

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7315475号
(P7315475)

(45)発行日 令和5年7月26日(2023.7.26)

(24)登録日 令和5年7月18日(2023.7.18)

(51)国際特許分類

C 12 N	15/85 (2006.01)	F I	C 12 N	15/85	Z Z N A
C 12 N	15/864 (2006.01)		C 12 N	15/864	1 0 0 Z
C 12 P	21/02 (2006.01)		C 12 P	21/02	C
C 12 N	15/62 (2006.01)		C 12 N	15/62	Z
A 61 K	35/76 (2015.01)		A 61 K	35/76	

請求項の数 21 (全82頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-563548(P2019-563548)
 (86)(22)出願日 平成30年5月18日(2018.5.18)
 (65)公表番号 特表2020-520643(P2020-520643
 A)
 (43)公表日 令和2年7月16日(2020.7.16)
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/033515
 (87)国際公開番号 WO2018/213786
 (87)国際公開日 平成30年11月22日(2018.11.22)
 審査請求日 令和3年5月17日(2021.5.17)
 (31)優先権主張番号 62/508,968
 (32)優先日 平成29年5月19日(2017.5.19)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 前置審査

(73)特許権者 519354980
 エンコーデッド セラピューティクス、
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, オ
 イスター ポイント ブールバード 341
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高活性制御エレメント

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

導入遺伝子に作動可能に連結された制御エレメントを含む発現力セットであって、前記導入遺伝子の内因性バージョンが、前記制御エレメントに連結されておらず、前記制御エレメントが、配列番号 1_4 の配列を含む、発現力セット。

【請求項2】

前記制御エレメントが、天然に存在しない、請求項1に記載の発現力セット。

【請求項3】

前記制御エレメントが、イントロン配列を含む、請求項1に記載の発現力セット。

【請求項4】

前記制御エレメントが、プロモーターと前記導入遺伝子との間に位置する、請求項3に記載の発現力セット。

【請求項5】

前記制御エレメントが、プロモーター配列を含む、請求項1に記載の発現力セット。

【請求項6】

前記制御エレメントが、前記力セット中の唯一のプロモーターである、請求項5に記載の発現力セット。

【請求項7】

前記発現力セットが、ウイルス粒子の一部である、請求項1から 6 のいずれか一項に記載の発現力セット。

【請求項 8】

前記ウイルス粒子が、組換えアデノ隨伴ウイルス（rAAV）、組換えレンチウイルス、組換えアデノウイルスまたは組換えレトロウイルスである、請求項7に記載の発現力セット。

【請求項 9】

前記ウイルス粒子がrAAVであり、前記rAAVが、rAAV1、rAAV2、rAAV3、rAAV3b、rAAV4、rAAV5、rAAV6、rAAV7、rAAV8、rAAV9、rAAV10、rAAV11、rAAV12、rAAV-DJまたはrscAAVである、請求項8に記載の発現力セット。

【請求項 10】

前記導入遺伝子が、ハプロ不全と関連する遺伝子、遺伝的欠陥と関連する遺伝子、ホルモン、増殖因子、分化因子、神経栄養因子、サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、免疫グロブリン、キメラT細胞受容体、インターフェロン、DNA結合タンパク質、遺伝子編集タンパク質、転写活性化因子、または転写抑制因子である、請求項1から9のいずれか一項に記載の発現力セット。

10

【請求項 11】

前記導入遺伝子が、治療用タンパク質をコードする、請求項1から10のいずれか一項に記載の発現力セット。

【請求項 12】

前記治療用タンパク質が、ATP7B、ATP7A、ATP8B1、ABC B4、ABC B11、CDKL5、CNTNAP2、ZEB2、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子、または第12因子である、請求項11に記載の発現力セット。

20

【請求項 13】

前記治療用タンパク質が、ATP7Bである、請求項12に記載の発現力セット。

【請求項 14】

前記治療用タンパク質が、第8因子である、請求項12に記載の発現力セット。

【請求項 15】

医薬として使用するための組成物であって、請求項11から14のいずれか一項に記載の発現力セットを含む、組成物。

30

【請求項 16】

ハプロ不全または遺伝的欠陥の処置を必要とする被験体においてハプロ不全または遺伝的欠陥を処置する方法における使用のための組成物であって、請求項11から14のいずれか一項に記載の発現力セットを含む、組成物。

【請求項 17】

ウィルソン病の処置を必要とする被験体においてウィルソン病を処置する方法における使用のための組成物であって、請求項13に記載の発現力セットを含む、組成物。

【請求項 18】

血液凝固障害の処置を必要とする被験体において血液凝固障害を処置する方法における使用のための組成物であって、請求項14に記載の発現力セットを含む、組成物。

40

【請求項 19】

被験体におけるハプロ不全または遺伝的欠陥を処置するための医薬の製造における請求項11から14のいずれか一項に記載の発現力セットの使用。

【請求項 20】

被験体におけるウィルソン病を処置するための医薬の製造における請求項13に記載の発現力セットの使用。

【請求項 21】

被験体における血液凝固障害を処置するための医薬の製造における請求項14に記載の発現力セットの使用。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】**【0001】****相互参照**

本願は、2017年5月19日に出願した米国仮出願第62/508,968号の利益を主張する。この出願は、その全体が本明細書に参考として援用される。

【0002】**配列表**

本願は、ASCI形式で電子的に提出された配列表を含み、この配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2018年5月17日に作成されたこのASCIコピーは、46482-707_601_SL.txtという名称であり、そのサイズは16,836バイトである。10

【背景技術】**【0003】****開示の背景**

遺伝子操作は、疾患の処置にとって、および治療的または他の使用のいずれかのためのタンパク質の産生にとって、莫大な可能性を有する。薬物または外科手術に依存するのではなく、患者、特に、根底にある遺伝学的要因を有するものは、根底にある原因を直接的に標的とすることによって、処置することができる。さらに、根底にある原因 자체を標的とすることによって、遺伝子療法は、患者を効果的に治癒する可能性を有する。しかしながら、それにもかかわらず、遺伝子療法の臨床適用は、依然として、いくつかの側面で改善を必要とする。1つの課題は、1つもしくは複数の標的組織における導入遺伝子の高率の発現、または1つもしくは複数の標的組織における遺伝子編集の高い効率を達成することである。別の課題は、一般に使用されるベクターのパッケージング制限（またはクローニング能力）によって導入される。作動可能に連結された導入遺伝子の高い発現を駆動させることができる短い制御エレメントが必要とされている。20

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0004】****開示の概要**

導入遺伝子の高い発現を駆動させるための(for driving)組成物および方法が、本明細書に記載される。1つまたは複数のヒトまたはヒト由来制御エレメント(REE)を含む、導入遺伝子の高い発現を駆動させるための組成物および方法もまた本明細書に記載され、このエレメントは、導入遺伝子に作動可能に連結されると、1つまたは複数の標的細胞型または組織において導入遺伝子の高い（または増加した）発現を促進することができるか、またはもたらすことができる。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態の高いまたは増加した導入遺伝子発現は、対照、たとえば、構成的プロモーター、CAG、CMVプロモーター、スーパー・コアプロモーター(SCP)、TTRプロモーター、Proto-1プロモーター、UCL-HLPプロモーターまたはCMV eプロモーターと比較して判定される。本明細書に開示される制御エレメントによる高いまたは増加した導入遺伝子発現を判定するための比較に使用され得る他の対照としては、緩衝液単独、minCMV、EFS、ベクター単独、または発現を駆動させない配列が挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に開示される1つまたは複数の制御エレメントは、細胞中で、またはin vivo、in vitroおよび/もしくはex vivoで、導入遺伝子の高い発現を駆動させる。一部の実施形態では、導入遺伝子に作動可能に連結された本明細書に記載される1つまたは複数の制御エレメントを含む発現力セットまたはベクターは、細胞、対象もしくは動物モデルにおける導入遺伝子の高い発現を駆動させるため、または細胞、対象もしくは動物モデルにおける導入遺伝子発現の治療有効レベルをもたらすために、任意の発現系または遺伝子療法における使用のために適合され得る。一部の実施形態では、本開示の1つまたは複数のREEは、細胞中でまたはin vivoで導入遺伝子の高い発現をもたらすために、大きな導入遺伝子（たとえば、その配列が、1kb、1.530

10

20

30

40

50

k b、2 k b、2 . 5 k b、3 k b、3 . 5 k b、4 k b、4 . 5 k b、5 k b、5 . 5 k b、6 k b、6 . 5 k b、7 k bまたは7 . 5 k bを上回る導入遺伝子)に作動可能に連結される。一部の事例では、細胞中でまたはin vivoでの導入遺伝子のそのような高い発現は、前記REなしの導入遺伝子の発現に対しての比較であり、ここで、REありの導入遺伝子の発現は、REなしの導入遺伝子発現と比較して少なくとも1 . 5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍であり、または100倍を上回る。一部の事例では、1つまたは複数のREは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10個の異なる細胞型において、そのような高い導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、本開示の1つまたは複数のREは、全身投与のために適合された遺伝子療法処置のために、導入遺伝子に作動可能に連結される。一部の事例では、本開示の1つまたは複数のREは、肝臓または肝細胞における発現のために適合された遺伝子療法処置のために、導入遺伝子に作動可能に連結される。一部の事例では、導入遺伝子は、DNA結合タンパク質、たとえば、内因性遺伝子をモジュレートする転写モジュレーターである。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、プロモーター配列、イントロン配列、5'UTR配列、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、ヒト由来配列(またはヒト参照ゲノム中の配列に対して少なくとも80%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列)である。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、長さが300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、140 bp、130 bp、120 bp、110 bp、100 bp、70 bpもしくは50 bp未満であるかまたはそれと等しい。一部の事例では、発現構築物(たとえば、ベクター、AAVまたはウイルスベクター)は、本開示の導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数の外因性RE配列を含み、ここで、各外因性RE配列は、表1に列挙された配列もしくは配列番号1~2、13~17および22~41から選択される;または各外因性RE配列は、表1の配列もしくは配列番号1~2、13~17および22~41を含む;または各外因性RE配列は、表1の配列もしくは配列番号1~2、13~17および22~41に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性(たとえば、局所的な配列同一性)(たとえば、BLASTによって測定された配列同一性)を有する配列を含む。一部の事例では、発現カセット(たとえば、ベクター、AAVまたはウイルスベクター)は、任意の導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数のRE配列を含み、ここで、各RE配列は、49 bp、50 bp、56 bp、60 bp、70 bp、80 bp、90 bp、100 bp、110 bp、117 bp、120 bp、130 bp、140 bp、150 bp、160 bp、170 bp、180 bp、190 bp、200 bp、210 bp、220 bp、230 bp、240 bp、250 bp、259 bp、260 bp、265 bp、270 bp、280 bp、290 bp、300 bp、310 bp、320 bp、330 bp、340 bp、350 bp、360 bp、370 bp、380 bp、390 bpまたは400 bp以下であり、表1または配列番号1~2、13~17および22~41のうちのいずれか1つに従う配列を含む。一部の事例では、発現構築物(たとえば、ベクター、AAVまたはウイルスベクター)は、本開示の導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数の外因性RE配列を含み、ここで、各RE配列は、49 bp、50 bp、56 bp、60 bp、70 bp、80 bp、90 bp、100 bp、110 bp、117 bp、120 bp、130 bp、140 bp、150 bp、160 bp、170 bp、180 bp、190 bp、200 bp、210 bp、220 bp、230 bp、240 bp、250 bp、259 bp、260 bp、265 bp、270 bp、280 bp、290 bp、300 bp、310 bp、320 bp、330 bp、340 bp、350 bp、360 bp、370 bp、380 bp、390 bpまたは400 bp以下であり、表1または配列番号1~2、13~17および22~41のうちのいずれか1つに従う配列を含む。

10
20
30
40
50

10 b p、320 b p、330 b p、340 b p、350 b p、360 b p、370 b p
 、380 b p、390 b pまたは400 b p以下であり、表1または配列番号1～2、1
 3～17および22～41のうちのいずれか1つに対して少なくとも70%、少なくとも
 75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、
 少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも
 96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を
 有する配列を含む。一部の事例では、局所的な配列同一性は、BLASTを使用して測定
 される。一部の事例では、パーセント配列同一性は、発現力セット中の外因性RE全体を
 カバーする全体的配列同一性を指す。他の事例では、パーセント配列同一性は、表1に列
 挙された配列のうちのいずれか1つに対応する領域または領域の一部をカバーする局所的
 な配列同一性を指す。一部の事例では、パーセント配列同一性は、導入遺伝子を含まない
 、発現力セットの49 b p、50 b p、56 b p、60 b p、70 b p、80 b p、90
 b p、100 b p、110 b p、117 b p、120 b p、130 b p、140 b p、1
 50 b p、160 b p、170 b p、180 b p、190 b p、200 b p、210 b p
 、220 b p、230 b p、240 b p、250 b p、259 b p、260 b p、265
 b p、270 b p、280 b p、290 b p、300 b p、310 b p、320 b p、3
 30 b p、340 b p、350 b p、360 b p、370 b p、380 b p、390 b p
 または400 b p以下を構成する領域をカバーする局所的な配列同一性を指す。本明細書
 で使用される場合、「比較的短い」は、本開示のREを記述する場合、好ましくは、45
 b p、49 b p、50 b p、56 b p、60 b p、70 b p、80 b p、90 b p、10
 0 b p、110 b p、117 b p、120 b p、130 b p、140 b p、150 b p、
 160 b p、170 b p、180 b p、190 b p、200 b p、210 b p、220 b
 p、230 b p、240 b p、250 b p、259 b p、260 b p、265 b p、27
 0 b p、280 b p、290 b p、300 b p、310 b p、320 b p、330 b p、
 340 b p、350 b p、360 b p、370 b p、380 b p、390 b pまたは40
 0 b p以下であるRE配列である。比較的短いREの例としては、表1に列挙された配列
 もしくは配列番号1～2、13～17および22～41；またはそれに対して少なくとも
 70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、
 少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも
 95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも
 99%の配列同一性を有する配列が挙げられ、これらはまた、45 b p、49 b p、50
 b p、56 b p、60 b p、70 b p、80 b p、90 b p、100 b p、110 b p、
 117 b p、120 b p、130 b p、140 b p、150 b p、160 b p、170 b
 p、180 b p、190 b p、200 b p、210 b p、220 b p、230 b p、24
 0 b p、250 b p、259 b p、260 b p、265 b p、270 b p、280 b p、
 290 b p、300 b p、310 b p、320 b p、330 b p、340 b p、350 b
 p、360 b p、370 b p、380 b p、390 b pまたは400 b p以下である。
 【0005】

一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のRE配列は、導入遺伝子の上
 流または下流に位置する。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態の2つ
 またはそれよりも多くのREは、導入遺伝子に作動可能に連結され、ここで、REのうち
 の少なくとも1つまたは複数は、導入遺伝子の上流または下流に位置する。一部の事例では、
 本開示の任意の実施形態の1つまたは複数のREは、導入遺伝子の全体的発現を駆動
 させるために、導入遺伝子に作動可能に連結され、ここで、全体的発現は、少なくとも2
 、3、4、5、6、7、8、9または10個の異なる細胞型における発現を指す。一部の
 事例では、本開示の任意の実施形態の1つまたは複数のREは、導入遺伝子の全体的発現
 を駆動させるために、導入遺伝子に作動可能に連結され、ここで、REおよび導入遺伝子
 を含む構築物は、全身的に、たとえば、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、くも膜下腔内、
 経腸または非経口投与を介して送達され得る。種々の実施形態では、本明細書に開示され
 るREは、ヒト由来（またはヒト参照ゲノム中の配列に対して少なくとも80%、90%
 10
 20
 30
 40
 50

、 95 %または99 %の配列同一性を有する配列)である。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態の R E は、天然に存在しない。

【 0 0 0 6 】

一部の事例では、発現ベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結された、 400 b p、 300 b p、 250 b p、 200 b p、 150 b p、 140 b p、 130 b p、 120 b p、 110 b p、 100 b p、 70 b p もしくは 50 b p 未満であるかまたはそれと等しい b p を有するヒト由来制御エレメントを含み、ここで、制御エレメントは、制御エレメントなしの第 2 の発現ベクターと比較して、導入遺伝子の全体的発現 (たとえば、少なくとも 2、3、4、5、6 つまたはそれよりも多くの異なる細胞型における発現) を少なくとも 2 倍増加させる。一部の事例では、第 2 の発現ベクターは、 CMV プロモーターなどの対照プロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子を含む。

10

【 0 0 0 7 】

一部の事例では、本開示の R E は、ヒト由来イントロン配列、たとえば、配列番号 1 ~ 2 を含む。一部の事例では、本開示の発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結された、配列番号 1 ~ 2 のうちの 1 つまたは複数を含む。一部の事例では、配列番号 1 ~ 2 のうちのいずれか 1 つまたは複数を含む R E は、導入遺伝子の上流、下流、または上流および下流の両方に位置する。

【 0 0 0 8 】

一部の事例では、本開示の R E は、ヒト由来プロモーター配列、たとえば、配列番号 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 を含む。一部の事例では、本開示の発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結された、配列番号 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 のうちの 1 つまたは複数を含む。一部の事例では、配列番号 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 のうちのいずれか 1 つまたは複数を含む R E は、導入遺伝子の上流、下流、または上流および下流の両方に位置する。

20

【 0 0 0 9 】

一部の事例では、本開示の R E は、ヒト由来のイントロン配列および / またはプロモーター配列、たとえば、配列番号 1 ~ 2、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 のうちの 2 つもしくはそれよりも多く ; または表 1 に列挙された配列のうちの 2 つもしくはそれよりも多くを含む。一部の事例では、本開示の発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結された、表 1 に列挙された配列のうちの 1 つもしくは複数、 2 つもしくはそれよりも多く、 3 つもしくはそれよりも多く、 4 つもしくはそれよりも多く、または 5 つもしくはそれよりも多くを含む。一部の事例では、表 1 に列挙された 1 つまたは複数の R E は、発現カセット中の導入遺伝子の上流、下流、または上流および下流の両方に位置する。一部の事例では、表 1 に列挙された 1 つまたは複数の R E は、本明細書に開示される発現カセット中の導入遺伝子の上流に位置する。

30

【 0 0 1 0 】

一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態の R E は、表 1 から選択される配列または配列番号 1 ~ 2、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 、ならびにそれらの任意の組合せからなる。一部の事例では、表 1 に列挙された 2 つまたはそれよりも多くの R E は、リンカー配列を用いることなく、組み合わされる。一部の事例では、表 1 に列挙された 2 つまたはそれよりも多くの R E は、 1 ~ 50 b p のリンカー配列を使用して組み合わされる。一部の事例では、表 1 に列挙された 2 つまたはそれよりも多くの R E は、 R E 配列の 5' 開始が、 2 b p、 5 b p、 10 b p、 20 b p、 30 b p、 40 b p、 50 b p、 60 b p、 70 b p、 80 b p、 90 b p、 100 b p、 200 b p、 300 b p、 400 b p、 500 b p、 600 b p、 700 b p、 800 b p、 900 b p、 1 k b、 1.5 k b、 2 k b、 2.5 k b、 3 k b、 3.5 k b、 4 k b、 4.5 k b、 5 k b、 5.5 k b、 6 k b、 6.5 k b、 7 k b または 7.5 k b 未満で離れるように、発現構築物中に置かれる。

40

【 0 0 1 1 】

一部の事例では、発現ベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結された、 300 b p、

50

250 bp、200 bp、150 bp、140 bp、130 bp、120 bp、110 bp、100 bp、70 bpもしくは50 bp未満であるかまたはそれと等しいbpを有するヒト由来制御エレメントを含み、ここで、導入遺伝子の発現は、対照制御エレメント、たとえば、構成的プロモーター、CMVプロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Prot o 1プロモーター、UCL-HLPプロモーターまたはCMV eプロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い。一部の事例では、REに作動可能に連結された導入遺伝子の発現は、REなしにUCL-HLPプロモーターに連結された同じ導入遺伝子の発現よりも高い。

【0012】

一部の事例では、発現ベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結されたヒト由来制御エレメントを含み、ここで、導入遺伝子によってコードされるタンパク質は、(i)導入遺伝子を検出するように構成されたELISAアッセイによって測定した場合に、濃度>1.0 IU/mL、>1.5 IU/mL、>2.0 IU/mL、>2.5 IU/mLもしくは>3.0 IU/mL；および/または(ii)Coatestアッセイによって測定した場合に、>20%、>25%、>30%、>35%、>40%、>45%、>50%、>55%、>60%、>65%、>70%、>75%、>80%、>85%、>90%もしくは>95%の活性を有する。一部の事例では、そのような活性または導入遺伝子発現は、動物モデル、たとえば、マウスにおいてアッセイされる。一部の事例では、本明細書に記載される導入遺伝子発現または活性は、細胞またはマウスに送達された発現カセット、ベクター、ウイルスまたはDNAの用量、たとえば、1マウス当たり16 µg（または10~20 µg）の用量の発現ベクターに対して正規化される。

10

【0013】

一部の事例では、ベクターは、細胞中でもin vivoでも制御エレメントと関連して見出されない、または制御エレメントに通常は連結されない導入遺伝子に作動可能に連結された、サイズが300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、140 bp、130 bp、120 bp、110 bp、100 bp、70 bpもしくは50 bp未満であるかまたはそれと等しい配列を有するヒト由来制御エレメントを含む。

20

【0014】

一部の事例では、本明細書に記載される発現カセットまたはベクターは、インtron配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、またはそれらの組合せである制御エレメントを含む。一部の事例では、発現カセットまたはベクターは、配列番号1、2、3、4、13、14、15、16、17、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40もしくは41、またはそれらの組合せ、あるいはそれに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する配列である制御エレメントを含む。一部の事例では、発現カセットまたはベクターは、レポーター遺伝子、たとえば、ルシフェラーゼである導入遺伝子を含む。一部の事例では、導入遺伝子としてのレポーター遺伝子、たとえば、ルシフェラーゼの使用は、マウス全体で測定した場合に、 1×10^8 光子/秒よりも高い全体的発現をもたらす、または動物、たとえば、マウスにおける少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10個もしくはそれよりも多くの細胞型において増加した導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、本明細書に記載される発現カセットまたはベクターの活性または導入遺伝子発現は、マウスに送達された発現カセット、ベクター、ウイルスまたはDNAの用量、たとえば、1マウス当たり12 µgの用量または10~20 µgの用量の発現ベクターに対して正規化される。一部の事例では、内因性バージョンの本明細書に開示される導入遺伝子は、細胞中でもin vivoでも制御エレメントに連結されない、または細胞中でもin vivoでも制御エレメントに通常は連結されることもそれと関連することもない。一部の事例では、導入遺伝子の全体的発現は、CMVプロモーター、CMV eプロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Pro

30

40

50

t o 1 プロモーターおよび U C L - H L P プロモーターからなる群から選択される制御エレメントを有するベクターを使用した導入遺伝子の発現よりも高いレベルである。一部の事例では、発現は、*in vivo*で（たとえば、マウスまたは異なるヒト細胞系における）少なくとも 2、3、4、5、6、7 つまたはそれよりも多くの異なる細胞型において検出可能である。一部の事例では、異なる細胞型は、肺胞細胞、心筋細胞、上皮細胞、肝細胞、腸細胞、筋細胞、ニューロンおよび腎細胞からなる群から選択される。一部の事例では、本明細書に開示される制御エレメントは、エンハンサー、プロモーター、5' UTR 配列、イントロン配列、もしくはそれらの任意の組合せである、またはエンハンサー、プロモーター、5' UTR 配列、イントロン配列、もしくはそれらの任意の組合せを含む。一部の事例では、本明細書に開示される制御エレメントは、プロモーター配列である、またはプロモーター配列を含む。一部の事例では、制御エレメントは、CMV プロモーター、CMV、プロモーター、スーパー・コアプロモーター、TTT プロモーター、Proto 1 プロモーター、UCL-HLP プロモーター、AAT プロモーター、KAR プロモーター、EFF1 プロモーター、EFS プロモーターもしくは CMV エンハンサー / CMV プロモーター組合せ、またはそれらの任意の組合せ、バリアントもしくは断片であるプロモーターを含む。

【0015】

一部の事例では、本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットは、1つまたは複数の転写後修飾部位をさらに含む。一部の事例では、発現ベクターまたはカセットは、Cas 9、s a Cas 9 または d Cas 9 である導入遺伝子を含む。一部の事例では、発現ベクターまたはカセットは、DNA 結合タンパク質または転写モジュレーター、たとえば、転写活性化因子である導入遺伝子を含む。一部の事例では、そのような転写モジュレータータンパク質は、細胞内でまたは *in vivo* で内因性遺伝子の発現を増加させるように、内因性遺伝子に対して作用する。

【0016】

他の事例では、発現ベクターは、*in vivo* で第 VILI 因子を検出するように構成された E L I S A アッセイによって測定した場合に、第 VILI 因子の発現を濃度 > 1 . 0 IU / mL まで駆動させることができる本明細書に開示される制御配列に作動可能に連結された第 VILI 因子導入遺伝子を含む。

【0017】

一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態における導入遺伝子は、ハプロ不全と関連する遺伝子である。一部の事例では、そのようなハプロ不全は、肝臓または肝細胞中にある。一部の事例では、導入遺伝子は、第 VILI 因子、Cas 9、ホルモン、増殖もしくは分化因子、インスリン、成長ホルモン、VEGF、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子 (fibroblast epithelial factor) ; サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壞死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラ T 細胞受容体；リポタンパク質受容体、嚢胞性線維症膜貫通制御因子 (cystic fibrosis transmembrane regulator) 、ムコ多糖症 I 型、II 型、III 型もしくは IV 型と関連する遺伝子、ベータグロビンまたはリポタンパク質リバーゼ、あるいはそれらのバリアント、サブユニットまたは機能性断片のうちのいずれか 1 つである。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、ATP7A、ATP7B、ATP8B1、ABC B4、ABC B11、またはそれらのバリアント、サブユニットもしくは機能性断片である。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、CDKL5、CNTNAP2、ZEB2、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子もしくは血液凝固因子（たとえば、第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 10 因子、第 11 因子または第 12 因子）、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である。

【0018】

一部の事例では、本明細書に記載される発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか 1 つは、ウイルス粒子である、またはウイルス粒子を使用して送達される、またはキャプ

10

20

30

40

50

シド形成されるもしくはウイルス粒子中に提供される。一部の事例では、ウイルス粒子は、アデノ随伴ウイルス、すなわち AAV である。一部の事例では、AAV は、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 3b、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 11、AAV 12、AAV-DJ および scAAV からなる群から選択される。他の事例では、ウイルス粒子は、レンチウイルスである。一部の事例では、ウイルス粒子は、アデノウイルスである。

【0019】

一部の事例では、本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか 1 つは、治療用導入遺伝子である導入遺伝子を含む。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、第 VILI 因子、Cas 9、DNA 結合タンパク質、ホルモン、増殖もしくは分化因子、インスリン、成長ホルモン、VEGF、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子；サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壞死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラ T 細胞受容体；リボタンパク質受容体、囊胞性線維症膜貫通制御因子、ムコ多糖症 I 型、II 型、III 型もしくは IV 型と関連する遺伝子、ベータグロビンまたはリポタンパク質リバーゼ、あるいはそれらのバリエントまたは機能性断片である。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、ATP7A、ATP7B、ATP8B1、ABC4、ABC4B11、またはそれらのバリエント、サブユニットもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、ATP7A、ATP7B、AT8B1（すなわち ATP8B1）、MDR3（すなわち ABC4）、ABCBB（すなわち ABCB11）、CDKL5、CNTP2（すなわち CNTNAP2）、ZEB2、第 V 因子、第 VI 因子、第 IX 因子もしくは第 X 因子、またはそれらのバリエント、サブユニットもしくは機能性断片のうちのいずれか 1 つである。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、CDKL5、CNTNAP2、ZEB2、またはそれらのバリエント、サブユニットもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子もしくは血液凝固因子（たとえば、第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 10 因子、第 11 因子または第 12 因子）、またはそれらのバリエントもしくは機能性断片である。

【0020】

一部の事例では、動物（たとえば、哺乳動物、ヒト、マウスなど）中の複数の異なる組織または細胞型に導入遺伝子を送達するための方法は、前記動物に、本明細書に開示される発現ベクターのうちのいずれか 1 つを投与することを含む。一部の事例では、投与することは、たとえば、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、くも膜下腔内、経腸または非経口投与を介した、全身投与を含む。

【0021】

一部の事例では、タンパク質、抗体または他の生物製剤の產生のための方法は、細胞を、本明細書に開示される発現ベクターのうちのいずれか 1 つと接触させることを含む。一部の事例では、タンパク質の产生に使用される細胞は、CHO 細胞または HEK293T 細胞である。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態の発現構築物は、遺伝子療法処置、たとえば、肝細胞、腎臓細胞および / またはニューロンにおける（または中枢神経系（CNS）における）発現のために使用される。他の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態の発現構築物は、タンパク質を、ex vivo で、たとえば、任意の哺乳動物または任意のヒト細胞系、たとえば、腎臓細胞、上皮細胞、肝臓細胞、肝細胞、ニューロン、線維芽細胞または CNS 細胞において产生するために使用される。

【0022】

一部の事例では、トランスジェニック動物または植物を产生するための方法は、動物または植物に、本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか 1 つを投与することを含む。一部の事例では、本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか 1 つにおいて使用される制御エレメントは、比較的短い、または 40 ~ 50 bp、50 ~ 60 bp、60 ~ 70 bp、70 ~ 80 bp、80 ~ 90 bp、90 ~ 100 bp、100 ~ 110 bp、110 ~ 120 bp もしくは 120 ~ 130 bp で

10

20

30

40

50

ある。一部の事例では、本明細書に開示される発現カセット中のR Eは、49 b p、56 b p、100 b p、117 b p、259 b pまたは266 b pである。一部の事例では、本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか1つにおいて使用される制御エレメントは、45～50 b p、50～60 b p、45～60 b p、90～117 b p、95～110 b p、115～120 b p、250～260 b pまたは260～270 b pである。一部の事例では、本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか1つにおいて使用される制御エレメントは、約100 b pである。一部の事例では、本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか1つにおいて使用される制御エレメントは、300 b p、250 b p、200 b p、150 b p、140 b p、130 b p、120 b p、110 b p、100 b p、70 b pもしくは50 b p未満であるかまたはそれと等しい。一部の事例では、本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか1つにおいて使用される制御エレメントは、100 b pまたはそれよりも小さい。一部の事例では、導入遺伝子の高い発現を駆動させるために、本明細書に開示される2つまたはそれよりも多くの比較的短いR Eが組み合わされ、導入遺伝子に作動可能に連結される。一部の事例では、2つまたはそれよりも多くのR Eは、いずれの介在するヌクレオチドもなしに組み合わされ得、または1～50 b pのリンクを使用して組み合わされる。

【0023】

一部の態様では、本明細書に開示される発現カセットは、治療用導入遺伝子に作動可能に連結されたヒト由来制御エレメントを含み、ここで、制御エレメントは、(i)配列番号1～2、13～17および22～41；(ii)それらの断片もしくは組合せ；または(iii)(i)および(ii)のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列のうちの1つまたは複数を含む。一部の事例では、制御エレメントは、h g 19のヒト配列に由来する。一部の事例では、制御エレメントは、天然に存在しない。一部の事例では、制御エレメントは、インtron配列を含む。一部の事例では、インtron配列は、プロモーターと治療用導入遺伝子との間に位置する。一部の事例では、制御エレメントは、プロモーター配列を含む。一部の事例では、制御エレメントは、カセット中の唯一のプロモーターである。一部の事例では、制御エレメントは、100 b p以下である。一部の事例では、制御エレメントは、60 b p以下である。一部の事例では、制御エレメントは、50 b p以下である。一部の事例では、発現カセットは、r A A Vの一部である。一部の事例では、r A A Vは、r A A V 8である。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、A T P 7 Bである。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、第V I I I 因子である。一部の態様では、ウィルソン病を処置する方法は、本明細書に開示される発現カセットを投与することを含み、ここで、導入遺伝子は、A T P 7 Bである。一部の事例では、A T P 7 Bにおけるハプロ不全または遺伝的欠陥を処置する方法は、本明細書に開示される発現カセットを投与することを含み、ここで、導入遺伝子は、A T P 7 Bである。一部の事例では、血液凝固障害を処置する方法は、本明細書に開示される発現カセットを投与することを含み、ここで、導入遺伝子は、第V I I I 因子である。一部の事例では、ハプロ不全または遺伝的欠陥を処置する方法は、本明細書に開示される発現カセットを投与することを含み、ここで、導入遺伝子は、A T P 7 A；A T P 7 B；A T P 8 B 1；A B C B 4；A B C B 1 1；C D K L 5；C N T N A P 2；Z E B 2；第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子および第12因子；ならびにそれらのバリアントまたは機能性断片から選択される。一部の事例では、ハプロ不全または遺伝的欠陥を処置する方法は、本明細書に開示される発現カセットを投与することを含み、ここで、導入遺伝子は、内因性遺伝子の発現をモジュレートする転写モジュレーターである。一部の事例では、ハプロ不全または遺伝的欠陥を処置する方法は、本明細書に開示される発現カセットを投与することを含み、ここで、導入遺伝子は、以下の内因性遺伝子：A T P 7 A；A T P 7 B；A T P 8 B 1；A B C B 4；A B C B 1 1；C D K L 5；C N T N A P 2；Z E B 2；ならびに第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子および第12因子；ならびにそれらのバリアントまたは機能性断片から選択される。

