liu et al., Cell Research 27: 154-157 (2017)を参照されたい。B2Mの第1のエクソンはまた、当業者によって理解される別の適切な修飾方法を用いて修飾され得る。ある実施形態において、本方法は、CRISPR-Casシステムを使用して、CAR又はTCRをコードする外因性遺伝子を、B2M遺伝子座にノックインすると同時に、内因性B2Mをノックアウトすることを含む（例えば、CAR cDNAの後の自己切断P2Aペプチドをコードするドナー配列を有する）。Eyquem et al., Nature 543: 113-117 (2017)を参照されたい。これはまた、当業者によって理解される別の適切な修飾方法を用いて達成され得る。ある実施形態において、外因性遺伝子は、内因性B2Mプロモーターの下流に動作可能に挿入されるプロモーターレスCARコード又はTCRコード配列を含む。

20

30

【0559】

ある実施形態において、本方法は、CRISPR-Casシステムによって操作された細胞、例えば、操作T細胞をエキスピボで編集して、外因性CAR又はTCRによって標的とされる抗原をコードする内因性遺伝子をノックアウト又はノックダウンすることを含む。これはまた、当業者によって理解される別の適切な修飾方法を用いて達成され得る。ある実施形態において、操作T細胞などの操作された細胞は、CRISPR-Casシステムによってエキスピボで編集されて、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）、サバイビン、マウス二重微小染色体2ホモログ（MDM2）、シトクロムP450 1B1（CYP1B）、HER2/neu、ウィルムス腫瘍遺伝子1（WT1）、リビン、αフェトタンパク質（AFP）、癌胎児性抗原（CEA）、ムチン16（MUC16）、MUC1、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、p53又はサイクリン（DI）（国際公開第2016/011210号パンフレットを参照）から選択される腫瘍抗原の発現をノックアウト又はノックダウンする。これはまた、当業者によって理解される別の適切な修飾方法を用いて達成され得る。ある実施形態において、操作T細胞などの操作された細胞は、CRISPR-Casシステムによってエキスピボで編集されて、B細胞成熟抗原（BC

40

50

MA)、膜貫通活性化因子及びCAML相互作用物質(TACI)、又はB細胞活性化因子受容体(BAFF-R)、CD38、CD138、CS-1、CD33、CD26、CD30、CD53、CD92、CD100、CD148、CD150、CD200、CD261、CD262、若しくはCD362(国際公開第2017/011804号パンフレットを参照)から選択される抗原の発現をノックアウト又はノックダウンする。これはまた、当業者によって理解される別の適切な修飾方法を用いて達成され得る。

【0560】

遺伝子ドライブ

本発明はまた、1つ以上のカーゴポリヌクレオチドの送達又は遺伝子ドライブを生成することが可能な1つ以上のカーゴポリヌクレオチドを有する操作AAVカプシド粒子の生成によって、遺伝子ドライブを生成するための、本明細書に記載される操作送達システム分子、ベクター、操作された細胞、及び／又は操作AAVカプシド粒子の使用を想定している。ある実施形態において、遺伝子ドライブは、例えばPCT特許公開国際公開第2015/105928号パンフレットに記載される遺伝子ドライブと類似のシステムにおいて、RNAガイド遺伝子ドライブを提供するために、Cas媒介性RNAガイド遺伝子ドライブ、例えば、Casであり得る。この種のシステムは、例えば、生殖細胞系細胞中に、RNAガイドDNAヌクレアーゼ及び1つ以上のガイドRNAをコードする核酸配列を導入することによって、真核生物生殖細胞系細胞を改変するための方法を提供し得る。ガイドRNAは、生殖細胞系細胞のゲノムDNAにおける1つ以上の標的位置に相補的であるように設計され得る。RNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸配列及びガイドRNAをコードする核酸配列が、隣接配列の間の構築物上に提供され得、プロモーターは、同様に隣接配列の間に位置する任意の所望のカーゴコード配列と一緒に、生殖細胞系細胞がRNAガイドDNAヌクレアーゼ及びガイドRNAを発現し得るように、配置される。隣接配列は、典型的に、選択された標的染色体上の対応する配列と同一の配列を典型的に含み、それによって、隣接配列は、構築物によってコードされる構成要素とともに機能して、相同的組み換えなどの機構によって標的切断部位におけるゲノムDNAへの外来核酸構築物配列の挿入を容易にして、生殖細胞系細胞を、外来核酸配列に対してホモ接合性にする。このように、遺伝子ドライブシステムは、育種集団を通して所望のカーゴ遺伝子を遺伝子移入することを可能にする(Gantz et al., 2015, Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*, PNAS 2015, published ahead of print November 23, 2015, doi:10.1073/pnas.1521077112; Esvelt et al., 2014, Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations eLife 2014; 3:e03401)。選択された実施形態において、標的配列は、ゲノムにおける潜在的なオフターゲット部位をほとんど有さないように選択され得る。複数のガイドRNAを用いて標的遺伝子座内の複数の部位を標的とすることは、ドライブ抵抗性対立遺伝子の切断頻度を増加させ、その発生を妨げ得る。切断型ガイドRNAは、オフターゲット切断を減少させ得る。対形成されたニッカーゼが、単一のヌクレアーゼの代わりに使用されて、特異性をさらに増加させ得る。遺伝子ドライブ構築物(遺伝子ドライブ操作送達システム構築物など)は、転写調節因子をコードするカーゴ配列を含み、例えば相同的組み換え遺伝子を活性化し、及び／又は非相同の末端接合を抑制し得る。標的部位は、必須遺伝子内で選択され得、それによって、非相同の末端接合事象が、ドライブ抵抗性対立遺伝子を生成せずに致死性を生じさせ得る。遺伝子ドライブ構築物は、ある範囲の温度で、ある範囲の宿主において機能するように操作され得る(Cho et al., 2013, Rapid and Tunable Control of Protein Stability in *Caenorhabditis elegans* Using a Small Molecule, PLoS

10

20

30

40

50

ONE 8 (8) : e72393. doi:10.1371/journal.pone.0072393)。

【0561】

移植及び異種移植

本明細書に記載される操作AAVカプシドシステム分子、ベクター、操作された細胞、及び／又は操作送達粒子は、2人の異なる人の間（移植）又は種の間（異種移植）での移植のために、カーゴポリヌクレオチドを送達し、及び／又は他の形で組織の修飾に関与するように使用され得る。トランスジェニック動物の生成のためのこのような技術が、本明細書における他の箇所に記載される。種間の移植技術は、当該技術分野において一般に公知である。例えば、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、本明細書に記載される操作AAVカプシドポリヌクレオチド、ベクター、操作された細胞、及び／又は操作AAVカプシド粒子を用いて送達され得、例えば、ヒト免疫系、すなわち異種抗原遺伝子によって認識されるエピトープをコードする遺伝子の発現を妨げることによって、移植（例えばエキスピボで（例えば収集後であるが、移植前）又はインビボ（ドナー又はレシピエント中））、動物、例えば、トランスジェニックブタ（ヒトヘムオキシゲナーゼ-1トランスジェニックブタ株など）のための器官において選択された遺伝子をノックアウト、ノックダウン又は阻害するのに使用され得る。阻害のための候補のブタ遺伝子は、例えば α （1,3）-ガラクトシルトランスフェラーゼ及びシチジナーリン酸塩-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ遺伝子（PCT特許公開国際公開第2014/066505号パンフレットを参照）を含み得る。さらに、内因性レトロウイルスをコードする遺伝子、例えば全てのブタ内因性レトロウイルスコードする遺伝子が、阻害され得る（Yang et al., 2015, Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs), Science 27 November 2015: Vol. 350 no. 6264 pp. 1101-1104を参照）。さらに、RNAガイドDNAヌクレアーゼが、ヒトCD55遺伝子などの異種移植ドナー動物におけるさらなる遺伝子の統合のための部位を標的とするのに使用され、超急性拒絶に対する保護を改善し得る。

【0562】

それが種間の移植（ヒトからヒトなど）である場合、本明細書に記載される操作AAVカプシドシステム分子、ベクター、操作された細胞、及び／又は操作送達粒子は、カーゴポリヌクレオチドを送達し、及び／又は移植される組織を修飾するために他の形で関与するのに使用され得る。ある実施形態において、修飾は、1つ以上のHLA抗原又は他の組織型決定基を修飾することを含み得、それによって、レシピエントによる拒絶の発生を減少させるために、免疫原性プロファイルが、ドナーの免疫原性プロファイルよりレシピエントの免疫原性プロファイルにより類似するか又は同一になる。関連組織型決定基は、当該技術分野において公知であり（器官適合を決定するのに使用されるものなど）、免疫原性プロファイル（組織型決定基の発現シグネチャを構成する）を決定するための技術は、当該技術分野において一般に公知である。

【0563】

ある実施形態において、ドナー（収集前など）又はレシピエント（移植後）は、移植された細胞、組織、及び／又は器官の免疫原性プロファイルを改変することが可能な本明細書に記載される操作AAVカプシドシステム分子、ベクター、操作された細胞、及び／又は操作送達粒子の1つ以上を投与され得る。ある実施形態において、移植された細胞、組織、及び／又は器官は、収集される細胞、組織、及び／又は器官を、例えば、低免疫原性になるか、又はレシピエントに移植されるときにいくつかの特定の特性を有するように修飾されるように改変することが可能なドナー及び本明細書に記載される操作AAVカプシドシステム分子、ベクター、操作された細胞、及び／又は操作送達粒子から収集され、収集される細胞、組織、及び／又は器官にエキスピボで送達され得る。送達の後、細胞、組織、及び／又は器官は、ドナーに移植され得る。

【0564】

遺伝子組み換え及びCNS、脳、及び／又は神経に影響を与える遺伝性又は後成的実施形態による疾患の処置

本明細書に記載される操作送達システム分子、ベクター、操作された細胞、及び／又は操作送達粒子（例えば、本明細書に記載されるCNS特異的標的化部分などの1つ以上の標的化部分を有するもの）は、遺伝子又は他のポリヌクレオチドを修飾し、及び／又は遺伝性及び／又は後成的実施形態により、CNS、脳、及び／又は神経の疾患を処置するのに使用され得る。本明細書における他の箇所に記載されるように、カーゴ分子は、細胞に送達され得、ある実施形態において、細胞のゲノムに統合され得るポリヌクレオチドであり得る。ある実施形態において、カーゴ分子は、1つ以上のCRISPR-Casシステム構成要素であり得る。ある実施形態において、CRISPR-Cas構成要素は、本明細書に記載される操作AAVカプシド粒子によって送達されるとき、任意にレシピエント細胞において発現され、レシピエント細胞のゲノムを配列特異的に修飾するように作用し得る。ある実施形態において、本明細書に記載される操作AAVカプシド粒子によってパッケージング及び送達され得るカーゴ分子は、CRISPR-Casに依存しない方法によってゲノム修飾を促進／媒介し得る。このような非CRISPR-Casゲノム修飾システムは、当業者によって即座に理解され、また、少なくとも部分的に、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、修飾は、特異的標的配列における。他の実施形態において、修飾は、ゲノム全体にわたってランダムであるような位置にある。

10

【0565】

本明細書に記載される操作送達AAV送達システム分子、ベクター、カプシド、操作された細胞、及び／又は操作送達粒子を用いて修飾され得るCNS、脳、及び／又は神経疾患に関連する遺伝子及びポリヌクレオチドの例が、後述される。

