(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-530023
(P2024-530023A)
(43)公表日　令和6年8月14日(2024.8.14)

| (51)国際特許分類 | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *C07K* | *5/08 (2006.01)* | C07K | 5/08 | 4B065 |
| *C12N* | *7/01 (2006.01)* | C12N | 7/01 | ZNA 4C084 |
| *C07K* | *5/10 (2006.01)* | C07K | 5/10 | 4C087 |
| *C07K* | *7/06 (2006.01)* | C07K | 7/06 | 4H045 |
| *C07K* | *7/08 (2006.01)* | C07K | 7/08 | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全261頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-506879(P2024-506879)
(86)(22)出願日　令和4年8月5日(2022.8.5)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月2日(2024.4.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/074611
(87)国際公開番号　WO2023/015297
(87)国際公開日　令和5年2月9日(2023.2.9)
(31)優先権主張番号　63/230,046
(32)優先日　令和3年8月5日(2021.8.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,
最終頁に続く

(71)出願人　515236259
ザ・ブロード・インスティテュート・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・メイン・ストリート・４１５
(71)出願人　505028576
プレジデント アンド フェロウズ オヴ ハーヴァード カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３８ ケンブリッジ クインシー・ストリート １７
(71)出願人　596060697
マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　操作された筋肉標的化組成物

(57)【要約】
筋特異的標的化部分及び筋特異的標的化モチーフを含む組成物が本明細書に記載される。筋特異的標的化モチーフ及び筋特異的標的化部分を含む組成物の使用もまた本明細書に記載される。ある実施形態において、筋特異的標的化部分及び筋特異的標的化部分を含む組成物は、筋細胞にカーゴを直接送達するために使用され得る。

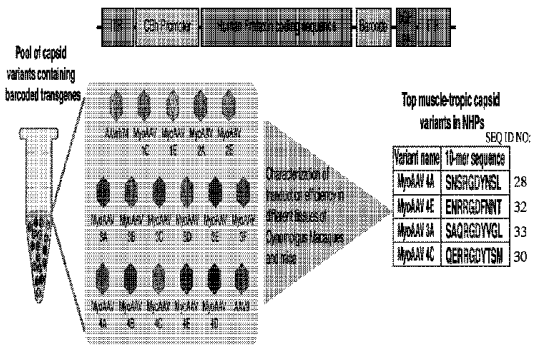



FIG. 28D

【特許請求の範囲】
【請求項１】
筋細胞を標的とするために有効な標的化部分であって、前記標的化部分が、１つ以上のｎ量体モチーフを含み、前記１つ以上のｎ量体モチーフのうちの少なくとも１つのｎ量体モチーフが、$X_mRGDX_n$を含むか又はそれからなり、式中、$X_m$及び$X_n$がそれぞれ独立していずれかのアミノ酸から選択され、ｎが１、２、３、４、５、６、７、８、又は９であり、ｍが１～４である、標的化部分と、
任意にカーゴを含み、前記カーゴが、前記標的化部分に連結されるか又はそれ以外では結合される、組成物。
【請求項２】
前記少なくとも１つのｎ量体モチーフが、表４（配列番号２～７、２０～２１、４１～４０９）、表５（配列番号２、２８、３０～３２、５５、７６、９６、１０３、１３５、１５８、２０７、２１４、２５２、３０６、３１６、３９８、４１０～７６８）、図１４Ｆ（配列番号８～１２、１４～１８）、表６（配列番号７７４～７９５）、図１３（配列番号２～１２）、図１４Ｆ（配列番号８～１２、１４～１８）、図１９Ｂ（２～７、２０～２１）、図２７Ｂ（配列番号２～１２）、図２８Ｂ（２８～３２）、図２８Ｄ（配列番号２８～３０）のいずれか１つ、又はそれらの任意の組合せにあるとおりである、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記標的化部分が、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、ポリマー、糖、又はそれらの組合せを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記標的化部分が、ウイルスタンパク質を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
前記ウイルスタンパク質が、カプシドタンパク質である、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
前記ウイルスタンパク質が、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）タンパク質である、請求項４に記載の組成物。
【請求項７】
前記ｎ量体モチーフがウイルスカプシドの外部であるように、前記ｎ量体モチーフが前記ウイルスタンパク質の２つのアミノ酸間に位置する、請求項５に記載の組成物。
【請求項８】
前記ｎ量体モチーフが、ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸２６２～２６９、３２７～３３２、３８２～３８６、４５２～４６０、４８８～５０５、５２７～５３９、５４５～５５８、５８１～５９３、７０４～７１４、若しくはそれらの任意の組合せの間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間、又はＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、ＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される、請求項６に記載の組成物。
【請求項９】
前記ｎ量体モチーフが、ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸５８８及び５８９の間、又はＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、ＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される、請求項６に記載の組成物。
【請求項１０】
前記組成物が、操作ウイルス粒子である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１１】
前記操作ウイルス粒子が、操作ＡＡＶウイルス粒子である、請求項１０に記載の組成物。
【請求項１２】
前記ＡＡＶウイルス粒子が、操作ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５

、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、又はＡＡＶ　ｒｈ．１０ウイルス粒子である、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記ｎ量体モチーフが、３～１５アミノ酸である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１４】
前記組成物が、非筋細胞に対する減少されたか又はなくされた特異性を有する、請求項１に記載の組成物。
【請求項１５】
前記非筋細胞が、肝細胞である、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
前記ウイルスカプシドが、対応する野生型ＡＡＶカプシドポリペプチドと比較して、非筋細胞における減少されたか又はなくされた取り込みを有する操作ＡＡＶカプシドタンパク質である、請求項５に記載の組成物。
【請求項１７】
野生型カプシドポリペプチドが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、又はＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドである、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
前記操作ＡＡＶカプシドタンパク質が、非筋細胞において取り込みを減少するか又はなくす１つ以上の変異を含む、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１９】
前記１つ以上の変異が、ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）の
ａ．２６７位に、
ｂ．２６９位に、
ｃ．５０４位に、
ｄ．５０５位に、
ｅ．５９０位に、
ｆ．又はそれらの任意の組合せに、
又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する１つ以上の位置にある、請求項１８に記載の組成物。
【請求項２０】
前記非ＡＡＶ９カプシドタンパク質が、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、又はＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドである、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における２６７位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、ＡへのＧ又はＸ変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２２】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における２６９位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Ｓ又はＸからＴへの変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２３】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における５０４位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Ｇ又はＸからＡへの変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２４】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における５０５位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Ｐ又はＸからＡへの変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項１９に記載の組成物。

【請求項２５】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における５９０位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Ｑ又はＸからＡへの変異であり、ここで、Ｘが何れかの何れかのアミノ酸である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２６】
前記操作ＡＡＶカプシドタンパク質が、野生型ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）の２６７位、２６９位又は両方における変異を含む操作ＡＡＶ９カプシドポリペプチドであり、２６７位における前記変異が、ＧからＡへの変異であり、２６９位における前記変異が、ＳからＴへの変異である、請求項１８に記載の組成物。
【請求項２７】
前記操作ＡＡＶカプシドタンパク質が、野生型ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）の５９０位における変異を含む操作ＡＡＶ９カプシドポリペプチドであり、５０９位における前記変異が、ＱからＡへの変異である、請求項１８に記載の組成物。
【請求項２８】
前記操作ＡＡＶカプシドタンパク質が、野生型ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）の５０４位、５０５位、又は両方における変異を含む操作ＡＡＶ９カプシドポリペプチドであり、５０４位における前記変異が、ＧからＡへの変異であり、５０５位における前記変異が、ＰからＡへの変異である、請求項１８に記載の組成物。
【請求項２９】
前記任意選択のカーゴが、筋疾患又は障害を処置又は予防することが可能である、請求項１～２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０】
前記筋疾患又は障害が、
ａ．自己免疫疾患；
ｂ．癌；
ｃ．筋ジストロフィー；
ｄ．神経筋疾患；
ｅ．糖若しくはグリコーゲン蓄積症；
ｆ．リピート伸長病；
ｇ．ドミナントネガティブ疾患；
ｈ．心筋症；
ｉ．ウイルス性疾患；
ｊ．早老性疾患；又は
ｋ．それらの任意の組合せである、
請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
前記カーゴが、モルホリノ、ペプチド連結モルホリノ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＰＭＯ、治療用導入遺伝子、治療用ポリペプチド若しくはペプチドをコードするポリヌクレオチド、ＰＰＭＯ、１つ以上のペプチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、ガイドＲＮＡ、若しくは両方をコードする１つ以上のポリヌクレオチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子を含むリボヌクレオタンパク質、治療用導入遺伝子ＲＮＡ、又は他の遺伝子組み換え若しくは治療用ＲＮＡ及び／若しくはタンパク質、又はそれらの任意の組合せである、請求項１に記載の組成物。
【請求項３２】
前記カーゴが、遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である、請求項１に記載の組成物。
【請求項３３】
前記カーゴが、ジストロフィン遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である、請求項１に記載の組成物。
【請求項３４】

前記カーゴが、ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子である、請求項１に記載の組成物。
【請求項３５】
前記ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子が、スペクトリン様リピート１、２、３、及び２４、並びに任意にｎＮＯＳドメインを含む、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
前記リピート伸長病が、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、又は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）である、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３７】
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、又はＦＳＨＤである、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３８】
前記筋強直性ジストロフィーが、１型又は２型である、請求項３６に記載の組成物。
【請求項３９】
前記心筋症が、拡張型心筋症、肥大型心筋症、ＤＭＤ関連心筋症、又はダノン病である、請求項２９に記載の組成物。
【請求項４０】
前記糖若しくはグリコーゲン蓄積症は、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患又はポンペ病である、請求項２９に記載の組成物。
【請求項４１】
前記ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患が、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ型、ＩＩＩＢ型、ＩＩＩＣ型、又はＩＩＩＤ型である、請求項４０に記載の組成物。
【請求項４２】
前記神経筋疾患が、シャルコー・マリー・トゥース病又はフリードライヒ運動失調症である、請求項２９に記載の組成物。
【請求項４３】
前記組成物が、増加した筋細胞能力、筋細胞特異性、減少した免疫原性、又はそれらの任意の組合せを有する、請求項１に記載の組成物。
【請求項４４】
ベクターを含むベクター系であって、前記ベクターが：
筋細胞を標的とするために有効な１つ以上の標的化部分の全て又は部分をそれぞれコードする１つ以上のポリヌクレオチドであって、各標的化部分が、１つ以上のｎ量体モチーフを含み、前記１つ以上のｎ量体モチーフの少なくとも１つのｎ量体モチーフが、$X_m$ＲＧＤ$X_n$を含むか又はそれからなり、式中、$X_m$及び$X_n$がそれぞれ独立していずれかのアミノ酸から選択され、ｎが、１、２、３、４、５、６、７、８、又は９であり、ｍが１～４であり、前記１つ以上のポリヌクレオチドの少なくとも１つが、前記少なくとも１つのｎ量体モチーフを少なくともコードする、ポリヌクレオチド；並びに
任意に、前記ポリヌクレオチドの１つ以上に動作可能に連結される調節要素を含む、ベクター系。
【請求項４５】
前記少なくとも１つのｎ量体モチーフが、表４（配列番号２～７、２０～２１、４１～４０９）、表５（配列番号２、２８、３０～３２、５５、７６、９６、１０３、１３５、１５８、２０７、２１４、２５２、３０６、３１６、３９８、４１０～７６８）、図１４Ｆ（配列番号８～１２、１４～１８）、表６（配列番号７７４～７９５）、図１３（配列番号２～１２）、図１４Ｆ（配列番号８～１２、１４～１８）、図１９Ｂ（２～７、２０～２１）、図２７Ｂ（配列番号２～１２）、図２８Ｂ（２８～３２）、図２８Ｄ（配列番号２８～３０）のいずれか１つ、又はそれらの任意の組合せにあるとおりである、請求項４４に記載のベクター系。
【請求項４６】

カーゴをさらに含む、請求項４４に記載のベクター系。
【請求項４７】
前記カーゴが、カーゴポリヌクレオチドであり、前記標的化部分をコードする前記１つ以上のポリヌクレオチドの１つ以上に任意に連結される、請求項４６に記載のベクター系。
【請求項４８】
前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的化部分をコードする前記１つ以上のポリヌクレオチドと同じベクターか又は異なるベクター上に存在する、請求項４６に記載のベクター系。
【請求項４９】
前記ベクター系が、存在する場合に前記カーゴを含有するウイルス粒子を生成することが可能である、請求項４４に記載のベクター系。
【請求項５０】
前記ベクター系が、前記標的化部分の１つ以上を含むウイルスポリペプチドを生成することが可能である、請求項４４に記載のベクター系。
【請求項５１】
前記ウイルスポリペプチドが、カプシドポリペプチドである、請求項５０に記載のベクター系。
【請求項５２】
前記カプシドポリペプチドが、ＡＡＶカプシドポリペプチドである、請求項５１に記載のベクター系。
【請求項５３】
前記ベクター系が、ＡＡＶウイルス粒子を生成することが可能である、請求項４４に記載のベクター系。
【請求項５４】
前記ＡＡＶウイルス粒子が、操作ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、又はＡＡＶ　ｒｈ．１０ウイルス粒子である、請求項５３に記載のベクター系。
【請求項５５】
前記カプシドポリペプチドが、操作ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、ＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドである、請求項５１に記載のベクター系。
【請求項５６】
前記ｎ量体モチーフが前記ウイルスカプシドの外部であるように、１つのｎ量体モチーフをコードする前記１つ以上のポリヌクレオチドが、前記ウイルスポリペプチドの２つのアミノ酸に対応する２つのコドン間に挿入される、請求項５０に記載のベクター系。
【請求項５７】
１つ以上のｎ量体モチーフをコードする前記１つ以上のポリヌクレオチドが、ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸２６２～２６９、３２７～３３２、３８２～３８６、４５２～４６０、４８８～５０５、５２７～５３９、５４５～５５８、５８１～５９３、７０４～７１４、若しくはそれらの任意の組合せの間のいずれか２つの連続したアミノ酸に対応する２つのコドン間、又はＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、ＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される、請求項５６に記載のベクター系。
【請求項５８】
１つ以上のｎ量体モチーフをコードする前記１つ以上のポリヌクレオチドが、前記ＡＡＶ９カプシドポリヌクレオチドにおけるアミノ酸５８８及び５８９に対応する前記コドン間、又はＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、ＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される、請求項５７に記載のベクター系。

【請求項５９】
前記カプシドタンパク質が、対応する野生型ＡＡＶカプシドポリペプチドと比較して、非筋細胞における減少された又はなくされた取り込みを有する操作ＡＡＶカプシドタンパク質である、請求項５１に記載のベクター系。
【請求項６０】
前記非筋細胞が、肝細胞である、請求項５９に記載のベクター系。
【請求項６１】
前記野生型カプシドポリペプチドが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、又はＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドである、請求項５９に記載のベクター系。
【請求項６２】
前記操作ＡＡＶカプシドタンパク質が、非筋細胞における取り込みを減少させるか又はなくす１つ以上の変異を含む、請求項５９に記載のベクター系。
【請求項６３】
前記１つ以上の変異が、前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における
ａ．２６７位に、
ｂ．２６９位に、
ｃ．５０４位に、
ｄ．５０５位に、
ｅ．５９０位に、
ｆ．又はそれらの任意の組合せに、
又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する１つ以上の位置にある、請求項６２に記載のベクター系。
【請求項６４】
前記非ＡＡＶ９カプシドタンパク質が、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、又はＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドである、請求項６３に記載のベクター系。
【請求項６５】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における２６７位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、ＡへのＧ又はＸ変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項６３に記載のベクター系。
【請求項６６】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における２６９位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Ｓ又はＸからＴへの変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項６３に記載のベクター系。
【請求項６７】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における５０４位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Ｇ又はＸからＡへの変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項６３に記載のベクター系。
【請求項６８】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における５０５位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Ｐ又はＸからＡへの変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項６３に記載のベクター系。
【請求項６９】
前記ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における５９０位又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する位置における変異が、Ｑ又はＸからＡへの変異であり、ここで、Ｘが何れかのアミノ酸である、請求項６３に記載のベクター系。
【請求項７０】
前記操作ＡＡＶカプシドタンパク質が、野生型ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）の２６７位、２６９位又は両方における変異を含む操作ＡＡＶ９カプシドポリペプチ

ドであり、２６７位における前記変異が、ＧからＡへの変異であり、２６９位における前記変異が、ＳからＴへの変異である、請求項６２に記載のベクター系。
【請求項７１】
前記操作ＡＡＶカプシドタンパク質が、野生型ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）の５９０位における変異を含む操作ＡＡＶ９カプシドポリペプチドであり、５０９位における前記変異が、ＱからＡへの変異である、請求項６２に記載のベクター系。
【請求項７２】
前記操作ＡＡＶカプシドタンパク質が、野生型ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）の５０４位、５０５位、又は両方における変異を含む操作ＡＡＶ９カプシドポリペプチドであり、５０４位における前記変異が、ＧからＡへの変異であり、５０５位における前記変異が、ＰからＡへの変異である、請求項６２に記載のベクター系。
【請求項７３】
前記１つ以上の標的化部分の全て又は部分をそれぞれコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含む前記ベクターが、スプライス調節要素を含まない、請求項４４に記載のベクター系。
【請求項７４】
ポリヌクレオチドをコードするウイルスｒｅｐタンパク質をさらに含む、請求項４４に記載のベクター系。
【請求項７５】
ポリヌクレオチドをコードする前記ウイルスｒｅｐタンパク質が、ポリヌクレオチドをコードするＡＡＶ　ｒｅｐタンパク質である、請求項７４に記載のベクター系。
【請求項７６】
ポリヌクレオチドをコードする前記ウイルスｒｅｐタンパク質が、１つ以上の標的化部分の全て又は部分をそれぞれコードする前記１つ以上のポリヌクレオチドと同じベクター又は異なるベクター上にある、請求項７４に記載のベクター系。
【請求項７７】
前記ウイルスｒｅｐタンパク質が、調節要素に動作可能に連結される、請求項７４に記載のベクター系。
【請求項７８】
請求項４４～７７のいずれか一項に記載のベクター系によってコードされるか、及び／又は生成されるポリペプチド。
【請求項７９】
前記ポリペプチドが、ウイルスポリペプチドである、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８０】
前記ウイルスポリペプチドが、ＡＡＶポリペプチドである、請求項７９に記載のポリペプチド。
【請求項８１】
請求項４４～７７のいずれか一項に記載のベクター系によって生成されるか、及び／又は請求項７８又は７９に記載のポリペプチドを含む粒子。
【請求項８２】
前記粒子が、ウイルス粒子である、請求項８１に記載の粒子。
【請求項８３】
前記ウイルス粒子が、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子、レンチウイルス粒子、又はレトロウイルス粒子である、請求項８２に記載の粒子。
【請求項８４】
前記ウイルス粒子が、筋特異的指向性を有する、請求項８３に記載の粒子。
【請求項８５】
前記カーゴが、筋疾患又は障害を処置又は予防することが可能である、請求項４６～７７のいずれか一項に記載のベクター系、請求項７８～８０のいずれか一項に記載のポリペ

プチド、又は請求項８１～８４のいずれか一項に記載の粒子。
【請求項８６】
前記筋疾患又は障害が、
ａ．自己免疫疾患；
ｂ．癌；
ｃ．筋ジストロフィー；
ｄ．神経筋疾患；
ｅ．糖若しくはグリコーゲン蓄積症；
ｆ．リピート伸長病；
ｇ．ドミナントネガティブ疾患；
ｈ．心筋症；
ｉ．ウイルス性疾患；
ｊ．早老性疾患；又は
ｋ．それらの任意の組合せである、
請求項８５に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項８７】
前記カーゴが、モルホリノ、ペプチド連結モルホリノ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＰＭＯ、治療用導入遺伝子、治療用ポリペプチド若しくはペプチドをコードするポリヌクレオチド、ＰＰＭＯ、１つ以上のペプチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、ガイドＲＮＡ、若しくは両方をコードする１つ以上のポリヌクレオチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子を含むリボヌクレオタンパク質、治療用導入遺伝子ＲＮＡ、若しくは他の遺伝子組み換え若しくは治療用ＲＮＡ及び／又はタンパク質、又はそれらの任意の組合せである、請求項８５又は８６に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項８８】
前記カーゴが、遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である、請求項８５～８７のいずれか一項に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項８９】
前記カーゴが、ジストロフィン遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である、請求項８５～８８のいずれか一項に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９０】
前記カーゴが、ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子である、請求項８５～８９のいずれか一項に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９１】
前記ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子が、スペクトリン様リピート１、２、３、及び２４、並びに任意にｎＮＯＳドメインを含む、請求項９０に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９２】
前記リピート伸長病が、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、又は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）である、請求項８６～９１のいずれか一項に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９３】
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、又はＦＳＨＤである、請求項８６～９２のいずれか一項に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９４】
前記筋強直性ジストロフィーが、１型又は２型である、請求項９３に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９５】

前記心筋症が、拡張型心筋症、肥大型心筋症、ＤＭＤ関連心筋症、又はダノン病である、請求項８５～９４のいずれか一項に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９６】
前記糖若しくはグリコーゲン蓄積症は、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患又はポンペ病である、請求項８５～９５のいずれか一項に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９７】
前記ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患が、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ型、ＩＩＩＢ型、ＩＩＩＣ型、又はＩＩＩＤ型である、請求項９６に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９８】
前記神経筋疾患が、シャルコー・マリー・トゥース病又はフリードライヒ運動失調症である、請求項８５～９７のいずれか一項に記載のベクター系、ポリペプチド、又は粒子。
【請求項９９】
前記ポリペプチド、前記粒子、又は両方が、増加した筋細胞能力、筋細胞特異性、減少した免疫原性、又はそれらの任意の組合せを有する、請求項７８～９８のいずれか一項に記載のポリペプチド又は粒子。
【請求項１００】
ａ．請求項１～４３のいずれか一項に記載の組成物；
ｂ．請求項４４～７７又は８５～９８のいずれか一項に記載のベクター系；
ｃ．請求項８１～８４又は８５～９９のいずれか一項に記載のポリペプチド；
ｄ．請求項８１～９９のいずれか一項に記載の粒子；又は
ｅ．それらの任意の組合せ
を含む細胞。
【請求項１０１】
前記細胞が、原核細胞である、請求項１００に記載の細胞。
【請求項１０２】
前記細胞が、真核細胞である、請求項１００に記載の細胞。
【請求項１０３】
ａ．請求項１～４３のいずれか一項に記載の組成物；
ｂ．請求項４４～７７又は８５～９８のいずれか一項に記載のベクター系；
ｃ．請求項８１～８４又は８５～９９のいずれか一項に記載のポリペプチド；
ｄ．請求項８１～９９のいずれか一項に記載の粒子；
ｅ．請求項１００～１０２のいずれか一項に記載の細胞；又は
ｆ．それらの任意の組合せ；及び
薬学的に許容される担体
を含む医薬製剤。
【請求項１０４】
ａ．請求項１～４３のいずれか一項に記載の組成物；
ｂ．請求項４４～７７又は８５～９８のいずれか一項に記載のベクター系；
ｃ．請求項８１～８４又は８５～９９のいずれか一項に記載のポリペプチド；
ｄ．請求項８１～９９のいずれか一項に記載の粒子；
ｅ．請求項１００～１０２のいずれか一項に記載の細胞；
ｆ．請求項１０３に記載の医薬製剤；又は
ｇ．それらの任意の組合せを、それを必要とする対象に投与することを含む方法。
【請求項１０５】
前記対象が、筋疾患又は障害を有する、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
前記筋疾患又は障害が、
ａ．自己免疫疾患；
ｂ．癌；
ｃ．筋ジストロフィー；

ｄ．神経筋疾患；
ｅ．糖若しくはグリコーゲン蓄積症；
ｆ．リピート伸長病；
ｇ．ドミナントネガティブ疾患；
ｈ．心筋症；
ｉ．ウイルス性疾患；
ｊ．早老性疾患；又は
ｋ．それらの任意の組合せである、
請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記リピート伸長病が、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、又は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）である、請求項１０６に記載の方法。
【請求項１０８】
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、又はＦＳＨＤである、請求項１０６又は１０７に記載の方法。
【請求項１０９】
前記筋強直性ジストロフィーが、１型又は２型である、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記心筋症が、拡張型心筋症、肥大型心筋症、ＤＭＤ関連心筋症、又はダノン病である、請求項１０６～１０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１１】
前記糖若しくはグリコーゲン蓄積症は、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患又はポンペ病である、請求項１０６～１０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１２】
前記ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患が、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ型、ＩＩＩＢ型、ＩＩＩＣ型、又はＩＩＩＤ型である、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
前記神経筋疾患が、シャルコー・マリー・トゥース病又はフリードライヒ運動失調症である、請求項１０６～１１２のいずれか一項に記載の方法。
【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、２０２１年８月５日に出願された米国仮特許出願第６３／２３０，０４６号の利益及び優先権を主張するものであり、これら仮特許出願の内容は、全体が参照により本明細書に援用される。
【０００２】
配列表
本出願は、２０２２年８月３日に作成され、１，０２８，６４９バイト、ディスク上で１ＭＢ）のサイズを有する、ＢＲＯＤ－５４５０ＷＰ＿ＳＴ２６．ｔｘｔという名称のＡＳＣＩＩ．テキストファイルとして電子的形態で提出された配列表を含む。配列表の内容は、全体が本明細書に援用される。
【０００３】
本明細書に開示される主題は、一般に、組み換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターを含む筋肉標的化組成物、並びにそのシステム、組成物、及びその使用に関する。
【背景技術】
【０００４】
組み換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、遺伝子治療及び遺伝子編集のための最も一般的に使用される送達ビヒクルである。それにもかかわらず、天然カプシド変異体を含有するｒＡＡ

Ｖは、限られた細胞指向性を有する。実際に、現在使用されているｒＡＡＶは、主に、全身送達後に肝臓に感染させる。さらに、天然カプシド変異体を有するこれらの従来のｒＡＡＶによる他の細胞型、組織、及び器官における従来のｒＡＡＶの形質導入効率は限られる。したがって、肝臓以外の細胞、組織、及び器官（例えば、神経系、骨格筋、及び心筋）を侵す疾患のためのＡＡＶ媒介性ポリヌクレオチド送達は、典型的に、多量のウイルス（典型的に、約１×１０$^{14}$ｖｇ／ｋｇ）の注入を必要とし、これは、肝臓毒性をもたらすことが多い。さらに、従来のｒＡＡＶを用いる場合、多量が必要とされるため、成人患者に投与する必要のある十分な量の治療用ｒＡＡＶを製造することは非常に難題である。さらに、遺伝子発現及び生理学の相違のため、マウス及び霊長類モデルは、ウイルスカプシドに対して異なって応答する。異なるウイルス粒子の形質導入効率は、異なる種間で変化し、結果として、マウスにおける前臨床試験は、ヒトを含む霊長類における結果を正確に反映しないことが多い。したがって、様々な遺伝性疾患の治療に使用するための改善されたｒＡＡＶの必要性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

いくつかの例の実施形態において、組成物であって、筋細胞を標的とするために有効な標的化部分であって、標的化部分が、１つ以上のｎ量体モチーフを含み、１つ以上のｎ量体モチーフの少なくとも１つのｎ量体モチーフが、$X_mRGDX_n$を含むか又はそれからなり、$X_m$及び$X_n$がそれぞれ、独立して、いずれかのアミノ酸から選択され、ｎが、１、２、３、４、５、６、７、８、又は９であり、ｍが、１～４である、標的化部分；並びに任意に、カーゴ（カーゴが、標的化部分に連結されるか又は他の形で結合される）を含む、組成物が、本明細書に記載される。

【０００６】

いくつかの例の実施形態において、少なくとも１つのｎ量体モチーフは、表４、表５、表６、図１３、図１４Ｆ、図１９Ｂ、図２７Ｂ、図２８Ｂ、図２８Ｄのいずれか１つ、又はそれらの任意の組合せにあるとおりである。

【０００７】

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

【０００８】

いくつかの例の実施形態において、標的化部分は、ウイルスタンパク質を含む。

【０００９】

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

【００１０】

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

【００１１】

いくつかの例の実施形態において、ｎ量体モチーフが、ウイルスカプシドの外部であるように、ｎ量体モチーフは、ウイルスタンパク質の２つのアミノ酸間に位置する。

【００１２】

いくつかの例の実施形態において、ｎ量体モチーフは、ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸２６２～２６９、３２７～３３２、３８２～３８６、４５２～４６０、４８８～５０５、５２７～５３９、５４５～５５８、５８１～５９３、７０４～７１４、若しくはそれらの任意の組合せの間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間又はＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ ｒｈ．７４、若しくはＡＡＶ ｒｈ．１０カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される。

【００１３】

いくつかの例の実施形態において、ｎ量体モチーフは、ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるアミノ酸５８８及び５８９の間又はＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、若しくはＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される。

【００１４】

いくつかの例の実施形態において、組成物は、操作ウイルス粒子である。

【００１５】

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

【００１６】

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

【００１７】

いくつかの例の実施形態において、ｎ量体モチーフは、３～１５アミノ酸である。

【００１８】

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

【００１９】

いくつかの例の実施形態において、筋疾患又は障害は、（ａ）自己免疫疾患；（ｂ）癌；（ｃ）筋ジストロフィー；（ｄ）神経筋疾患；（ｅ）糖若しくはグリコーゲン蓄積症；（ｆ）リピート伸長病；（ｇ）ドミナントネガティブ疾患；（ｈ）心筋症；（ｉ）ウイルス性疾患；（ｊ）早老性疾患；又は（ｋ）それらの任意の組合せである。

【００２０】

いくつかの例の実施形態において、カーゴは、モルホリノ、ペプチド連結モルホリノ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＰＭＯ、治療用導入遺伝子、治療用ポリペプチド若しくはペプチドをコードするポリヌクレオチド、ＰＰＭＯ、１つ以上のペプチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、ガイドＲＮＡ、若しくは両方をコードする１つ以上のポリヌクレオチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子を含むリボヌクレオタンパク質、治療用導入遺伝子ＲＮＡ、若しくは他の遺伝子組み換え若しくは治療用ＲＮＡ及び／又はタンパク質、又はそれらの任意の組合せである。

【００２１】

いくつかの例の実施形態において、カーゴは、遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である。

【００２２】

いくつかの例の実施形態において、カーゴは、ジストロフィン遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である。

【００２３】

いくつかの例の実施形態において、カーゴは、ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子である。

【００２４】

いくつかの例の実施形態において、ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子は、スペクトリン様リピート１、２、３、及び２４、並びに任意にｎＮＯＳドメインを含む。

【００２５】

いくつかの例の実施形態において、リピート伸長病は、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、又は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）である。

【００２６】

いくつかの例の実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、又はＦＳＨＤである。

【００２７】
いくつかの例の実施形態において、筋強直性ジストロフィーは、１型又は２型である。
【００２８】
いくつかの例の実施形態において、心筋症は、拡張型心筋症、肥大型心筋症、ＤＭＤ関連心筋症、又はダノン病である。
【００２９】
いくつかの例の実施形態において、糖若しくはグリコーゲン蓄積症は、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患又はポンペ病である。
【００３０】
いくつかの例の実施形態において、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患は、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ型、ＩＩＩＢ型、ＩＩＩＣ型、又はＩＩＩＤ型である。
【００３１】
いくつかの例の実施形態において、神経筋疾患は、シャルコー・マリー・トゥース病又はフリードライヒ運動失調症である。
【００３２】
いくつかの例の実施形態において、組成物は、増加した筋細胞能力、筋細胞特異性、減少した免疫原性、又はそれらの任意の組合せを有する。
【００３３】
ベクターを含むベクター系であって、ベクターが：筋細胞を標的とするために有効な１つ以上の標的化部分の全て又は部分をそれぞれコードする１つ以上のポリヌクレオチドであって、各標的化部分が、１つ以上のｎ量体モチーフを含み、１つ以上のｎ量体モチーフの少なくとも１つのｎ量体モチーフが、$X_mRGDX_n$を含むか又はそれからなり、$X_m$及び$X_n$がそれぞれ、独立して、いずれかのアミノ酸から選択され、ｎが、１、２、３、４、５、６、７、８、又は９であり、ｍが、１～４であり、１つ以上のポリヌクレオチドの少なくとも１つが、少なくとも１つのｎ量体モチーフを少なくともコードする、ポリヌクレオチド；並びに任意に、ポリヌクレオチドの１つ以上に動作可能に連結される調節要素を含むベクター系が、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。
【００３４】
いくつかの例の実施形態において、少なくとも１つのｎ量体モチーフは、表４、表５、表６、図１３、図１４Ｆ、図１９Ｂ、図２７Ｂ、図２８Ｂ、図２８Ｄのいずれか１つ、又はそれらの任意の組合せにあるとおりである。
【００３５】
いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、カーゴをさらに含む。
【００３６】
いくつかの例の実施形態において、カーゴは、カーゴポリヌクレオチドであり、標的化部分をコードする１つ以上のポリヌクレオチドの１つ以上に任意に連結される。
【００３７】
いくつかの例の実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、標的化部分をコードする１つ以上のポリヌクレオチドと同じベクター又は異なるベクター上に存在する。
【００３８】
いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、存在する場合にカーゴを含有するウイルス粒子を生成することが可能である。
【００３９】
いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、標的化部分の１つ以上を含むカプシドポリペプチドを生成することが可能である。
【００４０】
いくつかの例の実施形態において、ベクター系は、ＡＡＶウイルス粒子を生成することが可能である。
【００４１】
いくつかの例の実施形態において、ＡＡＶウイルス粒子は、操作ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、

ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、又はＡＡＶ　ｒｈ．１０ウイルス粒子である。

【００４２】

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

【００４３】

ベクター系のいくつかの例の実施形態において、ｎ量体モチーフが、ウイルスカプシドの外部であるように、１つのｎ量体モチーフをコードする１つ以上のポリヌクレオチドは、ウイルスタンパク質の２つのアミノ酸に対応する２つのコドン間に挿入される。

【００４４】

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

【００４５】

いくつかの例の実施形態において、１つ以上のｎ量体モチーフをコードする１つ以上のポリヌクレオチドは、ＡＡＶ９カプシドポリヌクレオチドにおけるアミノ酸５８８及び５８９に対応するコドン間、又はＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、ＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドにおける類似の位置に挿入される。

【００４６】

いくつかの例の実施形態において、１つ以上の標的化部分の全て又は部分をそれぞれコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含むベクターは、スプライス調節要素を含まない。

【００４７】

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

【００４８】

いくつかの例の実施形態において、ポリヌクレオチドをコードするウイルスｒｅｐタンパク質は、ポリヌクレオチドをコードするＡＡＶ　ｒｅｐタンパク質である。

【００４９】

いくつかの例の実施形態において、ポリヌクレオチドをコードするウイルスｒｅｐタンパク質は、１つ以上の標的化部分の全て又は部分をそれぞれコードする１つ以上のポリヌクレオチドと同じベクター又は異なるベクター上にある。

【００５０】

いくつかの例の実施形態において、ウイルスｒｅｐタンパク質は、調節要素に動作可能に連結される。

【００５１】

先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所におけるようなベクター系によってコードされる及び／又は生成されるポリヌクレオチドが、本明細書におけるいくつかの例の実施形態に記載される。

【００５２】

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

【００５３】

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

【００５４】
いくつかの例の実施形態において、先行する段落のいずれかに記載されるか又は本明細書における他の箇所に記載される、ベクター系によって生成されるか、及び／又はポリペプチドを含む粒子が、本明細書に記載される。
【００５５】
いくつかの例の実施形態において、粒子は、ウイルス粒子である。
【００５６】
いくつかの例の実施形態において、ウイルス粒子は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子、レンチウイルス粒子、又はレトロウイルス粒子である。
【００５７】
いくつかの例の実施形態において、ウイルス粒子は、筋特異的指向性を有する。
【００５８】
いくつかの例の実施形態において、カーゴは、筋疾患又は障害を処置又は予防することが可能である。
【００５９】
いくつかの例の実施形態において、筋疾患又は障害は、（ａ）自己免疫疾患；（ｂ）癌；（ｃ）筋ジストロフィー；（ｄ）神経筋疾患；（ｅ）糖若しくはグリコーゲン蓄積症；（ｆ）リピート伸長病；（ｇ）ドミナントネガティブ疾患；（ｈ）心筋症；（ｉ）ウイルス性疾患；（ｊ）早老性疾患；又は（ｋ）それらの任意の組合せである。
【００６０】
いくつかの例の実施形態において、カーゴは、モルホリノ、ペプチド連結モルホリノ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＰＭＯ、治療用導入遺伝子、治療用ポリペプチド若しくはペプチドをコードするポリヌクレオチド、ＰＰＭＯ、１つ以上のペプチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、ガイドＲＮＡ、若しくは両方をコードする１つ以上のポリヌクレオチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子を含むリボヌクレオタンパク質、治療用導入遺伝子ＲＮＡ、若しくは他の遺伝子組み換え若しくは治療用ＲＮＡ及び／又はタンパク質、又はそれらの任意の組合せである。
【００６１】
いくつかの例の実施形態において、カーゴは、遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である。
【００６２】
いくつかの例の実施形態において、カーゴは、ジストロフィン遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である。
【００６３】
いくつかの例の実施形態において、カーゴは、ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子である。
【００６４】
いくつかの例の実施形態において、ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子は、スペクトリン様リピート１、２、３、及び２４、並びに任意にｎＮＯＳドメインを含む。
【００６５】
いくつかの例の実施形態において、リピート伸長病は、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、又は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）である。
【００６６】
いくつかの例の実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、又はＦＳＨＤである。
【００６７】
いくつかの例の実施形態において、筋強直性ジストロフィーは、１型又は２型である。
【００６８】
いくつかの例の実施形態において、心筋症は、拡張型心筋症、肥大型心筋症、ＤＭＤ関

連心筋症、又はダノン病である。
【００６９】
いくつかの例の実施形態において、糖若しくはグリコーゲン蓄積症は、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患又はポンペ病である。
【００７０】
いくつかの例の実施形態において、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患は、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ型、ＩＩＩＢ型、ＩＩＩＣ型、又はＩＩＩＤ型である。
【００７１】
いくつかの例の実施形態において、神経筋疾患は、シャルコー・マリー・トゥース病又はフリードライヒ運動失調症である。
【００７２】
いくつかの例の実施形態において、ポリペプチド、粒子、又は両方は、増加した筋細胞能力、筋細胞特異性、減少した免疫原性、又はそれらの任意の組合せを有する。
【００７３】
いくつかの例の実施形態において、（ａ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載される組成物；（ｂ）先行する段落又は本明細書における他の箇所に記載されるベクター系；（ｃ）先行する段落又は本明細書における他の箇所に記載されるポリペプチド；（ｄ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載される粒子；又は（ｅ）それらの任意の組合せを含む細胞が、本明細書に記載される。
【００７４】
いくつかの例の実施形態において、細胞は、原核細胞である。いくつかの例の実施形態において、細胞は、真核細胞である。
【００７５】
いくつかの例の実施形態において、（ａ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載される組成物；（ｂ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載されるベクター系；（ｃ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載されるポリペプチド；（ｄ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載される粒子；（ｅ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載される細胞；又は（ｆ）それらの任意の組合せ；及び薬学的に許容される担体を含む医薬製剤が、本明細書に記載される。
【００７６】
いくつかの例の実施形態において、（ａ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載される組成物；（ｂ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載されるベクター系；（ｃ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載されるポリペプチド；（ｄ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載される粒子；（ｅ）先行する段落のいずれか又は本明細書における他の箇所に記載される細胞；（ｆ）先行する段落又は本明細書における他の箇所に記載される医薬製剤；又は（ｇ）それらの任意の組合せを、それを必要とする対象に投与することを含む方法が、本明細書に記載される。
【００７７】
いくつかの例の実施形態において、対象は、筋疾患又は障害を有する。
【００７８】
いくつかの例の実施形態において、筋疾患又は障害は、（ａ）自己免疫疾患；（ｂ）癌；（ｃ）筋ジストロフィー；（ｄ）神経筋疾患；（ｅ）糖若しくはグリコーゲン蓄積症；（ｆ）リピート伸長病；（ｇ）ドミナントネガティブ疾患；（ｈ）心筋症；（ｉ）ウイルス性疾患；（ｊ）早老性疾患；又は（ｋ）それらの任意の組合せである。
【００７９】
いくつかの例の実施形態において、リピート伸長病は、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、又は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）である。
【００８０】

いくつかの例の実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、又はＦＳＨＤである。

【００８１】

いくつかの例の実施形態において、筋強直性ジストロフィーは、１型又は２型である。

【００８２】

いくつかの例の実施形態において、心筋症は、拡張型心筋症、肥大型心筋症、ＤＭＤ関連心筋症、又はダノン病である。

【００８３】

いくつかの例の実施形態において、糖若しくはグリコーゲン蓄積症は、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患又はポンペ病である。

【００８４】

いくつかの例の実施形態において、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患は、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ型、ＩＩＩＢ型、ＩＩＩＣ型、又はＩＩＩＤ型である。

【００８５】

いくつかの例の実施形態において、神経筋疾患は、シャルコー・マリー・トゥース病又はフリードライヒ運動失調症である。

【００８６】

いくつかの例の実施形態において、組成物は、非筋細胞に対する減少された又はなくされた標的化又は特異性を有する。いくつかの例の実施形態において、非筋細胞は、肝細胞である。

【００８７】

例の実施形態のこれらの及び他の実施形態、目的、特徴、及び利点は、図示された例の実施形態の以下の詳細な説明を考慮すると、当業者に明らかになるであろう。

【００８８】

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

【図面の簡単な説明】

【００８９】

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

【００９０】

【図２】ＡＡＶ変異体のｍＲＮＡベースの選択は、ＤＮＡベースの選択よりもストリンジェントであり得る。ウイルスライブラリーを、ＣＭＶプロモーターの制御下で発現させた。

【００９１】

【図３Ａ－３Ｂ】肝臓におけるウイルスライブラリー及びベクターゲノムＤＮＡ（図３Ａ）及びｍＲＮＡ（図３Ｂ）の間の相関。

【００９２】

【図４Ａ－４Ｆ】ＤＮＡレベルで存在し、様々な組織内で特定されるｍＲＮＡレベルで発現されるカプシド変異体。この実験では、ウイルスライブラリーを、ＣＭＶプロモーターの制御下で発現させた。

【００９３】

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

【００９４】

【図６】種間の組織特異的遺伝子送達のためのカプシド変異体を生成及び選択する方法の実施形態を示す概略図。
【００９５】
【図７】ＡＡＶカプシド変異体ライブラリーを生成する実施形態、特に、野生型ＡＡＶ、例えば、ＡＡＶ９へのランダムｎ量体（ｎ＝３～１５アミノ酸）の挿入を示す概略図。
【００９６】
【図８】ＡＡＶカプシド変異体ライブラリーを生成する実施形態、特に、変異体ＡＡＶ粒子生成を示す概略図。各カプシド変異体が、ベクターゲノムとしてそれ自体のコード配列を封入する。
【００９７】
【図９】ＡＡＶカプシド変異体ライブラリーを生成するためにＡＡＶベクター系において使用され得る代表的なＡＡＶカプシドプラスミドライブラリーベクター（例えば、図８を参照）の例示的なベクターマップ。
【００９８】
【図１０】異なる構成的及び細胞型特異的哺乳動物プロモーターを含有する構築物によって生成されるウイルス力価（ＡＡＶ９ベクターゲノム／１５ｃｍ皿として計算される）。
【００９９】
【図１１】さらに最適化されたｍｙｏＡＡＶカプシド変異体（本明細書において、強化されたＭｙｏＡＡＶカプシド変異体とも呼ばれる）の選択の概略図。
【０１００】
【図１２】強化されたＭｙｏＡＡＶ（ｅＭｙｏＡＡＶ）カプシド変異体は、全身送達後、第一世代ＭｙｏＡＡＶと比較して、より有効にマウスの筋肉を形質導入し得る。
【０１０１】
【図１３】第一及び第二世代ｍｙｏＡＡＶカプシド変異体は、ヒト一次筋管の形質導入についてａＶｂ６インテグリンヘテロ二量体に依存する（配列番号２～１２）。
【０１０２】
【図１４Ａ－１４Ｆ】ＤＥＬＩＶＥＲは、ＲＧＤモチーフを含む筋指向性ＡＡＶカプシド変異体のクラスを同定する。図１４Ａ）ＤＥＬＩＶＥＲを用いるウイルスライブラリーの生成及びカプシド変異体の選択の概略図（配列番号１３）。図１４Ｂ）ＣＭＶ、ＣＫ８、又はＭＨＣＫ７プロモーターの制御下でＡＡＶ９カプシドコード配列を発現するＩＴＲ含有構築物を用いて生じるｒＡＡＶの力価の比較。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝４）として表される。Ｐ値は、テューキーの多重比較検定（ＭＣＴ）を用いた一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）によって計算される。図１４Ｃ－１４Ｄ）全身注射後、マウス骨格筋（図１４Ｃ）及び心臓（図１４Ｄ）において、ＣＭＶ、ＣＫ８、又はＭＨＣＫ７プロモーターの制御下で発現されるＡＡＶ９カプシドライブラリーｍＲＮＡのインビボ発現。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝３）として表される。Ｐ値は、テューキーのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡによって計算される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１。図１４Ｅ）異なるマウス骨格筋におけるＤＮＡ及びｍＲＮＡレベルでのウイルスライブラリーに対してＭＨＣＫ７プロモーター下で発現されるカプシド変異体の富化を示すグラフ。図１４Ｆ）２回目の転写産物ベースの選択後にマウス筋肉において最上位の高度に発現されたカプシド変異体における７量体挿入の配列。各群における同じ色の変異体は、同義ＤＮＡコドン（配列番号８～１２、１４～１８）によってコードされる。図２１Ａ～２１Ｉも参照されたい。
【０１０３】
【図１５Ａ－１５Ｄ】ＭｙｏＡＡＶは、全身注射後、高効率でマウス骨格筋を形質導入する。図１５Ａ－１５Ｂ）１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを全身注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス由来の骨格筋、心臓及び肝臓の全載蛍光画像（図１５Ａ）及び断面（図１５Ｂ）画像。緑色：ＥＧＦＰ、赤色：筋肉についてはラミニン、肝臓についてはレクチン、青色：Ｈｏｅｃｈｓｔ。断面のスケールバー：１００μｍ。図１５Ｃ）注射された雄及び雌Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの様々な組織におけるＥ

ＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現の倍率差の定量化。赤色の破線は、ＡＡＶ９－ＣＭＶ－ＥＧＦＰからの相対的発現を示す。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝３～４）として表される；＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（各群についてのＡＡＶ９及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射されたマウス間のスチューデントｔ検定）。図１５Ｄ）ビヒクル、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたマウス（左）及びヒト（右）一次筋管におけるインビトロ形質導入の定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される；＊＊：Ｐ＜０．０１（スチューデントｔ検定）。ドナー１：２９歳男性、ドナー２：１９歳女性、ドナー３：２０歳男性、ドナー４：３４歳女性。図２２Ａ～２２Ｋ及び２９Ａ～２９Ｏも参照されたい。

【０１０４】

【図１６Ａ－１６Ｄ】ＭｙｏＡＡＶの全身注射は、高速及び持続的な高レベルのレポーター導入遺伝子発現を全身の筋肉にもたらす。図１６Ａ）１２０日間にわたって撮影された、４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを全身注射されたＢＡＬＢ／ｃＪマウスの全身インビボ生物発光画像。図１６Ｂ）１２０日間にわたって評価された、ＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射された動物の前肢及び後肢からの全発光の定量化。Ｐ値は、テューキーのＭＣＴを用いた二元配置ＡＮＯＶＡによってＡＡＶ８、ＡＡＶ９、及びＭｙｏＡＡＶ１Ａ群間で計算され；データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。＊＊：ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ対ＡＡＶ８及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａ対ＡＡＶ９の両方についてＰ＜０．０１。ＡＡＶ８及びＡＡＶ９群間の差は、いずれの時点においても統計的に有意ではない。図１６Ｃ）注射の４か月後に採取された、４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射されたマウス由来のＴＡ、三頭筋、腓腹筋、大腿四頭筋、及び腹筋の全器官発光画像。カラースケール：１Ｅ＋７～１Ｅ＋８。図１６Ｄ）注射の１２０日後に採取された、ＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射された動物の様々な筋肉からの全発光の定量化。データは、平均±ＳＥＭ（ｎ＝５）として表される。＊：Ｐ＜０．０１（ＭｙｏＡＡＶ及びＡＡＶ９群間のマン・ホイットニーの検定）。図２２Ａ～２２Ｋ、２３Ａ～２３Ｂ、及び２９Ａ～２９Ｏも参照されたい。

【０１０５】

【図１７Ａ－１７Ｏ】ＭｙｏＡＡＶ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲ及びＭｙｏＡＡＶ－ヒトＭＴＭ１の全身投与は、ＤＭＤ及びＸＬＭＴＭそれぞれのマウスモデルにおける治療効果をもたらす。図１７Ａ）ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射されたｍｄｘ筋肉におけるジストロフィン（赤色）の代表的な免疫蛍光画像。スケールバー：４００μｍ。図１７Ｂ）ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射されたマウスの筋肉におけるジストロフィン及びＧＡＰＤＨを検出するウエスタンブロットであり、下部に濃度測定によって決定された相対的シグナル強度を含む。Ａ．Ｕ．：任意単位、ＧＡＰＤＨに対して正規化される。図１７Ｃ）ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射された成体ｍｄｘマウスの様々な筋肉におけるエクソン２３欠失ｍＲＮＡのＴａｑｍａｎベースの定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝９～１０）として表される；＊＊：Ｐ＜０．０１（スチューデントｔ検定）。図１７Ｄ－１７Ｅ）ビヒクルを注射された野生型Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（ｎ＝１１）、及びビヒクルを注射されたｍｄｘマウス（ｎ＝１５）、ＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲ（ｎ＝１５）、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲ（ｎ＝１７）についての前脛骨筋の比筋力（図１７Ｄ）及び６回の伸張性収縮後の筋力の低下（図１７Ｅ）。＊＊：Ｐ＜０．０１（テューキーのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。Ｆ）４週齢のＭｔｍ１ノックアウト（ＫＯ）マウスに全身送達された２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７－ヒトＭＴＭ１（ｈＭＴＭ１）の有効性を調べるための実験の概略図。図１７Ｇ）ビヒクル又は２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウス、及びビヒクルを注射された野生型同腹子対照の全体重。データは、平均±ＳＤ（ＫＯ　ＡＡＶ９についてｎ＝６、ＫＯ　Ｍｙｏ

ＡＡＶ　１Ａについてｎ＝６、野生型ビヒクルについてｎ＝３、ＫＯビヒクルについてｎ＝３）として表される。Ｐ値は、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ及びＡＡＶ９群間で計算される；＊＊：Ｐ＜０．０１（ホルム・サイダックのＭＣＴを用いた多重ｔ検定）。図１７Ｈ）ウイルスの注射の１６週間後の、２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇのＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｈＭＴＭ１又はＡＡＶ９－ｈＭＴＭ１のいずれかを注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスの写真。図１７Ｋ）ビヒクル、ＡＡＶ９－ｈＭＴＭ１、又はＭｙｏＡＡＶ－ｈＭＴＭ１を注射されたＭｔｍ１　ＫＯ動物、並びにビヒクルを注射された野生型同腹子についての生存曲線。ビヒクルを注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスについてのデータ点は、以前の実験からのものである。図１７Ｉ）ビヒクルを注射された野生型マウス、又はビヒクル、ＡＡＶ９－ｈＭＴＭ１、若しくはＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｈＭＴＭ１を、両方とも２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇで注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスから、ケージ内での回し車の回転によって評価される毎時の平均の受動的活動。データは、３週間の期間にわたって平均した毎週の測定値について平均±ＳＤとして表される（ＫＯ　ＡＡＶ９についてｎ＝６、ＫＯ　ＭｙｏＡＡＶ　１Ａについてｎ＝６、野生型ビヒクルについてｎ＝３、ＫＯビヒクルについてｎ＝３）。Ｐ値は、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ及びＡＡＶ９群間で計算される；＊＊：Ｐ＜０．０１（ホルム・サイダックのＭＣＴを用いた多重ｔ検定）。図１７Ｊ）ビヒクルを注射された野生型マウス、又はＡＡＶ９－ｈＭＴＭ１、若しくはＭｙｏＡＡＶ－ｈＭＴＭ１を、両方とも２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇで注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスによる、活動モニターにおける５分間における立ち上がり行動の回数。データは、３週間の期間にわたって平均した毎週の測定値について平均±ＳＥＭとして表される（ＫＯ　ＡＡＶ９についてｎ＝５、ＫＯ　ＭｙｏＡＡＶについてｎ＝６、野生型ビヒクルについてｎ＝３）。Ｐ値は、ＭｙｏＡＡＶ及びＡＡＶ９群間で計算される；＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（二段階Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ、Ｋｒｉｅｇｅｒ、及びＹｅｋｕｔｉｅｌｉ検定）。図１７Ｋ）ビヒクル、ＡＡＶ９－ｈＭＴＭ１、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｈＭＴＭ１を注射されたＭｔｍ１　ＫＯ動物、並びにビヒクルを注射された野生型同腹子についての生存曲線。（ＫＯ　ＡＡＶ９についてｎ＝６、ＫＯ　ＭｙｏＡＡＶ　１Ａについてｎ＝６、野生型ビヒクルについてｎ＝３、ＫＯビヒクルについてｎ＝４）。ビヒクルを注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスについてのデータ点は、以前の実験からのものである。Ｐ値は、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ及びＡＡＶ９群間で計算される；＊＊：Ｐ＜０．０１（マンテル・コックス検定）。図１７Ｌ）注射の４週間後に分析された、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｈＭＴＭ１を注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスの腓腹筋、大腿四頭筋、心筋、及び肝臓におけるｈＭＴＭ１　ｍＲＮＡ発現の倍率差の定量化。赤色の破線は、ＡＡＶ９－ｈＭＴＭ１からの相対的発現を示す。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝４）として表される；＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（各組織についてのＡＡＶ９及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射された群間のスチューデントｔ検定）。図１７Ｍ）注射の４週間後に分析された、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｈＭＴＭ１を注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスの様々な組織における２倍体ゲノム当たりのベクターゲノムの定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝４）として表される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（スチューデントｔ検定）。図１７Ｎ）ビヒクル、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｈＭＴＭ１を注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスの筋肉におけるｈＭＴＭ１及びＧＡＰＤＨを検出するウエスタンブロットであり、下部に濃度測定によって決定された相対的シグナル強度を含む。Ａ．Ｕ．：任意単位、ＧＡＰＤＨに対して正規化される。図１７Ｏ）ビヒクルを注射された野生型Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（ｎ＝４）、及びビヒクル（ｎ＝２）、ＡＡＶ９－ｈＭＴＭ１（ｎ＝４）、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｈＭＴＭ１（ｎ＝４）を注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスについての長趾伸筋（ＥＤＬ）比筋力。＊＊：Ｐ＜０．０１（テューキーのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図２４Ａ～２４Ｇも参照されたい。

【０１０６】

【図１８Ａ－１８Ｌ】ＭｙｏＡＡＶの形質導入は、インテグリンヘテロ二量体及びＡＡＶＲの両方に依存する。図１８Ａ－１８Ｂ）ＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体をコードするプラスミド又はｐＵＣ１９でトランスフェクトされ、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－

ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入されたＨＥＫ２９３細胞におけるインビトロ形質導入（図１８Ａ）及び細胞表面に結合されたウイルス（図１８Ｂ）の定量化。データは、平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）として表される。Ｐ値は、各群におけるｐＵＣ１９でトランスフェクトされた細胞と比較して計算される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（ダネットの多重比較検定を用いたＡＮＯＶＡ）。図１８Ｃ）様々な濃度のＧＬＰＧ－０１８７汎インテグリンαＶアンタゴニストで処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたマウス一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＥＭ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、各群における０ｎＭの小分子条件と比較して計算される。＊＊：Ｐ＜０．０１（ダネットの多重比較検定を用いたＡＮＯＶＡ）。図１８Ｄ）様々な濃度のＧＬＰＧ－０１８７汎インテグリンαＶアンタゴニストで処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、各群における０ｎＭの小分子条件と比較して計算される。＊：Ｐ＜０．０１（ダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図１８Ｅ－１８Ｆ）様々な濃度のαＶｂ１、αＶｂ３、αＶｂ６、αＶｂ８、又はＭＢＰ組み換えタンパク質とともにインキュベートされた、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃ（図１８Ｅ）又はＡＡＶ９－ＣＫ８－Ｎｌｕｃ（図１８Ｆ）で形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。＊：Ｐ＜０．０１、＊＊：Ｐ＜０．００１（各群について対照として設定された０ｎＭの組み換えタンパク質を用いたダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図１８Ｇ）様々な濃度の抗αＶｂ６抗体で処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＥＭ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、各群における０ｎｇ／ｕｌの抗体条件と比較して計算される。＊＊：Ｐ＜０．００１（ダネットの多重比較検定を用いたＡＮＯＶＡ）。図１８Ｇ－１８Ｈ）様々な濃度の抗αＶｂ６（図１８Ｇ）又はアイソタイプ対照（図１８Ｈ）抗体で処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、各群における０ｎｇ／ｕｌの抗体条件と比較して計算される；＊：Ｐ＜０．０１、＊＊：Ｐ＜０．００１（ダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図１８Ｉ－１８Ｊ）ＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体をコードするプラスミド又はｐＵＣ１９でトランスフェクトされ、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入されたＨＥＫ２９３細胞におけるインビトロ形質導入（図１８Ｉ）及び細胞表面に結合されたウイルス（図１８Ｊ）の定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝３）として表される；＊：Ｐ＜０．０１（対照として設定されたｐＵＣ１９でトランスフェクトされた細胞を用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図１８Ｋ）様々な濃度のＣＷＨＭ－１２汎インテグリンαＶアンタゴニストで処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率を示す。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、各群における０ｎＭの小分子条件と比較して計算される。＊：Ｐ＜０．０１（ダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ。図１８Ｌ）様々な濃度のアイソタイプ対照抗体で処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率を示す。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、各群における０ｎｇ／ｕｌの抗体条件と比較して計算される；＊：Ｐ＜０．０１、＊＊：Ｐ＜０．００１（ダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図２５Ａ～２５Ｋ及び２６Ａ～２６Ｏも参照されたい。

【０１０７】

【図１９Ａ－１９Ｍ】ＤＥＬＩＶＥＲを用いたＭｙｏＡＡＶのさらなる進化により、より強化された筋指向性カプシド変異体が生成される。図１９Ａ）ＡＡＶ９　ＶＲ－ＶＩＩＩ表面ループの構造及びアミノ酸注釈付きのＭｙｏＡＡＶ　１Ａ　ＶＲ－ＶＩＩＩ表面ループの予測構造。図１９Ｂ）２つの異なる用量での２回目のウイルスライブラリーの注射後のマウス筋肉から同定された最上位のヒットのウイルスライブラリー設計及び配列の概略

図（配列番号２～７、１９～２１）。図１９Ｃ）青色光で照射された、２Ｅ＋１１ｖｇのＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ（左）又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ（右）を全身注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの様々な組織。図１９Ｄ）２Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－、又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを全身注射されたマウスの腓腹筋、三頭筋、ＴＡ、及び大腿四頭筋の全載蛍光画像。図１９Ｅ）同じ用量のＡＡＶ９－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射されたマウスと比較した、２Ｅ＋１１ｖｇのＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－、又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを全身注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの様々な組織におけるＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現の倍率差の定量化。赤色の破線は、ＡＡＶ９－ＣＭＶ－ＥＧＦＰからの相対的発現を示す。データは、平均±ＳＤ（ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ及びＭｙｏＡＡＶ　２Ａについてｎ＝１１、ＡＡＶ９についてｎ＝８）として表される。Ｐ値は、ＡＡＶ９群と比較して計算される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（ダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図１９Ｆ）ＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－、又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入の定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。＊：Ｐ＜０．０１（テューキーのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図１９Ｇ）様々な濃度のＧＬＰＧ－０１８７インテグリンαＶアンタゴニストで処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、各群における０ｎＭの小分子条件と比較して計算される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（ダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図１９Ｈ－１９Ｉ）様々な濃度のαＶｂ１、αＶｂ３、αＶｂ６、αＶｂ８、又はＭＢＰ組み換えタンパク質とともにインキュベートされた、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃ（図１９Ｈ）又はＡＡＶ９－ＣＫ８－Ｎｌｕｃ（図１９Ｉ）で形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。＊＊：Ｐ＜０．０１、＊＊＊：Ｐ＜０．００１（対照として各群における０ｎＭの組み換えタンパク質条件を用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図１９Ｊ）２１日間にわたって撮影された、２Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶｒｈ７４－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを全身注射されたＢＡＬＢ／ｃＪマウスの全身インビボ生物発光画像。カラースケール：６Ｅ＋６～１Ｅ＋９。図１９Ｋ）２１日間にわたって評価された、ＡＡＶｒｈ７４－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射された動物の後肢からの全発光の定量化。Ｐ値は、テューキーのＭＣＴを用いた二元配置ＡＮＯＶＡによってＡＡＶｒｈ７４、ＡＡＶ９、及びＭｙｏＡＡＶ　２Ａ群間で計算される；＊＊：ＭｙｏＡＡＶ　２Ａ対ＡＡＶｒｈ７４及びＭｙｏＡＡＶ　２Ａ対ＡＡＶ９の両方についてＰ＜０．０１。ＡＡＶｒｈ７４及びＡＡＶ９群間の差は、いずれの時点においても統計的に有意ではない。図１９Ｌ）２Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－、又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの様々な組織における２倍体ゲノム当たりのベクターゲノムの定量化。データは、平均±ＳＤ（ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ及びＭｙｏＡＡＶ　２Ａについてｎ＝１１、ＡＡＶ９についてｎ＝８）として表される。Ｐ値は、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａ及びＡＡＶ９群間で計算される；＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（スチューデントｔ検定）。図１９Ｍ）様々な濃度の抗αＶｂ６抗体（左）又は１０ｎｇ／ｕｌのアイソタイプ対照抗体（右）で処理され、ＣＫ８プロモーターの制御下でＮｌｕｃをコードするＡＡＶ９－又は第一若しくは第二世代ＲＧＤ含有カプシド変異体で形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。抗αＶｂ６抗体データについてのＰ値は、第一世代及び第二世代群間で計算される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（テューキーのＭＣＴを用いた二元配置ＡＮＯＶＡ）。アイソタイプ対照データについてのＰ値は、各群についてのアイソタイプ対照及び１０ｎｇ／ｕｌの抗αＶｂ６抗体条件間で計算される；＊＊：Ｐ＜０．０１（スチューデントｔ検定）。図２７Ａ～２７Ｂも参照されたい。

【０１０８】

【図２０Ａ－２０Ｆ】低用量の２Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇでのＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＫ８－マイクロジストロフィンの全身注射は、成体ＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスにおける幅広いマイクロジストロフィン発現及び筋肉機能の有効な回復をもたらす。図２０Ａ）２Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－マイクロジストロフィンを注射されたＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスの筋肉におけるマイクロジストロフィン－ＦＬＡＧ（赤色）についての代表的な免疫蛍光画像。スケールバー：４００μｍ。図２０Ｂ）２Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－マイクロジストロフィンを注射されたマウスの筋肉におけるマイクロジストロフィン－ＦＬＡＧ及びＧＡＰＤＨを検出するウエスタンブロットであり、下部に濃度測定によって決定された相対的シグナル強度を含む。Ａ．Ｕ．：任意単位、ＧＡＰＤＨに対して正規化される。図２０Ｃ）同じ用量のＡＡＶ９－ＣＫ８－マイクロジストロフィンを注射されたマウスと比較した、２Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇのＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－マイクロジストロフィンを全身注射されたＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスの様々な筋肉及び肝臓におけるマイクロジストロフィンｍＲＮＡ発現の倍率差の定量化。赤色の破線は、ＡＡＶ９－ＣＫ８－マイクロジストロフィンからの相対的発現を示す。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝９～１０）として表される；＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（スチューデントｔ検定）。図２０Ｄ）２Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－マイクロジストロフィンを注射されたＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスの様々な筋肉及び肝臓における２倍体ゲノム当たりのベクターゲノムの定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝９～１０）として表される。＊＊：Ｐ＜０．０１（スチューデントｔ検定）。図２０Ｅ－２０Ｆ）ビヒクルを注射されたＤＢＡ２／Ｊマウス（ｎ＝１０）、及びビヒクル（ｎ＝１０）、ＡＡＶ９－ＣＫ８－マイクロジストロフィン（ｎ＝１０）、又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－マイクロジストロフィン（ｎ＝１０）を注射されたＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスについての比筋力（図２０Ｅ）及び伸張性収縮後の筋力の低下（図２０Ｆ）。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１、＊＊＊：Ｐ＜０．００１（テューキーのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。

【０１０９】

【図２１Ａ－２１Ｉ】ＤＥＬＩＶＥＲは、様々な組織における機能的形質導入が可能なカプシド変異体の選択を可能にする。図２１Ａ）ＡＡＶの形質導入における様々な工程の概略図。図２１Ｂ－２１Ｇ）注射されたマウスの脳（図２１Ｂ）、腎臓（図２１Ｃ）、肺（図２１Ｄ）、骨格筋（図２１Ｅ）、心臓（図２１Ｆ）、及び肝臓（図２１Ｇ）におけるＤＮＡ及びｍＲＮＡレベルでのウイルスライブラリーに対するユビキタスＣＭＶプロモーター下で発現されたカプシド変異体の富化を示すグラフ。ＤＥＬＩＶＥＲにおいて使用される転写産物ベースの選択により、ＤＮＡベースの選択と比較してよりストリンジェントな機能的カプシド変異体の同定が可能になる。ウイルスライブラリーに対する富化は、組織において同定された各変異体についての１００万分のリード（ＲＰＭ）を、ウイルスライブラリーにおける同じ変異体のＲＰＭで除算することによって計算される。図２１Ｈ－２１Ｉ）ウイルスライブラリーにおける各カプシド変異体の存在量と、ウイルスライブラリーを注射されたマウスの肝臓において同定されたその変異体からのベクターゲノムＤＮＡ（図２１Ｈ）又は発現ｍＲＮＡ（ＣＭＶプロモーターの制御下、図２１Ｉ）の存在量との間の相関関係。各変異体からのベクターゲノムＤＮＡの相対量が、ウイルスライブラリーにおけるその変異体の存在度と相関する一方、各変異体からのカプシドｍＲＮＡ発現のレベルと、ウイルスライブラリーにおけるその変異体の量との間には、２つのサンプルタイプ間の線形回帰に基づいて、相関関係はほとんどない。ＲＰＭ：１００万分のリード。

【０１１０】

【図２２Ａ－２２Ｋ】ＭｙｏＡＡＶは、ＡＡＶ９と比較して同様の力価で組み換えＡＡＶを産生し、成体ｍｄｘ－Ａｉ９マウスへの全身送達後、ＡＡＶ８及びＡＡＶ９より有効に筋肉幹細胞を形質導入する。図２２Ａ－２２Ｂ）全載蛍光画像（図２２Ａ）及び断面（図２２Ｂ）１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを全身注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス由来の三頭筋、腓腹筋、及び腹筋の画像。緑色：ＥＧＦＰ、赤色：ラミニン、青色：Ｈｏｅｃｈｓｔ。断面のスケールバー：１００μｍ。図２

２Ｃ）１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを全身注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス由来の肺、腎臓、脾臓、及び脳の全載蛍光画像。図２２Ｄ）１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの様々な組織における２倍体ゲノム当たりのベクターゲノムの定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝４）として表される；＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（スチューデントｔ検定）。図２２Ｅ）最上位のＲＧＤ含有カプシド変異体によって産生された組み換えＡＡＶの力価と、野生型ＡＡＶ９との比較。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝３）として表される。Ｐ値は、対照としてＡＡＶ９を用いたダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡによって計算される。図２２Ｆ）衛星細胞の形質導入分析実験の概略図。Ａｉ９遺伝子座を含む細胞へのＣｒｅリコンビナーゼの送達により、ゲノムからＳＴＯＰカセットが除去され、ｔｄＴｏｍａｔｏが発現する。図２２Ｇ）４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｃｒｅの全身注射の２週間後に、６か月齢のｍｄｘ－Ａｉ９マウスから単離されたｔｄＴｏｍａｔｏ＋形質導入筋幹細胞のパーセント。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝４）として表される；＊＊：Ｐ＜０．０１（テューキーのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図２２Ｈ）注射されたｍｄｘ－Ａｉ９マウスから単離された筋幹細胞からの代表的なＦＡＣＳプロット。図２２Ｉ）ＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｃｒｅを全身注射されたｍｄｘ－Ａｉ９マウスから単離されたＦＡＣＳでソートした筋幹細胞から分化した筋管の代表的な免疫蛍光画像。緑色、ミオシン重鎖（ＭＨＣ）；赤色、ｔｄＴｏｍａｔｏ；青色、Ｈｏｅｃｈｓｔ。スケールバー：４００μｍ。図２２Ｊ）ビヒクル、又は１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－若しくはＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射されたマウスの筋肉におけるＥＧＦＰ及びビンキュリンを検出するウエスタンブロット。図２２Ｋ）筋肉における単核細胞から骨格筋前駆体を単離するためのゲーティング手法。

【０１１１】

【図２３Ａ－２３Ｂ】ＭｙｏＡＡＶの全身投与は、ＢＡＬＢ／ｃＪマウス筋肉における長期の高レベルの導入遺伝子発現をもたらす。図２３Ａ）１２０日間にわたる、４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射されたＢＡＬＢ／ｃＪマウスの全身インビボ生物発光画像。この画像は、ＡＡＶ８－及びＡＡＶ９－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射されたマウスの筋肉におけるシグナルの検出を可能にするために、様々なカラースケール（５Ｅ＋６～５Ｅ＋７）で図１６Ａに示される同じマウスからの発光シグナルを示す。図２３Ｂ）注射の４か月後に採取された、４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射されたマウス由来のＴＡ、三頭筋、腓腹筋、大腿四頭筋、及び腹筋の全器官発光画像。この画像は、ＡＡＶ８－及びＡＡＶ９－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射されたマウスの筋肉におけるシグナルの検出を可能にするために、様々なカラースケール（５Ｅ＋５～５Ｅ＋７）で図１６Ｃに示される同じマウスからの発光シグナルを示す。

【０１１２】

【図２４Ａ－２４Ｇ】ＭｙｏＡＡＶ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲの全身投与は、全身の複数の筋肉においてＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲと比較してより高いレベルのＳａＣａｓ９及びｇＲＮＡ発現をもたらす。図２４Ａ）ＡＡＶ９－及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲウイルスを生成するために使用されるＡＡＶ構築物の概略図。図２４Ｂ）ｍｄｘマウスへのＡＡＶ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲ投与後のジストロフィン回復の概略図。マウスに、４．５Ｅ＋１２ｖｇのＳａＣａｓ９及び９Ｅ＋１２ｖｇのｇＲＮＡ　ＡＡＶを注射した。図２４Ｃ－２４Ｄ）４．５Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＳａＣａｓ９及び９Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｇＲＮＡを全身注射された８週齢のｍｄｘマウスの様々な筋肉におけるＳａＣａｓ９　ｍＲＮＡ（図２４Ｃ）又はｇＲＮＡ（図２４Ｄ）発現の倍率差の定量化。赤色の破線は、ＡＡＶ９－ＣＭＶ－ＳａＣａｓ９（図２４Ｆ）及びＡＡＶ９－ｇＲＮＡ（図２４Ｆ）からの相対的発現を示す。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５～６）として表される；＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１、＊＊＊：Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊：Ｐ＜０．０００１（スチューデ

ントｔ検定）。図２４Ｅ）ＡＡＶ９－及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７ヒトＭＴＭ１ウイルスを生成するために使用されるＡＡＶ構築物の概略図。図２４Ｆ）ＡＡＶ９－及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７ヒトＭＴＭ１ウイルスを生成するために使用されるＡＡＶ構築物の概略図。図２４Ｇ）ビヒクルを注射された野生型マウス、又はビヒクル、ＡＡＶ９－ｈＭＴＭ１、若しくはＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ｈＭＴＭ１を、両方とも２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇで注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスによる、５分間における立ち上がり行動の回数。データは、３週間の期間にわたって平均した毎週の測定値について平均±ＳＤとして表される（ＫＯ　ＡＡＶ９についてｎ＝６、ＫＯ　ＭｙｏＡＡＶ　１Ａについてｎ＝６、野生型ビヒクルについてｎ＝３、ＫＯビヒクルについてｎ＝４）。ビヒクルを注射されたＭｔｍ１　ＫＯマウスについてのデータ点は、以前の実験からのものである。Ｐ値は、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ及びＡＡＶ９群間で計算される；＊＊：Ｐ＜０．０１（ホルム・サイダックのＭＣＴを用いた多重ｔ検定）。

【０１１３】

【図２５Ａ－２５Ｋ】フローサイトメトリー及びウエスタンブロットにより、ＨＥＫ２９３細胞におけるプラスミドトランスフェクション後のインテグリンα及びβタンパク質の過剰発現が確認される。図２５Ａ－２５Ｇ）ＥＦ１αプロモーターの制御下でインテグリンαＶ（図２５Ａ）、β１（図２５Ｂ）、α５（図２５Ｃ）、β８（図２５Ｄ）、β５（図２５Ｅ）、β３（図２５Ｆ）、又はβ６（図２５Ｇ）を発現するｐＵＣ１９又はプラスミドでトランスフェクトされ、過剰発現したタンパク質に対する抗体で染色されたＨＥＫ２９３細胞のフローサイトメトリー分析からの代表的なヒストグラム。図２５Ｈ－２５Ｉ）ｐＵＣ１９（レーン３及び４）でトランスフェクトされた細胞と比較した、対応するインテグリンプラスミド（レーン１及び２）でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞におけるインテグリンα８（図２５Ｈ）、αＩＩｂ（図２５Ｉ）、β３（図２５Ｊ）、及びβ８（図２５Ｋ）の過剰発現を示すウエスタンブロット。

【０１１４】

【図２６Ａ－２６Ｏ】インテグリンαＶアンタゴニストは、一次マウス筋管、並びに異なるドナー由来の一次ヒト筋管において、ＭｙｏＡＡＶの形質導入を抑制するが、ＡＡＶ９の形質導入を抑制しない。図２６Ａ－２６Ｂ）様々な濃度のＣＷＨＭ－１２（図２６Ａ）又はＧＬＰＧ－０１８７（図２６Ｂ及び図２６Ｊ）インテグリンαＶアンタゴニストで処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃ（ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃ）で形質導入されたマウス一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＥＭ（ｎ＝５）として表される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（対照として各群について０ｎＭ条件を用いたダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図２６Ｃ－２６Ｈ）様々な濃度のＣＷＨＭ－１２（図２６Ｃ、２６Ｅ、及び２６Ｇ）又はＧＬＰＧ－０１８７（図２６Ｄ、２６Ｆ、及び２６Ｈ）インテグリンαＶアンタゴニストで処理され、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入された３人の異なるドナーに由来するヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１（対照として各群について０ｎＭ条件を用いたダネットのＭＣＴを用いたＡＮＯＶＡ）。図２６Ｉ）ＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体をコードするプラスミド又はｐＵＣ１９でトランスフェクトされ、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入された、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞、ＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ細胞、及びＡＡＶＲを過剰発現するＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ細胞におけるインビトロ形質導入の定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝３）として表される。＊＊：Ｐ＜０．０００１（対数変換データを用いたスチューデントｔ検定）。図２６Ｊ－２６Ｋ）ＡＡＶ２－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入された、非処理のＨＥＫ２９３細胞又はＮＡで前処理された細胞のインビトロ形質導入（図２６Ｊ）及び結合（図２６Ｋ）の定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される；＊：Ｐ＜０．０１、＊＊：Ｐ＜０．０００１（対数変換データを用いたスチューデントｔ検定）。図２６Ｌ）ＡＡＶ２－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃとともに、ＮＡ及びＥＣＬ

又はＮＡ単独で前処理されたＨＥＫ２９３細胞のインビトロ形質導入（Ｋ）及び結合（Ｌ）の定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される；＊：Ｐ＜０．０１、＊＊：Ｐ＜０．０００１（対数変換データを用いたスチューデントｔ検定）。図２６Ｍ）ＡＡＶ２－、ＡＡＶ４－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入されたＨＥＫ２９３ＦＴ及びＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ細胞間のインビトロ形質導入の比較。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝３）として表される。＊＊：Ｐ＜０．０００１（対数変換データを用いたスチューデントｔ検定）。図２６Ｎ）ＡＡＶ２－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃとともに、ＮＡ及びＥＣＬ又はＮＡ単独で前処理されたＨＥＫ２９３細胞のインビトロ結合の定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される；＊：Ｐ＜０．０１、＊＊：Ｐ＜０．０００１（対数変換データを用いたスチューデントｔ検定）。図２６Ｏ）ＡＡＶ２－、ＡＡＶ４－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入されたＨＥＫ２９３ＦＴ及びＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ細胞間のインビトロ形質導入の比較。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝３）として表される。＊＊：Ｐ＜０．０００１（対数変換データを用いたスチューデントｔ検定）。

【０１１５】

【図２７Ａ－２７Ｂ】第二世代ＲＧＤ含有カプシド変異体は、第一世代変異体と比較して、ヒト一次筋管の形質導入についてαＶβ６への依存が低い。図２７Ａ）２Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ－、又はＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの様々な組織における２倍体ゲノム当たりのベクターゲノムの定量化。データは、平均±ＳＥＭとして表される（ＭｙｏＡＡＶ及びＥＭｙｏＡＡＶについてｎ＝１１、ＡＡＶ９についてｎ＝８）。＊：Ｐ＜０．０５（マン・ホイットニーの検定）。図２７Ｂ）様々な濃度の抗αＶβ６抗体で処理され、ＣＫ８プロモーターの制御下でＮｌｕｃをコードするＡＡＶ９－又は第一若しくは第二世代ＲＧＤ含有カプシド変異体で形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＥＭ（ｎ＝５）として表される。左側のグラフは、各個々の変異体についての形質導入効率を示している。右側のグラフにおいて、第一世代変異体（ＲＧＤＬＴＴＰ（配列番号１２）、ＲＧＤＬＳＴＰ（配列番号８）、ＲＧＤＬＮＱＹ（配列番号９）、ＲＧＤＡＴＥＬ（配列番号１０）、及びＲＧＤＴＭＳＫ（配列番号１１））及び第二世代変異体（ＧＰＧＲＧＤＱＴＴＬ（配列番号２）、ＡＥＧＲＧＤＱＹＴＲ（配列番号３）、ＡＴＧＲＧＤＬＧＱＡ（配列番号４）、ＡＶＡＲＧＤＱＧＬＩ（配列番号５）、ＮＩＳＲＧＤＱＧＹＱ（配列番号６）、ＡＰＡＲＧＤＱＧＳＱ（配列番号７））からの結果が、２つの群としてプロットされている。＊：Ｐ＜０．０１（第一世代及び第二世代群間の二段階Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ、Ｋｒｉｅｇｅｒ、及びＹｅｋｕｔｉｅｌｉ検定）（配列番号２～１２）。

【０１１６】

【図２８Ａ－２８Ｋ】ＮＨＰにおいて進化したＭｙｏＡＡＶクラスのカプシド変異体は、高い効率でカニクイザルの様々な筋肉を形質導入する。図２８Ａ－２８Ｂ）ウイルスライブラリー設計の概略図及びランダム７量体インサート（図２８Ａ）（配列番号１３、２２～２７）を含むカプシド変異体からのカニクイザルにおける２回のインビボ選択後にＮＨＰ筋肉から、又はマウスにおける１回目のＲＧＤ固定選択から同定された最上位１２０，０００変異体を用いてカニクイザルにおける１回のインビボ選択（図２８Ｂ）（配列番号１９、２８～３２）から同定された最上位のヒットの配列。図２８Ｃ）４人の異なるドナーに由来するヒト一次筋管においてマウスにおいて選択された１１の筋指向性カプシド変異体の間のインビトロ形質導入の比較。データは、個々のデータ点として平均とともに表される；＊＊：Ｐ＜０．０１（対照としてＭｙｏＡＡＶ　１Ａを用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図２８Ｄ）ＮＨＰにおいて最上位の筋指向性変異体（配列番号２８、３０、３２～３３）の特性評価に使用されるバーコード化ヒトフラタキシン導入遺伝子及びカプシド変異体のプールの概略図。図２８Ｅ）３匹のカニクイザルの異なる骨格筋、心臓、及び肝臓におけるＡＡＶｒｈ７４に対するｍＲＮＡ発現の倍率変化。ｍＲＮＡ発現は、各カプシド変異体に関連するバーコードのディープシーケンシングによっ

て定量化される。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝３）として表される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１、＊＊＊：Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊：Ｐ＜０．０００１（対照としてＡＡＶｒｈ７４を用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図２８Ｆ）ＡＡＶｒｈ７４、ＭｙｏＡＡＶ　３Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　４Ｃ、及びＭｙｏＡＡＶ　４Ｅ、及びＡＡＶ９の力価と、６つの異なる導入遺伝子との比較。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝６）として表される。＊：Ｐ＜０．０５；＊＊＊＊：Ｐ＜０．０００１（対照としてＡＡＶｒｈ７４を用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図２８Ｇ）様々な濃度のＧＬＰＧ－０１８７インテグリンαＶアンタゴニストで処理され、ＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ　３Ａ－、ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ－、ＭｙｏＡＡＶ　４Ｃ－、又はＭｙｏＡＡＶ　４Ｅ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、各群について対照として設定された０ｎＭ条件を用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡを用いて計算される。：ＭｙｏＡＡＶ　３Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　４Ｃ、及びＭｙｏＡＡＶ　４ＥについてＰ＜０．０００１；：ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ及びＭｙｏＡＡＶ　４ＥについてＰ＜０．０００１。図２８Ｈ－２８Ｉ）様々な濃度のαＶｂ１、αＶｂ３、αＶｂ６、αＶｂ８、又はＭＢＰ組み換えタンパク質とともにインキュベートされた、ＡＡＶ９－ＣＫ８－Ｎｌｕｃ（図２８Ｈ）又はＭｙｏＡＡＶ　３Ａ－、ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ－、ＭｙｏＡＡＶ　４Ｃ－、又はＭｙｏＡＡＶ　４Ｅ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃ（図２８Ｉ）で形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。＊＊：Ｐ＜０．０１、＊＊＊：Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊：Ｐ＜０．０００１（対照として各群における０ｎＭの組み換えタンパク質条件を用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図２８Ｊ）様々な濃度の抗αＶｂ６抗体又はマウスアイソタイプ対照で処理され、ＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ　３Ａ－、ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ－、ＭｙｏＡＡＶ　４Ｃ－、又はＭｙｏＡＡＶ　４Ｅ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃで形質導入されたヒト一次筋管におけるインビトロ形質導入効率。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。：ＭｙｏＡＡＶ　３Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　４Ｃ、及びＭｙｏＡＡＶ　４ＥについてＰ＜０．０００１；：ＭｙｏＡＡＶ３Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ、及びＭｙｏＡＡＶ　４ＥについてＰ＜０．０００１（対照として各群について０ｎＭ条件を用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図２８Ｋ）ＡＡＶ２－、ＡＡＶ４－、ＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ　３Ａ－、ＭｙｏＡＡＶ　４Ａ－、ＭｙｏＡＡＶ　４Ｃ－、又はＭｙｏＡＡＶ　４Ｅ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入されたＨＥＫ２９３ＦＴ及びＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ細胞間のインビトロ形質導入の比較。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝４）として表される。：Ｐ＜０．０００１（対数変換データにおけるスチューデントｔ検定）。

【０１１７】

【図２９Ａ－２９Ｏ】ＭｙｏＡＡＶ　１Ａは、ＤＢＡ／２Ｊ及びＢＡＬＢ／ｃＪバックグラウンドからのマウスにおいて全身投与後に異なる骨格筋を有効に形質導入し、筋肉内送達後の筋肉形質導入において非常に強力である。図２９Ａ－２９Ｄ）青色光によって照射された、１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ（上）又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ（下）を全身注射された雌ＤＢＡ／２Ｊ（図２９Ａ）、雄ＤＢＡ／２Ｊ（図２９Ｂ）、雌ＢＡＬＢ／ｃＪ（図２９Ｃ）、及び雄ＢＡＬＢ／ｃＪ（図２９Ｄ）マウスの様々な組織。図２９Ｅ）１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを全身注射された雄及び雌ＤＢＡ／２Ｊ及びＢＡＬＢ／ｃＪマウスの三頭筋、腓腹筋、心臓、及び肝臓におけるＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現の倍率差の定量化。灰色の破線は、ＡＡＶ９－ＣＭＶ－ＥＧＦＰからの相対的発現を示す。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝４～５）として表される；＊＊：Ｐ＜０．０１、＊＊＊：Ｐ＜０．００１（各群についてのＡＡＶ９及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射されたマウス間のスチューデントｔ検定）。図２９Ｆ）２Ｅ＋１０ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを筋肉内に注射されたＣ５７ＢＬ／６ＪマウスのＴＡにおけるＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現の倍率差の定量化。灰色の破線は、ＡＡＶ９－ＣＭＶ－ＥＧＦＰからの相対的発現を示す。デー

タは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される；＊＊＊＊：Ｐ＜０．０００１（スチューデントｔ検定）。図２９Ｇ）ビヒクル、又は２Ｅ＋１０ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを筋肉内に注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの ＴＡ筋肉におけるＥＧＦＰ及びチューブリンを検出するウエスタンブロット。図２９Ｈ）ビヒクル、又は２Ｅ＋１０ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを筋肉内に注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス由来のＴＡの免疫蛍光画像。グレースケール：ＥＧＦＰ、赤色：ラミニン、青色：Ｈｏｅｃｈｓｔ。断面のスケールバー：４００μｍ。図２９Ｉ－２９Ｊ）ビヒクル、又は１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－若しくはＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰの注射前、並びにその全身注射の１４及び２８日後のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの血清中のＡＬＴ（図２９Ｉ）及びＡＳＴ（図２９Ｊ）酵素レベルの定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される。Ｐ値は、テューキーのＭＣＴを用いた二元配置ＡＮＯＶＡによって計算される。有意性閾値：Ｐ＜０．０５。各時点でいずれか２つの群間の差は有意ではない。図２９Ｋ－２９Ｌ）ＡＡＶ９－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ（図２９Ｋ）又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ　ＥＧＦＰ（図２９Ｌ）を注射されたマウスからの血清によるＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃ形質導入の阻害；データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される；＊＊＊＊：Ｐ＜０．０００１（サイダックのＭＣＴを用いた二元配置ＡＮＯＶＡ）。図２９Ｍ）注射の４か月後に採取された、４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射されたマウス由来のＴＡ、三頭筋、腓腹筋、大腿四頭筋、及び腹筋の全器官発光画像。グレースケール：１Ｅ＋７～１Ｅ＋８。図２９Ｎ）注射の１２０日後に採取された、ＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射された動物の様々な筋肉からの全発光の定量化。データは、平均±ＳＤ（ｎ＝５）として表される；＊＊：Ｐ＜０．０１、＊＊＊：Ｐ＜０．００１（テューキーのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図２９Ｏ）注射の４か月後に採取された、４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射されたマウス由来のＴＡ、三頭筋、腓腹筋、大腿四頭筋、及び腹筋の全器官発光画像。この画像は、ＡＡＶ８－及びＡＡＶ９－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射されたマウスの筋肉におけるシグナルの検出を可能にするためグレースケール（５Ｅ＋５～５Ｅ＋７）で図１７Ｃに示される同じマウスからの発光シグナルを示す。

【０１１８】

【図３０Ａ－３０Ｃ】カニクイザルにおいて進化した筋指向性カプシド変異体の特性評価。図３０Ａ－３０Ｂ）Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（図３０Ａ）又はカニクイザル（図３０Ｂ）の異なる組織におけるＡＡＶｒｈ７４に対するｍＲＮＡ発現の倍率変化。ｍＲＮＡ発現は、各カプシド変異体に関連するバーコードのディープシーケンシングによって定量化された。データは、平均±ＳＤ（マウスについてｎ＝５及びカニクイザルについてｎ＝３）として表される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１、＊＊＊：Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊：Ｐ＜０．０００１（対照としてＡＡＶｒｈ７４を用いたダネットのＭＣＴを用いた一元配置ＡＮＯＶＡ）。図３０Ｃ）Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス三頭筋、カニクイザル三頭筋、及びヒト前斜角筋における（ＩＴＧＢ６）インテグリンβ－６（グレースケール）及びアイソタイプ対照（グレースケール）についての代表的な免疫蛍光画像。スケールバー：４００μｍ。

【発明を実施するための形態】

【０１１９】

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

【０１２０】

一般的な定義

特に定義されない限り、本明細書において使用される専門用語及び科学用語は、本開示が関連する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学における一般的な用語及び技術の定義は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ

Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１２）（Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８７）（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．）；ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（１９９５）（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ，ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．）：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８８）（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．）：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ ２０１３（Ｅ．Ａ．Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ ｅｄ．）；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（１９８７）（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．）；Ｂｅｎｊａｍｉｎ Ｌｅｗｉｎ，Ｇｅｎｅｓ ＩＸ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｊｏｎｅｓ ａｎｄ Ｂａｒｔｌｅｔｔ，２００８（ＩＳＢＮ ０７６３７５２２２３）；Ｋｅｎｄｒｅｗ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｔｈｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．，１９９４（ＩＳＢＮ ０６３２０２１８２９）；Ｒｏｂｅｒｔ Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ（ｅｄ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，１９９５（ＩＳＢＮ ９７８０４７１１８５７１０）；Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９４），Ｍａｒｃｈ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４ｔｈ ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９２）；及びＭａｒｔｅｎ Ｈ．Ｈｏｆｋｅｒ ａｎｄ Ｊａｎ ｖａｎ Ｄｅｕｒｓｅｎ，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｍｏｕｓｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１１）に見出され得る。

【０１２１】

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

【０１２２】

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

【０１２３】

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

範囲のそれぞれの端点が、他方の端点に関連して、及び他方の端点とは無関係に有意であることがさらに理解されるであろう。本明細書に開示される多くの値が存在すること、及び各値はまた、値自体に加えて「約」その特定の値として本明細書に開示されることも理解される。例えば、値「１０」が開示される場合、「約１０」も開示される。範囲は、「約」ある特定の値から、及び／又は「約」別の特定の値までとして本明細書において表され得る。同様に、値が、先行する「約」の使用によって近似として表される場合、特定の値がさらなる実施形態を形成することが理解されるであろう。例えば、値「約１０」が開示される場合、「１０」も開示される。

【０１２４】

このような範囲の形式が、便宜上及び簡潔にするために使用され、したがって、範囲の

限度として明確に記述される数値を含むだけでなく、各数値及び部分範囲が明確に記載されているかのようにその範囲内に含まれる全ての個々の数値又は部分範囲も含むように柔軟な方式で解釈されるべきであることが理解されるべきである。説明するために、「約０．１％～５％」の数値範囲は、約０．１％～約５％の明確に記載された値を含むだけでなく、個々の値（例えば、約１％、約２％、約３％、及び約４％）並びに示される範囲内の部分範囲（例えば、約０．５％～約１．１％；約５％～約２．４％；約０．５％～約３．２％、及び約０．５％～約４．４％、及び他の可能な部分範囲）も含むものと解釈されるべきである。範囲が表される場合、さらなる実施形態は、一方の特定の値から及び／又は他方の特定の値までを含む。

【０１２５】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限との間の各介在値（文脈上特に明記されない限り、下限の単位の十分の一まで）、及びその記載された範囲内の任意の他の記載された値又は介在値が、本開示内に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、独立して、そのより小さな範囲に含まれ得、また、記載された範囲における任意の特に除外される限度を条件として、本開示内に包含される。記載された範囲が、限度値の一方又は両方を含む場合、それらの含まれる限度値のいずれか又は両方を除外する範囲も本開示に含まれる。例えば、記載された範囲が、限度値の一方又は両方を含む場合、それらの含まれる限度値のいずれか又は両方を除外する範囲も本開示に含まれ、例えば、「ｘ～ｙ」という語句は、「ｘ」～「ｙ」の範囲並びに「ｘ」を超え「ｙ」未満の範囲を含む。範囲はまた、上限、例えば、「約ｘ、ｙ、ｚ、又はそれ以下」として表され得、「約ｘ」、「約ｙ」、及び「約ｚ」の特定の範囲並びに「ｘ未満」、ｙ未満」、及び「ｚ未満」の範囲を含むものと解釈されるべきである。同様に、「約ｘ、ｙ、ｚ、又はそれ以上」という語句は、「約ｘ」、「約ｙ」、及び「約ｚ」の特定の範囲並びに「ｘ超」、ｙ超」、及び「ｚ超」の範囲を含むものと解釈されるべきである。さらに、「約「ｘ」～「ｙ」」という語句は、「ｘ」及び「ｙ」が数値である場合、「約「ｘ」～約「ｙ」」を含む。

【０１２６】

本明細書において使用される際の「約」又は「およそ」という用語は、パラメータ、量、一時的な持続時間などの測定可能な値に言及するとき、記載される値の及びそれからの変動、例えば、記載される値の及びそれからの＋／－１０％以下、＋／－５％以下、＋／－１％以下、及び＋／－０．１％以下の変動を、このような変動が開示される発明において機能するために適切である限り包含することが意図される。「約」又は「およそ」という修飾語句が指す値が、それ自体でも特定的に、及び好ましくは、開示されることが理解されるべきである。本明細書において使用される際、「約」、「およそ」、「～で又は約」、及び「実質的に」という用語は、該当する量又は値が、正確な値又は特許請求の範囲に記載される又は本明細書に教示されるものと同等の結果若しくは効果を提供する値であり得ることを意味し得る。すなわち、量、サイズ、製剤、パラメータ、及び他の量及び特性が、正確ではなく、正確である必要はないが、概算及び／又はより大きく又はより小さい場合があり、必要に応じて、許容範囲、換算率、四捨五入、測定誤差など、並びに同等の結果又は効果が得られるような当業者に公知の他の因子を反映することが理解される。いくつかの状況では、同等の結果又は効果を提供する値は、合理的に決定することはできない。一般に、量、サイズ、製剤、パラメータ又は他の量又は特性は、そのように明示的に記載されているか否かにかかわらず、「約」、「およそ」、又は「～で又は約」である。「約」、「およそ」、又は「～で又は約」が、定量値の前に使用される場合、パラメータは、特に記載されない限り、特定の定量値自体も含むことが理解される。

【０１２７】

本明細書において使用される際、「生体試料」は、全細胞及び／又は生細胞及び／又は細胞残屑を含み得る。生体試料は、「体液」を含み得る（又はそれに由来し得る）。本発明は、体液が、羊水、房水、硝子体液、胆汁、血清、母乳、脳脊髄液、耳垢（ｃｅｒｕｍｅｎ）（耳垢（ｅａｒｗａｘ））、乳糜、糜粥、内リンパ液、外リンパ液、滲出液、糞便

、女性精液、胃酸、胃液、リンパ液、粘液（鼻漏及び痰を含む）、心膜液、腹水、胸膜液、膿汁、カタル性分泌物、唾液、皮脂（ｓｅｂｕｍ）（皮脂（ｓｋｉｎ　ｏｉｌ））、精液、喀痰、滑液、汗、涙液、尿、膣分泌物、嘔吐物及びそれらの１つ以上の混合物から選択される実施形態を包含する。生体試料は、細胞培養物、体液、体液からの細胞培養物を含む。体液は、例えば、穿刺、又は他の収集又は試料採取手順によって、哺乳動物生物から得られる。

【０１２８】

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

【０１２９】

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

【０１３０】

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

【０１３１】

概説

本明細書に開示される実施形態は、カーゴに連結されるか又は他の形で結合され得る筋特異的標的化部分を提供する。本明細書に開示される実施形態は、筋特異的標的化部分の１つ以上を組み込み得るポリペプチド及び粒子を提供する。ポリペプチド及び／又は粒子は、カーゴに連結されるか、結合されるか、カーゴを封入するか、又は他の形で組み込み得、それによって、カーゴを標的化部分と結合する。

【０１３２】

本明細書に開示される実施形態は、本明細書にさらに記載されるｎ量体モチーフの１つ以上を含有し得る筋特異的標的化部分を提供する。ある実施形態において、ｎ量体モチーフは、強化されたｍｙｏＡＡＶモチーフである。ある実施形態において、ｎ量体モチーフは、標的化部分の筋特異性を付与し得る。

【０１３３】

ある実施形態において、ｎ量体モチーフは、モチーフの最初の３つのアミノ酸としてＲ－Ｇ－Ｄを含有しない。ある実施形態において、ｎ量体モチーフは、第二世代ＲＧＤモチーフである。ある実施形態において、第二世代ＲＧＤモチーフを含有するｎ量体モチーフは、第二世代ＲＧＤモチーフを含有しないｎ量体モチーフより高い筋特異性、標的化、及

び／又は有効性を有する。

【０１３４】

本明細書に開示される実施形態は、細胞特異的及び／又は種特異的指向性を操作ＡＡＶ粒子に与えるように操作され得る操作アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドを提供する。

【０１３５】

本明細書に開示される実施形態はまた、修飾された表面構造の変異体、例えば、変異体カプシドタンパク質の多様なライブラリーの生成を体系的に指向することを含み得る操作カプシドを有するｒＡＡＶを生成する方法も提供する。操作カプシドを有するｒＡＡＶを生成する方法の実施形態はまた、特定の細胞、組織、及び／又は器官タイプを標的とすることが可能なカプシド変異体のストリンジェントな選択も含み得る。操作カプシドを有するｒＡＡＶを生成する方法の実施形態は、少なくとも２つ以上の種における効率的な及び／又は均一な形質導入が可能なカプシド変異体のストリンジェントな選択を含み得る。

【０１３６】

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

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

【０１４０】

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

【０１４１】

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

【０１４２】

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

【０１４３】

筋特異的標的化部分及びその組成物

筋細胞を特異的に標的とし、それに結合し、それに関連し、又は他の形でそれと特異的に相互作用することが可能であり得る標的化部分が、本明細書に記載される。ある実施形態において、標的化部分は、ｎ量体モチーフであるか又はそれを含み得る。

【０１４４】

ある実施形態において、ｎ量体モチーフは、第二世代ＲＧＤモチーフを含有する。「第二世代ＲＧＤモチーフ」という用語は、アミノ酸モチーフＲ－Ｇ－Ｄの存在を含むｎ量体モチーフを指し、$X_mRGDX_n$からなる一般式を有し、$X_m$及び$X_n$がそれぞれ、独立して、いずれかのアミノ酸から選択され、ｎが、１、２、３、４、５、６、７、８、又は９であり、ｍが、１～４である。例示的なｎ量体モチーフ並びに筋肉を標的とすることが可能な好適なｎ量体モチーフを生成及び同定する方法は、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

【０１４５】

ある実施形態において、標的化部分は、２つ以上のｎ量体モチーフを含み得る。ある実施形態において、標的化部分は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上のｎ量体モチーフを含み得る。ある実施形態において、標的化部分に含まれる全てのｎ－モチーフは、同じであり得る。２つ以上のｎ量体モチーフが含まれるある実施形態において、ｎ量体モチーフの少なくとも２つは、互いに異なる。２つ以上のｎ量体モチーフが含まれるある実施形態において、全てのｎ量体モチーフは、互いに異なる。ある実施形態において、標的化部分に含まれる各ｎ量体モチーフは、表４、表５、表６、図１３、図１４Ｆ、図１９Ｂ、図２７Ｂ、図２８Ｂ、図２８Ｄのいずれかに記載のもののいずれか１つ、又は本明細書における他の箇所に記載される図面及び実施例に示されるもののいずれかであり得る。ある実施形態において、第二世代ＲＧＤモチーフを含有するｎ量体モチーフは、第二世代ＲＧＤモチーフを含有しないｎ量体モチーフより高い筋特異性、標的化、及び／又は有効性を付与する。ある実施形態において、第二世代ＲＧＤモチーフを含有するｎ量体モチーフは、モチーフの最初の３つのアミノ酸としてＲ－Ｇ－Ｄを有するｎ量体モチーフより高い筋特異性、標的化、及び／又は有効性を付与する。

【０１４６】

ある実施形態において、ｎ量体モチーフの最初の１、２、３、又は４つのアミノ酸は、それが挿入され、挿入部位に先行するポリペプチドの１、２、３、又は４つのアミノ酸を置換し得る。ある実施形態において、ｎ量体モチーフが挿入されるポリペプチドの１つ以上のアミノ酸を置換するｎ量体モチーフのアミノ酸は、ｎ量体モチーフにおける「ＲＧＤ」の前又は直前に位置する。例えば、例えば、表４～６に示される１０量体インサートの１つ以上において、示される最初の３つのアミノ酸は、それらが挿入され得るポリペプチド中の１～３つのアミノ酸を置換し得る。別の非限定的な例としてＡＡＶを用いて、ｎ量体モチーフの１つ以上は、例えば、ＡＡＶ９カプシドポリペプチド（ｐｒｏｌｙｌｐｅｐｔｉｄｅ）のアミノ酸５８８と５８９との間に挿入され得、このインサートは、挿入後のｎ量体モチーフの直前のアミノ酸が、残基５８５であるように、アミノ酸５８６、５８７、及び５８８を置換し得る。この原理が、任意の他の挿入の状況に適用され得、ＡＡＶ９カプシドの残基５８８と５８９との間又は別のＡＡＶカプシドにおける同等の位置の挿入に必ずしも限定されないことが理解されるであろう。ある実施形態において、ｎ量体モチーフが挿入されるポリペプチドにおけるアミノ酸が、ｎ量体モチーフで置換されないことがさらに理解されるであろう。

【０１４７】

筋特異的標的化部分は、カーゴと連結されるか又は他の形でそれと結合し得る。ある実施形態において、本明細書に記載される１つ以上の筋肉特異的標的化部分は、カーゴに直接結合される。ある実施形態において、本明細書に記載される１つ以上の筋肉特異的標的

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

【０１４８】

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

【０１４９】

本明細書において使用される際、２つの部分間の記載される相互作用に関して使用される場合の「特異的」という用語は、第１及び第２の部分の非共有物理的結合を指し、ここで、第１及び第２の部分間の結合は、結合が起こる環境中に存在するほとんど又は全ての他の部分とのいずれかの部分の結合より、少なくとも２倍強く、少なくとも５倍強く、少なくとも１０倍強く、少なくとも５０倍強く、少なくとも１００倍強く、又はより強い。用いられる条件下で、例えば、細胞の内部の又は細胞生存と合致するものなどの生理学的条件下で、平衡解離定数、Ｋｄが、$10^{-3}$Ｍ以下、$10^{-4}$Ｍ以下、$10^{-5}$Ｍ以下、$10^{-6}$Ｍ以下、$10^{-7}$Ｍ以下、$10^{-8}$Ｍ以下、$10^{-9}$Ｍ以下、$10^{-10}$Ｍ以下、$10^{-11}$Ｍ以下、又は$10^{-12}$Ｍ以下である場合、２つ以上の実体の結合は、特異的であると考えられ得る。ある実施形態において、特異的結合は、複数のより弱い相互作用（例えば、複数の個々の相互作用によって達成され得、ここで、各個々の相互作用は、$10^{-3}$Ｍ超のＫｄによって特徴付けられる）。ある実施形態において、「分子認識」と呼ばれ得る特異的結合は、各実体における官能基の相補的な配向に依存する２つの実体間の飽和結合相互作用である。特異的相互作用の例としては、プライマー－ポリヌクレオチド相互作用、アプタマー－アプタマー標的相互作用、抗体－抗原相互作用、アビジン－ビオチン相互作用、リガンド－受容体相互作用、金属－キレート相互作用、相補的な核酸間のハイブリダイゼーションなどが挙げられる。

【０１５０】

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

【０１５１】

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

【０１５２】

ある実施形態において、本明細書に記載される筋肉特異的標的化部分の１つ以上を含有する組成物は、増加した筋細胞能力、筋細胞特異性、低下した免疫原性、又はそれらの任意の組合せを有する。本明細書において使用される際、「筋特異的」、「筋細胞特異性」、「筋細胞能力」などの用語は、本発明の筋特異的標的化部分及び前記筋特異的標的化部分を組み込む組成物の、非筋細胞と比べて筋細胞に対して増加した特異性、選択性、又は効力を指す。ある実施形態において、本明細書に記載される筋特異的標的化部分又は筋特異的標的化部分を組み込む組成物の／における細胞特異性、若しくは選択性、若しくは効力、又はそれらの組合せは、非筋細胞と比べて筋細胞において少なくとも２～少なくとも

５００倍特異的、選択的、及び／又は強力である。ある実施形態において、本明細書に記載される筋特異的標的化部分の／における特異性、又は選択性、又は効力は、非筋細胞と比べて筋細胞に対して、少なくとも２倍から／又は３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９２、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００、２０１、２０２、２０３、２０４、２０５、２０６、２０７、２０８、２０９、２１０、２１１、２１２、２１３、２１４、２１５、２１６、２１７、２１８、２１９、２２０、２２１、２２２、２２３、２２４、２２５、２２６、２２７、２２８、２２９、２３０、２３１、２３２、２３３、２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３９、２４０、２４１、２４２、２４３、２４４、２４５、２４６、２４７、２４８、２４９、２５０、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６０、２６１、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２７３、２７４、２７５、２７６、２７７、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２８６、２８７、２８８、２８９、２９０、２９１、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２、３０３、３０４、３０５、３０６、３０７、３０８、３０９、３１０、３１１、３１２、３１３、３１４、３１５、３１６、３１７、３１８、３１９、３２０、３２１、３２２、３２３、３２４、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３１、３３２、３３３、３３４、３３５、３３６、３３７、３３８、３３９、３４０、３４１、３４２、３４３、３４４、３４５、３４６、３４７、３４８、３４９、３５０、３５１、３５２、３５３、３５４、３５５、３５６、３５７、３５８、３５９、３６０、３６１、３６２、３６３、３６４、３６５、３６６、３６７、３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７３、３７４、３７５、３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８７、３８８、３８９、３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、３９６、３９７、３９８、３９９、４００、４０１、４０２、４０３、４０４、４０５、４０６、４０７、４０８、４０９、４１０、４１１、４１２、４１３、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８、４２９、４３０、４３１、４３２、４３３、４３４、４３５、４３６、４３７、４３８、４３９、４４０、４４１、４４２、４４３、４４４、４４５、４４６、４４７、４４８、４４９、４５０、４５１、４５２、４５３、４５４、４５５、４５６、４５７、４５８、４５９、４６０、４６１、４６２、４６３、４６４、４６５、４６６、４６７、４６８、４６９、４７０、４７１、４７２、４７３、４７４、４７５、４７６、４７７、４７８、４７９、４８０、４８１、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８７、４８８、４８９、４９０、４９１、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９７、４９８、４９９、５００倍特異的又は選択的で

