

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7176737号

(P7176737)

(45)発行日 令和4年11月22日(2022.11.22)

(24)登録日 令和4年11月14日(2022.11.14)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

Z N A

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/14

A 6 1 P 31/18 (2006.01)

A 6 1 P 31/18

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

1 1 0

請求項の数 17 (全97頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-543090(P2018-543090)

(86)(22)出願日 平成29年2月13日(2017.2.13)

(65)公表番号 特表2019-504868(P2019-504868  
A)

(43)公表日 平成31年2月21日(2019.2.21)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/017652

(87)国際公開番号 WO2017/142835

(87)国際公開日 平成29年8月24日(2017.8.24)

審査請求日 令和2年2月13日(2020.2.13)

(31)優先権主張番号 62/295,390

(32)優先日 平成28年2月15日(2016.2.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/337,994

(32)優先日 平成28年5月18日(2016.5.18)

最終頁に続く

(73)特許権者 517324345

テンブル ユニバーシティ オブ ザ コ

モンウェルス システム オブ ハイヤー

エデュケーション

アメリカ合衆国, 19122 ペンシル

ベニア州, フィラデルフィア, ブロード

ストリート アンド モントゴメリー ア

ベニュー

(74)代理人 110000338

特許業務法人HARAKENZO WO

RLD PATENT &amp; TRADEM

ARK

(72)発明者 カリリ, カメル

アメリカ合衆国, 19004 ペンシル

ベニア州, ベラ カヌイド, プレジデン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レトロウイルス核酸配列の切除

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

アデノ随伴ウイルスベクター血清型9 (AAV<sub>9</sub>)であるアデノ随伴ウイルスベクターであって、

(a) Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) 関連エンドヌクレアーゼ;

(b) 第1ガイドRNA (gRNA)であり、当該第1gRNAは、第1標的配列に、レトロウイルスの長い末端反復 (LTR) 内で相補的である;および

(c) 第2gRNAであり、当該第2gRNAは、第1標的配列に、レトロウイルスの G a g D 領域内で相補的である;

をコードする核酸配列を含む、アデノ随伴ウイルスベクターであり、

上記CRISPR関連エンドヌクレアーゼ、上記第1gRNA、および上記第2gRNAは、上記第1標的配列および上記第2標的配列間の介在ウイルス配列を切除することができる、アデノ随伴ウイルスベクター。

## 【請求項2】

上記CRISPR関連エンドヌクレアーゼが、Cas9またはそのホモログである、請求項1に記載のAAV<sub>9</sub>発現ベクター。

## 【請求項3】

上記レトロウイルスがレンチウイルスである、請求項1または2に記載のAAV<sub>9</sub>発現ベクター。

## 【請求項 4】

上記レンチウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ウシ免疫不全ウイルス、ビスナウイルス、馬伝染性貧血ウイルスまたはヒトT細胞白血病ウイルスである、請求項 3 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。

## 【請求項 5】

長い末端反復 ( L T R ) 内の上記第 1 標的配列が、上記長い末端反復 ( L T R ) の U 3、R、または U 5 領域内の配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。

## 【請求項 6】

トランス活性化小 RNA ( t r a c r R N A ) をコードする配列をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。 10

## 【請求項 7】

上記トランス活性化小 RNA ( t r a c r R N A ) 配列が、上記第 1 g R N A または上記第 2 g R N A をコードする配列と融合している、請求項 6 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。

## 【請求項 8】

核局在シグナルをコードする配列をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。

## 【請求項 9】

上記第 1 g R N A は、配列番号 2 0 7 またはその逆相補体と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有している配列を含む上記第 1 標的配列とハイブリダイズする、請求項 1 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。 20

## 【請求項 1 0】

上記第 1 g R N A は、配列番号 2 0 7 またはその逆相補体と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有している配列を含む上記第 1 標的配列とハイブリダイズする、請求項 1 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。

## 【請求項 1 1】

上記第 1 g R N A は、配列番号 2 0 7 またはその逆相補体の配列を含む上記第 1 標的配列とハイブリダイズする、請求項 1 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。

## 【請求項 1 2】

上記第 2 g R N A は、配列番号 9 2 またはその逆相補体と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有している配列を含む上記第 2 標的配列とハイブリダイズする、請求項 1 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。 30

## 【請求項 1 3】

上記第 2 g R N A は、配列番号 9 2 またはその逆相補体と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有している配列を含む上記第 2 標的配列とハイブリダイズする、請求項 1 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。

## 【請求項 1 4】

上記第 2 g R N A は、配列番号 9 2 またはその逆相補体の配列を含む上記第 2 標的配列とハイブリダイズする、請求項 1 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。 40

## 【請求項 1 5】

上記第 1 g R N A は、配列番号 2 0 7 またはその逆相補体と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有している配列を含む上記第 1 標的配列とハイブリダイズし、かつ、

上記第 2 g R N A は、配列番号 9 2 またはその逆相補体と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有している配列を含む上記第 2 標的配列とハイブリダイズする、請求項 1 に記載の A A V<sub>9</sub> 発現ベクター。

## 【請求項 1 6】

上記第 1 g R N A は、配列番号 2 0 7 またはその逆相補体と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有している配列を含む上記第 1 標的配列とハイブリダイズし、かつ、

上記第 2 g R N A は、配列番号 9 2 またはその逆相補体と少なくとも 9 0 % の配列同一 50

性を有している配列を含む上記第2標的配列とハイブリダイズする、請求項1に記載のAAV<sub>9</sub>発現ベクター。

【請求項17】

上記第1gRNAは、配列番号207またはその逆相補体の配列を含む上記第1標的配列とハイブリダイズし、かつ、

上記第2gRNAは、配列番号92またはその逆相補体の配列を含む上記第2標的配列とハイブリダイズする、

請求項1に記載のAAV<sub>9</sub>発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

〔技術分野〕

（連邦政府資金による研究開発の記載）

本発明は、国立保健研究所によってP30MH092177およびR01NS087971を基に連邦政府の一部支援によってなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0002】

本発明の実施形態は、レトロウイルスによる感染を予防または処置する、遺伝子編集複合体およびインビボ送達担体に関する。特に、遺伝子編集複合体は、組換えウイルスベクターによってコードされるClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) 関連エンドヌクレアーゼを含む。

20

〔背景技術〕

世界で4000万人以上が感染し、毎年200万人以上の新たな感染が続いているため、HIV/AIDSは主要な公衆衛生問題のままである (Adejumo OA, et al. J Int AIDS Soc 2015; 18:20049)。多剤併用療法 (cART) によって、進行中のウイルス複製を効果的に制御し、CD4<sup>+</sup>T細胞の消失数を回復させることができる。しかしながら、この処置は潜伏感染細胞のウイルスを除去することができない (Kulpa DA, Chomont N. J Virus Erad 2015; 1:59-66)。増殖していないCD4<sup>+</sup>記憶T細胞のサブセットにおいて、組み込まれたプロウイルスDNAは存続し、再活性化して複製可能なウイルスを産生することができる。これは、cARTを中止するとき、急速なウイルスの回復をもたらすという結果になり得る (Coffin JM. Science 1995; 267:483-489; Coffin JM. AIDS 1996; 10 (Suppl 3):S75-84)。したがって、感染した人々は、細胞保有体 (cell reservoir) でのウイルス存続により、長期間の処置を維持しなければならない。

30

【0003】

潜伏プロウイルスDNAの除去については解明されていない。潜伏中、HIV感染細胞はウイルスタンパク質をほとんどまたは全く産生しないので、宿主抗ウイルス免疫クリアランスまたは直接のウイルス細胞毒性を防止する。ウイルスの根絶は、疾患の「治療」を達成するために、そのクリアランス、ならびに、脾臓、リンパ節、脳、尿生殖路および消化管に存在する、他の感染リンパ球および単球マクロファージ中の潜伏感染細胞CD4<sup>+</sup>Tエフェクター記憶細胞の再感染の予防を必要とする (Saleh S., et al. Blood 2007; 110:4161-4164; Swiggard WJ., et al., J Virol 2005; 79:141799-14188) (Lusic M, Giacca M. J Mol Biol 2015; 427:688-694)。

40

〔発明の概要〕

本発明の実施形態は、レトロウイルス核酸配列に特異的な、遺伝子編集複合体を含む組成物、および治療の必要がある対象へのこれらの遺伝子編集複合体の投与に関する。

【0004】

一実施形態において、組成物は、遺伝子編集複合体と、少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) とをコードするウイルスベクターを含む組成物であって、当該gRNAが、レトロウイルス配列の標的核酸配列、レトロウイルス群に特異的な抗原をコードする標的核酸配列、コード領域、非コード領域、またはそれらの組合せに相補的である。

【0005】

50

他の実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）、またはそれらの誘導体を含む。好ましくは、アデノ随伴ウイルスベクターは、AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、DJまたはDJ/8を含む。一実施形態において、AAVベクターはAAV血清型9（AAV<sub>9</sub>）を含む。

【0006】

他の実施形態において、遺伝子編集剤は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat（CRISPR）関連エンドヌクレアーゼ、またはそのホモログ（homologue）もしくはオルソログ（ortholog）である。一実施形態において、CRISPR関連エンドヌクレアーゼは、Cas9またはそのホモログもしくはオルソログである。

10

【0007】

他の実施形態において、gRNAは、レトロウイルス遺伝子配列の長い末端反復（LTR）、群に特異的な抗原（group-specific antigen）、またはそれらの組合せに相補的である。本発明の一実施形態において、標的配列はヒト免疫不全ウイルスの長い末端反復（LTR）内の配列を含む。好ましくは、ヒト免疫不全ウイルスの長い末端反復内の配列は、U3、R、またはU5領域内の配列を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、群に特異的な抗原は、ヒト免疫不全ウイルスコードおよび/または非コード核酸配列を含む。一実施形態において、群に特異的な抗原は、gag、pol、env、tat、rev、nef、vpr、vif、vpu、tev、またはそれらの断片を含む少なくとも1つのヒト免疫不全ウイルス核酸配列を含む。

20

【0009】

一実施形態において、組成物は、トランス活性化小RNA（tracrRNA）をコードする配列をさらに含む。一実施形態において、トランス活性化小RNA（tracrRNA）配列は、ガイドRNAをコードする配列と融合する。他の実施形態において、組成物は、核局在シグナルをコードする配列を含む。

【0010】

さらに別の実施形態は、遺伝子編集剤と、少なくとも1つのガイドRNA（gRNA）とをコードする単離核酸を含む発現ベクターであって、当該gRNAが、レトロウイルス遺伝子配列の標的核酸配列、群に特異的な抗原の標的核酸配列、またはそれらの組合せに相補的である。

30

【0011】

さらに別の実施形態において、単離核酸配列は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat（CRISPR）関連エンドヌクレアーゼ；プロウイルスDNAの第1標的プロトスペーサー配列に相補的である第1スペーサー配列を有する第1ガイドRNA（gRNA）；当該プロウイルスDNAの第2標的プロトスペーサー配列に相補的である第2スペーサー配列を有する第2gRNAを含み、当該第1標的プロトスペーサー配列および当該第2標的プロトスペーサー配列は当該プロウイルスDNAの長い末端反復（LTR）に位置する。いくつかの実施形態において、単離核酸配列は、複数の標的配列を標的とし、当該2つ以上の標的配列間の介在ウイルス配列を切除する。

40

【0012】

さらに別の実施形態は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat（CRISPR）関連エンドヌクレアーゼ；プロウイルスDNAの第1標的プロトスペーサー配列に相補的である第1スペーサー配列を有する第1ガイドRNA（gRNA）をコードする単離核酸配列；当該プロウイルスDNAの第2標的プロトスペーサー配列に相補的である第2スペーサー配列を有する第2gRNAをコードする単離核酸配列を含む、単離核酸配列をコードする発現ベクターであって、当該第1標的プロトスペーサー配列および当該第2標的プロトスペーサー配列は当該プロウイルスDNAの長い末端反復（LTR）に位置する。

【0013】

50

さらに別の実施形態は、対象のレトロウイルスを不活性化する方法であって、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) 関連エンドヌクレアーゼまたはそのホモログと、1つ以上のガイドRNAとをコードする発現ベクターを含む組成物を、上記対象に投与する工程を含み、当該ガイドRNAは当該レトロウイルスの標的核酸配列に相補的である。

#### 【0014】

さらに別の実施形態は、ヒト免疫不全ウイルス感染を患う対象を処置する、またはヒト免疫不全ウイルス感染のリスクがある対象のヒト免疫不全ウイルス感染のリスクを低減する方法であって、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) 関連エンドヌクレアーゼまたはそのホモログと、1つ以上のガイドRNAとをコードする発現ベクターとを含む組成物を治療上有効な量、当該対象に投与する工程を含み、当該ガイドRNAはレトロウイルスの標的核酸配列に相補的である。

#### 【0015】

本発明の他の態様は以下に示す。

#### 〔図面の簡単な説明〕

図1Aおよび1Bは、rAAVg:saCas9/gRNA Tg26 MEFによるHIV-1 DNAの切除を示す。図1Aは、Tg26動物を開発する導入遺伝子を作成するために除去された、GagおよびPol遺伝子間(3100bp)の位置を強調したHIV-1の模式図である。gRNA LTR1およびGagDの位置、ならびにそれらのヌクレオチドの組成を示す。赤字はPAM配列を示す。左上の図は、切除前後の予測される増幅産物と共に、PCR(P1とP2)およびネステッドPCR(P1'とP2')で使用したプライマーの位置を示す。図1Bは、Tg26由来MEFの図と、rAAVg:Cas9/gRNAの量の増加に伴う、処置後のHIV-1 DNAのPCR増幅のゲル分析の結果を示す。全長(1323bp)および短縮型(truncated)(345bp)のPCR産物の位置を示す。

#### 【0016】

図2A~2Dは、Tgマウスの様々な組織における、rAAVg:saCas9/gRNAによるインピボにおけるHIV-1 DNAの切除を示す。図2Aは、rAAVg:Cas9/gRNAの接種に使用した手順、および分析に使用した臓器の模式図である。図2Bは、rAAVgを有するTg26マウス系統およびrAAVgを有さないTg26マウス系統から得られたDNAのPCRの結果であり、rAAVg処置サンプル(左)において1323bpおよび短縮型345bpの位置を示す。345bpのフラグメントを検出するためのプライマーP1/P2と、160bpのフラグメントを検出するためのネステッドプライマーP1'/P2'を使用したPCR産物のゲル解析を示す。全長PCR産物を矢印で示す(中央)。MEF DNAの二重プライマーPCR増幅の結果は、予測される2つの短縮型HIV-1 DNAフラグメントを示す。全長増幅産物(矢印)および非特異的バンド(アスタリスク)の位置を示す。コントロール(Cont.)は、プライマー非存在下でのPCR反応物を示す(右)。図2Cは、パネルB(中央および右パネル)に示す160bpのDNAフラグメントのシーケンシングの結果を示す。プライマーならびにgRNA LTR1およびGagDの位置を示す。図2Dは、さまざまな組織(レーン1および2)およびMEFのDNAのPCR増幅結果を示し、rAAVg:saCas9/gRNAを接種していない動物において、160bpの短縮型DNAフラグメントは存在せず、rAAVg:saCas9/gRNAを与えた動物および細胞においてこのバンドが検出されたことを示した。

#### 【0017】

図3A、3Bは、rAAV9:saCas9/gRNA接種後のラット血液細胞の組み込まれたHIV-1 DNAのセグメントの除去、およびウイルスRNAの発現を示す。(図3A)コントロール(未処置)および実験(rAAV9:saCas9/gRNAで処置)ラットの循環リンパ球の全DNAを調製し、5'-LTRおよびGag遺伝子由来のプライマーセット(材料および方法を参照)を使用してPCR増幅に使用した。ゲル電気泳動後、~198bpの短いDNAフラグメントが処置サンプルで検出されたが、未処置サンプルでは検出されず、該フラグメントを次に精製し、TAベクターにクローニングした。いくつかのクローンをDNA

シーケンシング用に選択した。各動物から得られた4つの典型的なDNA配列(C1~C4)を、HIV-1 pNL4-1配列の参照LTR-Gag領域とアライメント(alignment)した。LTR1およびGagD標的配列の位置およびヌクレオチド組成を緑色、PAMを赤色、ならびにPCRに使用したLTR特異的プライマーを青色で示す。(図3B)コントロール(未処置)およびrAAV9:saCas9/gRNAで10日間処置した、トランスジェニックラットの循環リンパ球およびリンパ節から調製した全RNAを調製し、Gag RNAおよびEnv RNAを検出するための定量RT-PCRに使用した。各アッセイにおける-アクチンの発現量を測定し、その値をウイルスRNA発現における定量の参照として使用した。

#### 【0018】

図4A~4Eは、saCas9/sgRNAはHIV-1ゲノムを効率的に切除し、HIV-1ルシフェラーゼレポーター発現を抑制することを示す。図4A: sgRNA標的部位(赤矢印)およびPCRプライマー(黒矢印)の位置を示す。図4B、4C: EcoHIV-eLucレポーターアッセイを使用した、saCas9/sgRNAシステムおよびspCas9/sgRNAシステム間の効率の比較(図4B)と、ダイレクトPCRジェノタイピング(direct PCR genotyping)(図4C)を示す。矢印は、LTR1およびLTR3標的部位における典型的なフラグメントの欠失および追加の挿入を示しており、TACクローニングおよびサンガーシーケンシングで確認した(図4C)。図4Dおよび4E: ウイルス構造sgRNAと組み合わせた3つのLTR sgRNAは、ONE-GLOルシフェラーゼアッセイによるEcoHIV-eLuc活性を強力に阻害し(図4D)、図に示すプライマーでのダイレクトPCRジェノタイピングによるフラグメントの欠失/挿入を誘導した(図4E)。赤枠の典型的なフラグメント欠失はサンガーシーケンシングによって確認した。96ウェルプレートの6ウェル中のHEK293T細胞に、pNL4-3-EcoHIVホタルルシフェラーゼレポーター(10 ng/ウェル)、pCMV-ウミシイタケルシフェラーゼレポーター(2 ng/ウェル)および以下に示すCas9/sgRNA発現ベクターをコトランスフェクション: spCas9システム(図4B)についてはpLV-EF1a-spCas9-T2A-RFP(80 ng/ウェル)および図示する(indicated) sgRNA発現ベクター(組合せsgRNAに対して各60 ng/ウェル); SaCas9システム(図4B、4D)についてはpX601-saCas9/LTR sgRNA発現ベクター(図示する対に対して各100 ng/ウェル)。48時間後、細胞溶解物中のホタルルシフェラーゼ活性を、ONE-GLO(商標)ルシフェラーゼアッセイシステムで測定した。また、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を、ウミシイタケルシフェラーゼアッセイシステムを用いて測定した。データは、対応する空pX601ベクターと比較した、ウミシイタケルシフェラーゼ標準化後のホタルルシフェラーゼにおける、4つの独立したトランスフェクションでの割合変化の平均±SDを示す。トランスフェクションした細胞の2ウェルはさらに、ダイレクトPCRジェノタイピングに使用した(図4C、4E)。同様の実験を2~3回繰り返した。

#### 【0019】

図5A~5Jは、オールインワン(all-in-one)AAVベクターにおける多重(multiplex)sgRNAの有効性を示す。図5A、5B: 二重(duplex)sgRNA/saCas9は、EcoHIV-eLuc活性の強力な抑制(図5A)、およびHIV-1ゲノムの切除(図5B)を示した。割合は、野生型バンドと比較した、フラグメント欠失バンドの濃度を示す(図5B)。図5C~5J: 四重(quadruplex)sgRNA/saCas9は、EcoHIV-eLuc活性の強力な抑制(図5C)、および5'-LTR1/LTR3とGagD(図5D、5E)またはGagD/Po1Bと3'-LTR(図5F~5J)の両方で、高い切除効率を示した。プライマーT361/T458(図5D)は、5'-LTR1/LTR3とGagD(黒矢印)間のフラグメント欠失を検出し、さらなる挿入物が二重および四重の群(赤矢印)の両方で観察された。T710/T458は、5'-LTR3およびGagD間の欠失を検出した(図5E)。GagDまたはPo1Bと、3'-LTR1/LTR3との間の欠失は、プライマーT758/T363(図5F)およびT

10

20

30

40

50

689 / T363 (図5G)によって、それぞれ検出された。プライマー対T689 / T711は、PolBおよび3' - LTR1間の欠失を検出した(図5H)。ゲノムDNAをSaCas9および - アクチンで標準化した(図5J)。96ウェルプレート中のHEK293T細胞に、EcoHIV - eLucレポーターと、2つの独立した一重(monoplex)sgRNAを発現しているベクター(各100ng)、1つの二重sgRNAが発現しているベクター(100ng)およびsgRNAコントロール群(200ng、図5A、5B)と等量にするための空pX601ベクター(100ng)、または、1つの二重/四重sgRNAが発現しているベクターおよびsgRNAコントロール(各100ng、図5C~5J)をコトランスフェクションした。48時間後、ONE-Gloルシフェラーゼアッセイ(図5A、5C)を図4A~4Eに示すように行い、ダイレクトPCRジェノタイピングを図示するプライマー対を用いて行った(図5B、5D~5J)。

10

#### 【0020】

図6A~6Gは、多重sgRNA / saCas9発現ベクターのAAV-DJ媒介送達によって、Tg26トランスジェニックマウスの神経幹細胞(NSC)におけるHIV-1組込みゲノムを効率的に切除することを示す。10の機能的MOI(fMOI)による感染後20日目のNSCにおける、一重(図6A)、二重(図6B)および四重(図6C)の類似の感染効率を示す。感染細胞を、抗HAタグ抗体を用いた免疫蛍光細胞化学によって測定した。図6D~6F:ダイレクトPCR分析によって、導入遺伝子saCas9(図6D)およびLTR1 / GagD(図6E)の用量依存的送達、および5' - LTR / GagDとGagD / 3' - LTR(図6F)の感染後2日目の切除を確認した。(図6G)四重sgRNA / saCas9は、10fMOIによる感染後20日目において、二重sgRNA / saCas9よりもより強い切除効率を示した。プライマーT361 / T458は、5' - LTR1 / LTR3およびGagD間の欠失を検出し、プライマーT758 / T645は、GagDおよび3' - LTR1 / LTR3間の欠失を検出した(図6F、6G)。GAPDHはゲノムDNAの標準化のために使用した。コントロールである882AAV-DJウイルスは、非機能コントロールとして使用した。

20

#### 【0021】

図7A~7Gは、四重sgRNA / saCas9 AAV-DJ / 8が、Tg26トランスジェニックマウスの多くの器官/組織において、HIV-1プロウイルスDNA切除(図7A~7C)およびHIV-1 RNA転写の強力な減少(d-g)を誘導したことを示す。図7A、7B: Tg26マウスに、尾静脈を通じて、精製AAV-DJ / 8ウイルスを注入した( $1.535 \times 10^{12}$  GC / マウス)。注入してから2週間後、マウスを犠牲にし、ゲノムDNA抽出およびPCRジェノタイピングのために組織を回収した。ポジティブコントロールは、AAV-saCas9 / sgRNA (LTR1+GagD)ベクターをトランスフェクションしたHEK293T細胞において、EcoHIV - eLucレポーターの切除を示した。ネガティブコントロールは、モックAAVウイルスを注入したマウスを示した。図7C: 最初の注入から2週目にAAV-DJ / 8をさらに注入し、2週間後に図示するプライマーによるPCRジェノタイピングのために組織サンプルを回収した。典型的な欠失フラグメント(赤枠)を、TAKローニングおよびサンダーシーケンシングによって確認した(図16Aおよび16Bを参照されたい)。図7D: HIV転写物に対するRT-qPCRプライマー対の位置を示す模式図。図7E~7G: モックAAVウイルスを注入したコントロールマウスと比較した、sgRNA / saCas9処置マウスにおけるHIV-1 RNA転写物の量の強力な減少( $p < 0.001$ )を示すRT-qPCR分析。データは、ハウスキーピング遺伝子Ppiaによる標準化後の、3連の試験における平均±標準偏差を示す。

30

40

#### 【0022】

図8A~8Dは、インビボにおいて四重sgRNA / saCas9 AAV-DJ / 8がEcoHIV - eLucの切除を誘導したことを示す、生物発光イメージング分析である。図8A: EcoHIV - eLuc接種後すぐに、同じ注入部位に、各マウス( $n = 3$ )の右眼の血洞に眼窩後方注入によって、AAV-DJ / 8を投与した。EcoHIV接

50

種してから6、9、12、および19日目におけるマウスの典型的な生物発光イメージングを示した。すべてのイメージについて輝度（光子/秒/ $\text{Sr}^2$ ）を測定し、公正な比較による同じレインボースケールで疑似カラー化した。図8B：全光束の生物発光を、EcoHIV-eLucを接種してから各図示する日における、各群（19日目（ $n=2$ ）まで $n=3$ /群）の全身から測定した。図8C：各マウスのEcoHIV-eLuc感染細胞からの生物発光出力を、比較のため右眼に定義した関心領域（ROI）から測定した。データは、平均 $\pm$ 標準偏差であり、各比較における「\*」は統計的に有意であることを示す（ $p<0.05$ 、スチューデント片側t検定）。図8D：各マウス（19日目（ $n=2$ ）まで $n=3$ /群）の首リンパ節からの生物発光出力を、HIV切除における長期的なsaCas9/gRNA処置の有効性との比較のために用いた（p値は、線形混合効果モデルを使用した二面性（two-sided）である）。

10

#### 【0023】

図9A~9Iは、PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器/組織において、四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8による、遺伝子導入およびEcoHIV-eLucの切除効率を確認したことを示す。図9A~9C：四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8（上パネル）または空コントロールAAV-Cre-DJ/8（下パネル）による感染後19日目について、図示する組織/臓器における、saCas9（図9A）、GagD（図9B）およびLTR-1（図9C）に関する遺伝子導入の様々な程度（various extent）。図9D~9F：ネガティブコントロール（下パネル）と比較した、各図示する組織/臓器（上パネル）における、GagDと3'-LTR間のEcoHIV DNA切除の様々な程度を示す従来のPCRジェノタイピング。図9G~9I：B1M1（図9G）、B1M2（図9H）およびB1M3（図9I）から選択された異なる組織/臓器における3つの図示するフラグメントの切除タイプの定量PCR分析。データは3連における反応の平均 $\pm$ SDを示し、同じ組織/臓器におけるEcoHIV DNAの内部未切断（非標的）領域と比較した相対量として示した。BxMxは、枠およびマウスの番号を示す。

20

#### 【0024】

図10A~10Fは、AAV処置後2週目（図10A~10C）、3週目（図10D）および4週目（図10E、10F）において、HIVNL-BaL-eLucを接種したヒト化BLTマウスにおける、四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8によるHIVプロウイルスDNAの切除を示す。プライマー対T361/T458（5'-LTR/Gag増幅用）を使用した従来のPCR（35サイクル）を、HIVプロウイルスDNAの存在を検出するために使用し、saCas9/sgRNA処置なしのB6M3ネガティブコントロールの肺組織において、弱い野生型バンド（1.4kb）を示した（図10C）。1回目のPCR（プライマー対T361/T458による22サイクル）からのテンプレートによる、プライマー対T361/T946（5'-LTR/Gag用）を使用したネステッドPCR（35サイクル）は、すべてではないが、各BLTマウスの多くの臓器/組織においてHIV-1プロウイルスDNAの野生型DNAフラグメント（1.13kb）を特定した（図10A~10F）。また、saCas9/sgRNAで処置したHIV感染BLTマウスの心臓、結腸および膣においてHIV-1切除に起因するフラグメント欠失のPCR産生物も特定した（図10A）。1回目のPCR（25サイクル、T758/T425）からのテンプレートを使用した、プライマー対T758/T363（Gag/3'-LTR用）によるネステッドPCRは、saCas9/sgRNA処置BLTマウスの臓器/組織においてフラグメント欠失バンドを特定したが（図10A、10B、10D、10E）、未処置BLTマウスでは特定されなかった（図10C、10F）。フラグメント欠失バンドは赤枠で示したsaCas9編集に起因し、TAクローニングおよびサンガーシーケンシングで確認を行った（図20A、20B、21Aおよび21Bを参照されたい）。BxMxは、枠およびマウスの番号を示す。ポジティブコントロールは、AAV-saCas9/sgRNA (LTR1+GagD)ベクターをトランスフェクションしたHEK293T細胞におけるEcoHIV-eLucレポーターの切除を示した。

30

40

50



## 【0025】

図11A～11Cは、T Aクローニングおよびサンガーシーケンシング分析を使用した、E c o H I V - e L u c ゲノムの予測されるフラグメント欠失の確認を示す。図11A：s g R N A 標的部およびP C R プライマー位置の模式図。図11B：L T R 1 およびG a g D におけるP A M ( 赤字 ) から3つ目のヌクレオチドにおける正確な切断後の984のヌクレオチド欠失の比較分析。図11C：L T R 1 およびG a g D 間の編集 / 再ライゲーション部位を示す、典型的なサンガー配列トレーシング ( tracing ) 。

## 【0026】

図12Aおよび12Bは、H E K 2 9 3 T 細胞において多重s g R N A およびs a C a s 9 を保有するA A V - D J の機能的力価を示す。図12A：一重 ( プラスミド822 ) 、二重 ( プラスミド924および938 ) および四重 ( プラスミド962 ) のs g R N A / s a C a s 9 A A V - D J に対するゲノムおよび機能的力価のまとめである。図12B：96ウェルプレートに播いたH E K 2 9 3 T 細胞について、0 . 1  $\mu$  L のA A V - D J ウイルス感染してから2日目における、抗H A 抗体による免疫蛍光染色の典型的な画像。各3つのウェルの陽性細胞を数え、機能的力価は1 m L 当たりの導入ユニット ( T U ) として計算した。ゲノム力価は、標準サンプルのコピー数を使用した定量P C R 分析によって、1 m L のウイルスサンプル ( G C / m L ) 中のウイルスゲノムコピー数によって決定した。

## 【0027】

図13A～13Eは、二重または四重s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J で感染させたT g 2 6 トランスジェニックマウスの異なる臓器 / 組織において、導入遺伝子発現およびH I V - 1 ゲノム切除について同様の効率を示す。図13A、13B：感染してから1週間後の尾静脈からA A V - D J ウイルス ( 1 0 0  $\mu$  L のP B S 中全量で4 . 1 5 ~ 4 . 2 0  $\times 10^{12}$  G C / マウス ) を静脈内注入したT g 2 6 マウス ( 図13A ) および最初の注入から1週間後にさらに注入したマウスの肝臓および脾臓における、s a C a s 9 のA A V 送達の高効率および典型的なs g R N A L T R - 1 発現カセット。組織サンプルは、最初の注入から1週間後 ( 図13A ) および2週間後 ( 図13B ) に回収した。図13C、図13D：ネステッドP C R 分析によって、肝臓、心臓、骨髄および脾臓においてフラグメント欠失を特定した。典型的な欠失フラグメント ( 赤枠 ) はT Aクローニングおよびサンガーシーケンシングによって確認した ( 図13E ) 。

## 【0028】

図14A～14Cは、四重s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J / 8 が、効率的な導入遺伝子の導入を誘導し ( 図14A、14B ) 、R T - q P C R 分析によって、H I V T g 2 6 トランスジェニックマウスの様々な臓器 / 組織のT a t 転写を確認した。T g 2 6 マウスに、2週間に1回 ( 図14A ) または別々に2回 ( 図14B ) 、精製A A V - D J / 8 ウイルス ( 1 . 5 3 5  $\times 10^{12}$  G C / マウス ) を尾静脈から注入した。最後の注入から2週間後に、マウスを犠牲にし、ゲノムDNA抽出、ならびに図示するs g R N A およびs a C a s 9 をコードするc D N A に対するP C R ジェノタイピングのために組織を回収した。図14C：T a t 転写に対する、相対的なC t 値を示す典型的な増幅曲線である。