20

【0566】

ある実施形態において、治療薬又は予防薬、例えば、本明細書における他の箇所に記載される操作AAVカプシド及びそのシステムは、脳、神経、神経系、及び／又は中枢神経系疾患又は障害（CNS）を処置するためにそれを必要とする対象又はその細胞に送達され得る。ある実施形態において、脳、神経、神経系、及び／又はCNS疾患又は障害は、以下の遺伝子の正常な又は病的でない変異体と比較して、以下の遺伝子の1つ以上における1つ以上の変異によって、直接又は間接的に引き起こされ得る：筋萎縮性側索硬化症（ALS）の場合：SOD1、ALS2、STEX、FUS、TARDBP、VEGF（VEGF-a、VEGF-b、VEGF-c）；アルツハイマー病の場合：E1、CHIP、UCH、UBB、タウ、LRP、PICALM、クラステリン、PS1、SORL1、CR1、Vldlr、Uba1、Uba3、CHIP28、Aqp1、Uchl1、Uchl3、APP、AAA、CVAP、AD1、APOE、AD2、PSEN2、AD4、STM2、APBB2、FE65L1、NOS3、PLAU、URK、ACE、DCP1、ACE1、MPO、PACIP1、PAXIP1L、PTIP、A2M、BLMH、BMH、PSEN1、AD3）；自閉症の場合：Mecp2、BZRAP1、MDGA2、Sema5A、ニューレキシン1、GLO1、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、NLGN3、NLGN4、KIAA1260、AUTSX2；脆弱性X症候群の場合：FMR2、FXR1、FXR2、mGLUR5；ハンチントン病及びハンチントン病様障害の場合：HD、IT15、PRNP、PRIP、JPH3、JP3、HDL2、TBP、SCA17）；パーキンソン病の場合：NR4A2、NURR1、NOT、TINUR、SNCAIP、TBP、SCA17、SNCA、NACP、PARK1、PARK4、DJ1、PARK7、LRRK2、PARK8、PINK1、PARK6、UCHL1、PARK5、SNCA、NACP、PARK1、PARK4、PRKN、PARK2、PDJ、DBH、NDUFV2、PINK1、x-シヌクレイン）；レット症候群の場合：MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、CDKL5、STK9、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、x-シヌクレイン、DJ-1；統合失調症の場合：ニューレグリン1（Nr g1）、Erb4（ニューレグリンのための受容体）、コンプレキシン1（Cplx1）、Tph1トリプトファンヒド

30

40

50

ロキシラーゼ、Tph2、トリプトファンヒドロキシラーゼ2、ニューレキシン1、GSK3、GSK3a、GSK3b、5-HTT (Slc6a4)、COMT、DRD (Drd1a)、SLC6A3、DAOA、DTNBP1、Dao (Dao1)；セクレターゼ関連疾患 (APH-1 (α 及び β))、プレセニリン (Psen1)、ニカストリン、(Ncstn)、PEN-2、Nos1、Parp1、Nat1、Nat2) の場合；トリヌクレオチドリピート病 (HTT (ハンチントン病)、SBMA/SMAX1/AR (ケネディー病)、FXN/X25 (フリードライヒ運動失調症)、ATX3 (マシャド・ジョセフ病)、ATXN1 及び ATXN2 (脊髄小脳失調症)、DMPK (筋強直性ジストロフィー)、アトロフィン-1 及び Atn1 (DRPLA Dx)、CBP (Crebbp-全体不安定性)、VLDLR (アルツハイマー病)、Atxn7、Atxn10) の場合；脳、神経、及び／又は CNS における異常な又は正常でない軸索誘導シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；ITGAM；ROCK1；ITGA5；CXCR4；ADAM12；IGF1；RAC1；RAP1A；EIF4E；PRKCZ；NRP1；NTRK2；ARHGEF7；SMO；ROCK2；MAPK1；PGF；RAC2；PTPN11；GNAS；AKT2；PIK3CA；ERBB2；PRKCI；PTK2；CFL1；GNAQ；PIK3CB；CXCL12；PIK3C3；WNT11；PRKD1；GNB2L1；ABL1；MAPK3；ITGA1；KRAS；RHOA；PRKCD；PIK3C2A；ITGB7；GLI2；PXN；VASP；RAF1；FYN；ITGB1；MAP2K2；PAK4；ADAM17；AKT1；PIK3R1；GLI1；WNT5A；ADAM10；MAP2K1；PAK3；ITGB3；CDC42；VEGFA；ITGA2；EPHA8；CRKL；RND1；GSK3B；AKT3；PRKCA；脳、神経、及び／又は CNS における異常な又は正常でないアクチン細胞骨格シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ACTN4；PRKCE；ITGAM；ROCK1；ITGA5；IRAK1；PRKAA2；EIF2AK2；RAC1；INS；ARHGEF7；GRK6；ROCK2；MAPK1；RAC2；PLK1；AKT2；PIK3CA；CDK8；PTK2；CFL1；PIK3CB；MYH9；DIAPH1；PIK3C3；MAPK8；F2R；MAPK3；SLC9A1；ITGA1；KRAS；RHOA；PRKCD；PRKAA1；MAPK9；CDK2；PIM1；PIK3C2A；ITGB7；PPP1CC；PXN；VIL2；RAF1；GSN；DYRK1A；ITGB1；MAP2K2；PAK4；PIP5K1A；PIK3R1；MAP2K1；PAK3；ITGB3；CDC42；APC；ITGA2；TTK；CSNK1A1；CRKL；BRAF；VAV3；SGK；ハンチントン病シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；IGF1；EP300；RCOR1；PRKCZ；HDAC4；TGM2；MAPK1；CAPNS1；AKT2；EGFR；NCOR2；SP1；CAPN2；PIK3CA；HDAC5；CREB1；PRKCI；HSPA5；REST；GNAQ；PIK3CB；PIK3C3；MAPK8；IGF1R；PRKD1；GNB2L1；BCL2L1；CAPN1；MAPK3；CASP8；HDAC2；HDAC7A；PRKCD；HDAC11；MAPK9；HDAC9；PIK3C2A；HDAC3；TP53；CASP9；CREBBP；AKT1；PIK3R1；PDPK1；CASP1；APAF1；FRAF1；CASP2；JUN；BAX；ATF4；AKT3；PRKCA；CLTC；SGK；HDAC6；CASP3；脳、神経、及び／又は CNS 及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないアポトーシス調節及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；ROCK1；BID；IRAK1；PRKAA2；EIF2AK2；BAK1；BIRC4；GRK6；MAPK1；CAPNS1；PLK1；AKT2；IKBKB；CAPN2；CDK8；FAS；NFKB2；BCL2；MAP3K14；MAPK8；BCL2L1；CAPN1；MAPK3；CASP8；KRAS；RELA；PRKCD；PRKAA1；MAPK9；CDK2；PIM1；TP53；TNF；RAF1；IKBKG；RELB；CASP9；DYRK1A；MAP2K2；CHUK；APAF1；MAP2K1；NFKB1；

10

20

30

40

50

PAK3; LMNA; CASP2; BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK; CASP3; BIRC3; PARP1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない白血球溢血シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA; RAC1; RAP1A; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11; MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB; MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK; MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2; CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK; CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないインテグリンシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAP1A; TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2; CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2; CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない急性期反応シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1; TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN; AKT3; IL1R1; IL6; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないPTENシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11; MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA; CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1; MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR; RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFR; PDPK1; MAP2K1; NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2; GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないp53シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A; BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1; PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9; CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A; HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1; SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN; SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないアリアル炭化水素受容体シグナル伝達に関連す

10

20

30

40

50

るか又は関与する疾患又は障害の場合：HSPB1；EP300；FASN；TGM2；RXRA；MAPK1；NQO1；NCOR2；SP1；ARNT；CDKN1B；FOS；CHEK1；SMARCA4；NFKB2；MAPK8；ALDH1A1；ATR；E2F1；MAPK3；NRIP1；CHEK2；RELA；TP73；GSTP1；RB1；SRC；CDK2；AHR；NFE2L2；NCOA3；TP53；TNF；CDKN1A；NCOA2；APAF1；NFKB1；CCND1；ATM；ESR1；CDKN2A；MYC；JUN；ESR2；BAX；IL6；CYP1B1；HSP90AA1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない異物代謝シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；EP300；PRKCZ；RXRA；MAPK1；NQO1；NCOR2；PIK3CA；ARNT；PRKCI；NFKB2；CAMK2A；PIK3CB；PPP2R1A；PIK3C3；MAPK8；PRKD1；ALDH1A1；MAPK3；NRIP1；KRAS；MAPK13；PRKCD；GSTP1；MAPK9；NOS2A；ABCB1；AHR；PPP2CA；FTL；NFE2L2；PIK3C2A；PPARGC1A；MAPK14；TNF；RAF1；CREBBP；MAP2K2；PIK3R1；PPP2R5C；MAP2K1；NFKB1；KEAP1；PRKCA；EIF2AK3；IL6；CYP1B1；HSP90AA1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないSAPK/JNKシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；IRAK1；PRKAA2；EIF2AK2；RAC1；ELK1；GRK6；MAPK1；GADD45A；RAC2；PLK1；AKT2；PIK3CA；FADD；CDK8；PIK3CB；PIK3C3；MAPK8；RIPK1；GNB2L1；IRS1；MAPK3；MAPK10；DAXX；KRAS；PRKCD；PRKAA1；MAPK9；CDK2；PIM1；PIK3C2A；TRAF2；TP53；LCK；MAP3K7；DYRK1A；MAP2K2；PIK3R1；MAP2K1；PAK3；CDC42；JUN；TTK；CSNK1A1；CRKL；BRAF；SGK；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないPPAR/RXRシグナル伝達v：PRKAA2；EP300；INS；SMAD2；TRAF6；PPARA；FASN；RXRA；MAPK1；SMAD3；GNAS；IKBKB；NCOR2；ABCA1；GNAQ；NFKB2；MAP3K14；STAT5B；MAPK8；IRS1；MAPK3；KRAS；RELA；PRKAA1；PPARGC1A；NCOA3；MAPK14；INSR；RAF1；IKBKG；RELB；MAP3K7；CREBBP；MAP2K2；JAK2；CHUK；MAP2K1；NFKB1；TGFB1；SMAD4；JUN；IL1R1；PRKCA；IL6；HSP90AA1；ADIPOQ；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないNF-κBシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：IRAK1；EIF2AK2；EP300；INS；MYD88；PRKCZ；TRAF6；TBK1；AKT2；EGFR；IKBKB；PIK3CA；BTRC；NFKB2；MAP3K14；PIK3CB；PIK3C3；MAPK8；RIPK1；HDAC2；KRAS；RELA；PIK3C2A；TRAF2；TLR4；PDGFRB；TNF；INSR；LCK；IKBKG；RELB；MAP3K7；CREBBP；AKT1；PIK3R1；CHUK；PDGFRA；NFKB1；TLR2；BCL10；GSK3B；AKT3；TNFAIP3；IL1R1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないニューレグリンシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ERBB4；PRKCE；ITGAM；ITGA5；PTEN；PRKCZ；ELK1；MAPK1；PTPN11；AKT2；EGFR；ERBB2；PRKCI；CDKN1B；STAT5B；PRKD1；MAPK3；ITGA1；KRAS；PRKCD；STAT5A；SRC；ITGB7；RAF1；ITGB1；MAP2K2；ADAM17；AKT1；PIK3R1；PDPK1；MAP2K1；ITGB3；EREG；FRAP1；PSEN1；