ある。

【０１５３】

ある実施形態において代替例において記載される、本明細書に記載される筋特異的標的化部分及び／又は筋特異的標的化部分の１つ以上を含有する組成物は、減少した非筋細胞能力、非筋細胞特異性、減少した免疫原性、又はそれらの任意の組合せを有する。ある実施形態において、本明細書に記載される筋特異的標的化部分及び／又は筋特異的標的化部分の１つ以上を含有する組成物は、筋細胞と比べて非筋細胞に対して／において、特異性、選択性、及び／又は効力が少なくとも２倍～少なくとも５００倍低い。ある実施形態において、本明細書に記載される筋特異的標的化部分の／における特異性、又は選択性、又は効力は、筋細胞と比べて非筋細胞に対して、少なくとも２倍から／又は３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９２、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００、２０１、２０２、２０３、２０４、２０５、２０６、２０７、２０８、２０９、２１０、２１１、２１２、２１３、２１４、２１５、２１６、２１７、２１８、２１９、２２０、２２１、２２２、２２３、２２４、２２５、２２６、２２７、２２８、２２９、２３０、２３１、２３２、２３３、２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３９、２４０、２４１、２４２、２４３、２４４、２４５、２４６、２４７、２４８、２４９、２５０、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６０、２６１、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２７３、２７４、２７５、２７６、２７７、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２８６、２８７、２８８、２８９、２９０、２９１、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２、３０３、３０４、３０５、３０６、３０７、３０８、３０９、３１０、３１１、３１２、３１３、３１４、３１５、３１６、３１７、３１８、３１９、３２０、３２１、３２２、３２３、３２４、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３１、３３２、３３３、３３４、３３５、３３６、３３７、３３８、３３９、３４０、３４１、３４２、３４３、３４４、３４５、３４６、３４７、３４８、３４９、３５０、３５１、３５２、３５３、３５４、３５５、３５６、３５７、３５８、３５９、３６０、３６１、３６２、３６３、３６４、３６５、３６６、３６７、３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７３、３７４、３７５、３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８７、３８８、３８９、３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、３９６、３９７、３９８、３９９、４００、４０１、４０２、４０３、４０４、４０５、４０６、４０７、４０８、４０９、４１０、４１１、４１２、４１３、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８、４２９、４３０

、４３１、４３２、４３３、４３４、４３５、４３６、４３７、４３８、４３９、４４０、４４１、４４２、４４３、４４４、４４５、４４６、４４７、４４８、４４９、４５０、４５１、４５２、４５３、４５４、４５５、４５６、４５７、４５８、４５９、４６０、４６１、４６２、４６３、４６４、４６５、４６６、４６７、４６８、４６９、４７０、４７１、４７２、４７３、４７４、４７５、４７６、４７７、４７８、４７９、４８０、４８１、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８７、４８８、４８９、４９０、４９１、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９７、４９８、４９９、５００倍特異性又は選択性が低い。

【０１５４】

筋特異的標的化部分を組み込む組成物の免疫原性は、例えば、１～１００倍又はそれ以上減少され得る。ある実施形態において、免疫原性は、１から／又は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００倍又はそれ以上減少される。

【０１５５】

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

【０１５６】

ある実施形態において、カーゴは、筋疾患又は障害を処置又は予防することが可能である。ある実施形態において、筋疾患又は障害は、（ａ）自己免疫疾患；（ｂ）癌；（ｃ）筋ジストロフィー；（ｄ）神経筋疾患；（ｅ）糖若しくはグリコーゲン蓄積症；（ｆ）リピート伸長病；（ｇ）ドミナントネガティブ疾患；（ｈ）心筋症；（ｉ）ウイルス性疾患；（ｊ）早老性疾患；又は（ｋ）それらの任意の組合せである。ある実施形態において、リピート伸長病は、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、又は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）である。ある実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、又はＦＳＨＤである。ある実施形態において、筋強直性ジストロフィーは、１型又は２型である。ある実施形態において、糖若しくはグリコーゲン蓄積症は、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患又はポンペ病である。ある実施形態において、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患は、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ型、ＩＩＩＢ型、ＩＩＩＣ型、又はＩＩＩＤ型である。ある実施形態において、神経筋疾患は、シャルコー・マリー・トゥース病又はフリードライヒ運動失調症である。

【０１５７】

ある実施形態において、カーゴは、モルホリノ、ペプチド連結モルホリノ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＰＭＯ、治療用導入遺伝子、治療用ポリペプチド若しくはペプチドをコードするポリヌクレオチド、ＰＰＭＯ、１つ以上のペプチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、ガイドＲＮＡ、若しくは両方をコードする１つ以上のポリヌクレオチド、

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子を含むリボヌクレオタンパク質、治療用導入遺伝子ＲＮＡ、若しくは他の遺伝子組み換え若しくは治療用ＲＮＡ及び／又はタンパク質、又はそれらの任意の組合せである。

【０１５８】

ある実施形態において、カーゴは、遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である。

【０１５９】

ある実施形態において、カーゴは、ジストロフィン遺伝子におけるエクソンスキッピングを誘導することが可能である。

【０１６０】

ある実施形態において、カーゴは、ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子である。ある実施形態において、ミニ又はマイクロジストロフィン遺伝子は、スペクトリン様リピート１、２、３、及び２４、又はそれらの組合せ、並びに任意にｎＮＯＳドメインを含む。

【０１６１】

操作ウイルスカプシド及びポリヌクレオチドのコード化

細胞特異的指向性、例えば、筋特異的指向性を、操作ウイルス粒子に付与するように操作され得る操作ウイルスカプシド、例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドの様々な実施形態が、本明細書に記載される。操作ウイルスカプシドは、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、又はＡＡＶカプシドであり得る。操作カプシドは、操作ウイルス粒子（例えば、操作されたレンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、又はＡＡＶウイルス粒子）に含まれ得、細胞特異的指向性、減少した免疫原性、又はその両方を、操作ウイルス粒子に付与し得る。本明細書に記載される操作ウイルスカプシドは、本明細書に記載される１つ以上の操作ウイルスカプシドタンパク質を含み得る。本明細書に記載される操作ウイルスカプシドは、本明細書における他の箇所に記載されるｎ量体モチーフを含有するか又はそれから構成される筋特異的標的化部分を含有し得る本明細書に記載される１つ以上の操作ウイルスカプシドタンパク質を含み得る。

【０１６２】

操作ウイルスカプシド及び／又はカプシドタンパク質は、１つ以上の操作ウイルスカプシドポリヌクレオチドによってコードされ得る。ある実施形態において、操作ウイルスカプシドポリヌクレオチドは、操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド、操作レンチウイルスカプシドポリヌクレオチド、操作レトロウイルスカプシドポリヌクレオチド、又は操作アデノウイルスカプシドポリヌクレオチドである。ある実施形態において、操作ウイルスカプシドポリヌクレオチド（例えば、操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド、操作レンチウイルスカプシドポリヌクレオチド、操作レトロウイルスカプシドポリヌクレオチド、又は操作アデノウイルスカプシドポリヌクレオチド）は、３’ポリアデニル化シグナルを含み得る。ポリアデニル化シグナルは、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルであり得る。

【０１６３】

操作ウイルスカプシドは、野生型ウイルスカプシドの変異体であり得る。例えば、ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドは、野生型ＡＡＶカプシドの変異体であり得る。ある実施形態において、野生型ＡＡＶカプシドは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３カプシドタンパク質又はそれらの組合せから構成され得る。言い換えると、操作ＡＡＶカプシドは、野生型ＶＰ１、野生型ＶＰ２、及び／又は野生型ＶＰ３カプシドタンパク質の１つ以上の変異体を含み得る。ある実施形態において、参照野生型ＡＡＶカプシドの血清型は、ＡＡＶ－１、ＡＡＶ－２、ＡＡＶ－３、ＡＡＶ－４、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－６、ＡＡＶ－８、ＡＡＶ－９又はそれらの任意の組合せであり得る。ある実施形態において、野生型ＡＡＶカプシドの血清型は、ＡＡＶ－９であり得る。操作ＡＡＶカプシドは、参照野生型ＡＡＶカプシドのものと異なる指向性を有し得る。

【０１６４】

操作ウイルスカプシドは、１～６０個の操作カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作ウイルスカプシドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０

、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、又は６０個の操作カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作ウイルスカプシドは、０～５９個の野生型ウイルスカプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作ウイルスカプシドは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、又は５９個の野生型ウイルスカプシドタンパク質を含有し得る。

【０１６５】

ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドは、１～６０個の操作カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、又は６０個の操作カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドは、０～５９個の野生型ＡＡＶカプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、又は５９個の野生型ＡＡＶカプシドタンパク質を含有し得る。

【０１６６】

ある実施形態において、操作ウイルスカプシドタンパク質は、ｎ量体アミノ酸モチーフを有し得、ここで、ｎが、少なくとも３つのアミノ酸であり得る。ある実施形態において、ｎが、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、又は１５個のアミノ酸であり得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドは、６量体又は７量体アミノ酸モチーフを有し得る。ある実施形態において、ｎ量体アミノ酸モチーフは、野生型ウイルスタンパク質（ＶＰ）（又はカプシドタンパク質）中の２つのアミノ酸の間に挿入され得る。ある実施形態において、ｎ量体モチーフは、ウイルスカプシドタンパク質における可変アミノ酸領域における２つのアミノ酸間に挿入され得る。

【０１６７】

ある実施形態において、ｎ量体モチーフは、ＡＡＶカプシドタンパク質における可変アミノ酸領域における２つのアミノ酸間に挿入され得る。各野生型ＡＡＶウイルスタンパク質のコアは、自律性パルボウイルスカプシド中に保存される８本のβ－バレルモチーフ（βＢ～βＩ）及びα－ヘリックス（αＡ）を含有する（例えば、ＤｉＭａｔｔｉａ ｅｔａｌ．２０１２．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８６（１２）：６９４７－６９５８を参照）。構造的可変領域（ＶＲ）は、群になってカプシド表面における局所変化を生成するβ－鎖を連結する表面ループに存在する。ＡＡＶは、１２の可変領域（超可変領域とも呼ばれる）を有する（例えば、Ｗｅｉｔｚｍａｎ ａｎｄ Ｌｉｎｄｅｎ．２０１１．“Ａｄｅｎｏ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｖｉｒｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｙ．”Ｉｎ Ｓｎｙｄｅｒ，Ｒ．Ｏ．，Ｍｏｕｌｌｉｅｒ，Ｐ．（ｅｄｓ．）Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ：Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓを参照）。ある実施形態において、１つ以上のｎ量体モチーフは、野生型ＡＶＶカプシドタンパク質中の１２の可変領域の１つ以上における２つのアミノ酸の間に挿入され得る。ある実施形態において、１つ以上のｎ量体モチーフはそれぞれ、ＶＲ－Ｉ、ＶＲ－ＩＩ、Ｖ

Ｒ－ＩＩＩ、ＶＲ－ＩＶ、ＶＲ－Ｖ、ＶＲ－ＶＩ、ＶＲ－ＶＩＩ、ＶＲ－ＩＩＩ、ＶＲ－ＩＸ、ＶＲ－Ｘ、ＶＲ－ＸＩ、ＶＲ－ＸＩＩ、又はそれらの組合せにおける２つのアミノ酸の間に挿入され得る。ある実施形態において、ｎ量体は、カプシドタンパク質のＶＲ－ＩＩＩにおける２つのアミノ酸の間に挿入され得る。ある実施形態において、操作カプシドは、ＡＡＶ９ウイルスタンパク質のアミノ酸２６２～２６９の間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸３２７～３３２の間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸３８２～３８６の間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸４５２～４６０の間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸４８８～５０５の間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸５４５～５５８の間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸５８１～５９３の間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間、アミノ酸７０４～７１４の間のいずれか２つの連続したアミノ酸の間に挿入されたｎ量体を有し得る。ある実施形態において、操作カプシドは、ＡＡＶ９ウイルスタンパク質のアミノ酸５８８～５８９の間に挿入されたｎ量体を有し得る。ある実施形態において、操作カプシドは、ＡＡＶ９ウイルスタンパク質のアミノ酸５８８～５８９の間に挿入された７量体モチーフを有し得る。配列番号１は、上述される挿入部位を少なくとも参照するための参照ＡＡＶ９カプシド配列である。ｎ量体が、他の血清型のＡＡＶウイルスタンパク質における類似の位置に挿入され得ることが理解されるであろう。ある実施形態において、上述されるように、ｎ量体は、ＡＡＶウイルスタンパク質内のいずれか２つの連続したアミノ酸の間に挿入され得、ある実施形態において、挿入は、可変領域においてなされる。

【０１６８】

ある実施形態において、ｎ量体モチーフの最初の１、２、３、又は４つのアミノ酸は、それが挿入され、挿入部位に先行するポリペプチドの１、２、３、又は４つのアミノ酸を置換し得る。ある実施形態において、ｎ量体モチーフが挿入されるポリペプチドの１つ以上のアミノ酸を置換するｎ量体モチーフのアミノ酸は、ｎ量体モチーフにおける「ＲＧＤ」の前又は直前に位置する。例えば、例えば、表４～６に示される１０量体インサートの１つ以上において、示される最初の３つのアミノ酸は、それらが挿入され得るポリペプチド中の１～３つのアミノ酸を置換し得る。別の非限定的な例としてＡＡＶを用いて、ｎ量体モチーフの１つ以上は、例えば、ＡＡＶ９カプシドポリペプチドのアミノ酸５８８と５８９との間に挿入され得、このインサートは、挿入後のｎ量体モチーフの直前のアミノ酸が、残基５８５であるように、アミノ酸５８６、５８７、及び５８８を置換し得る。この原理が、任意の他の挿入の状況に適用され得、ＡＡＶ９カプシドの残基５８８と５８９との間又は別のＡＡＶカプシドにおける同等の位置の挿入に必ずしも限定されないことが理解されるであろう。ある実施形態において、ｎ量体モチーフが挿入されるポリペプチドにおけるアミノ酸が、ｎ量体モチーフで置換されないことがさらに理解されるであろう。

【０１６９】

配列番号１ＡＡＶ９カプシド参照配列。

【化１】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLG
PGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQ
PAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGV
GSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGY
STPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTI
ANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVG
RSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLS
KTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWP
GASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMI
TNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQ
GPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQ
YSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTR
YLTRNL

【０１７０】

ある実施形態において、ｎ量体は、アミノ酸であり得、本明細書における表４、表５、表６、図１３、図１４Ｆ、図１９Ｂ、図２７Ｂ、図２８Ｂ、図２８Ｄ、及び／又は実施例に示されるか又は示される核酸によってコードされる任意のアミノ酸モチーフであり得る。ある実施形態において、ＡＡＶ又は他のウイルスカプシドへのｎ量体の挿入は、細胞、組織、器官、特定の操作ＡＡＶ若しくは他のウイルスカプシド又は本発明のｎ量体モチーフ又はカプシドタンパク質を含む他の組成物をもたらし得る。ある実施形態において、ｎ量体モチーフを含有する操作カプシド又は他の組成物は、骨組織及び／又は細胞、肺組織及び／又は細胞、肝臓組織及び／又は細胞、膀胱組織及び／又は細胞、腎臓組織及び／又は細胞、心臓組織及び／又は細胞、骨格筋組織及び／又は細胞、平滑筋及び／又は細胞、ニューロン組織及び／又は細胞、腸組織及び／又は細胞、膵臓組織及び／又は細胞、副腎組織及び／又は細胞、脳組織及び／又は細胞、腱組織又は細胞、皮膚組織及び／又は細胞、脾臓組織及び／又は細胞、眼組織及び／又は細胞、血液細胞、滑液細胞、免疫細胞（特定のタイプの免疫細胞に対する特異性を含む）、及びそれらの組合せに対する特異性を有する。ある実施形態において、ｎ量体モチーフを含有する操作カプシド又は他の組成物は、限定はされないが、骨格筋組織及び／又は細胞及び平滑筋組織及び／又は細胞を含む筋肉細胞に対する特異性を有する。

【０１７１】

ある実施形態において、ＡＡＶカプシド又は他のウイルスカプシド又は組成物は、筋特異的であり得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶ又は他のウイルスカプシド又は他の組成物の筋特異性は、本明細書に記載される操作ＡＡＶ又は他のウイルスカプシド又は他の組成物に組み込まれる筋特異的ｎ量体モチーフによって与えられる。理論によって制約されることを意図するものではないが、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシド又は他のウイルスカプシド又は他の組成物を含有するウイルス粒子又は他の組成物の相互作用が、筋細胞の表面における細胞表面受容体及び／又は他の分子との増加又は改善された相互作用（例えば、増加した親和性）を有するように、ｎ量体モチーフが、操作ＡＡＶカプシド又は他のウイルスカプシド又は他の組成物ドメイン又は領域に又はその中に３Ｄ構造を与えるものと考えられる。ある実施形態において、細胞表面受容体は、ＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）である。ある実施形態において、細胞表面受容体は、筋細胞特異的ＡＡＶ受容体である。ある実施形態において、細胞表面受容体又は他の分子は、筋細胞の表面において選択的に発現される細胞表面受容体又は他の分子である。ある実施形態において、細胞表面受容体又は分子は、インテグリン又はその二量体である。ある実施形態において、細胞表面受容体又は分子は、Ｖｂ６インテグリンヘテロ二量体である。

【０１７２】

ある実施形態において、本明細書に記載される筋特異的な操作ウイルス粒子又は本明細書に記載される筋特異的カプシド、ｎ量体モチーフ、若しくは筋特異的標的化部分を含有する他の組成物は、他の細胞型及び／又は他のウイルス粒子（限定はされないが、ＡＡＶを含む）並びに本発明の筋特異的ｎ量体モチーフを含有しない他の組成物と比較して、筋細胞における増加した取り込み、送達率、形質導入率、効率、量、又はそれらの組合せを有し得る。

【０１７３】

本明細書に記載される操作された筋特異的標的化部分及び他の組成物（限定はされないが、操作ＡＡＶカプシドを含む）をコードする本明細書に記載されるポリヌクレオチドも、本明細書に記載される。

【０１７４】

ある実施形態において、操作されたポリヌクレオチドは、本明細書における他の箇所に記載される操作ウイルス粒子を生成するために使用され得るウイルスベクター系におけるウイルスゲノムドナーであるように構成されるポリヌクレオチドに含まれ得る。

【０１７５】

ある実施形態において、ポリヌクレオチドをコードする操作ＡＡＶカプシドは、本明細書における他の箇所に記載される操作ＡＡＶ粒子を生成するために使用され得るＡＡＶベクター系におけるＡＡＶゲノムドナーであるように構成されるポリヌクレオチドに含まれ得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドコードポリヌクレオチドは、ポリアデニル化テールに動作可能に連結され得る。ある実施形態において、ポリアデニル化テールは、ＳＶ４０ポリアデニル化テールであり得る。ある実施形態において、ＡＡＶカプシドコードポリヌクレオチドは、プロモーターに動作可能に連結され得る。ある実施形態において、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり得る。ある実施形態において、組織特異的プロモーターは、筋肉（例えば、心臓、骨格、及び／又は平滑筋）、神経及び指示細胞（例えば、星状膠細胞、グリア細胞、シュワン細胞など）、脂肪、脾臓、肝臓、腎臓、免疫細胞、髄液細胞、滑液細胞、皮膚細胞、軟骨、腱、結合組織、骨、膵臓、副腎、血液細胞、骨髄細胞、胎盤、内皮細胞、及びそれらの組合せに対して特異的である。ある実施形態において、プロモーターは、構成的プロモーターであり得る。好適な組織特異的プロモーター及び構成的プロモーターは、本明細書における他の箇所に記載され、当該技術分野において一般に公知であり、市販品として入手可能である。

【０１７６】

好適な筋特異的プロモーターとしては、限定はされないが、ＣＫ８、ＭＨＣＫ７、ミオグロビンプロモーター（Ｍｂ）、デスミンプロモーター、筋肉クレアチンキナーゼプロモーター（ＭＣＫ）及びその変異体、並びにＳＰｃ５－１２合成プロモーターが挙げられる。

【０１７７】

好適な免疫細胞特異的プロモーターとしては、限定はされないが、Ｂ２９プロモーター（Ｂ細胞）、ＣＤ１４プロモーター（単球細胞）、ＣＤ４３プロモーター（白血球及び血小板）、ＣＤ６８（マクロファージ）、及びＳＶ４０／ＣＤ４３プロモーター（白血球及び血小板）が挙げられる。

【０１７８】

好適な血液細胞特異的プロモーターとしては、限定はされないが、ＣＤ４３プロモーター（白血球及び血小板）、ＣＤ４５プロモーター（造血細胞）、ＩＮＦ－β（造血細胞）、ＷＡＳＰプロモーター（造血細胞）、ＳＶ４０／ＣＤ４３プロモーター（白血球及び血小板）、及びＳＶ４０／ＣＤ４５プロモーター（造血細胞）が挙げられる。

【０１７９】

好適な膵臓特異的プロモーターとしては、限定はされないが、エラスターゼ－１プロモーターが挙げられる。

【０１８０】

好適な内皮細胞特異的プロモーターとしては、限定はされないが、Ｆｉｔ－１プロモー

ター及びＩＣＡＭ－２プロモーターが挙げられる。
【０１８１】
好適な神経組織／細胞特異的プロモーターとしては、限定はされないが、ＧＦＡＰプロモーター（星状膠細胞）、ＳＹＮ１プロモーター（神経）、及びＮＳＥ／ＲＵ５’（成熟神経）が挙げられる。
【０１８２】
好適な腎臓特異的プロモーターとしては、限定はされないが、ＮｐｈｓＩプロモーター（有足細胞）が挙げられる。
【０１８３】
好適な骨特異的プロモーターとしては、限定はされないが、ＯＧ－２プロモーター（骨芽細胞、象牙芽細胞）が挙げられる。
【０１８４】
好適な肺特異的プロモーターとしては、限定はされないが、ＳＰ－Ｂプロモーター（肺）が挙げられる。
【０１８５】
好適な肝臓特異的プロモーターとしては、限定はされないが、ＳＶ４０／Ａｌｂプロモーターが挙げられる。
【０１８６】
好適な心臓特異的プロモーターとしては、限定はされないが、α－ＭＨＣが挙げられる。
【０１８７】
好適な構成的プロモーターとしては、限定はされないが、ＣＭＶ、ＲＳＶ、ＳＶ４０、ＥＦ１α、ＣＡＧ、及びβ－アクチンが挙げられる。
【０１８８】
低下した非筋細胞特異性を有するＡＡＶ
ある実施形態において、本明細書に記載されるｎ量体モチーフは、１つ以上の非筋細胞型に対する低下した特異性（又は検出不可能な、測定不可能な、又は臨床的に関連しない相互作用）を有するＡＡＶタンパク質（例えば、ＡＡＶカプシドタンパク質）中に挿入される。例示的な非筋細胞型としては、限定はされないが、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、中枢神経系又は末梢神経系細胞、骨、免疫、胃、腸、眼、皮膚細胞などが挙げられる。ある実施形態において、非筋細胞は、肝細胞である。
【０１８９】
いくつかの例の実施形態において、ＡＡＶカプシドタンパク質は、対応する野生型ＡＡＶカプシドポリペプチドと比較して、非筋細胞における減少された又はなくされた取り込みを有する操作ＡＡＶカプシドタンパク質である。
【０１９０】
いくつかの例の実施形態において、非筋細胞は、肝細胞である。
【０１９１】
いくつかの例の実施形態において、野生型カプシドポリペプチドは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ．７４、又はＡＡＶ　ｒｈ．１０カプシドポリペプチドである。
【０１９２】
いくつかの例の実施形態において、操作ＡＡＶカプシドタンパク質は、非筋細胞における減少された又はなくされた取り込みをもたらす１つ以上の変異を含む。
【０１９３】
いくつかの例の実施形態において、１つ以上の変異は、ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号１）における（ａ）２６７位に、（ｂ）２６９位に、（ｃ）５０４位に、（ｄ）５０５位に、（ｅ）５９０位に、（ｆ）又はそれらの任意の組合せに、又は非ＡＡＶ９カプシドポリペプチドにおけるそれに対応する１つ以上の位置にある。
【０１９４】

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

【０１９５】

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

【０１９６】

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

【０１９７】

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

【０１９８】

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

【０１９９】

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

【０２００】

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

【０２０１】

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

【０２０２】

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

【０２０３】

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

配列番号３３０

【化２】

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
Gly Tyr Lys Val Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ser Asn Asp Asn
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

**配列番号３３１**

【化３】

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
Gly Tyr Lys Val Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Ala Ser Thr Asn Asp Asn
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

【０２０４】

ある実施形態において、ｎ量体モチーフが挿入され得るＡＡＶカプシドタンパク質は、非ＣＮＳ細胞、特に、肝細胞に対して低下した特異性を有するＡｄａｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，（Ｎａｔ．Ｃｏｍｍ．２０１４．５：３０７５，ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ４０７５）に記載されるもののいずれかに対して８０～１００（例えば、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、から／又は１００）パーセント同一であり得る。Ａｄａｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，（Ｎａｔ．Ｃｏｍｍ．２０１４．５：３０７５，ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ４０７５）は、全体が表されているかのように参照により本明細

書に援用される。

【０２０５】

ある実施形態において、修飾ＡＡＶは、野生型ＡＡＶ又は対照と比較して、非筋細胞に対する特異性の約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００パーセント又は倍の低下を有し得る。ある実施形態において、修飾ＡＡＶはまた、１つ以上の非筋細胞における測定可能な若しくは検出可能な取り込み及び／又は発現を有さないことがある。

【０２０６】

操作ＡＡＶカプシドを生成する方法

操作ＡＡＶカプシドを生成する方法も、本明細書において提供される。操作ＡＡＶカプシド変異体は、野生型ＡＡＶカプシドの変異体であり得る。図６～８は、本明細書に記載される、変異体モチーフを有する操作ＡＡＶカプシドを生成することが可能な方法の様々な実施形態を示し得る。一般に、ＡＡＶカプシドライブラリーは、適切なＡＡＶ産生細胞株において、上述される操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチドをそれぞれ含有する操作カプシドベクターを発現させることによって生成され得る。例えば、図８を参照されたい。図８は、ＡＡＶ粒子産生のヘルパー依存的な方法を示すことが理解されるであろうが、これは、ヘルパーを含まない方法によっても行われ得ることが理解されるであろう。これは、もう１つの所望の細胞特異的操作ＡＡＶカプシド変異体を含有し得るＡＡＶカプシドライブラリーを生成し得る。図６に示されるように、ＡＡＶカプシドライブラリーは、１回目のｍＲＮＡベースの選択のために様々な非ヒト動物に投与され得る。図１に示されるように、ＡＡＶ及び関連ベクターによる形質導入プロセスは、細胞を形質導入したウイルスのゲノムを反映しているｍＲＮＡ分子の産生をもたらし得る。少なくとも本明細書における実施例において示されるように、ウイルスＤＮＡの存在を測定することによって細胞内のウイルス粒子の存在を単に検出することと対照的に、ｍＲＮＡベースの選択は、生成された機能的産物に基づくため、細胞を機能的に形質導入することが可能なウイルス粒子を決定するためにより特異的及び有効であり得る。

【０２０７】

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

【０２０８】

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

、全身性であり得る。

【０２０９】

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

【０２１０】

本方法は、（ｅ）工程（ｄ）において同定されたいくつか又は全ての操作ＡＡＶウイルス粒子カプシド変異体を、１つ以上の第２の対象に投与する工程；及び（ｆ）１つ以上の第２の対象における１つ以上の特定の細胞又は特定の細胞型において有意に高いレベルで生成される１つ以上の操作ＡＡＶウイルス粒子カプシド変異体を同定する工程をさらに含み得る。工程（ａ）における細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。ある実施形態において、工程（ｃ）、工程（ｅ）、又は両方における投与は、全身性である。ある実施形態において、１つ以上の第１の対象、１つ以上の第２の対象、又は両方は、非ヒト哺乳動物である。ある実施形態において、１つ以上の第１の対象、１つ以上の第２の対象、又は両方はそれぞれ、独立して、野生型非ヒト哺乳動物、ヒト化非ヒト哺乳動物、疾患特異的非ヒト哺乳動物モデル、及び非ヒト霊長類からなる群から選択される。

【０２１１】

ある実施形態において、変異体モチーフのさらなる最適化が行われ得る。ある実施形態において、第一及び／又は第二世代モチーフ、（カプシドＲＧＤ含有モチーフを含む）は、例えば、図１１に示されるように、及び本明細書における実施例にさらに記載されるように、カプシド変異体を最適化するためにさらに使用され得る。

【０２１２】

本明細書に記載されるポリヌクレオチド及びベクター系はまた、細胞に送達され得るカーゴ分子を含有するように生成され得るウイルス粒子及び他の組成物を生成するために使用され得る。

【０２１３】

操作ベクター及びベクター系

限定はされないが、操作ウイルスポリヌクレオチド（例えば、操作ＡＡＶポリヌクレオチド）を含む、本発明のｎ量体モチーフの１つ以上をコードし得る本明細書に記載される操作ポリヌクレオチドの１つ以上を含有し得るベクター及びベクター系も、本明細書において提供される。ある実施形態において、本発明のｎ量体モチーフをコードし得るポリヌクレオチドは、表４、表５、表６、図１３、図１４Ｆ、図１９Ｂ、図２７Ｂ、図２８Ｂ、図２８Ｄに記載されるか、及び／又は本明細書における他の箇所に記載されるいずれかであり得る。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、表４、表５、表６、図１３、図１４Ｆ、図１９Ｂ、図２７Ｂ、図２８Ｂ、図２８Ｄのいずれかに記載されるか、及び／又は本明細書における他の箇所に記載される任意のｎ量体モチーフをコードし得る。これに関して使用される際、操作ウイルスカプシドポリヌクレオチドは、本明細書における他の箇所に記載される操作ウイルスカプシドをコードすることが可能な本明細書に記載されるポリヌクレオチド及び／又は本明細書における他の箇所に記載される１つ以上の操作ウイルスカプシドタンパク質をコードすることが可能なポリヌクレオチドのいずれか１つ以上を指す。さらに、ベクターが、本明細書に記載される操作ウイルスカプシドポリヌクレオ

チドを含む場合、ベクターはまた、それ自体で特に示されないが、操作ベクター又はそのシステムと呼ばれ、操作ベクター又はそのシステムであると見なされ得る。実施形態において、ベクターは、本明細書に記載される操作ウイルスカプシドの１つ以上の要素をコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含有し得る。ベクター及びその系は、本明細書に記載される操作ウイルスカプシド、粒子、又は他の組成物の１つ以上の構成要素を発現し得る細菌、真菌、酵母、植物細胞、動物細胞、及びトランスジェニック動物を生成するために有用であり得る。本明細書に記載されるポリヌクレオチド配列の１つ以上を含有するベクターは、本開示の範囲内である。本明細書に記載される操作ウイルスカプシド及びその系の一部であるポリヌクレオチドの１つ以上が、ベクター又はベクター系に含まれ得る。

【０２１４】

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

ある実施形態において、ベクターは、１つ以上の最小スプライス調節要素、修飾スプライス調節要素、スプライスアクセプター、及び／又はスプライスドナーを含まない。

【０２１５】

ベクター及び／又はベクター系は、例えば、産生細胞などの細胞内で操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシド及び／又は他のポリヌクレオチドの１つ以上を発現させて、本明細書における他の箇所に記載される本発明のｎ量体モチーフを含有する操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシド若しくは他の組成物を含有する操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）粒子及び／又は他の組成物（例えば、ポリペプチド、粒子など）を生成するために使用され得る。本明細書に記載されるベクター及びベクター系のための他の使用も、本開示の範囲内である。一般に、本明細書全体を通して、この用語は、１つの環境から別の環境への実体の移動を可能にするか又は容易にするツールである。当業者によって理解されるいくつかの状況において、「ベクター」は、それが結合される別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す専門用語であり得る。ベクターは、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどのレプリコンであり得、それに、挿入されたセグメントの複製をもたらすように別のＤＮＡセグメントが挿入され得る。一般に、ベクターは、適切な制御要素に結合されるとき、複製が可能である。

【０２１６】

ベクターとしては、限定はされないが、一本鎖、二本鎖、又は部分的に二本鎖である核酸分子；１つ以上の自由端を含むか、自由端を含まない（例えば、環状）核酸分子；ＤＮＡ、ＲＮＡ、又は両方を含む核酸分子；及び当該技術分野において公知のポリヌクレオチドの他の種が挙げられる。他のタイプのベクターは、「プラスミド」であり、これは、標準的な分子クローニング技術などによってさらなるＤＮＡセグメントが挿入された環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、ここで、ウイルス由来のＤＮＡ又はＲＮＡ配列が、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ））にパッケージングするためにベクター中に存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためにウイルスによって運ばれるポリヌクレオチドも

含む。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自己複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）が、宿主細胞中への導入時に宿主細胞のゲノムに統合され、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが動作可能に結合される遺伝子の発現を指向することが可能である。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。組み換えＤＮＡ技術において有用な一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。

【０２１７】

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

【０２１８】

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

【０２１９】

細胞ベースのベクター増幅及び発現

ベクターは、好適な宿主細胞内の本明細書に記載されるウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドシステム又は本発明のｎ量体モチーフを含む他の組成物（例えば、核酸転写産物、タンパク質、酵素、及びそれらの組合せ）などの１つ以上の要素の発現のために設計され得る。ある実施形態において、好適な宿主細胞は、原核細胞である。好適な宿主細胞としては、限定はされないが、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞が挙げられる。ベクターは、ウイルスベース又は非ウイルスベースであり得る。ある実施形態において、好適な宿主細胞は、真核細胞である。ある実施形態において、好適な宿主細胞は、好適な細菌細胞である。好適な細菌細胞としては、限定はされないが、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）種の細菌からの細菌細胞が挙げられる。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）の多くの好適な株が、ベクターの発現のために当該技術分野において公知である。これらとしては、限定はされないが、Ｐｉｒ１、Ｓｔｂｌ２、Ｓｔｂｌ３、Ｓｔｂｌ４、ＴＯＰ１０、ＸＬ１　Ｂｌｕｅ、及びＸＬ１０　Ｇｏｌｄが挙げられる。ある実施形態において、宿主細胞は、好適な昆虫細胞である。好適な昆虫細胞としては、ツマジロクサヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）からのものが挙げられる。ツマジロクサヨトウ（Ｓ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞の好適な株としては、限定はされないが、Ｓｆ９及びＳｆ２１が挙げられる。ある実施形態において、宿主細胞は、好適な酵母細胞であ

る。ある実施形態において、酵母細胞は、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）に由来し得る。ある実施形態において、宿主細胞は、好適な哺乳動物細胞である。多くのタイプの哺乳類細胞が、ベクターを発現するために発達された。好適な哺乳類細胞としては、限定はされないが、ＨＥＫ２９３、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、マウス骨髄腫細胞、ＨｅＬａ、Ｕ２ＯＳ、Ａ５４９、ＨＴ１０８０、ＣＡＤ、Ｐ１９、ＮＩＨ　３Ｔ３、Ｌ９２９、Ｎ２ａ、ＭＣＦ－７、Ｙ７９、ＳＯ－Ｒｂ５０、ＨｅｐＧ　Ｇ２、ＤＩＫＸ－Ｘ１１、Ｊ５５８Ｌ、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）、及びニワトリ胚線維芽細胞（ＣＥＦ）が挙げられる。好適な宿主細胞は、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）においてさらに説明される。

【０２２０】

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

【０２２１】

ある実施形態において、ベクターは、バキュロウイルスベクター又は発現ベクターであり、昆虫細胞内でのポリヌクレオチド及び／又はタンパク質の発現に好適であり得る。培養された昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）内でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、ｐＡｃシリーズ（Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，１９８３．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２１５６－２１６５）及びｐＶＬシリーズ（Ｌｕｃｋｌｏｗ　ａｎｄ　Ｓｕｍｍｅｒｓ，１９８９．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１７０：３１－３９）が挙げられる。ｒＡＡＶ（組み換えアデノ随伴ウイルス）ベクターは、好ましくは、昆虫細胞、例えば、ツマジロクサヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）Ｓｆ９昆虫細胞内で生成され、無血清懸濁液培養物中で増殖される。無血清昆虫細胞は、商業的供給業者、例えば、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ（ＥＸ－ＣＥＬＬ　４０５）から購入され得る。

【０２２２】

ある実施形態において、ベクターは、哺乳動物発現ベクターである。ある実施形態において、哺乳動物発現ベクターは、哺乳動物細胞内で１つ以上のポリヌクレオチド及び／又

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

【０２２３】

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

【０２２４】

ある実施形態において、組み換え哺乳動物発現ベクターは、優先的に特定の細胞型（例えば、組織特異的調節要素は、核酸を発現させるのに使用される）の核酸の発現を指向することが可能である。組織特異的調節要素は、当該技術分野において公知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ系特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ ａｎｄ Ｅａｔｏｎ，１９８８．Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、Ｔ細胞受容体の特定のプロモーター（Ｗｉｎｏｔｏ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８９．ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３）及び免疫グロブリン（Ｂａｎｅｉｊｉ、ｅｔ ａｌ．，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０；Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）、神経特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター；Ｂｙｒｎｅ ａｎｄ Ｒｕｄｄｌｅ，１９８９．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄ，ｅｔ ａｌ．，１９８５．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、及び乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号明細書及び欧州特許出願公開第２６４，１６６号明細書）が挙げられる。発生調節プロモーター、例えば、マウスｈｏｘプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ ａｎｄ Ｇｒｕｓｓ、１９９０．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）及びα－フェトプロテインプロモーター（Ｃａｍｐｅｓ ａｎｄ Ｔｉｌｇｈｍａｎ、１９８９．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）も包含される。これらの原核生物及び真核生物ベクターに関連して、米国特許第６，７５０，０５９号明細書が言及され、その内容は、全体が参照により本明細書に援用される。他の実施形態は、ウイルスベクターを用いることができ、これに関して、米国特許出願第１３／０９２，０８５号明細書が言及され、その内容は、全体が参照により本明細書に援用される。組織特異的調節要素は、当該技術分野において公知であり、これに関して、米国特許第７，７７６，３２１号明細書が言及され、その内容は、全体が参照により本明細書に援用される。ある実施形態において、調節要素は、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステムの１つ以上の要素の発現を駆動するように、操作ＡＡＶカプシドシステムの１つ以上の要素に動作可能に結合され得る。

【０２２５】

ベクターは、原核生物又は原核細胞内で導入及び増殖され得る。ある実施形態において、原核生物は、真核細胞中に導入されるベクターのコピーを増幅するため、又は真核細胞中に導入されるベクターの産生における中間ベクターとして使用される（例えば、ウイルスベクターパッケージングシステムの一部としてプラスミドを増幅する）。ある実施形態

において、原核生物は、例えば、宿主細胞又は宿主生物への送達のために１つ以上のタンパク質の供給源を提供するために、ベクターのコピーを増幅し、１つ以上の核酸を発現するために使用される。

【０２２６】

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

【０２２７】

ある実施形態において、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドシステム又はｎ量体モチーフを含む他の組成物の１つ以上の要素の発現を駆動する１つ以上のベクターは、本明細書に記載される操作送達システムの要素の発現が、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドシステム又はｎ量体モチーフを含む他の組成物（限定はされないが、本明細書における他の箇所により詳細に記載される操作遺伝子導入剤粒子を含む）の形成を指向するように、宿主細胞中に導入される。例えば、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドシステム又はｎ量体モチーフを含む他の組成物の異なる要素がそれぞれ、別個のベクターにおける別個の調節要素に動作可能に結合され得る。本明細書に記載される操作送達システムの異なる要素のＲＮＡが、動物又は哺乳動物又はその細胞に送達されて、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドシステム又はｎ量体モチーフを含む他の組成物の１つ以上の要素を組み込むか又は本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドシステム又はｎ量体モチーフを含む他の組成物の１つ以上の要素を組み込むか及び／又は発現する１つ以上の細胞を含有する本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドシステム又はｎ量体モチーフを含む他の組成物の異なる要素を構成的に又は誘導的に又は調整的に発現する動物又は哺乳動物又はその細胞を生成し得る。

【０２２８】

ある実施形態において、同じか又は異なる調節要素から発現される要素の２つ以上が、

第１のベクターに含まれないシステムの任意の構成要素を提供する１つ以上のさらなるベクターとともに、単一のベクター中で組み合わされ得る。単一のベクター中で組み合わされる本発明の操作ポリヌクレオチドは、任意の好適な配向で配置され得、例えば、１つの要素が、第２の要素に対して５’側（「上流」）又は第２の要素に対して３’側（「下流」）に位置する。１つの要素のコード配列は、第２の要素のコード配列の同じ又は反対側の鎖に位置し、同じ又は反対方向に配向され得る。ある実施形態において、単一のプロモーターは、１つ以上のイントロン配列（例えば、異なるイントロンにおいてそれぞれ、少なくとも１つのイントロンにおいて２つ以上、又は単一のイントロンにおいて全て）内に埋め込まれた、本明細書に記載される１つ以上の操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドタンパク質又はｎ量体モチーフを含む他の組成物をコードする転写産物の発現を駆動する。ある実施形態において、本発明の操作ポリヌクレオチド（限定はされないが、操作ウイルスポリヌクレオチドを含む）は、同じプロモーターに動作可能に連結され、同じプロモーターから発現され得る。

【０２２９】

ベクターの特徴

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

【０２３０】

調節要素

実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチド及び／又はそのベクター（限定されないが、本発明の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチドなどを含む）は、ポリヌクレオチドに動作可能に結合され得る１つ以上の調節要素を含み得る。「調節要素」という用語は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、及び他の発現制御要素（例えば、転写終結シグナル、例えば、ポリアデニル化シグナル及びポリ－Ｕ配列）を含むことが意図される。このような調節要素は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）に記載される。調節要素は、多くのタイプの宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を指向するもの、及び特定の宿主細胞のみにおけるヌクレオチド配列（例えば、組織特異的調節配列）の発現を指向するものを含む。組織特異的プロモーターは、主に、対象とする所望の組織、例えば、筋肉、神経、骨、皮膚、血液、特定の器官（例えば、肝臓、膵臓）、又は特定の細胞型（例えば、リンパ球）における発現を指向し得る。調節要素はまた、時間依存的に、例えば、細胞周期依存的又は発生段階依存的に発現を指向することもあり、これはまた、組織又は細胞型特異的であっても又はなくてもよい。ある実施形態において、ベクターは、１つ以上のｐｏｌ ＩＩＩプロモーター（例えば、１、２、３、４、５、又はそれ以上のｐｏｌ ＩＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ ＩＩプロモーター（例えば、１、２、３、４、５、又はそれ以上のｐｏｌ ＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ Ｉプロモーター（例えば、１、２、３、４、５、又はそれ以上のｐｏｌ Ｉプロモーター）、又はそれらの組合せを含む。ｐｏｌ ＩＩＩプロモーター例としては、限定はされないが、Ｕ６及びＨ１プロモーターが挙げられる。ｐｏｌ ＩＩプロモーターの例としては、限定はされないが、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター（任意に、ＲＳＶエンハンサーとともに）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（任意に、ＣＭＶエンハンサーとともに）（例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ、４１：５２１－５３０（１９８５）を参照）、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、β－アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、及びＥＦ１αプロモ

ーターが挙げられる。エンハンサー要素、例えば、ＷＰＲＥ；ＣＭＶエンハンサー；ＨＴＬＶ－ＩのＬＴＲにおけるＲ－Ｕ５’セグメント（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，Ｖｏｌ．８（１），ｐ．４６６－４７２、１９８８）；ＳＶ４０エンハンサー；並びにウサギβ－グロビンのエクソン２及び３間のイントロン配列（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，Ｖｏｌ．７８（３），ｐ．１５２７－３１，１９８１）も、「調節要素」という用語によって包含される。

【０２３１】

ある実施形態において、調節配列は、米国特許第７，７７６，３２１号明細書、米国特許出願公開第２０１１／００２７２３９号明細書、及びＰＣＴ公開国際公開第２０１１／０２８９２９号パンフレットに記載される調節配列であり得、その内容は、全体が参照により本明細書に援用される。ある実施形態において、ベクターは、最小プロモーターを含有し得る。ある実施形態において、最小プロモーターは、Ｍｅｃｐ２プロモーター、ｔＲＮＡプロモーター、又はＵ６である。さらなる実施形態において、最小プロモーターは、組織特異的である。ある実施形態において、ベクターポリヌクレオチド、最小プロモーター及びポリヌクレオチド配列の長さは、４．４Ｋｂ未満である。

【０２３２】

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

【０２３３】

ある実施形態において、調節要素は、調節プロモーターであり得る。「調節プロモーター」は、構成的ではないが、時間的及び／又は空間的に調節された方式で遺伝子発現を指向するプロモーターを指し、組織特異的、組織選好的及び誘導性プロモーターを含む。ある実施形態において、調節プロモーターは、本明細書における他の箇所に上述される組織特異的プロモーターである。調節プロモーターは、調整プロモーター及び誘導性プロモーターを含む。ある実施形態において、調整プロモーターは、特定の細胞型で、特定の環境条件下で、及び／又は特定の発生段階中に、ポリヌクレオチドの発現を指向するために用いられ得る。好適な組織特異的プロモーターは、限定はされないが、肝臓特異的プロモーター（例えばＡＰＯＡ２、ＳＥＲＰＩＮ　Ａ１（ｈＡＡＴ）、ＣＹＰ３Ａ４、及びＭＩＲ１２２）、膵臓細胞プロモーター（例えばＩＮＳ、ＩＲＳ２、Ｐｄｘ１、Ａｌｘ３、Ｐｐｙ）、心臓特異的プロモーター（例えばＭｙｈ６（α　ＭＨＣ）、ＭＹＬ２（ＭＬＣ－２ｖ）、ＴＮＩ３（ｃＴｎｌ）、ＮＰＰＡ（ＡＮＦ）、Ｓｌｃ８ａ１（Ｎｃｘ１））、中枢神経系細胞プロモーター（ＳＹＮ１、ＧＦＡＰ、ＩＮＡ、ＮＥＳ、ＭＯＢＰ、ＭＢＰ、ＴＨ、ＦＯＸＡ２（ＨＮＦ３　β））、皮膚細胞特異的プロモーター（例えばＦＬＧ、Ｋ１４、ＴＧＭ３）、免疫細胞特異的プロモーター、（例えばＩＴＧＡＭ、ＣＤ４３プロモーター、ＣＤ１４プロモーター、ＣＤ４５プロモーター、ＣＤ６８プロモーター）、泌尿生殖器細胞特異的プロモーター（例えばＰｂｓｎ、Ｕｐｋ２、Ｓｂｐ、Ｆｅｒ１ｌ４）、内皮細胞特異的プロモーター（例えばＥＮＧ）、多能性及び胚性胚葉細胞特異的プロモーター（例えばＯｃｔ４、ＮＡＮＯＧ、合成Ｏｃｔ４、Ｔブラキウリ、ＮＥＳ、ＳＯＸ１７、ＦＯＸＡ２、ＭＩＲ１２２）、及び筋細胞特異的プロモーター（例えばデスミン）を含み得る。他の組織及び／又は細胞特異的プロモーターは、本明細書における他の箇所に記載され、当該技術分野において一般に公知であり得、本開示の範囲内である。

【０２３４】

誘導性／調整プロモーターは、正の誘導性／調整プロモーター（例えば、活性化された

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

【０２３５】

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

【０２３６】

構成的植物プロモーターは、植物の全て又はほぼ全ての発生段階の間の植物組織（「構成的発現」と呼ばれる）の全て又はほぼ全てにおいてそれが制御するオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を発現することが可能なプロモーターである。構成的プロモーターの１つの非限定的な例は、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーターである。異なるプロモーターは、様々な組織又は細胞型、又は異なる発生段階において、又は異なる環境条件に応答して、遺伝子の発現を指向し得る。特定の実施形態において、操作ＡＡＶカプシドシステム構成要素の１つ以上が、構成的プロモーターの制御下で発現され、例えば、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター問題選好プロモーターが、特定の植物組織、例えば葉若しくは根における血管細胞又は種子の特定の細胞における特定の細胞型において強化された発現を標的とするために用いられ得る。本発明の操作ＡＡＶカプシドシステム及び他の組成物において使用するための特定のプロモーターの例は、Ｋａｗａｍａｔａ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ ３８：７９２－８０３；Ｙａｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｊ １２：２５５－６５；Ｈｉｒｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９２）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２０：２０７－１８；Ｋｕｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９５）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２９：７５９－７２；及びＣａｐａｎａ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２５：６８１－９１に見出される。

【０２３７】

誘導性であり、遺伝子編集又は遺伝子発現の時空制御を可能にし得るプロモーターの例は、エネルギーの形態を使用し得る。エネルギーの形態は、限定はされないが音響エネルギー、電磁放射線、化学エネルギー及び／又は熱エネルギーを含み得る。誘導性システムの例としては、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Ｔｅｔ－Ｏｎ又はＴｅｔ－Ｏｆｆ）、小分子２ハイブリッド転写活性化システム（ＦＫＢＰ、ＡＢＡなど）、又は光誘導性システム（フィトクロム、ＬＯＶドメイン、又はクリプトクロム）、例えば、配列特異的に転写活性の変化を指向する光誘導性転写エフェクター（ＬＩＴＥ）が挙げられる。光誘導性システムの構成要素は、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステム又は本発明の他の組成物、光応答性シトクロムヘテロ二量体（例えば、シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ）由来）、及び転写活性化／抑制ドメインの１つ以上の要素を含み得る。ある実施形態において、ベクターは、ＰＣＴ公開国際公開第２０１４／０１８４２３号パンフレット及び米国特許出願公開第２０１５／０２９１９６６号明細書、同第２０１７／０１６６９０３号明細書、同第２０１９／０２０３２１２号明細書に

おいて示される誘導性ＤＮＡ結合タンパク質の１つ以上を含み得、これらの文献は、例えば、誘導性ＤＮＡ結合タンパク質及び使用方法の実施形態を記載し、本発明とともに使用するために適合され得る。

【０２３８】

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

【０２３９】

ある実施形態において、ベクター又はそのシステムは、特定の細胞構成要素又は細胞小器官への／中で本発明の操作ポリヌクレオチド（例えば、操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドポリヌクレオチド）を転座及び／又は発現することが可能な１つ以上の要素を含み得る。このような細胞小器官としては、限定はされないが、核、リボソーム、小胞体、ゴルジ体、葉緑体、ミトコンドリア、液胞、リソソーム、細胞骨格、細胞膜、細胞壁、ペルオキシソーム、中心小体などが挙げられる。

【０２４０】

選択可能マーカー及びタグ

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

【０２４１】

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

【０２４２】

好適な選択可能マーカー及びタグとしては、限定はされないが、親和性タグ、例えば、

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

【０２４３】

選択可能マーカー及びタグは、好適なリンカー、例えば、ＧＳ又はＧＧ程度から最大で（ＧＧＧＧＧ）$_3$（配列番号３５）又は（ＧＧＧＧＳ）$_3$（配列番号３４）のグリシン又はグリシンセリンリンカーを介して、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステム又は他の組成物及び／若しくはシステムの１つ以上の構成要素に動作可能に結合され得る。他の好適なリンカーが、本明細書における他の箇所に記載される。

【０２４４】

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

【０２４５】

無細胞ベクター及びポリヌクレオチド発現

ある実施形態において、本発明のｎ量体モチーフをコードするポリヌクレオチドは、無細胞インビトロシステムにおいてベクター又は好適なポリヌクレオチドから発現され得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドシステムの１つ以上の特徴をコードするポリヌクレオチドは、無細胞インビトロシステムにおいてベクター又は好適なポリヌクレオチドから発現され得る。言い換えると、ポリヌクレオチドは、インビトロで、転写され、

任意に翻訳され得る。インビトロ転写／翻訳システム及び適切なベクターは、当該技術分野において一般に公知であり、市販されている。一般に、インビトロ転写及びインビトロ翻訳システムは、細胞環境の外部で、ＲＮＡ及びタンパク質合成のそれぞれのプロセスを再現する。インビトロ転写のためのベクター及び好適なポリヌクレオチドは、Ｔ７、ＳＰ６、Ｔ３、ポリヌクレオチド又はベクターを転写するために適切なポリメラーゼによって認識され、作用され得るプロモーター調節配列を含み得る。

【０２４６】

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

【０２４７】

ベクターポリヌクレオチドのコドン最適化

本明細書における他の箇所に記載されるように、本発明のｎ多量体モチーフ及び／又は本明細書に記載される他のポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。ある実施形態において、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステムのポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。ある実施形態において、ｎ多量体、限定されないが、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステムの実施形態をコードする任意にコドン最適化されるポリヌクレオチドに加えて、本明細書に記載されるベクター（「ベクターポリヌクレオチド」）に含まれる１つ以上のポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。一般に、コドン最適化は、天然配列の少なくとも１つのコドン（例えば、約又は約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０超、若しくはそれ以上のコドン）を、天然アミノ酸配列を維持しながらその宿主細胞の遺伝子においてより高頻度で又は最も高頻度で使用されるコドンで置換することによって、対象とする宿主細胞内の強化された発現のために核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸の特定のコドンに対して特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用の差）は、多くの場合、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳の効率と相関し、これは、ひいては、特に、翻訳されるコドンの特性及び特定のトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存するものと考えられる。細胞内の選択されたｔＲＮＡの優位性は、一般に、ペプチド合成において最も高頻度で使用されるコドンの反映である。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づいて所与の生物における最適な遺伝子発現のために調整され得る。コドン使用表は、例えば、ｗｗｗ．ｋａｚｕｓａ．ｏｒｊｐ／ｃｏｄｏｎ／で入手可能な「コドン使用データベース」で容易に入手可能であり、これらの表は、いくつかの方法で適合され得る。Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｔａｂｕｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄａｔａｂａｓｅｓ：ｓｔａｔｕｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｙｅａｒ ２０００”Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）を参照されたい。

特定の宿主細胞内での発現のために特定の配列を最適化するコドンのコンピュータアルゴリズムも入手可能であり、例えば、Ｇｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ，ＰＡ）も入手可能である。ある実施形態において、ＤＮＡ／ＲＮＡ標的化Ｃａｓタンパク質をコードする配列における１つ以上のコドン（例えば、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、若しくはそれ以上、又は全てのコドン）は、特定のアミノ酸のための最も高頻度で使用されるコドンに対応する。酵母におけるコドン使用に関して、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｙｅａｓｔｇｅｎｏｍｅ．ｏｒｇ／ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ／ｃｏｄｏｎ＿ｕｓａｇｅ．ｓｈｔｍｌで利用可能なオンライン酵母ゲノムデータベース、又はＣｏｄｏｎ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ｉｎ ｙｅａｓｔ，Ｂｅｎｎｅｔｚｅｎ ａｎｄ Ｈａｌｌ，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．１９８２ Ｍａｒ ２５；２５７（６）：３０２６－３１が参照される。藻類を含む植物におけるコドン使用に関して、Ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｉｎ ｈｉｇｈｅｒ ｐｌａｎｔｓ，ｇｒｅｅｎ ａｌｇａｅ，ａｎｄ ｃｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉａ，Ｃａｍｐｂｅｌｌ ａｎｄ Ｇｏｗｒｉ，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１９９０ Ｊａｎ；９２（１）：１－１１．；並びにＣｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｉｎ ｐｌａｎｔ ｇｅｎｅｓ，Ｍｕｒｒａｙ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９８９ Ｊａｎ ２５；１７（２）：４７７－９８；又はＳｅｌｅｃｔｉｏｎ ｏｎ ｔｈｅ ｃｏｄｏｎ ｂｉａｓ ｏｆ ｃｈｌｏｒｏｐｌａｓｔ ａｎｄ ｃｙａｎｅｌｌｅ ｇｅｎｅｓ ｉｎ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｐｌａｎｔ ａｎｄ ａｌｇａｌ ｌｉｎｅａｇｅｓ，Ｍｏｒｔｏｎ ＢＲ、Ｊ Ｍｏｌ Ｅｖｏｌ．１９９８ Ａｐｒ；４６（４）：４４９－５９が参照される。

【０２４８】

ベクターポリヌクレオチドは、特定の細胞型、組織型、器官型、及び／又は対象型における発現のためにコドン最適化され得る。ある実施形態において、コドン最適化配列は、本明細書における他の箇所に記載されるように、真核生物、例えば、ヒト（すなわち、ヒト又はヒト細胞内での発現のために最適化される）において、又は別の真核生物、例えば、別の動物（例えば、哺乳動物又は鳥類）のための発現のために最適化される配列である。このようなコドン最適化配列は、本明細書における説明を考慮して当業者の技能の範囲内である。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、特定の細胞型のためにコドン最適化される。このような細胞型は、限定はされないが、上皮細胞（皮膚細胞、消化管の内側を覆う細胞、他の空洞器官の内側を覆う細胞を含む）、神経細胞（神経、脳細胞、脊柱細胞、神経支持細胞（例えば、星状膠細胞、グリア細胞、シュワン細胞など）、筋細胞（例えば、心筋、平滑筋細胞、及び骨格筋細胞）、結合組織細胞（脂肪及び他の軟組織充填細胞、骨細胞、腱細胞、軟骨細胞）、血液細胞、幹細胞及び他の前駆細胞、免疫系細胞、胚細胞、及びそれらの組合せを含み得る。このようなコドン最適化配列は、本明細書における説明を考慮して当業者の技能の範囲内である。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、特定の組織型のためにコドン最適化される。このような組織型は、限定はされないが、筋肉組織、結合組織、結合組織、神経組織、及び上皮組織を含み得る。このようなコドン最適化配列は、本明細書における説明を考慮して当業者の技能の範囲内である。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、特定の器官のためにコドン最適化される。このような器官としては、限定はされないが、筋肉、皮膚、腸、肝臓、脾臓、脳、肺、胃、心臓、腎臓、胆嚢、膵臓、膀胱、甲状腺、骨、血管、血液、及びそれらの組合せが挙げられる。このようなコドン最適化配列は、本明細書における説明を考慮して当業者の技能の範囲内である。

【０２４９】

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

【０２５０】

非ウイルスベクター及び担体

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

【０２５１】

裸のポリヌクレオチド

ある実施形態において、本明細書における他の箇所に記載される１つ以上の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド又は本発明の他のポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドに含まれ得る。本明細書において使用される際の専門用語「裸のポリヌクレオチド」は、多くの場合、環境因子及び／又は分解からそれを保護するのを助け得る別の分子（例えば、タンパク質、脂質、及び／又は他の分子）と結合されないポリヌクレオチドを指す。本明細書において使用される際、と結合される（ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｗｉｔｈ）は、限定はされないが、に結合される（ｌｉｎｋｅｄ　ｔｏ）、に付着される（ａｄｈｅｒｅｄ　ｔｏ）、に吸着される（ａｄｓｏｒｂｅｄ　ｔｏ）、に包まれる（ｅｎｃｌｏｓｅｄ　ｉｎ）、に若しくはその中に包まれる（ｅｎｃｌｏｓｅｄ　ｉｎ　ｏｒ　ｗｉｔｈｉｎ）、と混合される（ｍｉｘｅｄ　ｗｉｔｈ）などを含む。本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド又は本発明の他のポリヌクレオチドの１つ以上を含む裸のポリヌクレオチドは、宿主細胞に直接送達され、任意にそこで発現され得る。裸のポリヌクレオチドは、任意の好適な２次元及び３次元構造を有し得る。非限定的な例として、裸のポリヌクレオチドは、一本鎖分子、二本鎖分子、環状分子（例えば、プラスミド及び人工染色体）、一本鎖である部分及び二本鎖である部分を含む分子（例えば、リボザイム）などであり得る。ある実施形態において、裸のポリヌクレオチドは、本発明の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド又は他のポリヌクレオチドのみを含有する。ある実施形態において、裸のポリヌクレオチドは、本明細書における他の箇所に記載される操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド又は本発明の他のポリヌクレオチドに加えて、他の核酸及び／又はポリヌクレオチドを含有し得る。裸のポリヌクレオチドは、トランスポゾンシステムの１つ以上の要素を含み得る。トランスポゾン及びそのシステムは、本明細書における他の箇所により詳細に記載される。

【０２５２】

非ウイルスポリヌクレオチドベクター

ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド又は本発明の他のポリヌクレオチドの１つ以上が、非ウイルスポリヌクレオチドベクターに含まれ得る。好適な非ウイルスポリヌクレオチドベクターとしては、限定はされないが、トランスポゾンベクタ

ー及びベクター系、プラスミド、細菌人工染色体、酵母人工染色体、ＡＲ（抗生物質抵抗性）フリープラスミド及びミニプラスミド、共有結合性閉環状ベクター（例えば、ミニサークル、ミニベクター、ミニノット）、直鎖状共有結合性閉鎖型ベクター（「ダンベル形状」）、ＭＩＤＧＥ（最小限の免疫学的に定義された（ｍｉｎｉｍａｌｉｓｔｉｃ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ）遺伝子発現）ベクター、ＭｉＬＶ（マイクロ直鎖状ベクター）ベクター、ミニストリング（Ｍｉｎｉｓｔｒｉｎｇ）、ミニイントロンプラスミド、ＰＳＫシステム（分離後殺滅（ｐｏｓｔ－ｓｅｇｒｅｇａｔｉｏｎａｌｌｙ ｋｉｌｌｉｎｇ）システム）、ＯＲＴ（オペレーターリプレッサー滴定）プラスミド、などが挙げられる。例えば、Ｈａｒｄｅｅ ｅｔ ａｌ．２０１７．Ｇｅｎｅｓ．８（２）：６５を参照されたい。

【０２５３】

ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、調整複製起点を有し得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、ＯＲＴプラスミドであり得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、最小限の免疫学的に定義された遺伝子発現を有し得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、１つ以上の分離後殺滅システム遺伝子を有し得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、ＡＲフリーである。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、ミニベクターである。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、核局在シグナルを含む。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、１つ以上のＣｐＧモチーフを含み得る。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、１つ以上の足場／基質結合領域（Ｓ／ＭＡＲ）を含み得る。例えば、その技術及びベクターが、本発明において使用するために適合され得る、Ｍｉｒｋｏｖｉｔｃｈ ｅｔ ａｌ．１９８４．Ｃｅｌｌ．３９：２２３－２３２、Ｗｏｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１５．Ａｄｖ．Ｇｅｎｅｔ．８９：１１３－１５２を参照されたい。Ｓ／ＭＡＲは、核基質へのＤＮＡループ塩基結合によって染色体の空間的構成において役割を果たすＡＴリッチ配列である。Ｓ／ＭＡＲは、プロモーター、エンハンサー、及びＤＮＡ複製起点などの調節要素の近くに見られることが多い。１つ以上のＳ／ＭＡＲの包含は、娘細胞内のエピソームとして非ウイルスポリヌクレオチドベクターを維持する細胞周期につき一度（ｏｎｃｅ－ｐｅｒ－ｃｅｌｌ－ｃｙｃｌｅ）の複製を促進し得る。実施形態において、Ｓ／ＭＡＲ配列は、非ウイルスポリヌクレオチドベクターに含まれる活発に転写されたポリヌクレオチド（例えば、本発明の１つ以上の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド又は他のポリヌクレオチド又は分子）の下流に位置する。ある実施形態において、Ｓ／ＭＡＲは、β－インターフェロン遺伝子クラスターからのＳ／ＭＡＲであり得る。例えば、その技術及びベクターが、本発明において使用するために適合され得る、Ｖｅｒｇｈｅｓｅ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．４２：ｅ５３；Ｘｕ ｅｔ ａｌ．２０１６．Ｓｃｉ．Ｃｈｉｎａ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．５９：１０２４－１０３３；Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．２０１６．８：７０２－７１１；Ｋｏｉｒａｌａ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．８０１：７０３－７０９；及びＮｅｈｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．２００６．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０：２３３－２４４を参照されたい。

【０２５４】

ある実施形態において、非ウイルスベクターは、トランスポゾンベクター又はそのシステムである。本明細書において使用される際、「トランスポゾン」（転位性要素とも呼ばれる）は、ゲノムにおける位置を別の位置に移動することが可能なポリヌクレオチド配列を指す。いくつかのクラスのトランスポゾンがある。トランスポゾンは、レトロトランスポゾン及びＤＮＡトランスポゾンを含む。レトロトランスポゾンは、ポリヌクレオチドを、新たなゲノム又はポリヌクレオチドに転置するために、移動される（又は転置される）ポリヌクレオチドの転写を必要とする。ＤＮＡトランスポゾンは、ポリヌクレオチドを、新たなゲノム又はポリヌクレオチドに転置するために、移動される（又は転置される）ポリヌクレオチドの逆転写を必要としないものである。ある実施形態において、非ウイルス

ポリヌクレオチドベクターは、レトロトランスポゾンベクターであり得る。ある実施形態において、レトロトランスポゾンベクターは、長い末端反復を含む。ある実施形態において、レトロトランスポゾンベクターは、長い末端反復を含まない。ある実施形態において、非ウイルスポリヌクレオチドベクターは、ＤＮＡトランスポゾンベクターであり得る。ＤＮＡトランスポゾンベクターは、トランスポザーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含み得る。ある実施形態において、トランスポゾンベクターは、非自律性トランスポゾンベクターとして構成され、これは、転位が、それ自体で自然に起こらないことを意味する。これらの実施形態のいくつかにおいて、トランスポゾンベクターは、転位に必要なタンパク質をコードする１つ以上のポリヌクレオチド配列を欠く。ある実施形態において、非自律性トランスポゾンベクターは、１つ以上のＡｃ要素を欠く。

【０２５５】

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

【０２５６】

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

【０２５７】

化学的担体

ある実施形態において、本明細書に記載される本発明の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド又は他のポリヌクレオチド又は他の分子は、化学的担体に連結され得る。ポリヌクレオチドの送達に好適であり得る化学的担体は、大きく、以下のクラス：（ｉ）無機粒子、（ｉｉ）脂質ベース、（ｉｉｉ）ポリマーベース、及び（ｉｖ）ペプチドベースに分類され得る。それらは、（１ポリヌクレオチドと縮合複合体を形成し得るもの（本発明の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチドなど）、（２）特定の細胞を標的化することが可能であるもの、（３）宿主細胞の核又は細胞質への本発明のポリヌクレオチド又は他の分子の送達を増加させることが可能であるもの（操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチドなど）、（４）宿主細胞の細胞質におけるＤＮＡ／ＲＮＡから分解することが可能であるもの、及

び（５）持続又は制御放出が可能であるものに分類され得る。いずれか１つの所与の化学的担体が、複数のカテゴリーからの特徴を含み得ることが理解されるであろう。本明細書において使用される際の「粒子」という用語は、本明細書に記載される本発明の組成物（粒子、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、及び本明細書に記載される他の組成物を含む）の送達のための任意の好適なサイズの粒子を指す。好適なサイズは、マクロ－、マイクロ－、及びナノサイズの粒子を含む。

【０２５８】

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

【０２５９】

ある実施形態において、非ウイルス担体は、脂質ベースであり得る。好適な脂質ベースの担体も、本明細書においてより詳細に記載される。ある実施形態において、脂質ベースの担体は、送達されるポリヌクレオチド（例えば、本発明の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチドなど）における負電荷と結合するか又は他の形で相互作用することが可能なカチオン性脂質又は両親媒性脂質を含む。ある実施形態において、化学的非ウイルス担体システムは、ポリヌクレオチド（本発明の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド又は他の組成物又は分子など）及び脂質（カチオン性脂質など）を含み得る。これらは、当該技術分野においてリポプレックスとも呼ばれる。リポプレックスの他の実施形態は、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、非ウイルス脂質ベースの担体は、脂質ナノエマルジョンであり得る。脂質ナノエマルジョンは、別の安定化乳化剤中の非混和性液体の分散体によって形成され得、送達されるポリヌクレオチド（例えば、本発明の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド）を含有し得る脂質、水、及び界面活性剤から構成される約２００ｎｍの粒子を有し得る。ある実施形態において、脂質ベースの非ウイルス担体は、固体脂質粒子又はナノ粒子であり得る。

【０２６０】

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

【０２６１】

ある実施形態において、非ウイルス担体は、外部刺激、例えば、ｐＨ、温度、オスモル濃度、特定の分子又は組成物（例えば、カルシウム、ＮａＣｌなど）の濃度、圧力などに

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

【０２６２】

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

【０２６３】

ウイルスベクター

ある実施形態において、ベクターは、ウイルスベクターである。専門用語「ウイルスベクター」は、これに関して本明細書において使用される際、ポリヌクレオチド、例えば、本発明の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド、カーゴ、又は他の組成物若しくは分子を、ウイルス粒子へと発現及びパッケージングし、単独で又は１つ以上の他のウイルスベクター（ウイルスベクター系などにおけるように）とともに使用されるとき、前記ウイルス粒子を生成することが可能なウイルスの１つ以上の要素からの又はそれに基づく１つ以上の要素を含有するポリヌクレオチドベースのベクターを指す。ウイルスベクター及びそのシステムは、本明細書に記載される本発明の１つ以上の組成物（、限定はされないが、任意のウイルス粒子及び関連するカーゴを含む）の送達及び／又は発現及び／又は生成のためにウイルス粒子を産生するために使用され得る。ウイルスベクターは、複数のベクターを含むウイルスベクター系の一部であり得る。ある実施形態において、複数のウイルスベクターを組み込むシステムは、これらのシステムの安全性を高め得る。好適なウイルスベクターは、アデノウイルスベースのベクター、アデノ随伴ベクター、ヘルパー依存性アデノウイルス（ＨｄＡｄ）ベクター、ハイブリッドアデノウイルスベクターなどを含み得る。ウイルスベクター及びそれから生成されるウイルス粒子の他の実施形態は、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、ウイルスベクターは、これらのシステムの改善された安全性のために複製能力のないウイルス粒子を生成するように構成される。

【０２６４】

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

ある実施形態において、ベクターは、アデノウイルスベクターであり得る。ある実施形態において、アデノウイルスベクターは、ベクター又はそのシステムを用いて生成されたウイルス粒子が、血清型２、５、又は９であり得るような要素を含み得る。ある実施形態において、アデノウイルス粒子を介して送達されるポリヌクレオチドは、最大で約８ｋｂであり得る。したがって、ある実施形態において、アデノウイルスベクターは、約０．００１ｋｂ～約８ｋｂのサイズの範囲であり得る、送達されるＤＮＡポリヌクレオチドを含み得る。アデノウイルスベクターは、いくつかの状況において上首尾に使用されている（例えば、Ｔｅｒａｍａｔｏ ｅｔ ａｌ．２０００．Ｌａｎｃｅｔ．３５５：１９１１－１９１２；Ｌａｉ ｅｔ ａｌ．２００２．ＤＮＡ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２１：８９５－９１３；Ｆｌｏｔｔｅ ｅｔ ａｌ．，１９９６．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ．Ｔｈｅｒ．７：１１４５－１１５９；及びＫａｙ ｅｔ ａｌ．２０００．Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．２４：２５７－２６１を参照。操作ＡＡＶカプシドは、前記操作ＡＡＶカプシドを含有するアデ

ノウイルス粒子を生成するために、アデノウイルスベクターに含まれ得る。

【０２６５】

ある実施形態において、ベクターは、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター又はそのシステムであり得る。これらは、当該技術分野において「ガットレス（ｇｕｔｌｅｓｓ）」又は「ガッテド（ｇｕｔｔｅｄ）」ベクターとも呼ばれ、アデノウイルスベクターの修飾世代である（例えば、Ｔｈｒａｓｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．２００６．Ｎａｔｕｒｅ．４４３：Ｅ５－７を参照）。ヘルパー依存性アデノウイルスベクター系の実施形態において、１つのベクター（ヘルパー）が、複製に必要な全てのウイルス遺伝子を含有し得るが、パッケージングドメインにおける条件遺伝子欠陥を含有する。システムの第２のベクターは、ウイルスゲノムの末端、１つ以上の操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド、及び天然のパッケージング認識シグナルのみを含有し得、これは、細胞からの選択的なパッケージングされた放出を可能にし得る（例えば、Ｃｉｄｅｃｉｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．２００９．Ｎ Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ．３６１：７２５－７２７を参照）。ヘルパー依存性アデノウイルスベクター系が、いくつかの状況において遺伝子送達に成功している（例えば、Ｓｉｍｏｎｅｌｌｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１０．Ｊ Ａｍ Ｓｏｃ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１８：６４３－６５０；Ｃｉｄｅｃｉｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．２００９．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．３６１：７２５－７２７；Ｃｒａｎｅ　ｅｔ　ａｌ．２０１２．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１９（４）：４４３－４５２；Ａｌｂａ　ｅｔ　ａｌ．２００５．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１２：１８－Ｓ２７；Ｃｒｏｙｌｅ　ｅｔ　ａｌ．２００５．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１２：５７９－５８７；Ａｍａｌｆｉｔａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．１９９８．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：９２６－９３３；及びＭｏｒｒａｌ　ｅｔ　ａｌ．１９９９．ＰＮＡＳ．９６：１２８１６－１２８２１を参照）。これらの刊行物に記載される技術及びベクターは、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチドの包含及び送達のために適合され得る。ある実施形態において、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター又はそのシステムから生成されたウイルス粒子を介して送達されるポリヌクレオチドは、最大で約３８ｋｂであり得る。したがって、ある実施形態において、アデノウイルスベクターは、約０．００１ｋｂ～約３７ｋｂのサイズの範囲であり得る、送達されるＤＮＡポリヌクレオチドを含み得る（例えば、Ｒｏｓｅｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．２０１１．Ｊ．Ｇｅｎｅｔ．Ｓｙｎｄｒ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．Ｓｕｐｐｌ．５：００１を参照）。

【０２６６】

ある実施形態において、ベクターは、ハイブリッドアデノウイルスベクター又はそのシステムである。ハイブリッドアデノウイルスベクターは、遺伝子欠失アデノウイルスベクターの高い形質導入効率並びにアデノ随伴、レトロウイルス、レンチウイルス、及びトランスポゾンベースの遺伝子導入の長期ゲノム組み込み可能性から構成される。ある実施形態において、このようなハイブリッドベクター系は、安定した形質導入及び限られた組み込み部位をもたらし得る。例えば、Ｂａｌａｇｕｅ　ｅｔ　ａｌ．２０００．Ｂｌｏｏｄ．９５：８２０－８２８；Ｍｏｒｒａｌ　ｅｔ　ａｌ．１９９８．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．９：２７０９－２７１６；Ｋｕｂｏ　ａｎｄ　Ｍｉｔａｎｉ．２００３．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７７（５）：２９６４－２９７１；Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．２０１３．ＰｌｏＳ Ｏｎｅ．８（１０）ｅ７６７７１；及びＣｏｏｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．２０１５．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２３（４）：６６７－６７４）を参照されたい。これらの文献に記載されるその技術及びベクターが、本発明の操作ＡＡＶカプシドシステムにおいて使用するために修飾及び適合され得る。ある実施形態において、ハイブリッドアデノウイルスベクターは、レトロウイルス及び／又はアデノ随伴ウイルスの１つ以上の特徴を含み得る。ある実施形態において、ハイブリッドアデノウイルスベクターは、スプマレトロウイルス又は泡沫状ウイルス（ＦＶ）の１つ以上の特徴を含み得る。例えば、Ｅｈｒｈａｒｄｔ　ｅｔ　ａｌ．２００７．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１５：１４６－１５６及びＬｉｕ　ｅｔ　ａｌ．２００７．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１５：１８３４－１８４１を参照されたい。これらの文献に記載されるその技術及びベクターが、本発明の操作ＡＡＶカプシドシステムにおいて使用するために修飾及び適合され得る。ハイブリッドアデノウイルスベクター又はそのシステ

ムにおいてＦＶからの１つ以上の特徴を使用する利点は、広範囲の細胞を感染させるそれから生成されたウイルス粒子の能力、他のレトロウイルスとして大きなパッケージング容量、及び静止（非分裂）細胞内で持続する能力を含み得る。例えば、Ｅｈｒｈａｒｄｔ ｅｔ ａｌ．２００７．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１５６：１４６－１５６及びＳｈｕｊｉ ｅｔ ａｌ．２０１１．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１９：７６－８２も参照されたい。これらの文献に記載されるその技術及びベクターが、本発明の操作ＡＡＶカプシドシステムにおいて使用するために修飾及び適合され得る。

【０２６７】

アデノ随伴ベクター

一実施形態において、操作ベクター又はそのシステムは、アデノ随伴ベクター（ＡＡＶ）であり得る。例えば、Ｗｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６０：３８－４７（１９８７）；米国特許第４，７９７，３６８号明細書；国際公開第９３／２４６４１号パンフレット；Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３－８０１（１９９４）；及びＭｕｚｙｃｚｋａ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：１３５１（１９９４）を参照されたい。それらの特徴のいくつかがアデノウイルスベクターと同様であるが、ＡＡＶは、それらの複製及び／又は病原性のいくらかの欠損を有し、したがって、アデノウイルスベクターより安全であり得る。ある実施形態において、ＡＡＶは、観察可能な副作用を伴わずに、ヒト細胞の１９番染色体における特定の部位に統合し得る。ある実施形態において、ＡＡＶベクター、そのシステム、及び／又はＡＡＶ粒子の容量は、最大で約４．７ｋｂであり得る。ＡＡＶベクター又はそのシステムは、本明細書に記載される１つ以上の操作カプシドポリヌクレオチドを含み得る。

【０２６８】

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

【０２６９】

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

【０２７０】

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

【０２７１】

ＡＡＶベクター又はそのシステムは、特定の血清型を有するＡＡＶ粒子を生成するように構成され得る。ある実施形態において、血清型は、ＡＡＶ－１、ＡＡＶ－２、ＡＡＶ－３、ＡＡＶ－４、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－６、ＡＡＶ－８、ＡＡＶ－９又はそれらの任意の組合せであり得る。ある実施形態において、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ－２、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－９又はそれらの任意の組合せであり得る。標的とされる細胞に関してＡＡＶのＡＡＶを選択することができ；例えば、脳及び／又は神経細胞を標的化するためにＡＡ

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

【０２７２】

異なる血清型が、あるレベルの細胞、組織、及び／又は器官特異性を提供し得る一方、各血清型は依然として多栄養性であり、したがって、血清型が形質導入する際に効率が低い組織を標的とするために当該血清型を使用する場合、組織毒性をもたらし得ることが理解されるであろう。したがって、特定の血清型のＡＡＶを選択することによって、いくらかの組織標的化能力を達成することに加えて、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドによってＡＡＶ血清型の指向性が修飾され得ることが理解されるであろう。本明細書における他の箇所に記載されるように、任意の血清型の野生型ＡＡＶの変異体は、本明細書に記載される方法によって生成され、特定の細胞特異的指向性を有することが決定され得、これは、参照野生型ＡＡＶ血清型のものと同じか又は異なり得る。ある実施形態において、野生型血清型の細胞、組織、及び／又は特異性は強化され得る（例えば、血清型がそれに対して既にバイアスされた特定の細胞型に対してより選択的又は特異的にされた）。例えば、野生型ＡＡＶ－９は、ヒトにおける筋肉及び脳に対してバイアスされる（例えば、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ．２０１７．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｖｉｒｏｌ．２１：７５－８０を参照）。本明細書に記載される野生型ＡＡＶ－９の操作ＡＡＶカプシド及び／又はカプシドタンパク質変異体を含むことによって、例えば、脳に対するバイアスが低下されるか又はなくされ得、及び／又は筋特異性が、脳特異性が比較して低下されるようであるように増加し、したがって、野生型ＡＡＶ－９と比較して、筋に対する特異性を強化する。上述されるように、野生型ＡＡＶ血清型の操作カプシド及び／又はカプシドタンパク質変異体の包含は、野生型参照ＡＡＶ血清型と異なる指向性を有し得る。例えば、ＡＡＶ－９の操作ＡＡＶカプシド及び／又はカプシドタンパク質変異体は、ヒトにおける筋肉又は脳以外の組織に対する特異性を有し得る。

【０２７３】

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

とが理解されるであろう。

【０２７４】

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

【０２７５】

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

【表１】

表１

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

【０２７６】

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

【０２７７】

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

【０２７８】

ベクター構築

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

【０２７９】

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

【０２８０】

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

【０２８１】

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

【０２８２】

ウイルスベクターからのウイルス粒子生成

ＡＡＶ粒子生成

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

【０２８３】

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

【０２８４】

ベクター及びウイルス粒子送達

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

【０２８５】

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

【０２８６】

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

【０２８７】

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

【０２８８】

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

【０２８９】

粒子を介した細胞への操作ＡＡＶカプシドシステム構成要素（例えば、操作ＡＡＶカプシド及び／又はカプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチド）の送達。本明細書において使用される際の「粒子」という用語は、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステム構成要素の送達のための任意の好適なサイズの粒子を指す。好適なサイズは、マ

クロー、マイクロー、及びナノサイズの粒子を含む。ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドシステム構成要素（例えば、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、及びそれらの組合せ）のいずれかが、本明細書に記載される１つ以上の粒子又はその構成要に結合され、連結され、それと統合され、他の形で会合され得る。次に、本明細書に記載される粒子は、適切な経路及び／又は技術によって、細胞又は生物に投与され得る。ある実施形態において、粒子送達は、ポリヌクレオチド又はベクター構成要素の送達のために選択され、そのような送達に有利であり得る。実施形態において、粒子送達はまた、本明細書における他の箇所に記載される他の層さカプシドシステム分子及び製剤に有利であり得ることが理解されるであろう。

【０２９０】

操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドを含む操作ウイルス粒子

本明細書における他の箇所により詳細に記載される操作ウイルスカプシド（例えば、ＡＡＶカプシド、「操作ＡＡＶカプシド」と呼ばれる）を含有し得る操作ウイルス粒子（本明細書及び本明細書における他の箇所において「操作ウイルス粒子」とも呼ばれる）も、本明細書に記載される。操作ＡＡＶ粒子が、上述される少なくとも１つの操作ＡＡＶカプシドタンパク質を含有するアデノウイルスベースの粒子、ヘルパーアデノウイルスベースの粒子、ＡＡＶベースの粒子、又はハイブリッドアデノウイルスベースの粒子であり得ることが理解されるであろう。操作ＡＡＶカプシドは、本明細書における他の箇所に記載されるように１つ以上の操作ＡＡＶカプシドタンパク質を含有するものである。ある実施形態において、操作ＡＡＶ粒子は、本明細書に記載される１～６０個の操作ＡＡＶカプシドタンパク質を含み得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶ粒子は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、又は６０個の操作カプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶ粒子は、０～５９個の野生型ＡＡＶカプシドタンパク質を含有し得る。ある実施形態において、操作ＡＡＶ粒子は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、又は５９個の野生型ＡＡＶカプシドタンパク質を含有し得る。したがって、操作ＡＡＶ粒子は、上述されるように１つ以上のｎ量体モチーフを含み得る。

【０２９１】

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

【０２９２】

カーゴポリヌクレオチド

カーゴはまた、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、カーゴは、操作ウイルス粒子にパッケージングされ得、その後、細胞に送達され得るカーゴポリヌクレオチドである。ある実施形態において、送達は、筋特異的である。操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドポリヌクレオチド、他のウイルス（例えば、ＡＡＶ）ポリヌクレオチド、及び／又はベクターポリヌクレオチドは、１つ以上のカーゴポリヌクレオチドを含有し得る。ある実施形態において、１つ以上のカーゴポリヌクレオチドは、操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドポリヌクレオチドに動作可能に結合され得、本発明のウイルス（例えば、ＡＡＶ）システムの操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）ゲノムの一部であり得る。カーゴポリヌクレオチドは、操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）粒子にパッケー

ジングされ得、これは、例えば、細胞に送達され得る。ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、それが送達される細胞のポリヌクレオチド（例えば、遺伝子又は転写産物）を修飾することが可能であり得る。本明細書において使用される際、「遺伝子」は、染色体上の特定の位置を占有し、生物における特性又は特質のための遺伝的指令を含むＤＮＡの配列に対応する遺伝的単位を指し得る。遺伝子という用語は、ゲノムの翻訳及び／又は非翻訳領域を指し得る。「遺伝子」は、ポリペプチドへと翻訳され、又は限定はされないが、ｔＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、長鎖非コードＲＮＡ及びｓｈＲＮＡを含む触媒ＲＮＡ分子であり得るＲＮＡ転写産物へと転写されるＤＮＡの特定の配列を指し得る。ポリヌクレオチド、遺伝子、転写産物などの修飾は、限定はされないが、遺伝子編集並びに従来の組み換え遺伝子改変技術（例えば、全体的又は部分的な遺伝子挿入、欠失、及び変異誘発（例えば、挿入及び欠失変異誘発）技術を含む全ての遺伝子組み換え技術を含む。

【０２９３】

ある実施形態において、カーゴ分子は、ワクチンであるか又はそれをコードし得るポリヌクレオチドである。ある実施形態において、ワクチンは、癌に対する免疫応答を刺激し得る。ある実施形態において、ワクチンは、大腸癌又は膵臓癌に対する免疫応答を刺激し得る。ある実施形態において、ワクチンは、ｈＣＧ産生癌細胞などのｈＣＧ産生細胞にとって不安定な環境を創出し得る。

【０２９４】

遺伝子組み換えカーゴポリヌクレオチド

ある実施形態において、カーゴ分子は、単独で又はシステムの一部として送達される場合、システムの他の構成要素とともに送達されるか否かにかかわらず、それが送達される細胞のゲノム、エピゲノム、及び／又はトランスクリプトームを修飾するように作用し得るポリヌクレオチド又はポリペプチドであり得る。このようなシステムとしては、限定はされないが、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムが挙げられる。他の遺伝子組み換えシステム、例えば、ＴＡＬＥＮ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、Ｃｒｅ－Ｌｏｘ、モルホリノなどは、１つ以上の構成要素が、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）粒子によって送達され得る遺伝子組み換えシステムの他の非限定的な例である。

【０２９５】

ある実施形態において、カーゴ分子は、遺伝子編集システム又はその構成要素である。ある実施形態において、カーゴ分子は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子又はその構成要素である。ある実施形態において、カーゴ分子は、遺伝子組み換えシステム（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムなど）の１つ以上の構成要素をコードするポリヌクレオチドである。ある実施形態において、カーゴ分子は、ｇＲＮＡである。

【０２９６】

ある実施形態において、カーゴ分子は、単独で又はシステムの一部として送達される場合、システムの他の構成要素とともに送達されるか否かにかかわらず、それが筋肉又は骨格障害、神経疾患若しくは障害、及び／又はウイルス（一本鎖ＲＮＡウイルスなど）の疾患、障害、又はその症状を処置又は予防するように、それが送達される細胞のゲノム、エピゲノム、及び／又はトランスクリプトームを修飾するように作用し得るポリヌクレオチド又はポリペプチドであり得る。ある実施形態において、カーゴ分子は、システムの他の構成要素とともに送達されるか否かにかかわらず、それが早老性疾患（例えば早老性ラミノパシー）、糖原病、免疫障害（自己免疫疾患など）、癌、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、６肢帯型筋ジストロフィー疾患（ＬＧＭＤ）、シャルコー・マリー・トゥース病（ＣＭＴ）、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ、ポンペ病、又は他のＣＮＳ関連疾患、例えば、ハンチントン病及び他のリピート伸長病を処置又は予防するように、それが送達される細胞のゲノム、エピゲノム、及び／又はトランスクリプトームを修飾するように作用する。

【０２９７】

ある実施形態において、カーゴ分子は、システムの他の構成要素とともに送達されるか否かにかかわらず、内容が全体として本明細書に表されているかのように参照により援用

され、本発明との使用に適応され得る米国特許出願公開第２０１９０２８４５５５号明細書に記載されるもののいずれかなどのＧＡＡ遺伝子を修飾することができるように、それが送達される細胞のゲノム、エピゲノム、及び／又はトランスクリプトームを修飾するように作用する。

【０２９８】

ある実施形態において、カーゴ分子は、ＭＨＣＫ７、ＣＫ８、又は他の筋特異的プロモーターに連結されたオリゴヌクレオチドを含む。

【０２９９】

ある実施形態において、カーゴ分子は、タンパク質機能性のために最適化されたジストロフィン遺伝子の選択された領域のみを含むマイクロジストロフィンオリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、選択された領域は、スペクトリン様リピート１、２、３、及び２４を含む。例えば、Ｈａｒｐｅｒ ＳＱ，Ｈａｕｓｅｒ ＭＡ，ＤｅｌｌｏＲｕｓｓｏ Ｃ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｄｕｌａｒ ｆｌｅｘｉｂｉｌｉｔｙ ｏｆ ｄｙｓｔｒｏｐｈｉｎ：ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｄｕｃｈｅｎｎｅ ｍｕｓｃｕｌａｒ ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ．Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００２；８（３）：２５３－２６１を参照されたい。ある実施形態において、マイクロジストロフィンオリゴヌクレオチドは、臨床試験ＮＣＴ０３３７５１６４及びＮＣＴ０３７６９１１６に供されている、ＡＡＶｒｈ７４．ＭＨＣＫ７マイクロジストロフィン遺伝子又はＳＲＰ－９００１として知られているｒＡＡＶ剤によって送達される。このマイクロジストロフィン遺伝子構築物は、ＮＴ－Ｈ１－Ｒ１－Ｒ２－Ｒ３－Ｈ２－Ｒ２４－Ｈ４－ＣＲ－ＣＴを含む。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ＡＢＤ－Ｈ１－Ｒ１－Ｒ２－Ｒ３－Ｈ２－Ｒ２４－Ｈ４－ＣＲ－ＣＴを含む。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ヒンジ領域を表すＨを含む。Ｅｎｇｌａｎｄ ＳＢ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．１９９０；３４３（６２５４）：１８０－１８２；Ｗｅｌｌｓ ＤＪ，ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ．１９９５；４（８）：１２４５－１２５０，Ｓａｌｖａ ＭＺ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００７；１５（２）：３２０－３２９；Ｍｅｎｄｅｌｌ ＪＲ，ｅｔ ａｌ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ Ｌｅｔｔ．２０１２；５２７（２）：９０－９９；Ｒｏｄｉｎｏ－Ｋｌａｐａｃ ＬＲ，ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ．２０１３；２２（２４）：４９２９－４９３７；Ｖｅｌａｚｑｕｅｚ ＶＭ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．２０１７；４：１５９－１６８；Ｈａｒｐｅｒ ＳＱ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００２；８（３）：２５３－２６１；Ｎｅｌｓｏｎ ＤＭ，ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ．２０１８；２７（１２）：２０９０－２１００。ある実施形態において、選択された領域は、スペクトリン様リピート２及び３を少なくとも含む。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ｎＮＯＳドメインを含む。ある実施形態において、ｎＮＯＳドメインは、スペクトリン様リピート１６及び／又は１７から構成される。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、スペクトリン様リピート１６及び１７を含む。ある実施形態において、ｎＮＯＳドメインは、スペクトリン様リピートＲ１、Ｒ１６、Ｒ１７、Ｒ２３、及びＲ２４から構成される。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、筋特異的プロモーターに連結される。ある実施形態において、マイクロジストロフィンオリゴヌクレオチドは、ＭＨＣＫ７、ＣＫ８、ＳＮＰ１８、ＳＰ００３３、ＳＰ００５１、ＳＰ０１７３、ｔｍＣＫ、又は別の筋特異的プロモーターに連結される。

【０３００】

ある実施形態において、カーゴマイクロジストロフィンは、ＡＢＤ（アクチン結合ドメイン）、１つ以上のヒンジ領域（例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｈ４）、及び１つ以上のスペクトリン様リピート（例えばＲ１、Ｒ１’ Ｒ２、Ｒ３、Ｒ１６、Ｒ１７、Ｒ２０、Ｒ２１、Ｒ２２、Ｒ２３、Ｒ２４、Ｒ２４’及び任意にジストログリカン結合ドメイン（ＤＢＤ）を含む。ある実施形態において、マイクロジストロフィンは、ＡＢＤ－Ｈ１－Ｒ１－Ｒ１６－Ｒ１７－Ｒ２３－Ｒ２４－Ｈ４－ＤＢＤから構成される。ある実施形態におい

て、マイクロジストロフィンは、ＡＢＤ－Ｈ１－Ｒ１－Ｒ２－Ｒ３－Ｈ２－Ｒ２４－Ｈ４－ＣＲから構成される。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ＡＢＤ－Ｈ１－Ｒ１－Ｒ２－Ｒ３－Ｈ２－Ｒ２４－Ｈ４－ＣＲ－ＣＴを含む。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ＡＢＤ－Ｈ１－Ｒ１’－Ｒ２４’－Ｈ４－ＣＲ－ＣＴを含む。

【０３０１】

ある実施形態において、カーゴ分子は、マイクロジストロフィン遺伝子をコードし得るポリヌクレオチドであり、マイクロジストロフィン遺伝子は、スペクトリン様リピート、Ｒ１、Ｒ１６、Ｒ１７、Ｒ２３及びＲ２４を含有する。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ヒンジ領域（Ｈ）４及び／又はＨ１を含有する。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、Ｎ末端アクチン結合ドメインを含有する。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ヒト完全長ジストロフィンタンパク質のＣ末端ジストログリカン結合ドメインを含有する。マイクロジストロフィン遺伝子は、ｎＮＯＳドメインを含有し得る。ある実施形態において、ｎＮＯＳドメインは、スペクトリン様リピート１６及び／又は１７から構成される。ある実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、スペクトリン様リピート１６及び１７を含む。マイクロジストロフィン遺伝子は、全体として本明細書に表されているかのように参照により援用され、本発明との使用に適応され得る、国際公開第２０１９１１８８０６Ａ１号パンフレット及び国際公開第２０１６／１１５５４３号パンフレットに記載されるとおりであり得る。ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、ヒト完全長ジストロフィンタンパク質の、Ｎ末端からＣ末端へと、Ｎ末端アクチン結合ドメイン、ヒンジ領域１（Ｈｌ）、スペクトリン様リピートＲｌ、Ｒ１６、Ｒ１７、Ｒ２３、及びＲ２４、ヒンジ領域４（Ｈ４）、並びにＣ末端ジストログリカン結合ドメインを含有する５－リピートマイクロジストロフィンタンパク質をコードし得る。この５－リピートマイクロジストロフィン及び関連するジストロフィンミニ遺伝子のタンパク質配列は、国際公開第２０１６／１１５５４３号パンフレットに記載されている。ある実施形態において、カーゴポリヌクレオチドは、現在、識別番号ＮＣＴ０３３６８７４２を有する臨床試験中のＳＧＴ００１として知られている薬剤の一部であるマイクロジストロフィン遺伝子に対応し得る。

【０３０２】

ある実施形態において、カーゴ分子は、ミニジス遺伝子又はベクターである。ある実施形態において、ミニジス遺伝子又はベクターは、ＡＢＤ－Ｈ１－Ｒ１－Ｒ２－Ｒ３－Ｒ１６－Ｒ１７－Ｈ３－Ｒ２０－Ｒ２１；ＡＢＤ－Ｈ１－Ｒ１－Ｒ２－Ｒ３－Ｒ１６－Ｒ１７－Ｈ３－Ｒ２０－Ｒ２１－Ｒ２２－Ｒ２３－Ｒ２４－Ｈ４－ＣＲ；又はＨ３－Ｒ２０－Ｒ２１－Ｒ２２－Ｒ２３－Ｒ２４－Ｈ４－ＣＲ－ＣＴから構成され得る。

【０３０３】

ある実施形態において、カーゴ分子は、ＳＣＧＢ　ｃＤＮＡである。ある実施形態において、ＳＧＣＢ　ｃＤＮＡは、ＭＨＣＫ７、ＣＫ８プロモーター、ＳＮＰ１８プロモーター、ＳＰ００３３プロモーター、ＳＰ００５１、ＳＰ０１７３プロモーター、ｔｍＣＫプロモーター又は別の筋特異的プロモーターに連結される。ある実施形態において、カーゴ分子は、β－サルコグリカンｃＤＮＡ、α－サルコグリカンｃＤＮＡ、ジスフェリンｃＤＮＡ、γ－サルコグリカンｃＤＮＡ、カルピン－３　ｃＤＮＡ、ＳＧＳＨ　ｃＤＮＡ（例えば、ＬＹＳ－ＳＡＦ３０２）、ニューロトロピン３　ｃＤＮＡ、アノクタミン－５　ｃＤＮＡ、又はそれらの任意の組合せである。

【０３０４】

ある実施形態において、カーゴ分子は、システムの他の構成要素とともに送達されるか否かにかかわらず、ハンチントン病などのリピート伸長病に関連する遺伝子又は遺伝子産物、例えば、内容が全体として本明細書に表されているかのように参照により援用され、本発明との使用に適応され得る、米国特許出願公開第２０１９０１００７５５号明細書、米国特許第１００６６２２８号明細書に記載されるものを処置、予防、及び／又は修飾するように、それが送達される細胞のゲノム、エピゲノム、及び／又はトランスクリプトー

ムを修飾するように作用する。

【０３０５】

ある実施形態において、カーゴ分子は、アンチセンスオリゴマー又はＲＮＡ分子、例えば、内容が全体として本明細書に表されているかのように参照により援用され、本発明との使用に適応され得る、米国特許出願公開第２０１６０２５１３９８号明細書、米国特許出願公開第２０１５０２６７２０２号明細書、米国特許出願公開第２０１９００１５４４０号明細書、米国特許出願公開第２０１４０２８７９８３号明細書、米国特許出願公開第２０１８０２１６１１１号明細書、国際公開第２０１７／０６２８３５号パンフレット、米国特許出願公開第２０１９０１７７７２３号明細書、米国特許出願公開第２０１７００５１２７８号明細書、米国特許出願公開第２０１８０２７１８９３号明細書、国際公開第２０１６／１４９６５号パンフレット、米国特許第１００７６５３６号明細書、国際公開第２０１８／００５８０号パンフレット、国際公開第２０１８／１１８６６号パンフレット、国際公開第２０１９／０５９９７３号パンフレットに記載されるものである。

【０３０６】

ある実施形態において、カーゴ分子は、システムの他の構成要素とともに送達されるか否かにかかわらず、それが一本鎖ＲＮＡウイルス、例えば、インフルエンザ、ウエストナイルウイルス、ＳＡＲＳ、Ｃ型肝炎、デング熱、エボラ、マールブルグ、及び／又はカリシウイルスを処置又は予防するように、それが送達される細胞のゲノム、エピゲノム、及び／又はトランスクリプトームを修飾するように作用する。ある実施形態において、カーゴ分子は、アンチセンス抗ウイルス化合物、例えば、内容が全体として本明細書に表されているかのように参照により援用され、本発明との使用に適応され得る米国特許第８７０３７３５Ｂ２号明細書に記載されるもののいずれかであり得る。

【０３０７】

さらなる、本明細書に記載されるカーゴ分子によって修飾することが可能な例示的な遺伝的及び遺伝子関連疾患及び遺伝子は、本明細書における他の箇所に列挙されており、例えば、表５～６を参照されたい。

【０３０８】

ある実施形態において、カーゴ分子は、ＧＡＬＧＴ２遺伝子を付加又は修飾し得る。欠損ジストロフィンを補給するように作用する代わりに、ＧＡＬＧＴ２遺伝子治療は、疾患において変異も欠損もしていないタンパク質の発現を増加させることによって、ジストロフィンの非存在を補う方法で筋肉の構造的完全性を強化する。ＧＡＬＧＴ２は、特定のジストロフィン変異にかかわらず、ＤＭＤを処置する可能性をもたらし、また、他の筋ジストロフィーにおける実用性を有する。

【０３０９】

ある実施形態において、カーゴ分子は、内容が全体として本明細書に表されているかのように参照により援用され、本発明との使用に適応され得る米国特許出願公開第２０１８／０１６１３５９号明細書及び米国特許出願公開第２０１９／００５４１１３号明細書におけるものなどのモルホリノである。ある実施形態において、モルホリノは、モルホリノオリゴマー（ＰＭＯ）又はペプチド連結モルホリノＰＰＭＯである。ＰＭＯベースのプラットフォームは、ｍＲＮＡ転写を変化させることによって遺伝子疾患を処置するために使用され得る。ＰＭＯは、ＲＮＡの天然フレームワーク後にモデル化される合成化学構造である。ＰＭＯが、ＲＮＡに見られる同じ核酸塩基を有する一方、それらは、５角のリボース環の代わりに６角のモルホリン環に結合される。さらに、モルホリン環は、ＲＮＡに見られるホスホジエステル結合の代わりにホスホロジアミデート結合によって互いに接続される。ＰＭＯ及びＰＰＭＯは、エクソンスキッピング及び翻訳抑制のために使用され得る。

【０３１０】

ある実施形態において、カーゴ分子は、例えば、内容が全体として本明細書に表されているかのように参照により援用され、本発明との使用に適応され得る国際特許出願公報国際公開第２０１７１０６３０４Ａ１号パンフレットに記載されるようなペプチド－オリゴ

マーコンジュゲートであり得る。
【０３１１】
ある実施形態において、モルホリノは、エテプリルセンに見られるモルホリノであり、これは、ジストロフィンｍＲＮＡのエクソン５１を標的とするために有効であり得る。ある実施形態において、カーゴ分子は、例えば、内容が全体として本明細書に表されているかのように参照により援用され、本発明との使用に適応され得る、米国特許出願公開第２０１４／０３１５９７７Ａ１号明細書及び米国特許出願公開第２０１８／０１０５８１号明細書に記載されるものなどの、ＤＭＤとの関連におけるエクソンスキッピングを生成し得る。
【０３１２】
エクソンスキッピング
ある実施形態において、ヌクレオチド配列は、エクソンスキッピングを誘導することが可能な核酸をコードし得る。このようなコードされた核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はアンチセンスヌクレオチドシステムであり得る。本明細書において使用される際、「エクソンスキッピング」という用語は、１つ以上の相補的アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）を用いたプレ－ｍＲＮＡ内のスプライスドナー及び／又はアクセプター部位の標的化によるプレ－ｍＲＮＡスプライシングの修飾を指す。１つ以上のスプライスドナー又はアクセプター部位へのスプライセオソームのアクセスを遮断することによって、ＡＯＮは、スプライシング反応を防止し、それによって、完全にプロセシングされたｍＲＮＡから１つ以上のエクソンの欠失を引き起こし得る。エクソンスキッピングは、プレ－ｍＲＮＡの成熟プロセス中に核において達成され得る。いくつかの例において、エクソンスキッピングは、プレ－ｍＲＮＡ内のスプライスドナー配列と相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）を使用することによって標的とされたエクソンのスプライシングに関与する重要な配列のマスキングを含み得る。
【０３１３】
ある実施形態において、ヌクレオチド配列は、ジストロフィンｍＲＮＡにおけるエクソンスキッピングを誘導することが可能なアンチセンスオリゴヌクレオチド又はアンチセンスヌクレオチドシステムをコードする。例えば、ジストロフィン遺伝子のエクソンｘ内のナンセンス又はフレームシフト変異は、カルボキシ－末端切断型、非機能性ジストロフィンタンパク質をもたらす。その成熟ｍＲＮＡ転写産物の発現は、エクソンｘによってコードされるアミノ酸が欠失しているが、それらの欠失アミノ酸に対してＮ末端及びＣ末端の両方のジストロフィンアミノ酸を含む機能性ジストロフィンタンパク質をもたらし得る。
【０３１４】
ヌクレオチド配列は、エクソン１、２、３、４、５、６、７、８、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、４５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、又はそれらの任意の組合せでエクソンスキッピングを誘導することが可能なアンチセンスオリゴヌクレオチド又はアンチセンスヌクレオチドシステムをコードし得る。ヌクレオチド配列は、エクソン４３、４４、５０、５１、５２、５５、又はそれらの任意の組合せでエクソンスキッピングを誘導することが可能なアンチセンスオリゴヌクレオチド又はアンチセンスヌクレオチドシステムをコードし得る。
【０３１５】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムカーゴ分子
ある実施形態において、本明細書に記載される操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）又は他の粒子は、１つ以上のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子を含むことができ、これは、ポリヌクレオチド又はポリペプチドであり得る。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、１つ以上のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子をコードし得る。ある実施形態におい

て、ポリヌクレオチドは、Ｃａｓタンパク質、ＣＲＩＳＰＲカスケードタンパク質、ｇＲＮＡ、又はそれらの組合せをコードし得る。他のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子は、本明細書における他の箇所に記載され、ポリペプチド又はポリヌクレオチドのいずれかとして送達され得る。

【０３１６】

一般に、本明細書において及び国際特許出願公報国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）などの文献において使用される際のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ又はＣＲＩＳＰＲシステムは、ＣＲＩＳＰＲ関連（「Ｃａｓ」）遺伝子の活性の発現に関与する、又はその活性を指向する転写産物及び他の要素を集合的に指し、それは、Ｃａｓ遺伝子をコードする配列、ｔｒａｃｒ（ｔｒａｎｓ活性化ＣＲＩＳＰＲ）配列（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ又は活性部分的ｔｒａｃｒＲＮＡ）、ｔｒａｃｒ－メイト配列（「ダイレクトリピート」及び内因性ＣＲＩＳＰＲシステムとの関連におけるｔｒａｃｒＲＮＡプロセス部分的ダイレクトリピートを包含する）、ガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関して「スペーサー」とも呼ばれる）、又はその用語が本明細書において使用されるとおりである「ＲＮＡ」（例えば、Ｃａｓ９などのＣａｓをガイドするためのＲＮＡ、例えばＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ及びｔｒａｎｓ活性化（ｔｒａｃｒ）ＲＮＡ若しくはシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）（キメラＲＮＡ））又はＣＲＩＳＰＲ遺伝子座からの他の配列及び転写産物を含む。一般に、ＣＲＩＳＰＲシステムは、標的配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関してプロトスペーサーとも呼ばれる）の部位でＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する要素を特徴とする。例えば、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｄｉｖｅｒｓｅ Ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ”，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ，ＤＯＩ：ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１５．１０．００８を参照されたい。