## 【0029】

図15Aおよび15Bは、四重s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J / 8 を静脈内注入してから2週間後 ( 図15A ) および4週間後 ( 図15B ) での、T g 2 6 マウスの臓器 / 組織におけるs a C a s 9 タンパク質の発現を示す。図示する臓器 / 組織の全R N A は、RNeasy Mini kit によって抽出し、残留するゲノムDNAをRNase-Free DNase S et によるインカラムD N a s e 消化によって除去した。全R N A から逆転写 ( R T ) させたc D N A のリアルタイムP C R 分析は、肝臓および肺に主に局在する、導入遺伝子であるs a C a s 9 の発現を測定するために使用した。N o R T はゲノムDNAコンタミネーションに対するネガティブコントロールとして使用した。テンプレートなしはP C R コントロールとして使用した。組織凍結切片の典型的な顕微鏡写真は、ウサギ抗H A タグ抗

10

20

30

40

50

体（赤色）で免疫染色し、ファロイジン（緑色）で処理し、肝臓および肺において s a C a s 9 タンパク質の発現を示す。ネガティブコントロールでは二次抗体のみ使用した。白矢印は、核において s a C a s 9 様免疫反応の存在を示す。スケールバー = 10 μm。

#### 【0030】

図16Aおよび16Bは、四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 を静脈内投与してから2週間後での、T g 2 6 トランスジェニックマウスの脳（図16A）および肝臓（図16B）における、H I V - 1 ゲノムの G a g D から 3' - L T R 1 のフラグメント欠失の確認を示す。P A M（赤字で強調されている）の3番目のヌクレオチドでの切断後の、予測される欠失である 4992 b p のフラグメントは、T A クローニングにおける P C R 産生物の多くの細菌クローンで観察され、いくつかのクローンにおいて小さな挿入または欠失があった。典型的なサンガー配列トレーシングは、G a g D および 3' - L T R 1 間の切断/再ライゲーション部位（赤矢印）を示す。

#### 【0031】

図17A～17Fは、T 7 E 1 ミスマッチ切断アッセイの結果を示し、四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 の静脈内への単回注入を行った T g 2 6 マウスの肝臓組織においてオフターゲット効果がなかったことを示す。L T R 1（図17A、17B）、L T R 3（図17C、17D）および G a g D（図17E、17F）で予測される、最も可能性があるオフターゲット部位の典型を、s g R N A / s a C a s 9 処置してから4週間後における、T g 2 6 マウスの肝臓組織から抽出したゲノムDNAから増幅された P C R 産生物を使用した、T 7 E 1 ミスマッチ切断アッセイによって調査した。オンターゲット P C R 産生物は、ポジティブコントロールとして使用した。矢印は、L T R 1 に対するプライマー対 T 3 6 1 / T 3 6 3（図17A）、L T R 3 に対するプライマー対 T 3 6 1 / T 4 5 8（図17C）、および G a g D（図17E）によって生成されたポジティブコントロール P C R 産生物に関する、I n D e l 変異パターンを示す。図17B、17D、17F：マウスゲノムDNAにおいて予測される、オフターゲットの可能性のある部位を包含する、P C R 産生物の典型的な配列。P A M 配列を赤字で強調し、P C R プライマーを緑字で強調する。

#### 【0032】

図18A～18Cは、N C r ノードマウスの心臓および肺組織における四重 s g R N A / s a C a s 9 による E c o H I V - e L u c の切除を示す。マウスの右眼に眼窩後方注入によって E c o H I V - e L u c を投与し、同じ注入経路で四重 s g R N A / s a C a s 9 を保有する A A V - D J 8 をさらに注入した。注入してから2週間後にマウスを犠牲にした。図18A：プライマー T 7 5 8 / T 3 6 3 による P C R ジェノタイプリングは、G a g D および 3' - L T R 1 間に欠失を有する、予測されるフラグメントを増幅した。T A クローニングおよびサンガーシーケンシングのために、赤枠で示される、心臓および肺の欠失フラグメントをゲルから抽出した。図18B、18C：G a g D および 3' - L T R 1 間の予測される切断/再ライゲーション部位（赤矢印）を示す典型的なサンガー配列。欠失は、心臓（図18B）および肺（図18C）において、P A M（赤字で強調されている）から3つ目のヌクレオチドで正確に起こった。

#### 【0033】

図19は、H I V 切除効率を検出する q P C R 戦略を示す。表は、未切断（uncut）、切断（cut）および内在 E c o H I V DNA 量を示すためのすべての q P C R プライマー対を示し、模式図はすべてのプライマーの位置を示す。

#### 【0034】

図20A、20Bは、s a C a s 9 / s g R N A ゲノム編集後のヒト化 B L T マウスの臓器/組織における、5' - L T R 1 および G a g D 部位間の H I V - 1 プロウイルス DNA のフラグメント欠失の確認を示す。図20A：予測される切断部位間に挿入されるジャンクション配列および予測されない配列の模式図。プライマー T 3 6 1 / T 9 4 6（プライマー T 3 6 1 / T 4 5 8 による1回目の P C R からのテンプレート）を使用したネステッド P C R 産生物を T A クローニングのためにゲルから抽出し、各サンプルから2～5の

クローンをシーケンシングした。PAMから3番目のヌクレオチドにおける正確な切断部位（赤字で強調される）をはさみで示している。5' - LTR1およびGagD間の予測される欠失、および様々な追加の挿入（緑色）または欠失（黒点線）を特定した。青色およびピンク色の立体棒（solid bar）は、切断して残留する配列を示す。フラグメントの上の数は、ヌクレオチド部位の開始点および終点を示す。星印を有するTAクローンは、詳細な配列およびトレーシングを示すために選択する。図20B：クローンB5M3 - 心臓 - 1の典型的なサンガー配列トレーシングは、5' - LTR1およびGagD間の、切断/再ライゲーション部位（矢印で示す）を示す。5' - LTR1およびGagD間の結合配列（conjunctive sequence）をそれぞれ、オレンジ色および緑色で示す。プライマーT361およびT946配列をそれぞれ、青色および黄色で示す。

10

【0035】

図21Aおよび21Bは、ゲノム編集後のヒト化BLTマウスの臓器/組織における、GagDおよび3' - LTR1部位間のHIV - 1ゲノムのフラグメント欠失の確認を示す。図21A：プライマーT758 / T458による1回目のPCR増幅後、プライマーT758 / T363を用いたネステッドPCR産生物。PAM配列を赤字で強調する。はさみは、PAMから3番目のヌクレオチドにおける正確な切断部位を示す。GagDおよび3' - LTR1間の予測される欠失を、緑色で強調した、さらなる欠失または予測されない挿入物と共に示している。黒点線は、欠失部分を示す。青色およびピンク色の立体棒は、切断部位の位置を示す。フラグメントの上の数は、ヌクレオチド部位の開始点および終点を示す。星印を有するTAクローンは、詳細な配列を示すために選択する。図10Bにおいて緑色の矢印で示すマウスB5M3の胸腺組織（hThymus）の短いフラグメントは、シーケンシングによって非特異的であると特定された一方、上側のバンドは切断して残留する配列であった。図21B：矢印によって示される、GagDおよび3' - LTR1間の、切断/再ライゲーション部位を示すクローンB5M3 - 胸腺 - 1の典型的なサンガー配列トレーシング。欠失後結合した、GagDおよび3' - LTR1の切断配列を、それぞれ紫色および青色で強調している。プライマーT758およびT363配列をそれぞれ赤色および黄色で強調している。

20

【0036】

図22および22Bは、HIVNL - BaL - eLucおよびEcoHIV - eLucの模式図である。図22A：病原に関する完全なHIV - 1 Nefの発現および早期HIV感染を保持するために、P2Aペプチド、上流および下流の遺伝子間を切断し得る自己切断ペプチド、および5' Nef部分を各レポーターの3'末端に枠内（in frame）でクローニングした。2Aペプチドの切断部位は、正確でありかつよく定義されており、このような場合、NefのN末端における1つの追加のアミノ酸でさえ予測された。図22B：EcoHIV - eLucにおいて、HIV gp120はエコトロピックマウス白血病ウイルスのgp80に置換し、ヒト細胞よりもマウス細胞のみに感染する。

30

〔発明を実施するための形態〕

遺伝子編集技術は、特にHIV - 1ゲノムを標的とし、プロウイルスDNAが組み込まれたコピーを切除するためのRNA - 誘導Cas9（CRISPR / Cas9として知られている）に基づいて発展してきた。特異的ガイドRNA（gRNA）の作成の標的として機能し、単一または多重（multiplex）Cas9 / gRNA複合体によってその標的配列を編集する、HIV - 1の長い末端反復（LTR）に属するU3領域を含むいくつかの特異配列が同定された。この戦略によって、潜在感染CD4<sup>+</sup>T細胞および単核の食細胞（単核白血球、マクロファージ、ミクログリア、および樹枝状細胞）におけるウイルス複製の完全な切除が可能になる（Hu W, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2014; 111:11461-11466; Khalili K, et al. J Neurovirol 2015; 21:310-321、当該文献は参照によって本明細書に援用される）。CRISPR / Cas9は遺伝毒性作用をもたない、または、ホストゲノムのオフターゲット編集を行わない。さらに、プロウイルスゲノムの組込みにおける、HIV - 1のLTRの5'末端と3'末端との間の9709bpのDNA断片を正確に切除するという、この技術能力を初めて示した。多重gRNAおよびCas9

40

50

の存在もまた、後のHIV-1感染から保護し、ヒトの疾患における細胞モデルに首尾よく用いられた (Ebina H, et al. Sci Rep 2013; 3:2510; Liao HK, et al. Nat Commun 2015; 6:6413; Zhu W, et al. Retrovirology 2015; 12:22)。

【0037】

しかし、重要な課題は、ウイルスDNAを保有する (harbor) 組織および細胞への機能的なCRISPR/Cas9をインビボ送達することに関する。近年、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) は、遺伝子損失または変異によるヒトの疾患を治療するための遺伝子送達システムのような、より多くの注意を捉えてきた (Mittermeyer G, et al. Hum Gene Ther 2012; 23:377-381)。AAV送達の機構の利点には、その低い毒性、および1回の投与の後12ヶ月に及ぶ持続的な遺伝子発現が含まれる (Boudreau RL, et al. Hum Mol Genet 2011; 20:R21-R27; Naldini L. Nature 2015; 526:351-360)。AAV送達システムによって標的とされる最も一般的な疾患には、がん、心不全、神経樹状突起疾患、関節炎、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症およびキャナヴァン病に含まれるその他の疾患が含まれる (Bennett J, et al. Sci Transl Med. 2012; 4:120ra15; Janson C, et al. Hum Gene Ther 2002; 13:1391-1412)。

10

【0038】

本発明は、インビボマウスモデルにおいて組込みHIVゲノムの部分の切除を産出する組成物および方法を初めて提供する。特に、本発明は、AAV系Cas9/gRNA遺伝子編集送達システムを含む。

【0039】

よって、本発明の実施形態は、例えば、潜在感染ヒト細胞および動物疾患モデルによってヒト免疫不全ウイルス (HIV) のようなレトロウイルスDNAが組み込まれた配列を切除するために開発された、CRISPR/Cas9遺伝子編集システムの効率の良いインビボ細胞内送達のための組成物に関する。組込みプロウイルスDNAを編集するおよびウイルスを削除する方法は、CRISPR/Cas9システムの組成物の投与を含む。

20

【0040】

本明細書に記載の全ての遺伝子、遺伝子の名称、および遺伝子産物は、本明細書に記載の組成物および方法が適用可能な任意の種に由来する相同体に対応することが、意図される。特定の種に由来する遺伝子または遺伝子産物が開示される場合、本開示はただの例示を意図しているに過ぎず、文脈から明示されていると取れる場合を除き、限定と解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、例えば、本明細書に記載の遺伝子または遺伝子産物に関しては、他の種に由来する、相同および/またはオーソログな遺伝子および遺伝子産物を包含することを意図している。

30

【0041】

以下の好ましい実施形態の説明は、事実上の例に過ぎず、発明、その用途および利用を限定することを意図するものではない。本発明の実施形態は、論理的に提示された側面を除き、実施可能である。さらに、理論的な側面は、出願人が、提示された理論を超えずに得た理解が提示されている。

【0042】

数多くの特定の詳細、関係性および方法が、本発明の全体的な理解を提供するために述べられていることは理解されるべきである。しかし、関連性のある分野の当業者は、発明が、1つ以上の特有の詳細を伴わないか、他の方法を伴って実践できることを難なく認識するだろう。いくつかの作用が、その他の作用または事象を伴って、異なる順でおよび/または同時に発生し得るように、本発明は、作用または事象における順序の説明によって制限されない。さらに、全ての説明されたアクションまたは事象は、本発明の方法の実施が要求されない。

40

【0043】

別の方法で定義されない限り、本明細書で用いられる全ての用語 (専門および科学的用語を含む) は、この発明に属する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を持つ。一般的に使用される辞書に定義されるようなこれらの用語は、関連する分野における

50

文脈に整合する意味を持つとして解釈され、特に本明細書でそのように定義しない限り、理想化した、または過度に形式的な意味に解釈されないことは、さらに理解されることである。

【 0 0 4 4 】

( 定義 )

本明細書において使用する用語は、特定の実施形態を説明するという目的でのみ使用され、本発明を限定する意図は無いということも理解されたい。

【 0 0 4 5 】

本明細書で用いられるように、単数形の"a"、"an"および"the"は、文脈において明確に別な方法で示していない限り、単数形と同様に複数形をも含むことを意図している。また、用語「含んでいる (including)」、「含む (includes)」、「有している (having)」、「有する (has)」、「共に (with)」、またはそれらの異形が、詳細な説明および/または請求項にて使用される範囲において、そのような用語は、「備えている (comprising)」という用語と同様に、包括的であることを意図している。

【 0 0 4 6 】

本明細書に使用されるとき、用語「備えている (comprising)」または「備える (comprise)」または「備えられた (comprised)」およびそれらの変形は、関連する事項、組成、装置、方法、プロセス、システム、などの定義または記載された要素が、包括的またはオープンエンドであることを意味する。これらには追加の要素も認められるので、定義されたまたは記載された事項、組成、装置、方法、プロセス、システム、などは、その特定された要素 (または、適宜、その同等物) を含み、他の要素が含まれてもよいことを示す。また、他の要素が含まれても、依然として、定義された事項、組成、装置、方法、プロセス、システム、などの範囲/定義にも該当することを示す。

【 0 0 4 7 】

用語「約 (about)」または「およそ (approximately)」は、当業者などによって決定された特定の値が許容できる誤差範囲にあることを意味し、これは、どのように値を測定または決定したか、すなわち測定機器の限界など、によるものである。例えば、「約」は、その分野での習慣によって1または1より大きい標準偏差を意味し得る。あるいは、「約」は、与えられた値または範囲における20%に至るまで、10%に至るまで、5%に至るまで、または1%に至るまでの範囲を意味し得る。または、特に生物学的システムまたはプロセスにおいて、当該用語は、5倍以内のオーダー、および2倍以内のオーダーの値も意味し得る。本願および請求項にて特定の値が記載されている場合、特に断りのない限り、用語「約」は、特定の値にとって許容できる誤差の範囲以内であることを意味するものとする。

【 0 0 4 8 】

本明細書で用いられる用語「剤 (agent)」は、疾患または医療の好ましくない健康状態を予防、改善、または治療することができる任意の分子、化学的単位、組成物、薬剤、治療剤、化学血清療法剤、または生物製剤を含むことを意味する。この用語は小分子化合物、アンチセンス試薬、siRNA試薬、抗体、酵素、ペプチド類有機化合物または無機化合物、天然または化合物等を含む。剤は、臨床試験中、プレトリアル試験中またはFDA認可後のいずれの段階においても本発明の方法に従って分析され得る。

【 0 0 4 9 】

本明細書で用いられる用語「抗ウイルス剤」は、ウイルスの処置に用いられる任意の分子を指し、当該ウイルスと関連する任意の症状を緩和する剤、例えば、抗発熱剤、抗炎症剤、化学療法剤などを含む。抗ウイルス剤としては、抗体、アプタマー、アジュバント、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ケモカイン、サイトカイン、免疫促進剤、免疫調節剤、B細胞調節剤、T細胞調節剤、NK細胞調節剤、抗原提示細胞調節剤、酵素、siRNA、リバピリン、リボザイム、プロテアーゼ阻害剤、ヘリカーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、ヘリカーゼ阻害剤、ノイラミニダーゼ阻害剤、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、プリンヌクレオシド、ケモカイン受容体拮抗薬、インタ

ーロイキン、またはそれらの組合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0050】

ヌクレオシドに関する「アナログ」は、改変された塩基部分および/または改変された糖部分を有する合成ヌクレオシド(例えば、Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, Nucl. Acid. Res., 1997, 25(22), 4429-4443, Toulme, J.J., Nature Biotechnology 19:17-18 (2001); Manoharan M., Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139(1999); Freier S. M., Nucleic Acid Research, 25:4429-4443 (1997)、Uhlman, E., Drug Discovery & Development, 3: 203-213 (2000)、Herdewin P.,

Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310(2000)によって概説的に記載されたもの; 2'-O, 3'-C-linked [3.2.0]bicycloarabinonucleosides (例えば、N.K Christensen., et al., J. Am. Chem. Soc., 120: 5458-5463 (1998)を参照) )を含んでいる。そのようなアナログには、結合特性が向上するように設計された合成ヌクレオシド(例えば、2倍または3倍の安定性や特異性など)が含まれる。

【0051】

本明細書で用いられる用語「抗体」は、ウイルス(例えばHIVウイルス)に結合し、免疫媒介による当該ウイルスの破壊および一掃を助ける1つ以上のウイルス特異的結合領域を含む。抗体またはその断片は、IgA、IgM、IgG、IgE、IgD、またはそれらの組合わせを含む。

【0052】

用語「決定する(determining)」、「測定する(measuring)」、「評価する(evaluating)」、「検出する(detected)」、「評定する(assessing)」、「分析する(assaying)」は、明細書中、いずれの測定の形態をもいうために互換可能に使用され、要素が存在するかしないかを決定することを含む。これらの用語は、定量的および/または定性的な決定の両方を含む。評定することは、相対的または絶対的であり得る。「存在を評定すること」は、そのものが存在するか欠けているかを決定することと同様、存在する量を決定することを含む。

【0053】

本明細書に使用されるとき、「有効量、有効な量(effective amount)」は、治療的または予防的に利益を提供する量を意味する。本明細書で定義するように、「有効」量(すなわち効果的な服用量)の化合物または剤とは、望ましい結果(例えば臨床的に)を生み出すために十分な量を意味する。

【0054】

「コードする(encoding)」とは、ポリヌクレオチド(遺伝子、cDNA、またはmRNAなど)におけるヌクレオチドの特異的配列に固有の性質を指す。上記性質とは、ヌクレオチドの定義された配列(つまり、rRNA、tRNA、およびmRNA)またはアミノ酸の定義された配列のいずれかを有する生物学的プロセスにおいて、他の重合体および高分子の合成用テンプレートとして機能すること、ならびに、これに起因する生物学的性質、である。したがって、遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が、細胞または他の生物学的システム中でタンパク質を産生する場合には、当該遺伝子はタンパク質をコードしていると言える。コーディング鎖(自身のヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通例配列表に記載されている)、および非コーディング鎖(遺伝子またはcDNAの転写用テンプレートとして用いられる)の両方が、その遺伝子またはcDNAの、タンパク質または他の産物をコードしている、とすることができる。「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いに縮重したバージョンの関係にあり、同じアミノ酸配列をコードする、全てのヌクレオチド配列を含む。「タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列」という語は、上記タンパク質をコードするヌクレオチド配列のいくつかのバージョンがイントロンを含みうる程度に、イントロンを含んでもよい。

【0055】

本明細書に使用されるとき、ウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)の「根

10

20

30

40

50

絶 (eradication)」という用語は、当該ウイルスが複製できず、ゲノムが欠失し、断片化され、劣化し、遺伝子的に不活性化され、又は、当該ウイルスから遺伝性を失わせあるいは当該ウイルスが他の任意の細胞又は対象に感染するのを妨げる他の任意の物理的、生物学的、化学的、又は構造的発現が生じ、その結果、当該ウイルスがインビボで一掃されることを意味する。場合によっては、ウイルスゲノムの断片が検出されるかもしれないが、当該ウイルスは複製又は感染などができない。

【0056】

用語「外来性 (exogenous)」は、核酸またはポリペプチドが組換え核酸コンストラクトの一部であるか、もしくは組換え核酸コンストラクトにコードされていること、または、核酸またはポリペプチドがその自然環境にはないことを指す。例えば、外来性の核酸とは、ある種から別の種へ導入される配列 (つまり、異種核酸) であり得る。典型的には、そのような外来性の核酸は、組換え核酸コンストラクトを介して別の種へと導入される。外来性の核酸は、ある生物に固有の配列であって、その生物の細胞に再導入された配列であってもよい。外来性の核酸と結合した非天然配列 (例えば、組換え核酸コンストラクトにおいて、ネイティブ配列に隣接する非ネイティブ制御配列) の存在により、ネイティブ配列を含む外来性の核酸は、しばしば天然に存在する配列と区別されることがある。さらに、安定して形質転換された外来性の核酸は、一般的に、ネイティブ配列の位置とは別の位置に組み込まれる。

【0057】

用語「発現 (expression)」は、本明細書に使用されるとき、特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳 (そのプロモーターによって駆動される)、として定義される。

【0058】

「発現ベクター」とは、組換えポリヌクレオチド (発現すべきヌクレオチド配列と操作的に結合している、発現調節配列を有する) を含むベクターを指す。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用要素を含む。発現のための他の要素は、宿主細胞によって供給されてもよいし、または、インビトロ発現システム中に存在してもよい。発現ベクターは当該技術分野で知られているあらゆるものを含む。その例としては、組換えポリヌクレオチドが組み込まれた、コスミド、プラスミド (例えば、そのままの、またはリボソームに格納された)、およびウイルス (例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス) などが挙げられる。

【0059】

用語「免疫調製」、または「免疫細胞調節剤」は、免疫原性 (すなわち、免疫応答を刺激または増加させる) または免疫抑制性 (すなわち、免疫応答を減少させるまたは抑制する) 化合物、組成物、または物質を意図する。「免疫システムの細胞」または「免疫細胞」は、免疫応答の増大を検出し得るか、あるいは、免疫反応の増大に関連し得る、免疫システムの任意の細胞を含むことを意図する。例として、Bリンパ球 (B細胞とも呼ばれる)、Tリンパ球 (T細胞とも呼ばれる)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、ナチュラルキラーT (NK) 細胞、リンフォカイン活性化キラー (LAK) 細胞、単核白血球、マクロファージ、好中球、顆粒球、肥満細胞、血小板、ランゲルハンス細胞、幹細胞、樹状細胞、末梢血単核球細胞、腫瘍浸潤 (TIL) 細胞、遺伝子改変免疫細胞 (ハイブリドーマを含む)、薬剤改変免疫細胞、および、上記の細胞型の誘導体、前駆体、または原種が挙げられるが、これらに限定されない。抗原への機能または応答は、任意の種類の検定法 (例えば、RIA、ELISA、FACS、ウェスタンブロッティングなど) にて測定できる。

【0060】

用語「免疫応答を誘導するまたは高める」は、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質が投与されていないコントロールサンプルに比べて、免疫応答を統計的に測定可能なほど誘導または増強することを意図する。その反対に、免疫応答の「抑制」は、例えば、自己免疫シナリオにおいて、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質が投与されたコントロールサンプルに比べて、免疫応答を測定可能なほど減少させることである。免疫応答の誘導または増強は、対象における予防反応または治療反応をもたらすことが好ましい

10

20

30

40

50

。免疫応答の例としては、I 型 I F N の産生の増加、代わりの病原体によるウイルスまたは他の型の感染に対する抵抗力の増加が挙げられる。ウイルスに対する免疫応答（抗ウイルス応答）の増強、またはウイルス感染を防ぐもしくは現存のウイルスを除去するワクチンの開発。

#### 【0061】

「単離された (isolated)」とは、天然状態から変化したか、または取り去られたことを意味する。例えば、動物の生体中に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その天然状態の共存物質から部分的または完全に分離した同じ核酸またはペプチドは、「単離されて」いる。単離核酸または単離タンパク質は、実質的に純化された形態で存在してもよく、または、天然状態でない環境（例えば宿主細胞など）に存在してもよい。

10

#### 【0062】

「単離核酸」は、天然に存在する状態において隣接する配列から単離した、核酸セグメントまたは断片を指す。つまり、通常ならば上記断片が隣接している配列（つまり、上記断片が天然に存在するゲノムにおいて、当該断片に隣接している配列）から取り除かれた、DNA断片である。当該用語は、通常は核酸を伴う他の成分（つまり、通常は細胞中において核酸を伴う、RNAまたはDNAまたはタンパク質）から実質的に精製された核酸にも適用される。したがって、当該用語は、例えば、(i) ベクターに組み込まれた組換えDNA、(ii) 自律的に複製するプラスミドもしくはウイルスに組み込まれた組換えDNA、または (iii) 原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた組換えDNA、または (iv) 他の配列から独立した単離分子（つまり、cDNAまたは、PCRもしくは制限酵素消化によって作製されたゲノム断片もしくはcDNA断片）としての組換えDNA、を含む。また、追加のポリペプチド配列をコードしている、ハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNA；相補的DNA (cDNA)；天然および/または修飾されたモノマーまたはリンケージ（デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、その置換形態および アノマー形態、ペプチド核酸 (PNA)、ロック核酸 (LNA)、ホスホロチオアート、およびメチルホスホナートなども含む）の、直鎖状または環状のオリゴマーまたは重合体も含まれる。

20

#### 【0063】

用語「調節する (modulate)」に関していえば、活性に言及したいずれをも意味し、例えば、増加した、増強した、増加した、苦痛を与えた (agonized) (アゴニストについての作用)、促進した、減少した、抑制された、阻害された、拮抗した (アゴニストについての作用) を意味する。調節は、活性を基準値の1倍、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍以上などに増加し得る。調節はまた、その活性を、基準値を下回って減少させ得る。調節はまた、活性を基準値へ標準化し得る。

30

#### 【0064】

本明細書で用いられるように、「核酸」、「単離核酸配列」または「核酸配列」または「cDNA」は、自然発生状態において隣接する配列から単離した、核酸セグメントまたはフラグメントを指す。つまり、通常ならば上記フラグメントが隣接している配列（つまり、上記フラグメントが自然発生するゲノムにおいて、当該フラグメントに隣接している配列）から取り除かれた、DNAフラグメントである。当該用語は、通常は核酸を伴う他の成分（つまり、通常は細胞中において核酸を伴う、RNAまたはDNAまたはタンパク質）から実質的に精製された核酸にも適用される。したがって、当該用語は、例えば、(i) ベクターに組み込まれた組換えDNA、(ii) 自律的に複製するプラスミドもしくはウイルスに組み込まれた組換えDNA、または (iii) 原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた組換えDNA、または (iv) 他の配列から独立した単離分子（つまり、cDNAまたは、PCRもしくは制限酵素消化によって作製されたゲノムフラグメントもしくはcDNAフラグメント）としての組換えDNA、を含む。また、追加のポリペプチド配列をコードしている、ハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含む。

40

#### 【0065】

50



本文中の用語「核酸塩基」は、非天然の核酸塩基と同様に天然に存在する核酸塩基も包含する。当業者にとってみれば、種々のすでに検討されていた「非天然」核酸塩基が、後に自然界において発見されることは明らかである。このように、「核酸塩基」は、既知のプリンおよびピリミジン複素環のみでなく、これらの複素環類似体および互変異性体も含む。核酸塩基の実例としては、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、プリン、キサンチン、ジアミノプリン、8 - オキソ - N<sup>6</sup>メチルアデニン、7 - デアザキサンチン、7 - デアザグアニン、N<sup>4</sup>, N<sup>4</sup> - エタノシトシン、N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>エタノ - 2, 6 - ジアミノプリン、5 - メチルシトシン、5 - (C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub>) - アルキニルシトシン、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、偽異性シトシン、2 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 4 - トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシン、およびBenner et al., 米国特許第5,432,272号に記載の「天然に存在しない」核酸塩基である。用語「核酸塩基」は、これらの類似体および互変異性体と同様、上述の例それぞれおよび全てを範囲に入れることを意図している。特に興味深い核酸塩基は、ヒトにおいて治療学的および診断上の用途に関係する天然に存在する核酸塩基として検討されてきたアデニン、グアニン、チミン、シトシン、およびウラシルである。

【0066】

本明細書に使用されるとき、用語「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」および「遺伝子」は、明細書を通じて互換的に使用され、相補的DNA (cDNA) ; 天然および/または修飾されたモノマーまたはリンケージ (デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、その置換形態および アノマー形態、ペプチド核酸 (PNA)、ロック核酸 (LNA)、ホスホロチオアート、およびメチルホスホナートなども含む) の、直鎖状または環状のオリゴマーまたは重合体も含まれる。

【0067】

核酸配列は「キメラ (chimeric)」であり得る。つまり、異なる領域から構成され得る。本発明の文脈において、「キメラ」化合物は、2つ以上の化学領域 (例えば、DNA 領域、RNA 領域、PNA 領域など) を含む、オリゴヌクレオチドである。化学領域のそれぞれは、少なくとも1つのモノマーユニット (つまり、ヌクレオチド) から構成されている。これらの配列は、一般的に少なくとも1つの領域を含み、上記配列は、1つ以上の所望の性質を示すように修飾されている。

【0068】

本明細書で使用されるとき、「ヌクレオチド」は、Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) に記載されているように、例えば2' - デオキシおよび2' - ヒドロキシの形態を含む天然ヌクレオチドを含んでいる。

【0069】

「付加的 (optional)」または「付加的に (optionally)」とは、事象または事情がその後発生し得るまたはし得ないことを表しており、本明細書は事象または事情が発生する場合の具体例、およびそれが発生しない場合の具体例を含む。

【0070】

免疫原性組成物の「非経口的」投与は、例えば、皮下 (s.c.)、静脈内 (i.v.)、筋肉内 (i.m.)、または胸骨内 (intrasternal) への、注射または注入技術を含む。

【0071】

「患者」または「個体」または「対象」という用語は、本明細書中において互換的に用いられ、治療される哺乳類の対象を意味し、ヒト患者であることが好ましい。場合によっては、本発明の方法は、実験動物、獣医学への応用、および疾患動物モデル (マウス、ラット、ハムスターを含む齧歯類、および霊長類が挙げられるが、これらに限定されない) の開発に供される。

【0072】

本明細書で用いられる、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、明細書を通じて互換的に使用され、別の方法によって示さない限り、様々な大きさのア

10

20

30

40

50

ミノ酸の高分子をいう。これらの用語は、アミノ酸の高分子の特定の長さを意味するものではない。このように、例えば、用語オリゴペプチド、タンパク質および酵素は、組換え技術、化学的なまたは酵素による合成によって生成されたものも、天然に存在するものも、ポリペプチドまたはペプチドの定義に含まれる。この用語はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などによって改変または誘導されたポリペプチドを含む。

