(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6851319号
(P6851319)

(45)発行日　令和3年3月31日(2021.3.31)　(24)登録日　令和3年3月11日(2021.3.11)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	
A61P 1/16	(2006.01)	A61P	1/16	ZNA
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088	
A61K 35/76	(2015.01)	A61K	35/76	
A61K 47/56	(2017.01)	A61K	47/56	

請求項の数 20　(全 71 頁)

(21)出願番号　特願2017-556203 (P2017-556203)
(86)(22)出願日　平成28年4月26日 (2016.4.26)
(65)公表番号　特表2018-522530 (P2018-522530A)
(43)公表日　平成30年8月16日 (2018.8.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/029330
(87)国際公開番号　WO2016/176191
(87)国際公開日　平成28年11月3日 (2016.11.3)
審査請求日　平成31年4月23日 (2019.4.23)
(31)優先権主張番号　62/153,470
(32)優先日　平成27年4月27日 (2015.4.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/183,825
(32)優先日　平成27年6月24日 (2015.6.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(73)特許権者　502409813
ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・ペンシルベニア
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９１０４フィラデルフィア・ナインスフロアー・シビックセンタープールバード３６００
(74)代理人　110000741
特許業務法人小田島特許事務所
(72)発明者　ウイルソン，ジェームス・エム
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３４２グレンミルズ・フォールブルックレーン７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト疾患のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９媒介性の修正のためのデュアルＡＡＶベクター系

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
遺伝障害を処置するためのデュアルベクター系であって、該系が：
（ａ）障害をもたらす１個若しくはそれ以上の突然変異を有する標的遺伝子を含んでなる、標的細胞中でのその発現を指図する調節配列の制御下にＣａｓ９遺伝子を含んでなる遺伝子編集ＡＡＶベクター；並びに
（ｂ）ｓｇＲＮＡが、標的遺伝子中の選択された１部位に特異的に結合しかつＣａｓ９により特異的に認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に対し５’である最低２０ヌクレオチドを含んでなり、かつ、ドナーテンプレートが、標的遺伝子中の突然変異の最低１個を置換する核酸配列を含んでなる、ｓｇＲＮＡの１種若しくはそれ以上及びドナーテンプレートを含んでなるターゲッティングＡＡＶベクター、を含んでなり、そして；
ここで、（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターと（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターの比において、（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターが（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターを超過する、
上記系。
【請求項２】
標的細胞が、増殖細胞、前駆細胞、幹細胞若しくは肝細胞であり、場合によりここで該増殖細胞が、上皮細胞である、請求項１に記載のデュアルベクター系。
【請求項３】

（ａ）の編集ＡＡＶベクターと（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターの比が、約１：３ないし約１：１００であるか、若しくは約１：１０である、請求項１に記載のベクター系。

【請求項４】

（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターのｓｇＲＮＡが、約２４ヌクレオチドないし約２８ヌクレオチドを含んでなる、請求項１に記載のベクター系。

【請求項５】

ドナーテンプレートが、機能するタンパク質若しくは酵素をコードする完全長の遺伝子であるか、または、

（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターのドナーテンプレートが、部分的なタンパク質若しくは酵素をコードし、及び、欠陥のある遺伝子を補完しかつ標的細胞中での機能するタンパク質の産生を可能にするよう設計されている、

請求項１に記載のベクター系。

【請求項６】

（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターのｓｇＲＮＡが、標的遺伝子のイントロンを標的とするよう設計されており、その結果突然変異が該ドナーにより修正されるか、または、

（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターのｓｇＲＮＡが、遺伝子を標的とするよう設計されており、その結果該ドナーテンプレートが遺伝子欠損の上流に挿入される、

請求項１に記載のベクター系。

【請求項７】

（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターが、１個より多いｓｇＲＮＡを含んでなる、請求項１に記載のベクター系。

【請求項８】

（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクター及び（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターが、同一のＡＡＶキャプシドを有する、請求項１に記載のベクター系。

【請求項９】

ＡＡＶキャプシドが、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ｒｈ１０、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ３Ｂ、ｈｕ３７及び／若しくはｒｈ６４から選択される、請求項８に記載のベクター系。

【請求項１０】

Ｃａｓ９が、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅａｕｓ）若しくは化膿性連鎖球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＣａｓ９から選択される、請求項１に記載のベクター系。

【請求項１１】

Ｃａｓ９が、組織特異的プロモーターの制御下にあり、ここで該組織特異的プロモーターは任意に肝特異的プロモーターであり、ここで該肝特異的プロモーターは任意にヒトチロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）プロモーターである、請求項１に記載のベクター系。

【請求項１２】

Ｃａｓ９が、構成的プロモーターの制御下にある、請求項１に記載のベクター系。

【請求項１３】

遺伝障害を有する被験体に２種のベクターが同時投与される、請求項１に記載のベクター系。

【請求項１４】

ヒトにおける障害を処置するための、請求項１ないし１２のいずれかに記載のベクター系を含んでなる医薬。

【請求項１５】

新生児における肝代謝障害を処置するための、

（ａ）肝代謝障害をもたらす１個若しくはそれ以上の突然変異を有する標的遺伝子を含んでなる肝細胞中でのその発現を指図する調節配列の制御下にＣａｓ９遺伝子を含んでなる遺伝子編集ＡＡＶベクター；並びに

（ｂ）ｓｇＲＮＡが、標的遺伝子中の選択された１部位に特異的に結合しかつＣａｓ９により特異的に認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に対し５’である最低２０ヌクレオチドを含んでなり、かつ、ドナーテンプレートが、標的遺伝子中の突然変異の最低１個を置換する核酸配列を含んでなる、ｓｇＲＮＡ及びドナーテンプレートを含んでなるＡＡＶターゲッティングベクター；
を含んでなる、デュアルベクター系を含んでなる医薬であって、
ここで、（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターと（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターの比において、（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターが（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターを超過する、
上記医薬。

【請求項１６】
（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクター及び（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターが、同一経路を介して本質的に同時に送達される、請求項１５に記載の医薬。

【請求項１７】
（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターが、約２×１０^{11}ＧＣ／ｍＬないし約２×１０^{12}ＧＣ／ｍＬ
の濃度で注入のためのベヒクル中に懸濁されている、請求項１５に記載の医薬。

【請求項１８】
（ｂ）のターゲッティングＡＡＶベクターが、約２×１０^{12}ＧＣ／ｍＬないし約１×１０^{13}ＧＣ／ｍＬの濃度で注入のためベヒクル中に懸濁されている、請求項１５に記載の医薬。

【請求項１９】
肝代謝障害が、オルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）である請求項１５に記載の医薬。

【請求項２０】
ｓｇＲＮＡが、野生型ＯＴＣ遺伝子の番号付けに基づきヌクレオチド２４３に位置する、ＯＴＣ遺伝子のエクソン４中のＧ／Ａ突然変異部位に標的化されている、請求項１５に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
電子的形態で提出される資料の引用することによる組み込み
発明者は、ここに、これとともに電子的形態で提出される配列表資料を引用することにより組み込む。このファイルは「ＵＰＮ＿１５＿７５０６ＰＣＴ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」と表示される。

【０００２】
連邦に支援される研究若しくは開発に関する声明
本発明は、国立保健研究所からの助成金ＮＩＣＨＤ　Ｐ０１－ＨＤ０５７２４７号の下に政府の支援を伴いなされた。米国政府は本発明においてある種の権利を有する。

【背景技術】
【０００３】
早期の介入及び治療は多くの遺伝性疾患において決定的に重要である。多様な種類の治療が文献に記述されている。遺伝子突然変異若しくは特殊な表現型を伴う疾患の修正において可能性を有するとして記述されている１つの技術は、ＣＲＩＳＰＲ（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　Ｓｈｏｒｔ　Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　Ｒｅｐｅａｔ）及びＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（Ｃａｓ９）系である。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓは、外来遺伝物質の分解のため古細菌及び細菌により使用される養子免疫応答防御機構由来であった［非特許文献１；非特許文献２］。この機構は、遺伝子ノックアウト（ＫＯ）のような哺乳動物系のためのゲノム工学を包含する他の機能に別の目的で使

用し得る［非特許文献３；非特許文献４；非特許文献５；非特許文献６］。ＣＲＩＳＰＲタイプＩＩ系は現在、ゲノム工学のための最も普遍的に使用されるＲＮＡ誘導性エンドヌクレアーゼ技術である。この系に対し２つの異なる成分が存在する：（１）ガイドＲＮＡ及び（２）エンドヌクレアーゼ、この場合ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）ヌクレアーゼＣａｓ９。ガイドＲＮＡは、単一のキメラガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）転写物中への内因性の細菌ｃｒＲＮＡ（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ）及びｔｒａｃｒＲＮＡ（トランス活性化ｃｒＲＮＡ）の組合せである。ｇＲＮＡはｃｒＲＮＡのターゲッティング特異性をｔｒａｃｒＲＮＡの足場特性と単一転写物中に組合せる。ｇＲＮＡ及びＣａｓ９が細胞中で発現される場合、該ゲノム標的配列は改変若しくは永続的に破壊され得る。

【０００４】

アデノ随伴ウイルスは遺伝子治療のための有用なベクターであるとして記述されている。こうした用途はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を必要とするものを包含する。例えば非特許文献７及び非特許文献８を参照されたい。

【０００５】

上に述べられたとおり、若干の遺伝性障害は、乳児の死亡若しくは重大な罹病を回避するために非常に早期の介入、すなわちしばしば数時間若しくは数日以内を必要とする。しかしながら、ＡＡＶベクターは不安定であり従って新生児若しくは乳児に送達される場合に無効であるとして記述されており；これは生命のこの段階における肝の急速な増殖によるものであり、増殖細胞によるＡＡＶベクターの喪失及び／若しくは不十分な治療転帰をもたらすＡＡＶ含有細胞の希釈をもたらす。

【０００６】

必要とされるものは、遺伝障害、並びにとりわけ新生児若しくは乳児の死亡又は小児及び成人における重大な罹病と関連するものを処置するための有効な組成物及び技術である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｏｏｓｔ，Ｊ．ら　２０１４．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７：４７９－４９２

【非特許文献２】Ｈｓｕ，Ｐ．ら　２０１４．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ａｎｄ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｏｆ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９　ｆｏｒ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ．Ｃｅｌｌ　１５７：１２６２－１２７８

【非特許文献３】Ｃｏｎｇ，Ｌ．ら　２０１３．Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｕｓｉｎｇ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３９：８１９－８２３

【非特許文献４】Ｍａｌｉ，Ｐ．ら　２０１３．ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ｈｕｍａｎ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｖｉａ　Ｃａｓ９．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３９：８２３－８２６

【非特許文献５】Ｒａｎ，Ｆ．Ａ．ら　２０１３．Ｇｅｎｏｍｅ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｕｓｉｎｇ　ｔｈｅ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９　ｓｙｓｔｅｍ．Ｎａｔ．Ｐｒｏｔｏｃ．８：２２８１－２３０８

【非特許文献６】Ｓｈａｌｅｍ，Ｏ．ら　２０１４．Ｇｅｎｏｍｅ－ｓｃａｌｅ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９　ｋｎｏｃｋｏｕｔ　ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ　ｉｎ　ｈｕｍａｎ　ｃｅｌｌｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３４３：８４－８７

【非特許文献７】Ｙｉｎら、“Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、３２：５５１－３（２０１４）

【非特許文献８】“Ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｇｅｎｅ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｉｎ　ｔｈｅ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｂｒａｉｎ　ｕｓｉｎｇ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ”、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、３３：１０２－６（２０１５）

【発明の概要】
【０００８】
［発明の要約］
本発明は、遺伝障害の標的化処置のため新生児及び乳児被験体にデュアルＡＡＶベクターを介して送達されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を提供する。有利には、該系は、ＡＡＶ媒介性Ｃａｓエレメントを同時に希釈しつつＡＡＶ媒介性処置により修正される細胞を有する組織を生息させるために、新生児段階における細胞の急速な増殖を使用する。しかしながら、該方法は、例えば、発達中の及び成体組織中の増殖、前駆及び／若しくは幹細胞のターゲッティングによる、多様な障害の処置のためのより年長の小児及び成人における処置にもまた有用である。
【０００９】
一局面において、本発明は障害を処置するためのデュアルベクター系を提供し、該系は：（ａ）疾患若しくは障害（例えば肝代謝障害）をもたらす１個若しくはそれ以上の突然変異を有する標的遺伝子を含んでなる、標的細胞（例えば肝細胞）中でのその発現を指図する調節配列の制御下にＣａｓ９遺伝子を含んでなる遺伝子編集ベクター；並びに（ｂ）ｓｇＲＮＡの１個若しくはそれ以上及びドナーテンプレートを含んでなるターゲッティングベクターを含んでなり、該ｓｇＲＮＡは、標的遺伝子中の選択された１部位に特異的に結合しかつＣａｓ９により特異的に認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ（ｐｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ－ａｄｊａｃｅｎｔ　ｍｏｔｉｆ）（ＰＡＭ）に対し５’である最低２０ヌクレオチドを含んでなり、かつ、該ドナーテンプレートは、標的遺伝子中の突然変異の最低１個を置換する核酸配列を含んでなり；（ｂ）が（ａ）を超過するような、テンプレートを含有するベクター（ｂ）に対する（ａ）の遺伝子編集ベクターの比である。一態様において、障害は代謝障害である。別の態様において、障害は肝代謝障害である。一態様において、本系で使用されるベクターはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである。一例において、遺伝子編集ＡＡＶベクター及びターゲッティングＡＡＶベクターの双方が同一キャプシドを有する。
【００１０】
一局面において、本発明は、（ａ）肝代謝障害をもたらす１個若しくはそれ以上の突然変異を有する標的遺伝子を含んでなる肝細胞中でのその発現を指図する調節配列の制御下にＣａｓ９遺伝子を含んでなる遺伝子編集ＡＡＶベクター；並びに（ｂ）ｓｇＲＮＡ及びドナーテンプレートを含んでなるＡＡＶターゲッティングベクターを被験体に同時投与することを含んでなる、新生児における肝代謝障害の処置方法を提供し、該ｓｇＲＮＡは標的遺伝子中の選択された１部位に特異的に結合する最低２０ヌクレオチドを含んでなり、かつ、ドナーテンプレートは、標的遺伝子中の突然変異の最低１個を置換しかつＣａｓ９により特異的に認識されるＰＡＭに対し５’である核酸配列を含んでなり；（ｂ）が（ａ）を超過するような、（ｂ）に対する（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターの比である。一例において、肝代謝障害はオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症である。別の局面において、本発明は、肝代謝障害を処置するため、若しくは肝代謝障害の処置のための医薬品の製造のためのこれらＡＡＶベクターの使用を提供する。
【００１１】
さらなる一局面において、該方法は遺伝子編集により点突然変異を修正することにより肝以外の組織において遺伝性疾患を処置するために有用である。本方法は、疾患修正の効率を増大させるため、多様な部位に対し同時に標的とする単一の遺伝子編集ベクターを可能とする。本遺伝子編集ベクターはＣａｓ９とともに被験体に同時投与され、そして点突然変異並びに標的細胞中の小型の欠失及び挿入の修正を可能にする。適する標的組織は、例えば腸上皮、肺上皮、肝細胞、網膜（例えば網膜上皮）、筋及び中枢神経系の前駆細胞を包含しうる。
【００１２】
なお別の局面において、方法は、部位特異的様式で標的イントロンの上流でかつ天然の調節エレメントの下流に遺伝子カセット全体を挿入することにより遺伝性疾患を処置する

ために有用である。本方法は、それが突然変異の特定の部位に依存しないために有利である。１エクソン又は大型の欠失若しくは挿入もまた、挿入カセットがドナー部位により続かれかつ欠陥のあるエクソンのドナー部位を標的とする場合に本方法により修正され得、その結果遺伝子修正がスプライスされるｍＲＮＡのレベルで達成されることができる。コーディング配列並びにスプライスドナー及びアクセプター部位を、本明細書に記述される方法により修正し得る。

【００１３】

本発明のなお他の局面及び利点は本発明の以下の詳細な記述から容易に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【００１４】

【図１Ａ－１Ｃ】ＡＡＶ．ＣＲＩＳＰＲ－ＳａＣａｓ９によるｓｐｆ^{ash}マウス肝中のＯＴＣ遺伝子座のｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子修正を示す研究の結果を具体的に説明する。図１Ａはｓｐｆ^{ash}突然変異及び３個のＳａＣａｓ９標的を示すマウスＯＴＣ遺伝子座の図解である。ｓｐｆ^{ash}はトップストランド上で指定されるエクソン４の端のドナースプライス部位にＧからＡの突然変異を有する。反映されるヌクレオチド配列は配列番号１である。３個の選択されるＳａＣａｓ９標的化ゲノム遺伝子座（各２０ｂｐ）はより薄い灰色でありかつ下線を付けられ、ＰＡＭ配列に印が付けられている。エクソン４の上の黒色の線は１．８ｋｂのＯＴＣドナーテンプレートを示す。図１Ｂは、肝指向性かつＳａＣａｓ９媒介性の遺伝子修正のためのデュアルＡＡＶベクター系を示す漫画である。該ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒベクターは、図１Ａに示されるところの１．８ｋｂのマウスＯＴＣドナーテンプレート配列を含有し、対応するＰＡＭ配列が突然変異されている。図１Ｃは新生仔ＯＴＣ　ｓｐｆ^{ash}モデルにおけるＡＡＶ８．ＣＲＩＳＰＲ－ＳａＣａｓ９媒介性の遺伝子修正の重要な段階を示すフローチャートである。

【図２Ａ－２Ｆ】ＡＡＶ８．ＣＲＩＳＰＲ－ＳａＣａｓ９媒介性の遺伝子修正によるｓｐｆ^{ash}マウスの肝におけるＯＴＣ発現の効率的な復帰を具体的に説明する。ＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（５×１０^{10}ＧＣ／仔）及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ（５×１０^{11}ＧＣ／仔）を、出生後第２日（ｐ２）のｓｐｆ^{ash}仔に側頭静脈を介して投与した。ｓｐｆ^{ash}マウスを処置後３（ｎ＝５）若しくは８週（ｎ＝８）に屠殺した。非標的化ｓｐｆ^{ash}マウスはｐ２にＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（５×１０^{10}ＧＣ／仔）及びＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒ（５×１０^{11}ＧＣ／仔）を受領し、そして肝を処置８週後に採集した（ｎ＝６）。図２Ａは免疫染色によるＯＴＣを発現する肝切片上の領域のパーセンテージに基づく遺伝子修正の定量化を提供する。図２Ｂは、３週及び８週のＣＲＩＳＰＲ－ＳａＣａｓ９媒介性の遺伝子修正のためのデュアルＡＡＶベクターで処置されたｓｐｆ^{ash}マウスからの肝切片上のＯＴＣに対する抗体を用いる免疫蛍光染色を具体的に説明する。染色される領域は修正された肝細胞のクラスターを典型的に表す。非処置対照は、野生型（ｗｔ）、ｓｐｆ^{ash}ヘテロ接合性（ｈｅｔ）及びｓｐｆ^{ash}ヘミ接合性マウスからの肝を示す。スケールバー、１００μｍ。図２Ｃは、ＯＴＣ及び中心周囲マーカーとしてのグルタミン合成酵素（ＧＳ）に対する二重免疫染色により示される門脈－中心静脈系（ｐｏｒｔａｌ－ｃｅｎｔｒａｌ　ａｘｉｓ）に沿った修正された肝細胞のクラスターのランダムな分布を具体的に説明する（ｐ、門脈；ｃ、中心静脈）。スケールバー、３００μｍ（上図）及び１００μｍ（下図）。図２Ｄは、個々の肝細胞の輪郭を示すフルオレセイン標識トマトレクチン（トマト（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍ）レクチン、ＬＥＬ）で対染色された切片上で免疫蛍光により示されるＯＴＣを発現する修正された肝細胞の群を示す。スケールバー、５０μｍ。図２Ｅは、デュアルベクター処置後３及び８週のｓｐｆ^{ash}マウスの肝ライセート中のＯＴＣ酵素活性を示す。図２Ｆは、野生型ＯＴＣを増幅するためエクソン４－５に広がるプライマーを使用するＲＴ－ｑＰＣＲによる肝中のＯＴＣ　ｍＲＮＡレベルの定量を示す。平均±ＳＥＭを示す。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１、ダネットの検定。

【図３Ａ－３Ｅ】新生仔のベクター投与後のＳａＣａｓ９発現及び高蛋白餌投与後の機能

改良の時間経過を示す。図３Ａは、ＣＲＩＳＰＲ－ＳａＣａｓ９媒介性の遺伝子修正のためのデュアルＡＡＶベクターの新生仔の注入後１、３若しくは８週の非処置マウス若しくは処置ｓｐｆ^{ash}マウスからの肝切片上のＦｌａｇに対する抗体での免疫染色の結果を示す。ＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（５×１０^{10}ＧＣ／仔）及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ（５×１０^{11}ＧＣ／仔）を、ｐ２のｓｐｆ^{ash}仔に側頭静脈を介して投与した。Ｆｌａｇタグ化ＳａＣａｓ９の核染色は１週（ｎ＝５）で豊富であったが、しかし３週に劇的に低下し（ｎ＝６）、そしてベクター注入後８週（ｎ＝７）にわずかとなった。スケールバー、１００μｍ。図３ＢはＲＴ－ｑＰＣＲによる肝中のＳａＣａｓ９　ｍＲＮＡレベルの定量の結果を示す。平均±ＳＥＭを示す。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１、ダネットの検定。図３ＣはＱＰＣＲによる肝中のＳａＣａｓ９ベクターゲノムの定量を提供する。図３Ｄは、１週クールの高蛋白餌後の対照若しくはデュアルＡＡＶベクター処置ｓｐｆ^{ash}マウスにおける血漿アンモニアレベルを示す。デュアルＡＡＶベクターでの新生仔の処置７週後にマウスに高蛋白餌を７日間与えた。血漿アンモニアレベルを高蛋白餌７日後に測定した。ＷＴマウス（ｎ＝１３）及びＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９＋ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ処置ｓｐｆ^{ash}マウス（ｎ＝１３）における血漿アンモニアレベルは、７日の高蛋白餌後の非処置ｓｐｆ^{ash}マウス（ｎ＝１６）より有意により低かった。影を付けられた正方形は高蛋白餌６日後の瀕死の非処置ｓｐｆ^{ash}マウスから得られたサンプルを示し；影を付けられた三角形は高蛋白餌５日後の非標的化ベクター（ｓｇＲＮＡ１を含まないＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒ、ｎ＝１０）で処置された瀕死のｓｐｆ^{ash}マウスから得られたサンプルを示す。＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１、ダネットの検定。図３Ｅは、１週クールの高蛋白餌後の対照若しくはデュアルＡＡＶベクター処置ｓｐｆａｓｈマウスにおける生存曲線を示す。非処置ｓｐｆ^{ash}マウス（ｎ＝２０）若しくは非標的化ベクター（ＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒ、ｎ＝１３）で処置されたｓｐｆ^{ash}マウスは、高蛋白餌３日後に死亡することを開始した。全部のＷＴ（ｎ＝１３）及びＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９＋ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ処置マウス（ｎ＝１３）は生き残った。＊Ｐ＜０．０５、マンテル・コックス検定。

【図４Ａ－４Ｂ】ＯＴＣ　ｓｇＲＮＡｓ及びドナーテンプレートのｉｎ　ｖｉｔｒｏ検証を示す。図４Ａは、一過性トランスフェクション次いで４日ピューロマイシン濃縮及びＳＵＲＶＥＹＯＲ（登録商標）ヌクレアーゼアッセイによるＭＣ５７Ｇマウス細胞株におけるＯＴＣに標的化されたｓｇＲＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏ検証を示す。ｓｇＲＮＡ１は標的化された遺伝子座中に欠失挿入を誘導することにおいて最高の効率を示し、そして従ってその後の研究のため選ばれた。矢印はＯＴＣ　ＰＣＲ産物のＳＵＲＶＥＹＯＲ（登録商標）ヌクレアーゼ切断されたフラグメントを示す。結果は２回の独立した実験で複製された。図４ＢはＯＴＣドナーテンプレートのｉｎ　ｖｉｔｒｏ検証を示す。ＭＣ５７Ｇ細胞を、ＯＴＣ　ｓｇＲＮＡ１、ＳａＣａｓ９及びＡｇｅＩ制限部位でタグ化されたＯＴＣドナープラスミドを同時発現するプラスミドで一過性にトランスフェクトし、次いで４日ピューロマイシン濃縮した。ＲＦＬＰ分析を、ＨＤＲをｉｎ　ｖｉｔｒｏで検出するためＡｇｅＩ消化後に実施した。ＡｇｅＩタグ化ＯＴＣドナーテンプレートのＯＴＣ　ｓｇＲＮＡ１を含まないＳａＣａｓ９プラスミドとのコトランスフェクションは、検出可能なＨＤＲをもたらさなかった。矢印はＨＤＲから生じるＡｇｅＩ感受性切断産物を示す。結果は２回の独立した実験で複製された。欠失挿入及びＨＤＲの頻度をバンド強度に基づき計算した［Ｌ．Ｗａｎｇら、Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ、２３：５３３－５３９（２０１２）］。

【図５Ａ－５Ｂ】ｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子修正を改良するためのベクター用量最適化を示す。出生後第２日のｓｐｆ^{ash}仔が、５×１０^{10}ＧＣのＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９及び５×１０^{10}（ｎ＝５）、１×１０^{11}（ｎ＝３）若しくは５×１０^{11}（ｎ＝５）ＧＣいずれかのＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒベクターの側頭静脈注入を受領した。肝サンプルを分析のためベクター処置３週後に収集した。図５Ａは免疫染色によるＯＴＣを発現する肝切片上の領域のパーセンテージに基づく遺伝子修正の定量化を示す。図５Ｂは、野生型ＯＴ

Ｃを増幅するためのエクソン４－５に広がるプライマーを使用するＲＴ－ｑＰＣＲによる肝におけるＯＴＣ　ｍＲＮＡのレベルの定量を示す。平均±ＳＥＭを示す。＊＊Ｐ＜０．０１、ダネットの検定。

