

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-549138

(P2022-549138A)

(43)公表日 令和4年11月24日(2022.11.24)

(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 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全107頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-517337(P2022-517337)	(71)出願人	520324592		
(86)(22)出願日	令和2年9月18日(2020.9.18)		インターガラクティック セラピューテ		
(85)翻訳文提出日	令和4年4月25日(2022.4.25)		イクス インコーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/051507		アメリカ合衆国 0 2 1 3 5 マサチュー		
(87)国際公開番号	WO2021/055760		セッツ州 ブライトン ゲスト ストリート		
(87)国際公開日	令和3年3月25日(2021.3.25)		4 0		
(31)優先権主張番号	62/902,084	(74)代理人	100102978		
(32)優先日	令和1年9月18日(2019.9.18)		弁理士 清水 初志		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100102118		
(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	100160923		
			弁理士 山口 裕孝		
		(74)代理人	100119507		
			弁理士 刑部 俊		
		(74)代理人	100142929		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 合成DNAベクターおよびその使用法

(57)【要約】

異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターであって、インビボでの持続性を抑止し得る細菌プラスミドDNAおよび／または細菌シグネチャーを欠いている該DNAベクターが、本明細書において提供される。本発明はまた、対象における異種遺伝子の長期的なエピソーム発現の誘導に使用することができる、本発明のDNAベクターを含む薬学的組成物（非免疫原性薬学的組成物）を特徴とする。本発明は、標的遺伝子の欠陥に関連する障害を処置する方法を含む、本発明のDNAベクターを投与することによって対象を処置する方法を伴う。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療用置換タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

【請求項 2】

末端反復配列を含む、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 3】

前記末端反復配列が、少なくとも10 bp長である、請求項2記載のDNAベクター。

【請求項 4】

前記末端反復配列が、DDエレメントである、請求項3記載のDNAベクター。

【請求項 5】

免疫原性細菌シグネチャーを欠いている、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 6】

RNAポリメラーゼ停止部位を欠いている、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 7】

CpGアイランドを実質的に欠いているプロモーターを含む、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 8】

前記治療用置換タンパク質が、血液中に分泌される、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 9】

前記1つまたは複数の異種遺伝子が、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 10】

二本鎖である、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 11】

単量体である、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 12】

共有結合閉環型である、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 13】

スーパーコイル状である、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 14】

共有結合閉環型かつスーパーコイル状である、請求項13記載のDNAベクター。

【請求項 15】

前記治療用置換タンパク質が、眼障害の処置に必要とされる、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 16】

前記眼障害が網膜ジストロフィーである、請求項15記載のDNAベクター。

【請求項 17】

前記網膜ジストロフィーが、シュタルガルト病、レーバー先天性黒内障（LCA）、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される、請求項16記載のDNAベクター。

【請求項 18】

前記治療用置換タンパク質が、血液凝固障害の処置に必要とされる、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項 19】

前記血液凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、請求項18記載のDNAベクター。

【請求項20】

前記血液凝固障害が、
フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素
をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられる、請求項18記載のDNAベクター。

【請求項21】

抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

【請求項22】

前記抗原結合タンパク質が、抗体またはその抗原結合断片である、請求項21記載のDNAベクター。

【請求項23】

前記抗原結合タンパク質が、TNF、LT、IFN- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、EMAP-II、GM-CSF、EGF、HER2、HER3、FGF、PDGF、BDNF、CNTF、CSF、G-CSF、NGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、インスリン様増殖因子、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90、PD-1、PD-L1、アミロイド β 、アルカリホスファターゼ、アミロイドタンパク質A、CCR4、葉酸受容体、ムチン5AC、PCSK-9、ホスファチジルセリン、またはスクレロスチンに結合する、請求項21または22記載のDNAベクター。

【請求項24】

前記抗原結合タンパク質が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、または抗原結合断片である、請求項22記載のDNAベクター。

【請求項25】

1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項26】

前記異種遺伝子が、4.5 Kb長を上回る、請求項1記載のDNAベクター。

【請求項27】

酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む、単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

【請求項28】

前記酵素が、エピジェネティックレギュレーターである、請求項27記載のDNAベクター。

【請求項29】

前記エピジェネティックレギュレーターが、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、またはDN

10

20

30

40

50

Aデメチラーゼである、請求項28記載のDNAベクター。

【請求項30】

前記増殖因子が、BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-SCF、M-CSF、GM-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、またはインスリン様増殖因子である、請求項27記載のDNAベクター。

【請求項31】

前記インターロイキンが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、またはIL-21である、請求項27記載のDNAベクター。

【請求項32】

前記インターフェロンが、IFN- α またはIFN- γ である、請求項27記載のDNAベクター。

【請求項33】

前記凝固因子が、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォン・ウィルブランド因子である、請求項27記載のDNAベクター。

【請求項34】

前記神経保護因子が、ニューロトロフィン、Kifap3、Bcl-xl、Crmp1、Chk.beta.、CALM2、Caly、NPG11、NPT1、Eef1a1、Dhps、Cd151、Morf412、CTGF、LDH-A、At11、NPT2、Ehd3、Cox5b、Tuba1a、 γ -アクチン、Rpsa、NPG3、NPG4、NPG5、NPG6、NPG7、NPG8、NPG9、およびNPG10からなる群より選択される、請求項27記載のDNAベクター。

【請求項35】

前記ニューロトロフィンが、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、およびCNTFからなる群より選択される、請求項34記載のDNAベクター。

【請求項36】

眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含む、単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

【請求項37】

前記障害が、網膜ジストロフィーである眼障害である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項38】

前記障害がメンデル遺伝性網膜ジストロフィーである、請求項37記載のDNAベクター。

【請求項39】

前記メンデル遺伝性網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障(LCA)、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジューベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される、請求項38記載のDNAベクター。

【請求項40】

前記障害ががんであり、前記異種遺伝子が、CD40、CD40L、CD46、XCL1、MDA-7、IL-12、IL-24、またはOPCML(オピオイド結合タンパク質／細胞接着分子)である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項41】

前記障害ががんであり、前記異種遺伝子が腫瘍抑制遺伝子である、請求項36記載のDN

10

20

30

40

50

Aベクター。

【請求項42】

前記腫瘍抑制遺伝子が、細胞内タンパク質をコードする遺伝子である、請求項41記載のDNAベクター。

【請求項43】

前記腫瘍抑制遺伝子が、細胞増殖を阻害する、分泌ホルモンまたは発生シグナルに対する受容体またはシグナルトランスデューサーをコードする遺伝子である、請求項41記載のDNAベクター。

【請求項44】

前記腫瘍抑制遺伝子が、チェックポイント制御タンパク質をコードする遺伝子である、請求項41記載のDNAベクター。

【請求項45】

前記腫瘍抑制遺伝子が、アポトーシス促進タンパク質をコードする遺伝子である、請求項41記載のDNAベクター。

【請求項46】

前記腫瘍抑制遺伝子が、DNA修復タンパク質をコードする遺伝子である、請求項41記載のDNAベクター。

【請求項47】

前記凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項48】

前記凝固障害が、フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられる、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項49】

前記凝固障害が、FGA、FGB、FGG、F2、F5、F7、F10、F11、F13A、F13B、L MAN1、MCFD2、GGCX、またはVKORC1における変異によって特徴づけられる、請求項36または48記載のDNAベクター。

【請求項50】

前記神経学的障害が神経変性疾患である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項51】

前記神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、および多発性硬化症からなる群より選択される、請求項50記載のDNAベクター。

【請求項52】

前記神経変性疾患が、中枢神経系（CNS）の自己免疫疾患である、請求項50記載のDNAベクター。

【請求項53】

前記CNSの自己免疫疾患が、多発性硬化症、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群である、請求項52記載のDNAベクター。

【請求項54】

前記神経学的障害が、脳梗塞、脊髄損傷、中枢神経系障害、神経精神障害、またはチャネル病である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項55】

前記チャネル病が、てんかんまたは片頭痛である、請求項54記載のDNAベクター。

【請求項56】

10

20

30

40

50

前記神経学的障害が、不安障害、気分障害、小児障害、認知障害、統合失調症、物質関連障害、または摂食障害である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項57】

前記神経学的障害が、脳梗塞、脳卒中、外傷性脳損傷、または脊髄損傷の症状である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項58】

前記リソソーム貯蔵障害が、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ニーマン・ピック病、およびムコ多糖症（MPS）からなる群より選択される、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項59】

前記心血管障害が、変性心疾患、冠動脈疾患、虚血、狭心症、急性冠症候群、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、またはアテローム性動脈硬化症である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項60】

前記心血管障害が、虚血性心筋症、伝導疾患、および先天性欠損からなる群より選択される変性心疾患である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項61】

前記免疫障害が自己免疫障害である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項62】

前記自己免疫障害が、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、ループス、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群、自己免疫性肝炎、ブドウ膜炎、自己免疫性網膜症、視神経脊髄炎、乾癬性関節炎、乾癬、重症筋無力症、慢性ライム病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、末梢性ニューロパチー、線維筋痛症、橋本甲状腺炎、潰瘍性大腸炎、または川崎病である、請求項61記載のDNAベクター。

【請求項63】

前記疾患が、肝炎、アラジール症候群、胆道閉鎖症、肝がん、肝硬変、嚢胞性疾患、カロリ症候群、先天性肝線維症、脂肪肝、ガラクトース血症、原発性硬化性胆管炎、チロシン血症、糖原病、ウィルソン病、および内分泌欠損症からなる群より選択される肝疾患である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項64】

前記肝疾患が、肝細胞性過形成、肝細胞性腺腫、限局性結節性過形成、または肝細胞癌からなる群より選択される肝がんである、請求項63記載のDNAベクター。

【請求項65】

前記がんが、血液がんまたは固形組織がんである、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項66】

前記血液がんが、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、多発性骨髄腫、および非ホジキンリンパ腫である、請求項65記載のDNAベクター。

【請求項67】

前記固形組織がんが、肝がん、腎がん、乳がん、前立腺がん、胃（gastric）がん、食道がん、胃（stomach）がん、腸がん、結腸直腸がん、膀胱がん、頭頸部がん、皮膚がん、または脳がんである、請求項65記載のDNAベクター。

【請求項68】

前記異種遺伝子が、転写因子をコードする、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項69】

前記転写因子が、TSHZ2、HOXA2、MEIS2、HOXA3、HAND2、HOXA5、TBX18、PEG3、GLI2、CLOCK、HNF4A、VHL/HIF、WT-1、GSK-3、SPINT2、SMAD2、SMAD3、またはSMAD4である、請求項36記載のDNAベクター。

【請求項70】

10

20

30

40

50

前記障害が劣性遺伝性障害である、請求項1～69のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項71】

前記異種遺伝子が、肝細胞、網膜細胞、幹細胞、神経細胞、筋細胞、または血液細胞からなる群より選択される標的細胞において発現可能である、請求項1～70のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項72】

前記異種遺伝子が、分裂後の標的細胞において発現可能である、請求項1～71のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項73】

前記標的細胞が、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびシュワン細胞からなる群より選択される神経細胞である、請求項71または72記載のDNAベクター。 10

【請求項74】

前記治療用タンパク質が、血液中に分泌される、請求項1～73のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項75】

前記1つまたは複数の異種遺伝子の upstream にプロモーター配列を含む、請求項1～74のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項76】

前記1つまたは複数の異種遺伝子の downstream にポリアデニル化部位を含む、請求項1～75のいずれか一項記載のDNAベクター。 20

【請求項77】

前記1つまたは複数の異種遺伝子が、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む、請求項1～76のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項78】

末端反復配列を含む、51503-0の請求項1～77のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項79】

1つまたは複数の治療用核酸を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており； 30

(b) 組換え部位を欠いており；かつ

(c) 末端反復配列を含む、

前記単離された環状DNAベクター。

【請求項80】

前記治療用核酸が、siRNA、shRNA、miRNA、またはCRISPRi分子である、請求項79または66記載のDNAベクター。

【請求項81】

前記末端反復配列が、少なくとも10 bp長である、請求項79または80記載のDNAベクター。

【請求項82】 40

前記末端反復配列が、DDエレメントである、請求項79～81のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項83】

自殺遺伝子を含む、請求項1～82のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項84】

細菌プラスミドDNAを欠いている、請求項1～83のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項85】

1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、請求項1～79のいずれか一項 50

記載のDNAベクター。

【請求項 86】

- (a) 免疫原性細菌シグネチャーを欠いている；
- (b) RNAポリメラーゼ停止部位を欠いている；かつ／または
- (c) CpGアイランドを実質的に欠いている、

請求項1～85のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項 87】

前記異種遺伝子が、4.5 Kb長を上回る、請求項1～86のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項 88】

二本鎖である、請求項1～87のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項 89】

単量体である、請求項1～88のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項 90】

スーパーコイル状である、請求項1～89のいずれか一項記載のDNAベクター。

【請求項 91】

複数の、請求項1～90のいずれか一項記載のDNAベクターを含む、組成物。

【請求項 92】

前記複数のDNAベクターの少なくとも50%が、1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCTGG配列を含む、請求項91記載の組成物。

【請求項 93】

複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、治療用タンパク質をコードする異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに
- (b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

【請求項 94】

複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに
- (b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

【請求項 95】

複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに
- (b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

【請求項 96】

複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに
- (b) 組換え部位

10

20

30

40

50

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

【請求項 97】

複数の同一アンブリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンブリコンの各々が、1つまたは複数の治療用核酸を含み、該DNA分子が、

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；
- (b) 組換え部位を欠いており；かつ
- (c) 末端反復配列を含む、

前記単離された線状DNA分子。

【請求項 98】

制限酵素部位を含む、請求項93～97のいずれか一項記載の単離された線状DNA分子。

10

【請求項 99】

前記制限酵素部位が、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる、請求項98記載の単離された線状DNA分子。

【請求項 100】

以下の段階を含む、請求項1～90のいずれか一項記載の単離されたDNAベクターを生成する方法：

- (i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
- (ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；
- (iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；および
- (iv) 該複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

20

【請求項 101】

前記AAVゲノムが、末端反復配列を含む、請求項100記載の方法。

【請求項 102】

異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、該単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階
をさらに含む、請求項100または101記載の方法。

【請求項 103】

30

以下の段階を含む、請求項1～90のいずれか一項記載の単離されたDNAベクターを生成する方法：

- (i) 異種遺伝子および末端反復配列を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
- (ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；
- (iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；
- (iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；
- (v) 末端反復配列を含むプラスミドクローンを同定する段階；
- (vi) 該末端反復配列を含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；
- (vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鑄型を生成する段階；
- (viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該環状DNA鑄型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；
- (ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに
- (x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該末端反復配列を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

40

【請求項 104】

50

前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、請求項100～103のいずれか一項記載の方法。

【請求項105】

前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、請求項100～104のいずれか一項記載の方法。

【請求項106】

以下の段階を含む、請求項1～71のいずれか一項記載の単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法：

(i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、
線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；および

(iv) 該AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

【請求項107】

異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、該単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階

をさらに含む、請求項106記載の方法。

【請求項108】

前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、請求項106または107記載の方法。

【請求項109】

前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、請求項106～108のいずれか一項記載の方法。

【請求項110】

以下の段階を含む、請求項1～90のいずれか一項記載の単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；ならびに

(iv) 該複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

【請求項111】

以下の段階を含む、請求項1～90のいずれか一項記載の単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；

(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；

(v) DDエレメントを含むプラスミドクローンを同定する段階；

(vi) 該DDエレメントを含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；

(vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鑄型を生成する段階；

(viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該環状DNA鋳型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；

(ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに

(x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

【請求項112】

前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、請求項110または111記載の方法。

【請求項113】

前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、請求項110～112のいずれか一項記載の方法。

【請求項114】

以下の段階を含む、請求項1～90のいずれか一項記載の単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに

(iv) 該AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む治療用DNAベクターを生成する段階。

【請求項115】

前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、請求項114記載の方法。

【請求項116】

前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、請求項114または115記載の方法。

【請求項117】

それを必要とする対象に請求項1～90のいずれか一項記載の単離されたDNAベクターまたは請求項91もしくは92記載の組成物を投与する段階を含む、該対象において異種遺伝子のエピソーム発現を誘導する方法。

【請求項118】

請求項1～90のいずれか一項記載の単離されたDNAベクターまたは請求項91もしくは92記載の組成物の治療有効量を対象に投与する段階を含む、該対象における障害を処置する方法。

【請求項119】

前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が反復投与される、請求項117または118記載の方法。

【請求項120】

前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が全身投与される、請求項117または118記載の方法。

【請求項121】

前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が静脈内投与される、請求項117～120のいずれか一項記載の方法。

【請求項122】

前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が局所投与される、請求項117～120のいずれか一項記載の方法。

【請求項123】

10

20

30

40

50

前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が硝子体内投与される、請求項122記載の方法。

【請求項124】

前記障害が眼障害である、請求項117～123のいずれか一項記載の方法。

【請求項125】

前記眼障害がメンデル遺伝性網膜ジストロフィーである、請求項124記載の方法。

【請求項126】

前記眼障害が、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、またはワグナー症候群である、請求項124記載の方法。

【請求項127】

前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が全身投与される、請求項117～126のいずれか一項記載の方法。

【請求項128】

前記障害が凝固障害である、請求項127記載の方法。

【請求項129】

前記凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、請求項128記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、全体として参照により本明細書に組み入れられる配列表を含む。2020年9月16日に作成された該ASCIIコピーは、51503-026W02_Sequence_Listing_9.16.20_ST25 と命名され、18,453 バイトの大きさである。

【0002】

発明の分野

一般に、本発明は合成DNAベクターを特徴とする。

【背景技術】

【0003】

背景

遺伝子治療は、対象における障害の根底にある遺伝的欠陥を修正するために異種遺伝子を標的細胞に形質導入することを伴う。過去数十年にわたり、遺伝子治療に使用するために種々の形質導入アプローチが開発されてきた。例えば、従来の細菌プラスミドDNAベクターは、遺伝子送達における汎用性の高いツールであるが、細菌由来のために限界を示し得る。プラスミドDNAベクターは、抗生物質耐性遺伝子および複製開始点などの細菌遺伝子を含む。さらに、プラスミドDNAベクターは、CpGモチーフなどの細菌シグネチャーを含む。加えて、プラスミドDNAベクターを生成するための細菌発現系の使用は、エンドトキシンまたは細菌ゲノムDNAおよびRNAなどの、細菌宿主からの混入不純物を導入するリスクを伴い、これは、例えば転写サイレンシングによって、インビボでの遺伝子発現の喪失につながる可能性がある。

【0004】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターは、種々のモデル系において高効率遺伝子導入の実績が確立されており、現在、幅広いヒト疾患の治療様式として試験が行われている。rAAVベクターのゲノムは、インビボで（例えば、分裂後の細胞内で）環状エピソームとして持続し得る。感染後、一本鎖rAAV DNAは、細胞核内で二本鎖環状DNAに変換され、細胞の寿命の間エピソーム形態で持続する。このように、AAVベクター系の実質的な利点は、標的細胞内で長期間持続する能力である。一方、AAVベクターは、約4.5

10

20

30

40

50

Kbの限られたパッケージング容量、ウイルスタンパク質の免疫原性、および製造の難しさなどの付加的な欠点を伴い得る。

【0005】

したがって、大きなペイロードを可能にし、かつ有害作用（例えば、炎症）のリスクを減らしながら、rAAVによって提供されるような遺伝子発現の長期持続性を高めるための汎用的でかつ効率的な方法が、当技術分野において必要である。

【発明の概要】

【0006】

概要

本発明は、rAAVベクターのインビボ持続性を再現する、非ウイルス性環状DNAベクターを提供する。本DNAベクターは、非免疫原性であり、AAVパッケージング容量（約4.5 Kb）に制限されない。本発明はまた、（例えば、従来の細菌ベースの合成を上回る製造効率の向上を提供する無細胞方法を用いて）環状DNAベクターを生成する方法、環状DNAベクターを含む薬学的組成物、ならびに、例えば、異種遺伝子の持続的なエピソーム発現を誘導するため、および欠陥遺伝子に関連する疾患を処置するために、本明細書に記載されるベクターを使用する方法を特徴とする。

【0007】

1つの局面において、本発明は、治療用置換タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、(a) 複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）および／または薬物耐性遺伝子；ならびに(b) 組換え部位を欠いている、単離された環状DNAベクターを提供する。例えば、いくつかの態様において、DNAベクターは、複製開始点、薬物耐性遺伝子、および組換え部位を欠いている。治療用置換タンパク質は、例えば、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子であってもよい。いくつかの態様において、酵素は、エピジェネティックレギュレーターである。いくつかの態様において、エピジェネティックレギュレーターは、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、またはDNAデメチラーゼである。

【0008】

別の局面において、本発明は、抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターを提供する。いくつかの態様において、DNAベクターは、(a) 複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）および／または薬物耐性遺伝子；ならびに(b) 組換え部位を欠いている。例えば、いくつかの態様において、DNAベクターは、複製開始点、薬物耐性遺伝子、および組換え部位を欠いている。抗原結合タンパク質は、抗体またはその抗原結合断片であってもよい。抗原結合タンパク質は、サイトカイン、増殖因子、または細胞表面タンパク質（例えば、腫瘍関連抗原）に結合してもよい。いくつかの態様において、抗原結合タンパク質は、TNF、LT、IFN- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、EMAP-II、GM-CSF、EGF、HER2、HER3、FGF、PDGF、BDNF、CNTF、CSF、G-CSF、NGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、インスリン様増殖因子、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90、PD-1、PD-L1、アミロイド β 、アルカリホスファターゼ、アミロイドタンパク質A、CCR4、葉酸受容体、ムチン5AC、PCSK-9、ホスファチジルセリン、またはスクレロスチンに結合する。抗原結合タンパク質は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および／または抗原結合断片（例えば、Fab、scFv、scFabなど）であってもよい。

【0009】

別の局面において、本発明は、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インタ

ーフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、(a)複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）および／または薬物耐性遺伝子；ならびに(b)組換え部位を欠いている、単離された環状DNAベクターを提供する。増殖因子は、脳由来神経栄養因子（BDNF）、網様体神経栄養因子（CNTF）、コロニー刺激因子（CSF）、上皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、神経成長因子（NGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、色素上皮由来因子（PEDF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF；例えば、TGF- β ）、血管内皮増殖因子（VEGF）、ゴナドトロピン、またはインスリン様増殖因子であってもよい。インターロイキン（IL）は、IL-1（例えば、IL-1 β ）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、またはIL-21であってもよい。インターフェロン（IFN）は、IFN- α またはIFN- γ であってもよい。凝固因子は、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォン・ウィルブランド因子であってもよい。神経保護因子は、ニューロトロフィン（NT、例えば、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、またはCNTF）、Kifap3、Bcl-xl、Crmp1、Chk.beta.、CALM2、Caly、NPG11、NPT1、Eef1a1、Dhps、Cd151、Morf412、CTGF、LDH-A、At11、NPT2、Ehd3、Cox5b、Tuba1a、 γ -アクチン、Rpsa、NPG3、NPG4、NPG5、NPG6、NPG7、NPG8、NPG9、およびNPG10からなる群より選択されてもよい。

10

20

【0010】

別の局面において、本発明は、眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、(a)複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）および／または薬物耐性遺伝子；ならびに(b)組換え部位を欠いている、単離された環状DNAベクターを提供する。例えば、いくつかの態様において、DNAベクターは、複製開始点、薬物耐性遺伝子、および組換え部位を欠いている。

【0011】

30

障害は、網膜ジストロフィー（例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー）である眼障害であってもよい。網膜ジストロフィーは、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、先天性停止性夜盲症1C型（CSNB-1C）、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択されてもよい。いくつかの態様において、障害はがんであり、異種遺伝子は、CD40、CD40L、CD46、XCL1、MDA-7、IL-12、IL-24、またはOPCML（オピオイド結合タンパク質／細胞接着分子）である。障害は、いくつかの例において、がんであってもよく、異種遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子である。腫瘍抑制遺伝子は、細胞内タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。腫瘍抑制遺伝子は、細胞増殖を阻害する、分泌ホルモンまたは発生シグナルに対する受容体またはシグナルトランスデューサーをコードする遺伝子であってもよい。腫瘍抑制遺伝子はまた、チェックポイント制御タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。腫瘍抑制遺伝子は、アポトーシス促進タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。腫瘍抑制遺伝子は、DNA修復タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

40

【0012】

いくつかの態様において、障害は、血友病（例えば、血友病Aもしくは血友病B）、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症などの凝固障害である。凝固障害は、フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後

50

修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられてもよい。いくつかの態様において、凝固障害は、以下の遺伝子の1つまたは複数における変異によって特徴づけられる：フィブリノーゲン α (FGA)、フィブリノーゲン β (FGB)、フィブリノーゲン γ (FGG)、因子 (F) F2、F5、F7、F10、F11、F13A、F13B、レクチンマンノース結合1 (LMAN1)、複数凝固因子欠乏2 (MCFD2)、 γ グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX)、またはビタミンKエポキシド還元酵素複合体サブユニット1 (VKORC1)。

【0013】

障害は、神経学的障害、例えば、神経変性疾患であってもよい。神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、または多発性硬化症からなる群より選択されてもよい。神経変性疾患は、多発性硬化症、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群などの、中枢神経系 (CNS) の自己免疫疾患であってもよい。神経学的障害は、脳梗塞、脊髄損傷、中枢神経系障害、神経精神障害、またはチャネル病 (例えば、てんかんもしくは片頭痛) であってもよい。神経学的障害は、不安障害、気分障害、小児障害、認知障害、統合失調症、物質関連障害、または摂食障害であってもよい。いくつかの態様において、神経学的障害は、脳梗塞、脳卒中、外傷性脳損傷、または脊髄損傷の症状である。

【0014】

いくつかの態様において、障害は、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ニーマン・ピック病、またはムコ多糖症 (MPS) などのリソソーム貯蔵障害である。

【0015】

いくつかの態様において、障害は、変性心疾患、冠動脈疾患、虚血、狭心症、急性冠症候群、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、またはアテローム性動脈硬化症などの心血管障害である。心血管障害は、虚血性心筋症、伝導疾患、および先天性欠損からなる群より選択される変性心疾患であってもよい。

【0016】

障害は、免疫障害、例えば、自己免疫障害であってもよい。自己免疫障害は、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、ループス、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群、自己免疫性肝炎、ブドウ膜炎、自己免疫性網膜症、視神経脊髄炎、乾癬性関節炎、乾癬、重症筋無力症、慢性ライム病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、末梢性ニューロパチー、線維筋痛症、橋本甲状腺炎、潰瘍性大腸炎、または川崎病であってもよい。

【0017】

障害は、肝疾患、例えば、肝炎、アラジール症候群、胆道閉鎖症、肝がん、肝硬変、嚢胞性疾患、カロリー症候群、先天性肝線維症、脂肪肝、ガラクトース血症、原発性硬化性胆管炎、チロシン血症、糖原病、ウィルソン病、および内分泌欠損症からなる群より選択される肝疾患であってもよい。肝疾患は、肝細胞性過形成、肝細胞性腺腫、限局性結節性過形成、または肝細胞癌からなる群より選択される肝がんであってもよい。

【0018】

いくつかの態様において、障害は、血液がん (例えば、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、多発性骨髄腫、および非ホジキンリンパ腫)、または固形組織がん (例えば、肝がん、腎がん、乳がん、前立腺がん、胃 (gastric) がん、食道がん、胃 (stomach) がん、腸がん、結腸直腸がん、膀胱がん、頭頸部がん、皮膚がん、もしくは脳がん) などのがんである。いくつかの態様において、異種遺伝子は、TSHZ2、HOXA2、MEIS2、HOXA3、HAND2、HOXA5、TBX18、PEG3、GLI2、CLOCK、HNF4A、VHL/HIF、WT-1、GSK-3、SPINT2、SMAD2、SMAD3、またはSMAD4などの転写因子をコードする。

【0019】

いくつかの態様において、障害は、劣性遺伝性障害である。いくつかの態様において、

障害は、メンデル遺伝性障害である。

【0020】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、異種遺伝子は、肝細胞、網膜細胞、幹細胞、神経細胞、筋細胞、または血液細胞からなる群より選択される標的細胞において発現可能である。標的細胞は、分裂後の細胞であってもよい。いくつかの態様において、標的細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびシュワン細胞からなる群より選択される神経細胞であってもよい。

【0021】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、治療用タンパク質は、血液中に分泌される（例えば、内因的に発現される場合、タンパク質は通常、血液中に分泌される）。

【0022】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、DNAベクターは、末端反復配列（例えば、1つまたは複数の逆位末端反復（ITR）配列（例えば、2つのITR配列）もしくはその一部（例えば、2つのAエレメント、Bエレメント、Cエレメント、もしくはDエレメント）、または長い末端反復（LTR）配列（例えば、2つのLTR配列））を含む。いくつかの態様において、末端反復配列は、少なくとも10塩基対（bp）長（例えば、10 bp～500 bp、12 bp～400 bp、14 bp～300 bp、16 bp～250 bp、18 bp～200 bp、20 bp～180 bp、25 bp～170 bp、30 bp～160 bp、または50 bp～150 bp、例えば、10 bp～15 bp、15 bp～20 bp、20 bp～25 bp、25 bp～30 bp、30 bp～35 bp、35 bp～40 bp、40 bp～45 bp、45 bp～50 bp、50 bp～55 bp、55 bp～60 bp、60 bp～65 bp、65 bp～70 bp、70 bp～80 bp、80 bp～90 bp、90 bp～100 bp、100 bp～150 bp、150 bp～200 bp、200 bp～300 bp、300 bp～400 bp、または400 bp～500 bp、例えば、10 bp、11 bp、12 bp、13 bp、14 bp、15 bp、16 bp、17 bp、18 bp、19 bp、20 bp、21 bp、22 bp、23 bp、24 bp、25 bp、26 bp、27 bp、28 bp、29 bp、30 bp、31 bp、32 bp、33 bp、34 bp、35 bp、36 bp、37 bp、38 bp、39 bp、40 bp、41 bp、42 bp、43 bp、44 bp、45 bp、46 bp、47 bp、48 bp、49 bp、50 bp、51 bp、52 bp、53 bp、54 bp、55 bp、56 bp、57 bp、58 bp、59 bp、60 bp、61 bp、62 bp、63 bp、64 bp、65 bp、66 bp、67 bp、68 bp、69 bp、70 bp、71 bp、72 bp、73 bp、74 bp、75 bp、76 bp、77 bp、78 bp、79 bp、80 bp、81 bp、82 bp、83 bp、84 bp、85 bp、86 bp、87 bp、88 bp、89 bp、90 bp、91 bp、92 bp、93 bp、94 bp、95 bp、96 bp、97 bp、98 bp、99 bp、100 bp、101 bp、102 bp、103 bp、104 bp、105 bp、106 bp、107 bp、108 bp、109 bp、110 bp、111 bp、112 bp、113 bp、114 bp、115 bp、116 bp、117 bp、118 bp、119 bp、120 bp、121 bp、122 bp、123 bp、124 bp、125 bp、126 bp、127 bp、128 bp、129 bp、130 bp、131 bp、132 bp、133 bp、134 bp、135 bp、136 bp、137 bp、138 bp、139 bp、140 bp、141 bp、142 bp、143 bp、144 bp、145 bp、146 bp、147 bp、148 bp、149 bp、150 bp、またはそれ以上）である。いくつかの態様において、DNAベクターは、DDエレメントを含む。

【0023】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、DNAベクターは、1つまたは複数の異種遺伝子の上流にプロモーター配列を含む。

【0024】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、DNAベクターは、1つまたは複数の異種遺伝子の下流にポリアデニル化部位を含む。

【0025】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、1つまたは複数の異種遺伝子は、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む。

【0026】

10

20

30

40

50

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の治療用核酸を有する、単離された環状DNAベクターを提供する。そのような単離された環状DNAベクターは、複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；組換え部位を欠いており；かつ末端反復配列（例えば、DDエレメント）を含む。いくつかの態様において、治療用核酸は、siRNA、shRNA、miRNA、またはCRISPRi分子である。いくつかの態様において、末端反復配列（例えば、DDエレメント）は、少なくとも10 bp長である。

【0027】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、ベクターは、自殺遺伝子を含む。上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、DNAベクターは、細菌プラスミドDNAを欠いている。いくつかの態様において、DNAベクターは、1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む。付加的にまたは代替的に、DNAベクターは、(a) 免疫原性細菌シグネチャーを欠いていてもよく；(b) RNAポリメラーゼ停止部位を欠いていてもよく；かつ／または(c) CpGアイランドを実質的に欠いていてもよい。

【0028】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、異種遺伝子は、4.5 Kb長を上回る（例えば、1つまたは複数の異種遺伝子は、一緒にまたは各々単独で、4.5 Kb～25 Kb、4.6 Kb～24 Kb、4.7 Kb～23 Kb、4.8 Kb～22 Kb、4.9 Kb～21 Kb、5.0 Kb～20 Kb、5.5 Kb～18 Kb、6.0 Kb～17 Kb、6.5 Kb～16 Kb、7.0 Kb～15 Kb、7.5 Kb～14 Kb、8.0 Kb～13 Kb、8.5 Kb～12.5 Kb、9.0 Kb～12.0 Kb、9.5 Kb～11.5 Kb、または10.0 Kb～11.0 Kb長、例えば、4.5 Kb～8 Kb、8 Kb～10 Kb、10 Kb～15 Kb、15 Kb～20 Kb長、またはそれ以上、例えば、4.5 Kb～5.0 Kb、5.0 Kb～5.5 Kb、5.5 Kb～6.0 Kb、6.0 Kb～6.5 Kb、6.5 Kb～7.0 Kb、7.0 Kb～7.5 Kb、7.5 Kb～8.0 Kb、8.0 Kb～8.5 Kb、8.5 Kb～9.0 Kb、9.0 Kb～9.5 Kb、9.5 Kb～10 Kb、10 Kb～10.5 Kb、10.5 Kb～11 Kb、11 Kb～11.5 Kb、11.5 Kb～12 Kb、12 Kb～12.5 Kb、12.5 Kb～13 Kb、13 Kb～13.5 Kb、13.5 Kb～14 Kb、14 Kb～14.5 Kb、14.5 Kb～15 Kb、15 Kb～15.5 Kb、15.5 Kb～16 Kb、16 Kb～16.5 Kb、16.5 Kb～17 Kb、17 Kb～17.5 Kb、17.5 Kb～18 Kb、18 Kb～18.5 Kb、18.5 Kb～19 Kb、19 Kb～19.5 Kb、19.5 Kb～20 Kb、20 Kb～21 Kb、21 Kb～22 Kb、22 Kb～23 Kb、23 Kb～24 Kb、24 Kb～25 Kb長、またはそれ以上、例えば、約4.5 Kb、約5.0 Kb、約5.5 Kb、約6.0 Kb、約6.5 Kb、約7.0 Kb、約7.5 Kb、約8.0 Kb、約8.5 Kb、約9.0 Kb、約9.5 Kb、約10 Kb、約11 Kb、約12 Kb、約13 Kb、約14 Kb、約15 Kb、約16 Kb、約17 Kb、約18 Kb、約19 Kb、約20 Kb長、またはそれ以上である）。