【０３１７】

特定の実施形態において、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）又はＰＡＭ様モチーフは、対象とする標的の遺伝子座への、本明細書に開示されるエフェクタータンパク質複合体の結合を指向する。ある実施形態において、ＰＡＭは、５’ＰＡＭであり得る（すなわち、プロトスペーサーの５’末端の上流に位置する）。他の実施形態において、ＰＡＭは、３’ＰＡＭであり得る（すなわち、プロトスペーサーの５’末端の下流に位置する）。「ＰＡＭ」という用語は、「ＰＦＳ」又は「プロトスペーサー隣接部位」又は「プロトスペーサー隣接配列」という用語と同義的に使用され得る。

【０３１８】

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

【０３１９】

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

【０３２０】

いくつかの例の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質をコードする核酸分子を用いて送達され得る。ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質をコードする核酸分子は、有利には、コドン最適化ＣＲＩＳＰＲ

エフェクタータンパク質であり得る。コドン最適化配列の例は、この場合、真核生物、例えば、ヒトにおける発現用に最適化された配列（すなわち、ヒトにおける発現用に最適化されている）、又は本明細書に記載される別の真核生物、動物若しくは哺乳動物用に最適化された配列であり；例えば、国際特許出願公報国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）におけるＳａＣａｓ９ヒトコドン最適化配列を参照されたい。これが好ましいが、他の例が可能であることが理解され、ヒト以外の宿主種についてのコドン最適化、又は特定の器官用のコドン最適化のためのコドン最適化が公知である。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質をコードする酵素コード配列が、真核細胞などの特定の細胞における発現についてコドン最適化される。真核細胞は、特定の生物、例えば、植物又は限定はされないが、ヒト、又は本明細書に記載される非ヒト真核生物若しくは動物若しくは哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜、若しくはヒト哺乳動物若しくは霊長類を含む哺乳動物のものであるか又はそれに由来し得る。ある実施形態において、ヒトの生殖細胞系の遺伝的同一性を修飾するためのプロセス及び／又は人間又は動物に対して実質的な医学的な利点なしで苦痛をもたらす可能性のある動物の遺伝的同一性を修飾するためのプロセス、並びにこのようなプロセスから得られる動物も除外され得る。一般に、コドン最適化は、天然アミノ酸配列を維持しながら、天然配列の少なくとも１つのコドン（例えば、約又は約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０超、又はそれ以上のコドン）を、その宿主細胞の遺伝子においてより高頻度で又は最も高頻度で使用されるコドンで置き換えることによって、対象とする宿主細胞における発現の強化のために核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸の特定のコドンについて特定の偏りを示す。コドンの偏り（生物間のコドン使用頻度の差異）は、多くの場合、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳の効率と相関し、ひいては、とりわけ、翻訳されているコドンの特性及び特定のトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存すると考えられる。細胞における選択されたｔＲＮＡの優勢は、一般に、ペプチド合成において最も高頻度で使用されるコドンを反映するものである。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づいて所与の生物における最適な遺伝子発現のために調整され得る。コドン使用頻度表は、例えば、ｋａｚｕｓａ．ｏｒｊｐ／ｃｏｄｏｎ／で利用可能な“Ｃｏｄｏｎ Ｕｓａｇｅ Ｄａｔａｂａｓｅ”で容易に利用可能であり、これらの表は、いくつかの方法で適応され得る。Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｔａｂｕｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄａｔａｂａｓｅｓ：ｓｔａｔｕｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｙｅａｒ ２０００”Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）を参照されたい。特定の宿主細胞における発現のための特定の配列をコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズムも利用可能であり、例えば、Ｇｅｎｅ Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ，ＰＡ）も利用可能である。ある実施形態において、Ｃａｓをコードする配列における１つ以上のコドン（例えば、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、若しくはそれ以上、又は全てのコドン）は、特定のアミノ酸について最も高頻度で使用されるコドンに対応する。

【０３２１】

特定の実施形態において、本明細書に記載される方法は、１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸が、対象とする１つ以上の遺伝子のプロモーターを含む調節要素と細胞内で動作可能に接続されて提供又は導入される、Ｃａｓトランスジェニック細胞を提供することを含み得る。本明細書において使用される際、「Ｃａｓトランスジェニック細胞」という用語は、Ｃａｓ遺伝子がゲノム的に組み込まれた真核細胞などの細胞を指す。細胞の性質、型、又は起源は、本発明に従って特に限定しない。また、Ｃａｓ導入遺伝子が細胞に導入される方法は、様々であってもよく、当該技術分野において公知である任意の方法であり得る。特定の実施形態において、Ｃａｓトランスジェニック細胞は、単離された細胞にＣａｓ導入遺伝子を導入することによって得られる。特定の他の実施形態において、Ｃａｓトランスジェニック細胞は、Ｃａｓトランスジェニック生物から細胞を単

離することによって得られる。例として、限定はされないが、本明細書において言及されるＣａｓトランスジェニック細胞は、Ｃａｓノックイン真核生物などのＣａｓトランスジェニック真核生物から得てもよい。参照により本明細書に援用される国際特許出願公報国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ１３／７４６６７号明細書）が参照される。Ｓａｎｇａｍｏ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された、Ｒｏｓａ遺伝子座の標的化に関する米国特許出願公開第２０１２００１７２９０号明細書及び同第２０１１０２６５１９８号明細書の方法は、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステムを用いるために修飾され得る。Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓに譲渡された、Ｒｏｓａ遺伝子座の標的化に関する米国特許出願公開第２０１３０２３６９４６号明細書の方法も、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステムを用いるために修飾され得る。さらなる例として、参照により本明細書に援用される、Ｃａｓ９ノックインマウスを記載する、Ｐｌａｔｔ　ｅｔ．ａｌ．（Ｃｅｌｌ；１５９（２）：４４０－４５５（２０１４））が参照される。Ｃａｓ導入遺伝子は、Ｌｏｘ－Ｓｔｏｐ－ポリＡ－Ｌｏｘ（ＬＳＬ）カセットをさらに含み、それによって、Ｃａｓ発現をＣｒｅリコンビナーゼによって誘導可能にすることができる。或いは、Ｃａｓトランスジェニック細胞は、Ｃａｓ導入遺伝子を単離された細胞に導入することによって得てもよい。導入遺伝子用の送達システムは、当該技術分野において周知である。例として、Ｃａｓ導入遺伝子は、本明細書における他の箇所に同様に記載されるベクター（例えば、ＡＡＶ、アデノウイルス、レンチウイルス）及び／又は粒子及び／又はナノ粒子送達によって、例えば真核細胞に送達され得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム構成要素を送達するためのレンチウイルス及びレトロウイルスシステム、並びに非ウイルスシステムは、一般に、当該技術分野において公知である。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム構成要素用のＡＡＶ及びアデノウイルスベースのシステムは、当該技術分野において一般に公知であり、また、本明細書に記載される（例えば、本発明の操作ＡＡＶ）。

【０３２２】

本明細書において言及されるＣａｓトランスジェニック細胞などの細胞が、組み込まれたＣａｓ遺伝子又はＣａｓを標的遺伝子座にガイドすることが可能なＲＮＡと複合体を形成した場合にＣａｓの配列特異的作用から生じる変異を有する他に、さらなるゲノム変化を含み得ることが、当業者によって理解されるであろう。

【０３２３】

特定の実施形態において、本発明は、例えば、細胞内に、Ｃａｓ及び／又はＣａｓを標的遺伝子座にガイドすることが可能なＲＮＡ（すなわち、ガイドＲＮＡ）を送達又は導入するためであるが、これらの構成要素を（例えば、原核細胞内で）増殖させるためのものでもあるベクターを含む。これは、本明細書に記載される操作されたＡＡＶ粒子によってまだ送達されていない１つ以上のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ構成要素又は他の遺伝子組み換えシステム構成要素の送達に加えてであり得る。本明細書において使用される、「ベクター」は、ある環境から別の環境への実体の移動を可能にする又は促進するツールである。それは、別のＤＮＡセグメントが、挿入されたセグメントの複製をもたらすように挿入され得る、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどのレプリコンである。一般に、ベクターは、適切な制御要素に関連している場合、複製が可能である。一般に、「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す。ベクターとしては、限定はされないが、一本鎖、二本鎖、又は部分的二本鎖の核酸分子；１つ以上の自由端を含む、自由端を含まない（例えば、環状）核酸分子；ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はその両方を含む核酸分子；及び当該技術分野において公知の他の類のポリヌクレオチドが挙げられる。１つのタイプのベクターは、さらなるＤＮＡセグメントが、標準的な分子クローニング技術などによって挿入され得る環状二本鎖ＤＮＡループを指す「プラスミド」である。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、ウイルス由来のＤＮＡ又はＲＮＡ配列が、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ））へのパッケージングのためのベクターに存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためのウイルスによって保有されるポリヌクレオチドも含む。特定のベクターは、そ

れらが導入される宿主細胞において自己複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが動作可能に連結される遺伝子の発現を指向することが可能である。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。組み換えＤＮＡ技術において実用性のある一般的な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。

【０３２４】

組み換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態の本発明の核酸を含むことができ、これは、組み換え発現ベクターが、発現される核酸配列に動作可能に連結される、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択され得る１つ以上の調節要素を含むことを意味する。組み換え発現ベクター内で、「動作可能に連結される」は、対象とするヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロ転写／翻訳システムにおいて又はベクターが宿主細胞に導入される場合、宿主細胞において）ヌクレオチド配列の発現を可能にする方式で調節要素に連結されることを意味することが意図される。組み換え及びクローニング方法に関して、内容全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第２００４／０１７１１５６号明細書が言及される。したがって、本明細書に開示される実施形態は、ＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムを含むトランスジェニック細胞も含み得る。いくつかの例の実施形態において、トランスジェニック細胞は、個々の別々の体積として機能し得る。言い換えると、マスキング構築物を含むサンプルが、例えば好適な送達小胞中で細胞に送達されてもよく、標的が送達用小胞中で存在する場合、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、活性化され、検出可能なシグナルが生成される。

【０３２５】

ベクターは、調節要素、例えば、プロモーターを含み得る。ベクターは、Ｃａｓコード配列を含むことができ、及び／又は単一の、場合により少なくとも３又は８又は１６又は３２又は４８又は５０個のガイドＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）コード配列、例えば、１～２、１～３、１～４　１～５、３～６、３～７、３～８、３～９、３～１０、３～８、３～１６、３～３０、３～３２、３～４８、３～５０個のＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）も含み得る。単一のベクターにおいて、有利には、最大で約１６個のＲＮＡが存在する場合、ＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）ごとにプロモーターが存在し得；単一のベクターが、１６個を超えるＲＮＡを提供する場合、１つ以上のプロモーターは、ＲＮＡの２つ以上の発現を駆動することができ、例えば、３２個のＲＮＡが存在する場合、各プロモーターは、２つのＲＮＡの発現を駆動することができ、４８個のＲＮＡが存在する場合、下記プロモーターは、３つのＲＮＡの発現を駆動することができる。単純計算及び十分に確立されたクローニングプロトコル及び本開示の教示により、当業者は、ＡＡＶなどの好適な例示的なベクター、及びＵ６プロモーターなどの好適なプロモーターのためにＲＮＡについて本発明を容易に実施することができる。例えば、ＡＡＶのパッケージング限度は、約４．７ｋｂである。単一のＵ６－ｇＲＮＡ（及びクローニング用の制限部位）の長さは、３６１ｂｐである。したがって、当業者は、約１２～１６、例えば、１３個のＵ６－ｇＲＮＡカセットを単一のベクターに容易に入れることができる。これは、ＴＡＬＥアセンブリ（ｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇ／ｔａｌｅｆｆｅｃｔｏｒｓ／）に使用されるゴールデンゲート法（ｇｏｌｄｅｎ　ｇａｔｅ　ｓｔｒａｔｅｇｙ）などの任意の好適な手段によって組み立てられ得る。当業者はまた、タンデムガイド法を使用して、Ｕ６－ｇＲＮＡの数を約１．５倍増加させること、例えば、１２～１６、例えば、１３個を約１８～２４、例えば、約１９個のＵ６－ｇＲＮＡまで増加させることもできる。したがって、当業者は、単一のベクター、例えば、ＡＡＶベクターにおいて約１８～２４、例えば、約１９個のプロモーター－ＲＮＡ、例えば、Ｕ６－ｇＲＮＡに容易に到達することができる。ベクターにおけるプロモーター及びＲＮＡの数を増加させるためのさらなる手段は、単一のプロモーター（例えば、Ｕ６）を用いて、切断可能な配列によって隔てられたＲＮＡのアレイを発現させることである。ベクターにおけるプロモーター－ＲＮＡの数を

増加させるためのさらに他の手段は、コード配列又は遺伝子のイントロン中の切断可能な配列によって隔てられたプロモーター－ＲＮＡを発現させることであり；この場合、ポリメラーゼＩＩプロモーターを使用することが有利であり、これにより、増加した発現をもたらし、長いＲＮＡの転写を組織特異的に可能にすることができる。（例えば、ｎａｒ．ｏｘｆｏｒｄｊｏｕｒｎａｌｓ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／３４／７／ｅ５３．ｓｈｏｒｔ及びｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｍｔ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ１６／ｎ９／ａｂｓ／ｍｔ２００８１４４ａ．ｈｔｍｌを参照）。有利な実施形態において、ＡＡＶは、最大で約５０個の遺伝子を標的とするＵ６タンデムｇＲＮＡをパッケージングし得る。したがって、当該技術分野における知識から、及び本開示における教示から、当業者は、特に、本明細書に記載されるＲＮＡ又はガイドの数に関して、過度の実験を行うことなく、１つ以上のプロモーター制御下で、又はこれに動作可能に若しくは機能的に連結された複数のＲＮＡ又はガイドを発現するベクター、例えば、単一のベクターを容易に作製及び使用することができる。

【０３２６】

ガイドＲＮＡコード配列及び／又はＣａｓコード配列は、調節要素に機能的に又は動作可能に連結され得るため、調節要素は、発現を駆動する。プロモーターは、構成的プロモーター及び／又は条件付きプロモーター及び／又は誘導性プロモーター及び／又は組織特異的プロモーターであり得る。プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼ、ｐｏｌ　Ｉ、ｐｏｌ　ＩＩ、ｐｏｌ　ＩＩＩ、Ｔ７、Ｕ６、Ｈ１、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、β－アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、及びＥＦ１αプロモーターからなる群から選択され得る。有利なプロモーターは、Ｕ６である。

【０３２７】

本発明に係る使用のためのさらなるエフェクターは、ｃａｓ１遺伝子に近接していること、例えば、限定はされないが、ｃａｓ１遺伝子の開始から２０ｋｂ及びｃａｓ１遺伝子の最後から２０ｋｂの領域内であることによって同定され得る。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、少なくとも１つのＨＥＰＮドメイン及び少なくとも５００個のアミノ酸を含み、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質は、原核生物ゲノムにおいて、Ｃａｓ遺伝子又はＣＲＩＳＰＲアレイの２０ｋｂ上流又は下流内に天然に存在する。Ｃａｓタンパク質の非限定的な例としては、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１及びＣｓｘ１２としても知られている）、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１２ａ、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、それらのホモログ、又はそれらの修飾型が挙げられる。いくつかの例の実施形態において、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質は、原核生物ゲノムにおいて、Ｃａｓ１遺伝子の２０ｋｂ上流又は下流内に天然に存在する。「オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇｕｅ）」という用語（本明細書において「オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）」とも呼ばれる）及び「ホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇｕｅ）」（本明細書において「ホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇ）」とも呼ばれる）は、当該技術分野において周知である。さらなる指針によって、本明細書において使用される際のタンパク質の「ホモログ」は、それがホモログであるタンパク質と同じ又は同様の機能を果たす同じ種のタンパク質である。ホモログなタンパク質は、必ずしもではないが、構造的に関連していてもよく、又は一部のみが構造的に関連している。本明細書において使用される際のタンパク質の「オルソログ」は、それがオルソログであるタンパク質と同じ又は同様の機能を果たす異なる種のタンパク質である。オルソログなタンパク質は、必ずしもではないが、構造的に関連していてもよく、又は一部のみが構造的に関連している。

【０３２８】
ある実施形態において、核酸標的化システムの１つ以上の要素は、内因性ＣＲＩＳＰＲＲＮＡ標的化システムを含む特定の生物に由来する。特定の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ標的化システムは、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）及びルミノコッカス属（Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）に見出される。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、標的化されたコラテラルｓｓＲＮＡ切断活性を含む。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、二重ＨＥＰＮドメインを含む。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、Ｃａｓ１３ａのＨｅｌｉｃａｌ－１ドメインの対応ドメインを欠く。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、以前に特徴付けられたクラス２　ＣＲＩＳＰＲエフェクターより小さく、９２８ａａの中央値サイズを有する。この中央値サイズは、Ｃａｓ１３ｃのものより１９０ａａ（１７％）小さく、Ｃａｓ１３ｂのものより２００ａａ（１８％）超小さく、Ｃａｓ１３ａのものより３００ａａ（２６％）超小さい。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、隣接配列（例えば、ＰＦＳ、ＰＡＭ）を必要としない。

【０３２９】
特定の実施形態において、エフェクタータンパク質遺伝子座構造は、ＷＹＬドメイン含有アクセサリータンパク質（これらのドメインの最初に同定された群に保存された３つのアミノ酸にちなんでこのように表示される；例えば、ＷＹＬドメインＩＰＲ０２６８８１を参照）を含む。特定の実施形態において、ＷＹＬドメインアクセサリータンパク質は、少なくとも１つのヘリックスターンヘリックス（ＨＴＨ）又はリボンヘリックスヘリックス（ＲＨＨ）ＤＮＡ結合ドメインを含む。特定の実施形態において、ＷＹＬドメイン含有アクセサリータンパク質は、ＲＮＡ標的化エフェクタータンパク質の標的化された及びコラテラルｓｓＲＮＡ切断活性の両方を増加させる。特定の実施形態において、ＷＹＬドメイン含有アクセサリータンパク質は、Ｎ末端ＲＨＨドメイン、並びに元のＷＹＬモチーフに対応する不変のチロシン－ロイシンダブレットを含む主に疎水性の保存残基のパターンを含む。特定の実施形態において、ＷＹＬドメイン含有アクセサリータンパク質は、ＷＹＬ１である。ＷＹＬ１は、主にルミノコッカス属（Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）に関連する単一のＷＹＬドメインタンパク質である。

【０３３０】
他の例の実施形態において、ＶＩ型ＲＮＡ標的化Ｃａｓ酵素は、Ｃａｓ１３ｄである。特定の実施形態において、Ｃａｓ１３ｄは、ユウバクテリウム・シラエウム（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ）ＤＳＭ　１５７０２（ＥｓＣａｓ１３ｄ）又はルミノコッカス属（Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）Ｎ１５．ＭＧＳ－５７（ＲｓｐＣａｓ１３ｄ）（例えば、Ｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｓ１３ｄ　Ｉｓ　ａ　Ｃｏｍｐａｃｔ　ＲＮＡ－Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｔｙｐｅ　ＶＩ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｆｆｅｃｔｏｒ　Ｐｏｓｉｔｉｖｅｌｙ　Ｍｏｄｕｌａｔｅｄ　ｂｙ　ａ　ＷＹＬ－Ｄｏｍａｉｎ－Ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　Ａｃｃｅｓｓｏｒｙ　Ｐｒｏｔｅｉｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ（２０１８），ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１８．０２．０２８を参照）である。ＲｓｐＣａｓ１３ｄ及びＥｓＣａｓ１３ｄは、隣接配列（例えば、ＰＦＳ、ＰＡＭ）が必要ない。

【０３３１】
本明細書において提供される方法、システム、及びツールは、全体が参照により本明細書に援用されるＭａｋａｒｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｅ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｊｏｕｒｎａｌ，ｖ．１，ｎ．，５（２０１８）；ＤＯＩ：１０．１０８９／ｃｒｉｓｐｒ．２０１８．００３３に記載され、特に図１、ｐ．３２６に記載されるＩ型、ＩＩＩ型又はＩＶ型のＣａｓタンパク質であり得るクラス１　ＣＲＩＳＰＲタンパク質との使用のために設計され得る。クラス１システムは、典型的に、多タンパク質エフェクター複合体を使用し、これは、ある実施形態において、補助タンパク質、例えば、抗ウイルス防御（カスケード）用ＣＲＩＳＰＲ関連複合体と呼ばれる複合体における１つ以上のタンパク質、１つ以上の適応タンパク質（例えば、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、ＲＮＡヌクレアーゼ）、及び／又は１つ

以上のアクセサリータンパク質（例えばＣａｓ４、ＤＮＡヌクレアーゼ）、ＣＲＩＳＰＲ関連ロスマンフォールド（ＣＡＲＦ）ドメイン含有タンパク質、及び／又はＲＮＡ転写酵素を含み得る。クラス１システムは、限られた配列類似性を有するが、クラス１システムタンパク質は、１つ以上のリピート関連ミステリアスタンパク質（ＲＡＭＰ）ファミリーのサブユニット、例えば、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７を含むそれらの同様の構造によって同定され得る。ＲＡＭＰタンパク質は、１つ以上のＲＮＡ認識モチーフドメインを有することによって特徴付けられる。大きいサブユニット（例えばｃａｓ８又はｃａｓ１０）及び小さいサブユニット（例えば、ｃａｓ１１）も、クラス１システムに特有である。例えば、図１及び２を参照されたい。Ｋｏｏｎｉｎ ＥＶ，Ｍａｋａｒｏｖａ ＫＳ．２０１９ Ｏｒｉｇｉｎｓ ａｎｄ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｐｈｉｌ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｂ ３７４：２０１８００８７，ＤＯＩ：１０．１０９８／ｒｓｔｂ．２０１８．００８７。一実施形態において、クラス１システムは、シグネチャータンパク質Ｃａｓ３によって特徴付けられる。特定のクラス１タンパク質におけるカスケードは、プレ－ｃｒＲＮＡに結合し、プレ－ｃｒＲＮＡのプロセシングに直接関与するヌクレアーゼであるさらなるＣａｓタンパク質、例えばＣａｓ６又はＣａｓ５を動員する複数のＣａｓタンパク質の専用複合体を含み得る。一実施形態において、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、１つ以上のＣａｓ５サブユニット及び２つ以上のＣａｓ７サブユニットを含むエフェクター複合体を含む。クラス１サブタイプは、Ｉ－Ａ、Ｉ－Ｂ、Ｉ－Ｃ、Ｉ－Ｕ、Ｉ－Ｄ、Ｉ－Ｅ、及びＩ－Ｆ型、ＩＶ－Ａ及びＩＶ－Ｂ型、並びにＩＩＩ－Ａ、ＩＩＩ－Ｄ、ＩＩＩ－Ｃ、及びＩＩＩ－Ｂ型を含む。クラス１システムは、Ｉ－Ａ、Ｉ－Ｂ、Ｉ－Ｅ、Ｉ－Ｆ及びＩ－Ｕ型変異体を含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ変異体も含み、これは、Ｔｎ７様トランスポゾンの大きなファミリーによってコードされるサブタイプＩ－Ｆのバージョン及び同様に分解されるサブタイプＩ－Ｂシステムをコードする Ｔｎ７様トランスポゾンのより小さな群を含む、トランスポゾン及びプラスミドによって保有される変異体を含み得る。Ｐｅｔｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ １１４（３５）（２０１７）；ＤＯＩ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．１７０９０３５１１４；Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ，ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ Ｊｏｕｒｎａｌ，ｖ．１，ｎ５、図５も参照されたい。

【０３３２】

Ｃａｓ分子

ある実施形態において、カーゴ分子は、Ｃａｓポリペプチド又はそのフラグメントをコードし得るＣａｓポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドであるか又はそれを含み得る。任意のＣａｓ分子は、カーゴ分子であり得る。ある実施形態において、カーゴ分子は、クラスＩ ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓシステムＣａｓポリペプチドである。ある実施形態において、カーゴ分子は、クラスＩＩ ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓシステムＣａｓポリペプチドである。ある実施形態において、Ｃａｓポリペプチドは、Ｉ型Ｃａｓポリペプチドである。ある実施形態において、Ｃａｓポリペプチドは、ＩＩ型Ｃａｓポリペプチドである。ある実施形態において、Ｃａｓポリペプチドは、ＩＩＩ型Ｃａｓポリペプチドである。ある実施形態において、Ｃａｓポリペプチドは、ＩＶ型Ｃａｓポリペプチドである。ある実施形態において、Ｃａｓポリペプチドは、Ｖ型Ｃａｓポリペプチドである。ある実施形態において、Ｃａｓポリペプチドは、ＶＩ型Ｃａｓポリペプチドである。ある実施形態において、Ｃａｓポリペプチドは、ＶＩＩ型Ｃａｓポリペプチドである。Ｃａｓタンパク質の非限定的な例としては、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１及びＣｓｘ１２としても知られている）、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１２ａ、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、Ｃａｓ１３ｄ、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、それらのホモログ、又はそれらの

修飾型が挙げられる。

【０３３３】

ガイド配列

本明細書において使用される際、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムとの関連における「ガイド配列」及び「ガイド分子」という用語は、標的核酸配列とハイブリダイズするため、及び標的核酸配列との核酸標的化複合体の配列特異的結合を指向するために十分な、標的核酸配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。本明細書に開示される方法を用いて作製されたガイド配列は、完全長ガイド配列、切断型ガイド配列、完全長ｓｇＲＮＡ配列、切断型ｓｇＲＮＡ配列、又はＥ＋Ｆ　ｓｇＲＮＡ配列であり得る。各ｇＲＮＡは、同じ又は異なるアダプタータンパク質に特異的な複数の結合認識部位（例えば、アプタマー）を含むように設計され得る。各ｇＲＮＡは、転写開始部位（すなわち、ＴＳＳ）の上流のプロモーター領域－１０００から＋１核酸、好ましくは、－２００核酸に結合するように設計され得る。この位置決めにより、遺伝子活性化（例えば、転写活性化因子）又は遺伝子阻害（例えば、転写リプレッサー）に影響を与える機能的ドメインが改善される。修飾されたｇＲＮＡは、組成物に含まれる１つ以上の標的遺伝子座を標的とする１つ以上の修飾されたｇＲＮＡ（例えば、少なくとも１つのｇＲＮＡ、少なくとも２つのｇＲＮＡ、少なくとも５つのｇＲＮＡ、少なくとも１０個のｇＲＮＡ、少なくとも２０個のｇＲＮＡ、少なくとも３０個のｇＲＮＡ、少なくとも５０個のｇＲＮＡ）であり得る。前記複数のｇＲＮＡ配列は、タンデムに配列され得、好ましくは、ダイレクトリピートによって隔てられる。

【０３３４】

ある実施形態において、所与の標的配列に対するガイド配列の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントされる場合、約又は約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％超、又はそれ以上であり得る。いくつかの例の実施形態において、ガイド分子は、ガイド配列と標的配列との間にＲＮＡ二本鎖が形成されるように、標的配列との少なくとも１つのミスマッチを有するように設計され得るガイド配列を含む。したがって、相補性の程度は、好ましくは、９９％未満である。例えば、ガイド配列が、２４個のヌクレオチドからなる場合、相補性の程度は、より具体的には、約９６％以下である。特定の実施形態において、ガイド配列は、全ガイド配列にわたる相補性の程度が、さらに減少されるように、２つ以上の隣接するミスマッチヌクレオチドのストレッチを有するように設計される。例えば、ガイド配列が、２４個のヌクレオチドからなる場合、相補性の程度は、２つ以上のミスマッチヌクレオチドのストレッチが、２、３、４、５、６又は７個のヌクレオチドなどを包含するかどうかに応じて、より具体的には、約９６％以下、より具体的には、約９２％以下、より具体的には、約８８％以下、より具体的には、約８４％以下、より具体的には、約８０％以下、より具体的には、約７６％以下、より具体的には、約７２％以下である。ある実施形態において、１つ以上のミスマッチヌクレオチドのストレッチの他に、相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントされる場合、約又は約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％超、又はそれ以上である。最適アラインメントは、配列をアラインするための任意の好適なアルゴリズムを使用して決定され得、その非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ変換に基づくアルゴリズム（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ　Ｗｈｅｅｌｅｒ　Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍで利用可能））、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで利用可能））、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで利用可能））が挙げられる。ガイド配列（核酸標的化ガイドＲＮＡ内の）が核酸標的化複合体の配列特異的結合を標的核酸配列に指向する能力は、任意の好適なアッセイによって評価され得る。例えば、試験されるガイド

配列を含む核酸標的化複合体を形成するために十分な核酸標的化ＣＲＩＳＰＲシステムの構成要素は、核酸標的化複合体の構成要素をコードするベクターによるトランスフェクションなどによって、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に提供され、続いて、本明細書に記載されるＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどによって、標的核酸配列内の優先的標的化（例えば、切断）が評価され得る。同様に、標的核酸配列（又はその近傍の配列）の切断は、標的核酸配列、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含む核酸標的化複合体の構成要素を提供し、試験及び対照ガイド配列反応の間の標的配列での又はその近傍での結合又は切断率を比較することによって、試験管において評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に想到されるであろう。ガイド配列、ひいては核酸標的化ガイドＲＮＡは、任意の標的核酸配列を標的とするように選択され得る。

【０３３５】

本明細書において使用される際、Ｖ型又はＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座エフェクタータンパク質の「ｃｒＲＮＡ」又は「ガイドＲＮＡ」又は「シングルガイドＲＮＡ」又は「ｓｇＲＮＡ」又は「１つ以上の核酸構成要素」という用語は、標的核酸配列とハイブリダイズするため、及び標的核酸配列に対する核酸標的化複合体の配列特異的結合を指向するために、標的核酸配列との十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。ある実施形態において、相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントされる場合、約又は約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％超、又はそれ以上である。最適アラインメントは、配列をアラインするための任意の好適なアルゴリズムを使用して決定され得、その非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ変換に基づくアルゴリズム（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍで利用可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで利用可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで利用可能）が挙げられる。ガイド配列（核酸標的化ガイドＲＮＡ内の）が核酸標的化複合体の配列特異的結合を標的核酸配列に指向する能力は、任意の好適なアッセイによって評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含む核酸標的化複合体を形成するために十分な核酸標的化ＣＲＩＳＰＲシステムの構成要素は、核酸標的化複合体の構成要素をコードするベクターによるトランスフェクションなどによって、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に提供され、続いて、本明細書に記載されるＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどによって、標的核酸配列内の優先的標的化（例えば、切断）が評価され得る。同様に、標的核酸配列の切断は、標的核酸配列、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含む核酸標的化複合体の構成要素を提供し、試験及び対照ガイド配列反応の間の標的配列での結合又は切断率を比較することによって、試験管において評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に想到されるであろう。ガイド配列、ひいては核酸標的化ガイドは、任意の標的核酸配列を標的とするように選択され得る。標的配列は、ＤＮＡであり得る。標的配列は、任意のＲＮＡ配列であり得る。ある実施形態において、標的配列は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、プレ－ｍＲＮＡ、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、マイクロ－ＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、低分子核内ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、低分子核小体ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、長鎖非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）、及び低分子細胞質ＲＮＡ（ｓｃＲＮＡ）からなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であり得る。ある好ましい実施形態において、標的配列は、ｍＲＮＡ、プレ－ｍＲＮＡ、及びｒＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であり得る。ある好ましい実施形態において、標的配列は、ｎｃＲＮＡ、及びｌｎｃＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であり得る。あるより好ましい実施形態において、標的配列は、ｍＲＮＡ分子又はプレ－ｍＲＮＡ分子内の配列であり得る。

【０３３６】
ある実施形態において、核酸標的化ガイドは、核酸標的化ガイド内の二次構造の程度を低下させるように選択される。ある実施形態において、核酸標的化ガイドのうち約又は約７５％、５０％、４０％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、１％未満、又はそれ以下のヌクレオチドが、最適にフォールディングされるときに自己相補的な塩基対形成に関与する。最適なフォールディングは、任意の好適なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定され得る。いくつかのプログラムは、最小Ｇｉｂｂｓ自由エネルギーを計算することに基づいている。１つのこのようなアルゴリズムの例は、Ｚｕｋｅｒ ａｎｄ Ｓｔｉｅｇｌｅｒ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．９（１９８１），１３３－１４８）によって記載されるように、ｍＦｏｌｄである。別の例のフォールディングアルゴリズムは、重心構造予測アルゴリズムを用いて、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｔ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｖｉｅｎｎａで開発されたオンラインウェブサーバーＲＮＡｆｏｌｄである（例えば、Ａ．Ｒ．Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｃｅｌｌ １０６（１）：２３－２４；及びＰＡ Ｃａｒｒ ａｎｄ ＧＭ Ｃｈｕｒｃｈ，２００９，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２７（１２）：１１５１－６２を参照）。

【０３３７】
特定の実施形態において、ガイドＲＮＡ又はｃｒＲＮＡは、ダイレクトリピート（ＤＲ）配列及びガイド配列又はスペーサー配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり得る。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡ又はｃｒＲＮＡは、ガイド配列又はスペーサー配列に融合又は結合されたダイレクトリピート配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり得る。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、ガイド配列又はスペーサー配列の上流（すなわち、５’）に位置し得る。他の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、ガイド配列又はスペーサー配列の下流（すなわち、３’）に位置し得る。

【０３３８】
特定の実施形態において、ｃｒＲＮＡは、ステムループ、好ましくは、単一のステムループを含む。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、ステムループ、好ましくは、単一のステムループを形成する。

【０３３９】
特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは、１５～３５ｎｔである。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは、少なくとも１５ヌクレオチドである。特定の実施形態において、スペーサー長さは、１５～１７ｎｔ、例えば、１５、１６、又は１７ｎｔ、１７～２０ｎｔ、例えば、１７、１８、１９、又は２０ｎｔ、２０～２４ｎｔ、例えば、２０、２１、２２、２３、又は２４ｎｔ、２３～２５ｎｔ、例えば、２３、２４、又は２５ｎｔ、２４～２７ｎｔ、例えば、２４、２５、２６、又は２７ｎｔ、２７～３０ｎｔ、例えば、２７、２８、２９、又は３０ｎｔ、３０～３５ｎｔ、例えば、３０、３１、３２、３３、３４、又は３５ｎｔ、又は３５ｎｔ又はそれ以上である。

【０３４０】
「ｔｒａｃｒＲＮＡ」配列又は類似の用語は、ハイブリダイズするために、ｃｒＲＮＡ配列との十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。ある実施形態において、最適にアラインメントされるときに２つのうちの短い方の長さに沿ったｔｒａｃｒＲＮＡ配列及びｃｒＲＮＡ配列の間の相補性の程度は、約又は約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７．５％、９９％超、又はそれ以上である。ある実施形態において、ｔｒａｃｒ配列は、約又は約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０超、又はそれ以上のヌクレオチド長である。ある実施形態において、２つの間のハイブリダイゼーションが、ヘアピンなどの二次構造を有する転写産物を産生するように、ｔｒａｃｒ配列及びｃｒＲＮＡ配列は、単一の転写産物内に含まれる。本発明の一実施形

態において、転写産物又は転写されたポリヌクレオチド配列は、少なくとも２つ以上のヘアピンを有する。好ましい実施形態において、転写産物は、２、３、４又は５つのヘアピンを有する。本発明のさらなる実施形態において、転写産物は、最大で５つのヘアピンを有する。ヘアピン構造において、最後の「Ｎ」の配列５’の部分及びループの上流は、ｔｒａｃｒメイト配列に対応し、ループの配列３’の部分は、ｔｒａｃｒ配列に対応する。

【０３４１】

一般に、相補性の程度は、ｓｃａ配列及びｔｒａｃｒ配列の最適アラインメントに関し、２つの配列の短い方の長さに沿ったものである。最適アラインメントは、任意の好適なアラインメントアルゴリズムによって決定され得、ｓｃａ配列又はｔｒａｃｒ配列のいずれかにおける自己相補性などの二次構造をさらに説明し得る。ある実施形態において、２つの短い方の長さに沿ったｔｒａｃｒ配列及びｓｃａ配列の間の相補性の程度は、最適にアラインされた場合、約又は約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７．５％、９９％超、又はそれ以上である。

【０３４２】

一般に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９又はＣＲＩＳＰＲシステムは、国際特許出願公報国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）などの上記の文献において使用されるとおりであり得、ＣＲＩＳＰＲ関連（「Ｃａｓ」）遺伝子の活性の発現に関与する、又はその活性を指向する転写産物及び他の要素を集合的に指し、それは、Ｃａｓ遺伝子をコードする配列、特に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９の場合はＣａｓ９遺伝子をコードする配列、ｔｒａｃｒ（ｔｒａｎｓ活性化ＣＲＩＳＰＲ）配列（例えばｔｒａｃｒＲＮＡ又は活性部分的ｔｒａｃｒＲＮＡ）、ｔｒａｃｒ－メイト配列（「ダイレクトリピート」及び内因性ＣＲＩＳＰＲシステムとの関連におけるｔｒａｃｒＲＮＡプロセス部分的ダイレクトリピートを包含する））、ガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関して「スペーサー」とも呼ばれる）、又はその用語が本明細書において使用されるとおりである「ＲＮＡ」（例えば、Ｃａｓ９をガイドするＲＮＡ、例えば、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ及びトランス活性化（ｔｒａｃｒ）ＲＮＡ若しくはシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）（キメラＲＮＡ））又はＣＲＩＳＰＲ遺伝子座からの他の配列及び転写産物を含む。一般に、ＣＲＩＳＰＲシステムは、標的配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関してプロトスペーサーとも呼ばれる）の部位でＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する要素を特徴とする。ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成に関して、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計された配列を指し、標的配列及びガイド配列の間のハイブリダイゼーションは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。標的配列に対する相補性が切断活性にとって重要であるガイド配列のセクションは、本明細書においてシード配列と呼ばれる。標的配列は、ＤＮＡ又はＲＮＡポリヌクレオチドなどの任意のポリヌクレオチドを含み得る。ある実施形態において、標的配列は、細胞の核又は細胞質に位置し、細胞内に存在するミトコンドリア、細胞小器官、小胞、リポソーム又は粒子内の又はそれに由来する核酸を含み得る。ある実施形態において、特に非核内使用の場合、ＮＬＳは好ましくない。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲシステムは、１つ以上の核外搬出シグナル（ＮＥＳ）を含む。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲシステムは、１つ以上のＮＬＳ及び１つ以上のＮＥＳを含む。ある実施形態において、ダイレクトリピートは、以下の基準のうちのいずれか又は全てを満たす反復モチーフを検索することによってインシリコで同定され得る：１．　ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に隣接するゲノム配列２Ｋｂのウィンドウに見出される；２．　２０～５０ｂｐに及ぶ；及び３．　２０～５０ｂｐの間隔を空けている。ある実施形態において、これらの基準のうちの２つ、例えば、１及び２、２及び３、又は１及び３が使用され得る。ある実施形態において、３つ全ての基準が使用され得る。

【０３４３】

本発明の実施形態において、ガイド配列及びガイドＲＮＡという用語、すなわち、Ｃａｓを標的ゲノム遺伝子座にガイドすることが可能なＲＮＡは、国際特許出願公報国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細

書）などの上記の引用文献にあるように同義的に使用される。一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズするため、及び標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向するために、標的ポリヌクレオチド配列との十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。ある実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントされる場合、約又は約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％超、又はそれ以上である。最適アラインメントは、配列をアラインするための任意の好適なアルゴリズムを使用して決定され得、その非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ変換に基づくアルゴリズム（例えばＢｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍで利用可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで利用可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで利用可能）が挙げられる。ある実施形態において、ガイド配列は、約又は約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５超、又はそれ以上のヌクレオチド長である。ある実施形態において、ガイド配列は、約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２未満、又はそれ以下のヌクレオチド長である。好ましくは、ガイド配列は、１０　３０ヌクレオチド長である。ガイド配列がＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を標的配列に指向する能力は、任意の好適なアッセイによって評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するために十分なＣＲＩＳＰＲシステムの構成要素は、ＣＲＩＳＰＲ配列の構成要素をコードするベクターによるトランスフェクションなどによって、対応する標的配列を有する宿主細胞に提供され、続いて、本明細書に記載されるＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどによって、標的配列内の優先的切断が評価され得る。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の構成要素を提供し、試験及び対照ガイド配列反応の間の標的配列での結合又は切断率を比較することによって、試験管において評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に想到されるであろう。

【０３４４】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムのある実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、約又は約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、又は１００％超であり得；ガイド又はＲＮＡ又はｓｇＲＮＡは、約又は約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５超、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得；又はガイド又はＲＮＡ又はｓｇＲＮＡは、約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２未満、又はそれ以下のヌクレオチド長であり得；有利には、ｔｒａｃｒ ＲＮＡは、３０又は５０ヌクレオチド長である。しかしながら、本発明の一実施形態は、オフターゲット相互作用を低減するためのものであり、例えば、低い相補性を有する標的配列とのガイド相互作用を低減するためのものである。実際、例において、本発明が、８０％超～約９５％の相補性、例えば、８３％～８４％又は８８～８９％又は９４～９５％の相補性を有する標的配列とオフターゲット配列とを区別する（例えば、１８ヌクレオチドを有する標的と、１、２又は３つのミスマッチを有する１８ヌクレオチドのオフターゲットとを区別する）ことができるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムをもたらす変異を含むことが示される。したがって、本発明に関して、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、９４．５％若しくは９５％若しくは９５．５％若しくは９６％若しくは９６．５％若しくは９７％若しくは９７．５％若しくは９８％若しくは９８．５％若しくは９９％若しく

は９９．５％若しくは９９．９％超、又は１００％である。オフターゲットは、配列とガイドとの間が１００％又は９９．９％又は９９．５％又は９９％又は９９％又は９８．５％又は９８％又は９７．５％又は９７％又は９６．５％又は９６％又は９５．５％又は９５％又は９４．５％又は９４％又は９３％又は９２％又は９１％又は９０％又は８９％又は８８％又は８７％又は８６％又は８５％又は８４％又は８３％又は８２％又は８１％又は８０％未満の相補性であり、オフターゲットは、配列とガイドとの間が１００％又は９９．９％又は９９．５％又は９９％又は９９％又は９８．５％又は９８％又は９７．５％又は９７％又は９６．５％又は９６％又は９５．５％又は９５％又は９４．５％の相補性であることが有利である。

【０３４５】

本発明に係る特に好ましい実施形態において、ガイドＲＮＡ（Ｃａｓを標的遺伝子座にガイドすることが可能である）は、（１）真核細胞内のゲノム標的遺伝子座にハイブリダイズすることが可能なガイド配列；（２）ｔｒａｃｒ配列；及び（３）ｔｒａｃｒメイト配列を含み得る。（１）～（３）の全ては、単一のＲＮＡ、すなわち、ｓｇＲＮＡ（５’から３’の配向で配置される）に存在し得るか、又はｔｒａｃｒ　ＲＮＡは、ガイド及びｔｒａｃｒ配列を含有するＲＮＡと異なるＲＮＡであり得る。ｔｒａｃｒは、ｔｒａｃｒメイト配列にハイブリダイズし、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体を標的配列に指向する。ｔｒａｃｒ　ＲＮＡが、ガイド及びｔｒａｃｒ配列を含有するＲＮＡと異なるＲＮＡに存在する場合、各ＲＮＡの長さは、それらのそれぞれの天然の長さより短くなるように最適化され得、それぞれが、独立して化学修飾されて、細胞ＲＮａｓｅによる分解から保護し、又は他の形で安定性を増加させ得る。

【０３４６】

本明細書に記載される本発明に係る方法は、本明細書に記載されるベクターを細胞に送達することを含む、本明細書に記載される真核細胞における１つ以上の変異の誘導（インビトロ、すなわち、単離された真核細胞内で）を含む。変異は、ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを介した細胞の各標的配列における１つ以上のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを介した前記細胞の各標的配列における１～７５個のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを介した前記細胞の各標的配列における１、５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５個のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを介した前記細胞の各標的配列における５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５個のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを介した前記細胞の各標的配列における１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５個のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを介した前記細胞の各標的配列における２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５個のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを介した前記細胞の各標的配列における４０、４５、５０、７５、１００、２００、３００、４００又は５００個のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。

【０３４７】

毒性及びオフターゲット効果の最小化のために、送達されるＣａｓ　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの濃度を制御することが重要であり得る。Ｃａｓ　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの最適な濃度は、細胞又は非ヒト真核生物動物モデルにおいて異なる濃度で試験し、潜在的なオフターゲットゲノム遺伝子座における修飾の程度を分析するためのディープシーケンシングを用いることによって決定され得る。或いは、毒性及びオフターゲット効果のレベ

ルを最小限に抑えるために、Ｃａｓニッカーゼｍ ＲＮＡ（例えば、Ｄ１０Ａ変異を有する化膿レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９）は、対象とする部位を標的とする一対のガイドＲＮＡとともに送達され得る。ガイド配列及び毒性及びオフターゲット効果を最小限に抑えるための手法は、国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）にあるとおりであり得；又は、本明細書にあるように変異による。

【０３４８】

典型的に、内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関して、ＣＲＩＳＰＲ複合体（標的配列にハイブリダイズされ、１つ以上のＣａｓタンパク質と複合体形成されるガイド配列を含む）の形成は、標的配列又はその近傍（例えば、標的配列から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、又はそれ以上の塩基対以内）に一方又は両方の鎖の切断をもたらす。理論に制約されるのを望むものではないが、野生型ｔｒａｃｒ配列の全て又は一部を含むか又はそれからなり得るｔｒａｃｒ配列（例えば、野生型ｔｒａｃｒ配列の約又は約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５超、又はそれ以上のヌクレオチド）はまた、ガイド配列に動作可能に連結されるｔｒａｃｒメイト配列の全て又は一部に、ｔｒａｃｒ配列の少なくとも一部に沿ってハイブリダイゼーションなどによってＣＲＩＳＰＲ複合体の一部を形成し得る。

【０３４９】

特定の実施形態において、本発明のガイドは、非天然核酸及び／又は非天然ヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体、及び／又は化学修飾を含む。非天然核酸は、例えば、天然及び非天然ヌクレオチドの混合物を含み得る。非天然ヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体は、リボース、ホスフェート、及び／又は塩基部分で修飾され得る。本発明の一実施形態において、ガイド核酸は、リボヌクレオチド及び非リボヌクレオチドを含む。このような一実施形態において、ガイドは、１つ以上のリボヌクレオチド及び１つ以上のデオキシリボヌクレオチドを含む。本発明の一実施形態において、ガイドは、１つ以上の非天然ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体、例えば、ホスホロチオエート結合、ボラノホスフェート結合を有するヌクレオチド、リボース環の２’及び４’炭素間にメチレン架橋を含むロックト核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチド、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、又は架橋核酸（ＢＮＡ）を含む。修飾ヌクレオチドの他の例としては、２’－Ｏ－メチル類似体、２’－デオキシ類似体、２－チオウリジン類似体、Ｎ６－メチルアデノシン類似体、又は２’－フルオロ類似体が挙げられる。修飾ヌクレオチドのさらなる例としては、限定はされないが、ペプチド、核局在配列（ＮＬＳ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、トリエチレングリコール、又はテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）を含む、２’位における化学部分の結合が挙げられる。修飾塩基のさらなる例としては、限定はされないが、２－アミノプリン、５－ブロモ－ウリジン、プソイドウリジン（Ψ）、Ｎ$^{1}$－メチルプソイドウリジン（ｍｅ$^{1}$Ψ）、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）、イノシン、７－メチルグアノシンが挙げられる。ガイドＲＮＡ化学修飾の例としては、限定はされないが、１つ以上の末端ヌクレオチドにおける、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、ホスホロチオエート（ＰＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、２’－Ｏ－メチル－３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）、又は２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホノアセテート（ＭＰ）の組み込みが挙げられる。このような化学修飾されたガイドは、非修飾ガイドと比較して増加した安定性及び増加した活性を含み得るが、オンターゲット対オフターゲット特異性は、予測されない。（Ｈｅｎｄｅｌ，２０１５，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３３（９）：９８５－９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３２９０，２０１５年６月２９日にオンラインで公開；Ｒａｇｄａｒｍ ｅｔ ａｌ．，０２１５，ＰＮＡＳ，Ｅ７１１０－Ｅ７１１１；Ａｌｌｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００５，４８：９０１－９０４；Ｂｒａｍｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ．Ｇｅｎｅｔ．，２０１２，３：１５４；Ｄｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，２０１５，１１２：１１８７０－１１８７５；Ｓｈａｒｍａ ｅｔ ａｌ．，ＭｅｄＣｈｅｍＣｏｍｍ．，２０１４，５：１４５４－１４７１；Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ

．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３（９）：９８５－９８９；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１，００６６ ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１５５１－０１７－００６６；Ｒｙａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１８）４６（２）：７９２－８０３を参照）。ある実施形態において、ガイドＲＮＡの５’及び／又は３’末端は、蛍光色素、ポリエチレングリコール、コレステロール、タンパク質、又は検出タグを含む様々な官能基で修飾される。（Ｋｅｌｌｙ ｅｔ ａｌ．，２０１６，Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２３３：７４－８３を参照）。特定の実施形態において、ガイドは、標的ＤＮＡに結合する領域にリボヌクレオチドを含み、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、又はＣ２ｃ１に結合する領域に１つ以上のデオキシリボヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体を含む。本発明の一実施形態において、デオキシリボヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体は、操作されたガイド構造、例えば、限定はされないが、５’及び／又は３’末端、ステムループ領域、及びシード領域に組み込まれる。特定の実施形態において、修飾は、ステムループ領域の５’－ハンドルにはない。ガイドのステムループ領域の５’－ハンドルにおける化学修飾は、その機能を無効にし得る（Ｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１：００６６を参照）。特定の実施形態において、ガイドの少なくとも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、３５、４０、４５、５０、又は７５個のヌクレオチドが化学修飾される。ある実施形態において、ガイドの３’又は５’末端のいずれかにおける３～５個のヌクレオチドが化学修飾される。ある実施形態において、若干の修飾、例えば、２’－Ｆ修飾のみがシード領域に導入される。ある実施形態において、２’－Ｆ修飾は、ガイドの３’末端に導入される。特定の実施形態において、ガイドの５’及び／又は３’末端における３～５個のヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、２’－Ｏ－メチル－３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）、又は２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホノアセテート（ＭＰ）で化学修飾される。このような修飾により、ゲノム編集効率が向上され得る（Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３（９）：９８５－９８９；Ｒｙａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１８）４６（２）：７９２－８０３を参照）。特定の実施形態において、ガイドのホスホジエステル結合の全てが、遺伝子破壊のレベルを向上させるために、ホスホロチオネート（ＰＳ）で置換される。特定の実施形態において、ガイドの５’及び／又は３’末端における５個を超えるヌクレオチドが、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ又はＳ－拘束エチル（ｃＥｔ）で化学修飾される。このような化学修飾されたガイドは、向上されたレベルの遺伝子破壊を媒介し得る（Ｒａｇｄａｒｍ ｅｔ ａｌ．，０２１５，ＰＮＡＳ，Ｅ７１１０－Ｅ７１１１を参照）。本発明の一実施形態において、ガイドは、その３’及び／又は５’末端に化学部分を含むように修飾される。このような部分としては、限定はされないが、アミン、アジド、アルキン、チオ、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）、ローダミン、ペプチド、核局在配列（ＮＬＳ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、トリエチレングリコール、又はテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）が挙げられる。特定の実施形態において、化学部分は、アルキル鎖などのリンカーによってガイドにコンジュゲートされる。特定の実施形態において、修飾ガイドの化学部分は、ガイドを、別の分子、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、又はナノ粒子に結合するために使用され得る。このような化学修飾されたガイドは、ＣＲＩＳＰＲシステムによって一般に編集される細胞を特定又は濃縮するために使用され得る（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，ｅＬｉｆｅ，２０１７，６：ｅ２５３１２，ＤＯＩ：１０．７５５４を参照）。ある実施形態において、３’及び５’末端のそれぞれにおける３つのヌクレオチドが化学修飾される。特定の実施形態において、修飾は、２’－Ｏ－メチル又はホスホロチオエート類似体を含む。特定の実施形態において、テトラループにおける１２個のヌクレオチド及びステムループ領域における１６個のヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル類似体で置換される。このような化学修飾により、インビ

ボ編集及び安定性が改善される（Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ（２０１８），２２：２２２７－２２３５を参照）。ある実施形態において、ガイドの６０又は７０超のヌクレオチドが化学修飾される。ある実施形態において、この修飾は、２’－Ｏ－メチル又は２’－フルオロヌクレオチド類似体によるヌクレオチドの置換又はホスホジエステル結合のホスホロチオエート（ＰＳ）修飾を含む。ある実施形態において、化学修飾は、ＣＲＩＳＰＲ複合体が形成されるときにヌクレアーゼタンパク質の外側に延びるガイドヌクレオチドの２’－Ｏ－メチル又は２’－フルオロ修飾又はガイドの３’末端の２０～３０又はそれ以上のヌクレオチドのＰＳ修飾を含む。特定の実施形態において、化学修飾は、ガイドの５’末端における２’－Ｏ－メチル類似体又はシード及びテール領域における２’－フルオロ類似体をさらに含む。このような化学修飾により、ヌクレアーゼ分解に対する安定性が改善され、ゲノム編集活性又は効率が維持又は強化されるが、全てのヌクレオチドの修飾は、ガイドの機能を無効にし得る（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．（２０１８），３５（１２）：１１７９－１１８７を参照）。このような化学修飾は、限られた数のヌクレアーゼ及びＲＮＡ２’－ＯＨ相互作用の知識を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体の構造の知識によって導かれ得る（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．（２０１８），３５（１２）：１１７９－１１８７を参照）。ある実施形態において、１つ以上のガイドＲＮＡヌクレオチドは、ＤＮＡヌクレオチドで置換され得る。ある実施形態において、５’末端テール／シードのガイド領域の最大で２、４、６、８、１０、又は１２個のＲＮＡヌクレオチドが、ＤＮＡヌクレオチドで置換される。特定の実施形態において、３’末端におけるガイドＲＮＡヌクレオチドの大部分が、ＤＮＡヌクレオチドで置換される。特定の実施形態において、３’末端における１６個のガイドＲＮＡヌクレオチドが、ＤＮＡヌクレオチドで置換される。特定の実施形態において、５’末端テール／シード領域における８個のガイドＲＮＡヌクレオチド及び３’末端における１６個のＲＮＡヌクレオチドが、ＤＮＡヌクレオチドで置換される。特定の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ複合体が形成されるときにヌクレアーゼタンパク質の外側に延びるガイドＲＮＡヌクレオチドが、ＤＮＡヌクレオチドで置換される。ＤＮＡヌクレオチドによる複数のＲＮＡヌクレオチドのこのような置換は、非修飾ガイドと比較して、減少したオフターゲット活性は低下したが、オンターゲット活性は同様であったが；３’末端における全てのＲＮＡヌクレオチドの置換は、ガイドの機能を無効にし得る（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．（２０１８）１４，３１１－３１６を参照）。このような修飾は、限られた数のヌクレアーゼ及びＲＮＡ　２’－ＯＨ相互作用の知識を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体の構造の知識によって導かれ得る（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．（２０１８）１４，３１１－３１６を参照）。

【０３５０】

本発明の一実施形態において、ガイドは、５’－ハンドル並びにシード領域及び３’末端をさらに含むガイドセグメントを有する、Ｃｐｆ１用の修飾されたｃｒＲＮＡを含む。ある実施形態において、修飾ガイドは、アシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）ＢＶ３Ｌ６　Ｃｐｆ１（ＡｓＣｐｆ１）；野兎病菌亜種ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　ｓｕｂｓｐ．Ｎｏｖｉｃｉｄａ）Ｕ１１２　Ｃｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１）；Ｌ．バクテリウム（Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＭＣ２０１７　Ｃｐｆ１（Ｌｂ３Ｃｐｆ１）；ブチリビブリオ・プロテオクラスティカス（Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ　ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ）Ｃｐｆ１（ＢｐＣｐｆ１）；パークバクテリア・バクテリウム（Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＧＷＣ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７　Ｃｐｆ１（ＰｂＣｐｆ１）；ペレグリニバクテリア・バクテリウム（Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ＿３３＿１０　Ｃｐｆ１（ＰｅＣｐｆ１）；レプトスピラ・イナダイ（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ　ｉｎａｄａｉ）Ｃｐｆ１（ＬｉＣｐｆ１）；スミセラ属（Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ　ｓｐ．）ＳＣ＿Ｋ０８Ｄ１７　Ｃｐｆ１（ＳｓＣｐｆ１）；Ｌ．バクテリウム（Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＭＡ２０２０　Ｃｐｆ１（Ｌｂ２Ｃｐｆ１）；ポルフィロモナス・クレビオリカニス（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ）Ｃｐ

ｆ１（ＰｃＣｐｆ１）；ポルフィロモナス・マカカエ（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅ）Ｃｐｆ１（ＰｍＣｐｆ１）；カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム（Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ）Ｃｐｆ１（ＣＭｔＣｐｆ１）；ユーバクテリウム・エリゲンス（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ）Ｃｐｆ１（ＥｅＣｐｆ１）；モラクセラ・ボボクリ（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ）２３７ Ｃｐｆ１（ＭｂＣｐｆ１）；プレボテラ・ディシエンス（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ）Ｃｐｆ１（ＰｄＣｐｆ１）；又はＬ．バクテリウム（Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＮＤ２００６ Ｃｐｆ１（ＬｂＣｐｆ１）のいずれか１つのＣｐｆ１とともに使用され得る。

【０３５１】

ある実施形態において、ガイドの修飾は、化学修飾、挿入、欠失又は分割である。ある実施形態において、化学修飾としては、限定はされないが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）類似体、２’－デオキシ類似体、２－チオウリジン類似体、Ｎ６－メチルアデノシン類似体、２’－フルオロ類似体、２－アミノプリン、５－ブロモ－ウリジン、プソイドウリジン（Ψ）、Ｎ$^{1}$－メチルプソイドウリジン（ｍｅ$^{1}$Ψ）、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）、イノシン、７－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、ホスホロチオエート（ＰＳ）、２’－Ｏ－メチル－３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）、又は２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホノアセテート（ＭＰ）の組み込みが挙げられる。ある実施形態において、ガイドは、ホスホロチオエート修飾の１つ以上を含む。特定の実施形態において、ガイドの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又は２５個のヌクレオチドが化学修飾される。ある実施形態において、全てのヌクレオチドが化学修飾される。特定の実施形態において、シード領域における１つ以上のヌクレオチドが化学修飾される。特定の実施形態において、３’末端における１つ以上のヌクレオチドが化学修飾される。特定の実施形態において、５’－ハンドルにおけるヌクレオチドのいずれも化学修飾されない。ある実施形態において、シード領域における化学修飾は、若干の修飾、例えば、２’－フルオロ類似体の組み込みである。特定の実施形態において、シード領域の１つのヌクレオチドが、２’－フルオロ類似体で置換される。ある実施形態において、３’末端における５又は１０個のヌクレオチドが化学修飾される。Ｃｐｆ１ ＣｒＲＮＡの３’末端におけるこのような化学修飾により、遺伝子切断効率が改善される（Ｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１：００６６を参照）。特定の実施形態において、３’末端における５個のヌクレオチドが、２’－フルオロ類似体で置換される。特定の実施形態において、３’末端における１０個のヌクレオチドが、２’－フルオロ類似体で置換される。特定の実施形態において、３’末端における５つのヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）類似体で置換される。ある実施形態において、３’及び５’末端のそれぞれにおける３つのヌクレオチドが化学修飾される。特定の実施形態において、修飾は、２’－Ｏ－メチル又はホスホロチオエート類似体を含む。特定の実施形態において、テトラループにおける１２個のヌクレオチド及びステムループ領域における１６個のヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル類似体で置換される。このような化学修飾により、インビボ編集及び安定性が改善される（Ｆｉｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ（２０１８），２２：２２２７－２２３５を参照）。

【０３５２】

ある実施形態において、ガイドの５’－ハンドルのループが修飾される。ある実施形態において、ガイドの５’－ハンドルのループが、欠失、挿入、分割、又は化学修飾を有するように修飾される。特定の実施形態において、ループは、３、４、又は５個のヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、ループは、ＵＣＵＵ、ＵＵＵＵ、ＵＡＵＵ、又はＵＧＵＵの配列を含む。ある実施形態において、ガイド分子は、別々の非共有結合的に連結された配列でステムループを形成し、これは、ＤＮＡ又はＲＮＡであり得る。

【０３５３】

合成的に連結されたガイド

一実施形態において、ガイドは、化学的に連結されるか又は非ホスホジエステル結合を介してコンジュゲートされるｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒメイト配列を含む。一実施形態において、ガイドは、化学的に連結されるか又は非ヌクレオチドループを介してコンジュゲートされるｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒメイト配列を含む。ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、非ホスホジエステル共有結合リンカーを介して結合される。共有結合リンカーの例としては、限定はされないが、カルバメート、エーテル、エステル、アミド、イミン、アミジン、アミノトリアジン、ヒドロゾン（ｈｙｄｒｏｚｏｎｅ）、ジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ホスホロチオネート、ホスホロジチオエート、スルホンアミド、スルホネート、フルホン（ｆｕｌｆｏｎｅ）、スルホキシド、尿素、チオ尿素、ヒドラジド、オキシム、トリアゾール、光解離性結合、ディールス・アルダー環化付加対又は閉環メタセシス対、及びマイケル反応対などのＣ－Ｃ結合形成基からなる群から選択される化学部分が挙げられる。

【０３５４】

ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、最初に、標準的なホスホロアミダイト合成プロトコル（Ｈｅｒｄｅｗｉｊｎ，Ｐ．，ｅｄ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｃｏｌ ２８８，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ（２０１２））を用いて合成される。ある実施形態において、ｔｒａｃｒ又はｔｒａｃｒメイト配列は、当該技術分野において公知の標準的なプロトコル（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（２０１３））を用いて、ライゲーションに適切な官能基を含むように官能化され得る。官能基の例としては、限定はされないが、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸活性エステル、アルデヒド、カルボニル、クロロカルボニル、イミダゾリルカルボニル、ヒドロジド、セミカルバジド、チオセミカルバジド、チオール、マレイミド、ハロアルキル、スルホニル、アリル、プロパルギル、ジエン、アルキン、及びアジドが挙げられる。ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列が官能化された後、共有結合的化学結合又は連結が、２つのオリゴヌクレオチド間で形成され得る。化学結合の例としては、限定はされないが、カルバメート、エーテル、エステル、アミド、イミン、アミジン、アミノトリアジン、ヒドロゾン、ジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ホスホロチオネート、ホスホロジチオエート、スルホンアミド、スルホネート、フルホン、スルホキシド、尿素、チオ尿素、ヒドラジド、オキシム、トリアゾール、光解離性結合、ディールス・アルダー環化付加対又は閉環メタセシス対、及びマイケル反応対などのＣ－Ｃ結合形成基に基づくものが挙げられる。

【０３５５】

ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、化学合成され得る。ある実施形態において、化学合成は、２’－アセトキシエチルオルソエステル（２’－ＡＣＥ）（Ｓｃａｒｉｎｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９９８）１２０：１１８２０－１１８２１；Ｓｃａｒｉｎｇｅ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．（２０００）３１７：３－１８）又は２’－チオノカルバメート（２’－ＴＣ）化学（Ｄｅｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（２０１１）１３３：１１５４０－１１５４６；Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３：９８５－９８９）による自動固相オリゴヌクレオチド合成機械を使用する。

【０３５６】

ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、糖、ヌクレオチド間ホスホジエステル結合、プリン及びピリミジン残基の修飾を介して様々なバイオコンジュゲーション反応、ループ、架橋、及び非ヌクレオチド連結を用いて共有結合され得る。Ｓｌｅｔｔｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．（２００９）４８

：６９７４－６９９８；Ｍａｎｏｈａｒａｎ，Ｍ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．（２００４）８：５７０－９；Ｂｅｈｌｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ（２００８）１８：３０５－１９；Ｗａｔｔｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃｏｖ．Ｔｏｄａｙ（２００８）１３：８４２－５５；Ｓｈｕｋｌａ，ｅｔ ａｌ．，ＣｈｅｍＭｅｄＣｈｅｍ（２０１０）５：３２８－４９。

【０３５７】

ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、クリックケミストリーを用いて共有結合され得る。ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、トリアゾールリンカーを用いて共有結合され得る。ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、アルキン及びアジドドに関与するヒュスゲン１，３－双極性環状付加反応を用いて共有結合されて、高度に安定なトリアゾールリンカーが得られる（Ｈｅ ｅｔ ａｌ．，ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ（２０１５）１７：１８０９－１８１２；国際公開第２０１６／１８６７４５号パンフレット）。ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、５’－ヘキシンｔｒａｃｒＲＮＡ及び３’－アジドｃｒＲＮＡをライゲートすることによって共有結合される。ある実施形態において、５’－ヘキシンｔｒａｃｒＲＮＡ及び３’－アジドｃｒＲＮＡのいずれか又は両方が、２’－アセトキシエチルオルトエステル（２’－ＡＣＥ）基で保護され得、これが、その後、Ｄｈａｒｍａｃｏｎプロトコルを用いて除去され得る（Ｓｃａｒｉｎｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９９８）１２０：１１８２０－１１８２１；Ｓｃａｒｉｎｇｅ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．（２０００）３１７：３－１８）。

【０３５８】

ある実施形態において、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒメイト配列は、スペーサー、結合、バイオコンジュゲート、発色団、レポーター基、色素標識ＲＮＡ、及び非天然ヌクレオチド類似体などの部分を含むリンカー（例えば、非ヌクレオチドループ）を介して共有結合され得る。より具体的には、本発明のための好適なスペーサーとしては、限定はされないが、ポリエーテル（例えば、ポリエチレングリコール、多価アルコール、ポリプロピレングリコール又はエチレングリコールと及びプロピレングリコールとの混合物）、ポリアミン基（例えば、スペルミン（ｓｐｅｎｎｉｎｅ）、スペルミジン及びそれらのポリマー誘導体）、ポリエステル（例えば、ポリ（アクリル酸エチル））、ポリホスホジエステル、アルキレン、及びそれらの組合せが挙げられる。好適な結合としては、リンカーにさらなる特性を付加するためにリンカーに付加され得る任意の部分、例えば、限定はされないが、蛍光標識が挙げられる。好適なバイオコンジュゲートとしては、限定はされないが、ペプチド、グリコシド、脂質、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロール及びジアルキルグリセロール、脂肪酸、炭化水素、酵素基質、ステロイド、ビオチン、ジゴキシゲニン、炭水化物、多糖が挙げられる。好適な発色団、レポーター基、及び色素標識ＲＮＡとしては、限定はされないが、蛍光色素、例えば、フルオレセイン及びローダミン、化学発光、電気化学発光、及び生物発光マーカー化合物が挙げられる。２つのＲＮＡ構成要素をコンジュゲートする例のリンカーの設計はまた、国際特許出願公報国際公開第２００４／０１５０７５号パンフレットに記載されている。

【０３５９】

リンカー（例えば、非ヌクレオチドループ）は、任意の長さのものであり得る。ある実施形態において、リンカーは、約０～１６ヌクレオチドに相当する長さを有する。ある実施形態において、リンカーは、約０～８ヌクレオチドに相当する長さを有する。ある実施形態において、リンカーは、約０～４ヌクレオチドに相当する長さを有する。ある実施形態において、リンカーは、約２ヌクレオチドに相当する長さを有する。例のリンカーの設計はまた、国際特許出願公報国際公開第２０１１／００８７３０号パンフレットに記載されている。

【０３６０】

典型的なＩＩ型Ｃａｓ９ ｓｇＲＮＡは、（５’から３’の方向に）：ガイド配列、ポリＵトラクト、第１の相補的ストレッチ（「リピート」）、ループ（テトラループ）、第２

の相補的ストレッチ（リピートに相補的な「アンチリピート」）、ステム、並びにさらなるステムループ及びステム及びポリＡ（ＲＮＡでは多くの場合ポリＵ）テール（ターミネーター）を含む。好ましい実施形態において、ガイド構造の特定の実施形態は保持され、ガイド構造の特定の実施形態は、例えば特徴の付加、除去、又は置換によって修飾され得る一方、ガイド構造の特定の他の実施形態は維持される。限定はされないが、挿入、欠失、及び置換を含む、操作されたｓｇＲＮＡ修飾のための好ましい位置としては、ガイド末端及びＣＲＩＳＰＲタンパク質及び／又は標的と複合体形成されるときに曝露されるｓｇＲＮＡの領域、例えば、テトラループ及び／又はループ２が挙げられる。

【０３６１】

特定の実施形態において、本発明のガイドは、アダプタータンパク質のための特定の結合部位（例えば、アプタマー）を含み、これは、１つ以上の機能的ドメインを（例えば、融合タンパク質を介して）含み得る。このようなガイドがＣＲＩＳＰＲ複合体（すなわち、ガイド及び標的に結合するＣＲＩＳＰＲ酵素）を形成する場合、アダプタータンパク質が結合し、アダプタータンパク質に関連する機能的ドメインは、属性機能が有効であるために有利な空間的配向で配置される。例えば、機能的ドメインが転写活性化因子（例えば、ＶＰ６４又はｐ６５）である場合、転写活性化因子は、それが標的の転写に影響を与えるのを可能にする空間的配向で配置される。同様に、転写リプレッサーは、標的の転写に影響を与えるように有利に配置され、ヌクレアーゼ（例えば、Ｆｏｋ１）は、標的を切断又は部分的に切断するように有利に配置されるであろう。

【０３６２】

当業者は、アダプター＋機能的ドメインの結合を可能にするが、アダプター＋機能的ドメインの適切な配置を可能にしない（例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体の三次元構造内の立体障害に起因する）ガイドに対する修飾が、意図されない修飾であることを理解するであろう。１つ以上の修飾ガイドは、本明細書に記載されるように、テトラループ、ステムループ１、ステムループ２、又はステムループ３において、好ましくは、テトラループ又はステムループ２のいずれかにおいて、最も好ましくは、テトラループ及びステムループ２の両方において修飾され得る。

【０３６３】

リピート：アンチリピート二本鎖は、ｓｇＲＮＡの二次構造から明らかであろう。それは、典型的に、（５’から３’の方向に）ポリＵトラクトの後及びテトラループの前の第１の相補的ストレッチ；及び（５’から３’の方向に）テトラループの後及びポリＡトラクトの前の第２の相補的ストレッチであり得る。第１の相補的ストレッチ（「リピート」）は、第２の相補的ストレッチ（「アンチリピート」）に相補的である。したがって、それらは、ワトソン・クリック塩基対合して、互いに折り畳まれるときにｄｓＲＮＡの二本鎖を形成する。したがって、アンチリピート配列は、Ａ－Ｕ又はＣ－Ｇ塩基対合の観点から、また、アンチリピートがテトラループに起因して逆方向であるという観点からも、リピートの相補的配列である。

【０３６４】

本発明の一実施形態において、ガイド構造の修飾は、ステムループ２における塩基を置換することを含む。例えば、ある実施形態において、ステムループ２における「ａｃｔｔ」（ＲＮＡでは「ａｃｕｕ」）及び「ａａｇｔ」（ＲＮＡでは「ａａｇｕ」）塩基は、「ｃｇｃｃ」及び「ｇｃｇｇ」で置換される。ある実施形態において、ステムループ２における「ａｃｔｔ」及び「ａａｇｔ」塩基は、４ヌクレオチドの相補的ＧＣリッチ領域で置換される。ある実施形態において、４ヌクレオチドの相補的ＧＣリッチ領域は、「ｃｇｃｃ」及び「ｇｃｇｇ」（両方とも５’から３’の方向に）である。ある実施形態において、４ヌクレオチドの相補的ＧＣリッチ領域は、「ｇｃｇｇ」及び「ｃｇｃｃ」（両方とも５’から３’の方向に）である。４ヌクレオチドの相補的ＧＣリッチ領域におけるＣ及びＧの他の組合せは、ＣＣＣＣ及びＧＧＧＧを含めて明らかであろう。

【０３６５】

一実施形態において、ステムループ２、例えば、「ＡＣＴＴｇｔｔｔＡＡＧＴ」（配列

番号３６）は、任意の「ＸＸＸＸｇｔｔｔＹＹＹＹ」（配列番号３７）で置換され得、例えば、ＸＸＸＸ及びＹＹＹＹは、互いに塩基対合してステムを生成するヌクレオチドの任意の相補的なセットを表す。

【０３６６】

一実施形態において、ステムは、相補的なＸ及びＹ配列を含む少なくとも約４ｂｐを含むが、より多くのステム、例えば、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２又はそれ以下、例えば、３、２塩基対も考えられる。したがって、例えばＸ２－１２及びＹ２－１２（Ｘ及びＹは、ヌクレオチドの任意の相補的なセットを表す）が考えられ得る。一実施形態において、Ｘ及びＹヌクレオチドで作製されたステムは、「ｇｔｔｔ」と一緒に、全体二次構造において完全なヘアピンを形成し；これは、有利であり得、塩基対の量は、完全なヘアピンを形成する任意の量であり得る。一実施形態において、任意の相補的Ｘ：Ｙ塩基対合配列（例えば、長さに関して）は、全ｓｇＲＮＡの二次構造が保存される限り許容される。一実施形態において、ステムは、それがＤＲ：ｔｒａｃｒ二本鎖、及び３ステムループを有することから、全ｓｇＲＮＡの二次構造を破壊しないＸ：Ｙ塩基対合の形態であり得る。一実施形態において、ＡＣＴＴ及びＡＡＧＴ（又はＸ：Ｙ塩基対で作製された任意の代替的なステム）を接続する「ｇｔｔｔ」テトラループは、ｓｇＲＮＡの全二次構造を破壊しない同じ長さ（例えば、４塩基対）又はより長い任意の配列であり得る。一実施形態において、ステムループは、ステムループ２をさらに伸ばすものであることができ、例えば、ＭＳ２アプタマーであり得る。一実施形態において、ステムループ３「ＧＧＣＡＣＣＧａｇｔＣＧＧＴＧＣ」（配列番号３８）は、同様に「ＸＸＸＸＸＸＸａｇｔＹＹＹＹＹＹＹ」（配列番号３９）の形態をとることができ、例えば、Ｘ７及びＹ７は、互いに塩基対合してステムを生成するヌクレオチドの任意の相補的なセットを表す。一実施形態において、ステムは、相補的なＸ及びＹ配列を含む約７ｂｐを含むが、より多い又はより少ない塩基対のステムも考えられる。一実施形態において、Ｘ及びＹヌクレオチドで作製されたステムは、「ａｇｔ」と一緒に、全二次構造において完全なヘアピンを形成するであろう。一実施形態において、任意の相補的なＸ：Ｙ塩基対合配列は、全ｓｇＲＮＡの二次構造が保存される限り許容される。一実施形態において、ステムは、それがＤＲ：ｔｒａｃｒ二本鎖、及び３ステムループを有することから、全ｓｇＲＮＡの二次構造を破壊しないＸ：Ｙ塩基対合の形態であり得る。一実施形態において、ステムループ３の「ａｇｔ」配列は、アプタマー、例えば、ステムループ３の構造を他の形で一般に保存するＭＳ２アプタマー又は配列によって延長又は置換され得る。代替的なステムループ２及び／又は３の一実施形態において、各Ｘ及びＹ対は、任意の塩基対を指し得る。一実施形態において、非ワトソン・クリック塩基対合が考えられ、このような対合は、その位置でステムループの構造を他の形で一般に保存する。

【０３６７】

一実施形態において、ＤＲ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖は、形態：ｇＹＹＹＹａｇ（Ｎ）ＮＮＮＮｘｘｘＮＮＮＮ（ＡＡＮ）ｕｕＲＲＲＲｕ（配列番号４０）（ヌクレオチドについての標準ＩＵＰＡＣ命名法を用いる）で置換され得、（Ｎ）及び（ＡＡＮ）は、二本鎖におけるバルジの一部を表し、「ｘｘｘｘ」は、リンカー配列を表す。ダイレクトリピートにおけるＮＮＮＮは、ｔｒａｃｒＲＮＡの対応するＮＮＮＮ部分と塩基対合する限り、いずれのものでもよい。一実施形態において、ＤＲ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖は、それが全体構造を変化させない限り、任意の長さ（ｘｘｘｘ．．．）、任意の塩基組成物のリンカーによって接続され得る。

【０３６８】

一実施形態において、ｓｇＲＮＡの構造要件は、二本鎖及び３つのステムループを有することである。ほとんどの実施形態において、特定の塩基要件の多くについての実際の配列要件は、ＤＲ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖の構造は保存されるべきであるが、構造を生成する配列、すなわち、ステム、ループ、バルジなどが変化され得る点で緩い。

【０３６９】

アプタマー

第１のアプタマー／ＲＮＡ－結合タンパク質対を有する１つのガイドは、活性化因子に連結又は融合され得る一方、第２のアプタマー／ＲＮＡ－結合タンパク質対を有する第２のガイドは、リプレッサーに連結又は融合され得る。ガイドは、異なる標的（遺伝子座）に対するものであるため、これは、１つの遺伝子が活性化され、１つが抑制されるのを可能にする。例えば、以下の概要は、このような手法を示す：

【０３７０】

ガイド１－ＭＳ２アプタマー－－－－－－－－ＭＳ２　ＲＮＡ－結合タンパク質－－－－－－－－ＶＰ６４活性化因子；及び

【０３７１】

ガイド２－ＰＰ７アプタマー－－－－－－－－ＰＰ７　ＲＮＡ－結合タンパク質－－－－－－－－ＳＩＤ４ｘリプレッサー。

【０３７２】

本発明はまた、直交ＰＰ７／ＭＳ２遺伝子標的化に関する。この例では、異なる遺伝子座を標的とするｓｇＲＮＡは、ＭＳ２－ＶＰ６４又はＰＰ７－ＳＩＤ４Ｘを動員するために異なるＲＮＡループで修飾され、これは、それぞれ、標的遺伝子座を活性化及び抑制する。ＰＰ７は、バクテリオファージシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）のＲＮＡ結合コートタンパク質である。ＭＳ２と同様に、それは、特定のＲＮＡ配列及び二次構造に結合する。ＰＰ７　ＲＮＡ認識モチーフは、ＭＳ２のものとは異なる。その結果、ＰＰ７及びＭＳ２は、異なるゲノム遺伝子座で同時に異なる効果を媒介するように多重化され得る。例えば、遺伝子座Ａを標的とするｓｇＲＮＡは、ＭＳ２－ＶＰ６４活性化因子を動員しながら、ＭＳ２ループで修飾され得る一方、遺伝子座Ｂを標的とする別のｓｇＲＮＡは、ＰＰ７－ＳＩＤ４Ｘリプレッサードメインを動員しながら、ＰＰ７ループで修飾され得る。したがって、同じ細胞内で、ｄＣａｓ９は、直交的な遺伝子座特異的な修飾を媒介し得る。この原理は、Ｑ－βなどの他の直交ＲＮＡ結合タンパク質を組み込むように拡大され得る。

【０３７３】

直交的な抑制のための代替的な選択肢としては、相互作用的抑制的機能を有する非コードＲＮＡループをガイドに（ガイドに組み込まれるＭＳ２／ＰＰ７ループと同様の位置又はガイドの３’末端のいずれかで）組み込むことが挙げられる。例えば、ガイドを、ノンコーディング（であるが抑制的であることが知られている）ＲＮＡループ（例えば、哺乳類細胞内でＲＮＡポリメラーゼＩＩを妨げるＡｌｕリプレッサーを（ＲＮＡ内で）使用する）を用いて設計した。Ａｌｕ　ＲＮＡ配列は、本明細書において使用されるＭＳ２　ＲＮＡ配列の代わりに（例えば、テトラループ及び／若しくはステムループ２に）；及び／又はガイドの３’末端に位置した。これにより、テトラループ及び／又はステムループ２位置で、ＭＳ２、ＰＰ７又はＡｌｕの可能な組合せ、並びに、任意に、ガイドの３’末端におけるＡｌｕの付加（リンカーを伴う又は伴わない）がもたらされる。

【０３７４】

２つの異なるアプタマー（異なるＲＮＡ）の使用により、活性化因子－アダプタータンパク質融合及びリプレッサー－アダプタータンパク質融合を、異なるガイドとともに、使用することが可能になり、１つの遺伝子の発現が活性化される一方、別の遺伝子が抑制される。それらは、それらの異なるガイドとともに、多重化された手法において、一緒に、又は実質的に一緒に投与され得る。例えば１０又は２０又は３０などの多数のこのような修飾ガイドは、全て同時に使用され得る一方、比較的少数のＣａｓ９が多数の修飾ガイドとともに使用され得るため、１つのみ（又は少なくとも最小数）のＣａｓ９が送達され得る。アダプタータンパク質は、１つ以上の活性化因子又は１つ以上のリプレッサーに関連（好ましくは、連結又は融合）し得る。例えば、アダプタータンパク質は、第１の活性化因子及び第２の活性化因子に関連し得る。第１及び第２の活性化因子は、同じであってもよいが、それらは、好ましくは、異なる活性化因子である。例えば、一方がＶＰ６４であり得る一方、他方がｐ６５であり得るが、これらは単なる例であり、他の転写活性化因子が想定される。３つ以上又はさらに４つ以上の活性化因子（又はリプレッサー）が使用さ

れてもよいが、パッケージサイズは、５つより多い異なる機能的ドメインの数を制限する場合がある。アダプタータンパク質への直接融合より、リンカーが、好ましくは使用され、２つ以上の機能的ドメインが、アダプタータンパク質に関連する。好適なリンカーは、ＧｌｙＳｅｒリンカーを含み得る。

【０３７５】

酵素－ガイド複合体が全体として２つ以上の機能的ドメインに関連し得ることも想定される。例えば、酵素に関連する２つ以上の機能的ドメインが存在してもよく、又は（１つ以上のアダプタータンパク質を介して）ガイドに関連する２つ以上の機能的ドメインが存在してもよく、又は酵素に関連する１つ以上の機能的ドメイン及び（１つ以上のアダプタータンパク質を介して）ガイドに関連する１つ以上の機能的ドメインが存在してもよい。

【０３７６】

アダプタータンパク質及び活性化因子又はリプレッサーの間の融合は、リンカーを含み得る。例えば、ＧｌｙＳｅｒリンカーＧＧＧＳが使用され得る。それらは、必要に応じて、好適な長さを得るために、３（（ＧＧＧＧＳ）$_3$（配列番号３５））又は６、９又はさらには１２又はそれ以上のリピートで使用され得る。リンカーは、ＲＮＡ－結合タンパク質及び機能的ドメイン（活性化因子又はリプレッサー）の間、又はＣＲＩＳＰＲ酵素（Ｃａｓ９）及び機能的ドメイン（活性化因子又はリプレッサー）の間で使用され得る。リンカーは、使用者に適切な量の「機械的柔軟性」を操作させる。

【０３７７】

不活性型ガイド（ｄｅａｄ　ｇｕｉｄｅ）

一実施形態において、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成及び標的への上首尾な結合を可能にすると同時に、上首尾なヌクレアーゼ活性を可能にしない（すなわち、ヌクレアーゼ活性がない／インデル活性がない）方式で修飾されるガイド配列を提供する。説明のために、このような修飾ガイド配列は、「不活性型ガイド」又は「不活性型ガイド配列」と呼ばれる。これらの不活性型ガイド又は不活性型ガイド配列は、ヌクレアーゼ活性に関して、触媒的に不活性又は立体配座的に不活性であると考えられ得る。ヌクレアーゼ活性は、当該技術分野において一般的に使用されるｓｕｒｖｅｙｏｒ分析又はディープシーケンシング、好ましくは、ｓｕｒｖｅｙｏｒ分析を用いて測定され得る。同様に、不活性型ガイド配列は、触媒活性を促進する能力又はオンターゲットとオフターゲットの結合活性を区別する能力に関して生産的な塩基対合に十分に関与しない可能性がある。簡潔には、ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイは、遺伝子に対するＣＲＩＳＰＲ標的部位を精製及び増幅すること並びにＣＲＩＳＰＲ標的部位を増幅するプライマーとヘテロ二本鎖を形成することを含む。再アニーリング後、産物を、製造業者の推奨プロトコルに従ってＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ及びＳＵＲＶＥＹＯＲエンハンサーＳ（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃｓ）で処理し、ゲル上で分析し、相対バンド強度に基づいて定量した。

【０３７８】

したがって、関連する実施形態において、本発明は、本明細書に記載される機能的Ｃａｓ９、及びガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む非天然又は操作された組成物Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを提供し、ｇＲＮＡは、不活性型ガイド配列を含み、それによって、ｇＲＮＡは、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムが、ＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイによって検出した際にシステムの非変異Ｃａｓ９酵素のヌクレアーゼ活性に起因する検出可能なインデル活性なしに、細胞内の対象とするゲノム遺伝子座に向けられるように、標的配列にハイブリダイズすることが可能である。簡潔にするために、ｇＲＮＡがＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムが、ＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイによって検出した際にシステムの非変異Ｃａｓ９酵素のヌクレアーゼ活性に起因する検出可能なインデル活性なしに細胞内の対象とするゲノム遺伝子座に向けられるように、標的配列にハイブリダイズすることが可能である不活性型ガイド配列を含むｇＲＮＡは、本明細書において「不活性型ｇＲＮＡ」と呼ばれる。本明細書における他の箇所に記載される本発明に係るｇＲＮＡのいずれかが、本明細書において以下に記載される不活性型ガイド配列を含む不活性型ｇＲＮＡ／ｇＲＮＡとして使用され得ることが理解されるべきである。本明細書における

他の箇所に記載される方法、生成物、組成物及び使用のいずれかが、以下にさらに詳述される不活性型ガイド配列を含む不活性型ｇＲＮＡ／ｇＲＮＡとともに等しく適用可能である。さらなる指針によって、以下の特定の実施形態及び実施形態が提供される。

【０３７９】

不活性型ガイド配列がＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を標的配列に指向する能力は、任意の好適なアッセイによって評価され得る。例えば、試験される不活性型ガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するために十分なＣＲＩＳＰＲシステムの構成要素は、ＣＲＩＳＰＲ配列の構成要素をコードするベクターによるトランスフェクションなどによって、対応する標的配列を有する宿主細胞に提供され、続いて、本明細書に記載されるＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどによって、標的配列内の優先的切断が評価され得る。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験される不活性型ガイド配列及び試験不活性型ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の構成要素を提供し、試験及び対照ガイド配列反応の間の標的配列での結合又は切断率を比較することによって、試験管において評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に想到されるであろう。不活性型ガイド配列は、任意の標的配列を標的とするように選択され得る。ある実施形態において、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。

【０３８０】

本明細書においてさらに説明されるように、いくつかの構造パラメータが、このような不活性型ガイドに到達するための適切なフレームワークを可能にする。不活性型ガイド配列は、活性なＣａｓ９特異的インデル形成をもたらすそれぞれのガイド配列より短い。不活性型ガイドは、活性なＣａｓ９特異的インデル形成をもたらす同じＣａｓ９に向けられるそれぞれのガイドより５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％短い。

【０３８１】

以下に説明され、当該技術分野において公知であるように、ｇＲＮＡ－Ｃａｓ９特異性の一実施形態は、ダイレクトリピート配列であり、これは、このようなガイドに適切に連結されるものである。特に、これは、ダイレクトリピート配列が、Ｃａｓ９の起源に応じて設計されることを示唆する。したがって、有効な不活性型ガイド配列のために利用可能な構造データが、Ｃａｓ９特異的同等物を設計するために使用され得る。例えば、２つ以上のＣａｓ９エフェクタータンパク質のオーソロガスヌクレアーゼドメインＲｕｖＣ間の構造的類似性が、デザインが同等の不活性型ガイドを転写するために使用され得る。したがって、本明細書における不活性型ガイドは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成及び標的への上首尾な結合を可能にすると同時に、上首尾なヌクレアーゼ活性を可能にしない、このようなＣａｓ９特異的同等物を反映するように、長さ及び配列が適切に修飾され得る。

【０３８２】

本明細書並びに従来技術との関連における不活性型ガイドの使用は、インビトロ、エキソビボ、及びインビボ用途において、多重遺伝子標的化、特に、二方向性の多重遺伝子標的化を可能にする、ネットワーク生物学及び／又はシステム生物学のための驚くべき予想外のプラットフォームを提供する。不活性型ガイドの使用の前に、例えば遺伝子活性の活性化、抑制及び／又はサイレンシングの複数の標的に対処することは、難題であり、ある場合には不可能である。不活性型ガイドを使用すると、複数の標的、ひいては複数の活性が、例えば、同じ細胞内で、同じ動物内で、又は同じ患者内で対処され得る。このような多重化は、同時に行われるか又は所望の時間枠のためにずらされてもよい。

【０３８３】

例えば、不活性型ガイドは最初に、ヌクレアーゼ活性の結果を伴わずに、遺伝子標的化の手段としてｇＲＮＡを使用することを可能にすると同時に、活性化又は抑制に向けられた手段を提供する。不活性型ガイドを含むガイドＲＮＡは、遺伝子活性の活性化又は抑制を可能にする方式で、要素、特に、遺伝子エフェクター（例えば、遺伝子活性の活性化因子又はリプレッサー）の機能的配置を可能にする本明細書における他の箇所に記載されるタンパク質アダプター（例えば、アプタマー）をさらに含むように修飾され得る。一例は、本明細書及び従来技術において説明されるように、アプタマーの組み込みである。タン

パク質と相互作用するアプタマーを組み込むように不活性型ガイドを含むｇＲＮＡを操作すること（参照により本明細書に援用される、Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｇｅｎｏｍｅ－ｓｃａｌｅ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｂｙ ａｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｃｏｍｐｌｅｘ”，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ１４１３６）によって、複数の異なるエフェクタードメインからなる合成転写活性化複合体を組み立てることができる。これは、天然の転写活性化プロセス後にモデル化され得る。例えば、エフェクター（例えば、活性化因子又はリプレッサー；活性化因子又はリプレッサーとの融合タンパク質としての二量体化ＭＳ２バクテリオファージコートタンパク質）に選択的に結合するアプタマー、又はエフェクター（例えば、活性化因子又はリプレッサー）にそれ自体結合するタンパク質が、不活性型ｇＲＮＡテトラループ及び／又はステム－ループ２に付加され得る。ＭＳ２の場合、融合タンパク質ＭＳ２－ＶＰ６４は、テトラループ及び／又はステム－ループ２に結合し、次に、例えばＮｅｕｒｏｇ２について、転写上方制御を媒介する。他の転写活性化因子は、例えば、ＶＰ６４．Ｐ６５、ＨＳＦ１、及びＭｙｏＤ１である。この概念の単なる例として、ＰＰ７と相互作用するステム－ループによるＭＳ２ステム－ループの置換が、抑制要素を動員するために使用され得る。

【０３８４】

したがって、一実施形態は、不活性型ガイドを含む本発明のｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、本明細書に記載される遺伝子活性化又は抑制をもたらす修飾をさらに含む。不活性型ｇＲＮＡは、１つ以上のアプタマーを含み得る。アプタマーは、遺伝子エフェクター、遺伝子活性化因子又は遺伝子リプレッサーに特異的であり得る。或いは、アプタマーは、特定の遺伝子エフェクター、遺伝子活性化因子又は遺伝子リプレッサーに特異的であり、それを動員し／それに結合するタンパク質に特異的であり得る。活性化因子又はリプレッサー動員について複数の部位が存在する場合、これらの部位は、活性化因子又はリプレッサーのいずれかに特異的であることが好ましい。活性化因子又はリプレッサー結合について複数の部位が存在する場合、これらの部位は、同じ活性化因子又は同じリプレッサーに特異的であり得る。これらの部位はまた、異なる活性化因子又は異なるリプレッサーに特異的であり得る。遺伝子エフェクター、遺伝子活性化因子、遺伝子リプレッサーは、融合タンパク質の形態で存在し得る。

【０３８５】

一実施形態において、本明細書に記載される不活性型ｇＲＮＡ又は本明細書に記載されるＣａｓ９ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体は、２つ以上のアダプタータンパク質を含む非天然又は操作された組成物を含み、各タンパク質が、１つ以上の機能的ドメインに関連し、アダプタータンパク質は、不活性型ｇＲＮＡの少なくとも１つのループに挿入された異なるＲＮＡ配列に結合する。

【０３８６】

したがって、一実施形態は、細胞内の対象とするゲノム遺伝子座における標的配列にハイブリダイズすることが可能な本明細書において定義される不活性型ガイド配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、少なくとも１つ以上の核局在配列を含み、任意に少なくとも１つの変異を含むＣａｓ９を含む非天然又は操作された組成物を提供し、不活性型ｇＲＮＡの少なくとも１つのループは、１つ以上のアダプタータンパク質に結合する異なるＲＮＡ配列の挿入によって修飾され、アダプタータンパク質は、１つ以上の機能的ドメインに関連し；又は、不活性型ｇＲＮＡは、少なくとも１つの非コード機能的ループを有するように修飾され、組成物は、２つ以上のアダプタータンパク質を含み、各タンパク質は、１つ以上の機能的ドメインに関連する。

【０３８７】

特定の実施形態において、アダプタータンパク質は、機能的ドメインを含む融合タンパク質であり、融合タンパク質は、アダプタータンパク質と機能的ドメインとの間にリンカーを任意に含み、リンカーは、ＧｌｙＳｅｒリンカーを任意に含む。

【０３８８】

特定の実施形態において、不活性型ｇＲＮＡの少なくとも１つのループは、２つ以上のアダプタータンパク質に結合する異なるＲＮＡ配列の挿入によって修飾されない。

【０３８９】

特定の実施形態において、アダプタータンパク質に関連する１つ以上の機能的ドメインは、転写活性化ドメインである。

【０３９０】

特定の実施形態において、アダプタータンパク質に関連する１つ以上の機能的ドメインは、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ又はＳＥＴ７／９を含む転写活性化ドメインである。

【０３９１】

特定の実施形態において、アダプタータンパク質に関連する１つ以上の機能的ドメインは、転写抑制因子ドメインである。

【０３９２】

特定の実施形態において、転写抑制因子ドメインは、ＫＲＡＢドメインである。

【０３９３】

特定の実施形態において、転写抑制因子ドメインは、ＮｕＥドメイン、ＮｃｏＲドメイン、ＳＩＤドメイン又はＳＩＤ４Ｘドメインである。

【０３９４】

特定の実施形態において、アダプタータンパク質に関連する１つ以上の機能的ドメインの少なくとも１つは、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、ＤＮＡ組み込み活性ＲＮＡ切断活性、ＤＮＡ切断活性又は核酸結合活性を含む１つ以上の活性を有する。

【０３９５】

特定の実施形態において、ＤＮＡ切断活性は、Ｆｏｋ１ヌクレアーゼに起因する。

【０３９６】

特定の実施形態において、不活性型ｇＲＮＡは、不活性型ｇＲＮＡが、アダプタータンパク質に結合し、Ｃａｓ９及び標的にさらに結合した後、機能的ドメインが、機能的ドメインがその属性機能で機能するのを可能にする空間的配向にあるように修飾される。

【０３９７】

特定の実施形態において、不活性型ｇＲＮＡの少なくとも１つのループは、テトラループ及び／又はループ２である。特定の実施形態において、不活性型ｇＲＮＡのテトラループ及びループ２は、異なるＲＮＡ配列の挿入によって修飾される。

【０３９８】

特定の実施形態において、１つ以上のアダプタータンパク質に結合する異なるＲＮＡ配列の挿入は、アプタマー配列である。特定の実施形態において、アプタマー配列は、同じアダプタータンパク質に特異的な２つ以上のアプタマー配列である。特定の実施形態において、アプタマー配列は、異なるアダプタータンパク質に特異的な２つ以上のアプタマー配列である。

【０３９９】

特定の実施形態において、アダプタータンパク質は、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、ΦＣｂ５、ΦＣｂ８ｒ、ΦＣｂ１２ｒ、ΦＣｂ２３ｒ、７ｓ、ＰＲＲ１を含む。

【０４００】

特定の実施形態において、細胞は、真核細胞である。特定の実施形態において、真核細胞は、哺乳動物細胞、任意にマウス細胞である。特定の実施形態において、哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。

【０４０１】

特定の実施形態において、第１のアダプタータンパク質は、ｐ６５ドメインに関連し、第２のアダプタータンパク質は、ＨＳＦ１ドメインに関連している。

【０４０２】
特定の実施形態において、組成物は、少なくとも３つの機能的ドメイン（その少なくとも１つが、Ｃａｓ９に関連し、その少なくとも２つが、不活性型ｇＲＮＡに関連している）を有するＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を含む。
【０４０３】
特定の実施形態において、組成物は、第２のｇＲＮＡをさらに含み、第２のｇＲＮＡは、第２のＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムが、システムのＣａｓ９酵素のヌクレアーゼ活性に起因する第２のゲノム遺伝子座における検出可能なインデル活性を有する細胞内の対象とする第２のゲノム遺伝子座に向けられるように、第２の標的配列にハイブリダイズすることが可能な活性型ｇＲＮＡである。
【０４０４】
特定の実施形態において、組成物は、複数の不活性型ｇＲＮＡｓ及び／又は複数の活性型ｇＲＮＡをさらに含む。
【０４０５】
本発明の一実施形態は、ｇＲＮＡ足場のモジュラリティ及びカスタマイズ性を利用して、異なるタイプのエフェクターを直交的に動員するために、異なる結合部位（特に、アプタマー）を有する一連のｇＲＮＡ足場を確立するためのものである。この場合もやはり、例示及びより広い概念の説明のために、ＰＰ７と相互作用するステム－ループによるＭＳ２ステム－ループの置換が、抑制要素を結合／動員し、多重化された二方向性の転写制御を可能にするために使用され得る。したがって、一般に、不活性型ガイドを含むｇＲＮＡは、多重転写制御及び好ましい二方法性の転写制御をもたらすために用いられ得る。この転写制御は、遺伝子の最も好ましいものである。例えば、不活性型ガイドを含む１つ以上のｇＲＮＡは、１つ以上の標的遺伝子の活性化を標的化する際に用いられ得る。同時に、不活性型ガイドを含む１つ以上のｇＲＮＡは、１つ以上の標的遺伝子の抑制を標的化する際に用いられ得る。このような配列は、様々な異なる組合せにおいて適用され得、例えば、標的遺伝子は、最初に抑制され、次に、適切な期間に、他の標的が活性化され、又は選択された遺伝子が抑制されると同時に、選択された遺伝子が活性化され、その後さらに活性化及び／又は抑制が続く。結果として、１つ以上の生物系の複数の構成要素が、有利には一緒に対処され得る。
【０４０６】
一実施形態において、本発明は、本明細書に記載される不活性型ｇＲＮＡ又はＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体をコードする核酸分子又は組成物を提供する。
【０４０７】
一実施形態において、本発明は、本明細書において定義される不活性型ガイドＲＮＡをコードする核酸分子を含むベクター系を提供する。特定の実施形態において、ベクター系は、Ｃａｓ９をコードする核酸分子をさらに含む。特定の実施形態において、ベクター系は、（活性型）ｇＲＮＡをコードする核酸分子をさらに含む。特定の実施形態において、核酸分子又はベクターは、ガイド配列（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子及び／又はＣａｓ９及び／若しくは任意の核局在配列をコードする核酸分子に動作可能に連結される真核細胞において動作可能な調節要素をさらに含む。
【０４０８】
別の実施形態において、構造分析も、ＤＮＡ結合を可能にするが、ＤＮＡ切断を可能にしない、不活性型ガイド及び活性Ｃａｓ９ヌクレアーゼの間の相互作用を調べるのに使用され得る。このように、Ｃａｓ９のヌクレアーゼ活性に重要なアミノ酸が決定される。このようなアミノ酸の修飾は、遺伝子編集に使用される改善されたＣａｓ９酵素を可能にする。
【０４０９】
さらなる実施形態は、本明細書において説明される不活性型ガイドの使用を、本明細書において説明される並びに当該技術分野において公知である、ＣＲＩＳＰＲの他の用途を組み合わせることである。例えば、標的化された多重遺伝子活性化又は抑制又は標的化さ

れた多重二方向性遺伝子活性化／抑制のための不活性型ガイドを含むｇＲＮＡは、本明細書において説明されるように、ヌクレアーゼ活性を維持するガイドを含むｇＲＮＡと組み合わされ得る。ヌクレアーゼ活性を維持するガイドを含むこのようなｇＲＮＡは、遺伝子活性（例えば、アプタマー）の抑制を可能にする修飾をさらに含んでも又は含まなくてもよい。ヌクレアーゼ活性を維持するガイドを含むこのようなｇＲＮＡは、遺伝子活性（例えば、アプタマー）の活性化を可能にする修飾をさらに含んでも又は含まなくてもよい。このような方法で、多重遺伝子制御のためのさらなる手段が導入される（例えば、ヌクレアーゼ活性を有さない／インデル活性を有さない多重遺伝子標的化活性化は、ヌクレアーゼ活性を有する遺伝子標的化抑制と同時に又は組み合わせて提供され得る）。

【０４１０】

例えば、１）１つ以上の遺伝子を標的とし、遺伝子活性化因子の動員のために適切なアプタマーでさらに修飾された不活性型ガイドを含む１つ以上のｇＲＮＡ（例えば１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは、１～１０、より好ましくは、１～５）を使用することは；２）１つ以上の遺伝子を標的とし、遺伝子リプレッサーの動員のために適切なアプタマーでさらに修飾された不活性型ガイドを含む１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは、１～１０、より好ましくは、１～５）と組み合わされ得る。次に、１）及び／又は２）は、３）１つ以上の遺伝子を標的とする１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは、１～１０、より好ましくは、１～５）と組み合わされ得る。次に、この組合せは、１）＋２）＋３）とともに、１つ以上の遺伝子を標的とし、遺伝子活性化因子の動員のために適切なアプタマーでさらに修飾された４）１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは、１～１０、より好ましくは、１～５）を用いて行われ得る。次に、この組合せは、１）＋２）＋３）＋４）とともに、５）１つ以上の遺伝子を標的とし、遺伝子リプレッサーの動員のために適切なアプタマーでさらに修飾された１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは、１～１０、より好ましくは、１～５）を用いて行われ得る。結果として、様々な使用及び組合せが、本発明に含まれる。例えば、組合せ１）＋２）；組合せ１）＋３）；組合せ２）＋３）；組合せ１）＋２）＋３）；組合せ１）＋２）＋３）＋４）；組合せ１）＋３）＋４）；組合せ２）＋３）＋４）；組合せ１）＋２）＋４）；組合せ１）＋２）＋３）＋４）＋５）；組合せ１）＋３）＋４）＋５）；組合せ２）＋３）＋４）＋５）；組合せ１）＋２）＋４）＋５）；組合せ１）＋２）＋３）＋５）；組合せ１）＋３）＋５）；組合せ２）＋３）＋５）；組合せ１）＋２）＋５）。

【０４１１】

一実施形態において、本発明は、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを標的遺伝子座にガイドするための不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列（不活性型ガイド配列）を設計、評価、又は選択するためのアルゴリズムを提供する。特に、不活性型ガイドＲＮＡ特異性が、ｉ）ＧＣ含量及びｉｉ）標的化配列長さに関連し、それらを変化させることによって最適化され得ることが決定された。一実施形態において、本発明は、オフターゲット結合又は不活性型ガイドＲＮＡの相互作用を最小限に抑える不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列を設計又は評価するためのアルゴリズムを提供する。本発明の一実施形態において、生物においてＣＲＩＳＰＲシステムを遺伝子座に指向するための不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列を選択するためのアルゴリズムは、ａ）遺伝子座に１つ以上のＣＲＩＳＰＲモチーフを配置し、２０ヌクレオチド（ｎｔ）各ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列を、ｉ）配列のＧＣ含量を決定すること；及びｉｉ）生物のゲノムにおいてＣＲＩＳＰＲモチーフに最も近い下流の１５ヌクレオチドのオフターゲットマッチがあるかどうかを判断することによって分析すること、及びｃ）配列のＧＣ含量が７０％以下であり、オフターゲットマッチが特定されない場合、不活性型ガイドＲＮＡにおいて使用するための１５ヌクレオチド配列を選択することを含む。一実施形態において、配列は、ＧＣ含量が６０％以下である場合、標的化配列に選択される。特定の実施形態において、配列は、ＧＣ含量が、５５％以下、５０％以下、４５％以下、４０％以下、３５％以下又は３０％以下である場合、

標的化配列に選択される。一実施形態において、遺伝子座の２つ以上の配列が分析され、最も低いＧＣ含量、又は次に最も低いＧＣ含量、又は次に最も低いＧＣ含量を有する配列が選択される。一実施形態において、配列は、オフターゲットマッチが生物のゲノムにおいて特定されない場合、標的化配列に選択される。一実施形態において、標的化配列は、オフターゲットマッチがゲノムの調節配列において特定されない場合に選択される。

【０４１２】

一実施形態において、本発明は、生物において官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを遺伝子座に指向するための不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列を選択する方法を提供し、この方法は、ａ）遺伝子座に１つ以上のＣＲＩＳＰＲモチーフを配置すること；ｂ）各ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の２０ｎｔ配列を、ｉ）配列のＧＣ含量を決定すること；及びｉｉ）生物のゲノムにおいて配列の最初の１５ｎｔのオフターゲットマッチがあるかどうかを判断することによって分析すること；ｃ）配列のＧＣ含量が７０％以下であり、オフターゲットマッチが特定されない場合、ガイドＲＮＡにおいて使用するための配列を選択することを含む。一実施形態において、配列は、ＧＣ含量が５０％以下である場合に選択される。一実施形態において、配列は、ＧＣ含量が４０％以下である場合に選択される。一実施形態において、配列は、ＧＣ含量が３０％以下である場合に選択される。一実施形態において、２つ以上の配列が分析され、最も低いＧＣ含量を有する配列が選択される。一実施形態において、オフターゲットマッチが、生物の調節配列において決定される。一実施形態において、遺伝子座は、調節領域である。一実施形態は、上記の方法に従って選択された標的化配列を含む不活性型ガイドＲＮＡを提供する。