【図６Ａ－６Ｂ】ウエスタン分析による遺伝子発現の時間経過及びＲＦＬＰによるＨＤＲ分析を示す。図６ＡはＲＦＬＰによるＨＤＲ分析を提供する。ＯＴＣ標的領域を、非処置ＷＴ及びｓｐｆ^{ash}マウス若しくはデュアルＡＡＶベクターで処置されたｓｐｆ^{ash}マウスから単離された肝ゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅した。非処置ＷＴ及びｓｐｆ^{ash}対照サンプルを８週齢で収集し；処置ｓｐｆ^{ash}マウスからのサンプルは、デュアルＡＡＶ８ベクターの新生仔の注入後１、３及び８週（時点あたりｎ＝３動物）に収集した。標的化動物はＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（５×１０^{10}ＧＣ／仔）及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ（５×１０^{11}ＧＣ／仔）を受領し；非標的化動物はＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（５×１０^{10}ＧＣ／仔）及びＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒ（５×１０^{11}ＧＣ／仔）を受領した。ＡｇｅＩ消化を実施し、そして推定されるＨＤＲのパーセンテージを示す。図６Ｂはウエスタン分析を示す。肝ライセートを、Ｆｌａｇ－ＳａＣａｓ９及びＯＴＣタンパク質の検出のため、非処置ＷＴ及びｓｐｆ^{ash}マウス若しくはデュアルＡＡＶベクターで処置されたｓｐｆ^{ash}マウスから調製した。

【図７Ａ－７Ｂ】ＡＡＶ８．ＣＲＩＳＰＲ－ＳａＣａｓ９デュアルベクターで処置された動物における肝毒性の検査を示す。図７Ａは、デュアルベクター処置３及び８週後に収集された肝での組織学的分析の結果を示す。図７Ｂは、非処置ｓｐｆ^{ash}マウス（ｎ＝９）若しくはデュアルベクター処置８週後の肝トランスアミナーゼレベルを示す。非標的化マウスは５×１０^{10}ＧＣのＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９及び５×１０^{11}のＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒベクターを受領した（ｎ＝８）一方、遺伝子標的化マウスは５×１０^{10}ＧＣのＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９及び５×１０^{11}ＧＣのＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒを受領した（ｎ＝７）。平均±ＳＥＭを示す。群間に統計学的有意差は存在せず、ダネットの検定。

【図８Ａ－８Ｅ】ＡＡＶ８．ＣＲＩＳＰＲ－ＳａＣａｓ９ベクターにより成体として処置されたｓｐｆａｓｈマウスの肝中の遺伝子ターゲッティング／修正を具体的に説明する。成体ｓｐｆ^{ash}マウス（８～１０週齢）は、ＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（１×１０^{11}ＧＣ）及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ（１×１０^{12}ＧＣ）、若しくはより高用量のＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（１×１０^{12}ＧＣ）及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ（５×１０^{12}ＧＣ）、又は同等の用量の非標的化ベクターの静脈内注入を受領した。８Ａ。低用量コホートの生存曲線：ｓｇＲＮＡ１（ｎ＝１０）若しくは同一用量の非標的化ベクター（ｎ＝５）。８Ｂ。注入後３（低用量、ｎ＝３）若しくは２週（高用量、ｎ＝３）に収集された肝切片上でのＯＴＣに対する抗体での免疫蛍光染色。染色された細胞は典型的に、単一修正された（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｏｒｒｅｃｔｅｄ）肝細胞として示された。８Ｃ。個々の肝細胞の輪郭を示すフルオレセイン標識トマトレクチン（ＬＥＬ）で共染色された切片上の免疫蛍光により示されるＯＴＣを発現する単離された修正された肝細胞。スケールバー、５０μｍ。８Ｄ。高用量遺伝子ターゲッティングベクターでの処置後の成体ｓｐｆ^{ash}マウスにおける尿オロト酸レベルの変化（非処置ｓｐｆ^{ash}及び低用量群についてｎ＝３；高用量群についてｎ＝２）。８Ｅ。高用量遺伝子ターゲッティングベクターでの処置後の成体ｓｐｆ^{ash}マウスにおける血漿NH_3レベルの上昇（各群についてｎ＝３）。平均±ＳＥＭを示す。＊＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１、ダネットの検定。

【図９Ａ－９Ｂ】ＡＡＶ８．ＣＲＩＳＰＲ－ＳａＣａｓ９デュアルベクターで処置された成体動物における肝毒性の検査を具体的に説明する。図９Ａは、デュアルベクター処置３週（低用量）若しくは２週（高用量）後に収集された肝での組織学的分析を示す。スケールバー、１００μｍ。図９Ｂは、非処置ｓｐｆ^{ash}マウス、又は低用量デュアルベクター処置３週後若しくは高用量デュアルベクター処置２週後（各群についてｎ＝３）における肝トランスアミナーゼレベルを示す。低用量、非標的化マウスは１×１０^{11}ＧＣのＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９及び１×１０^{12}ＧＣのＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒベクター

を受領した一方、低用量、遺伝子標的化マウスは１×１０^{11}ＧＣのＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９及び１×１０^{12}ＧＣのＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒを受領した。高用量、非標的化マウスは１×１０^{12}ＧＣのＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９及び５×１０^{12}ＧＣのＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒベクターを受領した一方、高用量、遺伝子標的化マウスは１×１０^{12}ＧＣのＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９及び５×１０^{12}ＧＣのＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒを受領した。平均±ＳＥＭを示す。高用量の遺伝子標的化ベクターを受領した成体動物は上昇されたＡＬＴ及びＡＳＴレベルの傾向を示したとは言え、他の群と比較される場合に統計学的に異ならなかった（ダネットの検定）。

【図１０】実施例２に記述されるところのＭＰＳＩの修正について評価されるｓｇＲＮＡ１、ｓｇＲＮＡ２及びｓｇＲＮＡ３の場所を示す漫画である。反映されるヌクレオチド配列は配列番号２である。

【図１１】肝指向性かつＡｓＣｐｆ１媒介性の遺伝子修正のためのデュアルＡＡＶベクター系を具体的に説明する漫画である。ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ．ｄｏｎｏｒベクターは、対応するＰＡＭ配列が突然変異されている１．８ｋｂのドナーテンプレート配列を含有する。

【図１２】肝指向性かつＬｂＣｐｆ１媒介性の遺伝子修正のためのデュアルＡＡＶベクター系を具体的に説明する漫画である。ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ．ｄｏｎｏｒベクターは、対応するＰＡＭ配列が突然変異されている１．８ｋｂのドナーテンプレート配列を含有する。

【図１３Ａ】ＡＡＶ．ｓｇＲＮＡ．ＰＣＳＫ９．ＳｃＣａｓ９プラスミドを示す漫画である。

【図１３Ｂ】ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ．ＰＣＳＫ９．ＴＢＧ－Ｓ１．ＳａＣａｓ９ベクター（３×１０^{13}ＧＣ／ｋｇ）の投与後のアカゲザルにおける血清ＰＣＳＫ９レベルを具体的に説明する。ベクター投与後第１４日のおよそ約４０％の低下が第０日と比較して観察される。

【発明を実施するための形態】

【００１５】

［発明の詳細な記述］

本発明は、遺伝子異常を特徴とする疾患、障害若しくは状態の正確なｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子修正のためｓｇＲＮＡ及びドナーテンプレートＲＮＡを発現するためのデュアルベクター系を提供する。本系は、新生児段階及び／若しくは乳児期の間の肝細胞への送達にとりわけ良好に適するが、しかし、他の細胞型を標的とするために出生前段階又はより年長の小児若しくは成体で使用しうる。他の細胞型の例は、若齢及び成体患者における増殖、前駆及び／若しくは幹細胞、並びに場合によっては有糸分裂後細胞である。こうした細胞は、とりわけ、例えば上皮細胞（腸、肺、網膜など）、中枢神経系（ＣＮＳ）前駆細胞を包含しうる。

【００１６】

本明細書で使用されるところの「増殖細胞」という用語は、細胞の成長及び細胞分裂の結果として増殖若しくは再生する細胞を指す。細胞は所望の速度で天然に増殖していることができ、例えば上皮細胞、幹細胞、血液細胞、肝細胞；こうした態様において、本発明は、本明細書に記述されるところの細胞の天然の増殖速度を利用する。別の態様において、細胞は、例えば癌細胞、若しくは、アテローム動脈硬化症、血管形成術後の再狭窄、及び冠動脈バイパス術後の移植片アテローム動脈硬化症の閉塞性血管病変と関連する過度の過形成性細胞増殖におけるような、異常な若しくは望ましくない速度で増殖していてもよい。本態様において、本発明は、これら細胞の増殖速度を使用しかつ／若しくは該増殖速度を変える（例えば、高増殖速度をもたらす遺伝子異常を修正することにより）ことを求めさせるのいずれでもありうる。

【００１７】

本明細書で使用されるところの「障害」若しくは「遺伝障害」という用語は、野生型タンパク質のアミノ酸配列中の挿入、変化若しくは欠失と関連するいかなる疾患、障害若し

くは状態も指すのに本明細書を通じて使用される。別の方法で明記されない限り、こうした障害は、遺伝性及び／若しくは非遺伝性の遺伝障害、並びに乳児期若しくは小児期の間に身体症状を明示しないことができる疾患及び状態を包含する。

【００１８】

一般に、ヒトにおける新生児は出生から約２８日齢未満までの乳児を指すことができ；また、乳児は新生児を包含しかつ約１歳までないし２歳までにわたることができる。「若齢の小児」という用語は約１１～１２歳までにわたることができる。

【００１９】

本明細書に提供されるデュアルＣＲＩＳＰ－Ｃａｓベクター系は、１被験体に同時投与される２種の異なるベクター集団の組合せを利用する。これらベクターは、一緒に若しくは別個に配合されかつ本質的に同時に、好ましくは同一経路により送達されうる。下の作業実施例はＡＡＶベクターの使用を記述する。以下の議論はＡＡＶベクターに焦点を当てている一方、異なる、部分的に若しくは全体的に組込むウイルス（例えば別のパルボウイルス若しくはレンチウイルス）を、遺伝子編集ベクター及び／若しくはテンプレートを運搬するベクターの代わりに該系中で使用しうることが理解されるであろう。

【００２０】

一例において、デュアルベクター系は、（ａ）障害（例えば肝代謝障害）をもたらす１個若しくはそれ以上の突然変異を有する標的遺伝子を含んでなる、標的細胞（例えば肝細胞）中でのその発現を指図する調節配列の制御下に編集酵素の遺伝子を含んでなる遺伝子編集ベクター、並びに（ｂ）該編集酵素により特異的に認識される１配列及びドナーテンプレートを含んでなるターゲッティングベクターを含んでなり、該ドナーテンプレートは標的遺伝子中の突然変異の最低１個を置換する核酸配列を含んでなる。

【００２１】

一態様において、遺伝子編集ベクターは編集酵素としてＣａｓ９遺伝子を含んでなり、かつ、ターゲッティングベクターは、標的遺伝子中の選択された１部位に特異的に結合しかつＣａｓ９により特異的に認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に対し５’である、長さ最低２０ヌクレオチドであるｓｇＲＮＡを含んでなる。典型的には、対応するｓｇＲＮＡに対するＰＡＭ配列はドナーテンプレート上で突然変異されている。しかしながら、別の態様において、遺伝子編集ベクターは異なるＣｒｉｓｐｒを含有しうる。

【００２２】

「Ｃａｓ９」（ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９）は、２個のシグネチャーヌクレアーゼドメインＲｕｖＣ（非コーディング鎖を切断する）及びＨＮＨ（コーディング鎖）を特徴とするＲＮＡ誘導性ＤＮＡエンドヌクレアーゼのファミリーを指す。Ｃａｓ９の適する細菌供給源は、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）（ＳａＣａｓ９）、化膿性連鎖球菌（Ｓｔａｐｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（ＳｐＣａｓ９）及び髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｅｓ）を包含する［ＫＭ Ｅｓｔｅｌｔら、Ｎａｔ Ｍｅｔｈ、１０：１１１６－１１２１（２０１３）］。野生型コーディング配列を本明細書に記述される構築物中で利用しうる。あるいは、これら細菌のコドンは、例えば多様な既知のヒトコドン最適化アルゴリズムのいずれかを使用してヒトにおける発現のため最適化される。あるいは、これら配列は完全に若しくは部分的にのいずれかで合成で製造しうる。下の実施例において、ｃａｓ９の黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）（ＳａＣａｓ９）及び化膿性連鎖球菌（Ｓｔａｐｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（ＳｐＣａｓ９）バージョンが比較された。ＳａＣａｓ９はより短い配列を有する。類似の特性をもつ他のエンドヌクレアーゼを場合によっては代用しうる。例えば、ｈｔｔｐ：／／ｃｒｉｓｐｒ．ｕ－ｐｓｕｄ．ｆｒ／ｃｒｉｓｐｒでアクセス可能な公的ＣＲＩＳＰＲデータベース（ｄｂ）を参照されたい。

【００２３】

別の態様において、選択されるＣＲＩＳＰＲ系は、本明細書に記述される方法において

クラス２のＣＲＩＳＰＲすなわちタイプＩＩ　Ｃａｓ９に基づく系の代わりに使用しうるＣｐｆ１（プレボテラ属（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ）及びフランシセラ属（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ）からのＣＲＩＳＰＲ）でありうる。対照的に、Ｃｐｆ１の好ましいＰＡＭは５’－ＴＴＮであり；これは、ゲノム位置及びＧＣ含量双方においてＳｐＣａｓ９（５’－ＮＧＧ）及びＳａＣａｓ９（５’－ＮＮＧＲＲＴ；Ｎ＝いずれかのヌクレオチド；Ｒ＝アデニン若しくはグアニン）のものと対照的である。最低１６種のＣｐｆ１ヌクレアーゼの一方、２種のヒト化ヌクレアーゼ（ＡｓＣｐｆ１及びＬｂＣｐｆ１）がとりわけ有用である。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｄｄｇｅｎｅ．ｏｒｇ／６９９８２／ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ／＃ｄｅｐｏｓｉｔｏｒ－ｆｕｌｌ（ＡｓＣｐｆ１配列；及びｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｄｄｇｅｎｅ．ｏｒｇ／６９９８８／ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ／＃ｄｅｐｏｓｉｔｏｒ－ｆｕｌｌ（ＬｂＣｐｆ１配列）（引用することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい。さらに、Ｃｐｆ１はｔｒａｃｒＲＮＡを必要とせず；Ｃａｓ９に比較してより短いガイドＲＮＡ（約４２ヌクレオチド）の使用を可能にする。プラスミドは公的プラスミドデータベースＡｄｄｇｅｎｅから得ることができる。

【００２４】

該系は、テンプレートベクターに対する遺伝子編集ベクターの比が約１に対し約１である場合に有効であり得る一方、テンプレートベクターが遺伝子編集ベクターを超過して存在することが望ましい。一態様において、ターゲッティングベクター（ｂ）に対する編集ベクター（ａ）の比は約１：３ないし約１：１００若しくは約１：１０である。ドナーテンプレートに対する遺伝子編集酵素（例えばＣａｓ９若しくはＣｐｆ）のこの比は、該酵素がＡＡＶベクター以外の供給源により付加的に若しくは代替に供給される場合であっても維持されうる。こうした態様は下でより詳細に論考される。

【００２５】

多様な慣習的ベクターエレメントを、標的細胞への編集ベクターの送達及び酵素（Ｃａｓ９若しくはＣｐｆ１）の発現のため使用しうる。しかしながら、突然変異若しくは肝細胞中の表現型を特徴とする代謝障害の処置のため設計されるデュアルベクター系について、酵素が肝特異的プロモーターの制御下で発現されるような遺伝子編集ベクターを設計しうる。本明細書に記述される具体的に説明するプラスミド及びベクターは、肝特異的プロモーターチロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）若しくはＴＢＧの新規の短縮されたバージョン、すなわち配列：

ａｃｔｃａａａｇｔｔｃａａａｃｃｔｔａｔｃａｔｔｔｔｔｔｇｃｔｔｔｇｔｔｃｃｔｃｔｔｇｇｃｃｔｔｇｇｔｔｔｔｇｔａｃａｔｃａｇｃｔｔｔｇａａａａｔａｃｃａｔｃｃｃａｇｇｇｔｔａａｔｇｃｔｇｇｇｇｔｔａａｔｔｔａｔａａｃｔａａｇａｇｔｇｃｔｃｔａｇｔｔｔｔｇｃａａｔａｃａｇｇａｃａｔｇｃｔａｔａａａａａｔｇｇａａａｇａｔｇｔｔｇｃｔｔｔｃｔｇａｇａｇａ（配列番号３）

を特徴とする、本明細書でＴＢＧ－Ｓ１と命名されるバリアントを使用する。

【００２６】

あるいは、他の肝特異的プロモーターを使用しうる［例えば、肝特異的遺伝子プロモーターデータベース（Ｔｈｅ　Ｌｉｖｅｒ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｇｅｎｅ　Ｐｒｏｍｏｔｅｒ　Ｄａｔａｂａｓｅ）、コールドスプリングハーバー、ｈｔｔｐ：／／ｒｕｌａｉ．ｓｃｈｌ．ｅｄｕ／ＬＳＰＤ、α１アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）；ヒトアルブミン　Ｍｉｙａｔａｋｅら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７１：５１２４　３２（１９９７）、ｈｕｍＡｌｂ；及びＢ型肝炎ウイルスコアプロモーター、Ｓａｎｄｉｇら、Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．、３：１００２　９（１９９６）を参照されたい］。ＴＴＲミニマルエンハンサー／プロモーター、αアンチトリプシンプロモーター、ＬＳＰ（８４５ｎｔ）。異なる標的組織（例えば上皮細胞、ＣＮＳ）について、異なる組織特異的プロモーターを選択しうる。内皮細胞に特異的なプロモーターの例は、限定されるものでないが、エンドセリン－Ｉ（ＥＴ－Ｉ）、Ｆｌｔ－Ｉ、ＦｏｘＪ１（繊毛細胞を標的とする）及びＴ３^{b}［Ｈ　Ａｉｈａｒａら、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ、Ｖｏｌ．４６３（Ｉｓｓｕｅｓ１－２）、ｐ．１８５－１８８（１９９９年１２月１０日）（腸上皮細胞を標的とする）、Ｅ－カドヘリンプロモー

ター（Ｊ．Ｂｅｈｒｅｎｓら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ、Ｖｏｌ．８８：１１４９５－１１４９９（１９９１年１２月）］、ＣＥＡプロモーターを挙げることができる。ニューロン特異的プロモーターの例は、例えば、シナプシンＩ（ＳＹＮ）、カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＩＩ、チューブリンαＩ、微小管結合タンパク質１Ｂ（ＭＡＰ１Ｂ）、ニューロン特異的エノラーゼ（Ａｎｄｅｒｓｅｎら、Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．、１３：５０３－１５（１９９３））及び血小板由来増殖因子β鎖プロモーター、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター（Ｐｉｃｃｉｏｌｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８：５６１１－５（１９９１））、並びにニューロン特異的ｖｇｆ遺伝子プロモーター（Ｐｉｃｃｉｏｌｉら、Ｎｅｕｒｏｎ、１５：３７３－８４（１９９５））、ニューロン核（ＮｅｕＮ）、グリア繊維酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）、大腸腺腫症（ＡＰＣ）、並びにイオン化カルシウム結合アダプター分子１（Ｉｂａ－１）、ＨＢ９のミニマルプロモーター［Ｓ Ｐ ｆａｆｆ、Ｎｅｕｒｏｎ（１９９９）２３：６７５－６８７；Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９９）２３：７１－７５］を包含する。組織非特異的プロモーターもまた使用し得る。場合によってはこうしたプロモーターはエンハンサーでありうる（例えばサイトメガロウイルス）。あるいは、構成的プロモーター、調節可能なプロモーター［例えば第ＷＯ ２０１１／１２６８０８号明細書及び第ＷＯ ２０１３／０４９４９３号明細書（本明細書に引用することにより組み込まれる）を参照されたい］、若しくは生理学的合図に応答性のプロモーターのような他のプロモーターを、本明細書に記述されるベクター中で利用しうる。あるいは、異なる標的組織について、場合によっては、調節可能な系を選択する場合、第三のベクターが調節機能を提供するために必要とされうる。

【００２７】

発現エンハンサーエレメントは、遺伝子編集ベクター中で使用しうる他の慣習的ベクターエレメントの１つである。１つの望ましいエンハンサーは新規のＡＢＰＳ２（短縮されたＡＢＰエンハンサーエレメントの２個の反復配列）：
ｇｔｔａａｔｔｔｔｔａａａｃｔｇｔｔｔｇｃｔｃｔｇｇｔｔａａｔａａｔｃｔｃａｇｇ
ａｇｇｔｔａａｔｔｔｔｔａａａｃｔｇｔｔｔｇｃｔｃｔｇｇｔｔａａｔａａｔｃｔｃａ
（配列番号４）
である。

【００２８】

しかしながら、他の適するエンハンサーは、例えば、とりわけ、αフェトプロテインエンハンサー、ＴＴＲミニマルプロモーター／エンハンサー、ＬＳＰ（ＴＨ結合グロブリンプロモーター／α１ミクログロブリン／ビクニンエンハンサー）を包含しうる。なお他のプロモーター及びエンハンサーを肝及び／若しくは他の組織を標的とするのに使用し得る。他の適するベクターエレメントもまた本遺伝子編集ベクター中に包含しうる。しかしながら、酵素（Ｃａｓ９若しくはＣｐｆ１）遺伝子のサイズ及びＡＡＶのパッケージングの制限が、こうしたエレメントの切断すなわち短縮バージョンを選択することを望ましくするのである。従って、例えばＳＶ４０及びウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）を包含する慣習的ポリアデニン配列を選択しうる一方、短縮かつ／若しくは合成のポリアデニンもまた望ましいことができる。

【００２９】

遺伝子編集ベクターに加え、デュアルＡＡＶベクター系は、ｓｇＲＮＡ及びドナーテンプレートを含んでなるＡＡＶターゲッティングベクターである第二の種類のベクターを利用する。場合によっては、１個より多いｓｇＲＮＡを遺伝子修正の率を改良するため使用し得る。「ｓｇＲＮＡ」という用語は「ｓｉｎｇｌｅ－ｇｕｉｄｅ ＲＮＡ」を指す。ｓｇＲＮＡは特異的ＤＮＡ結合のための最低２０塩基配列（若しくは約２４～２８塩基）（標的ＤＮＡに相同）を有する。ｓｇＲＮＡの転写は正確にその５’端で開始すべきである。テンプレートＤＮＡ鎖を標的とする場合、ｓｇＲＮＡの塩基対形成領域は転写される配列と同一の配列同一性を有する。テンプレート以外のＤＮＡ鎖を標的とする場合、ｓｇＲＮＡの塩基対形成領域は転写される配列の逆相補物である。場合によっては、ターゲッテ

ィングベクターは１個より多いｓｇＲＮＡを含有しうる。ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓ９（若しくはＣｐｆ１）酵素により特異的に認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に対し５’である。典型的には、ｓｇＲＮＡはＰＡＭ配列に対し「すぐ」（ｉｍｍｅｄｉａｔｅｌｙ）５’である。すなわちスペーサー若しくは介在配列が存在しない。ＯＴＣ欠損症を引き起こすＯＴＣ遺伝子中の突然変異を修正するために設計されるｓｇＲＮＡ及びＰＡＭ配列の例を下に具体的に説明する。より具体的には、以下の標的配列が、正しい配列を含有するフラグメントを挿入（若しくはノックイン）することによりｗｔ　ＯＴＣのｎｔ２４３に対応する位置のＯＴＣ欠損症と関連するＧ／Ａ突然変異を修正するために設計される［例えば、イントロン及びエクソンのゲノムＤＮＡ配列及び同定について、Ｇｅｎｂａｎｋエントリ Ｄ００２３０．２、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｎｕｃｃｏｒｅ／－Ｄ００２３０．２を参照されたい］。

【００３０】

一般に、ＳａＣａｓ９のＰＡＭ配列はＮＮＧＲＲＴモチーフを有する。選択される標的配列が一旦選択されれば、該標的を含んでなるｓｇＲＮＡ及びＰＡＭ配列を、合成で若しくは慣習的部位特異的突然変異誘発を使用して生成しうる。オルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）遺伝子の修正を具体的に説明する下の実施例において、標的ＤＮＡはＧ／Ａ突然変異部位に対し３’であるイントロン４内にある。しかしながら、他の適する標的部位を修正のため標的とされる他の突然変異について選択しうる。例えばｈｔｔｐ：／／ｏｍｉｍ．ｏｒｇ／ｅｎｔｒｙ／３１１２５０を参照されたい。

【００３１】

【表１－１】

表 1

対立遺伝子バリアント（29 の選択された例）				
番号	表現型	突然変異	dbSNP	ClinVar
.0001	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, DEL		RCV000011733
.0002	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG109GLN	rs68026851	RCV000083434, RCV000011734
.0003	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG109TER	rs67960011	RCV000083433, RCV000011735
.0004	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, LEU111PRO	rs1800324	RCV000011736
.0005	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, GLN216GLU	rs72558423	RCV000011737, RCV000083523
.0006	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, GLU154TER	rs72556267	RCV000011738, RCV000083446
.0007	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, LEU45PRO	rs72554312	RCV000083338, RCV000011739
.0008	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG26GLN	rs68031618	RCV000011740, RCV000083565
.0009	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, LYS46ARG	rs1800321	RCV000079082, RCV000011741
.0010	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG245TRP		RCV000011742
.0011	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, GT-GC, INTRON	rs72558431	RCV000011743, RCV000083544

【００３２】

【表１－２】

対立遺伝子バリアント（29 の選択された例）				
番号	表現型	突然変異	dbSNP	ClinVar
	バミラーゼ欠損症	7		
.0012	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, GTA-GTG, INTRON 7		RCV000011744
.0013	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, IVS4, A-T, -2	rs66556380	RCV000083419, RCV000011745
.0014	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG277TRP	rs72558454	RCV000083586, RCV000011746
.0015	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, PRO225LEU	rs67120076	RCV000083536, RCV000011747
.0016	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, GLU87LYS	rs72554338	RCV000011748, RCV000083376
.0017	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, GLY50TER	rs67486158	RCV000083346, RCV000011749
.0018	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, GLY162ARG	rs66626662	RCV000083456, RCV000011750
.0019	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, 1-BP DEL, 403G		RCV000011751
.0020	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, IVS2, G-A, -1		RCV000011752
.0021	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, GLY47GLU	rs72554331	RCV000011753, RCV000083369
.0022	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG62THR	rs72554345	RCV000083388, RCV000011754