10

20

30

40

50

ITGA2; MYC; NRG1; CRKL; AKT3; PRKCA; HSP90AA1;
 RPS6KB1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常
 な、病的な、及び／又は正常でないwnt及びβカテニンシグナル伝達に関連するか又は
 関与する疾患又は障害の場合: CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1
 E; GJA1; SMO; AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK
 2; PPP2R1A; WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFR
 P2; ILK; LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7
 L2; AKT1; PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFB R1
 ; CCND1; GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1
 ; GSK3B; AKT3; SOX2; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又
 は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないインスリン受容体シグナル伝達に
 関連するか又は関与する疾患又は障害の場合: PTEN; INS; EIF4E; PTPN
 1; PRKCZ; MAPK1; TSC1; PTPN11; AKT2; CBL; PIK3C
 A; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IRS1; MAPK3; T
 SC2; KRAS; EIF4EBP1; SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC;
 INSR; RAF1; FYN; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3
 R1; PDPK1; MAP2K1; GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; A
 KT3; FOXO1; SGK; RPS6KB1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又は
 その疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないIL-6シグナル伝達
 に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合: HSPB1; TRAF6; MAPKAP
 K2; ELK1; MAPK1; PTPN11; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP
 3K14; MAPK8; MAPK3; MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK1
 3; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK
 14; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8
 ; JAK2; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN;
 IL1R1; SRF; IL6; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害
 における異常な、病的な、及び／又は正常でないIGF-1シグナル伝達に関連するか又
 は関与する疾患又は障害の場合: IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTP
 N11; NEDD4; AKT2; PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK
 3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7
 ; KRAS; PIK3C2A; YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K
 2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JU
 N; CYR61; AKT3; FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1; 脳、神経
 、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正
 常でないNRF2媒介性酸化ストレス反応経路調節又はシグナル伝達に関連するか又は関
 与する疾患又は障害の場合: PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK
 1; SQSTM1; NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PI
 K3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1;
 MAPK9; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP
 3K7; CREBBP; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPI
 B; JUN; KEAP1; GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP
 90AA1; PRDX1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害にお
 ける異常な、病的な、及び／又は正常でないPPAR（例えばPPAR α、PPAR
 β、PPAR δ、及び／又はPPAR γ）調節又はシグナル伝達に関連するか又は関
 与する疾患又は障害の場合: EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA;
 MAPK1; IKBKB; NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT
 5B; MAPK3; NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TR
 AF2; PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG;
 RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA; MA
 P2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1; 脳、神経、及び／又は

10

20

30

40

50

CNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないFcεRI調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；RAC1；PRKCZ；LYN；MAPK1；RAC2；PTPN11；AKT2；PIK3CA；SYK；PRKCI；PIK3CB；PIK3C3；MAPK8；PRKD1；MAPK3；MAPK10；KRAS；MAPK13；PRKCD；MAPK9；PIK3C2A；BTK；MAPK14；TNF；RAF1；FYN；MAP2K2；AKT1；PIK3R1；PDPK1；MAP2K1；AKT3；VAV3；PRKCA；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないGタンパク質共役受容体調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；RAP1A；RGS16；MAPK1；GNAS；AKT2；IKBKB；PIK3CA；CREB1；GNAQ；NFKB2；CAMK2A；PIK3CB；PIK3C3；MAPK3；KRAS；RELA；SRC；PIK3C2A；RAF1；IKBKG；RELB；FYN；MAP2K2；AKT1；PIK3R1；CHUK；PDPK1；STAT3；MAP2K1；NFKB1；BRAF；ATF4；AKT3；PRKCA；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないイノシトールリン酸代謝調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；IRAK1；PRKAA2；EIF2AK2；PTEN；GRK6；MAPK1；PLK1；AKT2；PIK3CA；CDK8；PIK3CB；PIK3C3；MAPK8；MAPK3；PRKCD；PRKAA1；MAPK9；CDK2；PIM1；PIK3C2A；DYRK1A；MAP2K2；PIP5K1A；PIK3R1；MAP2K1；PAK3；ATM；TTK；CSNK1A1；BRAF；SGK；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないPDGF調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：EIF2AK2；ELK1；ABL2；MAPK1；PIK3CA；FOS；PIK3CB；PIK3C3；MAPK8；CAV1；ABL1；MAPK3；KRAS；SRC；PIK3C2A；PDGFRB；RAF1；MAP2K2；JAK1；JAK2；PIK3R1；PDGFRA；STAT3；SPHK1；MAP2K1；MYC；JUN；CRKL；PRKCA；SRF；STAT1；SPHK2；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないVEGF調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ACTN4；ROCK1；KDR；FLT1；ROCK2；MAPK1；PGF；AKT2；PIK3CA；ARNT；PTK2；BCL2；PIK3CB；PIK3C3；BCL2L1；MAPK3；KRAS；HIF1A；NOS3；PIK3C2A；PXN；RAF1；MAP2K2；ELAVL1；AKT1；PIK3R1；MAP2K1；SFN；VEGFA；AKT3；FOXO1；PRKCA；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないナチュラルキラー細胞調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；RAC1；PRKCZ；MAPK1；RAC2；PTPN11；KIR2DL3；AKT2；PIK3CA；SYK；PRKCI；PIK3CB；PIK3C3；PRKD1；MAPK3；KRAS；PRKCD；PTPN6；PIK3C2A；LCK；RAF1；FYN；MAP2K2；PAK4；AKT1；PIK3R1；MAP2K1；PAK3；AKT3；VAV3；PRKCA；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な細胞周期G1／Sチェックポイント調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：HDAC4；SMAD3；SUV39H1；HDAC5；CDKN1B；BTRC；ATR；ABL1；E2F1；HDAC2；HDAC7A；RB1；HDAC11；HDAC9；CDK2；E2F2；HDAC3；TP53；CDKN1A；CCND1；E2F4；ATM；RBL2；SMAD4；CDKN2A；MYC；NRG1；GSK3B；RBL1；HDAC6；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないT細胞受容体調節又はシグナル伝達に関連

10

20

30

40

50

するか又は関与する疾患又は障害の場合：RAC1；ELK1；MAPK1；IKBKB
 ；CBL；PIK3CA；FOS；NFKB2；PIK3CB；PIK3C3；MAPK
 8；MAPK3；KRAS；RELA；PIK3C2A；BTK；LCK；RAF1；I
 KBKG；RELB；FYN；MAP2K2；PIK3R1；CHUK；MAP2K1；
 NFKB1；ITK；BCL10；JUN；VAV3；脳、神経、及び／又はCNS及び
 ／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない死亡受容体調節
 又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：CRADD；HSPB
 1；BID；BIRC4；TBK1；IKBKB；FADD；FAS；NFKB2；BC
 L2；MAP3K14；MAPK8；RIPK1；CASP8；DAXX；TNFRSF
 10B；RELA；TRAF2；TNF；IKBKG；RELB；CASP9；CHUK
 ；APAF1；NFKB1；CASP2；BIRC2；CASP3；BIRC3；脳、神
 経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は
 FGF調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：RAC1；
 FGFR1；MET；MAPKAPK2；MAPK1；PTPN11；AKT2；PIK
 3CA；CREB1；PIK3CB；PIK3C3；MAPK8；MAPK3；MAPK
 13；PTPN6；PIK3C2A；MAPK14；RAF1；AKT1；PIK3R1
 ；STAT3；MAP2K1；FGFR4；CRKL；ATF4；AKT3；PRKCA
 ；HGF；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はGM-CSF調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は
 障害の場合：LYN；ELK1；MAPK1；PTPN11；AKT2；PIK3CA；
 CAMK2A；STAT5B；PIK3CB；PIK3C3；GNB2L1；BCL2L
 1；MAPK3；ETS1；KRAS；RUNX1；PIM1；PIK3C2A；RAF
 1；MAP2K2；AKT1；JAK2；PIK3R1；STAT3；MAP2K1；C
 CND1；AKT3；STAT1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は
 障害における異常な、病的な、及び／又は筋萎縮性側索硬化症調節又はシグナル伝達に関
 連するか又は関与する疾患又は障害の場合：BID；IGF1；RAC1；BIRC4；
 PGF；CAPNS1；CAPN2；PIK3CA；BCL2；PIK3CB；PIK3
 C3；BCL2L1；CAPN1；PIK3C2A；TP53；CASP9；PIK3R
 1；RAB5A；CASP1；APAF1；VEGFA；BIRC2；BAX；AKT3
 ；CASP3；BIRC3；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害に
 おける異常な、病的な、及び／又はJAK／Stat調節又はシグナル伝達に関連するか
 又は関与する疾患又は障害の場合：PTPN1；MAPK1；PTPN11；AKT2；
 PIK3CA；STAT5B；PIK3CB；PIK3C3；MAPK3；KRAS；S
 OCS1；STAT5A；PTPN6；PIK3C2A；RAF1；CDKN1A；MA
 P2K2；JAK1；AKT1；JAK2；PIK3R1；STAT3；MAP2K1；
 FRAP1；AKT3；STAT1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又
 は障害における異常な、病的な、及び／又はニコチン酸及びニコチンアミド代謝調節又は
 シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；IRAK1；
 PRKAA2；EIF2AK2；GRK6；MAPK1；PLK1；AKT2；CDK8
 ；MAPK8；MAPK3；PRKCD；PRKAA1；PBEF1；MAPK9；CD
 K2；PIM1；DYRK1A；MAP2K2；MAP2K1；PAK3；NT5E；T
 TK；CSNK1A1；BRAF；SGK；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその
 疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はケモカインシグナル伝達調節又はシグ
 ナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：CXCR4；ROCK2；MA
 PK1；PTK2；FOS；CFL1；GNAQ；CAMK2A；CXCL12；MAP
 K8；MAPK3；KRAS；MAPK13；RHOA；CCR3；SRC；PPP1C
 C；MAPK14；NOX1；RAF1；MAP2K2；MAP2K1；JUN；CCL
 2；PRKCA；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常
 な、病的な、及び／又はIL-2シグナル伝達調節又はシグナル伝達に関連するか又は関
 与する疾患又は障害の場合：ELK1；MAPK1；PTPN11；AKT2；PIK3

10

20

30

40

50

CA; SYK; FOS; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2; JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害におけるシナプス長期抑圧に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; PRKCI; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3; KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はエストロゲン受容体調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1; HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はタンパク質ユビキチン化経路活性、調節、及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はIL-10調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; JUN; IL1R1; IL6; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はビタミンD受容体(VDR)及び／又はRXR調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; NCOR2; SP1; PRKCI; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はTGF-β調節又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はToll様受容体活性、調節、及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK; NFKB1; TLR2; JUN; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はp38 MAPK活性、調節、及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS; CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFBR1; MYC; ATF4; IL1R1; SRF; STAT1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はニューロトロフィン/TRK活性、調節、及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CRE

10

20

30

40

50

B1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; CDC42; JUN; ATF4; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はFXR及び／又はRXR活性、調節、及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; APOB; MAPK10; PPARG; MTTP; MAPK9; PPARGC1A; TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はシナプス長期増強に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE; RAP1A; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1; PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; ATF4; PRKCA; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はカルシウム調節及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：RAP1A; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1; CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11; HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4; HDAC6; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はEGF又はEGFR調節及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害におけるRXR機能、調節及び／又はシグナル伝達の異常な、病的な、及び／又はLPS／IL-1媒介性阻害に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1; MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はLXR／RXR機能、調節及び／又はシグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA; NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1; SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又はアミロイドプロセッシングに関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2; CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1; PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないIL-4活性、シグナル伝達、及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1; PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; FRAP1; AKT3; RPS6KB1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は異常な細胞周期：G2／M DNA損傷チェックポイント調節活性、シグナル伝達、及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC; CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないプリン代謝そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4

10

20

30

40

50

; PKM2 ; ENTPD1 ; RAD51 ; RRM2B ; TJP2 ; RAD51C ; NT5E ; POLD1 ; NME1 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないcAMP媒介性シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：RAP1A ; MAPK1 ; GNAS ; CREB1 ; CAMK2A ; MAPK3 ; SRC ; RAF1 ; MAP2K2 ; STAT3 ; MAP2K1 ; BRAF ; ATF4 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないミトコンドリア機能に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：SOD2 ; MAPK8 ; CASP8 ; MAPK10 ; MAPK9 ; CASP9 ; PARK7 ; PSEN1 ; PARK2 ; APP ; CASP3 ; AIF ; CytC ; SMAC (Diablo) ; Aifm-1 ; Aifm-2 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないnotchシグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：HES1 ; JAG1 ; NUMB ; NOTCH4 ; ADAM17 ; NOTCH2 ; PSEN1 ; NOTCH3 ; NOTCH1 ; DLL4 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない小胞体ストレス経路活性、シグナル伝達、及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：HSPA5 ; MAPK8 ; XBP1 ; TRAF2 ; ATF6 ; CASP9 ; ATF4 ; EIF2AK3 ; CASP3 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないピリミジン代謝、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：NME2 ; AICDA ; RRM2 ; EIF2AK4 ; ENTPD1 ; RRM2B ; NT5E ; POLD1 ; NME1 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないパーキンソン病シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：UCHL1 ; MAPK8 ; MAPK13 ; MAPK14 ; CASP9 ; PARK7 ; PARK2 ; CASP3 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない解糖／グルコース新生活性、シグナル伝達、及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：HK2 ; GCK ; GPI ; ALDH1A1 ; PKM2 ; LDHA ; HK1 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないインターフェロン活性、シグナル伝達、及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：IRF1 ; SOCS1 ; JAK1 ; JAK2 ; IFITM1 ; STAT1 ; IFIT3 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないソニック・ザ・ヘッジホッグ活性、シグナル伝達、及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ARRB2 ; SMO ; GLI2 ; DYRK1A ; GLI1 ; GSK3B ; DYRK1B ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないグリセロリン脂質代謝、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PLD1 ; GRN ; GPAM ; YWHAZ ; SPHK1 ; SPHK2 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないリン脂質分解、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRDX6 ; PLD1 ; GRN ; YWHAZ ; SPHK1 ; SPHK2 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないトリプトファン代謝、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：SIAH2 ; PRMT5 ; NEDD4 ; ALDH1A1 ; CYP1B1 ; SIAH1 ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないリジン分解、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：SUV39H1 ; EHMT2 ; NSD1 ; SETD7 ; PPP2R5C ; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないヌクレオチド除去修復経路活性、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾

