

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6683691号
(P6683691)

(45) 発行日 令和2年4月22日 (2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年3月30日 (2020.3.30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 35/545 (2015.01)
 A 6 1 K 35/28 (2015.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 0 0
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 35/545
 A 6 1 K 35/28
 A 6 1 K 48/00

請求項の数 19 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-516515 (P2017-516515)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月23日 (2015.9.23)
 (65) 公表番号 特表2017-529854 (P2017-529854A)
 (43) 公表日 平成29年10月12日 (2017.10.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/051785
 (87) 国際公開番号 W02016/049230
 (87) 国際公開日 平成28年3月31日 (2016.3.31)
 審査請求日 平成30年9月25日 (2018.9.25)
 (31) 優先権主張番号 62/054,899
 (32) 優先日 平成26年9月24日 (2014.9.24)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/063,587
 (32) 優先日 平成26年10月14日 (2014.10.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 598004424
 シティ・オブ・ホープ
 City of Hope
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9101
 0-0269, デュアーテ, イースト・デ
 ユアーテ・ロード 1500
 1500 East, Duarte Ro
 ad, Duarte, Californi
 a 91010-0269, United
 States of America
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高効率ゲノム編集のためのアデノ随伴ウイルスベクターバリエーション及びその方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類染色体の標的座位を編集するエキスピボの方法であって、前記方法が、複製欠損
 アデノ随伴ウイルス (AAV) で前記哺乳類染色体を含む哺乳類細胞を形質導入する工程
 を含み、前記複製欠損 AAV が、

a) AAV Clade F キャプシド、並びにb) 補正ゲノムであって、

(i) 標的座位への組み込みのためのヌクレオチド間結合又はヌクレオチド配列から
 選択される編集エレメント、

(ii) 前記標的座位に対する前記哺乳類染色体の 5' 領域と相同性を有する、前記
 編集エレメントの 5' 側にある 5' 相同アームヌクレオチド配列、及び

(iii) 前記標的座位に対する前記哺乳類染色体の 3' 領域と相同性を有する、前
 記編集エレメントの 3' 側にある 3' 相同アームヌクレオチド配列

を含む、補正ゲノム

を含み、

前記細胞が、外因性ヌクレアーゼ、又は外因性ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド
 配列を同時形質導入することなく形質導入され、

前記 AAV Clade F キャプシドが、

(i) 配列番号 2 ~ 17 のいずれか 1 つのアミノ酸 203 ~ 736 と 100% の配列
 同一性を有するアミノ酸配列を含むキャプシドタンパク質、

10

20

(i i) 配列番号 2 ~ 17 のいずれか 1 つのアミノ酸 138 ~ 736 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むキャプシドタンパク質、及び / 又は

(i i i) 配列番号 2 ~ 17 のいずれか 1 つのアミノ酸 1 ~ 736 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むキャプシドタンパク質を含む、
エキスピボの方法。

【請求項 2】

(a) 前記哺乳類細胞が、筋芽細胞、内皮細胞、肝細胞、線維芽細胞、乳房細胞、リンパ球、若しくは網膜細胞である、及び / 又は、

(b) 前記哺乳類細胞が、幹細胞であり、場合により、前記幹細胞が、造血幹細胞、臍帯血幹細胞、若しくは末梢血幹細胞であり、さらに場合により、前記幹細胞が、C D 3 4
+ 造血幹細胞である、

請求項 1 に記載のエキスピボの方法。

【請求項 3】

対象の疾患又は障害を治療する方法における使用のための複製欠損アデノ随伴ウイルス (A A V) を含む医薬組成物であって、前記方法が、外因性ヌクレアーゼ、又は外因性ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を同時投与することなく、前記対象に前記複製欠損 A A V を投与する工程を含み、

前記複製欠損 A A V が、

a) A A V C l a d e F キャプシド、並びに

b) 補正ゲノムであって、

(i) 哺乳類染色体の標的座位への組み込みのためのヌクレオチド間結合又はヌクレオチド配列から選択される編集エレメント、

(i i) 前記標的座位に対する前記哺乳類染色体の 5 ' 領域と同一性を有する、前記編集エレメントの 5 ' 側にある 5 ' 相同アームヌクレオチド配列、及び

(i i i) 前記標的座位に対する前記哺乳類染色体の 3 ' 領域と同一性を有する、前記編集エレメントの 3 ' 側にある 3 ' 相同アームヌクレオチド配列

を含む、補正ゲノム

を含み、

前記 A A V C l a d e F キャプシドが、

(i) 配列番号 2 ~ 17 のいずれか 1 つのアミノ酸 203 ~ 736 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むキャプシドタンパク質、

(i i) 配列番号 2 ~ 17 のいずれか 1 つのアミノ酸 138 ~ 736 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むキャプシドタンパク質、及び / 又は

(i i i) 配列番号 2 ~ 17 のいずれか 1 つのアミノ酸 1 ~ 736 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むキャプシドタンパク質

を含む、医薬組成物。

【請求項 4】

前記補正ゲノムが、前記編集エレメントヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを欠いている、請求項 1 又は 2 に記載のエキスピボの方法。

【請求項 5】

前記補正ゲノムが、前記編集エレメントに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載のエキスピボの方法。

【請求項 6】

前記 5 ' 及び 3 ' 相同アームヌクレオチド配列の各々が、独立して、約 50 ~ 2000
ヌクレオチドのヌクレオチド長を有する、請求項 1、2、4、及び 5 のいずれか一項に記載のエキスピボの方法。

【請求項 7】

前記編集エレメントが、1 つ以上のヌクレオチドの挿入、1 つ以上のヌクレオチドの欠失、又は 1 つ以上のヌクレオチドの置換を含み、場合により、前記編集エレメントが、エキソン、イントロン、5 ' 非翻訳領域 (U T R)、3 ' U T R、プロモーター、スプライ

10

20

30

40

50

スドナー、スプライスアクセプター、非コードRNAに相当する配列、インスレーター、遺伝子若しくはその断片、遺伝子のコード配列、又はそれらの組み合わせを含む、請求項1、2、及び4～6のいずれか一項に記載のエキスピボの方法。

【請求項8】

前記哺乳類染色体の前記標的座位が、対応する野生型哺乳類染色体と比較して、1つ以上の変異ヌクレオチドを含む変異標的座位であり、場合により、

(a) 前記変異標的座位が、無形質変異、新形質変異、反形質変異、常染色体優性変異、常染色体劣性変異、若しくはそれらの組み合わせを含み、並びに/又は、

(b) 前記変異標的座位が、プロモーター、エンハンサー、シグナル配列、イントロン、エキソン、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、内部リボソーム進入部位、逆エキソン、インスレーター、遺伝子若しくはその断片、染色体逆位、及び前記哺乳類染色体内における染色体転座から選択される、

請求項1、2、及び4～7のいずれか一項に記載のエキスピボの方法。

【請求項9】

前記補正ゲノムが、前記5'相同アームヌクレオチド配列の5'側にある5'末端逆位配列(5'ITR)ヌクレオチド配列、及び前記3'相同アームヌクレオチド配列の3'側にある3'末端逆位配列(3'ITR)ヌクレオチド配列を含み、場合により、

(a) 前記5'ITRヌクレオチド配列が、配列番号36と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'ITRヌクレオチド配列が、配列番号37と少なくとも95%の配列同一性を有する、又は

(b) 前記5'ITRヌクレオチド配列が、配列番号38と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'ITRヌクレオチド配列が、配列番号39と少なくとも95%の配列同一性を有する、

請求項1、2、及び4～8のいずれか一項に記載のエキスピボの方法。

【請求項10】

前記ヌクレオチド間結合が、ホスホジエステル結合である、請求項1、2、及び4～9のいずれか一項に記載のエキスピボの方法。

【請求項11】

前記標的座位が、セーフハーバー部位である、請求項1、2、及び4～10のいずれか一項に記載のエキスピボの方法。

【請求項12】

前記補正ゲノムが、前記編集エレメントヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを欠いている、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記補正ゲノムが、前記編集エレメントに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項14】

前記5'及び3'相同アームヌクレオチド配列の各々が、独立して、約50～2000ヌクレオチドのヌクレオチド長を有する、請求項3、12、及び13のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項15】

前記編集エレメントが、1つ以上のヌクレオチドの挿入、1つ以上のヌクレオチドの欠失、又は1つ以上のヌクレオチドの置換を含み、場合により、前記編集エレメントが、エキソン、イントロン、5'非翻訳領域(UTR)、3'UTR、プロモーター、スプライスドナー、スプライスアクセプター、非コードRNAに相当する配列、インスレーター、遺伝子若しくはその断片、遺伝子のコード配列、又はそれらの組み合わせを含む、請求項3、及び12～14のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項16】

前記哺乳類染色体の前記標的座位が、対応する野生型哺乳類染色体と比較して、1つ以上の変異ヌクレオチドを含む変異標的座位であり、場合により、

10

20

30

40

50

(a) 前記変異標的座位が、無形質変異、新形質変異、反形質変異、常染色体優性変異、常染色体劣性変異、若しくはそれらの組み合わせを含み、並びに/又は、

(b) 前記変異標的座位が、プロモーター、エンハンサー、シグナル配列、イントロン、エキソン、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、内部リボソーム進入部位、逆エキソン、インスレーター、遺伝子若しくはその断片、染色体逆位、及び前記哺乳類染色体内における染色体転座から選択される、

請求項 3、及び 12 ~ 15 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記補正ゲノムが、前記 5' 相同アームヌクレオチド配列の 5' 側にある 5' 末端逆位配列 (5' I T R) ヌクレオチド配列、及び前記 3' 相同アームヌクレオチド配列の 3' 側にある 3' 末端逆位配列 (3' I T R) ヌクレオチド配列を含み、場合により、

(a) 前記 5' I T R ヌクレオチド配列が、配列番号 36 と少なくとも 95% の配列同一性を有し、前記 3' I T R ヌクレオチド配列が、配列番号 37 と少なくとも 95% の配列同一性を有する、又は

(b) 前記 5' I T R ヌクレオチド配列が、配列番号 38 と少なくとも 95% の配列同一性を有し、前記 3' I T R ヌクレオチド配列が、配列番号 39 と少なくとも 95% の配列同一性を有する、

請求項 3、及び 12 ~ 16 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記ヌクレオチド間結合が、ホスホジエステル結合である、請求項 3、及び 12 ~ 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記標的座位が、セーフハーバー部位である、請求項 3、及び 12 ~ 18 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年8月25日に出願された米国仮出願第62/209,862号、2014年10月14日に出願された米国仮出願第62/063,587号、及び2014年9月24日に出願された米国仮出願第62/054,899号の優先権の利益を主張する。これらの参照された出願のそれぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の関心の声明

本発明は、国立衛生研究所から付与された助成金番号HL087285の下での政府の支援によってなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ゲノムは、約 4.9 キロベース長のプラスセンスまたはマイナスセンスのいずれかの一本鎖デオキシリボ核酸 (ssDNA) で構築される。ゲノムは、DNA 鎖の両端に逆方向末端反復 (ITR) を含み、2つのオープンリーディングフレーム (ORF) : rep 及び cap を含む。rep は、AAV ライフサイクルに必要な rep タンパク質をコードする 4つの重複する遺伝子から構成され、cap は、一緒に相互作用して正 20 面体対称のキャプシドを形成するキャプシドタンパク質、VP1、VP2、及び VP3 の重複ヌクレオチド配列を含む。

【0004】

複製欠損ヒトパルボウイルス AAV2 由来の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターは、病原性または発癌性のいずれかとして明確に同定されていない、安全かつ有効な遺伝子伝達ビヒクルであることが証明されている [3 ~ 4、6、18 ~ 19、26、3

10

20

30

40

50

1]。r A A V は非分裂初代細胞を形質導入し、免疫原性が低く、インビボで持続的な導入遺伝子発現を誘導する [6、10、20]。野生型 A A V による感染は、発癌性形質転換の阻害に関連し、A A V 逆位末端反復は、実際に発癌保護を与える可能性がある [2、28、52 - 55]。ヒト組織のパネルの最近の調査では、骨髄及び肝臓がヒトにおいて天然に生じる A A V 分離株の 2 つの最も一般的な部位であることが分かり、A A V による骨髄細胞の感染がまれではないことが示唆された。

【 0 0 0 5 】

遺伝子治療のためのウイルスベクターの使用が、長い間考慮されてきた。長期生存矯正の可能性及びエクスピボ操作の容易さのために、造血系は遺伝子治療の最も初期の標的の 1 つであった。しかしながら、大きな努力にもかかわらず、実際の治療上の成功は依然として分らない [5]。これは、ほとんどのウイルスベクターが静止した非分裂造血幹細胞 (H S C) に効率的に形質導入することができないこと [23]、ならびに挿入腫瘍形成に起因する安全性の懸念があるためである [15、22]。しかし、安定した遺伝子導入は、r A A V によってネズミ及びヒト H S C の両方に成功裏に実証されている [8、11 ~ 12、24、27、29 ~ 30、37]。

【 0 0 0 6 】

血液脳関門を通過すること、溶質の通過を制限する内皮細胞間の密着結合によって生じる脳細胞外液から循環血液の細胞性及び代謝性の分離の困難さにより、神経学的状態、特に中枢神経系の疾患または障害を治療するための遺伝子治療におけるウイルスベクターの効果的な使用はさらに困難であった。

【 0 0 0 7 】

C D 3 4 は、細胞表面糖タンパク質、及び細胞 - 細胞接着因子である。C D 3 4 タンパク質は早期の造血及び血管組織で発現され、C D 3 4 を発現する細胞は C D 3 4 + と命名されている。ヒト C D 3 4 + H S C [8、12、16、29] における r A A V の染色体組み込み、ならびに初代及び二次多系統生着を支持することができる原始、多分化能性、自己複製ヒト H S C の効率的な形質導入は、免疫不全 N O D - S C I D マウスにおいて実証されている [29]。連続生着を支持することができる原始 H S C の形質導入は、r A A V が、G 0 に存在する原始、静止 C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞を効率的に形質転換する傾向に起因することが示された [24]。インビトロ及びマウスにおけるヒト H S C、ならびにインビボにおける非ヒト霊長類 H S C への r A A V 媒介性遺伝子移入の成功のいくつかの報告にもかかわらず、H S C 形質導入に対する r A A V の有用性に関する論争は依然として残っている。これらの矛盾は、発現プロファイリングによる形質導入を評価する短期インビトロ研究から主に生じ、ウイルスアンコート [35]、細胞内輸送 [33]、核輸送、及び第 2 鎖合成を含む、A A V 2 からの導入遺伝子発現に対する同定された制限に起因する [36]。

【 0 0 0 8 】

A A V 2 は、A A V に基づくベクターの最も研究されたプロトタイプウイルスである一方 [1、13、18、21]、多数の新しい A A V 血清型の同定は、潜在的遺伝子伝達ベクターのレパートリーを有意に高める [14]。A A V 1、3、及び 4 をアデノウイルスストックの汚染物質として単離し、A A V 5 をヒトのコンジローム性疣贅から単離した。A A V 6 は、A A V 1 と A A V 2 との間の実験室組換え体として生じた。最近、ヒト及び非ヒト霊長類組織における天然に存在する A A V の 100 以上の異なる分離株が同定された。これにより、A A V 2 のエンベロープタンパク質を新規エンベロープに置き換えて、A A V 2 r e p 及び新規キャプシド遺伝子を用いて r A A V 2 ゲノムをパッケージングすることにより、これらの単離物の一部に由来するキャプシドをシュードタイピングに使用した。新規キャプシド、ウイルスの殻の一部としての該タンパク質の使用は、A A V 2 に関連する導入遺伝子発現の多くの制限を回避した [32、35 ~ 36]。

【 0 0 0 9 】

これらの制限を回避するために、最近の研究により、新規キャプシド配列は、プロテアソーム媒介性キャプシド分解の減少、核輸送の増加及び保持をもたらすことが示されてい

10

20

30

40

50

る。新規受容体を利用する新規キャプシドは、以前は難治性の組織の効率的な形質導入を可能にする r A A V の向性を広げ、最近の試験で大きな臨床上の制限をもたらした、A A V 2 に対する非常に一般的な既存の血清学的免疫を回避する手段を提供する。注目すべきことに、いくつかの新規キャプシドは、r A A V の細胞内プロセッシングを変化させるようである。例えば、天然の A A V 2 キャプシドと比較して、A A V 8 の文脈では、被覆のない状態及び導入遺伝子の発現が加速される。最近、導入遺伝子発現は、逆方向末端反復 (I T R) の血清型起源にかかわらず、キャプシドタンパク質に基づくことが示された。

【 0 0 1 0 】

天然に存在する A A V は、サイトカインで刺激された末梢血幹細胞において同定可能である。これらの A A V のキャプシド配列は独特である。これらのキャプシドは、組換え A A V 2 ゲノムをシュードタイピングすることができる。米国特許公開第 2 0 1 3 0 0 9 6 1 8 2 A 1 号はキャプシド A A V F 1 ~ 1 7 を記載し、細胞形質導入及び遺伝子導入のためのその使用を記載する。永久的及び可逆的な遺伝子導入と、治療目的のための発現との両方に関する遺伝子治療の領域における任意の改善は、当技術分野において顕著な改善であろう。さらに、幹細胞への安全で効率的な遺伝子送達は、何十年もの研究にもかかわらず、この分野において依然として重要な課題である。したがって、幹細胞を遺伝子組換えで安全に改変する能力は、大きな進歩をもたらすであろう。

【 0 0 1 1 】

さらに、ゲノム中のフットプリントを残さずに、ゲノムの特定の部位での遺伝子標的化または補正によるゲノム編集は、遺伝性疾患及び後天性疾患の正確な補正にとって魅力的である。現在の技術は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、T A L エンドヌクレアーゼ、またはカスパーゼ 9 / C R I S P R システムなどの外因性エンドヌクレアーゼの使用によってこれを達成する。しかしながら、これらの「伝統的な」アプローチは、エンドヌクレアーゼ切断の毒性及び標的効果に関連している。したがって、外因性エンドヌクレアーゼ切断を必要とせずに、幹細胞を高頻度で安全かつ効率的に遺伝的に改変する能力は、有意な進歩を示すであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 2 】

さらに、ヒト H S C の遺伝子形質導入の現在の方法は、精製されたドナー幹細胞のエクスピボ形質導入、続いて通常は「コンディショニング」されたレシピエントへの移植を含む。細胞回収手順は、侵襲的であり、骨髓採取またはドナーの顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) プライミングの複数日後に除去療法を伴う。エクスピボ形質導入手順は、幹細胞の造血能力に影響を及ぼす可能性がある。さらに、インビトロで形質導入された細胞は、移植前に無菌性、毒性などについて試験されなければならない。レシピエントに移植する前に、幹細胞は、生着を確実にするために化学療法または放射線によるコンディショニングをしなければならないことが多い。このプロセスは、通常、少なくとも数日間、時にはより長い間、患者の入院を必要とする。全体として、これは幹細胞遺伝子治療の有用性を大きく制限する、厄介で高価で危険性の高い手順である。精製及びエクスピボ形質導入を必要とせずに、現在の幹細胞形質導入法のより良い代替法を提供する手順が必要である。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

本明細書では、相同組換えを介した細胞のゲノム編集のための、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター (例えば、キャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損アデノ随伴ウイルス (A A V) などの C l a d e F ベクター、A A V C l a d e F キャプシドであるキャプシド) 及び使用方法ならびにそれらのキットが提供される。

【 0 0 1 4 】

いくつかの局面において、本開示は、キャプシドに封入された補正ゲノムを含み、キャプシドが A A V C l a d e F キャプシドであり、補正ゲノムが (a) 哺乳類染色体の

10

20

30

40

50

標的遺伝子座に組み込むためのヌクレオチド間結合またはヌクレオチド配列から選択される編集エレメントと、(b) 標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の5'領域と相同性を有する編集エレメントの5'側にある5'相同アームヌクレオチド配列と、(c) 標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の3'領域と相同性を有する編集エレメントの3'側にある3'相同アームヌクレオチド配列とを含む、複製欠損アデノ随伴ウイルス(AAV)を提供する。いくつかの態様では、本開示は、キャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損アデノ随伴ウイルス(AAV)であり、該キャプシドがAAV C1ade Fキャプシドであり、該補正ゲノムが哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むための編集エレメントヌクレオチド配列を含み、該補正ゲノムが編集エレメントヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターの本質的な非存在を有する、複製欠損アデノ随伴ウイルス(AAV)を提供する。さらなる態様において、本開示は、キャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損アデノ随伴ウイルス(AAV)であって、該キャプシドがAAV C1ade Fキャプシドであり、該補正ゲノムが細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むためのヌクレオチド間結合またはヌクレオチド配列から選択される編集エレメントを含み、該AAVが編集エレメントを細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むために少なくとも約1%の染色体組み込み効率を有する、複製欠損アデノ随伴ウイルス(AAV)を提供する。本開示の他の態様は、AAVキャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損アデノ随伴ウイルス(AAV)を含み、補正ゲノムが、哺乳類細胞染色体の標的遺伝子座に組み込むためのヌクレオチド間結合またはヌクレオチド配列から選択される編集エレメントと、標的遺伝子座に対する染色体の5'領域と相同性を有する編集エレメントの5'側にある5'相同アームヌクレオチド配列と、標的遺伝子座に対する染色体の3'領域と相同性を有する編集エレメントの3'側にある3'相同アームヌクレオチド配列とを含む遺伝子編集ベクターであって、AAVが外来性ヌクレアーゼの非存在下で哺乳類細胞染色体の標的遺伝子座に編集エレメントを組み込むために少なくとも10%の染色体組み込み効率を有する、遺伝子編集ベクターに関する。

【0015】

本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、AAVは、細胞内の哺乳類の染色体の標的遺伝子座に編集エレメントを組み込むために外因性ヌクレアーゼ非存在下で少なくとも約1%の染色体組み込み効率を有する。

【0016】

本明細書中に提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、補正ゲノムは、5'相同アームヌクレオチド配列の5'側にある5'逆方向末端反復(5'ITR)ヌクレオチド配列、及び3'相同アームヌクレオチド配列の3'側にある3'逆方向末端反復(3'ITR)ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、5'ITRヌクレオチド配列、及び3'ITRヌクレオチド配列は、それぞれ、AAV2ウイルス5'ITR、及びAAV2ウイルス3'ITRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、5'ITRヌクレオチド配列、及び3'ITRヌクレオチド配列は、互いに実質的に鏡像である。いくつかの実施形態では、5'ITRヌクレオチド配列は、配列番号36に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、3'ITRヌクレオチド配列は、配列番号37に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、5'ITRヌクレオチド配列、及び3'ITRヌクレオチド配列は、それぞれAAV5ウイルス5'ITR、及びAAV5ウイルス3'ITRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、5'ITRヌクレオチド配列、及び3'ITRヌクレオチド配列は、互いに実質的に鏡像である。いくつかの実施形態では、5'ITRヌクレオチド配列は、配列番号38に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、3'ITRヌクレオチド配列は、配列番号39に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0017】

本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、補正ゲノムは、編集エレメントヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターの本質的な欠如を有する。本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、補正

ゲノムは、編集エレメントに作動可能に連結された外因性プロモーターをさらに含む。

【0018】

本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、複製欠損AAVゲノムは、AAV rep 遺伝子、及びAAV cap 遺伝子の本質的な欠如を含む。

【0019】

本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、5'及び3'相同アームヌクレオチド配列のそれぞれは、独立して約500~1000ヌクレオチドまたは約600~1000ヌクレオチドのヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、5'及び3'相同アームヌクレオチド配列は実質的に等しいヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、5'及び3'相同アームヌクレオチド配列は、非対称的なヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、5'相同アームヌクレオチド配列は、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の5'領域と少なくとも約95%のヌクレオチド配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、3'相同アームヌクレオチド配列は、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の3'領域と少なくとも約95%のヌクレオチド配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、5'相同アームヌクレオチド配列は、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の5'領域と100%の配列同一性を有し、3'相同アームヌクレオチド配列は、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の3'領域と100%の配列同一性を有する。

10

【0020】

本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、編集エレメントは1ヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は1ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列であり、標的遺伝子座は哺乳類染色体の点変異を表す。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類染色体のイントロンを含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類染色体のエキソンを含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類染色体の非コード領域を含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類染色体の調節領域を含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、本明細書に記載の疾患状態に関連する遺伝子座であり得る。

【0022】

本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、編集エレメントは、少なくとも1、2、10、100、200、500、1000、1500、2000、3000、4000、または5000ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、編集エレメントは、1~5500、1~5000、1~4500、1~4000、1~3000、1~2000、1~1000、1~500、1~200、または1~100ヌクレオチド、または2~5500、2~5000、2~4500、2~4000、2~3000、2~2000、2~1000、2~500、2~200、または2~100ヌクレオチド、または10~5500、10~5000、10~4500、10~4000、10~3000、10~2000、10~1000、10~500、10~200、または10~100ヌクレオチドである。

30

【0023】

本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、編集エレメントは、エキソン、イントロン、5'非翻訳領域(UTR)、3'UTR、プロモーター、スプライスドナー、スプライスアクセプター、配列をコードするかまたはコードしないRNA、インスレーター、遺伝子、またはそれらの組み合わせを含む。本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、編集エレメントは、標的遺伝子座内またはそれにまたがる遺伝子のコード配列の断片である。

40

【0024】

本明細書で提供されるAAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、n個のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列であり、nは1以上の整数であり、編集エレメントはm個のヌクレオチドを含み、mはnに等しい整数であり、編集エレメントは

50

哺乳類染色体の標的遺伝子座の置換を表す。本明細書で提供される A A V のいずれか 1 つのいくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、n 個のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列であり、n は 1 以上の整数であり、編集エレメントは m 個のヌクレオチドを含み、m は n より大きい整数であり、編集エレメントは、哺乳類染色体の標的遺伝子座のための置換付加を表す。本明細書で提供される A A V のいずれか 1 つのいくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、n 個のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列であり、n は 2 以上の整数であり、編集エレメントは m 個のヌクレオチドを含み、m は n より小さい整数であり、編集エレメントは、哺乳類染色体の標的遺伝子座のための置換欠失を表す。本明細書で提供される A A V のいずれか 1 つのいくつかの実施形態では、標的遺伝子座はヌクレオチド間結合であり、編集エレメントは m 個のヌクレオチドを含み、m は 1 以上の整数であり、編集エレメントは、哺乳類染色体の標的遺伝子座に対する付加を表す。

10

【0025】

本明細書で提供される A A V のいずれか 1 つのいくつかの実施形態では、編集エレメントはヌクレオチド間結合である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、1 つ以上のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列であり、編集エレメントは、哺乳類染色体の標的遺伝子座についての欠失を含む。

【0026】

本明細書で提供される A A V のいずれか 1 つのいくつかの実施形態では、哺乳類染色体の標的遺伝子座は、対応する野生型哺乳類染色体と比較して、1 つ以上の変異ヌクレオチドを含む変異体標的遺伝子座である。いくつかの実施形態では、変異体標的遺伝子座が、点変異、ミスセンス変異、ナンセンス変異、1 つ以上のヌクレオチドの挿入、1 つ以上のヌクレオチドの欠失、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、変異体標的遺伝子座が、無形質変異、新形質変異、または反形質変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体標的遺伝子座が、常染色体優性変異、常染色体劣性変異、ヘテロ接合変異、ホモ接合変異、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、変異体標的遺伝子座が、哺乳類染色体内における、プロモーター、エンハンサー、シグナル配列、イントロン、エキソン、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、内部リボソーム進入部位、逆エクソン、インスレーター、遺伝子、染色体の逆位、及び染色体転座を含む。

20

【0027】

本明細書で提供される A A V のいずれか 1 つのいくつかの実施形態では、A A V Clade F キャプシドは、Clade F VP1、Clade F VP2、及び Clade F VP3 から選択される少なくとも 1 つのタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V Clade F キャプシドは、Clade F VP1、Clade F VP2、及び Clade F VP3 から選択される少なくとも 2 つのタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V Clade F キャプシドは、Clade F VP1、Clade F VP2、及び Clade F VP3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V Clade F キャプシドは、それぞれ A A V 9 キャプシドタンパク質 VP1、VP2、及び VP3 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 736、アミノ酸 138 ~ 736、またはアミノ酸 203 ~ 736 に対して少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有する VP1、VP2 または VP3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V Clade F キャプシドは、それぞれ A A V 9 キャプシドタンパク質 VP1 及び VP2 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 736、及びアミノ酸 138 ~ 736 に対して少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有する VP1 及び VP2 タンパク質か、それぞれ A A V 9 キャプシドタンパク質 VP1 及び VP3 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 と少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有する VP1 及び VP3 タンパク質か、それぞれ A A V 9 キャプシドタンパク質 VP2 及び VP3 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 1 のアミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 と少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有する VP

30

40

50

2 及び V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ A A V 9 キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、及び V P 3 のアミノ酸配列に対応する、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 7 3 6、アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6、及びアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 と少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有する V P 1、V P 2、及び V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ A A V F 1 ~ A A V F 9、及び A A V F 1 1 ~ A A V F 1 7 キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、及び V P 3 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 2、3、5、6、1 1、7、8、9、1 0、4、1 2、1 4、1 5、1 6、1 7、または 1 3 のいずれか 1 つのアミノ酸 1 ~ 7 3 6、アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6、またはアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 と少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有する V P 1、V P 2、または V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ A A V F 1 ~ A A V F 9 及び A A V F 1 1 ~ A A V F 1 7 キャプシドタンパク質 V P 1 及び V P 2 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 2、3、5、6、1 1、7、8、9、1 0、4、1 2、1 4、1 5、1 6、1 7、または 1 3 のいずれか 1 つのアミノ酸 1 ~ 7 3 6 及びアミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 と少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有する V P 1 及び V P 2 か、それぞれ A A V F 1 ~ A A V F 9 及び A A V F 1 1 ~ A A V F 1 7 キャプシドタンパク質 V P 1 及び V P 3 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 2、3、5、6、1 1、7、8、9、1 0、4、1 2、1 4、1 5、1 6、1 7、または 1 3 のいずれか 1 つのアミノ酸 1 ~ 7 3 6 及びアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 と少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有する V P 1 及び V P 3 か、それぞれ A A V F 1 ~ A A V F 9 及び A A V F 1 1 ~ A A V F 1 7 キャプシドタンパク質 V P 2 及び V P 3 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 2、3、5、6、1 1、7、8、9、1 0、4、1 2、1 4、1 5、1 6、1 7、または 1 3 のいずれか 1 つのアミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 及びアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 と少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有する V P 2 及び V P 3 か、を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ A A V F 1 ~ A A V F 9、及び A A V F 1 1 ~ A A V F 1 7 キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、及び V P 3 のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号 2、3、5、6、1 1、7、8、9、1 0、4、1 2、1 4、1 5、1 6、1 7、または 1 3 のいずれか 1 つのアミノ酸 1 ~ 7 3 6、アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6、及びアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 と少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有する V P 1、V P 2、及び V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ A A V 9 キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、及び V P 3 をコードするヌクレオチド配列に対応する、それぞれ配列番号 1 8 と少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 1、V P 2、または V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、配列番号 1 8 に対して少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 1 及び V P 2 タンパク質か、配列番号 1 8 に対して少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 1 及び V P 3 タンパク質か、または配列番号 1 8 に対して少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 2 及び V P 3 タンパク質かを含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、A A V 9 キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、及び V P 3 をコードするヌクレオチド配列に対応する、配列番号 1 8 に対して少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 1、V P 2、及び V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ A A V F 1 ~ A A V F 9、及び A A V F 1 1 ~ A A V F 1 7 キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、及び V P 3 をコードするヌクレオチド配列に対応する、それぞれ配列番号 2 0、2 1、2 2、2 3、2 5、2 4、2 7、2 8、2 9、2 6、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、または 3 5 のいずれか 1 つに対して少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 1、V P 2、または V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C

10

20

30

40

50

l a d e F キャプシドは、配列番号 20 ~ 35 のいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 1 及び V P 2 タンパク質か、配列番号 20 ~ 35 のいずれか 1 つと少なくとも 90 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 1 及び V P 3 タンパク質か、配列番号 20 ~ 35 のいずれか 1 つと少なくとも 90 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 2 及び V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ A A V F 1 ~ A A V F 9、及び A A V F 11 ~ A A V F 17 キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、及び V P 3 をそれぞれコードするヌクレオチド配列に対応する、配列番号 20、21、22、23、25、24、27、28、29、26、30、31、32、33、34、または 35 のいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる V P 1、V P 2、及び V P 3 タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ配列番号 1 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、アミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する A A V 9 V P 1、V P 2、または V P 3 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ配列番号 1 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、及びアミノ酸 138 ~ 736 に対応する、A A V 9 V P 1 及び V P 2 キャプシドタンパク質か、それぞれ、配列番号 1 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する、A A V 9 V P 1 及び V P 3 キャプシドタンパク質か、それぞれ配列番号 1 に記載のアミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する、A A V 9 V P 2 及び V P 3 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ配列番号 2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または 13 に記載のアミノ酸 1 ~ 736 に対応する、A A V F 1 ~ A A V F 9、及び A A V F 11 ~ A A V F 17 のいずれかの V P 1 キャプシドタンパク質から選択される V P キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ配列番号 2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または 13 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、及びアミノ酸 138 ~ 736 に対応する、A A V F 1 ~ A A V F 9、及び A A V F 11 ~ A A V F 17 のいずれかの V P 1 及び V P 2 キャプシドタンパク質から独立して選択される V P 1 及び V P 2 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ配列番号 2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または 13 に記載のアミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する、A A V F 1 ~ A A V F 9、及び A A V F 11 ~ A A V F 17 のいずれかの V P 1、V P 2、及び V P 3 キャプシドタンパク質から独立して選択される V P 1、V P 2、及び V P 3 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、A A V C l a d e F キャプシドは、それぞれ配列番号 2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または 13 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、アミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 に対応する、A A V F 1 ~ A A V F 9、及び A A V F 11 ~ A A V F 17 のいずれかの V P 1、V P 2、及び V P 3 キャプシドタンパク質のそれぞれを含む。

【0028】

提供される A A V のいずれか 1 つのいくつかの実施形態では、C l a d e F キャプシドが、A A V F 5 (配列番号 11)、A A V F 7 (配列番号 8)、A A V F 12 (配列番号 12)、A A V F 15 (配列番号 16)、A A V F 17 (配列番号 13)、A A V F 9 (配列番号 10)、A A V F 16 (配列番号 17)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも 95 % のパーセント配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。本明細書中で使用する A A V

F 1、A A V F 2、A A V F 3、A A V F 4、A A V F 5、A A V F 6、A A V F 7、A A V F 8、A A V F 9、A A V F 10、A A V F 11、A A V F 12、A A V F 13、A A V F 14、A A V F 15、A A V F 16、及びA A V F 17は、それぞれA A V H S C 1、A A V H S C 2、A A V H S C 3、A A V H S C 4、A A V H S C 5、A A V H S C 6、A A V H S C 7、A A V H S C 8、A A V H S C 9、A A V H S C 10、A A V H S C 11、A A V H S C 12、A A V H S C 13、A A V H S C 14、A A V H S C 15、A A V H S C 16、及びA A V H S C 17とも呼ばれる。言い換えれば、A A V F 1、A A V F 2、A A V F 3、A A V F 4、A A V F 5、A A V F 6、A A V F 7、A A V F 8、A A V F 9、A A V F 10、A A V F 11、A A V F 12、A A V F 13、A A V F 14、A A V F 15、A A V F 16、またはA A V F 17のいずれかの列挙は、それぞれA A V H S C 1、A A V H S C 2、A A V H S C 3、A A V H S C 4、A A V H S C 5、A A V H S C 6、A A V H S C 7、A A V H S C 8、A A V H S C 9、A A V H S C 10、A A V H S C 11、A A V H S C 12、A A V H S C 13、A A V H S C 14、A A V H S C 15、A A V H S C 16またはA A V H S C 17と同等であり、置換することができる。

10

【 0 0 2 9 】

本明細書で提供されるA A Vのいずれか1つのいくつかの実施形態では、哺乳類染色体は、ヒト染色体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、X、及びYから選択される。本明細書で提供されるA A Vのいずれか1つのいくつかの実施形態では、哺乳類染色体は、マウス染色体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、X、及びYから選択される。いくつかの実施形態では、哺乳類の染色体はヒト19番染色体ではない。

20

【 0 0 3 0 】

本明細書で提供されるA A Vのいずれか1つのいくつかの実施形態では、哺乳類の染色体は体細胞染色体である。いくつかの実施形態では、体細胞は、結合組織（血液を含む）、筋肉組織、神経組織、及び上皮組織からなる群から選択される組織由来である。いくつかの実施形態では、体細胞は、肺、心臓、肝臓、腎臓、筋肉、脳、眼、乳房、骨、及び軟骨からなる群から選択される器官由来である。いくつかの実施形態では、体細胞はC D 3 4 + 細胞である。

30

【 0 0 3 1 】

本明細書で提供されるA A Vのいずれか1つのいくつかの実施形態では、細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞、臍帯血幹細胞、骨髓幹細胞、胎児肝幹細胞、または末梢血幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、C D 3 4 + 造血幹細胞株（H S C）、K 5 6 2 C D 3 4 + 白血病細胞株、H e p G 2 ヒト肝細胞株、末梢血幹細胞、臍帯血幹細胞、C D 3 4 + 末梢血幹細胞、W I - 3 8 ヒト二倍体線維芽細胞株、M C F 7 ヒト乳癌細胞株、Y 7 9 ヒト網膜芽腫細胞株、S C I D - X 1 L B L ヒトE B V 不死化B細胞株、初代ヒト肝細胞、初代肝類洞内皮細胞、初代骨格筋芽細胞からなる群から選択される。

40

【 0 0 3 2 】

本明細書で提供されるA A Vのいずれか1つのいくつかの実施形態では、A A Vは、編集エレメントを細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むために少なくとも約5%の染色体組み込み効率を有する。いくつかの実施形態では、A A Vは、編集エレメントを細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むために、少なくとも約10%の染色体組み込み効率を有する。

【 0 0 3 3 】

本開示の他の態様は、本明細書に記載のA A Vを含む組成物であって、組成物が薬学的に許容される製剤である、組成物に関する。いくつかの実施形態では、製剤は、哺乳類への投与のために構成される。いくつかの実施形態では、製剤は、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射、自己細胞移動、または同種異系細胞移動を介して哺乳類に投与するために構

50

成される。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される製剤は、賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、賦形剤は、担体、アジュバント、及びビヒクル、またはそれらの組み合わせから選択される。

