(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-513999
(P2021-513999A)
(43)公表日　令和3年6月3日(2021.6.3)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00		4C084
C12N 15/86	(2006.01)	C12N	15/86	ZNAZ	4C085
C12N 15/864	(2006.01)	C12N	15/864	Z	4C087
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	
A61K 38/02	(2006.01)	A61K	38/02		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 156 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-544445 (P2020-544445)
(86)(22)出願日　平成31年2月21日(2019.2.21)
(85)翻訳文提出日　令和2年8月21日(2020.8.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/018927
(87)国際公開番号　WO2019/165050
(87)国際公開日　令和1年8月29日(2019.8.29)
(31)優先権主張番号　62/633,757
(32)優先日　平成30年2月22日(2018.2.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/633,882
(32)優先日　平成30年2月22日(2018.2.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

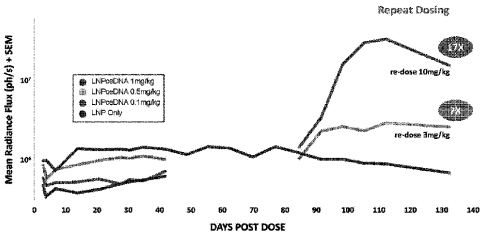
(71)出願人　520068043
ジェネレーション　バイオ　カンパニー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，　ビニー　ストリート　３０１，　４ティーエイチ　フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】閉端ＤＮＡ（ＣＥＤＮＡ）ベクターを使用した導入遺伝子の制御された発現

(57)【要約】
本明細書では導入遺伝子発現のレベルを所定の時間にわたって所定のレベルもしくは範囲で維持もしくは持続させるための、または細胞もしくは対象における導入遺伝子発現のレベルを増加させるための閉端ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡベクター）を含む方法および構築物が提供され、導入遺伝子発現レベルは初回プライミング投与後の１回以上の後続の投与（例えば再用量またはブースター投与）で調整する（例えば増加させる）ことができる。（例えば時間０での）初回プライミング投与後１回以上の投与によりｃｅＤＮＡベクターによって発現される導入遺伝子の発現レベルを増分的にまたは段階的な様式で調整し、それにより導入遺伝子の発現レベルの所望の所定の発現レベルまたは所望の発現レベル範囲へのタイトレーションを可能にすることによって個人のニーズを満たすレベルで導入遺伝子を発現するように個人の生涯にわたって遺伝子療法を個別化するための方法が提供される。

FIG. 6



【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における導入遺伝子の発現を調節する方法であって、
ａ．測定可能なレベルの前記導入遺伝子を発現させるために、隣接する逆位末端反復（ＩＴＲ）間のプロモーターに操作可能に連結された少なくとも１つの導入遺伝子を含む核酸カセットを含む、十分な量のキャプシド不含閉端ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）ベクターを対象に投与することであって、前記導入遺伝子が、疾患を治療するための所望のタンパク質をコードする、投与することと、
ｂ．隣接するＩＴＲ間に少なくとも１つの導入遺伝子を含む前記ｃｅＤＮＡベクターの少なくとも第２の用量を前記対象に投与して、所定の時間にわたって所定のレベルで前記所望のタンパク質の前記導入遺伝子発現を得るか、または前記所望のタンパク質の前記導入遺伝子発現を所定のレベルまで増加させることによって、前記ｃｅＤＮＡベクターをタイトレーションすることと、を含む、方法。
【請求項２】
前記対象をステップ（ａ）後に評価して、前記タイトレーションの用量を決定する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記評価が、ステップ（ａ）後の病態または前記対象において発現される所望のタンパク質のレベルを決定することである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
対象における導入遺伝子の発現を調節する方法であって、
ａ．測定可能なレベルの前記導入遺伝子を発現させるために、隣接する逆位末端反復（ＩＴＲ）間のプロモーターに操作可能に連結された少なくとも１つの導入遺伝子を含む核酸カセットを含む、十分な量のキャプシド不含閉端ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）ベクターを前記対象に投与することであって、前記導入遺伝子が、所望のタンパク質をコードする、投与することと、
ｂ．隣接するＩＴＲ間に少なくとも１つの導入遺伝子を含む前記ｃｅＤＮＡベクターの少なくとも第２の用量を前記対象に投与して、（ｉ）所定の時間にわたって所定のレベルで前記所望のタンパク質の発現を継続させるか、または（ｉｉ）前記所望のタンパク質の発現を所定のレベルに調整することと、を含む、方法。
【請求項５】
前記ｃｅＤＮＡベクターの２回目の投与が、前記所望のタンパク質の前記所定のレベルの発現を得るのを妨げるのに十分な免疫反応を生じない、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記ｃｅＤＮＡベクターが、薬学的に許容される担体と組み合わせて投与される、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
前記２回目の投与が、前記導入遺伝子の前記発現レベルが所望のレベルから減少したときに行われる、請求項１～６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
前記２回目の投与が、１回目の投与の少なくとも９０日後である、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
前記導入遺伝子が、治療用タンパク質をコードし、前記導入遺伝子の前記所望の発現レベルが、前記治療用タンパク質の治療有効量である、請求項１～８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
前記ｃｅＤＮＡベクターの少なくとも３回の投与があり、前記投与のいずれもが、前記所望のタンパク質の前記所定の発現レベルを達成するのを妨げる前記ｃｅＤＮＡベクターに対する免疫反応を生じない、請求項１～９のいずれかに記載の方法。

【請求項１１】
前記投与が、定期的なスケジュールで行われる、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
前記２回目の投与が、前記所望のタンパク質の前記発現レベルを増加させるためである、請求項１～１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
前記２回目の投与が、前記所望のタンパク質の前記発現を所定の発現レベルで延長するためである、請求項１～１２のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】
前記所望のタンパク質が、阻害タンパク質である、請求項１～１３のいずれかに記載の方法。
【請求項１５】
前記阻害タンパク質が、抗体または融合タンパク質である、請求項１～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
前記所望のタンパク質が、欠陥のあるタンパク質または発現されていないタンパク質に取って代わる、請求項１～１５のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
前記プロモーターが、誘導性または抑制性プロモーターである、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
前記導入遺伝子が、調節スイッチの制御下にある、請求項１～１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
第１、第２、または任意の後続の時点で投与される前記ｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む同じタイプのｃｅＤＮＡベクターである、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
前記第２のｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーターを有する、請求項１～１９４のいずれかに記載の方法。
【請求項２１】
前記２つの逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が、ＡＡＶ　ＩＴＲである、請求項１～２０のいずれかに記載の方法。
【請求項２２】
少なくとも１つのＩＴＲが、機能性末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含む、請求項１～２１のいずれかに記載の方法。
【請求項２３】
前記ＡＡＶ　ＩＴＲが、ＡＡＶ－２　ＩＴＲである、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記隣接するＩＴＲが、対称または非対称である、請求項１～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】
前記隣接するＩＴＲが、対称または実質的に対称である、請求項１～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】
前記隣接するＩＴＲが、非対称である、請求項１～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
前記ＩＴＲの一方または両方が野生型であるか、または前記ＩＴＲの両方が野生型であ

る、請求項１～２６のいずれかに記載の方法。
【請求項２８】
前記隣接するＩＴＲが、異なるウイルス血清型に由来する、請求項１～２７のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
前記ＩＴＲの一方または両方が、表２、４Ａ、４Ｂ、または５の配列から選択される配列を含む、請求項１～２８５のいずれかに記載の方法。
【請求項３０】
前記ＩＴＲの少なくとも一方が、野生型ＡＡＶ　ＩＴＲ配列から、前記ＩＴＲの全体的な３次元コンフォメーションに影響を与える欠失、付加、または置換によって変更されている、請求項１～２９のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
前記ＩＴＲの一方または両方が、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、およびＡＡＶ１２から選択されるＡＡＶ血清型に由来する、請求項１～３０のいずれかに記載の方法。
【請求項３２】
前記ＩＴＲの一方または両方が、合成のものである、請求項１～３１のいずれかに記載の方法。
【請求項３３】
前記ＩＴＲの一方もしくは両方が野生型ＩＴＲでないか、または前記ＩＴＲの両方が野生型でない、請求項１～３２のいずれかに記載の方法。
【請求項３４】
前記ＩＴＲの一方または両方が、Ａ、Ａ’、Ｂ、Ｂ’、Ｃ、Ｃ’、Ｄ、およびＤ’から選択される前記ＩＴＲ領域のうちの少なくとも１つにおける欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている、請求項１～３３のいずれかに記載の方法。
【請求項３５】
前記欠失、挿入、および／または置換が、通常は前記Ａ、Ａ’、Ｂ、Ｂ’Ｃ、またはＣ’領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、請求項１～３４のいずれかに記載の方法。
【請求項３６】
前記ＩＴＲの一方または両方が、通常は前記ＢおよびＢ’領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている、請求項１～３４のいずれかに記載の方法。
【請求項３７】
前記ＩＴＲの一方または両方が、通常は前記ＣおよびＣ’領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている、請求項１～３６のいずれかに記載の方法。
【請求項３８】
前記ＩＴＲの一方または両方が、通常は前記ＢおよびＢ’領域によって形成されるステムループ構造の一部、ならびに／または通常は前記ＣおよびＣ’領域によって形成されるステムループ構造の一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている、請求項１～３７のいずれかに記載の方法。
【請求項３９】
前記ＩＴＲの一方または両方が、通常は前記ＢおよびＢ’領域によって形成される第１のステムループ構造と、前記ＣおよびＣ’領域によって形成される第２のステムループ構造とを含む領域に、単一のステムループ構造を含む、請求項１～３８のいずれかに記載の方法。
【請求項４０】
前記ＩＴＲの一方または両方が、通常は前記ＢおよびＢ’領域によって形成される第１のステムループ構造と、前記ＣおよびＣ’領域によって形成される第２のステムループ構

造とを含む領域に、単一のステムおよび２つのループを含む、請求項１～３９のいずれかに記載の方法。
【請求項４１】
両方のＩＴＲが、前記ＩＴＲが互いに対して反転されたときに全体的な３次元対称性をもたらすような様式で変更されている、請求項１～４０のいずれかに記載の方法。
【請求項４２】
少なくとも１つの異種ヌクレオチド配列が、少なくとも１つの調節スイッチの制御下にある、請求項１～４１のいずれかに記載の方法。
【請求項４３】
少なくとも１つの調節スイッチが、バイナリ調節スイッチ、小分子調節スイッチ、パスコード調節スイッチ、核酸ベース調節スイッチ、転写後調節スイッチ、放射線制御または超音波制御の調節スイッチ、低酸素媒介調節スイッチ、炎症反応調節スイッチ、剪断活性化調節スイッチ、およびキルスイッチから選択される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記対象が、癌、自己免疫疾患、神経変性障害、高コレステロール血症、急性臓器拒絶、多発性硬化症、閉経後骨粗しょう症、皮膚状態、喘息、または血友病から選択される疾患または障害を有する、請求項１～４３のいずれかに記載の方法。
【請求項４５】
前記癌が、固形腫瘍、軟部組織肉腫、リンパ腫、および白血病から選択される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記自己免疫疾患が、関節リウマチおよびクローン病から選択される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
前記皮膚状態が、乾癬およびアトピー性皮膚炎から選択される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４８】
前記神経変性障害が、アルツハイマー病である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４９】
第２の時点後の１つ以上の時点で、ある用量の前記組成物を前記対象に投与して、前記異種核酸配列の前記発現レベルを、第２の時点もしくは以前の時点での前記組成物の投与後に達成される前記異種核酸の前記発現レベルと比較して増加させるか、または前記異種核酸配列の前記発現レベルを増加させて、所望の発現レベルを達成することをさらに含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項５０】
前記導入遺伝子が、核酸、阻害剤、ペプチドまたはポリペプチド、抗体または抗体断片、融合タンパク質、抗原、アンタゴニスト、アゴニスト、ＲＮＡｉ分子等のいずれかから選択される遺伝医学である、請求項１～４９のいずれかに記載の方法。
【請求項５１】
前記第２の時点または任意の後続の時点で投与される前記組成物の前記所定の用量が、前記第１の時点で投与される前記組成物の前記用量の２倍～１０倍の量である、請求項１～５０のいずれかに記載の方法。
【請求項５２】
前記第２の時点または任意の後続の時点で投与される前記組成物の前記所定の用量が、前記導入遺伝子の前記発現を、前記第１の時点での前記組成物の投与後の前記導入遺伝子の前記発現と比較して、少なくとも３倍、または少なくとも５倍、または少なくとも１０倍、または２～１５倍、または２～２０倍増加させる量である、請求項１～５１のいずれかに記載の方法。
【請求項５３】
前記第２の時点で投与される前記ｃｅＤＮＡベクターの前記所定の用量が、前記細胞に

おける前記導入遺伝子の前記所望の発現レベルを達成するために、前記ｃｅＤＮＡベクターの用量依存関係を使用して決定される、請求項１～５２のいずれかに記載の方法。
【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、米国特許法第１１９条（ｅ）の下、２０１８年２月２２日に出願された米国仮特許出願第６２／６３３，８８２号、２０１８年２月２２日に出願された同第６２／６３３，７５７号、２０１８年２月２２日に出願された同第６２／６３３，７９５号、２０１８年１０月１７日に出願された同第６２／７４６，７６２号の利益を主張し、各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０１９年２月２１日に作成された前述のＡＳＣＩＩコピーは、０８０１７０－０９１１９０－ＷＯＰＴ＿ＳＬ．ｔｘｔという名前が付けられ、サイズは１１６，８７２バイトである。
【０００３】
本発明は、対象または細胞における導入遺伝子または単離されたポリヌクレオチドの制御された発現のためのカプシド不含ベクターを含む、遺伝子療法の分野に関する。本明細書に記載される技術は、閉端（ｃｅＤＮＡ）ベクターを有するカプシド不含ＤＮＡベクターからのインビボでの導入遺伝子の制御された発現の方法に関し、発現レベルを所定の時間にわたって所望のレベルで持続させることができるか、または１回以上の後続の投与（例えば、ブースター投与または再用量）により増加させることができる。
【背景技術】
【０００４】
遺伝子療法は、遺伝子発現プロファイルにおける異常によって引き起こされる遺伝子突然変異または後天性疾患のいずれかを罹患している患者の臨床転帰を改善することを目的とする。遺伝子療法は、欠陥遺伝子、または障害、疾患、悪性腫瘍等をもたらし得る異常調節もしくは発現、例えば過小発現もしくは過剰発現から生じる医学的状態の治療または予防を含む。例えば、欠陥遺伝子によって引き起こされる疾患または障害は、患者への訂正遺伝物質の送達によって、欠陥遺伝子を変更もしくはサイレンシングするか、または治療抗体を送達すること、例えば、患者の体内で遺伝物質の治療的発現をもたらすことによって、治療、予防、または改善され得る。
【０００５】
遺伝子療法の基礎は、転写カセットに活性遺伝子産物（導入遺伝子と称される場合がある）を供給することであり、例えば、正の機能獲得効果、負の機能喪失効果、または別の結果をもたらし得る。遺伝子療法を使用して、他の要因によって引き起こされる疾患または悪性腫瘍を治療することもできる。ヒト単一遺伝子障害は、標的細胞への正常遺伝子の送達および発現によって治療され得る。患者の標的細胞中の補正遺伝子の送達および発現は、操作されたウイルスおよびウイルス遺伝子送達ベクターの使用を含む、多くの方法を介して実行され得る。使用可能な多くのウイルス由来ベクター（例えば、組み換えレトロウイルス、組み換えレンチウイルス、組み換えアデノウイルス等）の中で、組み換えアデノ関連ウイルス（ｒＡＡＶ）は、遺伝子療法において多用途ベクターとして人気を集めている。
【０００６】
アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）は、パルボウイルス科に属し、より具体的にはディペンドパルボウイルス属を構成する。ＡＡＶ由来のベクター（すなわち、組み換えＡＡＶ（ｒＡＶＶ）またはＡＡＶベクター）は、（ｉ）それらが筋細胞およびニューロンを含む多種多様な非分裂および分裂細胞型に感染する（形質導入する）ことができるため、（ｉｉ）それらがウイルス構造遺伝子を欠いていることによって、ウイルス感染に対する宿主細胞

反応、例えばインターフェロン媒介性反応を減少させるため、（ｉｉｉ）野生型ウイルスが、ヒトにおいて非病理的であるとみなされるため、（ｉｖ）宿主細胞ゲノム中に組み込むことができる野生型ＡＡＶと対照的に、複製欠損ＡＡＶベクターは、ｒｅｐ遺伝子を欠き、一般にエピソームとして持続し、したがって挿入変異または遺伝毒性の危険性を制限するため、ならびに（ｖ）他のベクター系と比較して、ＡＡＶベクターは、一般に比較的不良な免疫原であるとみなされるため、著しい免疫反応を誘起せず（ｉｉを参照）、したがって治療導入遺伝子のベクターＤＮＡおよび潜在的に長期発現の持続を得るため、遺伝物質を送達するために魅力的である。

【０００７】

しかしながら、ＡＡＶ粒子を遺伝子送達ベクターとして使用することには、いくつかの重大な欠陥が存在する。ｒＡＡＶに関連する１つの重大な欠点は、約４．５ｋｂの異種ＤＮＡの制限されたウイルスパッケージング能力であり（Ｄｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６、Ａｔｈａｎａｓｏｐｏｕｌｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００４、Ｌａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）、結果として、ＡＡＶベクターの使用は、１５０，０００Ｄａ未満のタンパク質コーディング能力に制限されている。第２の欠点は、集団における野生型ＡＡＶ感染の流行の結果として、ｒＡＡＶ遺伝子療法の候補を、患者からベクターを排除する中和抗体の存在についてスクリーニングする必要があることである。第３の欠点は、初回治療から排除されなかった患者への再投与を予防するカプシド免疫原性に関する。患者における免疫系は、「ブースター」ショットとして有効に作用するベクターに反応して、将来の治療を妨げる高力価抗ＡＡＶ抗体を生成する免疫系を刺激し得る。いくつかの最近の報告は、高用量状況における免疫原性との関係を示している。一本鎖ＡＡＶ　ＤＮＡが異種遺伝子発現前に二本鎖ＤＮＡに変換されなければならないことを考えると、別の顕著な欠点は、ＡＡＶ媒介性遺伝子発現の始まりが比較的遅いことである。

【０００８】

追加として、カプシドを有する従来のＡＡＶビリオンは、ＡＡＶゲノム、ｒｅｐ遺伝子、およびｃａｐ遺伝子を含有する１つまたは複数のプラスミドを導入することによって産生される（Ｇｒｉｍｍ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。しかしながら、そのようなカプシド化ＡＡＶウイルスベクターは、ある特定の細胞および組織型を非効率的に形質導入し、カプシドはまた、免疫反応を誘導することもわかった。

【０００９】

追加として、導入遺伝子の送達のための従来の遺伝子療法ベクター（例えば、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レンチウイルスベクター等）は、一部にはウイルスタンパク質に対する患者の免疫反応に起因して、典型的には患者へのベクターの単回投与に限定される。追加として、導入遺伝子の持続的な長期発現のために、典型的には初回投与で高力価を投与することが必要であり、これは有害な副作用につながり得る。そのようなものとして、遺伝子療法のための従来のウイルスベクターは、持続的な長期の導入遺伝子発現の欠如に起因して実用性を欠いている。さらに、そのようなウイルスベクターでの送達に好適な導入遺伝子遺伝物質の範囲は、ウイルスカプシドタンパク質のウイルスパッケージング能力（例えば、ＡＡＶでは約４．５ｋｂ）によって制限され、それにより治療のためのより大きな導入遺伝子の送達が除外される。遺伝子療法のための従来のアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）ベクターに関して、それらの使用は、（患者免疫反応に起因する）患者への単回投与、最小ウイルスパッケージング能力（約４．５ｋｂ）に起因するＡＡＶベクター中の送達に好適な導入遺伝子遺伝物質の制限された範囲、および遅いＡＡＶ媒介性遺伝子発現に起因して制限される。

【００１０】

追加として、過度に高い用量のウイルスベクターを使用することについて懸念を提起するいくつかの報告がある。ほとんどのウイルスベクターは、ＡＡＶについて提起されている免疫原性の懸念も抱えている。

【００１１】

したがって、遺伝子療法のためのベクターの複数回投与を可能にする技術が、当該技術

分野で必要とされている。さらに、最小のオフターゲット効果で遺伝子療法ベクターからの遺伝子発現を制御する方法が当該技術分野で必要であり、産生および／または発現特性が改善された制御可能な組み換えＤＮＡベクターの重要な満たされていないニーズが残っている。さらに、熟練した医師によって理解されるように、導入遺伝子の発現／用量をタイトレーションする能力は、対象の特定の一連の症状および／または疾患の重症度に基づいて遺伝子療法治療をカスタマイズし、さらに副作用または毒性を最小限に抑えることが望まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本明細書に記載される発明は、細胞における導入遺伝子の制御された発現のための、例えば、疾患を治療するための共有結合性閉端を有するカプシド不含ＤＮＡベクターである（本明細書では「閉端ＤＮＡベクター」または「ｃｅＤＮＡベクター」と称される）。特に、本明細書に記載される技術は、導入遺伝子の持続的発現、導入遺伝子の長期制御発現、導入遺伝子の用量依存的および／またはタイトレーション可能な発現、ならびに本明細書に記載されるベクターを使用した導入遺伝子の反復投与のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、導入遺伝子の制御された発現のためのカプシド不含閉端ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）ベクターに関する。したがって、本明細書に開示される方法は、導入遺伝子発現レベルを所定の時間にわたって所定のレベルで持続させるか、または代替として、初回プライミング投与後１回以上の投与により、導入遺伝子の発現を用量依存的な様式で増加させ、それにより導入遺伝子発現レベルを、再用量投与におけるｃｅＤＮＡベクターの濃度に基づいて所望の発現レベルまたは所望の発現レベル範囲に制御することによって、個人のニーズを満たすレベルで導入遺伝子を発現するように、個人の生涯を通して遺伝子療法を個別化することを可能にし、細胞または対象における導入遺伝子の発現の制御された特異的増加を可能にする。

【００１３】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターを再投与して（本明細書では、「再用量」もしくは「ブースター」投与とも称される）、導入遺伝子発現レベルを所定の時間にわたって所定のレベルで継続させるか、または導入遺伝子の発現レベルを、１回目または前のｃｅＤＮＡベクター投与で達成された前の発現レベルを超えて増加させることができ、２回目の投与またはブースター投与は、導入遺伝子の発現に影響を及ぼすベクター自体に対する免疫反応を生じないことによって導入遺伝子の発現を予防する免疫反応を生じないか、あるいは免疫反応は、限定されないが、パルボウイルスまたはレンチウイルスなどのカプシドを含むウイルスベクターを含む、ウイルスタンパク質を含むウイルスベクターの再投与と比較して低い。

【００１４】

理論に限定されることを望まないが、研究は、従来のＡＡＶウイルスベクターを使用した長期の導入遺伝子発現が、経時的に衰えることを示している。従来のＡＡＶベクターを使用して長期の導入遺伝子発現を保証する１つの方法は、従来、初回投与時に送達されるＡＡＶベクターの力価および用量を増加させることであった。しかしながら、過度に高いＡＡＶベクターの力価または用量は、様々な副作用をもたらし得ることが知られている。さらに、上記で考察したように、ＡＡＶウイルスベクターの再投与は、免疫反応に起因して従来は不可能である。ＡＡＶベクターの再投与に対する免疫反応を引き起こすことを回避する方法は、典型的に、任意の以前の投与で投与されたＡＡＶベクターと比較して、異なるカプシド構成を有するＡＡＶベクターの再投与を必要とする。しかしながら、そのような戦略は、ＡＡＶベクターに対する免疫反応および潜在的に有害な効果を誘導することにより、依然として対象に重大なリスクをもたらす可能性がある。

【００１５】

本明細書では、本発明は、閉端ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）ベクターを使用する長期発現を含む、導入遺伝子の制御された発現のための方法を提供する。本明細書では、ｃｅＤＮＡベ

クターをタイトレーションして、例えば、ｃｅＤＮＡベクターの反復または再投与によって、導入遺伝子発現レベルを増加させることができることが実証されている。追加として、導入遺伝子発現のレベルを長期にわたって維持することができ、発現レベルの何らかの低下が観察された場合は、ｃｅＤＮＡベクターの再用量投与を使用して、所望のレベルを維持するか、またはさらには望ましい場合、対象および／または治療される疾患もしくは障害について、導入遺伝子発現のレベルを増加させることができる。

【００１６】

したがって、本明細書では、細胞または対象におけるｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現レベルを持続および／または増加させるためにｃｅＤＮＡベクターを投与する方法が提供され、発現レベルは、１回以上の後続の投与（例えば、再用量またはブースター投与）で持続または増加させることができる。何らかの理由でｃｅＤＮＡによって送達される導入遺伝子の発現が減少した場合、ｃｅＤＮＡベクターの再投与により、導入遺伝子の所望の発現を所望のレベルで再確立または維持することができる。また本明細書では、（例えば、時間０での）初回プライミング投与後１回以上の投与により、ｃｅＤＮＡベクターによって発現される導入遺伝子の発現レベルを増分的にまたは段階的な様式で増加させることができ、それによって対象により必要とされるとき、導入遺伝子の発現レベルを所望の発現レベルまたは所望の発現レベル範囲内に調整（例えば、タイトレーション）する。

【００１７】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターおよび方法を使用して、ｃｅＤＮＡベクターによる導入遺伝子の発現レベルの増加をタイトレーションまたは達成することができ、導入遺伝子の発現レベルは、１回以上の後続の投与（例えば、用量依存的再用量またはブースター投与）により用量依存的な様式でタイトレーションされ得る。そのようなものとして、本明細書に開示される方法は、導入遺伝子発現レベルを所定のレベルで持続させるか、または代替として、（例えば、時間０での）初回プライミング投与後１回以上の投与により、導入遺伝子の発現を用量依存的な様式で増加させ、それにより導入遺伝子発現レベルを、再用量投与におけるｃｅＤＮＡベクターの濃度に基づいて所望の発現レベルまたは所望の発現レベル範囲に制御することによって、個人のニーズを満たすレベルで導入遺伝子を発現するように、個人の生涯を通して遺伝子療法を個別化することを可能にし、細胞または対象における導入遺伝子の発現の制御された特異的増加を可能にする。

【００１８】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターを再投与して（本明細書では「再用量」もしくは「ブースター」投与とも呼ばれる）、導入遺伝子発現レベルを所定の時間にわたって所定のレベルで継続させるか、または導入遺伝子の発現レベルを、１回目または前のｃｅＤＮＡベクター投与で達成された前の発現レベルを超えて増加させることができる。

【００１９】

したがって、本明細書に記載される技術の一態様は、制御された導入遺伝子発現のための方法における、例えば、導入遺伝子の発現レベルを調整するため、または導入遺伝子発現レベルの制御された増加のため、または細胞もしくは対象における導入遺伝子の用量依存的発現レベルのための方法におけるｃｅＤＮＡベクターの使用に関し、ｃｅＤＮＡベクターは、プロモーターに操作可能に連結され、２つの逆位末端反復配列の間に位置付けられる少なくとも１つの異種ヌクレオチド配列（例えば、導入遺伝子）を含み、ＩＴＲ配列は、非対称、対称、または実質的に対称であり得（これらの用語は本明細書で定義されるとおりである）、ＩＴＲのうちの少なくとも１つは、機能性末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、任意に異種核酸配列は、導入遺伝子をコードし、ベクターは、ウイルスカプシドにはない。

【００２０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるようなｃｅＤＮＡベクターは、本明細

書に記載されるようなプロモーターまたは他の調節スイッチに操作可能に連結されている導入遺伝子に隣接する２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）配列を含む、共有結合性閉端（直鎖状、連続、および非カプシド化構造）を有する相補的ＤＮＡの連続鎖から形成されるカプシド不含直鎖状二重鎖ＤＮＡ分子である。５′ＩＴＲおよび３′ＩＴＲは、互いに対して同じ対称の３次元構成を有し得るか（すなわち、対称もしくは実質的に対称）、または５′ＩＴＲおよび３′ＩＴＲは、互いに対して異なる３次元構成を有し得（すなわち、非対称ＩＴＲ）、これらの用語は本明細書で定義されるとおりである。さらに、ＩＴＲは、同じまたは異なる血清型に由来し得る。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、それらの構造が幾何学的空間で同じ形状であるか、または３次元空間で同じＡ、Ｃ－Ｃ’およびＢ－Ｂ’ループを有するように、対称の３次元空間構成を有するＩＴＲ配列を含み得る（すなわち、それらは同じであるか、または互いに対して鏡像である）。いくつかの実施形態では、一方のＩＴＲは、１つのＡＡＶ血清型に由来し得、他方のＩＴＲは、異なるＡＡＶ血清型に由来し得る。

【００２１】

したがって、本明細書に記載される技術のいくつかの態様は、限定されないが、導入遺伝子の持続的発現もしくは長期発現、導入遺伝子の用量依存的もしくはタイトレーション可能な発現、または導入遺伝子の反復投与のためのｃｅＤＮＡベクターに関し、ｃｅＤＮＡベクターは、（ｉ）少なくとも１つのＷＴ　ＩＴＲおよび少なくとも１つの修飾型ＡＡＶ逆位末端反復（ＩＴＲ）（例えば、非対称の修飾型ＩＴＲ）、（ｉｉ）ｍｏｄ－ＩＴＲ対が互いに対して異なる３次元空間構成を有する、２つの修飾型ＩＴＲ（例えば、非対称の修飾型ＩＴＲ）、または（ｉｉｉ）各ＷＴ－ＩＴＲが同じ３次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称のＷＴ－ＷＴ　ＩＴＲ対、または（ｉｖ）各ｍｏｄ－ＩＴＲが同じ３次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称の修飾型ＩＴＲ対のうちのいずれかから選択されるＩＴＲ配列を含む。本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、真核細胞中で産生され得、したがって昆虫細胞中の原核ＤＮＡ修飾および細菌内毒素汚染を欠き得る。

【００２２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような方法およびｃｅＤＮＡベクターは、個別化された遺伝医学アプローチ、すなわち、濃度依存的な様式での再用量投与による導入遺伝子発現のレベルの増加のタイトレーションを可能にする。導入遺伝子発現の増加は、再用量投与を使用して用量依存的な段階的様式で達成することができ、したがって、各再用量投与により、既定量またはある特定の量だけ導入遺伝子の発現レベルを増加させることが想定される。これは、導入遺伝子発現のレベルの制御された増加を、用量依存的な様式で可能にし、増分的に行うことができる。したがって、導入遺伝子の発現レベルを毎回既定量だけ増加させるために、既定する量のｃｅＤＮＡを１、２、３、４、５、または６以上の再用量を投与して、前の投与で、またはこの再用量投与の前に達成された発現レベルよりも高い、所望のレベルまたは所望の発現レベル範囲を達成することができる。

【００２３】

したがって、いくつかの実施形態では、宿主における導入遺伝子の発現を調節する方法は、（ｉ）隣接する逆位末端配列（ＩＴＲ）の間のプロモーターに操作可能に連結された少なくとも１つの導入遺伝子を含む核酸カセットを含む、十分な量の本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターを宿主に投与して、測定可能なレベルの導入遺伝子を発現させることと（導入遺伝子は、所望のタンパク質をコードする）、（ｉｉ）隣接するＩＴＲの間に少なくとも１つの導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む、少なくとも第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを投与して、（ｉ）所望のタンパク質の発現を、所定期間にわたって所定のレベルで継続させるか、または（ｉｉ）所望のタンパク質の発現を所定のレベルに調整することと、を含み、ここでｃｅＤＮＡベクターの２回目の投与は、所望のタンパク質の発現を予防する免疫反応を生じない。

【００２４】

本明細書に記載される技術の一態様は、細胞における導入遺伝子の所望の発現レベルを持続させるための方法におけるｃｅＤＮＡベクターの使用に関し、方法は、（ａ）第１の時点で、第１の用量のｃｅＤＮＡベクターを細胞に投与して、ｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現を達成することと、（ｂ）第２の時点で、別の用量の同じまたは異なるｃｅＤＮＡベクターを細胞に投与して、導入遺伝子の発現レベルを所望のレベルまで増加させるか、または初回ｃｅＤＮＡベクター投与後の導入遺伝子の発現レベルの低下を補償することと、を含む。導入遺伝子発現のそのような増分的増加により、対象における投与量を、そのような対象にとって望ましいレベルまでタイトレーションすることが可能になることが理解されるであろう。いくつかの実施形態では、細胞における導入遺伝子の発現レベルを持続させるための方法におけるｃｅＤＮＡベクターの使用は、少なくとも４２日間にわたって所望の発現レベルで導入遺伝子を発現する。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、少なくとも８４日間にわたって所望の発現レベルで導入遺伝子を発現する。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、少なくとも１３２日間にわたって所望の発現レベルで導入遺伝子を発現する。

【００２５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法において、例えば、細胞における導入遺伝子の発現を持続させるため、および／または疾患を有する対象を治療するための方法において使用されるｃｅＤＮＡベクターは、薬学的に許容される担体および／または賦形剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、第２の時点で投与され、第１の時点後少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月、または６～１２ヶ月、または１～２年、または２～３年である。

【００２６】

発現レベルが経時的に減少した場合に導入遺伝子発現のレベルを単に増加させる（例えば、所望の所定レベルで導入遺伝子発現を継続させる）ためのｃｅＤＮＡベクターの再用量投与に加えて、いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターの再投与の方法および組成物は、用量依存的な様式で導入遺伝子のレベルを増加させることができ、すなわち、規定量のｃｅＤＮＡベクターの再用量投与は、導入遺伝子の発現レベルの規定された増加をもたらし得る。言い換えると、単なる例示の目的で任意の単位を使用して、再用量投与における１単位用量のｃｅＤＮＡは、前のレベルから導入遺伝子発現のレベルの１０％増加を達成し、２単位用量のｃＤＮＡベクターは、前のレベルから導入遺伝子のレベルの２０％増加を達成し、０．５単位用量のｃｅＤＮＡは、前のレベルから導入遺伝子の発現レベルの５％増加を達成する。

【００２７】

したがって、一実施形態では、制御された導入遺伝子発現のための本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、制御された様式で細胞または対象における導入遺伝子の発現レベルを増加させるために使用することができる。例えば、導入遺伝子の発現レベルは、ｃｅＤＮＡベクターの１回以上の後続の投与（例えば、再用量またはブースター投与）で増加させることができる。

【００２８】

本明細書における技術の別の態様は、細胞における導入遺伝子の発現を増加させるため、例えば、導入遺伝子の発現レベルを、前のｃｅＤＮＡ投与で達成された前の発現レベルを超えて増加させるための方法に関し、この方法は、（ａ）第１の時点で、プライミング用量のｃｅＤＮＡベクターを細胞に投与して、導入遺伝子の発現を達成することと、（ｂ）第２の時点で、ある用量のｃｅＤＮＡベクターを細胞に投与して、導入遺伝子の発現レベルを、第１の時点でｃｅＤＮＡベクターの投与後に達成される導入遺伝子の発現レベルと比較して増加させるか、または導入遺伝子の発現レベルを増加させて所望の発現レベルを達成することと、を含む。

【００２９】

本明細書に記載されるすべての態様では、ｃｅＤＮＡベクターは、任意の時点（例えば

、第１、第２、第３の時点等）で投与され、薬学的に許容される担体と組み合わせて投与され、任意に、担体、例えば、粒子、リポソーム、または脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）とともに投与され得る。本明細書におけるすべての態様では、第１、第２、または任意の後続の時点のうちのいずれかで投与されるｃｅＤＮＡベクターは、薬学的に許容される担体と組み合わせて投与される。

【００３０】

本明細書に記載されるすべての態様では、本明細書に記載される制御された導入遺伝子発現の方法において、例えば、導入遺伝子の発現を持続させるため、または導入遺伝子の発現の制御された増加のため、または導入遺伝子の用量依存的発現のため、および／または疾患を有する対象を治療するための方法において使用されるｃｅＤＮＡベクターであって、第１、第２、または任意の後続の時点のうちのいずれかで投与されるｃｅＤＮＡベクターは、薬学的に許容される担体および／または賦形剤と組み合わせて投与される。

【００３１】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡの２回以上の投与が（例えば、第２または任意の後続の時点で）投与される場合、第２の時点または任意の後続の時点は、第１の時点または以前の時点でのｃｅＤＮＡベクター投与後、少なくとも１０日、または１０～３０日、または少なくとも３０日、または３０～６０日、少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月、または６～１２ヶ月、または少なくとも１年である。

【００３２】

いくつかの実施形態では、第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む同じｃｅＤＮＡベクターであり、代替実施形態では、第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む異なるｃｅＤＮＡベクター、例えば、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーターを有する異なるｃｅＤＮＡベクターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性または抑制性プロモーターである。導入遺伝子はまた、本明細書に開示されるように、調節スイッチの一部であり得る。

【００３３】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のために本明細書に記載される方法で使用されるｃｅＤＮＡベクター、第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む同じｃｅＤＮＡベクターである。代替実施形態では、第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む異なるｃｅＤＮＡベクターであり、例えば、限定されないが、異なるｃｅＤＮＡベクターは、同じ導入遺伝子、または修飾された導入遺伝子、または異なる導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーターを有する。単なる例示の目的で、第１の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子と、第１のプロモーターまたは調節スイッチとを含むことができ、第２または後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡは、同じまたは修飾された導入遺伝子と、第２のプロモーターまたは調節スイッチとを含むことができ、第１および第２のプロモーター（または調節スイッチ）は、異なるプロモーターまたは異なる調節スイッチである。本明細書では、例示的な調節スイッチが定義されている。

【００３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される制御された導入遺伝子発現のための方法における、例えば、導入遺伝子の発現を持続させるための、または導入遺伝子の発現の制御された増加のための、または導入遺伝子の用量依存的発現のための、および／または疾患を有する対象を治療するための方法におけるｃｅＤＮＡベクターの使用は、任意に、第２の時点後の１つ以上の時点で、さらなる用量のｃｅＤＮＡベクターを細胞に投与して、導入遺伝子の発現レベルを、第２の時点もしくは以前の時点でのｃｅＤＮＡベクターの投与後に達成された導入遺伝子の発現のレベルと比較して増加させるか、または導入遺伝

子の発現レベルを増加させて、所望の持続的発現レベルを維持するステップを含み得、第２の時点後の１つ以上の時点で投与される組成物は、本明細書に記載されるようなｃｅＤＮＡベクターを含む。

【００３５】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のために本明細書に開示される方法において有用なｃｅＤＮＡベクターは、治療有効量での導入遺伝子の発現を可能にする。

【００３６】

いくつかの実施形態では、第２の時点または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターの所定の用量を増加させると、細胞および／または対象における導入遺伝子の発現レベルが増加する。いくつかの実施形態では、第２の時点または後続の時点で細胞または対象に投与される所定の用量のｃｅＤＮＡベクターは、ｃｅＤＮＡベクターの用量依存的関係を使用して決定され、細胞または対象における導入遺伝子の所望の発現レベルを達成する。

【００３７】

いくつかの実施形態では、第２または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターの所定の用量は、第１の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターの用量の２倍～１０倍の量である。いくつかの実施形態では、第２または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターの所定の用量は、第１の時点または以前の時点でのｃｅＤＮＡの投与後に達成される導入遺伝子の発現と比較して、導入遺伝子の発現を少なくとも３倍、または少なくとも５倍、または少なくとも１０倍、または２～１５倍、または２～２０倍、または２０倍より多く増加させる量である。いくつかの実施形態では、第２の時点後の１つ以上の時点での組成物の投与後に達成される導入遺伝子の所望の発現レベルが、導入遺伝子の治療有効量である。

【００３８】

本発明の態様は、本明細書に記載されるような制御された導入遺伝子発現のための方法において、例えば、導入遺伝子の発現を持続させるための、または導入遺伝子の発現の制御された増加のための、または導入遺伝子の用量依存的発現のための、および／または疾患を有する対象を治療するための方法において使用されるｃｅＤＮＡベクターを産生するための方法に関する。すべての態様では、制御された導入遺伝子発現のためのカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡベクター）は、最初の５’逆位末端反復（例えば、ＡＡＶ　ＩＴＲ）、異種核酸配列、および３’ＩＴＲ（例えば、ＡＡＶ　ＩＴＲ）をこの順序で含むポリヌクレオチド発現構築物テンプレートを含むプラスミド（本明細書では「ｃｅＤＮＡ－プラスミド」と称される）から得られ、５’ＩＴＲおよび３’ＩＴＲは、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称または対称（例えば、ＷＴ－ＩＴＲまたは修飾型対称ＩＴＲ）であり得る。

【００３９】

本明細書に記載される制御された導入遺伝子発現のための方法において（例えば、導入遺伝子の発現レベルを持続させるため、および／または導入遺伝子発現レベルの制御された増加のため、または用量依存的導入遺伝子発現レベルのための方法において）有用なｃｅＤＮＡベクターは、この開示を読んだ後に当業者に知られているであろういくつかの手段によって取得可能である。例えば、本発明のｃｅＤＮＡベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド発現構築物テンプレートは、ｃｅＤＮＡ－プラスミド（例えば、図４Ｂを参照）、ｃｅＤＮＡ－バクミド、および／またはｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスであり得る。一実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、ＩＴＲの間に操作可能に位置付けられた制限クローニング部位（例えば、配列番号１２３および／または１２４を含み、例えば、導入遺伝子、例えばレポーター遺伝子および／または治療的遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットを挿入することができる。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、対称または非対称ＩＴＲ（修飾型またはＷＴ　ＩＴＲ）を含むポリヌクレオチドテンプレート（例えば、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ

－バクミド、ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルス）から産生される。
【００４０】
許容宿主細胞中、例えば、Ｒｅｐの存在下では、少なくとも２つのＩＴＲを有するポリヌクレオチドテンプレートが複製して、ｃｅＤＮＡベクターを産生する。ｃｅＤＮＡベクター産生は、第１の、Ｒｅｐタンパク質を介したテンプレート骨格（例えば、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ－バクミド、ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスゲノム等）からのテンプレートの切除（「レスキュー」）、および第２の、切除したｃｅＤＮＡベクターのＲｅｐ媒介型複製の２つのステップを経る。様々なＡＡＶ血清型のＲｅｐタンパク質およびＲｅｐ結合部位は、当業者に周知である。当業者は、少なくとも１つの機能的ＩＴＲに基づいて、核酸配列に結合し、複製する血清型からＲｅｐタンパク質を選択することを理解する。例えば、複製可能ＩＴＲがＡＡＶ血清型２に由来する場合、対応するＲｅｐは、その血清型と共働するＡＡＶ血清型に由来し、例えばＡＡＶ２　ＩＴＲはＡＡＶ２またはＡＡＶ４　Ｒｅｐと共働するが、ＡＡＶ５　Ｒｅｐとは共働しない。複製時に、共有結合性閉端ｃｅＤＮＡベクターは、許容細胞中で蓄積し続け、ｃｅＤＮＡベクターは、好ましくは標準複製条件下、Ｒｅｐタンパク質の存在下では、長期間にわたって十分に安定して、例えば、少なくとも１ｐｇ／細胞、好ましくは少なくとも２ｐｇ／細胞、好ましくは少なくとも３ｐｇ／細胞、より好ましくは少なくとも４ｐｇ／細胞、さらにより好ましくは少なくとも５ｐｇ／細胞の量で蓄積する。
【００４１】
したがって、本発明の一態様は、ａ）ポリヌクレオチド発現構築物テンプレート（例えば、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ－バクミド、および／またはｃｅＤＮＡ－バキュロウイルス）を内包する宿主細胞（例えば、昆虫細胞）の集団をインキュベートするステップであって、Ｒｅｐタンパク質の存在下では、宿主細胞内のｃｅＤＮＡベクターの産生を誘導するために効果的な条件下、かつそのために十分な時間にわたってウイルスカプシドコード配列を欠いており、宿主細胞が、ウイルスカプシドコード配列を含まない、インキュベートするステップと、ｂ）ｃｅＤＮＡベクターを宿主細胞から採取し、単離するステップと、を含む、本明細書に記載されるような制御された導入遺伝子発現のための方法において有用なｃｅＤＮＡベクターを産生するプロセスに関する。Ｒｅｐタンパク質の存在は、修飾型ＩＴＲを有するベクターポリヌクレオチドの複製を誘導して、宿主細胞中でｃｅＤＮＡベクターを産生する。しかしながら、ウイルス粒子（例えば、ＡＡＶビリオン）は発現されない。したがって、ビリオン強制サイズ制限はない。
【００４２】
宿主細胞から単離された本明細書に記載されるような導入遺伝子の制御された発現に有用なｃｅＤＮＡベクターの存在は、宿主細胞から単離されたＤＮＡを、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、および消化されたＤＮＡ材料を変性ゲルおよび非変性ゲル上で分析して、直鎖状で非連続的なＤＮＡと比較して、特徴的な直鎖状で連続的なＤＮＡのバンドの存在を確認することによって確認され得る。
【００４３】
この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターから制御された様式で発現される導入遺伝子は、治療用導入遺伝子、例えば、受容体、毒素、ホルモン、酵素、または細胞表面タンパク質を含むがこれらに限定されない関心対象のタンパク質である。この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、関心対象のタンパク質は、受容体である。この態様および本明細書で提供される他のすべての態様の別の実施形態では、関心対象のタンパク質は、酵素である。標的となる例示的な遺伝子および関心対象のタンパク質は、本明細書の使用方法および治療方法のセクションにおいて詳細に記載されている。
【００４４】
いくつかの実施形態では、本出願は、以下のパラグラフのうちのいずれかに定義され得る。
【００４５】

対象における導入遺伝子の発現を調節する方法は、（ａ）隣接する逆位末端反復（ＩＴＲ）の間のプロモーターに操作可能に連結された少なくとも１つの導入遺伝子を含む核酸カセットを含む、十分な量の非ウイルス性カプシド不含閉端ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）ベクターを対象に投与して、測定可能なレベルの導入遺伝子を発現させることと（導入遺伝子は、疾患を治療するための所望のタンパク質をコードする）、（ｂ）隣接するＩＴＲの間に少なくとも１つの導入遺伝子を含む、少なくとも第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与することによってｃｅＤＮＡベクターをタイトレーションして、所望のタンパク質の導入遺伝子発現を所定の時間にわたって所定のレベルで得るか、または所望のタンパク質の導入遺伝子発現を所定のレベルまで増加させることと、を含む。

【００４６】

いくつかの実施形態では、対象は、タイトレーションの用量を決定するために、ステップ（ａ）後の所定の時間、例えば、ステップ（ａ）後の少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０日より後に評価される。例えば、いくつかの実施形態では、対象は、ステップ（ａ）後の対象における病態および／または対象におけるｃｅＤＮＡベクターによって発現される所望のタンパク質のレベルを決定するために評価される。いくつかの実施形態では、病態の評価は、対象における疾患の少なくとも１つの症状の評価である。いくつかの実施形態では、対象の病態が定常状態のままであるか、または改善していない場合、または例えば、ｃｅＤＮＡベクターの第１の投与時またはステップ（ａ）前の任意の時点での病態と比較して対象の病態が低下している場合、対象は、ステップ（ｂ）に従って第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを投与される。任意の所与の疾患の病態は、医師または当業者によって決定することができ、タンパク質バイオマーカー、ｍｉＲＮＡおよびｍＲＮＡバイオマーカー等を含む、疾患の１つ以上の臨床症状および／またはバイオマーカーを評価することを含む。いくつかの実施形態では、対象における導入遺伝子発現のレベルが、所定のレベルから低下したか、または治療有効量から低下した場合、対象は、ステップ（ｂ）に従って第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを投与される。いくつかの実施形態では、導入遺伝子発現のレベルは、対象から得られた生体試料中のｃｅＤＮＡベクターから発現された導入遺伝子のレベルを測定する（例えば、タンパク質レベルまたはｍＲＮＡレベルを測定する）ことによって決定される。いくつかの実施形態では、生体試料は、血液試料、血漿、滑液、ＣＳＦ、唾液、または組織生検試料から選択される。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターが所望のタンパク質または治療遺伝子およびレポータータンパク質をコードする導入遺伝子を発現する場合、導入遺伝子のレベルは、当業者に一般的に知られている方法を使用して、ｃｅＤＮＡベクターから発現される所望のレポータータンパク質をインビボで測定することによって決定することができる。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターのタイトレーションは、ｃｅＤＮＡベクターから発現される導入遺伝子のレベルを決定し、第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与して、導入遺伝子発現を所定の所望のレベルに調節または調整することである。

【００４７】

本明細書に記載される技術の別の態様は、対象における導入遺伝子の発現を調節する方法に関し、（ａ）隣接する逆位末端反復（ＩＴＲ）の間のプロモーターに操作可能に連結された少なくとも１つの導入遺伝子を含む核酸カセットを含む十分な量の非ウイルス性カプシド不含閉端ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）ベクターを対象に投与して、測定可能なレベルの導入遺伝子を発現させることと（導入遺伝子は、所望のタンパク質をコードする）、（ｂ）隣接するＩＴＲの間に少なくとも１つの導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む、少なくとも第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与して、（ｉ）所定の時間にわたって所定のレベルで所望のタンパク質の発現を継続させるか、または（ｉｉ）所望のタンパク質の発現を所定のレベルに調整することと、を含む。

【００４８】

本明細書におけるすべての態様では、対象へのｃｅＤＮＡベクターの２回目の投与は、所望のタンパク質の所定のレベルの発現を得るのを妨げるのに十分な免疫反応を生じない

。
【００４９】
いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、薬学的に許容される担体と組み合わせて、１回目の投与、または２回目の投与、または任意の後続の投与で対象に投与される。
【００５０】
いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターの２回目の投与は、導入遺伝子の発現レベルが所望の所定のレベルから減少する時点であり、例えば、いくつかの実施形態では、２回目の投与は、１回目の投与後少なくとも約３０日、または少なくとも約６０日、または少なくとも約９０日である。３つ以上の用量のｃｅＤＮＡベクターが対象に投与される場合、各再用量（例えば、第３、第４、第５、第６、および後続の再用量）は、導入遺伝子の発現レベルが、以前の投与から達成された所望の所定のレベルから減少または低下したときに投与され、例えば、いくつかの実施形態では、各再投与は、以前のｃｅＤＮＡベクター投与後少なくとも約３０日、または少なくとも約６０日、または少なくとも約９０日である。
【００５１】
いくつかの実施形態では、方法は、ｃｅＤＮＡベクターの少なくとも３回以上の投与を対象に投与することを含み、ｃｅＤＮＡベクターの少なくとも３回の投与が投与される場合、いずれの投与も、所望のタンパク質の所定のレベルの発現を達成するのを妨げるｃｅＤＮＡベクターに対する免疫反応を生じない。
【００５２】
いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、定期的なスケジュール、例えば、２ヶ月毎、３ヶ月毎、６ヶ月毎、１２ヶ月毎、１８ヶ月毎等で対象に投与される。
【００５３】
いくつかの実施形態では、２回目の投与は、所望のタンパク質の発現レベルを増加させること、例えば、所定の発現レベルで所望のタンパク質の発現を延長することである。
【００５４】
本明細書におけるすべての態様では、導入遺伝子は、治療用タンパク質をコードし、導入遺伝子所望の発現レベルは、治療用タンパク質の治療有効量である。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、核酸、阻害剤、ペプチドまたはポリペプチド、抗体または抗体断片、融合タンパク質、抗原、アンタゴニスト、アゴニスト、ＲＮＡｉ分子等のうちのいずれかから選択される遺伝医学である。いくつかの実施形態では、所望のタンパク質または治療用タンパク質は、阻害タンパク質、例えば、限定されないが、抗体もしくは抗原結合断片、または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、所望のタンパク質または治療用タンパク質は、欠陥タンパク質、または発現されていないか、もしくは低レベルで発現されているタンパク質に取って代わる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、本明細書で定義されるように、調節スイッチの制御下にある。
【００５５】
いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、誘導性または抑制性プロモーターであるプロモーターを含む。
【００５６】
いくつかの実施形態では、第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む同じタイプのｃｅＤＮＡベクターである。例えば、言い換えると、同じｃｅＤＮＡベクターが対象に複数回投与され、同じ血清型のウイルスベクターを対象に複数回投与することに匹敵する。
【００５７】
いくつかの実施形態では、２回目の投与またはその後の任意の後続投与（例えば、再用量投与）で対象に投与されるｃｅＤＮＡベクターは、早い時点または投与で投与されたｃｅＤＮＡベクターのプロモーターと比較して、同じ導入遺伝子または修飾導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーターを有する。

【００５８】
いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、ＡＡＶ　ＩＴＲである２つの逆位末端反復配列（ＩＴＲ）を含み、例えば、ＡＡＶ－２、または表１から選択される任意のＩＴＲ、またはＡＡＶ１、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ　５、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ　１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ－ＤＪ、およびＡＡＶ－ＤＪ８であり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＩＴＲは、機能性末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で定義されるように、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターにおける隣接するＩＴＲは、対称または実質的に対称または非対称である。いくつかの実施形態では、ＩＴＲの一方もしくは両方が野生型であるか、またはＩＴＲの両方が野生型である。いくつかの実施形態では、隣接するＩＴＲは、異なるウイルス血清型に由来する。隣接するＩＴＲが両方とも野生型であるいくつかの実施形態では、それらは、表１に示されるように、任意のＡＡＶ血清型から選択され得る。

【００５９】
いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターにおける隣接するＩＴＲは、本明細書の表２、４Ａ、４Ｂ、または５の配列から選択される配列を含み得る。

【００６０】
いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターにおけるＩＴＲのうちの少なくとも１つが、ＩＴＲの３次元コンフォメーション全体に影響する欠失、付加、または置換によって野生型ＡＡＶ　ＩＴＲ配列から変更される。いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターにおけるＩＴＲの一方または両方は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、およびＡＡＶ１２から選択されるＡＡＶ血清型に由来する。

【００６１】
いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターにおけるＩＴＲの一方または両方は、合成のものである。いくつかの実施形態では、ＩＴＲの一方もしくは両方が野生型ＩＴＲでないか、またはＩＴＲの両方が野生型でない。

【００６２】
いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターにおけるＩＴＲの一方または両方が、Ａ、Ａ´、Ｂ、Ｂ´、Ｃ、Ｃ´、Ｄ、およびＤ´から選択されるＩＴＲ領域のうちの少なくとも１つにおける欠失、挿入、および／または置換によって修飾される。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、および／または置換は、通常はＡ、Ａ’、Ｂ、Ｂ’Ｃ、またはＣ’領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす。いくつかの実施形態では、ＩＴＲの一方または両方は、通常はＢおよびＢ’領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている。いくつかの実施形態では、ＩＴＲの一方または両方は、通常はＣおよびＣ’領域によって形成されるステムループ構造の全部または一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている。いくつかの実施形態では、ＩＴＲの一方または両方は、通常はＢおよびＢ’領域によって形成されるステムループ構造の一部、ならびに／または通常はＣおよびＣ’領域によって形成されるステムループ構造の一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、および／または置換によって修飾されている。いくつかの実施形態では、ＩＴＲの一方または両方は、通常はＢおよびＢ’領域によって形成される第１のステムループ構造と、ＣおよびＣ’領域によって形成される第２のステ

ムループ構造とを含む領域に、単一のステムループ構造を含む。いくつかの実施形態では、ＩＴＲの一方または両方は、通常はＢおよびＢ’領域によって形成される第１のステムループ構造と、ＣおよびＣ’領域によって形成される第２のステムループ構造とを含む領域に、単一のステムおよび２つのループを含む。

【００６３】

いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターにおける両方のＩＴＲは、ＩＴＲが互いに対して反転されたときに、全体的な３次元対称性をもたらす様式で変更される。

【００６４】

いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されたｃｅＤＮＡベクターは、少なくとも１つの調節スイッチの制御下で少なくとも１つの異種ヌクレオチド配列を含み、例えば、少なくとも１つの調節スイッチは、バイナリ調節スイッチ、小分子調節スイッチ、パスコード調節スイッチ、核酸ベース調節スイッチ、転写後調節スイッチ、放射線制御または超音波制御の調節スイッチ、低酸素媒介調節スイッチ、炎症反応調節スイッチ、剪断活性化調節スイッチ、およびキルスイッチから選択される。調節スイッチは、本明細書において下記により詳細に開示される。

【００６５】

いくつかの実施形態では、１回目の投与、または２回目の投与、またはその後の任意の後続投与で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、例えば、癌、自己免疫疾患、神経変性疾患、高コレステロール血症、急性臓器拒絶反応、多発性硬化症、閉経後骨粗しょう症、皮膚状態、喘息、または血友病から選択される疾患または障害を有する対象に投与される。いくつかの実施形態では、癌を有する対象は、固形腫瘍、軟部組織肉腫、リンパ腫、および白血病を有する。いくつかの実施形態では、対象は、例えば、関節リウマチおよびクローン病から選択される自己免疫疾患を有する。いくつかの実施形態では、対象は、例えば、乾癬およびアトピー性皮膚炎から選択される皮膚状態を有する。いくつかの実施形態では、対象は、神経変性障害、例えば、アルツハイマー病、ＡＬＳ、パーキンソン病、ハンチントン病を有する。

【００６６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、第２の時点後の１つ以上の時点で、ある用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与して、第２の時点もしくは以前の時点でのｃｅＤＮＡベクターの投与後に達成される導入遺伝子の発現レベルと比較して、異種核酸配列（例えば、導入遺伝子）の発現レベルを増加させるか、または導入遺伝子の発現レベルを増加させて、所望の発現レベルを達成することをさらに含む。

【００６７】

いくつかの実施形態では、第２または任意の後続の時点で対象に投与されるｃｅＤＮＡベクターの所定の用量は、第１の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクター組成物の用量の２倍～１０倍の量である。いくつかの実施形態では、第２または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクター組成物の所定の用量は、第１の時点または以前の投与でのｃｅＤＮＡの投与後の導入遺伝子の発現レベルと比較して、導入遺伝子の発現を少なくとも３倍、または少なくとも５倍、または少なくとも１０倍、または２～１５倍、または２～２０倍増加させる量である。いくつかの実施形態では、２回目の投与または第２の時点で投与される所定の用量のｃｅＤＮＡベクターは、ｃｅＤＮＡベクターの用量依存的関係を使用して決定され、細胞における導入遺伝子の所望の発現レベルを達成する。

【００６８】

本発明のこれらおよび他の態様は、下記でさらに詳述される。

【図面の簡単な説明】

【００６９】

上記に簡単に要約され、以下により詳細に論じられる本開示の実施形態は、添付の図面に描かれた本開示の例示的な実施形態を参照することによって理解することができる。しかしながら、添付の図面は、本開示の典型的な実施形態のみを示し、したがって、本開示

は他の等しく有効な実施形態を認めることができるため、範囲を限定するものとみなされるべきではない。

【図１Ａ】非対称ＩＴＲを含む、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの例示的な構造を示す。この実施形態では、例示的なｃｅＤＮＡベクターは、ＣＡＧプロモーター、ＷＰＲＥ、およびＢＧＨｐＡを含有する発現カセットを含む。導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、ＣＡＧプロモーターとＷＰＲＥとの間のクローニング部位（Ｒ３／Ｒ４）に挿入され得る。発現カセットは、２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）－発現カセットの上流（５’端）の野生型ＡＡＶ２　ＩＴＲおよび下流（３’端）の修飾型ＩＴＲによって隣接され、したがって、発現カセットに隣接する２つのＩＴＲは、互いに対して非対称である。

【図１Ｂ】ＣＡＧプロモーター、ＷＰＲＥ、およびＢＧＨｐＡを含む発現カセットを備えた非対称ＩＴＲを含む、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの例示的な構造を示す。導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、ＣＡＧプロモーターとＷＰＲＥとの間のクローニング部位に挿入され得る。発現カセットは、２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）－発現カセットの上流（５’端）の修飾型ＩＴＲおよび下流（３’端）の野生型ＩＴＲによって隣接される。

【図１Ｃ】エンハンサー／プロモーター、導入遺伝子、転写後エレメント（ＷＰＲＥ）、およびポリＡシグナルを含む発現カセットを備えた、非対称ＩＴＲを含む、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、ＣＡＧプロモーターとＷＰＲＥとの間のクローニング部位への導入遺伝子の挿入を可能にする。発現カセットは、互いに対して非対称である２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）、発現カセットの上流（５’端）の修飾型ＩＴＲおよび下流（３’端）の修飾型ＩＴＲによって隣接され、５’ＩＴＲおよび３’ＩＴＲの両方は、修飾型ＩＴＲであるが、異なる修飾を有する（すなわち、同じ修飾を有しない）。

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

【図１Ｅ】エンハンサー／プロモーター、導入遺伝子、転写後エレメント（ＷＰＲＥ）、およびポリＡシグナルを含む発現カセットを備えた、本明細書で定義される対称の修飾型ＩＴＲまたは実質的に対称の修飾型ＩＴＲを含む、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、ＣＡＧプロモーターとＷＰＲＥとの間のクローニング部位への導入遺伝子の挿入を可能にする。発現カセットは、５’修飾型ＩＴＲおよび３’修飾型ＩＴＲが対称または実質的に対称である、２つの修飾型逆位末端反復（ＩＴＲ）に隣接している。

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

【図１Ｇ】エンハンサー／プロモーター、導入遺伝子、転写後エレメント（ＷＰＲＥ）、およびポリＡシグナルを含む発現カセットを備えた、本明細書で定義される対称の修飾型ＩＴＲまたは実質的に対称の修飾型ＩＴＲを含む、本明細書に開示されるような制御され