10

20

30

40

50

患又は障害の場合：ERCC5；ERCC4；XPA；XPC；ERCC1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないヌクレオチドデンプン及びスクロース代謝、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：UCHL1；HK2；GCK；GPI；HK1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないアミノ糖代謝、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：NQO1；HK2；GCK；HK1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないアラキドン酸代謝、そのシグナル伝達、及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRDX6；GRN；YWHAZ；CYP1B1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない概日リズムシグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：CSNK1E；CREB1；ATF4；NR1D1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は凝固システム活性シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：BDKRB1；F2R；SERPINE1；F3；PAR（例えばPAR1、PAR2など）PLC、aPC；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないドーパミン受容体シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PPP2R1A；PPP2CA；PPP1CC；PPP2R5C；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないグルタチオン代謝シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：IDH2；GSTP1；ANPEP；IDH1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないグリセロ脂質代謝シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ALDH1A1；GPAM；SPHK1；SPHK2；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないリノール酸代謝シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRDX6；GRN；YWHAZ；CYP1B1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないメチオニン代謝シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：DNMT1；DNMT3B；AHCY；DNMT3A；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないピルビン酸代謝シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：GLO1；ALDH1A1；PKM2；LDHA；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないアルギニン及びプロリン代謝シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ALDH1A1；NOS3；NOS2A；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないエイコサノイドシグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRDX6；GRN；YWHAZ；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないフルクトース及びマンノース代謝シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：HK2；GCK；HK1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない抗原提示経路活性、シグナル伝達及び／又は調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：CALR；B2M；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないステロイド生合成に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：NQO1；DHCR7；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないブタン酸代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：ALDH1A1；NLGN1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正

10

20

30

40

50

常でないクエン酸回路に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：I D H 2；I D H 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない脂肪酸代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：A L D H 1 A 1；C Y P 1 B 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないグリセロリン脂質代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：P R D X 6；C H K A；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないヒスチジン代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：P R M T 5；A L D H 1 A 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないイノシトール代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：E R O 1 L；A P E X 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないフェニルアラニン代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：P R D X 6；P R D X 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないセレノアミノ酸代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：P R M T 5；A H C Y；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないスフィンゴ脂質代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：S P H K 1；S P H K 2；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないアミノホスホネート代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：P R M T 5；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないアンドロゲン及び／又はエストロゲン代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：P R M T 5；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないアスコルビン酸及びアルドン酸代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：A L D H 1 A 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないシステイン代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：L D H A；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない脂肪酸生合成に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：F A S N；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないグルタミン酸受容体シグナル伝達に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：G N B 2 L 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないペントースリン酸経路に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：G P I；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないレチノール代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：A L D H 1 A 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないペントース及びグルクロン酸塩相互変換に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：U C H L 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないリボフラビン代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：T Y R；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないチロシン代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：P R M T 5、T Y R；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないユビキノン生合成に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：P R M T 5；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないバリン、ロイシン及びイソロイシン分解に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：A L D H 1 A 1；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないグリシン、セリン、及びトレオニン代謝に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：C H K A；脳、神経、及び／又はC N S及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でないリジン分解に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：A L D H 1 A 1；脳、神経、

10

20

30

40

50

及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害における異常な、病的な、及び／又は正常でない疼痛又は疼痛シグナル伝達又は疼痛シグナル生成に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：TRPM7；TRPC5；TRPC6；TRPC1；Cnr1；cnr2；Grk2；Trpa1；Pomc；Cgrp；Crf；Pka；Era；Nr2b；TRPM5；Prkaca；Prkacb；Prkar1a；Prkar2a；異常な、病的な、及び／又は正常でない脳、神経、及び／又はCNS発達及び／又はその疾患又は障害に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：BMP-4；コーディン（Chrd）；ノギン（Nog）；WNT（Wnt2；Wnt2b；Wnt3a；Wnt4；Wnt5a；Wnt6；Wnt7b；Wnt8b；Wnt9a；Wnt9b；Wnt10a；Wnt10b；Wnt16）；β-カテニン；Dkk-1；Frizzled関連タンパク質；Otx-2；Gbx2；FGF-8；Reelin；Dab1；unc-86（Pou4f1又はBrn3a）；Numb；Reln；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害の又はそれにおけるプリオン病に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：Prp；脳、神経、及び／又はCNSの活性に関与する物質又は活性付加の場合：Prkce（アルコール）；Drd2；Drd4；ABAT（アルコール）；GRIA2；Grm5；Grin1；Htr1b；Grin2a；Drd3；Pdyn；Gria1（アルコール）；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害におけるPI3K／AKTシグナル伝達及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；ITGAM；ITGA5；IRAK1；PRKAA2；EIF2AK2；PTEN；EIF4E；PRK CZ；GRK6；MAPK1；TSC1；PLK1；AKT2；IKBKB；PIK3CA；CDK8；CDKN1B；NFKB2；BCL2；PIK3CB；PPP2R1A；MAPK8；BCL2L1；MAPK3；TSC2；ITGA1；KRAS；EIF4EBP1；RELA；PRKCD；NOS3；PRKAA1；MAPK9；CDK2；PPP2CA；PIM1；ITGB7；YWHAZ；ILK；TP53；RAF1；IKBK G；RELB；DYRK1A；CDKN1A；ITGB1；MAP2K2；JAK1；AKT1；JAK2；PIK3R1；CHUK；PDPK1；PPP2R5C；CTNNB1；MAP2K1；NFKB1；PAK3；ITGB3；CCND1；GSK3A；FRAP1；SFN；ITGA2；TTK；CSNK1A1；BRAF；GSK3B；AKT3；FOXO1；SGK；HSP90AA1；RPS6KB1；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害におけるERK／MAPKシグナル伝達及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE；ITGAM；ITGA5；HSPB1；IRAK1；PRKAA2；EIF2AK2；RAC1；RAP1A；TLN1；EIF4E；ELK1；GRK6；MAPK1；RAC2；PLK1；AKT2；PIK3CA；CDK8；CREB1；PRKCI；PTK2；FOS；RPS6KA4；PIK3CB；PPP2R1A；PIK3C3；MAPK8；MAPK3；ITGA1；ETS1；KRAS；MYCN；EIF4EBP1；PPARG；PRKCD；PRKAA1；MAPK9；SRC；CDK2；PPP2CA；PIM1；PIK3C2A；ITGB7；YWHAZ；PPP1CC；KSR1；PXN；RAF1；FYN；DYRK1A；ITGB1；MAP2K2；PAK4；PIK3R1；STAT3；PPP2R5C；MAP2K1；PAK3；ITGB3；ESR1；ITGA2；MYC；TTK；CSNK1A1；CRKL；BRAF；ATF4；PRKCA；SRF；STAT1；SGK；脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害におけるグルココルチコイド受容体シグナル伝達及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：RAC1；TAF4B；EP300；SMAD2；TRAF6；PCAF；ELK1；MAPK1；SMAD3；AKT2；IKBKB；NCOR2；UBE2I；PIK3CA；CREB1；FOS；HSPA5；NFKB2；BCL2；MAP3K14；STAT5B；PIK3CB；PIK3C3；MAPK8；BCL2L1；MAPK3；TSC22D3；MAPK10；NRIP1；KRAS；MAPK13；RELA；STAT5A；MAPK9；NOS2A；PBX1；NR3C1；PIK3C2A；CDKN1C；TRAF2；SERPINE1；NCOA3；

10

20

30

40

50

MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1; STAT1; IL6; HSP90AA1; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害におけるエフリン受容体シグナル伝達及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; GRK6; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2; DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14; CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4; AKT3; SGK; 脳、神経、及び／又はCNS及び／又はその疾患又は障害におけるB細胞受容体シグナル伝達及び／又はその調節に関連するか又は関与する疾患又は障害の場合：RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1; MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9; EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN; GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1。

10

20

30

40

50

【0567】

したがって、本明細書に記載される真核細胞又は原核細胞（インビトロ、すなわち、単離された真核細胞内）における1つ以上の変異を誘導する方法であって、細胞に、本明細書に記載されるベクターを送達することを含む方法も、本明細書に記載される。変異は、細胞の標的配列における1つ以上のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。ある実施形態において、変異は、前記細胞の各標的配列における1～75ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、各標的配列における1、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、又は75ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、前記細胞の各標的配列における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、又は75ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、前記細胞の各標的配列における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、又は75ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含む。変異は、前記細胞の各標的配列における20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、又は75ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、前記細胞の各標的配列における40、45、50、75、100、200、300、400又は500ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、前記細胞の各標的配列における500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、

3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、5500、5600、5700、5800、5900、6000、6100、6200、6300、6400、6500、6600、6700、6800、6900、7000、7100、7200、7300、7400、7500、7600、7700、7800、7900、8000、8100、8200、8300、8400、8500、8600、8700、8800、8900、9000、9100、9200、9300、9400、9500、9600、9700、9800、又は9900～10000ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。

【0568】

ある実施形態において、修飾は、CRISPR-Casシステムによって媒介されるものなどの、核酸構成要素（例えばガイドRNA又はsgRNA）によって前記細胞の各標的配列におけるヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。

【0569】

ある実施形態において、修飾は、非CRISPR-Casシステム又は技術によって前記細胞の標的又はランダム配列におけるヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。このような技術は、本明細書における他の箇所に記載され、例えば、操作された細胞並びに操作された細胞及び生物を生成する方法が記載される。

【0570】

CRISPR-Casシステムを用いる場合、毒性及びオフターゲット効果の最小化のために、送達されるCas mRNA及びガイドRNAの濃度を制御することが重要であり得る。Cas mRNA及びガイドRNAの最適な濃度は、細胞又は非ヒト真核生物動物モデルにおいて異なる濃度で試験し、潜在的なオフターゲットゲノム遺伝子座における修飾の程度を分析するためのディープシーケンシングを用いることによって決定され得る。或いは、毒性及びオフターゲット効果のレベルを最小限に抑えるために、CasニッカーゼmRNA（例えば、D10A変異を有する化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）Cas9様）は、対象とする部位を標的とする一対のガイドRNAとともに送達され得る。ガイド配列及び毒性及びオフターゲット効果を最小限に抑えるための手法は、国際公開第2014/093622号パンフレット（PCT/US2013/074667号明細書）にあるとおりであり得；又は、本明細書にあるように変異による。