【０４１３】

一実施形態において、本発明は、生物において官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを遺伝子座に標的化するための不活性型ガイドＲＮＡを提供する。本発明の一実施形態において、不活性型ガイドＲＮＡは、標的化配列を含み、標的配列のＣＧ含量は７０％以下であり、標的化配列の最初の１５ｎｔは、生物の別の遺伝子座の調節配列におけるＣＲＩＳＰＲモチーフから下流のオフターゲット配列にマッチしない。特定の実施形態において、標的化配列のＧＣ含量は、６０％以下、５５％以下、５０％以下、４５％以下、４０％以下、３５％以下又は３０％以下である。特定の実施形態において、標的化配列のＧＣ含量は、７０％～６０％又は６０％～５０％又は５０％～４０％又は４０％～３０％である。一実施形態において、標的化配列は、遺伝子座の潜在的な標的化配列の中で最も低いＣＧ含量を有する。

【０４１４】

本発明の一実施形態において、不活性型ガイドの最初の１５ｎｔは、標的配列にマッチする。別の実施形態において、不活性型ガイドの最初の１４ｎｔは、標的配列にマッチする。別の実施形態において、不活性型ガイドの最初の１３ｎｔは、標的配列にマッチする。別の実施形態において、不活性型ガイドの最初の１２ｎｔは、標的配列にマッチする。別の実施形態において、不活性型ガイドの最初の１１ｎｔは、標的配列にマッチする。別の実施形態において、不活性型ガイドの最初の１０ｎｔは、標的配列にマッチする。本発明の一実施形態において、不活性型ガイドの最初の１５ｎｔは、別の遺伝子座の調節領域におけるＣＲＩＳＰＲモチーフから下流のオフターゲット配列にマッチしない。他の実施形態において、最初の１４ｎｔ、又は不活性型ガイドの最初の１３ｎｔ、又はガイドの最初の１２ｎｔ、又は不活性型ガイドの最初の１１ｎｔ、又は不活性型ガイドの最初の１０ｎｔは、別の遺伝子座の調節領域におけるＣＲＩＳＰＲモチーフから下流のオフターゲット配列にマッチしない。他の実施形態において、不活性型ガイドの最初の１５ｎｔ、又は１４ｎｔ、又は１３ｎｔ、又は１２ｎｔ、又は１１ｎｔは、ゲノムにおけるＣＲＩＳＰＲモチーフから下流のオフターゲット配列にマッチしない。

【０４１５】

特定の実施形態において、不活性型ガイドＲＮＡは、標的配列にマッチしないさらなるヌクレオチドを３’末端に含む。したがって、ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の最初の１５ｎｔ、又は１４ｎｔ、又は１３ｎｔ、又は１２ｎｔ、又は１１ｎｔを含む不活性型ガイド

ＲＮＡの長さは、３’末端において、１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔに、又はそれより長く延長され得る。

【０４１６】

本発明は、限定はされないが、不活性型Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）又は官能化Ｃａｓ９系（これは、官能化Ｃａｓ９又は官能化ガイドを含み得る）を含むＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを、遺伝子座に指向するための方法を提供する。一実施形態において、本発明は、不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列を選択し、生物において官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを遺伝子座に指向するための方法を提供する。一実施形態において、本発明は、不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列を選択し、官能化Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムによって標的遺伝子座の遺伝子調節を行うための方法を提供する。特定の実施形態において、本方法は、オフターゲット効果を最小限に抑えながら、標的遺伝子調節を行うために使用される。一実施形態において、本発明は、２つ以上の不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列を選択し、官能化Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムによって２つ以上の標的遺伝子座の遺伝子調節を行うための方法を提供する。特定の実施形態において、本方法は、オフターゲット効果を最小限に抑えながら、２つ以上の標的遺伝子座の調節を行うために使用される。

【０４１７】

一実施形態において、本発明は、生物において官能化Ｃａｓ９を遺伝子座に指向するための不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列を選択する方法を提供し、この方法は、ａ）遺伝子座に１つ以上のＣＲＩＳＰＲモチーフを配置すること；ｂ）各ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列を、ｉ）ＣＲＩＳＰＲモチーフに隣接する１０～１５ｎｔを選択すること、ｉｉ）配列のＧＣ含量を決定することによって分析すること；及びｃ）配列のＧＣ含量が４０％以上である場合、ガイドＲＮＡにおいて使用するための標的化配列として１０～１５ｎｔ配列を選択することを含む。一実施形態において、配列は、ＧＣ含量が５０％以上である場合に選択される。一実施形態において、配列は、ＧＣ含量が６０％以上である場合に選択される。一実施形態において、配列は、ＧＣ含量が７０％以上である場合に選択される。一実施形態において、２つ以上の配列が分析され、最も高いＧＣ含量を有する配列が選択される。一実施形態において、本方法は、ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列にマッチしない選択された配列の３’末端にヌクレオチドを付加することをさらに含む。一実施形態は、上記の方法に従って選択された標的化配列を含む不活性型ガイドＲＮＡを提供する。

【０４１８】

一実施形態において、本発明は、生物において官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを遺伝子座に指向するための不活性型ガイドＲＮＡを提供し、不活性型ガイドＲＮＡの標的化配列は、遺伝子座のＣＲＩＳＰＲモチーフに隣接する１０～１５ヌクレオチドからなり、標的配列のＣＧ含量は、５０％以上である。特定の実施形態において、不活性型ガイドＲＮＡは、遺伝子座のＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列にマッチしない標的化配列の３’末端に付加されたヌクレオチドをさらに含む。

【０４１９】

一実施形態において、本発明は、１つ以上、又は２つ以上の遺伝子座に向けられる単一のエフェクターを提供する。特定の実施形態において、エフェクターは、Ｃａｓ９に関連し、１つ以上、又は２つ以上の選択された不活性型ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ９関連エフェクターを、１つ以上、又は２つ以上の選択された標的遺伝子座に指向するために使用される。特定の実施形態において、エフェクターは、１つ以上、又は２つ以上の選択された不活性型ガイドＲＮＡに関連し、各選択された不活性型ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ９酵素と複合体形成されるとき、その関連エフェクターを、不活性型ガイドＲＮＡ標的に局在させる。このようなＣＲＩＳＰＲシステムの１つの非限定的な例は、同じ転写因子による調節下にある１つ以上、又は２つ以上の遺伝子座の活性を調節する。

【０４２０】

一実施形態において、本発明は、１つ以上の遺伝子座に向けられる２つ以上のエフェク

ターを提供する。特定の実施形態において、２つ以上の不活性型ガイドＲＮＡが用いられ、２つ以上のエフェクターのそれぞれが、選択された不活性型ガイドＲＮＡに関連し、２つ以上のエフェクターのそれぞれが、その不活性型ガイドＲＮＡの選択された標的に局在化される。このようなＣＲＩＳＰＲシステムの１つの非限定的な例は、異なる転写因子による調節下にある１つ以上、又は２つ以上の遺伝子座の活性を調節する。したがって、１つの非限定的な実施形態において、２つ以上の転写因子は、単一の遺伝子の異なる調節配列に局在化される。別の非限定的な実施形態において、２つ以上の転写因子は、異なる遺伝子の異なる調節配列に局在化される。特定の実施形態において、１つの転写因子は、活性化因子である。特定の実施形態において、１つの転写因子は、阻害因子である。特定の実施形態において、１つの転写因子は、活性化因子であり、別の転写因子は、阻害因子である。特定の実施形態において、同じ調節経路の異なる構成要素を発現する遺伝子座が調節される。特定の実施形態において、異なる調節経路の構成要素を発現する遺伝子座が調節される。

【０４２１】

一実施形態において、本発明はまた、活性Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムによって媒介される標的ＤＮＡ切断又は標的結合及び遺伝子調節に特異的な不活性型ガイドＲＮＡを設計及び選択するための方法及びアルゴリズムを提供する。特定の実施形態において、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、１つの遺伝子座において標的ＤＮＡを切断すると同時に別の遺伝子座に結合し、その調節を促進する活性Ｃａｓ９を用いて、直交的遺伝子制御を提供する。

【０４２２】

一実施形態において、本発明は、生物において、切断なしで官能化Ｃａｓ９を遺伝子座に指向するための不活性型ガイドＲＮＡ標的化配列を選択する方法を提供し、この方法は、ａ）遺伝子座に１つ以上のＣＲＩＳＰＲモチーフを配置すること；ｂ）各ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列を、ｉ）ＣＲＩＳＰＲモチーフに隣接する１０～１５ｎｔを選択すること、ｉｉ）配列のＧＣ含量を決定することによって分析すること、及びｃ）配列のＧＣ含量が３０％以上、４０％以上である場合、不活性型ガイドＲＮＡにおいて使用するための標的化配列として１０～１５ｎｔ配列を選択することを含む。特定の実施形態において、標的化配列のＧＣ含量は、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、又は７０％以上である。特定の実施形態において、標的化配列のＧＣ含量は、３０％～４０％又は４０％～５０％又は５０％～６０％又は６０％～７０％である。本発明の一実施形態において、遺伝子座における２つ以上の配列が分析され、最も高いＧＣ含量を有する配列が選択される。

【０４２３】

本発明の一実施形態において、ＧＣ含量が評価される標的化配列の部分は、ＰＡＭに最も近い１５個の標的ヌクレオチドの１０～１５個の連続したヌクレオチドである。本発明の一実施形態において、ＧＣ含量が考慮されるガイドの部分は、ＰＡＭに最も近い１５個のヌクレオチドのうちの１０～１１個のヌクレオチド又は１１～１２個のヌクレオチド又は１２～１３個のヌクレオチド又は１３、若しくは１４、若しくは１５個の連続したヌクレオチドである。

【０４２４】

一実施形態において、本発明は、機能的活性化又は阻害を回避しながら、ＣＲＩＳＰＲシステム遺伝子座切断を促進する不活性型ガイドＲＮＡを識別するためのアルゴリズムをさらに提供する。１６～２０ヌクレオチドの不活性型ガイドＲＮＡにおける増加したＧＣ含量が、増加したＤＮＡ切断及び低下した機能的活性化と同時に起こることが観察される。

【０４２５】

ある実施形態において、官能化Ｃａｓ９の効率は、ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の標的配列にマッチしないガイドＲＮＡの３’末端へのヌクレオチドの付加によって増加され得る。例えば、不活性型ガイドＲＮＡ１１～１５ｎｔ長のうち、より短いガイドは、標的切

断を促進する可能性が低い場合があり、ＣＲＩＳＰＲシステム結合及び機能的制御を促進する際の効率も低い。特定の実施形態において、不活性型ガイドＲＮＡの３’末端への、標的配列にマッチしないヌクレオチドの付加は、活性化効率を増加させる一方、望ましくない標的切断を増加させない。一実施形態において、本発明はまた、ＤＮＡ結合及び遺伝子調節におけるＣＲＩＳＰＲＰシステム機能を有効に促進する一方、ＤＮＡ切断を促進しない改善された不活性型ガイドＲＮＡを識別するための方法及びアルゴリズムを提供する。したがって、特定の実施形態において、本発明は、ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の最初の１５ｎｔ、又は１４ｎｔ、又は１３ｎｔ、又は１２ｎｔ、又は１１ｎｔを含み、標的とミスマッチするヌクレオチドによって、３’末端において長さが、１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔに、又はそれより長く延長される不活性型ガイドＲＮＡを提供する。

【０４２６】

一実施形態において、本発明は、選択的直交的遺伝子制御をおこなうための方法を提供する。本明細書における本開示から理解されるように、本発明に係る不活性型ガイドの選択は、ガイド長さ及びＧＣ含量を考慮に入れると、例えば、活性化又は阻害によって遺伝子座の転写を調節し、オフターゲット効果を最小限に抑えるために、機能的Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムによる有効及び選択的転写制御を提供する。したがって、個々の標的遺伝子座の有効な調節を提供することによって、本発明はまた、２つ以上の標的遺伝子座の有効な直交的調節を提供する。

【０４２７】

特定の実施形態において、直交的遺伝子制御は、２つ以上の標的遺伝子座の活性化又は阻害による。特定の実施形態において、直交的遺伝子制御は、１つ以上の標的遺伝子座の活性化又は阻害及び１つ以上の標的遺伝子座の切断による。

【０４２８】

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載される方法又はアルゴリズムに従って開示又は作製される１つ以上の不活性型ガイドＲＮＡを含む非天然Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを含む細胞を提供し、１つ以上の遺伝子産物の発現が変化されている。本発明の一実施形態において、２つ以上の遺伝子産物の細胞における発現が変化されている。本発明はまた、このような細胞に由来する細胞株を提供する。

【０４２９】

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載される方法又はアルゴリズムに従って開示又は作製される１つ以上の不活性型ガイドＲＮＡを含む非天然Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを含む１つ以上の細胞を含む多細胞生物を提供する。一実施形態において、本発明は、本明細書に記載される方法又はアルゴリズムに従って開示又は作製される１つ以上の不活性型ガイドＲＮＡを含む非天然Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを含む細胞、細胞株、又は多細胞生物に由来する産物を提供する。

【０４３０】

本発明のさらなる実施形態は、本明細書に記載される不活性型ガイドを、任意に、本明細書又は従来技術において記載されるガイドを含むｇＲＮＡと組み合わせて、Ｃａｓ９の過剰発現又は好ましくは、Ｃａｓ９におけるノックインのいずれかのために操作されたシステム、例えば、細胞、トランスジェニック動物、トランスジェニックマウス、誘導性トランスジェニック動物、誘導性トランスジェニックマウス）と組み合わせて含むｇＲＮＡの使用である。結果として、単一の系（例えば、トランスジェニック動物、細胞）は、システム／ネットワーク生物学における多重遺伝子修飾の基礎となり得る。不活性型ガイドのために、これは、インビトロ、エキソビボ、及びインビボで可能である。

【０４３１】

例えば、Ｃａｓ９が提供された後、１つ以上の不活性型ｇＲＮＡは、多重遺伝子調節、好ましくは、多重二方向性遺伝子調節を指向するように提供され得る。１つ以上の不活性型ｇＲＮＡは、必要であれば又は必要に応じて、空間的及び時間的に適切な方法で提供され得る（例えばＣａｓ９発現の組織特異的誘導）。トランスジェニック／誘導性Ｃａｓ９

が、対象とする細胞、組織、動物において提供される（例えば、発現される）ことにより、不活性型ガイドを含むｇＲＮＡ又はガイドを含むｇＲＮＡは両方とも等しく有効である。同じように、本発明のさらなる実施形態は、本明細書に記載される不活性型ガイドを、任意に、本明細書又は従来技術において記載されるガイドを含むｇＲＮＡと組み合わせて、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓをノックアウトするために操作された系（例えば、細胞、トランスジェニック動物、トランスジェニックマウス、誘導性トランスジェニック動物、誘導性トランスジェニックマウス）と組み合わせて含むｇＲＮＡの使用である。

【０４３２】

結果として、本明細書に記載される不活性型ガイドと、本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲ用途及び当該技術分野において公知のＣＲＩＳＰＲ用途との組合せは、系（例えば、ネットワーク生物学）の多重スクリーニングのための高効率及び正確な手段をもたらす。このようなスクリーニングは、例えば、疾患、特に、遺伝子関連疾患に関与する遺伝子を同定するための遺伝子活性の特定の組合せ（例えば、オン／オフの組合せ）の同定を可能にする。このようなスクリーニングの好ましい用途は、癌である。同じように、疾患の処置のためのスクリーニングは、本発明に含まれる。細胞又は動物は、疾患又は疾患様作用をもたらす異常な状態に曝露され得る。候補組成物が提供され、所望の多重環境における効果についてスクリーニングされ得る。例えば、患者の癌細胞が、どの遺伝子組合せがそれらを死に至らしめるかについてスクリーニングされ得、次に、適切な治療法を確立するためにこの情報を使用する。

【０４３３】

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載される構成要素の１つ以上を含むキットを提供する。キットは、本明細書に記載されるガイドを含むか又は含まずに、本明細書に記載される不活性型ガイドを含み得る。

【０４３４】

本明細書において提供される構造情報は、全Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓシステムのＲＮＡ機能性を最適化するための不活性型ｇＲＮＡ構造の操作又は改変を可能にする、標的ＤＮＡ及びＣａｓ９との不活性型ｇＲＮＡの相互作用の調査を可能にする。例えば、不活性型ｇＲＮＡのループは、ＲＮＡに結合し得るアダプタータンパク質の挿入によって、Ｃａｓ９タンパク質と衝突せずに延長され得る。これらのアダプタータンパク質は、１つ以上の機能的ドメインを含むエフェクタータンパク質又は融合をさらに動員し得る。

【０４３５】

ある好ましい実施形態において、機能的ドメインは、転写活性化ドメイン、好ましくは、ＶＰ６４である。ある実施形態において、機能的ドメインは、転写抑制ドメイン、好ましくは、ＫＲＡＢである。ある実施形態において、転写抑制ドメインは、ＳＩＤ、又はＳＩＤのコンカテマー（例えば、ＳＩＤ４Ｘ）である。ある実施形態において、機能的ドメインは、後成的修飾酵素が提供されるように、後成的修飾ドメインである。ある実施形態において、機能的ドメインは、活性化ドメインであり、これは、Ｐ６５活性化ドメインであり得る。

【０４３６】

本発明の一実施形態は、上記の要素が単一の組成物に含まれるか又は個々の組成物に含まれるものである。これらの組成物は、ゲノムレベルで機能的効果を引き出すために、有利には、宿主に適用され得る。

【０４３７】

一般に、不活性型ｇＲＮＡは、（例えば、融合タンパク質を介して）結合するための１つ以上の機能的ドメインを含むアダプタータンパク質用の特異的結合部位（例えば、アプタマー）を提供する方式で修飾される。修飾された不活性型ｇＲＮＡは、不活性型ｇＲＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ複合体（すなわち、不活性型ｇＲＮＡ及び標的に結合するＣａｓ９）を形成した後、アダプタータンパク質が結合し、アダプタータンパク質における機能的ドメインが、属性機能が有効であるために有利である空間的配向で配置されるように修飾される。例えば、機能的ドメインが転写活性化因子（例えば、ＶＰ６４又はｐ６５）である

場合、転写活性化因子は、それが標的の転写に影響を与えるのを可能にする空間的配向で配置される。同様に、転写リプレッサーは、標的の転写に影響を与えるために有利に配置され、ヌクレアーゼ（例えば、Ｆｏｋ１）は、標的を切断又は部分的に切断するために有利に配置されるであろう。

【０４３８】

当業者は、アダプター＋機能的ドメインの結合を可能にするが、アダプター＋機能的ドメインの適切な配置を可能にしない（例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体の三次元構造内の立体障害に起因する）不活性型ｇＲＮＡに対する修飾が、意図されない修飾であることを理解するであろう。１つ以上の修飾された不活性型ｇＲＮＡは、本明細書に記載されるように、テトラループ、ステムループ１、ステムループ２、又はステムループ３において、好ましくは、テトラループ又はステムループ２のいずれかにおいて、最も好ましくは、テトラループ及びステムループ２の両方において修飾され得る。

【０４３９】

本明細書において説明されるように、機能的ドメインは、例えば、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、ＲＮＡ切断活性、ＤＮＡ切断活性、核酸結合活性、及び分子スイッチ（例えば、光誘導性）からなる群からの１つ以上のドメインであり得る。ある場合には、さらに少なくとも１つのＮＬＳが提供されることが有利である。ある場合には、ＮＬＳをＮ末端に配置することが有利である。２つ以上の機能的ドメインが含まれる場合、機能的ドメインは、同じか又は異なり得る。

【０４４０】

不活性型ｇＲＮＡは、同じか又は異なるアダプタータンパク質に特異的な複数の結合認識部位（例えば、アプタマー）を含むように設計され得る。不活性型ｇＲＮＡは、転写開始部位（すなわち、ＴＳＳ）の上流のプロモーター領域－１０００から＋１核酸、好ましくは、－２００核酸に結合するように設計され得る。この位置決めにより、遺伝子活性化（例えば、転写活性化因子）又は遺伝子阻害（例えば、転写リプレッサー）に影響を与える機能的ドメインが改善される。修飾された不活性型ｇＲＮＡは、組成物に含まれる１つ以上の標的遺伝子座を標的とする１つ以上の修飾された不活性型ｇＲＮＡ（例えば、少なくとも１つのｇＲＮＡ、少なくとも２つのｇＲＮＡ、少なくとも５つのｇＲＮＡ、少なくとも１０個のｇＲＮＡ、少なくとも２０個のｇＲＮＡ、少なくとも３０個のｇＲＮＡ、少なくとも５０個のｇＲＮＡ）であり得る。

【０４４１】

アダプタータンパク質は、修飾された不活性型ｇＲＮＡに導入されたアプタマー又は認識部位に結合し、１つ以上の機能的ドメインの適切な配置を可能にし、不活性型ｇＲＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ複合体に組み込まれた後、属性機能を有する標的に影響を与えるいくつものタンパク質であり得る。本出願において詳細に説明されるように、これは、コートタンパク質、好ましくは、バクテリオファージコートタンパク質であり得る。このようなアダプタータンパク質に関連する機能的ドメイン（例えば、融合タンパク質の形態で）は、例えば、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、ＲＮＡ切断活性、ＤＮＡ切断活性、核酸結合活性、及び分子スイッチ（例えば、光誘導性）からなる群からの１つ以上のドメインを含み得る。好ましいドメインは、Ｆｏｋ１、ＶＰ６４、Ｐ６５、ＨＳＦ１、ＭｙｏＤ１である。機能的ドメインが、転写活性化因子又は転写リプレッサーである場合、さらに少なくともＮＬＳが、好ましくはＮ末端で提供されることが有利である。２つ以上の機能的ドメインが含まれる場合、機能的ドメインは、同じか又は異なり得る。アダプタータンパク質は、このような機能的ドメインを結合するために公知のリンカーを用い得る。

【０４４２】

したがって、修飾された不活性型ｇＲＮＡ、（不活性化）Ｃａｓ９（機能的ドメインを有するか又は有さない）、及び１つ以上の機能的ドメインを有する結合タンパク質は、それぞれ個々に組成物に含まれてもよく、個々に又はまとめて宿主に投与され得る。或いは

、これらの構成要素は、宿主への投与のために単一の組成物において提供され得る。宿主への投与は、宿主への送達について、当業者に公知の又は本明細書に記載されるウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ＡＡＶベクター）を介して行われ得る。本明細書において説明されるように、異なる選択マーカー（例えば、レンチウイルスｇＲＮＡ選択のため）の使用及びｇＲＮＡの濃度（例えば、複数のｇＲＮＡが使用されるかどうかに依存する）は、改善された効果を引き出すために有利なものであり得る。

【０４４３】

この概念に基づいて、ＤＮＡ切断、遺伝子活性化、又は遺伝子不活性化を含むゲノム遺伝子座事象を引き出すためのいくつかの変化が適切である。提供される組成物を用いて、当業者は、１つ以上のゲノム遺伝子座事象を引き出すために同じか又は異なる機能的ドメインを有する単一又は複数の遺伝子座を有利に及び特異的に標的とし得る。組成物は、細胞内のライブラリーのスクリーニング及びインビボでの機能モデリングのための多種多様な方法に適用され得る（例えば、ｌｉｎｃＲＮＡの遺伝子活性化及び機能の確認；機能獲得型モデリング；機能喪失型モデリング；最適化及びスクリーニングの目的で細胞株及びトランスジェニック動物を確立するための本発明の組成物の使用）。

【０４４４】

本発明は、本発明又は本出願に先行すると見なされない、条件付き又は誘導性ＣＲＩＳＰＲトランスジェニック細胞／動物を確立及び利用するための本発明の組成物の使用を包含する。例えば、標的細胞は、条件付きで又は誘導可能に（例えば、Ｃｒｅ依存的構築物の形態で）Ｃａｓ９を含み、及び／又はアダプタータンパク質を条件付きで又は誘導可能に含み、標的細胞に導入されたベクターの発現の際に、ベクターは、標的細胞におけるＣａｓ９発現及び／又はアダプター発現の条件を誘導又は引き起こすものを発現する。ＣＲＩＳＰＲ複合体を生成する公知の方法とともに、本発明の教示及び組成物を適用することによって、機能的ドメインによって影響される誘導性ゲノム事象も、本発明の一実施形態である。この一例は、ＣＲＩＳＰＲノックイン／条件付きトランスジェニック動物（例えば、例えばＬｏｘ－Ｓｔｏｐ－ポリＡ－Ｌｏｘ（ＬＳＬ）カセットを含むマウス）の創出並びにその後の、本明細書に記載される１つ以上の修飾された不活性型ｇＲＮＡ（例えば、遺伝子活性化のために、対象とする標的遺伝子のＴＳＳに対して－２００ヌクレオチド）をもたらす１つ以上の組成物（例えば、コートタンパク質によって認識される１つ以上のアプタマー、例えば、ＭＳ２で修飾された不活性型ｇＲＮＡ）、本明細書に記載される１つ以上のアダプタータンパク質（１つ以上のＶＰ６４に連結されたＭＳ２結合タンパク質）及び条件付き動物を誘導するための手段（例えば、Ｃａｓ９発現を誘導可能にするためのＣｒｅリコンビナーゼ）の送達である。或いは、アダプタータンパク質は、スクリーニング目的の有効なモデルを提供するために、条件付き又は誘導性Ｃａｓ９とともに、条件付き又は誘導性要素として提供されてもよく、これは、有利には、幅広い用途について最小限の設計及び特定の不活性型ｇＲＮＡの投与のみを必要とする。

【０４４５】

別の実施形態において、不活性型ガイドは、特異性を改善するようにさらに修飾される。保護された不活性型ガイドが合成されてもよく、それによって、二次構造が、その特異性を改善するために不活性型ガイドの３’末端に導入される。保護されたガイドＲＮＡ（ｐｇＲＮＡ）は、細胞内の対象とするゲノム遺伝子座における標的配列にハイブリダイズすることが可能なガイド配列及び保護鎖を含み、保護鎖は、任意に、ガイド配列に相補的であり、ガイド配列は、保護鎖に部分的にハイブリダイズすることが可能であり得る。ｐｇＲＮＡは、任意に、伸長配列を含む。ｐｇＲＮＡ－標的ＤＮＡハイブリダイゼーションの熱力学は、ガイドＲＮＡ及び標的ＤＮＡの間で相補的な塩基の数によって決定される。「熱力学的保護」を用いることによって、不活性型ｇＲＮＡの特異性は、保護配列を付加することによって改善され得る。例えば、一方法は、様々な長さの相補的保護鎖を、不活性型ｇＲＮＡ内のガイド配列の３’末端に付加する。結果として、保護鎖は、不活性型ｇＲＮＡの少なくとも一部に結合され、保護されたｇＲＮＡ（ｐｇＲＮＡ）を提供する。次

に、本明細書における不活性型ｇＲＮＡの基準は、記載される実施形態を用いて容易に保護され、ｐｇＲＮＡをもたらし得る。保護鎖は、別個のＲＮＡ転写産物若しくは鎖又は不活性型ｇＲＮＡガイド配列の３’末端に結合されたキメラ形態のいずれかであり得る。

【０４４６】

多重（タンデム）標的化法におけるタンデムガイド及び使用

本発明者らは、本明細書において定義されるＣＲＩＳＰＲ酵素が、活性を失わずに２つ以上のＲＮＡガイドを用いることができることを示した。これにより、本明細書において定義される単一の酵素、システム又は複合体とともに、複数のＤＮＡ標的、遺伝子又は遺伝子座を標的化するために、本明細書において定義されるＣＲＩＳＰＲ酵素、システム又は複合体を使用することが可能になる。ガイドＲＮＡは、本明細書において定義されるダイレクトリピートなどのヌクレオチド配列によって任意に隔てられて、タンデムに配列され得る。異なるガイドＲＮＡの位置がタンデムであることは、活性に影響を与えない。「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム」、「ＣＲＩＳＰ－Ｃａｓ複合体」、「ＣＲＩＳＰＲ複合体」及び「ＣＲＩＳＰＲシステム」という用語が、同義的に使用されることが留意される。また、「ＣＲＩＳＰＲ酵素」、「Ｃａｓ酵素」、又は「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素」という用語が、同義的に使用され得る。好ましい実施形態において、前記ＣＲＩＳＰＲ酵素、ＣＲＩＳＰ－Ｃａｓ酵素又はＣａｓ酵素は、Ｃａｓ９、又は本明細書における他の箇所に記載されるその修飾若しくは変異された変異体のいずれか１つである。

【０４４７】

一実施形態において、本発明は、非天然又は操作されたＣＲＩＳＰＲ酵素、好ましくは、クラス２　ＣＲＩＳＰＲ酵素、好ましくは、本明細書に記載されるＶ又はＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えば、限定はされないが、タンデム又は多重標的化に使用される、本明細書における他の箇所に記載されるＣａｓ９を提供する。本明細書における他の箇所に記載される本発明に係るＣＲＩＳＰＲ（又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ若しくはＣａｓ）酵素、複合体、又はシステムのいずれかが、このような手法に使用され得ることが理解されるべきである。本明細書における他の箇所に記載される方法、産物、組成物及び使用のいずれかが、以下にさらに詳述される多重又はタンデム標的化法と同様に適用可能である。さらなる指針によって、以下の特定の実施形態及び実施形態が提供される。

【０４４８】

一実施形態において、本発明は、複数の遺伝子座を標的化するための本明細書において定義されるＣａｓ９酵素、複合体又はシステムの使用を提供する。一実施形態において、これは、複数の（タンデム又は多重）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）配列を使用することによって確立され得る。

【０４４９】

一実施形態において、本発明は、タンデム又は多重標的化のための、本明細書において定義されるＣａｓ９酵素、複合体又はシステムの１つ以上の要素を使用するための方法を提供し、前記ＣＲＩＳＰシステムは、複数のガイドＲＮＡ配列を含む。好ましくは、前記ｇＲＮＡ配列は、ヌクレオチド配列、例えば、本明細書における他の箇所に定義されるダイレクトリピートによって隔てられる。

【０４５０】

本明細書において定義されるＣａｓ９酵素、システム又は複合体は、複数の標的ポリヌクレオチドを修飾するための有効な手段を提供する。本明細書において定義されるＣａｓ９酵素、システム又は複合体は、多様な細胞型において１つ以上の標的ポリヌクレオチドを修飾（例えば、欠失、挿入、転座、不活性化、活性化）することを含む多種多様な有用性を有する。したがって、本発明の本明細書において定義されるＣａｓ９酵素、システム又は複合体は、単一のＣＲＩＳＰＲシステム内の複数の遺伝子座を標的化することを含め、例えば、遺伝子治療、薬物スクリーニング、疾患の診断、及び予測において、広範囲の用途を有する。

【０４５１】

一実施形態において、本発明は、本明細書において定義されるＣａｓ９酵素、システム

又は複合体、すなわち、少なくとも１つの不安定化ドメインが結合されたＣａｓ９タンパク質を有するＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体、及びＤＮＡ分子などの複数の核酸分子を標的とし、それによって、前記複数のガイドＲＮＡのそれぞれが、その対応する核酸分子、例えば、ＤＮＡ分子を特異的に標的とする複数のガイドＲＮＡを提供する。各核酸分子標的、例えば、ＤＮＡ分子は、遺伝子産物をコードするか、又は遺伝子座を包含し得る。したがって、複数のガイドＲＮＡを使用することにより、複数の遺伝子座又は複数の遺伝子の標的化が可能になる。ある実施形態において、Ｃａｓ９酵素は、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を切断し得る。ある実施形態において、遺伝子産物の発現が変化される。Ｃａｓ９タンパク質及びガイドＲＮＡは、天然には一緒に存在しない。本発明は、タンデムに配列されたガイド配列を含むガイドＲＮＡを包含する。本発明はさらに、真核細胞内での発現についてコドン最適されたＣａｓ９タンパク質のコード配列を包含する。好ましい実施形態において、真核細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞又は酵母細胞であり、より好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。遺伝子産物の発現は、低下され得る。Ｃａｓ９酵素は、ＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体の一部を形成し得、これは、一連の２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２５、２５、３０、又は３０超のガイド配列を含むタンデムに配列されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をさらに含み、それぞれ、細胞内の対象とするゲノム遺伝子座における標的配列に特異的にハイブリダイズすることが可能である。ある実施形態において、機能的Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体は、複数の標的配列に結合する。ある実施形態において、機能的ＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体は、複数の標的配列を編集し得、例えば、標的配列は、ゲノム遺伝子座を含んでもよく、ある実施形態において、遺伝子発現の改変があり得る。ある実施形態において、機能的ＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体は、さらなる機能的ドメインを含み得る。ある実施形態において、本発明は、複数の遺伝子産物の発現を改変又は修飾するための方法を提供する。本方法は、前記標的核酸、例えば、ＤＮＡ分子を含有する細胞、又は標的核酸、例えば、ＤＮＡ分子を含有及び発現する細胞に導入することを含んでもよく；例えば、標的核酸は、遺伝子産物をコードし、又は遺伝子産物（例えば、調節配列）の発現を提供し得る。

【０４５２】

好ましい実施形態において、多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９であるか、又はＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体は、Ｃａｓ９を含む。ある実施形態において、多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＡｓＣａｓ９であるか、又は多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体は、ＡｓＣａｓ９を含む。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＬｂＣａｓ９であるか、又はＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体は、ＬｂＣａｓ９を含む。ある実施形態において、多重標的化に使用されるＣａｓ９酵素は、ＤＮＡの両方の鎖を切断して、二本鎖切断（ＤＳＢ）を生成する。ある実施形態において、多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素は、ニッカーゼである。ある実施形態において、多重標的化に使用されるＣａｓ９酵素は、二重ニッカーゼである。ある実施形態において、多重標的化に使用されるＣａｓ９酵素は、本明細書における他の箇所に定義されるＤＤ　Ｃａｓ９酵素などのＣａｓ９酵素である。

【０４５３】

ある一般的な実施形態において、多重標的化に使用されるＣａｓ９酵素は、１つ以上の機能的ドメインに関連している。あるより具体的な実施形態において、多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素は、本明細書における他の箇所に定義される不活性型Ｃａｓ９である。

【０４５４】

一実施形態において、本発明は、本明細書において定義される多重標的化に使用されるＣａｓ９酵素、システム又は複合体又は本明細書において定義されるポリヌクレオチドを送達するための手段を提供する。このような送達手段の非限定的な例は、例えば、複合体の構成要素を送達する粒子、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（例えば、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする、ＣＲＩＳＰＲ複合体をコードするヌクレオチドを提供する）を含

むベクターである。ある実施形態において、ベクターは、プラスミド又はウイルスベクター、例えば、ＡＡＶ、若しくはレンチウイルスであり得る。プラスミドによる、例えば、ＨＥＫ細胞への一過性トランスフェクションは、特に、ＡＡＶのサイズ制限を考慮すると、Ｃａｓ９がＡＡＶに適合する間、さらなるガイドＲＮＡで上限に達し得ることが有利であり得る。

【０４５５】

多重標的化において使用するための、本明細書において使用されるＣａｓ９酵素、複合体又はシステムを構成的に発現するモデルも提供される。生物は、トランスジェニックであってもよく、本ベクターでトランスフェクトされていてもよく、又はそのようにトランスフェクトされた生物の子孫であってもよい。さらなる実施形態において、本発明は、本明細書において定義されるＣＲＩＳＰＲ酵素、システム及び複合体又は本明細書に記載されるポリヌクレオチド又はベクターを含む組成物を提供する。好ましくは、タンデムに配列された形式で複数のガイドＲＮＡを含むＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体も提供される。前記異なるガイドＲＮＡは、ダイレクトリピートなどのヌクレオチド配列によって隔てられ得る。

【０４５６】

対象、例えば、処置を必要とする対象を処置する方法であって、対象を、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体をコードするポリヌクレオチド又は本明細書に記載されるポリヌクレオチド又はベクターのいずれかで形質転換することによって遺伝子編集を誘導すること、及びそれらを対象に投与することを含む方法も提供される。好適な修復鋳型も提供され、例えば、前記修復鋳型を含むベクターによって送達され得る。対象、例えば、処置を必要とする対象を処置する方法であって、対象を、本明細書に記載されるポリヌクレオチド又はベクターで形質転換することによって、複数の標的遺伝子座の転写活性化又は抑制を誘導することを含み、前記ポリヌクレオチド又はベクターが、好ましくはタンデムに配列された複数のガイドＲＮＡを含むＣａｓ９酵素、複合体又はシステムをコードするか又はそれを含む、方法も提供される。任意の処置がエキソビボ、例えば、細胞培養物中で行われる場合、「対象」という用語が、「細胞又は細胞培養物」という語句で置き換えられ得ることが理解されるであろう。

【０４５７】

本明細書における他の箇所に定義される処置方法に使用するための、好ましくはタンデムに配列された複数のガイドＲＮＡを含むＣａｓ９酵素、複合体若しくはシステム、又は好ましくはタンデムに配列された複数のガイドＲＮＡを含む前記Ｃａｓ９酵素、複合体若しくはシステムをコードするか若しくは含むポリヌクレオチド若しくはベクターを含む組成物も提供される。このような組成物を含む、パーツのキットが提供され得る。このような処置方法のための薬剤の製造における前記組成物の使用も提供される。スクリーニングにおけるＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲシステムの使用、例えば、機能獲得スクリーニングも、本発明によって提供される。人工的に遺伝子を過剰発現させた細胞は、例えば、負のフィードバックループによって、時間とともに遺伝子を下方制御することが可能である（平衡を取り戻す）。スクリーニングを開始するまでに、調節されていない遺伝子は、再度減少され得る。誘導性Ｃａｓ９活性化因子を使用することにより、スクリーニングの直前に転写を誘導することが可能になり、ひいては偽陰性のヒットの機会を最小限に抑える。したがって、スクリーニング、例えば、機能獲得スクリーニングにおける本発明の使用により、偽陰性の結果の機会が最小限に抑えられ得る。

【０４５８】

一実施形態において、本発明は、Ｃａｓ９タンパク質及び複数のガイドＲＮＡを含む操作された非天然ＣＲＩＳＰＲシステムであって、複数のガイドＲＮＡがそれぞれ、細胞内の遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を特異的に標的とし、それによって、複数のガイドＲＮＡがそれぞれ、遺伝子産物をコードするそれらの特定のＤＮＡ分子を標的とし、Ｃａｓ９タンパク質は、遺伝子産物をコードする標的ＤＮＡ分子を切断し、それによって、遺伝子産物の発現が変化され；ＣＲＩＳＰＲタンパク質及びガイドＲＮＡが、天然には一緒

に存在しない、操作された非天然ＣＲＩＳＰＲシステムを提供する。本発明は、好ましくは、ダイレクトリピートなどのヌクレオチド配列によって隔てられ、任意に、ｔｒａｃｒ配列に融合された複数のガイド配列を含む複数のガイドＲＮＡを包含する。本発明の一実施形態において、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、Ｖ又はＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質であり、より好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。本発明はさらに、真核細胞内での発現についてコドン最適されたＣａｓ９タンパク質を包含する。好ましい実施形態において、真核細胞は、哺乳動物細胞であり、より好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。本発明のさらなる実施形態において、遺伝子産物の発現は、低下される。

【０４５９】

別の実施形態において、本発明は、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子をそれぞれが特異的に標的とする複数のＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲシステムガイドＲＮＡに動作可能に連結される第１の調節要素及びＣＲＩＳＰＲタンパク質をコードする動作可能に連結される第２の調節要素を含む１つ以上のベクターを含む操作された非天然ベクター系を提供する。両方の調節要素が、システムの同じベクター又はシステムの異なるベクターに位置し得る。複数のガイドＲＮＡは、細胞内の複数の遺伝子産物をコードする複数のＤＮＡ分子を標的とし、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、遺伝子産物をコードする複数のＤＮＡ分子を切断し得（それが、一方又は両方の鎖を切断し、又はヌクレアーゼ活性を実質的に有さないことがある）、それによって、複数の遺伝子産物の発現が変化され；ＣＲＩＳＰＲタンパク質及び複数のガイドＲＮＡは、天然には一緒に存在しない。好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、任意に、真核細胞内での発現についてコドン最適化されるＣａｓ９タンパク質である。好ましい実施形態において、真核細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞又は酵母細胞であり、より好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。本発明のさらなる実施形態において、複数の遺伝子産物のそれぞれの発現が変化され、好ましくは、低下される。

【０４６０】

一実施形態において、本発明は、１つ以上のベクターを含むベクター系を提供する。ある実施形態において、系は、（ａ）ダイレクトリピート配列及びダイレクトリピート配列の上流又は下流（いずれか適用可能な方）の１つ以上のガイド配列を挿入するための１つ以上の挿入部位に動作可能に連結される第１の調節要素であって、発現されるとき、１つ以上のガイド配列が、真核細胞内の１つ以上の標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、ＣＲＩＳＰＲ複合体が、１つ以上の標的配列にハイブリダイズされる１つ以上のガイド配列と複合体を形成するＣａｓ９酵素を含む、第１の調節要素；及び（ｂ）好ましくは、少なくとも１つの核局在配列及び／又は少なくとも１つのＮＥＳを含む前記Ｃａｓ９酵素をコードする酵素－コード配列に動作可能に連結される第２の調節要素を含み；構成要素（ａ）及び（ｂ）は、系の同じか又は異なるベクターに位置する。適用可能である場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。ある実施形態において、構成要素（ａ）は、第１の調節要素に動作可能に連結される２つ以上のガイド配列をさらに含み、発現されるとき、２つ以上のガイド配列のそれぞれが、真核細胞内の異なる標的配列へのＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向する。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、真核細胞の核内又は核外に検出可能な量の前記Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体の蓄積を駆動するために十分な強度の１つ以上の核局在配列及び／又は１つ以上のＮＥＳを含む。ある実施形態において、第１の調節要素は、ポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。ある実施形態において、第２の調節要素は、ポリメラーゼＩＩプロモーターである。ある実施形態において、ガイド配列のそれぞれが、少なくとも１６、１７、１８、１９、２０、２５ヌクレオチド、又は１６～３０、又は１６～２５、又は１６～２０ヌクレオチド長である。

【０４６１】

組み換え発現ベクターは、宿主細胞内の核酸の発現に好適な形態の、本明細書において定義される多重標的化に使用するためのＣａｓ９酵素、システム又は複合体をコードする

ポリヌクレオチドを含むことができ、これは、組み換え発現ベクターが、発現される核酸配列に動作可能に連結される、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択され得る１つ以上の調節要素を含むことを意味する。

【０４６２】

ある実施形態において、宿主細胞は、本明細書において定義される多重標的化において使用するためのＣａｓ９酵素、システム又は複合体をコードするポリヌクレオチドを含む１つ以上のベクターで一過性に又は非一過性にトランスフェクトされる。ある実施形態において、細胞は、それが対象において天然に存在するかのようにトランスフェクトされる。ある実施形態において、トランスフェクトされる細胞は、対象から取られる。ある実施形態において、細胞は、細胞株などの対象から取られた細胞に由来する。組織培養のための多種多様な細胞株が、当該技術分野において公知であり、本明細書における他の箇所に例示される。細胞株は、当業者に公知の様々な供給源（例えば、米国培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖａ．）を参照）から入手可能である。ある実施形態において、本明細書において定義される多重標的化において使用するためのＣａｓ９酵素、システム又は複合体をコードするポリヌクレオチドを含む１つ以上のベクターでトランスフェクトされた細胞が、１つ以上のベクター由来配列を含む新しい細胞株を確立するために使用される。ある実施形態において、本明細書に記載される多重標的化において使用するためのＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体の構成要素一過性にトランスフェクトされ（１つ以上のベクターの一過性トランスフェクション、又はＲＮＡによるトランスフェクションなどによる）、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲシステム又は複合体の活性によって修飾された細胞が、修飾を含むが、いずれかの他の外因性配列を欠く細胞を含む新しい細胞株を確立するために使用される。ある実施形態において、本明細書において定義される多重標的化において使用するためのＣａｓ９酵素、システム又は複合体をコードするポリヌクレオチドを含む１つ以上のベクターで一過性に又は非一過性にトランスフェクトされた細胞、又はこのような細胞に由来する細胞株が、１つ以上の試験化合物を評価する際に使用される。

【０４６３】

「調節要素」という用語は、本明細書における他の箇所に定義されるとおりである。

【０４６４】

有利なベクターは、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルスを含み、このようなベクターのタイプはまた、特定のタイプの細胞を標的とするために選択され得る。

【０４６５】

一実施形態において、本発明は、（ａ）ダイレクトリピート配列及びダイレクトリピート配列の上流又は下流（いずれか適用可能な方）に１つ以上のガイドＲＮＡ配列を挿入するための１つ以上の挿入部位に動作可能に連結される第１の調節要素であって、発現されるとき、ガイド配列が、真核細胞内のそれぞれの標的配列へのＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体が、それぞれの標的配列にハイブリダイズされる１つ以上のガイド配列と複合体を形成するＣａｓ９酵素を含む、第１の調節要素；及び／又は（ｂ）好ましくは、少なくとも１つの核局在配列及び／又はＮＥＳを含む前記Ｃａｓ９酵素をコードする酵素－コード配列に動作可能に連結される第２の調節要素を含む真核生物宿主細胞を提供する。ある実施形態において、宿主細胞は、構成要素（ａ）及び（ｂ）を含む。適用可能である場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。ある実施形態において、構成要素（ａ）、構成要素（ｂ）、又は構成要素（ａ）及び（ｂ）は、宿主真核細胞のゲノムに安定的に組み込まれる。ある実施形態において、構成要素（ａ）は、第１の調節要素に動作可能に連結され、任意にダイレクトリピートによって隔てられた２つ以上のガイド配列をさらに含み、発現されるとき、２つ以上のガイド配列のそれぞれが、真核細胞内の異なる標的配列へのＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向する。ある実施形態において、Ｃａｓ９酵素は、真核細胞の核内及び／又は核外に検出可能な量の前記ＣＲＩＳＰＲ酵素の蓄積を駆動するために十分な強度の１つ

以上の核局在配列及び／又は核外搬出配列又はＮＥＳを含む。

【０４６６】

ある実施形態において、Ｃａｓ９酵素は、Ｖ又はＶＩ型ＣＲＩＳＰＲシステム酵素である。ある実施形態において、Ｃａｓ９酵素は、Ｃａｓ９酵素である。ある実施形態において、Ｃａｓ９酵素は、野兎病菌（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）１、野兎病菌亜種ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｎｏｖｉｃｉｄａ）、プレボテーラ・アルベンシス（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ）、ラクノスピラセ・バクテリウム（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＭＣ２０１７ １、ブチリビブリオ・プロテオクラスティカス（Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ）、ペレグリニバクテリア・バクテリウム（Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、パークバクテリア・バクテリウム（Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、スミセラ属（Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ ｓｐ．）ＳＣＡＤＣ、アシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）ＢＶ３Ｌ６、ラクノスピラセ・バクテリウム（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＭＡ２０２０、カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム（Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ）、ユーバクテリウム・エリゲンス（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ）、モラクセラ・ボボクリ（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ）２３７、レプトスピラ・イナダイ（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ）、ラクノスピラセ・バクテリウム（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＮＤ２００６、ポルフィロモナス・クレビオリカニス（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ）３、プレボテラ・ディシエンス（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ）、又はポルフィロモナス・マカカエ（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅ）Ｃａｓ９に由来し、本明細書における他の箇所に定義されるＣａｓ９の変化又は変異をさらに含み得、キメラＣａｓ９であり得る。ある実施形態において、Ｃａｓ９酵素は、真核細胞内での発現のためにコドン最適化される。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の位置で１つ又は２つの鎖の切断を指向する。ある実施形態において、第１の調節要素は、ポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。ある実施形態において、第２の調節要素は、ポリメラーゼＩＩプロモーターである。ある実施形態において、１つ以上のガイド配列は、（それぞれ）少なくとも１６、１７、１８、１９、２０、２５ヌクレオチド、又は１６～３０、又は１６～２５、又は１６～２０ヌクレオチド長である。複数のガイドＲＮＡが使用されるとき、それらは、好ましくは、ダイレクトリピート配列によって隔てられる。

【０４６７】

一実施形態において、本発明は、真核細胞などの宿主細胞内の複数の標的ポリヌクレオチドを修飾する方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、Ｃａｓ９ＣＲＩＳＰＲ複合体が複数の標的ポリヌクレオチドに結合すること、例えば、前記複数の標的ポリヌクレオチドの切断を行い、それによって、複数の標的ポリヌクレオチドを修飾することを可能にすることを含み、Ｃａｓ９ＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の特定の標的配列にそれぞれハイブリダイズされた複数のガイド配列と複合体形成されるＣａｓ９酵素を含み、前記複数のガイド配列は、ダイレクトリピート配列に結合される。適用可能である場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る（例えば、シングルガイドＲＮＡ、ｓｇＲＮＡを提供するため）。ある実施形態において、前記切断は、前記Ｃａｓ９酵素によって標的配列のそれぞれの位置において１つ又は２つの鎖を切断することを含む。ある実施形態において、前記切断は、複数の標的遺伝子の減少した転写をもたらす。ある実施形態において、本方法は、外因性鋳型ポリヌクレオチドを用いた相同的組み換えによって、前記切断された標的ポリヌクレオチドの１つ以上を修復することをさらに含み、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの１つ以上の１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含む変異をもたらす。ある実施形態において、前記変異は、標的配列の１つ以上を含む遺伝子から発現されたタンパク質における１つ以上のアミノ酸変化をもたらす。ある

実施形態において、本方法は、１つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、１つ以上のベクターは、Ｃａｓ９酵素及びダイレクトリピート配列に結合された複数のガイドＲＮＡ配列の１つ以上の発現を駆動する。適用可能である場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。ある実施形態において、前記ベクターは、対象における真核細胞に送達される。ある実施形態において、前記修飾は、細胞培養物中で前記真核細胞において行われる。ある実施形態において、本方法は、前記修飾の前に対象から前記真核細胞を単離することをさらに含む。ある実施形態において、本方法は、前記真核細胞及び／又はそれから誘導される細胞を前記対象に戻すことをさらに含む。

【０４６８】

一実施形態において、本発明は、真核細胞内の複数のポリヌクレオチドの発現を修飾する方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体を複数のポリヌクレオチドに結合させ、それによって、前記結合が、前記ポリヌクレオチドの増加した又は低下した発現をもたらすようにすることを含み；Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記ポリヌクレオチド内のそれ自体の標的配列にそれぞれ特異的にハイブリダイズされた複数のガイド配列と複合体形成されるＣａｓ９酵素を含み、前記ガイド配列は、ダイレクトリピート配列に結合される。適用可能である場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。ある実施形態において、本方法は、１つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、１つ以上のベクターは、Ｃａｓ９酵素及びダイレクトリピート配列に結合された複数のガイド配列の１つ以上の発現を駆動する。適用可能である場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。

【０４６９】

一実施形態において、本発明は、ダイレクトリピート配列の上流又は下流（いずれか適用可能な方）に複数のガイドＲＮＡ配列を含む組み換えポリヌクレオチドを提供し、ガイド配列のそれぞれが、発現されるとき、真核細胞内に存在するその対応する標的配列へのＣａｓ９ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向する。ある実施形態において、標的配列は、真核細胞内に存在するウイルス配列である。適用可能である場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。ある実施形態において、標的配列は、癌原遺伝子又は癌遺伝子である。

【０４７０】

本発明の実施形態は、細胞内の対象とするゲノム遺伝子座における標的配列にハイブリダイズすることが可能なガイド配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及び少なくとも１つ以上の核局在配列を含み得る本明細書において定義されるＣａｓ９酵素を含み得る非天然又は操作された組成物を包含する。

【０４７１】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載される組成物のいずれかを細胞内に導入することによって、細胞内の遺伝子発現を変化させるように対象とするゲノム遺伝子座を修飾する方法を包含する。

【０４７２】

本発明の一実施形態は、上記の要素が、単一の組成物に含まれるか又は個々の組成物に含まれることである。これらの組成物は、有利には、宿主に適用されて、ゲノムレベルに対する機能的効果を引き起こし得る。

【０４７３】

前記操作ＡＡＶカプシドを発現する操作細胞及び生物

操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、及び／又はベクター系の１つ以上を含み得る操作細胞が、本明細書に記載される。ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチドの１つ以上が、操作細胞において発現され得る。ある実施形態において、操作細胞は、本明細書における他の箇所に記載される操作ＡＡＶカプシドタンパク質及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子を生成することが可能であり得る。本明細書に記載される１つ以上の操作細胞を含み得る改変又は操作された生物も、本明細書に記載される。操作細胞は、本明細書における他の箇所に記載される操作ＡＡＶカプシド

ポリヌクレオチドに依存して又はそれとは独立してカーゴ分子（例えば、カーゴポリヌクレオチド）を発現するように操作され得る。

【０４７４】

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

【０４７５】

操作細胞

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

【０４７６】

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

【０４７７】

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

【０４７８】

操作細胞は、原核細胞であり得る。原核細胞は、細菌細胞であり得る。原核細胞は、古細菌細胞であり得る。細菌細胞は、任意の好適な細菌細胞であり得る。好適な細菌細胞は、エシェリキア属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、バチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、ラク

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

【０４７９】

操作細胞は、真核細胞であり得る。真核細胞は、植物或いは、限定はされないが、ヒト、又は本明細書に記載される非ヒト真核生物又は動物又は哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜、又は非ヒト哺乳動物若しくは霊長類を含む哺乳動物などの特定の生物のものであるか又はそれに由来し得る。ある実施形態において、操作細胞は、細胞株であり得る。細胞株の例としては、限定はされないが、Ｃ８１６１、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ、ＭＯＬＴ、ｍＩＭＣＤ－３、ＮＨＤＦ、ＨｅＬａ－Ｓ３、Ｈｕｈ１、Ｈｕｈ４、Ｈｕｈ７、ＨＵＶＥＣ、ＨＡＳＭＣ、ＨＥＫｎ、ＨＥＫａ、ＭｉａＰａＣｅｌｌ、Ｐａｎｃ１、ＰＣ－３、ＴＦ１、ＣＴＬＬ－２、Ｃ１Ｒ、Ｒａｔ６、ＣＶ１、ＲＰＴＥ、Ａ１０、Ｔ２４、Ｊ８２、Ａ３７５、ＡＲＨ－７７、Ｃａｌｕ１、ＳＷ４８０、ＳＷ６２０、ＳＫＯＶ３、ＳＫ－ＵＴ、ＣａＣｏ２、Ｐ３８８Ｄ１、ＳＥＭ－Ｋ２、ＷＥＨＩ－２３１、ＨＢ５６、ＴＩＢ５５、ジャーカット、Ｊ４５．０１、ＬＲＭＢ、Ｂｃｌ－１、ＢＣ－３、ＩＣ２１、ＤＬＤ２、Ｒａｗ２６４．７、ＮＲＫ、ＮＲＫ－５２Ｅ、ＭＲＣ５、ＭＥＦ、Ｈｅｐ Ｇ２、ＨｅＬａ Ｂ、ＨｅＬａ Ｔ４、ＣＯＳ、ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－６、ＣＯＳ－Ｍ６Ａ、ＢＳ－Ｃ－１サル腎臓上皮、ＢＡＬＢ／３Ｔ３マウス胚性線維芽細胞、３Ｔ３ Ｓｗｉｓｓ、３Ｔ３－Ｌ１、１３２－ｄ５ヒト胎児線維芽細胞；１０．１マウス線維芽細胞、２９３－Ｔ、３Ｔ３、７２１、９Ｌ、Ａ２７８０、Ａ２７８０ＡＤＲ、Ａ２７８０ｃｉｓ、Ａ１７２、Ａ２０、Ａ２５３、Ａ４３１、Ａ－５４９、ＡＬＣ、Ｂ１６、Ｂ３５、ＢＣＰ－１細胞、ＢＥＡＳ－２Ｂ、ｂＥｎｄ．３、ＢＨＫ－２１、ＢＲ ２９３、ＢｘＰＣ３、Ｃ３Ｈ－１０Ｔ１／２、Ｃ６／３６、Ｃａｌ－２７、ＣＨＯ、ＣＨＯ－７、ＣＨＯ－ＩＲ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－Ｋ２、ＣＨＯ－Ｔ、ＣＨＯ Ｄｈｆｒ －／－、ＣＯＲ－Ｌ２３、ＣＯＲ－Ｌ２３／ＣＰＲ、ＣＯＲ－Ｌ２３／５０１０、ＣＯＲ－Ｌ２３／Ｒ２３、ＣＯＳ－７、ＣＯＶ－４３４、ＣＭＬ Ｔ１、ＣＭＴ、ＣＴ２６、Ｄ１７、ＤＨ８２、ＤＵ１４５、ＤｕＣａＰ、ＥＬ４、ＥＭ２、ＥＭ３、ＥＭＴ６／ＡＲ１、ＥＭＴ６／ＡＲ１０．０、ＦＭ３、Ｈ１２９９、Ｈ６９、ＨＢ５４、ＨＢ５５、ＨＣＡ２、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、Ｈｅｐａ１ｃ１ｃ７、ＨＬ－６０、ＨＭＥＣ、ＨＴ－２９、ジャーカット、ＪＹ細胞、Ｋ５６２細胞、Ｋｕ８１２、ＫＣＬ２２、ＫＧ１、ＫＹＯ１、ＬＮＣａｐ、Ｍａ－Ｍｅｌ １－４８、ＭＣ－３８、ＭＣＦ－７、ＭＣＦ－１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５、ＭＤＣＫ ＩＩ、ＭＤＣＫ ＩＩ、ＭＯＲ／０．２Ｒ、ＭＯＮＯ－ＭＡＣ ６、ＭＴＤ－１Ａ、ＭｙＥｎｄ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＣＰＲ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ１０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ２０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ４、ＮＩＨ－３Ｔ３、ＮＡＬＭ－１、ＮＷ－１４５、ＯＰＣＮ ／ ＯＰＣＴ細胞

株、Ｐｅｅｒ、ＰＮＴ－１Ａ ／ ＰＮＴ ２、ＲｅｎＣａ、ＲＩＮ－５Ｆ、ＲＭＡ／ＲＭＡＳ、Ｓａｏｓ－２細胞、Ｓｆ－９、ＳｋＢｒ３、Ｔ２、Ｔ－４７Ｄ、Ｔ８４、ＴＨＰ１細胞株、Ｕ３７３、Ｕ８７、Ｕ９３７、ＶＣａＰ、Ｖｅｒｏ細胞、ＷＭ３９、ＷＴ－４９、Ｘ６３、ＹＡＣ－１、ＹＡＲ、及びそれらのトランスジェニック種が挙げられる。細胞株は、当業者に公知の様々な供給源（例えば、米国培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖａ．）を参照）から入手可能である。

【０４８０】

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

【０４８１】

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

【０４８２】

本明細書において使用される際、「酵母細胞」という用語は、子嚢菌門（Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ）及び担子菌門（Ｂａｓｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ）内の任意の真菌細胞を指す。酵母細胞は、出芽酵母細胞、分裂酵母細胞、及びカビ細胞を含み得る。これらの生物に限定はされないが、研究室及び工業環境で使用される多くのタイプの酵母は、子嚢菌門（Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ）の一部である。ある実施形態において、酵母細胞は、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、クルイベロマイセス・マルシアヌス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ）、又はイサチェンキア・オリエンタリス（Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ ｏｒｉｅｎｔａｌｉｓ）細胞である。他の酵母細胞は、限定はされないが、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ ｓｐｐ．）（例えば、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ））、ヤロウィア属（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｓｐｐ．）（例えば、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ））、ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ ｓｐｐ．）（例えば、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ））、クルイベロマイセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐｐ．）（例えば、クルイベロマイセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）及び クルイベロマイセス・マルシアヌス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ））、ニューロスポラ属（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｓｐｐ．）（例えば、アカパンカビ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ））、フザリウム属（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐｐ．）（例えば、フザリウム・オキシスポルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ））、及びイサチェンキア属（Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ ｓｐｐ．）（例えば、イサチェンキア・オリエンタリス（Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ ｏｒｉｅｎｔａｌｉｓ）、別名ピキア・クドリアブゼビ（Ｐｉｃｈｉａ ｋｕｄｒｉａｖｚｅｖｉｉ）及びカンジダ・アシドサーモフィルム（Ｃａｎｄｉｄａ ａｃｉｄｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｍ））を含み得る。ある実施形態において、真菌細胞は、糸状真菌細胞である。本明細書において使用される際、「糸状真菌細胞」という用語は、糸状体、すなわち、菌糸又は菌糸体に生長する任意のタイプの真菌細胞を指す。糸状真菌細胞の例は、限定はされないがアスペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｓｐｐ．）（例えば、アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ））、トリコデルマ属（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｓｐｐ

．）（例えば、トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ））、リゾプス属（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ｓｐｐ．）（例えば、リゾプス・オリゼ（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ｏｒｙｚａｅ））、及びモルティエレラ属（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ｓｐｐ．）（例えば、モルティエレラ・イサベリナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ｉｓａｂｅｌｌｉｎａ））を含み得る。

【０４８３】

ある実施形態において、真菌細胞は、工業用菌株である。本明細書において使用される際、「工業用菌株」は、工業プロセス、例えば、商業的又は工業的規模での製品の生産に使用されるか又はそれから単離される真菌細胞の任意の菌株を指す。工業用菌株は、工業プロセスに典型的に使用される真菌種を指し得、又はそれは、非工業目的（例えば、実験研究）にも使用され得る真菌種の分離株を指し得る。工業プロセスの例は、発酵（例えば、食品又は飲料製品の製造）、蒸留、バイオ燃料生産、化合物の生産、及びポリペプチドの生産を含み得る。工業用菌株の例は、限定はされないが、ＪＡＹ２７０及びＡＴＣＣ４１２４を含み得る。

【０４８４】

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

【０４８５】

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

【０４８６】

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

【０４８７】
ある実施形態において、本明細書に記載される１つ以上のベクターでトランスフェクトされた細胞が、１つ以上のベクター由来配列を含む新しい細胞株を確立するために使用される。
【０４８８】
操作細胞は、操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドポリヌクレオチド、ベクター、及び／又は粒子を生成するために使用され得る。ある実施形態において、操作ウイルス（例えば、ＡＡＶ）カプシドポリヌクレオチド、ベクター、及び／又は粒子は、生成され、収集され、及び／又はそれを必要とする対象に送達される。ある実施形態において、操作細胞は、対象に送達される。操作細胞のための他の使用が、本明細書における他の箇所に記載される。ある実施形態において、操作細胞は、本明細書における他の箇所に記載される製剤及び／又はキットに含まれ得る。
【０４８９】
操作細胞は、後で使用するために短期間又は長期間貯蔵され得る。好適な貯蔵方法は、当該技術分野において一般に公知である。さらに、後で使用するために貯蔵された細胞を元の状態に戻す方法（貯蔵後の操作細胞における解凍、再構成、及び他の形で代謝を刺激することなど）も、当該技術分野において一般に公知である。
【０４９０】
製剤
本明細書に記載される組成物、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、粒子、細胞、ベクター系及びそれらの組合せが、医薬製剤などの製剤に含まれ得る。ある実施形態において、製剤は、本明細書に記載される１つ以上の筋特異的標的化部分を含むポリペプチド及び他の粒子を生成するために使用され得る。ある実施形態において、製剤は、それを必要とする対象に送達され得る。ある実施形態において、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステム、操作細胞、操作ＡＡＶカプシド粒子、及び／又はそれらの組合せの構成要素は、対象又は細胞に送達され得る製剤に含まれ得る。ある実施形態において、製剤は、医薬製剤である。本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの１つ以上が、それを必要とする対象又は細胞に、単独で又は医薬製剤中などで有効成分として提供され得る。したがって、ある量の、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、又はそれらの組合せの１つ以上を含有する医薬製剤も、本明細書に記載される。ある実施形態において、医薬製剤は、有効量の本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの１つ以上を含有し得る。本明細書に記載される医薬製剤は、それを必要とする対象又は細胞に投与され得る。
【０４９１】
ある実施形態において、医薬製剤に含まれる本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、ウイルス粒子、ナノ粒子、他の送達粒子、及びそれらの組合せの１つ以上の量は、それを必要とする対象の体重又は医薬製剤が投与され得る特定の患者集団の平均体重に基づいて、約１ｐｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲であり得る。医薬製剤中の本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの１つ以上の量は、約１ｐｇ～約１０ｇ、約１０ｎＬ～約１０ｍｌの範囲であり得る。医薬製剤が１つ以上の細胞を含有する実施形態において、量は、約１個の細胞～$1\times10^{2}$、$1\times10^{3}$、$1\times10^{4}$、$1\times10^{5}$、$1\times10^{6}$、$1\times10^{7}$、$1\times10^{8}$、$1\times10^{9}$、$1\times10^{10}$個又はそれ以上の細胞の範囲であり得る。医薬製剤が１つ以上の細胞を含有する実施形態において、量は、ｎＬ、μＬ、ｍＬ、又はＬ当たり、約１個の細胞～$1\times10^{2}$、$1\times10^{3}$、$1\times10^{4}$、$1\times10^{5}$、$1\times10^{6}$、$1\times10^{7}$、$1\times10^{8}$、$1\times10^{9}$、$1\times10^{10}$個又はそれ以上の細胞の範囲であり得る。
【０４９２】
実施形態において、操作ＡＡＶカプシド粒子が、製剤に含まれ、製剤は、１個～１×１

０$^{1}$、１×１０$^{2}$、１×１０$^{3}$、１×１０$^{4}$、１×１０$^{5}$、１×１０$^{6}$、１×１０$^{7}$、１×１０$^{8}$、１×１０$^{9}$、１×１０$^{10}$、１×１０$^{11}$、１×１０$^{12}$、１×１０$^{13}$、１×１０$^{14}$、１×１０$^{15}$、１×１０$^{16}$、１×１０$^{17}$、１×１０$^{18}$、１×１０$^{19}$、又は１×１０$^{20}$個の形質導入単位（ＴＵ）／ｍＬの操作ＡＡＶカプシド粒子を含有し得る。ある実施形態において、製剤は、０．１～１００ｍＬの体積であり得、１個～１×１０$^{1}$、１×１０$^{2}$、１×１０$^{3}$、１×１０$^{4}$、１×１０$^{5}$、１×１０$^{6}$、１×１０$^{7}$、１×１０$^{8}$、１×１０$^{9}$、１×１０$^{10}$、１×１０$^{11}$、１×１０$^{12}$、１×１０$^{13}$、１×１０$^{14}$、１×１０$^{15}$、１×１０$^{16}$、１×１０$^{17}$、１×１０$^{18}$、１×１０$^{19}$、又は１×１０$^{20}$個の形質導入単位（ＴＵ）／ｍＬの操作ＡＡＶカプシド粒子を含有し得る。

【０４９３】

薬学的に許容される担体及び補助成分及び薬剤

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

【０４９４】

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

【０４９５】

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

【０４９６】

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

【０４９７】

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

【０４９８】
好適な抗不安薬としては、限定はされないが、ベンゾジアゼピン（例えば、アルプラゾラム、ブロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロナゼパム、クロラゼペート、ジアゼパム、フルラゼパム、ロラゼパム、オキサゼパム、テマゼパム、トリアゾラム、及びトフィソパム）、セロトニン性抗うつ薬（例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害剤、三環系抗うつ薬、及びモノアミンオキシダーゼ阻害剤）、メビカール、ファボモチゾール、セランク、ブロマンタン、エモキシピン、アザピロン、バルビツール酸系薬、ヒドロキシジン、プレガバリン、バリドール、及びβ遮断薬が挙げられる。
【０４９９】
好適な抗精神病薬としては、限定はされないが、ベンペリドール、ブロムペリドール、ドロペリドール、ハロペリドール、モペロン、ピパムペロン、チミペロン、フルスピリレン、ペンフルリドール、ピモジド、アセプロマジン、クロルプロマジン、シアメマジン、ジキシラジン、フルフェナジン、レボメプロマジン、メソリダジン、ペラジン、ペリシアジン、ペルフェナジン、ピポチアジン、プロクロルペラジン、プロマジン、プロメタジン、プロチペンジル、チオプロペラジン、チオリダジン、トリフルオペラジン、トリフルプロマジン、クロルプロチキセン、クロペンチキソール、フルペンチキソール、チオチキセン、ズクロペンチキソール、クロチアピン、ロキサピン、プロチペンジル、カルピプラミン、クロカプラミン、モリンドン、モサプラミン、スルピリド、ベラリプリド、アミスルプリド、アモキサピン、アリピプラゾール、アセナピン、クロザピン、ブロナンセリン、イロペリドン、ルラシドン、メルペロン、ネモナプリド、オランザピン、パリペリドン、ペロスピロン、クエチアピン、レモキシプリド、リスペリドン、セルチンドール、トリミプラミン、ジプラシドン、ゾテピン、アルストニイ、ビフェプルノックス、ビトペルチン、ブレクスピプラゾール、カンナビジオール、カリプラジン、ピマバンセリン、ポマグルメタッドメチオニル、バビカセリン、キサノメリン、及びジクロナピンが挙げられる。
【０５００】
好適な鎮痛薬としては、限定はされないが、パラセタモール／アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びニメスリド）、ＣＯＸ－２阻害剤（例えば、ロフェコキシブ、セレコキシブ、及びエトリコキシブ）、オピオイド（例えば、モルヒネ、コデイン、オキシコドン、ヒドロコドン、ジヒドロモルヒネ、ペチジン、ブプレノルフィン）、トラマドール、ノルエピネフリン、フルピルチン、ネホパム、オルフェナドリン、プレガバリン、ガバペンチン、シクロベンザプリン、スコポラミン、メタドン、ケトベミドン、ピリトラミド、及びアスピリン及び関連サリチレート（例えば、サリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム、及びサリチル酸ナトリウム）が挙げられる。
【０５０１】
好適な鎮痙薬としては、限定はされないが、メベベリン、パパベリン、シクロベンザプリン、カリソプロドール、オルフェナドリン、チザニジン、メタキサロン、メトカルバモール、クロルゾキサゾン、バクロフェン、ダントロレン、バクロフェン、チザニジン、及びダントロレンが挙げられる。好適な抗炎症剤としては、限定はされないが、プレドニゾン、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びニメスリド）、ＣＯＸ－２阻害剤（例えば、ロフェコキシブ、セレコキシブ、及びエトリコキシブ）、及び免疫選択的抗炎症誘導体（例えば、顎下腺及びペプチド－Ｔ及びその誘導体）が挙げられる。
【０５０２】
好適な抗ヒスタミン剤としては、限定はされないが、Ｈ１－受容体拮抗薬（例えばアクリバスチン、アゼラスチン、ビラスチン、ブロムフェニラミン、ブクリジン、ブロモジフェンヒドラミン、カルビノキサミン、セチリジン、クロルプロマジン、シクリジン、クロルフェニラミン、クレマスチン、シプロヘプタジン、デスロラタジン、デクスブロムフェニラミン、デキスクロルフェニルアミン、ジメンヒドリナート、ジメチンデン、ジフェニルヒドラミン、ドキシラミン、エバスチン、エンブラミン、フェキソフェナジン、ヒドロ

キシジン、レボセチリジン、ロラタジン、メクリジン、ミルタザピン、オロパタジン、オルフェナドリン、フェニンダミン、フェニラミン、フェニルトロキサミン、プロメタジン、ピリラミン、クエチアピン、ルパタジン、トリペレナミン、及びトリプロリジン）、Ｈ２－受容体拮抗薬（例えば、シメチジン、ファモチジン、ラフチジン、ニザチジン、ラニチジン、及びロキサチジン）、トリトクアリン、カテキン、クロモグリケート、ネドクロミル、及びｐ２－アドレナリン作動薬が挙げられる。

【０５０３】

好適な抗感染薬としては、限定はされないが、抗アメーバ薬（例えば、ニタゾキサニド、パロモマイシン、メトロニダゾール、チニダゾール、クロロキン、ミルテホシン、アムホテリシンｂ、及びヨードキノール）、アミノグリコシド（例えば、パロモマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、カナマイシン、及びネオマイシン）、駆虫薬（例えば、ピランテル、メベンダゾール、イベルメクチン、プラジカンテル、アルベンダゾール、チアベンダゾール、オキサムニキン）、抗真菌剤（例えば、アゾール系抗真菌剤（例えばイトラコナゾール、フルコナゾール、パルコナゾール、ケトコナゾール、クロトリマゾール、ミコナゾール、及びボリコナゾール）、エキノキャンディン系（例えばキャスポファンギン、アニデュラファンギン、及びミカファンギン）、グリセオフルビン、テルビナフィン、フルシトシン、及びポリエン系（例えば、ナイスタチン、及びアムホテリシンｂ）、抗マラリア剤（例えば、ピリメタミン／スルファドキシン、アルテムエーテル／ルメファントリン、アトバコン／プログアニル、キニーネ、ヒドロキシクロロキン、メフロキン、クロロキン、ドキシサイクリン、ピリメタミン、及びハロファントリン）、抗結核剤（例えば、アミノサリチレート（例えば、アミノサリチル酸）、イソニアジド／リファンピン、イソニアジド／ピラジナミド／リファンピン、ベダキリン、イソニアジド、エタンブトール、リファンピン、リファブチン、リファペンチン、カプレオマイシン、及びサイクロセリン）、抗ウイルス薬（例えば、アマンタジン、リマンタジン、アバカビル／ラミブジン、エムトリシタビン／テノホビル、コビシスタット／エルビテグラビル／エムトリシタビン／テノホビル、エファビレンツ／エムトリシタビン／テノホビル、アバカビル／ラミブジン／ジドブジン、ラミブジン／ジドブジン、エムトリシタビン／テノホビル、エムトリシタビン／ロピナビル／リトナビル／テノホビル、インターフェロンα－２ｖ／リバビリン、ペグインターフェロンα－２ｂ、マラビロク、ラルテグラビル、ドルテグラビル、エンフビルチド、ホスカルネット、ホミビルセン、オセルタミビル、ザナミビル、ネビラピン、エファビレンツ、エトラビリン、リルピビリン、デラビルジン、ネビラピン、エンテカビル、ラミブジン、アデホビル、ソホスブビル、ジダノシン、テノホビル、アバカビル、ジドブジン、スタブジン、エムトリシタビン、ザルシタビン、テルビブジン、シメプレビル、ボセプレビル、テラプレビル、ロピナビル／リトナビル、ボセプレビル、ダルナビル、リトナビル、チプラナビル、アタザナビル、ネルフィナビル、アンプレナビル、インジナビル、サキナビル、リバビリン、バラシクロビル、アシクロビル、ファムシクロビル、ガンシクロビル、及びバルガンシクロビル）、カルバペネム（例えば、ドリペネム、メロペネム、エルタペネム、及びシラスタチン／イミペネム）、セファロスポリン（例えば、セファドロキシル、セフラジン、セファゾリン、セファレキシン、セフェピム、セファゾリン（ｃｅｆａｚｏｌｉｎｅ）、ロラカルベフ、セフォテタン、セフロキシム、セフプロジル、ロラカルベフ、セフォキシチン、セファクロル、セフチブテン、セフトリアキソン、セフォタキシム、セフポドキシム、セフジニル、セフィキシム、セフジトレン、セフチゾキシム、及びセフタジジム）、糖ペプチド抗生物質（例えばバンコマイシン、ダルババンシン、オリタバンシン、及びテラバンシン）、グリシルサイクリン系（例えば、チゲサイクリン）、抗らい菌薬（例えば、クロファジミン及びサリドマイド）、リンコマイシン及びその誘導体（例えば、クリンダマイシン及びリンコマイシン）、マクロライド及びその誘導体（例えば、テリスロマイシン、フィダキソマイシン、エリスロマイシン、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、及びトロレアンドマイシン）、リネゾリド、スルファメトキサゾール／トリメトプリム、リファキシミン、クロラムフェニコール、ホスホマイシン、メトロニダゾール、アズトレオナム、バシト

ラシン、ペニシリン（アモキシシリン、アンピシリン、バカンピシリン、カルベニシリン、ピペラシリン、チカルシリン、アモキシシリン／クラブラネート、アンピシリン／スルバクタム、ピペラシリン／タゾバクタム、クラブラネート／チカルシリン、ペニシリン、プロカインペニシリン、オキサシリン、ジクロキサシリン、及びナフシリン）、キノロン系（例えば、ロメフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、ガチフロキサシン、モキシフロキサシン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、ゲミフロキサシン、モキシフロキサシン、シノキサシン、ナリジクス酸、エノキサシン、グレパフロキサシン、ガチフロキサシン、トロバフロキサシン、及びスパルフロキサシン）、スルホンアミド系（例えば、スルファメトキサゾール／トリメトプリム、スルファサラジン、及びスルフイソキサゾール）、テトラサイクリン（例えば、ドキシサイクリン、デメクロサイクリン、ミノサイクリン、ドキシサイクリン／サリチル酸、ドキシサイクリン／ω－３多価不飽和脂肪酸、及びテトラサイクリン）、及び尿路感染症薬（例えば、ニトロフラントイン、メテナミン、ホスホマイシン、シノキサシン、ナリジクス酸、トリメトプリム、及びメチレンブルー）が挙げられる。

【０５０４】

好適な化学療法薬としては、限定はされないが、パクリタキセル、ブレンツキシマブベドチン、ドキソルビシン、５－ＦＵ（フルオロウラシル）、エベロリムス、ペメトレキセド、メルファラン、パミドロネート、アナストロゾール、エキセメスタン、ネララビン、オファツムマブ、ベバシズマブ、ベリノスタット、トシツモマブ、カルムスチン、ブレオマイシン、ボスチニブ、ブスルファン、アレムツズマブ、イリノテカン、バンデタニブ、ビカルタミド、ロムスチン、ダウノルビシン、クロファラビン、カボザンチニブ、ダクチノマイシン、ラムシルマブ、シタラビン、シトキサン、シクロホスファミド、デシタビン、デキサメタゾン、ドセタキセル、ヒドロキシウレア、ダカルバジン、ロイプロリド、エピルビシン、オキサリプラチン、アスパラギナーゼ、エストラムスチン、セツキシマブ、ビスモデギブ、黒脚病菌（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｃｈｒｙｓａｎｔｈｅｍｉ）由来アスパラギナーゼ、アミホスチン、エトポシド、フルタミド、トレミフェン、フルベストラント、レトロゾール、デガレリクス、プララトレキサート、メトトレキサート、フロクスウリジン、オビヌツズマブ、ゲムシタビン、アファチニブ、メシル酸イマチニブ、カルムスチン、エリブリン、トラスツズマブ、アルトレタミン、トポテカン、ポナチニブ、イダルビシン、イホスファミド、イブルチニブ、アキシチニブ、インターフェロンα－２ａ、ゲフィチニブ、ロミデプシン、イクサベピロン、ルキソリチニブ、カバジタキセル、ａｄｏ－トラスツズマブエムタンシン、カーフィルゾミブ、クロラムブシル、サルグラモスチム、クラドリビン、ミトタン、ビンクリスチン、プロカルバジン、メゲストロール、トラメチニブ、メスナ、塩化ストロンチウム－８９、メクロレタミン、マイトマイシン、ブスルファン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ビノレルビン、フィルグラスチム、ペグフィルグラスチム、ソラフェニブ、ニルタミド、ペントスタチン、タモキシフェン、ミトキサントロン、ペガスパルガーゼ、デニロイキンディフチトクス、アリトレチノイン、カルボプラチン、パーツズマブ、シスプラチン、ポマリドミド、プレドニゾン、アルデスロイキン、メルカプトプリン、ゾレドロン酸、レナリドミド、リツキシマブ、オクトレオチド、ダサチニブ、レゴラフェニブ、ヒストレリン、スニチニブ、シルツキシマブ、オマセタキシン、チオグアニン（チオグアニン）、ダブラフェニブ、エルロチニブ、ベキサロテン、テモゾロミド、チオテパ、サリドマイド、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ（ＢＣＧ）、テムシロリムス、ベンダムスチン塩酸塩、トリプトレリン、三酸化ヒ素、ラパチニブ、バルルビシン、パニツムマブ、ビンブラスチン、ボルテゾミブ、トレチノイン、アザシチジン、パゾパニブ、テニポシド、ロイコボリン、クリゾチニブ、カペシタビン、エンザルタミド、イピリムマブ、ゴセレリン、ボリノスタット、イデラリシブ、セリチニブ、アビラテロン、エポチロン、タフルポシド、アザチオプリン、ドキシフルリジン、ビンデシン、及びａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸が挙げられる。

【０５０５】

本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体

、ベクター、細胞、ウイルス粒子、ナノ粒子、他の送達粒子、及びそれらの組合せの１つ以上に加えて、医薬製剤に含まれる補助活性薬剤がある実施形態において、補助活性薬剤の有効量などの量は、補助活性薬剤に応じて変化する。ある実施形態において、補助活性薬剤の量は、０．００１マイクログラム～約１ミリグラムの範囲である。他の実施形態において、補助活性薬剤の量は、約０．０１ＩＵ～約１０００ＩＵの範囲である。さらなる実施形態において、補助活性薬剤の量は、０．００１ｍＬ～約１ｍＬの範囲である。さらに他の実施形態において、補助活性薬剤の量は、全医薬製剤の約１％ｗ／ｗ～約５０％ｗ／ｗの範囲である。さらなる実施形態において、補助活性薬剤の量は、全医薬製剤の約１％ｖ／ｖ～約５０％ｖ／ｖの範囲である。さらに他の実施形態において、補助活性薬剤の量は、全医薬製剤の約１％ｗ／ｖ～約５０％ｗ／ｖの範囲である。

【０５０６】

剤形

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

【０５０７】

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

【０５０８】

必要に応じて、本明細書に記載される剤形は、マイクロカプセル化され得る。

【０５０９】

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

関する情報を提供する。遅延放出は、約１時間～約３か月又はそれ以上の範囲であり得る。

【０５１０】

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

【０５１１】

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

【０５１２】

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

【０５１３】

鼻内又は吸入投与に適合された剤形は、エアロゾル、溶液、懸濁液滴、ゲル、又は乾燥粉末を含む。ある実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの１つ以上は、微粉化によって得られる又は得ることができる低粒径化形態で、吸入に適合された剤形に含まれる。ある実施形態において、低粒径化された（例えば、微粉化された）化合物又はその塩若しくは溶媒和物の粒径は、当該技術分野において公知の適切な方法によって測定される際、約０．５～約１０ミクロンのＤ５０値によって定義される。吸入による投与に適合された剤形は、粒子ダスト又はミストも含む。担体又は賦形剤が、鼻腔内スプレー又は点鼻薬として投与するための液体である好適な剤形は、有効成分（例えば、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの１つ以上及び／又は補助活性薬剤）の水性又は油性溶液／懸濁液を含み、これは、様々なタイプの定量式加圧エアロゾル、ネブライザー、又は吸入器によって生成され得る。

【０５１４】

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

【０５１５】

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

【０５１６】

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

【０５１７】

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

【０５１８】

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

【０５１９】

非経口投与に適合された及び／又は任意のタイプの注射（例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、骨内、硬膜外、心臓内、関節内、空洞内、歯肉、歯肉縁下、くも膜下腔内、硝子体内、脳内、及び脳室内）に適合された剤形は、水性及び／又は非水性滅菌注射溶液を含むことができ、これは、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、組成物を対象の血液と等張にする溶質、及び水性及び非水性滅菌懸濁液（懸濁化剤及び増粘剤を含み得る）を含有し得る。非経口投与に適合された剤形は、限定はされないが、密閉アンプル又はバイアルを含む単回単位用量又は複数回単位用量容器中で提供され得る。用量は、凍結乾燥され、投与前に滅菌担体に再懸濁されて用量を再構成し得る。即時調合注射溶液及び懸濁液が、ある実施形態において、滅菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製され得る。

【０５２０】

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

【０５２１】

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

【０５２２】
キット
組成物、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、又は本明細書に記載される他の構成要素及びそれらの組合せの１つ以上及び本明細書に記載される医薬製剤の１つ以上を含有するキットも、本明細書に記載される。実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの１つ以上は、組合せキットとして提供され得る。本明細書において使用される際、「組合せキット」又は「パーツのキット」という用語は、化合物、又は製剤、並びにそれに含まれる要素の組合せ又は単一の要素、例えば有効成分の包装、スクリーニング、試験、販売、流通、送達、及び／又は投与に使用され得るさらなる構成要素を指す。このようなさらなる構成要素は、限定はされないが、パッケージング、シリンジ、ブリスターパッケージ、ボトルなどを含む。組合せキットは、構成要素（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、及びそれらの組合せの１つ以上の１つ以上）又はその製剤の１つ以上を含有し得、単一の製剤（例えば、液体、凍結乾燥粉末など）、又は別個の製剤中で提供され得る。別個の構成要素又は製剤は、キット内の単一のパッケージ又は別個のパッケージに含まれ得る。キットは、有形的表現媒体に取扱説明書も含み、取扱説明書は、それに含まれる構成要素及び／又は製剤の内容に関する情報及び／又は指示、それに含まれる構成要素及び／又は製剤の内容に関する安全情報、それに含まれる構成要素及び／又は製剤の量、投与量、用法指示、スクリーニング方法、構成要素設計勧告及び／又は情報、推奨される治療計画に関する情報を含み得る。本明細書において使用される際、「有形的表現媒体」は、物理的に有形又は触れられる媒体を指し、単なる抽象的思考又は記録されていない話し言葉ではない。「有形的表現媒体」としては、限定はされないが、セルロース又はプラスチック材料上の言葉、又は好適なコンピュータ可読メモリー形態で保存されたデータが挙げられる。データは、フラッシュメモリドライブ若しくはＣＤ－ＲＯＭなどのユニットデバイス又は例えば、ウェブインターフェースを介してユーザによってアクセス可能なサーバに保存され得る。
【０５２３】
一実施形態において、本発明は、本明細書に記載される構成要素の１つ以上を含むキットを提供する。ある実施形態において、キットは、ベクター系及びキットを使用するための取扱説明書を含む。ある実施形態において、ベクター系は、本明細書における他の箇所に記載される１つ以上の操作ポリヌクレオチドに動作可能に連結される調節要素、例えば、筋特異的標的化部分を含有するもの、及び、任意に、調節要素に任意に動作可能に連結され得るカーゴ分子を含む。本明細書における他の箇所に記載される１つ以上の操作ポリヌクレオチド、例えば、筋特異的標的化部分を含有するものは、キット内にカーゴ分子を含有する実施形態においてカーゴ分子と同じか又は異なるベクターに含まれ得る。
【０５２４】
ある実施形態において、キットは、ベクター系及びキットを使用するための取扱説明書を含む。ある実施形態において、ベクター系は、（ａ）ダイレクトリピート配列及びダイレクトリピート配列の上流又は下流（いずれか適用可能な方）に１つ以上のガイド配列を挿入するための１つ以上の挿入部位に動作可能に結合される第１の調節要素であって、発現されるとき、ガイド配列が、真核細胞内の標的配列へのＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ複合体が、標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体を形成するＣａｓ９酵素を含む、第１の調節要素；及び／又は（ｂ）核局在配列を含む前記Ｃａｓ９酵素をコードする酵素－コード配列に動作可能に結合される第２の調節要素を含む。適用可能である場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。ある実施形態において、キットは、システムの同じ又は異なるベクターに位置する構成要素（ａ）及び（ｂ）を含む。ある実施形態において、構成要素（ａ）は、第１の調節要素に動作可能に結合される２つ以上のガイド配列をさらに含み、発現されるとき、２つ以上のガイド配列のそれぞれが、真核細胞内の異なる標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向する。ある実施形態において、Ｃａｓ９酵素は、真核細胞の核内に検

出可能な量の前記ＣＲＩＳＰＲ酵素の蓄積を駆動するために十分な強度の１つ以上の核局在配列を含む。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、タイプＶ又はＶＩ ＣＲＩＳＰＲシステム酵素である。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９酵素である。ある実施形態において、Ｃａｓ９酵素は、野兎病菌（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）１、野兎病菌亜種ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｎｏｖｉｃｉｄａ）、プレボテーラ・アルベンシス（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ）、ラクノスピラセ・バクテリウム（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＭＣ２０１７ １、ブチリビブリオ・プロテオクラスティカス（Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ）、ペレグリニ・バクテリウム（Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、パルクバクテリア・バクテリウム（Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、スミセラ属（Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ ｓｐ．）ＳＣＡＤＣ、アシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．） ＢＶ３Ｌ６、ラクノスピラセ・バクテリウム（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＭＡ２０２０、カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム（Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ）、ユウバクテリウム・エリゲンス（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ）、モラクセラ・ボボクリ（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ）２３７、レプトスピラ・イナダイ（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ）、ラクノスピラセ・バクテリウム（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ＮＤ２００６、ポルフィロモナス・クレビオリカニス（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ）３、プレボテラ・ディシエンス（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ）、又はポルフィロモナス・マカカエ（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅ）Ｃａｓ９（例えば、少なくとも１つのＤＤを有するか又はそれと結合されるように修飾された）に由来し、Ｃａｓ９の変化又は変異をさらに含み得、キメラＣａｓ９であり得る。ある実施形態において、ＤＤ－ＣＲＩＳＰＲ酵素は、真核細胞内での発現のためにコドン最適化される。ある実施形態において、ＤＤ－ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の位置で１つ又は２つの鎖の切断を指向する。ある実施形態において、ＤＤ－ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＤＮＡ鎖切断活性を欠くか又は実質的に欠く（例えば、野生型酵素又はヌクレアーゼ活性を減少させる変異又は変化を有さない酵素と比較して５％以下のヌクレアーゼ活性）。ある実施形態において、第１の調節要素は、ポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。ある実施形態において、第２の調節要素は、ポリメラーゼＩＩプロモーターである。ある実施形態において、ガイド配列は、少なくとも１６、１７、１８、１９、２０、２５ヌクレオチド、又は１６～３０、又は１６～２５、又は１６～２０ヌクレオチド長である。

【０５２５】

使用の方法

一般的な説明

筋特異的標的化部分、操作ＡＡＶカプシドシステムポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、操作細胞、操作ＡＡＶカプシド粒子の１つ以上を含む組成物は、一般に、１つ以上のカーゴをレシピエント細胞へとパッケージング及び／又は送達するために使用され得る。ある実施形態において、送達は、標的化部分の特異性に基づいて細胞特異的に行われる。ある実施形態において、これは、操作ＡＡＶカプシドの指向性によって与えられ、これは、本明細書における他の箇所に記載される１つ又はｎ量体モチーフを含めることによって少なくとも部分的に影響され得る。ある実施形態において、筋特異的標的化部分、操作ＡＡＶカプシド粒子の１つ以上を含む組成物は、対象又は細胞、組織、及び／又は器官に投与され、レシピエント細胞へのカーゴの移動及び／又は統合を促進し得る。他の実施形態において、筋特異的標的化部分の１つ以上を含有するポリペプチド及び他の粒子（例えば、操作ＡＡＶカプシド及びウイルス粒子）などの組成物を生成することが可能な操作細胞は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ベクター、及びベクター系などから生成され得る。これは、限定はされないが、操作ＡＡＶカプシドシステム分子（例えば、

ポリヌクレオチド、ベクター、及びベクター系など）を含む。ある実施形態において、筋特異的標的化部分の１つ以上を含有するポリペプチド及び他の粒子（例えば、操作ＡＡＶカプシド及びウイルス粒子）などの組成物を生成することが可能な、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ベクター、及びベクター系などは、細胞又は組織に、インビボ、エクスビボ、又はインビトロで送達され得る。ある実施形態において、対象に送達される場合、組成物は、対象の細胞をインビボ又はエクスビボで形質転換して、限定はされないが、操作ＡＡＶカプシド粒子を含む本明細書に記載される筋特異的標的化部分の１つ以上を含有する本明細書に記載される組成物を作製することが可能であり得る操作細胞を生成し得、これは、操作細胞から放出され、カーゴ分子を、インビボでレシピエント細胞に送達し、又はレシピエント細胞を得た対象への再導入のために個人化された操作組成物（例えば、ＡＡＶカプシド粒子）を生成し得る。

【０５２６】

ある実施形態において、操作細胞は、対象に送達され得、それは、それらがカーゴ（例えば、カーゴポリヌクレオチド）をレシピエント細胞に送達し得るように、本発明の生成された組成物（限定はされないが、操作ＡＡＶカプシド粒子を含む）を放出し得る。これらの一般的なプロセスは、対象における疾患若しくはその症状を処置及び／又は予防し、モデル細胞を生成し、修飾生物を生成し、細胞選択及びスクリーニングアッセイを提供するために、生物学的生産において、及び他の様々な用途において、様々な方法で使用され得る。

【０５２７】

ある実施形態において、筋特異的標的化部分の１つ以上を含有するポリペプチド及び他の粒子（例えば、操作ＡＡＶカプシド及びウイルス粒子））などの組成物は、対象又は細胞、組織、及び／又は器官に送達され得る。このように、それらは、それらが含有し得るか又は関連する任意のカーゴを筋細胞に送達するために使用され得る。

【０５２８】

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

【０５２９】

本発明は、結果又はデータの伝達がある研究プログラムの一環として使用され得る。コンピュータシステム（又はデジタルデバイス）は、結果を受信、送信、表示及び／又は保存し、データ及び／又は結果を分析し、及び／又は結果及び／又はデータ及び／又は分析のレポートを生成するために使用され得る。コンピュータシステムは、媒体（例えば、ソフトウェア）及び／又はネットワークポートから（例えば、インターネットから）命令を読み取ることができる論理的装置として理解され得、これは、任意に、固定媒体を有するサーバに接続され得る。コンピュータシステムは、ＣＰＵ、ディスクドライブ、キーボード及び／又はマウスなどの入力デバイス、及びディスプレイ（例えば、モニター）の１つ以上を含み得る。命令又はレポートの送信などのデータ通信は、通信媒体を介して、ローカル又はリモート位置でサーバへと行われ得る。通信媒体は、データを送信及び／又は受信する任意の手段を含み得る。例えば、通信媒体は、ネットワーク接続、無線接続、又はインターネット接続であり得る。このような接続は、ワールド・ワイド・ウェブにわたって通信を提供し得る。本発明に関連するデータが、受信機による受信及び／又は閲覧のためにこのようなネットワーク又は接続（又は限定はされないが、プリントアウトなどの郵送の物理的レポートを含む、情報を伝達するための任意の他の好適な手段）にわたって送信され得ると考えられる。受信機は、限定はされないが、個々の、又は電子システム（例えば、１つ以上のコンピュータ、及び／又は１つ以上のサーバ）であり得る。ある実施形態において、コンピュータシステムは、１つ以上のプロセッサーを含む。プロセッサーは

、１つ以上のコントローラ、計算ユニット、及び／又はコンピュータシステムの他のユニットと結合されるか、又は必要に応じてファームウェアに組み込まれ得る。ソフトウェアにおいて実装される場合、ルーティンが、ＲＡＭ、ＲＯＭ、フラッシュメモリ、磁気ディスク、レーザディスク、又は他の好適な記憶媒体などの任意のコンピュータ可読メモリーに記憶され得る。同様に、このソフトウェアは、例えば、通信チャネル、例えば、電話線、インターネット、無線接続などにわたって、又は輸送可能媒体、例えば、コンピュータ可読ディスク、フラッシュドライブなどを介した方法を含む任意の公知の送達方法によって、コンピュータデバイスに送達され得る。様々な工程が、ハードウェア、ファームウェア、ソフトウェア、又はハードウェア、ファームウェア、及び／若しくはソフトウェアの任意の組合せにおいて実装され得る様々なブロック、操作、ツール、モジュール、及び技術として実装され得る。ハードウェアにおいて実装される場合、ブロック、操作、技術などのいくつか又は全てが、例えば、カスタム集積回路（ＩＣ）、特定用途向け集積回路（ＡＳＩＣ）、フィールドプログラム可能な論理アレイ（ＦＰＧＡ）、プログラム可能な論理アレイ（ＰＬＡ）などにおいて実装され得る。クライアント・サーバ、リレーショナルデータベースアーキテクチャが、本発明の実施形態において使用され得る。クライアント・サーバアーキテクチャは、ネットワーク上の各コンピュータ又はプロセスが、クライアント又はサーバのいずれかであるネットワークアーキテクチャである。サーバコンピュータは、典型的に、ディスクドライブ（ファイルサーバ）、プリンター（印刷サーバ）、又はネットワークトラフィック（ネットワークサーバ）を管理するための専用の高性能のコンピュータである。クライアントコンピュータとしては、ＰＣ（パーソナルコンピュータ）又はユーザがアプリケーションを実行するワークステーション、並びに本明細書に開示される例の出力デバイスが挙げられる。クライアントコンピュータは、ファイル、デバイス、及びさらに処理能力などのリソースをサーバコンピュータに依拠する。本発明のある実施形態において、サーバコンピュータは、データベース機能の全てを扱う。クライアントコンピュータは、全てのフロントエンドデータ管理を扱うソフトウェアを有し得、ユーザからのデータ入力を受信することもできる。コンピュータ実行可能コードを含む機械可読媒体は、限定はされないが、有形記憶媒体、搬送波媒体又は物理的伝送媒体を含む多くの形態を取り得る。不揮発性記憶媒体は、例えば、光又は磁気ディスク、例えば、任意のコンピュータなどにおける記憶デバイスのいずれかを含み、例えば、図面に示されるデータベースなどを実装するために使用され得る。揮発性記憶媒体は、このようなコンピュータプラットフォームのメインメモリなどのダイナミックメモリを含む。有形送信媒体は、コンピュータシステム内のバスを含む配線を含む銅線及び光ファイバーの同軸ケーブルを含む。担体波送信媒体は、電気若しくは電磁気信号、又は無線周波数（ＲＦ）及び赤外線（ＩＲ）データ通信の間に生成されるものなどの音波若しくは光波の形式を取り得る。したがって、コンピュータ可読媒体の共通の形式は、例えば：フロッピーディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、任意の他の磁気媒体、ＣＤ－ＲＯＭ、ＤＶＤ又はＤＶＤ－ＲＯＭ、任意の他の光媒体、パンチカード、紙テープ、穴のパターンを備えた任意の他の物理的記憶媒体、ＲＡＭ、ＲＯＭ、ＰＲＯＭ及びＥＰＲＯＭ、ＦＬＡＳＨ－ＥＰＲＯＭ、任意の他のメモリチップ若しくはカートリッジ、データ又は指示を運ぶ搬送波、このような搬送波を輸送するケーブル若しくはリンク、又はコンピュータがプログラミングコード及び／又はデータを読み取り得る任意の他の媒体を含む。これらの形態のコンピュータ可読媒体の多くは、プロセッサーに実行のための１つ以上の指示の１つ以上の配列を運ぶことに関与し得る。したがって、本発明は、本明細書に記載される任意の方法を実施し、それからのデータ及び／又は結果及び／又はその分析を保存及び／又は送信すること、並びに中間体を含む、本明細書に記載される任意の方法を実施することからの生成物を包含する。

【０５３０】

治療薬

ある実施形態において、限定はされないが、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシド粒子、操作細胞、及び／又はその製剤を含む、本明細書に記載される筋特異的標的化部分

の１つ以上を含有する組成物は、１つ以上の疾患の処置としてそれを必要とする対象に送達され得る。ある実施形態において、処置される疾患は、遺伝性又は後成的疾患である。ある実施形態において、処置される疾患は、遺伝性又は後成的疾患でない。ある実施形態において、限定はされないが、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシド粒子、操作細胞、及び／又はその製剤を含む、本明細書に記載される筋特異的標的化部分の１つ以上を含有する組成物は、疾患の処置又は予防として（又は処置若しくは予防の一環として）それを必要とする対象に送達され得る。本発明の組成物、製剤、細胞などの送達によって処置及び／又は予防される特定の疾患が、本発明の組成物、製剤、細胞などに連結され、結合され、それに含まれ、又はそれに他の形で関連するカーゴに依存し得ることが理解されるであろう。

【０５３１】

処置され得る遺伝性疾患は、本明細書における他の箇所により詳細に記載される（例えば、以下の遺伝子組み換えによる療法についての説明を参照）。他の疾患は、限定はされないが、以下のもの：癌、アシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）感染症、放線菌症、アフリカ睡眠病、ＡＩＤＳ／ＨＩＶ、アメーバ症、アナプラズマ症、住血線虫症、アニサキス症、炭疽病、アルカノバクテリウム・ヘモリティカム（Ａｒｃａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｍ）感染症、アルゼンチン出血熱、回虫症、アスペルギルス症、アストロウイルス感染症、バベシア症、細菌性髄膜炎、細菌性肺炎、細菌性膣炎、バクテロイデス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）感染症、バランチジウム症、バルトネラ症、バイリサスカリス感染症、ＢＫウイルス感染症、黒色砂毛、ブラストシスチス症、ブラストミセス症、ボリビア出血熱、ボツリヌス症、ブラジル出血熱、ブルセラ症、腺ペスト、バークホルデリア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）感染症、ブルーリ潰瘍、カリシウイルス感染症、カンピロバクター感染症、カンジダ症、毛頭虫症、カリオン病、ネコ引っ掻き病、蜂巣炎、シャーガス病、軟性下疳、水痘、チクングニア熱、クラミジア、クラミジア肺炎菌（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、コレラ、黒色分芽菌症、ツボカビ症、肝吸虫症、クロストリジウム・ディフィシレ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）大腸炎、コクシジオイデス症、コロラドダニ熱、ライノウイルス／コロナウイルス感染症（風邪）、クロイツフェルト・ヤコブ病、クリミアコンゴ出血熱、クリプトコッカス症、クリプトスポリジウム症、皮膚幼虫移行症（ＣＬＭ）、サイクロスポーラ症、嚢虫症、サイトメガロウイルス感染症、デング熱、デスモデスムス（Ｄｅｓｍｏｄｅｓｍｕｓ）感染症、二核アメーバ症、ジフテリア、裂頭条虫症、メジナ虫症、エボラ出血熱、エキノコックス症、エーリキア症、蟯虫症、エンテロコッカス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）感染症、エンテロウイルス感染症、流行性発疹チフス、伝染性紅斑、突発性発疹、肝蛭、肥大吸虫症、致死性家族性不眠症、フィラリア症、ウェルシュ菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）感染症、フソバクテリウム（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）感染症、ガス壊疽（クロストリジウム性筋壊死）、ジオトリクム症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、ジアルジア症、鼻疽、顎口虫症、淋病、鼠径肉芽腫、Ａ群連鎖球菌（Ｇｒｏｕｐ　Ａ　ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ）感染症、Ｂ群連鎖球菌（Ｇｒｏｕｐ　Ｂ　ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ）感染症、インフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）感染症、手足口病、ハンタウイルス肺症候群、ハートランドウイルス病、ピロリ菌（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ）感染症、腎症候性出血熱、ヘンドラウイルス感染症、肝炎（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ型の全ての群）、単純ヘルペス、ヒストプラスマ症、鉤虫感染症、ヒトボカウイルス感染症、ヒトエーリキア症、ヒト顆粒球アナプラズマ症、ヒトメタ肺炎ウイルス感染症、ヒト単球性エーリキア症、ヒトパピローマウイルス、膜様条虫症、エプスタイン・バール感染症、単核球症、インフルエンザ、イソスポラ症、川崎病、キンゲラ・キンゲ（Ｋｉｎｇｅｌｌａ　ｋｉｎｇａｅ）感染症、クールー病、ラッサ熱、レジオネラ症（レジオネラ症及びポンティアック熱）、リーシュマニア症、ハンセン病、レプトスピラ症、リステリア症、ライム病、リンパ管フィラリア症、リンパ球性脈絡髄膜炎、マラリア、マールブルグ出血熱、麻疹、中東呼吸器症候群、類鼻疽症、髄膜炎、髄膜炎菌性疾患、メタゴニムス症、微

胞子虫症、伝染性軟属腫、サル痘、ムンプス、ネズミ発疹チフス、マイコプラズマ肺炎、マイコプラズマ・ジェニタリウム（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ）感染症、菌腫、ハエ蛆症、結膜炎、ニパウイルス感染症、ノロウイルス、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病、ノカルジア症、オンコセルカ症、オピストルキス症、パラコクシジオイデス症、肺吸虫症、パスツレラ症、アタマジラミ（Ｐｅｄｉｃｕｌｏｓｉｓ ｃａｐｉｔｉｓ）、コロモジラミ（Ｐｅｄｉｃｕｌｏｓｉｓ ｃｏｒｐｏｒｉｓ）、ケジラミ（Ｐｅｄｉｃｕｌｏｓｉｓ ｐｕｂｉｓ）、骨盤内炎症性疾患、百日咳、ペスト、肺炎球菌感染症、ニューモシスチス肺炎、肺炎、ポリオウイルス感染症、プレボテラ感染症、原発性アメーバ性髄膜脳炎、進行性多巣性白質脳症、オウム病、Ｑ熱、狂犬病、回帰熱、呼吸器合胞体ウイルス感染症、ライノウイルス感染症、リケッチア感染症、リケッチア痘、リフトバレー熱、ロッキー山紅斑熱、ロタウイルス感染症、風疹、サルモネラ症、ＳＡＲＳ、疥癬、猩紅熱、住血吸虫症、敗血症、細菌性赤痢、帯状疱疹、天然痘、スポロトリクム症、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌ）感染症（ＭＲＳＡを含む）、糞線虫症、亜急性硬化性全脳炎、梅毒、条虫症、破傷風、白癬菌属（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ）種感染症、トキソカラ症、トキソプラズマ症、トラコーマ、旋毛虫病、鞭虫症、結核、野兎病、腸チフス熱、発疹チフス熱、ウレアプラズマ・ウレアリチカム（Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｕｒｅａｌｙｔｉｃｕｍ）感染症、渓谷熱、ベネズエラウマ脳炎、ベネズエラ出血熱、ビブリオ属（Ｖｉｂｒｉｏ）種感染症、ウイルス肺炎、ウエストナイル熱、白色砂毛、エルシニア偽結核、エルシニア症、黄熱病、ジアスポラ症（Ｚｅａｓｐｏｒａ）、ジカ熱、接合菌症及びそれらの組合せのいずれかを含む。