【００３３】

【表１－３】

対立遺伝子バリアント（29の選択された例）				
番号	表現型	突然変異	dbSNP	ClinVar
.0023	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, LEU272PHE	rs72558465	RCV000011755, RCV000083607
.0024	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, TYR313ASP	rs66469337	RCV000011756, RCV000083325
.0025	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG129HIS	rs66656800	RCV000011757, RCV000083414
.0026	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, LEU148PHE	rs66741318	RCV000083441, RCV000011758
.0027	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, MET206ARG	rs72558412	RCV000011759, RCV000083513
.0028	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG40CYS	rs72554307	RCV000083332, RCV000011760
.0029	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC, ARG40HIS	rs72554308	RCV000083333, RCV000011761

【００３４】

ＯＴＣＤに関連する突然変異、挿入及び／若しくは欠失のより広範囲の一覧が、例えば

ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ００４８０（本明細書に引用することにより組み込まれる）に提供される。これ及び／若しくは他の障害における他の誤りを修正するための適する標的部位を選択しうる。例えば、ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔは他疾患、例えば嚢胞性線維症［ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ１３５６９；またＯＭＩＭ：２１９７００］、ＭＰＳＩＨ［ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ３５４７５；ＯＭＩＭ：６０７０１４］；血友病Ｂ［第ＩＸ因子、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ００４５１］；血友病Ａ［第ＶＩＩＩ因子、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ００４５１］と関連する突然変異の一覧を提供する。なお他の疾患並びに関連する突然変異、挿入及び／若しくは欠失をこのデータベースへの参照から得ることができる。他の適する情報源は、例えばｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ｇｏｖ／１０００１２００；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｋｕｍｃ．ｅｄｕ／ｇｅｃ／ｓｕｐｐｏｒｔ／；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｏｏｋｓ／ＮＢＫ２２１８３／を包含しうる。

【００３５】

それらが遺伝子の機能的な部分の発現を破壊しないような標的部位を選択する。場合によっては、１個より多い修正を、本明細書に記述される系を使用して標的遺伝子に対し行ってよい。適しては、ドナーテンプレートが修正されるべき遺伝子突然変異若しくは表現型の上流に挿入されるような、遺伝子フラグメントであるドナーテンプレートを送達するベクターを設計する。

【００３６】

一代替として、完全長の機能性遺伝子を、欠陥のある遺伝子を置換するためゲノム中に挿入しうる。従って、一態様において、挿入される配列は、完全長の遺伝子又は機能的なタンパク質若しくは酵素をコードする遺伝子でありうる。完全長の遺伝子を送達している場合、ターゲッティングのための標的遺伝子内により大きい融通性が存在する。別の代替として、単一エクソンを欠陥のあるエクソンの上流に挿入しうる。別の代替において、遺伝子欠失若しくは挿入を修正し得る。

【００３７】

なお別の態様において、本明細書に記述される組成物を、望ましくなく高い発現レベルを有する遺伝子の発現を低下させるために使用する。こうした遺伝子は、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）コレステロールの受容体に結合するＰＣＳＫ９であることができ；ＰＣＳＫ９発現を低下させることは循環ＬＤＬコレステロールレベルを増大させるのに使用し得る。癌関連遺伝子（例えばＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２）を標的とするためのなお他の遺伝子。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｅｕｐｅｄｉａ．ｃｏｍ／ｇｅｎｅｔｉｃｓ／ｃａｎｃｅｒ＿ｒｅｌａｔｅｄ＿ｓｎｐ．ｓｈｔｍｌもまた参照されたい。

【００３８】

本明細書に詳細に記述されるデュアルＡＡＶベクター系は、肝（肝細胞）における遺伝子異常を特徴とする代謝性肝障害の正確なｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子修正のためｓｇＲＮＡおよびドナーテンプレートＲＮＡを発現する。本系は新生児のベクター送達にとりわけ良好に適する。一態様において、新生児の処置は、分娩後８時間、最初の１２時間、最初の２４時間若しくは最初の４８時間以内又は約２８日までに処置を送達することと定義される。別の態様において、とりわけ霊長類について、新生仔の送達は、約１２時間ないし約１週、２週、３週若しくは約１か月の期間内、又は約２４時間ないし約４８時間後である。場合によっては、該系は出生前送達、乳児、年長の小児及び／若しくは成人における送達のため使用しうる。同一の系は、適切なドナー配列及びｓｇＲＮＡが該系中に組込まれる場合に多様な障害を修正するのにもまた適応させ得る。ＡＡＶキャプシドの選択及び異なる種類のベクター系の選択を包含する対応する変更もまた、ベクターエレメントの選択に対し行うことができる。

【００３９】

今日までに実施された１研究において、デュアルＡＡＶ８ベクター系が、新生児のベク

ター送達後に肝細胞の約２５％のＯＴＣ突然変異の正確なｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子修正のためｓｇＲＮＡ及びドナーテンプレートＤＮＡを発現するのに使用されている。これは、効率的な遺伝子送達及び肝細胞中でのＣＲＩＳＰＲ媒介性の遺伝子修正がＡＡＶベクター系を使用して示された最初であると考えられる。

【００４０】

ＡＡＶ８が作業実施例において本明細書に記述されるとは言え、多様な異なるＡＡＶキャプシドが記述されておりかつ使用しうるが、とは言え肝を優先的に標的としかつ／若しくは高効率で遺伝子を送達するＡＡＶがとりわけ望ましい。ＡＡＶ８の配列は例えば米国特許第７７９０４４９号明細書；米国特許第７２８２１９９明細書に記述されており、そして多様なデータベースから入手可能である。実施例は同一キャプシドを有するＡＡＶベクターを利用する一方、遺伝子編集ベクター及びＡＡＶターゲッティングベクターのキャプシドは同一のＡＡＶキャプシドである。別の適するＡＡＶは例えばｒｈ１０［第ＷＯ２００３／０４２３９７号明細書］でありうる。なお他のＡＡＶ供給源は、例えば、ＡＡＶ９［第ＵＳ　７，９０６，１１１号明細書；第ＵＳ　２０１１－０２３６３５３－Ａ１号明細書］及び／若しくはｈｕ３７［例えば第ＵＳ　７，９０６，１１１号明細書；第ＵＳ　２０１１－０２３６３５３－Ａ１号明細書を参照されたい］、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、［米国特許第７７９０４４９号明細書；米国特許第７２８２１９９号明細書］並びに他を包含しうる。これら及び他の適するＡＡＶの配列について、並びにＡＡＶベクターの生成方法について、例えば、第ＷＯ　２００３／０４２３９７号明細書；第ＷＯ　２００５／０３３３２１号明細書、第ＷＯ　２００６／１１０６８９号明細書；米国特許第７７９０４４９号明細書；米国特許第７２８２１９９号明細書；第ＵＳ　７５８８７７２Ｂ２号明細書を参照されたい。なお他のＡＡＶを、選択されるＡＡＶキャプシドの組織選好度を場合によっては考慮に入れて選択しうる。

【００４１】

組換えＡＡＶベクター（ＡＡＶウイルス粒子）は、５’ＡＡＶ　ＩＴＲ、本明細書に記述される発現カセット及び３’ＡＡＶ　ＩＴＲを含有する核酸分子をＡＡＶキャプシド内にパッケージングされて含みうる。本明細書に記述されるところの発現カセットは、各発現カセット内の読み取り枠（１個若しくは複数）のための調節エレメントを含有することができ、また、該核酸分子は場合によっては付加的な調節エレメントを含有しうる。

【００４２】

ＡＡＶベクターは完全長のＡＡＶ　５’末端逆位配列（ＩＴＲ）及び完全長の３’ＩＴＲを含有しうる。Ｄ配列及び末端分解部位（ｔｅｒｍｉｎａｌ　ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｓｉｔｅ）（ｔｒｓ）が欠失されているΔＩＴＲと命名される短縮バージョンの５’ＩＴＲが記述されている。略語「ｓｃ」は自己相補性を指す。「自己相補性ＡＡＶ」は、組換えＡＡＶ核酸配列により運搬されるコーディング領域が分子内二本鎖ＤＮＡテンプレートを形成するよう設計されている構築物を指す。感染に際して、第二鎖の細胞媒介性の合成を待機するよりはむしろ、ｓｃＡＡＶの２本の相補性の半分が会合して、即座の複製及び転写の準備ができている１個の二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）単位を形成することができる。例えば、Ｄ　Ｍ　ＭｃＣａｒｔｙら、“Ｓｅｌｆ－ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒｕｓ（ｓｃＡＡＶ）ｖｅｃｔｏｒｓ　ｐｒｏｍｏｔｅ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ　ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔｌｙ　ｏｆ　ＤＮＡ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ”、Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ、（２００１年8月）、Ｖｏｌ　８、Ｎｕｍｂｅｒ　１６、１２４８－１２５４ページを参照されたい。自己相補性ＡＡＶは、例えば米国特許第６，５９６，５３５号明細書；同第７，１２５，７１７号明細書；及び同第７，４５６，６８３号明細書（それらのそれぞれはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されている。

【００４３】

シュードタイピングされたＡＡＶが産生されるはずである場合、ＩＴＲをキャプシドの

ＡＡＶ供給源と異なる供給源から選択する。例えば、ＡＡＶ２　ＩＴＲを、選択された細胞受容体、標的組織若しくはウイルス標的について特定の効率を有するＡＡＶキャプシドを伴う使用のため選択しうる。一態様において、ＡＡＶ２からのＩＴＲ配列若しくはその欠失バージョン（ΔＩＴＲ）を、便宜上及び規制当局の承認を促進するために使用する。しかしながら他のＡＡＶ供給源からのＩＴＲを選択しうる。ＩＴＲの供給源がＡＡＶ２からでありかつＡＡＶキャプシドが別のＡＡＶ供給源からである場合、生じるベクターはシュードタイピングされたと呼ばれることができる。しかしながらＡＡＶ　ＩＴＲの他の供給源を利用しうる。

【００４４】

一本鎖ＡＡＶウイルスベクターを使用しうる。被験体への送達に適するＡＡＶウイルスベクターの生成及び単離方法は当該技術分野で既知である。例えば、米国特許第７７９０４４９号；米国特許第７２８２１９９号明細書；第ＷＯ　２００３／０４２３９７号明細書；第ＷＯ　２００５／０３３３２１号明細書、第ＷＯ　２００６／１１０６８９号明細書；及び第ＵＳ　７５８８７７２　Ｂ２号明細書を参照されたい］。１系において、産生体細胞株を、ＩＴＲにより隣接されている導入遺伝子をコードする構築物並びにｒｅｐ及びｃａｐをコードする構築物（１種若しくは複数）で一過性にトランスフェクトする。第二の系において、ｒｅｐ及びｃａｐを安定に供給するパッケージング細胞株を、ＩＴＲにより隣接されている導入遺伝子をコードする構築物で（一過性に若しくは安定に）トランスフェクトする。これらの系のそれぞれにおいて、ＡＡＶビリオンがヘルパーアデノウイルス若しくはヘルペスウイルスへの感染に反応して産生され、汚染するウイルスからのｒＡＡＶの分離を必要とする。より最近、ＡＡＶを回収するためのヘルパーウイルスへの感染を必要としない系が開発された－必要とされるヘルパー機能（すなわちアデノウイルスＥ１、Ｅ２ａ、ＶＡ及びＥ４、若しくはヘルペスウイルスＵＬ５、ＵＬ８、ＵＬ５２及びＵＬ２９、並びにヘルペスウイルスポリメラーゼ）もまた該系によりトランスに供給される。これらのより新しい系において、ヘルパー機能は、必要とされるヘルパー機能をコードする構築物での細胞の一過性トランスフェクションにより供給し得るか、又は、細胞を、その発現を転写若しくは転写後レベルで制御し得るヘルパー機能をコードする遺伝子を安定に含有するよう操作し得る。なお別の系において、ＩＴＲ及びｒｅｐ／ｃａｐ遺伝子により隣接されている導入遺伝子を、バキュロウイルスに基づくベクターへの感染により昆虫細胞中に導入する。これら産生系に関する総説については、全般として、例えばＺｈａｎｇら、２００９、“Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ－ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒｕｓ　ｈｙｂｒｉｄ　ｆｏｒ　ｌａｒｇｅ－ｓｃａｌｅ　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒｕｓ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ”、Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２０：９２２－９２９（それらのそれぞれの内容はそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい。これら及び他のＡＡＶ産生系の作成及び使用方法は、以下の米国特許（その内容はそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）：第５，１３９，９４１号明細書；第５，７４１，６８３号明細書；第６，０５７，１５２号明細書；第６，２０４，０５９号明細書；第６，２６８，２１３号明細書；第６，４９１，９０７号明細書；第６，６６０，５１４号明細書；第６，９５１，７５３号明細書；第７，０９４，６０４号明細書；第７，１７２，８９３号明細書；第７，２０１，８９８号明細書；第７，２２９，８２３号明細書；及び第７，４３９，０６５号明細書にもまた記載されている。

【００４５】

別の態様において、組込みベクター例えばヘルペスウイルス若しくはレンチウイルスを包含する他のウイルスベクターを使用しうるとは言え、他のウイルスを選択しうる。適しては、これら他のベクターの１種を生成する場合、それは複製欠損ウイルスベクターとして産生される。「複製欠損ウイルス」若しくは「ウイルスベクター」は、目的の遺伝子を含有する発現カセットがウイルスキャプシド若しくはエンベロープ中にパッケージングされている合成若しくは人工ウイルス粒子を指し、ここでウイルスキャプシド若しくはエンベロープ内にまたパッケージングされているいかなるウイルスゲノム配列も複製欠損であ

り；すなわち、それらは子孫ビリオンを生成し得ないがしかし標的細胞を感染させる能力を保持する。一態様において、該ウイルスベクターのゲノムは、複製するために必要とされる酵素をコードする遺伝子を包含しない（該ゲノムは「臆病（ｇｕｔｌｅｓｓ）」であるように操作し得る－人工ゲノムの増幅及びパッケージングに必要とされるシグナルにより隣接されている目的の導入遺伝子のみを含有する）が、しかしこれら遺伝子は産生の間に供給されうる。

【００４６】

１個若しくはそれ以上の遺伝子欠失、挿入若しくは突然変異と関連する多様な異なる疾患及び状態を、本明細書に記述される方法を使用して処置しうる。こうした状態の例は、例えば、α１アンチトリプシン欠損症、肝の状態（例えば胆道閉鎖症、アラジール症候群、α１アンチトリプシン、チロシン血症、新生児肝炎、ウィルソン病）、ビオチニダーゼ欠損症、糖タンパク質糖鎖不全症候群（ＣＤＧＳ）、クリグラー・ナジャー症候群、尿崩症、ファブリー病、ガラクトース血症、グルコース－６－リン酸脱水素酵素（Ｇ６ＰＤ）、脂肪酸酸化障害、グルタル酸尿症、低リン血症、クラッベ病、乳酸アシドーシス、リソソーム蓄積病、マンノース症、神経代謝性（ｎｅｕｒｏ－ｍｅｔａｂｏｌｉｃ）ミトコンドリア性メープルシロップ尿、有機酸血症、ＰＫＵ、プリン、ピルビン酸脱水素酵素欠損症、尿素サイクルの状態、ビタミンＤ欠乏症及び高シュウ酸尿症のような代謝性の状態を包含しうる。尿素サイクル障害は、例えば、Ｎ－アセチルグルタミン酸合成酵素欠損症、カルバモイルリン酸合成酵素Ｉ欠損症、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、「ＡＳ欠損症」すなわちシトルリン血症、「ＡＬ欠損症」すなわちアルギニノコハク酸尿症及び「アルギナーゼ欠損症」すなわちアルギニン血症を包含する。

【００４７】

他の疾患もまた本明細書に記述される方法に従った処置のため選択しうる。こうした疾患は、例えば、嚢胞性線維症（ＣＦ）、血友病Ａ（欠陥のある第ＶＩＩＩ因子を伴う）、血友病Ｂ（欠陥のある第ＩＸ因子を伴う）、ムコ多糖症（ＭＰＳ）（例えばハンター症候群、ハーラー症候群、マロトー・ラミー症候群、サンフィリポ症候群、シャイエ症候群、モルキオ症候群、他者、ＭＰＳＩ、ＭＰＳＩＩ、ＭＰＳＩＩＩ、ＭＳＩＶ、ＭＰＳ　７）；運動失調（例えばフリードライヒ運動失調症、脊髄小脳変性症、毛細血管拡張性運動失調症、本態性振戦、痙性対麻痺）；シャルコー・マリー・トゥース病（例えば腓骨筋萎縮症、遺伝性運動感覚性ニューロパシー）、糖原病（例えばＩ型グルコース－６－ホスファターゼ欠損症、フォンギールケ病）、ＩＩ型（αグルコシダーゼ欠損症、ポンペ病）、ＩＩＩ型（脱分枝酵素欠損症、コリ病）、ＩＶ型（脱分枝酵素欠損症、アンダーソン病）、Ｖ型（筋グリコーゲンホスホリラーゼ欠損症、マッカードル病）、ＶＩＩ型（筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症、タウリ病）、ＶＩ型（肝ホスホリラーゼ欠損症、ハース病）、ＩＸ型（肝グリコーゲンホスホリラーゼキナーゼ欠損症）を包含する。この一覧は網羅的でなく、そして他の遺伝性の状態が同定されており、例えば、ｗｗｗ．ｋｕｍｃ．ｅｄｕ／ｇｅｃ／ｓｕｐｐｏｒｔ；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ｇｏｖ／１０００１２００；及びｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｏｏｋｓ／ＮＢＫ２２１８３／（引用することにより本明細書に組み込まれる）。

【００４８】

他の障害は中枢神経系（ＣＮＳ）関連障害を包含する。本明細書で使用されるところの「ＣＮＳ関連障害」は中枢神経系の疾患若しくは状態である。こうした障害は、脊髄、脳、若しくは脳及び脊髄を取り巻く組織に影響しうる。ＣＮＳ関連障害の制限しない例は、パーキンソン病、リソソーム蓄積症、虚血、神経因性疼痛、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）（例えばスーパーオキシドジスムターゼＳＯＤ１をコードする遺伝子中の突然変異に結び付けられる）、多発性硬化症（ＭＳ）及びカナバン病（ＣＤ）、又は原発若しくは転移癌を包含する。

【００４９】

別の態様において、例えば網膜色素変性及び／若しくはレーバー先天黒内症（ＬＣＡ）の処置のため、網膜色素上皮（ＲＰＥ）及び光受容器を包含する網膜の細胞が標的とされ

る。場合によっては、この処置は網膜下注入を利用若しくはこれに続くことができ、かつ／又は該状態のための標準治療とともに使用しうる。

【００５０】

一局面において、該方法は、障害を有する被験体に同時投与することを含んでなる障害を処置することにおいて有用である。該デュアルＡＡＶ系は、（ａ）障害をもたらす１個若しくはそれ以上の突然変異を有する標的遺伝子を含んでなる標的細胞（例えば肝細胞若しくは肺細胞）中でのその発現を指図する調節配列の制御下にＣａｓ９（若しくはＣｐｆ１）遺伝子を含んでなる遺伝子編集ＡＡＶベクター；並びに（ｂ）ｓｇＲＮＡおよびドナーテンプレートを含んでなるＡＡＶターゲッティングベクターを使用し、該ｓｇＲＮＡは標的遺伝子中の選択された１部位に特異的に結合しかつＣａｓ９（若しくはＣｐｆ１）により特異的に認識されるＰＡＭに対し５’（若しくは３’）である最低２０ヌクレオチドを含んでなり、かつ、該ドナーテンプレートは、標的遺伝子中の突然変異の最低１個を置換する核酸配列を含んでなりかつＰＡＭ配列が突然変異されており；（ｂ）が（ａ）を超過するような、（ｂ）に対する（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターの比である。ヒトにおける障害を処置するための、若しくは障害の処置のための医薬品の製造における、本明細書に記述されるところのベクター系の使用もまた提供される。

【００５１】

一態様において、該方法は新生児若しくは乳児で使用される。あるいは、該方法はより高齢の被験体で使用される。一局面において、本発明は：肝代謝障害を有する被験体に同時投与することを含んでなる、新生児における肝代謝障害の処置方法を提供する。該デュアルＡＡＶ系は、（ａ）肝代謝障害をもたらす１個若しくはそれ以上の突然変異を有する標的遺伝子を含んでなる、肝細胞中でのその発現を指図する調節配列の制御下にＣａｓ９（若しくはＣｐｆ１）遺伝子を含んでなる遺伝子編集ＡＡＶベクター；並びに（ｂ）ｓｇＲＮＡおよびドナーテンプレートを含んでなるＡＡＶターゲッティングベクターを使用し、該ｓｇＲＮＡは、標的遺伝子中の選択された１部位に特異的に結合しかつ該酵素により特異的に認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に対し５’若しくは３’である最低２０ヌクレオチドを含んでなり、かつ、該ドナーテンプレートは、標的遺伝子中の突然変異の最低１個を置換する核酸配列を含んでなり、かつ、ｓｇＲＮＡに対応するＰＡＭが突然変異されており；（ｂ）が（ａ）を超過するような、（ｂ）に対する（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターの比である。新生児被験体における肝代謝障害を処置するための、（ａ）肝代謝障害をもたらす１個若しくはそれ以上の突然変異を有する標的遺伝子を含んでなる肝細胞中でのその発現を指図する調節配列の制御下にＣａｓ９遺伝子を含んでなる遺伝子編集ＡＡＶベクター；並びに（ｂ）ｓｇＲＮＡ及びドナーテンプレートを含んでなるＡＡＶターゲッティングベクターの使用であって、該ｓｇＲＮＡは標的遺伝子中の選択された１部位に特異的に結合しかつＣａｓ９により特異的に認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に対し５’である最低２０ヌクレオチドを含んでなり、かつ、該ドナーテンプレートは、標的遺伝子中の突然変異の最低１個を置換する核酸配列を含んでなり、（ｂ）が（ａ）を超過するような、（ｂ）に対する（ａ）の遺伝子編集ＡＡＶベクターの比である使用か、又は、肝代謝障害の処置のための医薬品の製造におけるこれらベクターの使用もまた提供される。

【００５２】

一態様において、ターゲッティングベクターに対する編集ベクターの比は、介在する比を包含する約１：３ないし約１：１００である。例えば、ターゲッティングベクターに対する編集ベクターの比は、約１：５ないし約１：５０若しくは約１：１０又は約１：２０でありうる。好ましいようでないとは言え、該比は１：１でありうるか、若しくはより多くのターゲッティングベクターが存在しうる。

【００５３】

一般に、ＡＡＶベクターの比は粒子コピー（ｐｔ）若しくはゲノムコピー（ＧＣ）に基づき決定され、これらの用語は各ベクターについて本明細書で互換性に使用しうる。適しては、２種若しくはそれ以上のＡＡＶベクターの相互に対する（例えばターゲッティング

ベクターに対する編集ベクター）比を決定する場合、同一の方法を使用して各種類のベクター（１種若しくは複数）の数を決定する。しかしながら、異なる方法が実質的に同等であることが決定される場合は異なる技術を使用しうる。ゲノムコピー（ＧＣ）の適する決定方法は記述されており、そして、例えば、例えばＭ．Ｌｏｃｋら、Ｈｕ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ、Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１４ Ａｐｒ；２５（２）：１１５－２５．ｄｏｉ：１０．１０８９／ｈｇｔｂ．２０１３．１３１．電子出版２０１４年２月１４日（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されるところのｏｑＰＣＲ若しくはデジタルドロップレットＰＣＲ（ｄｉｇｉｔａｌ ｄｒｏｐｌｅｔ ＰＣＲ）（ｄｄＰＣＲ）を包含する。

【００５４】

伝統的遺伝子増強治療と異なる一方、新生児における本明細書に記述されるところの遺伝子編集媒介性の修正は再投与を必要としないことができる。しかしながら、場合によっては、本明細書に提供されるデュアルベクターＣｒｉｓｐｒ／酵素系の同時投与を必要とする第二の若しくはその後の追加の処置を続行しうる。例えば、患者を新生児として処置しかつ／又は標的細胞が増殖細胞（例えば肝細胞、上皮細胞若しくは癌細胞）である場合、その後の処置が望ましいことができる。こうしたその後の処置は、１か月、数か月、１年若しくは数年だけ第一の処置に続くことができる。場合によっては、その後の処置は初回処置に利用されたと異なるキャプシドを有するベクターを利用しうる。例えば、初回処置がＡＡＶ８によった場合、第二の処置はｒｈ１０を利用しうる。別の例において、初回処置がｒｈ１０を利用した場合、その後の処置はＡＡＶ８を利用しうる。ＡＡＶキャプシドのなお他の組合せを当業者により選択しうる。

【００５５】

本明細書に記述される組成物は、いずれかの適する経路若しくは多様な経路の組合せによるそれの必要な被験体への送達のため設計される。肝疾患の処置のために肝への直接若しくは肝内送達が望ましく、かつ、場合によっては、例えば肝門脈、肝静脈、胆管を介する静脈内送達を介して若しくは移植により実施しうる。あるいは他の投与経路を選択しうる（例えば、経口、吸入、鼻内、気管内、動脈内、眼内、静脈内、筋肉内及び他の非経口経路）。例えば、静脈内送達を増殖、前駆及び／若しくは幹細胞への送達のため選択しうる。あるいは、別の送達経路を選択しうる。本明細書に記述される送達構築物は単一組成物若しくは複数組成物中で送達しうる。場合によっては、２種若しくはそれ以上の異なるＡＡＶを送達しうる［例えば第ＷＯ ２０１１／１２６８０８号明細書及び第ＷＯ ２０１３／０４９４９３号明細書を参照されたい］。別の態様において、こうしたデュアルベクター系は単一のＡＡＶ及び第二の異なるＣａｓ９送達系のみを含有しうる。例えば、Ｃａｓ９（若しくはＣｐｆ１）送達は、例えばミセル、リポソーム、カチオン脂質－核酸組成物、ポリグリカン組成物及び他のポリマー、脂質及び／若しくはコレステロールに基づく核酸複合物、並びに本明細書に記述されるような他の構築物を包含する多様な送達組成物及びナノ粒子と結合されている；ウイルス以外の構築物例えば「裸のＤＮＡ」、「裸のプラスミドＤＮＡ」、ＲＮＡ及びｍＲＮＡにより媒介しうる。例えば、Ｘ．Ｓｕら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ、２０１１、８（３）、ｐｐ ７７４－７８７；ウェブ公表：２０１１年３月２１日；第ＷＯ２０１３／１８２６８３号明細書、第ＷＯ ２０１０／０５３５７２号明細書及び第ＷＯ ２０１２／１７０９３０号明細書（その双方は引用することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい。こうしたウイルス以外の送達構築物を以前に記述された経路により投与しうる。