【0029】

上記の局面のいずれかのいくつかの態様において、DNAベクターは、二本鎖である。付加的にまたは代替的に、二本鎖ベクターは、単量体かつ／またはスーパーコイル状であってもよい。

【0030】

いくつかの態様において、DNAベクターは、共有結合閉環型である。

【0031】

別の局面において、本発明は、複数の、前述の局面のいずれかのDNAベクターを含む組成物（例えば、薬学的組成物）を提供する。いくつかの態様において、組成物（例えば、薬学的組成物）の複数のDNAベクターの少なくとも50％は、1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む。

【0032】

別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコン（例えば、コンカテマー）を含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、治療用置換タンパク質をコードする異種遺伝子を含む単離された線状DNA分子を含む。DNA分子は

、(a)複製開始点(例えば、細菌の複製開始点)および/または薬物耐性遺伝子;ならびに(b)組換え部位を欠いている。例えば、いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、複製開始点、薬物耐性遺伝子、および組換え部位を欠いている。いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、制限酵素部位を含み、例えば、各制限酵素部位は、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる。治療用置換タンパク質は、例えば、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子であってもよい。

【0033】

別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNAベクターが、(a)複製開始点(例えば、細菌の複製開始点)および/または薬物耐性遺伝子;ならびに(b)組換え部位を欠いている、単離された線状DNA分子を提供する。例えば、いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、複製開始点、薬物耐性遺伝子、および組換え部位を欠いている。いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、制限酵素部位を含み、例えば、各制限酵素部位は、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる。

【0034】

いくつかの態様において、抗原結合タンパク質は、抗体またはその抗原結合断片である。抗原結合タンパク質は、サイトカイン、増殖因子、または細胞表面タンパク質(例えば、腫瘍関連抗原)に結合してもよい。いくつかの態様において、抗原結合タンパク質は、腫瘍壊死因子(TNF)、ラージT抗原(LT)、IFN- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、内皮単球活性化ポリペプチドII(EMAP-II)、GM-CSF、EGF、ヒト上皮増殖因子2(HER2)、HER3、FGF、PDGF、BDNF、CNTF、CSF、G-CSF、NGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、インスリン様増殖因子、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90、プログラム死-1(PD-1)、プログラム死-リガンド1(PD-L1)、アミロイド β 、アルカリホスファターゼ、アミロイドタンパク質A、CCケモカイン受容体4(CCR4)、葉酸受容体、ムチン5AC、プロタンパク質転換酵素サプチリシン/ケキシシン9型(PCSK-9)、ホスファチジルセリン、またはスクレロスチンに結合する。抗原結合タンパク質は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、および/または抗原結合断片(例えば、Fab、scFv、scFabなど)であってもよい。

【0035】

別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、(a)複製開始点(例えば、細菌の複製開始点)および/または薬物耐性遺伝子;ならびに(b)組換え部位を欠いている、単離された線状DNA分子を提供する。例えば、いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、複製開始点、薬物耐性遺伝子、および組換え部位を欠いている。いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、制限酵素部位を含み、例えば、各制限酵素部位は、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる。

【0036】

増殖因子は、BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、またはインスリン様増殖因子であってもよい。インターロイキンは、IL-1(例えば、IL-1 β)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-

16、IL-17、IL-18、またはIL-21であってもよい。インターフェロンは、IFN- α またはIFN- γ であってもよい。凝固因子は、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォン・ウィルブランド因子であってもよい。神経保護因子は、ニューロトロフィン、Kifap3、Bcl-xl、Crmp1、Chk.beta.、CALM2、Caly、NPG11、NPT1、Eef1a1、Dhps、Cd151、Morf412、CTGF、LDH-A、At11、NPT2、Ehd3、Cox5b、Tuba1a、 γ -アクチン、Rpsa、NPG3、NPG4、NPG5、NPG6、NPG7、NPG8、NPG9、およびNPG10からなる群より選択されてもよい。ニューロトロフィンは、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、およびCNTFからなる群より選択されてもよい。

【0037】

別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、(a)複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）および／または薬物耐性遺伝子；ならびに(b)組換え部位を欠いている、単離された線状DNA分子を提供する。例えば、いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、複製開始点、薬物耐性遺伝子、および組換え部位を欠いている。いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、制限酵素部位を含み、例えば、各制限酵素部位は、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる。

【0038】

障害は、網膜ジストロフィー（例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー）である眼障害であってもよい。網膜ジストロフィーは、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択されてもよい。

【0039】

いくつかの態様において、障害は、血友病（例えば、血友病Aもしくは血友病B）、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症などの凝固障害である。凝固障害は、フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられてもよい。いくつかの態様において、凝固障害は、FGA、FGB、FGG、F2、F5、F7、F10、F11、F13A、F13B、LMAN1、MCFD2、GGCX、またはVKORC1における変異によって特徴づけられる。

【0040】

障害は、神経学的障害、例えば、神経変性疾患であってもよい。神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、または多発性硬化症からなる群より選択されてもよい。神経変性疾患は、多発性硬化症、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群などの、中枢神経系（CNS）の自己免疫疾患であってもよい。神経学的障害は、脳梗塞、脊髄損傷、中枢神経系障害、神経精神障害、またはチャネル病（例えば、てんかんもしくは片頭痛）であってもよい。神経学的障害は、不安障害、気分障害、小児障害、認知障害、統合失調症、物質関連障害、または摂食障害であってもよい。いくつかの態様において、神経学的障害は、脳梗塞、脳卒中、外傷性脳損傷、または脊髄損傷の症状である。

【0041】

いくつかの態様において、障害は、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ニーマン・ピック病、またはムコ多糖症（MPS）などのリソソーム貯蔵障害である。

10

20

30

40

50

【0042】

いくつかの態様において、障害は、変性心疾患、冠動脈疾患、虚血、狭心症、急性冠症候群、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、またはアテローム性動脈硬化症などの心血管障害である。心血管障害は、虚血性心筋症、伝導疾患、および先天性欠損からなる群より選択される変性心疾患であってもよい。

【0043】

障害は、免疫障害、例えば、自己免疫障害であってもよい。自己免疫障害は、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、ループス、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫内耳疾患、または眼球クロオス・ミオクロオス症候群、自己免疫性肝炎、ブドウ膜炎、自己免疫性網膜症、視神経脊髄炎、乾癬性関節炎、乾癬、重症筋無力症、慢性ライム病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、末梢性ニューロパチー、線維筋痛症、橋本甲状腺炎、潰瘍性大腸炎、または川崎病であってもよい。

10

【0044】

障害は、肝疾患、例えば、肝炎、アラジール症候群、胆道閉鎖症、肝がん、肝硬変、嚢胞性疾患、カロリ症候群、先天性肝線維症、脂肪肝、ガラクトース血症、原発性硬化性胆管炎、チロシン血症、糖原病、ウィルソン病、および内分泌欠損症からなる群より選択される肝疾患であってもよい。肝疾患は、肝細胞性過形成、肝細胞性腺腫、限局性結節性過形成、または肝細胞癌からなる群より選択される肝がんであってもよい。

【0045】

いくつかの態様において、障害は、血液がん（例えば、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、多発性骨髄腫、および非ホジキンリンパ腫）、または固形組織がん（例えば、肝がん、腎がん、乳がん、前立腺がん、胃がん、食道がん、胃がん、腸がん、結腸直腸がん、膀胱がん、頭頸部がん、皮膚がん、もしくは脳がん）などのがんである。

20

【0046】

いくつかの態様において、障害は、劣性遺伝性障害である。いくつかの態様において、障害は、メンデル遺伝性障害である。

【0047】

別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを有する、単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、1つまたは複数の治療用核酸を含む単離された線状DNA分子を提供する。いくつかの態様において、DNA分子は、(a)複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；(b)組換え部位を欠いており；かつ(c)末端反復配列を含む。例えば、いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、複製開始点、薬物耐性遺伝子、および組換え部位を欠いている。いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、制限酵素部位を含み、例えば、各制限酵素部位は、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる。

30

【0048】

いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、末端反復配列（例えば、1つまたは複数の逆位末端反復（ITR）配列（例えば、2つのITR配列）もしくはその一部（例えば、2つのAエレメント、Bエレメント、Cエレメント、もしくはDエレメント）、または長い末端反復（LTR）配列（例えば、2つのLTR配列））を含む。いくつかの態様において、末端反復配列は、少なくとも10塩基対（bp）長（例えば、10 bp～500 bp、12 bp～400 bp、14 bp～300 bp、16 bp～250 bp、18 bp～200 bp、20 bp～180 bp、25 bp～170 bp、30 bp～160 bp、または50 bp～150 bp、例えば、10 bp～15 bp、15 bp～20 bp、20 bp～25 bp、25 bp～30 bp、30 bp～35 bp、35 bp～40 bp、40 bp～45 bp、45 bp～50 bp、50 bp～55 bp、55 bp～60 bp、60 bp～65 bp、65 bp～70 bp、70 bp～80 bp、80 bp～90 bp、90 bp～100 bp、100 bp～150 bp、150 bp～200 bp、200 bp～300 bp、300 bp～400 bp、または400 bp～500 bp、例えば、10 bp、11 bp、12 bp、13 bp、14 bp、15 bp、16 bp、17 bp、18 bp、19 bp、20 bp、21 bp、22 bp、23 bp、24 b

40

50

p、25 bp、26 bp、27 bp、28 bp、29 bp、30 bp、31 bp、32 bp、33 bp、34 bp、35 bp、36 bp、37 bp、38 bp、39 bp、40 bp、41 bp、42 bp、43 bp、44 bp、45 bp、46 bp、47 bp、48 bp、49 bp、50 bp、51 bp、52 bp、53 bp、54 bp、55 bp、56 bp、57 bp、58 bp、59 bp、60 bp、61 bp、62 bp、63 bp、64 bp、65 bp、66 bp、67 bp、68 bp、69 bp、70 bp、71 bp、72 bp、73 bp、74 bp、75 bp、76 bp、77 bp、78 bp、79 bp、80 bp、81 bp、82 bp、83 bp、84 bp、85 bp、86 bp、87 bp、88 bp、89 bp、90 bp、91 bp、92 bp、93 bp、94 bp、95 bp、96 bp、97 bp、98 bp、99 bp、100 bp、101 bp、102 bp、103 bp、104 bp、105 bp、106 bp、107 bp、108 bp、109 bp、110 bp、111 bp、112 bp、113 bp、114 bp、115 bp、116 bp、117 bp、118 bp、119 bp、120 bp、121 bp、122 bp、123 bp、124 bp、125 bp、126 bp、127 bp、128 bp、129 bp、130 bp、131 bp、132 bp、133 bp、134 bp、135 bp、136 bp、137 bp、138 bp、139 bp、140 bp、141 bp、142 bp、143 bp、144 bp、145 bp、146 bp、147 bp、148 bp、149 bp、150 bp、またはそれ以上)である。いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、DDエレメントを含む。いくつかの態様において、単離された線状DNA分子は、1つまたは複数の異種遺伝子の上流にプロモーター配列を含む。いくつかの態様において、単離されたDNA分子は、1つまたは複数の異種遺伝子の下流にポリアデニル化部位を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の異種遺伝子は、トランススプライシング分子またはその一部(例えば、結合ドメイン)を含む。

10

20

【0049】

別の局面において、本発明は、以下の段階による、態様のいずれかの単離されたDNAベクターを生成する方法を提供する：(i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いてAAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いてコンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；および(iv) 複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

【0050】

別の局面において、本発明は、以下の段階による、上記の態様のいずれか1つの単離されたDNAベクターを生成する方法を提供する：(i) 異種遺伝子および末端反復配列を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いてAAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；(v) 末端反復配列を含むプラスミドクローンを同定する段階；(vi) 末端反復配列を含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；(vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鑄型を生成する段階；(viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて環状DNA鑄型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；(ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに(x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子および末端反復配列を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

30

40

【0051】

別の局面において、本発明は、以下の段階による、上記の態様のいずれかの単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法を提供する：(i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いてAAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いてコンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；および(iv) AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成

50

する段階。いくつかの態様において、方法は、異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階をさらに含む。

【0052】

別の局面において、本発明は、以下の段階による、上記の態様のいずれかの単離されたDNAベクターを生成する方法を提供する：(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いてAAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いてコンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；ならびに(iv) 複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、異種遺伝子およびDDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

10

【0053】

別の局面において、本発明は、以下の段階による、上記の態様のいずれか1つの単離されたDNAベクターを生成する方法を提供する：(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いてAAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；(v) DDエレメントを含むプラスミドクローンを同定する段階；(vi) DDエレメントを含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；(vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鑄型を生成する段階；(viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて環状DNA鑄型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；(ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに(x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子およびDDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

20

【0054】

別の局面において、本発明は、以下の段階による、上記の態様の単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法を提供する：(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む、試料を提供する段階；(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いてAAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いてコンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに(iv) AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子およびDDエレメントを含む治療用DNAベクターを生成する段階。

30

【0055】

前述の、単離されたDNAベクターを生成する方法のいずれかのいくつかの態様において、AAVゲノムは、末端反復配列（例えば、1つまたは複数の逆位末端反復（ITR）配列（例えば、2つのITR配列）もしくはその一部（例えば、2つのAエレメント、Bエレメント、Cエレメント、もしくはDエレメント）、または長い末端反復（LTR）配列（例えば、2つのLTR配列））を含む。いくつかの態様において、末端反復配列は、少なくとも10塩基対（bp）長（例えば、10 bp～500 bp、12 bp～400 bp、14 bp～300 bp、16 bp～250 bp、18 bp～200 bp、20 bp～180 bp、25 bp～170 bp、30 bp～160 bp、または50 bp～150 bp、例えば、10 bp～15 bp、15 bp～20 bp、20 bp～25 bp、25 bp～30 bp、30 bp～35 bp、35 bp～40 bp、40 bp～45 bp、45 bp～50 bp、50 bp～55 bp、55 bp～60 bp、60 bp～65 bp、65 bp～70 bp、70 bp～80 bp、80 bp～90 bp、90 bp～100 bp、100 bp～150 bp、150 bp～200 bp、200 bp～300 bp、300 bp～400 bp、または400 bp～500 bp、例えば、10 bp、11 bp、12 bp、13 bp、14 bp、15 bp、16 bp、17 bp、18 bp、19 bp、20 bp、21 bp、22 bp、23 bp、24 bp、25 bp、26 bp、27 bp、28 bp、29 bp、30 bp、31 bp、32 bp、33 bp、34 bp、35 bp、36 bp、37 bp

40

50

、38 bp、39 bp、40 bp、41 bp、42 bp、43 bp、44 bp、45 bp、46 bp、47 bp、48 bp、49 bp、50 bp、51 bp、52 bp、53 bp、54 bp、55 bp、56 bp、57 bp、58 bp、59 bp、60 bp、61 bp、62 bp、63 bp、64 bp、65 bp、66 bp、67 bp、68 bp、69 bp、70 bp、71 bp、72 bp、73 bp、74 bp、75 bp、76 bp、77 bp、78 bp、79 bp、80 bp、81 bp、82 bp、83 bp、84 bp、85 bp、86 bp、87 bp、88 bp、89 bp、90 bp、91 bp、92 bp、93 bp、94 bp、95 bp、96 bp、97 bp、98 bp、99 bp、100 bp、101 bp、102 bp、103 bp、104 bp、105 bp、106 bp、107 bp、108 bp、109 bp、110 bp、111 bp、112 bp、113 bp、114 bp、115 bp、116 bp、117 bp、118 bp、119 bp、120 bp、121 bp、122 bp、123 bp、124 bp、125 bp、126 bp、127 bp、128 bp、129 bp、130 bp、131 bp、132 bp、133 bp、134 bp、135 bp、136 bp、137 bp、138 bp、139 bp、140 bp、141 bp、142 bp、143 bp、144 bp、145 bp、146 bp、147 bp、148 bp、149 bp、150 bp、またはそれ以上）である。いくつかの態様において、末端反復配列は、DDエレメントを含む。いくつかの態様において、方法は、異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階をさらに含む。

10

【0056】

上記の方法のいずれかのいくつかの態様において、ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅は、等温ローリングサークル増幅である。ポリメラーゼは、Phi29 DNAポリメラーゼであってもよい。

20

【0057】

別の局面において、本発明は、上記の態様のいずれかのDNAベクターと、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物を特徴とする。薬学的組成物は、非免疫原性であり得る。

【0058】

別の局面において、本発明は、それを必要とする対象に上記の態様のいずれかの単離されたDNAベクターまたは組成物（例えば、薬学的組成物）を投与する段階による、該対象において異種遺伝子のエピソーム発現（例えば、持続的なエピソーム発現）を誘導する方法を特徴とする。

【0059】

別の局面において、本発明は、上記の態様のいずれかの単離されたDNAベクターまたは組成物（例えば、薬学的組成物）の治療有効量を対象に投与する段階による、該対象における障害を処置する方法を特徴とする。

30

【0060】

単離されたDNAベクターまたはその組成物は、反復投与されてもよい。単離されたDNAベクターまたは組成物は、全身投与されてもよい。単離されたDNAベクターまたは組成物は、静脈内投与されてもよい。単離されたDNAベクターまたは薬学的組成物は、局所投与されてもよい。単離されたDNAベクターまたは薬学的組成物は、硝子体内投与されてもよい。いくつかの態様において、障害は、眼障害である。眼障害は、メンデル遺伝性網膜ジストロフィーであってもよい。眼障害は、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、またはワグナー症候群であってもよい。

40

【0061】

いくつかの態様において、単離されたDNAベクターまたはその組成物は、全身投与される。いくつかの態様において、障害は、凝固障害（例えば、血友病（例えば、血友病Aもしくは血友病B）、フォン・ウィルブラント病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症）である。

【0062】

50

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）および／または薬物耐性遺伝子（例えば、細菌プラスミドの一部として）を欠いている、単離された環状DNAベクターを提供する。例えば、1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターは、複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）を欠いてもよい。付加的にまたは代替的に、1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターは、薬物耐性遺伝子（例えば、細菌プラスミドの一部として）を欠いてもよい。いくつかの態様において、1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターは、複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）および薬物耐性遺伝子（例えば、細菌プラスミドの一部として）を欠いてもよい。いくつかの態様において、DNA分子は細菌プラスミドDNAを欠いている。いくつかの態様において、DNAベクターは、免疫原性細菌シグネチャー（例えば、1つまたは複数の細菌関連CpGモチーフ、例えば、非メチル化CpGモチーフ、例えば、CpGアイランド）を欠いている。いくつかの態様において、DNAベクターは、RNAポリメラーゼ停止部位（例えば、RNAポリメラーゼII（RNAPII）停止部位）を欠いている。

10

【0063】

いくつかの態様において、単離された環状DNAベクターは、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー（例えば、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群）を処置するように構成された治療用タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む。例えば、1つまたは複数の異種遺伝子は、ABCA4、CEP290、ABCC6、RIMS1、LRP5、CC2D2A、TRPM1、IFT-172、COL11A1、TUBGCP6、KIAA1549、CACNA1F、MYO7A、VCAN、USH2A、およびHMCN1であってよい。

20

【0064】

別の局面において、本発明は、ABCA4、CEP290、ABCC6、RIMS1、LRP5、CC2D2A、TRPM1、IFT-172、COL11A1、TUBGCP6、KIAA1549、CACNA1F、MYO7A、VCAN、USH2A、およびHMCN1からなる群より選択される1つまたは複数の異種遺伝子を有する単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いている、単離された環状DNAベクターを提供する。いくつかの態様において、1つまたは複数の異種遺伝子は、網膜ジストロフィー（例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー、例えば、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される網膜ジストロフィー）を処置するように構成された治療用タンパク質をコードする。

30

【0065】

別の局面では、治療用タンパク質（例えば、抗体もしくはその一部、増殖因子、インターロイキン、インターフェロン、抗アポトーシス因子、サイトカイン、または抗糖尿病因子）をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を有する単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いている、単離された環状DNAベクターが、本明細書において提供される。

40

【0066】

別の局面において、本発明は、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む1つまたは複数の異種遺伝子を有する単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いている、単離された環状DNAベクターを提供する。

【0067】

別の局面において、本発明は、肝臓から分泌される治療用タンパク質をコードする1つ

50

または複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いている、単離された環状DNAベクターを提供する。いくつかの態様において、治療用タンパク質は血液中に分泌される。

【0068】

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、DNAベクターが、(a) 末端反復配列を含み；かつ (b) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いている、単離された環状DNAベクターを提供する。

【0069】

さらに別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを有する単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、治療用タンパク質（例えば、網膜ジストロフィー、例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィーを処置するように構成された治療用タンパク質）をコードする異種遺伝子を含み、該DNA分子が、(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに (b) 組換え部位を欠いている、DNA分子を提供する。いくつかの態様において、網膜ジストロフィーは、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、網膜色素変性症、加齢黄斑変性 (AMD)、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数の異種遺伝子は、ABCA4、CEP290、ABCC6、RIMS1、LRP5、CC2D2A、TRPM1、IFT-172、C3、COL11A1、TUBGCP6、KIAA1549、CACNA1F、MYO7A、VCAN、USH2A、およびHMCN1からなる群より選択される。

【0070】

別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを有する単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、ABCA4、CEP290、ABCC6、RIMS1、LRP5、CC2D2A、TRPM1、IFT-172、C3、COL11A1、TUBGCP6、KIAA1549、CACNA1F、MYO7A、VCAN、USH2A、およびHMCN1からなる群より選択される異種遺伝子を含み、該DNA分子が、(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに (b) 組換え部位を欠いている、DNA分子を提供する。いくつかの態様において、異種遺伝子は、網膜ジストロフィー（例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー、例えば、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、網膜色素変性症、AMD、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、またはワグナー症候群）を処置するように構成された治療用タンパク質をコードする。

【0071】

別の局面では、複数の同一アンプリコンを有する単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、抗体またはその一部、凝固因子、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、抗アポトーシス因子、抗腫瘍因子、サイトカイン、および抗糖尿病因子をコードする異種遺伝子を含み、該DNA分子が、(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに (b) 組換え部位を欠いている、DNA分子が、本明細書において提供される。

【0072】

さらに別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを有する単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む異種遺伝子を含み、該DNA分子が、(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに (b) 組換え部位を欠いている、該DNA分子を特徴とする。

【0073】

別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを有する単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、肝臓から分泌される治療用タンパク質（例えば、血液中に分泌される治療用タンパク質）をコードする異種遺伝子を含み、該

DNA分子が、複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いている、該DNA分子を提供する。

【0074】

前述の局面のいずれかのいくつかの態様において、環状DNAベクターまたは線状DNA分子は、1つまたは複数の末端反復配列（例えば、1つまたは複数の逆位末端反復（ITR）配列（例えば、2つのITR配列）もしくはその一部（例えば、2つのAエレメント、Bエレメント、Cエレメント、もしくはDエレメント）、または長い末端反復（LTR）配列（例えば、2つのLTR配列））をさらに含む。いくつかの態様において、末端反復配列は、少なくとも10塩基対（bp）長（例えば、10 bp～500 bp、12 bp～400 bp、14 bp～300 bp、16 bp～250 bp、18 bp～200 bp、20 bp～180 bp、25 bp～170 bp、30 bp～160 bp、または50 bp～150 bp、例えば、10 bp～15 bp、15 bp～20 bp、20 bp～25 bp、25 bp～30 bp、30 bp～35 bp、35 bp～40 bp、40 bp～45 bp、45 bp～50 bp、50 bp～55 bp、55 bp～60 bp、60 bp～65 bp、65 bp～70 bp、70 bp～80 bp、80 bp～90 bp、90 bp～100 bp、100 bp～150 bp、150 bp～200 bp、200 bp～300 bp、300 bp～400 bp、または400 bp～500 bp、例えば、10 bp、11 bp、12 bp、13 bp、14 bp、15 bp、16 bp、17 bp、18 bp、19 bp、20 bp、21 bp、22 bp、23 bp、24 bp、25 bp、26 bp、27 bp、28 bp、29 bp、30 bp、31 bp、32 bp、33 bp、34 bp、35 bp、36 bp、37 bp、38 bp、39 bp、40 bp、41 bp、42 bp、43 bp、44 bp、45 bp、46 bp、47 bp、48 bp、49 bp、50 bp、51 bp、52 bp、53 bp、54 bp、55 bp、56 bp、57 bp、58 bp、59 bp、60 bp、61 bp、62 bp、63 bp、64 bp、65 bp、66 bp、67 bp、68 bp、69 bp、70 bp、71 bp、72 bp、73 bp、74 bp、75 bp、76 bp、77 bp、78 bp、79 bp、80 bp、81 bp、82 bp、83 bp、84 bp、85 bp、86 bp、87 bp、88 bp、89 bp、90 bp、91 bp、92 bp、93 bp、94 bp、95 bp、96 bp、97 bp、98 bp、99 bp、100 bp、101 bp、102 bp、103 bp、104 bp、105 bp、106 bp、107 bp、108 bp、109 bp、110 bp、111 bp、112 bp、113 bp、114 bp、115 bp、116 bp、117 bp、118 bp、119 bp、120 bp、121 bp、122 bp、123 bp、124 bp、125 bp、126 bp、127 bp、128 bp、129 bp、130 bp、131 bp、132 bp、133 bp、134 bp、135 bp、136 bp、137 bp、138 bp、139 bp、140 bp、141 bp、142 bp、143 bp、144 bp、145 bp、146 bp、147 bp、148 bp、149 bp、150 bp、またはそれ以上）である。いくつかの態様において、DNAベクターはDDエレメントを含む。

10

20

30

【0075】

別の局面において、本発明は、複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が異種遺伝子を含み、該DNA分子が、(a) 末端反復配列（例えば、前述の末端反復配列のいずれか）を含み；かつ (b) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いている、該DNA分子を特徴とする。

【0076】

いくつかの態様において、環状DNAベクターは異種遺伝子（例えば、1つまたは複数の異種遺伝子）をさらに含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の異種遺伝子は、4.5 Kb長を上回る（例えば、1つまたは複数の異種遺伝子は、一緒にまたはそれぞれ単独で、4.5 Kb～25 Kb、4.6 Kb～24 Kb、4.7 Kb～23 Kb、4.8 Kb～22 Kb、4.9 Kb～21 Kb、5.0 Kb～20 Kb、5.5 Kb～18 Kb、6.0 Kb～17 Kb、6.5 Kb～16 Kb、7.0 Kb～15 Kb、7.5 Kb～14 Kb、8.0 Kb～13 Kb、8.5 Kb～12.5 Kb、9.0 Kb～12.0 Kb、9.5 Kb～11.5 Kb、または10.0 Kb～11.0 Kb長、例えば、4.5 Kb～8 Kb、8 Kb～10 Kb、10 Kb～15 Kb、15 Kb～20 Kb長、またはそれ以上、例えば、4.5 Kb～5.0 Kb、5.0 Kb～5.5 Kb、5.5 Kb～6.0 Kb、6.0 Kb～6.5 Kb、6.5 Kb～7.0 Kb、7.0 Kb～7.5 Kb、7.5 Kb～8.0 Kb、8.0 Kb～8.5 Kb、8.5 Kb～9.0 Kb、9.0 Kb～9.5 Kb、9.5 Kb～10 Kb、10 Kb～10.5 Kb、10.5 Kb～11 Kb、11 Kb～11.5 Kb、11.5 Kb～12 Kb、12 Kb～12.5 Kb、12.5 Kb～13 Kb、13

40

50

Kb～13.5 Kb、13.5 Kb～14 Kb、14 Kb～14.5 Kb、14.5 Kb～15 Kb、15 Kb～15.5 Kb、15.5 Kb～16 Kb、16 Kb～16.5 Kb、16.5 Kb～17 Kb、17 Kb～17.5 Kb、17.5 Kb～18 Kb、18 Kb～18.5 Kb、18.5 Kb～19 Kb、19 Kb～19.5 Kb、19.5 Kb～20 Kb、20 Kb～21 Kb、21 Kb～22 Kb、22 Kb～23 Kb、23 Kb～24 Kb、24 Kb～25 Kb長、またはそれ以上、例えば、約4.5 Kb、約5.0 Kb、約5.5 Kb、約6.0 Kb、約6.5 Kb、約7.0 Kb、約7.5 Kb、約8.0 Kb、約8.5 Kb、約9.0 Kb、約9.5 Kb、約10 Kb、約11 Kb、約12 Kb、約13 Kb、約14 Kb、約15 Kb、約16 Kb、約17 Kb、約18 Kb、約19 Kb、約20 Kb長、またはそれ以上である）。

【0077】

2つまたはそれ以上の異種遺伝子を有する環状DNAベクターの態様において、異種遺伝子は、同じ遺伝子であってもよいし、または異なる遺伝子であってもよい（例えば、それらは、機能的に（例えば、シグナル伝達経路の一部として）または構造的に（例えば、二量体化を介して、例えば、抗体もしくはその断片の重鎖および軽鎖）相互作用するペプチドをコードしてもよい）。

【0078】

いくつかの態様において、環状DNAベクターの異種遺伝子は、1つまたは複数のトランスプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む。

【0079】

いくつかの態様において、環状DNAベクターは、単量体環状ベクター、二量体環状ベクター、三量体環状ベクター、等である。いくつかの態様において、DNAベクターは単量体環状ベクターである。いくつかの態様において、環状DNAベクター（例えば、単量体環状ベクター）は二本鎖である。いくつかの態様において、環状DNAベクターはスーパーコイル状（例えば、単量体スーパーコイル状）である。

【0080】

いくつかの態様において、環状DNAベクターは、1つまたは複数の異種遺伝子上流にプロモーター配列を含む。付加的にまたは代替的に、環状DNAベクターは、1つまたは複数の異種遺伝子下流にポリアデニル化部位を含み得る。したがって、いくつかの態様において、環状DNAベクターは、5'側から3'側へまたは3'側から5'側へ機能的に連結された以下のエレメント：(i) プロモーター配列；(ii) 1つまたは複数の異種遺伝子；(iii) ポリアデニル化部位；および (iv) 末端反復配列（例えば、1つまたは複数の末端反復配列（例えば、1つまたは複数の逆位末端反復（ITR）配列（例えば、2つのITR配列）または長い末端反復（LTR）配列（例えば、2つのLTR配列））を含む。

【0081】

別の局面において、本発明は、単離された環状DNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクターのいずれか）を生成する方法を特徴とする。本方法は、(i) 異種遺伝子および末端反復配列（例えば、1つまたは複数の末端反復配列（例えば、1つまたは複数の逆位末端反復（ITR）配列（例えば、2つのITR配列）または長い末端反復（LTR）配列（例えば、2つのLTR配列））を含むAAVゲノム（例えば、組換えAAV（rAAV）ゲノム、例えば、AAVエピソーム）を含む環状DNA分子を含む試料を提供する段階、(ii) ポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ）媒介性ローリングサークル増幅（例えば、等温ポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ）媒介性ローリングサークル増幅）を用いてAAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いてコンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに (iv) AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子および末端反復配列を含む単離されたDNAベクターを生成する段階を含む。いくつかの態様において、本方法は、単離されたDNAベクターをカラム精製して、単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階をさらに含む。スーパーコイルDNAは、単量体スーパーコイルDNAであってもよい。いくつかの態様において、弛緩型開環状DNAは、カラム精製においてスーパーコイルDNAから分離され、廃棄され得る。いくつかの態様において、異種遺伝子は、任意のこれまでの局面において記載された異種遺伝子のいずれか、例えば、網膜ジストロフ

10

20

30

40

50

ィー（例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、網膜色素変性症、加齢黄斑変性（AMD）、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される網膜ジストロフィー）を処置するように構成された治療用タンパク質をコードする異種遺伝子；以下のうちの1つもしくは複数を含む異種遺伝子：ABCA4、CEP290、ABCC6、RIMS1、LRP5、CC2D2A、TRPM1、IFT-172、C3、COL11A1、TUBGCP6、KIAA1549、CACNA1F、MYO7A、VCAN、USH2A、およびHMCN1；抗体もしくはその一部、凝固因子、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、抗アポトーシス因子、抗腫瘍因子、サイトカイン、および抗糖尿病因子をコードする異種遺伝子；ならびに／またはトランススプライシング分子もしくはその一部（例えば、結合ドメイン）である異種遺伝子である。

10

【0082】

ポリメラーゼは、好熱性ポリメラーゼ、またはGCリッチな残基（例えば、参照ポリメラーゼと比較して）による高い処理能力を有するポリメラーゼであってよい。いくつかの態様において、ポリメラーゼはファージポリメラーゼである。いくつかの態様において、ファージポリメラーゼはPhi29 DNAポリメラーゼである。

【0083】

別の局面において、本発明は、以下の段階を含む、単離された環状DNAベクターを生成する方法を提供する：(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノム（例えば、AAVエピソーム）を含む環状DNA分子を含む試料を提供する段階；(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅（例えば、等温ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅）を用いてAAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；(v) 末端反復配列（例えば、1つまたは複数の末端反復配列（例えば、1つまたは複数の逆位末端反復（ITR）配列（例えば、2つのITR配列）または長い末端反復（LTR）配列（例えば、2つのLTR配列））を含むプラスミドクローンを同定する段階；(vi) 末端反復配列を含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；(vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鑄型を生成する段階；(viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅（例えば、等温ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅）を用いて環状DNA鑄型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；(ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに (x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子および末端反復配列を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。いくつかの態様において、環状DNAベクターを生成する方法において使用されるポリメラーゼは、ファージポリメラーゼ（例えば、Phi29 DNAポリメラーゼ）である。