【0073】

用語「ポリヌクレオチド」はヌクレオチドの鎖を指し、「核酸」としても知られている。本明細書において使用する場合、ポリヌクレオチドは、本分野において利用可能な任意の手段によって得られる全ての核酸配列を含み、天然核酸および合成核酸の両方を含むが、これらに限定されない。

【0074】

ポリヌクレオチド配列の文脈で使用する場合、用語「バリエーション」は、野生型遺伝子に関連するポリヌクレオチド配列を包含し得る。この定義は、例えば、「対立遺伝子の」バリエーション、「スプライス」バリエーション、「種」バリエーション、または「多形」バリエーションも含み得る。スプライスバリエーションは、参照元の分子との有意な同一性を持ち得るが、一般的には、より多いかまたはより少ない数のポリヌクレオチドを有する。これは、mRNAプロセッシング中に、異なるエクソンのスプライシングが行われるためである。対応するポリペプチドは、追加の機能ドメインを有するか、またはドメインの欠落を有し得る。種バリエーションは、ある種と別の種との間で異なっている、ポリヌクレオチド配列である。野生型標的遺伝子産物のバリエーションが、本発明において特に有用である。バリエーションは、核酸配列中の少なくとも1つの変異に起因してよく、異なるmRNAまたはポリペプチドが生じる（これらの構造または機能は、変化していてもよいし、変化していなくてもよい）。任意の天然遺伝子または組換え遺伝子は、対立遺伝子の形態をまったく有さないか、または1つ以上の対立遺伝子の形態を有してもよい。バリエーションを引き起こす一般的な変異は、一般的に、ヌクレオチドの自然的欠失、付加、または置換に起因している。これらの変化のそれぞれは、特定の配列中に、1回または複数回、単独または他との組み合わせで、起こり得る。

【0075】

得られたポリペプチドは一般的に、互いに関連する有意なアミノ酸同一性を有する。多形バリエーションは、所定の種の個体間の特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列における変異（variation）である。多形バリエーションは、1つの塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する、「一塩基多型（SNP）」または一塩基変異をも包含する。SNPの存在は、例えば、疾患状態である、すなわち耐性に対して感受性がある、一定の集団を示し得る。

【0076】

用語「標的核酸」は、レトロウイルスに由来する核酸配列を指し、オリゴヌクレオチドまたは例えばgRNAなどのガイド核酸配列が特異的にハイブリダイズされるようになっている。これは、検出対象である標的核酸の存在の有無、または定量対象の標的核酸の量のいずれかである。標的核酸は、標的に向けられている、対応するオリゴヌクレオチドの核酸配列に相補的な配列を有する。標的核酸という用語は、オリゴヌクレオチドが向けられている、より大きな核酸の特定の配列または配列全体（例えば、遺伝子またはmRNA）を意味し得る。

【0077】

本明細書において使用されるとき、ポリペプチドの「バリエーション」は、1つ以上のアミノ酸残基によって変更されたアミノ酸配列を指す。バリエーションは、置換されたアミノ酸が類似の構造的特性または化学的特性を有する「保存的な」変更（例えば、ロイシンをイソロイシンに置換すること）を有していてもよい。より珍しいものとして、バリエーションは「非保存的な」変更（例えば、グリシンをトリプトファンに置換すること）を有していてもよい。アナログでマイナーなバリエーションは、アミノ酸の欠失もしくは挿入またはその両方も含み得る。生物学的活性を消滅させずにどのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失され得るかを決定する指針は、当該分野で公知のコンピュータプログラム（例えば、LASE

10

20

30

40

50

RGENEソフトウェア (DNASTAR) ) を用いて見出せばよい。

【 0 0 7 8 】

「処置」は、病気の病状または症候の進行を妨げるまたは変える目的をもって行われる介入である。したがって、「処置」は、治療的処置および予防的または防止的方策の両方を指す。「処置」は、緩和ケアとして特定されてもよい。処置が必要な者としては、既に病気を患っている者、および、病気を防ぎたい者が挙げられる。したがって、状態、病気または異常を「処置すること (treating)」またはその「処置 (treatment)」は、( 1 ) 状態、病気もしくは異常に苦しむか、または、かかりやすくなっているが未だ当該状態、病気もしくは異常の臨床学的もしくは準臨床学的症候を経験もしくは顕示していないヒトまたは他の哺乳類において進行する当該状態、病気または異常の臨床学的症候の出現を防ぐことまたは遅らせること；( 2 ) 当該状態、病気または異常を阻害すること、すなわち、疾患の進行もしくはその再発 (持続処置の場合) またはその少なくとも 1 つの臨床学的もしくは準臨床学的症候を抑えること、低減すること、または遅らせること；または( 3 ) 疾患を軽減すること、すなわち、当該状態、病気もしくは異常またはその臨床学的もしくは準臨床学的症候の少なくとも 1 つの退行を起こすこと、を含んでいる。処置される個体への利益は、統計学的に有意であるか、または、患者もしくは医師が少なくとも認知できる。

10

【 0 0 7 9 】

ここで定義されるように、化合物または剤の「治療上有効な」量 (つまり、効果的な投与量) とは、所望の治療的 (例えば臨床的) 結果をもたらすのに、十分な量を意味する。組成物は、日に 1 回以上 ~ 週に 1 回以上投与されてもよい (2 日に 1 回の投与を含む)。当業者であれば、対象を効果的に処置するために必要な投与量およびタイミングが、ある種の要因に影響され得ることを理解するであろう。当該ある種の要因としては、疾患または障害の重篤度、過去の処置、対象の全身の健康状態および / または年齢、ならびに他に発症している疾患が挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明の化合物の治療上有効な量を用いる対象の処置としては、1 回の処置または一連の複数回の処置が挙げられる。

20

【 0 0 8 0 】

本明細書に使用されるとき、用語「キット」は、物質を送達する任意の送達システムを意味する。「キット」という用語は、研究用および臨床用の、両方の用途のキットを含む。反応分析の文脈において、そのような送達システムは、反応試薬 (例えば、適切な容器に入れられた、オリゴヌクレオチド、酵素、など) および / または補助的な物質 (例えば、緩衝液、分析を行うための説明書、など) を、ある場所から別の場所へ保管、移送、または配達することを可能にするシステムを含む。例えば、キットは、関連する反応試薬および / または補助的な物質を格納する、1 つ以上の格納容器 (例えば、ボックス) を備えている。本明細書に使用されるとき、「分裂キット (fragmented kit)」という用語は、2 つ以上の分離容器を備えており、それぞれが全キット構成要素の一部を格納している送達システムを意味する。当該容器は、対象とする受取人へ、一緒にまたは別々に届けられてもよい。例えば、第 1 の容器が分析に使用される酵素を格納し、一方、第 2 の容器がオリゴヌクレオチドまたはリポソームを格納してもよい。「分裂キット」という用語は、米連邦食品・医薬品・化粧品法のセクション 5 2 0 ( e ) において規制される検体特異的試薬 ( A S R ) を含むキットを包含することを意図しているが、これに限定されない。実際には、2 つ以上の分離容器を備えており、それぞれが全キット構成要素の一部を格納している任意の送達システムは、「分裂キット」という用語に含まれる。対照的に、「結合キット (combined kit)」とは、1 つの容器に反応分析用の全ての構成要素を格納している送達システム (例えば、所望の構成要素のそれぞれを格納する、1 つのボックス) を意味する。「キット」という用語は、分裂キットおよび結合キットの両方を含む。

30

40

【 0 0 8 1 】

用語「パーセント配列同一性」、または、「配列同一性」を有する、は、任意のクエリ配列と対象配列との間の、同一性の程度を意味する。

50

## 【 0 0 8 2 】

「薬学的に許容できる」（または「薬理学的に許容できる」という用語は、動物またはヒトに適宜投与されたときに、有害反応、アレルギー性反応、または他の不都合な反応を起こさない、分子の実体および組成物を意味する。本明細書に使用されるとき、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的に許容できる物質の媒体として使用され得る、溶媒、分散媒、被膜、抗菌剤、等張性薬剤、および吸収遅延剤、緩衝液、賦形剤、結合剤、潤滑剤、ゲル、界面活性剤、などの全てを含む。

## 【 0 0 8 3 】

範囲：本開示を通して、本発明の様々な様態を、範囲の形式で示すことができる。範囲の型式による記載は、単に便宜および簡潔さのためのものであることを理解されたい。また、このような記載は、本発明の範囲における変更できない限定と解釈されるべきではない。したがって、範囲の記載は、その範囲内の個々の数値だけでなく、具体的に開示された全ての取り得る部分範囲も含むと考えられるべきである。例えば、「1から6」という範囲の記載は、その範囲内の個々の数値（例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6）だけでなく、具体的に開示された部分範囲（1から3、1から4、1から5、2から4、2から6、3から6など）も含むと考えられるべきである。このことは、範囲の広さを問わず適用される。

10

## 【 0 0 8 4 】

任意のアミノ酸配列について、スイスプロットまたはGENBANK寄託番号によって具体的に言及する場合、当該配列は参照によって本開示に援用される。シグナルペプチドの特定、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、プロモーター配列、および翻訳開始点などの寄託番号に関連する情報も、参照により全て本開示に援用される。

20

## 【 0 0 8 5 】

## （一般的技術）

本発明のプラクティスにおいて有益な、一般的技術のさらなる詳細のために、当業者は一般的な本を参照し、細胞生物学、組織培養、発生学および生理学について見直すことができる。

## 【 0 0 8 6 】

分子および細胞生化学における一般的技術は以下のような本において参照することができる：A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001)、Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999)、Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996)、Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999)、Viral Vectors (Kapliff & Loewy eds., Academic Press 1995)、Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997)、and Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)。本明細書において開示される遺伝子学的操作のための試薬、クローニングベクターおよびキットは、次のような商業業者から入手することができる：BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, and ClonTech.

30

## （組成物）

40

本発明の実施形態は、インビボおよびインビトロにおいて感染した細胞からレトロウイルスの核酸配列を切除および/または根絶するための組成物について開示する。感染の処置または予防の方法は、本明細書で開示される組成物を用いることを含む。

## 【 0 0 8 7 】

要するに、ウイルスの長い末端反復（LTR）および群特異的な抗体（Gag）を認識するガイドRNA（gRNA）と共にCas9エンドヌクレアーゼは、組換えアデノ随伴ウイルス9（rAAV9）によってTg26トランスジェニックマウスに送達される。マウス細胞は第8染色体に組み込まれた複数のHIV-1のコピーを保有した。Tg26胎児マウスの繊維芽細胞の、saCas9/gRNAを発現するrAAV9処置によって、組み込みHIV-1 DNAのコピーを編集する能力および有効性を確認した。rAAV9:saC

50

as9/gRNAは、結果として組み込みHIV-1DNAを切断した。脾臓、肝臓、心臓、肺、腎臓、脳、および循環系リンパ球におけるHIV-1LTRとGag遺伝子との間にわたっている940塩基対のDNA断片の切除が検出された。これらの結果は、活性CRISPR/saCas9を、ウイルスを含む組織に効果的に送達するためのrAAV9の能力を明らかにした。

【0088】

よって、本発明の特徴である組成物は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼとHIVウイルスにおける標的配列に相補的なガイドRNAとをコードする核酸を含む医薬製剤と同様に、CRISPR関連エンドヌクレアーゼとウイルス（例えばHIV）における標的配列に相補的なガイドRNAとをコードする核酸を含む。また、本発明の特徴は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼポリペプチドとHIVウイルスにおける標的配列に相補的なガイドRNAとを含む医薬製剤と同様に、CRISPR関連エンドヌクレアーゼポリペプチドとHIVにおける標的配列に相補的なガイドRNAとを含む組成物である。

10

【0089】

また、本発明の特徴は、レトロウイルス感染（例えばHIV感染）の処置のための組成物の投与の方法、ウイルス複製を除去する方法、およびHIV感染を予防する方法である。本明細書で開示される治療方法は、関連する他の抗レトロウイルス治療（例えばHAART）において実行できる。

【0090】

本発明の方法は、宿主生物から、当該宿主の遺伝物質の完全性を妨げることなくウイルスまたは他の外来遺伝物質を除去することに使用され得る。ヌクレアーゼは、標的ウイルス核酸に対して使用され得る。それゆえ、ウイルス複製もしくは転写を妨げるか、または宿主ゲノムからウイルスの遺伝物質を削除さえもする。ヌクレアーゼは、ウイルス核酸が細胞内で粒子として存在する場合、または、ウイルス核酸が宿主ゲノム中に組み込まれている場合に、宿主物質に作用することなく、ウイルス核酸だけを除去するために特に標的とされ得る。ウイルス核酸を標的にすることは、配列特異的部分（ヌクレアーゼによる破壊のためにウイルスゲノム物質を標的とするが宿主細胞ゲノムを標的としないガイドRNA等）を用いて行われ得る。いくつかの実施形態において、CRISPR/CasヌクレアーゼおよびガイドRNA（gRNA）（共にウイルスのゲノム物質を標的とし、選択的に編集または破壊する）が使用される。CRISPR（clustered regularly interspaced shortpalindromic repeats）は、細菌をファージ感染から保護する、バクテリア免疫システムの天然に存在する要素である。ガイドRNAは、CRISPR/Cas複合体をウイルス標的配列に局在化させる。複合体の結合は、Casエンドヌクレアーゼをウイルスゲノム標的配列に局在化させ、ウイルスゲノムにおける破壊を引き起こす。他のヌクレアーゼシステム（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写アクチベータ様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、または宿主の遺伝物質の通常の機能を妨げることなくウイルス核酸を分解または阻害するために使用することができる任意の他のシステムが挙げられる）が使用され得る。

20

30

【0091】

組成物は、ウイルスの生活環における任意の形態において、または任意の段階において、ウイルス核酸を標的とするために使用され得る。標的とされるウイルス核酸は、独立した粒子として宿主細胞内に存在し得る。好ましい実施形態において、ウイルス感染は潜伏的であり、ウイルス核酸は宿主ゲノム中に組み込まれている。任意の適当なウイルス核酸が、裂開および消化の標的であり得る。

40

【0092】

本実施形態において、本発明の組成物は、遺伝子編集剤と、レトロウイルスの標的配列に相補的な少なくとも一つのガイドRNA（gRNA）とをコードする核酸を含む。本実施形態において、遺伝子編集剤は、以下を含む：Creリコンビナーゼ、CRISPR/Cas分子、TALE転写活性剤、Cas9ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、転写制御因子、ホモログ、オルソログ、またはそれらの組合せ。

50

## 【0093】

一実施形態において、組成物は、遺伝子編集剤と、少なくとも一つのガイドRNA (gRNA) とをコードするウイルスベクターを含む。ここで、gRNAはレトロウイルス遺伝子配列の標的核酸配列に相補的である。当該標的核酸配列は以下を含んでいる：レトロウイルス遺伝子配列をコードしているおよび/またはコードしていない核酸標的配列、レトロウイルス群に特異的な抗体の標的核酸配列またはそれらの組合せ。gRNAは、長い末端反復 (LTR)、レトロウイルスの群に特異的な抗体またはそれらの組合せと相補的である。本実施形態において、遺伝子編集剤は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) 関連エンドヌクレアーゼ、またはそのホモログである。CRISPR関連エンドヌクレアーゼの一例は、Cas9またはそのホモログまたはオルソログである。

10

## 【0094】

他の実施形態において、発現ベクターは、遺伝子編集剤と、少なくとも一つのガイドRNA (gRNA) とをコードする単離核酸を含み、ここで、gRNAは、レトロウイルス遺伝子配列の標的核酸配列、群に特異的な抗体の標的核酸配列またはその組合せに相補的である。実施形態において、遺伝子編集剤は、以下を含む：Creリコンビナーゼ、CRISPR/Cas分子、TALE転写活性剤、Cas9ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、転写制御因子、ホモログ、オルソログ、またはそれらの組合せ。別の実施形態において、遺伝子編集剤は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) 関連エンドヌクレアーゼまたはそのホモログまたはオルソログである。一実施形態において、gRNAは、長い末端反復 (LTR)、レトロウイルス遺伝子配列の群に特異的な抗体またはそれらの組合せに相補的である。

20

## 【0095】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスは、レンチウイルスであり、レンチウイルスは以下を含む：ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ウシ免疫不全ウイルス、またはヒトT細胞白血病ウイルス。よって、一実施形態においては、標的配列は、ヒト免疫不全ウイルスの長い末端反復 (LTR) に含まれる配列を含む。ヒト免疫不全ウイルスの長い末端反復に含まれる配列の一例としては、U3、RまたはU5領域に含まれる配列を含む。

## 【0096】

実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) またはその誘導体を含む。ウイルスベクターは、いくつかの実施形態において、AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、DJまたはDJ/8を含むアデノ随伴ウイルスベクターである。一実施形態において、AAVベクターは、AAV血清型9 (AAV9) である。

30

## 【0097】

いくつかの実施形態において、発現ベクターはトランス活性化小RNA (tracrRNA) であり、ここで、トランス活性化小RNA (tracrRNA) 配列は、ガイドRNAをコードする配列と融合する。

## 【0098】

他の実施形態において、発現ベクターはさらに、核局在シグナルをコードする配列をさらに含む。

40

## 【0099】

(遺伝子編集剤)

本発明の組成物は少なくとも1つの遺伝子編集剤を含み、当該少なくとも1つの遺伝子編集剤にはCRISPR関連ヌクレアーゼ (例えばCas9やCpf1 gRNA)、エンドヌクレアーゼのアルゴノートファミリー、clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、他のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ、またはそれらの組合せが含まれる

50

。Schiffer, 2012, J Virol 88(17):8920-8936を参照されたい。当該文献は参照によって本明細書に援用される。

#### 【0100】

上記組成物は、C2c2 RNAのみを標的とする最初の天然CRISPRシステムも含みうる。クラス2タイプVI-A CRISPR Casエフェクター「C2c2」は、RNA誘導RNAase機能を実証する。レプトトリキア・シャヒイ (Leptotrichia shahii) 細菌から得られたC2c2は、RNAファージに対する干渉を提供する。インビトロの生化学的分析により、C2c2は単一のcrRNAによってガイドされ、相補的なプロトスペーサーを有するssRNA標的を切断するようプログラムできることがわかる。細菌中で、C2c2は特定のmRNAをノックダウンするようプログラムできる。切断は、2つのコンセンサスHEPNドメイン (触媒不活性RNA結合タンパク質を生成する変異) 中の触媒残留物によって媒介される。これらの結果は、C2c2が新たなRNA標的ツールとなりうることを実証する。

10

#### 【0101】

C2c2は、細菌細胞中の特定のRNA配列を切断するようプログラムできる。RNAに集中したC2c2の作用は、細胞の個性および機能に関するゲノムの青写真であるDNAを標的とするCRISPR Cas9システムを補う。RNA (ゲノムの指示の実行を助ける) だけを標的とする能力は、高い処理能力でRNAを特異的に操作し、遺伝子機能をより広範に操作する能力を提供する。

#### 【0102】

20

CRISPR/Cpf1は、CRISPR/Cas9システムに類似したDNA編集技術であり、これは2015年にブロード研究所およびマサチューセッツ工科大学のFeng Zhangらによって特徴付けられている。Cpf1は、クラスIIのCRISPR/CasシステムのRNA誘導型エンドヌクレアーゼである。この後天性免疫メカニズムは、PrevotellaおよびFrancisella属の細菌において見られる。これはウイルスによる遺伝子損傷を防ぐ。Cpf1遺伝子は、CRISPRの遺伝子座と関連があり、ウイルスのDNAを見つけて切除するためのガイドRNAを用いるエンドヌクレアーゼをコードしている。Cpf1は、Cas9よりも小さく、単純なエンドヌクレアーゼであり、CRISPR/Cas9システムのいくつかの制限を受けない。CRISPR/Cpf1は、遺伝子疾患および悪化しやすい好ましくない健康状態の処置を含む、複数の用途を持ち得る。上述したように、アルゴノートは、他の潜在的な遺伝子編集システムである。

30

#### 【0103】

(CRISPR関連エンドヌクレアーゼ)

一実施形態において、組成物は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ (例えばCas9) またはそのホモログと、レトロウイルス (例えばHIV) の標的配列に相補的なガイドRNAとを含む。

#### 【0104】

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) は、細菌で見つかり、ファージ感染から細菌を保護すると思われる。最近までは、真核性DNAにおいて遺伝子発現を変化させる手段として用いられてきたが、抗ウイルス治療として、またはより広くはゲノム物質を破壊させるための方法として提唱されていない。むしろ、標的とされた細胞または細胞集団のDNAにおいて転写の増減を誘導する方法として挿入または欠失を誘導するために用いられてきた。例えば、以下を参照: Horvath et al., Science (2010) 327:167-170; Terns et al., Current Opinion in Microbiology (2011) 14:321-327; Bhaya et al., Annu Rev Genet (2011) 45:273-297; Wiedenheft et al., Nature (2012) 482:331-338; Jinek M et al., Science (2012) 337:816-821; Cong L et al., Science (2013) 339:819-823; Jinek M et al., (2013) eLife 2:e00471; Mali P et al. (2013) Science 339:823-826; Qi L S et al. (2013) Cell 152:1173-1183; Gilbert L A et al. (2013) Cell 154:442-451; Yang H et al. (2013) Cell 154:1370-1379; and Wang H et al. (20

40

50

13) Cell 153:910-918.

【0105】

CRISPR法はヌクレアーゼ、CRISPR関連(Cas)を採用し、これらは配列に特異的な方法によって、いずれかの遺伝子的位置においてプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の上流のDNAを切断するために、ガイドとしての小型RNA(gRNA)と複合体を形成する。CRISPRはcrRNAおよびtracrRNAとして知られている、別々のガイドRNAを使用し得る。これら2つの別々のRNAは単一のRNAに組み合わされ、短いガイドRNAの設計によって、部位特異的な哺乳動物ゲノムの切断を可能にする。CasおよびガイドRNA(gRNA)は公知の方法で合成することができる。Cas/ガイドRNA(gRNA)は、非特異的DNA切断タンパク質であるCasと、RNAオリゴヌクレオチドを標的のためにハイブリダイズするために使用し、Cas/gRNA複合体を回復する(recruit)。Chang et al., 2013, Cell Res. 23:465-472; Hwang et al., 2013, Nat. Biotechnol. 31:227-229; Xiao et al., 2013, Nucl. Acids Res. 1-11を参照。

10

【0106】

概して、CRISPR/Casタンパク質は、少なくとも1つのRNA認識および/またはRNA結合ドメインを含んでいる。RNA認識および/またはRNA結合ドメインは、ガイドRNAと相互作用する。CRISPR/Casタンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン(すなわち、DNaseドメインまたはRNaseドメイン)、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、RNaseドメイン、タンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、および他のドメインを含み得る。CRISPR/Cas9誘導変異がプロウイルスを不活性化するメカニズムは異なりうる。例えば、上記変異はプロウイルス複製およびウイルスゲノム発現に影響しうる。上記変異は1つ以上の欠失を含みうる。上記欠失のサイズは、単一のヌクレオチドの塩基対から約10000個の塩基対まで変わり得る。いくつかの実施形態では、上記欠失は、上記プロウイルス配列のすべてまたはほぼすべてを含みうる。いくつかの実施形態では、上記欠失は、上記プロウイルスを根絶し得る。上記変異は、1つ以上の挿入、すなわち、1つ以上のヌクレオチド塩基対を上記プロウイルス配列に加えることを含みうる。上記挿入された配列のサイズは、例えば、約1塩基対から約300ヌクレオチド塩基対まで変わってよい。上記変異は、1つ以上の点変異、すなわち、1個のヌクレオチドの他のヌクレオチドとの交換を含みうる。使い得る点変異は、機能的な結果を有するもの、例えば、アミノ酸コドンを終止コドンに変換する結果となる変異、あるいは、非機能的なタンパク質を産生する結果となる変異である。

20

30

【0107】

実施形態において、CRISPR/Cas様タンパク質は、野生型CRISPR/Casタンパク質、改変型CRISPR/Casタンパク質、または野生型もしくは改変型CRISPR/Casタンパク質の断片であり得る。CRISPR/Cas様タンパク質は、核酸結合アフィニティーおよび/もしくは特異性が増加する、酵素活性が変化する、ならびに/または当該タンパク質の別の特性が変化するよう改変され得る。例えば、CRISPR/Cas様タンパク質のヌクレアーゼ(すなわち、DNase、RNase)ドメインは、改変、削除、または不活性化され得る。あるいは、CRISPR/Cas様タンパク質は、融合タンパク質の機能に不可欠ではないドメインを除去するために切り詰められ得る。CRISPR/Cas様タンパク質は、融合タンパク質のエフェクタードメインの活性を最適化するために切り詰められ得るか、または改変され得る。

40

【0108】

いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas様タンパク質は、野生型Cas9タンパク質またはその断片によって由来され得る。他の実施形態では、CRISPR/Cas様タンパク質は、改変型Casタンパク質に由来され得る。例えば、Cas9タンパク質のアミノ酸配列は、タンパク質の1またはそれ以上の性質(例えば、ヌクレアーゼ活性、親和性、安定性)を変化させるために改変され得る。あるいは、RNA誘導切断に携わらないCas9タンパク質のドメインは、タンパク質から除去され得るので、改変型C

50



a s 9 タンパク質は野生型 C a s 9 タンパク質よりも小さい。

#### 【 0 1 0 9 】

3つのタイプ( I ~ I I I )のC R I S P Rシステムが特定されている。C R I S P R クラスタは、スペーサー(以前に経験した可動因子に相補的な配列)を含む。C R I S P R クラスタは、転写およびプロセッシングを経て、成熟C R I S P R R N A ( c r R N A )となる。実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、タイプI、タイプI I、またはタイプI I I システムであり得る。好適なC R I S P R / C a s タンパク質の非限定的な例として、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(またはCasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(またはCasA)、Cse2(またはCasB)、Cse3(またはCasE)、Cse4(またはCasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、およびCu1966が含まれている。

10

#### 【 0 1 1 0 】

一実施形態において、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、タイプI IのC R I S P R / C a s システムに由来する。C a s 9 (C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼ)は、タイプI IのC R I S P R / C a s システムに属し、切断標的のDNAに対して強いエンドヌクレアーゼ活性を有する。C a s 9 は、(i)成熟c r R N A (約20塩基対(b p))の固有の標的配列(スペーサーと呼ばれる)を有する)、および(ii)トランス活性型小型RNA( t r a c r R N A ) (前駆体c r R N A の、リボヌクレアーゼI I I によるプロセッシングのためのガイドとして機能する)によって誘導される。c r R N A : t r a c r R N A 二本鎖は、c r R N A のスペーサーと標的DNAの相補的な配列(プロトスペーサーと呼ばれる)との間の相補的な塩基対合を介して、C a s 9 を標的DNAへ誘導する。C a s 9 はトリヌクレオチド(N G G)のプロトスペーサー隣接モチーフ(P A M)を認識し、切断箇所(P A Mからの3番目のヌクレオチド)を特定する。c r R N A およびt r a c r R N A は別々に発現してもよい。または、合成ステムループ(A G A A A U)を介して人工的に融合された小型ガイドRNA(s g R N A)を合成して、天然c r R N A / t r a c r R N A 二本鎖と同様に作用させてもよい。そのようなs g R N A は、s h R N A のように、(i)合成してもよいし、(ii)RNAを直接トランスフェクションするために、インビトロで転写してもよいし、または、(iii)U 6もしくはH 1をプロモーターとするRNA発現ベクターによって発現させてもよい。しかしながら、人工s g R N A の切断効率は、c r R N A およびt r a c r R N A が別々に発現するシステムのものよりも低い。

20

30

#### 【 0 1 1 1 】

C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼは、C a s 9 ヌクレアーゼであってもよい。C a s 9 ヌクレアーゼは、野生型Streptococcus pyogenesの配列と、同一のヌクレオチド配列を有してもよい。C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼは、他の種に由来する配列であってもよく、例えば、他のStreptococcus sp. (thermophilesなど)に由来してもよい。C a s 9 ヌクレアーゼ配列は、下記に挙げる他の種に由来するものであってもよいが、これらに限定されない: Nocardiosis dassonvillei、Streptomycespristinaespiralis、Streptomyces viridochromogenes、Streptomyces roseum、Alicyclobacillus acidocaldarius、Bacillus pseudomycoides、Bacillus selenitireducens、Exiguobacteriumsibiricum、Lactobacillus delbrueckii、Lactobacillus salivarius、Microscilla marina、Burkholderiales bacterium、Polaromonasnaphthalenivorans、Polaromonas sp.、Crocospaera watsonii、Cyanotheca sp.、Microcystis aeruginosa、Synechococcus sp.、Acetohalobium arabaticum、Ammonifex degensii、Caldicelulosiruptor beccii、Candidatusdesulforudis、Clostridium botulinum、Clostridium difficile、Fingoldia magna、Natranaerobius thermophilus、Pelotomaculumthermopropionicum、Acidithiobacillus caldus、Acidithiobacillus ferro

40

50

xidans、Allochromatium vinosum、Marinobacter sp.、Nitrosococcus halophilus、Nitrosococcus watsoni、Pseudoalteromonas haloplanktis、Ktedonobacter racemifer、Methanohalobium evestigatum、Anabaena variabilis、Nodularia spumigena、Nostoc sp.、Arthrospira maxima、Arthrospira platensis、Arthrospira sp.、Lyngbya sp.、Microcoleus chthonoplastes、Oscillatoria sp.、Petrogobus mobilis、Thermosiphon africanus、またはAcaryochloris marina、Pseudomonas aeruginosa、Escherichia coli。または、配列が決定された他の細菌ゲノムおよび古細菌、または他の原核微生物も、本明細書に記載の実施形態において利用される C a s 9 配列の起源となり得る。

#### 【 0 1 1 2 】

野生型Streptococcus pyogenes C a s 9 配列は、改変され得る。核酸配列は哺乳類細胞における効率的な発現のために最適化されたコドンであり得る（すなわち「ヒト化」）。ヒト化 C a s 9 配列は、例えば、G e n b a n k アクセス番号KM099231.1 GI:669193757；KM099232.1 GI:669193761；またはKM099233.1 GI:669193765に挙げられている発現ベクターの何れかによってコードされている C a s 9 ヌクレアーゼ配列であり得る。あるいは、C a s 9 ヌクレアーゼ配列は、例えば、商業的に入手可能なベクター（Addgene社（マサチューセッツ州ケンブリッジ）のPX330またはPX260）内に含まれている配列であり得る。いくつかの実施形態において、C a s 9 エンドヌクレアーゼは、G e n b a n k アクセス番号KM099231.1 GI:669193757；KM099232.1 GI:669193761；もしくはKM099233.1 GI:669193765の C a s 9 エンドヌクレアーゼ配列またはPX330もしくはPX260（Addgene社，マサチューセッツ州ケンブリッジ）の C a s 9 アミノ酸配列の何れかのバリエーションまたは断片であるアミノ酸配列を有し得る。C a s 9 ヌクレオチド配列は、C a s 9 の生物学的に活性なバリエーションをコードするように改変され得、これらバリエーションは、例えば、1つ以上の変異（例えば、付加、欠失、もしくは置換変異、またはそのような変異の組み合わせ）を含むことによって野生型 C a s 9 とは異なるアミノ酸配列を有し得るか、または含み得る。1つ以上の置換変異は、置換（例えば、保存的アミノ酸置換）であり得る。例えば、C a s 9 ポリペプチドの生物学的に活性なバリエーションは、野生型 C a s 9 ポリペプチドに対して少なくともまたは約50%の配列同一性（例えば、少なくともまたは約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性）を備えるアミノ酸配列を有し得る。保存的アミノ酸置換は、典型的には、以下の群の範囲内の置換を含んでいる：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシン、およびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギン、グルタミン、セリンおよびスレオニン；リジン、ヒスチジンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。C a s 9 アミノ酸配列におけるアミノ酸残基は、天然に存在しないアミノ酸残基であり得る。天然に存在するアミノ酸残基としては、遺伝コードによって天然にコードされるもの、および標準的ではないアミノ酸（例えば、L-立体配置の代わりにD-立体配置を有するアミノ酸）が挙げられる。本ペプチドはまた、標準的な残基の改変バージョンであるアミノ酸残基（例えば、ピロリジンがリジンの代わりに使用され得、セレノステインがシステインの代わりに使用され得る）を含み得る。天然に存在しないアミノ酸残基は、自然界に見出されたことはないが、アミノ酸の基本的な式で構成されており、ペプチド中に組み込むことができるものである。これらとしては、D-アロイソロイシン（2R, 3S）-2-アミノ-3-メチルペンタン酸およびL-シクロペンチルグリシン（S）-2-アミノ-2-シクロペンチル酢酸が挙げられる。他の例については、教科書またはワールドワイドウェブ（カリフォルニア工科大学によって現在維持されているサイトが、機能的タンパク質に首尾よく組み込まれたことがある非天然アミノ酸の構造を掲げている）を参考にし得る。