【0034】

本開示のさらに他の態様は、アデノ随伴ウイルス (AAV) の組換え調製のためのパッケージングシステムであって、パッケージングシステムが1つ以上のAAV Repタンパク質をコードするRepヌクレオチド配列と、AAV Clade Fキャプシドの1つ以上のAAV Capタンパク質をコードするCapヌクレオチド配列と、本明細書に記載の補正ゲノムとを含むパッケージングシステムであって、パッケージングシステムがキャプシド中に補正ゲノムを封入してアデノ随伴ウイルスを形成するために細胞内で作用する、パッケージングシステムに関する。いくつかの実施形態では、パッケージングシステムは、Repヌクレオチド配列、及びCapヌクレオチド配列を含む第1のベクター、及び補正ゲノムを含む第2のベクターを含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドは、Clade F VP1、Clade F VP2、及びClade F VP3から選択される少なくとも1つのタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドは、Clade F VP1、Clade F VP2、及びClade F VP3から選択される少なくとも2つのタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドは、Clade F VP1、Clade F VP2、及びClade F VP3タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドは、本明細書に記載の任意のAAV Clade Fキャプシドである。いくつかの実施形態では、Repヌクレオチド配列は、AAV2 Repタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、コードされるAAV2 Repタンパク質は、Rep78/68またはRep68/52の少なくとも1つである。いくつかの実施形態では、AAV2 Repタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号40のAAV2 Repヌクレオチド配列と最小パーセント配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、最小パーセント配列同一性が、AAV2 Repタンパク質をコードするヌクレオチド配列の長さにならなくて少なくとも70%である。提供されるパッケージングシステムのいずれか1つのいくつかの実施形態では、パッケージングシステムは、第3のベクターをさらに含み、第3のベクターは、ヘルパーウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ヘルパーウイルスベクターは、独立した第3のベクターである。いくつかの実施形態では、ヘルパーウイルスベクターは、第1のベクターと一体である。いくつかの実施形態では、ヘルパーウイルスベクターは第2のベクターと一体である。いくつかの実施形態では、第3のベクターは、ヘルパーウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ヘルパーウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス (単純ヘルペスウイルス (HSV) を含む)、ワクシニアウイルス、及びサイトメガロウイルス (CMV) からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、ヘルパーウイルスはアデノウイルスである。いくつかの実施形態では、アデノウイルスゲノムは、E1、E2、E4、及びVAからなる群から選択される1つ以上のアデノウイルスRNA遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ヘルパーウイルスはHSVである。いくつかの実施形態では、HSVゲノムは、UL5/8/52、ICP0、ICP4、ICP22、及びUL30/UL42からなる群から選択される1つ以上のHSV遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、第1のベクター及び第3のベクターは、第1のトランスフェクションプラスミド内に含まれる。いくつかの実施形態では、第2のベクター及び第3のベクターのヌクレオチドは、第2のトランスフェクションプラスミド内に含まれる。いくつかの実施形態では、第1のベクター及び第3のベクターのヌクレオチドは、組換えヘルパーウイルスにクローニングされる。いくつかの実施形態では、第2のベクター及び第3のベクターのヌクレオチドは、組換えヘルパーウイルスにクローニングされる。いくつかの実施形態では、AAVキャプシドは、AAV9、AAVF1、AAVF2、AAVF3、AAVF4、AAVF5、AAVF6、AAVF7、AAVF8、AAVF9、AAVF11、AAVF12、AAVF13、AAVF14、AAVF1

10

20

30

40

50

5、AAVF16、AAVF17、AAVHU31、及びAAVHU32からなる群より選択されるClade F AAVのキャプシドである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のパッケージングシステムのいずれかがキット内に含まれる。

【0035】

本開示の他の態様は、アデノ随伴ウイルス(AAV)の組換え調製のための方法であって、該方法が、AAVを形成するキャプシド中に該補正ゲノムを封入するように作用する条件下で、本明細書に記載されるようなパッケージングシステムで細胞をトランスフェクトするかまたは形質導入することを含む。

【0036】

他の態様では、本開示は、哺乳類ゲノムを含む細胞を本明細書に記載のアデノ随伴ウイルス(AAV)で形質導入することを含む、哺乳類ゲノムの標的遺伝子座を編集する方法を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳類幹細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、結合組織(血液を含む)、筋肉組織、神経組織、及び上皮組織からなる群から選択される組織由来である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、肺、心臓、肝臓、腎臓、筋肉、脳、眼、乳房、骨、及び軟骨からなる群から選択される器官由来である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞、臍帯血幹細胞、または末梢血幹細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、筋芽細胞、内皮細胞、肝細胞、線維芽細胞、乳房細胞、リンパ球、または網膜細胞である。本開示の他の態様は、本明細書に記載の任意の方法によって得ることができる細胞に関する。

【0037】

本開示の別の態様は、哺乳類ゲノムの標的遺伝子座を編集するための方法であって、該方法が、(a)哺乳類細胞から哺乳類細胞を得ることと、(b)エキスピボで哺乳類細胞を培養してエキスピボ培養物を形成することと、(c)形質導入された哺乳類細胞を形成するためにエキスピボ培養において本明細書に記載のアデノ随伴ウイルス(AAV)で哺乳類細胞を形質導入することと、(d)形質導入された哺乳類細胞を哺乳類に投与することを含む、方法に関する。

【0038】

他の態様では、本開示は、哺乳類ゲノムの標的遺伝子座を編集する方法であって、該方法が、(a)第1の哺乳類から哺乳類細胞を得ることと、(b)エキスピボで哺乳類細胞を培養してエキスピボ培養物を形成することと、(c)形質導入された哺乳類細胞を形成するために、エキスピボ培養物中に本明細書に記載のアデノ随伴ウイルス(AAV)で哺乳類細胞を形質導入することと、(d)形質導入された哺乳類細胞を第2の哺乳類に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1哺乳類、及び第2哺乳類は同じ種である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、結合組織(血液を含む)、筋肉組織、神経組織、及び上皮組織からなる群から選択される組織に由来する。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、肺、心臓、肝臓、腎臓、筋肉、脳、眼、乳房、骨、及び軟骨からなる群から選択される器官由来である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞、臍帯血幹細胞、または末梢血幹細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞はCD34+細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、筋芽細胞、内皮細胞、肝細胞、線維芽細胞、乳房細胞、リンパ球、または網膜細胞である。

【0039】

本開示の別の態様は、哺乳類ゲノムの標的遺伝子座を編集するための方法であって、該方法が、本明細書に記載のAAVまたは本明細書に記載の組成物を、インピボで、AAVで哺乳類の細胞に形質導入するのに有効な量で哺乳類に投与することを含む、方法を提供する。

【0040】

提供される方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、AAVは、外因性ヌクレアーゼ、または外因性ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の同時形質導入または同

10

20

30

40

50

時投与なしに、形質導入または投与される。

【0041】

提供される方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、AAVは、編集エレメントを哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むための少なくとも約1%の染色体組み込み効率を有する。いくつかの実施形態では、編集エレメントを哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むために、AAVの染色体組み込み効率は少なくとも約2%、3%、4%または5%である。いくつかの実施形態では、補正ゲノムの編集エレメントは、哺乳類細胞の少なくとも10%、20%、40%、または50%の染色体組み込み効率で哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込まれる。いくつかの実施形態では、補正ゲノムの編集エレメントは、哺乳類細胞の10%~70%、20%~70%、40%~70%、または50%~70%の範囲の染色体組み込み効率で哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込まれる。

10

【0042】

提供される方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、AAVは、哺乳類の染色体の標的遺伝子座に組み込まれた編集エレメントを含む対立遺伝子について少なくとも約10%の細胞集団における対立遺伝子頻度によってさらに特徴づけられる染色体組み込み効率を有する。いくつかの実施形態では、AAVは、哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込まれた編集エレメントを含む対立遺伝子について少なくとも約50%の細胞集団における対立遺伝子頻度によってさらに特徴づけられる染色体組み込み効率を有する。いくつかの実施形態では、AAVは、哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込まれた編集エレメントを含む対立遺伝子について少なくとも約75%の細胞集団における対立遺伝子頻度によってさらに特徴づけられる染色体組み込み効率を有する。いくつかの実施形態では、細胞集団における対立遺伝子頻度は、インビトロでの細胞集団における対立遺伝子頻度である。

20

【0043】

本開示の他の態様は、トランスジェニック非ヒト動物を作製する方法であって、该方法が、非ヒト動物に本明細書に記載のAAVまたは本明細書に記載の組成物を投与することを含むか、非ヒト動物細胞を本明細書に記載のAAVまたは本明細書に記載の組成物で形質導入し、宿主非ヒト動物からトランスジェニック非ヒト動物を生成するのに十分な条件下で細胞を非ヒト動物に移植すること（例えば、移植された細胞が胚の一部を形成するかまたは胚の一部となることを可能にすることにより、宿主においてトランスジェニック非ヒト動物へと発達する）を含む、方法に関する。いくつかの実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物を別の非ヒト動物と交配させて、さらなるトランスジェニック非ヒト動物を作製する。いくつかの実施形態では、非ヒト動物細胞は、非ヒト動物の接合体または胚に由来する。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、または霊長類である。

30

【0044】

本開示の他の態様は、本明細書に記載の方法によって得ることができるトランスジェニック非ヒト動物、例えば上述の方法に関する。いくつかの実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物は、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、または霊長類である。

【0045】

本開示のさらに他の態様は、本明細書に記載のトランスジェニック非ヒト動物に由来する組織に関する。いくつかの実施形態では、組織は、結合組織（血液を含む）、筋肉組織、神経組織、内皮組織、及び上皮組織からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、組織は、肺、心臓、肝臓、腎臓、筋肉、脳、眼、乳房、骨、及び軟骨からなる群から選択される器官由来である。

40

【0046】

本開示の他の態様は、本明細書に記載のトランスジェニック非ヒト動物に由来する細胞に関する。いくつかの実施形態では、細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、CD34+細胞、筋芽細胞、内皮細胞、肝細胞、線維芽細胞、乳房細胞、リンパ球、または網膜細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は誘導性多能性幹（iPS）

50

細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、結合組織（血液を含む）、筋肉組織、神経組織、内皮組織、及び上皮組織からなる群から選択される組織由来である。いくつかの実施形態では、細胞は、肺、心臓、肝臓、腎臓、筋肉、脳、眼、乳房、骨、及び軟骨からなる群から選択される器官由来である。いくつかの実施形態では、細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞、臍帯血幹細胞、または末梢血幹細胞である。

【0047】

特定の実施形態によれば、細胞のゲノムを編集するための、アデノ随伴ウイルス（AAV）C1ade Fベクター（例えば、C1ade Fキャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損AAV）またはAAVベクターバリエーション（例えば、AAV9キャプシドに対するキャプシドバリエーションを含む複製欠損AAV）が提供される。特定の実施形態では、AAV C1ade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上のC1ade Fキャプシドまたは1つ以上のキャプシドバリエーションと（AAV9キャプシドと比較して）、ゲノムの標的遺伝子座（本明細書中では標的部位とも呼ばれる）に組み込まれる1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む編集エレメント（本明細書では標的カセットとも呼ばれる）と、編集エレメント（標的カセット）に隣接して、標的遺伝子座（標的部位）の上流にある領域と相同性を有する5'相同アームポリヌクレオチド配列と、編集エレメント（標的カセット）に隣接して、標的遺伝子座（標的部位）の下流にある領域と相同性を有する、3'相同アームポリヌクレオチド配列とを含み得る。編集エレメント（標的カセット）は、本明細書に記載の逆位末端反復（ITR）を含み、本明細書に記載されているように、補正ゲノム内に含まれていてもよい。特定の実施形態では、1つ以上のC1ade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、本明細書に記載のC1ade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションのいずれかであり得る。特定の実施形態では、1つ以上のC1ade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC1ade Fキャプシドまたは1つ以上のキャプシドバリエーションが、AAVF5（配列番号11）、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、AAVF9（配列番号10）、AAVF16（配列番号17）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC1ade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも95%のパーセント配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC1ade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF5（配列番号11）、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、AAVF9（配列番号10）、AAVF16（配列番号17）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも95%のパーセント配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、標的遺伝子座（標的部位）はセーフハーバー部位であり得る。特定の実施形態では、セーフハーバー部位は、第19染色体上のAAVS1遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、標的遺伝子座（標的部位）は、本明細書に記載の疾患状態に関連する遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、細胞は幹細胞であってもよい。特定の実施形態において、幹細胞は、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間充質幹細胞であり得る。

【0048】

特定の実施形態によれば、細胞のゲノムを編集する方法が提供される。特定の実施形態

10

20

30

40

50

では、細胞のゲノムを編集する方法は、細胞を1つ以上のAAV C l a d e Fベクター（例えば、C l a d e Fキャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損AAV）またはAAVベクターバリエーション（例えば、AAV9キャプシドに対するキャプシドバリエーションを含む複製欠損AAV）を含み得る。特定の実施形態では、形質導入は、さらなる外因性ヌクレアーゼなしに実施され得る。特定の実施形態では、AAV C l a d e FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションと（AAV9キャプシドと比較して）、ゲノムの標的遺伝子座（標的部位）に組み込まれる1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む編集エレメント（標的カセット）と、編集エレメント（標的カセット）に隣接して、標的遺伝子座（標的部位）の上流にある領域と相同性を有する5'相同アームポリヌクレオチド配列と、編集エレメント（標的カセット）に隣接して、標的遺伝子座（標的部位）の下流にある領域と相同性を有する、3'相同アームポリヌクレオチド配列とを含み得る。編集エレメント（標的カセット）は、本明細書に記載のITRを含む、本明細書に記載の補正ゲノム内に含まれる。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF5（配列番号11）、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、AAVF9（配列番号10）、AAVF16（配列番号17）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも95%のパーセント配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF5（配列番号11）、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、AAVF9（配列番号10）、AAVF16（配列番号17）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも95%のパーセント配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態において、AAV C l a d e FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列のためのプロモーターを含まない。特定の実施形態では、標的遺伝子座（標的部位）はセーフハーバー部位であり得る。特定の実施形態では、セーフハーバー部位は、第19染色体上のAAVS1遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、標的遺伝子座（標的部位）は、本明細書に記載の疾患状態に関連する遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、細胞は幹細胞であってもよい。特定の実施形態において、幹細胞は、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間充織幹細胞であり得る。

【0049】

特定の実施形態によれば、対象の細胞のゲノムを編集することによって対象の疾患または障害を治療する方法が提供される。特定の実施形態では、対象の細胞のゲノムを編集することによって対象の疾患または障害を治療する方法は、本明細書に記載のAAV C l a d e FベクターまたはAAVベクターバリエーションで対象の細胞を形質導入し、形質導入された細胞は、疾患または障害を治療する。特定の実施形態では、細胞の形質導入は、さらなる外因性ヌクレアーゼなしに実施され得る。特定の実施形態では、AAV C l a d e FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションと（AAV9キャプシドと比較して）、ゲノムの標的遺伝子座（標的部位）に組み込まれる1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む編集エレメント（標的カセット）と、編集エレメント（標的カセット）に隣接して、標的遺伝子座（

10

20

30

40

50

標的部位)の上流にある領域と相同性を有する5'相同アームポリヌクレオチド配列と、編集エレメント(標的カセット)に隣接して、標的遺伝子座(標的部位)の下流にある領域と相同性を有する、3'相同アームポリヌクレオチド配列とを含み得る。編集エレメント(標的カセット)は、本明細書に記載のITRを含む、本明細書に記載の補正ゲノム内に含み得る。特定の実施形態では、C l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF7(配列番号8)、AAVF12(配列番号12)、AAVF15(配列番号16)、AAVF17(配列番号13)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF5(配列番号11)、AAVF7(配列番号8)、AAVF12(配列番号12)、AAVF15(配列番号16)、AAVF17(配列番号13)、AAVF9(配列番号10)、AAVF16(配列番号17)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF7(配列番号8)、AAVF12(配列番号12)、AAVF15(配列番号16)、AAVF17(配列番号13)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも95%のパーセント配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションが、AAVF5(配列番号11)、AAVF7(配列番号8)、AAVF12(配列番号12)、AAVF15(配列番号16)、AAVF17(配列番号13)、AAVF9(配列番号10)、AAVF16(配列番号17)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも95%のパーセント配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態において、AAV C l a d e FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列のためのプロモーターを含まない。特定の実施形態では、標的遺伝子座(標的部位)はセーフハーバー部位であり得る。特定の実施形態では、セーフハーバー部位は、第19染色体上のAAVS1遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、標的遺伝子座(標的部位)は、本明細書に記載の疾患状態に関連する遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、細胞は幹細胞であってもよい。特定の実施形態において、幹細胞は、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間充織幹細胞であり得る。特定の実施形態では、疾患または障害は、細胞ゲノムにおける1つ以上の変異によって引き起こされ得る。特定の実施形態では、疾患または障害は、遺伝性代謝疾患、リソソーム蓄積症、ムコ多糖症、免疫不全疾患、及びヘモグロビン異常症、及び感染症から選択され得る。

【0050】

本明細書に記載のAAV C l a d e FベクターまたはAAVベクターバリエーションを対象に直接投与することによって、インビボゲノム編集によって対象の疾患または障害を治療する方法も本明細書に開示される。特定の実施形態では、AAV C l a d e FベクターまたはAAVベクターバリエーションを対象に直接投与することによって、対象の細胞のインビボゲノム編集によって対象の疾患または障害を治療する方法が開示される。特定の実施形態では、AAV C l a d e FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションと(AAV9キャプシドと比較して)、ゲノムの標的遺伝子座(標的部位)に組み込まれる1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む編集エレメント(標的カセット)と、編集エレメント(標的カセット)に隣接して、標的遺伝子座(標的部位)の上流にある領域と相同性を有する5'相同アームポリヌクレオチド配列と、編集エレメント(標的カセット)に隣接して、標的遺伝子座(標的部位)の下流にある領域と相同性を有する、3'相同アームポリヌクレオチド配列とを含んでも良く、該ベクターは前記対象の細胞に形質導入し、該1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を前記細胞のゲノムに組み込む。編集エレメント(標的カセット)は、本明細書に記載のITRを含む、本明細書に記載の補正ゲノム内に含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、AAV

F 1 (配列番号 2)、A A V F 2 (配列番号 3)、A A V F 1 1 (配列番号 4)、A A V F 3 (配列番号 5)、A A V F 4 (配列番号 6)、A A V F 6 (配列番号 7)、A A V F 7 (配列番号 8)、A A V F 8 (配列番号 9)、A A V F 9 (配列番号 10)、A A V F 5 (配列番号 11)、A A V F 1 2 (配列番号 12)、A A V F 1 7 (配列番号 13)、A A V F 1 3 (配列番号 14)、A A V F 1 4 (配列番号 15)、A A V F 1 5 (配列番号 16)、A A V F 1 6 (配列番号 17)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせを含む。特定の実施形態において、A A V C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションは、1 つ以上の治療用ヌクレオチド配列のためのプロモーターを含まない。特定の実施形態では、標的遺伝子座 (標的部) はセーフハーバー部位であり得る。特定の実施形態では、セーフハーバー部位は、第 19 染色体上の A A V S 1 遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、標的遺伝子座 (標的部) は、本明細書に記載の疾患状態に関連する遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、細胞は幹細胞であってもよい。特定の実施形態において、幹細胞は、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間充質幹細胞であり得る。特定の実施形態では、疾患または障害は、細胞ゲノムにおける 1 つ以上の変異によって引き起こされ得る。特定の実施形態では、疾患または障害は、遺伝性代謝疾患、リソソーム蓄積症、ムコ多糖症、免疫不全疾患、及びヘモグロビン異常症、及び感染症から選択され得る。また、本明細書には、細胞のゲノムを編集するための 1 つ以上の A A V C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションを含むキットが開示される。

10

【0051】

20

このアプリケーションには、カラーで実行される図面が少なくとも 1 つ含まれている。この申請書のカラー図面の写しは、要請に応じて、必要な手数料を支払って、オフィスによって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図 1】A A V 9 と比較して C l a d e F A A V キャプシドバリエーションポリペプチド配列のアライメントを示す。C l a d e F A A V キャプシドバリエーションポリヌクレオチド配列の対応するアライメントは、米国特許公開第 20130096182 A1 号の図 1 に提供されている。

【図 2】塩基変化、アミノ酸変化、及び V P 1 または V P 3 にあるかどうかを含む、各配列のキャプシドにおけるヌクレオチド変異のいくつかを列挙したチャートである。

30

【図 3】ゲノム編集に使用された 1 組のドナー I T R - A A V S 1 - F P ベクター構築物の一部の模式図を示す。A A V ベクターは、5' 相同性アーム、及び 3' 相同性アーム、ならびに 2 A 配列、スプライスアクセプター配列、及びポリアデニル化配列を含む調節エレメントを含んでいた。導入遺伝子として黄色蛍光タンパク質 (「YFP」または「FP」) を用いた。A A V 2 I T R は相同アームに隣接し、ベクターゲノムは A A V F キャプシドにパッケージングされて A A V F - A A V S 1 - F P ドナーベクターを形成した。重要なことに、F P 遺伝子を含むベクターは、発現を駆動するプロモーターを含まない。F P 遺伝子は、内因性染色体プロモーターの下流の A A V S 1 に正確に組み込まれる場合にのみ発現される。

40

【図 4】A A V F ベクターによって媒介される導入遺伝子組み込みの標的部であった、標的化染色体 A A V S 1 遺伝子座、及び編集された A A V S 1 遺伝子座の概略図を示す。上の図 (図 4 A) 「野生型 A A V S 1 遺伝子座」は、5' 相同性アーム、及び 3' 相同性アームを含むが、導入遺伝子を含まない野生型 A A V S 1 遺伝子座を示す。「OUT フォワードプライマー領域」プライマー、及び「OUT リバースプライマー領域」プライマーを用いた相同性領域の外側に位置するプライマーによる増幅は、約 1.9 kb の長さの断片 (「断片 1」と表示されたラインを参照) を生じ、組み込まれた導入遺伝子を含まない。下図 (図 4 B)、「編集 A A V S 1 遺伝子座」は、5' 相同性アーム、調節エレメント、組み込み導入遺伝子、及び 3' 相同性アームを含む編集された A A V S 1 遺伝子座を示す。「OUT フォワードプライマー領域」プライマー、及び「OUT リバースプライマー

50

領域」プライマーを用いた相同性領域の外側に位置するプライマーによる増幅は、約 3 . 0 k b の長さの断片を生じる（「断片 2」と表示されたラインを参照）導入遺伝子を含む。「OUTフォワードプライマーRegion」プライマー、及び「Inリバースプライマー」を用いた 5' 接合領域（5' 相同性アームと導入遺伝子との間の接合部）の増幅は、約 1 . 7 k b の長さの断片を生じる（「断片 3」）。「OUTリバースプライマーRegion」プライマー、及び「Inフォワードプライマー」を用いた 3' 接合領域（導入遺伝子と 3' 相同性アームとの間の接合部）を増幅すると、約 1 . 2 k b の断片が生じる（「断片 4」）。導入遺伝子が組み込まれていない場合、5' 接合領域または 3' 接合領域の増幅時に結果物が存在しない。

【図 5】形質導入の 24 時間後の K562 細胞における YFP 発現のフローサイトメトリー分析からの代表的な散布図を示す。（A）任意のベクターで形質導入しなかった細胞（非形質導入）、（B）50,000 MOI、（C）100,000 MOI、（D）200,000 MOI、及び（E）400,000 MOI で細胞を AAVF7 F P ベクターで様々な感染多重度で形質導入した。示されたデータは、代表サンプルからのものである。各散布図内の境界線上の事象は、これらの細胞において、内因性染色体プロモーターの下流のヒト 19 番染色体の AAVS1 に正確に組み込まれたドナー ITR - AAVS1 - F P ベクターからのプロモーターのない F P 遺伝子を示す F P 発現細胞を表す。

【図 6】形質導入 72 時間後の K562 細胞における YFP 発現のフローサイトメトリー分析からの代表的な散布図を示す。（A）任意のベクターで形質導入しなかった細胞（非形質導入）、（B）50,000 MOI、（C）100,000 MOI、（D）200,000 MOI、及び（E）400,000 MOI で細胞を AAVF7 F P ベクターで形質導入した。境界線の上の事象は、ドナー ITR - AAVS1 - F P ベクター中のプロモーターのない F P 遺伝子の正確に標的化された組み込みを有する細胞を表す。

【図 7】CD34+ K562 白血病細胞における AAVS1 遺伝子座におけるプロモーターのない YFP 導入遺伝子の標的化された組み込み後の YFP 発現の平均パーセンテージを示す。（A）50,000、100,000、150,000、200,000、300,000、及び 400,000 の MOI を有する細胞における AAVF7 ベクターによる形質導入の 24 時間後の YFP 発現を示す棒グラフ。（B）50,000、100,000、150,000、200,000、及び 400,000 の MOI を有する細胞における AAVF7 ベクターによる形質導入 72 時間後の YFP 発現を示す棒グラフ。各バーは、最大 7 つのサンプルからまとめられたデータを表す。

【図 8】K562 細胞における AAVS1 遺伝子座への YFP 導入遺伝子の標的組み込みの PCR 確認を示す。A）テンプレートなし、形質導入されていない、または 100,000 の MOI で AAVF7 F P ベクターで形質導入された K562 細胞由来の代表的サンプルから増幅された DNA を示すゲル。レーン 1：DNA ラダー、レーン 2：テンプレート対照なし、レーン 3：非形質導入対照、及びレーン 4：AAVF7 F P 形質導入 K562。矢印は、F P 組み込み AAVS1 ~ 3 . 1 k b 断片または非組み込み AAVS1 ~ 1 . 9 k b 断片のいずれかを指す。B）テンプレートなし、形質導入されていない、または 100,000 の MOI を有する AAVF7 F P ベクターで形質導入された K562 細胞由来の代表的サンプルから増幅された DNA を示すゲル。レーン 1：DNA ラダー、レーン 2：テンプレート対照なし、レーン 3：形質導入していない対照、レーン 4：AAVF7 F P ベクターで形質導入した K562。矢印は、増幅された F P 組み込み AAVS1 ~ 3 . 1 k b 断片または増幅された非組み込み AAVS1 ~ 1 . 9 k b 断片のいずれかを指す。

【図 9】AAVF7 F P ベクターによる形質導入の 1 日後の標的化された組み込み後の初代 CD34+ 細胞における YFP 発現の代表的な散布図を示す。（A）任意のベクターで形質導入されていない細胞（非形質導入）、（B）AAVF7 F P ベクターで形質導入された細胞、及び（C）AAVF17 F P ベクターで形質導入された細胞。AAVF7 または AAVF17 ベクターのいずれかで形質導入した細胞は、非形質導入細胞と比較して有意な量の YFP 発現を示した（A とそれぞれ B、及び C を比較する）。（B）、及び

10

20

30

40

50

(C)のYFP発現は、AAVFベクターによって送達されたプロモーターのないFP遺伝子が、染色体AAVS1座に正確に組み込まれたことを示す。

【図10】AAVF-FPベクターでの形質導入の4日後に標的化された組み込み後の初代CD34+細胞におけるYFP発現の代表的な散布図を示す。(A)任意のベクターで形質導入されていない細胞(非形質導入)、(B)AAVF7-FPベクターで形質導入された細胞、及び(C)AAVF17-FPベクターで形質導入された細胞。AAVF7またはAAVF17-FPベクターで形質導入された細胞は、非形質導入細胞と比較して有意な量のYFP発現を示した(それぞれB及びCを、Aと比較する)、AAVFベクターによって送達された遺伝子の正確な標的組み込みを示す。

【図11】代表的なサンプルからのAAVF-FPベクターによる形質導入の18日後の標的化された組み込み後の、初代CD34+細胞におけるYFP発現の代表的な散布図を示す。(A)任意のベクターで形質導入されていない細胞(非形質導入)、(B)AAVF7-FPベクターで形質導入された細胞、及び(C)AAVF17-FPベクターで形質導入された細胞。AAVF7またはAAVF17-FPベクターで形質導入された細胞は、非形質導入細胞と比較して有意な量のYFP発現を示した(AとそれぞれB、及びCを比較する)。

【図12】標的化された組み込み後の初代CD34+細胞におけるYFP発現を示す。(A)非形質導入細胞、及び形質導入後4、18、20、及び39日に、AAVF7-FPベクターまたはAAVF17-FPベクターのいずれかで形質導入された細胞に関するYFP陽性細胞のパーセンテージを示す表。(B)100,000のMOIでAAVF-FP形質導入後4、18、20、及び39日のYFPを発現する初代CD34+細胞の頻度を示す折れ線グラフ。菱形の線は非形質導入細胞を表し、四角の線はAAVF7-FPベクターで形質導入された細胞を表し、三角形の線はAAVF17-FPベクターで形質導入された細胞を表す。

【図13】初代CD34+細胞におけるAAVS1遺伝子座への標的化された組み込みのPCR確認を示す。テンプレートなし、形質導入されていない、または150,000のMOIを有するAAVF7-FPベクターで形質導入された初代CD34+細胞の代表的サンプルから増幅されたDNAを示すゲル。レーン1:DNAラダー、レーン2:テンプレート対照なし、レーン3:未形質転換対照、レーン4:DNAMarker、及びレーン5:形質導入されたAAVF7-FPベクター。矢印は、5'接合領域の増幅産物を示すFP組み込みAAVS1(~1.7kb断片)を指す。左のインセットは、レーン1にロードされたDNAラダーを示す。

【図14】OUTフォワードプライマー領域から始まるAAVS1遺伝子座におけるYFP遺伝子配列の標的組み込みの配列確認を示している。配列決定の結果は、YFP遺伝子が存在し、AAVS1遺伝子座に正しく組み込まれていることを示している。

【図15】5'相同性アームの近くから始まるAAVS1遺伝子座におけるYFP配列の標的化された組み込みの配列確認を示す。配列決定の結果は、YFP遺伝子が存在し、AAVS1遺伝子座に組み込まれていることを示している。

【図16】調節エレメントの5'領域の近くから始まるAAVS1遺伝子座におけるYFP配列の標的化された組み込みの配列確認を示す。配列決定の結果は、YFP遺伝子が存在し、AAVS1遺伝子座に組み込まれていることを示している。

【図17】調節エレメントの3'領域付近で開始するAAVS1遺伝子座におけるYFP配列の標的組み込みの配列確認を示す。配列決定の結果は、YFP遺伝子が存在し、AAVS1遺伝子座に組み込まれていることを示している。

【図18】導入遺伝子の5'領域付近で開始するAAVS1遺伝子座におけるYFP配列の標的化された組み込みの配列確認を示す。配列決定の結果は、YFP遺伝子が存在し、AAVS1遺伝子座に組み込まれていることを示している。

【図19】「INRリバースプライマー」領域の近くで開始するAAVS1遺伝子座におけるYFP配列の標的化された組み込みの配列確認を示す。配列決定の結果は、YFP遺伝子が存在し、AAVS1遺伝子座に組み込まれていることを示している。

【図20】実施例4の実験で実施されたステップの概略を示す。100万個のヒト臍帯血CD34+細胞が得られ（ステップ1参照）、亜致死的に照射された免疫不全のNOD/SCID成体マウスに注入された（ステップ2参照）。CD34+細胞を注射して2時間後、マウスにAAVF-ルシフェラーゼベクター（すなわち、AAVF7-ルシフェラーゼベクターまたはAAVF17-ルシフェラーゼベクター）を注射した。2～7日後、マウスにAAVF-Venusベクター（すなわち、AAVF7-VenusベクターまたはAAVF17-Venusベクター）を注射した（ステップ3参照）。最後に、インビボでのルシフェラーゼ発現を注射の4週間後に測定し、Venusの発現を注射の6週間後に定量した（ステップ4参照）。

【図21】代表的なレシピエントにおけるインビボ特異的ルシフェラーゼ発現を示す。図21Aは、AAVF-ルシフェラーゼベクターの静脈注射を受けたヒト臍帯血CD34+HSCで以前に異種移植された成体免疫不全マウスが、移植後の造血のすべての部位である脊椎、脾臓、臀部、及び長骨において特異的なルシフェラーゼ発現を示したことを示す。矢印は、脊椎、脾臓、肝臓、臀部、及び長骨におけるルシフェラーゼ発現を示す。肝臓及び脾臓のフラックスは 4.08×10^9 であり、尾部のフラックスは 1.74×10^9 であった。図21Bは、AAVF-ルシフェラーゼベクターの静脈内注射を受けたヒト臍帯血CD34+HSCで以前に異種移植されていない成体免疫不全マウスは、高レベルの特異的ルシフェラーゼ発現を示さないことを示す。肝臓及び脾臓のフラックスは 1.47×10^8 であり、尾部のフラックスは 2.22×10^8 であった。

【図22-1】AAVF7-VenusまたはAAVF17-Venusベクターの静脈内注射を受けたヒト臍帯血CD34+HSCで異種移植された成人免疫不全マウスにおけるVenus発現ヒトCD34+またはCD45+細胞のフローサイトメトリーデータを示すヒストグラムを示す。図22Aは、AAVF7-Venusベクターを注射した異種移植マウス的大腿CD34+細胞からのフローサイトメトリーデータを示す。移植されたヒト造血細胞の9.23%がVenusを発現した。図22Bは、AAVF7-Venusベクターを注射した異種移植マウス的大腿CD45+細胞からのフローサイトメトリーデータを示す。移植されたヒト造血細胞の8.35%がVenusを発現した。図22Cは、AAVF17-Venusベクターを注射した異種移植マウス的大腿CD34+細胞からのフローサイトメトリーデータを示す。移植されたヒト造血細胞の8.92%がVenusを発現した。図22Dは、AAVF17-Venusベクターを注射した異種移植マウス的大腿CD45+細胞からのフローサイトメトリーデータを示す。移植されたヒト造血細胞の8.59%がVenusを発現した。

【図22-2】図22Eは、AAVF7-Venusベクターを注射した異種移植マウスの脊椎CD45+細胞からのフローサイトメトリーデータを示す。移植されたヒト造血細胞の15.3%がVenusを発現した。図22Fは、AAVF17-Venusベクターを注射した異種移植マウスの脊椎CD45+細胞からのフローサイトメトリーデータを示す。移植されたヒト造血細胞の70.2%がVenusを発現した。図22Gは、AAVF7-Venusベクターを注入した異種移植マウスの脾臓CD45+細胞からのフローサイトメトリーデータを示す。移植されたヒト造血細胞の10.3%がVenusを発現した。図22Hは、AAVF17-Venusベクターを注射した異種移植マウスの脾臓CD45+細胞からのフローサイトメトリーデータを示す。移植されたヒト造血細胞の9.90%がVenusを発現した。図22の結果も表5に示す。

【図23】AAV Clade Fウイルスと他のAAV株との関係の鳥瞰図を示す。この鳥瞰図は、AAVFウイルスのキャプシド遺伝子のヌクレオチド配列相同性に基づく（Smithら、Mol Ther. 2014 Sep; 22(9): 1625-34）。

【図24】大きなDNAインサートの挿入のための一本鎖AAVベクターゲノムのマップを示す。一本鎖AAV2ゲノムは、AAV2 ITR、相同性アーム、調節配列、及びプロモーターを持たないVenusオープンリーディングフレーム（ORF）を含んでいた。Venusは蛍光レポータータンパク質である。Venus ORFを含むプロモーターを持たないVenusは、スプライスアクセプター、及び2A配列の下流にある。Ve

10

20

30

40

50

n u s O F の後にポリアデニル化シグナルが続く。各ホモロジーアームは 8 0 0 b p 長であり、第 1 9 染色体上の P P P 1 R 1 2 C 遺伝子のイントロン 1 を標的とする

【図 2 5】A A V S 1 における編集部分の挿入部位の模式図を示す。V e n u s のオープンリーディングフレームとスプライスアクセプター部位とに続く 2 A 配列からなる導入遺伝子カセットは、相同性アームによって両側に隣接している。相同性アームは、染色体 1 9 上の A A V S 1 座内のヒト P P P 1 R 1 2 C 遺伝子のイントロン 1 に相補的であり、2 つの相同性アーム間の部位への V e n u s の挿入を媒介する。

【図 2 6 - 1】A A V F 媒介ゲノム編集が頑強であり、ヒト C D 3 4 + 細胞、及び細胞株において効率的な編集があることを示す、ヒト細胞株、及び初代細胞における組換え A A V F ベクターによる大きなタンパク質コード配列の標的ゲノム挿入を示す。図 2 6 A : C D 3 4 + は、初代ヒト C D 3 4 + サイトカインで刺激された末梢血幹細胞を表す。図 2 6 B : K 5 6 2 は、ヒト C D 3 4 + 赤白血病細胞株である。図 2 6 C : H e p G 2 はヒト肝細胞株である。V e n u s 発現を示す細胞の割合（正確な挿入を示す）が、図 2 6 A ~ C に示されている。

【図 2 6 - 2】図 2 6 D は、形質導入されていない細胞と比較した組換え A A V F ウイルスによる形質導入後の C D 3 4 + 細胞の異なる V e n u s 発現集団を示す代表的なフロープロファイルを示す。

【図 2 6 - 3】図 2 6 E は、A A V F 7、A A V F 1 2、A A V F 1 5、A A V F 1 7、及び A A V 9 の編集活性を K 5 6 2 赤白血病の A A V 6、及び A A V 8 と比較して示す図である。図 2 6 F は、肝細胞株である H e p G 2 における同じウイルスの編集活性を示す。データは、編集と V e n u s の表現を表示する細胞の割合を示す。

【図 2 7】ヒト 1 9 番染色体上の A A V S 1 遺伝子座への大小のインサートの検出のための標的化された組み込みアッセイを示す。主題マップはプライマーの位置を示す。5' プライマーは染色体配列に相補的である。3' プライマーはインサートに特異的である。特異的なアンプリコンは、大きなインサートについて 1 . 7 k b であり、小さなインサートについて 1 k b であると予測される。スプリットプライマー対（染色体、及びインサート特異的）は、標的化された組み込みアッセイに特異性を与える。

【図 2 8】A A V F ベクターが特定のゲノム部位でのヌクレオチド置換を媒介することを示している。図 2 8 A は、ヒト P P P 1 R 1 2 C 遺伝子のイントロン 1 に 1 0 b p インサートを挿入するための一本鎖 A A V ベクターゲノムのマップを示す。このベクターは、N h e 1 制限酵素認識部位（G C T A G C）を含む野生型左相同性アーム（H A - L）をコードする。N S m u t ベクターは、第 1 9 染色体上の左相同性アームの T A 配列を A T に変更するように設計された。この変化は、N h e 1 部位の S p h 1 部位への変換をもたらし、配列を G C T A G C から G C A T G C に変更する。図 2 8 B は、染色体 1 9 上の P P P 1 R 1 2 C 遺伝子のイントロン 1 の 1 0 b p インサートに位置する上流プライマー、及び上流プライマーを使用して左側ホモロジーアームを増幅したことを示す。上の図は、K 5 6 2 細胞由来のゲノム DNA が野生型または N S M u t A A V F ベクターのいずれかを用いて編集されたときに生成される予想断片の相対的な大きさを示す。図 2 8 C は、野生型 A A V F ベクターで編集した K 5 6 2 細胞のゲノム DNA に由来する実際のアンプリコンを示すゲルである。レーンは、切断されていないアンプリコン（U n）、N h e 1（N h e 1）、及び S p h 1（S p h 1）で切断されたアンプリコンを示す。図 2 8 D は、野生型または N S M u t ゲノムのいずれかをコードする A A V F 7 または A A V F 1 7 ベクターで編集した後の K 5 6 2 DNA のゲル電気泳動を示す。図 2 8 E は、野生型または N S M u t ゲノムのいずれかをコードする A A V F 7 または A A V F 1 7 ベクターで編集した後の肝細胞癌細胞株、H e p G 2 のゲル電気泳動を示す。

【図 2 9】A A V F 7、及び A A V F 1 7 野生型または N S M u t ベクターで編集した細胞からの DNA の配列分析を示す。

【図 3 0】分裂細胞、及び非分裂細胞の両方において A A V F ベクターが編集を媒介すること、及び A A V F 媒介遺伝子編集が DNA 合成を必要としないことを示す表である。この図は、初代ヒト C D 3 4 + 細胞の分裂、及び非分裂サブセットにおける V e n u s を発