【００５６】

ウイルスベクター又はウイルス以外のＤＮＡ若しくはＲＮＡ移入部分は、遺伝子移入及び遺伝子治療の応用における使用のため生理学的に許容できる担体と配合し得る。ＡＡＶウイルスベクターの場合、ゲノムコピー（「ＧＣ」）の定量を該製剤中に含有される用量の尺度として使用しうる。当該技術分野で既知のいずれの方法も、本発明の複製欠損ウイルス組成物のゲノムコピー（ＧＣ）数を決定するのに使用し得る。ＡＡＶのＧＣ数滴定の１実施方法は後に続くとおりである：精製されたＡＡＶベクターサンプルをまずＤＮアー

ゼで処理して、被包化されていないＡＡＶゲノムＤＮＡ若しくは汚染するプラスミドＤＮＡを製造工程から排除する。ＤＮアーゼ耐性粒子をその後熱処理にかけてキャプシドからゲノムを放出させる。放出されたゲノムをその後、該ウイルスゲノムの特定領域（通常ポリアデニンシグナル）を標的とするプライマー／プローブ組を使用するリアルタイムＰＣＲにより定量する。複製欠損ウイルス組成物は、約１．０×10^{9}ＧＣないし約１．０×10^{15}ＧＣ（体重が７０ｋｇの平均的被験体を処置するため）、及び好ましくはヒト患者について１．０×10^{12}ＧＣないし１．０×10^{14}ＧＣの範囲にある複製欠損ウイルスの量を含有するよう投薬単位中に配合し得る。好ましくは、製剤中の複製欠損ウイルスの用量は、１．０×10^{9}ＧＣ、５．０×10^{9}ＧＣ、１．０×10^{10}ＧＣ、５．０×10^{10}ＧＣ、１．０×10^{11}ＧＣ、５．０×10^{11}ＧＣ、１．０×10^{12}ＧＣ、５．０×10^{12}ＧＣ若しくは１．０×10^{13}ＧＣ、５．０×10^{13}ＧＣ、１．０×10^{14}ＧＣ、５．０×１０１４ＧＣ又は１．０×10^{15}ＧＣである。

【００５７】

レンチウイルスの産生は本明細書に記述されるとおり測定され、かつ容量（例えばｍＬ）あたりＩＵとして表現される。ＩＵは感染単位、若しくは、あるいは形質導入単位（ＴＵ）であり；ＩＵ及びＴＵはウイルスベクター粒子製剤の力価の量的尺度として互換性に使用し得る。レンチウイルスベクターは典型的に組込む。ウイルス粒子の量は最低約３×10^{6}ＩＵであり、そして最低約１×10^{7}ＩＵ、最低約３×10^{7}ＩＵ、最低約１×10^{8}ＩＵ、最低約３×10^{8}ＩＵ、最低約１×10^{9}ＩＵ若しくは最低約３×10^{9}ＩＵであり得る。

【００５８】

加えて、本明細書に記述されるデュアルベクター系は、酵素（Ｃａｓ９若しくはＣｐｆ１）を運搬するＡＡＶ以外のベクターと組合せの本明細書に記述されるところのＡＡＶベクターの同時投与を必要としうる。例えば、該酵素は、異なるベクターを介して、又はｍＲＮＡ若しくはＤＮＡ単独を介して、又はＣａｓ９のＡＡＶベクター媒介性の送達と組合せで送達しうる。例えば、Ｃａｓ９（若しくはＣｐｆ１）配列は、当該技術分野で既知である多数の担体系の１つを使用するＲＮＡの形態（例えばｍＲＮＡ）での発現若しくは送達のための担体系を介することができる。こうした担体系は、ＰｈａｓｅＲｘのいわゆる「ＳＭＡＲＴＴ」技術のような商業的実体により提供されるものを包含する。これらの系は標的宿主細胞への送達のためブロックコポリマーを利用する。例えば、２０１１年１１月１２４日公開の“Ｍｕｌｔｉｂｌｏｃｋ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ（マルチブロックポリマー）”と題された第ＵＳ ２０１１／０２８６９５７号明細書；２０１１年１１月１７日公開の第ＵＳ ２０１１／０２８１３５４号明細書；２０１３年７月３１日公開の第ＥＰ２６２０１６１号明細書；及び２０１５年２月５日公開の第ＷＯ ２０１５／０１７５１９号明細書を参照されたい。Ｓ．Ｕｃｈｉｄａら、（Ｆｅｂ ２０１３）ＰＬｏＳ ＯＮＥ ８（２）：ｅ５６２２０もまた参照されたい。なお他の方法は、合成ｄｓＲＮＡを生成及び注入すること［Ｓｏｕｔｓｃｈｅｋら Ｎａｔｕｒｅ（２００４）４３２（７０１４）：１７３－８を参照されたい；Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙら Ｈｅｐａｔｏｌ．（２００５）４１（６）：１３４９－５６もまた参照されたい］を必要とし、肝への局所投与もまた、腎静脈カテーテル法を使用する肝を取り巻く循環系中に二本鎖ＲＮＡを直接注入することにより示されている。［Ｈａｍａｒら ＰＮＡＳ（２００４）１０１（４１）：１４８８３－８を参照されたい。］。なお他の系は、カチオン複合体若しくはリポソーム製剤を使用するｄｓＲＮＡ及びとりわけｓｉＲＮＡの送達を必要とする［例えばＬａｎｄｅｎら Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．（２００６）５（１２）を参照されたい；Ｋｈｏｕｒｙら Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．（２００６）５４（６）：１８６７－７７もまた参照されたい。他のＲＮＡ送達技術は例えばＶｅｒｉｔａｓ Ｂｉｏからもまた入手可能である［例えば、第ＵＳ ２０１３／０３２３００１号明細書、２０１０年１２月２３日、“Ｉｎ ｖｉｖｏ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｄｏｕｂｌｅ ｓｔｒａｎｄｅｄ ＲＮＡ ｔｏ ａ ｔａｒｇｅｔ ｃｅｌｌ（標的細胞への二本鎖ＲＮＡのｉｎ ｖｉｖｏ送達）”（ＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ、発現されたｓｉＲＮＡ／ｓｈＲＮＡ／ｍ

ｉＲＮＡ、並びに注入／導入されたｓｉＲＮＡ／ｓｈＲＮＡ／ｍｉＲＮＡ、若しくはおそらくなお、外小胞（ｅｘｏｖｅｓｉｃｌｅ）内にパッケージングされサイトゾル中に存在しかつ肝のような遠位部位に輸送されるトランスフェクトされたＤＮＡを包含するサイトゾル内容物）を参照されたい］。ＲＮＡ配列のｉｎ　ｖｉｖｏ送達のためのなお他の系が記述されている。例えば、第ＵＳ　２０１２／０１９５９１７号明細書（２０１２年８月２日）（安定性を改良しかつＲＮＡ発現を増大させるためのＲＮＡの５’キャップアナログ）、第ＷＯ　２０１３／１４３５５５Ａ１号明細書、２０１３年１０月３日を参照されたく、及び／若しくは商業的に入手可能である（ＢｉｏＮＴｅｃｈ、独国；Ｖａｌｅｒａ（マサチューセッツ州ケンブリッジ）；Ｚａｔａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）。

【００５９】

ＤＮＡ及びＲＮＡは一般にナノグラム（ｎｇ）ないしマイクログラム（μｇ）量の核酸で測定される。一般に、ヒトにおける処置のため、好ましくは、ＲＮＡの投薬量は１ｎｇないし７００μｇ、１ｎｇないし５００μｇ、１ｎｇないし３００μｇ、１ｎｇないし２００μｇの範囲であるか、若しくは１ｎｇないし１００μｇが配合かつ投与される。類似の投薬量のかつウイルスベクターを介して被験体に送達されないＤＮＡ分子（例えばＣａｓ９若しくは他の発現カセットを含有する）を、非ウイルスのＤＮＡ送達構築物のため利用しうる。

【００６０】

上述された組換えベクター若しくは他の構築物は公表された方法に従って宿主細胞に送達しうる。ベクター若しくは他の部分は、好ましくは生理学的に適合性の担体に懸濁され、ヒト若しくはヒト以外の哺乳動物患者に投与しうる。適する担体は、該移入ウイルスが向けられる適応症を考慮して当業者により容易に選択されうる。例えば、１種の適する担体は、多様な緩衝溶液と配合しうる生理食塩水（例えばリン酸緩衝生理食塩水）を包含する。他の例示的担体は、滅菌生理食塩水、乳糖、ショ糖、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ラッカセイ油、ゴマ油及び水を包含する。担体の選択は本発明の制限でない。

【００６１】

場合によっては、本発明の組成物は、ｒＡＡＶ及び担体（１種若しくは複数）に加え、保存剤若しくは化学的安定化剤のような他の慣習的製薬学的成分を含有しうる。適する例示的保存剤は、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化イオウ、没食子酸プロピル、パラベン類、エチルバニリン、グリセリン、フェノール及びパラクロロフェノールを包含する。適する化学的安定化剤はゼラチン及びアルブミンを包含する。

【００６２】

本明細書に記述される系は、十分な量の機能的な酵素若しくはタンパク質が患者の状態を改良するために生成される場合に治療上有用でありうる。ある態様において、健康な患者の５％くらい低い遺伝子発現レベルが、遺伝子治療以外のアプローチに対し患者が処置可能であるために十分な治療効果を提供することができる。他の態様において、遺伝子発現レベルは、ヒト（他の家畜被験体）において観察される正常範囲（レベル）の最低約１０％、最低約１５％ないし１００％までである。例えば、「機能的な酵素」により、野生型酵素（例えばＯＴＣアーゼ）の生物学的活性レベルの最低約５０％、最低約７５％、最低約８０％、最低約９０％若しくは約同一又は１００％超を提供する野生型酵素をコードする遺伝子、或いは疾患と関連しないその天然のバリアント若しくは多形を意味される。より具体的には、ヘテロ接合性の患者は約５０％若しくはより低いくらい低い酵素機能レベルを有しうるため、有効な処置は、「正常」すなわち欠損していない患者の範囲内のレベルまでの酵素活性の補充を必要としないかもしれない。同様に、検出可能な量の酵素を有しない患者は、１００％の活性レベル未満まで酵素機能を送達することにより救済されることができ、かつ、場合によってはその後さらなる処置にかけることができるかもしれない。ある態様において、遺伝子機能がドナーテンプレートにより送達されている場合、患者は、「正常な」健康被験体で見出されるより高いレベルを発現しうる。なお他の態様において、遺伝子発現の低下が所望される場合、約２０％低下ないし５０％低下、若しく

は約１００％までの低下が所望の利益を提供しうる。本明細書に記述されるところの、本明細書に記述される治療は、他の処置すなわち該被験体の（患者の）診断のための標準治療とともに使用しうる。

【００６３】

多様なアッセイがＯＴＣの発現および活性レベルをｉｎ ｖｉｔｒｏで測定するため存在する。例えば、Ｘ Ｙｅら、１９９６ Ｐｒｏｌｏｎｇｅｄ ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ｃｏｒｒｅｃｔｉｏｎ ｉｎ ａｄｕｌｔ ｏｒｎｉｔｈｉｎｅ ｔｒａｎｓｃａｒｂａｍｙｌａｓｅ－ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ ｍｉｃｅ ｗｉｔｈ ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７１：３６３９－３６４６を参照されたい）若しくはｉｎ ｖｉｖｏ。例えば、ＯＴＣ酵素活性は、［１，２，３，４，５－１３Ｃ５］シトルリン（９８％１３Ｃ）に対し正規化されたシトルリンの形成を検出するための液体クロマトグラフィー質量分析安定同位体希釈法を使用して測定し得る。該方法は、Ｎ－アセチルグルタミン酸合成酵素活性の検出のため以前に開発されたアッセイ［Ｍｏｒｉｚｏｎｏ Ｈら、Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｔａｍａｔｅ ｓｙｎｔｈａｓｅ．Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ Ｍｅｔａｂ．２００４；８１（Ｓｕｐｐｌ １）：Ｓ４－１１．］から翻案されている。新鮮凍結肝の破片の重量を測定し、そして１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、２．０ｍＭ ＥＤＴＡ及び０．５ｍＭ ＤＴＴを含有する緩衝液中で短時間均質化する。均質化緩衝液の容量を５０ｍｇ／ｍｌ組織を得るよう調節する。酵素活性は、５０ｍＭトリス酢酸、４ｍＭオルニチン、５ｍＭカルバミルリン酸、ｐＨ８．３中で２５０μｇの肝組織を使用して測定する。酵素活性を、５０ｍＭトリス酢酸 ｐＨ８．３に溶解された新鮮調製された５０ｍＭカルバミルリン酸の添加で開始し、２５℃で５分間進行させ、そして等容量の３０％ＴＣＡ中５ｍＭ１３Ｃ５－シトルリンの添加によりクエンチする。破片を５分の微小遠心分離により分離し、そして上清を質量分析のためバイアルに移す。１０μＬのサンプルを、９３％溶媒Ａ（１Ｌ水中１ｍｌトリフルオロ酢酸）：７％溶媒Ｂ（１Ｌの１：９ 水／アセトニトリル中１ｍｌトリフルオロ酢酸）の移動相を用いるアイソクラチック条件下にＡｇｉｌｅｎｔ １１００シリーズＬＣ－ＭＳ中に注入する。シトルリン［１７６．１質量電荷比（ｍ／ｚ）］及び１３Ｃ５－シトルリン（１８１．１ｍ／ｚ）に対応するピークを定量し、そしてそれらの比を、各アッセイとともに分析されるシトルリンの標準曲線について得られる比と比較する。サンプルを、全肝組織、若しくはＢｉｏ－Ｒａｄタンパク質アッセイキット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）を使用して測定されるタンパク質濃度いずれかに対し正規化する。肝生検を必要としない他のアッセイもまた使用しうる。１つのこうしたアッセイは、グルタミンおよびシトルリンの比を評価する血漿アミノ酸アッセイであり、そして、グルタミンが高く（＞８００マイクロリットル／リットル）かつシトルリンが低い（例えば１桁）場合は尿素サイクルの欠陥が疑われる。血漿アンモニアレベルを測定し得、そして１リットルあたり約１００マイクロモルの濃度がＯＴＣＤを示す。血液ガスは患者が過換気している場合に評価し得；呼吸性アルカローシスはＯＴＣＤで頻繁である。例えば１ミリモルのクレアチンあたり約２０マイクロモル以上の尿中のオロト酸は、アロプリノール投与試験後の上昇された尿オロト酸がそうであるようにＯＴＣＤを示す。ＯＴＣＤについての診断基準は、Ｔｕｃｈｍａｎら、２００８、Ｕｒｅａ Ｃｙｃｌｅ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ（ＵＣＤＣ）ｏｆ ｔｈｅ Ｒａｒｅ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｎｅｔｗｏｒｋ（ＲＤＣＲＮ）．Ｔｕｃｈｍａｎ Ｍら、Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ ｏｆ ｔｈｅ Ｒａｒｅ Ｄｉｓｅａｓｅｓ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｎｅｔｗｏｒｋ．Ｃｒｏｓｓ－ｓｅｃｔｉｏｎａｌ ｍｕｌｔｉｃｅｎｔｅｒ ｓｔｕｄｙ ｏｆ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｕｒｅａ ｃｙｃｌｅ ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ．Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ Ｍｅｔａｂ．２００８；９４：３９７－４０２（本明細書に引用することにより組み込まれる）に述べられている。ＯＴＣＤの現在の標準治療の議論を提供するｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｏｏｋｓ／ＮＢＫ１５４３７８／もまた参照されたい。

【００６４】
「ある（ａ）」若しくは「ある（ａｎ）」という用語が１若しくはそれ以上を指すことが注目されるべきである。であるから、「ある（ａ）」（又は「ある（ａｎ）」）、「１若しくはそれ以上」及び「最低１」という用語は本明細書で互換性に使用される。
【００６５】
「含んでなる（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含んでなる（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」及び「含んでなる（こと）（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という語は排他的よりはむしろ包括的に解釈されるべきである。「なる（ｃｏｎｓｉｓｔ）」「なる（こと）（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ）」という語及びその変形は包括的よりはむしろ排他的に解釈されるべきである。本明細中の多様な態様は「含んでなる（こと）（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という言語を使用して提示される一方、他の状況下で、関連する態様が「よりなる（こと）（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」若しくは「より本質的になる（こと）（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という言語を使用して解釈かつ記述されることもまた意図している。
【００６６】
本明細書で使用されるところの「約」という用語は、別の方法で明記されない限り、示される参照からの１０％の変動性（±１０％）を意味している。
【００６７】
「被験体」は、哺乳動物、例えばヒト、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、乳牛、ブタ、又はサル、チンパンジー、ヒヒ若しくはゴリラのようなヒト以外の霊長類である。患者はヒトを指す。家畜被験体はヒト以外の哺乳動物を指す。
【００６８】
本明細書で使用されるところの「疾患」、「障害」及び「状態」は、被験体における異常な状態を示すため互換性に使用される。
【００６９】
本明細中で別の方法で定義されない限り、本明細書で使用される技術及び科学用語は、当業者により、及び本出願で使用される用語の多くへの一般的手引きを当業者に提供する刊行された教科書への参照により普遍的に理解されると同一の意味するところを有する。
【００７０】
以下の実施例は具体的説明のみであり、そして本明細書に記述される本発明に対する制限でない。
【００７１】
実施例
【実施例１】
【００７２】
デュアルＡＡＶ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を使用するＯＴＣ欠損症の修正
ヒトにおけるＯＴＣ酵素のＸ連鎖性欠損症は、高アンモニア血症の再発性かつ生命を脅かすエピソードを引き起こす［Ｂａｔｓｈａｗ，Ｍ．ら、Ｍｏｌ　Ｇｅｎｅｔ　Ｍｅｔａｂ、１１３：１２７－１３９（２０１４）；Ｌｉｃｈｔｅｒ－Ｋｏｎｅｔｉ，Ｕら、Ｏｒｎｉｔｈｉｎｅ　Ｔｒａｎｓｃａｒｂａｍｙｌａｓｅ　Ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ（１９９３－２０１３）、Ｐａｇｏｎ　ＲＡ，Ａｄａｍ　ＭＰ，Ａｒｄｉｎｇｅｒ　ＨＨら編者。ＧｅｎｅＲｅｖｉｅｗｓ（登録商標）（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｏｏｋｓ／ＮＢＫ１５４３７８／）中］。ＯＴＣ欠損症についてヘミ接合性の男性において、最初のメタボリック・クライシス（ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　ｃｒｉｓｉｓ）は通常新生期に発生し得、及び５０％までの死亡率を伴い；生存者は典型的に生命の最初の１年に肝移植を受ける［Ａｈ　Ｍｅｗら、Ｊ　Ｐｅｄｉａｔｒ、１６２：３２４－３２９、ｅ３２１（２０１３）］。ＯＴＣ欠損症の動物モデル、雄性ｓｐａｒｓｅ　ｆｕｒ　ａｓｈ（ｓｐｆ^{ash}）マウスは、異常なスプライシング並びにＯＴＣのｍＲＮＡ及びタンパク質の２０倍の低下に至るＯＴＣ遺伝子のエクソン４の端の３ドナースプライス部位に点突然変異を有する［Ｈｏｄｇｅｓ，Ｐ．Ｅ．とＲｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｌ．Ｅ．Ｔｈｅ

ｓｐｆ^{ash}ｍｏｕｓｅ：ａ ｍｉｓｓｅｎｓｅ ｍｕｔａｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｏｒｎｉｔｈｉｎｅ ｔｒａｎｓｃａｒｂａｍｙｌａｓｅ ｇｅｎｅ ａｌｓｏ ｃａｕｓｅｓ ａｂｅｒｒａｎｔ ｍＲＮＡ ｓｐｌｉｃｉｎｇ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ８６、４１４２－４１４６（１９８９）］。冒された動物は固形飼料で生存し得るが、しかし、高蛋白餌を摂取して提供される場合に致死性となり得る高アンモニア血症を発症し得る。

【００７３】

本実施例における研究は、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）からのＣａｓ９酵素（ＳｐＣａｓ９）［Ｊｉｎｅｋ，Ｍ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、３３７：８１６－８２１（２０１２）；Ｃｏｎｇ Ｌ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、３３９：８１９－８２３（２０１３）；Ｍａｌｉ Ｐら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、３３９：８２３－８２６（２０１３）］及び黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）（ＳａＣａｓ９）［Ｒａｎ，ＦＡら、Ｎａｔｕｒｅ、５２０：１８６－１９１（２０１５）］を使用して新生ｓｐｆ^{ash}マウスにおいて該点突然変異を修正するために、高肝向性をもつＡＡＶベクター（すなわちＡＡＶ８）を利用した。ＯＴＣ遺伝子のｓｐｆ^{ash}突然変異の近接のプロトスペーサー隣接モチーフ（ｐｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ－ａｄｊａｃｅｎｔ ｍｏｔｉｆ）（ＰＡＭ）配列（ＮＮＧＲＲＴ）を、潜在的２０ｎｔガイド配列がそうであったように同定した。３種の配列ｓｇＲＮＡ１～３（図１Ａ）を、マウスＭＣ５７Ｇ細胞株中へのネオマイシン含有プラスミドのトランスフェクション後にさらに評価した。この細胞株における低いトランスフェクション効率は、ピューロマイシンへの短い曝露によるトランスフェクトされた細胞の濃縮を必要とした。所望の部位での二本鎖切断（ＤＳＢ）の証拠は該３種のガイドＲＮＡの２種を用いるＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイを使用して示された（図４Ａ）。ｓｇＲＮＡ３を伴う欠失挿入形成の非存在により、このガイド配列はさらに追求されなかった。残りの候補ｓｇＲＮＡ１及びｓｇＲＮＡ２は、ＤＳＢ誘導効率（図４Ａ）及びｓｐｆ^{ash}突然変異への近接（図１Ａ）の双方において類似であった。エクソン４内のその場所によりｓｇＲＮＡ２を回避し；エクソン内でのＤＳＢ誘導は相同組換え修復（ＨＤＲ）を伴わない非相同端結合（ＮＨＥＪ）につながり得、それはｓｐｆ^{ash}突然変異に特徴的な残余のＯＴＣ活性を消失させてそれにより残余の尿素生成を低下させ得る。結果として、イントロンのｓｇＲＮＡ１をさらなる実験のため選択した。該ｓｇＲＮＡ１ガイドをその後、ＳａＣａｓ９、及び対応するＰＡＭ配列が突然変異されかつＡｇｅＩ部位がＨＤＲの検出を助長するため包含された突然変異の各側に隣接するおよそ０．９ｋｂの配列をもつドナーＤＮＡでトランスフェクトした。高効率ＨＤＲが、ＳａＣａｓ９、ドナー及びｓｇＲＮＡ１のこの組合せで達成された（図４Ｂ）。

【００７４】

２ベクターアプローチが、全部の成分をＡＡＶ中に組み込むのに必要であった（図１Ｂ）。ベクター１は、ＴＢＧと呼ばれる肝特異的プロモーターからＳａＣａｓ９遺伝子を発現する（その後ＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９と称される）一方、ベクター２はＵ６プロモーターから発現されるｓｇＲＮＡ１配列及び１．８ｋｂのドナーＯＴＣ ＤＮＡ配列を含有する（ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒと称される）。全部の実験において、ｓｐｆ^{ash}仔にベクター１及びベクター２の混合物を出生後第２日にＩＶ注入し、そしてその後欠失挿入形成及びｓｐｆ^{ash}突然変異の機能修正について評価した（図１Ｃ）。

【００７５】

ＳａＣａｓ９によるｉｎ ｖｉｖｏ ＯＴＣ遺伝子修正のためデュアルＡＡＶベクター系を生成するため、われわれは２種のＡＡＶシスプラスミドを構築した：１）ｈＳａＣａｓ９を、完全長ＴＢＧプロモーター（αミクログロブリン／ビクニン遺伝子のエンハンサーエレメント２コピー、次いで肝特異的ＴＢＧプロモーター）及びウシ成長ホルモンポリアデニル化配列を含有するＡＡＶバックボーンプラスミド中にｐＸ３３０．ｈＳａＣａｓ９からサブクローニングし；２）１．８ｋｂのＯＴＣドナーテンプレートをｐＡＡＶバックボーン中にクローン化し、そしてＵ６－ＯＴＣ ｓｇＲＮＡ配列をＡｆｌＩＩ部位に挿入して（図１Ｃ）ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１ｄｏｎｏｒを生じた。ドナーテンプレートＡＡ

Ｖ．ｓｇＲＮＡ１ｄｏｎｏｒ上のＰＡＭ配列を、ＨＤＲ後のＣａｓ９による再切断を予防するために突然変異させ（表１）、そしてＡｇｅＩ部位をＨＤＲの検出を助長するため付加した。非標的化ＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒは、Ｕ６－ＯＴＣ ｓｇＲＮＡカセットからプロトスペーサーを排除することにより標的化ＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１ｄｏｎｏｒと異なる。ピューロマイシン耐性遺伝子を、ｉｎ ｖｉｔｒｏ一過性トランスフェクション後のトランスフェクトされた細胞の選択のためｐＸ３３０．ｈＳａＣａｓ９由来プラスミド中にクローン化した。全部のプラスミド構築物をシークエンシングにより確認した。

