

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-520764

(P2023-520764A)

(43)公表日 令和5年5月19日(2023.5.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 B 0 6 5
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 7
C 0 7 K	14/745 (2006.01)	C 0 7 K	14/745		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全166頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-557749(P2022-557749)			(71)出願人	520068043
(86)(22)出願日	令和3年3月24日(2021.3.24)				ジェネレーション バイオ カンパニー
(85)翻訳文提出日	令和4年11月11日(2022.11.11)				アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(86)国際出願番号	PCT/US2021/023891				2 1 4 2 ケンブリッジ ビネイ ストリ
(87)国際公開番号	WO2021/195214				ート 3 0 1 スイート 4 0 1
(87)国際公開日	令和3年9月30日(2021.9.30)			(74)代理人	100078282
(31)優先権主張番号	62/993,857				弁理士 山本 秀策
(32)優先日	令和2年3月24日(2020.3.24)			(74)代理人	100113413
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 森下 夏樹
(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,A T,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			(74)代理人	100181674
					弁理士 飯田 貴敏
				(74)代理人	100181641
					弁理士 石川 大輔
				(74)代理人	230113332
					弁護士 山本 健策
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 第 I X 因子治療薬を発現するための非ウイルス性 DNA ベクター及びその使用

(57)【要約】

本出願は、導入遺伝子の送達及び発現のための直鎖状かつ連続的な構造を有する c e DNA ベクターについて説明する。c e DNA ベクターは、2つの I T R 配列が隣接する発現カセットを含み、発現カセットは、F I X タンパク質をコードする導入遺伝子をコードする。一部の c e DNA ベクターは、調節スイッチを含むシス調節エレメントを更に含む。c e DNA ベクターを使用した、インビトロ、エクスピボ、及びインビボでの F I X タンパク質の信頼できる遺伝子発現のための方法及び細胞株が本明細書に更に提供される。細胞、組織、又は対象における F I X タンパク質の発現に有用な c e DNA ベクターを含む方法及び組成物、並びに F I X タンパク質を発現する当該 c e DNA ベクターによる疾患の治療方法が本明細書に提供される。このような F I X タンパク質は、疾患、例えば、血友病 B を治療するために発現され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カプシド不含閉端 DNA (c e DNA) ベクターであって、

隣接する逆方向末端反復配列 (ITR) 間に少なくとも 1 つの核酸配列を含み、前記少なくとも 1 つの核酸配列が、少なくとも 1 つの FIX タンパク質をコードする、c e DNA ベクター。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの FIX タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸配列が、表 1 に示される配列のうちのいずれか、又は表 1 2 に列挙される任意の c e DNA 配列に含まれる任意のオープンリーディングフレーム (ORF) 配列から選択される、請求項 1 に記載の c e DNA ベクター。

10

【請求項 3】

前記 c e DNA ベクターが、前記少なくとも 1 つの FIX タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸配列に作動可能に連結された、表 7 のプロモーター配列のうちのいずれかから選択されるプロモーター配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 4】

前記 c e DNA ベクターが、表 8 のエンハンサー配列のうちのいずれかから選択されるエンハンサー配列を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 5】

前記 c e DNA ベクターが、表 9 A の 5' UTR 及び／又はイントロン配列のうちのいずれかから選択される 5' UTR 及び／又はイントロン配列を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

20

【請求項 6】

前記 c e DNA ベクターが、表 9 B の 3' UTR 配列のうちのいずれかから選択される 3' UTR 配列を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 7】

前記 c e DNA ベクターが、表 1 0 のポリ A 配列のうちのいずれかから選択される少なくとも 1 つのポリ A 配列を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

30

【請求項 8】

前記 c e DNA ベクターが、少なくとも 1 つの核酸配列に作動可能に連結された少なくとも 1 つのプロモーター配列を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの核酸配列が、c DNA である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 1 0】

少なくとも 1 つの ITR が、機能的末端分解部位及び Rep 結合部位を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

40

【請求項 1 1】

前記 ITR の一方又は両方が、パルボウイルス、ディペンドウイルス、及びアデノ随伴ウイルス (AAV) から選択されるウイルスに由来する、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 1 2】

前記隣接する ITR が、互いに対して対称又は非対称である、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 1 3】

前記隣接する ITR が、対称又は実質的に対称である、請求項 1 2 に記載の c e DNA ベクター。

50

【請求項 14】

前記隣接する I T R が、非対称である、請求項 12 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 15】

前記 I T R の一方若しくは両方が野生型であるか、又は前記 I T R の両方が野生型 I T R である、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 16】

前記隣接する I T R が、異なるウイルス血清型に由来する、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 17】

前記隣接する I T R が、表 2 に示されるウイルス血清型のいずれかの対から選択される、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。 10

【請求項 18】

前記 I T R の一方又は両方が、表 3 の配列のうちの 1 つ以上から選択される配列を含む、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 19】

前記 I T R の少なくとも一方が、野生型 A A V I T R 配列から、前記 I T R の全体的な三次元立体構造に影響を与える欠失、付加、又は置換によって変更されている、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 20】

前記 I T R の一方又は両方が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、及び A A V 12 から選択される A A V 血清型に由来する、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。 20

【請求項 21】

前記 I T R の一方又は両方が、合成である、請求項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 22】

前記 I T R の一方若しくは両方が野生型 I T R でないか、又は前記 I T R の両方が野生型 I T R でない、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 23】

前記 I T R の一方又は両方が、A、A'、B、B'、C、C'、D、及び D' から選択される I T R 領域のうちの少なくとも 1 つにおける欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている、請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。 30

【請求項 24】

前記欠失、挿入、及び／又は置換が、通常は前記 A、A'、B、B'、C、又は C' 領域によって形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす、請求項 23 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 25】

前記 I T R の一方又は両方が、通常は前記 B 及び B' 領域によって形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている、請求項 1 ～ 24 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。 40

【請求項 26】

前記 I T R の一方又は両方が、通常は前記 C 及び C' 領域によって形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている、請求項 1 ～ 24 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 27】

前記 I T R の一方又は両方が、通常は前記 B 及び B' 領域によって形成されるステムループ構造の一部、並びに／又は通常は前記 C 及び C' 領域によって形成されるステムループ構造の一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている、請求項 1 ～ 24 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。 50

【請求項 28】

前記 I T R の一方又は両方が、通常は前記 B 及び B' 領域によって形成される第 1 のステムループ構造と、前記 C 及び C' 領域によって形成される第 2 のステムループ構造とを含む領域に、単一のステムループ構造を含む、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 29】

前記 I T R の一方又は両方が、通常は前記 B 及び B' 領域によって形成される第 1 のステムループ構造と、前記 C 及び C' 領域によって形成される第 2 のステムループ構造とを含む領域に、単一のステム及び 2 つのループを含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

10

【請求項 30】

前記 I T R の一方又は両方が、通常は前記 B 及び B' 領域によって形成される第 1 のステムループ構造と、前記 C 及び C' 領域によって形成される第 2 のステムループ構造とを含む領域に、単一のステム及び単一のループを含む、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 31】

両方の I T R が、前記 I T R が互いに対して反転されたときに全体的な三次元対称性をもたらすような様式で変更されている、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 32】

前記 I T R の一方又は両方が、表 3、5 A、5 B、及び 6 に示される配列から選択される核酸配列を含む、請求項 1～31 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

20

【請求項 33】

少なくとも 1 つの核酸配列が、少なくとも 1 つの調節スイッチの制御下にある、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 34】

前記少なくとも 1 つの調節スイッチが、バイナリ調節スイッチ、小分子調節スイッチ、パスコード調節スイッチ、核酸ベース調節スイッチ、転写後調節スイッチ、放射線制御又は超音波制御の調節スイッチ、低酸素媒介調節スイッチ、炎症反応調節スイッチ、剪断活性化調節スイッチ、及びキルスイッチからなる群から選択される、請求項 33 に記載の c e D N A ベクター。

30

【請求項 35】

表 12 から選択される核酸配列を含む、カプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクター。

【請求項 36】

配列番号 404、配列番号 405 又は配列番号 406 と少なくとも 85 % 同一である核酸配列を含む、カプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクター。

【請求項 37】

配列番号 404、配列番号 405 及び配列番号 406 からなる群から選択される核酸配列からなる、カプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクター。

40

【請求項 38】

細胞における F I X タンパク質を発現する方法であって、前記細胞を請求項 1～37 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクターと接触させることを含む、方法。

【請求項 39】

前記細胞が、肝細胞である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記細胞が、インビトロ又はインビボにある、請求項 38 又は 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記少なくとも 1 つの核酸配列が、真核細胞における発現のためにコドン最適化される、請求項 38～40 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 4 2】

前記コドン最適化された少なくとも1つの核酸配列が、表1に示される配列のうちのいずれか1つ、又は表12に列挙される任意のc e D N A配列に含まれる任意のオープンリーディングフレーム（O R F）配列から選択される、請求項38～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

血友病Bを有する対象を治療する方法であって、請求項1～37のいずれか一項に記載のc e D N Aベクターを前記対象に投与することを含み、少なくとも1つの核酸配列が、少なくとも1つのF I Xタンパク質をコードする、方法。

【請求項 4 4】

前記少なくとも1つのF I Xタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、表1に示される配列のうちのいずれか1つから選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記c e D N Aベクターが、肝細胞に投与される、請求項43又は44に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記c e D N Aベクターが、肝細胞において前記F I Xタンパク質を発現する、請求項44又は45に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記c e D N Aベクターが、静脈内又は筋肉内注射により投与される、請求項44～46のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記対象に免疫調節剤を投与することを更に含む、請求項44～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記免疫調節剤が、免疫抑制剤である、請求項48に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記免疫抑制剤が、チロシンキナーゼ阻害剤（T K I）である、請求項49に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記T K Iが、約0.5mg/kg～約700mg/kgの用量で前記対象に投与される、請求項50に記載の方法。

【請求項 5 2】

請求項1～37のいずれか一項に記載のc e D N Aベクターを含む、医薬組成物。

【請求項 5 3】

追加の化合物を更に含む、請求項52に記載の医薬組成物。

【請求項 5 4】

前記追加の化合物が、免疫調節剤である、請求項52に記載の医薬組成物。

【請求項 5 5】

前記免疫調節剤が、免疫抑制剤である、請求項54に記載の医薬組成物。

【請求項 5 6】

前記免疫抑制剤が、チロシンキナーゼ阻害剤（T K I）である、請求項55に記載の医薬組成物。

【請求項 5 7】

前記組成物が、賦形剤又は担体を更に含む、請求項56に記載の医薬組成物。

【請求項 5 8】

請求項1～37のいずれか一項に記載のc e D N Aベクターを含有する、細胞。

【請求項 5 9】

前記細胞が、肝細胞である、請求項58に記載の細胞。

【請求項 6 0】

請求項1～37のいずれか一項に記載のc e D N Aベクター及び脂質を含む、組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 6 1】

前記脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）である、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 6 2】

請求項 1 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター、請求項 5 2 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 5 8 に記載の細胞を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2020年3月24日に出願された米国仮出願第 6 2 / 9 9 3 , 8 5 7 号に対する優先権の利益を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出されており、その全体の参照により本明細書に組み込まれる、配列表を含む。2021年3月22日に作成された当該 A S C I I コピーは、1 3 1 6 9 8 - 0 6 5 2 0 _ S L . t x t という名前が付けられ、サイズが 3 9 4 , 6 9 4 バイトである。

【0 0 0 3】

本開示は、対象又は細胞において導入遺伝子又は単離されたポリヌクレオチドを発現させるための非ウイルス性ベクターの産生を含む、遺伝子療法の分野に関する。本開示はまた、ポリヌクレオチドを含む核酸構築物、プロモーター、ベクター、及び宿主細胞、並びに外因性 D N A 配列を標的細胞、組織、器官、又は生物に送達する方法に関する。例えば、本開示は、非ウイルス性 c e D N A ベクターを使用して、細胞から F I X を発現するための方法、例えば、血友病 B を有する対象の治療のための F I X 治療用タンパク質を発現する方法を提供する。方法及び組成物は、例えば、治療を必要とする対象の細胞又は組織において F I X タンパク質を発現することによって疾患を治療する目的で使用する事ができる。

20

【背景技術】

【0 0 0 4】

遺伝子療法は、遺伝子発現プロファイルにおける異常によって引き起こされる遺伝子変異又は後天性疾患のいずれかを罹患している患者についての臨床転帰を向上することを目的とする。遺伝子療法は、障害、疾患、悪性腫瘍などをもたらす得る欠陥遺伝子又は異常な遺伝子調節若しくは発現、例えば、過小発現若しくは過剰発現に起因する医学的状態の治療又は予防を含む。例えば、欠陥遺伝子によって引き起こされる疾患又は障害は、修復遺伝物質の患者への送達によって治療、予防、若しくは改善され得るか、又は患者の中で遺伝物質の治療的発現をもたらす、例えば、患者に対する修復遺伝物質を用いて欠陥遺伝子を変更若しくはサイレンシングすることによって治療、予防、若しくは改善され得る。

30

【0 0 0 5】

遺伝子療法の基礎は、転写カセットに活性遺伝子産物（導入遺伝子と称される場合がある）を供給することであり、例えば、正の機能獲得効果、負の機能喪失効果、又は別の結果をもたらす得る。そのような結果は、活性化抗体若しくは融合タンパク質又は阻害性（中和）抗体若しくは融合タンパク質の発現に起因し得る。遺伝子療法を使用して、他の因子によって引き起こされる疾患又は悪性腫瘍を治療することもできる。単一遺伝子における変異により引き起こされる障害であるヒト単一遺伝障害は、標的細胞への正常遺伝子の送達及び発現によって治療され得る。患者の標的細胞中の修復遺伝子の送達及び発現は、操作されたウイルス及びウイルス遺伝子送達ベクターの使用を含む、多くの方法を介して実行され得る。利用可能な多くのウイルス由来ベクター（例えば、組換えレトロウイルス、組換えレンチウイルス、組換えアデノウイルスなど）の中で、組換えアデノ随伴ウイルス（r A A V）は、遺伝子療法において多用途ベクターとして人気を集めている。

40

【0 0 0 6】

50

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科に属し、より具体的にはディペンドパルボウイルス属を構成する。AAV由来のベクター (すなわち、rAAV又はAAVベクター) は、(i) それらが筋細胞及びニューロンを含む多種多様な非分裂及び分裂細胞型に感染する (形質導入する) ことができるため、(ii) それらがウイルス構造遺伝子を欠いていることによって、ウイルス感染に対する宿主細胞応答、例えば、インターフェロン媒介性応答を減少させるため、(iii) 野生型ウイルスが、ヒトにおいて非病理的であるとみなされるため、(iv) 宿主細胞ゲノム中に組み込むことができる野生型AAVと対照的に、複製欠損AAVベクターは、複製 (rep) 遺伝子を欠き、一般にエピソードとして持続し、したがって挿入変異又は遺伝毒性の危険性を限定するため、並びに(v) 他のベクター系と比較して、AAVベクターは、一般に比較的不良な免疫原である

とみなされ、したがって著しい免疫応答を誘起せず (iiを参照されたい)、したがって治療導入遺伝子のベクターDNA及び潜在的に長期発現の持続を得るため、遺伝物質を送達するために魅力的である。

10

20

30

40

50

【0007】

しかしながら、AAV粒子を遺伝子送達ベクターとして使用することには、いくつかの重大な欠陥が存在する。rAAVに関連する1つの重大な欠点は、約4.5 kbの異種DNAのその限定されたウイルスパッケージング能力であり (Dong et al., 1996, Athanasopoulos et al., 2004, Lai et al., 2010)、結果として、AAVベクターの使用は、150,000 Da未満のタンパク質コーディング能力に制限されている。第2の欠点は、集団における野生型AAV感染の流行の結果として、rAAV遺伝子療法候補が、患者からベクターを排除する中和抗体の存在についてスクリーニングされる必要があることである。第3の欠点は、初回治療から除外されなかった患者への再投与を防ぐカプシド免疫原性に関する。患者における免疫系は、「ブースター」ショットとして有効に作用するベクターに応答して、将来の治療を妨げる高力価抗AAV抗体を生成する免疫系を刺激し得る。いくつかの最近の報告は、高用量状況における免疫原性との関係を示している。一本鎖AAV DNAが異種遺伝子発現前に二本鎖DNAに変換されなければならないことを考えると、別の顕著な欠点は、AAV媒介性遺伝子発現の始まりが比較的遅いことである。

【0008】

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

【0009】

したがって、遺伝子療法のためのアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの使用は、(患者免疫反応に起因する) 患者への単回投与、最小ウイルスパッケージング能力 (約4.5 kb) に起因するAAVベクター中の送達に好適な導入遺伝子遺伝物質の制限された範囲、及び遅いAAV媒介性遺伝子発現に起因して制限される。

【0010】

血友病Bには、疾患修飾療法に対する満たされていない大きなニーズがある。現在の療法は負担があり、頻繁な静脈内 (IV) 投与を必要とする。第一に、これらの第IX因子注射剤は、出血エピソードを可能にするトラフレベルで、因子の継続的送達を提供しない。第二に、血友病Bの承認された遺伝子治療はなく、AAVベースの治療は既存の抗体のために患者の25%~40%が使用することはできない。AAVは1回しか投与することができず、結果として得られる第IX因子レベルは、有効であるのに十分な高さではないか、又は異常であり得、用量レベルは滴定することはできない。第三に、一部の血友病B患者は、これらの外因性の人工凝固因子に対する中和抗体の開発のために、これらの治療法を利用することができない。

【0011】

したがって、血友病 B の治療のために、細胞、組織、又は対象において治療用 F I X タンパク質の発現を可能にする技術がこの分野で必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

簡単な説明

本明細書に記載される技術は、共有結合性閉端を有するカプシド不含（例えば、非ウイルス性）DNAベクター（本明細書では、「閉端DNAベクター」又は「ceDNAベクター」と称される）からの、第IX因子（FIX）タンパク質の発現による血友病 B の治療のための方法及び組成物に関し、ceDNAベクターは、FIX核酸配列又はそのコード最適化バージョンを含む。これらのceDNAベクターを使用して、治療、モニタリング、及び診断用のFIXタンパク質を産生することができる。血友病 B の治療のための対象へのFIXを発現するceDNAベクターの適用は、(i) FIX酵素の疾患修飾レベルを提供する、送達において低侵襲性である、再現性があり、効果を発揮するために投与される、治療効果の急速な発生を有する、肝臓における修正FIX酵素の持続的発現をもたらす、凝固カスケードを回復する、かつ／又は欠陥酵素の適切な薬理学的レベルを達成するための滴定可能であるのに有用である。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、FIXを発現するceDNAベクターは、血友病 B の治療のためのリボソームナノ粒子製剤（LNP）中に任意選択的に存在する。本明細書に記載されるceDNA LNP製剤は、FIXタンパク質の疾患修飾レベルを提供することと、送達において低侵襲性であること、再現性があり、効果を発揮するために投与されること、典型的には治療介入の日数内の治療効果の急速な発生を有すること、循環における修正FIXレベルの持続的発現を有すること、欠陥凝固因子の適切な薬理学的レベルを達成するための滴定可能であること、及び／又はこれらに限定されないが、第VIII因子欠乏症を含むが他の種類の血友病の治療を提供することを含む、1つ以上の利益を提供することができる。

20

【0014】

したがって、本開示は、細胞内でのFIX治療用タンパク質の発現を可能にするための、FIXをコードする遺伝子を含む共有結合性閉端を有するカプシド不含（例えば、非ウイルス性）DNAベクター（本明細書では「閉端DNAベクター」又は「ceDNAベクター」と称される）に関する。一実施形態では、FIXをコードする遺伝子は、異種遺伝子である。

30

【0015】

本明細書に記載されるFIXタンパク質産生の発現のためのceDNAベクターは、共有結合性閉端（直鎖状、連続、及び非カプシド化構造）を有する相補的DNAの連続鎖から形成されるカプシド不含直鎖状二重鎖DNA分子であり、5'逆位末端反復（ITR）配列及び3'ITR配列を含み、5'ITR及び3'ITRは、互いに対して同じ対称の三次元構成（すなわち、対称若しくは実質的に対称）を有し得るか、又は代替的に5'ITR及び3'ITRは、互いに対して異なる三次元構成（すなわち、非対称ITR）を有し得る。更に、ITRは、同じ又は異なる血清型に由来し得る。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、それらの構造が幾何学的空間で同じ形状であるか、又は三次元空間で同じA、C-C'及びB-B'ループを有するように、対称の三次元空間構成を有するITR配列を含み得る（すなわち、それらは同じであるか、又は互いに対して鏡像である）。いくつかの実施形態では、一方のITRは、1つのAAV血清型に由来し得、他方のITRは、異なるAAV血清型に由来し得る。

40

【0016】

したがって、本明細書に記載される技術のいくつかの態様は、表1に開示されるFIX核酸配列又は表12に開示される任意のceDNA配列に含まれる任意のオープンリーディングフレーム配列を含む核酸配列に隣接するITR配列を含む上記のFIXタンパク質

50

の改善されたタンパク質発現及び／又は産生のための c e D N A ベクターに関し、I T R 配列は、(i) 少なくとも 1 つの W T I T R 及び少なくとも 1 つの修飾型 A A V 逆位末端反復 (I T R) (例えば、非対称の修飾型 I T R)、(i i) m o d - I T R 対が互いに対して異なる三次元空間構成を有する、2 つの修飾型 I T R (例えば、非対称の修飾型 I T R)、又は (i i i) 各 W T - I T R が同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称の W T - W T I T R 対、又は (i v) 各 m o d - I T R が同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称の修飾型 I T R 対のうちのいずれかから選択される。本明細書に開示される c e D N A ベクターは、真核細胞中で産生され得、したがって昆虫細胞中の原核 D N A 修飾及び細菌内毒素汚染を欠き得る。

【 0 0 1 7 】

本明細書に記載される方法及び組成物は、一部には、少なくとも 1 つの F I X タンパク質、又は 2 つ以上の F I X タンパク質を、これに限定されないが肝臓の細胞を含む細胞から発現するために使用することができる共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含 D N A ベクター (c e D N A ベクター) の発見に関連する。

【 0 0 1 8 】

一態様では、少なくとも 1 つの核酸配列を含む D N A ベクター (例えば、c e D N A ベクター) が本明細書に提供され、核酸配列は、2 つの異なる A A V 逆位末端反復配列 (I T R) の間に位置付けられたプロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子をコードし、I T R の一方は、機能的 A A V 末端分解部位及び R e p 結合部位を含み、I T R の一方は、他方の I T R に対して欠失、挿入、又は置換を含み、導入遺伝子は、F I X タンパク質をコードし、D N A は、D N A ベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化されたとき、非変性ゲル上で分析されたときの直鎖状かつ非連続的な D N A 対照と比較して、直鎖状の連続的な D N A の特徴的なバンドの存在を有する。他の態様は、本明細書に記載の c e D N A ベクターからインビボでそれを発現することによる F I X タンパク質の送達、及び更に、F I X タンパク質をコードする c e D N A ベクターを使用する血友病 B の治療を含む。本明細書に記載される F I X タンパク質をコードする c e D N A ベクターを含む細胞も本明細書に企図される。

【 0 0 1 9 】

本開示の態様は、本明細書に記載される細胞における F I X タンパク質の産生に有用な c e D N A ベクターを産生する方法に関する。他の実施形態では、本明細書に提供される方法によって産生される c e D N A ベクターに関する。一実施形態では、F I X タンパク質の産生のためのカプシド不含 (例えば、非ウイルス性) D N A ベクター (c e D N A ベクター) は、最初の 5 ' 逆位末端反復 (例えば、A A V I T R)、核酸配列、及び 3 ' I T R (例えば、A A V I T R) をこの順序で含むポリヌクレオチド発現構築物テンプレートを含むプラスミド (本明細書では「c e D N A - プラスミド」と称される) から得られ、5 ' I T R 及び 3 ' I T R は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称又は対称 (例えば、W T - I T R 又は修飾型対称 I T R) であり得る。

【 0 0 2 0 】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、本開示を読むことにより、熟練者に既知であろういくつかの手段によって取得可能である。例えば、本開示の c e D N A ベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド発現構築物テンプレートは、c e D N A - プラスミド、c e D N A - バクミド、及び／又は c e D N A - バキュロウイルスであり得る。一実施形態では、c e D N A - プラスミドは、I T R の間に作動可能に位置付けられた制限クロニング部位 (例えば、配列番号 1 2 3 及び／又は 1 2 4) を含み、例えば、導入遺伝子、例えば F I X をコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットを挿入することができる。いくつかの実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、対称又は非対称 I T R (修飾型又は W T I T R) を含有するポリヌクレオチドテンプレート (例えば、c e D N A - プラスミド、c e D N A - バクミド、c e D N A - バキュロウイルス) から産生される。

10

20

30

40

50

【0021】

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

10

【0022】

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

20

30

【0023】

宿主細胞から単離されたFIXタンパク質の発現に有用なceDNAベクターの存在は、宿主細胞から単離されたDNAを、ceDNAベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、及び消化されたDNA材料を変性ゲル及び非変性ゲル上で分析して、直鎖状かつ非連続的なDNAと比較して特徴的な直鎖状で連続的なDNAのバンドの存在を確認することによって確認され得る。

【0024】

また本明細書では、ceDNAベクターを使用して、細胞又は対象において治療用途を有するFIXタンパク質を発現する方法も提供される。そのようなFIXタンパク質は、血友病Bの治療に使用することができる。したがって、治療用FIXタンパク質をコードするceDNAベクターを、それを必要とする対象に投与することを含む、血友病Bの治療のための方法が本明細書に提供される。

40

【0025】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術の一態様は、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含DNAベクター（ceDNAベクター）に関し、ceDNAベクターは、これらの用語が本明細書に定義されるように、ITR配列が非対称、又は対称、又は実質的に対称であり得る2つのITRの間に作動可能に位置付けられた少なくとも1つの核酸配列を含み、ITRのうちの少なくとも1つは、機能的末端分解部位（trs）及びRep結合部位を含み、任意選択的に核酸配列は、導入遺伝子（例えば、FIXタンパク質）をコードし、ベクターは、ウイルスカプシド中に存在しない。

50

【0026】

本開示のこれらの及び他の態様は、下記で更に詳述される。

【0027】

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

【図面の簡単な説明】

【0028】

10

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

【図1B】CAGプロモーター、WPRE、及びBGHpAを含有する発現カセットを有する非対称ITRを含む、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。FIX導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWPREとの間のクローニング部位に挿入され得る。発現カセットは、2つの逆位末端反復(ITR)－発現カセットの上流(5'端)の修飾型ITR及び下流(3'端)の野生型ITRに隣接している。

20

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

30

【図1D】CAGプロモーター、WPRE、及びBGHpAを含有する発現カセットを有する、本明細書で定義される対称な修飾型ITR又は実質的に対称な修飾型ITRを含む、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。FIX導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWPREとの間のクローニング部位に挿入される。発現カセットは、5'修飾型ITR及び3'修飾型ITRが対称又は実質的に対称である、2つの修飾型逆位末端反復(ITR)に隣接している。

40

【図1E】エンハンサー／プロモーター、導入遺伝子、転写後エレメント(WPRE)、及びポリAシグナルを含有する発現カセットを有する、本明細書で定義される対称な修飾型ITR又は実質的に対称な修飾型ITRを含む、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWPREとの間のクローニング部位への導入遺伝子(例えば、FIX)の挿入を可能にする。発現カセットは、5'修飾型ITR及び3'修飾型ITRが対称又は実質的に対称である、2つの修飾型逆位末端反復(ITR)に隣接している。

【図1F】CAGプロモーター、WPRE、及びBGHpAを含有する発現カセットを有する、本明細書で定義される対称なWT-ITR又は実質的に対称なWT-ITRを含む

50

、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの例示的な構造を示す。導入遺伝子（例えば、F I X）をコードするオープンリーディングフレーム（O R F）は、C A G プロモーターと W P R E との間のクローニング部位に挿入される。発現カセットは、5' W T - I T R 及び 3' W T I T R が対称又は実質的に対称である、2つの野生型逆位末端反復（W T - I T R）に隣接している。

【図 1 G】エンハンサー／プロモーター、導入遺伝子（例えば、F I X）、転写後エレメント（W P R E）、及びポリ A シグナルを含有する発現カセットを有する、本明細書で定義される対称な修飾型 I T R 又は実質的に対称の修飾型 I T R を含む、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム（O R F）は、C A G プロモーターと W P R E との間のクローニング部位への導入遺伝子（例えば、F I X）の挿入を可能にする。発現カセットは、5' W T - I T R 及び 3' W T I T R が対称又は実質的に対称である、2つの野生型逆位末端反復（W T - I T R）に隣接している。

10

【図 2 A】A - A' アーム、B - B' アーム、C - C' アーム、2つの R e p 結合部位（R B E 及び R B E'）の特定を有する A A V 2（配列番号 5 2）の野生型左 I T R の T 形ステムループ構造を提供し、末端分解部位（t r s）も示す。R B E は、R e p 7 8 又は R e p 6 8 のいずれかと相互作用すると考えられる一連の 4 つの二重四量体を含有する。加えて、R B E' はまた、構築物中の野生型 I T R 又は変異型 I T R 上で組み立てられた R e p 複合体と相互作用すると考えられる。D 及び D' 領域は、転写因子結合部位及び他の保存構造を含有する。

20

【図 2 B】A - A' アーム、B - B' アーム、C - C' アーム、2つの R e p 結合部位（R B E 及び R B E'）の特定を有する A A V 2 の野生型左 I T R の T 形ステムループ構造を含む、野生型左 I T R（配列番号 5 3）中の提案された R e p 触媒ニッキング及びライゲーション活性を示し、また末端分解部位（t r s）、並びにいくつかの転写因子結合部位を含む D 及び D' 領域、並びに他の保存構造も示す。

【図 3 A】野生型左 A A V 2 I T R（配列番号 5 4）の A - A' アーム、並びに C - C'、及び B - B' アームの R B E 含有部分の一次構造（ポリヌクレオチド配列）（左）並びに二次構造（右）を提供する。

【図 3 B】左 I T R についての例示的な変異型 I T R（修飾型 I T R とも称される）配列を示す。例示的な変異型左 I T R（I T R - 1、左）（配列番号 1 1 3）の A - A' アーム、C アーム、及び B - B' アームの R B E 部分の一次構造（左）及び予測された二次構造（右）が、示される。

30

【図 3 C】野生型右 A A V 2 I T R（配列番号 5 5）の A - A' ループ、並びに B - B'、及び C - C' アームの R B E 含有部分の一次構造（左）並びに二次構造（右）を示す。

【図 3 D】例示的な右修飾型 I T R を示す。例示的な変異体左 I T R（I T R - 1、右）（配列番号 1 1 4）の A - A' アーム、並びに B - B' 及び C アームの R B E 含有部分の一次構造（左）及び予測された二次構造（右）が、示される。左及び右の I T R（例えば、A A V 2 I T R 又は他のウイルス血清型又は合成 I T R）の任意の組み合わせを、本明細書で教示されるように使用することができる。図 3 A ~ 3 D ポリヌクレオチド配列の各々は、本明細書に記載される c e D N A を産生するために使用されるプラスミド又はバクミド／バキュロウイルスゲノム中で使用される配列を指す。プラスミド又はバクミド／バキュロウイルスゲノム中の c e D N A ベクター構成及び予測された G i b b s 自由エネルギー値から推定される対応する c e D N A 二次構造もまた、図 3 A ~ 3 D の各々に含まれる。

40

【図 4 A】図 4 B の概略図に記載されるプロセスにおける、本明細書に開示される F I X の発現のための c e D N A ベクターの産生に有用である、バキュロウイルス感染した昆虫細胞（B I I C）を作製するための上流プロセスを示す概略図である。

【図 4 B】c e D N A 産生の例示的な方法の概略図である。

【図 4 C】c e D N A ベクター産生を確認するための生化学方法及びプロセスを示す。

【図 4 D】図 4 B の c e D N A 産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取された

50

DNA中のceDNAの存在を特定するためのプロセスを説明する概略図である。図4Dは、左が未切断であるか、又は制限エンドヌクレアーゼで消化された後、未変性ゲル又は変性ゲルのいずれかで電気泳動に供される例示的なceDNAの概略的予想バンドを示す。左端の概略図は、未変性ゲルであり、その二重鎖及び未切断形態で、ceDNAが少なくとも単量体及び二量体状態で存在し、より速く移動する小さい単量体及び単量体のサイズの2倍である、より遅く移動する二量体として見えることを示唆する、多重バンドを示す。左から2番目の概略図は、ceDNAが制限エンドヌクレアーゼで切断された場合、元のバンドが消え、切断後に残存する予想断片サイズに対応する、より速く移動する（例えば、より小さな）バンドが出現することを示す。変性条件下、元の二重鎖DNAは、一本鎖であり、相補鎖が共有結合的に連結するため、未変性ゲル上で観察されるものの2倍大きな種として移動する。したがって、右から二番目の概略図において、消化されたceDNAは、未変性ゲル上で観察されるものと同様の結合分布を示すが、バンドは、未変性ゲル対応物のサイズの2倍の断片として移動する。右端の概略図は、変性条件下の未切断のceDNAが、一本鎖開環として移動し、したがって、観察されたバンドは、環が開いていない未変性条件下で観察されるもののサイズの2倍であることを示す。この図において、「kb」を使用して、文脈に応じて、ヌクレオチド鎖の長さ（例えば、変性状態で観察される単鎖分子の場合）又は塩基対の数（例えば、未変性状態で観察される二本鎖分子の場合）に基づくヌクレオチド分子の相対サイズを示す。図4Eは、非連続的な構造を有するDNAを示す。ceDNAは、ceDNAベクター上に単一認識部位を有する制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件及び変性条件の両方において、異なるサイズ（1kb及び2kb）を有する2つのDNA断片を生成することができる。図4Eはまた、直鎖状かつ連続的な構造を有するceDNAを示す。ceDNAベクターは、制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件において1kb及び2kbとして移動する2つのDNA断片を生成することができるが、変性条件では、鎖は、接続されたままであり、2kb及び4kbとして移動する一本鎖を産生する。

10

20

【図4E】図4BのceDNA産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取されたDNA中のceDNAの存在を特定するためのプロセスを説明する概略図である。図4Dは、左が未切断であるか、又は制限エンドヌクレアーゼで消化された後、未変性ゲル又は変性ゲルのいずれかで電気泳動に供される例示的なceDNAの概略的予想バンドを示す。左端の概略図は、未変性ゲルであり、その二重鎖及び未切断形態で、ceDNAが少なくとも単量体及び二量体状態で存在し、より速く移動する小さい単量体及び単量体のサイズの2倍である、より遅く移動する二量体として見えることを示唆する、多重バンドを示す。左から2番目の概略図は、ceDNAが制限エンドヌクレアーゼで切断された場合、元のバンドが消え、切断後に残存する予想断片サイズに対応する、より速く移動する（例えば、より小さな）バンドが出現することを示す。変性条件下、元の二重鎖DNAは、一本鎖であり、相補鎖が共有結合的に連結するため、未変性ゲル上で観察されるものの2倍大きな種として移動する。したがって、右から二番目の概略図において、消化されたceDNAは、未変性ゲル上で観察されるものと同様の結合分布を示すが、バンドは、未変性ゲル対応物のサイズの2倍の断片として移動する。右端の概略図は、変性条件下の未切断のceDNAが、一本鎖開環として移動し、したがって、観察されたバンドは、環が開いていない未変性条件下で観察されるもののサイズの2倍であることを示す。この図において、「kb」を使用して、文脈に応じて、ヌクレオチド鎖の長さ（例えば、変性状態で観察される単鎖分子の場合）又は塩基対の数（例えば、未変性状態で観察される二本鎖分子の場合）に基づくヌクレオチド分子の相対サイズを示す。図4Eは、非連続的な構造を有するDNAを示す。ceDNAは、ceDNAベクター上に単一認識部位を有する制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件及び変性条件の両方において、異なるサイズ（1kb及び2kb）を有する2つのDNA断片を生成することができる。図4Eはまた、直鎖状かつ連続的な構造を有するceDNAを示す。ceDNAベクターは、制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件において1kb及び2kbとして移動する2つのDNA断片を生成することができるが、変性条件では、鎖は、接続されたまま

30

40

50

であり、2 kb 及び 4 kb として移動する一本鎖を産生する。

【図 5】エンドヌクレアーゼでの消化を有する (+) 又は有しない (-) c e D N A ベクターの変性ゲル流動例の例示的な図である (c e D N A 構築物 1 及び 2 の場合 E c o R I、c e D N A 構築物 3 及び 4 の場合 B a m H I、c e D N A 構築物 5 及び 6 の場合 S p e I、並びに c e D N A ベクター 7 及び 8 の場合 X h o I) 構築物 1 ~ 8 は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際出願第 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 号の実施例 1 に記載されている。アスタリスクで強調されたバンドのサイズを判定し、図の下に示した。

【図 6】実施例 7 に記載される実験の結果を示し、具体的には、L N P - ポリ C 対照 (左端のマウス) で治療されたマウス及び L N P - c e D N A - ルシフェラーゼで治療された 4 匹のマウス (左端のマウス以外の全て) から得られた I V I S 画像を表す。4 匹の c e D N A で治療されたマウスは、マウスの肝臓を含む領域で有意な蛍光を示す。

【図 7】実施例 8 に記載される実験の結果を表す。暗い斑点は、発現された c e D N A 導入遺伝子から生じるタンパク質の存在を示し、投与した L N P - c e D N A と肝細胞との会合を実証する。

【図 8 A】実施例 9 に記載される眼の研究の結果を表す。図 8 A は、J e t P E I (登録商標) - c e D N A - ルシフェラーゼを注射したラットの眼 (左上) 及び同じラットの注射していない眼 (右上)、又はプラスミド - ルシフェラーゼ D N A を注射したラットの眼 (左下) 及び同じラットの注射していない眼 (右下) からの代表的な I V I S 画像を示す。図 8 B は、処置群の各々における処置された眼、又は対応する未処置の眼で観察された平均放射輝度のグラフを示す。c e D N A で処置したラットは、最小限の相対蛍光 (したがって、ルシフェラーゼ導入遺伝子の発現) が観察されたプラスミド - ルシフェラーゼで処置したラットとは明確な対照で、99 日間にわたって有意な蛍光 (したがって、ルシフェラーゼ導入遺伝子の発現) を実証した。

【図 8 B】実施例 9 に記載される眼の研究の結果を表す。図 8 A は、J e t P E I (登録商標) - c e D N A - ルシフェラーゼを注射したラットの眼 (左上) 及び同じラットの注射していない眼 (右上)、又はプラスミド - ルシフェラーゼ D N A を注射したラットの眼 (左下) 及び同じラットの注射していない眼 (右下) からの代表的な I V I S 画像を示す。図 8 B は、処置群の各々における処置された眼、又は対応する未処置の眼で観察された平均放射輝度のグラフを示す。c e D N A で処置したラットは、最小限の相対蛍光 (したがって、ルシフェラーゼ導入遺伝子の発現) が観察されたプラスミド - ルシフェラーゼで処置したラットとは明確な対照で、99 日間にわたって有意な蛍光 (したがって、ルシフェラーゼ導入遺伝子の発現) を実証した。

【図 9 A】実施例 10 に記載される R a g 2 マウスにおける c e D N A の持続及び再投与研究の結果を表す。図 9 A は、L N P - c e D N A - L u c で処置した野生型 c 5 7 b l / 6 マウス又は R a g 2 マウスで観察された経時的な全流束のグラフを示す。図 9 B は、R a g 2 マウスにおけるルシフェラーゼ導入遺伝子の発現レベルに対する再用量の影響を示すグラフを提供し、結果として、再用量後に観察される安定した発現の増加をもたらす (矢印は、再用量投与の時間を示す)。

【図 9 B】実施例 10 に記載される R a g 2 マウスにおける c e D N A の持続及び再投与研究の結果を表す。図 9 A は、L N P - c e D N A - L u c で処置した野生型 c 5 7 b l / 6 マウス又は R a g 2 マウスで観察された経時的な全流束のグラフを示す。図 9 B は、R a g 2 マウスにおけるルシフェラーゼ導入遺伝子の発現レベルに対する再用量の影響を示すグラフを提供し、結果として、再用量後に観察される安定した発現の増加をもたらす (矢印は、再用量投与の時間を示す)。

【図 10】実施例 11 に記載される治療されたマウスにおける c e D N A ルシフェラーゼ発現研究からのデータを提供し、研究の期間にわたる各群のマウスにおける全流束を示す。高レベルの非メチル化 C p G は、経時的にマウスで観察される全流束の低下と相関したが、肝臓特異的プロモーターの使用は、少なくとも 77 日間にわたって、c e D N A ベクターからの導入遺伝子の耐久性のある安定した発現と相関した。

【図 1 1 A】 F I X を発現する c e D N A ベクターの流体力学的送達を示す。図 1 1 A は、 F I X を発現する 2 つの異なる c e D N A ベクター（ L P S 1 - F I X - v 1、 L P S 1 - F I X - v 2 ）、又は対照 c e D N A ベクター（ルシフェラーゼのみを発現する c e D N A）（ビヒクルとして示される）の流体力学的注射後のマウスからの 3 日目及び 7 日目の血清試料における F I X 発現レベルを示す。これらの F I X c e D N A ベクターは、両方とも F I X 発現を示した。図 1 1 B は、 F I X を発現する 2 つの異なる c e D N A ベクター（ L P S 1 - F I X - v 1； L P S 1 - F I X - v 2）又はビヒクル対照 c e D N A ベクター（ルシフェラーゼのみを発現する）の流体力学的注射後のマウスからの血清試料における 28 日の期間にわたる F I X 発現レベルを示す。

【図 1 1 B】 F I X を発現する c e D N A ベクターの流体力学的送達を示す。図 1 1 A は、 F I X を発現する 2 つの異なる c e D N A ベクター（ L P S 1 - F I X - v 1、 L P S 1 - F I X - v 2 ）、又は対照 c e D N A ベクター（ルシフェラーゼのみを発現する c e D N A）（ビヒクルとして示される）の流体力学的注射後のマウスからの 3 日目及び 7 日目の血清試料における F I X 発現レベルを示す。これらの F I X c e D N A ベクターは、両方とも F I X 発現を示した。図 1 1 B は、 F I X を発現する 2 つの異なる c e D N A ベクター（ L P S 1 - F I X - v 1； L P S 1 - F I X - v 2）又はビヒクル対照 c e D N A ベクター（ルシフェラーゼのみを発現する）の流体力学的注射後のマウスからの血清試料における 28 日の期間にわたる F I X 発現レベルを示す。

【図 1 2】 0 日目及び 36 日目に L N P 製剤化 F I X c e D N A 構築物（ 2 . 0 m g / k g ）を注射し、 - 2 日目、 - 1 日目、 0 日目、 1 日目及び 36 日目にルキソリチニブ 300 m g / k g を経口投与したマウスにおける第 I X 因子の血漿レベル濃度を示す。

【図 1 3 A】 各々コドン最適化されたヒト F I X 配列を含む c e D N A - F I X 構築物（ c e D N A - F I X v 1、 c e D N A - F I X 2 1 0 9、又は c e D N A - F I X 2 1 1 2）で処理した雄 C D - 1 マウスにおける F I X 発現を示す。図 1 3 A は、 3 日目及び 7 日目に測定された、流体力学的送達により 1 μ g の c e D N A - F I X v 1、 c e D N A - F I X 2 1 0 9、又は c e D N A - F I X 2 1 1 2 で処置された C D - 1 マウスにおけるヒト F I X 発現レベルを示す。図 1 3 B は、 3 日目及び 7 日目に測定された、流体力学的送達により 10 μ g の c e D N A - F I X v 1、 c e D N A - F I X 2 1 0 9、又は c e D N A - F I X 2 1 1 2 で処置された C D - 1 マウスにおけるヒト F I X 発現レベルを示す。

【図 1 3 B】 各々コドン最適化されたヒト F I X 配列を含む c e D N A - F I X 構築物（ c e D N A - F I X v 1、 c e D N A - F I X 2 1 0 9、又は c e D N A - F I X 2 1 1 2）で処理した雄 C D - 1 マウスにおける F I X 発現を示す。図 1 3 A は、 3 日目及び 7 日目に測定された、流体力学的送達により 1 μ g の c e D N A - F I X v 1、 c e D N A - F I X 2 1 0 9、又は c e D N A - F I X 2 1 1 2 で処置された C D - 1 マウスにおけるヒト F I X 発現レベルを示す。図 1 3 B は、 3 日目及び 7 日目に測定された、流体力学的送達により 10 μ g の c e D N A - F I X v 1、 c e D N A - F I X 2 1 0 9、又は c e D N A - F I X 2 1 1 2 で処置された C D - 1 マウスにおけるヒト F I X 発現レベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 9 】

F I X 治療用タンパク質又はその断片をコードする 1 つ以上の核酸を含む c e D N A ベクターを使用して血友病 B を治療するための方法が本明細書に提供される。 F I X タンパク質をコードする 1 つ以上の核酸を含む、本明細書に記載される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターも本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、 F I X タンパク質の発現は、それが発現される細胞からの治療用タンパク質の分泌を含み得る。代替的に、いくつかの実施形態では、発現された F I X タンパク質は、それが発現される細胞内で作用又は機能することができる（例えば、その効果を発揮する）。いくつかの実施形態では、 c e D N A ベクターは、肝臓、対象の筋肉（例えば、骨格筋）、又は他の身体部分において F I X タンパク質を発現し、これは、 F I X 治療用タンパク質の産生及び

多くの全身区画への分泌のためのデポーとして作用し得る。

【0030】

I. 定義

本明細書で別途定義されない限り、本出願に関連して使用される科学的及び技術的用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。本開示は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、及び試薬などに限定されず、そのようなものとして変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、単に特許請求の範囲によって定義される本開示の範囲を限定することを意図されない。免疫学及び分子生物学における一般的な用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp&Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3)、Robert S. Porter et al. (eds.), Fields Virology, 6th Edition, published by Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2013)、Knipe, D. M. and Howley, P. M. (ed.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908)、及びRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)、Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006、Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor&Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305)、Lewin's Genes XI, published by Jones&Bartlett Publishers, 2014 (ISBN -1449659055)、Michael R. Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (2012) (ISBN 1936113414)、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X)、Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542)、Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385)、Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005、及びCurrent Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADAM Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strober, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)に見出すことができ、これらの内容は全て、参照によりそれら全体が本

10

20

30

40

50

明細書に組み込まれる。

【0031】

本明細書で使用される場合、「異種核酸配列」及び「導入遺伝子」という用語は、交換可能に使用され、本明細書で開示される c e D N A ベクターに組み込まれ、それによって送達及び発現され得る、関心対象の（カプシドポリペプチドをコードする核酸以外の）核酸を指す。いくつかの実施形態によれば、「異種核酸」という用語は、接触する細胞又は対象に存在しない、それにより発現されない、又はそれに由来しない核酸（又は導入遺伝子）を指すことを意図する。

【0032】

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

【0033】

本明細書で交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。したがって、この用語には、一本鎖、二本鎖、又は多重鎖の D N A 若しくは R N A、ゲノム D N A、c D N A、D N A-R N A ハイブリッド、又はプリン及びピリミジン塩基若しくは他の天然、化学的修飾若しくは生化学的修飾、非天然、若しくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。「オリゴヌクレオチド」は、一般に、一本鎖又は二本鎖 D N A の約 5 ～ 約 1 0 0 ヌクレオチドのポリヌクレオチドを指す。しかしながら、この開示の目的のために、オリゴヌクレオチドの長さには上限はない。オリゴヌクレオチドは、「オリゴマー」又は「オリゴ」としても知られており、遺伝子から単離するか、又は当該技術分野で既知である方法によって化学的に合成することができる。「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、記載されている実施形態に適用可能であるように、一本鎖（センス又はアンチセンスなど）及び二本鎖ポリヌクレオチドを含むと理解されるべきである。

【0034】

D N A は、例えば、アンチセンス分子、プラスミド D N A、D N A-D N A 二重鎖、事前に凝縮された D N A、P C R 産物、ベクター（P 1、P A C、B A C、Y A C、人工染色体）、発現カセット、キメラ配列、染色体 D N A、又はこれらのグループの誘導体及び組み合わせの形態であり得る。D N A は、ミニサークル、プラスミド、バクミド、ミニ遺伝子、ミニストリング D N A（直鎖状の共有結合性閉鎖 D N A ベクター）、閉端直鎖状の二重鎖 D N A（C E L i D 又は c e D N A）、d o g g y b o n e（d b D N A（商標））D N A、ダンベル形 D N A、最小限度に免疫学的に定義された遺伝子発現（M I D G E）ベクター、ウイルス性ベクター又は非ウイルス性ベクターの形態にあり得る。R N A は、低分子干渉 R N A（s i R N A）、ダイサー基質 d s R N A、低分子ヘアピン R N A（s h R N A）、非対称干渉 R N A（a i R N A）、マイクロ R N A（m i R N A）、m R N A、r R N A、t R N A、ウイルス性 R N A（v R N A）、及びそれらの組み合わせの形態にあり得る。核酸としては、既知のヌクレオチド類似体又は修飾型骨格残基若しくは連結を含有する核酸が挙げられ、これらは、合成、天然に存在する、及び天然に存在しないものであり、参照核酸と同様の結合特性を有する。そのような類似体及び／又は修飾残基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（モルホリノ）、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ロックド核酸（L N A（商標））、及びペプチド核酸（P N A）が挙げられる。別途限定されない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの既知の類似体を含有する核酸を包含する。別途明記しない

10

20

30

40

50

限り、特定の核酸配列はまた、その保存的修飾型バリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補的配列、同様に、明示的に示された配列を暗黙的に包含する。

【0035】

「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（DNA）又はリボース（RNA）、塩基、及びリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を介してともに連結している。

【0036】

「塩基」には、プリン及びピリミジンが含まれ、それらには、天然化合物のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、及び天然類似体、並びにプリン及びピリミジンの合成誘導体が更に含まれ、それらには、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、及びアルキルハライドなどであるがこれらに限定されない新しい反応基を配置する修飾が含まれるが、これらに限定されない。

【0037】

本明細書で使用される「核酸構築物」という用語は、天然に存在する遺伝子から単離されるか、又はそうでなければ天然に存在しなであろう様式で核酸のセグメントを含有するように修飾されるか、又は合成である、一本鎖又は二本鎖の核酸分子を指す。核酸構築物という用語は、核酸構築物が本開示のコード配列の発現に必要な制御配列を含有する場合、「発現カセット」という用語と同義である。「発現カセット」は、プロモーターに作動可能に連結されたDNAコード配列を含む。

【0038】

「ハイブリダイズ可能」又は「相補的」若しくは「実質的に相補的」とは、核酸（例えば、RNA）が、非共有結合的に結合する、すなわち、ワトソン・クリック塩基対及び／又はG/U塩基対を形成する、温度及び溶液イオン強度の適切なインビトロ及び／又はインビボ条件下で配列特異的、逆平行様式で別の核酸に「アニール」又は「ハイブリダイズ」する（すなわち、核酸は、相補的核酸に特異的に結合する）のを可能にするヌクレオチドの配列を含むことを意味する。当該技術分野で既知であるように、標準的なワトソン・クリック塩基対合には、チミジン（T）とのアデニン（A）対合、ウラシル（U）とのアデニン（A）対合、及びシトシン（C）とのグアニン（G）対合が含まれる。加えて、2つのRNA分子（例えば、dsRNA）間のハイブリダイゼーションのために、グアニン（G）塩基がウラシル（U）と対合することも、当該技術分野で既知である。例えば、G/U塩基対合は、mRNA中のコドンとのtRNAアンチコドン塩基対合の状況で、遺伝コードの縮重（すなわち、冗長性）を部分的に担っている。この開示の文脈において、対象のDNA標的化RNA分子のタンパク質結合セグメント（dsRNA二重鎖）のグアニン（G）は、ウラシル（U）に相補的であるとみなされ、逆もまた同様である。したがって、対象のDNA標的化RNA分子のタンパク質結合セグメント（dsRNA二重鎖）の所与のヌクレオチド位置でG/U塩基対を作製できる場合、その位置は、非相補的であるとみなされないが、代わりに相補的であるとみなされる。

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」という用語は、少なくとも2つの異な

10

20

30

40

50

るタンパク質からのタンパク質ドメインを含むポリペプチドを指す。例えば、融合タンパク質は、(i) F I X又はその断片、及び(ii)少なくとも1つの非対象遺伝子(G O I)タンパク質を含み得る。本明細書に包含される融合タンパク質は、抗体、又はF I Xタンパク質、例えば、受容体、リガンド、酵素、若しくはペプチドの細胞外ドメインに融合した抗体のF c若しくは抗原結合断片を含むが、これらに限定されない。融合タンパク質の一部であるF I Xタンパク質又はその断片は、単一特異性抗体又は二重特異性若しくは多重特異的性抗体であり得る。