10

20

30

40

50

現する編集細胞の頻度を示す。Venus陽性であり、BrdU陽性または陰性であったすべてのCD34+細胞の割合を、フローサイトメトリーによって決定した。BrdU陽性細胞は分裂細胞を表し、BrdU陰性細胞は非分裂細胞を表す。

【図31-1】全身送達されたAAVFベクターによるインビボでの生着されたヒト造血幹細胞の効率的な編集を示す。図31Aは、実験設計図を示す。免疫不全NOD/SCIDマウスにヒト臍帯血CD34+造血幹細胞を移植した。細胞をAAVF17-Venusの静脈内注射の前に7週間生着させた。造血細胞をAAVF注射の12.5週間後に異種移植マウスの脊髄、及び大腿骨髄、及び脾臓から採取した。Venus発現のための多色フローサイトメトリーならびにヒト特異的表面マーカーの存在によって細胞を分析した。具体的には、Venus発現は、原始CD34+ヒト造血幹/前駆細胞、CD45+ヒト分化単核造血細胞、及び赤血球系統のグリコホリンA+細胞で分析した。

10

【図31-2】図31Bは、CD34+前駆細胞からグリコホリンA+赤血球へのヒト赤血球系統の分化経路の概略図を示す。図31Cは、移植の20週間後の異種移植マウスの骨髄細胞、及び脾臓細胞における長期生着ヒト細胞のフローサイトメトリープロファイルを示す。細胞は、編集のマーカーであるVenusの発現、及び特異的ヒト細胞表面マーカーの両方について分析した。

【図32】ヒト臍帯血CD34+造血幹/前駆細胞を異種移植した免疫不全マウスへのAAVFベクターの静脈注射後のインビボデータの要約である。Venus発現は、インビボで移植されたヒト造血幹細胞、及びその子孫におけるヒトPPP1R12C遺伝子のイントロン1へのプロモーターを持たないVenusカセットの標的挿入を反映する。図32Bは、図32Aのデータの要約である。図32A、及びBは、編集が長期的であり、その編集が安定して継承され（インサートが分化した子孫細胞において効率的に発現される）、インビボ編集がエクスピボ形質導入よりもずっと効率的であり得、そして編集の子孫CD34+細胞はVenus発現を長期間保持する。

20

【図33】は、初代ヒトサイトカインで刺激された末梢血CD34+細胞(PBSC)、及びHepG2ヒト肝細胞株であるK562赤白血病細胞株におけるプロモーターのないSA/2AVenusORFの標的化染色体挿入の配列分析を示す。部位特異的に組み込まれた配列は、染色体特異的プライマー、及びインサート特異的プライマーを用いて増幅された。増幅産物をTOPO-TAベクターにクローニングし、Sanger配列決定を用いて配列決定した。

30

【図34】初代ヒトサイトカインで刺激された末梢血CD34+細胞、及びHepG2ヒト肝細胞株における10bpインサート断片の標的化染色体挿入の配列分析を示す。部位特異的に組み込まれた配列は、染色体特異的プライマー、及びインサート特異的プライマーを用いて増幅された。増幅産物をTOPO-TAベクターにクローニングし、Sanger配列決定を用いて配列決定した。

【図35】AAVFは、AAVS1-CD34+細胞への小さなインサートの組み込みを標的とすることを示している。

【図36】HepG2(Hepatoma)細胞株におけるプロモーターのないVenus、及びRFLPのAAV標的化を示す。

【図37】ソートされた総集団、Venus陽性及びVenus陰性集団のCD34及びglycoA陽性細胞、Venus陰性集団のCD34/glycoA陽性細胞のバックゲーティング、ならびにglycoA陽性及びCD34陽性集団を示す、代表的な大腿骨髄フローサイトメトリーグラフを示す。

40

【図38】ソートされた総集団、Venus陽性及びVenus陰性集団のCD34及びglycoA陽性細胞、Venus陰性集団のCD34/glycoA陽性細胞のバックゲーティング、ならびにglycoA陽性及びCD34陽性集団を示す、代表的な脾臓フローサイトメトリーグラフを示す。

【図39】AAVベクターの相対的形質導入対編集効率を決定するために使用されるCBA-mCherry、及びAAS1-Venusベクターゲノムのマップを示す。

【図40-1】ヒトCD34+臍帯血細胞におけるmCherry(図40A)発現のフ

50

ローサイトメトリープロファイルを示す。

【図40-2】ヒトCD34+臍帯血細胞におけるVenus(図40B)発現のフローサイトメトリープロファイルを示す。

【図40-3】図40Cは、形質導入48時間後のCD34+細胞におけるmCherry、及びVenus発現の定量を示す。

【図40-4】図40DはVenusとmCherryの相対的発現(編集比)の比較を示す。バーは、mCherryを発現する細胞と対応するキャプシドとの比として、Venusを発現する細胞の割合の比を示す。黒の水平バーは1の比を示し、これはVenus:mCherryの発現の同等の効率を示す。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明の特定の実施形態を、具体的な実施例、順序、及び図面を用いて詳細に説明する。列挙された実施形態は、本発明が特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲内に含まれ得る全ての代替物、改変物、及び同等物を包含することが意図されているので、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではない。当業者であれば、本発明の実施に用いることができる本明細書に記載されたものと類似または同等の多くの方法、及び材料を認識するであろう。他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語、及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。すべての刊行物及び/または特許は、本明細書に完全に記載されるように参照により組み込まれる。

【0054】

本明細書では、外因性ヌクレアーゼの添加を必要とせずに相同組換えを用いて細胞のゲノムを精密に編集するために開発された、アデノ随伴ウイルス(AAV)Clade Fベクター(例えば、Clade Fキャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損AAV)、またはAAVベクターバリエーション(例えば、AAV9キャプシドに対するキャプシドバリエーションを含む複製欠損AAV)、及びそれらに関連する方法が提供される。特定の実施形態では、ゲノム編集は、細胞のゲノム配列(例えば、哺乳類染色体の標的遺伝子座位)に挿入、欠失、改変、点変異またはそれらの任意の組み合わせを導入することを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書で提供されるAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーション、及びその関連方法は、1つ以上のヌクレオチド配列の組み込みの前に、外因性ヌクレアーゼの添加を必要とせずに、細胞ゲノムの特定の位置に1つ以上のヌクレオチド配列を挿入するために使用される。特定の実施形態では、本明細書で提供されるClade FベクターまたはAAVベクターバリエーション、及びそれらに関連する方法を使用して、ヌクレオチド間結合を組み込む前に外因性ヌクレアーゼを添加する必要なく、細胞ゲノムの特定の位置にヌクレオチド間結合を挿入することができる。特定の実施形態では、本明細書に記載のClade FベクターまたはAAVベクターバリエーションで細胞を形質導入することにより対象の細胞のゲノムをエキソビボで編集し、さらに形質導入された細胞をさらに移植することによって、対象の疾患または障害を処置するために対象に投与することを含む。本明細書に記載のClade FベクターまたはAAVベクターバリエーションを対象に直接投与することによるインビボゲノム編集によって、対象の疾患または障害を治療する方法もまた提供される。本明細書中に記載される1つ以上のClade FベクターまたはAAVベクターバリエーションを含む細胞のゲノム編集のためのキットも本明細書に提供される。

【0055】

種々のAAVベクター(例えば、AAV2、AAV6、及びAAV8)を用いる相同組換えは以前に報告されている。しかし報告された効率は非常に低く、100万個の細胞で約1個であった。以下の実施例1、及び2に示すように、AAV Clade Fベクター(またはAAVベクターバリエーション)を使用して、以前に見られたよりもはるかに高い頻度で特定の染色体位置に遺伝子挿入を再現可能に標的化した。例えば、標的ゲノム編集は、初代細胞をAAV Clade Fベクター(またはAAVベクターバリエーション)で

10

20

30

40

50

20

30

40

50

扱われる編集エレメントを含む補正ゲノムを含み、(b) 標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の5'領域に対して相同性を有する編集エレメントの5'側にある5'相同アームヌクレオチド配列、及び(c) 編集の3'側にある3'相同アームヌクレオチド配列標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の3'領域に対して相同性を有する。いくつかの実施形態では、複製欠損AAVは、哺乳類染色体の標的遺伝子座への組み込みのための編集エレメントヌクレオチド配列を含む補正ゲノムを含み、この補正ゲノムは、編集エレメントヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターの本質的な欠如を有する。いくつかの実施形態では、複製欠損AAVが補正ゲノムを含み、補正ゲノムが細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むためのヌクレオチド間結合またはヌクレオチド配列から選択される編集エレメントを含み、編集エレメントを細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むために、AAVが、少なくとも約1% (例えば、少なくとも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%) の染色体組み込み効率を有する。いくつかの実施形態では、複製欠損AAVが補正ゲノムを含み、補正ゲノムが細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むためのヌクレオチド間結合またはヌクレオチド配列から選択される編集エレメントを含み、編集エレメントを細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むために、外因性ヌクレアーゼの非存在下で、AAVが、少なくとも約1% (例えば、少なくとも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%) の染色体組み込み効率を有する。補正ゲノムのいずれか1つのいくつかの実施形態では、補正ゲノムは、編集エレメントヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターの本質的な欠如を有する。補正ゲノムのいずれか1つのいくつかの実施形態では、補正ゲノムは、編集エレメントに作動可能に連結された外因性プロモーターをさらに含む。複製欠損AAVのいずれか1つのいくつかの実施形態では、AAVは、少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約4%、少なくとも約5%の染色体組み込み効率を有し、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または編集エレメントを細胞内の哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込むために少なくとも約90%の配列同一性を有する。

【0059】

本開示の他の態様は、AAVキャプシドに封入された補正ゲノムで、(例えば、哺乳類細胞染色体の標的遺伝子座に組み込むためのヌクレオチド間結合またはヌクレオチド配列から選択される編集エレメントと、標的遺伝子座に対する染色体の5'領域と相同性を有する編集エレメントの5'側にある5'相同アームヌクレオチド配列と、標的遺伝子座に対する染色体の3'領域と相同性を有する編集エレメントの3'側にある3'相同アームヌクレオチド配列とを含む) 本明細書に記載の該補正ゲノムを含む、複製欠損アデノ随伴ウイルス(AAV)を含む遺伝子編集ベクターであって、本明細書に記載の標的遺伝子座に本明細書に記載の編集エレメントを組み込むために、AAVが少なくとも10% (例えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%) の染色体組み込み効率を有する、遺伝子編集ベクターに関する。いくつかの実施形態では、染色体組み込み効率は、少なくとも10% (例えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%)、本明細書に記載の編集エレメントを外因性ヌクレアーゼの非存在下で本明細書に記載されるような標的遺伝子座に組み込むことができる。

【0060】

本明細書に記載の補正ゲノムは、5'相同アームヌクレオチド配列の5'逆方向末端反

10

20

30

40

50

復(5' ITR)ヌクレオチド配列、及び3' 相同アームヌクレオチド配列の3' 逆方向末端反復(3' ITR)ヌクレオチド配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、5' ITRヌクレオチド配列、及び3' ITRヌクレオチド配列は、(例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%同一または100%同一)AAV2ウイルス5' ITR、及びAAV2ウイルス3' ITRをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、5' ITRヌクレオチド配列は、配列番号36に対して少なくとも95%(例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%)の配列同一性を有する3' ITRヌクレオチド配列は、配列番号37に対して少なくとも95%(例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%)の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、5' ITRヌクレオチド配列、及び3' ITRヌクレオチド配列は、(1つ以上の)ヌクレオチド配列と実質的に同一である(例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%同一または100%AAV5ウイルス5' ITR、及びAAV5ウイルス3' ITRをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、5' ITRヌクレオチド配列は、配列番号38に対して少なくとも95%(例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%)の配列同一性を有する3' ITRヌクレオチド配列は、配列番号39に対して少なくとも95%(例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%)の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、5' ITRヌクレオチド配列、及び3' ITRヌクレオチド配列は、互いに実質的に鏡像である(例えば、5'または3' ITRの1、2、3、4または5個のヌクレオチド位置以外の互いの鏡像である)。

【0061】

例示的なAAV2 5' ITR(配列番号36) - t t g g c c a c t c c c t c t c t g c g c g c t c g c t c a c t g a g g c c g g g c g a c c a a a g g t c g c c c g a c g c c c g g g c t t t g c c c g g g c g g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c g c a g a g a g g g a g t g g c c a a c t c c a t c a c t a g g g g t t c c t

【0062】

例示的なAAV2 3' ITR(配列番号37) - a g g a a c c c c t a g t g a t g g a g t t g g c c a c t c c c t c t c t g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c g g g c g a c c a a a g g t c g c c c g a c g c c c g g g c t t t g c c c g g g c g g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c g c a g a g a g a g a g t a g c c a a

【0063】

例示的なAAV5 5' ITR(配列番号38) - c t c t c c c c c t g t c g c g t t c g c t c g c t c g c t g g c t c g t t t g g g g g g t g g c a g c t c a a a g a g c t g c c a g a c g a c g g c c c t c t g g c c g t c g c t g g c c g t c g c c c c c c a a a c g a g c c a g c g a g c g a g c g a a c g c g a c a g g g g g a g a g t g c c a c a c t c t c a a g c a a g g g g g t t t t g t a

【0064】

例示的なAAV5 3' ITR(配列番号39) - t a c a a a a c c t c c t t g c t t g a g a g t g t g g c a c t c t c c c c c c t g t c g c g t t c g c t c g c t c g c t c g t t t g g g g g g t g g c a g c t c a a a g a g c t g c c a g a c g a c g g c c c t c t g g c c g t c g c c c c c c a a a c g a g c c a g c g a g c g a g c g a a c g c g a c a g g g g g a g a g

【0065】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の補正ゲノムは、7kb(キロベース)を超

10

20

30

40

50

えない、6 kbを超えない、5 kbを超えない、または4 kbを超えないサイズである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の補正ゲノムは、4 kb ~ 7 kb、4 kb、及び6 kb、4 kb、及び5 kb、または4 . 1 kb、及び4 . 9 kbである。

【0066】

特定の実施形態では、細胞のゲノムを編集するためのAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーション(AAV9キャプシドと比較してバリエーション)を含む。特定の実施形態では、細胞のゲノムを編集するためのAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上のAAV Clade Fキャプシドを含む。特定の実施形態において、ドナーベクターは、標準的なAAVパッケージング方法に従って本明細書に記載のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションにパッケージングして、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーション(例えば、Chatterjee、1992参照)を形成させることができる。特定の実施形態では、1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、特定の細胞に対するAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションの指向性に影響を及ぼす。

【0067】

特定の実施形態によれば、1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、ヒト幹細胞由来AAVに由来し得る。健康なドナーからのサイトカインで刺激された末梢血CD34⁺幹細胞は、それらのゲノム中の内因性天然AAV配列を有することが以前に示されている(例えば、米国特許公開第20130096182A1号、及び第20110294218A1号参照)。細胞形質導入における使用のための個々のキャプシドヌクレオチド、及びタンパク質の有効性を含むAAV単離変異体(AAV9に対する変異体)の効力は、以前に実証されている(例えば、米国特許公開第20130096182A1号、及び第20110294218A1号参照)。

【0068】

それらのゲノム中の内在性天然AAV配列を有するドナーからの全長AAVキャプシドバリエーション遺伝子(AAV9に対する変異体)を単離し、配列決定した。キャプシドバリエーションのポリヌクレオチド、及びポリペプチド配列は、図1、及び米国特許公開第20130096182A1号として公開された2012年11月2日に出願された米国特許出願第13/668,120号、及び米国特許出願第13/097,046号、2014年1月14日に米国特許第8,628,966号として発行された米国特許公開第20130096182A1号として公開された2011年4月28日の米国特許出願第20110294218A1号に記載されている。特定の実施形態では、本明細書に記載のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAVF1(配列番号20)、AAVF2(配列番号20)、またはAAVF2(配列番号20)の群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む、21)、AAVF3(配列番号22)、AAVF4(配列番号23)、AAVF5(配列番号25)、AAVF11(配列番号26)、AAVF7(配列番号27)、AAVF8(配列番号28)、AAVF9(配列番号29)、AAVF12(配列番号30)、AAVF13(配列番号31)、AAVF14(配列番号32)、AAVF15(配列番号33)、AAVF16(配列番号34)、AAVF17(配列番号35)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせを含む。特定の実施形態では、本明細書に記載のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAVF1(配列番号2)、AAVF2(配列番号3)、AAVF11(配列番号4)、AAVF3(配列番号5)、AAVF4(配列番号6)、AAVF6(配列番号7)、AAVF7(配列番号8)、AAVF8(配列番号9)、AAVF9(配列番号10)、AAVF5(配列番号11)、AAVF12(配列番号12)、AAVF17(配列番号13)、AAVF13(配列番号14)、AAVF14(配列番号15)、AAVF15(配列番号16)、AAVF16(配列番号17)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせから選択されるポリペプチド配列を含む、1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションを含む(例えば、図1参照

10

20

30

40

50

）。

【0069】

特定の実施形態によれば、C l a d e F キャプシドまたはキャプシドバリエーションのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、本明細書において教示された配列と少なくとも約95%、96%、97%、より好ましくは約98%、及び最も好ましくは約99%の配列同一性を有し得る。パーセンテージ同一性は、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988) のような多くの配列比較プログラムまたは方法、ならびにGAP、BESTFIT、FASTA、またはTFASTA (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. から)、または国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトから入手できるBLASTなどの、比較アルゴリズムを実施するプログラムのいずれかをを用いて計算することができる。

【0070】

C l a d e F キャプシドまたはキャプシドバリエーション配列は、V1及び/またはV3キャップ遺伝子の1つ以上の位置で修飾されてもよく、遺伝子のこれらの遺伝子または機能的部分は、AAV C l a d e F ベクターまたはAAVベクターバリエーション、及び方法を提供する。Cap遺伝子V1、V2、及びV3は、複数の変異した配列から置換されてよく、典型的には共線様式V1-V2-V3で使用される。しかし、配列は、部分的なV1-V2-V3またはV1-V3またはV1-V1-V2-V3のように、切断されてもよい。例えば、1つの配列は、AAVF14の(AAVF4)-V3の(AAVF8)-V2のV1であり得る。好ましくは、C l a d e F キャプシドまたはキャプシドバリエーションは、AAV2またはそれ以上のレベルで標的細胞に形質導入する。

【0071】

特定の実施形態では、1つ以上のキャプシドバリエーションは、キャプシドバリエーションの1つ以上のV1、V2、及びV3ポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号20~35、AAV9キャプシドに対する変異体）、AAV9キャプシド（配列番号18）、AAV2キャプシド（配列番号19）、その変異体、断片、または変異体を含む。特定の実施形態では、1つ以上のまたはキャプシドバリエーションは、キャプシドバリエーション（配列番号20~35、AAV9キャプシドに対する変異体）の1つ以上のV1、V2、及びV3ポリヌクレオチド配列、任意の他の既知のAAVキャプシド、変異体、断片、または変異体である。

【0072】

特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e F キャプシドまたはキャプシドバリエーションは、キャプシドバリエーションのV1、V2、及びV3ポリペプチド配列（配列番号2~17、AAV9キャプシドに対する変異体）、AAV9キャプシド（配列番号1）、その変異体、断片または変異体である。特定の実施形態では、1つ以上のキャプシドバリエーションは、C l a d e F キャプシドバリエーション（配列番号2~17、AAV9と比較してバリエーション）のV1、V2、及びV3ポリペプチド配列の組み合わせ、任意の他の既知のAAVキャプシド、変異体、断片、または変異体である。

【0073】

いくつかの実施形態では、細胞のゲノムを編集するためのAAV C l a d e F ベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAV C l a d e F キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、「AAV C l a d e F キャプシド」とは、それぞれ、AAV9のAAV VP1、VP2、及び/またはVP3配列との少なくとも86%（例えば、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%）の配列同一性を有するAAV VP1、VP2、及び/またはVP3配列を有するキャプシドをいう。例示的なC l a d e F キャプシドには、AAVF1~17（

本明細書中ではAAVHSC1～17と称する)、AAV9、AAVHU31、AAVHU32、及びAAVAnc110が含まれる(例えば、Zinnら、In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector(2015)Cell Reports, Vol 12, pp.1056-1068)。

【0074】

いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドは、Clade F VP1、Clade F VP2、及びClade F VP3から選択される少なくとも1つまたは少なくとも2つのタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドは、Clade F VP1、Clade F VP2、及びClade F VP3タンパク質を含む。

10

【0075】

AAV Clade Fキャプシドの例示的なAAV VP1、VP2、及びVP3タンパク質配列を以下の表に示す。

【0076】

【表 1 - 1】

AAVキャプシド	VP 1	VP 2	VP 3
AAV 9	配列番号 1 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 1 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 1 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 1	配列番号 2 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 2 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 2 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 2	配列番号 3 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 3 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 3 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 3	配列番号 5 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 5 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 5 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 4	配列番号 6 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 6 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 6 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 5	配列番号 1 1 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 1 1 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 1 1 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 6	配列番号 7 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 7 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 7 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 7	配列番号 8 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 8 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 8 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 8	配列番号 9 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 9 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 9 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 9	配列番号 1 0 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6 < 分	配列番号 1 0 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 1 0 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 1 0	配列番号 3 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 3 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 3 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 1 1	配列番号 4 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 4 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 4 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6
AAVF 1 2	配列番号 1 2 のアミノ酸 1 ～ 7 3 6	配列番号 1 2 のアミノ酸 1 3 8 ～ 7 3 6	配列番号 1 2 のアミノ酸 2 0 3 ～ 7 3 6

10

20

30

40

【表 1 - 2】

AAVF13	配列番号14のアミノ酸1～736	配列番号14のアミノ酸138～736	配列番号14のアミノ酸203～736
AAVF14	配列番号15のアミノ酸1～736	配列番号15のアミノ酸138～736	配列番号15のアミノ酸203～736
AAVF15	配列番号16のアミノ酸1～736	配列番号16のアミノ酸138～736	配列番号16のアミノ酸203～736
AAVF16	配列番号17のアミノ酸1～736	配列番号17のアミノ酸138～736	配列番号17のアミノ酸203～736
AAVF17	配列番号13のアミノ酸1～736	配列番号13のアミノ酸138～736	配列番号13のアミノ酸203～736

10

【0077】

いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれ、AAV9 キャプシドタンパク質VP1、VP2、及びVP3のアミノ酸配列に対応する、それぞれ、配列番号1のアミノ酸1～736、アミノ酸138～736、またはアミノ酸203～736に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP1、VP2、及びVP3タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドが、それぞれAAV9 キャプシドタンパク質VP1及びVP2のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号1のアミノ酸1～736、及びアミノ酸138～736に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP1及びVP2タンパク質が、それぞれAAV9 キャプシドタンパク質VP1及びVP3のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号1のアミノ酸1～736、及びアミノ酸203～736と少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP1及びVP3タンパク質が、それぞれAAV9 キャプシドタンパク質VP2及びVP3のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号1のアミノ酸138～736、及びアミノ酸203～736と少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP2及びVP3タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれ、AAV9 キャプシドタンパク質VP1、VP2、及びVP3のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号1のアミノ酸1～736、及びアミノ酸138～736及びアミノ酸203～736に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP1、VP2及びVP3タンパク質を含む。

【0078】

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれAAVF 1 ~ AAVF 9、及びAAVF 11 ~ AAVF 17 キャプシドタンパク質VP 1、VP 2、及びVP 3のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または13のいずれか1つのアミノ酸1 ~ 736、アミノ酸138 ~ 736、またはアミノ酸203 ~ 736と、少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP 1、VP 2、またはVP 3タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドが、それぞれAAVF 1 ~ AAVF 9及びAAVF 11 ~ AAVF 17 キャプシドタンパク質VP 1及びVP 2のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または13のいずれか1つのアミノ酸1 ~ 736及びアミノ酸138 ~ 736と、少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP 1及びVP 2タンパク質か、それぞれAAVF 1 ~ AAVF 9及びAAVF 11 ~ AAVF 17 キャプシドタンパク質VP 1及びVP 3のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または13のいずれか1つのアミノ酸1 ~ 736及びアミノ酸203 ~ 736と、少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP 1及びVP 3タンパク質か、それぞれAAVF 1 ~ AAVF 9及びAAVF 11 ~ AAVF 17 キャプシドタンパク質VP 2及びVP 3のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または13のいずれか1つのアミノ酸138 ~ 736及びアミノ酸203 ~ 736と、少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP 2及びVP 3タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれAAVF 1 ~ AAVF 9及びAAVF 11 ~ AAVF 17 キャプシドタンパク質VP 1、VP 2、及びVP 3のアミノ酸配列に対応する、それぞれ配列番号2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または13のいずれか1つのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸1 ~ 736、アミノ酸138 ~ 736、及びアミノ酸203 ~ 736の少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のアミノ酸配列同一性を有するVP 1、VP 2及びVP 3タンパク質を含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれAAV 9 キャプシドタンパク質VP 1、VP 2、及びVP 3をコードするヌクレオチド配列に対応する、配列番号18に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも約92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるVP 1、VP 2、またはVP 3タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドが、AAV 9 キャプシドタンパク質VP 1、VP 2、及びVP 3をコードするヌクレオチド配列に対応する、配列番号18と少なくとも85%（例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも約94%、少なくとも

96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされるVP1及びVP2か、配列番号18と少なくとも85%(例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされるVP1及びVP3か、配列番号18と少なくとも85%(例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされるVP2及びVP3を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドは、AAV9キャプシドタンパク質VP1、VP2、及びVP3をコードするヌクレオチド配列に対応する、配列番号18と少なくとも85%(例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるVP1、VP2、及びVP3を含む。

【0080】

いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドが、それぞれAAVF1~AAVF17キャプシドタンパク質VP1、VP2、及びVP3をコードするヌクレオチド配列に対応する、配列番号20、21、22、23、25、24、27、28、29、26、30、31、32、33、34、または35のいずれか1つに対して少なくとも85%(例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされるVP1、VP2、またはVP3タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドが、配列番号20~35のいずれか1つに対して少なくとも85%(例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされるVP1及びVP2タンパク質か、配列番号20~35のいずれか1つに対して少なくとも85%(例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされるVP1及びVP3タンパク質か、配列番号20~35のいずれか1つに対して少なくとも85%(例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされるVP2及びVP3タンパク質かを含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドが、それぞれAAVF1~AAVF17キャプシドタンパク質VP1、VP2、及びVP3をコードするヌクレオチド配列に対応する、配列番号20、21、22、23、25、24、27、28、29、26、30、31、32、33、34、または35のいずれか1つに対して少なくとも85%(例えば、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)のヌクレオチド配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされるVP1、VP2、及びVP3タンパク質を含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドは、それぞれ配列番号1に記載のアミノ酸1~736、アミノ酸138~736、及びアミノ酸203~736に

対応する AAV9 VP1、VP2 または VP3 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれ配列番号 1 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、及びアミノ酸 138 ~ 736 に対応する AAV9 VP1 及び VP2 キャプシドタンパク質か、それぞれ配列番号 1 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する AAV9 VP1 及び VP3 キャプシドタンパク質か、それぞれ配列番号 1 に記載のアミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する AAV9 VP2 及び VP3 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれ配列番号 1 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、アミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する AAV9 VP1、VP2、及び VP3 キャプシドタンパク質を含む。

10

【0082】

いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれ配列番号 2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または 13 に記載のアミノ酸 1 ~ 736 のアミノ酸に対応する AAVF1 ~ AAVF9、及び AAVF11 ~ AAVF17 のいずれかの VP1 キャプシドタンパク質から選択される VP1 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれ配列番号 2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または 13 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、及びアミノ酸 138 ~ 736 に対応する、AAVF1 ~ AAVF9、及び AAVF11 ~ AAVF17 のいずれかの VP1、及び VP2 キャプシドタンパク質から独立して選択される VP1、及び VP2 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれ配列番号 2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または 13 に記載のアミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する AAVF1 ~ AAVF9、及び AAVF11 ~ AAVF17 のいずれかの VP2、及び VP3 キャプシドタンパク質から独立して選択される VP2、及び VP3 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAV Clade F キャプシドは、それぞれ配列番号 2、3、5、6、11、7、8、9、10、4、12、14、15、16、17、または 13 に記載のアミノ酸 1 ~ 736、アミノ酸 138 ~ 736、及びアミノ酸 203 ~ 736 に対応する AAVF1 ~ AAVF9、及び AAVF11 ~ AAVF17 のいずれかの VP1、VP2、及び VP3 キャプシドタンパク質を含む。

20

30

【0083】

本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の断片は、全長ポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと実質的に同じ機能を提供するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの部分であり得る。本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の変異体は、特定のポリヌクレオチド配列への 1 つ以上のヌクレオチドの欠失、置換、付加、及び/または挿入によって得ることができる。このようなポリヌクレオチド配列の断片及び/または変異体は、全長ポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと実質的に同じ機能を有するポリペプチドをコードすることが理解されるべきである。

【0084】

40

本明細書中で使用される場合、ポリペプチド配列は、完全長ポリペプチド配列と実質的に同じ機能を提供しながら、ポリペプチド配列の断片及び/または変異体を含み得る。ポリペプチド配列の断片は、全長ポリペプチド配列と実質的に同じ機能を提供するポリペプチド配列の一部を意味する。ポリペプチド配列の変異体の例には、ポリペプチド配列に対する 1 つ以上のアミノ酸の欠失、置換、付加、及び/または挿入が含まれる。

【0085】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、組換えまたは非天然のポリヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は cDNA であり得る。

【0086】

特定の実施形態では、本明細書で提供される AAV Clade F ベクターまたは A

50

AAVベクターバリエーションは、AAVF（またはAAVHSC）または本明細書に記載の他のAAV Clade Fベクターのいずれかを含み得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAVF1、AAVF2、AAVF3、AAVF4、AAVF5、AAVF6、AAVF7、AAVF8、AAVF9、AAVF10、AAVF11、AAVF12、AAVF13、AAVF14、AAVF15、AAVF16、AAVF17、バリエーション、断片、変異体、またはそれらの任意の組み合わせなどの、本明細書に記載のAAVF（またはAAVHSC）ベクターのいずれかを含み得る。特定の実施形態において、Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAV9、AAVF1、AAVF2、AAVF3、AAVF4、AAVF5、AAVF6、AAVF7、AAVF8、AAVF9、AAVF10、AAVF11、AAVF12、AAVF13、AAVF14、AAVF15、AAVF16、AAVF17、AAVHU31、AAVHU32、バリエーション、断片、変異体、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0087】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、編集エレメント（本明細書では、標的カセットとも呼ばれ、「編集エレメント」、及び「標的カセット」という用語が、ゲノムの5'相同アームヌクレオチド配列5'、5'相同アームヌクレオチド配列5'、5'相同アームヌクレオチド配列5'、5'相同アームヌクレオチド配列5'標的遺伝子座（例えば、編集エレメントに隣接する5'相同アームポリヌクレオチド配列（標的カセット））と標的遺伝子座の上流にある領域（標的部位）との相同性を有する哺乳類染色体の5'）、及び編集エレメントの3'相同アームヌクレオチド配列3'を含み、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の3'領域に対して相同性を有する（標的カセット）に隣接し、標的遺伝子座（標的部位）の下流にある領域と相同性を有する3'相同アームポリヌクレオチド配列）を含む。

20

【0088】

特定の実施形態では、ゲノムの標的部位に組み込まれる1つ以上のヌクレオチド配列は、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列であり得る。本明細書で使用する「治療用」という用語は、疾患または障害の治療をもたらす物質またはプロセスを指す。「治療用ヌクレオチド配列」は、治療効果を提供するヌクレオチド配列である。治療効果は、直接的（例えば、タンパク質として発現される遺伝子の核酸の置換、または発現のためのイントロンへのcDNAの挿入）または間接的（例えば、プロモーターなどの調節要素の補正）であり得る。特定の実施形態では、治療用ヌクレオチド配列は、1つ以上のヌクレオチドを含み得る。特定の実施形態では、治療用ヌクレオチド配列は、その遺伝子、変異体、断片、または変異体であり得る。特定の実施形態では、遺伝子治療が所望される場合、治療用ヌクレオチド配列は、治療用抗体を含む治療上有効なタンパク質をコードする任意のヌクレオチド配列であり得る。治療用ヌクレオチド配列を含むClade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、好ましくは、注射、吸入、吸収、摂取または他の方法のような適切な投与経路を介して治療有効量で投与される。

30

【0089】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の編集エレメントは、1つのヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の編集エレメントは、1つのヌクレオチドからなり、本明細書に記載の標的遺伝子座は、1つのヌクレオチドからなるヌクレオチド配列であり、標的遺伝子座は点変異を表す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の編集エレメントは、少なくとも1、2、10、100、200、500、1000、1500、2000、3000、4000、または5000ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている編集エレメントは、1~5500、1~5000、1~4500、1~4000、1~3000、1~2000、1~1000、1~500、1~200、または1~100ヌクレオチド、または2~5500、2~5000、2~4500、2~4000、2~3000、2~2000、2~1000、2~500、2~200、または2~100ヌクレオチド、または10~5500、10~5

40

50

000、10～4500、10～4000、10～3000、10～2000、10～1000、10～500、10～200、または10～100ヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の編集エレメントは、エクソン、イントロン、5'非翻訳領域(UTR)、3'UTR、プロモーター、スプライスドナー、スプライスアクセプター、配列をコードするRNAもしくは非コードRNA、インスレーター、遺伝子、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の編集エレメントは、断片(例えば、2kb以下、1kb以下、500bp以下、250bp以下、100bp以下、50bp以下、または本明細書に記載されるような標的遺伝子座内またはそれにまたがる遺伝子のコード配列の少なくとも25bp)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の編集エレメントは、ヌクレオチド間結合(例えば、2つの隣接するヌクレオチドを連結するホスホジエステル結合)である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の編集エレメントはヌクレオチド間結合であり、本明細書に記載の染色体の標的遺伝子座は1つ以上のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列であり、編集エレメントは染色体の標的遺伝子座の欠失を含む。

10

【0090】

特定の実施形態において、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションの編集エレメント(または標的カセット)は、1つ以上の調節エレメントポリヌクレオチド配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、1つ以上の調節エレメントポリヌクレオチド配列は、2A配列、スプライスアクセプター配列、ポリアデニル化配列、及びそれらの任意の組み合わせから選択され得る。特定の実施形態では、標的カセットは、5'、及び3'相同アームポリヌクレオチド配列に隣接する1つ以上のAAV逆方向末端反復(ITR)ポリヌクレオチド配列を含み得る。特定の実施形態では、編集エレメント(または標的カセット)は、1つ以上のヌクレオチド配列の発現を駆動するプロモーターを含まない。特定の実施形態では、編集エレメント(または標的カセット)がプロモーターを含まない場合、細胞ゲノムへの組み込み後の1つ以上のヌクレオチド配列の発現は、細胞の1つ以上の調節要素によって制御され得る。特定の実施形態では、プロモーターを含まない1つ以上のヌクレオチド配列の発現は、1つ以上のヌクレオチド配列が細胞に正しく組み込まれたことを示す。

20

【0091】

特定の実施形態では、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上の相同アームポリヌクレオチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上の相同アームポリヌクレオチド配列は、ゲノムの標的遺伝子座(標的部位)の領域に相同であり得る。特定の実施形態において、1つ以上の相同アームポリヌクレオチド配列は、5'相同アームポリヌクレオチド配列であり得る。特定の実施形態では、5'相同アームポリヌクレオチド配列は、編集エレメント(または標的カセット)の5'末端に隣接し得る。特定の実施形態では、編集エレメント(または標的カセット)に隣接する5'相同アームポリヌクレオチド配列は、ゲノムの標的遺伝子座(標的部位)の上流にある領域と相同であり得る。特定の実施形態では、1つ以上の同種アームポリヌクレオチド配列は、3'相同アームポリヌクレオチド配列であり得る。特定の実施形態では、3'相同アームポリヌクレオチド配列は、編集エレメント(または標的カセット)の3'末端に隣接し得る。特定の実施形態では、編集エレメント(または標的カセット)に隣接する3'相同アームポリヌクレオチド配列は、ゲノムの標的遺伝子座(標的部位)の下流にある領域と相同であり得る。特定の実施形態では、相同アームポリヌクレオチド配列は、約500～1,000ヌクレオチド長であり得る。例えば、特定の実施形態では、相同アームポリヌクレオチド配列は、約800ヌクレオチド長であり得る。特定の実施形態では、相同アームポリヌクレオチド配列は、約3,000ヌクレオチド長までであり得る。いくつかの実施形態では、5'、及び3'相同アームヌクレオチド配列のそれぞれは、独立して、約50～2000ヌクレオチド、例えば約500～1000、約600～1000または約700～900ヌクレオチドのヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、5'、及び3'相同アームヌクレオチド配列のそれぞれは、独立して、約600ヌクレオチド

30

40

50

、約 800ヌクレオチド、または約 1000ヌクレオチドのヌクレオチド長を有する。

【0092】

いくつかの実施形態では、5'、及び3'相同アームヌクレオチド配列は、実質的に等しいヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、5'、及び3'相同アームヌクレオチド配列は、非対称的なヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド長の非対称性は、長さ50%まで、例えば長さ40%、30%、20%または10%までの、5'及び3'相同アームヌクレオチド配列長の差によって定義される。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド長の非対称性は、約600ヌクレオチドの長さを有する5'、及び3'相同アームのアームと、約800または約900ヌクレオチドを有する5'、及び3'相同アームのその他のアームとによって規定される。

10

【0093】

いくつかの実施形態では、5'相同アームヌクレオチド配列は、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の5'領域と少なくとも約90%（例えば、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.5%）のヌクレオチド配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、3'相同アームヌクレオチド配列は、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の3'領域と少なくとも約90%（例えば、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.5%）のヌクレオチド配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、5'相同アームまたは3'相同アームヌクレオチド配列と、それぞれ、対応する哺乳類染色体の5'領域または3'領域との相違を含み得、ヌクレオチド配列において、非コーディングの相違からなるか、本質的になる。いくつかの実施形態では、5'相同アームまたは3'相同アームヌクレオチド配列と、それぞれ、対応する哺乳類染色体の5'領域または3'領域との相違を含み得、保存的アミノ酸変化（例えば、塩基性アミノ酸が異なる塩基性アミノ酸に変化）を生じるヌクレオチド配列において、非コーディングの相違からなるか、本質的になる。いくつかの実施形態では、5'相同アームヌクレオチド配列は、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の5'領域と100%の配列同一性を有し、3'相同アームヌクレオチド配列は、標的遺伝子座に対する哺乳類染色体の3'領域と100%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座が、5'または3'相同アームと比較して、1つ以上の天然のSNPのような、1つ以上の変異を含む場合であっても、5'相同アームヌクレオチド配列、及び3'相同アームヌクレオチド配列は、それぞれ標的遺伝子座に対して哺乳動物染色体の5'領域、及び3'領域と相同であると考えられる。