#### 【 0 1 1 3 】

C a s 9 ヌクレアーゼ配列は、変異配列であり得る。例えば、C a s 9 ヌクレアーゼは、保存されたH N HおよびR u v C ドメイン（鎖特異的裂開に関与する）において変異さ

10

20

30

40

50

れ得る。例えば、RuvC触媒ドメインにおけるアスパラギン酸からアラニンへの変異(D10A)によって、Cas9ニッカーゼ変異体(Cas9n)がDNAを裂開するのではなくニックを入れ、一本鎖の切断が生じ、続くHDRを通じた選択的修復がオフターゲット二本鎖切断から望まないインデル変異の頻度を潜在的に減少させ得る。

#### 【0114】

Cas9はオルソログであり得る。6つのより小さいCas9のオルソログが用いられており、Staphylococcus aureus由来Cas9(SaCas9)は、SpCas9よりも1000塩基以上短いにもかかわらず、SpCas9と同様の効率でゲノムを編集できるという報告が示されている。

#### 【0115】

開示された野生型およびバリエーションCas9エンドヌクレアーゼに加え、本発明の実施形態は、劇的にオフターゲット切断を低減させる、新たに開発した「特異性が増強された(enhanced-specificity)」S. pyogenes Cas9バリエーション(eSpCas9)を含むCRISPRシステムをも包含する。これらのバリエーションは、DNAの非標的鎖と相互作用する、溝の正電荷部位を中和するために、アラニンと置換するように改変されている。この改変の目的は、Cas9と非標的鎖との相互作用を減少させることであり、これにより、標的鎖と非標的鎖との間で再度ハイブリダイゼーションすることを促す。この改変による効果は、gRNAと標的DNA鎖との間のより強いワトソン-クリック対の要求であり、これはオフターゲット切断を制限する。(Slaymaker, I.M. et al. (2015) DOI:10.1126/science.aad5227)。

#### 【0116】

いくつかの実施形態において、最も切断効率が良く、オフターゲット効果が最も低いことが発見されている3つのバリエーション: SpCas9(K855A)、SpCas9(K810A/K1003A/R1060A)(別名、eSpCas9 1.0)およびSpCas9(K848A/K1003A/R1060A)(別名、eSpCas9 1.1)が組成物中に用いられている。本発明は、3つのバリエーションに限られた方法だけでなく、全てのCas9バリエーションによるものをも包含する。

#### 【0117】

本発明はまた、他のタイプの特異性が増強されたCas9バリエーションである「高忠実度な」spCas9バリエーション(HF-Cas9)を含む(Kleinstiver, B. P. et al., 2016, Nature. DOI: 10.1038/nature16526)。

#### 【0118】

本明細書で用いられる用語「Cas」は、バリエーション、変異体、オルソログ、高忠実度なバリエーション等の全てのCas分子を含むことを意味している。

#### 【0119】

(ガイド核酸配列)

本発明に係るガイドRNA配列は、センス配列またはアンチセンス配列であってもよい。gRNAの具体的な配列は変わり得る。しかし有用なガイドRNA配列とは、配列に関係なく、オフターゲット効果を最小限にしつつ、高効率を達成し、ゲノム的に組み込まれたウイルスの除去を完遂する配列である。ガイドRNA配列は概して、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を含んでいる。PAMの配列は、使用されるCRISPRエンドヌクレアーゼの特異性要求に応じて変わり得る。S. pyogenesに由来するCRISPR-Casシステムにおいて、標的DNAは典型的には、5'-NGGプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の直前にある。それゆえ、S. pyogenesのCas9の場合、PAM配列は、AGG、TGG、CGGまたはGGGであり得る。他のCas9オルソログは、異なるPAM特異性を有し得る。例えば、S. thermophilusに由来するCas9は、CRISPR1に対して5'-NNAAGAAが必要であり、CRISPR3に対して5'-NGGN Gが必要である。Neisseria meningitidisに由来するCas9は、5'-NNNNGATTが必要である。ガイドRNAの具体的な配列は変わり得るが、配列に関係なく、有用なガイドRNA配列とは、オフターゲット効果を最小限にしつつ、高効率を達成し、ゲノム的に組み込まれているレトロウイルス(例えばHIVウイルス)の除去を完遂する配列であ

10

20

30

40

50

る。ガイドRNA配列の長さは、約20から約60ヌクレオチド、またはそれ以上であり、例えば、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約45、約50、約55、約60ヌクレオチド、またはそれ以上であり得る。

#### 【0120】

ガイドRNA配列は単一の配列として構成されてもよく、または1つ以上の異なる配列の組合わせ（例えば、多重構造）として構成されてもよい。多重構造は、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれ以上の異なるガイドRNAの組合わせを含んでもよい。いくつかの実施形態においては、組成物は複数の異なるgRNA分子を含み、それぞれ異なる標的配列を標的とする。いくつかの実施形態においては、この多重戦略は高い効果を奏する。これら多重gRNAは、異なるベクターにおいて別々に発現され得るか、一つの単一のベクターにおいて発現され得る。

10

#### 【0121】

本発明の組成物は、レトロウイルスにおける標的配列に相補的なガイドRNA（gRNA）をコードする配列を含んでいる。レトロウイルスは、レンチウイルスで有り得、例えば、ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ウシ免疫不全ウイルス、またはヒトT細胞白血病ウイルスである。ヒト免疫不全ウイルスは、HIV-1またはHIV-2であり得る。標的配列には、任意のHIV由来配列も含まれ、例えば、HIV-1およびHIV-2であり、これによる任意の組換え流行株が含まれる。HIVの遺伝的変異は、すでに記載した複数のグループおよびサブタイプにおいて反映される。HIV配列のコレクションは、ロスアラモスHIVデータベースおよび一覧表にまとめられている。本発明の方法および組成物は、上述の様々なグループ、サブタイプ、および組換え流行株のうち、任意のHIVに適用可能である。これらには、例えば、HIV-1メジャーグループ（グループMとも称される）およびマイナーグループ（グループN、O、およびP）、さらに、以下の任意のサブタイプA、B、C、D、F、G、H、J、およびKが挙げられるが、これらに限定されない。また、HIVのグループ（例えば、以下の任意のグループN、O、およびPがあるが、これらに限定されない）も挙げられる。方法および組成物は、HIV-2の任意の組換え流行株と同様にHIV-2および任意のクラスA、B、C、FまたはG（「サブタイプ」または「群」とも称される）に適用可能である。

20

30

#### 【0122】

ガイドRNAは、コーディングまたは非コーディング配列に相補的な配列であってもよい。例えば、ガイドRNAは、長い末端反復（LTR）配列、タンパク質コーディング配列、または調節配列のようなHIV配列に相補的で有り得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、HIVの長い末端反復（LTR）領域に相補的な配列を含む。HIV-1 LTRは、およそ640塩基対の長さである。HIV-1の長い末端反復（LTR）は、U3、R、およびU5領域に分かれる。LTRは遺伝子発現に必要なシグナルをすべて含んでおり、宿主細胞のゲノム内へのプロウイルスの組込みに関与している。例えば、基本プロモーターまたはコアプロモーター、コアエンハンサー、および調節領域がU3内にあり、転写促進反応因子がR内にある。HIV-1において、U5領域はいくつかのサブ領域、例えば、転写活性化に関与するTARまたはトランス作用反応因子や、二量化およびゲノムパッケージングに関与するPolyAや、PBSまたはプライマー結合部位や、Psiまたはパッケージングシグナルや、DISまたは二量体開始部位を含む。

40

#### 【0123】

有用なガイド配列はLTRのU3、R、またはU5領域に相補的である。ガイドRNA配列は、例えば、配列またはコンセンサス配列の標的プロトスペーサー配列に相補的な配列を含む。しかし、本発明はこれに限らず、ガイドRNA配列は、任意の変異体またはバリエーションHIV配列を標的として選択することができる。いくつかの実施形態において、一以上のガイドRNA配列が採用される。例えば第1ガイドRNA配列および第2ガイド

50

R N A 配列であり、第 1 および第 2 のガイド R N A 配列は、上述した任意のレトロウイルス領域の標的配列に相補的である。いくつかの実施形態において、ガイド R N A は、バリエーション配列または類似種の配列を含む。いくつかの実施形態において、ガイド R N A は、処置を受けている対象によって保有されるウイルスゲノムにおける配列に対応する配列であり得る。このように、例えば、対象によって保有されている H I V ウイルスにおける特定の U 3、R、または U 5 領域の配列を入手することができ、患者の特定の配列に相補的なガイド R N A を用いることができる。

#### 【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態において、ガイド R N A は、タンパク質コーディング配列、例えば、一つまたはそれ以上のウイルス構造タンパク質（例えば、g a g、p o l、e n v および t a t）をコードする配列、に相補的な配列であり得る。このように、配列は次に示すタンパク質内の配列と相補的である：例えば、M A（マトリクスタンパク質 p 1 7）、C A（カプシドタンパク質 p 2 4）、S P 1（スパーサーペプチド 1、p 2）、N C（ヌクレオカプシドタンパク質 p 7）、S P 2（スパーサーペプチド 2、p 1）および P 6 タンパク質等の g a g ポリタンパク質；例えば、逆転写酵素（R T）および R N アーゼ H、インテグラーゼ（I N）および H I V プロターゼ（P R）等の p o l；例えば、g p 1 6 0 または g p 1 6 0 の切断生成物、例えば g p 1 2 0 または S U、および g p 4 1 等の e n v；例えば、7 2 アミノ酸 1 エクソン T a t または 8 6 - 1 0 1 アミノ酸 2 エクソン T a t 等の t a t。いくつかの実施形態において、ガイド R N A は、例えば v i f、n e f（ネガティブ因子）v p u（ウイルスタンパク質 U）および t e v を含むアクセサリタンパク質をコードする配列に相補的な配列であり得る。

#### 【 0 1 2 5 】

いくつかの実施形態において、配列は、構造的または調節要素に相補的な配列、例えば、L T R、であり得る。L T R は、例えば、上述したように、以下のようなものがある；T A R（Target sequence for viral transactivation）（T a t タンパク質および細胞タンパク質の結合部位であって、ヘアピンステムループ構造を形成する H I V - 1（または H I V - 2 における第一の 1 0 0 ヌクレオチド）におけるウイルス m R N A の第一のおよそ 4 5 ヌクレオチドからなる）；R R E（Rev responsive element）（H I V - 1 の e n v 領域においてコードされている R N A 要素であって、およそ 2 0 0 ヌクレオチド（g p 1 2 0 から g p 4 1 にわたる、H I V - 1 の転写開始点から 7 7 1 0 ~ 8 0 6 1 番目）からなる）；P E（Psi element）（G a t 開始コドンの前かつ重複する 4 ステムループ構造のセット）；S L I P、T T T T T T「スリッペリーサイト（slippery site）」（ステムループ構造に続く）；C R S（Cis-acting repressive sequences）；I N S（Inhibitory/Instability RNA sequences）（例えば、H I V - 1 の g a g 領域における 4 1 4 から 6 3 1 番目のヌクレオチドにて見られる）。

#### 【 0 1 2 6 】

ガイド R N A 配列は、センス配列またはアンチセンス配列であってもよい。一般的に、ガイド R N A 配列は、プロトスパーサー隣接モチーフ（P A M）を含む。P A M の配列は、使用される C R I S P R エンドヌクレアーゼの特異的な要請に応じて、変わり得る。S. pyogenes に由来する C R I S P R - C a s システムにおいては、標的 D N A は、一般的に 5' - N G G プロトスパーサー隣接モチーフ（P A M）の直前に位置する。したがって、S. pyogenes C a s 9 の場合、P A M 配列は A G G、T G G、C G G、または G G G であり得る。他の C a s 9 オルソログは、異なる P A M 特異性を有し得る。例えば、S. thermophilus に由来する C a s 9 は、C R I S P R 1 に対して 5' - N N A G A A、C R I S P R 3 に対して 5' - N G G N G が必要である。Neisseria meningitidis に由来する C a s 9 は、5' - N N N N G A T T が必要である。ガイド R N A の具体的な配列は変わり得る。しかし有用なガイド R N A 配列とは、配列に関係なく、オフターゲット効果を最小限にしつつ、高効率を達成し、ゲノム的に組み込まれた H I V プロウイルスの除去を完遂する配列である。ガイド R N A 配列の長さは、約 2 0 から約 6 0 ヌクレオチド、またはそれ以上い

10

20

30

40

50

27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約45、約50、約55、約60ヌクレオチド、またはそれ以上である。外来ウイルスゲノムと宿主細胞ゲノム（内因性レトロウイルスDNAを含む）との相同性が非常に低い領域を特定する有用な選別方法としては、12bp + NGGの標的選択規準を用いた生物情報的スクリーニングにより、オフターゲットのヒトトランスクリプトームまたは（稀ではあるが）非翻訳ゲノム部位を除外する方法；HIV-1LTRプロモーター（宿主ゲノム中に潜在的に保存されている）内の、転写因子結合部位を避ける方法；(i) LTR-A-およびLTR-B-に特異的な、30bpのガイドRNAおよび元来の細菌免疫システムを反映している前駆crRNAシステムを選択して、20bpのガイドRNAおよびキメラcrRNA-tracrRNA系システムに対する特異性/効率を向上させる。(ii) WGS、サンガーシーケンシング、およびSURVEYORアッセイによって、潜在的なオフターゲット効果を特定し、除去する方法；が挙げられる。

#### 【0127】

ガイドRNA配列は1つの配列として構成されてもよく、または1つ以上の異なる配列の組み合わせ（例えば、多重構造）として構成されてもよい。多重構造は、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれ以上の異なるガイドRNAの組み合わせを含んでもよい。例えば、U3、R、またはU5中の配列の組み合わせを含んでもよい。いくつかの実施形態において、LTR A、LTR B、LTR CおよびLTR Dを用いることができる。発現ベクターによって組成物を投与する場合、ガイドRNAは1つのベクターによってコードされてもよい。または、複数のベクターを、それぞれが2つ以上の異なるガイドRNAを含むように設計してもよい。有用な構成によって、切断箇所の間のウイルス性配列を切除することができる。その結果、HIVゲノムまたはHIVタンパク質発現を、除去することができる。このように、2つ以上の異なるガイドRNAを使用することによって、CRISPRエンドヌクレアーゼによって認識された切断箇所の間における、ウイルス性配列の切除が促進される。切除された領域の大きさは、1ヌクレオチドから数千ヌクレオチドまで、様々であり得る。切除された領域の典型例は、実施例に記載する。

#### 【0128】

いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号1～76の任意の1つと少なくとも60%配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、SEQ ID NOS: 1から76の任意の1つを含む。

#### 【0129】

組成物が核酸として投与されるかまたは発現ベクター内に含まれる場合、CRISPRエンドヌクレアーゼは、ガイドRNA配列と同じ核酸またはベクターによってコードされていてもよい。他の場合（または、これに加えて）、CRISPRエンドヌクレアーゼは、ガイドRNA配列から物理的に分離した核酸においてコードされていてもよいし、または分離したベクター中にコードされていてもよい。

#### 【0130】

いくつかの実施形態において、RNA分子（例えば、crRNA、tracrRNA、gRNA）は、1つ以上の修飾核酸塩基を含むように設計される。例えば、RNA分子の公知の修飾としては、例えば、Genes VI, Chapter 9 ("Interpreting the Genetic Code"), Lewis, ed. (1997, Oxford University Press, New York)、およびModification and Editing of RNA, Grosjean and Benne, eds. (1998, ASM Press, Washington DC)に記載されている。修飾されたRNA成分としては、以下が挙げられる：2'-O-メチルシチジン；N<sup>4</sup>-メチルシチジン；N<sup>4</sup>-2'-O-ジメチルシチジン；N<sup>4</sup>-アセチルシチジン；5'-メチルシチジン；5', 2'-O-ジメチルシチジン；5'-ヒドロキシメチルシチジン；5'-ホルミルシチジン；2'-O-メチル-5'-ホルミルシチジン；3'-メチルシチジン；2'-チオシチジン；リシジン；2'-O-メチルウリジン；2'-チオウリジン；2'-チオ-2'-O-メチルウリジン；3', 2'-O-ジメチルウリジン；3'-(3'-

10

20

30

40

50

アミノ - 3 - カルボキシプロピル) ウリジン; 4 - チオウリジン; リボシルチミン; 5 ,  
 2' - O - ジメチルウリジン; 5 - メチル - 2 - チオウリジン; 5 - ヒドロキシウリジン;  
 5 - メトキシウリジン; ウリジン 5 - オキシ酢酸; ウリジン 5 - オキシ酢酸メチルエステ  
 ル; 5 - カルボキシメチルウリジン; 5 - メトキシカルボニルメチルウリジン; 5 - メト  
 キシカルボニルメチル - 2' - O - メチルウリジン; 5 - メトキシカルボニルメチル - 2'  
 - チオウリジン; 5 - カルバモイルメチルウリジン; 5 - カルバモイルメチル - 2' - O -  
 メチルウリジン; 5 - (カルボキシヒドロキシメチル) ウリジン; 5 - (カルボキシヒド  
 ロキシメチル) ウリジンメチルエステル; 5 - アミノメチル - 2 - チオウリジン; 5 - メ  
 チルアミノメチルウリジン; 5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウリジン; 5 - メチルア  
 ミノメチル - 2 - セレノウリジン; 5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン; 5 - カ  
 ルボキシメチルアミノメチル - 2' - O - メチル - ウリジン; 5 - カルボキシメチルアミノ  
 メチル - 2 - チオウリジン; ジヒドロウリジン; ジヒドロリボシルチミン; 2' - メチルア  
 デノシン; 2 - メチルアデノシン; N<sup>6</sup>N - メチルアデノシン; N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup> - ジメチルアデ  
 ノシン; N<sup>6</sup>, 2' - O - トリメチルアデノシン; 2 - メチルチオ - N<sup>6</sup>N イソペンテニル  
 アデノシン; N<sup>6</sup> - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) - アデノシン; 2 - メチルチオ  
 - N<sup>6</sup> - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) - アデノシン; N<sup>6</sup> - (グリニルカルバ  
 モイル) アデノシン; N<sup>6</sup> - トレオニルカルバモイルアデノシン; N<sup>6</sup> - メチル - N<sup>6</sup> - ト  
 レオニルカルバモイルアデノシン; 2 - メチルチオ - N<sup>6</sup> - メチル - N<sup>6</sup> - トレオニルカ  
 ルバモイルアデノシン; N<sup>6</sup> - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン; 2 - メチ  
 ルチオ - N<sup>6</sup> - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン; 2' - O - リボシルアデノ  
 シン (リン酸塩); イノシン; 2' - O - メチルイノシン; 1 - メチルイノシン; 1, 2' -  
 O - ジメチルイノシン; 2' - O - メチルグアノシン; 1 - メチルグアノシン; N<sup>2</sup> - メチ  
 ルグアノシン; N<sup>2</sup>, N<sup>2</sup> - ジメチルグアノシン; N<sup>2</sup>, 2' - O - ジメチルグアノシン;  
 N<sup>2</sup>, N<sup>2</sup>, 2' - O - トリメチルグアノシン; 2' - O - リボシルグアノシン (リン酸塩)  
 ; 7 - メチルグアノシン; N<sup>2</sup>, 7 - ジメチルグアノシン; N<sup>2</sup>, N<sup>2</sup>, 7 - トリメチルグ  
 アノシン; ワイオシン; メチルワイオシン; 修飾中ヒドロキシワイプトシン; ワイプトシ  
 ン; ヒドロキシワイプトシン; ペルオキシワイプトシン; クエオシン; エポキシクエオシ  
 ン; ガラクトシル - クエオシン; マンノシル - クエオシン; 7 - シアノ - 7 - デアザグア  
 ノシン; アラカエオシン [ 7 - ホルムアミド - 7 - デアザグアノシンとも呼ばれる ]; お  
 よび 7 - アミノメチル - 7 - デアザグアノシン。

#### 【 0 1 3 1 】

( 改変核酸配列または変異核酸配列 )

いくつかの実施形態において、核酸配列はいずれも、天然核酸配列から (例えば、変異  
 、欠失、置換、核酸塩基、骨格の改変などによって) 改変または誘導され得る。核酸配列  
 は、ベクター、遺伝子編集剤、gRNA、tracrRNAなどを含んでいる。本発明で  
 想像されるいくつかの改変核酸配列の例は、改変骨格 (例えば、ホスホロチオエート、ホ  
 スホトリエステル、メチルホスホナート、短鎖アルキルもしくはシクロアルキル糖内結合  
 、または短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式糖内結合) を含むものを含んでいる。いくつか  
 の実施形態において、改変オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格を備えるもの  
 、およびヘテロ原子骨格、CH<sub>2</sub>--NH--O--CH<sub>2</sub>、CH、--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub> [メチレン (メ  
 チルイミノ) またはMMI 骨格として知られている]、CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>--N(  
 CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>およびO--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>骨格 (ここで、ネイティブなホスホ  
 ジエステル骨格はO--P--O--CHと表される) を備えるものを含んでいる。De Mesmaeker  
 et al. Acc. Chem. Res. 1995, 28:366-374によって開示されているアミド骨格も、本  
 明細書において具体化される。いくつかの実施形態において、モルホリノ骨格構造を有す  
 る核酸配列 (Summerton and Weller, U.S. Pat. No. 5, 034,506)、ペプチド核酸 (PNA)  
 骨格 (オリゴヌクレオチドのホスホジエステル骨格がポリアミド骨格に置き換え  
 られており、核酸塩基がポリアミド骨格のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合して  
 いる) を有する核酸配列 (Nielsen et al. Science 1991, 254, 1497)。核酸配列はまた、  
 1つ以上の置換された糖部分を含み得る。核酸配列はまた、ペントフラノシル基の代

わりに、シクロブチル等の糖疑似体を有し得る。

#### 【0132】

核酸配列はまた、追加的に、または代替的に、核酸塩基（しばしば当該分野において単に「塩基」と呼ばれる）の改変および置換を含み得る。本明細書において使用されるとき、「改変されていない」または「天然の」核酸塩基は、アデニン（A）、グアニン（G）、チミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）を含んでいる。改変核酸塩基は、天然の核酸において稀にまたは一過的にしか見出されない核酸塩基（例えば、ヒポキサンチン、6-メチルアデニン、5-Meピリミジン（特には5-メチルシトシン（5-メチル-2'-デオキシシトシンとも呼ばれ、しばしば当該分野において5-Me-Cとも呼ばれる）、5-ヒドロキシメチルシトシン（HMC）、グリコシルHMCおよびгентピオシルHMC）、ならびに合成核酸塩基（例えば、2-アミノアデニン、2-（メチルアミノ）アデニン、2-（イミダゾリルアルキル）アデニン、2-（アミノアルキルアミノ）アデニンまたは他のヘテロ置換アルキルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-プロモウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、8-アザグアニン、7-デアザグアニン、N<sub>6</sub>（6-アミノヘキシル）アデニンおよび2,6-ジアミノプリン））を含んでいる。Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp75-77; Gebeyehu, G., et al. Nucl. Acids Res. 1987, 15:4513. 当該分野で知られている「遍在的な」塩基（例えば、イノシン）も含まれ得る。5-Me-C置換は、核酸二本鎖安定性を0.6~1.2 増加させることが示されている（Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）。

#### 【0133】

本発明の核酸配列の別の改変は、核酸配列と化学結合している、オリゴヌクレオチドの活性または細胞吸収を向上させる1つ以上の部分または共役を含んでいる。そのような部分としては、脂質部分（コレステロール部分、コレステリル部分（Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 6553）、コール酸（Manoharan et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4, 1053）等）、チオエステル（例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール（Manoharan et al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992, 660, 306; Manoharan et al.

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993, 3, 2765）、チオコレステロール（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res. 1992, 20, 533）、脂肪鎖（例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基（Saison-Behmoaras et al. EMBO J. 1991, 10, 111; Kabanov et al. F EBS Lett. 1990, 259, 327; Svinarchuk et al. Biochimie 1993, 75, 49）、リン脂質（例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホナート（Manoharan et al. Tetrahedron Lett. 1995, 36, 3651; Shea et al. Nucl. Acids Res. 1990, 18, 3777）、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖（Manoharan et al. Nucleosides & Nucleotides 1995, 14, 969）、またはアダマンタン酢酸（Manoharan et al. Tetrahedron Lett. 1995, 36, 3651）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0134】

所定の核酸配列における全ての位置について均一に改変されている必要はなく、実際、2つ以上の前述の改変が1つの核酸配列中に組み込まれていてもよいし、核酸配列内の1つのヌクレオチド内において組み込まれていてもよい。

#### 【0135】

（改変タンパク質またはペプチド）

ポリペプチドまたはその断片を含むハイブリッドタンパク質は、他のタイプのポリペプチドと結合し得る。これらの追加のポリペプチドは、精製、同定、タンパク質またはポリペプチドの全体的な投与量、および/またはペプチドの治療学的または予防学的な用途のために有用な任意のアミノ酸配列で有り得る。加えて、追加のポリペプチドは、シグナルペプチドまたは標的ペプチドなどであり得る。



## 【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、上述した任意の核酸配列によってコードされた C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼポリペプチドを含み得る。本明細書では用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」は、たとえ、様々な大きさのペプチド配列であっても互換的に用いられる。本明細書では、本発明のアミノ酸系組成物は「ポリペプチド」と称することができ、この組成物はアミノ酸残基の線状ポリマーであることを伝え、全長のタンパク質から区別することを助ける。本発明のポリペプチドは、C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼの断片を「構成する (constitute)」または「含む (include)」ものであって、本発明は、C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼの生物学的に活性なバリエーションを構成または含むポリペプチドを包含する。そのため、ポリペプチドは C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼの断片 (またはその生物学的に活性なバリエーション) だけでなく、追加の残基も同様に含み得ることが理解される。生物学的に活性なバリエーションは、標的 DNA を切断するための十分な活性を保持する。

10

## 【 0 1 3 7 】

いくつかの場合において、付加、置換、または欠失を含み得る C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼポリペプチドは、ポリペプチドの安定性 (タンパク質分解への耐性を含むがこれに限られない) を増加し得るか、ポリペプチドの、ポリペプチドに結合しているタンパク質への親和性を高め得る。いくつかの場合において、付加、置換または欠失は、ポリペプチドの溶解性を高め得る。いくつかの実施形態において、組換え宿主細胞での発現に続いて、ポリペプチドの溶解性を高めるための目的で、非天然アミノ酸を取り込むための部位に加えて、天然にコードされるまたは非天然アミノ酸に置換する部位が選ばれる。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、他の付加、置換または欠失を含み、関連するリガンド、結合タンパク質、および / またはレセプターへの親和性の調節、レセプターの二量体化の調節 (増減を含むがこれに限らない)、レセプター二量体の安定化、循環系半減期の調節、放出または生物学的利用能の調節、精製の促進、または、特に投与経路の向上または改変をする。同様に、非天然アミノ酸は、化学または酵素切断配列、プロテアーゼ切断配列、反応基、抗体結合ドメイン (F L A G または p o l y - H i s を含むがこれに限らない)、または他の親和性ベース配列 (F L A G、p o l y - H i s、G S T などを含むがこれに限らない) または結合分子 (ビオチンを含むがこれに限らない) を含み、検出 (G F P を含むがこれに限らない)、精製、組織または細胞膜を通しての輸送、プロドラッグの放出または活性化、サイズの縮小、またはポリペプチドの他の特徴を向上させる。

20

30

## 【 0 1 3 8 】

本明細書で開示される方法および組成物は、一またはそれ以上の非天然アミノ酸のポリペプチドへの取り込みを含む。一またはそれ以上の非天然アミノ酸は、一またはそれ以上のポリペプチドの活性を妨害しない特定の位置において取り込まれる。これは、「保守的な (conservative)」置換 (疎水性アミノ酸の非天然または天然の疎水性アミノ酸による置換、バルキーなアミノ酸の非天然または天然のバルキーなアミノ酸による置換、親水性アミノ酸の非天然または天然の親水性アミノ酸による置換が含まれるがこれに限らない) および / または活性を要求しない位置における非天然アミノ酸の挿入によって達成される。

40

## 【 0 1 3 9 】

生化学的および構造的アプローチの多様性は、ポリペプチドにおける非天然アミノ酸による置換に対する所望の位置を選択することによって得られ得る。任意のポリペプチド鎖の位置も非天然アミノ酸の取り込むための選択に適しており、選択は合理的なデザインに基づくものであるか、任意または特に望ましい意図のないランダムな選択によるものであり得る。所望の部位の選択は、任意の所望の特性または活性を有する非天然アミノ酸ポリペプチド (さらに改変されているか、改変されていないままのもの) (例えば、アゴニスト、スーパーアゴニスト、部分アゴニスト、インバースアゴニスト、アンタゴニスト、レセプター結合調節剤、レセプター活性調節剤、バインダーパートナーに結合する調節剤、バインダーパートナー活性調節剤、バインダーパートナー配置調節剤を含むが、これらに

50

限定されない)の生成、二量体または多量体の形成、天然分子と比較した活性または特性の未変化、または溶解性、凝集または安定性などの任意の物理的または化学的性質の操作に基づき得る。例えば、ポリペプチドの生物学的活性のために必要とされるポリペプチドにおける位置は、点変異解析、アラニンスキャンニング、またはホモログスキャンニング法を含む方法(これに限らない)を用いることで特定できる。アラニンまたはホモログスキャンニング突然変異を含む方法(これに限らない)によって生物学的活性に欠かせないと特定された残基以外の残基は、ポリペプチドのために探索された所望の活性に依る、非天然アミノ酸によって置換するための良い候補となり得る。あるいは、生物学的活性に欠かせないと特定された部位をもまた、ポリペプチドのために探索された所望の活性に依る、非天然アミノ酸によって再度置換するための良い候補となり得る。他にも、ポリペプチド鎖の各位置を非天然アミノ酸で連続的に置換し、ポリペプチドの活性における効果を観察することで代替できる。任意のポリペプチドにおける非天然アミノ酸によって置換する位置を選択するいずれの手段、技術、または方法も、本明細書で開示されている方法、技術、および組成物に用いるのに適している。