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

本明細書で使用される場合、「末端反復」又は「T R」という用語は、少なくとも1つの最小限必要な複製起源、及びパリンドロームヘアピン構造を含む領域を含む、任意のウイルス末端反復又は合成配列を含む。R e p結合配列(「R B S」)(R B E(R e p結合エレメント)とも称される)及び末端分解部位(「T R S」)は、一緒に「最小限必要な複製起源」を構成し、したがって、T Rは、少なくとも1つのR B S及び少なくとも1つのT R Sを含む。ポリヌクレオチド配列の所与のストレッチ内で互いの逆相補体であるT Rは、典型的に、各々「逆位末端反復」又は「I T R」と称される。ウイルスの文脈において、I T Rは、複製、ウイルスパッケージング、組み込み、及びプロウイルスレスキューを媒介する。予想外に見出されたように、全長にわたって逆相補体でないT Rは、依然としてI T Rの従来の機能を遂行することができ、したがって、I T Rという用語は、本明細書において、c e DNAベクターの複製を媒介することができるc e DNAゲノム又はc e DNAベクター中のT Rを指すように使用される。複合c e DNAベクター構成中、3つ以上のI T R又は非対称I T R対が存在し得ることは、当業者によって理解されるであろう。I T Rは、A A V I T R若しくは非A A V I T Rであり得るか、又はA A V I T R若しくは非A A V I T Rに由来し得る。例えば、I T Rは、パルボウイルス及びディペンドウイルス(例えば、イヌパルボウイルス、ウシパルボウイルス、マウスパルボウイルス、ブタパルボウイルス、ヒトパルボウイルスB-19)を包含するパルボウイルス科に由来し得るか、又はS V 40複製の起源として役立つS V 40ヘアピンは、切断、置換、欠失、挿入、及び/若しくは付加によって更に修飾され得る、I T Rとして使用され得る。パルボウイルス科ウイルスは、脊椎動物に感染するパルボウイルス亜科及び無脊椎動物に感染するデンソウイルス亜科の2つの亜科で構成されている。ディペンドパルボウイルスは、ヒト、霊長類、ウシ、イヌ、ウマ、ヒツジ種を含むが、これらに限定されない脊椎動物宿主における複製が可能である、アデノ随伴ウイルス(A A V)のウイルスファミリーを含む。本明細書では便宜上、c e DNAベクター中の発現カセットに対して5' (その上流)に位置するI T Rは、「5' I T R」又は「左I T R」と称され、c e DNAベクター中の発現カセットに対して3' (その下流)に位置するI T Rは、「3' I T R」又は「右I T R」と称される。

【0045】

「野生型I T R」又は「W T-I T R」は、例えば、R e p結合活性及びR e pニッキング能力を保持する、A A V又は他のディペンドウイルスにおける天然に存在するI T R配列の配列を指す。任意のA A V血清型からのW T-I T Rの核酸配列は、遺伝コード又はドリフトの縮退に起因して天然に存在する正準配列とわずかに異なる場合があり、した

10

20

30

40

50

がって本明細書における使用のために包含されるWT-I TR配列は、産生プロセス中に発生する天然に存在する変化（例えば、複製エラー）の結果としてWT-I TR配列を含む。

【0046】

本明細書で使用される場合、「実質的に対称なWT-I TR」又は「実質的に対称なWT-I TR対」という用語は、両方がそれらの全長にわたって逆相補配列を有する野生型I TRである単一のc e DNAゲノム又はc e DNAベクター内のWT-I TRの対を指す。例えば、変化が配列の特性及び全体的な三次元構造に影響を及ぼさない限り、天然に存在する正準配列から逸脱する1つ以上のヌクレオチドを有する場合でも、I TRが野生型の配列であるとみなすことができる。いくつかの態様では、逸脱するヌクレオチドは、保存的配列変化を表す。非限定的な一例として、配列は、正準配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性（例えば、デフォルト設定でBLASTを使用して測定される）を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、他のWT-I TRに対して対称な三次元空間構成を有する。実質的に対称なWT-I TRは、三次元空間で同じA、C-C'、及びB-B'ループを有する。実質的に対称なWT-I TRは、適切なRepタンパク質と対合する操作可能なRep結合部位（RBE又はRBE'）及び末端分解部位（trs）を有することを決定することによって、WTとして機能的に確認することができる。任意選択的に、許容条件下での導入遺伝子発現を含む他の機能を試験することができる。

10

20

【0047】

本明細書で使用される場合、「修飾型I TR」又は「mod-I TR」又は「変異体I TR」の語句は、本明細書で交換可能に使用され、同じ血清型からのWT-I TRと比較して、少なくとも1つ以上のヌクレオチドに変異を有するI TRを指す。変異は、同じ血清型のWT-I TRの三次元空間構成と比較して、I TRのA、C、C'、B、B'領域のうちの1つ以上の変化をもたらし得、三次元空間構成（すなわち、幾何学的空間におけるその三次元構造）の変化をもたらし得る。

【0048】

本明細書で使用される場合、「非対称I TR対」とも称される「非対称I TR」という用語は、全長にわたって逆相補体ではない単一のc e DNAゲノム又はc e DNAベクター内のI TRの対を指す。非限定的な一例として、非対称I TR対は、それらの三次元構造が、幾何学的空間において異なる形状であるように、それらの同族I TRに対して対称の三次元空間構成を有しない。言い換えると、非対称のI TR対は、全体的な幾何学的構造が異なり、すなわち、三次元空間でのそれらのA、C-C'、及びB-B'ループの構成が異なる（例えば、同族I TRと比較して、1つのI TRは、短いC-C'アーム及び／又は短いB-B'アームを有し得る）。2つのI TR間の配列の相違は、1つ以上のヌクレオチド付加、欠失、切断、又は点変異に起因し得る。一実施形態では、非対称I TR対の一方のI TRは、野生型AAV I TR配列であり得、他方のI TRは、本明細書で定義される修飾型I TR（例えば、非野生型又は合成I TR配列）であり得る。別の実施形態では、非対称I TR対のどちらのI TRも野生型AAV配列ではなく、2つのI TRは、幾何学的空間において異なる形状（すなわち、異なる全体的な幾何学的構造）を有する修飾型I TRである。いくつかの実施形態では、非対称I TR対の一方のmod-I TRは、短いC-C'アームを有することができ、他方のI TRは、それらが同族の非対称mod-I TRと比較して、異なる三次元空間構成を有するように異なる修飾（例えば、単一アーム、又は短いB-B'アームなど）を有し得る。

30

40

【0049】

本明細書で使用される場合、「対称I TR」という用語は、野生型ディペンドウイルスI TR配列に対して変異又は修飾され、それらの全長にわたって逆相補である単一のc e DNAゲノム又はc e DNAベクター内の一対のI TRを指す。どちらのI TRも野生型I TR AAV2配列ではなく（すなわち、それらは修飾型I TRであり、変異型I TRとも称される）、ヌクレオチドの付加、欠失、置換、切断、又は点変異により、野生型I

50

TRとは配列が異なり得る。本明細書では便宜上、ceDNAベクター中の発現カセットに対して5'（その上流）に位置するITRは、「5' ITR」又は「左ITR」と称され、ceDNAベクター中の発現カセットに対して3'（その下流）に位置するITRは、「3' ITR」又は「右ITR」と称される。

【0050】

本明細書で使用される場合、「実質的に対称の修飾型ITR」又は「実質的に対称のmod-ITR対」という用語は、両方がそれらの全長にわたって逆相補配列を有する単一のceDNAゲノム又はceDNAベクター内の修飾型ITRの対を指す。例えば、修飾型ITRは、変化が特性及び全体的な形状に影響を及ぼさない限り、逆相補配列から逸脱するいくつかのヌクレオチド配列がある場合でも、実質的に対称とみなすことができる。非限定的な一例として、配列は、正準配列に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性（デフォルト設定でBLASTを使用して測定される）を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、それらの同族の修飾型ITRに対して対称な三次元空間構成を有する。言い換えると、実質的に対称な修飾型ITR対は、三次元空間に構成された同じA、C-C'、及びB-B'ループを有する。いくつかの実施形態では、mod-ITR対からのITRは、異なる逆相補ヌクレオチド配列を有し得るが、依然として同じ対称な三次元空間構成を有し得る。すなわち、両方のITRは、同じ全体的な三次元形状をもたらす変異を有する。例えば、mod-ITR対の1つのITR（例えば、5' ITR）は、1つの血清型に由来し得、他方のITR（例えば、3' ITR）は、異なる血清型に由来し得るが、両方が同じ対応する変異を有し得（例えば、5' ITRがC領域に欠失を有する場合、異なる血清型の同族の修飾型3' ITRは、C'領域の対応する位置に欠失を有する）、それにより修飾型ITR対が同じ対称な三次元空間構成を有する。そのような実施形態では、修飾型ITR対の各ITRは、AAV2及びAAV6の組み合わせなどの異なる血清型（例えば、AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、及び12）に由来し得、1つのITRの修飾は、異なる血清型の同族のITRの対応する位置に反映される。一実施形態では、実質的に対称な修飾型ITR対は、ITR間のヌクレオチド配列の相違が特性又は全体的な形状に影響を及ぼさず、それらが三次元空間で実質的に同じ形状を有する限り、一对の修飾型ITR（mod-ITR）を指す。非限定的な例として、mod-ITRは、BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）又はデフォルト設定のBLASTNなどの当該技術分野において周知の標準的な手段によって決定される、正準mod-ITRに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、対称な三次元空間構成を有する。実質的に対称なmod-ITR対は、三次元空間で同じA、C-C'及びB-B'ループを有する。例えば、実質的に対称なmod-ITR対の修飾型ITRがC-C'アームの欠失を有する場合、同族のmod-ITRは、C-C'ループの対応する欠失を有し、またその同族のmod-ITRの幾何学的空間に同じ形状の残りのA及びB-B'ループの同様の三次元構造を有する。

【0051】

「隣接する」という用語は、別の核酸配列に関する1つの核酸配列の相対位置を指す。一般に、配列ABCでは、BはA及びCに隣接している。配置A x B x Cについても同様である。したがって、隣接する配列は、隣接される配列の前又は後に続くが、隣接される配列と連続している、又はすぐ隣である必要はない。一実施形態では、隣接するという用語は、直鎖状二重鎖ceDNAベクターの各末端における末端反復を指す。

【0052】

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

【0053】

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

10

【0054】

本明細書で使用される場合、「Rep結合部位」、「Rep結合エレメント」、「RBE」、及び「RBS」は、交換可能に使用され、Repタンパク質（例えば、AAV Rep78又はAAV Rep68）の結合部位を指し、Repタンパク質による結合時に、Repタンパク質が、RBSを組み込む配列上でその部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を実施することを可能にする。RBS配列及びその逆相補体は、一緒に単一RBSを形成する。RBS配列は、当該技術分野において既知であり、例えば、AAV2において特定されたRBS配列である5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号60）を含む。任意の既知のRBS配列は、他の既知のAAV RBS配列及び他の天然に既知の又は合成RBS配列を含む、本開示の実施形態において使用され得る。理論に束縛されるものではないが、Repタンパク質のヌクレアーゼドメインは、二重鎖核酸配列GCTCに結合し、したがって2つの既知のAAV Repタンパク質は、二重鎖オリゴヌクレオチド、5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3'（配列番号60）に直接結合し、安定してアセンブリすると考えられる。加えて、可溶性凝集配座異性体（すなわち、不定数の相互関連Repタンパク質）は解離し、Rep結合部位を含有するオリゴヌクレオチドに結合する。各Repタンパク質は、各鎖上の窒素塩基及びホスホジエステル骨格の両方と相互作用する。窒素塩基との相互作用は、配列特異性を提供するが、ホスホジエステル骨格との相互作用は、非配列特異性又は低配列特異性であり、タンパク質-DNA複合体を安定させる。

20

30

【0055】

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

40

【0056】

50

本明細書で使用される場合、「c e D N A」という用語は、合成又はその他の非ウイルス遺伝子導入のためのカプシド不含閉端直鎖状二本鎖（d s）二重鎖 D N A を指す。c e D N A の詳細な説明は、2017年3月3日に出願された P C T / U S 2017 / 020828 の国際出願に記載されており、その全容は参照により本明細書に明示的に組み込まれる。細胞ベースの方法を使用して様々な逆位末端反復（I T R）配列及び構成を含む c e D N A の産生のためのある特定の方法は、2018年9月7日に提出された国際出願第 P C T / U S 18 / 49996 号及び2018年12月6日に提出された同第 P C T / U S 2018 / 064242 号の実施例 1 に記載されており、その各々は、その全体の参照により本明細書に組み込まれる。様々な I T R 配列及び構成を含む合成 c e D N A ベクターの産生のためのある特定の方法は、例えば、2019年1月18日に提出された国際出願第 P C T / U S 2019 / 14122 号に記載されており、その全容は参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で使用される場合、「c e D N A ベクター」という用語は、交換可能に使用され、少なくとも 1 つの末端パリンドロームを含む閉端 D N A ベクターを指す。いくつかの実施形態では、c e D N A は、2 つの共有結合性閉端を含む。

10

【0057】

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

【0058】

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

20

【0059】

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

【0060】

本明細書で使用される場合、「c e D N A - バキュロウイルス感染昆虫細胞」及び「c e D N A - B I I C」という用語は、交換可能に使用され、c e D N A - バキュロウイルスに感染した無脊椎動物宿主細胞（限定されないが、昆虫細胞（例えば、S f 9 細胞）を含む）を指す。

30

【0061】

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

【0062】

本明細書で定義されるように、「レポーター」は、検出可能な読み出しを提供するために使用することができるタンパク質を指す。レポーターは、一般に、蛍光、色、又は発光などの測定可能なシグナルを産生する。レポータータンパク質コード配列は、細胞又は生物中の存在が容易に観察されるタンパク質をコードする。例えば、蛍光タンパク質は、特定波長の光で励起された場合に細胞を蛍光させ、ルシフェラーゼは、細胞に光を生じる反応を触媒させ、β - ガラクトシダーゼなどの酵素は、基質を着色産物に変換する。実験又は診断目的のために有用な例示的なレポーターポリペプチドとしては、β - ラクタマーゼ、β - ガラクトシダーゼ（L a c Z）、アルカリホスファターゼ（A P）、チミジンキナーゼ（T K）、緑色蛍光タンパク質（G F P）、及び他の蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（C A T）、ルシフェラーゼ、並びに当該技術分野において周知の他のものが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0063】

本明細書で使用される場合、「エフェクタータンパク質」という用語は、例えば、レポ

50

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

10

【0064】

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

20

【0065】

本明細書で使用される場合、「リプレッサータンパク質」又は「誘導因子タンパク質」は、調節配列エレメントに結合するタンパク質であり、調節配列エレメントに作動可能に連結した配列の転写をそれぞれ抑制又は活性化する。本明細書に記載される好ましいリプレッサー及び誘導因子タンパク質は、少なくとも1つの入力剤又は環境入力の存在又は不在に敏感である。本明細書に記載される好ましいタンパク質は、例えば、分離可能なDNA結合及び入力剤結合、又は応答性エレメント若しくはドメインを含む形態のモジュールである。

【0066】

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

30

【0067】

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

40

【0068】

「インビボ」という用語は、多細胞動物などの生物中又は生物内で起こるアッセイ又はプロセスを指す。本明細書に記載される態様のいくつかでは、方法又は使用は、細菌などの単細胞生物が使用される場合に「インビボで」起こると言われ得る。「エクスピボ」という用語は、多細胞動物又は植物、例えば、とりわけ外植片、培養細胞（一次細胞及び細胞株を含む）、形質転換細胞株、及び抽出組織又は細胞（血液細胞を含む）の体外に無傷膜を有する生細胞を使用して実施される方法及び使用を指す。「インビトロ」という用語は、細胞抽出物などの無傷膜を有する細胞の存在を必要としないアッセイ及び方法

50

を指し、非細胞系、例えば細胞抽出物などの細胞又は細胞系を含まない媒質にプログラム可能な合成生物的回路を導入することを指し得る。

【0069】

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

10

【0070】

本明細書で使用される場合、「エンハンサー」という用語は、1つ以上のタンパク質(例えば、アクチベータータンパク質又は転写因子)に結合して、核酸配列の転写活性化を増加させるシス作用性調節配列(例えば、10~1,500塩基対)を指す。エンハンサーは、それらが調節する遺伝子開始部位の上流又は遺伝子開始部位の下流で最大1,000,000塩基対に位置付けられ得る。エンハンサーは、非関連遺伝子のイントロン領域内又はエクソン領域内に位置付けられ得る。

20

【0071】

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

30

【0072】

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

40

【0073】

いくつかの実施形態では、コード核酸セグメントは、「組換えプロモーター」又は「異種プロモーター」の制御下で位置付けられ、これらの両方は、その自然環境において作動可能に連結されたコードされた核酸配列と通常は関連しないプロモーターを指す。組換え又は異種エンハンサーは、その自然環境において所与の核酸配列と通常は関連しないエンハンサーを指す。そのようなプロモーター又はエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーター又はエンハンサー、任意の他の原核、ウイルス性、又は真核細胞から単離されたプロモーター又はエンハンサー、及び「天然に存在」しない合成プロモーター又はエンハンサー

50

を含み得、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、及び／又は当該技術分野において既知である遺伝子操作の方法を通じて発現を変更する変異を含み得る。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成的に産生することに加えて、プロモーター配列は、本明細書に開示される合成生物的回路及びモジュールに関して、PCRを含む組換えクローニング及び／又は核酸増幅技術を使用して産生され得る（例えば、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照されたく、各々は参照により本明細書に組み込まれる）。更に、ミトコンドリア、クロロプラストなどの非核性細胞小器官内の配列の転写及び／又は発現を配向する制御配列が同様に用いられ得ることが企図される。

【0074】

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

【0075】

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

【0076】

本明細書で使用される「オープンリーディングフレーム（ORF）」という用語は、ペプチド又はタンパク質に翻訳され得るいくつかのヌクレオチドトリプレットの配列を指すことを意図する。オープンリーディングフレームは、好ましくは開始コドン、すなわちアミノ酸メチオニン（ATG）を通常コードする3つの後続ヌクレオチドの組み合わせをその5'末端に含み、また通常3ヌクレオチドの倍数の長さを示す後続領域を含む。ORFは、好ましくは終止コドン（例えば、TAA、TAG、TGA）によって終結する。典型的には、これはオープンリーディングフレームの唯一の終止コドンである。したがって、本発明の文脈におけるオープンリーディングフレームは、好ましくは、開始コドン（例えばATG）で始まり、好ましくは停止コドン（例えばTAA、TGA、又はTAG）で終わる、3で割ることができるいくつかのヌクレオチドからなるヌクレオチド配列である。オープンリーディングフレームは、単離されてもよく、又はより長い核酸配列、例えば本明細書に記載のceDNAベクターに組み込まれてもよい。

【0077】

「作動可能に連結された」とは、そのように記載された構成成分が、それらが意図された方法で機能することを許可する関係にある並列を指す。例えば、プロモーターがその転写又は発現に影響を与える場合、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結されている。「発現カセット」は、ceDNAベクターにおける導入遺伝子の転写を指示するのに

十分なプロモーター又は他の調節配列に作動可能に連結されているDNA配列を含む。好適なプロモーターには、例えば、組織特異的プロモーターが含まれる。プロモーターは、AAV起源でもあり得る。

【0078】

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

【0079】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本開示の核酸構築物又はc e DNA発現ベクターによる形質転換、トランスフェクション、形質導入などを受けやすい任意の細胞型を含む。非限定的な例として、宿主細胞は、単離された初代細胞、多能性幹細胞、CD34⁺細胞、人工多能性幹細胞、又はいくつかの不死化細胞株（例えば、He p G2細胞）のいずれかであり得る。代替的に、宿主細胞は、組織、器官、又は生物におけるインサイチュ又はインビボの細胞であり得る。

【0080】

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

【0081】

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

10

20

30

40

50

olecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, 上記)、好ましくはバージョン3.0.0以降において実装されるように、Needleman-Wunschアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970, 上記)を使用して決定される。使用される任意のパラメータは、ギャップオープンペナルティ10、ギャップ拡張ペナルティ0.5、及びEDNAFULL(NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン)置換マトリックスである。「最長同一性」とラベル付けされたNeedleの出力(-nobriefオプションを使用して取得される)は、同一性パーセントとして使用され、次のように計算される、(同一のデオキシリボヌクレオチド×100)/アラインメントの長さ-アラインメントにおけるギャップの総数)。アラインメントの長さは、好ましくは少なくとも10ヌクレオチド、好ましくは少なくとも25ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも100ヌクレオチドである。

10

【0082】

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

20

【0083】

本明細書で使用される「異種」という用語は、それぞれ天然の核酸又はタンパク質には見られないヌクレオチド又はポリペプチド配列を意味する。異種核酸配列は、天然に存在する核酸配列(又はそのバリエーション)に(例えば、遺伝子操作によって)連結されて、キメラポリペプチドをコードするキメラヌクレオチド配列を生成し得る。異種核酸配列は、バリエーションポリペプチドに(例えば、遺伝子操作によって)連結されて、融合バリエーションポリペプチドをコードする核酸配列を生成し得る。或いは、「異種」という用語は、細胞又は対象に天然には存在しない核酸配列を指す場合がある。

30

【0084】

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

40

【0085】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からのRNA又はポリペプチドの発現を指示するベクターを指す。発

50

現される配列は、多くの場合、しかし必ずしもそうではないが、細胞にとって異種である。発現ベクターは、追加の要素を含むことができ、例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有することができるため、それを2つの生物、例えば発現の場合はヒト細胞、並びにクローニング及び増幅の場合は原核生物宿主で維持することができる。「発現」という用語は、RNA及びタンパク質、また必要に応じて、例えば、転写、転写プロセッシング、翻訳及びタンパク質の折りたたみ、修飾及びプロセッシングを含むがこれらに限定されない分泌タンパク質の産生に關与する細胞プロセスを指す。「発現産物」には、遺伝子から転写されたRNA、及び遺伝子から転写されたmRNAの翻訳によって得られたポリペプチドが含まれる。「遺伝子」という用語は、適切な調節配列に作動可能に連結された場合に、インビトロ又はインビボでRNAに転写される核酸配列(DNA)を意味する。遺伝子には、コード領域の前後の領域、例えば、5'未翻訳(5'UTR)又は「リーダー」配列及び3'UTR又は「トレーラー」配列、同様に、個々のコードセグメント(エクソン)間の介在配列(イントロン)が含まれる場合及び含まれない場合がある。

10

【0086】

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

20

【0087】

本明細書で使用される「遺伝性疾患」という語句は、ゲノムの1つ以上の異常、特に出生時から存在する状態によって部分的又は完全に、直接的又は間接的に引き起こされる疾患を指す。異常は、変異、挿入、又は欠失であり得る。異常は、遺伝子のコード配列又はその調節配列に影響を与える可能性がある。いくつかの実施形態によれば、遺伝性疾患は、FIX遺伝子における突然変異の結果である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性疾患は、FIXタンパク質発現の減少の結果である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性疾患は、血友病である。いくつかの実施形態によれば、血友病は、血友病Bである。

【0088】

本明細書で使用される場合、「凝固第IX因子(fIX; FIX)」は、第IX因子の活性化因子として凝固において機能する、血液の効率的な凝固に必要なビタミンK依存性タンパク質を指すことを意図する。約1~5 µg/mlの濃度の血中fIXが、正常な範囲とみなされる。FIXの欠乏は血友病Bに関連し、FIXの濃度がFIXの正常濃度の約1%未満(すなわち、血液1ml当たり約0.01~0.05 µg未満のFIX)である場合、重症例が生じる。

30

【0089】

本明細書で使用される場合、「投与」、「投与する」という用語及びそれらの変形は、組成物又は薬剤(例えば、本明細書に記載されるceDNA)を対象に導入することを指し、1つ以上の組成物又は薬剤の同時及び連続導入を含む。「投与」は、例えば、治療、薬物動態、診断、研究、プラセボ、及び実験方法を指し得る。「投与」は、インビトロ及びエクスビボ治療も包含する。組成物又は薬剤の対象への導入は、経口、肺、鼻腔内、非経口(静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下)、直腸、リンパ管内、腫瘍内、又は局所を含む任意の好適な経路による。投与には、自己管理及び他者による投与が含まれる。投与は、任意の好適な経路によって実行され得る。好適な投与経路は、組成物又は薬剤がその意図された機能を遂行することを可能にする。例えば、好適な経路が静脈内である場合、組成物は、組成物又は薬剤を対象の静脈に導入することによって投与される。

40

【0090】

本明細書で使用される場合、「核酸治療」、「治療用核酸」及び「TNA」という語句は、交換可能に使用され、疾患又は障害を治療するための治療剤の活性成分として核酸を使用する治療の任意のモダリティを指す。本明細書で使用される場合、これらの語句は、

50

RNAベースの治療薬及びDNAベースの治療薬を指す。RNAベースの治療剤の非限定的な例としては、mRNA、アンチセンスRNA及びオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー、干渉RNA (RNAi)、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、非対称干渉RNA (aiRNA)、マイクロRNA (miRNA) が挙げられる。DNAベースの治療剤の非限定的な例としては、ミニサークルDNA、ミニ遺伝子、ウイルスDNA (例えば、レンチウイルス又はAAVゲノム) 又は非ウイルス合成DNAベクター、閉端直鎖状二本鎖DNA (ceDNA/CELiD)、プラスミド、バクミド、doggy bone (商標) DNAベクター、最小限の免疫学的に定義された遺伝子発現 (MIDGE) -ベクター、非ウイルスミニストリングDNAベクター (直鎖状の共有結合的に閉じたDNAベクター)、又はダンベル型DNA最小ベクター (「ダンベルDNA」) が挙げられる。いくつかの実施形態によれば、治療用核酸は、ceDNAである。

10

【0091】

本明細書で使用される場合、「免疫抑制剤」という用語は、チロシンキナーゼなどのタンパク質キナーゼを阻害する小分子、モノクローナル抗体、又はポリペプチドアンタゴニストの群を指す。

【0092】

本明細書で使用される場合、「治療効果」という用語は、治療の結果を指し、その結果は、望ましくかつ有益であると判断される。治療効果としては、直接的又は間接的に、疾患症状の阻止、低減、又は排除を挙げることができる。治療効果としてはまた、直接的又は間接的に、疾患症状の進行の阻止、低減、又は排除を挙げることができる。

20

【0093】

本明細書に記載される任意の治療剤について、治療有効量は、予備的なインビトロ研究及び／又は動物モデルから最初に決定することができる。治療有効用量はまた、ヒトのデータから決定することができる。適用される用量は、投与される化合物の相対的な生物学的利用能及び効力に基づいて調整することができる。上記の方法及び他の周知の方法に基づいて最大の効力を達成するように用量を調整することは、当業者の能力の範囲内である。参照により本明細書に組み込まれる、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Edition, McGraw-Hill (New York) (2001) の第1章に見出され得る治療有効性を決定するための一般原則を以下に要約する。

30

【0094】

薬物動態学的原理は、許容できない副作用を最小限に抑えながら、望ましい程度の治療効果を得るために投与計画を変更するための基礎を提供する。薬物の血漿濃度を測定でき、治療濃度域に関連している状況では、投与量の変更に関する追加のガイダンスを入手することができる。

【0095】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、及び／又は「治療」という用語は、状態の進行を抑制する、実質的に阻害する、遅らせる、若しくは逆転させる、状態の臨床症状を実質的に改善する、又は状態の臨床症状の出現を実質的に防ぐ、有益な若しくは望ましい臨床結果を得ることを含む。治療することは、(a) 障害の重症度を低減すること、(b) 治療されている障害に特徴的な症状の発症を限定すること、(c) 治療されている障害に特徴的な症状の悪化を限定すること、(d) 以前に障害を有していた患者における障害の再発を限定すること、及び(e) 以前は障害に関して無症候性であった患者の症状の再発を限定することのうちの1つ以上を達成することを更に指す。

40

【0096】

薬理学的及び／又は生理学的効果などの有益な又は所望の臨床結果は、疾患、障害又は状態の素因を有する可能性があるが、疾患の症状をまだ経験していないか、若しくは呈していない対象において疾患、障害又は状態が発生するのを防ぐこと (予防的治療)、疾患、障害又は状態の症状の緩和、疾患、障害又は状態の程度の減少、疾患、障害又は状態の

50

安定化（すなわち、悪化させない）、疾患、障害又は状態の蔓延を防ぐこと、疾患、障害又は状態の進行を遅らせる又は遅くすること、疾患、障害又は状態の改善又は軽減、及びそれらの組み合わせ、同様に治療を受けていない場合に予想される生存と比較して生存を延長することを含むが、これらに限定されない。

【0097】

本明細書で使用される場合、「増加する」、「増強する」、「上昇させる」という用語（及び同様の用語）は、一般に、天然、予測若しくは平均に対して、又は対照条件に対して、直接的又は間接的に、濃度、レベル、機能、活性、又は挙動を増加させる作用を指す。

【0098】

本明細書で使用される場合、「抑制する」、「減少する」、「妨害する」、「阻害する」及び／又は「低減する」という用語（並びに同様の用語）は、一般に、天然、予測若しくは平均に対して、又は対照条件に対して、直接的又は間接的に、濃度、レベル、機能、活性、又は挙動を低減する行為を指す。

【0099】

本明細書で使用される場合、「対照」は、参照標準を指すことを意図する。いくつかの実施形態では、対照は、健康な患者から得られた陰性対照試料である。他の実施形態では、対照は、血友病と診断された患者から得られた陽性対照試料である。更に他の実施形態では、対照は、歴史的な対照又は標準参照値若しくは値の範囲（予測若しくは転帰が既知の血友病A患者の群、又はベースライン若しくは正常値を表す試料の群など、以前に試験された対照試料など）である。試験試料と対照との差は、増加であってもよく、又は逆に減少であってもよい。差は、質的差又は量的差、例えば統計的に有意な差であってもよい。いくつかの例では、差は、対照と比較して、少なくとも約5%、例えば少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、少なくとも約300%、少なくとも約350%、少なくとも約400%、少なくとも約500%、又は500%超の増加又は減少である。

【0100】

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

【0101】

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

【0102】

「からなる」という用語は、実施形態の説明において列挙されていないいずれの要素も除いた、本明細書に記載される組成物、方法、及びそれらそれぞれの構成成分を指す。

【0103】

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

10

20

30

40

50

に由来し、本明細書では非限定例を示すように使用される。したがって、略語「例えば (e. g.)」は、「例えば (for example)」と同義である。

【0104】

作動例又は別途示される場合を除いて、本明細書で使用される成分又は反応条件の量を表す全ての数は、全ての場合において「約」という用語によって修飾されるものとして理解されたい。パーセンテージに関連して使用される「約」という用語は、±1%を意味する場合がある。本開示は、以下の実施例によって更に詳細に説明されるが、本開示の範囲は、それに限定されるべきではない。

【0105】

本明細書に開示される本開示の代替エレメント又は実施形態のグループ化は、限定として解釈されるべきではない。各郡のメンバーは、個別に、又は群の他のメンバー又は本明細書で見られる他のエレメントとの任意の組み合わせで参照及び主張することができる。群の1つ以上のメンバーは、利便性及び／又は特許性の理由から、群に含める、又は群から削除することができる。そのような任意の包含又は削除が発生した場合、本明細書では、明細書が修正されたグループを含むとみなされ、したがって添付の特許請求の範囲で使用されている全てのマーカッシュグループの記述を満たす。

【0106】

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

【0107】

本明細書では、本開示の様々な態様の説明内で他の用語が定義されている。

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

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

10

【0112】

II. c e D N A ベクターからの F I X タンパク質の発現

本明細書に記載される技術は、一般に、非ウイルス性 D N A ベクター、例えば、本明細書に記載される c e D N A ベクターからの細胞における F I X タンパク質の発現及び／又は産生を対象とする。F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、本明細書において「c e D N A ベクター全般」と題されたセクションに記載されている。特に、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、一対の I T R（例えば、本明細書に記載される対称又は非対称）、及び I T R 対の間に、プロモーター又は調節配列に作動可能に連結された、本明細書に記載される F I X タンパク質をコードする核酸を含む。従来の A A V ベクター、更にはレンチウイルスベクターを超える、F I X タンパク質の発現に対する c e D N A ベクターの明確な利点は、所望のタンパク質をコードする核酸配列にサイズの制約がないことである。したがって、全長 6 . 8 k b の F I X タンパク質でさえ、単一の c e D N A ベクターから発現することができる。したがって、本明細書に記載される c e D N A ベクターを使用して、それを必要とする対象、例えば、血友病 B を有する対象において治療用 F I X タンパク質を発現することができる。

20

【0113】

理解されるように、本明細書に記載される c e D N A ベクター技術は、任意のレベルの複雑さに適合させることができるか、又は F I X タンパク質の異なる構成成分の発現が独立した様式で制御され得るモジュール方式で 사용할ことができる。例えば、本明細書で設計された c e D N A ベクター技術は、単一の c e D N A ベクターを使用して単一の遺伝子配列（例えば、F I X タンパク質）を発現するのと同様に簡単であり得るか、又は複数の c e D N A ベクターを使用する場合と同様に複雑であり得、各ベクターは、異なるプロモーターによって各々独立して制御される複数の F I X タンパク質若しくは関連する補因子又はアクセサリタンパク質を発現する。以下の実施形態は、本明細書で具体的に企図され、必要に応じて当業者が適応させることができる。

30

【0114】

一実施形態では、単一の c e D N A ベクターを使用して、F I X タンパク質の単一の構成成分を発現することができる。代替的に、単一の c e D N A ベクターを使用して、単一のプロモーター（例えば、強力なプロモーター）の制御下で、F I X タンパク質の複数の構成成分（例えば、少なくとも 2 つ）を発現することができ、任意選択的に I R E S 配列を使用して、構成成分の各々、例えば、補因子又はアクセサリタンパク質の適切な発現を確実にする。

40

【0115】

また本明細書において、別の実施形態では、少なくとも 2 つの挿入物（例えば、重鎖又は軽鎖を発現する）を含む単一の c e D N A ベクターが企図され、各挿入物の発現はそれ自体のプロモーターの制御下にある。プロモーターは、同じプロモーターの複数のコピー、複数の異なるプロモーター、又はそれらの任意の組み合わせを含み得る。当業者が理解するように、多くの場合、F I X タンパク質の構成成分を異なる発現レベルで発現させ、したがって、発現される個々の構成成分の化学量論を制御して、細胞における効率的な F

50

I Xタンパク質の折りたたみ及び組み合わせを確実にすることが望ましい。

【0116】

c e D N Aベクター技術の更なるバリエーションは、当業者によって想定され得るか、又は従来のベクターを使用するタンパク質産生方法から適合され得る。

【0117】

A. 第I X因子 (F I X) の発現

いくつかの実施形態では、F I Xタンパク質をコードする導入遺伝子はまた、分泌配列もコードすることができ、それによりF I Xタンパク質は、ゴルジ装置及び小胞体に向けられ、F I Xタンパク質がE Rを通過して細胞から出ると、シャペロン分子によって正しい立体構造に折りたたまれる。例示的な分泌配列には、V H-02 (配列番号88) 及びV K-A26 (配列番号89) 及びI g_κシグナル配列 (配列番号126)、並びにタグ付きタンパク質がサイトソルから分泌されるのを可能にするG l u c分泌シグナル (配列番号188)、タグ付きタンパク質をゴルジ体に向けるT M D-S T分泌配列 (配列番号189) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0118】

調節スイッチを使用して、F I Xタンパク質の発現を微調整することもでき、それによりF I Xタンパク質は、必要に応じて (所望の発現レベル又は量でのF I Xタンパク質の発現を含むが、これに限定されない)、又は代替的に細胞シグナル伝達事象を含む特定のシグナルの存在又は不在がある場合に発現される。例えば、本明細書に記載されるように、c e D N AベクターからのF I Xタンパク質の発現は、本明細書において「調節スイッチ」と題されたセクションに記載されるように、特定の状態が発生したときにオン又はオフにすることができる。

20

【0119】

例えば、また単なる例示の目的のために、F I Xタンパク質を使用して、F I Xタンパク質の高すぎるレベルの産生などの望ましくない反応を止めることができる。F I X遺伝子は、F I Xタンパク質を所望の細胞にもたらしするためにシグナルペプチドマーカ含有し得る。しかしながら、いずれの状況でも、F I Xタンパク質の発現を調節することが望ましい場合がある。c e D N Aベクターは、調節スイッチの使用に容易に対応する。

【0120】

従来のA A Vベクター、更にはレンチウイルスベクターよりもc e D N Aベクターの明確な利点は、F I Xタンパク質をコードする核酸配列にサイズの制約がないことである。したがって、全長F I X、並びに任意選択的にいかなる補因子又は評価タンパク質でさえも、単一のc e D N Aベクターから発現することができる。更に、必要な原子化学に応じて、同じF I Xタンパク質の複数のセグメントを発現させることができ、同じ又は異なるプロモーターを使用することができ、また調節スイッチを使用して各領域の発現を微調整することができる。例えば、実施例に示されるように、デュアルプロモーター系を含むc e D N Aベクターを使用することができ、それによりF I Xタンパク質の各ドメインに異なるプロモーターが使用される。F I Xタンパク質を産生するためのc e D N Aプラスミドの使用は、機能的F I Xタンパク質の形成のための各ドメインの適切な比率をもたらす、F I Xタンパク質のドメインの発現のためのプロモーターの独自の組み合わせを含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターを使用して、F I Xタンパク質の異なる領域を別々に (例えば、異なるプロモーターの制御下で) 発現することができる。

30

40

【0121】

別の実施形態では、c e D N Aベクターから発現されるF I Xタンパク質は、蛍光、酵素活性、分泌シグナル、又は免疫細胞アクチベーターなどの追加の機能を更に含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、F I Xタンパク質をコードするc e D N Aは、例えば、リンカードメインを更に含むことができる。本明細書で使用される場合、「リンカードメイン」は、本明細書に記載されるF I Xタンパク質のドメイン／領域のうちのいずれかを一緒

50

に連結する、長さが約2～100アミノ酸のオリゴ又はポリペプチド領域を指す。いくつかの実施形態では、リンカーは、隣接するタンパク質ドメインが互いに対して自由に移動できるように、グリシン及びセリンなどの柔軟な残基を含むか、又はそれらから構成され得る。2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないようにすることが望ましい場合は、より長いリンカーを使用することができる。リンカーは、切断可能であるか、又は切断不可能であり得る。切断可能なリンカーの例には、2Aリンカー（例えば、T2A）、2A様リンカー又はそれらの機能的同等物、及びそれらの組み合わせが含まれる。リンカーは、Those assigned ウイルスに由来するT2Aであるリンカー領域であり得る。

【0123】

10

例えば、FIXなどの既知の及び／又は公的に利用可能なタンパク質配列を取り、cDNA配列を逆操作して、そのようなタンパク質をコードすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。次いで、意図される宿主細胞と一致するようにcDNAをコドン最適化し、本明細書に記載されるようにceDNAベクターに挿入することができる。

【0124】

B. FIXタンパク質を発現するceDNAベクター

所望のFIXをコードする1つ以上の配列を有するFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、プロモーター、分泌シグナル、ポリA領域、及びエンハンサーなどの調節配列を含むことができる。最低でも、ceDNAベクターは、FIXタンパク質をコードする1つ以上の核酸配列を含む。

20

【0125】

非常に効率的かつ正確なFIXタンパク質のアセンブリを実現するために、いくつかの実施形態では、FIXタンパク質が小胞体ERリーダー配列を含み、それをERに導き、タンパク質の折りたたみが発生することが特に企図される。例えば、発現されたタンパク質を折りたたみのためにERに向ける配列。

【0126】

いくつかの実施形態では、細胞又は細胞外局在化シグナル（例えば、分泌シグナル、核局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナルなど）は、FIXタンパク質の分泌又は所望の細胞内局在化を指示するために、ceDNAベクターに含まれ、それによりFIXタンパク質は、細胞内標的（例えば、イントラボディ）又は細胞外標的に結合することができる。

30

【0127】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、モジュール様式で任意の所望のFIXタンパク質のアセンブリ及び発現を可能にする。本明細書で使用される場合、「モジュール」という用語は、構築物から容易に除去され得る、ceDNA発現プラスミドにおけるエレメントを指す。例えば、ceDNA生成プラスミドのモジュールエレメントは、構築物内の各エレメントに隣接する制限部位の固有の対を含み、個々のエレメントの排他的な操作を可能にする（例えば、図1A～1Gを参照されたい）。したがって、ceDNAベクタープラットフォームは、任意の所望のFIXタンパク質構成の発現及びアセンブリを可能にすることができる。様々な実施形態では、FIXタンパク質をコードする所望のceDNAベクターをアセンブリするのに必要な操作量を低減及び／又は最小化できるceDNAプラスミドベクターが本明細書に提供される。

40

【0128】

C. ceDNAベクターによって発現される例示的なFIXタンパク質

特に、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、血友病Bの1つ以上の症状の治療、予防、及び／又は改善における使用のための、例えば、FIXタンパク質、並びにそのバリエーション及び／又は活性断片をコードすることができるが、これらに限定されない。一態様では、血友病Bは、ヒト血友病Bである。

【0129】

50

(i) F I X 治療用タンパク質及びその断片

本質的に、F I X 治療用タンパク質又はその断片（例えば、機能的断片）の任意のバージョンは、本明細書に記載されるように、c e D N A ベクターによってコードされ、c e D N A ベクターにおいて及び c e D N A ベクターから発現され得る。当業者は、F I X 治療用タンパク質が、F I X タンパク質の全てのスプライスバリエーション及びオルソログを含むことを理解するであろう。F I X 治療用タンパク質は、無傷の分子並びにその断片（例えば、機能的断片）を含む。

【0130】

第 I X 因子 (F I X)

第 I X 因子（又はクリスマス因子）（E C 3 . 4 . 2 1 . 2 2）は、凝固系のセリンプロテアーゼの1つであり、ペプチダーゼファミリー S 1 に属する。このタンパク質の欠乏は、血友病 B を引き起こす。第 I X 因子は、不活性な前駆体であるチモージェンとして産生される。シグナルペプチドを除去するために処理され、グリコシル化された後、第 X I a 因子（接触経路の）又は第 V I I a 因子（組織因子経路の）によって切断されて、鎖がジスルフィド架橋によって連結された2本鎖形態が生成される。第 I X a 因子に活性化されると、C a 2 +、膜リン脂質、及び第 V I I I 因子補因子の存在下で、第 X 因子の1つのアルギニン-イソロイシン結合を加水分解して第 X a 因子を形成する。第 I X 因子は、ビタミン K 依存性である。第 I X 因子は、アンチトロンビンによって阻害される。

【0131】

第 I X 因子遺伝子又はタンパク質は、F 9、凝固第 I X 因子、血漿トロンボプラスチン成分、血漿血栓形成成分、クリスマス因子、E C 3 . 4 . 2 1 . 2 2、P T C、クリスマス病、第 I X 因子 F 9、血友病 B、第 I X 因子、E C 3 . 4 . 2 1、第 9 因子、F 9 P 2 2、T H P H 8、H E M B、F I X、又は P 1 9 とともに称され得る。

【0132】

ヒト F I X の遺伝子は X 染色体にあり、8つのエクソンを有し、33.5 K b に及ぶ。第 I X 因子は肝臓で産生され、不活性な前駆体タンパク質は小胞体及びゴルジ体で処理され、そこで複数の翻訳後修飾を受け、プロペプチドのタンパク質分解切断時に血流に分泌される。

【0133】

第 I X 因子 m R N A の発現は、主に肝臓で生じる。骨髄、全血、リンパ節、胸腺、脳、大脳皮質、小脳、網膜、脊髄、脛骨神経、心臓、動脈、平滑筋、骨格筋、小腸、結腸、脂肪細胞、腎臓、肺、脾臓、胃、食道、膀胱、膵臓、甲状腺、唾液腺、副腎、下垂体、乳房、皮膚、卵巣、子宮、胎盤、前立腺、及び胸腺を含む追加的な組織が、第 I X 因子 m R N A を発現し得る。

【0134】

第 I X 因子タンパク質は、主に血清、血漿、及び単球で発現される。第 I X 因子タンパク質の発現はまた、これらに限定されないが、扁桃腺、骨髄間葉系幹細胞、脊髄、心臓、結腸筋、口腔上皮、食道、胃、噴門、結腸、直腸、肝臓、胎児肝臓、腎臓、脾臓、滑液、硝子体液、唾液腺、甲状腺、副腎、乳房、膵臓、ランゲルハンス島、胆嚢、前立腺、尿、膀胱、皮膚、胎盤、子宮、子宮頸部、卵巣、精巣、及び精嚢を含む体中の組織において検出され得る。

【0135】

第 I X 因子の1つのタンパク質アイソフォームを各々コードする、少なくとも2つの既知の m R N A バリエーションが存在する。バリエーション 1 は、より長い転写産物を表し、より長いアイソフォーム 1 をコードする。バリエーション 2 は、バリエーション 1 と比較して、5'コード領域に代わりのインフレームエクソンがない。これは、アイソフォーム 1 よりも短いアイソフォーム 2 をコードする。アイソフォーム 2 は、アイソフォーム 1 と同様のタンパク質分解処理を受ける可能性がある。m R N A バリエーション 1 及び 2、並びにタンパク質アイソフォーム 1 及び 2 の代表的な配列識別子を以下に示す：

ホモサピエンス凝固因子 I X (F 9)、転写バリエーション 1、m R N A (N C B I 参照配列

10

20

30

40

50

：NM__000133.3) 1386bp (配列番号377)

ホモサピエンス凝固因子IXアイソフォーム1プレプロタンパク質 (NCBI参照配列：NP__000124.1) 461アミノ酸 (配列番号378)

ホモサピエンス凝固因子IX (F9)、転写バリエーション2、mRNA (NCBI参照配列：NM__001313913.1) 2688bp (配列番号379)

ホモサピエンス凝固因子IXアイソフォーム2前駆体 (NCBI参照配列：NP__001300842.1) 423アミノ酸 (配列番号380)

【0136】

従来のAAVベクター、更にはレンチウイルスベクターよりもceDNAベクターの明確な利点は、所望のタンパク質をコードする核酸配列にサイズの制約がないことである。したがって、複数の全長FIX治療用タンパク質は、単一のceDNAベクターから発現することができる。

10

【0137】

ceDNAベクターからのFIX治療用タンパク質又はその断片の発現は、当該技術分野で知られているか、又は本明細書に記載されるように、本明細書に記載される調節スイッチを含む、1つ以上の誘導性又は抑制性プロモーターを使用して、空間的及び時間的の両方で達成することができる。

【0138】

一実施形態では、FIX治療用タンパク質は「治療用タンパク質バリエーション」であり、これは、対応する天然FIX治療用タンパク質と比較して変更されたアミノ酸配列、組成物、又は構造を有するFIX治療用タンパク質を指す。一実施形態では、FIXは、機能的バージョン (例えば、野生型) である。例えば、疾患の動物モデル及び／又は血友病Bの薬物を評価するために、血友病Bにつながる点変異又は欠失変異などのFIXタンパク質の変異体バージョンを発現することもまた有用であり得る。疾患モデルを生成するために、細胞又は動物モデル系への変異体又は修飾型FIXタンパク質の送達を行うことができる。そのような細胞又は動物モデルは、研究及び／又は薬物スクリーニングに使用することができる。ceDNAベクターから発現されるFIX治療用タンパク質は、蛍光、酵素活性、又は分泌シグナルなどの追加の機能を付与する配列／部分を更に含み得る。一実施形態では、FIX治療用タンパク質バリエーションは、それがレシピエント宿主細胞における内因性FIX治療用タンパク質と区別されることを可能にするための同定のための非天然タグ配列 (例えば、免疫タグ) を含む。

20

30

【0139】

例えば、FIX治療用タンパク質の既知の及び／又は公的に利用可能なタンパク質配列を取り、cDNA配列を逆操作して、そのようなタンパク質をコードすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。次いで、意図される宿主細胞と一致するようにcDNAをコドン最適化し、本明細書に記載されるようにceDNAベクターに挿入することができる。

【0140】

一実施形態では、FIX治療用タンパク質コード配列は、例えば、宿主から得られたmRNAを逆転写し、PCRを使用して配列を増幅することによって、既存の宿主細胞又は細胞株に由来し得る。

40

【0141】

(ii) ceDNAベクターを発現するFIX治療用タンパク質

所望のFIX治療用タンパク質をコードする1つ以上の配列を有するceDNAベクターは、プロモーター (例えば、表7を参照されたい)、分泌シグナル、ポリA領域 (例えば、表10を参照されたい)、及びエンハンサー (例えば、表8を参照されたい) などの調節配列を含むことができる。少なくとも、ceDNAベクターは、FIX治療用タンパク質又はその機能的断片をコードする1つ以上の核酸配列を含む。FIX治療用タンパク質をコードするceDNAベクターを生成するための例示的なカセット挿入を図1A～1Gに示す。一実施形態では、ceDNAベクターは、本明細書の表1に列挙されるFIX

50

配列を含む。

【表 1 - 1】

表 1 : 血友病 B の治療のための例示的な F I X 配列

説明	長さ	参照文献	配列番号
コドン最適化hFIX	1386	Nathwani et al., Blood(2006)107(7):2653-2661.	381
SPK9001由来のhFIXエクソン及び第1のイントロン	2824	米国特許公開第2016/0375110A1号	382
SPK9001由来のhFIXエクソンのみ	1386	米国特許公開第2016/0375110A1号	383
内因性hFIX cDNA	1386	NG_007994.1	384
G338L変異を含むJCat最適化Padua第IX因子ORF	1386		385
Jcat最適化野生型、ヒト第IX因子ORF	1386		386
Jcat最適化野生型、イス第IX因子ORF	1359		387
ヒトFIX ORF paduaバリエント(コドン最適化)1386bp	1386		388
ヒトFIX ORF(コドン最適化)1386bp	1386		389
マウス第IX因子cDNA	1419		390
GGGGSリンカー(配列番号391)及び6xHisタグ(配列番号392)を有するマウス第IX因子cDNA	1452		393
GGGGSリンカー(配列番号391)及びMycタグを有するマウス第IX因子cDNA	1464		394
Padua変異(R338L)を含むマウス第IX因子cDNA	1419		395
Padua変異(R338L)及びGGGGSリンカー(配列番号391)及び6xHisタグ(配列番号392)を含むマウス第IX因子cDNA	1452		396
CpG不含ヒトFIX Padua(G388L)COOL最適化	1386		397
ヒト第IX因子、WT。コドン最適化。	1194		398
WTマウス第IX因子;マウスコドン最適化	1416		399

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

GGGSリンカー(配列番号391)及び6xHis タグ(配列番号392)を有するWTマウス第IX 因子;マウスコドン最適化	1449		400
GGGSリンカー(配列番号391)及びMycタグ を有するWTマウス第IX因子;マウスコド ン最適化	1461		401
Paduaバリエントマウス第IX因子;マウスコ ドン最適化	1416		402
GGGSリンカー(配列番号391)及び6xHis タグ(配列番号392)を有するPaduaバリエ ントマウス第IX因子;マウスコドン最適化	1449		403

10

【0142】

(i i i) 血友病Bの治療のためのFIX治療用タンパク質及びその使用

本明細書に記載のc e D N Aベクターを使用して、FIXタンパク質の不適切な発現及び／又はFIXタンパク質内の変異に関連する血友病Bの治療のための治療用FIXタンパク質を送達することができる。

20

【0143】

本明細書に記載されるc e D N Aベクターを使用して、任意の所望のFIX治療用タンパク質を発現することができる。例示的な治療用FIX治療用タンパク質には、本明細書の表1に示される配列によって発現される任意のFIXタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

【0144】

一実施形態では、発現されたFIX治療用タンパク質は、血友病Bの治療に機能的である。いくつかの実施形態では、FIX治療用タンパク質は、免疫系反応を引き起こさない。

30

【0145】

別の実施形態では、FIX治療用タンパク質又はその断片（例えば、機能的断片）をコードするc e D N Aベクターを使用して、キメラタンパク質を生成することができる。したがって、キメラタンパク質を発現するc e D N Aベクターを、例えば、肝臓、腎臓、胆嚢、前立腺、副腎から選択される任意の1つ以上の組織に投与することができることが本明細書で具体的に企図される。いくつかの実施形態では、FIXを発現するc e D N Aベクターが乳児に投与されるか、又は子宮内の対象に投与される場合、血友病Bのインビボ若しくはエクスビボ治療のために、FIXを発現するc e D N Aベクターを、肝臓、副腎、心臓、腸、肺、及び胃から選択される任意の1つ以上の組織に、又はその肝臓幹細胞前駆体に投与することができる。