【0571】

典型的に、内因性CRISPRシステムに関して、CRISPR複合体（標的配列にハイブリダイズされ、1つ以上のCasタンパク質と複合体形成されるガイド配列を含む）の形成は、標的配列又はその近傍（例えば、標的配から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、又はそれ以上の塩基対以内）に一方又は両方の鎖の切断をもたらす。理論に制約されるのを望むものではないが、野生型tracr配列の全て又は一部を含むか又はそれからなり得るtracr配列（例えば、野生型tracr配列の約又は約20、26、32、45、48、54、63、67、85超、若しくはそれ以上のヌクレオチド）はまた、ガイド配列に動作可能に結合されるtracrメイト配列の全て又は一部に、tracr配列の少なくとも一部に沿ってハイブリダイゼーションなどによってCRISPR複合体の一部を形成し得る。

【0572】

一実施形態において、本発明は、真核細胞内で標的ポリヌクレオチドを修飾する方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、カーゴ分子としてCRISPR-Cas分子を有する、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せを、対象及び／又は細胞に送達することを含む。送達されるCRISPR-Casシステム分子は、複合体形成して、例えば、前記標的ポリヌクレオチドの切断をもたらす、それによって、標的ポリヌクレオチドを修飾するために標的ポリヌクレオチドに結合し得、ここで、CRISPR複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列

10

20

30

40

50

にハイブリダイズされたガイド配列と複合体形成されるC R I S P R酵素を含み、ここで、前記ガイド配列は、t r a c rメイト配列に結合され得、これが、今度は、t r a c r配列にハイブリダイズする。ある実施形態において、前記切断は、前記C R I S P R酵素によって標的配列の位置において1つ又は2つの鎖を切断することを含む。ある実施形態において、前記切断は、標的遺伝子の減少した転写をもたらす。ある実施形態において、本方法は、外因性鋳型ポリヌクレオチドを用いた相同的組み換えによって、前記切断された標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、ここで、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含む変異をもたらす。ある実施形態において、前記変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されたタンパク質における1つ以上のアミノ酸変化をもたらす。ある実施形態において、本方法は、1つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、ここで、1つ以上のベクターは、C R I S P R酵素を含み、1つ以上のベクターは、t r a c rメイト配列、及びt r a c r配列に結合されたガイド配列の1つ以上の発現を駆動する。ある実施形態において、前記C R I S P R酵素は、t r a c rメイト配列、及びt r a c r配列に結合されたガイド配列の1つ以上の発現を駆動する。ある実施形態において、このようなC R I S P R酵素は、対象における真核細胞に送達される。ある実施形態において、前記修飾は、細胞培養物中で前記真核細胞において行われる。ある実施形態において、本方法は、前記修飾の前に対象から前記真核細胞を単離することをさらに含む。ある実施形態において、本方法は、前記真核細胞及び／又はそれから誘導される細胞を、前記対象に戻すことをさらに含む。ある実施形態において、単離された細胞は、単離された細胞への、本明細書に記載される1つ以上の操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、A A V）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せの送達の後に対象に戻され得る。ある実施形態において、単離された細胞は、本明細書に記載される操作送達システムの1つ以上の分子を、単離された細胞に送達した後に対象に戻され得、それによって、単離された細胞を、上述されるように操作された細胞にし得る。

10

20

30

40

50

【0573】

スクリーニング及び細胞選択

本明細書に記載される標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、A A V）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せは、スクリーニングアッセイ及び／又は細胞選択アッセイにおいて使用され得る。本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、A A V）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せは、対象及び／又は細胞に送達され得る。ある実施形態において、細胞は、真核細胞である。細胞は、インビトロ、エキスピボ、インサイチュ、又はインピボであり得る。本明細書に記載される標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、A A V）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せは、カーゴなどの外因性分子又は化合物を、それらが送達される対象又は細胞に導入し得る。細胞及び／又はその属性の同定を可能にし得る、外因性分子又は化合物の存在が、検出され得る。ある実施形態において、送達される分子又は粒子は、遺伝子又は他のヌクレオチド修飾（例えば、変異、遺伝子又はポリヌクレオチド挿入及び／又は欠失など）に影響を与え得る。ある実施形態において、ヌクレオチド修飾は、シーケンシングによって細胞内で検出され得る。ある実施形態において、ヌクレオチド修飾は、細胞における検出可能な表現型変化をもたらす細胞への生理学的及び／又は生物学的修飾をもたらし得、これが、細胞の検出、同定、及び／又は選択を可能にし得る。ある実施形態において、表現型変化は、細胞死であり得、例えば、標的ポリヌクレオチドへのC R I S P R複合体の結合が、細胞死をもたらす実施形態である。本発明の実施形態は、選択マーカー又は対抗選択システムを含み得る2段階プロセスを必要とせずに、特定の細胞の選択を可能にする。細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。

【0574】

一実施形態において、本発明は、1つ以上の細胞内の遺伝子における1つ以上の変異を導入することによって1つ以上の細胞を選択する方法を提供し、本方法は、本明細書における他の箇所に記載される1つ以上の操作送達システム分子又はベクターを含み得る1つ以上のベクターを、細胞中に導入することを含み、ここで、1つ以上のベクターは、CRISPR酵素を含み、及び／又はtracrメイト配列、tracr配列、及び編集鋳型に結合されたガイド配列の1つ以上の発現を駆動し得；又は細胞及び／又はそのゲノムに挿入される他のポリヌクレオチドは；ここで、例えば、CRISPR酵素及び／又は編集鋳型内で発現され、それによってインビボで発現され、含まれる場合、CRISPR酵素切断を除去する1つ以上の変異を含み；選択される細胞内で標的ポリヌクレオチドにより編集鋳型の相同的組み換えを可能にし；CRISPR複合体を、標的ポリヌクレオチドに結合させて、前記遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの切断をもたらし、ここで、CRISPR複合体は、(1)標的ポリヌクレオチド内で標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、及び(2)tracr配列にハイブリダイズされるtracrメイト配列と複合体形成されるCRISPR酵素を含み、ここで、標的ポリヌクレオチドへのCRISPR複合体の結合は、細胞死を誘導し、それによって、1つ以上の変異が選択されるように導入された1つ以上の細胞を可能にする。好ましい実施形態において、CRISPR酵素は、Casタンパク質である。本発明の別の実施形態において、選択される細胞は、真核細胞であり得る。

10

【0575】

限定はされないが、1つ以上のCRISPR-Casシステム分子を細胞に送達するものを含む、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せを含むスクリーニング方法は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）などの検出方法において使用され得る。ある実施形態において、触媒不活性Casタンパク質を含む操作CRISPR-Casシステムの1つ以上の構成要素が、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えばAAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せによって、細胞に送達され得、FISH方法において使用され得る。CRISPR-Casシステムは、不活性化Casタンパク質（dCas）（例えばdCas9）を含み得、これは、DNA二本鎖破断を生成する能力を欠き、マーカー、例えば、蛍光タンパク質、例えば、強化された緑色蛍光タンパク質（eEGFP）と融合され得、低分子ガイドRNAと共発現されて、インビボで挟動原体、中心及びテロメアリピートを標的とする。dCasシステムは、ヒトゲノムにおける両方の反復配列及び個々の遺伝子を可視かするのに使用され得る。本明細書に記載される標識dCas、dCas CRISPR-Casシステム、操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えばAAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せのこのような新しい用途は、特に、低分子核体積又は複雑な3-D構造を有する場合、細胞をイメージングし、機能的核構造を調べるのに使用され得る（Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, Huang B. 2013. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. Cell 155 (7): 1479-91. doi:10.1016/j.cell.2013.12.001.、その教示内容が、本明細書に記載されるCRISPRシステムに適用及び／又は適合され得る。マーカー（例えば蛍光マーカー）に融合されるポリヌクレオチドを含む同様の手法が、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えばAAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せによって細胞に送達され、細胞のゲノムに統合され、及び／又はFISH分析のために細胞のゲノムの領域と他の形で相互作用し得る。

20

30

40

50

【0576】

他の細胞小器官及び他の細胞構造を調べるための同様の手法が、細胞（例えば、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば AAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せによって）に、マーカー（蛍光マーカーなど）に融合される1つ以上の分子を送達することによって達成され得、ここで、マーカーに融合される分子は、1つ以上の細胞構造を標的化することが可能である。マーカーの存在を分析することによって、特定の細胞構造を同定及び／又はイメージングすることができる。

【0577】

ある実施形態において、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せは、細胞の内部又は外部でスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。ある実施形態において、スクリーニングアッセイは、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば AAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せによって、CRISPR-Cas カargo 分子を送達することを含み得る。

【0578】

スクリーニング、例えば、機能獲得型スクリーン（gain of function screen）における本発明のシステムの使用も、本発明によって提供される。遺伝子を過剰発現するように人工的に強制された細胞は、例えば、負のフィードバックループによって、時間とともに遺伝子を下方制御することができる（平衡を取り戻す）。スクリーニングが開始する時間までに、無調節の遺伝子は、再度減少され得る。他のスクリーニングアッセイは、本明細書における他の箇所に記載される。

【0579】

一実施形態において、本発明は、インビトロ送達方法から又はインビトロ送達方法の細胞を提供し、ここで、本方法は、送達システムを細胞、任意に真核細胞と接触させ、それによって、送達システムの構成要素の細胞への送達があり、及び任意に接触からデータ又は結果を取得し、データ又は結果を送信することを含む。

【0580】

一実施形態において、本発明は、インビトロ送達方法から又はインビトロ送達方法の細胞を提供し、ここで、本方法は、送達システムを細胞、任意に真核細胞と接触させ、それによって、送達システムの構成要素の細胞への送達があり、任意に接触からデータ又は結果を取得し、データ又は結果を送信することを含み；ここで、細胞産物は、送達システムと接触しない細胞と比較して改変され、例えば、接触以外は細胞の野生型であったものから改変される。一実施形態において、細胞産物は、非ヒト又は動物である。ある実施形態において、細胞産物は、ヒトである。

【0581】

ある実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される1つ以上のベクターで一過性に又は非一過性にトランスフェクトされる。ある実施形態において、細胞は、任意にその中に再導入されるように対象において天然に存在するかのようにトランスフェクトされる。ある実施形態において、トランスフェクトされる細胞は、対象から取られる。ある実施形態において、細胞は、細胞株などの対象から取られた細胞から得られるか又はそれに由来する。本明細書に記載される標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せの送達機構及び技術。

【0582】

ある実施形態において、本明細書に記載される操作された標的化部分、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、ベクター系、粒子、ウイルス（例えば、AAV）粒子、細胞、又はそれらの任意の組合せの1つ以上を、直接宿主細胞に導入することが想定される。例えば、操作 AAV カプシドシステム分子は、操作 AAV 粒子にパッケージングされる

ように1つ以上のカーゴ分子と一緒に送達され得る。

【0583】

ある実施形態において、本発明は、本明細書に開示されるベクター送達システムのいずれかにしたがってベクターを導入する工程を含み得る、細胞内の操作ウイルス（例えばAAV）粒子にパッケージングされるように操作送達分子及びカーゴ分子を発現する方法を提供する。

【0584】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明され、これは、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【0585】

さらなる実施形態は、以下の実施例において例示され、これは、例示のために示されるに過ぎず、本発明の範囲を限定することは意図されていない。

【実施例】

【0586】

実施例1—mRNAベースの検出方法は、AAV変異体の選択についてよりストリンジェントである。

図1は、mRNAの産生をもたらす、アデノ随伴ウイルス（AAV）形質導入機構を示す。図1に示されるように、AAV粒子による細胞の機能的形質導入は、mRNA鎖の産生をもたらし得る。非機能的形質導入は、ウイルスゲノムがDNAベースのアッセイを用いて検出可能であるにもかかわらず、このような産物を生成しないであろう。したがって、例えば、AAVによって形質導入を検出するためのmRNAベースの検出アッセイは、よりストリンジェントであり得、細胞を機能的に形質導入することが可能なウイルス粒子の機能性についてフィードバックを提供し得る。図2は、AAV変異体のmRNAベースの選択が、DNAベースの選択よりストリンジェントであり得ることを示し得るグラフを示す。ウイルスライブラリーを、CMVプロモーターの制御下で発現させた。