た導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、ＣＡＧプロモーターとＷＰＲＥとの間のクローニング部位への導入遺伝子の挿入を可能にする。発現カセットは、５’ＷＴ－ＩＴＲおよび３’ＷＴ－ＩＴＲが対称または実質的に対称である、２つの野生型逆位末端反復（ＷＴ－ＩＴＲ）に隣接している。

【図２Ａ】Ａ－Ａ’アーム、Ｂ－Ｂ’アーム、Ｃ－Ｃ’アーム、２つのＲｅｐ結合部位（ＲＢＥおよびＲＢＥ’）の特定を有するＡＡＶ２（配列番号５２）の野生型左ＩＴＲのＴ形ステムループ構造を提供し、末端分解部位（ｔｒｓ）も示す。ＲＢＥは、Ｒｅｐ７８またはＲｅｐ６８のいずれかと相互作用すると考えられる一連の４つの二重四量体を含有する。さらに、ＲＢＥ’はまた、構築物中の野生型ＩＴＲまたは変位型ＩＴＲ上で集成したＲｅｐ複合体と相互作用すると考えられる。ＤおよびＤ’領域は、転写因子結合部位および他の保存構造を含有する。

【図２Ｂ】Ａ－Ａ’アーム、Ｂ－Ｂ’アーム、Ｃ－Ｃ’アーム、２つのＲｅｐ結合部位（ＲＢＥおよびＲＢＥ’）の特定を有するＡＡＶ２の野生型左ＩＴＲのＴ形ステムループ構造を含む、野生型左ＩＴＲ（配列番号５３）中の提案されたＲｅｐ触媒ニッキングおよびライゲーション活性を示し、また末端分解部位（ｔｒｓ）、ならびにいくつかの転写因子結合部位を含むＤおよびＤ’領域、ならびに他の保存構造も示す。

【図３Ａ】野生型左ＡＡＶ２　ＩＴＲ（配列番号５４）のＡ－Ａ’アーム、ならびにＣ－Ｃ’およびＢ－Ｂ’アームのＲＢＥ含有部分の一次構造（ポリヌクレオチド配列）（左）および二次構造（右）を提供する。

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

【図３Ｃ】野生型右ＡＡＶ２　ＩＴＲ（配列番号５５）のＡ－Ａ’ループ、ならびにＢ－Ｂ’およびＣ－Ｃ’アームのＲＢＥ含有部分の一次構造（左）および二次構造（右）を示す。

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

【図４Ａ】図４Ｂの概略図に記載されるプロセスにおける、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡの産生に有用である、バキュロウイルス感染した昆虫細胞（ＢＩＩＣ）を作製するための上流プロセスを示す概略図である。

【図４Ｂ】ｃｅＤＮＡ産生の例示的な方法の概略図である。

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

【図４Ｄ】図４Ｄおよび図４Ｅは、図４Ｂのｃｅ ＤＮＡ産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取されたＤＮＡ中のｃｅＤＮＡの存在を特定するためのプロセスを説明する概略図である。図４Ｄは、左が未切断であるか、または制限エンドヌクレアーゼで消化された後、未変性ゲルまたは変性ゲルのいずれかで電気泳動に共される例示的なｃｅＤＮＡの概略的予想バンドを示す。左端の概略図は、未変性ゲルであり、その二重鎖および未切断形態で、ｃｅＤＮＡが少なくとも単量体および二量体状態で存在し、より速く移動する小さい単量体および単量体のサイズの２倍である、より遅く移動する二量体として見えることを示唆する、多重バンドを示す。左から二番目の概略図は、ｃｅＤＮＡが制限エン

ドヌクレアーゼで切断されたとき、元のバンドが消え、分裂後に残存する予想断片サイズに対応する、より速く移動する（例えば、より小さい）バンドが出現することを示す。変性条件下、元の二重鎖ＤＮＡは単鎖であり、相補鎖が共有結合されるため、未変性ゲル上で観察されるものより２倍大きい種として移動する。したがって、右から二番目の概略図において、消化されたｃｅＤＮＡは、未変性ゲル上で観察されるものと同様のバンディング分布を示すが、バンドは、未変性ゲル対応物のサイズの２倍の断片として移動する。右端の概略図は、変性条件下の未切断のｃｅＤＮＡが、単鎖開環として移動し、したがって観察されたバンドは、環が開いていない未変性条件下で観察されるもののサイズの２倍であることを示す。この図において、「ｋｂ」を使用して、文脈に応じて、ヌクレオチド鎖の長さ（例えば、変性状態で観察される単鎖分子の場合）または塩基対の数（例えば、未変性状態で観察される二本鎖分子の場合）に基づくヌクレオチド分子の相対サイズを示す。

【図４Ｅ】図４Ｄおよび図４Ｅは、図４Ｂのｃｅ ＤＮＡ産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取されたＤＮＡ中のｃｅＤＮＡの存在を特定するためのプロセスを説明する概略図である。図４Ｅは、非連続的な構造を有するＤＮＡを示す。ｃｅＤＮＡは、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件および変性条件の両方において、異なるサイズ（１ｋｂおよび２ｋｂ）を有する２つのＤＮＡ断片を生成し得る。図４Ｅはまた、直鎖状で連続的な構造を有するｃｅＤＮＡを示す。ｃｅＤＮＡベクターは、制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、変性条件ではなく中性条件において１ｋｂおよび２ｋｂとして移動する２つのＤＮＡ断片を生成することができ、鎖は接続されたままであり、２ｋｂおよび４ｋｂとして移動する単鎖を産生する。

【図５】エンドヌクレアーゼでの消化を有する（＋）または有しない（－）ｃｅＤＮＡベクターの変性ゲル流動例の例示的な図である（ｃｅＤＮＡ構築物１および２の場合ＥｃｏＲＩ、ｃｅＤＮＡ構築物３および４の場合ＢａｍＨ１、ｃｅＤＮＡ構築物５および６の場合ＳｐｅＩ、ならびにｃｅＤＮＡベクター７および８の場合ＸｈｏＩ）構築物１～８は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際出願第ＰＣＴＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号の実施例１に記載されている。アスタリスクで強調されたバンドのサイズを判定し、図の下に示した。

【図６】リポソームを含む組成物中に存在するルシフェラーゼを発現するｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現レベルを増加させるための再用量（すなわち、ブースター投与）の効果を示すグラフである。ルシフェラーゼの発現を、実施例６に記載されるようにｃｅＤＮＡベクターの投与後に測定し、その後、８４日目または８７日目にｃｅＤＮＡベクターから産生されたｃｅＤＮＡベクターを再投与した。ルシフェラーゼ発現は、少なくとも１３２日間（評価された最長期間）まで、３つのグループすべてにおいて評価され、検出された。図６は、８０日目またはその付近に、リポソーム（ＬＮＰｃｅＤＮＡ）の存在下で１ｍｇ／ｋｇのｃｅＤＮＡベクターを投与されたマウスにおける導入遺伝子の発現レベルがわずかに減少することを示す。８４日目または８７日目のリポソームの存在下でのｃｅＤＮＡベクターの再投与を使用して、導入遺伝子発現を所望の所定のレベル（データは示さず）で継続させるか、またはｃｅＤＮＡからの導入遺伝子発現レベルを、前のｃｅＤＮＡベクター投与から達成されたレベルを超えて増加させることができる。ここでは、３ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰｃｅＤＮＡベクターを投与することによる、以前の導入遺伝子発現レベルを７倍上回る発現の増加、または１０ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰｃｅＤＮＡベクター組成物を投与することによる、以前の導入遺伝子発現レベルを１７倍上回る発現レベルの増加が示される。

【図７】実施例７に記載される実験の結果を示し、具体的には、ＬＮＰ－ポリＣ対照（左端のマウス）で治療されたマウスおよびＬＮＰ－ｃｅＤＮＡ－ルシフェラーゼで治療された４匹のマウス（左端のマウス以外のすべて）から得られたＩＶＩＳ画像を表す。４匹のｃｅＤＮＡで治療されたマウスは、マウスの肝臓を含む領域で有意な蛍光を示す。

【図８】実施例８に記載される実験の結果を表す。暗い斑点は、発現されたｃｅＤＮＡ導

入遺伝子から生じるタンパク質の存在を示し、投与したＬＮＰ－ｃｅＤＮＡと肝細胞との会合を実証する。
【図９Ａ】図９Ａ～９Ｂは、実施例９に記載される眼の研究の結果を表す。図９Ａは、ＪｅｔＰＥＩ（登録商標）－ｃｅＤＮＡ－ルシフェラーゼを注入したラットの眼（左上）および同じラットの注入していない眼（右上）、またはプラスミド－ルシフェラーゼＤＮＡを注入したラットの眼（左下）および同じラットの注入していない眼（右下）からの代表的なＩＶＩＳ画像を示す。
【図９Ｂ】図９Ａ～９Ｂは、実施例９に記載される眼の研究の結果を表す。図９Ｂは、処置群の各々における処置された眼、または対応する未処置の眼で観察された平均放射輝度のグラフを示す。ｃｅＤＮＡで処置したラットは、最小限の相対蛍光（したがって、ルシフェラーゼ導入遺伝子の発現）が観察されたプラスミド－ルシフェラーゼで処置したラットとは明確な対照で、９９日間にわたって有意な蛍光（したがって、ルシフェラーゼ導入遺伝子の発現）を実証した。
【図１０Ａ】図１０および１０Ｂは、実施例１０に記載されるＲａｇ２マウスにおけるｃｅＤＮＡの持続および再投与研究の結果を表す。図１０Ａは、ＬＮＰ－ｃｅＤＮＡ－Ｌｕｃで処置した野生型ｃ５７ｂｌ／６マウスまたはＲａｇ２マウスで観察された経時的な全流束のグラフを示す。
【図１０Ｂ】図１０および１０Ｂは、実施例１０に記載されるＲａｇ２マウスにおけるｃｅＤＮＡの持続および再投与研究の結果を表す。図１０Ｂは、Ｒａｇ２マウスにおけるルシフェラーゼ導入遺伝子の発現レベルに対する再用量の影響を示すグラフを提供し、結果として、再用量後に観察される安定した発現の増加をもたらす（矢印は、再用量投与の時間を示す）。
【図１１】実施例１１に記載される処置されたマウスにおけるｃｅＤＮＡルシフェラーゼ発現研究からのデータを提供し、研究の期間にわたるマウスの各群における全流束を示す。高レベルの非メチル化ＣｐＧは、経時的にマウスで観察される全流束の低下と相関したが、肝臓特異的プロモーターの使用は、少なくとも７７日間にわたって、ｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の耐久性のある安定した発現と相関した。
【発明を実施するための形態】
【００７０】
本明細書では、導入遺伝子の制御された発現のための、例えば、所望のおよび所定の時間にわたって所望の導入遺伝子の持続的発現を可能にするため、または細胞における導入遺伝子レベルの発現を、インビボもしくはインビトロのいずれかで調節する（発現レベルを増加させることを含む）ための共有結合性閉端（ｃｅＤＮＡ）を有する新規カプシド不含ＤＮＡベクターを含む方法および組成物が記載され、導入遺伝子の発現レベルは、少なくとも１回（すなわち、１回以上）の後続投与（例えば、ブースター投与、または再用量）により増加され得る。
【００７１】
本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターおよび方法は、宿主細胞または対象においてインビトロおよびインビボで導入遺伝子の発現レベルを持続させること、すなわち、発現を所望のレベルに維持すること、または初回投与後の時点で、少なくとも１回の再投与（本明細書では、再用量もしくはブースター投与とも称される）によって発現レベルのいかなる低下も止めることを可能にする。
【００７２】
本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターおよび方法は、導入遺伝子の発現レベルを、インビトロおよびインビボで前のレベルから増加させること、すなわち、発現を所望のレベル以上に増加させること、または初回投与後の時点で、少なくとも１回の再投与（本明細書では、「再用量」もしくは「ブースター」投与とも称される）によって発現レベルを所望の発現範囲内に増加させることを可能にする。
【００７３】
すなわち、ｃｅＤＮＡによって発現される導入遺伝子の発現を、前の投与からのレベル

よりも増加させることができる。前の投与が初回用量（すなわち、プライミング用量）であった場合、第２の時点での再用量投与を使用して、導入遺伝子の発現レベルを増加させることができる。同様に、前の投与が２回目の投与（すなわち、再用量投与）であった場合、追加の再用量投与を使用して、前の再用量投与よりも、導入遺伝子の発現レベルを所望の発現レベルまたは範囲以上のレベルに増加させることができる。したがって、本明細書に開示されるような技術、方法、およびｃｅＤＮＡベクターを使用して、制御された様式で、導入遺伝子の発現レベルを所望の発現レベルまで増分的に増加させることができる。導入遺伝子の発現レベルのそのような段階的かつ増分的増加は、実際に必要とされる量を超える高い初回用量を投与する必要があるというリスクなしに、および／または他のＡＡＶベースのベクターに関連する免疫合併症なしに、対象のニーズおよび／または対象におけるｃｅＤＮＡベクターおよび／もしくは発現された導入遺伝子（例えば、遺伝医学）の有効性に基づいて特定の個人に対する導入遺伝子の発現レベルのタイトレーションを可能にするため、対象の治療に有利である。

【００７４】

定義

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

ＮＡ，Ｊｏｎ Ｌｏｒｓｃｈ（ｅｄ．）Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，２０１３（ＩＳＢＮ ０１２４１９９５４２）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（ＣＰＭＢ），Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ（ｅｄ．），Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，２０１４（ＩＳＢＮ ０４７１５０３３８Ｘ，９７８０４７１５０３３８５），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ（ＣＰＰＳ），Ｊｏｈｎ Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ（ｅｄ．），Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，２００５、およびＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（ＣＰＩ）（Ｊｏｈｎ Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ，ＡＤＡ Ｍ Ｋｒｕｉｓｂｅｅｋ，Ｄａｖｉｄ Ｈ Ｍａｒｇｕｌｉｅｓ，Ｅｔｈａｎ Ｍ Ｓｈｅｖａｃｈ，Ｗａｒｒｅｎ Ｓｔｒｏｂｅ，（ｅｄｓ．）Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，２００３（ＩＳＢＮ ０４７１１４２７３５，９７８０４７１１４２７３７）に見出すことができ、これらの内容はすべて、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【００７５】

本明細書で使用される場合、「異種ヌクレオチド配列」および「導入遺伝子」という用語は、交換可能に使用され、本明細書で開示されるｃｅＤＮＡベクターに組み込まれ、それによって送達および発現され得る、関心対象の（カプシドポリペプチドをコードする核酸以外の）核酸を指す。関心対象の導入遺伝子には、ポリペプチドをコードする核酸、好ましくは治療的（例えば、医療、診断、もしくは獣医学的用途）または免疫原性ポリペプチド（例えば、ワクチン用）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、関心対象の核酸は、治療用ＲＮＡに転写される核酸を含む。本発明のｃｅＤＮＡベクターでの使用のために含まれる導入遺伝子は、１つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、アプタマー、ペプチド核酸、ｓｉＲＮＡ、ＲＮＡｉ、ｍｉＲＮＡ、ＩｎｃＲＮＡ、アンチセンスオリゴもしくはポリヌクレオチド、抗体、抗原結合断片、またはそれらの任意の組み合わせを発現またはコードするものを含むが、これらに限定されない。導入遺伝子は「遺伝医学」であり得、阻害剤、核酸、オリゴヌクレオチド、サイレンシング核酸、ｍｉＲＮＡ、ＲＮＡｉ、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリペプチド、ペプチド、抗体もしくは抗体断片、融合タンパク質、またはそれらの変異体、エピトープ、抗原、アプタマー、リボソーム等のうちのいずれかを包含する。本明細書においてｃｅＤＮＡベクター中でに使用される導入遺伝子は、サイズが限定されない。

【００７６】

本明細書に開示される「遺伝医学」という用語は、対象の疾患または障害を治療または予防するために使用できる任意のＤＮＡ構造または核酸配列に関する。

【００７７】

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

【００７８】

本明細書で使用される場合、「末端反復」または「ＴＲ」という用語は、少なくとも１つの最小限必要な複製起源、および回文ヘアピン構造を含む領域を含む、任意のウイルス末端配列または合成配列を含む。Ｒｅｐ結合配列（「ＲＢＳ」）（ＲＢＥ（Ｒｅｐ結合エレメント）とも称される）および末端分解部位（「ＴＲＳ」）は、一緒に「最小限必要な複製起源」を構成し、したがって、ＴＲは、少なくとも１つのＲＢＳおよび少なくとも１つのＴＲＳを含む。ポリヌクレオチド配列の所与のストレッチ内で互いの逆相補鎖であるＴＲは、典型的に、各々「逆位末端反復」または「ＩＴＲ」と称される。ウイルスの文脈において、ＩＴＲは、複製、ウイルスパッケージング、統合、およびプロウイルスレスキ

ューを媒介する。本明細書で本発明において予想外に見出されたように、全長にわたって逆相補鎖でないＴＲは、依然としてＩＴＲの従来の機能を行うことができ、したがって、ＩＴＲという用語は、本明細書において、ｃｅＤＮＡベクターの複製を媒介することができるｃｅＤＮＡゲノムまたはｃｅＤＮＡベクター中のＴＲを指すように使用される。複合ｃｅＤＮＡベクター構成中、２つより多くのＩＴＲまたは非対称ＩＴＲ対が存在し得ることは、当業者によって理解されるであろう。ＩＴＲは、ＡＡＶ　ＩＴＲもしくは非ＡＡＶ　ＩＴＲであり得るか、またはＡＡＶ　ＩＴＲもしくは非ＡＡＶ　ＩＴＲに由来し得る。例えば、ＩＴＲは、パルボウイルスおよびディペンドウイルス（例えば、イヌパルボウイルス、ウシパルボウイルス、マウスパルボウイルス、ブタパルボウイルス、ヒトパルボウイルスＢ－１９）を包含するパルボウイルス科に由来し得るか、またはＳＶ４０複製の起源として役立つＳＶ４０ヘアピンは、切断、置換、欠失、挿入、および／もしくは付加によってさらに修飾され得る、ＩＴＲとして使用され得る。Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅファミリーウイルスは、脊椎動物に感染するＰａｒｖｏｖｉｒｉｎａｅおよび無脊椎動物に感染するＤｅｎｓｏｖｉｒｉｎａｅの２つのサブファミリーで構成されている。ディペンドパルボウイルスは、ヒト、霊長類、ウシ、イヌ、ウマ、ヒツジ種を含むが、これらに限定されない脊椎動物宿主における複製が可能である、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）のウイルスファミリーを含む。

【００７９】

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

【００８０】

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

【００８１】

「ハイブリダイズ可能」または「相補的」または「実質的に相補的」とは、核酸（例えば、ＲＮＡ）が、非共有結合する、すなわち、ワトソン・クリック塩基対および／またはＧ／Ｕ塩基対を形成する、温度および溶液イオン強度の適切なインビトロおよび／またはインビボ条件下で配列特異的、逆平行方法で別の核酸に「アニール」または「ハイブリダイズ」する（すなわち、核酸は、相補的核酸に特異的に結合する）のを可能にするヌクレオチドの配列を含むことを意味する。当該技術分野で知られているように、標準的なワトソン・クリック塩基対合には、チミジン（Ｔ）とのアデニン（Ａ）対合、ウラシル（Ｕ）とのアデニン（Ａ）対合、およびシトシン（Ｃ）とのグアニン（Ｇ）対合が含まれる。さらに、２つのＲＮＡ分子（例えば、ｄｓＲＮＡ）間のハイブリダイゼーションのために、グアニン（Ｇ）塩基がウラシル（Ｕ）と対合することも当該技術分野で知られている。例えば、Ｇ／Ｕ塩基対合は、ｍＲＮＡ中のコドンとのｔＲＮＡアンチコドン塩基対合の状況

で、遺伝暗号の縮重（すなわち、冗長性）を部分的に担っている。この開示の文脈において、対象のＤＮＡ標的化ＲＮＡ分子のタンパク質結合セグメント（ｄｓＲＮＡ二重鎖）のグアニン（Ｇ）は、ウラシル（Ｕ）に相補的であるとみなされ、逆もまた同様である。したがって、対象のＤＮＡ標的ＲＮＡ分子のタンパク質結合セグメント（ｄｓＲＮＡ二重鎖）の所与のヌクレオチド位置でＧ／Ｕ塩基対を作製できる場合、その位置は、非相補的であるとみなされないが、代わりに相補的であるとみなされる。

【００８２】

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

【００８３】

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

【００８４】

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

【００８５】

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

【００８６】

本明細書で使用される場合、「末端反復」または「ＴＲ」という用語は、少なくとも１つの最小限必要な複製起源、および回文ヘアピン構造を含む領域を含む、任意のウイルス末端配列または合成配列を含む。Ｒｅｐ結合配列（「ＲＢＳ」）（ＲＢＥ（Ｒｅｐ結合エレメント）とも称される）および末端分解部位（「ＴＲＳ」）は、一緒に「最小限必要な複製起源」を構成し、したがって、ＴＲは、少なくとも１つのＲＢＳおよび少なくとも１つのＴＲＳを含む。ポリヌクレオチド配列の所与のストレッチ内で互いの逆相補鎖であるＴＲは、典型的に、各々「逆位末端反復」または「ＩＴＲ］と称される。ウイルスの文脈において、ＩＴＲは、複製、ウイルスパッケージング、統合、およびプロウイルスレスキューを媒介する。本明細書で本発明において予想外に見出されたように、全長にわたって逆相補鎖でないＴＲは、依然としてＩＴＲの従来の機能を行うことができ、したがって、ＩＴＲという用語は、本明細書において、ｃｅＤＮＡベクターの複製を媒介することができるｃｅＤＮＡゲノムまたはｃｅＤＮＡベクター中のＴＲを指すように使用される。複合ｃｅＤＮＡベクター構成中、２つより多くのＩＴＲまたは非対称ＩＴＲ対が存在し得ることは、当業者によって理解されるであろう。ＩＴＲは、ＡＡＶ　ＩＴＲもしくは非ＡＡＶ　ＩＴＲであり得るか、またはＡＡＶ　ＩＴＲもしくは非ＡＡＶ　ＩＴＲに由来し得る。例えば、ＩＴＲは、パルボウイルスおよびディペンドウイルス（例えば、イヌパルボウイルス、ウシパルボウイルス、マウスパルボウイルス、ブタパルボウイルス、ヒトパルボウイルスＢ－１９）を包含するパルボウイルス科に由来し得るか、またはＳＶ４０複製の起源として役立つＳＶ４０ヘアピンは、切断、置換、欠失、挿入、および／もしくは付加によってさらに修飾され得る、ＩＴＲとして使用され得る。Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅファ

ミリーウイルスは、脊椎動物に感染するＰａｒｖｏｖｉｒｉｎａｅおよび無脊椎動物に感染するＤｅｎｓｏｖｉｒｉｎａｅの２つのサブファミリーで構成されている。ディペンドパルボウイルスは、ヒト、霊長類、ウシ、イヌ、ウマ、ヒツジ種を含むが、これらに限定されない脊椎動物宿主における複製が可能である、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）のウイルスファミリーを含む。本明細書では便宜上、ｃｅＤＮＡベクター中の発現カセットに対して５’（その上流）に位置するＩＴＲは、「５’ＩＴＲ」または「左ＩＴＲ」と称され、ｃｅＤＮＡベクター中の発現カセットに対して３’（その下流）に位置するＩＴＲは、「３’ＩＴＲ」または「右ＩＴＲ」と称される。

【００８７】

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

【００８８】

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

【００８９】

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

【００９０】

本明細書で使用される場合、本明細書において「非対称ＩＴＲ対」とも呼ばれる「非対称ＩＴＲ」という用語は、全長にわたって逆相補鎖ではない単一のｃｅＤＮＡゲノムまたはｃｅＤＮＡベクター内のＩＴＲの対を指す。２つのＩＴＲ間の配列の相違は、ヌクレオチド付加、欠失、切断、または点突然変異に起因し得る。一実施形態では、対の一方のＩＴＲは、野生型ＡＡＶ配列であり得、他方は、非野生型または合成配列であり得る。別の実施形態では、対のどちらのＩＴＲも野生型ＡＡＶ配列ではなく、２つのＩＴＲは、互いに配列が異なる。本明細書では便宜上、ｃｅＤＮＡベクター中の発現カセットに対して５’（その上流）に位置するＩＴＲは、「５’ＩＴＲ」または「左ＩＴＲ」と称され、ｃｅＤＮＡベクター中の発現カセットに対して３’（その下流）に位置するＩＴＲは、「３’ＩＴＲ」または「右ＩＴＲ」と称される。非限定的な一例として、非対称ＩＴＲ対は、そ

れらの３次元構造が、幾何学的空間において異なる形状であるように、それらの同族ＩＴＲに対して対称の３次元空間構成を有しない。言い換えると、非対称のＩＴＲ対は、全体的な幾何学的構造が異なり、すなわち、３次元空間でのそれらのＡ、Ｃ－Ｃ’、およびＢ－Ｂ’ループの構成が異なる（例えば、同族ＩＴＲと比較して、１つのＩＴＲは、短いＣ－Ｃ’アームおよび／または短いＢ－Ｂ’ループを有し得る）。２つのＩＴＲ間の配列の相違は、１つ以上のヌクレオチド付加、欠失、切断、または点突然変異に起因し得る。一実施形態では、非対称ＩＴＲ対の一方のＩＴＲは、野生型ＡＡＶ　ＩＴＲ配列であり得、他方のＩＴＲは、本明細書で定義される修飾型ＩＴＲ（例えば、非野生型または合成ＩＴＲ配列）であり得る。別の実施形態では、非対称ＩＴＲ対のどちらのＩＴＲも野生型ＡＡＶ配列ではなく、２つのＩＴＲは、幾何学的空間において異なる形状（すなわち、異なる全体的な幾何学的構造）を有する修飾型ＩＴＲである。いくつかの実施形態では、非対称ＩＴＲ対の一方のｍｏｄ－ＩＴＲは、短いＣ－Ｃ’アームを有することができ、他のＩＴＲは、それらが同族の非対称ｍｏｄ－ＩＴＲと比較して、異なる３次元空間構成を有するように異なる修飾（例えば、単一アーム、または短いＢ－Ｂ’アーム等）を有し得る。

【００９１】

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

【００９２】

本明細書で使用される場合、「実質的に対称の修飾型ＩＴＲ」または「実質的に対称のｍｏｄ－ＩＴＲ対」という用語は、両方がそれらの全長にわたって逆相補配列を有する単一のｃｅＤＮＡゲノムまたはｃｅＤＮＡベクター内の修飾型ＩＴＲの対を指す。例えば、修飾型ＩＴＲは、変化が特性および全体的な形状に影響を及ぼさない限り、逆相補配列から逸脱するいくつかのヌクレオチド配列がある場合でも、実質的に対称とみなすことができる。非限定的な一例として、配列は、正準配列に対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性（デフォルト設定でＢＬＡＳＴを使用して測定される）を有し、またそれらの３次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、それらの同族の修飾型ＩＴＲに対して対称の３次元空間構成を有する。言い換えると、実質的に対称の修飾型ＩＴＲ対は、３次元空間に構成された同じＡ、Ｃ－Ｃ’、およびＢ－Ｂ’ループを有する。いくつかの実施形態では、ｍｏｄ－ＩＴＲ対からのＩＴＲは、異なる逆相補鎖ヌクレオチド配列を有し得るが、依然として同じ対称の３次元空間構成を有し得る。すなわち、両方のＩＴＲは、同じ全体的な３次元形状をもたらす突然変異を有する。例えば、ｍｏｄ－ＩＴＲ対の１つのＩＴＲ（例えば、５’ＩＴＲ）は、１つの血清型に由来し得、他方のＩＴＲ（例えば、３’ＩＴＲ）は、異なる血清型に由来し得るが、両方が同じ対応する突然変異を有し得（例えば、５’ＩＴＲがＣ領域に欠失を有する場合、異なる血清型の同族の修飾型３’ＩＴＲは、Ｃ’領域の対応する位置に欠失を有する）、それにより修飾型ＩＴＲ対が同じ対称の３次元空間構成を有する。そのような実施形態では、修飾型ＩＴＲ対の各ＩＴＲは、ＡＡＶ２およびＡＡＶ６の組み合わせなどの異なる血清型（例えば、ＡＡＶ１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、および１２）に由来し得、１つのＩＴＲの修飾は、異なる血清型の同族のＩＴＲの対応する位置に反映される。一実施形態では、実質的に対称の修飾型ＩＴＲ対は、ＩＴＲ間のヌクレオチド配列の相違が特性または全体的な形状に影響を与えず、それらが３次元空間で実質的に同じ形状を有する限り、一対の修飾型ＩＴＲ（ｍｏｄ－ＩＴＲ）を指す。非限定的な例として、ｍｏｄ－ＩＴＲは、ＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅ

ｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ）またはデフォルト設定のＢＬＡＳＴＮなどの当該該技術分野において周知の標準的な手段によって決定される、正準ｍｏｄ－ＩＴＲに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有し、またそれらの３次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、対称の３次元空間構成を有する。実質的に対称のｍｏｄ－ＩＴＲ対は、３次元空間で同じＡ、Ｃ－Ｃ’およびＢ－Ｂ’ループを有する。例えば、実質的に対称のｍｏｄ－ＩＴＲ対の修飾型ＩＴＲがＣ－Ｃ’アームの欠失を有する場合、同族のｍｏｄ－ＩＴＲは、Ｃ－Ｃ’ループの対応する欠失を有し、またその同族のｍｏｄ－ＩＴＲの幾何学的空間に同じ形状の残りのＡおよびＢ－Ｂ’ループの同様の３次元構造を有する。

【００９３】

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

【００９４】

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

【００９５】

本明細書で使用される場合、「ｃｅＤＮＡスペーサー領域」という用語は、ｃｅＤＮＡベクターまたはｃｅＤＮＡゲノム中の機能的エレメントを分離する介在配列を指す。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡスペーサー領域は、最適機能性のための所望の処理で２つの機能的エレメントを保持する。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡスペーサー領域は、例えば、プラスミドまたはバキュロウイルス内のｃｅＤＮＡゲノムの遺伝的安定性を提供する、または増大させる。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡスペーサー領域は、クローニング部位等に便利な位置を提供することによって、ｃｅＤＮＡゲノムの容易な遺伝子操作を促進する。例えば、ある特定の態様では、いくつかの制限エンドヌクレアーゼ部位を含有するオリゴヌクレオチド「ポリリンカー」、または既知のタンパク質（例えば、転写因子）結合部位を有しないように設計された非オープンリーディングフレーム配列をｃｅＤＮＡゲノム中に位置付けて、シス作用性因子を分離することができ、例えば、末端分解部位と、上流転写調節エレメントとの間に６ｍｅｒ、１２ｍｅｒ、１８ｍｅｒ、２４ｍｅｒ、４８ｍｅｒ、８６ｍｅｒ、１７６ｍｅｒ等を挿入する。同様に、スペーサーを、ポリアデニル化シグナル配列と３’末端分解部位との間に組み込むことができる。

【００９６】

本明細書で使用される場合、「Ｒｅｐ結合部位」、「Ｒｅｐ結合エレメント」、「ＲＢＥ」、および「ＲＢＳ」は、交換可能に使用され、Ｒｅｐタンパク質（例えば、ＡＡＶ　Ｒｅｐ７８またはＡＡＶ　Ｒｅｐ６８）の結合部位を指し、Ｒｅｐタンパク質による結合時に、Ｒｅｐタンパク質が、ＲＢＳを組み込む配列上でその部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を実行できるようにする。ＲＢＳ配列およびその逆相補鎖は、一緒に単一ＲＢＳを形成する。ＲＢＳ配列は、当該技術分野において既知であり、例えば、ＡＡＶ２において特定されたＲＢＳ配列である５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０）を含む。任意の既知のＲＢＳ配列は、他の既知のＡＡＶ　ＲＢＳ配列および他の天然に既知のまたは合成ＲＢＳ配列を含む、本発明の実施形態において使用され得る。理論に束縛されるものではないが、Ｒｅｐタンパク質のヌクレアーゼドメインは、二重鎖ヌクレオチド配列ＧＣＴＣに結合し、したがって２つの既知のＡＡＶ　Ｒｅｐタンパク質は、二重鎖オリゴヌクレオチド、５’－（ＧＣＧＣ）（ＧＣＴＣ）（ＧＣＴＣ）（ＧＣＴＣ）－３’（配列番号６０）に直接結合し、安定に集成すると考えられる。加えて、可溶性凝

集配座異性体（すなわち、不定数の相互関連Ｒｅｐタンパク質）は解離し、Ｒｅｐ結合部位を含有するオリゴヌクレオチドに結合する。各Ｒｅｐタンパク質は、各鎖上の窒素塩基およびホスホジエステル骨格の両方と相互作用する。窒素塩基との相互作用は、配列特異性を提供するが、ホスホジエステル骨格との相互作用は、非配列特異性または低配列特異性であり、タンパク質－ＤＮＡ複合体を安定させる。

【００９７】

本明細書で使用される場合、「末端分解部位」および「ＴＲＳ」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、Ｒｅｐが、細胞ＤＮＡポリメラーゼ、例えばＤＮＡ　ｐｏｌ　δまたはＤＮＡ　ｐｏｌ　εを介してＤＮＡ伸長の基質として役立つ３’ＯＨを生成する５’チミジンとのチロシン－ホスホジエステル結合を形成する領域を指す。代替として、Ｒｅｐ－チミジン複合体は、配位ライゲーション反応に関与し得る。いくつかの実施形態では、ＴＲＳは、最小限で非塩基対チミジンを包含する。いくつかの実施形態では、ＴＲＳのニッキング効率は、ＲＢＳからの同じ分子内のその距離によって少なくとも部分的に制御され得る。受容体基質が相補的ＩＴＲであるとき、得られる産生物は、分子間二重鎖である。ＴＲＳ配列は、当該技術分野において既知であり、例えば、ＡＡＶ２において特定されたヘキサヌクレオチド配列である５’－ＧＧＴＴＧＡ－３’（配列番号６１）を含む。他の既知のＡＡＶ　ＴＲＳ配列、ＡＧＴＴ（配列番号６２）、ＧＧＴＴＧＧ（配列番号６３）、ＡＧＴＴＧＧ（配列番号６４）、ＡＧＴＴＧＡ（配列番号６５）などの他の天然に既知のまたは合成ＴＲＳ配列、およびＲＲＴＴＲＲ（配列番号６６）などの他のモチーフを含む、任意の既知のＴＲＳ配列を、本発明の実施形態において使用することができる。

【００９８】

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

【００９９】

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

【０１００】

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

【０１０１】

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

【０１０２】

本明細書で使用される場合、「閉端ＤＮＡベクター」という用語は、少なくとも１つの共有結合性閉端を有し、ベクターの少なくとも一部が分子内二重鎖構造を有する、カプシド不含ＤＮＡベクターを指す。

【０１０３】

本明細書で使用される場合、「ｃｅＤＮＡベクター」および「ｃｅＤＮＡ」という用語は、交換可能に使用され、少なくとも１つの末端パリンドロームを含む閉端ＤＮＡベクターを指す。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡは、２つの共有結合性閉端を含む。

【０１０４】

本明細書で定義されるように、「レポーター」は、検出可能な読み出しを提供するために使用することができるタンパク質を指す。レポーターは、一般に、蛍光、色、または発光などの測定可能なシグナルを産生する。レポータータンパク質コード配列は、細胞また

は生物中の存在が容易に観察されるタンパク質をコードする。例えば、蛍光タンパク質は、特定波長の光で励起されたときに細胞を蛍光させ、ルシフェラーゼは、細胞に光を生成する反応を触媒させ、β－ガラクトシダーゼなどの酵素は、基質を着色産生物に変換する。実験または診断目的のために有用な例示的なレポーターポリペプチドとしては、β－ラクタマーゼ、β－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、アルカリンホスファターゼ（ＡＰ）、チミジンキナーゼ（ＴＫ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、および他の蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ルシフェラーゼ、ならびに当該技術分野において周知の他のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０５】

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

【０１０６】

転写調節因子は、関心対象の遺伝子の転写を活性化または抑制する、転写アクチベーターおよびリプレッサーを指す。プロモーターは、特定の遺伝子の転写を開始する核酸の領域である。転写アクチベーターは、典型的に、転写プロモーターの近くに結合し、ＲＮＡポリメラーゼを動員して転写を直接開始する。リプレッサーは、転写プロモーターに結合し、ＲＮＡポリメラーゼによる転写開始を立体的に妨害する。他の転写調節因子は、それらが結合する場所、ならびに細胞条件および環境条件に応じて、アクチベーターまたはリプレッサーのいずれかとして役立ち得る。転写調節因子クラスの非限定例としては、ホメオドメインタンパク質、亜鉛フィンガータンパク質、翼状らせん（フォークヘッド）タンパク質、およびロイシンージッパータンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０７】

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

【０１０８】

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

【０１０９】

本明細書で使用される場合、「入力剤反応性ドメイン」は、条件または入力剤に結合するか、またはそうでなければ連結ＤＮＡ結合融合ドメインをその条件もしくは入力の存在

に対して反応性にするように、条件または入力剤に反応する転写因子のドメインである。一実施形態では、条件または入力の存在は、入力剤反応性ドメインまたはそれが融合するタンパク質の立体構造変化をもたらし、それが転写因子の転写調節活性を修飾する。

【０１１０】

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

【０１１１】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、タンパク質またはＲＮＡをコードする異種標的遺伝子であり得る、核酸配列の転写を駆動することによって、別の核酸配列の発現を調節する任意の核酸配列を指す。プロモーターは、構成的、誘導性、抑制性、組織特異性、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。プロモーターは、核酸配列の残りの転写の開始および速度が制御される、核酸配列の制御領域である。プロモーターはまた、ＲＮＡポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節タンパク質および分子が結合し得る、遺伝子エレメントを含有し得る。本明細書に記載される態様のいくつかの実施形態では、プロモーターは、プロモーター自体の発現を調節する転写因子、または本明細書に記載される合成生体回路の別のモジュール構成要素で使用される別のプロモーターの転写因子の発現を駆動することができる。プロモーター配列内では、転写開始部位、ならびにＲＮＡポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメインが見出されるであろう。真核生物プロモーターは、必ずしもそうではないが、多くの場合、「ＴＡＴＡ」ボックスおよび「ＣＡＴ」ボックスを含有する。誘導性プロモーターを含む様々なプロモーターを使用して、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクター中の導入遺伝子の発現を駆動することができる。プロモーター配列は、その３’末端で転写開始部位によって結合され、バックグラウンドより上で検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基または要素を含むように上流（５’配向）に伸びる。

【０１１２】

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

【０１１３】

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

【０１１４】

プロモーターは、所与の遺伝子または配列のコードセグメントおよび／またはエクソン

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

【０１１５】

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

【０１１６】

本明細書に記載される場合、「誘導性プロモーター」は、誘導因子または誘導剤の存在下、それによって影響されるとき、またはそれによって接触されるときに、転写活性を開始または強化することによって特徴付けられるものである。本明細書に定義される場合、「誘導因子」または「誘導剤」は、内因性であり得るか、または誘導性プロモーターからの転写活性を誘導することにおいて活性であるような方法で投与される、通常は外因性の化合物またはタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、誘導因子または誘導剤、すなわち、化学物質、化合物、またはタンパク質は、それ自体が核酸配列の転写または発現の結果であり得（すなわち、誘導因子は、別の構成成分またはモジュールによって発現される誘導因子タンパク質であり得る）、それ自体が誘導性プロモーターの制御下であり得る。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、リプレッサーなどのある特定の薬剤の非存在下で誘導される。誘導性プロモーターの例としては、テトラサイクリン、メタロチオニン、エクジソン、哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、およびマウス乳腺腫瘍ウイルス長末端反復（ＭＭＴＶ－ＬＴＲ））、ならびに他のステロイド反応性プロモーター、ラパマイシン反応性プロモーター等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１７】

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

【０１１８】

「操作可能に連結された」という用語は、そのように記載された構成成分が、それらが意図された方法で機能することを許可する関係にある並列を指す。例えば、プロモーターがその転写または発現に影響を与える場合、プロモーターは、コード配列に操作可能に連結されている。「発現カセット」は、ｃｅＤＮＡベクターにおける導入遺伝子の転写を指示するのに十分なプロモーターまたは他の調節配列に操作可能に連結されている異種ＤＮ

Ａ配列を含む。好適なプロモーターには、例えば、組織特異的プロモーターが含まれる。プロモーターは、ＡＡＶ起源でもあり得る。

【０１１９】

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

【０１２０】

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

【０１２１】

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

【０１２２】

「配列同一性」という用語は、２つのヌクレオチド配列間の関連性を指す。本開示の目的のために、２つのデオキシリボヌクレオチド配列間の配列同一性の程度は、ＥＭＢＯＳＳパッケージのＮｅｅｄｌｅプログラム（ＥＭＢＯＳＳ：Ｔｈｅ Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｏｐｅｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｓｕｉｔｅ，Ｒｉｃ

ｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，上記）、好ましくはバージョン３．０．０以降において実装されるように、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，上記）を使用して決定される。使用される任意のパラメーターは、ギャップオープンペナルティ１０、ギャップ拡張ペナルティ０．５、およびＥＤＮＡＦＵＬＬ（ＮＣＢＩ　ＮＵＣ４．４のＥＭＢＯＳＳバージョン）置換マトリックスである。「最長同一性」とラベル付けされたＮｅｅｄｌｅの出力（－ｎｏｂｒｉｅｆオプションを使用して取得される）は、同一性パーセントとして使用され、次のように計算される：（同一のデオキシリボヌクレオチド×１００）／アラインメントの長さ－アラインメントにおけるギャップの総数）。アラインメントの長さは、好ましくは少なくとも１０ヌクレオチド、好ましくは少なくとも２５ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも５０ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも１００ヌクレオチドである。

【０１２３】

本明細書で使用される「相同性」または「相同」という用語は、必要に応じて配列を整列させ、ギャップを導入して最大の配列同一性パーセントを達成した後、標的染色体上の対応する配列のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基のパーセンテージとして定義される。ヌクレオチド配列相同性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、ＣｌｕｓｔａｌＷ２、またはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当該技術の範囲内である様々な方法で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメーターを決定することができる。いくつかの実施形態では、例えば相同性アームの核酸配列（例えば、ＤＮＡ配列）は、配列が、宿主細胞の対応する未変性または未編集の核酸配列（例えば、ゲノム配列）と少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％以上同一である場合、「相同」とみなされる。

【０１２４】

本明細書で使用される「異種」という用語は、それぞれ天然の核酸またはタンパク質には見られないヌクレオチドまたはポリペプチド配列を意味する。異種核酸配列は、天然に存在する核酸配列（またはその変異体）に（例えば、遺伝子操作によって）連結されて、キメラポリペプチドをコードするキメラヌクレオチド配列を生成し得る。異種核酸配列は、変異体ポリペプチドに（例えば、遺伝子操作によって）連結されて、融合変異体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を生成し得る。

【０１２５】

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

【０１２６】

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

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

【０１２７】

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

【０１２８】

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

【０１２９】

本明細書で使用される「バイオマーカー」という用語は、対象または試料の状態（例えば、疾患）または状態のステータス（例えば、病態）を特定するために使用できる任意のアッセイ可能な特徴または組成物を意味する。バイオマーカーは、本明細書に開示されるいくつかの実施例では、その発現特徴を用いて、対象または試料における状態または状態のステータスを特定することができる遺伝子であり得る。他の実施例では、バイオマーカーは、遺伝子産物であり得る。いくつかの実施形態では、「バイオマーカー」という用語は、個人において内因的に発現されるか、または個人からの生体試料において見出されるもしくは隔離されるポリペプチドを指す。

【０１３０】

「遺伝子産物」とは、転写物（例えば、ｍＲＮＡ）、核酸（例えば、ｍｉＲＮＡ）、またはタンパク質を意味する。したがって、本明細書では、その存在、不在、または相対量を使用して、対象または試料の状態または状態のステータスを特定することができるバイオマーカーが開示される。特定の一実施例では、バイオマーカーは、対象におけるその存在または不在が、特定の神経変性疾患を有するもしくは有しない、疾患（例えば、神経変性疾患）を発症する特定のリスクを有する、または特定の疾患段階にある対象に特徴的である遺伝子産物であり得る。さらに別の実施例では、バイオマーカーは、その増加または減少が、特定の病態、疾患を発症する特定のリスク、または特定の疾患段階を示す遺伝子産物であり得る。別の実施例では、バイオマーカーは、その存在または不在は、特定の疾患を有するもしくは有しない、疾患を発症する特定のリスクを有する、または特定の疾患段階にある対象を示す様々な遺伝子産物の群であり得る。さらなる実施例では、バイオマーカーは、その発現の増加および減少のパターンが、特定の疾患またはその欠如を特徴付

ける遺伝子産物の群であり得る。なおもさらに、バイオマーカーは、その発現パターンが、疾患の存在もしくは不在、または疾患の特定の予後もしくは転帰に特徴的である遺伝子産物または遺伝子産物の群であり得る。本明細書で使用される場合、バイオマーカーは、他の臨床試験の代理となり得る。本明細書で特定されたバイオマーカーを測定して、レベル、発現、活性を決定するか、または変異体を検出することができる。発現または活性のレベルを検出することについて論じるときに全体を通して使用されるように、これは、所与のバイオマーカーの変異体を反映する可能性があることが理解される。変異体には、アミノ酸または核酸変異体または翻訳後修飾変異体が含まれる。

【０１３１】

本明細書で使用される「生体試料」という用語は、対象からの細胞もしくは細胞の集団、またはある量の組織もしくは体液を指す。ほとんどの場合、試料は対象から取り除かれているが、「生体試料」という用語は、インビボで、すなわち対象から取り除かずに分析された細胞または組織も指し得る。多くの場合、「生体試料」には、対象からの細胞が含まれるが、この用語はまた、遺伝子発現またはタンパク質発現のレベルを測定するために使用することができる、血液、唾液、または尿の非細胞画分などの非細胞生体物質を指し得る。生体試料には、組織生検、掻爬（例えば、バッカル掻爬）、全血、血漿、血清、尿、唾液、細胞培養物、または脳脊髄液が含まれるが、これらに限定されない。生体試料にはまた、組織生検、細胞培養物も含まれる。生体試料または組織試料は、例えば、血液、血漿、血清、腫瘍生検、尿、便、痰、脊髄液、胸膜液、乳頭吸引液、リンパ液、皮膚の外部切片、呼吸器、腸管、および尿生殖路、涙、唾液、乳、細胞（血液細胞を含むがこれらに限定されない）、腫瘍、器官を含むがこれらに限定されない、個人から単離された組織または体液の試料、およびインビトロ細胞培養構築物の試料も指し得る。いくつかの実施形態では、試料は、原発性もしくは転移性腫瘍の切除、気管支鏡生検、もしくはコア針生検、または胸膜液からの細胞ブロックからのものである。さらに、細針吸引試料が使用される。試料は、パラフィン包埋または凍結組織のいずれかであり得る。試料は、対象から細胞の試料を取り除くことによって取得され得るが、以前に単離された細胞（例えば、別の人によって単離された）を使用することによって、またはインビボでｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子発現レベルの分析を実施することによって達成することもできる。生体試料はまた、例えば、血液、血漿、血清、腫瘍生検、尿、便、痰、脊髄液、胸膜液、乳頭吸引液、リンパ液、皮膚の外部切片、呼吸器、腸管、および尿生殖路、涙、唾液、乳、細胞（血液細胞を含むがこれらに限定されない）、腫瘍、器官を含むがこれらに限定されない、個人から単離された組織または体液の試料、およびインビトロ細胞培養構築物の試料も指し得る。いくつかの実施形態では、生体試料を調製することができ、例えば、生体試料は、新鮮、固定、凍結され得るか、またはパラフィン包埋され得る。

【０１３２】

本明細書で使用される「血液試料」または「血液」という用語は、全血、血清、または血漿を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、全血試料は、血清または血漿試料にさらに処理される。この用語はまた、上述の試料の混合物も含む。

【０１３３】

本明細書で使用される「阻害剤」という用語は、タンパク質の生物学的活性の阻害をもたらす任意の薬剤または実体を指す。遺伝子の活性レベルの文脈で使用される「減少」または「阻害」とは、細胞、細胞抽出物、または細胞上清におけるタンパク質または核酸レベルまたは生物活性の低減を指す。例えば、そのような阻害は、その内因性リガンドへのポリペプチドの結合の低下、または標的リガンド等の触媒活性または親和性を低減するためのポリペプチドへの阻害剤の非相補的結合、あるいは代替としてＲＮＡ安定性、転写、もしくは翻訳の低減、タンパク質分解の増加、またはＲＮＡ干渉に起因し得る。好ましくは、減少は、制御条件下での発現または活性のレベルの少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、またはさらに少なくとも約９０％である。本明細書で使用される「阻害する」という用語は、トポイソメラーゼＩタンパク質またはその変異体の活性の阻害に関連するた

め、発現および／または活性の完全な阻害を必ずしも意味しない。むしろ、タンパク質、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドの発現または活性は、所望の効果を生み出すのに十分な程度および／または時間で阻害される。

【０１３４】

「より低い」、「低減した」、「低減」、または「減少する」または「阻害する」という用語はすべて、本明細書では一般に、統計的に有意な量の減少を意味するために使用される。しかしながら、疑問を避けるために、「より低い」、「低減した」、「低減」または「減少する」または「阻害する」は、標準レベルと比較して少なくとも１０％の減少、例えば少なくとも約２０％の減少、もしくは少なくとも約３０％、もしくは少なくとも約４０％、もしくは少なくとも約５０％、もしくは少なくとも約６０％、もしくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％、もしくは１００％までの減少（すなわち、標準試料と比較して存在しないレベル）、または標準レベルと比較して１０～１００％の任意の減少を意味する。

【０１３５】

「増加した」、「増加する」、または「強化する」、または「より高い」という用語はすべて、本明細書で使用され、一般に静的に有意な量の増加を意味し、疑問を避けるために、「増加した」、「増加する」、または「強化する」、または「より高い」という用語は、標準レベルと比較して少なくとも１０％の増加、例えば少なくとも約２０％の増加、もしくは少なくとも約３０％、もしくは少なくとも約４０％、もしくは少なくとも約５０％、もしくは少なくとも約６０％、もしくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％、もしくは１００％までの増加、あるいは標準レベルと比較して１０～１００％の任意の増加、あるいは標準レベルと比較して少なくとも約２倍、もしくは少なくとも約３倍、もしくは少なくとも約４倍、もしくは少なくとも約５倍、もしくは少なくとも約１０倍の増加、または２倍～１０倍以上の任意の増加を意味する。

【０１３６】

遺伝子またはタンパク質の発現または活性の「増加」とは、細胞、細胞抽出物、または細胞上清におけるタンパク質またはポリペプチドまたは核酸のレベルまたは活性の正の変化を意味する。例えば、そのような増加は、ＲＮＡ安定性、転写、もしくは翻訳の増加、またはタンパク質分解の減少に起因し得る。好ましくは、この増加は、制御条件下での発現または活性のレベルよりも少なくとも５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約１００％、少なくとも約２００％、またはさらには約５００％である。

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

【０１４０】

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

【０１４１】
本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が別途明らかに示さない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「方法」に対する言及は、本明細書に記載される、および／または本開示等を読むことにより当業者に明らかとなるであろうタイプの１つ以上の方法、および／またはステップを含む。同様に、「または」という語は、文脈が別途明らかに示されない限り、「および」を含むことが意図される。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料を、本開示の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料は、下記で説明される。省略形「例えば（ｅ．ｇ．）」は、ラテン語のｅｘｅｍｐｌｉ　ｇｒａｔｉａに由来し、本明細書では非限定例を示すように使用される。したがって、省略形「例えば（ｅ．ｇ．）」は、「例えば（ｆｏｒ　ｅｘａｍｐｌｅ）」と同義である。

【０１４２】
作動例または別途示される場合を除いて、本明細書で使用される成分または反応条件の量を表すすべての数は、すべての場合において「約」という用語によって修飾されるものとして理解されたい。パーセンテージに関連して使用される「約」という用語は、±１％を意味する場合がある。本発明は、以下の実施例によってさらに詳細に説明されるが、本発明の範囲は、それに限定されてはならない。

【０１４３】
本明細書に開示される本発明の代替要素または実施形態のグループ化は、限定として解釈されるべきではない。各グループのメンバーは、個別に、またはグループの他のメンバーまたは本明細書で見られる他の要素との任意の組み合わせで参照および主張することができる。グループの１つ以上のメンバーは、利便性および／または特許性の理由から、グループに含める、またはグループから削除することができる。そのような任意の包含または削除が発生した場合、本明細書では、明細書が修正されたグループを含むとみなされ、したがって添付の特許請求の範囲で使用されているすべてのマーカッシュグループの記述を満たす。

【０１４４】
いずれかの態様のいくつかの実施形態では、本明細書に記載される開示は、人間のクローン化プロセス、人間の生殖細胞系列の遺伝的同一性を修正するプロセス、産業もしくは商業目的でのヒト胚の使用、または人もしくは動物にいかなる実質的な医学的利益ももたらすことなく苦しみを引き起こす可能性が高い動物、およびそのようなプロセスから生じる動物の遺伝的同一性を修正するためのプロセスに関係しない。

【０１４５】
本明細書では、本発明の様々な態様の説明内で他の用語が定義されている。

【０１４６】
文献参照、発行済み特許、公開済みの特許出願、および係属中の特許出願を含む、本出願を通して引用されるすべての特許および他の出版物は、例えば、本明細書に記載される技術に関連して使用され得るそのような刊行物に記載される方法論を説明および開示する目的で、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。これらの出版物は、本出願の出願日より前のそれらの開示のためにのみ提供されている。この点に関するいかなるものも、発明者が先行発明のおかげで、またはいかなる他の理由のためにもそのような開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。日付に関するすべての記述またはこれらの文書の内容に関する表現は、出願人が入手できる情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確さに関するいかなる承認も構成するものではない。

【０１４７】
本開示の実施形態の説明は、網羅的であること、または本開示を開示された正確な形態に限定することを意図したものではない。本開示の特定の実施形態および実施例が、例示の目的で本明細書で説明されているが、当業者が認識するように、本開示の範囲内で様々

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

【０１４８】

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

【０１４９】

本明細書に記載される技術は、以下の実施例によってさらに説明されており、決してこれらをさらに限定するものと解釈されるべきではない。本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、および試薬等に限定されず、そのようなものとして変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、単に特許請求の範囲によって定義される、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【０１５０】

Ｉ．ｃｅＤＮＡベクターを使用した導入遺伝子の制御された発現のための方法

本明細書では、（ｉ）所定の期間にわたる導入遺伝子の持続的発現レベル（すなわち、導入遺伝子発現レベルを維持する）、または（ｉｉ）用量依存的な様式での導入遺伝子の発現レベルを増加させるかのいずれかを可能にする、インビボまたはインビトロでのｃｅＤＮＡベクターの投与の方法が説明され、この方法は、ｃｅＤＮＡベクターの少なくとも１回（例えば、１回以上）の後続の投与（例えば、「ブースター」または「再用量」投与）を含む。

【０１５１】

したがって、本明細書に記載される技術は、インビボでのｃｅＤＮＡベクターの投与に関し、導入遺伝子発現のレベルは、所望のレベルで持続されるか、または１回以上の後続の投与（例えば、ブースター投与、または再用量）でレベルが増加される。本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、インビトロおよびインビボでの前のレベルからの導入遺伝子発現のレベルの増加を可能にする。導入遺伝子のレベルの増加は、初回投与後の任意の時点での少なくとも１回の再投与（本明細書では「再用量」とも称される）により、所望のレベル以上であり得るか、または発現レベルを所望の発現範囲内に増加させることができる。場合によっては、所望の増加は、最終用量が以前に所望されたレベル、例えば持続用量レベルへの復帰であるように、それらのレベルの天然に存在する減少を修正することである。本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターのそのような再用量投与または反復投与が、導入遺伝子発現のレベルを増加させるために使用され得ることは、ｃｅＤＮＡベクターが、宿主免疫反応を誘発するカプシドを有しないために可能であり（例えば、ベクターは非免疫原性特性を有する）、したがって既存のＡＡＶベクター技術に比べて重要な利点があり、前のＡＡＶ曝露による、または例えば初回ＡＡＶベクター投与による宿主の免疫反応またはＡＡＶ免疫に起因して、再用量は不可能である。したがって、ｒＡＡＶベクターを使用して高レベルの発現を達成するには、典型的には、初回の高用量が必要であり、免疫反応の問題に起因して、再用量は不可能であり、かつ／または効果的でない。対照的に、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターの１回以上の再用量投与

は、導入遺伝子の発現レベルを増加させるため、例えば、発現のレベルを所望の発現レベルに、または所望の閾値レベルを超えて、または所望の発現レベルの範囲内で増加させるために投与することができる。

【０１５２】

したがって、本発明は、（ｉ）導入遺伝子発現のレベルを、１つ以上の時点でのｃｅＤＮＡベクターの再投与によって、所定の時間にわたって所望のレベルで維持もしくは持続させる、（ｉｉ）１つ以上の時点でのｃｅＤＮＡベクターの再投与によって、導入遺伝子発現レベルを増加させる、または（ｉｉｉ）用量依存的な様式でのｃｅＤＮＡベクターの投与による用量依存的導入遺伝子発現（すなわち、導入遺伝子のタイトレーション可能な発現）のうちのいずれかのための、制御された導入遺伝子発現のための方法およびｃｅＤＮＡベクターに関する。本明細書で論じられるように、ｃＤＮＡベクターは、ｃｅＤＮＡベクターを対象に複数回、例えば、短期間（例えば、数ヶ月）にわたって、または長期間（例えば、数年以上）にわたって投与して、導入遺伝子の発現を制御可能にすることができ、それにより対象のニーズに合わせて遺伝子療法をカスタマイズまたは調整することができるという点で、他のウイルスベクターと比較して独特である。

【０１５３】

Ａ．導入遺伝子からの増加したまたは用量依存的に制御された発現

（ｉ）制御された導入遺伝子発現：ｃｅＤＮＡベクターの再投与による持続的な導入遺伝子発現

本明細書に記載される技術の一態様は、細胞における導入遺伝子の発現レベルを維持または持続させるための方法における、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターの使用に関し、この方法は、（ａ）第１の時点で、プライミング用量のｃｅＤＮＡベクターを細胞に投与して、導入遺伝子の発現を達成することと、（ｂ）第１の時点でのｃｅＤＮＡベクター投与後、第２の時点で、ある用量のｃｅＤＮＡベクターを細胞に投与して、導入遺伝子の発現レベルの任意の減少を補償することと、を含む。

【０１５４】

図６に示すように、ｃｅＤＮＡによって発現された導入遺伝子の発現レベルは、少なくとも４２日間、または少なくとも６０日間、または少なくとも８０日間にわたって達成および持続（すなわち、維持）され得、（例えば、時間０での）初回プライミング投与後の第２の時点以降の後続の時点での再用量投与により必要な所定の発現レベルに増加させることができる。図６はまた、ｃｅＤＮＡによって発現される導入遺伝子の発現レベルが、少なくとも４２日間、または少なくとも６０日間にわたって達成および持続され得、（例えば、時間０での）初回プライミング投与後の第２の時点以降の後続の時点で、既定量のｃｅＤＮＡベクターを含む再用量投与により用量依存的に増加され得ることを実証する。

【０１５５】

導入遺伝子の発現は、典型的には、再用量後約７～２０日以内に起こり、第２の用量の投与後（すなわち、第２もしくは後続の時点での再用量もしくは投与）、少なくとも約３０日、または約６０日、または約９０日、または約１２０日、または１２０日以上にわたって、再用量投与後からの導入遺伝子の発現レベルを維持する（すなわち、持続的発現である）。

【０１５６】

本明細書に記載される技術の別の態様は、対象における疾患を治療するための方法、または代替的に、対象における制御された導入遺伝子発現のための方法に関し、この方法は、（ａ）第１の時点で、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを含むプライミング用量の組成物を対象に投与して、第１のレベル（または第１の量）での導入遺伝子の発現を達成することと、（ｂ）第２の時点で、ある用量または量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与して、導入遺伝子の発現レベルを所望の持続的発現レベルで維持することと、を含み、持続的発現レベルは、第１の時点でのｃｅＤＮＡベクターの初回（すなわち、プライミング）投与のみが与えられた場合に達成された導入遺伝子発現のレベルと比較して、より高い発現レベルであり、それにより対象における疾患を治療する。