20

30

【0084】

別の局面において、本発明は、以下の段階を含む、治療用環状DNAベクターを生成する無細胞方法の特徴とする：(i) 異種遺伝子および末端反復配列（例えば、1つまたは複数の末端反復配列（例えば、1つまたは複数の逆位末端反復（ITR）配列（例えば、2つのITR配列）または長い末端反復（LTR）配列（例えば、2つのLTR配列））を含むAAVゲノム（例えば、組換えAAV（rAAV）ゲノム、例えば、AAVエピソーム）を含む環状DNA分子を含む試料を提供する段階；(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅（例えば、等温ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅）を用いてAAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いてコンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに (iv) AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子および末端反復配列を含む単離された環状DNAベクターを生成する段階。いくつかの態様において、ポリメラーゼは、ファージポリメラーゼ（例えば、Phi29 DNAポリメラーゼ）である。いくつかの態様において、本方法は、単離されたDNAベク

40

50

ターをカラム精製して、単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階をさらに含む。スーパーコイルDNAは、単量体スーパーコイルDNAであってよい。いくつかの態様において、弛緩型開環状DNAは、カラム精製においてスーパーコイルDNAから分離され、廃棄され得る。

【0085】

別の局面では、前述の環状DNAベクターのうちの任意の1つまたは複数、および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は非免疫原性である（例えば、例えばCpGモチーフといった細菌シグネチャーなどの細菌成分を実質的に欠いている）。いくつかの態様において、薬学的組成物はウイルス粒子を実質的に欠いている。

10

【0086】

別の局面において、本発明は、それを必要とする対象に前述の環状DNAベクターのいずれかおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物（例えば、非免疫原性薬学的組成物）を投与する段階を含む、該対象において異種遺伝子の発現（例えば、エピソーム発現）を誘導する方法を特徴とする。

【0087】

さらに別の局面において、本発明は、本明細書に記載される環状DNAベクターおよび組成物（例えば、前述の局面の環状DNAベクターまたはその組成物のいずれか）を用いる処置の方法を特徴とする。本発明は、対象に前述の局面のいずれかの薬学的組成物の治療有効量を投与する段階を含む、該対象における障害（例えば、眼障害、例えば、網膜ジストロフィー、例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー）を処置する方法を含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、反復して（例えば、1日に約2回、1日に約1回、1週間に約5回、1週間に約4回、1週間に約3回、1週間に約2回、1週間に約1回、1ヶ月に約2回、1ヶ月に約1回、6週間に約1回、2ヶ月に約1回、3ヶ月に約1回、4ヶ月に約1回、1年に約2回、1年に約1回、またはそれ未満の頻度で）投与される。

20

【0088】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、局所的に（例えば、眼内に（例えば、硝子体内に）、肝内、脳内、筋肉内、エアロゾル化により、皮内、経皮、または皮下）投与される。いくつかの態様において、対象は、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、またはワグナー症候群の処置を受けている。

30

【0089】

別の局面において、本発明は、細菌プラスミドDNAを欠いたDNA分子中に二重D（DD）エレメントを含むことによってrAAVベクターのインビボ持続性を再現する、非ウイルス性の単離されたDNAベクターを特徴とする。したがって、本明細書において提供されるDNAベクターは、非免疫原性であり、約4.5 KbのAAVパッケージング容量に制限されない。本発明はまた、DD含有DNAベクターを生成する方法、DD含有DNAベクターを含む薬学的組成物、ならびに、例えば、異種遺伝子のエピソーム発現を誘導するため、および欠陥遺伝子に関連する疾患を処置するために、本明細書に記載されるベクターを使用する方法を特徴とする。

40

【0090】

1つの局面において、本発明は、DDエレメントを含む単離されたDNAベクターであって、複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）および／または薬物耐性遺伝子（例えば、細菌プラスミドの一部として）を欠いているDNAベクターを提供する。例えば、DDエレメントを含む単離されたDNAベクターは、複製開始点（例えば、細菌の複製開始点）を欠いてもよい。付加的にまたは代替的に、DDエレメントを含む単離されたDNAベクターは、薬物耐性遺伝子（例えば、細菌プラスミドの一部として）を欠いてもよい。いくつかの態様において、DDエレメントを含む単離されたDNAベクターは、複製開始点（例えば

50

、細菌の複製開始点) および薬物耐性遺伝子 (例えば、細菌プラスミドの一部として) を欠いてもよい。いくつかの態様において、DNA分子は細菌プラスミドDNAを欠いている。いくつかの態様において、DNAベクターは、免疫原性細菌シグネチャー (例えば、1つまたは複数の細菌関連CpGモチーフ、例えば、非メチル化CpGモチーフ) を欠いている。いくつかの態様において、DNAベクターは、RNAポリメラーゼ停止部位 (例えば、RNAポリメラーゼII (RNAPII) 停止部位) を欠いている。

【0091】

別の局面において、本発明は、DDエレメントならびに細菌の複製開始点および／または薬物耐性遺伝子 (例えば、細菌プラスミドの一部として) を含む単離されたDNAベクターを特徴とする。

【0092】

これまでの局面のいずれかのいくつかの態様において、DNAベクターは異種遺伝子 (例えば、1つまたは複数の異種遺伝子) をさらに含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の異種遺伝子は、4.5 Kb長を上回る (例えば、1つまたは複数の異種遺伝子は、一緒にまたはそれぞれ単独で、4.5 Kb~25 Kb、4.6 Kb~24 Kb、4.7 Kb~23 Kb、4.8 Kb~22 Kb、4.9 Kb~21 Kb、5.0 Kb~20 Kb、5.5 Kb~18 Kb、6.0 Kb~17 Kb、6.5 Kb~16 Kb、7.0 Kb~15 Kb、7.5 Kb~14 Kb、8.0 Kb~13 Kb、8.5 Kb~12.5 Kb、9.0 Kb~12.0 Kb、9.5 Kb~11.5 Kb、または10.0 Kb~11.0 Kb長、例えば、4.5 Kb~8 Kb、8 Kb~10 Kb、10 Kb~15 Kb、15 Kb~20 Kb長、またはそれ以上、例えば、4.5 Kb~5.0 Kb、5.0 Kb~5.5 Kb、5.5 Kb~6.0 Kb、6.0 Kb~6.5 Kb、6.5 Kb~7.0 Kb、7.0 Kb~7.5 Kb、7.5 Kb~8.0 Kb、8.0 Kb~8.5 Kb、8.5 Kb~9.0 Kb、9.0 Kb~9.5 Kb、9.5 Kb~10 Kb、10 Kb~10.5 Kb、10.5 Kb~11 Kb、11 Kb~11.5 Kb、11.5 Kb~12 Kb、12 Kb~12.5 Kb、12.5 Kb~13 Kb、13 Kb~13.5 Kb、13.5 Kb~14 Kb、14 Kb~14.5 Kb、14.5 Kb~15 Kb、15 Kb~15.5 Kb、15.5 Kb~16 Kb、16 Kb~16.5 Kb、16.5 Kb~17 Kb、17 Kb~17.5 Kb、17.5 Kb~18 Kb、18 Kb~18.5 Kb、18.5 Kb~19 Kb、19 Kb~19.5 Kb、19.5 Kb~20 Kb、20 Kb~21 Kb、21 Kb~22 Kb、22 Kb~23 Kb、23 Kb~24 Kb、24 Kb~25 Kb長、またはそれ以上、例えば、約4.5 Kb、約5.0 Kb、約5.5 Kb、約6.0 Kb、約6.5 Kb、約7.0 Kb、約7.5 Kb、約8.0 Kb、約8.5 Kb、約9.0 Kb、約9.5 Kb、約10 Kb、約11 Kb、約12 Kb、約13 Kb、約14 Kb、約15 Kb、約16 Kb、約17 Kb、約18 Kb、約19 Kb、約20 Kb長、またはそれ以上である)。

【0093】

2つまたはそれ以上の異種遺伝子を有する態様において、異種遺伝子は、同じ遺伝子であってもよいし、または異なる遺伝子であってもよい (例えば、それらは、機能的に (例えば、シグナル伝達経路の一部として) または構造的に (例えば、二量体化を介して、例えば、抗体もしくはその断片の重鎖および軽鎖) 相互作用するペプチドをコードしてもよい)。

【0094】

いくつかの態様において、異種遺伝子は、1つまたは複数のトランススプライシング分子またはその一部 (例えば、結合ドメイン) を含む。

【0095】

いくつかの態様において、DNAベクターは、環状ベクター (例えば、単量体環状ベクター、二量体環状ベクター、三量体環状ベクター、等) である。いくつかの態様において、DNAベクターは単量体環状ベクターである。

【0096】

いくつかの態様において、DNAベクターは、1つまたは複数の異種遺伝子上流にプロモーター配列を含む。付加的にまたは代替的に、DNAベクターは、1つまたは複数の異種遺伝子下流にポリアデニル化部位を含み得る。したがって、いくつかの態様において、DNAベクターは、5'側から3'側へまたは3'側から5'側へ機能的に連結された以下のエレ

10

20

30

40

50

メント：(i) プロモーター配列；(ii) 1つまたは複数の異種遺伝子；(iii) ポリアデニル化部位；および (iv) DDエレメントを含む。

【0097】

別の局面において、本発明は、以下の段階を含む、単離されたDNAベクター（例えば、本明細書に記載されるDNAベクターのいずれか）を生成する方法を特徴とする：(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノム（例えば、組換えAAV (rAAV) ゲノム、例えば、AAVエピソーム）を含む環状DNA分子を含む試料を提供する段階；(ii) ポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ）媒介性ローリングサークル増幅（例えば、等温ポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ）媒介性ローリングサークル増幅）を用いてAAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いてコンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに (iv) AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子およびDDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。ポリメラーゼは、好熱性ポリメラーゼ、またはGCリッチな残基（例えば、参照ポリメラーゼと比較して）による高い処理能力を有するポリメラーゼであってよい。いくつかの態様において、ポリメラーゼはファージポリメラーゼである。いくつかの態様において、ファージポリメラーゼはPhi29 DNAポリメラーゼである。

10

【0098】

別の局面において、本発明は、以下の段階を含む、単離されたDNAベクターを生成する方法を提供する：(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノム（例えば、AAVエピソーム）を含む環状DNA分子を含む試料を提供する段階；(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅（例えば、等温ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅）を用いてAAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；(v) DDエレメントを含むプラスミドクローンを同定する段階；(vi) DDエレメントを含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；(vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鑄型を生成する段階；(viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅（例えば、等温ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅）を用いて環状DNA鑄型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；(ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに (x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子およびDDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。いくつかの態様において、ポリメラーゼはファージポリメラーゼ（例えば、Phi29 DNAポリメラーゼ）である。

20

30

【0099】

別の局面において、本発明は、以下の段階を含む、治療用DNAベクターを生成する無細胞方法を特徴とする：(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノム（例えば、組換えAAV (rAAV) ゲノム、例えば、AAVエピソーム）を含む環状DNA分子を含む試料を提供する段階；(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅（例えば、等温ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅）を用いてAAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；(iii) 制限酵素を用いてコンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに (iv) AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、異種遺伝子およびDDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。いくつかの態様において、ポリメラーゼはファージポリメラーゼ（例えば、Phi29 DNAポリメラーゼ）である。

40

【0100】

別の局面では、前述の局面のいずれかのDNAベクターおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は非免疫原性である（例えば、例えばCpGモチーフといった細菌シグネチャーなどの免疫原性成分を実質的に欠いている）。いくつかの態様において、薬学的組成物はウイルス粒子を実質的に欠いている。

50

【0101】

別の局面において、本発明は、それを必要とする対象に前述の局面のいずれかのDNAベクターおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物（例えば、非免疫原性薬学的組成物）を投与する段階を含む、該対象において異種遺伝子の発現（例えば、エピソーム発現）を誘導する方法を特徴とする。いくつかの態様において、発現は対象の肝臓内で誘導される。肝臓は、異種遺伝子によってコードされる治療用タンパク質を（例えば、血液中に）分泌し得る。

【0102】

さらに別の局面において、本発明は、本明細書に記載されるDNAベクターおよび組成物（例えば、前述の局面のベクターまたは組成物のいずれか）を用いる処置の方法を特徴とする。本発明は、対象に前述の局面のいずれかの薬学的組成物の治療有効量を投与する段階を含む、該対象における障害（例えば、眼障害、例えば、網膜ジストロフィー、例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー）を処置する方法を含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、反復して（例えば、1日に約2回、1日に約1回、1週間に約5回、1週間に約4回、1週間に約3回、1週間に約2回、1週間に約1回、1ヶ月に約2回、1ヶ月に約1回、6週間に約1回、2ヶ月に約1回、3ヶ月に約1回、4ヶ月に約1回、1年に約2回、1年に約1回、またはそれ未満の頻度で）投与される。

【0103】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、局所的に（例えば、眼内に（例えば、硝子体内に）、肝内、脳内、筋肉内、エアロゾル化により、皮内、経皮、または皮下）投与される。他の態様において、薬学的組成物は、全身に（例えば、静脈内に）投与される。いくつかの態様において、対象は、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、またはワグナー症候群の処置を受けている

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1】図1は、AAV2の末端反復配列（この場合、二重D（DD）エレメント）の形成を示す模式図である。AAV2逆位末端反復配列（ITR）は145-bp長であり、AAVゲノムの各末端に位置している。ITRは、塩基対合しヘアピン様構造を形成し得る逆位配列（A、B、C、およびDと称される）を含む。単一のITRは、2つの「A」、「B」、および「C」領域、ならびに単一の「D」領域を含む。2つのITRは、組換えによってDDエレメントを形成することができ、DDエレメントは165 bp長であり、単一のITRと類似しているが、今度は2つの「D」領域を含む。

【図2A】図2A～2Iは、様々なAAV血清型の例示的なITR配列を示す一連の図解であり、ITR内のA、B、C、およびDエレメントの位置および配列を示している。図2Aは、AAV1 ITRの図解である。図2Bは、AAV2 ITRの図解である。図2Cは、AAV3 ITRの図解である。図2Dは、AAV4 ITRの図解である。図2Eは、AAV5 ITRの図解である。図2Fは、AAV6 ITRの図解である。図2Gは、AAV7 ITRの図解である。図2Hは、部分的AAV8 ITRの図解である。図2Iは、部分的AAV9 ITRの図解である。

【図2B】図2Aの説明を参照されたい。

【図2C】図2Aの説明を参照されたい。

【図2D】図2Aの説明を参照されたい。

【図2E】図2Aの説明を参照されたい。

【図2F】図2Aの説明を参照されたい。

【図2G】図2Aの説明を参照されたい。

【図2H】図2Aの説明を参照されたい。

【図2I】図2Aの説明を参照されたい。

【図3A】実施例に記載されるDDベクターの生成および特徴づけ過程の例示的な段階を

示すフローチャートである。第1段階は、下流の機能に必要な発現カセット（例えば、異種遺伝子）を含むウイルスrAAVベクターを作製するまたは得ることである。ウイルスをインビトロで細胞に感染させ、DDエレメントを有する環状二本鎖エピソームを形成させる。第2の主要な段階では、環状rAAVゲノムを細胞からクローニングし、配列決定してDDエレメントの存在を確認する。次いでこれを用いて、プラスミドベースの鋳型を作製し、ローリングサークル増幅を用いてインビトロでDDベクターを生成することができる（段階3および4）。最終段階は、インビボ研究に進む前に、インビトロでDDベクターの遺伝子発現を確認することである。

【図3B】実施例に記載される合成環状ベクターの生成および特徴づけ過程の例示的な段階を示すフローチャートである。第1段階は、下流の機能に必要な発現カセット（例えば、異種遺伝子）を含むウイルスrAAVベクターを作製するまたは得ることである。ウイルスをインビトロで細胞に感染させ、末端反復配列（この場合、DDエレメント）を有する環状二本鎖エピソームを形成させる。第2の主要な段階では、環状rAAVゲノムを細胞からクローニングし、配列決定してDDエレメントの存在を確認する。次いでこれを用いて、プラスミドベースの鋳型を作製し、ローリングサークル増幅を用いてインビトロでDDベクターを生成することができる（段階3および4）。最終段階は、インビボ研究に進む前に、インビトロでDDベクターの遺伝子発現を確認することである。

【図4】図4は、インビトロで環状rAAVゲノムを作製するための過程を示す模式図である。関心対象のrAAVゲノムを有するプラスミドを、付加的なAAV産生プラスミドと共にトランスフェクションして（三重トランスフェクション）、パッケージングされたゲノムを含むrAAVウイルスベクター（血清型2）を生成する。結果として生じたウイルスをHE K293T細胞に感染させると、その中で環状rAAVゲノムが生成される。

【図5】図5は、rAAV環状ゲノムの検出のためのローリングサークル増幅反応を示す模式図である。全細胞DNAを、AAVゲノム内で切断しない制限酵素（この場合、A_{VR}II）で消化した。DNAを次いで、線状断片を分解するが、環状二本鎖DNAをそのままにしておくPlasmid-Safe DNaseで処理した。消化反応物は、ランダムプライマーおよびPhi 29 DNAポリメラーゼを用いる線状ローリングサークル増幅の鋳型として機能した。環状AAVエピソームの増幅後に、大きな線状コンカテマーアレイが生成された。線状アレイをその後、AAVゲノムを単一点で切断するEcoRIによる制限酵素消化により、単位長単量体AAVゲノムに消化した。単位長AAVゲノムを次いで、さらなる配列解析のためにpBlueScriptベクターにクローニングした。

【図6A】図6A～6Jは、様々なAAV2末端反復配列（この場合、DDエレメント）の例示的な配列を示す一連の図解である。図6Aは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、5'Aエレメント、5'Cエレメント、3'Cエレメント、5'Bエレメント、3'Bエレメント、3'Aエレメント、および3'Dエレメントを含む標準的なDDエレメント（SEQ ID NO: 9）の図解である。図6Bは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、5'Aエレメント、5'Bエレメント、3'Bエレメント、5'Cエレメント、3'Cエレメント、3'Aエレメント、および3'Dエレメントを含む標準的なDDエレメント（SEQ ID NO: 10）の図解である。図6Cは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、5'Aエレメント、5'Cエレメント、3'Cエレメント、3'Aエレメント、および3'Dエレメントを含む、BエレメントのないDDエレメント（SEQ ID NO: 11）の図解である。図6Dは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、5'Aエレメント、5'Bエレメント、3'Bエレメント、3'Aエレメント、および3'Dエレメントを含む、CエレメントのないDDエレメント（SEQ ID NO: 12）の図解である。図6Eは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、5'Aエレメント、3'Aエレメント、および3'Dエレメントを含む、BおよびCエレメントのないDDエレメント（SEQ ID NO: 13）の図解である。図6Fは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメントおよび3'Dエレメントを含む、A、B、およびCエレメントのないDDエレメント（SEQ ID NO: 14）の図解である。図6Gは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、5'Aエレメント、5'Cエレメント、3'Aエレメントの代わりの核酸、および3'Dエレメントを含むDDエレメント（SEQ ID NO:

10

20

30

40

50

15) の図解である。図6Hは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、5'Aエレメント、重複した5'Cエレメントと3'Aエレメント、および3'Dエレメントを含むDDエレメント (SEQ ID NO: 16) の図解である。図6Iは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、部分的5'Aエレメント、部分的3'Aエレメント、および3'Dエレメントを含むDDエレメント (SEQ ID NO: 17) の図解である。図6Jは、5'→3'配置で機能的に連結された、5'Dエレメント、5'Aエレメント、部分的3'Aエレメント、および3'Dエレメントを含むDDエレメント (SEQ ID NO: 18) の図解である。

【図6B】図6Aの説明を参照されたい。

【図6C】図6Aの説明を参照されたい。

【図6D】図6Aの説明を参照されたい。

【図6E】図6Aの説明を参照されたい。

【図6F】図6Aの説明を参照されたい。

【図6G】図6Aの説明を参照されたい。

【図6H】図6Aの説明を参照されたい。

【図6I】図6Aの説明を参照されたい。

【図6J】図6Aの説明を参照されたい。

【図7】図7は、プラスミド由来の環状鑄型の作製を示す略図である。プラスミドTG-18を最初にEcoRIで消化して、末端反復配列 (DDエレメント；リボン型として表される) を含む線状rAAVゲノムを放出させる。線状断片の末端を共にライゲーションして、二本鎖環状物を形成する。

【図8】図8は、鑄型形成過程の異なる段階におけるDNAのバンドを含むアガロースゲルの写真である。レーン1は、pBlueScriptベクターから放出された線状DNA断片である。この断片は、CMVプロモーター、eGFP cDNA、BGHpA、および末端反復配列 (DDエレメント) を含む。レーン2は、レーン1からの線状断片の自己ライゲーションの結果である。複数のDNA形態が存在し、1つまたは複数のDNA断片のライゲーションによって生じる様々なサイズの環状および線状DNAを含む。レーン3は、線状DNAを分解するが環状DNAを分解しないplasmid-safe DNaseによる処理後に残存するDNAを示す。

【図9】図9は、末端反復配列 (DDエレメント) を増幅する際のPhi29忠実度を解析するための過程を示す模式図である。細菌由来の環状DDベクターは、ランダムプライマーおよびPhi29 DNAポリメラーゼを用いる線状ローリングサークル増幅の鑄型として機能する。環状AAVエピソームの増幅後に、大きな線状コンカテマーアレイが生成される。線状アレイをその後、DDエレメントの存在を評価するために、制限酵素消化により消化する。SwaI酵素は、DDエレメントの両側で切断して244-bp断片を生じる。AhdI酵素は、DDエレメント内で1回切断し、コンカテマーを2.1 Kbの単位長断片に消化する。

【図10】図10は、増幅されたDNAのSwaI消化の結果を示すアガロースゲルの写真である。1 ngまたは6 ngのいずれかのTG-18プラスミド鑄型から増幅されたDNAをSwaIで消化すると、244-bpの断片が生じた (レーン2および3、矢印)。これは、元のTG-18プラスミドベクターから放出された断片 (レーン1) と同じサイズである。SwaI消化を用いてTG-18からDDエレメントを除去することによって生成された、DDエレメントを欠いたプラスミド鑄型 (TG-dDD) から増幅されたDNAも含めてある (レーン4および5) 。

【図11】図11は、増幅されたDNAのAhdI消化を示すアガロースゲルの写真である。AhdIは、DDエレメント内で1回切断する。1 ngまたは6 ngのいずれかのTG-18プラスミド鑄型から増幅されたDNAをAhdIで消化すると、2.1-kbの断片が生じた (レーン1および2、矢印)。DDエレメントを欠いたプラスミド鑄型 (TG-dDD) から増幅されたDNAも含めてある (レーン3および4)。このDNAはDDエレメントを含まないため、AhdIで消化されないはずである。

【図12A】図12Aは、細菌プラスミド由来の鑄型の自己ライゲーションを示す模式図である。末端反復配列含有ベクター (この場合、DDエレメント含有ベクター) を有するプラスミドを最初にEcoRIで消化して、遺伝子配列内にリボン型として表される末端反

10

20

30

40

50

復配列（DDエレメント）を含む線状rAAVゲノムを放出させる。線状断片の末端を共にライゲーションして、二本鎖環状物を形成する。

【図12B】図12Bは、鑄型形成過程の異なる段階におけるDNAを示すアガロースゲルの写真である。レーン1は、pBlueScriptベクターから放出された線状DNA断片である。この断片は、CMVプロモーター、eGFP cDNA、BGHpA、およびDDエレメントを含む。レーン2は、レーン1からの線状断片の自己ライゲーションの結果である。複数のDNA形態が存在し、1つまたは複数のDNA断片のライゲーションによって生じる様々なサイズの環状および線状DNAを含む。レーン3は、線状DNAを分解するが環状DNAを分解しないplasmid-safe DNaseによる処理後に残存するDNAを示す。

【図13A】図13Aは、Phi29ポリメラーゼによる線状コンカテマーの生成を示す模式図である。図11Aおよび11Bに示される細菌由来の鑄型は、ランダムプライマーおよびPhi29 DNAポリメラーゼを用いる線状RCAの鑄型として機能した。環状AAVエピソームの増幅後に、大きな線状コンカテマーアレイが生成された。線状アレイをその後、EcoRIによる制限酵素消化により、単位長単量体AAVゲノムに消化した。

【図13B】図13Bは、サイズ分画された消化DNAを示すアガロースゲルの写真である。

【図14】図14Aは、線状型から環状産物に自己ライゲーションされたインビトロ由来のrAAVゲノムの略図である。図14Bは、図14Aに図示された、結果として生じた単量体環状DNAベクターを示すアガロースゲルの写真である。DNAの大部分は、単量体スーパーコイル環状DNAである。

【図15】図15Aは、図14Bにおいて特徴づけられた合成ベクターをトランスフェクトした細胞のGFP蛍光を示す顕微鏡写真である。蛍光は、Spectramax MiniMax300イメージングサイトメーターを用いて検出した。図15Bは、rAAVゲノムを含む元のプラスミドをトランスフェクトした細胞のGFP蛍光を示す顕微鏡写真である。蛍光は、Spectramax MiniMax300イメージングサイトメーターを用いて検出した。

【図16】図16は、pBS単独（レーン1）、インビトロで生成されたTG-18由来のDDベクター（レーン2）、DDエレメントのない、インビトロで生成されたTG-18由来のベクター（レーン3）、プラスミド由来のTG-18由来のDDベクター（レーン4）、およびDDエレメントのない、プラスミド由来のTG-18由来のベクター（レーン5）をトランスフェクションした細胞によるGFP発現を示すウェスタンブロットの写真である。抗チューブリン染色を示すバンドを対照として示す。

【図17】図17は、ローリングサークル増幅を用いて合成DNAベクターを生成するための例示的な過程を示す模式図である。この過程は、開環状DNA分子をスーパーコイルDNA単量体から分離するためのカラム精製を含む。

【発明を実施するための形態】

【0105】

詳細な説明

本発明は、AAVベクターに類似した様式で静止細胞（例えば、分裂後の細胞）の長期形質導入を提供する非ウイルス性DNAベクターを特徴とする。本発明は、一部には、等温ローリングサークル増幅およびライゲーション媒介性の環状化により（例えば、細菌発現および部位特異的組換えとは対照的に）、環状のAAV様DNAベクター（例えば、DDエレメントなどの末端反復配列を含むDNAベクター）を合成によって生成するためのインビトロ（例えば、無細胞）系の開発に基づいている。本発明の方法によって、環状のAAV様DNAベクターの生成における拡張可能性および製造効率の向上が可能になる。さらに、これらの方法によって生成されたベクターは、プラスミドDNAベクターに付随する問題、例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられるLu et al., Mol. Ther. 2017, 25(5): 1187-98において考察された問題の多くを克服するように設計されている。例えば、CpGアイランドおよび／またはRNAPII停止部位などの細菌プラスミドDNA配列の存在を排除するまたは減少させることにより、転写サイレンシングを減少させるまたは排除することができ、結果として異種遺伝子の持続性を増大させることができる。さらに、免疫原性成分（例えば、細菌のエンドトキシン、DNA、もしくはRNA、また

はCpGモチーフなどの細菌シグネチャー)の存在を排除することにより、宿主免疫系を刺激するリスクが低下する。そのような利点は、網膜ジストロフィー(例えば、メンデル遺伝性網膜ジストロフィー)のなどのある特定の障害の処置において特に有利である。

【0106】

したがって、本発明のベクターは、(i)細菌プラスミドDNA配列(例えば、RNAPII停止部位、複製開始点、および／もしくは耐性遺伝子)およびその他の細菌シグネチャー(例えば、免疫原性CpGモチーフ)を実質的に欠いている；かつ／または(ii)試験管内で完全に合成および増幅することができる(例えば、細菌内での複製は不要である、例えば、細菌の複製開始点および細菌の耐性遺伝子は不要である)合成DNAベクターを含む。いくつかの態様において、ベクターは、AAVベクターに特有のDDエレメントを含む。本発明により、標的細胞(例えば、網膜細胞)を、ウイルス自体を必要とせずに、AAVウイルスDNAのように挙動する(例えば、転写サイレンシングが低くかつ持続性が増強された)、異種遺伝子を有するDNAベクターで形質導入することが可能になる。

10

【0107】

1. 定義

特に定義されない限り、本明細書で用いられる技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により、および出版された教科書を参照することにより、一般に理解されている意味と同じ意味を有し、出版された教科書は、本出願において用いられる用語の多くに対する一般的な指針を当業者に提供する。本明細書に記載される定義と参照出版物の定義との間に何らかの矛盾がある場合には、本明細書において提供される定義が優先するものとする。

20

【0108】

本明細書で用いられる場合、「環状ベクター」または「環状DNAベクター」という用語は、環状型の核酸分子を指す。そのような環状型は、典型的には、ローリングサークル増幅により増幅してコンカテマーにすることができる。その末端において結合した鎖(例えば、例えばヘアピンループまたは他の構造により共有結合した骨格)を有する線状二本鎖核酸は、本明細書で用いられる場合、環状ベクターではない。「環状DNAベクター」という用語は、「共有結合閉環型環状DNAベクター」という用語と、本明細書で互換的に用いられる(例えば、実施例2を参照されたい)。当業者は、そのような環状ベクターが、本明細書に記載されるように、スーパーコイルを形成するかつ複雑なDNAトポロジーを有する、共有結合閉環型であるベクターを含み得ることを理解するであろう。

30

【0109】

本明細書で用いられる場合、「メンデル遺伝性網膜ジストロフィー」は、可変的な浸透度(すなわち、完全浸透度または不完全浸透度)でメンデル遺伝パターンに従う網膜の障害を指す。メンデル遺伝性網膜ジストロフィーは、(a)1つの対立遺伝子における単一の変異(優性遺伝障害の場合のように)または(b)各対立遺伝子における単一の変異(劣性遺伝障害の場合のように)の結果として起こり得る。変異は、点変異、挿入、欠失、またはスプライス変種変異であってよい。例示的なメンデル遺伝性網膜ジストロフィーには、レーバー先天性黒内障(LCA)、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシュャー症候群、ならびにワグナー症候群が含まれる。メンデル遺伝性網膜ジストロフィーには、加齢黄斑変性(AMD)などの、疾患を発症する可能性と共に複数の遺伝的関連を有する多因子障害は含まれない。

40

【0110】

本明細書で用いられる場合、「組換え部位」という用語は、部位特異的組換えの産物である核酸配列を指し、これは、第1のリコンビナーゼ付着部位の一部に対応する第1の配列および第2のリコンビナーゼ付着部位の一部に対応する第2の配列を含む。ハイブリッド組換え部位の1つの例は、部位特異的組換えの産物であり、attPの一部に対応する第1の配列およびattBの一部に対応する第2の配列を含む、attRである。あるいは、組換え

50

部位を、Cre/Lox組換えから作製することができる。したがって、Cre/Lox組換えから作製されたベクター（例えば、LoxP部位を含むベクター）は、本明細書で用いられるような組換え部位を含む。組換え部位を作製する他の部位特異的組換え事象は、例えば、ラムダイнтеグラーゼ、FLPリコンビナーゼ、およびKwリコンビナーゼを含む。非部位特異的組換え事象（例えば、ITR媒介性分子間組換え）から結果として生じた核酸配列は、本明細書で定義されるような組換え部位ではない。

【0111】

本明細書で用いられる場合、「治療用置換タンパク質」という用語は、正常な（例えば、健常な）個体によって内因的に発現されるタンパク質に構造的に類似している（例えば、構造的に同一である）タンパク質を指す。治療用置換タンパク質は、置換されるタンパク質の機能不全（または欠如）に関連する障害に苦しむ個体に投与することができる。いくつかの態様において、治療用置換タンパク質は、タンパク質をコードする遺伝子における変異（例えば、点変異、挿入変異、欠失変異、またはスプライス変種変異）から結果として生じたタンパク質の欠陥を修正する。治療用置換タンパク質には、（例えば、ワクチンの一部としての）病原体に関連するタンパク質などの、非内因性タンパク質は含まれない。治療的置換タンパク質には、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子が含まれ得る。いくつかの例において、治療用置換タンパク質は、一遺伝子性である。

【0112】

本明細書で用いられる場合、「治療用核酸」という用語は、対象における分子（例えば、タンパク質または核酸）に結合して（例えば、それとハイブリダイズして）、（すなわち、必ずしも転写または翻訳されずに）その治療効果を付与する核酸を指す。治療用核酸は、DNAまたはRNA、例えば、低分子干渉RNA（siRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、CRISPR分子（例えば、ガイドRNA（gRNA））、オリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）、アプタマー、またはDNAワクチンなどであることができる。いくつかの態様において、治療用核酸は、非炎症性または非免疫原性の治療用核酸であり得る。

【0113】

本明細書で用いられる場合、「末端反復配列」という用語は、核酸分子の隣接部分において反復されるヌクレオチドの配列を有する、核酸分子の部分（例えば、同方向または逆方向に反復されてよい（例えば、それぞれABCDABCDまたはABCDDCBA））。いくつかの態様において、例えば、末端反復配列は、逆位末端反復配列（ITR）もしくは長い末端反復配列（LTR）であってよく、またはそれらに由来し得る（例えば、それらのライゲーションの産物および／またはそれらの一部であり得る）。ITR由来の末端反復配列は、反復されたAエレメント、Bエレメント、Cエレメント、および／またはDエレメント（A、B、C、およびDエレメントは、SEQ ID NO: 31～37によって定義され、図2A～2Hに示される）を有し得る。例えば、図6A～6Jの各々は末端反復配列であり、すべてのDDエレメント（例えば、SEQ ID NO: 9または10）は末端反復配列の例である。末端反復配列は、相同組換え（例えば、分子間相同組換えまたは分子内相同組換え）の結果として生じる構造を有し得る。単一の末端反復配列は、それ自体ではヘアピンを形成しない。

【0114】

「逆位末端反復」または「ITR」という用語は、Muzyczka and Berns, Fields Virology 2001, 2: 2327-2359に記載されているような、AAVの溶菌および潜伏ライフサイクルを完了するために必要な、T字型の回文構造を形成し得る、AAVおよび／または組換えAAV（rAAV）中に存在する核酸のひと続きを指す。「二重Dエレメント」および「DDエレメント」という用語は、本明細書で互換的に用いられ、5'Dエレメント（すなわち、SEQ ID NO: 1、19、21、23、25、27、29、38、および40からなる群より選択される核酸配列と少なくとも80%の相同性（例えば、80%、85%、90%、95%、