【0587】

実施例2—mRNAベースの検出方法は、カプシド変異体ライブラリーからAAVカプシド変異体を検出するのに使用され得る。

図3A～3Bは、肝臓におけるウイルスライブラリー及びベクターゲノムDNA（図3A）及びmRNA（図3B）の間の相関を実証し得るグラフを示す。図4A～4Fは、様々な組織内で特定されるmRNAレベルで発現されるカプシド変異体を実証し得るグラフを示す。

【0588】

実施例3—カプシドmRNA発現は、組織特異的プロモーターによって駆動され得る。

図5A～5Cは、細胞型特異的プロモーター（x軸上に示される）の制御下での様々な組織におけるカプシドmRNA発現を実証し得るグラフを示す。CMVが、例示的な構成的プロモーターとして含まれていた。CK8は、筋肉特異的プロモーターである。MHCK7は、筋肉特異的プロモーターである。hSynは、神経特異的プロモーターである。

【0589】

実施例4—カプシド変異体ライブラリー生成、変異体スクリーニング、及び変異体同定。

一般に、AAVカプシドライブラリーは、適切なAAV産生細胞株において上述される操作AAVカプシドポリヌクレオチドをそれぞれ含有する操作カプシドベクターを発現させることによって生成され得る。例えば、図8を参照されたい。これは、1つ以上の所望の細胞特異的操作AAVカプシド変異体を含むAAVカプシドライブラリーを生成し得る。図7は、AAVカプシド変異体ライブラリーを生成する実施形態、特に、野生型AAV、例えば、AAV9へのランダムn量体（n=3～15アミノ酸）の挿入を示す概略図を示す。この実施例において、ランダム7量体が、AAV9ウイルスタンパク質の可変領域VIIIIのaa588～589の間に挿入され、ベクターにつき1つの変異体を有するベクターを含むウイルスゲノムを形成するのに使用された。図8に示されるように、カプシド変異体ベクターライブラリーを用いて、AAV粒子を生成し、ここで、各カ

10

20

30

40

50

プシド変異体が、ベクターゲノムとしてそのコード配列を封入した。図9は、AAVカプシド変異体ライブラリーを生成するためにAAVベクター系において使用され得る代表的なAAVカプシドプラスミドライブラリーベクター（例えば、図8を参照）のベクターマップを示す。ライブラリーは、組織特異的プロモーター又は構成的プロモーターの制御下で、カプシド変異体ポリヌクレオチドにより生成され得る。ライブラリーはまた、ポリ阿德ニル化シグナルを含むカプシド変異体ポリヌクレオチドにより作製された。

【0590】

図6Aに示されるように、AAVカプシドライブラリーは、1回目のmRNAベースの選択のために様々な非ヒト動物に投与され得る。図1に示されるように、AAV及び関連ベクターによる形質導入プロセスは、細胞を形質導入したウイルスのゲノムの反映であるmRNA分子の産生をもたらし得る。少なくとも本明細書における実施例において実証されるように、ウイルスDNAの存在を測定することによって細胞内のウイルス粒子の存在を単に検出することと対照的に、mRNAベースの選択は、生成された機能的産物に基づくため、細胞を機能的に形質導入することが可能なウイルス粒子を決定するためにより特異的及び有効であり得る。

【0591】

図6Aにさらに示されるように、1回目の投与の後、次に、所望のカプシド変異体をする1つ以上の操作AAVウイルス粒子が、フィルター処理されたAAVカプシドライブラリーを形成するのに使用され得る。望ましいAAVウイルス粒子は、カプシド変異体のmRNA発現を測定し、どの変異体が、望まれていない細胞型と比較して所望の細胞型において高度に発現されるかを決定することによって同定され得る。所望の細胞、組織、及び／又は器官型において高度に発現されるものは、所望のAAVカプシド変異体粒子である。ある実施形態において、AAVカプシド変異体コードポリヌクレオチドは、所望の細胞、組織、又は器官において選択的活性を有する組織特異的プロモーターの制御下にある。

【0592】

次に、1回目から同定された操作AAVカプシド変異体粒子は、様々な非ヒト動物に投与され得る。ある実施形態において、2回目の選択及び同定において使用される動物は、1回目の選択及び同定に使用される動物と同じでない。1回目と同様に、投与の後、所望の細胞、組織、及び／又は器官型において上位で発現する変異体は、細胞内のウイルスmRNA発現を測定することによって同定され得る。次に、2回目の後に同定された上位の変異体が、任意にバーコード化され、任意にプールされ得る。ある実施形態において、特に、上位の変異体の最終用途がヒト内である場合、次に、2回目からの上位の変異体が、非ヒト霊長類に投与されて、上位の細胞特異的変異体を同定し得る。各回における投与は、全身性であり得る。図6Bにさらに示されるように、2回目の選択の後、公知の、対照、及び／又は標準（例えば、ベンチマーク）変異体に対するベンチマークを任意に含み得る3回目の選択、が行われ得る。

【0593】

図10は、異なるプロモーターを用いて生成されたライブラリーによって生成されたウイルス力価（AAV9ベクターゲノム／15cm皿として計算される）を実証し得るグラフを示す。図10に示されるように、ウイルス力価は、異なるプロモーターの使用によって有意に影響されなかった。

【0594】

実施例5－CNS n量体インサート。

CNS n量体インサートは、本明細書における他の箇所に記載されるように生成され、次に、マウスの様々な株（C57BL／6J及びBALB／cJ）における形質導入効率についてスクリーニングされた。表1は、CNS形質導入に基づいて上位のモチーフを示す。上述されるように、CNS細胞における各n量体インサートの形質導入有効性を、aa587及びaa588としてAQ及びDGの両方において試験した（AAVにおける2つのアミノ酸が、n量体インサートの直前にある。AQが前にあるときに表されるいく

つかの例示的なn量体インサートは、K T V G T V Y（配列番号3）、R S V G S V Y（配列番号4）、R Y L G D A S（配列番号5）、W V L P S G G（配列番号6）、V T V G S I Y（配列番号7）、V R G S S I L（配列番号8）、R H H G D A A（配列番号9）、V I Q A M K L（配列番号10）、L T Y G M A Q（配列番号11）、L R I G L S Q（配列番号12）、G D Y S M I V（配列番号13）、V N Y S V A L（配列番号14）、R H I A D A S（配列番号15）、R Y L G D A T（配列番号16）、Q R V G F A Q（配列番号17）、Q I A H G Y S T（配列番号18）、W T L E S G H（配列番号19）、及びG E N S A R W（配列番号20）である。

【0595】

D Gが前にあるときに表されるいくつかの例示的なn量体インサートは、A S N P G R W（配列番号22）、W T L E S G H（配列番号23）、R E Q K K L W（配列番号24）、E R L L V Q L（配列番号25）、R M Q R T L Y（配列番号26）、及びR E Q Q K L W（配列番号21）である。表1のC N S n量体を含む操作A A Vは、マウスの両方の株においてC N S細胞を特異的に形質導入する能力を実証し、これは、当該技術分野において一般的に使用されるC N S A A Vと対照的である。理論によって制約されるものではないが、この観察は、本明細書に記載されるC N S特異的なn量体モチーフを含有する操作A A Vが、当該技術分野において使用される従来のA A Vとは異なる、C N S細胞の表面における受容体を介して動作して、C N S特異性を達成し得ることを実証し得る。上位スコアでA Qが前にあるn量体モチーフが必ずしも機能しなかったことを所与として、D Gが前にある場合、n量体によって与えられるカプシドの3D構造及びその内因性A A Vアミノ酸との相互作用が、細胞を形質導入する操作A A Vカプシドの能力に影響を与え得ることを示唆し得、したがって、理論によって制約されるものではないが、操作カプシドの細胞型特異性に寄与する役割を果たし得る。

【0596】

実施例6－非ヒト霊長類におけるC N S n量体インサート。

C N S n量体インサートを、本明細書における他の箇所に記載されるように生成し、次に、非ヒト霊長類において形質導入効率についてスクリーニングした。表2～3は、上位のn量体モチーフを示す。遺伝的モチーフが、非常に上位のヒットで観察された（表3）。観察されたモチーフは、アミノ酸配列の式 $P X_1 Q G T X_2 R$ （配列番号317）を有するPモチーフであり、ここで、 X_1 及び X_2 がそれぞれ、任意のアミノ酸から選択される。Pモチーフを含有する例示的なn量体モチーフ変異体が、表3に示される。

【0597】

実施例7－ベンチマーク。

図6A～6Bに示されるように、C N S特異的なカプシドを選択するための一般的な概略図を示し、これは、例えば、C N Sへの送達について、現在使用されているカプシドに対して、選択されたカプシドの性能を評価するベンチマーク回を含む。表7は、選択のベンチマーク回において使用される選択されたカプシドを示す。マウスにおける選択を用いて発達された4つの変異体及びN H Pにおける選択を用いた8つを、ベンチマークに使用した。本明細書におけるベンチマークについて、カプシド変異体特異的なバーコードが、各変異体とともに含まれた。各カプシド変異体のためのウイルス粒子が、個々に生成され、次に、ウイルス粒子がプールされた。このようなバーコード化及びプール方法は、本明細書における他の箇所により詳細に記載され、これに関して適用される。次に、プールされたウイルス粒子が、異なるマウス株（C 5 7 B L / 6 J（「C 5 7」）及びB A L B / c（「B A L B c」））及び非ヒト霊長類（マカク）の末端に（静脈内（I . V .）投与によって）全身投与され、それによって、カプシド変異体異なる種において血液脳関門を越える能力が、評価され得る。マウス及び非ヒト霊長類選択（1及び／又は2回目）からの両方の操作カプシド変異体及び現在使用されているカプシド変異体（A A V - C A P - B 1 0、A A V - C A P - B 2 2、及びA A V - P h P . 2 2）が、ベンチマークに含まれていた。次に、様々な組織中のカプシド変異体に対応するm R N A及びD N Aを調べて、カプシド変異体のC N S、株、及び種特異性を決定した。

【表 8】

表 7.		
カプシド変異体	挿入配列	配列番号
マウス変異体 1	RSVGSVY	318
マウス変異体 2	KTVGTVY	319
マウス変異体 3	WVLPSGG	320
マウス変異体 4	(DG)REQQKLW	321
NHP 変異体 1	PTQGTVR	322
NHP 変異体 2	PSQGTLR	323
NHP 変異体 3	PTQGTLR	324
NHP 変異体 4	RVDPSGL	325
NHP 変異体 5	VVSDYTV	326
NHP 変異体 6	TDALTTK	327
NHP 変異体 7	STIPTMK	328
NHP 変異体 8	PTQGTFR	329

図 1 1 A ～ 1 1 P は、2 回目の選択からの上位選択されたカプシドのベンチマークからの結果を示す。文献と一致して、A A V - C A P - B 1 0、A A V - C A P 2 2、及び A A V - P h P . 2 2 カプシドは、種及び株選好を示し、重要なことには、非ヒト霊長類において十分に機能しないようであった。実際に、本明細書に記載され、ベンチマークされた方法を用いて発達された N H P カプシド変異体は、1 つ以上の C N S 組織に上首尾に送達され、1 つ以上の C N S 組織において発現された。さらに、本明細書において試験された、いくつかの N H P カプシド変異体は、C N S を標的とし、血液脳関門を越えることが現在公知であり、そのように報告されているカプシド変異体（A A V - C A P - B 1 0、A A V - C A P 2 2、及び A A V - P h P . 2 2）と比較して、C N S への増加した送達を示した。さらに、N H P 変異体の大部分は、強力な肝臓送達又は発現を有することが観察されなかった（例えば、図 1 1 O 及び 1 1 P を参照）。後根神経節における発現は、かなりの毒性をもたらし得る。いくつかの N H P 変異体は、後根神経節（D R G）における減少した又はごくわずかな送達及び／又は発現を示した（例えば、図 1 1 N を参照）。