40

【0146】

血友病B

血友病Bは、第IX因子の遺伝子の遺伝的変異によりあざ及び出血が起こりやすくなり、第IX因子が欠乏する血液凝固障害である。血友病Bは、X連鎖劣性形質として遺伝する。血友病B患者の出血を防ぐための現在の治療には、第IX因子の静脈内注入及び／又は輸血が含まれる。

【0147】

血友病Bの治療に関連する多くの合併症が存在する。小児では、頻繁な外傷性静脈内カニューレ挿入を最小限に抑えるために、簡単にアクセスできる静脈内ポートが挿入され得

50

る。しかしながら、これらのポートは、高い感染率、及びカテーテルの先端に血栓が形成されるリスクを伴い、役に立たなくなる。ウイルス感染症は、HIV、B型肝炎、及びC型肝炎などの血液媒介感染症にかかるリスクに患者を晒す頻繁な輸血により、血友病患者において共通し得る。プリオン感染症は輸血によっても伝染し得る。

【0148】

いくつかの場合では、FIX遺伝子のプロモーター領域の変異により、小児期にFIXがほぼ完全に欠如し、思春期に内因性FIXのレベルがほぼ正常値まで着実に増加することを特徴とする、重症度の低い血友病Bライデンが発生する。

【0149】

凝固カスケード

血栓形成とも呼ばれる凝固は、血液が液体からゲルに変化して血栓を形成するプロセスである。それは潜在的に止血、損傷した血管からの失血の停止、それに続く修復をもたらす。凝固の機序には、フィブリンの沈着及び成熟に加えて、血小板の活性化、接着、及び凝集が含まれる。凝固の障害は、出血（出血又はあざ）又は閉塞性凝固（血栓症）をもたらし得る疾患状態である。

【0150】

凝固は、血管の損傷が血管の内側を覆う内皮を損傷した後、ほぼ瞬時に始まる。内皮下腔への血液の曝露は、血小板の変化と、最終的にフィブリン形成につながる血漿第VII因子への内皮下組織因子の曝露という2つのプロセスを開始する。血小板は、損傷部位ですぐに血栓を形成し、これは一次止血と呼ばれる。二次止血は同時に起こる：第VII因子（第VII因子を含む）を超える追加の凝固因子又は血栓形成因子が複雑なカスケードで反応してフィブリン鎖を形成し、血小板血栓を強化する。

【0151】

二次止血の凝固カスケードには、フィブリン形成につながる2つの初期経路を有する。これらは、接触活性化経路（内因性経路としても知られている）及び組織因子経路（外因性経路としても知られている）であり、両方がフィブリンを生成する同じ基本的な反応を引き起こす。血液凝固を開始するための主要な経路は、組織因子（外因性）経路である。経路は一連の反応であり、そこでセリンプロテアーゼのチモーゲン（不活性酵素前駆体）とその糖タンパク質共因子が活性化されて活性成分になり、カスケード内の次の反応を触媒して、最終的に架橋フィブリンをもたらす。凝固因子は一般にローマ数字で示され、活性形態を示すために小文字が追加される。

【0152】

凝固因子は一般にセリンプロテアーゼ（酵素）であり、下流のタンパク質を切断することによって作用する。組織因子であるFV、FVII、FXは例外である。組織因子であるFV及びFVIIは糖タンパク質であり、第XI因子はトランスグルタミナーゼである。凝固因子は不活性チモーゲンとして循環する。したがって、凝固カスケードは古典的に3つの経路に分割される。組織因子及び接触活性化経路は両方とも、第X因子、トロンビン、及びフィブリンの「最終共通経路」を活性化する。

【0153】

組織因子（外因性）経路の主な役割は、「トロンビンバースト」を生成することであり、これは、そのフィードバック活性化の役割の観点から凝固カスケードの最も重要な構成要素であるトロンビンが非常に迅速に放出されるプロセスである。FVIIaは、他のどの活性化凝固因子よりも多い量で循環する。このプロセスには、以下のステップが含まれる。

【0154】

ステップ1：血管の損傷後、FVIIは循環を離れ、組織因子を含む細胞（間質性線維芽細胞及び白血球）に発現する組織因子（TF）と接触し、活性化複合体（TF-FVIIa）を形成する。

【0155】

ステップ2：TF-FVIIaはFIX及びFXを活性化する。

10

20

30

40

50

【0156】

ステップ3：F V I I 自体は、トロンビン、F X I a、F X I I、及びF X aによって活性化される。

【0157】

ステップ4：T F - F V I I aによるF Xの活性化（F X aを形成するため）は、組織因子経路阻害剤（T F P I）によってほぼ即座に阻害される。

【0158】

ステップ5：F X aとその共因子F V aは、プロトロンビンをトロンビンに活性化するプロトロンビナーゼ複合体を形成する。

【0159】

ステップ6：次いで、トロンビンは、F V及びF V I I I（F I Xと複合体を形成する）を含む凝固カスケードの他の構成成分を活性化し、F V I I Iを活性化して、フォンウィルブランド因子（v W F）への結合から解放する。

【0160】

ステップ7：F V I I I aは、F I X aの共因子であり、それらが一緒になってF Xを活性化する「テナーゼ」複合体を形成し、それによりこのサイクルは継続する。

【0161】

接触活性化（内因性）経路は、高分子キニノーゲン（H M W K）、プレカリクレイン、及びF X I I（ハーゲマン因子）によるコラーゲン上の一次複合体の形成から始まる。プレカリクレインはカリクレインに変換され、F X I IはF X I I aになる。F X I I aはF X IをF X I aに変換する。第X I a因子はF I Xを活性化し、それはその共因子F V I I I aとともにテナーゼ複合体を形成し、F XをF X aに活性化する。血栓形成の開始における接触活性化経路の小さな役割は、F X I I、H M W K、及びプレカリクレインの重度の欠乏症を有する患者が出血障害を有しないという事実によって説明することができる。代わりに、接触活性化システムは、炎症及び自然免疫により関与している。

【0162】

内因性及び外因性の凝固経路によって共有される最終共通経路は、プロトロンビンのトロンビンへの変換及びフィブリノーゲンのフィブリンへの変換を伴う。トロンビンは、フィブリノーゲンから止血血栓の構成要素であるフィブリンへの変換だけでなく、幅広い数々の機能を有する。更に、それは最も重要な血小板活性化因子であり、その上、第V I I I因子及び第V因子、並びにそれらの阻害剤プロテインC（トロンボモジュリンの存在下で）を活性化し、第X I I I因子を活性化し、これは、活性化された単量体から形成するフィブリンポリマーを架橋する共有結合を形成する。

【0163】

接触因子又は組織因子経路による活性化に続いて、凝固カスケードは、抗凝固経路によって下方制御されるまで、F V I I I及びF I Xの継続的な活性化によって血栓好発状態に維持されてテナーゼ複合体を形成する。

【0164】

方法は、本明細書に記載されるように、F I X治療用タンパク質又はその断片（例えば、機能的断片）をコードするc e D N Aベクターを含む有効量の組成物を対象に投与することを含む。当業者によって理解されるように、「有効量」という用語は、疾患又は障害の治療のための「治療有効量」でのタンパク質の発現をもたらす、投与されたc e D N A組成物の量を指す。

【0165】

F I X治療用タンパク質又はその断片（例えば、機能的断片）をコードするc e D N Aベクターを含む組成物の投与量範囲は、効力（例えば、プロモーターの効率）に依存し、血友病Bの治療のために、所望の効果、例えば、所望のF I X治療用タンパク質の発現を生み出すのに十分な量を含む。投与量は、許容できない有害な副作用を引き起こすほど多くあるべきではない。一般に、投与量は、c e D N Aベクターの特定の特性、発現効率、並びに患者の年齢、状態、及び性別によって異なるだろう。投与量は、当業者が決定でき

10

20

30

40

50

、c e D N A ベクターは反復投薬を防止する免疫活性化カプシドタンパク質を含まないため、従来のA A V ベクターとは異なって、合併症の場合には個々の医師により調整することもできる。

【0166】

本明細書に記載されるc e D N A 組成物の投与は、限られた期間繰り返すことができる。いくつかの実施形態では、用量は、定期的に又はパルス投与によって与えられる。好ましい実施形態では、上に列挙された用量は、数ヶ月にわたって投与される。治療の持続期間は、対象の臨床的進歩及び治療への応答性に依存する。経時的なブースター治療が企図されている。更に、発現のレベルは、対象が成長するにつれて滴定することができる。

【0167】

F I X 治療用タンパク質は、対象において、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月／1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも15年、少なくとも20年、少なくとも30年、少なくとも40年、少なくとも50年、又はそれ以上発現され得る。長期の発現は、本明細書に記載されるc e D N A ベクターを所定の又は所望の間隔で繰り返し投与することによって達成することができる。

【0168】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、疾患バイオマーカーの発現の統計的に有意な測定可能な変化又は所与の疾患症状の低減をもたらすのに十分である、発現したF I X 治療用タンパク質又はその機能的断片の量である（以下の「有効性の測定」を参照されたい）。そのような有効量は、所与のc e D N A 組成物についての臨床試験並びに動物実験で評価することができる。

【0169】

投与する必要のあるc e D N A ベクターの正確な量は、開業医の判断に依存し、各固体に特有である。投与に好適なレジームも様々であるが、最初の投与とそれに続くその後の注射又は他の投与による1つ以上の間隔での反復用量によって代表される。代替的に、特に急性疾患／障害の治療のために、インビボ治療のために指定された範囲内の血中濃度を維持するのに十分な連続静脈内注入が企図されている。

【0170】

本明細書に記載される方法及び組成物において有用な薬剤は、局所的、静脈内（ボラス又は連続注入による）、細胞内注射、組織内注射、経口、吸入、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内で投与することができ、必要に応じてぜん動手段によって、又は当業者による他の既知の手段によって送達することができる。薬剤は、必要に応じて、全身投与することができる。子宮内で投与することもできる。

【0171】

血友病Bの所与の治療法の有効性は、熟練した臨床医によって判定され得る。しかしながら、疾患又は障害の兆候又は症状のいずれか1つ又は全てが有益な方法で変更された場合、又は他の臨床的に許容される疾患の症状若しくはマーカーが、例えば、F I X をコードするc e D N A ベクター、又はその機能的断片での治療後に少なくとも10%向上又は改善された場合、その用語が本明細書において使用されるように、治療は「有効な治療」とみなされる。有効性はまた、疾患の安定化、又は医療介入の必要性（すなわち、疾患の進行が停止するか、少なくとも遅くなる）によって評価される個人の悪化の失敗によって測定することもできる。これらの指標を測定する方法は、当業者に既知であり、かつ／又は本明細書に記載される。治療は、個人又は動物（いくつかの非限定的な例としては、ヒト又は哺乳動物が挙げられる）における疾患の任意の治療を含み、以下：（1）疾患を阻害すること、例えば、疾患若しくは障害の進行を停止若しくは遅延させること、又は（2）疾患を緩和すること、例えば、症状の軽減を引き起こすこと、及び（3）疾患の発症の可能性を防止若しくは低減すること、又は疾患に関連する二次的疾患／障害、例えば、肝不全又は腎不全を防止することを含む。疾患の治療のための有効量とは、それを必要とする哺乳動物に投与した場合、その用語が本明細書で定義されているように、その疾患に対

10

20

30

40

50

して有効な治療をもたらすのに十分である量を意味する。

【0172】

薬剤の有効性は、血友病Bに特有の物理的指標を評価することによって決定することができる。血友病B指標の標準的な分析方法は、当該技術分野で既知である。

【0173】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、補因子又は他のポリペプチド、センス若しくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はRNA（コード若しくは非コード、例えば、siRNA、shRNA、マイクロRNA、ceDNAから発現したFIXタンパク質と組み合わせて使用され得るアンチセンス対応物（例えば、antagomiR））をコードすることもできる。追加的に、FIXタンパク質をコードする配列を含む発現カセットはまた、実験又は診断の目的で使用されるレポータータンパク質をコードする外因性配列、例えばβ-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ（lacZ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ルシフェラーゼ、及び当該技術分野において周知の他のものを含み得る。

10

【0174】

一実施形態では、ceDNAベクターは、血友病Bの治療に機能的である治療用FIXタンパク質を発現するための核酸配列を含む。好ましい実施形態では、治療用FIXタンパク質は、それが望まれない限り、免疫系反応を引き起こさない。

【0175】

III. FIX治療用タンパク質の産生に使用するための一般的なceDNAベクター

本開示の実施形態は、FIX導入遺伝子を発現することができる、閉端線形二本鎖（ceDNA）ベクターを含む方法及び組成物に基づく。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、FIXタンパク質をコードする配列である。本明細書に記載されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、サイズによって制限されず、それにより、例えば、単一ベクターからの導入遺伝子の発現に必要な全ての構成成分の発現を可能にする。FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、好ましくは、発現カセットなどの分子の少なくとも一部分にわたって二重鎖、例えば、自己相補的である（例えば、ceDNAは、二本鎖環状分子ではない）。ceDNAベクターは、共有結合性閉端を有し、したがって、例えば、1時間以上37℃でエキソヌクレアーゼ消化（例えば、エキソヌクレアーゼI又はエキソヌクレアーゼIII）に対して耐性である。

20

30

【0176】

一般に、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、5'から3'方向に、第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復（ITR）、関心対象の核酸配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、及び第2のAAV ITRを含む。ITR配列は、(i)少なくとも1つのWT ITR及び少なくとも1つの修飾型AAV逆位末端反復（mod-ITR）（例えば、非対称の修飾型ITR）、(ii) mod-ITR対が互いに対して異なる三次元空間構成を有する、2つの修飾型ITR（例えば、非対称の修飾型ITR）、又は(iii)各WT-ITRが同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称のWT-WT ITR対、又は(iv)各mod-ITRが同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称の修飾型ITR対のうちのいずれかから選択される。

40

【0177】

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

50

【0178】

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

【0179】

図1 A ~ 1 Eは、F I Xタンパク質の発現のための非限定的な例示的c e D N Aベクターの概略図、又は対応するc e D N Aプラスミドの配列を示す。F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターはカプシドを含まず、第1のI T R、導入遺伝子を含む発現カセット、及び第2のI T Rをこの順序でコードするプラスミドから得ることができる。発現カセットは、導入遺伝子の発現を可能にする及び／又は制御する1つ以上の調節配列を含み得、例えば、発現カセットは、エンハンサー／プロモーター、O R Fレポーター（導入遺伝子）、転写後調節エレメント（例えば、W P R E）、並びにポリアデニル化及び終結シグナル（例えば、B G HポリA）のうちの1つ以上をこの順番で含み得る。

【0180】

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

【0181】

発現カセットは、4 0 0 0ヌクレオチド超、5 0 0 0ヌクレオチド、1 0 , 0 0 0ヌクレオチド、若しくは2 0 , 0 0 0ヌクレオチド、若しくは3 0 , 0 0 0ヌクレオチド、若しくは4 0 , 0 0 0ヌクレオチド、又は5 0 , 0 0 0ヌクレオチド、又は約4 0 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0ヌクレオチド、若しくは1 0 , 0 0 0 ~ 5 0 , 0 0 0ヌクレオチドの任意の範囲、又は5 0 , 0 0 0ヌクレオチド超を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、5 0 0 ~ 5 0 , 0 0 0ヌクレオチド長の範囲の導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、5 0 0 ~ 7 5 , 0 0 0ヌクレオチド長の範囲の導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、5 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、1 0 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、5 0 0 ~ 5 , 0 0 0ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。c e D N Aベクターは、カプシド化A A Vベクターのサイズ制限を有さず、したがって、大サイズの発現カセットの送達が効率的な導入遺伝子の発現をもたらすようにすることができる。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターは、原核細胞特異的メチル化を欠いている。

【0182】

c e D N A発現カセットは、例えば、レシピエント対象において存在しない、不活性、若しくは不十分な活性であるタンパク質をコードする発現可能な外因性配列（例えば、オープンリーディングフレーム）若しくは導入遺伝子、又は所望の生物学的若しくは治療的效果を有するタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。導入遺伝子は、欠陥遺伝子又は転写産物の発現を訂正するように機能することができる遺伝子産物をコードすることができる。原則として、発現カセットは、変異のために減少若しくは欠如しているタンパク質

、ポリペプチド、若しくはRNAをコードする、又は過剰発現が本開示の範囲内であるとみなされる場合に治療効果をもたらす任意の遺伝子を含み得る。

【0183】

発現カセットは、任意の導入遺伝子（例えば、FIXタンパク質をコードする）、例えば、対象において血友病Bを治療するのに有用なFIXタンパク質、すなわち、治療用FIXタンパク質を含み得る。ceDNAベクターを単独で、又はポリペプチドをコードする核酸若しくは非コード核酸（例えば、RNAi、miRなど）、並びに対象のゲノム中のウイルス配列、例えば、HIVウイルス配列などを含む外因性遺伝子及び核酸配列と組み合わせ使用して、関心対象の任意のFIXタンパク質を対象に送達し、発現することができる。好ましくは、本明細書に開示されるceDNAベクターは、治療目的（例えば、医療、診断、若しくは獣医学的使用）又は免疫原性ポリペプチドに使用される。ある特定の実施形態では、ceDNAベクターは、1つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、siRNA、RNAis、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、又はRNA（コード又は非コード、例えば、siRNA、shRNA、マイクロRNA、及びそれらのアンチセンス対応物（例えば、antagomiR））、抗体、融合タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせを含む、任意の関心対象の遺伝子を対象において発現させるのに有用である。

10

【0184】

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

20

【0185】

発現カセット、本明細書に記載されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの発現構築物で提供される配列は、標的宿主細胞に対してコドン最適化され得る。本明細書で使用される場合、「最適化されたコドン」又は「コドン最適化」という用語は、目的の脊椎動物、例えばマウス又はヒトの細胞中の発現強化のために、少なくとも1つ、2つ以上、又は相当数の未変性配列（例えば、原核細胞配列）のコドンを、その脊椎動物の遺伝子中でより頻繁に又は最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、ある特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定の偏向を呈する。典型的に、コドン最適化は、元の翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を変更しない。最適化されたコドンは、例えば、AptagenのGENE FORGE（登録商標）コドン最適化及びカスタム遺伝子合成プラットフォーム（Aptagen, Inc., 2190 Fox Mill Rd, Suite 300, Herndon, Va. 20171）又は別の公開データベースを使用して決定することができる。いくつかの実施形態では、FIXタンパク質をコードする核酸は、当該技術分野で知られているように、ヒト発現のために最適化され、かつ／又はヒトFIX若しくはその機能的断片である。

30

40

【0186】

本明細書に開示されるように、FIXタンパク質の発現のためにceDNAベクターによって発現される導入遺伝子は、FIXタンパク質をコードする。プラスミドベース発現ベクターとは異なるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの多くの構造特徴が存在する。ceDNAベクターは、以下の特徴：元の（すなわち、挿入されていない）細菌DNAの欠失、原核細胞複製起源の欠失、自蔵である（すなわち、Rep結合及び末端分解部位（RBS及びTRS）を含む2つのITR以外のいかなる配列も、ITR間の外因性配列も必要としない）、ヘアピンを形成するITR配列の存在、並びに細菌型D

50

N Aメチル化、又は実際に哺乳動物宿主によって異常であるとみなされる任意の他のメチル化の非存在のうちの1つ以上を有し得る。一般に、本ベクターは、いかなる原核細胞DNAも含有しないことが好ましいが、いくつかの原核細胞DNAが、外因性配列として、非限定的な例としてプロモーター又はエンハンサー領域に挿入されてもよいことが企図される。ceDNAベクターをプラスミド発現ベクターと区別する別の重要な特徴は、ceDNAベクターが、閉端を有する一本鎖直鎖状DNAであるが、プラスミドは、常に二本鎖DNAである。

【0187】

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

【0188】

プラスミドベース発現ベクターを超える本明細書に記載されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターを使用するいくつかの利点があり、そのような利点としては、次のことが挙げられるが、これらに限定されない。1) プラスミドは、細菌DNA配列を含有し、原核細胞特異的メチル化、例えば、6-メチルアデノシン及び5-メチルシトシンメチル化に供されるが、カプシド不含AAVベクター配列は、真核細胞起源であり、原核細胞特異的メチル化を受けず、結果として、カプシド不含AAVベクターは、プラスミドと比較して炎症及び免疫反応を誘導する可能性が低い。2) プラスミドは、産生プロセス中に耐性遺伝子の存在を必要とするが、ceDNAベクターは必要としない。3) 環状プラスミドは、細胞への導入時に核に送達されず、細胞ヌクレアーゼによる分解をバイパスするために過負荷を必要とするが、ceDNAベクターは、ヌクレアーゼに対する耐性を付与するウイルスシスエレメント、すなわちITRを含有し、核に対して標的化され、送達されるように設計され得る。ITR機能に不可欠な最小定義エレメントは、Rep結合部位(RBS、AAV2の場合5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(配列番号60))及び末端分解部位(TRS、AAV2の場合5'-AGTTGG-3'(配列番号64))に加えて、ヘアピン形成を可能にする可変パリンドローム配列であると仮定する。4) ceDNAベクターは、報告によれば受容体のToll様ファミリーのメンバーに結合し、T細胞媒介性免疫反応を誘起する原核細胞由来のプラスミドにおいてしばしば見出されるCpGジヌクレオチドの過剰提示を有しない。対照的に、本明細書に開示されるカプシド不含AAVベクターでの形質導入は、様々な送達試薬を使用し、従来のAAVビリオンで形質導入することが困難である細胞及び組織型を効率的に標的とし得る。

【0189】

IV. 逆位末端反復(ITR)

本明細書に開示されているように、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベク

ーは、2つの逆位末端反復（ITR）配列の間に位置付けられた導入遺伝子又は核酸配列を含有し、これらの用語が本明細書に定義されるように、ITR配列は、非対称ITR対又は対称若しくは実質的に対称のITR対であり得る。本明細書に開示されるc e DNAベクターは、（i）少なくとも1つのWT ITR及び少なくとも1つの修飾型AAV逆位末端反復（mod-ITR）（例えば、非対称の修飾型ITR）、（ii）mod-ITR対が互いに対して異なる三次元空間構成を有する、2つの修飾型ITR（例えば、非対称の修飾型ITR）、又は（iii）各WT-ITRが同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称のWT-WT ITR対、又は（iv）各mod-ITRが同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称の修飾型ITR対のうちのいずれかから選択されるITR配列を含み得、本開示の方法は、限定されないが、リポソームナノ粒子送達系などの送達系を更に含み得る。

10

【0190】

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

20

【0191】

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

30

40

【0192】

熟練者であれば、ITR配列が、二本鎖ホリデージャンクションの一般構造を有し、典型的には、T形又はY形ヘアピン構造であり（例えば、図2A及び図3Aを参照されたい）、各WT-ITRが、より大きなパリンドロームアーム（A-A'）に埋め込まれた2つのパリンドロームアーム又はループ（B-B'及びC-C'）、並びに一本鎖D配列によって形成される（これらのパリンドローム配列の順序は、ITRのフリップ又はフロップ配向を定義する）ことを知っている。例えば、異なるAAV血清型（AAV1～AAV6）からの、及びGrimm et al., J. Virology, 2006; 80 (1

50

); 426-439, Yan et al., J. Virology, 2005; 364-379, Duan et al., Virology 1999; 261; 8-14に記載されるITRの構造分析及び配列比較を参照されたい。当業者は、本明細書に提供される例示的なAAV2 ITR配列に基づいて、ceDNAベクター又はceDNAプラスミドで使用するための任意のAAV血清型からWT-ITR配列を容易に決定することができる。例えば、Grimm et al., J. Virology, 2006; 80(1); 426-439に記載される異なるAAV血清型(AAV1~AAV6、並びにトリAAV(AAAV)及びウシAAV(BAAV))からのITRの配列比較を参照されたい。これは、他の血清型からの左ITRに対するAAV2の左ITRの同一性%を示す: AAV-1(84%)、AAV-3(86%)、AAV-4(79%)、AAV-5(58%)、AAV-6(左ITR)(100%)、及びAAV-6(右ITR)(82%)。

10

【0193】

A. 対称ITR対

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、5'から3'方向に、第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)、関心対象の核酸配列(例えば、本明細書に記載される発現カセット)、及び第2のAAV ITRを含み、第1のITR(5' ITR)及び第2のITR(3' ITR)は、互いに対して対称又は実質的に対称であり、すなわち、ceDNAベクターは、対称の三次元空間構成を有するITR配列を含み得、それによりそれらの構造は、幾何学的空間で同じ形状であるか、又は三次元空間で同じA、C-C'、B-B'ループを有する。そのような実施形態では、対称のITR対、又は実質的に対称のITR対は、野生型ITRではない修飾型ITR(例えば、mod-ITR)であり得る。mod-ITR対は、野生型ITRからの1つ以上の修飾を有し、互いに逆相補(逆位)である同じ配列を有し得る。代替実施形態では、修飾型ITR対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型ITR対は、異なる配列を有し得るが、対応する又は同じ対称の三次元形状を有し得る。

20

【0194】

(i) 野生型ITR

いくつかの実施形態では、対称のITR、又は実質的に対称のITRは、本明細書に記載されるように野生型(WT-ITR)である。すなわち、両方のITRが野生型配列を有するが、必ずしも同じAAV血清型のWT-ITRである必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、一方のWT-ITRは、1つのAAV血清型に由来し得、他方のWT-ITRは、異なるAAV血清型に由来し得る。そのような実施形態では、WT-ITR対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称的な三次元空間構成を維持しながら、1つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。

30

【0195】

したがって、本明細書で開示されるように、ceDNAベクターは、2つの隣接する野生型逆位末端反復(WT-ITR)配列の間に位置付けられた導入遺伝子又は核酸配列を含有し、互いに逆相補(逆位)であるか、又は代替的に互いに実質的に対称である。すなわち、WT-ITR対は、対称の三次元空間構成を有する。いくつかの実施形態では、野生型ITR配列(例えば、AAV WT-ITR)は、機能的Rep結合部位(RBS、例えば、AAV2の場合5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'、配列番号60)及び機能的末端分解部位(TRS、例えば、5'-AGTT-3'、配列番号62)を含む。

40

【0196】

一態様では、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、2つのWT逆位末端反復配列(WT-ITR)(例えば、AAV WT-ITR)の間に作動可能に位置付けられた核酸をコードするベクターポリヌクレオチドから取得可能である。すなわち、

50

両方の I T R が野生型配列を有するが、必ずしも同じ A A V 血清型の W T - I T R である必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、一方の W T - I T R は、1つの A A V 血清型に由来し得、他方の W T - I T R は、異なる A A V 血清型に由来し得る。そのような実施形態では、W T - I T R 対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称の三次元空間構成を維持しながら、1つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。いくつかの実施形態では、5' W T - I T R は、1つの A A V 血清型に由来し、3' W T - I T R は、同じ又は異なる A A V 血清型に由来する。いくつかの実施形態では、5' W T - I T R 及び 3' W T - I T R は、互いの鏡像であり、すなわち、それらは対称である。いくつかの実施形態では、5' W T - I T R 及び 3' W T - I T R は、同じ A A V 血清型に由来する。

10

【0197】

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

20

【0198】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術の一態様は、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターに関し、c e D N A ベクターは、2つの野生型逆位末端反復配列 (W T - I T R) の間に作動可能に位置付けられた F I X タンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含み、W T - I T R は、同じ血清型、異なる血清型に由来し得るか、又は互いに対して実質的に対称であり得る (すなわち、それらの構造が幾何学的空間で同じ形状であるように対称の三次元空間構成を有するか、又は三次元空間で同じ A、C - C'、及び B - B' ループを有する)。いくつかの実施形態では、対称 W T - I T R は、機能的末端分解部位及び R e p 結合部位を含む。いくつかの実施形態では、核酸配列は、導入遺伝子をコードし、ベクターは、ウイルスカプシドにはない。

30

【0199】

いくつかの実施形態では、W T - I T R は同じであるが、互いの逆相補体である。例えば、5' I T R の配列 A A C G は、対応する部位の 3' I T R の C G T T (すなわち、逆相補体) であり得る。一実施例では、5' W T - I T R センス鎖は、A T C G A T C G の配列を含み、対応する 3' W T - I T R センス鎖は、

【化1】

CGATCGAT

40

(すなわち、A T C G A T C G の逆相補体) を含む。いくつかの実施形態では、W T - I T R c e D N A は、末端分解部位及び複製タンパク質結合部位 (R P S) (複製タンパク質結合部位と称されることもある)、例えば、R e p 結合部位を更に含む。

【0200】

W T - I T R を含む F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターで使用するための例示的な W T - I T R 配列は、W T - I T R の対 (5' W T - I T R 及び 3' W T - I T R) を示す本明細書の表 2 に示されている。

【0201】

例示的な実施例として、本開示は、調節スイッチの有無にかかわらず、導入遺伝子 (例えば、核酸配列) に作動可能に連結されたプロモーターを含む F I X タンパク質の発現の

50

ための c e D N A ベクターを提供し、c e D N A はカプシドタンパク質を欠き、(a) W T - I T R をコードする c e D N A - プラスミド (例えば、図 1 F ~ 1 G を参照されたい) から産生され、各 W T - I T R は、そのヘアピン二次構成で同じ数の分子内二重化塩基対を有し (好ましくはこれらの参照配列と比較して、この構成のいかなる A A A 又は T T T 末端ループの欠失も除外する)、及び (b) 実施例 1 の未変性ゲル及び変性条件下でのアガロースゲル電気泳動による c e D N A の同定のためのアッセイを使用して c e D N A として同定される。

【0202】

いくつかの実施形態では、隣接する W T - I T R は、互いに実質的に対称である。この実施形態では、W T - I T R が同一の逆相補体ではないように、5' W T - I T R は、A A V の 1 つの血清型に由来し、3' W T - I T R は、A A V の異なる血清型に由来し得る。例えば、5' W T - I T R は、A A V 2 に由来し得、3' W T - I T R は、異なる血清型 (例えば、A A V 1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12) に由来し得る。いくつかの実施形態では、W T - I T R は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、ヘビパルボウイルス (例えば、ロイヤルパイソパルボウイルス)、ウシパルボウイルス、ヤギパルボウイルス、トリパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ウマパルボウイルス、エビパルボウイルス、ブタパルボウイルス、又は昆虫 A A V のうちのいずれかから選択される 2 つの異なるパルボウイルスから選択され得る。いくつかの実施形態では、W T - I T R のそのような組み合わせは、A A V 2 及び A A V 6 からの W T - I T R の組み合わせである。一実施形態では、実質的に対称の W T - I T R は、一方が他方の I T R に対して反転されたときに、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 96% . . . 97% . . . 98% . . . 99% . . . 99.5%、及びその間の全てのポイントであり、同じ対称の三次元空間構成を有する。いくつかの実施形態では、W T - I T R 対は、それらが対称の三次元空間構成を有する、例えば、A、C - C'、B - B'、及び D アームの同じ三次元構成を有するため、実質的に対称である。一実施形態では、実質的に対称の W T - I T R 対は、他方に対して反転され、少なくとも 95% 同一、少なくとも 96% . . . 97% . . . 98% . . . 99% . . . 99.5%、及びその間の全てのポイントであり、一方の W T - I T R は、5' - G C G C G C T C G C T C G C T C - 3' (配列番号 60) の R e p 結合部位 (R B S) 及び末端分解部位 (t r s) を保持する。いくつかの実施形態では、実質的に対称の W T - I T R 対は、互いに対して反転され、少なくとも 95% 同一、少なくとも 96% . . . 97% . . . 98% . . . 99% . . . 99.5%、及びその間の全てのポイントであり、一方の W T - I T R は、ヘアピン二次構造形成を可能にする可変パリンドローム配列に加えて、5' - G C G C G C T C G C T C G C T C - 3' (配列番号 60) の R e p 結合部位 (R B S) 及び末端分解部位 (t r s) を保持する。相同性は、B L A S T (B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l)、デフォルト設定の B L A S T N など、当該技術分野で周知の標準的な手段によって決定することができる。

【0203】

いくつかの実施形態では、I T R の構造エレメントは、I T R と大きな R e p タンパク質 (例えば、R e p 78 又は R e p 68) との機能的相互作用に関与する任意の構造エレメントであり得る。ある特定の実施形態では、構造エレメントは、I T R と大きな R e p タンパク質との相互作用に対する選択性を提供する。すなわち、少なくとも部分的に、どの R e p タンパク質が I T R と機能的に相互作用するかを判定する。他の実施形態では、構造エレメントは、R e p タンパク質が I T R に結合されたとき、大きな R e p タンパク質と物理的に相互作用する。各構造エレメントは、例えば、I T R の二次構造、I T R の核酸配列、2 つ以上のエレメント間の空間、又は上記のうちのいずれかの組み合わせであり得る。一実施形態では、構造エレメントは、A 及び A' アーム、B 及び B' アーム、C 及び C' アーム、D アーム、R e p 結合部位 (R B E) 及び R B E' (すなわち、相補的 R B E 配列)、並びに末端分解部位 (t r s) からなる群から選択される。

【0204】

単なる例として、表2は、WT-ITRの例示的な組み合わせを示す。

【0205】

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

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 : WT - I T R の例示的な組み合わせ

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

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

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

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

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

【表 2 - 4】

ヒツジ、ガチョウ	B19、ヘビ			
ヒツジ、ヘビ				

【0206】

単なる例として、表 3 は、いくつかの異なる AAV 血清型からの例示的な WT-ITR の配列を示す。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3：例示的なWT-ITR

AAV血清型	5' WT-ITR(左)	3' WT-ITR(右)
AAV1	配列番号5	配列番号10
AAV2	配列番号2	配列番号1
AAV3	配列番号6	配列番号11
AAV4	配列番号7	配列番号12
AAV5	配列番号8	配列番号13
AAV6	配列番号9	配列番号14

10

【0207】

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

20

【0208】

本開示のある特定の実施形態では、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、配列番号1、2、5～14のうちのいずれかから選択される核酸配列からなるWT-ITRを有さない。本開示の代替実施形態では、ceDNAベクターが、配列番号1、2、5～14のうちのいずれかから選択される核酸配列を含むWT-ITRを有する場合、隣接するITRもWTであり、ceDNAは、例えば、本明細書及び国際出願第PCT/US18/49996号に開示されているように、調節スイッチを含む（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT/US18/49996の表11を参照されたい）。いくつかの実施形態では、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書に開示されるような調節スイッチ、及び配列番号1、2、5～14からなる群のうちのいずれかから選択される核酸配列を有する選択されたWT-ITRを含む。

30

【0209】

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

40

【0210】

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

本明細書で論じられるように、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、対称ITR対又は非対称ITR対を含み得る。どちらの場合も、一方又は両方のITR

50

は修飾型 I T R であり得、その違いは、第 1 の場合（すなわち、対称 m o d - I T R）では、m o d - I T R は、同じ三次元空間構成を有する（すなわち、同じ A - A'、C - C'、及び B - B' アーム構成を有する）が、第 2 の場合（すなわち、非対称 m o d - I T R）では、m o d - I T R は、異なる三次元空間構成を有する（すなわち、A - A'、C - C'、及び B - B' アームの異なる構成を有する）ことである。

【0211】

いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、野生型 I T R 配列（例えば、A A V I T R）と比較して、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾される I T R である。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの I T R のうちの少なくとも 1 つは、機能性 R e p 結合部位（R B S；例えば、A A V 2 の場合は 5' - G C G C G C T C G C T C G C T C - 3'、配列番号 60）及び機能性末端分解部位（T R S；例えば、5' - A G T T - 3'、配列番号 62）を含む。一実施形態では、I T R のうちの少なくとも 1 つは、非機能性 I T R である。一実施形態では、異なる又は修飾型 I T R は各々、異なる血清型からの野生型 I T R ではない。

【0212】

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

【0213】

いくつかの実施形態では、m o d - I T R は、合成であり得る。一実施形態では、合成 I T R は、2 つ以上の A A V 血清型からの I T R 配列に基づいている。別の実施形態では、合成 I T R は、A A V ベース配列を含まない。更に別の実施形態では、合成 I T R は、上記の I T R 構造を保存するが、わずかな A A V 源配列を有するか、又は全く有しない。いくつかの態様では、合成 I T R は、野生型 R e p 又は特定血清型の R e p と選択的に相互作用し得るか、又は場合によっては、野生型 R e p によって認識されず、変異型 R e p によってのみ認識される。

【0214】

当業者であれば、既知の手段によって他の血清型における対応する配列を判定することができる。例えば、A、A'、B、B'、C、C'、又は D 領域中に変化が存在するかどうかを判定し、別の血清型における対応する領域を判定する。B L A S T（登録商標）（B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l）又は他の相同性アラインメントプログラムをデフォルト状態で使用して、対応する配列を判定することができる。本開示は、異なる A A V 血清型の組み合わせから m o d - I T R を含む集団及び複数の c e D N A ベクターを更に提供する。すなわち、1 つの m o d - I T R は、1 つの A A V 血清型に由来し得、他の m o d - I T R は、異なる血清型に由来し得る。理論に束縛されるものではないが、一実施形態では、1 つの I T R は、A A V 2 I T R 配列に由来し得るか、又はそれに基づき得、c e D N A ベクターの他の I T R は、A A V 血清型 1（A A V 1）、A A V 血清型 4（A A V 4）、A A V 血清型 5（A A V 5）、A A V 血清型 6（A A V 6）、A A V 血清型 7（A A V 7）、A A V 血清型 8（A A V 8）、A A V 血清型 9（A A V 9）、A A V 血清型 10（A A V 10）、A A V 血清型 11（A A V 11）、又は A A V 血清型 12（A A V 12）の任意の 1 つ以上の I T R 配列に由来し得るか、又はそれに基づき得る。

【0215】

任意のパルボウイルス I T R を、I T R として、又は塩基 I T R として修飾に使用することができる。好ましくは、パルボウイルスは、ディペンドウイルスである。より好ましくは、A A V である。選択される血清型は、その血清型の組織向性に基づき得る。A A V

2 は、広い組織向性を有し、AAV1 は、ニューロン及び骨格筋を選好的に標的し、AAV5 は、ニューロン、網膜色素上皮、及び光受容体を標的とする。AAV6 は、骨格筋及び肺を選好的に標的とする。AAV8 は、肝臓、骨格筋、心臓、及び脾臓組織を選好的に標的とする。AAV9 は、肝臓、骨格、及び肺組織を選好的に標的とする。一実施形態では、修飾型 ITR は、AAV2 ITR に基づく。

【0216】

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

【0217】

単なる例として、表 4 は、修飾型 ITR の領域中の少なくとも 1 つのヌクレオチドの例示的な修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を示し、X は、対応する野生型 ITR に対するそのセクションにおける少なくとも 1 つの核酸の修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を示す。いくつかの実施形態では、C 及び／又は C' 及び／又は B 及び／又は B' の領域のうちのいずれかにおける少なくとも 1 つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）は、少なくとも 1 つの末端ループに 3 つの連続 T ヌクレオチド（すなわち、TTT）を保持する。例えば、修飾が、単一アーム ITR（例えば、単一 C-C' アーム、若しくは単一 B-B' アーム）、又は修飾型 C-B' アーム若しくは C'-B アーム、又は少なくとも 1 つの切断されたアーム（例えば、切断された C-C' アーム及び／若しくは切断された B-B' アーム）を有する 2 つのアーム ITR のうちのいずれかをもちた場合、少なくとも単一アーム、又は 2 つのアーム ITR のアーム（1 つのアームは切断され得る）のうちの少なくとも 1 つは、少なくとも 1 つの末端ループに 3 つの連続 T ヌクレオチド（すなわち、TTT）を保持する。いくつかの実施形態では、切断された C-C' アーム及び／又は切断された B-B' アームは、末端ループに 3 つの連続 T ヌクレオチド（すなわち、TTT）を有する。

【表 4】

表4：I T Rの異なるB-B' 及びC-C' 領域又はアームに対する少なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）の例示的な組み合わせ（Xは、ヌクレオチド修飾、例えば、領域中の少なくとも1つのヌクレオチドの付加、欠失、又は置換を示す）。

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

10

20

【0218】

いくつかの実施形態では、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターで使用するためのm o d - I T Rは、本明細書に開示される非対称I T R対又は対称m o d - I T R対を含み、表4に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか1つ、またA'とCとの間、CとC'との間、C'とBとの間、BとB'との間、及びB'とAとの間から選択される領域のうちのいずれか1つ以上における少なくとも1つのヌクレオチドの修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、C若しくはC'又はB若しくはB'領域中の少なくとも1つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）は、依然としてステムループの末端ループを保存する。いくつかの実施形態では、CとC'との間及び／又はBとB'との間の少なくとも1つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）は、少なくとも1つの末端ループに3つの連続Tヌクレオチド（すなわち、T T T）を保持する。代替実施形態では、CとC'との間及び／又はBとB'との間の少なくとも1つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）は、少なくとも1つの末端ループに3つの連続Aヌクレオチド（すなわち、A A A）を保持する。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型I T Rは、表4に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか1つ、またA'、A、及び／又はDから選択される領域のうちのいずれか1つ以上における少なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型I T Rは、表4に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか1つ、またA領域における少なくとも1つの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）も含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型I T Rは、表4に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか1つ、またA'領域における少なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型I T Rは、表4に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか1つ、またA及び／又はA'領域における少

40

50

なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 I T R は、表 4 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また D 領域における少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を含み得る。

【0219】

一実施形態では、構造エレメントのヌクレオチド配列を修飾して（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20以上のヌクレオチド、又はその中の任意の範囲）、修飾型構造エレメントを産生することができる。一実施形態では、I T R に対する特定の修飾が本明細書に例示されているか（例えば、配列番号 3、4、15～47、101～116、若しくは165～187）、又は2018年12月6日に出願された国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 6 4 2 4 2 号の図 7 A ～ 7 B に示されている（例えば、P C T / U S 2 0 1 8 / 0 6 4 2 4 2 の配列番号 97～98、101～103、105～108、111～112、117～134、545～54）。いくつかの実施形態では、I T R は、（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20以上のヌクレオチド、又はその中の任意の範囲を修飾することによって）修飾され得る。他の実施形態では、I T R は、配列番号 3、4、15～47、101～116、若しくは165～187の修飾型 I T R のうちの1つ、又は配列番号 3、4、15～47、101～116、若しくは165～187、又は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際特許出願第 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 号の表 2 ～ 9（すなわち、配列番号 110～112、115～190、200～468）に示されている、A - A' アーム及び C - C' 及び B - B' アームの R B E 含有セクションと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又はそれ以上の配列同一性を有し得る。

【0220】

いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、例えば、特定アームの全部、例えば、A - A' アームの全部若しくは一部、又は B - B' アームの全部若しくは一部、又は C - C' アームの全部若しくは一部の除去又は欠失、又は代替的にステム（例えば、単一アーム）をキャップする最終ループが依然として存在する限り、ループのステムを形成する1、2、3、4、5、6、7、8、9、又はそれ以上の塩基対の除去（例えば、2018年12月6日に提出された P C T / U S 2 0 1 8 / 0 6 4 2 4 2 の図 7 A の I T R - 21 を参照されたい）を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、B - B' アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9以上の塩基対の除去を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、C - C' アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9、又はそれ以上の塩基対の除去を含み得る（例えば、2018年12月6日に提出された国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 6 4 2 4 2 号の図 3 B の I T R - 1 又は図 7 A の I T R - 45 を参照されたい）。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、C - C' アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9以上の塩基対の除去、及び B - B' アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9以上の塩基対の除去を含み得る。塩基対の除去の任意の組み合わせが想起され、例えば、C - C' アームにおける6つの塩基対、及び B - B' アームにおける2つの塩基対が除去され得る。例示的な実施例として、図 3 B は、修飾型 I T R が、少なくとも1つのアーム（例えば、C - C'）が切断される2つのアームを含むように、C 部分及び C' 部分の各々から欠失された少なくとも7つの塩基対、C 領域と C' 領域との間のループ中のヌクレオチドの置換、並びに B 領域及び B' 領域の各々からの少なくとも1つの塩基対の欠失を有する例示的な修飾型 I T R を示す。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R はまた、B 領域及び B' 領域の各々からの少なくとも1つの塩基対の欠失を含み、それにより B - B' アームも W T I T R に対して切断される。

【0221】

いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、全長野生型 I T R 配列に対して 1 ～ 50（

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

【0222】

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

【0223】

いくつかの実施形態では、対称ITR対又は非対称ITR対を含むFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書に開示される調節スイッチ、及び配列番号3、4、15~47、101~116、又は165~187からなる群のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する選択された少なくとも1つの修飾型ITRを含む。

【0224】

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

【0225】

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

【0226】

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

【0227】

本明細書に記載されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書に開示される野生型AAV2 ITR構造に関して修飾されるITR構造を含み得るが、依然として作動可能なRBE、trs、及びRBE'部分を保持する。図2A及び図2Bは、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの野生型ITR構造内のtrs部位の操作のための1つの可能な機序を示す。いくつかの実施形態では、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、Rep-結合部位(RBS、AAV2の場合5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(配列番号60))及び末端分解部位(RS、5'-AGTT(配列番号62))を含む1つ以上の機能的ITRポリヌクレオチド配列を含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのITR(野生型又は修飾

10

20

30

40

50

型 I T R) は、機能的である。F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターが、互いに異なるか、又は非対称である 2 つの修飾型 I T R を含む代替実施形態では、少なくとも 1 つの修飾型 I T R は、機能的であり、少なくとも 1 つの修飾型 I T R は、非機能的である。

【 0 2 2 8 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの修飾型 I T R (例えば、左又は右 I T R) は、ループアーム、切断アーム、又はスペーサー内に修飾を有する。ループアーム、切断アーム、又はスペーサー内に修飾を有する I T R の例示的な配列は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際特許出願第 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 号の表 2 (すなわち、配列番号 1 3 5 ~ 1 9 0、2 0 0 ~ 2 3 3)、表 3 (例えば、配列番号 2 3 4 ~ 2 6 3)、表 4 (例えば、配列番号 2 6 4 ~ 2 9 3)、表 5 (例えば、本明細書の配列番号 2 9 4 ~ 3 1 8)、表 6 (例えば、配列番号 3 1 9 ~ 4 6 8)、及び表 7 ~ 9 (例えば、配列番号 1 0 1 ~ 1 1 0、1 1 1 ~ 1 1 2、1 1 5 ~ 1 3 4) 又は表 1 0 A 若しくは 1 0 B (例えば、配列番号 9、1 0 0、4 6 9 ~ 4 8 3、4 8 4 ~ 4 9 9) に列挙されている。

10

【 0 2 2 9 】

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

20

【 0 2 3 0 】

上記のクラスの各々に非対称 I T R 対又は対称 m o d - I T R 対を含む F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターで使用するための追加の例示的な修飾型 I T R を表 5 A 及び 5 B に示す。表 5 A の右修飾型 I T R の予測二次構造は、2 0 1 8 年 1 2 月 6 日に出願された国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 6 4 2 4 2 号の図 7 A に示され、表 5 B の左修飾型 I T R の予測二次構造は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる 2 0 1 8 年 1 2 月 6 日に出願された国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 6 4 2 4 2 号の図 7 B に示される。

【 0 2 3 1 】

30

表 5 A 及び表 5 B は、例示的な右及び左修飾型 I T R の配列番号を列挙する。

40

50

【表 5 A】

表 5 A：例示的な修飾型右 I T R。これらの例示的な修飾型右 I T Rは、R B EであるG C G C G C T C G C T C G C T C − 3′（配列番号 6 0）、スパーサーであるA C T G A G G C（配列番号 6 9）、スパーサー補体G C C T C A G T（配列番号 7 0）、及びR B E′（すなわち、R B Eに対する補体）であるG A G C G A G C G A G C G C G C（配列番号 7 1）を含み得る。

ITR構築物	配列番号
ITR-18右	15
ITR-19右	16
ITR-20右	17
ITR-21右	18
ITR-22右	19
ITR-23右	20
ITR-24右	21
ITR-25右	22
ITR-26右	23
ITR-27右	24
ITR-28右	25
ITR-29右	26
ITR-30右	27
ITR-31右	28
ITR-32右	29
ITR-49右	30
ITR-50右	31

10

20

30

40

50

【表 5 B】

表 5 B：例示的な修飾型左 I T R。これらの例示的な修飾型左 I T Rは、RBEである G C G C G C T C G C T C G C T C - 3'（配列番号 6 0）、スパーサーである A C T G A G G C（配列番号 6 9）、スパーサー補体 G C C T C A G T（配列番号 7 0）、及び RBE 相補体（RBE'）である G A G C G A G C G A G C G C G C（配列番号 7 1）を含み得る。

ITR構築物	配列番号
ITR-33左	32
ITR-34左	33
ITR-35左	34
ITR-36左	35
ITR-37左	36
ITR-38左	37
ITR-39左	38
ITR-40左	39
ITR-41左	40
ITR-42左	41
ITR-43左	42
ITR-44左	43
ITR-45左	44
ITR-46左	45
ITR-47左	46
ITR-48左	47

【 0 2 3 2 】

一実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、5' から 3' 方向に、第 1 のアデノ関連ウイルス（A A V）逆位末端反復（I T R）、関心対象の核酸配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、及び第 2 の A A V I T R を含み、第 1 の I T R（5' I T R）及び第 2 の I T R（3' I T R）は、互いに非対称である、すなわち、それらは互いに異なる三次元空間構成を有する。例示的な実施形態として、第 1 の I T R は、野生型 I T R であり得、第 2 の I T R は、変異型又は修飾型 I T R であり得るか、又はその逆であり、第 1 の I T R は、変異型又は修飾型 I T R であり得、第 2 の I T R は、野生型 I T R であり得る。いくつかの実施形態では、第 1 の I T R 及び第 2 の I T R は、両方とも m o d - I T R であるが、異なる配列を有するか、又は異なる修飾を有し、したがって同じ修飾型 I T R ではなく、異なる三次元空間構成を有する。言い換えると、非対称 I T R を用いる c e D N A ベクターは、W T - I T R に対する 1 つの I T R のいかなる変更も他の I T R に反映されない I T R を含むか、又は代替的に非対称 I T R が修飾された非対称 I T R 対を有する場合は、互いに対して異なる配列及び異なる三次元形状を有し得る。F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクター中の、c e D N A - プラスミドを生成するために使用するための例示的な非対称 I T R は、表 5 A 及び 5 B に示されている。

【 0 2 3 3 】

代替実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、2 つの対称的な m o d - I T R を含む。すなわち、両方の I T R は、同じ配列を有するが、互いの逆相補体（逆位）である。いくつかの実施形態では、対称 m o d - I T R 対は、同じ A A V 血清型からの野生型 I T R 配列と比較して、欠失、挿入、又は置換の少なくとも 1 つ又は任意の組み合わせを含む。対称 I T R の付加、欠失、又は置換は同じであるが、互いの

逆相補体である。例えば、5' I T RのC領域への3ヌクレオチドの挿入は、3' I T RのC'領域の対応するセクションへの3つの逆相補ヌクレオチドの挿入に反映される。単に説明の目的でのみ、付加が5' I T RのA A C Gである場合、付加は、対応する部位における3' I T RのC G T Tである。例えば、5' I T Rセンス鎖が

【化2】

ATCGATCG

であり、GとAとの間に

【化3】

AACG

10

の付加を伴い、配列

【化4】

ATCGAACGATCG (配列番号51)

をもたらす場合。対応する3' I T Rセンス鎖は、

【化5】

CGATCGAT (ATCGATCGの逆相補体)

20

であり、TとCとの間に

【化6】

CGTT

(すなわち、A A C Gの逆相補体)の付加を伴い、配列

【化7】

CGATCGTTTCGAT (配列番号49)

【化8】

(ATCGAACGATCGの逆相補体) (配列番号51)

30

をもたらす。

【0234】

代替実施形態では、修飾型I T R対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型I T R対は、異なる配列を有し得るが、対応する又は同じ対称の三次元形状を有し得る。例えば、1つの修飾型I T Rは、1つの血清型に由来し得、他の修飾型I T Rは、異なる血清型に由来し得るが、それらは同じ領域において同じ変異(例えば、ヌクレオチド挿入、欠失、又は置換)を有する。言い換えると、単なる説明の目的で、5' m o d - I T Rは、A A V 2に由来し得、C領域に欠失を有し、3' m o d - I T Rは、A A V 5に由来し得、C'領域に対応する欠失を有する。5' m o d - I T R及び3' m o d - I T Rが同じ又は対称な三次元空間構成を有することを条件として、それらは本明細書における修飾型I T R対としての使用に包含される。