10

20

30

40

50

子、第10因子、第11因子および第12因子のうちのいずれか1つの転写活性化因子である。

【0024】

一部の態様では、AAV発現カセットは、少なくとも3kbの導入遺伝子に作動可能に連結された120bp以下のヒト由来制御エレメントを含み、ここで、制御エレメントは、CMVプロモーターに作動可能に連結された場合の導入遺伝子の発現と比較して少なくとも2倍(by at least 2 fold)増加した導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、制御エレメントは、配列番号1～2、13～17および22～41から選択される。一部の事例では、制御エレメントは、(i)配列番号1～2、13～17および22～41；(ii)それらの組合せ；または(iii)(i)および(ii)のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。一部の事例では、増加した導入遺伝子発現は、少なくとも50倍である。一部の事例では、増加した導入遺伝子発現は、少なくとも100倍である。一部の事例では、増加した導入遺伝子発現は、少なくとも2つの異なる細胞型(たとえば、肝細胞および腎臓細胞)において生じる。一部の事例では、増加した導入遺伝子発現は、少なくとも3つの異なる細胞型(たとえば、肝細胞、腎臓細胞、ニューロンおよび/または上皮細胞)において生じる。一部の事例では、制御エレメントは、配列番号22～41のうちのいずれか1つまたは複数を含み、他のプロモーター配列は、発現カセット中に存在しない。一部の事例では、制御エレメントは、導入遺伝子の上流に位置する。一部の事例では、制御エレメントは、配列番号1および配列番号2のうちの1つまたは複数を含む。一部の事例では、制御エレメントは、プロモーターの下流に位置する。一部の事例では、導入遺伝子は、ATP7A；ATP7B；ATP8B1；ABC-B4；ABC-B11；CDKL5；CNTNAP2；ZEB2；第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子および第12因子；ならびにそれらのバリエントまたは機能性断片から選択される。一部の事例では、導入遺伝子は、ATP7AもしくはATP7B、またはそれらのバリエントもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子および第12因子、またはそれらのバリエントもしくは機能性断片のうちのいずれか1つである。一部の事例では、導入遺伝子は、第8因子、またはそのバリエントもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、遺伝子編集タンパク質である。一部の事例では、遺伝子編集タンパク質は、Cas(たとえば、Cas9)である。一部の事例では、導入遺伝子は、DNA結合タンパク質である。一部の事例では、導入遺伝子は、内因性遺伝子の発現を増加させる転写活性化因子である。一部の事例では、導入遺伝子は、内因性遺伝子の発現を減少させる転写抑制因子である。一部の事例では、転写活性化因子は、以下の内因性遺伝子：ATP7A；ATP7B；ATP8B1；ABC-B4；ABC-B11；CDKL5；CNTNAP2；ZEB2；ならびに第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子および第12因子のうちのいずれか1つの発現を増加させる。一部の事例では、AAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJおよびscAAVからなる群から選択される。

【0025】

一部の態様では、組換えタンパク質を产生する方法は、タンパク質をコードする配列を、(i)配列番号1～2、13～17および22～41；(ii)それらの組合せ；または(iii)(i)および(ii)のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列のうちの1つまたは複数に作動可能に連結させることを含む。

【0026】

一部の態様では、肝臓の疾患または状態を処置する方法は、(i)配列番号1～2、13～17および22～41；(ii)それらの組合せ；または(iii)(i)および(ii)のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列から選

10

20

30

40

50

択される 1 つまたは複数の制御エレメントに作動可能に連結された治療用導入遺伝子を含む遺伝子療法 (gene therapy) を投与することを含む。一部の事例では、肝臓の疾患または状態は、ウィルソン病である。一部の事例では、肝臓の疾患または状態は、血液凝固障害である。一部の事例では、導入遺伝子は、A T P 7 A もしくは A T P 7 B 、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 10 因子、第 11 因子、第 12 因子、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、第 8 因子、またはそのバリアントもしくは機能性断片である。一部の事例では、制御エレメントは、少なくとも 2 つの細胞型において増加した導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、制御エレメントは、少なくとも 3 つの細胞型において増加した導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、制御エレメントは、肝細胞において増加した導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、制御エレメントは、C M V プロモーターに作動可能に連結された場合の導入遺伝子の発現と比較して少なくとも 2 倍であるレベルの、増加した導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、遺伝子療法は、A A V である。一部の事例では、A A V は、A A V 8 である。

【 0 0 2 7 】

一部の態様では、発現ベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結された 1 0 0 b p 未満であるかまたはそれと等しい b p を有するヒト由来制御エレメントを含み、ここで、制御エレメントは、制御エレメントなしの第 2 の発現ベクターと比較して、導入遺伝子の全体的発現を少なくとも 2 倍増加させる。一部の事例では、第 2 の発現ベクターは、C M V プロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子を含む。

【 0 0 2 8 】

一部の態様では、発現ベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結された 1 0 0 b p 未満であるかまたはそれと等しい b p を有するヒト由来制御エレメントを含み、ここで、導入遺伝子の発現は、C M V プロモーター、スーパーコアプロモーター、T T R プロモーター、P r o t o 1 プロモーター、U C L - H L P プロモーターまたはC M V e プロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い。一部の事例では、導入遺伝子の発現は、U C L - H L P プロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い。一部の態様では、発現ベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結されたヒト由来制御エレメントを含み、ここで、導入遺伝子によってコードされるタンパク質は、(i) 導入遺伝子を検出するように構成された E L I S A アッセイによって測定した場合に、濃度 > 1 . 0 I U / m L ; および / または (i i) C o a t e s t アッセイによって測定した場合に、> 2 5 % の活性を有する。一部の態様では、本明細書に開示されるベクターは、細胞中でも i n v i v o でも制御エレメントと関連して見出されない導入遺伝子に作動可能に連結された、サイズが 1 0 0 b p 未満であるかまたはそれと等しい配列を有するヒト由来制御エレメントを含む。一部の事例では、本明細書に開示されるベクターは、イントロン配列である制御エレメントを含む。一部の事例では、制御エレメントは、配列番号 1 もしくは配列番号 2 、またはそれに対して少なくとも 8 0 % の相同性を有する配列である。一部の事例では、導入遺伝子としてのルシフェラーゼの使用は、マウス全体で測定した場合に、 $1 \times 1 0 ^ 8$ 光子 / 秒よりも高い全体的発現をもたらす。一部の事例では、活性または導入遺伝子発現は、1 マウス当たり 1 6 μ g の用量の発現ベクターに対応する。一部の事例では、活性または導入遺伝子発現は、1 マウス当たり 1 2 μ g の用量の発現ベクターに対応する。一部の事例では、内因性バージョンの導入遺伝子は、i n v i v o では制御エレメントに連結されない。一部の事例では、導入遺伝子の全体的発現は、C M V プロモーター、C M V e プロモーター、スーパーコアプロモーター、T T R プロモーター、P r o t o 1 プロモーターおよび U C L - H L P プロモーターからなる群から選択される制御エレメントを有するベクターを使用した導入遺伝子の発現よりも高いレベルである。一部の事例では、発現は、マウスにおいて、i n v i v o で、または細胞系において、少なくとも 2 、 3 、 4 、 5 、 6 または 7 つの異なる細胞型において検出可能である。一部の事例では、異なる細胞型は、肺胞細胞、心筋細胞、上皮細胞、肝細胞、腸細胞、筋細胞、

10

20

30

40

50

ニューロンおよび腎細胞からなる群から選択される。一部の事例では、制御エレメントは、エンハンサーである。一部の事例では、本明細書に開示されるベクターは、プロモーターをさらに含む。一部の事例では、プロモーターは、CMVプロモーター、CMV、プロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Proto1プロモーター、UCL-HLPプロモーター、AATプロモーター、KARプロモーター、EF1プロモーター、EFSプロモーターまたはCMVeエンハンサー/CMVプロモーター組合せである。一部の事例では、本明細書に開示されるベクターは、1つまたは複数の転写後修飾部位をさらに含む。一部の事例では、導入遺伝子は、Cas9である。一部の事例では、導入遺伝子は、sacCas9である。

【0029】

一部の態様では、発現ベクターは、*in vivo*で第VIII因子を検出するように構成されたELISAアッセイによって測定した場合に、第VIII因子の発現を濃度>1.0IU/mLまで駆動させることができる制御配列に作動可能に連結された第VIII因子導入遺伝子を含む。一部の事例では、ウイルス粒子は、本明細書に開示される発現ベクターを含む。一部の事例では、ウイルス粒子は、AAVである。一部の事例では、AAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJおよびscAAVからなる群から選択される。一部の事例では、ウイルス粒子は、レンチウイルスである。一部の事例では、ウイルス粒子は、アデノウイルスである。一部の事例では、導入遺伝子は、治療用導入遺伝子である。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、第VIII因子、Cas9、DNA結合タンパク質、ホルモン、増殖もしくは分化因子、インスリン、成長ホルモン、VEGF、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子；サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラT細胞受容体；リポタンパク質受容体、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ムコ多糖症I型、II型、III型もしくはIV型と関連する遺伝子、ベータグロビンまたはリボタンパク質リバーゼである。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、ATP7A、ATP7B、ATP8B1、ABC B4、ABC B11、またはそれらのバリエントもしくは機能性断片である。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、CDKL5、CNTNA P2、ZEB2、またはそれらのバリエントもしくは機能性断片である。一部の事例では、動物中の複数の異なる組織または細胞型に導入遺伝子を送達するための方法は、前記動物に、本明細書に開示される発現ベクターを投与することを含む。一部の事例では、タンパク質の産生のための方法は、細胞に、本明細書に開示される発現ベクターをトランسفクトすることを含む。一部の事例では、細胞は、CHO細胞またはHEK293T細胞である。一部の事例では、トランシジェニック動物または植物を産生するための方法は、動物または植物に、本明細書に開示される任意の実施形態の発現ベクターを投与することを含む。一部の事例では、制御エレメントは、40~50bpである。一部の事例では、制御エレメントは、50~60bpである。

【0030】

一部の態様では、発現ベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結されたヒト由来制御エレメントを含み、ここで、導入遺伝子によってコードされるタンパク質は、(i)導入遺伝子を検出するように構成されたELISAアッセイによって測定した場合に、濃度>0.1IU/mL；および/または(ii)Coatestアッセイによって測定した場合に、>10%の活性を有する。他の態様では、発現ベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結された、<120bpのbpを有するヒト由来制御エレメントを含み、ここで、導入遺伝子の発現は、UCL-HLPプロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い。一部の事例では、制御エレメントは、プロモーターである。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、DNA結合ドメインおよび転写制御ドメインを含む融合タンパク質である。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

10

20

30

40

50

治療用導入遺伝子に作動可能に連結された制御エレメントを含む発現力セットであって、前記制御エレメントが、(i)配列番号1～2、13～17および22～41；または(ii)(i)のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列のうちの1つまたは複数を含む、発現力セット。

(項目2)

前記制御エレメントが、天然に存在しない、項目1に記載の発現力セット。

(項目3)

前記制御エレメントが、イントロン配列を含む、項目1に記載の発現力セット。

(項目4)

前記制御エレメントが、プロモーターと前記治療用導入遺伝子との間に位置する、項目3に記載の発現力セット。

10

(項目5)

前記制御エレメントが、プロモーター配列を含む、項目1に記載の発現力セット。

(項目6)

前記制御エレメントが、前記力セット中の唯一のプロモーターである、項目5に記載の発現力セット。

(項目7)

前記制御エレメントが、100bp以下である、項目1に記載の発現力セット。

(項目8)

前記制御エレメントが、60bp以下である、項目1に記載の発現力セット。

20

(項目9)

前記制御エレメントが、50bp以下である、項目1に記載の発現力セット。

(項目10)

前記発現力セットが、rAAVの一部である、項目1に記載の発現力セット。

(項目11)

前記rAAVが、rAAV8である、項目1に記載の発現力セット。

(項目12)

前記治療用導入遺伝子が、ATP7Bまたはそのバリアントである、項目1から11のいずれか一項に記載の発現力セット。

(項目13)

30

前記治療用導入遺伝子が、第VII因子またはそのバリアントである、項目1から1のいずれか一項に記載の発現力セット。

(項目14)

項目1から11のいずれか一項に記載の発現力セットを投与することを含む、ウィルソン病を処置する方法であって、前記導入遺伝子が、ATP7Bまたはそのバリアントである、方法。

(項目15)

項目1から11のいずれか一項に記載の発現力セットを投与することを含む、ATP7Bにおける遺伝的欠陥を処置する方法であって、前記導入遺伝子が、ATP7Bまたはそのバリアントである、方法。

40

(項目16)

項目1から11のいずれか一項に記載の発現力セットを投与することを含む、血液凝固障害を処置する方法であって、前記導入遺伝子が、第VII因子またはそのバリアントである、方法。

(項目17)

項目1から11のいずれか一項に記載の発現力セットを投与することを含む、ハプロ不全または遺伝的欠陥を処置する方法。

(項目18)

前記導入遺伝子が、ATP7Aまたはそのバリアントである、項目17に記載の方法。

(項目19)

50

前記導入遺伝子が、A T P 7 B またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目20)

前記導入遺伝子が、A T P 8 B 1 またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目21)

前記導入遺伝子が、A B C B 4 またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目22)

前記導入遺伝子が、A B C B 1 1 またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目23)

前記導入遺伝子が、C D K L 5 またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目24)

前記導入遺伝子が、C N T N A P 2 またはそのバリエントである、項目17に記載の方

法。

(項目25)

前記導入遺伝子が、Z E B 2 またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目26)

前記導入遺伝子が、第V因子またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目27)

前記導入遺伝子が、第VII因子またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目28)

前記導入遺伝子が、第VIII因子またはそのバリエントである、項目17に記載の方

法。

(項目29)

前記導入遺伝子が、第IX因子またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目30)

前記導入遺伝子が、第XI因子またはそのバリエントである、項目17に記載の方法。

(項目31)

項目1から11のいずれか一項に記載の発現カセットを投与することを含む、ハプロ不全または遺伝的欠陥を処置する方法であって、前記導入遺伝子が、内因性遺伝子の発現をモジュレートする転写モジュレーターである、方法。

(項目32)

前記転写モジュレーターが、前記内因性遺伝子の転写活性化因子である、項目31に記

載の方法。

(項目33)

前記内因性遺伝子が、A T P 7 A である、項目32に記載の方法。

(項目34)

前記内因性遺伝子が、A T P 7 B である、項目32に記載の方法。

(項目35)

前記内因性遺伝子が、A T P 8 B 1 である、項目32に記載の方法。

(項目36)

前記内因性遺伝子が、A B C B 4 である、項目32に記載の方法。

(項目37)

前記内因性遺伝子が、A B C B 1 1 である、項目32に記載の方法。

(項目38)

前記内因性遺伝子が、C D K L 5 である、項目32に記載の方法。

(項目39)

前記内因性遺伝子が、C N T N A P 2 である、項目32に記載の方法。

(項目40)

前記内因性遺伝子が、Z E B 2 である、項目32に記載の方法。

(項目41)

前記導入遺伝子が、第V因子である、項目32に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目42)

前記導入遺伝子が、第VII因子である、項目32に記載の方法。

(項目43)

前記導入遺伝子が、第VIII因子である、項目32に記載の方法。

(項目44)

前記導入遺伝子が、第IX因子である、項目32に記載の方法。

(項目45)

前記導入遺伝子が、第XI因子である、項目32に記載の方法。

(項目46)

少なくとも3kbの導入遺伝子に作動可能に連結された120bp以下のヒト由来制御エレメントを含むAAV発現力セットであって、前記制御エレメントが、CMVプロモーターに作動可能に連結された場合の前記導入遺伝子の発現と比較して少なくとも2倍増加した導入遺伝子発現をもたらす、AAV発現力セット。

10

(項目47)

前記制御エレメントが、(i)配列番号1～2、13～17および22～41；(ii)それらの組合せ；または(iii)(i)および(ii)のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、項目46に記載のAAV発現力セット。

(項目48)

前記増加した導入遺伝子発現が、CMVプロモーターに作動可能に連結された場合の前記導入遺伝子の発現と比較して少なくとも50倍である、項目46に記載のAAV発現力セット。

20

(項目49)

前記増加した導入遺伝子発現が、少なくとも100倍である、項目46に記載のAAV発現力セット。

(項目50)

前記制御エレメントが、前記導入遺伝子に作動可能に連結されたCMVプロモーターのサイズ正規化された発現活性と比較して少なくとも1.5倍であるサイズ正規化された発現活性を呈する、項目46に記載のAAV発現力セット。

30

(項目51)

前記増加した導入遺伝子発現が、少なくとも2つの異なる細胞型において生じる、項目46に記載のAAV発現力セット。

(項目52)

前記少なくとも2つの異なる細胞型が、腎臓細胞、ニューロンおよび肝臓細胞から選択される、項目51に記載のAAV発現力セット。

(項目53)

前記制御エレメントが、配列番号22～41のうちのいずれか1つまたは複数を含み、他のプロモーター配列が、前記発現力セット中に存在しない、項目46に記載のAAV発現力セット。

40

(項目54)

前記制御エレメントが、配列番号1または配列番号2を含む、項目46に記載のAAV発現力セット。

(項目55)

前記制御エレメントが、プロモーターの下流に位置する、項目54に記載のAAV発現力セット。

(項目56)

前記導入遺伝子が、ATP7a；ATP7B；ATP8B1；ABC B4；ABC B1 1；CDKL5；CNTNAP2；ZEB2；第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子および第12因子；またはそれらのバリエントもしくは機能性断片のうちのいずれか1つである

50

項目 4 6 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 5 7)

前記導入遺伝子が、A T P 7 B またはそのバリエントである、項目 4 6 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 5 8)

前記導入遺伝子が、F V I I I またはそのバリエントである、項目 4 6 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 5 9)

前記導入遺伝子が、遺伝子編集タンパク質である、項目 4 6 に記載の A A V 発現力セット。

10

(項目 6 0)

前記遺伝子編集タンパク質が、C a s である、項目 5 9 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 6 1)

前記導入遺伝子が、D N A 結合タンパク質である、項目 4 6 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 6 2)

前記 D N A 結合タンパク質が、内因性遺伝子の発現を増加させる転写活性化因子である項目 6 1 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 6 3)

前記導入遺伝子が、内因性遺伝子の発現を減少させる転写抑制因子である、項目 6 1 に記載の A A V 発現力セット。

20

(項目 6 4)

前記転写活性化因子が、以下の内因性遺伝子：A T P 7 A ; A T P 7 B ; A T P 8 B 1 ; A B C B 4 ; A B C B 1 1 ; C D K L 5 ; C N T N A P 2 ; Z E B 2 ; ならびに第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 1 0 因子、第 1 1 因子および第 1 2 因子のうちのいずれか 1 つの発現を増加させる項目 6 2 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 6 5)

前記転写活性化因子が、内因性 A T P 7 A の発現を増加させる、項目 6 2 に記載の A A V 発現力セット。

30

(項目 6 6)

前記転写活性化因子が、内因性 A T P 7 B の発現を増加させる、項目 6 2 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 6 7)

前記転写活性化因子が、内因性 A T P 8 B 1 の発現を増加させる、項目 6 2 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 6 8)

前記転写活性化因子が、内因性 A B C B 4 の発現を増加させる、項目 6 2 に記載の A A V 発現力セット。

40

(項目 6 9)

前記転写活性化因子が、内因性 A B C B 1 1 の発現を増加させる、項目 6 2 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 7 0)

前記転写活性化因子が、内因性 F V I I I の発現を増加させる、項目 6 2 に記載の A A V 発現力セット。

(項目 7 1)

前記 A A V が、A A V 1 、A A V 2 、A A V 3 、A A V 3 b 、A A V 4 、A A V 5 、A A V 6 、A A V 7 、A A V 8 、A A V 9 、A A V 1 0 、A A V 1 1 、A A V 1 2 、A A V - D J および s c A A V からなる群から選択される、項目 4 6 から 7 0 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

50

(項目 7 2)

前記 AAV が、AAV 8 である、項目 7 1 に記載の AAV 発現力セット。

(項目 7 3)

組換えタンパク質を産生する方法であって、前記タンパク質をコードする配列を、(i) 配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41；(ii) それらの組合せ；または(iii)(i) および(ii) のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列のうちの 1 つまたは複数に作動可能に連結させることを含む、方法。

(項目 7 4)

肝臓の疾患または状態を処置する方法であって、(i) 配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41；(ii) それらの組合せ；または(iii)(i) および(ii) のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列から選択される 1 つまたは複数の制御エレメントに作動可能に連結された治療用導入遺伝子を含む遺伝子療法を投与することを含む、方法。

10

(項目 7 5)

前記肝臓の疾患または状態が、ウィルソン病である、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 7 6)

前記肝臓の疾患または状態が、血液凝固障害である、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 7 7)

前記導入遺伝子が、ATP7A もしくは ATP7B、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である、項目 7 5 に記載の方法。

20

(項目 7 8)

前記導入遺伝子が、第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 10 因子、第 11 因子、第 12 因子、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である、項目 7 6 に記載の方法。

(項目 7 9)

前記導入遺伝子が、第 8 因子、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

前記制御エレメントが、少なくとも 2 つの細胞型において増加した導入遺伝子発現をもたらす、項目 7 4 に記載の方法。

30

(項目 8 1)

前記制御エレメントが、少なくとも 3 つの細胞型において増加した導入遺伝子発現をもたらす、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 8 2)

前記制御エレメントが、肝細胞において増加した導入遺伝子発現をもたらす、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記制御エレメントが、CMV プロモーターに作動可能に連結された場合の前記導入遺伝子の発現と比較して少なくとも 2 倍であるレベルの、増加した導入遺伝子発現をもたらす、項目 7 4 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 8 4)

前記遺伝子療法が、AAV を利用する、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記 AAV が、AAV 8 である、項目 8 4 に記載の方法。

(項目 8 6)

導入遺伝子に作動可能に連結された 100 bp 未満であるかまたはそれと等しい bp を有するヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、前記制御エレメントが、前記制御エレメントなしの第 2 の発現ベクターと比較して、前記導入遺伝子の全体的発現を少なくとも 2 倍增加させる、発現ベクター。

(項目 8 7)

50

前記第2の発現ベクターが、CMVプロモーターに作動可能に連結された前記導入遺伝子を含む、項目86に記載の発現ベクター。

(項目88)

導入遺伝子に作動可能に連結された100bp未満であるかまたはそれと等しいbpを有するヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、それにより、前記導入遺伝子の発現が、CMVプロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Proto1プロモーター、UCL-HLPプロモーターまたはCMVeプロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い、発現ベクター。

(項目89)

前記導入遺伝子の発現が、UCL-HLPプロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い、項目88に記載の発現ベクター。

10

(項目90)

導入遺伝子に作動可能に連結されたヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、前記導入遺伝子によってコードされるタンパク質が、(i)前記導入遺伝子を検出するように構成されたELISAアッセイによって測定した場合に、濃度>1.0IU/mL;または(ii)Coatestアッセイによって測定した場合に、>25%の活性を有する、発現ベクター。

(項目91)

サイズが100bp未満であるかまたはそれと等しい配列を有するヒト由来制御エレメントを含む、ベクターであって、前記制御エレメントは、細胞中でもin vivoでも前記制御エレメントと関連して見出されない導入遺伝子に作動可能に連結されている、ベクター。

20

(項目92)

前記制御エレメントが、インtron配列である、項目86、88、90または91に記載のベクター。

(項目93)

前記制御エレメントが、配列番号1もしくは配列番号2、またはそれに対して少なくとも80%の相同性を有する配列である、項目86、88、90または91に記載のベクター。

(項目94)

前記導入遺伝子としてのルシフェラーゼの使用が、マウス全体で測定した場合に、1×10⁸光子/秒よりも高い全般的発現をもたらす、項目86、88または90に記載の発現ベクター。

30

(項目95)

前記活性または導入遺伝子発現が、1マウス当たり16μgの用量の発現ベクターに対応する、項目90に記載の発現ベクター。

(項目96)

前記活性または導入遺伝子発現が、1マウス当たり12μgの用量の発現ベクターに対応する、項目94に記載の発現ベクター。

(項目97)

内因性バージョンの前記導入遺伝子が、in vivoでは前記制御エレメントに連結していない、項目86、88または90に記載の発現ベクター。

40

(項目98)

前記導入遺伝子の全般的発現が、CMVプロモーター、CMVeプロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Proto1プロモーターおよびUCL-HLPプロモーターからなる群から選択される制御エレメントを有するベクターを使用した前記導入遺伝子の発現よりも高いレベルである、項目86に記載の発現ベクター。

(項目99)

発現が、マウスにおける少なくとも3、4、5、6または7つの異なる細胞型においてin vivoで検出可能である、項目86、88、90または91に記載の発現ベクター

50

一。

(項目 100)

前記異なる細胞型が、肺胞細胞、心筋細胞、上皮細胞、肝細胞、腸細胞、筋細胞、ニューロンおよび腎細胞からなる群から選択される、項目 88 に記載の発現ベクター。

(項目 101)

前記制御エレメントが、エンハンサーである、項目 86、88、90 または 91 に記載の発現ベクター。

(項目 102)

プロモーターをさらに含む、項目 101 に記載の発現ベクター。

(項目 103)

前記プロモーターが、CMV プロモーター、CMV、プロモーター、スーパー・コア・プロモーター、TTT R プロモーター、Proto 1 プロモーター、UCL-HLP プロモーター、AAT プロモーター、KAR プロモーター、EF1 プロモーター、EFS プロモーターまたは CMV e エンハンサー / CMV プロモーターの組合せである、項目 102 に記載の発現ベクター。

10

(項目 104)

1つまたは複数の転写後修飾部位をさらに含む、項目 101 に記載の発現ベクター。

(項目 105)

前記導入遺伝子が、Cas9 である、項目 86、88、90 または 91 に記載の発現ベクター。

20

(項目 106)

前記導入遺伝子が、s a Cas9 である、項目 105 に記載の発現ベクター。

(項目 107)

細胞中でまたは in vivo で第 VILI 因子を検出するように構成された ELISA アッセイによって測定した場合に、前記第 VILI 因子の発現を濃度 > 1.0 IU / mL まで駆動させることができる制御配列に作動可能に連結された第 VILI 因子導入遺伝子を含む、発現ベクター。

(項目 108)

項目 86 から 107 のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む、ウイルス粒子。

(項目 109)

30

前記ウイルス粒子が、AAV である、項目 108 に記載のウイルス粒子。

(項目 110)

前記AAVが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJ および scAAV からなる群から選択される、項目 109 に記載のウイルス粒子。

(項目 111)

前記ウイルス粒子が、レンチウイルスである、項目 108 に記載のウイルス粒子。

(項目 112)

前記ウイルス粒子が、アデノウイルスである、項目 108 に記載のウイルス粒子。

(項目 113)

40

前記導入遺伝子が、治療用導入遺伝子である、項目 86、88、90 または 91 に記載の発現ベクター。

(項目 114)

前記治療用導入遺伝子が、第 VILI 因子、Cas9、DNA 結合タンパク質、ホルモン、増殖もしくは分化因子、インスリン、成長ホルモン、VEGF、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子；サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壞死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラ T 細胞受容体；リポタンパク質受容体、囊胞性線維症膜貫通制御因子、ムコ多糖症 I 型、II 型、III 型もしくは IV 型と関連する遺伝子、ベータグロビンまたはリポタンパク質リバーゼである、項目 113 に記載の発現ベクター。

50

(項目115)

前記治療用導入遺伝子が、A T P 7 A、A T P 7 B、A T P 8 B 1、A B C B 4、A B C B 1 1、またはそれらのバリアントもしくは断片である、項目113に記載の発現ベクター。

(項目116)

前記治療用導入遺伝子が、C D K L 5、C N T N A P 2、Z E B 2、またはそれらのバリアントもしくは断片である、項目113に記載の発現ベクター。

(項目117)

動物中の複数の異なる組織に導入遺伝子を送達するための方法であって、前記動物に、項目8 6 から 1 1 6 のいずれか一項に記載の発現ベクターを投与することを含む、方法。

10

(項目118)

タンパク質、抗体または他の生物製剤の產生のための方法であって、細胞を、項目8 6 から 1 1 6 のいずれか一項に記載の発現ベクターと接触させることを含む、方法。

(項目119)

前記細胞が、C H O 細胞またはH E K 2 9 3 T 細胞である、項目118に記載の方法。

(項目120)

トランスジェニック動物または植物を產生するための方法であって、動物または植物に、項目8 6 から 1 1 6 のいずれか一項に記載の発現ベクターを投与することを含む、方法。

(項目121)

前記制御エレメントが、4 0 ~ 5 0 b p である、項目8 6、8 8、9 0 または9 1 に記載の発現ベクター。

20

(項目122)

前記制御エレメントが、5 0 ~ 6 0 b p である、項目8 6、8 8、9 0 または9 1 に記載の発現ベクター。

(項目123)

導入遺伝子に作動可能に連結されたヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、前記導入遺伝子によってコードされるタンパク質が、(i) 前記導入遺伝子を検出するように構成されたE L I S A アッセイによって測定した場合に、濃度 > 0 . 1 I U / m L ; または (i i) Co a t e s t アッセイによって測定した場合に、> 1 0 % の活性を有する、発現ベクター。

30

(項目124)

導入遺伝子に作動可能に連結された1 2 0 b p 未満であるかまたはそれと等しいb p を有するヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、それにより、前記導入遺伝子の発現が、U C L - H L P プロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い、発現ベクター。

(項目125)

前記制御エレメントが、プロモーターである、項目123または124に記載の発現ベクター。

(項目126)

前記治療用導入遺伝子が、D N A 結合ドメインおよび転写制御ドメインを含む融合タンパク質である、項目123または124に記載の発現ベクター。

40

【0031】

参照による援用

本明細書において言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれ個別の刊行物、特許、または特許出願が、具体的かつ個別に参照により援用されると示されるのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

【0032】

本発明の新規な特徴を、添付の特許請求の範囲において具体的に示す。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理を利用する例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明、および以下の添付の図面を参照することによって得られる。

50

【図面の簡単な説明】**【0033】**

【図1A】図1Aは、異なる制御エレメント（たとえば、配列番号1および配列番号2）を含むプラスミドの正規化されたルシフェラーゼ値を示し、HEK293T細胞におけるルシフェラーゼの発現に対してREが有した影響を実証する。たとえば、配列番号3（ミニマルCMV（minCMV）プロモーターと組み合わせた配列番号1を含む）は、minCMVプロモーター単独によって駆動された発現よりも約1.4倍高いレベルで、またSCPプロモーターによって駆動された発現よりも約60倍高いレベルで、ルシフェラーゼの発現を駆動させた。

【0034】

【図1B】図1Bは、HEK293T細胞における、SCP、minCMVおよびCAGと比較した、各制御エレメント（たとえば、配列番号3および配列番号4）のサイズ正規化された活性（正規化されたルシフェラーゼ活性を、塩基対で表される制御エレメントの長さで除することによって計算される）を示す。配列番号4（minCMVプロモーターに連結された配列番号2を含む）は、minCMVプロモーター単独よりも約3.5倍高いレベルで、またSCPプロモーターよりも約140倍高いレベルで、サイズ正規化された活性をもたらした。

10

【0035】

【図1C】図1Cは、陰性対照および陽性対照（配列番号4）と比較した、組み合わせた配列番号17および22、組み合わせた配列番号16および23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号28、配列番号29、配列番号31、配列番号32、ならびに配列番号33の制御エレメントの、正規化されたルシフェラーゼ発現を示す。すべてのREは、配列番号4によって駆動された発現のレベルと同等の、高いレベルの正規化されたルシフェラーゼ発現をもたらした。

20

【0036】

【図1D】図1Dは、HEK293T細胞における、陰性対照、陽性対照（配列番号4）、CMV+CMVeおよびCMV単独と比較した、配列番号28、配列番号30、配列番号26または配列番号27の制御エレメントの正規化されたルシフェラーゼ発現を示す。各制御エレメントは、CMV単独およびCMV+CMVeよりも高いルシフェラーゼ発現を駆動させた。

30

【0037】

【図1E】図1Eは、HEK293T細胞における、陰性対照と比較した、組み合わせた配列番号17および22、組み合わせた配列番号16および23、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、または配列番号41の制御エレメントの正規化されたルシフェラーゼ発現を示す。試験した各制御エレメントは、陰性対照よりも高いルシフェラーゼ発現を駆動させた。

【0038】

【図2A】図2Aは、異なる制御エレメント（SCP、SerpE_TTR、Proto1、minCMV、UCL-HLP、CMVe、配列番号3または配列番号4）の制御下にルシフェラーゼを含む発現カセットを投薬したマウスにおけるルシフェラーゼの発現を示す。

40

【0039】

【図2B】図2Bは、図2Aの発現カセットを注射した3匹のマウスにおいて観察されたルシフェラーゼ発現からの平均総発光（光子/秒）の定量を示す。

【0040】

【図3A】図3Aは、酵素結合免疫吸着アッセイによって測定した場合の、マウスにおけるヒト第8因子（FVIII）の発現に対する、様々な制御エレメント（UCL-HLP、配列番号3または配列番号4）の影響を示す。配列番号3または配列番号4のいずれかを含む発現カセットは、上昇したレベルのヒトFVIII（IU/mL）をもたらした。

【0041】

50

【図3B】図3Bは、ヒトFVIIIのパーセント活性をアッセイするCoatestアッセイによって測定した場合の、マウスにおけるヒト第8因子(FVIII)の発現に対する、様々な制御エレメント(UCL-HLP、配列番号3または配列番号4)の影響を示す。

【0042】

【図4A】図4Aは、tdTomato(赤色蛍光タンパク質(RFP)とも称される)の上流に提供された終結配列を欠失させるために、Cas9酵素、ガイドRNA、およびいくつかの制御エレメント(minCMV、EFSまたは配列番号4)のうちの1つを含む単一のAAVを用いてマウス脳の歯状回(dente gyrus)において実施した遺伝子編集を示す。RFPは、薄い灰色によって示される。配列番号4を含む発現カセットは、陰性対照、minCMVおよびEFSと比較して、RFPのより高い発現をもたらす遺伝子編集をもたらした。

10

【0043】

【図4B】図4Bは、図4AのRFP発現細胞の平均数の定量を示す。

【0044】

【図5A】図5Aは、本開示の制御エレメントを含むrAAV発現カセットを使用した、FVIIIノックアウトマウスにおいて血液凝固欠損をin vivoで処置するために使用される遺伝子療法の例を示す。PBS対照、または 3^{11} ゲノムコピー/kg(gc/kg)の用量もしくは 3^{12} gc/kgの用量の、本開示の制御エレメントを含むrAAVで処置したマウスの血液喪失(g)結果を、未処置の非ノックアウトマウスと比較した。 3^{12} gc/kgの用量のrAAV遺伝子療法によるマウスの処置は、対照(たとえば、PBS対照マウス)と比較して、血液喪失の低減をもたらした。