【０１５７】
したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターを再投与して（本明細書では「再用量」とも称される）、所望の導入遺伝子発現レベルを維持することができ、ｃｅＤＮＡベクターは、プロモーターに操作可能に連結された導入遺伝子ポリヌクレオチド配列に隣接する２つのＩＴＲ配列（例えば、本明細書に記載される対称ＩＴＲまたは非対象ＩＴＲ対）を含む。
【０１５８】
いくつかの実施形態では、細胞における導入遺伝子の発現レベルを持続させるための方法におけるｃｅＤＮＡベクターの使用は、少なくとも４２日間にわたって所望の発現レベルで導入遺伝子を発現する。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、少なくとも８４日間にわたって所望の発現レベルで導入遺伝子を発現する。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、少なくとも１３２日間にわたって所望の発現レベルで導入遺伝子を発現する。単なる例示の目的で、実施例１に開示される方法によって産生されたｃｅＤＮＡベクターは、ＣＤ－１　ＩＧＳマウスのマウスモデルにおける導入遺伝子の発現レベルを、他の方法によって産生され、同じマウスモデルにおいて試験された同様の閉端ＤＮＡベクターと比較して、投与後７～２８日目からより高いレベルで持続させることができる。
【０１５９】
いくつかの実施形態では、増加した導入遺伝子発現は、用量依存的でないか、または完全に用量依存的でないが、導入遺伝子の発現の増加が、典型的に、再用量投与後７～２０日以内に起こり、第２の用量の投与（すなわち、第２の時点またはそれ以降の時点での再用量または投与）後、少なくとも約３０日、または少なくとも約６０日、または少なくとも約９０日、または少なくとも約１２０日、または約１２０日以上にわたって、再用量から増加した導入遺伝子の発現のレベルを維持するという点で持続的発現である。
【０１６０】
本明細書に開示される所与のｃｅＤＮＡベクターまたは組成物の特定の用量反応関係は、例えば、実施例６に記載されているものを含む、当業者に周知の手段によって決定され得る。本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、所望の発現レベルを達成するために必要とされる初回投与後１つ以上の時点での追加用量のｃｅＤＮＡベクターの投与によってタイトレーションすることができる。導入遺伝子の発現レベルを所望のレベルまたはその付近でタイトレーションするために、１、２、３、４、５、または６回以上の反復投与を投与することができる。典型的には、各反復投与は、以前の投与からの導入遺伝子の発現の減少が観察されるおよそ７日前に投与される。実際に、反復投与は、導入遺伝子の発現レベルを所望のレベルにタイトレーションするのに役立つか、または言い換えると、反復投与は、導入遺伝子の発現レベルを所望の発現レベル範囲内に、例えば、疾患もしくは障害を治療するために治療的である所望の範囲で、または組成物の治療濃度域内で維持することを可能にする。
【０１６１】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを使用して、インビボでの導入遺伝子発現のレベルを調整することができ、発現のレベルは、前のレベル（ここで、前のレベルは、前のプライミングまたは再用量投与後のレベルである）から所望の発現レベルまで、または所望の発現レベル範囲内、またはインビボでの所望の閾値レベルを超えて増加し、増加した発現レベルは、ｃｅＤＮＡベクターの再用量投与後約３０～６０日、または約４０～７０日、または約５０～８０日、または約６０～９０日、または約７０～１００日、または約８０～１１０日、または約４０～１２０日、または１２０日以上持続または維持される。
【０１６２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法において、例えば、細胞における導入遺伝子の発現を持続させるため、および／または疾患を有する対象を治療するための方法において使用されるｃｅＤＮＡベクターは、薬学的に許容される担体および／または

賦形剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、第２の時点で投与され、第１の時点後少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月、または６～１２ヶ月、または１～２年、または２～３年である。

【０１６３】

（ｉｉ）制御された導入遺伝子発現：ｃｅＤＮＡベクターの再投与により遺伝子発現を増加させる

発現レベルが経時的に低下した場合に導入遺伝子発現のレベルを単に増加させる（例えば、所望の所定レベルで導入遺伝子発現を継続または維持する）ためのｃｅＤＮＡベクターの再用量投与に加えて、いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターの再投与の方法および組成物は、用量依存的な様式で導入遺伝子のレベルを増加させることができ、すなわち、規定量のｃｅＤＮＡベクターの再用量投与は、導入遺伝子の発現レベルの規定された増加をもたらし得る。言い換えると、単なる例示の目的で任意の単位を使用して、再用量投与における１単位用量のｃｅＤＮＡは、前のレベルから導入遺伝子発現のレベルの１０％増加を達成し、２単位用量のｃＤＮＡベクターは、前のレベルから導入遺伝子のレベルの２０％増加を達成し、０．５単位用量のｃｅＤＮＡは、前のレベルから導入遺伝子の発現レベルの５％増加を達成する。

【０１６４】

したがって、一実施形態では、制御された導入遺伝子発現のための本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、制御された様式で細胞または対象における導入遺伝子の発現レベルを増加させるために使用することができる。例えば、導入遺伝子の発現レベルは、ｃｅＤＮＡベクターの１回以上の後続の投与（例えば、再用量またはブースター投与）で増加させることができる。

【０１６５】

本明細書に記載されるようなｃｅＤＮＡベクターは、初回プライミング投与後の１つ以上の時点でのｃｅＤＮＡの用量依存的または濃度依存的な再用量投与により、導入遺伝子の発現レベルをインビボで既定量だけ増加させるのを可能にする。いくつかの実施形態では、既定量の導入遺伝子発現の増加は、所望の閾値（または所定のレベル）以上、または所望の発現レベル範囲内の導入遺伝子発現レベルをインビボでもたらすことができ、所望の閾値または所望の発現レベル範囲は、前の投与（すなわち、初回プライミング投与もしくは前の再用量投与）の導入遺伝子発現レベルを超える。

【０１６６】

図６は、対象が再用量（すなわち、再投与またはブースター）のｃｅＤＮＡベクターをインビボで投与された後、導入遺伝子の発現レベルを容易に増加させることができることを示す。特に、図６は、対象がインビボでの再用量投与において異なる濃度のｃｅＤＮＡベクターを投与された後の導入遺伝子の発現レベルの異なる増加を示す。特に、３ｍｇ／ｍＬのｃｅＤＮＡの再用量濃度は、導入遺伝子の発現の７倍増加を達成し、１０ｍｇ／ｋｇのｃｅＤＮＡの再用量濃度は、用量依存的再用量投与なしの発現レベルと比較して、導入遺伝子の発現の１７倍増加をもたらした。したがって、本明細書に記載される技術は、インビボでの対象へのｃｅＤＮＡの少なくとも２回の投与に関し、２回目または後続の投与は、導入遺伝子の発現レベルを所望の量だけ用量依存的に増加させ、いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターの前の投与で、または用量依存的再用量投与なしで達成される導入遺伝子の発現レベルと比較して、所望の発現レベル範囲、または所望の発現レベル、または閾値発現レベルを達成する。すなわち、導入遺伝子の発現レベルの増加は、１回以上の用量依存的再用量投与によって達成されて、導入遺伝子の発現レベルを制御された様式で増加させる、すなわち、再用量投与におけるｃｅＤＮＡの用量（または量）に基づいて、導入遺伝子の発現をタイトレーションする。

【０１６７】

言い換えると、本明細書に開示される用量依存的再用量投与は、導入遺伝子発現レベルを増加させる。導入遺伝子発現の増加は、用量依存的であり、持続可能な発現である、す

なわち、より高いレベルでの導入遺伝子の発現（用量依存的再用量投与に起因する）は、規定の期間にわたって維持されるか、または減少しないか、または再用量投与なしで観察される発現レベルを下回らない。

【０１６８】

典型的には、各用量依存的再用量は、導入遺伝子の発現の所望の増加が望まれるおよそ７日前に投与される。実際に、用量依存的再投与は、導入遺伝子の発現レベルを所望のレベル、もしくは所望の発現レベル範囲にタイトレーションするのに役立つか、または言い換えると、用量依存的再用量は、導入遺伝子の発現レベルを、前の発現レベルを超える既定量だけ増加させるのを可能にし、その増加は、少なくとも１回の用量依存的再用量投与におけるもの、または代替として、２回以上の用量依存的再用量投与による増分的増加におけるものであり得、それにより所望の発現レベル範囲内、例えば、疾患もしくは障害を治療するために治療的である所望の範囲で発現される導入遺伝子は、制御されたタイトレーション様式で増加される。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、所望の範囲の発現レベル、または所望の発現レベルの導入遺伝子は、疾患の症状を効果的に治療または低減するための治療有効量の導入遺伝子であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、そのような治療有効量の導入遺伝子を達成するために、本明細書に記載される１回以上の再用量投与を使用して導入遺伝子の発現レベルを増加させて、レベルを導入遺伝子の治療有効量まで増分的に増加させることができる。したがって、いくつかの実施形態では、低い発現レベル（すなわち、治療有効量以下）で導入遺伝子を発現するプライミング用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与することができ、１回以上の再用量投与を、ある期間にわたって対象に投与して、所望の治療効果が達成されるまで、発現レベルを増加させることができる。そのような戦略により、対象の身体を発現された導入遺伝子のレベルに調整することを可能にし、効果的に、導入遺伝子の発現レベルを増分でタイトレーションまたは調整して（この場合は増加させる）、所望の治療目標または効果に到達し、かつ／または導入遺伝子の過剰発現に起因する過剰投薬および／もしくは副作用を予防するのを可能にする。代替として、いくつかの実施形態では、対象が幼児または子供である場合に所望の発現レベル、典型的には低い発現レベルで導入遺伝子を発現するプライミング用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与することができ、治療効果が維持されるように、対象が成長して発現レベルを増加させるにつれて、１回以上の用量依存的再用量投与を、ある期間にわたって対象に投与することができる。

【０１７０】

Ｂ．再投与におけるｃｅＤＮＡベクターのタイミングおよび量

本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現レベルは、初回投与後１回以上のｃｅＤＮＡベクターの再投与（すなわち、再用量）によって、前のレベル（０日目の前のプライミング投与または前の再用量から達成された発現レベル）から増加させることができる。典型的には、発現レベルを所望のレベルまたは所望の発現レベル範囲に増加させるための再用量投与は、発現の増加が所望される約７日前、または７日以上前に投与される。例示的な実施例として、導入遺伝子発現レベルの増加が、前の投与（すなわち、プライミングまたは前の再用量投与）の約３０日後に望まれる場合、再用量を２８日以前に与えることができる。同様に、導入遺伝子発現の増加が、前の投与（すなわち、プライミングまたは前の再用量投与）の約９０日（または約３ヶ月）後に望まれる場合、９０日またはその付近で導入遺伝子の発現レベルを所望のレベルまたは所望の発現レベル範囲内に増加させるために、再用量を約８３日または８４日以前に投与することができ、所望のレベルまたは所望の発現レベル範囲は、前の投与で達成された導入遺伝子発現レベルを超える。

【０１７１】

本明細書で論じられるように、本明細書に記載される方法およびｃｅＤＮＡベクターは、個別化された遺伝医学アプローチ、すなわち、再用量投与で段階的な様式で導入遺伝子発現のレベルをタイトレーションするのを可能にして、発現レベルを増分的に増加させる

ため、導入遺伝子の発現レベルを、前の投与またはこの再用量投与の前に達成された発現レベルよりも高い所望のレベル、または所望の発現レベル範囲に増加させるために、１、２、３、４、５、もしくは６、または６以上の再用量が、経時的に投与され得ることが想定される。各再用量投与による導入遺伝子の発現レベルの増分的増加は同じであり得る、すなわち、各再用量投与は、導入遺伝子の発現レベルを前の発現レベルから約１０％増加させ得るか、または異なり得る、すなわち、１回目の再用量投与は、前の発現レベルから約１０％発現を増加させることができ、２回目の再用量投与は、前の発現レベルから約２０％発現を増加させることができる。典型的には、各再用量は、導入遺伝子の発現の所望の増加が望まれるおよそ７日前に投与される。実際に、再用量は、導入遺伝子の発現レベルを所望のレベル、もしくは所望の発現レベル範囲にタイトレーションするのに役立つか、または言い換えると、再用量は、導入遺伝子の発現レベルを、前の発現レベルよりも増加させるのを可能にし、その増加は、所望の発現レベル範囲内であるレベルで、例えば、疾患または障害を治療するために治療的である所望の範囲で導入遺伝子が発現されるように、１回以上の再用量投与で増分的であり得る。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子発現レベルを増加させるための再用量は、ｃｅＤＮＡ組成物の前の投与（例えば、０日目の初回プライミング投与もしくは前の再用量投与）後、少なくとも約２０日、または少なくとも約３０日、または少なくとも約４０日、または少なくとも約５０日、または少なくとも約６０日、または約６０～９０日、または約９０～１２０日、または約１２０～１５０日である。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術は、インビボでの導入遺伝子発現を増加させるためのｃｅＤＮＡの再用量に関し、導入遺伝子の発現は、ｃｅＤＮＡ組成物の１つ以上の再用量（すなわち、再投与またはブースター投与）によって増加させることができる。いくつかの実施形態では、第２または後続の時点での再用量投与におけるｃｅＤＮＡベクターの用量（または量）は、この再用量投与前または先行する投与（０日目の初回プライミング投与もしくは前の再用量投与）におけるｃｅＤＮＡの用量（すなわち、量）と同じまたは異なる量である。一例として、第１の時点で投与されるｃｅＤＮＡの量が、１ｍｇ／ｋｇである場合、第２または後続の時点での再用量投与の量は、１ｍｇ／ｋｇ、または１ｍｇ／ｋｇ未満、または１ｍｇ／ｋｇ以上であり得る。いくつかの実施形態では、再用量は、約２ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約１０ｍｇ／ｋｇ、または約２～５ｍｇ／ｋｇ、または５～１０ｍｇ／ｋｇ、または１０～１５ｍｇ／ｋｇ、または１５ｍｇ／ｋｇ以上のうちのいずれかから選択される量であり得る。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、１回以上の再用量投与（すなわち、導入遺伝子発現レベルを増分的に増加させるための連続再用量投与）によって導入遺伝子の発現レベルを増加させるために、各再用量投与は、同じであり得る、すなわち、各再用量投与は、導入遺伝子の発現レベルを、前の発現レベルから約１０％増加させ得るか、または異なり得る、すなわち、１回目の再用量投与は、前の発現レベルから約１０％発現を増加させることができ、２回目の再用量投与は、前の発現レベルから約２０％発現を増加させることができる。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、２つ以上の再用量が投与される場合、各再用量投与による導入遺伝子の発現レベルの増加量は同じであり得る、すなわち、投与される各再用量は、導入遺伝子の発現レベルを前の発現レベルから約１０％増加させ得るか、または異なり得る、すなわち、１回目の再用量投与は、前の発現レベルから約１０％発現を増加させることができ、２回目の再用量投与は、前の発現レベルから約２０％発現を増加させることができる。いくつかの実施形態では、２つ以上の再用量が投与される場合、各再用量投与による導入遺伝子の発現レベルの増加量は、同じであり得る、すなわち、投与される各再用量は、導入遺伝子の発現レベルを、前の発現レベルから約１倍、もしくは２倍、もしくは３

倍等だけ増加させることができるか、または異なり得る、すなわち、１回目の再用量投与は、前の発現レベルから約２倍発現を増加させることができ、２回目の再用量投与は、前の発現レベルから約６倍、または初回プライミング投与から達成された発現レベルから約６倍発現を増加させることができる。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、２回目または任意の後続投与（例えば、再用量投与）で細胞または対象に投与されるものと同じ、プライム投与（すなわち、時間０での１回目の投与）で投与されるｃｅＤＮＡベクターである。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、同じｃｅＤＮＡベクターであり得る。単なる例示の目的で、ウイルスベクター、例えばＡＡＶベクターの再投与は、通常、以前に投与されたものとは異なる血清型である。対照的に、再投与におけるｃｅＤＮＡベクターは、以前に投与されたｃｅＤＮＡベクターと同じである、すなわち、ｃｅＤＮＡベクターは、同じＡＡＶの血清型を複数回投与することと同等になるように変更されていない。

【０１７７】

それでもやはり、再投与される同じｃｅＤＮＡベクター血清型と同等であるが、いくつかの実施形態では、初回プライム投与後の２回目または任意の後続の投与（例えば、再用量投与）で投与されるｃｅＤＮＡベクターは、異なる、例えば、異なるＩＴＲ対、導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーター、異なる導入遺伝子、または修飾された導入遺伝子などである。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は同じであるか、または修飾された導入遺伝子であり得る。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターの１回目の投与（すなわち、プライミング投与）と再用量投与（すなわち、第２の時点またはその後の任意の後続の時点、例えば、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、第１０等）との間の間隔は、前の投与（すなわち、プライミング用量もしくは前の再用量投与）後、少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または少なくとも８０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約２～３ヶ月、または約３～６ヶ月、または約６～１２ヶ月、または約１年、または１～２年、または約２年、または２～３年、または約３年、または３～４年、または約５年、または５～６年、または５～１０年、または１０～２０年等であり得る。本明細書で論じられるように、一実施形態では、導入遺伝子の発現レベルを増加させるための再用量投与は、発現の増加が望まれる約７日前、または７日以上（例えば、８～１０日、もしくは１４日）前に投与される。

【０１７９】

単なる例示の目的で、０日目の初回投与におけるｃｅＤＮＡベクターの量が、任意の単位１に設定されている場合、第２、第３、第４、第５、第６の時点での再用量投与におけるｃｅＤＮＡベクターの量は、０日目の初回投与におけるｃｅＤＮＡベクターの量よりも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、または１５～２０倍、または２０～５０倍超（もしくはそれ以上）のうちのいずれかから選択され得る。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、０日目の初回投与におけるｃｅＤＮＡベクターの量が、任意の単位１倍で示される発現のレベルをもたらし、第２、第３、第４、第５、第６の時点での再用量投与におけるｃｅＤＮＡベクターの量は、０日目におけるｃｅＤＮＡベクターの初回投与からの導入遺伝子発現のレベルと比較して、少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、または１５～２０倍、または２０～５０倍超（もしくはそれ以上）の導入遺伝子の発現レベルの増加をもたらす、ｃｅＤＮＡベクターの量であり得る。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、再用量は、０日目におけるｃｅＤＮＡの初回投与と同じ様式または同じ投与経路で投与される。いくつかの実施形態では、再用量は、０日目における

ｃｅＤＮＡの初回投与と異なる様式または異なる投与経路で投与される。いくつかの実施形態では、初回投与（すなわち、時間０でのプライム投与）の後に１回以上の再用量（すなわち、ブースター投与）が続く場合、投与は、静脈内投与、鼻腔内もしくは筋肉内投与、またはｃｅＤＮＡベクターを含む組成物の任意の他の医学的に適切な投与経路によるものであり得る。

【０１８２】

本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、第１の時点（例えば、初回投与、例えば０日目）、および必要または望ましい場合は第１の時点後の時点で対象に投与することができる。本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターを第２の時点で投与して、導入遺伝子のレベルを所望のレベル（例えば、有効性の閾値を超える）または所望の発現レベル範囲内（例えば、組成物の治療濃度域内）でタイトレーションすることができる。本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターの２つ以上の用量が、対象に投与され得ることが想定され、例えば、反復投与は、第２の時点、第３の時点、第４の時点等のうちのいずれか１つ以上で付与され得る。所望の導入遺伝子発現のレベルを維持する（すなわち、同じ導入遺伝子発現のレベルを維持または持続させる）ために、追加の用量が投与され得ることが包含される。１回目と２回目、または任意の２つの連続する再用量の間の間隔は、同じである必要はない。

【０１８３】

Ｃ．所定の導入遺伝子発現レベル

いくつかの実施形態では、所望の導入遺伝子発現レベル（所望の発現レベルの範囲もしくは導入遺伝子の所望の発現レベル範囲とも称される）は、疾患の症状を効果的に治療または低減するための治療有効量の導入遺伝子であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、そのような治療有効量の導入遺伝子を達成するために、本明細書に記載されるような１回以上の再用量投与を使用して、本明細書に開示されるように、導入遺伝子の発現レベルを維持し、かつ／または導入遺伝子の発現レベルを増加させて、レベルを導入遺伝子の治療有効量まで増分的に増加させることができる。したがって、いくつかの実施形態では、所望の発現レベルで、典型的には、低い発現レベル（すなわち、治療有効量以下）で導入遺伝子を発現するプライミング用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与することができ、１回以上の用量依存的再用量投与を、ある期間にわたって対象に投与して、所望の治療効果が達成されるまで、発現レベルを増加させることができる。そのような戦略により、対象の身体を発現された導入遺伝子のレベルに調整することを可能にし、効果的に、少なくとも１回またはそれ以上の用量依存的再用量投与で（すなわち、少なくとも２つ以上の増分で）導入遺伝子の発現レベルをタイトレーションまたは調整して（この場合は増加させる）、所望の治療目標または効果に到達し、かつ／または導入遺伝子の過剰発現に起因する過剰投薬および／もしくは副作用を予防するのを可能にする。代替として、いくつかの実施形態では、対象が幼児または子供である場合に所望の発現レベル、典型的には低い発現レベルで導入遺伝子を発現するプライミング用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与することができ、治療効果が維持されるように、対象が成長して発現レベルを増加させるにつれて、１回以上の用量依存的再用量投与を、ある期間にわたって対象に投与することができる。同様に、いくつかの実施形態では、対象において所望の発現レベルで導入遺伝子を発現するプライミング用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与することができ、治療効果が維持されるように、対象が体重増加等して発現レベルを増加させるにつれて、１回以上の用量依存的再用量投与を、ある期間にわたって対象に投与することができる。

【０１８４】

すなわち、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、第１の時点（例えば、初回投与、例えば、０日目）で対象に投与され、第１の時点後の時点で、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子の発現レベルを所定の導入遺伝子発現レベル（例えば、所望のレベルまたは所望の発現レベル範囲内）に増加させ、所定の導入遺伝子発現レベルは、再用量投与前の導入遺伝子の発現レベルを超える。いくつかの実施形態では、所定の導入遺伝子発現レベルは、必ずしも導入遺伝子の治療的有効量ではないが

、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターの２つ以上の用量依存的再用量を、第２の時点、第３の時点、第４の時点等のうちのいずれか１つ以上で対象に投与できることが想定され、導入遺伝子は、所定の導入遺伝子発現レベルまで増加する。用量依存的再用量を投与して、再用量投与におけるｃｅＤＮＡの用量に依存する既定量だけ導入遺伝子の発現レベルを増加させることができ、いくつかの実施形態では、それを使用して、導入遺伝子の治療有効量である発現レベルを達成するために段階的な様式で発現レベルを増加させることができる（例えば、所望の治療効果をもたらすか、または疾患もしくは障害の１つ以上の症状を低減するレベルである）。

【０１８５】

再用量投与は導入遺伝子の発現の用量依存的増加をもたらすが、いくつかの実施形態では、再用量投与の効果は相乗的である、すなわち、導入遺伝子発現の増加は、単回投与の合計よりも大きい。例えば、図６で実証されるように、再用量投与でのｃｅＤＮＡベクターの量の３倍の増加は、３倍を超える導入遺伝子発現の増加をもたらし、再用量投与におけるｃｅＤＮＡベクターの量の１０倍の増加は、導入遺伝子発現の１０倍を超える増加をもたらした。

【０１８６】

本明細書に記載される特定の実施形態では、初回投与（すなわち、第１の時点、すなわち、０日目）についてｃｅＤＮＡの用量反応曲線で低い用量を選択すること、および任意に、第２、第３、第４等の投与における１回以上の用量依存的再用量投与により、用量（すなわち、導入遺伝子発現のレベル）を増分で増加させて、治療効果を誘導する一方で、組成物に対する有害な副作用または不耐性の発症も予防することが望ましい場合がある。一実施形態では、所与のｃｅＤＮＡベクターの用量反応関係を使用して、組成物の治療ウィンドウの境界内に十分にある所与の疾患の効果的な治療のための最適用量を決定および／または推定する。すなわち、（例えば、０日目での）初回プライミング投与を使用した本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターの用量のタイトレーションおよび後続の時点での再用量投与の増分用量依存的増加を達成して、発現された導入遺伝子の治療効果を最大化する一方で、副作用または望ましくない毒性を最小限に抑えることができる。

【０１８７】

インビボおよび／またはインビトロアッセイを任意に用いて、所定の導入遺伝子発現レベルを達成するための再投与におけるｃｅＤＮＡベクターの最適な投与量範囲を特定するのを助けることができる。（例えば、時間０での）初回プライミング投与におけるｃｅＤＮＡベクターの正確な用量およびその後の各再投与はまた、投与経路および病態の重症度に依存し、当業者の判断および各対象の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から推定され得る。

【０１８８】

制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、所望の組織の細胞をトランスフェクトし、過度の副作用なしに十分なレベルの導入遺伝子発現をもたらすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路としては、「投与」セクションで上述されるもの、例えば選択された器官への直接送達（例えば、肝臓への門脈内送達）、経口、吸入（鼻腔内および気管内送達を含む）、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、および他の非経口投与経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与経路は、所望の場合、組み合わせることができる。

【０１８９】

特定の「治療効果」を達成するために必要な制御された導入遺伝子発現のための初回プライミング投与抗（例えば、時間０）およびその後の各再投与におけるｃｅＤＮＡベクターの量の用量は、核酸投与の経路、治療効果を達成するために必要な遺伝子またはＲＮＡ発現のレベル、治療される特定の疾患または障害、および遺伝子（複数可）、ＲＮＡ産物（複数可）、または得られる発現タンパク質（複数可）の安定性を含むが、これらに限定されないいくつかの因子に基づいて変化する。当業者は、前述の因子ならびに当該技術分野において周知の他の因子に基づいて、特定疾患または障害を有する患者を治療するため

のｃｅＤＮＡベクター用量範囲を容易に判定することができる。

【０１９０】

最適な治療反応を提供するように、投与量レジームを調整することができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、繰り返し投与することができ、例えば、いくつかの用量が毎日投与され得るか、または治療状況の急迫によって示されるように、用量を比例的に低減することができる。当業者は、オリゴヌクレオチドが細胞に投与されるか、または対象に投与されるかにかかわらず、対象オリゴヌクレオチドの投与の適切な用量およびスケジュールを容易に判定することができる。

【０１９１】

「治療有効量」は、臨床治験を通じて判定され得る比較的広い範囲内に含まれ、特定の用途に依存する（神経細胞は、極少量を必要とするが、全身注入は、多量を必要とする）。例えば、ヒト対象の骨格筋または心筋への直接インビボ注入の場合、治療有効量は、およそ約１μｇ～１００ｇのｃｅＤＮＡベクターとなる。ｃｅＤＮＡベクターを送達するためにエキソソームまたは微粒子が使用される場合、治療有効量は、経験的に判定され得るが、１μｇ～約１００ｇのベクターを送達することが予想される。さらに、治療有効量とは、疾患の１つ以上の症状の低減をもたらすが、著しいオフターゲットまたは著しい有害副作用には至らない、対象に影響を与えるのに十分な量の導入遺伝子を発現するｃｅＤＮＡベクターの量である。

【０１９２】

薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の配合は、様々な治療レジメンにおいて本明細書に記載される特定の組成物を使用するための好適な投与および治療レジメンの開発と同様に、当業者に周知である。

【０１９３】

インビトロトランスフェクションの場合、細胞（1×10^{6}細胞）に送達されるｃｅＤＮＡベクターの有効量は、およそ０．１～１００μｇのｃｅＤＮＡベクター、好ましくは１～２０μｇ、より好ましくは１～１５μｇまたは８～１０μｇとなる。より大きなｃｅＤＮＡベクターは、より多い用量を必要とする。エキソソームまたは微粒子が使用される場合、有効なインビトロ用量は、経験的に判定されるが、一般に同量のｃｅＤＮＡベクターを送達することが意図される。

【０１９４】

任意の特定の理論に束縛されるものではないが、本開示によって記載されるｃｅＤＮＡベクターの投与によって誘起される典型的な抗ウイルス免疫反応の欠失（すなわち、カプシド構成成分の非存在）は、複数の場合にｃｅＤＮＡベクターを宿主に投与できるようになる。いくつかの実施形態では、異種核酸が対象に送達される場合の数は、２～１０回の範囲内（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回）である。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、１０回より多く対象に送達される。

【０１９５】

特定の実施形態では、２回以上の投与（例えば、２、３、４回またはそれ以上の投与）を用いて、様々な間隔の期間にわたって（例えば、毎日、毎週、毎月、毎年等）、所望のレベルの遺伝子発現を達成することができる。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターによってコードされる導入遺伝子は、それが対象において少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも５時間、少なくとも１０時間、少なくとも１２時間、少なくとも１８時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、少なくとも４８時間、少なくとも７２時間、少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも１ヶ月、少なくとも２ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも１２ヶ月／１年、少なくとも２年、少なくとも５年、少なくとも１０年、少なくとも１５年、少なくとも２０年、少なくとも３０年、少なくとも４０年、少なくとも５０年以上にわたって発現されるように、調節スイッチ、誘導性または抑制性プロモーターによって調節され得る。一実施形態では、発現

は、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを所定のまたは所望の間隔で繰り返し投与することによって達成することができる。代替として、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターからの制御された発現は、遺伝子編集システム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ、ＴＡＬＥＮ、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ等）の構成成分をさらに含み、実質的に永久的な治療または疾患の「治癒」のための導入遺伝子をコードする１つ以上の核酸配列の挿入を可能にし得る。遺伝子編集構成成分を含むそのようなｃｅＤＮＡベクターは、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／６４２４２号に開示されており、導入遺伝子をコードする核酸を、限定されないが、アルブミン遺伝子またはＣＣＲ５遺伝子などのセーフハーバー領域に挿入するために、５′および３′相同性アーム（例えば、配列番号１５１～１５４、またはそれに対して少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％または、８０％の相同性を有する配列）を含み得る。

【０１９７】

治療の持続期間は、対象の臨床的進歩および治療への応答性に依存する。継続的で比較的低い維持用量は、初回のより高い治療用量の後に企図される。

【０１９８】

ＩＩ．個別化された遺伝子療法

本明細書で論じられるように、本明細書に記載される方法およびｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子発現レベルを各再用量投与である特定の量だけ増加させるために、再用量を使用して、例えば１回以上の再用量投与により段階的な様式で、個別化された遺伝医学アプローチ、すなわち、導入遺伝子発現のレベルの用量依存的タイトレーションを可能にする。そのようなものとして、再用量を使用して、導入遺伝子の発現レベルを増分でタイトレーションすることができる。したがって、いくつかの実施形態では、導入遺伝子の発現レベルを毎回既定量（すなわち、各再用量）だけ増加させるために、１、２、３、４、５、もしくは６、または６以上の用量依存的再用量を投与して、前の投与で、またはこの再用量投与の前に達成された発現レベルよりも高い、所望のレベルまたは所望の発現レベル範囲まで増加させることができる。

【０１９９】

ベクターの用量反応関係に基づいて、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを含む組成物の用量をタイトレーションする当業者の能力は、様々な方法で疾患の治療に有益である。少なくとも、効果の増加が望まれる場合（例えば、導入遺伝子の発現）、当業者は、ｃｅＤＮＡベクターの用量を増加させることができる。代替として、当業者は、ｃｅＤＮＡ組成物についての用量反応関係の事前知識に基づいて、治療的である発現レベルを達成することが知られている用量を選択することができる。いくつかの実施形態では、例えば、所与の疾患の重篤な症状を有する対象の治療を加速させるために、用量反応曲線で比較的高い用量を選択することが望ましい場合がある。対照的に、用量反応曲線で低い用量を選択すること、および任意に、用量を増分で増加させて治療効果を誘発する一方で、組成物に対する有害な副作用または不耐性の発症も予防することが一般に望ましい。一実施形態では、所与のｃｅＤＮＡベクターの用量反応関係を使用して、組成物の治療濃度域の境界内に十分にある所与の疾患の効果的な治療のための最適用量を決定および／または推定する。すなわち、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターの用量のタイトレーションは、発現された導入遺伝子の治療効果を最大化する一方で、副作用または望ましくない毒性も最小化する。

【０２００】

単なる例示的な実施例として、嚢胞性線維症を有する対象は、疾患の重症度が異なり、かつ／またはＣＦＴＲ１遺伝子の同じレベルの導入遺伝子発現に対して異なる反応を有し、かつ／または通常よりも低いまたは高い薬物クリアランスを有し得、したがって、ＣＦＴＲ１導入遺伝子を含むｃｅＤＮＡベクターの１回以上の再用量投与により、ＣＦＴＲ１導入遺伝子の発現を段階的な様式で増加させることによって、ＣＦＴＲ１導入遺伝子の発現レベルを増分ステップで、すなわち、その特定の対象における嚢胞性線維症疾患の１つ以上の症状を低減することにおいて有効な発現レベルまで増加させるのを可能にする。以

前は、そのような個別化されたアプローチ、または導入遺伝子の発現レベルを増加させるタイトレーション方法は、ＡＡＶベクターなどの他のウイルスベースのベクターに関連する免疫反応に起因して、効果的でなかった、および／または不可能であった。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、用量依存的再用量投与は、導入遺伝子発現のレベルの制御された増加を可能にし、したがって、本明細書に開示されるような方法および組成物は、遺伝子療法に対する個別化された医療アプローチを可能にする。単なる例示的な実施例として、嚢胞性線維症を有する対象は、疾患の重症度が異なり、かつ／またはＣＦＴＲ１遺伝子の同じレベルの導入遺伝子発現に対して異なる反応を有し、かつ／または通常よりも低いまたは高い薬物クリアランスを有し得、したがって、ＣＦＴＲ１導入遺伝子を含むｃｅＤＮＡベクターの１回以上の用量依存的再用量投与によるＣＦＴＲ１導入遺伝子の発現の制御された増加は、ＣＦＴＲ１導入遺伝子の発現レベルを制御された様式で増加させるのを可能にし、いくつかの実施形態では、制御された発現の増加は、その特定の対象における嚢胞性線維症疾患の１つ以上の症状を低減することにおいて有効な発現レベルまで増加させることができる。以前は、そのような個別化されたアプローチ、または導入遺伝子の発現レベルを用量依存的に増加させるタイトレーション方法は、他のウイルスまたはＡＡＶベースのベクターに関連する免疫反応に起因して、効果的でなかった、および／または不可能であった。

【０２０２】

本明細書で論じられるように、いくつかの実施形態では、対象は、ｃｅＤＮＡベクターの１回目の投与後の所定の時間に、例えば、タイトレーションの用量を決定するためのｃｅＤＮＡベクターの１回目の投与後、少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０日以上の任意の時点で評価される。例えば、いくつかの実施形態では、対象は、ｃｅＤＮＡベクターの１回目の投与後の対象の病態および／または対象においてｃｅＤＮＡベクターによって発現される導入遺伝子のレベルを決定するために評価される。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、病態の評価は、対象における疾患の少なくとも１つの症状の評価である。任意の所与の疾患の病態は、医師または当業者によって決定することができ、タンパク質バイオマーカー、ｍｉＲＮＡおよびｍＲＮＡバイオマーカー、ならびに他の分子プロファイリングシステムを含む、疾患の１つ以上の臨床症状および／またはバイオマーカーを評価することを含む。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、対象の病態の評価は、医師によって行われる観察（例えば、国際疾患分類からのコード、およびそのようなコードが決定された日付など）、臨床検査結果、Ｘ線、生検結果、患者の発言、および特定の疾患の診断を行うために医師が典型的に信頼する任意の他の医療情報などの患者の臨床的特徴と組み合わせた分子プロファイリングを使用して決定することができる。対象における分子プロファイリングに基づいて病態を決定する方法は、米国特許第７，１６７，７３４号、同第９，３７２，１９３号、同第９，３８３，３６５号、米国特許出願第２００６／０２２４１９１号、同第２０１１／０１７２５０１号、同第２００９／０１０４５９６号、同第２００９／００２３１４９号に開示されており、各々は参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法を使用して、特定の病態に対する個別化された医学的介入のために、対象に対してｃｅＤＮＡベクターをタイトレーションすることができる。

【０２０６】

様々なバイオマーカーの変化を調べると、バイオマーカーを取得した対象の状態に関する情報が得られる。バイオマーカーが疾患の進行とともにどのように変化するか（例えば、増加、減少、変化なし）を、単一の生体試料を単一の時点で測定することによって理解

することにより、検証（例えば、疾患もしくは疾患なし）、疾患分類、および病態の特徴付け（例えば、早期もしくは「発症」期に対して後期もしくは「回復」期）を可能にする。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、各バイオマーカーのレベルならびに経時的なそれらの傾向（増加、減少、または一定）に基づいて、発症または回復などの疾患進行の状態を評価するバイオマーカーを評価することができる。対象の病態のバイオマーカーのプロファイリングは、個人が健康であるか疾患状態にあるかを評価するために、呼吸中に天然に存在する安定同位体比（例えば、米国特許第５，９１２，１７８号）などの他の技法と組み合わせることもできる。病態は、バイオマーカーレベル、特に、病態に関連する生物学的経路内で相互に関連する複数のバイオマーカーの変化を測定することによって検出される。いくつかの実施形態では、特定の病態は、ＮＭＲスペクトルからの複雑な信号を検出および分析し、疾患が進行するにつれてそのレベルが変化しているバイオマーカーを決定することによって特徴付けることができる。この初期の病態評価は、疾患の進行に関連する動的な変化を「フィンガープリンティング」することを可能にし、疾患の進行およびプロセスの現状を評価するのに役立つ。病態が特定されると、ｃｅＤＮＡベクターの投与は、疾患の時間経過を短縮するように、対象に合わせて調整および／またはタイトレーションすることができる。

【０２０８】

いくつかの実施形態では、対象から得られた生体試料内のバイオマーカープロファイルを評価することによって、病態を評価することができる。測定される特定のバイオマーカーは、疾患の基礎となる主要な生化学的経路および関連する宿主免疫反応の分析から決定される。実施形態では、標準的なバイオマーカープロファイルは、健康な個人および疾患を有する個人から取得される。生体試料からのバイオマーカープロファイルを標準的なバイオマーカープロファイル（健康および疾患）と比較することで、病態を明確に特定することができる。任意に、バイオマーカープロファイルの傾向（例えば、どのバイオマーカーが第１の試料と第２の試料との間で変化しているか）を取得するために、第２の時点または疾患の進行時点で、第２の生体試料が患者から分離され、それにより病態または患者の状態に関するさらなる情報が提供される。いくつかの実施形態では、標準的なバイオマーカープロファイルは、以下の時間のうちの１つ以上で評価される。ｃｅＤＮＡベクターの１回目の投与前、ｃｅＤＮＡベクターの１回目の投与後、少なくとも３０日、もしくは少なくとも６０日、もしくは６０～９０日、もしくは９０日以上、またはｃｅＤＮＡベクターの２回目（例えば、再用量）の投与後、少なくとも３０日、もしくは少なくとも６０日、もしくは６０～９０日、もしくは９０日以上、またはｃｅＤＮＡベクターの任意の後続の投与（例えば、再用量投与）後、少なくとも３０日、もしくは少なくとも６０日、もしくは６０～９０日、もしくは９０日以上。

【０２０９】

タンパク質バイオマーカーは、糖尿病、アルツハイマー病、および癌について特定されている。（例えば、米国特許第７，１２５，６６３号、同第７，０９７，９８９号、同第７，０７４，５７６号、および同第６，９２５，３８９号を参照されたく、これらは、それら全体が本明細書に組み込まれる）。質量分析および抗体への特異的結合などのタンパク質バイオマーカーの検出のための方法を使用することもできる。マイクロアレイを使用したハイスループット発現分析法は、ｍＲＮＡバイオマーカー、ならびに集中アレイおよび複数の関連遺伝子のｑＰＣＲに使用して、ストレス関連遺伝子を特定することができる（例えば、ＷＯ２００７／１０６６８５Ａ２を参照）。ＤＮＡマイクロアレイは、患者の腫瘍試料における遺伝子発現を測定し、診断を容易にするために使用されている。遺伝子発現は、患者の癌の存在、そのタイプ、病期、および起源、ならびに遺伝子突然変異が関与しているかどうかを明らかにすることができる。遺伝子発現は、化学療法の有効性を予測することにも役割を果たす場合がある。最近の数十年にわたって、国立癌研究所（ＮＣＩ）は、６０のヒト癌細胞株の増殖を制限する効果について、化学療法剤を含む化合物を

試験してきた。ＮＣＩはまた、ＤＮＡマイクロアレイを使用して、これら６０の癌細胞株における遺伝子発現を測定した。様々な研究が、ＮＣＩデータセットを使用して、遺伝子発現と化合物効果との間の関係を調査している。癌を有する患者に有効な化学療法を見つけるための試行錯誤的アプローチにより、重要な時間が失われる場合が多い。さらに、癌細胞は、以前に有効であった治療法に対して耐性ができる場合が多い。そのような状況では、そのような耐性を早期に検出することによって、患者の転帰を大幅に改善することができる。

【０２１０】

いくつかの実施形態では、病態のバイオマーカー発現のレベルは、遺伝子（複数可）から転写されたｍＲＮＡのレベルを測定することによって、遺伝子（複数可）のタンパク質産物のレベルを検出することによって、または遺伝子（複数可）のタンパク質産物の生物活性のレベルを検出することによって決定される。いくつかの実施形態では、病態のバイオマーカー（ｍｉＲＮＡバイオマーカーを含む）のレベルは、定量的逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＲＴ－ＰＣＲ）を使用して測定される。遺伝子発現産物、例えばタンパク質レベルを測定するためのそのような方法には、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、ウェスタンブロット、および抗体またはタンパク質結合剤などの検出試薬を使用する免疫沈降、免疫蛍光が含まれる。代替として、標識された抗ペプチド抗体および他のタイプの検出剤を対象に導入することによって、対象においてペプチドを検出することができる。例えば、抗体は、対象におけるその存在および位置が標準的な撮像技法によって検出される放射性マーカーで標識することができる。

【０２１１】

ある特定の実施形態では、遺伝子発現産物は、疾患バイオマーカーのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）発現のレベルを測定することによって決定することができる。そのような分子は、全血または血漿、例えば多血小板血漿などの生体試料から単離、誘導、または増幅することができる。ｍＲＮＡ発現の検出は当業者に既知であり、例えば、限定されないが、ＰＣＲ手順、ＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロット分析、差次的遺伝子発現、ＲＮＡ保護アッセイ、マイクロアレイ分析、ハイブリダイゼーション法等を含む。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡのレベルは、定量的ＲＴ－ＰＣＲを使用して測定することができる。一般に、ＰＣＲ手順は、（ｉ）核酸試料またはライブラリー内の特定の遺伝子または配列へのプライマーの配列特異的ハイブリダイゼーション、（ｉｉ）熱安定性ＤＮＡポリメラーゼを使用した複数ラウンドのアニーリング、伸長、および変性を伴う後続の増幅、ならびに（ｉｉｉ）正しいサイズのバンドについてのＰＣＲ産物のスクリーニングで構成される、遺伝子増幅の方法を説明する。使用されるプライマーは、重合の開始をもたらすのに十分な長さおよび適切な配列のオリゴヌクレオチドである。すなわち、各プライマーは、増幅されるゲノム遺伝子座の鎖に相補的であるように特に設計される。代替実施形態では、本明細書に記載される遺伝子発現産物のｍＲＮＡレベルは、逆転写（ＲＴ）ＰＣＲおよび定量的ＲＴ－ＰＣＲ（ＱＲＴ－ＰＣＲ）またはリアルタイムＰＣＲ法によって決定することができる。ＲＴ－ＰＣＲおよびＱＲＴ－ＰＣＲの方法は、当該技術分野において周知である。

【０２１２】

いくつかの実施形態では、病態の１つ以上のバイオマーカー、またはｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現レベルを測定する方法は、免疫組織化学（ＩＨＣ）分析および／またはマイクロアレイ分析、比較ゲノムハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）マイクロアレイ、一塩基多型（ＳＮＰ）マイクロアレイ、蛍光ｉｎ－ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）、ｉｎ－ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）、およびプロテオミクスアレイのうちのいずれかから選択されるアッセイであり得る。

【０２１３】

本明細書で使用される「マイクロアレイ」という用語は、一度に１つ以上の対象オリゴヌクレオチド、例えば、ＤＮＡもしくはＲＮＡ、またはそれらの類似体を定量化する任意の方法によって用いられるデバイスを意味する。マイクロアレイの１つの例示的なクラス

は、ガラスまたは石英の表面に取り付けられたＤＮＡプローブからなる。多くのマイクロアレイ、例えば、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘによって作製されたものは、単一の遺伝子の発現を決定するためにいくつかのプローブを使用する。ＤＮＡマイクロアレイは、例えば、ＲＮＡに相補的な全長ｃＤＮＡまたはＲＮＡの一部にハイブリダイズするｃＤＮＡ断片であり得るオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。例示的なＲＮＡには、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、およびｍｉＲＮＡ前駆体が含まれる。例示的なマイクロアレイはまた、基質に結合した複数の核酸を有する「核酸マイクロアレイ」を含み、複数の結合した核酸の各々へのハイブリダイゼーションは、別々に検出可能である。基質は、中実または多孔性、平面または非平面、単一または分散であり得る。例示的な核酸マイクロアレイは、Ｓｃｈｅｎａ（ｅｄ．），ＤＮＡ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ Ｓｅｒｉｅｓ），Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９９）、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．２１（１）（ｓｕｐｐｌ．）：１－６０（１９９９）、およびＳｃｈｅｎａ（ｅｄ．），Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ Ｂｉｏｃｈｉｐ：Ｔｏｏｌｓ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｅａｔｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ／ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ Ｂｏｏｋｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ（２０００）においてそのように呼ばれるデバイスのすべてを含む。追加として、例示的な核酸マイクロアレイは、とりわけＢｒｅｎｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７（４）：１６６５－１６７０（２０００）に記載されているように、複数の核酸が、単一の平面基質上ではなく、複数のビーズ上に配置されている基質に結合した複数の核酸を含むことができる。核酸マイクロアレイの例は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第６，３９１，６２３号、同第６，３８３，７５４号、同第６，３８３，７４９号、同第６，３８０，３７７号、同第６，３７９，８９７号、同第６，３７６，１９１号、同第６，３７２，４３１号、同第６，３５１，７１２号、同第６，３４４，３１６号、同第６，３１６，１９３号、同第６，３１２，９０６号、同第６，３０９，８２８号、同第６，３０９，８２４号、同第６，３０６，６４３号、同第６，３００，０６３号、同第６，２８７，８５０号、同第６，２８４，４９７号、同第６，２８４，４６５号、同第６，２８０，９５４号、同第６，２６２，２１６号、同第６，２５１，６０１号、同第６，２４５，５１８号、同第６，２６３，２８７号、同第６，２５１，６０１号、同第６，２３８，８６６号、同第６，２２８，５７５号、同第６，２１４，５８７号、同第６，２０３，９８９号、同第６，１７１，７９７号、同第６，１０３，４７４号、同第６，０８３，７２６号、同第６，０５４，２７４号、同第６，０４０，１３８号、同第６，０８３，７２６号、同第６，００４，７５５号、同第６，００１，３０９号、同第５，９５８，３４２号、同第５，９５２，１８０号、同第５，９３６，７３１号、同第５，８４３，６５５号、同第５，８１４，４５４号、同第５，８３７，１９６号、同第５，４３６，３２７号、同第５，４１２，０８７号、および同第５，４０５，７８３号に見出すことができる。

【０２１４】

例示的なマイクロアレイはまた、基質に結合した複数のポリペプチドを有する「ペプチドマイクロアレイ」または「タンパク質マイクロアレイ」も含み得、オリゴヌクレオチド、ペプチド、またはタンパク質の、複数の結合ポリペプチドへの結合は、別々に検出可能である。代替として、ペプチドマイクロアレイは、特定のオリゴヌクレオチド、ペプチド、またはタンパク質の結合を特異的に検出することができる、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ファージディスプレイ結合剤、酵母２ハイブリッド結合剤、アプタマーを含むが、これらに限定されない複数の結合剤を有し得る。ペプチドアレイの例は、参照により本明細書に組み込まれる、国際特許公開第ＷＯ０２／３１４６３号、同第ＷＯ０２／２５２８８号、同第ＷＯ０１／９４９４６号、同第ＷＯ０１／８８１６２号、同第ＷＯ０１／６８６７１号、同第ＷＯ０１／５７２５９号、同第ＷＯ００／６１８０６号、同第ＷＯ００／５４０４６号、同第ＷＯ００／４７７７４号、同第ＷＯ９９／４０４３４号、同第ＷＯ９９／３９２１０号、および同第ＷＯ９７／４２５０７号、ならびに米国特許第６，２６８，２１０号、同第５，７６６，９６０号、および同第５，１４３，８５４号に

見出すことができる。

【０２１５】

いくつかの実施形態では、対象の病態が定常状態のままであるか、または改善されていない場合、または例えば、ｃｅＤＮＡベクターの１回目の投与の時点もしくはｃｅＤＮＡベクターの投与前の任意の時点での病態と比較して、病態が対象おいて低下した場合、対象は、第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを投与され、例えば、いくつかの実施形態では、投与されるｃｅＤＮＡベクターの量は、タイトレーションされた用量である。

【０２１６】

代替実施形態では、対象における導入遺伝子発現のレベルが所定のレベルから低下した、または治療有効量から低下した、例えば、ｃｅＤＮＡベクターの１回目の投与後に初期導入遺伝子発現レベルから低下した場合、対象は、第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを投与され、例えば、いくつかの実施形態では、投与されるｃｅＤＮＡベクターの量は、タイトレーションされた用量である。いくつかの実施形態では、導入遺伝子発現のレベルは、対象から得られた生体試料中のｃｅＤＮＡベクターから発現された導入遺伝子のレベルを測定する（例えば、タンパク質レベルおよび／またはｍＲＮＡレベルを測定する）ことによって決定される。いくつかの実施形態では、生体試料は、血液、血漿、滑液、ＣＳＦ、唾液、または組織生検試料のうちのいずれかから選択される。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターが、所望のタンパク質または治療遺伝子をコードする導入遺伝子に加えて、レポータータンパク質を発現する場合、導入遺伝子のレベルは、当業者に一般的に知られている方法を使用して、ｃｅＤＮＡベクターから発現されるレポータータンパク質のレベルをインビボで測定することによって決定することができる。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターのタイトレーションは、ｃｅＤＮＡベクターから発現される導入遺伝子のレベルを決定し、第２の用量のｃｅＤＮＡベクターを対象に投与して、導入遺伝子発現を所定の所望のレベルに調節または調整することである。

【０２１８】

ＩＩＩ．ｃｅＤＮＡベクター全般

本発明の実施形態は、本明細書で定義されるように、導入遺伝子を発現することができる、閉端直鎖状二本鎖（ｃｅＤＮＡ）ベクターを含む方法および組成物に基づく。本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターは、サイズによって制限されず、それにより、例えば、単一ベクターからの導入遺伝子の発現に必要なすべての構成成分の発現を可能にする。ｃｅＤＮＡベクターは、好ましくは、発現カセットなどの分子の少なくとも一部分にわたって二重鎖、例えば、自己相補的である（例えば、ｃｅＤＮＡは、二本鎖環状分子ではない）。ｃｅＤＮＡベクターは、共有結合性閉端を有し、したがって、例えば、１時間以上３７℃でエキソヌクレアーゼ消化（例えば、エキソヌクレアーゼＩまたはエキソヌクレアーゼＩＩＩ）に対して耐性である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、ｃｅＤＮＡベクターにおける導入遺伝子、例えば、遺伝医学導入遺伝子の発現が起こり得る核に転座される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子、例えば、２つのＩＴＲの間に位置する遺伝医学導入遺伝子の発現が起こり得る核に転座した。

【０２１９】

一般に、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、５’から３’方向に、第１のアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）逆位末端反復（ＩＴＲ）、関心対象のヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、および第２のＡＡＶ　ＩＴＲを含む。ＩＴＲ配列は、（ｉ）少なくとも１つのＷＴ　ＩＴＲおよび少なくとも１つの修飾されたＡＡＶ逆位末端反復（ｍｏｄ－ＩＴＲ）（例えば、非対称の修飾型ＩＴＲ）、（ｉｉ）ｍｏｄ－ＩＴＲ対が互いに対して異なる３次元空間構成を有する、２つの修飾型ＩＴＲ（例えば、非対称の修飾型ＩＴＲ）、または（ｉｉｉ）各ＷＴ－ＩＴＲが同じ３次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称のＷＴ－ＷＴ　ＩＴＲ対、または（ｉｖ）各ｍｏｄ－Ｉ

ＴＲが同じ３次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称の修飾型ＩＴＲ対のうちのいずれかから選択される。

【０２２０】

ｃｅＤＮＡベクターを含む方法および組成物が本明細書に包含され、限定されないが、リポソームナノ粒子送達系などの送達系をさらに含み得る。使用のために包含される非限定的な例示的リポソームナノ粒子系が、本明細書に開示されている。いくつかの態様では、本開示は、ｃｅＤＮＡおよびイオン化脂質を含む脂質ナノ粒子を提供する。例えば、プロセスにより得られたｃｅＤＮＡを用いて作製および負荷される脂質ナノ粒子製剤は、２０１８年９月７日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５００４２号に開示されており、本明細書に組み込まれる。

【０２２１】

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

【０２２２】

図１Ａ～１Ｅは、非限定的な例示的ｃｅＤＮＡベクターの概略図、または対応するｃｅＤＮＡプラスミドの配列を示す。ｃｅＤＮＡベクターはカプシドを含まず、第１のＩＴＲ、導入遺伝子を含む発現カセット、および第２のＩＴＲをこの順序でコードするプラスミドから得ることができる。発現カセットは、導入遺伝子の発現を可能にするおよび／または制御する１つ以上の調節配列を含み得、例えば、発現カセットは、エンハンサー／プロモーター、ＯＲＦレポーター（導入遺伝子）、転写後調節エレメント（例えば、ＷＰＲＥ）、ならびにポリアデニル化および終結シグナル（例えば、ＢＧＨポリＡ）のうちの１つ以上をこの順番で含み得る。

【０２２３】

発現カセットはまた、内部リボソームエントリー部位（ＩＲＥＳ）（例えば、配列番号１９０）および／または２Ａエレメントを含み得る。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、ｍｉｒ調節エレメント、転写後調節エレメント、組織および細胞型特異的プロモーター、ならびにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＩＴＲは、導入遺伝子のプロモーターとして作用し得る。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成分、例えば、本明細書において「調節スイッチ」と題するセクションに記載されている、導入遺伝子の発現を制御および調節するための調節スイッチを含み、所望される場合、ｃｅＤＮＡベクターを含む細胞の制御された細胞死を可能にするキルスイッチである調節スイッチを含み得る。

【０２２４】

発現カセットは、４０００ヌクレオチド超、５０００ヌクレオチド、１０，０００ヌクレオチド、もしくは２０，０００ヌクレオチド、もしくは３０，０００ヌクレオチド、もしくは４０，０００ヌクレオチド、または５０，０００ヌクレオチド、または約４０００～１０，０００ヌクレオチド、もしくは１０，０００～５０，０００ヌクレオチドの任意の範囲、または５０，０００ヌクレオチド超を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、５００～５０，０００ヌクレオチド長の範囲の導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、５００～７５，０００ヌクレオチド長の範囲の導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、５００～１０，０００ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、１０００～１０，０００ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、５００～５，０００ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。ｃｅＤＮＡベクターは、カプシド化ＡＡＶベクターのサイズ制限を有さず、したがって、大サイズの発現カセットの送達が効率的な導入遺伝子をもたら

すようにすることができる。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、原核細胞特異的メチル化を欠いている。

【０２２５】

ｃｅＤＮＡ発現カセットは、例えば、レシピエント対象において存在しない、不活性、もしくは不十分な活性であるタンパク質をコードする発現可能な外因性配列（例えば、オープンリーディングフレーム）もしくは導入遺伝子、または所望の生物学的もしくは治療的効果を有するタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。導入遺伝子は、欠陥遺伝子または転写産物の発現を訂正するように機能することができる遺伝子産物をコードすることができる。原則として、発現カセットは、突然変異のために減少もしくは欠如しているタンパク質、ポリペプチド、もしくはＲＮＡをコードする、または過剰発現が本開示の範囲内であるとみなされる場合に治療効果をもたらす任意の遺伝子を含み得る。

【０２２６】

発現カセットは、対象の疾患または障害を治療するために有用な任意の導入遺伝子を含み得る。ｃｅＤＮＡベクターを使用して、ポリペプチドをコードする核酸、または非コード核酸（例えば、ＲＮＡｉ、ｍｉＲなど）、ならびに対象のゲノム中のウイルス配列、例えば、ＨＩＶウイルス配列等を含む外因性遺伝子およびヌクレオチド配列を含むがこれらに限定されない、任意の関心対象の遺伝子を対象に送達し、発現させることができる。好ましくは、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、治療目的（例えば、医療、診断、もしくは獣医学的使用）または免疫原性ポリペプチドに使用される。ある特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、１つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、ｓｉＲＮＡ、ＲＮＡｉ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、またはＲＮＡ（コードまたは非コード；例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、およびそれらのアンチセンス対応物（例えば、ａｎｔａｇｏＭｉＲ））、抗体、抗原結合断片、またはそれらの任意の組み合わせを含む、任意の関心対象の遺伝子を対象において発現させるのに有用である。

【０２２７】

発現カセットはまた、ポリペプチド、センスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはＲＮＡ（コードもしくは非コード；例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、およびそれらのアンチセンス対応物（例えば、ａｎｔａｇｏＭｉＲ））をコードし得る。発現カセットは、実験または診断の目的で使用されるレポータータンパク質をコードする外因性配列、例えばβ－ラクタマーゼ、β－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ルシフェラーゼ、および当該技術分野において周知の他のものを含み得る。

【０２２８】

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

【０２２９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された発現のためのｃｅＤＮＡベクターによって発現される導入遺伝子は、治療遺伝子である。いくつかの実施形態

では、治療遺伝子は、抗体、または抗体断片、またはその抗原結合断片、または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、抗体またはその融合タンパク質は、活性化抗体または中和抗体または抗体断片等である。いくつかの実施形態では、制御された遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、２０１９年２月１４日に出願された国際特許第ＰＣＴ／ＵＳ１９／１８０１６号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されているような抗体または融合タンパク質を含む。

【０２３０】

特に、治療遺伝子は、例えば、疾患、機能不全、傷害、および／または障害のうちの１つ以上の症状の治療、予防、および／または改善における使用のための、タンパク質（複数可）、ポリペプチド（複数可）、ペプチド（複数可）、酵素（複数可）、抗体、抗原結合断片、ならびにその変異体および／または活性断片を含むが、これらに限定されない１種以上の治療剤（複数可）である。例示的な治療遺伝子は、本明細書において「治療の方法」と題されたセクションに記載されている。

【０２３１】

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

【０２３２】

本明細書に提供される方法によって産生されたｃｅＤＮＡベクターは、好ましくは、制限酵素消化アッセイによって判定して、非連続的な構造ではなく直鎖状で連続的な構造を有する（図４Ｄ）。直鎖状で連続的な構造は、細胞エンドヌクレアーゼによる攻撃に対してより安定であると同時に、組み換えられて突然変異誘発を引き起こす可能性が低いと考えられる。したがって、直鎖状で連続的な構造のｃｅＤＮＡベクターは、好ましい実施形態である。連続的な直鎖状の一本鎖分子内二重鎖ｃｅＤＮＡベクターは、ＡＡＶカプシドタンパク質をコードする配列なしに、終端に共有結合している可能性がある。これらのｃｅＤＮＡベクターは、細菌起源の環状二重鎖核酸分子であるプラスミド（本明細書に記載されるｃｅＤＮＡプラスミドを含む）とは構造的に異なる。プラスミドの相補鎖は、変性に続いて分離されて２つの核酸分子を産生することができるが、反対に、ｃｅＤＮＡベクターは、相補鎖を有するが、単一ＤＮＡ分子であり、したがって変性された場合でも単一分子のままである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターは、プラスミドとは異なり、原核細胞タイプのＤＮＡ塩基メチル化なしに産生され得る。したがって、ｃｅＤＮＡベクターおよびｃｅＤＮＡ－プラスミドは、構造（特に、直鎖状対環状）およびこれらの異なる対象物（下記を参照）を産生および精製するために使用される方法の両方に関して、またｃｅＤＮＡ－プラスミドの場合は原核細胞タイプおよびｃｅＤＮＡベクターの場合は真核細胞タイプのものである、それらのＤＮＡメチル化に関して異なる。

【０２３３】

プラスミド系発現ベクターを超える本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを使用するいくつかの利点があり、そのような利点としては、次のことが挙げられるが、これらに限定されない。１）プラスミドは、細菌ＤＮＡ配列を含有し、原核細胞特異的メチル化、例えば、６－メチルアデノシンおよび５－メチルシトシンメチル化に供されるが、カプシ

ド不含ＡＡＶベクター配列は、真核細胞起源であり、原核細胞特異的メチル化を受けず、結果として、カプシド不含ＡＡＶベクターは、プラスミドと比較して炎症および免疫反応を誘導する可能性が低い。２）プラスミドは、産生プロセス中に耐性遺伝子の存在を必要とするが、ｃｅＤＮＡベクターは必要としない。３）環状プラスミドは、細胞への導入時に核に送達されず、細胞ヌクレアーゼによる分解をバイパスするために過負荷を必要とするが、ｃｅＤＮＡベクターは、ヌクレアーゼに対する耐性を付与するウイルスシスエレメント、すなわちＩＴＲを含有し、核に対して標的化され、送達されるように設計され得る。ＩＴＲ機能に不可欠な最小定義エレメントは、Ｒｅｐ結合部位（ＲＢＳ、ＡＡＶ２の場合５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０））および末端分解部位（ＴＲＳ、ＡＡＶ２の場合５’－ＡＧＴＴＧＧ－３’（配列番号６４））に加えて、ヘアピン形成を可能にする可変パリンドローム配列であると仮定する。４）ｃｅＤＮＡベクターは、報告によれば受容体のＴｏｌｌ様ファミリーのメンバーに結合し、Ｔ細胞媒介性免疫反応を誘起する原核細胞由来のプラスミドにおいてしばしば見出されるＣｐＧジヌクレオチドの過剰提示を有しない。対照的に、本明細書に開示されるカプシド不含ＡＡＶベクターでの形質導入は、様々な送達試薬を使用し、従来のＡＡＶビリオンで形質導入することが困難である細胞および組織型を効率的に標的とし得る。