【００７６】

Ａ．ベクター構築

ｈＳｐＣａｓ９若しくはｈＳａＣａｓ９でマウスＯＴＣ遺伝子座を編集するため、２０ｎｔの標的配列、例えば下の表及び図１に具体的に説明されるｈＳｐＣａｓ９若しくはｈＳａＣａｓ９標的を、５’－ＮＧＧ プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）若しくは５’－ＮＮＧＲＲＴ ＰＡＭ配列の前に置くために選択した。図１はＳａＣａｓ９標的部位を示す。

【００７７】

【表２】

表2

標的配列	PAM シグネチャー配列	Cas9 の供給源
AGTTTGAAATAAACTTTGGA (配列番号5)	AGG	SpCas9
GAAAAGTTTTACAAACTGAG (配列番号6)	CGG	SpCas9
TCAGAGTTTGAAATAAACTT (配列番号7)	TGG	SpCas9
TCTCTTTTAAACTAACCCAT (配列番号8)	CAGAGT	SaCas9
CACAAGACATTCACTTGGGT (配列番号9)	GTGAAT	SaCas9
AAAGTTTATTTCAAACTCTG (配列番号10)	ATGGGT	SaCas9

【００７８】

３種の標的配列を選択し、そしてｓｇＲＮＡ及びヒト化ＳｐＣａｓ９（ｈＳｐＣａｓ９）を同時発現するｐＸ３３０プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ）中に個別にクローン化した。ＯＴＣドナーテンプレートプラスミドを、テンプレートとしてＣ５７ＢＬ／６マウスから単離されたゲノムＤＮＡを使用してｓｐｆ^{ash}マウスにおいてＧ／Ａ突然変異部位に隣接する１．８ｋｂのフラグメントを増幅することにより構築した。ＡｇｅＩ制限部位をその後、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）ＨＤクローニング系（Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ）（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてドナーテンプレート中に導入した。ｉｎ ｖｉｖｏ ＯＴＣ遺伝子編集（ｈＳｐＣａｓ９）のためのデュアルＡＡＶベクター系を生成するため、２個のＡＡＶシスプラスミドを構築した：１）ｈＳｐＣａｓ９を、２コピーのαミクログロブリン／ビクニン遺伝子の短縮エンハンサーエレメント［ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｎｅ／２５９、２０１５年４月２４日受託］、次いで短縮肝特異的ＴＢＧプロモーター（ＴＢＧ－Ｓ１）及びミニマルポリアデニル化シグナル（ＰＡ７５）（シグナルパターン：ＡＡＴＡＡＡ）［ＧＢ受託番号ＣＮ４８０５８５

、ｈｔｔｐｓ：／／ｆａｓｔｅｒｄｂ．ｌｙｏｎ．ｕｎｉｃａｎｃｅｒ．ｆｒ］を含有するＡＡＶバックボーンプラスミド中にｐＸ３３０からサブクローニングし；２）１．８ｋｂのＯＴＣドナーテンプレートをｐＡＡＶバックボーン中にクローン化し、及びＵ６－ＯＴＣ　ｓｇＲＮＡ配列をＡｆｌＩＩ部位中に挿入した。

【００７９】

黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）からのより小さいサイズのＣａｓ９（ＳａＣａｓ９）が、それをＡＡＶベクター中へのパッケージングに望ましくした。ＦＬＡＧタグ化ＳａＣａｓ９を、ヒトにおけるコドン出現頻度に従ってコドン最適化し（ｈＳａＣａｓ９）、そしてｐＸ３３０．ｈＳａＣａｓ９を、ｐＸ３３０中のｈＳｐＣａｓ９及びｓｇＲＮＡ足場をｈＳａＣａｓ９及びＳａＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ足場で置換することにより構築した。５’ＮＮＧＲＲＴ　ＰＡＭ配列に先行する３種の２０ｎｔ標的配列をＯＴＣ遺伝子編集のため選択した。

【００８０】

具体的に説明するプラスミド配列は付属される配列表中に提供され、そして、ｐＡＡＶ．ＡＢＰＳ２．ＴＢＧ－Ｓ１．ｈＳｐＣａｓ９；ｐＡＡＶ．ＴＢＧ．ｈＳａＣａｓ９．ｂＧＨ；ｐＡＡＶ．Ｕ６．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｍＯＴＣ．Ｔ１．９（ｈＳａＣａｓ９）；ｐＡＡＶ．Ｕ６．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｍＯＴＣ．Ｔ１．８（ｈＳｐＣａｓ９）；ｐＡＡＶ．Ｕ６．ＯＴＣ＼ｓｇＲＮＡ１．ｍＯＴＣ．Ｔ１．８．ＭｆｅＩ＼（ｈＳａＣａｓ９）＼；ｐＡＡＶ．Ｕ６．ＯＴＣ＼ｓｇＲＮＡ１．ｍＯＴＣ．Ｔ１．８．ＭｆｅＩ（ｈＳｐＣａｓ９）；ｐＡＡＶ．Ｕ６．ＯＴＣ＼ｓｇＲＮＡ１．ｍＯＴＣ．Ｔ１．８．ＴＢＧ．ｈＯＴＣｃｏ．ＢＧＨ（ｈＳａＣａｓ９）；ｐＡＡＶ．Ｕ６．ＯＴＣ＼ｓｇＲＮＡ２．ｍＯＴＣ．Ｔ１．８．Ｍ２＼（ｈＳａＣａｓ９）＼；及びｐＡＡＶ．Ｕ６．ｍＯＴＣ＼ｓｇＲＮＡ４．ｍＯＴＣ．Ｔ１．８．ＭｆｅＩ（ｈＳｐＣａｓ９）＼を包含する。

【００８１】

Ｂ．ＯＴＣ　ｓｇＲＮＡ及びドナーテンプレートのｉｎ　ｖｉｔｒｏ検証

ＭＣ５７Ｇ細胞を、増大する量のＡｇｅＩタグ化ＯＴＣドナープラスミド（２５０、５００、１０００ｎｇ）とともにＯＴＣ標的化Ｃａｓ９プラスミド（２５０ｎｇ）で一過性にトランスフェクトし、次いで４日ピューロマイシン濃縮しかつＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイした。ＳｐＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ３及びＳａＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ１は、標的遺伝子座中で欠失挿入を誘導することにおいて最高の効率を示し、そして従ってその後の研究のため選択した。

【００８２】

ドナーテンプレートの量を増大することは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで増大するレベルのＨＤＲをもたらさなかった。非標的化Ｃａｓ９プラスミド（２５０ｎｇ）及びＡｇｅＩタグ化ＯＴＣドナーテンプレート（１０００ｎｇ）のコトランスフェクションは検出可能なＨＤＲをもたらさなかった。矢印はＨＤＲから生じるＡｇｅＩ感受性切断産物を示す。定量を伴わないレーンは検出可能な欠失挿入若しくはＨＤＲを有しなかった。

【００８３】

Ｃ．細胞培養及びトランスフェクション

ＭＣ５７Ｇ細胞（ＡＴＣＣ）を１０％ＦＢＳで補充されたＤＭＥＭ培地中で維持し、そして５％CO_2を伴い３７℃で培養した。細胞株はＡＴＣＣからの受領に際して直接使用し、そして、本物であることを証明せず、若しくはマイコプラズマ汚染について試験しなかった。ｉｎ　ｖｉｔｒｏの標的及び／若しくはドナーテンプレート試験のため、プラスミドを、製造元の推奨に従って、Ｐｌｕｓ™試薬を伴うＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＬＴＸ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用してＭＣ５７Ｇ細胞中にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞は、トランスフェクトされた細胞を濃縮するため、ピューロマイシン（４μｇ　mL^{-1}）選択下に４日間あった。

【００８４】

Ｄ．ゲノムＤＮＡ抽出及びＳＵＲＶＥＹＯＲ（登録商標）アッセイ

トランスフェクトされたＭＣ５７Ｇ細胞からのゲノムＤＮＡを、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａ

ｃｔ　ＤＮＡ抽出溶液（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して抽出した。個々のｓｇＲＮＡの効率を、構築のためのプライマー及び配列並びにドナーテンプレート及びｓｇＲＮＡプラスミドの分析を提供する下の表３に列挙されるＰＣＲプライマーを使用するＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃｓ）により試験した。

【００８５】

【表３－１】

表 3

ID	プライマー配列 (5'->3')	配列番号	注
WT 配列	GAAAGTCTCACAGACACCGCTCGGTTTGTAA AACTTTTCTTCCTTCCAAAGTTTATTTCAAACT CTGATGGGTTAGTTTAAAAGAGAAGATG	11	OTC エクソン 4 及びイントロン 4 の一部
spf^{ash} 配列	GAAAGTCTCACAGACACCGCTCAGTTTGTAA AACTTTTCTTCCTTCCAAAGTTTATTTCAAACT CTGATGGGTTAGTTTAAAAGAGAAGATG	12	*spf*^{ash} G->A 突然変異
OTC ドナー配列 (SpCas9, 892-983 bp)	AAAGTCTCACAGACACCGCTCGGTTTGTAAA ACTTTTCTTCCTTGCAAAGTTTATTTCAAACTC TGATGGGTTAGTTTAAAAGAGAAGATG	13	PAM 突然変異
OTC ドナー配列 (SaCas9, 892-989 bp)	GAAAGTCTCACAGACACCGCTCGGTTTGTAA AACTTTTCTTCCTTCCAAAGTTTACCGGT ATTTCAATTGGTGATGGGTTAGTTTAAAAGAG AAGATG	14	PAM 突然変異; AgeI 制限部位挿入
OTC sgRNA1_Fwd	CACCGTCTCTTTTAAACTAACCCAT	15	OTC 標的配列 1
OTC sgRNA1_Rev	AAACATGGGTTAGTTTAAAAGAGAC	16	OTC 標的配列 1

【００８６】

【表３－２】

ID	プライマー配列 (5'->3')	配列番号	注
OTC sgRNA2_Fwd	CACCGCACAAGACATTCACTTGGGT	17	OTC 標的配列 2
OTC sgRNA2_Rev	AAACACCCAAGTGAATGTCTTGTGC	18	OTC 標的配列 2
OTC sgRNA3_Fwd	CACCGAAAGTTTATTTCAAACTCTG	19	OTC 標的配列 3
OTC sgRNA3_Rev	AAACCAGAGTTTGAAATAAACTTTC	20	OTC 標的配列 3
HDR-Fwd	TGGAGCAATTCTGCACATGGA	21	RFLP 分析のための OTC PCR
HDR-Rev	CTTACTGAACATGGCAGTTTCCC	22	RFLP 分析のための OTC PCR
OTC_PointM_F	GGCTATGCTTGGGAATGTCCT	23	Surveyor アッセイのための OTC PCR

【００８７】

【表３－３】

ID	プライマー配列 (5'->3')	配列番号	注
OTC_PointM_R	GCTACAGAATGAAAGAGAGGCG	24	Surveyor アッセイのための OTC PCR
mOTC hSpCas9 sgRNA1_Fwd	CACCGAGTTTGAAATAAACTTTGGA	25	hSpCas9 の mOTC 標的配列 1
mOTC hSpCas9 sgRNA1_Rev	AAACTCCAAAGTTTATTTCAAACTC	26	
mOTC hSpCas9 sgRNA2_Fwd	CACCGAAAAGTTTTACAAACTGAG	27	hSpCas9 の mOTC 標的配列 2
mOTC hSpCas9 sgRNA2_Rev	AAACCTCAGTTTGTAAAACTTTTC	28	
mOTC hSpCas9 sgRNA3_Fwd	CACCGTCAGAGTTTGAAATAAACTT	29	hSpCas9 の mOTC 標的配列 3
mOTC hSpCas9 sgRNA3_Rev	AAACAAGTTTATTTCAAACTCTGAC	30	
mOTC hSaCas9 sgRNA1_Fwd	CACCGTCTCTTTTAAACTAACCCAT	31	hSaCas9 の mOTC 標的配列 1

【００８８】

【表３－４】

ID	プライマー配列 (5'->3')	配列番号	注
mOTC hSaCas9 sgRNA1_Rev	AAACATGGGTTAGTTTAAAAGAGAC	32	
mOTC hSaCas9 sgRNA2_Fwd	CACCGCACAAGACATTCACTTGGGT	33	hSaCas9 の mOTC 標的配列 2
mOTC hSaCas9 sgRNA2_Rev	AAACACCCAAGTGAATGTCTTGTGC	34	
mOTC hSaCas9 sgRNA3_Fwd	CACCGAAAGTTTATTTCAAACTCTG	35	hSaCas9 の mOTC 標的配列 3
mOTC hSaCas9 sgRNA3_Rev	AAACCAGAGTTTGAAATAAACTTTC	36	

【００８９】

Ｅ．ＡＡＶ８ベクター製造

本研究で使用された全部のベクターは、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）に基づく三重トランスフェクションにより２９３細胞中にＡＡＶ血清型８キャプシドでパッケージングし、上清接線流濾過（ＴＦＦ）から濃縮し、そして以前に記述された（Ｌｏｃｋ　Ｍら、２０１０）ところのイオジキサノールグラジエント超遠心分離法によりさらに精製した。ＡＡＶベクターのゲノム力価（ＧＣ／ｍｌ$^{-1}$）を定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）により測定した。本研究で使用された全部のベクターは、ＱＣＬ－１０００発色性ＬＡＬ試験キット（Ｃａｍｂｒｅｘ　Ｂｉｏ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を使用するエンドトキシンアッセイに合格した。

【００９０】

Ｆ．動物

ｓｐｆ^{ash}マウスは、以前に記述された［ＭＬ　Ｂａｔｓｈａｗら、Ｍｏｌ　Ｇｅｎｅｔ　Ｍｅｔａｂ、１１３：１２７－１３０（２０１４）］とおり、ペンシルバニア大学のトランスレーショナルリサーチ研究所（Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）の動物施設で飼育した。全部の動物手順は、ペンシルバニア大学の動物実験委員会（Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ）（ＩＡＣＵＣ）により承認されたプロトコルに従って実施した。交尾ケージを出生について毎日監視した。新生（出生後第２日、ｐ２）雄性仔が、記述された［Ｄａｌｙ，ＴＭら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ、２４６：１９５－１９９（２００４）］とおり、５０μｌの容量中のそれぞれについて意図された用量の２種のベクターの混合物の側頭静脈注入を受領した。非処置ＷＴ、ｓｐｆ^{ash}ヘテロ接合性（Ｈｅｔ）及びｓｐｆ^{ash}ヘミ接合性マウスが対照としてはたらいた。マウスをベクター処置後１、３若しくは８週に屠殺しそして肝サンプルを分析のため収集した。マウスを離乳時若しくは剖検の時点で遺伝子型判定して遺伝子型を確認した。

【００９１】

ＯＴＣ修正の有効性を試験するため、高蛋白餌（４０％タンパク質、Ａｎｉｍａｌ　Ｓｐｅｃｉａｌｔｉｅｓ＆Ｐｒｏｖｉｓｉｏｎｓ）を７週齢マウスに７日間与えた。この時間後に、血漿を、Ｓｉｇｍａアンモニアアッセイキット（Ａｍｍｏｎｉａ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ）を使用する血漿NH_3の測定のため収集した。残存するサンプルは、ＡＬＴ、ＡＳＴ及び総ビリルビンの測定のためＡｎｔｅｃｈ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓに送付した。

【００９２】

新生雄性仔の同腹子全体が試験若しくは対照いずれかのベクターを注入されかつ特定のランダム化法を使用しなかったことに注意されたい。以下のアッセイは、研究者がベクターの性質若しくはベクター用量を知らなかった盲検化様式で実施した：ベクター注入、ＯＴＣ及びＣａｓ９（ＦＬＡＧ）免疫染色及び定量、肝での組織病理学分析、ＯＴＣ酵素活性アッセイ、並びに遺伝子発現解析及びＲＴ－ｑＰＣＲ。

【００９３】

成体の遺伝子編集実験は８ないし１０週齢の雄性ｓｐｆ^{ash}マウスにおいて実施した。低用量群の動物は、ＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（１×１０^{11}ＧＣ）及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ（１×１０^{12}ＧＣ）若しくは同一用量の非標的化ベクターの尾静脈注入を受領し、そしてそれらを注入後３週に分析のため屠殺した。高用量群の動物は、ＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９（１×１０^{12}ＧＣ）及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ（５×１０^{12}ＧＣ）若しくは同一用量の非標的化ベクターの尾静脈注入を受領し、そしてそれらを注入後２週に分析のため屠殺した。

【００９４】

Ｇ．ＯＴＣ免疫染色

ＯＴＣ発現についての免疫蛍光を凍結肝切片で実施した。凍結切片（８μｍ）を風乾し、そして４％パラホルムアルデヒド（全部の溶液がリン酸緩衝生理食塩水中）中で１０分間固定した。切片をその後透過処理し、そして１％ロバ血清を含有する０．２％Ｔｒｉｔｏｎ中で３０分間ブロッキングした。１％ロバ血清中１：１０００希釈されたウサギ抗ＯＴＣ抗体［Ａｕｇｕｓｔｉｎ，Ｌ．ら、Ｐｅｄｉａｔｒ　Ｒｅｓ、４８：８４２－８４６

（２０００）］を使用して切片を１ｈインキュベートした。洗浄後、切片を、１％ロバ血清中テトラメチルローダミン（ＴＲＩＴＣ）結合ロバ抗ウサギ抗体（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｓ）で３０ｍｉｎ染色し、洗浄しかつＶｅｃｔａｓｈｉｅｌｄ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｓ）を用いてマウントした。

【００９５】

いくつかの切片を、中心周囲の肝細胞についてのマーカーとしてのグルタミン合成酵素に対するモノクローナル抗体（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、クローン６、カタログ番号６１０５１７）、次いでフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）標識ロバ抗マウス抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カタログ番号７１５－０９５－１５０）で追加染色した。二重染色は、２種の一次及び二次抗体をそれぞれ混合すること並びに上のプロトコルに従うことにより実施した。他の切片は、二次抗体溶液にＬＥＬを１：５００の希釈で添加することにより、フルオレセイン標識トマトレクチン（トマト（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍ）レクチン、ＬＥＬ；Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カタログ番号ＦＬ－１１７１）で対染色した。

【００９６】

Ｃａｓ９発現は、モノクローナル抗体Ｍ２（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｆ１８０４）を使用するＦＬＡＧタグについての免疫染色を介してパラフィン包埋肝からの切片で検出された。パラフィン切片を、抗原回収段階（１０ｍＭクエン酸緩衝液、ｐＨ６．０中で６ｍｉｎ沸騰）を伴う標準的プロトコルに従って処理した。染色は、製造元の説明書に従ってマウス・オン・マウス（ｍｏｕｓｅ－ｏｎ－ｍｏｕｓｅ）（ＭＯＭ）キット（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して実施した。

【００９７】

ＯＴＣを発現する肝細胞のパーセンテージを定量化するため、１０個のランダムな画像を、ＯＴＣ発現について染色された各肝切片から１０倍対物レンズを用いて撮影した。小型の肝切片のみが利用可能であったいくつかの場合においては５画像のみを撮影した。ＩｍａｇｅＪソフトウェア（Ｒａｓｂａｎｄ Ｗ．Ｓ．、米国国立保健研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，ＵＳＡ）；ｈｔｔｐ：／／ｒｓｂ．ｉｎｆｏ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｉｊ／）を使用して、画像をＯＴＣ陽性領域について閾値設定し（ｔｈｒｅｓｈｏｌｄｅｄ）（すなわちＯＴＣ陽性領域を選択した）、そしてＯＴＣ陽性領域のパーセンテージを各画像について決定した。第二の測定において、画像を「空の」領域（例えば静脈及び類洞）について閾値設定して、肝組織により占有されない領域のパーセンテージを決定した。これは、肝組織の弱いバックグラウンド蛍光の存在の結果として可能であった。ＯＴＣ陽性の肝組織（すなわちＯＴＣ陽性肝細胞）の最終的パーセンテージをその後、補正された領域（総領域－空の領域）あたりで計算し、そして値を各肝について平均した。

【００９８】

Ｃａｓ９陽性肝細胞のパーセンテージを決定するため、各肝からの２切片を分析し、一方はＣａｓ９について染色し（ＦＬＡＧタグを介して）、他方の切片は全部の核を標識するためヘマトキシリンで染色した。各切片からの３画像を１０倍対物レンズを用いて撮影し、そしてＣａｓ９陽性若しくはヘマトキシリン染色された肝細胞核のいずれかの数を、染色された肝細胞核を選択かつ計数することを可能にするＩｍａｇｅＪの“Ａｎａｌｙｚｅ Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ”ツールを使用して決定した。他の細胞型からのヘマトキシリン染色された核は、大きさ及び真円度パラメータに基づき排除し得た。Ｃａｓ９陽性核のパーセンテージをその後、ヘマトキシリン染色された切片中で見える肝細胞核の総数に基づき計算した。

【００９９】

ＯＴＣ活性の組織化学的染色のため、薄片にされた肝組織（２ｍｍ）を固定し、包埋し、薄片を作り（８μｍ）、そして以前に記述された［Ｙｅ，Ｘ．ら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．、２７１：３６３９－３６４６（１９９６）］とおりＯＴＣ酵素活性の組織学的染

色のためスライド上にマウントした。ヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色を、標準的プロトコルに従って処理かつ染色されたパラフィン包埋肝サンプルからの切片で実施した。切片を非処置動物からの肝と比較してあらゆる異常について分析した。

【０１００】

Ｈ．ＯＴＣ酵素活性アッセイ

ＯＴＣ酵素活性を、改変を伴う以前に記述された［Ｍｏｒｉｚｏｎｏ，Ｈら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．、３２２（Ｐｔ２）：６２５－６３１（１９９７）］とおり肝ライセート中でアッセイした。全肝断片を液体窒素中で凍結し、そしてＯＴＣ測定を実施するまで－８０℃で保存した。１ｍＬあたり５０ｍｇ肝組織のホモジェネートを、Ｐｏｌｙｔｒｏｎホモジェナイザー（Ｋｉｎｅｍａｔｉｃａ ＡＧ）を用い５０ｍＭトリス酢酸緩衝液ｐＨ７．５中で調製した。合計２５０μｇの肝組織をアッセイチューブあたりに使用し、そしてアッセイを三重で実施した。タンパク質濃度は、製造元の説明書に従いＢｉｏ－Ｒａｄタンパク質アッセイキット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して残存する肝ホモジェネートで測定した。

【０１０１】

Ｉ．ウエスタンブロット分析

ウエスタンブロットを、以前に記述された［Ｗａｎｇ，Ｌ．ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ、１９：４０４－４１０（２０１２）］とおり肝ライセートで実施した。ＯＴＣタンパク質は、カスタムウサギポリクローナル抗体（１：１０，０００希釈）［Ａｕｇｕｓｔｉｎ，Ｌ．ら、Ｐｅｄｉａｔｒ Ｒｅｓ、４８：８４２－８４６（２０００）］により検出した。マウス抗ＦＬＡＧ Ｍ２抗体（１：２０００希釈、Ｓｉｇｍａ）及びマウス抗αチューブリン抗体（１：５００希釈、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ）を使用して、Ｃａｓ９及びαチューブリンを検出した。マウス抗アクチン抗体（１：１，０００希釈、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号８４５７Ｌ）を使用して、ＩｍａｇｅＬａｂ ４．１ソフトウェアを伴うＣｈｅｍｉＤｏｃ ＭＰシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて画像化されたアクチンブロットを検出した。

【０１０２】

Ｊ．遺伝子発現解析、ＲＴ－ＰＣＲ及びＲＴ－ｑＰＣＲ

ＲＮＡをトリゾール（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用して精製し、そして大容量（Ｈｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ）ｃＤＮＡ逆転写（Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ）キット（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して逆転写した。マウスＯＴＣ、ＳａＣａｓ９及びＧＡＰＤＨを測定するためのリアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）反応を、遺伝子特異的プライマー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して実施した。データをＧＡＰＤＨに対し正規化した。

【０１０３】

Ｋ．オンターゲット及びオフターゲット突然変異誘発分析

ＨＤＲ媒介性の標的化改変を、以前に記述された［Ｒａｎ，Ｆ．ら、Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ、８：２２８－２３０８（２０１３）］ところの制限断片長多形（ＲＦＬＰ）分析により確認した。ＨＤＲ－Ｆｗｄ及びＨＤＲ－Ｒｅｖプライマーを、ドナーテンプレートと標的ゲノム領域の間の相同性の領域の外側にアニーリングするよう設計した。ＰＣＲ産物を精製しかつＡｇｅＩ制限酵素で消化した。ＯＴＣのイントロン４のオンターゲット部位をさらに確認するため、該ゲノム領域をネステッドＰＣＲにより増幅した。簡潔には、ゲノムＤＮＡをまず、Ｑ５（登録商標）高忠実度（Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ）ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用してＨＤＲ－Ｆｗｄおよびｈｄｒ－Ｒｅｖプライマー（表３）により増幅し、そしてゲル精製してゲノムＤＮＡ中の残余のＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒを除去した。その後、ネステッドＰＣＲを、精製された第１回のＰＣＲアンプリコンを使用することにより実施した。ライブラリーを、ＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）Ｕｌｔｒａ™ ＤＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｐｒｅｐ Ｋｉｔ ｆｏｒ Ｉｌｌｕｍｉｎａ（ＮＥＢ）を使用して２５０ｎｇの第二のＰＣＲ産物から作成し、そしてＩｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑ（２×２５０塩基対（ｂｐ）の対形

成端若しくは２×３００ｂｐの対形成端、Ｇｅｎｅｗｉｚ）上でシークエンシングした。データを標準的Ｉｌｌｕｍｉｎａシークエンシング分析手順に従って処理した。処理された読み取りデータを、カスタムスクリプトを伴うＢｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ　Ａｌｉｇｎｅｒを使用して参照配列としてのＰＣＲアンプリコンに位置付けた。参照に位置しなかった読み取りデータは廃棄した。挿入及び／若しくは欠失を、カスタムスクリプトを使用する参照に対する読み取りデータの比較により決定した。最もありそうなオフターゲット部位を、ｗｗｗ．ｂｅｎｃｈｌｉｎｇ．ｃｏｍに記述されるアルゴリズムを使用して決定し、ＯＴ１からＯＴ１６（下の表４）と称した。これらの部位に広がるプライマー（すぐ後に続く表を参照されたい）を使用して、関連する配列をネステッドＰＣＲにより増幅した。精製されたＰＣＲフラグメントをその後、上述されたところのディープシークエンシングにかけた。