20

【0045】

【図5B】図5Bは、凝固までの分数(分)で表されるマウスの出血時間を示す。

【0046】

【図6A】図6Aは、AAV-ITR-LおよびITR-R、ならびに導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数の制御エレメント、たとえば、エンハンサー、プロモーター、安定性エレメントおよびポリアシグナルを含む本開示の例示的な発現カセット、ベクターまたはプラスミドを示す。そのようなrAAVベクターは、遺伝子療法に使用され得る。

30

【0047】

【図6B】図6Bは、配列番号1の制御エレメントが導入遺伝子に作動可能に連結され、制御エレメントが、プロモーターの下流かつ遺伝子およびポリアデニル化シグナルの上流に位置する、発現カセットの拡大図を示す。

【0048】

【図6C】図6Cは、配列番号2の制御エレメントが導入遺伝子に作動可能に連結され、制御エレメントが、プロモーターの下流かつ遺伝子およびポリアデニル化シグナルの上流に位置する、発現カセットを示す。

【0049】

【図7】図7は、AAV-ITR-LおよびITR-R、ならびに大きな導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の1つまたは複数の比較的短いヒト由来制御エレメント(たとえば、配列番号13～17および22～41)を含む本開示の例示的な発現カセット、ベクターまたはプラスミドを示し、ここで、導入遺伝子は、サイズが少なくとも3kbまたは3～5kbである。そのようなrAAVベクターは、遺伝子療法処置に使用され得る。

40

【0050】

【図8】図8は、未処置のノックアウトマウスおよび配列番号9(UCL-HLP)と比較した、本開示の様々な発現カセット、たとえば、配列番号13～17の制御エレメントのうちのいずれか1つを含む発現カセットで処置したマウスにおいて発現されたヒトFVIIIの濃度(IU/mL)を示す。

【0051】

50

【図9】図9は、本開示の様々な発現力セットで処置したマウスにおけるヒトFVIIのパーセント活性を示し、ここで、配列番号13～17は、制御エレメントを指す。

【 0 0 5 2 】

【図10】図10は、本開示の様々な発現力セットで処置したマウスを用いた、グラム(g)で測定した血液喪失実験を示し、ここで、配列番号13～17は、制御エレメントを指す。

【 0 0 5 3 】

【図11】図11は、本開示の様々な発現力セットで処置したマウスにおける、凝固までの分数(分)で表される出血時間を示し、ここで、配列番号13～17は、制御エレメントを指す。

10

[0 0 5 4]

【図12】図12は、1マウス当たりのゲノムコピー（g c / マウス） 1×10 （すなわち 10^{10} ）、 1×11 （すなわち 10^{11} ）g c / マウスまたは 1×12 （すなわち 10^{12} ）g c / マウスの用量の、配列番号13の配列を有する制御エレメントを含む発現力セットで処置したマウスにおける、ATP7Bの相対的発現（Log₂）を示す。データは、配列番号13を含む発現力セットの用量とin vivoでのATP7Bの発現との間の正の相關を示した。

【 0 0 5 5 】

【図13】図13は、5E11g c / マウスの用量で投与した、配列番号4、13、14、15、16、17または27の配列を有する制御エレメントを含む発現力セットで処置したマウスにおける、EGFPの相対的発現(Log10)を示す。データは、RNA転写物によって測定した場合に、これらのREが、マウスの肝臓においてin vivoで、上昇したレベルのEGFP発現をもたらしたことを示した。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 6 】

開示の詳細な説明

30

とも200倍、少なくとも250倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1000倍、少なくとも1010倍、少なくとも1020倍、少なくとも1030倍、少なくとも1040倍または少なくとも1050倍である。

【0057】

一部の事例では、1つまたは複数のREは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10個の異なる細胞型において、高い導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、本開示の1つまたは複数のREは、全身投与のために適合された遺伝子療法処置のために、導入遺伝子に作動可能に連結される。一部の事例では、本開示の1つまたは複数のREは、肝臓または肝細胞における発現のために適合された遺伝子療法処置のために、導入遺伝子に作動可能に連結される。一部の事例では、導入遺伝子は、肝臓もしくは肝細胞において発現される遺伝子であり、または肝臓の疾患もしくは状態と関連する遺伝子、たとえば、ウィルソン病と関連するATP7B；進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型と関連するABC B4；遺伝性フルクトース不耐症と関連するALDOB；IV型糖原病と関連するGBE1；チロシン血症I型と関連するFAH；アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症と関連するASL；シトリン欠損症(CTLN2、NICCD)と関連するSLC25A13；コレステロールエステル蓄積症と関連するLIPA；アルファ-1アンチトリプシン欠損症と関連するSERPINA1；嚢胞性線維症と関連するCFTR；遺伝性ヘモクリマトーシスと関連するHFE；もしくはアルストレーム症候群と関連するALMS1である。一部の事例では、本明細書に開示される1つまたは複数の制御エレメントは、遺伝性の肝臓疾患、たとえば、胆汁酸合成の障害、炭水化物代謝の障害、アミノ酸代謝の障害、尿素サイクル異常症、または脂質代謝の障害を処置するための遺伝子療法処置のために使用される。一部の事例では、導入遺伝子は、DNA結合タンパク質、たとえば、内因性遺伝子をモジュレートする転写モジュレーターである。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、プロモーター配列、イントロン配列、5'UTR配列、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、ヒト由来配列(またはヒト参照ゲノム中の配列に対して少なくとも80%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列)である。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、長さが50bp、60bp、100bp、120bp、260bpもしくは270bp未満であるかまたはそれと等しい。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、300bp、250bp、200bp、150bp、140bp、130bp、120bp、110bp、100bp、70bpもしくは50bp未満であるかまたはそれと等しい。一部の事例では、発現カセット(たとえば、ベクター、AAVまたはウイルスベクター)は、本開示の導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数のRE配列を含み、ここで、各RE配列は、表1に列挙された配列のうちのいずれか1つ、または表1の配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性(たとえば、局所的な配列同一性)を有する配列である。一部の事例では、発現構築物(たとえば、ベクター、AAVまたはウイルスベクター)は、本開示の導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数のRE配列を含み、ここで、各RE配列は、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、110bp、120bp、130bp、140bp、150bp、160bp、170bp、180bp、190bp、200bp、210bp、220bp、230bp、240bp、250bp、260bp、270bp、280bp、290bp、300bp、310bp、320bp、330bp、340bp、350bp、360bp、370bp、380bp、390bpまたは400bp以下であり、表1の配列のうちのいずれか1つまたは複数に従う配列を含む。一部の事例では、発現カセット(たとえば、ベクター、AAVまたはウイルス

10

20

30

40

50

ベクター)は、本開示の導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数のRE配列を含み、ここで、各RE配列は、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、110bp、120bp、130bp、140bp、150bp、160bp、170bp、180bp、190bp、200bp、210bp、220bp、230bp、240bp、250bp、260bp、270bp、280bp、290bp、300bp、310bp、320bp、330bp、340bp、350bp、360bp、370bp、380bp、390bpまたは400bp以下であり、表1に列挙された配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の局所的な配列同一性を有する配列を含む。一部の事例では、局所的な配列同一性は、BLASTを使用して測定される。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のRE配列は、導入遺伝子の上流または下流に位置する。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態の2つまたはそれよりも多くのREは、導入遺伝子に作動可能に連結され、ここで、REのうちの少なくとも1つまたは複数は、導入遺伝子の上流、下流、または上流および下流の両方に位置する。

【0058】

一部の事例では、本開示の任意の実施形態の1つまたは複数のREは、導入遺伝子の全体的発現を駆動させるために、導入遺伝子に作動可能に連結され、ここで、全体的発現は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10個の異なる細胞型における導入遺伝子発現を指す。一部の事例では、本開示の任意の実施形態の1つまたは複数のREは、対象または動物中に全身送達された場合に導入遺伝子の全体的発現を駆動させるために、導入遺伝子に作動可能に連結される。一部の事例では、本明細書に開示される発現力セツトの全身送達または投与は、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、くも膜下腔内、経腸および/または非経口投与を介した送達である。種々の実施形態では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、ヒト由来(またはヒト参照ゲノム中の配列に対して少なくとも80%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列)である。一部の事例では、本明細書に開示される任意の実施形態のREは、天然に存在しない。

【0059】

遺伝子操作法は、所望される結果を達成するために、遺伝子を置き換える、遺伝子を修飾する、または遺伝子を付加することができる。遺伝子療法は、疾患または障害を処置するための遺伝子操作の使用である。遺伝子操作は、目的の1つまたは複数のタンパク質の产生のために、細胞または生物を修飾するためにも使用され得る。遺伝子操作の1つの課題は、治療効果を達成するのに十分に高いレベルで、または産業的/产生レベルを達成するのに十分に高いレベルで、発現を駆動させる制御エレメントを有することである。遺伝子操作の別の課題は、所望されるベクター内に収まるのに十分に小さいが、目的のタンパク質の完全コーディング配列を含み、高い発現を確実にするのに十分な制御配列を含む発現力セツトを設計することである。ベクターまたはウイルス発現ベクターのクローニング能力は、大きな導入遺伝子の発現にとって、特に問題である。たとえば、AAVベクターは、約4.8kbのパッケージング能力を有し、レンチウイルスは、約8kbの能力を有し、アデノウイルスは、約7.5kbの能力を有し、アルファウイルスは、約7.5kbの能力を有する。一部のウイルスは、より大きなパッケージング能力を有し、たとえば、ヘルペスウイルスは、30kbを上回る能力を有し、ワクシニアは、約25kbの能力を有するが、他のウイルスを使用することには利点があり得る。たとえば、AAVの利点としては、病原性が低いこと、宿主ゲノムに組み込まれる頻度が非常に低いこと、ならびに分裂細胞および非分裂細胞に感染する能力が挙げられる。

【0060】

遺伝子療法における1つの課題は、導入遺伝子が、in vivoで治療効果をもたらすために、少なくとも1つまたは複数の標的細胞型または組織において十分に高いレベル

10

20

30

40

50

で発現されることを確実にすることである。一部の事例では、増加した導入遺伝子発現は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれよりも多くの異なる細胞型または組織、たとえば、腎臓細胞、上皮細胞、肝臓細胞、肝細胞、ニューロン、線維芽細胞および / または CNS 細胞において所望される。一部の事例では、増加した導入遺伝子発現は、タンパク質合成のために、ex vivo で、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個の細胞系、たとえば、哺乳動物またはヒト細胞系、たとえば、腎臓細胞、上皮細胞、肝臓細胞、肝細胞、ニューロン、線維芽細胞、免疫細胞および / または CNS 細胞において所望される。遺伝子療法のための従来的な方法は、送達方法および / またはビヒクリ（たとえば、使用されるウイルスまたはウイルスのキャプシド配列を変化させること）に頼ることが多かった。当該分野における 1 つの技術的課題は、特に、遺伝子が、大型である場合に、治療効果を発揮するために、1 つまたは複数の細胞型または組織における遺伝子発現のレベルを増加させることである。大きな導入遺伝子の発現は、技術的な課題と関連するが、これは、ベクター、たとえば、ウイルスまたは AA V ベクターが、限定的なクローニング能力を有するからである。より大きな導入遺伝子（たとえば、その配列が、1 kb、1.5 kb、2 kb、2.5 kb、3 kb、3.5 kb、4 kb、4.5 kb、5 kb、5.5 kb、6 kb、6.5 kb、7 kb または 7.5 kb を上回る導入遺伝子）を発現させるために、ベクター中により大きな導入遺伝子を収容するために、より小さな制御エレメントを使用しなくてはならない。したがって、RE なしの発現；陰性対照（たとえば、いずれの発現も駆動させないことが既知の配列、空のベクター、または緩衝液単独対照）と比較して、または導入遺伝子に作動可能に連結されたプロモーター（たとえば、CMV プロモーター、SCP、UCL-HLP など）と比較して、細胞中でまたは in vivo で増加した導入遺伝子発現をもたらす新規な短い制御エレメント（たとえば、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、140 bp、130 bp、120 bp、110 bp、100 bp、70 bp もしくは 50 bp 未満であるかまたはそれと等しい RE）が必要とされている。

【0061】

本明細書で使用される場合、单数形の「1 つの (a)」、「1 つの (an)」、および「その (the)」は、文脈により別途明確に示されない限り、複数形も含むことが意図される。さらに、「含むこと (including)」、「含む (includes)」、「有すること (having)」、「有する (has)」、「有する (with)」、またはこれらの变形が、詳細な説明および / または特許請求の範囲のいずれかにおいて使用される範囲内で、そのような用語は、「含む (comprising)」という用語と同様の様式で、包含的であることが意図される。

【0062】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって判定される、特定の値に対する許容可能な誤差の範囲内であることを意味し、これは、部分的に、その値が、どのように測定または判定されるか、すなわち、測定システムの制限に依存するであろう。たとえば、「約」は、当該技術分野における慣例に従い、1 または 1 を上回る標準偏差以内を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の最大 20%、最大 15%、最大 10%、最大 5%、または最大 1% の範囲を意味し得る。

【0063】

「判定すること」、「測定すること」、「評価すること (evaluating)」、「評価すること (assessing)」、「アッセイすること」、「分析すること」という用語、およびこれらの文法上の同等物は、任意の形態の測定を指して、本明細書において互換可能に使用することができ、ある要素が存在するかしないかを判定すること（たとえば、検出）を含む。これらの用語は、定量的および / または定性的判定の両方を含み得る。アッセイすることは、相対的であっても絶対的であってもよい。

【0064】

「発現」という用語は、核酸配列またはポリヌクレオチドが、DNA 鑄型から（たとえば、mRNA もしくは他の RNA 転写物へと）転写されるプロセス、および / または転写

10

20

30

40

50

されたmRNAが、続いて、ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物およびコードされるポリペプチドは、集合的に、「遺伝子産物」と称され得る。ポリヌクレオチドが、ゲノムDNAに由来する場合は、発現には、真核生物細胞におけるmRNAのスプライシングが含まれ得る。一部の事例では、全体的発現が所望され、全体的発現は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10個もしくはそれよりも多くの異なる細胞型もしくは組織における遺伝子（たとえば、導入遺伝子）の発現、または複数の細胞型における遺伝子の発現を指す。細胞型は、異なる細胞マーカー、形態学、表現型、遺伝子型、機能を有することによって、および／または細胞型を分類するための任意の他の手段によって、区別される。一部の事例では、異なる細胞型または組織は、in vivoの細胞型または組織を指す。一部の事例では、異なる細胞型または組織は、ex vivoの細胞型または組織を指す。一部の事例では、異なる細胞型または組織としては、異なる哺乳動物細胞系、ヒト細胞系、腎臓細胞、上皮細胞、肝臓細胞、肝細胞、ニューロン、線維芽細胞および／またはCNS細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0065】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された(operably linked)」、「作動可能な連結」、「操作可能に連結された(operatively linked)」、またはこれらの文法上の同等物は、遺伝子エレメント、たとえば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化配列などの並置を指し、ここで、これらのエレメントは、エレメントが予測された様式で作動するのを許容する関係性にある。たとえば、プロモーターおよび／またはエンハンサー配列を含み得る制御エレメントは、制御エレメントがコーディング配列の転写開始を補助する場合に、コーディング領域に操作可能に連結されている。この機能的関係性が維持される限り、制御エレメントとコーディング領域との間に、介在する残基が存在してもよい。

【0066】

「ベクター」は、本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドを含むかまたはそれと会合し、ポリヌクレオチドを細胞に送達するのを媒介するために使用することができる、巨大分子または巨大分子の会合を指す。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター、リポソーム、および他の遺伝子送達ビヒクルが挙げられる。ベクターは、一般に、標的における遺伝子の発現を促進するために、遺伝子に操作可能に連結された、遺伝子エレメント、たとえば、制御エレメントを含む。制御エレメントと、発現のために制御エレメントが作動可能に連結される1つまたは複数の遺伝子との組合せは、「発現力セット」と称される。

【0067】

「AAV」という用語は、アデノ随伴ウイルスの略語であり、ウイルスそのものまたはその誘導体を指して使用され得る。この用語は、すべての血清型、サブタイプ、ならびに天然に存在する形態および組換え形態の両方を包含するが、そうでないことが求められる場合を除く。「rAAV」という略語は、組換えアデノ随伴ウイルスを指し、組換えAAVベクター（または「rAAVベクター」）とも称される。「AAV」という用語には、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、rh10、およびそれらのハイブリッド、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、靈長類AAV、非靈長類AAV、ならびにヒツジAAVが含まれる。様々な血清型のAAVのゲノム配列、ならびに天然の末端反復(TR)、Repタンパク質、およびキャプシドサブユニットの配列は、当該技術分野において公知である。そのような配列は、文献、または公的なデータベース、たとえば、GenBankにおいて見出すことができる。「rAAVベクター」は、本明細書で使用される場合、AAV起源のものではないポリヌクレオチド配列（すなわち、AAVにとって異種のポリヌクレオチド）、典型的には、細胞の遺伝子形質転換の目的とされる配列を含む、AAVベクターを指す。一般に、異種ポリヌクレオチドには、少なくとも1つの、および一般的には2つの、AAV末端逆位反復配列(ITS)が隣接している。

10

20

30

40

50

r A A V ベクターという用語は、r A A V ベクター粒子およびr A A V ベクタープラスミドの両方を包含する。r A A V ベクターは、一本鎖(s s A A V)または自己相補性(s c A A V)のいずれであってもよい。「A A Vウイルス」または「A A Vウイルス粒子」または「r A A V ベクター粒子」は、少なくとも1つのA A V キャプシドタンパク質およびキャプシド形成されたポリヌクレオチドr A A V ベクターから構成される、ウイルス粒子を指す。粒子が、異種ポリヌクレオチド(すなわち、哺乳動物細胞に送達される導入遺伝子など、野生型A A Vゲノム以外のポリヌクレオチド)を含む場合は、典型的には、「r A A V ベクター粒子」または単純に「r A A V ベクター」と称される。したがって、そのようなベクターは、r A A V 粒子内に含まれるため、r A A V 粒子の产生には、必然的に、r A A V ベクターの产生が含まれる。

10

【0068】

本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置」、「治療法」などの用語は、所望される薬理学的および/または生理学的作用を得ることを指し、これには、疾患または障害を軽減すること、その進行を遅延もしくは緩徐化すること、その作用もしくは症状を低減すること、その発症を予防すること、それを阻害すること、その発症を緩和すること、疾患、障害、または病態に関して有益または所望される結果、たとえば、治療上の利益および/または予防上の利益を得ることが含まれるが、これらに限定されない。「処置」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特に、ヒトにおける疾患のあらゆる処置を包含し、これには、(a)疾患の素因があり得るかまたは疾患を生じる危険性にあり得るが、まだ疾患有すると診断されていない被験体において、疾患が発症するのを予防すること、(b)疾患を阻害すること、すなわち、その発生を停止させること、および(c)疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退縮を引き起こすことが含まれる。治療上の利益には、処置されている根底にある障害の根絶または緩和が含まれる。また、治療上の利益は、根底にある障害と関連する生理学的症状のうちの1つまたは複数の根絶または緩和により達成され、そのため、被験体が、根底にある障害に依然として罹患している場合があったとしても、改善が、被験体において観察される。一部の事例では、予防上の利益については、本組成物は、特定の疾患を発症する危険性にある被験体、または疾患の生理学的症状のうちの1つもしくは複数を報告している被験体に投与されるが、この疾患の診断は、まだ行われていなくてもよい。本開示の方法は、任意の哺乳動物に使用することができる。一部の事例では、処置は、症状の減少または停止(たとえば、けいれんの頻度または期間の低減)をもたらし得る。予防的效果としては、疾患もしくは状態の出現の遅延もしくは排除、疾患もしくは状態の症状の発症の遅延もしくは排除、疾患もしくは状態の進行の緩徐化、停止、もしくは逆転、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。

20

【0069】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、以下に定義されるように、これに限定されないが疾患の処置を含む意図される適用を達成するのに十分な本明細書に記載される組成物の量を指す。治療有効量は、当業者によって容易に判定することができる、意図される処置適用(細胞中またはin vivo)、または処置されている被験体および疾患状態、たとえば、被験体の体重および年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などに応じて、変動し得る。この用語はまた、標的細胞において特定の応答を誘導するであろう用量にも当てはまる。具体的な用量は、選択される具体的な組成物、従うべき投薬レジメン、組成物が他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、組成物が投与される組織、および組成物が運搬される物理的な送達システムに応じて、変動するであろう。

30

【0070】

ヌクレオチドまたはペプチド配列の「断片」とは、「全長」配列であると考えられるものよりも短い配列を指すことを意味する。

40

【0071】

分子の「バリエント」は、そのような配列の対立遺伝子変形形態、すなわち、分子全体またはその断片のいずれかに、構造および生物学的活性が実質的に類似である配列を指す

50

。本明細書で使用される場合、遺伝子のバリアントは、最も一般的な野生型DNA配列（たとえば、cDNA、またはそのGenBankによって参照される配列、もしくはそのUniProt受託番号によって参照されるタンパク質配列に対応する配列）と比較して、遺伝的変更または突然変異を有する配列を指す。遺伝子バリアントは、突然変異体、たとえば、野生型配列と比較して強化された活性または機能を有する突然変異体；タンパク質の任意の公知のサブユニット；および選択的スプライシングからもたらされる遺伝子の公知のアイソフォームを包含する。

【0072】

「機能性断片」という用語は、分子の「断片」、「バリアント」、「類似体」、または「化学的誘導体」を含むことが意図される。DNAまたはタンパク質配列の「機能性断片」は、配列の少なくとも生物学的に活性な断片を有するが、これは、全長DNAまたはタンパク質配列の生物学的活性に実質的に類似する生物学的活性（機能的または構造的のいずれかで）を保持する断片を指す。DNA配列の生物学的活性は、全長配列に帰属することが公知の様式で、発現に影響を及ぼすその能力であり得る。たとえば、制御エレメントの機能性断片は、全長REとして転写に影響を及ぼす能力を保持する。

10

【0073】

「被験体」および「個体」という用語は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指して、本明細書において互換可能に使用される。「被験体」とは、動物、たとえば、哺乳動物、たとえば、ヒトを指す。本明細書に記載される方法は、ヒトの治療法、獣医学的適用、および／または疾患もしくは状態の動物モデルにおける前臨床研究において、有用であり得る。一部の事例では、被験体は、哺乳動物であり、一部の事例では、被験体は、ヒトである。

20

【0074】

「*in vivo*」という用語は、被験体の身体において生じる事象を指す。

【0075】

「*in vitro*」という用語は、被験体の身体の外部で生じる事象を指す。たとえば、*in vitro*アッセイは、被験体の外部で行われる任意のアッセイを包含する。*in vitro*アッセイは、生存細胞または死細胞を用いる、細胞に基づくアッセイを包含する。*in vitro*アッセイはまた、インタクトな細胞を用いない、無細胞アッセイも包含する。

30

【0076】

同一性、変異、または試験配列の1つもしくは複数の位置が、参照配列の1つもしくは複数の指定された位置と比較してどこに含まれるかを評価するなどの目的での配列比較は、ニードルマン・ウンシュアルゴリズム（たとえば、www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なEMBOSS Needleアライナーを、必要に応じてデフォルトの設定とともに参照されたい）、BLASTアルゴリズム（たとえば、blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiにおいて利用可能なBLASTアルゴリズムツールを、必要に応じてデフォルトの設定とともに参照されたい）、およびスミス・ウォーターマンアルゴリズム（たとえば、www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/において利用可能なEMBOSS Waterアライナーを、必要に応じてデフォルトの設定とともに参照されたい）を含むがこれらに限定されない、任意の好適なアライメントアルゴリズムによって行うことができる。最適なアライメントは、デフォルトパラメーターを含め、選択されたアルゴリズムの任意の好適なパラメーターを使用して、評価することができる。

40

【0077】

一般に、互換可能に使用することができる「配列同一性」または「配列相同性」は、それぞれ、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列のヌクレオチド間またはアミノ酸間での厳密な対応を指す。典型的に、配列同一性を判定するための技法には、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を判定することおよび／またはそれによってコードされるアミノ酸配列を判定すること、ならびにこれらの配列を、第2のヌクレオチドまたはアミノ酸配列と比較することが含まれる。2つまたはそれを上回る配列（ポリヌクレオチドまた

50

はアミノ酸)は、「相同性パーセント」とも称される、それらの「同一性パーセント」を判定することによって、比較することができる。より長い分子(たとえば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)内の配列であり得る、参照配列(たとえば、核酸またはアミノ酸配列)に対する同一性パーセントは、2つの最適にアライメントした配列間での厳密な一致の数を、参照配列の長さで除し、100を乗じたものとして、計算することができる。同一性パーセントはまた、たとえば、バージョン2.2.9を含め、National Institutes of Healthから入手可能なadvanced BLASTコンピュータプログラムを使用して、配列情報を比較することによって、判定することもできる。BLASTプログラムは、KarlinおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻：2264～2268頁(1990年)のアライメント方法に基づくものであり、Altschulら、J. Mol. Biol.、215巻：403～410頁(1990年)、KarlinsおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：5873～5877頁(1993年)、ならびにAltschulら、Nucleic Acids Res.、25巻：3389～3402頁(1997年)において考察されている通りである。簡単に述べると、BLASTプログラムは、アライメントされた同一の記号(すなわち、ヌクレオチドまたはアミノ酸)の数を、2つの配列のうちの短い方における記号の総数で除したものとして、同一性を定義する。このプログラムを使用して、比較されている配列の全長にわたって、同一性パーセントを判定することができる。デフォルトのパラメーターは、短いクエリ配列での、たとえば、blastpプログラムでの検索を最適化するように提供される。このプログラムはまた、WoottonおよびFederhen、Computers and Chemistry、17巻：149～163頁(1993年)のSEGプログラムによって判定される、クエリ配列のセグメントをマスキングにより排除(mask-off)するSEGフィルターの使用が可能である。所望される配列同一性の程度の範囲は、およそ80%～100%、およびこれらの間の整数値である。典型的には、開示される配列と、請求される配列との間の同一性パーセントは、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%、または少なくとも99%である。一般に、厳密な一致は、参照配列の長さにわたって100%の同一性を示す。一部の事例では、配列同一性パーセントへの言及は、BLAST(基本的な局所的アライメント検索ツール、Basic Local Alignment Search Tool)を使用して測定される、配列同一性を指す。他の事例では、ClustalWが、複数の配列のアライメントに使用され得る。

【0078】

別途示されない限り、本明細書において使用されるすべての用語は、当業者にとってのものと同じ意味を有し、本発明の実施は、分子生物学、微生物学、および組換えDNA技術の従来的な技法を採用することになるが、これらは、当業者の知識の範囲内である。

【0079】

制御エレメント

制御エレメントは、DNAおよび/またはRNAレベルで機能し得る。制御エレメントは、目的の細胞型において、遺伝子発現の選択性をモジュレートするように機能し得る。制御エレメントは、遺伝子発現の転写の段階、翻訳後の段階、または翻訳の段階で、遺伝子発現をモジュレートするように機能し得る。制御エレメントとしては、プロモーター、エンハンサー、インtron配列、または他の非コード配列が挙げられるが、これらに限定されない。RNAレベルでは、制御は、翻訳(たとえば、翻訳のためにmRNAを安定化する安定性エレメント)、RNA切断、RNAスプライシング、および/または転写終結のレベルで、生じ得る。一部の事例では、制御エレメントは、転写因子を、目的の細胞型における遺伝子発現の選択性を増加させるコーディング領域に動員することができる。一部の事例では、制御エレメントは、RNA転写物が産生される速度を増加させる、産生されるRNAの安定性を増加させる、および/またはRNA転写物からのタンパク質合成の速度を増加させることができる。

【0080】

制御エレメントは、1つまたは複数の細胞型または組織における遺伝子(たとえば、レ

10

20

30

40

50

ポーター遺伝子、たとえば、EGFPもしくはルシフェラーゼ；導入遺伝子；または治療用遺伝子）の発現に影響を及ぼす（たとえば、増加させる）ことが可能な核酸配列または遺伝子エレメントである。一部の事例では、制御エレメントは、導入遺伝子、イントロン、プロモーター、エンハンサー、UTR、末端逆位反復（ITR）配列、長い末端反復配列（LTR）、安定性エレメント、翻訳後応答エレメントもしくはポリA配列、またはそれらの組合せであり得る。一部の事例では、制御エレメントは、プロモーター、エンハンサー、イントロン配列、またはそれらの組合せである。一部の事例では、制御エレメントは、ヒト配列（たとえば、hg19）に由来する。

【0081】

制御エレメントを単離する1つの方法は、動物モデルに由来する1つまたは複数の細胞型から核を単離すること（これは、1つまたは複数の組織または細胞型を単離する親和性精製方法（たとえば、ある特定の細胞型に結合するビーズ）を使用することによって、達成することができる）、高スループットの天然のプライミングおよびDNA合成を使用して、核内のオープンクロマチン領域に由来する配列のプールを生成すること、この配列のプールをシーケンシングして、1つまたは複数の組織または細胞型における遺伝子発現を駆動させる推定上の配列を特定すること、ならびに *in vitro* で1つもしくは複数の細胞系におけるおよび/または動物モデルにおける、レポーター系における発現が含まれる。一部の事例では、2つまたはそれよりも多くの制御エレメントは、より大きなREを形成するために組み合わされる。一部の事例では、組み合わされた制御エレメントは、複数の細胞型、たとえば、少なくとも2、3、4、5、6つまたはそれよりも多くの細胞型において、強化された遺伝子発現を呈する。一部の事例では、制御エレメントは、導入遺伝子発現を増加させるその能力を保持する最小限の量の配列を判定するために、一度に1つまたは複数の塩基が短縮される。導入遺伝子発現活性を保持するより小さな制御エレメントは、大きな導入遺伝子を含む遺伝子療法を作製するのに役立つか、またはベクターもしくはプラスミドのクローニング能力が、遺伝子療法を使用して送達したい導入遺伝子のサイズの観点で制限される場合に役立つ。たとえば、本開示の1つまたは複数のREは、導入遺伝子に作動可能に連結された場合に、増加した導入遺伝子発現を駆動させ、ここで、導入遺伝子は、少なくとも1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb、5kb、5.5kb、6kb、6.5kb、7kbまたは7.5kbである。一部の事例では、導入遺伝子発現のそのような増加は、陰性対照、構成的プロモーター、CMVプロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Proto1プロモーター、UCL-HLPプロモーターまたはCMV eプロモーターと比較して少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍または少なくとも1000倍である。

【0082】

一部の事例では、本開示の制御エレメントは、作動可能に連結された導入遺伝子の高いまたは増加した発現をもたらし、ここで、高いまたは増加した発現は、対照、たとえば、構成的プロモーター、CMVプロモーター、CAG、スーパーコアプロモーター（SCP）、TTRプロモーター、Proto1プロモーター、UCL-HLPプロモーター、minCMV、EFSまたはCMV eプロモーターと比較して判定される。本明細書に開示される制御エレメントによる高いまたは増加した導入遺伝子発現を判定するために使用され得る他の対照としては、緩衝液単独またはベクター単独が挙げられる。一部の事例では、陽性対照は、比較のために使用できる、公知の発現活性を有するRE、たとえば、配列番号4を指す。一部の事例では、制御エレメントは、陽性対照（たとえば、導入遺伝子に作動可能に連結された配列番号4または公知のプロモーター）と同等の、またはそれと比較してより高い導入遺伝子発現を駆動させる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 3 】

一部の事例では、配列番号 13 ~ 17 の最も 5' 側の 17 ヌクレオチドは、発現活性を保持するより短い RE を形成するために除去され得る。たとえば、最も 5' 側の 17 ヌクレオチドを有さない配列番号 13 ~ 17 は、それぞれ、配列番号 30、26、28、23 および 22 である。

【 0 0 8 4 】

他の事例では、2つまたはそれよりも多くの比較的短い RE は、高い導入遺伝子発現活性および / またはサイズ正規化された遺伝子発現活性を有するより大きな RE を形成するために組み合わされ得る。たとえば、配列番号 17 は、配列番号 22 と組み合わされ得；または配列番号 16 は、配列番号 22 と組み合わされ得る。

【 0 0 8 5 】

本開示は、作動可能に連結された導入遺伝子の発現を増加させる比較的短いヒト由来制御エレメントを企図する。一部の事例では、短いヒト由来 RE は、表 1 の配列、または配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41 のうちのいずれか 1 つである。

【 0 0 8 6 】**【 表 1 - 1 】**

表1:制御エレメント(RE)の例

配列番号	配列 (5' から 3')	長さ
1	GTAAGGTAAAGAATTGAATTCTCAGTTGAAGGATGCTTACACTCTT GTCCATCTAG	56bp
2	GTGTGTATGCTCACGGGCTGGAAAGGAGGGAGGGAGCTCCGGC TCAG	49bp
3	GTGATCGGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGATAGCGGTTG ACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG TTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAAC AACTCCGCCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG GAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTACCGTAAGGTAAGAATTGAAT TTCTCAGTTGAAGGATGCTTACACTCTGTCCATCTAG	266bp
4	GTGATCGGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGATAGCGGTTG ACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG TTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAAC AACTCCGCCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG GAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTACCGTGTATGCTCAGGGC TGGGAAAGGAGGGAGGGAGCTCCGGCTCAG	259bp
13	GTGATGACGTGTCATCAAGGCCCTCGTCTAAGGCTCCATT TCCTGGITCGCCGGCGCCATTGGGTGGAAGCGATAGCTGAGTG GCAGCGGCTGCTGATTGTGTTCTAG	117bp
14	GTGATGACGTGTCATCACTTCCGGGTCAAGGTGGGCCGGCTGTCTT GACCTTCTTGCAGCTGGCCATTGTCAGTCAGTCCGGAGGC TGCGGCTGCAGAAGTACCGCCTGCG	117bp
15	GTGATGACGTGTCATCACTCGCGAGACTGTGAGCGGC	117bp