または100%の相同性)を有する核酸配列)ならびに3'Dエレメント(すなわち、SEQ ID NO: 8、20、22、24、26、28、30、39、および41からなる群より選択される核酸配列と少なくとも80%の相同性(例えば、80%、85%、90%、95%、または100%の相同性)を有する核酸配列)を核酸の同一鎖上に有するDNA構造である、一種の末端反復配列を指す。いくつかの態様において、5'Dエレメントは、SEQ ID NO: 1の核酸配列と100%相同的であり、および/または3'Dエレメントは、SEQ ID NO: 8の核酸配列と100%相同的である。DDエレメントは、図1に示されるように、ライゲーションによって、同じ分子(分子内組換え)または異なる分子(分子間組換え)からの2つのAAV逆位末端反復(ITR)を連結することによって作製され得る。そのようなライゲーションは、任意のAAV血清型のITRの間で起こり得、その例示的な構造は図2A~2Iに示される。DDエレメントは、単一の核酸鎖上に2つのDエレメントを含み、5'Dエレメントの3'末端と3'Dエレメントの5'末端を機能的に連結する1つまたは複数のA、B、および/もしくはCエレメント、またはそれらの一部などの付加的なエレメントを含んでもよい。いくつかの態様において、5'Dエレメントの3'末端と3'Dエレメントの5'末端との間に異種遺伝子は存在しない。AAV2に由来する例示的なDDエレメントの配列は、図6A~6Jのそれぞれによって示される。他のAAV血清型(例えば、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、またはAAV9)に由来するDDエレメントを使用してもよい。AAV血清型1~7からの代表的な5'および3'Dエレメントを以下に提供する。

10

【0115】

(表1) AAV血清型1~7からの代表的な5'および3'Dエレメント

20

種類	SEQ ID NO.	配列
5' D, AAV1	19	TTACCCCTAGTGATGGAG
3' D, AAV1	20	CTCCATCACTAGGGGTAA
5' D, AAV2	1	AGGAACCCCTAGTGATGGAG
3' D, AAV2	8	CTCCATCACTAGGGGTTTCCT
5' D, AAV3	21	GCCATACCTCTAGTGATGGAG
3' D, AAV3	22	CTCCATCACTAGAGGTATGGC
5' D, AAV4	23	GGGCAAACCTAGATGATGGAG
3' D, AAV4	24	CTCCATCATCTAGGTTTGCCC
5' D, AAV5	25	TACAAAACCTCCTTGCTTGAGAGTGTGGCA
3' D, AAV5	26	TGCCACACTCTCAAGCAAGGAGGTTTTGTA
5' D, AAV6	27	AGGAACCCCTAGTGATGGAG
3' D, AAV6	28	CTCCATCACTAGGGGTTTCCT
5' D, AAV7	29	CGCGGTACCCCTAGTGATGGAC
3' D, AAV7	30	CTCCATCACTAGGGGTACCGCG
5' D, AAV8	38	CGCGCTACCCCTAGTGATGGAG
5' D, AAV8	39	CTCCATCACTAGGGGTAGCGCG
5' D, AAV9	40	CGCGATTACCCCTAGTGATGGAG
5' D, AAV9	41	CTCCATCACTAGGGGTAATCGCG

30

40

【0116】

「異種遺伝子」という用語は、ウイルスゲノムの一部として天然に存在しない遺伝子を指す。例えば、異種遺伝子は、哺乳動物遺伝子、例えば、治療用遺伝子(例えば、治療用

50

置換タンパク質や抗原結合タンパク質などをコードする遺伝子)、例えば、治療用タンパク質をコードする哺乳動物遺伝子であってよい。いくつかの態様において、異種遺伝子は、標的細胞および／または対象において欠陥があるかまたは存在しないタンパク質またはその一部(例えば、治療用置換タンパク質)をコードする。いくつかの態様において、異種遺伝子は、標的細胞および／または対象において欠陥があるかまたは存在しないタンパク質をコードする1つまたは複数のエキソンを含む。例えば、いくつかの態様において、異種遺伝子は、例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられるWO 2017/087900に記載されているような、1つまたは複数のトランススプライシング分子またはその一部(例えば、結合ドメイン)を含む。いくつかの態様において、異種遺伝子は、治療用RNA(例えば、マイクロRNA)などの治療用核酸を含む。

10

【0117】

本明細書で用いられる場合、「トランススプライシング分子」は、3つの主要なエレメント:(a)トランススプライシング分子をその標的遺伝子(例えば、プレmRNA)に繋留することによって特異性を付与する結合ドメイン(例えば、オリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド);(b)スプライシングドメイン(例えば、3'または5'スプライス部位を有するスプライシングドメイン);および(c)標的遺伝子中の1つまたは複数のエキソン(例えば、1つまたは複数の変異エキソン)を置換することができる、標的遺伝子上にトランススプライシングされるように構成されたコード配列を有する。

【0118】

「プロモーター」という用語は、プロモーターに機能的に連結された異種遺伝子の転写を調節する配列を指す。プロモーターは、転写を指示するのに十分な配列、ならびに／またはRNAポリメラーゼおよび効率的な転写に必要な他の転写因子のための認識部位を提供し、細胞特異的な発現を指示することができる。本発明のプロモーター配列は、転写を指示するのに十分な配列に加えて、転写の調節に関与する他の調節エレメント(例えば、エンハンサー、コザック配列、およびイントロン)の配列もまた含み得る。当技術で公知であり、本明細書に記載されるウイルスベクターにおいて有用なプロモーターの例には、CMVプロモーター、CBAプロモーター、smCBAプロモーター、および免疫グロブリン遺伝子、SV40、または他の組織特異的遺伝子に由来するプロモーターが含まれる。公知の調節エレメントを混合し適合させることにより機能的なプロモーターを作出するための標準的な技法が、当技術分野で公知である。プロモーター断片から、または公知の調節エレメントの断片を混合し適合させることにより、「切断型プロモーター」を作製することもできる;例えば、smCBAプロモーターはCBAプロモーターの切断型である。

20

30

【0119】

本明細書で用いられる場合、ベクターまたは組成物(例えば、本発明のDNAベクターを含む薬学的組成物)は、組成物が治療的に関連する用量で測定可能な炎症反応(例えば、トール様受容体シグナル伝達に関連する表現型)を誘発しない場合、免疫原性細菌シグネチャーなどの免疫原性成分を「実質的に欠いている」。免疫原性成分の存在について組成物をスクリーニングする方法には、当技術分野で公知の方法に従ったインビトロおよびインビボ動物アッセイが含まれる。いくつかの態様において、免疫原性成分を実質的に欠いているベクターまたは組成物は、非免疫原性である。

40

【0120】

本明細書で用いられる場合、「非免疫原性」という用語は、ベクターまたは組成物が、治療的に関連する用量で測定可能な炎症反応(例えば、トール様受容体シグナル伝達に関連する表現型)を誘発しないことを意味する。免疫原性成分の存在について組成物をスクリーニングする方法には、当技術分野で公知の方法に従ったインビトロおよびインビボ動物アッセイが含まれる。例えば、ベクターまたは組成物が非免疫原性であるかどうかを判定するための適切なインビトロアッセイは、ベクターまたは組成物の存在下でヒト末梢血単核細胞(PBMC)またはヒトPBMC由来の骨髓細胞(例えば、単球)を培養し、8時間後に培養物中のIL-1 β 、IL-6、および／またはIL-12の量を測定することを伴う。IL-1

50

β、IL-6、および／またはIL-12の濃度が、陰性対照と比較して、ベクターまたは組成物を含む試料中で上昇しない場合、ベクターまたは組成物は非免疫原性である。

【0121】

本明細書で用いられる場合、「コンカテマー」は、典型的には連続して連結された同一または実質的に同一の核酸配列（例えば、サブユニット）の複数コピーを含む核酸分子を指す。

【0122】

本明細書で用いられる場合、「単離された」という用語は、人工的に生成されたことを意味する。いくつかの態様において、DNAベクターに関して、「単離された」という用語は、(i) 例えばローリングサークル増幅もしくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、インビトロで（例えば、無細胞環境で）増幅された；(ii) 分子クローニングにより組換えで生成された；(iii) 制限エンドヌクレアーゼ切断およびゲル電気泳動分画、もしくはカラムクロマトグラフィーなどによって、精製された；または (iv) 例えば化学合成によって合成されたDNAベクターを指す。単離されたDNAベクターは、当技術分野で周知の組換えDNA技法によって容易に操作可能なものである。したがって、5'および3'制限部位が公知であるか、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマー配列が開示されている、ベクターに含まれるヌクレオチド配列は単離されていると見なされるが、その天然状態でその天然宿主中に存在する核酸配列は単離されていると見なされない。単離されたDNAベクターは、実質的に精製されていてもよいが、そうである必要はない。

【0123】

本明細書で用いられる場合、「ベクター」は、異種遺伝子を標的細胞に運び込むことができる核酸分子を指し、標的細胞内で異種遺伝子は次いで複製、プロセッシング、および／または発現され得る。標的細胞または宿主細胞がベクターのゲノムをプロセッシングした後（例えば、DDエレメント作製することによって）、そのゲノムはベクターとは見なされない。

【0124】

本明細書で用いられる場合、DNAベクターを生成する「無細胞方法」は、方法の任意の段階を容易にするための、細菌（例えば、大腸菌（E.coli））宿主細胞などの宿主細胞内の、DNAのいずれの封じ込めにも依存しない方法を指す。例えば、無細胞方法は、1つまたは複数の合成容器（例えば、ガラスまたはプラスチックのチューブまたは他の容器）内で、DNA増幅、修飾、および単離を容易にするために酵素および他の剤が加えられてもよい、適切な溶液（例えば、緩衝液）内で行われる。

【0125】

本明細書で用いられる場合、「標的細胞」は、標的遺伝子を発現し、ベクターが感染するかまたは感染することが意図される任意の細胞を指す。ベクターは、対象に存在する標的細胞（インサイチューで）または培養中の標的細胞に感染することができる。いくつかの態様において、本発明の標的細胞は分裂後の細胞である。標的細胞には、脊椎動物細胞および無脊椎動物細胞の両方（ならびに動物起源の細胞株）が含まれる。脊椎動物細胞の代表例には、哺乳動物細胞、例えば、ヒト、げっ歯類（例えば、ラットおよびマウス）、ならびに有蹄動物（例えば、ウシ、ヤギ、ヒツジ、およびブタ）などが含まれる。標的細胞には、網膜細胞などの眼球細胞が含まれる。あるいは、標的細胞は、幹細胞（例えば、多能性細胞（すなわち、その子孫がいくつかの限定された細胞型に分化し得る細胞、例えば、造血幹細胞もしくは他の幹細胞など）または全能性細胞（すなわち、その子孫が生物内の任意の細胞型になり得る細胞、例えば、胚性幹細胞、および体性幹細胞、例えば、造血細胞））であってよい。さらに他の態様において、標的細胞には、卵母細胞、卵子、胚の細胞、接合子、精子細胞、ならびに種々の器官または組織由来の体性（非幹）成熟細胞、例えば、肝細胞、神経細胞、筋肉細胞、および血液細胞（例えば、リンパ球）などが含まれる。

【0126】

「宿主細胞」は、関心対象のDNAベクターを保有する任意の細胞を指す。宿主細胞は

、本開示によって記載されるようなDNAベクターのレシピエントとして使用することができる。本用語は、トランスフェクトされた元の細胞の子孫を含む。したがって、本明細書で用いられる「宿主細胞」は、（例えば、本明細書に記載されるDNAベクターによって）異種遺伝子をトランスフェクトされた細胞を指し得る。単一の親細胞の子孫は、自然の、偶発的な、または意図的な変異により、形態またはゲノムもしくは全DNA補完物が元の親と必ずしも完全に同一でない可能性があることが理解される。

【0127】

本明細書で用いられる場合、「対象」という用語は、本明細書に記載される処置または予防の方法を必要とする任意の哺乳動物を含む。いくつかの態様において、対象はヒトである。そのような処置または予防を必要とする他の哺乳動物には、イヌ、ネコ、または他の飼育動物、ウマ、家畜、非ヒト霊長類を含む実験動物、等が含まれる。対象は雄であってもまたは雌であってもよい。1つの態様において、対象は、標的遺伝子の変異によって引き起こされる疾患または障害を有する。別の態様において、対象は、標的遺伝子の変異によって引き起こされる疾患または障害を発症するリスクがある。別の態様において、対象は、標的遺伝子の変異によって引き起こされる疾患または障害の臨床徴候を示している。対象は、処置または予防療法が有益であり得る任意の年齢であってよい。例えば、いくつかの態様において、対象は、0～5歳、5～10歳、10～20歳、20～30歳、30～50歳、50～70歳であるか、または70歳を超える。

【0128】

本明細書で用いられる場合、ベクターまたはその組成物の「有効量」または「有効用量」は、例えば、選択された投与の形態、経路、および／またはスケジュールに従って細胞または生物に送達される場合に、所望の生物学的大約／または薬理学的効果を達成するのに十分な量を指す。当業者によって認識されるように、有効な特定のベクターまたは組成物の絶対量は、所望の生物学的大約または薬理学的エンドポイント、送達される薬物、標的組織、等のような要因に応じて変動し得る。当業者は、「有効量」を、単一用量でまたは複数用量の使用により、細胞と接触させるかまたは対象に投与することができることをさらに理解するであろう。

【0129】

本明細書で用いられる場合、「持続性」という用語は、遺伝子が細胞内で発現可能である期間を指す。DNAベクターの持続性、またはDNAベクター内の異種遺伝子の持続性は、当技術分野で公知の任意の遺伝子発現特性決定法を用いて、細菌内で生成された対照ベクター（例えば、細菌内で生成されるか、または本発明のベクターには存在しない1つもしくは複数の細菌シグネチャーを有する環状ベクター）などの参照ベクターに対して定量化することができる。いくつかの態様において、対照ベクターはDDエレメントを欠いている。付加的にまたは代替的に、持続性は、ベクターの投与後の任意の所与の時点で定量化することができる。例えば、いくつかの態様において、本発明のDNAベクターの異種遺伝子は、ベクターの投与から6ヶ月後にその発現がインサイチューで検出される場合、投与後少なくとも6ヶ月間持続する。いくつかの態様において、遺伝子は、その転写が、投与後3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、1年、2年、またはそれ以上の時点で検出可能である場合、標的細胞内で「持続する」。いくつかの態様において、遺伝子は、投与後の所与の期間（例えば、投与後3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、1年、2年、またはそれ以上）の後に、元の発現レベルの任意の検出可能な割合（例えば、元の発現レベルの少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも100%）が残存している場合、持続すると称される。

【0130】

本明細書で用いられる場合、「変異」は、欠陥のある（例えば、非機能的な、機能が低下した、異常な機能の、通常よりも少ない産生量の）タンパク質産物を引き起こす任意の異常な核酸配列を指す。変異には、塩基対変異（例えば、一塩基多型）、ミスセンス変異

、フレームシフト変異、欠失、挿入、およびスプライス変異が含まれる。

【0131】

本明細書で用いられる場合、「変異に関連する障害」または「障害に関連する変異」という用語は、障害と変異との間の相関関係を指す。いくつかの態様において、変異に関連する障害は、その変異によって、完全にもしくは部分的に、または直接的にもしくは間接的に引き起こされることが公知であるかまたは疑われる。例えば、変異を有する対象は、障害を発症するリスクがある可能性があり、そのリスクは、他の（例えば、独立した）変異（例えば、同じ遺伝子もしくは異なる遺伝子における）または環境因子などの他の因子に付加的に依存し得る。

【0132】

本明細書で用いられる場合、「免疫障害」という用語は、損なわれた（低活動性の）免疫機能（例えば、外来もしくは病原性の抗原に対して適している免疫応答を展開できないこと）または過活動性の免疫機能（例えば、内因性「自己」抗原を外来もしくは病原性の抗原から区別することができず、それにより、例えば、異常な炎症、慢性感染、および／または自己免疫をもたらすこと）によって特徴づけられる、免疫系の機能不全を指す。免疫障害には、正常な免疫応答（例えば、正常な炎症、感染、および病原体排除）は含まれない。したがって、例えば、ワクチンは、本明細書で定義されるような免疫障害のための処置ではない。

【0133】

本明細書で用いられる場合、「処置」という用語またはその文法的派生語は、疾患の進行を軽減すること、疾患症状の重症度を軽減すること、疾患症状の進行を遅らせること、疾患症状を取り除くこと、または疾患の発症を遅らせることと定義される。

【0134】

本明細書で用いられる場合、障害の「予防」という用語またはその文法的派生語は、疾患の発症リスクを減らすこと、例えば、変異に関連した障害を発症するリスクがある対象に対する予防療法と定義される。対象は、当技術分野で公知であるかまたは本明細書に記載される任意の適切な方法に従って、障害に関連する変異を同定することにより、障害を発症する「リスクがある」と特徴づけることができる。いくつかの態様において、障害を発症するリスクがある対象は、障害に関連する1つまたは複数の変異を有する。付加的にまたは代替的に、対象は、対象が障害の家族歴を有する場合、その障害を発症する「リスクがある」と特徴づけることができる。

【0135】

本明細書に記載される方法において用いられる「投与する」という用語またはその文法的派生語は、組成物またはエキスピボで処理された細胞を、それを必要とする、例えば、標的遺伝子に変異または欠陥を有する対象に送達することを指す。例えば、眼球細胞が標的とされる1つの態様において、該方法は、光受容細胞または他の眼球細胞への網膜下注射によって組成物を送達することを伴う。別の態様では、眼球細胞への硝子体内注射または眼球細胞への眼瞼静脈を介した注射を用いてもよい。別の態様において、組成物は静脈内投与される。投与のさらに他の方法は、本開示を考慮して、当業者によって選択され得る。

【0136】

「薬学的に許容される」という用語は、ヒトなどの哺乳動物への投与に安全であることを意味する。いくつかの態様において、薬学的に許容される組成物は、動物、およびより具体的にはヒトにおいて使用するために、連邦政府もしくは州政府の規制機関によって承認されているか、または米国薬局方もしくは他の一般に認識される薬局方に収載されている。

【0137】

「担体」という用語は、本発明のベクターまたは組成物と共に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。適切な薬学的担体の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」 Mack Publishing Co., Easton, PA., 2nd edited, 200

10

20

30

40

50

5に記載されている。

【0138】

「1つの (a)」および「1つの (an)」という用語は、「1つまたは複数」を意味する。例えば、「1つの遺伝子」は、1つまたは複数のそのような遺伝子を表すと理解される。したがって、「1つの (a)」および「1つの (an)」、「1つの (a) (または1つの (an)) の1つまたは複数」、ならびに「1つの (a) (または1つの (an)) の少なくとも1つ」という用語は、本明細書で互換的に用いられる。

【0139】

本明細書で用いられる場合、「約」という用語は、特に指定がない限り、参照値から±10%の変動内の値を指す。

【0140】

様々な情報源または参考文献の間で定義に何らかの矛盾がある場合には、本明細書において提供される定義が優先するものとする。

【0141】

II. ベクター

異種遺伝子を備える合成DNAベクターが、本明細書において提供される。該DNAベクターは、二重D (DD) エlementをさらにも含む。DDElementを有する合成DNAベクターは、例えばAAVベクターに類似した様式で、エピソードとして細胞内で（例えば、分裂後の細胞などの静止細胞内で）持続し得る。本明細書において提供されるベクターは、ウイルスベクターに固有の成分（例えば、ウイルスタンパク質）および細菌プラスミドDNA、例えば、免疫原性成分（例えば、免疫原性細菌シグネチャー（例えば、CpGアイランドもしくはCpGモチーフ））、または持続性の低下と付加的にもしくはその他の点に関連する成分（例えば、CpGアイランドもしくはCpGモチーフ）などを欠いた裸のDNAベクターであってよい。

【0142】

複製開始点および／または薬物耐性遺伝子のない、異種遺伝子を特徴とする合成環状DNAベクターがさらに提供され、これは本明細書において環状DNAベクターと称される。本発明は、合成によって生成される環状DNAベクターを提供する。

【0143】

本発明の合成環状DNAベクターは、例えばAAVベクターに類似した様式で、エピソードとして細胞内で（例えば、分裂後の細胞などの静止細胞内で）持続し得る。本明細書において提供されるベクターは、ウイルスベクターに固有の成分（例えば、ウイルスタンパク質）および細菌プラスミドDNA、例えば、免疫原性成分（例えば、免疫原性細菌シグネチャー（例えば、CpGモチーフ））、または持続性の低下と付加的にもしくはその他の点に関連する成分（例えば、CpGアイランド）などを欠いた裸のDNAベクターであってよい。例えば、いくつかの態様において、ベクターは、DNAの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的にすべて）が、細菌プラスミドDNAの1つまたは複数のElement、例えば、免疫原性成分（例えば、免疫原性細菌シグネチャー（例えば、CpGモチーフ））、または持続性の低下と付加的にもしくはその他の点に関連する成分（例えば、CpGアイランド）などを欠いている、DNAを含む。いくつかの態様において、DNAの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的にすべて）は、CpGメチル化を欠いている。いくつかの態様において、ベクターは、DNAの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的にすべて）が、Damメチル化およびDcmメチル化などの細菌メチル化シグネチャーを欠いている、DNAを含む。例えば、いくつかの態様において、ベクターは、GATC配列の少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくと

10

20

30

40

50

も99%、または本質的にすべて)が、(例えば、Damメチラーゼによって)メチル化されていない、DNAを含む。付加的にまたは代替的に、ベクターは、CCAGG配列および/またはCCTGG配列の少なくとも50%(例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的にすべて)が、(例えば、Dcmメチラーゼによって)メチル化されていない、DNAを含む。

【0144】

前述のベクターの各々に関するいくつかの態様において、DNAベクターは、インビボで持続し得る(例えば、環状および非細菌性(すなわち、インビトロ(例えば、無細胞)合成による)は、DNAベクターの異種遺伝子の長期転写または発現に関連している)。いくつかの態様において、環状DNAベクターの持続性は、参照ベクター(例えば、細菌内で生成されるか、または本発明のベクターには存在しない1つもしくは複数の細菌シグネチャーを有する環状ベクター)よりも、5%~50%高い、50%~100%高い、その1倍~5倍、または5倍~10倍である(例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%高い、その1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上である)。いくつかの態様において、本発明の環状DNAベクターは、1週間~4週間、1ヶ月~4ヵ月、4ヶ月~1年、1年~5年、5年~20年、または20年~50年(例えば、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヵ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも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20年、少なくとも30年、少なくとも40年、または少なくとも50年)持続する。いくつかの態様において、DNAベクターはDDエレメントを含み、DDエレメントは持続性の増加と関連している可能性がある。

【0145】

DNAベクターは環状DNAベクターであってよい。環状DNAベクターは、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、等であってよい。好ましくは、環状DNAベクターは単量体である。他の好ましい態様において、環状DNAベクターは単量体スーパーコイル環状DNA分子である。いくつかの態様において、DNAベクターはニックが入っている。いくつかの態様において、DNAベクターは開環状である。いくつかの態様において、DNAベクターは二本鎖の環状である。

【0146】

付加的にまたは代替的に、DNAベクターはDDエレメントを含み得る。ある特定の態様において、DNAベクター(例えば、環状DNAベクター、例えば、単量体環状DNAベクター)は、5'から3'方向に機能的に連結された(i) 5'Dエレメント、(ii) 異種遺伝子、および(iii) 3'Dエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に機能的に連結された(i) 5'Dエレメント、(ii) プロモーター、(iii) 異種遺伝子、および(iv) 3'Dエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に機能的に連結された(i) 5'Dエレメント、(ii) プロモーター、(iii) 異種遺伝子、(iv) ポリアデニル化部位、および(v) 3'Dエレメントを含む。

【0147】

例えば、DNAベクターは、5'から3'方向に機能的に連結された(i) 5'Aエレメント、(ii) 5'Dエレメント、(iii) 異種遺伝子、(iv) 3'Dエレメント、および(v) 5'Aエレメントを含み得る。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に(i) 5'Aエレメント、(ii) 5'Dエレメント、(iii) プロモーター、(iv) 異種遺伝子、(v) 3'Dエレメント、および(vi) 5'Aエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に(i) 5'Aエレメント、(ii) 5'Dエレメント、(iii) プロモーター、(iv) 異種遺伝子、(v) ポリアデニル化部位、(vi) 3'Dエレメント、および(vii) 5'Aエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に(i) 5'Cエレメント、(ii) 5'Aエレメント、(iii) 5'Dエレメント、(iv) 異種遺伝子、(v) 3'Dエレメント、(vi) 3'Aエレメント、および(vii) 3'Bエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に(i) 5'Cエレメント、(ii) 5'Aエレメント、(ii)

i) 5'Dエレメント、(iv) プロモーター、(v) 異種遺伝子、(vi) 3'Dエレメント、(vii) 3'Aエレメント、および (viii) 3'Bエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に (i) 5'Cエレメント、(ii) 5'Aエレメント、(iii) 5'Dエレメント、(iv) プロモーター、(v) 異種遺伝子、(vi) ポリアデニル化部位、(vii) 3'Dエレメント、(viii) 3'Aエレメント、および (ix) 3'Bエレメントを含む。

【0148】

いくつかの態様において、DNAベクターは、同じ核酸（例えば、DNA）鎖上に少なくとも5'Dエレメントおよび3'Dエレメントを有する核酸配列を有するDDエレメントを含む。例えば、いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に機能的に連結された (i) 異種遺伝子および (ii) DDエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に (i) プロモーター、(ii) 異種遺伝子、および (iii) DDエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に (i) 異種遺伝子、(ii) ポリアデニル化部位、および (iii) DDエレメントを含む。いくつかの態様において、DNAベクターは、5'から3'方向に (i) プロモーター、(ii) 異種遺伝子、(iii) ポリアデニル化部位、および (iv) DDエレメントを含む。

【0149】

末端反復配列

本発明のいくつかの態様において、本明細書において提供されるベクターおよび組成物は末端反復配列を含み、これは、例えば環状化の結果として、例えば、ITR、LTR、または他の末端構造に由来し得る。末端反復配列は、少なくとも10塩基対 (bp) 長（例えば、10 bp～500 bp、12 bp～400 bp、14 bp～300 bp、16 bp～250 bp、18 bp～200 bp、20 bp～180 bp、25 bp～170 bp、30 bp～160 bp、または50 bp～150 bp、例えば、10 bp～15 bp、15 bp～20 bp、20 bp～25 bp、25 bp～30 bp、30 bp～35 bp、35 bp～40 bp、40 bp～45 bp、45 bp～50 bp、50 bp～55 bp、55 bp～60 bp、60 bp～65 bp、65 bp～70 bp、70 bp～80 bp、80 bp～90 bp、90 bp～100 bp、100 bp～150 bp、150 bp～200 bp、200 bp～300 bp、300 bp～400 bp、または400 bp～500 bp、例えば、10 bp、11 bp、12 bp、13 bp、14 bp、15 bp、16 bp、17 bp、18 bp、19 bp、20 bp、21 bp、22 bp、23 bp、24 bp、25 bp、26 bp、27 bp、28 bp、29 bp、30 bp、31 bp、32 bp、33 bp、34 bp、35 bp、36 bp、37 bp、38 bp、39 bp、40 bp、41 bp、42 bp、43 bp、44 bp、45 bp、46 bp、47 bp、48 bp、49 bp、50 bp、51 bp、52 bp、53 bp、54 bp、55 bp、56 bp、57 bp、58 bp、59 bp、60 bp、61 bp、62 bp、63 bp、64 bp、65 bp、66 bp、67 bp、68 bp、69 bp、70 bp、71 bp、72 bp、73 bp、74 bp、75 bp、76 bp、77 bp、78 bp、79 bp、80 bp、81 bp、82 bp、83 bp、84 bp、85 bp、86 bp、87 bp、88 bp、89 bp、90 bp、91 bp、92 bp、93 bp、94 bp、95 bp、96 bp、97 bp、98 bp、99 bp、100 bp、101 bp、102 bp、103 bp、104 bp、105 bp、106 bp、107 bp、108 bp、109 bp、110 bp、111 bp、112 bp、113 bp、114 bp、115 bp、116 bp、117 bp、118 bp、119 bp、120 bp、121 bp、122 bp、123 bp、124 bp、125 bp、126 bp、127 bp、128 bp、129 bp、130 bp、131 bp、132 bp、133 bp、134 bp、135 bp、136 bp、137 bp、138 bp、139 bp、140 bp、141 bp、142 bp、143 bp、144 bp、145 bp、146 bp、147 bp、148 bp、149 bp、150 bp、またはそれ以上）であってよい。

【0150】

本発明のいくつかの態様において、合成ベクターの末端反復配列は、DDエレメント（例えば、ITRに由来する、および／またはITRの1つもしくは複数の部分を含むDDエレメント）であってよい。DDエレメントは、単一のDNA分子上に2つのDエレメントを含む。いくつかの態様において、2つのDエレメントは、約125個の核酸によって分離されている。DDエレメントは、任意の血清型のAAV、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、またはAAV9に由来し得る。

【0151】

いくつかの態様において、DDエレメントは、例えば図6Fに示される構成において、互いに直接連結された2つのDエレメントを含む。したがって、いくつかの態様において、DDエレメントは、SEQ ID NO: 14の核酸配列を有する。いくつかの態様において、DDエレメントは、SEQ ID NO: 14の核酸配列と80%、82.5%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、または100%相同的である。

【0152】

他の態様において、本発明のDDエレメントは、5'Dエレメントを3'Dエレメントから分離する少なくとも1つの付加的なエレメント、例えば、1つもしくは複数のAエレメント；1つもしくは複数のBエレメント；および／または1つもしくは複数のCエレメントなどを有し、これらは任意の適切な順序で配置されてよい。例えば、いくつかの態様において、DDエレメントは、5'→3'配置で機能的に連結された (i) 5'Dエレメント（すなわち、SEQ ID NO: 1、19、21、23、25、27、29、38、または40のうちのいずれか1つの核酸配列と少なくとも80%の相同性（例えば、80%、85%、90%、95%、または100%の相同性）を有する核酸配列）；(ii) 1つまたは複数の内部核酸（例えば、非異種核酸）、および (iii) 3'Dエレメント（すなわち、SEQ ID NO: 8、20、22、24、26、28、30、39、または41のうちのいずれか1つの核酸配列と少なくとも80%の相同性（例えば、80%、85%、90%、95%、または100%の相同性）を有する核酸配列）を含む。いくつかの態様において、(ii) の1つまたは複数の核酸は、1~125個の核酸、2~100個の核酸、5~80個の核酸、または10~50個の核酸、例えば、1~20個の核酸、20~40個の核酸、40~60個の核酸、60~80個の核酸、80~100個の核酸、または100~125個の核酸、例えば、1~5個の核酸、5~10個の核酸、10~15個の核酸、15~20個の核酸、20~25個の核酸、25~30個の核酸、30~35個の核酸、35~40個の核酸、40~45個の核酸、45~50個の核酸、50~55個の核酸、55~60個の核酸、60~65個の核酸、65~70個の核酸、70~75個の核酸、75~80個の核酸、80~85個の核酸、85~90個の核酸、90~95個の核酸、95~100個の核酸、100~105個の核酸、105~110個の核酸、110~115個の核酸、115~120個の核酸、120~125個の核酸、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、または125個の核酸である。

【0153】

いくつかの態様において、DDエレメントは、2つのAエレメント（例えば、5'Aエレメント（例えば、SEQ ID NO: 2）および3'Aエレメント（例えば、SEQ ID NO: 7））、2つのBエレメント（例えば、5'Bエレメント（例えば、SEQ ID NO: 5）および3'Bエレメント（例えば、SEQ ID NO: 6））、ならびに2つのCエレメントに加えて、2つのDエレメント（例えば、5'Dエレメント（例えば、SEQ ID NO: 1、19、21、23、25、27、29、38、または40）および3'Dエレメント（例えば、SEQ ID NO: 8、20、22、24、26、28、30、39、または41））、例えば、SEQ ID NO: 1~8を含む。SEQ ID NO: 1~8の核酸配列は、例えば図6Aに示されるように、5'から3'方向に順に機能的に連結されてよい。したがって、いくつかの態様において、DDエレメントはSEQ ID NO: 9の核酸配列を含む。あるいは、SEQ ID NO: 1~8は、任意の適切な順序で機能的に連結され得る。例えば、いくつかの態様において、DDエレメントはSEQ ID NO: 10の核酸配列を含む。特定の態様において、SEQ ID NO: 1および8（すなわち、2つのDエレメント）は、Dエレメントの内側で残りのエレメントおよび／または核酸と隣接して

いる。

【0154】

SEQ ID NO: 1~8の要素は、それぞれ互いに直接連結され得るか、または間接的に連結（例えば、機能的に連結）され得、例えば、SEQ ID NO: 1~8は、5'から3'方向に機能的に連結され得る。あるいは、図6Aおよび6Bに示されるように、1つまたは複数の機能的に連結された要素を分離する1つまたは複数の核酸が存在してもよい。いくつかの態様において、DD要素は、5'D要素と3'D要素との間に（例えば、要素の以下の対：5'D要素と5'A要素、5'D要素と5'B要素、5'D要素と3'B要素、5'D要素と5'C要素、5'D要素と3'C要素、5'D要素と3'A要素、5'D要素と3'D要素、5'A要素と5'B要素、5'A要素と3'B要素、5'A要素と5'C要素、5'A要素と3'C要素、5'A要素と3'A要素、5'A要素と3'D要素、5'B要素と3'B要素、5'B要素と5'C要素、5'B要素と3'C要素、5'B要素と3'A要素、5'B要素と3'D要素、3'B要素と5'C要素、3'B要素と3'C要素、3'B要素と3'A要素、3'B要素と3'D要素、5'C要素と3'C要素、5'C要素と3'A要素、5'C要素と3'D要素、3'C要素と3'A要素、3'C要素と3'D要素、または3'A要素と3'D要素のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の間に）配置された1~100個の付加的な核酸（例えば、3~50個の核酸、例えば、3~10個の核酸、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個、またはそれ以上の付加的な核酸）を含む。

10

20

【0155】

付加的な核酸は、例えば、図6Aおよび6BにおけるAhdI部位によって示されるように、制限部位として役立ち得る。

【0156】

いくつかの態様では、要素A、B、またはC（例えば、SEQ ID NO: 2~7）のうちの1つまたは複数が存在しない。例えば、図6Cは、B要素のないAAV2由来のDD要素を示す。したがって、いくつかの態様において、本発明のDD要素は、SEQ ID NO: 11と80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を有してよい。同様に、図6Dは、C要素のないDD要素を示す。したがって、いくつかの態様において、本発明のDD要素は、SEQ ID NO: 12と80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を有してよい。いくつかの態様において、DD要素は、図6Eに示されるように、B要素もC要素も含まない。したがって、いくつかの態様において、本発明のDD要素は、SEQ ID NO: 13と80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を有してよい。