【０２３４】

ＩＶ．ＩＴＲｓ

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

【０２３５】

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

【０２３６】

ＩＴＲは、明細書において例証されており、本明細書における例は、ＡＡＶ２　ＷＴ－ＩＴＲであるが、当業者であれば、上述のように、任意の既知のパルボウイルス、例えば、ディペンドウイルス、例えばＡＡＶ（例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ５、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ－ＤＪ、およびＡＡＶ－ＤＪ８ゲノム

からのＩＴＲを使用できることを認識する。例えば、ＮＣＢＩ：ＮＣ００２０７７；ＮＣ００１４０１；ＮＣ００１７２９；ＮＣ００１８２９；ＮＣ００６１５２；ＮＣ００６２６０；ＮＣ００６２６１）、キメラＩＴＲ、または任意の合成ＡＡＶからのＩＴＲ。いくつかの実施形態では、ＡＡＶは、温血動物、例えば、鳥類（ＡＡＡＶ）、ウシ（ＢＡＡＶ）、イヌ、ウマ、およびヒツジアデノ関連ウイルスに感染し得る。いくつかの実施形態では、ＩＴＲは、Ｂ１９パルボウイルス（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ０００８８３）、マウスからの微小ウイルス（ＭＶＭ）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ００１５１０）、ガチョウパルボウイルス（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ００１７０１）、ヘビパルボウイルス１（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ００６１４８）に由来する。いくつかの実施形態では、本明細書で論じられるように、５’ＷＴ－ＩＴＲは、１つの血清型に由来し、３’ＷＴ－ＩＴＲは、異なる血清型に由来し得る。

【０２３７】

熟練者であれば、ＩＴＲ配列が、二本鎖ホリデージャンクションの一般構造を有し、典型的には、Ｔ形またはＹ形ヘアピン構造であり（例えば、図２Ａおよび図３Ａを参照）、各ＷＴ－ＩＴＲが、より大きなパリンドロームアーム（Ａ－Ａ’）に埋め込まれた２つのパリンドロームアームまたはループ（Ｂ－Ｂ’およびＣ－Ｃ’）、ならびに一本鎖Ｄ配列によって形成される（これらのパリンドローム配列の順序は、ＩＴＲのフリップまたはフロップ配向を定義する）ことを知っている。例えば、異なるＡＡＶ血清型（ＡＡＶ１～ＡＡＶ６）からのＩＴＲの構造分析および配列比較を参照されたい。Ｇｒｉｍｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，２００６；８０（１）；４２６－４３９、Ｙａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，２００５；３６４－３７９、Ｄｕａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９９９；２６１；８－１４に記載されている。当業者は、本明細書に提供される例示的なＡＡＶ２ ＩＴＲ配列に基づいて、ｃｅＤＮＡベクターまたはｃｅＤＮＡ－プラスミドで使用するための任意のＡＡＶ血清型からＷＴ－ＩＴＲ配列を容易に決定することができる。例えば、Ｇｒｉｍｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，２００６；８０（１）；４２６－４３９に記載される異なるＡＡＶ血清型（ＡＡＶ１～ＡＡＶ６、ならびにトリＡＡＶ（ＡＡＡＶ）およびウシＡＡＶ（ＢＡＡＶ））からのＩＴＲの配列比較を参照されたい。これは、他の血清型からの左ＩＴＲに対するＡＡＶ２の左ＩＴＲの同一性％を示す：ＡＡＶ－１（８４％）、ＡＡＶ－３（８６％）、ＡＡＶ－４（７９％）、ＡＡＶ－５（５８％）、ＡＡＶ－６（左ＩＴＲ）（１００％）、およびＡＡＶ－６（右ＩＴＲ）（８２％）。

【０２３８】

Ａ．対称ＩＴＲ対

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターは、５’から３’方向に、第１のアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）逆位末端反復（ＩＴＲ）、関心対象のヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、および第２のＡＡＶ ＩＴＲを含み、第１のＩＴＲ（５’ＩＴＲ）および第２のＩＴＲ（３’ＩＴＲ）は、互いに対して対称または実質的に対称であり、すなわち、ｃｅＤＮＡベクターは、対称の３次元空間構成を有するＩＴＲ配列を含み得、それによりそれらの構造は、幾何学的空間で同じ形状であるか、または３次元空間で同じＡ、Ｃ－Ｃ’、Ｂ－Ｂ’ループを有する。そのような実施形態では、対称のＩＴＲ対、または実質的に対称のＩＴＲ対は、野生型ＩＴＲではない修飾型ＩＴＲ（例えば、ｍｏｄ－ＩＴＲ）であり得る。ｍｏｄ－ＩＴＲ対は、野生型ＩＴＲからの１つ以上の修飾を有し、互いに逆相補（逆位）である同じ配列を有し得る。代替実施形態では、修飾型ＩＴＲ対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型ＩＴＲ対は、異なる配列を有し得るが、対応するまたは同じ対称の３次元形状を有し得る。

【０２３９】

【０２４０】

（ｉ）野生型ＩＴＲ

いくつかの実施形態では、対称のＩＴＲ、または実質的に対称のＩＴＲは、本明細書に

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

【０２４１】

したがって、本明細書で開示されるように、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、２つの隣接する野生型逆位末端反復（ＷＴ－ＩＴＲ）配列の間に位置付けられた導入遺伝子または異種核酸配列を含み、互いに逆相補（逆位）であるか、または代替として互いに実質的に対称である、すなわち、ＷＴ－ＩＴＲ対は、対称の３次元空間構成を有する。いくつかの実施形態では、野生型ＩＴＲ配列（例えば、ＡＡＶ　ＷＴ－ＩＴＲ）は、機能性Ｒｅｐ結合部位（ＲＢＳ、例えば、ＡＡＶ２の場合５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’、配列番号６０）および機能性末端分解部位（ＴＲＳ、例えば５’－ＡＧＴＴ－３’、配列番号６２）を含む。

【０２４２】

一態様では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、２つのＷＴ逆位末端反復配列（ＷＴ－ＩＴＲ）（例えば、ＡＡＶ　ＷＴ－ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた異種核酸をコードするベクターポリヌクレオチドから取得可能である。すなわち、両方のＩＴＲが野生型配列を有するが、必ずしも同じＡＡＶ血清型のＷＴ－ＩＴＲである必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、一方のＷＴ－ＩＴＲは、１つのＡＡＶ血清型に由来し得、他方のＷＴ－ＩＴＲは、異なるＡＡＶ血清型に由来し得る。そのような実施形態では、ＷＴ－ＩＴＲ対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称の３次元空間構成を維持しながら、１つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。いくつかの実施形態では、５’ＷＴ－ＩＴＲは、１つのＡＡＶ血清型に由来し、３’ＷＴ－ＩＴＲは、同じまたは異なるＡＡＶ血清型に由来する。いくつかの実施形態では、５’ＷＴ－ＩＴＲおよび３’ＷＴ－ＩＴＲは、互いの鏡像であり、すなわち、それらは対称である。いくつかの実施形態では、５’ＷＴ－ＩＴＲおよび３’ＷＴ－ＩＴＲは、同じＡＡＶ血清型に由来する。

【０２４３】

ＷＴ　ＩＴＲは周知である。一実施形態では、２つのＩＴＲは、同じＡＡＶ２血清型に由来する。ある特定の実施形態では、他の血清型からのＷＴを使用することができる。相同であるいくつかの血清型、例えば、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８がある。一実施形態では、密接に相同なＩＴＲ（例えば、類似のループ構造を有するＩＴＲ）を使用することができる。別の実施形態では、より多様なＡＡＶ　ＷＴ　ＩＴＲ、例えばＡＡＶ２およびＡＡＶ５を使用することができ、さらに別の実施形態では、実質的にＷＴであるＩＴＲを使用することができる、すなわち、それはＷＴの基本ループ構造を有するが、特性を変更しないかまたは影響しないいくつかの保存的ヌクレオチド変化を有する。同じウイルス血清型に由来するＷＴ－ＩＴＲを使用する場合、１つ以上の調節配列をさらに使用することができる。ある特定の実施形態では、調節配列は、ｃｅＤＮＡの活性の調整を可能にする調節スイッチである。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術の一態様は、ｃｅＤＮＡベクターに関し、ｃｅＤＮＡベクターは、２つの野生型逆位末端反復配列（ＷＴ－ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた少なくとも１つの異種ヌクレオチド配列を含み、ＷＴ－ＩＴＲは、同じ血清型、異なる血清型に由来し得るか、または互いに対して実質的に対称であり得る（すなわち、それらの構造が幾何学的空間で同じ形状であるように対称の３次元空間構成を有するか、または３次元空間で同じＡ、Ｃ－Ｃ’、およびＢ－Ｂ’ループを有する）。いくつかの実施形態では、対称ＷＴ－ＩＴＲは、機能性末端分解部位およびＲｅｐ結

合部位を含む。いくつかの実施形態では、異種核酸配列は、導入遺伝子をコードし、ベクターは、ウイルスカプシドにはない。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、ＷＴ－ＩＴＲは同じであるが、互いの逆相補鎖である。例えば、５’ＩＴＲの配列ＡＡＣＧは、対応する部位の３’ＩＴＲのＣＧＴＴ（すなわち、逆相補鎖）であり得る。一実施例では、５’ＷＴ－ＩＴＲセンス鎖は、ＡＴＣＧＡＴＣＧの配列を含み、対応する３’ＷＴ－ＩＴＲセンス鎖は、ＣＧＡＴＣＧＡＴ（すなわち、ＡＴＣＧＡＴＣＧの逆相補鎖）を含む。いくつかの実施形態では、ＷＴ－ＩＴＲ　ｃｅＤＮＡは、末端分解部位および複製タンパク質結合部位（ＲＰＳ）（複製タンパク質結合部位と呼ばれることもある）、例えばＲｅｐ結合部位をさらに含む。

【０２４６】

ＷＴ－ＩＴＲを含む制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターで使用するための例示的なＷＴ－ＩＴＲ配列は、ＷＴ－ＩＴＲの対（５’ＷＴ－ＩＴＲおよび３’ＷＴ－ＩＴＲ）を示す本明細書の表２に示されている。

【０２４７】

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

【０２４８】

いくつかの実施形態では、隣接するＷＴ－ＩＴＲは、互いに実質的に対称である。この実施形態では、ＷＴ－ＩＴＲが同一の逆相補鎖ではないように、５’ＷＴ－ＩＴＲは、ＡＡＶの１つの血清型に由来し、３’ＷＴ－ＩＴＲは、ＡＡＶの異なる血清型に由来し得る。例えば、５’ＷＴ－ＩＴＲは、ＡＡＶ２に由来し得、３’ＷＴ－ＩＴＲは、異なる血清型（例えば、ＡＡＶ１、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２）に由来し得る。いくつかの実施形態では、ＷＴ－ＩＴＲは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ヘビパルボウイルス（例えば、ロイヤルパイソンパルボウイルス）、ウシパルボウイルス、ヤギパルボウイルス、トリパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ウマパルボウイルス、エビパルボウイルス、ブタパルボウイルス、または昆虫ＡＡＶのうちのいずれかから選択される２つの異なるパルボウイルスから選択され得る。いくつかの実施形態では、ＷＴ　ＩＴＲのそのような組み合わせは、ＡＡＶ２およびＡＡＶ６からのＷＴ－ＩＴＲの組み合わせである。一実施形態では、実質的に対称のＷＴ－ＩＴＲは、一方が他方のＩＴＲに対して反転されたときに、少なくとも９０％同一、少なくとも９５％同一、少なくとも９６％．．．９７％．．．９８％．．．９９％．．．９９．５％、およびその間のすべてのポイントであり、同じ対称の３次元空間構成を有する。いくつかの実施形態では、ＷＴ－ＩＴＲ対は、それらが対称の３次元空間構成を有する、例えば、Ａ、Ｃ－Ｃ’、Ｂ－Ｂ’、およびＤアームの同じ３次元構成を有するため、実質的に対称である。一実施形態では、実質的に対称のＷＴ－ＩＴＲ対は、他方に対して反転され、互いに少なくとも９５％同一、少なくとも９６％．．．９７％．．．９８％．．．９９％．．．９９．５％、およびその間のすべてのポイントであり、一方のＷＴ－ＩＴＲは、５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０）のＲｅｐ結合部位（ＲＢＳ）および末端分解部位（ｔｒｓ）を保持する。いくつかの実施形態では、実質的に対称のＷＴ－ＩＴＲ対は、互いに対して反転され、互いに少なくとも９５％同一、少なくとも９６％．．．９７％．．．９８％．．．９９％．．．９９．５％、およびその間のすべてのポイントであり、一方のＷＴ－ＩＴＲは、ヘアピン二次構造形成を可能にする可変パリンド

ローム配列に加えて、５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０）のＲｅｐ結合部位（ＲＢＳ）および末端分解部位（ｔｒｓ）を保持する。相同性は、ＢＬＡＳＴ（ベーシックローカルアラインメント検索ツール）、デフォルト設定のＢＬＡＳＴＮなど、当該技術分野で周知の標準的な手段によって決定することができる。

【０２４９】

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

【０２５０】

単なる例として、表１は、ＷＴ－ＩＴＲの例示的な組み合わせを示す。

【０２５１】

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

【０２５２】

【表１－１】

表１：

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

【表１－２】

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

【表１－３】

AAV11、AAVRH8	AAV12、AAVRH10	AAVRH8、AAV13	AAVRH10、AAVDJ	AAV13、AAVDJ8
AAV11、AAVRH10	AAV12、AAV13	AAVRH8、AAVDJ	AAVRH10、AAVDJ8	AAV13、トリ
AAV11、AAV13	AAV12、AAVDJ	AAVRH8、AAVDJ8	AAVRH10、トリ	AAV13、ウシ
AAV11、AAVDJ	AAV12、AAVDJ8	AAVRH8、トリ	AAVRH10、ウシ	AAV13、イヌ
AAV11、AAVDJ8	AAV12、トリ	AAVRH8、ウシ	AAVRH10、イヌ	AAV13、ウマ
AAV11、トリ	AAV12、ウシ	AAVRH8、イヌ	AAVRH10、ウマ	AAV13、ヤギ
AAV11、ウシ	AAV12、イヌ	AAVRH8、ウマ	AAVRH10、ヤギ	AAV13、エビ
AAV11、イヌ	AAV12、ウマ	AAVRH8、ヤギ	AAVRH10、エビ	AAV13、ブタ
AAV11、ウマ	AAV12、ヤギ	AAVRH8、エビ	AAVRH10、ブタ	AAV13、昆虫
AAV11、ヤギ	AAV12、エビ	AAVRH8、ブタ	AAVRH10、昆虫	AAV13、ヒツジ
AAV11、エビ	AAV12、ブタ	AAVRH8、昆虫	AAVRH10、ヒツジ	AAV13、B19
AAV11、ブタ	AAV12、昆虫	AAVRH8、ヒツジ	AAVRH10、B19	AAV13、MVM
AAV11、昆虫	AAV12、ヒツジ	AAVRH8、B19	AAVRH10、MVM	AAV13、ガチョウ
AAV11、ヒツジ	AAV12、B19	AAVRH8、MVM	AAVRH10、ガチョウ	AAV13、ヘビ
AAV11、B19	AAV12、MVM	AAVRH8、ガチョウ	AAVRH10、ヘビ	
AAV11、MVM	AAV12、ガチョウ	AAVRH8、ヘビ		
AAV11、ガチョウ	AAV12、ヘビ			
AAV11、ヘビ				
AAVDJ、AAVDJ	AAVDJ8、AVVDJ8	トリ、トリ	ウシ、ウシ	イヌ、イヌ
AAVDJ、AAVDJ8	AAVDJ8、トリ	トリ、ウシ	ウシ、イヌ	イヌ、ウマ
AAVDJ、トリ	AAVDJ8、ウシ	トリ、イヌ	ウシ、ウマ	イヌ、ヤギ
AAVDJ、ウシ	AAVDJ8、イヌ	トリ、ウマ	ウシ、ヤギ	イヌ、エビ
AAVDJ、イヌ	AAVDJ8、ウマ	トリ、ヤギ	ウシ、エビ	イヌ、ブタ
AAVDJ、ウマ	AAVDJ8、ヤギ	トリ、エビ	ウマ、ブタ	イヌ、昆虫
AAVDJ、ヤギ	AAVDJ8、エビ	トリ、ブタ	ウシ、昆虫	イヌ、ヒツジ
AAVDJ、エビ	AAVDJ8、ブタ	トリ、昆虫	ウシ、ヒツジ	イヌ、B19
AAVDJ、ブタ	AAVDJ8、昆虫	トリ、ヒツジ	ウシ、B19	イヌ、MVM
AAVDJ、昆虫	AAVDJ8、ヒツジ	トリ、B19	ウシ、MVM	イヌ、ガチョウ
AAVDJ、ヒツジ	AAVDJ8、B19	トリ、MVM	ウシ、ガチョウ	イヌ、ヘビ
AAVDJ、B19	AAVDJ8、MVM	トリ、ガチョウ	ウシ、ヘビ	
AAVDJ、MVM	AAVDJ8、ガチョウ	トリ、ヘビ		
AAVDJ、ガチョウ	AAVDJ8、ヘビ			

【表１－４】

AAVDJ、ヘビ				
ウマ、ウマ	ヤギ、ヤギ	エビ、エビ	ブタ、ブタ	昆虫、昆虫
ウマ、ヤギ	ヤギ、エビ	エビ、ブタ	ブタ、昆虫	昆虫、ヒツジ
ウマ、エビ	ヤギ、ブタ	エビ、昆虫	ブタ、ヒツジ	昆虫、B19
ウマ、ブタ	ヤギ、昆虫	エビ、ヒツジ	ブタ、B19	昆虫、MVM
ウマ、昆虫	ヤギ、ヒツジ	エビ、B19	ブタ、MVM	昆虫、ガチョウ
ウマ、ヒツジ	ヤギ、B19	エビ、MVM	ブタ、ガチョウ	昆虫、ヘビ
ウマ、B19	ヤギ、MVM	エビ、ガチョウ	ブタ、ヘビ	
ブタ、MVM	ヤギ、ガチョウ	エビ、ヘビ		
ウマ、ガチョウ	ヤギ、ヘビ			
ウマ、ヘビ				
ヒツジ、ヒツジ	B19、B19	MVM、MVM	ガチョウ、ガチョウ	ヘビ、ヘビ
ヒツジ、B19	B19、MVM	MVM、ガチョウ	ガチョウ、ヘビ	
ヒツジ、MVM	B19、ガチョウ	MVM、ヘビ		
ヒツジ、ガチョウ	B19、ヘビ			
ヒツジ、ヘビ				

【０２５３】

単なる例として、表２は、いくつかの異なるＡＡＶ血清型からの例示的なＷＴ－ＩＴＲの配列を示す。

【０２５４】

【表２－１】

表２

AAV 血清型	5′ WT-ITR(左)	3′ WT-ITR(右)
AAV1	5'-TTGCCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAAAGGTCCGCAGACGGCAGAGGTCTCCTCTGCCGGCCCCACCGAGCGAGCGACGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGCAACTCCATCACTAGGGTAA-3' (配列番号:5)	5'-TTACCCTAGTGATGGAGTTGCCCACTCCCTCTCTGCGCGCGTCGCTCGCTCGGTGGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCGTCTGCGGACCTTTGGTCCGCAGGCCCCACCGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGCAA-3' (配列番号:10)
AAV2	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT 配列番号:2)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号:1)

【表２－２】

AAV3	5’- TTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGCT CGCTCGGTGGGGCCTGGCGACCAAAGG TCGCCAGACGGACGTGGGTTTCCACGTC CGGCCCCACCGAGCGAGCGAGTGCGCA TAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GAGGTAT-3’ (配列番号:6)	5’- ATACCTCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC CCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCGGTGG GGCCGGACGTGGAAACCCACGTCCGTCT GGCGACCTTTGGTCGCCAGGCCCCACCG AGCGAGCGAGTGCGCATAGAGGGAGTG GCCAA-3’ (配列番号:11)
AAV4	5’- TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGCT CACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAGG TCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCCGGCA GGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGCGCAT AGAGGGAGTGGCCAACT-3’ (配列番号:7)	5’- AGTTGGCCACATTAGCTATGCGCGCTCG CTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAG GTCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCCGGC AGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGCGCA TAGAGGGAGTGGCCAA-3’ (配列番号:12)
AAV5	5’- TCCCCCCTGTCGCGTTCGCTCGCTCGCT GGCTCGTTTGGGGGGGCGACGGCCAGA GGGCCGTCGTCTGGCAGCTCTTTGAGCT GCCACCCCCCCCAAACGAGCCAGCGAGC GAGCGAACGCGACAGGGGGGGAGAGTGC CACACTCTCAAGCAAGGGGGTTTTGTAA G -3’ (配列番号:8)	5’- CTTACAAAACCCCCTTGCTTGAGAGTGT GGCACTCTCCCCCCTGTCGCGTTCGCTCG CTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGTGGCAG CTCAAAGAGCTGCCAGACGACGGCCCTC TGGCCGTCGCCCCCCCAAACGAGCCAGC GAGCGAGCGAACGCGACAGGGGGGA-3’ (配列番号:13)
AAV6	5’- TTGCCCACTCCCTCTAATGCGCGCTCGC TCGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAAAG GTCCGCAGACGGCAGAGGTCTCCTCTGC CGGCCCCACCGAGCGAGCGAGCGCGCA TAGAGGGAGTGGGCAACTCCATCACTA GGGGTAT-3’ (配列番号:9)	5’- ATACCCCTAGTGATGGAGTTGCCCACTC CCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCGGTGG GGCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCGTCTG CGGACCTTTGGTCCGCAGGCCCCACCGA GCGAGCGAGCGCGCATTAGAGGGAGTG GGCAA (配列番号:14)

【０２５５】

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

【０２５６】

本発明のある特定の実施形態では、合成的に産生されたｃｅＤＮＡベクターは、配列番号１、２、５～１４のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列からなるＷＴ－ＩＴＲを有しない。本発明の代替実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターが、配列番号１、２、５～１４のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列を含むＷＴ－ＩＴＲを有する場合、隣接するＩＴＲもＷＴであり、ｃｅＤＮＡは、例えば、本明細書および国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号に開示されているように、調節スイッチを含む（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６の表１１を参照）。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、本明細書に開示されるような調節スイッチ、および配列番号１、２、５～

１４からなる群のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する選択されたＷＴ－ＩＴＲを含む。

【０２５７】

本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターは、操作可能なＲＢＥ、ｔｒｓ、およびＲＢＥ’部分を保持するＷＴ－ＩＴＲ構造を含み得る。例示の目的で野生型ＩＴＲを使用する図２Ａおよび図２Ｂは、ｃｅＤＮＡベクターの野生型ＩＴＲ構造部分内のｔｒｓ部位の操作のための１つの可能な機序を示す。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、Ｒｅｐ－結合部位（ＲＢＳ、ＡＡＶ２の場合５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０））および末端分解部位（ＴＲＳ、５’－ＡＧＴＴ（配列番号６２））を含む１つ以上の機能性ＷＴ－ＩＴＲポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＷＴ－ＩＴＲは、機能的である。ｃｅＤＮＡベクターが互いに実質的に対称である２つのＷＴ－ＩＴＲを含む代替実施形態では、少なくとも１つのＷＴ－ＩＴＲが機能的であり、少なくとも１つのＷＴ－ＩＴＲが非機能的である。

【０２５８】

Ｂ．非対称ＩＴＲ対または対称ＩＴＲ対を含む制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの一般的な修飾型ＩＴＲ（ｍｏｄ－ＩＴＲ）

本明細書で論じられるように、ｃｅＤＮＡベクターは、対称ＩＴＲ対または非対称ＩＴＲ対を含み得る。どちらの場合も、一方または両方のＩＴＲは修飾型ＩＴＲであり得、その違いは、第１の場合（すなわち、対称ｍｏｄ－ＩＴＲ）では、ｍｏｄ－ＩＴＲは、同じ３次元空間構成を有する（すなわち、同じＡ－Ａ’、Ｃ－Ｃ’、およびＢ－Ｂ’アーム構成を有する）が、第２の場合（すなわち、非対称ｍｏｄ－ＩＴＲ）では、ｍｏｄ－ＩＴＲは、異なる３次元空間構成を有する（すなわち、Ａ－Ａ’、Ｃ－Ｃ’、およびＢ－Ｂ’アームの異なる構成を有する）ことである。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、修飾型ＩＴＲは、野生型ＩＴＲ配列（例えば、ＡＡＶ　ＩＴＲ）と比較して、欠失、挿入、および／または置換によって修飾されるＩＴＲである。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターのＩＴＲのうちの少なくとも１つは、機能性Ｒｅｐ結合部位（ＲＢＳ；例えば、ＡＡＶ２の場合は５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’、配列番号６０）および機能性末端分解部位（ＴＲＳ；例えば、５’－ＡＧＴＴ－３’、配列番号６２）を含む。一実施形態では、ＩＴＲのうちの少なくとも１つは、非機能性ＩＴＲである。一実施形態では、異なるまたは修飾型ＩＴＲは各々、異なる血清型からの野生型ＩＴＲではない。

【０２６０】

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

【０２６１】

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

【０２６２】

熟練者であれば、既知の手段によって他の血清型における対応する配列を判定することができる。例えば、Ａ、Ａ’、Ｂ、Ｂ’、Ｃ、Ｃ’、またはＤ領域中に変化が存在するかどうかを判定し、別の血清型における対応する領域を判定する。ＢＬＡＳＴ（登録商標）（Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ）または他の相同性アラインメントプログラムをデフォルト状態で使用して、対応する配列を判定することができる。本発明は、異なるＡＡＶ血清型の組み合わせからｍｏｄ－ＩＴＲを含む、制御された導入遺伝子発現のための集団および複数のｃｅＤＮＡベクターをさらに提供する、すなわち、１つのｍｏｄ－ＩＴＲは、１つのＡＡＶ血清型に由来し得、他のｍｏｄ－ＩＴＲは、異なる血清型に由来し得る。理論に束縛されるものではないが、一実施形態では、１つのＩＴＲは、ＡＡＶ２　ＩＴＲ配列に由来し得るか、またはそれに基づき得、ｃｅＤＮＡベクターの他のＩＴＲは、ＡＡＶ血清型１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ血清型４（ＡＡＶ４）、ＡＡＶ血清型５（ＡＡＶ５）、ＡＡＶ血清型６（ＡＡＶ６）、ＡＡＶ血清型７（ＡＡＶ７）、ＡＡＶ血清型８（ＡＡＶ８）、ＡＡＶ血清型９（ＡＡＶ９）、ＡＡＶ血清型１０（ＡＡＶ１０）、ＡＡＶ血清型１１（ＡＡＶ１１）、またはＡＡＶ血清型１２（ＡＡＶ１２）の任意の１つ以上のＩＴＲ配列に由来し得るか、またはそれに基づき得る。

【０２６３】

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

【０２６４】

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

【０２６５】

単なる例として、表３は、修飾型ＩＴＲの領域中の少なくとも１つのヌクレオチドの例示的な修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を示し、Ｘは、対応する野生型ＩＴＲに対するそのセクションにおける少なくとも１つの核酸の修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を示す。いくつかの実施形態では、Ｃおよび／またはＣ’および／またはＢおよび／またはＢ’の領域のうちのいずれかにおける少なくとも１つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）は、少なくとも１つの末端ループに３つの連続Ｔヌクレオチド（すなわち、ＴＴＴ）を保持する。例えば、修

飾が、単一アームＩＴＲ（例えば、単一Ｃ－Ｃ’アーム、もしくは単一Ｂ－Ｂ’アーム）、または修飾型Ｃ－Ｂ’アームもしくはＣ’－Ｂアーム、または少なくとも１つの切断されたアーム（例えば、切断されたＣ－Ｃ’アームおよび／もしくは切断されたＢ－Ｂ’アーム）を有する２つのアームＩＴＲのうちのいずれかをもたらす場合、少なくとも単一アーム、または２つのアームＩＴＲのアーム（１つのアームは切断され得る）のうちの少なくとも１つは、少なくとも１つの末端ループに３つの連続Ｔヌクレオチド（すなわち、ＴＴＴ）を保持する。いくつかの実施形態では、切断されたＣ－Ｃ’アームおよび／または切断されたＢ－Ｂ’アームは、末端ループに３つの連続Ｔヌクレオチド（すなわち、ＴＴＴ）を有する。

【０２６６】

【表３】

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

B 領域	B′ 領域	C 領域	C′ 領域
X			
	X		
X	X		
		X	
			X
		X	X
X		X	
X			X
	X	X	
	X		X
X	X	X	
X	X		X
X		X	X
	X	X	X
X	X	X	X

【０２６７】

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

）を保持する。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型ＩＴＲは、表３に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか１つ、またＡ’、Ａ、および／またはＤから選択される領域のうちのいずれか１つ以上における少なくとも１つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型ＩＴＲは、表３に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか１つ、またＡ領域における少なくとも１つの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）も含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型ＩＴＲは、表３に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか１つ、またＡ’領域における少なくとも１つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型ＩＴＲは、表３に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか１つ、またＡおよび／またはＡ’領域における少なくとも１つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型ＩＴＲは、表３に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか１つ、またＤ領域における少なくとも１つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、および／または置換）を含み得る。

【０２６８】

一実施形態では、構造エレメントのヌクレオチド配列を修飾して（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０以上のヌクレオチド、またはその中の任意の範囲）、修飾型構造エレメントを産生することができる。一実施形態では、ＩＴＲに対する特定の修飾が本明細書に例示されているか（例えば、配列番号３、４、１５～４７、１０１～１１６、もしくは１６５～１８７）、または２０１８年１２月６日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２の図７Ａ～７Ｂに示されている（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２の配列番号９７～９８、１０１～１０３、１０５～１０８、１１１～１１２、１１７～１３４、５４５～５４）。いくつかの実施形態では、ＩＴＲは、（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０以上のヌクレオチド、またはその中の任意の範囲を修飾することによって）修飾され得る。他の実施形態では、ＩＴＲは、配列番号３、４、１５～４７、１０１～１１６、もしくは１６５～１８７の修飾型ＩＴＲのうちの１つ、あるいは配列番号３、４、１５～４７、１０１～１１６、もしくは１６５～１８７の、または参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号の表２～９（すなわち、配列番号１１０～１１２、１１５～１９０、２００～４６８）に示されている、Ａ－Ａ’アームおよびＣ－Ｃ’およびＢ－Ｂ’アームのＲＢＥ含有セクションと少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれ以上の配列同一性を有し得る。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、修飾型ＩＴＲは、例えば、特定アームの全部、例えば、Ａ－Ａ’アームの全部もしくは一部、またはＢ－Ｂ’アームの全部もしくは一部、またはＣ－Ｃ’アームの全部もしくは一部の除去または欠失、あるいはステム（例えば、単一アーム）をキャップする最終ループが依然として存在する限り、ループのステムを形成する１、２、３、４、５、６、７、８、９、またはそれ以上の塩基対の除去（例えば、２０１８年１２月６日に提出されたＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２の図７ＡのＩＴＲ－２１を参照）を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾型ＩＴＲは、Ｂ－Ｂ’アームからの１、２、３、４、５、６、７、８、９、またはそれ以上の塩基対の除去を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾型ＩＴＲは、Ｃ－Ｃ’アームからの１、２、３、４、５、６、７、８、９、またはそれ以上の塩基対の除去を含み得る（例えば、２０１８年１２月６日に提出されたＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２の図３ＢのＩＴＲ－１または図７ＡのＩＴＲ－４５を参照）。いくつかの実施形態では、修飾型ＩＴＲは、Ｃ－Ｃ’アームからの

１、２、３、４、５、６、７、８、９、またはそれ以上の塩基対の除去、およびＢ－Ｂ’アームからの１、２、３、４、５、６、７、８、９、またはそれ以上の塩基対の除去を含み得る。塩基対の除去の任意の組み合わせが想起され、例えば、Ｃ－Ｃ’アームにおける６つの塩基対、およびＢ－Ｂ’アームにおける２つの塩基対が除去され得る。例示的な実施例として、図３Ｂは、修飾型ＩＴＲが、少なくとも１つのアーム（例えば、Ｃ－Ｃ’）が切断される２つのアームを含むように、Ｃ部分およびＣ’部分の各々から欠失された少なくとも７つの塩基対、Ｃ領域とＣ’領域との間のループ中のヌクレオチドの置換、ならびにＢ領域およびＢ’領域の各々からの少なくとも１つの塩基対の欠失を有する例示的な修飾型ＩＴＲを示す。いくつかの実施形態では、修飾型ＩＴＲはまた、Ｂ領域およびＢ’領域の各々からの少なくとも１つの塩基対の欠失を含み、それによりＢ－Ｂ’アームもＷＴ　ＩＴＲに対して切断される。

【０２７０】

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

【０２７１】

いくつかの実施形態では、修飾型ＩＴＲは、ＤＮＡ複製（例えば、Ｒｅｐタンパク質によるＲＢＥへの結合、もしくは末端分解部位でのニッキング）に干渉しないように、ＡまたはＡ’領域のＲＢＥ含有部分にいかなるヌクレオチド欠失も含まない。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のために包含される修飾型ＩＴＲは、本明細書に記載されるＢ、Ｂ’、Ｃ、および／またはＣ領域に１つ以上の欠失を有する。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、対称ＩＴＲ対または非対称ＩＴＲ対を含む合成的に産生されたｃｅＤＮＡベクターは、本明細書に開示されるような調節スイッチ、および配列番号３、４、１５～４７、１０１～１１６、または１６５～１８７からなる群のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する選択された少なくとも１つの修飾型ＩＴＲを含む。

【０２７３】

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

【０２７４】

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

【０２７５】

別の実施形態では、２つのエレメント（限定されないが、ＲＢＥおよびヘアピンなど）の間の空間を変更して（例えば、増加または減少）、大きなＲｅｐタンパク質との機能的

相互作用を変更することができる。例えば、空間は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、もしくは２１ヌクレオチド以上、またはその中の任意の範囲であり得る。

【０２７６】

本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターは、本明細書に開示される野生型ＡＡＶ２ＩＴＲ構造に関して修飾されるＩＴＲ構造を含み得るが、依然として操作可能なＲＢＥ、ｔｒｓ、およびＲＢＥ’部分を保持する。図２Ａおよび図２Ｂは、ｃｅＤＮＡベクターの野生型ＩＴＲ構造内のｔｒｓ部位の操作のための１つの可能な機序を示す。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、Ｒｅｐ－結合部位（ＲＢＳ、ＡＡＶ２の場合５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０））および末端分解部位（ＴＲＳ、５’－ＡＧＴＴ（配列番号６２））を含む１つ以上の機能的ＩＴＲポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＩＴＲ（野生型または修飾型ＩＴＲ）は、機能的である。ｃｅＤＮＡベクターが、互いに異なるか、または非対称である２つの修飾型ＩＴＲを含む代替実施形態では、少なくとも１つの修飾型ＩＴＲは、機能的であり、少なくとも１つの修飾型ＩＴＲは、非機能的である。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成的に産生されたｃｅＤＮＡベクターの修飾型ＩＴＲ（例えば、左または右ＩＴＲ）は、ループアーム、切断アーム、またはスペーサー内に修飾を有する。ループアーム、切断アーム、またはスペーサー内に修飾を有するＩＴＲの例示的な配列は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号の表２（すなわち、配列番号１３５～１９０、２００～２３３）；表３（例えば、配列番号２３４～２６３）；表４（例えば、配列番号２６４～２９３）；表５（例えば、本明細書の配列番号２９４～３１８）；表６（例えば、配列番号３１９～４６８）；および表７～９（例えば、配列番号１０１～１１０、１１１～１１２、１１５～１３４）または表１０Ａもしくは１０Ｂ（例えば、配列番号９、１００、４６９～４８３、４８４～４９９）に列挙されている。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、非対称ＩＴＲ対または対称ｍｏｄ－ＩＴＲ対を含むｃｅＤＮＡベクターにおける使用のための修飾型ＩＴＲは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号の表２、３、４、５、６、７、８、９、および１０Ａ～１０Ｂに示されるもののうちのいずれか、またはそれらの組み合わせから選択される。

【０２７９】

上記のクラスの各々に非対称ＩＴＲ対または対称ｍｏｄ－ＩＴＲ対を含むｃｅＤＮＡベクターで使用するための追加の例示的な修飾型ＩＴＲを表４Ａおよび４Ｂに示す。表４Ａの右修飾型ＩＴＲの予測二次構造は、２０１８年１２月６日に提出された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２号の図７Ａに示され、表４Ｂの左修飾型ＩＴＲの予測二次構造は、２０１８年１２月６日に提出された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の図７Ｂに示される。

【０２８０】

表４Ａおよび表４Ｂは、例示的な右および左修飾型ＩＴＲを示す。

【０２８１】

表４Ａ：例示的な修飾型右ＩＴＲこれらの例示的な修飾型右ＩＴＲは、ＲＢＥであるＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０）、スペーサーであるＡＣＴＧＡＧＧＣ（配列番号６９）、スペーサー補体ＧＣＣＴＣＡＧＴ（配列番号７０）、およびＲＢＥ’（すなわち、ＲＢＥに対する補体）であるＧＡＧＣＧＡＧＣＧＡＧＣＧＣＧＣ（配列番号７１）を含み得る。

【表４Ａ－１】

表 4A:例示的な右修飾型 ITR		
ITR 構築物	配列	配列番号
ITR-18 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	15
ITR-19 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	16
ITR-20 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	17
ITR-21 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCTTTGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	18
ITR-22 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACAAAGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	19
ITR-23 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAAAATCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	20
ITR-24 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAAACGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	21
ITR-25 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAAAGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	22
ITR-26 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	23

【表４Ａ－２】

ITR-27 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGTTTCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	24
ITR-28 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGTTTCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	25
ITR-29 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTTGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	26
ITR-30 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCTTTGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	27
ITR-31 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCTTTGCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	28
ITR-32 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGTTTCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	29
ITR-49 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	30
ITR-50 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	31

【０２８２】

表４Ｂ：例示的な修飾型左ＩＴＲこれらの例示的な修飾型左ＩＴＲは、ＲＢＥであるＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０）、スペーサーであるＡＣＴＧＡＧＧＣ（配列番号６９）、スペーサー補体ＧＣＣＴＣＡＧＴ（配列番号７０）、およびＲＢＥ補体（ＲＢＥ’）であるＧＡＧＣＧＡＧＣＧＡＧＣＧＣＧＣ（配列番号７１）を含み得る。

【表４Ｂ－１】

表 4B:例示的な修飾型左 ITR		
ITR-33 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAA ACCCGGGCGTGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT GGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	32
ITR-34 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGTCGGGCGA CCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	33
ITR-35 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG AGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	34
ITR-36 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCCCGGGCGTC GGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	35
ITR-37 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCAAAGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG GGTTCCT	36
ITR-38 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGACTTTGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	37
ITR-39 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGATTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	38
ITR-40 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	39
ITR-41 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCTTTGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	40
ITR-42 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAA ACCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	41
ITR-43 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGAAA CCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	42
ITR-44 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGAAAC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	43
ITR-45 左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCAAAGG GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	44

【表４Ｂ－２】

ITR-46左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGC GTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	45
ITR-47左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCAAAGCGT CGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	46
ITR-48左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAAACGTCG GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG AGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	47

【０２８３】

一実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、５′から３′方向に、第１のアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）逆位末端反復（ＩＴＲ）、関心対象のヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、および第２のＡＡＶ　ＩＴＲを含み、第１のＩＴＲ（５′ＩＴＲ）および第２のＩＴＲ（３′ＩＴＲ）は、互いに非対称である、すなわち、それらは互いに異なる３次元空間構成を有する。例示的な実施形態として、第１のＩＴＲは、野生型ＩＴＲであり得、第２のＩＴＲは、突然変異型または修飾型ＩＴＲであり得るか、またはその逆であり、第１のＩＴＲは、突然変異型または修飾型ＩＴＲであり得、第２のＩＴＲは、野生型ＩＴＲであり得る。いくつかの実施形態では、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲは、両方ともｍｏｄ－ＩＴＲであるが、異なる配列を有するか、または異なる修飾を有し、したがって同じ修飾型ＩＴＲではなく、異なる３次元空間構成を有する。言い換えると、非対称ＩＴＲを用いたｃｅＤＮＡベクターは、ＷＴ－ＩＴＲに対する１つのＩＴＲのいかなる変更も他のＩＴＲに反映されないＩＴＲを含むか、あるいは非対称ＩＴＲが修飾された非対称ＩＴＲ対を有する場合は、互いに対して異なる配列および異なる３次元形状を有し得る。ｃｅＤＮＡベクター中の、ｃｅＤＮＡ－プラスミドを生成するために使用するための例示的な非対称ＩＴＲは、表４Ａおよび４Ｂに示されている。

【０２８４】

代替実施形態では、合成的に産生されたｃｅＤＮＡベクターは、２つの対称的なｍｏｄ－ＩＴＲを含む。すなわち、両方のＩＴＲは、同じ配列を有するが、互いの逆相補鎖（逆位）である。いくつかの実施形態では、対称ｍｏｄ－ＩＴＲ対は、同じＡＡＶ血清型からの野生型ＩＴＲ配列と比較して、欠失、挿入、または置換の少なくとも１つまたは任意の組み合わせを含む。対称ＩＴＲの付加、欠失、または置換は同じであるが、互いの逆相補鎖である。例えば、５’ＩＴＲのＣ領域への３ヌクレオチドの挿入は、３’ＩＴＲのＣ’領域の対応するセクションへの３つの逆相補ヌクレオチドの挿入に反映される。単に説明の目的でのみ、付加が５’ＩＴＲのＡＡＣＧである場合、付加は、対応する部位における３’ＩＴＲのＣＧＴＴである。例えば、５’ＩＴＲセンス鎖が

【化１】

ATCGATCG

であり、ＧとＡとの間に

【化２】

AACG

の付加を伴い、

【化３】

配列ATCG*AACG*ATCG（配列番号５１）

をもたらす場合。対応する３’ＩＴＲセンス鎖は、

【化４】
CGATCGAT（ATCGATCGの逆相補鎖）
であり、ＴとＣとの間に
【化５】
CGTT
（すなわち、ＡＡＣＧの逆相補鎖）の付加を伴い、
【化６】
配列CGAT*CGTT*CGAT（配列番号４９）

【化７】
（ATCG*AACG*ATCGの逆相補鎖）（配列番号５１）

をもたらす。
【０２８５】
代替実施形態では、修飾型ＩＴＲ対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型ＩＴＲ対は、異なる配列を有し得るが、対応するまたは同じ対称の３次元形状を有し得る。例えば、１つの修飾型ＩＴＲは、１つの血清型に由来し得、他の修飾型ＩＴＲは、異なる血清型に由来し得るが、それらは同じ領域において同じ突然変異（例えば、ヌクレオチド挿入、欠失、または置換）を有する。言い換えると、単なる説明の目的で、５’ｍｏｄ－ＩＴＲは、ＡＡＶ２に由来し得、Ｃ領域に欠失を有し、３’ｍｏｄ－ＩＴＲは、ＡＡＶ５に由来し得、Ｃ’領域に対応する欠失を有する。５’ｍｏｄ－ＩＴＲおよび３’ｍｏｄ－ＩＴＲが同じまたは対称の３次元空間構成を有することを条件として、それらは本明細書における修飾型ＩＴＲ対としての使用に包含される。
【０２８６】
いくつかの実施形態では、実質的に対称のｍｏｄ－ＩＴＲ対は、３次元空間で同じＡ、Ｃ－Ｃ’およびＢ－Ｂ’ループを有する。例えば、実質的に対称のｍｏｄ－ＩＴＲ対の修飾型ＩＴＲがＣ－Ｃ’アームの欠失を有する場合、同族のｍｏｄ－ＩＴＲは、Ｃ－Ｃ’ループの対応する欠失を有し、またその同族のｍｏｄ－ＩＴＲの幾何学的空間に同じ形状の残りのＡおよびＢ－Ｂ’ループの同様の３次元構造を有する。単なる例として、実質的に対称のＩＴＲは、それらの構造が幾何学的空間において同じ形状であるように、対称空間構成を有し得る。これは、例えば、Ｇ－Ｃ対が、例えばＣ－Ｇ対に、もしくはその逆に修飾されたとき、またはＡ－Ｔ対がＴ－Ａ対に、もしくはその逆に修飾されたときに起こり得る。したがって、
【化８】
ATCG*AACG*ATCG（配列番号５１）
としての修飾型５’ＩＴＲ、および
【化９】
CGAT*CGTT*CGAT（配列番号４９）
としての修飾型３’ＩＴＲ
（すなわち、
【化１０】
ATCG*AACG*ATCGの逆相補（配列番号５１）

）の上記の例示的な実施例を使用し、例えば、５’ＩＴＲが
【化１１】
ATCG*AACC*ATCGの配列（配列番号５０）

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

【化１２】
CGAT*CGTT*CGATの配列（配列番号４９）

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

【０２８７】

表５は、例示的な対称修飾型ＩＴＲ対（すなわち、左修飾型ＩＴＲおよび対称右修飾型ＩＴＲ）を示す。配列の太字（赤）部分は、図３１Ａ～４６Ｂにも示されている部分的なＩＴＲ配列（すなわち、Ａ－Ａ’、Ｃ－Ｃ’およびＢ－Ｂ’ループの配列）を識別する。これらの例示的な修飾型ＩＴＲは、ＲＢＥであるＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’（配列番号６０）、スペーサーであるＡＣＴＧＡＧＧＣ（配列番号６９）、スペーサー補体ＧＣＣＴＣＡＧＴ（配列番号７０）、およびＲＢＥ’（すなわち、ＲＢＥに対する補体）であるＧＡＧＣＧＡＧＣＧＡＧＣＧＣＧＣ（配列番号７１）を含み得る。

【表５－１】

表 5:例示的な対称修飾型 ITR 対

左修飾型 ITR (修飾型 5′ ITR)		対称右修飾型 ITR (修飾型 3′ ITR)	
配列番号 32(ITR-33 左)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCTCG** **CTCACTGAGGCCGCCCGGGAAACCCG** **GGCGTGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAG**	配列番号 15(ITR-18、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGT TGGCCACTCCCTCTCT**GCGCGC** **TCGCTCGCTCACTGAGGCGCAC**

【表５－２】

	CGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCC ATCACTAGGGGTTCCT		GCCCGGGTTTCCCGGGCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGCTGCCTGCAGG
配列番号33(ITR-34左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGTCGGGCGACCTTTG GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC CATCACTAGGGGTTCCT	配列番号48(ITR-51、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGT TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCGACG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号34(ITR-35左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC CATCACTAGGGGTTCCT	配列番号16(ITR-19、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGT TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGAC GCCCGGGCTTTGCCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGCTGCCTGCAGG
配列番号35(ITR-36左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCGCCCGGGCGTCGGGC GACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号17(ITR-20、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGT TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCGACG CCCGGGCGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGCTGCCTGCA GG
配列番号36(ITR-37左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCAAAGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC CAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号18(ITR-21、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGT TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCTTTG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGCTGCCTGCAGG
配列番号37(ITR-38左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACTTTGTCGCCCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCT	配列番号19(ITR-22右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGT TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACAAAGTCGCCCGACGCC CGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG

【表５－３】

配列番号38(ITR-39左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGATTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号20(ITR-23、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAAAATCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号39(ITR-40左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号21(ITR-24、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAAACGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号40(ITR-41左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCTTTGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号22(ITR-25右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAAAGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号41(ITR-42左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAAACCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号23(ITR-26右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号42(ITR-43左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGAAACCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号24(ITR-27右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGTTTCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

【表５－４】

配列番号43(ITR-44左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGAAACGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号25(ITR-28右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGTTTCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号44(ITR-45左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCAAAGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号26(ITR-29、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTTGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号45(ITR-46左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号27(ITR-30、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCTTTGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号46(ITR-47、左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCAAAGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号28(ITR-31、右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCTTTGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号47(ITR-48、左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAAACGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	配列番号29(ITR-32右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGTTTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

【０２８８】

いくつかの実施形態では、非対称ＩＴＲ対を含むｃｅＤＮＡベクターは、本明細書の表４Ａ～４Ｂのいずれか１つ以上に示されるＩＴＲ配列もしくはＩＴＲ部分配列、あるいは２０１８年１２月６日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２号（その全体が本明細書に組み込まれる）の図７Ａ～７Ｂに示されているか、または２０１８年９月７日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の表２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０Ａ～１０Ｂに開示されている配列における修飾のうちのいずれかに対応する修飾を有するＩＴＲを含み得る。

【０２８９】

Ｖ．制御された導入遺伝子発現のための例示的なｃｅＤＮＡベクター

上記のように、本開示は、組み換えｃｅＤＮＡ発現ベクター、および上記のような非対称ＩＴＲ対、対称ＩＴＲ対、または実質的に対称のＩＴＲ対のうちのいずれか１つを含む導入遺伝子をコードする制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターに関する。ある特定の実施形態では、本開示は、隣接するＩＴＲ配列および導入遺伝子を有する制御された導入遺伝子発現のための組み換えｃｅＤＮＡベクターに関し、ＩＴＲ配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、または実質的に対称であり、ｃｅＤＮＡは、隣接するＩＴＲの間に位置する関心対象のヌクレオチド配列（例えば、導入遺伝子の核酸を含む発現カセット）をさらに含み、当該核酸分子は、ウイルスカプシドタンパク質コード配列を欠いている。

【０２９０】

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

【０２９１】

ここで図１Ａ～１Ｇを参照すると、本開示のｃｅＤＮＡベクターを作製するのに有用な２つの非限定的プラスミドの機能的構成成分の概略図が示されている。図１Ａ、１Ｂ、１Ｄ、１Ｆは、ｃｅＤＮＡベクターの構築物または対応するｃｅＤＮＡプラスミドの配列を示す。ｃｅＤＮＡベクターは、カプシドを含まず、第１のＩＴＲ、発現可能な導入遺伝子カセット、および第２のＩＴＲをこの順序でコードするプラスミドから取得することができ、第１および第２のＩＴＲ配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、または実質的に対称である。ｃｅＤＮＡベクターは、カプシドを含まず、第１のＩＴＲ、発現可能な導入遺伝子（タンパク質または核酸）、および第２のＩＴＲをこの順序でコードするプラスミドから取得することができ、第１および第２のＩＴＲ配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、または実質的に対称である。いくつかの実施形態では、発現可能な導入遺伝子カセットは、必要に応じて、エンハンサー／プロモーター、１つ以上の相同性アーム、ドナー配列、転写後調節エレメント（例えば、ＷＰＲＥ、例えば、配列番号６７）、ならびにポリアデニル化および終結シグナル（例えば、ＢＧＨポリＡ、例えば、配列番号６８）を含む。

【０２９２】

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

【０２９３】

Ａ．調節エレメント

本明細書で定義されるような非対称のＩＴＲ対または対称のＩＴＲ対を含む、本明細書に記載されるようなｃｅＤＮＡベクターは、シス調節エレメントの特定の組み合わせをさらに含み得る。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、ｍｉｒ調節エレメント、転写後調節エレメント、組織および細胞型特異的プロモーター、ならびにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＩＴＲは、導入遺伝子のプロモーターとして作用し得る。いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成分、例えば、本明細書に記載されるような調節スイッチを含み、導入遺伝子、またはｃｅＤＮＡベクターを含む細胞を殺傷し得るキルスイッチの発現を調節する。本発明で使用され得る調節スイッチを含む調節エレメントは、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）においてより完全に論じられている。

【０２９４】

実施形態では、第２のヌクレオチド配列は、調節配列、およびヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、遺伝子調節配列は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されている。ある特定の実施形態では、調節配列は、宿主細胞におけるヌクレアーゼの発現を制御するのに適している。ある特定の実施形態では、調節配列は、本開示のヌクレアーゼ（複数可）をコードするヌクレオチド配列などのプロモーター配列に操作可能に連結された遺伝子の転写を指示することができる、好適なプロモーター配列を含む。ある特定の実施形態では、第２のヌクレオチド配列は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の５’末端に連結されたイントロン配列を含む。ある特定の実施形態では、エンハンサー配列がプロモーターの上流に提供されて、プロモーターの効力を増大させる。ある特定の実施形態では、調節配列は、エンハンサーおよびプロモーターを含み、第２のヌクレオチド配列は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の上流のイントロン配列を含み、イントロンは、１つ以上のヌクレアーゼ切断部位（複数可）を含み、プロモーターは、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されている。

【０２９５】

合成的に、または本明細書において実施例に記載されるような細胞ベースの産生方法を使用して産生されたｃｅＤＮＡベクターは、ＷＨＰ転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）（例えば、配列番号６７）およびＢＧＨポリＡ（配列番号６８）などのシス調節エレメントの特定の組み合わせをさらに含み得る。発現構築物における使用のための好適な発現カセットは、ウイルスカプシドによって課されるパッケージング制約によって制限されない。

【０２９６】

（ｉ）．プロモーター：

当業者は、本発明のｃｅＤＮＡベクターで使用されるプロモーターが、それらが促進する特定の配列に対して適切に調整されるべきであることを理解するであろう。例えば、ガイドＲＮＡは、その機能が、未変性ＤＮＡ上の特定の標的配列と二重鎖を形成して組み換え事象を発生させるため、プロモーターをまったく必要としない場合がある。対照的に、ｃｅＤＮＡベクターによってコードされるヌクレアーゼは、プロモーターから恩恵を受けるため、ベクターから効率的に、かつ任意に調節可能な方法で発現させることができる。

【０２９７】

本発明の発現カセットは、全体発現レベルとともに細胞特異性に影響を及ぼし得るプロモーターを含む。導入遺伝子発現の場合、それらは、非常に活発なウイルス由来の最初期プロモーターを含み得る。発現カセットは、導入遺伝子発現を特定の細胞型に制限し、無秩序な異所性発現から生じる毒性効果および免疫反応を低減するために組織特異的真核細胞プロモーターを含有し得る。好ましい実施形態では、発現カセットは、ＣＡＧプロモーター（配列番号７２）などの合成調節エレメントを含有し得る。ＣＡＧプロモーターは、（ｉ）サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）早期エンハンサーエレメント、（ｉｉ）プロモーター、ニワトリβ－アクチン遺伝子の第１のエクソンおよび第１のイントロン、ならびに

（ｉｉｉ）ウサギβ－グロブリン遺伝子のスプライスアクセプターを含む。代替として、発現カセットは、α－１－抗トリプシン（ＡＡＴ）プロモーター（配列番号７３もしくは配列番号７４）、肝臓特異的（ＬＰ１）プロモーター（配列番号７５もしくは配列番号７６）、またはヒト伸長因子－１α（ＥＦ１ａ）プロモーター（例えば、配列番号７７もしくは配列番号７８）を含有し得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、１つ以上の構成的プロモーター、例えば、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター（任意にＲＳＶエンハンサーを有する）、またはサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）最初期プロモーター（任意にＣＭＶエンハンサーを有する、例えば、配列番号７９）を含む。代替として、誘導性プロモーター、導入遺伝子の未変性プロモーター、組織特異的プロモーター、または当該技術分野において既知の様々なプロモーターを使用することができる。

【０２９８】

上記のものを含む好適なプロモーターは、ウイルスに由来し得るため、ウイルスプロモーターと称され得るか、またはそれらは、原核生物または真核生物を含む任意の生物に由来し得る。好適なプロモーターを使用して、任意のＲＮＡポリメラーゼ（例えば、ｐｏｌ　Ｉ、ｐｏｌ　ＩＩ、ｐｏｌ　ＩＩＩ）によって発現を駆動することができる。例示的なプロモーターとしては、ＳＶ４０初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス長末端配列（ＬＴＲ）プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（Ａｄ　ＭＬＰ）；単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、例えばＣＭＶ最初期プロモーター領域（ＣＭＶＩＥ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター、ヒトＵ６小核プロモーター（Ｕ６、例えば、配列番号８０（Ｍｉｙａｇｉｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０，４９７－５００（２００２））、強化Ｕ６プロモーター（例えば、Ｘｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００３　Ｓｅｐ．１；３１（１７））、ヒトＨ１プロモーター（Ｈ１）（例えば、配列番号８１）、ＣＡＧプロモーター（配列番号７２）、ヒトα１－抗チプシン（ＨＡＡＴ）プロモーター（例えば、配列番号８２）等が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、これらのプロモーターは、それらの下流イントロン含有端で変更され、１つ以上のヌクレアーゼ切断部位を含む。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ切断部位（複数可）を含有するＤＮＡは、プロモーターＤＮＡに対して外来である。

【０２９９】

一実施形態では、使用されるプロモーターは、治療タンパク質をコードする遺伝子の未変性プロモーターである。治療タンパク質をコードするそれぞれの遺伝子のプロモーターおよび他の調節配列は既知であり、特徴付けられている。使用されるプロモーター領域は、１つ以上の追加の調節配列（例えば、未変性）、例えば、ＳＶ４０エンハンサー（配列番号１２６）を含むエンハンサー（例えば、配列番号７９および配列番号８３）をさらに含み得る。

【０３００】

本発明に従う使用のための好適なプロモーターの非限定的な例としては、例えば、ＣＡＧプロモーター（配列番号７２）、ＨＡＡＴプロモーター（配列番号８２）、ヒトＥＦ１－αプロモーター（配列番号７７）、またはＥＦ１ａプロモーター（配列番号７８）、ＩＥ２プロモーター（例えば、配列番号８４）、およびラットＥＦ１－αプロモーター（配列番号８５）、または１Ｅ１プロモーター断片（配列番号１２５）が挙げられる。

【０３０１】

（ｉｉ）．ポリアデニル化配列：

ポリアデニル化配列をコードする配列は、ｃｅＤＮＡベクターから発現されたｍＲＮＡを安定化するため、および核輸送および翻訳を助けるために、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクター中に含まれ得る。一実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、ポリアデニル化配列を含まない。他の実施形態では、ベクターは、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５

、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、またはそれ以上のアデニンジヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、約４３ヌクレオチド、約４０～５０ヌクレオチド、約４０～５５ヌクレオチド、約４５～５０ヌクレオチド、約３５～５０ヌクレオチド、またはその間の任意の範囲を含む。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターが、例えば、抗体の制御された発現の場合に２つの導入遺伝子を含み得るいくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、抗体重鎖（例えば、例示的な重鎖は配列番号５７である）をコードする核酸と、抗体軽鎖（例えば、例示的な軽鎖は配列番号５８である）をコードする核酸とを含み得、第１の導入遺伝子の３′のポリアデニル化、および第１の導入遺伝子と第２の導入遺伝子との間（例えば、抗体重鎖をコードする核酸と抗体軽鎖をコードする核酸との間）にＩＲＥＳ（例えば、配列番号１９０）が位置し得る。そのような実施形態では、２つ以上の導入遺伝子（例えば、２つまたは３つ以上）をコードする制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、例えば、ＩＲＥＳ配列が、ポリアデニル化配列の３′に位置する場合、ＩＲＥＳ（内部リボソームエントリー部位）配列（配列番号１９０）を含み得、それにより最初の導入遺伝子の３′に位置する２番目の導入遺伝子（例えば、抗体または抗原結合断片）が、同じｃｅＤＮＡベクターによって翻訳および発現され、ｃｅＤＮＡベクターが、ｃｅＤＮＡベクターによってコードされる２つ以上の導入遺伝子を発現できるようになる。

【０３０２】

発現カセットは、当該技術分野において既知のポリアデニル化配列またはその変形、例えば、ウシＢＧＨｐＡ（例えば、配列番号６８）もしくはウイルスＳＶ４０ｐＡ（例えば、配列番号８６）から単離された天然に存在する配列、または合成配列（例えば、配列番号８７）を含み得る。いくつかの発現カセットはまた、ＳＶ４０後期ポリＡシグナル上流エンハンサー（ＵＳＥ）配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ＵＳＥは、ＳＶ４０ｐＡまたは異種ポリＡシグナルと組み合わせて使用され得る。

【０３０３】

発現カセットはまた、導入遺伝子の発現を増加させるために、転写後エレメントを含み得る。いくつかの実施形態では、ウッドチャック肝炎ウイルス（ＷＨＰ）転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）（例えば、配列番号６７）を使用して、導入遺伝子の発現を増加させる。他の転写後処理エレメント、例えば、単純ヘルペスウイルスまたはＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）のチミジンキナーゼ遺伝子からの転写後エレメントを使用することができる。分泌配列は、導入遺伝子、例えば、ＶＨ－０２（配列番号８８）およびＶＫ－Ａ２６配列（配列番号８９）、またはＩｇＫシグナル配列（配列番号１２８）、Ｇｌｕ分泌シグナル配列（配列番号１８８）、またはＴＮＤ分泌シグナル配列（配列番号１８９）に連結され得る。

【０３０４】

（ｉｉｉ）．核局在化配列

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼをコードするベクターは、１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のＮＬＳを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のＮＬＳは、アミノ末端またはその近く、カルボキシ末端またはその近く、またはこれらの組み合わせ（例えば、アミノ末端における１つ以上のＮＬＳおよび／またはカルボキシ末端における１つ以上のＮＬＳ）に位置する。複数のＮＬＳが存在する場合、各々を他のＮＬＳから独立して選択することができ、それにより、単一のＮＬＳが複数のコピーに、および／または１つ以上のコピーに存在する１つ以上の他のＮＬＳと組み合わせて存在する。ＮＬＳの非限定的な例を表６に示す。