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

配列番号	配列 (5' から 3')	長さ
	CATCTTGGTCCTGCCCTGACAGATTCTCCTATCGGGGTACAGGGAA CGCTAAGATTGCTACCTGGACTTTC	
16	GTGATGACGTGTCCCATGGCCTCATTGGATGAGAGGTCCCACCTCA CGGCCCCGAGGCGGGGCTTCTTGCCTAAAAGCCGAGCCGGGCC AATGTTCAAATGCGCAGCTCTTAGTC	117bp
17	GTGATGACGTGTCCCATCCCCCTCCACCCCTAGCCCGCGAGCA CGCTGGGATTGGCGCCCCCTCCTCGGTGCAACCTATATAAAGGCT CACAGTCTCGCCTCGGTACACGC	117bp
22	CCCCCCTCCACCCCTAGCCCCGGAGCACGCTGGGATTGGGCC CCCCCTCCTCGGTGCAACCTATATAAAGGCTCACAGTCTCGCCTCG GTACACGC	100bp
23	GGCCTCATTGGATGAGAGGTCCCACCTCACGGCCCAGGGGG TTCTTGCGCTTAAAAGCCGAGCCGGCCAATGTTCAAATGCGCAG CTCTTAGTC	100bp
24	GGGTGGGGCCCGCGCGTATAAAGGGGGCGCAGGGGGCTGGCG TTCCACAGGCCAAGTGCCTGCTCGAGGGGTGCCGCCAGGCC TGAGCGAGCGA	100bp
25	GGTGCATATTGGATTGGCTGGAGTCGCCATCACGCTCCAGCTA CGCCACTTCTTTCTGGCACTATAAAGGGTCTGCACGGCGCTT GCATCTCT	100bp
26	ACTTCCGGGTCAAGTGGGGCCGGCTGTCTGACCTCTTGGCCTC GGCCATTTCAGTCCAGTCAGTCCGGAGGCTGGCTGCAGAAGTA CCGCGTGC	100bp
27	GCTGAGCGCGCGCGATGGGGCGGGAGGTTGGGGTCAAGGAGCA AACTCTGCACAAGATGGCGCGGTAGCGGCAGTGGCGGCGTAG GAGGCAGGTGAG	100bp
28	ATTTTCATCTCGCGAGACTTGTGAGCGGCCATCTGGCTCTGCCCT GACAGATTCTCCTATCGGGGTACAGGGACGCTAACATTGCTACCT GGACTTTC	100bp
29	TGGGACCCCCCGGAAGGCCGAAGTTCTAGGGCGGAAGTGGCGAG AGGAGAGGAGAATGGCGCGGAAGGCTGGATTGGCGTTGGGCT GGGGCCGGCG	100bp
30	AAGGCCCTCGGTCTAACGGCTCCCTATTCCCTGGGTCGCCGG CCATTGGGTGGAAGCGATAGCTGAGTGGCGGCCGCTGCTGATT GTGTTCTAG	100bp
31	AGTGACCCCGAAGTAGAAGTGGCCCTTGCAGGCAAGAGTGCTGGA GGCGGGCAGCGCGACCGGAGCGGTAGGAGCAGCAATTATCCGT GTGCAGCCCC	100bp
32	GGGAGGGCGCGCTGGGAGCTCGCGCATCGCGCTGAGGCCT GCCTGACCGACCTCAGCAGGGCTGTGGTACCATGTTCTCGCG CGGGTGTG	100bp
33	ACTGCGCACCGCGCGCGTGCACCGATTACGCCCTTCCGGCG CCTAGAGCACCGCTGCCGCCATGTTGAGGGGGGACCGCGACCA CTGGGCCCT	100bp
34	CCCTCGAGGGCGGAGCAAAAGTGGAGGCAAGCCTCCTTAT CCTCGCTCCCGTTTCAGTTCAATAAGGTCCGATGTTCTGTAT AAATGCTCG	100bp
35	CTTGGTGACCAAATTGAAAAAAGGGGACCAACTCAT GTTGTTCAATCAGGTCCGCCAAGTTGTTATTAAGGAAGTGT CAGTTCA	100bp
36	GGCTGAGCTATCCTATTGGCTATCGGGACAAAATTGCTTGAGCCA ATCAAAGTGCTCCGTGGACAATCGCCGTTCTGTCTATAAAAAGGTG	100bp

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

配列番号	配列(5'から3')	長さ
	AAGCAGCG	
37	GGAAGTGCCAGACCGGAGGTGCGTCATTCAACGGCGACGCCGATA CGGTTCTCCACCGAGGCCATCGAAGCTTCCACTATGGCTTCC AGCACTGTC	100bp
38	CCCTCGAGGGGGCGGAGCAAAAAGTGAGGCAGCAACGCCCTCTTAT CCTCGCTCCCCTTCAGTTCTCAATAAGGTCCGATGTTCGTGTAT AAATGCTCG	100bp
39	CTTGGTGACCAAATTGAAAAAAAAACCGCGCCAACTCAT GTTGTTTCAATCAGGTCCGCCAAGTTGTATTAAAGGAACGTGTT CAGTTCTATA	100bp
40	GGCTGAGCTATCCTATTGGCTATCGGGACAAAATTGCTTGAGCCA ATCAAAGTGCTCCGTGGACAATGCCGTTCTGTCTATAAAAAGGTG AAGCAGCG	100bp
41	GGAAGTGCCAGACCGGAGGTGCGTCATTCAACGGCGACGCCGATA CGGTTCTCCACCGAGGCCATCGAAGCTTCCACTATGGCTTCC AGCACTGTC	100bp

【0087】

一部の事例では、比較的短いヒト由来 RE は、表 1 の配列もしくは配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41；または表 1 の配列もしくは配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41 に対して少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性（たとえば、局所的な配列同一性）を有する配列を含む。一部の事例では、短いヒト由来 RE は、hg19 のヒト配列に対して少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 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% または少なくとも 99% の配列同一性を有する、天然に存在しない配列を含む。一部の事例では、比較的短いヒト由来 RE は、表 2 に列挙された以下のゲノム位置または染色体位置のうちの 1 つに位置するヒト配列に対して少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 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% または少なくとも 99% の配列同一性を有する、天然に存在しない配列を含む。

【0088】

【表 2 - 1】

表2: REを誘導するためのゲノム位置の例

配列番号	ゲノム位置	陰性対照と比べた 増加倍数 (正規化されている)
22	PEG10-cs;PEG10-he_chr7:94285387-94285887-3	154
23	SAT1-he_chrX:23801204-23801704-1	207
24	CDKN1C-he;CDKN1C-cs_chr11:2906751-2907251-3	532
25	BTG1-cs;BTG1-he_chr12:92539423-92539923-3	501
26	ATP5A1-he_chr18:43678011-43678511-3	1049

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

配列番号	ゲノム位置	陰性対照と比べた 増加倍数 (正規化されている)
27	GANAB-he_chr11:62413828-62414328-3	54
28	ATP5F1-he_chr1:111991856-111992356-3	675
29	LMAN2-cs_chr5:176778403-176778903-3	
30	RAB1A-he_chr2:65356988-65357488-3	1049
31	NEDD8-he_chr14:24701287-24701787-3	253
32	ATP5C1-he_chr10:7829892-7830392-3	
33	SSR4-he_chrX:153059879-153060379-1	
34	HIST1H4B-he_chr6:26027230-26027730(-)-2	
35	HIST1H4C-he_chr6:26103854-26104354(+)-3	313
36	HIST2H2AA3-he_chr1:149814228-149814728(-)-4	
37	TOMM6-he_chr6:41755153-41755653(+)-3	
38	HIST1H4B-he_chr6:26027230-26027730(-)-2	
39	HIST1H4C-he_chr6:26103854-26104354(+)-3	
40	HIST2H2AA3-he_chr1:149814228-149814728(-)-4	
41	TOMM6-he_chr6:41755153-41755653(+)-3	

【0089】

一部の事例では、比較的短いヒト由来 R E は、表 2 に列挙されたゲノム位置におけるプロモーターに由来し、陰性対照（たとえば、ベクター単独対照、緩衝液対照、または発現活性を有さないことが既知の配列）と比較して、または構成的プロモーター、CMV プロモーター、スーパーコアプロモーター、TTR プロモーター、Proto 1 プロモーター、UCL-HLP プロモーターもしくは CMVe プロモーターと比較して少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 15 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 25 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 200 倍、少なくとも 300 倍、少なくとも 400 倍、少なくとも 500 倍、少なくとも 600 倍、少なくとも 700 倍、少なくとも 800 倍、少なくとも 900 倍または少なくとも 1000 倍の導入遺伝子発現を呈する。

【0090】

一部の事例では、本開示の比較的短い R E は、イントロン配列（たとえば、配列番号 1 または配列番号 2）を含み、これは、発現力セット中の導入遺伝子に作動可能に連結されると、SCP の制御下での導入遺伝子発現または陰性対照（たとえば、ベクター単独、緩衝液単独、またはいずれの発現活性も有さない配列）と比較して少なくとも 50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍もしくは 5000 倍の、または 10000 倍を上回る、正規化された遺伝子（たとえば、ルシフェラーゼ、ATP7B または FVIII）発現をもたらす。一部の事例では、本開示の比較的短い R E（たとえば、配列番号 1 または配列番号 2）は、発現力セット中の導入遺伝子に作動可能に連結されると、SCP または CAG のサイズ正規化された活性と比較して少なくとも 1.5 倍、2.5 倍、5 倍、10 倍、15 倍もしくは 20 倍またはそれよりも高い、サイズ正規化された活性をもたらす。一部の事例では、本開示の比較的短い R E（たとえば、配列番号 1 または配列番号 2）は、発現力セット中の導入遺伝子（たとえば、ルシフェラーゼ）に作動可能に連結されると、SCP、SerpE_TTR、Proto 1、minCMV、UCL-HLP もしくは CMVe の制御下でのルシフェラーゼと比較して；または緩衝液対照と比較して少なくとも 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍またはそれよりも高い、総ルシフェラーゼ発光（光子 / 秒）をもたらす。一部の事例では、本開示の比較的短い R E（たとえば、配列番号 1 または配列番号 2）は、発現力セット中のヒト FVIII に作動可能に連結されると、緩衝液対照、または FVIII に作動可能に連結された UCL-HLP と比較して

、 *in vivo* でヒト F V I I I 濃度の増加をもたらし、ここで、濃度の増加は、少なくとも 1 I U / mL、1.2 I U / mL、1.5 I U / mL の、または 1 I U / mL を上回る F V I I I である。

【 0 0 9 1 】

一部の事例では、本開示の比較的短い R E は、ヒトプロモーター配列（たとえば、配列番号 13 ~ 17 および 22 ~ 41）に由来し、発現カセット中の導入遺伝子（たとえば、ルシフェラーゼ、A T P 7 B または F V I I I ）に作動可能に連結されると、陰性対照（たとえば、ベクター単独、緩衝液単独、または発現活性を有さないことが既知の配列）と比較して少なくとも 50 倍、100 倍、200 倍、300 倍、400 倍、500 倍、600 倍、700 倍、800 倍、900 倍もしくは 1000 倍またはそれよりも高い、正規化された導入遺伝子発現をもたらす。一部の事例では、R E は、C M V または C M V e の制御下でのルシフェラーゼ発現と比較して少なくとも 5 倍、10 倍もしくは 100 倍またはそれよりも高い、正規化されたルシフェラーゼ発現をもたらす。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くの R E は、より大きな R E を形成するために組み合わされ得る。一部の事例では、R E は、導入遺伝子の上流に位置する。

【 0 0 9 2 】

一部の事例では、本明細書に開示される比較的短いヒト由来 R E は、40 b p、45 b p、49 b p、50 b p、56 b p、60 b p、70 b p、80 b p、90 b p、100 b p、110 b p、117 b p、120 b p、130 b p、140 b p、150 b p、160 b p、170 b p、180 b p、190 b p、200 b p、210 b p、220 b p、230 b p、240 b p、250 b p、259 b p、260 b p、265 b p、270 b p、280 b p、290 b p、300 b p、310 b p、320 b p、330 b p、340 b p、350 b p、360 b p、370 b p、380 b p、390 b p または 400 b p 以下を構成し、表 1 または配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41 のうちのいずれか 1 つに従う配列を含む。一部の事例では、表 1 に列挙された配列または配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41 のうちの、2つもしくはそれよりも多く、3つもしくはそれよりも多く、4つもしくはそれよりも多く、5つもしくはそれよりも多く、6つもしくはそれよりも多く、7つもしくはそれよりも多く、8つもしくはそれよりも多く、9つもしくはそれよりも多く、または 10 個もしくはそれよりも多くは、発現カセットまたはベクター中に組み合わされ得るまたはタンデムで使用され得る。

【 0 0 9 3 】

様々な態様では、比較的短いヒト由来制御エレメントは、ベクターに対するサイズに関する制約が存在する場合（たとえば、A A V 遺伝子療法において）、または非常に高いレベルの発現の必要性が存在する場合（たとえば、*e x vivo* タンパク質産生において）に、特に有用である。本明細書に開示される制御エレメントは、構成的または誘導性であり得る。したがって、本開示は、高い発現ならびに短い制御エレメントの両方の利益を提供する。一部の事例では、本明細書に開示される R E は、対照制御エレメント、たとえば、構成的プロモーター、C M V プロモーター、スーパーコアプロモーター、T T R プロモーター、P r o t o 1 プロモーター、U C L - H L P プロモーターまたは C M V e プロモーターと比較して、1 塩基対当たりまたは 1 ヌクレオチド当たり、より高い発現レベルを呈する。一部の事例では、配列番号 4 は、遺伝子発現のレベルを比較するための対照として使用される。

【 0 0 9 4 】

一部の事例では、本開示の 1 つまたは複数の R E は、顕著なクローニング能力をとることなしに導入遺伝子発現を強化するので、これらの R E は、（たとえば、遺伝子療法または発現カセット中の）大きな導入遺伝子の発現を増加させるために適合される。一部の事例では、本開示の R E は、49 b p、50 b p、56 b p、60 b p、70 b p、80 b p、90 b p、100 b p、110 b p、117 b p、120 b p、130 b p、140 b p、150 b p、160 b p、170 b p、180 b p、190 b p、200 b p、210 b p、220 b p、230 b p、240 b p、250 b p、259 b p、260 b p

10

20

30

40

50

、 2 6 5 b p、 2 7 0 b p、 2 8 0 b p、 2 9 0 b p、 3 0 0 b p、 3 1 0 b p、 3 2 0 b p、 3 3 0 b p、 3 4 0 b p、 3 5 0 b p、 3 6 0 b p、 3 7 0 b p、 3 8 0 b p、 3 9 0 b p または 4 0 0 b p 以下であり、 表 1 もしくは配列番号 1 ~ 2、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 のうちのいずれか 1 つに従う配列、 またはそれに対して少なくとも 7 0 %、 少なくとも 7 5 %、 少なくとも 8 0 %、 少なくとも 8 5 %、 少なくとも 9 0 %、 少なくとも 9 1 %、 少なくとも 9 2 %、 少なくとも 9 3 %、 少なくとも 9 4 %、 少なくとも 9 5 %、 少なくとも 9 6 %、 少なくとも 9 7 %、 少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の事例では、 本開示の比較的短い R E は、 R E なしの導入遺伝子発現と比較して、 または陰性対照（たとえば、 ベクター単独対照、 緩衝液単独、 または発現活性を有さないことが既知の配列）と比較して、 導入遺伝子発現を、 少なくとも 1.5 倍、 少なくとも 2 倍、 少なくとも 3 倍、 少なくとも 4 倍、 少なくとも 5 倍、 少なくとも 6 倍、 少なくとも 7 倍、 少なくとも 8 倍、 少なくとも 9 倍、 少なくとも 10 倍、 少なくとも 15 倍、 少なくとも 20 倍、 少なくとも 25 倍、 少なくとも 50 倍、 少なくとも 100 倍、 少なくとも 200 倍、 少なくとも 300 倍、 少なくとも 400 倍、 少なくとも 500 倍、 少なくとも 600 倍、 少なくとも 700 倍、 少なくとも 800 倍、 少なくとも 900 倍または少なくとも 1000 倍増加させる。一部の事例では、 対照は、 同じ導入遺伝子（たとえば、 ルシフェラーゼ）に作動可能に連結された構成的プロモーターである。導入遺伝子に作動可能に連結された R E の導入遺伝子発現との比較のための対照として使用され得る他のプロモーターの例としては、 CMV プロモーター、 スーパーコアプロモーター、 TTR プロモーター、 Proto 1 プロモーター、 UCL - HLP プロモーター、 AAT プロモーター、 KAR プロモーター、 EF1 プロモーター、 EFS プロモーターまたは CMV e エンハンサー / CMV プロモーター組合せが挙げられるが、 これらに限定されない。
10

【 0 0 9 5 】

本明細書の制御エレメントは、 プロモーターであり得、 発現カセット中に含めた場合、 下流配列の転写を駆動させ、 下流配列（たとえば、 導入遺伝子）と近接して関連していても、 直接接触していてもよい。プロモーターは、 連結された導入遺伝子の高い、 中間の、 または低い発現を駆動させ得る。一部の事例では、 プロモーターは、 1 つもしくは複数の細胞型に対して特異的であり得、 または多数のもしくは複数の細胞型（たとえば、 少なくとも 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9 または 10 個の細胞型）において、 類似のレベルで発現し得る。
20

【 0 0 9 6 】

一部の事例では、 本明細書に開示される R E は、 ヒト由来配列を含む。一部の事例では、 本開示の R E は、 天然に存在しない。「ヒト由来」という用語は、 本明細書で使用される場合、 ヒト参照ゲノム（またはヒトゲノム構造、 たとえば hg19）中の配列に対して少なくとも 8 0 %、 9 0 %、 9 5 % または 9 9 % の配列同一性を有する配列を指す。相同な配列は、 ヒトゲノムの領域と比較して少なくとも 8 0 % の配列同一性（たとえば、 BLAST によって測定した場合）を有する領域を有する配列であり得る。たとえば、 ヒト配列に対して少なくとも 8 0 %、 少なくとも 8 5 %、 少なくとも 9 0 %、 少なくとも 9 1 %、 少なくとも 9 2 %、 少なくとも 9 3 %、 少なくとも 9 4 %、 少なくとも 9 5 %、 少なくとも 9 6 %、 少なくとも 9 7 %、 少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % 相同である配列は、 ヒト由来配列とみなされる。
30

【 0 0 9 7 】

一部の事例では、 制御エレメントは、 制御エレメント全体が、 ヒトゲノム中の配列に対して低い配列同一性を有するように、 ヒト由来配列および追加の配列を含むが、 一方で、 制御エレメントの一部は、 ヒトゲノム中の配列に対して 100 % の配列同一性（または局所的な配列同一性）を有する。一部の事例では、 パーセント配列同一性は、 表 1 に列挙された配列または配列番号 1 ~ 2、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 のうちのいずれかの、 少なくとも 5 0 %、 5 5 %、 6 0 %、 6 5 %、 7 0 %、 7 5 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % または 1 0 0
40

%をカバーする領域内の相同性を指す。

【0098】

一部の事例では、ヒト由来制御エレメントは、ヒト配列に対して100%同一である配列である。一部の事例では、制御エレメントの配列は、100%ヒト由来であり、ここで、REは、ヒト配列とは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90または95ヌクレオチドまたは塩基対異なる。

【0099】

他の事例では、制御エレメント配列の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%または99%は、ヒト由来である。たとえば、制御エレメントは、その配列のうちの50%がヒト由来であり、残りの50%が、非ヒト由来（たとえば、マウス由来または完全に合成）であり得る。さらなる例として、50%がヒト由来であるとみなされ、300bpを含む制御エレメントは、ヒトゲノムにおける配列に対して、全体としては45%の配列同一性を有し得るが、一方で、REの塩基対1～150は、同様にサイズ決定したヒトゲノムの領域に対して90%の同一性（局所的な配列同一性）を有し得る。

10

【0100】

一部の事例では、本開示のREは、プロモーター配列、イントロン配列、エンハンサー配列、5'UTR配列、またはそれらの組合せを含む。一部の事例では、本開示のREは、天然に存在しない。一部の事例では、本開示のREは、ヒト由来（またはヒト参照ゲノム中の配列に対して少なくとも80%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列）である。

20

【0101】

一部の事例では、本明細書に開示される比較的短い制御エレメントは、ゲノムプロモーター配列（たとえば、表2中のゲノム位置）に由来し得る。一部の事例では、本明細書に開示される制御エレメントは、ゲノムプロモーター配列および3'非翻訳領域(3'UTR)の両方に由来し得る。一部の事例では、本明細書に開示される制御エレメントは、遺伝子間配列に由来し得る。一部の事例では、本明細書に開示される制御エレメントは、遺伝子の下流のゲノム配列に由来し得る、または5'UTR配列、もしくは5'UTRおよび下流配列の混合に由来し得る。

30

【0102】

本明細書の制御エレメントは、エンハンサーであり得、プロモーターと併せて発現ベクターまたはカセットにおけるその存在は、エンハンサーなしのプロモーターによる同じ導入遺伝子の発現と比較して、作動可能に連結された導入遺伝子の発現を増加させる。エンハンサーは、転写機序、転写後機序、または両方のいずれかを通じて、連結された導入遺伝子の発現を増加させ得る。

【0103】

一部の事例では、本明細書の制御エレメントは、イントロン配列（たとえば、配列番号1～2）であり、またはイントロンを含み、プロモーターと併せて発現ベクターまたはカセットにおけるその存在は、イントロン配列なしのプロモーターによる同じ導入遺伝子の発現と比較して、作動可能に連結された導入遺伝子の発現を増加させる。イントロン配列または制御エレメントは、転写機序、転写後機序、または両方のいずれかを通じて、連結された導入遺伝子の発現を増加させ得る。

40

【0104】

一部の事例では、本明細書の制御エレメントは、プロモーター配列（たとえば、配列番号13～17および22～41）であり、またはプロモーター配列を含み、これは、導入遺伝子を発現させるための任意の他のプロモーター配列および/またはエンハンサー配列なしに、発現カセット中の導入遺伝子に作動可能に連結され得る。

50

【0105】

種々の実施形態では、表1のREのうちの1つまたは複数は、発現力セット中のプロモーターを必要とせずに、作動可能に連結された導入遺伝子の増加した発現を駆動させることができる。一部の実施形態では、大きな導入遺伝子（たとえば、その配列が、1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb、5kb、5.5kb、6kb、6.5kb、7kbまたは7.5kbを上回る導入遺伝子）が、従来的な発現力セットにおいて発現されるには大きすぎる場合、そのような導入遺伝子は、従来的なプロモーターを必要とせずに、表1の1つまたは複数のREに作動可能に連結され得、REなしの発現力セットにおける導入遺伝子発現と比較して、または対照（たとえば、空のベクター、構成的プロモーター、CMVプロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Proto1プロモーター、UCL-HLPプロモーターまたはCMV eプロモーター）と比較して、より高いレベルで発現され得る。

【0106】

本明細書に開示される制御エレメントの利点の1つは、それらの比較的短い長さである。一部の事例では、本発明の制御エレメントは、長さが40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、200bp、300bpもしくは400bp未満であるかまたはそれと等しい。一部の事例では、制御エレメントは、長さが100bp未満であるかもしくはそれと等しい、長さが<90bp、<80bp、<70bp、<60bpもしくは<50bpである、または48～57bpの間または40～60bpもしくは50～100bpの間である。一部の事例では、本明細書に記載される制御エレメントは、40～50bp、45～55bp、50～60bpまたは55～65bpである。一部の事例では、制御エレメントは、45～60bpである。一部の事例では、本明細書に記載される制御エレメントは、49bpまたは56bpである。たとえば、配列番号1の制御エレメントは、長さが56bpであり、配列番号2の制御エレメントは、長さが49bpである。一部の事例では、制御エレメントは、100bpと150bpとの間、110bpと140bpとの間、110bpと130bpとの間または115bpと125bpとの間であり得る。たとえば、配列番号13～17の制御エレメントは、長さが117bpである。一部の事例では、制御エレメントは、100bpであるまたは約100bpである。たとえば、配列番号22～41は各々、長さが100bpである。

【0107】

本開示の制御エレメントは、好ましくは、ヒト由来配列を有する。制御エレメントは、転写開始部位の上流のゲノム配列、5'UTR配列、エクソン配列、イントロン配列、または3'UTR配列に由来し得る。一部の実施形態では、ヒト由来制御エレメントは、ヒト由来イントロン配列である。一部の事例では、ヒト由来制御エレメントは、ヒト配列由來のプロモーター配列である。一部の実施形態では、ヒト由来制御エレメントは、配列番号1、配列番号2、もしくはそれらの組合せのイントロン配列、またはそれに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性（たとえば、BLASTによって測定した場合）を有する配列である。一部の実施形態では、ヒト由来制御エレメントは、配列番号13、14、15、16、17、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、もしくはそれらの組合せのプロモーター配列、またはそれに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性（たとえば、BLASTによって測定した場合）を有する配列である。

【0108】

一部の事例では、制御エレメントは、5'非翻訳領域(5'UTR)の一部またはすべて

10

20

30

40

50

を含む。5'UTR制御エレメントは、いくつかの異なる方法で、遺伝子の発現に影響を及ぼし得る。5'UTR制御エレメントは、RNA結合タンパク質のための結合部位を含み得る。さらに、5'UTRにおいて制御エレメントによって形成される二次構造は、翻訳に必要なRNA結合タンパク質の結合に影響を及ぼし得る。一部の例では、制御エレメントは、高度の二次構造を有し得る。一部の事例では、制御エレメントは、二次構造をほとんど有さなくても、全く有さなくてもよい。制御エレメントは、内部リボソーム進入部位(IRES)もまた含み得、5'キャップ非依存的翻訳を可能にする。制御エレメントは、上流の翻訳開始コドン(uAUG)を含み得る。一部の実施形態では、制御エレメントは、上流の翻訳開始コドンを含まない。一部の実施形態では、制御エレメントは、AUGコドンの1塩基以内のいずれのコドンも含まず、または偶然により予測されるよりも少ない、AUGコドンと類似のコドンを含む。一部の事例では、制御エレメントは、上流のAUG(または十分に類似の配列)が存在し、その後にインフレームの停止コドンが続く場合に存在する、上流のオープンリーディングフレームを含み得る。一部の例では、制御エレメントは、uORFを含まない。一部の事例では、制御エレメントは、microRNA結合部位、またはRNA結合タンパク質のための結合部位を含む。

【0109】

一部の事例では、本開示の制御エレメントは、ヒト由来配列に対して相同である配列を含む。配列は、ヒト配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性を有する場合、「ヒト由来配列に対して相同」である。好ましくは、ヒト由来制御配列に対して相同である配列は、ヒト配列に対して少なくとも90%同一である。一部の実施形態では、本明細書の制御エレメントは、配列番号1～2、13～17および22～41に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性を有する制御エレメントである。制御エレメントが、配列番号1～2のいずれかに対して相同である場合、そのような制御エレメントは、制御エレメントなしの類似のベクターと比較して、作動可能に連結された導入遺伝子のより高い発現をもたらす(プロモーターも発現ベクターまたはカセット中に存在する場合)。導入遺伝子のそのようなより高い発現は、たとえば、HEK293TまたはCHO細胞における発現において観察され得る。一部の事例では、導入遺伝子のそのようなより高い発現は、複数の細胞型、たとえば、2つまたはそれよりも多くの哺乳動物細胞系、ヒト細胞系、腎臓細胞、上皮細胞、肝臓細胞、肝細胞、ニューロン、線維芽細胞および/またはCNS細胞において観察され得る。

【0110】

一部の事例では、制御エレメントが、配列番号13～17および22～41のいずれかに対して相同である場合、そのような制御エレメントは、制御エレメントなしの類似のベクターと比較して、作動可能に連結された導入遺伝子のより高い発現をもたらす(他のプロモーターが発現ベクターまたはカセット中に存在しない場合であっても)。導入遺伝子のそのようなより高い発現は、たとえば、HEK293TまたはCHO細胞における発現において観察され得る。一部の事例では、導入遺伝子のそのようなより高い発現は、複数の細胞型、たとえば、2つまたはそれよりも多くの哺乳動物細胞系、ヒト細胞系、腎臓細胞、上皮細胞、肝臓細胞、肝細胞、ニューロン、線維芽細胞および/またはCNS細胞において観察され得る。

【0111】

本開示の制御エレメントはまた、上記のいずれかの機能性断片、たとえば、配列番号1～2、13～17および22～41の断片、またはそれらの任意の組合せであり得る。そのような機能性断片もまた、制御エレメントなしの類似の発現カセットまたはベクターと比較した場合、発現カセットまたはベクター中の導入遺伝子の発現を増加させる。機能性断片が、エンハンサー、イントロン配列、プロモーター配列、またはそれらの組合せである場合、より高い発現が、機能性断片なしの類似のベクターまたはカセットと比較して、断片が導入遺伝子に作動可能に連結された場合に観察される。断片は、好ましくは、長さが25bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp

10

20

30

40

50

、 1 0 0 b p もしくは 1 1 0 b p 未満であるかまたはそれと等しい。一部の事例では、ヒトプロモーター配列由来の本開示の R E は、発現力セットまたはベクター中の第 2 のプロモーターを必要とせずに、作動可能に連結された導入遺伝子の発現を増加させ得る。一部の事例では、従来的な発現力セットまたはベクター中のプロモーターは、1 つもしくは複数の配列番号 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 、それらの組合せ、あるいは配列番号 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 に対して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、少なくとも 9 2 % 、少なくとも 9 3 % 、少なくとも 9 4 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性（たとえば、 B L A S T によって測定した場合）を有する配列、またはそれらの組合せで置き換えられ得る。

10

【 0 1 1 2 】

一部の実施形態では、制御エレメントは、(i) 配列番号 1 、 2 、 3 、 4 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 (i i) 配列番号 1 、 2 、 3 、 4 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % 、 8 1 % 、 8 2 % 、 8 3 % 、 8 4 % 、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列、(i i i) (i) もしくは(i i) の任意の配列の機能性断片、または(i v) (i) 、(i i) および(i i i) の任意の配列の組合せのうちのいずれか 1 つである。一部の実施形態では、2 つまたはそれよりも多くのコピーの制御エレメント、たとえば、2 つまたはそれよりも多くのコピーの配列番号 1 ~ 2 、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 のうちの 1 つまたは複数が、導入遺伝子発現を強化するために使用される。一部の実施形態では、配列番号 1 および 2 の組合せ、またはそれらの機能性断片の組合せが、導入遺伝子発現を増加させるために制御エレメントとして使用される。他の実施形態では、配列番号 1 および / または 2 のうちの 1 つまたは複数は、導入遺伝子発現を増加させるために、別の制御エレメント、たとえば、プロモーターまたはエンハンサーに結合または作動可能に連結される。他の実施形態では、配列番号 1 および / または 2 のうちの 1 つまたは複数は、導入遺伝子発現を増加させるために、配列番号 1 ~ 2 、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 のうちの 1 つまたは複数に結合または作動可能に連結される。一部の実施形態では、イントロン配列である制御エレメントは、制御エレメントが任意のプロモーターに結合または作動可能に連結された場合に、導入遺伝子発現を増加させ得る。一部の事例では、ヒトプロモーター配列由來の制御エレメントは、制御エレメントが、いずれの他のプロモーター配列もなしに、導入遺伝子に結合または作動可能に連結された場合に、導入遺伝子発現を増加させ得る。一部の事例では、ヒト由來のプロモーター配列およびイントロン配列を含む制御エレメントは、組み合わされた制御エレメントが、いずれの他のプロモーター配列もなしに、導入遺伝子に結合または作動可能に連結された場合に、導入遺伝子発現を増加させ得る。

20

【 0 1 1 3 】

一部の実施形態では、遺伝子療法からの導入遺伝子発現を改善または増加させるために、本明細書に開示される 1 つまたは複数の制御エレメント（たとえば、配列番号 1 ~ 2 、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 ）を付加することによって、任意の遺伝子療法または公知の遺伝子療法を強化することができる。

30

【 0 1 1 4 】

一部の事例では、制御エレメントは、制御エレメント全体がヒトゲノムに対して低い配列同一性を有するように、ヒト由來配列および非ヒト由來配列を含む。しかし、制御エレメントの一部は、ヒトゲノムに対して 1 0 0 % の配列同一性を有する。他の事例では、制御エレメント配列の少なくとも 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % もしくは 9 9 % は、ヒト由來である、または少なくとも 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 もしくは 5 0 の連続的なヌクレオチドは、ヒト由來である。たとえば、制御エレメントは、その