10

#### 【0140】

アミノ酸残基間の結合は、従来のペプチド結合またはその他の共有結合(エステル結合またはエーテル結合など)であり得、ポリペプチドは、アミド化、リン酸化、またはグリコシル化され得る。改変はポリペプチドの主鎖および/または側鎖に影響し得る。化学的改変は、ポリペプチドをコードするmRNAの翻訳に続いてインビボで行われる天然の改変(例えば、細菌の宿主におけるグリコシル化)、またはインビトロで行われる合成的改変であり得る。CRISPR関連エンドヌクレアーゼの生物学的活性バリエーションは、天然の改変(すなわち、インビボにおいて天然で行われる)および合成的改変(すなわち、インビトロにおいて行われる天然由来または天然由来ではない改変)の任意の組合せに起因する1つ以上の構造的改変を含み得る。改変の例としては、以下の改変が挙げられるが、これらに限定されない:アミド化(例えば、C末端におけるアミノ基による、遊離カルボキシル基の置き換え);ピオチン化(例えば、リジンまたはその他の反応性アミノ酸残基のピオチン分子によるアシル化);グリコシル化(例えば、アスパラギン、ヒドロキシリジン、セリンまたはトレオニン残基のいずれかへのグリコシル基の付加による糖タンパク質または糖ペプチドを生成);アセチル化(例えば、アセチル基、一般的にはポリペプチドのN末端への付加);アルキル化(例えば、アルキル基の付加);イソプレニル化(例えば、イソプレノイド基の付加);リポイル化(例えば、リポ酸部分の付着);およびリン酸化(例えば、セリン、チロシン、トレオニン、またはヒスチジンへのリン酸基の付加)。

20

30

上述のように、生物学的活性バリエーションにおける一またはそれ以上のアミノ酸残基は、非天然アミノ酸残基であってもよい。天然アミノ酸残基は、遺伝子コードによって天然にコードされたものに加えて、標準的でないアミノ酸(例えば、L型ではなくD型のアミノ酸)も含む。本発明のペプチドは、標準的な残基の修飾バージョンであるアミノ酸残基も含んでもよい(例えば、ピロリジンをリジンの代わりに使用してもよく、セレノシステインをシステインの代わりに使用してもよい)。非天然アミノ酸残基は、天然に存在しないが、アミノ酸の基本式に合致するものであり、ペプチドに組み込まれることができる。これらには、D-アロイソロイシン((2R, 3S)-2-アミノ-3-メチル吉草酸)およびL-シクロペンチルグリシン((S)-2-アミノ-2-シクロペンチル酢酸)が含まれる。他の例は、教科書またはワールドワイドウェブで調べることができる(現在カリフォルニア工科大学が運営しているサイトでは、機能タンパク質に正常に組み込まれた非天然アミノ酸の構造が公開されている)。

40

#### 【0141】

あるいは、または、これに加えて、生物学的活性バリエーションにおける一またはそれ以上のアミノ酸残基は、天然の残基で有り得、これは、野生型配列の対応する位置において見られる天然の残基とは異なる。言い換えれば、生物学的活性バリエーションは、一またはそれ以上のアミノ酸置換を含み得る。アミノ酸残基の置換、付加、または欠失を、野生型配列の変異と呼ぶ。記載したように、置換は、天然のアミノ酸残基の、非天然アミノ酸残基ま

50

たは天然の残基とは異なるアミノ酸残基への置き換えで有り得る。さらに、置換は、保存的なまたは保存的でない置換を構成し得る。保存的なアミノ酸残基は、典型的には、以下の基における置換を含む：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシンおよびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギン、グルタミン、セリンおよびトレオニン；リジン、ヒスチジン、およびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。

#### 【0142】

C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼの生物学的活性バリエーションであるポリペプチドは、その配列が対応する野生型ポリペプチドと類似または同一である程度の点で特徴付けることができる。例えば、生物学的活性バリエーションの配列は、野生型ポリペプチドにおいて対応するアミノ残基が少なくとも約80%の同一性を有し得る。例えば、C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼの生物学的活性バリエーションは、C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼまたはそのホモログまたはオルソログと、少なくとも約80%の配列同一性（例えば、少なくともまたは約85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性）を有している。

10

#### 【0143】

C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼのポリペプチドの生物学的活性バリエーションは、本発明の方法において有用であるための、十分な生物学的活性を保持している。生物学的活性バリエーションは、標的DNA切断において十分に機能するための活性を保持している。生物学的活性は、当業者に知られた方法によって評価することができ、インビボ切断アッセイまたは機能的アッセイが含まれるが、これに限らない。

20

#### 【0144】

（送達ビヒクル）

本明細書で使用される送達ビヒクルは、本明細書において具現化されている組成物の、インビトロ送達用またはインビボ送達用両方の、送達のためのあらゆる型の分子を含む。例としては、非限定的に、発現ベクター、ナノ粒子、コロイド組成物、脂質、リボソーム、ナノソーム、糖質、有機もしくは無機組成物などを含む。

#### 【0145】

いくつかの実施形態において、送達ビヒクルは発現ベクターであり、発現ベクターは、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (C R I S P R) 関連エンドヌクレアーゼをコードする単離された核酸配列および少なくとも一つのガイドRNA (gRNA) を含む。ここで、gRNAは、レトロウイルスゲノムにおける標的核酸配列に相補的なものである。

30

#### 【0146】

本発明では、組換えコンストラクトも提供される。この組換えコンストラクトは、短縮型Tat応答HIV LTRプロモーターの制御下においてCas9を発現させるための、細胞の形質転換に使用することができる。同様に、組換えコンストラクトは、HIV中の標的配列に相補的なガイドRNAを発現させるために利用されてもよい。組換え核酸コンストラクトは、本明細書に記載のように、Cas9および/またはガイドRNA (HIVにおける標的配列に相補的な) をコードする核酸であって、Cas9および/またはガイドRNA (HIVにおける標的配列に相補的な) を細胞中で発現させるのに適した調節領域と操作可能に結合している核酸を含む。多数の核酸により特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドがコードされることが、理解されるであろう。遺伝コードの縮重が、当該技術分野でよく知られている。多くのアミノ酸では、1つより多いヌクレオチド・トリプレットが、アミノ酸のコドンとして機能している。例えば、特定の生物において最適な発現が得られるように、その生物にとって適切なコドンバイアス表を用いて、Cas9をコードする配列中のコドンを変更してもよい。

40

#### 【0147】

本明細書に記載されているような核酸を含むベクターもまた提供される。「ベクター」は、プラスミド、ファージまたはコスミドなどのレプリコンであり、その中に別のDNA

50

セグメントが挿入され得、挿入セグメントの複製を生じさせる。一般的に、適切な調節エレメントと関連付いている場合に、ベクターは複製可能となる。適したベクター骨格は、例えば、プラスミド、ウイルス、人工染色体、BAC、YACまたはPACなど、本技術分野において日常的に用いられているものである。用語「ベクター」は、クローニングベクターおよび発現ベクターの他に、ウイルスベクターおよび組込みベクターも含む。本明細書に記載されている核酸配列を発現させるために、幅広い種類の宿主/発現ベクターの組み合わせが用いられ得る。適した発現ベクターは、非限定的に、例えばバクテリオファージ、バキュロウイルスおよびレトロウイルスに由来する、プラスミドおよびウイルスベクターを含む。多くのベクターおよび発現システムが、例えば、Novagen (Madison, Wis.)、Clontech (Palo Alto, Calif.)、Stratagene (La Jolla, Calif.)、およびInvitrogen/Life Technologies (Carlsbad, Calif.)などの会社から市販されている。

10

#### 【0148】

ベクターはまた、例えば、複製開始点、足場付着領域(SAR)、および/またはマーカーを含んでもよい。マーカー遺伝子は、宿主細胞に選別可能な表現型を与えることができる。例えば、マーカーは、抗生物質(例えば、カナマイシン、G418、ブレオマイシン、またはハイグロマイシン)に対する抵抗性などの、殺生物剤抵抗性を与えることができる。上述したように、発現ベクターは、発現するポリペプチドの操作または検出(例えば、精製または局在化)を促進するように設計された、タグ配列を含んでもよい。タグ配列(緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、ポリヒスチジン、c-myc、ヘマグルチニン、またはFlag(登録商標)タグ(Kodak, New Haven, Conn.)配列など)は、一般的に、コードされているポリペプチドと融合した状態で発現する。そのようなタグは、ポリペプチド中のどの場所に挿入されてもよい(カルボキシルまたはアミノ末端のいずれかをも含む)。

20

#### 【0149】

一実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、またはそれらの誘導体である。アデノ随伴ベクターは、AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、DJまたはDJ/8を含む。一実施形態において、AAVベクターは、AAV血清型9(AAV9)である。

#### 【0150】

また、追加の発現ベクターは、例えば、染色体DNA配列のセグメント、非染色体DNA配列のセグメント、および合成DNA配列のセグメントを含んでもよい。好適なベクターとしては、SV40および公知の細菌性プラスミドの誘導体(例えば、E. coliプラスミドであるcolE1、pCR1、pBR322、pMal-C2、pET、pGEX、pMB9およびそれらの誘導体、RP4などのプラスミド);ファージDNA(例えば、ファージ1の多数の誘導体(例えば、NM989)、および他のファージDNA(例えば、M13)、および線維状一本鎖ファージDNA);酵母プラスミド(2μプラスミドなど)またはその誘導体、真核細胞において有用なベクター(昆虫細胞または哺乳動物細胞において有用なベクターなど);プラスミドおよびファージDNAの組み合わせから得られるベクター(ファージDNAまたは他の発現制御配列を用いるように改変されたプラスミドなど)が挙げられる。

30

40

#### 【0151】

酵母発現システムもまた使用できる。例えば、二つだけ例に挙げると、非融合pYES2ベクター(XbaI、SphI、ShoI、NotI、GstXI、EcoRI、BstXI、BamHI、SacI、KpnI、およびHindIIIクローニング部位;Invitrogen)または融合pYESHisA,B,C(XbaI、SphI、ShoI、NotI、BstXI、EcoRI、BamHI、SacI、KpnI、およびHindIIIクローニング部位、ProBond樹脂を用いて精製し、エンテロキナーゼを用いて切断したN末端ペプチド;Invitrogen)を、本発明に従って使用し得る。イーストツーハイブリッド発現システムもまた、本発明に従って用意し得る。

#### 【0152】

50

ベクターは、調節領域も含んでもよい。「調節領域」という用語は、転写または翻訳の開始および速度、ならびに転写産物または翻訳産物の安定性および/または移動性に影響を及ぼす、ヌクレオチド配列を意味する。調節領域としては、プロモーター配列、エンハンサー配列、応答要素、タンパク質認識部位、誘導要素、タンパク質結合配列、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域(UTR)、転写開始部位、終止配列、ポリアデニル化配列、核局在化シグナル、およびイントロンが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0153】

ここで用いられる「操作可能に結合している」という用語は、調節領域および転写される配列が、当該配列が配列の転写または翻訳に影響を及ぼすように、核酸中に位置していることを意味する。例えば、コーディング配列をプロモーターの制御下に置くために、ポリペプチドの翻訳リーディングフレームの翻訳開始点は、一般的に、プロモーターから1~約50ヌクレオチドに下流に位置する。しかしながら、プロモーターは翻訳開始点から約5,000ヌクレオチドも上流に位置してもよく、または、転写開始点から約2,000ヌクレオチドも上流に位置してもよい。プロモーターは、一般的に、少なくともコア(基本)プロモーターを含む。プロモーターは、少なくとも1つの制御要素(エンハンサー配列、上流要素、または上流活性化領域(UAR)など)も含み得る。含まれるプロモーターは、いくつかの要因に合わせて選択される。当該要因としては、効率、選択性、誘導性、所望の発現レベル、ならびに細胞または組織優先的な発現が挙げられるが、これらに限定されない。コーディング配列に関連するプロモーターおよび他の調節領域を、適宜選択および配置することによりコーディング配列の発現を調節することは、当業者にとっては通常の事項である。

#### 【0154】

ベクターとしては、例えば、ウイルスベクター(アデノウイルスAd、アデノ随伴ウイルス(AAV)、および水疱性口内炎ウイルス(VSV)およびレトロウイルスなど)、リボソームおよび他の脂質含有複合体、ならびにポリヌクレオチドの宿主細胞への送達を仲介できる他の高分子複合体、が挙げられる。複製不全組換えアデノウイルスベクターを、公知の技術を用いて作製することができる(Quantin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2581-2584 (1992); Stratford-Perricadot, et al., J. Clin. Invest., 90: 626-630 (1992); および Rosenfeld, et al., Cell, 68:143-155 (1992)を参照)。

#### 【0155】

実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、またはそれらの誘導体を含む。いくつかの実施形態においてウイルスベクターは、AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、DJまたはDJ/8を含むアデノ随伴ウイルスベクターである。一実施形態において、AAVベクターは、AAV血清型9(AAV<sub>9</sub>)である。

#### 【0156】

ベクターは、他の要素または機能性も備えてもよい。当該他の要素または機能性としては、(i)遺伝子送達および/または遺伝子発現をさらに調節するもの、または(ii)その他の有益な性質を標的細胞に与えるもの、が挙げられる。下記に詳細に記載・説明する通り、そのような他の要素としては、例えば、細胞に対する結合または標的化に影響を及ぼす要素(細胞型または組織特異的な結合を媒介する要素を含む);細胞によるベクター核酸の取り込みに影響を及ぼす要素;取り込み後、細胞内におけるポリヌクレオチドの局在化に影響を及ぼす要素(核局在化を仲介する薬剤など);および、ポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼす要素、が挙げられる。そのような要素としてはまた、マーカーも含まれ得る。このようなマーカーには、ベクターによって送達された核酸を取り込み発現している細胞の検知または選別に使用できる、検知可能および/または選別可能なマーカーが挙げられる。上記の要素はベクターに本来備わっている性質として得られてもよく(結合および取り込みを仲介する要素または機能性を有する、特定のウイルスベクターの使用など)、または、上記の機能性が得られるようにベクターを修飾してもよい。他のベクターとしては、Chen et al; BioTechniques, 34: 167-171 (2003)に記載のものが挙げられる

10

20

30

40

50

。そのようなベクターは、様々な種類が当該技術分野で知られており、一般的に入手可能である。

#### 【 0 1 5 7 】

「組換えウイルスベクター」とは、1つ以上の異種遺伝子産物または配列を含んでいる、ウイルスベクターを意味する。多くのウイルスベクターは格納物に関して大きさの制約があるので、異種遺伝子産物または配列は、一般的に、ウイルスゲノムの1つ以上の部分を置換することによって導入される。そのようなウイルスは複製欠損性であることがあり、ウイルス複製およびカプシド形成に際して、欠失した機能をトランスに提供される必要がある（例えば、複製および/またはカプシド形成に必要な遺伝子産物を輸送する、ヘルパーウイルスまたはパッケージング細胞株を用いて）。送達されるポリヌクレオチドがウイルス粒子の外側に配置されている、改変ウイルスベクターも記載されている（例えば、Curiel, D T, et al. PNAS 88: 8850-8854, 1991を参照）。

10

#### 【 0 1 5 8 】

適した核酸送達システムは、組換えウイルスベクター、典型的には、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ヘルパー依存性アデノウイルス、レトロウイルス、またはセンダイウイルス-リポソーム（HVJ）複合体の少なくとも一つに由来する配列を含む。いくつかの場合において、ウイルスベクターは、ポリヌクレオチドに操作可能に結合している強力な真核生物性プロモーター、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターを含む。組換えウイルスベクターは、その中のポリヌクレオチドの1以上、好ましくは約1のポリヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態において、本発明の方法に使用されるウイルスベクターは、約 $10^8$ から約 $5 \times 10^{10}$  pfu (plaque forming units) を有する。非ウイルスベクターを用いてポリヌクレオチドが導入されることになっている実施形態において、約0.1ナノグラムから約4000マイクログラムの使用が、多くの場合に実用的であり、例えば、約1ナノグラムから約100マイクログラムである。

20

#### 【 0 1 5 9 】

さらなるベクターとしては、ウイルスベクター、融合タンパク質、および化学複合体が挙げられる。レトロウイルスベクターとしては、Moloneyマウス白血病ウイルスおよびHIV系ウイルスが挙げられる。あるHIV系ウイルスベクターは、少なくとも2つのベクターを含み、gag遺伝子およびpol遺伝子はHIVゲノムから得られ、env遺伝子は別のウイルスから得られる。DNAウイルスベクターとしては、ポックスベクター（orthopoxベクターまたはavipoxベクターなど）、ヘルペスウイルスベクター（単純ヘルペスウイルスI（HSV）ベクターなど）[Geller, A.I. et al., J. Neurochem, 64: 487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A.:90 7603 (1993); Geller, A.I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA: 87:1149 (1990)]、アデノウイルスベクター[LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet. 3: 219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69: 2004 (1995)]、およびアデノ随伴ウイルスベクター[Kaplitt, M.G., et al., Nat. Genet. 8:148 (1994)]がある。

30

40

#### 【 0 1 6 0 】

ポックスウイルスベクターは、細胞の細胞質に遺伝子を導入する。アビポックスウイルスベクターは、短い期間のみの核酸発現に終わる。アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターは、本発明のいくつかの実施形態のための表示であり得る。アデノウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスよりも短い期間（例えば、約1ヶ月未満）の発現に終わるが、いくつかの実施形態においては、より長い発現をもたらす得る。選ばれる特定のベクターは、標的細胞および処置される条件に依存するだろう。適したプロモーターの選択は容易になされ得る。適したプロモーターの例は、763塩基対サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターである。遺伝子発現に用いられる他の適したプロモーターは、非限定的に、ラウス肉腫ウイルス（RS

50

V) (Davis, et al., Hum Gene Ther 4:151 (1993)), SV40 初期プロモーター領域、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター、メタロチオネイン (MMT) 遺伝子調節配列、 $\beta$ -ラクタマーゼプロモーター等の原核生物性発現ベクター、tacプロモーター、酵母菌または他の菌類からのプロモーター要素 (例えば、Gal4プロモーター、ADC (アルコール脱水素酵素) プロモーター、PGK (ホスホグリセロールキナーゼ) プロモーター、アルカリ・ホスファターゼ・プロモーター)、および動物の転写制御領域 (組織特異性を示し、トランスジェニック動物で用いられてきた) が挙げられるが、これらに限定されない。上記動物の転写制御領域としては、膵臓の腺房細胞で活性化するエラスターゼ I 遺伝子制御領域、膵臓のベータ細胞で活性化するインシュリン遺伝子制御領域、リンパ細胞で活性化する免疫グロブリン遺伝子制御領域、精巣細胞、乳腺細胞、リンパ細胞、および肥満細胞で活性化するマウス乳癌ウイルス制御領域、肝臓で活性化するアルブミン遺伝子制御領域、肝臓で活性化するアルファ-フェトプロテイン遺伝子制御領域、肝臓で活性化するアルファ1-抗トリプシン遺伝子制御領域、骨髄性細胞で活性化するベータ-グロビン遺伝子制御領域、脳の希突起膠細胞で活性化するミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域、骨格筋で活性化するミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域、および視床下部で活性化する性腺刺激性放出ホルモン遺伝子制御領域が挙げられる。ある種のタンパク質は、自身のプロモーターを用いて発現し得る。tat遺伝子およびtar要素などの、高発現レベルをもたらすエンハンサーまたはシステムなど、発現を増強し得る他の要素も含み得る。このカセットは、次いで、例えばEcoI複製起点を含むベクター、例えばpUC19、pUC118、pBR322または他の公知のプラスミドベクターなどに挿入され得る。Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory press, (1989)を参照。プラスミドベクターは、処置される生物の代謝にマーカーペプチドが悪影響を及ぼさないことを前提に、アンピシリン耐性のためのラクタマーゼ遺伝子などの選択マーカーを含んでいてもよい。カセットは、例えばWO 95/22618に開示されているシステムなどの、合成送達システムにおける核酸結合部分に結合していてもよい。

10

20

#### 【0161】

本発明において、ポリヌクレオチドは、マイクロ送達ビヒクル (カチオン性リポソームおよびアデノウイルスベクターなど) と共に使用されてもよい。リポソームの調製、標的化、および内容物の送達の手順としては、Mannino and Gould-Fogerite, BioTechniques, 6:682 (1988)を参照。また、Feigner and Holm, Bethesda Res. Lab. Focus, 11(2):21 (1989)およびMaurer, R.A., Bethesda Res. Lab. Focus, 11(2):25 (1989)も参照。

30

#### 【0162】

別の送達方法では、細胞内で発現産物を産生されられる、一本鎖DNA産生ベクターを用いる。例えば、Chen et al, BioTechniques, 34: 167-171 (2003)を参照 (その全てが参照により本開示に援用される)。

#### 【0163】

別の送達方法では、細胞内で発現産物を産生されられる、一本鎖DNA産生ベクターを用いる。例えば、Chen et al, BioTechniques, 34: 167-171 (2003)を参照 (その全てが参照により本開示に援用される)。

40

#### 【0164】

本発明の核酸配列は、対象の適切な細胞へと送達され得る。これは、例えば、食細胞 (マクロファージなど) による食作用に最適な大きさの、高分子送達媒体、生物分解性微粒子送達媒体、またはマイクロカプセル送達媒体を用いることで達成し得る。例えば、直径約1~10  $\mu$ mのPLGA (ポリ-ラクト-コ-グリコリド) 微粒子を、使用することができる。ポリヌクレオチドはこれらの微粒子内に格納され、マクロファージによって取り込まれて、細胞内で徐々に生分解される。これによって、ポリヌクレオチドが放出される。ポリヌクレオチドが放出されると、細胞内でDNAが発現する。第2の種類の微粒子は細胞によって直接取り込まれず、主に核酸の徐放性保有体として機能する。上記核酸は、

50

生分解を通じて微粒子から放出されたときのみ、細胞によって取り込まれる。したがって、これらの高分子粒子は、食作用を妨げるために、十分な大きさであるべきである（つまり、 $5\text{ }\mu\text{m}$ より大きく、好ましくは $20\text{ }\mu\text{m}$ より大きい）。核酸を能動的に取り込む別の方法では、リポソーム（標準的な方法で調製される）を使用する。核酸は、これらの送達ビヒクルに単独で組み込まれてもよく、組織特異的抗体と共に組み込まれてもよい。当該組織特異的抗体としては、例えば、HIV感染症の一般的な潜伏感染保有体である、細胞型（例えば、脳マクロファージ、小膠細胞、星状膠細胞、および腸関連リンパ系細胞）を標的にする抗体が挙げられる。別の場合としては、電氣的にまたは共有結合によってポリ-L-リジンに結合している、プラスミドまたは他のベクターから構成される分子複合体を調製してもよい。ポリ-L-リジンは、標的細胞の受容体に結合し得るリガンドに、結合する。インビボでの発現を実現する別の手段では、「そのままのDNA」（つまり、送達ビヒクルを含まない）を、筋肉内、皮膚内または皮下の部位へ送達する。関連するポリヌクレオチド（例えば、発現ベクター）において、上述したように、核酸配列は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼおよびレトロウイルスの標的配列に相補的なガイドRNAをコードする配列を含む単離核酸配列をコードする。

#### 【0165】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、ナノ粒子として製剤化されてもよい。当該ナノ粒子は、例えば、(i) DNAと複合体を形成している、高分子量の線状ポリエチレンイミン（LPEI）からなるコアを有し、さらに(ii) ポリエチレングリコールによって修飾された（PEG化された）低分子量のLPEIからなるシェルによって覆われている、ナノ粒子である。

#### 【0166】

いくつかの実施形態において、組成物は、HIVの性感染を防止する局所ゲルとして製剤化されてもよい。局所ゲルは、性交に先立って、男性器または女性器の皮膚または粘膜に直接塗布することができる。他の場合（またはそれに加えて）、局所ゲルは、男性用または女性用のコンドームまたはペッサリーの表面に塗布されるか、またはそれらの中に收容されていてもよい。

#### 【0167】

いくつかの実施形態において、組成物は、本明細書に記載された組成物を封入したナノ粒子として調製され得る。

#### 【0168】

組成物は、核酸であるかポリペプチドであるかに限らず、哺乳動物細胞による取り込みを促進するように製剤化される。有用なベクターシステムおよび製剤は、上述したとおりである。いくつかの実施形態において、ベクターは、組成物を特定の細胞型に送達することができる。しかしながら、本発明はこれに限定されず、物理的送達方法（エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション、弾道粒子、および「ジーン・ガン」システムなど）と同様に、他のDNA送達方法（例えば、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、リポソーム、リポプレックス、界面活性剤、およびペルフルオロ薬液を使用した化学的トランスフェクションなど）が予期される。

#### 【0169】

他の実施形態において、組成物は、1つ以上のCas9/gRNAを用いて形質転換またはトランスフェクションされた、細胞を含む。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、エクスピボで適用することができる。つまり、対象の細胞を体から取り出し、培養中に組成物で処置して、例えばHIVウイルス配列を切除し、処置された細胞を上記対象の体に戻してもよい。細胞は、対象の細胞であってもよく、または、ハプロタイプ適合細胞または細胞株であってもよい。複製を防止するために、細胞に放射線を照射してもよい。いくつかの実施形態において、細胞はヒト白血球抗原（HLA）適合細胞、自家移植細胞、細胞株、またはそれらの組合わせである。他の実施形態において、細胞は幹細胞であってもよい。例えば、胚性幹細胞または人工的な多能性幹細胞（人工多能性幹細胞（iPS細胞））が挙げられる。胚性幹細胞（ES細胞）および人工的な多能性幹細胞（人工

10

20

30

40

50



多能性幹細胞、i P S細胞)は、ヒトを含む多数の動物種から確立されてきた。これらの種類の多能性幹細胞は、再生医療用の細胞の、最も有用な供給源と考えられる。なぜなら、これらの細胞は、その多能性を保有しつつ活発に分裂する能力を維持しながら、適切な分化誘導によって、ほとんど全ての器官へと分化可能であるからである。特にi P S細胞は、自己由来の体細胞から確立することができる。したがって、胚を破壊することによって作製されるE S細胞と比較して、倫理的および社会的問題を引き起こす可能性が低い。さらに、i P S細胞は自己由来の細胞であるので、再生医療または移植療法において最大の障害となる、拒絶反応を回避することが可能になる。さらに、i P S細胞は自己由来の細胞であるので、再生医療または移植療法において最大の障害となる、拒絶反応を回避することが可能になる。

10

#### 【0170】

単離された核酸は、当該分野で公知の方法(例えば、s i R N Aを送達する方法)によって対象へ容易に送達され得る。いくつかの態様において、C a sは、当該C a s分子の活性ドメインを含んでいるフラグメントであり得、それによって分子のサイズが削減されている。それゆえ、C a s 9 / g R N A分子は、現在の遺伝子治療に採用されているアプローチと同様に、臨床的に使用され得る。特に、細胞移植療法およびワクチン接種のためのC a s 9 / 多重g R N A安定発現幹細胞またはi P S細胞が、対象における使用のために開発され得る。

#### 【0171】

形質導入された細胞が、確立された方法に従って再注入のために調製される。約2 ~ 4週間の培養期間の後、細胞は $1 \times 10^6$ から $1 \times 10^{10}$ の間の数になり得る。この点については、細胞の増殖特性は、患者間および細胞の種類間で変わる。形質導入された細胞の再注入前の約72時間、表現型の分析および治療剤を発現している細胞のパーセンテージの分析のために一部が採取される。投与については、本発明の細胞は、細胞型のL D 50ならびに患者の体重および全体的な健康に適用されるときのような様々な濃度における細胞型の副作用によって決定される割合にて投与され得る。投与は1回投与または分割投与を介して達成され得る。成体幹細胞は、それらの産生を刺激し組織または空隙(骨髄または脂肪組織が挙げられるが、これらに限定されない)から出る、外因的に投与される因子を用いて集められてもよい。

20

#### 【0172】

(併用療法)

いくつかの実施形態において、インビトロまたはインビボにおいてレトロウイルスを根絶する組成物は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (C R I S P R) 関連エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸配列; レトロウイルスゲノムの標的核酸配列と相補的である、少なくとも1つのガイドR N A (g R N A); 抗ウイルス剤またはそれらの組み合わせを、有効量含む。さらに、ウイルス感染と関連し得る他の任意の症状(例えば、発熱、さむけ、頭痛、二次感染)を緩和する1つ以上の剤を、上記薬学的組成物に含ませて、または上記薬学的組成物の一部として、または別々の時間に、投与してよい。これらの剤として、抗発熱剤、抗炎症剤、抗真菌剤、駆虫剤、化学療法剤、抗生物質、免疫調節剤、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0173】

いくつかの実施形態において、抗ウイルス剤は、抗体、アプタマー、アジュバント、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ケモカイン、サイトカイン、免疫促進剤、免疫調節剤、B細胞調節剤、T細胞調節剤、NK細胞調節剤、抗原提示細胞調節剤、酵素、s i R N A、インターフェロン、リバビリルン、リボザイム、プロテアーゼ阻害剤、ヘリカーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、ヘリカーゼ阻害剤、ノイラミニダーゼ阻害剤、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、プリンヌクレオシド、ケモカイン受容体拮抗薬、インターロイキン、ワクチンまたはそれらの組み合わせを治療有効量含む。

#### 【0174】

免疫促進剤は、サイトカイン、リンフォカイン、T細胞共刺激リガンドなどが挙げられ

50

るが、これらに限定されない。免疫促進分子は、液体および／または細胞免疫システムにポジティブまたはネガティブに影響を与える。特に、免疫促進分子は、その細胞および／または非細胞成分、その機能、および／または他の生理学的システムとの相互関係に影響を与える。免疫促進分子は、サイトカイン、ケモカイン、マクロファージ遊走阻止因子（MIF；とりわけ、Bernhagen (1998), Mol Med 76(3-4): 151-61 or Metz (1997), Adv Immunol 66, 197-223に記載のとおり）、T細胞受容体または可溶MHC分子よりなる群から選択され得る。このような免疫促進エフェクター分子は当技術分野でよく知られている。とりわけ、Paul, “Fundamental immunology”, Raven Press, New York (1989)に記載されている。特に、既知のサイトカインおよびケモカインは、Meager, “The Molecular Biology of Cytokines” (1998), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, England; (Bacon (1998). Cytokine Growth Factor Rev 9(2):167-73; Oppenheim (1997). Clin Cancer Res 12, 2682-6; Taub, (1994) Ther. Immunol. 1(4), 229-46 or Michiel, (1992). Semin Cancer Biol 3(1), 3-15)に記載されている。

#### 【0175】

測定され得る免疫細胞活性には、以下のものが含まれるが、これらに限定されない、（１）DNA複製の測定による細胞増殖；（２）サイトカイン（例えば、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、またはTNF- $\alpha$ ）の特定の測定を含む、サイトカイン産生の増強；（３）細胞媒介標的殺滅または溶解；（４）細胞分化；（５）イムノグロブリン産生；（６）表現型の変化；（７）走化性因子の産生または走化性、すなわち、走化性によるケモタクチン（chemotactin）産生能力；（８）いくつかの他の免疫細胞種の活性阻害による、免疫抑制；および（９）アポトーシス。アポトーシスは、異常活性の徴候として、一定の状況下での活性免疫細胞の断片化を示す。

#### 【0176】

また、細胞毒性Tリンパ球またはLAK細胞が標的に送達する溶解パッケージ（lytic package）に存在する酵素も対象である。孔形成タンパク質であるパーフォリンおよびFasリガンドはこれらの細胞で主要な細胞溶解分子である（Brandau et al., Clin. Cancer Res. 6:3729, 2000; Cruz et al., Br. J. Cancer 81:881, 1999）。また、CTLは、グランザイムと呼ばれる少なくとも11のセリンプロテアーゼファミリーを発現する。それらは、4つの主要な基質特異性を有する（Kam et al., Biochim. Biophys. Acta 1477:307, 2000）。ストレプトリジンOおよびニューモリシンは、グランザイムB依存アポトーシスを促進する（Browne et al., Mol. Cell Biol. 19:8604, 1999）。