【０１０４】

【表４－１】

表 4: ディープシークエンシングによる潜在的オフターゲット効果を検出するためのＰＣＲプライマー配列。

プライマー名	配列 (5'->3')	配列番号	注
OTC_OT1F1	CTGGTGCCTTTTTCTATCGCC	37	OT1 のためのプライマー
OTC_OT1R1	CCAAGAGCAACTACAATGGCTT	38	
OTC_OT1F2	GCATTTTCATGAGCATTCCA	39	
OTC_OT1R2	CATGTTGTGCCTGCATCTCT	40	
OTC_OT2F1	GCAGACTCCAAGATGCAAGAC	41	OT2 のためのプライマー
OTC_OT2R1	GATGTTGTTCCACCCGCATCT	42	
OTC_OT2F2	CACTGAGCCAAGTCACTGGA	43	
OTC_OT2R2	AGGGACAAAACCAAACAGCA	44	
OTC_OT3F1	TGGCCTTCTAAAGCAACCAA	45	OT3 のためのプライマー
OTC_OT3R1	CCGTCTCCCAGATCACATGAC	46	
OTC_OT3F2	ATAACTCATAATCTATGCATGGCACAA	47	
OTC_OT3R2	TTTGATCATGGTGTTTATCAGAGC	48	
OTC_OT4F1	GTCCCCGACAAACCAAGCTA	49	OT4 のためのプライマー
OTC_OT4R1	TGAACTGGCAGTATGCAGGG	50	
OTC_OT4F2	AACATGGTTTCTGCCCTCAG	51	
OTC_OT4R2	GGACCATGCCGAACTCTTAC	52	
OTC_OT5F1	TTGAGACCTAGCTCATGCCC	53	OT5 のためのプライマー
OTC_OT5R1	TAACGCAGAACTGGCACAGG	54	
OTC_OT5F2	CTCTCCCATGGAGAAAGCTG	55	
OTC_OT5R2	GAATGTGGCATTGGCTTTTT	56	
OTC_OT6F1	GAGAGAGCCAATCTGCCCAT	57	OT6 のためのプライマー
OTC_OT6R1	CACCGGAAACGTGTGAGAGA	58	
OTC_OT6F2	ACTTCCCATGATCCCATTGA	59	
OTC_OT6R2	AGCTTCCCTCCAAGTGTCCT	60	
OTC_OT7F1	GATGGGCATAAGCCCGAAGTA	61	OT7 のためのプ
OTC_OT7R1	TAAGGCCCAGTGTTGTTGTGT	62	

【０１０５】

【表４－２】

プライマー名	配列 (5'->3')	配列番号	注
OTC_OT7F2	GTAGCAGGGGCTCTGTGAAG	63	ライマー
OTC_OT7R2	TGGCCTGAAATACCCAGAAC	64	
OTC_OT8F1	GTTGAATTCGCGTGTCCAGG	65	
OTC_OT8R1	TCCCATGGCGAGAATGTCAC	66	OT8 のためのプライマー
OTC_OT8F2	CCCTGTAGGAAACACAGAGGA	67	
OTC_OT8R2	TGCTTTGGATGTTGATTCTAAA	68	
OTC_OT9F1	GGCAAAGGACTAGCTTGCAC	69	
OTC_OT9R1	GGGTGCTATGAGGACCAGTG	70	OT9 のためのプライマー
OTC_OT9F2	CAGTGGTGTGTGGAGAGCTG	71	
OTC_OT9R2	AGAGAGAGCGCTTGACTTTGA	72	
OTC_OT10F1	CTTTGACTCCCGGCGAAAGA	73	
OTC_OT10R1	TTGTCCATCCGGGTCATTGC	74	OT10 のためのプライマー
OTC_OT10F2	AAGTCCTTCTTGCCCAACTT	75	
OTC_OT10R2	CAGCCCCAATGCATTTTT	76	
OTC_OT11F1	ATTACAGGTCCTGGTTGGGC	77	
OTC_OT11R1	ACTGAGCCTGGTAGAGCCTT	78	OT11 のためのプライマー
OTC_OT11F2	GGAAGGTGAAGGAAGGAAGG	79	
OTC_OT11R2	TTTTCTAGGAATTCAGGACATACA	80	
OTC_OT12F	TCATGGTCCTTAAAATTTTTGC	81	OT12 のためのプライマー
OTC_OT12R	TCCAGGTATGCAAAGTGGAT	82	
OTC_OT13F1	TTCAGTTGTACTTTGGATGCTCTGA	83	
OTC_OT13R1	CATCTGAATAGCAGCAGGCG	84	OT13 のためのプライマー
OTC_OT13F2	TAGCACAGCCCAAATGACTT	85	
OTC_OT13R2	TCATGAAACCCCATAATCAGAA	86	
OTC_OT14F1	AGTGGGTCATCCTTTGTTACCC	87	
OTC_OT14R1	TGCCAGTTATCAGCCAAGCA	88	OT14 のためのプライマー
OTC_OT14F2	CCCAGGAACTTAACTCAGGTG	89	
OTC_OT14R2	TGCCATTTGACCTCATAAGTCT	90	

【０１０６】

【表４－３】

プライマー名	配列 (5'->3')	配列番号	注
OTC_OT15F1	TTCAGCCCCCTTGAGTGTTTA	91	OT15 のためのプライマー
OTC_OT15R1	GTCTCTGAGCACAAAGAGACGA	92	
OTC_OT15F2	TTGCCTGTCCCAACTAGAGC	93	
OTC_OT15R2	GGCCCAAGAATGCACATTTA	94	
OTC_OT16F1	CCACACACTGGCTAGGACTG	95	OT16 のためのプライマー
OTC_OT16R1	ACTGGCAGCACTTGAGACAA	96	
OTC_OT16F2	GATGGCATGCTGTGGTTTTT	97	
OTC_OT16R2	CAATGCTTCCACACAGAACC	98	

【０１０７】

オンターゲット及びオフターゲットの欠失挿入（ｉｎｄｅｌｓ）並びにｓｐｆ^{ash}突然変異のオンターゲット修正の頻度を後に続くとおり決定した。ＭｉＳｅｑの読み取りデータをカスタムスクリプトを使用して分析して、参照に対し読み取りデータを整合させることにより欠失挿入を特定し、欠失挿入は、可能性のあるオフターゲット効果であると考えられる予測されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９切断部位（ＰＡＭの３ｎｔ下流、プロトスペーサー内）の１５ｎｔ上流若しくは下流内の配列のいずれかの部分を伴う。候補欠失挿入の上流若しくは下流いずれかに、参照配列の対応する１８ｎｔの部分を伴い３個以上のミスマッチを含むいずれかの１８ｎｔ配列が存在した読み取りデータを、誤りとして廃棄した。ＯＴ１からＯＴ１６部位についての全部の候補欠失挿入を確認のため手動で精選した。ＯＴＣイントロン４のオンターゲット部位について、読み取りデータを、アンチセンス鎖上に、ＰＡＭの場所でドナー特異的「ＣＡＣＣＡＡ」で開始し、ドナー特異的ＡｇｅＩインサート「ＡＣＣＧＧＴ」を通りかつｓｐｆ^{ash}ＯＴＣ突然変異部位でＳＮＶ「Ｃ」で終了する、ドナーからの５１ｎｔ配列との完全なマッチが存在した場合は、「完全なＨＤＲ」を有するとみなした。読み取りデータは、それが（１）「完全なＨＤＲ」の基準に一致、若しくは（２）予測されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９切断部位（ドナー特異的ＡｇｅＩインサート「ＡＣＣＧＧＴ」のサイズから成る）の５４ｎｔ上流の期待されるｓｐｆ^{ash}ＯＴＣ突然変異部位中のセンス鎖上にＳＮＶ「Ｇ」を有し、ｓｐｆ^{ash}ＯＴＣ突然変異部位に隣接する参照配列の１８ｎｔのイントロン部分と２個までのミスマッチを含む、のいずれかの場合に「「Ｇ」を含む読み取りデータ」であるとみなした。読み取りデータは、それが「完全なＨＤＲ」及び「「Ｇ」を含む読み取りデータ」の基準に合致しなかった場合、並びに標的部位の３’端のドナー特異的「ＣＡＣＣＡＡ」で開始しかつドナー特異的ＡｇｅＩインサート「ＡＣＣＧＧＴ」で終了する、ドナーからの１８ｎｔ配列との完全なマッチが存在した場合に、「部分的ＨＤＲ」を有するとみなした。

【０１０８】

Ｌ．統計学的解析

試験および対照ベクターを、再現性を確認するため各時点で群あたり最低３マウスにおいて評価した。サンプルサイズを図の説明に示す。成功裏の側頭静脈注入を伴う全部の動物を試験解析に包含した。不成功の注入を伴うものは除外した。注入の成功はｑＰＣＲを介する肝中のベクターゲノムコピーに従って決定し、同一時点の投与群の平均値の１０％未満のベクターゲノムコピーをもつ動物は不成功であるとみなした。

【０１０９】

統計学的解析はＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　６．０３　ｆｏｒ　Ｗｉｎｄｏｗｓを用いて実施した。ダンの多重比較検定を使用して多数の変数を単一対照と比較した。マン

・ホイットニー検定を使用して２群間の差違を決定した。マンテル・コックス検定を使用して生存分布を差違について検定した。群の平均（ａｖｅｒａｇｅ）は平均（ｍｅａｎ）±Ｓ．Ｅ．Ｍ．として表した。

【０１１０】

Ｍ．ＲＦＬＰノックイン及びターゲッティングアッセイ

ｐＸ３３０及びＯＴＣドナーテンプレートでコトランスフェクトされたＭＣ５７Ｇ細胞のゲノムＤＮＡを、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ™ ＤＮＡ抽出溶液（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して抽出した。ＲＦＬＰアッセイを実施して相同組換え修復（ＨＤＲ）を検出した。簡潔には、ゲノムＤＮＡをＨＤＲ－Ｆｗｄ及びＨＤＲ－Ｒｅｖプライマーを使用することにより増幅した。ＨＤＲ－Ｆｗｄ及びＨＤＲ－Ｒｅｖプライマーは、ＯＴＣドナーテンプレートと標的ゲノム領域の間の相同性の領域の外側にアニーリングするよう設計されている。ＰＣＲ産物（３０サイクル、６７℃アニーリング及び７２℃で１ｍｉｎ伸長）を、ＱＩＡＱｕｉｃｋ ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）により精製しかつＡｇｅＩで消化した。消化された産物を４－２０％勾配ポリアクリルアミドＴＢＥゲル上に負荷しかつＳＹＢＲ Ｇｏｌｄ色素で染色した。切断産物を画像化し、そしてＳＵＲＶＥＹＯＲ（登録商標）アッセイについて上述されたとおり定量した。全部のＰＣＲ反応は、ＨＦ緩衝液及び３％ジメチルスルホキシドとともにＰｈｕｓｉｏｎ（登録商標）ハイフィデリティ（Ｈｉｇｈ－ｆｉｄｅｌｉｔｙ）ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）を使用して実施した。

【０１１１】

サンプルをベクター注入１、３及び８週後に得たｓｐｆ^{ash}動物中のＳｐＣａｓ９及びＳａＣａｓ９双方のベクター系の完全な分析を実施した。対照は、野生型同腹子、並びに非処置若しくはガイドＲＮＡを伴わないＡＡＶ８．Ｃａｓ９及びＡＡＶ８．ｄｏｎｏｒを投与されたかのいずれかであったｓｐｆａｓｈマウス（非標的化と呼ばれる）からのサンプルを包含した。非処置及び非標的化ｓｐｆ^{ash}動物はｓｐｆ^{ash}対照と称される一方、ＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒを注入されたｓｐｆ^{ash}マウスは処置動物と称される。パイロット実験は、該２種のベクターの用量及び比に関するベクター注入の最適条件を解明し（図５）；新生仔における全部のその後の実験は、５×１０^{11}ＧＣのＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ１．ｄｏｎｏｒ（若しくはＡＡＶ８．ｃｏｎｔｒｏｌ．ｄｏｎｏｒ）及び５×１０^{10}ＧＣのＡＡＶ８．ＳａＣａｓ９を用いて実施した。

【０１１２】

ｉｎ ｖｉｖｏの欠失挿入形成及びＨＤＲを評価するため、肝ＤＮＡを新生仔ベクター処置後３週（ｎ＝３）及び８週（ｎ＝３）にマウスから回収し、次いでネステッドＰＣＲによりＯＴＣ標的領域を増幅し及びディープシークエンシングし；同様の分析を非処置ｓｐｆ^{ash}マウスからのＤＮＡで実施してシークエンシングの誤りによるバックグラウンドを評価した。下の表５は該データを要約する。遺伝子修正後、欠失挿入は６処置動物からのＯＴＣ対立遺伝子の３１％（２６．５％～３５．５％）で検出された（図５）。２処置マウスにおけるより詳細な研究は、欠失の９０％超が２０ｂｐ未満でありかつわずか１％が隣接エクソン中に伸長したことを示した。ＧからＡの突然変異のＨＤＲに基づく修正が、６処置動物からのＯＴＣ対立遺伝子の１０％（６．７％～２０．１％）で観察された。ＧからＡの突然変異と、隣接イントロン中に５１ｎｔに位置するドナー特異的な変えられたＰＡＭとの間の、増幅されたＤＮＡの解析は、修正された対立遺伝子のおよそ８３％がこれら２目標間にドナー由来配列のみを含有した（完全なＨＤＲを含む読み取りデータ）一方、全ＯＴＣ対立遺伝子の３．５％が不完全なＨＤＲ事象の証拠を有した（部分的ＨＤＲを含む読み取りデータ）ことを示した。ＨＤＲ媒介性の標的化改変はまた、該３時点のそれぞれで収集された３動物においてドナーＤＮＡ中に導入された制限断片長多形（ＲＦＬＰ）の存在によっても推定された。平均ＨＤＲ率は、１週で２．６％、３週で１８．５％及び８週で１４．３％であり、ディープシークエンシングにより観察される高いＨＤＲ率を確認した（図６Ａ）。

【０１１３】

【０１１４】

表５．デュアルAAV遺伝子ターゲッティングベクターで処置された動物における欠失挿入の頻度、*OTC spf*^{ash}突然変異の修正及びHDR、の要約。

【表５－１】

ID	処置	処置後時間(週)	欠失挿入 (%)	「G」を含む*OTC*読み取りデータ(%)	完全なHDRを含む読み取りデータ (%)	部分的HDRを含む読み取りデータ (%)
4001	新生仔, sgRNA1	3	26.5	20.1	17.2	7.6
4003	新生仔, sgRNA1	3	35.5	7.2	6.4	2.7
307	新生仔, sgRNA1	3	30.5	8.9	7.2	2.9
835	新生仔, sgRNA1	8	26.7	6.8	5.5	2.2
836	新生仔, sgRNA1	8	29.6	10.8	8.9	3.3
844	新生仔, sgRNA1	8	34.4	6.7	5.4	2.4
630	成体, 非標的化, 低用量	3	0.3	0.02	0.01	0.01
637	成体, sgRNA1, 低用量	3	50.3	0.3	0.2	0.1
640	成体, sgRNA1, 低用量	3	45.0	0.3	0.3	0.1
641	成体, sgRNA1, 低用量	3	38.5	0.2	0.1	0.04
658	成体, 非標的化, 高用量	2	0.1	0.03	0.02	0.01
648	成体, sgRNA1, 高用量	2	43.6	1.8	1.5	0.3
649	成体, sgRNA1, 高用量	2	48.5	2.1	1.7	0.4

【表５－２】

ID	処置	処置後時間（週）	欠失挿入（%）	「G」を含むOTC読み取りデータ(%)	完全なHDRを含む読み取りデータ（%）	部分的HDRを含む読み取りデータ（%）
653	成体, sgRNA1, 高用量	2	34.0	1.3	1.1	0.2
	非処置 *spf*^{ash}	n/a	0.04	0.002	0.001	0.004

【０１１５】

ｗｗｗ．ｂｅｎｃｈｌｉｎｇ．ｃｏｍに記述されるアルゴリズムはｓｇＲＮＡ１につい

ての４９個の潜在的オフターゲット部位を同定し；ＤＳＢを創成することが最もありそうな上位１５部位をＰＣＲにより増幅しかつディープシークエンシングにかけた（後に続く表６を参照されたい）。シークエンシングの誤りによる非処置動物のＤＮＡからのバックグラウンドは部位間で異なったとは言え、それは通常ほんの数パーセントであった。処置動物からのサンプルは、このバックグラウンドより上であった欠失挿入の証拠を示さなかった。

【０１１６】

【表６－１】

表6. オフターゲット部位の完全な一覧。

ID	配列	配列番号	PAM	スコア	オンターゲット	染色体
sgRNA1	TCTCTTTTAAACTAACCCAT	99	CAGAG	100.00	真	X
OT1	TATCTTTTCAACTAACCCAA	100	TAGGA	1.14	偽	chr17
OT2	TTTCTTTTATACTAGCCCAT	101	AGGGG	0.86	偽	chrX
OT3	TCTTTTTTTAAATAACCCAT	102	TAGAA	0.86	偽	chr8
OT4	TGGCATTTAAACTAACCCAA	103	CTGGG	0.85	偽	chr5
OT5	TCTTCATGAAACTAACCCAT	104	CTGAA	0.83	偽	chr19
OT6	ATTTTTTTAAACAAACCCAT	105	CTGGA	0.66	偽	chr2
OT7	GATCTTGTAATCTAACCCAT	106	GTGAA	0.63	偽	chr6
OT8	CCTTTTATAATCTAACCCAT	107	GTGAA	0.62	偽	chr9
OT9	TCTGTTTTAAAGTAACCCTT	108	CAGGG	0.59	偽	chr1
OT10	TTGCTTTTCAACTAACCCAA	109	GTGGG	0.54	偽	chr8
OT11	AATATTTTAAACTATCCCAT	110	GTGAG	0.48	偽	chr12
OT12	TTACTTTAAAACTATCCCAT	111	CTGAA	0.48	偽	chrX
OT13	ACACTTTTAAAATAACCCAG	112	ATGAA	0.47	偽	chr8

【０１１７】

【表６－２】

ID	配列	配列番号	PAM	スコア	オンターゲット	染色体
OT14	AATCTTCTAAACCAACCCAT	113	TGGAG	0.46	偽	chr6
OT15	TCTTTATTAGACTAACCCAG	114	CTGAG	0.46	偽	chrX
OT16	TTTCATTTAACATAACCCAT	115	ATGGA	0.46	偽	chr15
OT17	TCTTTTTAGAAGTAACCCAT	116	GTGAA	0.46	偽	chr6
OT18	TCCCTTTTTCACTAACCCAC	117	CAGAG	0.46	偽	chr5
OT19	TCTTTGTAAAATTAACCCAT	118	CAGAG	0.46	偽	chr18
OT20	TTTATTTTAAAGTAACCCAC	119	ATGAA	0.45	偽	chr17
OT21	TATCTTTCAAAATAACCCAC	120	AGGGA	0.43	偽	chr1
OT22	TATCTTGGAAACTAACCCCT	121	GTGGA	0.42	偽	chr7
OT23	CTTCTTTTAAACAAACCCAG	122	AAGGA	0.39	偽	chr8
OT24	AATCTTTTATACTAACCAAT	123	AAGAA	0.39	偽	chr12
OT25	TATTTTTTAAATTAACTCAT	124	TGGGG	0.38	偽	chr6
OT26	TTTATTTTAAAATAACACAT	125	TGGGA	0.38	偽	chr15
OT27	TCTCTTTCAAACTATCCCAA	126	GGGAA	0.37	偽	chr11
OT28	TATCTTTAAAAATAACACAT	127	GAGAA	0.36	偽	chrX

【０１１８】

【表６－３】

ID	配列	配列番号	PAM	スコア	オンターゲット	染色体
OT29	TTTCTTTAAAAATAACACAT	128	GAGGG	0.36	偽	chr8
OT30	GTTCTTTTAAAAAAACCCAT	129	AAGAA	0.35	偽	chr12
OT31	TCTGATTTAAAATAACACAT	130	TTGGA	0.35	偽	chr8
OT32	CCTCTTATAACCTAACCCAC	131	TGGGA	0.35	偽	chr6
OT33	CCTCTTGTAAGCTAACCCAC	132	ATGGA	0.35	偽	chr3
OT34	CCTATTTTAAAGTAACCCTT	133	TTGGA	0.34	偽	chr9
OT35	CATCTTGTAAACTAGCCCAT	134	TAGAA	0.34	偽	chr19
OT36	ACTCTTTTACAATAACACAT	135	TAGAA	0.34	偽	chr18
OT37	TCTCCTTTAGCCTAACTCAT	136	AAGAG	0.33	偽	chr19
OT38	CCTCTTTAAAAATAACCCCT	137	TAGAA	0.33	偽	chr2
OT39	TATCTTTGAAATAAACCCAT	138	GGGAA	0.32	偽	chr2
OT40	TATATTTAAAACTAAGCCAT	139	CTGAA	0.32	偽	chr13
OT41	TGACTTTAAAACTAAGCCAT	140	GTGAA	0.32	偽	chr11
OT42	CTTCTTTTCAACTATCCCAT	141	TTGGA	0.31	偽	chr17
OT43	GCTCTTATAAATTAACCCAG	142	AAGAA	0.31	偽	chr14

【０１１９】

【表６－４】

ID	配列	配列番号	PAM	スコア	オンターゲット	染色体
OT44	TTTCTTTTAAATTAAGCCAT	143	CTGAG	0.31	偽	chr10
OT45	TCTCTTTGTCACAAACCCAT	144	GTGAG	0.31	偽	chr2
OT46	TTTCTTCTAAGTTAACCCAT	145	TTGAG	0.31	偽	chr3
OT47	TCACTTCCAAACTACCCCAT	146	AAGGG	0.30	偽	chr9
OT48	TATCTTATAAAATAACCCAG	147	TGGGA	0.30	偽	chr14
OT49	TCAATTTTTAACTATCCCAT	148	TTGAG	0.28	偽	chr1

【０１２０】

［これら標的部位は見込みの順序で列挙されている。ＭＬＥすなわち標的領域に真の欠失

挿入を含む読み取りデータの割合についての最大見込み推定値（ｍａｘｉｍｕｍ－ｌｉｋｅｌｉｈｏｏｄ ｅｓｔｉｍａｔｅ）を、Ｈｓｕら Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈ、３１：８２７－８３２（２０１３）に記述されるところのＣａｓ９／ｓｇＲＮＡ－１処置サンプル及び非処置対照についてのコンピュータ計算された欠失挿入率に基づくオフターゲットシークエンシングサンプルに適用した。乏しいシークエンシングの質によりＯＴ４についてデータは入手可能でない。］

【０１２１】

肝ホモジェネートをウエスタンブロットによりＯＴＣの発現について評価した。大部分の処置動物におけるＯＴＣタンパク質はｓｐｆ^{ash}対照においてよりも高かったが、しかし野生型マウスで見出されるレベルに達しなかった（図６Ｂ）。肝の組織切片をＯＴＣ発現について免疫組織化学により分析した（図２Ｃ－２Ｅ）。図２ＣはＯＴＣ発現の代表的蛍光顕微鏡写真を示し、これは形態計測分析を使用する％補正のため図２Ｂで定量化された。シグナルはｓｐｆ^{ash}対照で観察されなかった（＜１％）一方、ヘテロ接合体の分析は予測されるモザイク現象を示した（図２Ｃ）。形態計測は、ｓｐｆ^{ash}対照群で見出されたよりも処置群で１０ないし１００倍より多い数のＯＴＣ発現細胞を示した（図２Ｂ；１５％（３週で６．８％～２４．４％及び１３％（８週で７．５％～２０．１％）。処置された動物は、グルタミン合成酵素についての染色により可視化された、中心静脈周囲を除く門脈系の全部の部分内に局在化したＯＴＣ発現細胞の斑を示した（図２Ｄ）。これは内因性ＯＴＣの予測される分布である［ＭＡ Ｄｉｎｇｅｍａｎｓｅら、Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ、２４：４０７－４１１（１９９６）］。より高倍率の組織学的視野は、増殖する肝の状況における修正次いでクローン増殖と矛盾しないＯＴＣ発現肝細胞のクラスターを示した（図２Ｅ）。肝ホモジェネートからのＯＴＣ酵素活性及び肝からの全細胞ＲＮＡからのＯＴＣ ｍＲＮＡの直接測定は処置動物における同様に高レベルの修正を表し、３及び８週でそれぞれ正常ＯＴＣ活性の２０％（１３．４％～３３．７％（ｎ＝５）及び１６％（１１．０％～２５．４％；ｎ＝８）（図２Ｆ）、並びに３及び８週で正常ＯＴＣ ｍＲＮＡの１３％（８．６％～２１．８％、ｎ＝５）及び９％（５．０％～１６．８％ ｎ＝８）をもたらした（図２Ｇ）。３から８週までのＯＴＣ$^{+}$肝細胞、ＯＴＣ酵素活性及びＯＴＣ ｍＲＮＡ発現の減少にもかかわらず、これらの差違のいずれも統計学的に有意でなかった（それぞれ図２ｂ；ｐ＝０．４８２８、図２ｅ；ｐ＝０．２７２３、図２ｆ；ｐ＝０．１４７５）。肝ホモジェネートをウエスタンブロットによりＯＴＣの発現についてもまた評価した。ほとんどの処置動物におけるＯＴＣタンパク質レベルはｓｐｆ^{ash}対照においてよりも高かったが、しかし野生型マウスで見出されたレベルに達しなかった。全体として、個々の動物内の組織学、タンパク質及びｍＲＮＡに基づく修正の推定値に良好な相関が存在した。