40

【0235】

いくつかの実施形態では、実質的に対称のm o d - I T R対は、三次元空間で同じA、C - C'及びB - B'ループを有する。例えば、実質的に対称のm o d - I T R対の修飾型I T RがC - C'アームの欠失を有する場合、同族のm o d - I T Rは、C - C'ループの対応する欠失を有し、またその同族のm o d - I T Rの幾何学的空間に同じ形状の残りのA及びB - B'ループの同様の三次元構造を有する。単なる例として、実質的に対称のI T Rは、それらの構造が幾何学的空間において同じ形状であるように、対称空間構成を有し得る。これは、例えば、G - C対が、例えばC - G対に、若しくはその逆に修飾された

50

とき、又は A-T 対が T-A 対に、若しくはその逆に修飾されたときに起こり得る。したがって、

【化 9】

ATCGAACGATCG (配列番号 51)

としての修飾型 5' ITR、及び

【化 10】

CGATCGTTCGAT (配列番号 49)

としての修飾型 3' ITR (すなわち、

【化 11】

ATCGAACGATCG

10

の逆相補体 (配列番号 51)) の上記の例示的な実施例を使用し、例えば、5' ITR が

【化 12】

ATCGAACCATCG

の配列 (配列番号 50) を有していた場合 (付加部の G は、C に修飾される)、これらの修飾型 ITR は、依然として対称であり、実質的に対称の 3' ITR は、付加部の T を対応する a に修飾することなく、

【化 13】

CGATCGTTCGAT

20

の配列 (配列番号 49) を有する。いくつかの実施形態では、修飾型 ITR 対が対称立体化学を有するため、そのような修飾型 ITR は、実質的に対称である。

【0236】

表 6 は、FIX タンパク質の発現のための ceDNA ベクターで使用するための、例示的な対称修飾型 ITR 対 (すなわち、左修飾型 ITR 及び対称右修飾型 ITR) を示す。配列の太字 (赤) 部分は、図 31A ~ 46B にも示される、部分的な ITR 配列 (すなわち、A-A'、C-C'、及び B-B' ループの配列) を識別する。これらの例示的な修飾型 ITR は、RBE である GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (配列番号 60)、スパーサーである ACTGAGGC (配列番号 69)、スパーサー補体 GCCTCAGT (配列番号 70)、及び RBE' (すなわち、RBE に対する補体) である GAGCGAGCGAGCGCGC (配列番号 71) を含み得る。

30

40

50

【表 6】

表 6：F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターにおける例示的な対称修飾型 I T R 対

左修飾型 ITR (修飾型 5' ITR)		対称右修飾型 ITR (修飾型 3' ITR)	
ITR-33 左	配列番号 32	ITR-18、右	配列番号 15
ITR-34 左	配列番号 33	ITR-51、右	配列番号 48
ITR-35 左	配列番号 34	ITR-19、右	配列番号 16
ITR-36 左	配列番号 35	ITR-20、右	配列番号 17
ITR-37 左	配列番号 36	ITR-21、右	配列番号 18
ITR-38 左	配列番号 37	ITR-22 右	配列番号 19
ITR-39 左	配列番号 38	ITR-23、右	配列番号 20
ITR-40 左	配列番号 39	ITR-24、右	配列番号 21
ITR-41 左	配列番号 40	ITR-25 右	配列番号 22
ITR-42 左	配列番号 41	ITR-26 右	配列番号 23
ITR-43 左	配列番号 42	ITR-27 右	配列番号 24
ITR-44 左	配列番号 43	ITR-28 右	配列番号 25
ITR-45 左	配列番号 44	ITR-29、右	配列番号 26
ITR-46 左	配列番号 45	ITR-30、右	配列番号 27
ITR-47、左	配列番号 46	ITR-31、右	配列番号 28
ITR-48、左	配列番号 47	ITR-32 右	配列番号 29

10

20

【0237】

いくつかの実施形態では、非対称 I T R 対を含む F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、本明細書の表 5 A ~ 5 B のいずれか 1 つ以上に示される I T R 配列若しくは I T R 部分配列、或いはその全体が本明細書に組み込まれる 2018 年 12 月 6 日に出願された国際特許出願第 P C T / U S 2018 / 064242 号の図 7 A ~ 7 B に示されているか、又は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる 2018 年 9 月 7 日に出願された国際特許出願第 P C T / U S 18 / 49996 号の表 2、3、4、5、6、7、8、9、若しくは 10 A ~ 10 B に開示されている配列における修飾のうちのいずれかに対応する修飾を有する I T R を含み得る。

30

【0238】

V. 例示的な c e D N A ベクター

上記のように、本開示は、組換え c e D N A 発現ベクター、及び上記の非対称の I T R 対、対称の I T R 対、又は実質的に対称の I T R 対のうちのいずれか 1 つを含む F I X タンパク質をコードする c e D N A ベクターに関する。ある特定の実施形態では、本開示は、隣接する I T R 配列及び導入遺伝子を有する F I X タンパク質の発現のための組換え c e D N A ベクターに関し、I T R 配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、又は実質的に対称であり、c e D N A は、隣接する I T R の間に位置する関心対象の核酸配列（例えば、導入遺伝子の核酸を含む発現カセット）を更に含み、当該核酸分子は、ウイルスカプシドタンパク質コード配列を欠いている。

40

【0239】

F I X タンパク質の発現のための c e D N A 発現ベクターは、少なくとも 1 つの I T R が変更されている場合、本明細書に記載される核酸配列を含む組換え D N A 手順に都合よく供することができる任意の c e D N A ベクターであってもよい。本開示の F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、c e D N A ベクターが導入される宿主細胞と適合性がある。ある特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、直鎖状かつであってもよ

50

い。ある特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、染色体外実体として存在し得る。ある特定の実施形態では、本開示の c e D N A ベクターは、宿主細胞のゲノムへのドナー配列の組み込みを可能にするエレメントを含有し得る。本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」、「核酸配列」及び「異種核酸配列」は同義であり、本明細書に記載されるように、F I X タンパク質をコードする。

【0240】

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

10

20

【0241】

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

【0242】

A. 調節エレメント。

本明細書で定義される非対称の I T R 対又は対称の I T R 対を含む、本明細書に記載される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、シス調節エレメントの特定の組み合わせを更に含み得る。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、m i r 調節エレメント、転写後調節エレメント、組織及び細胞型特異的プロモーター、並びにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なプロモーターは、表7に列挙される。例示的なエンハンサーは、表8に列挙される。いくつかの実施形態では、I T R は、導入遺伝子、例えば、F I X タンパク質のプロモーターとして作用し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成分、例えば、本明細書に記載される調節スイッチを含み、導入遺伝子、又はその F I X タンパク質をコードする c e D N A ベクターを含む細胞を殺傷し得るキルスイッチの発現を調節する。本開示で使用され得る調節スイッチを含む調節エレメントは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際特許出願第 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 号においてより完全に論じられている。

30

40

【0243】

実施形態では、第2の核酸配列は、調節配列、及びヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む。ある特定の実施形態では、遺伝子調節配列は、ヌクレアーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結されている。ある特定の実施形態では、調節配列は、宿主細胞におけるヌクレアーゼの発現を制御するのに適している。ある特定の実施形態では、調節配列は、本開示のヌクレアーゼをコードする核酸配列などのプロモーター配列に作動可能に連結された遺伝子の転写を指示することができる、好適なプロモーター配列を含む。ある特定の実施形態では、第2の核酸配列は、ヌクレアーゼをコードする核酸配列の5'末端に連結されたイントロン配列を含む。ある特定の実施形態では、エンハンサー配列がプロモ-

50

ターの上流に提供されて、プロモーターの効力を増大させる。ある特定の実施形態では、調節配列は、エンハンサー及びプロモーターを含み、第2の核酸配列は、ヌクレアーゼをコードする核酸配列の上流のイントロン配列を含み、イントロンは、1つ以上のヌクレアーゼ切断部位を含み、プロモーターは、ヌクレアーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結されている。

【0244】

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

10

【0245】

(i) . プロモーター :

当業者は、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターで使用されるプロモーターが、それらが促進する特定の配列に対して適切に調整されるべきであることを理解するであろう。ceDNAベクターにおいて有用な導入遺伝子(例えば、FIX)に作動可能に連結された例示的なプロモーターの配列識別子は、本明細書の表7に開示されている。

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 7 : 例示的なプロモーター

説明	長さ	組織特異性	CG含量	配列番号
ニワトリB-アクチンコアプロモーター;構成的CAGプロモーターセットの一部	278	構成的	33	200
hAATプロモーター;HAATプロモーターセットの一部	348	肝臓	12	201
CpG不含ヒトEF1aコアプロモーター(3'配列AAGCTTはスパーサー/制限酵素切断部位であってもよく、吸収された);CETプロモーターセットの一部	226	構成的	0	202
マウスTTR肝臓特異的プロモーター(3'CTCCTGはスパーサー/制限酵素切断部位であってもよく、吸収された);CRM8 VandenDriesscheプロモーターセットの一部	225	肝臓	5	203
BMN270由来のHLPプロモーター	143	肝臓	5	204
SPK-8011由来の変異TTRプロモーター	222	肝臓	4	205
Sangamo CRMSBS2-Intron3由来のTTRプロモーター	223	肝臓	4	206
内因性hFIXプロモーター(5'隣接ゲノム配列の-3000~-1)	3000	内因性	21	207
hFIX由来のhAATプロモーター	205	肝臓	10	208
SPK9001由来のhAATプロモーター	397	肝臓	12	209
内因性hG6Paseプロモーター(5'隣接の-2864~-1)	2864	内因性(肝臓)	28	210
ヒトロドプシンキナーゼ(GRK1)プロモーター(genbankエントリーAY327580の1793~2087)	295	光受容体	11	211
切断hAATコアプロモーター;LP1プロモーターセットの一部	206	肝臓	10	212
ヒトEF-1aプロモーター(EF-1aイントロンAを含む)	1179	構成的	94	213

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

hRKプロモーター-ヒトロドプシンキナーゼ(GRK1)プロモーター(genbankエントリーAY327580の1793~2087)とほぼ同一であるが、起源が不明なインデルがいくつかある。	292	光受容体	11	214
光受容体間レチノイド結合タンパク質(IRBP)プロモーター配列	1325	光受容体	14	215
CpGmin CME Enhancer、SV40_Enhancer_Invivogen、及びCpG不含hEF1aコアプロモーターを含むプロモーターセット	883	構成的	0	216
SV40_Enhancer_Invivogen、CpG不含hEF1aコアプロモーター、及びCET Intronを含むプロモーターセット	639	構成的	0	217
CpGmin hAATプロモーターセット;CpGmin APOe-CR hAATエンハンサー、hAATコアプロモーター、及びCpGmin hAAT-Intronを含む	1272	肝臓	24	218
LP1プロモーターセット;hAAT-HCR_LP1_Enhancer、hAAT_LP1_promoter、及びhAAT-Intronを含む	547	肝臓	14	219
5つのCpGを含む合成CRM8 TBGプロモーターセット;HS-CRM8_SERP_Enhancer、TBGプロモーター、及びMVMイントロンの2つのコピーを含む	709	肝臓	5	220
TBGコアプロモーター(チロキシン結合グロブリン;肝臓特異的)	460	肝臓	1	221
18個のCpGを含む合成CRM8 LP1プロモーターセット;HS-CRM8_SERP_Enhancer、hAPO-HCR_LP1_Enhancer、hAAT_LP1_promoter、及びhAAT-Intronの2つのコピーを含む	699	肝臓	18	222
合成mic/bik TBGプロモーターセット;mic/bikエンハンサー、TBGコアプロモーターの2つのコピーを含む;イントロンを含まない	681	肝臓	1	223
合成ヒトCEFIプロモーターセット;human_CMV_Enhancer及びhEF1aコアプロモーターを含む	532	構成的	0	224

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

合成ヒトCEFIプロモーターセット; murine_CMV_Enhancer、 human_CMV_Enhancer、及びhEF1aコアプロモーターを(この順序で)含む	955	構成的	0	225
合成ヒトCEFIプロモーターセット; human_CMV_Enhancer、 murine_CMV_Enhancer、及びhEF1aコアプロモーターを(この順序で)含む	955	構成的	0	226
CMVエンハンサー、gB-actin_promoter、及びCAG-intronを含む構成的プロモーターセット	1923	構成的	192	227
hAATプロモーターセット;APOe-CR hAATエンハンサー、hAATコアプロモーター、及びhAATイントロンを含む(hAAT 5'UTR及びmodSV40イントロンで構成される)	1272	肝臓	26	228
CpG不含CETプロモーターセット; murine_CMV_Enhancer、hEF1aコアプロモーター、及びCET合成イントロンを含む	826	構成的	0	229
正準VandenDriesscheプロモーターセット; HS-SERP_Enhancer、TTR肝臓特異的プロモーター、及びMVMイントロンの1つのコピーを含む	399	肝臓	9	230
CMVエンハンサー及びCMVプロモーターを含む構成的プロモーターセット(イントロンなし)	654	構成的	33	231
マウスホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター	500	構成的	39	232
SV40+ヒトアルブミンInvivogenプロモーターセット; SV40エンハンサー(Invivogen)及びhuAlbプロモーター(Invivogen)を含む	450	肝臓	3	233
CMVエンハンサー+ヒトアルブミンInvivogenプロモーターセット; CMVエンハンサー及びhuAlbプロモーター(Invivogen)を含む	594	肝臓	22	234
ヒトUBCプロモーター	1210	構成的	95	235
内因性hGFAPプロモーター(5' 3kb領域)	3000	ミューラー細胞	44	236

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

内因性hRLBP1プロモーター(5' 3kb領域)	3000	ミューラー細胞	32	237
マウスRPE65プロモーター	718	RPE細胞	2	238
ラットEF-1aプロモーター	1313	構成的	102	239
SV40_Enhancer_Oz及び human_FullLength_EF1aプロモーターから 構成されるヒトEF-1aプロモーターセット	1420	構成的	95	240
CMV_Enhancer及びrat_FullLength_EF1aプロモーターから構成されるラットEF-1aプロモーターセット	1831	構成的	124	241
内因性hABCB11プロモーター(5' 3kb領域)	3000	内因性(肝臓)	21	242
内因性hFIXプロモーター(5' 3kb領域)	3095	内因性(肝臓)	37	243
マウスCD44プロモーター配列	1807	ミューラー細胞	34	244
内因性hABCB4プロモーター(5' 3kb領域)	3000	内因性(肝臓)	91	245
NG_008472.1のヒトRPE65プロモーター(-742:+15)	757	RPE細胞	1	246
tMCKプロモーター。マウスMCKプロモーターの[-80:+7]が続く2R5Sエンハンサー配列のトリプレット反復	720	筋	16	247
MHCK7プロモーター	772	筋	16	248
rAAVrh74.MCK GALGT2由来のMCKプロモーター(Utrophinの使用を促進するSereptaのジストログリカン修飾療法)。MCKコアプロモーター(351bp)に融合したマウスMCKコアエンハンサー(206bp)由来	558	筋	12	249
rAAVrh74.MCK GALGT2由来のMCKプロモーター/5pUTR(ユートロフィンUtrophinの使用を促進するSereptaのジストログリカン修飾療法)	766	筋	21	250
SV40イントロンに連結されたMHCK7プロモーターを含む	961	筋	25	251

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

ヒトデスミン遺伝子由来の筋肉特異的プロモーター。転写開始部位の上流1.7kbからDESのエクソンI内の下流35bpまでの約1.7kbのヒトDESプロモーター/エンハンサー領域を含む。	1736	筋	39	252
Stargen pONY8.95CMVABCRコンストラクトで使用されるCMVエンハンサー+CMVプロモーター+5pUTR+Kozak	807	構成的	48	253
内因性hFIX ORF(-973~3)	973	内因性(光受容体)	17	254
筋肉特異的CK8プロモーター	450	筋	9	255
筋肉特異的ヒトcTnT_Promoter	455	筋	4	256
内因性hABC4プロモーター(5' 3050bp領域)	3050	内因性(肝臓)	91	257
内因性hUSH1bプロモーター(5' 3kb領域)	3000	内因性(光受容体)	49	258
内因性hUSH2aプロモーター(5' 3kb領域)	3000	内因性(光受容体)	21	259
CMVエンハンサー、ユビキチンCエンハンサーエレメント、及びニワトリB-アクチンコアプロモーターを含むCASIプロモーターセット	1053	構成的	99	260
内因性hABC4プロモーター(5' 3kb領域)	3000	内因性(肝臓)	38	261
内因性hABC4プロモーター(5' 3.1kb領域)	3102	肝臓	33	262
マウスアルブミンプロモーター(muAlbエンハンサー領域+コアmuAlbプロモーター)	2337	肝臓	15	263
キメラプロモーターhAPOeエンハンサー+TBGコアプロモーター+modSV40intron	1330	肝臓	14	264
mCMVエンハンサー+EF-1aコアプロモーター+SI 126イントロン	937	構成的	21	265
LSPプロモーター#2-合成mTTRenhプロモーターShire	367	肝臓	11	266
LSPプロモーター#4-HS-CRM8 2x SerpEnh TTRmin MVMIntron	468	肝臓	9	267

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

LSPプロモーター#5-HS-CRM1 AlbEnh TTRmin MVM	426	肝臓	7	268
LSPプロモーター#6-HS-CRM2 Apo4Enh TTRmin MVM	396	肝臓	7	269
LSPプロモーター#7-HS-CRM10 Enh TTRmin MVM	495	肝臓	6	270
LSPプロモーター#8-HS-CRM8 SerpEnh huTBGpro MVM	640	肝臓	4	271
LSPプロモーター#9-HS-CRM1 AlbEnh huTBGpro MVM	667	肝臓	3	272
LSPプロモーター#10-HS-CRM2 Apo4Enh huTBGpro MVM	637	肝臓	3	273
LSPプロモーター#11-HS-CRM10 Enh huTBGpro MVM	736	肝臓	2	274
LSPプロモーター#12-HS-CRM8 SerpEnh muAlbpro MVM	515	肝臓	6	275
LSPプロモーター#13-HS-CRM1 AlbEnh muAlbpro MVM	542	肝臓	5	276
LSPプロモーター#14-HS-CRM2 Apo4Enh muAlbpro MVM	512	肝臓	5	277
LSPプロモーター#15-HS-CRM10 Enh muAlbpro MVM	611	肝臓	4	278
LSPプロモーター#16-CRM8 SerpEnh huAlbpro MVM	355	肝臓	5	279
LSPプロモーター#17-HS-CRM1 AlbEnh huAlbpro MVM	382	肝臓	4	280
LSPプロモーター#18-HS-CRM2 Apo4Enh huAlbpro MVM	352	肝臓	4	281
LSPプロモーター#19-HS-CRM10 Enh huAlbpro MVM	451	肝臓	3	282
LSPプロモーター#20-HS-CRM8 SerpEnh huAATpro MVM	430	肝臓	13	283
LSPプロモーター#21-HS-CRM1 AlbEnh huAATpro MVM	457	肝臓	12	284
LSPプロモーター#22-HS-CRM2 Apo4Enh huAATpro MVM	427	肝臓	12	285
LSPプロモーター#23-HS-CRM10 Enh huAATpro MVM	526	肝臓	11	286

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

LSPプロモーター#24-HS-CRM8 SerpEnh huAATpro SV40in	435	肝臓	14	287
LSPプロモーター#25-HS-CRM1 AlbEnh huAATpro SV40in	462	肝臓	13	288
LSPプロモーター#26-HS-CRM2 Apo4Enh huAATpro SV40in	448	肝臓	16	289
LSPプロモーター#27-HS-CRM10 Enh huAATpro SV40in	531	肝臓	12	290
LSPプロモーター#28-HS-CRM8 SerpEnh huTBGpro SV40in	636	肝臓	4	291
LSPプロモーター#29-HS-CRM1 AlbEnh huTBGpro SV40in	663	肝臓	3	292
LSPプロモーター#30-HS-CRM2 Apo4Enh huTBGpro SV40in	633	肝臓	3	293
LSPプロモーター#31-HS-CRM10 Enh huTBGpro SV40in	732	肝臓	2	294
LSPプロモーター#32-AMPBenh2x- huTBGpro SV40in	762	肝臓	4	295
LSPプロモーター#33-AMPBenh2x- huTBGpro MVM	766	肝臓	4	296

【 0 2 4 6 】

F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターの発現カセットは、全体発現レベルとともに細胞特異性に影響を及ぼし得るプロモーター、例えば表7から選択されるプロモーターのうちのいずれかを含み得る。導入遺伝子発現、例えば、F I Xタンパク質の発現の場合、それらは、非常に活発なウイルス由来の最初期プロモーターを含み得る。発現カセットは、導入遺伝子発現を特定の細胞型に制限し、無秩序な異所性発現から生じる毒性効果及び免疫反応を低減するために組織特異的真核生物プロモーターを含有し得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、C A Gプロモーター（配列番号72）などのプロモーター又は合成調節エレメントを含み得る。C A Gプロモーターは、（i）サイトメガロウイルス（C M V）早期エンハンサーエレメント、（i i）プロモーター、ニワトリβ-アクチン遺伝子の第1のエクソン及び第1のイントロン、並びに（i i i）ウサギβ-グロビン遺伝子のスプライスアクセプターを含む。代替的に、発現カセットは、α-1-抗トリプシン（A A T）プロモーター（配列番号73若しくは配列番号74）、肝臓特異的（L P 1）プロモーター（配列番号75若しくは配列番号76）、又はヒト伸長因子-1α（E F 1 a）プロモーター（例えば、配列番号77若しくは配列番号78）を含有し得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、1つ以上の構成的プロモーター、例えば、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（R S V）L T Rプロモーター（任意選択的にR S Vエンハンサーを有する）、又はサイトメガロウイルス（C M V）最初期プロモーター（任意選択的にC M Vエンハンサーを有する、例えば、配列番号79）を含む。代替的に、誘導性プロモーター、導入遺伝子の未変性プロモーター、組織特異的プロモーター、又は当該技術分野において既知の様々なプロモーターを使用することができる。

【 0 2 4 7 】

表 7 に記載のもの及び上記のものを含む好適なプロモーターは、ウイルスに由来し得るため、ウイルスプロモーターと称され得るか、又はそれらは、原核生物又は真核生物を含む任意の生物に由来し得る。好適なプロモーターを使用して、任意の RNA ポリメラーゼ（例えば、pol I、pol II、pol III）によって発現を駆動することができる。例示的なプロモーターとしては、SV40 初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス長末端反復（LTR）プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP）、単純ヘルペスウイルス（HSV）プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、例えば CMV 最初期プロモーター領域（CMVIE）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、ヒト U6 小核プロモーター（U6、例えば、配列番号 80）（Miyagishi et al., Nature Biotechnology 20, 497-500 (2002)）、強化 U6 プロモーター（例えば、Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep. 1; 31 (17)）、ヒト H1 プロモーター（H1）（例えば、配列番号 81 又は配列番号 155）、CAG プロモーター、ヒト $\alpha 1$ -抗トリプシン（HAAT）プロモーター（例えば、配列番号 82）などが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、これらのプロモーターは、それらの下流イントロン含有端で変更され、1 つ以上のヌクレアーゼ切断部位を含む。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ切断部位を含有する DNA は、プロモーター DNA に対して外来である。

10

【0248】

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

20

【0249】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、ヒトユビキチン C（hUbC）、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、又はヒトメタロチオネインなどのヒト遺伝子からのプロモーターであってもよい。プロモーターはまた、天然又は合成の、組織特異的プロモーター、例えば、肝臓特異的プロモーター、例えば、ヒト $\alpha 1$ -アンチタイプシン（HAAT）であり得る。一実施形態では、肝臓への送達は、肝細胞の表面上に存在する低密度リポタンパク質（LDL）受容体を介して、肝細胞への c e DNA ベクターを含む組成物の内因性 Apo E 特異的標的を使用して達成され得る。

30

【0250】

本開示に従う使用のための好適なプロモーターの非限定的な例としては、表 7 に列挙されたプロモーターのうちのいずれか、又は例えば、CAG プロモーター（配列番号 72）、HAAT プロモーター（配列番号 82）、ヒト EF1- α プロモーター（配列番号 77）、又は EF1a プロモーター（配列番号 78）、IE2 プロモーター（例えば、配列番号 84）、及びラット EF1- α プロモーター（配列番号 85）、mEF1 プロモーター（配列番号 59）、若しくは 1E1 プロモーター断片（配列番号 125）のうちのいずれかが挙げられる。

40

【0251】

（ii）エンハンサー

いくつかの実施形態では、FIX を発現する c e DNA は、1 つ以上のエンハンサーを含む。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列は、プロモーター配列の 5' に位置する。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列は、プロモーター配列の 3' に位置する。例示的なエンハンサーの配列識別子は、本明細書の表 8 に列挙される。

50

【表 8】

表 8：例示的なエンハンサー配列

説明	長さ	組織特異性	CG含量	配列番号
サイトメガロウイルスエンハンサー	518	構成的	22	300
ヒトアポリポタンパク質E/C-I肝臓特異的エンハンサー	777	肝臓	13	301
CpG不含マウスCMVエンハンサー	427	構成的	0	302
HS-CRM8 SERPエンハンサー	83	肝臓	4	303
ヒトアポリポタンパク質E/C-I肝臓特異的エンハンサー	777	肝臓	12	304
34bpのAPOe/c-Iエンハンサー及び32bpのAAT X領域	66	肝臓	1	305
侵襲配列及びhAPO-HCRエンハンサー	212	肝臓	4	306
SPK9001由来のhAPO-HCRエンハンサー	330	肝臓	4	307
hAPO-HCRエンハンサー	194	肝臓	3	308
SV40エンハンサー Invivogen	240	構成的	0	309
全てのスパーサー/切断部位が除去されたHS-CRM8 SERPエンハンサー	73	肝臓	2	310
アルファmic/bikエンハンサー	100	肝臓	0	311
CpG不含ヒトCMVエンハンサーv2	296	構成的	0	312
SV40エンハンサー	235	構成的	1	313

【0252】

(iii) 例示的な5'UTR配列及びイントロン配列

いくつかの実施形態では、cDNAベクターは、5'UTR配列及び／又は5'ITR配列の3'に位置するイントロン配列を含む。いくつかの実施形態では、5'UTRは、導入遺伝子、例えば、FIXタンパク質をコードする配列の5'に位置する。表9Aに列挙される例示的な5'UTR配列の配列識別子。

10

20

30

40

50

【表 9 A - 1】

表 9 A : 例示的な 5' UTR 配列及びイントロン配列

説明	長さ	参照文献	CG含量	配列番号
ニワトリB-アクチン5' UTR/イントロン及びウサギB-グロビンイントロン及び第1エクソンで構成される合成5' UTR要素	1127		137	315
修飾SV40イントロン	93		0	316
ORFのすぐ上流にあるhAATの5'UTR(3' CGGAはスパーサー/制限酵素切断部位である可能性があり、配列に吸収された)	54		1	317
CETプロモーターセット合成イントロン	173		0	318
マウス微小ウイルス(MVM)イントロン	91		0	319
hAATの5'UTR	54		0	320
modSV40イントロンと組み合わせたhAATの5'UTR	147		1	321
modSV40イントロンと組み合わせたhAATの5'UTR(3' TAATTAはスパーサー/制限酵素切断部位である可能性があり、配列に吸収された)	147		0	322
BMN270に由来するAATの5'UTRの42bp-コザックを含む	48	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29292164	1	323
EF1a1のイントロン/エンハンサー	128	US2017/0216408	6	324
Sangamo CRMSBS2-イントロン3由来の合成SBRイントロン-コザックを含む	98	WO2017/074526	2	325
内因性hFIX5'UTR	172	NG_011403.1	0	326
hAAT5'UTR+modSV40+コザック	160	http://www.bloodjournal.org/content/early/2005/12/01/blood-2005-10-4035?sso-checked=true	1	327

10

20

30

40

50

【表 9 A - 2】

hFIX5' UTR及びコザック	29	US2016/03751 10	0	328
キメライントロン	133	U47119.2	2	329
ヒトアルファ-1アンチトリプシン (AAT)5' UTRの大断片	341		9	330
5pUTR	316	US9644216	6	331
ヒトcDNA ABCB4 5pUTR(変異体 A、優勢イソ型)	76	NM_000443	8	332
ヒトcDNA ABCB11 5pUTR	127	NM_003742	2	333
ヒトG6Pase 5pUTR	80	NM_000151.3	0	334
rAAVrh74.MCK GALGT2由来の MCK5pUTR。53bpの内因性マウス MCKエクソン1(非翻訳)、SV40後期 16S/19Sスプライシングナル、ブラ スミドpCMVB由来の5pUTRが含ま れる。	208	https://patentimages.storage.googleapis.com/4f/8a/d6/b915c650f5eeb5/WO2017049031A1.pdf	8	335
CpG不含5' UTR合成(SII26)イント ロン	159		0	336
ヒトチトクロームb-245アルファ鎖 (CYBA)遺伝子の5'UTR	36	(NM_000101.4)	5	337
ヒト2,4-ジエノイル-CoAレダクタ ーゼ1(DECRI)遺伝子の5'UTR	141	(NM_0013305 75.1)	14	338
ヒトグリア成熟因子ガンマ(GMFG) 遺伝子の5'UTR	110	(NM_0013010 08.1)	4	339
ヒト後期エンドソーム/リソソーム アダプター、MAPK及びMTOR活性 因子2(LAMTOR2)の5'UTR	164	(NM_0011452 64.1)	13	340
ヒトミオシン軽鎖6B(MYL6B)の 5'UTR	127	(NM_002475.4)	8	341
ヒトアルファ-1アンチトリプシン (AAT)5' UTRの大断片	341		9	342

【0253】

(iv) 3' UTR 配列

いくつかの実施形態では、cDNAベクターは、3' ITR配列の5'に位置する3' UTR配列を含む。いくつかの実施形態では、3' UTRは、導入遺伝子、例えば、FIXタンパク質をコードする配列の3'に位置する。表9Bに列挙される例示的な3' UTR配列の配列識別子。

10

20

30

40

【表 9 B】

表 9 B：例示的な 3' UTR 配列及びイントロン配列

説明	長さ	参照文献	CG含量	配列番号
WHP転写後応答要素	581		20	345
mir-142結合部位のトリプレット反復	77		1	346
SPK9001由来のhFIX3' UTR及びポリA スパーサー	88	US2016/03 75110	0	347
ヒトヘモグロビンベータ(HBB)3pUTR	395		1	348
インターフェロンベータS/MAR(足場/マ トリックスに関連する領域)	800		0	349
ベータ-グロブリンMAR(マトリックスに 関連する領域)	407		0	350
ヒトアルブミン3' UTR配列	186		1	351
CpG最小化HBB 3pUTR	395		0	352
WHP転写後応答要素。3' シトシン欠損。	580		20	353
ヒトチトクロームb-245アルファ鎖 (CYBA)遺伝子の3'UTR	64	(NM_0001 01.4)	5	354
最小限のガンマ及びアルファ要素を有 する短縮WPRE3配列	247	WPRE3 ref https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975461/	10	355
ヒトヘモグロビンベータ(HBB)3pUTR	144		1	356
WPRE 3pUTR要素の最初の62bp	62		1	357

【0254】

(v) . ポリアデニル化配列：

ポリアデニル化配列をコードする配列は、c e D N A ベクターから発現された m R N A を安定化するため、及び核輸送及び翻訳を助けるために、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクター中に含まれ得る。一実施形態では、c e D N A ベクターは、ポリアデニル化配列を含まない。他の実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50、又はそれ以上のアデニンジヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、約 43ヌクレオチド、約 40～50ヌクレオチド、約 40～55ヌクレオチド、約 45～50ヌクレオチド、約 35～50ヌクレオチド、又はその間の任意の範囲を含む。

【0255】

発現カセットは、当技術分野で既知の任意のポリアデニル化配列又はその変形を含むこ

とができる。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化（ポリA）配列は、表10に列挙されたもののいずれかから選択される。当該技術分野で一般的に知られている他のポリA配列も使用することができ、例えば、ウシBGHpA（例えば、配列番号68）又はウイルスSV40pA（例えば、配列番号86）から単離された天然に存在する配列、又は合成配列（例えば、配列番号87）を含むが、これらに限定されない。いくつかの発現カセットはまた、SV40後期ポリAシグナル上流エンハンサー（USE）配列を含み得る。いくつかの実施形態では、USE配列は、SV40pA又は異種ポリAシグナルと組み合わせて使用され得る。ポリA配列は、FIXタンパク質をコードする導入遺伝子の3'に位置する。

【0256】

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

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10：例示的なポリ A 配列の配列識別子

説明	長さ	参考文献	CG 含量	配列番号
ウシ成長ホルモンターミネーター及び ポリアデニル化配列。	225		3	360
BMN270由来の合成ポリ A	49	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29292164	0	361
SPK8011由来の合成ポリ A	54	US2017/0216408	2	362
Sangamo_CRMSBS2-イントロン3由来の 合成ポリ A 及び遮断配列	74	WO2017/074526	2	363
SV40後期ポリ A 及びhFIX由来の3' 遮断 配列	143	http://www.bloodjournal.org/content/early/2005/12/01/blood-2005-10-4035?sso-checked=true	1	364
SPK9001由来のbGHポリ A	228	US2016/0375110	0	365
CpG 不含SV40ポリ A	222		0	366
SV40後期ポリ A	226		0	367
A64ポリ A配列及びC30ヒストンステム ループ配列を含むC60pAC30HSLポリ A	129		0	368
SV40ポリ Aを含むJ.Chou G6Pase構築物 で使用されるポリ A	232	US9644216	4	369
SV40ポリアデニル化シグナル	135		0	370
ヘルペスウイルスチミジンキナーゼポリ リアデニル化シグナル	49		4	371
SV40後期ポリアデニル化シグナル	226		0	372
ヒトアルブミン3' UTR及びターミネー ター/ポリ A配列	416		2	373
ヒトアルブミン3' UTR及びターミネー ター/ポリ A配列	415		2	374
CpG 不含、短いSV40ポリ A	122		0	375
CpG 不含、短いSV40ポリ A	133		0	376

【0257】

(v i) . 核局在化配列

いくつかの実施形態では、FIXタンパク質の発現のためのcDNAベクターは、1つ以上の核局在化配列(NLS)、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上のNLSを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のNLSは、アミノ末端又はその近く、カルボキシ末端又はその近く、又はこれらの組み合わせ(例えば、アミノ末端における1つ以上のNLS及び／又はカルボキシ末端における1つ以上のNLS)に位置する。2つ以上のNLSが存在する場合、各々を他のNLSから独立して選択することができ、それにより、単一のNLSが2つ以上のコピーに、及び／又は1つ以上の

コピーに存在する1つ以上の他のNLSと組み合わせて存在する。NLSの非限定的な例の配列識別子を表11に示す。

【表11】

表11：核局在化配列

起源	配列番号
SV40ウイルスの大きなT抗原	90
ヌクレオプラスミン	92
c-myc	93
	94
hRNPA1 M9	95
インポーチン- α からのIBBドメイン	96
筋腫Tタンパク質	97
	98
ヒトp53	99
マウスc-abl IV	100
インフルエンザウイルスNS1	117
	118
肝炎ウイルス δ 抗原	119
マウスMx1タンパク質	120
ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ	121
ステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイド	122

10

20

30

40

50

【0258】

B. ceDNAベクターの追加の構成成分

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

できる。

【0259】

C. 調節スイッチ

分子調節スイッチは、シグナルに反応して、状態の測定可能な変化を生成するものである。そのような調節スイッチは、本明細書に記載されるF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターと有用に組み合わせて、c e D N AベクターからのF I Xタンパク質の発現の出力を制御することができる。いくつかの実施形態では、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターは、F I Xタンパク質の発現を微調整するのに役立つ調節スイッチを含む。例えば、c e D N Aベクターの生物学的封じ込め機能として役立ち得る。いくつかの実施形態では、スイッチは、c e D N AベクターにおけるF I Xタンパク質の発現を制御可能かつ調節可能な様式で開始又は停止（すなわち、シャットダウン）するように設計された「オン／オフ」スイッチである。いくつかの実施形態では、スイッチは、一旦スイッチが起動されると、c e D N Aベクターを含む細胞がプログラム細胞死を受けるよう指示することができる「キルスイッチ」を含み得る。F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターでの使用に含まれる例示的な調節スイッチは、導入遺伝子の発現を調節するために使用することができ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際出願第P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6号においてより完全に論じられている。

【0260】

(i) バイナリ調節スイッチ

いくつかの実施形態では、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターは、F I Xタンパク質の発現を制御可能に調整するのに役立ち得る調節スイッチを含む。例えば、c e D N AベクターのI T Rの間に位置する発現カセットは、追加として、F I Xタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結された調節領域、例えば、プロモーター、シスエレメント、リプレッサー、エンハンサーなどを含み得、この調節領域は、1つ以上の共因子又は外因性薬剤によって調節される。単なる例として、調節領域は、小分子スイッチ又は誘導性若しくは抑制性プロモーターによって調節され得る。誘導性プロモーターの非限定的な例は、ホルモン誘導性又は金属誘導性プロモーターである。他の例示的な誘導性プロモーター／エンハンサーエレメントとしては、R U 4 8 6 誘導性プロモーター、エクジソン誘導性プロモーター、ラパマイシン誘導性プロモーター、及びメタロチオネインプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0261】

(i i) 小分子調節スイッチ

様々な当該技術分野において既知の小分子ベース調節スイッチは、当該技術分野において既知であり、本明細書に開示されるF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターと組み合わせて、調節スイッチによって制御されるc e D N Aベクターを形成することができる。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、直交リガンド／核受容体対、例えば、レチノイド受容体バリエーション／L G 3 3 5 及びG R Q C I M F I (T a y l o r , e t a l . , B M C B i o t e c h n o l o g y 1 0 (2 0 1 0) : 1 5 に開示されるものなどの、作動可能に連結された導入遺伝子の発現を制御する人工プロモーターとともに)、操作されたステロイド受容体、例えば、プロゲステロンに結合することはできないが、R U 4 8 6 (ミフェプリストン)には結合するC末端切断を有する修飾型プロゲステロン受容体(米国特許第5,364,791号)、D r o s o p h i l aからのエクジソン受容体及びそれらのエクジステロイドリガンド(S a e z , e t a l . , P N A S , 9 7 (2 6) (2 0 0 0) , 1 4 5 1 2 - 1 4 5 1 7)、又はS a n d o R 3rd; N a t M e t h o d s . 2 0 1 3 , 1 0 (1 1) : 1 0 8 5 - 8 に開示される抗生物質トリメトプリム(T M P)によって制御されるスイッチのうちのいずれか1つ又は組み合わせから選択され得る。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターによって発現される導入遺伝子を制御するための調節スイッチは、米国特許第8,771,679号及び同第6,339,070号に開示されるものなどのプロドラッグ活性化スイッチである。

【0262】

10

20

30

40

50

(i i i) 「パスコード」調節スイッチ

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

【 0 2 6 3 】

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

【 0 2 6 4 】

本明細書に開示される調節スイッチ、例えば、小分子スイッチ、核酸ベーススイッチ、小分子-核酸ハイブリッドスイッチ、転写後導入遺伝子調節スイッチ、翻訳後調節放射線制御スイッチ、低酸素媒介性スイッチ、及び本明細書に開示される当業者に既知の他の調節スイッチのうちのいずれか及び全ての組み合わせを、本明細書に開示されるパスコード調節スイッチにおいて使用することができる。使用のために包含される調節スイッチはまた、レビュー論文 K i s e t a l . , J R S o c I n t e r f a c e . 1 2 : 2 0 1 4 1 0 0 0 (2 0 1 5) において論じられ、K i s の表 1 に要約されている。いくつかの実施形態では、パスコード系で使用するための調節スイッチは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際特許出願第 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 号の表 1 1 に開示されるスイッチのうちのいずれか又はそれらの組み合わせから選択することができる。

【 0 2 6 5 】

(i v) . 導入遺伝子発現を制御するための核酸系調節スイッチ

いくつかの実施形態では、c e D N A によって F I X タンパク質の発現を制御するための調節スイッチは、核酸ベース制御機序に基づく。例示的な核酸制御機序は、当該技術分野において既知であり、使用が想定される。例えば、そのような機序としては、リボスイッチ、例えば、U S 2 0 0 9 / 0 3 0 5 2 5 3、U S 2 0 0 8 / 0 2 6 9 2 5 8、U S 2 0 1 7 / 0 2 0 4 4 7 7、W O 2 0 1 8 / 0 2 6 7 6 2 A 1、米国特許第 9, 2 2 2, 0 9 3 号、及び欧州特許出願第 2 8 8 0 7 1 号に開示されるもの、また V i l l a J K e t a l . , M i c r o b i o l S p e c t r . 2 0 1 8 M a y ; 6 (3) によるレビューに開示されるものなどが挙げられる。W O 2 0 1 8 / 0 7 5 4 8 6 及び W O 2 0

17 / 147585に開示されるものなどの、代謝物反応性転写バイオセンサーもまた含まれる。使用が想定される他の当該技術分野において既知の機序としては、siRNA又はRNAi分子（例えば、miR、shRNA）による導入遺伝子のサイレンシングが挙げられる。例えば、ceDNAベクターは、ceDNAベクターによって発現される導入遺伝子の一部に対して相補的であるRNAi分子をコードする調節スイッチを含み得る。導入遺伝子（例えば、FIXタンパク質）は、ceDNAベクターによって発現されたとしてもそのようなRNAiが発現される場合、相補的RNAi分子によってサイレンシングされ、導入遺伝子がceDNAベクターによって発現されたときにRNAiが発現されない場合、導入遺伝子（例えば、FIXタンパク質）は、RNAiによってサイレンシングされない。

10

【0266】

いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、US2002/0022018に開示される組織特異的自己不活化調節スイッチであり、これにより調節スイッチは、そうでなければ導入遺伝子発現が不利益となり得る部位において、導入遺伝子（例えば、FIXタンパク質）を意図的にスイッチオフする。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、US2014/0127162及び米国特許第8,324,436号に開示されるリコンビナーゼ可逆的遺伝子発現系である。

【0267】

(v)．転写後及び翻訳後調節スイッチ。

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターによってFIXタンパク質の発現を制御するための調節スイッチは、転写後修飾系である。例えば、そのような調節スイッチは、US2018/0119156、GB2011/07768、WO2001/064956A3、欧州特許第2707487号、及びBeilstein et al., ACS Synth. Biol., 2015, 4(5), pp526-534、Zhong et al., Elife. 2016 Nov 2; 5. pii: e18858に開示されるように、テトラサイクリン又はテオフィリンに感受性であるアプタザイムリボスイッチであり得る。いくつかの実施形態では、当業者であれば、導入遺伝子、及びリガンド感受性（オフスイッチ）アプタマーを含有し、その最終結果がリガンド感受性オンスイッチである、阻害性siRNAの両方をコードすることができると想定される。

20

【0268】

(vi)．他の例示的な調節スイッチ

任意の既知の調節スイッチをceDNAベクター中で使用して、環境変化によってトリガーされるものを含む、ceDNAベクターによってFIXタンパク質の発現を制御することができる。追加の例としては、Suzuki et al., Scientific Reports 8; 10051 (2018)のBOC方法、遺伝コード拡張及び非生理的アミノ酸、放射線制御型又は超音波制御型オン／オフスイッチが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Scott S et al., Gene Ther. 2000 Jul; 7(13): 1121-5、米国特許第5,612,318号、同第5,571,797号、同第5,770,581号、同第5,817,636号、及びWO1999/025385A1を参照されたい）。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、米国特許第7,840,263号、US2007/0190028A1に開示される、埋め込み可能な系によって制御され、遺伝子発現は、ceDNAベクター中の導入遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを活性化する電磁エネルギーを含む、1つ以上のエネルギー形態によって制御される。

30

【0269】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターにおける使用が想定される調節スイッチは、低酸素媒介性又はストレス活性化スイッチ、例えば、WO1999/060142A2、米国特許第5,834,306号、同第6,218,179号、同第6,709,858号、US2015/0322410、Greco et al., (2004) Targeted Cancer Therapies 9, S368に開示されるものなど、

40

50

並びに F R O G、T O A D、及び N R S E エlement、及び条件的に誘導可能なサイレンス Element（例えば、米国特許第 9, 394, 526 号に開示される、低酸素反応 Element（H R E）、炎症反応 Element（I R E）、及び剪断応力活性化 Element（S S A E）を含む）である。そのような実施形態は、虚血後、又は虚血性組織及び／若しくは腫瘍において、c e D N A ベクターからの導入遺伝子の発現をオンにするために有用である。

【0270】

（v i i）．キルスイッチ

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

【0271】

当業者に知られている他のキルスイッチは、例えば U S 2010 / 0175141、U S 2013 / 0009799、U S 2011 / 0172826、U S 2013 / 0109568 に開示される、本明細書に開示されるような F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクター、並びに J u s i a k e t a l, R e v i e w s i n C e l l B i o l o g y a n d m o l e c u l a r M e d i c i n e ; 2014 ; 1-56、K o b a y a s h i e t a l., P N A S, 2004 ; 101 ; 8419-9、M a r c h i s i o e t a l., I n t. J o u r n a l o f B i o c h e m a n d C e l l B i o l., 2011 ; 43 ; 310-319、及び R e i n s h a g e n e t a l., S c i e n c e T r a n s l a t i o n a l M e d i c i n e, 2018, 11 に開示されるキルスイッチでの使用に包含される。

【0272】

したがって、いくつかの実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、エフェクター毒素又はレポータータンパク質をコードする核酸を含むキルスイッチ核酸構築物を含むことができ、エフェクター毒素（例えば、死タンパク質）又はレポータータンパク質の発現は、所定の条件によって制御される。例えば、所定の条件は、例えば外因性物質などの環境物質の存在であり得、それがなければ、細胞はデフォルトでエフェクター毒素（例えば、死タンパク質）の発現を起こして殺傷される。代替実施形態では、所定の条件は、2 つ以上の環境物質の存在であり、例えば、細胞は、2 つ以上の必要な外因性物質が供給された場合のみに生き残り、いずれもなければ、c e D N A ベクターを含む細胞が殺傷される。

【0273】

いくつかの実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、c e D N A ベクターを含む細胞を破壊するキルスイッチを組み込むように修飾され、c e D N A ベクターによって発現される導入遺伝子のインビボ発現（例えば、F I X タンパク質の発現）を効果的に終了させる。具体的には、c e D N A ベクターは、通常の生理学的条

件下で哺乳動物細胞では機能しないスイッチタンパク質を発現するように更に遺伝子操作される。このスイッチタンパク質を特異的に標的とする薬物又は環境条件を投与したときのみ、スイッチタンパク質を発現する細胞が破壊され、それにより治療用タンパク質又はペプチドの発現を終了させる。例えば、HSV-チミジンキナーゼを発現する細胞は、ガンシクロビル及びシトシンデアミナーゼなどの薬物を投与すると殺傷される可能性があると報告された。例えば、Dey and Evans, Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase (HSV-TK), in Targets in Gene Therapy, edited by You (2011)、及びBeltinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15): 8699-8704 (1999)を参照されたい。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、DISE（生存遺伝子排除によって引き起こされる死）と称されるsiRNAキルスイッチを含むことができる（Murmann et al., Oncotarget. 2017; 8: 84643-84658. Induction of DISE in ovarian cancer cells in vivo）。

10

20

30

40

50

【0274】

D. 例示的なceDNA-FIXベクター

いくつかの実施形態によれば、例示的なceDNA-FIXベクターは、以下の表12に示されるceDNA-FIXベクターから選択される。いくつかの実施形態によれば、本開示は、隣接する逆方向末端反復配列（ITR）間に少なくとも1つの核酸配列を含むカプシド不含閉端DNA（ceDNA）ベクターを提供し、少なくとも1つの核酸配列は、少なくとも1つのFIXタンパク質をコードし、ここで、ceDNAベクターは、表12に示されるceDNA-FIXベクターから選択される。

【表12】

表12：ceDNA-FIX構築物

構築物	配列識別子
ceDNA-FIX v1	配列番号404
ceDNA-FIX 2109	配列番号405
ceDNA-FIX 2112	配列番号406
ceDNA-FIX 2113	配列番号407
ceDNA-FIX 2114	配列番号408
ceDNA-FIX 2115	配列番号409
ceDNA-FIX 2116	配列番号410

【0275】

いくつかの実施形態によれば、例示的なceDNAベクターは、配列番号404を含むceDNA-FIX v1である。いくつかの実施形態によれば、ceDNAベクターは、配列番号404と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一である。

【0276】

いくつかの実施形態によれば、例示的なceDNAベクターは、配列番号405を含むceDNA-FIX 2109である。いくつかの実施形態によれば、ceDNAベクターは、配列番号405と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なく

とも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % 同一である。

【0277】

いくつかの実施形態によれば、例示的な c e D N A ベクターは、配列番号 406 を含む c e D N A - F I X 2 1 1 2 である。いくつかの実施形態によれば、c e D N A ベクターは、配列番号 406 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % 同一である。

10

【0278】

いくつかの実施形態によれば、例示的な c e D N A ベクターは、配列番号 407 を含む c e D N A - F I X 2 1 1 3 である。いくつかの実施形態によれば、c e D N A ベクターは、配列番号 407 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % 同一である。

【0279】

いくつかの実施形態によれば、例示的な c e D N A ベクターは、配列番号 408 を含む c e D N A - F I X 2 1 1 4 である。いくつかの実施形態によれば、c e D N A ベクターは、配列番号 408 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % 同一である。

20

【0280】

いくつかの実施形態によれば、例示的な c e D N A ベクターは、配列番号 409 を含む c e D N A - F I X 2 1 1 5 である。いくつかの実施形態によれば、c e D N A ベクターは、配列番号 409 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % 同一である。

30

【0281】

いくつかの実施形態によれば、例示的な c e D N A ベクターは、配列番号 410 を含む c e D N A - F I X 2 1 1 6 である。いくつかの実施形態によれば、c e D N A ベクターは、配列番号 410 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % 同一である。

【0282】

いくつかの実施形態によれば、本開示は、隣接する逆方向末端反復配列 (I T R) 間に少なくとも 1 つの核酸配列を含むカプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクターを提供し、少なくとも 1 つの核酸配列は、少なくとも 1 つの F I X タンパク質をコードし、ここで、c e D N A ベクターは配列番号 404 を含む。いくつかの実施形態によれば、c e D N A ベクターは、配列番号 404 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % 同一である。

40

【0283】

いくつかの実施形態によれば、本開示は、隣接する逆方向末端反復配列 (I T R) 間に少なくとも 1 つの核酸配列を含むカプシド不含閉端 D N A (c e D N A) ベクターを提供

50

し、少なくとも1つの核酸配列は、少なくとも1つのFIXタンパク質をコードし、ここで、ceDNAベクターは配列番号405を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNAベクターは、配列番号405と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一である。

【0284】

いくつかの実施形態によれば、本開示は、隣接する逆方向末端反復配列(ITR)間に少なくとも1つの核酸配列を含むカプシド不含閉端DNA(ceDNA)ベクターを提供し、少なくとも1つの核酸配列は、少なくとも1つのFIXタンパク質をコードし、ここで、ceDNAベクターは配列番号406を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNAベクターは、配列番号406と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一である。

【0285】

いくつかの実施形態によれば、配列番号404は以下の成分を含み、数字は核酸残基を示す：

1 . . 1 4 1 = 左 - I T R _ _ v 1
 1 4 2 . . 1 9 4 = スペーサー _ _ 左 - I T R _ _ v 1
 1 9 5 . . 5 2 4 = エンハンサー
 5 2 5 . . 9 2 1 = プロモーター
 9 2 2 . . 9 5 0 = 5 p U T R
 9 5 1 . . 1 0 3 4 = h F I X シグナルペプチド
 9 5 1 . . 1 0 3 7 = C D S
 9 5 1 . . 3 7 7 4 = エクソンイントロン _ _ O R F
 1 0 3 9 . . 2 4 7 6 = イントロン
 2 4 7 6 . . 3 7 7 4 = C D S 「翻訳 2 4 7 6 - 3 7 7 4」
 3 5 3 8 . . 3 5 4 0 = R 3 3 8 L P a d u a 変異
 3 7 7 5 . . 3 8 6 2 = 3 p U T R
 3 8 6 3 . . 4 0 9 0 = ポリ A
 4 0 9 1 . . 4 1 5 1 = スペーサー 右 - I T R
 4 1 5 2 . . 4 2 8 1 = 右 - I T R