#### 【0177】

他の好適なエフェクターはポリペプチドをコードする。該ポリペプチドの活性は、それ自体が細胞にとって毒性ではなく、細胞の代謝を変化させるまたは非毒性プロドラッグを致死性薬剤に変化させるかのいずれかによって、細胞を他の非毒性化合物に対する感受性を与える。例として、単純ヘルペスウイルスおよび触媒的に同等のバリエーション由来である、チミジンキナーゼ（tk）が挙げられる。

#### 【0178】

いくつかの実施形態において、抗ウイルス剤は、天然または組換えインターフェロン（IFN- $\alpha$ ）、インターフェロン（IFN- $\beta$ ）、インターフェロン（IFN- $\gamma$ ）、インターフェロン（IFN- $\delta$ ）、またはそれらの組合わせを含む。いくつかの実施形態において、インターフェロンはIFN- $\gamma$ である。任意のこれらのインターフェロンを安定化または改変して、耐性および生物学的安定性または他の生物学的特性を改善し得る。一般的な改変の一つはペグ化（pegylation）（ポリエチレングリコールによる改変）である。

#### 【0179】

（薬学的組成物）

上述した通り、本発明の組成物は、当業者に公知の様々な方法によって調製することができる。その原材料またはそれを得る方法にかかわらず、本明細書に記載の組成物は、そ

の用途に合わせて製剤化され得る。例えば、上述した核酸およびベクターは、組織培養の細胞に適用するための組成物、または、患者もしくは対象に投与するための組成物として、製剤化できる。本発明の薬学的組成物はいずれも、医薬品の調製への使用のために製剤化され得る。特定の用途は、治療（例えば、HIV感染を患う対象またはHIV感染のリスクがある対象の治療）という文脈の中で後述されている。医薬として用いられる場合、任意の核酸およびベクターを、薬学的組成物の形態で投与してもよい。それらの組成物は、薬学の分野において周知の方法で調製することが可能である。また、局所的治療と全身治療のいずれが望まれるかに応じて、さらに治療される部位に応じて、様々な経路で投与することができる。投与としては、局所投与（点眼および粘膜（鼻腔、膣、および直腸を含む）への送達を含む）、肺内投与（例えば、粉末またはエアロゾルの吸入または吹送（噴霧器によるものを含む）による；気管内、鼻腔内、表皮、および経皮）、点眼投与、経口投与、または非経口投与が挙げられる。目への送達方法としては、（i）局所投与（点眼）、（ii）結膜下、眼周囲もしくは硝子体内への注射、または（iii）バルーンカテーテルもしくは手術により結膜嚢に配置された眼内挿入物による導入、が挙げられる。非経口投与としては、（i）静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内への注射もしくは注入、または（ii）頭蓋内投与（例えば、クモ膜下投与または脳室内投与）が挙げられる。非経口投与は、単回のボラス投与の形態で行われてもよい。または、例えば、連続灌流ポンプによって行われてもよい。局所投与用の薬学的組成物および製剤としては、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴薬、座薬、スプレー、液体、粉末、などが挙げられる。従来の薬学的担体（水系、粉末系または油系の基剤、増粘剤など）が、必要であるかまたは望ましい場合がある。

#### 【0180】

本発明はまた、薬学的組成物を含み、当該薬学的組成物は、本明細書に記載の核酸およびベクターを有効成分として含み、1つ以上の薬学的に許容される担体をさらに含んでもよい。本明細書に使用されるとき、薬学的に許容される担体という用語は、薬学的に許容できる物質の媒体として使用され得る、溶媒、分散媒、被膜、抗菌剤、等張性薬剤、および吸収遅延剤、緩衝液、賦形剤、結合剤、潤滑剤、ゲル、界面活性剤、などのいずれかおよび全てを含む。本発明の組成物を調製する際、当該有効成分は一般的に賦形剤と混合され、（i）賦形剤によって希釈されるか、または（ii）担体（例えば、カプセル、錠剤、小袋、紙包み、またはその他の容器の形態である）の中に封入される。賦形剤が希釈剤として機能する場合、当該賦形剤は、固体、半固体、または液体（例えば、生理食塩水）であってもよく、有効成分用のビヒクル、担体、または媒体としての役割を果たす。したがって、組成物は、錠剤、ピル、粉末、トローチ剤、小袋、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁液、エマルジョン、溶液、シロップ、エアロゾル（固体または液体媒体中の）、ローション、クリーム、軟膏、ゲル、軟質および硬質ゼラチンカプセル、座薬、無菌注射液、ならびに無菌包装粉末の形態であり得る。当該技術分野で知られている通り、希釈剤の種類は、目的とする投与経路に合わせて変わり得る。得られる組成物は、追加の薬剤（防腐剤など）を含んでもよい。いくつかの実施形態において、担体は、脂質系もしくは重合体系コロイドであるか、またはこれらを含んでもよい。いくつかの実施形態において、担体物質は、リポソーム、ヒドロゲル、微粒子、ナノ粒子、またはブロック共重合体ミセルとして製剤化された、コロイドであってもよい。上述の通り、担体物質はカプセルを形成してもよく、その材料は重合体系コロイドであってもよい。

#### 【0181】

本発明の核酸配列は、対象の適切な細胞へと送達され得る。これは、例えば、食細胞（マクロファージなど）による食作用に最適な大きさの、重合体送達ビヒクル、生分解性微粒子送達ビヒクル、またはマイクロカプセル送達ビヒクルを用いることで達成され得る。例えば、直径約1～10 μmのPLGA（ポリ-ラクト-コ-グリコリド）微粒子が使用され得る。ポリヌクレオチドはこれら微粒子内に格納され、マクロファージによって取り込まれて、細胞内で徐々に生分解される。これによって、ポリヌクレオチドが放出される。ポリヌクレオチドが放出されると、細胞内でDNAが発現する。第2の種類の微粒子は

細胞によって直接取り込まれず、主に核酸の徐放性保有体として機能する。上記核酸は、生分解を通じて微粒子から放出されたときのみ、細胞によって取り込まれる。したがって、これらの重合体粒子は、食作用を妨げるために、十分な大きさであるべきである（すなわち、5  $\mu\text{m}$  より大きく、好ましくは20  $\mu\text{m}$  より大きい）。核酸を能動的に取り込む別の方法は、リボソーム（標準的な方法で調製される）を使用することである。核酸は、これらの送達ビヒクルに単独で組み込まれてもよいし、組織特異的抗体と共に組み込まれてもよい。当該組織特異的抗体としては、例えば、HIV感染の一般的な潜伏感染保有体である細胞型（例えば、脳マクロファージ、小膠細胞、星状膠細胞、および腸関連リンパ系細胞）を標的にする抗体が挙げられる。あるいは、電氣的にまたは共有結合によってポリ-L-リジンに結合している、プラスミドまたは他のベクターから構成される分子複合体を調製してもよい。ポリ-L-リジンは、標的細胞の受容体に結合し得るリガンドに結合する。インビボでの発現を実現する別の手段では、「そのままのDNA」（すなわち、送達媒体を含まない）を、筋肉内、皮膚内または皮下の部位へ送達する。関連するポリヌクレオチド（例えば、発現ベクター）において、CRISPR関連エンドヌクレアーゼおよびガイドRNAをコードする配列を含む単離核酸配列をコードする核酸配列は、プロモーターまたはエンハンサーとプロモーターとの組み合わせと操作可能に結合されている。プロモーターおよびエンハンサーは上記に記載されている。

#### 【0182】

核酸およびベクターは、器具（例えば、カテーテル）の表面に適用されてもよく、またはポンプ、パッチ、または他の薬物送達装置内に含まれていてもよい。本発明の核酸およびベクターは単独で投与されてもよいし、薬学的に許容できる賦形剤または担体（例えば、生理的食塩水）の存在下において混合物として投与されてもよい。賦形剤または担体は、投与の方法および経路に基づいて選択される。好適な薬学的担体は、医薬製剤における使用のための医薬必需品と共に、当該分野においてよく知られた参考書であるRemington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin)、およびUSP/NF (United States Pharmacopeia and the National Formulary)に記載されている。

#### 【0183】

いくつかの実施形態において、組成物は、HIVの性感染を防止する局所ゲルとして製剤化されてもよい。局所ゲルは、性交に先立って、男性器または女性器の皮膚または粘膜に直接塗布することができる。他の場合（またはそれに加えて）、局所ゲルは、男性用または女性用のコンドームまたはペッサリーの表面に塗布されるか、またはそれらの中に收容されていてもよい。

#### 【0184】

いくつかの実施形態において、組成物は、Cas9またはバリエーションCas9と、標的HIVに相補的なgRNA配列をコードする核酸、または、Cas9と標的HIVと相補的なガイドRNA配列をコードする核酸を含むベクターを内包しているナノ粒子として製剤化され得る。あるいは、組成物は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼポリペプチド（例えば、Cas9またはバリエーションCas9）と、標的に相補的なガイドRNA配列を内包しているナノ粒子として製剤化され得る。

#### 【0185】

本発明の製剤は、Cas9と、標的HIVに相補的であるガイドRNA配列とをコードするベクターを包含し得る。ガイドRNA配列は、単一領域（例えば、LTR A、B、C、またはD）と相補的な配列、またはLTR A、B、C、およびDと相補的な配列の任意の組み合わせを含んでいてもよい。あるいは、Cas9をコードする配列と、ガイドRNAをコードする配列を別々のベクターに存在させてもよい。

#### 【0186】

（処置方法）

本明細書に記載の組成物は、概して、HIV感染症等のレトロウイルス感染を患う対象の治療にとって、様々な形で有用である。当該方法は、任意のHIV（例えば、HIV-1およびHIV-2）、およびそれらの組換え流行株を標的とするのに有用である。臨床

10

20

30

40

50

的に有益な結果が得られる場合は常に、対象は効果的に処置されている。これは、例えば、疾患の症状の完全な解消、疾患の症状の重篤度の低減、または疾患の進行の減速を意味し得る。これらの方法はさらに、以下の工程を含んでもよい：a) HIV感染症を患う対象を特定する工程（例えば患者、より具体的にはヒト患者）；およびb) Cas9等のCRISPR関連エンドヌクレアーゼと、HIVLTR等のHIV標的配列に相補的であるガイドRNAとをコードする核酸を含む組成物を対象に与える工程。対象は、標準的な臨床テストを用いて特定することができる。当該標準的な臨床テストとしては、例えば、対象の血清におけるHIV抗体またはHIVポリペプチドp24の存在を検出するイムノアッセイ、またはHIV核酸増幅アッセイが挙げられる。対象に与えられる組成物の量であって、感染症の症状の完全解消、感染症の症状の重篤度の低減、または感染症の進行の減速をもたらす量を、治療上有効な量とみなす。本発明の方法は、投与量および投与計画を最適化するための監視工程に加えて、結果を予測する工程も含んでもよい。本発明のいくつかの方法において、まず患者が潜伏期のHIV感染症であるか否かを判定し、その後、本明細書に記載の1つ以上の組成物を用いて患者を処置するか否かを決定してもよい。薬物耐性の発症を検出し、応答性患者を非応答性患者と迅速に区別するためにも、監視工程を利用することができる。いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、患者が保有する特定のHIVの核酸配列を決定する工程、および次いでそれらの特定の配列に相補的になるようにガイドRNAを設計する工程を含んでもよい。例えば、対象のLTRのU3領域、R領域もしくはU5領域を決定し、次いで患者の配列に正確に相補的になるように1つ以上のガイドRNAを設計または選択し得る。

10

20

#### 【0187】

組成物は、レトロウイルス感染（例えば、HIV感染）のリスクを有する対象の処置（例えば、予防的治療として）にも有用である。これらの方法は、以下の工程をさらに含んでもよい：a) HIV感染のリスクを有する対象を特定する工程；b) CRISPR関連エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9）と、HIV標的配列（例えば、HIVLTR）に相補的であるガイドRNAとをコードする核酸を含む組成物を対象に与える工程。HIV感染のリスクを有する対象としては、例えば、無防備な性交（つまり、コンドームを使用しない性行為を行った）現在性交渉のある個体；別の性感染症を患う現在性交渉のある個体；静脈内薬の使用者；または割礼を受けていない男性、が挙げられる。HIV感染のリスクを有する対象としては、例えば、職業上HIV感染した人々と接触することになる個体（例えば、医療関係者または初期対応者）が挙げられる。HIV感染のリスクを有する対象としては、例えば、矯正施設の収容者、またはセックスワーカー（つまり、収入を得る仕事のために、または貨幣以外のもの（食物、薬物、または宿など）のために、性交を行う個体）が挙げられる。

30

#### 【0188】

組成物は、母からその子供へのHIVの伝染の可能性を減少させるために、HIV感染症を患う妊婦または授乳婦にも投与することができる。HIVに感染した妊婦は、子宮内で胎盤を通じて、産道を通る分娩の時、または分娩後に母乳を通じて、ウイルスをその子供に移すことがある。本明細書に記載の組成物は、HIVに感染した母に対して、(i) 出産前、周産期もしくは出産後の授乳期に投与してもよいし、または(ii) 出産前投与、周産期投与および出産後投与の、任意の組合わせであってもよい。組成物は、標準的な抗レトロウイルス療法（後述）と共に、母に投与してもよい。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、分娩後すぐの乳児に投与してもよい。また、いくつかの実施形態において、その後一定の期間ごとに投与してもよい。上記の乳児は、標準的な抗レトロウイルス療法も受けてもよい。

40

#### 【0189】

本明細書の方法および組成物は、レトロウイルス感染の処置に有用である。当該レトロウイルスとしては、例えば、HIV-1、HIV-2等のヒト免疫不全ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス(SIV)；ネコ免疫不全ウイルス(FIV)；ウシ免疫不全ウイルス(BIV)；馬伝染性貧血ウイルス(EIAV)；およびヤギ関節

50

炎/脳炎ウイルス(CAEV)が挙げられる。場合によっては、本発明の方法は、実験動物、獣医学への応用、および疾患動物モデル(マウス、ラット、ハムスターを含む齧歯類、および霊長類が挙げられるが、これらに限定されない)の開発に供される。

#### 【0190】

本明細書に記載の組成物はいずれも、後に標的細胞へ送達されるように、宿主の身体の任意の場所に投与することができる。組成物は、哺乳類の、脳、髄液、関節、鼻粘膜、血液、肺、腸、筋組織、皮膚、または腹腔に送達され得るが、これらに限定されない。送達経路の観点から、組成物は、静脈内注射、頭蓋内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、筋肉内注射、直腸内注射、腔内注射、髄腔内注射、気管内注射、皮内注射、または経皮注射によって、経口投与または経鼻投与によって、または時間をかけた漸次的灌流(gradual perfusion)によって、投与されてもよい。さらなる例としては、組成物のエアロゾル調製物を、吸入によって宿主に与えてもよい。

10

#### 【0191】

必要な投与量は、投与経路、製剤の性質、患者の病気の性質、患者の大きさ、体重、表面積、年齢および性別、投与されている他の薬物、ならびに担当臨床医の判断、に基づいて決定される。様々な細胞標的、および様々な投与経路により異なる効率の観点から、広範囲にわたる必要投与量が予想される。これらの投与量レベルの変化幅は、当該分野においてよく理解される通り、標準的な経験的最適化ルーチンを用いて調節することができる。投与は、1倍または複数倍(例えば、2倍もしくは3倍、4倍、6倍、8倍、10倍、20倍、50倍、100倍、150倍、またはより大きい倍率)であってもよい。化合物を好適な送達ビヒクル(例えば、高分子微粒子または埋入器具)に封入することにより、送達効率を向上させることができる。

20

#### 【0192】

本明細書に提供されている任意の組成物を用いた治療の期間は、1日という短い期間から宿主の生存期間(例えば、長年)という長い期間まで、任意の長さの期間であってもよい。例えば、化合物を週に1回(例えば、4週間から何カ月間または何年間にも渡って)；月に1回(例えば、3~12カ月間または何年間にも渡って)；または年に1回を5年間、10年間、またはより長い期間、投与してもよい。なお、治療の頻度も変わり得る。例えば、本発明の化合物は、日に、週に、月に、または年に1回(または2回、3回、など)投与されてもよい。

30

#### 【0193】

本明細書に提供されている任意の組成物の有効量を、処置が必要な個体に投与することができる。有効量は患者において所望の反応を誘導する一方、重大な毒性は誘導しない。当該量は、既知量の特定の組成物の投与後、患者の反応を評価することによって決定し得る。さらに、毒性(もしあれば)のレベルは、既知量の特定の組成物を投与する前後において、患者の臨床症状を評価することによって決定すればよい。なお、患者に投与される特定の組成物の有効量は、患者の反応および毒性のレベルだけではなく、所望の成果に合わせて調節してもよい。大きな毒性は、特定の患者それぞれによって異なり得るものであり、複数の要因に依存している。当該複数の要因としては、患者の疾患状態、年齢、および副作用に対する耐性が挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0194】

当該分野において知られている任意の方法を、特定の反応が誘導されるか否かの判定に用いることができる。特定の疾患状態の程度を評価できる臨床的方法を、反応が誘導されるか否かの判定に用いることができる。反応を評価するために使用される特定の方法は、患者の障害の特質、患者の年齢および性別、投与されている他の薬物、ならびに担当臨床医の判断によって決定される。

#### 【0195】

組成物は、他の治療剤(例えば、HAARTに使用される抗レトロウイルス剤)と共に投与されてもよい。抗レトロウイルス薬としては、例えば、逆転写酵素阻害剤(例えば、ヌクレオシド/ヌクレオチド逆転写酵素阻害剤、ジドブジン、エムトリシチビン(emtricitabine))と共

50

itibine)、ラミブジン、およびテノイフビル(tenofovir)；ならびに非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(エファバレンツ(efavirenz)、ネビラピン、リルピビルなど)；プロテアーゼ阻害剤(例えば、チピラビル(tipiravir)、ダルナビル、インジナビル)；侵入阻害剤(例えば、マラビロク)；融合阻害剤(例えば、エンフュビリタイド(enfuvirtide))；またはインテグラーゼ阻害剤(例えば、ラルテググリビル(raltegravir)、ドルテググリビル)が挙げられる。抗レトロウイルス薬としては、多種を組み合わせた薬剤もある。多種を組み合わせた薬剤としては、例えば、エムトリシタビン、エファバレンツ、およびテノイフビルの組合わせ；エムトリシタビン、リルピビル、およびテノイフビルの組合わせ；またはエルビテググリビル、コビススタット、エムトリシタビンおよびテノイフビルの組合わせが挙げられる。

10

#### 【0196】

2つ以上の治療剤を併せて投与する場合、それらの治療剤の治療的効果が発揮されている期間が重複する限り、それらの治療剤を同時に投与する必要、または同一経路で投与する必要はない。同時投与または逐次投与には、別々の日または別々の週に投与することが予期されている。治療剤は、規則的な投薬計画に基づき投与されてもよい(例えば、治療剤の継続的な少量投与)。

#### 【0197】

そのような組成物の投与量、毒性、および治療の有効性は、培養細胞または実験用動物における、標準的な薬学的手順によって決定してもよい。例えば、LD<sub>50</sub>(母集団の50%が致死する投与量)およびED<sub>50</sub>(母集団の50%に対して治療的効果のある投与量)を決定するための薬学的手順によって決定してもよい。毒性効果と治療的効果との間の用量比は、治療上の指標であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比として示すことができる。

20

#### 【0198】

培養細胞の分析および動物実験から得られたデータを、ヒトに使用される投与量の範囲を策定するために使用することができる。そのような組成物の投与量は、毒性が微小または皆無である状態で、かつ血中濃度の範囲にED<sub>50</sub>が含まれることが好ましい。投与量は、この範囲内で、採用される投与形態および利用される投与経路に合わせて変わり得る。本発明の方法において使用される任意の組成物について、治療的効果のある投与量は、まず培養細胞の分析から推定されてもよい。投与量は、培養細胞において決定されたように、動物モデルにおいて策定されてもよい。この場合、血漿中濃度の範囲にIC<sub>50</sub>(つまり、症状を最大値の半分だけ抑制するような試験化合物の濃度)が含まれるように、投薬量が策定されてもよい。そのような情報は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィによって測定してもよい。

30

#### 【0199】

記載したとおり、組成物の治療上有効な量(つまり、効果的な投与量)とは、所望の治療的(例えば臨床的)結果をもたらすのに、十分な量を意味する。組成物は、日に1回以上~週に1回以上投与されてもよい(2日に1回の投与を含む)。当業者であれば、対象を効果的に治療するために必要な投与量およびタイミングが、ある種の要因に影響され得ることを理解するであろう。当該一定の要因としては、疾患または障害の重篤度、過去の治療、対象の全身の健康状態および/または年齢、ならびに他に発症している疾患が挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明の組成物の治療上有効な量を用いる対象の治療としては、1回の治療または一連の複数回の治療が挙げられる。

40

#### 【0200】

本明細書に記載の組成物は、上述した様々な薬物送達システムにおける使用に、好適である。さらに、投与される化合物のインビボ血清中における半減期を長期化させるため、組成物は、カプセル化されるか、リポソームの腔内に導入されるか、コロイドとして調製されてもよい。または、組成物の血中における半減期を延長する、他の従来技術を採用してもよい。リポソームの調製には様々な方法が利用可能であり、例えば、米国特許第4,235,871号(Szoka, et al.)、同第4,501,728号、および同第4,837,028

50

号に記載の方法が利用可能である（それぞれが参照により、本開示に援用される）。さらに、薬物は標的薬物送達システムによって投与されてもよい。例えば、組織特異的抗体によってコーティングされたリボソームとして投与されてもよい。リボソームは、ある器官を標的にしており、その器官に選択的に取り込まれる。

#### 【0201】

レトロウイルスを不活性化する方法も、提供される。当該レトロウイルスとしては、例えば、哺乳動物細胞中のレンチウイルス（ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、またはウシ免疫不全ウイルスなど）が挙げられる。ヒト免疫不全ウイルスは、HIV-1またはHIV-2であり得る。ヒト免疫不全ウイルスは、染色体に組み込まれているプロウイルスであり得る。哺乳動物細胞は、HIVに感染した任意の細胞型であってもよい。当該細胞型としては、CD4+リンパ球、マクロファージ、線維芽細胞、単球、Tリンパ球、Bリンパ球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞（ランゲルハンス細胞および濾胞樹状細胞など）、造血幹細胞、内皮細胞、脳小膠細胞、星状膠細胞、ならびに胃腸上皮細胞が挙げられるが、これらに限定されない。そのような細胞型には、通常は初期感染において感染される細胞型が含まれる。当該細胞型としては、例えば、CD4+リンパ球、マクロファージ、単球またはランゲルハンス細胞に加えて、潜伏HIV保有体を構成する細胞型（つまり、潜伏感染細胞）が挙げられる。

#### 【0202】

本発明の方法は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼと、1つ以上のガイドRNAとを含む遺伝子編集複合体をコードする発現ベクターを含む組成物を、上記対象に投与する工程を含むことができ、当該ガイドRNAが当該レトロウイルスの標的核酸配列に相補的である。好ましい実施形態において、上述に記載のとおり、レトロウイルスにより潜在感染した宿主細胞のゲノムに組み込まれるプロウイルスDNAを不活性化する方法は、以下の工程を含む：CRISPR関連エンドヌクレアーゼと、2つ以上の異なるガイドRNA（gRNA）を含む組成物を対象に投与することによって宿主細胞を処置する工程であって、当該少なくとも2つのgRNAそれぞれがプロウイルスDNAの異なる標的核酸配列と相補的である工程；プロウイルスDNAを不活性化する工程。当該少なくとも2つのgRNAは、単一の配列として構成されてもよく、または1つ以上の異なる配列の組み合わせ（例えば、多重構造）として構成されてもよい。多重構造は、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれ以上の異なるgRNAの組み合わせを含んでもよい。例えば、U3、R、またはU5中の配列の組み合わせを含んでもよい。いくつかの実施形態において、LTR A、LTR B、LTR CおよびLTR Dの組み合わせを用いることができる。実施例に記載されている実験において、2つの異なるgRNAの使用により、CRISPRエンドヌクレアーゼによって認識される切断部位間のウイルス配列の切除を引き起こした。切除領域は、HIV-1ゲノム全体を含み得る。処置工程はインビボで行ってもよく、すなわち、組成物はHIV感染を患う対象に直接投与し得る。しかしながら、本方法はこれに限定されず、処置工程はエクスピボで行ってもよい。例えば、1つの細胞もしくは複数の細胞、または組織外植片を、HIV感染を患う対象から取り出して培養し、CRISPR関連エンドヌクレアーゼとガイドRNAとを含み、該ガイドRNAがヒト免疫不全ウイルスの核酸配列に相補的である、組成物で処置し得る。上述のとおり、組成物は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼとガイドRNAとをコードし、該ガイドRNAがヒト免疫不全ウイルスの核酸配列に相補的である、核酸であってもよく；該核酸配列を含む発現ベクターであってもよく；または、CRISPR関連エンドヌクレアーゼとガイドRNAとをコードする核酸を含み、該ガイドRNAがヒト免疫不全ウイルスの核酸配列に相補的である、薬学的組成物であってもよく；または、該核酸配列を含む発現ベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、遺伝子編集複合体はCRISPR関連エンドヌクレアーゼとガイドRNAとを含んでいてもよく、該ガイドRNAがヒト免疫不全ウイルスの核酸配列に相補的である。

#### 【0203】

組成物が核酸として投与されるかポリペプチドとして投与されるかに関わらず、組成物



は、哺乳動物細胞による取り込みを促進するように製剤化される。有用なベクターシステムおよび製剤は、上述したとおりである。いくつかの実施形態において、ベクターは、組成物を特定の細胞型に送達することができる。しかしながら、本発明はこれに限定されず、物理的送達方法（エレクトロポーション法、マイクロインジェクション、弾道粒子、および「遺伝子銃」システムなど）と同様に、他のDNA送達方法（例えば、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、リボソーム、リボプレックス、界面活性剤、およびペルフルオロ薬液を使用した化学的トランスフェクションなど）が予期される。

#### 【0204】

遺伝子編集複合体は、CRISPR関連ヌクレアーゼ（例えば、Cas9またはそのホモログ）と、レトロウイルス標的配列（例えば、HIV標的配列）と相補的なガイドRNAと、を含む。遺伝子編集複合体は、プロウイルスDNA中に様々な変異を誘導し得る。このような変異がプロウイルスを不活性化するメカニズムは様々であり得る。例えば、変異は、プロウイルスの複製、ウイルス遺伝子の発現またはプロウイルスの切除に影響を与え得る。変異は、調節配列または構造遺伝子配列中に位置し、HIVの不完全な産生をもたらしてもよい。変異は欠失を含み得る。欠失のサイズは、1ヌクレオチド塩基対から約10,000塩基対まで変わり得る。いくつかの実施形態において、欠失は、レトロウイルス核酸配列の全てまたは実質的に全てを含み得る。変異は、挿入（すなわち、プロウイルス配列に対する1つ以上のヌクレオチド塩基対の付加）を含み得る。挿入される配列のサイズも変わり得る（例えば、約1塩基対から約300ヌクレオチド塩基対）。変異は、点変異（すなわち、1つのヌクレオチドが別のヌクレオチドに置換される）を含み得る。有用な点変異は、機能的な結果（例えば、アミノ酸コドンを終止コドンに変化させる変異、または、非機能的なタンパク質の産生をもたらす変異）を有するものである。

#### 【0205】

一実施形態は、宿主細胞のゲノムに組み込まれたプロウイルスDNAを不活性化する方法である。この方法において、2つの異なるgRNA配列を展開し（deploy）、各gRNA配列はプロウイルスDNAの異なる部位を標的とする。すなわち、本発明は、単離核酸（たとえば、AAV<sub>9</sub>発現ベクター）を含む組成物に、宿主細胞をさらす工程を含む。単離核酸は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ；プロウイルスDNAの第1標的プロトスペーサー配列に相補的である第1スペーサー配列を有する第1gRNA；当該プロウイルスDNAの第2標的プロトスペーサー配列に相補的である第2スペーサー配列を有する第2gRNAを含む、単離核酸配列を含む。本方法はさらに、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ、第1gRNA、および第2gRNAを宿主細胞内で発現させる工程；CRISPR関連エンドヌクレアーゼおよび第1gRNAを含む第1遺伝子編集複合体と、CRISPR関連エンドヌクレアーゼおよび第2gRNAを含む第2遺伝子編集複合体とを、宿主細胞内で集合させる工程；第1スペーサー配列と第1標的プロトスペーサー配列との間の相補的な塩基組合せによって、第1遺伝子編集複合体を第1標的プロトスペーサー配列の標的とする工程；第2スペーサー配列と第2標的プロトスペーサー配列との間の相補的な塩基組合せによって、第2遺伝子編集複合体を第2標的プロトスペーサー配列の標的とする工程；CRISPR関連エンドヌクレアーゼで、第1標的プロトスペーサー配列のプロウイルスを切断する工程；プロウイルスDNAに少なくとも1つの変異を誘導する工程を含む。同じ多重方法（multiplex method）は、ヒト免疫不全ウイルスを有する対象を処置する方法、およびヒト免疫不全ウイルス感染のリスクを低減する方法に容易に組み込まれる。用語「組成物」は、成分の混合物のみではなく、同時に投与される必要がない別個の成分も含み得ると理解される。非限定的な例として、本発明の組成物は、核酸配列（例えば、Cas9ヌクレアーゼと、第1gRNAと、第2gRNAとをコードするAAV<sub>9</sub>発現ベクター）の別個の成分調製物を含み得る。宿主細胞を3つの成分すべてにさらす時間枠中、これらの各成分を注入により続けて投与する。

#### 【0206】

他の実施形態において、組成物は、1つ以上のCas/gRNAベクターを用いて形質転換またはトランスフェクションした細胞を含んでいる。いくつかの実施形態において、

本発明の方法は、エキスピボで適用することができる。すなわち、対象の細胞を体から取り出し、培養中に組成物で処置して例えばH I Vウイルス配列を切除し、処置された細胞を上記対象の体に戻してもよい。細胞は、対象の細胞であってもよいし、ハプロタイプ適合細胞または細胞株であってもよい。細胞は、複製を防止するために放射線が照射されていてもよい。いくつかの実施形態において、細胞はヒト白血球抗原（H L A）適合細胞、自家移植細胞、細胞株、またはそれらの組合せである。他の実施形態において、細胞は幹細胞であってもよい。例えば、胚性幹細胞または人工的な多能性幹細胞（人工多能性幹細胞（i P S細胞））が挙げられる。胚性幹細胞（E S細胞）および人工的な多能性幹細胞（人工多能性幹細胞、i P S細胞）は、ヒトを含む多数の動物種から確立されてきた。これらの種類の多能性幹細胞は、再生医療用の細胞の最も有用な供給源と考えられる。なぜなら、これらの細胞は、その多能性を保有しつつ活発に分裂する能力を維持しながら、適切な分化誘導によって、ほとんど全ての器官へと分化可能であるからである。特にi P S細胞は、自己由来の体細胞から確立することができる。したがって、胚を破壊することによって作製されるE S細胞と比較して、倫理的および社会的問題を引き起こす可能性が低い。さらに、i P S細胞は自己由来の細胞であるので、再生医療または移植療法において最大の障害となる拒絶反応を回避することが可能になる。