【０３０５】

【表６】

表６：核局在化シグナル

ソース	配列	配列番号
SV40 ウイルスの大きなＴ抗原	PKKKRKV（CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTG によってコードされる、配列番号 91）	90
ヌクレオプラスミン	KRPAATKKAGQAKKKK	92
c－myc	PAAKRVKLD	93
	RQRRNELKRSP	94
hRNPA1 M9	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY	95
インポーチンーαからの IBB ドメイン	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV	96
筋腫Ｔタンパク質	VSRKRPRP	97
	PPKKARED	98
ヒト p53	PQPKKKPL	99
マウス c－abl IV	SALIKKKKKMAP	100
インフルエンザウイルス NS1	DRLRR	117
	PKQKKRK	118
肝炎ウイルスδ抗原	RKLKKKIKKL	119
マウス Mx1 タンパク質	REKKKFLKRR	120
ヒトポリ（ADP－リボース）ポリメラーゼ	KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK	121
ステロイドホルモン受容体（ヒト）グルココルチコイド	RKCLQAGMNLEARKTKK	122

【０３０６】

Ｂ．ｃｅＤＮＡベクターの追加の構成成分

本開示のｃｅＤＮＡベクターは、遺伝子発現のための他の構成成分をコードするヌクレオチドを含み得る。例えば、特定の遺伝子標的事象を選択するには、保護ｓｈＲＮＡをマイクロＲＮＡに埋め込み、アルブミン遺伝子座などの高活性遺伝子座に部位特異的に統合するように設計された組み換えｃｅＤＮＡベクターに挿入することができる。そのような実施形態は、Ｎｙｇａａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ａ ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ｓｙｓｔｅｍ ｔｏ ｓｅｌｅｃｔ ｇｅｎｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ ｉｎ ｖｉｖｏ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｊｕｎｅ ８，２０１６に記載されているような任意の遺伝的背景における遺伝子修飾肝細胞のインビボ選択および拡大のための系を提供し得る。本開示のｃｅＤＮＡベクターは、形質転換、トランスフェクト、形質導入などされた細胞の選択を可能にする１つ以上の選択可能なマーカーを含み得る。選択可能なマーカーは、その産生物が殺生物剤またはウイルス耐性、重金属に対する耐性、栄養要求性に対する原栄養性、ＮｅｏＲ等を提供する遺伝子である。ある特定の実施形態では、正の選択マーカーが、ＮｅｏＲなどのドナー配列に組み込まれる。負の選択マーカーは、ドナー配

列の下流に組み込むことができ、例えば、負の選択マーカーをコードする核酸配列ＨＳＶ－ｔｋを、ドナー配列の下流の核酸構築物に組み込むことができる。

【０３０７】

実施形態では、本明細書に記載される合成プロセスを使用して産生された、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、例えば、２０１８年１２月６日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されているように遺伝子編集に使用することができ、５′相同性アーム、３′相同性アーム、ポリアデニル化部位上流、および５′相同性アームに近接のうちの１つ以上を含み得る。例示的な相同性アームは、５′および３′アルブミン相同性アーム（配列番号１５１および１５２）またはＣＣＲ５　５′および３′相同性アーム（例えば、配列番号１５３、１５４）である。

【０３０８】

Ｃ．調節スイッチ

分子調節スイッチは、シグナルに反応して、状態の測定可能な変化を生成するものである。そのような調節スイッチは、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターと有用に組み合わせて、ｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現の出力を制御することができる。いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子の発現を微調整するのに役立つ調節スイッチを含む。例えば、ｃｅＤＮＡベクターの生物学的封じ込め機能として役立ち得る。いくつかの実施形態では、スイッチは、ｃｅＤＮＡベクターにおける関心対象の遺伝子の、制御可能かつ調節可能な発現を開始または停止（すなわち、シャットダウン）するように設計された「オン／オフ」スイッチである。いくつかの実施形態では、スイッチは、一旦スイッチが起動されると、ｃｅＤＮＡベクターを含む細胞がプログラム細胞死を受けるよう指示することができる「キルスイッチ」を含み得る。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターでの使用に含まれる例示的な調節スイッチは、導入遺伝子の発現を調節するために使用することができ、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）においてより完全に論じられている。

【０３０９】

（ｉ）バイナリ調節スイッチ

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子の発現を制御可能に調整するのに役立ち得る調節スイッチを含む。例えば、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターのＩＴＲの間に位置する発現カセットは、追加として、関心対象の遺伝子に操作可能に連結された調節領域、例えば、プロモーター、シスエレメント、リプレッサー、エンハンサー等を含み得、この調節領域は、１つ以上の共因子または外因性薬剤によって調節される。単なる例として、調節領域は、小分子スイッチまたは誘導性もしくは抑制性プロモーターによって調節され得る。誘導性プロモーターの非限定例は、ホルモン誘導性または金属誘導性プロモーターである。他の例示的な誘導性プロモーター／エンハンサーエレメントとしては、ＲＵ４８６誘導性プロモーター、エクジソン誘導性プロモーター、ラパマイシン誘導性プロモーター、およびメタロチオネインプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３１０】

（ｉｉ）小分子調節スイッチ

様々な当該技術分野において既知の小分子系調節スイッチは、当該技術分野において既知であり、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターと組み合わせて、調節スイッチによって制御されるｃｅＤＮＡベクターを形成することができる。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、直交リガンド／核受容体対、例えば、レチノイド受容体変異形／ＬＧ３３５およびＧＲＱＣＩＭＦＩ（Ｔａｙｌｏｒ，ｅｔ　ａｌ．ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０（２０１０）：１５に開示されているものなどの、操作可能に連結された導入遺伝子の発現を制御する人工プロモーターとともに）；操作されたステロイド受容体、例えば、プロゲステロンに結合することはできないが、ＲＵ４８６（ミフェプリストン

）には結合するＣ末端切断を有する修飾型プロゲステロン受容体（米国特許第５，３６４，７９１号）；Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａからのエクジソン受容体およびそれらのエクジステロイドリガンド（Ｓａｅｚ，ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，９７（２６）（２０００），１４５１２－１４５１７）、またはＳａｎｄｏ　Ｒ　３ｒｄ；Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１３，１０（１１）：１０８５－８に開示されるような抗生物質トリメトプリム（ＴＭＰ）によって制御されるスイッチのうちのいずれか１つまたは組み合わせから選択され得る。いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターによって発現される導入遺伝子を制御するための調節スイッチは、米国特許第８，７７１，６７９号および同第６，３３９，０７０号に開示されているものなどのプロドラッグ活性化スイッチである。

【０３１１】

（ｉｉｉ）「パスコード」調節スイッチ

いくつかの実施形態では、調節スイッチは、「パスコードスイッチ」または「パスコード回路」であり得る。パスコードスイッチは、特定の条件が起こったときに、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現の制御の微調整を可能にする、すなわち、導入遺伝子の発現および／または抑制が起こるためには、条件の組み合わせが存在する必要がある。例えば、導入遺伝子の発現が起こるためには、少なくとも条件ＡおよびＢが起こらなければならない。パスコード調節スイッチは、任意の数の条件であり得、例えば、導入遺伝子の発現が起こるためには、少なくとも２、または少なくとも３、または少なくとも４、または少なくとも５、または少なくとも６、または少なくとも７、またはそれ以上の条件が存在する。いくつかの実施形態では、少なくとも２つの条件（例えば、Ａ、Ｂ条件）が起こる必要があり、いくつかの実施形態では、少なくとも３つの条件が起こる必要がある（例えば、Ａ、Ｂ、およびＣまたはＡ、Ｂ、およびＤ）。単なる例として、パスコード「ＡＢＣ」調節スイッチを有するｃｅＤＮＡからの遺伝子発現が起こるためには、条件Ａ、Ｂ、およびＣが存在しなければならない。条件Ａ、Ｂ、およびＣは、以下のとおりであり得る。条件Ａは、病態または疾患の存在であり、条件Ｂは、ホルモン反応であり、条件Ｃは、導入遺伝子の発現に対する反応である。例えば、導入遺伝子が欠陥ＥＰＯ遺伝子を編集する場合、条件Ａは、慢性腎疾患（ＣＫＤ）の存在であり、条件Ｂは、対象が腎臓中に低酸素状態を有する場合に起こり、条件Ｃは、腎臓中のエリスロポエチン産生細胞（ＥＰＣ）動員が不全であるか、または代替としてＨＩＦ－２活性化が不全である。一旦酸素レベルが増加するか、または所望のＥＰＯレベルに達すると、導入遺伝子は、３つの条件が起こるまで再度オフになり、オンに戻る。

【０３１２】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターにおける使用のために包含されるパスコード調節スイッチまたは「パスコード回路」は、生物学的封じ込め条件を定義するために使用される環境シグナルの範囲および複雑性を拡張するために、ハイブリッド転写因子（ＴＦ）を含む。既定条件の存在下で細胞死をトリガーするデッドマンスイッチとは対照的に、「パスコード回路」は、特定の「パスコード」の存在下での細胞生存または導入遺伝子発現を可能にし、所定の環境条件またはパスコードが存在する場合にのみ導入遺伝子発現および／または細胞生存を可能にするように容易に再プログラムされ得る。

【０３１３】

本明細書に開示される調節スイッチ、例えば、小分子スイッチ、核酸系スイッチ、小分子－核酸ハイブリッドスイッチ、転写後導入遺伝子調節スイッチ、翻訳後調節放射線制御スイッチ、低酸素媒介性スイッチ、および本明細書に開示される当業者に既知の他の調節スイッチのうちのいずれかおよびすべての組み合わせを、本明細書に開示されるパスコード調節スイッチにおいて使用することができる。使用のために包含される調節スイッチはまた、レビュー論文Ｋｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｒ　Ｓｏｃ　Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ．１２：２０１４１０００（２０１５）において考察され、Ｋｉｓの表１に要約されている。いくつかの実施形態では、パスコード系における使用のための調節スイッチは、表１１のス

イッチのうちのいずれか、またはそれらの組み合わせから選択され得る。
【０３１４】
（ｉｖ）．導入遺伝子発現を制御するための核酸系調節スイッチ
いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡによって発現された導入遺伝子を制御するための調節スイッチは、核酸系制御機序に基づく。例示的な核酸制御機序は、当該技術分野において既知であり、使用が想定される。例えば、そのような機序としては、リボスイッチ、例えば、ＵＳ２００９／０３０５２５３、ＵＳ２００８／０２６９２５８、ＵＳ２０１７／０２０４４７７、ＷＯ２０１８／０２６７６２Ａ１、米国特許第９，２２２，０９３号、および欧州特許出願第ＥＰ２８８０７１号に開示されるもの、またＶｉｌｌａ　ＪＫ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｓｐｅｃｔｒ．２０１８　Ｍａｙ；６（３）によるレビューに開示されるものなどが挙げられる。ＷＯ２０１８／０７５４８６およびＷＯ２０１７／１４７５８５に開示されるものなどの、代謝物反応性転写バイオセンサーもまた含まれる。使用が想定される他の当該技術分野において既知の機序としては、ｓｉＲＮＡまたはＲＮＡｉ分子（例えば、ｍｉＲ、ｓｈＲＮＡ）による導入遺伝子のサイレンシングが挙げられる。例えば、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、ｃｅＤＮＡベクターによって発現される導入遺伝子に対して相補的であるＲＮＡｉ分子をコードする調節スイッチを含み得る。導入遺伝子は、ｃｅＤＮＡベクターによって発現されたとしてもそのようなＲＮＡｉが発現される場合、相補的ＲＮＡｉ分子によってサイレンシングされ、導入遺伝子がｃｅＤＮＡベクターによって発現されたときにＲＮＡｉが発現されない場合、導入遺伝子は、ＲＮＡｉによってサイレンシングされない。
【０３１５】
いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、ＵＳ２００２／００２２０１８に開示されている組織特異的自己不活化調節スイッチであり、これにより調節スイッチは、そうでなければ導入遺伝子発現が不利益となり得る部位において、導入遺伝子発現を意図的にスイッチオフする。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、ＵＳ２０１４／０１２７１６２および米国特許第８，３２４，４３６号に開示されるリコンビナーゼ可逆的遺伝子発現系である。
【０３１６】
（ｖ）．転写後および翻訳後調節スイッチ。
いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターによって発現された関心対象の導入遺伝子または遺伝子を制御するための調節スイッチは、転写後修飾系である。例えば、そのような調節スイッチは、ＵＳ２０１８／０１１９１５６、ＧＢ２０１１／０７７６８、ＷＯ２００１／０６４９５６Ａ３、欧州特許第２７０７４８７号、およびＢｅｉｌｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＣＳ　Ｓｙｎｔｈ．Ｂｉｏｌ．，２０１５，４（５），ｐｐ　５２６－５３４、Ｚｈｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｌｉｆｅ．２０１６　Ｎｏｖ　２；５．ｐｉｉ：ｅ１８８５８に開示されているように、テトラサイクリンまたはテオフィリンに感受性であるアプタザイムリボスイッチであり得る。いくつかの実施形態では、当業者であれば、導入遺伝子、およびリガンド感受性（オフスイッチ）アプタマーを含有し、その最終結果がリガンド感受性オンスイッチである、阻害性ｓｉＲＮＡの両方をコードすることができると想定される。
【０３１７】
（ｖｉ）．他の例示的な調節スイッチ
任意の既知の調節スイッチをｃｅＤＮＡベクター中で使用して、環境変化によってトリガーされるものを含む、ｃｅＤＮＡベクターによって発現された導入遺伝子の遺伝子発現を制御することができる。追加の例としては、Ｓｕｚｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　８；１００５１（２０１８）のＢＯＣ方法、遺伝子コード拡張および非生理的アミノ酸、放射線制御型または超音波制御型オン／オフスイッチが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Ｓｃｏｔｔ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２０００　Ｊｕｌ；７（１３）：１１２１－５、米国特許第５，６１２，３１８号、同第５，５７１，７９７号、同第５，７７０，５８１号、同第５，８１７，６３

６号、およびＷＯ１９９９／０２５３８５Ａ１を参照）。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、米国特許第７，８４０，２６３号、ＵＳ２００７／０１９００２８Ａ１に開示されている、埋め込み可能な系によって制御され、遺伝子発現は、ｃｅＤＮＡベクター中の導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターを活性化する電磁エネルギーを含む、１つ以上のエネルギー形態によって制御される。

【０３１８】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターにおける使用が想定される調節スイッチは、低酸素媒介性またはストレス活性化スイッチ、例えば、ＷＯ１９９９／０６０１４２Ａ２、米国特許第５，８３４，３０６号、同第６，２１８，１７９号、同第６，７０９，８５８号、ＵＳ２０１５／０３２２４１０、Ｇｒｅｃｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）Ｔａｒｇｅｔｅｄ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｉｅｓ　９，Ｓ３６８に開示されるものなど、ならびにＦＲＯＧ、ＴＯＡＤ、およびＮＲＳＥエレメント、および条件的に誘導可能なサイレンスエレメント（例えば、米国特許第９，３９４，５２６号に開示される、低酸素反応エレメント（ＨＲＥ）、炎症反応エレメント（ＩＲＥ）、および剪断応力活性化エレメント（ＳＳＡＥ）を含む）である。そのような実施形態は、虚血後、または虚血性組織および／もしくは腫瘍において、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現をオンにするために有用である。

【０３１９】

（ｉｖ）．キルスイッチ

本発明の他の実施形態は、キルスイッチを含む、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターに関する。本明細書に開示されるキルスイッチは、ｃｅＤＮＡベクターを含む細胞が殺滅されるか、または導入されたｃｅＤＮＡベクターを対象の系から永久に除去する手段としてプログラム細胞死を受けるようにすることができる。本発明のｃｅＤＮＡベクターにおけるキルスイッチの使用が、通常は、対象が許容可能に喪失し得る限定数の細胞、またはアポトーシスが望ましい細胞型（例えば、癌細胞）へのｃｅＤＮＡベクターの標的と結びつけられることは、当業者によって理解されるであろう。すべての態様では、本明細書に開示される「キルスイッチ」は、入力生存シグナルまたは他の指定条件の非存在下でｃｅＤＮＡベクターを含む細胞の急速かつロバストな細胞殺滅をもたらすように設計される。言い換えれば、本明細書においてｃｅＤＮＡベクターによりコードされるキルスイッチは、ｃｅＤＮＡベクターを含む細胞の細胞生存を、特定の入力シグナルによって定義される環境に制限し得る。そのようなキルスイッチは、対象からｃｅＤＮＡベクターを除去すること、またはコードされた導入遺伝子を発現しないことを保証することが望ましいときに、生物学的封じ込め機能として役立つ。

【０３２０】

ＶＩ．ｃｅＤＮＡベクターの産生の詳細な方法

Ａ．一般的な産生

本明細書で定義されるような非対称ＩＴＲ対または対称ＩＴＲ対を含む、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターのある特定の産生方法は、２０１８年９月７日に提出された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号のセクションＩＶに記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような方法および組成物で使用するための制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、本明細書に記載されるように、昆虫細胞を使用して産生され得る。ａｎｔｅｒｌａｔｉｖｅ実施形態では、本明細書に開示されるような方法または組成物で使用するためのは、２０１９年１月１８日に提出された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１９／１４１２２号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されているように、合成的に、またいくつかの実施形態では無細胞法で産生することができる。

【０３２１】

本明細書に記載されるように、一実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、例えば、ａ）ポリヌクレオチド発現構築物テンプレート（例えば、

ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ－バクミド、および／またはｃｅＤＮＡ－バキュロウイルス）を内包する宿主細胞（例えば、昆虫細胞）の集団をインキュベートするステップであって、Ｒｅｐタンパク質の存在下では、宿主細胞内のｃｅＤＮＡベクターの産生を誘導するために効果的な条件下、かつそのために十分な時間にわたってウイルスカプシドコード配列を欠いており、宿主細胞が、ウイルスカプシドコード配列を含まない、インキュベートするステップと、ｂ）ｃｅＤＮＡベクターを宿主細胞から採取し、単離するステップと、を含むプロセスによって取得され得る。Ｒｅｐタンパク質の存在は、修飾型ＩＴＲを有するベクターポリヌクレオチドの複製を誘導して、宿主細胞中でｃｅＤＮＡベクターを産生する。しかしながら、ウイルス粒子（例えば、ＡＡＶビリオン）は発現されない。したがって、ＡＡＶまたは他のウイルス系ベクターにおいて天然に課されるものなどのサイズ制限はない。

【０３２２】

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

【０３２３】

さらに別の態様では、本発明は、例えば、Ｌｅｅ，Ｌ．ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｐｌｏｓ　Ｏｎｅ　８（８）：ｅ６９８７９に記載されるように、非ウイルスＤＮＡベクターの産生において、ＤＮＡベクターポリヌクレオチド発現テンプレート（ｃｅＤＮＡテンプレート）をそれら自体のゲノムに安定して組み込んでいる宿主細胞株の使用を提供する。好ましくは、Ｒｅｐは、約３のＭＯＩで宿主細胞に付加される。宿主細胞株が哺乳類細胞株、例えば、ＨＥＫ２９３細胞である場合、細胞株は、安定して組み込まれたポリヌクレオチドベクターテンプレートを有し得、ヘルペスウイルスなどの第２のベクターを使用して、Ｒｅｐタンパク質を細胞に導入することができ、Ｒｅｐおよびヘルパーウイルスの存在下でのｃｅＤＮＡの切除および増幅を可能にする。

【０３２４】

一実施形態では、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを作製するために使用される宿主細胞は、昆虫細胞であり、バキュロウイルスは、Ｒｅｐタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、例えば図４Ａ～４Ｃおよび実施例１に記載される、ｃｅＤＮＡの非ウイルス性ＤＮＡベクターポリヌクレオチド発現構築物テンプレートとを両方送達するために使用される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Ｒｅｐタンパク質を発現するために操作される。

【０３２５】

次いで、ｃｅＤＮＡベクターは、宿主細胞から採取され、単離される。本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを細胞から採取するための時間は、ｃｅＤＮＡベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存性、細胞形態論、細胞増殖等を考慮して選択され得る。一実施形態では、細胞は、十分な条件下で増殖し、ｃｅＤＮＡベクターを産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の対部分がバキュロウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取される。ＤＮＡ－ベクターは、Ｑｉａｇｅｎ　Ｅｎｄｏ－Ｆｒｅｅプラスミドキットなどのプラスミド精製キットを使用して単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、ＤＮＡ－ベクターに対して適合され得る。一般に、任意の核酸精製方法が採用され得る。

【０３２６】

ＤＮＡベクターは、ＤＮＡの精製のための当業者に既知の任意の手段によって精製され得る。一実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、ＤＮＡ分子として精製される。別の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、エキソソームまたは微粒子として精製される。

【０３２７】

ｃｅＤＮＡベクターの存在は、細胞から単離されたベクターＤＮＡをＤＮＡベクター上

に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、ならびにゲル電気泳動を使用し、消化されたＤＮＡ材料および未消化のＤＮＡ材料の両方を分析して、直鎖状で非連続的なＤＮＡと比較して特徴的な直鎖状で連続的なＤＮＡの存在を確認することによって確認され得る。図４ＣおよびＦＩＧ．４Ｄは、本明細書におけるプロセスによって産生された閉端ｃｅＤＮＡベクターの存在を特定するための一実施形態を示す。

【０３２８】

【０３２９】

Ｂ．ｃｅＤＮＡプラスミド

ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、ｃｅＤＮＡベクターの後期産生に使用されるプラスミドである。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、転写方向の操作可能に連結された構成成分として、少なくとも（１）５’ＩＴＲ配列、（２）シス調節エレメントを含有する発現カセット、例えば、プロモーター、誘導性プロモーター、調節スイッチ、エンハンサー等、および（３）修飾型３’ＩＴＲ配列（３’ＩＴＲ配列は、５’ＩＴＲ配列に対して非対称である）を提供する既知の技法を使用して構築され得る。いくつかの実施形態では、ＩＴＲによって隣接された発現カセットは、外因性配列を導入するためのクローニング部位を含む。発現カセットは、ＡＡＶゲノムのｒｅｐおよびｃａｐコード領域を置き換える。

【０３３０】

一態様では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、本明細書では、第１のアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）逆位末端反復（ＩＴＲ）、導入遺伝子を含む発現カセット、および突然変異型または修飾型ＡＡＶ　ＩＴＲをこの順序でコードする「ｃｅＤＮＡ－プラスミド」と参照されるプラスミドから取得され、当該ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、ＡＡＶカプシドタンパク質コード配列を欠いている。代替実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、第１の（または５’）修飾型または突然変異型ＡＡＶ　ＩＴＲ、導入遺伝子を含む発現カセット、および第２の（または３’）修飾型ＡＡＶ　ＩＴＲをこの順序でコードし、当該ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、ＡＡＶカプシドタンパク質コード配列を欠いており、５’および３’ＩＴＲは、互いに対して対称である。代替実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、第１の（または５’）修飾型または突然変異型ＡＡＶ　ＩＴＲ、導入遺伝子を含む発現カセット、および第２の（または３’）突然変異型または修飾型ＡＡＶ　ＩＴＲをこの順序でコードし、当該ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、ＡＡＶカプシドタンパク質コード配列を欠いており、５’および３’修飾型ＩＴＲは、同じ修飾を有する（すなわち、それらは互いに対して逆相補または対称である）。

【０３３１】

さらなる実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミド系は、ウイルスカプシドタンパク質コード配列を欠いている（すなわち、ＡＡＶカプシド遺伝子だけでなく、他のウイルスのカプシド遺伝子も欠いている）。追加として、特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミドはまた、ＡＡＶ　Ｒｅｐタンパク質コード配列を欠いている。したがって、好ましい実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、機能的ＡＡＶ　ｃａｐおよびＡＡＶ　ｒｅｐ遺伝子（ＡＡＶ２の場合ＧＧ－３’）に加えて、ヘアピン形成を可能にする可変パリンドローム配列を欠いている。

【０３３２】

本発明のｃｅＤＮＡ－プラスミドは、当該技術分野において周知の任意のＡＡＶ血清型のゲノムの天然ヌクレオチド配列を使用して生成され得る。一実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミド骨格は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ５、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ－ＤＪ、およびＡＡＶ－ＤＪ８ゲノムに由来する。例えば、ＮＣＢＩ：ＮＣ００２０７７、ＮＣ００１４０１、ＮＣ００１７２９、ＮＣ００１８２９、ＮＣ００６１５２、ＮＣ００６２６０、ＮＣ００６２６１、Ｓｐｒｉｎｇｅｒによって維持されるＵＲＬで入手可能なＫｏｔｉｎ　ａｎｄ　Ｓｍｉｔｈ，Ｔｈｅ　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｉｎｄｅｘ　ｏｆ　Ｖｉｒｕｓｅｓ（ｗｗｗウェブアドレス：ｏｅｓｙｓ．ｓｐｒｉｎ

ｇｅｒ．ｄｅ／ｖｉｒｕｓｅｓ／ｄａｔａｂａｓｅ／ｍｋｃｈａｐｔｅｒ．ａｓｐ？ｖｉｒＩＤ＝４２．０４）（注記－ＵＲＬまたはデータベースに対する参照は、本出願の有効な出願日現在のＵＲＬまたはデータベースの内容を指す）。特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミド骨格は、ＡＡＶ２ゲノムに由来する。別の特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡ－プラスミド骨格は、これらのＡＡＶゲノムのうちの１つに由来する５’および３’ＩＴＲに含まれるように遺伝子操作された合成骨格である。

【０３３３】

ｃｅＤＮＡ－プラスミドは、ｃｅＤＮＡベクター産生細胞株の確立における使用のための選択可能または選択マーカーを任意に含み得る。一実施形態では、選択マーカーは、３’ＩＴＲ配列の下流（すなわち、３’）に挿入され得る。別の実施形態では、選択マーカーは、５’ＩＴＲ配列の上流（すなわち、５’）に挿入され得る。適切な選択マーカーは、例えば、薬物耐性を付与するものを含む。選択マーカーは、例えば、ブラスチシジンＳ耐性遺伝子、カナマイシン、ゲネチシン等であり得る。好ましい実施形態では、薬物選択マーカーは、ブラスチシジンＳ耐性遺伝子である。

【０３３４】

例示的なｃｅＤＮＡ（例えば、ｒＡＡＶ０）は、ｒＡＡＶプラスミドから産生される。ｒＡＡＶベクターの産生のための方法は、（ａ）宿主細胞に上記のようなｒＡＡＶプラスミドを提供することであって、宿主細胞およびプラスミドの両方が、カプシドタンパク質コード遺伝子を描いている、提供することと、（ｂ）ｃｅＤＮＡゲノムの産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することと、（ｃ）細胞を採取し、当該細胞から産生されたＡＡＶゲノムを単離することと、を含み得る。

【０３３５】

Ｃ．ｃｅＤＮＡプラスミドからｃｅＤＮＡベクターを作製する例示的な方法

カプシド不含ｃｅＤＮＡベクターを作製するための方法、特にインビボ実験に十分なベクターを提供するために十分に高い収率を有する方法もまた、本明細書に提供される。

【０３３６】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの産生方法は、（１）発現カセットおよび２つの対称ＩＴＲ配列を含む核酸構築物を宿主細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入するステップと、（２）任意に、例えば、プラスミド上に存在する選択マーカーを使用することによってクローン細胞株を確立するステップと、（３）Ｒｅｐコード遺伝子を（当該遺伝子を担持するバキュロウイルスでのトランスフェクションまたは感染のいずれかによって）前述の昆虫細胞中に導入するステップと、（４）細胞を採取し、ｃｅＤＮＡベクターを精製するステップと、を含む。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの産生のために上記の発現カセットおよび２つのＩＴＲ配列を含む核酸構築物は、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、または下記のようにｃｅＤＮＡプラスミドで生成されたバクミドもしくはバキュロウイルスの形態であり得る。核酸構築物は、トランスフェクション、ウイルス形質導入、安定した組み込み、または当該技術分野において既知の他の方法によって宿主細胞中に導入され得る。

【０３３７】

Ｄ．細胞株：

制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの産生において使用される宿主細胞株は、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ（Ｓｆ９、Ｓｆ２１など）もしくはＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ細胞に由来する昆虫細胞株、または他の無脊椎動物、脊椎動物、もしくは哺乳類細胞を含む他の真核細胞株を含み得る。熟練者に既知の他の細胞株、例えば、ＨＥＫ２９３、Ｈｕｈ－７、ＨｅＬａ、ＨｅｐＧ２、ＨｅｐｌＡ、９１１、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＭｅＷｏ、ＮＩＨ３Ｔ３、Ａ５４９、ＨＴ１　１８０、単球、ならびに成熟および未成熟樹状細胞を使用することもできる。宿主細胞株は、高収率のｃｅＤＮＡベクター産生のために、ｃｅＤＮＡ－プラスミドの安定した発現のためにトランスフェクトされ得る。

【０３３８】

ＣｅＤＮＡ－プラスミドは、当該技術分野において既知の試薬（例えば、リポソーム、リン酸カルシウム）または物理的手段（例えば、電気穿孔）を使用し、一時的なトランスフェクションによってＳｆ９細胞中に導入され得る。代替として、ｃｅＤＮＡ－プラスミドをそれらのゲノム中に安定して組み込んでいる安定したＳｆ９細胞株が確立され得る。そのような安定した細胞株は、選択マーカーを上記のｃｅＤＮＡ－プラスミド中に組み込むことによって確立され得る。細胞株をトランスフェクトするために使用されるｃｅＤＮＡ－プラスミドが、抗生物質などの選択マーカーを含む場合、ｃｅＤＮＡ－プラスミドでトランスフェクトされ、ｃｅＤＮＡ－プラスミドＤＮＡをそれらのゲノム中に組み込んでいる細胞は、細胞増殖培地への抗生物質の添加によって選択され得る。次いで、細胞の耐性クローンは、単一細胞希釈またはコロニー移動技法によって単離され、伝播され得る。

【０３３９】

Ｅ．ｃｅＤＮＡベクターを単離し、精製する

ｃｅＤＮＡベクターを入手し、単離するためのプロセスの例は、図４Ａ～４Ｅおよび下記の特定の実施例に記載されている。本明細書に開示されるｃｅＤＮＡ－ベクターは、ＡＡＶ　Ｒｅｐタンパク質（複数可）を発現するプロデューサー細胞から取得され、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ－バクミド、またはｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスでさらに形質転換され得る。ｃｅＤＮＡベクターの産生に有用なプラスミドには、１つ以上のＲｅｐタンパク質を組み込むプラスミド、およびｃｅＤＮＡベクターを取得するために使用されるプラスミドが含まれる。導入遺伝子の制御された発現のためのｃｅＤＮＡベクターの産生のための例示的なプラスミドは、２０１８年１２月６日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２号（その全体が本明細書に組み込まれる）の図６Ｂに示されるプラスミドである。抗体の制御された発現のためのｃｅＤＮＡベクターの産生のためのｃｅＤＮＡプラスミドは、図６Ａに開示されており、アデュカヌマブの産生のための例示的なｃｅＤＮＡプラスミドを開示している２０１９年2月１４日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１９／１８０１６号の配列番号５６である。

【０３４０】

一態様では、ＡＡＶ　Ｒｅｐタンパク質（Ｒｅｐ７８もしくはＲｅｐ６８）をコードするポリヌクレオチドは、プラスミド（Ｒｅｐ－プラスミド）、バクミド（Ｒｅｐ－バクミド）、またはバキュロウイルス（Ｒｅｐ－バキュロウイルス）中のプロデューサー細胞に送達される。Ｒｅｐ－プラスミド、Ｒｅｐ－バクミド、およびＲｅｐ－バキュロウイルスは、上記の方法によって生成され得る。

【０３４１】

例示的なｃｅＤＮＡベクターである、ｃｅＤＮＡベクターを産生するための方法は、本明細書に記載されている。本発明のｃｅＤＮＡベクターを生成するために使用される発現構築物は、プラスミド（例えば、ｃｅＤＮＡ－プラスミド）、バクミド（例えば、ｃｅＤＮＡ－バクミド）、および／またはバキュロウイルス（例えば、ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルス）であり得る。単なる例として、ｃｅＤＮＡベクターは、ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスおよびＲｅｐ－バキュロウイルスに共感染した細胞から生成され得る。Ｒｅｐ－バキュロウイルスから産生されたＲｅｐタンパク質は、ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスを複製して、ｃｅＤＮＡベクターを生成する。代替として、ｃｅＤＮＡベクターは、Ｒｅｐ－プラスミド、Ｒｅｐ－バクミド、またはＲｅｐ－バキュロウイルス中で送達されるＡＡＶ　Ｒｅｐタンパク質（Ｒｅｐ７８／５２）をコードする配列を含む構築物で安定してトランスフェクトされた細胞から生成され得る。ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスは、細胞に一時的にトランスフェクトされ、Ｒｅｐタンパク質によって複製され、ｃｅＤＮＡベクターを産生し得る。

【０３４２】

バクミド（例えば、ｃｅＤＮＡ－バクミド）は、Ｓｆ９、Ｓｆ２１、Ｔｎｉ（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ）細胞、Ｈｉｇｈ　Ｆｉｖｅ細胞などの許容昆虫細胞中にトランスフェクトされ得、対称ＩＴＲおよび発現カセットを含む配列を含む組み換えバキュロウイルスである、ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスを生成し得る。ｃｅＤＮＡ－バキュロウイ

ルスを昆虫細胞中に再度感染させて、次世代の組み換えバキュロウイルスを取得することができる。任意に、このステップを一回または複数回繰り返して、より多い量の組み換えバキュロウイルスを産生することができる。

【０３４３】

本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを細胞から採取するための時間は、ｃｅＤＮＡベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存性、細胞形態論、細胞増殖等を考慮して選択され得る。通常、細胞は、ｃｅＤＮＡベクター（例えば、ｃｅＤＮＡベクター）を産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の対部分がウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取され得る。ｃｅＤＮＡベクターは、Ｑｉａｇｅｎ　ＥＮＤＯ－ＦＲＥＥ　ＰＬＡＳＭＩＤ（登録商標）キットなどのプラスミド精製キットを使用して、Ｓｆ９細胞から単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、ｃｅＤＮＡベクターに対して適合され得る。一般に、任意の当該技術分野において既知の核酸精製方法、ならびに市販のＤＮＡ抽出キットが採用され得る。

【０３４４】

代替として、細胞ペレットをアルカリ溶解プロセスに供し、得られた溶解物を遠心分離し、クロマトグラフィー分離を実施することによって、精製が実装され得る。１つの非限定例として、このプロセスは、核酸を保持するイオン交換カラム（例えば、ＳＡＲＴＯＢＩＮＤ　Ｑ（登録商標））上に上澄を負荷し、次いで溶出し（例えば、１．２Ｍ　ＮａＣｌ溶液で）、ゲル濾過カラム（例えば、６高速流ＧＥ）上でさらなるクロマトグラフィー精製を実施することによって実施され得る。次いで、カプシド不含ＡＡＶベクターは、例えば、沈殿によって回収される。

【０３４５】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターはまた、エキソソームまたは微粒子の形態で精製され得る。多くの細胞型が、膜微小胞の脱落を介して、可溶性タンパク質だけでなく、複合タンパク質／核酸カーゴも放出することは、当該技術分野において既知である（Ｃｏｃｕｃｃｉ　ｅｔ　ａｌ，２００９、ＥＰ１０３０６２２６．１）。そのような小胞は、微小胞（微粒子とも称される）およびエキソソーム（ナノ小胞とも称される）を含み、それらの両方が、タンパク質およびＲＮＡをカーゴとして含む。微小胞は、形質膜の直接出芽から生成され、エキソソームは、多小胞エンドソームと形質膜との融合時に細胞外環境に放出される。したがって、ｃｅＤＮＡベクターを含有する微小胞および／またはエキソソームは、ｃｅＤＮＡプラスミド、またはｃｅＤＮＡプラスミドで生成されたバクミドもしくはバキュロウイルスで形質導入された細胞から単離され得る。

【０３４６】

微小胞は、培養培地を２０，０００ｘｇでの濾過または超遠心分離、および１００，０００ｘｇでのエキソソームにかけることによって単離され得る。超遠心分離の最適な期間は、実験的に決定することができ、小胞が単離される特定の細胞型に依存する。好ましくは、培養培地は、最初に低速遠心分離（例えば、２０００×ｇで５～２０分間）によって一掃され、例えば、ＡＭＩＣＯＮ（登録商標）スピンカラム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｗａｔｆｏｒｄ，ＵＫ）を使用し、スピン濃度に供される。微小胞およびエキソソームは、微小胞およびエキソソーム上に存在する特定の表面抗原を認識する特定の抗体を使用することによって、ＦＡＣＳまたはＭＡＣＳを介してさらに精製され得る。他の微小胞およびエキソソーム精製方法としては、免疫沈殿、親和性クロマトグラフィー、濾過、および特定の抗体またはアプタマーでコーティングされた磁気ビーズが挙げられるが、これらに限定されない。精製時に、小胞を、例えば、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。ｃｅＤＮＡ含有小胞を送達するために微小胞またはエキソソームを使用する１つの利点は、これらの小胞が、それぞれの細胞型上の特定の受容体によって認識されるそれらの膜タンパク質上に含めることによって、様々な細胞型に標的化され得ることである。（ＥＰ１０３０６２２６も参照）

【０３４７】

本明細書における本発明の別の態様は、ｃｅＤＮＡ構築物をそれら自体のゲノム中に安定して組み込んでいる宿主細胞株からｃｅＤＮＡベクターを精製する方法に関する。一実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、ＤＮＡ分子として精製される。別の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、エキソソームまたは微粒子として精製される。

【０３４８】

国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６号の図５は、実施例に記載される方法を使用して、複数のｃｅＤＮＡプラスミド構築物からｃｅＤＮＡの産生を確認するゲルを示す。ｃｅＤＮＡは、実施例の図４Ｄに関して考察されるように、ゲル中の特徴的なバンドパターンによって確認される。

【０３４９】

ＶＩＩ．薬学的組成物

別の態様では、薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は、閉端ＤＮＡベクター、例えば本明細書に記載されるような合成プロセスを使用して産生された制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクター、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む。

【０３５０】

本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、対象の細胞、組織、または器官へのインビボ送達のために対象に投与するのに好適な薬学的組成物に組み込まれ得る。典型的に、薬学的組成物は、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターおよび薬学的に許容される担体を含む。例えば、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターは、治療的投与（例えば、非経口投与）の所望の経路に好適な薬学的組成物に組み込まれ得る。高圧静脈内または動脈内注射を介した受動組織形質導入、ならびに細胞内注入、例えば、核内微量注入もしくは細胞質内注入もまた企図される。治療目的のための薬学的組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高ｃｅＤＮＡベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌注射液は、必要に応じて、上記に列挙した成分の１つまたは組み合わせとともに、適切なバッファーに必要量のｃｅＤＮＡベクター化合物を組み込んだ後、ｃｅＤＮＡベクターを含む濾過滅菌によって調製することができ、核酸中の導入遺伝子をレシピエントの細胞に送達するように製剤化して、その中の導入遺伝子またはドナー配列の治療的発現をもたらし得る。この組成物はまた、薬学的に許容される担体を含み得る。

【０３５１】

制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを含む薬学的に活性な組成物は、細胞、例えば対象の細胞に様々な目的のための導入遺伝子を送達するように製剤化することができる。

【０３５２】

本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、対象の細胞、組織、または器官へのインビボ送達のために対象に投与するのに好適な薬学的組成物に組み込まれ得る。典型的に、薬学的組成物は、本明細書に開示されるＤＮＡベクターおよび薬学的に許容される担体を含む。例えば、本発明のｃｅＤＮＡベクターは、治療的投与（例えば、非経口投与）の所望の経路に好適な薬学的組成物に組み込まれ得る。高圧静脈内または動脈内注射を介した受動組織形質導入、ならびに細胞内注入、例えば、核内微量注入もしくは細胞質内注入もまた企図される。治療目的のための薬学的組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高ｃｅＤＮＡベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌の注入可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量のｃｅＤＮＡベクター化合物を、上記で列挙した成分のうちの１つまたは組み合わせに組み込み、濾過滅菌することによって調製され得る。

【０３５３】

ｃｅＤＮＡベクターを含む薬学的に活性な組成物は、核酸中の導入遺伝子をレシピエントの細胞に送達するように製剤化され得、その中の導入遺伝子の治療的発現をもたらす。この組成物はまた、任意に、薬学的に許容される担体および／または賦形剤を含み得る。

【０３５４】
本明細書に提供される組成物およびベクターを使用して、様々な目的のために導入遺伝子を送達することができる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、研究目的のため、例えば、導入遺伝子を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成するため、例えば、導入遺伝子産生物の機能を研究するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的ＲＮＡをコードする。別の実施例では、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを作成するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的ＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、哺乳類対象における疾患状態の治療または予防に有用である、１つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。導入遺伝子は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、または機能不全に関連した疾患を治療するのに十分な量で患者に導入され得る（例えば、発現され得る）。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、遺伝子編集分子（例えば、ヌクレアーゼ）である。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（Ｃａｓヌクレアーゼ）である。

【０３５５】
治療目的のための薬学的組成物は、典型的に、無菌であり、製造および貯蔵の条件下で安定していなければならない。無菌の注入可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量のｃｅＤＮＡベクター化合物を、上記で列挙した成分のうちの１つまたは組み合わせに組み込み、濾過滅菌することによって調製され得る。

【０３５６】
ある特定の状況では、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡ組成物またはベクターを、本明細書に開示される適切に製剤化された薬学的組成物で、皮下、膵臓内、鼻腔内、非経口、静脈内、筋肉内、髄腔内、全身投与、または経口、腹腔内、または吸入によって送達することが望ましい。

【０３５７】
本明細書では、具体的に、本明細書に記載される組成物は、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを、ｃｅＤＮＡベクターの用量反応関係によって決定される所与の用量、例えば、投与時に、典型的な対象において遺伝医学の望ましい効果または発現レベルをもたらすことが確実に期待され得る「単位用量」で含むことが企図される。

【０３５８】
治療目的のための薬学的組成物は、典型的に、無菌であり、製造および貯蔵の条件下で安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高ｃｅＤＮＡベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌の注入可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量のｃｅＤＮＡベクター化合物を、上記で列挙した成分のうちの１つまたは組み合わせに組み込み、濾過滅菌することによって調製され得る。

【０３５９】
本明細書に開示される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、局所、全身、羊膜内、髄腔内、頭蓋内、動脈内、静脈内、リンパ内、腹腔内、皮下、気管、組織内（例えば、筋肉内、心臓内、肝内、腎臓内、脳内）、髄腔内、膀胱内、結膜（例えば、眼窩外、眼窩内、眼窩後、網膜内、網膜下、脈絡膜、脈絡膜下、間質内、房内、および硝子体内）、蝸牛内、ならびに粘膜（例えば、経口、直腸、経鼻）投与に適した薬学的組成物に組み込むことができる。高圧静脈内または動脈内注射を介した受動組織形質導入、ならびに細胞内注入、例えば、核内微量注入もしくは細胞質内注入もまた企図される。

【０３６０】
いくつかの態様では、本明細書で提供される方法は、本明細書に開示されるような１つ以上のｃｅＤＮＡベクターを宿主細胞に送達することを含む。本明細書ではまた、そのような方法によって産生される細胞、およびそのような細胞を含むかまたはそのような細胞から産生される生物（動物、植物、または真菌など）も提供される。核酸の送達方法には、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリステ

ィック、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸複合体、裸のＤＮＡ、およびＤＮＡでの薬剤強化取り込みが含まれ得る。リポフェクションは、例えば、米国特許第５，０４９，３８６号、同第４，９４６，７８７号、および同第４，８９７，３５５号に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）およびＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標））。送達は、細胞（例えば、インビトロもしくはエクスビボ投与）または標的組織（例えば、インビボ投与）に対するものであり得る。

【０３６１】

核酸を細胞に送達するための様々な技法および方法が、当該技術分野において既知である。例えば、ｃｅＤＮＡなどの核酸は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リピドイド、リポソーム、脂質ナノ粒子、リポプレックス、またはコアシェルナノ粒子中に製剤化され得る。典型的に、ＬＮＰは、核酸（例えば、ｃｅＤＮＡ）分子、１つ以上のイオン化またはカチオン性脂質（もしくはそれらの塩）、１つ以上の非イオン性または中性脂質（例えば、リン脂質）、凝集を防ぐ分子（例えば、ＰＥＧもしくはＰＥＧ－脂質複合体）、および任意にステロール（例えば、コレステロール）で構成される。

【０３６２】

ｃｅＤＮＡなどの核酸を細胞に送達するための別の方法は、細胞によって内在化されるリガンドと核酸を複合することによるものである。例えば、リガンドは、細胞表面上の受容体に結合し、エンドサイトーシスを介して内在化され得る。リガンドは、核酸中のヌクレオチドに共有結合され得る。核酸を細胞中に送達するための例示的な複合体は、例えば、ＷＯ２０１５／００６７４０、ＷＯ２０１４／０２５８０５、ＷＯ２０１２／０３７２５４、ＷＯ２００９／０８２６０６、ＷＯ２００９／０７３８０９、ＷＯ２００９／０１８３３２、ＷＯ２００６／１１２８７２、ＷＯ２００４／０９０１０８、ＷＯ２００４／０９１５１５、およびＷＯ２０１７／１７７３２６に記載されている。

【０３６３】

ｃｅＤＮＡなどの核酸はまた、トランスフェクションによって細胞に送達され得る。有用なトランスフェクション方法としては、脂質媒介性トランスフェクション、カチオン性ポリマー媒介性トランスフェクション、またはリン酸カルシウム沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。トランスフェクション試薬は、当該技術分野において周知であり、ＴｕｒｂｏＦｅｃｔトランスフェクション試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、Ｐｒｏ－Ｊｅｃｔ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＴＲＡＮＳＰＡＳＳ（商標）Ｐタンパク質トランスフェクション試薬（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）、ＣＨＡＲＩＯＴ（商標）タンパク質送達試薬（Ａｃｔｉｖｅ Ｍｏｔｉｆ）、ＰＲＯＴＥＯＪＵＩＣＥ（商標）タンパク質トランスフェクション試薬（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、２９３フェクチン、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（商標）２０００、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（商標）３０００（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（商標）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（商標）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＤＭＲＩＥ－Ｃ、ＣＥＬＬＦＥＣＴＩＮ（商標）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＯＬＩＧＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（商標）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＣＥ（商標）、ＦＵＧＥＮＥ（商標）（Ｒｏｃｈｅ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、ＦＵＧＥＮＥ（商標）ＨＤ（Ｒｏｃｈｅ）、ＴＲＡＮＳＦＥＣＴＡＭ（商標）（Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ，Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．）、ＴＦＸ－１０（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）、ＴＦＸ－２０（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）、ＴＦＸ－５０（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）、ＴＲＡＮＳＦＥＣＴＩＮ（商標）（Ｂｉｏ Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）、ＳＩＬＥＮＴＦＥＣＴ（商標）（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）、Ｅｆｆｅｃｔｅｎｅ（商標）（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，Ｃａｌｉｆ．）、ＤＣ－ｃｈｏｌ（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ）、ＧＥＮＥＰＯＲＴＥＲ（商標）（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａ

ｌｉｆ．）、ＤＨＡＲＭＡＦＥＣＴ　１（商標）（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ，Ｌａｆａｙｅｔｔｅ，Ｃｏｌｏ．）、ＤＨＡＲＭＡＦＥＣＴ　２（商標）（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ）、ＤＨＡＲＭＡＦＥＣＴ　３（商標）（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ）、ＤＨＡＲＭＡＦＥＣＴ　４（商標）（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ）、ＥＳＣＯＲＴ（商標）ＩＩＩ（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．）、およびＥＳＣＯＲＴ（商標）ＩＶ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．）が挙げられるが、これらに限定されない。ｃｅＤＮＡなどの核酸もまた、当業者に既知のマイクロフルイディクス方法を介して細胞に送達され得る。

【０３６４】

本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターはまた、インビボでの細胞の形質導入のために生物に直接投与され得る。投与は、分子を血液または組織細胞と最終的に接触させるために通常使用される経路のうちのいずれかによるものであり、注入、注射、局所適用、および電気穿孔が挙げられるが、これらに限定されない。そのような核酸を投与する好適な方法は、当業者によって使用可能かつ周知であり、特定の組成物を投与するために２つ以上の経路が使用され得るが、特定の経路は、多くの場合、別の経路よりも即時であり、効果的な反応をもたらし得る。

【０３６５】

核酸ベクターの導入のための方法本明細書に開示される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、例えば米国特許第５，９２８，６３８号に記載される方法によって、例えば造血幹細胞中に送達され得る。

【０３６６】

本発明によるｃｅＤＮＡベクターは、対象中の細胞または標的器官への送達のためにリポソームに付加され得る。リポソームは、少なくとも１つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療剤送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物または活性製剤成分（ＡＰＩ）を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。化合物を含有するポリエチレングリコール（ＰＥＧ）官能基を含むが、これに限定されない例示的なリポソームおよびリポソーム製剤は、２０１８年９月７日に提出された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５００４２号および２０１８年１２月６日に提出された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２号に開示されている。例えば、「薬学的製剤」と題されるセクションを参照されたい。］

【０３６７】

当該技術分野において既知の様々な送達方法またはそれらの修正を使用して、ｃｅＤＮＡベクターをインビトロまたはインビボで送達することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、機械的、電気的、超音波、流体力学的、またはレーザー系エネルギーによって細胞膜に一時的な貫通を作製することによって送達され、それにより標的化細胞へのＤＮＡ進入が促進される。例えば、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、サイズ制限されたチャネルを通して細胞を圧搾することによるか、または当該技術分野において既知の他の手段によって細胞膜を一時的に崩壊させることによって送達され得る。場合によっては、ｃｅＤＮＡベクターは単独で、裸のＤＮＡとして皮膚、甲状腺、心筋、骨格筋、または肝臓細胞中に直接注入される。場合によっては、ｃｅＤＮＡベクターは、遺伝子銃によって送達される。カプシド不含ＡＡＶベクターでコーティングされた金またはタングステン球状粒子（１～３μｍ径）は、加圧ガスによって高速に加速され、標的組織細胞中に貫通することができる。

【０３６８】

本明細書では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターおよび薬学的に許容される担体を含む組成物が、具体的に企図されている。いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、脂質送達系、例えば、本明細書に記載されるリポソームで製剤化される。いくつかの実施形態では、そのような組成物は

、熟練した開業医によって望まれる任意の経路によって投与される。組成物は、経口、非経口、舌下、経皮、直腸、経粘膜、局所、吸入を介した、口腔内投与を介した、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、髄腔内、および関節内、またはそれらの組み合わせを含む異なる経路によって対象に投与され得る。獣医学的使用のために、組成物は、通常の獣医学的慣習に従って適切に許容される製剤として投与され得る。獣医師は、特定の動物に最も適切な投与計画および投与経路を容易に決定することができる。組成物は、従来のシリンジ、無針注射デバイス、「マイクロプロジェクタイルボンバードメントガン」、または電気穿孔（「ＥＰ」）、「流体力学的方法」、または超音波などの他の物理的方法によって投与することができる。

【０３６９】

場合によっては、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、内臓および肢全体の骨格筋への、任意の水溶性化合物および粒子の直接細胞内送達のための単純かつ非常に効率的な方法である流体力学的注入によって送達される。

【０３７０】

場合によっては、ｃｅＤＮＡベクターは、膜中にナノスコピック孔を作製することにより、超音波によって送達され、内臓または腫瘍の細胞へのＤＮＡ粒子の細胞内送達を促進するため、プラスミドＤＮＡのサイズおよび濃度は、この系の効率性において大きな役割を果たす。場合によっては、ｃｅＤＮＡベクターは、磁場を使用することによってマグネトフェクションにより送達され、核酸を含有する粒子を標的細胞中に濃縮する。

【０３７１】

場合によっては、化学送達系は、例えば、カチオン性リポソーム／ミセルまたはカチオン性ポリマーに俗するポリカチオン性ナノマー粒子による負電荷核酸の圧縮を含むナノマー複合体を使用することによって使用され得る。送達方法に使用されるカチオン性脂質としては、一価カチオン性脂質、多価カチオン性脂質、グアニジン含有化合物、コレステロール誘導体化合物、カチオン性ポリマー（例えば、ポリ（エチレンイミン）、ポリ－Ｌ－リジン、プロタミン、他のカチオン性ポリマー）、および脂質－ポリマーハイブリッドが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３７２】

Ａ．エキソソーム：

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、エキソソームにパッケージ化されることによって送達される。エキソソームは、多胞体と形質膜との融合に続いて、細胞外環境中に放出されるエンドサイトーシス起源の小膜小胞である。それらの表面は、ドナー細胞の細胞膜からの脂質二層からなり、それらは、エキソソームを産生したｓ細胞からのサイトゾルを含有し、表面上の親細胞からの膜タンパク質を呈する。エキソソームは、上皮細胞、ＢおよびＴリンパ球、マスト細胞（ＭＣ）、ならびに樹状細胞（ＤＣ）を含む様々な細胞型によって産生される。いくつかの実施形態では、１０ｎｍ～１μｍ、２０ｎｍ～５００ｎｍ、３０ｎｍ～２５０ｎｍ、５０ｎｍ～１００ｎｍの直径を有するエキソソームが、使用のために想定される。エキソソームは、それらのドナー細胞を使用するか、または特定の核酸をそれらに導入するかのいずれかによって、標的細胞への送達のために単離され得る。当該技術分野において既知の様々なアプローチを使用して、本発明のカプシド不含ＡＡＶベクターを含有するエキソソームを産生することができる。

【０３７３】

Ｂ．微粒子／ナノ粒子：

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、脂質ナノ粒子によって送達される。一般に、脂質ナノ粒子は、例えば、Ｔａｍ ｅｔ ａｌ．（２０１３）．Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｓｉＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ ５（３）：４９８－５０７によって開示されているイオン化アミノ脂質（例えば、ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（

ジメチルアミノ）ブタノエート、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ホスファチジルコリン（１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、ＤＳＰＣ）、コレステロール、およびコート脂質（ポリエチレングリコール－ジミリストールグリセロール、ＰＥＧ－ＤＭＧ）を含む。

【０３７４】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約１０～約１０００ｎｍの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、３００ｎｍ未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約１０～約３００ｎｍの直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、２００ｎｍ未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約２５～約２００ｎｍの直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子調製物（例えば、複数の脂質ナノ粒子を含む組成物）は、サイズ分布を有し、平均サイズ（例えば、直径）は、約７０ｎｍ～約２００ｎｍであり、より典型的に、平均サイズは、約１００ｎｍ以下である。

【０３７５】

当該技術分野において既知の様々な脂質ナノ粒子を使用して、本明細書に開示される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを送達することができる。例えば、脂質ナノ粒子を使用する様々な送達方法は、米国特許第９，４０４，１２７号、同第９，００６，４１７号、および同第９，５１８，２７２号に記載される。

【０３７６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、金ナノ粒子によって送達される。一般に、核酸は、例えば、Ｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１４）．Ｇｏｌｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２２（６）；１０７５－１０８３によって記載されるように、金ナノ粒子に共有結合され得るか、または金ナノ粒子に非共有結合され得る（例えば、電荷－電荷相互作用によって結合される）。いくつかの実施形態では、金ナノ粒子－核酸複合体は、例えば、米国特許第６，８１２，３３４号に記載されている方法を使用して産生される。

【０３７７】

Ｃ．複合体

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、複合される（例えば、細胞取り込みを増加させる薬剤に共有結合される）。「細胞取り込みを増加させる薬剤」は、脂質膜を通した核酸の輸送を促進する分子である。例えば、核酸は、親油性化合物（例えば、コレステロール、トコフェロール等）、細胞貫通ペプチド（ＣＰＰ）（例えば、ペネトラチン、ＴＡＴ、Ｓｙｎ１Ｂ等）、およびポリアミン（例えば、スペルミン）に複合され得る。細胞取り込みを増加させる薬剤のさらなる例は、例えば、Ｗｉｎｋｌｅｒ（２０１３）．Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｔｈｅｒ．Ｄｅｌｉｖ．４（７）；７９１－８０９に開示されている。

【０３７８】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、ポリマー（例えば、ポリマー分子）または葉酸塩分子（例えば、葉酸分子）に複合される。一般に、ポリマーに複合された核酸の送達は、例えば、ＷＯ２０００／３４３４３およびＷＯ２００８／０２２３０９に記載されているように、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、例えば、米国特許第８，９８７，３７７号によって記載されているように、ポリ（アミド）ポリマーに複合される。いくつかの実施形態では、本開示によって記載される核酸は、米国特許第８，５０７，４５５号に記載されているように、葉酸分子に複合される。

【０３７９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のた

めのｃｅＤＮＡベクターは、例えば、米国特許第８，４５０，４６７号に記載されているように、炭水化物に複合される。

【０３８０】

Ｄ．ナノカプセル

代替として、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターのナノカプセル製剤が使用され得る。ナノカプセルは、一般に、安定かつ再生可能な方法で物質を捕捉することができる。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を避けるために、そのような微細粒子（およそ０．１μｍのサイズ）は、ポリマーを使用して、インビボで分解され得るように設計されるべきである。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキル－シアノアクリレートナノ粒子が、使用のために企図される。

【０３８１】

Ｅ．リポソーム

本発明によるｃｅＤＮＡベクターは、対象中の細胞または標的器官への送達のためにリポソームに付加され得る。リポソームは、少なくとも１つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療剤送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物または活性製剤成分（ＡＰＩ）を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。

【０３８２】

リポソームの形成および使用は、一般に、当業者に既知である。改善された血清安定性および循環半減期を有するリポソームが開発された（米国特許第５，７４１，５１６号）。さらに、潜在的な薬物担体としてのリポソームおよびリポソーム様調製物の様々な方法が記載されている（米国特許第５，５６７，４３４号、同第５，５５２，１５７号、同第５，５６５，２１３号、同第５，７３８，８６８号、および同第５，７９５，５８７号）。

【０３８３】

Ｆ．例示的なリポソームおよび脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物

本発明によるｃｅＤＮＡベクターは、細胞、例えば、導入遺伝子の発現を必要とする細胞への送達のためにリポソームに付加され得る。リポソームは、少なくとも１つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療剤送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物または活性製剤成分（ＡＰＩ）を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。

【０３８４】

ｃｅＤＮＡを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、２０１８年９月７日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５００４２号および２０１８年１２月６日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２号に開示されており、それら全体が本明細書に組み込まれ、本明細書に開示されるような方法および組成物での使用が想定されている。

【０３８５】

いくつかの態様では、ｃｅＤＮＡを含む脂質ナノ粒子は、イオン化脂質である。

【０３８６】

一般に、脂質粒子は、約１０：１～３０：１の全脂質対ｃｅＤＮＡ（質量または重量）比で調製される。いくつかの実施形態では、脂質対ｃｅＤＮＡ比（質量／質量比、ｗ／ｗ比）は、約１：１～約２５：１、約１０：１～約１４：１、約３：１～約１５：１、約４：１～約１０：１、約５：１～約９：１、または約６：１～約９：１の範囲内であり得る。脂質およびｃｅＤＮＡの量を調整して、所望のＮ／Ｐ比、例えば３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上のＮ／Ｐ比を提供し得る。一般に、脂質粒子製剤の全体脂質