【０５３２】

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

【０５３３】

ある実施形態において、処置される疾患は、筋又は筋関連疾患又は障害、例えば、遺伝性筋疾患又は障害である。

【０５３４】

他の疾患及び障害が、当業者によって理解されるであろう。

【０５３５】

養子細胞療法

一般的に言えば、養子細胞移入は、対象への細胞（自己細胞、同種異系細胞、及び／又は異種細胞）の移入を含む。

【０５３６】

ある実施形態において、本明細書に記載される操作細胞は、養子細胞移入治療に含まれ得る。ある実施形態において、本明細書に記載される操作細胞は、それを必要とする対象に送達され得る。ある実施形態において、細胞は、対象から単離され、それが操作細胞を生成するために本明細書に記載される、本明細書における他の箇所に記載される筋特異的標的化部分（限定はされないが、操作ＡＡＶカプシド粒子を含む）を含有する本発明の組成物を含むか、及び／又はそれを生成することが可能であるようにインビトロで操作され、自己移植により対象に戻されるか又は同種異系若しくは異種移植により異なる対象に送達され得る。単離、操作、及び／又は送達される細胞は、真核細胞であり得る。単離、操

作、及び／又は送達される細胞は、幹細胞であり得る。単離、操作、及び／又は送達される細胞は、分化した細胞であり得る。単離、操作、及び／又は送達される細胞は、免疫細胞、血液細胞、内分泌細胞、腎細胞、外分泌細胞、神経系細胞、血管細胞、筋細胞、泌尿器系細胞、骨細胞、軟組織細胞、心臓細胞、ニューロン、又は外皮系細胞であり得る。他の特定の細胞型が、当業者によって即座に理解されるであろう。

【０５３７】

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

【０５３８】

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

【０５３９】

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

【０５４０】

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

【０５４１】

有害反応を防ぐために、操作細胞は、細胞を特定のシグナルへの曝露に対して脆弱にする導入遺伝子の形態のトランスジェニック安全スイッチを備え得る。例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＴＫ）遺伝子は、例えばＧｒｅｃｏ、ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ　ｔｈｅ　ｓａｆｅｔｙ　ｏｆ　ｃｅｌｌ　ｔｈｅｒａｐｙ　ｗｉｔｈ　ｔｈｅ　ＴＫ－ｓｕｉｃｉｄｅ　ｇｅｎｅ．Ｆｒｏｎｔ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１５；６：９５に記載されるものと同様の操作細胞への導入によって、このように使用され得る。このような細胞において、ガンシクロビル又はアシクロビルなどのヌクレオシドプロドラッグの投与は、細胞死を引き起こす。別の安全スイッチ構築物は、例えば２つの非機能的ｉｃａｓｐ９分子を一緒にして活性酵素を形成する小分子ジメライザー（ｄｉｍｅｒｉｚｅｒ）の投与によって誘発される誘導性カスパーゼ９を含む。細胞増殖制御を実施するための多種多様な別の手法が、記載されている（米国特許出願公開第２０１３００７１４１４号明細書；ＰＣＴ特許公開国際公開第２０１１１４６８６２号パンフレット；ＰＣＴ特許公開国際公開第２０１４０１１９８７号パンフレット；ＰＣＴ特許公開国際公開第２０１３０４０３７１号パンフレット；Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．ＢＬＯＯＤ、２０１４、１２３／２５：３８９５－３９０５；Ｄｉ　Ｓｔａｓｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｅ　Ｎｅｗ

England Journal of Medicine ２０１１；３６５：１６７３－１６８３；Sadelain M，The New England Journal of Medicine ２０１１；３６５：１７３５－１７３；Ramos et al.，Stem Cells ２８（６）：１１０７－１５（２０１０）を参照）。

【０５４２】

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

【０５４３】

同種異系細胞は、宿主免疫系によって迅速に拒絶される。未照射血液産物中に存在する同種異系白血球が、５～６日以下持続することが実証されている（Ｂｏｎｉ、Ｍｕｒａｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．２００８ Ｂｌｏｏｄ １；１１２（１２）：４７４６－５４）。したがって、同種異系細胞の拒絶を防ぐために、宿主の免疫系は、通常、ある程度抑制される必要がある。しかしながら、養子細胞移入の場合、免疫抑制剤の使用はまた、本明細書に記載される操作細胞などの導入された治療用細胞に有害な影響を及ぼす。したがって、これらの条件で養子免疫療法を有効に使用するために、導入される細胞は、免疫抑制療法に耐性である必要があるであろう。したがって、特定の実施形態において、本発明は、好ましくは、免疫抑制剤に対する標的をコードする少なくとも１つの遺伝子を不活性化することによって、操作細胞を修飾して、それらを免疫抑制剤に対して耐性にする工程をさらに含む。免疫抑制剤は、いくつかの作用機序の１つによって免疫機能を抑制する薬剤である。免疫抑制剤は、限定はされないが、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン－２受容体α－鎖遮断薬、イノシン一リン酸デヒドロゲナーゼの阻害剤、ジヒドロ葉酸レダクターゼの阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤であり得る。本発明は、操作細胞内の免疫抑制剤の標的を不活性化することによって、養子細胞療法のために操作細胞に免疫抑制抵抗性を与えることを可能にする。非限定的な例として、免疫抑制剤の標的は、ＣＤ５２、グルココルチコイド受容体（ＧＲ）、ＦＫＢＰファミリー遺伝子メンバー及びシクロフィリンファミリー遺伝子メンバーなどの免疫抑制剤に対する受容体であり得る。

【０５４４】

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

【０５４５】

さらなる免疫チェックポイントは、Ｓｒｃ相同性２ドメイン含有タンパク質チロシンホスファターゼ１（ＳＨＰ－１）（Ｗａｔｓｏｎ ＨＡ，ｅｔ ａｌ．，ＳＨＰ－１：ｔｈｅ ｎｅｘｔ ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ ｔａｒｇｅｔ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ？ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｏｃ Ｔｒａｎｓ．２０１６ Ａｐｒ １５；４４（２）：３５６－６２）を含む。ＳＨＰ－１は、広く発現される阻害性タンパク質チロシンホスファターゼ（ＰＴＰ）である。Ｔ細胞において、それは、抗原依存性活性化及び増殖の負の調節因子である。それは、細胞質タンパク質であり、したがって、抗体媒介性治療法に適していないが、活性化及び増殖におけるその役割により、キメラ抗原受容

体（ＣＡＲ）Ｔ細胞などの養子移入手法における遺伝子操作の魅力的な標的になっている。免疫チェックポイントは、Ｉｇ及びＩＴＩＭドメイン（ＴＩＧＩＴ／Ｖｓｔｍ３／ＷＵＣＡＭ／ＶＳＩＧ９）及びＶＩＳＴＡを有するＴ細胞免疫受容体も含み得る（Ｌｅ Ｍｅｒｃｉｅｒ Ｉ，ｅｔ ａｌ．，（２０１５）Ｂｅｙｏｎｄ ＣＴＬＡ－４及びＰＤ－１、ｔｈｅ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ Ｚ ｏｆ ｎｅｇａｔｉｖｅ ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ．Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：４１８）。

【０５４６】

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

【０５４７】

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

【０５４８】

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

【０５４９】

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

【０５５０】

ある実施形態において、本方法は、本明細書における他の箇所に記載される好適な遺伝子組み換え方法によってエクスビボで操作細胞を編集して（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａ

ｓ　ｓｙｓｔｅｍによる遺伝子編集）、潜在的なアロ反応性ＴＣＲ又は他の受容体を除去して、同種異系の養子移入を可能にすることを含む。ある実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム又は他の好適なゲノム修飾技術によってエクスビボで編集されて、ＴＣＲ（例えば、αβ　ＴＣＲ）又は他の関連受容体をコードする内因性遺伝子をノックアウト又はノックダウンして、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を防ぐ。ある実施形態において、操作細胞がＴ細胞である場合、操作細胞は、ＣＲＩＳＰＲ又は他の適切な遺伝子組み換え方法によってエクスビボで編集されて、ＴＲＡＣ遺伝子座を変異させる。ある実施形態において、Ｔ細胞は、ＴＲＡＣの第１のエクソンを標的とする１つ以上のガイド配列を用いて、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムによってエクスビボで編集される。Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２７：１５４－１５７（２０１７）を参照されたい。ある実施形態において、ＴＲＡＣの第１のエクソンは、別の適切な遺伝子組み換え方法を用いて修飾される。ある実施形態において、本方法は、ＣＲＩＳＰＲ又は他の適切な方法を使用して、ＣＡＲ又はＴＣＲをコードする外因性遺伝子をＴＲＡＣ遺伝子座にノックインすると同時に、内因性ＴＣＲをノックアウトすることを含む（例えば、ＣＡＲ　ｃＤＮＡの後の自己切断Ｐ２Ａペプチドをコードするドナー配列を有する）。Ｅｙｑｕｅｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　５４３：１１３－１１７（２０１７）を参照されたい。ある実施形態において、外因性遺伝子は、内因性ＴＣＲプロモーターの下流に動作可能に挿入されるプロモーターレスＣＡＲコード又はＴＣＲコード配列を含む。

【０５５１】

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

【０５５２】

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

ト又はノックダウンする。これはまた、当業者によって理解される別の適切な修飾方法を用いて達成され得る。ある実施形態において、操作Ｔ細胞などの操作細胞は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムによってエクスビボで編集されて、Ｂ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）、膜貫通活性化因子及びＣＡＭＬ相互作用物質（ＴＡＣＩ）、又はＢ細胞活性化因子受容体（ＢＡＦＦ－Ｒ）、ＣＤ３８、ＣＤ１３８、ＣＳ－１、ＣＤ３３、ＣＤ２６、ＣＤ３０、ＣＤ５３、ＣＤ９２、ＣＤ１００、ＣＤ１４８、ＣＤ１５０、ＣＤ２００、ＣＤ２６１、ＣＤ２６２、若しくはＣＤ３６２（例えば、国際公開第２０１７／０１１８０４号パンフレットを参照）から選択される抗原の発現をノックアウト又はノックダウンする。これはまた、当業者によって理解される別の適切な修飾方法を用いて達成され得る。

【０５５３】

遺伝子ドライブ

本発明はまた、１つ以上のカーゴポリヌクレオチドの送達又は遺伝子ドライブを生成することが可能な１つ以上のカーゴポリヌクレオチドを有する、本明細書における他の箇所に記載される筋特異的標的化部分（限定はされないが、操作ＡＡＶカプシド粒子を含む）を含有する組成物の生成によって、遺伝子ドライブを生成するための、本明細書における他の箇所に記載される筋特異的標的化部分、その製剤、その細胞、ベクター系などを含有する組成物の使用を想定している。ある実施形態において、遺伝子ドライブは、例えば特許国際公開第２０１５／１０５９２８号パンフレットに記載される遺伝子ドライブと類似のシステムにおいて、ＲＮＡガイド遺伝子ドライブを提供するために、Ｃａｓ媒介性ＲＮＡガイド遺伝子ドライブ、例えば、Ｃａｓ－であり得る。この種のシステムは、例えば、生殖細胞系列細胞中に、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ及び１つ以上のガイドＲＮＡをコードする核酸配列を導入することによって、真核生物生殖細胞系列細胞を改変するための方法を提供し得る。ガイドＲＮＡは、生殖細胞系列細胞のゲノムＤＮＡにおける１つ以上の標的位置に相補的であるように設計され得る。ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードする核酸配列及びガイドＲＮＡをコードする核酸配列が、隣接配列の間の構築物上に提供され得、プロモーターは、同様に隣接配列の間に位置する任意の所望のカーゴコード配列と一緒に、生殖細胞系列細胞がＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡを発現し得るように、配置される。隣接配列は、典型的に、選択された標的染色体上の対応する配列と同一の配列を典型的に含み、それによって、隣接配列は、構築物によってコードされる構成要素とともに機能して、相同的組み換えなどの機構によって標的切断部位におけるゲノムＤＮＡへの外来核酸構築物配列の挿入を容易にして、生殖細胞系列細胞を、外来核酸配列に対してホモ接合性にする。このように、遺伝子ドライブシステムは、育種集団を通して所望のカーゴ遺伝子を遺伝子移入することを可能にする（例えば、Ｇａｎｔｚ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｈｉｇｈｌｙ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｃａｓ９－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｇｅｎｅ ｄｒｉｖｅ ｆｏｒ ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｍａｌａｒｉａ ｖｅｃｔｏｒ ｍｏｓｑｕｉｔｏ Ａｎｏｐｈｅｌｅｓ ｓｔｅｐｈｅｎｓｉ，ＰＮＡＳ ２０１５，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ａｈｅａｄ ｏｆ ｐｒｉｎｔ Ｎｏｖｅｍｂｅｒ ２３，２０１５，ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．１５２１０７７１１２；Ｅｓｖｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ｃｏｎｃｅｒｎｉｎｇ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｇｅｎｅ ｄｒｉｖｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ａｌｔｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｗｉｌｄ ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎｓ ｅＬｉｆｅ ２０１４；３：ｅ０３４０１）。選択された実施形態において、標的配列は、ゲノムにおける潜在的なオフターゲット部位をほとんど有さないように選択され得る。複数のガイドＲＮＡを用いて標的遺伝子座内の複数の部位を標的とすることは、ドライブ抵抗性対立遺伝子の切断頻度を増加させ、その発生を妨げ得る。切断型ガイドＲＮＡは、オフターゲット切断を減少させ得る。対形成されたニッカーゼが、単一のヌクレアーゼの代わりに使用されて、特異性をさらに増加させ得る。遺伝子ドライブ構築物（遺伝子ドライブ操作送達システム構築物など）は、転写調節因子をコードするカーゴ配列を含み、例えば相同的組み換え遺伝子を活性化し、及び／又は非相同の末端接合を抑制し得る。標的部位は、必須遺伝子内で選択され得、それによって、非相同の末端接合事象が、ドライブ抵抗性対立遺伝子を生成せずに

致死性を生じさせ得る。遺伝子ドライブ構築物は、ある範囲の温度で、ある範囲の宿主において機能するように操作され得る（Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．２０１３，Ｒａｐｉｄ ａｎｄ Ｔｕｎａｂｌｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔａｂｉｌｉｔｙ ｉｎ Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ ｅｌｅｇａｎｓ Ｕｓｉｎｇ ａ Ｓｍａｌｌ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ，ＰＬｏＳ ＯＮＥ ８（８）：ｅ７２３９３．ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．００７２３９３）。

【０５５４】

移植及び異種移植

本明細書における他の箇所に記載される筋特異的標的化部分、その製剤、その細胞、ベクター系などを含有する組成物は、２人の異なる人の間（移植）又は種の間（異種移植）での移植のために、カーゴポリヌクレオチドを送達し、及び／又は他の形で組織の修飾に関与するように使用され得る。トランスジェニック動物の生成のためのこのような技術が、本明細書における他の箇所に記載される。種間の移植技術は、当該技術分野において一般に公知である。例えば、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼは、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチド、ベクター、操作細胞、及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子を用いて送達され得、例えば、ヒト免疫系、すなわち異種抗原遺伝子によって認識されるエピトープをコードする遺伝子の発現を妨げることによって、移植（例えばエクスビボで（例えば収集後であるが、移植前）又はインビボ（ドナー又はレシピエント中））、動物、例えば、トランスジェニックブタ（ヒトヘムオキシゲナーゼ－１トランスジェニックブタ株など）のための器官において選択された遺伝子をノックアウト、ノックダウン又は阻害するために使用され得る。阻害のための候補のブタ遺伝子は、例えばα（ｌ，３）－ガラクトシルトランスフェラーゼ及びシチジン一リン酸塩－Ｎ－アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ遺伝子（ＰＣＴ特許公開国際公開第２０１４／０６６５０５号パンフレットを参照）を含み得る。さらに、内因性レトロウイルスをコードする遺伝子、例えば全てのブタ内因性レトロウイルスコードする遺伝子が、阻害され得る（Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｒｃｉｎｅ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ（ＰＥＲＶｓ），Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７ Ｎｏｖｅｍｂｅｒ ２０１５：Ｖｏｌ．３５０ ｎｏ．６２６４ ｐｐ．１１０１－１１０４を参照）。さらに、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼが、ヒトＣＤ５５遺伝子などの異種移植ドナー動物におけるさらなる遺伝子の統合のための部位を標的とするために使用され、超急性拒絶に対する保護を改善し得る。

【０５５５】

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

【０５５６】

ある実施形態において、ドナー（収集前など）又はレシピエント（移植後）は、移植された細胞、組織、及び／又は器官の免疫原性プロファイルを改変することが可能な、本明細書に記載される、本明細書における他の箇所に記載される筋特異的標的化部分、その製剤、その細胞、ベクター系、操作ＡＡＶカプシドシステム分子、ベクター、操作細胞、及び／又は操作送達粒子を含有する組成物の１つ以上を投与され得る。ある実施形態において、移植された細胞、組織、及び／又は器官は、ドナーから収集され得、収集される細胞

、組織、及び／又は器官を、例えば、低免疫原性になるか、又はレシピエントに移植されるときにいくつかの特定の特性を有するように修飾されるように改変することが可能な、本明細書に記載される、本明細書における他の箇所に記載される筋特異的標的化部分、その製剤、その細胞、ベクター系、操作ＡＡＶカプシドシステム分子、ベクター、操作細胞、及び／又は操作送達粒子を含有する組成物は、収集される細胞、組織、及び／又は器官にエクスビボで送達され得る。送達の後、細胞、組織、及び／又は器官は、ドナーに移植され得る。

遺伝子組み換え及び遺伝性又は後成的態様による疾患の処置

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

【０５５７】

疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチド及び疾患特異的な情報の例が、ワールド・ワイド・ウェブで利用可能なＭｃＫｕｓｉｃｋ－Ｎａｔｈａｎｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．）及びＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．）から入手可能である。これらのいずれかが、本明細書に記載される方法の１つ以上によって処置されるのに適切であり得る。ある実施形態において、疾患は、筋疾患若しくは障害、神経筋疾患若しくは障害、又は心筋症である。ある実施形態において、疾患又は障害は、以下のもの：

（ａ）自己免疫疾患；
（ｂ）癌；
（ｃ）筋ジストロフィー；
（ｄ）神経筋疾患；
（ｅ）糖若しくはグリコーゲン蓄積症；
（ｆ）リピート伸長病；
（ｇ）ドミナントネガティブ疾患；
（ｈ）心筋症；
（ｉ）ウイルス性疾患；
（ｊ）早老性疾患；又は
（ｋ）それらの任意の組合せ

のいずれか１つ以上から選択される。

【０５５８】

ある実施形態において、リピート伸長病は、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、又は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）である。ある実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢

帯筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、又はＦＳＨＤである。ある実施形態において、筋強直性ジストロフィーは、１型又は２型である。ある実施形態において、心筋症は、拡張型心筋症、肥大型心筋症、ＤＭＤ関連心筋症、又はダノン病である。ある実施形態において、糖若しくはグリコーゲン蓄積症は、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患又はポンペ病である。ある実施形態において、ＭＰＳ型ＩＩＩ疾患は、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ型、ＩＩＩＢ型、ＩＩＩＣ型、又はＩＩＩＤ型である。ある実施形態において、神経筋疾患は、シャルコー・マリー・トゥース病又はフリードライヒ運動失調症である。

【０５５９】

より具体的には、これらの遺伝子及び経路における変異は、機能に影響を与える不適切なタンパク質又は不適切な量のタンパク質の産生をもたらし得る。遺伝子、疾患及びタンパク質のさらなる例は、２０１２年１２月１２日に出願された米国仮特許出願第６１／７３６，５２７号明細書から参照により本明細書に援用される。このような遺伝子、タンパク質及び経路は、本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチド又は遺伝子組み換えの他の方法であり得る。疾患関連及び／又は細胞機能関連遺伝子及びポリヌクレオチドの例は、表２及び３に列挙される。さらなる例は、本明細書における他の箇所に記載されている。

【表２】

表 2. 例示的な遺伝子疾患及び他の疾患並びに関連遺伝子

| 疾患名 | 罹患した原発組織又は系 | 罹患したさらなる組織/系 | 遺伝子 |
|---|---|---|---|
| 軟骨形成不全症 | 骨及び筋肉 | | 線維芽細胞増殖因子受容体3(FGFR3) |
| 色覚異常 | 眼 | | CNGA3、CNGB3、GNAT2、PDE6C、PDE6H、ACHM2、ACHM3、 |
| 急性腎傷害 | 腎臓 | | NFκB、AATF、p85α、FAS、アポトーシスカスケード要素(例えばFASR、カスパーゼ 2、3、4、6、7、8、9、10、AKT、TNF α、IGF1、IGF1R、RIPK1)、p53 |
| 加齢黄斑変性症 | 眼 | | Abcr; CCL2; CC2; CP(セルロプラスミン); Timp3; カテプシン D; VLDLR、CCR2 |
| AIDS | 免役系 | | KIR3DL1、NKAT3、NKB1、AMB11、KIR3DS1、IFNG、CXCL12、SDF1 |
| 白皮症(眼皮膚白皮症(1～7型)及び眼白子症を含む) | 皮膚、毛髪、眼、 | | TYR、OCA2、TYRP1、及びSLC45A2、SLC24A5及びC10orf11 |
| アルカプトン尿症 | アミノ酸の代謝 | ホモゲンチジン酸が蓄積する組織/器官、特に軟骨(関節)、心臓弁、腎臓 | HGD |
| α-1 抗トリプシン欠乏症(AATD又はA1AD) | 肺 | 肝臓、皮膚、血管系、腎臓、GI | SERPINA1、国際公開第2017165862号パンフレットに記載されるもの、PiZアレル |
| ALS | CNS | | SOD1; ALS2; ALS3; ALS5; ALS7; STEX; FUS; TARDBP; VEGF(VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c); DPP6; NEFH、PTGS1、SLC1A2、TNFRSF10B、PRPH、HSP90AA1、CRIA2、IFNG、AMPA2 S100B、FGF2、AOX1、CS、TXN、RAPHJ1、MAP3K5、NBEAL1、GPX1、ICA1L、RAC1、MAPT、ITPR2、ALS2CR4、GLS、ALS2CR8、CNTFR、ALS2CR11、FOLH1、FAM117B、P4HB、CNTF、SQSTM1、STRADB、NAIP、NLR、YWHAQ、SLC33A1、TRAK2、SCA1、NIF3L1、NIF3、PARD3B、COX8A、CDK15、HECW1、HECT、C2、WW 15、NOS1、MET、SOD2、HSPB1、NEFL、CTSB、ANG、HSPA8、RNase A、VAPB、VAMP、SNCA、α HGF、CAT、ACTB、NEFM、TH、BCL2、FAS、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | CASP3、CLU、SMN1、G6PD、BAX、HSF1、RNF19A、JUN、ALS2CR12、HSPA5、MAPK14、APEX1、TXNRD1、NOS2、TIMP1、CASP9、XIAP、GLG1、EPO、VEGFA、ELN、GDNF、NFE2L2、SLC6A3、HSPA4、APOE、PSMB8、DCTN2、TIMP3、KIFAP3、SLC1A1、SMN2、CCNC、STUB1、ALS2、PRDX6、SYP、CABIN1、CASP1、GART、CDK5、ATXN3、RTN4、C1QB、VEGFC、HTT、PARK7、XDH、GFAP、MAP2、CYCS、FCGR3B、CCS、UBL5、MMP9m SLC18A3、TRPM7、HSPB2、AKT1、DEERL1、CCL2、NGRN、GSR、TPPP3、APAF1、BTBD10、GLUD1、CXCR4、S:C1A3、FLT1、PON1、AR、LIF、ERBB3、:GA:S1、CD44、TP53、TLR3、GRIA1、GAPDH、AMPA、GRIK1、DES、CHAT、FLT4、CHMP2B、BAG1、CHRNA4、GSS、BAK1、KDR、GSTP1、OGG1、IL6 |
| アルツハイマー病 | 脳 | | E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM; CLU; PS1; SORL1; CR1; VLDLR; UBA1; UBA3; CHIP28; AQP1; UCHL1; UCHL3; APP、AAA、CVAP、AD1、APOE、AD2、DCP1、ACE1、MPO、PACIP1、PAXIP1L、PTIP、A2M、BLMH、BMH、PSEN1、AD3、ALAS2、ABCA1、BIN1、BDNF、BTNL8、C10RF49、CDH4、CHRNB2、CKLFSF2、CLEC4E、CR1L、CSF3R、CST3、CYP2C、DAPK1、ESR1、FCAR、FCGR3B、FFA2、FGA、GAB2、GALP、GAPDHS、GMPB、HP、HTR7、IDE、IF127、IFI6、IFIT2、IL1RN、IL-1RA、IL8RA、IL8RB、JAG1、KCNJ15、LRP6、MAPT、MARK4、MPHOSPH1、MTHFR、NBN、NCSTN、NIACR2、NMNAT3、NTM、ORM1、P2RY13、PBEF1、PCK1、PICALM、PLAU、PLXNC1、PRNP、PSEN1、PSEN2、PTPRA、RALGPS2、RGSL2、SELENBP1、SLC25A37、SORL1、ミトフェリン-1、TF、TFAM、TNF、TNFRSF10C、UBE1C |
| アミロイドーシス | | | APOA1、APP、AAA、CVAP、AD1、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | GSN、FGA、LYZ、TTR、PALB |
| アミロイドニューロパシー | | | TTR、PALB |
| 貧血 | 血液 | | CDAN1 、 CDA1 、 RPS19 、 DBA 、 PKLR 、 PK1 、 NT5C3 、 UMPH1 、 PSN1 、 RHAG 、 RH50A 、 NRAMP2 、 SPTB 、 ALAS2 、 ANH1 、 ASB 、 ABCB7、ABC7、ASAT |
| アンジェルマン症候群 | 神経系、脳 | | UBE3A |
| 注意欠陥多動性障害(ADHD) | 脳 | | PTCHD1 |
| 自己免疫性リンパ増殖症候群 | 免役系 | | TNFRSF6 、 APT1 、 FAS 、 CD95 、 ALPS1A |
| 自閉症、アスペルガー及び広汎性発達障害(PDD)と呼ばれる一般的な診断カテゴリーを含む自閉症スペクトラム障害(ASD) | 脳 | | PTCHD1; Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; ニューレキシン 1; GLO1、RTT、PPMX、MRX16、RX79、NLGN3 、 NLGN4 、 KIAA1260 、 AUTSX2 、 FMR1 、 FMR2; FXR1; FXR2; MGLUR5、ATP10C、CDH10、GRM6 、 MGLUR6 、 CDH9 、 CNTN4 、 NLGN2 、 CNTNAP2 、 SEMA5A 、 DHCR7、NLGN4X、NLGN4Y、DPP6、NLGN5 、 EN2 、 NRCAM 、 MDGA2 、 NRXN1 、 FMR2 、 AFF2 、 FOXP2 、 OR4M2、OXTR、FXR1、FXR2、PAH、GABRA1、PTEN、GABRA5、PTPRZ1、GABRB3 、 GABRG1 、 HTRTP3 、 SEZ6L2 、 HOXA1 、 SHANK3 、 IL6 、 SHBZRAP1 、 LAMB1 、 SLC6A4 、 SERT 、 MAPK3 、 TAS2R1 、 MAZ 、 TSC1 、 MDGA2 、 TSC2 、 MECP2 、 UBE3A、WNT2、20110023145 号も参照 |
| 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)-(フォン・ヒッペル・リンドウ病及び結節性硬化症などの疾患を含む) | 腎臓 | 肝臓 | PKD1、PKD2 |
| 常染色体劣性多発性嚢胞腎(ARPKD) | 腎臓 | 肝臓 | PKDH1 |
| 運動失調-毛細血管拡張症(別名ルイ・バー症候群) | 神経系、免役系 | 様々 | ATM |
| B細胞非ホジキンリンパ腫 | | | BCL7A、BCL7 |
| バルデー・ビードル症候群 | 眼 、 筋骨格系、腎臓、生殖器 | 肝臓、耳、胃腸系、脳 | ARL6、BBS1、BBS2、BBS4、BBS5、BBS7 、 BBS9 、 BBS10 、 BBS12 、 CEP290、INPP5E、LZTFL1、MKKS、MKS1、SDCCAG8、TRIM32、TTC8 |
| 裸リンパ球症候群 | 血液 | | TAPBP 、 TPSN 、 TAP2 、 ABCB3 、 PSF2 、 RING11 、 MHC2TA 、 C2TA 、 RFX5、RFXAP、RFX5 |
| バーター症候群(I、II、III、IVA及びB、及びV型) | 腎臓 | | SLC12A1(I 型)、KCNJ1(II 型)、CLCNKB(III 型)、BSND(IV A 型)、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | 又は CLCNKA CLCNKB 遺伝子の両方(IV B 型)、CASR(V 型)。 |
| ベッカー型筋ジストロフィー | 筋肉 | | DMD、BMD、MYF6 |
| ベスト病(卵黄様黄斑ジストロフィー2 型) | 眼 | | VMD2 |
| 出血障害 | 血液 | | TBXA2R、P2RX1、P2X1 |
| 青色錐体一色型色覚異常 | 眼 | | OPN1LW、OPN1MW、及び LCR |
| 乳癌 | 乳房組織 | | BRCA1、BRCA2、COX-2 |
| ブルトン病(別名 X 連鎖無ガンマグロブリン血症) | 免役系、特に B 細胞 | | BTK |
| 癌(例えば、リンパ腫、慢性リンパ球性白血病(CLL)、B 細胞急性リンパ球性白血病(B-ALL)、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、非ホジキンリンパ腫(NHL)、びまん性大細胞型リンパ腫(DLCL)、多発性骨髄腫、腎細胞癌(RCC)、神経芽細胞腫、大腸癌、乳癌、卵巣癌、黒色腫、肉腫、前立腺癌、肺癌、食道癌、肝細胞癌、膵臓癌、星状細胞腫、中皮腫、頭頸部癌、及び髄芽腫 | 様々 | | FAS、BID、CTLA4、PDCD1、CBLB、PTPN6、TRAC、TRBC、国際公開第 2015048577 号パンフレットに記載されるもの |
| 心血管疾患 | 心臓 | 血管系 | IL1B、XDH、TP53、PTGS、MB、IL4、ANGPT1、ABCG8、CTSK、PTGIR、KCNJ11、INS、CRP、PDGFRB、CCNA2、PDGFB、KCNJ5、KCNN3、CAPN10、ADRA2B、ABCG5、PRDX2、CPAN5、PARP14、MEX3C、ACE、RNF、IL6、TNF、STN、SERPINE1、ALB、ADIPOQ、APOB、APOE、LEP、MTHFR、APOA1、EDN1、NPPB、NOS3、PPARG、PLAT、PTGS2、CETP、AGTR1、HMGCR、IGF1、SELE、REN、PPARA、PON1、KNG1、CCL2、LPL、VWF、F2、ICAM1、TGFB、NPPA、IL10、EPO、SOD1、VCAM1、IFNG、LPA、MPO、ESR1、MAPK、HP、F3、CST3、COG2、MMP9、SERPINC1、F8、HMOX1、APOC3、IL8、PROL1、CBS、NOS2、TLR4、SELP、ABCA1、AGT、LDLR、GPT、VEGFA、NR3C2、IL18、NOS1、NR3C1、FGB、HGF、IL1A、AKT1、LIPC、HSPD1、MAPK14、SPP1、ITGB3、CAT、UTS2、THBD、F10、CP、TNFRSF11B、EGFR、MMP2、PLG、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | NPY、RHOD、MAPK8、MYC、FN1、CMA1、PLAU、GNB3、ADRB2、SOD2、F5、VDR、ALOX5、HLA-DRB1、PARP1、CD40LG、PON2、AGER、IRS1、PTGS1、ECE1、F7、IRMN、EPHX2、IGFBP1、MAPK10、FAS、ABCB1、JUN、IGFBP3、CD14、PDE5A、AGTR2、CD40、LCAT、CCR5、MMP1、TIMP1、ADM、DYT10、STAT3、MMP3、ELN、USF1、CFH、HSPA4、MMP12、MME、F2R、SELL、CTSB、ANXA5、ADRB1、CYBA、FGA、GGT1、LIPG、HIF1A、CXCR4、PROC、SCARB1、CD79A、PLTP、ADD1、FGG、SAA1、KCNH2、DPP4、NPR1、VTN、KIAA0101、FOS、TLR2、PPIG、IL1R1、AR、CYP1A1、SERPINA1、MTR、RBP4、APOA4、CDKN2A、FGF2、EDNRB、ITGA2、VLA-2、CABIN1、SHBG、HMGB1、HSP90B2P、CYP3A4、GJA1、CAV1、ESR2、LTA、GDF15、BDNF、CYP2D6、NGF、SP1、TGIF1、SRC、EGF、PIK3CG、HLA-A、KCNQ1、CNR1、FBN1、CHKA、BEST1、CTNNB1、IL2、CD36、PRKAB1、TPO、ALDH7A1、CX3CR1、TH、F9、CH1、TF、HFE、IL17A、PTEN、GSTM1、DMD、GATA4、F13A1、TTR、FABP4、PON3、APOC1、INSR、TNFRSF1B、HTR2A、CSF3、CYP2C9、TXN、CYP11B2、PTH、CSF2、KDR、PLA2G2A、THBS1、GCG、RHOA、ALDH2、TCF7L2、NFE2L2、NOTCH1、UGT1A1、IFNA1、PPARD、SIRT1、GNHR1、PAPPA、ARR3、NPPC、AHSP、PTK2、IL13、MTOR、ITGB2、GSTT1、IL6ST、CPB2、CYP1A2、HNF4A、SLC64A、PLA2G6、TNFSF11、SLC8A1、F2RL1、AKR1A1、ALDH9A1、BGLAP、MTTP、MTRR、SULT1A3、RAGE、C4B、P2RY12、RNLS、CREB1、POMC、RAC1、LMNA、CD59、SCM5A、CYP1B1、MIF、MMP13、TIMP2、CYP19A1、CUP21A2、PTPN22、MYH14、MBL2、SELPLG、AOC3、CTSL1、PCNA、IGF2、ITGB1、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | CAST、CXCL12、IGHE、KCNE1、TFRC、COL1A1、COL1A2、IL2RB、PLA2G10、ANGPT2、PROCR、NOX4、HAMP、PTPN11、SLCA1、IL2RA、CCL5、IRF1、CF:AR、CA:CA、EIF4E、GSTP1、JAK2、CYP3A5、HSPG2、CCL3、MYD88、VIP、SOAT1、ADRBK1、NR4A2、MMP8、NPR2、GCH1、EPRS、PPARGC1A、F12、PECAM1、CCL4、CERPINA34、CASR、FABP2、TTF2、PROS1、CTF1、SGCB、YME1L1、CAMP、ZC3H12A、AKR1B1、MMP7、AHR、CSF1、HDAC9、CTGF、KCNMA1、UGT1A、PRKCA、COMT、S100B、EGR1、PRL、IL15、DRD4、CAMK2G、SLC22A2、CCL11、PGF、THPO、GP6、TACR1、NTS、HNF1A、SST、KCDN1、LOC646627、TBXAS1、CUP2J2、TBXA2R、ADH1C、ALOX12、AHSG、BHMT、GJA4、SLC25A4、ACLY、ALOX5AP、NUMA1、CYP27B1、CYSLTR2、SOD3、LTC4S、UCN、GHRL、APOC2、CLEC4A、KBTBD10、TNC、TYMS、SHC1、LRP1、SOCS3、ADH1B、KLK3、HSD11B1、VKORC1、SERPINB2、TNS1、RNF19A、EPOR、ITGAM、PITX2、MAPK7、FCGR3A、LEEPR、ENG、GPX1、GOT2、HRH1、NR112、CRH、HTR1A、VDAC1、HPSE、SFTPD、TAP2、RMF123、PTK2Bm NTRK2、IL6R、ACHE、GLP1R、GHR、GSR、NQO1、NR5A1、GJB2、SLC9A1、MAOA、PCSK9、FCGR2A、SERPINF1、EDN3、UCP2、TFAP2A、C4BPA、SERPINF2、TYMP、ALPP、CXCR2、SLC3A3、ABCG2、ADA、JAK3、HSPA1A、FASN、FGF1、F11、ATP7A、CR1、GFPA、ROCK1、MECP2、MYLK、BCHE、LIPE、ADORA1、WRN、CXCR3、CD81、SMAD7、LAMC2、MAP3K5、CHGA、IAPP、RHO、ENPP1、PTHLH、NRG1、VEGFC、ENPEP、CEBPB、NAGLU,. F2RL3、CX3CL1、BDKRB1、ADAMTS13、ELANE、ENPP2、CISH、GAST、MYOC、ATP1A2、NF1、GJB1、MEF2A、VCL、BMPR2、TUBB、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | CDC42、KRT18、HSF1、MYB、PRKAA2、ROCK2、TFP1、PRKG1、BMP2、CTNND1、CTH、CTSS、VAV2、NPY2R、IGFBP2、CD28、GSTA1、PPIA、APOH、S100A8、IL11、ALOX15、FBLN1、NR1H3、SCD、GIP、CHGB、PRKCB、SRD5A1,HSD11B2、CALCRL、GALNT2、ANGPTL4、KCNN4、PIK3C2A、HBEGF、CYP7A1、HLA-DRB5、BNIP3、GCKR、S100A12、PADI4、HSPA14、CXCR1、H19、KRTAP19-3、IDDM2、RAC2、YRY1、CLOCK、NGFR、DBH、CHRNA4、CACNA1C、PRKAG2、CHAT、PTGDS、NR1H2、TEK、VEGFB、MEF2C、MAPKAPK2、TNFRSF11A、HSPA9、CYSLTR1、MAT1A、OPRL1、IMPA1、CLCN2、DLD、PSMA6、PSMB8、CHI3L1、ALDH1B1、PARP2,STAR、LBP、ABCC6、RGS2、EFNB2、GJB6、APOA2、AMPD1、DYSF、FDFT1,EMD2、CCR6、GJB3、IL1RL1、ENTPD1、BBS4、CELSR2、F11R、RAPGEF3、HYAL1、ZNF259、ATOX1、ATF6、KHK、SAT1、GGH、TIMP4、SLC4A4、PDE2A、PDE3B、FADS1、FADS2、TMSB4X、TXNIP、LIMS1、RHOB、LY96、FOXO1、PNPLA2,TRH、GJC1、S:C17A5、FTO、GJD2、PRSC1、CASP12、GPBAR1、PXK、IL33、TRIB1、PBX4、NUPR1、15-SEP、CILP2、TERC、GGT2、MTCO1、UOX、AVP、ANGPLT3 |
| 白内障 | 眼 | | CRYAA、CRYA1、CRYBB2、CRYB2、PITX3、BFSP2、CP49、CP47、CRYAA、CRYA1、PAX6、AN2、MGDA、CRYBA1、CRYB1、CRYGC、CRYG3、CCL、LIM2、MP19、CRYGD、CRYG4、BFSP2、CP49、CP47、HSF4、CTM、HSF4、CTM、MIP、AQP0、CRYAB、CRYA2、CTPP2、CRYBB1、CRYGD、CRYG4、CRYBB2、CRYB2、CRYGC、CRYG3、CCL、CRYAA、CRYA1、GJA8、CX50、CAE1、GJA3、CX46、CZP3、CAE3、CCM1、CAM、KRIT1 |
| CDKL-5欠損症又は媒介疾患 | 脳、CNS | | CDKL5 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| シャルコー・マリー・トゥース(CMT)病(1、2、3、4型) | 神経系 | 筋肉(ジストロフィー) | PMP22(CMT1A及びE)、MPZ(CMT1B)、LITAF(CMT1C)、EGR2(CMT1D)、NEFL(CMT1F)、GJB1(CMT1X)、MFN2(CMT2A)、KIF1B(CMT2A2B)、RAB7A(CMT2B)、TRPV4(CMT2C)、GARS(CMT2D)、NEFL(CMT2E)、GAPD1(CMT2K)、HSPB8(CMT2L)、DYNC1H1、CMT20)、LRSAM1(CMT2P)、IGHMBP2(CMT2S)、MORC2(CMT2Z)、GDAP1(CMT4A)、MTMR2又はSBF2/MTMR13(CMT4B)、SH3TC2(CMT4C)、NDRG1(CMT4D)、PRX(CMT4F)、FIG4(CMT4J)、NT-3 |
| チェディアック・東症候群 | 免役系 | 皮膚、毛髪、眼、ニューロン | LYST |
| 先天性脈絡膜欠如 | | | CHM、REP1、 |
| 網脈絡膜萎縮症 | 眼 | | PRDM13、RGR、TEAD1 |
| 慢性肉芽腫症 | 免役系 | | CYBA、CYBB、NCF1、NCF2、NCF4 |
| 慢性粘膜皮膚カンジダ症 | 免役系 | | AIRE、CARD9、CLEC7A IL12B、IL12B1、IL1F、IL17RA、IL17RC、RORC、STAT1、STAT3、TRAF31P2 |
| 肝硬変 | 肝臓 | | KRT18、KRT8、CIRH1A、NAIC、TEX292、KIAA1988 |
| 結腸癌(家族性腺腫性ポリポーシス(FAP)及び遺伝性非ポリポーシス結腸癌(HNPCC)) | 胃腸 | | FAP: APC HNPCC: MSH2、MLH1、PMS2、SH6、PMS1 |
| 複合免疫不全 | 免役系 | | IL2RG、SCIDX1、SCIDX、IMD4);HIV-1(CCL5、SCYA5、D17S136E、TCP228 |
| 錐体杆体ジストロフィー | 眼 | | AIPL1、CRX、GUA1A、GUCY2D、PITPM3、PROM1、PRPH2、RIMS1、SEMA4A、ABCA4、ADAM9、ATF6、C21ORF2、C8ORF37、CACNA2D4、CDHR1、CERKL、CNGA3、CNGB3、CNNM4、CNAT2、IFT81、KCNV2、PDE6C、PDE6H、POC1B、RAX2、RDH5、RPGR1P1、TTLL5、RetCG1、GUCY2E |
| 先天性停止性夜盲症 | 眼 | | CABP4、CACNA1F、CACNA2D4、GNAT1、CPR179、GRK1、GRM6、LRIT3、NYX、PDE6B、RDH5、RHO、RLBP1、RPE65、SAG、SLC24A1、TRPM1、 |
| 先天性フルクトース不耐症 | 代謝 | | ALDOB |
| コリ病(グリコーゲン蓄積症III型) | 様々-グリコーゲンが蓄積する場所、特 | | AGL |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | に肝臓、心臓、骨格筋 | | |
| 角膜混濁及びジストロフィー | 眼 | | APOA1、TGFBI、CSD2、CDGG1、CSD、BIGH3、CDG2、TACSTD2、TROP2、M1S1、VSX1、RINX、PPCD、PPD、KTCN、COL8A2、FECD、PPCD2、PIP5K3、CFD |
| フルクトース不耐扁平角膜 | | | KERA、CNA2 |
| クリ・デュ・チャット症候群、別名 5p 症候群及び猫鳴き症候群 | | | バンド 5p15.2 のみから 5 番染色体の短腕全体を含む欠失、例えば CTNND2、TERT、 |
| 嚢胞性線維症(CF) | 肺及び呼吸器系 | 膵臓、肝臓、消化器系、生殖器系、外分泌、腺、 | CTFR、ABCC7、CF、MRP7、SCNN1A、国際公開第 2015157070 号パンフレットに記載されるもの |
| 糖尿病性腎症 | 腎臓 | | グレムリン、12/15- リポキシゲナーゼ、TIM44、 |
| デント病(1 及び 2 型) | 腎臓 | | 1 型: CLCN5、2 型: ORCL |
| 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)(別名ハウリバー及び内藤・小柳病) | CNS、脳、筋肉 | | アトロフィン-1 及び Atn1 |
| ダウン症候群 | 様々 | | 21 番染色体トリソミー |
| 薬物中毒 | 脳 | | Prkce; Drd2; Drd4; ABAT; GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 |
| デュアン症候群(1、2、及び 3 型、サブグループ A、B 及び C を含む)。この病態の他の名称としては、デュアン眼球後退症候群(又は DR 症候群)、眼球後退症候群、退縮症候群、先天性退縮症候群及びスティルリング・タ-ク・デュアン症候群が挙げられる | 眼 | | CHN1、4 及び 8 番染色体上のインデル |
| デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD) | 筋肉 | 心血管、呼吸器 | DMD、BMD、ジストロフィン遺伝子、DMD 遺伝子のエクソン 51 に隣接するイントロン、DMD 遺伝子のエクソン 51 突然変異、国際公開第 2013163628 号パンフレット及び米国特許出願公開第 20130145487 号明細書も参照 |
| エドワーズ症候群<br>(18 トリソミー) | | | 18 番染色体の完全又は部分的トリソミー |
| エーラス・ダンロス症候群(I～VI 型) | 型に応じて様々: 筋骨格、眼、血管系、免役、及び皮膚を含む | | COL5A1、COL5A2、COL1A1、COL3A1、TNXB、PLOD1、COL1A2、FKBP14 及び ADAMTS2 |
| エメリー・ドレイフス型筋ジ | 筋肉 | | LMNA、LMN1、EMD2、FPLD、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ストロフィー | | | CMD1A、HGPS、LGMD1B、LMNA、LMN1、EMD2、FPLD、CMD1A |
| S錐体増強症候群 | 眼 | | NR2E3、NRL |
| ファブリー病 | 様々 - 皮膚、眼、及び胃腸系、腎臓、心臓、脳、神経系を含む | | GLA |
| 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー | 筋肉 | | FSHMD1A、FSHD1A、FRG1, |
| H因子及びH因子様1 | 血液 | | HF1、CFH、HUS |
| V因子ライデン血栓性素因及びV因子欠乏症 | 血液 | | V因子(F5) |
| V因子及びVII因子欠乏症 | 血液 | | MCFD2 |
| VII因子欠乏症 | 血液 | | F7 |
| X因子欠乏症 | 血液 | | F10 |
| XI因子欠乏症 | 血液 | | F11 |
| XII因子欠乏症 | 血液 | | F12、HAF |
| XIIIA因子欠乏症 | 血液 | | F13A1、F13A |
| XIIIB因子欠乏症 | 血液 | | F13B |
| 家族性高コレステロール血症 | 心血管系 | | APOB、LDLR、PCSK9 |
| 家族性地中海熱(FMF)、別名再発性多漿膜炎又は家族性発作性多漿膜炎 | 様々- 漿膜又は滑膜を有する器官/組織、皮膚、関節 | 心臓、腎臓、脳/CNS、生殖器 | MEFV |
| ファンコニ貧血 | 様々 - 血液(貧血)、免役系、認知、腎臓、眼、筋骨格 | | FANCA、FACA、FA1、FA、FAA、FAAP95、FAAP90、FLJ34064、FANCC、FANCG、RAD51、BRCA1、BRCA2、BRIP1、BACH1、FANCJ、FANCB、FANCD1、FANCD2、FANCD、FAD、FANCE、FACE、FANCF、FANCI、ERCC4、FANCL、FANCM、PALB2、RAD51C、SLX4、UBE2T、FANCB、XRCC9、PHF9、KIAA1596 |
| ファンコニ症候群I型(小児期発症)及びII(成人発症) | 腎臓 | | FRTS1、GATM |
| 脆弱X症候群及び関連障害 | 脳 | | FMR1、FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5 |
| 脆弱XE精神遅滞(別名マーチンベル症候群) | 脳、神経系 | | FMR1 |
| フリードライヒ運動失調(FRDA) | 脳、神経系 | 心臓 | FXN/X25 |
| フックス角膜内皮ジストロフィー | 眼 | | TCF4; COL8A2 |
| ガラクトース血症 | 炭水化物代謝障害 | 様々-ガラクトースが蓄積する場所- 肝臓、脳、眼 | GALT、GALK1、及びGALE |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 胃腸上皮癌、GI 癌 | | | CISH |
| ゴーシェ病(1、2、及び 3 型、並びにこれらの型に当てはまらない可能性がある他の異型) | 脂肪代謝障害 | 様々-肝臓、脾臓、血液、CNS、骨格系 | GBA |
| グリセリ症候群 | | | |
| 緑内障 | 眼 | | MYOC、TIGR、GLC1A、JOAG、GPOA、OPTN、GLC1E、FIP2、HYPL、NRP、CYP1B1、GLC3A、OPA1、NTG、NPG、CYP1B1、GLC3A、国際公開第 2015153780 号パンフレットに記載されるもの |
| 糸球体硬化症 | 腎臓 | | CC ケモカインリガンド 2 |
| グリコーゲン蓄積症 I～VI 型 - コリ病、ポンペ病、マッカードル病、ハース病、及びフォン・ギールケ病も参照 | 代謝性疾患 | | SLC2A2、GLUT2、G6PC、G6PT、G6PT1、GAA、LAMP2、LAMPB、AGL、GDE、GBE1、GYS2、PYGL、PFKM、コリ病、ポンペ病、マッカードル病、ハース病、及びフォン・ギールケ病も参照 |
| RBC 解糖酵素欠乏症 | 血液 | | ヘキソキナーゼ I 及び II、グルコキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、アルドラーゼ Bm トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホグリセロキナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、エノラーゼ I、ピルビン酸キナーゼについての遺伝子の突然変異を含む解糖経路における酵素についての遺伝子の何らかの突然変異 |
| ハートナップ病 | 吸収不良疾患 | 様々- 脳、胃腸、皮膚、 | SLC6A19 |
| 聴力低下 | 耳 | | NOX3、Hes5、BDNF、 |
| ヘモクロマトーシス(HH) | 鉄吸収調節疾患 | 様々- 鉄が蓄積する場所、肝臓、心臓、膵臓、関節、脳下垂体 | HFE 及び H63D |
| 血球貪食性リンパ組織球症 | 血液 | | PRF1、HPLH2、UNC13D、MUNC13-4、HPLH3、HLH3、FHL3 |
| 出血性障害 | 血液 | | PI、ATT、F5 |
| ハース病(グリコーゲン蓄積症 VI 型) | 肝臓 | 筋肉 | PYGL |
| 遺伝性血管性浮腫(HAE) | | | カリクレイン B1 |
| 遺伝性出血性毛細管拡張症(オスラー・ウェーバー・ランデュ症候群) | 皮膚及び粘膜 | | ACVRL1、ENG 及び SMAD4 |
| 遺伝性球状赤血球症 | 血液 | | NK1、EPB42、SLC4A1、SPTA1、及 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | びSPTB |
| 遺伝性高胎児ヘモグロビン血症 | 血液 | | HBG1、HBG2、BCL11A、HBG 1及び/又は2のプロモーター領域(CCAATボックスにおける) |
| 血友病(血友病A(古典的)B(別名クリスマス病)及びC) | 血液 | | A: FVIII、F8C、HEMA<br>B: FVIX、HEMB、FIX<br>C: F9、F11 |
| 肝腺腫 | 肝臓 | | TCF1、HNF1A、MODY3 |
| 肝不全、早期発症、及び神経障害 | 肝臓 | | SCOD1、SCO1 |
| 肝性リパーゼ欠損症 | 肝臓 | | LIPC |
| 肝芽腫、癌及び癌腫 | 肝臓 | | CTNNB1、PDGFRL、PDGRL、PRLTS、AXIN1、AXIN、CTNNB1、TP53、P53、LFS1、IGF2R、MPR1、MET、CASP8、MCH5 |
| ヘルマンスキー・パドラック症候群 | 皮膚、眼、血液、肺、腎臓、腸 | | HPS1、HPS3、HPS4、HPS5、HPS6、HPS7、DTNBP1、BLOC1、BLOC1S2、BLOC3 |
| HIV感受性又は感染 | 免役系 | | IL10、CSIF、CMKBR2、CCR2、CMKBR5、CCCKR5(CCR5)、国際公開第2015148670A1号パンフレットにおけるもの |
| 全前脳症(HPE)(無分葉、半分葉、及び分葉) | 脳 | | ACVRL1、ENG、SMAD4 |
| ホモシスチン尿症 | 代謝性疾患 | 様々-結合組織、筋肉、CNS、心血管系 | CBS、MTHFR、MTR、MTRR、及びMMADHC |
| HPV | | | HPV16及びHPV18 E6/E7 |
| HSV1、HSV2、及び関連する角膜炎 | 眼 | | HSV1遺伝子(前初期及び後期HSV-1遺伝子(UL1、1.5、5、6、8、9、12、15、16、18、19、22、23、26、26.5、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、42、48、49.5、50、52、54、S6、RL2、RS1、国際公開第2015153789号パンフレット、国際公開第2015153791号パンフレットに記載されるもの |
| ハンター症候群(別名ムコ多糖症II型) | リソソーム蓄積症 | 様々-肝臓、脾臓、眼、関節、心臓、脳、骨格 | IDS |
| ハンチントン病(HD)及びHD様障害 | 脳、神経系 | | HD、HTT、IT15、PRNP、PRIP、JPH3、JP3、HDL2、TBP、SCA17、PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4;及びTGM2、及び国際公開第2013130824号パンフレット、国際公開第2015089354号パンフレットに記載されるもの |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ハンター症候群(別名ムコ多糖症ＩＩ型、MPS II) | リソソーム蓄積症 | 様々－肝臓、脾臓、眼、関節、心臓、脳、骨格 | IDUA、α-L-イズロニダーゼ |
| ハーラー・シェイ症候群(別名ムコ多糖症ＩＨ-Ｓ型、MPS I H-S) | リソソーム蓄積症 | 様々－肝臓、脾臓、眼、関節、心臓、脳、骨格 | IDUA、α-L-イズロニダーゼ |
| ヒアルロニダーゼ欠乏症(別名 MPS IX) | 軟部組織及び結合組織 | | HYAL1 |
| 高 IgM 症候群 | 免役系 | | CD40L |
| 高血圧が引き起こす腎障害 | 腎臓 | | 鉱質コルチコイド受容体 |
| 免疫不全 | 免役系 | | CD3E、CD3G、AICDA、AID、HIGM2、TNFRSF5、CD40、UNG、DGU、HIGM4、TNFSF5、CD40LG、HIGM1、IGM、FOXP3、IPEX、AIID、XPID、PIDX、TNFRSF14B、TACI |
| 先天性代謝異常:尿素サイクル異常症、有機酸血症を含む)、脂肪酸酸化欠陥、アミノ酸代謝異常症、炭水化物障害、ミトコンドリア病 | 代謝性疾患、肝臓 | 様々な器官及び細胞 | 炭水化物代謝障害(例えば、ガラクトース血症)、アミノ酸代謝障害(例えば、フェニルケトン尿症)、脂肪酸代謝(例えば、MCAD 欠乏症)、尿素サイクル異常症(例えば、シトルリン血症)、有機酸血症(例えば、メープルシロップ尿症)、ミトコンドリア病(例えば、MELAS)、ペルオキシソーム病(例えば、ツェルウェーガー症候群)も参照 |
| 炎症 | 様々 | | IL-10; IL-1(IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17(IL-17a(CTLA8); IL-17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); II-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; IBD については NOD2/CARD15; IL-6; IL-12(IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3c11 |
| 炎症性腸疾患(例えば、潰瘍性大腸炎及びクローン病) | 胃腸 | 関節、皮膚 | NOD2、IRGM、LRRK2、ATG5、ATG16L1、IRGM、GATM、ECM1、CDH1、LAMB1、HNF4A、GNA12、IL10、CARD9/15. CCR6、IL2RA、MST1、TNFSF15、REL、STAT3、IL23R、IL12B、FUT2 |
| 間質性腎線維症 | 腎臓 | | TGF-β II型受容体 |
| ヨブ症候群(別名高 IgE 症候群) | 免役系 | | STAT3、DOCK8 |
| 若年性網膜分離症 | 眼 | | RS1、XLRS1 |
| 歌舞伎症候群 1 | | | MLL4、KMT2D |
| ケネディ病(別名球脊髄性筋萎縮症) | 筋肉、脳、神経系 | | SBMA/SMAX1/AR |

| | | | |
|---|---|---|---|
| クラインフェルター症候群 | 様々－特に雄性の発達に関与するもの | | 男性における余分なX染色体 |
| ラフォーラ病 | 脳、CNS | | EMP2A及びEMP2B |
| レーバー先天性黒内障 | 眼 | | CRB1、RP12、CORD2、CRD、CRX、IMPDH1、OTX2、AIPL1、CABP4、CCT2、CEP290、CLUAP1、CRB1、CRX、DTHD1、GDF6、GUCY2D、IFT140、IQCB1、KCNJ13、LCA5、LRAT、NMNAT1、PRPH2、RD3、RDH12、RPE65、RP20、RPGRIP1、SPATA7、TULP1、LCA1、LCA4、GUC2D、CORD6、LCA3、 |
| レッシュ・ナイハン症候群 | 代謝性疾患 | 様々－関節、認知、脳、神経系 | HPRT1 |
| 白血球欠損症及び障害 | 血液 | | ITGB2、CD18、LCAMB、LAD、EIF2B1、EIF2BA、EIF2B2、EIF2B3、EIF2B5、LVWM、CACH、CLE、EIF2B4 |
| 白血病 | 血液 | | TAL1、TCL5、SCL、TAL2、FLT3、NBS1、NBS、ZNFN1A1、IK1、LYF1、HOXD4、HOX4B、BCR、CML、PHL、ALL、ARNT、KRAS2、RASK2、GMPS、AF10、ARHGEF12、LARG、KIAA0382、CALM、CLTH、CEBPA、CEBP、CHIC2、BTL、FLT3、KIT、PBT、LPP、NPM1、NUP214、D9S46E、CAN、CAIN、RUNX1、CBFA2、AML1、WHSC1L1、NSD3、FLT3、AF1Q、NPM1、NUMA1、ZNF145、PLZF、PML、MYL、STAT5B、AF10、CALM、CLTH、ARL11、ARLTS1、P2RX7、P2X7、BCR、CML、PHL、ALL、GRAF、NF1、VRNF、WSS、NFNS、PTPN11、PTP2C、SHP2、NS1、BCL2、CCND1、PRAD1、BCL1、TCRA、GATA1、GF1、ERYF1、NFE1、ABL1、NQO1、DIA4、NMOR1、NUP214、D9S46E、CAN、CAIN |
| 肢帯型筋ジストロフィー疾患 | 筋肉 | | LGMD |
| ロウ症候群 | 脳、眼、腎臓 | | OCRL |
| ループス糸球体腎炎 | 腎臓 | | MAPK1 |
| マシャド・ジョセフ病(別名脊髄小脳失調症3型) | 脳、CNS、筋肉 | | ATX3 |
| 黄斑変性症 | 眼 | | ABC4、CBC1、CHM1、APOE、C1QTNF5、C2、C3、CCL2、CCR2、CD36、CFB、CFH、CFHR1、CFHR3、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | CNGB3、CP、CRP、CST3、CTSD、CX3CR1、ELOVL4、ERCC6、FBLN5、FBLN6、FSCN2、HMCN1、HTRA1、IL6、IL8、PLEKHA1、PROM1、PRPH2、RPGR、SERPING1、TCOF1、TIMP3、TLR3 |
| 黄斑ジストロフィー | 眼 | | BEST1、C1QTNF5、CTNNA1、EFEMP1、ELOVL4、FSCN2、GUCA1B、HMCN1、IMPG1、OTX2、PRDM13、PROM1、PRPH2、RP1L1、TIMP3、ABCA4、CFH、DRAM2、IMG1、MFSD8、ADMD、STGD2、STGD3、RDS、RP7、PRPH、AVMD、AOFMD、VMD2 |
| 家族性ドルーゼン(Malattia Leventinese) | 眼 | | EFEMP1、FBLN3 |
| メープルシロップ尿症 | 代謝性疾患 | | BCKDHA、BCKDHB、及びDBT |
| マルファン症候群 | 結合組織 | 筋骨格 | FBN1 |
| マロトー・ラミー症候群(別名MPS VI) | 筋骨格系、神経系 | 肝臓、脾臓 | ARSB |
| マッカードル病(グリコーゲン蓄積症V型) | グリコーゲン蓄積症 | 筋肉 | PYGM |
| 髄質嚢胞性腎疾患 | 腎臓 | | UMOD、HNFJ、FJHN、MCKD2、ADMCKD2 |
| 異染性白質ジストロフィー | リソソーム蓄積症 | 神経系 | ARSA |
| メチルマロン酸血症(MMA) | 代謝性疾患 | | MMAA、MMAB、MUT、MMACHC、MMADHC、LMBRD1 |
| モルキオ症候群(別名 MPS IV A及びB) | 結合組織、皮膚、骨、眼 | 心臓 | GALNS |
| ムコ多糖症(I H/S、I H、II、III A B及びC、I S、IVA及びB、IX、VII、及びVI型) | リソソーム蓄積症 -様々な器官/組織を侵す | | ハーラー・シャイエ症候群、ハーラー病、サンフィリッポ症候群、シャイエ症候群、モルキオ症候群、ヒアルロニダーゼ欠乏症、スライ症候群、及びマロトー・ラミー症候群も参照 |
| 筋萎縮症 | 筋肉 | | VAPB、VAPC、ALS8、SMN1、SMA1、SMA2、SMA3、SMA4、BSCL2、SPG17、GARS、SMAD1、CMT2D、HEXB、IGHMBP2、SMUBP2、CATF1、SMARD1 |
| 筋ジストロフィー | 筋肉 | | FKRP、MDC1C、LGMD2I、LAMA2、LAMM、LARGE、KIAA0609、MDC1D、FCMD、TTID、MYOT、CAPN3、CANP3、DYSF、LGMD2B、SGCG、LGMD2C、DMDA1、SCG3、SGCA、ADL、DAG2、LGMD2D、DMDA2、SGCB、LGMD2E、SGCD、SGD、LGMD2F、CMD1L、TCAP、LGMD2G、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | CMD1N、TRIM32、HT2A、LGMD2H、FKRP、MDC1C、LGMD2I、TTN、CMD1G、TMD、LGMD2J、POMT1、CAV3、LGMD1C、SEPN1、SELN、RSMD1、PLEC1、PLTN、EBS1 |
| 筋強直性ジストロフィー(1型及び2型) | 筋肉 | 眼、心臓、内分泌 | CNBP(2型)及びDMPK(1型) |
| 腫瘍 | | | PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR α; PPAR γ; WT1(ウィルムス腫瘍); FGF受容体ファミリーメンバー(5メンバー: 1、2、3、4、5); CDKN2a; APC; RB(網膜芽細胞腫); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR(アンドロゲン受容体); TSG101; IGF; IGF受容体; Igf1(4変異体); Igf2(3変異体); Igf 1受容体; Igf 2受容体; Bax; Bcl2; カスパーゼファミリー(9メンバー: 1、2、3、4、6、7、8、9、12); Kras; Apc |
| 神経線維腫症(NF)(NF1、旧カスパーゼファミリーNF、及びNF2) | 脳、脊髄、神経、及び皮膚 | | NF1、NF2 |
| ニーマン・ピックリピドーシス(A、B、及びC型) | リソソーム蓄積症 | 様々- スフィンゴミエリンが蓄積する場所、特に脾臓、肝臓、血液、CNS | A及びB型: SMPD1; C型: NPC1又はNPC2 |
| ヌーナン症候群 | 様々 - 筋骨格、心臓、眼、生殖器、血液 | | PTPN11、SOS1、RAF1及びKRAS |
| ノリエ病又はX連鎖家族性滲出性硝子体網膜症 | 眼 | | NDP |
| ノースカロライナ黄斑ジストロフィー | 眼 | | MCDR1 |
| 骨形成不全症(OI)(I、II、III、IV、V、VI、VII型) | 骨、筋骨格 | | COL1A1、COL1A2、CRTAP、P3H |
| 大理石骨病 | 骨 | | LRP5、BMND1、LRP7、LR3、OPPG、VBCH2、CLCN7、CLC7、OPTA2、OSTM1、GL、TCIRG1、TIRC7、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | OC116、OPTB1 |
| パトウ症候群<br>(13トリソミー) | 脳、心臓、骨格系 | | 13番染色体のさらなるコピー |
| パーキンソン病(PD) | 脳、神経系 | | SNCA(PARK1)、UCHL1(PARK 5)、及び LRRK2(PARK8)、(PARK3)、PARK2、PARK4、PARK7(PARK7)、PINK1(PARK6); x-シヌクレイン、DJ-1、パーキン、NR4A2、NURR1、NOT、TINUR、SNCA1P、TBP、SCA17、NCAP、PRKN、PDJ、DBH、NDUFV2 |
| RPE のパターンジストロフィー | 眼 | | RDS/ペリフェリン |
| フェニルケトン尿症(PKU) | 代謝障害 | 組織及び CNS におけるフェニルアラニン、フェニルケトンの蓄積により様々 | PAH、PKU1、QDPR、DHPR、PTS |
| 多発性嚢胞腎及び嚢胞肝 | 腎臓、肝臓 | | FCYT、PKHD1、ARPKD、PKD1、PKD2、PKD4、PKDTS、PRKCSH、G19P1、PCLD、SEC63 |
| ポンペ病 | グリコーゲン蓄積症 | 様々 - 心臓、肝臓、脾臓 | GAA |
| ポルフィリン症(実際は、全てが特定のヘム酸性プロセス異常を有する様々な疾患の群を指す) | 様々- ヘム前駆体が蓄積する場所 | | ALAD、ALAS2、CPOX、FECH、HMBS、PPOX、UROD、又は UROS |
| 後部多形性角膜ジストロフィー | 眼 | | TCF4; COL8A2 |
| 原発性高シュウ酸尿症(例えば、1型) | 様々 - 眼、心臓、腎臓、骨格系 | | LDHA(乳酸デヒドロゲナーゼ A)及びヒドロキシ酸オキシダーゼ 1(HAO1) |
| 原発性開放隅角緑内障(POAG) | 眼 | | MYOC |
| 原発性硬化性胆管炎 | 肝臓、胆嚢 | | TCF4; COL8A2 |
| 早老症(別名ハッチンソン・ギルフォード早老症候群) | 全て | | LMNA |
| プラダー・ウィリ症候群 | 筋骨格系、脳、生殖器系及び内分泌系 | | UBE3A を含む 15 番染色体の短腕の領域の欠失 |
| 前立腺癌 | 前立腺 | | HOXB13、MSMB、GPRC6A、TP53 |
| ピルビン酸デヒドロゲナーゼ欠損症 | 脳、神経系 | | PDHA1 |
| 腎臓/腎癌 | 腎臓 | | RLIP76、VEGF |
| レット症候群 | 脳 | | MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、CDKL5、STK9、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、x-シヌクレイン、DJ-1 |
| 網膜色素変性症(RP) | 眼 | | ADIPOR1、ABCA4、AGBL5、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | ARHGEF18、ARL2BP、ARL3、ARL6、BEST1、BBS1、BBS2、C2ORF71、C8ORF37、CA4、CERKL、CLRN1、CNGA1、CMGB1、CRB1、CRX、CYP4V2、DHDDS、DHX38、EMC1、EYS、FAM161A、FSCN2、GPR125、GUCA1B、HK1、HPRPF3、HGSNAT、IDH3B、IMPDH1、IMPG2、IFT140、IFT172、KLHL7、KIAA1549、KIZ、LRAT、MAK、MERTK、MVK、NEK2、NUROD1、NR2E3、NRL、OFD1、PDE6A、PDE6B、PDE6G、POMGNT1、PRCD、PROM1、PRPF3、PRPF4、PRPF6、PRPF8、PRPF31、PRPH2、RPB3、RDH12、REEP6、RP39、RGR、RHO、RLBP1、ROM1、RP1、RP1L1、RPY、RP2、RP9、RPE65、RPGR、SAMD11、SAG、SEMA4A、SLC7A14、SNRNP200、SPP2、SPATA7、TRNT1、TOPORS、TTC8、TULP1、USH2A、ZFN408、ZNF513、20120204282 号も参照 |
| シャイエ症候群(別名ムコ多糖症ＩＳ型(MPS I-S)) | 様々- 肝臓、脾臓、眼、関節、心臓、脳、骨格 | | IDUA、α-L-イズロニダーゼ |
| 統合失調症 | 脳 | | ニューレグリン 1(Nrg1); Erb4(ニューレグリンの受容体);<br>コンプレキシン 1(Cplx1); Tph1 トリプトファンヒドロキシラーゼ; Tph2<br>トリプトファンヒドロキシラーゼ 2; ニューレキシン 1; GSK3; GSK3a;<br>GSK3b; 5-HTT(Slc6a4); COMT; DRD(Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao(Dao1); TCF4; COL8A2 |
| セクレターゼ関連障害 | 様々 | | APH-1(α 及び β); PSEN1; NCSTN; PEN-2; Nos1、Parp1、Nat1、Nat2、CTSB、APP、APH1B、PSEN2、PSENEN、BACE1、ITM2B、CTSD、NOTCH1、TNF、INS、DYT10、ADAM17、APOE、ACE、STN、TP53、IL6、NGFR、IL1B、ACHE、CTNNB1、IGF1、IFNG、NRG1、CASP3、MAPK1、CDH1、APBB1、HMGCR、CREB1、PTGS2、HES1、CAT、TGFB1、ENO2、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | ERBB4、TRAPPC10、MAOB、NGF、MMP12、JAG1、CD40LG、PPARG、FGF2、LRP1、NOTCH4、MAPK8、PREP、NOTCH3、PRNP、CTSG、EGF、REN、CD44、SELP、GHR、ADCYAP1、INSR、GFAP、MMP3、MAPK10、SP1、MYC、CTSE、PPARA、JUN、TIMP1、IL5、IL1A、MMP9、HTR4、HSPG2、KRAS、CYCS、SMG1、IL1R1、PROK1、MAPK3、NTRK1、IL13、MME、TKT、CXCR2、CHRM1、ATXN1,PAWR、NOTCJ2、M6PR、CYP46A1、CSNK1D、MAPK14、PRG2、PRKCA、L1 CAM、CD40、NR1I2、JAG2、CTNND1、CMA1、SORT1、DLK1、THEM4、JUP、CD46、CCL11、CAV3、RNASE3、HSPA8、CASP9、CYP3A4、CCR3、TFAP2A、SCP2、CDK4、JOF1A、TCF7L2、B3GALTL、MDM2、RELA、CASP7、IDE、FANP4、CASK、ADCYAP1R1、ATF4、PDGFA、C21ORF33、SCG5、RMF123、NKFB1、ERBB2、CAV1、MMP7、TGFA、RXRA、STX1A、PSMC4、P2RY2、TNFRSF21、DLG1、NUMBL、SPN、PLSCR1、UBQLN2、UBQLN1、PCSK7、SPON1、SILV、QPCT、HESS、GCC1 |
| 選択的IgA欠損症 | 免役系 | | 1型: MSH5; 2型: TNFRSF13B |
| 重症複合免疫不全症(SCID)及びSCID-X1、及びADA-SCID | 免役系 | | JAK3、JAKL、DCLRE1C、ARTEMIS、SC1DA、RAG1、RAG2、ADA、PTPRC、CD45、LCA、IL7R、CD3D、T3D、IL2RG、SCIDX1、SCIDX、IMD4、米国特許出願公開第20110225664号明細書、同第20110091441号明細書、同第20100229252号明細書、同第20090271881号明細書及び同第20090222937号明細書において同定されるもの; |
| 鎌状赤血球病 | 血液 | | HBB、BCL11A、BCL11Ae、B-グロビン遺伝子座のcis-調節要素、HBG1/2プロモーター、HBG転写開始部位の-92と-130との間のHBG遠位CCAATボックス領域、国際公開第2015148863号パンフレット、国際公開第2013/126794号パンフレット、米国特許出願公開第 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | 20110182867 号明細書に記載されるもの |
| スライ症候群(別名 MPS VII) | | | GUSB |
| 脊髄小脳失調(SCA 1、2、3、6、7、8、12 及び 17 型) | | | ATXN1、ATXN2、ATX3 |
| ソースビー眼底変性症 | 眼 | | TIMP3 |
| スターガルト病 | 眼 | | ABCR、ELOVL4、ABCA4、PROM1 |
| テイ・サックス病 | リソソーム蓄積症 | 様々 - CNS、脳、眼 | HEX-A |
| サラセミア(α、β、δ) | 血液 | | HBA1、HBA2(α)、HBB(β)、HBB 及び HBD(δ)、LCRB、BCL11A、BCL11Ae、B-グロビン遺伝子座の cis-調節要素、HBG 1/2 プロモーター、国際公開第 2015148860 号パンフレット、米国特許出願公開第 20110182867 号明細書、同第 2015/148860 号明細書に記載されるもの |
| 胸腺無形成症(ディジョージ症候群;22q11.2 欠損症候群) | 免役系、胸腺 | | TBX1、DGCR8 を含む、22 番染色体の中央の 22q11.2 として知られている位置における 30～40 遺伝子の欠失 |
| トランスサイレチン アミロイドーシス(ATTR) | 肝臓 | | TTR(トランスサイレチン) |
| トリメチルアミン尿症 | 代謝性疾患 | | FMO3 |
| トリヌクレオチドリピート病(全般) | 様々 | | HTT; SBMA/SMAX1/AR; FXN/X25 ATX3; ATXN1; ATXN2; DMPK; アトロフィン-1 及び Atn1 (DRPLA Dx); CBP(Creb-BP - 全体的な不安定性); VLDLR; Atxn7; Atxn10; FEN1、TNRC6A、PABPN1、JPH3、MED15、ATXN1、ATXN3、TBP、CACNA1A、ATXN80S、PPP2R2B、ATXN7、TNRC6B、TNRC6C、CELF3、MAB21L1、MSH2、TMEM185A、SIX5、CNPY3、RAXE、GNB2、RPL14、ATXN8、ISR、TTR、EP400、GIGYF2、OGG1、STC1、CNDP1、C10ORF2、MAML3、DKC1、PAXIP1、CASK、MAPT、SP1、POLG、AFF2、THBS1、TP53、ESR1、CGGBP1、ABT1、KLK3、PRNP、JUN、KCNN3、BAX、FRAXA、KBTBD10、MBNL1、RAD51、NCOA3、ERDA1、TSC1、COMP、GGLC、RRAD、MSH3、DRD2、CD44、CTCF、CCND1、CLSPN、MEF2A、PTPRU、GAPDH、TRIM22、WT1、AHR、 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | GPX1、TPMT、NDP、ARX、TYR、EGR1、UNG、NUMBL、FABP2、EN2、CRYGC、SRP14、CRYGB、PDCD1,HOXA1、ATXN2L、PMS2、GLA、CBL、FTH1、IL12RB2、OTX2、HOXA5、POLG2、DLX2、AHRR、MANF、RMEM158、20110016540号も参照 |
| ターナー症候群(XO) | 様々 - 生殖器、及び性徴、血管系 | | モノソミーX |
| 結節性硬化症 | CNS、心臓、腎臓 | | TSC1、TSC2 |
| アッシャー症候群(I、II、及びIII型) | 耳、眼 | | ABHD12、CDH23、CIB2、CLRN1、DFNB31、GPR98、HARS、MYO7A、PCDH15、USH1C、USH1G、USH2A、USH11A、国際公開第2015134812A1号パンフレットに記載されるもの |
| 口蓋心臓顔面症候群(別名22q11.2欠損症候群、ディジョージ症候群、円錐動脈幹異常顔貌症候群(CTAF)、常染色体優性オピッツ G/BB 症候群又はケイラー心臓顔面症候群) | 様々 - 骨格、心臓、腎臓、免役系、脳 | | 多くの遺伝子が欠失、COM、TBX1、及びその他が症状に関連する |
| フォン・ギールケ病(グリコーゲン蓄積症1型) | グリコーゲン蓄積症 | 様々 - 肝臓、腎臓 | G6PC及びSLC37A4 |
| フォン・ヒッペル・リンドウ症候群 | 様々 - 細胞増殖調節障害 | CNS、腎臓、眼、内臓器官 | VHL |
| フォン・ヴィレブランド病(I、II及びIII型) | 血液 | | VWF |
| ウィルソン病 | 様々 - 銅蓄積症 | 肝臓、脳、眼、銅が蓄積する他の組織 | ATP7B |
| ウィスコット・アルドリッチ症候群 | 免役系 | | WAS |
| 色素性乾皮症 | 皮膚 | 神経系 | POLH |
| XXX症候群 | 内分泌、脳 | | X染色体トリソミー |

【表３】

表 3. 細胞機能を制御する例示的な遺伝子

| 細胞機能 | 遺伝子 |
|---|---|
| PI3K/AKT シグナル伝達 | PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2; PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2; ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7; YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKBKG; RELB; DYRK1A; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2; TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; HSP90AA1; RPS6KB1 |
| ERK/MAPK シグナル伝達 | PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1; PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN; EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ; PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1; PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK |
| グルココルチコイド受容体シグナル伝達 | RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1; MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I; PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2; MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13; RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1; PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1; STAT1; IL6; HSP90AA1 |
| 軸索誘導シグナル伝達 | PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12; IGF1; RAC1; RAP1A; EIF4E; PRKCZ; NRP1; NTRK2; ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2; CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11; PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1; GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B; AKT3; PRKCA |

| | |
|---|---|
| エフリン受容体シグナル伝達<br>アクチン細胞骨格シグナル伝達 | PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1;<br>PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; GRK6; ROCK2;<br>MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2;<br>DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14;<br>CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1;<br>KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2;<br>PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1;<br>MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10;<br>MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2;<br>EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4;<br>AKT3; SGK |
| | ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1;<br>PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6;<br>ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8;<br>PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8;<br>F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD;<br>PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7;<br>PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1;<br>MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3;<br>ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL;<br>BRAF; VAV3; SGK |
| ハンチントン病シグナル伝達 | PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2;<br>MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SP1; CAPN2;<br>PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST;<br>GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1;<br>GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2;<br>HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A;<br>HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1;<br>PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX;<br>ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3 |
| アポトーシスシグナル伝達 | PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1;<br>BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB;<br>CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8;<br>BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA;<br>PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF;<br>RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2;<br>CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2;<br>BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK;<br>CASP3; BIRC3; PARP1 |
| B 細胞受容体シグナル伝達 | RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11;<br>AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A;<br>MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1;<br>MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9;<br>EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB;<br>MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1;<br>NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN;<br>GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1 |

| | |
|---|---|
| 白血球血管外遊出シグナル伝達 | ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA; RAC1; RAP1A; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11; MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB; MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK; MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2; CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK; CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9 |
| インテグリンシグナル伝達 | ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAP1A; TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2; CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2; CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3 |
| 急性期反応シグナル伝達 | IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1; TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN; AKT3; IL1R1; IL6 |
| PTEN シグナル伝達 | ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11; MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA; CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1; MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR; RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1; NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2; GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1 |
| p53 シグナル伝達<br>アリール炭化水素受容体シグナル伝達 | PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A; BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1; PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9; CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A; HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1; SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN; SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3 |
| | HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1; SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1; MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1; SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF; CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1; CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1; HSP90AA1 |

| | |
|---|---|
| 異物代謝シグナル伝達 | PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD; GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1; CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1; NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1; HSP90AA1 |
| SAPK/JNK シグナル伝達 | PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1; GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; SGK |
| PPAr/RXR シグナル伝達 | PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN; RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2; ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8; IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A; NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1; ADIPOQ |
| NF-KB シグナル伝達 | IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2; KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF; INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10; GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1 |
| ニューレグリンシグナル伝達<br>Wnt/βカテニンシグナル伝達 | ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI; CDKN1B; STAT5B; PRKD1; MAPK3; ITGA1; KRAS; PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2; ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3; EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL; AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1 |
| | CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO; AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A; WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK; LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1; PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFBR1; CCND1; GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; SOX2 |

| | |
|---|---|
| インスリン受容体シグナル伝達 | PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCZ; MAPK1; TSC1; PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1; SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; RPS6KB1 |
| IL-6 シグナル伝達 | HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3; MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6 |
| 肝胆汁鬱滞 | PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA; RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8; CHUK; NR1H2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6 |
| IGF-1 シグナル伝達 | IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2; PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A; YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3; FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1 |
| NRF2 媒介酸化ストレス反応 | PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1; NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1; GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1 |
| 肝線維症/肝星細胞活性化 | EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF; SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9; IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8; PDGFRA; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; VEGFA; BAX; IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9 |
| PPAR シグナル伝達 | EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB; NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3; NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2; PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA; MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1 |
| Fc ε RI シグナル伝達 | PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD; MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3; VAV3; PRKCA |

| | |
|---|---|
| G タンパク質共役受容体シグナル伝達 | PRKCE; RAP1A; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3; PRKCA |
| イノシトールリン酸代謝 | PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK |
| PDGF シグナル伝達 | EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2 |
| VEGF シグナル伝達 | ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA |
| ナチュラルキラー細胞シグナル伝達 | PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA |
| 細胞周期: G1/S チェックポイント調節 | HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC; ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RB1; HDAC11; HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; GSK3B; RBL1; HDAC6 |
| T 細胞受容体シグナル伝達 | RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS; NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10; JUN; VAV3 |
| 細胞死受容体シグナル伝達 | CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8; DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB; CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3; BIRC3 |
| FGF シグナル伝達 | RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4; AKT3; PRKCA; HGF |

| | |
|---|---|
| GM-CSF シグナル伝達 | LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3; ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3; STAT1 |
| 筋萎縮性側索硬化症シグナル伝達 | BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2; PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1; PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1; APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3 |
| JAK/Stat シグナル伝達 | PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3; STAT1 |
| ニコチン酸及びニコチンアミド代謝 | PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2; MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK |
| ケモカインシグナル伝達 | CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ; CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13; RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1; MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA |
| IL-2 シグナル伝達 | ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2; JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3 |
| シナプス長期抑制 | PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; PRKCI; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3; KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA |
| エストロゲン受容体シグナル伝達 | TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; SMARCA4; MAPK3; NR1P1; KRAS; SRC; NR3C1; HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2 |
| タンパク質ユビキチン化経路 | TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3 |
| IL-10 シグナル伝達 | TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; JUN; IL1R1; IL6 |
| VDR/RXR 活性化 | PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; NCOR2; SP1; PRKCI; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA |
| TGF-β シグナル伝達 | EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; |

| | |
|---|---|
| | MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5 |
| Toll 様受容体シグナル伝達 | IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK; NFKB1; TLR2; JUN |
| p38 MAPK シグナル伝達 | HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS; CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFBR1; MYC; ATF4; IL1R1; SRF; STAT1 |
| ニューロトロフィン/TRK シグナル伝達 | NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; CDC42; JUN; ATF4 |
| FXR/RXR 活性化 | INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; APOB; MAPK10; PPARG; MTTP; MAPK9; PPARGC1A; TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1 |
| シナプス長期増強 | PRKCE; RAP1A; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1; PRKC1; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; ATF4; PRKCA |
| カルシウムシグナル伝達 | RAP1A; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1; CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11; HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4; HDAC6 |
| EGF シグナル伝達 | ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1 |
| 心血管系における低酸素症シグナル伝達 | EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT; HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM; VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1 |
| RXR 機能の LPS/IL-1 媒介性阻害 | IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1; MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1 |
| LXR/RXR 活性化 | FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA; NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1; SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9 |
| アミロイドプロセシング | PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2; CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1; PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP |
| IL-4 シグナル伝達 | AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1; PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; FRAP1; AKT3; RPS6KB1 |
| 細胞周期: G2/M DNA 損傷チェックポイント調節 | EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC; CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A |
| 心血管系における一酸化窒素シグナル伝達 | KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; CAV1; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1; |

| | |
|---|---|
| | VEGFA; AKT3; HSP90AA1 |
| プリン代謝 | NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4; PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C; NT5E; POLD1; NME1 |
| cAMP 媒介性シグナル伝達 | RAP1A; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3; SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4 |
| ミトコンドリア機能障害 Notch シグナル伝達 | SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9; PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3 HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2; PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4 |
| 小胞体ストレス経路ピリミジン代謝 | HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4; EIF2AK3; CASP3 NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B; NT5E; POLD1; NME1 |
| パーキンソン病シグナル伝達 | UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7; PARK2; CASP3 |
| 心臓及び β アドレナリンシグナル伝達 | GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C |
| 解糖/糖新生 | HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1 |
| インターフェロンシグナル伝達 | IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3 |
| ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達 | ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B |
| グリセロリン脂質代謝 | PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2 |
| リン脂質分解 | PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2 |
| トリプトファン代謝 | SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1 |
| リジン分解 | SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C |
| ヌクレオチド除去修復経路 | ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1 |
| デンプン及びスクロース代謝 | UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1 |
| アミノ糖代謝 | NQO1; HK2; GCK; HK1 |
| アラキドン酸代謝 | PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1 |
| 概日リズムシグナル伝達 | CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1 |
| 凝固系 | BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3 |
| ドーパミン受容体シグナル伝達 | PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C |
| グルタチオン代謝 | IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1 |
| グリセロ脂質代謝 | ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2 |
| リノール酸代謝 | PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1 |
| メチオニン代謝 | DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3A |
| ピルビン酸代謝 | GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA |
| アルギニン及びプロリン代謝 | ALDH1A1; NOS3; NOS2A |
| エイコサノイドシグナル伝達 | PRDX6; GRN; YWHAZ |

| | |
|---|---|
| フルクトース及びマンノース代謝 | HK2; GCK; HK1 |
| ガラクトース代謝 | HK2; GCK; HK1 |
| スチルベン、クマリン及びリグニン生合成 | PRDX6; PRDX1; TYR |
| 抗原提示経路 | CALR; B2M |
| ステロイドの生合成 | NQO1; DHCR7 |
| ブタン酸代謝 | ALDH1A1; NLGN1 |
| クエン酸回路 | IDH2; IDH1 |
| 脂肪酸代謝 | ALDH1A1; CYP1B1 |
| グリセロリン脂質代謝 | PRDX6; CHKA |
| ヒスチジン代謝 | PRMT5; ALDH1A1 |
| イノシトール代謝 | ERO1L; APEX1 |
| シトクロム p450 による生体異物の代謝 | GSTP1; CYP1B1 |
| メタン代謝 | PRDX6; PRDX1 |
| フェニルアラニン代謝 | PRDX6; PRDX1 |
| プロパン酸代謝 | ALDH1A1; LDHA |
| セレノアミノ酸代謝 | PRMT5; AHCY |
| スフィンゴ脂質代謝 | SPHK1; SPHK2 |
| アミノホスホネート代謝 | PRMT5 |
| アンドロゲン及びエストロゲン代謝 | PRMT5 |
| アスコルビン酸及びアルダル酸代謝 | ALDH1A1 |
| 胆汁酸生合成 | ALDH1A1 |
| システイン代謝 | LDHA |
| 脂肪酸生合成 | FASN |
| グルタミン酸受容体シグナル伝達 | GNB2L1 |
| NRF2 媒介性酸化ストレス反応 | PRDX1 |
| ペントースリン酸経路 | GPI |
| ペントース及びグルクロン酸塩相互変換 | UCHL1 |
| レチノール代謝 | ALDH1A1 |
| リボフラビン代謝 | TYR |
| チロシン代謝 | PRMT5, TYR |
| ユビキノン生合成 | PRMT5 |
| バリン、ロイシン及びイソロイシン分解 | ALDH1A1 |
| グリシン、セリン及びトレオニン代謝 | CHKA |
| リジン分解 | ALDH1A1 |

| | |
|---|---|
| 疼痛/味覚 | TRPM5; TRPA1 |
| 疼痛 | TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2; Trpa1; Pomc; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca; Prkacb; Prkar1a; Prkar2a |
| ミトコンドリア機能 | AIF; CytC; SMAC(Diablo); Aifm-1; Aifm-2 |
| 発達神経学 | BMP-4; コーディン(Chrd); ノギン(Nog); WNT(Wnt2; Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b; Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16); β-カテニン; Dkk-1; Frizzled 関連タンパク質; Otx-2; Gbx2; FGF-8; リーリン; Dab1; unc-86(Pou4f1 又は Brn3a); Numb; Reln |

【０５６０】

したがって、本明細書に記載される真核細胞又は原核細胞（インビトロ、すなわち、単離された真核細胞内）における１つ以上の変異を誘導する方法であって、細胞に、本明細書に記載されるベクターを送達することを含む方法も、本明細書に記載される。変異は、細胞の標的配列における１つ以上のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。ある実施形態において、変異は、前記細胞の各標的配列における１～７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、各標的配列における１、５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、前記細胞の各標的配列における５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、前記細胞の各標的配列における１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含む。変異は、前記細胞の各標的配列における２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、前記細胞の各標的配列における４０、４５、５０、７５、１００、２００、３００、４００又は５００ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。変異は、前記細胞の各標的配列における５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２７００、２８００、２９００、３０００、３１００、３２００、３３００、３４００、３５００、３６００、３７００、３８００、３９００、４０００、４１００、４２００、４３００、４４００、４５００、４６００、４７００、４８００、４９００、５０００、５１００、５２００、５３００、５４００、５５００、５６００、５７００、５８００、５９００、６０００、６１００、６２００、６３００、６４００、６５００、６６００、６７００、６８００、６９００、７０００、７１００、７２００、７３００、７４００、７５００、７６００、７７００、７８００、７９００、８０００、８１００、８２００、８３００、８４００、８５００、８６００、８７００、８８００、８９００、９０００、９１００、９２００、９３００、９４００、９５００、９６００、９７００、９８００、又は９９００～１００００ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。

【０５６１】

ある実施形態において、修飾は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムによって媒介されるものなどの、核酸構成要素（例えばガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡ）によって前記細胞の各標的配列におけるヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。

【０５６２】

ある実施形態において、修飾は、非ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム又は技術によって前

記細胞の標的又はランダム配列におけるヌクレオチドの導入、欠失、又は置換を含み得る。このような技術は、本明細書における他の箇所に記載され、例えば、操作細胞並びに操作細胞及び生物を生成する方法が記載される。

【０５６３】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを用いる場合、毒性及びオフターゲット効果の最小化のために、送達されるＣａｓ　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの濃度を制御することが重要であり得る。Ｃａｓ　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの最適な濃度は、細胞又は非ヒト真核生物動物モデルにおいて異なる濃度で試験し、潜在的なオフターゲットゲノム遺伝子座における修飾の程度を分析するためのディープシーケンシングを用いることによって決定され得る。或いは、毒性及びオフターゲット効果のレベルを最小限に抑えるために、Ｃａｓニッカーゼｍ ＲＮＡ（例えば、Ｄ１０Ａ変異を有する化膿レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９様）は、対象とする部位を標的とする一対のガイドＲＮＡとともに送達され得る。ガイド配列及び毒性及びオフターゲット効果を最小限に抑えるための手法は、国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）にあるとおりであり得；又は、本明細書にあるように変異による。

【０５６４】

典型的に、内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関して、ＣＲＩＳＰＲ複合体（標的配列にハイブリダイズされ、１つ以上のＣａｓタンパク質と複合体形成されるガイド配列を含む）の形成は、標的配列又はその近傍（例えば、標的配から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、又はそれ以上の塩基対以内）に一方又は両方の鎖の切断をもたらす。理論に制約されるのを望むものではないが、野生型ｔｒａｃｒ配列の全て又は一部を含むか又はそれからなり得るｔｒａｃｒ配列（例えば、野生型ｔｒａｃｒ配列の約又は約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５超、若しくはそれ以上のヌクレオチド）はまた、ガイド配列に動作可能に結合されるｔｒａｃｒメイト配列の全て又は一部に、ｔｒａｃｒ配列の少なくとも一部に沿ってハイブリダイゼーションなどによってＣＲＩＳＰＲ複合体の一部を形成し得る。

【０５６５】

一実施形態において、本発明は、真核細胞内で標的ポリヌクレオチドを修飾する方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、カーゴ分子としてＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ分子を有する、本明細書に記載される操作細胞及び／又は本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシド粒子を、対象及び／又は細胞に送達することを含む。送達されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子は、複合体形成して、例えば、前記標的ポリヌクレオチドの切断をもたらし、それによって、標的ポリヌクレオチドを修飾するために標的ポリヌクレオチドに結合し得、ここで、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされたガイド配列と複合体形成されるＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ここで、前記ガイド配列は、ｔｒａｃｒメイト配列に結合され得、これが、今度は、ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。ある実施形態において、前記切断は、前記ＣＲＩＳＰＲ酵素によって標的配列の位置において１つ又は２つの鎖を切断することを含む。ある実施形態において、前記切断は、標的遺伝子の減少した転写をもたらす。ある実施形態において、本方法は、外因性鋳型ポリヌクレオチドを用いた相同的組み換えによって、前記切断された標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、ここで、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含む変異をもたらす。ある実施形態において、前記変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されたタンパク質における１つ以上のアミノ酸変化をもたらす。ある実施形態において、本方法は、１つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、ここで、１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、１つ以上のベクターは、ｔｒａｃｒメイト配列、及びｔｒａｃｒ配列に結合されたガイド配列の１つ以上の発現を駆動する。ある実施形態において、前記ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ｔｒａｃｒメイト配列、及びｔｒａｃｒ配列に結合されたガイド配列の１つ以上の発現を駆動する。ある実施形態において、このようなＣＲＩＳＰＲ酵素は、対象における真核細胞に送達される。ある実施形態において、前記修飾は、細胞培養

物中で前記真核細胞において行われる。ある実施形態において、本方法は、前記修飾の前に対象から前記真核細胞を単離することをさらに含む。ある実施形態において、本方法は、前記真核細胞及び／又はそれから誘導される細胞を、前記対象に戻すことをさらに含む。ある実施形態において、単離された細胞は、単離された細胞への１つ以上の操作ＡＡＶカプシド粒子の送達の後に対象に戻され得る。ある実施形態において、単離された細胞は、本明細書に記載される操作送達システムの１つ以上の分子を、単離された細胞に送達した後に対象に戻され得、それによって、単離された細胞を、上述されるように操作細胞にし得る。

【０５６６】

スクリーニング及び細胞選択

本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステムベクター、操作細胞、及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子は、スクリーニングアッセイ及び／又は細胞選択アッセイにおいて使用され得る。操作送達系ベクター、操作細胞、及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子は、対象及び／又は細胞に送達され得る。ある実施形態において、細胞は、真核細胞である。細胞は、インビトロ、エクスビボ、インサイチュ、又はインビボであり得る。本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステム分子、ベクター、操作細胞、及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子は、外因性分子又は化合物を、それらが送達される対象又は細胞に導入し得る。細胞及び／又はその属性の同定を可能にし得る、外因性分子又は化合物の存在が、検出され得る。ある実施形態において、送達される分子又は粒子は、遺伝子又は他のヌクレオチド修飾（例えば、変異、遺伝子又はポリヌクレオチド挿入及び／又は欠失など）に影響を与え得る。ある実施形態において、ヌクレオチド修飾は、シーケンシングによって細胞内で検出され得る。ある実施形態において、ヌクレオチド修飾は、細胞における検出可能な表現型変化をもたらす細胞への生理学的及び／又は生物学的修飾をもたらし得、これが、細胞の検出、同定、及び／又は選択を可能にし得る。ある実施形態において、表現型変化は、細胞死であり得、例えば、標的ポリヌクレオチドへのＣＲＩＳＰＲ複合体の結合が、細胞死をもたらす実施形態である。本発明の実施形態は、選択マーカー又は対抗選択システムを含み得る２段階プロセスを必要とせずに、特定の細胞の選択を可能にする。細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。

【０５６７】

一実施形態において、本発明は、１つ以上の細胞内の遺伝子における１つ以上の変異を導入することによって１つ以上の細胞を選択する方法を提供し、本方法は、本明細書における他の箇所に記載される１つ以上の操作送達システム分子又はベクターを含み得る１つ以上のベクターを、細胞中に導入することを含み、ここで、１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、及び／又はｔｒａｃｒメイト配列、ｔｒａｃｒ配列、及び編集鋳型に結合されたガイド配列の１つ以上の発現を駆動し得；又は細胞及び／又はそのゲノムに挿入される他のポリヌクレオチドは；ここで、例えば、ＣＲＩＳＰＲ酵素及び／又は編集鋳型内で発現され、それによってインビボで発現され、含まれる場合、ＣＲＩＳＰＲ酵素切断を除去する１つ以上の変異を含み；選択される細胞内で標的ポリヌクレオチドにより編集鋳型の相同的組み換えを可能にし；ＣＲＩＳＰＲ複合体を、標的ポリヌクレオチドに結合させて、前記遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの切断をもたらし、ここで、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）標的ポリヌクレオチド内で標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、及び（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされるｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成されるＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ここで、標的ポリヌクレオチドへのＣＲＩＳＰＲ複合体の結合は、細胞死を誘導し、それによって、１つ以上の変異が選択されるように導入された１つ以上の細胞を可能にする。好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓタンパク質である。本発明の別の実施形態において、選択される細胞は、真核細胞であり得る。

【０５６８】

限定はされないが、１つ以上のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム分子を細胞に送達するものを含む、操作ＡＡＶカプシドシステム分子、ベクター、操作細胞、及び／又は操作ＡＡ

Ｖカプシド粒子を含むスクリーニング方法は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）などの検出方法において使用され得る。ある実施形態において、触媒不活性Ｃａｓタンパク質を含む操作ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの１つ以上の構成要素が、本明細書における他の箇所に記載される操作ＡＡＶカプシドシステム分子、操作細胞、及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子によって、細胞に送達され得、ＦＩＳＨ方法において使用され得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、不活性化Ｃａｓタンパク質（ｄＣａｓ）（例えば、ｄＣａｓ９）を含み得、これは、ＤＮＡ二本鎖破断を生成する能力を欠き、マーカー、例えば、蛍光タンパク質、例えば、強化された緑色蛍光タンパク質（ｅＧＦＰ）と融合され得、低分子ガイドＲＮＡと共発現されて、インビボで挟動原体、中心及びテロメアリピートを標的とする。ｄＣａｓシステムは、ヒトゲノムにおける両方の反復配列及び個々の遺伝子を可視化するために使用され得る。標識ｄＣａｓ、ｄＣａｓ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム、操作ＡＡＶカプシドシステム分子、操作細胞、及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子のこのような新しい用途は、特に、低分子核体積又は複合体３－Ｄ構造を有する場合、細胞をイメージングし、機能的核構造を調べるのに使用され得る。（Ｃｈｅｎ Ｂ，Ｇｉｌｂｅｒｔ ＬＡ，Ｃｉｍｉｎｉ ＢＡ，Ｓｃｈｎｉｔｚｂａｕｅｒ Ｊ，Ｚｈａｎｇ Ｗ，Ｌｉ ＧＷ，Ｐａｒｋ Ｊ，Ｂｌａｃｋｂｕｒｎ ＥＨ，Ｗｅｉｓｓｍａｎ ＪＳ，Ｑｉ ＬＳ，Ｈｕａｎｇ Ｂ．２０１３．Ｄｙｎａｍｉｃ ｉｍａｇｉｎｇ ｏｆ ｇｅｎｏｍｉｃ ｌｏｃｉ ｉｎ ｌｉｖｉｎｇ ｈｕｍａｎ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ａｎ ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍ．Ｃｅｌｌ １５５（７）：１４７９－９１．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｃｅｌｌ．２０１３．１２．００１．、その教示内容が、本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲシステムに適用及び／又は適合され得る。マーカー（例えば、蛍光マーカー）に融合されるポリヌクレオチドを含む同様の手法が、本明細書に記載される操作ＡＡＶカプシドシステム分子、ベクター、操作細胞、及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子によって細胞に送達され、細胞のゲノムに統合され、及び／又はＦＩＳＨ分析のために細胞のゲノムの領域と他の形で相互作用し得る。

【０５６９】

他の細胞小器官及び他の細胞構造を調べるための同様の手法が、細胞（例えば、本明細書に記載される操作送達ＡＡＶカプシド分子、操作細胞、及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子によって）に、マーカー（蛍光マーカーなど）に融合される１つ以上の分子を送達することによって達成され得、マーカーに融合される分子は、１つ以上の細胞構造を標的化することが可能である。マーカーの存在を分析することによって、特定の細胞構造を同定及び／又はイメージングすることができる。

【０５７０】

ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドシステム分子及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子は、細胞の内部又は外部でスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。ある実施形態において、スクリーニングアッセイは、操作ＡＡＶカプシド粒子によって、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓカーゴ分子を送達することを含み得る。

【０５７１】

スクリーニング、例えば、機能獲得型スクリーン（ｇａｉｎ ｏｆ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｓｃｒｅｅｎ）における本発明のシステムの使用も、本発明によって提供される。遺伝子を過剰発現するように人工的に強制された細胞は、例えば、負のフィードバックループによって、時間とともに遺伝子を下方制御することができる（平衡を取り戻す）。スクリーニングが開始する時間までに、無調節の遺伝子は、再度減少され得る。他のスクリーニングアッセイは、本明細書における他の箇所に記載される。

【０５７２】

一実施形態において、本発明は、インビトロ送達方法から又はインビトロ送達方法の細胞を提供し、ここで、本方法は、送達システムを細胞、任意に真核細胞と接触させ、それによって、送達システムの構成要素の細胞への送達があり、及び任意に接触からデータ又は結果を取得し、データ又は結果を送信することを含む。

【０５７３】

一実施形態において、本発明は、インビトロ送達方法から又はインビトロ送達方法の細胞を提供し、ここで、本方法は、送達システムを細胞、任意に真核細胞と接触させ、それによって、送達システムの構成要素の細胞への送達があり、任意に接触からデータ又は結果を取得し、データ又は結果を送信することを含み；ここで、細胞産物は、送達システムと接触しない細胞と比較して改変され、例えば、接触以外は細胞の野生型であったものから改変される。一実施形態において、細胞産物は、非ヒト又は動物である。ある実施形態において、細胞産物は、ヒトである。

【０５７４】

ある実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される１つ以上のベクターで一過性に又は非一過性にトランスフェクトされる。ある実施形態において、細胞は、任意にその中に再導入されるように対象において天然に存在するかのようにトランスフェクトされる。ある実施形態において、トランスフェクトされる細胞は、対象から取られる。ある実施形態において、細胞は、細胞株などの対象から取られた細胞から得られるか又はそれに由来する。操作ＡＡＶカプシドシステム、操作ＡＡＶカプシド粒子の送達機構及び技術は、本明細書における他の箇所に記載される。

【０５７５】

ある実施形態において、操作ＡＡＶカプシドシステム分子及び／又は操作ＡＡＶカプシド粒子を、直接宿主細胞に導入することが想定される。例えば、操作ＡＡＶカプシドシステム分子は、操作ＡＡＶカプシド粒子にパッケージングされるように１つ以上のカーゴ分子と一緒に送達され得る。

【０５７６】

ある実施形態において、本発明は、本明細書に開示されるベクター送達システムのいずれかにしたがってベクターを導入する工程を含み得る、細胞内の操作ＧＴＡ粒子にパッケージングされるように操作送達分子及びカーゴ分子を発現する方法を提供する。

【０５７７】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明され、これは、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【０５７８】

実施例１－ｍＲＮＡベースの検出方法は、ＡＡＶ変異体の選択についてよりストリンジェントである。

図１は、ｍＲＮＡの産生をもたらす、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）形質導入機構を示す。図１に示されるように、ＡＡＶ粒子による細胞の機能的形質導入は、ｍＲＮＡ鎖の産生をもたらし得る。非機能的形質導入は、ウイルスゲノムがＤＮＡベースのアッセイを用いて検出可能であるにもかかわらず、このような産物を生成しないであろう。したがって、例えば、ＡＡＶによって形質導入を検出するためのｍＲＮＡベースの検出アッセイは、よりストリンジェントであり得、細胞を機能的に形質導入することが可能なウイルス粒子の機能性についてフィードバックを提供し得る。図２は、ＡＡＶ変異体のｍＲＮＡベースの選択が、ＤＮＡベースの選択よりストリンジェントであり得ることを示し得るグラフを示す。ウイルスライブラリーを、ＣＭＶプロモーターの制御下で発現させた。

【０５７９】

実施例２－ｍＲＮＡベースの検出方法は、カプシド変異体ライブラリーからＡＡＶカプシド変異体を検出するために使用され得る

図３Ａ～３Ｂは、肝臓におけるウイルスライブラリー及びベクターゲノムＤＮＡ（図３Ａ）及びｍＲＮＡ（図３Ｂ）の間の相関を実証し得るグラフを示す。図４Ａ～４Ｆは、様々な組織内で特定されるｍＲＮＡレベルで発現されるカプシド変異体を実証し得るグラフを示す。

【０５８０】

実施例３－カプシドｍＲＮＡ発現は、組織特異的プロモーターによって駆動され得る。

図５Ａ～５Ｃは、細胞型特異的プロモーター（ｘ軸上に示される）の制御下での様々な

組織におけるカプシドｍＲＮＡ発現を実証し得るグラフを示す。ＣＭＶが、例示的な構成的プロモーターとして含まれていた。ＣＫ８は、筋肉特異的プロモーターである。ＭＨＣＫ７は、筋肉特異的プロモーターである。ｈＳｙｎは、神経特異的プロモーターである。

【０５８１】

実施例４－カプシド変異体ライブラリー生成、変異体スクリーニング、及び変異体同定

一般に、ＡＡＶカプシドライブラリーは、適切なＡＡＶ産生細胞株において上述される操作ＡＡＶカプシドポリヌクレオチドをそれぞれ含有する操作カプシドベクターを発現させることによって生成され得る。例えば、図８を参照されたい。これは、１つ以上の所望の細胞特異的操作ＡＡＶカプシド変異体を含有し得るＡＡＶカプシドライブラリーを生成し得る。図７は、ＡＡＶカプシド変異体ライブラリーを生成する実施形態、特に、野生型ＡＡＶ、例えば、ＡＡＶ９へのランダムｎ量体（ｎ＝３～１５アミノ酸）の挿入を示す概略図を示す。この実施例において、ランダム７量体が、ＡＡＶ９ウイルスタンパク質の可変領域ＶＩＩＩのａａ５８８～５８９の間に挿入され、ベクターにつき１つの変異体を有するベクターを含有するウイルスゲノムを形成するために使用された。図８に示されるように、カプシド変異体ベクターライブラリーを用いて、ＡＡＶ粒子を生成し、ここで、各カプシド変異体が、ベクターゲノムとしてそのコード配列を封入した。図９は、ＡＡＶカプシド変異体ライブラリーを生成するためにＡＡＶベクター系において使用され得る代表的なＡＡＶカプシドプラスミドライブラリーベクター（例えば、図８を参照）のベクターマップを示す。ライブラリーは、組織特異的プロモーター又は構成的プロモーターの制御下で、カプシド変異体ポリヌクレオチドにより生成され得る。ライブラリーはまた、ポリアデニル化シグナルを含むカプシド変異体ポリヌクレオチドにより作製された。