【0598】

本発明の記載される方法、医薬組成物、及びキットの様々な変更及び変形が、本発明の範囲及び趣旨から逸脱せずに、当業者に明らかであろう。本発明が、特定の実施形態とともに記載されてきたが、さらなる変更が可能であること及び権利請求される本発明が、このような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことが理解されるであろう。実際に、当業者に明らかである本発明を実施するための記載される形態の様々な変更が、本発明の範囲内であることが意図される。本出願は、一般に、本発明の原理にしたがう本発明の任意の変形、使用、又は改変を包含することが意図され、本開示からのこのような逸脱を含め、本発明が関連する当該技術分野における公知の慣行の範囲内に含まれ、上述される本明細書における本質的な特徴に適用され得る。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

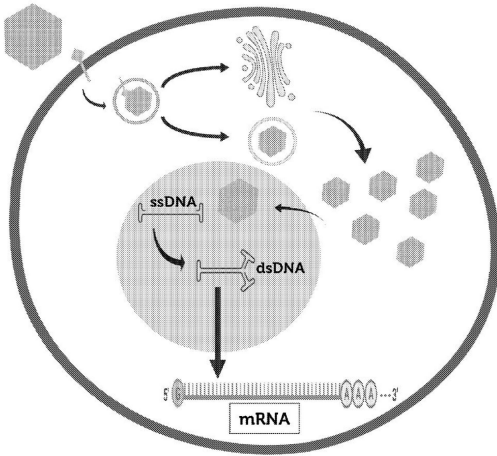


図 1

【図 2】

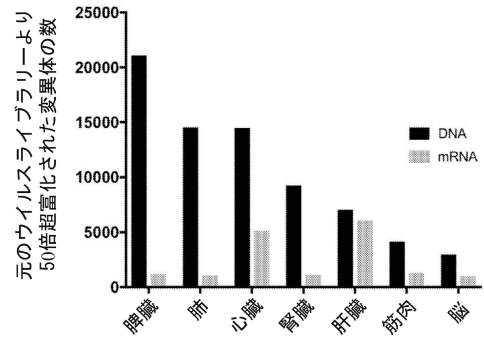


図 2

【図 3 A - 3 B】

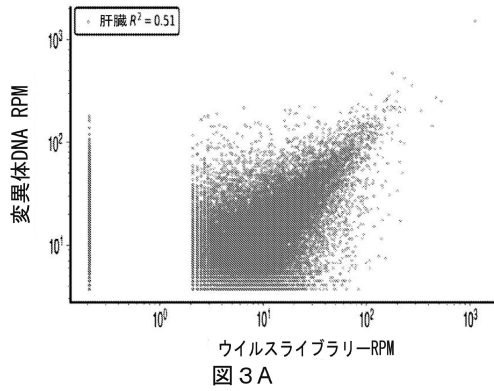


図 3 A

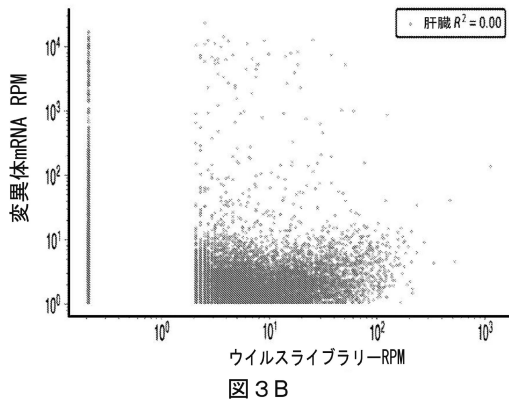
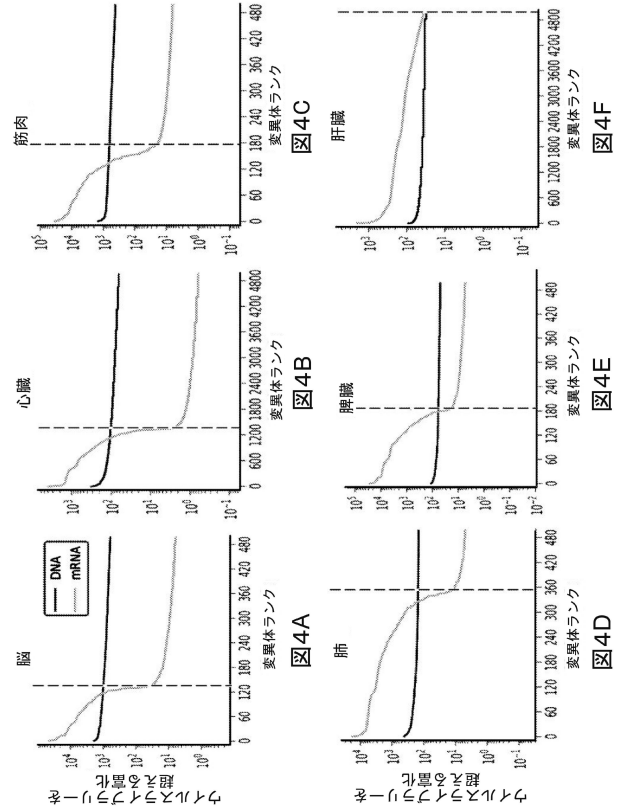


図 3 B

【図 4 A - 4 F】



10

20

30

40

50

【図5A - 5B】

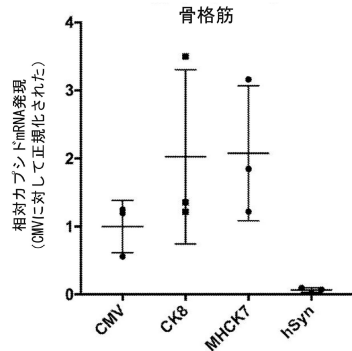


図5A

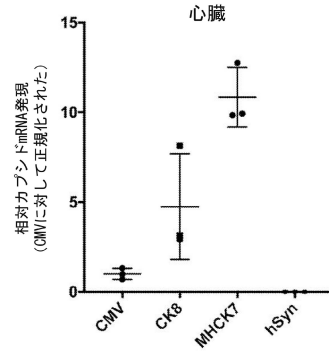


図5B

【図5C】

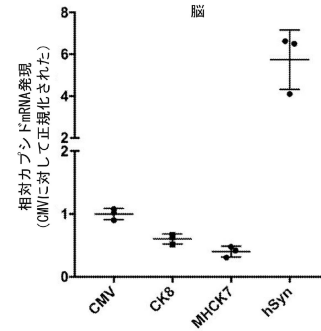


図5C

10

20

【図6A - 6B】

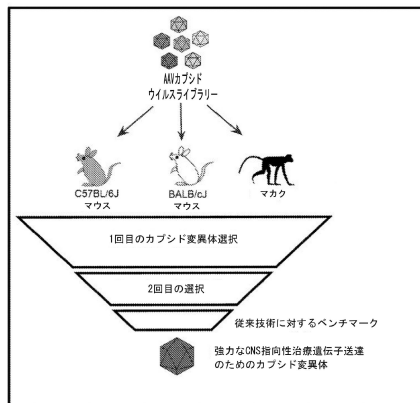


図7

AAV9

30

図6A

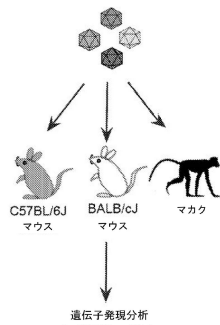


図6B

40

50

【図 8】

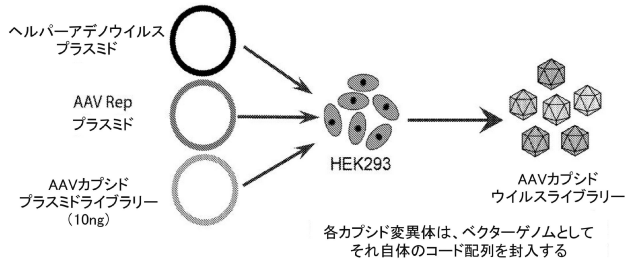


図 8

【図 9】

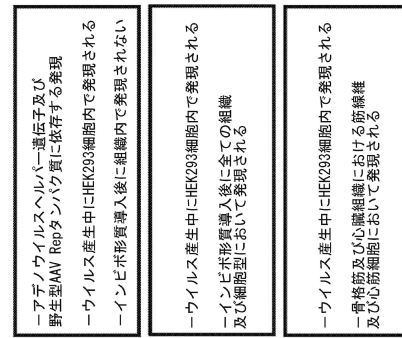
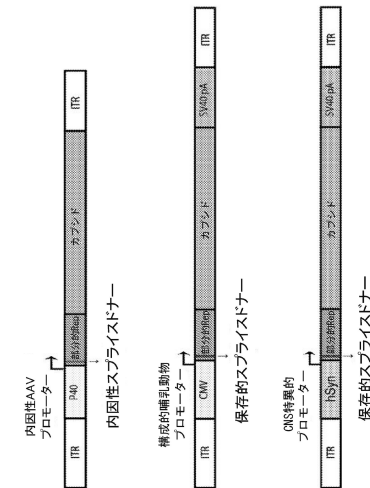