40

50

配列のうちの 50 % がヒト由来であり、残りの 50 % が、非ヒト由来（たとえば、マウス由来、ウイルス由来または完全合成）であり得る。

【 0 1 1 5 】

発現の増加は、転写または転写後レベルで生じ得る。たとえば、転写レベルでは、制御エレメントは、転写因子および／もしくは RNA ポリメラーゼを動員し、転写の開始を増加させ、または転写のレベルを増加させる DNA および／もしくはヒストン修飾を動員することによって、発現を増加させ得る。発現のそのような増加は、導入遺伝子を代表する RNA 転写物の量の増加を測定することによって検出され得る。転写後レベルでは、制御エレメントは、タンパク質へと翻訳されるタンパク質の量を増加させることによって、発現を増加させ得る。これは、様々な機序を介して、たとえば、mRNA の安定性を増加させること、または翻訳に必要なタンパク質の動員および組み立てを増加させることによって、達成され得る。発現のそのような増加は、導入遺伝子を代表する発現されたタンパク質の量を測定することによって検出され得る。產生されたタンパク質の量は、たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によって直接的に、またはたとえば、機能的アッセイによって間接的に、測定され得る。機能的アッセイで一般に測定されるタンパク質は、ルシフェラーゼである。しかし、他のタンパク質、たとえば、第VIII因子もまた、機能的アッセイによって測定され得る。好ましくは、本明細書の制御エレメントは、発現ベクターまたはカセットの遺伝子、導入遺伝子または治療用導入遺伝子の発現を、制御エレメントなしの同じ発現ベクターを使用した導入遺伝子の発現と比較して少なくとも 1 . 4 、 1 . 5 、 1 . 6 、 1 . 7 、 1 . 8 、 1 . 9 、 2 、 2 . 5 、 3 、 3 . 5 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 もしくは 10 倍、または 5 倍を上回って、または 10 倍を上回って増加させる。一部の事例では、本明細書の制御エレメントは、発現ベクターまたはカセットの遺伝子、導入遺伝子または治療用導入遺伝子の発現を、制御エレメントなしの同じ発現ベクターを使用した導入遺伝子の発現と比較して少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 15 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 25 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 200 倍、少なくとも 300 倍、少なくとも 400 倍、少なくとも 500 倍、少なくとも 600 倍、少なくとも 700 倍、少なくとも 800 倍、少なくとも 900 倍または少なくとも 1000 倍増加させる。そのような発現ベクターまたはカセットは、制御エレメントとは別のプロモーターを含み得る。プロモーターの例としては、minCMV プロモーター、スーパーコアプロモーター（SCP）、TTR プロモーター、Proto1 プロモーター、UCL-HLP プロモーター、AAT プロモーター、KAR プロモーター、EF1 プロモーターおよび EFS プロモーターが挙げられる。一部の事例では、導入遺伝子に作動可能に連結された配列番号 13 ~ 17 および 22 ~ 41 のうちの 1 つまたは複数を含む発現ベクターまたはカセットは、導入遺伝子発現のために別のプロモーターを必要としない。

【 0 1 1 6 】

一部の事例では、minCMV プロモーターと一緒に本明細書の制御エレメントのいずれかに作動可能に連結された導入遺伝子の発現は、本明細書に記載される制御エレメントなしに minCMV プロモーターに連結された導入遺伝子の発現よりも高い。一部の事例では、minCMV プロモーターおよび本明細書に記載される制御エレメントに連結された場合、導入遺伝子の発現は、制御エレメントなしに以下のプロモーター：スーパーコアプロモーター、TTR プロモーター、Proto1 プロモーター、UCL-HLP プロモーター、AAT プロモーター、KAR プロモーター、EF1 プロモーターまたは EFS プロモーターのうちのいずれか 1 つに連結された場合の導入遺伝子の発現よりも高い。

【 0 1 1 7 】

一部の事例では、本明細書の制御エレメント（たとえば、配列番号 1 ~ 2 、 13 ~ 17 および 22 ~ 41 ）のいずれかに作動可能に連結された導入遺伝子の発現は、UCL-HLP プロモーターに連結された場合の導入遺伝子の発現よりも高い。

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

50

一部の事例では、本明細書に記載される制御エレメントは、それらの長さに対して高い発現を駆動させる。たとえば、CMVプロモーターの長さの半分である本開示の制御エレメントは、CMVプロモーターのレベルの半分を上回る発現を駆動させる。一部の事例では、制御エレメントは、1塩基対当たりの活性（または導入遺伝子発現）によって定義される、またはサイズ正規化された活性と称される。たとえば、CMVプロモーターと同じレベルの発現を駆動させるが、CMVプロモーターの長さの半分である制御エレメントは、1塩基対当たり2倍の活性を有する。図1Aに示されるように、配列番号3（min CMVプロモーターと組み合わされた配列番号1）は、5552の正規化されたルシフェラーゼ値をもたらし、図1Bに示されるように、約21のサイズ正規化された活性値を生じる（配列番号3は、266bpである）。配列番号4（min CMVプロモーターと組み合わされた配列番号2）は、53のサイズ正規化された値をもたらす。図1Bに示されるように、min CMVプロモーター単独は、19のサイズ正規化された値を生じ、SCPプロモーターおよびCAGプロモーターは、それぞれ、1および10のサイズ正規化された値を生じる。

【0119】

発現、特に、高い遺伝子発現は、当該分野において公知の任意の技法を使用して測定され得る。一部の事例では、本開示の制御エレメントによって制御される場合の、導入遺伝子の相対的およびより高い発現は、RNA定量／シーケンシング技術、たとえば、定量的PCR、ノーザンプロットティングまたは次世代シーケンシングを使用して測定される。

【0120】

一部の事例では、高い発現は、目的の導入遺伝子／遺伝子から產生／発現されたタンパク質の濃度によって測定され得る。タンパク質の濃度は、当該分野において公知の任意の方法によって測定され得る。タンパク質発現を測定するための方法の非限定的な例としては、ELISA、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンプロットティングまたは高速液体クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。たとえば、Noble JE、Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes、Methods Enzymol. 2014年；536巻：17～26頁；Kurien BT、Scofield RH. A brief review of other notable protein detection methods on acrylamide gels、Methods Mol Biol. 2012年；869巻：617～20頁；ならびにDaniel M. Bollag、Michael D. RozyckiおよびStuart J. Edelstein、Protein Methods、第2版、Wiley Publishers(1996年)を参照されたい。タンパク質発現は、in vitroまたはin vivoで測定され得る。

【0121】

種々の実施形態では、導入遺伝子発現は、PCR法を使用して、導入遺伝子から產生されたmRNAまたはRNA転写物の量を測定することによって判定することができる。一部の事例では、導入遺伝子の遺伝子発現は、遺伝子産物と相互作用するタンパク質またはイムノアッセイを使用することによって測定され得る。一部の事例では、ノーザンプロット分析および／またはin situハイブリダイゼーションもまた、導入遺伝子発現をin vivoで分析するために使用され得る。導入遺伝子から発現されたタンパク質（たとえば、蛍光レポーター導入遺伝子からの蛍光）のレベルもまた、転写に関しての導入遺伝子発現の増加、ならびに細胞中またはin vivoでのタンパク質合成（すなわち、翻訳）の増加を判定するために、モニタリングされ得る。タンパク質レベルは、ウェスタンプロット分析、免疫組織化学、免疫蛍光組織化学、および／またはELISAアッセイを含む様々な方法を使用してアッセイすることができるが、これらに限定されない。

【0122】

一部の例では、本開示の制御エレメントは、ELISAによって測定した場合、関連細胞型において、少なくとも0.5、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5または3IU/mlのレベルで、作動可能に連結された導入遺伝子の発現をもたらす。関連細胞型の例としては、肝細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、肺細胞、上皮細胞、ならびに腎臓細胞、たとえば、293TおよびCH

10

20

30

40

50

○細胞が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、導入遺伝子発現を増加させる制御エレメントの能力は、マウスにおいて評価することができ、ここで、マウス全体における導入遺伝子発現の総量および／または導入遺伝子発現を有する細胞型もしくは組織型の総数が測定される。一部の事例では、本開示の制御エレメントは、E L I S Aによって測定した場合、マウスまたは他の生物の血液中に、少なくとも0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5または3.0 IU / mLの全体的レベルで、作動可能に連結された導入遺伝子の発現をもたらすことができる。

【0123】

10

発現力セットまたはベクターの活性を評価するとき、活性または発現は、単位用量当たりの活性もしくは発現レベルとして表すことができるか、または細胞もしくはマウスに投与もしくは送達された発現力セットもしくはベクターの用量に対して正規化され得る。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現または活性は、制御エレメントありまたはなしでの様々な発現ベクターまたはカセットにわたる比較を可能にするために、使用されたプラスミドもしくはDNAの量に対して正規化されるか（たとえば、1マウス当たりの $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、またはウイルス粒子の量に対して正規化される（たとえば、1マウス当たりのゲノムコピーの量/kgに対して正規化される）。たとえば、マウスにおける制御エレメントの活性を評価する場合、アッセイした発現または活性は、1マウス当たり、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 μg の、または10もしくは20 μg を上回る、発現ベクター、カセット、またはプラスミドの用量に対して、正規化され得る。一部の実施形態では、発現レベルまたは活性は、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、または 10^{15} g c/kg の、1マウス当たりの本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットを含むウイルス粒子に対して、正規化され得る。

20

【0124】

他の例では、連結された導入遺伝子の発現は、発現されたタンパク質の活性についての機能的アッセイによって測定される。機能的アッセイの例としては、ルシフェラーゼ活性を定量するためのルシフェラーゼアッセイおよび第VIII因子活性を定量するためのCoatestアッセイが挙げられる。Coatestアッセイでは、補因子である活性な第VIII因子の発現は、発色団pNAを放出する反応を促進する。放出された発色団と関連する色は、405 nmで測光法で読み取られ、色の強度は、第VIII因子活性の量と比例する。第VIII因子活性は、1.0 IU/mLの第VIII因子を含む血漿によって示される活性レベルのパーセンテージとして測定できる。m i n C M Vおよび第VIII因子に作動可能に連結された本開示の制御エレメント、たとえば、配列番号1または2は、タンパク質が1.0 IU/mLの濃度である場合、制御エレメントなしの類似の発現ベクター、たとえば、制御エレメントなしのUCL-HLPと比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%を上回る第VIII因子活性レベル、または250%を上回る活性レベルをもたらし得る。一部の事例では、第VIII因子に作動可能に連結された本開示の制御エレメント、たとえば、配列番号13、14、15、16、17、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41は、たとえば、タンパク質が1.0 IU/mLの濃度である場合、UCL-HLPプロモーターありの類似の発現ベクターと比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%を上回る第VIII因子活性レベル、または250%を上回る活性レベルをもたらし得る。

30

【0125】

40

50

本明細書に開示される制御エレメントは、1つまたは複数の異なる細胞型において導入遺伝子の発現を駆動または増加させることができる。制御エレメントが、複数の細胞型において導入遺伝子の発現を増加させることができると場合、そのような発現は、全体的発現とみなされる。全体的発現は、生物のすべての細胞における導入遺伝子の発現を要求しない。全体的制御エレメントは、異なる発現性細胞型において類似のレベルで、または異なる細胞型においてある範囲の発現レベルで、導入遺伝子を発現できる。一部の事例では、全体的制御エレメントは、少なくとも2、3、4、5、10、15または20個の異なる細胞型において導入遺伝子の発現を駆動または増加させることができる。たとえば、全体的発現を有する制御エレメントは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個の異なる細胞系における導入遺伝子の発現を駆動または増加させることができる。細胞系の例としては、293細胞、CHO細胞、がん細胞系および不死化細胞系が挙げられる。一部の事例では、制御エレメントは、in vivoで、動物中の1つまたは複数の細胞型において導入遺伝子の発現を駆動または増加させる。

【0126】

一部の実施形態では、本明細書の制御エレメントは、肝臓細胞において遺伝子の発現を駆動させる。一部の実施形態では、制御エレメントは、以下の細胞型：肺胞細胞、心筋細胞、上皮細胞、肝細胞、腎臓細胞、腸細胞、筋細胞、ニューロン、卵巣細胞および腎細胞のうちのいずれか1つまたは複数において遺伝子の発現を駆動させる。一部の実施形態では、制御エレメントは、以下の細胞系：チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、マウス骨髄腫細胞（NSO）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、B16黒色腫細胞、HEK293T細胞、HeLa細胞、HT-1080細胞およびPER.C5細胞のうちのいずれか1つまたは複数において遺伝子の発現を駆動させる。一部の事例では、制御エレメントは、ex vivoまたはin vitroで、細胞系において遺伝子の発現を駆動させる。

【0127】

本開示の制御エレメントは、一緒に組み合わされ得る、または他の制御エレメントと組み合わされ得る。そのような他の制御エレメントとしては、たとえば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、リプレッサー、エンハンサーまたは転写後安定性エレメントが挙げられる。一実施形態では、ベクターは、連結された導入遺伝子の上流に配列番号1およびminCMVプロモーターを含む配列番号3の制御エレメントを含む。本明細書で企図されるプロモーターの例としては、minCMVプロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Proto1プロモーター、UCL-HLPプロモーター、CMVeエンハンサー/CMVプロモーター組合せ、AATプロモーター、KARプロモーター、EFF1プロモーター、EFSプロモーターまたはCBAプロモーターが挙げられる。

【0128】

本開示の組み合わされた制御エレメントは、なおも短くすることができる。組み合わされた制御エレメントは、長さが約50～500、100～400、50～200、100～200または150～300塩基対の全長を有し得る。組み合わされた制御エレメントは、長さが約500、450、400、350、300、250、200、150または100塩基対未満の組み合わされた長さを有し得る。一部の実施形態では、制御エレメントは、40～50bp、45～50、49、50～60、56、50～55または45～60bpである。

【0129】

組み合わされた制御エレメントは、異なる種に由来し得る。好ましい例では、組み合わされた制御エレメントの少なくとも1つの部分は、ヒト由来である。非ヒト由来エレメントは、哺乳動物、ウイルスまたは合成配列に由来し得る。

【0130】

発現力セット

「発現力セット」および「核酸力セット」という用語は、ポリヌクレオチド分子または

10

20

30

40

50

核酸配列を指して、互換可能に使用される。一部の事例では、発現力セットは、導入遺伝子に作動可能に連結された本明細書に開示される 1つまたは複数の制御エレメントを含む。一部の事例では、発現力セットは、1つまたは複数の制御エレメントを含む。一部の事例では、発現力セットは、プロモーターをさらに含む。一部の事例では、発現力セットは、配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41 のうちの 1つまたは複数の配列ならびに / またはそれらの任意の組合せを含む。一部の事例では、発現力セットは、配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41、(i i) 配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41 のうちのいずれか 1つに対して少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有する核酸配列、(i i i) (i) もしくは (i i) の任意の配列の機能性断片、または (i v) (i)、(i i) および / もしくは (i i i) の任意の配列の組合せのうちの 1つまたは複数を含む。一部の事例では、配列同一性は、B L A S T によって測定される。一部の事例では、制御エレメントは、発現力セット中で導入遺伝子の上流に位置する。一部の事例では、制御エレメントは、発現力セット中で導入遺伝子の下流に位置する。

【 0 1 3 1 】

一部の態様では、本明細書に記載される 1つまたは複数の制御エレメント（たとえば、配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41）は、発現力セット中の導入遺伝子（たとえば、レポーター遺伝子または治療用導入遺伝子）に作動可能に連結される。一部の事例では、遺伝子療法は、導入遺伝子、たとえば、レポーター遺伝子、e G F P、R F P、第 V I I I 因子、C a s 9、D N A 結合タンパク質、ホルモン、増殖もしくは分化因子、インスリン、成長ホルモン、V E G F、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子；サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラ T 細胞受容体；リポタンパク質受容体、囊胞性線維症膜貫通制御因子、ムコ多糖症 I 型、I I 型、I I I 型もしくは I V 型と関連する遺伝子、ベータグロビンまたはリポタンパク質リパーゼ、あるいはそれらのバリアントまたは断片の増加した発現をもたらすために、1つもしくは複数、2つもしくはそれよりも多く、3つもしくはそれよりも多く、4つもしくはそれよりも多く、または 5つもしくはそれよりも多くの本開示の制御エレメントに作動可能に連結された導入遺伝子を含む発現力セットを含む。一部の事例では、導入遺伝子は、A T P 7 A、A T P 7 B、A T P 8 B 1、A B C B 4、A B C B 1 1、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片、あるいはそれに対して少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 99% の配列同一性を有する配列である。一部の事例では、導入遺伝子は、C D K L 5、C N T N A P 2、Z E B 2、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片、あるいはそれに対して少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 99% の配列同一性を有する配列である。一部の事例では、導入遺伝子は、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子もしくは血液凝固因子（たとえば、第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 10 因子、第 11 因子または第 12 因子）、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である。

【 0 1 3 2 】

一部の事例では、発現力セットは、遺伝子療法を介する送達のために適合される。一部の事例では、発現力セットは、直鎖状または環状の構築物である。一部の事例では、発現力セットは、プラスミド、ベクター、ウイルスベクターまたは r A A V の一部である。一部の事例では、導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の 1つまたは複数の R E を含む発現力セットは、複数の細胞、たとえば、任意の哺乳動物もしくはヒト細胞系、腎臓細胞、上皮細胞、肝臓細胞、肝細胞、ニューロン、線維芽細胞および / または C N S 細胞における発現のために適合される。一部の事例では、導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の 1つまたは複数の R E （たとえば、配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41）を含む発現力セットは、2つもしくはそれよりも多く、3つもしくはそれよりも多く、4

10

20

30

40

50

つもしくはそれよりも多く、または 5 つもしくはそれよりも多くの哺乳動物またはヒト細胞系または細胞型における発現のために適合される。一部の事例では、導入遺伝子発現は、以下の細胞型：腎臓細胞、上皮細胞、肝細胞、ニューロン、線維芽細胞、心筋細胞、C NS 細胞、筋肉細胞、血球および / または幹細胞のうちの 2 つもしくはそれよりも多く、3 つもしくはそれよりも多く、4 つもしくはそれよりも多く、または 5 つもしくはそれよりも多くにおいて生じる。

【 0 1 3 3 】

一部の事例では、導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の 1 つまたは複数の R E (たとえば、配列番号 1 ~ 2 、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1) を含む発現力セットは、肝臓または肝細胞における導入遺伝子発現のために適合される。一部の事例では、導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の 1 つまたは複数の R E を含む発現力セットは、たとえば、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、くも膜下腔内、経腸または非経口投与を介した、導入遺伝子の全身送達のために適合される。一部の事例では、導入遺伝子の全身送達には、肝臓または肝細胞における増加した導入遺伝子発現が関与する。一部の事例では、導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の 1 つまたは複数の R E を含む発現力セットは、R E なしの発現力セットと比較して、または対照 (たとえば、ベクター単独対照、緩衝液対照、またはいずれの発現活性も有さない配列) と比較して少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 2 5 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 1 0 0 倍、少なくとも 2 0 0 倍、少なくとも 3 0 0 倍、少なくとも 4 0 0 倍、少なくとも 5 0 0 倍、少なくとも 6 0 0 倍、少なくとも 7 0 0 倍、少なくとも 8 0 0 倍、少なくとも 9 0 0 倍または少なくとも 1 0 0 0 倍であるレベルで、肝細胞における導入遺伝子の発現をもたらす。一部の事例では、比較的短い R E によって駆動される発現は、同じ導入遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーター、C M V プロモーター、スーパーコアプロモーター、T T R プロモーター、P r o t o 1 プロモーター、U C L - H L P プロモーターまたは C M V e プロモーターによって駆動される発現と比較される。

【 0 1 3 4 】

一部の事例では、本開示の制御エレメントを含む発現力セットは、作動可能に連結された導入遺伝子の高いまたは増加した発現をもたらし、ここで、高いまたは増加した発現は、対照、たとえば、構成的プロモーター、C M V プロモーター、スーパーコアプロモーター (S C P) 、T T R プロモーター、P r o t o 1 プロモーター、U C L - H L P プロモーターまたは C M V e プロモーターと比較して判定される。高いまたは増加した導入遺伝子発現を判定するための比較に使用され得る他の対照としては、緩衝液単独、m i n C M V 、E F S 、ベクター単独、または発現活性を有さないことが既知の配列が挙げられる。一部の事例では、C A G または配列番号 4 は、発現レベルおよび / またはサイズ正規化された活性を比較するための陽性対照として使用される。

【 0 1 3 5 】

目的の導入遺伝子または遺伝子の発現は、発現ベクターまたは発現力セットを介して生じ得る。そのような発現ベクターまたはカセットは、以下の追加のエレメント：プロモーター、エンハンサーまたは転写後制御エレメントのうちのいずれか 1 つまたは複数を含み得る。本開示の制御エレメントは、導入遺伝子の上流または下流に位置し得、転写されても転写されなくてもよい。一部の例では、本開示の制御エレメントは、プロモーターの下流かつ導入遺伝子の上流に位置する。一部の例では、制御エレメントは、導入遺伝子のプロモーターとして位置する。一部の事例では、本開示の 1 つまたは複数の R E は、発現ベクターまたはカセット中で、いずれの他のプロモーターもなしに導入遺伝子に作動可能に連結される。

【 0 1 3 6 】

発現ベクターまたはカセットは、環状または直鎖状の核酸分子であり得る。一部の事例では、ベクターまたはカセットは、細胞 (たとえば、標的細胞もしくは細胞型および / ま

10

20

30

40

50

たは非標的細胞もしくは細胞型を含む、複数の異なる細胞または細胞型)に送達される。ベクターまたはカセットは、発現ベクターもしくはカセットを一部もしくは全体として、および/または導入遺伝子を細胞のゲノムに組み込むベクターまたはカセットの能力に言及して、組込みベクターであっても非組込みベクターであってもよい。組込みベクターであっても非組込みベクターであっても、制御エレメントに作動可能に連結された導入遺伝子を送達するために使用することができる。ベクターまたはカセットの例としては、(a)非ウイルスベクター、たとえば、直鎖状オリゴヌクレオチドおよび環状プラスミドを含む核酸ベクター;人工染色体、たとえば、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)および細菌人工染色体(BACまたはPAC));エピソームベクター;トランスポゾン(たとえば、PigglyBac);ならびに(b)ウイルスベクター、たとえば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスは、高い感染性を含め、核酸の送達に関するいくつかの利点を有する。一部の実施形態では、ウイルスは、本明細書に記載されるように、導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数の制御エレメントを含む核酸分子または発現カセットを送達するために使用される。

【0137】

本明細書に記載されるベクターは、直接、または送達システムを介して、目的の細胞に送達され得る。送達システムの例としては、ウイルスベクター(たとえば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴(AAV)、ヘルパー依存性アデノウイルス系、ハイブリッドアデノウイルス系、単純ヘルペス、ポックスウイルス、レンチウイルスおよびエプスタイン・バーウイルス)、物理系(ネイキッドDNA、DNA衝突、電気穿孔、流体力学、超音波、およびマグネットフェクション)、ならびに化学系(カチオン性脂質、異なるカチオン性ポリマー、および脂質ポリマー)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0138】

任意の公知の技法を使用して、制御エレメント(複数可)および作動可能に連結された導入遺伝子、または制御エレメントおよび導入遺伝子を含む組成物を、目的の細胞に送達して、目的の細胞型、組織または生物において、in vitro、in vivo、またはex vivoにおける導入遺伝子の発現をもたらすか、または誘導することができる。

【0139】

ウイルス遺伝子療法ベクターまたは遺伝子送達ベクターの好ましい特徴としては、高い力値で再生可能かつ安定に繁殖および精製される能力、標的化された送達を媒介する能力(たとえば、ベクターが他の場所に広く散らばることなく、目的の組織または臓器に特異的に導入遺伝子を送達する能力)、ならびに有害な副作用を誘導することなく、遺伝子の送達および導入遺伝子の発現を媒介する能力が挙げられる。

【0140】

いくつかの型のウイルス、たとえば、非病原性パルボウイルス、アデノ随伴ウイルスが、遺伝子送達の目的で操作されている。様々な遺伝子療法適用のためのウイルスに基づくベクターは、ウイルス感染経路を利用できるが、複製および毒性をもたらし得るウイルス遺伝子の続く発現を回避できる。そのようなウイルスに基づくベクターは、ウイルスゲノムからコーディング領域のすべてまたは一部を欠失させるが、発現ベクターをウイルスキヤブシドにパッケージングすることあるいはベクター核酸または異種遺伝子もしくはDNAの宿主ゲノムへの組込みなどの機能に必要とされる配列(たとえば、末端反復配列)をインタクトなまま残すことによって、得ることができる。導入遺伝子を含む発現ベクターまたはカセットは、たとえば、ウイルス骨格、たとえば、ウイルス遺伝子が欠如した修飾または操作されたウイルス骨格にクローニングすることができ、追加のベクター(たとえば、パッケージングベクター)と併せて使用することができ、これらは、たとえば、コトランスフェクションを行うと、組換えウイルスベクター粒子を産生することができる。

【0141】

非病原性パルボウイルスであるAAVのいくつかの血清型が、遺伝子送達の目的で操作

10

20

30

40

50

されており、そのうちのいくつかは、ある特定の組織または細胞型に対する指向性を有することが公知である。様々な遺伝子療法適用に使用されるウイルスは、対象または宿主において、複製欠損となるか、または低い毒性および低い病原性を有するように、操作され得る。そのようなウイルスに基づくベクターは、ウイルスゲノムからコーディング領域のすべてまたは一部を消失させ、ベクターゲノムをウイルスキャプシドにパッケージングすることまたはベクター核酸（たとえば、異種DNA配列）の宿主ゲノムへの組込みなどの機能に必要とされる配列（たとえば、末端逆位反復配列）をインタクトなまま残すことによって、得ることができる。導入遺伝子を含む発現ベクターまたはカセットは、たとえば、ウイルス骨格、たとえば、ウイルス遺伝子が欠如した修飾または操作されたウイルス骨格にクローニングすることができ、追加のベクター（たとえば、パッケージングベクター）と併せて使用することができ、これらは、たとえば、コトランスフェクションを行うと、組換えウイルスベクター粒子を產生することができる。

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態では、1つまたは複数の制御エレメントおよび導入遺伝子を、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*において、細胞、細胞型、または組織に送達するために使用されるAAVベクターもしくはAAVウイルス粒子、またはビリオンは、好ましくは、複製欠損性である。一部の実施形態では、AAVウイルスは、ヘルパー因子の存在下においてのみ複製し、ビリオンを生成することができるよう、操作または遺伝子修飾される。

【 0 1 4 3 】

一部の実施形態では、発現ベクターまたはカセットは、AAVまたは組換えAAV（rAAV）による送達のために設計される。一部の実施形態では、発現ベクターまたはカセットは、レンチウイルスまたはレンチウイルスベクターを使用して送達される。一部の実施形態では、より大きな導入遺伝子、すなわち、AAVのクローニング能力を上回る遺伝子は、好ましくは、レンチウイルスまたはレンチウイルスベクターを使用して送達される。

【 0 1 4 4 】

発現ベクターまたはカセットは、AAVによる送達のために設計することができる。AAVは、任意の血清型、たとえば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJ、またはキメラ、ハイブリッドもしくはバリアントAAVであり得る。AAVは、自己相補性AAV（scAAV）であってもよい。AAVによる送達のために設計される発現ベクターまたはカセットは、5'LTR、1つまたは複数の制御エレメント、必要に応じてミニマルプロモーター、導入遺伝子、必要に応じて1つまたは複数のイントロン、必要に応じてポリAシグナル、および3'LTRを含み得る。一部の事例では、発現ベクターまたはカセットは、1つまたは複数の転写後RNA制御エレメントもまた含む。

【 0 1 4 5 】

配列番号1または配列番号2を含む例示的な発現ベクターまたはカセットは、それぞれ、図6Bおよび図6Cに示される。プロモーター位置に配列番号13～17および22～41のうちのいずれか1つまたは複数を含むことができる例示的な発現ベクターは、図7に示される。そのような発現ベクターまたはカセットは、AAV、レンチウイルス、アデノウイルスまたはレトロウイルスが挙げられるが、これらに限定されない、本明細書に記載される送達システムまたは遺伝子療法のうちのいずれか1つを使用する導入遺伝子発現のために適合され得る。

【 0 1 4 6 】

発現ベクターまたはカセットは、最適化された治療用レトロウイルスベクターによる送達用に設計することができる。レトロウイルスベクターは、左端(5')LTR；ウイルス、少なくとも1つの核酸細胞型選択的制御エレメント、必要に応じてレンチウイルス逆転応答エレメント(RRE)のパッケージングおよび/または核内移行を補助する配列；必要に応じてプロモーターまたはその活性部分；様々な制御エレメントに作動可能に連結さ

10

20

30

40

50

れた治療用導入遺伝子；必要に応じてインシュレーター；ならびに右端（3'）レトロウイルスLTRを含む、レンチウイルスであり得る。

【0147】

一部の実施形態では、発現ベクターまたはカセットは、1つまたは複数の制御エレメントを含む。一部の例では、ベクターまたはカセットは、組み合わされた2つまたはそれよりも多くの制御エレメントを含む。一部の例では、ベクターまたはカセットは、組み合わされていない2つまたはそれよりも多くの制御エレメント、たとえば、導入遺伝子の上流のプロモーターおよび導入遺伝子の下流に位置するエンハンサーを含む。一部の実施形態では、イントロン配列は、プロモーターの下流に位置する。

【0148】

一部の事例では、発現ベクターまたはカセットは、高駆動体制御エレメント、全体的制御エレメントまたは短い制御エレメントを含む。一部の事例では、高駆動体制御エレメントは、全体的発現を駆動させるおよび/または短い。一部の事例では、制御エレメントは、短い全体的制御エレメントである。一部の実施形態では、制御エレメントを含む発現ベクターまたはカセットは、ウイルスベクターにおいて使用され、またはウイルス中にパッケージングされ、これは、動物モデルにおいて全体として、またはある特定の細胞型もしくは標的細胞型において制御エレメントの活性を評価するために、動物モデルに *in vivo* で感染するためまたは細胞を *ex vivo* もしくは *in vitro* でトランスフェクトするために使用され得る。

10

【0149】

一部の実施形態では、本開示の制御エレメントを含む発現カセットは、1つまたは複数の導入遺伝子もまた含む。導入遺伝子は、タンパク質コーディング遺伝子であり得る。一部の事例では、発現カセットは、治療用導入遺伝子を含む。治療用導入遺伝子は、不在もしくは欠陥のある遺伝子を置き換えるか、またはタンパク質の発現欠損を補うことができる。治療用導入遺伝子は、細胞シグナル伝達経路に関与し得る。一部の事例では、発現ベクターまたはカセットは、商業的產生のための導入遺伝子を含む。一部の実施形態では、商業的產生のための導入遺伝子は、治療用タンパク質を産生でき、または宿主細胞の機能を改善でき、または宿主細胞の表現型を回復もしくはレスキューできる。

20

【0150】

本明細書に開示される制御エレメントは、発現ベクターまたはカセット内の任意の位置に位置することができる。たとえば、制御エレメントは、エンハンサーの上流、エンハンサーの下流であるが、プロモーターの上流、導入遺伝子の5'UTR内、導入遺伝子のイントロン内、導入遺伝子の3'UTR内、または導入遺伝子の下流に位置し得る。一部の事例では、1つまたは複数の制御エレメントは、作動可能に連結された導入遺伝子の上流または下流に位置する。たとえば、配列番号3および4は、*minCMV*プロモーターの下流に、それぞれ配列番号1および2の配列を含む。制御エレメントは、発現カセットまたはベクター内の異なる位置からの導入遺伝子発現に対して異なる影響を有し得る。各制御エレメントは、その制御エレメントからの最適な発現をもたらす、発現ベクターまたはカセット内の好ましい位置を有し得る。

30

【0151】

高い活性を有するより短い制御エレメントを利用することで、導入遺伝子発現も高い発現も犠牲にすることなしに、同じパッケージング能力内でのより大きな導入遺伝子の送達を可能にすることができます。一部の事例では、より短い制御エレメントの使用は、単一のベクターでの2つもしくはそれよりも多くの導入遺伝子の送達、または制御エレメントなしの類似のベクターもしくはカセットと比較して比較的高いレベルの発現での大きな導入遺伝子の送達を可能にする。2つまたはそれよりも多くの導入遺伝子は、2つもしくはそれよりも多くの異なるタンパク質コーディング遺伝子、またはタンパク質コーディング遺伝子および非コーディングエレメントを含み得る。一例では、ベクターは、実施例4において記載されるように、*Cas9*コーディング配列および1つまたは複数のガイドRNAを含む。一部の事例では、制御エレメントは、長さが約20~100、30~100、4

40

50

0 ~ 80 または 50 ~ 60 塩基対である。一部の事例では、制御エレメントは、長さが 150、120、110、100、90、80、70 または 60 塩基対未満である。本開示の組み合わされた制御エレメントは、短くてもよい。組み合わされた制御エレメントは、長さが約 50 ~ 500、100 ~ 400、50 ~ 200、100 ~ 200 または 150 ~ 300 塩基対の全長を有し得る。組み合わされた制御エレメントは、長さが約 500、450、400、350、300、250、200、150 または 100 塩基対未満の組み合わされた長さを有し得る。

【0152】

一部の事例では、発現力セットまたはベクターは、その配列が 1 kb、1.5 kb、2 kb、2.5 kb、3 kb、3.5 kb、4 kb、4.5 kb、5 kb、5.5 kb、6 kb、6.5 kb、7 kb または 7.5 kb を上回る大きな導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の 1つまたは複数の RE を含む。一部の事例では、大きな導入遺伝子は、1つまたは複数の RE に作動可能に連結され、ここで、各 RE は、49 bp、50 bp、56 bp、60 bp、70 bp、80 bp、90 bp、100 bp、110 bp、117 bp、120 bp、130 bp、140 bp、150 bp、160 bp、170 bp、180 bp、190 bp、200 bp、210 bp、220 bp、230 bp、240 bp、250 bp、259 bp、260 bp、265 bp、270 bp、280 bp、290 bp、300 bp、310 bp、320 bp、330 bp、340 bp、350 bp、360 bp、370 bp、380 bp、390 bp または 400 bp 以下であり、表 1 または配列番号 1 ~ 2、13 ~ 17 および 22 ~ 41 のうちのいずれか 1 つに従う配列を含む。一部の事例では、RE は、導入遺伝子の発現を、RE なしの発現ベクターもしくはカセットと比較して、または陰性対照（たとえば、ベクター単独対照、または既知の発現活性を有さない配列を含むベクター）と比較して少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 15 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 25 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 200 倍、少なくとも 300 倍、少なくとも 400 倍、少なくとも 500 倍、少なくとも 600 倍、少なくとも 700 倍、少なくとも 800 倍、少なくとも 900 倍または少なくとも 1000 倍増加させる。