【0286】

いくつかの実施形態によれば、配列番号405は以下の成分を含み、数字は核酸残基を示す：

1 . . 1 4 1 = 左 - I T R
 1 4 2 . . 1 8 3 = スペーサー _ _ 左 - I T R _ _ v . 2 . 1
 1 8 4 . . 2 5 5 = セルピンエンハンサー
 1 8 4 . . 8 3 7 = 3 x セルピン - T T R e _ _ プロモーターセット
 2 5 7 . . 3 2 8 = セルピンエンハンサー
 3 3 0 . . 4 0 1 = セルピンエンハンサー
 5 6 2 . . 7 4 5 = マウス T T R 5 p U T R
 7 1 4 . . 7 4 5 = 5 p U T R
 7 4 6 . . 8 3 6 = M V M イントロン
 8 3 8 . . 8 4 5 = P m e I _ _ 部位
 8 4 6 . . 8 5 4 = コンセンサスコザック
 8 5 5 . . 2 2 4 0 = F I X - c D N A - 6 9 1 _ _ 2
 2 2 4 1 . . 2 2 4 8 = P a c I 部位
 2 2 4 9 . . 2 8 2 9 = W P R E _ _ 3 p U T R

2 8 3 0 . . 3 0 5 4 = b G H
 3 0 5 5 . . 3 1 1 5 = スペーサー __ 右 - I T R __ v 1
 3 1 1 6 . . 3 2 4 5 = 右 - I T R __ v 1

【0287】

いくつかの実施形態によれば、配列番号 406 は以下の成分を含み、数字は核酸残基を示す：

1 . . 1 4 1 = 左 - I T R __ v 1
 1 4 2 . . 1 8 3 = スペーサー __ 左 - I T R __ v 2 . 1
 1 8 4 . . 2 5 5 = セルピンエンハンサー
 1 8 4 . . 8 3 7 = 3 x セルピン - T T R e __ プロモーターセット
 2 5 7 . . 3 2 8 = セルピンエンハンサー
 3 3 0 . . 4 0 1 = セルピンエンハンサー
 5 6 2 . . 7 4 5 = マウス T T R 5 p U T R (N M __ 0 1 3 6 9 7 . 5)
 7 1 4 . . 7 4 5 = 5 p U T R
 7 4 6 . . 8 3 6 = M V M イントロン
 8 3 8 . . 8 4 5 = P m e I __ 部位
 8 4 6 . . 8 5 4 = C o n s e n s u s __ K o z a k
 8 5 5 . . 2 2 4 0 = F I X - c D N A - 6 9 1 __ 1 6
 2 2 4 1 . . 2 2 4 8 = P a c I __ 部位
 2 2 4 9 . . 2 8 2 9 = W P R E __ 3 p U T R
 2 8 3 0 . . 3 0 5 4 = b G H
 3 0 5 5 . . 3 1 1 5 = スペーサー __ 右 - I T R __ v 1
 3 1 1 6 . . 3 2 4 5 = 右 - I T R __ v 1

10

20

【0288】

V I . c e D N A ベクターの産生の詳細な方法

A . 一般的な産生

本明細書で定義されるような非対称 I T R 対又は対称 I T R 対を含む、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターのある特定の産生方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる 2018 年 9 月 7 日に出願された国際出願第 P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 号のセクション I V に記載されている。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、本明細書に記載されるように、昆虫細胞を使用して産生され得る。代替実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる 2019 年 1 月 18 日に出願された国際出願第 P C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2 号に開示されるように、合成的に、またいくつかの実施形態では無細胞法で産生することができる。

30

【0289】

本明細書に記載されるように、一実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、例えば、a) ポリヌクレオチド発現構築物テンプレート（例えば、c e D N A - プラスミド、c e D N A - バクミド、及び／又は c e D N A - バキュロウイルス）を内包する宿主細胞（例えば、昆虫細胞）の集団をインキュベートするステップであって、R e p タンパク質の存在下では、宿主細胞内の c e D N A ベクターの産生を誘導するために効果的な条件下、かつそのために十分な時間にわたってウイルスカプシドコード配列を欠いており、宿主細胞が、ウイルスカプシドコード配列を含まない、インキュベートするステップと、b) c e D N A ベクターを宿主細胞から採取し、単離するステップと、を含むプロセスによって取得され得る。R e p タンパク質の存在は、修飾型 I T R を有するベクターポリヌクレオチドの複製を誘導して、宿主細胞中で c e D N A ベクターを産生する。但し、ウイルス粒子（例えば、A A V ビリオン）は発現されない。したがって、A A V 又は他のウイルスベクターにおいて天然に課されるものなどのサイズ制限はない。

40

50

【0290】

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

【0291】

更に別の態様では、本開示は、例えば、L e e , L . e t a l . (2 0 1 3) P l o s O n e 8 (8) : e 6 9 8 7 9 に記載されるように、非ウイルス性 D N A ベクターの産生において、D N A ベクターポリヌクレオチド発現テンプレート (c e D N A テンプレート) をそれら自体のゲノムに安定して組み込んでいる宿主細胞株の使用を提供する。好ましくは、R e p は、約 3 の M O I で宿主細胞に付加される。宿主細胞株が哺乳動物細胞株、例えば、H E K 2 9 3 細胞である場合、細胞株は、安定して組み込まれたポリヌクレオチドベクターテンプレートを有し得、ヘルペスウイルスなどの第 2 のベクターを使用して、R e p タンパク質を細胞に導入することができ、R e p 及びヘルパーウイルスの存在下での c e D N A の切除及び増幅を可能にする。

10

【0292】

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

20

【0293】

次いで、c e D N A ベクターは、宿主細胞から採取され、単離される。本明細書に記載される c e D N A ベクターを細胞から採取及び収集するための時間は、c e D N A ベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存率、細胞形態論、細胞増殖などを考慮して選択され得る。一実施形態では、細胞は増殖し、c e D N A ベクターを産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞のほとんどがバキュロウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取される。D N A - ベクターは、Q i a g e n E n d o - F r e e プラスミドキットなどのプラスミド精製キットを使用して単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、D N A - ベクターに対して適合され得る。一般に、任意の核酸精製方法が採用され得る。

30

【0294】

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

【0295】

F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの存在は、細胞から単離されたベクター D N A を D N A ベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、並びにゲル電気泳動を使用し、消化された D N A 材料及び未消化の D N A 材料の両方を分析して、直鎖状かつ非連続的な D N A と比較して特徴的な直鎖状かつ連続的な D N A の存在を確認することによって確認され得る。図 4 C 及び図 4 D は、本明細書におけるプロセスによって産生された閉端 c e D N A ベクターの存在を同定するための一実施形態を示す。

40

【0296】

いくつかの実施形態によれば、c e D N A は無細胞環境で合成的に産生される。

【0297】

B. c e D N A プラスミド

c e D N A - プラスミドは、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの後期産生に使用されるプラスミドである。いくつかの実施形態では、c e D N A - プラスミ

50

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

【0298】

一態様では、FIX タンパク質の発現のための ceDNA ベクターは、本明細書では、第 1 のアデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、導入遺伝子を含む発現カセット、及び変異型又は修飾型 AAV ITR をこの順序でコードする「ceDNA-プラスミド」と称されるプラスミドから取得され、当該 ceDNA-プラスミドは、AAV カプシドタンパク質コード配列を欠いている。代替実施形態では、ceDNA-プラスミドは、第 1 の（又は 5'）修飾型又は変異型 AAV ITR、導入遺伝子を含む発現カセット、及び第 2 の（又は 3'）修飾型 AAV ITR をこの順序でコードし、当該 ceDNA-プラスミドは、AAV カプシドタンパク質コード配列を欠いており、5' 及び 3' ITR は、互いに対して対称である。代替実施形態では、ceDNA-プラスミドは、第 1 の（又は 5'）修飾型又は変異型 AAV ITR、導入遺伝子を含む発現カセット、及び第 2 の（又は 3'）変異型又は修飾型 AAV ITR をこの順序でコードし、当該 ceDNA-プラスミドは、AAV カプシドタンパク質コード配列を欠いており、5' 及び 3' 修飾型 ITR は、同じ修飾を有する（すなわち、それらは互いに対して逆相補又は対称である）。

【0299】

更なる実施形態では、ceDNA-プラスミド系は、ウイルスカプシドタンパク質コード配列を欠いている（すなわち、AAV カプシド遺伝子だけでなく、他のウイルスのカプシド遺伝子も欠いている）。追加として、特定の実施形態では、ceDNA-プラスミドはまた、AAV Rep タンパク質コード配列を欠いている。したがって、好ましい実施形態では、ceDNA-プラスミドは、機能的 AAV cap 及び AAV rep 遺伝子（AAV 2 の場合 GG-3'）に加えて、ヘアピン形成を可能にする可変パリンドローム配列を欠いている。

【0300】

本開示の ceDNA-プラスミドは、当該技術分野において周知の任意の AAV 血清型のゲノムの天然核酸配列を使用して生成され得る。一実施形態では、ceDNA-プラスミド骨格は、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 5、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 11、AAV 12、AAV rh 8、AAV rh 10、AAV-DJ、及び AAV-DJ 8 ゲノムに由来する。例えば、NCBI: NC 002077、NC 001401、NC 001729、NC 001829、NC 006152、NC 006260、NC 006261、Springer によって維持される URL で入手可能な Kotin and Smith, The Springer Index of Viruses (www.oesys.springer.de/viruses/database/mkchapter.asp?virID=42.04)（注記—URL 又はデータベースに対する参照は、本出願の有効な出願日現在の URL 又はデータベースの内容を指す）。特定の実施形態では、ceDNA-プラスミド骨格は、AAV 2 ゲノムに由来する。別の特定の実施形態では、ceDNA-プラスミド骨格は、これらの AAV ゲノムのうちの 1 つに由来する 5' 及び 3' ITR に含まれるように遺伝子操作された合成骨格である。

【0301】

ceDNA-プラスミドは、ceDNA ベクター産生細胞株の確立における使用のための選択可能又は選択マーカーを任意選択的に含み得る。一実施形態では、選択マーカーは、3' ITR 配列の下流（すなわち、3'）に挿入され得る。別の実施形態では、選択マ-

カーは、5' ITR 配列の上流（すなわち、5'）に挿入され得る。適切な選択マーカーは、例えば、薬物耐性を付与するものを含む。選択マーカーは、例えば、プラスチジン S 耐性遺伝子、カナマイシン、ゲネチシンなどであり得る。好ましい実施形態では、薬物選択マーカーは、プラスチジン S 耐性遺伝子である。

【0302】

FIXタンパク質の発現のための例示的な c e DNA（例えば、r A A V 0）ベクターは、r A A V プラスミドから産生される。r A A V ベクターの産生のための方法は、（a）宿主細胞に上記のような r A A V プラスミドを提供することであって、宿主細胞及びプラスミドの両方が、カプシドタンパク質コード遺伝子を欠いている、提供することと、（b）c e DNA ゲノムの産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することと、（c）細胞を採取し、当該細胞から産生された A A V ゲノムを単離することと、を含み得る。

10

【0303】

C. c e DNA プラスミドから c e DNA ベクターを作製する例示的な方法

FIXタンパク質の発現のためのカプシドのない c e DNA ベクターを作製するための方法、特にインビボ実験に十分なベクターを提供するために十分に高い収率を有する方法もまた、本明細書に提供される。

【0304】

いくつかの実施形態では、FIXタンパク質の発現のための c e DNA ベクターの産生方法は、（1）発現カセット及び2つの対称 ITR 配列を含む核酸構築物を宿主細胞（例えば、S f 9 細胞）中に導入するステップと、（2）任意選択的に、例えば、プラスミド上に存在する選択マーカーを使用することによってクローン細胞株を確立するステップと、（3）R e p コード遺伝子を（当該遺伝子を担持するバキュロウイルスでのトランスフェクション又は感染のいずれかによって）当該昆虫細胞中に導入するステップと、（4）細胞を採取し、c e DNA ベクターを精製するステップと、を含む。c e DNA ベクターの産生のために上記の発現カセット及び2つの ITR 配列を含む核酸構築物は、c e DNA プラスミド、又は下記のように c e DNA プラスミドで生成されたバクミド若しくはバキュロウイルスの形態であり得る。核酸構築物は、トランスフェクション、ウイルス形質導入、安定した組み込み、又は当該技術分野において既知の他の方法によって宿主細胞中に導入され得る。

20

【0305】

D. 細胞株

FIXタンパク質の発現のための c e DNA ベクターの産生において使用される宿主細胞株は、S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a（S f 9、S f 21 など）若しくは T r i c h o p l u s i a n i 細胞に由来する昆虫細胞株、又は他の無脊椎動物、脊椎動物、若しくは哺乳動物細胞を含む他の真核細胞株を含み得る。当業者に既知の他の細胞株、例えば、H E K 2 9 3、H u h - 7、H e L a、H e p G 2、H e p l A、9 1 1、C H O、C O S、M e W o、N I H 3 T 3、A 5 4 9、H T 1 1 8 0、単球、並びに成熟及び未成熟樹状細胞を使用することもできる。宿主細胞株は、高収率の c e DNA ベクター産生のために、c e DNA プラスミドの安定した発現のためにトランスフェクトされ得る。

30

40

【0306】

c e DNA プラスミドは、当該技術分野において既知の試薬（例えば、リポソーム、リン酸カルシウム）又は物理的手段（例えば、エレクトロポレーション）を使用し、一時的なトランスフェクションによって S f 9 細胞中に導入され得る。代替的に、c e DNA プラスミドをそれらのゲノム中に安定して組み込んでいる安定した S f 9 細胞株が確立され得る。そのような安定した細胞株は、選択マーカーを上記の c e DNA プラスミド中に組み込むことによって確立され得る。細胞株をトランスフェクションするために使用される c e DNA プラスミドが、抗生物質などの選択マーカーを含む場合、c e DNA プラスミドでトランスフェクションされ、c e DNA プラスミド DNA をそれらのゲノム中に組み込んでいる細胞は、細胞増殖培地への抗生物質の添加によって選択され得る

50

。次いで、細胞の耐性クローンは、単一細胞希釈又はコロニー移動技法によって単離され、伝播され得る。

【0307】

E. c e D N A ベクターを単離し、精製する

c e D N A ベクターを入手し、単離するためのプロセスの例は、図 4 A ~ 4 E 及び下記の特実の実施例に記載される。本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A - ベクターは、A A V R e p タンパク質を発現するプロデューサー細胞から取得され、c e D N A - プラスミド、c e D N A - バクミド、又は c e D N A - バキュロウイルスで更に形質転換され得る。c e D N A ベクターの産生に有用なプラスミドには、F I X タンパク質をコードするプラスミド、又は 1 つ以上の R E P タンパク質をコードするプラスミドが含まれる。

10

【0308】

一態様では、ポリヌクレオチドは、プラスミド (R e p - プラスミド)、バクミド (R e p - バクミド)、又はバキュロウイルス (R e p - バキュロウイルス) 中のプロデューサー細胞に送達された A A V R e p タンパク質 (R e p 7 8 若しくは 6 8) をコードする。R e p - プラスミド、R e p - バクミド、及び R e p - バキュロウイルスは、上記の方法によって生成され得る。

【0309】

F I X タンパク質の発現の c e D N A ベクターを産生する方法が本明細書に記載される。本明細書に記載される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを生成するために使用される発現構築物は、プラスミド (例えば、c e D N A - プラスミド)、バクミド (例えば、c e D N A - バクミド)、及び／又はバキュロウイルス (例えば、c e D N A - バキュロウイルス) であり得る。単なる例として、c e D N A ベクターは、c e D N A - バキュロウイルス及び R e p - バキュロウイルスに共感染した細胞から生成され得る。R e p - バキュロウイルスから産生された R e p タンパク質は、c e D N A - バキュロウイルスを複製して、c e D N A ベクターを生成し得る。代替的に、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、R e p - プラスミド、R e p - バクミド、又は R e p - バキュロウイルス中で送達される A A V R e p タンパク質 (R e p 7 8 / 5 2) をコードする配列を含む構築物で安定してトランスフェクトされた細胞から生成され得る。c e D N A - バキュロウイルスは、細胞に一時的にトランスフェクトされ、R e p タンパク質によって複製され、c e D N A ベクターを産生し得る。

20

30

【0310】

バクミド (例えば、c e D N A - バクミド) は、S f 9、S f 2 1、T n i (T r i c h o p l u s i a n i) 細胞、H i g h F i v e 細胞などの許容昆虫細胞中にトランスフェクトされ得、対称 I T R 及び発現カセットを含む配列を含む組換えバキュロウイルスである、c e D N A - バキュロウイルスを生成し得る。c e D N A - バキュロウイルスを昆虫細胞中に再度感染させて、次世代の組換えバキュロウイルスを取得することができる。任意選択的に、このステップを一回又は複数回繰り返して、より多い量の組換えバキュロウイルスを産生することができる。

【0311】

本明細書に記載される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを細胞から採取及び収集するための時間は、c e D N A ベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存率、細胞形態、細胞増殖などを考慮して選択され得る。通常、細胞は、c e D N A ベクター (例えば、c e D N A ベクター) を産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の大半がウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取され得る。c e D N A ベクターは、Q i a g e n E N D O - F R E E P L A S M I D (登録商標) キットなどのプラスミド精製キットを使用して、S f 9 細胞から単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、c e D N A ベクターに対して適合され得る。一般に、任意の当該技術分野において既知の核酸精製方法、並びに市販の D N A 抽出キットが採用され得る。

40

50

【0312】

代替的に、細胞ペレットをアルカリ溶解プロセスに供し、得られた溶解物を遠心分離し、クロマトグラフィー分離を実施することによって、精製が実装され得る。1つの非限定例として、このプロセスは、核酸を保持するイオン交換カラム（例えば、SARTOBIND Q（登録商標））上に上清を装填し、次いで溶出し（例えば、1.2M NaCl溶液で）、ゲル濾過カラム（例えば、6高速流GE）上で更なるクロマトグラフィー精製を実施することによって実施され得る。次いで、カプシド不含AAVベクターは、例えば、沈殿によって回収される。

【0313】

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

【0314】

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

【0315】

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

【0316】

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

【0317】

VII. 医薬組成物

別の態様では、医薬組成物が提供される。医薬組成物は、本明細書に記載されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクター、及び薬学的に許容される担体又は希釈剤

を含む。

【0318】

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

10

【0319】

F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを含む薬学的に活性な組成物は、細胞、例えば、対象の細胞に様々な目的のための導入遺伝子を送達するように製剤化することができる。

20

【0320】

治療目的のための医薬組成物は、典型的に、無菌であり、製造及び貯蔵の条件下で安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、又は高 c e D N A ベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌の注射可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量の c e D N A ベクター化合物を、必要に応じて、上記で列挙した成分のうちの 1 つ又は組み合わせと組み込み、濾過滅菌によって調製され得る。

【0321】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、局所、全身、羊膜内、くも膜下腔内、頭蓋内、動脈内、静脈内、リンパ内、腹腔内、皮下、気管、組織内（例えば、筋肉内、心臓内）、肝内、腎臓内、脳内）、くも膜下腔内、膀胱内、結膜（例えば、眼窩外、眼窩内、眼窩後、網膜内、網膜下、脈絡膜、脈絡膜下、間質内、房内、及び硝子体内）、蝸牛内、並びに粘膜（例えば、経口、直腸、経鼻）投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる。高圧静脈内又は動脈内注入を介した受動組織形質導入、同様に、核内微量注射若しくは細胞質内注射などの細胞内注射もまた、企図される。

30

【0322】

いくつかの態様では、本明細書で提供される方法は、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための 1 つ以上の c e D N A ベクターを宿主細胞に送達することを含む。本明細書ではまた、そのような方法によって産生される細胞、及びそのような細胞を含むか又はそのような細胞から産生される生物（動物、植物、又は真菌など）も提供される。核酸の送達方法には、リポフェクション、ヌクレオフェクション、微量注射、バイオリスティック、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン又は脂質：核酸コンジュゲート、裸の D N A、及び D N A での薬剤増強取り込みが含まれ得る。リポフェクションは、例えば、米国特許第 5, 0 4 9, 3 8 6 号、同第 4, 9 4 6, 7 8 7 号、及び同第 4, 8 9 7, 3 5 5 号に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、T r a n s f e c t a m（商標）及び L i p o f e c t i n（商標））。送達は、細胞（例えば、インビトロ若しくはエクスピボ投与）又は標的組織（例えば、インビボ投与）に対するものであり得る。

40

【0323】

核酸を細胞に送達するための様々な技法及び方法が、当該技術分野において既知である

50

。例えば、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aなどの核酸は、脂質ナノ粒子（L N P）、リポドイド、リボソーム、脂質ナノ粒子、リポプレックス、又はコアシェルナノ粒子中に製剤化され得る。典型的に、L N Pは、核酸（例えば、c e D N A）分子、1つ以上のイオン化又はカチオン性脂質（若しくはそれらの塩）、1つ以上の非イオン性又は中性脂質（例えば、リン脂質）、凝集を防ぐ分子（例えば、P E G若しくはP E G-脂質コンジュゲート）、及び任意選択的にステロール（例えば、コレステロール）で構成される。

【0324】

F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aなどの核酸を細胞に送達するための別の方法は、細胞によって内在化されるリガンドと核酸を複合することによるものである。例えば、リガンドは、細胞表面上の受容体に結合し、エンドサイトーシスを介して内在化され得る。リガンドは、核酸中のヌクレオチドに共有結合的に連結され得る。核酸を細胞中に送達するための例示的なコンジュゲートは、例えば、W O 2 0 1 5 / 0 0 6 7 4 0、W O 2 0 1 4 / 0 2 5 8 0 5、W O 2 0 1 2 / 0 3 7 2 5 4、W O 2 0 0 9 / 0 8 2 6 0 6、W O 2 0 0 9 / 0 7 3 8 0 9、W O 2 0 0 9 / 0 1 8 3 3 2、W O 2 0 0 6 / 1 1 2 8 7 2、W O 2 0 0 4 / 0 9 0 1 0 8、W O 2 0 0 4 / 0 9 1 5 1 5、及びW O 2 0 1 7 / 1 7 7 3 2 6に記載される。

【0325】

F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aなどの核酸はまた、トランスフェクションによって細胞に送達され得る。有用なトランスフェクション方法としては、脂質媒介性トランスフェクション、カチオン性ポリマー媒介性トランスフェクション、又はリン酸カルシウム沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。トランスフェクション試薬は、当該技術分野において周知であり、T u r b o F e c t トランスフェクション試薬（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）、P r o - J e c t 試薬（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）、T R A N S P A S S（商標）Pタンパク質トランスフェクション試薬（N e w E n g l a n d B i o l a b s）、C H A R I O T（商標）タンパク質送達試薬（A c t i v e M o t i f）、P R O T E O J U I C E（商標）タンパク質トランスフェクション試薬（E M D M i l l i p o r e）、293フェクチン、L I P O F E C T A M I N E（商標）2000、L I P O F E C T A M I N E（商標）3000（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）、L I P O F E C T A M I N E（商標）（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）、L I P O F E C T I N（商標）（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）、D M R I E - C、C E L L F E C T I N（商標）（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）、O L I G O F E C T A M I N E（商標）（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）、L I P O F E C T A C E（商標）、F U G E N E（商標）（R o c h e, B a s e l, S w i t z e r l a n d）、F U G E N E（商標）H D（R o c h e）、T R A N S F E C T A M（商標）（T r a n s f e c t a m, P r o m e g a, M a d i s o n, W i s.）、T F X - 1 0（商標）（P r o m e g a）、T F X - 2 0（商標）（P r o m e g a）、T F X - 5 0（商標）（P r o m e g a）、T R A N S F E C T I N（商標）（B i o R a d, H e r c u l e s, C a l i f.）、S I L E N T F E C T（商標）（B i o - R a d）、E f f e c t e n e（商標）（Q i a g e n, V a l e n c i a, C a l i f.）、D C - c h o l（A v a n t i P o l a r L i p i d s）、G E N E P O R T E R（商標）（G e n e T h e r a p y S y s t e m s, S a n D i e g o, C a l i f.）、D H A R M A F E C T 1（商標）（D h a r m a c o n, L a f a y e t t e, C o l o.）、D H A R M A F E C T 2（商標）（D h a r m a c o n）、D H A R M A F E C T 3（商標）（D h a r m a c o n）、D H A R M A F E C T 4（商標）（D h a r m a c o n）、E S C O R T（商標）I I I（S i g m a, S t. L o u i s, M o.）、及びE S C O R T（商標）I V（S i g m a C h e m i c a l C o.）が含まれるが、これらに限定されない。c e D N Aなどの核酸もまた、当業者に既知のマイクロフルイディクス方法を介して細胞に送達され得る。

【0326】

本明細書に記載されるF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターはまた、インビボでの細胞の形質導入のために生物に直接投与され得る。投与は、分子を血液又は組織細胞と最終的に接触させるために通常使用される経路のうちのいずれかによるものであり、注射、注入、局所用途、及びエレクトロポレーションが挙げられるが、これらに限定されない。そのような核酸を投与する好適な方法は、当業者によって利用可能かつ周知であり、特定の組成物を投与するために2つ以上の経路が使用され得るが、特定の経路は、多くの場合、別の経路よりも即時であり、効果的な反応を提供し得る。

【0327】

本明細書に開示されるF I Xタンパク質の発現のための核酸ベクターのc e D N Aベクター導入方法は、例えば、米国特許第5, 928, 638号に記載される方法によって、例えば、造血幹細胞に送達され得る。

【0328】

本開示によるF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターは、対象中の細胞又は標的器官への送達のためにリポソームに付加され得る。リポソームは、少なくとも1つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療薬送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物又は活性製剤成分(A P I)を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。化合物を含有するポリエチレングリコール(P E G)官能基を含むが、これに限定されない例示的なリポソーム及びリポソーム製剤は、2018年9月7日に出願された国際出願第P C T / U S 2018 / 050042号及び2018年12月6日に出願された国際出願第P C T / U S 2018 / 064242号に開示され、例えば、「薬学的製剤」と題されるセクションを参照されたい。

【0329】

当該技術分野において既知の様々な送達方法又はそれらの修正を使用して、c e D N Aベクターをインビトロ又はインビボで送達することができる。例えば、いくつかの実施形態では、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターは、機械的、電氣的、超音波、流体力学的、又はレーザーベースエネルギーによって細胞膜に一時的な貫通を作製することによって送達され、それにより標的化された細胞へのD N A進入が促進される。例えば、c e D N Aベクターは、サイズ制限されたチャネルを通して細胞を圧搾することによるか、又は当該技術分野において既知の他の手段によって細胞膜を一時的に崩壊させることにより送達され得る。場合によっては、c e D N Aベクターのみが、裸のD N Aとして、肝臓、腎臓、胆嚢、前立腺、副腎、心臓、腸、肺、及び胃、皮膚、甲状腺、心筋、又は骨格筋から選択される任意の1つ以上の組織のうちのいずれか1つに直接注射される。場合によっては、c e D N Aベクターは、遺伝子銃によって送達される。カプシド不含A A Vベクターでコーティングされた金又はタングステン球状粒子(1~3 µ m直径)は、加圧ガスによって高速に加速され、標的組織細胞中に貫通することができる。

【0330】

本明細書では、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクター及び薬学的に許容される担体を含む組成物が具体的に企図されている。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターは、脂質送達系、例えば、本明細書に記載されるリポソームで製剤化される。いくつかの実施形態では、そのような組成物は、熟練した開業医によって望まれる任意の経路によって投与される。組成物は、経口、非経口、舌下、経皮、直腸、経粘膜、局所、吸入を介した、口腔内投与を介した、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、髄腔内、及び関節内、又はそれらの組み合わせを含む異なる経路によって対象に投与され得る。獣医学的使用のために、組成物は、通常の獣医学的慣習に従って好適に許容される製剤として投与され得る。獣医師は、特定の動物に最も適切な投与計画及び投与経路を容易に決定することができる。組成物は、従来のシリンジ、無針注射デバイス、「

マイクロプロジェタイルボンバードメントガン」、又はエレクトロポレーション（「EP」）、「流体力学的方法」、又は超音波などの他の物理的方法によって投与することができる。

【0331】

場合によっては、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、内臓及び肢全体の骨格筋への、任意の水溶性化合物及び粒子の直接細胞内送達のための単純かつ非常に効率的な方法である流体力学的注射によって送達される。

【0332】

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

【0333】

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

【0334】

A. エキソソーム：

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

【0335】

B. 微粒子／ナノ粒子

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、脂質ナノ粒子によって送達される。一般に、脂質ナノ粒子は、例えば、Tam et al. (2013). *Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery*. *Pharmaceuticals* 5 (3) : 498–507によって開示されるように、イオン化アミノ脂質（例えば、ヘプタトリアコンター6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル4-（ジメチルアミノ）ブタノエート、DLin-MC3-DMA、ホスファチジルコリン（1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、DSPC）、コレステロール、及びコート脂質（ポリエチレングリコール-ジミリスツールグリセロール、PEG-DMG）を含む。

【0336】

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

【0337】

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

【0338】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、金ナノ粒子によって送達される。一般に、核酸は、金ナノ粒子に共有結合的に結合され得るか、又は金ナノ粒子に非共有結合的に結合され得（例えば、電荷-電荷相互作用によって結合され）、例えば、Ding et al. (2014). Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. Mol. Ther. 22(6); 1075-1083によって記載されるように、金ナノ粒子に共有結合され得るか、又は金ナノ粒子に非共有結合され得（例えば、電荷-電荷相互作用によって結合される）。いくつかの実施形態では、金ナノ粒子-核酸コンジュゲートは、例えば、米国特許第6,812,334号に記載される方法を使用して産生される。

【0339】

C. コンジュゲート

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、複合される（例えば、細胞取り込みを増加させる薬剤に共有結合される）。「細胞取り込みを増加させる薬剤」は、脂質膜を通した核酸の輸送を促進する分子である。例えば、核酸は、親油性化合物（例えば、コレステロール、トコフェロールなど）、細胞貫通ペプチド（CPP）（例えば、ペネトラチン、TAT、Syn1Bなど）、及びポリアミン（例えば、スベルミン）にコンジュゲートし得る。細胞取り込みを増加させる薬剤の更なる例は、例えば、Winkler (2013). Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. Ther. Deliv. 4(7); 791-809に開示される。

【0340】

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

【0341】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、例えば、米国特許第8,450,467号によって記載されるように、炭水化物に複合される。

【0342】

10

20

30

40

50

D. ナノカプセル

代替的に、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターのナノカプセル製剤が使用され得る。ナノカプセルは、一般に、安定かつ再生可能な方式で物質を捕捉することができる。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を避けるために、そのような微細粒子（およそ 0.1 μm のサイズ）は、ポリマーを使用して、インビボで分解され得るように設計されるべきである。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子が、使用のために企図される。

【0343】

E. リポソーム

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

10

【0344】

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

20

【0345】

F. 例示的なリポソーム及び脂質ナノ粒子（L N P）組成物

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

30

【0346】

c e D N A ベクターを含む脂質ナノ粒子（L N P）は、2018年9月7日に提出された国際出願第 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 5 0 0 4 2 号及び2018年12月6日に提出された国際出願第 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 6 4 2 4 2 号に開示されており、それらの全体が本明細書に組み込まれ、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターについての方法及び組成物での使用が想定されている。

【0347】

いくつかの態様では、本開示は、免疫原性／抗原性を低減し、化合物に対する親水性及び疎水性を提供し、投与頻度を低減することができる、ポリエチレングリコール（P E G）官能基を有する1つ以上の化合物（いわゆる「P E G 化合物」）を含む、リポソーム製剤を提供する。又は、リポソーム製剤は、単にポリエチレングリコール（P E G）ポリマーを追加の構成成分として含む。そのような態様では、P E G 又は P E G 官能基の分子量は、62 D a ～ 約 5,000 D a であり得る。

40

【0348】

いくつかの態様では、本開示は、延長放出又は制御放出プロファイルを有する A P I を、数時間～数週間の期間にわたって送達するであろうリポソーム製剤を提供する。いくつかの関連態様では、リポソーム製剤は、脂質二層によって結合される水性チャンバを含み得る。他の関連態様では、リポソーム製剤は、数時間～数週間の期間にわたって A P I を

50

放出する、高温で物理的移行を経る構成成分を有する A P I を封入する。

【0349】

いくつかの態様では、リボソーム製剤は、スフィンゴミエリン及び本明細書に開示される1つ以上の脂質を含む。いくつかの態様では、リボソーム製剤は、O p t i s o m e を含む。

【0350】

いくつかの態様では、本開示は、N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000）-1，2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、（ジステアロイル-sn-グリセロ-ホスホエタノールアミン）、M P E G（メトキシポリエチレングリコール）コンジュゲート脂質、H S P C（水素化ダイズホスファチジルコリン）、P E G（ポリエチレングリコール）、D S P E（ジステアロイル-sn-グリセロ-ホスホエタノールアミン）、D S P C（ジステアロイルホスファチジルコリン）、D O P C（ジオレオイルホスファチジルコリン）、D P P G（ジパルミトイルホスファチジルグリセロール）、E P C（卵ホスファチジルコリン）、D O P S（ジオレオイルホスファチジルセリン）、P O P C（パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン）、S M（スフィンゴミエリン）、M P E G（メトキシポリエチレングリコール）、D M P C（ジミリストイルホスファチジルコリン）、D M P G（ジミリストイルホスファチジルグリセロール）、D S P G（ジステアロイルホスファチジルグリセロール）、D E P C（ジエルコイルホスファチジルコリン）、D O P E（ジオレオイル-sn-グリセロ-ホスホエタノールアミン）、硫酸コレステリル（C S）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（D P P G）、D O P C（ジオレオイル-sn-グリセロ-ホスファチジルコリン）、又はそれらの任意の組み合わせから選択される1つ以上の脂質を含むリボソーム製剤を提供する。

【0351】

いくつかの態様では、本開示は、リン脂質、コレステロール、及びP E G化脂質を56：38：5のモル比で含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リボソーム製剤の全体脂質含有量は、2～16mg/mLである。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、及びP E G化脂質を含有するリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、及びP E G化脂質を、それぞれ3：0.015：2のモル比で含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基、コレステロール、及びP E G化脂質を含有する脂質を含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基及びコレステロールを含有する脂質を含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、P E G化脂質は、P E G-2000-D S P Eである。いくつかの態様では、本開示は、D P P G、ダイズP C、M P E G-D S P E脂質コンジュゲート、及びコレステロールを含むリボソーム製剤を提供する。

【0352】

いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する1つ以上の脂質、及びエタノールアミン官能基を含有する1つ以上の脂質を含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、1つ以上のホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、及びステロール、例えば、コレステロールを含むリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リボソーム製剤は、D O P C/D E P C、及びD O P Eを含む。

【0353】

いくつかの態様では、本開示は、1つ以上の薬学的賦形剤、例えば、スクロース及び／又はグリシンを更に含むリボソーム製剤を提供する。

【0354】

いくつかの態様では、本開示は、本開示は、単一ラメラ構造又は多ラメラ構造のいずれかであるリボソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子及び／

10

20

30

40

50

又は発泡ベース粒子を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、一般的なナノ粒子に対する相対サイズでより大きく、約150～250 nmのサイズであるリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、凍結乾燥粉末である。

いくつかの態様では、本開示は、リポソームの外側に単離されたceDNAを有する混合物に弱塩基を添加することにより、本明細書に開示又は記載されるceDNAベクターで作製及び充填されたリポソーム製剤を提供する。この付加は、リポソームの外側のpHをおよそ7.3まで増加させ、APIをリポソーム中に送る。いくつかの態様では、本開示は、リポソームの内側で酸性であるpHを有するリポソーム製剤を提供する。そのような場合、リポソームの内側は、pH4～6.9、より好ましくはpH6.5であり得る。他の態様では、本開示は、リポソーム内薬物安定化技術を使用することにより作製されたリポソーム製剤を提供する。そのような場合、ポリマー又は非ポリマー高電荷アニオン及びリポソーム内捕捉剤、例えば、ポリリン酸塩又はオクタ硫酸スクロースが利用される。

10

【0355】

いくつかの態様では、本開示は、ceDNA及びイオン化脂質を含む脂質ナノ粒子を提供する。例えば、プロセスにより得られたceDNAを用いて作製及び負荷される脂質ナノ粒子製剤は、2018年9月7日に提出された国際出願第PCT/US2018/050042号に開示されており、本明細書に組み込まれる。これは、イオン化脂質をプロトン化し、粒子のceDNA/脂質会合及び核形成に好ましいエネルギー論を提供する、低pHでのエタノール脂質と水性ceDNAとの高エネルギー混合によって達成され得る。粒子は、水性希釈及び有機溶媒の除去によって更に安定化され得る。粒子は、所望のレベルに濃縮され得る。

20

【0356】

一般に、脂質ナノ粒子は、約10:1～60:1の全脂質対ceDNA（質量又は重量）比で調製される。いくつかの実施形態では、脂質対ceDNA比（質量/質量比、w/w比）は、約1:1～約60:1、約1:1～約55:1、約1:1～約50:1、約1:1～約45:1、約1:1～約40:1、約1:1～約35:1、約1:1～約30:1、約1:1～約25:1、約10:1～約14:1、約3:1～約15:1、約4:1～約10:1、約5:1～約9:1、約6:1～約9:1、約30:1～約60:1の範囲内であり得る。いくつかの実施形態によれば、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、約60:1の全脂質比に対するceDNA（質量又は重量）で調製される。いくつかの実施形態によれば、脂質粒子は、約10:1～30:1の全脂質対ceDNA（質量又は重量）比で調製される。いくつかの実施形態では、脂質対ceDNA比（質量/質量比、w/w比）は、約1:1～約25:1、約10:1～約14:1、約3:1～約15:1、約4:1～約10:1、約5:1～約9:1、又は約6:1～約9:1の範囲内であり得る。脂質及びceDNAの量を調整して、所望のN/P比、例えば3、4、5、6、7、8、9、10以上のN/P比を提供し得る。一般に、脂質粒子製剤の全体脂質含有量は、約5 mg/mL～約30 mg/mLの範囲であり得る。

30

【0357】

イオン化脂質は、典型的に、核酸カーゴ、例えばceDNAを低pHで凝縮させるため、及び膜会合及び膜融合性を駆動するために用いられる。一般に、イオン化脂質は、正に電荷される、又は例えばpH6.5以下の酸性条件下でプロトン化される少なくとも1つのアミノ基を含む脂質である。イオン化脂質はまた、本明細書ではカチオン性脂質と称される。

40

【0358】

例示的なイオン化脂質は、国際PCT特許公開第2015/095340号、同第2015/199952号、同第2018/011633号、同第2017/049245号、同第2015/061467号、同第2012/040184号、同第2012/000104号、同第2015/074085号、同第2016/081029号、同第2017/004143号、同第2017/075531号、同第2017/117528号

50

、同第2011/022460号、同第2013/148541号、同第2013/116126号、同第2011/153120号、同第2012/044638号、同第2012/054365号、同第2011/090965号、同第2013/016058号、同第2012/162210号、同第2008/042973号、同第2010/129709号、同第2010/144740号、同第2012/099755号、同第2013/049328号、同第2013/086322号、同第2013/086373号、同第2011/071860号、同第2009/132131号、同第2010/048536号、同第2010/088537号、同第2010/054401号、同第2010/054406号、同第2010/054405号、同第2010/054384号、同第2012/016184号、同第2009/086558号、同第2010/042877号、同第2011/000106号、同第2011/000107号、同第2005/120152号、同第2011/141705号、同第2013/126803号、同第2006/007712号、同第2011/038160号、同第2005/121348号、同第2011/066651号、同第2009/127060号、同第2011/141704号、同第2006/069782号、同第2012/031043号、同第2013/006825号、同第2013/033563号、同第2013/089151号、同第2017/099823号、同第2015/095346号、及び同第2013/086354号、並びに米国特許公開第2016/0311759号、同第2015/0376115号、同第2016/0151284号、同第2017/0210697号、同第2015/0140070号、同第2013/0178541号、同第2013/0303587号、同第2015/0141678号、同第2015/0239926号、同第2016/0376224号、同第2017/0119904号、同第2012/0149894号、同第2015/0057373号、同第2013/0090372号、同第2013/0274523号、同第2013/0274504号、同第2013/0274504号、同第2009/0023673号、同第2012/0128760号、同第2010/0324120号、同第2014/0200257号、同第2015/0203446号、同第2018/0005363号、同第2014/0308304号、同第2013/0338210号、同第2012/0101148号、同第2012/0027796号、同第2012/0058144号、同第2013/0323269号、同第2011/0117125号、同第2011/0256175号、同第2012/0202871号、同第2011/0076335号、同第2006/0083780号、同第2013/0123338号、同第2015/0064242号、同第2006/0051405号、同第2013/0065939号、同第2006/0008910号、同第2003/0022649号、同第2010/0130588号、同第2013/0116307号、同第2010/0062967号、同第2013/0202684号、同第2014/0141070号、同第2014/0255472号、同第2014/0039032号、同第2018/0028664号、同第2016/0317458号、及び同第2013/0195920号に記載されており、これら全ての内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

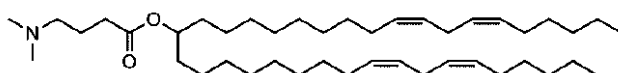
30

40

【0359】

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

【化14】



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

50

【0360】

脂質DLin-MC3-DMAは、Jayaraman et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. (2012), 51(34):8529-8533に記載され、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0361】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、WO2015/074085（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される、脂質ATX-002である。

【0362】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、WO2012/040184（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される、(13Z, 16Z)-N, N-ジメチル-3-ノニルドコサ-13, 16-ジエン-1-アミン（化合物32）である。

10

【0363】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、WO2015/199952（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される、化合物6又は化合物22である。

【0364】

限定なく、イオン化脂質は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の20~90% (mol)を含み得る。例えば、イオン化脂質モル含有量は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の20~70% (mol)、30~60% (mol)、又は40~50% (mol)であり得る。いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の約50mol%~約90mol%を含む。

20

【0365】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、非カチオン性脂質を更に含み得る。非イオン性脂質としては、両親媒性脂質、中性脂質、及びアニオン性脂質が挙げられる。したがって、非カチオン性脂質は、中性の非電荷、双性イオン性、又はアニオン性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、典型的に、膜融合性を増強するために用いられる。

【0366】

本明細書に開示される方法及び組成物での使用が想定される例示的な非カチオン性脂質は、2018年9月7日に出願された国際出願第PCT/US2018/050042号、及び2018年12月6日に提出された同第PCT/US2018/064242号に記載されている。例示的な非カチオン性脂質は、国際出願公開第2017/099823号及び米国特許公開第2018/0028664号に記載されており、これら両方の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0367】

非カチオン性脂質は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の0~30% (mol)を含み得る。例えば、非カチオン性脂質含有量は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の5~20% (mol)又は10~15% (mol)である。様々な実施形態では、イオン化脂質対中性脂質のモル比は、約2:1~約8:1の範囲である。

40

【0368】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、リン脂質を全く含まない。いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、膜統合性を提供するために、ステロールなどの構成成分を更に含み得る。

【0369】

脂質ナノ粒子中で使用され得る1つの例示的なステロールは、コレステロール及びその誘導体である。例示的なコレステロール誘導体は、国際出願第2009/127060号及び米国特許公開第2010/0130588号に記載されており、これら両方の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0370】

50

ステロールなどの膜統合性を提供する構成成分は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の 0 ~ 50 % (mol) を構成し得る。いくつかの実施形態では、そのような構成成分は、脂質ナノ粒子の全脂質含有量の 20 ~ 50 % (mol)、30 ~ 40 % (mol) である。

【0371】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール (PEG) 又はコンジュゲートした脂質分子を更に含み得る。一般に、これらを使用して、脂質ナノ粒子の凝集を阻害し、かつ／又は立体安定化を提供する。例示的な複合脂質としては、PEG-脂質コンジュゲート、ポリオキサゾリン (POZ)-脂質コンジュゲート、ポリアミド-脂質コンジュゲート (ATTA-脂質コンジュゲートなど)、カチオン性-ポリマー脂質 (CPL) コンジュゲート、及びそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、複合脂質分子は、PEG-脂質コンジュゲート、例えば、(メトキシポリエチレングリコール)-複合脂質である。例示的な PEG-脂質コンジュゲートとしては、PEG-ジアシルグリセロール (DAG) (1-(モノメトキシ-ポリエチレングリコール)-2, 3-ジミリスチルグリセロール (PEG-DMG) など)、PEG-ジアシルオキシプロピル (DAA)、PEG-リン脂質、PEG-セラミド (Cer)、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE)、PEGコハク酸ジアシルグリセロール (PEG-S-DAG) (4-O-(2', 3'-ジ(テトラデカノイルオキシ)プロピル-1-O-(w-メトキシ(ポリエトキシ)エチル)ブタンジオエート (PEG-S-DMG))、PEG ジアルコキシプロピルカルバム、N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、又はそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。追加の例示的な PEG-脂質コンジュゲートは、例えば、US 5, 885, 613、US 6, 287, 591、US 2003/0077829、US 2003/0077829、US 2005/0175682、US 2008/0020058、US 2011/0117125、US 2010/0130588、US 2016/0376224、及び US 2017/0119904 に記載されており、それら全ての内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0372】

いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、US 2018/0028664 に定義されている化合物であり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、US 2015/0376115 又は US 2016/0376224 に開示されており、これら両方の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0373】

PEG-DAA コンジュゲートは、例えば、PEG-ジラウリルオキシプロピル、PEG-ジミリスチルオキシプロピル、PEG-ジパルミチルオキシプロピル、又は PEG-ジステアリルオキシプロピルであり得る。PEG-脂質は、PEG-DMG、PEG-ジラウリルグリセロール、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステリルグリセロール、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、PEG-ジステリルグリカミド、PEG-コレステロール (1-[8'-(コレスト-5-エン-3[ベータ]-オキシ)カルボキシアミド-3', 6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)、PEG-DMB (3, 4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)エーテル)、及び 1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]のうちの 1 つ以上であり得る。いくつかの実施例では、PEG-脂質は、PEG-DMG、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] からなる群から選択され得る。

【0374】

PEG 以外の分子と複合した脂質は、PEG-脂質の代わりに使用することもできる。

例えば、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲート、ポリアミド-脂質コンジュゲート（ATT-脂質コンジュゲートなど）、及びカチオン性-ポリマー脂質（CPL）コンジュゲートを、PEG-脂質の代わりに、又はそれに加えて使用することができる。例示的な複合脂質、すなわち、PEG-脂質、（POZ）-脂質コンジュゲート、ATT-脂質コンジュゲート、及びカチオン性ポリマー-脂質は、国際特許出願公開第1996/010392号、同第1998/051278号、同第2002/087541号、同第2005/026372号、同第2008/147438号、同第2009/086558号、同第2012/000104号、同第2017/117528号、同第2017/099823号、同第2015/199952号、同第2017/004143号、同第2015/095346号、同第2012/000104号、同第2012/000104号、及び同第2010/006282号、米国特許出願公開第2003/0077829号、同第2005/0175682号、同第2008/0020058号、同第2011/0117125号、同第2013/0303587号、同第2018/0028664号、同第2015/0376115号、同第2016/0376224号、同第2016/0317458号、同第2013/0303587号、同第2013/0303587同第2011/0123453号、並びに米国特許第5,885,613号、同第6,287,591号、同第6,320,017号、及び同第6,586,559号に記載されており、これら全ての内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0375】

いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の化合物は、治療剤であり得る。治療剤は、治療目的に好適な任意のクラスから選択され得る。言い換えれば、治療剤は、治療目的に好適な任意のクラスから選択され得る。言い換えれば、治療剤は、所望の治療目的及び生物作用に従って選択され得る。例えば、LNP内のceDNAが、血友病Bを治療するために有用である場合、追加の化合物は、抗血友病B剤（例えば、化学療法剤、又は他の血友病B療法（小分子又は抗体を含むが、これらに限定されない）であり得る。別の実施例では、ceDNAを含有するLNPが、感染症を治療するために有用である場合、追加の化合物は、抗微生物剤（例えば、抗生物質又は抗ウイルス化合物）であり得る。更に別の実施例では、ceDNAを含有するLNPが、免疫疾患又は障害を治療するために有用である場合、追加の化合物は、免疫応答を調節する化合物（例えば、免疫抑制剤、免疫刺激性化合物、又は1つ以上の特定の免疫経路を調節する化合物）であり得る。いくつかの実施形態では、異なるタンパク質又は異なる化合物（治療薬など）をコードするceDNAなどの、異なる化合物を含有する異なる脂質ナノ粒子の異なるカクテルを、本開示の組成物及び方法で使用することができる。

【0376】

いくつかの実施形態では、追加の化合物は、免疫調節剤である。例えば、追加の化合物は、免疫抑制剤である。本明細書に記載の免疫抑制剤には、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）などのタンパク質キナーゼ阻害剤（PKI）が含まれ、これには、小分子化合物、生物製剤（モノクローナル抗体など）、及び、例えばIFNシグナル伝達及び産生経路の活性を阻害する大きなポリペプチド分子、又は免疫応答経路における標的タンパク質の発現を減少させることができる他の形態のアンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない。本開示は、例えば、免疫応答を調節するIFNシグナル伝達及び産生経路のアンタゴニストとして作用することができる治療の任意のモダリティの使用を企図することが理解されるべきである。

【0377】

免疫抑制剤は、タンパク質キナーゼの活性を阻害する広範なクラスの化合物に属するタンパク質キナーゼ阻害剤であり、宿主細胞又は遺伝性疾患に罹患している対象において免疫応答（自然及び／又は適応）を誘引する任意の核酸治療と組み合わせて使用することができる。チロシンキナーゼは、細胞増殖（例えば、IFNシグナル伝達及び産生及び上皮増殖因子（ERBB1、ERBB2/HER2、ERBB3/HER3、ERBB4/H

ER4などの「EGFR」))を含む様々な細胞機能を調節する。これらは、複数のサイトカイン、成長因子、及びホルモンの下流で作用し、それによって免疫応答を調節する主要なシグナルトランスデューサー及びアクチベーターである。例えば、特定のリガンドがその同族受容体に結合すると、コンフォメーションの変化により、受容体のオリゴマー化及び受容体関連JAKの活性化が生じる。JAKは相互に自己及びトランスリン酸化し、受容体鎖をリン酸化し、STAT分子のドッキング部位を提供する。次いで、STATはJAKを介したリン酸化を受け、二量体化し、核に移行し、そこで免疫応答（例えば、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、TNF α 、IL2、IL-6、IL-18など）に關与する標的遺伝子の転写を調節する。

【0378】

いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、Jak1、Jak2、Jak3、Stat、Tyk2、c-MET、EGFR、c-KIT、BTK、ALK、ABL、SRC、ROS1、Syk、MEK、ATM、NRF2、Flt3、fms/CSF1R、FDGFR、RON、IGF1R、EPHA2、EPHA3、VEGF、又はVEGFRのアンタゴニストである。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、チロシンキナーゼのアンタゴニストである。一実施形態では、免疫抑制剤は、Jak1のアンタゴニストである。別の実施形態では、免疫抑制剤は、Jak2のアンタゴニストである。一実施形態では、免疫抑制剤は、Jak3のアンタゴニストである。更に別の実施形態では、免疫抑制剤は、Tyk2のアンタゴニストである。更に別の実施形態では、免疫抑制剤は、EGFRのアンタゴニストである。一実施形態では、免疫抑制剤は、ALKのアンタゴニストである。更に別の実施形態では、免疫抑制剤は、Sykのアンタゴニストである。

【0379】

一実施形態では、免疫抑制剤は、小分子アンタゴニストである。別の実施形態では、免疫抑制剤は、タンパク質キナーゼ標的に結合する抗体である。別の実施形態では、免疫抑制剤は、チロシンキナーゼに結合する抗体である。別の実施形態では、免疫抑制剤は、タンパク質キナーゼに対するモノクローナル抗体である。別の実施形態では、免疫抑制剤は、チロシンキナーゼに対するモノクローナル抗体である。別の実施形態では、免疫抑制剤は、Jak1、Jak2、Jak3、Stat、Tyk2、c-MET、EGFR、c-KIT、BTK、ALK、ABL、SRC、ROS1、Syk、MEK、ATM、NRF2、Flt3、fms/CSF1R、FDGFR、RON、IGF1R、EPHA2、EPHA3、VEGF及びVEGFRからなる群から選択される標的に対するモノクローナル抗体である。更に別の実施形態では、免疫抑制剤は、タンパク質キナーゼに対して結合親和性を有するポリペプチドである。更に別の実施形態では、免疫抑制剤は、Jak1、Jak2、Jak3、Stat、Tyk2、c-MET、EGFR、c-KIT、BTK、ALK、ABL、SRC、ROS1、Syk、MEK、ATM、NRF2、Flt3、fms/CSF1R、FDGFR、RON、IGF1R、EPHA2、EPHA3、VEGF、又はVEGFRの発現を減衰させるRNAi又はアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの核酸である。