【０５８２】

図６に示されるように、ＡＡＶカプシドライブラリーは、１回目のｍＲＮＡベースの選択のために様々な非ヒト動物に投与され得る。図１に示されるように、ＡＡＶ及び関連ベクターによる形質導入プロセスは、細胞を形質導入したウイルスのゲノムの反映であるｍＲＮＡ分子の産生をもたらし得る。少なくとも本明細書における実施例において実証されるように、ウイルスＤＮＡの存在を測定することによって細胞内のウイルス粒子の存在を単に検出することと対照的に、ｍＲＮＡベースの選択は、生成された機能的産物に基づくため、細胞を機能的に形質導入することが可能なウイルス粒子を決定するためにより特異的及び有効であり得る。

【０５８３】

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

【０５８４】

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

【０５８５】

図１０は、異なるプロモーターを用いて生成されたライブラリーによって生成されたウイルス力価（ＡＡＶ９ベクターゲノム／１５ｃｍ皿として計算される）を実証し得るグラフを示す。図１０に示されるように、ウイルス力価は、異なるプロモーターの使用によって有意に影響されなかった。

【０５８６】

実施例５－筋指向性強化ｍｙｏＡＡＶカプシド

【０５８７】

第一及び第二世代筋特異的ＡＡＶカプシドを、筋特異的プロモーターを用いて開発し、得られたカプシドライブラリーを、本明細書における他の箇所に記載されるように、及び／又は例えば、米国仮特許出願第６２／８９９，４５３号明細書、同第６２／９１６，２０７号明細書、及び同第６３／０１８，４５４号明細書に記載されるように、マウス及び非ヒト霊長類においてスクリーニングした。第一及び第二世代ｍｙｏＡＡＶカプシドを、上述されるようにマウス及び非ヒト霊長類において最適化して、強化されたｍｙｏＡＡＶカプシドを生成した（例えば、図１１を参照）。表４及び５は、強化された筋特異的ｎ量体モチーフの最上位のヒット及びそれらのコード配列を各表内のランク順に示す。図１２は、強化されたＭｙｏＡＡＶ（ｅＭｙｏＡＡＶ）カプシド変異体が、全身送達後、第一世代ＭｙｏＡＡＶと比較して、より有効にマウスの筋肉を形質導入し得ることを実証することができる。

【０５８８】

図１３は、第一及び第二世代ｍｙｏＡＡＶカプシド変異体が、ヒト一次筋管の形質導入についてａＶｂ６インテグリンヘテロ二量体に依存することを実証することができる。

【表４】

表 4. マウス強化 MyoAAV(eMyoAAV)カプシド変異体

| ランク | N 量体モチーフ | 配列番号 | コード配列 | 配列番号 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | AEGRGDQYTR | 3 | GCTGAGGGTAGAGGAGACCAGTATACTCGT | 41 |
| 2 | GPGRGDQTTL | 2 | GGGCCGGGTAGAGGAGACCAGACTACGTTG | 42 |
| 3 | AEGRGDQYTR | 3 | GCGGAAGGCAGAGGAGACCAATACACAAGG | 43 |
| 4 | ATGRGDLGQA | 4 | GCGACTGGTAGAGGAGACCTGGGTCAGGCT | 44 |
| 5 | AVARGDQGLI | 5 | GCGGTGGCGAGAGGAGACCAGGGTCTTATT | 45 |
| 6 | NISRGDQGYQ | 6 | AACATCTCCAGAGGAGACCAAGGTTACCAA | 46 |
| 7 | APARGDQGSQ | 7 | GCGCCGGCTAGAGGAGACCAGGGGAGTCAG | 47 |
| 8 | AVSRGDRMEF | 20 | GCCGTTAGCAGAGGAGACCGGATGGAATTC | 48 |
| 9 | QMGRGDMGIK | 49 | CAGATGGGTAGAGGAGACATGGGGATTAAG | 50 |
| 10 | EYRRGDKADI | 51 | GAGTATCGGAGAGGAGACAAGGCGGATATT | 52 |
| 11 | ESRRGDKEPL | 53 | GAGAGTCGGAGAGGAGACAAGGAGCCGCTG | 54 |
| 12 | AHMRGDLGGT | 55 | GCACACATGAGAGGAGACCTAGGCGGCACG | 56 |
| 13 | VWQRGDKMDM | 57 | GTGTGGCAAAGAGGAGACAAAATGGACATG | 58 |
| 14 | SIGRGDTGHM | 59 | TCTATTGGGAGAGGAGACACGGGTCATATG | 60 |
| 15 | NIARGDAGQY | 61 | AATATTGCTAGAGGAGACGCTGGTCAGTAT | 62 |
| 16 | AVARGDQGLI | 5 | GCAGTAGCAAGAGGAGACCAAGGCTTAATC | 63 |
| 17 | SVSRGDQGLH | 64 | TCGGTCTCGAGAGGAGACCAAGGATTGCAC | 65 |
| 18 | EYRRGDKADI | 51 | GAATACAGGAGAGGAGACAAAGCAGACATC | 66 |
| 19 | AHMRGDLGGT | 55 | GCGCATATGAGAGGAGACTTGGGGGGGACT | 67 |
| 20 | QIGRGDITHG | 68 | CAGATTGGTAGAGGAGACATTACTCATGGG | 69 |
| 21 | EVRRGDLHGT | 70 | GAAGTCAGAAGAGGAGACTTGCACGGGACA | 71 |
| 22 | SVSRGDVHTM | 72 | AGTGTCTCAAGAGGAGACGTGCACACGATG | 73 |
| 23 | MVTRGDLGTR | 74 | ATGGTGACTAGAGGAGACCTTGGTACGCGG | 75 |
| 24 | NGGRGDTTHF | 76 | AACGGCGGGAGAGGAGACACGACGCACTTC | 77 |
| 25 | TMGRGDMNSL | 78 | ACGATGGGGAGAGGAGACATGAATTCGCTT | 79 |
| 26 | AISRGDQGLS | 80 | GCGATTAGTAGAGGAGACCAGGGTCTTTCT | 81 |
| 27 | NDARGDKSTY | 82 | AACGACGCAAGAGGAGACAAATCCACATAC | 83 |
| 28 | VGLRGDLTGS | 84 | GTGGGGCTGAGAGGAGACTTGACGGGTTCG | 85 |
| 29 | EMRRGDLGTS | 86 | GAGATGAGGAGAGGAGACCTGGGGACGAGT | 87 |
| 30 | AMSRGDMGMA | 88 | GCGATGAGTAGAGGAGACATGGGGATGGCG | 89 |
| 31 | ATGRGDLGQA | 4 | GCAACGGGCAGAGGAGACTTAGGCCAAGCA | 90 |
| 32 | NVARGDQVNY | 91 | AACGTAGCAAGAGGAGACCAAGTTAACTAC | 92 |
| 33 | SIGRGDTGIM | 59 | AGCATCGGAAGAGGAGACACCGGCCACATG | 93 |
| 34 | ASVRGDLSGS | 94 | GCATCCGTAAGAGGAGACCTATCAGGCTCA | 95 |
| 35 | SAARGDTERL | 96 | AGCGCCGCGAGAGGAGACACTGAACGGCTA | 97 |
| 36 | AMSRGDMGMA | 88 | GCCATGTCAAGAGGAGACATGGGTATGGCT | 98 |
| 37 | SPSRGDQGRT | 21 | AGTCCATCGAGAGGAGACCAAGGACGCACT | 99 |
| 38 | VPGRGDLNTM | 100 | GTGCCTGGGAGAGGAGACCTTAATACTATG | 101 |
| 39 | GPGRGDQTTL | 2 | GGTCCTGGGAGAGGAGACCAAACGACCCTT | 102 |
| 40 | TSVRGDHGTL | 103 | ACATCGGTCAGAGGAGACCACGGAACATTG | 104 |
| 41 | TPSRGDLGQT | 105 | ACGCCTTCGAGAGGAGACCTTGGGCAGACT | 106 |
| 42 | AGHRGDTGVI | 107 | GCTGGACACAGAGGAGACACAGGAGTCATC | 108 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 43 | APARGDQGSM | 109 | GCGCCGGCGAGAGGAGACCAGGGTAGTATG | 110 |
| 44 | MSLRGDLNGS | 111 | ATGTCGTTGAGAGGAGACTTGAATGGGTCG | 112 |
| 45 | EAKRGDVHSI | 113 | GAGGCTAAGAGAGGAGACGTGCATTCTATT | 114 |
| 46 | SAQRGDVQAV | 115 | AGTGCTCAGAGAGGAGACGTGCAGGCGGTG | 116 |
| 47 | STARGDQGDR | 117 | AGTACGGCGAGAGGAGACCAGGGGGATAGG | 118 |
| 48 | QISRGDLGIN | 119 | CAGATTAGTAGAGGAGACCTGGGGATTAAT | 120 |
| 49 | TFTRGDMTMN | 121 | ACGTTCACAAGAGGAGACATGACGATGAAC | 122 |
| 50 | QEGRGDLNMR | 123 | CAAGAAGGAAGAGGAGACCTGAACATGAGG | 124 |
| 51 | AHARGDTSSL | 125 | GCACACGCAAGAGGAGACACCAGCTCCCTG | 126 |
| 52 | TNGRGDAGTL | 127 | ACGAATGGGAGAGGAGACGCTGGGACTCTG | 128 |
| 53 | AFGRGDQGQL | 129 | GCTTTCGGCAGAGGAGACCAAGGGCAACTA | 130 |
| 54 | ADGRGDRSSL | 131 | GCTGATGGGAGAGGAGACCGTTCGTCTCTG | 132 |
| 55 | DGRRGDGHSL | 133 | GACGGACGCAGAGGAGACGGACACAGCCTT | 134 |
| 56 | EKLRGDLHST | 135 | GAGAAGTTGAGAGGAGACCTTCATTCGACT | 136 |
| 57 | EARRGDASAM | 137 | GAGGCGCGTAGAGGAGACGCTTCGGCGATG | 138 |
| 58 | MGTRGDKMDF | 139 | ATGGGAACGAGAGGAGACAAAATGGACTTC | 140 |
| 59 | STSRGDRESY | 141 | TCGACTTCGAGAGGAGACCGGGAGTCGTAT | 142 |
| 60 | CQPRGDTTRC | 143 | TGTCAGCCGAGAGGAGACACGACTCGGTGT | 144 |
| 61 | MHTRGDKMDF | 145 | ATGCACACGAGAGGAGACAAAATGGACTTC | 146 |
| 62 | YSARGDTSGL | 147 | TACAGTGCCAGAGGAGACACAAGTGGCCTG | 148 |
| 63 | STMRGDHEKL | 149 | TCGACGATGAGAGGAGACCATGAGAAGTTG | 150 |
| 64 | TQMRGDGVTL | 151 | ACCCAAATGAGAGGAGACGGGGTCACACTA | 152 |
| 65 | TTRRGDMGDN | 153 | ACTACTCGTAGAGGAGACATGGGGGATAAT | 154 |
| 66 | ANGRGDRLEL | 155 | GCGAATGGTAGAGGAGACAGGCTGGAGTTG | 156 |
| 67 | AVSRGDRMEF | 20 | GCTGTGTCTAGAGGAGACAGGATGGAGTTT | 157 |
| 68 | ENQRGDLSGR | 158 | GAGAATCAGAGAGGAGACTTGTCGGGTCGG | 159 |
| 69 | STGRGDLGQA | 160 | TCGACTGGTAGAGGAGACCTGGGGCAGGCT | 161 |
| 70 | MHTRGDKMDF | 145 | ATGCATACTAGAGGAGACAAGATGGATTTT | 162 |
| 71 | SSARGDYSEV | 163 | AGTAGTGCGAGAGGAGACTATAGTGAGGTG | 164 |
| 72 | AFGRGDQGQL | 129 | GCGTTTGGGAGAGGAGACCAGGGTCAGCTT | 165 |
| 73 | STARGDAATY | 166 | AGTACGGCGAGAGGAGACGCGGCGACTTAT | 167 |
| 74 | VNTRGDTQKL | 168 | GTCAACACAAGAGGAGACACTCAAAAACTT | 169 |
| 75 | AMSRGDHASL | 170 | GCGATGAGTAGAGGAGACCATGCGTCGCTT | 171 |
| 76 | QAARGDVNKL | 172 | CAGGCTGCTAGAGGAGACGTTAATAAGCTG | 173 |
| 77 | RGTRGDTVEL | 174 | AGGGGTACGAGAGGAGACACGGTTGAGTTG | 175 |
| 78 | TTRRGDMGDN | 153 | ACCACCCGGAGAGGAGACATGGGAGACAAC | 176 |
| 79 | ASTRGDYAGV | 177 | GCTAGTACGAGAGGAGACTATGCGGGTGTT | 178 |
| 80 | DDRRGDKLPL | 179 | GACGACAGGAGAGGAGACAAACTGCCCCTT | 180 |
| 81 | SGSRGDLNAV | 181 | TCGGGGTCGAGAGGAGACCTGAATGCGGTG | 182 |
| 82 | EYRRGDQQIQ | 183 | GAGTATAGGAGAGGAGACCAGCAGATTCAG | 184 |
| 83 | TYVRGDRAEV | 185 | ACGTACGTCAGAGGAGACAGAGCAGAAGTG | 186 |
| 84 | QSLRGDLNGS | 187 | CAATCACTAAGAGGAGACTTGAACGGATCC | 188 |
| 85 | EGRRGDTTSL | 189 | GAGGGTCGGAGAGGAGACACGACGTCGTTG | 190 |
| 86 | AENRGDRSSL | 191 | GCGGAGAATAGAGGAGACCGGTCGAGTTTG | 192 |
| 87 | VAGRGDRSEL | 193 | GTGGCTGGGAGAGGAGACCGTAGTGAGCTG | 194 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 88 | DPARGDIGAR | 195 | GATCCGGCGAGAGGAGACATTGGTGCGCGT | 196 |
| 89 | EMRRGDLGTS | 86 | GAAATGCGCAGAGGAGACTTGGGAACTTCA | 197 |
| 90 | VWQRGDKMDM | 57 | GTTTGGCAGAGAGGAGACAAGATGGATATG | 198 |
| 91 | VIGRGDKALQ | 199 | GTGATTGGGAGAGGAGACAAGGCGCTTCAG | 200 |
| 92 | SFERGDKNSL | 201 | AGCTTCGAAAGAGGAGACAAAAACTCTCTT | 202 |
| 93 | QIARGDIASV | 203 | CAGATTGCTAGAGGAGACATTGCTAGTGTG | 204 |
| 94 | TISRGDLGGA | 205 | ACGATTAGTAGAGGAGACCTGGGTGGGGCT | 206 |
| 95 | AMIRGDMTHS | 207 | GCGATGATTAGAGGAGACATGACGCATAGT | 208 |
| 96 | TSVRGDHGTL | 103 | ACGAGTGTGAGAGGAGACCATGGGACGCTG | 209 |
| 97 | TMRRGDLNDS | 210 | ACGATGCGGAGAGGAGACCTGAATGATAGT | 211 |
| 98 | AYSRGDLGNH | 212 | GCCTACTCCAGAGGAGACCTAGGCAACCAC | 213 |
| 99 | EERRGDTHRL | 214 | GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGCTG | 215 |
| 100 | SQLRGDAGTI | 216 | TCACAACTAAGAGGAGACGCGGGGACAATC | 217 |
| 101 | AMVRGDAHQL | 218 | GCGATGGTGAGAGGAGACGCGCATCAGCTG | 219 |
| 102 | TTSRGDLNSV | 220 | ACGACTAGTAGAGGAGACTTGAATTCGGTT | 221 |
| 103 | WEQRGDMIGK | 222 | TGGGAGCAGAGAGGAGACATGATTGGGAAG | 223 |
| 104 | YTTRGDLQSN | 224 | TACACCACCAGAGGAGACCTCCAATCAAAC | 225 |
| 105 | MSQRGDLSHQ | 226 | ATGTCGCAGAGAGGAGACCTTTCGCATCAG | 227 |
| 106 | ASTRGDTTHM | 228 | GCGAGTACTAGAGGAGACACGACGCATATG | 229 |
| 107 | SDTRGDTHRL | 230 | TCAGACACCAGAGGAGACACCCACAGACTG | 231 |
| 108 | TLGRGDQYTS | 232 | ACGCTGGGTAGAGGAGACCAGTATACGAGT | 233 |
| 109 | SYARGDVREV | 234 | TCGTATGCGAGAGGAGACGTTAGGGAGGTT | 235 |
| 110 | ETRRGDLSQN | 236 | GAGACTCGTAGAGGAGACCTGAGTCAGAAT | 237 |
| 111 | TIGRGDLMDK | 238 | ACAATCGGGAGAGGAGACCTGATGGACAAA | 239 |
| 112 | SYTRGDLSQN | 240 | AGTTACACCAGAGGAGACCTTAGCCAAAAC | 241 |
| 113 | SKLRGDASEI | 242 | TCGAAGCTGAGAGGAGACGCTAGTGAGATT | 243 |
| 114 | SMARGDKAEI | 244 | TCGATGGCGAGAGGAGACAAGGCGGAGATT | 245 |
| 115 | GAVRGDHSSL | 246 | GGAGCCGTCAGAGGAGACCACTCATCGTTA | 247 |
| 116 | METRGDMSNR | 248 | ATGGAGACGAGAGGAGACATGAGTAATCGT | 249 |
| 117 | AYTRGDKDAL | 250 | GCGTACACAAGAGGAGACAAAGACGCACTA | 251 |
| 118 | ENRRGDITQS | 252 | GAGAATCGGAGAGGAGACATTACGCAGTCG | 253 |
| 119 | STGRGDLGQA | 160 | TCCACGGGCAGAGGAGACCTTGGACAAGCA | 254 |
| 120 | GAVRGDHSSL | 246 | GGTGCTGTTAGAGGAGACCATAGTAGTCTT | 255 |
| 121 | SQLRGDAGTI | 216 | TCTCAGCTTAGAGGAGACGCTGGTACGATT | 256 |
| 122 | MLLRGDKNDF | 257 | ATGCTCCTAAGAGGAGACAAAAACGACTTC | 258 |
| 123 | KVQRGDASDW | 259 | AAGGTGCAGAGAGGAGACGCGAGTGATTGG | 260 |
| 124 | AFTRGDMQTA | 261 | GCGTTTACGAGAGGAGACATGCAGACTGCT | 262 |
| 125 | QPKRGDVQAQ | 263 | CAGCCTAAGAGAGGAGACGTTCAGGCTCAG | 264 |
| 126 | ASLRGDMGVS | 265 | GCTAGTCTGAGAGGAGACATGGGGGTGAGT | 266 |
| 127 | AYSRGDKESF | 267 | GCCTACTCCAGAGGAGACAAAGAATCGTTC | 268 |
| 128 | RFQRGDLTDA | 269 | CGGTTCCAAAGAGGAGACTTGACCGACGCT | 270 |
| 129 | SDARGDTMKL | 271 | TCTGATGCTAGAGGAGACACGATGAAGCTG | 272 |
| 130 | SGARGDTVSL | 273 | AGCGGGGCCAGAGGAGACACAGTAAGTCTC | 274 |
| 131 | DEKRGDQKHL | 275 | GATGAGAAGAGAGGAGACCAGAAGCATCTT | 276 |
| 132 | NGVRGDVQNF | 277 | AACGGAGTAAGAGGAGACGTCCAAAACTTC | 278 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 133 | MTLRGDLGGS | 279 | ATGACGTTGAGAGGAGACCTGGGTGGGTCG | 280 |
| 134 | EARRGDASAM | 137 | GAGGCTAGGAGAGGAGACGCTAGTGCGATG | 281 |
| 135 | GQERGDLGTR | 282 | GGGCAGGAGAGAGGAGACCTGGGGACTCGG | 283 |
| 136 | RGARGDLVDA | 284 | AGAGGCGCCAGAGGAGACCTAGTCGACGCT | 285 |
| 137 | QYSRGDHTDL | 286 | CAATACTCCAGAGGAGACCACACCGACCTT | 287 |
| 138 | MNTRGDVHAM | 288 | ATGAACACCAGAGGAGACGTGCACGCTATG | 289 |
| 139 | TVRRGDLATE | 290 | ACGGTACGGAGAGGAGACCTAGCAACCGAA | 291 |
| 140 | NIARGDAGQY | 61 | AATATTGCGAGAGGAGACGCTGGTCAGTAT | 292 |
| 141 | SVGRGDKADI | 293 | TCTGTTGGGAGAGGAGACAAGGCTGATATT | 294 |
| 142 | SHNRGDTGTM | 295 | TCACACAACAGAGGAGACACCGGAACCATG | 296 |
| 143 | TNTRGDKESV | 297 | ACGAACACCAGAGGAGACAAAGAATCAGTA | 298 |
| 144 | SIGRGDQYTI | 299 | TCGATTGGTAGAGGAGACCAGTATACGATT | 300 |
| 145 | QTSRGDAGSW | 301 | CAGACGAGTAGAGGAGACGCGGGGTCTTGG | 302 |
| 146 | AENRGDRSSL | 191 | GCTGAAAACAGAGGAGACCGAAGCAGCCTA | 303 |
| 147 | AISRGDVQSL | 304 | GCGATTTCGAGAGGAGACGTTCAGTCGTTG | 305 |
| 148 | NAQRGDHGQL | 306 | AACGCACAAAGAGGAGACCACGGGCAACTG | 307 |
| 149 | LNSRGDQASV | 308 | CTCAACTCGAGAGGAGACCAAGCCTCCGTC | 309 |
| 150 | SGNRGDIGTF | 310 | TCGGGAAACAGAGGAGACATAGGTACATTC | 311 |
| 151 | NVGRGDQATM | 312 | AACGTGGGAAGAGGAGACCAAGCCACAATG | 313 |
| 152 | SYSRGDTGRL | 314 | TCGTATTCTAGAGGAGACACTGGTCGGCTT | 315 |
| 153 | SHLRGDQALA | 316 | AGCCACTTAAGAGGAGACCAAGCGTTGGCC | 317 |
| 154 | YFARGDMTMN | 318 | TACTTCGCCAGAGGAGACATGACTATGAAC | 319 |
| 155 | QSQRGDLNPM | 320 | CAGTCGCAGAGAGGAGACCTTAATCCTATG | 321 |
| 156 | EQRRGDKTEL | 322 | GAGCAGAGGAGAGGAGACAAGACGGAGCTG | 323 |
| 157 | VSARGDAGQL | 324 | GTGTCTGCGAGAGGAGACGCGGGTCAGTTG | 325 |
| 158 | SPSRGDQGRT | 21 | TCTCCGTCTAGAGGAGACCAGGGGCCGACG | 326 |
| 159 | EASRGDKGTH | 327 | GAGGCTAGTAGAGGAGACAAGGGTACGCAT | 328 |
| 160 | LSTRGDMGMQ | 329 | CTGTCTACTAGAGGAGACATGGGTATGCAG | 332 |
| 161 | ANMRGDQLIIT | 333 | GCGAATATGAGAGGAGACCAGCTGCATACT | 334 |
| 162 | ENTRGDLTHA | 335 | GAGAATACGAGAGGAGACCTTACTCATGCG | 336 |
| 163 | IERRGDSAGL | 337 | ATTGAGCGTAGAGGAGACTCGGCGGGGCTG | 338 |
| 164 | SAMRGDGVSL | 339 | AGTGCGATGAGAGGAGACGGAGTGAGCTTG | 340 |
| 165 | TVSRGDQGLS | 341 | ACGGTTTCGAGAGGAGACCAGGGGTTGTCT | 342 |
| 166 | SIVRGDLNST | 343 | TCGATCGTCAGAGGAGACCTGAACTCCACG | 344 |
| 167 | DVARGDKTNF | 345 | GACGTAGCGAGAGGAGACAAAACAAACTTC | 346 |
| 168 | WSQRGDLSGT | 347 | TGGAGCCAAAGAGGAGACCTGAGTGGAACC | 348 |
| 169 | LNQRGDVSNM | 349 | CTGAACCAAAGAGGAGACGTTTCCAACATG | 350 |
| 170 | AALRGDLSGS | 351 | GCCGCCCTAAGAGGAGACCTATCCGGCTCA | 352 |
| 171 | RVARGDITDI | 353 | AGGGTTGCGAGAGGAGACATTACGGATATT | 354 |
| 172 | STNRGDLNQV | 355 | TCGACGAACAGAGGAGACCTCAACCAAGTT | 356 |
| 173 | DSRRGDSVSL | 357 | GATTCGCGGAGAGGAGACTCTGTGAGTCTT | 358 |
| 174 | SVGRGDQSQM | 359 | AGTGTTGGGAGAGGAGACCAGTCTCAGATG | 360 |
| 175 | SNTRGDTNSL | 361 | TCCAACACGAGAGGAGACACAAACTCCCTA | 362 |
| 176 | DNRRGDGTTM | 363 | GATAATCGGAGAGGAGACGGTACGACTATG | 364 |
| 177 | TPSRGDQGRL | 365 | ACGCCTTCGAGAGGAGACCAAGGAAGACTA | 366 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 178 | NYSRGDSMTL | 367 | AACTACAGCAGAGGAGACTCAATGACGCTT | 368 |
| 179 | MQARGDAGTL | 369 | ATGCAGGCTAGAGGAGACGCTGGGACTCTG | 370 |
| 180 | TQSRGDLSGA | 371 | ACGCAGTCGAGAGGAGACTTGTCTGGTGCG | 372 |
| 181 | FAQRGDLTGV | 373 | TTTGCGCAGAGAGGAGACTTGACTGGGGTT | 374 |
| 182 | APVRGDLIGT | 375 | GCGCCCGGTGAGAGGAGACCTGATTGGTACG | 376 |
| 183 | SNTRGDTNSL | 361 | TCGAATACTAGAGGAGACACGAATAGTTTG | 377 |
| 184 | EPKRGDLSNT | 378 | GAGCCGAAGAGAGGAGACTTGAGTAATACG | 379 |
| 185 | SVGRGDTYPL | 380 | TCGGTTGGGAGAGGAGACACTTATCCTCTG | 381 |
| 186 | QTARGDMTGH | 382 | CAAACAGCCAGAGGAGACATGACTGGCCAC | 383 |
| 187 | AGARGDLENR | 384 | GCTGGTGCGAGAGGAGACTTGGAGAATCGG | 385 |
| 188 | MSTRGDLNNV | 386 | ATGAGCACTAGAGGAGACCTAAACAACGTC | 387 |
| 189 | EKQRGDLNSM | 388 | GAAAAACAAAGAGGAGACCTCAACAGCATG | 389 |
| 190 | IKTRGDLGHE | 390 | ATTAAGACGAGAGGAGACCTTGGTCATGAG | 391 |
| 191 | IGRRGDMELS | 392 | ATTGGGAGGAGAGGAGACATGGAGTTGTCT | 393 |
| 192 | TTGRGDLKEV | 394 | ACTACGGGTAGAGGAGACTTGAAGGAGGTT | 395 |
| 193 | TDKRGDQNTV | 396 | ACGGATAAGAGAGGAGACCAGAATACTGTG | 397 |
| 194 | SNVRGDREAV | 398 | TCGAATGTTAGAGGAGACCGGGAGGCGGTT | 399 |
| 195 | SVGRGDQSQM | 359 | TCAGTCGGCAGAGGAGACCAAAGTCAAATG | 400 |
| 196 | YANRGDLSHQ | 401 | TACGCCAACAGAGGAGACCTGAGTCACCAA | 402 |
| 197 | QISRGDLGIN | 119 | CAAATATCGAGAGGAGACCTAGGTATCAAC | 403 |
| 198 | SMMRGDAGQL | 404 | TCGATGATGAGAGGAGACGCTGGGCAGTTG | 405 |
| 199 | EARRGDSQGL | 406 | GAGGCGCGGAGAGGAGACAGTCAGGGGCTG | 407 |
| 200 | MPTRGDQTKF | 408 | ATGCCCACAAGAGGAGACCAAACCAAATTC | 409 |

【表５】

表 5. 非ヒト霊長類強化 MyoAAV(cMyoAAV)カプシド変異体

| ランク | N 量体インサート | 配列番号 | コード配列 | 配列番号 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | SNSRGDYNSL | 28 | TCAAACTCCAGAGGAGACTACAACTCCTTG | 410 |
| 2 | SSARGDRDYL | 411 | TCGTCGGCTAGAGGAGACCGTGATTATCTG | 412 |
| 3 | STVRGDYTSV | 413 | AGCACGGTCAGAGGAGACTACACGTCCGTG | 414 |
| 4 | QERRGDYTSM | 30 | CAGGAGCGGAGAGGAGACTATACGAGTATG | 415 |
| 5 | NGGRGDTTHF | 76 | AACGGCGGGAGAGGAGACACGACGCACTTC | 416 |
| 6 | ASTRGDHGVL | 31 | GCGAGTACTAGAGGAGACCATGGTGTGTTG | 417 |
| 7 | SYQRGDQHNM | 418 | TCGTACCAAAGAGGAGACCAACACAACATG | 419 |
| 8 | NDTRGDRSYM | 420 | AACGACACAAGAGGAGACCGATCTTACATG | 421 |
| 9 | ENRRGDFNNT | 32 | GAAAACAGGAGAGGAGACTTCAACAACACT | 422 |
| 10 | SGSRGDLSGH | 423 | TCCGGCTCGAGAGGAGACTTGTCAGGACAC | 424 |
| 11 | ENRRGDITQS | 252 | GAGAATCGGAGAGGAGACATTACGCAGTCG | 425 |
| 12 | DKPRGDRQLL | 426 | GATAAGCCGAGAGGAGACCGGCAGTTGTTG | 427 |
| 13 | EERRGDTHRL | 214 | GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGCTG | 428 |
| 14 | AMIRGDMTHS | 207 | GCGATGATTAGAGGAGACATGACGCATAGT | 429 |
| 15 | SNNRGDYTTM | 430 | TCAAACAACAGAGGAGACTACACGACAATG | 431 |
| 16 | QGGRGDLSTL | 432 | CAGGGTGGGAGAGGAGACTTGTCGACGTTG | 433 |
| 17 | SKDRGDYQTL | 434 | TCGAAGGATAGAGGAGACTATCAGACTCTT | 435 |
| 18 | ATARGDQMKL | 436 | GCTACGGCGAGAGGAGACCAGATGAAGCTG | 437 |
| 19 | QHMRGDLTGA | 438 | CAGCATATGAGAGGAGACTTGACTGGTGCG | 439 |
| 20 | DGTRGDLGRY | 440 | GACGGCACGAGAGGAGACCTTGGAAGGTAC | 441 |
| 21 | DSRRGDYANL | 442 | GACTCTCGGAGAGGAGACTACGCAAACCTC | 443 |
| 22 | SAMRGDYTST | 444 | TCGGCGATGAGAGGAGACTATACTAGTACT | 445 |
| 23 | ENRRGDAQLL | 446 | GAGAATCGGAGAGGAGACGCGCAGCTGCTG | 447 |
| 24 | TTLRGDHSQL | 448 | ACGACGCTGAGAGGAGACCATAGTCAGCTT | 449 |
| 25 | DAGRGDMHRM | 450 | GACGCAGGGAGAGGAGACATGCACCGTATG | 451 |
| 26 | QHTRGDLSST | 452 | CAGCATACGAGAGGAGACTTGAGTTCTACT | 453 |
| 27 | QVYRGDRESV | 454 | CAAGTTTACAGAGGAGACAGGGAATCCGTG | 455 |
| 28 | SSQRGDLAGT | 456 | TCGAGTCAGAGAGGAGACTTGGCTGGTACT | 457 |
| 29 | TDVRGDRGTF | 458 | ACGGATGTTAGAGGAGACAGGGGGACGTTT | 459 |
| 30 | SSVRGDREVT | 460 | TCGTCTGTGAGAGGAGACCGGGAGGTGACG | 461 |
| 31 | ENRRGDLTNA | 462 | GAGAATAGGAGAGGAGACCTGACTAATGCG | 463 |
| 32 | SYARGDVHSI | 464 | TCGTATGCGAGAGGAGACGTTCATTCTATT | 465 |
| 33 | DSSRGDLNLR | 466 | GACAGCTCAAGAGGAGACCTCAACCTCCGG | 467 |
| 34 | SNARGDYSNM | 468 | TCGAACGCGAGAGGAGACTACTCAAACATG | 469 |
| 35 | SSVRGDHSVL | 470 | TCGTCTGTGAGAGGAGACCATTCGGTGCTT | 471 |
| 36 | SAFRGDLHAT | 472 | TCGGCTTTTAGAGGAGACCTGCATGCTACT | 473 |
| 37 | SAMRGDYTST | 444 | TCCGCCATGAGAGGAGACTACACAAGCACG | 474 |
| 38 | NAQRGDHGQL | 306 | AACGCACAAAGAGGAGACCACGGGCAACTG | 475 |
| 39 | SDRRGDQLLY | 476 | TCGGATCGGAGAGGAGACCAGCTGTTGTAT | 477 |
| 40 | SGVRGDRLAV | 478 | AGCGGCGTAAGAGGAGACCGCCTAGCCGTA | 479 |
| 41 | ASLRGDLSST | 480 | GCCAGCCTAAGAGGAGACCTCAGCTCAACG | 481 |
| 42 | TNGRGDLHGM | 482 | ACGAACGGAAGAGGAGACCTTCACGGAATG | 483 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 43 | TNTRGDHGML | 484 | ACGAATACGAGAGGAGACCATGGGATGCTG | 485 |
| 44 | SSARGDRDYL | 411 | AGTTCCGCCAGAGGAGACCGGGACTACCTC | 486 |
| 45 | EDRRGDLLRT | 487 | GAGGATCGGAGAGGAGACCTTTTGAGGACT | 488 |
| 46 | SSLRGDLLHS | 489 | TCGTCGCTGAGAGGAGACCTGTTGCATTCT | 490 |
| 47 | ENRRGDLTNA | 462 | GAAAACCGTAGAGGAGACCTCACGAACGCT | 491 |
| 48 | DGRRGDRESI | 492 | GACGGCAGGAGAGGAGACCGGGAATCGATC | 493 |
| 49 | TGTRGDTMTW | 494 | ACTGGAACCAGAGGAGACACAATGACATGG | 495 |
| 50 | STVRGDYTSV | 413 | TCGACTGTTAGAGGAGACTATACTTCTGTT | 496 |
| 51 | SATRGDHNVL | 497 | TCGGCAACGAGAGGAGACCACAACGTACTG | 498 |
| 52 | TDRRGDSGTL | 499 | ACGGATCGGAGAGGAGACAGTGGTACTCTG | 500 |
| 53 | TSARGDLIHT | 501 | ACGAGTGCTAGAGGAGACCTGATTCATACG | 502 |
| 54 | SGVRGDRLAV | 478 | AGTGGGGTGAGAGGAGACCGGCTGGCGGTG | 503 |
| 55 | AVERGDRLML | 504 | GCGGTTGAGAGAGGAGACCGTCTTATGCTG | 505 |
| 56 | DRSRGDTHVL | 506 | GACAGGTCGAGAGGAGACACGCACGTACTC | 507 |
| 57 | ESTRGDLRVV | 508 | GAGTCGACGAGAGGAGACCTTCGTGTTGTG | 509 |
| 58 | TTIRGDYREL | 510 | ACGACGATTAGAGGAGACTATCGTGAGTTG | 511 |
| 59 | TFIRGDLAGA | 512 | ACGTTCATCAGAGGAGACCTGGCAGGTGCG | 513 |
| 60 | MTSRGDLTTY | 514 | ATGACGAGCAGAGGAGACTTGACAACATAC | 515 |
| 61 | ADRRGDQLYS | 516 | GCGGATCGTAGAGGAGACCAGCTTTATTCG | 517 |
| 62 | AHMRGDLGGT | 55 | GCACACATGAGAGGAGACCTAGGCGGCACG | 518 |
| 63 | GYVRGDLGQH | 519 | GGGTACGTCAGAGGAGACCTGGGGCAACAC | 520 |
| 64 | DASRGDRTSL | 521 | GATGCGAGTAGAGGAGACAGGACTAGTTTG | 522 |
| 65 | TEVRGDRSQV | 523 | ACGGAGGTGAGAGGAGACAGGTCGCAGGTT | 524 |
| 66 | SHLRGDQALA | 316 | TCGCATCTGAGAGGAGACCAGGCTCTTGCG | 525 |
| 67 | SEVRGDRLSI | 526 | TCGGAGGTGAGAGGAGACCGGTTGAGTATT | 527 |
| 68 | SAARGDTERL | 96 | AGCGCCGCGAGAGGAGACACTGAACGGCTA | 528 |
| 69 | SDRRGDLSGA | 529 | TCAGACCGTAGAGGAGACCTGTCGGGCGCT | 530 |
| 70 | SVTRGDRVVI | 531 | AGCGTCACAAGAGGAGACAGAGTAGTCATC | 532 |
| 71 | SEGRGDRMAL | 533 | TCGGAGGGGAGAGGAGACAGGATGGCTCTT | 534 |
| 72 | SSTRGDHLSL | 535 | TCGTCTACTAGAGGAGACCATCTTTCGCTG | 536 |
| 73 | AMIRGDMTHS | 207 | GCTATGATCAGAGGAGACATGACCCACTCC | 537 |
| 74 | SSTRGDQIYV | 538 | TCGTCGACGAGAGGAGACCAGATTTATGTG | 539 |
| 75 | EERRGDTHRL | 214 | GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGTTG | 540 |
| 76 | SNSRGDYNSL | 28 | TCGAATTCGAGAGGAGACTATAATAGTCTT | 541 |
| 77 | SAQRDRMGSP | 542 | TCCGCACAAAGGGATCGTATGGGTTCTCCG | 543 |
| 78 | TGTRGDIATF | 544 | ACGGGTACGAGAGGAGACATTGCGACTTTT | 545 |
| 79 | SMQRGDLLST | 546 | TCGATGCAGAGAGGAGACCTGCTTTCTACT | 547 |
| 80 | EDVRGDRSKL | 548 | GAGGATGTGAGAGGAGACAGGAGTAAGCTT | 549 |
| 81 | AHMRGDLGGT | 55 | GCGCATATGAGAGGAGACTTGGGGGGGACT | 550 |
| 82 | TSVRGDQSQY | 551 | ACGAGTGTGAGAGGAGACCAGAGTCAGTAT | 552 |
| 83 | ADRRGDTGLF | 553 | GCGGATCGGAGAGGAGACACGGGGTTGTTT | 554 |
| 84 | NTYRGDRDSL | 555 | AACACTTACAGAGGAGACCGAGACAGCCTG | 556 |
| 85 | TDVRGDRGTF | 458 | ACGGATGTTAGAGGAGACCGGGGGACGTTT | 557 |
| 86 | SRGRGDLNDL | 558 | TCTCGTGGGAGAGGAGACCTGAATGATTTG | 559 |
| 87 | SNVRGDREAV | 398 | AGCAACGTAAGAGGAGACAGGGAAGCCGTC | 560 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 88 | MDRRGDASIL | 561 | ATGGACAGGAGAGGAGACGCCTCCATACTG | 562 |
| 89 | SIWRGDRTEV | 563 | TCGATATGGAGAGGAGACCGTACAGAAGTC | 564 |
| 90 | NSQRGDYSGM | 565 | AACTCACAAAGAGGAGACTACAGTGGAATG | 566 |
| 91 | SSVRGDIGGI | 567 | TCTAGCGTAAGAGGAGACATCGGGGGGATC | 568 |
| 92 | ENQRGDLSGR | 158 | GAGAATCAGAGAGGAGACTTGTCGGGTCGG | 569 |
| 93 | EIRRGDLLAQ | 570 | GAGATTCGGAGAGGAGACCTTCTGGCTCAG | 571 |
| 94 | SNIRGDHAVM | 572 | TCGAACATCAGAGGAGACCACGCAGTCATG | 573 |
| 95 | LDTRGDRSQV | 574 | CTGGATACGAGAGGAGACCGGAGTCAGGTT | 575 |
| 96 | ANTRGDHQNF | 576 | GCGAATACGAGAGGAGACCATCAGAATTTT | 577 |
| 97 | QVYRGDRESV | 454 | CAGGTGTATAGAGGAGACCGTGAGTCTGTT | 578 |
| 98 | TSVRGDLSMN | 579 | ACGTCGGTGAGAGGAGACCTTTCGATGAAT | 580 |
| 99 | ASTRGDHGVL | 31 | GCCTCAACGAGAGGAGACCACGGAGTTCTC | 581 |
| 100 | TTTRGDYLNT | 582 | ACGACGACGAGAGGAGACTATCTTAATACG | 583 |
| 101 | AERRGDIKEY | 584 | GCGGAGAGGAGAGGAGACATTAAGGAGTAT | 585 |
| 102 | SHARGDLGST | 586 | TCGCATGCTAGAGGAGACTTGGGTTCGACT | 587 |
| 103 | TSQRGDYVSL | 588 | ACGTCTCAGAGAGGAGACTATGTTTCTCTT | 589 |
| 104 | GPGRGDQTTL | 2 | GGGCCGGGTAGAGGAGACCAGACTACGTTG | 590 |
| 105 | VNVRGDRGEV | 591 | GTGAATGTGAGAGGAGACCGTGGTGAGGTG | 592 |
| 106 | SYRRGDHDQL | 593 | TCGTATCGTAGAGGAGACCATGATCAGCTT | 594 |
| 107 | SGTRGDRVDL | 595 | AGCGGCACAAGAGGAGACAGGGTAGACCTC | 596 |
| 108 | SHFRGDLHTS | 597 | TCCCACTTCAGAGGAGACTTGCACACGTCC | 598 |
| 109 | SDRRGDLSVP | 599 | TCGGATCGTAGAGGAGACCTTTCGGTGCCT | 600 |
| 110 | SGTRGDTLIL | 601 | AGCGGCACCAGAGGAGACACCCTTATACTC | 602 |
| 111 | ENTRGDLHGK | 603 | GAAAACACCAGAGGAGACCTCCACGGCAAA | 604 |
| 112 | DRARGDTHVL | 605 | GATCGGGCGAGAGGAGACACGCATGTGCTG | 606 |
| 113 | ASGRGDIAGL | 607 | GCGTCTGGTAGAGGAGACATTGCGGGGCTT | 608 |
| 114 | EGRRGDLFQA | 609 | GAGGGTCGTAGAGGAGACCTGTTTCAGGCG | 610 |
| 115 | RSERGDRLEI | 611 | AGATCCGAAAGAGGAGACAGGCTAGAAATC | 612 |
| 116 | AAYRGDAHVL | 613 | GCGGCCTACAGAGGAGACGCACACGTGCTC | 614 |
| 117 | NDSRGDQHRL | 615 | AACGACTCGAGAGGAGACCAACACCGATTG | 616 |
| 118 | SSARGDHSQL | 617 | TCATCGGCAAGAGGAGACCACTCTCAACTG | 618 |
| 119 | TNERGDRLSI | 619 | ACGAATGAGAGAGGAGACCGTCTTTCGATT | 620 |
| 120 | SNSRGDYTSV | 621 | AGCAACTCCAGAGGAGACTACACCAGTGTC | 622 |
| 121 | NVTRGDHTVM | 623 | AACGTCACAAGAGGAGACCACACCGTTATG | 624 |
| 122 | TMVRGDVKGL | 625 | ACGATGGTGAGAGGAGACGTTAAGGGGCTT | 626 |
| 123 | TGTRGDIATF | 544 | ACCGGGACAAGAGGAGACATAGCCACGTTC | 627 |
| 124 | VQLRGDLAST | 628 | GTGCAGCTGAGAGGAGACTTGGCTTCTACT | 629 |
| 125 | MNRRGDYSEQ | 630 | ATGAACCGGAGAGGAGACTACTCGGAACAA | 631 |
| 126 | ANTRGDLSPV | 632 | GCGAATACTAGAGGAGACCTGAGTCCGGTT | 633 |
| 127 | TGMRGDAGSL | 634 | ACGGGTATGAGAGGAGACGCTGGGAGTCTT | 635 |
| 128 | LDRRGDFSSA | 636 | CTAGACCGCAGAGGAGACTTCAGCTCCGCG | 637 |
| 129 | MYHRGDMTSV | 638 | ATGTACCACAGAGGAGACATGACTTCCGTG | 639 |
| 130 | GSMRGDLHST | 640 | GGGTCGATGAGAGGAGACTTGCATTCGACG | 641 |
| 131 | SSSRGDFSSV | 642 | TCGTCGTCCAGAGGAGACTTCAGCTCTGTT | 643 |
| 132 | TGTRGDLHTY | 644 | ACGGGTACGAGAGGAGACTTGCATACTTAT | 645 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 133 | YTQRGDLATV | 646 | TACACCCAAAGAGGAGACCTTGCCACCGTC | 647 |
| 134 | TDVRGDRMYV | 648 | ACGGATGTTAGAGGAGACCGGATGTATGTG | 649 |
| 135 | TSVRGDHGTL | 103 | ACATCGGTCAGAGGAGACCACGGAACATTG | 650 |
| 136 | SNSRGDLSVN | 651 | TCGAACTCCAGAGGAGACCTATCGGTAAAC | 652 |
| 137 | QSGRGDQMTL | 653 | CAGTCTGGGAGAGGAGACCAGATGACGTTG | 654 |
| 138 | MNTRGDLQQS | 655 | ATGAACACCAGAGGAGACTTGCAACAATCG | 656 |
| 139 | AGSRGDLQTV | 657 | GCGGGATCAAGAGGAGACCTACAAACGGTG | 658 |
| 140 | SNMRGDQTYV | 659 | TCGAACATGAGAGGAGACCAAACTTACGTC | 660 |
| 141 | TPSRGDMSNV | 661 | ACGCCAAGTAGAGGAGACATGTCCAACGTC | 662 |
| 142 | NSTRGDLHMA | 663 | AACAGCACAAGAGGAGACCTACACATGGCA | 664 |
| 143 | ANTRGDLSVS | 665 | GCTAACACCAGAGGAGACCTCTCAGTCAGT | 666 |
| 144 | TDRRGDTGLL | 667 | ACCGACCGAAGAGGAGACACCGGCTTACTG | 668 |
| 145 | DGVRGDRATW | 669 | GACGGCGTAAGAGGAGACCGTGCAACATGG | 670 |
| 146 | ENRRGDFNNT | 32 | GAGAATCGTAGAGGAGACTTTAATAATACG | 671 |
| 147 | EPSRGDRMVL | 672 | GAGCCTAGTAGAGGAGACAGGATGGTGTTG | 673 |
| 148 | SGVRGDRIII | 674 | AGCGGCGTTAGAGGAGACCGGATCATAATC | 675 |
| 149 | TSMRGDYTHV | 676 | ACGTCGATGAGAGGAGACTATACGCATGTT | 677 |
| 150 | ASSRGDLTVI | 678 | GCGTCGAGTAGAGGAGACTTGACTGTTATT | 679 |
| 151 | ETRRGDLSLQ | 680 | GAGACGCGTAGAGGAGACCTGTCGCTTCAG | 681 |
| 152 | NNARGDQSMH | 682 | AACAACGCAAGAGGAGACCAATCAATGCAC | 683 |
| 153 | TDRRGDSSAL | 684 | ACGGATAGGAGAGGAGACTCTAGTGCGCTT | 685 |
| 154 | SSQRGDLTGV | 686 | TCAAGCCAAAGAGGAGACTTGACAGGTGTG | 687 |
| 155 | QTARGDVMVH | 688 | CAGACGGCTAGAGGAGACGTTATGGTTCAT | 689 |
| 156 | VSQRGDLNAV | 690 | GTGTCGCAGAGAGGAGACCTGAATGCTGTT | 691 |
| 157 | TMTRGDLAAN | 692 | ACGATGACCAGAGGAGACCTCGCTGCTAAC | 693 |
| 158 | NASRGDHSSL | 694 | AATGCTTCGAGAGGAGACCATTCGTCGTTG | 695 |
| 159 | SNTRGDMGLT | 696 | TCAAACACCAGAGGAGACATGGGCCTCACG | 697 |
| 160 | MYSRGDTHSL | 698 | ATGTATTCGAGAGGAGACACTCATAGTCTG | 699 |
| 161 | ADQRGDRAPL | 700 | GCGGATCAGAGAGGAGACAGGGCTCCGCTT | 701 |
| 162 | QERRGDYTSM | 30 | CAAGAAAGGAGAGGAGACTACACCTCTATG | 702 |
| 163 | SQNRGDLANT | 703 | TCCCAAAACAGAGGAGACCTAGCCAACACG | 704 |
| 164 | EKLRGDLIIST | 135 | GAGAAGTTGAGAGGAGACCTTCATTCGACT | 705 |
| 165 | QGGRGDLSTL | 432 | CAAGGCGGAAGAGGAGACCTGAGTACACTG | 706 |
| 166 | SNRRGDTEMQ | 707 | TCGAATAGGAGAGGAGACACTGAGATGCAG | 708 |
| 167 | SGSRGDVSAL | 709 | TCGGGTAGTAGAGGAGACGTGAGTGCTTTG | 710 |
| 168 | ESTRGDRGTL | 711 | GAGTCGACGAGAGGAGACCGTGGTACGCTG | 712 |
| 169 | SAVRGDAALH | 713 | TCGGCGGTGAGAGGAGACGCGGCGCTTCAT | 714 |
| 170 | LSSRGDVNRL | 715 | CTGAGCAGCAGAGGAGACGTTAACCGCCTT | 716 |
| 171 | EQRRGDIQTI | 717 | GAGCAGAGGAGAGGAGACATTCAGACTATT | 718 |
| 172 | AAYRGDAIIVL | 613 | GCTGCGTATAGAGGAGACGCGCATGTTCTT | 719 |
| 173 | SPVRGDHGAL | 720 | TCGCCGGTGAGAGGAGACCATGGGGCTTTG | 721 |
| 174 | DSRRGDYANL | 442 | GATTCGAGGAGAGGAGACTATGCGAATCTG | 722 |
| 175 | LSRRGDYQEL | 723 | TTGAGTCGGAGAGGAGACTATCAGGAGTTG | 724 |
| 176 | SYARGDVHSI | 464 | TCCTACGCAAGAGGAGACGTCCACTCCATC | 725 |
| 177 | DSRRGDASYH | 726 | GACTCACGCAGAGGAGACGCGTCGTACCAC | 727 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 178 | NHQRGDLSSS | 728 | AACCACCAAAGAGGAGACCTGAGCTCGAGT | 729 |
| 179 | SSTRGDHLSL | 535 | TCCTCAACGAGAGGAGACCACCTGTCTTTG | 730 |
| 180 | SWNRGDISGL | 731 | TCGTGGAACAGAGGAGACATATCTGGCCTT | 732 |
| 181 | TGTRGDLGTM | 733 | ACGGGTACTAGAGGAGACCTGGGGACGATG | 734 |
| 182 | QQLRGDTHTL | 735 | CAGCAGCTTAGAGGAGACACGCATACTCTT | 736 |
| 183 | AGLRGDRDSL | 737 | GCGGGGTTGAGAGGAGACCGTGATTCGCTT | 738 |
| 184 | QVYRGDRDQL | 739 | CAGGTTTATAGAGGAGACCGGGATCAGTTG | 740 |
| 185 | AGVRGDRVTI | 741 | GCAGGAGTAAGAGGAGACAGAGTGACCATC | 742 |
| 186 | NSARGDLLHS | 743 | AACTCAGCCAGAGGAGACCTTCTGCACTCC | 744 |
| 187 | NHSRGDLTGV | 745 | AACCACAGTAGAGGAGACCTGACAGGCGTT | 746 |
| 188 | NAYRGDTSAF | 747 | AACGCTTACAGAGGAGACACATCCGCGTTC | 748 |
| 189 | SANRGDTMHT | 749 | TCGGCTAACAGAGGAGACATAATGCACACG | 750 |
| 190 | QSARGDLVSY | 751 | CAATCCGCCAGAGGAGACCTCGTCAGTTAC | 752 |
| 191 | DSRRGDASYII | 726 | GATAGTAGGAGAGGAGACGCTAGTTATCAT | 753 |
| 192 | SFVRGDVRTL | 754 | TCGTTTGTGAGAGGAGACGTTCGTACGCTG | 755 |
| 193 | SDMRGDRSVY | 756 | AGCGACATGAGAGGAGACCGATCTGTGTAC | 757 |
| 194 | SGIRGDRYPI | 758 | TCCGGAATCAGAGGAGACCGCTACCCAATA | 759 |
| 195 | SNVRGDMAHS | 760 | TCCAACGTCAGAGGAGACATGGCTCACAGC | 761 |
| 196 | TEVRGDRSQV | 523 | ACTGAGGTTAGAGGAGACCGTTCGCAGGTT | 762 |
| 197 | ASSRGDLQQT | 763 | GCGAGCAGCAGAGGAGACCTGCAACAAACG | 764 |
| 198 | QSARGDLVSY | 751 | CAGTCTGCTAGAGGAGACCTTGTGTCTTAT | 765 |
| 199 | DASRGDRTSL | 521 | GACGCATCTAGAGGAGACCGAACATCCCTC | 766 |
| 200 | NSVRGDLNQT | 767 | AACAGTGTCAGAGGAGACCTCAACCAAACT | 768 |

【０５８９】

実施例６－操作ＡＡＶカプシド及び筋肉カプシド変異体の指向進化

組み換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）は、前臨床及び臨床研究におけるインビボ遺伝子置換療法及び遺伝子編集のために最も一般的に使用されるビヒクルであるが、全身送達後の特定の組織の選択的形質導入は、いまだ課題である。天然カプシドを用いて生成された組み換えＡＡＶは、主に、全身注射後に肝臓内に隔離される。この隔離により、他の器官における形質導入の効率が制限され（Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，２００６；Ｍｕｒｒｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｚｉｎｃａｒｅｌｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）、骨格筋への遺伝子送達に特定の課題がもたらされる。筋肉は、全体重の最大で４０％を構成するため、天然カプシド変異体により筋肉における治療閾値を達成するには、極めて高いウイルス量（約２Ｅ＋１４ｖｇ／ｋｇ）（Ｄｕａｎ，２０１８ａ、ｂ）を必要とし、これは、ベクター製造にとって厄介な障害を生じ、いくつかの最近の臨床試験において観察されるように、治療制限毒性をもたらし得る（Ｍｏｒａｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）。

【０５９０】

インビボ選択と連動されたＡＡＶカプシドタンパク質操作は、様々な組織への強力な遺伝子送達を可能にする有望な手法である。ＡＡＶカプシドは、５つのＶＰ１、５つのＶＰ２、及び５０つのＶＰ３サブユニットから組み立てられ、これらが合体して、全身送達後の組織指向性を規定する複合体３Ｄ構造を形成する。カプシド表面に位置するＶＰ３サブユニットにおける単一のアミノ酸変化でさえ、様々な組織についての指向性を変化させ得る（Ｐｕｌｉｃｈｅｒｌａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１；Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。したがって、ＡＡＶカプシド操作手法は、典型的に、様々な方法によって多様なカプシドライブラリーを生成すること、その後、動物モデルにおいて所望の指向性を有する変異体の選択を含む。この手法は、マウス網膜（Ｄａｌｋａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）並びに中枢及び末梢神経系（Ｃｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｄｅｖｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）を含むいくつかの組織への送達のために最適化されたベクターを

生成した。

【０５９１】

それにもかかわらず、現行のカプシド操作手法には、それらの選択方法、それらが使用することができる動物モデル、及びそれらがスクリーニングすることができるライブラリーの多様性に関して主要な制限がある。ＡＡＶ形質導入は、細胞表面における受容体への結合、細胞内移動、エンドソーム脱出、核移行、ベクターゲノム第二鎖ＤＮＡ合成、及び導入遺伝子発現（（Ｂｅｒｒｙ ａｎｄ Ａｓｏｋａｎ，２０１６；Ｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００５）、図２１Ａ）を含む多段階プロセスであり、これらの工程のいずれかにおける非効率性が、ベクター効力を制限し得る。したがって、強力なカプシドの同定の成功には、形質導入の全ての段階を通して効果的に進行する変異体を選択することが必要である。ＡＡＶ形質導入に関与する遺伝子のコード配列及び発現の種特異的及び株特異的な差は、特定のマウス株において選択されたカプシド変異体が、他の株又は他の種において強力な形質導入をもたらさないことがあるため、さらに別の課題を示す（Ｈｏｒｄｅａｕｘ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。したがって、異なる株及び種にわたって強力なカプシド変異体の選択を可能にする操作手法が非常に望ましい。

【０５９２】

この実施例は、これらの課題に対処するためのＤＥＬＩＶＥＲ（Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ＡＡＶ ｃａｐｓｉｄｓ Ｌｅｖｅｒａｇｉｎｇ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｔｒａｎｓｇｅｎｅ ＲＮＡ）手法を記載する。ＤＥＬＩＶＥＲは、多様なカプシドライブラリー生成を、ストリンジェントな転写産物ベースのインビボ選択と組み合わせて、指向進化を可能にし、続いて対象とする任意の組織及び任意の動物モデルにおける強力なカプシド変異体を同定する。したがって、マウスにおける筋指向性カプシドを開発するためのＤＥＬＩＶＥＲの有用性が実証され、結果が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）についての遺伝子置換試験（ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子：ＮＣＴ０３３６２５０２及びＮＣＴ０３３６８７４２）において現在臨床的に使用されている天然ＡＡＶカプシドであるＡＡＶ９と全般的に比較される。全体として、筋指向性ベクターは、骨格筋及び心臓組織の両方の形質導入について優れた効力及び選択性を実証し、ＡＡＶ９と比較した際に大幅に減少した投与量で、並びにマウス及びヒト筋細胞の両方について保存された感染性で、治療効果をもたらす。筋肉で富化された変異体カプシド配列の相互比較により、最上位の変異体の間で共通のＲＧＤモチーフがさらに同定され、さらなる分析により、ＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体の標的細胞発現との強力な相互作用、及びそれに対する依存が明らかになった。総合すれば、この実施例は、とりわけ、治療法の開発及び横紋筋における試験のための特定の有用性を有する新たなクラスのカプシド変異体、並びに代替的な組織指向性を有するＡＡＶのさらなるファミリーの今後の進化のための実験的フレームワークを実証する。

【０５９３】

結果

ＤＥＬＩＶＥＲを用いたＡＡＶ９カプシドのインビボ進化は、あるクラスの筋指向性変異体を識別する

ライブラリー設計は、任意のスクリーニングキャンペーンの成功のための重要な決定因子である。この研究のために設計されたＡＡＶ９ベースのカプシドライブラリーは、インビボでの使用のための高い効力を有する筋指向性ベクターの同定を促進するいくつかの重要な特徴を含んでいた。最初に、各変異体は、ＡＡＶ９カプシドの超可変領域ＶＩＩＩにおけるアミノ酸５８８及び５８９の間に挿入されたランダム７量体ペプチドを含んでおり、カプシド表面における可変ペプチド配列の露出を確実にする設計を含んでいた（（ＤｉＭａｔｔｉａ ｅｔ ａｌ．，２０１２）、図１４Ａ）。各変異体はまた、ユビキタス又は細胞型特異的哺乳動物プロモーターのいずれかの制御下でそれ自体のカプシド配列をコードする導入遺伝子を封入し、これにより、ウイルスライブラリーの生成に使用されるＨＥＫ２９３細胞（図１４Ｂ）及びインビボ送達後にウイルスで形質導入される動物組織（図１４Ｃ～１４Ｄ）の両方における導入遺伝子（カプシド変異体）の発現が可能になった

。
【０５９４】
異なるマウス組織を機能的に形質導入するカプシド変異体を選択するためのＤＥＬＩＶＥＲのストリンジェンシーを、ユビキタスＣＭＶプロモーター下でカプシド変異体が発現されたウイルスライブラリーを用いて、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおいて評価した。様々な組織においてＤＮＡ及びｍＲＮＡレベルでウイルスライブラリーと比べて富化された変異体を同定した。ｍＲＮＡ発現に基づく変異体の選択により、ベクターゲノムＤＮＡの存在に基づく選択と比較して、少数精鋭の機能的カプシドが得られ（図２１Ｂ～２１Ｇ）、これは、標的細胞に物理的に侵入するカプシド変異体のごく一部のみが、これらの細胞を機能的に形質導入して、それらのコードされる導入遺伝子を発現することができることを示唆する。この知見と一致して、注射されたウイルスライブラリー中でより多い量のカプシド変異体が、ベクターゲノムＤＮＡレベルで注射された動物の肝臓中により多く存在していたが、ウイルスライブラリーにおける各変異体の量と及び肝臓における同じ変異体からの導入遺伝子ｍＲＮＡのレベルとの間に相関はほとんどなかった（図２１Ｈ～２１Ｉ）。
【０５９５】
強力な筋指向性カプシド変異体の選択を強化するために筋特異的プロモーターを使用する実現可能性を次に評価した。骨格筋及び心筋は、いくつかの異なる細胞型を含むが、特に２つの細胞型、すなわち筋線維及び心筋細胞への有効な導入遺伝子送達が可能なＡＡＶカプシドが、遺伝的筋疾患のための治療遺伝子送達にとって最も望ましい。インビボでこれらの細胞型で特異的に発現した変異体の選択を可能にするために、本発明者らは、ＩＴＲ含有構築物を用いて、カプシドコード配列の発現を筋特異的ＣＫ８又はＭＨＣＫ７プロモーターによって制御したＨＥＫ２９３細胞内でＡＡＶカプシドライブラリーを生成した。これらの構築物は、ユビキタスＣＭＶプロモーター下でカプシドを発現する構築物を用いて生成されたものと同様のｒＡＡＶ力価を生じた（図１４Ｂ）。さらに、注射されたマウスの骨格筋及び心筋内で、ＣＫ８又はＭＨＣＫ７プロモーター下で発現されたウイルスライブラリーは、ＣＭＶ下で発現されるものと比較してさらに高い導入遺伝子ｍＲＮＡ発現を生じ、筋線維及び心筋細胞を形質導入する機能的変異体の同定を大幅に促進した（図１４Ｃ～１４Ｄ）。
【０５９６】
指向進化による２回のインビボ選択を行い、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの複数の様々な筋肉におけるＭＨＣＫ７プロモーターから発現された変異体をスクリーニングした。このプロセスは、５，０００，０００を超えるカプシド変異体の多様なライブラリーから開始し、７種の筋肉（大腿四頭筋、前脛骨筋、腓腹筋、三頭筋、腹筋、横隔膜筋、及び心筋）において高度に発現された最上位の３０，０００の変異体を選択した（図１４Ａ及び１４Ｅ）。２回目のインビボ選択では、２つの対照を導入した。１つ目は、同義コドン対照であり、一次スクリーニングからの各選択された変異体に対して同定された同じ７量体挿入ペプチドが、同義ＤＮＡコドンを用いてコードされている。２つ目は、発現対照であり、二連のウイルスライブラリーを、２つの骨格筋特異的プロモーター、ＣＫ８又はＭＨＣＫ７のいずれかの下で変異体を発現させるために生成した（図１４Ａ）。図１４Ｆは、２回目の転写産物ベースの選択の後、マウス筋肉内で最上位の高度に発現されたカプシド変異体における７量体挿入の配列を示す。各群における同じ色の変異体は、同義ＤＮＡコドンによってコードされる。
【０５９７】
著しくは、２回目の選択では、ＣＫ８又はＭＨＣＫ７ライブラリーのいずれかから筋肉内で高度に発現された最上位の１２カプシド変異体の全てが、７量体インサートの最初の３つのアミノ酸位置に同じアルギニン－グリシン－アスパラギン酸（ＲＧＤ）モチーフを含有していた。筋肉のそれらの優れた形質導入におけるこれらのカプシド変異体に含まれる特定のペプチド配列、ＣＫ８群では最上位１２のうち１０ヒット及びＭＨＣＫ７群では最上位１２のうちの８ヒットが、同義対に由来していたことがさらに示唆される（すなわ

ち、同義ＤＮＡコドンによってコードされた対応する変異体も、最上位の１２の筋発現変異体内にあった）（図１４Ｆ）。

【０５９８】

最上位５つの固有のＲＧＤ含有カプシド変異体を用いて生成されたｒＡＡＶの力価を定量化して、これらの操作カプシドをインビボ研究に使用することの実現可能性を評価した。ｒＡＡＶの力価の比較は、最上位５つのＲＧＤ含有カプシド変異体と親ＡＡＶ９カプシドとの間の有意な差を示さなかった（図２２Ｅ）。最上位１２のＲＧＤ含有ヒットからの各位置でコンセンサスアミノ酸ともマッチするＲＧＤＬＴＴＰ（配列番号１２）ペプチド挿入を含む変異体を、さらなる特性評価のために選択し、この変異体を「ＭｙｏＡＡＶ」と命名した。

【０５９９】

ＭｙｏＡＡＶは、全身投与後に前例のない効率でマウス筋肉を形質導入する

全身送達後に様々なマウス組織において、ＭｙｏＡＡＶを用いて生成されたｒＡＡＶの形質導入プロファイル及び生体内分布を調べるために、成体Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、１Ｅ＋１２ｖｇ（約４Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇ）のＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射し、注射の２週間後に様々な組織における導入遺伝子発現及びベクターゲノム量を分析した。採取した組織の全載蛍光イメージングは、ＭｙｏＡＡＶを注射したマウスの筋肉において、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、はるかに高い蛍光強度を示した（図１５Ａ及び２２Ａ）。重要なことには、ＭｙｏＡＡＶは、多くの遺伝的筋疾患の主要な罹患器官である心臓を、ＡＡＶ９より有効に形質導入した。ＭｙｏＡＡＶを注射したマウスの筋線維及び心筋細胞における強力な導入遺伝子発現を、免疫蛍光分析によってさらに確認した（図１５Ｂ及び２２Ｂ）。意外なことに、ＭｙｏＡＡＶは、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおいて全身送達後に肝臓の比較的減少した形質導入を示し、これは、ＡＡＶ９と比較して、この変異体についての肝臓標的解除した形質導入プロファイルを示唆する（図１５Ａ～１５Ｃ）。

【０６００】

様々な骨格筋におけるＥＧＦＰ　ｍＲＮＡの定量化は、ＭｙｏＡＡＶの筋肉において、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、１０～２５倍高い導入遺伝子発現を示した（図１５Ｃ）。ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現は、心臓において６．３倍高く、ＭｙｏＡＡＶを注射した動物の肝臓において２．８倍低かった（図１５Ｃ）。とりわけ、ＭｙｏＡＡＶによって改善された形質導入効率は、横紋筋組織に限られ、この操作カプシド変異体は、ＡＡＶ９と比較して同様又はより低い効率で、注射された動物の肺、腎臓、脾臓、及び脳を形質導入した（図１５Ｃ及び２２Ｃ）。生体内分布分析により、ＭｙｏＡＡＶが、ＡＡＶ９より有効にＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの腹筋以外の全ての筋肉にベクターゲノムを送達し、全身投与後に肝臓における有意に低い数のベクターゲノムをもたらすことが実証された（図２２Ｄ）。

【０６０１】

ヒト骨格筋を形質導入する際のＭｙｏＡＡＶの効率を次に分析した。４人の異なるドナー（男性２人及び女性２人）に由来するヒト一次筋管に、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＫ８－ナノルシフェラーゼ（Ｎｌｕｃ）をインビトロで形質導入した。ＭｙｏＡＡＶは、ＡＡＶ９より３５～５２倍有効に、異なるドナーに由来する筋管を形質導入した（図１５Ｄ）。ＭｙｏＡＡＶはまた、ＡＡＶ９と比較して２３倍高い効率で、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに由来するマウス一次筋管を形質導入した（図１５Ｄ）。

【０６０２】

さらに、ＭｙｏＡＡＶによる筋肉幹細胞（衛星細胞）形質導入の効率を、６か月齢のｍｄｘ－Ａｉ９マウスにおける静脈内投与後に評価した。これらのジストロフィン欠損マウスは、ヒトＤＭＤの遺伝モデルであり、Ｃｒｅ活性化型ｔｄＴｏｍａｔｏ導入遺伝子をさらに保有し、これは、ＣｒｅをコードするＡＡＶによる形質導入のためのレポーターとして働く。ＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｃｒｅを注射されたマウスの筋肉からの衛星細胞の蛍光活性化細胞分類（ＦＡＣＳ）は、ＭｙｏＡＡＶを投与された

動物において有意に高いパーセンテージの衛星細胞の形質導入を示した（図２２Ｆ～２２Ｉ）。

【０６０３】

ＭｙｏＡＡＶの全身送達後のインビボ遺伝子発現の速度を調べるために、本発明者らは、成体ＢＡＬＢ／ｃＪマウスに、４Ｅ＋１１ｖｇ（約１．６Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇ）のＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－ホタルルシフェラーゼ（Ｆｌｕｃ）を注射し、注射後１２０日にわたって異なる時点で全身生物発光画像法を行った。ＭｙｏＡＡＶを投与されたマウスは、ＡＡＶ８又はＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、四肢及び身体全体での導入遺伝子発現のより速い速度及び有意に高い全体レベルを示した（図１６Ａ～１６Ｂ及び２３Ａ）。注射の４か月後に採取されたマウスの筋肉からの全器官生物発光画像法により、ＭｙｏＡＡＶを注射した動物の筋肉において著しく高いルシフェラーゼ発現が確認された（図１６Ｃ～１６Ｄ及び２３Ｂ）。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊとは対照的にＢａｌｂ／ｃＪにおいて得られたこれらのデータは、全身送達後のＭｙｏＡＡＶによる強力な筋肉形質導入が、異なるマウス株にわたって保存されることをさらに実証する。

【０６０４】

ＭｙｏＡＡＶを用いた治療用導入遺伝子の全身投与は、ＤＭＤ及びＸＬＭＴＭのマウスモデルにおける機能的改善をもたらす

治療用導入遺伝子のインビボ送達のためにＭｙｏＡＡＶを使用する実現可能性を調べるために、成体ｍｄｘマウス（Ｄｍｄエクソン２３におけるナンセンス変異を保有するＤＭＤのマウスモデル）に、ＳａＣａｓ９をコードする構築物を保有するＡＡＶ９又はＭｙｏＡＡＶを、ｍｄｘ変異の５’及び３’を標的とするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）と一緒に注射した（図２４Ａ～２４Ｂ）。このＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介手法が、ｍｄｘ細胞のゲノムからのエクソン２３の切除及び筋肉における切断されているが依然として機能する形態のジストロフィンタンパク質の発現をもたらすことが既に示されている（Ｎｅｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。切断型変異体を生成する一方、このインフレーム欠失は、依然として機能的タンパク質を作製し、それによって、ＤＭＤにおける治療効果をもたらす。

【０６０５】

ＭｙｏＡＡＶ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲは、様々なｍｄｘ筋肉において全Ｄｍｄ　ｍＲＮＡの３．４％～２５％の範囲の効率でエクソン２３欠失Ｄｍｄ　ｍＲＮＡの産生をもたらした。対照的に、同じ用量のＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射されたｍｄｘマウスの筋肉におけるエクソン２３欠失ｍＲＮＡの産生の効率は、わずか１．３％～８．７％の範囲であった（図１７Ｃ）。ＳａＣａｓ９及びｇＲＮＡ発現の定量化により、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して、ＭｙｏＡＡＶを注射したマウスの筋肉において６．７～１９倍高いＳａＣａｓ９発現及び３．５～７．８倍高いｇＲＮＡ発現が示された（図２４Ｃ～２４Ｄ）。

【０６０６】

いくつかの知見は、ＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲと比較して、ＭｙｏＡＡＶ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲによるジストロフィン発現の優れたレスキューを指摘している。免疫蛍光及びウエスタンブロット分析により、ＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲと比較して、ＭｙｏＡＡＶ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射されたマウスの筋肉におけるより高い及びより多い幅広いジストロフィン修復が確認された（図１７Ａ～１７Ｂ）。ＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲで処置された動物の前脛骨筋（ＴＡ）筋肉の生理的評価により、ビヒクル又はＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲ注射対照のいずれかと比較した際、ＭｙｏＡＡＶ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射したｍｄｘマウスにおいて、有意に高い比筋力（図１７Ｄ）及び伸張性収縮後の減少した筋力低下パーセント（図１７Ｅ）が実証された。したがって、ＭｙｏＡＡＶは、従来の広く使用されているＡＡＶ９と比較して、筋肉への治療用遺伝子編集複合体の送達について顕著に強化された効力を示す。

【０６０７】

低用量の全身投与後の遺伝子置換についてのＭｙｏＡＡＶの性能を、Ｘ連鎖筋細管ミオ

パシー（ＸＬＭＴＭ）のマウスモデルにおいて評価した。Ｍｔｍ１ノックアウト（ＫＯ）マウスは、ＸＬＭＴＭの優れた遺伝及び表現型モデルを提供し；それらは、顕著な筋肉消耗、運動機能の喪失及び寿命の大幅な短縮を示す。４週齢のＭｔｍ１　ＫＯマウスに、ＭＨＣＫ７プロモーターの制御下で発現されるヒトＭＴＭ１（ｈＭＴＭ１）（ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１）をコードするＡＡＶ９又はＭｙｏＡＡＶを２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇで注射した。本発明者らは、７か月の期間にわたって各群について体重、活動、及び生存を測定した（図１７Ｆ及び２４Ｅ）。この実験において使用されたウイルスの用量は、ＸＬＭＴＭについての進行中のヒト臨床試験（ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子：ＮＣＴ０３１９９４６９）において使用されている用量の５０～１５０分の１であり、ＸＬＭＴＭ遺伝子治療についての既に公開されている前臨床試験（Ｃｈｉｌｄｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｅｌｖｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｍａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）において使用された用量の１５～２５０分の１であった。

【０６０８】

ＭｙｏＡＡＶ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射したマウスは、機能及び生存の著しい改善を示した。２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射されたマウスは全て、活動が最小限であり、注射後１１～２１週間で安楽死の人道的エンドポイントに達した。対照的に、同じ用量のＭｙｏＡＡＶ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射されたマウスは全て、野生型マウスと同様の軌道で生存し、試験全体を通して、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して体重も増加し、著しく活動的であった（図１７Ｇ～１７Ｋ）。

【０６０９】

ＭｙｏＡＡＶは、マウス及びヒト一次筋管の形質導入についてインテグリンヘテロ二量体に依存する

選択からのＭｙｏＡＡＶ及び他の最上位の変異体の全てにおけるＲＧＤモチーフの存在を考慮して、ＭｙｏＡＡＶ形質導入におけるＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体の役割を評価した。ＲＧＤモチーフは、その受容体への結合を促進するフィブロネクチンにおける最小配列として１９８４年に最初に認められ、後にインテグリンヘテロ二量体α５β１として同定された（Ｐｉｅｒｓｃｈｂａｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｒｕｏｓｌａｈｔｉ，１９８４；Ｐｙｔｅｌａ　ｅｔ　ａｌ．，１９８５）。ＲＧＤは、その後、いくつかの異なるインテグリンヘテロ二量体；具体的には、αＩＩｂβ３、α５β１、α８β１、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、及びαＶβ８認識モチーフとして同定された（Ｒｕｏｓｌａｈｔｉ，１９９６）。ＡＡＶ９－及びＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃの形質導入効率を、これら８つのヒトＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体のそれぞれを過剰発現するＨＥＫ２９３細胞内で比較した（図２５５Ａ～２５Ｉ）。α８β１、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、又はαＶβ８の過剰発現により、ＰＵＣ１９トランスフェクト対照と比較して、トランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞においてＭｙｏＡＡＶの形質導入効率が増加したが、ＡＡＶ９形質導入は、これらのインテグリンヘテロ二量体のいずれの過剰発現によっても強化されなかった（図１８Ａ）。

【０６１０】

次に、細胞表面へのＭｙｏＡＡＶ及びＡＡＶ９の結合効率に対する異なるインテグリンヘテロ二量体の影響を、過剰発現実験によって評価した。８つのＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体のそれぞれ又はＰＵＣ１９対照プラスミドでトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞の表面に結合されたベクターゲノムを定量し、α８β１、αＶβ６、及び比較的程度は小さいが、αＶβ１が、ＰＵＣ１９トランスフェクト対照と比較してインテグリントランスフェクト細胞への、ＡＡＶ９ではなくＭｙｏＡＡＶの結合を増加させたことが分かった（図１８Ｂ）。初代細胞におけるＭｙｏＡＡＶ形質導入効率に対する２つの異なる汎αＶインテグリンアンタゴニスト（ＣＷＨＭ－１２及びＧＬＰＧ－０１８７）の影響も調べた。両方の阻害剤が、マウス（図１８Ｃ及び２６Ａ）及びヒト（図１８Ｄ及び２６Ｂ～２６Ｈ）の一次骨格筋の筋管の両方において用量依存的にＭｙｏＡＡＶ形質導入を妨げたが、いずれの阻害剤も、ＡＡＶ９形質導入効率に対する用量依存効果を与えなかった。これらの結果は、αＶ含有インテグリンヘテロ二量体を阻害することにより、マウス及

びヒト一次筋管の両方を形質導入するＭｙｏＡＡＶの能力がほぼ完全に除去されたことを実証する。

【０６１１】

ＭｙｏＡＡＶの結合親和性に対する個々のαＶ含有インテグリンヘテロ二量体の影響をさらに明らかにするために、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、αＶβ８、又はマルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）組み換えタンパク質とともにこれらのウイルスをプレインキュベートした後、ヒト一次筋管をＭｙｏＡＡＶ又はＡＡＶ９で形質導入した。意外なことに、増加する濃度のαＶβ６によるＭｙｏＡＡＶのプレインキュベーションは、ヒト一次筋管の形質導入の用量依存的阻害をもたらしたが、本発明者らが試験した他の組み換えタンパク質のいずれも、ＭｙｏＡＡＶ又はＡＡＶ９のいずれかによる細胞の形質導入に対する用量依存的効果を与えなかった（図１８Ｅ～１８Ｆ）。反対に、増加する濃度の抗αＶβ６抗体によるヒト筋管のプレインキュベーションは、ＭｙｏＡＡＶによる形質導入効率を用量依存的に低下させ、ＡＡＶ９による筋管の形質導入に影響を与えなかった（図１８Ｇ）。これらのデータは、ＭｙｏＡＡＶ形質導入を促進する能力を有するαＶ含有インテグリンヘテロ二量体の中でも、αＶβ６が、このカプシド変異体に結合する最も高い親和性を有することを示唆する。さらに、αＶβ６は、ＭｙｏＡＡＶによるそれらの最適な形質導入を可能にするためにヒト筋細胞の表面において利用可能でなければならない。

【０６１２】

以前に同定されたＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）に対するＭｙｏＡＡＶ形質導入の依存性を評価した。以前に同定されたＡＡＶ受容体は、ＡＡＶ４及びＡＡＶｒｈ３２．３３を除いて最も知られているＡＡＶ血清型の有効な形質導入に必要な急速に取り込まれる細胞膜タンパク質である（Ｄｕｄｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８；Ｐｉｌｌａｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。ＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲノックアウト（ＫＯ）及び親ＨＥＫ２９３ＦＴ野生型（ＷＴ）細胞を、ＡＡＶ４－、ＡＡＶ２－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入し、ＡＡＶ２及びＡＡＶ９と同様に、ＭｙｏＡＡＶ形質導入は、ＡＡＶＲ発現を必要とすることが分かった（図１８Ｈ）。

【０６１３】

インテグリンヘテロ二量体及びＡＡＶＲが、ＭｙｏＡＡＶ形質導入において重複した役割を果たすかどうかを調べるために、α８β１、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、又はαＶβ８を、ＡＡＶＲ過剰発現の存在下又は非存在下でＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ細胞内で過剰発現させ、次に、細胞を、ＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入した。これらの結果は、インテグリンヘテロ二量体の過剰発現により、モックトランスフェクト対照と比較してＡＡＶＲ　ＫＯ細胞においてＭｙｏＡＡＶ形質導入効率が増加された一方、インテグリン過剰発現は、ＡＡＶＲを過剰発現するＡＡＶＲ　ＫＯ細胞又はＷＴ　ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞内で観察されたレベルまで形質導入をレスキューするには十分ではないことを実証した（図２６Ｉ）。これらのデータは、インテグリンヘテロ二量体及びＡＡＶＲが、ＭｙｏＡＡＶ形質導入において異なる役割を果たすこと及び異なる段階で用いられる可能性が高いことを示唆する。

【０６１４】

ＤＥＬＩＶＥＲを用いたインビボ進化のさらなる回により、第二世代ＲＧＤ含有筋指向性変異体が生成される

ＭｙｏＡＡＶによる筋管の形質導入についてのインテグリンヘテロ二量体とのＲＧＤモチーフの相互作用の重要性を考慮し、理論に制約されることなく、モチーフに隣接するアミノ酸を修飾することにより、この相互作用を改善することができ、さらに一層強力な筋指向性カプシド変異体が生成されると考えられる。ＭｙｏＡＡＶ超可変領域ＶＩＩＩ表面ループの予測構造に基づいて、ＲＧＤモチーフの上流の５８６、５８７、及び５８８位並びに下流の５９２、５９３、５９４、及び５９５位のアミノ酸を、ＭｙｏＡＡＶの表面ループに位置する可能性が高いものとして同定した（図１９Ａ）。それぞれ５８９、５９０、及び５９１位に固定されたＲＧＤモチーフ及び上記の隣接位置における様々なアミノ酸を有するカプシドの多様なライブラリーを生成した（図１９Ｂ）。

【０６１５】
ＤＥＬＩＶＥＲを用いた筋指向性変異体についての２回のインビボ選択を、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ及びｍｄｘマウスにおいて行った。２回目のウイルスライブラリーを、２つの異なる用量（マウス当たり１Ｅ＋１２ｖｇ及び１Ｅ＋１１ｖｇ）で注射して、高用量及び低用量の両方で筋肉組織を効率的に形質導入する変異体を同定した（図１９Ｂ）。本出願人は、これらの選択からの最上位のヒットの中でも、グリシン及びアラニンが、５８８位で濃縮され、グルタミンが、５９２位で濃縮されていたことを見出した。ＧＰＧＲＧＤＱＴＴＬ（配列番号２）配列を含む変異体が、２回目の選択から１Ｅ＋１２及び１Ｅ＋１１の用量の両方で最も厳選された筋指向性カプシドとして浮上した（図１９Ｂ）。この第二世代変異体を、「強化されたＭｙｏＡＡＶ」（ＥＭｙｏＡＡＶ）と命名し、それをさらなる特性評価に使用した。

【０６１６】
ＥＭｙｏＡＡＶの形質導入効率を、ＡＡＶ９及びＭｙｏＡＡＶと比較して、低用量のウイルスの全身送達後に異なるマウス組織において評価した。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、２Ｅ＋１１ｖｇ（約８Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇ）のＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ－、又はＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射し、様々な組織における導入遺伝子発現及びベクターゲノム生体内分布を分析した。全組織の蛍光イメージングは、ＥＭｙｏＡＡＶによる全身遺伝子送達が、異なる骨格筋にわたってＭｙｏＡＡＶ又はＡＡＶ９と比較してより高いレベルの導入遺伝子発現をもたらすことを実証した（図１９Ｃ～１９Ｄ）。ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡの定量化により、ＥＭｙｏＡＡＶが、ＡＡＶ９より１０～８０倍効率的にマウス骨格筋を、及び１７倍効率的に心臓を形質導入することが明らかになった。さらに、導入遺伝子ｍＲＮＡ発現は、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、ＥＭｙｏＡＡＶを注射した動物の肝臓において２．５分の１であった（図１９Ｅ）。同様に、ベクターゲノム生体内分布分析は、ＥＭｙｏＡＡＶを注射したマウスが、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して、骨格筋及び心臓において２倍体ゲノム当たり有意に高いベクターゲノムを有し、肝臓において２倍体ゲノム当たり有意に低いベクターゲノムを有することを示した（図２７Ａ）。

【０６１７】
ヒト一次筋管の形質導入についてのＥＭｙｏＡＡＶの効率及びインテグリン依存性を次に分析した。意外なことに、ＥＭｙｏＡＡＶは、ヒト一次筋管を、ＡＡＶ９と比較して１２８倍効率的に、及びＭｙｏＡＡＶより４．１倍高く形質導入した（図１９Ｆ）。増加する濃度の汎αＶインテグリンアンタゴニストＧＬＰＧ－０１８７は、ＥＭｙｏＡＡＶの形質導入効率の用量依存的低下をもたらし（図１９Ｇ）、これは、ＥＭｙｏＡＡＶの感染性が、標的細胞で発現されるαＶ含有インテグリンヘテロ二量体に依然として依存することを裏付けている。

【０６１８】
異なる個々のαＶインテグリンヘテロ二量体に対するＥＭｙｏＡＡＶの結合親和性を評価するために、ＥＭｙｏＡＡＶ又はＡＡＶ９を、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、αＶβ８、又はマルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）組み換えタンパク質とともにプレインキュベートしてから、ヒト一次筋管を形質導入した。興味深いことに、及びＭｙｏＡＡＶを用いたこれらの同じアッセイで得られた結果（図１８Ｅ）とは対照的に、試験された４つ全てのαＶ含有インテグリンヘテロ二量体が、ＥＭｙｏＡＡＶによるヒト筋管の形質導入を用量依存的に阻害した一方（図１９Ｈ～１９Ｉ）、ＡＡＶ９形質導入に対する用量依存的影響はなかった。この結果は、ＥＭｙｏＡＡＶに含まれるアミノ酸置換が、主にαＶβ６に依存するＭｙｏＡＡＶと比較した際、より広いクラスのαＶインテグリンヘテロ二量体へのより高い親和性結合を可能にすることを示唆する。

【０６１９】
ＤＥＬＩＶＥＲを用いて進化させた最上位の第一世代及び第二世代カプシド変異体のαＶβ６ヘテロ二量体に対する依存性を評価した。ヒト一次筋管を、抗αＶβ６抗体とともにプレインキュベートしてから、細胞を、最上位の第一世代（ＲＧＤＬＴＴＰ（配列番号１２）、ＲＧＤＬＳＴＰ（配列番号８）、ＲＧＤＬＮＱＹ（配列番号９）、ＲＧＤＡＴＥ

Ｌ（配列番号１０）、ＲＧＤＴＭＳＫ（配列番号１１））及び第二世代（ＧＰＧＲＧＤＱＴＴＬ（配列番号２）、ＡＥＧＲＧＤＱＹＴＲ（配列番号３）、ＡＴＧＲＧＤＬＧＱＡ（配列番号４）、ＡＶＡＲＧＤＱＧＬＩ（配列番号５）、ＮＩＳＲＧＤＱＧＹＱ（配列番号６）、ＡＰＡＲＧＤＱＧＳＱ（配列番号７））変異体で形質導入した。抗体結合が、これらの変異体の全てによってある程度までヒト筋管の形質導入を阻害したが、第一世代カプシドは、筋管形質導入についてαＶβ６により大きく依存していた（図２７Ｂ）。

【０６２０】

ＥＭｙｏＡＡＶは、低用量のウイルスの注射後に高い治療可能性を示す

最後に、ヒト神経筋疾患について現在臨床試験中であるカプシドと比較して、ＥＭｙｏＡＡＶの治療関連性を調べた。具体的には、ＤＭＤの場合、ＡＡＶ９及びＡＡＶｒｈ７４の両方が、進行中の臨床試験（ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子：ＮＣＴ０３３６２５０２、ＮＣＴ０３３６８７４２、及びＮＣＴ０３７６９１１６）において調査中である。筋特異的ＭＨＣＫ７プロモーターから発現され、ＡＡＶｒｈ７４ベクターを用いて送達される機能補完ジストロフィンミニ遺伝子（マイクロジストロフィンと呼ばれる）の全身投与は、４人のＤＭＤ患者を含む最近報告されたヒト臨床試験において有望な結果を示した。この試験では、高ウイルス量の２Ｅ＋１４ｖｇ／ｋｇを投与することにより、筋肉における導入遺伝子発現及び疾病表現型の機能的改善がもたらされた（Ｍｅｎｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）。

【０６２１】

ＥＭｙｏＡＡＶ媒介遺伝子送達を、ＡＡＶｒｈ７４及びＡＡＶ９ベクターの両方のものと比較し、ＤＭＤのＤＢＡ－ｍｄｘマウスモデルにおいて性能をさらに調べた。縦方向のインビボイメージング実験において、本発明者らは、成体ＢＡＢＬ／ｃＪマウスに、低用量（２Ｅ＋１１ｖｇ、約８Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇを表す）のＡＡＶｒｈ７４、ＡＡＶ９、又はＣＭＶ－Ｆｌｕｃレポーター遺伝子をコードするＥＭｙｏＡＡＶを注射した。ＥＭｙｏＡＡＶを注射したマウスは、分析される全ての時点で、ＡＡＶｒｈ７４又はＡＡＶ９を投与されたマウスと比較して、四肢及び身体全体において著しく高い生物発光シグナルを示した（図１９Ｊ～１９Ｋ）。次に、本発明者らは、同等の低用量（２Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇ）の各ＡＡＶを用いた、ＤＭＤのＤＢＡ－ｍｄｘマウスモデルへの、マイクロジストロフィン導入遺伝子（ＣＫ８－マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧ）を保有するＥＭｙｏＡＡＶ又はＡＡＶ９の全身送達を試験した。ＥＭｙｏＡＡＶを注射した動物は、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して、複数の筋肉群において、筋細胞膜に局在した、マイクロジストロフィンの比較的高い、より幅広い発現を実証した（図２０Ａ）。ウエスタンブロットにより、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して、ＥＭｙｏＡＡＶを注射されたマウスの筋肉においてより高いレベルのマイクロジストロフィンタンパク質が確認された（図２０Ｂ）。定量的ＲＴ－ＰＣＲにより、ＡＡＶ９－ＣＫ８－マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧと比較して、ＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＫ８－マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧを注射されたマウスの骨格筋において７．６～１５倍高いレベルのマイクロジストロフィンｍＲＮＡが示された（図２０Ｃ）。

【０６２２】

最後に、ＥＭｙｏＡＡＶを注射したマウスにおけるベクターゲノムの量及び筋機能を、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して評価した。ＥＭｙｏＡＡＶは、ＡＡＶ９と比較して、ＤＢＡ－ｍｄｘマウスの骨格筋では２倍体ゲノム当たり１２～４６倍多い数のベクターゲノム及び肝臓では２倍体ゲノム当たり２．５分の１のベクターゲノムを送達した（図２０Ｄ）。著しくは、ＡＡＶ９を注射した動物が、それらの筋肉と比較してそれらの肝臓において２倍体ゲノム当たり４０倍超多い数のベクターゲノムを有していた一方、ＥＭｙｏＡＡＶを注射したマウスは、それらの肝臓及び筋肉において同様のレベルを有していた。比筋力及び遠心性損傷後の筋力低下パーセントの定量化により、ＥＭｙｏＡＡＶを注射したＤＢＡ－ｍｄｘマウスのＴＡ筋肉が、等量のＡＡＶ９を投与されたマウスの筋肉及びビヒクルを注射した動物と比較して、有意に高い比筋力を回復したこと、及び損傷からより保護されたことが実証された（図２０Ｅ～２０Ｆ）。

【０６２３】
方法詳細
構築物
ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを生成するために使用されるプラスミドを、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＥＧＦＰコード配列、及びウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（ｂＧＨ　ｐＡ）を、ｐＺａｃ２．１　ＡＡＶプラスミド骨格に、Ｇｉｂｓｏｎアセンブリを用いてクローニングすることによって生成した。ＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃ及びＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを生成するために使用される構築物を、ｐＺａｃ２．１－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ－ｂＧＨ　ｐＡにおけるＥＧＦＰコード配列を、Ｎｌｕｃ及びＦｌｕｃコード配列でそれぞれ置換することによって産生した。ｐＺａｃ２．１構築物は、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ　ｖｅｃｔｏｒ　ｃｏｒｅから購入された。ＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｃｒｅ及びＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲウイルスを生成するために使用されるプラスミドは、以前に記載された（Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９；Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。プラスミドライブラリーレシピエントプラスミドは、ＣＭＶ、ＭＨＣＫ７（Ｓａｌｖａ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）、又はＣＫ８（Ｂｅｎｇｔｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）プロモーター、ＡＡＶ２　ｒｅｐのスプライシング配列（（Ｄｅｖｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）に記載される配列から修飾されて、保存されたスプライスドナーを含む（Ｆａｒｒｉｓ　ａｎｄ　Ｐｉｎｔｅｌ，２００８））、Ｑ４８６及びＱ５８８の直後にＢｓｍＢＩ制限部位を含むＡＡＶ９カプシドコード配列、及びＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを、ｐＺａｃ２．１骨格に、Ｇｉｂｓｏｎアセンブリを用いてクローニングすることによって生成した。インテグリンタンパク質及びＡＡＶＲをコードする構築物を生成するために、ヒトインテグリンαＶ、α５、α８、αＩＩｂ、β１、β３、β５、β６、β８、及びＡＡＶＲのコード配列を、ヒト骨格筋ｃＤＮＡから増幅した。アンプリコンを、ヒト伸長因子１α（ＥＦ１α）プロモーターの下流及びＳＶ４０後期ポリアデニル化シグナル配列の上流のｐＵＣ５７骨格に、Ｇｉｂｓｏｎを用いて挿入した。ＡＡＶ－ＭＨＣＫ７－ヒトＭＴＭ１を生成するために使用されるプラスミドは、ＭＨＣＫ７プロモーター、ｐＣＩ－ｎｅｏ哺乳動物発現ベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）からのキメライントロン、ヒトＭＴＭ１コード配列、及びｂＧＨ　ｐＡを、ｐＺａｃ２．１　ＡＡＶプラスミド骨格に、Ｇｉｂｓｏｎアセンブリを用いてクローニングすることによって生成した。ｐＺａｃ２．１－ＣＫ８－マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧは、ＣＫ８プロモーター、５リピートマイクロジストロフィンのコード配列（Ｈａｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）、ＦＬＡＧタグ、及び合成ポリアデニル化シグナル（Ｌｅｖｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９）を、ｐＺａｃ２．１骨格のＩＴＲ間に組み込むことによってクローニングした。
【０６２４】
カプシドライブラリー生成
１回目の選択のためのカプシドライブラリーを調製するために、本発明者らは、ＢｓｍＢＩを用いて、ＣＭＶ又はＭＨＣＫ７プロモーターを含むＡＡＶライブラリーレシピエントプラスミドを消化させた。本発明者らは、鋳型としてＡＡＶ９カプシドコード配列を用いて、ｌｉｂ－Ｆ（５’－ＧＣＡＡＣＡＴＧＧＣＴＧＴＣＣＡＧＧＧＡＡＧＡＡＡＣＴＡＣＡＴＡＣＣＴＧ－３’（配列番号７６９））及び
【化４】
ＮＮＫ－Ｒ（５’－ＧＴＴＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＣＣＧＧＴＣＴＧＣＧＣＣＴＧＴＧＣ
ＭＮＮＭＮＮＭＮＮＭＮＮＭＮＮＭＮＮＭＮＮＴＴＧＧＧＣＡＣＴＣＴＧＧＴＧＧＴＴ
ＴＧＴＧＧＣＣ－３’

（配列番号７７０））プライマーを用いて、ランダム７量体をコードするフラグメントを増幅し、このフラグメントを、消化されたライブラリーレシピエントプラスミドに、Ｇｉｂｓｏｎアセンブリを用いて組み込んだ。２回目のプラスミドライブラリーを生成するために、本発明者らは、１回目で選択された変異体をコードするオリゴヌクレオチドのプー

ル、並びにＡｇｉｌｅｎｔによって合成された同義ＤＮＡコドン複製を使用した。オリゴヌクレオチドライブラリーのプールを、ＮＮＫ－Ｒプライマーの代わりに使用して、Ｇｉｂｓｏｎアセンブリ用のアンプリコンを、消化されたライブラリーレシピエントプラスミドへと生成した。ＨＥＫ２９３細胞を、トランスフェクションの１日前に、２×１０$^{7}$個の細胞／皿の密度で１５ｃｍ皿に播種した。各プレートを、１６μｇのｐＡＬＤＸ－８０ヘルパープラスミド（Ａｌｄｅｖｒｏｎ）、８μｇのＲｅｐ－ＡＡＰプラスミド（ＢｅｎＤｅｖｅｒｍａｎからの寄贈（Ｄｅｖｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１６））、８μｇのｐＵＣ１９及び１０ｎｇのプラスミドライブラリーで、ＰＥＩ ＭＡＸ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてトランスフェクトした。カプシドライブラリーを、細胞及び培地から採取し、以前に記載されたようにイオジキサノール勾配を用いて超遠心分離によって精製した（Ｒｏｓｅｍａｒｙ Ｃ Ｃｈａｌｌｉｓ，２０１８）。

【０６２５】

組み換えＡＡＶの産生及び精製

ＨＥＫ２９３細胞を、２×１０$^{7}$個の細胞／皿の密度で１５ｃｍ皿に入れた。翌日、各プレートを、１６μｇのｐＡＬＤＸ－８０ヘルパープラスミド（Ａｌｄｅｖｒｏｎ）、８μｇのＲｅｐ／Ｃａｐプラスミド、及び８μｇのＩＴＲ含有プラスミドで、ＰＥＩ ＭＡＸ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてトランスフェクトした。組み換えウイルスを、細胞及び培地から採取し、以前に記載されたようにイオジキサノール勾配を用いて超遠心分離によって精製した（Ｒｏｓｅｍａｒｙ Ｃ Ｃｈａｌｌｉｓ，２０１８）。ＡＡＶの力価を、ｔａｑｍａｎベースのｑＰＣＲによって定量化した。

【０６２６】

インビボ選択

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、１Ｅ＋１２ｖｇのカプシドライブラリーを注射した。注射の２週後、マウスを、ＰＢＳで灌流し、複数の骨格筋（前脛骨筋、大腿四頭筋、腓腹筋、三頭筋、腹筋、及び横隔膜筋）及び心臓を採取した。全ＲＮＡ及びＤＮＡを、ＴＲＩｚｏｌ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて組織から抽出した。ｍＲＮＡを、オリゴｄＴビーズ（（ＮＥＢ）を用いて全ＲＮＡサンプルから濃縮し、ｃＤＮＡ合成を、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＶ逆転写酵素（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）及びカプシド特異的プライマー（５’－ＧＡＡＡＧＴＴＧＣＣＧＴＣＣＧＴＧＴＧＡＧＧ－３’（配列番号７７１））を用いて行った。カプシド変異体ＤＮＡ及び発現されたｍＲＮＡを、Ｑ５ Ｈｉｇｈ Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ２ｘマスターミックスを用いて、７量体インサートの上流（５’－ＡＣＡＡＧＴＧＧＣＣＡＣＡＡＡＣＣＡＣＣＡ－３’（配列番号７７２））及び下流（５’－ＧＧＴＴＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＣＣＧＧＴＣ－３’（配列番号７７３））に結合するプライマーで、ＤＮＡ及びｃＤＮＡサンプルのそれぞれから増幅した。Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプター及び固有のインデックス（ＮＥＢ Ｅ７６００Ｓ）を含むアンプリコンを、量子ビットを用いて定量化し、等モル比でプールし、Ｎｅｘｔｓｅｑにおいてシーケンシングした。

【０６２７】

次世代シーケンシングデータ分析及びウイルスライブラリー設計

Ｉｌｌｕｍｉｎａシーケンシングのリードを、ｂｃｌ２ｆａｓｔｑ２－ｖ２．１７．１を用いて逆多重化した。得られたＦＡＳＴＱ配列をフィルタリングして、可変領域の周辺の対応する構築物配列に直接マッチしたもののみを保持し、そこから２１ｂｐの変異体を抽出した。ペアードエンドシーケンシングランの場合、変異体をさらにフィルタリングして、フォワード及びリバースリードの両方において一致した変異体のみを保持した。変異体を、各サンプルについて計数し、１００万分のリード（ＲＰＭ）としてシーケンシングの深度によって正規化した。さらなる正規化もまた、必要に応じて、変異体のＲＰＭを、一致したウイルスライブラリーサンプルにおける同じ変異体のＲＰＭで除算することによって行った。さらなる分析を単純にするため、１０未満のリードを有するサンプル変異体を、後の分析のために廃棄した。変異体を、ウイルスライブラリーＲＰＭで除算したサンプルＲＰＭのＲＰＭ比を用いてランク付けし、最も高いスコアの変異体を、２回目の選択

において使用するために識別した。各選択されたアミノ酸変異体について、同義ＤＮＡコドンによる同じアミノ酸をコードする変異体が、対照として２回目のライブラリーの設計に含まれた。シーケンシングされたサンプルにおいて既に観察された同義変異体を有する変異体の場合、最も高いスコアの同義変異体が、２回目の設計に含まれた。シーケンシングされたサンプルの中に同義形態を含まない変異体の場合、同義変異体を、可能であれば、元のアミノ酸配列の各可能なコドンを異なるコドンにランダム化し、ひいては元のＤＮＡ配列を最大限にスクランブリングすることによってコンピュータ的に生成した。さらに、本発明者らは、オリゴの５％を、終止コドンを含むランダム変異体であるように設計して、ウイルスライブラリーの生成中の交差パッケージングを制御した。設計された変異体を用いた２回目の選択からのシーケンシングデータを処理し、上記のように計数し、これは、オリゴ設計ツールにマッチしない変異体をフィルタリングして除去するさらなる制限を伴っていた。

【０６２８】

エクソンスキッピング、導入遺伝子発現、及びベクターゲノム定量化

ＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ及びＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ実験では、ＲＮＡを、ＴＲＩｚｏｌ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて組織サンプルから抽出した。ＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ及びマイクロジストロフィン実験からのサンプルの場合、抽出されたＲＮＡを、Ｔｕｒｂｏ　ＤＮａｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）で処理し、ｃＤＮＡを、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＶ　ＶＩＬＯ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて作製した。エクソン４－５連結に対するｔａｑｍａｎアッセイを、全Ｄｍｄ転写産物の定量化に使用し、エクソン２２－２４連結に対する別のアッセイを、エクソン２３－欠失転写産物の定量化に使用した。エクソン４－５及びエクソン２２－２４アンプリコンのそれぞれについて、標準曲線を、各ランにｔａｑｍａｎアッセイ標的配列を含むｇｂｌｏｃｋを増幅させることによって生成した。Ｄｍｄ転写産物及びエクソン２３－欠失転写産物の総量を、標準曲線に基づいて定量化した。これらの組織サンプルにおけるＳａＣａｓ９及びｇＲＮＡ発現を、ｔａｑｍａｎアッセイを用いて定量化した。マウスＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡを、ＳａＣａｓ９及びｇＲＮＡ発現の定量化のためのハウスキーピング対照として使用した。ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ実験からのサンプルについて、抽出されたＲＮＡを、Ｔｕｒｂｏ　ＤＮａｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）で処理し、ｃＤＮＡを、オリゴｄＴプライマーとともにＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＶ逆転写酵素（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて生成した。マウスβアクチンｍＲＮＡを、マイクロジストロフィン発現の定量化のためのハウスキーピング対照として使用した。マウスＧＡＰＤＨ及びβアクチンｍＲＮＡ（ハウスキーピング対照）を、予め設計されたｔａｑｍａｎアッセイであるＩＤＴのＭｍ．ＰＴ．３９ａ．１及びＭｍ．ＰＴ．３９ａ．２２２１４８４３．ｇのそれぞれを用いて定量化した。ベクターゲノム定量化実験では、全ＤＮＡを、迅速ＤＮＡ抽出溶液（Ｌｕｃｉｇｅｎ）を用いて組織サンプルから抽出した。２倍体ゲノム当たりのベクターゲノムの数を、導入遺伝子（ＥＧＦＰ又はマイクロジストロフィン）又はマウスＧＡＰＤＨ　ＤＮＡを増幅するように設計されたｔａｑｍａｎアッセイを用いて、ｑＰＣＲに基づいて定量化した。各サンプルにおける導入遺伝子及びＧＡＰＤＨ分子の絶対数を、各ランにおいて異なる量のｔａｑｍａｎアッセイ標的配列を増幅することによって生成された標準曲線を用いて定量化した。

【０６２９】

インビトロＡＡＶ形質導入及び結合実験

ヒト及びマウス一次筋管を、ヒト筋芽細胞及びマウス衛星細胞のそれぞれから分化させた。初代ヒト骨格筋筋芽細胞（Ｌｏｎｚａ）を、５％のＣＯ２で、３７℃で、ＳｋＧＭ－２培地（Ｌｏｎｚａ）中で維持した。初代マウス衛星細胞を、以前に記載されたように（Ｃｅｒｌｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスから単離し、６日間にわたって、マウス筋肉幹細胞増殖培地（１％のＧｌｕｔａｍａｘ（ＬｉｆｅＴｅｃｈ）、１％のペニシリン－ストレプトマイシン（ＬｉｆｅＴｅｃｈ）、及び５ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦ（Ｓｉｇｍａ）を含有するＦ１０（Ｇｉｂｃｏ）中２０％のドナーウマ血清（

Ａｔｌａｎｔａ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ））中で増殖させた。ヒト及びマウス筋芽細胞を、１５，０００個の細胞／ウェルの密度で、コラーゲン及びラミニン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）で被覆された９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に播種した。プレーティングの２４時間後、培地を、２％のウマ血清（Ｇｉｂｃｏ）を含有するＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ）に変更し、筋芽細胞を、４～６日間にわたって筋管に分化させてから、それらを、５Ｅ＋３ｖｇ／細胞で、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－Ｃｋ８－Ｎｌｕｃで形質導入した。インテグリン過剰発現実験では、ＨＥＫ２９３細胞を、５％のウシ胎仔血清（Ｇｉｂｃｏ）を含有するＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ）中の９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）において、３５，０００個の細胞／ウェルで播種した。インテグリン過剰発現実験では、細胞を、翌日、ＰＥＩ　ＭＡＸ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて、合計１００ｎｇのプラスミド／ウェルで、異なる対のインテグリン構築物でトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、細胞を、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃの１Ｅ＋４ｖｇ／細胞で形質導入した。インテグリン過剰発現及び形質導入分析実験では、プレート中の培地の体積に等しいＮａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）を加え、発光を、形質導入の２４時間後にＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｌマイクロプレートリーダーにおいて測定した。インテグリン過剰発現及び結合分析実験では、細胞を、エンドサイトーシスを阻害するために氷冷し、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－Ｎｌｕｃを、トランスフェクションの７２時間後に、１Ｅ＋４ｖｇ／細胞で細胞に加えた。細胞を、氷上で３０分間保持し、それらを、ＰＢＳで３回洗浄してから、それらを迅速ＤＮＡ抽出溶液（Ｌｕｃｉｇｅｎ）に溶解させた。ベクターゲノム及び２倍体ゲノムを、Ｎｌｕｃコード配列及びヒトＧＡＰＤＨゲノム遺伝子座を標的とするアッセイを用いて、ｔａｑｍａｎ　ｑＰＣＲによって定量化した。ＡＡＶＲ依存性実験では、ＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ、及びＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＷＴ細胞を、９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）において３５，０００個の細胞／ウェルで播種した。翌日、細胞を、１Ｅ＋３ｖｇ／細胞で、ＡＡＶ２－、ＡＡＶ４－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－ＮＬｕｃで形質導入した。ＡＡＶＲレスキュー実験では、ＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ及びＨＥＫ２９３ＦＴ　ＷＴ細胞を、３３．３ｎｇの各インテグリン構築物又はｐＵＣ１９及び３３．３ｎｇのＡＡＶＲ構築物又はｐＵＣ１９でトランスフェクトした。トランスフェクションにつき合計１００ｎｇのプラスミドＤＮＡを使用した。トランスフェクションの４８時間後、細胞を、１Ｅ＋３ｖｇ／細胞で、ＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入した。Ｎａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）を、形質導入の２４時間後に、プレート中の培地の体積に等しい体積で加え、発光を、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｌマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