【0153】

発現力セットまたはベクターの活性を評価するとき、活性または発現は、単位用量当たりの活性もしくは発現レベルとして表すことができるか、または細胞、マウス、もしくは被験体に投与もしくは送達された発現力セットもしくはベクターの用量に対して正規化され得る。一部の事例では、導入遺伝子の発現または活性は、制御エレメントありまたはなしでの様々な発現ベクターまたはカセットにわたる比較を可能にするために、使用されたプラスミドもしくはDNA の量に対して正規化されるか（たとえば、1マウス当たりの μ g / kg）、またはウイルス粒子の量に対して正規化される（たとえば、1マウスもしくは被験体当たりのゲノムコピーの量 / kg に対して正規化される）。たとえば、マウスにおける制御エレメントの活性を評価する場合、アッセイした細胞における導入遺伝子の発現または導入遺伝子の活性は、1マウス当たり、約 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは 20 μ g、または 10 を上回るか、または 20 μ g を上回る発現ベクター、カセット、またはプラスミドの用量に対して、正規化され得る。一部の事例では、発現レベルまたは活性は、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、または 10^{15} g c / kg の、1マウス当たりの本明細書に開示される発現ベクターまたはカセットを含むウイルス粒子に対して、正規化され得る。

【0154】

遺伝子療法、たとえば、rAAV を使用して、本開示の発現力セットを送達することの 1つの利点は、そのような療法が、より標的化された持続的な治療効果を長時間にわたり提供できることである。加えて、ウイルス遺伝子療法は、目的の 1つまたは複数の細胞型または組織（たとえば、肝細胞または肝臓）に対して指向性を有するように操作すること

10

20

30

40

50

ができる。たとえば、ウイルス遺伝子療法は、1つまたは複数の領域、組織、または細胞型に、*in vivo*で感染し、ペイロードまたは治療剤、たとえば、転写モジュレーターまたは導入遺伝子を送達するように、操作することができる。

【0155】

導入遺伝子

本明細書に開示される構築物（たとえば、発現カセットまたはベクター）は、目的の細胞または複数の細胞における導入遺伝子の発現を駆動させるために使用できる。一部の事例では、本明細書に開示される構築物は、組換えタンパク質発現のために使用される。たとえば、本明細書に開示される制御エレメントは、組換えタンパク質の発現を駆動させるために使用できる。本開示の方法で產生された組換えタンパク質は、治療目的、研究目的または商業目的のために產生され得る。*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*のタンパク質発現系の一部として発現され得る導入遺伝子の例としては、Cas9、第VII因子、DNA結合タンパク質、ホルモン、増殖／分化因子、たとえば、インスリン、成長ホルモン、VEGF、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子；免疫系を制御またはモジュレートする治療用タンパク質、たとえば、サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラT細胞受容体；リポタンパク質受容体；囊胞性線維症膜貫通制御因子；ムコ多糖症I型、II型、III型およびIV型と関連する遺伝子；ペータグロビン；ならびにリポタンパク質リバーゼが挙げられるが、これらに限定されない。一部の事例では、発現される導入遺伝子は、ATP7A、ATP7B、ATP8B1、ABC B4、ABC B11、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である。一部の事例では、発現される導入遺伝子は、CDKL5、CNTNAP2、ZEB2、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子または血液凝固因子（たとえば、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子）、それらのバリアントまたは機能性断片である。

10

20

30

40

【0156】

一部の事例では、導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の1つまたは複数のREを含む発現カセットは、遺伝子療法処置のために適合される。一部の事例では、遺伝子療法処置は、たとえば、静脈内注入もしくは注射によって投与される、または静脈内注入もしくは注射による全身送達のために適合される。一部の事例では、遺伝子療法は、肝臓または肝細胞における発現のために適合される。一部の事例では、作動可能に連結された導入遺伝子は、肝臓もしくは肝細胞において発現される遺伝子であり、または肝臓の疾患もしくは状態と関連する遺伝子、たとえば、ウィルソン病と関連するATP7B；進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型と関連するABC B4；遺伝性フルクトース不耐症と関連するALDOB；IV型糖原病と関連するGBE1；チロシン血症I型と関連するFAH；アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症と関連するASL；シトリン欠損症（CTLN2、NICCD）と関連するSLC25A13；コレステロールエステル蓄積症と関連するLIPA；アルファ-1アンチトリプシン欠損症と関連するSERPINA1；囊胞性線維症と関連するCFTR；遺伝性ヘモクロマトーシスと関連するHFE；もしくはアルストレーム症候群と関連するALMS1である。一部の事例では、1つもしくは複数の制御エレメント、または本明細書に開示されるREを含む発現カセットは、遺伝性の肝臓疾患、たとえば、胆汁酸合成の障害、炭水化物代謝の障害、アミノ酸代謝の障害、尿素サイクル異常症、または脂質代謝の障害を処置するための遺伝子療法処置のために使用される。一部の事例では、1つもしくは複数の制御エレメント、または本明細書に開示されるREを含む発現カセットは、ウィルソン病；進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型；遺伝性フルクトース不耐症；IV型糖原病；チロシン血症I型；アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症；シトリン欠損症（CTLN2、NICCD）；コレステロールエステル蓄積症；アルファ-1アンチトリプシン欠損症；囊胞性線維症；遺伝性ヘモクロマトーシス；またはアルストレーム症候群を処置するための遺伝子療法処置（たとえば、AAV遺伝子療法）のために使用

50

される。一部の事例では、1つもしくは複数の制御エレメント、または本明細書に開示されるR Eを含む発現力セットは、血液凝固障害（たとえば、血友病、血友病Aもしくは血友病B）またはウィルソン病を処置するための遺伝子療法処置（たとえば、AAV遺伝子療法）のために使用される。

【0157】

一部の事例では、組換えタンパク質を発現させる方法は、細胞または複数の細胞中に発現力セットまたはベクターを導入することを含み、ここで、発現力セットまたはベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結された、本開示の1つまたは複数のR E（配列番号1～2、13～17および22～41）を含む。一部の事例では、導入遺伝子は、Cas9、第VII因子、DNA結合タンパク質、ホルモン、増殖/分化因子、たとえば、インスリン、成長ホルモン、VEGF、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子；免疫系を制御またはモジュレートする治療用タンパク質、たとえば、サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壞死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラT細胞受容体；リポタンパク質受容体；嚢胞性線維症膜貫通制御因子；ムコ多糖症I型、II型、III型およびIV型と関連する遺伝子；ペータグロビン；ならびにリポタンパク質リパーゼのうちのいずれか1つである。一部の事例では、発現される導入遺伝子は、ATP7A、ATP7B、ATP8B1、ABC B4、ABC B11、またはそれらのバリエントもしくは断片である。一部の事例では、発現される導入遺伝子は、CDKL5、CNTNAP2、ZEB2、またはそれらのバリエントもしくは断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子、もしくは血液凝固因子（たとえば、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子）である。

10

20

30

【0158】

本明細書に開示されるヒト遺伝子のヌクレオチドおよびタンパク質配列は、GenBank（NCBI）またはUniProtKBデータベースを含む様々な公的なデータベースにおいて見出すことができる。たとえば、ヒトUniProtKB受託番号としては、Q04656(ATP7A)；P35670(ATP7B)；O43520(AT8B1)；P21439(ABC B4とも称されるMDR3)；O95342(ABC B11とも称されるABC BB)；O76039(CDKL5)；Q9UHC6(CNTNAP2とも称されるCNTP2)；O60315(ZEB2)；P12259(F5すなわち第V因子)；P00451(F8すなわち第VII因子)；P00740(F9すなわち第IX因子)；P00742(F10すなわち第X因子)が挙げられる。そのようなタンパク質配列のうちのいずれか1つは、本明細書に開示される発現力セット中の核酸配列（すなわち導入遺伝子）によってコードされ得る。

40

【0159】

組換えタンパク質は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞または哺乳動物細胞において産生され得る。一部の例では、組換えタンパク質は、哺乳動物細胞において産生される。一部の事例では、タンパク質は、動物モデルにおいて産生される。タンパク質を产生するために使用され得る細胞系の例としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、マウス骨髄腫細胞（NSO）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）およびB16黒色腫細胞が挙げられる。一部の例では、ヒト由来細胞系が使用される。タンパク質を产生するために使用され得るヒト細胞系の例としては、HEK293T、HeLa、HT-1080およびPER.C5が挙げられる。組換えタンパク質は、動物または動物産物においても産生され得る。組換えタンパク質は、植物においても産生され得る。組換えタンパク質は、植物の葉、茎、花、果実または種子において発現され得る。

50

【0160】

一部の実施形態では、本開示の制御エレメントは、ルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子の発現を駆動または増加させるために使用され得る。一部の実施形態では、1つまたは複数の制御エレメントは、実施例2の方法に従って測定した場合、10¹⁷、10¹⁸、10¹⁹、10²⁰または10²¹光子/秒/マウスを上回るアウトプットを生じるレベル

50

で、作動可能に連結されたルシフェラーゼ導入遺伝子の発現をもたらし得る。

【0161】

不十分な遺伝子発現および／またはタンパク質活性もしくは合成（または遺伝子の過小発現）と関連するハプロ不全または任意の障害もしくは状態を処置する方法であって、それを必要とする対象において発現力セットまたはベクターを投与することを含み、ここで、発現力セットまたはベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の1つまたは複数のRE（配列番号1～2、13～17および22～41）を含む、方法もまた本明細書で企図される。一部の事例では、導入遺伝子は、内因性遺伝子の増加した発現をもたらすDNA結合タンパク質または転写モジュレーター（たとえば、転写活性化因子）である。一部の事例では、発現力セットまたはベクター中の導入遺伝子は、治療用導入遺伝子である。一部の事例では、治療用導入遺伝子は、Cas9、第VII因子、DNA結合タンパク質、ホルモン、増殖／分化因子、たとえば、インスリン、成長ホルモン、VEGF、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子；免疫系を制御またはモジュレートする治療用タンパク質、たとえば、サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラT細胞受容体；リポタンパク質受容体；囊胞性線維症膜貫通制御因子；ムコ多糖症I型、II型、III型およびIV型と関連する遺伝子；ベータグロビン；ならびにリボタンパク質リバーゼのうちのいずれか1つである。一部の事例では、発現される導入遺伝子は、ATP7A、ATP7B、AT8B1（すなわちATP8B1）、MDR3（すなわちABC B4）、ABC BB（すなわちABC B11）、CDKL5、CNTP2（すなわちCNTNAP2）、ZEB2、第V因子、第VII因子、第IX因子もしくは第X因子、またはそれらのバリアント、サブユニット、アイソフォームもしくは機能性断片である。進行性家族性肝内胆汁うっ滞症（PFIGC）としては、ATP8B1、ABC B11およびABC B4遺伝子中の突然変異（複数可）と関連するPFIGC1、PFIGC2およびPFIGC3が挙げられる。進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型（PFIGC2）は、ABC B11中の欠陥または突然変異と関連する。ATP8B1遺伝子突然変異は、PFIGC1を引き起こし得る。ABC B11遺伝子における突然変異は、PFIGC2を引き起こし得る。ABC B4遺伝子突然変異は、PFIGC3を引き起こし得る。一部の事例では、本明細書に開示される導入遺伝子は、CDKL5であり、CDKL5欠損障害を処置するための遺伝子療法において使用される。CNTNAP2における突然変異または欠陥は、自閉症スペクトラム障害をもたらし得る。一部の事例では、導入遺伝子は、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子もしくは血液凝固因子（たとえば、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子）、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である。一部の事例では、導入遺伝子は、肝細胞において優先的に発現される。一部の事例では、投与することは、たとえば、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、くも膜下腔内、経腸または非経口投与を介して、全身である。一部の事例では、この方法は、静脈内注入または注射を介して発現力セットまたはベクターを送達することを含む。一部の事例では、投与することは、たとえば、肝臓、CNS、または身体中の臓器への注射を介して、局所である。一部の事例では、発現力セットまたはベクターは、AAV、たとえば、AAV8である。

【0162】

一部の事例では、遺伝子の過剰発現と関連する障害または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に発現力セットまたはベクターを投与することを含み、ここで、発現力セットまたはベクターは、導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の1つまたは複数のRE（配列番号1～2、13～17および22～41）を含む、方法が本明細書で企図される。一部の事例では、導入遺伝子は、内因性遺伝子の減少した発現をもたらすDNA結合タンパク質または転写モジュレーター（たとえば、転写抑制因子）である。一部の事例では、導入遺伝子は、肝細胞において優先的に発現される。一部の事例では、投与することは、たとえば、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、くも膜下腔内、経腸または非経口投与を介して、全身である。一部の事例では、この方法は、静脈内注入または注射を介

10

20

30

40

50

して発現力セットまたはベクターを送達することを含む。一部の事例では、投与することは、たとえば、肝臓、CNS、または身体中の臓器への注射を介して、局所である。一部の事例では、発現力セットまたはベクターは、AAV、たとえば、AAV8である。

【0163】

一部の事例では、以下の遺伝子のうちのいずれか1つにおける欠陥と関連する遺伝性障害または状態を処置する方法が本明細書で企図される：ATP7A、ATP7B、AT8B1（すなわちATP8B1）、MDR3（すなわちABC4）、ABCBB（すなわちABC11）、CDKL5、CNTP2（すなわちCNTNAP2）、ZEB2、第V因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子または血液凝固因子（たとえば、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子）。一部の事例では、ウィルソン病を処置する方法が、本明細書に開示される。一部の事例では、ウィルソン病、またはATP7A、ATP7B、AT8B1（すなわちATP8B1）、MDR3（すなわちABC4）、ABCBB（すなわちABC11）、CDKL5、CNTP2（すなわちCNTNAP2）、ZEB2、第V因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子もしくは血液凝固因子（たとえば、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子）と関連する任意の他の遺伝性障害もしくは状態を処置する方法は、それを必要とする対象（たとえば、動物またはヒト）に、本明細書に開示される発現力セットまたはベクターを投与することを含み、ここで、発現力セットまたはベクターは、本開示の導入遺伝子、たとえば、ATP7A、ATP7B、AT8B1（すなわちATP8B1）、MDR3（すなわちABC4）、ABCBB（すなわちABC11）、CDKL5、CNTP2（すなわちCNTNAP2）、ZEB2、第V因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子、血液凝固因子（たとえば、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子）、DNA結合タンパク質または転写モジュレーターに作動可能に連結された、本開示の1つまたは複数のREを含む。一部の事例では、導入遺伝子は、内因性遺伝子を編集するCasタンパク質（たとえば、Cas9またはsacas9タンパク質）および/またはガイドRNAである（たとえば、Casは、内因性遺伝子から突然変異を除去する）。一部の事例では、発現力セットまたはベクターは、肝臓において導入遺伝子を優先的に発現させる。一部の事例では、投与することは、たとえば、静脈内注入または注射を介して全身である。一部の事例では、投与することは、局所、たとえば、組織または臓器への直接注射、たとえば、肝臓またはCNSへの注射である。

【0164】

一部の事例では、本明細書に開示される発現力セットまたはベクターは、ウィルソン病を処置するために使用され、ここで、発現力セットまたはベクターは、治療用導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数のRE（たとえば、配列番号1、2、3、4、13、14、15、16、17、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41）を含み、ここで、導入遺伝子は、ATP7B、または細胞中でもしくはin vivoでATP7B発現を増加させるように内因性ATP7B遺伝子に対して作用する転写モジュレーターもしくはDNA結合タンパク質である。一部の事例では、そのような発現力セットまたはベクターは、ウィルソン病と診断されたまたはその危険性がある対象に送達される。一部の事例では、そのような発現力セットまたはベクターは、静脈内注入または注射を介して対象に送達される。一部の事例では、送達は、全身である。一部の事例では、ウィルソン病を処置する方法は、それを必要とする対象に遺伝子療法（たとえば、AAV遺伝子療法）を投与することを含み、ここで、遺伝子療法は、治療用導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数のRE（たとえば、配列番号1、2、3、4、13、14、15、16、17、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、3

10

20

30

40

50

4、35、36、37、38、39、40、41)を含み、ここで、導入遺伝子は、ATP7B、または細胞中でもしくはin vivoでATP7B発現を増加させるように内因性ATP7B遺伝子に対して作用する転写モジュレーターである。一部の事例では、発現力セットまたはベクターは、AAV、たとえば、AAV8である。一部の事例では、発現力セットまたはベクターは、肝細胞または肝臓において優先的に発現される。

【0165】

一部の事例では、本明細書に開示される発現力セットまたはベクターは、血液凝固障害を処置するために使用され、ここで、発現力セットまたはベクターは、治療用導入遺伝子に作動可能に連結された1つまたは複数のRE(たとえば、配列番号1、2、3、4、13、14、15、16、17、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41)を含み、ここで、導入遺伝子は、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子もしくは血液凝固因子(たとえば、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子)、またはフィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子もしくは血液凝固因子(たとえば、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子)に対応する内因性遺伝子に対して作用する転写モジュレーターである。一部の事例では、導入遺伝子は、第VIII因子である。一部の事例では、そのような発現力セットまたはベクターは、血液凝固障害と診断されたまたはその危険性がある対象に送達される。一部の事例では、そのような発現力セットまたはベクターは、静脈内注入または注射を介して対象に送達される。一部の事例では、送達は、全身である。一部の事例では、血液凝固障害を処置する方法は、それを必要とする対象に遺伝子療法(たとえば、AAV遺伝子療法)を投与することを含み、ここで、遺伝子療法は、治療用導入遺伝子に作動可能に連結された本開示の1つまたは複数のRE(たとえば、配列番号1、2、3、4、13、14、15、16、17、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41)を含み、ここで、導入遺伝子は、第VIII因子、または細胞中でもしくはin vivoでその発現を増加させるように内因性第VIII因子遺伝子に対して作用する転写モジュレーターである。一部の事例では、導入遺伝子は、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子または第12因子のうちのいずれか1つである。一部の事例では、発現力セットまたはベクターは、AAVである。一部の事例では、発現力セットまたはベクターは、肝細胞または肝臓において優先的に発現される。

【0166】

一部の事例では、導入遺伝子は、DNA結合タンパク質、またはDNA結合と関連するタンパク質であり得る。一部の事例では、DNA結合タンパク質は、転写因子、または転写因子の一部であり得る。一部の事例では、DNA結合タンパク質は、Cas9、Casファミリータンパク質、sacCas9、dCas9、dCasファミリータンパク質、転写活性化因子様エフェクター(TALE)タンパク質もしくは亜鉛フィンガータンパク質、または融合タンパク質であり得る。一部の事例では、遺伝性障害を処置する方法は、遺伝子編集タンパク質(たとえば、Cas9およびガイドRNA)および本開示の1つまたは複数のRE(たとえば、配列番号1、2、3、4、13、14、15、16、17、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41)を含む発現力セットまたはベクターを投与することを含む。一部の事例では、ガイドRNAは、Casタンパク質を、目的とされる内因性遺伝子または本明細書に開示される内因性遺伝子に標的化する。

【0167】

一部の事例では、本明細書に開示される構築物は、遺伝子療法を送達するために使用される。特に、本開示の比較的短い制御エレメントは、第VIII因子またはATP7Bなどの大きな導入遺伝子の発現を必要とする遺伝子療法に特に有用であり得る。一部の実施

10

20

30

40

50

形態では、大きな導入遺伝子は、肝細胞などの肝臓細胞において発現される。他の実施形態では、大きな導入遺伝子は、ニューロンなど、中枢神経系（CNS）において発現される。一部の実施形態では、本明細書に開示される導入遺伝子のうちのいずれか1つは、導入遺伝子の発現を増加させるために、本明細書に開示される1つまたは複数の制御エレメントに作動可能に連結される。一部の事例では、本明細書に開示される導入遺伝子は、細胞中で、または *in vivo*、*in vitro* および / もしくは *ex vivo* で発現される。一部の事例では、そのような大きな導入遺伝子は、遺伝子療法、組換え発現ベクターもしくはプラスミド、またはウイルスベクターもしくはプラスミドを使用して、細胞に送達される。遺伝子療法または発現系の一部として *ex vivo* または *in vitro* で発現され得る大きな導入遺伝子の例としては、メンケスタンパク質（ATP7A）、ATP結合力セットサブファミリーbメンバー4（ABC B4）、ATPaseリン脂質輸送8B1（ATP8B1）、ATPase銅輸送ベータ（ATP7B）、サイクリン依存性キナーゼ様5（CDKL5）、コンタクチン関連タンパク質様2（CNTNAP2）、ATP結合力セットサブファミリーBメンバー11（ABC B11）および亜鉛フィンガーエ - ポックス結合ホメオボックス2（ZEB2）、ならびにコドン最適化されたバリアントを含む、それらの任意のバリアント、サブユニット、突然変異体または機能性断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0168】

一部の実施形態では、本明細書に開示される構築物は、遺伝子編集のために使用される。たとえば、構築物は、本明細書に開示される制御エレメント、Cas9コーディング配列、およびガイドRNAを含み得る。一部の事例では、Cas9コーディング配列は、sacCas9をコードする。Cas9またはsacCas9コーディング配列およびガイドRNAを有する構築物は、たとえば、突然変異を補正すること（たとえば、未成熟停止コドンを除去すること）によって、機能不全遺伝子を補正するために使用され得る。

【0169】

様々な遺伝性障害、たとえば、重症複合免疫不全症（ADA - SCID）、メンケス病、家族性肝内胆汁うっ滞症、バイラー症候群、ウィルソン病、皮質異形成 - 焦点性てんかん症候群、モワット・ウィルソン症候群、PFIC2、PFIC3、慢性肉芽腫性障害、血友病、先天性失明、代謝障害、リソソーム蓄積症、筋ジストロフィー、がん、ウイルス感染症、心臓疾患および糖尿病を含む様々な疾患を処置するための、本明細書に開示される1つまたは複数の制御エレメントを含む遺伝子療法または発現ベクターもまた、本明細書で企図される。一部の事例では、本明細書に開示される1つまたは複数の制御エレメントを含む遺伝子療法は、ウィルソン病を処置するために使用され得る。

【0170】

一部の実施形態では、本明細書に開示される制御エレメントは、血液凝固障害を有する対象を処置するために使用される。たとえば、本開示の制御エレメントおよびFVIIのコーディング配列を含む発現カセットは、FVII欠損を有する対象において、凝固障害または疾患をレスキューするために使用され得る。本開示の制御エレメントおよびFVIIのコーディング配列を含む発現カセットを、凝固障害を有する対象中にトランスフェクトすることは、図5Aおよび図10に示されるように、傷害後の血液喪失の減少をもたらし得る。本開示の制御エレメントおよびFVIIのコーディング配列を含む発現カセットを、凝固障害を有する対象中にトランスフェクトすることは、少なくとも約10%、20%、30%の血液喪失をもたらし得る。本開示の制御エレメントおよびFVIIのコーディング配列を含む発現カセットを、凝固障害を有する対象中にトランスフェクトすることは、図5Bおよび図11に示されるように、傷害後に出血が停止するまでの時間の減少をもたらし得る。

【0171】

本開示の構築物、遺伝子療法または発現ベクター / カセットのうちのいずれか1つで処置され得る対象としては、ヒト、靈長類、イヌ、ネコ、齧歯動物、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタおよび他の家畜が挙げられる。一部の事例では、対象は、疾患 / 障害を有する、また

10

20

30

40

50

は疾患 / 障害の危険性がある。たとえば、対象は、遺伝性疾患を有し得る、または遺伝性疾患もしくはその疾患の素因と関連することが公知の D N A 配列を有し得る。一部の事例では、対象は、血友病を有する。一部の事例では、対象は、血友病 A を有する。一部の実施形態では、対象は、第 V I I I 因子中に欠陥を有する。一部の実施形態では、第 V I I I 因子に作動可能に連結された本明細書に記載される 1 つまたは複数の制御エレメントを含む遺伝子療法は、血友病 A と診断された対象を処置するために使用される。

【実施例】

【0172】

これらの実施例は、例示的な目的のみで提供され、本明細書において提供される特許請求の範囲を限定するためのものではない。

10

【0173】

(実施例 1)

H E K 2 9 3 T 細胞における高い発現

H E K 2 9 3 T 細胞に、いくつかの異なる制御エレメント、すなわち、プロモーターなしの対照、S C P、C M V、配列番号 3 (m i n C M V に作動可能に連結された配列番号 1)、配列番号 4 (m i n C M V に作動可能に連結された配列番号 2) および C A G のうちの 1 つの制御下にルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミド D N A をトランスフェクトした。各構築物からの正規化されたルシフェラーゼ値は、図 1 A に示される。各構築物からのサイズ正規化された活性値は、図 1 B に示される。本明細書で使用される制御エレメントおよびプロモーターの配列は、上記表 1 および下記表 3 に提供される。m i n C M V プロモーターに連結された配列番号 1 の制御エレメントおよび m i n C M V プロモーターに連結された配列番号 2 の制御エレメントは、m i n C M V 単独および S C P 単独よりも高いレベルのルシフェラーゼ発現を駆動させた。配列番号 1 および配列番号 2 は共に、m i n C M V プロモーターに連結されると、対照、S C P、または制御エレメント (すなわち、配列番号 1 または 2) なしの m i n C M V プロモーターと比較して、H E K 2 9 3 T 腎臓細胞においてルシフェラーゼの高い発現を駆動させた。

20

【0174】

類似の正規化されたルシフェラーゼ発現実験を、図 1 C、図 1 D および図 1 E に示されるように、追加の対照および制御配列を用いて実施した。ホタル発現もまたアッセイして、試験したすべての試料における類似のトランスフェクション効率を確実にした。図 1 C では、配列番号 4、組み合わせた配列番号 1 7 および 2 2 (すなわち配列番号 1 7 / 2 2)、組み合わせた配列番号 1 6 および 2 3 (すなわち配列番号 1 6 / 2 3)、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 1、配列番号 3 2、ならびに配列番号 3 3 の制御エレメントの正規化されたルシフェラーゼ発現を、2 つの陰性対照 (すなわち、いずれの発現も駆動させないことが既知の配列) と比較した。試験した制御エレメントは各々、陰性対照と比較して、たとえば、少なくとも 1 0、5 0 もしくは 1 0 0 倍またはそれよりも高い、高いレベルのルシフェラーゼ発現を生じた。

30

【0175】

図 1 D では、配列番号 4、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 2 6 または配列番号 2 7 の制御エレメントを含むプラスミドからの正規化されたルシフェラーゼ発現を、陰性対照、およびルシフェラーゼに作動可能に連結された、C M V e に連結された C M V または C M V のいずれかを含む類似のプラスミドと比較した。試験した各制御エレメント (すなわち、配列番号 4、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 2 6 および配列番号 2 7) は、陰性対照、C M V 単独および C M V + C M V e よりも高いルシフェラーゼ発現をもたらした。試験した比較的短い R E は、ルシフェラーゼに連結された C M V プロモーターまたは C M V + C M V e を含むプラスミドと比較して少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 4 0 倍の、または 5 0 倍を上回る、正規化されたルシフェラーゼ発現を示した。

40

【0176】

図 1 E では、ルシフェラーゼに作動可能に連結された配列番号 1 7 / 2 2、配列番号 1

50

6 / 2 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0 または配列番号 4 1 の制御エレメントを含むプラスミドからの正規化されたルシフェラーゼ発現を、陰性対照（すなわち、発現活性を有さないことが既知の配列）と比較した。各制御エレメント（すなわち、配列番号 1 7 / 2 2、1 6 / 2 3 および 3 4 ~ 4 1）は、陰性対照よりも高いルシフェラーゼ発現を駆動させたが、一方で、配列番号 3 5 および配列番号 3 9 は各々、10² よりも高い正規化されたルシフェラーゼ発現、または陰性対照よりも少なくとも 100 倍高いルシフェラーゼ発現を駆動させた。

【0 1 7 7】

【表 3 - 1】

表3:本明細書に開示される追加の配列

配列番号	配列(5'から3')	名称
5	GTACTTATATAAGGGGGTGGGGCGCGTTCGTCCTCAGTCGCGA TCGAACACTCGAGCCGAGCAGACGTGCCTACGGACC	SCP
6	GGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTACCCCCAGTTATC GGAGGAGCAAACAGGGCTAACGTCACGCTAGCGTCTGTCTGCA CATTTCGTAGAGCGAGTGTCCGATACTCTAAATCTCCCTAGGCAA GGITCATATTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTGTTGACTAAGT CAATAATCAGAATCAGCAGGTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATC AGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGTATAAAAGCCCCTCACCA GGAGAAGCCGTC	SerpE_TTR
7	GTTTGCTGCTTGCAATGTTGCCATTAGGGTGGACACAGGAC GCTGTGGTTCTGAGCCAGGGCTAGCGGGCGACTCAGATCCCAG CCAGTGGACTTAGCCCCTGTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGAC	Proto1

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

配列番号	配列(5'から3')	名称
	CTTGGTTAATATTCAACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGAT CCACTGCTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGC TTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATGCCAC	
8	TGATGCGGTTTGCACTGACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTT GACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGG GAGTTGTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTC GTAACAACCTCGCCCCATTGACGAAATGGCGGTAGGCGTGT CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT	minCMV
9	GTTTGCTGCTTGCAATGTTGCCATTAGGGTGGACACAGGAC GCTGTGGTTCTGACGCCAGGGGGGACTCAGATCCCAGCCAGTG GACTTAGCCCCCTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGT TAATATTCAACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTG CTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGG CACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATC	UCL-HLP
10	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCGCCCTGGCTGACCGCCCA ACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATA GTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA TTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAATGGCCCG CCTGGCATTATGCCCACTGACCTTATGGGACTTCCCTACTT GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGG TGAGCCCCACGTTCTGCTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCC ACCCCCAATTGTATTATTTATTAAATTATTTGTGCAGCG ATGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGGGGGGGG CGGGCGAGGGCGGGCGGGCGAGGGCGAGAGGTGCGGGCG CAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCTTTATGGCG AGGCAGGGCGCGCGCCATTAAAAAGCGAAGCGCGCG GGGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTCGCCCCGTGCCCCGCTCCG GCCGCCTCGCGCCGCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTC CCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTCTCCTCCGGCTGTAA TTAGCGCTGGTTAATGACGGCTCGTTCTTTCTGTGGCTGCGT GAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGAGGGCCCTTGCGGGGGGA GCGGCTGGGGGTGCGTGCCTGTTGCGTGGGAGGCC GCGTGCGGCCCGCGCTGCCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCG GGCGCGGGCTTGCGCTCCCGCTGTGCGCGAGGGAGCGCG GCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGCTGCAGGGAA CAAAGGCTGCGTGGGGGTGTTGCGTGGGGGGTGAGCAGGG GGTGTGGCGCGGGCTGGCTGTAACCCCCCCCCTGACCCCC CTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTTGGGTGCGGGGCTC CGTGCGGGGCGTGGCGCGGGCTCGCCGTGCCGGCGGGGG GGCGCGAGGTGGGGGTGCCGGCGGGGGCGGGCGCTCGGGC CGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGGCGCGGGCCCCGGAGCGCCG GCGGCTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCAAATCTG GCGGAGCCGAAATCTGGGAGGGCGCCGCCGACCCCTCTAGCGG	CMV ^e
11		CAG

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

配列番号	配列(5'から3')	名称
	GCGCGGGCGAAGCGGTGC GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGCG GGGAGGGCCTTCGTGCGCGCCGCCGTCCCCCTCTCCATC TCCAGCCTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTCGGGGG GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGGCGC TCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTCTTCTTCTAC AGCTCCTGGCAACGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCATTTG GCAAAGAATT	
12	GCTCCGGTCCCCGTCAGTGGCAGAGCGCACATGCCACAGTC CCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCTA GAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGAAAGTGATGTCGTGTACT GGCTCCGCCTTTCCGAGGGTGGGGAGAACCGTATAAGT GCAGTAGTCGCGTGAACGTTCTTCGCAACGGGTTGCCGCC AGAACACAGG	EFS

【0178】

(実施例2)

全体的高駆動体

配列番号1および配列番号2の制御エレメントの発現パターンを評価するために、ルシフェラーゼに連結された各制御エレメントを含む組換えAAVベクターを作製した。以下の制御エレメントを使用した：SCP、SERPE_TTR、Protocol1、CMV、UCL-HLP、CMVe、配列番号1および配列番号2。プラスミドDNAを、流体力学的尾静脈注射を介してSCID-ベージュマウスに送達し（1マウス当たり12μgの発現ベクター）、ルシフェラーゼの発現を、注射の48時間後にマウスに5ug（約0.25mg/kg）のフリマジン(furimazine)を注射することによってアッセイした。図2Aは、異なる制御エレメントの制御下でのルシフェラーゼの発現を示し、各REがmin CMVに連結された場合に、配列番号1および2が、マウス中の様々な組織におけるルシフェラーゼ発現を示す白い領域によって示されるように、少なくとも1つの追加の細胞型ならびに腎臓細胞において、作動可能に連結された導入遺伝子の発現を駆動させることができたことを示す。図2Bに示されるように、配列番号3および配列番号4の制御エレメントは各々、光子/秒で表されるルシフェラーゼ発光によって測定した場合、他の制御エレメントと比較して、高いレベルのルシフェラーゼ発現をもたらした。

【0179】

(実施例3)

ヒト第VIII因子の発現

SCID-ベージュマウスに、UCL-HLPに作動可能に連結された第VIII因子(NIH Protein Accession ID ABV90867.1)のコーディング配列；配列番号1を伴うmin CMV；または配列番号2を伴うmin CMVを含む16μgの発現カセットDNAを注射した。少なくとも8匹のマウスに、3つのプラスミドの各々を注射し、追加の少なくとも8匹のマウスに、緩衝液を注射した。プラスミドDNA注射の24時間後、血液試料を採取し、確立された方法(COATEST(登録商標)SP4 FVIII、Chromogenix; Visualize(商標)DVI III Antigen Kit、Affinity Biologicals INC.)を使用して、第VIII因子の活性および濃度について血漿を分析した。図3Aに示されるように、配列番号1を伴うmin CMVおよび配列番号2を伴うmin CMVの両方の発現カセットは、1.5IU/mlまたはそれよりも高いレベルの、第VIII因子の高い血漿濃度をもたらした。図3Bは、配列番号3(配列番号1を伴うmin CMV)および配列番号4(配列番号2を伴うmin CMV)が共に、100%またはそれよりも高い血漿第VIII因子活性レベルをもたらしたことを示している。配列番号1および/または2の制御エレメントは、min CMVと一緒に第VIII因子コーディング配列に作動