【0380】

いくつかの実施形態では、タンパク質キナーゼ、例えばチロシンキナーゼの阻害は、所与のタンパク質キナーゼのATPポケットに結合し、それが標的タンパク質のリン酸化を触媒するのをブロックする小分子を使用することによって達成することができる。したがって、いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、タンパク質キナーゼの小分子アンタゴニストであってもよい。免疫抑制タンパク質キナーゼアンタゴニストの非限定的な例としては、メシル酸イマチニブ（GLEEVEC（登録商標））、ニロチニブ（TASIGNA（登録商標））、ソラフェニブ（NEXAVAR（登録商標））、スニチニブ（SUTENT（登録商標））、ダサチニブ（SPRCEL（登録商標））、アカラブルチニブ、アレクチニブ、アキシチニブ、バリシチニブ、アフアチニブ、ボスチニブ、ブリガチニブ、カボザンチニブ、セルデュラチニブ、セリチニブ、コビメチニブ、クリゾチニブ、ダコミチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、イマチニブ、フォスタマチニブ、ゲフィチニブ、A

10

20

30

40

50

G-1478、ラパチニブ、ロルラチニブ、TAK-659、ルキシロチニブ、オシメルチニブ、パゾパニブ、ペガブタニブ、ペガブチニブ、レゴラフェニブ、サラカチニブ、トファシチニブ、BMS-986165、バンデチニブ、ベムラフェニブ、又はその薬学的に許容される塩が挙げられる。

【0381】

いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、チロシンキナーゼの小分子アンタゴニストであってもよく、バリシチニブ、アフアチニブ、ブリガチニブ、セルデュラチニブ、セリチニブ、コビメチニブ、ダコミチニブ、ダサチニブ、オシメルチニブ、フォスタマチニブ、サラカチニブ、TAK-659、ルキシロチニブ、BMS-986165、トファシチニブ、及びその薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

10

【0382】

いくつかの実施形態では、当該TKIは、スニチニブ、イマチニブ、ソラフェニブ、ダサチニブ、エントプレスチニブ、フォスタマチニブ、TAK-659、ルキシロチニブ、バリシチニブ、BMS-986165、トファシチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

【0383】

いくつかの実施形態では、TKIは、フォスタマチニブ、ルキシロチニブ、BMS-986165、及びその薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

【0384】

一実施形態では、TKIは、ルキシロチニブ又はリン酸ルキシロチニブである。

20

【0385】

いくつかの実施形態では、TKIは、1つ若しくは複数のキナーゼを選択的に阻害し得るか、又は同じ経路で複数のキナーゼを標的化し得る。例えば、ルキシロチニブ及びバリシチニブは、Jak1及びJak2を阻害し得る。ロルラチニブはROS1及びALKを阻害し得る。ダサチニブは、Abl、Src、及びc-Kitを阻害し得る。ブリガチニブ、ゲンフィニチニブ、エルロチニブ、AG-1478、及びラパチニブはEGFRを阻害し得る。クリジチニブは、ALK及びc-Metの両方を阻害し得る。フォスタマチニブ及びセルデュリチニブは、Sykを選択的に阻害し得る。サラカチニブは、Src及びAblを阻害し得る。いくつかの実施形態では、TKIは、Jak1の阻害剤である。いくつかの実施形態では、TKIは、Jak2の阻害剤である。いくつかの実施形態では、TKIは、Jak1及びJak2の阻害剤である。いくつかの実施形態では、TKIは、EGFRの阻害剤である。いくつかの実施形態では、TKIは、ALKの阻害剤である。いくつかの実施形態では、TKIは、Sykの阻害剤である。

30

【0386】

免疫応答経路におけるタンパク質キナーゼ活性は、タンパク質キナーゼに対するモノクローナル抗体などの生物製剤によっても阻害され得る。これらの治療薬は、受容体タンパク質キナーゼの活性化を防ぐことで効果を発揮し、高い特異性で細胞表面抗原に結合することができる。いくつかのモノクローナル抗体は、免疫応答シグナル伝達経路を感知するDNAに関与するタンパク質キナーゼを阻害する役割を果たす受容体タンパク質キナーゼを標的化する。トラスツズマブ及びペバシズマブは、そのようなモノクローナル抗体の非限定的な例である。

40

【0387】

いくつかの実施形態では、TNAに対する望ましくない免疫応答を抑制するように機能する生物学的薬剤は、アド-トラスツズマブエムタンシン、セツキシマブ、Cetuximab（商標）、シクツムマブ、ダロツズマブ、デュリゴツマブ、エルツマキシマブ、フツキシマブ、ガニツマブ、イクルクマブ、マルゲツキシマブ、ナルナツマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ（h-R3）、オララツマブ、オナルツズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、ラムシルマブ、セリバンツマブ、タニビルマブ、テプロツムマブ、trastuzumab（商標）、トラスツズマブ、及びザツキシマブからなる群から選択されるモノクローナル抗体である。一実施形態では、モノクローナル抗体は、トラスツズマブであ

50

る。別の実施形態では、モノクローナル抗体は、セツキシマブである。

【0388】

いくつかの実施形態では、タンパク質キナーゼ阻害剤は、ペプチドである。ペプチドは、Jak1、Jak2、Jak3、STAT、Tyk2、c-MET、EGFR、c-KIT、BTK、ALK、ABL、SRC、ROS1、Syk、MEK、ATM、NRF2、Flt3、fms／CSF1R、FDGFR、RON、IGF1r、EPHA2、EPHA3、VEGF、又はVEGFRなどの標的タンパク質に結合する特異的な親和性を有するポリペプチドであってもよい。ポリペプチド免疫抑制剤の非限定的な例には、アフリベルセプト（VEGF）が含まれる。ペプチドの結合標的は、例えばIFN応答及び産生経路に關与するシグナル伝達経路にあり得る。

10

【0389】

いくつかの実施形態では、本開示の免疫抑制剤は、免疫抑制剤が核酸治療薬と組み合わせて存在する場合、インビトロ及びインビボでの炎症誘発性サイトカイン及びケモカインのレベルを効果的に低減する。炎症誘発性サイトカインは、インターフェロン- α （IFN- α ）、インターフェロン- γ （IFN- γ ）、腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）、インターロイキン-1 β （IL-1 β ）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-8（IL-8）、インターロイキン-10（IL-10）、インターロイキン-12（IL-12）、インターロイキン-18（IL-18）、血管内皮増殖因子（VEGF）、白血病抑制因子（LIF）、マトリックスメタロプロテイナーゼ2（MMP2）、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）、RANTES（CCL5）、IP-10（CXCL10）、マクロファージ炎症性タンパク質-1 α （MIP-1 α ）；CCL3）及び／又はマクロファージ炎症性タンパク質-1 β （MIP-1 β ；CCL4）のいずれか又は組み合わせから選択され得る。

20

【0390】

いくつかの実施形態では、追加の化合物は、免疫刺激剤である。本明細書では、產生された脂質ナノ粒子に封入された昆虫細胞、又は本明細書に記載されるFIXタンパク質の発現のための合成的に產生されたceDNAベクター、及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む医薬組成物もまた提供される。

【0391】

いくつかの態様では、本開示は、1つ以上の薬学的賦形剤を更に含む脂質ナノ粒子製剤を提供する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、スクロース、トリス、トレハロース、及び／又はグリシンを更に含む。

30

【0392】

ceDNAベクターは、粒子の脂質部分と複合され得るか、又は脂質ナノ粒子の脂質位置に封入され得る。いくつかの実施形態では、ceDNAは、脂質ナノ粒子の脂質位置に完全に封入され得、それによって例えば水溶液中のヌクレアーゼによる分解からそれを保護する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中のceDNAは、37℃で少なくとも約20、30、45、又は60分間のヌクレアーゼへの脂質ナノ粒子の曝露後に実質的に分解されない。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中のceDNAは、37℃で少なくとも約30、45、若しくは60分、又は少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、若しくは36時間の血清中の粒子のインキュベーション後に実質的に分解されない。

40

【0393】

ある特定の実施形態では、脂質ナノ粒子は、対象、例えばヒトなどの哺乳動物に対して実質的に非毒性である。いくつかの態様では、脂質ナノ粒子製剤は、凍結乾燥粉末である。

【0394】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、少なくとも1つの脂質二層を有する固体コア粒子である。他の実施形態では、脂質ナノ粒子は、非二層構造、すなわち非ラメラ（すなわち、非二層）形態を有する。限定なく、非二層の形態には、例えば、三次元の管、口

50

ッド、立方対称などが含まれ得る。例えば、脂質ナノ粒子の形態（ラメラ対非ラメラ）は、US 2010/0130588（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される Cryo-TEM 分析を使用して容易に評価され、特徴付けられ得る。

【0395】

いくつかの更なる実施形態では、非ラメラ形態を有する脂質ナノ粒子は、高電子密度である。いくつかの態様では、本開示は、単一ラメラ構造又は多ラメラ構造のいずれかである脂質ナノ粒子を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子及び／又は発泡ベース粒子を含む脂質ナノ粒子を提供する。

【0396】

脂質構成成分の組成物及び濃度を制御することによって、脂質コンジュゲートが脂質粒子外で交換する速度、順に脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を制御することができる。加えて、例えば、pH、温度、又はイオン強度を含む他の変数を使用して、脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を変化及び／又は制御することができる。脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を制御するために使用され得る他の方法は、本開示に基づいて当業者に明らかとなるであろう。脂質コンジュゲートの組成物及び濃度を制御することによって、脂質粒径を制御することも明らかとなるであろう。

【0397】

製剤化されたカチオン性脂質の pKa は、核酸の送達のための LNP の有効性と相関し得る（Jayaraman et al, Angewandte Chemie, International Edition (2012), 51 (34), 8529-8533、Semple et al, Nature Biotechnology 28, 172-176 (2010) を参照されたく、それらの両方は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。pKa の好ましい範囲は、約 5 ～ 約 7 である。カチオン性脂質の pKa は、2-（p-トリイジノ）-6-ナフタレンスルホン酸（TNS）の蛍光に基づくアッセイを使用し、脂質ナノ粒子中で決定され得る。

【0398】

VIII. 使用方法

本明細書に開示される FIX タンパク質の発現のための cDNA ベクターはまた、関心対象の核酸配列（例えば、FIX タンパク質をコードする）を標的細胞（例えば、宿主細胞）に送達するための方法において使用され得る。方法は、特に、FIX タンパク質を、それを必要とする対象の細胞に送達するため、及び血友病 B を治療するための方法であり得る。本開示は、FIX タンパク質の発現の治療効果が生じるように、対象の細胞内の cDNA ベクターにコードされる FIX タンパク質のインビボ発現を可能にする。これらの結果は、cDNA ベクター送達のインビボ及びインビトロ両方の形態で見られる。

【0399】

加えて、本開示は、当該 FIX タンパク質をコードする本開示の cDNA ベクターの複数回投与を含む、それを必要とする対象の細胞中の FIX タンパク質の送達のための方法を提供する。本開示の cDNA ベクターは、カプシド化ウイルスベクターに対して典型的に観察されるような免疫応答を誘導しないため、そのような複数回投与戦略は、cDNA ベースの系においてより大きな成功を収めるであろう。cDNA ベクターは、所望の組織の細胞をトランスフェクトし、過度の副作用なしに、FIX タンパク質の十分なレベルの遺伝子導入及び発現をもたらすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路には、網膜投与（例えば、網膜下注射、脈絡膜上注射又は硝子体内注射）、静脈内（例えば、リポソーム製剤で）、選択された器官への直接送達（例えば、肝臓、腎臓、胆嚢、前立腺、副腎、心臓、腸、肺、及び胃から選択される任意の 1 つ以上の組織）、筋肉内、及び他の親投与経路が含まれるが、これらに限定されない。所望される場合、投与経路を組み合わせることができる。

【0400】

本明細書に記載されるような FIX タンパク質の発現のための cDNA ベクターの送

10

20

30

40

50

達は、発現された F I X タンパク質の送達に限定されない。例えば、従来の方法で產生された（例えば、細胞ベースの產生方法（例えば、昆虫細胞產生方法）を使用して）又は合成的に產生された本明細書に記載される c e D N A ベクターは、遺伝子療法の一部を提供するために提供される他の送達系とともに使用され得る。本開示に従って c e D N A ベクターと組み合わせることができる系の 1 つの非限定的な例は、F I X タンパク質を発現する c e D N A ベクターの効果的な遺伝子発現のために 1 つ以上の補因子又は免疫抑制因子を別々に送達する系を含む。

【0401】

本開示はまた、治療有効量の c e D N A ベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、それを必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞又は組織）に導入することを含む、対象における血友病 B を治療する方法を提供する。c e D N A ベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。選択される c e D N A ベクターは、血友病 B を治療するために有用な F I X タンパク質をコードする核酸配列を含む。特に、c e D N A ベクターは、対象に導入されたときに、外因性 D N A 配列によってコードされる所望の F I X タンパク質の転写を指示することができる制御エレメントに作動可能に連結された所望の F I X タンパク質配列を含み得る。c e D N A ベクターは、上記及び本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【0402】

本明細書に提供される組成物及びベクターを使用して、様々な目的のために F I X タンパク質を送達することができる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、研究目的のため、例えば、導入遺伝子を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成するため、例えば、F I X タンパク質産生物の機能を研究するために使用されることが意図される F I X タンパク質をコードする。別の実施例では、導入遺伝子は、血友病 B の動物モデルを作成するために使用されることが意図される F I X タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、コードされる F I X タンパク質は、哺乳動物対象における血友病 B 状態の治療又は予防に有用である。F I X タンパク質は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、又は機能不全に関連した血友病 B を治療するのに十分な量で患者に導入され得る（例えば、発現され得る）。

【0403】

原則として、発現カセットは、変異によって減少若しくは欠如している F I X タンパク質をコードする、又は過剰発現が本開示の範囲内であるとみなされる場合に、治療効果をもたらす核酸又は任意の導入遺伝子を含み得る。好ましくは、挿入されていない細菌 D N A は存在せず、好ましくは、本明細書に提供される c e D N A 組成物中に細菌 D N A は存在しない。

【0404】

c e D N A ベクターは、1 種の c e D N A ベクターに限定されない。そのようなものとして、別の態様では、異なるタンパク質、又は異なるプロモーター若しくはシス調節エレメントに作動可能に連結されるが同じ F I X タンパク質を発現する複数の c e D N A ベクターは、標的細胞、組織、器官、又は対象に同時に又は順次を送達され得る。したがって、この戦略では、複数のタンパク質の遺伝子療法又は遺伝子送達を同時に行うことができる。F I X タンパク質の異なる部分を別々の c e D N A ベクターに分離することも可能であり（例えば、F I X タンパク質の機能に必要な異なるドメイン及び／又は補因子）、同時に又は異なる時間に投与することができ、別々に調節可能であり得、それによって追加レベルの F I X タンパク質の発現の制御を付加する。送達はまた、複数回、及び重要なことに、ウイルスカプシドの不在に起因する抗カプシド宿主免疫反応の欠失を仮定して、後に増加又は減少する用量で臨床状況において遺伝子療法のために実施され得る。カプシドが存在しないため、抗カプシド反応は起こらないと予想される。

【0405】

本開示はまた、本明細書に開示される治療有効量の c e D N A ベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、それを必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞又は

組織）に導入することを含む、対象における血友病 B を治療する方法を提供する。c e D N A ベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実施される c e D N A ベクターは、血友病 B を治療するために有用な関心対象の核酸配列を含む。特に、c e D N A ベクターは、対象に導入されたときに、外因性 D N A 配列によってコードされる所望のポリペプチド、タンパク質、又はオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに作動可能に連結された所望の外因性 D N A 配列を含み得る。c e D N A ベクターは、上記及び本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【0406】

IX. F I X タンパク質産生のための c e D N A ベクターの送達方法

いくつかの実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、様々な好適な方法によってインビトロ又はインビボで標的細胞に送達され得る。c e D N A ベクターは、単独で適用又は注射され得る。c e D N A ベクターは、トランスフェクション試薬又は他の物理的手段の助けなく細胞に送達され得る。代替的に、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、細胞への D N A の進入を促進する任意の当該技術分野において既知のトランスフェクション試薬又は他の当該技術分野において既知の物理的手段、例えば、リボソーム、アルコール、高ポリリジン化合物、高アルギニン化合物、リン酸カルシウム、微小胞、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを使用して送達され得る。

【0407】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、様々な送達試薬を使用し、従来の A A V ビリオンで形質導入することが通常は困難である細胞及び組織型を効率的に標的とし得る。

【0408】

本明細書に記載される技術の一態様は、F I X タンパク質を細胞に送達する方法に関する。典型的には、インビボ及びインビトロ方法では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、本明細書に開示される方法、並びに当該技術分野で既知の他の方法を使用して細胞に導入されてもよい。本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、好ましくは、生物学的に有効な量で細胞に投与される。c e D N A ベクターがインビボで細胞に（例えば、対象に）投与される場合、c e D N A ベクターの生物学的有効量は、標的細胞における F I X タンパク質の形質導入及び発現をもたらすのに十分な量である。

【0409】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの例示的な投与形態としては、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入（例えば、エアロゾルを介した）、頬側（例えば、舌下）、膣、髄腔内、眼内、経皮、内皮内、子宮内（又は卵内）、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、筋肉内〔骨格、横隔膜、及び／又は心筋への投与を含む〕、胸膜内、脳内、及び動脈内）が挙げられる。投与は、肝臓又は他の部位（例えば、いずれかの腎臓、胆嚢、前立腺、副腎、心臓、腸、肺、及び胃）への全身的又は直接的な送達であり得る。

【0410】

投与は、局所（例えば、気道表面を含む皮膚及び粘膜表面への、並びに経皮投与）、リンパ内など、並びに直接組織又は器官注射（例えば、限定されないが、肝臓、また眼、骨格筋、心筋、横隔膜を含む筋肉、若しくは脳への）であり得る。

【0411】

c e D N A ベクターの投与は、肝臓及び／又はまた眼、脳、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、気道上皮、腎臓、脾臓、膵臓、皮膚からなる群から選択される部位を含むが、これらに限定されない、対象の任意の部位に対して行われ得る。

【0412】

任意の所与の症例における最も好適な経路は、治療、改善、及び／又は予防される病態

10

20

30

40

50

の性質及び重症度、並びに使用されている特定の c e D N A ベクターの性質に依存するであろう。追加的に、c e D N A は、単一のベクター又は複数の c e D N A ベクター（例えば、c e D N A カクテル）中に 2 つ以上の F I X タンパク質を投与することを可能にする。

【0413】

A. c e D N A ベクターの筋肉内投与

いくつかの実施形態では、対象における疾患を治療する方法は、治療有効量の F I X タンパク質をコードする c e D N A ベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞又は組織）に導入することを含む。いくつかの実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、対象の筋組織に投与される。

10

【0414】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの投与は、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、又は眼の筋肉からなる群から選択される部位を含むが、これらに限定されない、対象の任意の部位に対して行われ得る。

【0415】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの、本開示に従う骨格筋への投与としては、肢（例えば、上腕、下腕、上肢、及び／又は下肢）、腰、首、頭（例えば、舌）、咽頭、腹部、骨盤／会陰、及び／又は指の骨格筋への投与が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示される c e D N A ベクターは、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内、四肢灌流（任意選択的に、脚及び／若しくは腕の単離された四肢灌流、例えば、Arruda et al., (2005) Blood 105: 3458-3464 を参照されたい）並びに／又は直接筋肉内注射によって骨格筋に送達され得る。特定の実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、対象（例えば、DMD などの筋ジストロフィーを有する対象）の肝臓、眼、四肢灌流、任意選択的に単離された四肢灌流（例えば、静脈内又は動脈内投与による）によって四肢（腕及び／又は脚）に投与される。実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、「流体力学的」技法を用いることなく投与され得る。

20

【0416】

例えば、従来のウイルスベクターの（例えば、網膜への）組織送達は、血管系内の圧力を増加させ、ウイルスベクターが内皮細胞バリアと交差する能力を促進する流体力学的技法（例えば、大容量での静脈内／静脈内投与）によってしばしば強化される。特定の実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターは、大量注入及び／又は血管内圧の上昇（例えば、通常の収縮期圧よりも高い、例えば通常の収縮期血圧よりも血管内圧力の 5 %、10 %、15 %、20 %、25 % 以下の増加）などの流体力学的技法の不在で投与することができる。そのような方法は、浮腫、神経損傷、及び／又は区画症候群などの流体力学的技法に関連する副作用を低減又は回避することができる。

30

【0417】

更に、骨格筋に投与される、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを含む組成物は、四肢（例えば、上腕、下腕、上脚、及び／若しくは下肢）の骨格筋、背中、首、頭（例えば、舌）、胸部、腹部、骨盤／会陰、及び／又は指に投与することができる。好適な骨格筋には、小指外転筋（手の）、小趾外転筋（足の）、母趾外転筋、第五中足骨外転筋（abductor ossis metatarsi quinti）、短母指外転筋、長母指外転筋、短内転筋、母趾内転筋、長内転筋、大内転筋、母指内転筋、肘筋、前斜角筋、膝関節筋、上腕二頭筋、大腿二頭筋、上腕筋、腕橈骨筋、頬筋、烏口腕筋、皺眉筋、三角筋、口角下制筋、下唇下制筋、顎二腹筋、背側骨間筋（手の）、背側骨間筋（足の）、短橈側手根伸筋、長橈側手根伸筋、尺側手根伸筋、小指伸筋、指伸筋、短趾伸筋、長趾伸筋、短母趾伸筋、長母趾伸筋、示指伸筋、短母指伸筋、長母指伸筋、橈側手根屈筋、尺側手根屈筋、短小指屈筋（手の）、短小趾屈筋（足の）、短趾屈筋、長趾屈筋、深指屈筋、浅指屈筋、短母趾屈筋、長母趾屈筋、短母指屈筋、長

40

50

母指屈筋、前頭筋、腓腹筋、オトガイ舌骨筋、大臀筋、中臀筋、小臀筋、薄筋、頸腸肋筋、腰腸肋筋、胸腸肋筋、腸骨筋 (iliacus)、下双子筋、下斜筋、下直筋、棘下筋、棘間筋、横突間筋 (intertransversi)、外側翼突筋、外直筋、広背筋、口角拳筋、上唇拳筋、上唇鼻翼拳筋、上眼瞼拳筋、肩甲拳筋、長回旋筋 (long rotators)、頭最長筋、頸最長筋、胸最長筋、頭長筋、頸長筋、虫様筋 (手の)、虫様筋 (足の)、咬筋、内側翼突筋、内直筋、中斜角筋、多裂筋、顎舌骨筋、下頭斜筋、上頭斜筋、外閉鎖筋、内閉鎖筋、後頭筋、肩甲舌骨筋、小指対立筋、母指対立筋、眼輪筋、口輪筋、掌側骨間筋、短掌筋、長掌筋、恥骨筋、大胸筋、小胸筋、短腓骨筋、長腓骨筋、第三腓骨筋、梨状筋、底側骨間筋、足底筋、広頸筋、膝窩筋、後斜角筋、方形回内筋、円回内筋、大腰筋、大腿方形筋、足底方形筋、前頭直筋、外側頭直筋、大後頭直筋、小後頭直筋、大腿直筋、大菱形筋、小菱形筋、笑筋、縫工筋、最小斜角筋、半膜様筋、頭半棘筋、頸半棘筋、胸半棘筋、半腱様筋、前鋸筋、短回旋筋 (short rotators)、ヒラメ筋、頭棘筋、頸棘筋、胸棘筋、頭板状筋、頸板状筋、胸鎖乳突筋、胸骨舌骨筋、胸骨甲状筋、茎突舌骨筋、鎖骨下筋、肩甲下筋、上双子筋、上斜筋、上直筋、回外筋、棘上筋、側頭筋、大腿筋膜張筋、大円筋、小円筋、胸部の筋、甲状舌骨筋、前脛骨筋、後脛骨筋、僧帽筋、上腕三頭筋、中間広筋、外側広筋、内側広筋、大頰骨筋及び小頰骨筋、並びに当該技術分野において既知の任意の他の好適な骨格筋が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0418】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの、横隔膜筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、及び／又は腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。いくつかの実施形態では、発現した導入遺伝子の c e D N A ベクターから標的組織への送達は、c e D N A ベクターを含む合成デポーを送達することによって達成することもでき、c e D N A ベクターを含むデポーは、骨格、平滑、心臓及び／若しくは横隔膜に移植されるか、又は筋肉組織は、本明細書に記載されるような c e D N A ベクターを含むフィルム若しくは他のマトリックスと接触させることができる。そのような移植可能なマトリックス又は基質は、米国特許第 7, 201, 898 号に記載されている。

20

【0419】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの、心筋への投与には、左心房、右心房、左心室、右心室、及び／又は中隔への投与が含まれる。本明細書に記載される c e D N A ベクターは、静脈内投与、大動脈内投与などの動脈内投与、直接心臓注射 (例えば、左心房、右心房、左心室、右心室への)、及び／又は冠動脈灌流によって心筋に送達され得る。

30

【0420】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの、平滑筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、及び／又は腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。一実施形態では、投与は、平滑筋内、その付近、及び／又はその上に存在する内皮細胞に対して行われ得る。平滑筋の非限定的な例には、目の虹彩、肺の細気管支、喉頭筋 (声帯)、胃、食道、小腸及び大腸の筋肉層、胃腸管、尿管、膀胱の排尿筋、子宮筋層、陰茎、又は前立腺が含まれる。

40

【0421】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、骨格筋、横隔膜筋、及び／又は心筋に投与される。代表的な実施形態では、本開示による c e D N A ベクターは、骨格筋、心臓筋及び／又は横隔膜筋の障害を治療及び／又は予防するために使用される。

【0422】

具体的には、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを含む組成物は、眼 (例えば、外直筋、内直筋、上直筋、下直筋、上斜筋、下斜筋)、顔面筋 (例えば、後頭前頭筋、側頭頭頂筋、鼻根筋、鼻筋、鼻中隔下制筋、眼輪筋、皺眉

50

筋、眉毛下制筋、耳介筋、口輪筋、口角下制筋、笑筋、大頬骨筋、小頬骨筋、上唇挙筋、上唇鼻翼挙筋、下唇下制筋、口角挙筋、頬筋、オトガイ筋）又は舌筋（例えば、オトガイ舌筋、舌骨舌筋、小角舌筋、茎突舌筋、口蓋舌筋、上縦舌筋、下縦舌筋、垂直舌筋、及び横筋）の1つ以上の筋肉に送達され得ることが企図される。

【0423】

（i）筋肉内注射：いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む組成物は、対象における所定の筋肉、例えば、骨格筋（例えば、三角筋、外側広筋、背腹筋の腹側腹筋、又は幼児の場合は前外側大腿）の1つ以上の部位に針を使用して注射され得る。c e D N Aを含む組成物は、筋細胞の他のサブタイプに導入することができる。筋細胞サブタイプの非限定的な例には、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、及び／又は横隔膜筋細胞が含まれる。

10

【0424】

筋肉内注射のための方法は当業者に知られており、したがって、本明細書では詳細に説明しない。しかしながら、筋肉内注射を実施する場合、適切な針のサイズは、患者の年齢及びサイズ、組成物の粘度、並びに注射部位に基づいて決定されるべきである。表13は、例示的な注射部位及び対応する針のサイズについてのガイドラインを提供する。

【表13】

表13：ヒト患者における筋肉内注射のガイドライン

注射部位	針ゲージ	針サイズ	組成物の最大量
臀筋部位(中殿筋及び小殿筋)	水溶液:20~25ゲージ 粘性又は油ベースの溶液:18~21ゲージ	やせた成人:15~25mm 平均的な成人:25mm より大きな成人(150lbs超):25~38mm。 子供及び幼児:より小さい針を必要とする	3mL
外側広筋	水溶液:20~25ゲージ 粘性又は油ベースの溶液:18~21ゲージ 子供/幼児:22~25ゲージ	成人:25mm~38mm	3mL
三角筋	22~25ゲージ	男性: 130~260lbs:25mm 女性: <130lbs:16mm 130~200lbs:25mm >200lbs:38mm	1mL

20

30

40

【0425】

50

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、少量、例えば、所与の対象について表 1 3 に概説される例示的な量で製剤化される。いくつかの実施形態では、必要に応じて、対象は、注射の前に全身麻酔又は局所麻酔を投与され得る。これは、上記の一般的な注射部位ではなく、複数回の注射が必要な場合、又はより深部の筋肉に注射される場合に特に望ましい。

【 0 4 2 6 】

いくつかの実施形態では、筋肉内注射を、エレクトロポレーション、送達圧力、又はトランスフェクション試薬の使用と組み合わせて、c e D N A ベクターの細胞取り込みを増強することができる。

【 0 4 2 7 】

(i i) トランスフェクション試薬：いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、筋管又は筋肉組織へのベクターの取り込みを促進するための 1 つ以上のトランスフェクション試薬を含む組成物中で製剤化される。したがって、一実施形態では、本明細書に記載されている核酸は、本明細書の他の場所に記載されている方法を使用したトランスフェクションにより、筋細胞、筋管、又は筋組織に投与される。

【 0 4 2 8 】

(i i i) エレクトロポレーション：ある特定の実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、c e D N A の細胞への侵入を促進するための担体の非存在下、又は生理学的に不活性な薬学的に許容される担体（すなわち、カプシド不含非ウイルス性ベクターの筋管への取り込みを改善又は増強しない担体）中で投与される。そのような実施形態では、カプシド不含非ウイルス性ベクターの取り込みは、細胞又は組織のエレクトロポレーションによって促進することができる。

【 0 4 2 9 】

細胞膜は、細胞外への細胞質への通過に自然に抵抗する。この抵抗を一時的に低減するための 1 つの方法は「エレクトロポレーション」であり、電界を使用して、細胞に永続的な損傷を与えることなく、細胞に細孔を作成する。これらの細孔は、D N A ベクター、医薬品、D N A、及び他の極性化合物が細胞の内部にアクセスできるように十分な大きさである。時間の経過とともに、細胞膜の孔が閉じ、細胞が再び不透過性になる。

【 0 4 3 0 】

エレクトロポレーションは、例えば、外因性 D N A を生細胞に導入するために、インビトロ及びインビボの両方の適用で 사용할 ことができる。インビトロ適用は、典型的には、生細胞の試料を、例えば、D N A を含む組成物と混合する。次いで、細胞を平行板などの電極間に配置し、細胞／組成物混合物に電界を印加する。

【 0 4 3 1 】

インビボエレクトロポレーションにはいくつかの方法があり、電極は、例えば、治療される細胞の領域の上にある表皮を把持するキャリパーなどの様々な構成で提供することができる。代替的に、針状電極を組織に挿入して、より深部に位置する細胞にアクセスすることもできる。いずれの場合でも、例えば、核酸を含む組成物が治療領域に注射された後、電極は、領域に電界を印加する。いくつかのエレクトロポレーション適用では、この電界は、約 1 0 ～ 6 0 m s 持続期間の 1 0 0 ～ 5 0 0 V / c m 程度の単一の方波パルスを含む。そのようなパルスは、例えば、Genetronics, Inc. の B T X D i v i s i o n によって作製された E l e c t r o S q u a r e P o r a t o r T 8 2 0 の既知のアプリケーションで生成されてもよい。

【 0 4 3 2 】

典型的には、例えば、核酸の取り込みの成功は、筋肉が速やかに電氣的に刺激された場合、又は例えば筋肉への注射による組成物の投与直後にのみ起こる。

【 0 4 3 3 】

ある特定の実施形態では、エレクトロポレーションは、電界のパルスを使用して、又は低電圧／長パルス治療計画を使用して（例えば、方波パルスエレクトロポレーション系

10

20

30

40

50

を使用して）達成される。パルス電界を生成することができる例示的なパルス発生器は、例えば、指数波形を生成することができるECM600、及び方形波を生成することができるElectroSquarePorator（T820）を含み、いずれもGeneTronics, Inc.（San Diego, Calif.）の部門であるBTXから入手可能である。方形波エレクトロポレーション系は、設定された電圧まで急速に上昇し、設定された時間（パルス長）にわたってそのレベルに留まり、その後すぐにゼロまで低下する制御された電気パルスを送達する。

【0434】

いくつかの実施形態では、局所麻酔剤は、例えば、本明細書に記載されるカプシド不含非ウイルス性ベクターを含む組成物の存在下で組織のエレクトロポレーションに関連し得る疼痛を軽減するために、治療部位への注射によって投与される。更に、当業者は、筋肉の線維症、壊死、又は炎症をもたらす過剰な組織損傷を最小化及び／又は防止する組成物の用量が選択されるべきであることを理解するであろう。

【0435】

（iv）送達圧力：いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの筋肉組織への送達は、大容量と四肢（例えば、腸骨動脈）に供給する動脈への迅速な注射との組み合わせを使用する送達圧力によって促進される。この投与方法は、典型的に筋肉が血管クランプの止血帯を使用して体循環から隔離されている間に、ceDNAベクターを含む組成物を肢血管系に注入することを含む様々な方法によって達成され得る。1つの方法において、組成物は、四肢の脈管構造を通して循環されて、細胞への管外遊出を可能にする。別の方法では、血管内流体力学的圧力を増加させて血管床を拡張し、筋肉細胞又は組織へのceDNAベクターの取り込みを増加させる。一実施形態では、ceDNA組成物は、動脈に投与される。

【0436】

（v）脂質ナノ粒子組成物：いくつかの実施形態では、筋肉内送達のために本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書の他の場所に記載されるリボソームを含む組成物中で製剤化される。

【0437】

（vi）筋肉組織を標的とするceDNAベクターの全身投与：いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、間接的送達投与を介して筋肉を標的とするように製剤化され、ceDNAは、肝臓とは対照的に筋肉に輸送される。したがって、本明細書に記載される技術は、例えば、全身投与による、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターを含む組成物の筋肉組織への間接投与を包含する。そのような組成物は、局所的、静脈内（ボーラス又は連続注入による）、細胞内注射、組織内注射、経口、吸入、腹腔内、皮下、腔内で投与することができ、必要に応じてぜん動手段によって、又は当業者による他の既知の手段によって送達することができる。薬剤は、必要に応じて、例えば静脈内注入によって全身投与することができる。

【0438】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの筋肉細胞／組織への取り込みは、ベクターを筋肉組織に優先的に向ける標的化剤又は部分を使用することによって増加する。したがって、いくつかの実施形態では、カプシド不含ceDNAベクターは、身体他の細胞又は組織に存在するカプシド不含ceDNAベクターの量と比較して、筋肉組織に濃縮することができる。

【0439】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターを含む組成物は、筋細胞への標的化部分を更に含む。他の実施形態では、発現された遺伝子産物は、作用が望まれる組織に特異的な標的化部分を包含。標的化部分は、細胞又は組織の細胞内、細胞表面、又は細胞外バイオマーカーを標的化、相互作用、連結、及び／又は結合することができる任意の分子又は分子の複合体を含み得る。バイオ

10

20

30

40

50

マーカーは、例えば、細胞プロテアーゼ、キナーゼ、タンパク質、細胞表面受容体、脂質、及び／又は脂肪酸を含み得る。標的化部分が、標的、相互作用、連結、及び／又は結合して、特定の疾患に関連する分子を含むことができるバイオマーカーの他の例。例えば、バイオマーカーは、上皮成長因子受容体及びトランスフェリン受容体などの、がん発生に関係する細胞表面受容体を含み得る。標的化部分には、合成化合物、天然化合物又は産生物、高分子実体、生体工学分子（例えば、ポリペプチド、脂質、ポリヌクレオチド、抗体、抗体断片）、及び標的筋組織で発現する分子に結合する小実体（例えば、小分子、神経伝達物質、基質、リガンド、ホルモン、元素化合物）が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0440】

ある特定の実施形態では、標的化部分は、例えば、標的細胞の特定の所望の分子を自然に認識する受容体を含む、受容体分子を更に含み得る。そのような受容体分子には、標的分子との相互作用の特異性を高めるために修飾された受容体、受容体によって自然に認識されない所望の標的分子と相互作用するように修飾された受容体、及びそのような受容体の断片が含まれる（例えば、Skerra, 2000, J. Molecular Recognition, 13:167-187を参照されたい）。好ましい受容体は、ケモカイン受容体である。例示的なケモカイン受容体は、例えば、Lapidot et al, 2002, Exp Hematol, 30:973-81及びOnuffer et al, 2002, Trends Pharmacol Sci, 23:459-67に記載されている。

【0441】

他の実施形態では、追加の標的化部分は、例えば、トランスフェリン（Tf）リガンドなどの、標的細胞の特定の所望の受容体を自然に認識するリガンドを含むリガンド分子を含み得る。そのようなリガンド分子には、標的受容体との相互作用の特異性を高めるために修飾されたリガンド、リガンドによって自然に認識されない所望の受容体と相互作用するように修飾されたリガンド、及びそのようなリガンドの断片が含まれる。

【0442】

更に他の実施形態では、標的化部分は、アプタマーを含み得る。アプタマーは、標的細胞の所望の分子構造に特異的に結合するように選択されるオリゴヌクレオチドである。アプタマーは、典型的には、ファージディスプレイの親和性選択（インビトロ分子進化としても知られている）と同様の親和性選択プロセスの産物である。このプロセスは、例えば、罹患した免疫原が結合している固体支持体を使用して親和性分離のいくつかのタンデム反復を実施し、続いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行って免疫原に結合した核酸を増幅することを含む。したがって、親和性分離の各ラウンドは、所望の免疫原に首尾よく結合する分子の核酸集団を濃縮する。このようにして、核酸のランダムなプールを「教育」して、標的分子に特異的に結合するアプタマーを得ることができる。アプタマーは、典型的にはRNAであるが、限定されないが、ペプチド核酸（PNA）及びホスホロチオエート核酸などのDNA又はその類似体又は誘導体であり得る。

【0443】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、カプシド不含非ウイルス性ベクター又は遺伝子産物が特定の組織に標的化されるように、例えば集束光線から放出される光分解性リガンド（すなわち、「ケージ化」リガンド）を含み得る。

【0444】

本明細書では、組成物が対象の1つ以上の筋肉の複数の部位に送達されることも企図される。すなわち、注入は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100の注射部位において行われ得る。そのような

部位は、単一の筋肉の領域に広がることできるか、又は複数の筋肉に分散することできる。

【0445】

B. 非筋肉部位へのFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの投与

別の実施形態では、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターが肝臓に投与される。ceDNAベクターはまた、角膜及び／又は視神経などの眼の異なる領域に投与されてもよい。ceDNAベクターはまた、脊髄、脳幹（延髄、脳橋）、中脳（視床下部、視床、視床上部、脳下垂体、黒質、松果体）、小脳、終脳（線条体、後頭葉、側頭葉、頭頂葉、及び前頭葉、皮質、基底核、海馬、及び扁桃体（*port a amy g d a l a*）を含む大脳）、辺縁系、新皮質、線条体、大脳、並びに下丘中に導入されてもよい。ceDNAベクターは、脳脊髄液中に（例えば、腰椎穿刺によって）送達されてもよい。FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、更に、血液脳関門が攪乱された状況（例えば、脳腫瘍又は脳梗塞）において、CNSに血管内投与されてもよい。

10

【0446】

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

20

【0447】

いくつかの実施形態では、FIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、CNS中の所望の領域又は区画への直接注射（例えば、定位的注射）によって、液体製剤中で投与される。他の実施形態では、ceDNAベクターは、所望の領域への局所適用によって、又はエアロゾル製剤の鼻腔内投与によって提供され得る。眼への投与は、液滴の局所適用によって行われてもよい。更なる代替として、ceDNAベクターは、固体の徐放性製剤として投与され得る（例えば、米国特許第7,201,898号を参照されたい）。更に追加の実施形態では、ceDNAベクターを、逆行性輸送に使用して、運動ニューロンが関与する疾患及び障害（例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄性筋萎縮症（SMA）など）を治療、改善、及び／又は予防することできる。例えば、ceDNAベクターは、筋組織に送達され得、そこからニューロン中に移動し得る。

30

【0448】

C. エクスビボ治療

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

40

【0449】

本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターで形質導入された細胞は、好ましくは、薬学的担体と組み合わせて「治療有効量」で対象に投与される。当業者であれば、いくらかの利益が対象にもたらされる限り、治療効果が完全又は治療的である必要はないことを理解するであろう。

【0450】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、インビトロ、エクスビボ、又はインビボで細胞内で産生される、本明細書に記載されるFIXタンパク質（導入遺伝子又は核酸配列と呼ばれることもある）をコードすることできる。例えば、本明細書で論じられる治療方法における本明細書に記

50

載される c e D N A ベクターの使用とは対照的に、いくつかの実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを培養した細胞に導入し、発現した F I X タンパク質を、例えば、抗体及び融合タンパク質の産生のために細胞から単離することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを含む培養細胞は、抗体又は融合タンパク質の商業的産生に使用することができる、例えば、抗体又は融合タンパク質の小規模又は大規模バイオ製造の細胞源として役立つ。代替実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、小規模な産生を含む抗体又は融合タンパク質のインビボ産生並びに商業的な大規模 F I X タンパク質産生のために、宿主非ヒト対象の細胞に導入される。

【0451】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、獣医学及び医学の両方の用途で使うことができる。上記のエクスピボ遺伝子送達方法に好適な対象としては、鳥類（例えば、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、七面鳥、及びキジ）及び哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ネコ、イヌ、及びウサギ類）が挙げられ、哺乳動物が好ましい。ヒト対象が最も好ましい。ヒト対象は、新生児、幼児、年少者、及び成人を含む。

【0452】

D. 用量範囲

本明細書では、本明細書に記載される F I X タンパク質をコードする c e D N A ベクターを含む有効量の組成物を対象に投与することを含む治療方法が提供される。当業者によって理解されるように、「有効量」という用語は、血友病 B の治療のための「治療有効量」での F I X タンパク質の発現をもたらす、投与された c e D N A 組成物の量を指す。

【0453】

インビボ及び／又はインビトロアッセイを任意選択的に用いて、使用のための最適投与量範囲を同定するのを助けることができる。製剤に用いられる正確な用量はまた、投与経路及び病態の重症度に依存し、当業者の判断及び各対象の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、インビトロ又は動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から推定され得る。

【0454】

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

【0455】

特定の「治療効果」を達成するために必要な、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの量の用量は、核酸投与の経路、治療効果を達成するために必要な遺伝子又は R N A 発現のレベル、治療される特定の疾患又は障害、及び遺伝子、R N A 産物、又は得られる発現タンパク質の安定性を含むが、これらに限定されないいくつかの因子に基づいて変化するであろう。当業者は、前述の因子並びに当該技術分野において周知の他の因子に基づいて、特定疾患又は障害を有する患者を治療するための c e D N A ベクター用量範囲を容易に判定することができる。

【0456】

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

10

20

30

40

50

することができるであろう。

【0457】

「治療有効量」は、臨床治験を通じて判定され得る比較的広い範囲内に含まれ、特定の用途に依存する（神経細胞は、極少量を必要とするが、全身注入は、多量を必要とする）であろう。例えば、ヒト対象の骨格筋又は心筋への直接インビボ注射の場合、治療有効量は、およそ約 $1\mu\text{g}\sim 100\text{g}$ のceDNAベクターとなるであろう。ceDNAベクターを送達するためにエキソソーム又は微粒子が使用される場合、治療有効量は、経験的に判定され得るが、 $1\mu\text{g}\sim$ 約 100g のベクターを送達することが予想される。更に、治療有効量とは、疾患の1つ以上の症状の低減をもたらすが、著しいオフターゲット又は著しい有害副作用には至らない、対象に影響を与えるのに十分な量の導入遺伝子を発現するceDNAベクターの量である。一実施形態では、「治療有効量」は、血友病Bバイオマーカーの発現の統計的に有意な測定可能な変化又は所与の疾患症状の低減をもたらすのに十分である、発現したFIXタンパク質の量である。そのような有効量は、所与のceDNAベクター組成物についての臨床試験及び動物実験で評価することができる。

10

【0458】

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

【0459】

インビトロトランスフェクションの場合、細胞（ 1×10^6 細胞）に送達される本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターの有効量は、およそ $0.1\sim 100\mu\text{g}$ のceDNAベクター、好ましくは $1\sim 20\mu\text{g}$ 、より好ましくは $1\sim 15\mu\text{g}$ 又は $8\sim 10\mu\text{g}$ となる。より大きなceDNAベクターは、より多い用量を必要とするであろう。エキソソーム又は微粒子が使用される場合、有効なインビトロ用量は、経験的に判定され得るが、一般に同量のceDNAベクターを送達することが意図される。

20

【0460】

血友病Bの治療のために、本明細書に開示されるFIXタンパク質を発現するceDNAベクターの適切な投与量は、治療される特定のタイプの疾患、FIXタンパク質のタイプ、血友病B疾患の重症度及び経過、患者の病歴及び抗体に対する応答、並びに主治医の裁量に依存する。FIXタンパク質をコードするceDNAベクターは、一度に又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。本明細書では、様々な時点にわたる単回投与又は複数回投与、ボラス投与、及びパルス注入を含むがこれらに限定されない、様々な投与スケジュールが企図される。

30

【0461】

疾患のタイプ及び重症度に応じて、ceDNAベクターは、コードされたFIXタンパク質が、約 $0.3\text{mg}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $15\text{mg}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 、又はその範囲内の任意の投与量）で発現される量で、1回以上の別々の投与、又は持続注入によって投与される。ceDNAベクターの1つの典型的な1日用量は、上述の要因に応じて、約 $15\text{mg}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲でコードされたFIXタンパク質の発現をもたらすのに十分である。ceDNAベクターの1つの例示的な用量は、約 $10\text{mg}/\text{kg}\sim$ 約 $50\text{mg}/\text{kg}$ の範囲の、本明細書に開示されるコードされたFIXタンパク質の発現をもたらすのに十分な量である。したがって、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、 $15\text{mg}/\text{kg}$ 、 $20\text{mg}/\text{kg}$ 、 $25\text{mg}/\text{kg}$ 、 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、 $35\text{mg}/\text{kg}$ 、 $40\text{mg}/\text{kg}$ 、 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、 $60\text{mg}/\text{kg}$ 、 $70\text{mg}/\text{kg}$ 、 $80\text{mg}/\text{kg}$ 、 $90\text{mg}/\text{kg}$ 、又は $100\text{mg}/\text{kg}$ （又はそれらの任意の組み合わせ）でコードされたFIXタンパク質の発現をもたらすのに十分な量のceDNAベクターの1回以上の用量を患者に投与することができる。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、 $50\text{mg}\sim 2500\text{mg}$ の範囲の総用量について、

40

50

コードされた F I X タンパク質の発現をもたらすのに十分な量である。c e D N A ベクターの例示的な用量は、約 5 0 m g、約 1 0 0 m g、2 0 0 m g、3 0 0 m g、4 0 0 m g、約 5 0 0 m g、約 6 0 0 m g、約 7 0 0 m g、約 7 2 0 m g、約 1 0 0 0 m g、約 1 0 5 0 m g、約 1 1 0 0 m g、約 1 2 0 0 m g、約 1 3 0 0 m g、約 1 4 0 0 m g、約 1 5 0 0 m g、約 1 6 0 0 m g、約 1 7 0 0 m g、約 1 8 0 0 m g、約 1 9 0 0 m g、約 2 0 0 0 m g、約 2 0 5 0 m g、約 2 1 0 0 m g、約 2 2 0 0 m g、約 2 3 0 0 m g、約 2 4 0 0 m g、又は約 2 5 0 0 m g（又はそれらの任意の組み合わせ）でコードされた F I X タンパク質の総発現をもたらすのに十分な量である。c e D N A ベクターからの F I X タンパク質の発現は、本明細書の調節スイッチによって、又は代替的に対象に投与される複数回用量の c e D N A ベクターによって慎重に制御され得るため、c e D N A ベクターからの F I X タンパク質の発現は、発現された F I X タンパク質の用量が断続的に、例えば、毎週、2 週間毎、3 週間毎、4 週間毎、毎月、2 ヶ月毎、3 ヶ月毎、又は 6 ヶ月毎に投与され得るような方法で制御され得る。この治療法の進行は、従来の技法及びアッセイによってモニタリングされ得る。

10

【0462】

ある特定の実施形態では、c e D N A ベクターは、1 5 m g / k g、3 0 m g / k g、4 0 m g / k g、4 5 m g / k g、5 0 m g / k g、6 0 m g / k g の用量で、又は一定用量、例えば 3 0 0 m g、5 0 0 m g、7 0 0 m g、8 0 0 m g 以上で、コードされた F I X タンパク質の発現をもたらすのに十分な量で投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターからの F I X タンパク質の発現は、F I X タンパク質が一定期間にわたって毎日、隔日、毎週、2 週間毎、又は 4 週間毎に発現されるように制御される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターからの F I X タンパク質の発現は、F I X タンパク質が一定期間にわたって 2 週間毎又は 4 週間毎に発現されるように制御される。ある特定の実施形態では、期間は、6 ヶ月、1 年、1 8 ヶ月、2 年、5 年、1 0 年、1 5 年、2 0 年、又は患者の生涯である。

20

【0463】

治療は、単一用量又は複数用量の投与を必要とし得る。いくつかの実施形態では、複数の用量を対象に投与することができ、c e D N A ベクターは、ウイルスカプシドの非存在に起因して、抗カプシド宿主免疫反応を誘起しないため、実際に、必要に応じて 2 以上の用量を投与することができる。そのようなものとして、当業者は、適切な用量数を判定することができる。投与される用量数は、例えば、およそ 1 ~ 1 0 0、好ましくは 2 ~ 2 0 用量であり得る。

30

【0464】

任意の特定の理論に束縛されるものではないが、本開示によって記載される c e D N A ベクターの投与によって誘起される典型的な抗ウイルス免疫反応の欠失（すなわち、カプシド構成成分の不在）は、複数の場合に F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを宿主に投与することが可能になる。いくつかの実施形態では、核酸が対象に送達される場合の数は、2 ~ 1 0 回の範囲内（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 1 0 回）である。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、1 1 回以上対象に送達される。

40

【0465】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの用量は、1 暦日（例えば、2 4 時間）当たり 1 回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、2、3、4、5、6、又は 7 暦日当たり 1 回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの用量は、歴週（例えば、7 暦日）当たり 1 回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、2 週間に 1 回（例えば、2 暦週期間に 1 回）だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、1 暦月当たり 1 回（例えば、3 0 暦日に 1 回）だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの用量は、6 暦月

50

当たり1回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターの用量は、歴年（例えば、365日又は閏年では366日）当たり1回だけ対象に投与される。

【0466】

いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターの用量は、0日目に投与される。0日目の初回治療に続いて、c e D N Aベクターを用いた初回治療の約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、又は約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月、又は約1年、約2年、約3年、約4年、約5年、約6年、約7年、約8年、約9年、約10年、約11年、約12年、約13年、約14年、約15年、約16年、約17年、約18年、約19年、約20年、約21年、約22年、約23年、約24年、約25年、約26年、約27年、約28年、約29年、約30年、約31年、約32年、約33年、約34年、約35年、約36年、約37年、約38年、約39年、約40年、約41年、約42年、約43年、約44年、約45年、約46年、約47年、約48年、約49年又は約50年後に、2回目の投薬（再投与）を実施することができる。

10

【0467】

いくつかの実施形態によれば、治療用核酸の再投薬は、治療用核酸の発現の増加をもたらす。いくつかの実施形態によれば、初回投薬後の治療用核酸の発現と比較して、再投薬後の治療用核酸の発現の増加は、核酸の再投薬後、約0.5倍～約10倍、約1倍～約5倍、約1倍～約2倍、又は約0.5倍、約1倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、又は約10倍高い。

20

【0468】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターの2回以上の投与（例えば、2、3、4回又はそれ以上の投与）を用いて、様々な間隔の期間にわたって（例えば、毎日、毎週、毎月、毎年など）、所望のレベルの遺伝子発現を達成することができる。

【0469】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるc e D N Aベクターによってコードされる治療用F I Xタンパク質は、それが対象において少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも5時間、少なくとも10時間、少なくとも12時間、少なくとも18時間、少なくとも24時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月／1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも15年、少なくとも20年、少なくとも30年、少なくとも40年、少なくとも50年以上にわたって発現されるように、調節スイッチ、誘導性又は抑制性プロモーターによって調節され得る。一実施形態では、発現は、本明細書に記載されるc e D N Aベクターを所定の又は所望の間隔で繰り返し投与することによって達成することができる。代替的に、本明細書に開示されるF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターは、遺伝子編集系（例えば、C R I S P R／C a s、T A L E N、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼなど）の構成成分を更に含み、実質的に永久的な治療又は疾患の「治療」のためのF I Xタンパク質をコードする1つ以上の核酸配列の挿入を可能にし得る。遺伝子編集構成成分を含むそのようなc e D N Aベクターは、国際出願第P C T／U S 18／64242号に開示されており、限定されないが、F I Xタンパク質をコードする核酸をアルブミン遺伝子又はC C R 5遺伝子などのセーフハーバー領域に挿入するために、5'及び3'相同性アーム（例えば、配列番号151～154、又はそれに対して少なくとも40%、50%、60%、70%又は、80%の相同性を有する配列）を含み得る。例として、F I Xタンパク質を発現するc e D N Aベクターは、F I X導入遺伝子をゲノムセーフハーバーに挿入するための少なくとも1つのゲノムセーフハーバー（G S H）特異的相同性アームを含むことができ、2019年3月1日出願された国際特許出願第P C T／U S 2019／020225号に開示されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