【０６３０】

小分子及び抗体阻害実験

Ｐａｎ－αＶインテグリンアンタゴニストＣＷＨＭ－１２及びＧＬＰＧ０１８７（ＭｅｄＣｈｅｍ　Ｅｘｐｒｅｓｓ）、又は抗αＶβ６抗体（ａｂ７７９０６、ａｂｃａｍ）を、特定の濃度で、２％のウマ血清を含有するＤＭＥＭ中で希釈した。培地を、分化した筋管から除去し、希釈された阻害剤で置換し、その後、筋管を氷上で３０分間インキュベートして、エンドサイトーシスを阻害した。このインキュベーションの後、ＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ－、又はＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＫ８－Ｎｌｕｃを、５Ｅ＋３ｖｇ／細胞で細胞に加え、プレートを、組織培養インキュベータに戻した。形質導入の２４時間後、ルシフェラーゼ強度を、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて測定した。

【０６３１】

組み換えタンパク質阻害実験

ヒト初代骨格筋筋芽細胞（Ｌｏｎｚａ）を、コラーゲン及びラミニンでさらに被覆された９６ウェルポリ－Ｄ－リジン被覆プレート上で、２％のウマ血清（Ｇｉｂｃｏ）を含むＤＭＥＭ中で筋管に分化させた。ＭｙｏＡＡＶ－、ＡＡＶ９－、又はＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃを、３０分間にわたって３７℃で、組み換え可溶性ヒトインテグリンヘテ

ロ二量体αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、αＶβ８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、又はマルトース－結合タンパク質（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）とともにプレインキュベートした。次に、ウイルス及びタンパク質を、１Ｅ＋４ｖｇ／細胞で細胞に加えた。細胞を、２４時間にわたって３７℃に戻してから、ルシフェラーゼ強度を、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて測定した。

【０６３２】

マウス及びＡＡＶ注射

全ての動物の世話及び実験手順は、Ｂｒｏａｄ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＩＡＣＵＣ）、並びにＨａｒｖａｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ａｎｄ　Ｂｏｓｔｏｎ　Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ　ｈｏｓｐｉｔａｌ　ＩＡＣＵＣに従った。以下のマウスは、Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから購入された：ｍｄｘ（ＪＡＸ、＃００１８０１）、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ（ＪＡＸ、＃０００６６４）、ＤＢＡ／２Ｊ（ＪＡＸ、０００６７１）、ＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘ（ＪＡＸ、０１３１４１）、及びＢＡＬＢ／ｃＪマウス（ＪＡＸ、＃０００６５１）。ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ実験では、８週齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、１Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰ、又は２Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ－、又はＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰのいずれかを注射した。ＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ実験では、８週齢のｍｄｘマウスに、４．５Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－ＳａＣａｓ９及び９Ｅ＋１２ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ－ｇＲＮＡを注射した。インビボイメージング実験では、本発明者らは、８週齢のＢＡＬＢ／ｃＪマウスに、４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、若しくはＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃのいずれか、又は２Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶｒｈ７４－、ＡＡＶ９－、若しくはＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｆｌｕｃを注射した。衛星細胞形質導入実験では、６か月齢のｍｄｘ；Ａｉ９マウスに、４Ｅ＋１１ｖｇのＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｃｒｅを注射した。ＭＴＭ１　ＫＯマウスに、２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射した。本発明者らは、ＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスに、２Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－、又はＥＭｙｏＡＡＶ－ＣＫ８－マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧを注射した。全ての注射は、眼窩後方に行った。

【０６３３】

マウスの活動測定

ａｃｔｉｍｅｔｅｒ（Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓ）を用いて、２週間置きに各マウスの立ち上がり行動の回数を測定した。各動物を、ａｃｔｉｍｅｔｅｒのケージに５分間入れ、立ち上がり行動の回数を、Ａｃｔｉｔｒａｃｋソフトウェアを用いて、その期間について定量した。自発的な回し車の回転を測定するために、マウスを５週齢の時点で個室に収容し、生涯を通じて薄型のワイヤレス回し車（Ｍｅｄ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ）を備えたケージで飼育した。動物は、回し車に自由に出入りし、それらの上で自発的に走ることができた。各回し車の回転を継続的に記録し、データを週１回ダウンロードし、その際に回し車を清掃し、適切に操作するかどうかを点検した。データを正規化するために、各週の全活動を、１時間あたりの車の回転の合計の平均として表した。

【０６３４】

免疫蛍光

ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射されたＣ６７ＢＬ／６Ｊマウスから採取された組織について、サンプルを、室温（ＲＴ）で１時間にわたって４％のパラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、ＤＰＢＳで３回洗浄した。固定された組織を、４Ｃで３０％のスクロースに浸水するまで浸漬させ、Ｏ．Ｃ．Ｔ化合物（Ｔｉｓｓｕｅ－Ｔｅｋ）に包埋し、液体窒素低温イソペンタン中で凍結させた。ＡＡＶ－ＣＲＩＰＳＲを注射されたｍｄｘマウスから採取された筋肉を、解剖の直後に液体窒素低温イソペンタン中で凍結させた。組織を、ＣＭ１８６０クリオスタット（Ｌｅｉｃａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて、１２μｍの厚さの切片にした。組織切片のラミニン及びジストロフィン免疫染色を、以前に記

載されたように行った（Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧ免疫染色では、組織切片を、ジストロフィン免疫染色と同じプロトコルを用いて、ウサギ抗ＦＬＡＧ抗体（Ｓｉｇｍａ）で染色した。肝臓サンプルのレクチン染色では、組織切片を、ＰＢＳＴ（ＰＢＳ＋０．１％のＴｗｅｅｎ－２０）で３×５分洗浄し、室温で１０分間にわたって１０μｇ／ｍｌのＤｙｌｉｇｈｔ　５９４（Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で標識したリコペルシコン・エスクレンタム（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　Ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍ）（トマト）レクチンとともにインキュベートし、ＰＢＳＴで３×５分洗浄し、５分間にわたって１０μｇ／ｍｌのＨｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）で染色し、ＰＢＳＴで２×５分洗浄し、ＤＡＰＩ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）なしでＶｅｃｔａｓｈｉｅｌｄ退色防止封入媒体を用いてマウントした。インビトロで分化した筋管を、以前に記載されたようにミオシン重鎖（ＭＨＣ）について免疫染色した（Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。

【０６３５】

ウエスタンブロット

ジストロフィンウエスタンブロットでは、タンパク質を、ＲＩＰＡ緩衝液（Ｃｅｌｌ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）を用いて筋肉サンプルから抽出した。全タンパク質（２５μｇ）を、酢酸トリス３～８％ステインフリーポリアクリルアミドゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いた電気泳動によって分離し、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜（Ｂｉｏｒａｄ）に転写した。各ゲルの最初の３レーンについて、全てのレーンの全タンパク質量が同じ（２５μｇ）になるように、異なるパーセンテージの野生型筋肉タンパク質を、同じ筋肉型からのｍｄｘタンパク質で希釈した。膜を、室温で１時間にわたってＴＢＳＴ（ＴＢＳ＋０．１％のＴｗｅｅｎ－２０）中の５％の脱脂乳（Ｂｉｏｒａｄ）でブロックした。ジストロフィン及びＧＡＰＤＨ（ローディング対照）を、ジストロフィン（１：１００、Ａｂｃａｍ、ａｂ１５２７７）及びＧＡＰＤＨ（１：２５０００、Ｓａｎｔａ－Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ｓｃ－３２２３３）に対する一次抗体、続いて、ヤギ抗ウサギＩｇＧ　ＨＲＰ結合（１：５０００、ａｂｃａｍ　ａｂ９７０５１）又はウマ抗マウスＩｇＧ　ＨＲＰ結合（１：５０００、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　７０７６Ｐ２）二次抗体のそれぞれによって検出した。ジストロフィン及びＧＡＰＤＨのサイズの大きな差、並びに異なる電気泳動時間の必要条件のため、同じタンパク質サンプルを、２つの酢酸トリス３～８％ゲルで泳動して、ジストロフィン及びＧＡＰＤＨブロットを生成した。ＦｌｕｏｒＣｈｅｍ　Ｅイメージングシステム（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｉｍｐｌｅ）を用いて、Ｓｕｐｅｒｓｉｇｎａｌ　ｗｅｓｔ　Ｄｕｒａ　ＥＣＬキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）の使用後に化学発光を検出した。全タンパク質中のジストロフィンの相対量を、Ｉｍａｇｅ　Ｊを用いて計算されたジストロフィン及びＧＡＰＤＨシグナルの比率によって半定量的に評価し、任意単位（Ａ．Ｕ．）で示す。マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧウエスタンブロットでは、ＡＡＶ９及びＥＭｙｏＡＡＶを注射したマウスの前脛骨筋、大腿四頭筋、三頭筋、及び心臓からの組織溶解物中のタンパク質含量を、Ｐｉｅｒｃｅ　６６０ｎｍタンパク質アッセイ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて測定した。各サンプルからの２０μｇの全タンパク質を、４～２０％のＣｒｉｔｅｒｉｏｎ　ＴＧＸゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）におけるＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分画し、製造業者の説明書（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に従って、湿潤転写タンクにおいてＰＶＤＦ膜に転写した。膜を、ＴＢＳＴ中の５％ｗ／ｖの脱脂粉乳（１０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１％のＴｗｅｅｎ－２０）中で１時間ブロックし、それぞれＴＢＳＴで１０分間にわたって３回洗浄し、１６時間にわたって４℃で、ＦＬＡＧタグ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｆ７４２５、１：４００）又はＧＡＰＤＨ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　ｓｃ－３２２３３、１：２５，０００）に対する一次抗体とともにインキュベートした。次に、膜を、それぞれＴＢＳＴで１０分間にわたって３回洗浄し、室温で１時間にわたって、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗ウサギ（Ａｂｃａｍ　ａｂ９７０５１、１：５０００）又は抗マウス（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　７０７６Ｐ２、１：５０００）二次抗体中でインキュ

ベートした。ブロットを、ＴＢＳＴで３回洗浄し、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ ＰＬＵＳ化学発光基質（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて発色させ、ＣＣＤ撮像装置を用いてイメージングした。

【０６３６】

インテグリンα８及びαＩＩｂウエスタンブロットでは、全細胞抽出物を、ＮＰ－４０溶解緩衝液（１５０ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ ｐＨ７．５、１％のＮＰ－４０）中での溶解及び細胞残屑を除去するための遠心分離によって、ｐＵＣ１９、α８、又はαＩＩｂインテグリン一本鎖を過剰発現するＨＥＫ２９３細胞から調製した。各サンプルからの２μｇの全タンパク質を、４～２０％のＭｉｎｉ－ＰＲＯＴＥＡＮ ＴＧＸゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）において電気泳動させ、ＰＶＤＦ膜に転写した。膜を、ＴＢＳＴ中５％ｗ／ｖの脱脂粉乳中で１時間ブロックし、１６時間にわたって４℃で、インテグリンα８（１：１０００、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＭＡ５－３１４４９）、インテグリンαＩＩｂ（１：５０００、ａｂｃａｍ ａｂ１３４１３１）、又はα－チューブリン（１：５０００、ａｂｃａｍ ａｂ７２９１）に対する一次抗体とともにインキュベートした。次に、膜を、それぞれＴＢＳＴで１０分間にわたって３回洗浄し、室温で１時間にわたって１：１０，０００希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗マウス又は抗ウサギ二次抗体でインキュベートした。ブロットを、ＴＢＳＴで３回洗浄し、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ ＰＬＵＳ化学発光基質（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて発色させた。α８ブロットを、ＣＣＤ撮像装置（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ）を用いてイメージングし、αＩＩｂブロットを、Ｘ線フィルムにおいて、２０秒及び１５分の露光時間で、α－チューブリン及びαＩＩｂ切片のそれぞれについてイメージングした。

【０６３７】

フローサイトメトリー

ｐＵＣ１９又はインテグリン一本鎖を過剰発現するＨＥＫ２９３細胞を、５ｍＭのＥＤＴＡを含有するＰＢＳ中に採取し、染色緩衝液（ＰＢＳ中２％のＦＢＳ）で３回洗浄した。次に、細胞を、染色緩衝液で希釈された一次抗体中で、４℃で１時間染色した。細胞を、染色緩衝液で３回洗浄した。インテグリンβ８抗体で染色されたサンプルについて、細胞を、染色緩衝液で希釈されたＰＥコンジュゲートヤギ抗マウスＩｇＧ二次抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１２－４０１０－８２）とともに４℃で３０分間インキュベートした。細胞を３回洗浄し、染色緩衝液中で再懸濁させ、ＣｙｔｏＦＬＥＸ Ｓフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ）を用いて分析した。フローサイトメトリーデータを、ＦｌｏｗＪｏを用いて分析した。

【０６３８】

マウス衛星細胞の単離、培養、及び分化

ＡＡＶ－ＣＭＶ－Ｃｒｅを注射されたｍｄｘ－Ａｉ９マウスからの衛星細胞単離を、以前に記載されたように行った（Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１９）。注射された動物から単離された衛星細胞を、衛星細胞増殖培地（１％のＧｌｕｔａｍａｘ（ＬｉｆｅＴｅｃｈ）、１％のペニシリン－ストレプトマイシン（ＬｉｆｅＴｅｃｈ）、及び５ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦ（Ｓｉｇｍａ）を含有するＦ１０（Ｇｉｂｃｏ）中２０％のドナーウマ血清（Ａｔｌａｎｔａ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ））中で、コラーゲン／ラミニン被覆プレートに播種した。増殖培地を１日置きに交換した。６日後、衛星細胞を採取し、細胞数を計数し、細胞を、分化のために１０，０００個の細胞／ウェルの密度で、９６ウェルプレートの複数のウェルに再プレーティングした。翌日、増殖培地を、分化培地（２％のドナーウマ血清（Ａｔｌａｎｔａ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ）を含有するＤＭＥＭ（ＧＩＢＣＯ））に交換した。分化の開始から６０時間後、筋管を、４％のＰＦＡで固定した。

【０６３９】

筋肉生理学分析

マウスを、前脛骨筋のインサイチュ評価のために、以前に記載されたように調製した（Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ ｅｔ ａｌ．，２０１６）。筋力を、２０～２００Ｈｚの範囲

の９つの異なる刺激周波数で記録した。得られたデータを、Ｐ＝Ｐ$_{min}$＋（（Ｐ$_{max}$－Ｐ$_{min}$）／（１＋（Ｋ／ｆ）$^{H}$））の形式のＳ字形曲線によってフィットさせ、式中、Ｐは、刺激周波数ｆにおける筋力であり、Ｐ$_{min}$は、最小の筋力であり、Ｐ$_{max}$は、最大の筋力であり、Ｋは、曲線の変曲点における刺激周波数であり、Ｈは、ヒル係数又は傾きである（Ｃｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。パラメータＫを用いて、変曲点における筋力を計算し、それは、中間筋力又はＰ$_{int}$と呼ばれた。次に、ＴＡを、一連の５回の等尺性－伸張性収縮に供して、損傷（１００ｍｓの固定端収縮の直後に、４線維長／ｓで１．２線維長の最終長までの積極的伸展）に対するその感受性を評価した。このシリーズは、等尺性筋力の損失を、プロトコル前及びプロトコル後の筋力間の相対的差異として定量化し得るように、等尺性収縮によって一括りにされた。線維長及びＴＡの断面積を、以前に記載されたように計算した（Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。

【０６４０】

生物発光画像法

マウスに、１５０ｍｇ／ｋｇのＤ－ルシフェリン（Ｇｏｌｄｂｉｏ）を注射し、イソフルランで麻酔してからイメージングした。生物発光画像を、Ｄ－ルシフェリン注射の５分後に、２分当たり１画像の速度で２５分間にわたって取得した。全及び平均放射輝度を、Ｌｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅ　４．７．３ソフトウェア（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いて、同じサイズの関心領域（ＲＯＩ）から測定した。イメージング時間にわたって捕捉された最も高い放射輝度を、反応速度曲線のピークとして決定し、分析のために選択した。切開された筋肉からの放射輝度を測定するために、マウスを、Ｄ－ルシフェリン注射の１２分後に安楽死させた。切開された筋肉を、ペトリ皿に入れた後、ＩＶＩＳスペクトルを用いて生物発光画像法を行った。

【０６４１】

参考文献

Ａｓｏｋａｎ，Ａ．，Ｈａｍｒａ，Ｊ．Ｂ．，Ｇｏｖｉｎｄａｓａｍｙ，Ｌ．，Ａｇｂａｎｄｊｅ－ＭｃＫｅｎｎａ，Ｍ．，ａｎｄ　Ｓａｍｕｌｓｋｉ，Ｒ．Ｊ．（２００６）．Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒｕｓ　ｔｙｐｅ　２　ｃｏｎｔａｉｎｓ　ａｎ　ｉｎｔｅｇｒｉｎ　ａｌｐｈａ５ｂｅｔａ１　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｄｏｍａｉｎ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｆｏｒ　ｖｉｒａｌ　ｃｅｌｌ　ｅｎｔｒｙ．Ｊ　Ｖｉｒｏｌ　８０，８９６１－８９６９．

【０６４２】

Ｂｅｎｇｔｓｓｏｎ，Ｎ．Ｅ．，Ｈａｌｌ，Ｊ．Ｋ．，Ｏｄｏｍ，Ｇ．Ｌ．，Ｐｈｅｌｐｓ，Ｍ．Ｐ．，Ａｎｄｒｕｓ，Ｃ．Ｒ．，Ｈａｗｋｉｎｓ，Ｒ．Ｄ．，Ｈａｕｓｃｈｋａ，Ｓ．Ｄ．，Ｃｈａｍｂｅｒｌａｉｎ，Ｊ．Ｒ．，ａｎｄ　Ｃｈａｍｂｅｒｌａｉｎ，Ｊ．Ｓ．（２０１７）．Ｍｕｓｃｌｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｄｙｓｔｒｏｐｈｉｎ　ｇｅｎｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ　ａｍｅｌｉｏｒａｔｅｓ　ｐａｔｈｏｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ　ｉｎ　ａ　ｍｏｕｓｅ　ｍｏｄｅｌ　ｆｏｒ　Ｄｕｃｈｅｎｎｅ　ｍｕｓｃｕｌａｒ　ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ．Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ　８，１４４５４．

【０６４３】

Ｂｅｒｒｙ，Ｇ．Ｅ．，ａｎｄ　Ａｓｏｋａｎ，Ａ．（２０１６）．Ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ　ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ　ｏｆ　ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒａｌ　ｖｅｃｔｏｒｓ．Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｖｉｒｏｌ　２１，５４－６０．

【０６４４】

Ｃｅｒｌｅｔｔｉ，Ｍ．，Ｊｕｒｇａ，Ｓ．，Ｗｉｔｃｚａｋ，Ｃ．Ａ．，Ｈｉｒｓｈｍａｎ，Ｍ．Ｆ．，Ｓｈａｄｒａｃｈ，Ｊ．Ｌ．，Ｇｏｏｄｙｅａｒ，Ｌ．Ｊ．，ａｎｄ　Ｗａｇｅｒｓ，Ａ．Ｊ．（２００８）．Ｈｉｇｈｌｙ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ，ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｅｎｇｒａｆｔｍｅｎｔ　ｏｆ　ｓｋｅｌｅｔａｌ　ｍｕｓｃｌｅ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎ　ｄｙｓｔｒｏｐｈｉｃ　ｍｕｓｃｌｅｓ．Ｃｅｌｌ　１３４，３７－４７．

【0645】
Chan, K.Y., Jang, M.J., Yoo, B.B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.L., Sanchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S.K., Deverman, B.E., et al. (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. Nat Neurosci 20, 1172-1179.
【0646】
Chan, S., Head, S.I., and Morley, J.W. (2007). Branched fibers in dystrophic mdx muscle are associated with a loss of force following lengthening contractions. Am J Physiol Cell Physiol 293, C985-992.
【0647】
Childers, M.K., Joubert, R., Poulard, K., Moal, C., Grange, R.W., Doering, J.A., Lawlor, M.W., Rider, B.E., Jamet, T., Daniele, N., et al. (2014). Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy. Sci Transl Med 6, 220ra210.
【0648】
Dalkara, D., Byrne, L.C., Klimczak, R.R., Visel, M., Yin, L., Merigan, W.H., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2013). In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. Sci Transl Med 5, 189ra176.
【0649】
Davidsson, M., Wang, G., Aldrin-Kirk, P., Cardoso, T., Nolbrant, S., Hartnor, M., Mudannayake, J., Parmar, M., and Bjorklund, T. (2019). A systematic capsid evolution approach performed in vivo for the design of AAV vectors with tailored properties and tropism. Proc Natl Acad Sci U S A.
【0650】
Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., et al. (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. Nat Biotechnol 34, 204-209.
【0651】
DiMattia, M.A., Nam, H.J., Van Vliet, K., Mitchell, M., Bennett, A., Gurda, B.L., McKenna, R., Olson, N.H., Sinkovits, R.S., Potter, M., et al. (2012). Structural insight into the un

ique properties of adeno-associated virus serotype 9. J Virol 86, 6947-6958.
【0652】
Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., and Engelhardt, J. F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. Gene Ther 12, 873-880.
【0653】
Duan, D. (2018a). Micro-Dystrophin Gene Therapy Goes Systemic in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. Hum Gene Ther 29, 733-736.
【0654】
Duan, D. (2018b). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. Mol Ther 26, 2337-2356.
【0655】
Dudek, A. M., Pillay, S., Puschnik, A. S., Nagamine, C. M., Cheng, F., Qiu, J., Carette, J. E., and Vandenberghe, L. H. (2018). An Alternate Route for Adeno-associated Virus (AAV) Entry Independent of AAV Receptor. J Virol 92.
【0656】
Elverman, M., Goddard, M. A., Mack, D., Snyder, J. M., Lawlor, M. W., Meng, H., Beggs, A. H., Buj-Bello, A., Poulard, K., Marsh, A. P., et al. (2017). Long-term effects of systemic gene therapy in a canine model of myotubular myopathy. Muscle Nerve 56, 943-953.
【0657】
Farris, K. D., and Pintel, D. J. (2008). Improved splicing of adeno-associated viral (AAV) capsid protein-supplying pre-mRNAs leads to increased recombinant AAV vector production. Hum Gene Ther 19, 1421-1427.
【0658】
Gao, G., Lu, Y., Calcedo, R., Grant, R. L., Bell, P., Wang, L., Figueredo, J., Lock, M., and Wilson, J. M. (2006). Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. Mol Ther 13, 77-87.
【0659】
Goldstein, J. M., Tabebordbar, M., Zhu, K., Wang, L. D., Messemer, K. A., Peacker, B., Ashrafi Kakhki, S., Gonzalez-Celeiro, M., Shwartz, Y., Cheng, J. K. W., et al. (2019). In Situ Modification of Tissue Stem and Progenitor Cell Genomes. Cell Rep 27, 1254-1264 e1257.
【0660】

Hakim, C. H., Wasala, N. B., Pan, X., Kodippili, K., Yue, Y., Zhang, K., Yao, G., Haffner, B., Duan, S. X., Ramos, J., et al. (2017). A Five-Repeat Micro-Dystrophin Gene Ameliorated Dystrophic Phenotype in the Severe DBA/2J-mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. Mol Ther Methods Clin Dev 6, 216-230.

【0661】

Hanlon, K. S., Meltzer, J. C., Buzhdygan, T., Cheng, M. J., Sena-Esteves, M., Bennett, R. E., Sullivan, T. P., Razmpour, R., Gong, Y., Ng, C., et al. (2019). Selection of an Efficient AAV Vector for Robust CNS Transgene Expression. Mol Ther Methods Clin Dev 15, 320-332.

【0662】

Hinderer, C., Katz, N., Buza, E. L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L. K., and Wilson, J. M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. Hum Gene Ther 29, 285-298.

【0663】

Hordeaux, J., Wang, Q., Katz, N., Buza, E. L., Bell, P., and Wilson, J. M. (2018). The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. Mol Ther 26, 664-668.

【0664】

Levitt, N., Briggs, D., Gil, A., and Proudfoot, N. J. (1989). Definition of an efficient synthetic poly(A) site. Genes Dev 3, 1019-1025.

【0665】

Li, C., and Samulski, R. J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. Nat Rev Genet 21, 255-272.

【0666】

Mack, D. L., Poulard, K., Goddard, M. A., Latournerie, V., Snyder, J. M., Grange, R. W., Elverman, M. R., Denard, J., Veron, P., Buscara, L., et al. (2017). Systemic AAV8-Mediated Gene Therapy Drives Whole-Body Correction of Myotubular Myopathy in Dogs. Mol Ther 25, 839-854.

【0667】

Mendell, J. R., Sahenk, Z., Lehman, K., Nease, C., Lowes, L. P., Miller, N. F., Iammarino, M. A., Alfano, L. N., Nicholl, A., Al-Zaidy, S., et al. (2020). Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Ch

ildren With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Neurol.
【0668】
Morales, L., Gambhir, Y., Bennett, J., and Stedman, H. H. (2020). Broader Implications of Progressive Liver Dysfunction and Lethal Sepsis in Two Boys following Systemic High-Dose AAV. Mol Ther 28, 1753-1755.
【0669】
Murrey, D. A., Naughton, B. J., Duncan, F. J., Meadows, A. S., Ware, T. A., Campbell, K. J., Bremer, W. G., Walker, C. M., Goodchild, L., Bolon, B., et al. (2014). Feasibility and safety of systemic rAAV9-hNAGLU delivery for treating mucopolysaccharidosis IIIB: toxicology, biodistribution, and immunological assessments in primates. Hum Gene Ther Clin Dev 25, 72-84.
【0670】
Nelson, C. E., Hakim, C. H., Ousterout, D. G., Thakore, P. I., Moreb, E. A., Castellanos Rivera, R. M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F. A., Yan, W. X., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science 351, 403-407.
【0671】
Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309, 30-33.
【0672】
Pillay, S., Meyer, N. L., Puschnik, A. S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y., Jae, L. T., Wosen, J. E., Nagamine, C. M., Chapman, M. S., et al. (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature 530, 108-112.
【0673】
Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Asokan, A. (2011). Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. Mol Ther 19, 1070-1078.
【0674】
Pytela, R., Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein w

ith properties expected of a fibronectin receptor. Cell 40, 191-198.
【0675】
Rosemary C Challis, S. R. K., Ken Y Chan, Collin Challis, Min J Jang, Pradeep S Rajendran, John D Tompkins, Kalyanam Shivkumar, Benjamin E Deverman, Viviana Gradinaru (2018). Widespread and targeted gene expression by systemic AAV vectors: Production, purification, and administration. bioRxiv.
【0676】
Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. Annu Rev Cell Dev Biol 12, 697-715.
【0677】
Salva, M. Z., Himeda, C. L., Tai, P. W., Nishiuchi, E., Gregorevic, P., Allen, J. M., Finn, E. E., Nguyen, Q. G., Blankinship, M. J., Meuse, L., et al. (2007). Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. Mol Ther 15, 320-329.
【0678】
Summerford, C., Bartlett, J. S., and Samulski, R. J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. Nat Med 5, 78-82.
【0679】
Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J. K. W., Chew, W. L., Widrick, J. J., Yan, W. X., Maesner, C., Wu, E. Y., Xiao, R., Ran, F. A., et al. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. Science 351, 407-411.
【0680】
Wu, Z., Asokan, A., Grieger, J. C., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R. J. (2006). Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. J Virol 80, 11393-11397.
【0681】
Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J. E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. Mol Ther 16, 1073-1080.
【0682】
実施例7－種間で強力な筋指向性遺伝子送達を可能にする操作ＡＡＶカプシド変異体のクラスの指向進化。

組み換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）は、前臨床及び臨床研究におけるインビボ遺伝子置換療法及び遺伝子編集のための最も一般的に使用されるビヒクルであるが、全身送達後の特定の組織の選択的形質導入は、いまだ課題である。天然カプシドを用いて生成された組み換えＡＡＶは、主に、全身注射後に肝臓内に隔離される。この隔離により、他の器官における形質導入の効率が制限され（（Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，２００６；Ｍｕｒｒｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｚｉｎｃａｒｅｌｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）、骨格筋への遺伝子送達に特定の課題がもたらされる。筋肉は、全体重の最大で４０％を構成するため、天然カプシド変異体により筋肉における治療閾値を達成するには、極めて高いウイルス量（約２Ｅ＋１４ｖｇ／ｋｇ）（Ｄｕａｎ，２０１８）を必要とし、これは、ベクター製造にとって厄介な障害を生じ、いくつかの最近の臨床試験において観察されるように、治療制限毒性をもたらし得る（Ｍｏｒａｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）。

【０６８３】

インビボ選択と連動されたＡＡＶカプシドタンパク質操作は、様々な組織への強力な遺伝子送達を可能にする有望な手法である。ＡＡＶカプシド指向進化手法は、典型的に、様々な方法によって多様なカプシドライブラリーを生成すること、その後、動物モデルにおいて所望の指向性を有する変異体の選択を含む。この手法は、いくつかの組織への送達のために最適化されたベクターを生成した（Ｃｈｏｕｄｈｕｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｄａｌｋａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３；Ｄｅｖｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｋｏｒｂｅｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｍｉｃｈｅｌｆｅｌｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００９；Ｔｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００９；Ｙａｎｇ　ａｎｄ　Ｘｉａｏ，２０１３）。

【０６８４】

ＡＡＶ形質導入は、細胞表面における受容体への結合、細胞内移動、エンドソーム脱出、核移行、ベクターゲノム第二鎖ＤＮＡ合成、及び導入遺伝子発現（（Ｂｅｒｒｙ　ａｎｄ　Ａｓｏｋａｎ，２０１６；Ｄｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）、図Ｓ１Ａ）を含む多段階プロセスであり、これらの工程のいずれかにおける非効率性が、ベクター効力を制限し得る。したがって、強力なカプシドの同定の成功には、形質導入の全ての段階を通して効果的に進行する変異体を選択することが必要である。しかしながら、インビボカプシド指向進化手法の大部分は、上首尾のカプシド変異体を、対象とする組織において、導入遺伝子ｍＲＮＡではなく、ベクターゲノムＤＮＡの存在に基づいて選択する（Ｌｉ　ａｎｄ　Ｓａｍｕｌｓｋｉ，２０２０）。ＡＡＶ形質導入に関与する遺伝子のコード配列及び発現の種特異的及び株特異的な差は、特定のマウス株において選択されたカプシド変異体が、他の株又は他の種において強力な形質導入をもたらさないことがあるため、さらに別の課題を示す（Ｈｏｒｄｅａｕｘ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８）。したがって、異なる株及び種にわたって機能的カプシド変異体のストリンジェントな選択を可能にする指向進化手法が、非常に適切であり、必要である。

【０６８５】

この実施例は、少なくとも、多様なカプシドライブラリー生成を、ストリンジェントな転写産物ベースのインビボ選択と組み合わせて、指向進化を可能にし、続いて対象とする任意の組織及び任意の動物モデルにおいて機能的カプシド変異体を同定するＤＥＬＩＶＥＲ（Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　ｏｆ　ＡＡＶ　ｃａｐｓｉｄｓ　Ｌｅｖｅｒａｇｉｎｇ　Ｉｎ　Ｖｉｖｏ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　ｔｒａｎｓｇｅｎｅ　ＲＮＡ）手法を説明及び実証する。この実施例は、マウス及び非ヒト霊長類における筋指向性カプシドを開発するためのＤＥＬＩＶＥＲの有用性を実証し、これらの結果を、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）についての遺伝子置換試験（ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子：ＮＣＴ０３３６２５０２、ＮＣＴ０３３６８７４２、ＮＣＴ０３３７５１６４、及びＮＣＴ０３７６９１１６）において現在臨床的に使用されている天然ＡＡＶカプシドであるＡＡＶ９及びＡＡＶｒｈ７４と比較する。全体として、この筋指向性ベクターは、骨格筋及び心臓組織の両方の形質導入について優れた効力及び選択性を実証し、ＡＡＶ９と比較した際に大幅に減少した投与量で、並びにマウス、ＮＨＰ、及

びヒト筋細胞にわたって保存された形質導入効力で、治療効果をもたらす。マウス及びＮＨＰにおける筋肉で富化された変異体カプシド配列の相互比較により、最上位の変異体の間で共通のＲＧＤモチーフが同定され、さらなる分析により、ＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体の標的細胞発現との強力な相互作用、及びそれに対する依存が明らかになった。総合すれば、この研究は、治療法の開発及び横紋筋における試験のための特定の有用性を有するあるクラスのＡＡＶカプシド変異体、並びに代替的な組織指向性を有するＡＡＶのさらなるファミリーの今後の進化のための実験的フレームワークを提供する。

【０６８６】

結果

ＤＥＬＩＶＥＲを用いたＡＡＶ９カプシドのインビボ進化は、あるクラスの筋指向性変異体を識別する。

【０６８７】

この研究のために設計されたＡＡＶ９ベースのカプシドライブラリーは、インビボでの使用のための高い効力を有する筋指向性ベクターの同定を促進するいくつかの重要な特徴を含んでいた。最初に、各変異体は、ＡＡＶ９カプシドの超可変領域ＶＩＩＩにおけるアミノ酸５８８及び５８９の間に挿入されたランダム７量体ペプチドを含んでおり、カプシド表面における可変ペプチド配列の露出を確実にする設計を含んでいた（（Ｂｏｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０；ＤｉＭａｔｔｉａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２））、図１４Ａ）。各変異体はまた、ユビキタス又は細胞型特異的哺乳動物プロモーターのいずれかの制御下でそれ自体のカプシド配列をコードする導入遺伝子を封入し、これにより、ウイルスライブラリーの生成に使用されるＨＥＫ２９３細胞（図１４Ｂ）及びインビボ送達後にウイルスで形質導入される動物組織（図１４Ｃ～１４Ｄ）の両方における導入遺伝子（カプシド変異体）の発現が可能になった。

【０６８８】

異なるマウス組織を機能的に形質導入するカプシド変異体を選択するためのＤＥＬＩＶＥＲのストリンジェンシーを、ユビキタスＣＭＶプロモーター下でカプシド変異体が発現されたウイルスライブラリーを用いて、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおいて最初に評価した。様々な組織においてＤＮＡ及びｍＲＮＡレベルでウイルスライブラリーと比べて富化された変異体を同定した。ｍＲＮＡ発現に基づく変異体の選択により、ベクターゲノムＤＮＡの存在に基づく選択と比較して、少数精鋭の機能的カプシドが得られ（図２１Ａ～２１Ｇ）、これは、標的細胞に物理的に侵入するカプシド変異体のごく一部のみが、これらの細胞を機能的に形質導入して、それらのコードされる導入遺伝子を発現することができることを示唆する。この知見と一致して、注射されたウイルスライブラリー中でより多い量のカプシド変異体が、ベクターゲノムＤＮＡレベルで注射された動物の肝臓中により多く存在していたが、ウイルスライブラリーにおける各変異体の量と肝臓における同じ変異体からの導入遺伝子ｍＲＮＡのレベルとの間に相関はほとんどなかった（図２１Ｈ～２１Ｉ）。

【０６８９】

次に、強力な筋指向性カプシド変異体の選択を強化するために筋特異的プロモーターを使用する実現可能性を評価した。骨格筋及び心筋は、いくつかの異なる細胞型を含むが、特に２つの細胞型、すなわち、筋線維及び心筋細胞への有効な導入遺伝子送達が可能なＡＡＶカプシドが、遺伝的筋疾患のための治療遺伝子送達にとって最も望ましい。インビボでこれらの細胞型で特異的に発現した変異体の選択を可能にするために、本発明者らは、ＩＴＲ含有構築物を用いて、カプシドコード配列の発現を筋特異的ＣＫ８又はＭＨＣＫ７プロモーターによって制御したＨＥＫ２９３細胞内でＡＡＶカプシドライブラリーを生成した。これらの構築物は、ユビキタスＣＭＶプロモーター下でカプシドを発現する構築物を用いて生成されたものと同様のｒＡＡＶ力価を生じた（図１４Ｂ）。さらに、注射されたマウスの骨格筋及び心筋内で、ＣＫ８又はＭＨＣＫ７プロモーター下で発現されたウイルスライブラリーは、ＣＭＶ下で発現されるものと比較して同様か又はより高い導入遺伝子ｍＲＮＡ発現を生じ、筋線維及び心筋細胞を形質導入する機能的変異体の同定を大幅に

促進した（図１４Ｃ～１４Ｄ）。

【０６９０】

指向進化による２回のインビボ選択を行い、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの複数の様々な筋肉におけるＭＨＣＫ７プロモーターから発現されたカプシド変異体をスクリーニングした。１回目のウイルスライブラリーのシーケンシングにより、５，０００，０００超の固有のカプシド変異体を同定した。１回目の選択の後、本発明者らは、７種の筋肉（大腿四頭筋、前脛骨筋、腓腹筋、三頭筋、腹筋、横隔膜筋、及び心筋）において高度に発現された最上位の３０，０００の変異体を選択した（図１４Ａ及び１４Ｅ）。２回目のインビボ選択では、２つの対照を導入した。１つ目は、同義コドン対照であり、一次スクリーニングからの各選択された変異体に対して同定された同じ７量体挿入ペプチドが、同義ＤＮＡコドンを用いてコードされている。２つ目は、発現対照であり、二連のウイルスライブラリーを、２つの骨格筋特異的プロモーター、ＣＫ８又はＭＨＣＫ７のいずれかの下で変異体を発現させるために生成した（図１４Ａ）。

【０６９１】

著しくは、２回目の選択では、ＣＫ８又はＭＨＣＫ７ライブラリーのいずれかから筋肉内で高度に発現された最上位の１２カプシド変異体の全てが、７量体インサートの最初の３つのアミノ酸位置に同じアルギニン－グリシン－アスパラギン酸（ＲＧＤ）モチーフを含有していた。筋肉のそれらの優れた形質導入におけるこれらのカプシド変異体に含まれる特定のペプチド配列、ＣＫ８群では最上位１２のうち１０ヒット及びＭＨＣＫ７群では最上位１２のうちの８ヒットが、同義対に由来していたことがさらに示唆される（すなわち、同義ＤＮＡコドンによってコードされた対応する変異体も、最上位の１２の筋発現変異体内にあった）（図１４Ｆ）。

【０６９２】

最上位５つの固有のＲＧＤ含有カプシド変異体を用いて生成されたｒＡＡＶの力価を定量化して、これらの操作カプシドをインビボ研究に使用することの実現可能性を評価した。ｒＡＡＶの力価の比較は、最上位５つのＲＧＤ含有カプシド変異体と親ＡＡＶ９カプシドとの間の有意な差を示さなかった（図２２Ｅ）。最上位１２のＲＧＤ含有ヒットからの各位置でコンセンサスアミノ酸ともマッチするＲＧＤＬＴＴＰ（配列番号１２）ペプチド挿入を含む変異体を、さらなる特性評価のために選択し、この変異体を「ＭｙｏＡＡＶ１Ａ」（本明細書における他の箇所においてＭｙｏＡＡＶとも呼ばれる）と命名した。

【０６９３】

ＭｙｏＡＡＶ　１Ａは、全身投与後に高い効率でマウス筋肉を形質導入する

全身送達後に様々なマウス組織において、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを用いて生成されたｒＡＡＶの形質導入プロファイル及び生体内分布を調べるために、成体Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、１Ｅ＋１２ｖｇ（約４Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇ）のＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射し、注射の２週間後に様々な組織における導入遺伝子発現及びベクターゲノム量を分析した。採取した組織の全載蛍光イメージングは、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射したマウスの筋肉において、はるかに高い蛍光強度を示した（図１５Ａ及び２２Ａ）。重要なことには、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａは、多くの遺伝的筋疾患の主要な罹患器官である心臓を、ＡＡＶ９より有効に形質導入した。ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射したマウスの筋線維及び心筋細胞における強力な導入遺伝子発現を、免疫蛍光分析によってさらに確認した（図１５Ｂ及び２２Ｂ）。意外なことに、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａは、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおいて全身送達後に肝臓の比較的減少した形質導入を示し、これは、ＡＡＶ９と比較して、この変異体についての肝臓標的解除した形質導入プロファイルを示唆する（図１５Ａ～１５Ｃ）。

【０６９４】

雄及び雌Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの様々な骨格筋におけるＥＧＦＰ　ｍＲＮＡの定量化は、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａの筋肉において、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、１０～２９倍高い導入遺伝子発現を示した（図１５Ｃ）。ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現は、心臓において６．３倍高く、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射した動物の肝臓において２．８倍低かった

（図１５Ｃ）。とりわけ、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａによって改善された形質導入効率は、横紋筋組織に限られ、この操作カプシド変異体は、ＡＡＶ９と比較して同様又はより低い効率で、注射された動物の肺、腎臓、脾臓、及び脳を形質導入した（図１５Ｃ及び２２Ｃ）。ウエスタンブロット分析により、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射した動物の腓腹筋及び三頭筋においてＥＧＦＰタンパク質の著しく高い発現及び肝臓におけるより低いＥＧＦＰ発現が確認された（図２２Ｊ）。生体内分布分析により、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａが、ＡＡＶ９より有効に、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの腹筋を除く全ての筋肉にベクターゲノムを送達し、全身投与後に肝臓における有意に低い数のベクターゲノムをもたらすことが実証された（図２２Ｄ）。

【０６９５】

異なるマウス株におけるＭｙｏＡＡＶ　１Ａの全身投与後の筋肉形質導入の効率を評価するために、ＢＡＬＢ／ｃＪ及びＤＢＡ／２Ｊバックグラウンドからの雄及び雌マウスに、１Ｅ＋１２ｖｇ（約４Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇ）のＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射し、注射されたマウスの異なる組織における導入遺伝子発現を比較した。全器官イメージング及びＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ定量化は、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａの強力な筋肉形質導入及び肝臓標的解除特性が、ＢＡＬＢ／ｃＪ及びＤＢＡ／２Ｊマウスにも及ぶことを示した（図２９Ａ～２９Ｅ）。

【０６９６】

ＡＡＶ９と比較した、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａの筋肉内送達後の筋肉形質導入の効率も評価した。Ｃ５７ＢＬ／６ＪマウスにおけるＴＡ筋肉への２Ｅ＋１０ｖｇのＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰの筋肉内投与は、ＡＡＶ９を注射したマウスの筋肉と比べてＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射した筋肉において、ウエスタンブロット及び免疫蛍光によって分析される、１４倍高いＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現、並びに著しく高いＥＧＦＰタンパク質発現をもたらした（図２２Ｅ～２２Ｆ及び２２Ｋ）。

【０６９７】

全身ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ投与後の肝臓障害の可能性を調べるために、本発明者らは、ビヒクル（生理食塩水）、又は１Ｅ＋１２ｖｇ（約４Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇ）のＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射されたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）酵素のレベルを、注射前、並びに注射の１４及び２８日後に測定した。ＡＡＶ９又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射したマウスの血清中のＡＬＴ及びＡＳＴ酵素のレベルは、ビヒクルを注射した動物と比較して有意差はなく、これは、本発明者らが注射した用量で肝臓障害がなかったことを示唆する（図２２Ｇ、２２Ｈ）。ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＥＧＦＰを注射されたマウスから単離された血清によるＡＡＶ９及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入の阻害の分析は、ＡＡＶ９に対して生成された抗体が、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａと交差反応し、逆もまた同様であることを実証した（図２９Ｋ～２９Ｌ）。

【０６９８】

次に、ヒト骨格筋を形質導入する際のＭｙｏＡＡＶ　１Ａの効率を分析した。４人の異なるドナー（男性２人及び女性２人）に由来するヒト一次筋管に、インビトロでＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＫ８－ナノルシフェラーゼ（Ｎｌｕｃ）を形質導入した。ＭｙｏＡＡＶ　１Ａは、ＡＡＶ９より３５～５２倍有効に、異なるドナーに由来する筋管を形質導入した（図１５Ｄ）。ＭｙｏＡＡＶ　１Ａはまた、ＡＡＶ９と比較して２３倍高い効率で、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに由来するマウス一次筋管を形質導入した（図１５Ｄ）。

【０６９９】

さらに、静脈内投与後のＭｙｏＡＡＶ　１Ａによる筋肉幹細胞（衛星細胞）形質導入の効率を、６か月齢のｍｄｘ－Ａｉ９マウスにおいて評価した。これらのジストロフィン欠損マウスは、ヒトＤＭＤの遺伝モデルであり、Ｃｒｅ活性化型ｔｄＴｏｍａｔｏ導入遺伝子をさらに保有し、これは、ＣｒｅをコードするＡＡＶによる形質導入のためのレポーターとして働く。ＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｃｒｅを注射

されたマウスの筋肉からの衛星細胞の蛍光活性化細胞分類（ＦＡＣＳ）は、ＭｙｏＡＡＶ１Ａを投与された動物において有意に高いパーセンテージの衛星細胞の形質導入を示した（図２２Ｉ～２２Ｋ）。

【０７００】

ＭｙｏＡＡＶ　１Ａの全身送達後のインビボ遺伝子発現の速度を調べるために、成体ＢＡＬＢ／ｃＪマウスに、４Ｅ＋１１ｖｇ（約１．６Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇ）のＡＡＶ８－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－ホタルルシフェラーゼ（Ｆｌｕｃ）を注射し、注射後１２０日にわたって異なる時点で全身生物発光画像法を行った。ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを投与されたマウスは、ＡＡＶ８又はＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、四肢及び身体全体での導入遺伝子発現のより速い速度及び有意に高い全体レベルを示した（図１６Ａ～１６Ｂ）。注射の４か月後に採取されたマウスの筋肉からの全器官生物発光画像法により、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射した動物の筋肉において著しく高いルシフェラーゼ発現が確認された（図２９Ｍ～２９Ｏ）。

【０７０１】

ＭｙｏＡＡＶ　１Ａが、ＤＢＡ／２Ｊ及びＢＡＬＢ／ｃＪバックグラウンドからのマウスにおいて全身投与後に異なる骨格筋を有効に形質導入し、筋肉内送達後の筋肉形質導入において非常に強力であることをさらに裏付けるさらなる結果が、図２９Ｆ～２９Ｌに示される。

【０７０２】

ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを用いた治療用導入遺伝子の全身投与は、ＤＭＤ及びＸ連鎖筋細管ミオパシー（ＸＬＭＴＭ）のマウスモデルにおける機能的改善をもたらす

治療用導入遺伝子のインビボ送達のためにＭｙｏＡＡＶ　１Ａを使用する実現可能性を調べるために、成体ｍｄｘマウス（Ｄｍｄエクソン２３におけるナンセンス変異を保有するＤＭＤのマウスモデル）に、ＳａＣａｓ９をコードする構築物を保有するＡＡＶ９又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａを、ｍｄｘ変異の５’及び３’を標的とするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）と一緒に注射した（図２４Ａ～２４Ｂ）。本出願人らは、このＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介手法が、ｍｄｘ細胞のゲノムからのエクソン２３の切除及び筋肉における切断されているが依然として機能する形態のジストロフィンタンパク質の発現をもたらすことを既に示している（Ｎｅｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。切断型変異体を生成する一方、このインフレーム欠失は、依然として機能的タンパク質を作製し、それによって、ＤＭＤにおける治療効果をもたらす。

【０７０３】

ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲは、様々なｍｄｘ筋肉において全Ｄｍｄ　ｍＲＮＡの３．４％～２５％の範囲の効率でエクソン２３欠失Ｄｍｄ　ｍＲＮＡの産生をもたらした。対照的に、同じ用量のＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射されたｍｄｘマウスの筋肉におけるエクソン２３欠失ｍＲＮＡの産生の効率は、わずか１．３％～８．７％の範囲であった（図４Ｃ）。ＳａＣａｓ９及びｇＲＮＡ発現の定量化により、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａを注射したマウスの筋肉において６．７～１９倍高いＳａＣａｓ９発現及び３．５～７．８倍高いｇＲＮＡ発現が示された（図２４Ｆ、２４Ｃ）。

【０７０４】

いくつかの知見は、ＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲと比較して、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲによるジストロフィン発現の優れたレスキューを指摘している。免疫蛍光及びウエスタンブロット分析により、ＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲと比較して、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射されたマウスの筋肉におけるより高い及びより多い幅広いジストロフィン修復が確認された（図１８Ｉ～１８Ｊ及び２４Ｆ）。ＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲで処置された動物の前脛骨筋（ＴＡ）筋肉の生理的評価により、ビヒクル又はＡＡＶ９－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲ注射対照のいずれかと比較した際、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲを注射したｍｄｘマウスにおいて有意に高い比筋力（図４Ｄ）及び遠心性収縮後の減少した筋力低下パーセント（図１８Ｅ）が実証された

。したがって、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａは、従来の広く使用されているＡＡＶ９と比較して、筋肉への治療用遺伝子編集複合体の送達について顕著に強化された効力を示す。

【０７０５】

低用量の全身投与後の遺伝子置換についてのＭｙｏＡＡＶ　１Ａの性能を、ＸＬＭＴＭのマウスモデルにおいてさらに評価した。Ｍｔｍ１ノックアウト（ＫＯ）マウスは、ＸＬＭＴＭの優れた遺伝及び表現型モデルを提供し；それらは、顕著な筋肉消耗、運動機能の喪失及び寿命の大幅な短縮を示す。４週齢のＭｔｍ１　ＫＯマウスに、ＭＨＣＫ７プロモーターの制御下で発現されるヒトＭＴＭ１（ｈＭＴＭ１）をコードするＡＡＶ９又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａを２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇで注射した（図２４Ｅ）。本発明者らは、８か月の期間にわたって各群について体重、活動、及び生存を測定した（図１８Ｆ）。この実験において使用されたウイルスの用量は、ＸＬＭＴＭについての進行中のヒト臨床試験（ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子：ＮＣＴ０３１９９４６９）において使用されている用量の５０～１５０分の１であり、ＸＬＭＴＭ遺伝子治療についての既に公開されている前臨床試験（Ｃｈｉｌｄｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｅｌｖｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｍａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）において使用された用量の１５～２５０分の１であった。

【０７０６】

ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射したマウスは、機能及び生存の著しい改善を示した。２Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ９－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射されたマウスは全て、活動が最小限であり、注射後１１～２１週間で安楽死の人道的エンドポイントに達した。対照的に、同じ用量のＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射されたマウスは全て、野生型マウスと同様の軌道で生存し、試験全体を通して、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して体重も増加し、著しく活動的であった（図２９Ｇ～２９Ｊ及び２４Ｇ）。ＡＡＶ投与の４週間後の、注射されたマウスの腓腹筋、大腿四頭筋、心筋、及び肝臓におけるｈＭＴＭ１　ｍＲＮＡ発現及びベクターゲノム生体内分布の定量化は、ＡＡＶ９－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射した動物と比較して、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射したマウスの筋肉において有意に高い導入遺伝子発現及びｖｇ／ｄｇを示した一方、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射されたマウスの肝臓におけるｈＭＴＭ１の発現及びｖｇ／ｄｇの数は、ＡＡＶ９－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射された動物より少なかった（図１７Ｌ及び１７Ｍ）。ウエスタンブロット分析により、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射されたマウスの腓腹筋及び大腿四頭筋におけるより高いｈＭＴＭ１タンパク質発現が確認され（図１７Ｎ）、長趾伸筋（ＥＤＬ）筋肉の生理分析により、ビヒクル又はＡＡＶ９－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１注射対照のいずれかと比較した際、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＭＨＣＫ７－ｈＭＴＭ１を注射したマウスにおいて有意に高い比筋力が実証された（図１７Ｏ）。

【０７０７】

ＤＭＤ及びＸＬＭＴＭそれぞれのマウスモデルにおけるＭｙｏＡＡＶ－Ｄｍｄ　ＣＲＩＳＰＲ及びＭｙｏＡＡＶ－ヒトＭＴＭ１の全身投与からのさらなる結果が、図１７Ａ～１７Ｉ及び１７Ｋに示される。ＭｙｏＡＡＶ　１Ａは、マウス及びヒト一次筋管の形質導入についてインテグリンヘテロ二量体に依存する。

【０７０８】

選択からのＭｙｏＡＡＶ及び他の最上位の変異体の全てにおけるＲＧＤモチーフの存在を考慮して、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入におけるＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体の役割を評価した。ＲＧＤモチーフは、その受容体への結合を促進するフィブロネクチンにおける最小配列として１９８４年に最初に認められ、後にインテグリンヘテロ二量体α５β１として同定された（Ｐｉｅｒｓｃｈｂａｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｒｕｏｓｌａｈｔｉ，１９８４；Ｐｙｔｅｌａ　ｅｔ　ａｌ．，１９８５）。ＲＧＤは、その後、いくつかの異なるインテグリンヘテロ二量体；具体的には、αＩＩｂβ３、α５β１、α８β１、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、及びαＶβ８認識モチーフとして同定された（Ｒｕｏｓｌａｈｔｉ，１９９６）。これら８つのヒトＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体

のそれぞれをコードするプラスミド又は対照としてのｐＵＣ１９プラスミドでトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞におけるＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃの形質導入効率を比較した。α８β１、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、又はαＶβ８の過剰発現により、ｐＵＣ１９対照と比較してトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞においてＭｙｏＡＡＶ　１Ａの形質導入効率が増加した（図１８Ｉ及び２５Ａ～２５Ｋ）。

【０７０９】

次に、細胞表面へのＭｙｏＡＡＶ　１Ａの結合効率に対する異なるインテグリンヘテロ二量体の影響を、過剰発現実験によって分析した。８つのＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体のそれぞれ又はＰＵＣ１９対照プラスミドでトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞の表面に結合されたベクターゲノムを定量し、αＶβ６、及び比較的程度は小さいが、α８β１及びαＶβ１が、トランスフェクト対照と比較してインテグリントランスフェクト細胞へのＭｙｏＡＡＶ　１Ａ　ＰＵＣ１９の結合を増加させたことが分かった（図１８Ｊ）。初代細胞におけるＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入効率に対する２つの異なる汎αＶインテグリンアンタゴニスト（ＣＷＨＭ－１２及びＧＬＰＧ－０１８７）の影響も調べた。両方の阻害剤が、マウス（図２６Ａ及び２６Ｊ）及びヒト（図１８Ｋ、１８Ｄ及び２６Ｃ～２６Ｈ）の一次骨格筋の筋管の両方において用量依存的にＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入を妨げたが、いずれの阻害剤も、ＡＡＶ９形質導入効率に対する用量依存効果を与えなかった。これらの結果は、αＶ含有インテグリンヘテロ二量体を阻害することにより、マウス及びヒト一次筋管の両方を形質導入するＭｙｏＡＡＶ　１Ａ能力がほぼ完全に除去されたことを実証する。

【０７１０】

ＭｙｏＡＡＶ　１Ａの結合親和性に対する個々のαＶ含有インテグリンヘテロ二量体の影響をさらに明らかにするために、本発明者らは、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、αＶβ８、又はマルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）組み換えタンパク質とともにこれらのウイルスをプレインキュベートした後、ヒト一次筋管をＭｙｏＡＡＶ　１Ａ又はＡＡＶ９で形質導入した。意外なことに、増加する濃度のαＶβ６によるＭｙｏＡＡＶ　１Ａのプレインキュベーションは、ヒト一次筋管の形質導入の用量依存的阻害をもたらしたが、本発明者らが試験した他の組み換えタンパク質のいずれも、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ又はＡＡＶ９のいずれかによる細胞の形質導入に対する用量依存的効果を与えなかった（図１８Ｅ、１８Ｆ）。反対に、増加する濃度の抗αＶβ６抗体によるヒト筋管のプレインキュベーションは、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａによる形質導入効率を用量依存的に低下させ、ＡＡＶ９による筋管の形質導入に影響を与えなかった（図１８Ｇ、１８Ｌ）。これらのデータは、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入を促進する能力を有するαＶ含有インテグリンヘテロ二量体の中でも、αＶβ６が、このカプシド変異体に結合する最も高い親和性を有することを示唆する。さらに、αＶβ６は、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａによるそれらの最適な形質導入を可能にするためにヒト筋細胞の表面において利用可能でなければならない。

【０７１１】

細胞への形質導入及びＡＡＶ９の結合における末端シアル酸を有するグリカンの重要性（Ｂｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）を考慮して、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入及び結合におけるグリカン及びシアル酸の役割を次に評価した。細胞表面でグリカンへのシアル酸結合を切断するノイラミニダーゼ（ＮＡ）によるＨＥＫ２９３細胞の処理は、非処理の対照と比較して、処理された細胞に対してＭｙｏＡＡＶ　１Ａによって１７２倍高い形質導入及び４倍効率的な結合をもたらした（図２６Ｋ、２６Ｌ）。末端ガラクトースが、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａの形質導入及び結合に重要であるかどうかをさらに試験した。細胞表面における末端ガラクトースに結合するアメリカデイゴ（Ｅｒｙｔｈｒｉｎａ　ｃｒｉｓｔａｇａｌｌｉ）レクチン（ＥＣＬ）の、ＮＡ処理ＨＥＫ２９３細胞への添加は、ＡＡＶ９及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａの両方による結合及び形質導入を有意に阻害した一方、ＡＡＶ２結合及び形質導入には影響を与えなかった（図２６Ｍ、２６Ｎ）。これらの結果は、ＡＡＶ９と同様に、細胞へのＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入及び結合が、細胞表面におけるシアル酸の除去及びガラクトースの露出によって強化されることを実証した。

【０７１２】
以前に同定されたＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）に対するＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入の依存性を評価した。ＡＡＶＲは、ＡＡＶ４及びＡＡＶｒｈ３２．３３を除いて最も知られているＡＡＶ血清型の有効な形質導入に必要な急速に取り込まれる細胞膜タンパク質である（Ｄｕｄｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８；Ｐｉｌｌａｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。ＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲノックアウト（ＫＯ）及び親ＨＥＫ２９３ＦＴ野生型（ＷＴ）細胞を、ＡＡＶ４－、ＡＡＶ２－、ＡＡＶ９－、又はＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入し、ＡＡＶ２及びＡＡＶ９と同様に、ＭｙｏＡＡＶ形質導入は、ＡＡＶＲ発現を必要とすることが分かった（図２６Ｏ）。

【０７１３】
インテグリンヘテロ二量体及びＡＡＶＲが、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入において重複した役割を果たすかどうかを調べるために、本発明者らは、ＡＡＶＲ過剰発現の存在下又は非存在下でＨＥＫ２９３ＦＴ　ＡＡＶＲ　ＫＯ細胞内でα８β１、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、又はαＶβ８を過剰発現させ、次に、細胞をＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－ＣＭＶ－Ｎｌｕｃで形質導入した。これらの結果は、インテグリンヘテロ二量体の過剰発現により、モックトランスフェクト対照と比較してＡＡＶＲ　ＫＯ細胞においてＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入効率が増加された一方、インテグリン過剰発現は、ＡＡＶＲを過剰発現するＡＡＶＲ　ＫＯ細胞又はＷＴ　ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞内で観察されたレベルまで形質導入をレスキューするには十分ではないことを実証した（図２６Ｉ）。このデータは、インテグリンヘテロ二量体及びＡＡＶＲが、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ形質導入において異なる役割を果たすこと及び異なる段階で用いられる可能性が高いことを示唆する。

【０７１４】
マウスＤＥＬＩＶＥＲを用いたインビボ進化のさらなる回により、マウスにおける第二世代ＲＧＤ含有筋指向性変異体が生成される
ＭｙｏＡＡＶ　１Ａによる筋管の形質導入についてのインテグリンヘテロ二量体とのＲＧＤモチーフの相互作用の重要性を考慮して、モチーフに隣接するアミノ酸を修飾することにより、この相互作用を改善することができ、さらに一層強力な筋指向性カプシド変異体が生成されると仮説を立てられた。ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ超可変領域ＶＩＩＩ表面ループの予測構造に基づいて、本発明者らは、ＲＧＤモチーフの上流の５８６、５８７、及び５８８位並びに下流の５９２、５９３、５９４、及び５９５位のアミノ酸を、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａの表面ループに位置する可能性が高いものとして同定した（図１９Ａ）。次に、それぞれ５８９、５９０、及び５９１位に固定されたＲＧＤモチーフ及び上記の隣接位置における様々なアミノ酸を有するカプシドの多様なライブラリーを生成した（図１９Ｂ）。

【０７１５】
ＤＥＬＩＶＥＲを用いた筋指向性変異体についての２回のインビボ選択を、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ及びｍｄｘマウスにおいて行った。２回目のＲＧＤ固定ウイルスライブラリーを、２つの異なる用量（マウス当たり１Ｅ＋１２ｖｇ及び１Ｅ＋１１ｖｇ）で注射して、高用量及び低用量の両方で筋肉組織を効率的に形質導入する変異体を同定した（図１９Ｂ）。これらの選択からの本発明者らの最上位のヒットの中でも、グリシン及びアラニンが、５８８位で濃縮され、グルタミンが、５９２位で濃縮されていたことを見出された。ＧＰＧＲＧＤＱＴＴＬ（配列番号２）配列を含む変異体が、２回目の選択から１Ｅ＋１２及び１Ｅ＋１１の用量の両方で最も厳選された筋指向性カプシドとして浮上した（図１９Ｂ）。これを、この第二世代変異体ＭｙｏＡＡＶ　２Ａと命名し（本明細書においてＥＭｙｏＡＡＶ又は強化されたＭｙｏＡＡＶとも呼ばれる）、それをさらなる特性評価に使用した。

【０７１６】
異なるマウス組織におけるＭｙｏＡＡＶ　２Ａの形質導入効率を、低用量のウイルスの全身送達後に調べた。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、２Ｅ＋１１ｖｇ（約８Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇ）のＡＡＶ９－、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ－、又はＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＭＶ－ＥＧＦＰを注射し、様々な組織における導入遺伝子発現及びベクターゲノム生体内分布を分析した。全組織の蛍光イメージングは、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａによる全身遺伝子送達が、異なる

骨格筋にわたってＭｙｏＡＡＶ　１Ａ又はＡＡＶ９と比較してより高いレベルの導入遺伝子発現をもたらすことを実証する（図１９Ｃ～１９Ｄ）。ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡの定量化により、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａが、ＡＡＶ９より１０～８０倍効率的にマウス骨格筋を、及び１７倍効率的に心臓を形質導入することが明らかになった。さらに、導入遺伝子ｍＲＮＡ発現は、ＡＡＶ９を注射したマウスと比較して、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射した動物の肝臓において２．５分の１であった（図１９Ｅ）。同様に、ベクターゲノム生体内分布分析は、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射したマウスが、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して、骨格筋及び心筋において有意に高いｖｇ／ｄｇを有し、肝臓において有意に低いｖｇ／ｄｇを有することを示した（図１９Ｌ）。

【０７１７】

次に、ヒト一次筋管の形質導入についてのＭｙｏＡＡＶ　２Ａの効率及びインテグリン依存性。意外なことに、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａは、ヒト一次筋管をＡＡＶ９と比較して１２８倍効率的に、及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａより４．１倍高く形質導入した（図１９Ｆ）。増加する濃度の汎αＶインテグリンアンタゴニストＧＬＰＧ－０１８７は、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａの形質導入効率の用量依存的低下をもたらし（図１９Ｇ）、これは、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａの感染性が、標的細胞で発現されるαＶ含有インテグリンヘテロ二量体に依然として依存することを裏付けている。

【０７１８】

異なる個々のαＶインテグリンヘテロ二量体に対するＭｙｏＡＡＶ　２Ａの結合親和性を評価するために、本発明者らは、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａ又はＡＡＶ９を、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、αＶβ８、又はマルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）組み換えタンパク質とともにプレインキュベートしてから、ヒト一次筋管を形質導入した。興味深いことに、及びＭｙｏＡＡＶ　１Ａを用いたこれらの同じアッセイで得られた結果（図１８Ｅ）とは対照的に、試験された４つ全てのαＶ含有インテグリンヘテロ二量体が、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａによるヒト筋管の形質導入を用量依存的に阻害した一方（図１９Ｈ）、ＡＡＶ９形質導入に対する用量依存的影響はなかった（図１９Ｉ）。この結果は、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａに含まれるアミノ酸置換が、主にαＶβ６に依存するＭｙｏＡＡＶ　１Ａと比較した際、より広いクラスのαＶインテグリンヘテロ二量体へのより高い親和性結合を可能にすることを示唆する。

【０７１９】

マウスにおいてＤＥＬＩＶＥＲを用いて進化させた最上位の第一世代及び第二世代カプシド変異体の依存性を、αＶβ６ヘテロ二量体において評価した。ヒト一次筋管を、抗αＶβ６抗体とともにプレインキュベートしてから、細胞を、最上位の第一世代（ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　１Ｂ、ＭｙｏＡＡＶ　１Ｃ、ＭｙｏＡＡＶ　１Ｅ、ＭｙｏＡＡＶ　１Ｆ）及び第二世代（ＭｙｏＡＡＶ　２Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　２Ｂ、ＭｙｏＡＡＶ　２Ｃ、ＭｙｏＡＡＶ　２Ｄ、ＭｙｏＡＡＶ　２Ｅ、ＭｙｏＡＡＶ　２Ｆ）マウス変異体で形質導入した。抗体結合が、これらの変異体の全てによってある程度までヒト筋管の形質導入を阻害したが、第一世代カプシドは、筋管形質導入についてαＶβ６により大きく依存していた（図１９Ｍ）。

【０７２０】

ＭｙｏＡＡＶ　２Ａは、低用量のウイルスの注射後に高い治療可能性を示す

ヒト神経筋疾患について現在臨床試験中であるカプシドと比較して、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａの可能な将来の治療関連性を評価するために、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａの形質導入効率を、ＤＭＤについての進行中の臨床試験（ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子：ＮＣＴ０３３６２５０２、ＮＣＴ０３３６８７４２、及びＮＣＴ０３７６９１１６）において調べられているＡＡＶ９及びＡＡＶｒｈ７４の両方と比較した。筋特異的ＭＨＣＫ７プロモーターから発現され、ＡＡＶｒｈ７４ベクターを用いて送達される機能補完ジストロフィンミニ遺伝子（マイクロジストロフィンと呼ばれる）の全身投与は、４人のＤＭＤ患者を含む最近報告されたヒト臨床試験において有望な結果を示した。この試験では、高ウイルス量の２Ｅ＋１４ｖｇ／ｋｇを投与することにより、筋肉における導入遺伝子発現

及び疾病表現型の機能的改善がもたらされた（Ｍｅｎｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）。

【０７２１】

ＭｙｏＡＡＶ　２Ａ媒介遺伝子送達を、ＡＡＶｒｈ７４及びＡＡＶ９ベクターの両方のものと比較し、ＤＭＤのＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスモデルにおいて性能をさらに調べた。縦方向のインビボイメージング実験において、本発明者らは、成体ＢＡＢＬ／ｃＪマウスに、低用量（２Ｅ＋１１ｖｇ、約８Ｅ＋１２ｖｇ／ｋｇを表す）のＡＡＶｒｈ７４、ＡＡＶ９、又はＣＭＶ－Ｆｌｕｃレポーター遺伝子をコードするＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射した。ＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射したマウスは、ＡＡＶｒｈ７４又はＡＡＶ９を投与されたマウスと比較して、四肢及び身体全体において著しく高い生物発光シグナルを示した（図１９Ｊ～１９Ｋ）。次に、同等の低用量（２Ｅ＋１３ｖｇ／ｋｇ）の各ＡＡＶを用いた、ＤＭＤのＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスモデルへの、マイクロジストロフィン導入遺伝子（ＣＫ８－マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧ）を保有するＭｙｏＡＡＶ　２Ａ又はＡＡＶ９の全身送達を試験した。ＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射した動物は、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して、複数の筋肉群において、筋細胞膜に局在した、マイクロジストロフィンの比較的高い、より幅広い発現を実証した（図２０Ａ）。ウエスタンブロットにより、ＡＡＶ９を注射した動物と比較して、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射されたマウスの筋肉においてより高いレベルのマイクロジストロフィンタンパク質が確認された（図２０Ｂ）。定量的ＲＴ－ＰＣＲにより、ＡＡＶ９－ＣＫ８－マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧと比較して、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａ－ＣＫ８－マイクロジストロフィン－ＦＬＡＧを注射されたマウスの骨格筋において７．６～１５倍高いレベルのマイクロジストロフィンｍＲＮＡが示された（図２０Ｃ）。

【０７２２】

最後に、ＡＡＶ９を注射した動物と比較した、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射したマウスにおけるベクターゲノムの量及び筋機能を評価した。ＭｙｏＡＡＶ　２Ａは、ＡＡＶ９と比較して、ＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスの骨格筋では１２－４６倍多い数のｖｇ／ｄｇ及び肝臓では２．５分の１のｖｇ／ｄｇを送達した（図２０Ｄ）。著しくは、ＡＡＶ９を注射した動物が、それらの筋肉と比較してそれらの肝臓において４０倍超多い数のｖｇ／ｄｇを有していた一方、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射したマウスは、それらの肝臓及び筋肉において同様のレベルを有していた。比筋力及び遠心性損傷後の筋力低下パーセントの定量化により、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａを注射したＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘマウスのＴＡ筋肉が、等量のＡＡＶ９を投与されたマウスの筋肉及びビヒクルを注射した動物と比較して、有意に高い比筋力を回復したこと、及び損傷からより保護されたことが実証された（図２０Ｅ～２０Ｆ）。

【０７２３】

インビボ指向進化は、カニクイザルにおける最上位のヒットとしてカプシド変異体ＭｙｏＡＡＶクラスを同定する

ＮＨＰにおける全身投与後の強力な筋指向性遺伝子送達を可能にするカプシド変異体を同定するために、ＡＡＶ９のインビボ指向進化を、カニクイザルにおいてＤＥＬＩＶＥＲを用いて行った。５８８位におけるランダム７量体ペプチド挿入から開始する２回のインビボ選択により、最上位のヒットとしてＲＧＤモチーフを含む６つの変異体が同定された（図２８Ａ）。これらの結果は、全身投与後の霊長類におけるＭｙｏＡＡＶクラスのカプシドの高い筋指向性の証拠を示した。種間で強力な筋肉形質導入を可能にするさらに進化したＭｙｏＡＡＶクラスの変異体を選択するために、マウスにおける本発明者らの１回目のＲＧＤ固定選択から同定された最上位１２０，０００の変異体を用いてＮＨＰにおけるインビボ選択の回を行った（図２８Ｂ）。興味深いことに、本発明者らがＮＨＰにおいて同定した最上位のヒットにおいてＲＧＤモチーフ後の最初の位置でチロシンが富化されていることが分かった。

【０７２４】

ＮＨＰにおいて同定された筋指向性が最も高い変異体（ＭｙｏＡＡＶ　３Ａ－Ｆ及びＭ

ｙｏＡＡＶ　４Ａ－Ｅ）、並びに高い効率でヒト一次筋管を形質導入したマウスにおいて同定された４つの筋指向性変異体（ＭｙｏＡＡＶ　１Ｃ、ＭｙｏＡＡＶ　１Ｅ、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａ、及びＭｙｏＡＡＶ　２Ｅ）の形質導入効率（図２８Ｃ）を、マウス及びＮＨＰにおいてＡＡＶｒｈ７４及びＡＡＶ９で評価した。ＣＢｈプロモーターの制御下でヒトフラタキシン導（ｈＦＸＮ）導入遺伝子をコードするために、ｒＡＡＶを、カプシド変異体のそれぞれ、並びにＡＡＶｒｈ７４及びＡＡＶ９を用いて生成した。カプシドのそれぞれを用いて生成された組み換えＡＡＶは、導入遺伝子の３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）において固有のバーコードのセットを含んでいた（図２８Ｄ）。等しい力価の１７ウイルス全てを含むｒＡＡＶのプールを調製し、次に、プールを、カニクイザル及びマウスの両方に投与した。ＮＨＰの異なる組織における導入遺伝子ｍＲＮＡ発現の定量化により、カニクイザルにおいてＡＡＶｒｈ７４及びＡＡＶ９と比較して、異なる骨格筋を形質導入する際にＭｙｏＡＡＶ　４Ａ、ＭｙｏＡＡＶ　４Ｅ、ＭｙｏＡＡＶ　３Ａ、及びＭｙｏＡＡＶ　４Ｃが最も強力な変異体であることが同定された（図２８Ｄ～２８Ｅ及び３０Ｂ）。これらの４つの変異体はまた、マウス及びＮＨＰの両方において、ＡＡＶｒｈ７４及びＡＡＶ９と比較して、異なるマウス骨格筋を非常に効果的に形質導入し、肝臓を標的解除する（図３０Ａ及び２８Ｅ）。

【０７２５】

最上位４つのカプシドについての生産収率を評価するために、本発明者らは、６つの異なる導入遺伝子を用いて、最上位４つの変異体並びにＡＡＶｒｈ７４及びＡＡＶ９を用いてｒＡＡＶを産生した。ＡＡＶ９は、本発明者らが試験したカプシドの中で産生が最良であり、全てのＭｙｏＡＡＶ変異体が、ＡＡＶｒｈ７４と比較して、同様又はより高いウイルス力価を生じた（図２８Ｆ）。

【０７２６】

最上位４つのカプシド変異体の形質導入依存性及び親和性を、αＶインテグリンヘテロ二量体において次に評価した。増加する濃度のＧＬＰＧ－０１８７は、ヒト一次筋管における４つ全ての変異体についての形質導入を用量依存的に減少させた（図２８Ｇ）。αＶβ１、αＶβ３、αＶβ６、αＶβ８、又はＭＢＰとの、カプシド変異体のプレインキュベーションは、４つ全ての最上位の変異体がαＶβ６に対して最も高い親和性を有し、αＶβ８及びαＶβ３がそれに続くことを実証した（図２８Ｈ～２８Ｉ）。これらの結果と一致して、増加する濃度のαＶβ６抗体でヒト一次筋管を処理することにより、４つ全ての変異体による形質導入が用量依存的に減少した（図２８Ｊ）。さらに、ＡＡＶＲ　ＫＯ及び野生型細胞における最上位の４つの変異体の形質導入効率を分析することにより、これらの全ての変異体が、形質導入についてＡＡＶＲに依存することが明らかになった（図２８Ｋ）。

【０７２７】

最後に、αＶβ６に対するＭｙｏＡＡＶクラスのカプシド変異体の高い依存性及び親和性を考慮して、本発明者らは、マウス、ＮＨＰ及びヒト筋肉において、αＶとのみヘテロ二量体を形成するインテグリンβ６の発現を分析した（Ｈｙｎｅｓ，２００２）。免疫蛍光分析は、３つ全ての種からの筋肉におけるインテグリンβ６の発現を実証した（図３０Ｃ）。

【０７２８】

考察

この実施例は、少なくとも、対象とする任意の組織及び／又は細胞型への強力な遺伝子送達に有効なＡＡＶカプシド変異体を操作及び選択するための手法を説明及び実証する。ＤＥＬＩＶＥＲは、ストリンジェントな及び広く適用可能なＡＡＶカプシド操作手法に必要な３つの重要な特徴を兼ね備えている：（ｉ）ＤＥＬＩＶＥＲは、インビボで細胞に物理的に結合又は侵入するだけでなく、組織を機能的に形質導入し、それらの導入遺伝子を特定の細胞型において発現もするカプシド変異体の選択を可能にする。（ｉｉ）ＤＥＬＩＶＥＲは、任意の哺乳動物種において、インビボ又はインビトロで適用され得、前臨床動物モデルからヒトへの応用に直接移行され得るベクター系の同定を可能にする。（ｉｉｉ

）ＤＥＬＩＶＥＲは、極めて多様なカプシドライブラリーのスクリーニングを支援し、指向進化手法と完全に適合する。

【０７２９】

最終的に、ＤＥＬＩＶＥＲシステムの開発への関心は、より強力及び選択的なウイルスベクターの生成によるゲノム医学の進歩のためのその潜在的利益に根差し、本研究で同定された筋指向性ＡＡＶカプシド変異体は、この用途のために重要な概念実証の役割を果たす。しかしながら、カプシドの筋肉効力を増加させるのと同様に重要なのは、肝臓の形質導入の減少を確実にすることであった。肝臓は、天然ＡＡＶカプシドによる形質導入の主要な部位であり、大型動物モデル（Ｈｉｎｄｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８）及びヒト患者（Ｍｏｒａｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）においてＡＡＶベクターの高用量投与に関連する毒性の標的である。特に、２つの遺伝子治療試験（臨床試験識別子ＮＣＴ０３３６８７４２及びＮＣＴ０３１９９４６９）が、肝臓毒性に関連する深刻な副作用のため、ＦＤＡによって臨床試験差し止めとなった。遺伝的筋疾患のためのＡＡＶベースの遺伝子治療の臨床応用におけるこれらの最近の後退（Ｍｏｒａｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）は、筋肉への送達についての並外れた難題を強調しており、この実施例に記載されるものなどの強力な筋指向性ＡＡＶ変異体に対する明確な必要性を示す。

【０７３０】

ＤＥＬＩＶＥＲを適用して、新規なＡＡＶカプシドを開発したが、これは、全身投与された場合、臨床試験及び前臨床開発努力で現在使用されているカプシドより高い効率及び選択性で、及び潜在的により好ましい安全性プロファイルで、全身の骨格筋に遺伝子カーゴを輸送することができる。２回のストリンジェントな転写産物ベースの選択により、筋肉形質導入について、普及しているカプシドの１０倍を超える効率を示したＭｙｏＡＡＶ１Ａを含む新規なクラスのＲＧＤ含有カプシド変異体が明らかになった。さらに、ＤＥＬＩＶＥＲを用いて選択された筋指向性ＡＡＶは、肝臓の著しく低下した標的化を示した。これらの２つの属性は、この新たなクラスのＡＡＶカプシドが、治療レベルの標的細胞形質導入を達成するために必要なウイルスの用量を減少させ、治療効果にとって不要である、肝細胞における形質導入の潜在的に有害な結果を軽減し得ることを示唆する。

【０７３１】

ＤＥＬＩＶＥＲは、インテグリンヘテロ二量体に結合することが知られている重要なＲＧＤモチーフを有する多くの変異体を同定し、さらなる研究により、マウス及びヒト一次筋管を形質導入するためのこのモチーフの機能的重要性が示唆された。マウス及びＮＨＰにおける筋肉標的化カプシドのスクリーニングは、挿入された７量体ペプチドの最初の３つのアミノ酸としてＲＧＤを含有する変異体の著しい濃縮を特定した。インビボ選択からの最上位の変異体は、インテグリンヘテロ二量体との相互作用を示し、可溶性インテグリンヘテロ二量体、抗インテグリン抗体、及び小分子アンタゴニストによって、標的細胞形質導入から遮断され得る。この観察されたインテグリン依存性は、マウス及びヒト一次筋管の間で保存され、これは、ＭｙｏＡＡＶクラスのカプシド形質導入についての一般的な作用機序を示唆する。インテグリンとのＭｙｏＡＡＶクラスのカプシドの相互作用は、これらの変異体による標的細胞形質導入にも必要であった以前に同定されたＡＡＶ結合タンパク質ＡＡＶＲと並行して作用するようである。ＲＧＤ結合インテグリンヘテロ二量体の中でも、αＶβ６は、結合に対する最も高い親和性を示し、本発明者らが同定した最上位の変異体によるそれらの形質導入を可能にするためにヒト筋細胞の表面において特に必要とされた。これらの観察は、ＲＧＤモチーフを欠いているが、一見関連するＮＧＲモチーフを介して、ウイルス内在化のための共受容体としてα５β１及びαＶβ５を含むインテグリンヘテロ二量体を依然として用いる、ＡＡＶ２の先行研究を考慮して特に興味深い（Ａｓｏｋａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００６；Ｓｕｍｍｅｒｆｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９）。

【０７３２】

筋肉へのＡＡＶ媒介遺伝子送達のためのＲＧＤ－インテグリンヘテロ二量体相互作用の根底にある分子基盤を理解するためにはより多くの研究が必要であるが、本発明者らが発

見したクラスの筋指向性ベクターに対するその重要性により、必須のＲＧＤモチーフの周辺の隣接残基を体系的に変更することによって、本発明者らがこれらのカプシドをさらに進化させることが可能になった。この２回目の進化により、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａよりさらに高い親和性でインテグリンヘテロ二量体のより広いサブセットを結合することが可能なさらなる変異体が同定された。マウスにおける最上位の第二世代変異体、ＭｙｏＡＡＶ２Ａは、インビボ及びインビトロアッセイの両方において、筋肉形質導入に対する大幅に向上された効力（ＡＡＶ９のものに対して最大１２８倍）を示した一方、低い肝臓の形質導入を維持し、その成功は、対象とする他の標的組織に対する超高効力ベクターの反復的開発のためのフレームワークを提供する。

【０７３３】

ゲノム医学を進歩させる本発明者らの目的で、本発明者らは、ヒト遺伝的筋疾患のために現在開発及び試験中の遺伝子編集及び遺伝子治療法のための送達ベクターとしてＭｙｏＡＡＶ　１Ａ及びＭｙｏＡＡＶ　２Ａを適用した。これらの研究では、標的化ＤＮＡ切除及び転写産物の「再構成」（Ｎｅｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）又は完全長若しくは小型化された治療用導入遺伝子による遺伝的相補性（Ｃｈｉｌｄｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｈａｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）が機能的利益を以前に示している、ＤＭＤ及びＸＬＭＴＭの確立されたマウスモデルを用いた。両方のモデルにおいて、疾患を標的とするタンパク質の発現のレスキュー、筋肉強度及び性能の有意な増加、並びに、ＸＬＭＴＭの場合、非処理及びＡＡＶ９処理対照の平均寿命を超えて、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ処理動物の観察された寿命を大幅に延長した、疾患による死亡率からの著しいレスキューを含む顕著な治療効果が観察された。

【０７３４】

治療結果は、それらが、同じ遺伝子治療手法に基づく既に公開されている前臨床試験（Ｃｈｉｌｄｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｅｌｖｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｈａｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｍａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）又は現在進行中のヒト臨床試験（ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子：ＮＣＴ０３３６２５０２、ＮＣＴ０３３６８７４２、ＮＣＴ０３７６９１１６、及びＮＣＴ０３１９９４６９）において使用されている用量の１０～２５０分の１の用量の治療用ベクターを注射した後に達成されたことを考慮すると、一層注目に値する。これらの新たなＡＡＶ変異体による治療効果を達成するためのより少ない必要投与量は、発現及び安全性プロファイルの改善並びに製造コストの減少を含む、臨床応用における大きな利益をもたらし得る。

【０７３５】

最後に、ＭｙｏＡＡＶクラスのカプシドからの変異体を、ＮＨＰにおけるインビボ指向進化後に筋指向性が最も高い変異体として同定した。これらの結果は、これらの変異体が、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ、ＢＡＬＢ／ｃＪ、ＤＢＡ／２Ｊ、ｍｄｘ、及びＤＢＡ／２Ｊ－ｍｄｘを含む複数の近交系マウス株、並びにカニクイザル、及び複数のドナーから得られたヒト初代筋芽細胞の培養物において筋肉形質導入について広い活性を示したため、マウス、ＮＨＰ、及びヒトにわたるＭｙｏＡＡＶクラスのカプシド変異体の直接適用性を示唆する。さらに、マウス及びヒト筋細胞の両方におけるＭｙｏＡＡＶクラスのカプシドの感染性に対するインテグリンヘテロ二量体の必要性は、マウス及びヒト筋肉における保存された形質導入様式を強く示唆し、これにより、広範囲の遺伝的筋疾患のための新たな遺伝子治療手法を開発及び実行するための予定が加速され得る。

【０７３６】

Ｗｅｉｎｍａｎｎらによる最近の刊行物（Ｗｅｉｎｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）は、マウスにおける全身投与後に１８３の野生型及び修飾ＡＡＶカプシドの形質導入効率を試験した後の筋指向性カプシド変異体の同定を報告した。興味深いことに、Ｗｅｉｎｍａｎｎらがスクリーニングから同定した筋指向性変異体は、カプシド表面において提示されるＲＧＤモチーフを含み、本発明者らの知見の独立した検証の役割を果たし得る。し

かしながら、著者らは、ＮＨＰ及びヒト細胞におけるそれらの変異体による形質導入の機構及び形質導入の効率を特性評価しなかった。マウス及びＮＨＰにおけるカプシドのインビボ指向進化からのこの実施例における知見は、挿入されたペプチドにおけるＲＧＤモチーフの周囲のアミノ酸の配列が、異なる種におけるカプシドの形質導入効率の規定する際に重要な役割を果たすことを実証する。マウス及びＮＨＰにおけるインビボ指向進化から同定された筋指向性が最も高い変異体は全て、ＲＧＤモチーフを含むが、この実施例において実証されるように、各種における最上位のヒットとして同定された個々の変異体についてのモチーフの周囲のアミノ酸の配列は異なる。例えば、ＭｙｏＡＡＶ　２Ａは、マウスにおいて本発明者らが同定した最上位の第二世代変異体であり、それは、マウス筋肉を形質導入する際に非常に強力であるが、全身投与後にＮＨＰ筋肉を高い効率で形質導入しない。実際、本明細書におけるこれらのＮＨＰ選択から同定された全ての変異体は、ＮＨＰにおける組み換えＡＡＶとしての全身送達後に筋肉形質導入について試験されたとき、マウスにおいて同定された変異体の性能を上回っていた。幸運にも、本発明者らのＮＨＰ選択からの最上位のカプシド変異体は、マウス筋肉を形質導入する際にも非常に強力であり、治療法の開発のために非常に適切なものになる。これらの結果は、霊長類において最も強力なカプシド変異体を選択するためにストリンジェントな選択手法でインビボ指向進化を使用することの重要性を強調している。

【０７３７】

要約すると、この実施例は、種間で非常に強力な筋指向性ＡＡＶカプシド変異体のファミリーの進化、操作、及び機構的特性を説明及び実証する。本明細書において同様に実証されるのは、遺伝的筋疾患の複数のマウスモデルにおいて、低投与量でさえ、これらのベクターの治療効果があることである。これらのベクターは、多数の筋骨格障害のための筋指向性治療遺伝子送達を進歩させる可能性を有する。さらに広く見れば、本明細書に記載されるＤＥＬＩＶＥＲシステムは、身体内の任意の組織又は細胞型に対して正確なＡＡＶカプシド変異体を同定するために高度に適応可能なプラットフォーム、すなわち、分野及び領域の壁を超えてこのベクター系の臨床的及び実験的応用を大きく広げ得る革新を提供する。さらなる組織及び器官系へのＤＥＬＩＶＥＲの採用は、様々なヒト疾患のための新規な遺伝子治療及び他のゲノム医学手法の開発及び変換の促進に広範囲な影響を与えるであろう。

【０７３８】

実施例７に関する参考文献

Ａｓｏｋａｎ，Ａ．，Ｈａｍｒａ，Ｊ．Ｂ．，Ｇｏｖｉｎｄａｓａｍｙ，Ｌ．，Ａｇｂａｎｄｊｅ－ＭｃＫｅｎｎａ，Ｍ．，ａｎｄ Ｓａｍｕｌｓｋｉ，Ｒ．Ｊ．（２００６）．Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ ｔｙｐｅ ２ ｃｏｎｔａｉｎｓ ａｎ ｉｎｔｅｇｒｉｎ ａｌｐｈａ５ｂｅｔａ１ ｂｉｎｄｉｎｇ ｄｏｍａｉｎ ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ｆｏｒ ｖｉｒａｌ ｃｅｌｌ ｅｎｔｒｙ．Ｊ Ｖｉｒｏｌ ８０，８９６１－８９６９．

【０７３９】

Ｂｅｌｌ，Ｃ．Ｌ．，Ｖａｎｄｅｎｂｅｒｇｈｅ，Ｌ．Ｈ．，Ｂｅｌｌ，Ｐ．，Ｌｉｍｂｅｒｉｓ，Ｍ．Ｐ．，Ｇａｏ，Ｇ．Ｐ．，Ｖａｎ Ｖｌｉｅｔ，Ｋ．，Ａｇｂａｎｄｊｅ－ＭｃＫｅｎｎａ，Ｍ．，ａｎｄ Ｗｉｌｓｏｎ，Ｊ．Ｍ．（２０１１）．Ｔｈｅ ＡＡＶ９ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｎｄ ｉｔｓ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ ｉｍｐｒｏｖｅ ｉｎ ｖｉｖｏ ｌｕｎｇ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｉｎ ｍｉｃｅ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２１，２４２７－２４３５．

【０７４０】

Ｂｅｒｒｙ，Ｇ．Ｅ．，ａｎｄ Ａｓｏｋａｎ，Ａ．（２０１６）．Ｃｅｌｌｕｌａｒ ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ｏｆ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｖｉｒｏｌ ２１，５４－６０．

【０７４１】

Ｂｏｒｎｅｒ，Ｋ．，Ｋｉｅｎｌｅ，Ｅ．，Ｈｕａｎｇ，Ｌ．Ｙ．，Ｗｅｉｎｍａｎｎ

, J., Sacher, A., Bayer, P., Stullein, C., Fakhiri, J., Zimmermann, L., Westhaus, A., et al. (2020). Pre-arrayed Pan-AAV Peptide Display Libraries for Rapid Single-Round Screening. Mol Ther 28, 1016-1032.

【0742】

Childers, M.K., Joubert, R., Poulard, K., Moal, C., Grange, R.W., Doering, J.A., Lawlor, M.W., Rider, B.E., Jamet, T., Daniele, N., et al. (2014). Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy. Sci Transl Med 6, 220ra210.

【0743】

Choudhury, S.R., Fitzpatrick, Z., Harris, A.F., Maitland, S.A., Ferreira, J.S., Zhang, Y., Ma, S., Sharma, R.B., Gray-Edwards, H.L., Johnson, J.A., et al. (2016). In Vivo Selection Yields AAV-B1 Capsid for Central Nervous System and Muscle Gene Therapy. Mol Ther 24, 1247-1257.

【0744】

Dalkara, D., Byrne, L.C., Klimczak, R.R., Visel, M., Yin, L., Merigan, W.H., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2013). In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. Sci Transl Med 5, 189ra176.

【0745】

Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., et al. (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. Nat Biotechnol 34, 204-209.

【0746】

DiMattia, M.A., Nam, H.J., Van Vliet, K., Mitchell, M., Bennett, A., Gurda, B.L., McKenna, R., Olson, N.H., Sinkovits, R.S., Potter, M., et al. (2012). Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9. J Virol 86, 6947-6958.

【0747】

Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., and Engelhardt, J.F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. Gene Ther 12, 873-880.

【0748】

Duan, D. (2018). Systemic AAV Micro-dystro

phin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. Mol Ther 26, 2337-2356.
【0749】
Dudek, A.M., Pillay, S., Puschnik, A.S., Nagamine, C.M., Cheng, F., Qiu, J., Carette, J.E., and Vandenberghe, L.H. (2018). An Alternate Route for Adeno-associated Virus (AAV) Entry Independent of AAV Receptor. J Virol 92.
【0750】
Elverman, M., Goddard, M.A., Mack, D., Snyder, J.M., Lawlor, M.W., Meng, H., Beggs, A.H., Buj-Bello, A., Poulard, K., Marsh, A.P., et al. (2017). Long-term effects of systemic gene therapy in a canine model of myotubular myopathy. Muscle Nerve 56, 943-953.
【0751】
Gao, G., Lu, Y., Calcedo, R., Grant, R.L., Bell, P., Wang, L., Figueredo, J., Lock, M., and Wilson, J.M. (2006). Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. Mol Ther 13, 77-87.
【0752】
Hakim, C.H., Wasala, N.B., Pan, X., Kodippili, K., Yue, Y., Zhang, K., Yao, G., Haffner, B., Duan, S.X., Ramos, J., et al. (2017). A Five-Repeat Micro-Dystrophin Gene Ameliorated Dystrophic Phenotype in the Severe DBA/2J-mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. Mol Ther Methods Clin Dev 6, 216-230.
【0753】
Hinderer, C., Katz, N., Buza, E.L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L.K., and Wilson, J.M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. Hum Gene Ther 29, 285-298.
【0754】
Hordeaux, J., Wang, Q., Katz, N., Buza, E.L., Bell, P., and Wilson, J.M. (2018). The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. Mol Ther 26, 664-668.
【0755】
Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110, 673-687.
【0756】
Korbelin, J., Sieber, T., Michelfelder, S., Lunding, L., Spies, E., Hunger, A., Alawi, M., Ra

pti, K., Indenbirken, D., Muller, O. J., et al. (2016). Pulmonary Targeting of Adeno-associated Viral Vectors by Next-generation Sequencing-guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries. Mol Ther 24, 1050-1061.

【0757】

Li, C., and Samulski, R. J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. Nat Rev Genet 21, 255-272.

【0758】

Li, C., Wu, S., Albright, B., Hirsch, M., Li, W., Tseng, Y. S., Agbandje-McKenna, M., McPhee, S., Asokan, A., and Samulski, R. J. (2016). Development of Patient-specific AAV Vectors After Neutralizing Antibody Selection for Enhanced Muscle Gene Transfer. Mol Ther 24, 53-65.

【0759】

Mack, D. L., Poulard, K., Goddard, M. A., Latournerie, V., Snyder, J. M., Grange, R. W., Elverman, M. R., Denard, J., Veron, P., Buscara, L., et al. (2017). Systemic AAV8-Mediated Gene Therapy Drives Whole-Body Correction of Myotubular Myopathy in Dogs. Mol Ther 25, 839-854.

【0760】

Mendell, J. R., Sahenk, Z., Lehman, K., Nease, C., Lowes, L. P., Miller, N. F., Iammarino, M. A., Alfano, L. N., Nicholl, A., Al-Zaidy, S., et al. (2020). Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Neurol.

【0761】

Michelfelder, S., Kohlschutter, J., Skorupa, A., Pfennings, S., Muller, O., Kleinschmidt, J. A., and Trepel, M. (2009). Successful expansion but not complete restriction of tropism of adeno-associated virus by in vivo biopanning of random virus display peptide libraries. PLoS One 4, e5122.

【0762】

Morales, L., Gambhir, Y., Bennett, J., and Stedman, H. H. (2020). Broader Implications of Progressive Liver Dysfunction and Lethal Sepsis in Two Boys following Systemic High-Dose AAV. Mol Ther 28, 1753-1755.

【0763】

Murrey, D. A., Naughton, B. J., Duncan, F. J., Meadows, A. S., Ware, T. A., Campbell, K. J., Bremer, W. G., Walker, C. M., Goodchild, L., Bolon, B., et al. (2014). Feasibility and safety of systemic rAAV9-hNAGLU delivery for treating mucopolysaccharidosis IIIB: toxicology, biodistribution, and immunological assessments in primates. Hum Gene Ther Clin Dev 25, 72-84.

【0764】

Nelson, C. E., Hakim, C. H., Ousterout, D. G., Thakore, P. I., Moreb, E. A., Castellanos Rivera, R. M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F. A., Yan, W. X., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science 351, 403-407.

【0765】

Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309, 30-33.

【0766】

Pillay, S., Meyer, N. L., Puschnik, A. S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y., Jae, L. T., Wosen, J. E., Nagamine, C. M., Chapman, M. S., et al. (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature 530, 108-112.

【0767】

Pytela, R., Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. Cell 40, 191-198.

【0768】

Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. Annu Rev Cell Dev Biol 12, 697-715.

【0769】

Summerford, C., Bartlett, J. S., and Samulski, R. J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. Nat Med 5, 78-82.