20

30

【0094】

特定の実施形態において、細胞ゲノムの標的遺伝子座（標的部位）は、細胞ゲノムの編集が起こることが望ましいゲノムの任意の領域であり得る。例えば、細胞ゲノムの標的遺伝子座（標的部位）は、細胞内の染色体の座位（例えば、哺乳類の染色体の領域）を含むことができる。特定の実施形態では、染色体の遺伝子座はセーフハーバー部位であり得る。セーフハーバー部位は、ヌクレオチド配列が内因性遺伝子活性を混乱させることなく予測可能な様式で組み込み、機能し得るゲノム内の場所である。特定の実施形態では、セーフハーバー部位は、ヒト第19染色体（PPP1R12C遺伝子座としても知られる）のAAVS1遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、セーフハーバー部位は、ヒト19番染色体のAAVS1遺伝子座におけるPPP1R12Cの第1のイントロンであり得る。第19染色体qter13.3~13.4上のAAVS1遺伝子座は、ここに挿入された遺伝子が病原性のない状態で発現され、これを組み込む野生型AAVに類似しているので、導入遺伝子の挿入のための「セーフハーバー」部位であることが以前に示された病原性のない遺伝子座（Giraud 1994; Linden, 1996A; Linden 1996B）。特定の実施形態では、標的遺伝子座（標的部位）は、本明細書に記載の疾患状態に関連する遺伝子座であり得る。

40

【0095】

50

特定の実施形態では、標的遺伝子座は、対応する野生型哺乳類染色体と比較して、1つ以上の変異体ヌクレオチドを含む哺乳類染色体中の変異体標的遺伝子座である。いくつかの実施形態では、変異体標的遺伝子座が、点変異、ミスセンス変異、ナンセンス変異、1つ以上のヌクレオチドの挿入、1つ以上のヌクレオチドの欠失、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、変異体標的遺伝子座が、無形質変異、新形質変異、または反形質変異を含む。いくつかの実施形態では、変異標的遺伝子座は、常染色体優性変異、常染色体劣性変異、ヘテロ接合変異、ホモ接合変異、またはそれらの組み合わせを含む。本明細書に記載の変異標的遺伝子座のいずれか1つのいくつかの実施形態では、変異標的遺伝子座が、哺乳類染色体内における、プロモーター、エンハンサー、シグナル配列、イントロン、エキソン、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、内部リボソーム、逆エキソン、インスレーター、遺伝子、染色体の逆位、及び染色体転座を含むが、これらに限定されない。

10

【0096】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の染色体における標的遺伝子座は、 n 個のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列であり、 n は1以上の整数である（例えば、1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、500、1000、2000、3000、4000、5000またはその間の任意の整数）である場合、本明細書に記載の編集エレメントは m 個のヌクレオチドを含み、 m は n に等しい整数であり、編集エレメントは染色体の標的遺伝子座の置換を表す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の染色体における標的遺伝子座は、 n 個のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列であり、 n は1以上の整数である（例えば、1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、500、1000、2000、3000、4000、ここで記述されるような編集エレメントは m 個のヌクレオチドを含み、 m は n より大きい整数であり、編集エレメントは染色体の標的遺伝子座に対する置換付加を表す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の染色体における標的遺伝子座は、 n 個のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列であり、 n は1以上の整数である（例えば、1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、500、1000、2000、3000、4000、5000、またはそれらの間の任意の整数）であり、本明細書に記載の編集エレメントは m 個のヌクレオチドを含み、 m は n より小さい整数であり、編集エレメントは、染色体の標的遺伝子座のための置換欠失を表す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の染色体中の標的遺伝子座はヌクレオチド間結合であり、本明細書に記載の編集エレメントは m 個のヌクレオチドを含み、 m は1以上の整数である（例えば、1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、500、1000、2000、3000、4000、5000、またはそれらの間の任意の整数）。編集エレメントは、染色体の標的遺伝子座に対する付加を表す。

20

30

【0097】

いくつかの実施形態では、染色体中の標的遺伝子座は、哺乳類染色体（例えば、ヒト、マウス、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ラットまたはウサギ染色体）の標的遺伝子座である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類染色体のイントロンを含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類染色体のエキソンを含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類染色体の非コード領域を含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類染色体の調節領域を含み得る。いくつかの実施形態では、哺乳類染色体は、ヒト染色体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、X、及びYいくつかの実施形態では、哺乳類染色体は、マウス染色体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、X、及びYから選択される。いくつかの実施形態では、哺乳類の染色体はヒト19番染色体ではない。いくつかの実施形態では、哺乳類染色体は体細胞染色体である。例示的な体細胞が本明細書にさらに記載される。

40

【0098】

50

特定の実施形態では、1つ以上のヌクレオチド配列または編集エレメントは、組み込みの前にDNA切断の必要性なしに、相同組換えを介してゲノムに組み込まれ得る。特定の実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写アクチベーター様エレメントヌクレアーゼ(TALEN(登録商標))などの外因性ヌクレアーゼの添加を必要とせず、相同組換えを介して1つ以上のヌクレオチド配列または編集エレメントをゲノムに組み込むことができる。)、またはRNA誘導ヌクレアーゼ(CRISPR/Cas)である。

【0099】

特定の実施形態では、本明細書に記載のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションによって編集される細胞は、任意のタイプの細胞であり得る。特定の実施形態では、細胞は、肝臓、肺、軟骨、及び他の結合組織の細胞、眼、中枢及び末梢神経系、リンパ系、骨、筋肉、血液、脳、皮膚、心臓、及び消化管などの多種多様な哺乳類細胞であってもよい。AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションによって編集される細胞が、例えば肝細胞である場合、挿入されたヌクレオチド配列は、(疾患を改善または治療させる、または疾患または障害のさらなる進行を止めること)、または状態を防ぐ。AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションによって編集される細胞が肝細胞である場合、治療または予防される肝臓状態は、血友病、酵素送達、肝硬変、癌またはアテローム性動脈硬化症を含む。特定の実施形態では、細胞は体細胞(例えば、哺乳類体細胞)であってもよい。特定の実施形態では、細胞(例えば、哺乳類体細胞などの体細胞)は、結合組織(血液を含む)、筋肉組織、神経組織、及び上皮組織からなる群から選択される組織由来であり得る。特定の実施形態では、細胞(例えば、哺乳類体細胞などの体細胞)は、肺、心臓、肝臓、腎臓、筋肉、脳、眼、乳房、骨、及び軟骨からなる群から選択される器官由来であり得る。いくつかの実施形態では、細胞はCD34+細胞(例えば、CD34+体細胞)である。いくつかの実施形態では、細胞(例えば、哺乳類体細胞などの体細胞)は、肝細胞、線維芽細胞、乳房細胞、リンパ球または網膜細胞である。

【0100】

本明細書に示すように、本明細書に記載のClade FキャプシドまたはキャプシドバリエーションとともにパッケージングされたAAVは、血液幹細胞、肝臓、心臓、眼、乳房、及び関節組織などの特定の標的組織に対する特異指向性を示し、幹細胞目的の遺伝子を対象組織に導入する。ある種のベクターは、ゲノム編集による遺伝子治療の方法を提供する、追加の新規用途、及びベクターの標的器官を開く、血液脳関門のようなしっかりと制御された生物学的接合部を交差することができる。したがって、Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、それらのClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションに基づいて、特定の細胞について指向性を示すことができる。例えば、a) 筋肉組織または細胞の場合、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAVF5、AAVF7、AAVF13、AAVF15、及びAAVF17の群から選択することができ；b) 心臓または肺の組織または細胞について、ベクターは、AAVF13、AAVF15、及びAAVF17の群から選択され得る；c) 肝臓またはCNS組織または細胞について、ベクターは、AAVF5、AAVF13、AAVF17、AAVF7またはAAVF15から選択され得る；d) 幹細胞については、ベクターはAAVF17であり得る；e) B細胞前駆体については、ベクターはAAVF5であり得る；f) 骨髄性、及び赤血球系の前駆細胞では、ベクターはAAVF12であり得る；g) リンパ節、腎臓、脾臓、軟骨、及び骨の組織または細胞では、ベクターは、AAVF7、AAVF13、AAVF15、及びAAVF17の群から選択されるベクターの群から選択され得る。

【0101】

さらに、Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、6-Hisタグまたは親和性タグなどの様々なタグを含む細胞、または誘発された天然に存在する抗体または応答して投与されるモノクローナル抗体などのインターフェロン応答の向性を有し得

る 病原体または腫瘍細胞に送達される。

【 0 1 0 2 】

特定の実施形態において、細胞は、幹細胞（例えば、哺乳類幹細胞）であり得る。特定の実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞または間充織幹細胞を含む任意のタイプの幹細胞であり得る。特定の実施形態において、幹細胞（例えば、哺乳類幹細胞）は、造血幹細胞、臍帯血幹細胞、骨髓幹細胞、胎児肝幹細胞、または末梢血幹細胞であり得る。いくつかの実施形態では、幹細胞は、C D 3 4 + 幹細胞であり得る。特定の実施形態において、幹細胞（例えば、哺乳類幹細胞）は、造血幹細胞または末梢血幹細胞であり得る。幹細胞の形質導入は、一時的または永続的（永続的とも呼ばれる）のいずれかであり得る。一過性である場合、一実施形態は、治療用ヌクレオチドが、ベクター、ベクターに付着した物質、または外部因子または力のいずれかによって制御されるように使用されるかまたは発現される時間を可能にする。

10

【 0 1 0 3 】

特定の実施形態では、細胞は、C D 3 4 + 造血幹細胞株（H S C）、K 5 6 2 C D 3 4 + 白血病細胞株、H e p G 2 ヒト肝細胞株、末梢血幹細胞、臍帯血幹細胞、C D 3 4 + 末梢血幹細胞、W I - 3 8 ヒト二倍体線維芽細胞株、M C F 7 ヒト乳癌細胞株、Y 7 9 ヒト網膜芽細胞腫細胞株、S C I D - X 1 L B L ヒト E B V 不死化 B 細胞株、初代肝類洞内皮細胞、初代骨格筋芽細胞腫を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 0 4 】

本明細書中に記載されるようなクラッド F または A A V ベクターバリエーションで細胞を形質導入することを含む、対象の細胞のゲノムのエキスピボ編集方法も本明細書において提供される。特定の実施形態では、細胞を C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションで形質導入することは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）または R N A 誘導ヌクレアーゼ（C R I S P R / C a s）等の、さらなる外因性ヌクレアーゼなしで起こり得る。特定の実施形態において、細胞は、任意のタイプの細胞であり得る。特定の実施形態では、細胞は、本明細書に記載の幹細胞であり得る。例えば、特定の実施形態では、幹細胞のゲノムを編集する方法は、幹細胞を 1 つ以上の C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションで形質導入することを含み得る。特定の実施形態において、幹細胞の形質導入は、さらなる外因性ヌクレアーゼを必要とせずに実施され得る。特定の実施形態では、細胞は、本明細書に記載の体細胞であり得る。例えば、特定の実施形態では、体細胞のゲノムを編集する方法は、体細胞を 1 つ以上の C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションで形質導入することを含み得る。特定の実施形態において、体細胞の形質導入は、さらなる外因性ヌクレアーゼを必要とせずに実施され得る。特定の実施形態では、C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションは、1 つ以上の C l a d e F キャプシドまたはキャプシドバリエーション（A A V 9 と比較してバリエーション）、標的に組み込むためのヌクレオチド間結合またはヌクレオチド配列から選択される編集エレメント（標的カセット）に隣接し、ゲノムの標的遺伝子座（標的部位）に組み込まれる 1 つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む 5 ' 相同アームポリヌクレオチド配列（標的カセット）に隣接し、標的遺伝子座の下流にある領域（標的部位）と同一性を有する 3 ' 相同アームポリヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、インターヌクレオチド結合またはヌクレオチド配列または 1 つ以上の治療用ヌクレオチド配列は、組み込みの前に D N A 切断のためのさらなる外因性ヌクレアーゼを必要とせずにゲノムに組み込まれ得る。

20

30

40

【 0 1 0 5 】

本明細書では、C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションで細胞を形質導入し、形質導入細胞を対象にさらに移植して疾患または障害を治療することを含む、対象の細胞のゲノムをエキスピボで編集することによって、対象における疾患または障害を治療する方法も提供される。特定の実施形態では、本方法は、本明細書に記載の C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションベクターで対象の細胞を形質導入することを含み得る。特定の実施形態において、細胞は、さらなる外因性ヌクレアーゼなしに形

50

質導入され得る。特定の実施形態において、C l a d e FベクターまたはA A Vベクターバリエーションによる細胞の形質導入は、本明細書で提供されるように、または当業者に公知の形質導入の任意の方法によって実施され得る。特定の実施形態では、細胞を50,000、100,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、または500,000の感染多重度(MOI)で、または細胞の最適な形質導入を提供する任意のMOIで、C l a d e FベクターまたはA A Vベクターバリエーションで形質導入し得る。特定の実施形態では、形質導入細胞は、対象にさらに移植され、ここで、形質導入細胞は、疾患または障害を治療する。特定の実施形態では、細胞は、本明細書に記載される任意のタイプの細胞であり得る。

10

【0106】

本明細書に記載の哺乳類ゲノムの標的遺伝子座を編集する方法も本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に記載のA A V(例えば、キャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損A A V)での哺乳類ゲノムを含む細胞(ヒト、マウス、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ラット、またはウサギ細胞など)を、形質導入することを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、(a)哺乳類(ヒト、マウス、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ラットまたはウサギなど)から哺乳類細胞を得ること、(b)エキスピボで哺乳類細胞を培養してエキスピボ培養物を形成すること、(c)形質導入された哺乳類細胞を形成するために、本明細書に記載のA A V(例えば、キャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損A A V)で哺乳類細胞を形質導入すること、(d)形質導入された哺乳類細胞を哺乳類に投与すること、を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、(a)第1の哺乳類から哺乳類細胞を得ること、(b)エキスピボで哺乳類細胞を培養してエキスピボ培養物を形成すること、(c)哺乳類細胞を、本明細書に記載のA A V(例えば、形質導入された哺乳類細胞を形成するためにエキスピボ培養物中のキャプシドに封入された補正ゲノムを含む複製欠損A A V)に形質導入し；そして(d)形質導入された哺乳類細胞第2の哺乳類に投与することを含む。いくつかの実施形態では、第1哺乳類、及び第2哺乳類は異なる種である(例えば、第1哺乳類はヒト、マウス、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ラットまたはウサギであり、第2哺乳類は異なる種である)。いくつかの実施形態では、第1哺乳類、及び第2哺乳類は同じ種である(例えば、ヒト、マウス、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ラットまたはウサギの両方)。いくつかの実施形態では、本方法は、イン

20

30

【0107】

本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、結合組織(血液を含む)、筋肉組織、神経組織、及び上皮組織からなる群から選択される組織からのものである。本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、肺、心臓、肝臓、腎臓、筋肉、脳、眼、乳房、骨、及び軟骨からなる群から選択される器官由来である。本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、哺乳類細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞または末梢血幹細胞である。方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、哺乳類細胞はC D 3 4 +細胞である。

40

【0108】

本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、外因性ヌクレアーゼ、または外因性ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を同時形質導入または同時投与することなく、A A V(例えば、クラッドF A A V)を形質導入または投与する。例示的な外因性ヌクレアーゼには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、またはRNA誘導ヌクレアーゼ(CRISPR/Cas)が含まれる。本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、A A Vは、外因性ジンクフィンガーヌクレアーゼまたは外因性ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードす

50

るヌクレオチド配列を同時形質導入または同時投与することなく、形質導入または投与される。いくつかの実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、AAVS1遺伝子座を標的とするDNA結合ドメイン（例えば、AAVS1遺伝子座におけるPPPR12Cの第1のイントロンを標的とするDNA結合ドメイン）を含むジンクフィンガーヌクレアーゼである。

【0109】

本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、AAV（例えば、Clade F AAV）は、哺乳類染色体の標的遺伝子座に編集エレメントを組み込むために、少なくとも約1%（例えば、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約4%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%）の染色体組み込み効率を有する。本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、AAV（例えば、Clade F AAV）は、外因性ヌクレアーゼの非存在下で哺乳類染色体の標的遺伝子座に編集エレメントを組み込むために、少なくとも約1%（例えば、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約4%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%）の染色体組み込み効率を有する。本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、補正ゲノムの編集エレメントは、哺乳類細胞の10%~70%、20%~70%、40%~70%、50%~70%、10%~80%、20%~80%、40%~80%、50%~80%、10%~90%、20%~90%、40%~90%、50%~90%、10%~100%、20%~100%、40%~100%、または50%~100%の範囲の染色体組み込み効率で哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込まれる。本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、補正ゲノムの編集エレメントは、外因性ヌクレアーゼの非存在下で、哺乳類細胞の10%~70%、20%~70%、40%~70%、50%~70%、10%~80%、20%~80%、40%~80%、50%~80%、10%~90%、20%~90%、40%~90%、50%~90%、10%~100%、20%~100%、40%~100%、または50%~100%の範囲の染色体組み込み効率で哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込まれる。

【0110】

本方法のいずれか1つのいくつかの実施形態では、AAV（例えば、Clade F AAV）は、哺乳類染色体の標的遺伝子座に組み込まれた編集エレメントを含む対立遺伝子について、少なくとも約10%（例えば、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%）の細胞集団における対立遺伝子頻度をさらに特徴とする染色体組み込み効率を有する。いくつかの実施形態では、細胞集団における対立遺伝子頻度は、インビトロで本明細書で提供される細胞タイプの集団（例えば、CD34+造血幹細胞株（HSC）、K562 HepG2ヒト肝細胞株、末梢血幹細胞、臍帯血幹細胞、CD34+末梢血幹細胞、WI-38ヒト二倍体線維芽細胞株、MCF7ヒト乳癌細胞株、SCID-X1 LBLヒトEBV不死化B細胞株、初代ヒト肝細胞、初代肝類洞内皮細胞、または初代骨格筋芽細胞）を含むが、これらに限定されない。

【0111】

特定の実施形態によれば、対象の幹細胞のゲノムをエクスピボで編集し、編集された細胞を対象に移植して疾患または障害を治療することによって、対象の疾患または障害を治療する方法が提供される。特定の実施形態では、対象の幹細胞のゲノムを編集することによって対象の疾患または障害を治療する方法は、対象の幹細胞を、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションで形質導入するステップ形質導入された幹細胞

胞を対象に移植する段階を含み、形質導入された幹細胞は、疾患または障害を治療する。特定の実施形態では、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーション、標的遺伝子座に組み込まれる1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む編集エレメント（標的カセット）に隣接し、標的遺伝子座（標的部位）の上流にある領域と相同性を有する5'相同アームポリヌクレオチド配列、及び3'相同アームポリヌクレオチド配列（標的カセット）に隣接し、標的遺伝子座（標的部位）の下流にある領域と相同性を有する。特定の実施形態において、幹細胞への形質導入は、さらなる外因性ヌクレアーゼなしに実施され得る。特定の実施形態では、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列は、組み込みの前にDNA切断のためのさらなる外因性ヌクレアーゼを必要とせず、ゲノムに組み込まれ得る。

10

【0112】

特定の実施形態では、細胞が幹細胞である場合、治療される疾患または障害は、ゲノムの1つ以上の変異によって引き起こされる任意の疾患または障害であり得る。特定の実施形態では、治療される疾患または障害は、遺伝性代謝疾患、リソソーム蓄積症、ムコ多糖症、免疫不全疾患、ならびにヘモグロビン病疾患及び感染症から選択される。特定の実施形態では、編集される細胞が幹細胞である場合、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAVF7、AAVF12、AAVF15、AAVF17、改変体、変異体、及びそれらの組み合わせの群から選択され得る。ある実施形態では、編集される細胞が幹細胞である場合、Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAVF5、AAVF7、AAVF12、AAVF15、AAVF17、変異体、変異体、及びそれらの組み合わせの群から選択され得る。特定の実施形態では、Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAVF7（配列番号27）、AAVF12（配列番号30）、AAVF15（配列番号33）、AAVF17（配列番号35）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの組み合わせの群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションを含み得る。特定の実施形態では、Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、AAVF5（配列番号25）、AAVF7（配列番号27）、AAVF12（配列番号30）、AAVF15（配列番号33）、AAVF17（配列番号35）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの組み合わせ及びAAVF5の群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションを含み得る。特定の実施形態では、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションが、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列を含む1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションを含み得る。特定の実施形態では、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションが、AAVF5（配列番号11）、AAVF7（配列番号8）、AAVF12（配列番号12）、AAVF15（配列番号16）、AAVF17（配列番号13）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列を含む1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションを含み得る。

20

30

40

【0113】

別の実施形態では、CD34⁺HSCまたは別の供給源からのゲノム編集が可能なAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、HSC及びiPSCを含む幹細胞、及び、心臓、関節、脳、筋肉、肝臓を含む中枢神経系などの他の細胞の高効率な形質導入のために用いられても良い。AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションがインビトロで使用される場合、それらは研究及び調査の目的のために、または対象に後で移植される細胞または組織を調製するために使用され得る。好ましくは、対象は、ヒトなどの哺乳類であるが、本ベクターによって形質導入され得る組織を有する任意の他の動物、及びそれらのベクターを使用する方法であり得る。本発明のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、ヒト及び獣医学的使用

50

の両方に適している。AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションはまた、HSCなどの幹細胞の一過性形質導入のためにインビトロで使用され得る。形質導入の長さは、培養条件によって制御することができる。AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションがインビボで使用される場合、これらは、肝細胞または軟骨細胞などの標的細胞における取り込みまたは使用のための治療を受ける対象に直接投与され得る。AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションが中枢神経系の細胞を形質導入するために使用される場合、それらは好ましくは血液脳関門を通過してその有効性を維持することができる。

【0114】

AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションを対象に直接投与することにより、対象の細胞のインビボゲノム編集により対象の疾患または障害を治療する方法も本明細書で提供される。特定の実施形態において、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、本明細書に記載の任意のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションであり得る。特定の実施形態では、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーション、標的遺伝子座に組み込まれる1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む編集エレメント（標的カセット）に隣接し、標的遺伝子座（標的部位）の上流にある領域と相同性を有する5'相同アームポリヌクレオチド配列、及び3'相同アームポリヌクレオチド配列（標的カセット）に隣接し、標的遺伝子座（標的部位）の下流にある領域と相同性を有する。特定の実施形態において、投与されるAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、対象の細胞のゲノム編集によって疾患または障害を治療する。特定の実施形態では、インビボゲノム編集は、さらなる外因性ヌクレアーゼなしで行われ得る。特定の実施形態では、1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、本明細書で提供されるポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を含む。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、米国特許公開第20130096182A1号の図1または本明細書の図1に提供される配列、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの組み合わせから選択され得る。特定の実施形態では、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、好ましくは、注射、吸入、吸収、摂取または他の方法のような適切な投与経路を介して治療有効量で投与される。

【0115】

Xuら、Wangら、及びCarbonaroらを含む以前の研究は、ウイルスベクターのインビボ送達後のHSCの形質導入を示した（Xu 2004；Wang 2014；及びCarbonaro 2006参照）。しかし、これらの3つの研究のすべてに、レトロウイルス（Xu 2004）またはレンチウイルス（Wang 2014、及びCarbonaro 2006）のいずれかが関与していた。さらに、Xu et al.、及びCarbonaro et al.では注射が新生児マウスで実施され、ラパマイシン、及び大腿内注射が、Wangらの効率的な形質導入に必要であった。しかしながら、これらの論文のいずれも、成体マウスへのClade FベクターまたはAAVベクターバリエーションのインビボ形質導入によるHSCの形質導入を報告していない。実施例3で提供される新規な結果は、静脈注射によるHSC上でのAAVベクター形質導入を最初に示すものである。

【0116】

以下の実施例3に示すように、AAVF7またはAAVF17でシュードタイプ化されたClade Fベクター（またはAAVベクターバリエーション）の静脈内注射は、インビボでのヒトCD34+造血幹細胞、及び前駆細胞の形質導入をもたらした。静脈注射されたClade FベクターまたはAAVベクターは、ヒト造血部位に輸送され、ヒト細胞に形質導入された。Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションの静脈注射は、ヒトCD34+幹前駆細胞ならびにそれらのCD45+子孫におけるVenus発現をもたらした。これらのデータは、幹細胞採取、エクスビボ形質導入、レシピエントのコ

ンディショニング、及びその後の形質導入細胞の移植を必要とせずに、インビボゲノム工学にC l a d e FベクターまたはA A Vベクターバリエーションの静脈内注射を用いることができることを示している。このアプローチにより、幹細胞遺伝子治療は、世界中の患者にとってより安全で、よりアクセスしやすく、安価であり、入院の必要性がなくなる。

【0117】

特定の実施形態では、A A V C l a d e FベクターまたはA A Vベクターバリエーションを対象に直接投与することによって、対象の細胞のインビボゲノム編集によって対象の疾患または障害を治療する方法が開示される。特定の実施形態では、A A V C l a d e FベクターまたはA A Vベクターバリエーションは、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションと、ゲノムの標的遺伝子座（標的部位）に組み込まれる1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む編集エレメント（標的カセット）と、編集エレメント（標的カセット）に隣接して、標的遺伝子座（標的部位）の上流にある領域と相同性を有する5'相同アームポリヌクレオチド配列と、編集エレメント（標的カセット）に隣接して、標的遺伝子座（標的部位）の下流にある領域と相同性を有する、3'相同アームポリヌクレオチド配列とを含んでも良く、該ベクターは前記対象の細胞に形質導入し、該1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を前記細胞のゲノムに組み込む。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、A A V F 1（配列番号2）、A A V F 2（配列番号3）、A A V F 1 1（配列番号4）、A A V F 3（配列番号5）、A A V F 4（配列番号6）、A A V F 6（配列番号7）、A A V F 7（配列番号8）、A A V F 8（配列番号9）、A A V F 9（配列番号10）、A A V F 5（配列番号11）、A A V F 1 2（配列番号12）、A A V F 1 7（配列番号13）、A A V F 1 3（配列番号14）、A A V F 1 4（配列番号15）、A A V F 1 5（配列番号16）、A A V F 1 6（配列番号17）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせを含む。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、A A V F 7（配列番号8）またはA A V F 1 7（配列番号13）のポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態では、1つ以上のC l a d e Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、A A V F 5（配列番号11）、A A V F（配列番号8）またはA A V F 1 7（配列番号13）のポリペプチド配列を含み得る。特定の実施形態において、A A V C l a d e FベクターまたはA A Vベクターバリエーションは、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列のためのプロモーターを含まない。特定の実施形態では、標的遺伝子座（標的部位）はセーフハーバー部位であり得る。特定の実施形態では、セーフハーバー部位は、第19染色体上のA A V S 1遺伝子座であり得る。特定の実施形態では、細胞は幹細胞であってもよい。特定の実施形態において、幹細胞は、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間充質幹細胞であり得る。特定の実施形態では、疾患または障害は、細胞ゲノムにおける1つ以上の変異によって引き起こされ得る。特定の実施形態では、疾患または障害は、遺伝性代謝疾患、リソソーム蓄積症、ムコ多糖症、免疫不全疾患、及びヘモグロビン異常症、及び感染症から選択され得る。

【0118】

インビボ適用の有効性をさらに実証することにより、単離された変異体（A A V 9と比較して）を有する免疫不全マウスへの形質導入細胞の移植は、延長された持続的な導入遺伝子発現をもたらす、遺伝子治療に使用され得る。特定の実施形態では、全身的に送達される場合、これらのベクターは、遺伝性、後天性、感染性、及び腫瘍性疾患の治療に関与する肝臓、及び軟骨の指向性を示す。肝形質導入に関して、本A A V単離体は、肝臓への全身性遺伝子送達の現在の金標準であるA A V 8よりも約10倍高い肝形質導入レベルを有する。この性質は、血友病、酵素欠乏症、及びアテローム性動脈硬化症のような疾患のための肝臓からの遺伝子ベースの酵素補充療法に利用することができる。関節における軟骨組織のための本A A V単離物の付加指向性は、関節炎、骨粗鬆症または他の軟骨/骨ベースの疾患のような骨障害の治療のために利用され得る。したがって、変異体配列、及び方法は、長期間の組み込みが望ましくない一過性形質導入のために使用され得る。

【0119】

A A V C l a d e F キャプシドファミリーまたはA A V キャプシドバリエーションファミリーのメンバーはH S C を形質導入し、例えばA A V F 1 5 及びA A V F 1 7 は、持続的な遺伝子発現による長期生着をもたらすので、したがって、幹細胞遺伝子治療ベクターの強力な候補である。A A V F 1 7、及びA A V F 1 5 (「H S C 1 7」、及び「H S C 1 5」と略称する)は、移植後22週間までの最高レベルのインビボでの長期間の形質導入を支持した。A A V 変異体の静脈内注射後の連続生物発光イメージングは、A A V F 1 5 が一般にインビボでの長期導入遺伝子発現の最高レベルを支持することを明らかにした。A A V F 1 3、及び17を含む他のA A V 変異体も強力なインビボ形質導入を支持した。

10

【0120】

A A V F 1 5 は、高度に肝臓向性であり、A A V 9 より約5 ~ 10 倍高いことが判明した。A A V F 1 3、及びA A V F 1 5 はまた、心臓、及び骨格筋にA A V 9 よりも少なくとも10 倍良好に形質導入した。インビトロ中和力価は、プールされたヒトI V I G におけるA A V F 1 ~ 9 キャプシドに対する抗体の有病率はA A V 9 と類似していたが、A A V F 1 3、A A V F 1 5、A A V F 1 6、及びA A V F 1 7 に対する抗体は幾分優勢ではないことを明らかにした。インビボ中和アッセイは、A A V F 1 5 をI V I G 投与した後の肝臓、及び筋肉において、A A V 9 と比較して100 倍以上高いベクターゲノムコピー数/細胞が見出され、既存の抗体がA A V F 1 5 を完全に中和しないことを示唆した。筋肉疾患または障害は、冠状動脈性心疾患または心筋症などの心臓を含む疾患または障害を有する筋肉細胞を含む任意の細胞、組織、器官または系を含むことができる。

20

【0121】

さらに、部位特異的変異誘発実験は、A A V F 1 5 におけるR 5 0 5 G 変異が肝臓向性の増強の原因であることを示している。A A V C l a d e F ベクターまたはA A V ベクターバリエーションは、血友病、アテローム性動脈硬化症、及び種々の先天性代謝異常などの遺伝病の全宿主を治療するために使用され得る。ある例では、A A V F 1 5 は血友病B を効果的に治療する。このファミリーの一部のメンバーは、関節炎などの関節、及び軟骨疾患を治療するために使用され得る、全身注射後の関節を標的にする。家族の他のメンバーは、静脈注射の際に心臓を標的とする。しかし、家族の他のメンバーは脳を標的にしている。いくつかの実施形態では、A A V F 5 キャプシドタンパク質を含むベクターは、A A V F 5 が複数の細胞タイプを形質導入することが示されたので、本明細書で提供される方法、キットまたは組成物の一部として提供される(図4 参照)。

30

【0122】

特定の実施形態では、ゲノム編集によって対象における神経学的疾患または障害を治療する方法は、血液脳関門、血液眼関門または血液神経関門を通過することができるA A V C l a d e F ベクターまたはA A V ベクターバリエーションを投与することを含み得る。本明細書中に開示される特定のA A V C l a d e F ベクターまたはA A V ベクターバリエーションの特定のものは、改変されたウイルスベクターを用いて、遺伝子治療または他の診断または治療目的のために任意のベクターに接近可能であることが以前は不明であった生物学的接合部を横断する独特の能力を有する。これらの接合部は共通の特性を有する。血液脳関門は、体内を循環する血液と中枢神経系の脳細胞外液との間の分離であり、毛細血管の周りの密着結合によって形成される。血液脳関門は、一般に、小さな疎水性分子の拡散による通過のみを可能にする。血液 - 眼球関門は、局所血管と眼の大部分との間でなされる分離であり、網膜、及び虹彩の毛細管の内皮によって作られる。血液 - 神経関門は、軸索、シュワン細胞、及び末梢神経機能の他の関連する細胞が、神経鞘、及び投資する髄膜内の内胚葉の微小血管からなる生理学的空間である。これらの3つの障壁と同様に、内部環境、ここでは血管や他の細胞外空間における劇的な濃度変化から神経を保護するための透過性が制限されている。これらの障壁のいずれかを横断するベクターは、神経疾患または障害を治療するため、または標識された及び/または診断薬として作用するために、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を送達する独特な能力を有する。A A V F 1 5、A

40

50

A V F 1 5 A 3 4 6 T、及び A A V F 1 5 R 5 0 5 G が、これらの生物学的障壁を横切るのに特に適していると実験的に立証された A A V C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションの特定のものが含まれる。

【 0 1 2 3 】

脳、脊髄、神経節、運動神経、感覚神経の疾患または障害などの細胞または臓器型によって一般的に分類され得る、当業者に周知の多くの神経学的疾患または障害が存在する、自律神経、視神経、網膜神経、及び聴覚神経が挙げられる。例として、脳疾患または障害は、癌または他の脳腫瘍、炎症、細菌感染、狂犬病、アメーバまたは寄生虫感染を含むウイルス感染、脳卒中、麻痺、アルツハイマー病、パーキンソン病または他の認知症、脳卒中、筋ジストロフィー、筋ジストロフィー、震え、脳性麻痺、自閉症、ダウン症候群、注意欠陥多動性障害、及び注意欠陥多動性障害、睡眠時無呼吸症候群、睡眠時無呼吸症候群、睡眠時無呼吸症候群、慢性炎症、てんかん、昏睡、髄膜炎、多発性硬化症、重症筋無力症、種々の神経障害、不穏下肢症候群、及びテイ - サックス病が挙げられる。

10

【 0 1 2 4 】

筋肉疾患または障害には、筋萎縮症、慢性疲労症候群、線維筋痛、筋ジストロフィー、多発性硬化症、萎縮、痙攣、痙攣、硬直、皮膚筋炎、横紋筋融解症、ミオトニック障害、麻痺、腱炎、リウマチ性多発筋痛症、癌、及び腱炎、及び腱鞘炎などの腱障害を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 2 5 】

心疾患または障害には、冠動脈疾患、冠状動脈性心疾患、うっ血性心不全、心筋症、心筋炎、心膜疾患、先天性心疾患、癌、心内膜炎、及び弁疾患が含まれる。

20

【 0 1 2 6 】

肺疾患または障害としては、ほんの一例として、喘息、アレルギー、慢性閉塞性肺疾患、気管支炎、肺気腫、嚢胞性線維症、肺炎、結核、肺水腫、癌、急性呼吸窮迫症候群、塵肺症、及び間質性肺疾患。

【 0 1 2 7 】

肝臓疾患または障害には、例としてのみであるが、癌、A型肝炎、B型肝炎、及びC型肝炎硬変、黄疸、及び肝臓病が含まれる。腎疾患、先天性疾患、多発性嚢胞腎疾患、腎炎、初代高酸素尿症、及びシスチン尿症が挙げられるが、これらに限定されない。脾臓の疾患または障害には、単なる例として、癌、脾臓梗塞、サルコイドーシス、及びゴーシェ病が含まれる。骨疾患または障害は、ほんの一例として、骨粗鬆症、癌、低骨密度、パジェット病、及び感染を含む。

30

【 0 1 2 8 】

治療用ヌクレオチド配列または A A V C l a d e F ベクター、または A A V ベクターの変異体によって、またはで搬送小さな分子を用いて治療これらの疾患または障害のいずれかを用いて、治療用ヌクレオチド配列は、一例として、核酸は、治療用タンパク質をコードすることができる、アポトーシスタンパク質、m i R N A、s h R N A、s i R N A、他の R N A サブタイプまたはそれらの組み合わせのような、癌のような癌の治療に使用することができる。いくつかの実施形態では、ベクターは、本明細書に記載のように単離、及び精製される。有効性を高め、汚染を低減するために、単離、及び精製がインビボ投与に好ましい。ベクターは、1つの生物から単離され、別の生物に導入された遺伝子または他の遺伝物質である導入遺伝子に永続的または一時的に形質導入することができる。ここで、他の生物はベクターを受ける被験者であってもよい。

40

【 0 1 2 9 】

特定の実施形態では、ゲノム編集のための A A V C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーションは、本明細書に示される所与の疾患または障害についての所与の標的細胞または組織における最も高い有効性の実験結果に基づいて選択され得る。筋肉を介して対象に投与される筋肉疾患または障害ならびに抗体遺伝子または他のワクチン処置のために、A A V F 5、A A V F 7、A A V F 1 3、A A V F 1 5、及び A A V F 1 7 の群から選択される A A V C l a d e F ベクターまたは A A V ベクターバリエーション； b)

50

心臓、及び肺の疾患または障害について、AAVF 13、AAVF 15、及びAAVF 17の群から選択されるベクター；c) 肝臓または神経系の疾患または障害について、AAVF 5、及びAAVF 15から選択されるベクター；d) 造血幹細胞を処置した状態については、ベクターAAVF 17；e) B細胞前駆体を形質導入することによって治療される状態については、ベクターAAVF 5；f) 骨髄性及び赤血球系の前駆細胞を形質導入することによって治療される状態については、ベクターAAVF 12；g) リンパ節、腎臓、脾臓、軟骨、及び骨の疾患または障害のために、AAVF 7、AAVF 13、AAVF 15、及びAAVF 17の群から選択されるベクターの群から選択される、ベクターであって、該AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは細胞または組織に形質導入し、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列は細胞のゲノムに組み込まれ、疾患または障害を治療する。特定の実施形態では、AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションは、本明細書に記載の細胞の指向性を示す1つ以上のClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーション(AAV 9と比較して)を含み得る。

10

【0130】

対象は、この方法が作用する任意の動物であるが、好ましくはヒトであり得る哺乳類である。ベクターが抗体遺伝子または他のワクチン処置を含む場合、それは筋肉内注射により投与され、HIV、インフルエンザ、マラリア、破傷風、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、HPV、百日咳または他のものを含む疾患に対して免疫学的防御を提供し得るワクチン。ベクターは、パッケージングされ、単離され、精製され得、少なくとも1つの治療用ヌクレオチド配列を有する任意のタイプの幹細胞に形質導入され得る。ベクターはまた、導入遺伝子を形質導入するか、または対象及び/または同じ種の他の対象に内因性の矯正遺伝子を担持し得る。

20

【0131】

「AAV」はアデノ随伴ウイルスである。この用語は、他に指示がない限り、ウイルスまたはその誘導体、ウイルスサブタイプ、ならびに天然、及び組換え形態を指すために使用され得る。AAVは、AAV-1、AAV-2などと呼ばれる100以上の異なるサブタイプを有し、ヒト、及び非ヒト由来AAVの両方を含む。約12のAAV血清型がある。AAVの様々なサブタイプは、多くの異なる細胞タイプを形質導入するための組換え遺伝子導入ウイルスとして使用することができる。

【0132】

ポリヌクレオチドに適用される「組換え」は、ポリヌクレオチドが、クローニング、制限またはライゲーションステップ、及び天然に存在するポリヌクレオチドとは異なる構築物を生じる他の手順の様々な組み合わせの産物であることを意味する。組換えウイルスは、元のポリヌクレオチド構築物の複製物、及び元のウイルス構築物の子孫を含む、組換えポリヌクレオチドを含むウイルス粒子である。「rAAVベクター」は、AAV起源ではないポリヌクレオチド配列（すなわち、AAVに対して異種のポリヌクレオチド）を含む組換えAAVベクターを指し、これは、通常、細胞の遺伝子形質転換のための目的の配列である。

30

【0133】

本明細書で使用するAAVの「ヘルパーウイルス」は、AAVを複製して哺乳類細胞によってパッケージングすることを可能にするウイルスである。AAVのヘルパーウイルスは、例えば、アデノウイルス（サブグループCのアデノウイルス5型など）、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス、エプスタインバーウイルス、及びサイトメガロウイルスなど）、及びポックスウイルスを含む。