10

20

30

40

50

可能に連結された場合に、それぞれ 114 % および 166 % の血液第 V I I I 因子活性レベルをもたらし、これらは、U C L - H L P プロモーターを用いて見られた活性よりも、約 10 倍および 15 倍高かった。

【 0 1 8 0 】

(実施例 4)

遺伝子編集

トランスジェニックマウス A i 9 (J a x S t o c k N o : 0 0 7 9 0 9) において、t d T o m a t o の上流の停止カセットを欠失させるために、オールインワン組換え A A V ビリオンを開発した。停止カセットを s a C a s 9 によって欠失させた後、t d T o m a t o を、C A G プロモーターの制御下で発現させる。配列番号 2 と共に、E F S プロモーター、C M V プロモーターまたは C M V プロモーターのいずれかの制御下に s a C a s 9 を含む r A A V を開発した。これらの r A A V は、U 6 プロモーターの制御下に 2 つの S a ガイド R N A 足場をさらに含んだ。これらの r A A V ビリオンを、上記トランスジェニックマウスの歯状回に注射した。3 週間後に脳を固定して切片化し、歯状回における t d T o m a t o の発現を評価した。図 4 B に示されるように、配列番号 2 を伴う C M V (すなわち配列番号 4) は、C M V 単独または E F S よりも多くの t d T o m a t o 発現細胞をもたらした。図 4 A は、C M V に連結された配列番号 2 (すなわち配列番号 4) が、脳細胞、たとえば、ニューロンの少なくとも部分集団において、連結された導入遺伝子 (R F P) の発現を駆動させたことを示している。

10

【 0 1 8 1 】

(実施例 5)

血液凝固障害の遺伝子療法処置

遺伝子操作された F V I I I ノックアウトマウス (F 8 t m 1 S r c m o 、 F 8 遺伝子のエクソン 16 ~ 19 の欠失； Shanghai Model Organism Center, Inc. 、 Shanghai, China から得た) は、凝固欠損を有し、凝固欠損は、尾の終端を切り、凝固が生じるまで出血させることによって放出された血液の容積、または凝固が生じるまでに経過した時間のいずれかを測定することによってアッセイすることができる。F V I I I ノックアウトマウスに、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S 対照)、または F V I I I 導入遺伝子の発現を駆動させる配列番号 4 を含む組換え A A V ビリオンを注射した。r A A V ビリオンを、2 つの異なる用量： 3¹ g c / k g または 3² g c / k g で注射した。注射の 3 週間後、処置された F V I I I - ノックアウトマウスの尾を切り、凝固までの時間および血液容積喪失を測定した。非ノックアウトマウスの群の尾も切り、凝固までの血液容積および時間について評価した。図 5 A に示されるように、P B S 処置した F V I I I ノックアウトマウスは、未処置の非ノックアウトマウスの 2 倍を上回る容積の血液を喪失した。しかし、r A A V 処置した F V I I I ノックアウトマウスは、P B S 処置したマウスよりも少ない血液を喪失した。より高い r A A V 用量では、処置したマウスは、未処置の非ノックアウトマウスと同じ血液容積を喪失した。図 5 B に示されるように、類似の結果が、出血時間アッセイについて見られた。より低い r A A V 用量は、出血時間に対する影響を示さなかったが、一方で、F V I I I に作動可能に連結された配列番号 4 を含む r A A V のより高い用量は、出血時間をほぼ非ノックアウトマウスについての時間まで低減させた。

20

【 0 1 8 2 】

(実施例 6)

血液凝固障害の遺伝子療法処置

F V I I I ノックアウトマウス (実施例 5 に記載した通り) に、リン酸緩衝生理食塩水、または F V I I I の発現を駆動させる配列番号 1 3 ~ 1 7 の各々を含む組換え A A V ビリオン、または F V I I I の発現を駆動させる配列番号 9 (U C L - H L P) を含む対照ビリオンを注射した。図 8 は、未処置のノックアウトマウス (K O) および様々なビリオンで処置したマウスについての、トランスフェクションの 3 週間後の血液中の F V I I I の濃度を示す。配列番号 1 3 、配列番号 1 4 または配列番号 1 7 を含むビリオンは、in

30

40

50

v i v o で F V I I I の最も高い発現をもたらした；配列番号 15 は、他の制御エレメントと比較して、F V I I I の中程度の発現をもたらした；配列番号 16 は、他の配列と比較して、F V I I I の低い発現をもたらした。しかし、配列番号 16 はなおも、U C L - H L P プロモーターを用いた場合よりも約 2 倍高い F V I I I 濃度をもたらした。

【 0 1 8 3 】

発現された F V I I I の活性もまた、実施例 3 に記載したようにアッセイし、図 9 および表 4 に示した。様々なビリオンからの活性レベルは、発現レベルと同じパターンに従った。

【 0 1 8 4 】

【 表 4 - 1 】

表4:トランスフェクトしたマウスの血液中のFVIIIの活性

	KO	配列番号 13	配列番号 14	配列番号 15	配列番号 16	配列番号 17	配列番号 9
様々なマウスにおけるFVIIIの活性 様々なマウスにおけるFVIIIの活性 レベル(野生型%)	-1.4019	-1.1497	172.7369	19.9399	1.0077	5.2719	-0.7564
	-1.412	93.1133	46.0407	14.038	0.8576	6.1928	-0.4091
	-1.0884	62.7729	198.6102	3.0212	0.8175	20.677	-0.2897
	-1.9783	2.2538	4.9381	9.5587	0.6174	23.1995	-0.7022
	-2.1097	86.574	6.5522	12.6458	2.6694	12.9859	-0.8216
	-1.8427	14.8857	35.0801	4.5446	3.4701	154.5709	-0.4308
	-1.9392	64.9174	13.806	12.3936	2.0187	53.9879	0.3508

10

【 表 4 - 2 】

	KO	配列番号 13	配列番号 14	配列番号 15	配列番号 16	配列番号 17	配列番号 9
平均	-1.6585	12.4836	31.4121	2.9909	-0.8641	15.8733	-0.7347
	-1.5796	1.2449	26.6502	18.2246	-0.794	44.1145	-0.5285
			1.2355	8.8654	1.0177	63.181	-0.192
平均	-1.6678	37.4551	53.7062	10.62227	1.0818	40.00547	-0.45142

20

【 0 1 8 5 】

注射の 3 週間後、処置した F V I I I ノックアウトマウスの尾を切り、凝固までの時間および血液容積を測定した。非ノックアウトマウスの群の尾も切り、凝固までの血液容積および時間について評価した。図 10 および表 5 に示されるように、P B S 処置した F V I I I ノックアウトマウスは、未処置の非ノックアウトマウス（すなわち W T マウス）の 2 倍を上回る容積の血液を喪失した。しかし、r A A V 処置した F V I I I ノックアウトマウスは、P B S 処置したマウスよりも少ない血液を喪失した。配列番号 17 を含むビリオンを受けたマウスは、未処置の非ノックアウトマウスと類似の血液容積を喪失した。図 11 および表 6 に示されるように、類似の結果が、出血時間アッセイについて観察された。配列番号 15 を含むビリオンで処置したマウスについての出血時間は、出血時間および血液喪失の最も強い低減を示した。

30

【 0 1 8 6 】

40

50

【表5】

表5:様々なビリオンをトランスフェクトしたマウスにおける凝固前に喪失された血液容積

	KO	配列番号 13	配列番号 14	配列番号 15	配列番号 16	配列番号 17	配列番号 9	WT
様々なマウスから喪失された血液容積(g)	0.0814	0.3264	0.1107	0.0223	0.3606	-0.0114	0.5145	0.0447
	0.4122	0.05	0.1479	0.1471	0.1367	0.0145	1.1232	0.0001
	-0.0522	0.6822	0.2897	0.0136	0.6372	0.0341	0.4819	-0.0357
	0.6397	0.0178	0.0526	0.0449	0.219	0.0575	0.486	0.0836
	0.3505	0.0356	0.2819	0.3934	0.2606	0.0963	0.4708	0.1065
	0.4982	0.1057	0.1665	0.0331	0.201	0.0837	0.0806	0.0693
	-0.0116	0.2129	0.0934	0.0919	0.0827	0.0288	0.34	0.061
	0.1827	0.0133	0.197	0.0748	0.438	0.103	0.2327	0.0423
	0.2793	0.0573	0.0355	0.0782	0.0275	0.0223	0.4931	0.0919
			0.1657	0.0456	0.1477	0.191	0.0281	0.1329
平均	0.264	0.167	0.154	0.094	0.251	0.062	0.425	0.060

【0187】

【表6-1】

表6:様々なビリオンをトランスフェクトしたマウスについての凝固までの出血時間

	KO	配列番号 13	配列番号 14	配列番号 15	配列番号 16	配列番号 17	配列番号 9	WT
様々なマウスについての出血時間(分)	6.42	13.25	3.28	6.78	11.22	2.38	27.63	4.55
	25.23	8.3	11.02	9.5	15.6	1.95	26.88	0.38
	0	28.4	14.78	1.28	24.27	18.93	20.4	0.63
	26.17	0.92	2.52	3.62	27.5	17.73	20.2	5.15
	19.98	4.22	19.02	13.28	19.17	6.7	30	4.6
	30	16.95	3.27	1.15	23.5	9.95	13.15	2.13

【表6-2】

	KO	配列番号 13	配列番号 14	配列番号 15	配列番号 16	配列番号 17	配列番号 9	WT
	14.65	30	6.38	14.1	13.23	3.87	29.67	3.7
	21.93	7.58	8.17	1.58	22.45	21.43	14.43	4.68
	22.35	17.82	4.73	11.52	12.43	8.5	30	2.33
			14.6	0.35	13.32	13.33	1.66	8.63
	平均	18.52	14.16	8.13	6.97	18.81	10.16	23.59

【0188】

(実施例7)

肝臓におけるATP7B発現

C57BL6/Jマウスに、配列番号13の制御下にATP7Bを含むAAV8ベクターを静脈内注射した。ウイルス送達の2週間後、肝臓を採取した。肝臓パンチを、100uL/mLのベータ-メルカプトエタノールを補充した600uLのRLT中で破壊およびホモジナイズし、RNAを、オン-カラムDNase処理を含む製造業者のプロトコルに従ってRNeasy Miniキット(Qiagen)を使用して抽出した。各試料について、RNA(3ug)を、OligoDTプライマーを使用してSuperscript IV(Invitrogen)を用いて逆転写した(65℃ 5分、55℃ 10分、85℃ 10分)。ヒトATP7Bに対するプライマー(5'-CATTCCAGGACTGTCCATTCT-3'(配列番号18)；5'-GGCCTGAACGTAGAAGTACCA-3'(配列番号19))、およびGAPDHに対するプライマー(5'ACCA CAGTCCATGCCATCAC-3'(配列番号20)；5'-TCCACCAACC

10

20

30

50

T G T T G C T G T A - 3' (配列番号 21) を、検量線を用いて検証して、信頼性を確実にし、以下の増幅条件下での qPCR (Phusion, SYBR Green) に使用した：(98 2分、40×[98 10秒、67 30秒、92 15秒])。ATP7B 発現を、GAPDH に対して正規化し、デルタ - デルタ Ct 法を使用して、ベースラインと比べた変化倍数として表した。図 12 および表 7 に示されるように、配列番号 13 は、3 つの異なる用量で肝臓において ATP7B の発現を駆動させ、最も高いウイルス用量で最も高い ATP7B 発現をもたらす用量応答を示した。

【0189】

【表 7】

表7:トランスフェクトしたマウスの肝臓におけるATP7B発現

10

	緩衝液	配列番号 13; 1E10 gc/マウス	配列番号 13; 1E11 gc/マウス	配列番号 13; 1E12 gc/マウス
トランスフェクトしたマウスの 肝臓における相対的 ATP7B 発現 (log2)	3.214475452	111.7850412	87.30041862	5639.103082
	1.992504985	7.333913922	375.1308235	6142.385453
	2.857162979	20.64780715	306.8202728	1207.591395
	3.20705701	27.24494487	183.2814118	4273.64098
	0.339445061	1.698879272	3.813855015	2376.435176
	0.45520343	0.501590988	2.734448707	1352.347313
	0.405540152		19.17626705	26577.47941
	0.271919214		0.5721968	128.407293
平均	1.592913535	28.20202957	122.3537118	5962.17376

20

【0190】

実施例 7 は、ATP7B 導入遺伝子に作動可能に連結された本明細書に開示される 1 つまたは複数の RE を含む発現力セットが、それを必要とする動物、哺乳動物またはヒト対象において、ATP7B 欠損と関連する障害または状態、たとえば、ウィルソン病を処置するために使用することができることを示している。さらに、そのような発現力セットは、たとえば、静脈内注射または注入を介して、rAAV8 を使用して in vivo で全身送達することができる。

【0191】

30

(実施例 8)

肝臓における高い EGFP 転写

C57BL/6J マウスに、様々な RE : 配列番号 4、13、14、15、16、17 および 27 の制御下に EGFP を含む AAV8 ベクターを静脈内注射した。各 AAV8 ベクターを、5 × 10¹¹ gc / マウスの用量で投与した。ウイルス送達の 2 週間後、肝臓を採取した。肝臓パンチを、10 uL / mL のベータ - メルカプトエタノールを補充した 600 uL の RLT 中で破壊およびホモジナイズし、RNA を、オン - カラム DNase 处理を含む製造業者のプロトコルに従って RNAeasy Mini キット (Qiagen) を使用して抽出した。各試料について、RNA (3 ug) を、Oligo DT プライマーを使用して Superscript IV (Invitrogen) を用いて逆転写した (65 5 分、55 10 分、85 10 分)。EGFP に対するプライマー (5' - GCTACCCCGACCATGAG - 3' (配列番号 42) ; 5' - TCTTG TAGTTGCCGTCTGCC - 3' (配列番号 43))、および GAPDH に対するプライマー (配列番号 20 および配列番号 21) を、以下の増幅条件下での qPCR (Phusion, SYBR Green) に使用した：(98 2分、40×[98 10秒、65 30秒、92 15秒])。EGFP 発現を、GAPDH に対して正規化し、デルタ - デルタ Ct 法を使用して、ベースラインと比べた変化倍数として表した (図 13)。図 13 に示されるように、試験した RE の各々は、RNA 転写物によって測定した場合、肝臓において、EGFP 発現を増加させた。さらに、配列番号 4、配列番号 27 および配列番号 14 は、同等のレベルの EGFP をもたらした。

40

50

【 0 1 9 2 】

実施例 8 は、本開示の比較的短い R E が、R N A 転写物によって測定した場合、肝臓において、高いレベルの導入遺伝子発現をもたらすことができることを示している。

【 0 1 9 3 】

本発明の好ましい実施形態が、本明細書に示され記載されてきたが、一方で、そのような実施形態が例のみとして提供されていることは、当業者に明らかである。多数のバリエーション、変化および置換が、本発明から逸脱することなしに当業者に想起される。本明細書に記載される発明の実施形態の様々な代替法が、本発明を実施する際に使用され得ると理解すべきである。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲およびそれらの同等物の範囲内の方法および構造がそれによってカバーされることが意図される。

【 0 1 9 4 】

本開示の様々な実施形態は、以下の番号を付けた項を参照して定義される。

項 1 . 治療用導入遺伝子に作動可能に連結された制御エレメントを含む発現力セットであって、制御エレメントが、(i) 配列番号 1 ~ 2 、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 ; または (i i) (i) のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % または 9 5 % の配列同一性を有する配列のうちの 1 つまたは複数を含む、発現力セット。

項 2 . 制御エレメントが、天然に存在しない、項 1 に記載の発現力セット。

項 3 . 制御エレメントが、イントロン配列を含む、項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 4 . 制御エレメントが、プロモーターと治療用導入遺伝子との間に位置する、項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 5 . 制御エレメントが、プロモーター配列を含む、項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 6 . 制御エレメントが、カセット中の唯一のプロモーターである、項 5 に記載の発現力セット。

項 7 . 制御エレメントが、比較的短い、項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 8 . 制御エレメントが、 1 0 0 b p 以下である、項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 9 . 制御エレメントが、 6 0 b p 以下である、項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 0 . 制御エレメントが、 5 0 b p 以下である、項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 1 . r A A V の一部である、項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 2 . r A A V が、 r A A V 8 である、項 1 1 に記載の発現力セット。

項 1 3 . アデノウイルスの一部である、項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 4 . レンチウイルスの一部である、項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 5 . 治療用導入遺伝子が、 1 k b 、 1 . 5 k b 、 2 k b 、 2 . 5 k b 、 3 k b 、 3 . 5 k b 、 4 k b 、 4 . 5 k b 、 5 k b 、 5 . 5 k b 、 6 k b 、 6 . 5 k b 、 7 k b または 7 . 5 k b よりも大きい、項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 6 . 治療用導入遺伝子が、 A T P 7 B 、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 7 . 治療用導入遺伝子が、 A T P 7 A 、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 8 . 治療用導入遺伝子が、 A T P 8 B 1 、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 1 9 . 治療用導入遺伝子が、 A B C B 4 、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。

10

20

30

40

50

項20. 治療用導入遺伝子が、A B C B 1 1、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項21. 治療用導入遺伝子が、C D K L 5、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項22. 治療用導入遺伝子が、C N T N A P 2、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項23. 治療用導入遺伝子が、Z E B 2、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項24. 治療用導入遺伝子が、第V因子、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。 10

項25. 治療用導入遺伝子が、第V I I I 因子、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項26. 治療用導入遺伝子が、第I X 因子、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項27. 治療用導入遺伝子が、第X 因子、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項28. 治療用導入遺伝子が、血液凝固因子である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項29. 血液凝固因子が、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子もしくは第12因子、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片のうちのいずれか1つである、項28に記載の発現力セット。 20

項30. 治療用導入遺伝子が、D N A 結合タンパク質である、項1～14のいずれか一項に記載の発現力セット。

項31. D N A 結合タンパク質が、内因性遺伝子の転写モジュレーターである、項30に記載の発現力セット。

項32. 転写モジュレーターが、転写活性化因子である、項31に記載の発現力セット。

項33. 内因性遺伝子が、i n v i v oで過少発現される、項32に記載の発現力セット。

項34. 内因性遺伝子が、肝臓の疾患または状態と関連する、項30～33のいずれか一項に記載の発現力セット。 30

項35. 内因性遺伝子が、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(P F I C)1型、2型または3型と関連する、項30～33のいずれか一項に記載の発現力セット。

項36. 内因性遺伝子が、自閉症スペクトラム障害と関連する、項30～33のいずれか一項に記載の発現力セット。

項37. 内因性遺伝子が、血友病と関連する、項30～33のいずれか一項に記載の発現力セット。

項38. 内因性遺伝子が、ウィルソン病と関連する、項30～33のいずれか一項に記載の発現力セット。

項39. 内因性遺伝子が、メンケス病またはオクシピタル・ホーン症候群と関連する、項30～33のいずれか一項に記載の発現力セット。 40

項40. 内因性遺伝子が、C D K L 5である、項30～33のいずれか一項に記載の発現力セット。

項41. 内因性遺伝子が、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型(P F I C 2)と関連するA B C B 1 1である、項35に記載の発現力セット。

項42. 内因性遺伝子が、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型(P F I C 1)と関連するA T P 8 B 1である、項35に記載の発現力セット。

項43. 内因性遺伝子が、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型(P F I C 3)と関連するA B C B 4である、項35に記載の発現力セット。

項44. 内因性遺伝子が、自閉症スペクトラム障害と関連するC N T N A P 2である、 50

項 3 6 に記載の発現力セット。

項 4 5 . 内因性遺伝子が、血友病 A と関連する第 V I I I 因子またはそのバリアントである、項 3 7 に記載の発現力セット。

項 4 6 . 内因性遺伝子が、血友病 B と関連する第 I X 因子またはそのバリアントである、項 3 7 に記載の発現力セット。

項 4 7 . 内因性遺伝子が、第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 1 0 因子、第 1 1 因子または第 1 2 因子のうちのいずれか 1 つである、項 3 7 に記載の発現力セット。

項 4 8 . 内因性遺伝子が、ウィルソン病と関連する A T P 7 B またはそのバリアントである、項 3 8 に記載の発現力セット。

項 4 9 . 内因性遺伝子が、メンケス病またはオクシピタル・ホーン症候群と関連する A T P 7 A またはそのバリアントである、項 3 9 に記載の発現力セット。

項 5 0 . 治療用導入遺伝子が、遺伝子編集タンパク質である、項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 5 1 . 遺伝子編集タンパク質が、C a s タンパク質である、項 5 0 に記載の発現力セット。

項 5 2 . 内因性遺伝子を含むゲノム遺伝子座に C a s タンパク質を標的化するガイド R N A をさらに含む、項 5 1 に記載の発現力セット。

項 5 3 . 内因性遺伝子が、突然変異を含む、または異常に発現される、項 5 2 に記載の発現力セット。

項 5 4 . 突然変異が、内因性遺伝子の過小発現をもたらす、項 5 3 に記載の発現力セット。

項 5 5 . 内因性遺伝子が、A T P 7 A 、A T P 7 B 、A T P 8 B 1 、A B C B 4 、A B C B 1 1 、C D K L 5 、C N T N A P 2 、Z E B 2 または第 V I I I 因子である、項 5 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 5 6 . 内因性遺伝子が、第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 1 0 因子、第 1 1 因子または第 1 2 因子である、項 5 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 5 7 . 制御エレメントが、制御エレメントなしの発現力セットと比較して、治療用導入遺伝子または内因性遺伝子の、少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 2 5 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 1 0 0 倍、少なくとも 2 0 0 倍、少なくとも 3 0 0 倍、少なくとも 4 0 0 倍、少なくとも 5 0 0 倍、少なくとも 6 0 0 倍、少なくとも 7 0 0 倍、少なくとも 8 0 0 倍、少なくとも 9 0 0 倍または少なくとも 1 0 0 0 倍増加した発現をもたらす、項 1 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 5 8 . 増加した発現が、P C R アッセイを使用して、治療用導入遺伝子または内因性遺伝子からの R N A 転写物の量によって判定される、項 5 7 に記載の発現力セット。

項 5 9 . 増加した発現が、イムノアッセイを使用して、治療用導入遺伝子または内因性遺伝子から合成されたタンパク質のレベルによって判定される、項 5 7 に記載の発現力セット。

項 6 0 . 制御エレメントが、制御エレメントなしの発現力セットと比較して、内因性遺伝子の、少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 2 5 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 1 0 0 倍、少なくとも 2 0 0 倍、少なくとも 3 0 0 倍、少なくとも 4 0 0 倍、少なくとも 5 0 0 倍、少なくとも 6 0 0 倍、少なくとも 7 0 0 倍、少なくとも 8 0 0 倍、少なくとも 9 0 0 倍または少なくとも 1 0 0 0 倍増加した発現をもたらす、項 3 0 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の発現力セット。

項 6 1 . 制御エレメントが、健康な対象における内因性遺伝子の発現と同等のレベルで

10

20

30

40

50

、内因性遺伝子の増加した発現をもたらす、項30～56のいずれか一項に記載の発現力セット。

項62. 増加した発現が、PCRアッセイを使用して、内因性遺伝子からのRNA転写物の量によって判定される、項60～61のいずれか一項に記載の発現力セット。

項63. 増加した発現が、イムノアッセイを使用して、内因性遺伝子から合成されたタンパク質のレベルによって判定される、項60～61のいずれか一項に記載の発現力セット。

項64. 項1～16、30～34、38、48、50～55および57～63に記載の発現力セットを投与することを含む、ウィルソン病を処置する方法。

項65. 項1～16、30～34、38、48、50～55および57～63のいずれか一項に記載の発現力セットを投与することを含む、ATP7Bにおける遺伝的欠陥を処置する方法。 10

項66. 項1～15、24～34、37、45～47および50～63のいずれか一項に記載の発現力セットを投与することを含む、血液凝固障害を処置する方法。

項67. 項1～66のいずれか一項に記載の発現力セットを投与することを含む、ハプロ不全または遺伝的欠陥を処置する方法。

項68. 治療用導入遺伝子または内因性遺伝子が、ATP7A、ATP7B、ATP8B1、ABC B4、ABC B11、CDKL5、CNTNAP2、ZEB2もしくは第VII因子、またはそれらのバリエントである、項67に記載の方法。

項69. 治療用導入遺伝子または内因性遺伝子が、第1因子、第2因子、第3因子、第4因子、第5因子、第6因子、第7因子、第8因子、第9因子、第10因子、第11因子もしくは第12因子、またはそれらのバリエントである、項67に記載の方法。 20

項70. 導入遺伝子が、ATP7B、またはそのバリエントもしくは機能性断片である、項67または68に記載の方法。

項71. 導入遺伝子が、内因性遺伝子の発現をモジュレートする転写モジュレーターである、項67または68に記載の方法。

項72. 内因性遺伝子が、ATP7A、ATP7B、ATP8B1、ABC B4、ABC B11、CDKL5、CNTNAP2、ZEB2もしくは第VII因子、またはそれらのバリエントである、項71に記載の方法。

項73. 細胞中に項1～63のいずれか一項に記載の発現力セットを導入することを含む、組換えタンパク質または生物製剤を產生する方法。 30

項74. 少なくとも3kbの導入遺伝子に作動可能に連結された120bp以下のヒト由来制御エレメントを含むAAV発現力セットであって、制御エレメントが、CMVプロモーターに作動可能に連結された場合の導入遺伝子の発現と比較して少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍または少なくとも1000倍增加した導入遺伝子発現をもたらす、AAV発現力セット。

項75. 少なくとも3kbの導入遺伝子に作動可能に連結された比較的短いヒト由来制御エレメントを含むAAV発現力セットであって、比較的短い制御エレメントが、制御エレメントなしの同等の発現力セットと比較して少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍または少なくとも1000倍增加した導入遺伝子発現をもたらす、AAV発現力セット。 40

項76. 制御エレメントが、(i)配列番号1～2、13～17および22～41；(

10

20

30

40

50

i i) それらの組合せ ; または (i i i) (i) および (i i) のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % または 9 5 % の配列同一性を有する配列を含む、項 7 4 または 7 5 に記載の A A V 発現力セット。

項 7 7 . 増加した導入遺伝子発現が、 C M V プロモーターに作動可能に連結された場合の導入遺伝子の発現と比較して少なくとも 5 0 倍である、項 7 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 7 8 . 増加した導入遺伝子発現が、少なくとも 1 0 0 倍である、項 7 7 に記載の A A V 発現力セット。

項 7 9 . 制御エレメントが、導入遺伝子に作動可能に連結された C M V プロモーターのサイズ正規化された発現活性と比較して少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 2 5 倍、少なくとも 5 0 倍または少なくとも 1 0 0 倍であるサイズ正規化された発現活性を呈する、項 7 4 ~ 7 8 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 8 0 . 増加した導入遺伝子発現が、少なくとも 2 つの細胞型において生じる、項 7 4 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 8 1 . 少なくとも 2 つの細胞型が、腎臓細胞、上皮細胞、ニューロンおよび肝臓細胞からなる群から選択される、項 8 0 に記載の A A V 発現力セット。

項 8 2 . 制御エレメントが、配列番号 2 2 ~ 4 1 のうちのいずれか 1 つまたは複数を含み、他のプロモーター配列が、発現力セット中に存在しない、項 7 4 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 8 3 . 制御エレメントが、配列番号 1 または配列番号 2 を含む、項 7 4 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 8 4 . 制御エレメントが、プロモーターの下流に位置する、項 8 3 に記載の A A V 発現力セット。

項 8 5 . 制御エレメントが、導入遺伝子の上流に位置する、項 7 4 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 8 6 . 導入遺伝子が、 A T P 7 A ; A T P 7 B ; A T P 8 B 1 ; A B C B 4 ; A B C B 1 1 ; C D K L 5 ; C N T N A P 2 ; Z E B 2 ; 第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 1 0 因子、第 1 1 因子もしくは第 1 2 因子；またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である、項 7 4 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 8 7 . 導入遺伝子が、 A T P 7 B 、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項 8 6 に記載の A A V 発現力セット。

項 8 8 . 導入遺伝子が、 F V I I I 、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項 8 6 に記載の A A V 発現力セット。

項 8 9 . 導入遺伝子が、遺伝子編集タンパク質である、項 7 4 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 9 0 . 遺伝子編集タンパク質が、 C a s である、項 8 9 に記載の A A V 発現力セット。

項 9 1 . 導入遺伝子が、 D N A 結合タンパク質である、項 7 4 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 9 2 . D N A 結合タンパク質が、内因性遺伝子の発現を増加させる転写活性化因子である、項 9 1 に記載の A A V 発現力セット。

項 9 3 . D N A 結合タンパク質が、内因性遺伝子の発現を減少させる転写抑制因子である、項 9 1 に記載の A A V 発現力セット。

項 9 4 . 転写活性化因子が、 A T P 7 A ; A T P 7 B ; A T P 8 B 1 ; A B C B 4 ; A B C B 1 1 ; C D K L 5 ; C N T N A P 2 ; Z E B 2 ；または第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 1 0 因子、第 1 1 因子もしくは第 1 2 因子、あるいはそれらのバリアントの発現を増加させる、項 9 2 に記載の A A V 発現力セット。

10

20

30

40

50

項 9 5 . 転写活性化因子が、内因性 A T P 7 A の発現を増加させる、項 9 4 に記載の A A V 発現力セット。

項 9 6 . 転写活性化因子が、内因性 A T P 7 B の発現を増加させる、項 9 4 に記載の A A V 発現力セット。

項 9 7 . 転写活性化因子が、内因性 A T P 8 B 1 の発現を増加させる、項 9 4 に記載の A A V 発現力セット。

項 9 8 . 転写活性化因子が、内因性 A B C B 4 の発現を増加させる、項 9 4 に記載の A A V 発現力セット。

項 9 9 . 転写活性化因子が、内因性 A B C B 1 1 の発現を増加させる、項 9 4 に記載の A A V 発現力セット。

項 1 0 0 . 転写活性化因子が、内因性 F V I I I の発現を増加させる、項 9 4 に記載の A A V 発現力セット。

項 1 0 1 . A A V が、A A V 1 、A A V 2 、A A V 3 、A A V 3 b 、A A V 4 、A A V 5 、A A V 6 、A A V 7 、A A V 8 、A A V 9 、A A V 1 0 、A A V 1 1 、A A V 1 2 、A A V - D J および s c A A V からなる群から選択される、項 7 4 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の A A V 発現力セット。

項 1 0 2 . A A V が、A A V 8 である、項 1 0 1 に記載の A A V 発現力セット。

項 1 0 3 . 組換えタンパク質を產生する方法であって、タンパク質をコードする配列を、(i) 配列番号 1 ~ 2 、1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 ; (i i) それらの組合せ；または(i i i) (i) および(i i) のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % 、8 5 % 、9 0 % または 9 5 % の配列同一性を有する配列のうちの 1 つまたは複数に作動可能に連結させることを含む、方法。

項 1 0 4 . タンパク質をコードする配列が、1 k b 、1 . 5 k b 、2 k b 、2 . 5 k b 、3 k b 、3 . 5 k b 、4 k b 、4 . 5 k b 、5 k b 、5 . 5 k b 、6 k b 、6 . 5 k b 、7 k b または 7 . 5 k b を上回る、項 1 0 3 に記載の方法。

項 1 0 5 . 肝臓の疾患または状態を処置する方法であって、(i) 配列番号 1 ~ 2 、1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 ; (i i) それらの組合せ；または(i i i) (i) および(i i) のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % 、8 5 % 、9 0 % または 9 5 % の配列同一性を有する配列から選択される 1 つまたは複数の制御エレメントに作動可能に連結された治療用導入遺伝子を含む遺伝子療法を投与することを含む、方法。

項 1 0 6 . 肝臓の疾患または状態が、ウィルソン病である、項 1 0 5 に記載の方法。

項 1 0 7 . 肝臓の疾患または状態が、血液凝固障害である、項 1 0 5 に記載の方法。

項 1 0 8 . 導入遺伝子が、A T P 7 A もしくは A T P 7 B 、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である、項 1 0 5 に記載の方法。

項 1 0 9 . 導入遺伝子が、第 1 因子、第 2 因子、第 3 因子、第 4 因子、第 5 因子、第 6 因子、第 7 因子、第 8 因子、第 9 因子、第 1 0 因子、第 1 1 因子、第 1 2 因子、またはそれらのバリアントもしくは機能性断片である、項 1 0 5 に記載の方法。

項 1 1 0 . 導入遺伝子が、第 8 因子、またはそのバリアントもしくは機能性断片である、項 1 0 9 に記載の方法。

項 1 1 1 . 制御エレメントが、少なくとも 2 つの細胞型において増加した導入遺伝子発現をもたらす、項 1 0 5 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

項 1 1 2 . 制御エレメントが、少なくとも 3 つの細胞型において増加した導入遺伝子発現をもたらす、項 1 5 0 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

項 1 1 3 . 制御エレメントが、肝細胞において増加した導入遺伝子発現をもたらす、項 1 0 5 ~ 1 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

項 1 1 4 . 制御エレメントが、C M V プロモーターに作動可能に連結された場合の導入遺伝子の発現と比較して少なくとも 2 倍であるレベルで、増加した導入遺伝子発現をもたらす、項 1 0 5 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

項 1 1 5 . 遺伝子療法が、A A V を利用する、項 1 0 5 ~ 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

項 116 . AAV が、 AAV 8 である、 項 115 に記載の方法。

項 117 . 遺伝子療法が、 アデノウイルスを利用する、 項 105 ~ 114 のいずれか一項に記載の方法。

項 118 . 遺伝子療法が、 レンチウイルスを利用する、 項 105 ~ 114 のいずれか一項に記載の方法。

項 119 . 導入遺伝子に作動可能に連結された 100 bp 未満であるかまたはそれと等しい bp を有するヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、 制御エレメントが、 制御エレメントなしの第 2 の発現ベクターと比較して、 導入遺伝子の全体的発現を少なくとも 2 倍増加させる、 発現ベクター。

項 120 . 第 2 の発現ベクターが、 CMV プロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子を含む、 項 119 に記載の発現ベクター。 10