【0770】

Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J. K. W., Chew, W. L., Widrick, J. J., Yan, W. X., Maesner, C., Wu, E. Y., Xiao, R., Ran, F. A., et al. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. Science 351, 4

０７－４１１．
【０７７１】
Ｔｓｅ，Ｌ．Ｖ．，Ｋｌｉｎｃ，Ｋ．Ａ．，Ｍａｄｉｇａｎ，Ｖ．Ｊ．，Ｃａｓｔｅｌｌａｎｏｓ Ｒｉｖｅｒａ，Ｒ．Ｍ．，Ｗｅｌｌｓ，Ｌ．Ｆ．，Ｈａｖｌｉｋ，Ｌ．Ｐ．，Ｓｍｉｔｈ，Ｊ．Ｋ．，Ａｇｂａｎｄｊｅ－ＭｃＫｅｎｎａ，Ｍ．，ａｎｄ Ａｓｏｋａｎ，Ａ．（２０１７）．Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ｇｕｉｄｅｄ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ａｎｔｉｇｅｎｉｃａｌｌｙ ｄｉｓｔｉｎｃｔ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ ｖａｒｉａｎｔｓ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｅ ｅｖａｓｉｏｎ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １１４，Ｅ４８１２－Ｅ４８２１．
【０７７２】
Ｗｅｉｎｍａｎｎ，Ｊ．，Ｗｅｉｓ，Ｓ．，Ｓｉｐｐｅｌ，Ｊ．，Ｔｕｌａｌａｍｂａ，Ｗ．，Ｒｅｍｅｓ，Ａ．，Ｅｌ Ａｎｄａｒｉ，Ｊ．，Ｈｅｒｒｍａｎｎ，Ａ．Ｋ．，Ｐｈａｍ，Ｑ．Ｈ．，Ｂｏｒｏｗｓｋｉ，Ｃ．，Ｈｉｌｌｅ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．（２０２０）．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｍｙｏｔｒｏｐｉｃ ＡＡＶ ｂｙ ｍａｓｓｉｖｅｌｙ ｐａｒａｌｌｅｌ ｉｎ ｖｉｖｏ ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ｂａｒｃｏｄｅｄ ｃａｐｓｉｄ ｖａｒｉａｎｔｓ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ １１，５４３２．
【０７７３】
Ｙａｎｇ，Ｌ．，Ｊｉａｎｇ，Ｊ．，Ｄｒｏｕｉｎ，Ｌ．Ｍ．，Ａｇｂａｎｄｊｅ－ＭｃＫｅｎｎａ，Ｍ．，Ｃｈｅｎ，Ｃ．，Ｑｉａｏ，Ｃ．，Ｐｕ，Ｄ．，Ｈｕ，Ｘ．，Ｗａｎｇ，Ｄ．Ｚ．，Ｌｉ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．（２００９）．Ａ ｍｙｏｃａｒｄｉｕｍ ｔｒｏｐｉｃ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ （ＡＡＶ） ｅｖｏｌｖｅｄ ｂｙ ＤＮＡ ｓｈｕｆｆｌｉｎｇ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０６，３９４６－３９５１．
【０７７４】
Ｙａｎｇ，Ｌ．，ａｎｄ Ｘｉａｏ，Ｘ．（２０１３）．Ｃｒｅａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｃａｒｄｉｏｔｒｏｐｉｃ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ：ｔｈｅ ｓｔｏｒｙ ｏｆ ｖｉｒａｌ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ．Ｖｉｒｏｌ Ｊ １０，５０．
【０７７５】
Ｚｉｎｃａｒｅｌｌｉ，Ｃ．，Ｓｏｌｔｙｓ，Ｓ．，Ｒｅｎｇｏ，Ｇ．，ａｎｄ Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚ，Ｊ．Ｅ．（２００８）．Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ＡＡＶ ｓｅｒｏｔｙｐｅｓ １－９ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ ｔｒｏｐｉｓｍ ｉｎ ｍｉｃｅ ａｆｔｅｒ ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １６，１０７３－１０８０．
【０７７６】
実施例８－例示的な筋標的化モチーフ
この実施例は、表６において、マウス（１Ｅ＋１１ｖｇ／マウス）におけるＲＧＤ固定選択（例えば、本明細書における実施例６に上述される方法）から確認されるようなさらなる例示的な筋標的化モチーフを提供する。

【表６】

表６

| 配列番号 | ペプチド配列 |
|---|---|
| 774 | ETGRGDMYSR |
| 775 | ETGRGDRQSL |
| 776 | NVSRGDRLTI |
| 777 | GPSRGDHGMM |
| 778 | TTQRGDSTYL |
| 779 | SNARGDTALQ |
| 780 | TTERGDKASY |
| 781 | SGLRGDLGQS |
| 782 | MEKRGDLGGA |
| 783 | AVGRGDLSNH |
| 784 | QVGRGDLARA |
| 785 | DNARGDVGRL |
| 786 | QSGRGDLGSI |
| 787 | YGVRGDRDAL |
| 788 | ATVRGDLEKA |
| 789 | STLRGDMSSG |
| 790 | SYARGDLSDS |
| 791 | ISARGDLTNT |
| 792 | SSLRGDLGVA |
| 793 | TRARGDTAEL |
| 794 | VTARGDLQDK |
| 795 | ATRRGDLDGT |

【０７７７】

本発明の記載される方法、医薬組成物、及びキットの様々な変更及び変形が、本発明の範囲及び趣旨から逸脱せずに、当業者に明らかであろう。本発明が、特定の実施形態とともに記載されてきたが、さらなる変更が可能であること及び権利請求される本発明が、このような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことが理解されるであろう。実際に、当業者に明らかである本発明を実施するための記載される形態の様々な変更が、本発明の範囲内であることが意図される。本出願は、一般に、本発明の原理にしたがう本発明の任意の変形、使用、又は改変を包含することが意図され、本開示からのこのような逸脱を含め、本発明が関連する当該技術分野における公知の慣行の範囲内に含まれ、上述される本明細書における本質的な特徴に適用され得る。

【図面】

【図１】

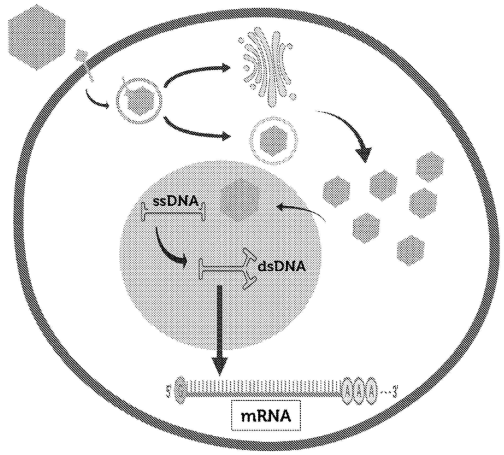



図1

【図２】

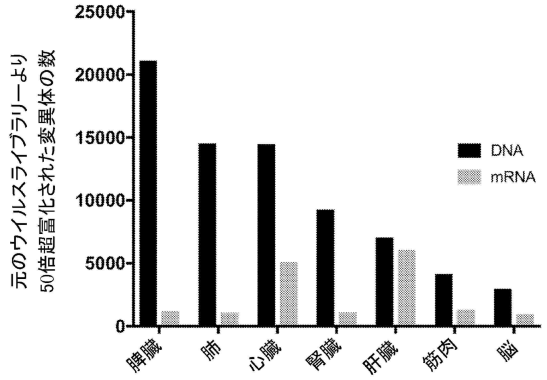



図2

【図３】

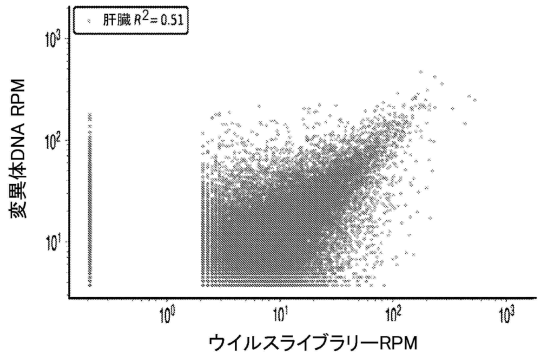



図3A

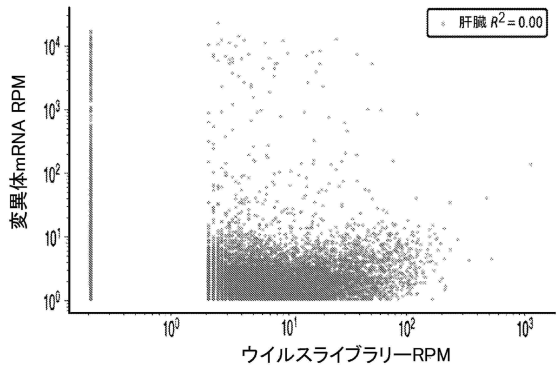



図3B

【図４】

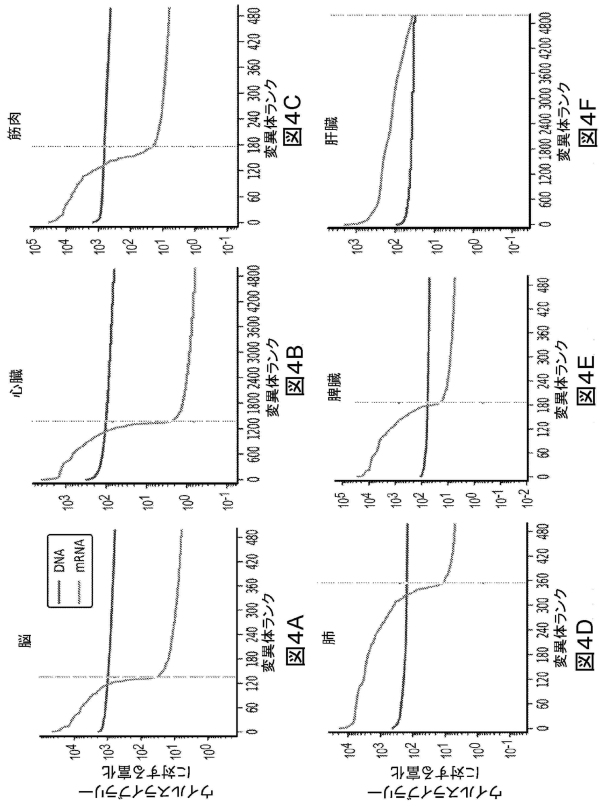



図4A 図4B 図4C 図4D 図4E 図4F

【図５－１】

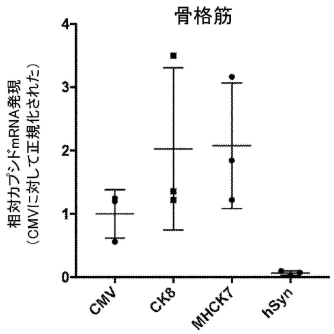



図5A

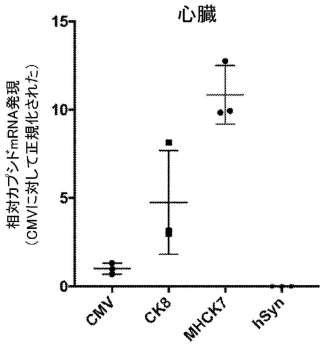



図5B

【図５－２】

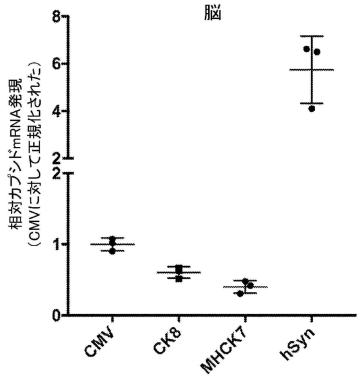



図5C

【図６】

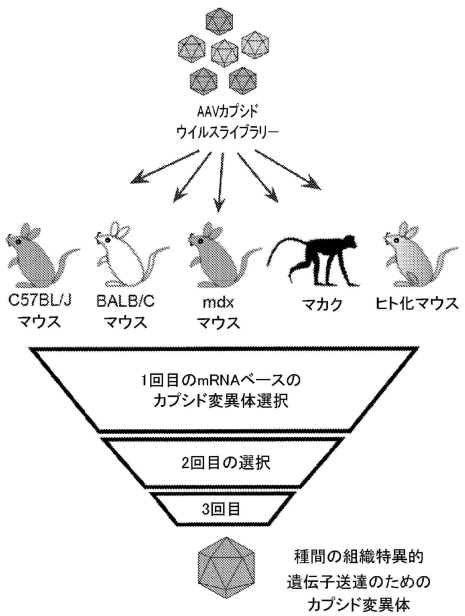



図6

【図７】

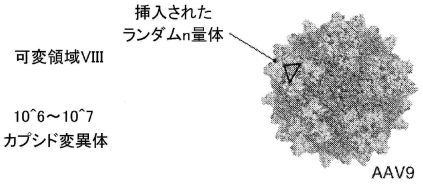



図7

【図８】

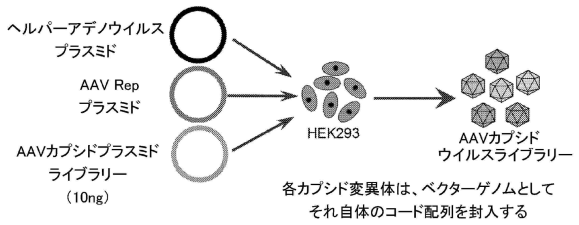



図8

【図９】

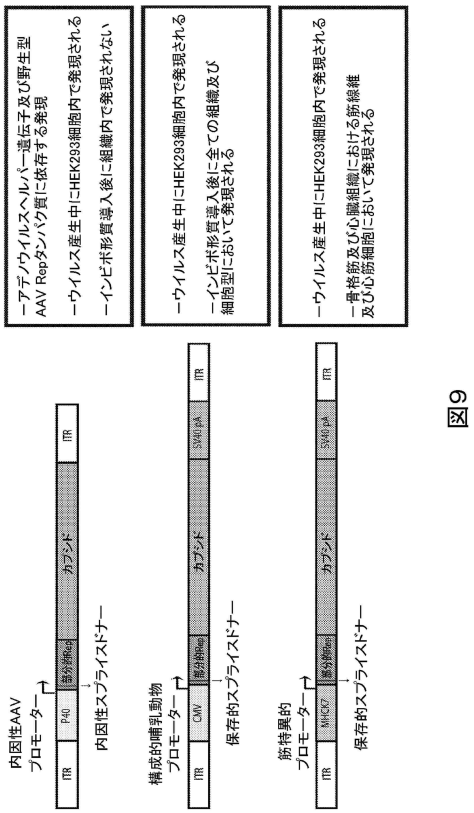



図9

【図１０】

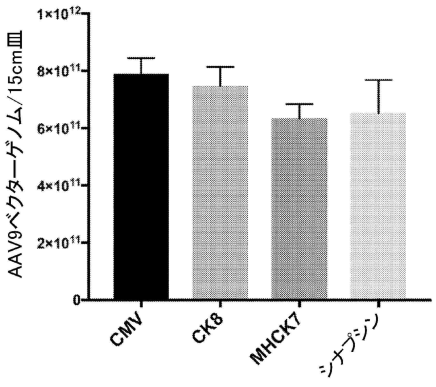



図10

【図１１】

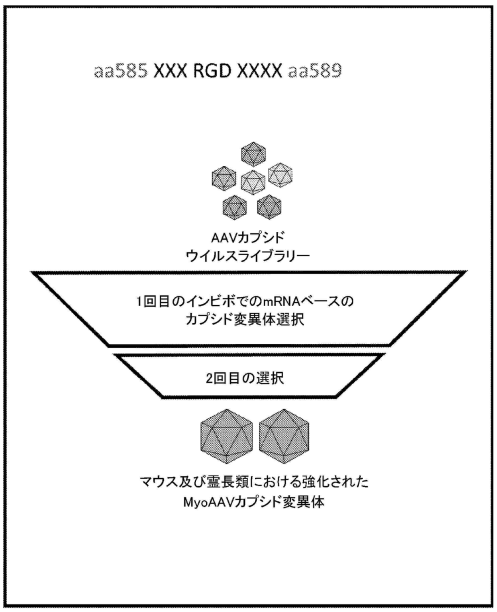



図11

【図１２】

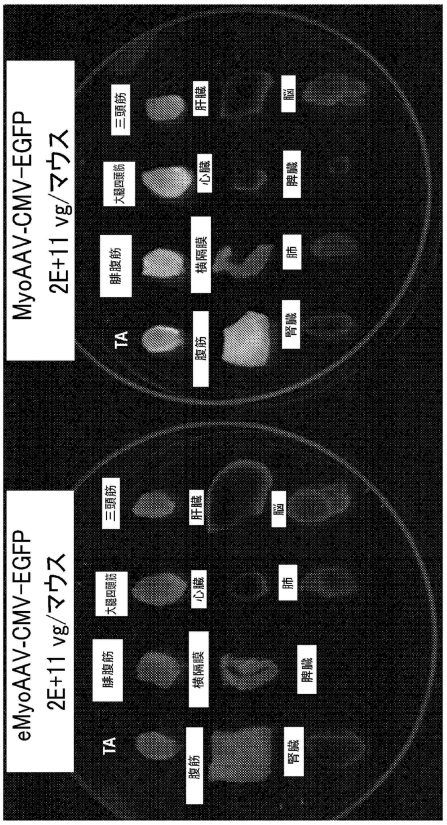



図12

【図１３】

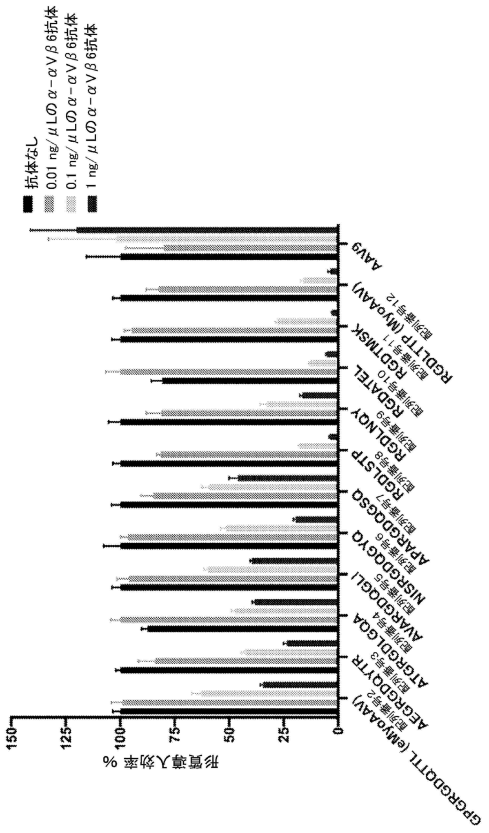



図13

【図１４－１】

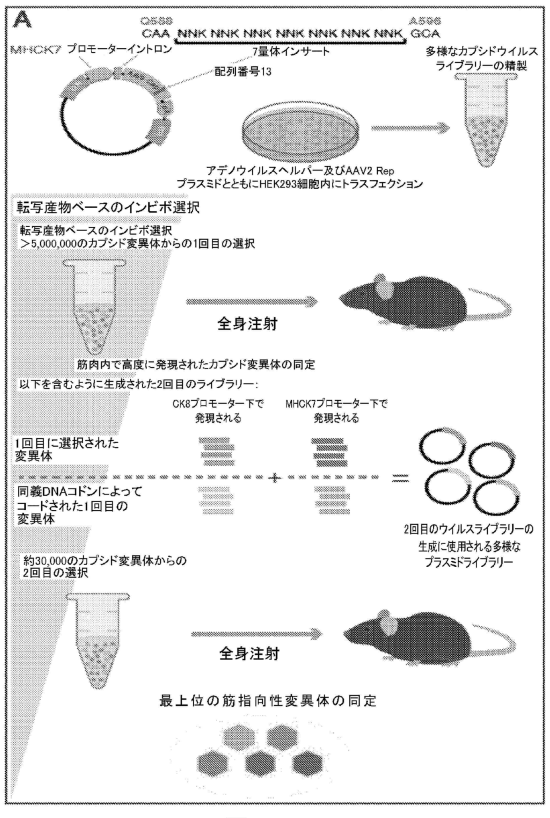
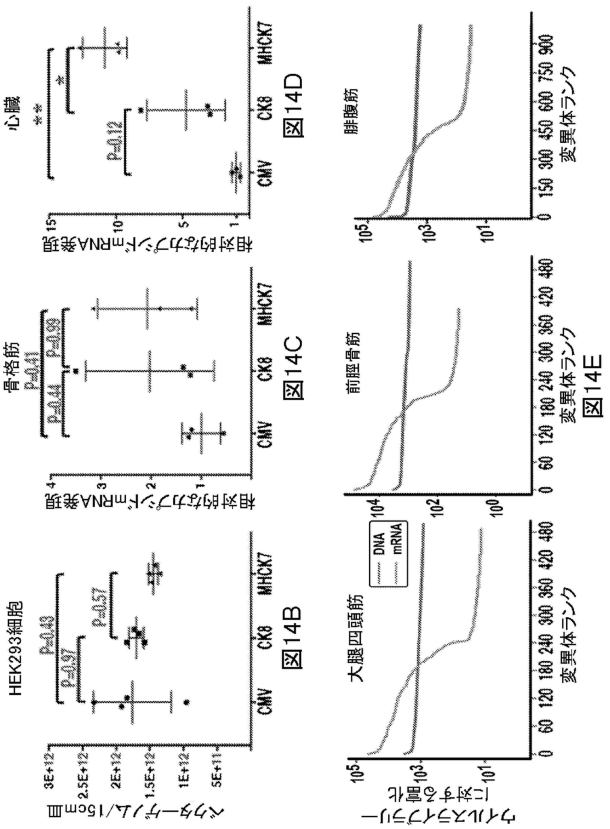



図14A

【図１４－２】



【図１４－３】

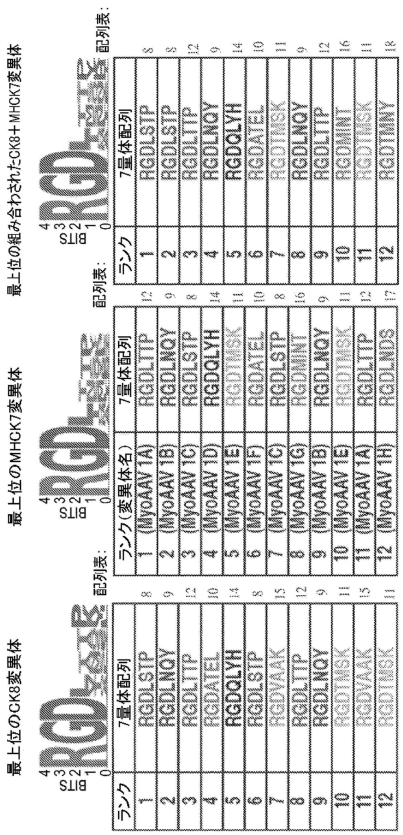



図14F

【図１５－１】

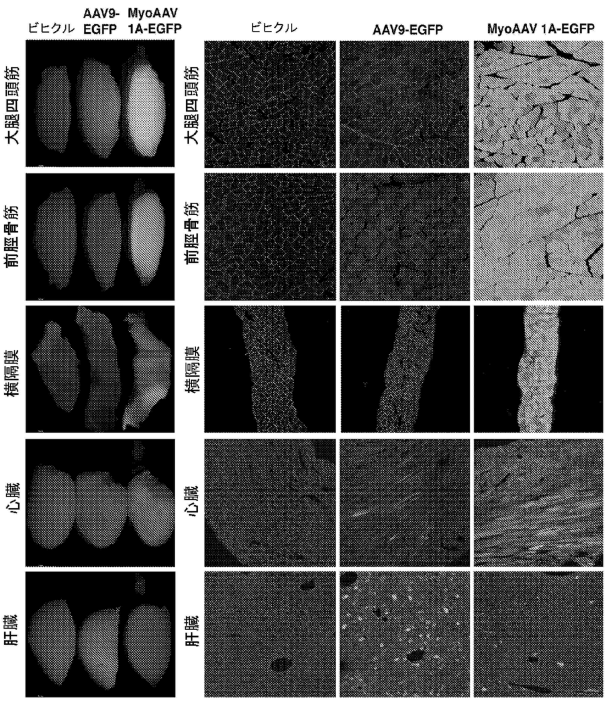



図15A　図15B

【図１５－２】

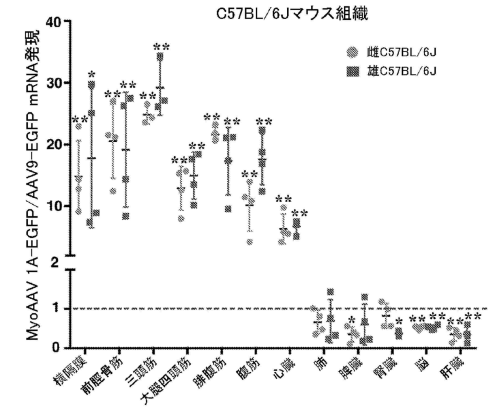



図15C

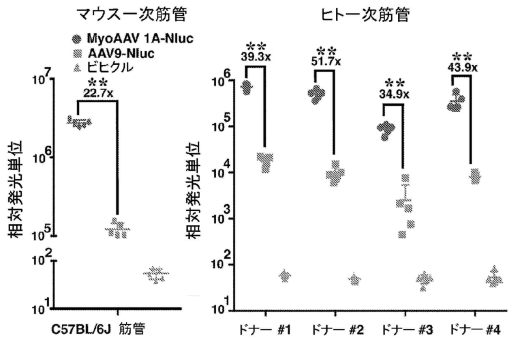



図15D

【図１６Ａ】

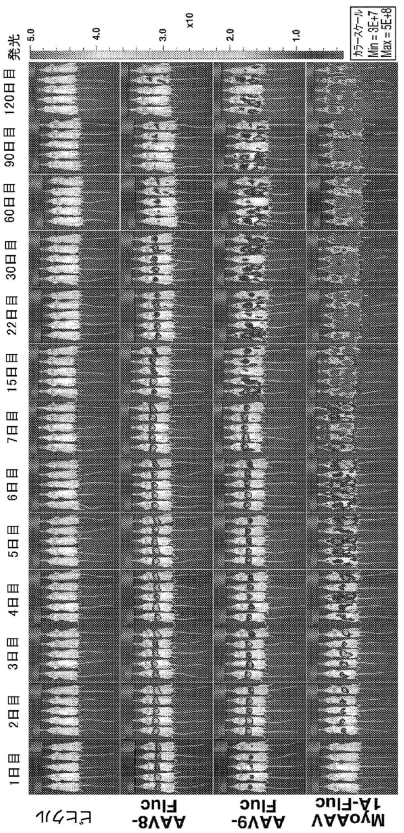



図16A

【図１６Ｂ】

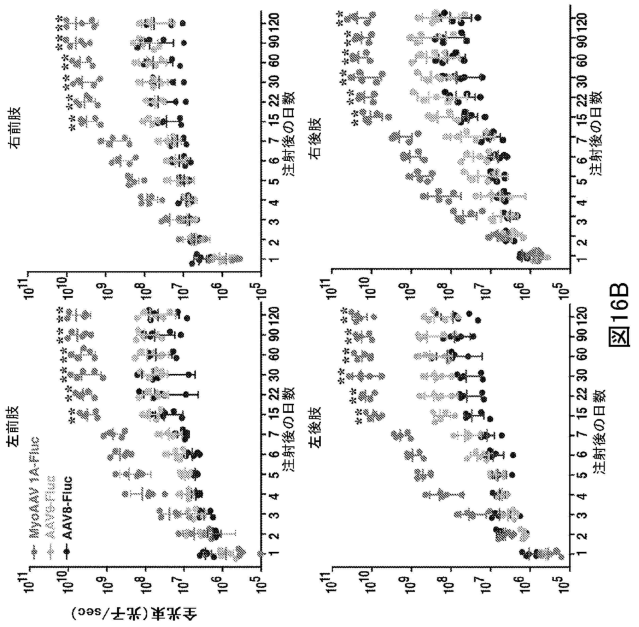



図16B

【図１６Ｃ】

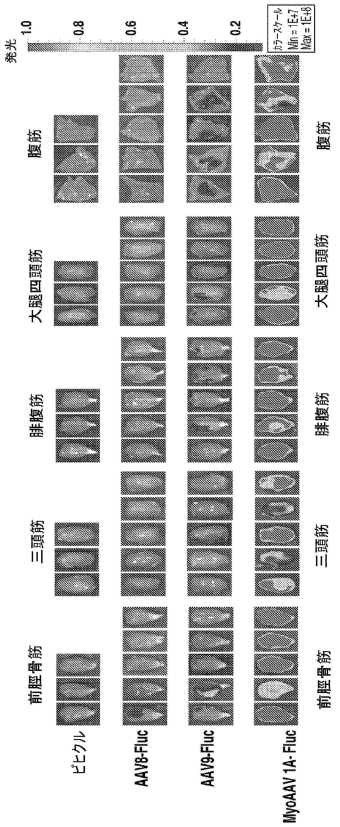



図16C

【図１６Ｄ】

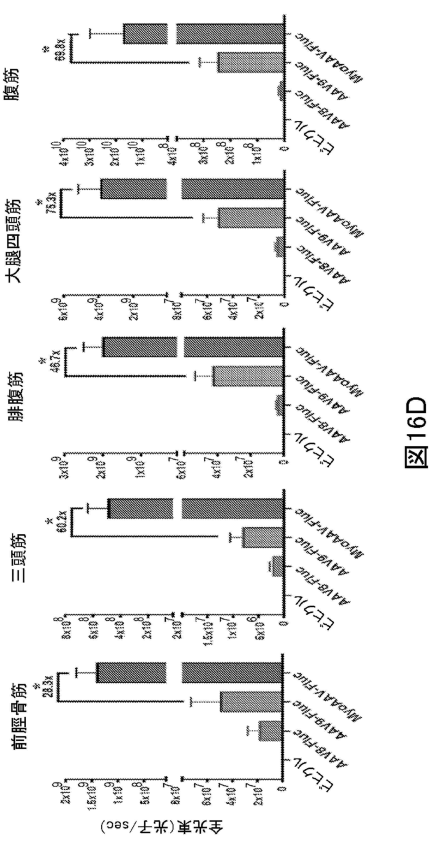



図16D

【図１７－１】

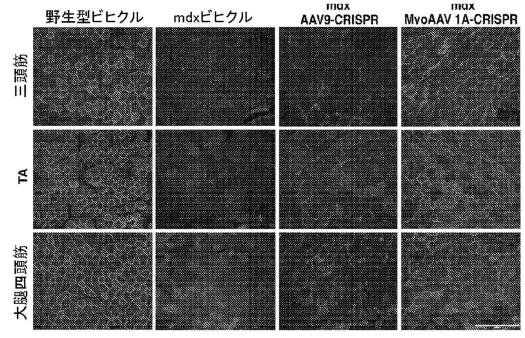



図17A

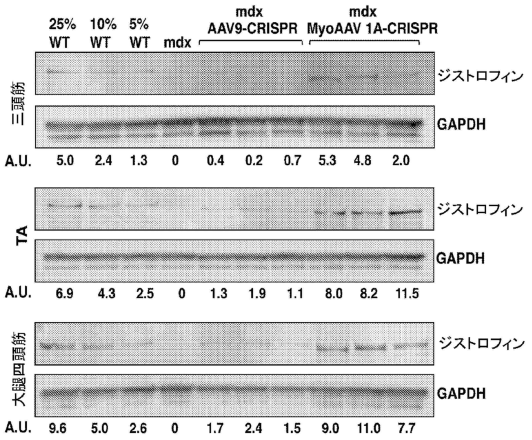
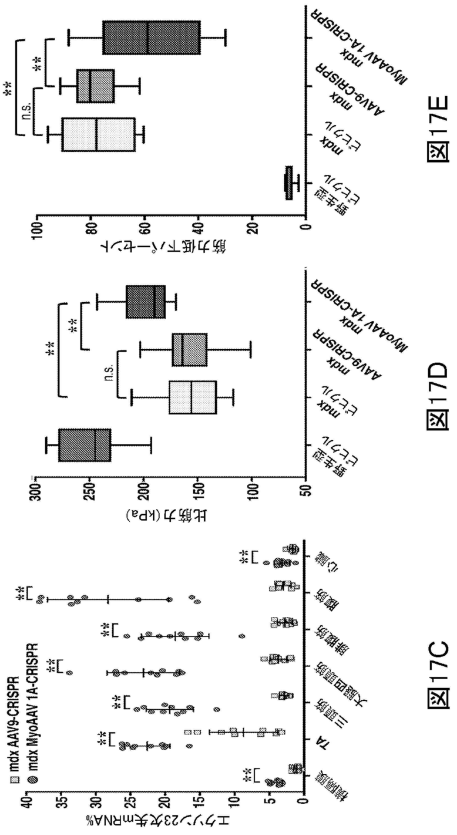
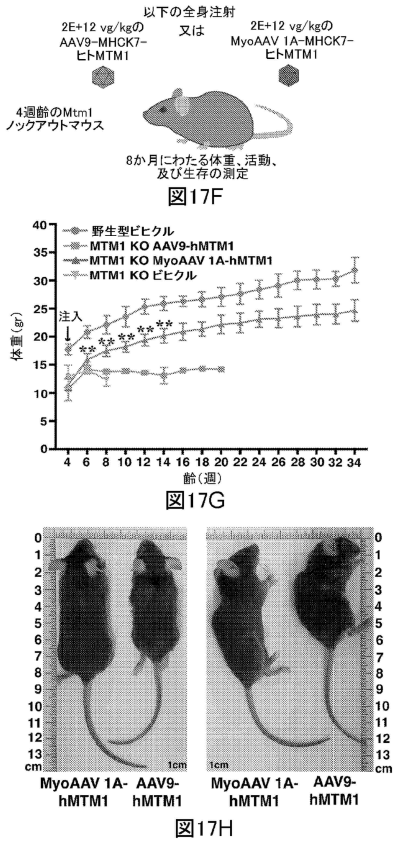



図17B

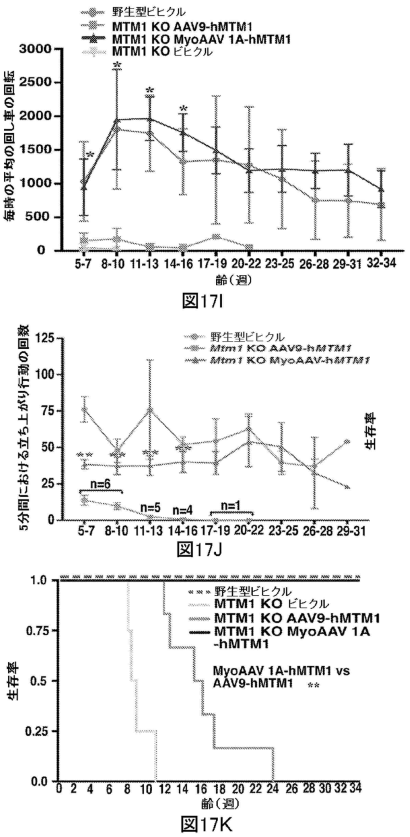
【図１７－２】



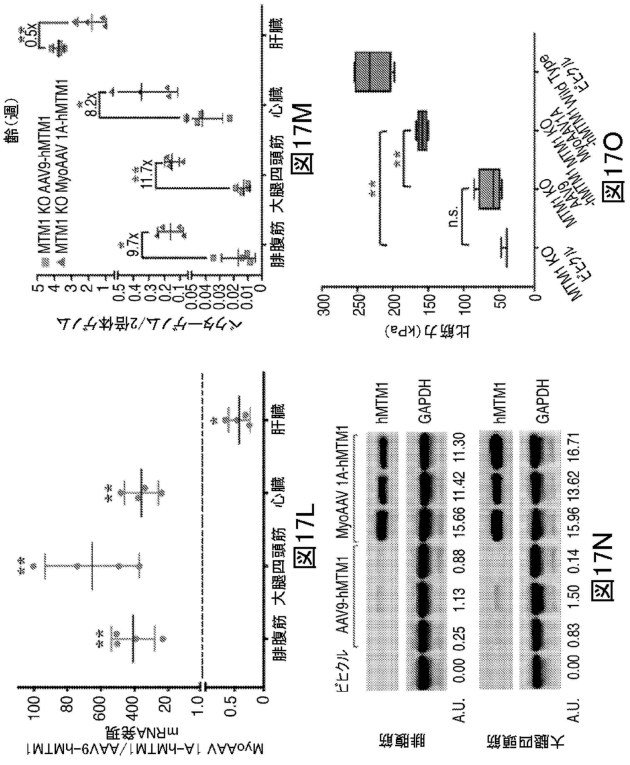

【図１７－３】




【図１７－４】




【図１７－５】



【図１８－１】

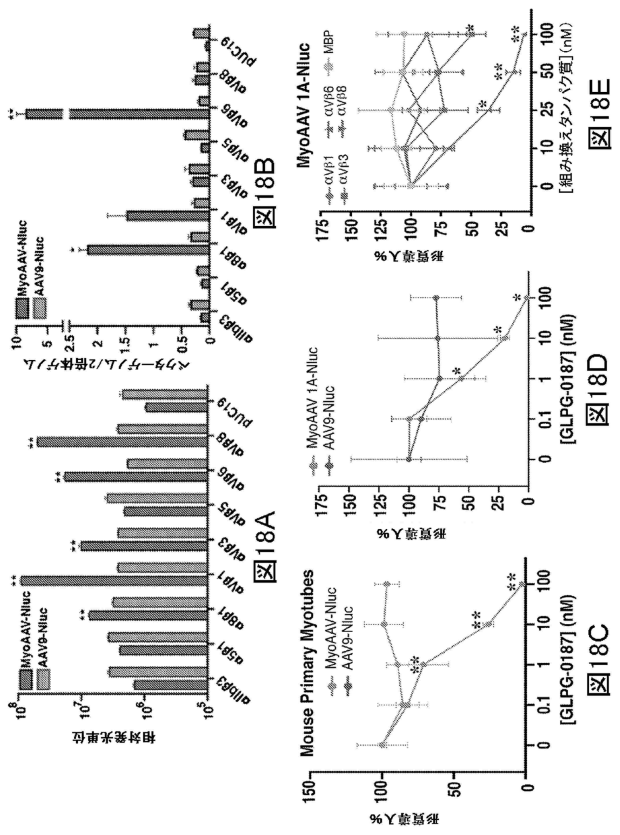



図18E　図18D　図18C　図18B　図18A

【図１８－２】

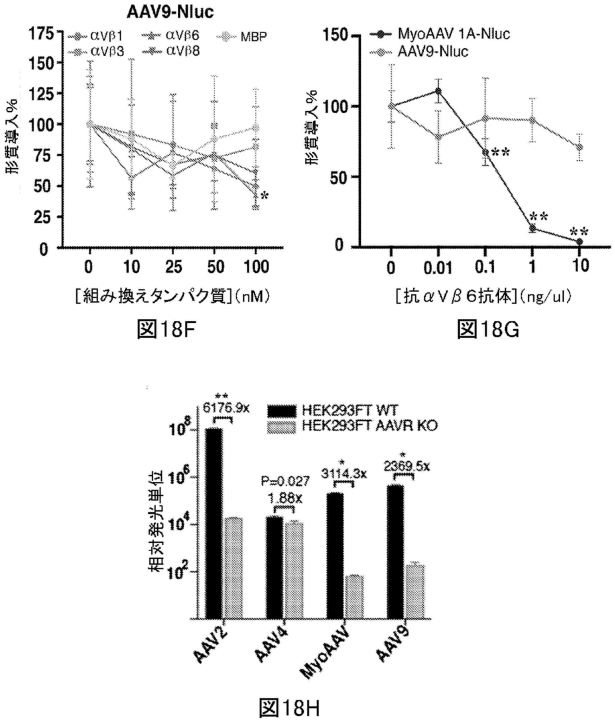



図18F　図18G　図18H

【図１８－３】

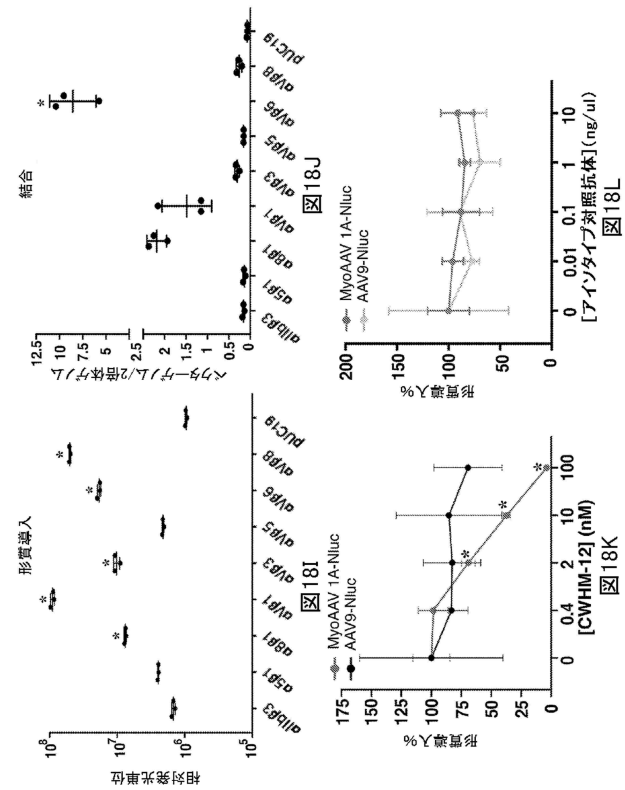



図18J　図18I　図18L　図18K

【図１９－１】

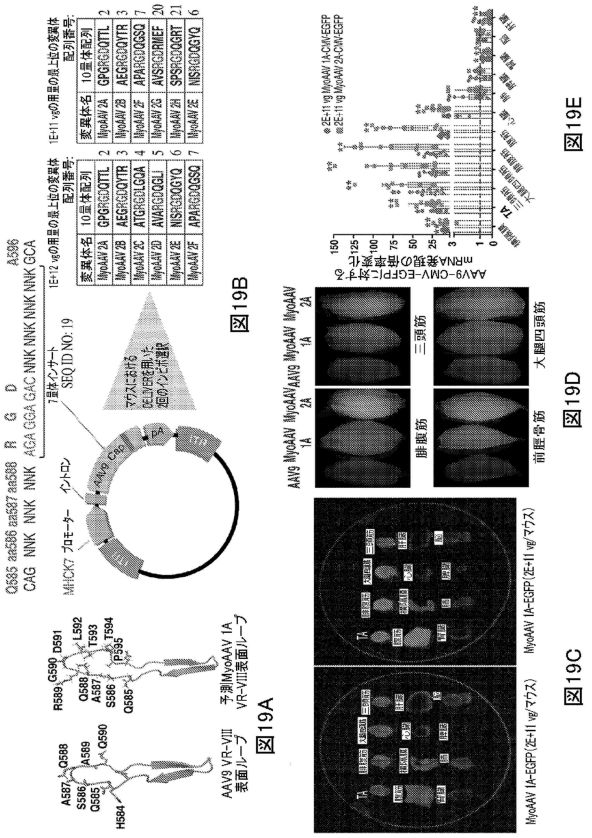



図19B　図19A　図19E　図19D　図19C

【図１９－２】

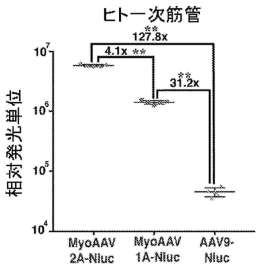



図19F

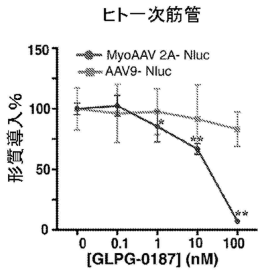



図19G

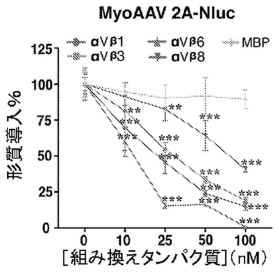



図19H

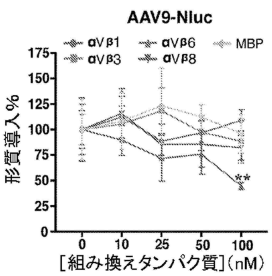



図19I

【図１９－３】

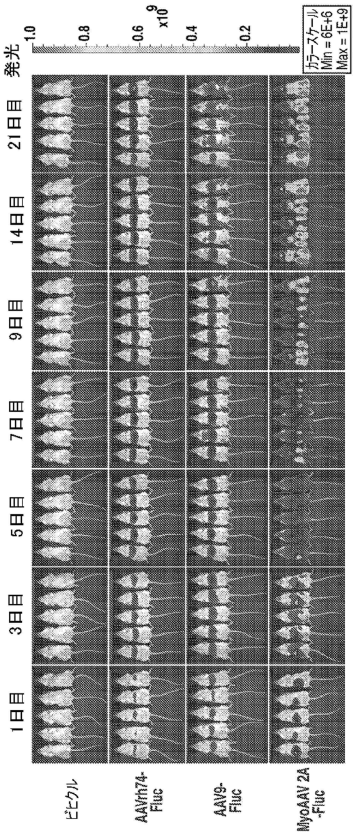



図19J

【図１９－４】

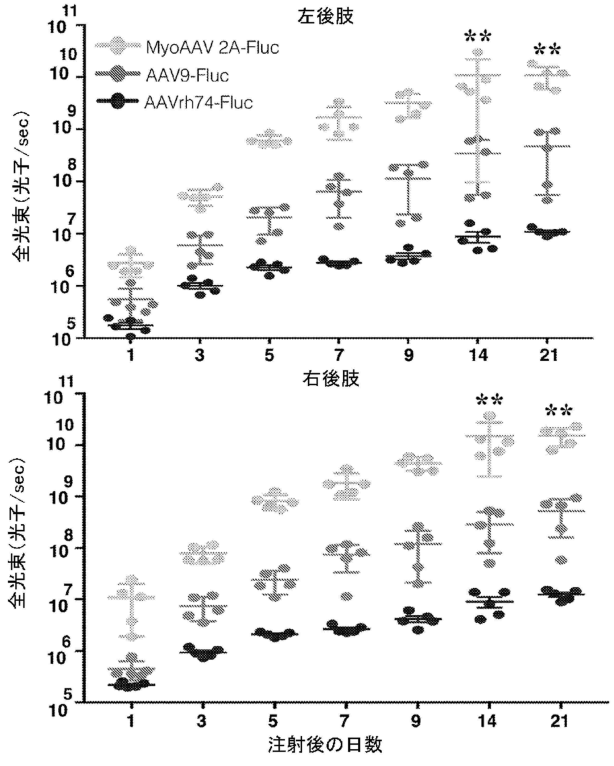



図19K

【図１９－５】

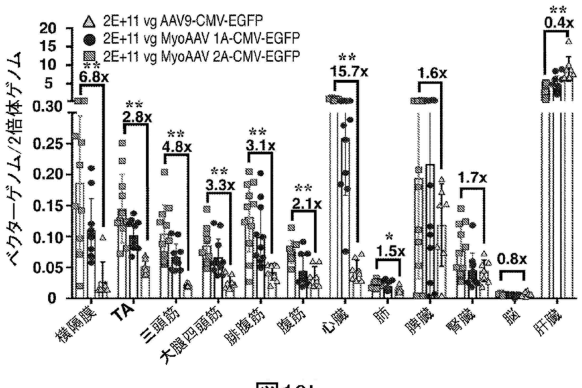



図19L

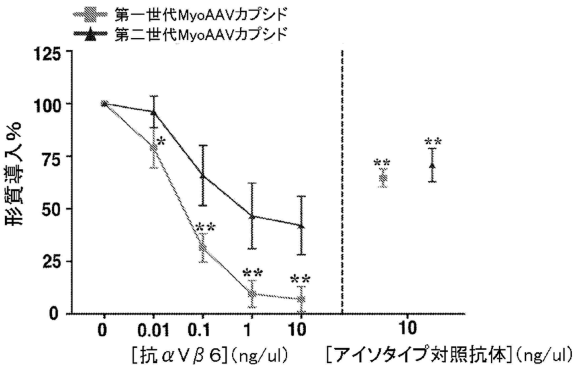



図19M

【図２０－１】

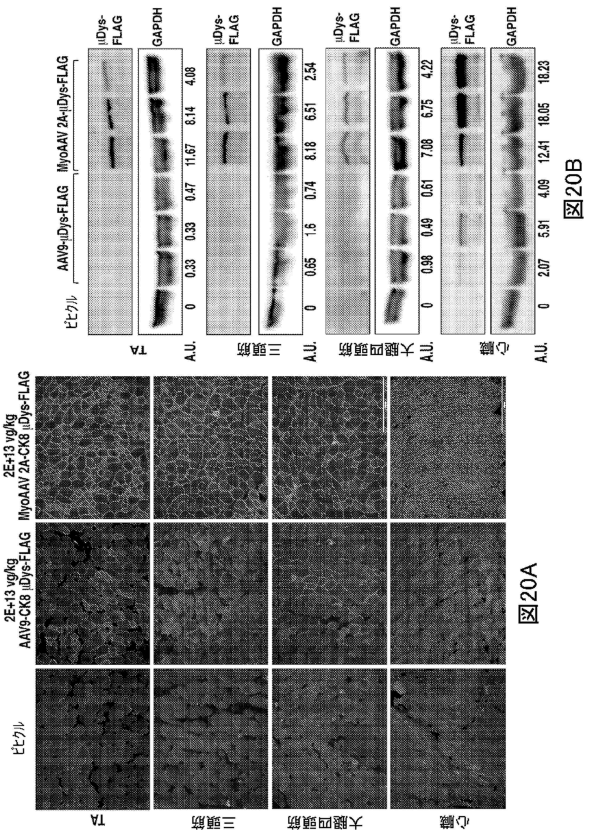



図20A

図20B

【図２０－２】

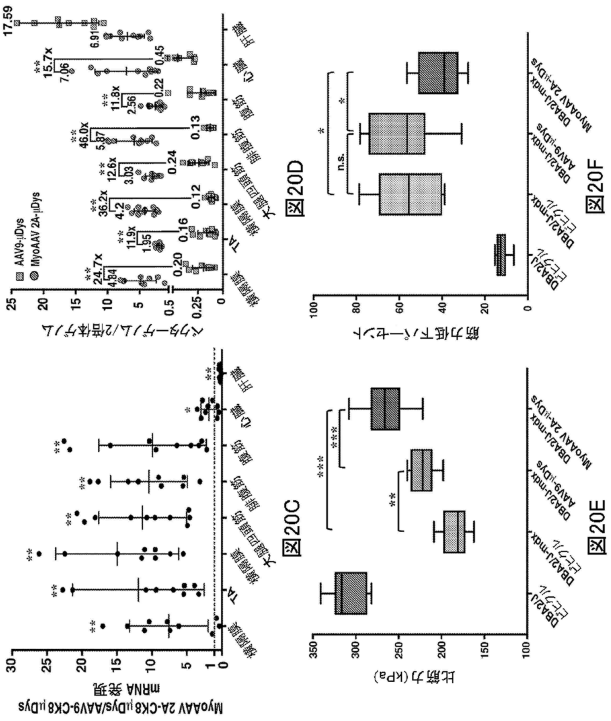



図20C

図20D

図20E

図20F

【図２１－１】

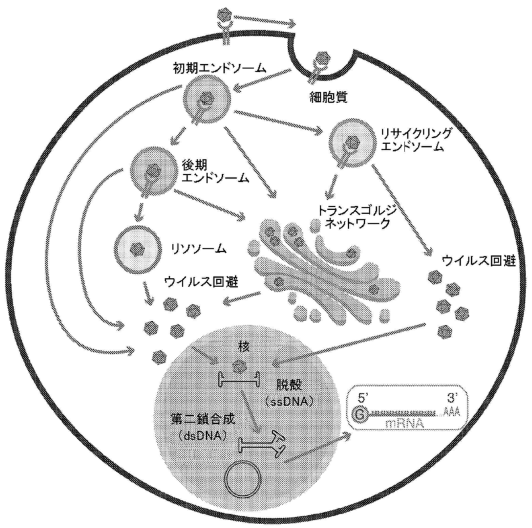



図21A

【図２１－２】

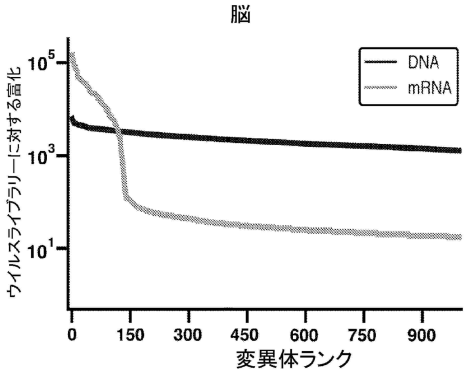



図21B

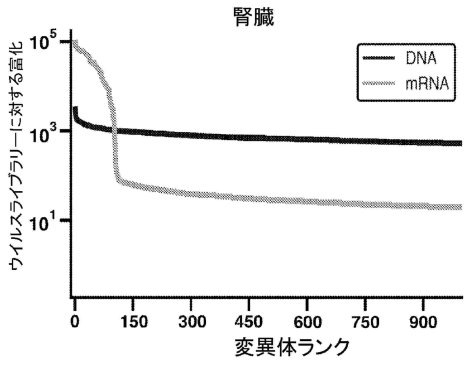
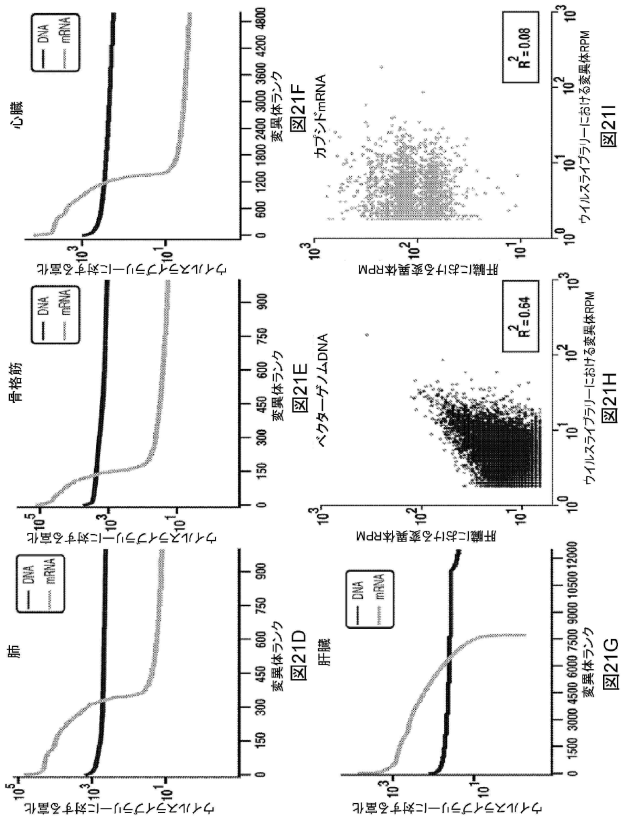
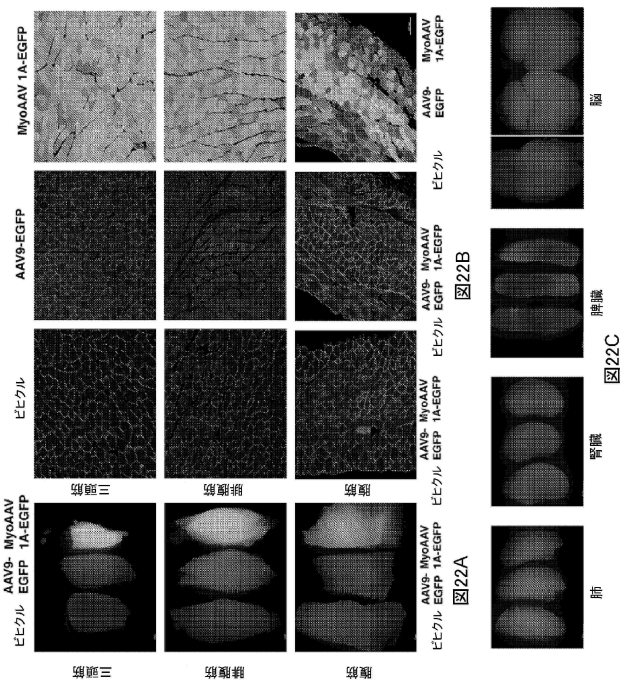



図21C

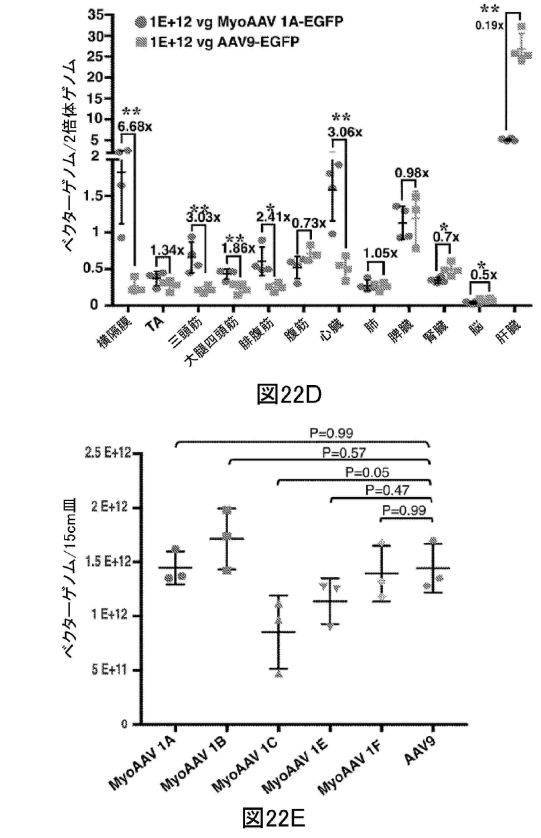
【図２１－３】



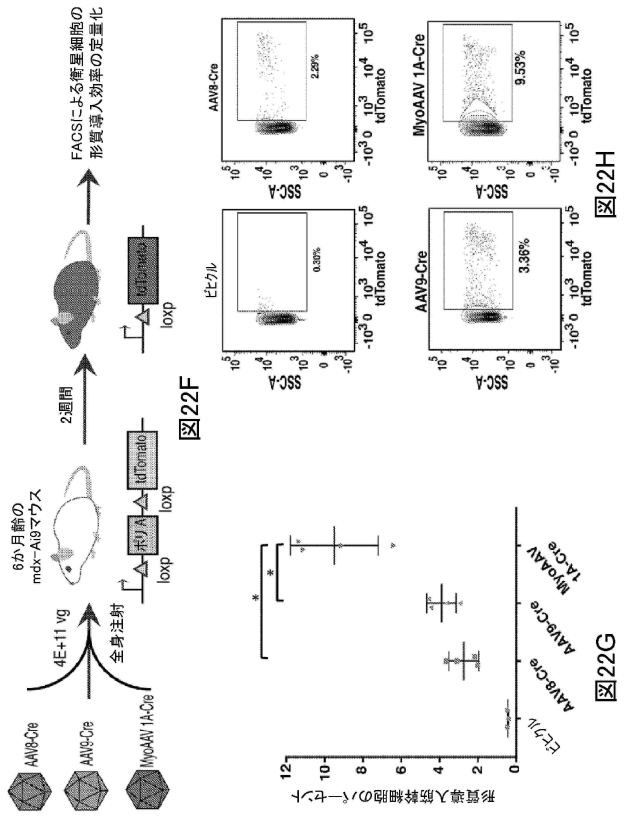

【図２２－１】



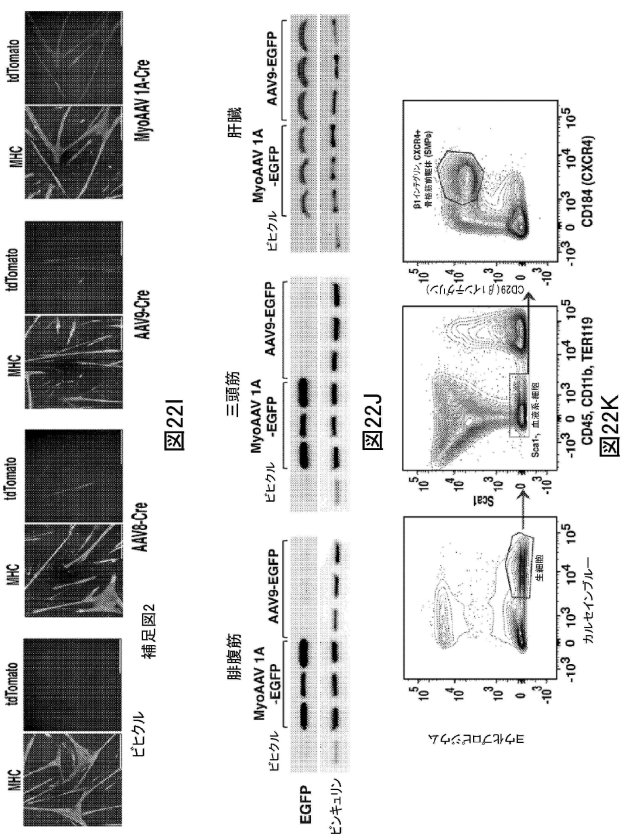

【図２２－２】



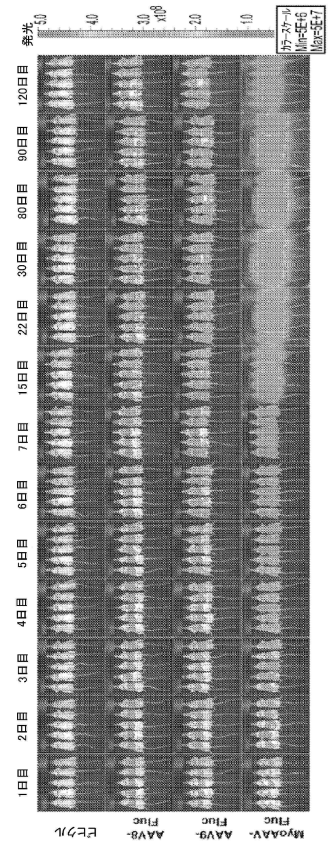

【図２２－３】



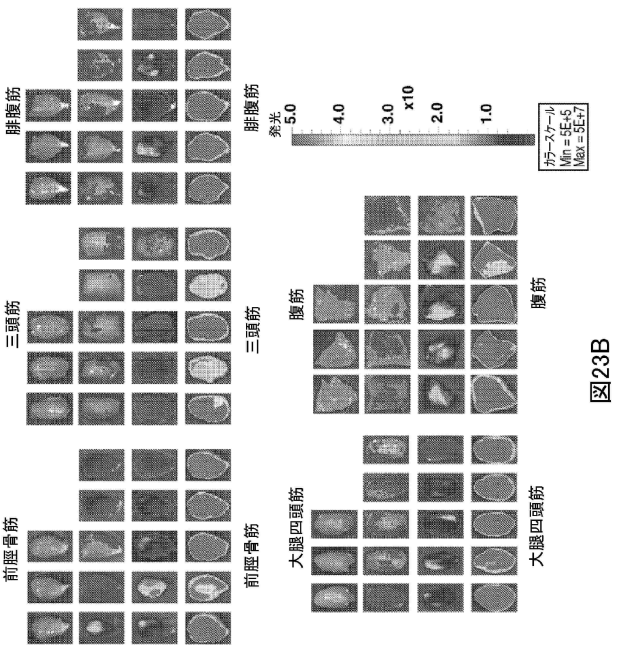
【図２２－４】



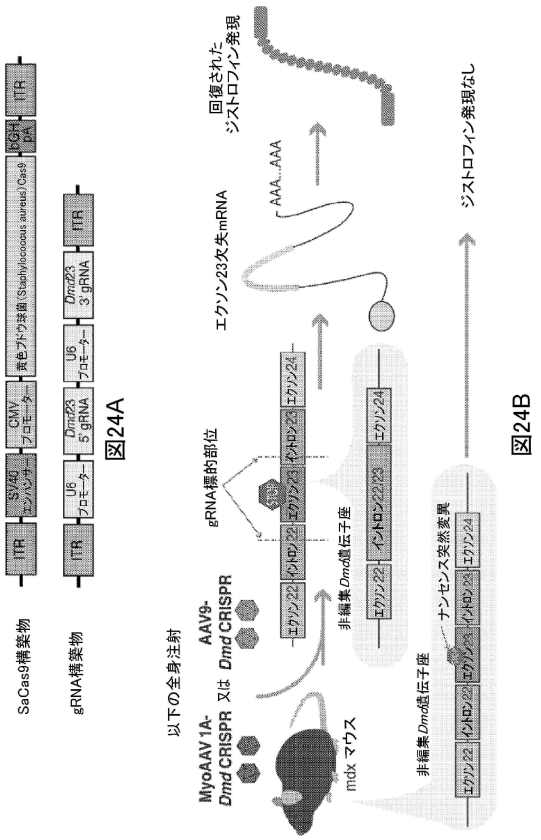

【図２３Ａ】




【図２３Ｂ】




【図２４－１】



【図２４－２】

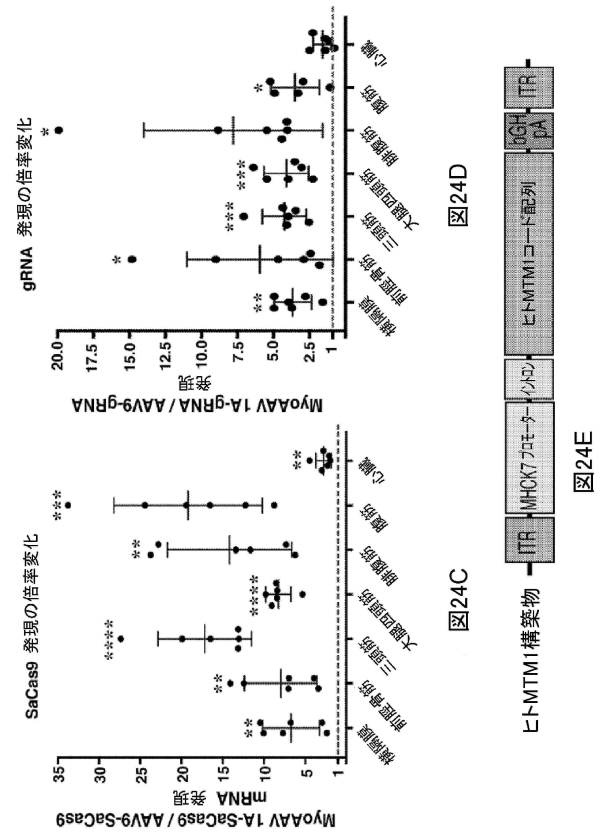



図24C　図24D　図24E

【図２４－３】

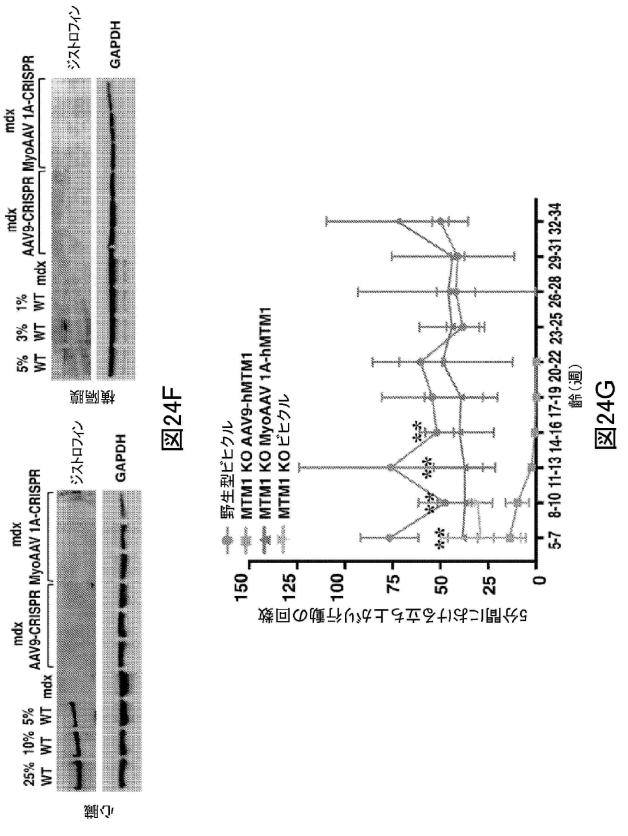



図24F　図24G

【図２５－１】

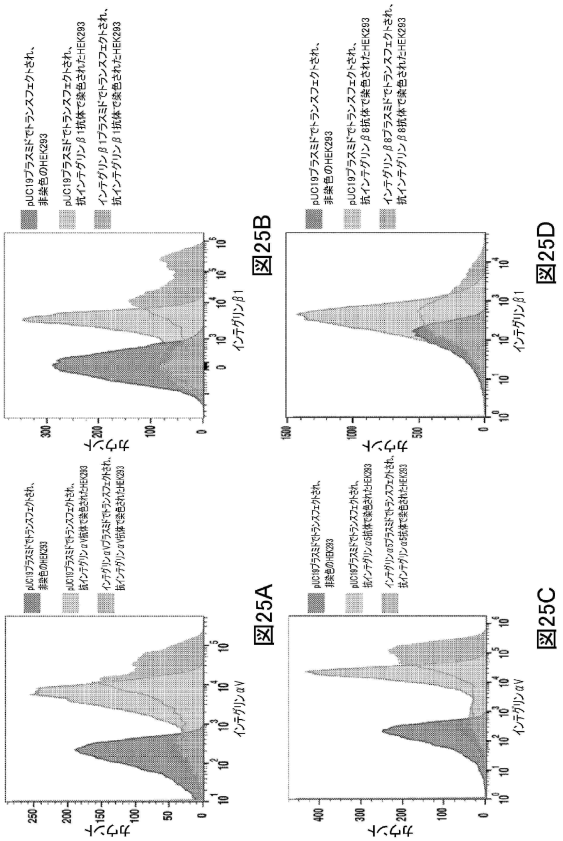



図25A　図25B　図25C　図25D

【図２５－２】

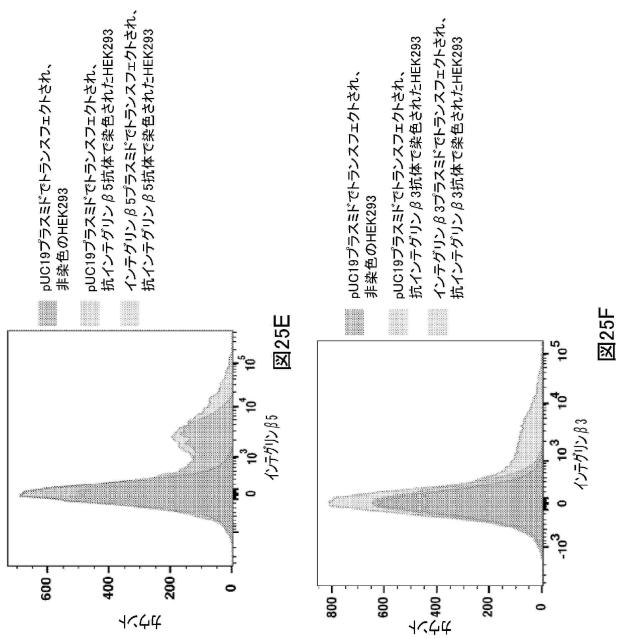



図25E　図25F

【図２５－３】

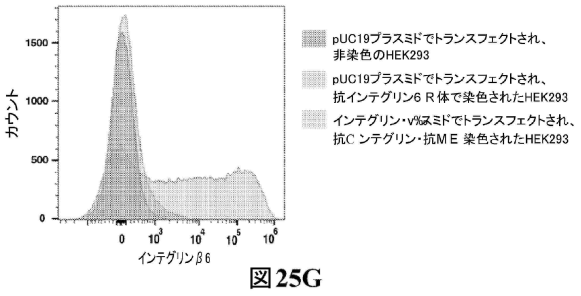



図25G

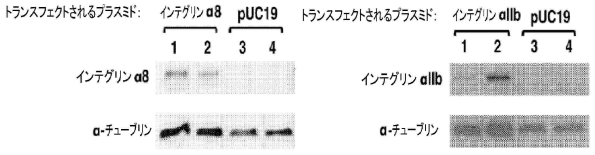



図25H




図25I

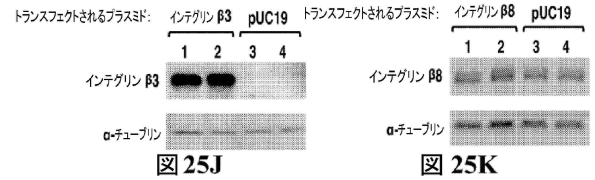



図25J




図25K

【図２６－１】

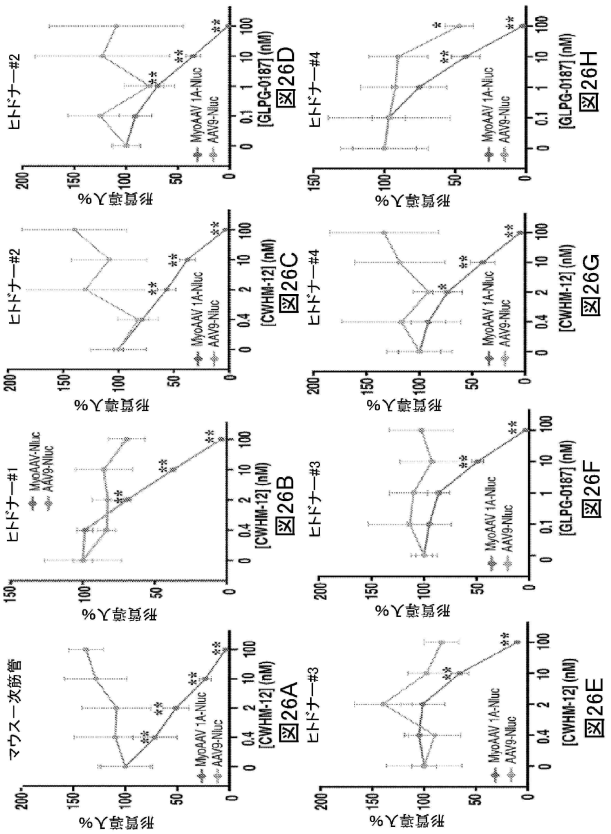



図26D 図26H 図26C 図26G 図26B 図26F 図26A 図26E

【図２６－２】

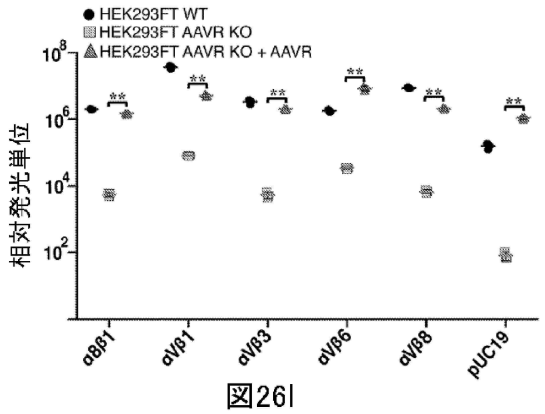



図26I

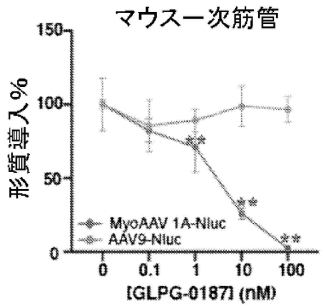



図26J

【図２６－３】

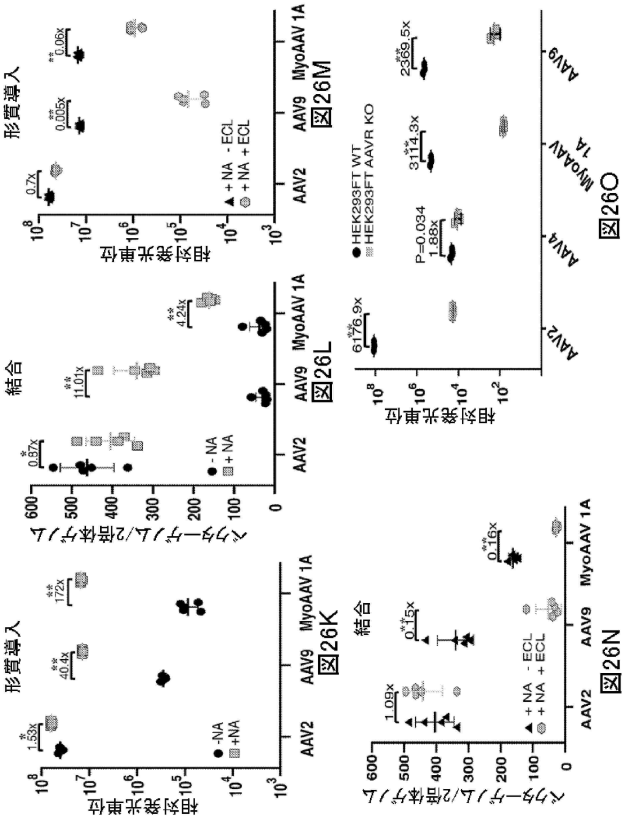



図26M 図26L 図26O 図26K 図26N

【図２７Ａ】

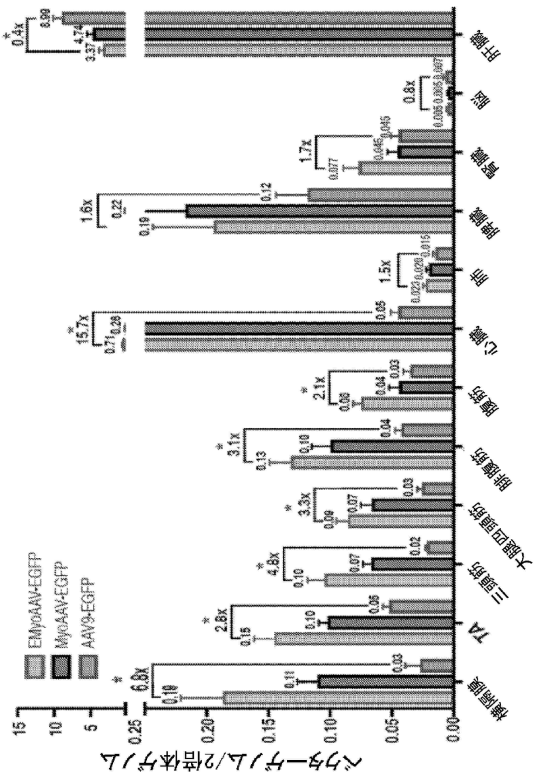



図27A

【図２７Ｂ】

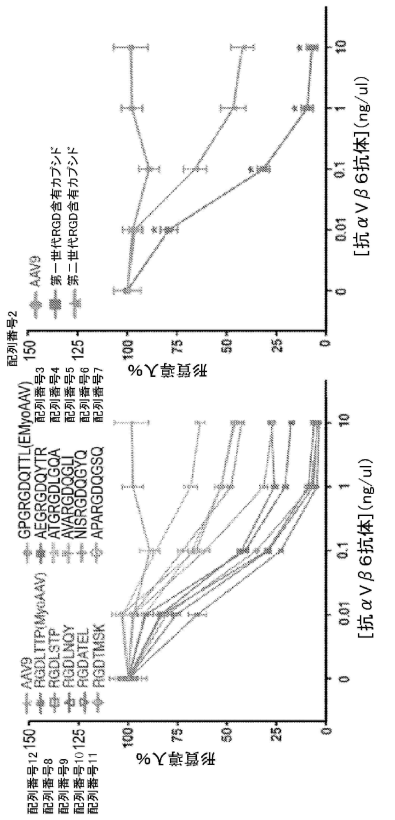



図27B

【図２８－１】

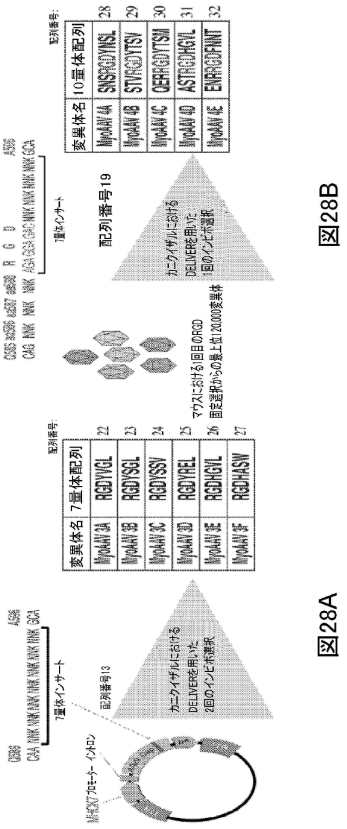



図28A

図28B

【図２８－２】

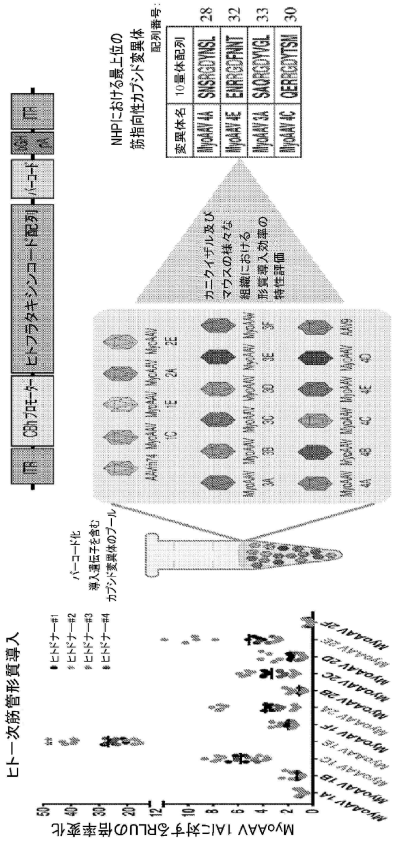



図28C

図28D

【図２８－３】

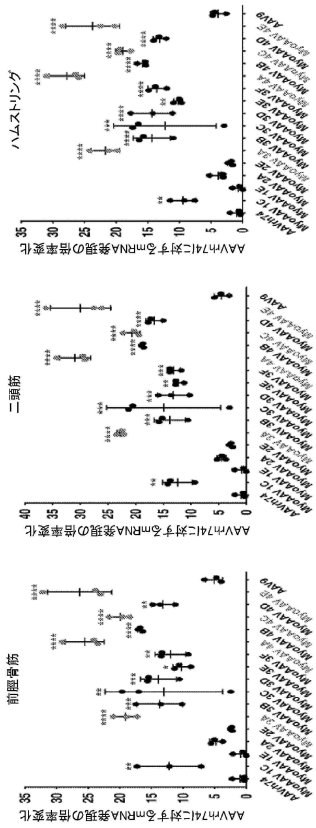



図28E

【図２８－４】

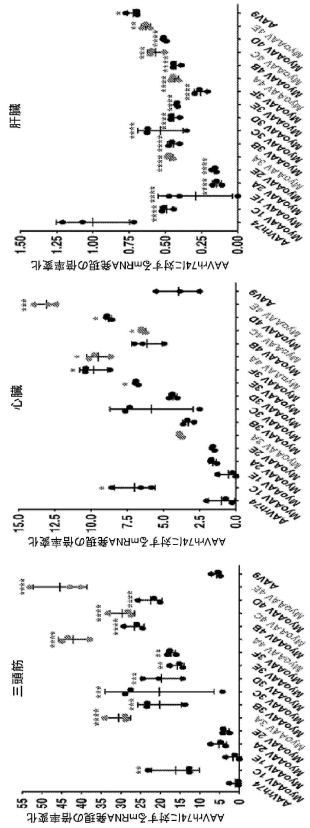



図28E（続き）

【図２８－５】

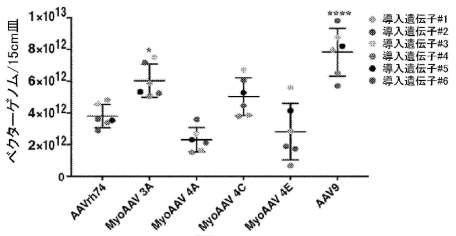



図28F

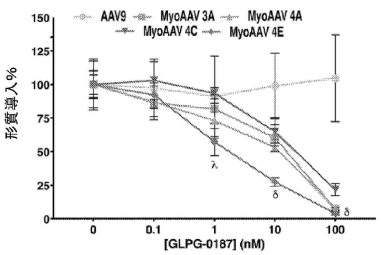



図28G

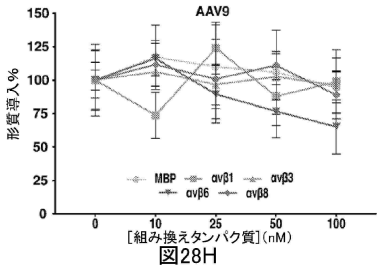



図28H

【図２８－６】

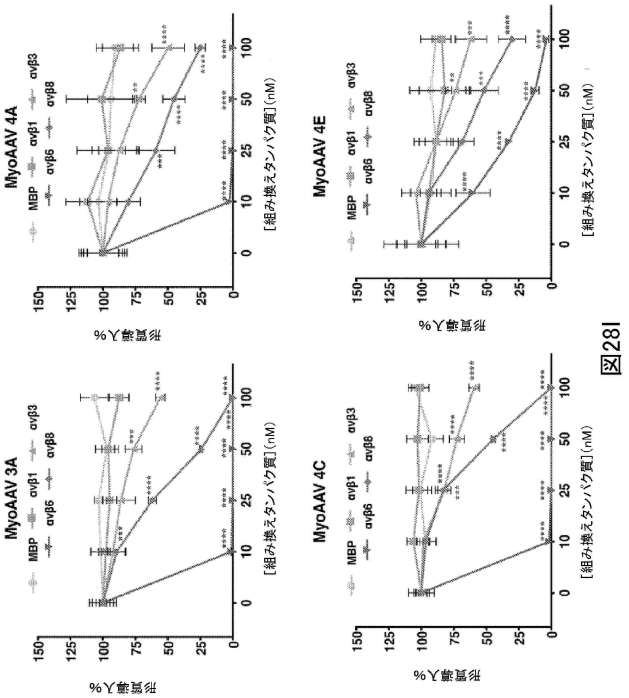



図28I

【図２８－７】

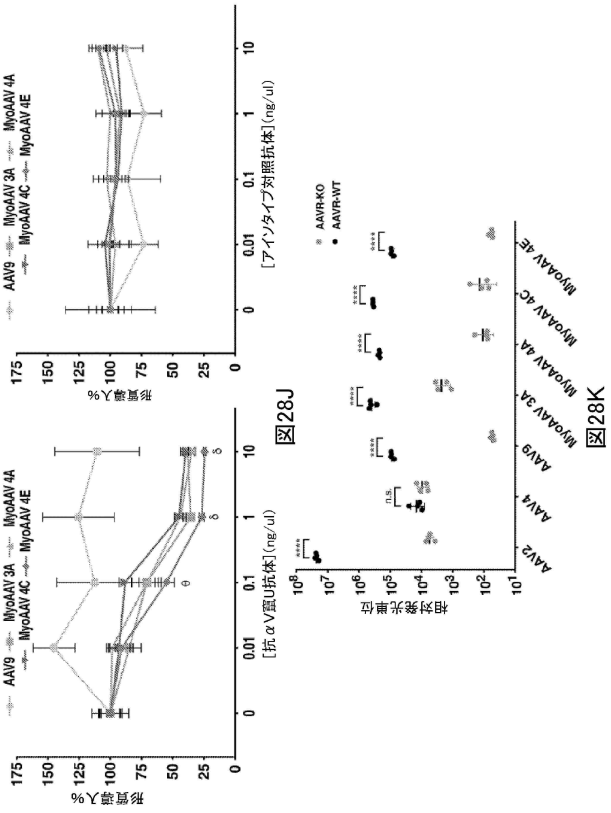



図28J

図28K

【図２９－１】

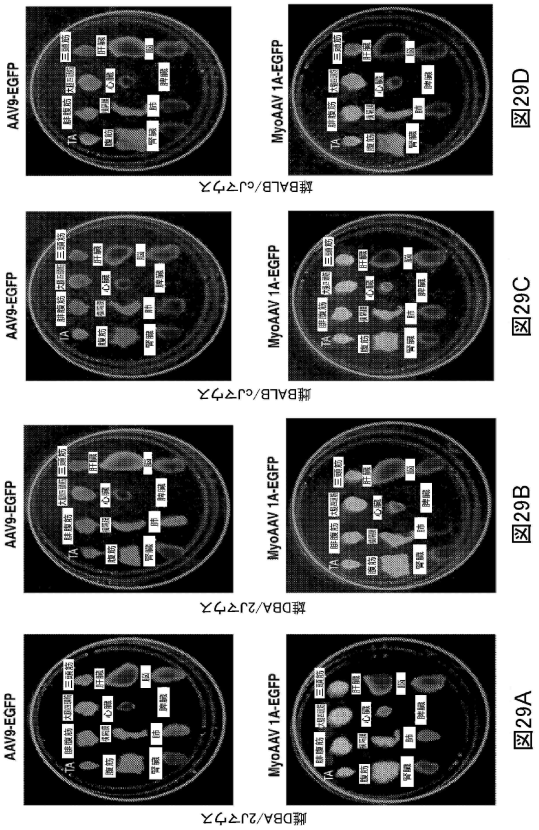



図29D

図29C

図29B

図29A

【図２９－２】

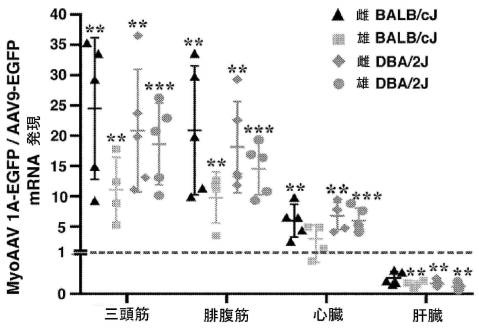



図29E

【図２９－３】

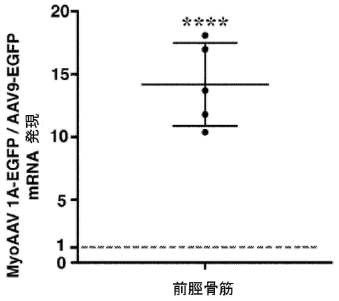



図29F

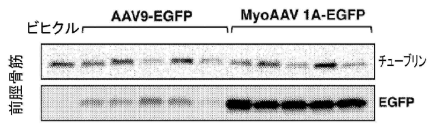



図29G

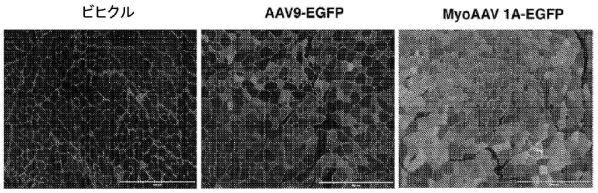



図29H

【図２９－４】

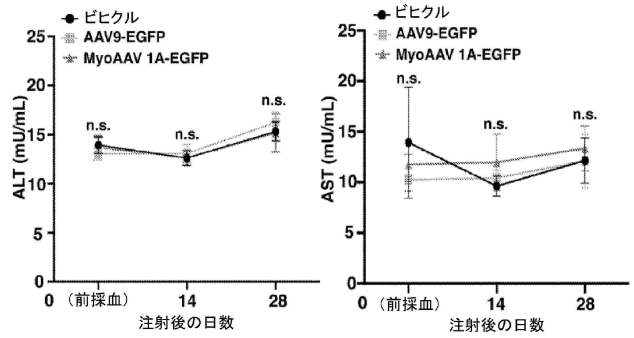



図29I　図29J

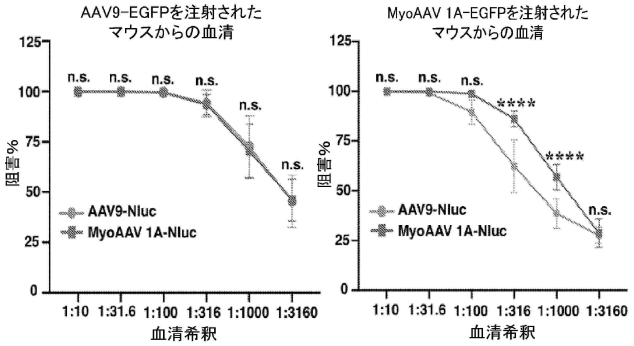



図29K　図29L

【図２９－５】

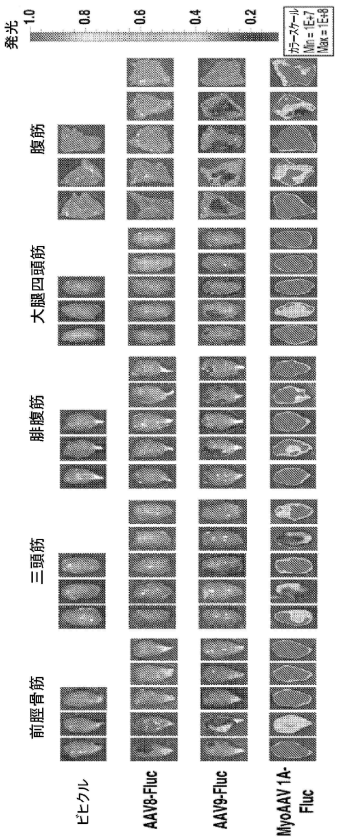



図29M

【図２９－６】

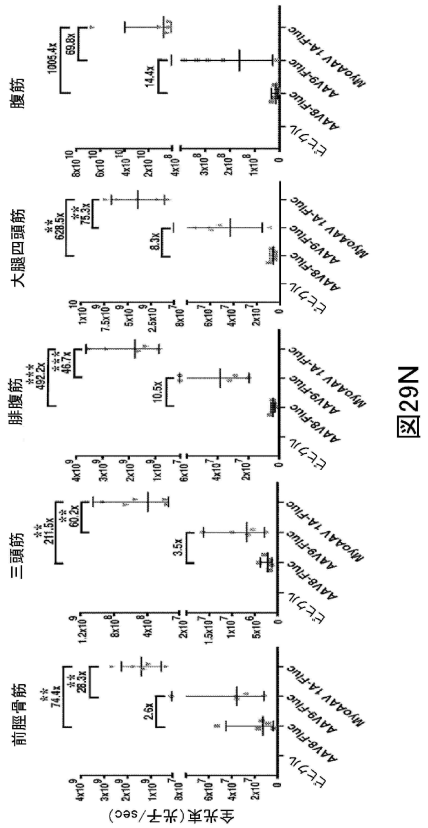



図29N

【図２９－７】

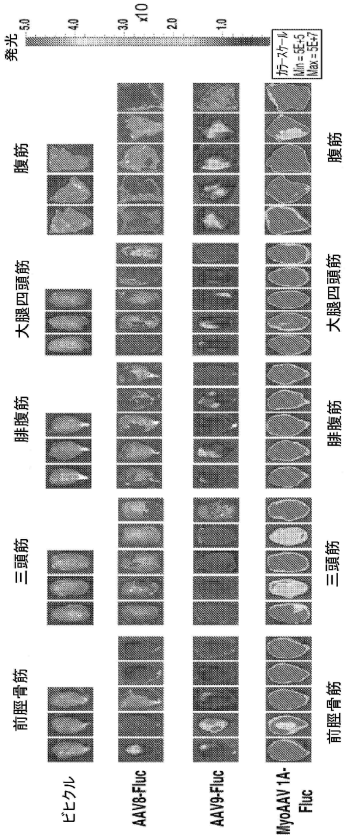



図29O

【図３０－１】

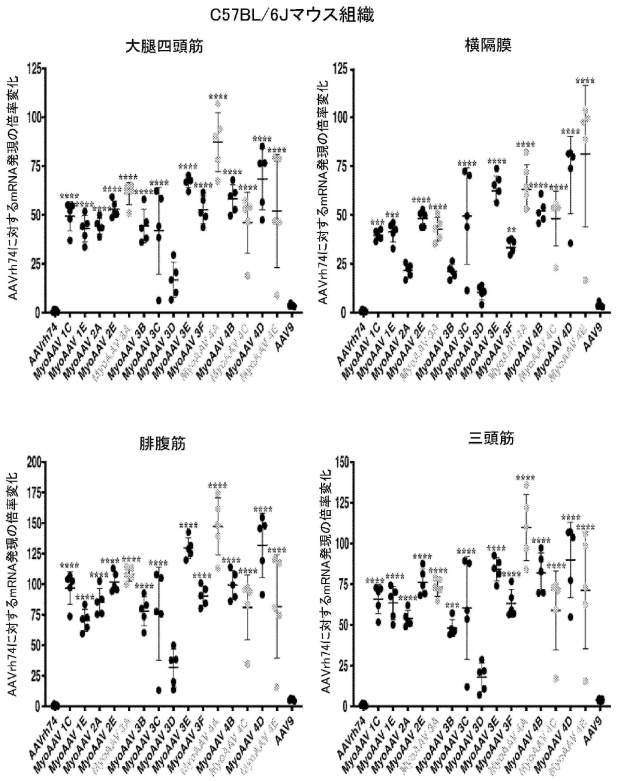



図30A

【図３０－２】

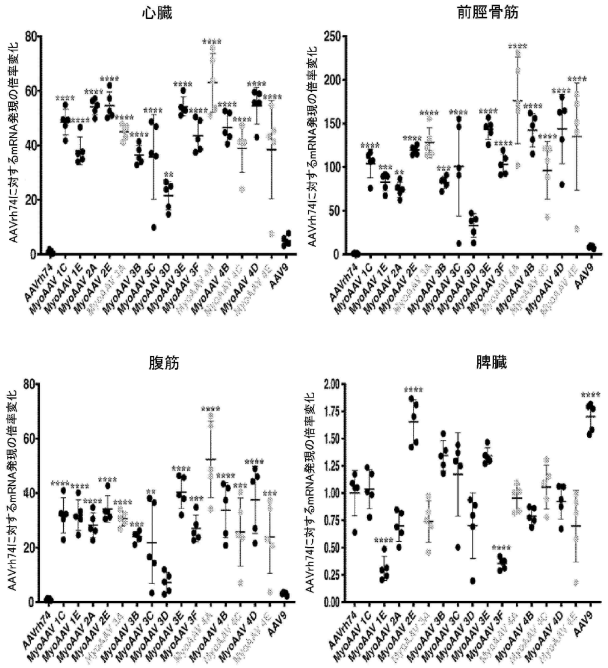



図30A（続き）

【図３０－３】

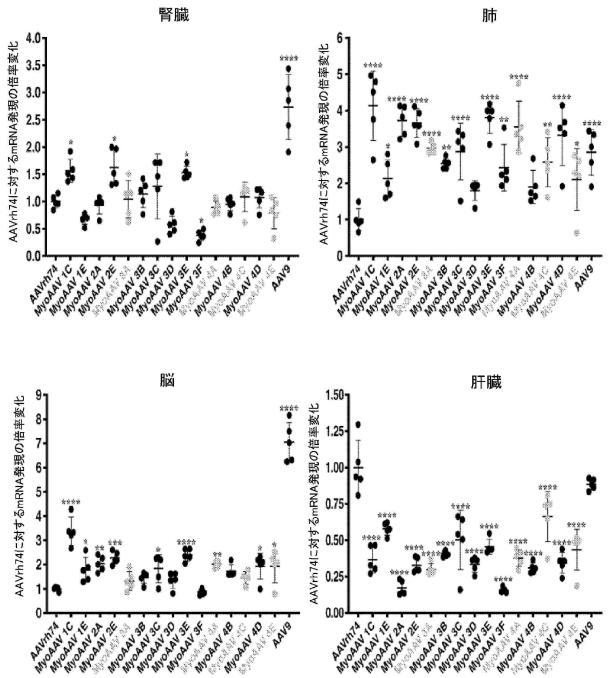



図30A（続き）

【図３０－４】

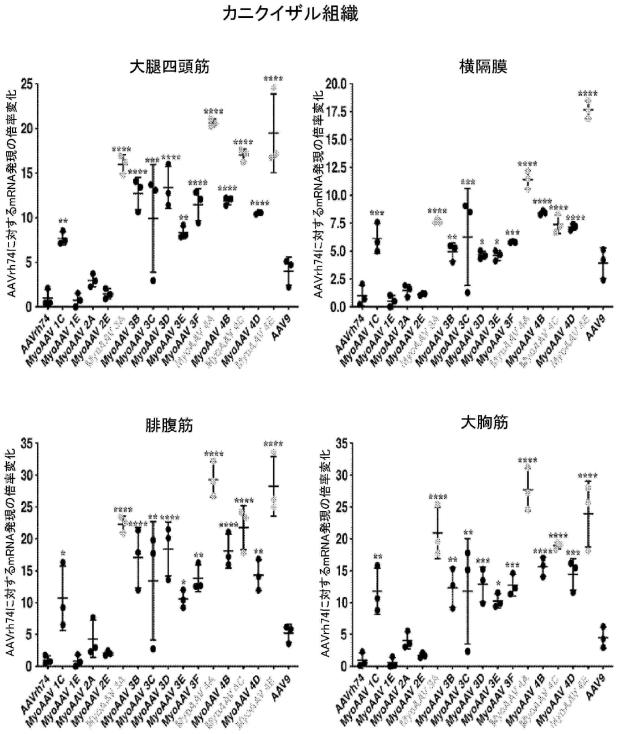



図30B

【図３０－５】

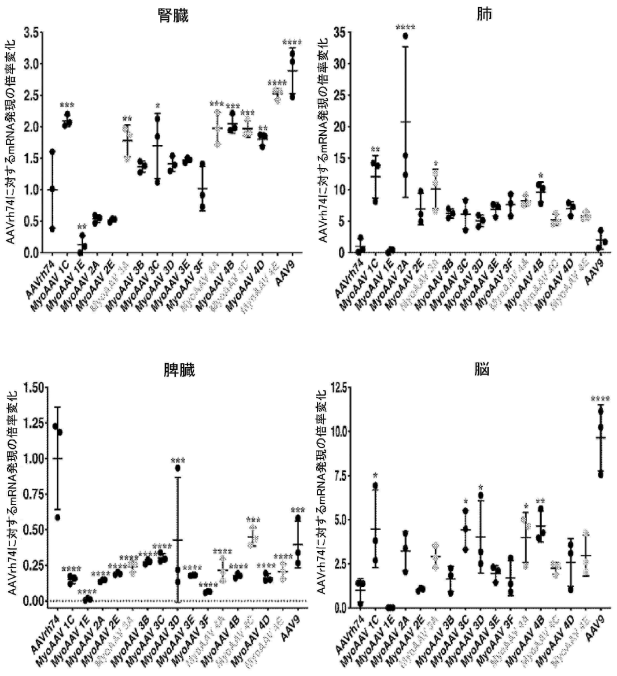



図30B（続き）

【図３０－６】

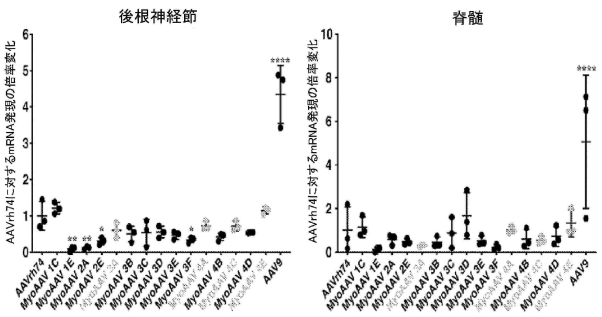



図30B（続き）

【図３０－７】

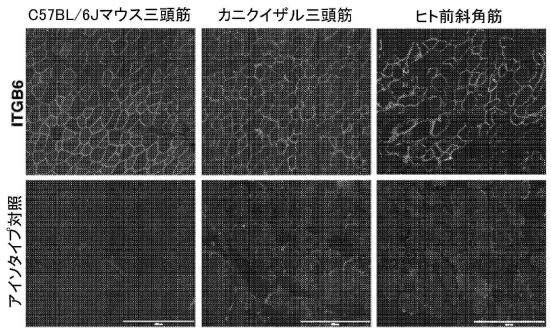



図30C

【配列表】

<u>２０２４５３００２３０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/74611

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12N 15/86 (2022.01)
ADD. A61P 21/00 (2022.01)
CPC - INV. C07K 14/005
ADD. C12N 2310/20, C12N 2750/14143
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 2021/077000 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC. et al.) 22 April 2021 (22.04.2021); para [0100], [0164]-[0165], [0173], [0238]; claim 1, 3, 6-11, 13-14, 62-63, 73; Figure 20A-C | 1, 3-8, 10-17, (29-30)(1, 3-8, 10-17), 31-33, 43 |
| A | WANG et al., Evaluation of Amphiphilic Peptide Modified Antisense Morpholino Oligonucleotides In Vitro and In Dystrophic mdx Mice. Polymers. 15 May 2017, Vol. 9, No. 5, pages 1-14; entire document | 1, 3-8, 10-17, (29-30)(1, 3-8, 10-17), 31-33, 43 |
| X, p | WO 2022/020616 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC. et al.) 27 January 2022 (27.01.2022); entire document | 1, 3-8, 10-17, (29-30)(1, 3-8, 10-17), 31-33, 43 |

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

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

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 31 October 2022 | JAN 12 2023 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer<br>Kari Rodriquez<br>Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/74611

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as fi led.

   b. ☐ furnished subsequent to the international fi ling date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/74611

**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.: 81-113
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:
—See Supplemental Box —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 3-8, 10-17, (29-30)(in part), 31-33, 43, limited to composition as described in extra sheet

**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)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/74611

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-43, directed to a protein composition. The composition will be searched to the extent that the composition encompasses wherein the targeting moiety comprises one n-mer motif, wherein the n-mer motif comprises or consists of XmRGDXn, wherein Xm and Xn are each independently selected from any amino acid, wherein n is 1, and wherein m is 1; further wherein the n-mer motif is inserted between any two contiguous amino acids between amino acids 262-269 in an AAV9 capsid polypeptide, further wherein the optional cargo is capable of treating or preventing an auto immune disease; further wherein the cargo is a morpholino (note, these are the first claimed sequence options for the inventive protein composition). The first named invention was determined based on the first claimed options for m and n values for Xm and Xn (claim 1), AAV9 capsid (claim 8), muscle disease (claim 30), and cargo (claim 31) for the inventive composition. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1, 3-8, 10-17, (29-30)(in part), 31-33, 43 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the composition encompasses wherein the targeting moiety comprises one n-mer motif, wherein the n-mer motif comprises or consists of XmRGDXn, wherein Xm and Xn are each independently selected from any amino acid, wherein n is 1, and wherein m is 1; further wherein the n-mer motif is inserted between any two contiguous amino acids between amino acids 262-269 in an AAV9 capsid polypeptide, further wherein the optional cargo is capable of treating or preventing an auto immune disease; further wherein the cargo is a morpholino. Additional composition(s) comprising additional polypeptide sequence(s), viral capsid(s), insertion site(s), capsid mutation(s), disease(s), cargo and/or combination(s) thereof will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected composition(s) comprising additional polypeptide sequence(s), viral capsid(s), insertion site(s), capsid mutation(s), disease(s), cargo and/or combination(s) thereof. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a protein composition comprising wherein the targeting moiety comprises SEQ ID NO:2; further wherein the n-mer motif is inserted between any two contiguous amino acids between amino acids 262-269 in an AAV9 capsid polypeptide, further wherein the optional cargo is capable of treating or preventing an auto immune disease; further wherein the cargo is a morpholino (claims 1-8, 10-17, (29-30)(in part), 31-33, 43).

Group II+, claims 44-80, directed to a vector system. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The vector system may be searched, for example, to encompass wherein the targeting moiety comprises one n-mer motif, wherein the n-mer motif comprises or consists of XmRGDXn, wherein Xm and Xn are each independently selected from any amino acid, wherein n is 1, and wherein m is 1; further wherein the n-mer motif is inserted between any two contiguous amino acids between amino acids 262-269 in an AAV9 capsid polypeptide, for an additional fee and election as such. It is believed that claims 44-57, 59-61, 73-77, (78-80)(in part) read on this exemplary invention. Additional vector system(s) comprising additional sequence(s), viral capsid(s), insertion site(s), capsid mutation(s), and/or combination(s) thereof will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected vector system(s) comprising additional sequence(s), viral capsid(s), insertion site(s), capsid mutation(s), and/or combination(s) thereof . Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the"+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a vector system wherein the targeting moiety comprises SEQ ID NO:2; further wherein the n-mer motif is inserted between any two contiguous amino acids between amino acids 262-269 in an AAV9 capsid polypeptide (claims 44-57, 59-61, 73-77, (78-80)(in part)).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Groups I+ and II+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence. Each amino acid sequence comprises a unique peptide, and is considered a distinct technical feature.
Additionally,
Group I+ has the special technical feature of an a protein composition comprising a targeting moiety effective to target a muscle cell, that is not required by Group II+.
Group II+ has the special technical feature of a vector system comprising one or more polynucleotides, that is not required by Group I+.

Common technical features

Groups I+ and II+ share the technical features of including:
a targeting moiety effective to target a muscle cell, wherein the targeting moiety comprises one or more n-mer motif, wherein at least one n-mer motif of the one or more n-mer motifs comprises or consists of XmRGDXn, wherein Xm and Xn are each independently selected from any amino acid, wherein n is 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 9, and wherein m is 1-4.
However, these shared technical features are previously disclosed by prior art, as discussed below.

Group I+ inventions additionally share the technical features of including:
a composition comprising:
a targeting moiety effective to target a muscle cell, wherein the targeting moiety comprises one or more n-mer motif, wherein at least one n-mer motif of the one or more n-mer motifs comprises or consists of XmRGDXn, wherein Xm and Xn are each independently selected from any amino acid, wherein n is 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 9, and wherein m is 1-4; and optionally a cargo, wherein the cargo is coupled to or is otherwise associated with the targeting moiety.

—See next Supplemental Box —

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/74611

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group II+ inventions additionally share the technical features of including:
a vector system comprising:
a vector comprising:
one or more polynucleotides each encoding all or part of one or more targeting moieties effective to target a muscle cell, wherein each targeting moiety comprises one or more n-mer motifs, wherein at least one n-mer motif of the one or more n-mer motifs comprises or consists of XmRGDXn, wherein X. and Xn are each independently selected from any amino acid, wherein n is 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 9, and wherein m is 1-4, and wherein at least one of the one or more polynucleotides at least encodes the at least one n-mer motif and optionally, a regulatory element operatively coupled to one or more of the polynucleotide(s).

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2021/077000 A1 to The Broad Institute, Inc. et al. (hereinafter "Broad").

Broad discloses a composition (claim 1 - "A composition") comprising:
a targeting moiety effective to target a muscle cell (claim 1 - "a targeting moiety effective to target a muscle cell"), wherein the targeting moiety comprises one or more n-mer motif (claim 1 - "wherein the targeting moiety comprises an n-mer motif"), wherein at least one n-mer motif of the one or more n-mer motifs comprises or consists of XmRGDXn (claim 3 - "wherein the RGD motif has a formula of XmRGDXn"), wherein Xm and Xn are each independently selected from any amino acid (claim 3 - "wherein each X amino acid present is independently selected from the others from the group consisting of: any amino acid"), wherein n is 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 9, and wherein m is 1-4 (claim 3 - "wherein m is 0-4 amino acids, wherein n is 0-15 amino acids"); and optionally a cargo (claim 1 - "and a cargo"), wherein the cargo is coupled to or is otherwise associated with the targeting moiety (claim 1 - "wherein the cargo is coupled to or is otherwise associated with the targeting moiety").

Broad also discloses a vector system comprising:
a vector comprising:
one or more polynucleotides each encoding all or part of one or more targeting moieties effective to target a muscle cell (Abstract - 'Also described herein are vector systems, particles, polypeptides that can encode and/or contain one or more targeting moieties'; Claim 32 - 'A vector system comprising: a vector comprising: one or more polynucleotides each encoding all or part of one or more targeting moieties effective to target a muscle cell, wherein each targeting moiety comprises one or more n-mer motifs, wherein each n-mer motif an RGD motif or a non-RGD n-mer motif, and wherein each polynucleotide at least encodes one or more of the one or more n-mer motifs; and optionally, a regulatory element operatively coupled to one or more of the one or more polynucleotides.').

Broad further discloses wherein the n-mer motif is inserted between any two contiguous amino acids of an AAV viral particle that is an engineered AAV9 viral particle (Claim 11 - 'The composition of claim 10, wherein the n-mer motif is inserted between any two contiguous amino acids between amino acids 262-269, 327-332, 382-386, 452-460, 488-505, 527-539, 545-558, 581-593, 704-714, or any combination thereof in an AAV9 capsid polypeptide or in an analogous position in an AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, or AAV rh.IO capsid polypeptide.'; para [0100] - "a schematic demonstrating embodiments of generating an AAV capsid variant library, particularly insertion of a random n- mer (n=3-15 amino acids) into a wild-type AAV, e.g. AAV9").

Broad further discloses wherein the composition is used to treat a muscle disease wherein the muscle disease or disorder is a. an auto immune disease (Claim 16 - 'The composition of claim 1, wherein the cargo is capable of treating or preventing a muscle disease or disorder.'; para [0164] - " the muscle disease or disorder is (a) an auto immune disease").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ and II+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4 above: claims 81-113 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Note, Claims 36, 37, 39, 40 and 42 drafted as dependent of claim 29 are objected to for improper antecedent because claim 29 does not recite an expanded repeat disease, muscular dystrophy, cardiomyopathy, sugar or glycogen storage disease, or neuro-muscular disease, respectively. For this application, claims 36, 37, 39, 40 and 42 are reconstrued as dependent on claim 30 which does recite an expanded repeat disease, muscular dystrophy, cardiomyopathy, sugar or glycogen storage disease, or neuro-muscular disease.

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *C07K 14/01 (2006.01)* | | C07K | 14/01 | |
| *C12N 15/113 (2010.01)* | | C12N | 15/113 Z | |
| *C12N 15/864 (2006.01)* | | C12N | 15/864 100Z | |
| *C12N 15/34 (2006.01)* | | C12N | 15/34 | |
| *C12N 1/21 (2006.01)* | | C12N | 1/21 | |
| *C12N 5/10 (2006.01)* | | C12N | 5/10 | |
| *C12N 1/15 (2006.01)* | | C12N | 1/15 | |
| *A61P 21/00 (2006.01)* | | A61P | 21/00 | |
| *A61P 37/02 (2006.01)* | | A61P | 37/02 | |
| *A61P 35/00 (2006.01)* | | A61P | 35/00 | |
| *A61P 9/00 (2006.01)* | | A61P | 9/00 | |
| *A61P 31/12 (2006.01)* | | A61P | 31/12 | |
| *A61P 43/00 (2006.01)* | | A61P | 43/00 | |
| *A61P 25/14 (2006.01)* | | A61P | 25/14 | |
| *A61K 48/00 (2006.01)* | | A61K | 48/00 | |
| *A61P 3/00 (2006.01)* | | A61P | 3/00 | |
| *A61K 35/76 (2015.01)* | | A61K | 35/76 | |
| *A61K 38/17 (2006.01)* | | A61K | 38/17 | |

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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

２．ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７

(74)代理人 110000109

弁理士法人特許事務所サイクス

(72)発明者 サベッティ パルディス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３８ ケンブリッジ クインシー ストリート １７

(72)発明者 タブボードバー ムハンマドシャリフ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２ ケンブリッジ メイン ストリート ４１５

(72)発明者 イー サイモン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９ ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー ７７

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C084 AA13 BA44 DC50 NA13 NA14 ZA011 ZA221 ZA361 ZA941 ZB071 ZB261 ZB331 ZC211 ZC521

4C087 BC83 CA12 NA13 NA14 ZA94 ZB07 ZB26 ZB33 ZC21 ZC52

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 CA01 EA20 FA74