【０１２２】

ＳａＣａｓ９を送達するためにＡＡＶを使用することについての１つの懸念は、編集を達成するために必要でなくかつ事実免疫及び／若しくはゲノム毒性に寄与しうる安定な導入遺伝子発現を達成するその傾向である。ウエスタンブロット分析は、８週までに検出不可能なレベルに低下した、高レベルＳａＣａｓ９タンパク質を１週で示した（図６Ｂ）。さらに、免疫組織化学は、１週で肝細胞の２１％において核局在化されたＳａＣａｓ９タンパク質を表し、これは８週までに検出不可能なレベル（０．１％未満の肝細胞）に低下した（図３Ａ）。ＳａＣａｓ９ ｍＲＮＡは、この８週の期間の間に、非常に低いがしかしなお検出可能なレベルまで４３倍低下した（図３Ｂ）。この同一の時間間隔の間のＳａＣａｓ９ ＤＮＡの２５倍の低下は、増殖する新生仔肝の状況におけるベクターゲノムの排除がＳａＣａｓ９発現の所望の低下への主要な寄与体であることを示す（図３Ｃ）。

【０１２３】

ＯＴＣ欠損症の臨床症状に対する遺伝子修正の影響を評価することにおいて、われわれは、１週クールの高蛋白餌に対するｓｐｆ^{ash}マウスの耐性を評価した。期待されたとおり、該餌の終了時の血液アンモニアの測定は、野生型対照における８３±９μＭ（ｎ＝１３）からｓｐｆ^{ash}対照における３１２±３０μＭ（ｎ＝１６）までの統計学的に有意の

上昇を表した（図３Ｄ；ｐ＜０．０００１）。血液アンモニアの実質的変動が７日の高蛋白餌後に非処置ｓｐｆ^{ash}動物で見出され、これは比較的短期間にわたりアンモニアの大幅な変動を示すＯＴＣ欠損患者における所見と矛盾しない［Ｄ．Ｍｏｓｃｉｏｎｉら、Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ、１４：２５－３３（２００６）］。非処置ｓｐｆ^{ash}と非標的化ｓｐｆ^{ash}対照の間に有意差は存在せず（図３Ｄ；ｐ＝０．８３）；逆に、アンモニアの統計学的に有意の４０％の低下が、非処置ｓｐｆ^{ash}と処置ｓｐｆ^{ash}動物の間で観察された（図３Ｄ；ｐ＝０．００１４）。重要なことに、処置ｓｐｆ^{ash}マウスは、非処置若しくは非標的化ｓｐｆ^{ash}を上回る生存の統計学的に有意の改良もまた示した（図３Ｅ；ｐ＝０．０３）。蛋白餌の該クールの間、非処置ｓｐｆ^{ash}（ｎ＝２０）及び非標的化ｓｐｆ^{ash}（ｎ＝１３）の双方の３０％が、高アンモニア血症の臨床徴候を発症しかつ死亡したか若しくは安楽死されなければならなかった一方、野生型マウス（ｎ＝１３）及び処置ｓｐｆ^{ash}マウス（ｎ＝１３）の全部が生存した（図３Ｅ）。

【０１２４】

本研究における驚くべき高レベルの修正は、分裂細胞の状況における豊富なドナーＤＮＡのＳａＣａｓ９の高発現によるようである。新生サル中へのＡＡＶ８ベクターの注入は、減少の類似のキネティクスを伴い、これらマウスの研究（すなわちそれぞれ２１％のＳａＣａｓ９発現肝細胞及び細胞あたり５２のベクターゲノム）において達成されたと同一の高いピークレベルの形質導入及び遺伝子移入（すなわちそれぞれｌａｃＺを発現する９２％の肝細胞及び細胞あたり３２のベクターゲノム）を示し、これはヒトを包含するより大型の種への橋渡しに関して有望である。

【０１２５】

安全性の問題は、主に、発癌性の続発症を伴いオフターゲットＤＳＢを創成し得るｓｇＲＮＡの状況におけるＣａｓ９の発現に関する。これら潜在的毒性のより広範囲の特徴付けが臨床的橋渡しを考慮し得る前に必要であるとは言え、われわれは、ありそうなオフターゲット部位のディープシークエンシングにより達成される感度のレベルでオフターゲット欠失挿入を検出し得なかった。Ｃａｓ９は、導入遺伝子が外来タンパク質である遺伝子置換療法で観察されているとおり病理学的免疫応答もまた導き出し得た。しかしながら、新生仔におけるＡＡＶの全身送達はいくつかの理由上潜在的免疫学的有害事象を軽減するのに役立つ。第一に、原核生物のＳａＣａｓ９タンパク質の発現は、組込まれないベクターが肝細胞増殖の間に失われるため一過性である。さらに、ＡＡＶにコードされるタンパク質への新生アカゲザルの曝露は、これらのタンパク質に対する耐性を誘発してそれにより破壊的養子免疫応答により引き起こされる毒性を回避することが示されている。高蛋白餌投与の終了時に収集されたＳａＣａｓ９処置ｓｐｆ^{ash}マウスにおける肝及びトランスアミナーゼレベルの詳細な組織学的分析は、いずれかの病理若しくは毒性を明らかにすることに失敗した（図７）。

【実施例２】

【０１２６】

ＭＰＳＩ

Ａ．ＭＰＳＩマウス

本研究における使用のため、ＭＰＳＩ遺伝子のＭＰＳＩ　Ｗ３９２Ｘ突然変異の近接のＰＡＭ配列（ＮＮＧＲＲＴ）を潜在的２０ｎｔプロトスペーサー配列と同定した。３種の配列ｓｇＲＮＡ１～３（図１０）を、マウスＭＣ５７Ｇ細胞株中へのピューロマイシン含有プラスミドのトランスフェクション後にさらに評価した。この細胞株における低いトランスフェクション効率は、ピューロマイシンへの短時間曝露によるトランスフェクトされた細胞の濃縮を必要とした。所望の部位の二本鎖切断（ＤＳＢ）及び欠失挿入の形成についての証拠が、ＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイを使用して示された。

【０１２７】

ＡＡＶドナープラスミドを、Ｕ６プロモーターの制御下のｓｇＲＮＡ、及び突然変異の各側に隣接するおよそ１ｋｂの配列を含むそれぞれのドナーテンプレートにおいてクローン化することにより構築し、そしてドナーテンプレート中の対応するＰＡＭ配列を、ＨＤ

Ｒ後の再切断を減少させるため突然変異させる。

【０１２８】

初期ｉｎ　ｖｉｖｏ評価を、肝特異的ＴＧＢプロモーターの制御下にＳａＣａｓ９を発現するＡＡＶ８ベクター（ＡＡＶ８．ＴＢＧ．ＳａＣａｓ９）及びＡＡＶ８．ｓｇＲＮＡ．ｄｏｎｏｒの同時注入によりにより肝を標的として新生ＭＰＳＷＸ仔において実施した。ベクター処置８週後に肝ＤＮＡをＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイによる欠失挿入分析のため単離し、そして欠失挿入の高頻度がｓｇＲＮＡ２及びｓｇＲＮＡ３双方により生成された。

【０１２９】

野生型及びＭＰＳＷＸマウスからの組織ライセートでのウエスタンブロットは、脳が、心、肝、脾及び腎と比較してＩＤＵＡ酵素を発現する支配的組織であることを示した。ｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子修正のため、脳を標的とするために、遍在性プロモーターＣＢｈの制御下にＳａＣａｓ９を発現するＡＡＶ９ベクターを作成した。ｓｇＲＮＡ及びドナーテンプレートベクターもまた、広範なｉｎ　ｖｉｖｏ形質導入及び血液脳関門の横断のために、ＡＡＶ９キャプシドでパッケージングされる。ｉｎ　ｖｉｖｏ評価のため、ＡＡＶ９．ＳａＣａｓ９及びＡＡＶ９．ｓｇＲＮＡ．ｄｏｎｏｒベクターを、側頭静脈若しくは脳室内（ＩＣＶ）送達を介して新生ＭＰＳＩ仔に同時注入することができる。該修正を処置されたマウスで特徴付けされる：生化学（ＩＤＵＡタンパク質及び活性）、組織学（ＧＡＧ貯蔵）、ＤＮＡ、ＲＮＡ、並びにオフターゲット分析。

【０１３０】

Ｂ．ＭＰＳＩイヌ

ドナーテンプレート配列を以下の表に提供する。

【０１３１】

【表７】

表7

ID	配列(5'->3')	配列番号	注
dIDUA_sgRNA1_Fwd	CACCGTTCTGATGAGGGCTCCGCGG	149	hSpCas9
dIDUA_sgRNA1_Rev	AAACCCGCGGAGCCCTCATCAGAAC	150	
dIDUA_sgRNA2_Fwd	CACCGCACCTGGTGCTCGTGGACG	151	
dlDUA_sgRNA2_Rev	AAACCGTCCACGAGCACCAGGTGC	152	
dIDUA_sgRNA3_Fwd	CACCGGGCCGCGTCCACGAGCACC	153	
dlDUA_sgRNA3_Rev	AAACGGTGCTCGTGGACGCGGCCC	154	
dIDUA_sgRNA4_Fwd	CACCGTCCACGAGCACCAGGTGCG	155	
dlDUA_sgRNA4_Rev	AAACCGCACCTGGTGCTCGTGGAC	156	
dIDUA_sgRNA5_Fwd	CACCGTGGACGCGGCCCGCGCGCTG	157	
dlDUA_sgRNA5_Rev	AAACCAGCGCGCGGGCCGCGTCCAC	158	
dIDUA_sgRNA6_Fwd	CACCGCTTCTGATGAGGGCTCCGC	159	
dlDUA_sgRNA6_Rev	AAACGCGGAGCCCTCATCAGAAGC	160	

【０１３２】

上の表中に列挙されるｓｇＲＮＡ候補をＭＤＣＫ細胞（イヌ細胞株）で検証することができる。部位特異的突然変異誘発を、選択されたｓｇＲＮＡに対応するドナーテンプレート上のＰＡＭ配列で実施される。ＡＡＶドナープラスミドを、ｓｇＲＮＡ及びそれぞれのドナーテンプレートにおいてクローン化することにより構築し、そしてＡＡＶベクター製造に使用する。該デュアルＡＡＶベクター系を新生ＭＰＳＩ仔イヌに注入する。修正を、

生化学、組織学、ＤＮＡ、ＲＮＡ及びオフターゲット分析によりイヌにおいて特徴付けする。

【実施例３】

【０１３３】

ｈＣＦＴＲ－ΔＦ５０８ヒト気道細胞

ＳａＣａｓ９のｓｇＲＮＡは選択されている。ｓｇＲＮＡプライマーをｐＸ３３０．ＳａＣａｓ９中にクローン化される。ドナーテンプレートはその後ＰＣＲクローン化される。

【０１３４】

【表８】

表8

ID	配列(5'->3'	配列番号	注
hCFTR_sgRNA1_Fwd	CACCGAATGGTGCCAGGCATAATCC	161	hSpCas9
hCFTR_sgRNA1_Rev	AAACGGATTATGCCTGGCACCATTC	162	
hCFTR_sgRNA2_Fwd	CACCGCAAAGCATGCCAACTAGAAG	163	
hCFTR_sgRNA2_Rev	AAACCTTCTAGTTGGCATGCTTTGC	164	
hCFTR_sgRNA3_Fwd	CACCGACCATTAAAGAAAATATCAT	165	
hCFTR_sgRNA3_Rev	AAACATGATATTTTCTTTAATGGTC	166	
hCFTR_sgRNA4_Fwd	CACCGAGTTTCTTACCTCTTCTAGT	167	
hCFTR_sgRNA4_Rev	AAACACTAGAAGAGGTAAGAAACTC	168	

【０１３５】

ｓｇＲＮＡをｉｎ　ｖｉｔｒｏで検証するために、ｐＸ３３０．ＳａＣａｓ９－ｓｇＲＮＡは２９３細胞中にトランスフェクトされる。ＤＮＡはその後欠失挿入分析のため単離される。ＡＡＶドナープラスミドを、ｓｇＲＮＡ及びそれぞれのドナーテンプレートにおいてクローン化することにより構築する。生じるプラスミドを使用してＡＡＶベクター（ＡＡＶ６．２）を構築する。該デュアルＡＡＶ６．２ウイルスベクター系をΔＦ５０８ヒト気道細胞でのｉｎ　ｖｉｔｒｏ形質導入に使用し、そしてこれら気道細胞中での修正を特徴付けする。ｉｎ　ｖｉｖｏ評価について、試験系はＤＦ５０８　ＣＦＴＲマウスである。ベクターを新生マウスに；若しくは成体マウス肺に全身性に送達し得る。ＡＡＶ血清型はＡＡＶ６．２若しくはＡＡＶ９であり得る。

【実施例４】

【０１３６】

マウスにおけるＦＩＸ　ＫＯ表現型の修正。

治療遺伝子のＳａＣａｓ９媒介性の挿入。マウス第ＩＸ因子遺伝子のエクソン２中のＰＡＭ配列（ＮＮＧＲＲＴ）を、本研究での使用のため潜在的２０ｎｔプロトスペーサー配列と同定した。ｓｇＲＮＡ候補を、マウス細胞株中へのトランスフェクション後に欠失挿入についてｉｎ　ｖｉｔｒｏで検証し、そしてｓｇＲＮＡ３が欠失挿入生成において最高の効率を示した。ＡＡＶドナーベクターは、Ｕ６．ｓｇＲＮＡ、ドナーアームを含有し、そして．ｈＦＩＸｃｏ－Ｐａｄｕａ．ｂＧＨ（エクソン２～８）を構築した。ＡＡＶ８ベクターを製造し、そして新生ＦＩＸ－ＫＯ仔及び成体ＦＩＸ－ＫＯマウスに注入した。Ｃ

ａｓ９の発現が特徴付けされ、そして、表現型の修正が、ＦＩＸ発現を測定すること及び組織学的検査を実施することにより確認される。ＤＮＡ及びＲＮＡ種もまた特徴付けされ、そしてオフターゲット分析が実施される。

【０１３７】

【表９】

表9

ID	配列(5'->3')	配列番号	注
mFIXsgRNA1_Fwd	CACCGTTTAGGATATCTACTCAGTA	169	hSaCas9のmFIX標的配列1
mFIXsgRNA1_Rev	AAACTACTGAGTAGATATCCTAAAC	170	
mFIXsgRNA2_Fwd	CACCGACAAACCTGCACATTCGGTA	171	hSaCas9のmFIX標的配列2
mFIXsgRNA2_Rev	AAACTACCGAATGTGCAGGTTTGTC	172	
mFIXsgRNA3_Fwd	CACCGCACCTGAACACCGTCATGG	173	hSaCas9のmFIX標的配列3
mFIXsgRNA3_Rev	AAACCCATGACGGTGTTCAGGTGC	174	
mFIX_PointM_F	CGAGGGAGATGGACAACAAT	175	FIX PCR のプライマー
mFIX_PointM_R	GCACCACAAGCCCTGTAAAT	176	

【実施例５】

【０１３８】

アカゲザルにおける治療遺伝子の挿入。

ｓｇＲＮＡ候補は同定されておりかつｐＸ３３０．ＳａＣａｓ９プラスミド中にクローン化されており、そしてドナーテンプレートが新規に合成されている。ｓｇＲＮＡ候補のｉｎ　ｖｉｔｒｏ検証が、最適トランスフェクション条件でＬＬＣ－ＭＫ２細胞株中で実施される。細胞はＣａｓ９の存在下にｐＸ３３０－ｓｇＲＮＡプラスミドでトランスフェクトされる。ＤＮＡは精製され、そして欠失挿入の存在について評価される。欠失挿入評価に基づき、好ましいｓｇＲＮＡ候補がアカゲザルにおいて同定されかつ特徴付けされる。選択されたｓｇＲＮＡを、ｈＦＩＸｃｏ－ＰａｄｕａがＨＤＲアームにより隣接されているＡＡＶドナープラスミドの構築のため使用される。デュアルＡＡＶ系を使用して新生サルに全身性に注入され、そして遺伝子挿入が、ｈＦＩＸ発現を測定すること、及び活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＰＴ）を測定することにより特徴付けされる。

【０１３９】

【表１０】

表10

ID	配列(5'->3'	配列番号	注
rhFIXsgRNA1_Fwd	CACCGCGTGTGAACATGATCATGG	177	hSaCas9 の rhFIX 標的配列 1
rhFIXsgRNA1_Rev	AAACCCATGATCATGTTCACACGC	178	
rhFIXsgRNA2_Fwd	CACCGTTTAGGATATCTACTCAGTG	179	hSaCas9 の rhFIX 標的配列 2
rhFIXsgRNA2_Rev	AAACCACTGAGTAGATATCCTAAAC	180	
rhFIXsgRNA3_Fwd	CACCGACAAACCTGTACATTCAGCA	181	hSaCas9 の rhFIX 標的配列 3
rhFIXsgRNA3_Rev	AAACTGCTGAATGTACAGGTTTGTC	182	

【実施例６】

【０１４０】

デュアルＡＡＶ　Ｃｐｆ１　ＣＲＩＳＰＲ系を使用する遺伝子スプライシング

Ｕ６－ｇＲＮＡ足場ターミネーター（ｓｃａｆｆｏｌｄ－ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ）を、ＡｓＣｐｆ１及びＬｂＣｐｆ１（Ａｄｄｇｅｎｅ（非営利プラスミドレポジトリ、ｗｗｗ．ａｄｄｇｅｎｅ．ｏｒｇ）から得られるＣｐｆ１を含有するプラスミド中にクローン化し、その後、陽性対照としてのＤＮＭＴ１標的配列［Ｌ．Ｓｗｉｅｃｈら、Ｎａｔｕｒｅ　ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、３３：１０２－１０６（２０１５）、電子出版２０１４年１０月１９日］を含むプラスミドを２９３細胞中で試験した。Ｓｕｒｖｅｙｏｒデータは双方の構築物が設計されたとおり機能したことを示した。次に、ＯＴＣ　ｓｐｆ^{ash}突然変異近くのＣｐｆ１プロトスペーサー配列が、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイによりｉｎｖｉｔｒｏで検証される。最も効率的なｓｇＲＮＡが、対応するＰＡＭ配列が突然変異されているｐＡＡＶドナープラスミド中にクローン化される。肝の応用（最初のモデルとしてＯＴＣ及びｍＦＩＸ－ＫＯ）のためのエンハンサー／プロモーターとしてのＡＢＰ２．ＴＢＧ－Ｓ１により駆動されるＡｓＣｐｆ１及びＬｂＣｐｆ１を発現するＡＡＶ８ベクターが生成されている（図１１及び１２）。

【実施例７】

【０１４１】

ＡＡＶ　ＳａＣａｓ９及びＰＣＳＫ９　ｓｇＲＮＡを使用する遺伝子不活性化

サル及びヒト双方のＰＣＳＫ９エクソンを標的とする７種のＰＣＳＫ９　ｓｇＲＮＡを選択し（下の表を参照されたい）、そしてｐＸ３３０．ＳａＣａｓ９プラスミド中にクローン化した。プラスミドを、サル細胞株ＬＬＣ－ＭＫ２及び２９３細胞中にトランスフェクトした。ＤＮＡを単離し、そして標的領域をＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイのためＰＣＲにより増幅した。ｓｇＲＮＡ３はサル及びヒト双方の細胞株中で最高の効率を示し、そして最上位候補として選択した。

【０１４２】

【表１１】

表11

ID	配列 (5'->3')	配列番号	注
EGFP-sgRNAF	CACCGTCGTGCTGCTTCATGTGGT	183	対照
EGFP-sgRNAR	AAACACCACATGAAGCAGCACGAC	184	
PCSK9_sgRNA1F	CACCGATGCTCTGGGCAAAGACAG	185	エクソン3
PCSK9_sgRNA1R	AAACCTGTCTTTGCCCAGAGCATC	186	
PCSK9_sgRNA2F	CACCGATCTCCTAGACACCAGCATA	187	エクソン4
PCSK9_sgRNA2R	AAACTATGCTGGTGTCTAGGAGATC	188	
PCSK9_sgRNA3F	CACCGAAGTTGGTCCCCAAAGTCCC	189	エクソン7
PCSK9_sgRNA3R	AAACGGGACTTTGGGGACCAACTTC	190	
PCSK9_sgRNA4F	CACCGCAGCACCTGCTTTGTGTCA	191	エクソン7
PCSK9_sgRNA4R	AAACTGACACAAAGCAGGTGCTGC	192	
PCSK9_sgRNA5F	CACCGAGTCTCTGCCTCAACTCGGC	193	エクソン8
PCSK9_sgRNA5R	AAACGCCGAGTTGAGGCAGAGACTC	194	
PCSK9_sgRNA6F	CACCGATGACATCTTTGGCAGAGAA	195	エクソン8
PCSK9_sgRNA6R	AAACTTCTCTGCCAAAGATGTCATC	196	
PCSK9_sgRNA7F	CACCGCCTGGTTCCCTGAGGACCA	197	エクソン8
PCSK9_sgRNA7R	AAACTGGTCCTCAGGGAACCAGGC	198	

【０１４３】

ｓｇＲＮＡ３を、肝特異的エンハンサー／プロモーターＡＢＰ２．ＴＢＧ－Ｓ１により駆動されるＳａＣａｓ９を含有するＡＡＶプラスミド中にクローン化した（図１３Ａ）。ＡＡＶ８ベクターを製造し、そして３×１０^{13}ＧＣ／ｋｇの用量でアカゲザルに静脈内送達した。ベクター処置２週後に、血清ＰＣＳＫ９レベルは第０日に比較して４０％低下した（図１３Ｂ）。血清コレステロール、ＨＤＬ、ＬＤＬ及びトリグリセリドレベルは現在監視中である。ＤＮＡ及びＲＮＡ分析が、肝生検サンプルで実施される。

【０１４４】

本出願は配列及び配列表を含有し、それらは引用することによりここに組み込まれる。本出願中に引用される全部の刊行物、特許及び特許出願、並びに、２０１６年１月２７日出願の米国仮出願第６２／２８７，５１１号明細書、２０１５年１１月１２日出願の米国仮出願第６２／２５４，２２５号明細書、２０１５年６月２４日出願の米国仮出願第６２／１８３，８２５号明細書、及び２０１５年４月２７日出願の米国仮出願第６２／１５３，４７０号明細書は、各個々の刊行物若しくは特許出願が引用することにより組み込まれることを特別にかつ個々に示されたかのように、そっくりそのまま引用することによりここに組み込まれる。前述の発明は、理解の明確さの目的上具体的説明及び実施例によって若干詳細に記述されたとは言え、ある種の変更及び改変を、付属される特許請求の範囲の技術思想若しくは範囲から離れることなくそれに対し行い得ることが、本発明の教示に照らして当業者に容易に明らかであろう。

【０１４５】

【表１２－１】

表12

(配列表フリーテキスト)

以下の情報が、数値識別子<223＞の下にフリーテキストを含む配列について提供される。

配列番号 (フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
1	<220> <221> misc_feature <222> (4)..(23) <223> sgRNA2 <220> <221> misc_feature <222> (24)..(29) <223> PAM <220> <221> misc_feature <222> (52)..(52) <223> spfash 突然変異部位 G->A <220> <221> misc_feature <222> (77)..(96) <223> sgRNA3 <220> <221> misc_feature <222> (91)..(96) <223> PAM (逆相補配列) <220> <221> misc_feature <222> (97)..(102) <223> PAM <220> <221> misc_feature <222> (97)..(116) <223> sgRNA1 (逆相補配列)
2	<220> <221> misc_feature <222> (3)..(21) <223> sgRNA1 <220> <221> misc_feature <222> (22)..(27)

【０１４６】

【表１２－２】

配列番号 (フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<223> PAM <220> <221> misc_feature <222> (98)..(103) <223> PAM (逆相補配列) <220> <221> misc_feature <222> (102)..(104) <223> W392X 突然変異:TGG->TGA <220> <221> misc_feature <222> (104)..(123) <223> sgRNA3 (逆相補配列) <220> <221> misc_feature <222> (130)..(149) <223> sgRNA2 <220> <221> misc_feature <222> (150)..(155) <223> PAM
3	TBG バリアント TBG-S1
4	新規エンハンサー ABPS2
5	標的配列
6	標的配列
7	標的配列
8	標的配列
9	標的配列
10	標的配列
12	spfash G->A 突然変異配列
13	OTC ドナー配列 (SpCas9, 892-983 bp)
14	OTC ドナー配列 (SaCas9, 892-989 bp)
15	OTC sgRNA1_Fwd
16	OTC sgRNA1_Rev
17	OTC sgRNA2_Fwd
18	OTC sgRNA2_Rev
19	OTC sgRNA3_Fwd
20	OTC sgRNA3_Rev
21	HDR-Fwd
22	HDR-Rev

【０１４７】

【表１２－３】

配列番号 (フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
23	OTC_PointM_F
24	OTC_PointM_R
25	mOTC hSpCas9 sgRNA1_Fwd
26	mOTC hSpCas9 sgRNA1_Rev
27	mOTC hSpCas9 sgRNA2_Fwd
28	mOTC hSpCas9 sgRNA2_Rev
29	mOTC hSpCas9 sgRNA3_Fwd
30	mOTC hSpCas9 sgRNA3_Rev
31	mOTC hSaCas9 sgRNA1_Fwd
32	mOTC hSaCas9 sgRNA1_Rev
33	mOTC hSaCas9 sgRNA2_Fwd
34	mOTC hSaCas9 sgRNA2_Rev
35	mOTC hSaCas9 sgRNA3_Fwd
36	mOTC hSaCas9 sgRNA3_Rev
37	OTC_OT1F1
38	OTC_OT1R1
39	OTC_OT1F2
40	OTC_OT1R2
41	OTC_OT2F1
42	OTC_OT2R1
43	OTC_OT2F2
44	OTC_OT2R2
45	OTC_OT3F1
46	OTC_OT3R1
47	OTC_OT3F2
48	OTC_OT3R2
49	OTC_OT4F1
50	OTC_OT4R1
51	OTC_OT4F2
52	OTC_OT4R2
53	OTC_OT5F1
54	OTC_OT5R1
55	OTC_OT5F2
56	OTC_OT5R2
57	OTC_OT6F1
58	OTC_OT6R1
59	OTC_OT6F2
60	OTC_OT6R2
61	OTC_OT7F1
62	OTC_OT7R1
63	OTC_OT7F2
64	OTC_OT7R2