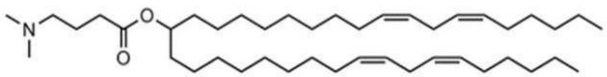
含有量は、約５ｍｇ／ｍＬ～約３０ｍｇ／ｍＬの範囲であり得る。イオン化脂質はまた、本明細書ではカチオン性脂質と称される。例示的なイオン化脂質は、国際ＰＣＴ特許公開第ＷＯ２０１５／０９５３４０号、同第ＷＯ２０１５／１９９９５２号、同第ＷＯ２０１８／０１１６３３号、同第ＷＯ２０１７／０４９２４５号、同第ＷＯ２０１５／０６１４６７号、同第ＷＯ２０１２／０４０１８４号、同第ＷＯ２０１２／０００１０４号、同第ＷＯ２０１５／０７４０８５号、同第ＷＯ２０１６／０８１０２９号、同第ＷＯ２０１７／００４１４３号、同第ＷＯ２０１７／０７５５３１号、同第ＷＯ２０１７／１１７５２８号、同第ＷＯ２０１１／０２２４６０号、同第ＷＯ２０１３／１４８５４１号、同第ＷＯ２０１３／１１６１２６号、同第ＷＯ２０１１／１５３１２０号、同第ＷＯ２０１２／０４４６３８号、同第ＷＯ２０１２／０５４３６５号、同第ＷＯ２０１１／０９０９６５号、同第ＷＯ２０１３／０１６０５８号、同第ＷＯ２０１２／１６２２１０号、同第ＷＯ２００８／０４２９７３号、同第ＷＯ２０１０／１２９７０９号、同第ＷＯ２０１０／１４４７４０号、同第ＷＯ２０１２／０９９７５５号、同第ＷＯ２０１３／０４９３２８号、同第ＷＯ２０１３／０８６３２２号、同第ＷＯ２０１３／０８６３７３号、同第ＷＯ２０１１／０７１８６０号、同第ＷＯ２００９／１３２１３１号、同第ＷＯ２０１０／０４８５３６号、同第ＷＯ２０１０／０８８５３７号、同第ＷＯ２０１０／０５４４０１号、同第ＷＯ２０１０／０５４４０６号、同第ＷＯ２０１０／０５４４０５号、同第ＷＯ２０１０／０５４３８４号、同第ＷＯ２０１２／０１６１８４号、同第ＷＯ２００９／０８６５５８号、同第ＷＯ２０１０／０４２８７７号、同第ＷＯ２０１１／０００１０６号、同第ＷＯ２０１１／０００１０７号、同第ＷＯ２００５／１２０１５２号、同第ＷＯ２０１１／１４１７０５号、同第ＷＯ２０１３／１２６８０３号、同第ＷＯ２００６／００７７１２号、同第ＷＯ２０１１／０３８１６０号、同第ＷＯ２００５／１２１３４８号、同第ＷＯ２０１１／０６６６５１号、同第ＷＯ２００９／１２７０６０号、同第ＷＯ２０１１／１４１７０４号、同第ＷＯ２００６／０６９７８２号、同第ＷＯ２０１２／０３１０４３号、同第ＷＯ２０１３／００６８２５号、同第ＷＯ２０１３／０３３５６３号、同第ＷＯ２０１３／０８９１５１号、同第ＷＯ２０１７／０９９８２３号、同第ＷＯ２０１５／０９５３４６号、および同第ＷＯ２０１３／０８６３５４号、ならびに米国特許公開第ＵＳ２０１６／０３１１７５９号、同第ＵＳ２０１５／０３７６１１５号、同第ＵＳ２０１６／０１５１２８４号、同第ＵＳ２０１７／０２１０６９７号、同第ＵＳ２０１５／０１４００７０号、同第ＵＳ２０１３／０１７８５４１号、同第ＵＳ２０１３／０３０３５８７号、同第ＵＳ２０１５／０１４１６７８号、同第ＵＳ２０１５／０２３９９２６号、同第ＵＳ２０１６／０３７６２２４号、同第ＵＳ２０１７／０１１９９０４号、同第ＵＳ２０１２／０１４９８９４号、同第ＵＳ２０１５／００５７３７３号、同第ＵＳ２０１３／００９０３７２号、同第ＵＳ２０１３／０２７４５２３号、同第ＵＳ２０１３／０２７４５０４号、同第ＵＳ２０１３／０２７４５０４号、同第ＵＳ２００９／００２３６７３号、同第ＵＳ２０１２／０１２８７６０号、同第ＵＳ２０１０／０３２４１２０号、同第ＵＳ２０１４／０２００２５７号、同第ＵＳ２０１５／０２０３４４６号、同第ＵＳ２０１８／０００５３６３号、同第ＵＳ２０１４／０３０８３０４号、同第ＵＳ２０１３／０３３８２１０号、同第ＵＳ２０１２／０１０１１４８号、同第ＵＳ２０１２／００２７７９６号、同第ＵＳ２０１２／００５８１４４号、同第ＵＳ２０１３／０３２３２６９号、同第ＵＳ２０１１／０１１７１２５号、同第ＵＳ２０１１／０２５６１７５号、同第ＵＳ２０１２／０２０２８７１号、同第ＵＳ２０１１／００７６３３５号、同第ＵＳ２００６／００８３７８０号、同第ＵＳ２０１３／０１２３３３８号、同第ＵＳ２０１５／００６４２４２号、同第ＵＳ２００６／００５１４０５号、同第ＵＳ２０１３／００６５９３９号、同第ＵＳ２００６／０００８９１０号、同第ＵＳ２００３／００２２６４９号、同第ＵＳ２０１０／０１３０５８８号、同第ＵＳ２０１３／０１１６３０７号、同第ＵＳ２０１０／００６２９６７号、同第ＵＳ２０１３／０２０２６８４号、同第ＵＳ２０１４／０１４１０７０号、同第ＵＳ２０１４／０２５５４７２号、同第ＵＳ２０１４／００３９０３２号、同第ＵＳ２０１８／００２８６６４号、同第ＵＳ２０１６／０３１７４５８号、同第ＵＳ２０１３／０１９５９２０号に記載されており、これらすべての内容は、参照によ

りそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【０３８７】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、以下の構造を有するＭＣ３（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル－４－（ジメチルアミノ）ブタン酸（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡまたはＭＣ３）である：

【化１３】



DLin-M-C3-DMA ("MC3")

【０３８８】

ＶＩＩＩ．ｃｅＤＮＡベクターを送達する方法

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、様々な好適な方法によってインビトロまたはインビボで標的細胞に送達され得る。ｃｅＤＮＡベクターは、単独で適用または注入され得る。ｃｅＤＮＡベクターは、トランスフェクション試薬または他の物理的手段の助けなしに細胞に送達され得る。代替として、ｃｅＤＮＡベクターは、細胞へのＤＮＡの進入を促進する任意の当該技術分野において既知のトランスフェクション試薬または他の当該技術分野において既知の物理的手段、例えば、リポソーム、アルコール、高ポリリジン化合物、高アルギニン化合物、リン酸カルシウム、微小胞、マイクロインジェクション、電気穿孔等を使用して送達され得る。

【０３８９】

対照的に、本明細書に開示されるカプシド不含ＡＡＶベクターでの形質導入は、様々な送達試薬を使用し、従来のＡＡＶビリオンで形質導入することが困難である細胞および組織型を効率的に標的とし得る。

【０３９０】

別の実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、ＣＮＳ（例えば、脳または眼）に投与される。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、脊髄、脳幹（延髄、脳橋）、中脳（視床下部、視床、視床上部、脳下垂体、黒質、松果体）、小脳、終脳（線条体、後頭葉、側頭葉、頭頂葉、および前頭葉、皮質、基底核、海馬、および偏桃体を含む大脳）、辺縁系、新皮質、線条体、大脳、ならびに下丘中に導入されてもよい。ｃｅＤＮＡベクターはまた、網膜、角膜、および／または視神経などの眼の異なる領域に投与されてもよい。ｃｅＤＮＡベクターは、脳脊髄液中に（例えば、腰椎穿刺によって）送達されてもよい。ｃｅＤＮＡベクターは、さらに、血液脳関門が撹乱された状況（例えば、脳腫瘍または脳梗塞）において、ＣＮＳに血管内投与されてもよい。

【０３９１】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、当該技術分野において既知の任意の経路によってＣＮＳの所望の領域（複数可）に投与され得、髄腔内、眼内、脳内、脳室内、静脈内（例えば、マンニトールなどの糖の存在下）、鼻腔内、耳内、眼内（例えば、硝子体内、網膜下、前房）、および眼周囲（例えば、テノン下領域）送達、ならびに運動ニューロンへの逆行性送達を伴う筋肉内送達を含むが、これらに限定されない。

【０３９２】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、ＣＮＳ中の所望の領域または区画への直接注入（例えば、定位的注入）によって、液体製剤中で投与される。他の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、所望の領域への局所適用によって、またはエアロゾル製剤の鼻腔内投与によって提供され得る。眼への投与は、液滴の局所適用によって行われてもよい。さらなる代替例として、ｃｅＤＮＡベクターは、固体の徐放性製剤として投与され得る（例えば、米国特許第７，２０１，８９８号を参照

）。さらに追加の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターを、逆行性輸送に使用して、運動ニューロンが関与する疾患および障害（例えば、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）等）を治療、改善、および／または予防することができる。例えば、ｃｅＤＮＡベクターは、筋組織に送達され、そこからニューロン中に移動し得る。

【０３９３】

ＩＸ．ｃｅＤＮＡベクターの追加の使用

本明細書に記載されるような組成物およびｃｅＤＮＡベクターを使用して、様々な目的で標的遺伝子または導入遺伝子を発現させることができる。いくつかの実施形態では、得られる導入遺伝子は、研究目的のため、例えば、導入遺伝子を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成するため、例えば、導入遺伝子産生物の機能を研究するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的ＲＮＡをコードする。別の実施例では、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを作成するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的ＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、得られる導入遺伝子は、哺乳類対象における疾患状態または障害の治療、予防、または改善に有用である、１つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。得られる導入遺伝子は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、または機能不全に関連した疾患を治療するのに十分な量で対象に導入され得る（例えば、発現され得る）。いくつかの実施形態では、得られる導入遺伝子は、発現の増加、遺伝子産物の活性、または遺伝子の不適切な上方調節（得られる導入遺伝子が、その発現を抑制する、または他の方法でその発現を低減させる）に関連した疾患を治療するのに十分な量で対象において発現され得る。さらに他の実施形態では、得られる導入遺伝子は、未変性遺伝子の欠陥コピーを置換または補足する。導入遺伝子は、それ自体が転写される遺伝子のオープンリーディングフレームでなくてもよいことが当業者によって理解されるであろう。代わりに、それは標的遺伝子のプロモーター領域またはリプレッサー領域であり得、ｃｅＤＮＡベクターは、関心対象の遺伝子の発現をそのように調整する結果でそのような領域を修飾し得る。

【０３９４】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを作成するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的ＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、哺乳類対象における疾患状態の治療または予防に有用である、１つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。導入遺伝子は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、または機能不全に関連した疾患を治療するのに十分な量で患者に導入され得る（例えば、発現され得る）。

【０３９５】

Ｘ．使用の方法

本明細書に開示される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターはまた、関心対象のヌクレオチド配列（例えば、導入遺伝子）を標的細胞（例えば、宿主細胞）に送達するための方法において使用され得る。この方法は、特に導入遺伝子を、それを必要とする対象の細胞に送達するため、および関心対象の疾患を治療するための方法であり得る。本発明は、導入遺伝子の発現の治療効果が生じるように、対象の細胞内のｃｅＤＮＡベクターにコードされる導入遺伝子、例えばタンパク質、抗体、ｍｉＲＮＡなどの核酸などのインビボ発現を可能にする。これらの結果は、ｃｅＤＮＡベクター送達のインビボおよびインビトロ両方の形態で見られる。

【０３９６】

加えて、本発明は、導入遺伝子発現を所望のレベルにタイトレーションするための、当該関心対象の核酸または導入遺伝子を含む本発明のｃｅＤＮＡベクターの多回投与を含む、それを必要とする対象の細胞中の導入遺伝子の送達のための方法を提供する。

【０３９７】

ｃｅＤＮＡベクター核酸（複数可）は、所望の組織の細胞をトランスフェクトし、過度の有害作用なしに、十分なレベルの遺伝子導入および発現をもたらすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路としては、静脈内（例えば、リポソーム製剤

）、選択された器官への直接送達（例えば、肝臓への門脈内送達）、筋肉内、および他の投与経路が挙げられるが、これらに限定されない。所望される場合、投与経路を組み合わせることができる。

【０３９８】

閉端ＤＮＡベクター（例えば、ｃｅＤＮＡベクター）の送達は、送達遺伝子置換に限定されない。例えば、本明細書に記載されるような従来の方法で産生された（例えば、細胞ベースの産生方法を使用するか、または合成的に産生された閉端ＤＮＡベクター）（例えば、ｃｅＤＮＡベクター）は、遺伝子療法の一部分を提供するために提供される他の送達系とともに使用され得る。本開示に従って合成的に産生されたｃｅＤＮＡベクターと組み合わせることができる系の１つの非限定的な例は、導入遺伝子の効果的な遺伝子発現のために１つ以上の補因子または免疫抑制因子を別々に送達する系を含む。

【０３９９】

本発明はまた、治療有効量のｃｅＤＮＡベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、それを必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞または組織）に導入することを含む、対象における疾患を治療する方法を提供する。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。選択されるｃｅＤＮＡベクターは、疾患を治療するために有用な関心対象のヌクレオチド配列を含む。特に、ｃｅＤＮＡベクターは、対象に導入されたときに、外因性ＤＮＡ配列によってコードされる所望のポリペプチド、タンパク質、またはオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに操作可能に結合された所望の外因性ＤＮＡ配列を含み得る。ｃｅＤＮＡベクターは、上記および本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【０４００】

本明細書に提供される組成物およびベクターを使用して、様々な目的のために導入遺伝子を送達することができる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、研究目的のため、例えば、導入遺伝子を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成するため、例えば、導入遺伝子産生物の機能を研究するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的ＲＮＡをコードする。別の実施例では、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを作成するために使用されることが意図されるタンパク質または機能的ＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、哺乳類対象における疾患状態の治療または予防に有用である、１つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。導入遺伝子は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、または機能不全に関連した疾患を治療するのに十分な量で患者に導入され得る（例えば、発現され得る）。

【０４０１】

原則として、発現カセットは、突然変異によって減少もしくは欠如しているタンパク質またはポリペプチドをコードする、または過剰発現が本発明の範囲内であると考えられるときに、治療効果をもたらす核酸または任意の導入遺伝子を含み得る。好ましくは、挿入されていない細菌ＤＮＡは存在せず、好ましくは、本明細書に提供されるｃｅＤＮＡ組成物中に細菌ＤＮＡは存在しない。

【０４０２】

制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、１種のｃｅＤＮＡベクターに限定されない。そのようなものとして、別の態様では、異なる導入遺伝子、または異なるプロモーターもしくはシス調節エレメントに操作可能に連結されるが同じ導入遺伝子を含む複数のｃｅＤＮＡベクターは、標的細胞、組織、器官、または対象に同時にまたは順次に送達され得る。したがって、この戦略では、複数の遺伝子の遺伝子療法または遺伝子送達を同時に行うことができる。導入遺伝子の異なる部分を別々のｃｅＤＮＡベクターに分離することも可能であり（例えば、導入遺伝子の機能に必要な異なるドメインおよび／または補因子）、同時にまたは異なる時間に投与することができ、別々に調節可能であり得、それによって追加レベルの導入遺伝子の発現の制御を付加する。送達はまた、複数回、および重要なことに、ウイルスカプシドの非存在に起因する抗カプシド宿主免疫反応の

欠失を仮定して、後に増加または減少する用量で臨床状況において遺伝子療法のために実施され得る。カプシドが存在しないため、抗カプシド反応は起こらないと予想される。

【０４０３】

本発明はまた、治療有効量の本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターを、任意に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞または組織）に導入することを含む、対象における疾患を治療する方法を提供する。ｃｅＤＮＡベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実装されるｃｅＤＮＡベクターは、疾患を治療するために有用な関心対象のヌクレオチド配列を含む。特に、ｃｅＤＮＡベクターは、対象に導入されたときに、外因性ＤＮＡ配列によってコードされる所望のポリペプチド、タンパク質、またはオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに操作可能に結合された所望の外因性ＤＮＡ配列を含み得る。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、上記および本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【０４０４】

ＸＩ．治療の方法

本明細書に記載される技術はまた、開示されるｃｅＤＮＡベクターを作製するための方法、ならびにそれを様々な方法（例えば、原位置外、インビトロおよびインビボ適用、方法論、診断手順、ならびに／または遺伝子療法レジメン）で使用する方法を実証する。

【０４０５】

治療有効量のｃｅＤＮＡベクターを、任意に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（例えば、筋細胞もしくは組織、または他の罹患した細胞型）に導入することを含む、対象における疾患または障害を治療する方法が、本明細書に提供される。ｃｅＤＮＡベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実装されるｃｅＤＮＡベクターは、疾患を治療するために有用な関心対象のヌクレオチド配列を含む。特に、ｃｅＤＮＡベクターは、対象に導入されたときに、外因性ＤＮＡ配列によってコードされる所望のポリペプチド、タンパク質、またはオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに操作可能に結合された所望の外因性ＤＮＡ配列を含み得る。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、上記および本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【０４０６】

本発明のｃｅＤＮＡベクターのうちの１つ以上を、１種以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、または賦形剤と一緒に含む、ｃｅＤＮＡベクター組成物および製剤が、本明細書に開示される。そのような組成物は、疾患、傷害、障害、外傷、または機能不全の１つ以上の症状を診断、予防、治療、または改善するための、１つ以上の診断的または治療的キットに含まれ得る。一態様では、疾患、傷害、障害、外傷、または機能不全は、ヒト疾患、傷害、障害、外傷、または機能不全である。

【０４０７】

本明細書に記載される技術の別の態様は、診断的または治療的に有効な量のｃｅＤＮＡベクターを、それを必要とする対象に提供するための方法を提供し、この方法は、本明細書に開示されるある量のｃｅＤＮＡベクターを、それを必要とする対象の細胞、組織、または器官に、ｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現を可能にするのに有効な時間にわたって提供し、それによって診断的または治療的に有効な量のｃｅＤＮＡベクターによって発現されるタンパク質、ペプチド、核酸を対象に提供することを含む。さらなる態様では、対象は、ヒトである。

【０４０８】

本明細書に記載される技術の別の態様は、対象における疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、または外傷のうちの少なくとも１つ以上の症状を診断、予防、治療、または改善するための方法を提供する。全体的かつ一般的な意味において、この方法は、少なくとも開示されるｃｅＤＮＡベクターのうちの１つ以上を、それを必要とする対象に、対象の疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、または外傷の１つ以上の症状を診断、予防、治

療、または改善するための量および時間にわたって投与するステップを含む。さらなる態様では、対象は、ヒトである。

【０４０９】

別の態様は、疾患または病態の１つ以上の症状を治療または低減するためのツールとしての、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの使用である。欠陥遺伝子が知られているいくつかの遺伝疾患が存在し、典型的に、通常は一般に劣性的に遺伝される酵素の欠乏状態と、調節または構造タンパク質に関与し得るが、典型的には常に優性的に遺伝されるとは限らない不均衡状態との２つのクラスに分類される。欠乏状態の疾患の場合、ｃｅＤＮＡベクターを使用し、導入遺伝子を送達して、置換療法のために正常な遺伝子を罹患した組織に運び入れるとともに、いくつかの実施形態では、アンチセンス突然変異を使用して、疾患の動物モデルを創り出すことができる。不均衡疾患状態の場合、ｃｅＤＮＡベクターを使用して、モデルシステムにおいて病態を創り出すことができ、次いでこれを使用して、その病態に対処する試みに使用することができる。したがって、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターおよび方法は、遺伝子疾患の治療を可能にする。本明細書で使用される場合、病態は、疾患を引き起こす、またはそれをより重篤にする欠乏または不均衡を部分的または全体的に修繕することによって治療される。

【０４１０】

Ａ．宿主細胞：

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、対象の宿主細胞に導入遺伝子を送達する。いくつかの実施形態では、対象の宿主細胞は、ヒト宿主細胞であり、例えば、血液細胞、幹細胞、造血細胞、ＣＤ３４$^{+}$細胞、肝細胞、癌細胞、血管細胞、筋細胞、膵臓細胞、神経細胞、眼もしくは網膜細胞、上皮もしくは内皮細胞、樹状細胞、線維芽細胞、または哺乳類起源の任意の他の細胞（無制限に、肝（すなわち、肝臓）細胞、肺細胞、心臓細胞、膵臓細胞、腸細胞、横隔膜細胞、腎（すなわち、腎臓）細胞、ニューロン細胞、血液細胞、骨髄細胞、もしくは遺伝子療法が企図される対象の任意の１つ以上の選択された組織を含む）が挙げられる。一態様では、対象宿主細胞は、ヒト宿主細胞である。

【０４１１】

本開示はまた、本明細書に記載されるようなｃｅＤＮＡベクターを含む、上記のような組み換え宿主細胞に関する。したがって、当業者には明らかであるように、目的に応じて複数の宿主細胞を使用することができる。ドナー配列を含む構築物または制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを宿主細胞に導入して、ドナー配列が、前述のように染色体組み込み体として維持されるようにする。宿主細胞という用語は、複製中に生じる突然変異のために親細胞と同一ではない親細胞の任意の子孫を包含する。宿主細胞の選択は、ドナー配列およびその供給源に大きく依存する。宿主細胞はまた、哺乳類、昆虫、植物、または真菌細胞などの真核生物であってもよい。一実施形態では、宿主細胞は、ヒト細胞（例えば、初代細胞、幹細胞、または不死化細胞株）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターをエクスビボで投与され、次いで遺伝子治療事象の後に対象に送達され得る。宿主細胞は、任意の細胞型、例えば、体細胞または幹細胞、人工多能性幹細胞、または血液細胞、例えば、Ｔ細胞もしくはＢ細胞、または骨髄細胞であり得る。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、同種細胞である。例えば、Ｔ細胞ゲノム操作は、癌免疫療法、ＨＩＶ療法（例えば、ＣＸＣＲ４およびＣＣＲ５などの受容体ノックアウト）などの疾患調整、および免疫不全療法に有用である。Ｂ細胞上のＭＨＣ受容体は、免疫療法の標的となり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾型宿主細胞、例えば、骨髄幹細胞、例えば、ＣＤ３４$^{+}$細胞、または人工多能性幹細胞を、治療用タンパク質の発現のために患者に移植して戻すことができる。

【０４１２】

Ｂ．ｃｅＤＮＡベクターで治療される例示的な導入遺伝子および疾患

ｃｅＤＮＡベクターはまた、欠陥遺伝子の修正にも役立つ。非限定的な例として、デュ

シェン型筋ジストロフィーのＤＭＤ遺伝子は、本明細書に開示されるようにｃｅＤＮＡベクターを使用して送達することができる。

【０４１３】

制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターまたはその組成物は、任意の遺伝性疾患の治療に使用され得る。非限定的な例として、ｃｅＤＮＡベクターまたはその組成物は、トランスサイレチンアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）、突然変異体タンパク質が神経、心臓、胃腸系等でミスフォールドして凝集する奇病の治療に使用することができる。本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクター系を使用して、突然変異体疾患遺伝子（ｍｕｔＴＴＲ）の欠失によって疾患を治療できることが本明細書で企図される。遺伝性疾患のそのような治療は、疾患の進行を止めることができ、確立された疾患の後退または疾患の少なくとも１つの症状の少なくとも１０％の軽減を可能にし得る。

【０４１４】

別の実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症（ＯＴＣ欠損症）、高アンモニア血症、または新生児もしくは幼児のアンモニアを解毒する能力を損なう他の尿素サイクル障害の治療に使用することができる。先天性代謝のすべての疾患と同様に、野生型対照と比較した酵素活性の部分的回復でさえ（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９９％）、ＯＴＣ欠乏症を有する対象の少なくとも１つの症状ＯＴＣの低減および／または生活の質の改善に十分であり得る。一実施形態では、ＯＴＣをコードする核酸は、インビボタンパク質置換のためにアルブミン内因性プロモーターの後ろに挿入され得る。

【０４１５】

別の実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ酵素をコードする核酸配列を送達することによるフェニルケトン尿症（ＰＫＵ）の治療において使用して、ＰＫＵ患者に毒性であり得る食事性フェニルアラニンの蓄積を低減することができる。先天性代謝のすべての疾患と同様に、野生型対照と比較した酵素活性の部分的回復でさえ（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９９％）、ＰＫＵを有する対象のＰＫＵの少なくとも１つの症状の低減および／または生活の質の改善に十分であり得る。一実施形態では、フェニルアラニンヒドロキシラーゼをコードする核酸を、インビボタンパク質置換のためにアルブミン内因性プロモーターの後ろに挿入することができる。

【０４１６】

別の実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、酵素をコードする核酸配列を送達して、ＧＳＤを有する対象における異常なグリコーゲン合成または分解を訂正することによる、グリコーゲン蓄積症（ＧＳＤ）の治療に使用され得る。本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターおよび方法を使用して送達および発現され得る酵素の非限定的な例には、グリコーゲンシンターゼ、グルコース－６－ホスファターゼ、酸－αグルコシダーゼ、グリコーゲン分岐酵素、グリコーゲン分岐酵素、筋肉グリコーゲンホスホリラーゼ、肝臓グリコーゲンホスホリラーゼ、筋肉ホスホフルクトキナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グルコース輸送体－２（ＧＬＵＴ－２）、アルドラーゼＡ、β－エノラーゼ、ホスホグルコムターゼ－１（ＰＧＭ－１）、およびグリコゲニン－１が含まれる。先天性代謝のすべての疾患と同様に、野生型対照と比較した酵素活性の部分的回復でさえ（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９９％）、ＧＳＤを有する対象のＧＳＤの少なくとも１つの症状の低減および／または生活の質の改善に十分であり得る。一実施形態では、異常なグリコーゲン貯蔵を訂正するために酵素をコードする核酸を、インビボタンパク質

置換のためにアルブミン内因性プロモーターの後ろに挿入することができる。

【０４１７】

本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターはまた、レーバー先天性黒内障（ＬＣＡ）、ポリＱリピートを含むポリグルタミン病、およびα－１アンチトリプシン欠乏症（Ａ１ＡＴ）のうちのいずれかの治療での使用も企図されている。ＬＣＡは、失明を引き起こす稀な先天性眼疾患であり、以下の遺伝子：ＧＵＣＹ２Ｄ、ＲＰＥ６５、ＳＰＡＴＡ７、ＡＩＰＬ１、ＬＣＡ５、ＲＰＧＲＩＰ１、ＣＲＸ、ＣＲＢ１、ＮＭＮＡＴ１、ＣＥＰ２９０、ＩＭＰＤＨ１、ＲＤ３、ＲＤＨ１２、ＬＲＡＴ、ＴＵＬＰ１、ＫＣＮＪ１３、ＧＤＦ６、および／またはＰＲＰＨ２のうちのいずれか１つにおける突然変異によって引き起こされ得る。本明細書では、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターおよび組成物および方法が、ＬＣＡの症状の原因である遺伝子（複数可）のエラーを訂正するために、ＬＣＡに関連する１つ以上の遺伝子の送達に適合され得ることが企図される。ポリグルタミン病には、歯列核淡蒼球ルイ体萎縮症、ハンチントン病、脊髄および球根筋萎縮症、ならびに脊髄小脳失調１型、２型、３型（マシャド・ジョセフ病としても知られている）、６型、７型、および１７型が含まれるが、これらに限定されない。Ａ１ＡＴ欠乏症は、α－１アンチトリプシンの産生不良を引き起こす遺伝性疾患であり、血液および肺での酵素活性の低下を招き、次にそれが罹患した対象の肺気腫または慢性閉塞性肺疾患につながり得る。本明細書に概説されるようなｃｅＤＮＡベクターまたはその組成物を使用したＡ１ＡＴ欠損症を有する対象の治療が、本明細書で具体的に企図される。本明細書では、ＬＣＡ、ポリグルタミン病またはＡ１ＡＴ欠損症の治療のための所望のタンパク質をコードする核酸を含む、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを、治療を必要とする対象に投与できることが企図される。

【０４１８】

さらなる実施形態では、本明細書に記載されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを含む組成物を使用して、とりわけウイルス配列、病原体配列、染色体配列、転座接合部（例えば、癌に関連する転座）、非コードＲＮＡ遺伝子またはＲＮＡ配列、疾患関連遺伝子を送達することができる。

【０４１９】

関心対象の任意の核酸または標的遺伝子は、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターによって送達または発現され得る。標的核酸および標的遺伝子には、ポリペプチドをコードする核酸、または非コード核酸（例えば、ＲＮＡｉ、ｍｉＲｓ等）、好ましくは治療剤（例えば、医療、診断、もしくは獣医用途用）、または免疫原性ポリペプチド（例えば、ワクチン用）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターによって標的とされる標的核酸または標的遺伝子は、１つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、ｓｉＲＮＡ、ＲＮＡｉ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、抗体、抗原結合断片、またはそれらの任意の組み合わせをコードする。

【０４２０】

特に、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターによる発現のための遺伝子標的または導入遺伝子は、例えば、限定されないが、疾患、機能不全、傷害、および／または障害のうちの１つ以上の症状の治療、予防、および／または改善における使用のための、タンパク質（複数可）、ポリペプチド（複数可）、ペプチド（複数可）、酵素（複数可）、抗体、抗原結合断片、ならびにその変異型、および／または活性断片をコードし得る。一態様では、疾患、機能不全、外傷、傷害、および／または障害は、ヒト疾患、機能不全、外傷、傷害、および／または障害である。

【０４２１】

発現カセットはまた、ポリペプチド、センスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはＲＮＡ（コードもしくは非コード；例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、およびそれらのアンチセンス対応物（例えば、ａｎｔａｇｏＭｉＲ））をコード

コードし得る。発現カセットは、実験または診断の目的で使用されるレポータータンパク質をコードする外因性配列、例えばβ－ラクタマーゼ、β－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ルシフェラーゼ、および当該技術分野において周知の他のものを含み得る。

【０４２２】

発現カセット、本明細書に記載される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの発現構築物で提供される配列は、宿主細胞に最適化されたコドンであり得る。本明細書で使用される場合、「最適化されたコドン」または「コドン最適化」という用語は、関心対象の脊椎動物、例えばマウスまたはヒトの細胞中の発現強化のために、少なくとも１つ、２つ以上、または相当数の未変性配列（例えば、原核細胞配列）のコドンを、その脊椎動物の遺伝子中でより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定の偏向を呈する。典型的には、コドン最適化は、元の翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を変更しない。最適化されたコドンは、例えば、ＡｐｔａｇｅｎのＧｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅ（登録商標）コドン最適化およびカスタム遺伝子合成プラットフォーム（Ａｐｔａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，２１９０　Ｆｏｘ　Ｍｉｌｌ　Ｒｄ．Ｓｕｉｔｅ　３００，Ｈｅｒｎｄｏｎ，Ｖａ．２０１７１）または別の公開データベースを使用して決定することができる。

【０４２３】

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

【０４２４】

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

【０４２５】

本明細書に記載されるように、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、タンパク質もしくはペプチド、または治療核酸配列をコードすることができ、または治療剤としては、１種以上のアゴニスト、アンタゴニスト、抗アポトーシス因子、阻害剤、受容体、サイトカイン、細胞毒、エリスロポエチン剤、糖タンパク質、増殖因子、増殖因子受容体、ホルモン、ホルモン受容体、インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン受容体、神経増殖因子、向神経活性ペプチド、向神経活性ペプチド受容体、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害剤、タンパク質デカルボキシラーゼ、タンパク質キナーゼ、タンパク質キナーゼ阻害剤、酵素、受容体結合タンパク質、輸送タンパク質もしくはその１種以上の阻害剤、セロトニン受容体、またはその１種以上の取り込み阻害剤、セルピン、セルピン受容体、腫瘍抑制剤、診断的分子、化学療法剤、細胞毒、あるいはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４２６】

ｃｅＤＮＡ遺伝子ベクターはまた、遺伝子発現の除去にも有用である。例えば、一実施

形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを使用して、アンチセンス核酸または機能的ＲＮＡを発現させ、標的遺伝子のノックダウンを誘導することができる。非限定的な例として、ＨＩＶ受容体であるＣＸＣＲ４およびＣＣＲ５の発現は、初代ヒトＴ細胞において首尾よく切除されている。参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＳｃｈｕｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５），ＰＮＡＳ　１１２（３３）：１０４３７－１０４４２を参照されたい。標的化阻害の別の遺伝子はＰＤ－１であり、ｃｅＤＮＡベクターは、阻害核酸またはＲＮＡｉまたは機能的ＲＮＡを発現させてＰＤ－１の発現を阻害することができる。ＰＤ－１は、悪性腫瘍で起こる慢性的に活性なＴ細胞に免疫チェックポイント細胞表面受容体を発現する。上記のＳｃｈｕｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．を参照されたい。

【０４２７】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、罹患した遺伝子を標的とする導入遺伝子を発現させることによって、欠陥遺伝子を訂正するために有用である。本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターによる治療の影響を受けやすい疾患または障害の非限定的な例は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１４／０１７０７５３号のそれらの遺伝子およびそれらの関連遺伝子とともに表Ａ～Ｃに示されている。

【０４２８】

代替実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、セーフハーバー遺伝子、例えば不活性イントロンにおける治療用タンパク質またはレポータータンパク質の発現のための発現カセットの挿入に使用される。ある特定の実施形態では、プロモーターレスカセットが、セーフハーバー遺伝子に挿入される。そのような実施形態では、プロモーターレスカセットは、セーフハーバー遺伝子調節エレメント（プロモーター、エンハンサー、およびシグナル伝達ペプチド）を利用することができ、セーフハーバー遺伝子座での挿入の非限定的な例は、Ｂｌｏｏｄ（２０１５）１２６（１５）：１７７７－１７８４（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているアルブミン遺伝子座への挿入である。アルブミンへの挿入は、血液への導入遺伝子の分泌を可能にするという利点を有する（例えば、実施例２２を参照）。さらに、ゲノムセーフハーバー部位は、当該技術分野において既知であり、例えば、Ｐａｐａｐｅｔｒｏｕ，ＥＲ＆Ｓｃｈａｍｂａｃｈ，Ａ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２４（４）：６７８－６８４（２０１６）またはＳａｄｅｌａｉｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｃａｎｃｅｒ　１２：５１－５８（２０１２）（各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている技法を使用して決定され得る。アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）ゲノムのセーフハーバー部位（例えば、ＡＡＶＳ１セーフハーバー部位）は、本明細書に記載される方法および組成物とともに使用され得る（例えば、Ｏｃｅｇｕｅｒａ－Ｙａｎｅｚ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１０１：４３－５５（２０１６）またはＴｉｙａｂｏｏｎｃｈａｉ，Ａ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ　１２（３）：６３０－７（２０１４）を参照。各々の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）。例えば、ＡＡＶＳ１ゲノムセーフハーバー部位は、胚性幹細胞（例えば、ヒト胚性幹細胞）または人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）における造血特異的導入遺伝子発現および遺伝子サイレンシングの目的のために、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターおよび組成物とともに使用することができる。さらに、染色体１９上のＡＡＳＶ１セーフハーバー部位に挿入するための、合成または市販の相同性指向修復ドナーテンプレートを、本明細書に記載されるようなｃｅＤＮＡベクターまたは組成物とともに使用できることが本明細書において企図される。例えば、相同性指向修復テンプレート、およびガイドＲＮＡは、例えば、Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）から商業的に購入し、ｃｅＤＮＡベクターにクローニングすることができる。

【０４２９】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、導入遺伝子を発現させるか、またはＴ細胞中の標的遺伝子をノックアウトするもしくはその発現を減少させるために、例えば

、養子細胞移入および／またはＣＡＲ－Ｔ治療の改善のためにＴ細胞を操作するために使用される（例えば、実施例２４を参照）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、遺伝子をノックアウトする導入遺伝子を発現させることができる。Ｔ細胞の治療に関連するノックアウトの非限定的な例は、ＰＮＡＳ（２０１５）１１２（３３）：１０４３７－１０４４２に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４３０】

Ｃ．遺伝子療法のための追加の疾患：

一般に、上記の説明に従って本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを使用して任意の導入遺伝子を送達し、遺伝子発現に関する任意の障害に関連する症状を治療、予防、または改善することができる。例示的な病態としては、嚢胞性線維症（および他の肺の疾患）、血友病Ａ、血友病Ｂ、サラセミア、貧血症および他の血液障害、ＡＩＤＳ、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、癲癇および他の神経障害、癌、糖尿病、筋ジストロフィー（例えば、デュシェンヌ型、ベッカー型）、ハーラー病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、代謝障害、網膜変性疾患（および他の眼の疾患）、ミトコンドリオパチー（例えば、レーベル遺伝性視神経症（ＬＨＯＮ）、リー症候群、および亜急性硬化性脳炎）、ミオパチー（例えば、顔面肩甲上腕型ミオパチー（ＦＳＨＤ）および心筋症）、固形臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓）の疾患等が挙げられるが、これらに限定されない。．いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、代謝障害（例えば、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症）を有する個人の治療において有利に使用され得る。

【０４３１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを使用して、遺伝子または遺伝子産生物中の突然変異によって引き起こされる疾患または障害を治療、改善、および／または予防することができる。ｃｅＤＮＡベクターで治療され得る例示的な疾患または障害としては、代謝疾患または障害（例えば、ファブリー病、ゴーシェ病、フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）、グリコーゲン蓄積疾患）；尿素サイクル疾患または障害（例えば、オルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）欠損症）；リソソーム蓄積疾患または障害（例えば、異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）、ムコ多糖症ＩＩ型（ＭＰＳＩＩ、ハンター症候群））；肝疾患または障害（例えば、進行性家族性肝内胆汁うっ滞（ＰＦＩＣ）；血液疾患または障害（例えば、血友病（ＡおよびＢ）、サラセミア、および貧血症）；癌および腫瘍、ならびに遺伝子疾患または障害（例えば、嚢胞性線維症）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３２】

なおもさらなる態様として、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを用いて、導入遺伝子（例えば、本明細書に記載される、ホルモンまたは増殖因子をコードする導入遺伝子）の発現レベルを調節することが望ましい状況において、異種ヌクレオチド配列を送達することができる。

【０４３３】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを使用して、疾患または障害をもたらす遺伝子産生物の異常なレベルおよび／または機能（例えば、タンパク質中の非存在または欠損）を訂正することができる。ｃｅＤＮＡベクターは、機能的タンパク質を産生し、かつ／またはタンパク質のレベルを修正して、タンパク質中の非存在もしくは欠損によって引き起こされる特定の疾患もしくは障害から生じる症状を緩和もしくは低減するか、または利益を付与することができる。例えば、ＯＴＣ欠損症の治療は、機能的ＯＴＣ酵素を産生することによって達成され得る。血友病ＡおよびＢの治療は、第ＶＩＩＩ因子、第ＩＸ因子、および第Ｘ因子のレベルを修正することによって達成され得る。ＰＫＵの治療は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ酵素のレベルを修正することによって達成され得る。ファブリー病またはゴーシェ病の治療は、それぞれ機能的αガラクトシダーゼまたはβグルコセレブロシダ

ーゼを産生することによって達成され得る。ＭＬＤまたはＭＰＳＩＩの治療は、それぞれ機能的アリールスルファターゼＡまたはイズロネート－２－スルファターゼを産生することによって達成され得る。嚢胞性線維症の治療は、機能的嚢胞性線維症の膜貫通コンダクタンス調節剤を産生することによって達成され得る。グリコーゲン蓄積疾患の治療は、機能的Ｇ６Ｐａｓｅ酵素機能を回復することによって達成され得る。ＰＦＩＣの治療は、機能的ＡＴＰ８Ｂ１、ＡＢＣＢ１１、ＡＢＣＢ４、またはＴＪＰ２遺伝子を産生することによって達成され得る。

【０４３４】

代替実施形態では、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターを使用して、アンチセンス核酸をインビトロまたはインビボで細胞に提供することができる。例えば、導入遺伝子が、ＲＮＡｉ分子である場合、標的細胞中のアンチセンス核酸またはＲＮＡｉの発現は、細胞による特定のタンパク質の発現を減少させる。したがって、ＲＮＡｉ分子またはアンチセンス核酸である導入遺伝子を投与して、それを必要とする対象における特定のタンパク質の発現を減少させることができる。アンチセンス核酸をインビトロで細胞に投与して、細胞生理学を調節する、例えば、細胞または組織培養系を最適化することもできる。

【０４３５】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターによってコードされる例示的な導入遺伝子としては、Ｘ、リソソーム酵素（例えば、タイ・サックス病に関連するヘキソサミニダーゼＡ、またはハンター症候群／ＭＰＳ　ＩＩに関連するイズロネートスルファターゼ）、エリスロポエチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、スーパーオキシドジスムターゼ、グロビン、レプチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、ならびにサイトカイン（例えば、インターフェロン、β－インターフェロン、インターフェロン－γ、インターロイキン－２、インターロイキン－４、インターロイキン１２、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシン等）、ペプチド増殖因子およびホルモン（例えば、ソマトトロピン、インスリン、インスリン様増殖因子１および２、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、神経増殖因子（ＮＧＦ）、神経栄養因子－３および４、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、グリア由来増殖因子（ＧＤＮＦ）、形質転換増殖因子－αおよび－β等）、受容体（例えば、腫瘍壊死因子受容体）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３６】

いくつかの例示的な実施形態では、導入遺伝子は、１つ以上の所望の標的に特異的なモノクローナル抗体をコードする。本明細書に開示されるような方法における抗体および融合タンパク質の制御された発現のための例示的なｃｅＤＮＡベクターは、２０１９年２月１４日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１９／１８０１６号に開示され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４３７】

いくつかの例示的な実施形態では、２つ以上の導入遺伝子が、ｃｅＤＮＡベクターによってコードされる。いくつかの例示的な実施形態では、導入遺伝子は、関心対象の２つの異なるポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、本明細書に定義されるように、全長抗体または抗体断片を含む、抗体をコードする。いくつかの実施形態では、抗体は、本明細書に定義されるように、抗原結合ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列である。他の例示的な導入遺伝子配列は、自殺遺伝子産生物（チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクロームＰ４５０、デオキシシチジンキナーゼ、および腫瘍壊死因子）、癌治療において使用される薬物に対する耐性を付与するタンパク質、および腫瘍抑制因子遺伝子産生物をコードする。

【０４３８】

代表的な実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターによって発現される導入遺伝子は、筋ジストロフィーの治療を必要とする対象における治療のた

めに使用され得る。この方法は、治療、改善、または予防に有効な量の、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターを投与することを含み、ｃｅＤＮＡベクターは、異種核酸をコードするジストロフィン、ミニジストロフィン、マイクロジストロフィン、ミオスタチンプロペプチド、フォリスタチン、アクチビンＩＩ型可溶性受容体、ＩＧＦ－１、抗炎症性ポリペプチド、例えば、ＩκＢ優性突然変異体、サルコスパン、ウトロフィン、マイクロジストロフィン、ラミニン－α２、α－サルコグリカン、β－サルコグリカン、γ－サルコグリカン、δ－サルコグリカン、ＩＧＦ－１、ミオスタチンもしくはミオスタチンポリペプチドに対する抗体もしくは抗体断片、および／またはミオスタチンに対するＲＮＡｉを含む。特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、本明細書の別の場所に記載されるように、骨格筋、横隔膜筋、および／または心筋に投与され得る。

【０４３９】

いくつかの実施形態では、通常は血液中で循環するポリペプチド（例えば、酵素）もしくは機能的ＲＮＡ（例えば、ＲＮａｉ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ）の産生のため、あるいは障害（例えば、代謝障害、例えば糖尿病（例えば、インスリン）、血友病（例えば、ＶＩＩＩ）、ムコ多糖障害（例えば、スライ症候群、ハーラー症候群、シャイエ症候群、ハーラー・シャイエ症候群、ハンター症候群、サンフィリポ症候群Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、モルキオ症候群、マロトー・ラミー症候群等）またはリソソーム蓄積症（ゴーシェ病［グルコセレブロシダーゼ］、ポンペ病［リソソーム酸α－グルコシダーゼ］もしくはファブリー病［α－ガラクトシダーゼＡ］）またはグリコーゲン蓄積疾患（ポンペ病［リソソーム酸αグルコシダーゼ）を治療、改善、および／または予防するための他の組織への全身送達のため、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを使用して、導入遺伝子を骨格筋、心筋、または横隔膜筋に送達することができる。代謝障害を治療、改善、および／または予防するための他の好適なタンパク質は、上に記載される。

【０４４０】

他の実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを使用して、代謝障害の治療、改善、および／または予防を必要とする対象においてそれを行う方法において、導入遺伝子を送達することができる。例示的な代謝障害およびポリペプチドをコードする導入遺伝子が、本明細書に記載される。任意に、ポリペプチドが分泌される（例えば、その未変性状態の分泌ポリペプチドであるポリペプチド、または例えば、当該技術分野において既知のような分泌シグナル配列との操作可能な会合によって分泌されるように操作されたポリペプチド）。

【０４４１】

本発明の別の態様は、先天性心疾患またはＰＡＤの治療、改善、および／または予防を必要とする対象においてそれを行う方法に関し、その方法は、本明細書に記載されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを哺乳類対象に投与することを含み、ｃｅＤＮＡベクターが、例えば、筋形質小胞体Ca^{2+}－ＡＴＰａｓｅ（ＳＥＲＣＡ２ａ）、血管新生因子、ホスファターゼ阻害剤Ｉ（Ｉ－１）、ホスホランバンなどのＲＮＡｉ；ホスホランバン阻害剤または優性陰性分子、例えばホスホランバンＳ１６Ｅ、ホスホランバン遺伝子を調節する亜鉛フィンガータンパク質、β２－アドレナリン受容体、β２－アドレナリン受容体キナーゼ（ＢＡＲＫ）、ＰＩ３キナーゼ、カルサルシン、β－アドレナリン受容体キナーゼ阻害剤（βＡＲＫｃｔ）、タンパク質ホスファターゼ１の阻害剤１、Ｓ１００Ａ１、パルバルブミン、アデニリルシクラーゼ６型、Ｇ－タンパク質連結受容体キナーゼ２型ノックダウンに影響を及ぼす分子、例えば、切断された構成的活性型のβＡＲＫｃｔ、Ｐｉｍ－１、ＰＧＣ－１α、ＳＯＤ－１、ＳＯＤ－２、ＥＣ－ＳＯＤ、カリクレイン、ＨＩＦ、チモシン－β４、ｍｉｒ－１、ｍｉｒ－１３３、ｍｉｒ－２０６、および／またはｍｉｒ－２０８をコードする導入遺伝子を含む。

【０４４２】

本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターを、任意の好適な手段によって、任意に、ｃｅＤＮＡベクターを含む呼吸域粒子のエアロゾル懸濁液を投与することによって、対象の肺に投与することができ、これを対象が吸入する。呼吸域粒子は、液体または固体であり

得る。ｃｅＤＮＡベクターを含む液体粒子のエアロゾルは、当業者に既知であるように、圧力駆動型エアロゾル噴霧器または超音波噴霧器を用いるなど、任意の好適な手段によって産生され得る。例えば、米国特許第４，５０１，７２９号を参照されたい。ｃｅＤＮＡベクターを含む固体粒子のエアロゾルは、薬学分野において既知の技法によって、任意の固体粒子薬剤エアロゾル生成器を用いて同様に産生され得る。

【０４４３】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、ＣＮＳ（例えば、脳、眼）の組織に投与され得る。特定の実施形態では、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、遺伝子障害、神経変性障害、精神障害、および腫瘍を含むＣＮＳの疾患を治療、改善、または予防するために投与され得る。ＣＮＳの例示的な疾患としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナバン病、リー病、レフサム病、トゥーレット症候群、原発性側索硬化症、筋委縮性側索硬化症、進行性筋萎縮、ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ビンスワンガー病、脊椎または頭部傷害に起因する外傷、タイ・サック病、リーシュ・ナイアン病、癲癇、脳梗塞、気分障害（例えば、抑うつ、双極性感情障害、持続性感情障害、二次気分障害）を含む精神障害、統合失調症、薬物依存（例えば、アルコール依存および他の薬物依存）、ノイローゼ（例えば、不安症、強迫性障害、身体表現性障害、解離性障害、悲痛、産後うつ病）、精神病（例えば、幻覚および妄想）、認知症、偏執病、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛障害、摂食または体重障害（例えば、肥満、悪液質、拒食症、および過食症）、ならびにＣＮＳの癌および腫瘍（例えば、下垂体腫瘍）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４４４】

本発明のｃｅＤＮＡベクターを治療、改善、または予防され得る眼障害としては、網膜、後視床路、および／または視神経に関与する眼科障害（例えば、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、および他の網膜変性疾患、ブドウ膜炎、加齢性黄斑変性、緑内障）が挙げられる。多くの眼科疾患および障害は、（１）血管新生、（２）炎症、および（３）変性の３種類の適応症の１つ以上に関連している。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを用いて、抗血管新生因子、抗炎症性因子、細胞変性を遅らせる、細胞節約を促進する、または細胞増殖を促進する因子、およびそれらの組み合わせを送達することができる。糖尿病性網膜症は、例えば、血管新生によって特徴付けられる。糖尿病性網膜症は、眼内（例えば、硝子体内）または眼周囲（例えば、テノン嚢下領域内）のいずれかで１つ以上の抗血管新生因子を送達することによって治療され得る。１つ以上の神経栄養因子を、眼内（例えば、硝子体内）または眼周囲のいずれかに共送達することもできる。本発明のｃｅＤＮＡベクターを治療、改善、または予防され得る追加の眼疾患としては、地図状萎縮、血管性または「滲出型」黄斑変性、スタルガルト病、レーバー先天黒内障（ＬＣＡ）、アッシャー症候群、弾性線維性偽性黄色腫（ＰＸＥ）、Ｘ連鎖性網膜色素変性（ＸＬＲＰ）、Ｘ連鎖性網膜分離症（ＸＬＲＳ）、全脈絡膜萎縮、レーバー遺伝性視神経萎縮症（ＬＨＯＮ）、色盲、錐体杆体変性、フックス角膜内皮変性症、糖尿病黄斑浮腫、ならびに眼の癌および腫瘍が挙げられる。

【０４４５】

いくつかの実施形態では、炎症性眼疾患または障害（例えば、ブドウ膜炎）は、本発明のｃｅＤＮＡベクターによって治療、改善、または予防され得る。１つ以上の抗炎症性因子は、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの眼内（例えば、硝子体または前眼房）投与によって発現され得る。他の実施形態では、網膜変性（例えば、網膜色素変性）によって特徴付けられる眼疾患または障害は、本発明のｃｅＤＮＡベクターによって治療、改善、または予防され得る。１つ以上の神経栄養因子をコードする本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターの眼内（例えば、硝子体）投与を使用して、そのような網膜変性に基づく疾患を治療することができる。いくつかの実施形態では、血管新生および網膜変性（例えば、加齢性黄斑変性）の両方に関与する疾患または障害は、本発明のｃｅＤＮＡベクターで治療され得る。加齢性黄斑変性は、眼内に

１つ以上の神経栄養因子および／または眼内もしくは眼周囲（例えば、テノン嚢下領域内）に１つ以上の抗血管新生因子をコードする本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターを投与することによって治療され得る。緑内障は、増加した眼圧および網膜神経節細胞の喪失を特徴とする。緑内障の治療は、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターを使用して興奮毒性損傷から細胞を保護する１種以上の神経保護剤の投与を含む。したがって、そのような薬剤としては、Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸塩（ＮＭＤＡ）アンタゴニスト、サイトカイン、および神経栄養因子は、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターを使用して、眼内、任意に硝子体内に送達され得る。

【０４４６】

他の実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを使用して、発作を治療する、例えば、発作の徴候、発生率、または重症度を低減することができる。発作の治療的処置の有効性は動作的（例えば、揺動、眼もしくは口のチック）および／または電子記録的手段（ほとんどの発作は、顕著な電子記録的異常を有する）によって評価され得る。したがって、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターを使用して、経時的に複数の発作によってマークされる癲癇を治療することもできる。代表的な一実施形態では、脳下垂体腫瘍を治療するために、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターを使用して、ソマトスタチン（またはその活性断片）が脳に投与される。この実施形態に従い、ソマトスタチン（またはその活性断片）をコードする本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、脳下垂体への微小注入によって投与される。同様に、そのような治療を使用して、末端肥大症（脳下垂体からの異常な成長ホルモン分泌）を治療することができる。ソマトスタチンの核酸（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｊ００３０６）およびアミノ酸（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｐ０１１６６、処理された活性ペプチドソマトスタチン－２８およびソマトスタチン－１４を含有する）配列は、当該技術分野において既知のとおりである。特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、米国特許第７，０７１，１７２号に記載される分泌シグナルを含む導入遺伝子をコードすることができる。

【０４４７】

本発明の別の態様は、インビボでの対象への全身送達のためのアンチセンスＲＮＡ、ＲＮＡｉ、または他の機能的ＲＮＡ（例えば、リボザイム）を産生するための、本明細書に記載される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの使用に関する。したがって、いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、アンチセンス核酸、リボザイム（例えば、米国特許第５，８７７，０２２号に記載される）、スプライソソーム媒介性トランススプライシングに影響を及ぼすＲＮＡ（Ｐｕｔｔａｒａｊｕ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：２４６、米国特許第６，０１３，４８７号、米国特許第６，０８３，７０２号を参照）、遺伝子サイレンシングを媒介する干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）（Ｓｈａｒｐ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７：２４３１を参照）または他の非翻訳ＲＮＡ、例えば「ガイド」ＲＮＡ（Ｇｏｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：４９２９、Ｙｕａｎらへの米国特許第５，８６９，２４８号）等をコードする導入遺伝子を含み得る。

【０４４８】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターはまた、レポーターポリペプチド（例えば、緑色蛍光タンパク質またはアルカリホスファターゼなどの酵素）をコードする導入遺伝子をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、実験または診断の目的で有用なレポータータンパク質をコードする導入遺伝子は、β－ラクタマーゼ、β－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ルシフェラーゼ、および当該技術分野において周知の他のもののうちのいずれかから選択される。いくつかの態様では、レポーターポリペプチドをコードする導入遺伝子を含むｃｅＤＮＡベクターを、診断目的のために、またはそれらが投与される対象

におけるｃｅＤＮＡベクターの活性のマーカーとして使用することができる。

【０４４９】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、宿主染色体と相同性を共有し、宿主染色体上の遺伝子座と組み替える、導入遺伝子または異種ヌクレオチド配列を含み得る。このアプローチを利用して、宿主細胞中の遺伝子欠陥を訂正することができる。

【０４５０】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、対象における免疫原性ポリペプチドを発現するため、例えば、ワクチン接種のために使用され得る導入遺伝子を含み得る。導入遺伝子は、当該技術分野において既知の関心対象の任意の免疫原をコードし得、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、ｇａｇタンパク質、腫瘍抗原、癌抗原、細菌抗原、ウイルス抗原等からの免疫原が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４５１】

【０４５２】

Ｄ．ｃｅＤＮＡベクターを使用した良好な遺伝子発現の試験

当該技術分野で周知のアッセイを使用して、ｃｅＤＮＡベクターによる遺伝子送達の効率を試験することができ、インビトロおよびインビボの両方のモデルで実施され得る。ｃｅＤＮＡによる所望の導入遺伝子のノックインまたはノックアウトは、所望の導入遺伝子のｍＲＮＡおよびタンパク質レベルを測定することによって（例えば、逆転写ＰＣＲ、ウエスタンブロット分析、および酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ））当業者により評価され得る。ｃｅＤＮＡによる核酸変更（例えば、点突然変異、ＤＮＡ領域の欠失）は、ゲノム標的ＤＮＡのディープシーケンシングによって評価することができる。一実施形態では、ｃｅＤＮＡは、例えば、蛍光顕微鏡法または発光プレートリーダーによりレポータータンパク質の発現を調べることによって、所望の導入遺伝子の発現を評価するために使用できるレポータータンパク質を含む。インビボ適用の場合、タンパク質機能アッセイを使用して、所与の遺伝子および／または遺伝子産物の機能を試験して、遺伝子発現が成功したかどうかを判断することができる。例えば、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子遺伝子（ＣＦＴＲ）の点突然変異は、アニオン（例えば、Cl^-）をアニオンチャネルを介して移動させるＣＦＴＲの能力を阻害し、機能的（すなわち非突然変異型）ＣＦＴＲ遺伝子をｃｅＤＮＡベクターとともに対象に送達することによって訂正され得ることが想定される。ｃｅＤＮＡベクターの投与後、当業者は、アニオンがアニオンチャネルを通って移動する能力を評価して、ＣＦＴＲ遺伝子が送達および発現されたかどうかを決定することができる。当業者は、インビトロまたはインビボでタンパク質の機能性を測定するための最良の試験を決定することができるであろう。

【０４５３】

本明細書では、細胞または対象におけるｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の遺伝子発現の効果は、少なくとも１ヶ月、少なくとも２ヶ月、少なくとも３ヶ月、少なくとも４ヶ月、少なくとも５ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも１０ヶ月、少なくとも１２ヶ月、少なくとも１８ヶ月、少なくとも２年、少なくとも５年、少なくとも１０年、少なくとも２０年にわたって継続し得るか、または永続的であり得ることが企図される。

【０４５４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセット、発現構築物、またはｃｅＤＮＡベクター中の導入遺伝子は、宿主細胞に対して最適化されたコドンであり得る。本明細書で使用される場合、「最適化されたコドン」または「コドン最適化」という用語は、関心対象の脊椎動物、例えばマウスまたはヒト（例えば、ヒト化）の細胞中の発現強化のために、少なくとも１つ、２つ以上、または相当数の未変性配列（例えば、原核細胞配列）のコドンを、その脊椎動物の遺伝子中でより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定の偏向を呈する。典型的には、コドン最適化

は、元の翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を変更しない。最適化されたコドンは、例えば、ＡｐｔａｇｅｎのＧｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅ（登録商標）コドン最適化およびカスタム遺伝子合成プラットフォーム（Ａｐｔａｇｅｎ，Ｉｎｃ．）または別の公的に入手可能なデータベースを使用して判定され得る。

【０４５５】

ＸＩＩ．投与

本明細書に開示される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの例示的な投与形態としては、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入（例えば、エアロゾルを介した）、頬側（例えば、舌下）、膣、髄腔内、眼内、経皮、内皮内、子宮内（または卵内）、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、筋肉内［骨格、横隔膜、および／または心筋への投与を含む］、胸膜内、脳内、および動脈内）、局所（例えば、気道表面を含む皮膚および粘膜表面への、ならびに経皮投与）、リンパ内等、ならびに直接組織または器官注入（例えば、肝臓、眼、骨格筋、心筋、横隔膜、筋肉、もしくは脳への）が挙げられる。

【０４５６】

制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの投与は、脳、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、気道上皮、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、皮膚、および眼からなる群から選択される部位を含むが、これらに限定されない、対象の任意の部位に対して行われ得る。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの投与はまた、腫瘍（例えば、腫瘍またはリンパ節内またはその付近）に対するものであり得る。任意の所与の症例における最も好適な経路は、治療、改善、および／または予防される病態の性質および重症度、ならびに使用されている特定のｃｅＤＮＡベクターの性質に依存する。追加として、ｃｅＤＮＡは、単一のベクターまたは複数のｃｅＤＮＡベクター（例えば、ｃｅＤＮＡカクテル）中に複数の導入遺伝子を投与できるようにする。

【０４５７】

本明細書に開示される制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの、本発明に従う骨格筋への投与としては、肢（例えば、上腕、下腕、上肢、および／または下肢）、腰、首、頭（例えば、舌）、咽頭、腹部、骨盤／会陰、および／または指の骨格筋への投与が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示されるようなｃｅＤＮＡベクターは、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内、四肢灌流（任意に、脚および／もしくは腕の単離された四肢灌流、例えば、Ａｒｒｕｄａ　ｅｔ　ａｌ．，（２００５）Ｂｌｏｏｄ　１０５：３４５８－３４６４を参照）ならびに／または直接筋肉内注入によって骨格筋に送達され得る。特定の実施形態では、本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、対象（例えば、ＤＭＤなどの筋ジストロフィーを有する対象）に、四肢灌流、任意に単離された四肢灌流（例えば、静脈内または動脈内投与による）によって投与される。ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、「流体力学的技法」を用いることなく投与され得る。

【０４５８】

本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターの、心筋への投与としては、左心房、右心房、左心室、右心室、および／または中隔への投与が挙げられる。本明細書に記載されるｃｅＤＮＡベクターは、静脈内投与、大動脈内投与などの動脈内投与、直接心臓注入（例えば、左心房、右心房、左心室、右心室への）、および／または冠動脈灌流によって心筋に送達され得る。横隔膜筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、および／または腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。平滑筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、および／または腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。一実施形態では、投与は、平滑筋内、その付近、および／またはその上に存在する内皮細胞に対して行われ得る。

【０４５９】

いくつかの実施形態では、本発明による制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、骨格筋、横隔膜筋、および／または心筋に投与される（例えば、筋ジストロ

フィーまたは心疾患（例えば、ＰＡＤもしくはうっ血性心不全）を治療、改善、および／または予防するため）。

【０４６０】

Ａ．エクスビボ治療

いくつかの実施形態では、細胞を対象から除去し、ｃｅＤＮＡベクターをその中に導入した後、細胞を対象に戻す。エクスビボでの治療のために対象から細胞を除去し、続いて対象に戻す方法は、当該技術分野において既知である（例えば、米国特許第５，３９９，３４６号を参照されたく、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。代替として、ｃｅＤＮＡベクターは、別の対象からの細胞中に、培養細胞中に、または任意の他の好適な源からの細胞中に導入され、これらの細胞は、それを必要とする対象に投与される。

【０４６１】

ｃｅＤＮＡベクターで形質導入された細胞は、好ましくは薬学的担体と組み合わせて、「治療有効量」で対象に投与される。当業者であれば、いくらかの利益が対象にもたらされる限り、治療効果が完全または治癒的である必要はないことを理解するであろう。

【０４６２】

いくつかの実施形態では、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、望ましくはインビトロ、エクスビボ、またはインビボで細胞中で産生される任意のポリペプチドである、導入遺伝子（時には異種ヌクレオチド配列と呼ばれる）をコードすることができる。例えば、本明細書で論じられる治療方法におけるｃｅＤＮＡベクターの使用とは対照的に、いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、例えば、抗原またはワクチンの産生のために、培養した細胞、およびそれから単離された発現遺伝子産物中に導入されてもよい。

【０４６３】

ｃｅＤＮＡベクターは、獣医用途および医療用途の両方に使用することができる。上記のエクスビボ遺伝子送達方法に好適な対象としては、鳥類（例えば、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、七面鳥、およびキジ）および哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ネコ、イヌ、およびウサギ類）が挙げられ、哺乳動物が好ましい。ヒト対象が最も好ましい。ヒト対象は、新生児、幼児、少年、および成人を含む。

【０４６４】

本明細書に記載される技術の一態様は、導入遺伝子を細胞に送達する方法に関する。典型的には、インビトロ方法の場合、制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターは、本明細書に開示されるような方法ならびに当該技術分野において既知の他の方法を使用して導入され得る。本明細書に開示されるｃｅＤＮＡベクターは、好ましくは生物学的有効量で細胞に投与される。ｃｅＤＮＡベクターがインビボで細胞に（例えば、対象に）投与される場合、ｃｅＤＮＡベクターの生物学的有効量は、標的細胞における導入遺伝子の形質導入および発現をもたらすのに十分な量である。