10

#### 【0207】

g R N A発現カセットは、当該分野で公知の方法（例えば、s i R N Aを送達する方法）によって対象へ容易に送達され得る。いくつかの局面において、C a sは、当該C a s分子の活性ドメインを含んでいるフラグメントであり得、それによって分子のサイズが削減されている。それゆえ、C a s 9 / g R N A分子は、現在の遺伝子治療に採用されているアプローチと同様に、臨床的に使用され得る。特に、細胞移植療法およびワクチン接種のためのC a s 9 / 多重g R N A安定発現幹細胞またはi P S細胞が、対象における使用のために開発され得る。

20

#### 【0208】

形質導入された細胞が、確立された方法に従って自家輸血のために調製される。約2 ~ 4週間の培養期間の後、細胞は $1 \times 10^6$ から $1 \times 10^{10}$ の間の数になり得る。この点については、細胞の増殖特性は、患者間および細胞の種類間で変わる。形質導入された細胞の自家輸血前の約72時間、表現型の分析および治療剤を発現している細胞のパーセンテージのために一部が採取される。投与については、本発明の細胞は、細胞型のL D<sub>50</sub>ならびに患者の体重および全体的な健康に適用されるときに様々な濃度における細胞型の副作用によって決定される割合において投与され得る。投与は1回投与または分割投与を介して達成され得る。成体幹細胞は、それらの産生を刺激し組織または空隙（骨髄または脂肪組織が挙げられるが、これらに限定されない）から出る、外因的に投与される因子を用いて集められてもよい。

30

#### 【0209】

（キット）

本明細書に記載の組成物は、例えば、「レトロウイルス感染症（例えばH I V感染症）を患う対象またはレトロウイルス感染症（例えばH I V感染症）に罹患している対象を治療するための療法用」とラベル付けした、適切な容器に入れられてもよい。容器は、上述したとおり、C R I S P R関連エンドヌクレアーゼ（例えば、C a s 9エンドヌクレアーゼ）をコードする、例えば、A A V<sub>9</sub>発現ベクターの核酸配列を含む組成物を、収容していてもよい。配列はさらに、H I V中の標的配列に相補的なガイドR N A、またはその核酸をコードするベクター、および1つ以上の適切な安定剤、担体分子、および/または香料などを、適宜目的の用途に合わせてコードしていてもよい。したがって、パッケージ化された製品（例えば、本明細書に記載された組成物であって、保管、出荷、または販売のために、濃縮状態で、またはすぐに使用可能な濃度でパッケージ化されている組成物の1つ以上を含む滅菌容器）およびキット（本発明の少なくとも1つの組成物（例えば、C R I S P R関連エンドヌクレアーゼ（例えば、C a s 9エンドヌクレアーゼ）をコードする核酸配列と、ウイルス中の標的配列に相補的なガイドR N Aまたは上記核酸をコードする

40

50

ベクター)、および使用上の注意書きを含む)も、本発明の範囲に含まれる。製品は、本発明の1つ以上の組成物を含む容器(例えば、ビン、ジャー、ボトル、袋など)を含みうる。それに加えて、製品はさらに、例えば、パッケージ材料、使用上の注意書き、注射器、送達装置、緩衝剤、または予防または処置が求められる状態を処置または監視する調整試薬を含んでよい。

#### 【0210】

いくつかの実施形態において、キットは、1つ以上の追加の抗レトロウイルス剤(例えば、逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、または侵入阻害剤)を含んでもよい。追加の薬剤(agent)は、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(例えば、Cas9エンドヌクレアーゼ)と、ヒト免疫不全ウイルスの標的配列に相補的なガイドRNAとをコードする核酸配列として、またはその核酸をコードするベクターとして、同じ容器と一緒に収容されてもよい。または、それらは別々に収容されてもよい。CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(例えば、Cas9エンドヌクレアーゼ)と、ヒト免疫不全ウイルスの標的配列に相補的なガイドRNAとをコードする核酸配列、またはその核酸をコードするベクター、および追加の薬剤を、使用直前に混合させてもよい。また、それらを別々に投与してもよい。

10

#### 【0211】

製品はまた、説明(例えば、印刷されたラベル、または挿入物、または当該製品の用途を説明する他の媒体(例えば、音声テープまたは映像テープ))も含んでよい。上記説明は容器に付随させる(例えば、容器に貼る)ことができ、当該製品内の組成物の投与の仕方(例えば、投与の頻度および経路)を説明でき、当該製品の各表示を説明でき、他の用途を説明できる。上記組成物は、すぐに投与できる状態であってよく(例えば、適切な服用量単位になっている)、1つ以上の薬学的に許容できる追加のアジュバント、担体、または他の希釈剤および/または追加の治療薬を含んでよい。あるいは、上記組成物は、希釈剤および希釈の指示を伴った濃縮形態で提供されてもよい。

20

#### 【0212】

本発明のさまざまな実施形態を説明してきたが、それらは例示としてのみ提示されたものであり、限定として提示されたものではないことを理解されたい。開示された実施形態は、本明細書の開示に従い、本発明の精神または範囲から離れることなく、さまざまに変更することが可能である。したがって、本発明の範囲は、上述の実施形態のいずれによっても限定されるべきものではない。

30

#### 【0213】

本明細書で言及したすべての文献は、参照により本明細書に援用される。本願で引用されたすべての刊行物および特許文献は、参照によって援用され、各刊行物または各特許文献が個別に示されたのと同じ効果を持つ。出願人は、本明細書でさまざまな文献を引用することにより、いかなる特定の文献も本発明に対する「従来技術」だと認めたわけではない。本発明の組成物および方法に関する実施形態を以下の実施例で説明する。

#### 〔実施例〕

##### 〔実施例1：遺伝子編集によるHIV-1 DNAの切除：インビボ研究〕

潜伏感染ヒト細胞および動物疾患モデルから組み込まれたHIV-1 DNA配列を除去するために、CRISPR/Cas9遺伝子編集戦略を開発した。HIV-1 DNAの除去効率について、ウイルスゲノムを保有するマウス組織を調査した。

40

#### 【0214】

##### <材料および方法>

##### (AAV9送達ベクターの構築)

AAV送達システムを作成するバックグラウンドプラスミド(background plasmid)は、px601-AAV-CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHpA;U6::Bsa1-sgRNAだった(「px601」と略記する)(Ran FA, et al. Nature 2015; 520:186-191)。LTRおよびGag標的に対応するDNA配列を包含するオリゴヌクレオチドを、px601におけるBsa1部位のU6プロモーターの前にクローニングした。LTRおよびGagを標

50

的とする gRNA を図 1 A に示し、さらに以下にも示し、PAM 配列を太字で示す。

【0215】

【化1】

gRNA LTR-1 : GGATCA GATATC CAC TGA CCT **TTG GAT**

【0216】

【化2】

gRNA Gag D : GGA TAG ATG TAA AAG ACA CCA **AGG AGG**

10

【0217】

シーケンシングによる確認後、20 ng の pX601 saCas9 gRNA HIV-1 LTR1/GagD プラスミドを、プラスミド DNA 産生、DNA 構造 / 配列分析、AAV 血清型へのパッケージング、および高力価産生のために、Penn Vector Core, Gene Therapy Program (Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania) に提供した。

【0218】

(マウス胚繊維芽細胞 (MEF))

HIV-1 Tg26 マウス胚繊維芽細胞 (MEF) を、妊娠 17 日目の胚から機械的および酵素的分離によって調製し、10% ウシ胎児血清が補充された DMEM に維持した。MEF 細胞を上述のように調製し (Behringer et al., Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual, Fourth edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014)、HIV 導入遺伝子に特異的なプライマーを使用した PCR によって遺伝子型を決定した (genotyped) (Kopp JB, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:1577-1581; Dickie P, et al. Virology 1991; 185:109-119)。

20

【0219】

(Tg26 MEF のインビトロ形質導入)

Tg26 MEF 細胞に、AAV-CRISPR/Cas9 を MOI が  $10^5$  および  $10^6$  で形質導入させた。ウイルス接種材料は Opti-Mem で調製し、最小量 (6 ウェルプレートにおいて、0.5 mL / ウェル) で 1 時間ウイルスをインキュベーションし、1 mL の増殖培地を加え、一晩放置した。翌日、接種材料を除去し、細胞を PBS で洗浄し、新鮮な増殖培地を供給した。形質導入してから 1 週間後、DNA 分析のために細胞を回収した。

30

【0220】

(インビボ rAAV<sub>9</sub>:saCas9/gRNA 投与)

100 μL の AAV<sub>9</sub> CRISPR/Cas9 またはコントロール動物へは 100 μL の PBS をマウスの尾静脈を通じて 0 日目と 5 日目に注入した。5 日目において、1 対 (AAV および PBS) の動物について、血液試料用に眼窩後方出血させ、安楽死させて組織を回収した。別の対の動物については、AAV-Cas9 または PBS の 2 回目の尾静脈からの注入を行い、眼窩後方出血させてから 7 日目に組織の回収のために安楽死させた。組織として、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、およびリンパ球回収用末梢血を回収した。

40

【0221】

(DNA 分析)

製造業者のプロトコールにしたがって、NUCLEOSPIN Tissue kit (Macherey-Nagel) を使用して、細胞 / 組織からゲノム DNA を単離した。25 ng のゲノム DNA について、Terra PCR direct polymerase mix (Takara, Clontech) を用いて、次に示す条件で PCR を行った: 98 °C において 3 分間、35 サイクル (98 °C において 10 秒、68 °C において 1.30 分)、68 °C において 5 分間、そして 1% アガロースゲルで分離させた。5 μL の最初の PCR 反応物を使用して、同じ条件下で、ネステッド PCR (nest

50

ed PCR)を行った。PCR産物を精製し、TAベクター (Invitrogen) にクローニングして、Sanger sequencing (Genewiz, South Plainfield, NJ, USA) に送り、参照配列として HIV-1 NL4-3 配列を使用して、Clustal Omega (EMBL-EBI) ソフトウェア (Cambridgeshire, UK) でアライメントした (aligned)。

#### 【0222】

##### (RNA分析)

製造業者のプロトコールに従い、TRIzol試薬 (Ambion, Foster City, CA, USA) を使用して組織から全RNAを調製し、次に、RNeasy Mini Prep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用してDNase I処理およびRNAクリーンアップを行った。次に、1 µg のRNAを使用して、M-MLV逆転写反応 (Invitrogen) を行った。cDNAを希釈し、細胞ラット - アクチン遺伝子を参照して、HIV-1 GagおよびEnv遺伝子に特異的なTaqMan qPCRを使用して定量した (プライマーについては表1を参照されたい)。qPCR条件: 98 °C で5分間、45サイクル (98 °C で5分間、45サイクル (98 °C で15秒間、取得と共に (with acquisition) 62 °C で30秒間、72 °C で1分間)。反応を行い、データは相対定量モードを使用して、LightCycler480 (Roche, Basel, Switzerland) で分析した。

#### 【0223】

##### <結果>

試験プラットフォームとして、GagのC末端およびPol遺伝子のN末端に及び3.1 kbの欠失 (図1A) を有するHIV-1 NL4-3 のゲノム由来の導入遺伝子を保有する、HIV-1 Tg26トランスジェニックマウスを使用した。増殖性HIV-1複製は報告されていない一方、低レベルのウイルス転写物の発現は、疾患発症前に様々な組織で検出されている (Curreli S, et al. Retrovirology 2013; 10:92; Kopp JB, et al., Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:1577-1581; Santoro TJ, et al., Virology, 1994; 201:147-151)。HIV-1 関連腎症 (HIVAN) を含む、HIV-1 感染およびAIDSの選択的な臨床的特徴が観察されている (Barisoni L, et al. Kidney Int 2000; 58:173-181; Dickie P, et al. Virology 1991; 185:109-119)。マウスの早期致死性により、TgマウスをC57BL/6Lバックグラウンドと交配し、二次疾患が制限され、12月齢まで生存することができる動物を作成した。Cas9およびgRNAを発現する遺伝子の送達に関し、AAV9ベクターを選択した。AAV9ベクターの使用に関連する主要な課題の1つは、そのゲノム受容能力に関する。この課題を軽減するために、より小さなCas9またはホモログであるsaCas9 (3.3 kDa) を選択した。それは、Staphylococcus aureus由来であり、Streptococcus pyogenes由来の元のCas9 (spCas9) の効率と同様の効率でゲノムを編集することができ、spCas9に比べて1 kb以上短い (Ran FA, et al. Nature 2015; 520:186-191)。HIV-1 LTR (gRNA LTR 1) およびGag遺伝子 (gRNA Gag D) を標的とする2つのgRNAに対応するDNA配列と共に、saCas9をコードする遺伝子をAAV9ベクターDNAにクローニングした。図1Aは、Tg26マウスにおいて導入遺伝子を作成するために除去したウイルス遺伝子領域を強調したHIV-1ゲノムの構造組織と、gRNA LTR 1およびgRNA Gag Dの位置を示す。最初のステップとして、エキスピボ研究を行い、Tg26動物由来のマウス胚線維芽細胞 (MEF) の培養物を調製 (develop) し、組込みHIV-1 DNA部位の切除における、saCas9/gRNAを含む組換えAAV9 (rAAV9) である、rAAV9:saCas9/gRNAの能力を評価するために使用した。図1Bは、LTRについて - 413 / - 391 およびGag遺伝子について + 888 / + 910 に及びプライマー対 (P1およびP2) を利用したPCR遺伝子増幅の結果を示す (図1A)。

#### 【0224】

予測される全長増幅産物である1323塩基対 (bp) に加えて、345 bpのより小さな断片がrAAV9処置細胞で検出された。これらは、コントロールの未処置細胞では見られなかった。シーケンシングのデータの結果によって、2つのガイドRNA間にわ

10

20

30

40

50

たる 978 bp の DNA フラグメントの切除、および切除後の残存ウイルス DNA の再結合を確認した（模式図を図 1 A に示す）。インビボ研究において、2 匹の Tg26 動物および 2 匹の月齢が一致する（2 月）コントロールマウスを選択し、 $10^{12}$  の機能的な力価の rAAVg:saCas9/gRNA を尾静脈注入した。5 日後、注入を繰り返し、5 日後に動物を犠牲にし、肝臓、心臓、脾臓、肺、腎臓、脳および血液リンパ球を採取した（図 2 A）。初回通過実験（first pass experiment）において、肝臓の DNA を、P1 および P2 プライマーを用いた PCR 増幅により分析した。MEF 細胞培養物の結果と一致して、PCR 産生物のゲル分析の結果は、rAAVg:saCas9/gRNA 処置マウスからの増幅後の、全長（1323 bp）および短縮型（345 bp）DNA フラグメントの存在を示したが、月齢が一致したコントロール動物においては見られなかった（図 2 B 左）。ネステッドプライマー対である、P1'（-375 / -354）および P2'（+755 / +763）（図 1 A に示す）の存在下での DNA 増幅の伸長により、160 bp のさらなる小さな DNA フラグメントを得た（図 2 B、中央および右パネル）。160 bp DNA の DNA シークエンシングの結果、gRNA LTR1 および gRNA GagD におよぶ 978 bp の DNA 配列の切除を確認した（図 2 C）。他の組織における HIV-1 DNA に対する rAAVg:saCas9/gRNA の効果を評価した。図 2 D に示すように、DNA シークエンシングによって確認されたように、gRNA LTR1 および gRNA GagD によって、LTR および Gag 遺伝子間の HIV-1 DNA の切除を示す、特徴のある 160 bp の DNA フラグメントは、rAAV9:saCas9/gRNA 処置動物のすべての組織で観察された（レーン 2）。これらはコントロールである未処置動物では観察されなかった（レーン 1）。160 bp の増幅産物が、追加コントロールとして担う、rAAVg による MEF の処置において産生した（レーン 3）。並行研究において、切除戦略効果を、別の小動物モデル、すなわち、ラットで評価した。ラットは、マウスモデルの構築で使用した同一の導入遺伝子を包含する。ここで、rAAVg の眼窩後方経路からの接種を利用した。標的的特異的 PCR によって生成した増幅産物のダイレクトシークエンシングによって確認したように、30 日齢のラットに 5 日間隔で、 $2.73 \times 10^{12}$  の rAAVg:saCas9/gRNA を 2 回注入し、循環血球の 5' - LTR および Gag 遺伝子におよぶ HIV-1 DNA セグメントの切除を導いた。図 3 A、3 B に示すように、切除されたフラグメントのいくつかの PCR 産生物のシークエンシングデータの詳細な分析および HIV-1 DNA を参照としたアラインメントによって、rAAVg:saCas9/gRNA で処置したマウスの組織において、ウイルス DNA の切除にいくつかの変異が見られることを確認した。ウイルス遺伝子発現量は、定量 RT-PCR を用いて Gag および Env 転写物量を測定することによって調べた。図 3 A、3 B に示すように、ウイルス RNA 量は、rAAVg:saCas9/gRNA で処置した動物から得られた循環血球において劇的に減少し、ウイルスゲノム切除は、HIV-1 DNA の組込みコピーのウイルス遺伝子発現量に顕著な影響を与えることを示した。リンパ節におけるウイルス RNA の結果はまた、処置ラットにおけるウイルス RNA の抑制を示した。

【0225】

表 1 は、使用した PCR プライマーのヌクレオチド配列を示す。

【0226】

10

20

30

40

50

【表 1】

プライマー	配列
<i>LTR-Gag PCR</i>	
P1 (LTR F [-413/+391] T361)	5'-GATCTGTGGATCTACACACACA-3'
P2 (Gag R [+888/+910] T458)	5'-CCCACTGTGTTTAGCATGGTATT-3'
P1 (ネステッド LTR F [-375/+354])	5'-TTGGCAGAACTACACACAGGG-3'
P2 (ネステッド Gag R [+744/+763])	5'-ACCACTTGCCCTGGAGGT-3'
<i>Tagman qPCR</i>	
HIV-1 Env F	5'-TCCTTGGGATGTTGATGATCT-3'
HIV-1 Env R	5'-TGGCCCAACATTATGTACC-3'
HIV-1 Env プローブ	5'-FAM-TGGTGGTTGCTCTTCCACACA-ZEN-IowaBlackFQ-3'
HIV-1 Gag F	5'-AAGTAGTGTGTGCCCTCTG-3'
HIV-1 Gag R	5'-TCGAGAGATCTCTCTGGCT-3'
HIV-1 Gag プローブ	5'-FAM-CTGTTGGGGCGCCACTGCTA-ZEN-IowaBlackFQ-3'
Rn b-アタチン F	5'-AGCGCAAGTACTCTGTGG-3'
Rn b-アタチン R	5'-AACAGTCCGCTAGAAGCAT-3'
Rn b-アタチン プローブ	5'-FAM-CCTCCATCGTGACCGCAA-ZEN-IowaBlackFQ-3'

10

## 【0227】

## &lt; 考察 &gt;

本明細書において証明したように、AAV<sub>9</sub>系 sCas9 / gRNA 遺伝子編集戦略システムは、HIV-1 DNA 配列を保有するトランスジェニックマウスにおける、HIV-1 ゲノムの組込みコピーのセグメントを切除することができる。これらの結果は、HIV-1 感染ヒト化マウスの HIV-1 DNA を編集する、sCas9 / gRNA の送達における rAAV<sub>9</sub> の同様の能力を示す。さらに、これらの結果は、治療的 rAAV<sub>9</sub> で処置した動物におけるウイルス RNA 産生の抑制、および血液およびリンパ節における sCas9 / gRNA によるウイルスゲノムの特定セグメントの切除を証明する。

20

## 【0228】

本研究により、強力な HIV-1 遺伝子除去戦略としての、CRISPR / Cas9 プラットフォーム技術の利用が一歩前進する。原則として、本技術は、感染動物、特にヒトにおいて、編集効率を向上し、それ自体は同様の良好な結果を導く、抗レトロウイルス療法と共に、改良および使用され得る。CRISPR / Cas9 技術に対する AAV 送達の容易性および CRISPR / Cas9 の柔軟性は、ヌクレオチド変動が最小限である、HIV-1 の DNA 配列を標的とする新規の gRNA の開発において、適切とみなされれば、治療戦略を個別化するこの治療的プラットフォームへの付加価値をもたらす。

30

## 【0229】

〔実施例 2：前臨床動物モデルにおける、sCas9 および多重 sgRNA による、インビボでの HIV プロウイルスの根絶〕

本研究において、sCas9 / sgRNA システムと、効率的に HIV-1 ゲノムを根絶する、保存された HIV-1 調節および構造領域を標的とする sgRNA との組合せを最適化し、HIV-1 Tg26 トランスジェニックマウスおよび EcoHIV 増強ポタールシフェラーゼ (eLuc) 感染マウス (Rabinovich, B. A. et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105, 14342-14346; Potash, M. J. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 3760-3765, doi:10.1073/pnas.0500649102 (2005)) の両方において、インビボでの HIV-1 プロウイルス切除に関し、二重 (duplex) 対四重 (quadrex) sgRNA と sCas9 との実行可能性および有効性を試験した。さらに、オールインワン (all-in-one) AAV ベクターによって送達された多重 sgRNA / sCas9 がインビボにおいて暴露前予防投与 (PrEP) として使用し得ることを証明した。

40

## 【0230】

## &lt; 材料および方法 &gt;

(高効率である gRNA のバイオインフォマティクス設計)

spCas9 システムに関する拡張スペーサー配列 (NNNN[20nt]NGGNNN) を提供する、高効率の gRNA 設計のために、Broad Institute gRNA designer tool (broadinstitute.org) を使用した。最適のオンターゲット切断に対する sCas9 PAM 配列は、NGG PAM を含み、確立された spCas9 システムを用い

50

得るので、NNGRRTのみを使用した。これを試験するために、H I V - 1 L T R プロモーター領域を標的とする3つのs g R N A、G a gを標的とする3つのs g R N A、およびP o 1を標的とする1つのs g R N Aを選択した。これらのs g R N A標的に対するオリゴヌクレオチドを表2に列挙した。

#### 【0231】

(プラスミドおよび多重g R N A発現A A Vベクターのクローニング)

pNL4-3-EcoHIV-eLuc レポーターウイルスを上述の通りに構築した (Yin, C. et al. AIDS, doi:10.1097/QAD.0000000000001079 (2016); Zhang, Y. et al. Scientific reports 5, 16277, doi:10.1038/srep16277 (2015))。5' -CACCおよび3' -AAAC オーバーハングを有する、各標的部位に対するオリゴヌクレオチド対 (表2) は、Alpha DNA (Montreal, Canada) から得た。標的シード配列を、B s a I 部位を介して、pX601- AAV-CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHpA;U6::BsaI-sgRNA (Addgene # 61591; Ran, F. A. et al. Nature 520, 186-191, doi:10.1038/nature14299 (2015)) にクローニングした。p X 6 0 1 A A V を B s a I で消化し、Antarctic Phosphatase で処理し、Quick nucleotide removal kit (Qiagen) で精製した。等量の相補的オリゴヌクレオチドをアニーリング用T4ポリヌクレオチドキナーゼ (P N K) バッファーに混合させた。これらのアニールしたシード対をT4 P N Kでリン酸化し、T7 DNAリガーゼを使用してB s a I 消化A A V にライゲーションした。陽性クローンをP C R スクリーニングによって特定し、サンガーシーケンシングによって確認した。多重s g R N A クローニングに関し、2つのアプローチを構築した：2種類の制限酵素による従来のクローニングおよびIn-FusionシームレスP C R クローニングである。2種類の制限酵素による戦略において、まず標的A A V ベクターをK p n I で消化および末端平滑化し、E c o R I で消化した。一方、予測されるs g R N A 発現カセットを保有する伝達挿入物 (transfer insert) をまず、N o t I で消化および末端平滑化し、E c o R I で消化した。挿入物およびベクターをQIAquick Gel Extraction Kitによって精製後、標準のオーバーハング/平滑末端クローニングを行った。ポジティブクローンである、二重s g R N A を発現しているA A V クローンを、N o t I およびB a m H I またはE c o R I による2種類の制限酵素によって特定した。In-Fusion P C R クローニング戦略において、標的A A V ベクターをE c o R I およびK p n I で線形化した。(新しいs g R N A のさらなる追加のために) 3' 末端K p n I 部位に変異を有するプライマー対T795 / T796 (表2) および伝達s g R N A A A V ベクターをテンプレートとして使用したP C R によって、挿入フラグメントを産生した。精製後、線形ベクターおよび挿入P C R 産生物を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いてライゲーションした。ポジティブクローンである、二重s g R N A を発現しているA A V クローンを、N o t I およびB a m H I またはE c o R I による2種類の制限酵素によって特定した。クローニング戦略の両方に対して同様の概念実証を用いて、二重s g R N A / s a C a s 9 ベクターは、さらなる1 - n のs g R N A 発現カセットを挿入する標的ベクターとして機能し得る。選択s g R N A のシード配列において、消化部位 (K p n I、N o t I、E c o R I) の非存在の確認が唯一1つの注意である。

#### 【0232】

(細胞培養、トランスフェクション、およびホタルルシフェラーゼレポーターアッセイ)

H E K 2 9 3 T 細胞を、37 °C および5 % C O <sub>2</sub> の加湿雰囲気下における、10 % F B S および抗生物質 (100 U / m L ペニシリンおよび100 μ g / m L ストレプトマイシン) を含む高グルコースD M E M において培養した。ルシフェラーゼレポーターアッセイについて、細胞を96ウェルプレートで培養 (3 × 10<sup>4</sup> 細胞 / ウェル) し、標準のリン酸カルシウム沈殿プロトコールを使用して、図示する (indicated) プラスミドをトランスフェクションした。48時間後、細胞を溶解し、2104 ENVISION (登録商標) Multilabel Reader (PerkinElmer) でONE-GLOルシフェラーゼアッセイシステムを用いて分析した。

#### 【0233】



(TERRA (商標) PCRダイレクトジェノタイピングおよびネステッドPCR)

PCRを使用した高スループットジェノタイピング (genotyping) を行うために、細胞を96ウェルプレートに播き、図示するベクターをトランスフェクションした。48時間後、培地を除去し、1ウェル当たり45  $\mu$ Lの50 mM NaOHで細胞を処置し、95 で10分間インキュベートした。5  $\mu$ Lの1 M Tris-HCl (pH 8.0) で中和後、0.5  $\mu$ LのDNA抽出物を用いて、TERRA (商標) PCR Direct Polymerase Mix (Clontech) および図示するプライマーを使用した10  $\mu$ LのPCR反応に使用した。EcoHIV-eLuc接種マウスから単離した組織および臓器の切除されたHIVプロウイルスDNAのジェノタイピングに関し、二次汚染を避けるために別個のはさみにより各組織を粉々にし、55 の水浴において、1% SDS、10 mMのTris (pH 8.0)、5 mM EDTAおよび100 mM NaClから成る溶解バッファー中のプロテイナーゼKで消化させた。そしてゲノムDNAを、従来のフェノール/クロロホルム抽出法によって組織溶解物から抽出した。特定のTg26マウス組織からゲノムDNA、RNA、およびタンパク質を抽出するために、組織サンプルをすり鉢とすりこぎで機械的に破壊し、製造業者のプロトコールにしたがって、NUCLEOSPIN (登録商標) Tissue kitおよびNUCLEOSPIN (登録商標) RNA/Protein kit (CLONTECH) を用いて処理し、ゲノムDNA、RNAおよびタンパク質を抽出した。PCRジェノタイピングを行うために、DNAサンプルを98 で3分間変性させてから、1分/kbで68 において35サイクルのアニーリング/伸長ステップを行う従来の2ステップPCRを行った。ネステッドPCRに対して、図示するプライマーを用いて22~25サイクルの1回目の反応を行い、ネステッドPCRプライマーを用いて35サイクルの2回目のPCR反応を行った。

#### 【0234】

(定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR))

図示する臓器/組織の全RNAは、製造業者の指示に従って、RNeasy Mini kit (Qiagen) を使用して抽出した。残留する可能性があるゲノムDNAを、RNase-Free DNase Set (Qiagen) を使用したオンカラムDNase消化によって除去した。各サンプルにつき1  $\mu$ gのRNAについて、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen, Grand Island, NY) を使用して、ランダムヘキサヌクレオチドプライマーを用いてcDNAに逆転写させた。cDNAまたはHIVゲノムDNAの定量PCR (qPCR) 分析を、SYBR (登録商標) Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) を使用して、LightCycler480 (Roche) で行った。saCas9、Gag、Env、Tatに対するプライマー対を表2に示すように設計した。ヒト2ミクログロブリンおよびマウスPpiaハウスキーピング遺伝子に対するプライマーはRealTimePrimers (Elkins Park, PA) から得た。HIV切除定量に対するプライマーは図18A~18Cに示すように設計した。各サンプルは3連で試験した。サイクル閾値 (Ct) 値は、標的遺伝子およびハウスキーピング遺伝子に関する図から得た。ハウスキーピング遺伝子および標的遺伝子間のCt値の違いは、Ct値として示した。Ct値は、実験サンプルのCt値から、コントロールサンプルのCt値を引いて得られた。遺伝子発現またはHIV DNA切除における相対倍率または割合は $2^{-Ct}$ として計算した。いくつかの場合において、増幅曲線および融解ピーク曲線を、比較分析に使用した。

#### 【0235】

(AAVおよびEcoHIV-eLucパッケージングおよび精製)

AAV-DJおよびAAV-DJ/8の少量および大量の調製は、公開されているプロトコール (Zolotukhin, S. et al. Gene Ther 6, 973-985 (1999)) に従って、ViGene Biosciences Inc. (Rockville, MD) でのAAV産生サービスによって行った。簡潔に示すと、HEK293T細胞に3つのベクターをコトランスフェクションし、イオジキサノール勾配超遠心分離によってウイルス粒子を回収および精製した。ウイルスを濃縮し、リン酸緩衝食塩水で製剤化した。ウイルス力価は、線形ゲノムプラスミドを標準としたリアルタイムPCRを使用して、1 mLのサンプル中のウイルスゲノムコピー数 (GC/mL) によって決定した。

## 【0236】

パッケージング複製可能であるEcoHIV-eLucおよびHIV<sub>NL</sub>-BaL-eLucについて、BLIレポーターを有するEcoHIVまたはHIV-1(図22A、22B)のいずれか一方の全長分子クローンをコードするプラスミドDNAを、LIPOFECTAMINE 3000(Invitrogen)を使用して、HEK293T細胞(Invitrogen)に導入した。トランスフェクションしてから24時間後に、トランスフェクション試薬を含む培地およびDNAを吸引し、細胞をPBSで2回洗浄した。新鮮な培地を加えた。トランスフェクションしてから48時間および60時間後に、上清を回収し、0.45 μmのフィルターでろ過した。製造業者の指示に従ったLenti-X Concentrator(Clontech, CA, USA)を使用するか、20,000×gでの20%スクロース密度遠心分離を4℃で4時間行うことにより、レンチウイルス上清を濃縮した。EcoHIV-eLucについて、p24の定量は、製造業者のプロトコールにしたがって、ELISA(XpressBio, Frederick, MD)によって行った。蛍光活性化細胞選別器(FACS)分析によって分析したGFP発現について、GHOST(3) X4/R5を基にHIV<sub>NL</sub>-BaL-eLucの力価を決定した。

10

## 【0237】

(ヒト化BLTマウスのウイルス接種)