【０１４８】

【表１２－４】

配列番号 (フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
65	OTC_OT8F1
66	OTC_OT8R1
67	OTC_OT8F2
68	OTC_OT8R2
69	OTC_OT9F1
70	OTC_OT9R1
71	OTC_OT9F2
72	OTC_OT9R2
73	OTC_OT10F1
74	OTC_OT10R1
75	OTC_OT10F2
76	OTC_OT10R2
77	OTC_OT11F1
78	OTC_OT11R1
79	OTC_OT11F2
80	OTC_OT11R2
81	OTC_OT12F
82	OTC_OT12R
83	OTC_OT13F1
84	OTC_OT13R1
85	OTC_OT13F2
86	OTC_OT13R2
87	OTC_OT14F1
88	OTC_OT14R1
89	OTC_OT14F2
90	OTC_OT14R2
91	OTC_OT15F1
92	OTC_OT15R1
93	OTC_OT15F2
94	OTC_OT15R2
95	OTC_OT16F1
96	OTC_OT16R1
97	OTC_OT16F2
98	OTC_OT16R2
99	sgRNA1
100	OT1
101	OT2
102	OT3
103	OT4
104	OT5
105	OT6
106	OT7

【０１４９】

【表１２－５】

配列番号 (フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
107	OT8
108	OT9
109	OT10
110	OT11
111	OT12
112	OT13
113	OT14
114	OT15
115	OT16
116	OT17
117	OT18
118	OT19
119	OT20
120	OT21
121	OT22
122	OT23
123	OT24
124	OT25
125	OT26
126	OT27
127	OT28
128	OT29
129	OT30
130	OT31
131	OT32
132	OT33
133	OT34
134	OT35
135	OT36
136	OT37
137	OT38
138	OT39
139	OT40
140	OT41
141	OT42
142	OT43
143	OT44
144	OT45
145	OT46
146	OT47
147	OT48
148	OT49

【０１５０】

【表１２－６】

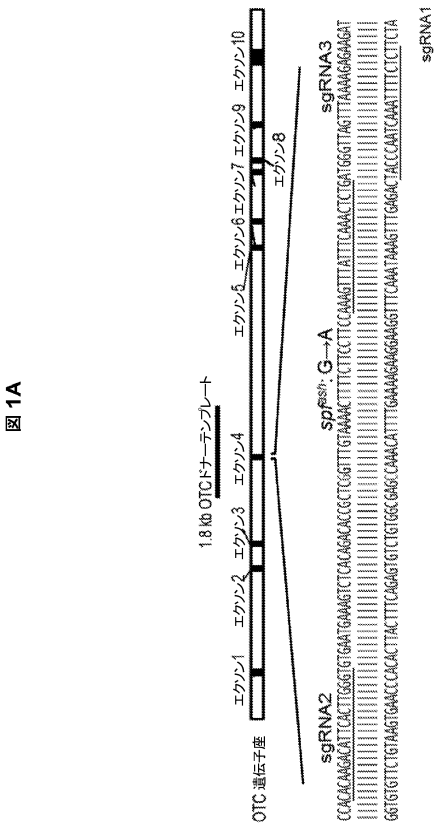
配列番号 (フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
149	dIDUA_sgRNA1_Fwd
150	dIDUA_sgRNA1_Rev
151	dIDUA_sgRNA2_Fwd
152	dlDUA_sgRNA2_Rev
153	dIDUA_sgRNA3_Fwd
154	dlDUA_sgRNA3_Rev
155	dIDUA_sgRNA4_Fwd
156	dlDUA_sgRNA4_Rev
157	dIDUA_sgRNA5_Fwd
158	dlDUA_sgRNA5_Rev
159	dIDUA_sgRNA6_Fwd
160	dlDUA_sgRNA6_Rev
161	hCFTR_sgRNA1_Fwd
162	hCFTR_sgRNA1_Rev
163	hCFTR_sgRNA2_Fwd
164	hCFTR_sgRNA2_Rev
165	hCFTR_sgRNA3_Fwd
166	hCFTR_sgRNA3_Rev
167	hCFTR_sgRNA4_Fwd
168	hCFTR_sgRNA4_Rev
169	mFIXsgRNA1_Fwd
170	mFIXsgRNA1_Rev
171	mFIXsgRNA2_Fwd
172	mFIXsgRNA2_Rev
173	mFIXsgRNA3_Fwd
174	mFIXsgRNA3_Rev
175	mFIX_PointM_F
176	mFIX_PointM_R
177	rhFIXsgRNA1_Fwd
178	rhFIXsgRNA1_Rev
179	rhFIXsgRNA2_Fwd
180	rhFIXsgRNA2_Rev
181	rhFIXsgRNA3_Fwd
182	rhFIXsgRNA3_Rev
183	EGFP-sgRNAF
184	EGFP-sgRNAR
185	PCSK9_sgRNA1F
186	PCSK9_sgRNA1R
187	PCSK9_sgRNA2F
188	PCSK9_sgRNA2R
189	PCSK9_sgRNA3F
190	PCSK9_sgRNA3R

【０１５１】

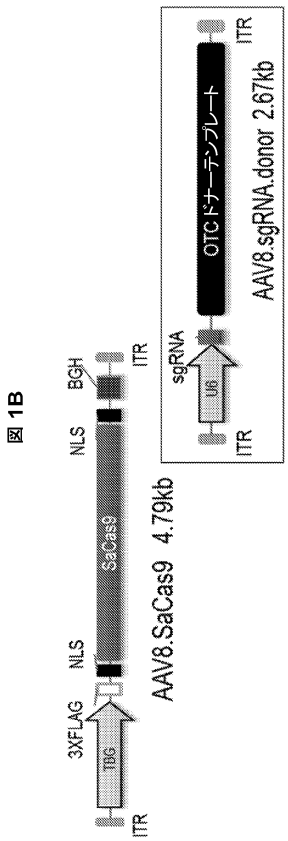
【表１２－７】

配列番号 (フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
191	PCSK9_sgRNA4F
192	PCSK9_sgRNA4R
193	PCSK9_sgRNA5F
194	PCSK9_sgRNA5R
195	PCSK9_sgRNA6F
196	PCSK9_sgRNA6R
197	PCSK9_sgRNA7F
198	PCSK9_sgRNA7R

【図１Ａ】



【図１Ｂ】



【図１Ｃ】

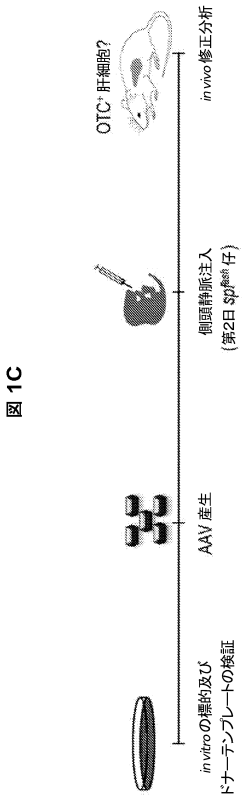
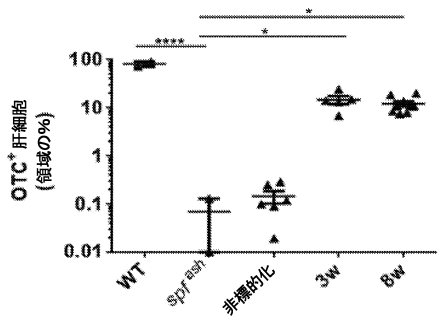


図 1C

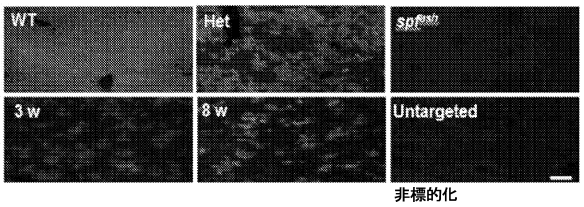
【図２Ａ】

図 2A



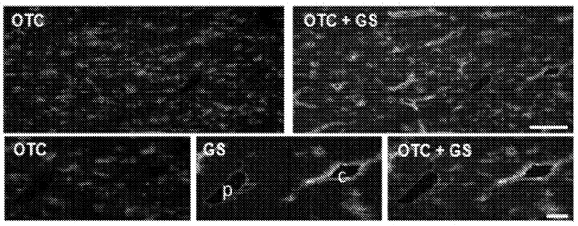
【図２Ｂ】

図 2B



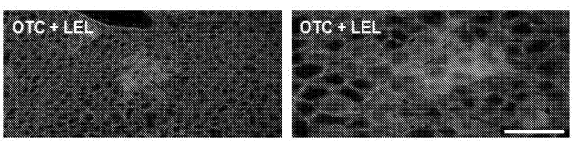
【図２Ｃ】

図 2C



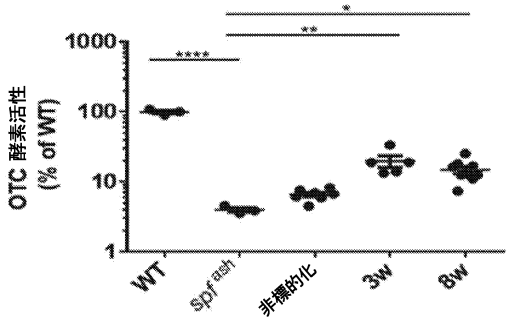
【図２Ｄ】

図 2D



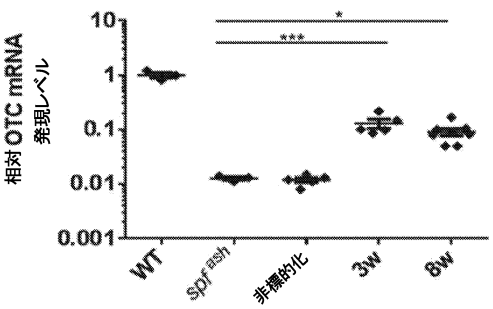
【図２Ｅ】

図 2E

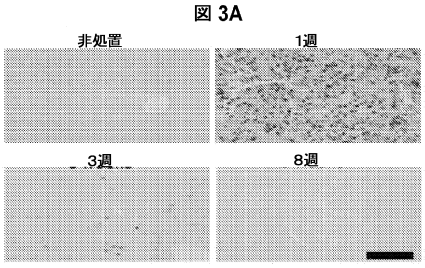


【図２Ｆ】

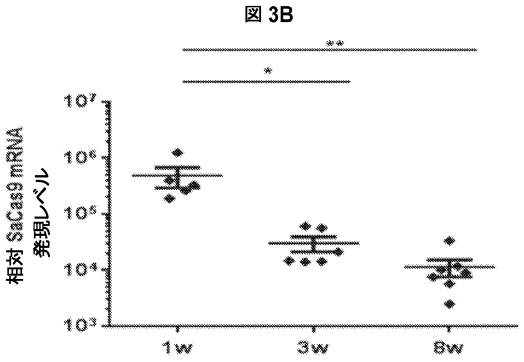
図 2F



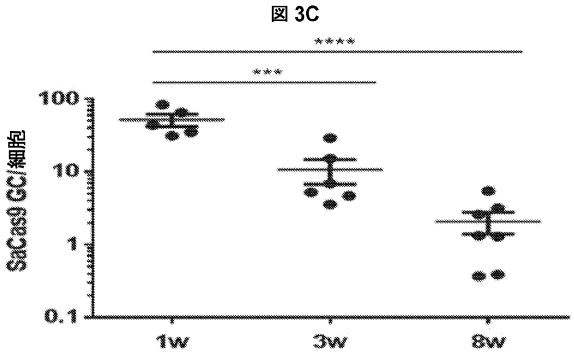
【図３Ａ】



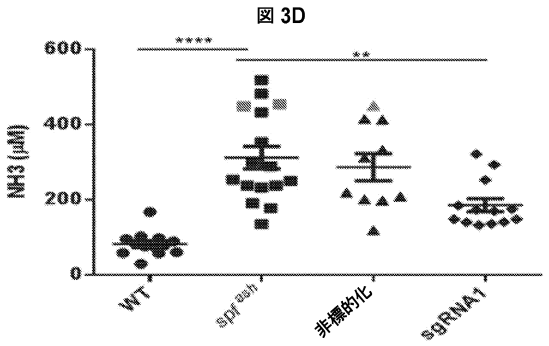
【図３Ｂ】



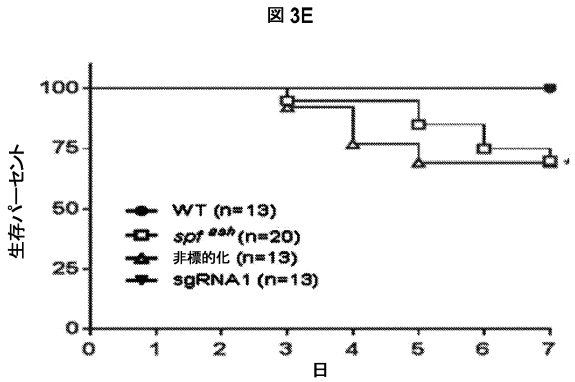
【図３Ｃ】



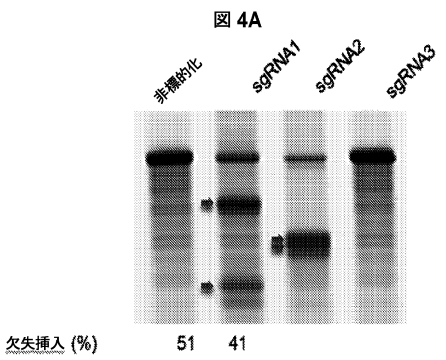
【図３Ｄ】



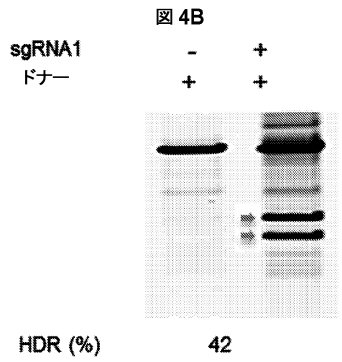
【図３Ｅ】



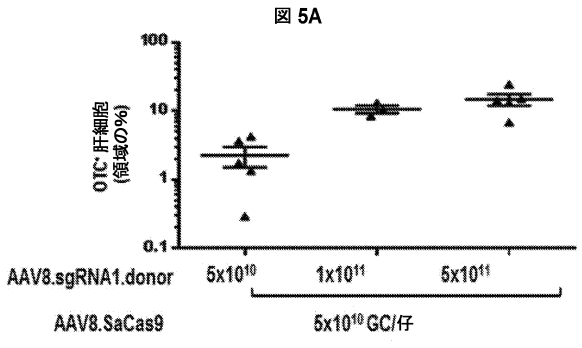
【図４Ａ】



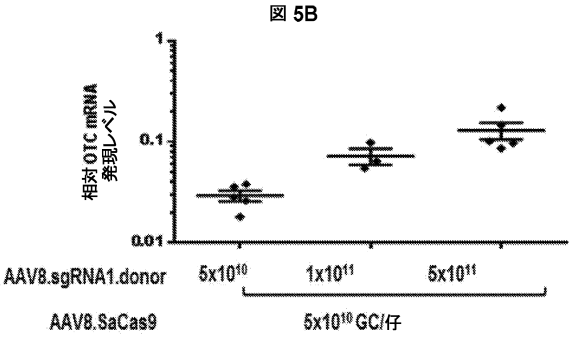
【図４Ｂ】



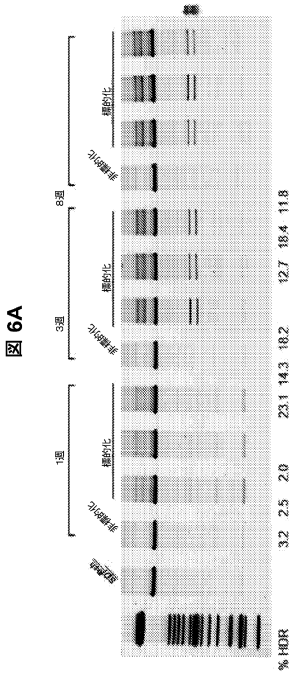
【図５Ａ】



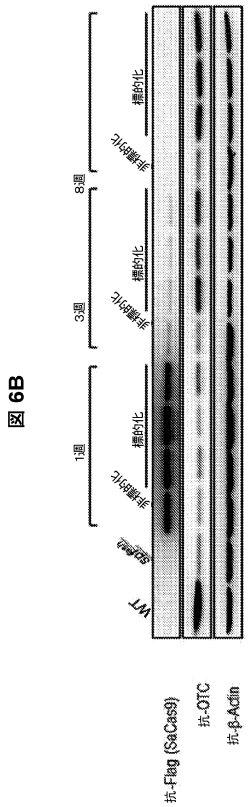
【図５Ｂ】



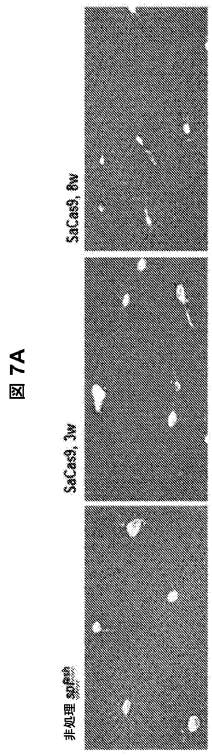
【図６Ａ】



【図６Ｂ】

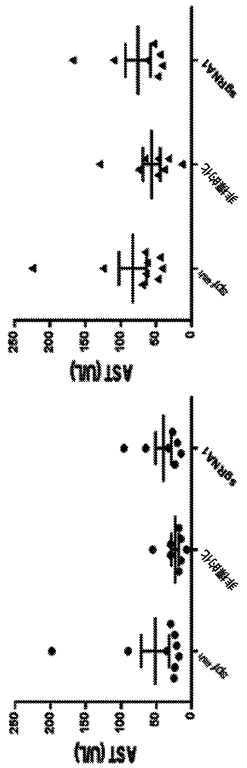


【図７Ａ】



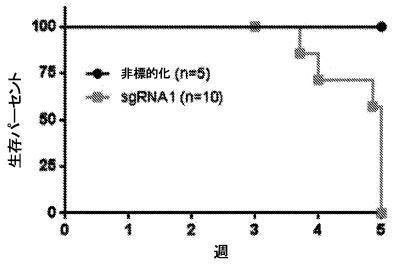
【図７Ｂ】

図 7B



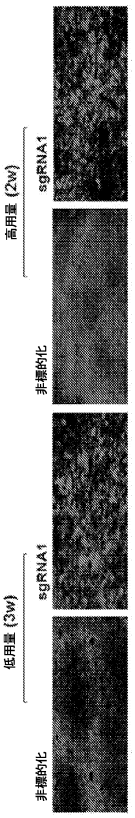
【図８Ａ】

図 8A



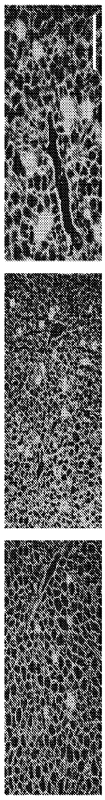
【図８Ｂ】

図 8B

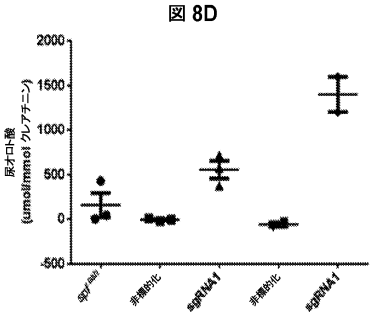


【図８Ｃ】

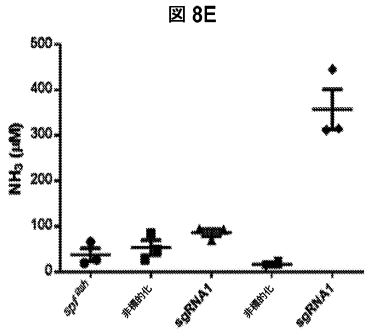
図 8C



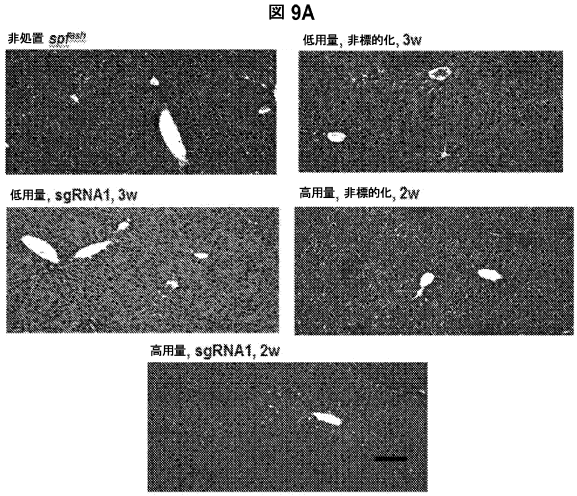
【図８Ｄ】



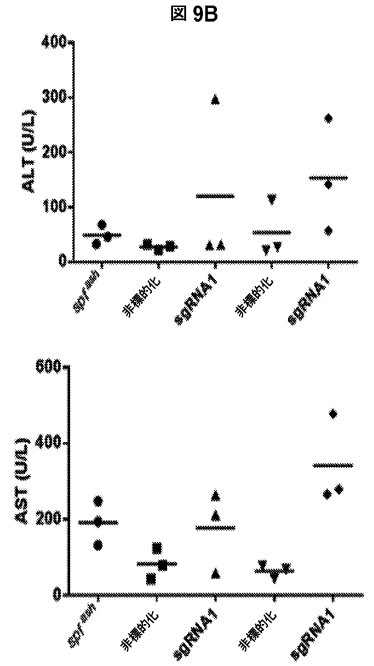
【図８Ｅ】



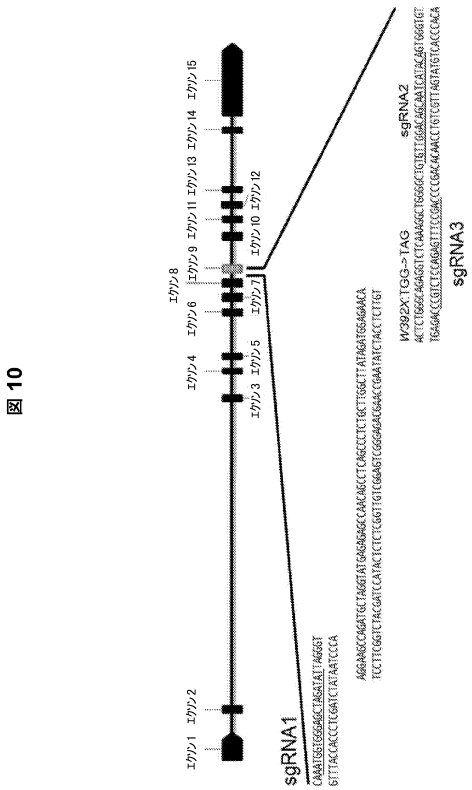
【図９Ａ】



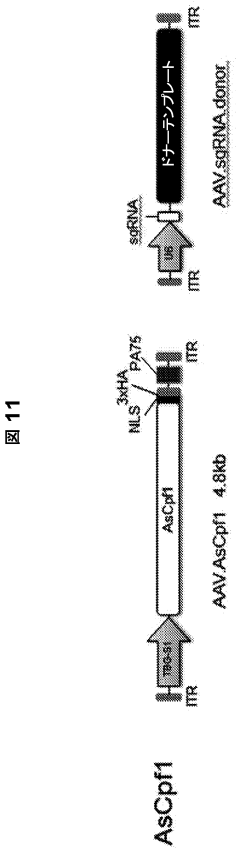
【図９Ｂ】



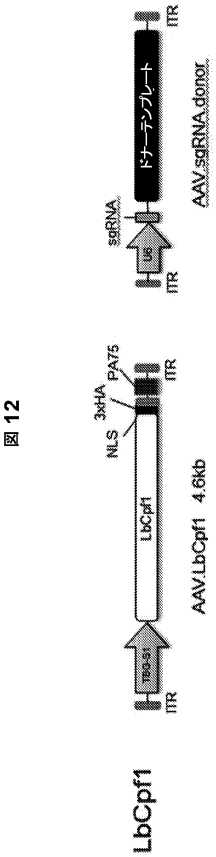
【図１０】



【図１１】

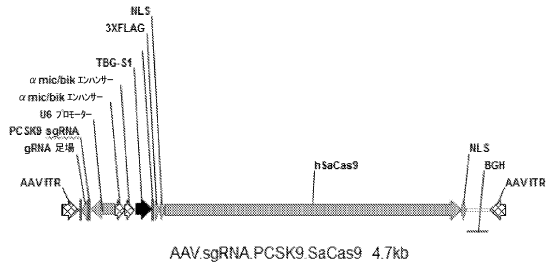


【図１２】



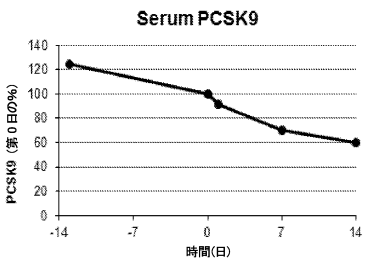
【図１３Ａ】

図 13A



【図１３Ｂ】

図 13B



【配列表】
0006851319000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 62/254,225
(32)優先日 平成27年11月12日(2015.11.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/287,511
(32)優先日 平成28年1月27日(2016.1.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 ワン，リリ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９４６０フェニックスビル・シェフィールドコート３５
(72)発明者 ヤン，ヤン
中華人民共和国６１００９１四川省・チェングドゥ・シンヤンディストリクト１２－２－５０６・チェンフェイアベニュー１９９

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献 国際公開第２０１４／２０４７２６（WO，Ａ１）
nature biotechnology，２０１４年１０月１９日，Vol.33(1)，pp.102-106
Nature，２０１５年 ４月，Vol.520，pp.186-191
Nature，２０１１年，Vol.475，pp.217-221

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ４８／００
Ａ６１Ｋ ４７／００
Ａ６１Ｋ ３５／００
Ａ６１Ｋ ３１／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）