【０４６５】

Ｂ．単位剤形

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、単位剤形で便宜的に提示され得る。単位剤形は、典型的に、薬学的組成物の１つ以上の投与経路に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、吸入による投与に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、蒸発器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、噴霧器による投与に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、エアロゾル化器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、経口投与のため、頬側投与のため、または舌下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、静脈内、筋肉内、または皮下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、髄腔内または脳室内投与のために適合される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、局所投与のために製剤化される。単一剤形を産生するために担体材料と複合され得る活性成分の量は、一般に、治療効果をもたらす化合物の量となる。

【０４６６】
ＸＩＩＩ．様々な適用
本明細書に提供される組成物およびｃｅＤＮＡベクターを使用して、上記のような様々な目的のために導入遺伝子を送達することができる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、タンパク質をコードするか、または機能的ＲＮＡであり得、いくつかの実施形態では、研究目的、例えば、１つ以上の突然変異を有する体細胞トランスジェニック動物モデルを創り出すため、例えば、標的遺伝子の機能を研究するために修飾されたタンパク質または機能的ＲＮＡであり得る。別の実施例では、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを創り出すためにタンパク質または機能的ＲＮＡをコードする。
【０４６７】
いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、哺乳類対象における病態の治療、改善、または予防に有用である、１つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターによって発現された導入遺伝子は、異常な遺伝子配列に関連する疾患を治療するのに十分な量で患者に投与され得、これは標的遺伝子の発現の低減、発現の欠如、または機能不全のうちのいずれか１つ以上をもたらし得る。
【０４６８】
いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、診断およびスクリーニング方法における使用のために想定され、これにより導入遺伝子は、細胞培養系または代替としてトランスジェニック動物モデルにおいて一時的または安定して発現される。
【０４６９】
本明細書に記載される技術の別の態様は、哺乳類細胞の集団を形質導入する方法を提供する。全体的かつ一般的な意味において、この方法は、少なくとも有効量の本明細書に開示されるｃｅＤＮＡのうちの１つ以上を含む組成物を、その集団の１つ以上の細胞に導入するステップを含む。
【０４７０】
追加として、本発明は、１つ以上の追加の成分で配合されるか、またはそれらの使用のために１つ以上の指示で調製された、開示されるｃｅＤＮＡベクターまたはｃｅＤＮＡ組成物の１つ以上を含む、組成物、ならびに治療および／または診断キットを提供する。
【０４７１】
本明細書に開示されるような制御された導入遺伝子発現のためのｃｅＤＮＡベクターが投与される細胞は、任意のタイプのものであり得、神経細胞（末梢および中枢神経系の細胞、特に脳細胞を含む）、肺細胞、腎細胞、上皮細胞（例えば、胃および呼吸器上皮細胞）、筋細胞、樹状細胞、膵細胞（島細胞を含む）、肝細胞、心筋細胞、骨細胞（例えば、骨髄幹細胞）、造血幹細胞、脾臓細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、前立腺細胞、生殖細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。代替として、細胞は、任意の前駆細胞であり得る。さらなる代替として、細胞は、幹細胞（例えば、神経幹細胞、肝幹細胞）であり得る。なおもさらなる代替として、細胞は、癌または腫瘍細胞であり得る。さらに、細胞は、上に示されるように、任意の種の起源に由来し得る。
【０４７２】
本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態は、以下の番号が付けられたパラグラフのうちのいずれかに従って定義することができる。
１．以前の発現レベルから導入遺伝子の発現レベルを増加させるために再投与され得るｃｅＤＮＡベクターを含む組成物であって、ｃｅＤＮＡが、プロモーターに操作可能に連結された導入遺伝子ポリヌクレオチド配列に隣接する非対称または対称ＩＴＲ配列を含み、ＩＴＲのうちの少なくとも１つが、複製能を有するＩＴＲである、組成物。
２．ｃｅＤＮＡベクターが、少なくとも４２日、少なくとも８４日、および少なくとも１３２日から選択される期間にわたって導入遺伝子を発現する、パラグラフ１に記載の組成物。
３．導入遺伝子が、核酸、阻害剤、ペプチドまたはポリペプチド、抗体もしくは抗体断片

、融合タンパク質、抗原、アンタゴニスト、アゴニスト、またはＲＮＡｉ分子のうちのいずれかから選択される遺伝医学である、パラグラフ１に記載の組成物。
４．細胞における導入遺伝子の発現レベルを増加させるための方法であって、方法が、
ａ．第１の時点でプライミング用量の組成物を細胞に投与して、異種核酸配列の発現を達成することと、
ｂ．第２の時点で、ある用量の組成物を細胞に投与して、異種核酸配列の発現レベルを、第１の時点での組成物の投与後に達成される異種核酸の発現レベルと比較して増加させるか、または異種核酸配列の発現レベルを増加させて、所望の発現レベルを達成することと、を含み、
第１および第２の時点で投与される組成物が、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）を含み、ｃｅＤＮＡベクターが、２つの非対称または対称のＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた導入遺伝子をコードする異種核酸配列を含み、ＩＴＲの一方が、機能的ＡＡＶ末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲの一方が、他方のＩＴＲに対して欠失、挿入、または置換を含み、
ｃｅＤＮＡが、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状で非連続的なＤＮＡ対照と比較して、直鎖状の連続的なＤＮＡの特徴的なバンドの存在を有する、方法。
５．２つの非対称または対称の逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が、ＡＡＶ　ＩＴＲである、パラグラフ４に記載の方法。
６．機能的末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含むを含むＩＴＲが、野生型ＡＡＶ　ＩＴＲである、パラグラフ４または５に記載の方法。
７．ＡＡＶ　ＩＴＲが、ＡＡＶ－２　ＩＴＲである、パラグラフ４～６のいずれかに記載の方法。
８．２つの非対称または対称ＩＴＲが、（ｉ）配列番号１および配列番号４、ならびに（ｉｉ）配列番号３および配列番号２からなる群から選択される一対のＩＴＲである、パラグラフ４～７のいずれかに記載の方法。
９．ｃｅＤＮＡベクターが、薬学的に許容される担体および／または賦形剤と組み合わせて投与される、パラグラフ４～８のいずれかに記載の方法。
１０．第２の時点が、第１の時点後少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月である、パラグラフ４～９のいずれかに記載の方法。
１１．異種核酸配列が、治療用導入遺伝子をコードし、導入遺伝子の所望の発現レベルが、治療有効量である、パラグラフ４～１０のいずれかに記載の方法。
１２．ｃｅＤＮＡベクターが、ベクターポリヌクレオチドから得られ、ベクターポリヌクレオチドが、２つの非対称または対称の逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた異種核酸をコードし、ＩＴＲのうちの少なくとも１つが、機能的末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲのうちの１つが、他のＩＴＲと比較して、欠失、挿入、または置換を含み、Ｒｅｐタンパク質の存在が、昆虫細胞におけるベクターポリヌクレオチドの複製およびＤＮＡベクターの産生を誘導し、ＤＮＡベクターが、
ａ．Ｒｅｐタンパク質の存在下、昆虫細胞内でカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡベクターの産生を誘導するのに有効な条件下および十分な時間にわたって、ウイルスカプシドコード配列を欠くベクターポリヌクレオチドを内包する昆虫細胞の集団をインキュベートするステップであって、昆虫細胞が、昆虫細胞内にカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡの産生を含まない、ステップと、
ｂ．カプシド不含非ウイルス性ＤＮＡを昆虫細胞から採取し、分離するステップと、を含むプロセスから取得可能であり、
昆虫細胞から単離されたカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡの存在が、昆虫細胞から単離されたＤＮＡをＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、および消化されたＤＮＡ材料を非変性ゲル上で分析して、直鎖状で非連続的なＤＮＡと比較して

特徴的な直鎖状で連続的なＤＮＡのバンドの存在を確認することによって確認され得る、パラグラフ４～１１のいずれかに記載の方法。
１３．第２の時点後の１つ以上の時点で、ある用量の組成物を細胞に投与して、異種核酸配列の発現レベルを、第２の時点もしくは以前の時点での組成物の投与後に達成される異種核酸の発現レベルと比較して増加させるか、または異種核酸配列の発現レベルを増加させて、所望の発現レベルを達成することをさらに含み、
第２の時点後の１つ以上の時点で投与される組成物が、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）を含み、ｃｅＤＮＡベクターが、２つの非対称または対称のＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられる導入遺伝子をコードする異種核酸配列を含み、ＩＴＲの一方が、機能的ＡＡＶ末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲの一方が、他方のＩＴＲに対して欠失、挿入、または置換を含み、
ｃｅＤＮＡが、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状で非連続的なＤＮＡ対照と比較して、直鎖状の連続的なＤＮＡの特徴的なバンドの存在を有する、パラグラフ４～１１のいずれかに記載の方法。
１４．第１、第２、または任意の後続の時点のうちのいずれかで投与されるｃｅＤＮＡベクターが、薬学的に許容される担体および／または賦形剤と組み合わせて投与される、パラグラフ４～１３のいずれかに記載の方法。
１５．第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む同じｃｅＤＮＡベクターである、パラグラフ１～１４のいずれかに記載の方法。
１６．第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む異なるｃｅＤＮＡベクターである、パラグラフ１～１５のいずれかに記載の方法。
１７．異なるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーターを有する、パラグラフ１６に記載の方法。
１８．導入遺伝子が、遺伝医学である、パラグラフ１～１７のいずれかに記載の方法。
１９．対象における疾患を治療するための方法であって、方法が、
ａ．第１の時点で、異種核酸配列の発現を達成するために共有結合性閉端（ｃｅＤＮＡ）を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクターを含む組成物のプライミング用量を対象に投与することと、
ｂ．第２の時点で、共有結合性閉端（ｃｅＤＮＡ）を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクターを含む、ある用量の組成物を対象に投与して、異種核酸配列の発現レベルを、第１の時点での組成物の投与後に達成される異種核酸の発現レベルと比較して増加させるか、または異種核酸配列の発現レベルを増加させて、所望の発現レベルを達成し、それにより対象における疾患を治療することと、を含み、
第１および第２の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、２つの非対称または対称のＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた導入遺伝子をコードする異種核酸配列を含み、ＩＴＲの一方が、機能的ＡＡＶ末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲの一方が、他方のＩＴＲに対して欠失、挿入、または置換を含み、
ｃｅＤＮＡベクターが、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状で非連続的なＤＮＡ対照と比較して、直鎖状の連続的なＤＮＡの特徴的なバンドの存在を有する、方法。
２０．２つの非対称または対称の逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が、ＡＡＶ　ＩＴＲである、パラグラフ１９に記載の方法。
２１．機能的末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含むＩＴＲが、野生型ＡＡＶ　ＩＴＲである、パラグラフ１９または２０に記載の方法。
２２．ＡＡＶ　ＩＴＲが、ＡＡＶ－２　ＩＴＲである、パラグラフ１９～２１のいずれかに記載の方法。

２３．２つの非対称ＩＴＲが、（ｉ）配列番号１および配列番号４、ならびに（ｉｉ）配列番号３および配列番号２からなる群から選択される一対のＩＴＲである、パラグラフ１９～２２のいずれかに記載の方法。
２４．ｃｅＤＮＡベクターが、薬学的に許容される担体および／または賦形剤と組み合わせて投与される、パラグラフ１９～２３のいずれかに記載の方法。
２５．第２の時点が、第１の時点後少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月である、パラグラフ１９～２４のいずれかに記載の方法。
２６．第２の時点での組成物の投与後に達成される導入遺伝子の所望の発現レベルが、導入遺伝子の治療有効量である、パラグラフ１９～２５のいずれかに記載の方法。
２７．第２の時点後の１つ以上の時点で、ｃｅＤＮＡベクターを含むある用量の組成物を対象に投与して、異種核酸配列の発現レベルを、第２の時点もしくは以前の時点での組成物の投与後に達成される異種核酸の発現レベルと比較して増加させるか、または異種核酸配列の発現レベルを所望の発現レベルまで増加させることをさらに含み、
第２の時点後の１つ以上の時点で投与される組成物が、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）を含み、ｃｅＤＮＡベクターが、２つの非対称または対称のＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられる導入遺伝子をコードする異種核酸配列を含み、ＩＴＲの一方が、機能的ＡＡＶ末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲの一方が、他方のＩＴＲに対して欠失、挿入、または置換を含み、
ｃｅＤＮＡが、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状で非連続的なＤＮＡ対照と比較して、直鎖状の連続的なＤＮＡの特徴的なバンドの存在を有する、パラグラフ１９～２６のいずれかに記載の方法。
２８．第２の時点後の１つ以上の時点での組成物の投与後に達成される導入遺伝子の所望の発現レベルが、導入遺伝子の治療有効量である、パラグラフ１９～２７のいずれかに記載の方法。
２９．ｃｅＤＮＡベクターが、第１、第２、または任意の後続の時点で投与され、薬学的に許容される担体とともに投与される、パラグラフ１９～２８のいずれかに記載の方法。
３０．第２の時点後の１つ以上の時点が、先行する時点後少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月である、パラグラフ１９～２９のいずれかに記載の方法。
３１．第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む同じｃｅＤＮＡベクターである、パラグラフ１９～３０のいずれかに記載の方法。
３２．第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む異なるｃｅＤＮＡベクターである、パラグラフ１９～３０のいずれかに記載の方法。
３３．異なるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーターを有する、パラグラフ３１に記載の方法。
３４．ｃｅＤＮＡベクターが、ベクターポリヌクレオチドから得られ、ベクターポリヌクレオチドが、２つの非対称または対称の逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた異種核酸をコードし、ＩＴＲのうちの少なくとも１つが、機能的末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲのうちの１つが、他のＩＴＲと比較して、欠失、挿入、または置換を含み、Ｒｅｐタンパク質の存在が、昆虫細胞におけるベクターポリヌクレオチドの複製およびＤＮＡベクターの産生を誘導し、ＤＮＡベクターが、
ａ．Ｒｅｐタンパク質の存在下、昆虫細胞内でカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡベクターの産生を誘導するのに有効な条件下および十分な時間にわたって、ウイルスカプシドコード配列を欠くベクターポリヌクレオチドを内包する昆虫細胞の集団をインキュベートするステップであって、昆虫細胞が、昆虫細胞内にカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡの産生

を含まない、ステップと、
ｂ．カプシド不含非ウイルス性ＤＮＡを昆虫細胞から採取し、分離するステップと、を含むプロセスから取得可能であり、
昆虫細胞から単離されたカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡの存在が、昆虫細胞から単離されたＤＮＡをＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、および消化されたＤＮＡ材料を非変性ゲル上で分析して、直鎖状で非連続的なＤＮＡと比較して特徴的な直鎖状で連続的なＤＮＡのバンドの存在を確認することによって確認され得る、パラグラフ１９または３３のいずれかに記載の方法。
３５．導入遺伝子が、遺伝医学である、パラグラフ１９～３４のいずれかに記載の方法。
３６．導入遺伝子の持続的発現レベルを維持するために再投与され得るｃｅＤＮＡベクターを含む組成物であって、ｃｅＤＮＡが、プロモーターに操作可能に連結された導入遺伝子ポリヌクレオチド配列に隣接する非対称または対称ＩＴＲ配列を含み、ＩＴＲのうちの少なくとも１つが、複製能を有するＩＴＲである、組成物。
３７．ｃｅＤＮＡベクターが、少なくとも４２日、少なくとも８４日、および少なくとも１３２日から選択される期間にわたって導入遺伝子を発現する、パラグラフ３６に記載の組成物。
３８．導入遺伝子が、核酸、阻害剤、ペプチドまたはポリペプチド、抗体もしくは抗体断片、抗原、アンタゴニスト、アゴニスト、またはＲＮＡｉ分子のうちのいずれかから選択される遺伝医学である、パラグラフ３６に記載の組成物。
３９．細胞における導入遺伝子の発現レベルを持続させるための方法であって、方法が、
ａ．第１の時点でプライミング用量の組成物を細胞に投与して、異種核酸配列の発現を達成することと、
ｂ．第２の時点で、ある用量の組成物を細胞に投与して、第１の時点での組成物の投与後の異種核酸配列の発現レベルのいかなる低下も補償することと、を含み、
第１および第２の時点で投与される組成物が、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）を含み、ｃｅＤＮＡベクターが、２つの非対称または対称のＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた導入遺伝子をコードする異種核酸配列を含み、ＩＴＲの一方が、機能的ＡＡＶ末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲの一方が、他方のＩＴＲに対して欠失、挿入、または置換を含み、
ｃｅＤＮＡが、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状で非連続的なＤＮＡ対照と比較して、直鎖状の連続的なＤＮＡの特徴的なバンドの存在を有する、方法。
４０．２つの非対称または対称の逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が、ＡＡＶ　ＩＴＲである、パラグラフ３９に記載の方法。
４１．機能的末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含むＩＴＲが、野生型ＡＡＶ　ＩＴＲである、パラグラフ３９または４０に記載の方法。
４２．ＡＡＶ　ＩＴＲが、ＡＡＶ－２　ＩＴＲである、パラグラフ３９～４１のいずれかに記載の方法。
４３．２つの非対称ＩＴＲが、（ｉ）配列番号１および配列番号４、ならびに（ｉｉ）配列番号３および配列番号２からなる群から選択される一対のＩＴＲである、パラグラフ３９～４２のいずれかに記載の方法。
４４．ｃｅＤＮＡベクターが、薬学的に許容される担体および／または賦形剤と組み合わせて投与される、パラグラフ３９～４３のいずれかに記載の方法。
４５．第２の時点が、第１の時点後少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月である、パラグラフ３９～４４のいずれかに記載の方法。
４６．異種核酸配列が、治療用導入遺伝子をコードし、導入遺伝子の持続的発現レベルが治療有効量である、パラグラフ３９～４５のいずれかに記載の方法。
４７．ｃｅＤＮＡベクターが、ベクターポリヌクレオチドから得られ、ベクターポリヌク

レオチドが、２つの非対称逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた異種核酸をコードし、ＩＴＲのうちの少なくとも１つが、機能的末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲのうちの１つが、他のＩＴＲと比較して、欠失、挿入、または置換を含み、Ｒｅｐタンパク質の存在が、昆虫細胞におけるベクターポリヌクレオチドの複製およびＤＮＡベクターの産生を誘導し、ＤＮＡベクターが、

ａ．Ｒｅｐタンパク質の存在下、昆虫細胞内でカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡベクターの産生を誘導するのに有効な条件下および十分な時間にわたって、ウイルスカプシドコード配列を欠くベクターポリヌクレオチドを内包する昆虫細胞の集団をインキュベートするステップであって、昆虫細胞が、昆虫細胞内にカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡの産生を含まない、ステップと、

ｂ．カプシド不含非ウイルス性ＤＮＡを昆虫細胞から採取し、分離するステップと、を含むプロセスから取得可能であり、

昆虫細胞から単離されたカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡの存在が、昆虫細胞から単離されたＤＮＡをＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、および消化されたＤＮＡ材料を非変性ゲル上で分析して、直鎖状で非連続的なＤＮＡと比較して特徴的な直鎖状で連続的なＤＮＡのバンドの存在を確認することによって確認され得る、パラグラフ３９～４６のいずれかに記載の方法。

４８．第２の時点後の１つ以上の時点で、さらなる用量の組成物を細胞に投与して、異種核酸配列の発現レベルを、第２の時点もしくは以前の時点での組成物の投与後に達成される異種核酸の発現レベルと比較して増加させるか、または異種核酸配列の発現レベルを増加させて、所望の持続的発現レベルを維持することをさらに含み、

第２の時点後の１つ以上の時点で投与される組成物が、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）を含み、ｃｅＤＮＡベクターが、２つの非対称または対称のＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられる導入遺伝子をコードする異種核酸配列を含み、ＩＴＲの一方が、機能的ＡＡＶ末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲの一方が、他方のＩＴＲに対して欠失、挿入、または置換を含み、

ｃｅＤＮＡが、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状で非連続的なＤＮＡ対照と比較して、直鎖状の連続的なＤＮＡの特徴的なバンドの存在を有する、パラグラフ３９～４７のいずれかに記載の方法。

４９．第１、第２、または任意の後続の時点のうちのいずれかで投与されるｃｅＤＮＡベクターが、薬学的に許容される担体および／または賦形剤と組み合わせて投与される、パラグラフ３９～４８のいずれかに記載の方法。

５０．第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む同じｃｅＤＮＡベクターである、パラグラフ３９～４９のいずれかに記載の方法。

５１．第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む異なるｃｅＤＮＡベクターである、パラグラフ３９～５０のいずれかに記載の方法。

５２．異なるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーターを有する、パラグラフ５１に記載の方法。

５３．導入遺伝子が、遺伝医学である、パラグラフ１～５２のいずれかに記載の方法。

５４．対象における疾患を治療するための方法であって、方法が、

ａ．第１の時点で、異種核酸配列の発現を達成するために共有結合性閉端（ｃｅＤＮＡ）を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクターを含む組成物のプライミング用量を対象に投与することと、

ｂ．第２の時点で、共有結合性閉端（ｃｅＤＮＡ）を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクターを含む、ある用量の組成物を対象に投与して、異種核酸配列の発現レベルを、第１の時点での組成物の投与後に達成される異種核酸の発現レベルと比較して、所望

の持続レベルで維持し、それにより対象における疾患を治療することと、を含み、
　第１および第２の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、２つの非対称または対称のＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた導入遺伝子をコードする異種核酸配列を含み、ＩＴＲの一方が、機能的ＡＡＶ末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲの一方が、他方のＩＴＲに対して欠失、挿入、または置換を含み、
　ｃｅＤＮＡベクターが、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状で非連続的なＤＮＡ対照と比較して、直鎖状の連続的なＤＮＡの特徴的なバンドの存在を有する、方法。
５５．２つの非対称または対称の逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が、ＡＡＶ　ＩＴＲである、パラグラフ５４に記載の方法。
５６．機能的末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含むＩＴＲが、野生型ＡＡＶ　ＩＴＲである、パラグラフ５４または５５に記載の方法。
５７．ＡＡＶ　ＩＴＲが、ＡＡＶ－２　ＩＴＲである、パラグラフ５４～５６のいずれかに記載の方法。
５８．２つの非対称ＩＴＲが、（ｉ）配列番号１および配列番号４、ならびに（ｉｉ）配列番号３および配列番号２からなる群から選択される一対のＩＴＲである、パラグラフ５４～５７のいずれかに記載の方法。
５９．ｃｅＤＮＡベクターが、薬学的に許容される担体および／または賦形剤と組み合わせて投与される、パラグラフ５４～５８のいずれかに記載の方法。
６０．第２の時点が、第１の時点後少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月である、パラグラフ５４～５９のいずれかに記載の方法。
６１．第２の時点での組成物の投与後に達成される導入遺伝子の所望の発現レベルが、導入遺伝子の治療有効量である、パラグラフ５４～６０のいずれかに記載の方法。
６２．第２の時点後の１つ以上の時点で、ｃｅＤＮＡベクターを含むある用量の組成物を対象に投与して、異種核酸配列の発現レベルを、第２の時点での組成物の投与後に達成される異種核酸の発現レベルと比較して増加させ、それにより異種核酸の所望の持続的発現レベルを維持することをさらに含み、
　第２の時点後の１つ以上の時点で投与される組成物が、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含ＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）を含み、ｃｅＤＮＡベクターが、２つの非対称または対称のＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられる導入遺伝子をコードする異種核酸配列を含み、ＩＴＲの一方が、機能的ＡＡＶ末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲの一方が、他方のＩＴＲに対して欠失、挿入、または置換を含み、
　ｃｅＤＮＡが、ｃｅＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状で非連続的なＤＮＡ対照と比較して、直鎖状の連続的なＤＮＡの特徴的なバンドの存在を有する、パラグラフ５４～６１のいずれかに記載の方法。
６３．第２の時点後の１つ以上の時点での組成物の投与後に達成される導入遺伝子の所望の発現レベルが、導入遺伝子の治療有効量である、パラグラフ５４～６２のいずれかに記載の方法。
６４．ｃｅＤＮＡベクターが、第１、第２、または任意の後続の時点で投与され、薬学的に許容される担体とともに投与される、パラグラフ５４～６３のいずれかに記載の方法。
６５．第２の時点後の１つ以上の時点が、先行する時点後少なくとも３０日、または少なくとも６０日、または６０～９０日、または９０～１２０日、または約３～６ヶ月である、パラグラフ５４～６４のいずれかに記載の方法。
６６．第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む同じｃｅＤＮＡベクターである、パラグラフ５４～６５のいずれかに記載の方法。
６７．第１、第２、または任意の後続の時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導

入遺伝子または修飾された導入遺伝子を含む異なるｃｅＤＮＡベクターである、パラグラフ５４～６５のいずれかに記載の方法。
６８．異なるｃｅＤＮＡベクターが、同じ導入遺伝子または修飾された導入遺伝子に操作可能に連結された異なるプロモーターを有する、パラグラフ６７に記載の方法。
６９．ｃｅＤＮＡベクターが、ベクターポリヌクレオチドから得られ、ベクターポリヌクレオチドが、２つの非対称または対称の逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の間に操作可能に位置付けられた異種核酸をコードし、ＩＴＲのうちの少なくとも１つが、機能性末端分解部位およびＲｅｐ結合部位を含み、ＩＴＲのうちの１つが、他のＩＴＲと比較して、欠失、挿入、または置換を含み、Ｒｅｐタンパク質の存在が、昆虫細胞におけるベクターポリヌクレオチドの複製およびＤＮＡベクターの産生を誘導し、ＤＮＡベクターが、
ｃ．Ｒｅｐタンパク質の存在下、昆虫細胞内でカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡベクターの産生を誘導するのに有効な条件下および十分な時間にわたって、ウイルスカプシドコード配列を欠くベクターポリヌクレオチドを内包する昆虫細胞の集団をインキュベートするステップであって、昆虫細胞が、昆虫細胞内にカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡの産生を含まない、ステップと、
ｄ．カプシド不含非ウイルス性ＤＮＡを昆虫細胞から採取し、分離するステップと、を含むプロセスから取得可能であり、
昆虫細胞から単離されたカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡの存在が、昆虫細胞から単離されたＤＮＡをＤＮＡベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、および消化されたＤＮＡ材料を非変性ゲル上で分析して、直鎖状で非連続的なＤＮＡと比較して特徴的な直鎖状で連続的なＤＮＡのバンドの存在を確認することによって確認され得る、パラグラフ５４～６８のいずれかに記載の方法。
７０．導入遺伝子が、遺伝医学である、パラグラフ５４～６９のいずれかに記載の方法。
【実施例】
【０４７３】
以下の実施例は、限定ではない例証によって提供される。本明細書に記載される野生型または修飾型ＩＴＲのうちのいずれかからｃｅＤＮＡベクターを構築できること、および以下の例示的な方法を使用して、そのようなｃｅＤＮＡベクターの活性を構築し、評価できることを当業者は理解するであろう。これらの方法は、ある特定のｃｅＤＮＡベクターを用いて例示されているが、それらは、説明に沿って任意のｃｅＤＮＡベクターに適用可能である。
【０４７４】
実施例１：昆虫細胞ベースの方法を使用してｃｅＤＮＡベクターを構築する
ポリヌクレオチド構築物テンプレートを使用したｃｅＤＮＡベクターの産生は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６の実施例１に記載されている。例えば、本発明のｃｅＤＮＡベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ－バクミド、および／またはｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスであり得る。理論に限定されるものではないが、許容宿主細胞中、例えば、Ｒｅｐの存在下、２つの対称ＩＴＲ（ＩＴＲのうちの少なくとも１つが、野生型ＩＴＲ配列に対して修飾されている）および発現構築物を有するポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ｃｅＤＮＡベクターを産生するように複合する。ｃｅＤＮＡベクター産生は、第１の、テンプレート骨格（例えば、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ－バクミド、ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスゲノムなど）からのテンプレートの切除（「レスキュー」）、および第２の、切除したｃｅＤＮＡベクターのＲｅｐ媒介型複製の２つのステップを経る。
【０４７５】
ｃｅＤＮＡベクターを産生するための例示的な方法は、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡ－プラスミドに由来する。図１Ａおよび１Ｂを参照すると、各ｃｅＤＮＡ－プラスミドのポリヌクレオチド構築物テンプレートは、左修飾型ＩＴＲおよび右修飾型ＩＴＲの両方を含み、ＩＴＲ配列の間には、（ｉ）エンハンサー／プロモーター、（ｉｉ）導入遺伝子

のクローニング部位、（ｉｉｉ）転写後応答エレメント（例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ））、（ｉｖ）ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモン遺伝子（ＢＧＨｐＡ）から）を有する。固有の制限エンドヌクレアーゼ認識部位（Ｒ１～Ｒ６）（図１Ａおよび図１Ｂに示される）もまた、各構成成分の間に導入して、構築物中の特定部位への新たな遺伝子構成成分の導入を促進した。Ｒ３（ＰｍｅＩ）ＧＴＴＴＡＡＡＣ（配列番号１２３）およびＲ４（ＰａｃＩ）ＴＴＡＡＴＴＡＡ（配列番号１２４）酵素部位は、導入遺伝子のオープンリーディングフレームを導入するために、クローニング部位の中に設計される。これらの配列を、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから取得したｐＦａｓｔＢａｃ　ＨＴ　Ｂプラスミドにクローニングした。

【０４７６】

【０４７７】

ｃｅＤＮＡ－バクミドの産生：

ＤＨ１０Ｂａｃコンピテント細胞（ＭＡＸ　ＥＦＦＩＣＩＥＮＣＹ（登録商標）ＤＨ１０Ｂａｃ（商標）コンピテント細胞、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を、製造元の指示によるプロトコルに従って、試験プラスミドまたは制御プラスミドのいずれかで形質転換した。ＤＨ１０Ｂａｃ細胞中のプラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組み換えを誘導して、組み換えｃｅＤＮＡ－バクミドを生成した。バクミドおよびトランスポサーゼプラスミドの形質転換体および維持のために選択する抗生物質とともに、Ｘ－ｇａｌおよびＩＰＴＧを含有する細菌寒天平板上のＥ．ｃｏｌｉ中の青白スクリーニングに基づいて（Φ８０ｄｌａｃＺΔＭ１５マーカーは、バクミドベクターからのβ－ガラクトシダーゼ遺伝子のα－相補性を提供する）正の選択をスクリーニングすることによって、組み換えバクミドを選択した。β－ガラクトシダーゼ指標遺伝子を妨害する転位によって引き起こされる白色コロニーを採取し、１０ｍＬの培地中で培養した。

【０４７８】

組み換えｃｅＤＮＡ－バクミドをＥ．ｃｏｌｉから単離し、ＦｕｇｅｎｅＨＤを使用してＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞中にトランスフェクトして、感染性バキュロウイルスを産生した。付着したＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞を、２５℃のＴ２５フラスコ中の５０ｍＬの培地で培養した。４日後、培養培地（Ｐ０ウイルスを含有する）を細胞から取り除き、０．４５μｍフィルターで濾過し、感染性バキュロウイルス粒子を細胞または細胞残屑から分離した。

【０４７９】

任意に、第１世代のバキュロウイルス（Ｐ０）を、ナイーブＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞を感染させることによって５０～５００ｍＬの培地中で増幅させた。オービタルシェーカー培養器内の懸濁液培養物中の細胞を、１３０ｒｐｍ、２５℃で維持し、細胞が（１４～１５ｎｍのナイーブ直径から）１８～１９ｎｍの直径に到達するまで、細胞直径および生存性、ならびに約４．０Ｅ＋６細胞／ｍＬの密度を監視した。感染３日後～８日後に、培地中のＰ１バキュロウイルス粒子を、遠心分離後に収集し、細胞および残屑を除去した後、０．４５μｍフィルターで濾過した。

【０４８０】

試験構築物を含むｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性または力価を判定した。具体的には、２．５Ｅ＋６細胞／ｍＬの４×２０ｍＬ　Ｓｆ９細胞培養物を、次の希釈１／１０００、１／１０，０００、１／５０，０００、１／１００，０００のＰ１バキュロウイルスで処理し、２５～２７℃でインキュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存性の変化によって４～５日間にわたって毎日判定した。

【０４８１】

「Ｒｅｐ－プラスミド」は、Ｒｅｐ７８（配列番号１３１もしくは１３３）またはＲｅｐ６８（配列番号１３０）およびＲｅｐ５２（配列番号１３２）またはＲｅｐ４０（配列番号１２９）の両方を含むｐＦＡＳＴＢＡＣ（商標）二重発現ベクター（ＴｈｅｒｍｏＦ

ｉｓｈｅｒ）において産生された。Ｒｅｐ－プラスミドを、製造元によって提供されるプロトコルに従って、ＤＨ１０Ｂａｃコンピテント細胞（ＭＡＸ　ＥＦＦＩＣＩＥＮＣＹ（登録商標）ＤＨ１０Ｂａｃ（商標）コンピテント細胞（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）中に形質転換した。ＤＨ１０Ｂａｃ細胞中のＲｅｐ－プラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組み換えを誘導して、組み換えバクミド（「Ｒｅｐ－バクミド」）を生成した。Ｘ－ｇａｌおよびＩＰＴＧを含有する細菌寒天平板上のＥ．ｃｏｌｉ中の青白スクリーニング（Φ８０ｄｌａｃＺΔＭ１５マーカーは、バクミドベクターからのβ－ガラクトシダーゼ遺伝子のα－相補性を提供する）を含む正の選択によって、組み換えバクミドを選択した。単離された白色コロニーを採取し、１０ｍＬの選択培地（ＬＢブロス中のカナマイシン、ゲンタマイシン、テトラシクリン）中に播種した。組み換えバクミド（Ｒｅｐ－バクミド）をＥ．ｃｏｌｉから単離し、Ｒｅｐ－バクミドをＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞中にトランスフェクトして、感染性バキュロウイルスを産生した。

【０４８２】

Ｓｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞を、５０ｍＬの培地中で４日間培養し、感染性組み換えバキュロウイルス（「Ｒｅｐ－バキュロウイルス）を、培養物から単離した。任意に、第１世代のＲｅｐ－バキュロウイルス（Ｐ０）を、ナイーブＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞を感染させることによって増幅させ、５０～５００ｍＬの培地中で培養した。感染３日後～８日後に、培地中のＰ１バキュロウイルス粒子を、遠心分離によって細胞を分離するか、または濾過もしくは別の分画プロセスのいずれかによって収集した。Ｒｅｐ－バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性を判定した。具体的には、２．５×10^6細胞／ｍＬの４×２０ｍＬ　Ｓｆ９細胞培養物を、次の希釈１／１０００、１／１０，０００、１／５０，０００、１／１００，０００のＰ１バキュロウイルスで処理し、インキュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存性の変化によって４～５日間にわたって毎日判定した。

【０４８３】

ｃｅＤＮＡベクター生成および特徴付け

図４Ｂを参照して、次に、（１）ｃｅＤＮＡ－バクミドを含有する試料またはｃｅＤＮＡ－バキュロウイルス、および（２）上記のＲｅｐ－バキュロウイルスのいずれかを含有するＳｆ９昆虫細胞培養培地を、Ｓｆ９細胞（２．５Ｅ＋６細胞／ｍＬ、２０ｍＬ）の新鮮な培養物に、それぞれ１：１０００および１：１０，０００の比で添加した。次いで、細胞を２５℃、１３０ｒｐｍで培養した。同時感染の４～５日後に、細胞の直径および生存率が検出される。細胞直径が１８～２０ｎｍに到達し、生存性が約７０～８０％であったとき、細胞培養物を遠心分離し、培地を取り除き、細胞ペレットを収集した。最初に、細胞ペレットを、適量の水性培地（水または緩衝液のいずれか）に再懸濁する。ｃｅＤＮＡベクターを単離し、Ｑｉａｇｅｎ　ＭＩＤＩ　ＰＬＵＳ（商標）精製プロトコル（Ｑｉａｇｅｎ、カラムあたり０．２ｍｇの処理された細胞ペレット質量）を使用して、細胞から精製した。

【０４８４】

Ｓｆ９昆虫細胞から産生および精製されるｃｅＤＮＡベクターの収率は、最初に、２６０ｎｍでのＵＶ吸光度に基づいて判定した。

【０４８５】

ｃｅＤＮＡベクターは、図４Ｄに例示されるような未変性条件または変性条件下で、アガロースゲル電気泳動によって特定することによって評価することができ、（ａ）制限エンドヌクレアーゼ切断およびゲル電気泳動分析後の、未変性ゲルに対して変性ゲル上で２倍のサイズで移行する特徴的なバンドの存在、ならびに（ｂ）未切断材料の変性ゲル上の単量体および二量体（２ｘ）バンドの存在は、ｃｅＤＮＡベクターの存在に特有である。

【０４８６】

単離されたｃｅＤＮＡベクターの構造を、共感染Ｓｆ９細胞から得られたＤＮＡ（本明細書に記載される）を、制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、ａ）ｃｅＤＮＡベクター内の単一切断部位のみの存在、およびｂ）０．８％変性アガロースゲル（＞８

００ｂｐ）上で分画したときに明らかに見えるほど十分に大きい、得られる断片についてさらに分析した。図４Ｄおよび４Ｅに示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状ＤＮＡベクターおよび直鎖状で連続的な構造を有するｃｅＤＮＡベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別することができ、例えば、非連続的な構造を有するＤＮＡベクターは、１ｋｂおよび２ｋｂ断片を産生することが期待されるが、連続的な構造を有する非カプシド化ベクターは、２ｋｂおよび４ｋｂ断片を産生することが期待される。

【０４８７】

したがって、定義によって必要とされるように、単離されたｃｅＤＮＡベクターが共有結合性閉端であることを定性的に実証するために、試料を、特定のＤＮＡベクター配列の文脈において、単一制限部位を有すると特定された制限エンドヌクレアーゼで消化させ、好ましくは、等しくないサイズ（例えば、１０００ｂｐおよび２０００ｂｐ）の２つの切断産物をもたらす。変性ゲル（２つの相補的ＤＮＡ鎖を分離する）上の消化および電気泳動に続いて、直鎖状の非共有結合的に閉じたＤＮＡは、２つのＤＮＡ鎖が連結され、展開されて２倍の長さであるとき（但し、一本鎖である）、１０００ｂｐおよび２０００ｂｐのサイズで溶解するが、共有結合的に閉じたＤＮＡ（すなわち、ｃｅＤＮＡベクター）は、２倍サイズ（２０００ｂｐおよび４０００ｂｐ）で溶解するであろう。さらに、ＤＮＡベクターの単量体、二量体、およびｎ量体形態の消化は、多量体ＤＮＡベクターの末端間連結に起因して、同じサイズの断片としてすべて溶解する（図４Ｄを参照）。

【０４８８】

本明細書で使用される場合、「未変性ゲルおよび変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるＤＮＡベクターの特定のためのアッセイ」という語句は、制限エンドヌクレアーゼ消化に続いて、消化産物の電気泳動的評価を実施することによって、ｃｅＤＮＡの閉端性を評価するためのアッセイを指す。１つのそのような例示的アッセイを以下に示すが、当業者であれば、この実施例に関する当該技術分野において既知の多くの変形が可能であることを理解するであろう。およそ１／３×および２／３×のＤＮＡベクター長の産生物を生成するであろう関心対象のｃｅＤＮＡベクターに対する単一切断酵素であるように、制限エンドヌクレアーゼが選択される。これは、未変性ゲルおよび変性ゲルの両方でバンドを溶解する。変性前に、試料から緩衝液を取り除くことが重要である。Ｑｉａｇｅｎ ＰＣＲクリーンアップキットまたは脱塩「スピンカラム」、例えば、ＧＥ ＨＥＡＬＴＨＣＡＲＥ ＩＬＵＳＴＲＡ（商標）ＭＩＣＲＯＳＰＩＮ（商標）Ｇ－２５カラムは、エンドヌクレアーゼ消化のための当該技術分野において既知のいくつかのオプションである。アッセイは、例えば、ｉ）ＤＮＡを適切な制限エンドヌクレアーゼ（複数可）で消化すること、２）例えば、Ｑｉａｇｅｎ ＰＣＲクリーンアップキットに適用し、蒸留水で溶出すること、ｉｉｉ）１０×変性溶液（１０×＝０．５Ｍ ＮａＯＨ、１０ｍＭ ＥＤＴＡ）を添加し、１０×色素を添加し、緩衝せず、１０×変性溶液を、１ｍＭ ＥＤＴＡおよび２００ｍＭ ＮａＯＨで以前にインキュベートされた０．８～１．０％ゲル上で４×に添加することによって調製されたＤＮＡラダーと一緒に分析して、ＮａＯＨ濃度が、ゲルおよびゲルボックス中で均一であり、１×変性溶液（５０ｍＭ ＮａＯＨ、１ｍＭ ＥＤＴＡ）の存在下でゲルを流動させることを保証することを含む。当業者であれば、サイズおよび所望のタイミングの結果に基づいて、電気泳動を実行するために使用する電圧を理解すであろう。電気泳動後に、ゲルを排出し、１×ＴＢＥまたはＴＡＥ中で中和し、蒸留水または１×ＳＹＢＲ Ｇｏｌｄを含む１×ＴＢＥ／ＴＡＥに移す。次いで、例えば、Ｔｈｅｒｍｏ ＦｉｓｈｅｒのＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｏｌｄ核酸ゲル染料（ＤＭＳＯ中１０，０００Ｘ濃縮物）および落射蛍光灯（青色）またはＵＶ（３１２ｎｍ）を用いてバンドを可視化することができる。

【０４８９】

生成されたｃｅＤＮＡベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。１つの例示的な非限定的方法として、試料の全体ＵＶ吸光度に対するｃｅＤＮＡ－プラスミドの寄与は、ｃｅＤＮＡベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。例えば、ＵＶ吸光度に基づいて、４μｇのｃｅＤＮＡベクター

をゲル上に負荷し、ｃｅＤＮＡベクター蛍光強度が、１μｇであることが知られている２ｋｂバンドに相当する場合、１μｇのｃｅＤＮＡベクターが存在し、ｃｅＤＮＡベクターは、全ＵＶ吸光材料の２５％である。次いで、ゲル上のバンド強度を、バンドが表す計算されたインプットに対してプロットする。例えば、全ｃｅＤＮＡベクターが８ｋｂであり、切除された比較バンドが２ｋｂである場合、バンド強度は、全インプットの２５％としてプロットされ、この場合、１．０μｇのインプットに対して０．２５μｇとなる。ｃｅＤＮＡベクタープラスミドタイトレーションを使用して、標準曲線をプロットする場合、回帰直線等式を使用して、ｃｅＤＮＡベクターバンドの量を計算し、次いで、これを使用して、ｃｅＤＮＡベクターにより表される全インプットのパーセント、または純度パーセントを判定することができる。

【０４９０】

例示目的で、実施例１は、昆虫細胞ベースの方法およびポリヌクレオチド構築物テンプレートを使用するｃｅＤＮＡベクターの産生を記載し、また参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ１８／４９９９６の実施例１にも記載される。例えば、実施例１に従って本発明のｃｅＤＮＡベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ－バクミド、および／またはｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスであり得る。理論に限定されるものではないが、許容宿主細胞中、例えば、Ｒｅｐの存在下、２つの対称ＩＴＲ（ＩＴＲのうちの少なくとも１つが、野生型ＩＴＲ配列に対して修飾されている）および発現構築物を有するポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ｃｅＤＮＡベクターを産生するように複合する。ｃｅＤＮＡベクター産生は、第１の、テンプレート骨格（例えば、ｃｅＤＮＡ－プラスミド、ｃｅＤＮＡ－バクミド、ｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスゲノムなど）からのテンプレートの切除（「レスキュー」）、および第２の、切除したｃｅＤＮＡベクターのＲｅｐ媒介型複製の２つのステップを経る。

【０４９１】

昆虫細胞を使用する方法でｃｅＤＮＡベクターを産生するための例示的な方法は、本明細書に記載されるｃｅＤＮＡ－プラスミドに由来する。図１Ａおよび１Ｂを参照すると、各ｃｅＤＮＡ－プラスミドのポリヌクレオチド構築物テンプレートは、左修飾型ＩＴＲおよび右修飾型ＩＴＲの両方を含み、ＩＴＲ配列の間には、（ｉ）エンハンサー／プロモーター、（ｉｉ）導入遺伝子のクローニング部位、（ｉｉｉ）転写後応答エレメント（例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ））、（ｉｖ）ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモン遺伝子（ＢＧＨｐＡ）から）を有する。固有の制限エンドヌクレアーゼ認識部位（Ｒ１～Ｒ６）（図１Ａおよび図１Ｂに示される）もまた、各構成成分の間に導入して、構築物中の特定部位への新たな遺伝子構成成分の導入を促進した。Ｒ３（ＰｍｅＩ）ＧＴＴＴＡＡＡＣ（配列番号１２３）およびＲ４（ＰａｃＩ）ＴＴＡＡＴＴＡＡ（配列番号１２４）酵素部位は、導入遺伝子のオープンリーディングフレームを導入するために、クローニング部位の中に設計される。これらの配列を、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから取得したｐＦａｓｔＢａｃ ＨＴ Ｂプラスミドにクローニングした。

【０４９２】

ｃｅＤＮＡ－バクミドの産生：

ＤＨ１０Ｂａｃコンピテント細胞（ＭＡＸ ＥＦＦＩＣＩＥＮＣＹ（登録商標）ＤＨ１０Ｂａｃ（商標）コンピテント細胞、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を、製造元の指示によるプロトコルに従って、試験プラスミドまたは制御プラスミドのいずれかで形質転換した。ＤＨ１０Ｂａｃ細胞中のプラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組み換えを誘導して、組み換えｃｅＤＮＡ－バクミドを生成した。バクミドおよびトランスポサーゼプラスミドの形質転換体および維持のために選択する抗生物質とともに、Ｘ－ｇａｌおよびＩＰＴＧを含有する細菌寒天平板上のＥ．ｃｏｌｉ中の青白スクリーニングに基づいて（Φ８０ｄｌａｃＺΔＭ１５マーカーは、バクミドベクターからのβ－ガラクトシダーゼ遺伝子のα－相補性を提供する）正の選択をスクリーニングすることによって、

組み換えバクミドを選択した。β－ガラクトシダーゼ指標遺伝子を妨害する転位によって引き起こされる白色コロニーを採取し、１０ｍＬの培地中で培養した。

【０４９３】

組み換えｃｅＤＮＡ－バクミドをＥ．ｃｏｌｉから単離し、ＦｕｇｅｎｅＨＤを使用してＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞中にトランスフェクトして、感染性バキュロウイルスを産生した。付着したＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞を、２５℃のＴ２５フラスコ中の５０ｍＬの培地で培養した。４日後、培養培地（Ｐ０ウイルスを含有する）を細胞から取り除き、０．４５μｍフィルターで濾過し、感染性バキュロウイルス粒子を細胞または細胞残屑から分離した。

【０４９４】

任意に、第１世代のバキュロウイルス（Ｐ０）を、ナイーブＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞を感染させることによって５０～５００ｍＬの培地中で増幅させた。オービタルシェーカー培養器内の懸濁液培養物中の細胞を、１３０ｒｐｍ、２５℃で維持し、細胞が（１４～１５ｎｍのナイーブ直径から）１８～１９ｎｍの直径に到達するまで、細胞直径および生存性、ならびに約４．０Ｅ＋６細胞／ｍＬの密度を監視した。感染３日後～８日後に、培地中のＰ１バキュロウイルス粒子を、遠心分離後に収集し、細胞および残屑を除去した後、０．４５μｍフィルターで濾過した。

【０４９５】

試験構築物を含むｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性または力価を判定した。具体的には、２．５Ｅ＋６細胞／ｍＬの４×２０ｍＬ　Ｓｆ９細胞培養物を、次の希釈１／１０００、１／１０，０００、１／５０，０００、１／１００，０００のＰ１バキュロウイルスで処理し、２５～２７℃でインキュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存性の変化によって４～５日間にわたって毎日判定した。

【０４９６】

「Ｒｅｐ－プラスミド」は、Ｒｅｐ７８（配列番号１３１もしくは１３３）またはＲｅｐ６８（配列番号１３０）およびＲｅｐ５２（配列番号１３２）またはＲｅｐ４０（配列番号１２９）の両方を含むｐＦＡＳＴＢＡＣ（商標）二重発現ベクター（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）において産生された。Ｒｅｐ－プラスミドを、製造元によって提供されるプロトコルに従って、ＤＨ１０Ｂａｃコンピテント細胞（ＭＡＸ　ＥＦＦＩＣＩＥＮＣＹ（登録商標）ＤＨ１０Ｂａｃ（商標）コンピテント細胞（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）中に形質転換した。ＤＨ１０Ｂａｃ細胞中のＲｅｐ－プラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組み換えを誘導して、組み換えバクミド（「Ｒｅｐ－バクミド」）を生成した。Ｘ－ｇａｌおよびＩＰＴＧを含有する細菌寒天平板上のＥ．ｃｏｌｉ中の青白スクリーニング（Φ８０ｄｌａｃＺΔＭ１５マーカーは、バクミドベクターからのβ－ガラクトシダーゼ遺伝子のα－相補性を提供する）を含む正の選択によって、組み換えバクミドを選択した。単離された白色コロニーを採取し、１０ｍＬの選択培地（ＬＢブロス中のカナマイシン、ゲンタマイシン、テトラシクリン）中に播種した。組み換えバクミド（Ｒｅｐ－バクミド）をＥ．ｃｏｌｉから単離し、Ｒｅｐ－バクミドをＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞中にトランスフェクトして、感染性バキュロウイルスを産生した。

【０４９７】

Ｓｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞を、５０ｍＬの培地中で４日間培養し、感染性組み換えバキュロウイルス（「Ｒｅｐ－バキュロウイルス）を、培養物から単離した。任意に、第１世代のＲｅｐ－バキュロウイルス（Ｐ０）を、ナイーブＳｆ９またはＳｆ２１昆虫細胞を感染させることによって増幅させ、５０～５００ｍＬの培地中で培養した。感染３日後～８日後に、培地中のＰ１バキュロウイルス粒子を、遠心分離によって細胞を分離するか、または濾過もしくは別の分画プロセスのいずれかによって収集した。Ｒｅｐ－バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性を判定した。具体的には、２．５×10^6細胞／ｍＬの４×２０ｍＬ　Ｓｆ９細胞培養物を、次の希釈１／１０００、１／１０，０００、１／５０，０００、１／１００，０００のＰ１バキュロウイルスで処理し、イン

キュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存性の変化によって４～５日間にわたって毎日判定した。

【０４９８】

ｃｅＤＮＡベクター生成および特徴付け

次いで、（１）ｃｅＤＮＡ－バクミドまたはｃｅＤＮＡ－バキュロウイルスを含有する試料、および（２）上記のＲｅｐ－バキュロウイルスのいずれかを含有するＳｆ９昆虫細胞培養培地を、Ｓｆ９細胞（２．５Ｅ＋６細胞／ｍＬ、２０ｍＬ）の新鮮な培養物に、それぞれ１：１０００および１：１０，０００の比で添加した。次いで、細胞を２５℃、１３０ｒｐｍで培養した。同時感染の４～５日後に、細胞の直径および生存率が検出される。細胞直径が１８～２０ｎｍに到達し、生存性が約７０～８０％であったとき、細胞培養物を遠心分離し、培地を取り除き、細胞ペレットを収集した。最初に、細胞ペレットを、適量の水性培地（水または緩衝液のいずれか）に再懸濁する。ｃｅＤＮＡベクターを単離し、Ｑｉａｇｅｎ　ＭＩＤＩ　ＰＬＵＳ（商標）精製プロトコル（Ｑｉａｇｅｎ、カラムあたり０．２ｍｇの処理された細胞ペレット質量）を使用して、細胞から精製した。

【０４９９】

Ｓｆ９昆虫細胞から産生および精製されるｃｅＤＮＡベクターの収率は、最初に、２６０ｎｍでのＵＶ吸光度に基づいて判定した。精製されたｃｅＤＮＡベクターは、実施例５に記載される電気泳動方法論を使用して、適切な閉端構成について評価され得る。

【０５００】

実施例２：二本鎖ＤＮＡ分子からの切除による合成ｃｅＤＮＡ産生

ｃｅＤＮＡベクターの合成産生は、２０１９年１月１８日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１９／１４１２２号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の実施例２～６に記載されている。二本鎖ＤＮＡ分子の切除を伴う合成方法を使用してｃｅＤＮＡベクターを産生する１つの例示的な方法。手短に言えば、ｃｅＤＮＡベクターは、二本鎖ＤＮＡ構築物を使用して生成され得る。例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／１４１２２の図７Ａ～８Ｅを参照されたい。いくつかの実施形態では、二本鎖ＤＮＡ構築物はｃｅＤＮＡプラスミドであり、例えば、２０１８年１２月６日に出願された国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０６４２４２号の図６を参照されたい）。

【０５０１】

いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターを作製するための構築物は、本明細書に記載される調節スイッチを含む。

【０５０２】

例示の目的で、実施例２は、この方法を使用して生成された例示的な閉端ＤＮＡベクターとして、ｃｅＤＮＡベクターを産生することを説明する。しかしながら、この実施例では、ＩＴＲおよび発現カセット（例えば、異種核酸配列）を含む二本鎖ポリヌクレオチドの切除に続いて、本明細書に記載される遊離３′および５′末端のライゲーションによって閉端ＤＮＡベクターを生成するインビトロ合成産生方法を例証するためにｃｅＤＮＡベクターが例示されているが、当業者は、上で例証されるように、ドギーボーンＤＮＡ、ダンベルＤＮＡなどを含むが、これらに限定されない任意の所望の閉端ＤＮＡベクターが生成されるように、二本鎖ＤＮＡポリヌクレオチド分子を修飾できることを認識する。

【０５０３】

この方法は、（ｉ）二本鎖ＤＮＡ構築物から発現カセットをコードする配列を切除することと、（ｉｉ）ＩＴＲのうちの１つ以上でヘアピン構造を形成することと、（ｉｉｉ）ライゲーションによって、例えば、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼによって遊離５′および３′末端を結合することとを伴う。

【０５０４】

二本鎖ＤＮＡ構築物は、５′から３′に順番に、第１の制限エンドヌクレアーゼ部位、上流ＩＴＲ、発現カセット、下流ＩＴＲ、および第２の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む。次いで、二本鎖ＤＮＡ構築物を１つ以上の制限エンドヌクレアーゼと接触させて、制限エンドヌクレアーゼ部位の両方で二本鎖切断を生成する。１つのエンドヌクレアーゼが

両方の部位を標的とすることも、制限部位がｃｅＤＮＡベクターテンプレート内に存在しない限り、各部位を異なるエンドヌクレアーゼによって標的とすることもできる。これにより、制限エンドヌクレアーゼ部位の間の配列が、残りの二本鎖ＤＮＡ構築物から切除される。ライゲーションすると、閉端ＤＮＡベクターが形成される。

【０５０５】

この方法で使用されるＩＴＲの一方または両方は、野生型ＩＴＲであり得る。修飾型ＩＴＲが使用されてもよく、ここで修飾は、ＢおよびＢ′アームならびに／またはＣおよびＣ′アームを形成する配列における野生型ＩＴＲからの１つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、または置換を含み得（例えば、図３Ｂおよび３Ｄを参照）、２つ以上のヘアピンループまたは単一のヘアピンループを有し得る。ヘアピンループ修飾型ＩＴＲは、既存のオリゴの遺伝子修飾によって、または新規の生物学的合成および／もしくは化学合成によって生成され得る。

【０５０６】

非限定的な例では、ＩＴＲ－６左および右（配列番号１１１および１１２）は、ＡＡＶ２の野生型ＩＴＲからのＢ－Ｂ′およびＣ－Ｃ′アームに４０ヌクレオチドの欠失を含む。修飾型ＩＴＲに残っているヌクレオチドは、単一のヘアピン構造を形成すると予測される。構造を展開するＧｉｂｂｓ自由エネルギーは、約－５４．４ｋｃａｌ／ｍｏｌである。機能的Ｒｅｐ結合部位またはＴｒｓ部位の任意の欠失を含む、ＩＴＲへの他の修飾を行うこともできる。

【０５０７】

実施例３：オリゴヌクレオチドの構築によるｃｅＤＮＡの産生

様々なオリゴヌクレオチドの集成を伴う合成方法を使用してｃｅＤＮＡベクターを産生する別の例示的な方法は、ＰＣＴ／ＵＳ１９／１４１２２の実施例３に提供されており、ｃｅＤＮＡベクターは、５′オリゴヌクレオチドおよび３′ＩＴＲオリゴヌクレオチドを合成し、ＩＴＲオリゴヌクレオチドを、発現カセットを含む二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションすることによって産生される。ＰＣＴ／ＵＳ１９／１４１２２の図１１Ｂは、５′ＩＴＲオリゴヌクレオチドおよび３′ＩＴＲオリゴヌクレオチドを、発現カセットを含む二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションする例示的な方法を示す。

【０５０８】

本明細書に開示されるように、ＩＴＲオリゴヌクレオチドは、ＷＴ－ＩＴＲまたは修飾されたＩＴＲを含むことができる（例えば、その全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ／ＵＳ１９／１４１２２の図６Ａ、６Ｂ、７Ａ、および７Ｂを参照されたい）。例示的なＩＴＲオリゴヌクレオチドには、限定されないが、配列番号１３４～１４５が含まれる（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／１４１２２の表７を参照）。修飾型ＩＴＲは、ＢおよびＢ′アームならびに／またはＣおよびＣ′アームを形成する配列における野生型ＩＴＲからの１つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、または置換を含み得る。無細胞合成で使用される、本明細書に記載されるＷＴ－ＩＴＲまたはｍｏｄ－ＩＴＲを含むＩＴＲオリゴヌクレオチドは、遺伝子修飾または生物学的および／もしくは化学的合成によって生成することができる。本明細書で論じられるように、実施例２および３のＩＴＲオリゴヌクレオチドは、本明細書で論じられるように、対称または非対称構成のＷＴ－ＩＴＲまたは修飾型ＩＴＲ（ｍｏｄ－ＩＴＲ）を含み得る。

【０５０９】

実施例４：一本鎖ＤＮＡ分子によるｃｅＤＮＡ産生

合成方法を使用してｃｅＤＮＡベクターを産生する別の例示的な方法は、ＰＣＴ／ＵＳ１９／１４１２２の実施例４において提供され、センス発現カセット配列に隣接する２つのセンスＩＴＲを含む一本鎖ＤＮＡを使用し、アンチセンス発現カセットに隣接する２つのアンチセンスＩＴＲに共有結合し、次いで、この一本鎖の直鎖状ＤＮＡの末端をライゲーションして、閉端一本鎖分子を形成する。非限定的な一例は、一本鎖ＤＮＡ分子を合成および／または産生し、分子の一部をアニーリングして、二次構造の１つ以上の塩基対合領域を有する単一の直鎖状ＤＮＡ分子を形成し、次いで遊離５′および３′末端を互いに

ライゲーションして、閉じた一本鎖分子を形成する。
【０５１０】
ｃｅＤＮＡベクターの産生のための例示的な一本鎖ＤＮＡ分子は、５′から３′に、
センス第１のＩＴＲ、
センス発現カセット配列、
センス第２のＩＴＲ、
アンチセンス第２のＩＴＲ、
アンチセンス発現カセット配列、および
アンチセンス第１のＩＴＲを含む。
【０５１１】
実施例４の例示的な方法で使用するための一本鎖ＤＮＡ分子は、本明細書に記載される任意のＤＮＡ合成方法論、例えば、インビトロＤＮＡ合成によって形成され得るか、またはヌクレアーゼでＤＮＡ構築物（例えば、プラスミド）を切断し、得られたｄｓＤＮＡ断片を融解して、ｓｓＤＮＡ断片を提供することによって提供され得る。
【０５１２】
アニーリングは、センス配列およびアンチセンス配列の対の計算された融解温度を下回って温度を下げることによって達成され得る。融解温度は、特定のヌクレオチド塩基含有量、および使用している溶液の特性、例えば塩濃度に依存する。任意の所与の配列および溶液の組み合わせの融解温度は、当業者によって容易に計算される。
【０５１３】
アニーリングされた分子の遊離５′および３′末端は、互いにライゲーションされるか、またはヘアピン分子にライゲーションされてｃｅＤＮＡベクターを形成することができる。好適な例示的ライゲーション方法論およびヘアピン分子は、実施例２および３に記載されている。
【０５１４】
実施例５：ｃｅＤＮＡの精製および／または産生の確認
例えば、実施例１に記載される昆虫細胞ベースの産生方法、または実施例２～４に記載される合成産生方法を含む、本明細書に記載される方法によって産生されたＤＮＡベクター産物のいずれも、例えば、熟練者に一般に知られている方法を使用して、不純物、未使用成分、または副産物を除去するために精製することができ、かつ／または分析して、産生されたＤＮＡベクター（この例では、ｃｅＤＮＡベクター）が所望の分子であることを確認することができる。ＤＮＡベクター、例えばｃｅＤＮＡの精製のための例示的な方法は、Ｑｉａｇｅｎ　Ｍｉｄｉ　Ｐｌｕｓ精製プロトコル（Ｑｉａｇｅｎ）を使用することおよび／またはゲル精製によるものである。
【０５１５】
以下は、ｃｅＤＮＡベクターの同一性を確認するための例示的な方法である。
【０５１６】
ｃｅＤＮＡベクターは、図４Ｃおよび４Ｄに例示されるような未変性条件または変性条件下で、アガロースゲル電気泳動によって特定することによって評価することができ、（ａ）制限エンドヌクレアーゼ切断およびゲル電気泳動分析後の、未変性ゲルに対して変性ゲル上で２倍のサイズで移行する特徴的なバンドの存在、ならびに（ｂ）未切断材料の変性ゲル上の単量体および二量体（２ｘ）バンドの存在は、ｃｅＤＮＡベクターの存在に特有である。
【０５１７】
単離されたｃｅＤＮＡベクターの構造を、精製されたＤＮＡを、選択された制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、ａ）ｃｅＤＮＡベクター内の単一切断部位のみの存在、およびｂ）０．８％変性アガロースゲル（＞８００ｂｐ）上で分画したときに明らかに見えるほど十分に大きい、得られる断片についてさらに分析した。図４Ｃおよび４Ｄに示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状ＤＮＡベクターおよび直鎖状で連続的な構造を有するｃｅＤＮＡベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別すること