30

【0157】

あるいは、要素A、B、またはC（例えば、SEQ ID NO: 2~7）のうちの1つまたは複数は、その3'A要素の代わりに異なる核酸配列を有する適切なDD要素を示す図6Gのように、異なる核酸配列で置換されもよい。したがって、いくつかの態様において、DD要素はSEQ ID NO: 1~3および8を含む。いくつかの態様において、本発明のDD要素は、SEQ ID NO: 15と80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を有してよい。

40

【0158】

いくつかの態様では、1つまたは複数の（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上の）核酸が、2つの隣接する要素の間で重複する。例えば、第1要素の3'末端の1つまたは複数の核酸が、その3'末端に連結された第2要素の5'末端の1つまたは複数の核酸と一致する場合のいくつかの態様において、重複する核酸

50

は反復される必要はない。そのようなDDエレメントの例は図6Hに示されており、この場合、5'Cエレメントの3'末端が3'Aエレメントの5'末端と重複している。したがって、いくつかの態様において、本発明のDDエレメントは、SEQ ID NO: 16と80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の相同性を有する核酸配列を有してよい。

【0159】

5'Dエレメントと3'Dエレメントとの間の核酸配列は、5'もしくは3'Aエレメント、5'もしくは3'Bエレメント、または5'もしくは3'Cエレメントのうちの任意の1つまたは複数の部分であってよい。特定の態様において、DDエレメントは、図6Iおよび6Jに示されるように、1つまたは複数の部分的Aエレメントを含む。部分的Aエレメントは、SEQ ID NO: 2または7と6個またはそれ以上の連続した一致する核酸（例えば、6～40個、8～35個、10～30個、または15～25個、例えば、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、または40個の連続した一致する核酸）を有する核酸配列を含み得る。いくつかの態様において、本発明のDDエレメントは、SEQ ID NO: 17と80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の相同性を有する核酸配列を有してよい。いくつかの態様において、本発明のDDエレメントは、SEQ ID NO: 18と80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の相同性を有する核酸配列を有してよい。

【0160】

AAV2由来のDDエレメントおよびそのサブエレメントの例示的な核酸配列を、以下の表2に提供する。

【0161】

（表2）DDエレメントおよびそのサブエレメントの例示的な核酸配列

SEQ ID NO:	種類	配列
1	5'Dエレメント	AGGAACCCCTAGTGATGGAG
2	5'Aエレメント	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTDGCTCGCTCACTGAGGC
3	5'Cエレメント	CGCCCGGGC
4	3'Cエレメント	GCCCGGGCG
5	5'Bエレメント	CGGGCGACC
6	3'Bエレメント	GGTCGCCCCG
7	3'Aエレメント	GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA
8	3'Dエレメント	CTCCATCACTAGGGGTTTCCT
9	標準DD (フロップ)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
10	標準DD (フリップ)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACG CCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
11	BB欠失	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC CATCACTAGGGGTTTCCT

12	CC欠失	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCC ATCACTAGGGGTTTCCT
13	BBCC 欠失	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
14	BBCCAA 欠失	AGGAACCCCTAGTGATGGAGCTCCATCACTAGGGGTTTCCT
15	クローン: T88-16	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
16	クローン: 302A-12	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTC CT
17	クローン: 304B-68	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
18	クローン: 307A-9	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTTCCT

10

20

【0162】

異種遺伝子

本発明のベクター（例えば、DDエレメントを含む、環状構造を有する、またはその両方であるDNAベクター）のいずれかを使用して、異種遺伝子を標的細胞に挿入することができる。本明細書において開示されるように、本発明のベクターによって、広範囲の異種遺伝子を標的細胞に送達することができる。いくつかの態様において、異種遺伝子は、異種遺伝子、例えば、例えば標的細胞および／または対象において欠陥があるかまたは存在しないタンパク質などの治療用タンパク質をコードする遺伝子の発現によって処置される疾患に関連する変異を有する標的細胞にトランスフェクトするように構成される。

30

【0163】

そのような例において、異種遺伝子は、眼球タンパク質、例えば、CEP290、ABCA4、ABCC6、RIMS1、LRP5、CC2D2A、TRPM1、C3、IFT172、COL11A1、TUBGCP6、KIAA1549、CACNA1F、SNRNP200、RP 1、MYO7A、PRPF8、VCAN、USH2A、およびHMCN1などのすべてまたは一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）をコードし得る。他の例示的な治療用タンパク質には、増殖因子、インターロイキン、インターフェロン、抗アポトーシス因子、サイトカイン、抗糖尿病因子、抗アポトーシス剤、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、神経保護因子、またはニューロトロフィンからなる群より選択される1つまたは複数のポリペプチドが含まれる。治療用タンパク質には、BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-CSF、GM-CSF、ゴナドトロピン、IFN、IFN- α 、IFN- γ 、IFG-1、M-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、TGF-B2、TNF、プロラクチン、ソマトトロピン、XIAP1、I-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-10、ウイルス性IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、および／またはIL-18が

40

50

含まれ得る。

【0164】

異種遺伝子は、神経保護因子、例えば、Kifap3、Bcl-xl、Crmp1、Chk.beta.、CALM2、Caly、NPG11、NPT1、Eef1a1、Dhps、Cd151、Morf412、CTGF、LDH-A、At11、NPT2、Ehd3、Cox5b、Tuba1a、 γ -アクチン、Rpsa、NPG3、NPG4、NPG5、NPG6、NPG7、NPG8、NPG9、およびNPG10などのすべてまたは一部をコードし得る。例示的なニューロトロフィンは、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、およびCNTFである。

【0165】

いくつかの例において、異種遺伝子は、眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する。

【0166】

血液凝固障害の処置のための異種遺伝子には、フィブリノーゲン、プロトロンビン、トロンボプラスチン、第V因子、第VII因子（例えば、第VIIa因子）、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォン・ウィルブランド因子からなる群より選択される1つまたは複数の凝固因子などの、凝固因子または凝固因子のセットにおける欠陥を修正する遺伝子が含まれる。いくつかの例において、異種遺伝子は、フィブリノーゲン、プロトロンビン、トロンボプラスチン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォン・ウィルブランド因子をコードする。例えば、いくつかの例において、フィブリノーゲンをコードする異種遺伝子は、FGA、FGB、またはFGGであり；プロトロンビンをコードする異種遺伝子は、F2であり；第V因子をコードする異種遺伝子は、F5であり；第VII因子をコードする異種遺伝子は、F7であり；第VIII因子をコードする異種遺伝子は、F8であり；第IX因子をコードする異種遺伝子は、F9であり；第X因子をコードする異種遺伝子は、F10であり；第XII因子をコードする異種遺伝子は、F11であり；第XII因子をコードする異種遺伝子は、F12であり；第XIII因子をコードする異種遺伝子は、F13AまたはF13Bである。いくつかの例において、異種遺伝子は、LMAN1またはMCFD2である。あるいは、異種遺伝子は、前述の凝固因子のいずれかの翻訳後修飾に関与する酵素をコードし得る。

【0167】

本発明のベクターの一部として、関心対象のポリペプチドをコードする他の異種遺伝子を含めることができ、これには、例えば、トランスジェニック動物の成長を促進するための成長ホルモン、またはインスリン様増殖因子(IGF)、 α -アンチトリプシン、エリスロポエチン(EPO)、血液凝固系の第VIII因子、第IX因子、第X因子、および第XI因子、LDL受容体、GATA-1、等が含まれる。核酸配列には、例えばアポトーシスまたはアポトーシス関連酵素をコードする自殺遺伝子、およびAIF、Apaf（例えば、Apaf-1、Apaf-2、またはApaf-3）、APO-2(L)、APO-3(L)、アポパイン、Bad、Bak、Bax、Bcl-2、Bcl-x.sub.L、Bcl-x.sub.S、bik、CAD、カルパイン、カスパーゼ、例えば、カスパーゼ-1、カスパーゼ-2、カスパーゼ-3、カスパーゼ-4、カスパーゼ-5、カスパーゼ-6、カスパーゼ-7、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9、カスパーゼ-10、カスパーゼ-11、またはグランザイムB、ced-3、ced-9、セラミド、c-Jun、c-Myc、CPP32、crm A、シトクロムc、D4-GDP-DI、Daxx、CdR1、DcR1、DD、DED、DISC、DNA-PK.sub.CS、DR3、DR4、DR5、FADD/MORT-1、FAK、Fas、FasリガンドCD95/fas（受容体）、FLICE/MACH、FLIP、フォドリン、fos、G-アクチン、Gas-2、ゲルゾリン、グルココルチコイド/グルココルチコイド受容体、グランザイムA/B、hnRNP C1/C2、ICAD、ICE、JNK、ラミンA/B、MAP、MCL-1、Mdm-2、MEKK-1、MORT-1、NEDD、NF- κ B、NuMa、p53、PAK-2、PARP、パーフォリン、PITSLRE、PKC- δ 、pRb、プレセニリン、prICE、RAIDD、Ras、RIP、スフィンゴミエリナーゼ、SREBP、単純ヘルペス由来のチミジンキナーゼ、TNF- α 、TNF- α 受容体、TRADD、TRAF2

、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、トランスグルタミナーゼ、U1 70 kDa snRNP、YAMA、等を含む遺伝子が含まれ得る。

【0168】

いくつかの態様において、異種遺伝子は、抗体、またはその一部、断片、もしくは変種をコードする。抗体には、抗原に結合し得る断片、例えば、Fv、一本鎖Fv (scFv)、Fab、Fab'、di-scFv、sdAb (単ドメイン抗体)、および (Fab')₂ (化学的に連結されたF(ab')₂を含む) が含まれる。抗体のパパイン消化によって、それぞれが単一の抗原結合部位を有する、「Fab」断片と称される2つの同一の抗原結合断片、およびその名称が容易に結晶化するその能力を反映する残りの「Fc」断片が生じる。ペプシン処理によって、2つの抗原結合部位を有し、なお抗原を架橋し得るF(ab')₂断片が得られる。抗体には、キメラ抗体およびヒト化抗体もまた含まれる。さらに、本明細書において提供されるすべての抗体構築物について、他の生物からの配列を有する変種もまた企図される。したがって、抗体のヒトバージョンが開示される場合、当業者は、ヒト配列に基づく抗体をどのようにマウス、ラット、ネコ、イヌ、ウマ、等の配列に変換するかを認識するであろう。抗体断片には、一本鎖scFv、タンデムdi-scFv、ダイアボディ、タンデムtri-sdscFv、ミニボディ、等のいずれかの配向性も含まれる。抗体がscFvである場合などのいくつかの態様において、異種遺伝子の単一ポリヌクレオチドは、共に連結された重鎖および軽鎖の両方を含む単一ポリペプチドをコードする。抗体断片には、ナノボディ (例えば、sdAb、一対の重鎖可変ドメインなどの単一の単量体ドメインを有し、軽鎖のない抗体) もまた含まれる。多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体、三重特異性抗体、等) が当技術分野で公知であり、本発明の異種遺伝子の発現産物として企図される。

10

20

【0169】

いくつかの態様において、異種遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子 (例えば、細胞周期の特定の段階への進行を制御する細胞内タンパク質をコードする遺伝子 (例えば、RB1)) ; 細胞増殖を阻害する、分泌ホルモンもしくは発生シグナルに対する受容体もしくはシグナルトランスデューサーをコードする遺伝子 (例えば、大腸腺腫症 (APC)) ; DNA損傷もしくは染色体欠陥に応答して細胞周期停止を誘発するチェックポイント制御タンパク質をコードする遺伝子 (例えば、乳がん1型感受性タンパク質 (BRCA1)、p16 (INK4)、もしくはp14 (ARF)) ; アポトーシスを誘導するタンパク質をコードする遺伝子 (例えば、PUMA、NOXA、およびBIM) ; または、DNAにおける誤りの修復に関与するタンパク質をコードする遺伝子 (例えば、DNAミスマッチ修復タンパク質2 (MSH2)) のすべてまたは一部をコードする。

30

【0170】

いくつかの態様において、異種遺伝子は、転写因子 (例えば、マスターレギュレーター、例えば、疾患に関連するマスターレギュレーター) の機能喪失のすべてまたは一部をコードする。いくつかの態様において、異種遺伝子は、TSHZ2、HOXA2、MEIS2、HOXA3、HAND2、HOXA5、TBX18、PEG3、GLI2、CLOCK、HNF4A、VHL/HIF、WT-1、GSK-3、SPINT2、SMAD2、SMAD3、またはSMAD4である。いくつかの態様において、異種遺伝子は、エピジェネティックレギュレーターのすべてまたは一部をコードする。いくつかの態様において、エピジェネティックレギュレーターは、例えば、SETDB1、PRMT5などのヒストンメチルトランスフェラーゼである。いくつかの態様において、エピジェネティックレギュレーターは、例えば、ヒストンリジンデメチラーゼ (KDM) などのヒストンデメチラーゼである。いくつかの態様において、エピジェネティックレギュレーターは、ヒストンアセチラーゼ (HDAC) である。いくつかの態様において、エピジェネティックレギュレーターは、DNAメチルトランスフェラーゼ (DNMT) である。いくつかの態様において、エピジェネティックレギュレーターは、DNAデメチラーゼ (例えば、TET1-3) である。

40

【0171】

いくつかの態様において、異種遺伝子はレポーター配列を含み、これは、例えば特定の細胞および組織における異種遺伝子の発現を検証するのに有用であり得る。導入遺伝子に

50

提供され得るレポーター配列には、非限定的に、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ (LacZ)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、および当該技術分野で周知の他のものをコードするDNA配列が含まれる。レポーター配列は、それらの発現を駆動する調節エレメントと関連している場合、酵素アッセイ、放射線アッセイ、比色アッセイ、蛍光アッセイ、または他の分光学的アッセイ、蛍光活性化細胞選別アッセイ、ならびに酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、および免疫組織化学的検査を含む免疫学的アッセイを含む、従来手段によって検出可能なシグナルを提供する。例えば、マーカー配列がLacZ遺伝子である場合、そのシグナルを保有するベクターの存在は、 β -ガラクトシダーゼ活性のアッセイによって検出される。導入遺伝子が緑色蛍光タンパク質またはルシフェラーゼである場合、そのシグナルを保有するベクターは、ルミノメーターで色または光の生成により視覚的に測定され得る。

10

20

30

40

50

【0172】

いくつかの態様において、異種遺伝子はコード配列を含まない。shRNA、プロモーター、エンハンサー、DNAを標識するための配列 (例えば、抗体認識のため)、PCR増幅部位、制限酵素部位を規定する配列、部位特異的リコンビナーゼ認識部位、核酸に結合するおよび／または核酸を修飾するタンパク質によって認識される配列、ならびにリンカーなどの非コード配列をベクターに含めてもよい。異種遺伝子がトランススプライシング分子である例では、非コード配列は、標的イントロンと結合する結合ドメインを含む。いくつかの態様において、異種遺伝子は結合ドメイン (例えば、結合ドメイン、例えば、トランススプライシング分子のpre-mRNA結合部分) を含む。

【0173】

いくつかの態様において、異種遺伝子は、0.1 Kb~100 Kb長である (例えば、異種遺伝子は、0.2 Kb~90 Kb、0.5 Kb~80 Kb、1.0 Kb~70 Kb、1.5 Kb~60 Kb、2.0 Kb~50 Kb、2.5 Kb~45 Kb、3.0 Kb~40 Kb、3.5 Kb~35 Kb、4.0 Kb~30 Kb、4.5 Kb~25 Kb、4.6 Kb~24 Kb、4.7 Kb~23 Kb、4.8 Kb~22 Kb、4.9 Kb~21 Kb、5.0 Kb~20 Kb、5.5 Kb~18 Kb、6.0 Kb~17 Kb、6.5 Kb~16 Kb、7.0 Kb~15 Kb、7.5 Kb~14 Kb、8.0 Kb~13 Kb、8.5 Kb~12.5 Kb、9.0 Kb~12.0 Kb、9.5 Kb~11.5 Kb、または10.0 Kb~11.0 Kb長、例えば、0.1 Kb~0.5 Kb、0.5 Kb~1.0 Kb、1.0 Kb~2.5 Kb、2.5 Kb~4.5 Kb、4.5 Kb~8 Kb、8 Kb~10 Kb、10 Kb~15 Kb、15 Kb~20 Kb長、またはそれ以上、例えば0.1 Kb~0.25 Kb、0.25 Kb~0.5 Kb、0.5 Kb~1.0 Kb、1.0 Kb~1.5 Kb、1.5 Kb~2.0 Kb、2.0 Kb~2.5 Kb、2.5 Kb~3.0 Kb、3.0 Kb~3.5 Kb、3.5 Kb~4.0 Kb、4.0 Kb~4.5 Kb、4.5 Kb~5.0 Kb、5.0 Kb~5.5 Kb、5.5 Kb~6.0 Kb、6.0 Kb~6.5 Kb、6.5 Kb~7.0 Kb、7.0 Kb~7.5 Kb、7.5 Kb~8.0 Kb、8.0 Kb~8.5 Kb、8.5 Kb~9.0 Kb、9.0 Kb~9.5 Kb、9.5 Kb~10 Kb、10 Kb~10.5 Kb、10.5 Kb~11 Kb、11 Kb~11.5 Kb、11.5 Kb~12 Kb、12 Kb~12.5 Kb、12.5 Kb~13 Kb、13 Kb~13.5 Kb、13.5 Kb~14 Kb、14 Kb~14.5 Kb、14.5 Kb~15 Kb、15 Kb~15.5 Kb、15.5 Kb~16 Kb、16 Kb~16.5 Kb、16.5 Kb~17 Kb、17 Kb~17.5 Kb、17.5 Kb~18 Kb、18 Kb~18.5 Kb、18.5 Kb~19 Kb、19 Kb~19.5 Kb、19.5 Kb~20 Kb、20 Kb~21 Kb、21 Kb~22 Kb、22 Kb~23 Kb、23 Kb~24 Kb、24 Kb~25 Kb長、またはそれ以上、例えば、約4.5 Kb、約5.0 Kb、約5.5 Kb、約6.0 Kb、約6.5 Kb、約7.0 Kb、約7.5 Kb、約8.0 Kb、約8.5 Kb、約9.0 Kb、約9.5 Kb、約10 Kb、約11 Kb、約12 Kb、約13 Kb、約14 Kb、約15 Kb、約16 Kb、約17 Kb、約18 Kb、約19 Kb、長さ約20 Kb長、またはそれ以上である)。

【0174】

いくつかの態様において、異種遺伝子は、少なくとも1,100 bp長 (例えば、1,100 bp~10,000 bp、1,100 bp~8,000 bp、または1,100 bp~5,000 bp長) である。

【0175】

いくつかの態様において、異種遺伝子は、少なくとも2,500 bp長（例えば、2,500 bp～10,000 bp、2,500 bp～8,000 bp、または2,500 bp～5,000 bp長）である。例えば、特定の態様において、異種遺伝子は、タンパク質をコードするのに十分大きく、オリゴヌクレオチド療法ではない（例えば、アンチセンス、siRNA、shRNA療法などではない）。

【0176】

制御エレメント

末端反復配列（例えば、DDエレメント）および異種遺伝子に加えて、本発明のDNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター）は、標的細胞における転写、翻訳、および/または発現を可能にする様式で異種遺伝子に機能的に連結されている、必要な従来の制御エレメントを含み得る。

【0177】

発現制御配列には、適切な転写開始、終止、プロモーター、およびエンハンサー配列；効率的なRNAプロセシングシグナル、例えば、スプライシングおよびポリアデニル化（ポリA）シグナルなど；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を高める配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を高める配列；ならびにコードされる産物の分泌を高める配列が含まれる。天然、構成的、誘導性、および/または組織特異的であるプロモーターを含む様々な発現制御配列が当技術分野で公知であり、本発明の一部として利用され得る。プロモーター領域がその遺伝子の転写に影響を及ぼすことができ、その結果、結果として生じた転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳され得る場合、プロモーター領域は異種遺伝子に機能的に連結されている。本明細書に記載されるDNAベクターの一部として有用なプロモーターには、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターが含まれる。構成的プロモーターの例には、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（任意にCMVエンハンサーを伴う）、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（任意にRSVエンハンサーを伴う）、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター、およびEF1 α プロモーターが含まれる。

【0178】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外因的に供給される化合物、温度などの環境因子、もしくは特定の生理学的状態の存在、例えば、急性期、細胞の特定の分化状態により、または複製細胞においてのみ調節され得る。誘導性プロモーターおよび誘導系は、種々の商業的供給源から入手可能である。他の多くの系が記載されており、当業者によって容易に選択され得る。外因的に供給されるプロモーターによって調節される誘導性プロモーターの例には、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン（MT）プロモーター、デキサメタゾン誘導性マウス乳癌ウイルスプロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制系、テトラサイクリン誘導系、RU486誘導系、およびラパマイシン誘導系が含まれる。この文脈で有用であり得るさらに他の種類の誘導性プロモーターは、特定の生理学的状態、例えば、温度、急性期、細胞の特定の分化状態により、または複製細胞においてのみ調節されるものである。

【0179】

別の態様では、異種遺伝子の天然プロモーターが使用される。異種遺伝子の発現が天然発現を模倣することが望ましい場合、天然プロモーターが好ましいと考えられる。異種遺伝子の発現が、時間的もしくは発生的に、または組織特異的な様式で、または特定の転写刺激に応答して調節されなければならない場合、天然プロモーターが使用され得る。さらなる態様では、天然発現を模倣するために、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位、またはコザックコンセンサス配列などの他の天然の発現制御エレメントもまた使用され得る。

【0180】

タンパク質をコードする異種遺伝子に関して、ポリアデニル化（pA）配列は、異種遺伝子の後かつ末端反復配列の前に挿入され得る。本開示において有用な異種遺伝子はまた

10

20

30

40

50

、望ましくはプロモーター／エンハンサー配列と異種遺伝子との間に位置するイントロンを含み得る。イントロンおよび他の一般的なベクターエレメントの選択は慣習的であり、多くのそのような配列が利用可能である。

【0181】

宿主細胞における遺伝子発現に必要な調節配列の正確な性質は、種、組織、または細胞型によって変動し得るが、一般に、必要に応じて、それぞれ転写および翻訳の開始に関する5'非転写配列および5'非翻訳配列、例えば、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列、エンハンサーエレメント、および同様のものなどを含むものとする。特に、そのような5'非転写調節配列は、機能的に連結された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。調節配列はまた、所望により、エンハンサー配列または上流の活性化配列を含み得る。本開示のベクターは、任意に、5'リーダー配列またはシグナル配列を含み得る。

【0182】

III. 生成の方法

合成DNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および／またはDDエレメントを有するDNAベクター）を生成する方法が、本明細書において提供される。特に、本明細書において提供される方法は、細菌細胞合成によるのではなく、（例えば、細胞の非存在下（すなわち、無細胞）での）インビトロ合成を伴い、これは、細菌由来のベクターと比べて、得られるDNAベクターのより高純度な組成物を提供し、かつ、より早くてより効率的な合成を可能にする。DNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および／またはDDエレメントを含むDNAベクター）の無細胞合成は、ファージポリメラーゼ（例えば、Phi29ポリメラーゼ）などのポリメラーゼを使用する効果的な複製に依存する。いくつかの態様において、Phi29ポリメラーゼは、DDエレメントなどの末端反復配列の複製を処理するのに特に有用である。本明細書で用いられるポリメラーゼは、GCリッチな残基による高い処理能力を有する好熱性ポリメラーゼであってよい。いくつかの態様において、DDエレメントを複製（例えば、増幅）するために用いられるポリメラーゼは、Phi29ポリメラーゼである。本発明のDNAベクターを生成する特定の方法は、以下の実施例に詳細に記載されている。

【0183】

一般に、本発明のDNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター）の生成は、異種遺伝子および末端反復配列（例えば、DDエレメント）を有するAAVゲノム（例えば、rAAVゲノム）を含む環状DNA分子を有する試料を提供することから始めることができる。例えば、試料は、AAVベクター（例えば、rAAVベクター）に感染した細胞（例えば、哺乳動物細胞）からの溶解物または他の調製物であってよい。二本鎖環状DNAは、標準的なDNA抽出／単離技法を用いて細胞から得ることができる。いくつかの態様では、例えばplasmid-safe DNaseを用いて線状DNAを特異的に分解して、環状DNAを精製する。

【0184】

次に、DNAをポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ、例えば、Phi29 DNAポリメラーゼ；TempliPhiキット、GE Healthcare）、プライマー（例えば、ランダムプライマー、例えば、ランダムヘキサマープライマー）、ならびにヌクレオチド混合物（例えば、dNTP、例えば、dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP）と共にインキュベートすることにより、AAVゲノムを有する二本鎖環状DNAをインビトロで、無細胞調製物中で増幅することができる。いくつかの態様では、ヌクレオチド混合物は天然ヌクレオチド混合物である（すなわち、ヌクレオチドアナログを実質的に欠いている）。ポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ、例えば、Phi29ポリメラーゼ）は、ローリングサークル増幅（例えば、等温ローリングサークル増幅）によってAAVゲノム（例えば、インタクトな末端反復配列、例えばDDエレメントを含むAAVゲノム）を増幅して、複数のAAVゲノムコピーを有する線状コンカテマーを作製する。適切なポリメラーゼには、好熱性ポリメラーゼ、およびGCリッチな残基による高い処理能力を特徴とするポリメラー

ゼが含まれる。

【0185】

結果として生じたコンカテマーを制限酵素を用いて消化してゲノム内で1回切断し、異種遺伝子および末端反復配列（例えば、DDエレメント）を含む単位長線状AAVゲノムを作製することができる。（例えば、DNAリガーゼの添加による）この線状DNA分子の自己ライゲーションにより、異種遺伝子と、任意で、インタクトな末端反復配列（例えば、DDエレメント）とを備えた、本発明の環状の合成DNAベクターが得られる。あるいは、自己ライゲーションの前に、公知の技法に従って線状DNA分子をプラスミドベクターにクローニングし、以下の実施例において例証されるように、最終的なDNAベクター（例えば、本明細書に記載されるような環状ベクター、および／またはDD含有DNAベクター）を形成するための自己ライゲーションの前に特徴づけることができる。

10

【0186】

ゲノムの複製および増幅は、無細胞条件下でポリメラーゼを用いて実施可能であるため、合成DNAベクターを、それがクローニングされたプラスミドの細菌成分から単離することができ、細菌CpGモチーフおよび／またはdamもしくはdcmメチル化などの細菌シグネチャーは、単離されたベクターには存在しない。

【0187】

IV. 薬学的組成物

薬学的に許容される担体中に、本明細書に記載されるDNAベクター（例えば、合成DNAベクター）（例えば、DDエレメントを含むDNAベクター、および／または上記の環状DNAベクター）のいずれかを含む薬学的組成物が、本明細書において提供される。本明細書に記載される薬学的組成物は、ウイルス粒子、ウイルスキャプシドタンパク質、またはそのペプチド断片などの混入物を実質的に欠いている。いくつかの態様において、本明細書において提供される薬学的組成物は、非免疫原性である。例えば、非免疫原性の薬学的組成物は、自然免疫系の細胞によって認識可能な病原体関連分子パターンを実質的に欠いている可能性がある。そのような病原体関連分子パターンには、CpGモチーフ（例えば、非メチル化CpGモチーフまたは低メチル化CpGモチーフ）、エンドトキシン（例えば、リポ多糖（LPS）、例えば、細菌LPS）、フラジェリン、リポテイコ酸、ペプチドグリカン、および二本鎖RNAなどのウイルス核酸分子が含まれる。

20

【0188】

本明細書に記載される薬学的組成物は、従来法により混入について評価し、適切な投与経路を意図した薬学的組成物に製剤化することができる。DNAベクターを含むさらに他の組成物を、適切な担体と共に、同様に製剤化してもよい。そのような製剤化は、特に標的細胞への投与を対象にした、薬学的および／または生理学的に許容されるビヒクルまたは担体の使用を伴う。1つの態様において、標的細胞への投与に適した担体には、緩衝生理食塩水、等張塩化ナトリウム溶液、またはpHを適切な生理学的レベルに維持するための他の緩衝液、例えばHEPES、および任意に、他の薬剤、薬学的物質、安定剤、緩衝液、担体、補助剤、または希釈剤が含まれる。

30

【0189】

いくつかの態様において、担体は注射用液である。例示的な生理学的に許容される担体には、無菌でパイロジェンフリーの水および無菌でパイロジェンフリーのリン酸緩衝生理食塩水が含まれる。種々のそのような公知の担体は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,629,322号に提供されている。1つの態様において、担体は等張塩化ナトリウム溶液である。別の態様において、担体は平衡塩溶液である。1つの態様において、担体にはtweenが含まれる。ベクターを長期間貯蔵しようとする場合には、それをグリセロールまたはTween20の存在下で凍結することができる。

40

【0190】

他の態様において、本明細書に記載されるベクターを含む組成物は、界面活性剤を含む。ブルロニックF68（ポロキサマー188、LUTROL（登録商標）F68としても公知である）などの有用な界面活性剤は、AAVが不活性表面に付着するのを防ぎ、従って所望の

50

用量の送達を確実にするため、これを含めてもよい。担体は、等張塩化ナトリウム溶液であり、界面活性剤プルロニックF68を含む。

【0191】

本開示の組成物を適切な宿主細胞に導入するために、リポソーム、ナノ粒子、微粒子、マイクロスフェア、脂質粒子、小胞、および同様のものなどの送達ビヒクルを使用することができる。特に、DNAベクターは、脂質粒子、リポソーム、小胞、またはナノ粒子中に封入することにより、送達用に製剤化することができる。いくつかの態様において、DNAベクターは、ポロキサマーおよび／またはポリカチオン性物質などの送達ビヒクルと複合化される。

【0192】

本発明のDNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および／またはDDエレメントを含むDNAベクター）のいずれかを有する薬学的組成物は、10 μg～10 mgのDNA（例えば、25 μg～5.0 mg、50 μg～2.0 mg、または100 μg～1.0 mgのDNA、例えば、10 μg～20 μg、20 μg～30 μg、30 μg～40 μg、40 μg～50 μg、50 μg～75 μg、75 μg～100 μg、100 μg～200 μg、200 μg～300 μg、300 μg～400 μg、400 μg～500 μg、500 μg～1.0 mg、1.0 mg～5.0 mg、または5.0 mg～10 mgのDNA、例えば、約10 μg、約20 μg、約30 μg、約40 μg、約50 μg、約60 μg、約70 μg、約80 μg、約90 μg、約100 μg、約150 μg、約200 μg、約250 μg、約300 μg、約350 μg、約400 μg、約450 μg、約500 μg、約600 μg、約700 μg、約750 μg、約1.0 mg、約2.0 mg、約2.5 mg、約5.0 mg、約7.5 mg、または約10 mgのDNA）の量を含む単位用量を含み得る。

【0193】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、少なくとも約0.01重量%のDNAベクターを含む。例えば、薬学的組成物は、0.01重量%～80重量%のDNAベクター（例えば、0.05重量%～50重量%、0.1重量%～10重量%、0.5重量%～5重量%、または1重量%～2.5重量%のDNAベクター、例えば、0.01重量%～0.05重量%、0.05重量%～0.1重量%、0.1重量%～0.5重量%、0.5重量%～1.0重量%、1.0重量%～2重量%、2重量%～3重量%、3重量%～5重量%、5重量%～10重量%、10重量%～20重量%、または20重量%～50重量%のDNAベクター）を含み得る。

【0194】

本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載される合成環状DNAベクターのいずれかを単量体型で含み得る（例えば、50%超の単量体、60%超の単量体、70%超の単量体、80%超の単量体、90%超の単量体、95%超の単量体、97%超の単量体、98%超の単量体、または99%超の単量体）。いくつかの態様において、薬学的組成物中の合成環状DNAベクター分子の70%～99.99%が単量体である（例えば、薬学的組成物中の合成環状DNAベクター分子の70%～99.9%、70%～99.5%、70%～99%、75%～99.9%、75%～99.5%、75%～99%、80%～99.9%、80%～99.5%、80%～99%、85%～99.9%、85%～99.5%、85%～99%、90%～99.9%、90%～99.5%、90%～99%、95%～99.9%、95%～99.5%、または95%～99%が単量体である、例えば、薬学的組成物中の合成環状DNAベクター分子の約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%が単量体である）。

【0195】

V. 使用方法

本明細書に記載されるDNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および／もしくはDDエレメントを含むDNAベクター）またはその薬学的組成物のいずれかを対象に投与することにより、（例えば、遺伝子治療レジメンの一部として）それを必要とする対象において異種遺伝子の発現（例えば、エピソーム発現）を誘導する方法が、本明細書において提供される。異種遺伝子を含む対象の細胞は、宿主細胞の核酸配列（例えば、RNA配列、例えば、mRNA配列）をサザンブロッティングまたはPCR解析などによって調べて、ベクター中に含まれる異種遺伝子の存在についてアッセイすることに

より、特徴づけることができる。あるいは、対象における異種遺伝子の発現は、異種遺伝子に対応する標的遺伝子の欠陥または変異に関連する疾患の進行をモニターすることによって、（例えば、定量的または定性的に）特徴づけることができる。いくつかの態様において、異種遺伝子の発現（例えば、エピソーム発現）は、疾患に関連する1つまたは複数の症状の減退を観察することによって確認される。

【0196】

したがって、本発明は、本明細書に記載されるDNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および／もしくはDDエレメントを含むDNAベクター）またはその薬学的組成物のいずれかを対象に投与することにより、標的遺伝子（例えば、異種遺伝子に対応する遺伝子）の欠陥に関連する対象の疾患を処置する方法を提供する。いくつかの態様において、疾患は眼疾患である。いくつかの態様において、対象は、異種CEP290遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、レーバー先天性黒内障（LCA、例えば、LCA 10）の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種ABCA4遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、シユタルガルト病の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種ABCC6遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、弾性線維性仮性黄色腫の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種RIMS1遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、杆体錐体ジストロフィー（例えば、杆体錐体ジストロフィー7）の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種LRP5遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、滲出性硝子体網膜症の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種CC2D2A遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、ジュベール症候群の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種TRPM1遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、CSNB-1Cの処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種C3遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、加齢黄斑変性の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種IFT172遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、網膜色素変性症71の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種COL11A1遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、スティックラー症候群（例えば、スティックラー症候群2）の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種TUBGCP6遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、小頭症および網脈絡膜症の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種KIAA1549遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、網膜色素変性症（例えば、劣性RP）の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種CACNA1F遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、CSNB 2の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種MYO7A遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、アッシャー症候群（例えば、アッシャー症候群1B型）の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種VCAN遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、ワグナー症候群の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種USH2A遺伝子またはその一部（例えば、トランススプライシング分子の一部として）を有するDNAベクターを用いて、アッシャー症候群2A型の処置を受けている。いくつかの態様において、対象は、異種HMCN1遺伝子またはその一部（例えば、トランススプ