40

【0134】

「関節組織」は、軟骨、滑液、及び成熟した前駆細胞、及び(i)軟骨産生細胞、(ii)I型滑膜細胞、(iii)II型滑膜細胞、(iv)常在または循環白血球、(v)線維芽細胞、(vi)血管内皮細胞、及び(vii)周皮細胞を生じさせる、またはそれを生じる幹細胞を含む多数の組織からなる。

【0135】

50

「複製適格」ウイルスとは、感染性で、感染細胞内で複製可能なウイルスをいう。AAVの場合、複製能力は、一般に、機能的AAVパッケージング遺伝子、ならびにアデノウイルス、及び単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルス遺伝子の存在を必要とする。一般に、1つ以上のAAVパッケージング遺伝子がないため、rAAVベクターは複製不能（本明細書では複製欠損とも呼ばれる）である。いくつかの実施形態では、AAVがAAV rep 遺伝子、及び/またはAAV cap 遺伝子の本質的な欠損を有する場合、AAVは複製欠損（または複製不能）とみなされ得る。いくつかの実施形態では、AAVは、AAV rep 遺伝子、及び/またはAAV cap 遺伝子が欠損している場合、複製欠損（または複製不能）とみなされ得る。いくつかの実施形態では、AAV Clade FベクターまたはAAVバリエーション単離物を含む組成物は無細胞組成物である。組成物は、一般に、細胞タンパク質、及び/または他の汚染物質を含まず、緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液）、塩（例えば、NaCl、MgCl₂）、イオン（例えば、マグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン）、防腐剤、可溶化剤、または界面活性剤（例えば、非イオン性界面活性剤；ジメチルスルホキシド）を含む。

10

【0136】

別の実施形態では、発現カセットは、Clade FキャプシドまたはAAV変異体単離物の1つ以上を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも約95%、96%、97%、より好ましくは約98%、最も好ましくは約99%の配列同一性を有する。パーセンテージ同一性は、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:2444 (1988) のような多くの配列比較プログラムまたは方法、ならびにGAP、BESTFIT、FASTA、またはTFASTA (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. から)、または国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトから入手できるBLASTなどの、比較アルゴリズムを実施するプログラムのいずれかを用いて計算することができる。

20

【0137】

別の態様では、発現カセットは、キャプシドタンパク質V1~V3（VP1~VP3としても参照される）を含む3つの遺伝子の部分からなる、Clade FキャプシドまたはAAVバリエーション単離物の1つ以上を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。例えば、カセットは、キャプシドAAVF1由来のV1、AAV9hu.14と比較した標準V2、及びAAVF17キャプシド由来のV3を含むことができる。さらに別の実施形態において、キャプシドは、キャプシド遺伝子成分のそれぞれの1つより多くを含み得る。例えば、Clade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、本明細書に記載のキャプシド配列についてVP1~VP3（V1~V3）のいずれかから選択することができ、所望の性質が増加する限り任意の順序、及び任意の組み合わせで組み合わせることができる形質導入が達成される。例えば、キャプシド配列は、VP1A-VP1B-VP2-VP3（V1A-V1B-V2-V3）、VP3-VP1-VP2（V3-V1-V2）、またはVP1-VP2-VP3A-VP3B（V1-V2-V3A-V3B）であり得る。

30

40

【0138】

別の実施形態は、対象の免疫化方法を含む。Clade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションを含む組成物は、免疫学的反応を引き起こして対象に免疫をもたらすように対象に導入され得る。Clade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションは、組成物中に単独でまたは発現カセットの一部として存在し得る。一実施形態では、発現カセット（またはポリヌクレオチド）は、遺伝子送達ベクターを使用して導入することができる。遺伝子送達ベクターは、例えば、非ウイルスベクターまたはウイルスベクターであり得る。例示的なウイルスベクターとしては、シンドビスウイルス由来ベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。免疫

50

学的応答を生じさせるために有用な組成物はまた、微粒子担体を用いて送達され得る。さらに、このような組成物は、例えば、金またはタングステン粒子上に被覆することができ、被覆された粒子は、例えば遺伝子銃を使用して対象に送達される。組成物はまた、リボソームとして処方され得る。この方法の一実施形態において、対象は哺乳類であり、例えばヒトであり得る。

【0139】

用語「親和性タグ」は、本明細書では、第2ポリペプチドの精製または検出を提供するためまたは第2ポリペプチドの基材への結合部位を提供するために第2ポリペプチドに結合され得るポリペプチドセグメントを示すために使用される。原則として、抗体または他の特異的結合剤が利用可能な任意のペプチドまたはタンパク質を親和性タグとして使用することができる。親和性タグは、ポリヒスチジン管、プロテインA (Nilssonら、EMBO J. 4:1075, 1985; Nilssonら、Methods Enzymol. 198:3, 1991)、グルタチオンSトランスフェラーゼ (Smith及びJohnson、Gene 67:31, 1988)、Glu-Glu親和性タグ (Grussemeyerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4, 1985)、サブスタンスP、Flag (商標) ペプチド (Hoppら、Biotechnology 6:1204-10, 1988)、ストレプトアビジン結合ペプチド、または他の抗原性エピトープまたは結合ドメインを含む。一般に、Fordら、Protein Expression and Purification 2:95-107, 1991を参照されたい。親和性タグをコードするDNAは、商業的供給者 (例えば、Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ) から入手可能である。

【0140】

利用可能な親和性タグ精製システムの数のうち、最も頻繁に使用されるものは、ポリヒスチジン (His) またはグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) タグを利用する。彼は、典型的にはイミノ二酢酸またはニトリロ三酢酸キレート基で固定化されたNi²⁺イオンを含むマトリックスに対する良好な選択性で結合する。この技術は、固定化金属親和性クロマトグラフィーとして知られている。弱塩基性ヒスチジンイミダゾール基のプロトン化、及び結合能力の喪失を防ぐために、Hisタグ付きタンパク質の吸収を中性〜わずかにアルカリ性のpHで行う。結合したタンパク質の溶出は、イミダゾールまたは低pH条件下での置換によって引き起こされる。

【0141】

外来DNAを永久的に導入することなく体細胞から誘導された多能性幹細胞を作製する方法も記載されている。該方法は、ポリペプチド配列、またはそのVP1 (V1) もしくはVP3 (V3) 部分をコードする本明細書に記載されるようなClade Fキャプシドまたはキャプシドバリエーションクレオチド配列を含むベクターで幹細胞を一過性に形質導入することを含む。

【0142】

これら、及び他の実験のために、当業者はAAVをどのように改変、及び増殖させるかを知っている。例えば、AAV-2は溶菌性ウイルス、及びプロウイルスの両方として増殖することができる。溶解増殖のために、AAVはヘルパーウイルスとの同時感染を必要とする。アデノウイルスまたは単純ヘルペスのいずれかが、ヘルパー機能を供給することができる。ヘルパーが利用できない場合、AAVは、AAV末端と宿主配列との間の組換えを含む統合されたプロウイルスとして存続することができ、大部分のAAV配列は、プロウイルスにおいて無傷のままである。宿主DNAに組み込まれるAAVの能力は、ヘルパーウイルスが存在しない場合の増殖を可能にする。AAVプロウイルスを保有する細胞が続いてヘルパーに感染すると、統合されたAAVゲノムが救済され、生産的な溶解サイクルが生じる。特定の改変を有するrAAVベクターの構築、及び例えば改変されたキャプシドを有するrAAV粒子の産生は、例えば、Shiet al. (2001)、Human Gene Therapy 12:1697-1711; Rabinowitz

z et al. (1999)、Virology 265:274-285; Nicklin et al. (2001)、Molecular Therapy 4:174-181; Wuら(2000)、J. Virology 74:8635-8647、及びGrifman et al. (2001)、Molecular Therapy 3:964-974。

【0143】

さらに別の態様は、本明細書に記載のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションまたはAAV粒子を含む医薬組成物に関する。AAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションまたは粒子を含む医薬組成物は、好ましくは、薬学的に許容される賦形剤、アジュバント、希釈剤、ビヒクルまたは担体、またはそれらの組み合わせを含む。「薬学的に許容される担体」は、組成物の有効成分と組み合わせられたときに、成分が生物学的活性を保持し、意図しない免疫反応などの破壊的な生理学的反応を引き起こさない任意の物質を含む。薬学的に許容される担体としては、水、リン酸緩衝化生理食塩水、油/水エマルジョンなどのエマルジョン、及び湿潤剤が挙げられる。そのような担体を含む組成物は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Current Ed.、Mack Publishing Co.、Easton Pa. 18042、USA; A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy"、20th edition、Lippincott、Williams、Wilkins; H. C. Anselら、7th ed、Lippincott、Williams、及びWilkins; (Handbook of Pharmaceutical Excipients) (2000) A. H. Kibbeら、3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.に記載されているような周知の従来の方法によって製剤化される。そのような担体は、従来の方法によって処方することができ、適切な用量で対象に投与することができる。適切な組成物の投与は、様々な方法、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所または皮内投与によって投与することができる。いくつかの実施形態では、組成物は、哺乳類への投与のために処方される。いくつかの実施形態では、組成物は、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射、自己細胞移動、または同種異系細胞移動を介して哺乳類に投与するために処方される。投与経路は、もちろん、とりわけ、薬学的組成物中に含まれるベクターの種類に依存する。投与レジメンは主治医、及び他の臨床的要因によって決定される。医学分野において周知であるように、任意の1人の患者のための投薬量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、性別、投与される特定の化合物、投与の時間、及び経路、感染症または疾病、一般的な健康状態、及び他の薬物が同時に投与される。

【0144】

AAV Clade Fベクターまたはキャプシドバリエーションのいくつかは、形質導入された造血幹細胞の移植後、またはrAAVの直接的な全身送達の後、インビボで長期間安定した導入遺伝子発現を支持することができる。

【0145】

特定の実施形態では、Clade FキャプシドまたはAAVキャプシド単離体変異体を含む核酸を、新しいウイルスのゲノムに挿入することができ、ここで、Clade Fキャプシドまたはキャプシド単離体変異体遺伝子の添加で、同じまたは類似の組織または器官 Clade FキャプシドまたはAAVキャプシドの指向性は、新しいウイルスに分離する。このような遺伝子治療は、インビボ、及びエクスピボの遺伝子治療手順を用いて行うことができる。例えば、米国特許第5,474,935号; Okada, Gene Ther. 3:957-964, 1996を参照のこと。AAV Clade FキャプシドまたはAAVキャプシドバリエーション遺伝子を用いる遺伝子治療は、典型的には、単独でまたは治療目的のために意図された別の遺伝子とともにインビトロで標的遺伝子新規ウイルスを導入することを含む。トロピック遺伝子が1つ以上のさらなる遺伝子とともに導入される場合、好ましくは、得られたポリペプチドは、治療目的のために、Clad

e FキャプシドまたはAAV単離物が向性を有する組織において投与される。次いで、このような治療を必要とする患者にウイルスを投与してもよく、または移植を待つ器官のように、エキスピボで投与してもよい。ウイルスは、レトロウイルス、RNAウイルス、アデノウイルスベクターなどのDNAウイルス、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターなどであってもよい。新規ウイルスベクターを封入した投与用リポソームを用いたウイルスベクターを用いたトランスフェクション法も考えられる。

【0146】

本明細書で提供される特定の実施形態によれば、本明細書に記載の1つ以上のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションまたはその組成物または製剤を含むキットが提供される。特定の実施形態では、キット中の1つ以上のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションを細胞のゲノム編集に使用することができる。特定の実施形態では、キットは、1つ以上のAAV Clade FベクターまたはAAVベクターバリエーションによるゲノム編集の効果を調べるための研究ツールとして使用することができる。

【0147】

本開示の他の態様は、本明細書に記載のAAV（例えば、AAV Clade FベクターまたはAAV変異ベクター）の組換え調製のためのパッケージングシステム、及びその使用方法に関する。いくつかの実施形態では、パッケージングシステムは、1つ以上のAAV Repタンパク質をコードするRepヌクレオチド配列；本明細書に記載のAAV Clade Fキャプシドの1つ以上のAAV Capタンパク質をコードするCapヌクレオチド配列；本明細書に記載の補正ゲノムを含み、パッケージングシステムは、キャプシド中に補正ゲノムを封入してアデノ随伴ウイルスを形成するために細胞内で作動する。

【0148】

いくつかの実施形態では、パッケージングシステムは、Repヌクレオチド配列、及びCapヌクレオチド配列を含む第1のベクター、及び補正ゲノムを含む第2のベクターを含む。本明細書に記載のパッケージングシステムの文脈で使用される場合、「ベクター」とは、核酸を細胞（例えば、プラスミド、ウイルス、コスミド、人工染色体など）に導入するための媒体である核酸分子を指す。

【0149】

パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドが、Clade F VP1、Clade F VP2、及びClade F VP3から選択される少なくとも1つまたは少なくとも2つのタンパク質を含む。パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドが、Clade F VP1、Clade F VP2、及びClade F VP3タンパク質を含む。パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、AAV Clade Fキャプシドが、AAV9、AAVHSC1、AAVHSC2、AAVHSC3、AAVHSC4、AAVHSC5、AAVHSC6、AAVHSC7、AAVHSC8、AAVHSC9、AAVHSC10、AAVHSC11、AAVHSC12、AAVHSC13、AAVHSC14、AAVHSC15、AAVHSC16、AAVHSC17、AAVHU31、及びAAVHU32からなる群より選択される。

【0150】

パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、Repヌクレオチド配列がAAV2 Repタンパク質をコードする。パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、コードされるAAV2 Repタンパク質が、Rep78/68またはRep68/52の少なくとも1つである。パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、AAV2 Repタンパク質をコードするヌクレオチド配列が、配列番号40のAAV2 Repアミノ酸配列に対して最小パーセント配列同一性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、最小パーセント配列同一性 全長にわたって少なくとも70%（例

えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%)である。のAAV2 Repタンパク質のアミノ酸配列の一部である。

【0151】

例示的なAAV2 Repアミノ酸配列(配列番号40) -

```
mpgfyeivikvpsdldehlpgisdsfvnwvaekewelppd
sdmdlnlieqapltvaeeklqrdfltewrsvskapealffv
qfekgesyfhmhvlvettgvksmvlg r flsqirekliqr
iyrגיעptlpnwfavtktrngagggnkvvdecyipylylp
ktqpelqwawtnmeqylsaclnlterkrlvaqhllthvsqt
10 qeqnkenqnpsndapvirsksarsymelvgwlvdkgitse
kqwiquedqasyisfnaasnrsqikaaldnagkimslltkt
apdylvgqqpvedissnriykil elngydpqyaasvflgw
atkkgfgrntiwlfgpat t gktniaeaiahtvpfygcvnw
tnenfpfndcvdkmviwweegkmtakvvesakailggskv
rvdqkckssaqidptpvivtsntnmcavidgnsttf ehqq
plqdrmfkfeltrrldhdfgkvtkqevkdf frwakdhvve
vehefyvkkggakkrpapsdadisepkrvresvaqpstsd
aeasinyadryqnkc srhv gmnllm l fpcrqcermnqn sni
20 c fthgqkdcl ecfpvsesqpvs v k k a y q k l c y i h h i m g k
vpdactacdlvnvdlddcifeq
```

【0152】

パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、パッケージングシステムが、第3のベクター、例えば、ヘルパーウイルスベクターをさらに含む。第3のベクターは、独立した第3のベクターであってもよく、第1のベクターと組み込みされていてよいし、第2のベクターと組み込みされていてよい。いくつかの実施形態では、第3のベクターは、ヘルパーウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含む。

【0153】

パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、ヘルパーウイルスが、アデノウイルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス(HSV)を含む)、ポックスウイルス(ワクシニアウイルスなど)、サイトメガロウイルス(CMV)、及びバキュロウイルスからなる群より選択される。ヘルパーウイルスがアデノウイルスであるパッケージングシステムのいくつかの実施形態では、アデノウイルスゲノムが、E1、E2、E4、及びVAからなる群から選択される1つ以上のアデノウイルスRNA遺伝子を含む。ヘルパーウイルスがHSVであるパッケージングシステムのいくつかの実施形態では、HSVゲノムが、UL5/8/52、ICPO、ICP4、ICP22、及びUL30/UL42からなる群から選択されるHSV遺伝子の1つ以上を含む。

【0154】

パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、第1、第2、及び/または第3のベクターが、1つ以上のトランスフェクトプラスミド内に含まれる。いくつかの実施形態では、第1のベクター、及び第3のベクターは、第1のトランスフェクションプラスミド内に含まれる。いくつかの実施形態では、第2のベクター、及び第3のベクターは、第2のトランスフェクションプラスミド内に含まれる。

【0155】

パッケージングシステムのいくつかの実施形態では、第1、第2、及び/または第3のベクターが、1つ以上の組換えヘルパーウイルス内に含まれる。いくつかの実施形態では、第1のベクター、及び第3のベクターは、組換えヘルパーウイルス内に含まれる。いくつかの実施形態では、第2のベクター、及び第3のベクターは、組換えヘルパーウイルス内に含まれる。

【0156】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載の A A V（例えば、A A V C l a d e F ベクターまたは A A V バリエーションベクター）の組換え調製のための方法を提供し、この方法は、本明細書に記載の A A V（例えば、A A V C l a d e F ベクターまたは A A V バリエーションベクター）を形成するために、キャプシド中に補正ゲノムを封入するために使用される。A A V の組換え調製のための例示的な方法は、一過性トランスフェクション（例えば、本明細書に記載の第 1、及び第 2 の、及び場合により第 3 のベクターを含む 1 つ以上のトランスフェクションプラスミドによる）、ウイルス感染（例えば、1 つ以上の組換えヘルパーウイルス、（例えば、本明細書に記載の第 1、及び第 2 の、及び場合により第 3 のベクターを含む）アデノウイルス、ポックスウイルス（ワクシニアウイルス）、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス（H S V）、サイトメガロウイルス、またはパキキュロウイルスなど）、安定な生産細胞株トランスフェクションまたは感染（例えば、本明細書に記載されているような A A V C l a d e F キャプシドの、1 つ以上の A A V R e p タンパク質をコードする R e p ヌクレオチド配列、及び/または 1 つ以上の A A V C a p タンパク質をコードする C a p ヌクレオチド配列、及びトランスフェクションプラスミドまたは組換えヘルパーウイルスの形態で送達される本明細書中に記載されるような補正ゲノムを含む、哺乳類または昆虫細胞などの、安定な生産細胞株）を含む。

【0157】

本開示の他の例示的で非限定的な実施形態が以下に提供される。

【0158】

実施形態 1。1 つ以上のキャプシドバリエーションと、ゲノムの標的部位に組み込まれる 1 つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む標的カセットと、標的カセットに隣接し、標的カセットの上流にある領域と同一性を有する 5' 相同アームポリヌクレオチド配列と、標的カセットに隣接し、標的カセットの下流にある領域と同一性を有する 3' 相同アームポリヌクレオチド配列とを含む、幹細胞のゲノムを編集するためのアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターバリエーション。

【0159】

実施形態 2。1 つ以上のキャプシドバリエーションが、H S C 7（配列番号 8）、H S C 1 2（配列番号 1 2）、H S C 1 5（配列番号 1 6）、H S C 1 7（配列番号 1 3）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列を含む、実施形態 1 に記載の A A V ベクターバリエーション。

【0160】

実施形態 3。1 つ以上のキャプシドバリエーションが、H S C 7（配列番号 8）、H S C 1 2（配列番号 1 2）、H S C 1 5（配列番号 1 6）、H S C 1 7（配列番号 1 3）、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、を含む、実施形態 2 に記載の A A V ベクターバリエーション。

【0161】

実施形態 4。標的カセットがセーフハーバー部位である、実施形態 1 に記載の A A V ベクターバリエーション。

【0162】

実施形態 5。セーフハーバー部位が第 1 9 染色体上の A A V S 1 遺伝子座である、実施形態 4 に記載の A A V ベクターバリエーション。

【0163】

実施形態 6。幹細胞が、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間充質幹細胞である、実施形態 1 に記載の A A V ベクターバリエーション。

【0164】

実施形態 7。1 つ以上のキャプシドバリエーションと、ゲノムの標的カセットに組み込まれる 1 つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む標的カセットと、標的カセットに隣接し、標的カセットの上流にある領域と同一性を有する 5' 相同アームポリヌクレオチド配列と、標的カセットに隣接し、標的カセットの下流にある領域と同一性を有する 3' 相同アームポリヌクレ

オチド配列とを含む、1つ以上のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターバリエーションで、幹細胞を、追加の外因性ヌクレアーゼなしで形質導入することを含む、幹細胞のゲノムを編集する方法。

【0165】

実施形態8。1つ以上のキャプシドバリエーションが、HSC7(配列番号8)、HSC12(配列番号12)、HSC15(配列番号16)、HSC17(配列番号13)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせのグループから選択されるポリペプチド配列を含む、実施形態7に記載の方法。

【0166】

実施形態9。AAVベクターバリエーションが、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列のプロモーターを含まない、実施形態7に記載の方法。

10

【0167】

実施形態10。標的部位がセーフハーバー部位である、実施形態7に記載の方法。

【0168】

実施形態11。セーフハーバー部位が第19染色体上のAAVS1遺伝子座である、実施形態10に記載の方法。

【0169】

実施形態12。幹細胞が、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間葉系幹細胞である、実施形態7に記載の方法。

【0170】

20

実施形態13。対象の幹細胞をさらなる外因性ヌクレアーゼなしで、1つ以上のキャプシドバリエーションと、幹細胞のゲノム中の標的部位に組み込まれる1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む標的カセットと、標的カセットに隣接し、標的部位の上流にある領域と相同性を有する5'相同アームポリヌクレオチド配列と、標的カセットに隣接し、標的部位の下流にある領域と相同性を有する3'相同アームポリヌクレオチド配列を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)とを含む、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターバリエーションで、形質導入すること、ならびに形質導入された幹細胞を対象に移植することを含む、対象の幹細胞のゲノムを編集することにより対象の疾患または障害を処置する方法であって、形質導入された幹細胞は、疾患または障害を治療する。

【0171】

30

実施形態14。1つ以上のキャプシドバリエーションが、HSC7(配列番号8)、HSC12(配列番号12)、HSC15(配列番号16)、HSC17(配列番号13)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせの群からのポリペプチド配列を含む、実施形態13に記載の方法。

【0172】

実施形態15。AAVベクターバリエーションが前記1つ以上の治療用ヌクレオチド配列のプロモーターを含まない、実施形態13に記載の方法。

【0173】

実施形態16。標的部位がセーフハーバー部位である、実施形態13に記載の方法。

【0174】

40

実施形態17。セーフハーバー部位が第19染色体上のAAVS1遺伝子座である、実施形態16に記載の方法。

【0175】

実施形態18。幹細胞が、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間葉系幹細胞である、実施形態13に記載の方法。

【0176】

実施形態19。疾患または障害が、細胞ゲノム中の1つ以上の変異によって引き起こされる、実施形態13に記載の方法。

【0177】

実施形態20。疾患または障害が、遺伝性代謝疾患、リソソーム蓄積症、ムコ多糖症、

50

免疫不全疾患、及びヘモグロビン異常症、及び感染から選択される、実施形態 19 に記載の方法。

【0178】

実施形態 21。1つ以上のキャプシドバリエーションと、ゲノムの標的部位に組み込まれる 1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を含む標的カセットと、標的カセットに隣接し、標的部位の上流にある領域と相同性を有する 5' 相同アームポリヌクレオチド配列と、標的カセットに隣接し、標的部位の下流にある領域と相同性を有する 3' 相同アームポリヌクレオチド配列とを含む、AAV ベクターバリエーションを、対象に直接投与することによって、対象の細胞のインピボゲノム編集によって対象の疾患または障害を治療する方法であって、ベクターを対象の細胞に形質導入し、1つ以上の治療用ヌクレオチド配列を細胞のゲノムに組み込む。

10

【0179】

実施形態 22。1つ以上のキャプシドバリエーションが、HSC1 (配列番号 2)、HSC2 (配列番号 3)、HSC11 (配列番号 4)、HSC3 (配列番号 5)、HSC4 (配列番号 6)、HSC6 (配列番号 7)、HSC7 (配列番号 8)、HSC8 (配列番号 9)、HSC9 (配列番号 10)、HSC5 (配列番号 11)、HSC12 (配列番号 12)、HSC17 (配列番号 13)、HSC13 (配列番号 14)、HSC14 (配列番号 15)、HSC15 (配列番号 16)、HSC16 (配列番号 17)、バリエーション、断片、変異体、及びそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 21 に記載の方法。

20

【0180】

実施形態 23。細胞が幹細胞である、実施形態 21 に記載の方法。

【0181】

実施形態 24。幹細胞が、造血幹細胞、多能性幹細胞、胚性幹細胞、または間充質幹細胞である、実施形態 23 に記載の方法。

【0182】

実施形態 25。疾患または障害が、細胞ゲノム中の 1つ以上の変異によって引き起こされる、実施形態 24 に記載の方法。

【0183】

実施形態 26。疾患または障害が、遺伝性代謝疾患、リソソーム蓄積症、ムコ多糖症、免疫不全疾患、ならびにヘモグロビン病疾患及び感染から選択される、実施形態 25 に記載の方法。

30

【0184】

実施形態 27。AAV ベクターバリエーションが、前記 1つ以上の治療用ヌクレオチド配列のプロモーターを含まない、実施形態 21 に記載の方法。

【0185】

実施形態 28。標的部位がセーフハーバー部位である、実施形態 22 に記載の方法。

【0186】

実施形態 29。セーフハーバー部位が第 19 染色体上の AAVS1 遺伝子座である、実施形態 23 に記載の方法。

40

【0187】

以下の実施例は、本開示の様々な実施形態を説明することを意図している。このように、議論された特定の実施形態は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。当業者には、本開示の範囲から逸脱することなく様々な同等物、変更、及び修正を行うことができ、そのような同等な実施形態が本明細書に含まれることは明らかであろう。さらに、本開示に引用される全ての参考文献は、本明細書に完全に記載されているかのように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0188】

実施例 1: CD34 + ヒト造血幹細胞株または K562 細胞株における AAV C1ade F ベクターバリエーション媒介ゲノム編集

50

外因性ヌクレアーゼを使用せずに A A V F (A A V H S C) ベクターを用いた特定の D N A 配列の部位特異的挿入または標的化された組み込みによるゲノム編集を、健康なドナーからのヒト C D 3 4 + 造血細胞株または C D 3 4 + 赤白血病細胞である K 5 6 2 細胞株で行った。1組のドナー組換え A A V ベクター、I T R - A A V S 1 - F P ベクターを構築し、これを用いて天然の野生型 A A V 組み込み部位である染色体 19 の A A V S 1 座に導入遺伝子を組み込んだ (K o t i n 、 1 9 9 2 ; G i r a u d 、 1 9 9 4) 。第 19 染色体 q t e r 1 3 . 3 - 1 3 . 4 上の A A V S 1 遺伝子座は、ここに挿入された遺伝子が病原性のない状態で発現され、これを組み込む野生型 A A V に類似しているため、導入遺伝子の挿入のための「セーフハーバー」部位であることが以前に示された (G i r a u d 、 1 9 9 4 ; L i n d e n 、 1 9 9 6 A ; L i n d e n 1 9 9 6 B) 。統合される導入遺伝子は、ヒト染色体 19 上の A A V S 1 遺伝子座と相同性を有する約 8 0 0 ヌクレオチドの両側に隣接する V e n u s 黄色蛍光タンパク質 (「 Y F P 」 または 「 F P 」) 遺伝子であった (図 3 の模式図参照) 。ドナー A A V ベクターは、導入遺伝子がプロモーターを持たず、染色体上コードされた調節配列の下流にある正しい遺伝子座に組み込まれている場合にのみ発現されるように設計された (図 4 参照) 。したがって、発生した V e n u s Y F P 導入遺伝子の発現は、A A V S 1 またはその近くに位置する染色体プロモーターの制御下にあった。

【 0 1 8 9 】

ドナーベクター、I T R - A A V S 1 - F P は、C h a t t e r j e e ら、1 9 9 2 に記載されている標準的な A A V パッケージング法に従って A A V H S C キャプシドにパッケージングした。具体的には、I T R - A A V S 1 - F P を、偽型 A A V H S C - A A V S 1 - F P ベクターを形成する A A V H S C 7 、A A V H S C 1 5 または A A V H S C 1 7 キャプシド (すなわち、A A V ベクターバリエーション) にパッケージングした。ヒト C D 3 4 + 造血細胞株または K 5 6 2 細胞を、異なる感染多重度 (M O I) (すなわち、5 0 , 0 0 0 M O I ; 1 0 0 , 0 0 0 M O I ; 2 0 0 , 0 0 0 M O I ; 3 0 0 , 0 0 0 M O I 、及び 4 0 0 , 0 0 0 M O I) で、偽型 A A V H S C - A A V S 1 - F P で形質導入した。

【 0 1 9 0 】

相同組換えによる A A V S 1 遺伝子座への Y F P 導入遺伝子の組み込みを、形質導入された K 5 6 2 細胞における Y F P 発現の細胞蛍光分析によって最初にアッセイした。A A V H S C 7 F P ベクターを用いた標的化された組み込みは、形質導入後 2 4 時間 (図 5 、及び 7 A) 、及び形質導入後 7 2 時間 (図 6 、及び 7 B) の Y F P 導入遺伝子の発現をもたらした。さらに、A A V H S C 7 F P ベクターの M O I が増加するにつれて、Y F P 発現の平均パーセンテージもまた増加した (図 7 A 、及び 7 B) 。

【 0 1 9 1 】

相同領域の外側に位置するプライマーを用いて編集されたゲノムの P C R 増幅によって、Y F P 導入遺伝子の標的化された組み込みがさらに確認された。簡潔には、A A V H S C 7 F P ベクターを用いて 1 0 0 , 0 0 0 個のベクターゲノム / 細胞の M O I で形質導入した K 5 6 2 細胞から D N A を抽出した。P C R 増幅は、「O U T フォワードプライマー R e g i o n」、及び「O U T リバースプライマー R e g i o n」プライマーを用いて行った (図 4 参照) 。Y F P 導入遺伝子の組み込みは、約 1 . 9 k b の野生型サイズから ~ 3 . 1 k b 断片を含む Y F P 導入遺伝子までの A A V S 1 遺伝子座のサイズの増加をもたらした (図 4 参照、「断片 1」で表示されたラインと「断片 2」で表示されたラインとを比較) 。染色体 19 A A V S 1 遺伝子座内の Y F P 導入遺伝子を含む約 3 . 1 k b 断片の増幅は、Y F P 導入遺伝子が A A V H S C 7 F P ベクターで形質導入された細胞において A A V S 1 座に効果的に組み込まれていることを示した (図 8 A 、及び 8 B 、レーン 4 参照) 。

【 0 1 9 2 】

実施例 2 : 初代ヒト C D 3 4 + 末梢血幹細胞における A A V ベクターバリエーション媒介ゲノム編集。

10

20

30

40

50

ヒトCD34+初代末梢血由来ヒト造血幹細胞(PBSC)においても、外因性ヌクレアーゼを使用せずにAAVHSCベクターを用いた特異的DNA配列の部位特異的挿入または標的化組み込みによるゲノム編集を行った。簡単に述べると、ITR-AAVS1-FPベクターは、AAVHSC7、AAVHSC12、AAVHSC15、及びAAVHSC17を含むAAVHSCキャプシドにパッケージングされた(標準的なAAVパッケージング方法については、Chatterjee、1992参照)。初代CD34+細胞を、偽型AAVHSC-AAVS1-FPベクター(すなわち、AAVベクターバリエーション)で、100,000、及び150,000のMOIで形質導入した。

【0193】

相同組換えによるYFP導入遺伝子のAAVS1遺伝子座への組み込みを、YFP発現の細胞蛍光分析によりアッセイした。初代CD34+細胞におけるAAVHSC7FP、及びAAVHSC17FPベクターを用いた標的化された組み込みでは、150,000のMOIで形質導入後1日(図9)、100,000のMOIで形質導入後4日(図10)、100,000のMOIで形質導入後18日(図11)にYFP導入遺伝子の発現をもたらした。MOI100,000(39日)で、形質導入後5.5週でYFPを発現する陽性細胞のパーセンテージは低下しなかった(図12A及びB、20日の結果と39日の結果とを比較)。分裂細胞集団におけるプロモーターのないYFP導入遺伝子のこの長期発現は、導入遺伝子の正確な組み込みを示す。

【0194】

YFP導入遺伝子の標的化された組み込みは、PCR分析によってさらに確認された。編集されたゲノムは、挿入された導入遺伝子配列と天然の染色体5'相同性アーム配列との間の5'接合領域を増幅するプライマーを用いて増幅された(図4参照、「断片3」と表示されたライン参照)。簡潔には、AAVHSC7FPベクターを用いて150,000個のベクターゲノム/細胞のMOIで形質導入した初代CD34+細胞からDNAを抽出した。PCR増幅は、「OUTフォワードプライマーRegion」、及び「INリバースプライマー」プライマーを用いて行った(図4参照)。形質導入された初代CD34+細胞の5'接合領域の約1.7kb断片の増幅は、YFP導入遺伝子がAAVS1座にうまく組み込まれたことを示した(図13、レーン5参照)。一方、AAVHSC7FPベクターで形質導入されなかった細胞については増幅産物は存在しなかった(図13、レーン3参照)。

【0195】

YFP導入遺伝子の標的化された組み込みは、編集されたAAVS1遺伝子座の異なる部分の配列分析によってさらに確認された。調節エレメント(図16参照)の5'領域付近、3'領域の近く、5'相同性アーム(図15参照)の近くの「OUTフォワードプライマーRegion」(図14参照)(図17参照)、導入遺伝子の5'領域付近(図18参照)、及び「INリバースプライマー」領域(図19参照)の近くに存在する。配列決定の結果は、YFP遺伝子が存在し、AAVS1座に首尾よく組み込まれていることを示した。

【0196】

実施例1及び2に示されるように、AAVHSCベクターは、外因性エンドヌクレアーゼの添加を必要とせずに、ヒトCD34+造血細胞株、及びCD34+PBSCにおける効率的な標的ゲノム編集を首尾よく媒介した。AAVHSCベクターは、AAVS1遺伝子座に対応する隣接相同性アームに基づいて、YFP導入遺伝子の第19染色体上のAAVS1座への組み込みを指向することができた。AAV媒介性トランスジェネシスは以前に報告されている。しかし報告された頻度は低く、通常、1e6細胞の1対1e4細胞の1のオーダーである。本明細書に示すように、AAVHSCベクターを用いた標的ゲノム編集は、以前に報告されたものよりも1,000~100,000倍効率が高い、初代細胞の長期間の約10%の頻度で生じた(例えば、Khan、2011参照)。ヒトCD34+造血細胞株におけるYFP導入遺伝子の発現は、形質導入後1日目に早く観察され、3日目に確認された。PBSC中のYFP導入遺伝子の発現は、1日目から開始し、分析さ

10

20

30

40

50

れた最新の時点である長期間（約6週間まで）観察された。AAVHSCベクター形質導入の結果として明白な毒性は観察されなかった。高頻度の挿入、使用の容易さ、及び毒性の欠如が観察されることに基づいて、AAVHSCベクターを用いた標的ゲノム編集に基づく治療は実用的かつ実現可能である。

【0197】

実施例3：AAVベクターバリエーションを用いたインビボゲノム工学。

Venusをコードするルシフェラーゼ、及びAAVHSCベクターをコードするAAVHSCベクターを、以前にヒト臍帯血CD34+HSCで異種移植した成体免疫不全マウスに注射した。以下に示すように、AAVHSCベクターの静脈内注射は、ヒトCD34+造血幹細胞、及び前駆細胞のインビボでの形質導入をもたらす、静脈内注射AAVHSCベクターは、ヒト造血部位に輸送され、ヒト細胞に形質導入した。

【0198】

方法。簡単に説明すると、免疫不全のNOD/SCID成体マウスに、最初に¹³⁷Cs供給源から350cGyの亜致死量を照射した。第二に、百万人のヒト臍帯血CD34+細胞を、亜致死的に照射された免疫不全NOD/SCIDマウスに注射した。次に、CD34+HSC移植の2時間後、マウスに約1E11-5E11粒子のAAVHSC-ルシフェラーゼベクター（AAVHSC7-ルシフェラーゼベクターまたはAAVHSC17-ルシフェラーゼベクターのいずれか）を静脈注射した。これらのベクターは、外因性ヌクレアーゼの非存在下で使用した。AAVHSC-ルシフェラーゼベクターは、ユビキタスCBAプロモーターの制御下で一本鎖ホタルルシフェラーゼ遺伝子（ssLuc）をコードして、導入遺伝子発現のインビボ生物発光モニタリングを連続的に可能にする。これらのベクターは、米国特許出願第13/668,120号（米国特許公開第20130096182A1号として公開）、及びSmithら（本明細書中に完全に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれる）に詳細に記載されている（Smith、2014）。AAVHSC-ルシフェラーゼベクターは、HSC7キャプシドバリエーション（HSC7キャプシドのポリヌクレオチド配列は配列番号27として提供され、HSC7キャプシドのポリペプチド配列は配列番号8（図1参照）として提供される）、またはシュードタイピングされたHSC17キャプシドバリエーション（HSC17キャプシドのポリヌクレオチド配列は配列番号35として提供され、HSC17キャプシドのポリペプチド配列は配列番号13（図1参照）として提供される）、AAVHSC7-ルシフェラーゼベクター、及びAAVHSC17-ルシフェラーゼベクター（Smith、2014参照）を形成する（標準的なAAVパッケージング方法については、Chatterjee、1992を参照）。AAVHSC-ルシフェラーゼベクターは、マウス、及びヒト細胞の両方に形質導入することができることに留意されたい。しかしながら、下記のAAVHSC-VenusベクターにコードされているVenusとは対照的に、ルシフェラーゼはAAVS1に組み込まれないであろう。代わりに、ルシフェラーゼは無作為に組み込むことができ、またはエピソームにとどまることができる。

【0199】

AAVHSC-ルシフェラーゼベクターを注射して2-7日後、マウスに約1E11-5E11粒子のAAVHSC-Venusベクターを注射した。具体的には、最初にAAVHSC7-ルシフェラーゼベクターを注射したマウスにAAVHSC7-Venusベクターを注射し、AAVHSC17-ルシフェラーゼベクターを最初に注射したマウスにAAVHSC17-Venusベクターを注射した。Venusドナーベクターは、上記の実施例1、及び2に具体的に記載されている。ドナーAAVベクターは、Venus導入遺伝子がプロモーターを持たず、染色体コードされた調節配列の下流にある正しいAAVS1遺伝子座に組み込まれている場合にのみ発現されるように設計した（図3、及び4参照）。したがって、発生したVenus導入遺伝子の発現は、AAVS1またはその近くに位置する染色体プロモーターの制御下にあった。重要なことに、Venus遺伝子を含むベクターは、発現を駆動するプロモーターを含まない。Venus遺伝子は、内因性染色体プロモーターの下流のヒト細胞においてAAVS1に正しく組み込まれる場合にの