図 9



【図 10】

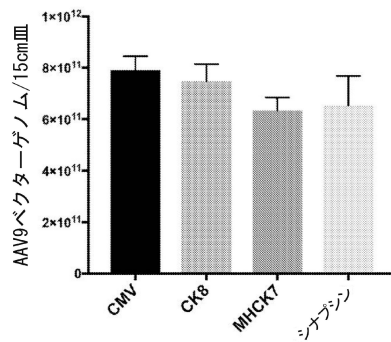


図 10

【図 11 A】

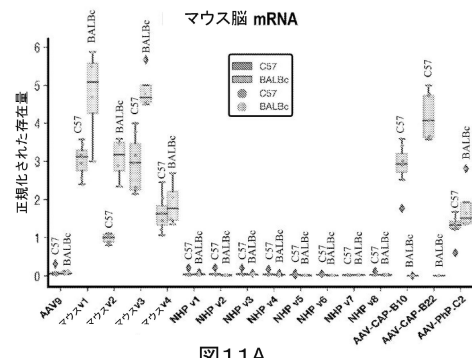


図 11A

10

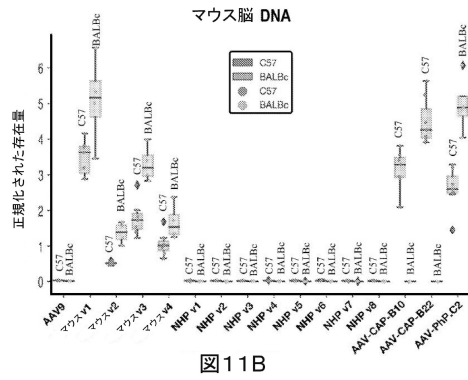
20

30

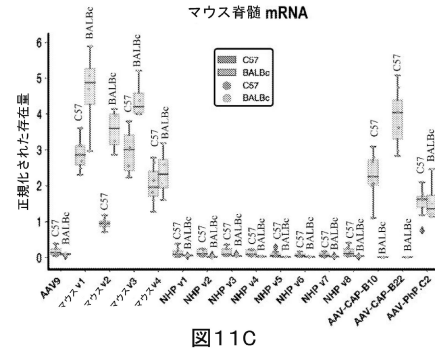
40

50

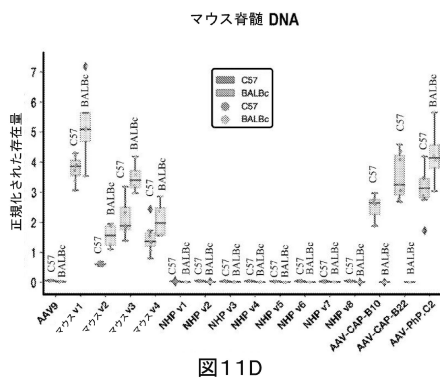
【図 1 1 B】



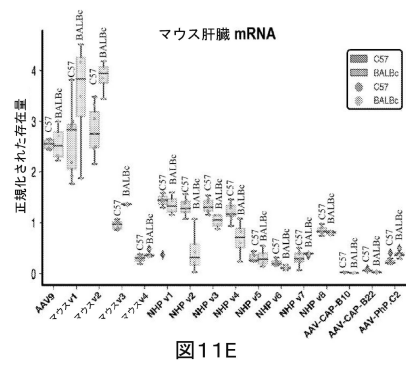
【図 1 1 C】



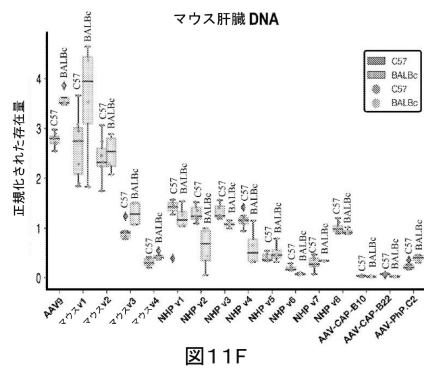
【図 1 1 D】



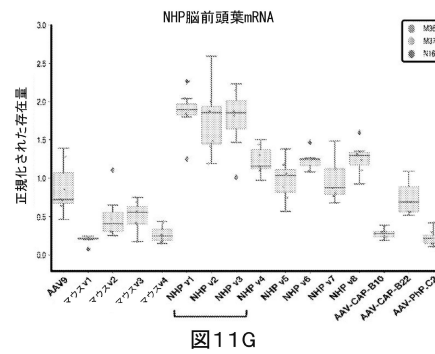
【図 1 1 E】



【図 1 1 F】



【図 1 1 G】



10

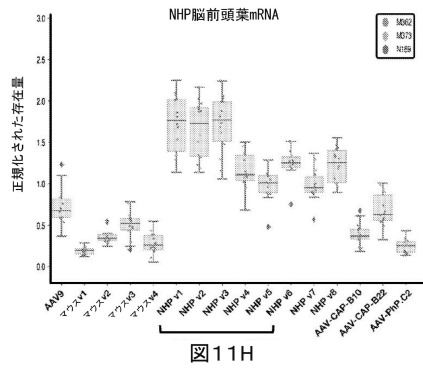
20

30

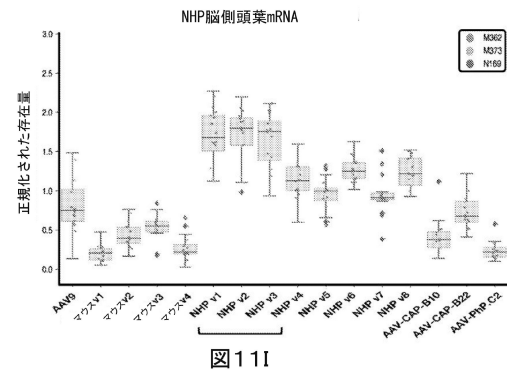
40

50

【図 1 1 H】

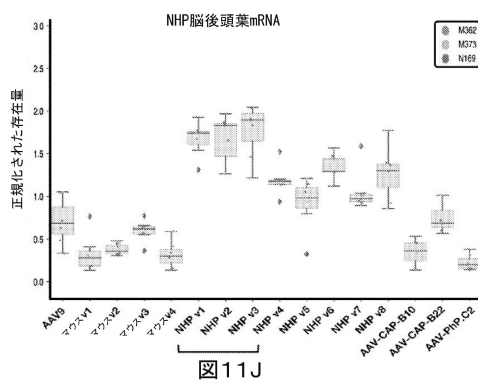


【図 1 1 I】

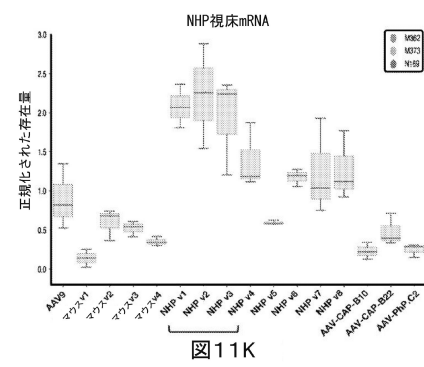


10

【図 1 1 J】

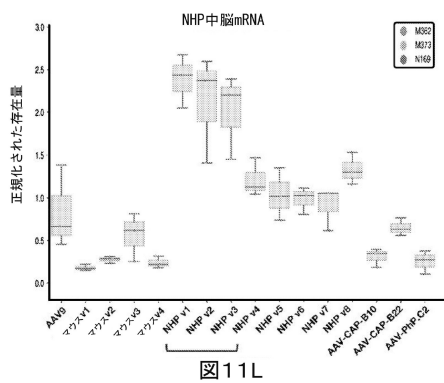


【図 1 1 K】

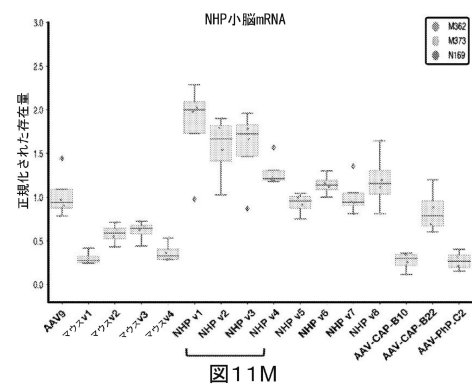


20

【図 1 1 L】



【図 1 1 M】

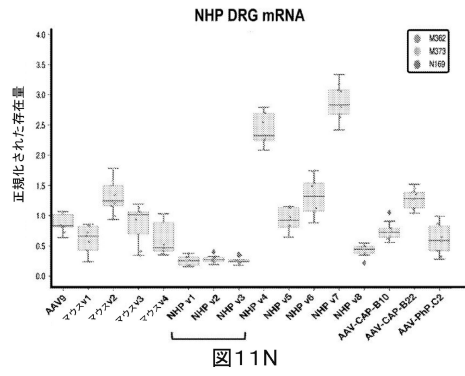


30

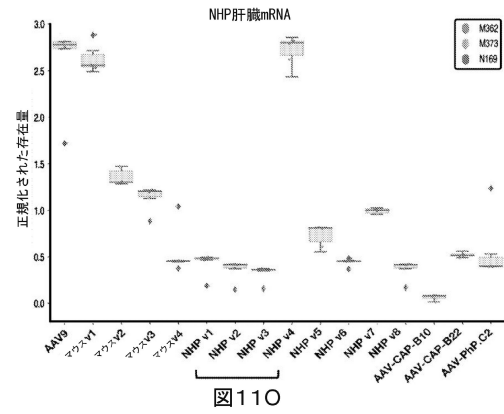
40

50

【図 1 1 N】

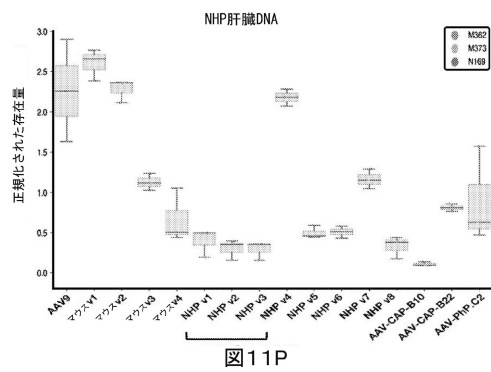


【図 1 1 O】



10

【図 1 1 P】



20

【配列表】

2023524061000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/30298

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 7/00, C12N 7/01, C12N 15/86, C07K 11/00 (2021.01)

CPC - A61K 47/62, C12N 7/00, C07K 7/06, C12N 15/86, C07K 2319/10, C12N 2750/14123, C12N 2750/14145

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

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAN et al., Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems, Nature Neuroscience, August 2017, Vol 20, No 8, pp 1172-1179. Especially pg 2, col 1, para 2; Figure 1 Legend; pg 9, col 1, para 2	1, 3-4, 6, 10-16, 18-22, 24, 29, (32-34)/(1, 3-4, 6, 10-16, 18-22, 24, 29), 36, 38-39, 41, (45-46)/(36, 38-39, 41)
A	WO 2014/139182 A1 (SHENZHEN HIGHTIDE BIOPHARMACEUTICAL, LTD) 18 September 2014 (18.09.2014) Claim 11; SEQ ID NO 19	1, 3-4, 6, 10-16, 18-22, 24, 29, (32-34)/(1, 3-4, 6, 10-16, 18-22, 24, 29), 36, 38-39, 41, (45-46)/(36, 38-39, 41)

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

18 October 2021 (18.10.2021)

Date of mailing of the international search report

NOV 04 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/30298

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Groups I+: Claims 1-34, 36-46, drawn to a targeting moiety comprising one or more P-motifs or n-mer inserts or both. The composition will be searched to the extent that the targeting moiety encompasses a P-motif SEQ ID NO: 200 (PSQGTLR) (see claim 6 and the first entry in Table 2) inserted in between amino acids 262-269 of AAV9 capsid polypeptide and the capsid polypeptide has a mutation in position 267. It is believed that claims 1, 3-4, 6, 10-16, 18-22, 24, 29, (32-34)(in part), 36, 38-39, 41, (45-46)(in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 200, inserted between 263-269 of AAV9 capsid polypeptide having a mutation in position 267. Additional targeting moiety(ies), AAV insertion site(s), and AAV mutation(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected targeting moiety(ies), AAV insertion site(s), and AAV mutation(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. An exemplary election would be a targeting moiety of SEQ ID NO: 65 (AQRSGSVY), AAV insertion site between amino acids 588-589, and AAV mutation at position 289 (Claims 1-6, 8-22, 25, 29, (32-34)(in part), 36-41, 43-44, (45-46)(in part)).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

No technical features are shared between the amino acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features, these shared technical features are previously disclosed, as discussed further below.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+ share the technical feature of a composition comprising: a targeting moiety effective to target a central nervous system (CNS) cell.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of the article "Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems" to Chan et al. (hereinafter "Chan") (Nature Neuroscience, August 2017, Vol 20, No 8, pp 1172-1179).

Chan teaches (instant claim 1) a composition comprising: a targeting moiety effective to target a central nervous system (CNS) cell, wherein the targeting moiety comprises: one or more n-mer inserts (pg 2, col 1, para 2 - "Here we report two new AAV capsids that provide increased gene transfer to the CNS and the PNS via the vasculature. We developed these vectors by applying the previously published in vivo capsid selection method CREATE20 (Fig. 1a) to AAV-PHP.B and AAV9 as parental capsids. ...We generated an AAV capsid library in which the AAV-PHP.B heptamer targeting sequence was modified by randomizing three consecutive amino acids in an overlapping fashion across the heptamer and flanking amino acids"; Figure 1 Legend - "Engineered AAV capsids for efficient transduction across the peripheral and central nervous systems. (a) Schematic of the CREATE selection method. (b) The amino acid sequences for the heptamer insertions and flanking AAV9 sequences for AAV-PHP.S, AAV-PHP.B and AAV-PHP.eB; the heptamer and adjacent substitutions are highlighted in colored text"; pg 9, col 1, para 2 - "In each primer mix, the position of the three randomized NNK codons was shifted by 6 bp (2 codons) such that each position in the heptamer and the two amino acids on each side of the heptamer amino acids were randomized, three amino acid at a time, in an overlapping manner").

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued):

Claims 35, 47-93 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/30298

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/30298

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.: 35, 47-93
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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

-----Please see Supplemental Sheet-----

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.:
1, 3-4, 6, 10-16, 18-22, 24, 29, (32-34)(in part), 36, 38-39, 41, (45-46)(in part) limited to SEQ ID NO: 200, amino acid 262-269 of AAV9, and mutation at amino acid 267 of capsid.

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

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	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	5/00	(2006.01)	C 0 7 K	5/00
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C 0 7 K	14/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62

Z Z N A

,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,D
K,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),O
A(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,B
B,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,IT,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 3 9 ケンブリッジ, マサチューセッツ・アヴェニュー・
7 7

(74)代理人 110000109

弁理士法人特許事務所サイクス

(72)発明者 サベッティ パルディス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 8 ケンブリッジ クインシー ストリート 1 7

(72)発明者 タブボードバー ムハンマドシャリフ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ メイン ストリート 4 1 5

(72)発明者 イー サイモン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー 7 7

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA95X AB01 BA02 CA44

4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 NA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA23
ZA94 ZC54

4H045 AA10 AA30 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17