10

20

30

40

50

ライシング分子の一部として)を有するDNAベクターを用いて、AMD 1の処置を受けている。

【0197】

本発明はまた、眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される疾患または障害を処置する方法も提供する。障害は、網膜ジストロフィーである眼障害であってもよい。

【0198】

障害は、メンデル遺伝性網膜ジストロフィーであってもよい。網膜ジストロフィーは、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択されてもよい。

【0199】

障害は、神経学的障害であってもよく、該神経学的障害は、神経変性疾患である。神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、または多発性硬化症からなる群より選択されてもよい。神経変性疾患は、中枢神経系(CNS)の自己免疫疾患であってもよい。CNSの自己免疫疾患は、多発性硬化症、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群であってもよい。神経学的障害は、脳梗塞、脊髄損傷、中枢神経系障害、神経精神障害、またはチャンネル病であってもよい。神経学的障害は、てんかんまたは片頭痛から選択されるチャンネル病であってもよい。神経学的障害は、不安障害、気分障害、小児障害、認知障害、統合失調症、物質関連障害、または摂食障害であってもよい。神経学的障害は、脳梗塞、脳卒中、外傷性脳損傷、または脊髄損傷の症状であってもよい。

【0200】

リソソーム貯蔵障害は、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ニーマン・ピック病、およびムコ多糖症(MPS)からなる群より選択されてもよい。

【0201】

心血管障害は、変性心疾患、冠動脈疾患、虚血、狭心症、急性冠症候群、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、またはアテローム性動脈硬化症であってもよい。心血管障害は、虚血性心筋症、伝導疾患、および先天性欠損からなる群より選択される変性心疾患であってもよい。

【0202】

障害は、自己免疫障害である免疫障害であってもよい。自己免疫障害は、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、ループス、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群、自己免疫性肝炎、ブドウ膜炎、自己免疫性網膜症、視神経脊髄炎、乾癬性関節炎、乾癬、重症筋無力症、慢性ライム病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、末梢性ニューロパチー、線維筋痛症、橋本甲状腺炎、潰瘍性大腸炎、または川崎病であってもよい。

【0203】

疾患は、肝炎、アラジール症候群、胆道閉鎖症、肝がん、肝硬変、嚢胞性疾患、カリリ症候群、先天性肝線維症、脂肪肝、ガラクトース血症、原発性硬化性胆管炎、チロシン血症、糖原病、ウィルソン病、および内分泌欠損症からなる群より選択される肝疾患であってもよい。肝疾患は、肝細胞性過形成、肝細胞性腺腫、限局性結節性過形成、または肝細胞癌からなる群より選択される肝がんであってもよい。

【0204】

疾患は、血液がんまたは固形組織がんである、がんであってもよい。血液がんは、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、多発性骨髄腫、および非ホジキンリンパ腫であってもよい。固形組織がんは、肝がん、腎がん、乳がん、前立腺がん、胃がん、食道がん、胃がん、腸がん、結腸直腸がん、膀胱がん、頭頸

10

20

30

40

50

部がん、皮膚がん、もしくは脳がんであってもよい。

【0205】

本発明のベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および/またはDDエレメントを含むDNAベクター）のいずれかを、10 μ g～10 mgのDNA（例えば、25 μ g～5.0 mg、50 μ g～2.0 mg、または100 μ g～1.0 mgのDNA、例えば、10 μ g～20 μ g、20 μ g～30 μ g、30 μ g～40 μ g、40 μ g～50 μ g、50 μ g～75 μ g、75 μ g～100 μ g、100 μ g～200 μ g、200 μ g～300 μ g、300 μ g～400 μ g、400 μ g～500 μ g、500 μ g～1.0 mg、1.0 mg～5.0 mg、または5.0 mg～10 mgのDNA、例えば、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ g、約150 μ g、約200 μ g、約250 μ g、約300 μ g、約350 μ g、約400 μ g、約450 μ g、約500 μ g、約600 μ g、約700 μ g、約750 μ g、約1.0 mg、約2.0 mg、約2.5 mg、約5.0 mg、約7.5 mg、または約10 mgのDNA）の投薬量で対象に投与することができる

10

【0206】

いくつかの態様において、本発明のDNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および/もしくはDDエレメントを含むDNAベクター）またはその組成物の投与は、非免疫原性であるか、または他の遺伝子治療ベクター（例えば、プラスミドDNAベクターおよびウイルスベクター）の投与と比較して、対象において免疫応答を誘導する可能性が低い。ベクターの免疫原性を評価する方法は、上記されている。

【0207】

本明細書において提供される合成DNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および/またはDDエレメントを含むDNAベクター）は、上記のように、免疫応答を誘発せずに、またはAAVベクターと比較して減少した免疫応答を誘導して、標的細胞を感染させる能力に起因して、反復投与に適していると考えられる。したがって、本発明は、本明細書に記載されるベクターおよび薬学的組成物を反復投与する方法を提供する。前述の投与量のいずれかを、適切な頻度および期間で反復することができる。いくつかの態様において、対象は、1日に約2回、1日に約1回、1週間に約5回、1週間に約4回、1週間に約3回、1週間に約2回、1週間に約1回、1ヶ月に約2回、1ヶ月に約1回、6週間に約1回、2ヶ月に約1回、3ヶ月に約1回、4ヶ月に約1回、1年に2回、1年に1回、またはそれ未満の頻度で用量を受け取る。いくつかの態様において、用量の数および頻度は、標的細胞の代謝回転率に対応する。本明細書に記載されるベクターを用いてトランスフェクトされた長寿命の分裂後の標的細胞において、ベクターの単一用量は、標的細胞内で異種遺伝子の発現を実質的な期間維持するのに十分であり得ることが理解されるであろう。したがって、他の態様において、本明細書において提供されるDNAベクターは、単一用量で対象に投与してもよい。異種核酸が対象に送達される機会の数は、臨床的（例えば、治療的）利点を維持するために必要とされるものであり得る。

20

30

【0208】

本発明の方法は、任意の適切な経路を介した、DNAベクター（例えば、本明細書に記載される環状DNAベクター、および/もしくはDDエレメントを含むDNAベクター）またはその薬学的組成物の投与を含む。DNAベクターまたはその薬学的組成物は、全身にまたは局所的に、例えば、静脈内に、眼内に（例えば、硝子体内に、網膜下に、点眼により、眼球内に、眼窩内に）、筋肉内に、硝子体内に（例えば、硝子体内注射により）、皮内に、肝内に、脳内に、筋肉内に、経皮的に（percutaneously）、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、くも膜下腔内に、鼻腔内に、腔内に、直腸内に、腫瘍内に、皮下に、結膜下に、小胞内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、経口的に、局所に、経皮的に（transdermally）、吸入により、エアロゾル化により、注射により（例えば、ジェット注射により）、エレクトロポレーションにより、埋め込みにより、注入により（例えば、持続注入により）、標的細胞を直接浸す局所灌流により、カテーテルにより、洗浄により、クリーム中で、または脂質組成物中で投与することができる。

40

50

【0209】

付加的にまたは代替的に、ベクターを、個々の患者から細胞を外植するなどしてエキソビボで宿主細胞に投与し、その後、例えばベクターを組み込んだ細胞を選択した後に、宿主細胞を患者に再移植することができる。したがって、いくつかの局面において、本開示は、疾患を処置するためのトランスフェクトされた宿主細胞およびその投与方法を提供する。

【0210】

本発明は、それを必要とする対象において異種遺伝子のエピソーム発現を誘導する方法を提供する。例えば、治療用置換タンパク質（例えば、一遺伝子性治療用置換タンパク質）をコードする異種遺伝子のエピソーム発現を、置換されるタンパク質の欠陥または欠乏を有する（例えば、それにより、凝固障害、リソソーム貯蔵障害、またはタンパク質置換療法によって処置可能な任意の他の障害を引き起こす）対象において、本発明の単離されたDNAベクター（またはその組成物）（例えば、複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；組換え部位；ならびに細菌合成に関連する任意の他のエレメント（例えば、damおよびdcmメチル化パターン）を欠いている、単離された環状DNAベクター）を該対象に投与する段階によって、誘導することができる。特定の例では、第VII因子をコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、第VII因子欠乏症を有する対象において、第VII因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、第VIII因子をコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、血友病Aを有する対象において、第VIII因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、第IX因子をコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、血友病Bを有する対象において、第IX因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、第X因子をコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、第X因子欠乏症を有する対象において、第X因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、第XI因子をコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、第XI因子欠乏症を有する対象において、第XI因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、第XIII因子をコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、第XIII因子欠乏症を有する対象において、第XIII因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、フォン・ウィルブランド因子をコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、フォン・ウィルブランド病を有する対象において、フォン・ウィルブランド因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、プロテインCをコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、プロテインC欠損症を有する対象において、プロテインCをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、アンチトロンビンIIIをコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、アンチトロンビンIII欠損症を有する対象において、アンチトロンビンIIIをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、フィブリノーゲンをコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、フィブリノーゲン欠損症を有する対象において、フィブリノーゲンをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、C1エステラーゼインヒビターをコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、遺伝性血管性浮腫を有する対象において、C1エステラーゼインヒビターをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、 α -1プロテアーゼインヒビターをコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、 α 1-P1欠損症を有する対象において、 α -1プロテアーゼインヒビターをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、グルコセレブロシダーゼをコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、ゴーシェ病を有する対象において、グルコセレブロシダーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、 α -L-イズロニダーゼをコードする異種遺伝子のエピソーム発現が、ムコ多糖症Iを有する対象において

10

20

30

40

50

、 α -L-イズロニダーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、イズロン酸スルファターゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、ムコ多糖症IIを有する対象において、イズロン酸スルファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、ムコ多糖症VIを有する対象において、N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、ムコ多糖症IVAを有する対象において、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、ヘパラン硫酸スルファターゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、ムコ多糖症IIIAを有する対象において、ヘパラン硫酸スルファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、 α -ガラクトシダーゼAをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、ファブリー病を有する対象において、 α -ガラクトシダーゼAをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、 α -グルコシダーゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、ポンペ病を有する対象において、 α -グルコシダーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、酸性スフィンゴミエリナーゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、ニーマン・ピック病B型を有する対象において、酸性スフィンゴミエリナーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、アリールスファターゼ (arylsuphatase) Aをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、異染色性白質ジストロフィーを有する対象において、アリールスファターゼAをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、リソソーム酸性リパーゼ (LAL) をコードする異種遺伝子のエピソード発現が、LAL欠損症を有する対象において、リソソーム酸性リパーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、スクラーゼ・イソマルターゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、スクラーゼ・イソマルターゼ欠損症を有する対象において、スクラーゼ・イソマルターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、アデノシンデアミナーゼ (ADA) をコードする異種遺伝子のエピソード発現が、ADA欠損症を有する対象において、アデノシンデアミナーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。他の例では、インスリン様増殖因子1 (IGF-1) をコードする異種遺伝子のエピソード発現が、IGF-1欠損症 (例えば、原発性IGF-1欠損症) を有する対象において、IGF-1をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、アルカリホスファターゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、低ホスファターゼ症を有する対象において、アルカリホスファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。いくつかの例では、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼをコードする異種遺伝子のエピソード発現が、急性間欠性ポルフィリン症を有する対象において、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって誘導される。

10

20

30

40

50

【0211】

付加的にまたは代替的に、本発明は、本発明の単離されたDNAベクター (またはその組成物) (例えば、複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；組換え部位；ならびに細菌合成に関連する任意の他のエレメント (例えば、damおよびdcmメチル化パターン) を欠いている、単離された環状DNAベクター) を、疾患または障害を有する対象に投与する段階によって、該対象を処置する方法を含む。特定の例では、第VII因子欠乏症を有する対象が、第VII因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、血友病Aを有する対象が、第VIII因子をコードする

本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、血友病Bを有する対象が、第IX因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、第X因子欠乏症を有する対象が、第X因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、第XI因子欠乏症を有する対象が、第XI因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、第XIII因子欠乏症を有する対象が、第XIII因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、フォン・ウィルブランド病を有する対象が、フォン・ウィルブランド因子をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、プロテインC欠乏症を有する対象が、プロテインCをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、アンチトロンビンIII欠乏症を有する対象が、アンチトロンビンIIIをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、フィブリノーゲン欠乏症を有する対象が、フィブリノーゲンをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、遺伝性血管性浮腫を有する対象が、C1エステラーゼインヒビターをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、 α 1-P1欠損症を有する対象が、 α -1プロテアーゼインヒビターをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、ゴーシェ病を有する対象が、グルコセレブロシダーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、ムコ多糖症Iを有する対象が、 α -L-イズロニダーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、ムコ多糖症IIを有する対象が、イズロン酸スルファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、ムコ多糖症VIを有する対象が、N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、ムコ多糖症IVAを有する対象が、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、ムコ多糖症IIIAを有する対象が、ヘパラン硫酸スルファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、ファブリー病を有する対象が、 α -ガラクトシダーゼAをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、ポンペ病を有する対象が、 α -グルコシダーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、ニーマン・ピック病B型を有する対象が、酸性スフィンゴミエリナーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、異染性白質ジストロフィーを有する対象が、アリアルスファターゼAをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、LAL欠損症を有する対象が、リソソーム酸性リパーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、スクラーゼ・イソマルターゼ欠損症を有する対象が、スクラーゼ・イソマルターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、ADA欠損症を有する対象が、アデノシンデアミナーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。他の例では、IGF-1欠損症（例えば、原発性IGF-1欠損症）を有する対象が、IGF-1をコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、低ホスファターゼ症を有する対象が、アルカリホスファターゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。いくつかの例では、急性間欠性ポルフィリン症を有する対象が、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼをコードする本発明のDNAベクターを該対象に投与する段階によって処置される。

【0212】

10

20

30

40

50

評価およびモニタリング

本明細書に記載されるベクターのいずれかのトランスフェクション効率の評価は、当技術分野で公知であるかまたは本明細書に記載される任意の方法を用いて行うことができる。トランスフェクトされた細胞の単離もまた、標準的な技法に従って行うことができる。例えば、異種遺伝子を含む細胞は、異種遺伝子を含む1つまたは複数の細胞の同定および単離に役立つ、異種遺伝子の配列によってコードされる、蛍光タンパク質（例えば、GFP）または他のレポータータンパク質などの可視マーカーを発現し得る。異種遺伝子を含む細胞はまた、該遺伝子から選択可能なマーカーを発現し得る。例えば、細胞毒性物質への曝露、または通常生存に必要とされる栄養素もしくは基質の欠乏といった、ある特定の条件下での細胞の生存は、選択可能なマーカーの発現または発現の欠如に依存し得る。したがって、そのような条件下での細胞の生存または生存の欠如により、異種遺伝子を含む細胞または細胞のコロニーの同定および単離が可能になる。異種遺伝子を含む細胞はまた、宿主細胞の核酸配列（例えば、RNA配列、例えば、mRNA配列）をサザンブロットィングまたはPCR解析などによって調べて、ベクター中に含まれる異種遺伝子の存在についてアッセイすることにより、特徴づけることができる。

10

20

30

40

50

【0213】

したがって、本発明の方法は、本明細書に記載されるベクターのいずれかを対象に投与した後、続いて、対象における異種遺伝子の発現を検出することを含む。発現は、投与の1週間～4週間後、投与の1ヶ月～4ヶ月後、投与の4ヶ月～1年後、投与の1年～5年後、または投与の5年～20年後（例えば、投与の少なくとも1週間後、少なくとも2週間後、少なくとも1ヶ月後、少なくとも4ヶ月後、少なくとも1年後、少なくとも2年後、少なくとも5年後、少なくとも10年後）に検出することができる。これらの検出時点のいずれかで、DNAベクターの持続性（例えば、エピソーム持続性）が観察され得る。いくつかの態様において、環状DNAベクターの持続性は、参照ベクター（例えば、細菌内で生成されるか、または本発明のベクターには存在しない1つもしくは複数の細菌シグネチャーを有する環状ベクター）よりも、5%～50%大きい、50%～100%大きい、1倍～5倍大きい、または5倍～10倍（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上）大きい。

【0214】

以下の実施例は、本明細書に記載される態様の範囲を限定しない。当業者は、以下の実施例において、本発明の精神および範囲によって包含されることが意図される改変を行うことができることを認識するであろう。

【実施例】

【0215】

組換えAAV (rAAV) ベクターは、種々のモデル系において高効率遺伝子導入の実績が確立されており、現在、幅広いヒト疾患の治療様式として試験が行われている。動物およびヒトにおける研究により、rAAVベクターゲノムが主に環状エピソームとしてインビボで持続することが示されている。本発明は、環状DNAベクターを生成するために合成技法を用いて、そのような持続性を再現することができるという発見に基づく。動物およびヒトの両方から単離されたrAAVエピソームゲノムの分子解析により、これらの環状ゲノムが末端反復配列を含むことが明らかになる。以下の実施例のいくつかにおいて、rAAVエピソームゲノム内で同定された末端反復配列は、二重D (DD) エレメントを含み、これは、図1に示されるように、線状AAVゲノムの各末端に位置する逆位末端反復 (ITR) の組換えの結果である。細菌内で生成されたDNAは、インビボでのプラスミドおよび遺伝子発現の喪失を引き起こし得る固有の細菌シグネチャー (CpGモチーフ) ならびに細菌自体からの不純物 (エンドトキシン、細菌ゲノムDNAおよびRNA) を含むため、そのような合成DNAベクターは、細菌内で作製されたベクターと比較して、宿主における免疫原性および炎症を軽減することができる。

【0216】

実施例1. DDエレメントを有するDNAベクターの合成による生成

段階1-rAAV2-eGFPウイルスの生成およびその後の細胞形質導入

eGFPタンパク質を駆動するCMVエンハンサー／プロモーターとBGHpAシグナルからなる発現カセットに隣接するAAV2 ITRを含むプラスミドpAAV-BASIC-EGFPを入手した (Vector Biolabs、Malvern, PA)。このプラスミドをHEK293T細胞における三重トランスフェクション戦略で使用して、rAAV2-eGFPウイルスベクターを生成した。三重トランスフェクションで使用した他の2種類のプラスミドは、AAVヘルパープラスミドpRep-Cap2 (Part No. 0912; Applied Viromics、Fremont, CA) およびpHELP (Part No. 0913; Applied Viromics、Fremont, CA) であった。細胞は、リン酸カルシウムキット (Profection哺乳動物トランスフェクションシステム、Part No. TM012; Promega、Madison, WI) を用いてトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に、細胞を凍結／融解によって溶解し、ベンゾナーゼで処理して粗製ウイルス溶解物を作製した。粗製溶解物中のウイルス力価は、qPCRにより 5.3×10^{12} 個のDNase耐性粒子 (DRP)/mLと決定された。環状rAAVゲノムを作製するために、HEK293T細胞にrAAV2-eGFPウイルスを 1×10^5 の感染多重度 (MOI) で感染させた。図4はこの過程を要約している。

10

【0217】

段階2-DDエレメントを有するrAAVゲノムのクローニングおよび特徴づけ

DDエレメントを有するrAAVゲノムのクローニングおよび特徴づけの要約を、図5に示す。感染細胞を感染の7日後に収集し、DNeasy血液および組織キット (Qiagen; Germantown, MD) を用いて全細胞DNAを細胞から抽出した。残存する線状rAAVゲノムを除去するために、線状DNAを特異的に分解し、二本鎖環状rAAVゲノムをそのままにしておくplasmid-safe DNase (Lucigen、Middleton, WI) でDNAを処理した。残存する環状rAAVゲノムを、TEMPLIPHI (商標) キット (Part No. 25640010、GE Healthcare; Pittsburgh, PA) を用いて増幅した。TEMPLIPHI (商標) キットは、バクテリオファージPhi29 DNAポリメラーゼを使用する環状DNAの指数関数的増幅のために等温ローリングサークル増幅 (RCA) を用いるPhi29ポリメラーゼを含む。Phi29増幅の結果は、DNAの長い線状コンカテマーである。このDNAを次いで、rAAVゲノム内で1回切断する酵素 (EcoRI) で消化して単位長ゲノムを生成し、これをpBlueScript II KS+プラスミド (Part No. 212207、Agilent Technologies; Chicago, IL) にクローニングする。

20

30

【0218】

結果として生じたクローン内のDDエレメントを配列決定し、クローン「TG-18」は、165 bp長のインタクトなDDエレメント (欠失も再構成もない) を有すると同定された。クローンTG-18の配列を図6Aに示す。

【0219】

段階3-DDベクター生成用の鋳型の作製

DDエレメントを含むrAAVゲノム (クローンTG-18) が同定されたため、次の段階は、DDベクターの下流生成のための環状鋳型を生成することであった。プラスミドTG-18を制限酵素EcoRIで消化し、プラスミド骨格から線状の単位長rAAVゲノムを放出させた。線状断片を次いで自己ライゲーションさせて (DNAの異種片とライゲーションさせるのではなく)、環状rAAVゲノムを再構築した。環状産物を形成するようにライゲーションされなかった任意の線状断片は、plasmid-safe DNase処理によって除去した。この過程の図解を図7に示す。

40

【0220】

段階4-試験管内でのDDベクターの生成

段階3で生成された環状rAAVゲノムは、細菌に由来し、宿主において持続性を低下させる、かつ／または免疫原性である可能性を有する細菌シグネチャーを含む。段階4では、試験管内でこの環状鋳型を増幅して、細菌シグネチャーおよび混入物を欠いた、より多くのrAAVゲノムを作製する。これは、細菌内で生成される従来の遺伝子導入ベクターに

50

勝る利点である。試験管生成のために、環状鋳型を、TEMPLIPHI（商標）キット（Part# 25640010、GE Healthcare、Pittsburgh, PA）を用いて増幅する。TEMPLIPHI（商標）キットは、バクテリオファージPhi29 DNAポリメラーゼを使用する環状DNAの指数関数的増幅のために等温ローリングサークル増幅（RCA）を用いるPhi29ポリメラーゼを含む。Phi29増幅の結果は、DNAの長い線状コンカテマーである。DDエレメントがPhi29 DNAポリメラーゼで忠実に複製されたかどうかを確かめるために、増幅されたDNAを調べた。結果を図8に示す。

【0221】

増幅されたDNAを最初に、DDエレメントの両側で切断して（図9）244 bp長の断片を放出するSwaIで消化した。増幅DNAからのSwaI断片は、元のTG-18 pBlueScriptプラスミドからのSwaI断片と同じ大きさであり（図10、矢印）、Phi29がDDエレメントを増幅できることが示された。増幅されたDDエレメントの完全性を、DDエレメント内で切断するAhdIによる消化によってさらに解析した。AhdIは、DDベクター内で1回切断し、図11（矢印）において実証されるように、コンカテマーDNAを2.1 kbの単位長ゲノムに消化する。

【0222】

DDベクター内のDDエレメントが忠実に増幅され得ることが実証されたため、次の段階は、最終的な環状DDベクター産物を作製することであった。生成戦略の概要を図12～14に示す。段階3で生成された環状rAAVゲノムを、バクテリオファージPhi29 DNAポリメラーゼを使用する環状DNAの指数関数的増幅のために等温RCAを用いるPhi29ポリメラーゼを使用して増幅する。Phi29増幅の結果は、DNAの長い線状コンカテマーである（図13A）。このDNAを次いで、rAAVゲノム内で1回切断する酵素（EcoRI）で消化して、AAVゲノム（すなわち、単位長AAVゲノム；図13A）を生成する。このAAVゲノムを次いで自己ライゲーションさせて、環状rAAVゲノムを再構築する（図14A）。環状産物を形成するようにライゲーションされなかった任意の線状断片は、plasmid-safe DNase処理によって除去した。

【0223】

段階5 - DDベクターの遺伝子発現の確認

インビトロ生成過程における最後の段階は、DDベクターが生物学的に活性がある（すなわち、培養細胞において導入遺伝子を発現する）ことを確認することである。eGFP発現カセットを異種遺伝子として含むDD含有DNAベクターを、Lipofectamine2000（Life Technologies、Carlsbad, CA）を用いてHEK293T細胞にトランスフェクトした。細胞を、48時間後に、免疫蛍光（図15Aおよび15B）またはウェスタンブロッティング（図16）によりGFP発現について解析した。

【0224】

実施例2. 環状DNAベクターの合成による生成

細菌プラスミドDNA配列を含まず、試験管内で完全に合成された（細菌内での複製を必要としない）単量体DNAベクターが生成された。したがって、合成DNAベクターは、ウイルス自体を必要とせずに、AAVウイルスDNAのように挙動する導入遺伝子DNAを所与の標的細胞に付与することができる。この戦略は、ウイルスベクターに勝るいくつかの利点をもたらす。第一に、一般的なウイルスベクターにパッケージングするには大きすぎる遺伝子を送達することが可能になる。さらに、免疫反応を誘発して別のウイルスベクターの反復投与を妨げるウイルスタンパク質がないため、反復投与が可能になる。加えて、インビトロ合成過程は、他のウイルスベクターと比較して、より効率的な製造のためのより大きな可能性を有する。

【0225】

合成環状DNAベクターを作製するための例示的な過程を図17に示す。phi29ポリメラーゼを用いてスーパーコイル単量体DNA鋳型の増幅を行い、反復するDNA断片間の境界を規定する制限部位を有する線状コンカテマーDNAを作製した。コンカテマーを、DNAを単位長断片に切断する制限酵素を用いて消化した。次に、DNAリガーゼを添加してDN

A断片の自己ライゲーションを誘導し、弛緩型開環状DNA単量体およびスーパーコイルDNA単量体を含むDNA構造の混合物を作製した。この混合物を、プラスミドDNAのスーパーコイル状共有結合閉環型を開環型から分離することができる選択性を有するチオフィリック芳香族吸着クロマトグラフィー樹脂（Plasmidselect Xtra、GE Healthcare 28-4024-01）を用いてカラム精製した。この精製から得られたスーパーコイルDNA単量体を回収したが、これは、本明細書に記載される方法において使用することができ、または代替的に、さらなる増幅のための鋳型として役立ち得る。

【0226】

実施例3. インビボ持続性の特徴づけ - GFP発現

本発明の合成環状DNAベクターの持続性の程度を特徴づけるために、マウスに、それぞれ異なるDNAベクター：(1) 持続性の陰性対照としてのプラスミドCAG-GFP (SEQ ID NO: 42)；(2) ΔDD CAG-GFP (DDエレメントを欠いた合成環状DNAベクター)；および(3) DD CAG-GFP (DDエレメントを有する合成環状DNAベクター)を含む3種の組成物を投与する。各群は合計32匹のマウス（各時点につき8匹のマウス）を含み、各組成物を水圧注射によりマウス1匹当たり10 μgのDNAで投与する。各群からのマウス8匹を、以下の時点：2週間、4週間、8週間、および16週間のそれぞれにおいて殺し、各時点で肝組織を収集し処理する。肝細胞におけるGFPの発現を、公知の方法に従って定量化し、各時点において群間で比較する。合成環状CAG-GFPを投与されたマウスからの肝細胞が、プラスミドCAG-GFPを投与されたマウスからの肝細胞と比較してより高レベルのGFPを発現する場合、合成環状CAG-GFPは持続性が高いと判断される。

【0227】

実施例4. インビボ持続性の特徴づけ - mSEAP発現

本発明の合成環状DNAベクターの持続性の程度を特徴づけるための別の研究は、マウスでは内因的に発現されないマウス分泌アルカリホスファターゼ (mSEAP) の異種発現を伴う。この実験では、マウスに、それぞれ異なるDNAベクター：(1) 持続性の陰性対照としてのプラスミドCAG-mSEAP；(2) CpGモチーフを欠くプラスミドCAG-mSEAP-ΔCpG；(3) DDエレメントおよびCpGモチーフを欠くΔDD CAG-mSEAP-ΔCpG；ならびに(4) DDエレメントを含み、CpGモチーフを欠くDD CAG-mSEAP ΔCpGを含む4種の組成物を投与する。各群は12匹のマウスを含み、各組成物を水圧注射によりマウス1匹当たり20 μgのDNAで投与する。各群からのマウス2匹を、以下の時点：2週間、4週間、8週間、12週間、16週間、および24週間のそれぞれにおいて殺し、200 μLの血液を採取する。mSEAPの血清濃度を、公知の方法に従って各試料中で定量化し、各時点において群間で比較する。

【0228】

実験群間でmSEAP濃度を比較することにより、持続性に及ぼすCpGモチーフおよび／またはDDエレメントの効果を定量化する。例えば、血清mSEAPレベルは、初期の時点では実験群間でほぼ同等である；しかしながら、より高い持続性を有するベクターを投与されたマウスは、後期の時点でより高いmSEAP濃度を示す。

【0229】

態様の列挙

本明細書に記載される技術のいくつかの態様は、以下の番号付けされた項目のいずれかに従って規定され得る：

1. 治療用置換タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

2. 末端反復配列を含む、項目1のDNAベクター。

3. 前記末端反復配列が、少なくとも10 bp長である、項目2のDNAベクター。

4. 前記末端反復配列が、DDエレメントである、項目1～3のいずれか一つのDNAベ

クター。

5. 免疫原性細菌シグネチャーを欠いている、項目1～4のいずれか一つのDNAベクター。

6. RNAポリメラーゼ停止部位を欠いている、項目1～5のいずれか一つのDNAベクター。

7. CpGアイランドを実質的に欠いている、項目1～6のいずれか一つのDNAベクター。

8. 前記治療用置換タンパク質が、血液中に分泌される、項目1～7のいずれか一つのDNAベクター。

9. 前記1つまたは複数の異種遺伝子が、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む、項目1～8のいずれか一つのDNAベクター。

10. 1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目1～9のいずれか一つのDNAベクター。

11. 前記異種遺伝子が、4.5 Kb長を上回る、項目1～10のいずれか一つのDNAベクター。

12. 二本鎖である、項目1～11のいずれか一つのDNAベクター。

13. 単量体である、項目1～12のいずれか一つのDNAベクター。

14. スーパーコイル状である、項目1～13のいずれか一つのDNAベクター。

15. 前記治療用置換タンパク質が、眼障害の処置に必要とされる、項目1～14のいずれか一つのDNAベクター。

16. 前記眼障害が網膜ジストロフィーである、項目15のDNAベクター。

17. 前記網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される、項目16のDNAベクター。

18. 前記治療用置換タンパク質が、血液凝固障害の処置に必要とされる、項目1～14のいずれか一つのDNAベクター。

19. 前記血液凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、項目18のDNAベクター。

20. 前記凝固障害が、

フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素

をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられる、項目19のDNAベクター。

21. 抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

22. 前記抗原結合タンパク質が、抗体またはその抗原結合断片である、項目21のDNAベクター。

23. 前記抗原結合タンパク質が、TNF、LT、IFN- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、EMAP-II、GM-CSF、EGF、HER2、HER3、FGF、PDGF、BDNF、CNTF、CSF、G-CSF、NGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、インスリン様増殖因子、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90、PD-1、PD-L1、アミロイド β 、アルカリホスファターゼ、アミロイドタンパク質A、CCR4、葉酸受容体、ムチン5AC、PCSK-9、ホスファチジルセリン、またはスクレロスチンに結合する、

10

20

30

40

50

項目21または22のDNAベクター。

24. 前記抗原結合タンパク質が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、または抗原結合断片である、項目22のDNAベクター。

25. 酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む、単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

10

26. 前記増殖因子が、BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-SCF、M-CSF、GM-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、またはインスリン様増殖因子である、項目25のDNAベクター。

27. 前記インターロイキンが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、またはIL-21である、項目25のDNAベクター。

28. 前記インターフェロンが、IFN- α またはIFN- γ である、項目25のDNAベクター。

29. 前記凝固因子が、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォン・ウィルブランド因子である、項目25のDNAベクター。

20

30. 前記神経保護因子が、ニューロトロフィン、Kifap3、Bcl-xl、Crmp1、Chk.b eta., CALM2、Caly、NPG11、NPT1、Eef1a1、Dhps、Cd151、Morf412、CTGF、LDH-A、At11、NPT2、Ehd3、Cox5b、Tuba1a、 γ -アクチン、Rpsa、NPG3、NPG4、NPG5、NPG6、NPG7、NPG8、NPG9、およびNPG10からなる群より選択される、項目25のDNAベクター。

31. 前記ニューロトロフィンが、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、およびCNTFからなる群より選択される、項目30のDNAベクター。

32. 眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含む、単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

30

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

33. 前記障害が、網膜ジストロフィーである眼障害である、項目32のDNAベクター。

34. 前記障害がメンデル遺伝性網膜ジストロフィーである、項目33のDNAベクター。

35. 前記網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障(LCA)、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される、項目33のDNAベクター。

40

36. 前記凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、項目32のDNAベクター。

37. 前記凝固障害が、

フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素

をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられる、項目32のDNAベクター。

38. 前記凝固障害が、FGA、FGB、FGG、F2、F5、F7、F10、F11、F13A、F13

50

B、LMAN1、MCFD2、GGCX、またはVKORC1における変異によって特徴づけられる、項目32または37のDNAベクター。

39. 前記神経学的障害が神経変性疾患である、項目32のDNAベクター。

40. 前記神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、および多発性硬化症からなる群より選択される、項目39のDNAベクター。

41. 前記神経変性疾患が、中枢神経系（CNS）の自己免疫疾患である、項目39のDNAベクター。

42. 前記CNSの自己免疫疾患が、多発性硬化症、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群である、項目41のDNAベクター。

10

43. 前記神経学的障害が、脳梗塞、脊髄損傷、中枢神経系障害、神経精神障害、またはチャネル病である、項目32のDNAベクター。

44. 前記チャネル病が、てんかんまたは片頭痛である、項目43のDNAベクター。

45. 前記神経学的障害が、不安障害、気分障害、小児障害、認知障害、統合失調症、物質関連障害、または摂食障害である、項目32のDNAベクター。

46. 前記神経学的障害が、脳梗塞、脳卒中、外傷性脳損傷、または脊髄損傷の症状である、項目32のDNAベクター。

47. 前記リソソーム貯蔵障害が、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ニーマン・ピック病、およびムコ多糖症（MPS）からなる群より選択される、項目32のDNAベクター。