み発現される。ドナーベクター、I T R - A A V S 1 - V e n u s (図 3 参 照) を、C h a t t e r j e e ら、1 9 9 2 に記載されている標準的な A A V パッケージング法に従って A A V H S C キャプシドにパッケージングした。このベクターは、H S C 7 キャプシドバリエーション (H S C 7 キャプシドのポリヌクレオチド配列は配列番号 2 7 として提供され、H S C 7 キャプシドのポリペプチド配列は配列番号 8 (図 1 参 照) として提供される) または H S C 1 7 キャプシドバリエーション (H S C 1 7 キャプシドのポリヌクレオチド配列は配列番号 3 5 として提供され、H S C 1 7 キャプシドのポリペプチド配列は配列番号 1 3 (図 1 参 照) として提供される) を用いて A A V H S C 7 - V e n u s ベクター、及び A A V H S C 1 7 - V e n u s ベクターを形成する。

【 0 2 0 0 】

最後に、インビボでのルシフェラーゼ発現を注射の 4 週間後に測定した。注入 6 週間後、ヒト C D 3 4 +、及び C D 4 5 + 細胞の生着を測定し、V e n u s 発現を定量した。この実施例で実施された実験の全体概略図については、図 2 0 を参照。

【 0 2 0 1 】

結果。注入後 4 週間、A A V H S C - ルシフェラーゼベクターの静脈内注射を受けた異種移植、及び非異種移植マウスで、インビボイメージングを行った。結果は、移植後の造血部位である脊椎、脾臓、臀部、及び長骨において特異的なルシフェラーゼ発現を示した (図 2 1 A 参 照) 。しかしながら、以前にヒト臍帯血 C D 3 4 + H S C で異種移植されていないマウスでは、造血器官における特異的なルシフェラーゼ発現は観察されなかった (図 2 1 B 参 照) 。これらの結果は、静脈内注射された A A V H S C ベクターが、ヒト造血のインビボ部位へのトラフィックを伝達し、幹細胞、及び前駆細胞を優先的に形質導入することを示す。

【 0 2 0 2 】

A A V H S C - V e n u s ベクターを注射して 6 週間後、ヒト C D 3 4 +、及び C D 4 5 + 細胞を、フローサイトメトリーを用いて分析した。結果は、注入されたヒト臍帯血 C D 3 4 + 細胞がマウスに移植され、より成熟した血液細胞を生じることを示した。具体的には、原始ヒト血液前駆細胞 (すなわち、C D 3 4 + 細胞) が骨髄で観察された (表 1、C D 3 4 + 細胞、及び大腿骨髄を参照) 。さらに、表 1 に示すように、大腿骨髄、脊椎骨髄、及び脾臓において、ヒト単核球細胞 (すなわち、C D 4 5 + 細胞) が明らかであった。

【 0 2 0 3 】

【 表 2 】

表 1 : 免疫不全マウスにおけるヒト血球の正着

AAVHSC 7			
細胞タイプ	大腿骨髄	椎骨骨髄	脾臓
CD 4 5 +	6 8 . 4	3 0 . 4	2 4 . 3
CD 3 4 +	2 2	NT *	NT
AAVHSC 1 7			
細胞タイプ	大腿骨髄	椎骨骨髄	脾臓
CD 4 5 +	4 6 . 6	2 4	1 8 . 3
CD 3 4 +	1 3 . 1	NT	NT
* NT = 試験されていない			
CD 4 5 + 細胞 : ヒト単核球			
CD 3 4 + 細胞 : ヒト造血前駆細胞			

【 0 2 0 4 】

注射から 6 週間後、フローサイトメトリーを用いて、A A V H S C 7 - V e n u s または A A V H S C 1 7 - V e n u s ベクターのいずれかの静脈内注射を受けた異種移植マウスのヒト H S C からの V e n u s 発現を分析した。結果は、A A V H S C 形質導入が大腿骨、及び脊椎骨髄由来の C D 4 5 + ヒト H S C、及び C D 3 4 + ヒト H S C において容易

に観察されたことを明らかにした（表2、及び図22A～F参照）。

【0205】

【表3】

表2：Venusを発現している移植されたヒト造血細胞のパーセンテージ

AAVHSC7			
細胞タイプ	大腿骨髄	椎骨骨髄	脾臓
CD45+	8.35	15.3	10.3
CD34+	9.23	NT*	NT
AAVHSC17			
細胞タイプ	大腿骨髄	椎骨骨髄	脾臓
CD45+	8.59	70.2	9.9
CD34+	8.92	NT	NT
*NT＝試験されていない			
CD45+細胞：ヒト単核球			
CD34+細胞：ヒト造血前駆細胞			

【0206】

さらに、脾臓のヒトCD45+細胞は、Venusがこれらの細胞で発現されると容易に形質導入の証拠を示した（表2、ならびに図22G及びH参照）。これは、移植されたヒト臍帯血CD34+細胞から生じるCD45+細胞がVenusを発現することを実証する。これらの結果は、インビボでのAAVHSCベクターの静脈内注射が、ヒト造血細胞の形質導入をもたらすことを示す。

【0207】

実施例4：AAV Clade Fベクターを用いた大小の編集エレメントのゲノムへの挿入

方法。rAAVの生産、精製、滴定。NEBuilder v.1.6.2 (Ipswich, MA)を用いて設計したプライマーを用いて、New England Biolabs Gibson Assembly Cloning Kitを使用して、すべての標的化ゲノムをAAV2骨格にクローニングした。全ての標的ゲノムを配列決定し、AAV2 ITRの完全性を制限ダイジェスト、及び配列決定を用いて確認した。一本鎖標的ゲノムを、単純ヘルペスウイルス(HSV)感染293細胞のAAVFキャプシドにパッケージングした。得られた組換えAAVベクターを2ラウンドのCsCl2密度遠心分離勾配で精製し、導入遺伝子特異的プライマー、及びプローブを用いてqPCRを用いて力価を測定した。

【0208】

K562、HepG2、及びPBSC形質導入が含まれる。慢性骨髄性白血病(CML)細胞株、K562、及び肝細胞癌細胞株HepG2は、American Type Culture Collection(ATCC)(Manassas, VA)から入手し、ATCCガイドラインに従って培養した。末梢血幹細胞(PBSC)を、CD34+間接分離キット(Miltenyi Biotech)を用いて健康なドナーのサイトカイン下塗したPBから単核細胞から精製し、単離直後に形質導入を行った。PBSCを、20%FCS、100µg/mLストレプトマイシン、100U/mLペニシリン、2mmol/L L-グルタミン、IL-3(10ng/mL; R&D Systems)、IL-6(10ng/mL; R&D Systems)、及び幹細胞因子(1ng/mL; R&D Systems)を含むイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)(Irving Scientific)で培養した。HepG2細胞を分割し、形質導入の約24時間前にプレATINGした。形質導入の直前にK562細胞をプレATINGした。K562s、HepG2sまたはPBSCを、5E4～4E5のMOIで、AAVF標的ベクターで形質導入した。細胞に形質導入し、外因性ヌクレアーゼの非存在下で相同組換えを達成した。形質導入の1～39日後の時点で細胞をフロー、及び分子分析のために採

取した。インビトロでの形質導入のBrdU標識は、APC BrdUフローキット(BD Biosciences)を指示通りに用いて採取する前に行った。

【0209】

TI PCR、及びシーケンシング。高分子量DNAを、AAVF標的ベクターで形質導入したK562、HepG2またはPBSCから単離した。TI特異的PCRは、相同性アームの外側の染色体領域であるSigma AAVS1フォワードプライマー(5' - GGC CCT GGC CAT TGT CAC TT - 3')と挿入されたカセットにアニールするプライマー-Venus リバースプライマー(5' - AAC GAG AAG CGC GAT CAC A - 3')またはRFLP HindIII リバースプライマー(5' - CCAATCCTGTCCCTAGTAAAGCTT - 3')。Roche Expand High Fidelity PCRシステム(インディアナポリス、インディアナ州)を使用し、以下のサイクル条件を用いた: 1サイクル、5分間~95 ; 15サイクル、30秒~95 、30秒~62 で開始し、0.5 / サイクル、2分~68 ; 20サイクル、30秒~95 、30秒~53 、2分~68 ; 1サイクル、5分~68 。PCR産物を、Qiaquick PCR精製キット(Qiagen)を用いる直接配列決定のためにPCR精製し、または配列決定のためのTOPOTAクローニングキット、及びSanger Sequencing(Life Technologies)によって配列決定したクローンを用いてクローニングした。

【0210】

CD34+細胞の移植。すべての動物のケア、及び実験は、施設の動物用ケア、及び使用委員会によって承認されたプロトコルの下で行われた。6-8週齢の雄のNOD.CB17-Prkdcscid/NCrCr1(NOD/SCID)マウスを特定の病原体のない施設で維持した。マウスを、移植前少なくとも48時間、スルファメトキサゾール、及びトリメトプリム経口小児抗生物質(Hi-Tech Pharmacal(Amitiville, NY)、10ml/500ml H2O)上に置いた。マウスに、137Cs源から350cGyの亜致死量の放射線を照射し、移植の前に最低4時間回復させた。CD34+間接分離キット(Miltenyi Biotec)を用いて臍帯血(CB)CD34+細胞を単離した。1 X 10⁶CCBCD34+細胞を約200µlに再懸濁し、尾静脈注射により移植した。AAVF標的ベクターの2.4E11~6.0E11粒子を、CB CD34+移植の1週間または7週間後に尾静脈に静脈内注射した。大腿骨髄(BM)、椎骨BM、及び脾臓を、移植後6, 7または19週に採取した。

【0211】

フローサイトメトリー分析。インビトロ形質導入は、AAVフローサイトメーター(Dako)を用いて、AAVF標的ベクター媒介組み込み、及びBrdU、及び7-AADについて分析した。特異的蛍光を、自己蛍光の減算に続いて定量した。ヒト特異的抗体、APC結合抗CD34、及びPE結合抗Glycophorin A、及びPEで染色することにより、採取した脊椎BM、大腿骨BM、及び異種移植マウスの脾臓において、CD34+、及び赤血球細胞における統合された蛍光カセットのインビボ発現を分析した、及びFACS Aria SORP(BD Biosciences)上のAPC結合IgG対照(BD Biosciences)を用いて行った。FlowJoソフトウェア(TreeStar)を用いてフローサイトメトリーデータを分析した。

【0212】

結果。幹細胞由来AAVは、キャプシド遺伝子のヌクレオチド配列相同性に基づいてAAV Clade Fにマッピングされることが示された(図23、Smithら、Mol Ther. 2014 Sep; 22(9): 1625-34)。これらの幹細胞由来のAAVをAAVHSC1~17と命名した。これらのAAVは、本明細書ではそれぞれAAVF1~17とも呼ばれる。

【0213】

一本鎖AAVベクターゲノムを用いて、相同性アーム、及び大きなインサートを含む補正ゲノムを設計した(図24)。インサートは、スプライスアクセプター(SA)、及び

2 A 配列 (2 A) の下流にプロモーターのない Venus オープンリーディングフレーム (ORF) を含み、独立したタンパク質発現を可能にした。Venus は、黄色蛍光タンパク質の変異体である (例えば、Nagai ら、Nat Biotechnol、2002、20 (1) : 87 - 90 参照)。左右の相同性アーム (HA) はそれぞれ 800 bp 長であり、染色体 19 (図 25) の AAVS1 遺伝子座に位置するヒト PPP1R12C のイントロン 1 の配列に相補的であった。同様の一本鎖 AAV ベクターゲノムを、2 つの相同性アームの間に 10 bp インサートを用いて設計した (図 35)。AAVS1 遺伝子座は、異種導入遺伝子の挿入のためのセーフハーバー部位と考えられている。

【 0214 】

相同性アーム、オープンリーディングフレーム、及び調節配列を AAV2 逆位末端反復 (ITR) の間でクローニングした。この補正ゲノムは、AAVHSC、AAV8、9、6、及び 2 を含む異なる AAV キャプシドにパッケージング (シュードタイピング) された。次に、組換えウイルスを使用して、編集ゲノムを標的細胞の核に送達した。試験した標的細胞には、CD34 + 赤白血病細胞株、肝細胞株、及び初代ヒト CD34 + 造血幹 / 前駆細胞ならびにそれらの造血子孫が含まれた。

【 0215 】

Venus ORF を含み、ヒト PPP1R12C 遺伝子のイントロン 1 に相補的な相同性アームが隣接している AAVF ベクターを使用して、編集ヒトゲノムを初代ヒト CD34 + サイトカイン刺激末梢血幹細胞 (図 26A)、ヒト K562 CD34 + 赤白血病細胞株 (図 26B)、及びヒト肝細胞株 HepG2 (図 26C)。主要な CD34 + 細胞は最高 60 % の編集レベルを支持した (図 26A ~ F)。K562 及び HepG2 を含む不死化細胞株も、有意なレベルの編集を示した。すべての場合において、達成された編集のレベルは、AAV6、及び AAV8 を含む非 Clade F ウイルスで達成されたレベルよりも一貫して有意に高かった (図 26A ~ F、及び図 36)。

【 0216 】

別の実験では、AAVF7、AAVF15 または AAVF17 ベクターで形質導入されたサイトカインで刺激された CD34 + 末梢血幹細胞 (PBSC) から抽出された DNA を、染色体特異的プライマー、及びインサート特異的プライマーで増幅した。ベクターには大きなインサート (Venus) または短いインサート (10 bp、RFLP) が含まれていた。ゲルは、正確なサイズのアンプリコンが、編集された CD34 細胞から増幅されたことを示した (図 27、図 35、及び図 36)。1.7 kb、及び 1 kb バンドの存在は、それぞれ大きなインサート、及び小さなインサートの正確に標的化された組み込みを反映した。標的化された組み込みは、AAVF ベクターで編集した後の短期、及び長期の両方の時点で示された (図 27)。

【 0217 】

別の実験では、ヒト PPP1R12C 遺伝子のイントロン 1 に 10 bp インサートを挿入するために、一本鎖 AAV ベクターゲノムを設計した (図 28A)。これらのベクターは、Nhe1 制限酵素認識部位 (GCTAGC) を含む野生型左相同性アーム (HA-L) を含んでいた。NS mut ベクターは、第 19 染色体上の左相同性アームの TA 配列を AT に変更するように設計された。この変化は、Nhe1 部位の Sph1 部位への変換をもたらし、配列を GCTAGC から GCATGC に変更する。図 28B は、K562 細胞由来のゲノム DNA を野生型または NS Mut AAVF ベクターのいずれかを用いて編集した場合に、Nhe1 または Sph1 で切断することによって作製された予想断片の相対的サイズを示す。野生型 AAVF ベクターで編集した K562 細胞のゲノム DNA 由来の実際のアンプリコンを Nhe1 で消化したが、Sph1 で消化しなかった (図 28C)。野生型または NS Mut ゲノムのいずれかをコードする AAVF7 または AAVF17 ベクターで編集した後に増幅した K562 DNA を用いた結果は、Nhe1 による消化が、未編集細胞からのアンプリコンに匹敵するアンプリコンの切断をもはやもたらさないことを示した。Sph1 での消化は切断をもたらし、染色体の左側の相同性アームの Nhe1 部位が Sph1 部位によって置換されたことを示した (図 28D)。野生型ま

10

20

30

40

50

たはNS MutゲノムのいずれかをコードするAAVF7またはAAVF17ベクターで編集した後の肝細胞癌腫細胞株HepG2からの増幅DNAの電気泳動は、Nhe1による消化が、未編集細胞からのアンプリコンに匹敵するアンプリコンの切断をもはやもたらさないことを示した(図28E)。Sph1による消化は切断をもたらし、染色体の左側の相同性アームのNhe1部位がSph1部位によって置換されたことを実証した。配列分析により、AAVF7、及びAAVF17野生型またはNS Mutベクターによる編集が確認された(図29)。これらの結果は、AAVF7、及びAAVF17の両方が、2つの異なる細胞系における染色体配列における2ヌクレオチド置換を首尾よく媒介したことを示している。これらの結果はまた、ヒト細胞のゲノムDNAにおける2塩基対置換を媒介するAAVFベクターの能力を示し、疾患誘発変異の矯正またはゲノムにおける新しい変異の誘導のためのそれらの使用を示唆する。

10

【0218】

別の実験では、AAVFベクターの編集能力に対する細胞分裂の潜在的な必要性を健康なヒトCD34+ PBSCで試験した。10μMのBrdUで2時間パルスすることにより、形質導入したヒトCD34+ PBSCにBrdUを組み込んだ。AAVFで形質導入したCD34+細胞を採取し、透過処理し、DNase処理の前に固定した。DNase処理後、処理した細胞を抗BrdU APC抗体で20分間染色した。インビトロで編集した細胞のBrdU標識を、指示に従ってAPC BrdUフローキット(BD Biosciences)を用いて採取する前に行った。その後、細胞を、Venus発現ならびにBrdU標識のためのフローサイトメトリーによって分析した。結果は、BrdU陽性、及び陰性集団の両方におけるVenus発現の同様の頻度を示し、細胞分裂がAAVF媒介性編集に必要でないことを示唆した(図30)。

20

【0219】

別の実験では、インビボでの生着されたヒト造血幹細胞の編集を、ヒト臍帯血CD34+造血幹細胞で移植された全身送達AAVFベクター免疫不全NOD/SCIDマウスによって試験した(図31A、及びB)。骨髓、及び脾臓の両方において、ヒト細胞の大部分はVenusを発現することが見出されたが、Venus発現はマウス細胞では観察されなかった(図31C、図37、及び図38)。マウスゲノムは、相同性アームに相補的なAAVS1座を含まないので、これらの知見は、遺伝子標的の特異性を実証する。分析されたヒト細胞のうち、Venus発現は、原始CD34+前駆細胞ならびに成熟グリコホリンA+赤血球細胞(骨髓、及び脾臓の両方)において観察された。

30

【0220】

別の実験では、マウスをヒト臍帯血CD34+細胞で移植し、AAVF-Venusを1または7週間後に静脈内経路で注射した。Venusの静脈注射の5, 6または13週間後に、脊椎または大腿骨髓または脾臓を採取した。これらは移植後6, 7または20週間の累積時間を表している。結果は、AAVF-Venusの静脈注射は、より成熟した、分化した(CD45+)インビボで生着されたヒト造血細胞と同様に、原始(CD34+)ウェルとしての編集をもたらしことを明らかにする。ヒト赤血球系統の細胞は、移植、及び注射後に長期間にわたり非常に効率的な編集を示した(図32)。AAVF媒介性編集は長期間安定であることが判明し、インビボで移植されたヒトCD34+細胞の分化した子孫によって安定して遺伝した(図32)。編集されたCD34+細胞の分化した子孫は、Venus長期間を示した(図32)。

40

【0221】

別の実験では、K562赤白血病細胞株、初代ヒトサイトカインで刺激された末梢血CD34+細胞、及びHepG2ヒト肝細胞株(図33)におけるプロモーターレスSA/2AVenus ORFの標的染色体挿入について配列分析を行った。部位特異的に組み込まれた配列は、染色体特異的プライマー、及びインサート特異的プライマーを用いて増幅された。結果は、すべての場合において、左、及び右の相同性アーム間の接合部にSA/2AVenusの正確な挿入を示した(図33)。

【0222】

50

別の実験では、初代ヒトサイトカインで刺激された末梢血CD34+細胞、及びHep G2ヒト肝細胞株（図34）における10bpインサートの標的化染色体挿入のための配列分析を行った。部位特異的に組み込まれた配列は、染色体特異的プライマー、及びインサート特異的プライマーを用いて増幅された。結果は、いずれの場合においても、左、及び右の相同性アーム間の接合部に10bpインサートの正確な挿入を示した（図34）。

【0223】

これらのデータは、AAV Clade Fベクターを使用して、大きなインサート断片、及び短いインサート断片の両方をゲノムにうまく編集することができ、ゲノムへの組み込みが正確であることを示す。これらのデータはまた、AAV Clade Fベクターが、外因性ヌクレアーゼの非存在下で高効率ゲノム編集に使用され得ることを示す。

10

【0224】

実施例5：ヒト細胞株におけるPPP1R12c遺伝子座の編集

方法

【0225】

AAVFベクターによるヒト細胞タイプの編集を評価するために、以下のヒト細胞株を使用した：

【0226】

【表4】

細胞株	組織タイプ
WI-38	正常ヒト二倍体線維芽細胞
MCF7	ヒト乳癌細胞株
Hep-G2	ヒト肝細胞癌細胞株
K562	CD34+赤白血病細胞株
Y79	ヒト網膜芽腫細胞株
SCID-X1 BL	SCID-X1患者由来のヒトEBV不死化B細胞株

20

【0227】

使用したAAVFベクターはそれぞれ、プロモーターを持たないVenusレポーターをコードする編集エレメントを含むベクターゲノムを含んでいた。プロモーターを持たないVenusは、Venusのスプライスアクセプター（SA）、及び2A配列（2A）の下流のオープンリーディングフレーム（ORF）を含み、独立したタンパク質発現を可能にした。左右の相同性アーム（HA）はそれぞれ800bp長であり、19番染色体上のAAVS1座に位置するヒトPPP1R12Cのイントロン1の配列に相補的であった。AAVS1遺伝子座は、異種導入遺伝子の挿入のためのセーフハーバー部位と考えられている。相同性アーム、Venus ORF、及び調節配列を含む編集エレメントを、AAV2逆位末端反復（ITR）間にクローン化した。

30

【0228】

細胞培養。全細胞株を、37℃で5%CO₂の加湿雰囲気下で成長させ、以下の条件で培養した。SCID-X1リンパ芽球（Coriell）を、15%ウシ胎児血清（FBS）（Gibco、カタログ番号26140）を補充したRPMI1640（Gibco、カタログ番号21875）で培養した。K562細胞（ATCC）を10%FBS（Gibco、カタログ番号26140）、及び1%L-グルタミン（Gibco、カタログ番号25030）を補充したDMEM（Corning、カタログ番号15-017-CVR）で培養した。HepG2細胞（ATCC）を、10%FBS（Gibco、カタログ番号26140）を補充したEMEM（ATCC、カタログ番号30-2003）中で培養した。MCF-7細胞（ATCC）を、10%FBS（Gibco、カタログ番号26140）、1%MEM非必須アミノ酸（Gibco、カタログ番号11140）、1%のSodiumピルビン酸（Gibco、カタログ番号11360）、及び10µg/mLヒト組換えインスリン（Gibco、カタログ番号12585-014）を補充したM

40

50

EM (Gibco、カタログ番号11095) 中で培養した。WI-38 線維芽細胞 (ATCC)、及び HEK293 細胞 (ATCC) 11140) を、10% FBS (Gibco、cat # 26140)、1% MEM 非必須アミノ酸 (Gibco、カタログ番号: 11140)、及び 1% ピルビン酸ナトリウム (Gibco、カタログ番号 11360) を補充した MEM (Gibco、カタログ番号 11095) 中で培養した。そして Y79 細胞 (ATCC) を、20% FBS (Gibco、カタログ番号 26140) を補充した RPMI 1640 (Gibco、カタログ番号 A10491) で培養した。

【0229】

ヒト細胞株の AAVF 媒介性編集。接着細胞を、96 ウェルフォーマットについては 20,000 細胞 / 0.1 mL で、または 24 ウェルフォーマットについては 20000 細胞 / 0.5 mL で 0 日目に播種した。AAVF ベクターの添加の 24 時間後 (1 日目) の細胞数を測定した。サスペンド細胞を、96 ウェルフォーマットで 20,000 細胞 / 0.1 mL または 24 ウェルプレートフォーマットで 20,000 細胞 / 0.5 mL で 1 日目に播種した。1 日目に、150,000 個のベクターゲノム (VG) / 細胞の多重感染 (MOI) を用いて AAVF を細胞に添加した。AAVF 添加の前に、移送に使用したピペットチップを硫酸プロタミン (10 mg / mL) でコーティングした。AAVF を、形質導入の直前に最大速度のボルテックスミキサーで 30 秒間完全に懸濁させた。細胞に添加された AAVF の量は、ウェル中の総体積の 5% を超えなかった。3 日目に、細胞を採取し (接着細胞を穏やかにトリプシン処理して組織培養プレートから除去した)、洗浄し、Hypercyt オートサンプラーを備えた Intellicyt フローサイトメーターを用いてフローサイトメトリーにより Venus 発現を分析した。編集は、非形質導入細胞 (典型的には 1% 未満の Venus 陽性細胞) において観察された、Venus 陽性であった全細胞集団からバックグラウンド蛍光を差し引いた割合として表された。AAVF 編集実験は、外因性ヌクレアーゼを使用せずに行った。

【0230】

結果

【0231】

試験した全ての AAVF についてヒト PPP1R12c 遺伝子座の編集が観察され、細胞タイプの選択性が示された (表 3)。一般に、AAVF 5 は、48 時間の感染後、全細胞集団の 12 ~ 45% から各細胞株において最高レベルの編集を生じた。AAVF 9 は、Bリンパ芽球細胞株 (SCID-X1 LBL、及び K562) においても高レベルの遺伝子編集をもたらした。AAVF 17 は、これらの条件下で正常ヒト二倍体線維芽細胞 (WI-38 細胞) において遺伝子編集の最高レベルを生じた。AAVF 1、AAVF 4、AAVF 7 ベクターは、形質導入されていない細胞で見られるものより一貫して大きい。一般に AAVF 5、AAVF 9、及び AAVF 17 で観察された最大レベルよりも低いレベルの編集をもたらした。これらのデータは、AAVF がヒト組織に広い指向性を有し、肝臓、CNS (網膜)、組織線維芽細胞、乳房、及びリンパ球における遺伝子編集に有用であり得ることを示す。

【0232】

【表 5】

表 3. ヒト細胞株の AAVF による編集

	ヒト細胞株					
ベクター	K562	Hep-G2	WI-38	Y79	MCF7	SCID-X1 LBL
	パーセント Venus 陽性細胞					
AAVF1	2.06	1.92	1.39	0.7	2.71	0.57
AAVF4	1.36	2.95	6.29	0.35	3.42	0.12
AAVF5	45.32	—	11.85	12.5	20.47	45.02
AAVF7	5.78	3.83	4.87	1.42	3.6	0.94
AAVF9	18.06	—	—	2.46	6.14	6.79
AAVF17	3.18	3.71	17.6	1.29	5.66	0.44

10

【 0 2 3 3 】

実施例 6：初代ヒト細胞における AAVF 編集

AAVF ベクターによる初代ヒト細胞の編集を評価するために、ヒト肝細胞、肝類洞内皮細胞、及び骨格筋芽細胞の初代培養を使用した。

【 0 2 3 4 】

それぞれ使用された AAVF、及び AAV ベクターは、プロモーターを含まない Venus レポーターをコードするベクターゲノムをパッケージした。インサートは、スプライスアクセプター (SA)、及び 2A 配列 (2A) の下流の Venus オープンリーディングフレーム (ORF) を含み、独立したタンパク質発現を可能にした。左右の相同性アーム (HA) はそれぞれ 800 bp 長であり、19 番染色体上の AAVS1 座に位置するヒト PPP1R12C のイントロン 1 の配列に相補的であった。AAVS1 遺伝子座は、異種導入遺伝子の挿入のためのセーフハーバー部位と考えられている。相同性アーム、オープンリーディングフレーム、及び調節配列からなる補正ゲノムを AAV2 逆位末端反復 (ITR) の間にクローニングした。

20

【 0 2 3 5 】

方法

【 0 2 3 6 】

細胞培養。全ての初代ヒト細胞を、組織培養インキュベーター中、37℃、5% 加湿 CO₂ 下で培養した。すべての材料、及び媒体成分は、別段の指定がない限り Life Technologies から入手した。

30

【 0 2 3 7 】

ヒト肝細胞の初代培養物を Invitrogen から入手し、I 型コラーゲンコートプレート上で製造業者によって示唆されるように培養した。細胞を、解凍 / プレート培地 [最終体積 35.0 mL あたり、ウィリアムズ E 培地 (#A12176) 32.5 mL、ウシ胎仔血清 1.6 mL、10 mM デキサメタゾン 3.2 µL、及び 0.9 mL のメッキカクテル A] の、液体窒素での保存から回収した。0.5 mL ペニシリン (10,000 U/mL) / ストレプトマイシン (10,000 µg/mL) 溶液 (Cat # 15140)、0.05 mL の 4.0 mg ヒト組換えインスリン / mL (カタログ番号 12585-014)、0.5 mL の最終容量 1.8 mL あたり 200 mM の GlutaMAX TM 溶液 (カタログ番号 35050)、及び 0.75 mL の 1.0 M Hepes、pH 7.4 (カタログ番号 15630) で溶出した。ヒト肝細胞は、最終体積 103.6 mL あたり、Williams E 培地 100 mL、デキサメタゾン 0.001 mL、及びメンテナンスカクテル B (カタログ番号 A13448) 3.6 mL を含むメンテナンス培地で維持した。

40

【 0 2 3 8 】

ヒト骨格筋芽細胞の初代培養物を Lonza (Lonza) から入手し、製造者の記載に従って SK-GM (商標) 培地で培養した。

50

【0239】

SkGM (商標) - 2 Bullit (商標) キット (Lonza、カタログ番号CC-3245) は、500mLのSkGM-2培地 (#0000482653) 中、0.5mLのヒト上皮成長因子 [hEGF] (#0000482653)、0.5mLのデキサメタゾン (#0000474738)、10mLのL-グルタミン (#0000474740)、50mLのウシ胎児血清 (#0000474741)、0.5mLのゲンタマイシン/アンホテリシン-B [GA] (#0000474736) を含む。

【0240】

ヒト肝臓洞様内皮細胞の初代培養物をCreative Bioarrayから購入し、SuperCult (登録商標) 内皮細胞培地で培養し、製造者の記載に従ってゼラチンベースのコートニング上で増殖させた。SuperCult (登録商標) Endothelial Cell Medium Supplement Kit (カタログ#ECM-500 Kit) は、0.5mLのVEGF (#15206)、0.5mLのヘパリン (#15250)、0.5mLのEGF、0.5mLのHydrocortisone (#15318)、5.0mLのAntibiotic-Antimycotic Solution (#15179)、5.0mLのL-glutamine (#15409)、10.0mLのEndothelial Cell Supplement (#15604)、50.0mLのFBS (#15310)、及び500.0mLのSuperCult (登録商標) Endothelial Cell Supplement (#15517) を含む

【0241】

初代ヒト細胞のAAVF媒介性編集。ヒト初代肝細胞を、96ウェルフォーマットについては 2×10^4 細胞/0.1mL、または24ウェルフォーマットについては 2×10^4 細胞/0.5mLで、0日目に播種した。ウイルスベクターは、後述のように、2日目の48時間後に添加した。ヒト骨格筋芽細胞、及びヒト肝臓洞様内皮細胞を、1日目に96ウェルフォーマットで 2×10^4 細胞/0.1mLまたは24ウェルフォーマットで 2×10^4 細胞/0.5mLで播種した。2日目に、ウイルスベクターを150,000 VG (ベクターゲノム)/細胞の感染多重度 (MOI)/細胞 (AAVF5についてMOI 5×10^4 VG/細胞AAVF17については、 2.5×10^4 VG/細胞のMOIを使用した)。ベクターを細胞に添加する前に、ベクター送達に使用した全てのピペットチップを硫酸プロタミン (10mg/mL) でコートニングし、ベクターを形質導入の直前に30秒間ボルテックスして完全に混合した。細胞に添加されたベクターの体積は、ウェル中の総体積の5%を超えなかった。

【0242】

ヒト初代肝細胞の培養培地を3日目にリフレッシュした。4日目に、細胞を採取し (接着細胞をトリプシン処理した)、Hypercyt Autosamplerを備えたIntellicytフローサイトメーターを用いてフローサイトメトリーによりVenus発現を分析した。編集は、非形質導入細胞 (典型的には1%未満のVenus陽性細胞) において観察された、Venus陽性であった全細胞集団からバックグラウンド蛍光を差し引いた全細胞集団のパーセントとして表した。

【0243】

結果

【0244】

試験した全てのAAVFについてヒトPPP1R12c遺伝子座の編集が観察され、細胞タイプの選択性が示された (表4)。一般に、AAVF5は、初代細胞集団のそれぞれにおいて、ヒト肝細胞の2%の低さから、初代骨格筋芽細胞、及び肝臓の類洞状内皮細胞における24%~35%まで、48時間の感染後、最高レベルの編集を与えた。AAVF7、及びAAVF17はまた、初代肝類洞内皮細胞、及び骨格筋芽細胞において高レベルの遺伝子編集をもたらした。これらの細胞におけるAAVFベクターによる編集のレベルは、AAV2またはAAV6で観察されたレベルより10~50倍高かった。AAVFベ

クターは、プロモーターを持たないVenusベクターゲノムをパッケージングしたAAV2またはAAV6で形質導入された形質導入されていない細胞または細胞で見られたものより一貫して高いレベルの編集をもたらした。これらの細胞におけるAAV2またはAAV6のいずれかについては、編集がほとんどまたは全く観察されなかった。初代ヒト細胞におけるこれらのデータは、AAVF5、AAVF7、及びAAVF17がヒト組織に広い指向性を有し、肝臓、骨格筋、及び内皮細胞集団に向けられた遺伝子治療用途に有用であり得ることを示している。

【0245】

比較のために、初代ヒト細胞集団のそれぞれに、チキンベータアクチン(CBA)プロモーターの制御下でmCherryをパッケージングするAAVF遺伝子導入ベクターを形質導入した。Venus/mCherryのタンパク質発現比は、実験(Venus)の遺伝子編集ベクターを用いて多様な細胞タイプにおいて検出可能なタンパク質発現を有する細胞の数と、AAV6、AAVF5、及びAAVF7に対して上記の遺伝子導入ベクター(mCherry)を用いて検出可能なタンパク質発現を有する細胞の数とを反映した、編集比を推定するために用いられた。表5に示すように、AAV6媒介遺伝子編集は、一般に、研究された初代ヒト細胞における対応するAAVF媒介遺伝子導入アプローチよりもタンパク質発現に対してより有効であるが、AAV6媒介遺伝子編集は、実質的に同じか、そのような細胞におけるAAV6媒介遺伝子導入よりもあまり有効ではない。注目すべきことに、表5に示すように、AAVF媒介遺伝子編集は、研究した初代ヒト細胞のAAV6媒介遺伝子編集で観察されたものよりも高かった。これらのデータは、AAVF媒介遺伝子編集が様々な初代ヒト細胞においてAAV6よりも効率的であり、AAVF媒介遺伝子編集が、そのような細胞における対応する遺伝子伝達アプローチよりも好ましいことを示す。

【0246】

mCherryレポーターをパッケージングするAAVFベクターも、初代ヒト細胞に効果的に形質導入し、細胞タイプ特異性を示した(表6)。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、及び肝類洞内皮細胞(HSEC)では、AAVF9による形質導入は48時間の感染後に38~50% mCherry陽性細胞を産生した。AAVF9はまた、ヒト骨格筋筋芽細胞を効率的に形質導入し、より少ない程度で、試験したAAVFの全てが、これらの条件下でHSECに効果的に形質導入した(表6)。理論に拘束されるものではないが、これらの研究におけるmCherry発現の大部分は、相同性アームがmCherryベクターゲノムに存在しないため、発現がCBAプロモーターによって駆動されるため、レポーターのエピソーム発現を表す可能性が高い。

【0247】

【表 6】

表 4. 初代ヒト細胞の AAVF 媒介性編集

ベクター	HSEC	肝細胞	SMM
	パーセント Venus 陽性細胞		
AAV2	0.34	0.06	0.52
AAV6	0.00	0.00	0.00
AAVF5	34.70	2.00	24.20
AAVF7	18.40	0.62	18.65
AAVF17	21.40	1.37	19.60

表 5. 初代ヒト細胞における AAVF の編集比

ベクター	肝細胞		SMM	
	Venus/mCherry	AAVF/AAV6	Venus/mCherry	AAVF/AAV6
AAV6	0.84		0.80	
AAVF5	9.42	11.21	14.32	17.90
AAVF7	0.95	1.10	13.05	16.30

ベクター	HSEC	
	Venus/mCherry	AAVF/AAV6
AAV6	0.60	
AAVF5	5.30	8.80
AAVF7	2.70	4.50

HSEC=肝臓洞内皮細胞

SMM=骨格筋芽細胞

表 6 mCherry AAV をパッケージングするベクターを用いた初代ヒト細胞の形質導入

ベクター	HSEC	肝細胞	SMM	HUVEC
	パーセント mCherry 陽性細胞			
AAVF1	7.04	0.13	1.65	1.47
AAVF4	9.10	0.05	1.72	0.61
AAVF5	4.00	0.01	1.03	0.71
AAVF7	4.43	0.70	0.77	2.15
AAVF9	38.24	1.05	29.27	50.13

HSEC=肝臓洞内皮細胞

SMM=骨格筋芽細胞

HUVEC=ヒト臍静脈内皮細胞

【0248】

実施例 7: AAVF 相対遺伝子編集 (HDR) 対、遺伝子導入 (形質導入) 効率の研究

相対的遺伝子編集効率対、AAVF ベクターの遺伝子導入形質導入効率を評価するために、2 種類の AAV ベースのベクター (CBA-mCherry 遺伝子伝達ベクター、及び AAVS1-Venus 遺伝子編集ベクター、図 39) を使用した。AAV2、及び AAV6 の相対的な発現を示す。遺伝子導入ベクターについては、CBA-mCherry

構築物はニワトリ アクチン (CBA) プロモーターの制御下に mCherry 遺伝子を含み、ポリアデニル化シグナルを利用したが、相同性アームを含まなかった。遺伝子編集ベクターのために、AAVS1-Venus 構築物は、Venus ORF を、染色体 19 の AAVS1 領域内の PPP1R12C 遺伝子のイントロン 1 に標的化する (HA-L) 及び (HA-R) 相同性アームを有するプロモーターのない Venus オープンリーディングフレーム (ORF) を含ませた。Venus ORF の上流にスプライスアクセプター (splice acceptor) (SA)、及び 2A 配列があり、Venus 転写産物をスプライシングして PPP1R12C 遺伝子とは独立して発現させた。

【0249】

初代ヒト臍帯血 CD34 + 造血幹 / 前駆細胞において、AAVF、AAV2、及び AAV6 ベクターが遺伝子編集対遺伝子伝達を仲介する能力を比較した。使用した細胞を複数のドナーからプールした。精製された CD34 + 細胞を、1細胞当たり 150,000 個のベクターゲノム (VG) の多重度で遺伝子導入ベクター (AAV* - CBA - mCherry) または遺伝子編集ベクター (AAV* - Venus) のいずれかで形質導入した。48 時間後、細胞を採取し、フローサイトメトリーによって分析した (図 40A、及び 40B)。示されるデータは、バックグラウンド非形質導入細胞の減算を含む。

【0250】

Venus の発現は遺伝子編集の効率を表すのに対して、mCherry 発現は形質導入効率を表すと仮定された。理論に拘束されるものではないが、以下は AAV 形質導入と編集の潜在的メカニズムの要約である。感染すると、AAV は細胞表面受容体に結合し、核移行、及び進入の前に内在化される。核では、AAV はコーティングされず、ベクターゲノムが放出される。これらのプロセスは、ベクターゲノムにかかわらず、同じ細胞集団中の各所定のキャプシドについて同じ速度で起こる可能性が高い。コーティングしないと、一本鎖 CBA - mCherry ゲノムは mCherry 発現の前に第二鎖合成を受ける。他方、プロモーターを持たない Venus 編集ベクターは、染色体 19 上の相補性のゲノム領域に向けられている。次いで、相同性アームによって境界を定められた SA / 2A - Venus カセットは、相同性依存修復 (HDR) 機構を介して相同性アームの内部接合部で染色体に組換えられ得る。この再結合事象に続いて、Venus は正常に編集された細胞内で発現される。