50

【0470】

本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態によれば、F I Xタンパク質を発現するc e D N Aベクターは、追加の化合物と併用して投与することができる。

【0471】

本明細書に開示される方法は、治療用核酸の安全な投与を可能にする免疫応答の十分なレベルの低減を伴う遺伝性疾患を改善するために、免疫抑制剤（例えば、T K I又はその誘導体若しくは塩）と治療用核酸（例えば、F I Xタンパク質をコードする核酸配列を含むc e D N Aベクター）との組み合わせを有効量で対象に投与することを含むことができる。これらの2剤は、合剤で同時に、異なる製剤で同時に投与することも、又は別個に異なる時間で投与することもできる。

10

【0472】

いくつかの実施形態では、1つ以上の免疫抑制剤（又はその誘導体若しくは塩）、及び本明細書に記載のF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物を同時に対象に投与することができる。例えば、この方法は、免疫抑制剤、及び本明細書に記載のF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物を、2つの別個の製剤として、しかし同時に対象に投与することを含み得る。別の例では、この方法は、免疫抑制剤、及び本明細書に記載のF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物を、1つの製剤として、同時に対象に投与することを含んでもよく、それにより免疫抑制剤及び治療用核酸が同時に対象に投与され得る。

【0473】

いくつかの実施形態では、1つ以上の免疫抑制剤（又はその誘導体若しくは塩）、及び本明細書に記載のF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物を順次に対象に投与することができる。例えば、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与前に投与され得る。

20

【0474】

連続投与の場合、1つ以上の免疫抑制剤の投与と、本明細書に記載のF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物との間に遅延期間があってもよい。例えば、免疫抑制剤は、本明細書に記載のF I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物の投与の数時間、数日、又は数週間前に（例えば、治療用核酸投与の少なくとも30分、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも3時間、少なくとも4時間、少なくとも5時間、少なくとも6時間、少なくとも7時間、少なくとも8時間、少なくとも9時間、少なくとも10時間、少なくとも11時間、少なくとも12時間、少なくとも13時間、少なくとも14時間、少なくとも15時間、少なくとも16時間、少なくとも17時間、少なくとも18時間、少なくとも19時間、少なくとも20時間、少なくとも21時間、少なくとも22時間、少なくとも23時間、少なくとも24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約4日、少なくとも約5日、少なくとも約6日、少なくとも約1週間、少なくとも約2週間、少なくとも約3週間前、及び少なくとも約4週間前）投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約30分前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約1時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約2時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約3時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、治療用核酸の投与の約4時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約5時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約6時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約7時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約8時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約9時間前に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、医薬組成物の投与の約10時間前に投与され得る。

30

40

【0475】

50

一実施形態では、免疫抑制剤は、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物の投与の約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、又は24時間以下前に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物の投与の約1日、約2日、約3日、約4日、約6日、又は約7日以下前に投与することができる。

【0476】

いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物の投与の約30分、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、又は24時間後に投与され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物の投与の約1日、約2日、約3日、約4日、約6日、又は約7日後に投与することができる。

【0477】

一実施形態では、免疫抑制剤は、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物の投与の約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、又は24時間以下後に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物の投与の約1日、約2日、約3日、約4日、約6日、又は約7日以下後に投与することができる。

【0478】

いくつかの実施形態では、F I Xタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターを含む医薬組成物の投与前、投与と同時、及び／又は投与後に、1つ以上の免疫抑制剤を複数回投与することができる。

いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターは、本明細書に開示される1つ以上の免疫抑制剤と併せて複数回投与及び再投与され得る。例えば、c e D N Aベクターは、初回投薬計画における治療用核酸の投与前、投与後、又は投与と同時に投与される、1つ以上の免疫抑制剤とともに、0日目に投与され得る。0日目の初回治療に続いて、好ましくは本明細書に開示される1つ以上の免疫抑制剤とともに、c e D N Aベクターを用いた初回治療の約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、又は約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月、又は約1年、約2年、約3年、約4年、約5年、約6年、約7年、約8年、約9年、約10年、約11年、約12年、約13年、約14年、約15年、約16年、約17年、約18年、約19年、約20年、約21年、約22年、約23年、約24年、約25年、約26年、約27年、約28年、約29年、約30年、約31年、約32年、約33年、約34年、約35年、約36年、約37年、約38年、約39年、約40年、約41年、約42年、約43年、約44年、約45年、約46年、約47年、約48年、約49年又は約50年後に、2回目の投薬（再投与）を実施することができる。

【0479】

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

【0480】

E. 単位剤形

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるF I Xタンパク質の発現のためのc e

DNAベクターを含む医薬組成物は、単位剤形で都合よく提示され得る。単位剤形は、典型的に、医薬組成物の1つ以上の投与経路に適合されるであろう。いくつかの実施形態では、単位剤形は、液滴が眼に直接投与されるように適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、吸入による投与に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、吸入器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、噴霧器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、エアロゾル化器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、経口投与のため、頬側投与のため、又は舌下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、静脈内、筋肉内、又は皮下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、網膜下注射、脈絡膜上注射、又は硝子体内注射に適合される。

10

【0481】

いくつかの実施形態では、単位剤形は、髄腔内又は脳室内投与のために適合される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、局所投与のために製剤化される。単一剤形を産生するために担体材料と組み合わせられ得る活性成分の量は、一般に、治療効果をもたらす化合物の量となるであろう。

【0482】

X. 治療方法

本明細書に記載される技術はまた、FIXタンパク質の発現のための開示されるceDNAベクターを作製するための方法、並びにそれを様々な方法（例えば、エクスピボ、エクサイチュ、インビトロ及びインビボ適用、方法論、診断手順、並びに／又は遺伝子療法計画）で使用方法を実証する。

20

【0483】

一実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターから発現される発現された治療用FIXタンパク質は、疾患の治療に機能的である。好ましい実施形態では、治療用FIXタンパク質は、それが望まれない限り、免疫系反応を引き起こさない。

【0484】

治療有効量の、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（例えば、筋細胞若しくは組織、又は他の罹患した細胞型）に導入することを含む、対象における血友病Bを治療する方法が、本明細書に提供される。ceDNAベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実施されるceDNAベクターは、疾患を治療するために有用な、本明細書に記載されるFIXタンパク質をコードする核酸配列を含む。特に、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、対象に導入されたときに、外因性DNA配列によってコードされる所望のFIXタンパク質の転写を指示することができる制御エレメントに作動可能に連結された所望のFIXタンパク質DNA配列を含み得る。本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、上記及び本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

30

【0485】

本開示のceDNAベクターのうちの1つ以上を、1種以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、又は賦形剤と一緒に含む、本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクター組成物及び製剤が、本明細書に開示される。そのような組成物は、血友病Bの1つ以上の症状を診断、予防、治療、又は改善するための、1つ以上の診断的又は治療的キットに含まれ得る。一態様では、疾患、傷害、障害、外傷、又は機能不全は、ヒト疾患、傷害、障害、外傷、又は機能不全である。

40

【0486】

本明細書に記載される技術の別の態様は、診断的又は治療的に有効な量の本明細書に開示されるFIXタンパク質の発現のためのceDNAベクターを、それを必要とする対象に提供するための方法を提供し、この方法は、本明細書に開示されるある量のceDNAベクターを、それを必要とする対象の細胞、組織、又は器官に、ceDNAベクターから

50

の F I X タンパク質の発現を可能にするのに有効な時間にわたって提供し、それによって診断的又は治療的に有効な量の c e D N A ベクターによって発現された F I X タンパク質を対象に提供することを含む。更なる態様では、対象は、ヒトである。

【0487】

本明細書に記載される技術の別の態様は、対象における血友病 B、障害、機能不全、傷害、異常状態、又は外傷のうちの少なくとも 1 つ以上の症状を診断、予防、治療、又は改善するための方法を提供する。全体的かつ一般的な意味において、この方法は、少なくとも F I X タンパク質の産生のための開示される c e D N A ベクターのうちの 1 つ以上を、それを必要とする対象に、対象の疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、又は外傷の 1 つ以上の症状を診断、予防、治療、又は改善するための量及び時間にわたって投与するステップを含む。そのような実施形態では、対象は、F I X タンパク質の有効性、又は代替的に、対象における F I X タンパク質若しくは F I X タンパク質の組織位置（細胞及び細胞内位置を含む）の検出について評価され得る。したがって、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、例えば、がん又は他の適応症の検出のためのインビボ診断ツールとして使用することができる。更なる態様では、対象は、ヒトである。

10

【0488】

別の態様は、血友病 B 又は疾患状態の 1 つ以上の症状を治療又は低減するためのツールとしての、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの使用である。欠陥遺伝子が知られているいくつかの遺伝性疾患が存在し、典型的に、通常は一般に劣性的に遺伝される酵素の欠乏状態と、調節又は構造タンパク質に関与し得るが、典型的に常に優性的に遺伝されるとは限らない不均衡状態との 2 つのクラスに分類される。不均衡疾患状態の場合、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを使用して、モデル系において血友病 B 状態を創り出すことができ、次いでこれを使用して、その疾患状態に対処する試みに使用することができる。したがって、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、遺伝子疾患の治療を可能にする。本明細書で使用される場合、血友病 B 状態は、疾患を引き起こす、又はそれをより重篤にする欠乏又は不均衡を部分的又は全体的に修繕することによって治療される。

20

【0489】

A. 宿主細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、F I X タンパク質導入遺伝子を対象の宿主細胞に送達する。いくつかの実施形態では、細胞は、光受容細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、R P E 細胞である。いくつかの実施形態では、対象の宿主細胞は、ヒト宿主細胞であり、例えば、血液細胞、幹細胞、造血細胞、C D 3 4⁺細胞、肝細胞、がん細胞、血管細胞、筋細胞、膵臓細胞、神経細胞、眼若しくは網膜細胞、上皮若しくは内皮細胞、樹状細胞、線維芽細胞、又は哺乳類起源の任意の他の細胞（無制限に、肝（すなわち、肝臓）細胞、肺細胞、心臓細胞、膵臓細胞、腸細胞、横隔膜細胞、腎（すなわち、腎臓）細胞、ニューロン細胞、血液細胞、骨髄細胞、若しくは遺伝子療法が企図される対象の任意の 1 つ以上の選択された組織を含む）が挙げられる。一態様では、対象宿主細胞は、ヒト宿主細胞である。

30

40

【0490】

本開示はまた、本明細書に記載される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを含む、上述のような組換え宿主細胞に関する。したがって、当業者には明らかであるように、目的に応じて複数の宿主細胞を使用することができる。構築物、又はドナー配列を含む本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを宿主細胞に導入して、ドナー配列が、前述のように染色体組み込み体として維持されるようにする。宿主細胞という用語は、複製中に生じる変異のために親細胞と同一ではない親細胞の任意の子孫を包含する。宿主細胞の選択は、ドナー配列及びその供給源に大きく依存する。

50

【0491】

宿主細胞はまた、哺乳類、昆虫、植物、又は真菌細胞などの真核生物であってもよい。一実施形態では、宿主細胞は、ヒト細胞（例えば、初代細胞、幹細胞、又は不死化細胞株）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターをエキスピボで投与され、次いで遺伝子療法事象の後に対象に送達され得る。宿主細胞は、任意の細胞型、例えば、体細胞又は幹細胞、人工多能性幹細胞、又は血液細胞、例えば、T細胞若しくはB細胞、又は骨髄細胞であり得る。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、同種細胞である。例えば、T細胞ゲノム操作は、がん免疫療法、H I V 療法（例えば、C X C R 4 及び C C R 5 などの受容体ノックアウト）などの疾患調整、及び免疫不全療法に有用である。B細胞上のM H C 受容体は、免疫療法の標的となり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾型宿主細胞、例えば、骨髄幹細胞、例えば、C D 3 4 ⁺細胞、又は人工多能性幹細胞を、治療用タンパク質の発現のために患者に移植して戻すことができる。

10

【0492】

B. 遺伝子療法のための追加の疾患

一般に、上記の説明に従って本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを使用して、任意の F I X タンパク質を送達して、対象における異常タンパク質発現又は遺伝子発現に関する血友病 B に関連する症状を治療、予防、又は改善することができる。

【0493】

いくつかの実施形態では、血液中の分泌及び循環のための F I X タンパク質の産生のため、或いは血友病 B を治療、改善、及び／又は予防するための他の組織への全身送達のために、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを使用して、F I X タンパク質を骨格筋、心筋、又は横隔膜筋に送達することができる。

20

【0494】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを、任意の好適な手段によって、任意選択的に、c e D N A ベクターを含む呼吸域粒子のエアロゾル懸濁液を投与する（これを対象が吸入する）ことによって、対象の肺に投与することができる。呼吸域粒子は、液体又は固体であり得る。c e D N A ベクターを含む液体粒子のエアロゾルは、当業者に既知であるように、圧力駆動型エアロゾル噴霧器又は超音波噴霧器を用いるなど、任意の好適な手段によって産生され得る。例えば、米国特許第 4, 5 0 1, 7 2 9 号を参照されたい。c e D N A ベクターを含む固体粒子のエアロゾルは、薬学分野において既知の技法によって、任意の固体粒子薬剤エアロゾル生成器を用いて同様に産生され得る。

30

【0495】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、C N S（例えば、脳、眼）の組織に投与することができる。いくつかの実施形態では、F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、血友病に関連する眼出血の治療のために、C N S の組織、例えば眼組織に投与することができる。

【0496】

いくつかの態様では、レポーターポリペプチドに連結された F I X タンパク質を発現する c e D N A ベクターを、診断目的のために、並びに有効性を決定するため、又はそれらが投与される対象における c e D N A ベクターの活性のマーカーとして使用することができる。

40

【0497】

C. c e D N A ベクターを使用した良好な遺伝子発現の試験

当該技術分野で周知のアッセイを使用して、c e D N A ベクターによる F I X タンパク質の遺伝子送達の効率を試験することができ、インビトロ及びインビボの両方のモデルで実施され得る。c e D N A による F I X タンパク質の発現のレベルは、F I X タンパク質の m R N A 及びタンパク質レベルを測定することによって（例えば、逆転写 P C R、ウェ

50

スタンプロット分析、及び酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A））当業者により評価され得る。一実施形態では、c e D N A は、例えば、蛍光顕微鏡法又は発光プレートリーダーによりレポータータンパク質の発現を調べることによって、F I X タンパク質の発現を評価するために使用できるレポータータンパク質を含む。インビボ適用の場合、タンパク質機能アッセイを使用して、所与の F I X タンパク質の機能を試験して、遺伝子発現が成功したかどうかを判断することができる。当業者は、インビトロ又はインビボで c e D N A ベクターによって発現された F I X タンパク質の機能を測定するための最良の試験を決定することができるであろう。

【0498】

本明細書では、細胞又は対象における c e D N A ベクターからの F I X タンパク質の遺伝子発現の効果は、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも10ヶ月、少なくとも12ヶ月、少なくとも18ヶ月、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも20年にわたって継続し得るか、又は永続的であり得ることが企図される。

10

【0499】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセット、発現構築物、又は c e D N A ベクター中の F I X タンパク質は、宿主細胞に対して最適化されたコドンであり得る。

【0500】

D. c e D N A ベクターからの F I X タンパク質発現を評価することによる有効性の決定

20

本質的に、タンパク質発現を決定するための当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、c e D N A ベクターからの F I X タンパク質の発現を分析することができる。そのような方法／アッセイの非限定的な例には、酵素結合免疫測定法（E L I S A）、親和性 E L I S A、E L I S P O T、連続希釈、フローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴分析、速度論的排除アッセイ、質量分析、ウェスタンプロット、免疫沈降、及び P C R が含まれる。

【0501】

インビボでの F I X タンパク質発現を評価する場合、分析のために生物学的試料を対象から取得することができる。例示的な生体試料には、生体液試料、体液試料、血液（全血を含む）、血清、血漿、尿、唾液、生検及び／又は組織試料などが含まれる。生体試料又は組織試料はまた、腫瘍生検、便、脊髄液、胸膜液、乳頭吸引液、リンパ液、皮膚の外切片、呼吸器、腸管、尿生殖路、涙、唾液、母乳、細胞（血液細胞を含むがこれに限定されない）、腫瘍、臓器、及びインビトロ細胞培養成分の試料を含むがこれらに限定されない、個人から分離された組織又は体液の試料も指し得る。この用語はまた、上述の試料の混合物も含む。「試料」という用語は、未治療又は前治療済み（又は前処理済み）の生体試料も含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるアッセイ及び方法に使用される試料は、試験される対象から収集された血清試料を含む。

30

【0502】

E. 臨床パラメータによる発現された F I X タンパク質の有効性の決定

血友病 B のための c e D N A ベクターによって発現される所与の F I X タンパク質の有効性（すなわち、機能的発現）は、熟練した臨床医によって決定され得る。しかしながら、血友病 B の兆候又は症状のいずれか1つ又は全てが有益な方法で変更された場合、又は他の臨床的に許容される疾患の症状若しくはマーカーが、例えば、本明細書に記載される治療用 F I X タンパク質をコードする c e D N A ベクターでの治療後に少なくとも10%向上又は改善された場合、その用語が本明細書において使用されるように、治療は「有効な治療」とみなされる。有効性はまた、血友病 B の安定化、又は医療介入の必要性（すなわち、疾患の進行が停止するか、少なくとも遅くなる）によって評価される個人の悪化の失敗によって測定することもできる。これらの指標を測定する方法は、当業者に既知であり、かつ／又は本明細書に記載される。治療は、個人又は動物（いくつかの非限定的な例は、ヒト又は哺乳動物を含む）における疾患の任意の治療を含み、以下を含む。（1）血

40

50

友病 B を阻害すること、例えば、血友病 B の進行の停止若しくは遅延させること、又は（ 2 ）血友病 B を緩和すること、例えば、血友病 B の症状の軽減を引き起こすこと、及び（ 3 ）血友病 B 疾患の発症の可能性を防止若しくは低減すること、又は血友病 B に関連する二次的疾患／障害を防止すること。疾患の治療のための有効量とは、それを必要とする哺乳動物に投与したとき、その用語が本明細書で定義されているように、その疾患に対して有効な治療をもたらすのに十分である量を意味する。薬剤の有効性は、血友病 B 疾患に特有の物理的指標を評価することによって決定することができる。医師は、以下を含む血友病 B の臨床症状のうちのいずれか 1 つ以上を評価することができる。＊ ＊ （ i ）血清第 F I X 因子の低下。F I X の低下は、血友病 B の治療の開発における重要なバイオマーカーである。

10

【 0 5 0 3 】

X I . 抗体又は融合タンパク質を発現する c e D N A ベクターの様々な適用

本明細書に開示されるように、本明細書に記載される F I X タンパク質の発現のための組成物及び c e D N A ベクターを使用して、一連の目的のために F I X タンパク質を発現することができる。一実施形態では、F I X タンパク質を発現する c e D N A ベクターを使用して、例えば、血友病 B の機能又は疾患の進行を研究するために、導入遺伝子を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成することができる。いくつかの実施形態では、F I X タンパク質を発現する c e D N A ベクターは、哺乳動物対象の血友病 B 状態又は障害の治療、予防、又は改善に有用である。

20

【 0 5 0 4 】

いくつかの実施形態では、F I X タンパク質は、発現の増加、遺伝子産物の活性の増加、又は遺伝子の不適切な上方調節に関連する疾患を治療するのに十分な量で対象の c e D N A ベクターから発現され得る。

【 0 5 0 5 】

いくつかの実施形態では、F I X タンパク質は、タンパク質の発現の低下、発現の欠如、又は機能不全を含む血友病 B を治療するのに十分な量で対象の c e D N A ベクターから発現させることができる。

【 0 5 0 6 】

導入遺伝子は、それ自体が転写される遺伝子のオープンリーディングフレームでなくともよいことが当業者によって理解されるであろう。代わりに、それは標的遺伝子のプロモーター領域又はリプレッサー領域であり得、c e D N A ベクターは、F I X 遺伝子の発現をそのように調整する結果でそのような領域を修飾し得る。

30

【 0 5 0 7 】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための組成物及び c e D N A ベクターを使用して、上記のような様々な目的のために F I X タンパク質を送達することができる。

【 0 5 0 8 】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、哺乳動物対象における血友病 B 状態の治療、改善、又は予防に有用である、1 つ以上の F I X タンパク質をコードする。c e D N A ベクターによって発現された F I X タンパク質は、異常な遺伝子配列に関連する血友病 B を治療するのに十分な量で患者に投与され、これはタンパク質発現の増加、タンパク質の過剰活性、標的遺伝子又はタンパク質の発現の低減、発現の欠如、又は機能不全のうちのいずれか 1 つ以上をもたらし得る。

40

【 0 5 0 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、診断及びスクリーニング方法における使用のために想定され、これにより F I X タンパク質は、細胞培養系又は代替的にトランスジェニック動物モデルにおいて一時的又は安定して発現される。

【 0 5 1 0 】

本明細書に記載されている技術の別の態様は、本明細書に開示されている F I X タンパ

50

ク質の発現のための c e D N A ベクターで哺乳動物細胞の集団を形質導入する方法を提供する。全体的かつ一般的な意味において、この方法は、少なくとも有効量の本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターのうちの 1 つ以上を含む組成物を、その集団の 1 つ以上の細胞に導入するステップを含む。

【0511】

追加的に、本開示は、1 つ以上の追加の成分で製剤化されるか、又はそれらの使用のために 1 つ以上の指示で調製された、本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための開示される c e D N A ベクター又は c e D N A 組成物のうちの 1 つ以上を含む、組成物、並びに治療及び／又は診断キットを提供する。

【0512】

本明細書に開示される F I X タンパク質の発現のための c e D N A ベクターが投与される細胞は、任意のタイプのものであり得、神経細胞（末梢及び中枢神経系の細胞、特に脳細胞を含む）、肺細胞、腎細胞、上皮細胞（例えば、胃及び呼吸器上皮細胞）、筋細胞、樹状細胞、脾細胞（島細胞を含む）、肝細胞、心筋細胞、骨細胞（例えば、骨髄幹細胞）、造血幹細胞、脾臓細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、前立腺細胞、生殖細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。代替的に、細胞は、任意の前駆細胞であり得る。更なる代替として、細胞は、幹細胞（例えば、神経幹細胞、肝幹細胞）であり得る。なおも更なる代替として、細胞は、がん又は腫瘍細胞であり得る。更に、細胞は、上に示されるように、任意の種の起源に由来し得る。

【0513】

A. F I X を発現する c e D N A ベクターの産生及び精製

本明細書に開示される c e D N A ベクターは、インビトロ又はインビボのいずれかで F I X タンパク質を産生するために使用されるものとする。この方法で産生された F I X タンパク質は、単離され、所望の機能について試験され、研究での更なる使用又は治療的治療として精製され得る。タンパク質の産生の各系には、独自の利点／欠点がある。インビトロで産生されたタンパク質は容易に精製することができ、短時間でタンパク質を産生することができるが、インビボで産生されたタンパク質は、グリコシル化などの翻訳後修飾を有し得る。

【0514】

c e D N A ベクターを使用して産生された F I X 治療用タンパク質は、当業者に既知の任意の方法、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、沈殿、又は電気泳動を使用して精製することができる。

【0515】

本明細書に記載される方法及び組成物によって産生された F I X 治療用タンパク質は、所望の標的タンパク質への結合について試験することができる。

【実施例】

【0516】

以下の実施例は、限定ではない例証によって提供される。本明細書に記載される野生型又は修飾型 I T R のうちのいずれかから c e D N A ベクターを構築できること、及び以下の例示的な方法を使用して、そのような c e D N A ベクターの活性を構築し、評価できることを当業者は理解するであろう。これらの方法は、ある特定の c e D N A ベクターを用いて例示されているが、それらは、説明に沿って任意の c e D N A ベクターに適用可能である。

【0517】

実施例 1：昆虫細胞ベースの方法を使用して c e D N A ベクターを構築する

ポリヌクレオチド構築物テンプレートをを使用した c e D N A ベクターの産生は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 の実施例 1 に記載される。例えば、本開示の c e D N A ベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド構築物テンプレートは、c e D N A - プラスミド、c e D N A - バクミド、及び／又は c e D N A - バキュロウイルスであり得る。理論に限定されるものではないが、許容宿主

10

20

30

40

50

細胞中、例えば、Repの存在下、2つの対称ITR（ITRのうちの少なくとも1つが、野生型ITR配列に対して修飾されている）及び発現構築物を有するポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ceDNAベクターを産生するように複製する。ceDNAベクター産生は、Repタンパク質を介して、第1の、テンプレート骨格（例えば、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バクミド、ceDNA-バキュロウイルスゲノムなど）からのテンプレートの切除（「レスキュー」）、及び第2の、切除したceDNAベクターのRep媒介型複製の2つのステップを経る。

【0518】

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

【0519】

ceDNA-バクミドの産生：

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

【0520】

組換えceDNA-バクミドを、E.coliから単離し、FugeneHDを使用してSf9又はSf21昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生した。付着したSf9又はSf21昆虫細胞を、25℃のT25フラスコ中の50mLの培地で培養した。4日後、培養培地(P0ウイルスを含有する)を細胞から取り除き、0.45µmフィルターで濾過し、感染性バキュロウイルス粒子を細胞又は細胞残屑から分離した。

【0521】

任意選択的に、第1世代のバキュロウイルス(P0)を、ナイーブSf9又はSf21昆虫細胞を感染させることによって50～500mLの培地中で増幅させた。オービタルシェーカー培養器内の懸濁液培養物中の細胞を、130rpm、25℃で維持し、細胞が(14～15nmのナイーブ直径から)18～19nmの直径に到達するまで、細胞直径及び生存率、並びに約4.0E+6細胞/mLの密度をモニタリングした。感染3日後～8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離後に収集し、細胞及び残屑を除去した後、0.45µmフィルターで濾過した。

【0522】

10

20

30

40

50

試験構築物を含む c e D N A - バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性又は力価を決定した。具体的には、 2.5×10^6 細胞/mL の 4×20 mL S f 9 細胞培養物を、次の希釈 $1/1000$ 、 $1/10,000$ 、 $1/50,000$ 、 $1/100,000$ の P 1 バキュロウイルスで処理し、 $25 \sim 27^\circ\text{C}$ でインキュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度及び細胞周期停止、並びに細胞生存率の変化によって 4～5 日間にわたって毎日判定した。

【0523】

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6 の図 8 A に開示される「Rep-プラスミド」を、Rep 7 8 (配列番号 1 3 1 又は 1 3 3) 及び Rep 5 2 (配列番号 1 3 2) 又は Rep 6 8 (配列番号 1 3 0) 及び Rep 4 0 (配列番号 1 2 9) の両方を含む p F A S T B A C (商標) 二重発現ベクター (Thermo Fisher) において産生した。Rep-プラスミドを、製造元によって提供されるプロトコルに従って、DH 1 0 B a c コンピテント細胞 (MAX EFFICIENCY (登録商標) DH 1 0 B a c (商標) コンピテント細胞 (Thermo Fisher) 中に形質転換した。DH 1 0 B a c 細胞中の Rep-プラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組換えを誘導して、組換えバクミド (「Rep-バクミド」) を生成した。X-gal 及び IPTG を含有する細菌寒天平板上の E. coli 中の青白スクリーニング ($\Phi 80$ d l a c Z Δ M 1 5 マーカーは、バクミドベクターからの β -ガラクトシダーゼ遺伝子の α -相補性を提供する) を含む正の選択によって、組換えバクミドを選択した。単離された白色コロニーを採取し、10 mL の選択培地 (LB ブロス中のカナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン) 中に播種した。組換えバクミド (Rep-バクミド) を E. coli から単離し、Rep-バクミドを S f 9 又は S f 2 1 昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生した。

【0524】

S f 9 又は S f 2 1 昆虫細胞を、50 mL の培地中で 4 日間培養し、感染性組換えバキュロウイルス (「Rep-バキュロウイルス」) を、培養物から単離した。任意選択的に、第 1 世代の Rep-バキュロウイルス (P 0) を、ナイーブ S f 9 又は S f 2 1 昆虫細胞を感染させることによって増幅させ、 $50 \sim 500$ mL の培地中で培養した。感染 3 日後～8 日後に、培地中の P 1 バキュロウイルス粒子を、遠心分離によって細胞を分離するか、又は濾過若しくは別の分画プロセスのいずれかによって収集した。Rep-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性を決定した。具体的には、 2.5×10^6 細胞/mL の 4×20 mL S f 9 細胞培養物を、次の希釈 $1/1000$ 、 $1/10,000$ 、 $1/50,000$ 、 $1/100,000$ の P 1 バキュロウイルスで処理し、インキュベーションした。感染性は、細胞直径増加の速度及び細胞周期停止、並びに細胞生存率の変化によって 4～5 日間にわたって毎日決定した。

【0525】

c e D N A ベクター生成及び特徴付け

図 4 B を参照して、次に、(1) c e D N A - バクミドを含有する試料又は c e D N A - バキュロウイルス、及び (2) 上記の Rep-バキュロウイルスのいずれかを含有する S f 9 昆虫細胞培養培地を、S f 9 細胞 (2.5×10^6 細胞/mL、20 mL) の新鮮な培養物に、それぞれ $1:1000$ 及び $1:10,000$ の比で添加した。次いで、細胞を 25°C 、130 rpm で培養した。同時感染の 4～5 日後に、細胞の直径及び生存率が検出される。生存率が約 70～80% で細胞直径が $18 \sim 20$ nm に到達した場合、細胞培養物を遠心分離し、培地を取り除き、細胞ペレットを収集した。最初に、細胞ペレットを、適量の水性培地 (水又は緩衝液のいずれか) に再懸濁する。c e D N A ベクターを単離し、Q i a g e n M I D I P L U S (商標) 精製プロトコル (Q i a g e n、カラム当たり 0.2 mg の処理された細胞ペレット質量) を使用して、細胞から精製した。

【0526】

S f 9 昆虫細胞から産生及び精製される c e D N A ベクターの収率は、最初に、260 nm での UV 吸光度に基づいて判定された。

【0527】

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

【0528】

単離された c e D N A ベクターの構造を、共感染 S f 9 細胞から得られた D N A (本明細書に記載されるように) を、制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、a) c e D N A ベクター内の単一切断部位のみの存在、及び b) 0.8% 変性アガロースゲル (>800 bp) 上で分画したときに明らかに見えるほど十分に大きい、得られる断片について更に分析した。図 4 D 及び 4 E に示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状 D N A ベクター及び直鎖状かつ連続的な構造を有する c e D N A ベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別することができ、例えば、非連続的な構造を有する D N A ベクターは、1 kb 及び 2 kb 断片を産生することが期待されるが、連続的な構造を有する非カプシド化ベクターは、2 kb 及び 4 kb 断片を産生することが期待される。

【0529】

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

【0530】

本明細書で使用される場合、「未変性ゲル及び変性条件下でのアガロースゲル電気泳動による D N A ベクターの特定のためのアッセイ」という句は、制限エンドヌクレアーゼ消化に続いて、消化産物の電気泳動的評価を実施することによって、c e D N A の閉端性を評価するためのアッセイを指す。1 つのそのような例示的アッセイを以下に示すが、当業者であれば、この実施例に関する当該技術分野において既知の多くの変形が可能であることを理解するであろう。およそ 1/3 倍及び 2/3 倍の D N A ベクター長の産物を生成するであろう目的の c e D N A ベクターに対する単一切断酵素であるように、制限エンドヌクレアーゼが選択される。これは、未変性ゲル及び変性ゲルの両方でバンドを溶解する。変性前に、試料から緩衝液を取り除くことが重要である。Q i a g e n P C R クリーンアップキット又は脱塩「スピンカラム」、例えば、G E H E A L T H C A R E I L U S T R A (商標) M I C R O S P I N (商標) G-25 カラムは、エンドヌクレアーゼ消化のための当該技術分野において既知のいくつかのオプションである。アッセイは、例えば、i) D N A を適切な制限エンドヌクレアーゼで消化すること、2) 例えば、Q i a g e n P C R クリーンアップキットに適用し、蒸留水で溶出すること、i i i) 10 倍変性溶液 (10 倍 = 0.5 M N a O H、10 mM E D T A) を添加し、10 倍色素を添加し、緩衝せず、10 倍変性溶液を、1 mM E D T A 及び 200 mM N a O H で以前にインキュベーションされた 0.8~1.0% ゲル上で 4 倍に添加することによって調製された D N A ラダーと一緒に分析して、N a O H 濃度が、ゲル及びゲルボックス中で均一であり、1 倍変性溶液 (50 mM N a O H、1 mM E D T A) の存在下でゲルを流動させることを保証することを含む。当業者であれば、サイズ及び所望のタイミングの結果に基づいて、電気泳動を実行するために使用する電圧を理解するであろう。電気泳動後に

、ゲルを排出し、1倍TBE又はTAE中で中和し、蒸留水又は1倍SYBR Goldを含む1倍TBE／TAEに移す。次いで、例えば、Thermo FisherのSYBR（登録商標）Gold核酸ゲル染料（DMSO中10,000倍濃縮物）及び落射蛍光灯（青色）又はUV（312nm）を用いてバンドを可視化することができる。

【0531】

生成されたceDNAベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。1つの例示的な非限定的方法として、試料の全体UV吸光度に対するceDNA－プラスミドの寄与は、ceDNAベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。例えば、UV吸光度に基づいて、4μgのceDNAベクターをゲル上に充填し、ceDNAベクター蛍光強度が、1μgであることが知られている2kbバンドに相当する場合、1μgのceDNAベクターが存在し、ceDNAベクターは、全UV吸光材料の25%である。次いで、ゲル上のバンド強度を、バンドが表す計算されたインプットに対してプロットする。例えば、全ceDNAベクターが8kbであり、切除された比較バンドが2kbである場合、バンド強度は、全インプットの25%としてプロットされ、この場合、1.0μgのインプットに対して0.25μgとなる。ceDNAベクター－プラスミドタイトレーションを使用して、標準曲線をプロットする場合、回帰直線等式を使用して、ceDNAベクターバンドの量を計算し、次いで、これを使用して、ceDNAベクターにより表される全インプットのパーセント、又は純度パーセントを決定することができる。

【0532】

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

【0533】

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

【0534】

ceDNA－バクミドの産生：

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

10

【0535】

組換えceDNA-バクミドを、E. coliから単離し、FugeneHDを使用してSf9又はSf21昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生した。付着したSf9又はSf21昆虫細胞を、25℃のT25フラスコ中の50mLの培地で培養した。4日後、培養培地(P0ウイルスを含有する)を細胞から取り除き、0.45μmフィルターで濾過し、感染性バキュロウイルス粒子を細胞又は細胞残屑から分離した。

【0536】

任意選択的に、第1世代のバキュロウイルス(P0)を、ナイプSf9又はSf21昆虫細胞を感染させることによって50~500mLの培地中で増幅させた。オービタルシェーカー培養器内の懸濁液培養物中の細胞を、130rpm、25℃で維持し、細胞が(14~15nmのナイプ直径から)18~19nmの直径に到達するまで、細胞直径及び生存率、並びに約4.0E+6細胞/mLの密度をモニタリングした。感染3日後~8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離後に収集し、細胞及び残屑を除去した後、0.45μmフィルターで濾過した。

20

【0537】

試験構築物を含むceDNA-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性又は力価を決定した。具体的には、2.5E+6細胞/mLの4×20mL Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、25~27℃でインキュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度及び細胞周期停止、並びに細胞生存率の変化によって4~5日間にわたって毎日決定した。

30

【0538】

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

40

【0539】

50

S f 9 又は S f 2 1 昆虫細胞を、50 mL の培地中で4日間培養し、感染性組換えバキュロウイルス（「Rep-バキュロウイルス」）を、培養物から単離した。任意選択的に、第1世代のRep-バキュロウイルス（P0）を、ナীব S f 9 又は S f 2 1 昆虫細胞を感染させることによって増幅させ、50～500 mL の培地中で培養した。感染3日後～8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離によって細胞を分離するか、又は濾過若しくは別の分画プロセスのいずれかによって収集した。Rep-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性を決定した。具体的には、 2.5×10^6 細胞/mL の 4×20 mL S f 9 細胞培養物を、次の希釈 1/1000、1/10、000、1/50、000、1/100、000 の P1 バキュロウイルスで処理し、インキュベーションした。感染性は、細胞直径増加の速度及び細胞周期停止、並びに細胞生存率の変化によって4～5日間にわたって毎日決定した。

10

【0540】

c e D N A ベクター生成及び特徴付け

次いで、(1) c e D N A -バクミド又は c e D N A -バキュロウイルスを含有する試料、及び(2) 上記のRep-バキュロウイルスのいずれかを含有するS f 9 昆虫細胞培養培地を、S f 9 細胞 (2.5×10^6 細胞/mL、20 mL) の新鮮な培養物に、それぞれ1:1000及び1:10,000の比で添加した。次いで、細胞を25℃、130 rpmで培養した。同時感染の4～5日後に、細胞の直径及び生存率が検出される。生存率が約70～80%で細胞直径が18～20 nmに到達した場合、細胞培養物を遠心分離し、培地を取り除き、細胞ペレットを収集した。最初に、細胞ペレットを、適量の水性培地（水又は緩衝液のいずれか）に再懸濁する。c e D N A ベクターを単離し、Q i a g e n M I D I P L U S（商標）精製プロトコル（Q i a g e n、カラム当たり0.2 mgの処理された細胞ペレット質量）を使用して、細胞から精製した。

20

【0541】

S f 9 昆虫細胞から産生及び精製される c e D N A ベクターの収率は、最初に、260 nmでのUV吸光度に基づいて判定された。精製された c e D N A ベクターは、実施例5に記載される電気泳動方法論を使用して、適切な閉端構成について評価され得る。

【0542】

実施例2：二本鎖DNA分子からの切除による合成 c e D N A 産生

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

30

【0543】

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

40

【0544】

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

50

示的な c e D N A ベクターは、「I I I c e D N A ベクター全般」と題されたセクションで論じられている。c e D N A ベクターによって発現される例示的な抗体及び融合タンパク質は、「I I C c e D N A ベクターによって発現される例示的な抗体及び融合タンパク質」と題されたセクションに記載される。

【0545】

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

【0546】

二本鎖DNA構築物は、5'から3'に順番に、第1の制限エンドヌクレアーゼ部位、上流ITR、発現カセット、下流ITR、及び第2の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む。次いで、二本鎖DNA構築物を1つ以上の制限エンドヌクレアーゼと接触させて、制限エンドヌクレアーゼ部位の両方で二本鎖切断を生成する。1つのエンドヌクレアーゼが両方の部位を標的とすることも、制限部位がc e D N A ベクターテンプレート内に存在しない限り、各部位を異なるエンドヌクレアーゼによって標的とすることもできる。これにより、制限エンドヌクレアーゼ部位の間の配列が、残りの二本鎖DNA構築物から切除される(PCT/US19/14122の図9を参照されたい)。ライゲーションすると、閉端DNAベクターが形成される。

【0547】

この方法で使用されるITRの一方又は両方は、野生型ITRであり得る。修飾型ITRが使用されてもよく、ここで修飾は、B及びB'アーム並びに/又はC及びC'アームを形成する配列における野生型ITRからの1つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、又は置換を含み得(例えば、PCT/US19/14122の図6~8及び10、図11Bを参照されたい)、2つ以上のヘアピンループ(例えば、PCT/US19/14122の図6~8、図11Bを参照されたい)又は単一のヘアピンループ(例えば、PCT/US19/14122の図10A~10B、図11Bを参照されたい)を有し得る。ヘアピンループ修飾型ITRは、既存のオリゴの遺伝子修飾によって、又は新規の生物学的合成及び/若しくは化学的合成によって生成され得る。

【0548】

非限定的な例では、ITR-6左及び右(配列番号111及び112)は、AAV2の野生型ITRからのB-B'及びC-C'アームに40ヌクレオチドの欠失を含む。修飾型ITRに残っているヌクレオチドは、単一のヘアピン構造を形成すると予測される。構造を展開するGibbs自由エネルギーは、約-54.4 kcal/molである。機能的Rep結合部位又はTrs部位の任意の欠失を含む、ITRへの他の修飾を行うこともできる。

【0549】

実施例3:オリゴヌクレオチドの構築によるc e D N Aの産生

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

【0550】

本明細書に開示されるように、ITRオリゴヌクレオチドは、WT-ITR(例えば、図3A、図3Cを参照されたい)、又は修飾型ITR(例えば、図3B及び図3Dを参照されたい)を含み得る。(例えば、その全体が本明細書に組み込まれるPCT/US19/14122の図6A、6B、7A、及び7Bも参照されたい)。例示的なITRオリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドには、限定されないが、配列番号 134～145 が含まれる（例えば、PCT/US19/14122 の表 7 を参照されたい）。修飾型 ITR は、B 及び B' アーム並びに／又は C 及び C' アームを形成する配列における野生型 ITR からの 1 つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、又は置換を含み得る。無細胞合成で使用される、本明細書に記載される WT-ITR 又は mod-ITR を含む ITR オリゴヌクレオチドは、遺伝子修飾又は生物学的及び／若しくは化学的合成によって生成することができる。本明細書で論じられるように、実施例 2 及び 3 の ITR オリゴヌクレオチドは、本明細書で論じられるように、対称又は非対称構成の WT-ITR 又は修飾型 ITR (mod-ITR) を含み得る。

【0551】

実施例 4：一本鎖 DNA 分子による ceDNA 産生

合成方法を使用して ceDNA ベクターを産生する別の例示的な方法は、PCT/US19/14122 の実施例 4 において提供され、センス発現カセット配列に隣接しアンチセンス発現カセットに隣接する 2 つのアンチセンス ITR に共有結合的に結合される 2 つのセンス ITR を含む一本鎖の直鎖状 DNA を使用し、次いで、この一本鎖の直鎖状 DNA の末端をライゲーションして、閉鎖一本鎖分子を形成する。非限定的な一例は、一本鎖 DNA 分子を合成及び／又は産生し、分子の一部をアニーリングして、二次構造の 1 つ以上の塩基対合領域を有する単一の直鎖状 DNA 分子を形成し、次いで遊離 5' 及び 3' 末端を互いにライゲーションして、閉鎖一本鎖分子を形成する。

【0552】

ceDNA ベクターの産生のための例示的な一本鎖 DNA 分子は、5' から 3' に、
センス第 1 の ITR、
センス発現カセット配列、
センス第 2 の ITR、
アンチセンス第 2 の ITR、
アンチセンス発現カセット配列、及び
アンチセンス第 1 の ITR を含む。

【0553】

実施例 4 の例示的な方法で使用するための一本鎖 DNA 分子は、本明細書に記載される任意の DNA 合成方法論、例えば、インビトロ DNA 合成によって形成され得るか、又はヌクレアーゼで DNA 構築物（例えば、プラスミド）を切断し、得られた dsDNA 断片を融解して、ssDNA 断片を提供することによって提供され得る。

【0554】

アニーリングは、センス配列及びアンチセンス配列の対の計算された融解温度を下回って温度を下げることによって達成され得る。融解温度は、特定のヌクレオチド塩基含有量、及び使用している溶液の特性、例えば、塩濃度に依存する。任意の所与の配列及び溶液の組み合わせの融解温度は、当業者によって容易に計算される。

【0555】

アニーリングされた分子の遊離 5' 及び 3' 末端は、互いにライゲーションされるか、又はヘアピン分子にライゲーションされて ceDNA ベクターを形成することができる。好適な例示的ライゲーション方法論及びヘアピン分子は、実施例 2 及び 3 に記載される。

【0556】

実施例 5：ceDNA の精製及び／又は産生の確認

例えば、実施例 1 に記載される昆虫細胞ベースの産生方法、又は実施例 2～4 に記載される合成産生方法を含む、本明細書に記載される方法によって産生された DNA ベクター産物のいずれも、例えば、熟練者に一般に知られている方法を使用して、不純物、未使用の構成要素、又は副産物を除去するために精製することができ、かつ／又は分析して、産生された DNA ベクター（この例では、ceDNA ベクター）が所望の分子であることを確認することができる。DNA ベクター、例えば ceDNA の精製のための例示的な方法は、Qiagen Midi Plus 精製プロトコル (Qiagen) を使用すること

10

20

30

40

50

及び／又はゲル精製によるものである。

【0557】

以下は、c e D N A ベクターの同一性を確認するための例示的な方法である。

【0558】

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

【0559】

単離されたc e D N A ベクターの構造を、精製されたD N Aを、選択された制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、a) c e D N A ベクター内の単一切断部位のみの存在、及びb) 0.8%変性アガロースゲル(>800bp)上で分画した場合に明らかに見えるほど十分に大きな、得られる断片について更に分析した。図4C及び4Dに示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状D N A ベクター及び直鎖状かつ連続的な構造を有するc e D N A ベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別することができ、例えば、非連続的な構造を有するD N A ベクターは、1kb及び2kb断片を生成することが期待されるが、連続的な構造を有するc e D N A ベクターは、2kb及び4kb断片を生成することが期待される。

【0560】

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

【0561】

本明細書で使用される場合、「未変性ゲル及び変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるD N A ベクターの特定のためのアッセイ」という句は、制限エンドヌクレアーゼ消化に続いて、消化産物の電気泳動的評価を実施することによって、c e D N A の閉端性を評価するためのアッセイを指す。1つのそのような例示的アッセイを以下に示すが、当業者であれば、この実施例に関する当該技術分野において既知の多くの変形が可能であることを理解するであろう。およそ1/3倍及び2/3倍のD N A ベクター長の産物を生成するであろう目的のc e D N A ベクターに対する単一切断酵素であるように、制限エンドヌクレアーゼが選択される。これは、未変性ゲル及び変性ゲルの両方でバンドを溶解する。変性前に、試料から緩衝液を取り除くことが重要である。Q i a g e n P C R クリーンアップキット又は脱塩「スピнкаラム」、例えば、G E H E A L T H C A R E I L U S T R A (商標) M I C R O S P I N (商標) G - 2 5 カラムは、エンドヌクレアーゼ消化のための当該技術分野において既知のいくつかのオプションである。アッセイは、例えば、i) D N A を適切な制限エンドヌクレアーゼで消化すること、2) 例えば、Q i a g e n P C R クリーンアップキットに適用し、蒸留水で溶出すること、i i i) 10倍変性溶液(10倍=0.5M N a O H、10mM E D T A)を添加し、10倍色素を添加し、緩衝せず、10倍変性溶液を、1mM E D T A 及び200mM N a O H で以前にインキュベーションされた0.8~1.0%ゲル上で4倍に添加することによって調製されたD N A ラダーと一緒に分析して、N a O H 濃度が、ゲル及びゲルボックス中で均一

10

20

30

40

50

であり、1 倍変性溶液（50 mM NaOH、1 mM EDTA）の存在下でゲルを流動させることを保証することを含む。当業者であれば、サイズ及び所望のタイミングの結果に基づいて、電気泳動を実行するために使用する電圧を理解するであろう。電気泳動後に、ゲルを排出し、1 倍 TBE 又は TAE 中で中和し、蒸留水又は 1 倍 SYBR Gold を含む 1 倍 TBE / TAE に移す。次いで、例えば、Thermo Fisher の SYBR（登録商標）Gold 核酸ゲル染料（DMSO 中 10,000 倍濃縮物）及び落射蛍光灯（青色）又は UV（312 nm）を用いてバンドを可視化することができる。前述のゲルベースの方法は、ceDNA ベクターをゲルバンドから単離し、それを復元できるようにすることによって、精製目的に適合させることができる。

【0562】

生成された ceDNA ベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。1 つの例示的な非限定的方法として、試料の全体 UV 吸光度に対する ceDNA プラスミドの寄与は、ceDNA ベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。例えば、UV 吸光度に基づいて、4 µg の ceDNA ベクターをゲル上に充填し、ceDNA ベクター蛍光強度が、1 µg であることが知られている 2 kb バンドに相当する場合、1 µg の ceDNA ベクターが存在し、ceDNA ベクターは、全 UV 吸光材料の 25 % である。次いで、ゲル上のバンド強度を、バンドが表す計算されたインプットに対してプロットする。例えば、全 ceDNA ベクターが 8 kb であり、切除された比較バンドが 2 kb である場合、バンド強度は、全インプットの 25 % としてプロットされ、この場合、1.0 µg のインプットに対して 0.25 µg となる。ceDNA ベクタープラスミドタイトレーションを使用して、標準曲線をプロットする場合、回帰直線等式を使用して、ceDNA ベクターバンドの量を計算し、次いで、これを使用して、ceDNA ベクターにより表される全インプットのパーセント、又は純度パーセントを決定することができる。

【0563】

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

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

【0564】

ceDNA ベクターからのインビボでの導入遺伝子の持続的な発現を長期間にわたって評価するために、LNP-ceDNA をおよそ 5～7 週齢の CD-1（登録商標）IGS マウスに尾静脈内注射によって滅菌 PBS で投与した。3 つの異なる投与量群：0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、及び 1.0 mg/kg を、群当たり 10 匹のマウス（群当たり 15 匹のマウスを有していた 1.0 mg/kg を除く）を評価した。注射は、0 日目に投与された。各群からの 5 匹のマウスに、28 日目に追加の同一用量を注射した。ルシフェラーゼ発現は、CD-1（登録商標）IGS マウス（Charles River Laboratories, WT マウス）への静脈内投与後の IVIS 撮像によって測定された。ルシフェラーゼ発現は、3、4、7、14、21、28、31、35、及び 42 日目、並びに定期的に（例えば、毎週、隔週、又は 10 日毎、又は 2 週間毎）、42～110 日に 150 mg/kg のルシフェリン基質を腹腔内注射した後、IVIS 撮像によ

10

20

30

40

50

て評価した。3つの異なる投与プロトコル後、少なくとも132日間IVIS撮像によって測定された例示的なFIXとしてのルシフェラーゼ導入遺伝子の発現（データには示さず）。

【0565】

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

【0566】

この研究では、ceDNAベクターからのルシフェラーゼ発現の生体内分布を、0日目及び28日目（群A）における、1.0mg/kg（すなわち、プライミング用量）の初回静脈内投与後にCD-1（登録商標）IGSマウスにおけるIVISによって評価した。ceDNAベクターの第2の投与は、84日目に、1.2mLの3mg/kg（B群）又は10mg/kg（C群）の尾静脈注入によって投与した。この研究では、群A、B、及びCの各々における5匹のCD-1（登録商標）マウスを使用した。上記のような49、56、63、及び70日目の追加投与前、並びに84日目と91、98、105、112、及び132日目の再用量後に、ルシフェラーゼ発現についてのマウスのIVIS撮像を実施した。ルシフェラーゼ発現は、少なくとも110日（評価された最長期間）まで、群A、B、及びCの3つ全てにおいて評価され、検出された。

【0567】

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

【0568】

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

【0569】

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

【0570】

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

【0571】

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

10

【0572】

実施例7：LNP製剤化ceDNAベクターのインビボでの持続的導入遺伝子発現

異なる脂質ナノ粒子を用いた実施例6の結果の再現性を、マウスにおいてインビボで評価した。0日目に、実施例6で使用したものと異なるLNPに封入されたCAGプロモーターによって駆動されるルシフェラーゼ導入遺伝子を含むceDNAベクター、又はポリCを含むがceDNA又はルシフェラーゼ遺伝子を欠いている同じLNPのいずれかをマウスに投与した。具体的には、およそ4週齢の雄CD-1（登録商標）マウスを、0.5mg/kgのLNP-TTX-ルシフェラーゼ又は対照LNP-ポリCの単回注入で治療し、0日目に側尾静脈から静脈内投与した。14日目に動物にルシフェリン150mg/kgを2.5mL/kgの腹腔内注射により全身投与した。ルシフェリン投与後およそ15分で、各動物をインビボ撮像システム（「IVIS」）を使用して撮像した。

20

【0573】

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

【0574】

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

30

別の実験では、治療された動物の肝臓内のLNP送達されたceDNAの局在を評価した。関心対象の機能的導入遺伝子を含むceDNAベクターを、実施例7で使用したものと同一LNPに封入し、静脈内注射により0.5mg/kgの用量レベルで、インビボでマウスに投与した。6時間後、マウスを終了させ、肝臓試料を採取し、標準的なプロトコルを使用してホルマリン固定し、パラフィン包埋した。RNA scope（登録商標）インサイチュハイブリダイゼーションアッセイを実施して、ceDNA導入遺伝子に特異的なプローブを使用して、組織内のceDNAベクターを可視化し、発色反応及びヘマトキシリン染色（Advanced Cell Diagnostics）を使用して検出した。図8は結果を示し、ceDNAが肝細胞に存在することを示す。