20

48. 前記心血管障害が、変性心疾患、冠動脈疾患、虚血、狭心症、急性冠症候群、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、またはアテローム性動脈硬化症である、項目32のDNAベクター。

49. 前記心血管障害が、虚血性心筋症、伝導疾患、および先天性欠損からなる群より選択される変性心疾患である、項目32のDNAベクター。

50. 前記免疫障害が自己免疫障害である、項目32のDNAベクター。

51. 前記自己免疫障害が、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、ループス、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群、自己免疫性肝炎、ブドウ膜炎、自己免疫性網膜炎、視神経脊髄炎、乾癬性関節炎、乾癬、重症筋無力症、慢性ライム病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、末梢性ニューロパチー、線維筋痛症、橋本甲状腺炎、潰瘍性大腸炎、または川崎病である、項目50のDNAベクター。

30

52. 前記疾患が、肝炎、アラジール症候群、胆道閉鎖症、肝がん、肝硬変、嚢胞性疾患、カロリ症候群、先天性肝線維症、脂肪肝、ガラクトース血症、原発性硬化性胆管炎、チロシン血症、糖原病、ウィルソン病、および内分泌欠損症からなる群より選択される肝疾患である、項目32のDNAベクター。

53. 前記肝疾患が、肝細胞性過形成、肝細胞性腺腫、限局性結節性過形成、または肝細胞癌からなる群より選択される肝がんである、項目52のDNAベクター。

54. 前記がんが、血液がんまたは固形組織がんである、項目33のDNAベクター。

55. 前記血液がんが、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、多発性骨髄腫、および非ホジキンリンパ腫である、項目54のDNAベクター。

40

56. 前記固形組織がんが、肝がん、腎がん、乳がん、胃（gastric）がん、食道がん、胃（stomach）がん、腸がん、結腸直腸がん、膀胱がん、頭頸部がん、皮膚がん、または脳がんである、項目54のDNAベクター。

57. 前記障害が劣性遺伝性障害である、項目1～56のいずれか一つのDNAベクター。

58. 前記異種遺伝子が、肝細胞、網膜細胞、幹細胞、神経細胞、筋細胞、または血液細胞からなる群より選択される標的細胞において発現可能である、項目1～57のいずれか一つのDNAベクター。

59. 前記異種遺伝子が、分裂後の標的細胞において発現可能である、項目1～58のい

50

ずれか一つのDNAベクター。

60. 前記標的細胞が、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびシュワン細胞からなる群より選択される神経細胞である、項目58または59のDNAベクター。

61. 前記治療用タンパク質が、血液中に分泌される、項目1～60のいずれか一つのDNAベクター。

62. 前記1つまたは複数の異種遺伝子の上流にプロモーター配列を含む、項目1～61のいずれか一つのDNAベクター。

63. 前記1つまたは複数の異種遺伝子の下流にポリアデニル化部位を含む、項目1～62のいずれか一つのDNAベクター。

64. 前記1つまたは複数の異種遺伝子が、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む、項目1～63のいずれか一つのDNAベクター。

65. 末端反復配列を含む、項目1～64のいずれか一つのDNAベクター。

66. 1つまたは複数の治療用核酸を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；

(b) 組換え部位を欠いており；かつ

(c) 末端反復配列を含む、

前記単離された環状DNAベクター。

67. 前記治療用核酸が、siRNA、shRNA、miRNA、またはCRISPRi分子である、項目66のDNAベクター。

68. 前記末端反復配列が、少なくとも10 bp長である、項目65～67のいずれか一つのDNAベクター。

69. 前記末端反復配列が、DDエレメントである、項目65～68のいずれか一つのDNAベクター。

70. 前記ベクターが自殺遺伝子を含む、項目1～69のいずれか一つのDNAベクター。

71. 細菌プラスミドDNAを欠いている、項目1～70のいずれか一つのDNAベクター。

72. 1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目1～66のいずれか一つのDNAベクター。

73. (a) 免疫原性細菌シグネチャーを欠いている；

(b) RNAポリメラーゼ停止部位を欠いている；かつ／または

(c) CpGアイランドを実質的に欠いている、

項目1～72のいずれか一つのDNAベクター。

74. 前記異種遺伝子が、4.5 Kb長を上回る、項目1～73のいずれか一つのDNAベクター。

75. 二本鎖である、項目1～74のいずれか一つのDNAベクター。

76. 単量体である、項目1～75のいずれか一つのDNAベクター。

77. スーパーコイル状である、項目1～76のいずれか一つのDNAベクター。

78. 複数の、項目1～77のいずれか一つのDNAベクターを含む、組成物。

79. 前記複数のDNAベクターの少なくとも50%が、1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目78の組成物。

80. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、治療用タンパク質をコードする異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

81. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一

10

20

30

40

50

アンプリコンの各々が、抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに
- (b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

82. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

10

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに
- (b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

83. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに
- (b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

20

84. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、1つまたは複数の治療用核酸を含み、該DNA分子が、

- (a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；
- (b) 組換え部位を欠いており；かつ
- (c) 末端反復配列を含む、

前記単離された線状DNA分子。

85. 制限酵素部位を含む、項目80～84のいずれか一つの単離された線状DNA分子。

86. 前記制限酵素部位が、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる、項目85の単離された線状DNA分子。

87. 以下の段階を含む、項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

30

- (i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
- (ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；
- (iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；および
- (iv) 該複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

88. 前記AAVゲノムが、末端反復配列を含む、項目87の方法。

89. 異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、該単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階をさらに含む、項目87または88の方法。

40

90. 以下の段階を含む、項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

- (i) 異種遺伝子および末端反復配列を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
- (ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；
- (iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；

50

- (iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；
 - (v) 末端反復配列を含むプラスミドクローンを同定する段階；
 - (vi) 該末端反復配列を含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；
 - (vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鋳型を生成する段階；
 - (viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該環状DNA鋳型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；
 - (ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに
 - (x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該末端反復配列を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。 10
91. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目87～90のいずれか一つの方法。
92. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目87～91のいずれか一つの方法。
93. 以下の段階を含む、項目1～58のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法：
- (i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
 - (ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階； 20
 - (iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；および
 - (iv) 該AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。
94. 異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、該単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階
- をさらに含む、項目93の方法。
95. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目93または94の方法。
96. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目93～95のいずれか一つの方法。 30
97. 以下の段階を含む、項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：
- (i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
 - (ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；
 - (iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；ならびに
 - (iv) 該複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。 40
98. 以下の段階を含む、項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：
- (i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
 - (ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；
 - (iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；
 - (iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階； 50

- (v) DDエレメントを含むプラスミドクローンを同定する段階；
- (vi) 該DDエレメントを含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；
- (vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鋳型を生成する段階；
- (viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該環状DNA鋳型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；
- (ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに
- (x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

10

99. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目97または98の方法。

100. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目97～99のいずれか一つの方法。

101. 以下の段階を含む、項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法：

- (i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；
- (ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；
- (iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに
- (iv) 該AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む治療用DNAベクターを生成する段階。

20

102. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目101の方法。

103. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目101または102の方法。

104. それを必要とする対象に項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターまたは項目78もしくは79の組成物を投与する段階を含む、該対象において異種遺伝子のエピソード発現を誘導する方法。

30

105. 項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターまたは項目78もしくは79の組成物の治療有効量を対象に投与する段階を含む、該対象における障害を処置する方法。

106. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が反復投与される、項目104または105の方法。

107. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が局所投与される、項目104～106のいずれか一つの方法。

108. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が硝子体内投与される、項目107の方法。

40

109. 前記障害が眼障害である、項目104～108のいずれか一つの方法。

110. 前記眼障害がメンデル遺伝性網膜ジストロフィーである、項目109の方法。

111. 前記眼障害が、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、またはワグナー症候群である、項目110の方法。

112. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が全身投与される、項目104～106のいずれか一つの方法。

113. 前記障害が凝固障害である、項目112の方法。

114. 前記凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィ

50

ブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、項目113の方法。

【0230】

本明細書に記載される技術のその他の態様は、以下の番号付けされた項目のいずれかに従って規定され得る：

1. 治療用置換タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

2. 末端反復配列を含む、項目1のDNAベクター。

3. 前記末端反復配列が、少なくとも10 bp長である、項目2のDNAベクター。

4. 前記末端反復配列が、DDエレメントである、項目1～3のいずれか一つのDNAベクター。

5. 免疫原性細菌シグネチャーを欠いている、項目1～4のいずれか一つのDNAベクター。

6. RNAポリメラーゼ停止部位を欠いている、項目1～5のいずれか一つのDNAベクター。

7. CpGアイランドを実質的に欠いている、項目1～6のいずれか一つのDNAベクター。

8. 前記治療用置換タンパク質が、血液中に分泌される、項目1～7のいずれか一つのDNAベクター。

9. 前記1つまたは複数の異種遺伝子が、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む、項目1～8のいずれか一つのDNAベクター。

10. 1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目1～9のいずれか一つのDNAベクター。

11. 前記異種遺伝子が、4.5 Kb長を上回る、項目1～10のいずれか一つのDNAベクター。

12. 二本鎖である、項目1～11のいずれか一つのDNAベクター。

13. 単量体である、項目1～12のいずれか一つのDNAベクター。

14. スーパーコイル状である、項目1～13のいずれか一つのDNAベクター。

15. 前記治療用置換タンパク質が、眼障害の処置に必要とされる、項目1～14のいずれか一つのDNAベクター。

16. 前記眼障害が網膜ジストロフィーである、項目15のDNAベクター。

17. 前記網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される、項目16のDNAベクター。

18. 前記治療用置換タンパク質が、血液凝固障害の処置に必要とされる、項目1～14のいずれか一つのDNAベクター。

19. 前記血液凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、項目18のDNAベクター。

20. 前記凝固障害が、

フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素

をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられる、項目18のDNAベクター。

21. 抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

10

20

30

40

50

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

22. 前記抗原結合タンパク質が、抗体またはその抗原結合断片である、項目21のDNAベクター。

23. 前記抗原結合タンパク質が、TNF、LT、IFN- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、EMAP-II、GM-CSF、EGF、HER2、HER3、FGF、PDGF、BDNF、CNTF、CSF、G-CSF、NGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、インスリン様増殖因子、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90、PD-1、PD-L1、アミロイド β 、アルカリホスファターゼ、アミロイドタンパク質A、CCR4、葉酸受容体、ムチン5AC、PCSK-9、ホスファチジルセリン、またはスクレロスチンに結合する、項目21または22のDNAベクター。

10

24. 前記抗原結合タンパク質が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、または抗原結合断片である、項目22のDNAベクター。

25. 酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む、単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

20

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

26. 前記増殖因子が、BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、またはインスリン様増殖因子である、項目25のDNAベクター。

27. 前記インターロイキンが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、またはIL-21である、項目25のDNAベクター。

28. 前記インターフェロンが、IFN- α またはIFN- γ である、項目25のDNAベクター。

30

29. 前記凝固因子が、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォン・ウィルブランド因子である、項目25のDNAベクター。

30. 前記神経保護因子が、ニューロトロフィン、Kifap3、Bcl-xl、Crmp1、Chk.b eta.、CALM2、Caly、NPG11、NPT1、Eef1a1、Dhps、Cd151、Morf412、CTGF、LDH-A、At11、NPT2、Ehd3、Cox5b、Tuba1a、 γ -アクチン、Rpsa、NPG3、NPG4、NPG5、NPG6、NPG7、NPG8、NPG9、およびNPG10からなる群より選択される、項目25のDNAベクター。

31. 前記ニューロトロフィンが、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、およびCNTFからなる群より選択される、項目30のDNAベクター。

40

32. 眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含む、単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

33. 前記障害が、網膜ジストロフィーである眼障害である、項目32のDNAベクター。

34. 前記障害がメンデル遺伝性網膜ジストロフィーである、項目33のDNAベクター。

35. 前記網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障(LCA)、シュタルガルト病

50

、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される、項目33のDNAベクター。

36. 前記凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、項目32のDNAベクター。

37. 前記凝固障害が、

フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素

をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられる、項目32のDNAベクター。

38. 前記凝固障害が、FGA、FGB、FGG、F2、F5、F7、F10、F11、F13A、F13B、LMAN1、MCFD2、GGCX、またはVKORC1における変異によって特徴づけられる、項目32または37のDNAベクター。

39. 前記神経学的障害が神経変性疾患である、項目32のDNAベクター。

40. 前記神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、および多発性硬化症からなる群より選択される、項目39のDNAベクター。

41. 前記神経変性疾患が、中枢神経系（CNS）の自己免疫疾患である、項目39のDNAベクター。

42. 前記CNSの自己免疫疾患が、多発性硬化症、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群である、項目41のDNAベクター。

43. 前記神経学的障害が、脳梗塞、脊髄損傷、中枢神経系障害、神経精神障害、またはチャネル病である、項目32のDNAベクター。

44. 前記チャネル病が、てんかんまたは片頭痛である、項目43のDNAベクター。

45. 前記神経学的障害が、不安障害、気分障害、小児障害、認知障害、統合失調症、物質関連障害、または摂食障害である、項目32のDNAベクター。

46. 前記神経学的障害が、脳梗塞、脳卒中、外傷性脳損傷、または脊髄損傷の症状である、項目32のDNAベクター。

47. 前記リソソーム貯蔵障害が、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ニーマン・ピック病、およびムコ多糖症（MPS）からなる群より選択される、項目32のDNAベクター。

48. 前記心血管障害が、変性心疾患、冠動脈疾患、虚血、狭心症、急性冠症候群、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、またはアテローム性動脈硬化症である、項目32のDNAベクター。

49. 前記心血管障害が、虚血性心筋症、伝導疾患、および先天性欠損からなる群より選択される変性心疾患である、項目32のDNAベクター。

50. 前記免疫障害が自己免疫障害である、項目32のDNAベクター。

51. 前記自己免疫障害が、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、ループス、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群、自己免疫性肝炎、ブドウ膜炎、自己免疫性網膜症、視神経脊髄炎、乾癬性関節炎、乾癬、重症筋無力症、慢性ライム病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、末梢性ニューロパチー、線維筋痛症、橋本甲状腺炎、潰瘍性大腸炎、または川崎病である、項目50のDNAベクター。

52. 前記疾患が、肝炎、アラジール症候群、胆道閉鎖症、肝がん、肝硬変、嚢胞性疾患、カロリー症候群、先天性肝線維症、脂肪肝、ガラクトース血症、原発性硬化性胆管炎、チロシン血症、糖原病、ウィルソン病、および内分泌欠損症からなる群より選択される肝疾患である、項目32のDNAベクター。

53. 前記肝疾患が、肝細胞性過形成、肝細胞性腺腫、限局性結節性過形成、または肝細胞癌からなる群より選択される肝がんである、項目52のDNAベクター。

10

20

30

40

50

54. 前記がんが、血液がんまたは固形組織がんである、項目33のDNAベクター。

55. 前記血液がんが、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、多発性骨髄腫、および非ホジキンリンパ腫である、項目54のDNAベクター。

56. 前記固形組織がんが、肝がん、腎がん、乳がん、胃 (gastric) がん、食道がん、胃 (stomach) がん、腸がん、結腸直腸がん、膀胱がん、頭頸部がん、皮膚がん、または脳がんである、項目54のDNAベクター。

57. 前記障害が劣性遺伝性障害である、項目1~56のいずれか一つのDNAベクター。

58. 前記異種遺伝子が、肝細胞、網膜細胞、幹細胞、神経細胞、筋細胞、または血液細胞からなる群より選択される標的細胞において発現可能である、項目1~57のいずれか一つのDNAベクター。

10

59. 前記異種遺伝子が、分裂後の標的細胞において発現可能である、項目1~58のいずれか一つのDNAベクター。

60. 前記標的細胞が、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびシュワン細胞からなる群より選択される神経細胞である、項目58または59のDNAベクター。

61. 前記治療用タンパク質が、血液中に分泌される、項目1~60のいずれか一つのDNAベクター。

62. 前記1つまたは複数の異種遺伝子の upstream にプロモーター配列を含む、項目1~61のいずれか一つのDNAベクター。

20

63. 前記1つまたは複数の異種遺伝子の downstream にポリアデニル化部位を含む、項目1~62のいずれか一つのDNAベクター。

64. 前記1つまたは複数の異種遺伝子が、トランススプライシング分子またはその一部 (例えば、結合ドメイン) を含む、項目1~63のいずれか一つのDNAベクター。

65. 末端反復配列を含む、項目1~64のいずれか一つのDNAベクター。

66. 1つまたは複数の治療用核酸を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；

(b) 組換え部位を欠いており；かつ

(c) 末端反復配列を含む、

30

前記単離された環状DNAベクター。

67. 前記治療用核酸が、siRNA、shRNA、miRNA、またはCRISPRi分子である、項目66のDNAベクター。

68. 前記末端反復配列が、少なくとも10 bp長である、項目65~67のいずれか一つのDNAベクター。

69. 前記末端反復配列が、DDエレメントである、項目65~68のいずれか一つのDNAベクター。

70. 自殺遺伝子を含む、項目1~69のいずれか一つのDNAベクター。

71. 細菌プラスミドDNAを欠いている、項目1~70のいずれか一つのDNAベクター。

72. 1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目1~66のいずれか一つのDNAベクター。

40

73. (a) 免疫原性細菌シグネチャーを欠いている；

(b) RNAポリメラーゼ停止部位を欠いている；かつ／または

(c) CpGアイランドを実質的に欠いている、

項目1~72のいずれか一つのDNAベクター。

74. 前記異種遺伝子が、4.5 Kb長を上回る、項目1~73のいずれか一つのDNAベクター。

75. 二本鎖である、項目1~74のいずれか一つのDNAベクター。

76. 単量体である、項目1~75のいずれか一つのDNAベクター。

50

77. スーパーコイル状である、項目1～76のいずれか一つのDNAベクター。

78. 複数の、項目1～77のいずれか一つのDNAベクターを含む、組成物。

79. 前記複数のDNAベクターの少なくとも50%が、1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目78の組成物。

80. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、治療用タンパク質をコードする異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

81. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

82. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

83. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

84. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、1つまたは複数の治療用核酸を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；

(b) 組換え部位を欠いており；かつ

(c) 末端反復配列を含む、

前記単離された線状DNA分子。

85. 制限酵素部位を含む、項目80～84のいずれか一つの単離された線状DNA分子。

86. 前記制限酵素部位が、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる、項目85の単離された線状DNA分子。

87. 以下の段階を含む、項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；および

(iv) 該複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

10

20

30

40

50

88. 前記AAVゲノムが、末端反復配列を含む、項目87の方法。

89. 異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、該単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階をさらに含む、項目87または88の方法。

90. 以下の段階を含む、項目1〜77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子および末端反復配列を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；

(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；

(v) 末端反復配列を含むプラスミドクローンを同定する段階；

(vi) 該末端反復配列を含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；

(vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鑄型を生成する段階；

(viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該環状DNA鑄型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；

(ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに

(x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該末端反復配列を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

91. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目87〜90のいずれか一つの方法。

92. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目87〜91のいずれか一つの方法。

93. 以下の段階を含む、項目1〜58のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法：

(i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；および

(iv) 該AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

94. 異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、該単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階をさらに含む、項目93の方法。

95. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目93または94の方法。

96. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目93〜95のいずれか一つの方法。

97. 以下の段階を含む、項目1〜77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階

10

20

30

40

50

；ならびに

(iv) 該複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

98. 以下の段階を含む、項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；

(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；

(v) DDエレメントを含むプラスミドクローンを同定する段階；

(vi) 該DDエレメントを含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；

(vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鑄型を生成する段階；

(viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該環状DNA鑄型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；

(ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに

(x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

99. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目97または98の方法。

100. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目97～99のいずれか一つの方法。

101. 以下の段階を含む、項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに

(iv) 該AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む治療用DNAベクターを生成する段階。

102. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目101の方法。

103. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目101または102の方法。

104. それを必要とする対象に項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターまたは項目78もしくは79の組成物を投与する段階を含む、該対象において異種遺伝子のエピソード発現を誘導する方法。

105. 項目1～77のいずれか一つの単離されたDNAベクターまたは項目78もしくは79の組成物の治療有効量を対象に投与する段階を含む、該対象における障害を処置する方法。

106. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が反復投与される、項目104または105の方法。

107. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が局所投与される、項目104～106のいずれか一つの方法。

10

20

30

40

50

108. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が硝子体内投与される、項目107の方法。

109. 前記障害が眼障害である、項目104～108のいずれか一つの方法。

110. 前記眼障害がメンデル遺伝性網膜ジストロフィーである、項目109の方法。

111. 前記眼障害が、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、またはワグナー症候群である、項目110の方法。

【0231】

本明細書に記載される技術のその他の態様は、以下の番号付けされた項目のいずれかに従って規定され得る：

1. 治療用置換タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

2. 末端反復配列を含む、項目1のDNAベクター。

3. 前記末端反復配列が、少なくとも10 bp長である、項目2のDNAベクター。

4. 前記末端反復配列が、DDエレメントである、項目1～3のいずれか一つのDNAベクター。

5. 免疫原性細菌シグネチャーを欠いている、項目1～4のいずれか一つのDNAベクター。

6. RNAポリメラーゼ停止部位を欠いている、項目1～5のいずれか一つのDNAベクター。

7. CpGアイランドを実質的に欠いているプロモーターを含む、項目1～6のいずれか一つのDNAベクター。

8. 前記治療用置換タンパク質が、血液中に分泌される、項目1～7のいずれか一つのDNAベクター。

9. 前記1つまたは複数の異種遺伝子が、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む、項目1～8のいずれか一つのDNAベクター。

10. 二本鎖である、項目1～9のいずれか一つのDNAベクター。

11. 単量体である、項目1～10のいずれか一つのDNAベクター。

12. 共有結合閉環型である、項目1～11のいずれか一つのDNAベクター。

13. スーパーコイル状である、項目1～12のいずれか一つのDNAベクター。

14. 共有結合閉環型かつスーパーコイル状である、項目1～13のいずれか一つのDNAベクター。

15. 前記治療用置換タンパク質が、眼障害の処置に必要とされる、項目1～14のいずれか一つのDNAベクター。

16. 前記眼障害が網膜ジストロフィーである、項目15のDNAベクター。

17. 前記網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される、項目16のDNAベクター。

18. 前記治療用置換タンパク質が、血液凝固障害の処置に必要とされる、項目1～14のいずれか一つのDNAベクター。

19. 前記血液凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、項目18のDNAベクター。

20. 前記血液凝固障害が、

フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、

10

20

30

40

50

第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素

をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられる、項目18のDNAベクター。

21. 抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

22. 前記抗原結合タンパク質が、抗体またはその抗原結合断片である、項目21のDNAベクター。

23. 前記抗原結合タンパク質が、TNF、LT、IFN- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、EMAP-II、GM-CSF、EGF、HER2、HER3、FGF、PDGF、BDNF、CNTF、CSF、G-CSF、NGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、インスリン様増殖因子、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90、PD-1、PD-L1、アミロイド β 、アルカリホスファターゼ、アミロイドタンパク質A、CCR4、葉酸受容体、ムチン5AC、PCSK-9、ホスファチジルセリン、またはスクレロスチンに結合する、項目21または22のDNAベクター。

24. 前記抗原結合タンパク質が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、または抗原結合断片である、項目22のDNAベクター。

25. 1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目1のDNAベクター。

26. 前記異種遺伝子が、4.5 Kb長を上回る、項目1のDNAベクター。

27. 酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む、単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

28. 前記酵素が、エピジェネティックレギュレーターである、項目27のDNAベクター。

29. 前記エピジェネティックレギュレーターが、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、またはDNAデメチラーゼである、項目28のDNAベクター。

30. 前記増殖因子が、BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、ゴナドトロピン、またはインスリン様増殖因子である、項目27のDNAベクター。

31. 前記インターロイキンが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、またはIL-21である、項目27のDNAベクター。

32. 前記インターフェロンが、IFN- α またはIFN- γ である、項目27のDNAベクター。

33. 前記凝固因子が、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォン・ウィルブランド因子である、項目27のDNAベクター。

34. 前記神経保護因子が、ニューロトロフィン、Kifap3、Bcl-xl、Crmp1、Chk.b eta.、CALM2、Caly、NPG11、NPT1、Eef1a1、Dhps、Cd151、Morf412、CTGF、LDH-A、At11、NPT2、Ehd3、Cox5b、Tuba1a、 γ -アクチン、Rpsa、NPG3

10

20

30

40

50

、NPG4、NPG5、NPG6、NPG7、NPG8、NPG9、およびNPG10からなる群より選択される、項目27のDNAベクター。

35. 前記ニューロトロフィンが、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、およびCNTFからなる群より選択される、項目34のDNAベクター。

36. 眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含む、単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された環状DNAベクター。

37. 前記障害が、網膜ジストロフィーである眼障害である、項目36のDNAベクター。

38. 前記障害がメンデル遺伝性網膜ジストロフィーである、項目37のDNAベクター。

39. 前記メンデル遺伝性網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障（LCA）、シユタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、ならびにワグナー症候群からなる群より選択される、項目38のDNAベクター。

40. 前記障害ががんであり、前記異種遺伝子が、CD40、CD40L、CD46、XCL1、MDA-7、IL-12、IL-24、またはOPCML（オピオイド結合タンパク質／細胞接着分子）である、項目36のDNAベクター。

41. 前記障害ががんであり、前記異種遺伝子が腫瘍抑制遺伝子である、項目36のDNAベクター。

42. 前記腫瘍抑制遺伝子が、細胞内タンパク質をコードする遺伝子である、項目41のDNAベクター。

43. 前記腫瘍抑制遺伝子が、

細胞増殖を阻害する、分泌ホルモンまたは発生シグナルに対する受容体またはシグナルトランスデューサーをコードする遺伝子である、項目41のDNAベクター。

44. 前記腫瘍抑制遺伝子が、チェックポイント制御タンパク質をコードする遺伝子である、項目41のDNAベクター。

45. 前記腫瘍抑制遺伝子が、アポトーシス促進タンパク質をコードする遺伝子である、項目41のDNAベクター。

46. 前記腫瘍抑制遺伝子が、DNA修復タンパク質をコードする遺伝子である、項目41のDNAベクター。

47. 前記凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、項目36のDNAベクター。

48. 前記凝固障害が、

フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、第XI因子、第XIII因子、もしくはそれらの翻訳後修飾に関与する酵素、またはビタミンK代謝に関与する酵素

をコードする遺伝子における変異によって特徴づけられる、項目36のDNAベクター。

49. 前記凝固障害が、FGA、FGB、FGG、F2、F5、F7、F10、F11、F13A、F13B、LMAN1、MCFD2、GGCX、またはVKORC1における変異によって特徴づけられる、項目36または48のDNAベクター。

50. 前記神経学的障害が神経変性疾患である、項目36のDNAベクター。

51. 前記神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、および多発性硬化症からなる群より選択される、項目50のDNAベクター。

52. 前記神経変性疾患が、中枢神経系（CNS）の自己免疫疾患である、項目50のDNAベクター。

10

20

30

40

50

53. 前記CNSの自己免疫疾患が、多発性硬化症、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローン・ミオクローン症候群である、項目52のDNAベクター。

54. 前記神経学的障害が、脳梗塞、脊髄損傷、中枢神経系障害、神経精神障害、またはチャネル病である、項目36のDNAベクター。

55. 前記チャネル病が、てんかんまたは片頭痛である、項目54のDNAベクター。

56. 前記神経学的障害が、不安障害、気分障害、小児障害、認知障害、統合失調症、物質関連障害、または摂食障害である、項目36のDNAベクター。

57. 前記神経学的障害が、脳梗塞、脳卒中、外傷性脳損傷、または脊髄損傷の症状である、項目36のDNAベクター。

10

58. 前記リソソーム貯蔵障害が、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ニーマン・ピック病、およびムコ多糖症(MPS)からなる群より選択される、項目36のDNAベクター。

59. 前記心血管障害が、変性心疾患、冠動脈疾患、虚血、狭心症、急性冠症候群、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、またはアテローム性動脈硬化症である、項目36のDNAベクター。

60. 前記心血管障害が、虚血性心筋症、伝導疾患、および先天性欠損からなる群より選択される変性心疾患である、項目36のDNAベクター。

61. 前記免疫障害が自己免疫障害である、項目36のDNAベクター。

62. 前記自己免疫障害が、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、ループス、脳脊髄炎、腫瘍随伴症候群、自己免疫性内耳疾患、または眼球クローン・ミオクローン症候群、自己免疫性肝炎、ブドウ膜炎、自己免疫性網膜炎、視神経脊髄炎、乾癬性関節炎、乾癬、重症筋無力症、慢性ライム病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、末梢性ニューロパチー、線維筋痛症、橋本甲状腺炎、潰瘍性大腸炎、または川崎病である、項目61のDNAベクター。

20

63. 前記疾患が、肝炎、アラジール症候群、胆道閉鎖症、肝がん、肝硬変、嚢胞性疾患、カロリー症候群、先天性肝線維症、脂肪肝、ガラクトース血症、原発性硬化性胆管炎、チロシン血症、糖原病、ウィルソン病、および内分泌欠損症からなる群より選択される肝疾患である、項目36のDNAベクター。

64. 前記肝疾患が、肝細胞性過形成、肝細胞性腺腫、限局性結節性過形成、または肝細胞癌からなる群より選択される肝がんである、項目63のDNAベクター。

30

65. 前記がんが、血液がんまたは固形組織がんである、項目36のDNAベクター。

66. 前記血液がんが、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、多発性骨髄腫、および非ホジキンリンパ腫である、項目65のDNAベクター。

67. 前記固形組織がんが、肝がん、腎がん、乳がん、前立腺がん、胃(gastric)がん、食道がん、胃(stomach)がん、腸がん、結腸直腸がん、膀胱がん、頭頸部がん、皮膚がん、または脳がんである、項目65のDNAベクター。

68. 前記異種遺伝子が、転写因子をコードする、項目36のDNAベクター。

69. 前記転写因子が、TSHZ2、HOXA2、MEIS2、HOXA3、HAND2、HOXA5、TBX18、PEG3、GLI2、CLOCK、HNF4A、VHL/HIF、WT-1、GSK-3、SPINT2、SMAD2、SMAD3、またはSMAD4である、項目36のDNAベクター。

40

70. 前記障害が劣性遺伝性障害である、項目1~69のいずれか一つのDNAベクター。

71. 前記異種遺伝子が、肝細胞、網膜細胞、幹細胞、神経細胞、筋細胞、または血液細胞からなる群より選択される標的細胞において発現可能である、項目1~70のいずれか一つのDNAベクター。

72. 前記異種遺伝子が、分裂後の標的細胞において発現可能である、項目1~71のいずれか一つのDNAベクター。

73. 前記標的細胞が、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびシュワン細胞からなる群より選択される神経細胞である、項目71または72のDNAベク

50

ター。

74. 前記治療用タンパク質が、血液中に分泌される、項目1〜73のいずれか一つのDNAベクター。

75. 前記1つまたは複数の異種遺伝子上流にプロモーター配列を含む、項目1〜74のいずれか一つのDNAベクター。

76. 前記1つまたは複数の異種遺伝子下流にポリアデニル化部位を含む、項目1〜75のいずれか一つのDNAベクター。

77. 前記1つまたは複数の異種遺伝子が、トランススプライシング分子またはその一部（例えば、結合ドメイン）を含む、項目1〜76のいずれか一つのDNAベクター。

78. 末端反復配列を含む、項目1〜77のいずれか一つのDNAベクター。

79. 1つまたは複数の治療用核酸を含む単離された環状DNAベクターであって、該DNAベクターが、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；

(b) 組換え部位を欠いており；かつ

(c) 末端反復配列を含む、

前記単離された環状DNAベクター。

80. 前記治療用核酸が、siRNA、shRNA、miRNA、またはCRISPRi分子である、7966のDNAベクター。

81. 前記末端反復配列が、少なくとも10 bp長である、項目79または80のDNAベクター。

82. 前記末端反復配列が、DDエレメントである、項目79〜81のいずれか一つのDNAベクター。

83. 自殺遺伝子を含む、項目1〜82のいずれか一つのDNAベクター。

84. 細菌プラスミドDNAを欠いている、項目1〜83のいずれか一つのDNAベクター。

85. 1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目1〜79のいずれか一つのDNAベクター。

86. (a) 免疫原性細菌シグネチャーを欠いている；

(b) RNAポリメラーゼ停止部位を欠いている；かつ／または

(c) CpGアイランドを実質的に欠いている、

項目1〜85のいずれか一つのDNAベクター。

87. 前記異種遺伝子が、4.5 Kb長を上回る、項目1〜86のいずれか一つのDNAベクター。

88. 二本鎖である、項目1〜87のいずれか一つのDNAベクター。

89. 単量体である、項目1〜88のいずれか一つのDNAベクター。

90. スーパーコイル状である、項目1〜89のいずれか一つのDNAベクター。

91. 複数の、項目1〜90のいずれか一つのDNAベクターを含む、組成物。

92. 前記複数のDNAベクターの少なくとも50%が、1つもしくは複数の非メチル化GATC配列、1つもしくは複数の非メチル化CCAGG配列、および／または1つもしくは複数のCCTGG配列を含む、項目91の組成物。

93. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、治療用タンパク質をコードする異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

94. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、抗原結合タンパク質をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

10

20

30

40

50

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

95. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓から分泌されるタンパク質、または神経保護因子をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

96. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、眼障害、肝障害、神経学的障害、免疫障害、がん、心血管障害、血液凝固障害、リソソーム貯蔵障害、または2型糖尿病からなる群より選択される障害に関連する1つまたは複数の異種遺伝子を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子；ならびに

(b) 組換え部位

を欠いている、前記単離された線状DNA分子。

97. 複数の同一アンプリコンを含む単離された線状DNA分子であって、該複数の同一アンプリコンの各々が、1つまたは複数の治療用核酸を含み、該DNA分子が、

(a) 複製開始点および／または薬物耐性遺伝子を欠いており；

(b) 組換え部位を欠いており；かつ

(c) 末端反復配列を含む、

前記単離された線状DNA分子。

98. 制限酵素部位を含む、項目93～97のいずれか一つの単離された線状DNA分子。

99. 前記制限酵素部位が、異種遺伝子と末端反復配列との間に位置づけられる、項目98の単離された線状DNA分子。

100. 以下の段階を含む、項目1～90のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；および

(iv) 該複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

101. 前記AAVゲノムが、末端反復配列を含む、項目100の方法。

102. 異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、該単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階