【0251】

Venus は、AAVF9 を除く全てのベクターについて、mCherry よりもはるかに高い割合の細胞で発現された (図 40A、及び 40C)。Venus 発現は、AAVF1、AAVF5、AAVF7、AAVF16、及び AAVF17 による形質導入後に特に高かった。同じキャプシドが、mCherry 発現のレベルをはるかに低くした (図 40A、及び 40C)。AAV2、及び AAV6 による形質導入後に、mCherry、及び Venus 発現の両方の発現量が最小限であることが観察された。Venus と mCherry の相対的発現の比較も行った。具体的には、上述の遺伝子導入ベクター (mCherry) を用いて検出可能なタンパク質発現を有する細胞の数に対する、実験 (Venus) の遺伝子編集ベクターを用いた様々な細胞タイプにおける検出可能なタンパク質発現を有する細胞数の比を反映する編集比が決定された。編集比は、核内でのコーティングを通じたウイルス侵入のプロセスのための正規化後の各 AAV キャプシドによって媒介される編集の相対効率の推定値を提供する。試験したすべての AAV ベクターは、AAVF9 を除いて、遺伝子導入 / 導入遺伝子発現 (mCherry) と比較して、より効率的な遺伝子編集 (Venus) を示した (図 40D、及び表 7)。AAVF5、及び AAVF7 が最も高い編集比を示した (図 40D、及び表 7)。AAV2、及び AAV6 媒介遺伝子編集 (Venus) と比較して、AAVF 媒介遺伝子編集 (Venus) もまた比較した (AAV2 または AAV6 のいずれかに対して同じ比で割った AAVF の Venus : mCherry 比を示す表 7)。AAVF 遺伝子編集構築物の遺伝子編集効果は、AAV2、及び AAV6 遺伝子編集構築物と比較して有利に比較された。AAVF5、及び AAVF7 の編集比は、比較したベクターの中で最高であり、これらのベクターが特に効率的

な編集を媒介することを示している。

【0252】

【表7】

表7 CD34+CB細胞における編集-形質導入比

ベクター	比率編集：形質導入 (Venus：mCherry)	比 AAVF編集：AAV 6編集	比 AAVF編集：AAV2編 集
AAVF1	4.32	1.23	3.02
AAVF4	3.42	0.98	0.98
AAVF5	16.60	4.74	11.62
AAVF7	14.66	4.19	10.26
AAVF9	0.73	0.21	0.51
AAV2	1.43	0.41	1.00
AAV6	3.50	1.00	2.45

【0253】

本発明は、本発明のいくつかの態様の例示として意図される実施例に開示される特定の
実施形態によって範囲が限定されず、機能的に同等の任意の実施形態は本発明の範囲内
である。実際、本明細書に示され説明されたものに加えて、本発明の様々な改変は、当業者
には明らかとなり、添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。

参考文献

1. BAINBRIDGE, J. W., SMITH, A. J., BARKER, S. S., ROBBIE, S., HENDERSON, R., BALAGGAN, K., VISWANATHAN, A., HOLDER, G. E., STOCKMAN, A., TYLER, N., PETERSEN-JONES, S., BHATTACHARYA, S. S., THRASHER, A. J., FITZKE, F. W., CARTER, B. J., RUBIN, G. S., MOORE, A. T., and ALI, R. R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358, 2231-2239.
2. BATCHU, R. B., SHAMMAS, M. A., WANG, J. Y., FREEMAN, J., ROSEN, N., and MUNSHI, N. C. (2002). Adeno-associated virus protects the retinoblastoma family of proteins from adenoviral-induced functional inactivation. Cancer Res 62, 2982-2985.
3. BELL, P., WANG, L., LEBHERZ, C., FLIEDER, D. B., BOVE, M. S., WU, D., GAO, G. P., WILSON, J. M., a

- nd WIVEL, N. A. (2005). No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. *Mol Ther* 12, 299-306.
4. BERNIS, K. I., and GIRAUD, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 218, 1-23.
5. BIFFI, A., and CESANI, M. (2008). Human hematopoietic stem cells in gene therapy: preclinical and clinical issues. *Curr Gene Ther* 8, 135-146.
6. BRANTLY, M. L., CHULAY, J. D., WANG, L., MUELLER, C., HUMPHRIES, M., SPENCER, L. T., ROUHANI, F., CONLON, T. J., CALCEDO, R., BETTS, M. R., SPENCER, C., BYRNE, B. J., WILSON, J. M., and FLOTTE, T. R. (2009). Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
7. CHATTERJEE, S., JOHNSON, P. R., and WONG, K. K., JR. (1992). Dual-target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisense vector. *Science* 258, 1485-1488.
8. CHATTERJEE, S., LI, W., WONG, C. A., FISHER-ADAMS, G., LU, D., GUHA, M., MACER, J. A., FORMAN, S. J., and WONG, K. K., JR. (1999). Transduction of primitive human marrow and cord blood-derived hematopoietic progenitor cells with adeno-associated virus vectors. *Blood* 93, 1882-1894.
9. CHATTERJEE, S., WONG, K. K. (1993). Adeno-Associated Viral Vectors for the Delivery of Antisense RNA. *METHODS - LONDON - A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY* - 5, 1.
10. CIDECIYAN, A. V., HAUSWIRTH, W. W., ALEMAN, T. S., KAUSHAL, S., SCHWARTZ, S. B., BOYE, S. L., WINDSOR, E. A., CONLON, T. J., SUMAROKA, A., PANG, J. J., ROMAN, A. J., BYRNE, B. J., and JACOBSON, S. G. (2009). Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Hum Gene Ther* 20, 999-1004.
11. EINERHAND, M. P., ANTONIOU, M., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., BERNIS, K. I., GROSVELD, F., and VALERIO, D. (1995). Regulated high-level human beta-globin gene expression in erythroid cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2, 336-343.
12. FISHER-ADAMS, G., WONG, K. K., JR., PODSAK

10

20

30

40

50

OFF, G., FORMAN, S. J., and CHATTERJEE, S. (1996). Integration of adeno-associated virus vectors in CD34+ human hematopoietic progenitor cells after transduction. *Blood* 88, 492 - 504.

13. FLOTTE, T. R., BRANTLY, M. L., SPENCER, L. T., BYRNE, B. J., SPENCER, C. T., BAKER, D. J., and HUMPHRIES, M. (2004). Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther* 15, 93 - 128.

10

14. GAO, G., VANDENBERGHE, L. H., ALVIRA, M. R., LU, Y., CALCEDO, R., ZHOU, X., and WILSON, J. M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78, 6381 - 6388.

15. HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., LE DEIST, F., WULFFRAAT, N., MCINTYRE, E., RADFORD, I., VILLEVAL, J. L., FRASER, C. C., CAVAZZANA-CALVO, M., and FISCHER, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255 - 256.

20

16. HAN, Z., ZHONG, L., MAINA, N., HU, Z., LI, X., CHOUTHAI, N. S., BISCHOF, D., WEIGEL-VAN AKEN, K. A., SLAYTON, W. B., YODER, M. C., and SRIVASTAVA, A. (2008). Stable integration of recombinant adeno-associated virus vector genomes after transduction of murine hematopoietic stem cells. *Hum Gene Ther* 19, 267 - 278.

30

17. JAYANDHARAN, G. R., ZHONG, L., LI, B., KACHNIARZ, B., and SRIVASTAVA, A. (2008). Strategies for improving the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 15, 1287 - 1293.

18. KAPLITT, M. G., FEIGIN, A., TANG, C., FITZSIMONS, H. L., MATTIS, P., LAWLOR, P. A., BLAND, R. J., YOUNG, D., STRYBING, K., EIDELBERG, D., and DURING, M. J. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369, 2097 - 2105.

40

19. KELLS, A. P., HADACZEK, P., YIN, D., BRINGAS, J., VARENIKA, V., FORSAYETH, J., and BANKIEWICZ, K. S. (2009). Efficient gene therapy - b

50

ased method for the delivery of therapeutics to primate cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 2407-2411.

20. KESSLER, P. D., PODSAKOFF, G. M., CHEN, X., MCQUISTON, S. A., COLOSI, P. C., MATELIS, L. A., KURTZMAN, G. J., and BYRNE, B. J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 14082-14087.

10

21. MANNO, C. S., CHEW, A. J., HUTCHISON, S., LARSON, P. J., HERZOG, R. W., ARRUDA, V. R., TAI, S. J., RAGNI, M. V., THOMPSON, A., OZELO, M., COUTO, L. B., LEONARD, D. G., JOHNSON, F. A., MCCLELLAND, A., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A. W., KAY, M. A., HIGH, K. A., and GLADER, B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. Blood 101, 2963-2972.

22. MCCORMACK, M. P., and RABBITTS, T. H. (2004). Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 350, 913-922.

20

23. MILLER, D. G., ADAM, M. A., and MILLER, A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. Mol Cell Biol 10, 4239-4242.

24. PAZ, H., WONG, C. A., LI, W., SANTAT, L., WONG, K. K., and CHATTERJEE, S. (2007). Quiescent subpopulations of human CD34-positive hematopoietic stem cells are preferred targets for stable recombinant adeno-associated virus type 2 transduction. Hum Gene Ther 18, 614-626.

30

25. PETRS-SILVA, H., DINCULESCU, A., LI, Q., MIN, S. H., CHIODO, V., PANG, J. J., ZHONG, L., ZLOTUKHIN, S., SRIVASTAVA, A., LEWIN, A. S., and HAUSWIRTH, W. W. (2009). High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. Mol Ther 17, 463-471.

40

26. PODSAKOFF, G., WONG, K. K., JR., and CHATTERJEE, S. (1994). Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. J Virol 68, 5656-5666.

27. PONNAZHAGAN, S., YODER, M. C., and SRIVASTAVA, A. (1997). Adeno-associated virus typ

50

e 2-mediated transduction of murine hematopoietic cells with long-term repopulating ability and sustained expression of a human globin gene in vivo. *J Virol* 71, 3098-3104.

28. RAJ, K., OGSTON, P., and BEARD, P. (2001). Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature* 412, 914-917.

29. SANTAT, L., PAZ, H., WONG, C., LI, L., MACER, J., FORMAN, S., WONG, K.K., and CHATTERJEE, S. (2005). Recombinant AAV2 transduction of primitive human hematopoietic stem cells capable of serial engraftment in immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11053-11058.

30. SRIVASTAVA, A. (2004). Gene delivery to human and murine primitive hematopoietic stem and progenitor cells by AAV2 vectors. *Methods Mol Biol* 246, 245-254.

31. TOWNE, C., SCHNEIDER, B.L., KIERAN, D., REDMOND, D.E., JR., and AEBISCHER, P. (2009). Efficient transduction of non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV serotype 6. *Gene Ther*.

32. ZHONG, L., CHEN, L., LI, Y., QING, K., WEIGEL-KELLEY, K.A., CHAN, R.J., YODER, M.C., and SRIVASTAVA, A. (2004a). Self-complementary adeno-associated virus 2 (AAV)-T cell protein tyrosine phosphatase vectors as helper viruses to improve transduction efficiency of conventional single-stranded AAV vectors in vitro and in vivo. *Mol Ther* 10, 950-957.

33. ZHONG, L., LI, B., JAYANDHARAN, G., MAH, C.S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJEMCKENNA, M., HERZOG, R.W., WEIGEL-VAN AKEN, K.A., HOBBS, J.A., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., and SRIVASTAVA, A. (2008a). Tyrosine phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression. *Virology* 381, 194-202.

34. ZHONG, L., LI, B., MAH, C.S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., COOPER, M., HERZOG, R.W., ZOLOTUKHIN, I., WARRINGTON, K.H., JR., WEIGEL-VAN AKEN, K.A., HOBBS, J.A., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., and SRIVASTAVA, A. (2008b). Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction

10

20

30

40

50

- at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7827 - 7832.
35. ZHONG, L., LI, W., YANG, Z., QING, K., TAN, M., HANSEN, J., LI, Y., CHEN, L., CHAN, R. J., BISC HOF, D., MAINA, N., WEIGEL - KELLEY, K. A., ZHAO, W., LARSEN, S. H., YODER, M. C., SHOU, W., and SR IVASTAVA, A. (2004b). Impaired nuclear tran sport and uncoating limit recombinant ad eno - associated virus 2 vector-mediated t ransduction of primary murine hematopoie tic cells. *Hum Gene Ther* 15, 1207 - 1218. 10
36. ZHONG, L., ZHAO, W., WU, J., LI, B., ZOLOTUK HIN, S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJEMCKENNA, M., and SRIVASTAVA, A. (2007). A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling i n ubiquitination of AAV2 capsids and vir al second-strand DNA synthesis. *Mol Ther* 15, 1323 - 1330.
37. ZHOU, S. Z., BROXMEYER, H. E., COOPER, S., H ARRINGTON, M. A., and SRIVASTAVA, A. (1993). A deno - associated virus 2-mediated gene tr ansfer in murine hematopoietic progenito r cells. *Exp Hematol* 21, 928 - 933. 20
38. KHAN, I. G., HIRATA, R. K., RUSSELL, D. W. (20 11) AAV-mediated gene targeting methods for human cells. *Nat Protoc.* 4, 482 - 501.
39. KHOTIN, R. M., LINDEN, R. M., and BERNIS, K. I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integra tion of adeno - associated virus DNA by no n-homologous recombination. *EMBO* 13, 5071 - 8. 30
40. GIRAUD, C., WINOCOUR, E., and BERNIS, K. I. (1994). Site-specific integration by adeno - associated virus is directed by a cellu lar DNA sequence. *Proc. Natl Acad Sci USA* 21, 10039 - 43.
41. LINDEN, R. M., WARD, P., GIRAUD, C., WINOCOU R, E., and BERNIS, K. I. (1996A). Site-specific integration by adeno - associated virus. *P roc. Natl Acad Sci USA* 21, 11288 - 94. 40
42. LINDEN, R. M., WINOCOUR, E., and BERNIS, K. I. (1996B). The recombination signals for a deno - associated virus site-specific inte gration. *Proc. Natl Acad Sci USA* 15, 7966 - 7 2.
43. XU, L., O' MALLEY, T., SANDS, M. S., WANG, B., MEYERROSE, T., HASKINS, M. E., and PONDER, K. P (2004). In Vivo Transduction of Hematopoi etic Stem Cells After Neonatal Intraveno 50

【 図 1 - 3 】

[illegible]

【 図 1 - 4 】

[illegible]

【 図 1 - 5 】

[illegible]

【 図 1 - 6 】

[illegible]

【図 1 - 7】

721	726
HSC17ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC27ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC117ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC37ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC47ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC77ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC87ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC97ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC127ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC137ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC147ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC157ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
HSC167ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL
AAV97ミノノ酸配列	XSEPRRIGTSTLPRRL

【図 2 - 1】

キャプシド 配列番号	塩基変化	AAV 9、h.u.、アミノ酸 を分離する	新しいアミノ酸をクローン化	アミノ酸の違い	アミノ酸の配置 (HVR = 変異領域)
HSC1 配列番号 2	GからA	GCT - アラニン	ACT - スレオニン	アラニンは中性で中位であ る。スレオニンは酸性及び中 性である。	キャプシドに4塩基、第2のアミノ 酸：HVRにはない、VP1
HSC1 配列番号 2	GからA	CGA - アルギニン	CAA - グルタミン	アルギニンは酸性で強く基 性である。グルタミンは酸性 及び中位である。	キャプシドの335塩基、312番 目のアミノ酸：HVRにはない、V P3
HSC2 配列番号 3	AからG	GGA - グリシン	GGG - グリシン	アミノ酸の違いなし	キャプシドの1875塩基、505 番目のアミノ酸：HVRにはない、 7、後のアミノ酸、VP3
HSC2 配列番号 3	AからG	GAC - アスパラギン酸	GGC - グリシン	グルタミン酸は酸性及び中性 である。グリシンは中性であ る。	キャプシドの2153塩基、718 番目のアミノ酸：HVR、12で は、最後のアミノ酸である、VP3
HSC3 配列番号 5	GからA	GGC - グリシン	GAC - アスパラギン	グリシンは酸性及び中性であ る。アスパラギンは酸性 及び中性である。	キャプシドの479塩基、160 番目のアミノ酸：HVRにはな い、VP1
HSC3 配列番号 5	AからG	TCA - セリン	TGG - セリン	アミノ酸の違いなし	キャプシドの1044塩基、348 番目のアミノ酸：HVRにはない、 VP3
HSC4 配列番号 6	TからC	TTC - フェニルアラニン	CTC - ロイシン	フェニルアラニンは無毒性及 び中位である。ロイシンは中 性及び中位である。	キャプシドの955塩基、119 番目のアミノ酸：HVRにはない、 VP1
HSC4 配列番号 6	CからT	CCC - プロリン	TCC - セリン	プロリンは中性で中位であ る。セリンは酸性及び中性で ある。	キャプシドの1402塩基、第46 8位のアミノ酸：HVR、5、VP 3
HSC4 配列番号 6	GからA	CCG - プロリン	CCA - プロリン	アミノ酸の違いなし	キャプシドの1809塩基、603 番目のアミノ酸：HVRにはない、 VP3

【図 2 - 2】

キャプシド 配列番号	塩基変化	AAV 9、h.u.、アミノ酸 を分離する	新しいアミノ酸をクローン化	アミノ酸の違い	アミノ酸の配置 (HVR = 可 変領域)
HSC6 配列番号 8	AからG	CAG - グルタミン	CGG - アルギニン	グルタミンは酸性及び中位で ある。中位：アルギニンは中 性及び塩基性である。	キャプシドの1769塩基、59 番目のアミノ酸：HVR、10 で、VP3
HSC5 配列番号 11	AからG	AAG - リジン	AGG - アルギニン	リジンは酸性及び塩基性であ る。アルギニンは酸性及び強 塩基性である。	キャプシドの中に230塩基、7 番目のアミノ酸：HVRにはな い、VP1
HSC5 配列番号 11	CからT	CCC - プロリン	CCT - プロリン	アミノ酸の違いなし	キャプシドの1404塩基、第4 68位のアミノ酸：HVR、5、 VP3
HSC5 配列番号 11	GからA	GAA - グルタミン酸	AAA - リジン	グルタミン酸は酸性及び中 性である。リジンは酸性及び強 塩基性である。	キャプシドの2068塩基、9 番目のアミノ酸：HVRにはな い、VP3
HSC5 配列番号 11	TからC	AAT - アスパラギン	AAT - アスパラギン	アミノ酸の違いなし	キャプシドの2148塩基、71 6番目のアミノ酸：HVR、1 3、VP3
HSC1 配列番号 15	GからA	GTC - バリン	ATC - イソロイシン	イソロイシンは無毒性及び中 性である。バリンは酸性及び 塩基性である。	キャプシドの193塩基、65番 目のアミノ酸：HVRにはない、 VP4
HSC1 配列番号 14	GからT	GAC - アスパラギン	TAC - チロシン	アスパラギンは、酸性及び 中性である。チロシンは酸性 及び中位である。	キャプシドの1115塩基、62 番目のアミノ酸：HVRではな い、VP3
HSC7 配列番号 8	CからT	GCA - アラニン	GTA - バリン	アラニンは酸性及び中位であ る。バリンは酸性及び中位 である。	キャプシドの2033塩基、68番 目のアミノ酸：HVRではない、 VP3
HSC7 配列番号 8	CからT	TTC - フェニルアラニン	TTT - フェニルアラニン	アミノ酸の違いなし	キャプシドの924塩基、308 番目のアミノ酸：HVRではな い、VP3
HSC8 配列番号 9	AからG	CAG - グルタミン	CGG - アルギニン	グルタミンは酸性及び中位で ある。アルギニンは酸性及び 強塩基性である。	キャプシドの中に452塩基：1 51番目のアミノ酸：HVR、1 で、VP1

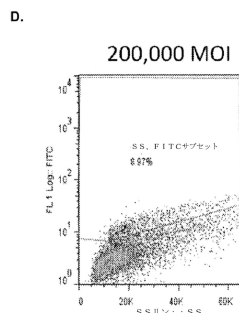
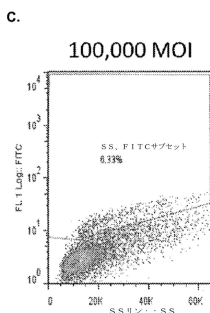
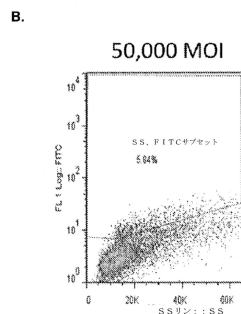
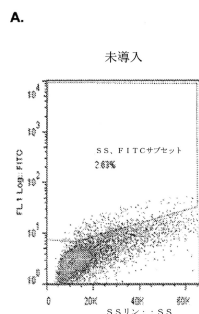
【図 2 - 3】

キャプシド 配列番号	塩基変化	AAV 9、h.u.、アミノ酸 を分離する	新しいアミノ酸をクローン化	アミノ酸の違い	アミノ酸の配置 (HVR = 可 変領域)
HSC8 配列番号 9	GからA	GAG - グルタミン酸	GAA - グルタミン酸	アミノ酸の違いなし	2058塩基をキャプシドに導入 する。686番目のアミノ酸：H VRではない、VP3
HSC9 配列番号 10	TからC	TTT - フェニルアラニン	TTC - フェニルアラニン	アミノ酸の違いなし	キャプシドの557塩基、119 番目のアミノ酸：HVRではな い、VP1
HSC9 配列番号 10	TからG	TGT - シスチン	GGT - グリシン	シスチンは酸性及び中位で ある。グリシンは酸性及び 中位である。	キャプシドの116塩基、206 番目のアミノ酸：HVRではな い、VP3の塩基
HSC1 配列番号 12	AからT	GCA - アラニン	GCT - アラニン	アミノ酸の違いなし	キャプシドに574塩基、193 番目のアミノ酸：キャプシドに、 HVR、2付近のVP2の末元に
HSC1 配列番号 12	GからA	CGT - アルギニン	CAT - ヒスチジン	アルギニンは酸性及び塩基性 である。ヒスチジンは酸性で 強塩基性である。	キャプシドに887塩基、キャプ シドに296番目のアミノ酸：V P3で、HVRではなく
HSC1 配列番号 12	GからA	AGT - セリン	AAT - アスパラギン	セリンは酸性及び中位であ る。アスパラギンは酸性及び 中位である。	キャプシドの1391塩基、キャ プシドに464番目のアミノ酸： HVR、50VP3で
HSC1 配列番号 12	TからC	GCT - アラニン	GCC - アラニン	アミノ酸の違いなし	キャプシドの206番目のア ミノ酸：HVR、50VP3で、H VR、76の塩基のVP3で
HSC1 配列番号 12	GからA	GGA - グリシン	AGA - アルギニン	グリシンは無毒性及び中位で ある。アルギニンは酸性及び 塩基性である。	キャプシドに1533塩基、305番 目のアミノ酸：キャプシドに導入 する、HVR
HSC1 配列番号 12	GからA	GTC - バリン	ATG - メチオニン	バリンは酸性及び塩基性で ある。メチオニンは酸性及び 中位である。	キャプシドの2041塩基、68 1番目のアミノ酸：VP3で、H VRにはない
HSC1 配列番号 12	GからA	GGA - グリシン	AGA - アルギニン	グリシンは無毒性及び中位で ある。アルギニンは酸性及び 塩基性である。	キャプシドに1513塩基、604番 目のアミノ酸：HVR、50VP3 で、VP3の塩基のVP3で

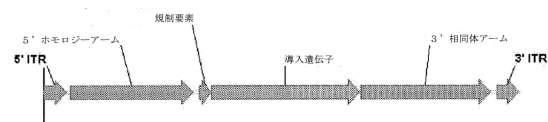
【 図 2 - 4 】

	塩基変化	AAG G h ₀ アミノ酸 が変化する	新しいアミノ酸をクロロニン化	アミノ酸の違い	アミノ / 酸の配置 (HVR = 可変領域)
キャプシド 第1分節 4配列番号 1から15	GからA	GGA - グリシン	AGA - アルバニン	グリシンは無極性で中性である。アルバニンは極性で強く塩基性である。	キャプシドに1613塩基、508番目のアミノ / 酸とキャプシドに挿入する。 HVR、7 の後部の VP3 で
HSC1 5配列番号 1から15	TからG	CTG - コイシン	CGG - アルギニン	ロイシンは無極性で中性である。アルボニンは極性で強く塩基性である。	キャプシドの2060塩基、キャプシドに687番目のアミノ / 酸：VP3で； HVRではない。
HSC1 5配列番号 1から16	AからG	ACG - スレオニン	GGC - アラニン	スレオニンは極性及び中性である； アルボニンは極性で強く塩基性である。	キャプシドに1036塩基、346番目のアミノ / 酸とキャプシドに挿入する。 VHPで； HVRではない。
HSC1 5配列番号 1から16	GからA	GGA - グリニン	AGA - アルバニン	グリシンは無極性で中性である。アルボニンは極性で強く塩基性である。	キャプシドに1519塩基、505番目のアミノ / 酸とキャプシドに挿入する。 HVR、7 の後部の VP3で
HSC1 6配列番号 1から17	TからA	TTT - フェニルアラニン	ATT - イソロイシン	フェニルアラニンは無極性で中性である。イソロイシンは極性で中性である。	キャプシドに1501塩基、503番目のアミノ / 酸とキャプシドに挿入する。 HVRで； VP3で
HSC1 6配列番号 1から17	GからA	GGA - グリニン	AGA - アルバニン	グリシンは無極性で中性である。アルボニンは極性で強く塩基性である。	キャプシドに1613塩基、508番目のアミノ / 酸とキャプシドに挿入する。 HVR、7 の後部の VP3で
HSC1 6配列番号 1から17	GからA	CCG - プロリン	CCA - プロリン	プロリンは中性でありなし	キャプシドに1713塩基、518番目のアミノ / 酸：VP3で； HVRではない。
HSC1 6配列番号 1から17	AからG	TAC - チロシン	TGC - レウチン	チロシンは極性及び中性である。レウチンは無極性で中性である。	2117塩基はキャプシドを含む。キャプシドに706番目のアミノ / 酸：VP3で； HVRに2つあり、VY変異がある。
HSC1 7配列番号 1から18	CからT	GAC - アスパラギン	GAT - アスパラギン	アミノ酸の違いなし	キャプシドに1807塩基、527番目のアミノ / 酸：VP3で； HVRではない。
HSC1 7配列番号 1から18	GからA	GGA - グリニン	AGA - アルバニン	グリシンは無極性で中性である。アルボニンは極性で強く塩基性である。	キャプシドに1813塩基、509番目のアミノ / 酸とキャプシドに挿入する。 HVR、7 の後部の VP3で

【 図 5 - 1 】

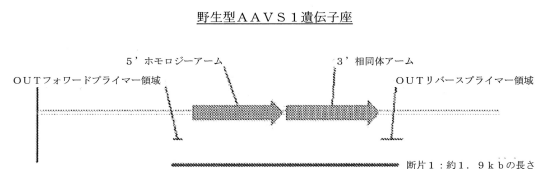


【图 3】

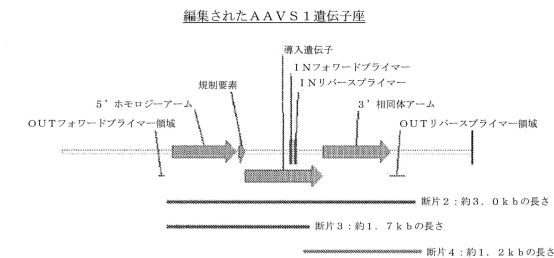


【 図 4 】

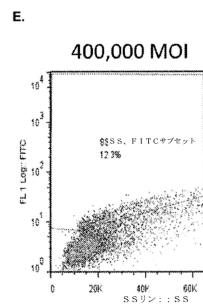
(图 4 A)



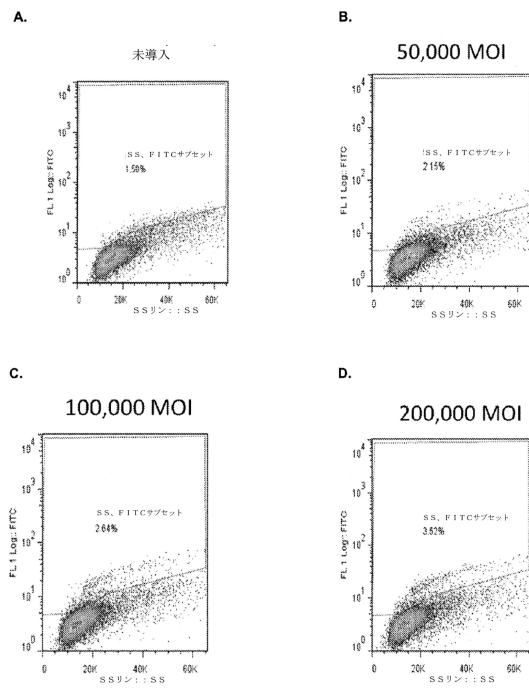
(図 4 B)