ができ、例えば、非連続的な構造を有するＤＮＡベクターは、１ｋｂおよび２ｋｂ断片を産生することが期待されるが、連続的な構造を有するｃｅＤＮＡベクターは、２ｋｂおよび４ｋｂ断片を産生することが期待される。

【０５１８】

したがって、定義によって必要とされるように、単離されたｃｅＤＮＡベクターが共有結合性閉端であることを定性的に実証するために、試料を、特定のＤＮＡベクター配列の文脈において、単一制限部位を有すると特定された制限エンドヌクレアーゼで消化させ、好ましくは、等しくないサイズ（例えば、１０００ｂｐおよび２０００ｂｐ）の２つの切断産物をもたらす。変性ゲル（２つの相補的ＤＮＡ鎖を分離する）上の消化および電気泳動に続いて、直鎖状の非共有結合的に閉じたＤＮＡは、２つのＤＮＡ鎖が連結され、展開されて２倍の長さであるとき（但し、一本鎖である）、１０００ｂｐおよび２０００ｂｐのサイズで溶解するが、共有結合的に閉じたＤＮＡ（すなわち、ｃｅＤＮＡベクター）は、２倍サイズ（２０００ｂｐおよび４０００ｂｐ）で溶解するであろう。さらに、ＤＮＡベクターの単量体、二量体、およびｎ量体形態の消化は、多量体ＤＮＡベクターの末端間連結に起因して、同じサイズの断片としてすべて溶解する（図４Ｄおよび４Ｅを参照）。

【０５１９】

本明細書で使用される場合、「未変性ゲルおよび変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるＤＮＡベクターの特定のためのアッセイ」という語句は、制限エンドヌクレアーゼ消化に続いて、消化産物の電気泳動的評価を実施することによって、ｃｅＤＮＡの閉端性を評価するためのアッセイを指す。１つのそのような例示的アッセイを以下に示すが、当業者であれば、この実施例に関する当該技術分野において既知の多くの変形が可能であることを理解するであろう。およそ１／３×および２／３×のＤＮＡベクター長の産生物を生成するであろう関心対象のｃｅＤＮＡベクターに対する単一切断酵素であるように、制限エンドヌクレアーゼが選択される。これは、未変性ゲルおよび変性ゲルの両方でバンドを溶解する。変性前に、試料から緩衝液を取り除くことが重要である。Ｑｉａｇｅｎ ＰＣＲクリーンアップキットまたは脱塩「スピンカラム」、例えば、ＧＥ ＨＥＡＬＴＨ ＣＡＲＥ ＩＬＵＳＴＲＡ（商標）ＭＩＣＲＯＳＰＩＮ（商標）Ｇ－２５カラムは、エンドヌクレアーゼ消化のための当該技術分野において既知のいくつかのオプションである。アッセイは、例えば、ｉ）ＤＮＡを適切な制限エンドヌクレアーゼ（複数可）で消化すること、２）例えば、Ｑｉａｇｅｎ ＰＣＲクリーンアップキットに適用し、蒸留水で溶出すること、ｉｉｉ）１０×変性溶液（１０×＝０．５Ｍ ＮａＯＨ、１０ｍＭ ＥＤＴＡ）を添加し、１０×色素を添加し、緩衝せず、１０×変性溶液を、１ｍＭ ＥＤＴＡおよび２００ｍＭ ＮａＯＨで以前にインキュベートされた０．８～１．０％ゲル上で４×に添加することによって調製されたＤＮＡラダーと一緒に分析して、ＮａＯＨ濃度が、ゲルおよびゲルボックス中で均一であり、１×変性溶液（５０ｍＭ ＮａＯＨ、１ｍＭ ＥＤＴＡ）の存在下でゲルを流動させることを保証することを含む。当業者であれば、サイズおよび所望のタイミングの結果に基づいて、電気泳動を実行するために使用する電圧を理解すであろう。電気泳動後に、ゲルを排出し、１×ＴＢＥまたはＴＡＥ中で中和し、蒸留水または１×ＳＹＢＲ Ｇｏｌｄを含む１×ＴＢＥ／ＴＡＥに移す。次いで、例えば、Ｔｈｅｒｍｏ ＦｉｓｈｅｒのＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｏｌｄ核酸ゲル染料（ＤＭＳＯ中１０，０００Ｘ濃縮物）および落射蛍光灯（青色）またはＵＶ（３１２ｎｍ）を用いてバンドを可視化することができる。前述のゲルベースの方法は、ｃｅＤＮＡベクターをゲルバンドから単離し、それを復元できるようにすることによって、精製目的に適合させることができる。

【０５２０】

生成されたｃｅＤＮＡベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。１つの例示的な非限定的方法として、試料の全体ＵＶ吸光度に対するｃｅＤＮＡ－プラスミドの寄与は、ｃｅＤＮＡベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。例えば、ＵＶ吸光度に基づいて、４μｇのｃｅＤＮＡベクターをゲル上に負荷し、ｃｅＤＮＡベクター蛍光強度が、１μｇであることが知られている２

ｋｂバンドに相当する場合、１μｇのｃｅＤＮＡベクターが存在し、ｃｅＤＮＡベクターは、全ＵＶ吸光材料の２５％である。次いで、ゲル上のバンド強度を、バンドが表す計算されたインプットに対してプロットする。例えば、全ｃｅＤＮＡベクターが８ｋｂであり、切除された比較バンドが２ｋｂである場合、バンド強度は、全インプットの２５％としてプロットされ、この場合、１．０μｇのインプットに対して０．２５μｇとなる。ｃｅＤＮＡベクタープラスミドタイトレーションを使用して、標準曲線をプロットする場合、回帰直線等式を使用して、ｃｅＤＮＡベクターバンドの量を計算し、次いで、これを使用して、ｃｅＤＮＡベクターにより表される全インプットのパーセント、または純度パーセントを判定することができる。

【０５２１】

実施例６：ｃｅＤＮＡからの制御された導入遺伝子発現：インビボでのｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子発現は、再用量投与によって持続および／または増加させることができる。

ｃｅＤＮＡベクターは、ＣＡＧプロモーター（配列番号７２）および非対称ＩＴＲ（例えば、５′ＷＴ－ＩＴＲ（配列番号２）および３′ｍｏｄ－ＩＴＲ（配列番号３）の間に隣接したルシフェラーゼ導入遺伝子（配列番号５６）を含むｃｅＤＮＡプラスミドを使用して、上記の実施例１に記載される方法により産生され、異なる治療パラグラムにおいてインビボで評価された。このｃｅＤＮＡベクターは、実施例６～１０に記載されているすべての後続の実験で使用された。実施例６では、ｃｅＤＮＡベクターを精製し、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ　ｃｅＤＮＡ）で製剤化し、各ＣＤ－１（登録商標）ＩＧＳマウスの尾静脈に注入した。リポソームは、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、コレステロール、およびＰＥＧ脂質を含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）リポソームを形成するための４つの構成成分を含む適切な脂質ブレンドで製剤化された。

【０５２２】

ｃｅＤＮＡベクターからのインビボでの導入遺伝子の持続的な発現を長期間にわたって評価するために、ＬＮＰ－ｃｅＤＮＡをおよそ５～７週齢のＣＤ－１（登録商標）ＩＧＳマウスに尾静脈内注入によって滅菌ＰＢＳで投与した。３つの異なる投与量群：０．１ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、および１．０ｍｇ／ｋｇを、群あたり１０匹のマウス（群あたり１５匹のマウスを有していた１．０ｍｇ／ｋｇを除く）を評価した。注入は、０日目に投与された。各群からの５匹のマウスに、２８日目に追加の同一用量を注入した。ルシフェラーゼ発現は、ＣＤ－１（登録商標）ＩＧＳマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，ＷＴマウス）への静脈内投与後のＩＶＩＳ撮像によって測定された。ルシフェラーゼ発現は、３、４、７、１４、２１、２８、３１、３５、および４２日目、ならびに定期的に（例えば、毎週、隔週、または１０日毎、または２週間毎）、４２～１１０日に１５０ｍｇ／ｋｇのルシフェリン基質を腹腔内注入した後、ＩＶＩＳ撮像によって評価した。結果を図６に示す。この図は、３つの異なる投与プロトコル後、少なくとも１３２日間にわたってＩＶＩＳ撮像によって測定されたルシフェラーゼ導入遺伝子発現を示すグラフである。

【０５２３】

再用量、例えばＬＮＰ－ｃｅＤＮＡで治療した対象のＬＮＰ－ｃｅＤＮＡ発現ルシフェラーゼの再投与の効果を調査するために、延長研究を実施した。特に、ｃｅＤＮＡベクターの１回以上の追加投与によって発現レベルが増加され得るかどうかを決定するために評価した。

【０５２４】

この研究では、ｃｅＤＮＡベクターからのルシフェラーゼ発現の生体内分布を、０日目および２８日目（群Ａ）における、１．０ｍｇ／ｋｇ（すなわち、プライミング用量）の初回静脈内投与後にＣＤ－１（登録商標）ＩＧＳマウスによって評価した。ｃｅＤＮＡベクターの２回目の投与は、８４日目に、１．２ｍＬの３ｍｇ／ｋｇ（Ｂ群）または１０ｍｇ／ｋｇ（Ｃ群）の尾静脈注入によって投与した。この研究では、群Ａ、Ｂ、およびＣの各々における５匹のＣＤ－１（登録商標）マウスを使用した。上記のような４９、５６、

６３、および７０日目の追加投与前、ならびに８４日目と９１、９８、１０５、１１２、および１３２日目の再用量後に、ルシフェラーゼ発現についてのマウスのＩＶＩＳ撮像を実施した。ルシフェラーゼ発現は、少なくとも１１０日（評価された最長期間）まで、群Ａ、Ｂ、およびＣのすべてにおいて評価され、検出された。

【０５２５】

ルシフェリンの存在下でのルシフェラーゼ活性の評価によって決定されるように、ルシフェラーゼの発現レベルは、ＬＮＰ－ｃｅＤＮＡ－Ｌｕｃの再用量（すなわち、ｃｅＤＮＡ組成物の再投与）によって増加することが示された。結果を図６に示す。これは、３つの異なる投与プロトコル（Ａ、Ｂ、およびＣ群）後の少なくとも１１０日間のＩＶＩＳ撮像によって測定されたルシフェラーゼ導入遺伝子発現を示すグラフである。追加の再用量（１ｍｇ／ｋｇプライミング用量（すなわち、群Ａ）治療を受けなかったマウスは、研究の期間にわたって安定したルシフェラーゼ発現が観察された。３ｍｇ／ｋｇの再用量のｃｅＤＮＡベクターを投与されたＢ群のマウスは、Ｃ群のマウスと比較して、観察された放射輝度のおよそ７倍の増加を示した。驚いたことに、１０ｍｇ／ｋｇのｃｅＤＮＡベクターは、いかなる再用量も受けていないマウス（Ａ群）と比較して、観察されたルシフェラーゼ放射輝度が１７倍増加した。

【０５２６】

Ａ群は、０日目および２８日目での尾静脈への１ｍｇ／ｋｇのｃｅＤＮＡベクターの静脈内投与後の、ＣＤ－１（登録商標）ＩＧＳマウスにおけるルシフェラーゼ発現を示す。Ｂ群およびＣ群は、第１の時点（０日目）で１ｍｇ／ｋｇのｃｅＤＮＡベクターを投与され、８４日目の第２の時点でｃｅＤＮＡベクターの投与により再投与されたＣＤ－１（登録商標）ＩＧＳマウスにおけるルシフェラーゼ発現を示す。予期せぬことに、ｃｅＤＮＡベクターの２回目の投与（すなわち、再用量）は、発現を少なくとも７倍、最大で１７倍まで増加させた。

【０５２７】

予期せぬことに、Ｂ群の再用量投与におけるｃｅＤＮＡベクターの用量（すなわち、量）の３倍増加（すなわち、３ｍｇ／ｋｇが再用量で投与される）は、ルシフェラーゼの発現の７倍増加をもたらした。また、予期せぬことに、Ｃ群の再用量投与（すなわち、１０ｍｇ／ｋｇの再用量が投与される）におけるｃｅＤＮＡベクターの量の１０倍増加は、ルシフェラーゼの発現の１７倍増加をもたらした。したがって、ｃｅＤＮＡの２回目の投与（すなわち、再用量）は、発現を少なくとも７倍、最大で１７倍まで増加させた。これは、再用量による導入遺伝子発現の増加が予想よりも大きく、再用量投与におけるｃｅＤＮＡベクターの用量または量に依存することを示し、０日目での初回プライミング投与からの初期導入遺伝子発現と相乗的であるように見える。すなわち、導入遺伝子発現の用量依存的増加は相加的ではなく、むしろ導入遺伝子の発現レベルは用量依存的であり、各時点で投与されるｃｅＤＮＡベクターの量の合計よりも大きい。

【０５２８】

Ｂ群およびＣ群の両方は、第２の時点で、ｃｅＤＮＡベクターを再投与されなかった対照マウス（Ａ群）と比較して、ルシフェラーゼの発現に有意な用量依存的増加を示した。まとめると、これらのデータは、ｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現が、少なくとも第２の時点でｃｅＤＮＡベクターの再用量（すなわち、再投与）によって、用量依存的に増加され得ることを示す。

【０５２９】

まとめると、図６のこれらのデータは、ｃｅＤＮＡベクターからの導入遺伝子の発現レベルが少なくとも８４日間にわたって持続レベルで維持することができ、少なくとも第２の時点で投与されたｃｅＤＮＡベクターの再用量後にインビボで増加され得ることを示す。

【０５３０】

実施例７：ＬＮＰ製剤化ｃｅＤＮＡベクターのインビボでの持続的導入遺伝子発現

異なる脂質ナノ粒子を用いた実施例６の結果の再現性を、マウスにおいてインビボで評

価した。０日目に、実施例６で使用したものとは異なるＬＮＰに封入されたＣＡＧプロモーターによって駆動されるルシフェラーゼ導入遺伝子を含むｃｅＤＮＡベクター、またはポリＣを含むがｃｅＤＮＡまたはルシフェラーゼ遺伝子を欠いている同じＬＮＰのいずれかをマウスに投与した。具体的には、およそ４週齢の雄ＣＤ－１（登録商標）マウスを、０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ－ＴＴＸ－ルシフェラーゼまたは対照ＬＮＰ－ポリＣの単回注入で治療し、０日目に側尾静脈から静脈内投与した。１４日目に動物にルシフェリン１５０ｍｇ／ｋｇを２．５ｍＬ／ｋｇの腹腔内注入により全身投与した。ルシフェリン投与後およそ１５分で、各動物をインビボ撮像システム（「ＩＶＩＳ」）を使用して撮像した。

【０５３１】

図７に示されるように、４匹のｃｅＤＮＡ治療されたマウスすべてにおいて肝臓の有意な蛍光が観察され、注入部位以外では動物において他の蛍光はほとんど観察されなかったことから、ＬＮＰがｃｅＤＮＡ構築物の肝臓特異的送達を媒介したこと、および送達されたｃｅＤＮＡベクターが、投与後少なくとも２週間にわたって、その導入遺伝子の持続的発現を制御可能であったことを示す。

【０５３２】

実施例８：ｃｅＤＮＡベクター投与によるインビボでの肝臓における持続的導入遺伝子発現

別の実験では、治療された動物の肝臓内のＬＮＰ送達されたｃｅＤＮＡの局在を評価した。関心対象の機能的導入遺伝子を含むｃｅＤＮＡベクターを、実施例７で使用したものと同じＬＮＰに封入し、静脈内注入により０．５ｍｇ／ｋｇの用量レベルでインビボでマウスに投与した。６時間後、マウスを終了させ、肝臓試料を採取し、標準的なプロトコルを使用してホルマリン固定し、パラフィン包埋した。ＲＮＡｓｃｏｐｅ（登録商標）ｉｎｓｉｔｕハイブリダイゼーションアッセイを実施して、ｃｅＤＮＡ導入遺伝子に特異的なプローブを使用して、組織内のｃｅＤＮＡベクターを可視化し、発色反応およびヘマトキシリン染色（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を使用して検出した。図８は結果を示し、ｃｅＤＮＡが肝細胞に存在することを示す。

【０５３３】

実施例９：インビボでのｃｅＤＮＡの持続的眼導入遺伝子発現

肝臓以外の組織でのｃｅＤＮＡベクター導入遺伝子発現の持続可能性を評価して、インビボでの眼内投与後のｃｅＤＮＡベクターの耐性および発現を決定した。０日目に、およそ９週齢の雄のＳｐｒａｑｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットに、５μＬのｊｅｔＰＥＩ（登録商標）トランスフェクション試薬（Ｐｏｌｙｐｌｕｓ）で製剤化されたルシフェラーゼ導入遺伝子を含むｃｅＤＮＡベクターまたはＪｅｔＰＥＩ（登録商標）で製剤化されたルシフェラーゼをコードするプラスミドＤＮＡのいずれかを、いずれも０．２５μｇ／μＬの濃度で網膜下注入した。各群において４匹のラットを試験した。動物を鎮静させ、３３ゲージ針を使用して、被験物質を右眼に網膜下注入した。各動物の左眼は未治療であった。注入直後、網膜下ブレブの存在を確認するために、光干渉トモグラフィーまたは眼底撮像で眼を確認した。標準的な手順に従って、ラットをブプレノルフィンおよび局所抗生物質軟膏で治療した。

【０５３４】

７、１４、２１、２８、および３５日目に、両方の群の動物に、作りたてのルシフェリン１５０ｍｇ／ｋｇを、２．５ｍＬ／ｋｇの腹腔内注入を介して全身投与した。ルシフェリン投与後５～１５分で、イソフルラン麻酔下でＩＶＩＳを使用して、すべての動物を撮像した。眼を含む関心対象の領域の全流束［ｐ／ｓ］および平均流束［ｐ／ｓ／ｓｒ／ｃｍ^2）は、５分間の曝露で得られた。結果は、未治療の眼（「注入されていない」）の各治療群の平均放射輝度に対する、治療された眼（「注入された」）の各治療群の平均輝度としてグラフ化した（図９Ｂ）。有意な蛍光は、ｃｅＤＮＡベクターで治療された眼において容易に検出可能であったが、プラスミドで治療された眼ではるかに弱かった（図９Ａ）。３５日後、プラスミドを注入したラットは終了したが、ｃｅＤＮＡで治療されたラットについて研究を継続し、４２、４９、５６、６３、７０、および９９日目にルシフェ

リン注入およびＩＶＩＳ撮像を行った。結果は、ラットの眼に単回注入で導入されたｃｅＤＮＡベクターが、インビボでの導入遺伝子発現を媒介し、その発現が少なくとも注入後９９日まで高レベルで持続されたことを実証する。

【０５３５】

実施例１０：Ｒａｇ２マウスにおけるｃｅＤＮＡベクターの持続投与および再投与。

ｃｅＤＮＡベクターの遺伝子発現カセットにコードされている導入遺伝子のうちの１つ以上が、発現したタンパク質が外来であると認識される宿主環境（例えば、細胞または対象）で発現される状況では、宿主が発現産物の望ましくない枯渇をもたらし得る適応免疫反応を開始する可能性が存在し、これは、発現の欠如と混同される可能性がある。場合によっては、これは、通常の宿主環境に対して異種であるレポーター分子で起こり得る。したがって、ｃｅＤＮＡベクター導入遺伝子の発現は、Ｂ細胞およびＴ細胞を欠くＲａｇ２マウスモデルにおいてインビボで評価されたため、ルシフェラーゼなどの非天然マウスタンパク質に対する適応免疫反応を開始しない。簡単に言うと、０日目に、ｃ５７ｂｌ／６およびＲａｇ２ノックアウトマウスに、０．５ｍｇ／ｋｇの、ルシフェラーゼを発現するＬＮＰ封入されたｃｅＤＮＡベクターまたはポリＣ対照を尾静脈注入により静脈内投与し、２１日目に、ある特定のマウスに同じＬＮＰ封入されたｃｅＤＮＡベクターを同じ用量レベルで再投与した。すべての試験群は、各々４匹のマウスで構成された。実施例９に記載されているように、ルシフェリン注入後に週間隔でＩＶＩＳ撮像を実施した。

【０５３６】

ＩＶＩＳ分析から観察された全流束を比較すると、ＬＮＰ－ｃｅＤＮＡベクター－Ｌｕｃを投与した野生型マウス（発現されたルシフェラーゼの存在の間接的測定）で観察された蛍光は、２１日後に徐々に減少したが、同じ治療を施したＲａｇ２マウスは、４２日の実験にわたってルシフェラーゼの比較的一定の持続的発現を示した（図１０Ａ）。野生型マウスで観察された減少のおよそ２１日の時点は、適応免疫反応がもたらされると予想される時間枠に対応する。Ｒａｇ２マウスにおけるｌｎｐ－ｃｅＤＮＡベクターの再投与は、発現の顕著な増加をもたらし、これは、この研究で追跡された少なくとも２１日間にわたって持続した（図１０Ｂ）。結果は、非天然タンパク質が、宿主においてｃｅＤＮＡベクターから発現されるときに適応免疫が役割を果たすことができ、初回投与から２０日以上の時間枠で観察された発現の減少が、発現の低下ではなく（またはそれに加えて）、発現された分子に対して交絡する適応免疫反応を知らせることができることを示唆する。注目すべきことに、宿主が発現された分子を自己として適切に認識し、そのような免疫反応を起こさないことが予想される宿主において未変性タンパク質を発現する場合、この反応は低いと予想される。

【０５３７】

実施例１１：持続的発現に対する肝臓特異的発現およびＣｐＧ調節の影響

実施例１０に記載されているように、望ましくない宿主免疫反応は、場合によっては、導入されたｃｅＤＮＡベクターからの１つ以上の所望の導入遺伝子の持続的発現であるものを人工的に弱めることがある。ｃｅＤＮＡベクターからの持続的発現に対する潜在的な宿主免疫反応の回避および／または抑制の影響を評価するために、２つのアプローチが取られた。第１に、前の実施例で使用されたｃｅＤＮＡ－Ｌｕｃベクターは構成的ＣＡＧプロモーターの制御下にあったため、肝臓特異的プロモーター（ｈＡＡＴ）または異なる構成的プロモーター（ｈＥＦ－１）を使用して同様の構築物を作製して、骨髄細胞または非肝臓組織への長期曝露を回避することで、観察された免疫効果が低減したかどうかを判断した。第２に、ある特定のｃｅＤＮＡ－ルシフェラーゼ構築物は、宿主免疫反応の既知のトリガーであるＣｐＧ含有量が低減するように操作された。そのような操作され、プロモーターが切り替えられたｃｅＤＮＡベクターをマウスに投与した際のｃｅＤＮＡコード化ルシフェラーゼ遺伝子発現を測定した。

【０５３８】

各々が導入遺伝子としてルシフェラーゼをコードする、３つの異なるｃｅＤＮＡベクターを使用した。１つ目のｃｅＤＮＡベクターは、多数の非メチル化ＣｐＧ（約３５０）を

有し、構成的ＣＡＧプロモーター（「ｃｅＤＮＡ　ＣＡＧ」）を含んでいた。２つ目は、中程度の数の非メチル化ＣｐＧ（約６０）を有し、肝臓特異的ｈＡＡＴプロモーター（「ｃｅＤＮＡ　ｈＡＡＴ低ＣｐＧ」）を含んでいた。また３つ目は、非メチル化ＣｐＧを含まず、ｈＡＡＴプロモーター（「ｃｅＤＮＡ　ｈＡＡＴ無ＣｐＧ」）を含むように、２つ目のメチル化形態であった。他の点では、ｃｅＤＮＡベクターは同一であった。上記のようにベクターを調製した。

【０５３９】

およそ４週齢の４匹の雄ＣＤ－１（登録商標）マウスの４つの群を、ＬＮＰに封入されたｃｅＤＮＡベクターまたはポリＣ対照のうちの１つで治療した。０日目に、各マウスに０．５ｍＬ／ｋｇのｃｅＤＮＡベクターを５ｍＬ／ｋｇの容量で単回静脈内尾静脈注入で投与した。－１、－、１、２、３、７日目、およびその後マウスが絶命するまで毎週、体重を記録した。全血試料および血清試料は、０、１、および３５日目に採取した。生存中の撮像は、７、１４、２１、２８、および３５日目、その後は毎週、インビボ撮像システム（ＩＶＩＳ）を使用して実施した。撮像のために、各マウスに、２．５ｍＬ／ｋｇの腹腔内注入を介して１５０ｍｇ／ｋｇのルシフェリンを注入した。１５分後、各マウスを麻酔し、撮像した。マウスは９３日目に絶命し、肝臓および脾臓を含む終末組織を収集した。サイトカイン測定は、０日目の投与の６時間後に行った。

【０５４０】

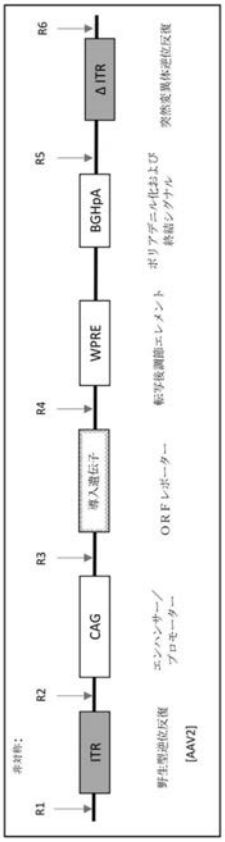
すべてのｃｅＤＮＡ治療マウスは、７日目および１４日目に有意な蛍光を示したが、蛍光は、ｃｅＤＮＡ　ＣＡＧマウスでは１４日後に急速に減少し、残りの研究では徐々に減少した。対照的に、ｃｅＤＮＡ　ｈＡＡＴ低ＣｐＧおよび無ＣｐＧ治療マウスの全流束は、安定した高レベルのままであった（図１１）。これは、ｃｅＤＮＡベクターの送達を特異的に肝臓に向けることで、単回注入後、少なくとも７７日間にわたってベクターからの持続的で耐久性のある導入遺伝子発現がもたらされたことを示唆していた。ＣｐＧが最小化されているか、またはＣｐＧ含有量が完全に存在しない構築物は、同様の耐久性のある持続的発現プロファイルを有していたが、高ＣｐＧ構成的プロモーター構築物は、経時的に発現の低下を呈し、ｃｅＤＮＡベクターの導入による宿主免疫活性化が、対象におけるそのようなベクターから観察された発現の減少において役割を果たし得ることを示唆している。これらの結果は、組織の制限されたプロモーターを選択すること、および／または宿主の免疫反応（潜在的に導入遺伝子特異的な反応）が観察された場合にｃｅＤＮＡベクターのＣｐＧ含有量を変更することによって、反応の持続時間を所望のレベルに調整する代替方法を提供する。

【０５４１】

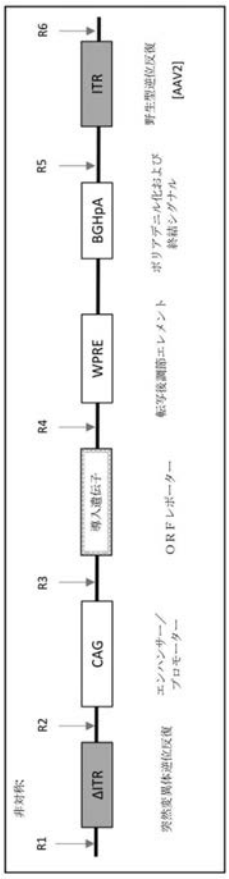
参考文献

特許および特許出願を含むがこれらに限定されない、本明細書および本明細書の実施例で引用されるすべての刊行物および参考文献は、あたかも個々の刊行物または参考文献が、完全に記載されるように参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、それら全体が参照により組み込まれる。この出願が優先権を主張する任意の特許出願もまた、刊行物および参考文献について上述した方法で、参照により本明細書に組み込まれる。

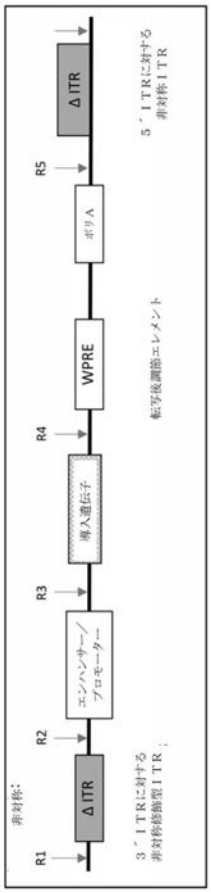
【図１Ａ】



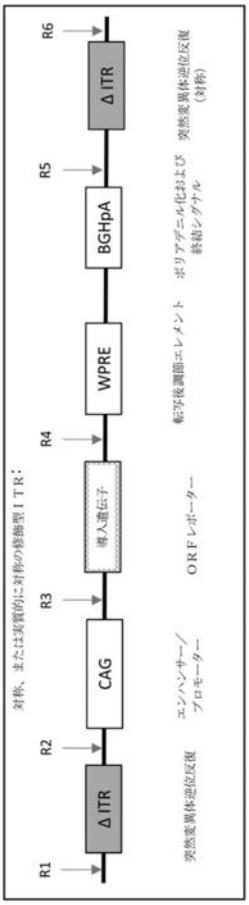
【図１Ｂ】



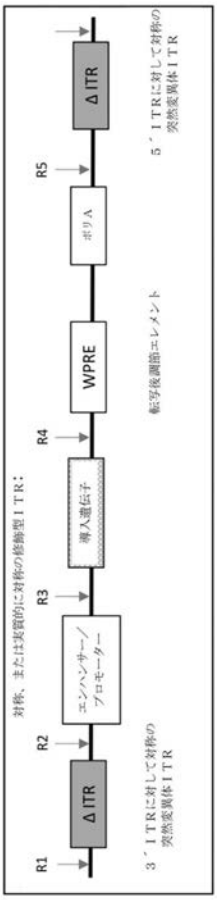
【図１Ｃ】



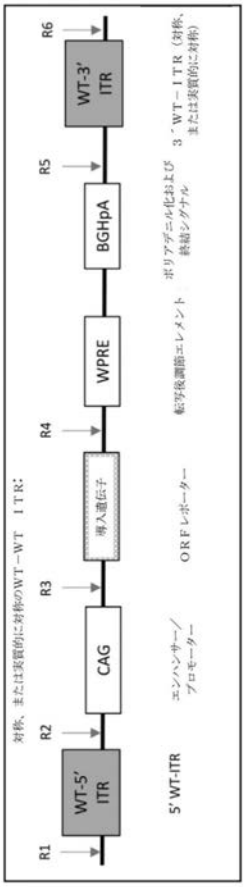
【図１Ｄ】



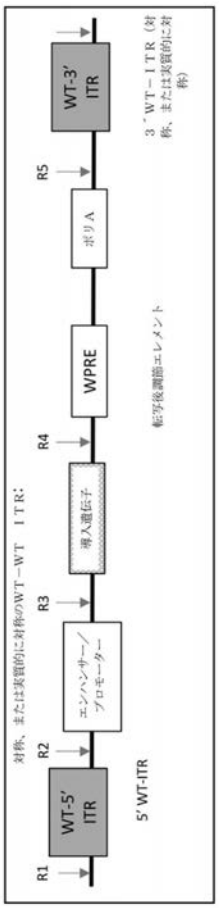
【図１Ｅ】



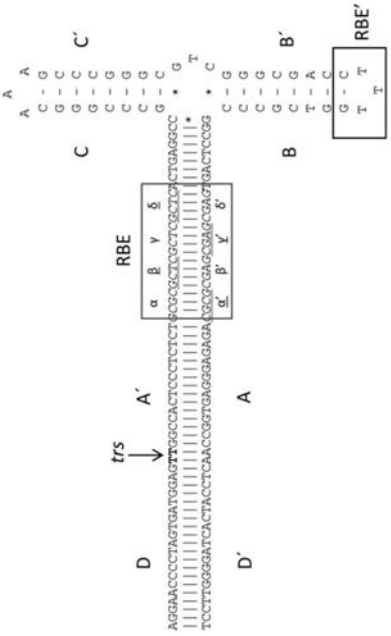
【図１Ｆ】



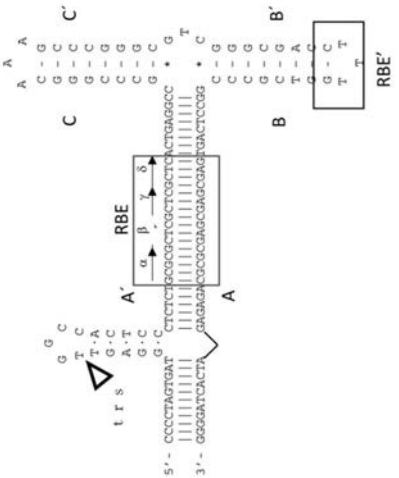
【図１Ｇ】



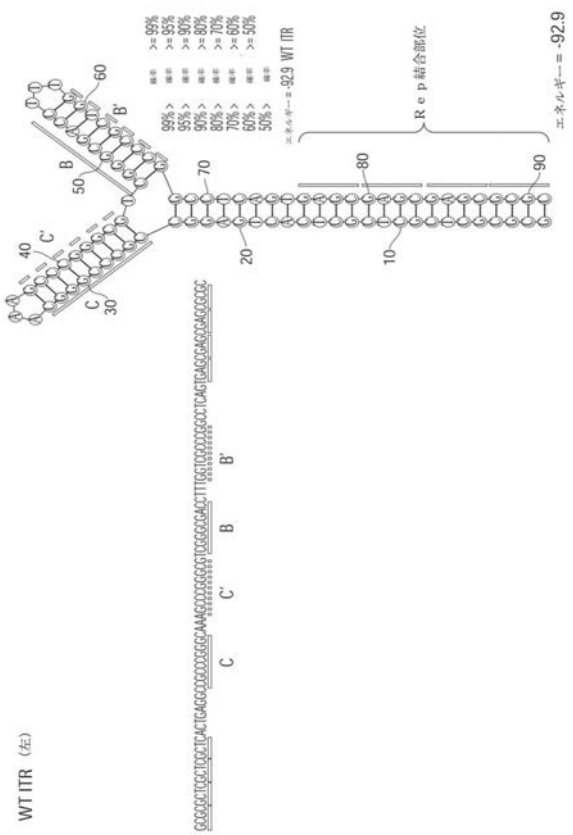
【図２Ａ】



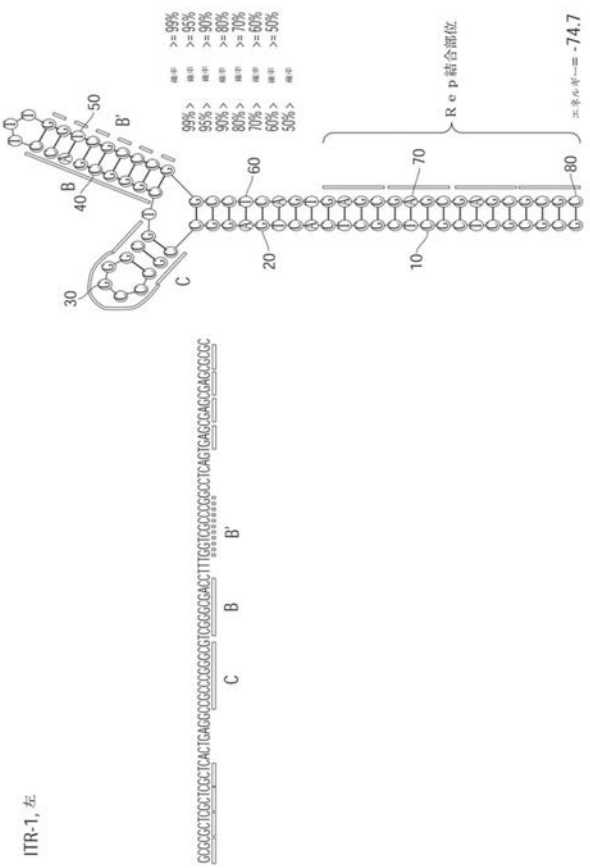
【図２Ｂ】



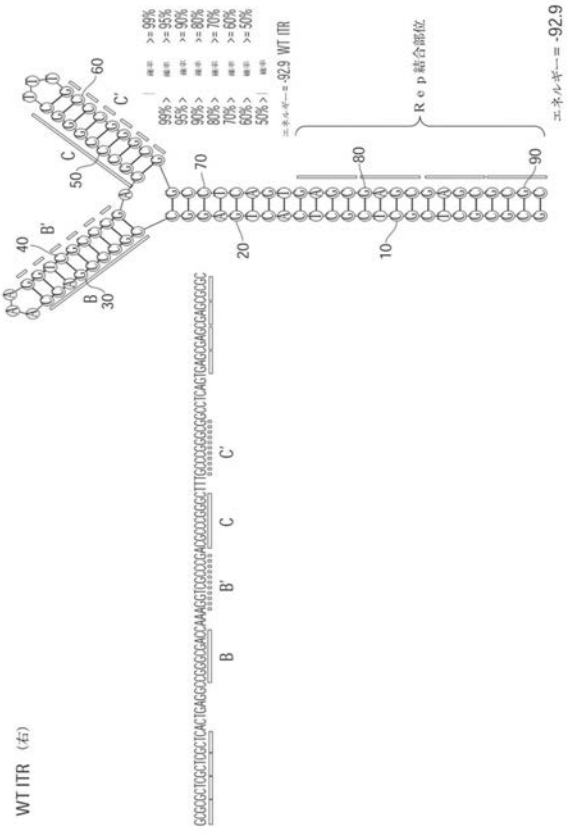
【図３Ａ】



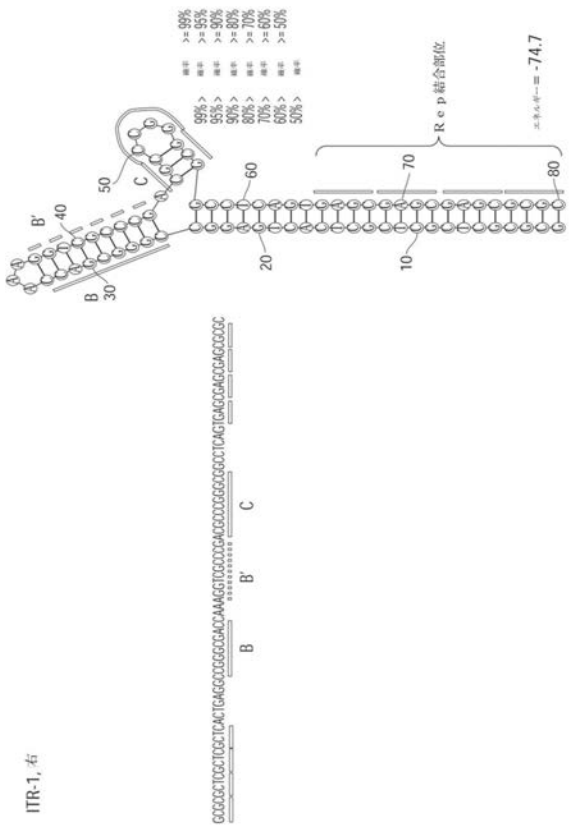
【図３Ｂ】



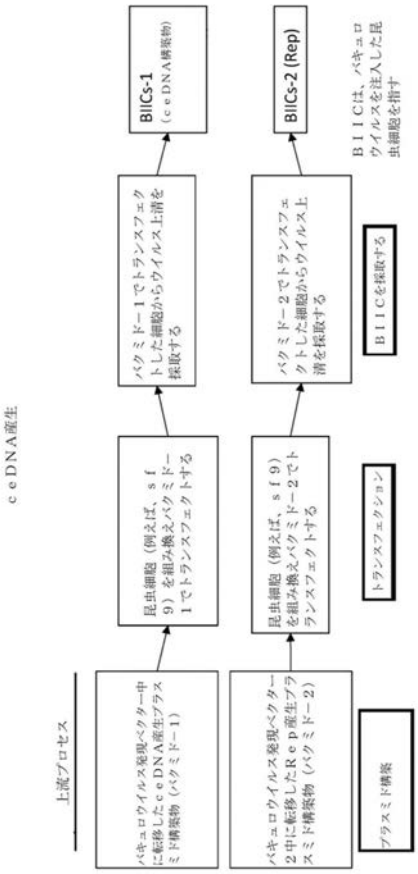
【図３Ｃ】



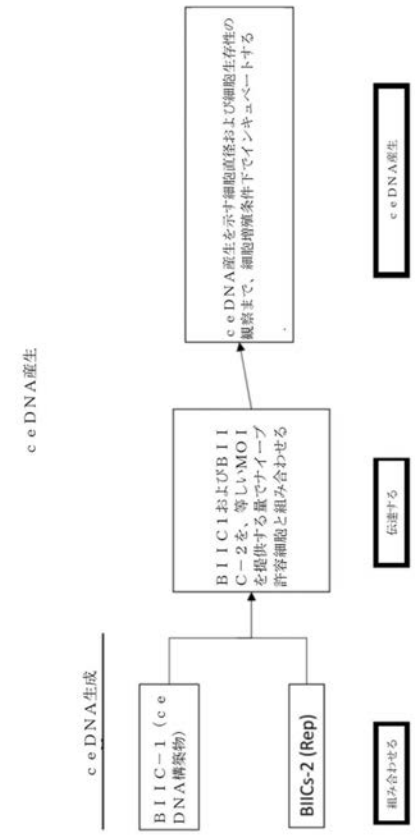
【図３Ｄ】



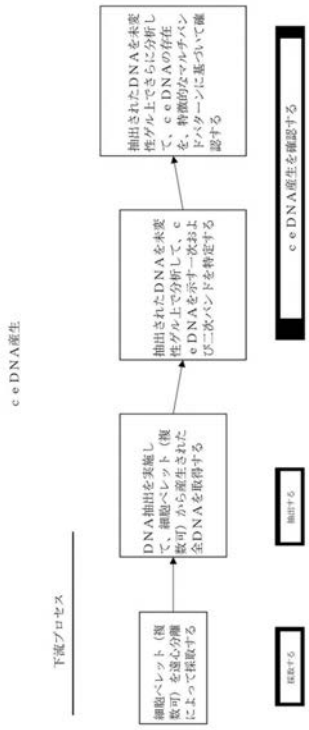
【図４Ａ】



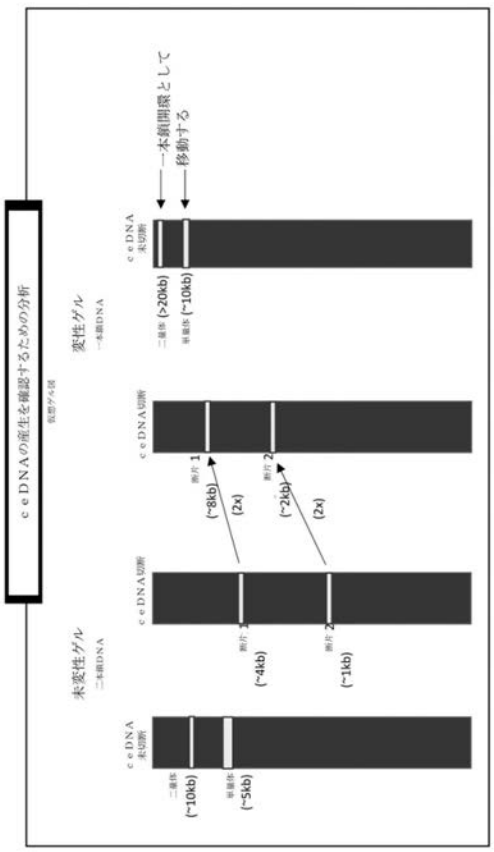
【図４Ｂ】



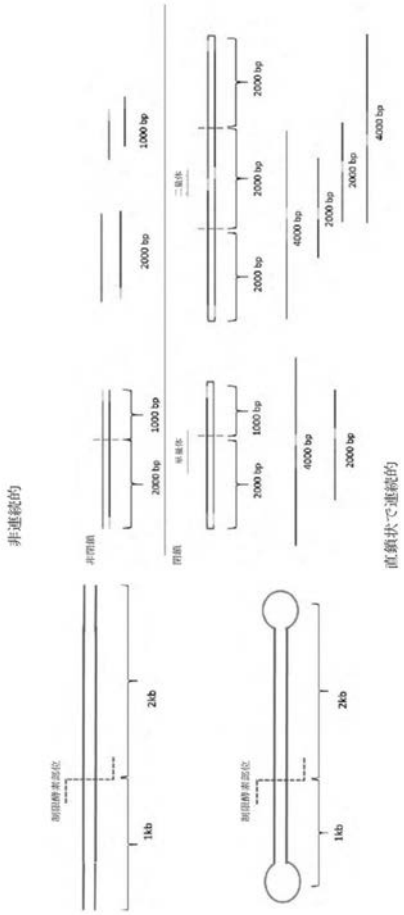
【図４Ｃ】



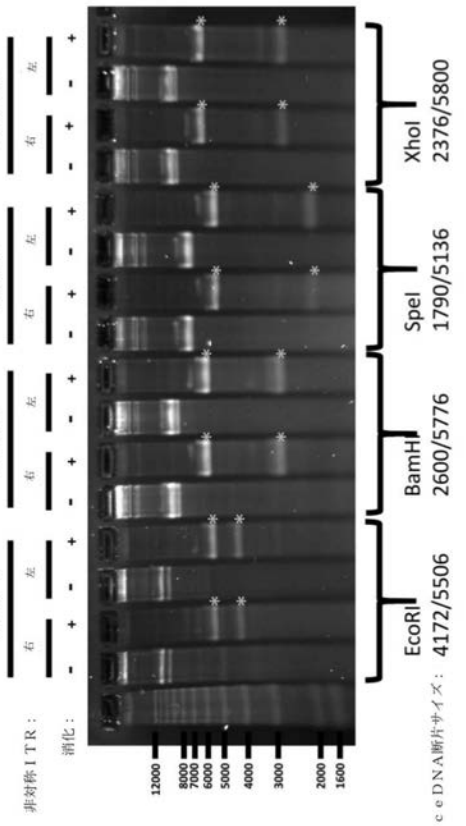
【図４Ｄ】


ｃｅＤＮＡの産生を確認するための分析
変性ゲル
一本鎖DNA
ｃｅＤＮＡ未切断
二量体 (>20kb)
単量体 (~10kb)
一本鎖開環として
移動する
ｃｅＤＮＡ切断
断片 1
断片 2
(~8kb)
(2x)
(~2kb)
(2x)
未変性ゲル
二本鎖DNA
ｃｅＤＮＡ切断
(~4kb)
(~1kb)
ｃｅＤＮＡ未切断
二量体
(~10kb)
単量体
(~5kb)

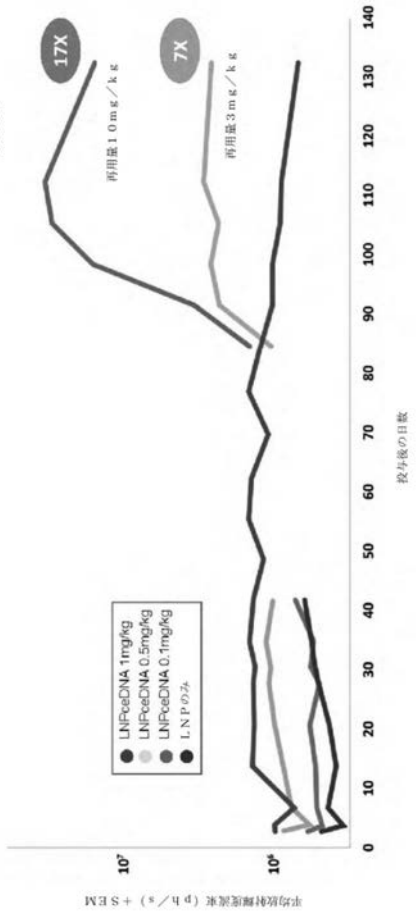
【図４Ｅ】


非連続的
直鎖状で連続的
2000 bp
1000 bp
4000 bp
1kb
2kb

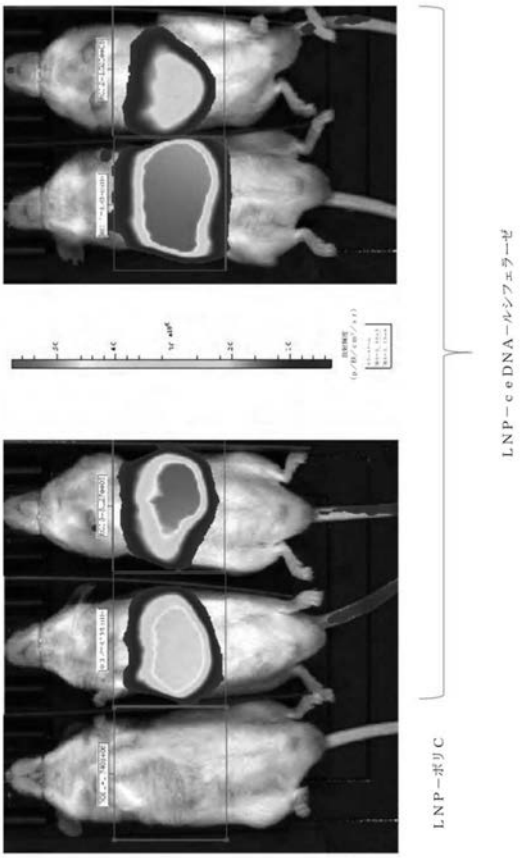
【図５】


非対称ＩＴＲ：
消化：
構築物1、2
構築物3、4
構築物5、6
構築物7、8
EcoRI
BamH
SpeI
XhoI
ｃｅＤＮＡ断片サイズ：
4172/5506
2600/5776
1790/5136
2376/5800
12000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1600

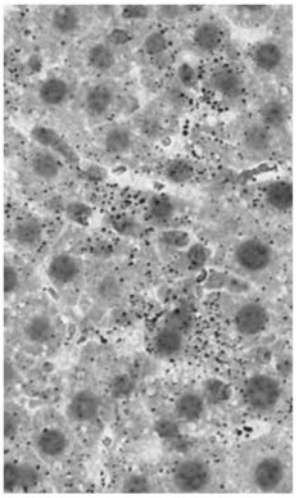
【図６】


反復投与
17X
7X
再用量１０ｍｇ／ｋｇ
再用量３ｍｇ／ｋｇ
LNPceDNA 1mg/kg
LNPceDNA 0.5mg/kg
LNPceDNA 0.1mg/kg
ＬＮＰのみ
投与後の日数
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140

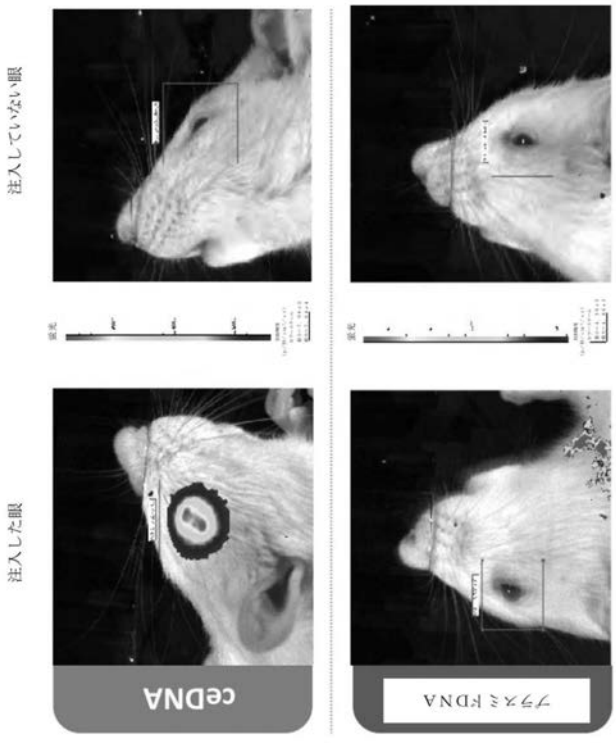
【図７】


LNP－ポリC
LNP－ceDNA－ルシフェラーゼ

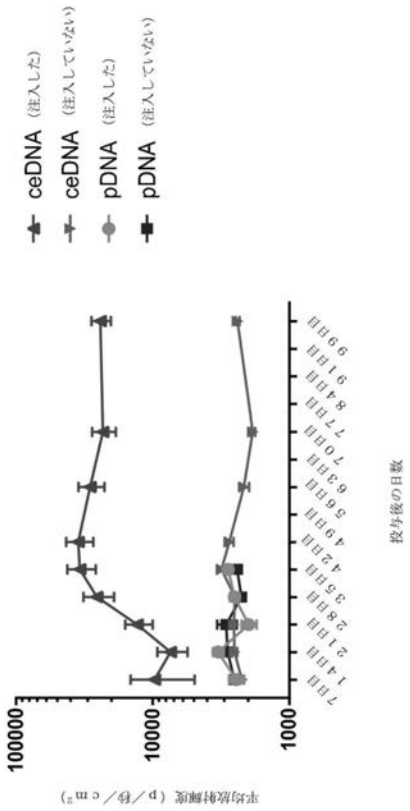
【図８】



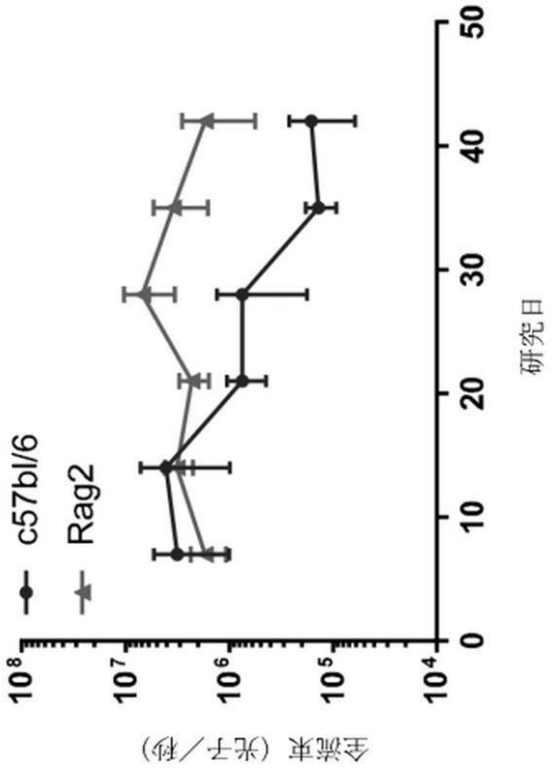
【図９Ａ】


注入していない眼
注入した眼
ceDNA
プラスミドDNA

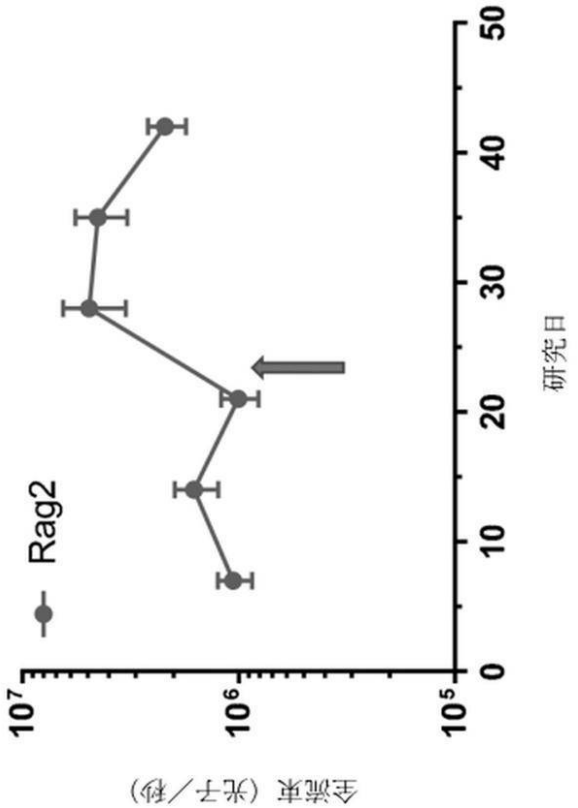
【図９Ｂ】


ceDNA (注入した)
ceDNA (注入していない)
pDNA (注入した)
pDNA (注入していない)
平均放射輝度 (p/秒/cm²)
100000
10000
1000
投与後の日数

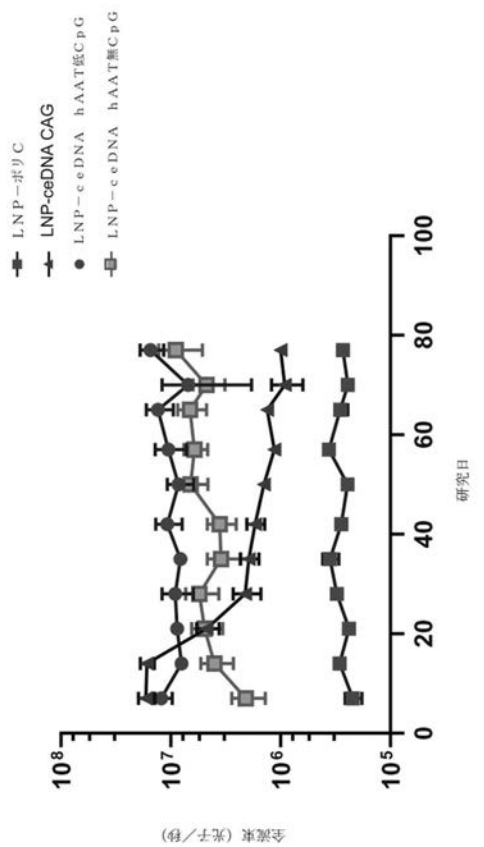
【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】



【図１１】



【配列表】
2021513999000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/018927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 15/86; C12N 15/864; C12N 15/87 (2019.01)
CPC - A61K 48/0066; C12N 15/86; C12N 15/8645; C12N 2750/14111; C12N 2750/14122; C12N 2750/14143; C12N 2799/025 (2019.02)

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
USPC - 424/93.6; 435/457; 435/320.1; 536/23.5; 536/24.1 (keyword delimited)

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.
X -- Y	WO 2015/191508 A1 (VOYAGER THERAPEUTICS, INC.) 17 December 2015 (17.12.2015) entire document	1-4, 6, 17 ---------- 5
Y	WO 2012/123430 A1 (ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE et al) 20 September 2012 (20.09.2012) entire document	5
A	WO 2006/130581 A2 (AVIGEN, INC. et al) 07 December 2006 (07.12.2006) entire document	1-6, 17
A	WO 2009/038462 A1 (AMSTERDAM MOLECULAR THERAPEUTICS B.V. et al) 26 March 2009 (26.03.2009) entire document	1-6, 17
A	WO 2017/152149 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 08 September 2017 (08.09.2017) entire document	1-6, 17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 April 2019	01 MAY 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/018927

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.: 7-16, 18-53
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:

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.:

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (January 2015)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ　37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
Ａ６１Ｐ　25/28	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28	
Ａ６１Ｐ　3/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/06	
Ａ６１Ｐ　25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ　19/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/10	
Ａ６１Ｐ　17/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ　11/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06	
Ａ６１Ｐ　7/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04	
Ａ６１Ｐ　35/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	
Ａ６１Ｐ　19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ　29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１
Ａ６１Ｐ　1/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04	
Ａ６１Ｐ　17/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06	
Ａ６１Ｐ　37/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08	
Ａ６１Ｋ　35/761	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/761	

(31)優先権主張番号　62/633,795
(32)優先日　平成30年2月22日(2018.2.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/746,762
(32)優先日　平成30年10月17日(2018.10.17)
(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,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策
(72)発明者　カー，　ダグラス　エー.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，　ビニー　ストリート　３０１，　４ティーエイチ　フロア，　ジェネレーション　バイオ　カンパニー　気付
(72)発明者　スタントン，　マシュー　ジー.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，　ビニー　ストリート　３０１，　４ティーエイチ　フロア，　ジェネレーション　バイオ　カンパニー　気付
(72)発明者　チオッコ，　マット
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，　ビニー　ストリート　３０１，　４ティーエイチ　フロア，　ジェネレーション　バイオ　カンパニー　気付
(72)発明者　アンジェリーノ，　マーク　ディー.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，　ビニー　ストリート　３０

１，　４ティーエイチ　フロア，　ジェネレーション　バイオ　カンパニー　気付
(72)発明者　コーティン，　ロバート　エム.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，　ビニー　ストリート　３０
１，　４ティーエイチ　フロア，　ジェネレーション　バイオ　カンパニー　気付
(72)発明者　サマヨア，　フィリップ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，　ビニー　ストリート　３０
１，　４ティーエイチ　フロア，　ジェネレーション　バイオ　カンパニー　気付

Ｆターム(参考)　4C084 AA13 BA41 NA14 ZA02 ZA16 ZA53 ZA59 ZA68 ZA89 ZA96
ZA97 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26 ZC33
4C085 AA13 EE01
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA02 ZA16 ZA53 ZA59 ZA68
ZA89 ZA96 ZA97 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26 ZC33