をさらに含む、項目100または101の方法。

103. 以下の段階を含む、項目1～90のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子および末端反復配列を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；

(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；

(v) 末端反復配列を含むプラスミドクローンを同定する段階；

(vi) 該末端反復配列を含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製

10

20

30

40

50

する段階；

(vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鋳型を生成する段階；

(viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該環状DNA鋳型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；

(ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに

(x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該末端反復配列を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

104. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目100～103のいずれか一つの方法。

105. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目100～104のいずれか一つの方法。

106. 以下の段階を含む、項目1～71のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法：

(i) 異種遺伝子を含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；および

(iv) 該AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

107. 異種遺伝子を含む単離されたDNAベクターをカラム精製して、該単離されたDNAベクターからスーパーコイルDNAを精製する段階をさらに含む、項目106の方法。

108. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目106または107の方法。

109. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目106～108のいずれか一つの方法。

110. 以下の段階を含む、項目1～90のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、複数のAAVゲノムを作製する段階；ならびに

(iv) 該複数のAAVゲノムの各々を自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

111. 以下の段階を含む、項目1～90のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) 第1のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、第1の線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて第1の線状コンカテマーを消化して、第1のAAVゲノムを作製する段階；

(iv) 第1のAAVゲノムをプラスミドベクターにクローニングする段階；

(v) DDエレメントを含むプラスミドクローンを同定する段階；

(vi) 該DDエレメントを含むプラスミドクローンを消化して、第2のAAVゲノムを作製する段階；

10

20

30

40

50

- (vii) 第2のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、環状DNA鋳型を生成する段階；
- (viii) 第2のポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該環状DNA鋳型を増幅して、第2の線状コンカテマーを作製する段階；
- (ix) 制限酵素を用いて第2の線状コンカテマーを消化して、第3のAAVゲノムを作製する段階；ならびに
- (x) 第3のAAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む単離されたDNAベクターを生成する段階。

112. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目110または111の方法。

113. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目110～112のいずれか一つの方法。

114. 以下の段階を含む、項目1～90のいずれか一つの単離されたDNAベクターを生成する無細胞方法：

(i) 異種遺伝子およびDDエレメントを含むAAVゲノムを含む環状DNAベクターを含む試料を提供する段階；

(ii) ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅を用いて該AAVゲノムを増幅して、線状コンカテマーを作製する段階；

(iii) 制限酵素を用いて該コンカテマーを消化して、AAVゲノムを作製する段階；ならびに

(iv) 該AAVゲノムを自己ライゲーションさせて、該異種遺伝子および該DDエレメントを含む治療用DNAベクターを生成する段階。

115. 前記ポリメラーゼ媒介性ローリングサークル増幅が、等温ローリングサークル増幅である、項目114の方法。

116. 前記ポリメラーゼが、Phi29 DNAポリメラーゼである、項目114または115の方法。

117. それを必要とする対象に項目1～90のいずれか一つの単離されたDNAベクターまたは項目91もしくは92の組成物を投与する段階を含む、該対象において異種遺伝子のエピソード発現を誘導する方法。

118. 項目1～90のいずれか一つの単離されたDNAベクターまたは項目91もしくは92の組成物の治療有効量を対象に投与する段階を含む、該対象における障害を処置する方法。

119. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が反復投与される、項目117または118の方法。

120. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が全身投与される、項目117または118の方法。

121. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が静脈内投与される、項目117～120のいずれか一つの方法。

122. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が局所投与される、項目117～120のいずれか一つの方法。

123. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が硝子体内投与される、項目122の方法。

124. 前記障害が眼障害である、項目117～123のいずれか一つの方法。

125. 前記眼障害がメンデル遺伝性網膜ジストロフィーである、項目124の方法。

126. 前記眼障害が、LCA、シュタルガルト病、弾性線維性仮性黄色腫、杆体錐体ジストロフィー、滲出性硝子体網膜症、ジュベール症候群、CSNB-1C、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、スティックラー症候群、小頭症および網脈絡膜症、網膜色素変性症、CSNB 2、アッシャー症候群、またはワグナー症候群である、項目124の方法。

127. 前記単離されたDNAベクターまたは前記組成物が全身投与される、項目117～126のいずれか一つの方法。

128. 前記障害が凝固障害である、項目127の方法。

10

20

30

40

50

129. 前記凝固障害が、血友病、フォン・ウィルブランド病、第XI因子欠乏症、フィブリノーゲン障害、またはビタミンK欠乏症である、項目128の方法。

【0232】

他の態様

本明細書において言及される出版物、特許、および特許出願はすべて、それぞれ個々の出版物または特許出願が具体的にかつ個別に参照により組み入れられることが示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【0233】

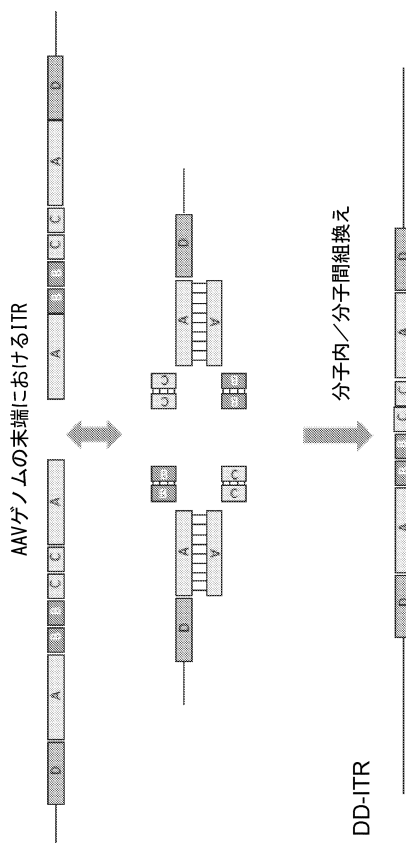
本発明をその特定の態様に関連して説明したが、本発明はさらなる改変が可能であること、ならびに本出願が、一般に本発明の原理に従い、かつ本発明が属する技術分野内で公知のまたは慣例的な実施内に入る、および本明細書に上記される本質的特徴に適用される、および添付の特許請求の範囲に従う本開示からの逸脱を含む、本発明の任意の変更、使用、または適合を包含するよう意図されることが、理解されるであろう。

【0234】

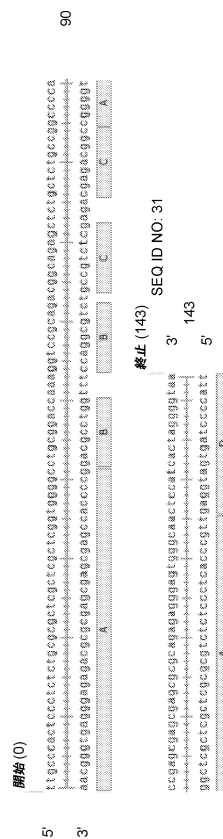
他の態様は、添付の特許請求の範囲の範囲内である。

【図面】

【図1】



【図2A】



10

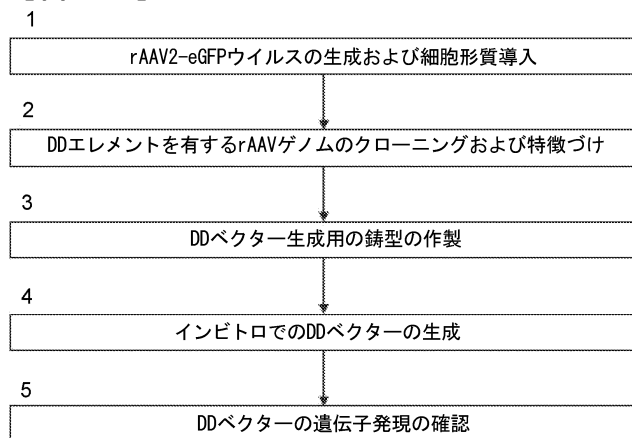
20

30

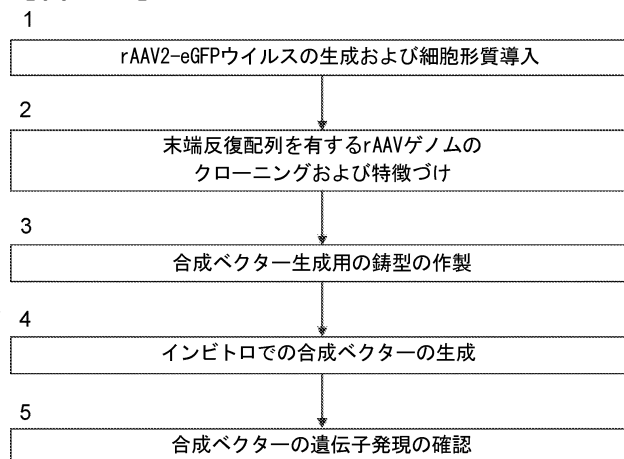
40

50

【図 3 A】

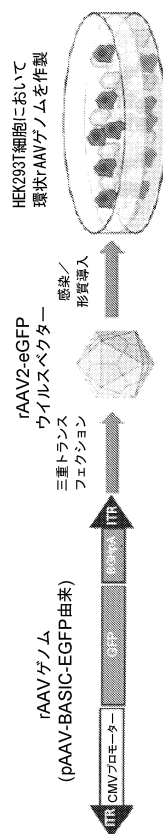


【図 3 B】

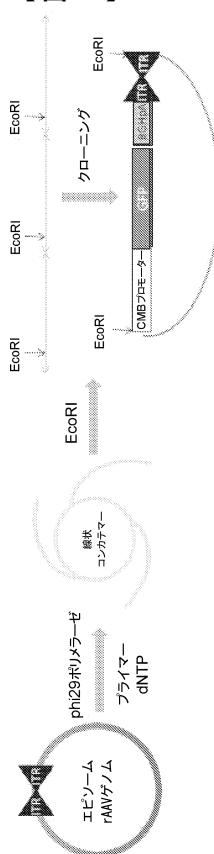


10

【図 4】



【図 5】

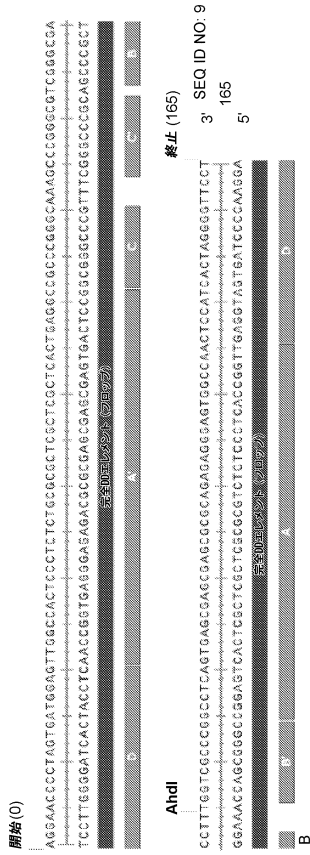


20

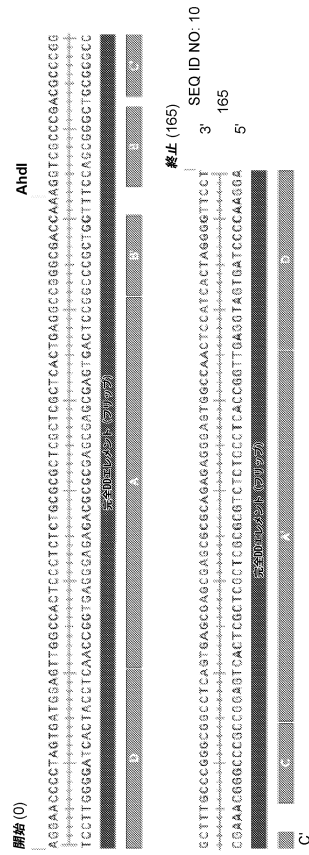
30

40

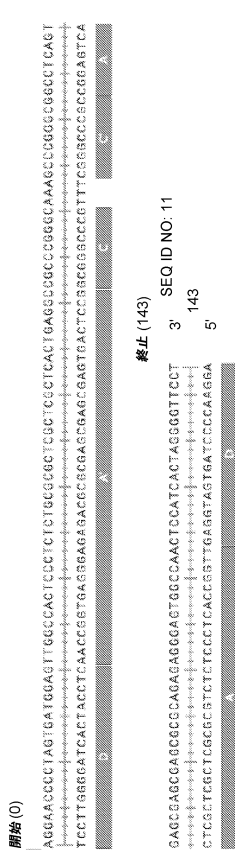
【図 6 A】



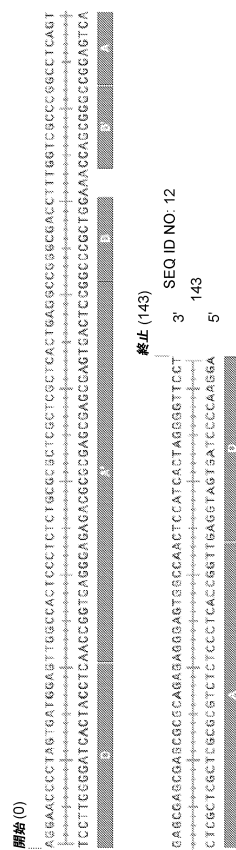
【図 6 B】



【図 6 C】



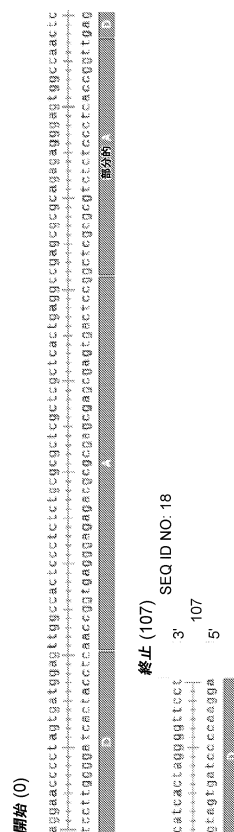
【図 6 D】



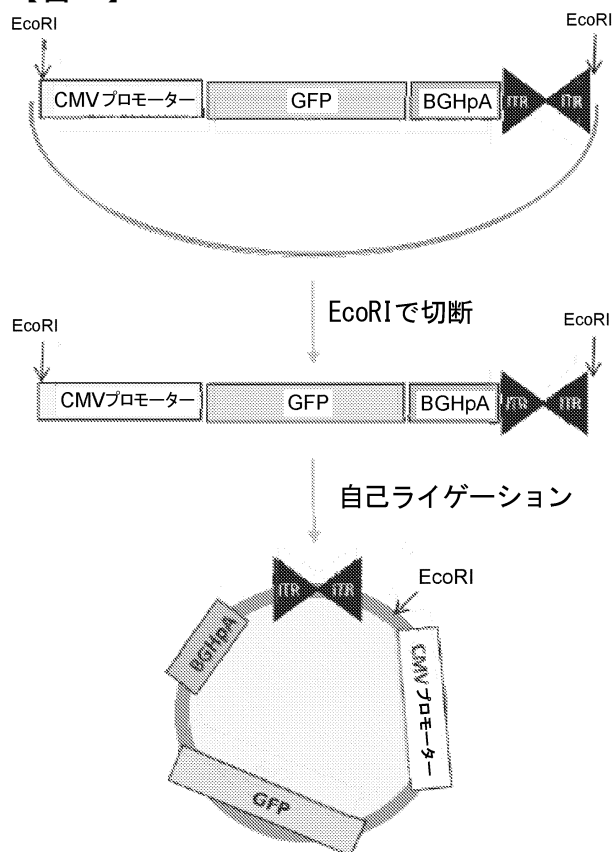
【圖 6 I】



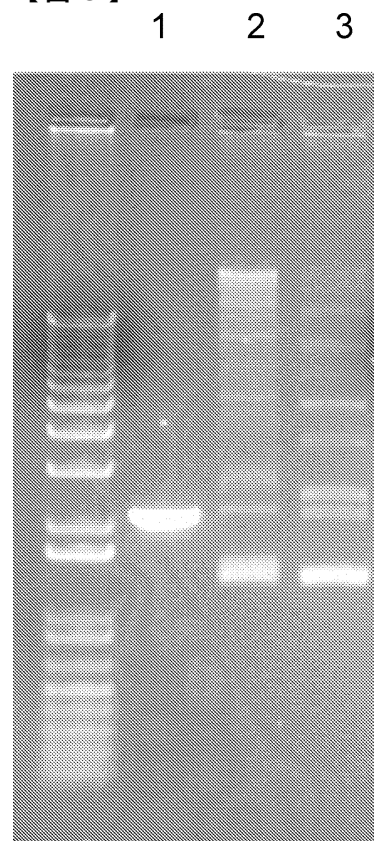
【図 6 J】



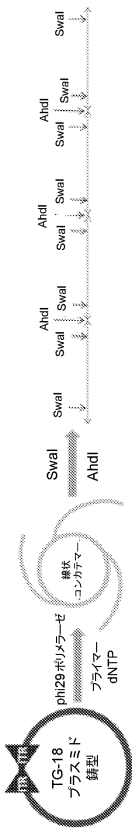
【圖 7】



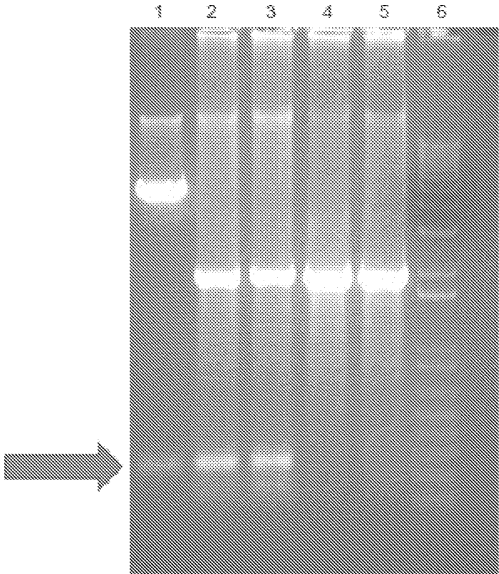
【圖 8】



【図 9】



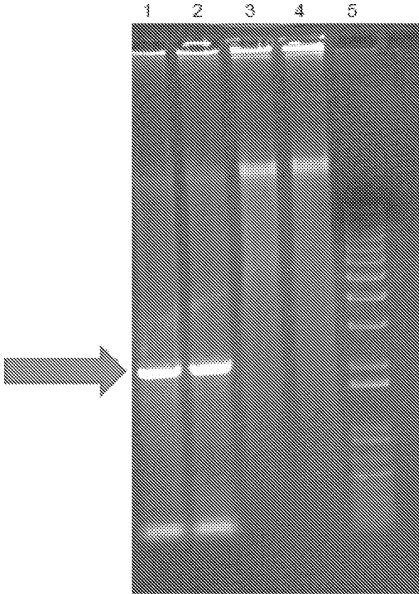
【図 10】



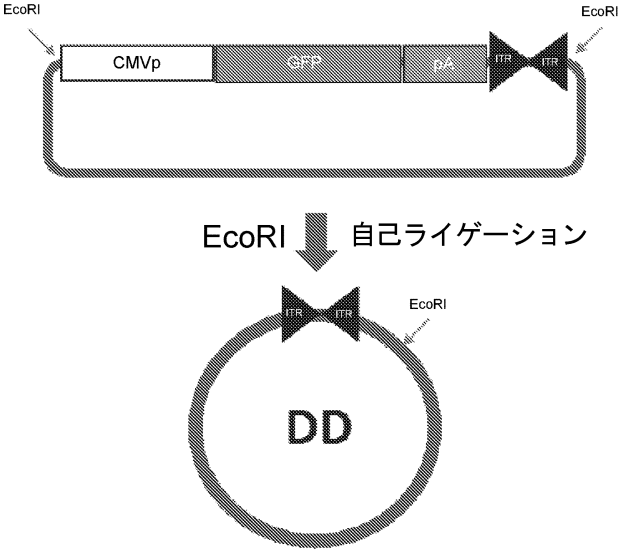
10

20

【図 11】



【図 12 A】

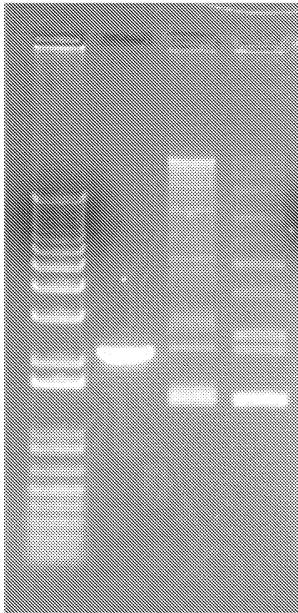


30

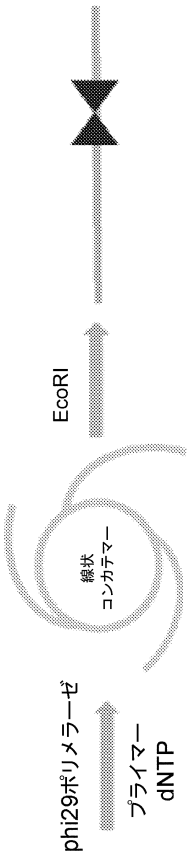
40

50

【図 1 2 B】
自己ライゲーション + Plasmid- Safe



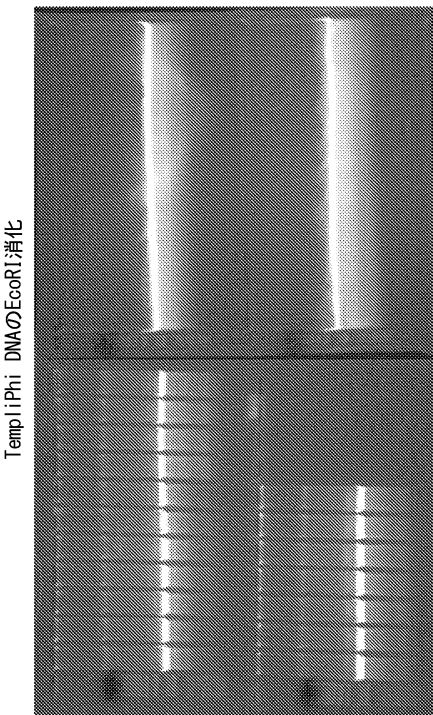
【図 1 3 A】



10

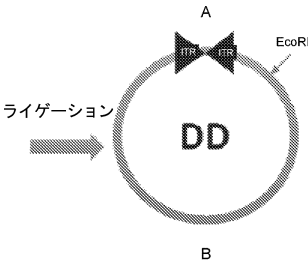
20

【図 1 3 B】

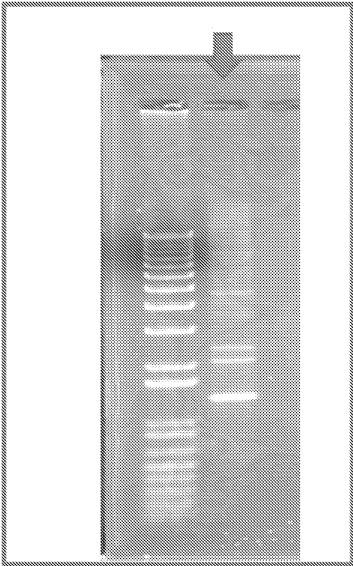


TempliPhi DNAのEcoRI消化

【図 1 4】



30

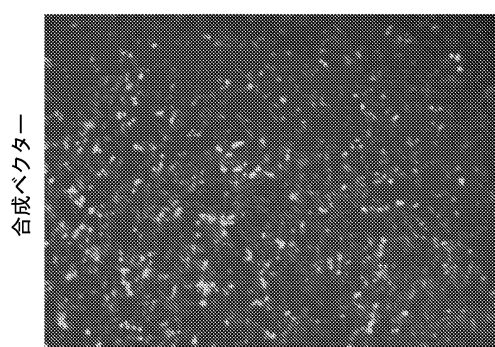


40

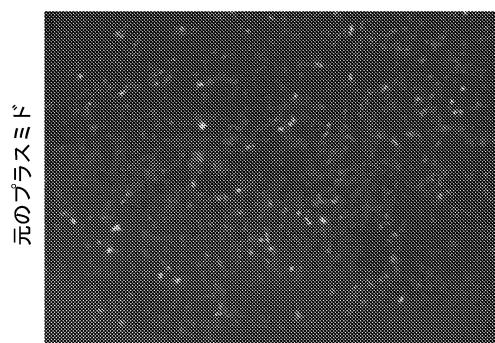
50

【図 15】

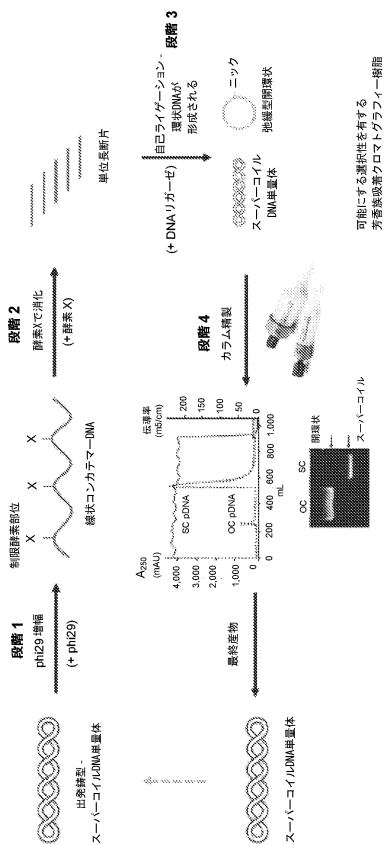
A



B

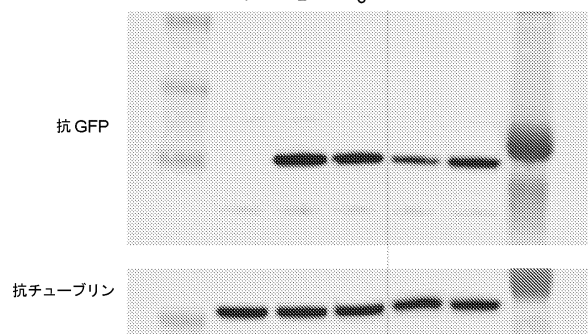


【図 17】



【図 16】

1 2 3 4 5



10

20

30

40

50

【配列表】

2022549138000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/51507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/63, C12N 15/79, C12N 15/64 (2020.01)

CPC - C12N 15/8509, A61P 25/00, C07K 14/82, C12N 2800/108, C12N 2830/002

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/0032092 A1 (BLANCHE et al.) 13 February 2003 (13.02.2003) Abstract; para [0036]; para [0046]; para [0070]; para [0116]; para [0117]; para [0121]; para [0230]; para [0247]; para [0284]; claim 1	1-8, 10-14, 18-20, 25-27, 33, 36, 47-49
Y	WO 2012/045722 A1 (RENTSCHLER BIOTECHNOLOGIE GMBH) 12 April 2012 (12.04.2012) Abstract; page 3, para 14; page 3, para 21; page 7, para 12-14; claim 1; claim 4	1-8, 10-14, 18-20, 25-27, 33, 36, 47-49, 93, 95-96, (98-99)/(93, 95-96)
Y	WO 2018/229226 A1 (TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN) 20 December 2018 (20.12.2018) page 14, para 4; page 18, para 3; page 25, para 4; page 26, para 6 page 58, para 2, Fig. 4 and 5	93, 95-96, (98-99)/(93, 95-96)
Y	WO 2019/051255 A1 (GENERATION BIO CO.) 14 March 2019 (14.03.2019) Abstract; para [0023]; para [00128]; Table 2	2-4, 99/(93, 95-96)
Y	US 2004/0219677 A1 (DROCOURT et al.) 4 November 2004 (04.11.2004) Abstract; para [0024]	5, 7
Y	LU et al. "Sequence-Modified Antibiotic Resistance Genes Provide Sustained Plasmid-Mediated Transgene Expression in Mammals" Mol Ther 3 May 2017 Vol. 25 No. 5. pp 1187-1198 especially, page 1193, Col. 2, para 2	6

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 2021

Date of mailing of the international search report

22 FEB 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/51507

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005/0069991 A1 (HYMAN) 31 March 2005 (31.03.2005) para [0079]; claim 1	12, 14
Y ~	LAENGLE-ROUAULT et al. "GATC sequence and mismatch repair in Escherichia coli" EMBO J. August 1986 Vol. 5 No. 8. pp 2009-2013, especially, Abstract	25
A	US 2019/0169637 A1 (JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITAT WARZBURG) 6 June 2019 (06.06.2019), whole document	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/51507

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/51507

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 70-78, 81-92, 100-129
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

-----continued on supplemental sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8, 10-14, 18-20, 25-27, 33, 36, 47-49, 93, 95-96, 98-99 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 20/51507

Continuation of Box III: Observations where unity of invention is lacking:

Group I+: Claims 1-69, 79-80, and 93-99 directed to an isolated DNA vector comprising an origin of replication, and/or a drug resistance gene; a recombination site, and one or more heterologous genes encoding a therapeutic agent. The isolated DNA vector will be searched to the extent that the agent is a therapeutic replacement protein that is secreted into blood and is indicated for treatment of a blood coagulation disorder. It is believed that claims 1-8, 10-14, 18-20, 25-27, 33, 36, 47-49, 93, 95-96, and 98-99 (in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass said therapeutic circular DNA vector comprising a secreted blood coagulation protein. Additional therapeutic vectors will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected therapeutic vectors. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a circular DNA vector comprising an agent indicated for treatment of an ocular disorder (claims 1-7, 10-17, 27, 34-39, 61-62, 79-80, 93, 95-6 and 98-99 (in part)).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is an isolated circular DNA vector comprising a therapeutic agent for treatment of a disorder (e.g. an ocular, blood coagulation, neurological or cancer disorder) not required by any of the other inventions.

Common Technical Features

The inventions of Group I+ share the technical feature of an isolated circular DNA vector comprising one or more expressed sequences, wherein the DNA vector lacks:

- (a) an origin of replication and/or a drug resistance gene; and
- (b) a recombination site.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is made obvious by WO 2012/045722 A1 to Rentschler Biotechnologie GmbH (hereinafter 'RBG'; [Note: refer RBG translation]) in view of US 2019/0169637 A1 to Julius-Maximilians-Universität Würzburg (hereinafter 'JMU'). RBG discloses an isolated circular DNA vector comprising one or more expressed sequences encoding a therapeutic replacement protein (Abstract- "for producing DNA vectors, in particular minicircle (MC) DNA vectors, in superhelical"; page 3, para 14- "the DNA vector may be a pharmaceutically acceptable DNA Sequence include, for example, a gene or a cDNA from mammals, in particular a human gene or a recombinant variant thereof for therapeutic applications"), wherein the DNA vector lacks:

- (b) a recombination site (page 3, para 21- "plasmid free of recombinase recognition sequences, e.g. free of recognition sequences for sequence-specific recombinases, such as about FLP, Cre, RecA, Phi-C31 and other"), but does not teach that the vector lacks (a) an origin of replication and/or a drug resistance gene.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is made obvious by RBG in view of JMU. RBG discloses an isolated circular DNA vector comprising one or more expressed sequences encoding a therapeutic replacement protein (Abstract- "for producing DNA vectors, in particular minicircle (MC) DNA vectors, in superhelical"; page 3, para 14- "the DNA vector may be a pharmaceutically acceptable DNA Sequence include, for example, a gene or a cDNA from mammals, in particular a human gene or a recombinant variant thereof for therapeutic applications"), wherein the DNA vector lacks:

- (b) a recombination site (page 3, para 21- "plasmid free of recombinase-recognition sequences, eg free of recognition sequences for sequence-specific recombinases, such as about FLP, Cre, RecA, Phi-C31 and other"), but does not teach that the vector lacks (a) an origin of replication and/or a drug resistance gene.

However, RBG does not teach that the disclosed vector is a minicircle DNA vector.

JMU teaches a minicircle DNA (Abstract- "a minicircle DNA-encoded transposable element") which lacks an origin of replication and/or a drug resistance gene (para [0019]- "The MC-DNA contains exclusively the transgene and its promoter but no longer carries the bacterial origin of replication or the antibiotic resistance markers"). Since JMU teaches that minicircle DNA does not comprise of origin of replication and drug resistance gene (para [0086]- "minicircle DNA" refers to vectors which are supercoiled DNA molecules that lack a bacterial origin of replication and an antibiotic resistance gene"), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art, to have combined the teachings of RBG with JMU and optimized the method to have a minicircle DNA vector without origin of replication in addition to lack of recombinase, based on the desired application, using routine experimentation.

-----continued on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/51507

continuation of previous sheet:

The Inventions of Group I+ share the technical feature of an isolated circular DNA vector comprising one or more agents such as expressed protein sequences (sequences encoding a therapeutic protein) or RNA wherein the DNA vector lacks:

(a) an origin of replication and/or a drug resistance gene; and

(b) a recombination site. However, as discussed above, RBG teaches said vector (refer to translation of RBG) (Abstract- "for producing DNA vectors, in particular minicircle (MC) DNA vectors, in superhelical"; page 3, para 14-15 "the DNA vector may be a pharmaceutically acceptable DNA Sequence include, for example, a gene or a cDNA from mammals, in particular a human gene or a recombinant variant thereof for therapeutic applications ... Preferred are medical applications such as ... gene therapy, reprogramming or reprogramming of cells or the use of RNAi.").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the inventions of Group I+.

The inventions of Group I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

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	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	38/21	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	A
A 6 1 K	38/43 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	H
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	38/43	
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/08 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/06 (2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/06	
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	25/22 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/22	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
		A 6 1 P	5/14	
		A 6 1 P	35/02	

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

(特許序注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シュネップ ブルース シー.

アメリカ合衆国 1 9 0 8 3 ペンシルベニア州 ハイバータウン グリーン バレー ロード 1 7 2 3

(72)発明者 ジョンソン フィリップ アール.

アメリカ合衆国 1 9 0 1 0 ペンシルベニア州 ブリンマー ウィリアムソン ロード 7 0 0

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA13 BA44 DA12 DA13 DA14 DA15 DA16 DA17 DA18
DA24 DA25 DA26 DB01 DB52 DB54 DB55 DB58 DB59 DC01 DC10
DC14 DC15 DC17 DC18 DC20 DC22 DC25 DC50 MA55 MA58 MA66
NA14 ZA011 ZA021 ZA061 ZA081 ZA151 ZA161 ZA181 ZA331 ZA341 ZA361
ZA401 ZA451 ZA541 ZA661 ZA681 ZA751 ZA811 ZA941 ZA961 ZB071 ZB151
ZB261 ZB271 ZC061 ZC351 ZC751
4C085 AA13 AA14
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 NA05 NA14 ZC35