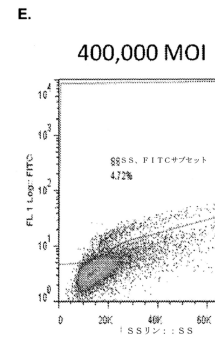
【 図 5 - 2 】



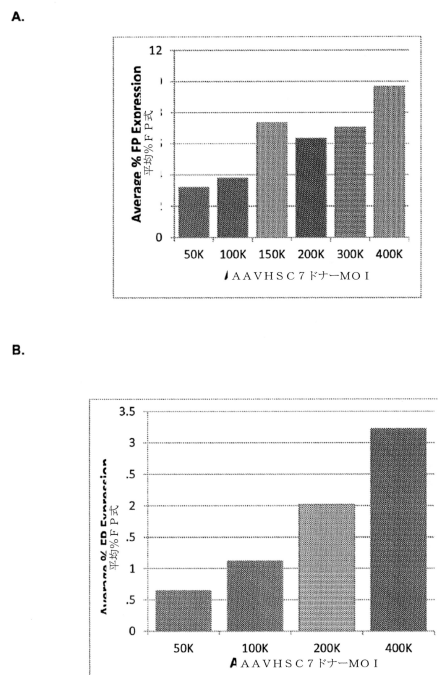
【図 6 - 1】



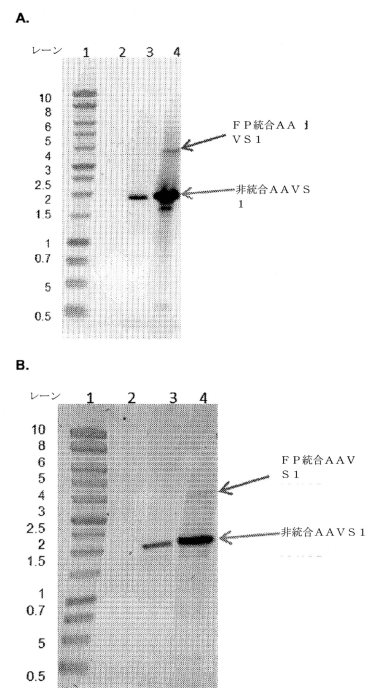
【図 6 - 2】



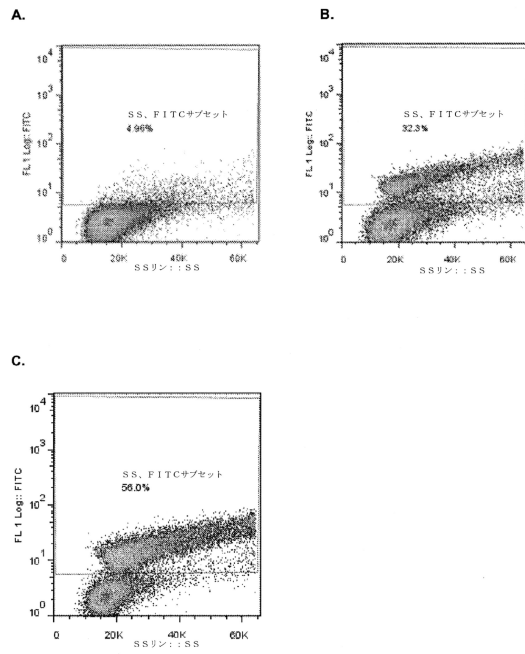
【図 7】



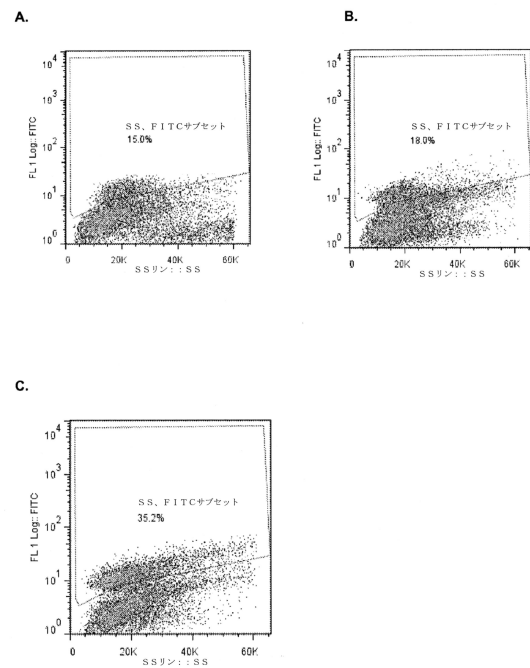
【図 8】



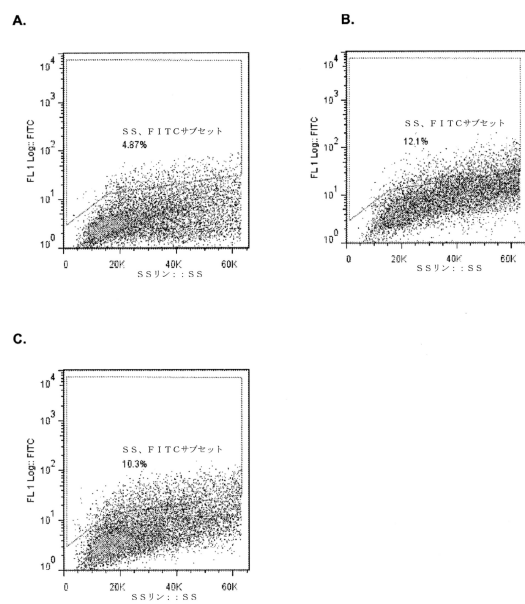
【図 9】



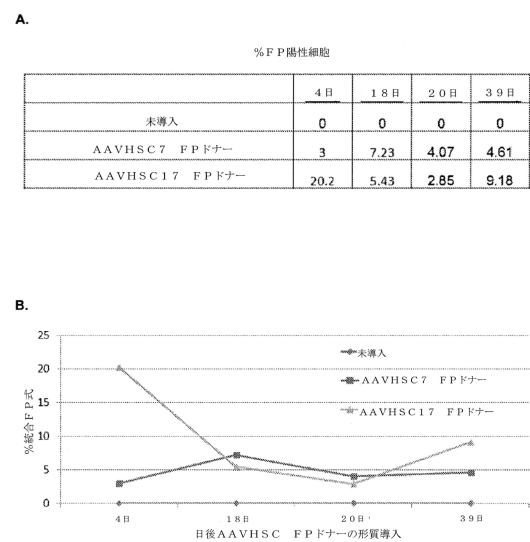
【図 10】



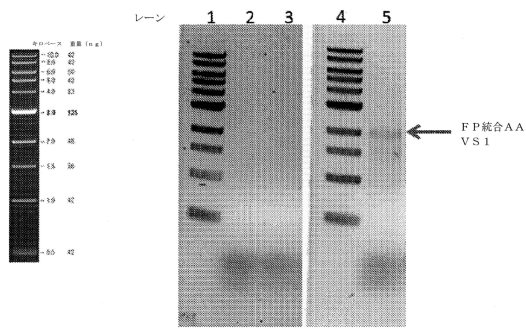
【図 11】



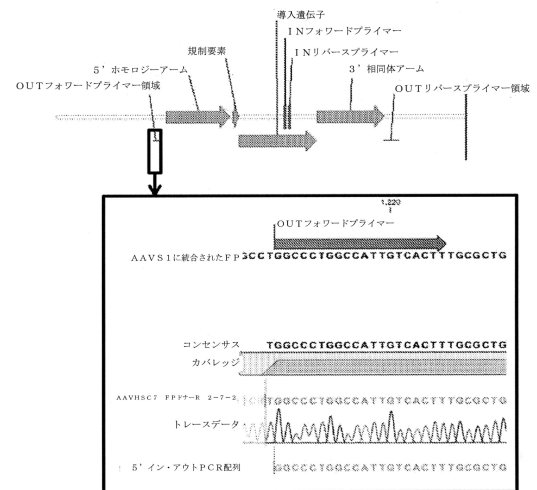
【図 12】



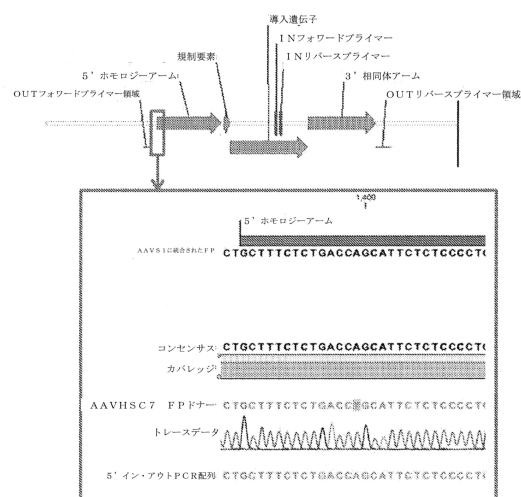
【図 13】



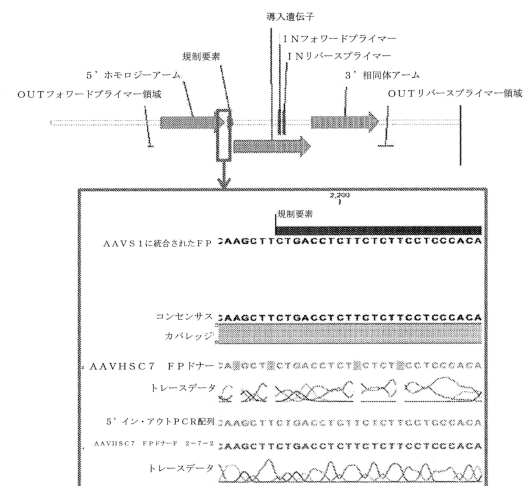
【図 14】



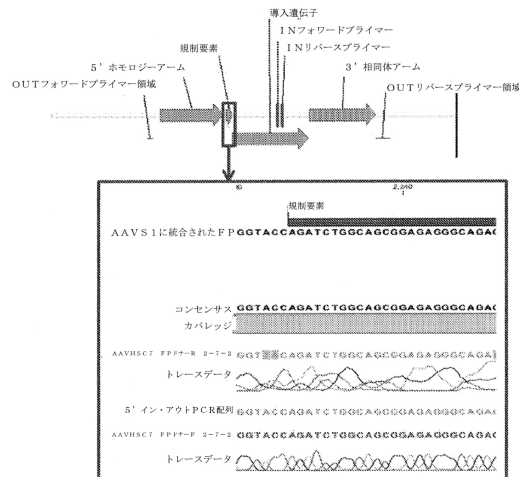
【図 15】



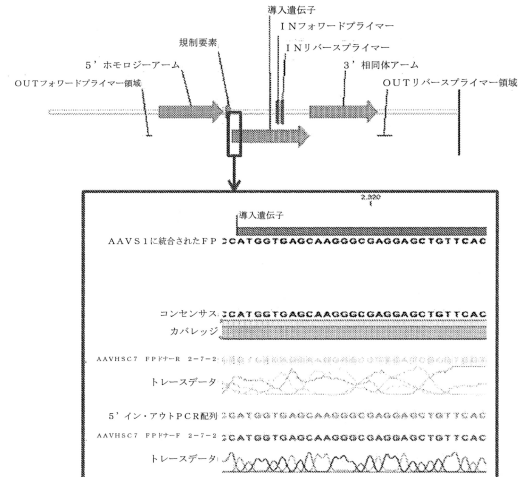
【図 16】



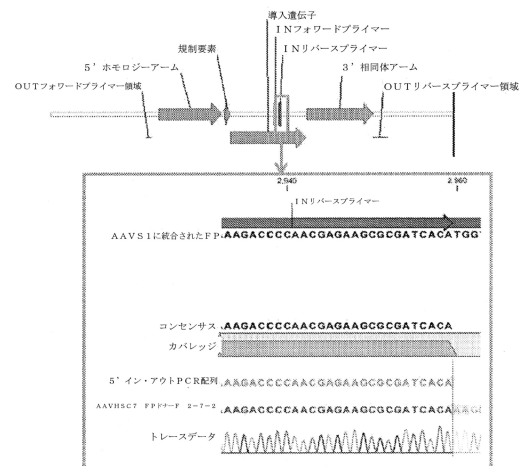
【図 17】



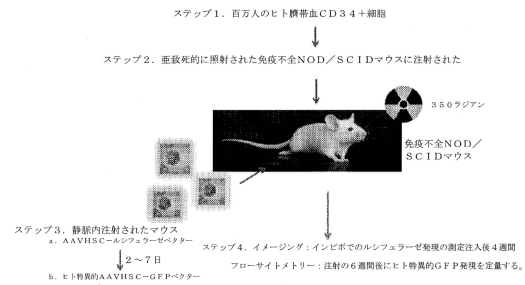
【図 18】



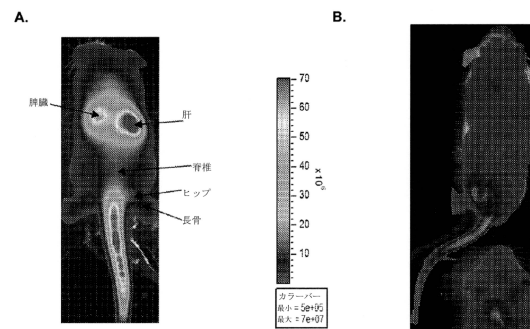
【図 19】



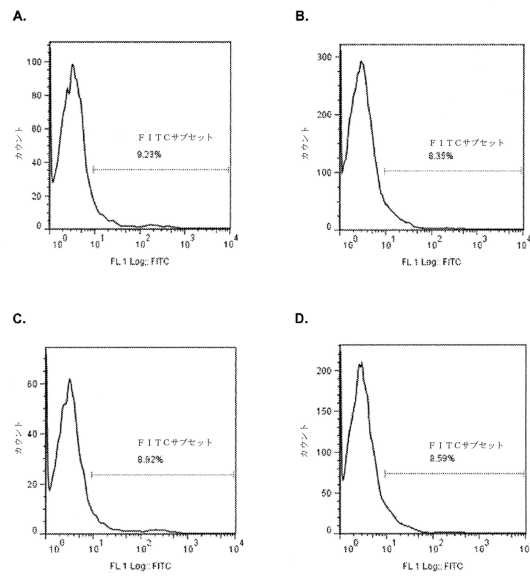
【図 20】



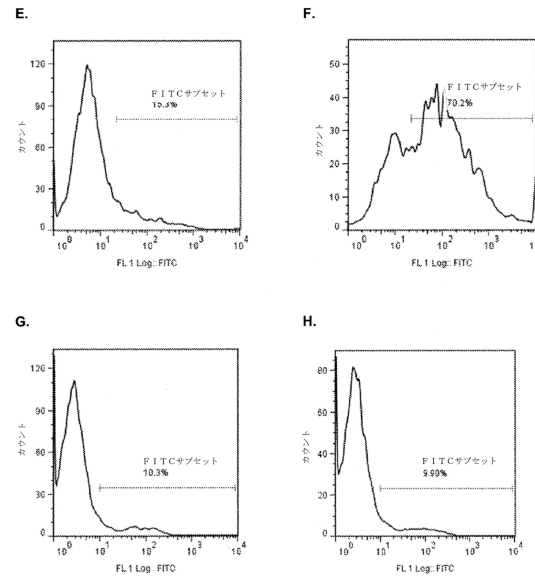
【図 21】



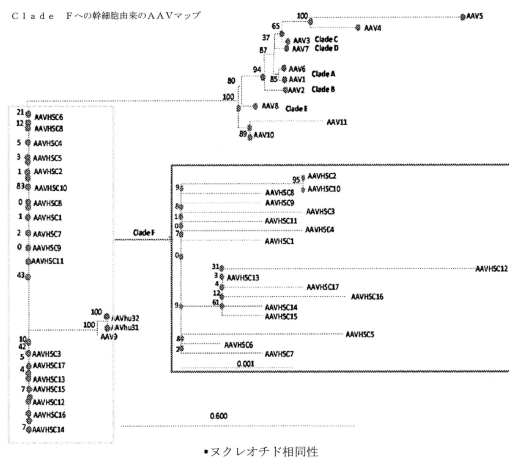
【図 22 - 1】



【図 22 - 2】

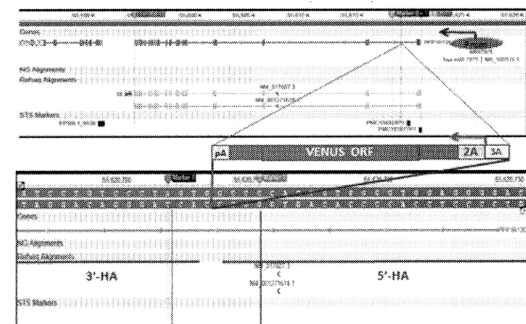


【図 23】



【図 25】

スキーム：PPP1r12Cイントロン（AAVS1）へのプロモーターレスレポーターの標的統合



【図 24】

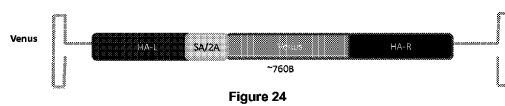
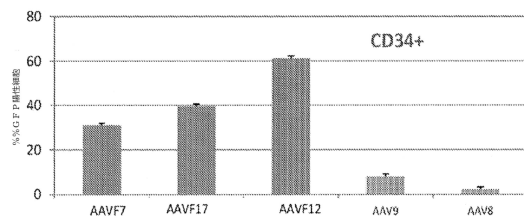


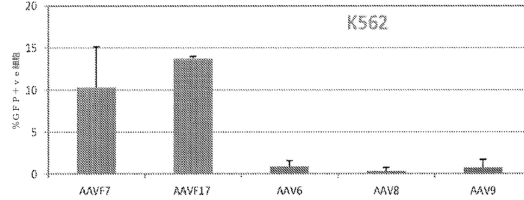
Figure 24

【図 26 - 1】

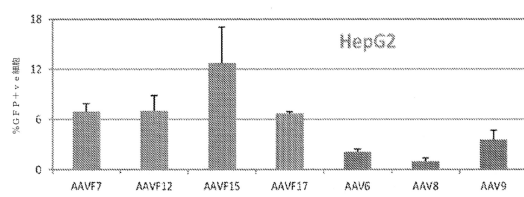
(図 26 A)



(図 26 B)

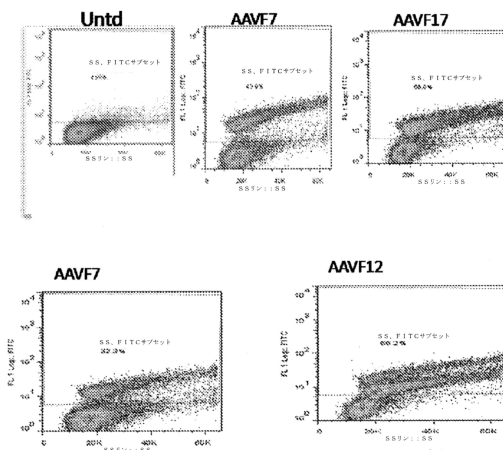


(図 26 C)



【図 26 - 2】

(図 26 D)



- AAVFは、初代CD34+細胞における効率的な遺伝子標的化を媒介する
- ヒト白血病細胞株、及び肝細胞株で高効率標的が観察される
- AAVF編集はDNA合成を必要としない

【図 26 - 3】

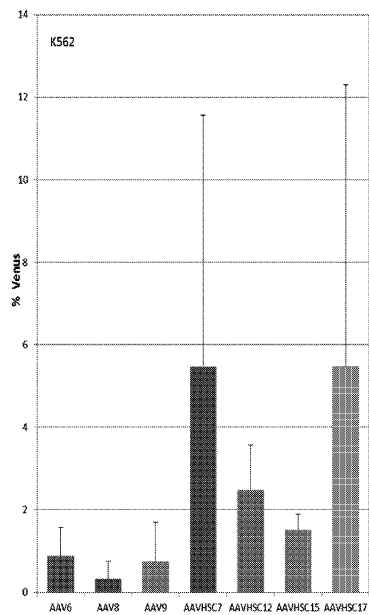


Figure 26E

【図 26 - 4】

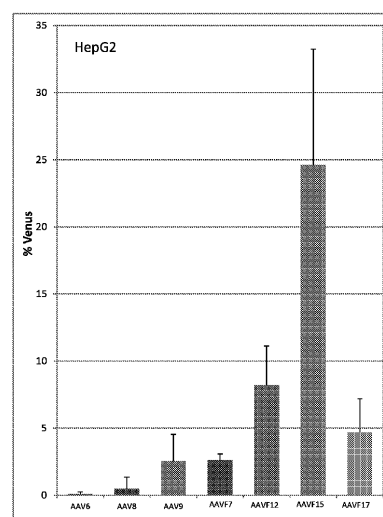
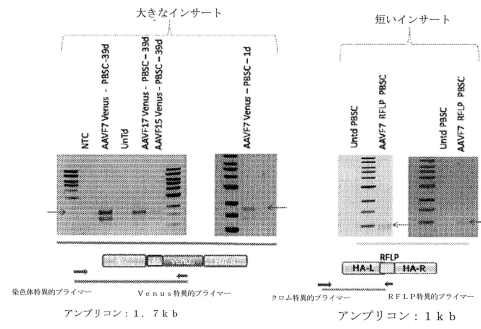


Figure 26F

【図 27】

AAVFベクターは、CD34+細胞内のAAVS1の位置に大きなORFを組み込むことを目標とする

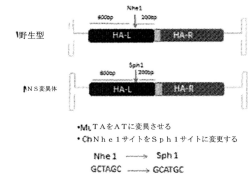


HA-L: 5' - 相同性アーム
HA-R: 3' - 相同性アーム
NTC: テンプレート対照なし
Untd: 非形質導入細胞

【図 28】

(図 28 A)

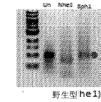
ヌクレオチド置換のためのAAVFベクター



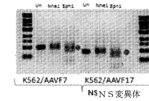
(図 28 B)



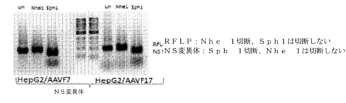
(図 28 C)



(図 28 D)

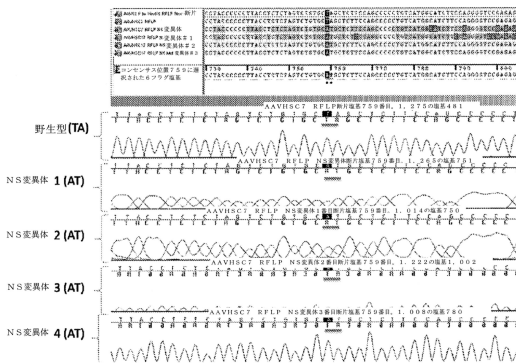


(図 28 E)



【図 29】

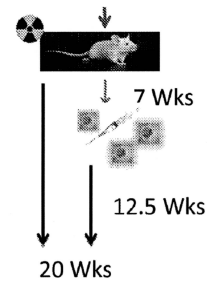
AAV媒介性の精密な核内移行



【図 31 - 1】

(図 31 A)

1e6 ヒト臍帯血CD34+幹細胞



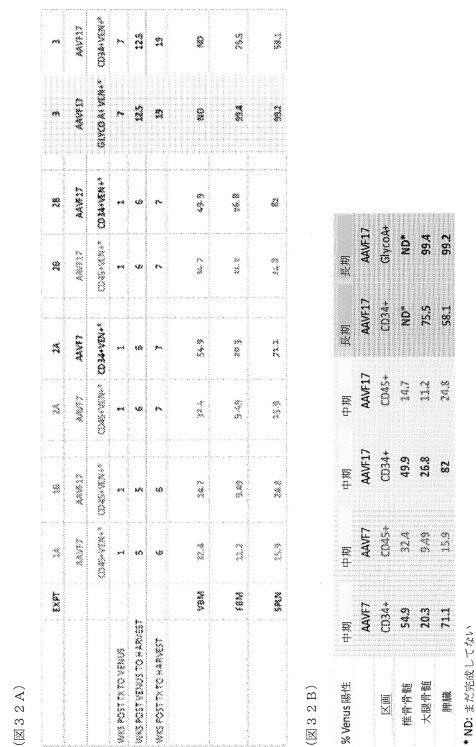
骨髄、及び脾臓におけるヒト血液系の解析

- フロー解析
- フローソート
- Venus, CD34+, Glyco A+ (赤血球)

【図 30】

	GFP+ BrdU- (非分裂細胞)	GFP+BrdU+ (分裂細胞)
AAVHSC7	12	14.6
AAVHSC17	6.15	6.9
AAV9	4.31	3.73
AAV8	1.37	0.839

【 図 3 2 】



(X 3 2 B)

【 図 3 3 - 2 】

[illegible][illegible]

【 図 3 3 - 4 】

[illegible]

【 図 3 3 - 6 】

[illegible]

【 図 3 3 - 8 】

[illegible]

【 図 3 4 - 1 】

[illegible]

AAVFベクターによるPPP1R12Cのイントロン1への短い配列の染色体挿入を示す配列分析

[illegible]

【 図 3 4 - 3 】

	261	AGATGCTTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	325
> AVH85C7 RF1P F8SC #1	(322)	CAGATCTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	
> AVH85C7 RF1P F8SC #2	(322)	CAGATCTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #1	(322)	CAGATCTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #2	(322)	CAGATCTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #3	(322)	CAGATCTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #4	(322)	CAGATCTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	
> RF1P <-> 9-8 両側	(8)	CAGATCTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	
> AC010327 AAWS1	(174)		
> 赤毛ロブスター A.S.	(8)	CAGATCTTCCTGCGAGCTGCTTCAGGTCGCTGCTCGACGCTCTCTGCTGTCGTCGCT	
> 赤毛ロブスター A.S.	(1)		
	326		391
> AVH85C7 RF1P F8SC #1	(327)	CGTGTGTCTCTCCGAGAGAGGCGCTTTCGCGAGAGCTCCCTCTCGAGGTGACGACATGATG	
> AVH85C7 RF1P F8SC #2	(327)	CGTGTGTCTCTCCGAGAGAGGCGCTTTCGCGAGAGCTCCCTCTCGAGGTGACGACATGATG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #1	(327)	CGTGTGTCTCTCCGAGAGAGGCGCTTTCGCGAGAGCTCCCTCTCGAGGTGACGACATGATG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #2	(327)	CGTGTGTCTCTCCGAGAGAGGCGCTTTCGCGAGAGCTCCCTCTCGAGGTGACGACATGATG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #3	(327)	CGTGTGTCTCTCCGAGAGAGGCGCTTTCGCGAGAGCTCCCTCTCGAGGTGACGACATGATG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #4	(327)	CGTGTGTCTCTCCGAGAGAGGCGCTTTCGCGAGAGCTCCCTCTCGAGGTGACGACATGATG	
> RF1P <-> 9-8 両側	(15)	CGTGTGTCTCTCCGAGAGAGGCGCTTTCGCGAGAGCTCCCTCTCGAGGTGACGACATGATG	
> AC010327 AAWS1	(174)		
> 赤毛ロブスター A.S.	(15)	CGTGTGTCTCTCCGAGAGAGGCGCTTTCGCGAGAGCTCCCTCTCGAGGTGACGACATGATG	
> 赤毛ロブスター A.S.	(1)		
	391		455
> AVH85C7 RF1P F8SC #1	(392)	TGCTTCGAGGGAGATCTCGCTGCTGCTGGGCTGCTCGGAGATCTCTGCTGCTCGACGACG	
> AVH85C7 RF1P F8SC #2	(392)	TGCTTCGAGGGAGATCTCGCTGCTGCTGGGCTGCTCGGAGATCTCTGCTGCTCGACGACG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #1	(392)	TGCTTCGAGGGAGATCTCGCTGCTGCTGGGCTGCTCGGAGATCTCTGCTGCTCGACGACG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #2	(392)	TGCTTCGAGGGAGATCTCGCTGCTGCTGGGCTGCTCGGAGATCTCTGCTGCTCGACGACG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #3	(392)	TGCTTCGAGGGAGATCTCGCTGCTGCTGGGCTGCTCGGAGATCTCTGCTGCTCGACGACG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #4	(392)	TGCTTCGAGGGAGATCTCGCTGCTGCTGGGCTGCTCGGAGATCTCTGCTGCTCGACGACG	
> RF1P <-> 9-8 両側	(218)	TGCTTCGAGGGAGATCTCGCTGCTGCTGGGCTGCTCGGAGATCTCTGCTGCTCGACGACG	
> AC010327 AAWS1	(174)		
> 赤毛ロブスター A.S.	(218)	TGCTTCGAGGGAGATCTCGCTGCTGCTGGGCTGCTCGGAGATCTCTGCTGCTCGACGACG	
> 赤毛ロブスター A.S.	(1)		
	456		520
> AVH85C7 RF1P F8SC #1	(457)	CATGCGGCTCTTCACGCGAGGCTGCTTTCCTCTCTCTCTCGGAGGCTGTCGACATCTCTG	
> AVH85C7 RF1P F8SC #2	(457)	CATGCGGCTCTTCACGCGAGGCTGCTTTCCTCTCTCTCTCGGAGGCTGTCGACATCTCTG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #1	(457)	CATGCGGCTCTTCACGCGAGGCTGCTTTCCTCTCTCTCTCGGAGGCTGTCGACATCTCTG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #2	(457)	CATGCGGCTCTTCACGCGAGGCTGCTTTCCTCTCTCTCTCGGAGGCTGTCGACATCTCTG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #3	(457)	CATGCGGCTCTTCACGCGAGGCTGCTTTCCTCTCTCTCTCGGAGGCTGTCGACATCTCTG	
> AVH85C7 RF1P Heq2 #4	(457)	CATGCGGCTCTTCACGCGAGGCTGCTTTCCTCTCTCTCTCGGAGGCTGTCGACATCTCTG	
> RF1P <-> 9-8 両側	(457)	CATGCGGCTCTTCACGCGAGGCTGCTTTCCTCTCTCTCTCGGAGGCTGTCGACATCTCTG	
> AC010327 AAWS1	(174)		
> 赤毛ロブスター A.S.	(283)	CATGCGGCTCTTCACGCGAGGCTGCTTTCCTCTCTCTCTCGGAGGCTGTCGACATCTCTG	
> 赤毛ロブスター A.S.	(1)		

	521		595
> AVH507 RFLP F8SC #1	(522) CTTTATGATGAGGCTTCCTCGAGGATGCTCGCTGCTGGCTCGCTCGCTCTCTCTAGAGCGTC		
> AVH507 RFLP F8SC #2	(522) CTTTATGATGAGCTCTCTCGAGGATGCTCTCGCTGCTCGCTCGCTCGCTCTCTCTAGAGCTGCT		
> AVH507 RFLP Bep2 #1	(522) CTTTATGATGAGCTTCCTCGAGGATGCTCTCTCTCTCTGAGCTCGCTCGCTCTCTCTAGAGCTG		
> AVH507 RFLP Bep2 #2	(522) CTTTATGATGAGCTTCCTCGAGGATGCTCTCTCTCTCTGAGCTCGCTCGCTCTCTCTAGAGCTG		
> AVH507 RFLP Bep2 #3	(522) CTTTATGATGAGCTTCCTCGAGGATGCTCTCTCTCTCTGAGCTCGCTCGCTCTCTCTAGAGCTG		
> AVH507 RFLP Bep2 #4	(522) CTTTATGATGAGCTTCCTCGAGGATGCTCTCTCTCTCTGAGCTCGCTCGCTCTCTCTAGAGCTG		
> REF1 <オナキ>AHN	(522) CTTTATGATGAGCTTCCTCGAGGATGCTCTCTCTCTCTGAGCTCGCTCGCTCTCTCTAGAGCTG		
> AC101327 ARV51	(1474)		
> 本細胞シークエンス	(346) CTTTATGATGAGCTTCCTCGAGGATGCTCTCTCTCTCTGAGCTCGCTCGCTCTCTCTAGAGCTG		
	(1)		
	586		650
> AVH507 RFLP F8SC #1	(587) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
> AVH507 RFLP F8SC #2	(587) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
> AVH507 RFLP Bep2 #1	(587) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
> AVH507 RFLP Bep2 #2	(587) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
> AVH507 RFLP Bep2 #3	(587) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
> AVH507 RFLP Bep2 #4	(587) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
> REF1 <オナキ>AHN	(587) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
> AC101327 ARV51	(1474)		
> 本細胞シークエンス	(413) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
	(1) ATCATCAAGCTTTTCTTGAGACACCCAAATGAGTACGCTCGCTGGCTTTAGACACTCTCTCA		
	(1)		
	651		715
> AVH507 RFLP F8SC #1	(652) CTTCTCTCTCTCTCTCTTGAGACACCCCTCTCTCTTGATGTGATGTACCTCTCACTCTCTTC		
> AVH507 RFLP F8SC #2	(652) CTTCTCTCTCTCTCTCTTGAGACACCCCTCTCTCTTGATGTGATGTACCTCTCACTCTCTTC		
> AVH507 RFLP Bep2 #1	(652) CTTCTCTCTCTCTCTCTTGAGACACCCCTCTCTCTTGATGTGATGTACCTCTCACTCTCTTC		
> AVH507 RFLP Bep2 #2	(652) CTTCTCTCTCTCTCTCTTGAGACACCCCTCTCTCTTGATGTGATGTACCTCTCACTCTCTTC		
> AVH507 RFLP Bep2 #3	(652) CTTCTCTCTCTCTCTCTTGAGACACCCCTCTCTCTTGATGTGATGTACCTCTCACTCTCTTC		
> AVH507 RFLP Bep2 #4	(652) CTTCTCTCTCTCTCTCTTGAGACACCCCTCTCTCTTGATGTGATGTACCTCTCACTCTCTTC		
> REF1 <オナキ>AHN	(652) CTTCTCTCTCTCTCTCTTGAGACACCCCTCTCTCTTGATGTGATGTACCTCTCACTCTCTTC		
> AC101327 ARV51	(1474)		
> 本細胞シークエンス	(478) CTTCTCTCTCTCTCTCTTGAGACACCCCTCTCTCTTGATGTGATGTACCTCTCACTCTCTTC		
	(1)		
	(1)		
	716		780
> AVH507 RFLP F8SC #1	(717) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		
> AVH507 RFLP F8SC #2	(717) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		
> AVH507 RFLP Bep2 #1	(717) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		
> AVH507 RFLP Bep2 #2	(717) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		
> AVH507 RFLP Bep2 #3	(717) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		
> AVH507 RFLP Bep2 #4	(717) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		
> REF1 <オナキ>AHN	(717) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		
> AC101327 ARV51	(543) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		
> 本細胞シークエンス	(1474)		
> 本細胞シークエンス	(943) ATTATGGAGAGCTGCTACGCGCTTACCTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT		

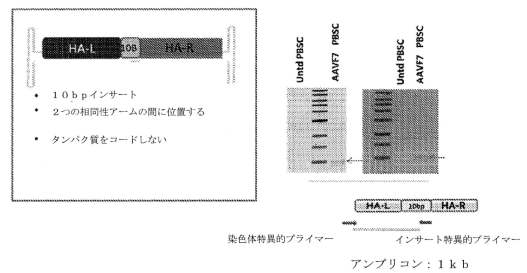
【 図 3 5 】

```

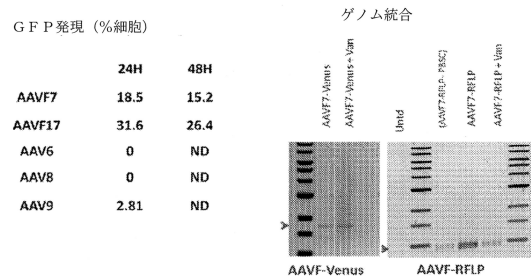
781
> AVH5C7 RF1P F8SC #1 (782) TGGACATCTTCACAGGCGTCAGAGCTACGATGCTCTCTCTTCACCAACCGGGCCGATATGTCGA
> AVH5C7 RF1P F8SC #2 (782) TGGACATCTTCACAGGCGTCAGAGCTACGATGCTCTCTCTTCACCAACCGGGCCGATATGTCGA
> AVH5C7 RF1P HspG2 #1 (782) TGGACATCTTCACAGGCGTCAGAGCTACGATGCTCTCTCTTCACCAACCGGGCCGATATGTCGA
> AVH5C7 RF1P HspG2 #2 (782) TGGACATCTTCACAGGCGTCAGAGCTACGATGCTCTCTCTTCACCAACCGGGCCGATATGTCGA
> AVH5C7 RF1P HspG2 #3 (782) TGGACATCTTCACAGGCGTCAGAGCTACGATGCTCTCTCTTCACCAACCGGGCCGATATGTCGA
> AVH5C7 RF1P HspG2 #4 (782) TGGACATCTTCACAGGCGTCAGAGCTACGATGCTCTCTCTTCACCAACCGGGCCGATATGTCGA
> REFP -> RFL -> AUM
> AC010327 AVWS1 (+174)
> <ホトシジメ-アーム> (168) TGGACATCTTCACAGGCGTCAGAGCTACGATGCTCTCTCTTCACCAACCGGGCCGATATGTCGA
> <ホトシジメ-アーム> (1)
846
> AVH5C7 RF1P F8SC #1 (847) CTTACAGACAGCATCTTTCTCTCTCTTCACAGGATCTCTGTGTCCTACAGCTGGGACCACTTATAT
> AVH5C7 RF1P F8SC #2 (847) CTTACAGACAGCATCTTTCTCTCTCTTCACAGGATCTCTGTGTCCTACAGCTGGGACCACTTATAT
> AVH5C7 RF1P HspG2 #1 (847) CTTACAGACAGCATCTTTCTCTCTCTTCACAGGATCTCTGTGTCCTACAGCTGGGACCACTTATAT
> AVH5C7 RF1P HspG2 #2 (847) CTTACAGACAGCATCTTTCTCTCTCTTCACAGGATCTCTGTGTCCTACAGCTGGGACCACTTATAT
> AVH5C7 RF1P HspG2 #3 (847) CTTACAGACAGCATCTTTCTCTCTCTTCACAGGATCTCTGTGTCCTACAGCTGGGACCACTTATAT
> AVH5C7 RF1P HspG2 #4 (847) CTTACAGACAGCATCTTTCTCTCTCTTCACAGGATCTCTGTGTCCTACAGCTGGGACCACTTATAT
> REFP -> RFL -> AUM (673)
> AC010327 AVWS1 (+174)
> <ホトシジメ-アーム> (713) CTTACAGACAGCATCTTTCTCTCTCTTCACAGGATCTCTGTGTCCTACAGCTGGGACCACTTATAT
> <ホトシジメ-アーム> (1)
911
> AVH5C7 RF1P F8SC #1 (912) CCACAGCGCGCTTAATGTGCTCTGTCTCTGGGATCTTTATCTCTGTGCTCTCCACCAACGAGTGG
> AVH5C7 RF1P F8SC #2 (912) CCACAGCGCGCTTAATGTGCTCTGTCTCTGGGATCTTTATCTCTGTGCTCTCCACCAACGAGTGG
> AVH5C7 RF1P HspG2 #1 (912) CCACAGCGCGCTTAATGTGCTCTGTGTTGTGTTGTGCTTTATCTCTGTGCTCTCCACCAACGAGTGG
> AVH5C7 RF1P HspG2 #2 (912) CCACAGCGCGCTTAATGTGCTCTGTGTTGTGTTGTGCTTTATCTCTGTGCTCTCCACCAACGAGTGG
> AVH5C7 RF1P HspG2 #3 (912) CCACAGCGCGCTTAATGTGCTCTGTGTTGTGTTGTGCTTTATCTCTGTGCTCTCCACCAACGAGTGG
> AVH5C7 RF1P HspG2 #4 (912) CCACAGCGCGCTTAATGTGCTCTGTGTTGTGTTGTGCTTTATCTCTGTGCTCTCCACCAACGAGTGG
> REFP -> RFL -> AUM (736)
> AC010327 AVWS1 (+174)
> <ホトシジメ-アーム> (738) CCACAGCGCGCTTAATGTGCTCTGTGTTGTGTTGTGCTTTATCTCTGTGCTCTCCACCAACGAGTGG
> <ホトシジメ-アーム> (1)
976
> AVH5C7 RF1P F8SC #1 (977) GCGACGCTTTTATAGGACAGAGCTGG
> AVH5C7 RF1P F8SC #2 (977) GCGACGCTTTTATAGGACAGAGCTGG
> AVH5C7 RF1P HspG2 #1 (977) GCGACGCTTTTATAGGACAGAGCTGG
> AVH5C7 RF1P HspG2 #2 (977) GCGACGCTTTTATAGGACAGAGCTGG
> AVH5C7 RF1P HspG2 #3 (977) GCGACGCTTTTATAGGACAGAGCTGG
> AVH5C7 RF1P HspG2 #4 (977) GCGACGCTTTTATAGGACAGAGCTGG
> REFP -> RFL -> AUM (703)
> AC010327 AVWS1 (+174)
> <ホトシジメ-アーム> (+102)
> <ホトシジメ-アーム> (1) TAGGACAGAGCTGTGACAGAGAGAGGCGGATCTTAGGCTCTCTCTCTCTCTA
> > HspD IIT
AGCTT

```

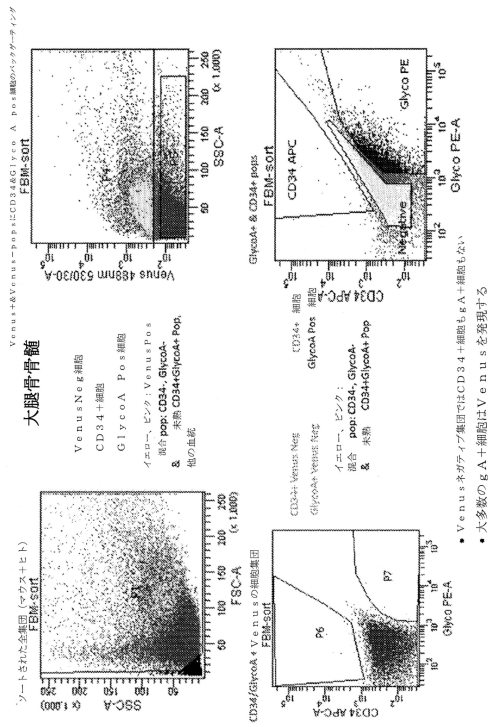
AAVSは、小細胞のAAVS1-CD34+細胞への集積を標的とする



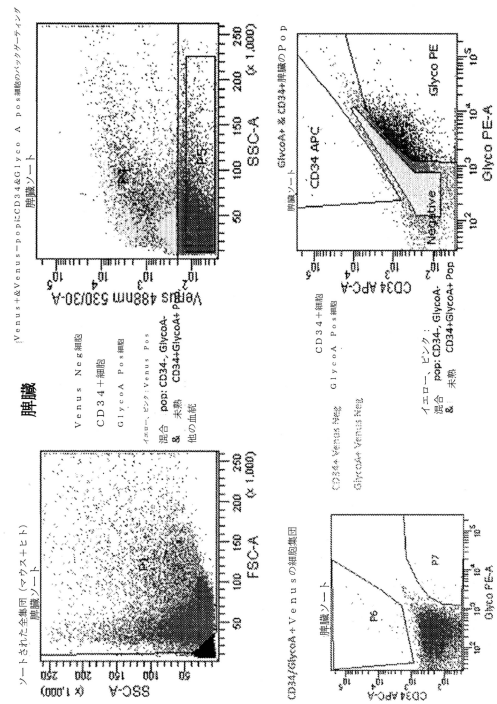
【 図 3 6 】



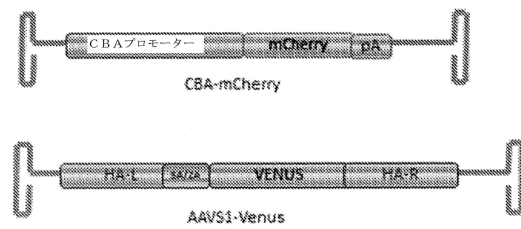
【 図 3 7 】



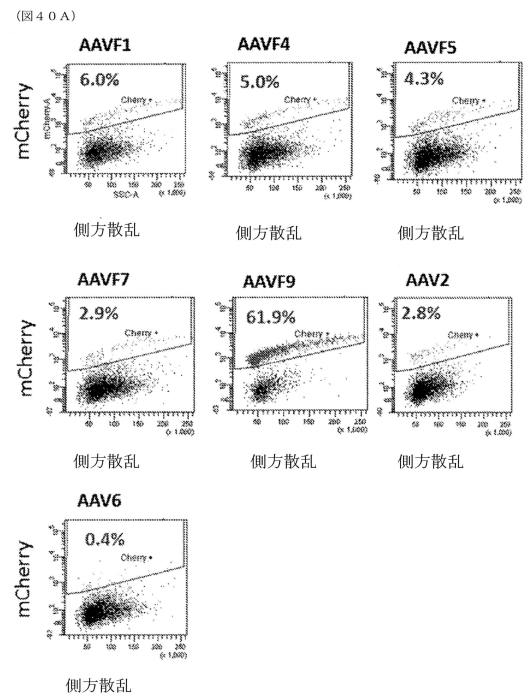
【 図 3 8 】



【 図 3 9 】

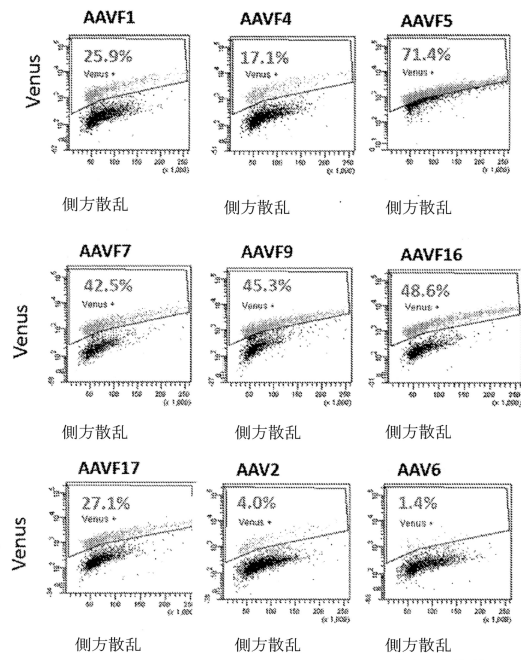


【 図 4 0 - 1 】



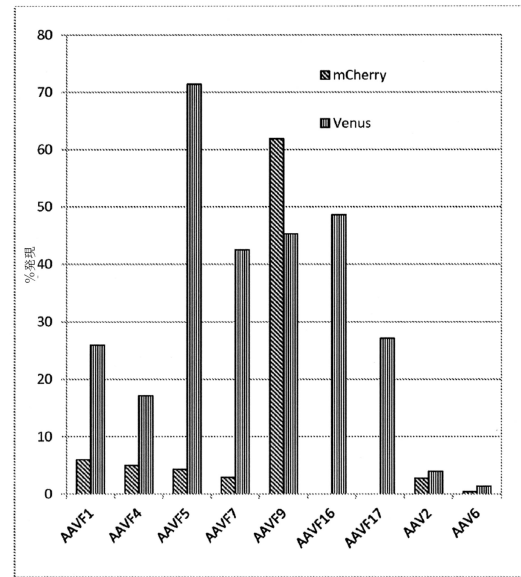
【図 40 - 2】

(図 40 B)



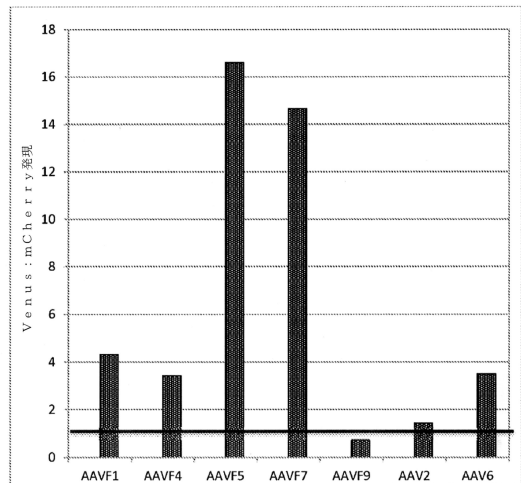
【図 40 - 3】

(図 40 C)



【図 40 - 4】

(図 40 D)



【配列表】

0006683691000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00	
C 1 2 N 7/01	(2006.01)	C 1 2 N 7/01	Z N A

(31)優先権主張番号 62/209,862

(32)優先日 平成27年8月25日(2015.8.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 サスワティ・チャタジー

アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 1 0 0 1・アルタデナ・チャーチ・キャニオン・プレイス・
6 1 4

(72)発明者 ローラ・スミス

アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 1 1 0 1・パサデナ・ノース・マディソン・アヴェニュー・
4 0 5・アパートメント・2 1

(72)発明者 カメハメハ・ウォン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 1 0 0 1・アルタデナ・チャーチ・キャニオン・プレイス・
6 1 4

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 特表2 0 1 3 - 5 4 4 0 7 7 (J P , A)

米国特許出願公開第2 0 1 3 / 0 0 9 6 1 8 2 (U S , A 1)

SMITH, Laura J. et al., GENE TRANSFER PROPERTIES AND STRUCTURAL MODELING OF HUMAN STEM
CELL-DERIVED AAV, MOLECULAR THERAPY, 英国, 2 0 1 4 年 6 月 1 3 日, VOL:22, NR:9, PAGE(
S):1625-1634, U R L , <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2014.107>KHAN, Iram F. et al., AAV-MEDIATED GENE TARGETING METHODS FOR HUMAN CELLS, NATURE PROT
OCOLS, 英国, NATURE PUBLISHING GROUP, 2 0 1 1 年 3 月, VOL:6, NR:4, PAGE(S):482 - 501
, U R L , <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.301>

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 /

C 1 2 N 7 /

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)