40

【0575】

実施例9：インビボでのceDNAの持続的眼導入遺伝子発現

肝臓以外の組織でのceDNAベクター導入遺伝子発現の持続可能性を評価して、インビボでの眼内投与後のceDNAベクターの耐性及び発現を決定した。実施例9でルシフェラーゼを例示的な導入遺伝子として使用したが、当業者は、ルシフェラーゼ導入遺伝子を、表1に列挙されたもの又は表12に含まれるもののうちのいずれかからのFIX配列で容易に置換することができる。

【0576】

0日目に、およそ9週齢の雄のSprague Dawleyラットに、5µLのjetPEI（登録商標）トランスフェクション試薬（PolypIus）で製剤化されたル

50

シフェラーゼ導入遺伝子を含む c e D N A ベクター又は J e t P E I（登録商標）で製剤化されたルシフェラーゼをコードするプラスミド D N A のいずれかを、いずれも $0.25 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ の濃度で網膜下注射した。各群において4匹のラットを試験した。動物を鎮静させ、33ゲージ針を使用して、被験物質を右眼に網膜下注射した。各動物の左眼は未治療であった。注射直後、網膜下ブレブの存在を確認するために、光干渉トモグラフィー又は眼底撮像で眼を確認した。標準的な手順に従って、ラットをブプレノルフィン及び局所抗生物質軟膏で治療した。

【0577】

7、14、21、28、及び35日目に、両方の群の動物に、作りたてのルシフェリン $150 \text{mg} / \text{kg}$ を、 $2.5 \text{mL} / \text{kg}$ の腹腔内注射を介して全身投与した。ルシフェリン投与後5～15分で、イソフルラン麻酔下で I V I S を使用して、全ての動物を撮像した。眼を含む関心対象の領域の全流束 $[p / s]$ 及び平均流束 $[p / s / s r / \text{cm}^2]$ は、5分間の曝露で得られた。結果は、未治療の眼（「注射されていない」）の各治療群の平均放射輝度に対する、治療された眼（「注射された」）の各治療群の平均放射輝度としてグラフ化した（図9B）。有意な蛍光は、c e D N A ベクターで治療された眼において容易に検出可能であったが、プラスミドで治療された眼でははるかに弱かった（図9A）。35日後、プラスミドを注射したラットは終了したが、c e D N A で治療されたラットについて研究を継続し、42、49、56、63、70、及び99日目にルシフェリン注射及び I V I S 撮像を行った。結果は、ラットの眼に単回注射で導入された c e D N A ベクターが、インビボでの導入遺伝子発現を媒介し、その発現が少なくとも注射後99日まで高レベルで持続されたことを実証する。

【0578】

実施例10：R a g 2 マウスにおける c e D N A ベクターの持続投与及び再投与。

c e D N A ベクターの遺伝子発現カセットにコードされている導入遺伝子のうちの1つ以上が、発現したタンパク質が外来であると認識される宿主環境（例えば、細胞又は対象）で発現される状況では、宿主が発現産物の望ましくない枯渇をもたらし得る適応免疫反応を開始する可能性が存在し、これは、発現の欠如と混同される可能性がある。場合によっては、これは、通常の宿主環境に対して異種であるレポーター分子で起こり得る。したがって、c e D N A ベクター導入遺伝子の発現は、B細胞及びT細胞を欠く R a g 2 マウスモデルにおいてインビボで評価されたため、ルシフェラーゼなどの非天然マウスタンパク質に対する適応免疫反応を開始しない。簡潔には、0日目に、c 5 7 b l / 6 及び R a g 2 ノックアウトマウスに、 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ の、ルシフェラーゼを発現する L N P 封入された c e D N A ベクター又はポリC対照を尾静脈注射により静脈内投与し、21日目に、ある特定のマウスに同じ L N P 封入された c e D N A ベクターを同じ用量レベルで再投与した。全ての試験群は、各々4匹のマウスで構成された。実施例9に記載されているように、ルシフェリン注射後に週間隔で I V I S 撮像を実施した。

【0579】

I V I S 分析から観察された全流束を比較すると、L N P - c e D N A ベクター - L u c を投与した野生型マウス（発現されたルシフェラーゼの存在の間接的測定）で観察された蛍光は、21日後に徐々に減少したが、同じ治療を施した R a g 2 マウスは、42日の実験にわたってルシフェラーゼの比較的一定の持続的発現を示した（図10A）。野生型マウスで観察された減少のおよそ21日の時点は、適応免疫反応がもたらされると予想され得る時間枠に対応する。R a g 2 マウスにおける L N P - c e D N A ベクターの再投与は、発現の顕著な増加をもたらし、これは、この研究で追跡された少なくとも21日間にわたって持続した（図10B）。結果は、非天然タンパク質が、宿主において c e D N A ベクターから発現されるときに適応免疫が役割を果たすことができ、初回投与から20日以上時間枠で観察された発現の減少が、発現の低下ではなく（又はそれに加えて）、発現された分子に対して交絡する適応免疫反応を知らせることができることを示唆する。注目すべきことに、宿主が発現された分子を自己として適切に認識し、そのような免疫反応を起こさないことが予想される宿主において未変性タンパク質を発現する場合、この反応

は低いと予想される。

【0580】

実施例11：持続的発現に対する肝臓特異的発現及びCpG調節の影響

実施例10に記載されているように、望ましくない宿主免疫反応は、場合によっては、導入されたceDNAベクターからの1つ以上の所望の導入遺伝子の持続的発現であるものを人工的に弱めることがある。ceDNAベクターからの持続的発現に対する潜在的な宿主免疫反応の回避及び／又は抑制の影響を評価するために、2つのアプローチが取られた。第一に、前の実施例で使用されたceDNA-Lucベクターは構成的CAGプロモーターの制御下にあったため、肝臓特異的プロモーター(hAAT)又は異なる構成的プロモーター(hEF-1)を使用して同様の構築物を作製して、骨髓細胞又は非肝臓組織への長期曝露を回避することで、観察された免疫効果が低減したかどうかを判断した。第二に、ある特定のceDNA-ルシフェラーゼ構築物は、宿主免疫反応の既知のトリガーであるCpG含有量が低減するように操作された。そのような操作され、プロモーターが切り替えられたceDNAベクターをマウスに投与した際のceDNAコード化ルシフェラーゼ遺伝子発現を測定した。

10

【0581】

各々が導入遺伝子としてルシフェラーゼをコードする、3つの異なるceDNAベクターを使用した。1つ目のceDNAベクターは、多数の非メチル化CpG(約350)を有し、構成的CAGプロモーター(「ceDNA CAG」)を含んでいた。2つ目は、中程度の数の非メチル化CpG(約60)を有し、肝臓特異的hAATプロモーター(「ceDNA hAAT低CpG」)を含んでいた。また3つ目は、非メチル化CpGを含有せず、hAATプロモーター(「ceDNA hAAT無CpG」)を含むように、2つ目のメチル化形態であった。他の点では、ceDNAベクターは同一であった。上記のようにベクターを調製した。

20

【0582】

およそ4週齢の4匹の雄CD-1(登録商標)マウスの4つの群を、LNPに封入されたceDNAベクター又はポリC対照のうちの1つで治療した。0日目に、各マウスに0.5mg/kgのceDNAベクターを5mL/kgの容量で、単回静脈内尾静脈注射で投与した。-1、-、1、2、3、7日目、及びその後マウスが絶命するまで毎週、体重を記録した。全血試料及び血清試料は、0、1、及び35日目に採取した。生存中の撮像は、7、14、21、28、及び35日目、その後は毎週、インビボ撮像系(IVIS)を使用して実施した。撮像のために、各マウスに、2.5mL/kgの腹腔内注射を介して150mg/kgのルシフェリンを注射した。15分後、各マウスを麻酔し、撮像した。マウスは93日目に絶命し、肝臓及び脾臓を含む終末組織を収集した。サイトカイン測定は、0日目の投与の6時間後に行った。

30

【0583】

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

40

50

【0584】

実施例12：選択されたチロシンキナーゼ阻害剤のインビボ効果

拡張研究では、ヒト第IX因子（FIX）を運ぶ治療用ceDNAをマウス（ $n=4$ ）に投与し、56日間にわたり、免疫抑制剤TKI（例えば、ルキソリチニブ）及び治療用FIX核酸の組み合わせがFIXのインビボ発現に及ぼす効果を評価した。研究設計及び詳細は、以下に示すように行われた。

【0585】

研究設計

表14は、研究のキナーゼ阻害剤投与成分の設計を示す。表14に示すように、雄のCD-1マウスの2つの群（群1、 $n=4$ ；群2、 $n=4$ ）に、ビヒクル又はルキソリチニブ（ 300 mg/kg ）を 10 mL/kg の投与量で投与した。群1及び2の両方について、投薬は-2、-1、1、0、及び36日目に行われた。

【表14】

表14：キナーゼ阻害剤投与の研究設計

群番号	群当たりの動物	阻害剤 ^a	用量レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	治療計画、PO
1	4	ビヒクル	該当せず	10	-2日目、-1日目及び1日目 0日目：投薬の90分前 36日目：投薬の30分前 及び投与の5時間後
2	4	ルキソリチニブ	300		

No. = 番号、PO = 強制経口投与、ROA = 投与経路、min = 分、hrs = 時間。^a 投薬及び阻害剤調製用のビヒクル = 0.5%メチルセルロース

【0586】

表15は、研究の試験物質投与成分の設計を示している。表15に示されるように、雄CD-1マウスの1つの群（群1、 $n=4$ ）に、 1 mg/kg の用量レベル及び 5 mL/kg の用量体積で、0日目にLNP:Empty又は36日目にLNP:Emptyのいずれかを静脈内投与した。雄CD-1マウスの第2の群（群2、 $n=4$ ）には、 2 mg/kg の用量レベル及び 5 mL/kg の用量体積で、0日目にLNP:ceDNA-FIXを静脈内投与し、36日目にLNP:ceDNA-FIXを再投与した。56日目は研究の最終時点であった。

【表15】

表15：LNP:ceDNA-FIX投与の研究設計

群番号	群当たりの動物	治療	用量レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	治療計画、IV	終末時点
1	4	LNP:Empty(0日目)又は LNP:Empty(36日目)	1.0	5	0日目及び 36日目に1回	56日目
2	4	LNP:ceDNA-FIX LNP:ceDNA-FIX(36日目)	2.0			

No. = 番号、IV = 静脈内、ROA = 投与経路

【0587】

試料収集

採血又は血漿収集（中間）は次のように行った。群1及び群2の両方のマウスについて

、120 μ lの全血の試料を、7、14、21、28、35、42、49、及び56日目に眼窩から収集した。血漿試料は、7、14、21、28、35、42、49、及び56日目に血液から収集した。120 μ lの全血を13.33 μ Lの3.2%クエン酸ナトリウムでプレコーティングされたチューブに加え、処理されるまで周囲で維持した。血漿試料を処理及び保存するために、血漿の1つのアリコートを公称-70℃で凍結した。

【0588】

研究の詳細

体重：全ての動物の体重を、-2、-1、0、1、2、3、7、14、21、28、35、36、37、38、39、42、49、及び56日目（安楽死前）に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録した。

【0589】

中間採血：群1～2の全ての動物は、0日目、試験物質投与の6時間後（ $\pm 5\%$ ）、その後は上記のように7、14、21、28、35、42、49、及び56日目に中間採血を行った。

【0590】

阻害剤の投与：阻害剤又はビヒクルは、-2、-1、0及び1日目に投与し、36日目に10 mL / kgでPO投与（強制経口投与）により再び投与した。0日目に、0日目のceDNA投与の1.5時間前（ ± 10 分）に阻害剤又はビヒクルを投与した。36日目に、0日目のceDNA投与の0.5時間（ ± 10 分）前及び投与の5時間（ ± 20 分）後に阻害剤又はビヒクルを投与した。阻害剤は、毎日ほぼ同じ時間（ ± 1 時間）に投与した。

【0591】

用量投与：被験物質を、外側尾静脈を介した静脈内（IV）投与により、群1～2に0日目及び36日目に5 mL / kgで投与した。

【0592】

安楽死及び終末採取：56日目に、血漿のための出血後、CO₂窒息及びそれに続く開胸又は頸椎脱臼により動物を安楽死させた。組織は収集しない。

【0593】

図12に示されるように、-2、-1、1、0及び36日目にルキソリチニブ（300 mg / kg）で処置され、0日目及び36日目にLNP：ceDNA-FIX（2.0 mg / kg）で処置されたマウスは、インビボで7日目から研究終了時（56日目）まで検出されたFIX因子（FIX）タンパク質（IU / mL）を発現した。特に、36日目にceDNA-FIXを再投与すると、42日を超えて研究終了時までFIX発現が劇的に増加した。対照的に、-48時間、-24時間、-1.5時間、及び24時間にビヒクル対照で処置され、0日目又は36日目にLNP：empty（1.0 mg / kg）で処置されたマウスは、FIXタンパク質を発現しなかった。

【0594】

これらの結果はまた、治療モデルにおいて、治療用核酸（例えば、ceDNA-FIX）を1つ以上の免疫抑制剤TKI（例えば、JAK阻害剤ルキソリチニブ）と併せて複数回投与及び再投与できることを示した。図12に示されるように、併用アプローチはceDNA-FIXの再投与を可能にし、FIX発現の著しい増加をもたらした。

【0595】

実施例13：FIXを発現するceDNAの流体力学的送達

げっ歯類の肝臓に核酸を導入する周知の方法は、流体力学的尾静脈注射によるものである。この系では、封入されていない核酸を大量に加圧注射すると、細胞透過性が一過性に増加し、組織及び細胞に直接送達される。これは、マクロファージ送達など、宿主の免疫系の多くを迂回する実験的な機序を提供し、そのような活性の不在下で送達及び発現を観察する機会を提供する。

【0596】

各々が野生型左ITR及び切断変異体右ITRを有し、FIXをコードする導入遺伝子

10

20

30

40

50

領域を有する2つの異なる c e D N A ベクターを、上記の実施例 1 及び 5 に記載されるように調製し、精製した。異なる肝臓特異的プロモーター制御下にある c e D N A F I X ベクター、又はベクターを含まない P B S を、およそ 6 週齢の雄 C 5 7 b l / 6 J マウスに投与した。裸の c e D N A ベクターを、5 ～ 8 秒にわたって投与される 1 0 0 m L / k g の用量で、側尾静脈を介した流体力学的静脈内注射により、動物当たり 0 . 0 0 5 m g (群当たり 4 匹の動物) で投与した。体重を、0、1、2、3、及び 7 日目並びにその後毎週測定した。血液試料を、3、7、14、21 日目、及び最終 28 日目に各治療動物から収集した。第 I X 因子 (F 9、F I X) E L I S A キット (A f f i n i t y B i o l o g i c a l s) を使用して、血漿試料中の発現 F I X の存在を測定した。

【0597】

図 1 1 A に示されるように、F I X は、c e D N A F I X ベクターの各々で治療されたマウスからの 3 日目及び 7 日目の血漿試料で容易に検出されたが、P B S で治療されたマウスでは観察されなかった。図 1 1 B は、F I X 発現が 28 日間の研究期間にわたって持続し、21 日の時点で平坦域に達したことを示している。この実験は、c e D N A ベクターが流体力学的注射後に肝臓から F I X を発現することができたこと、及び F I X が c e D N A 投与後の血漿中で迅速かつ容易に検出可能であったことを示した。

【0598】

実施例 14：雄 C D - 1 マウスにおける流体力学的送達による F I X 構築物の同定

この研究の目的は、組換え D N A の流体力学的注入後の F I X タンパク質発現を決定することであった。

【0599】

研究設計

【表 16】

表 16：c e D N A - F I X 流体力学的投与の研究設計

群番号	動物数	試験材料	用量レベル (μ g/an)	用量体積 (mL/kg)	投薬レジメン ROA	終末時点
1	5	PBS	該当せず ^a	90~100M L/KG (設定用量)	流体力学的IVにより0日目に1回	7日目
2	5	CEDNA-FIX V1	1.0			
3	5	CEDNA-FIX V1	10.0			
4	5	CEDNA-FIX 2109	1.0			
5	5	CEDNA-FIX 2109	10.0			
6	5	CEDNA-FIX 2112	1.0			
7	5	CEDNA-FIX 2112	10.0			

N o . = 番号、I V = 静脈内、R O A = 投与経路、a n = 動物

種：M u s M u s c u l u s

株：C D - 1

雄の数：35 プラス 3 スペア

齢：到着時 4 週齢

【0600】

C D - 1 マウスは、接触床を有する透明なポリカーボネート製ケージ内に群で収容し、M o u s e D i e t 5 0 5 8 及び 1 N H C l で 2 . 5 ～ 3 . 0 の目標 p H に酸性化した濾過した水道水を自由摂取させた。

【0601】

用量処方、投与及び観察

c e D N A - F I X 構築物 (すなわち、c e D N A - F I X v 1、c e D N A - F I X 2 1 0 9 及び c e D N A - F I X 2 1 1 2) を室温まで温め、使用直前に付属の P

BSで希釈した。例示的ceDNA-FIX v1ベクターの配列情報を、本明細書において表12に示す。ceDNA-FIX v1、2109及び2112を、0日目に流体力学的IV投与により、外側尾静脈を介して、動物1匹当たり90～100mL/kg（群内で最も軽い動物に応じる）の設定容量で投与した（5秒以内で投与）。用量は、0.1mL単位で四捨五入される。ケージ側の動物の健康チェックは少なくとも1日1回行われ、一般的な健康、死亡率、及び瀕死状態がチェックされた。臨床観察は、投与の約1時間後、投与日の終わりまで（3～6時間）、次いで0日目の試験物質投与の約24時間後に行った。例外毎に追加の観察を行った。全ての動物の体重を、0、1、2、3、7日目に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録した。

【0602】

10

血液採取

群1～7の全ての動物は、3日目に中間血液採取された。採取後、動物は0.5～1.0mLの乳酸リンゲル液を皮下に受けた。血漿採取のために、全血を、麻酔下で眼窩洞穿刺を介して、コーティングされていないエッペンドルフスタイルのチューブに採取した。120μLを取り、13.33μLの3.2%クエン酸ナトリウムを含有するチューブに入れた。血液試料を穏やかに混合し、処理されるまで周囲で維持した。全血試料を2,000gで15分間、周囲条件（20～25℃）で遠心分離した。血漿試料を、細胞パックを避けて採取した。終末全血をシリンジにより採取し、500μLをすぐに55.6μLの3.2%クエン酸ナトリウムを含有するチューブに入れた。

【0603】

20

結果

図13Aに示すように、動物1匹当たり1μgで、発現は3つ全ての構築物について同等である。高用量（動物1匹当たり10μg）では、ceDNA-FIX 2109は、試験した他の構築物と比較して、7日目に優れたFIX発現レベルの増加を示した（図13B）。

【0604】

実施例15：雄C57BL/6マウスにおけるIV送達によるceDNA-FIX製剤を評価する研究

以下の研究は、LNP製剤化ceDNAのIV注射後のタンパク質発現を決定するために行われた。ceDNA-FIXは、2つの異なるLNP組成で製剤化された（LNP製剤1：イオン性脂質：DSPC：コレステロール：PEG-Lipid+DSPE-PEG-GalNAc4（47.5：10.0：39.2：3.3）（「DP No. 1」と指定）；及びLNP製剤2：イオン性脂質：DSPC：Cholesterol：PEG-Lipid+DSPE-PEG2000-GalNAc4（47.3：10.0：40.5：2.3）（「DP No. 2」と指定）。0日目に、側尾静脈への静脈内投与により試験物質の用量を投与した。ceDNA-FIXを含むLNPは、5mL/kg（2mg/kg）の用量体積で投与された。研究のための試験材料を以下の表17に示す。第IX因子を発現するceDNA（ceDNA-FIX）を独立対照として使用した。

【表17】

30

表17

40

群番号	動物数	試験材料	用量レベル(mg/kg)	用量体積(mL/kg)	投薬レジメン ROA	終末時点
1	5	PBS	該当せず	5	IVにより0日目に1回	14日目
4	5	ceDNA-FIX v1	2.0			
5	5	ceDNA-FIX v1	2.0			
6	5	ceDNA-FIX v1	2.0			

【0605】

50

ceDNA-FIX v1 LNP製剤（DP No. 1又はDP No. 2）で処理されたマウスは、hFIXを示さないビヒクルで処理されたマウスと比較して、血漿中にhFIXの存在を示し、ceDNA-FIX v1 LNP製剤がFIXタンパク質の発現につながる細胞を標的として統合することに成功できたことを示した。全体として、ceDNA-FIX LNP製剤は忍容性が良好であった。

【0606】

実施例16：カニクイザルにおける脂質ナノ粒子製剤の14日間単回投与静脈内注入毒性研究

この研究の目的は、オスのカニクイザルにLNP製剤化ceDNAをIV投与した後、脂質ナノ粒子の単回静脈内（IV）投与のceDNA導入遺伝子発現への毒性効果を調べることであった。投与は、 0.42 mL/kg/hr で15分間投与し、次いで 4.59 mL/kg/hr で55分間に漸増させた伏在静脈（必要に応じて頭静脈又は尾静脈を使用）へのIV注入（70分±10分）によるものであった。注入反応を防止／緩和するために、漸増投薬速度設計による長期注入が必要であった。投薬の初日を1日目と指定した。投薬は1日目に1回行い、15日間行った。研究の詳細を表18に示す。

【表18】

表18：ceDNA-FIX製剤毒性研究における試験材料の投与

群番号	試験材料	用量レベル (mg/kg/用量)	用量体積 ^a (mL/kg)	用量濃度 (mg/mL)	動物数
					雄 ^b
1	ビヒクル	0	4.31	0	2
2	ceDNA-FIX v1	2.0	4.31	0.46	2
3	ceDNA-FIX v1	2.0	4.31	0.46	2
4	ceDNA-FIX v1	2.0	4.31	0.46	2

最新の体重測定に基づく。投薬の初日は、1日目の体重に基づいた。

【0607】

注入を開始する前に、カテーテルを約2mLの滅菌生理食塩水で洗い流した。次に、投薬製剤を最初の15分間（目標時間） 0.42 mL/kg/hr で投与した。注入ポンプを停止し、注入の残りの55分間（目標時間）に 4.59 mL/kg/hr の注入速度で残りの用量を注入するように再プログラムした。用量投与後、滅菌生理食塩水の約1.0mLのフラッシュをカテーテルを介して投与した。

【0608】

注入反応の可能性を軽減するために、注入開始の約30±5分前に全ての動物をジフェンヒドラミン及びデキサメタゾンで前処理した。更に、注入の約4時間±10分後に全ての動物に、ジフェンヒドラミン及びデキサメタゾンの2回目の投薬を行った。ジフェンヒドラミンは、 5 mg/kg の用量レベルを達成するために、 0.1 mL/kg の用量体積で筋肉内注射として投与された。デキサメタゾンは、 1 mg/kg の用量レベルを達成するために、 0.25 mL/kg の用量体積で筋肉内注射として投与された。

10

20

30

40

50

【表 19】

表 19：第 IX 因子試料の収集、処理及び分析

群番号	第IX因子血液試料の収集		
	前処置	5日目	14日目
群1~4	X	X	X

X＝収集する試料

【0609】

試料を穏やかに混合し、できるだけ早く遠心分離した。得られた血漿を分離し、2つのアリコートに分けた。全てのアリコートは、独自にラベル付けしたポリプロピレンチューブ内で作製し、試料分析までドライアイス又は -70°C 以下に維持するように設定された冷凍庫ですぐに凍結した。

【0610】

結果

c e D N A - F I X v 1 で処置されたカニクイザルは、発現を示さなかったビヒクルのみで処置されたカニクイザルと比較して、ヒト F I X の血漿濃度 (I U / m l) の上昇を示した。有害事象は観察されず、被験物質は十分に許容されるようであり、本明細書に開示される c e D N A 構築物を使用して血漿 F I X タンパク質を増加させ、霊長類及び潜在的にヒトの患者における血液凝固を促進できることを示唆している。

【0611】

参考文献

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

10

20

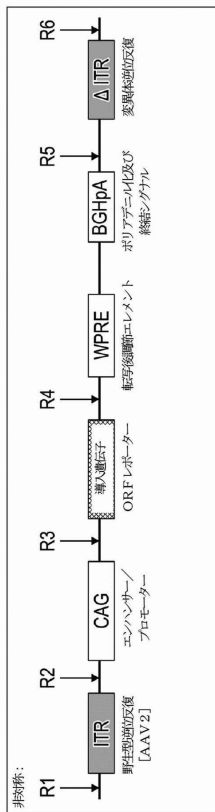
30

40

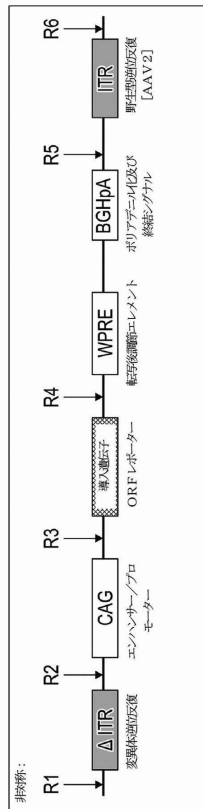
50

【図面】

【図 1 A】



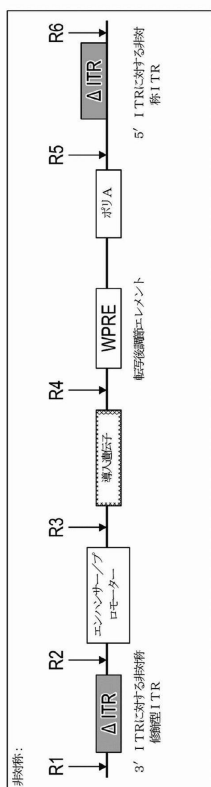
【図 1 B】



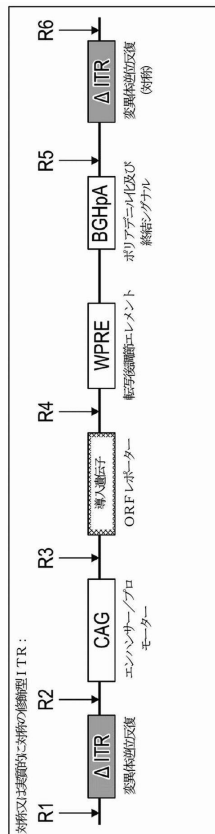
10

20

【図 1 C】



【図 1 D】

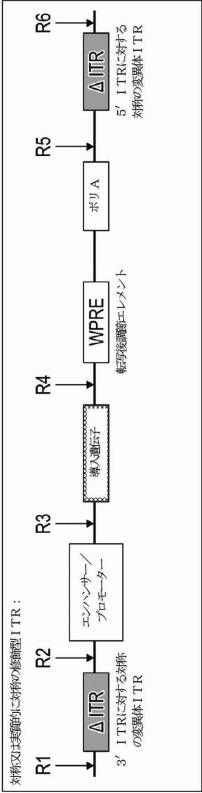


30

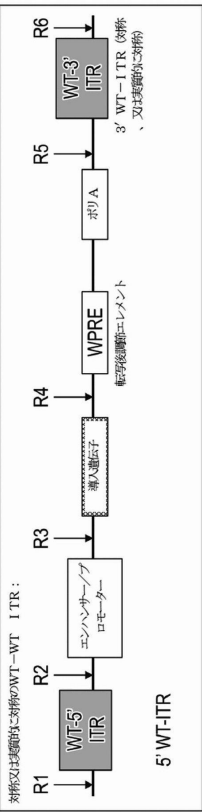
40

50

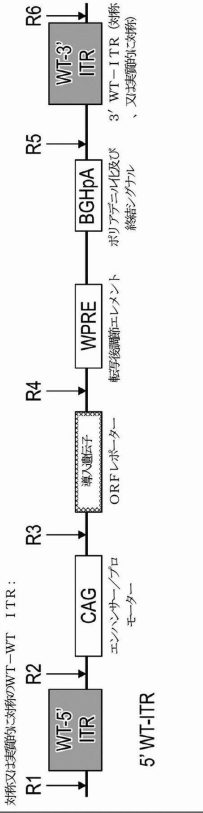
【図 1 E】



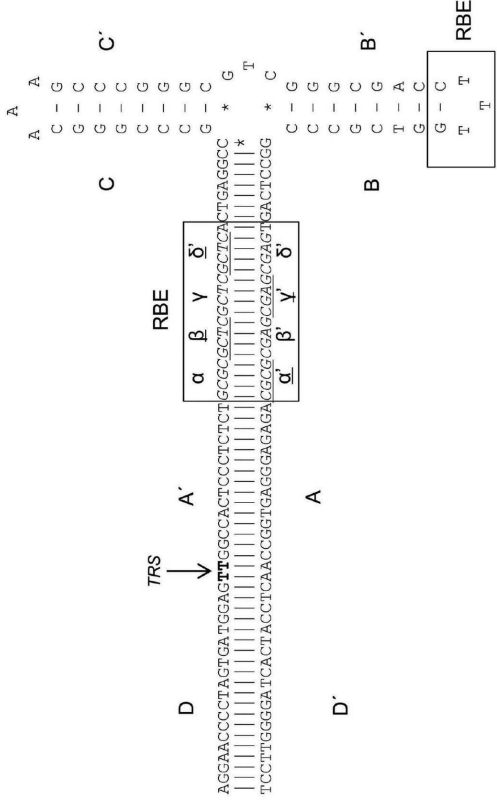
【図 1 G】



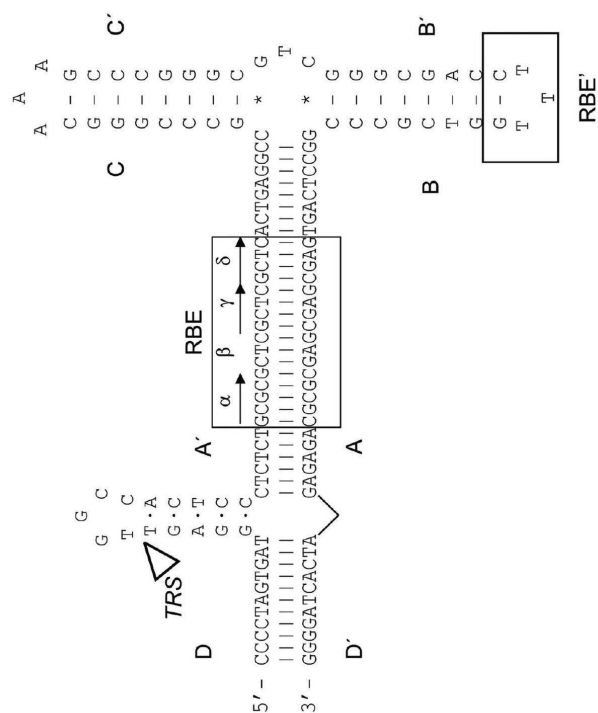
【図 1 F】



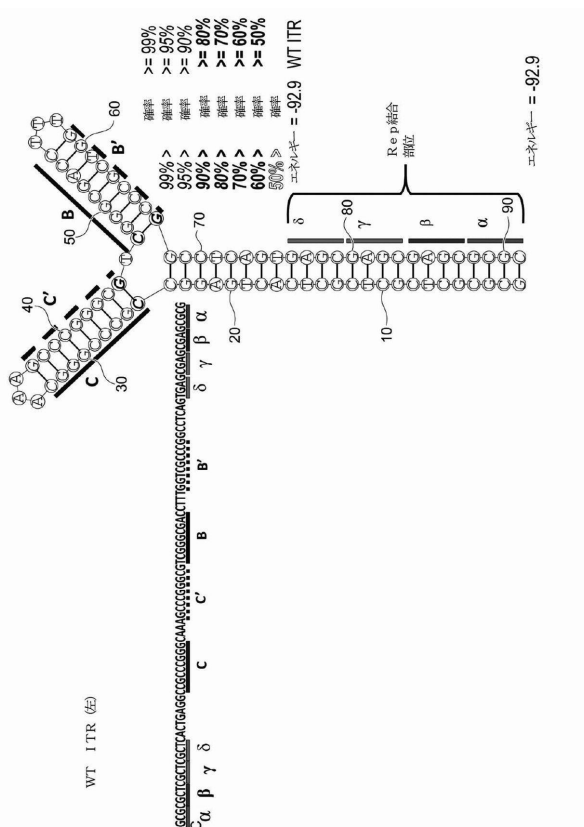
【図 2 A】



【図 2 B】



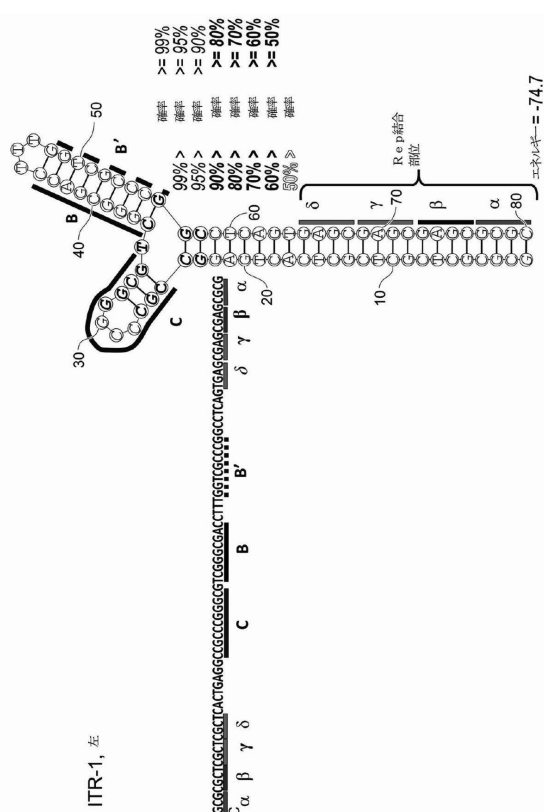
【図 3 A】



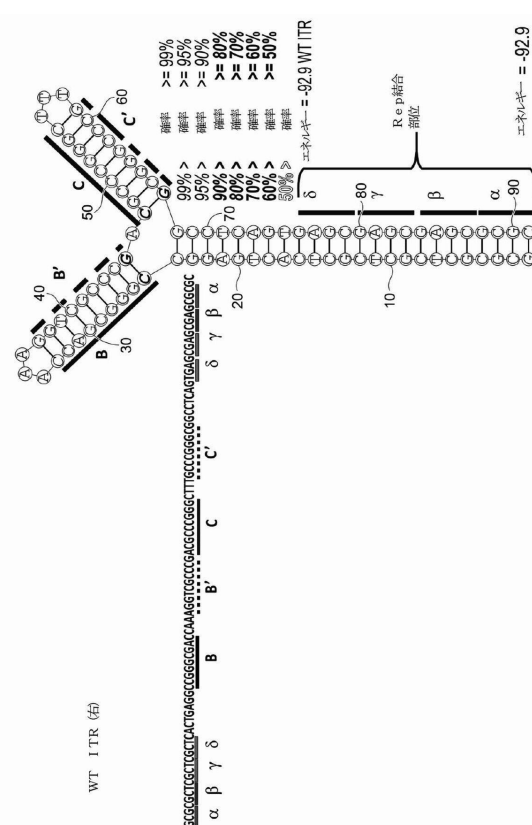
10

20

【図 3 B】



【図 3 C】

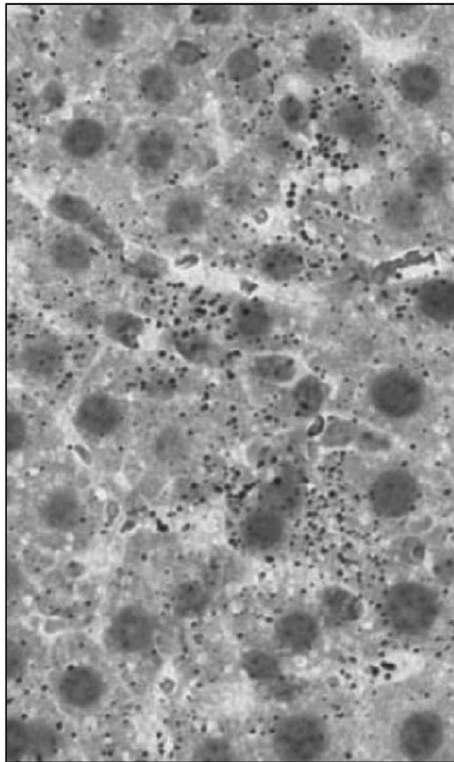


30

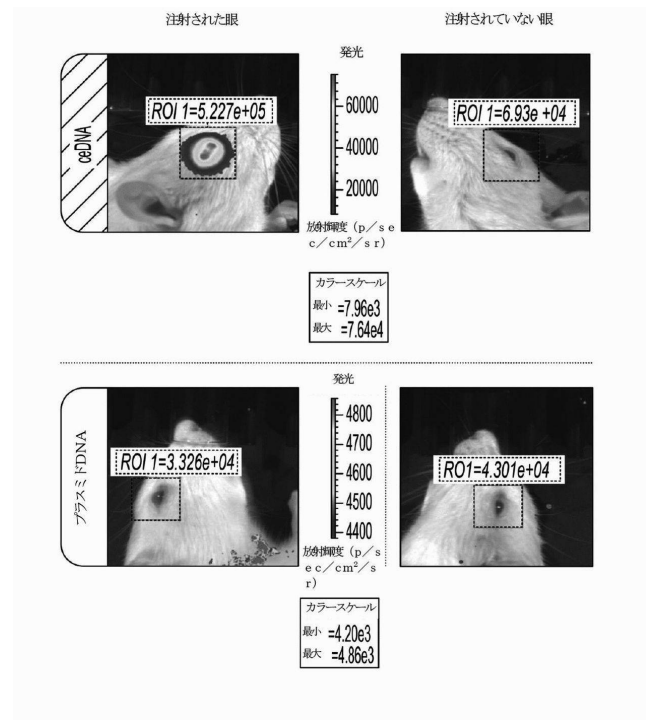
40

50

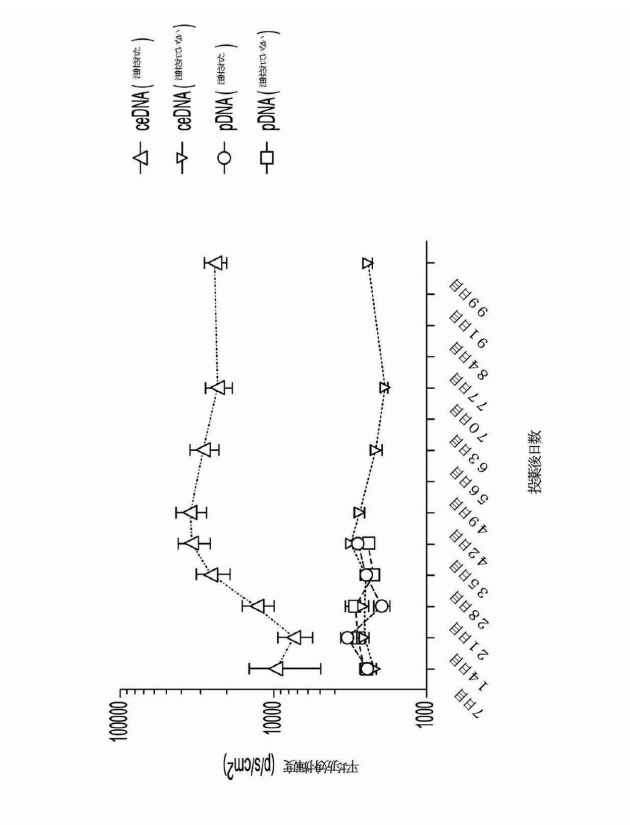
【図 7】



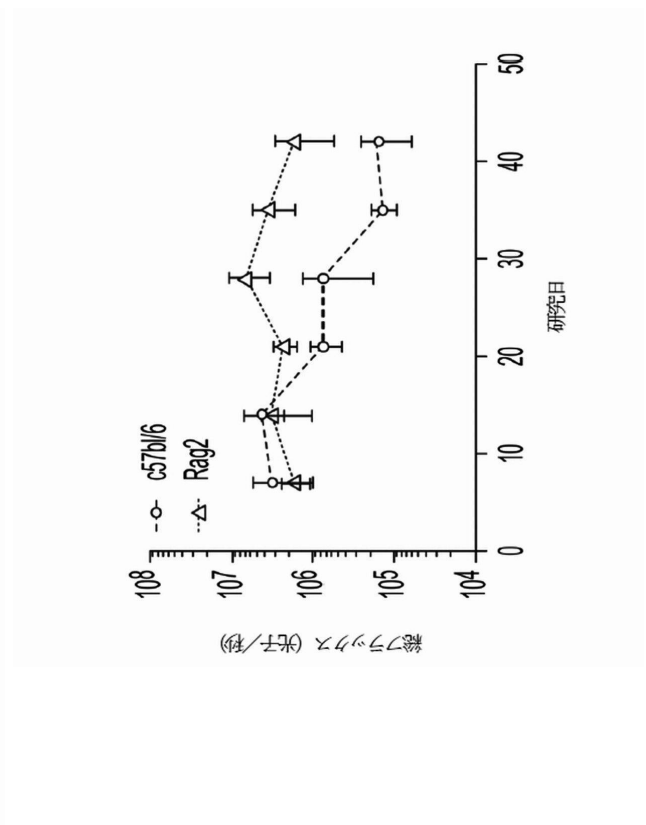
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9 A】



10

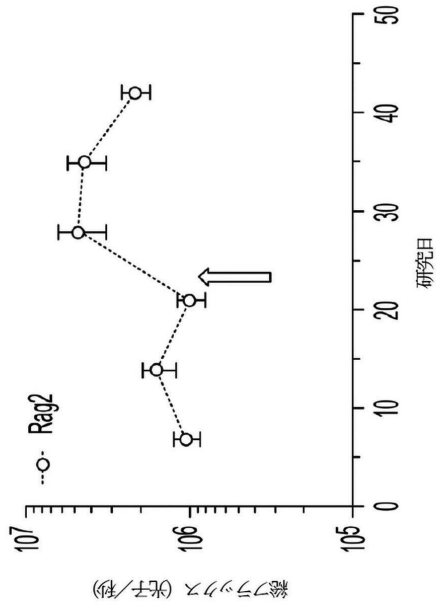
20

30

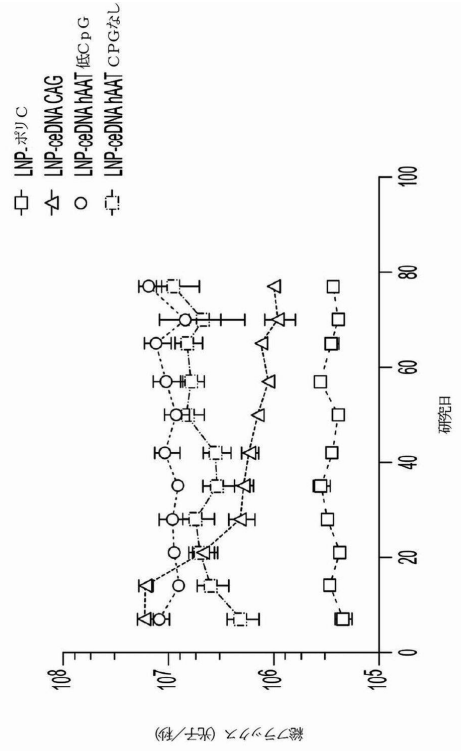
40

50

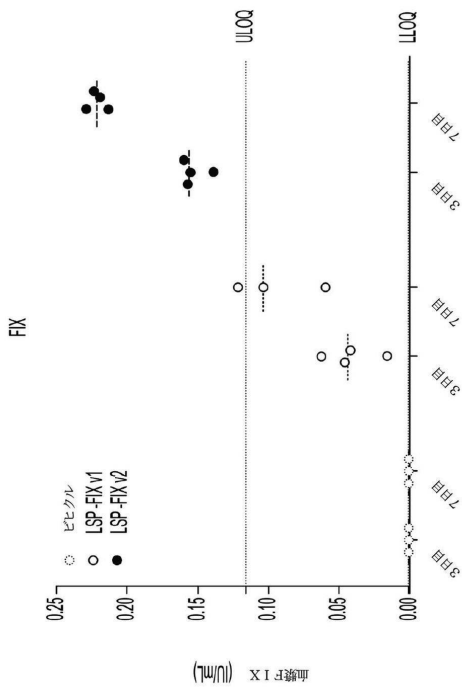
【図 9 B】



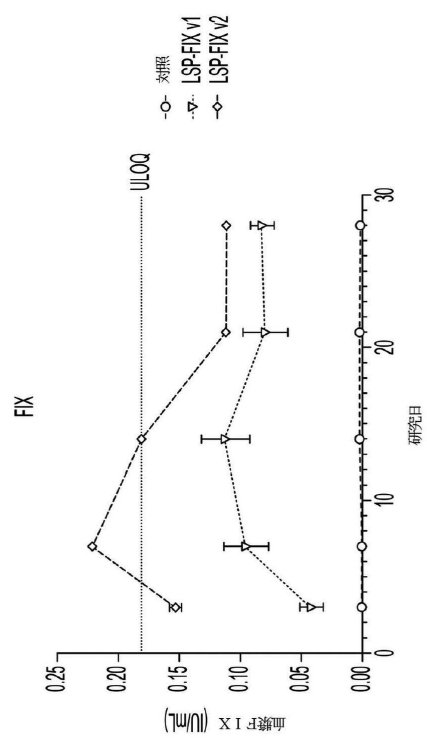
【図 10】



【図 11 A】



【図 11 B】



10

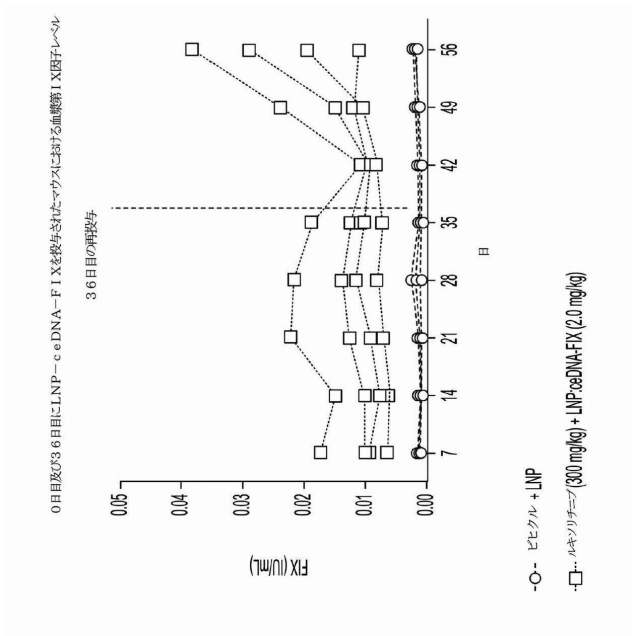
20

30

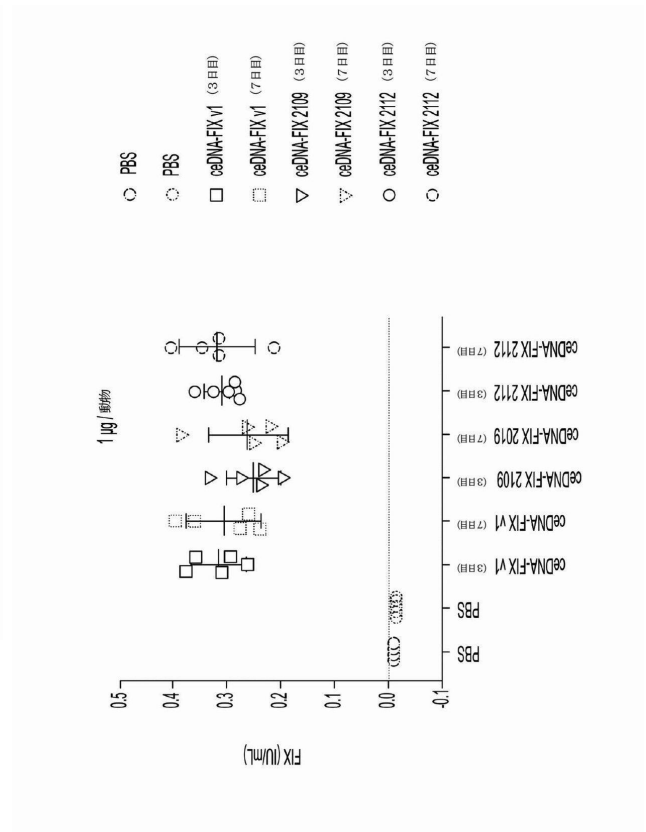
40

50

【図 1 2】



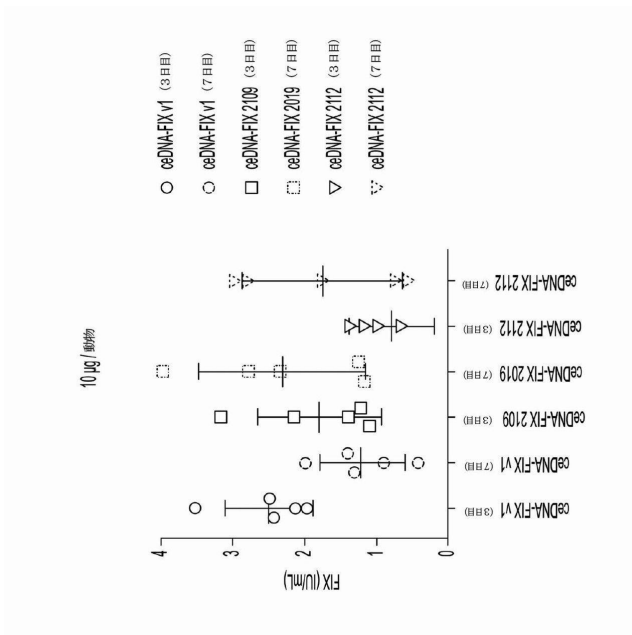
【図 1 3 A】



10

20

【図 1 3 B】



30

40

【配列表】

202352076400001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/023891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/85 C07K14/745
ADD.

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)
C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/165050 A1 (GENERATION BIO CO [US]) 29 August 2019 (2019-08-29) abstract paragraphs [0003], [0012], [0019] - [0021], [0069] - [0076], [0306], [0312] - [0317], [0445], [0448] figure 1	1-62
X	WO 2019/113310 A1 (GENERATION BIO CO [US]) 13 June 2019 (2019-06-13) abstract paragraphs [0014] - [0018], [0071] - [0080], [0089], [0160] - [0167], [0203] - [0213], [0397] - [0404], [0624] examples 5, 6, 10, 13 figures 1, 10, 16 ----- -/--	1-62

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 July 2021

Date of mailing of the international search report

23/07/2021

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/023891

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/023891

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/246544 A2 (ASKLEPIOS BIOPHARMACEUTICAL INC [US]) 26 December 2019 (2019-12-26) abstract paragraphs [0002], [0111], [0168], [0193] - [0198], [0259], [0262], [0266], [0267] example 6 -----	1-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/023891

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019165050 A1	29-08-2019	AU 2019225937 A1	13-08-2020
		BR 112020017060 A2	15-12-2020
		CA 3092059 A1	29-08-2019
		CN 111886343 A	03-11-2020
		EP 3755803 A1	30-12-2020
		JP 2021513999 A	03-06-2021
		KR 20200124250 A	02-11-2020
		SG 11202007621T A	29-09-2020
		WO 2019165050 A1	29-08-2019

WO 2019113310 A1	13-06-2019	AU 2018378672 A1	09-07-2020
		BR 112020009858 A2	17-11-2020
		CA 3084185 A1	13-06-2019
		CN 111527200 A	11-08-2020
		EP 3720952 A1	14-10-2020
		JP 2021505159 A	18-02-2021
		KR 20200093635 A	05-08-2020
		PH 12020550771 A1	10-05-2021
		SG 10202012132W A	28-01-2021
		SG 11202005281X A	29-07-2020
		WO 2019113310 A1	13-06-2019

WO 2019246544 A2	26-12-2019	AU 2019290228 A1	28-01-2021
		CA 3104113 A1	26-12-2019
		CN 112639110 A	09-04-2021
		EP 3810782 A2	28-04-2021
		WO 2019246544 A2	26-12-2019

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76

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,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,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

(72)発明者 カー, ダグラス アンソニー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 サマヨア, フィリップ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 シルバー, ナサニエル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 アギーレ, セバスチャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 クラット, デブラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 バサコウ, エリ ヘルツェル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

F ターム (参考) 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90Y AA91X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C084 AA13 AA19 NA05 NA06 ZA53

4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 BC83 CA12 MA02 NA14 ZA53

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA65 EA20 FA74