項 121 . 導入遺伝子に作動可能に連結された 100 bp 未満であるかまたはそれと等しい bp を有するヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、 ここで、 導入遺伝子の発現が、 CMV プロモーター、 スーパーコアプロモーター、 TTR プロモーター、 Proto1 プロモーター、 UCL - HLP プロモーターまたは CMV e プロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い、 発現ベクター。

項 122 . 導入遺伝子の発現が、 UCL - HLP プロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い、 項 121 に記載の発現ベクター。

項 123 . 導入遺伝子に作動可能に連結されたヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、 導入遺伝子によってコードされるタンパク質が、 (i) 導入遺伝子を検出するように構成された ELISA アッセイによって測定した場合に、 濃度 > 1.0 IU / mL ; または (ii) Coatest アッセイによって測定した場合に、 > 25 % の活性を有する、 発現ベクター。 20

項 124 . 細胞中でも in vivo でも制御エレメントと関連して見出されない導入遺伝子に作動可能に連結された、 サイズが 100 bp 未満であるかまたはそれと等しい配列を有するヒト由来制御エレメントを含む、 ベクター。

項 125 . 制御エレメントが、 イントロン配列である、 項 119 ~ 124 のいずれか一項に記載のベクター。

項 126 . 制御エレメントが、 配列番号 1 もしくは配列番号 2 、 またはそれに対して少なくとも 80 % 、 85 % 、 90 % もしくは 95 % の相同性を有する配列である、 項 125 に記載のベクター。 30

項 127 . 導入遺伝子としてのルシフェラーゼの使用が、 マウス全体で測定した場合に、 1×10^8 光子 / 秒よりも高い全体的発現をもたらす、 項 1 ~ 63 、 74 ~ 102 および 119 ~ 126 のいずれか一項に記載の発現ベクターまたはカセット。

項 128 . 活性または導入遺伝子発現が、 1 マウス当たり、 16 μ g の用量の発現ベクターに対応する、 項 127 に記載の発現ベクターまたはカセット。

項 129 . 活性または導入遺伝子発現が、 1 マウス当たり 12 μ g の用量の発現ベクターに対応する、 項 127 に記載の発現ベクターまたはカセット。

項 130 . 内因性バージョンの導入遺伝子が、 in vivo では制御エレメントに連結されない、 項 1 ~ 63 、 74 ~ 102 、 および 119 ~ 129 のいずれか一項に記載の発現ベクターまたはカセット。 40

項 131 . 導入遺伝子の全体的発現が、 CMV プロモーター、 CMV e プロモーター、 スーパーコアプロモーター、 TTR プロモーター、 Proto1 プロモーターおよび UCL - HLP プロモーターからなる群から選択される制御エレメントを有するベクターまたはカセットを使用した導入遺伝子の発現よりも高いレベルである、 項 127 に記載の発現ベクターまたはカセット。

項 132 . 発現が、 マウスにおける少なくとも 3 、 4 、 5 、 6 または 7 つの異なる細胞型において in vivo で検出可能である、 項 1 ~ 63 、 74 ~ 102 、 および 119 ~ 131 のいずれか一項に記載の発現ベクターまたはカセット。

項 133 . 異なる細胞型が、 肺胞細胞、 心筋細胞、 上皮細胞、 肝細胞、 腸細胞、 筋細胞 50

、ニューロンおよび腎細胞からなる群から選択される、項132に記載の発現ベクターまたはカセット。

項134. 制御エレメントが、エンハンサーである、項119～133のいずれか一項に記載の発現ベクターまたはカセット。

項135. プロモーターをさらに含む、項134に記載の発現ベクターまたはカセット。

項136. プロモーターが、CMVプロモーター、CMV、プロモーター、スーパーコアプロモーター、TTRプロモーター、Proto1プロモーター、UCL-HLPプロモーター、AATプロモーター、KARプロモーター、EF1プロモーター、EFSプロモーターまたはCMVeエンハンサー/CMVプロモーター組合せである、項135に記載の発現ベクターまたはカセット。

項137. 1つまたは複数の転写後修飾部位をさらに含む、項119～136のいずれか一項に記載の発現ベクター。

項138. 導入遺伝子が、Cas9である、項119～137のいずれか一項に記載の発現ベクター。

項139. 導入遺伝子が、sacCas9である、項138に記載の発現ベクター。

項140. 細胞中でまたはin vivoで第VIII因子を検出するように構成されたELISAアッセイによって測定した場合に、第VIII因子の発現を濃度>1.0IU/mLまで駆動させることができる制御配列に作動可能に連結された第VIII因子導入遺伝子を含む、発現ベクター。

項141. 制御配列が、比較的短い、項140に記載の発現ベクター。

項142. 制御配列が、配列番号1～2、13～17および22～41、もしくはそれらの組合せ；またはそれに対して少なくとも80%、85%、90%もしくは95%の配列同一性を有する配列のうちの1つまたは複数を含む、項140または141に記載の発現ベクター。

項143. 項119～142のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む、ウイルス粒子。

項144. AAVである、項143に記載のウイルス粒子。

項145. AAVが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJおよびscAAVからなる群から選択される、項144に記載のウイルス粒子。

項146. レンチウイルスである、項143に記載のウイルス粒子。

項147. アデノウイルスである、項143に記載のウイルス粒子。

項148. 導入遺伝子が、治療用導入遺伝子である、項119～147に記載の発現ベクター。

項149. 治療用導入遺伝子が、第VIII因子、Cas9、DNA結合タンパク質、ホルモン、増殖もしくは分化因子、インスリン、成長ホルモン、VEGF、神経栄養因子、線維芽細胞上皮因子；サイトカイン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壞死因子、抗体、免疫グロブリン、インターフェロン、キメラT細胞受容体；リポタンパク質受容体、囊胞性線維症膜貫通制御因子、ムコ多糖症I型、II型、III型もしくはIV型と関連する遺伝子、ベータグロビンまたはリボタンパク質リバーゼである、項148に記載の発現ベクター。

項150. 治療用導入遺伝子が、ATP7A、ATP7B、ATP8B1、ABC B4、ABC B11、またはそれらのバリエントもしくは機能性断片である、項148に記載の発現ベクター。

項151. 治療用導入遺伝子が、CDKL5、CNTNAP2、ZEB2、またはそれらのバリエントもしくは機能性断片である、項148に記載の発現ベクター。

項152. 動物中の複数の異なる組織に導入遺伝子を送達するための方法であって、前記動物に、項119～151のいずれか一項に記載の発現ベクターを投与することを含む、方法。

10

20

30

40

50

項 1 5 3 . タンパク質、抗体または他の生物製剤の產生のための方法であって、細胞を、項 1 1 9 ~ 1 5 1 のいずれか一項に記載の発現ベクターと接觸させることを含む、方法。

項 1 5 4 . 細胞が、C H O 細胞またはH E K 2 9 3 T 細胞である、項 1 5 3 に記載の方法。

項 1 5 5 . トランスジェニック動物または植物を產生するための方法であって、動物または植物に、項 1 1 9 ~ 1 5 1 のいずれか一項に記載の発現ベクターを投与することを含む、方法。

項 1 5 6 . 制御エレメントが、4 0 ~ 5 0 b p である、項 1 1 9 ~ 1 5 1 のいずれか一項に記載の発現ベクター。

項 1 5 7 . 制御エレメントが、5 0 ~ 6 0 b p である、項 1 1 9 ~ 1 5 1 のいずれか一項に記載の発現ベクター。 10

項 1 5 8 . 導入遺伝子に作動可能に連結されたヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、導入遺伝子によってコードされるタンパク質が、(i) 導入遺伝子を検出するように構成されたE L I S A アッセイによって測定した場合に、濃度 > 0 . 1 I U / m L ; または(i i) Co a t e s t アッセイによって測定した場合に、> 1 0 % の活性を有する、発現ベクター。

項 1 5 9 . 導入遺伝子に作動可能に連結された 1 2 0 b p 未満であるかまたはそれと等しい b p を有するヒト由来制御エレメントを含む発現ベクターであって、ここで、導入遺伝子の発現が、U C L - H L P プロモーターによって発現される同じ導入遺伝子の発現よりも高い、発現ベクター。 20

項 1 6 0 . 制御エレメントが、プロモーターである、項 1 5 8 ~ 1 5 9 のいずれか一項に記載の発現ベクター。

項 1 6 1 . 治療用導入遺伝子が、D N A 結合ドメインおよび転写制御ドメインを含む融合タンパク質である、項 1 5 8 ~ 1 6 0 のいずれか一項に記載の発現ベクター。

項 1 6 2 . 治療用導入遺伝子に作動可能に連結された比較的短い制御エレメント(R E)を含む、発現カセット。

項 1 6 3 . 比較的短い R E が、(i) 配列番号 1 ~ 2 、 1 3 ~ 1 7 および 2 2 ~ 4 1 ; または(i i)(i) のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % もしくは 9 5 % の配列同一性を有する配列のうちの 1 つまたは複数を含む、項 1 6 2 に記載の発現カセット。 30

項 1 6 4 . 投与することが、全身である、項 6 4 ~ 7 2 および 1 0 5 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

項 1 6 5 . 投与することが、対象における静脈内注射または注入を含む、項 1 6 4 に記載の方法。

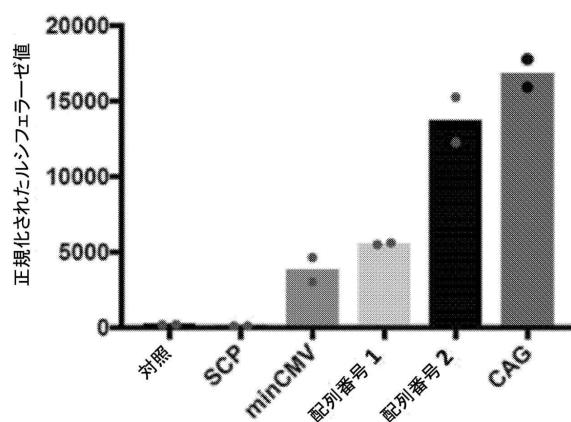
項 1 6 6 . 対象が、ヒトである、項 1 6 5 に記載の方法。

項 1 6 7 . 対象が、動物である、項 1 6 5 に記載の方法。

【図面】

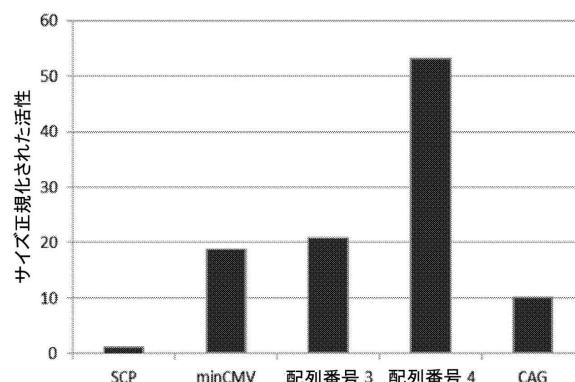
【図 1 A】

FIG. 1A



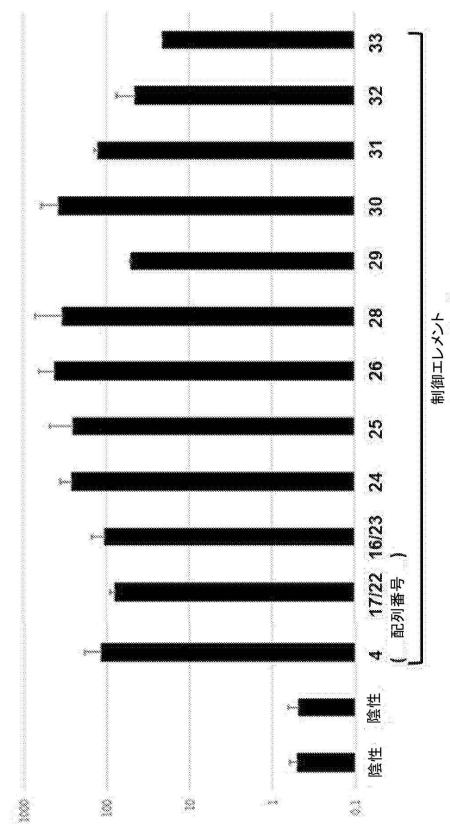
【図 1 B】

FIG. 1B



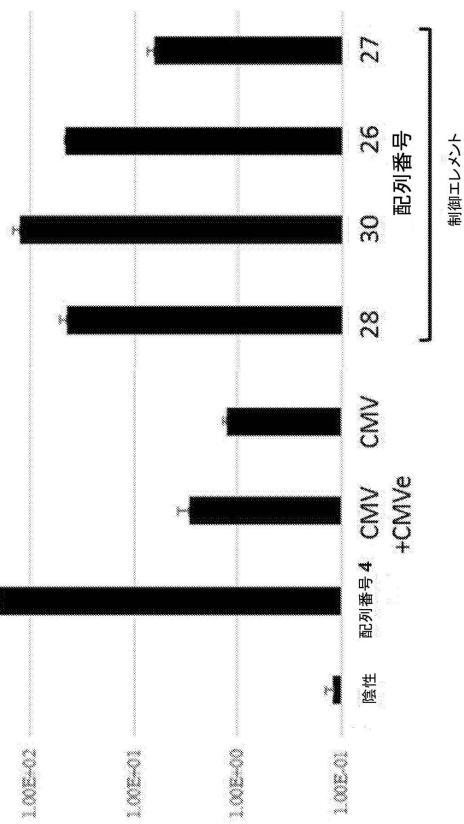
【図 1 C】

FIG. 1C



【図 1 D】

FIG. 1D



10

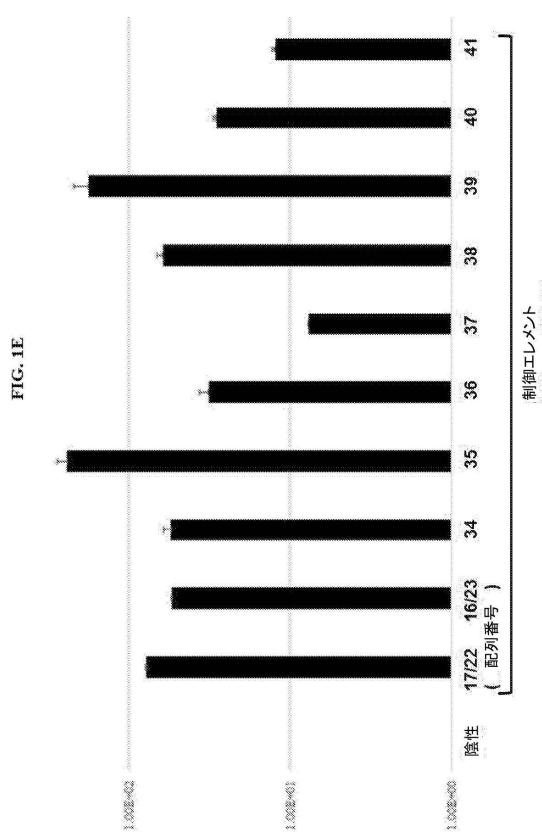
20

30

40

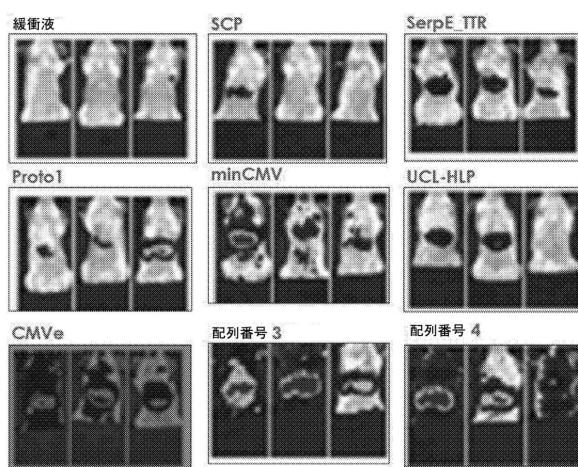
50

【図 1 E】



【図 2 A】

FIG. 2A



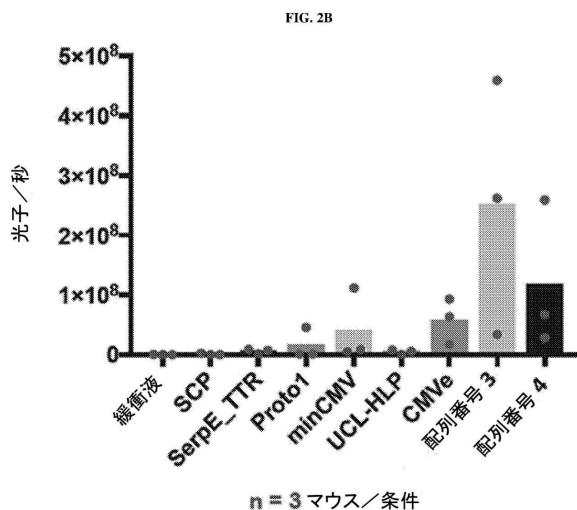
10

20

30

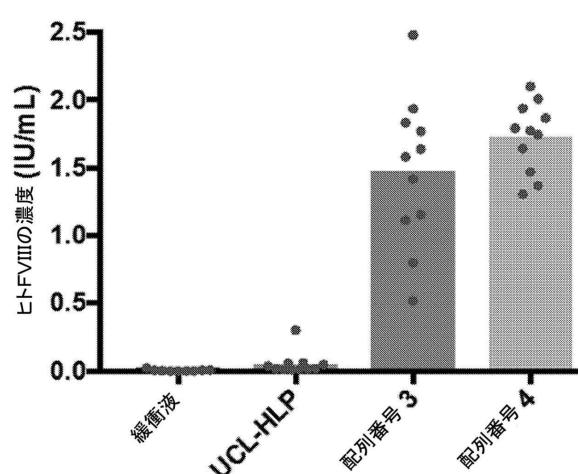
40

【図 2 B】



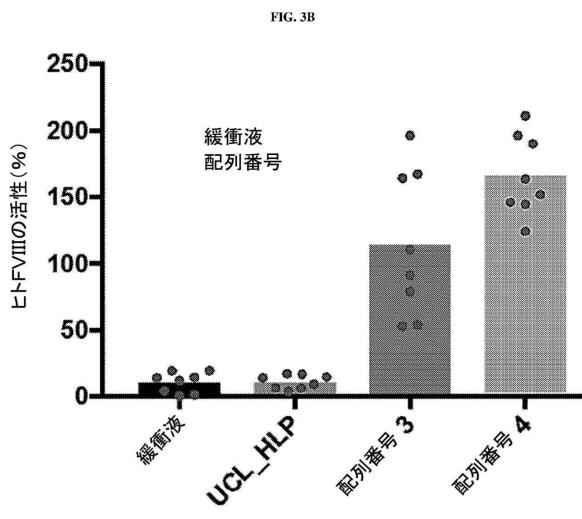
【図 3 A】

FIG. 3A

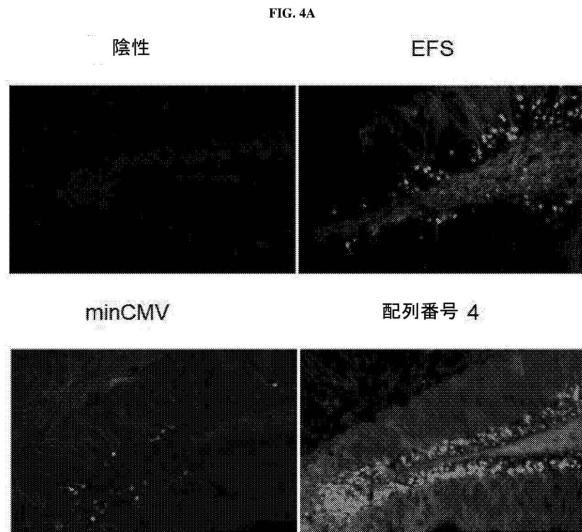


50

【図 3 B】

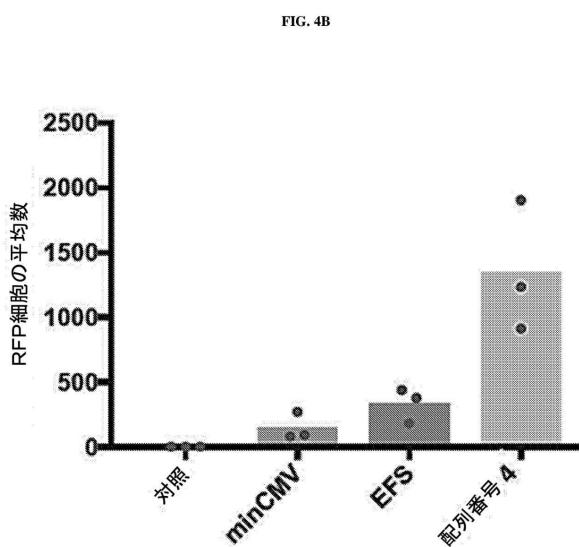


【図 4 A】

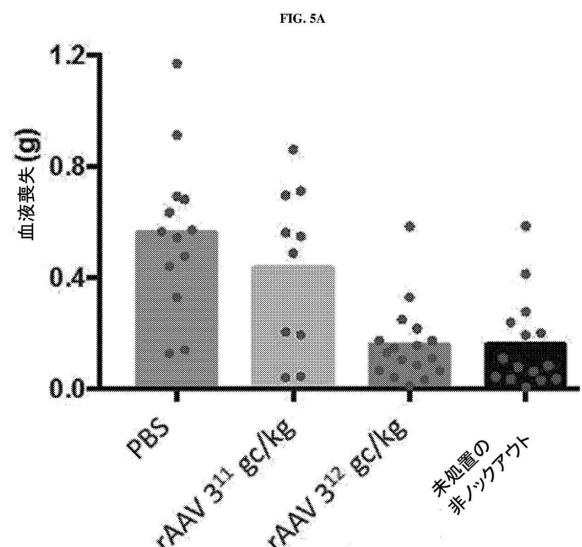


10

【図 4 B】



【図 5 A】



20

30

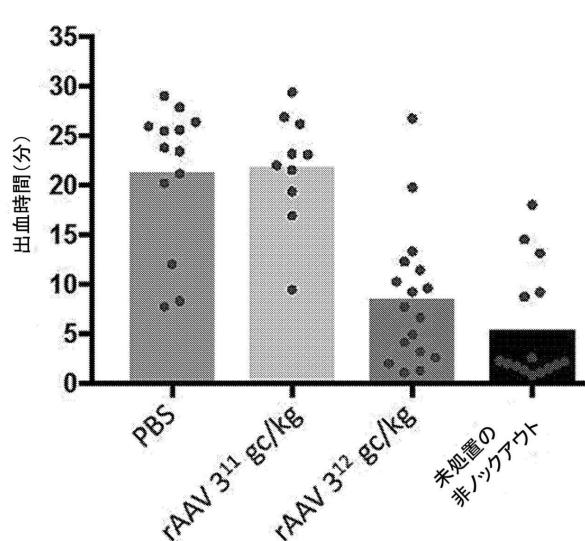
40

 $n = 3$ マウス／条件

50

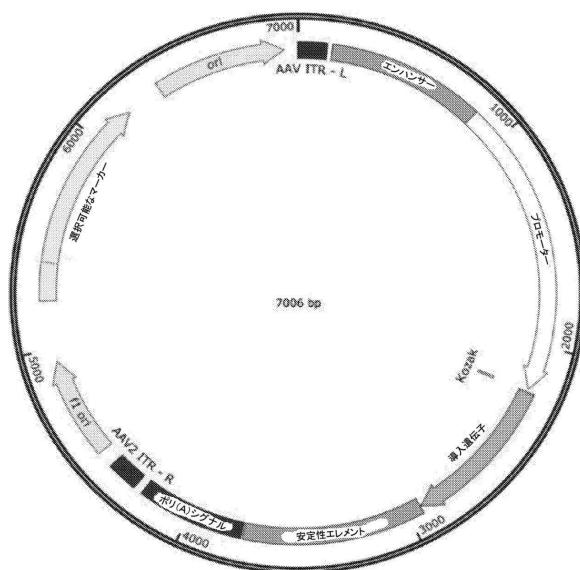
【図 5 B】

FIG. 5B



【図 6 A】

FIG. 6A



10

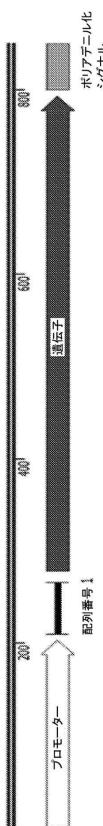
20

30

40

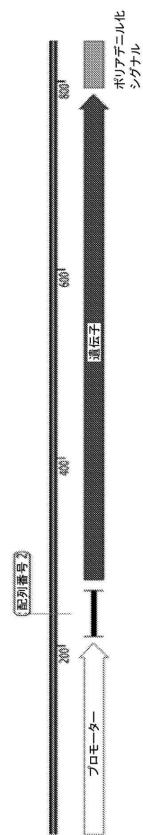
【図 6 B】

FIG. 6B



【図 6 C】

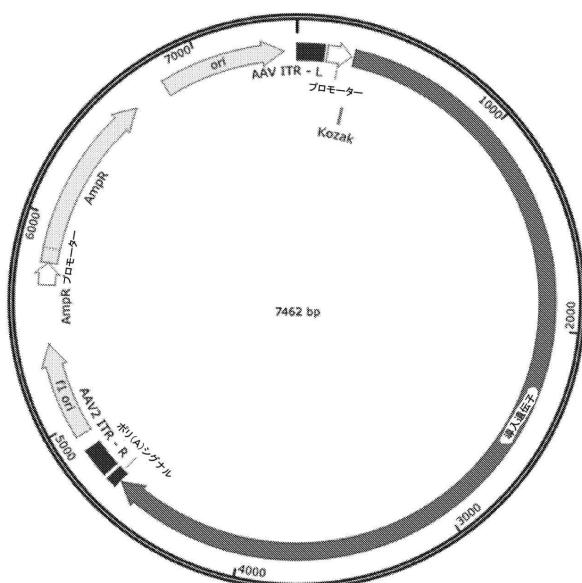
FIG. 6C



50

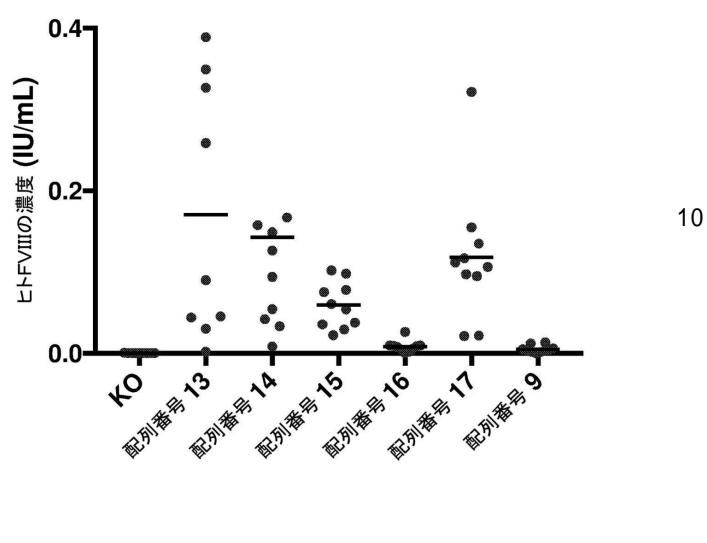
【図 7】

FIG. 7



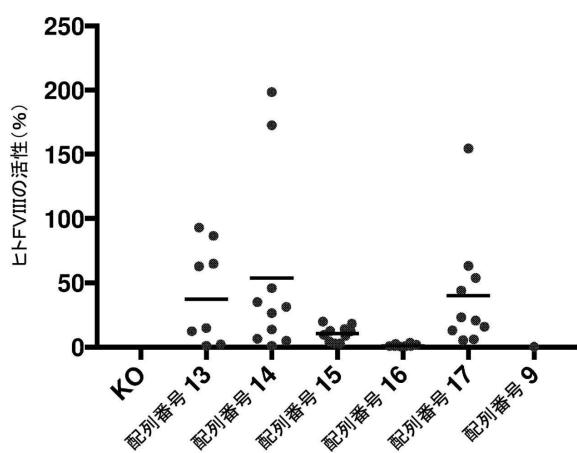
【図 8】

FIG. 8



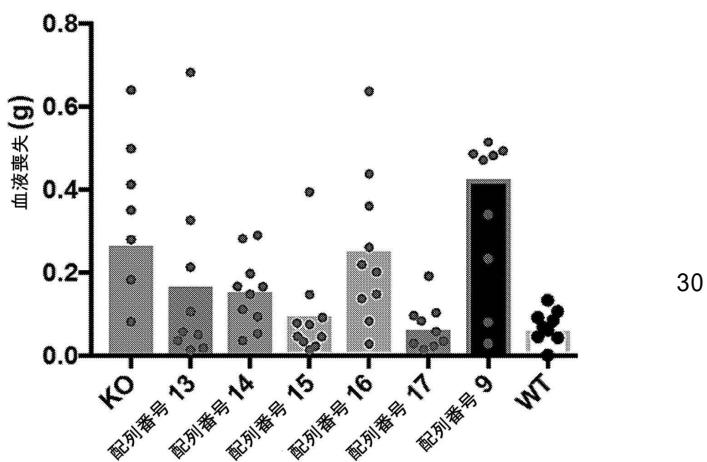
【図 9】

FIG. 9



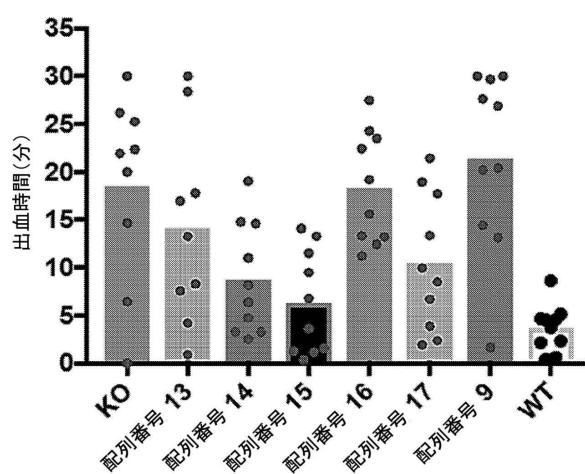
【図 10】

FIG. 10



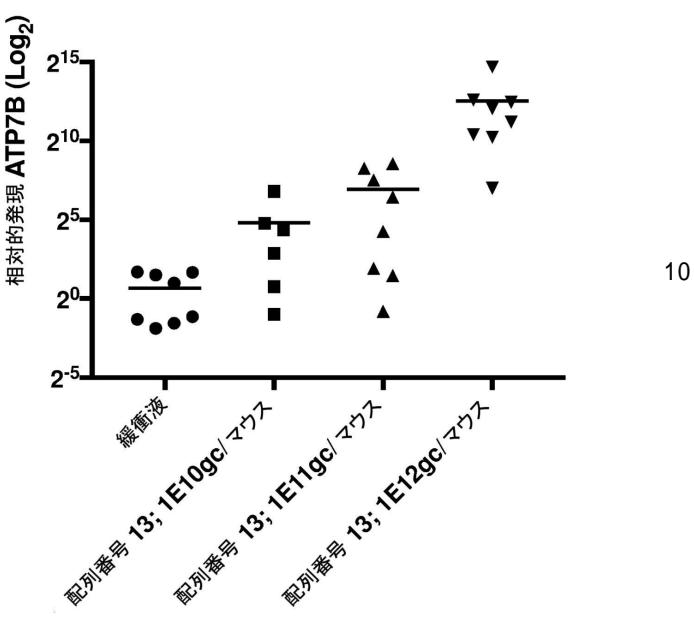
【図 1 1】

FIG. 11



【図 1 2】

FIG. 12

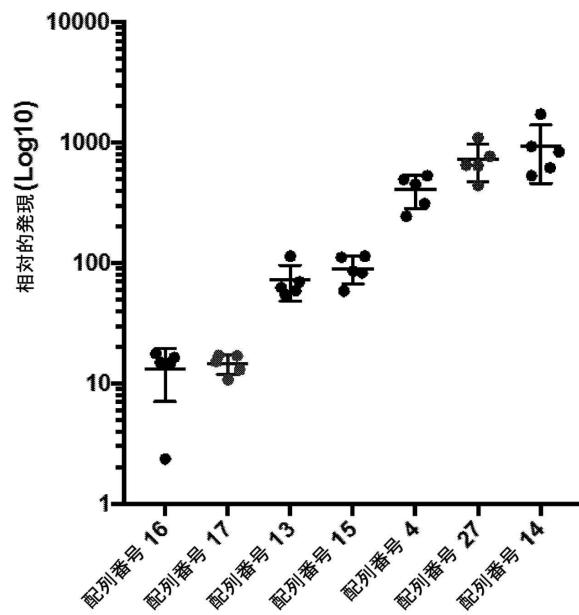


10

20

【図 1 3】

FIG. 13



30

40

【配列表】

0007315475000001.app

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F	I	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	38/37 (2006.01)	A 6 1 K	38/37
A 6 1 K	38/22 (2006.01)	A 6 1 K	38/22
A 6 1 K	38/27 (2006.01)	A 6 1 K	38/27
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	38/21
A 6 1 K	38/43 (2006.01)	A 6 1 K	38/43
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 0 1 K	67/027(2006.01)	A 0 1 K	67/027
A 0 1 H	5/00 (2018.01)	A 0 1 H	5/00

V

A

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ラマモールティ， カルティク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント
ブールバード 341

(72)発明者 タグリアテラ， ステファニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント
ブールバード 341

(72)発明者 タネンハウス， アン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント
ブールバード 341

(72)発明者 ヤング， アンドリュー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント
ブールバード 341

(72)発明者 チェン， ズー-イン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント
ブールバード 341

(72)発明者 ジャン， チー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント
ブールバード 341

(72)発明者 マーティン， ステファニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント
ブールバード 341

(72)発明者 オーバーコラー， デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント
ブールバード 341

審査官 中野 あい

(56)参考文献 国際公開第01/036620 (WO, A2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)