すべての動物実験および手順は、ピッツバーグ大学またはテンブル大学の動物実験委員会(IACUC)によって承認された。ヒト胎児肝臓、胸腺および同性の肝臓から単離されたCD34<sup>+</sup>細胞が移植された、NSG(登録商標)株を基にしたヒト化BLTマウスをJackson Lab(Bar Harbor, ME)から購入した。感染に関し、イソフルラン吸入を通じて(2L/分の酸素流量と共に、2~2.5%)、マウスを麻酔した。中サイズのピペットチップを使用して、膣管に20 μLのウイルス上清をゆっくりとピペティングすることによって、膣内接種(マウス1匹当たり全量 $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>のHIV<sub>NL</sub>-BaL-eLuc)を行った。29ゲージのニードルおよびインスリンシリンジを使用して、100 μLの図示するウイルス力価を腹腔内に注入することによって、腹腔内接種(マウス1匹当たり全量 $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>のHIV<sub>NL</sub>-BaL-eLuc)を行った。BLTマウスにおけるHIV感染は、インビボBLIを用いて可視化し、長期的なHIV伝播を示した。AAV-DJ/8/Cas9-sgRNA投与前の少なくとも70日間以上、インビボで検出できるHIV-レポーター活性が存在しない可能性のある潜伏を示すために、選択したHIV感染BLTマウスを予め測定した。

20

30

## 【0238】

(インビボAAV注入)

Tg26トランスジェニックマウスにおけるsgRNA/saCas9遺伝子送達効率および機能アッセイについて、100 μLの未精製AAV-DJ血清型、または、全量100 μLである、血清を含まない1×DMEMで希釈した5 μLの精製AAV-DJ/8血清型を、尾静脈を通じて動物に注入した。AAV-DJを注入したマウスについて、グループ1を犠牲にし、グループ2には最初の注入から1週間後にさらに注入した。グループ2は2回目の注入から1週間後に犠牲にした。コントロールマウスには、空ベクターを有するAAVウイルスを注入した。AAV-DJ/8を注入したマウスについて、グループ1およびグループ2間の間隔は2週間だった。選択した臓器の組織サンプルを、すり鉢とすりこぎで機械的に破壊し、ユーザーマニュアルに従って、NUCLEOSPIN(登録商標)Tissue kitおよびNUCLEOSPIN(登録商標)RNA/Protein kit(CLONTECH)を用いて処理し、ゲノムDNA、RNAおよびタンパク質を抽出した。

40

## 【0239】

EcoHIV-eLucを接種したNCrヌードマウスへのAAV-DJ/8のインビボ注入において、全量100 μLのEcoHIV-eLucの上清を眼窩後方注入後すぐに、同じ注入部位に、各マウスの右眼の血洞への眼窩後方注入のために、全量10 μLの精製AAV-DJ/8をまず希釈した。当該上清は、ELIZA(ZeptoMetrix)によって決定した全量250 ngのp24を含んでいた。また、当該精製AAV-DJ/8は、90 μLのPBSに、saCas9/sgRNA( $3.07 \times 10^{14}$  GC/mL)を含

50

んでいた。

#### 【0240】

B L Tマウスにおける四重 s g R N A / s a C a s 9 / A A V - D J / 8 送達を、腔内もしくは静脈内または両方の経路によって行った。上述の H I V 接種と同様に、1匹の B L Tマウス当たり全部で  $6.14 \times 10^{12}$  の G C の AAV-DJ/8/saCas9-sgRNAを含む、全量  $20 \mu\text{L}$  の P B S を腔内接種した。1匹の B L Tマウス当たり全部で  $6.14 \times 10^{12}$  の G C の AAV-DJ/8/saCas9-sgRNAを含む、 $100 \mu\text{L}$  の P B S を、29ゲージのニードルを有するインスリンシリンジを使用して、右眼の血洞を通じて（眼窩後方注入で）静脈内接種を行った。

#### 【0241】

（生物発光イメージング（B L I））

ウイルス接種してから図示する時点でイメージングを開始した。すべてのイメージング中、イソフルラン吸入を通じて（ $2 \text{ L} / \text{分}$ の酸素流量と共に、 $2 \sim 2.5\%$ ）、マウスを麻酔した。D - ルシフェリンカリウム塩（Gold BioTechnology, Olivette, MO）を滅菌 P B S に溶解し、 $150 \text{ mg} / \text{kg}$  体重の用量で腹腔内注入した。生物発光イメージを、I VIS Lumina XR小動物光学イメージングシステム（Perkin Elmer, Hopkinton, MA）を用いて、2分間得た（光フィルター開、ピニング  $8 \times 8$ 、f/stop 1、視野  $100 \text{ mm}$ ）。

#### 【0242】

（画像解析）

すべてのイメージ分析は、Living Image 4.3.1を用いて行った。関心領域（R O I）は、測定領域のまわりまたは比較用に動物全体のまわりに設定し、平均輝度値（ユニット： $\text{p} / \text{s} / \text{cm}^2 / \text{s t r}$ ）をすべてのイメージ評価に用いた。画像に関し、イメージをウィンドーに表示させ、マウスに隣接する背景レベル上の光出力すべてを見た。最大輝度値  $110,000 \text{ p} / \text{s} / \text{cm}^2 / \text{s t r}$  をイメージングスケールの最高位（high end）として選択し、背景カットオフを  $6,000 \text{ p} / \text{s} / \text{cm}^2 / \text{s t r}$  に設定し、これはウイルス接種前の2つの異なる時点においてイメージングした、マウスの平均光放出だった。

#### 【0243】

（ゲノムDNA、RNAおよびタンパク質抽出）

選択した臓器の組織サンプルを、すり鉢とすりこぎで機械的に破壊し、ユーザーマニュアルに従ったゲノムDNA、RNAおよびタンパク質の抽出に続いて、NUCLEOSPIN（登録商標）Tissue kitおよびNUCLEOSPIN（登録商標）RNA/Protein kit（CLONTECH）を使って処理した。抽出した組織を、殺菌し、汚染物質が存在しないはさみを使って細かく刻み、プロテイナーゼKおよび $1\%$  S D Sを含む溶解バッファー（ $2.5 \text{ mM}$  T r i s - 塩基、 $5 \text{ mM}$  E D T A、 $5 \text{ mM}$  N a C l、 $\text{pH} 8.0$ ）に加え、 $55^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートした。インキュベート後、得られた混合物を、一定量のフェノール： $\text{CHCl}_3$ ：イソアミルアルコール（ $25:24:1$ ）で10分間反転（inversion）させて抽出を行った。混合物を10分間  $12,000 \text{ RPM}$  で遠心分離させ、水相を除去し、再度一定量の  $\text{CHCl}_3$ ：イソアミルアルコール（ $24:1$ ）で抽出を行い、遠心分離で分離した。抽出したDNAを沈殿させるために、一定量のイソプロパノールを除去した水相に加え、混合物を15分間反転させた。DNAを10分間  $12,000 \text{ RPM}$  で遠心分離させて、ペレット化した。次に、DNAペレットを、 $75\%$  エタノールで洗浄し、空気乾燥させた。ほぼ乾燥させて、TEバッファー（ $\text{pH} 8.0$ ）をペレットに加え、 $55^\circ\text{C}$ で一晩分離した（resolved）。

#### 【0244】

（TAクローニングおよびサンガーシーケンシング）

関心があるバンドをゲル精製し、p C R I I T - Aベクター（Invitrogen）内にダイレクトクローニングし、個々のクローンの核酸配列をユニバーサルT7および/またはSP6プライマーを使用して、Genewizにおけるシーケンシングによって決定した。

#### 【0245】

10

20

30

40

50

(免疫細胞化学および免疫組織化学)

細胞を4%パラホルムアルデヒドで、続いてモノクローナル抗HA抗体(1:200、Proteintech, Cat# 66006-1-Ig)による標準の免疫細胞化学で固定した。Hoechst陽性核と比較した、saCas9-HA陽性細胞の割合を、3ウェルに対して、1ウェル当たり6つの無作為領域において定量した。免疫組織化学に関し、急速凍結した組織/臓器を10μmのクリオスタット切片にし、10分間4%パラホルムアルデヒドで固定した。洗浄後、0.5%のTriton X-100で透過させ、10%正常ロバ血清でブロッキングし、0.1%のTriton X-100を含むPBS中のウサギ抗HAポリクローナル抗体(1:100、Proteintech, Cat# 51064-2-AP)で、切片を一晩4℃でインキュベートした。10分間で3回洗浄後、切片を対応するALEXA FLOUR(登録商標)コンジュゲートロバ二次抗体(1:500; Invitrogen, Grand Island, NY)およびファロイジン(100nM; Cat. # PHDR1 cytoskeleton, Inc.)を用いて、室温で1時間インキュベーションした。核の対比染色にHoechst 33258を用いた。

10

【0246】

(統計解析)

定量データは2~4の独立した試験からの平均±標準偏差(SD)を示し、スチューデントt検定によって評価した。<0.05または<0.01であるp値は、統計学的に有意に異なるとした。EcoHIV感染マウスモデルにおけるBLIデータに関し、スチューデントt検定および線形混合効果モデルを、背側および腹側の両方それぞれからのBLIによって測定された、saCas9+EcoHIVおよびEcoHIV間の経時の全光子流速変化の比較に使用した。

20

【0247】

<結果>

(saCas9/sgRNAシステムは効率的にHIV-1プロウイルスDNAを切除する)

saCas9システムの有効性を測定するために、HIV-1 LTR(図4A)を標的とする3つのsgRNAを、最適のPAM NNGRRNを使用して選択した。EcoHIV-eLucレポーターアッセイおよびダイレクトPCRジェノタイピングを記載のとおり行った(Yin, C. et al. AIDS, doi:10.1097/QAD.0000000000001079 (2016))。機能的レポーターアッセイおよびPCRジェノタイピングによるHIV-1の成功した切除をより確実に特定するために、sgRNA組合せ法を採用した。図4Bに示すように、saCas9の存在下、選択した3つのLTR sgRNA間のすべての組合せで、EcoHIV-eLuc活性がほぼ完全になくなった(95~99%まで)。これらの設計したsgRNAに対するsaCas9 PAMがspCas9システムと同じPAM(NGG)を利用しているので、これらのシード配列をレンチウイルス(LV)-WGベクターにクローニングした(Yin, C. et al. Functional screening of guide RNA targeting the regulatory and structural HIV-1 viral genome for a cure of AIDS. AIDS, doi:10.1097/QAD.0000000000001079 (2016))。これは、saCas9のsgRNA配列とは異なるcrRNA-loop-tracrRNA(=sgRNA)配列を保有する(Ran, FA, et al. (2015). Nature 520: 186-191; Nishimasu, H, et al. (2015). Cell 162: 1113-1126) 2, 21。そして、saCas9/sgRNAとspCas9/sgRNAとのHIV-1切除効率を比較した。並列の(side-by-side)トランスフェクションおよびEcoHIV-eLucレポーター研究は、これらの3つの組合せ法とのspCas9は、ルシフェラーゼ活性の減少に対して大きく効果を示さなかった(図4B)。spCas9と比較したsaCas9のすばらしい結果は、これまでの報告と一致する(Ran, F. A. et al. Nature 520, 186-191 (2015); Friedland, A. E. et al. Genome Biol 16, 257 (2015))。spCas9と比較したsaCas9の高効率率は、次のいくつかの要因に起因し得る:(1)単一のベクターに存在することによる、同じ細胞におけるsgRNAとsaCas9の高い共発現;(2)小さなサイズであるsaCas9により高い遺伝子送達効率が可能であり得る;(3)saCas9の内在性ヌクレアーゼは、DSB作製の点で

30

40

50

活性が強い (Ran, F. A. et al. Nature 520, 186-191 (2015); Nishimasu, H. et al. Cell 162, 1113-1126 (2015))。s a C a s 9 および s p C a s 9 の両方における L T R s g R N A の組合せによる効率的な根絶は、P C R ジェノタイピングおよびサンガーシークエンシングによってさらに確認された (図 4 C)。

#### 【0248】

(L T R s g R N A、および G a g または P o l の併用は効果的な根絶を誘導した) s p C a s 9 / s g R N A システムを用いて、より容易な P C R ジェノタイピング、および、G a g、P o l 等のウイルス構造遺伝子 (Yin, C. et al. AIDS, doi:10.1097/QAD.0000000000001079 (2016)) との L T R s g R N A 組合せによるより効率的な H I V - 1 根絶を立証した。これがさらに s p C a s 9 / s g R N A システムに応用可能か試験するために、G a g または P o l を標的とする s g R N A を、3 つの L T R s g R N A のうちの 1 つと組み合わせた。G a g または P o l s g R N A と、L T R - 1 または - 3 とのすべての組合せにおいて、細胞培養物中で E c o H I V - e L u c 活性の強力な減少を誘導した (図 4 D)。L T R - 2 および G a g D の組合せも強力な減少を誘導したが、G a g B、G a g C および P o l B との組合せは、レポーター活性の減少への効果は低かった (図 4 D)。5' - L T R または 3' - L T R のプライマー対によるダイレクト P C R ジェノタイピングによって、すべての s g R N A 組合せの切断効率を確認した (図 4 E)。フラグメント欠失をさらに確認し、四重 s g R N A (以下を参照されたい) の合理性を提供するために、L T R - 1 および G a g D との組合せを、T A クローニングおよびサンガーシークエンシングの典型として選択した。結果は、2 つの標的部位の切断後の、フラグメントの予測配列を示した (図 11 A ~ 11 C)。これらのデータは、s a C a s 9 システムに対して選択されたすべての s g R N A が、予測される標的部位において D S B を作製するうえで効率が高かったことを示す。また、L T R s g R N A とウイルス構造領域を標的とする s g R N A との組合せが、機能的切除の様々な程度を誘導したことを示す。

#### 【0249】

(オールインワン A A V ベクターにおける多重 s g R N A はより効果的な根絶を誘導した)

上述に示した 2 つの s g R N A の組合せについて、2 つの個別のプラスミドは、コトランスフェクションの間、同じ細胞内に送達され得ない。H I V - 1 根絶および抑制の最大効率を確実にするために、L T R - 1 および G a g D の組合せを選択した。そして、レポーター低減の効率を、2 つの単一 s g R N A を発現しているベクターのコトランスフェクションと、二重 s g R N A を発現しているベクターのトランスフェクション間で比較した。より小さなサイズの s a C a s 9 (3.159 k b) は、効率的な A A V パッケージングおよび遺伝子送達のために、単一の A A V ベクターが、2 つの s g R N A を発現するカセットおよび s a C a s 9 発現カセットを保有することを可能にする (Friedland, A. E. et al. Genome Biol 16, 257 (2015))。図 5 A に示すように、二重 s g R N A / s a C a s 9 ベクターのトランスフェクションによってさらに、2 つの独立した単一 s g R N A / s a C a s 9 ベクターのコトランスフェクションと比べて、ルシフェラーゼレポーター活性の減少を誘導した。レポーター DNA の切断を P C R ジェノタイピングによって確認した。そして、野生型バンドと比較した切断されたフラグメントバンドの割合は、2 つの独立した s g R N A / s a C a s 9 ベクターよりも、二重 s g R N A / s a C a s 9 ベクターにおいて、より強い切断能力を示した (図 5 B)。二重 s g R N A / s a C a s 9 の際立った効果はおそらく、同じ細胞においてこれらの 3 つの組成の共発現に起因し得る。

#### 【0250】

上述で証明したとおり、2 つの L T R s g R N A は、両方の L T R のフラグメント欠失に加えて、全体の H I V - 1 ゲノムを切除することができた。そして、L T R s g R N A と構造遺伝子を標的とする s g R N A との組合せは、高いプロウイルス切断効率およびより容易な P C R ジェノタイピングをもたらした。根絶効率の最適化のためにこれらの 2 つの特徴を組み合わせるために、L T R - 1、L T R - 3、G a g D および P o l B

s g R N A の組合せを選択し、新規の互換性 Infusion クローニング戦略を使用して、発現カセットをオールインワン s a C a s 9 A A V ベクターにクローニングした。同量の二重または四重 s g R N A / s a C a s 9 が発現している単一プラスミドを一時的にトランスフェクションさせることによって、四重 s g R N A / s a C a s 9 プラスミドが、E c o H I V - e L u c レポーター活性の減少においてより効果的であることを見出した (図 5 C)。このことは、P C R ジェノタイピングによって確認し、5' - L T R および G a g にわたる P C R プライマーによって生成される野生型バンドを強く減少させた (図 5 D、5 E)。プライマー T 3 6 1 / T 4 5 8 (図 4 A) は、二重および四重群の両方において、L T R - 1 と G a g D 間のフラグメント欠失、およびさらなる挿入を検出された一方、L T R - 3 と G a g D との間の予測される別のフラグメント欠失は四重群で観察された (図 5 D)。プライマー対 T 7 1 0 / T 4 5 8 は、5' - L T R - 3 および G a g D 部位間のライゲーション後の予測されるフラグメントを検出した (図 5 E)。G a g / P o l および 3' - L T R を包含する P C R ジェノタイピング分析は、H I V - 1 ゲノム全体の切断への四重の強い可能性を示した。プライマー T 7 5 8 / T 3 6 3 は、G a g D および 3' - L T R - 1 または - 3 間の 2 つの欠失を検出した一方 (図 5 F)、T 6 8 9 / T 3 6 3 は、P o l B および L T R - 1 または - 3 間の 2 つの欠失を検出した (図 5 G)。プライマー T 6 8 9 / T 7 1 1 は、予測されたとおり 1 つの欠失を検出した (図 5 H)。フラグメント欠失に対するバンド強度の比較分析は、L T R - 1 および G a g D がより効率的であった一方、L T R - 3 が四重 s g R N A / s a C a s 9 システムにおいて効率が低かった (図 5 D、5 F、5 G)。これらの切断パターンは、四重カクテル戦略が、多重のフラグメント欠失および標的配列周辺の複数の I n D e l 変異によって、より効果的であることを示す。

#### 【 0 2 5 1 】

(四重 s g R N A / s a C a s 9 は、より効率的な遺伝子編集のために、単一 A A V - D J ベクターにパッケージされ得る)

一重 (monoplex) および二重 s g R N A / s a C a s 9 A A V ベクターのパッケージングの成功は近年報告されている (Friedland, A. E. et al. Genome Biol 16, 257 (2015))。二重 s g R N A / s a C a s 9 が発現しているカセット (4 . 9 6 9 k b) は、A A V ウイルスのパッケージング限界に近い (一般的に 5 ~ 5 . 2 k b) Wu, Z., et al. Mol Ther 18, 80-86 (2010))。しかしながら、5 . 2 ~ 8 . 9 k b に及ぶゲノムサイズについて、いくつかの導入遺伝子において、インビトロおよびインビボの両方で効率的な A A V パッケージングおよび遺伝子送達が行われている (Allocca, M. et al. J Clin Invest 118, 1955-1964 (2008); Grieger, J. C. & Samulski, R. J. J Virol 79, 9933-9944 (2005); Wu, J. et al. Hum Gene Ther 18, 171-182 (2007))。四重 s g R N A / s a C a s 9 発現カセット (5 . 7 1 6 k b) が A A V ウイルス内に効率的にパッケージングされるか否かを試験した。次の理由で A A V - D J 血清型を選択した：(1) 8 つの天然 A A V 血清型 (A A V - 2、A A V - 4、A A V - 5、A A V - 8、A A V - 9、トリ A A V、ウシ A A V、およびヤギ A A V) の特徴を組み合わせ、よりよい形質導入効率を導き、標的細胞 / 組織の範囲を広げる (Grimm, D. et al. J Virol 82, 5887-5911 (2008))；(2) 抗体中和化を避けることができる (Bartel, M., et al. Front Microbiol 2, 204 (2011))；(3) インビボにおける C a s 9 / s g R N A 媒介 H I V - 1 根絶に対して、肝臓への最も高い形質導入効率を提供する。肝濃縮は、H I V - 1 プロウイルスがインビボにおいて切除し得る概念実証を証明するのに不可欠である。二重 s g R N A / s a C a s 9 に対して、H E K 2 9 3 T 細胞のウイルス力価は予測されたとおり、P C R によって決定された 4 . 1 5 ~ 4 . 3 x 1 0<sup>13</sup> ゲノムコピー (G C) / m L (未精製粗溶解物) のゲノム力価、および、H A タグ s a C a s 9 タンパク質を検出する抗 H A 抗体を用いた免疫細胞化学による、4 . 4 ~ 9 . 7 x 1 0<sup>8</sup> 導入ユニット (T U) / m L の機能的力価だった。四重 s g R N A / s a C a s 9 に対して、同様のゲノム力価である 4 . 2 x 1 0<sup>13</sup> G C / m L が、二重 s g R N A / s a C a s 9 と比較して、2 . 5 x 1 0<sup>8</sup> T U / m L の機能的力価の 1 . 8 ~ 3 . 9 倍のみだった (図 1 1 A、1 1

B)。これらのデータは、生成した5.7 kbのゲノムである四重sgRNA/saCas9 AAVが、saCas9タンパク質の機能的発現を有して、哺乳動物細胞に効率的に感染し得るAAV-DJウイルス内へのパッケージングが成功し得ることを示す。

#### 【0252】

(多重sgRNA/saCas9のAAV媒介遺伝子送達は、HIV-1 Tg26トランスジェニックマウスの神経幹細胞におけるHIV-1プロウイルスDNAを効果的に根絶した)

HIV-1 Tg26トランスジェニックマウスは、部分的なGagおよびPol遺伝子におよぶ3.1 kbの欠失を有する、pNL4-3プロウイルスゲノムの10を超えるコピー数が組み込まれた座を含むように以前構築され、ウイルス複製が不能の状態である (Dickie, P. et al. *Virology* 185, 109-119 (1991))。Tg26マウスは、よく特徴づけられた腎臓疾患 (Kopp, J. B. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1577-1581 (1992); Haque, S. et al. *Am J Pathol* 186, 347-358 (2016))、発症の可能性のある特徴づけられていない神経および心血管欠陥 (Cheung, J. Y. et al. *Clin Transl Sci* 8, 305-310 (2015))、および他の疾患を発症する。インビボ研究の前に、Tg26トランスジェニックマウスから単離した神経幹/前駆細胞 (NSC/NPC) を使用して、多重sgRNA/saCas9のHIV-1切除効率を評価した。NSC/NPCを使用する論理的証拠は、NSC/NPCにおけるHIV感染/潜伏に対する累積証拠であり、HIV関連神経認知障害に関連し得る。sgRNA/saCas9 AAV-DJ注入後のマウスNSC/NPCにおける抗HA抗体による免疫細胞化学は、一重sgRNA/saCas9 AAV-DJが、10の機能的MOI (fMOI) による接種後20日目における測定によって92.3%の細胞を感染させ、この数字は $1.8 \times 10^5$  gMOIと等しく、NSC/NPCの感染においてAAV-DJウイルスが高効率であることを示した。二重 (=  $6.5 \times 10^5$  gMOI) または四重 (=  $2.1 \times 10^6$  gMOI) sgRNA/saCas9 AAV-DJの等量のfMOI (図12A、12B) は、それぞれ、約87.63%および90.52%の同様の感染効率であった (図6A~6C)。その後、培養NSC/NPCでの組込みHIV-1プロウイルスDNAの切除における二重および四重sgRNA/saCas9の両方の効率を測定した。saCas9およびsgRNAの用量依存的送達は、AAV-DJ感染してから2日目のPCR分析によって確認した (図6D、6E)。そして、HIV-1切除効率をPCRジェノタイピングによって評価した。二重および四重sgRNA/saCas9の両方とも、AAV感染から2日目において予測されるDNAフラグメントが用量依存的に欠失したが、四重sgRNA/saCas9は、等量のfMOIを使用したときに切断効率が高かった (図6F)。saCas9/sgRNAの持続的な発現および累積的なゲノム編集を導く、長期AAV導入によって、感染後20日目において切断効率が劇的に上昇した (図6G)。再び、四重は、類似の感染効率にもかかわらず、高効率のHIV-1を誘導した (図6B、6C)。これらのデータは、AAV媒介多重sgRNA/saCas9が、HIV-1 Tg26トランスジェニックマウス由来培養NSC/NPCにおいて組込みHIV-1プロウイルスゲノムを効率的に切除でき、特大の四重sgRNA/saCas9 AAV-DJが高効率の遺伝子導入および機能的なゲノム編集を保有することが示す。

#### 【0253】

(多重sgRNA/saCas9は、HIV-1 Tg26トランスジェニックマウスの様々な組織/臓器におけるHIV-1プロウイルスDNAを効果的に根絶した)

Cas9/sgRNAが、インビボにおける組込みHIV-1プロウイルスDNAを根絶することができるか否かを試験するために、肝臓において最も高い伝染力で組織の広範囲を感染させることができるAAV-DJ血清型を選択した (Grimm, D. et al. *J Virol* 82, 5887-5911 (2008); Mao, Y. et al. *BMC Biotechnol* 16, 1 (2016))。図13Aに示すように、尾静脈注入によるAAV-DJウイルス ( $4.15 \sim 4.20 \times 10^{12}$  GC) の単回投与は、sgRNAおよびsaCas9が発現しているcDNAを1週間のみで肝臓および脾臓に効率的に送達できた。肝臓の組織病理学的および免疫組織学的調査

10

20

30

40

50

によって、いかなる AAV 関連組織毒性は特定されなかった。観察された高形質導入効率および最小組織毒性は、成熟マウスで同様の用量を使用した報告と一致している。しかしながら、最初の注入から 1 週間後のさらなる同じ用量の注入によって、遺伝子送達の一致したパターンは見られなかった (図 13B)。saCas9 と共に二重または四重 sgRNA を保有する AAV-DJ は、四重 sgRNA / saCas9 の挿入物が AAV パッケージング能力の限界を超えていると思われるにもかかわらず、多くの臓器において同様の遺伝子送達効率が得られた (図 13A、13B)。動物組織 / 臓器の組込み HIV-1 ゲノムの切断における sgRNA / saCas9 の効率を測定するために、フラグメント欠失を増幅することができ、上述で証明した根絶事象を確認することができるプライマー対を用いて PCR ジェノタイピングを行った。5' - LTR / Gag 欠失に関し、ネステッド PCR 増幅を用いたときでさえ、感染から 1 週間後にフラグメント欠失は観察されず、これはインビボ AAV 送達してから 1 週間において Cas9 の発現量が低かったことによる可能性がある。しかしながら、ネステッド PCR 分析を行った後 (図 13C)、様々な程度のフラグメント欠失の様々な程度が多くの臓器 / 組織、特に肝臓、骨髄、および脾臓において観察された (図 13D)。最初の感染から 7 日目におけるさらなる AAV 感染によって、多くの臓器 / 組織において切断効率が上昇した (図 13D)。フラグメント欠失のサイズは組織 / 臓器で変動し、組織 / 臓器間における DNA 修復事象が異なる可能性が暗示された。これらのフラグメント欠失を典型的なバンドの T-A クローニングおよびサンガーシーケンシングによって確認した (図 13E)。再び、二重および四重 sgRNA / saCas9 AAV-DJ の両方において、主に肝臓でフラグメント欠失の同様のパターンを誘導した一方、他の臓器ではフラグメント欠失のパターンが変動した (図 13D)。

#### 【0254】

Tg26 トランスジェニックマウスにおける、HIV-1 根絶の組織範囲および可能性のある細胞種を広げるために、四重 sgRNA / saCas9 オールインワンベクターを AAV-DJ / 8 ウイルスにパッケージングした。インビボにおける形質導入効率を最大化するために、大量の調製物を使用して、AAV-DJ / 8 ウイルスを精製および濃縮した (Holehonnur, R. et al. (2014). BMC Neurosci 15: 28)。特大の四重 sgRNA / saCas9 のパッケージング効率は、 $3.07 \times 10^{14}$  GC / mL に達し、同時に調製される 3 kb の挿入物を保有するコントロール AAV-Cre-rluc ベクターに対する並列のパッケージングの力価 ( $4.21 \times 10^{14}$  GC / mL) に近かった。精製した四重 sgRNA / saCas9 AAV-DJ / 8 の単回尾 i.v. 注入 ( $1.5 \times 10^{12}$  GC) は、回収した多くの臓器 / 組織において saCas9 遺伝子の効率的な導入を誘導した (図 14A)。導入された臓器 / 組織における saCas9 mRNA およびタンパク質の発現を、saCas9 を標的とするプライマーによる RT-qPCR、および抗 HA 抗体による免疫組織化学によって確認した (図 15A)。5' - LTR / Gag プライマー対について、設計したサイズの明らかなフラグメント欠失を、従来の PCR 条件を用いて観察された (図 7A)。Gag / 3' - LTR プライマー対を使用して、肝臓、肺、および脳組織におけるフラグメント欠失を従来の PCR 条件下で観察した (図 7B)。TA クローニングおよびサンガーシーケンシングによって、脳および肝臓の両方における設計サイズのフラグメントの欠失が確認された (図 16A、16B)。最初の注入から 2 週間後のさらなる感染 ( $1.5 \times 10^{12}$  GC) によって、導入された組織 / 臓器の範囲が拡張し、最初の注入から 4 週間後には saCas9 および sgRNA の遺伝子形質導入効率が上昇した (図 14B、15B)。Gag / 3' - LTR プライマー対によるフラグメント欠失によって示される切除効率は肝臓および肺でさらに上昇し、腎臓および脾臓等の他の臓器にも拡張した (図 7C)。RT-qPCR 分析は、脳および腎臓における調節タンパク質 Tat (図 7G、14C) と同様に、脳、腎臓、肝臓および肺構造ウイルスタンパク質 Gag および Env の mRNA 発現の有意な減少を示した (図 7D ~ 7F)。まとめると、二重または四重 sgRNA / saCas9 を保有する AAV-DJ および AAV-DJ / 8 とともに、インビボにおいて十分な遺伝子送達感染を誘導し、続いて、Tg2



6 トランスジェニックマウスの様々な臓器 / 組織において組込み H I V - 1 ゲノムの根絶を誘導した。

【 0 2 5 5 】

全ゲノムシーケンシングおよびオフターゲット分析 (Ebina, H. et al., (2013). *Scientific reports* 3: 2510; Kaminski, R, et al. (2016). *Sci Rep* 6: 22555; Yin, C, et al. (2016). *AIDS* 30: 1163-1174) は、培養一次細胞または細胞株において、多重の s g R N A による s p C a s 9 のいかなる明らかなオフターゲット効果を検出しなかった。本研究において、インビボにおけるオフターゲット効果のいかなる可能性を調査するために、四重 s g R N A / s a C a s 9 で処置した T g 2 6 マウスの組織 / 臓器のゲノム D N A を用いて、T 7 E 1 アッセイを行った。バイオインフォマティクス分析によって予測される、可能性のあるオフターゲット部位を基に、最も高いスコアの特異性を有する各 s g R N A 標的 ( L T R - 1、L T R - 3 および G a g D ) に対する 2 ~ 3 の予測部位を選択し、T 7 E 1 評価に対する 5 0 0 ~ 8 0 0 b p の産生物を生成する高忠実性 P C R を行った。図 1 7 A ~ 1 7 F に示すように、マウスゲノム中の 7 つの予測されるオフターゲット部位で変異は見つからなかったが、オンターゲット P C R 産生物において明らかな変異が検出された。

【 0 2 5 6 】

( インビボ H I V - 1 切除を、無細胞 E c o H I V - e L u c レポーターウイルスを接種した実験マウスモデルで可視化する )

T g 2 6 マウスについて上述に示すように、四重 s g R N A カクテルは A A V ウイルスに効率的にパッケージングされ得、インビトロおよびインビボの両方において宿主ゲノムの H I V - 1 プロウイルス D N A 全体を効率的に切除する。これらの結果は、A A V - s g R N A / s a C a s 9 アプローチによる全身の H I V 感染の実行可能性および有効性のさらなる試験を促進させた。しかしながら、これは、H I V - 1 プロウイルスコピー / 座、ランダム組込み、感染細胞種の稀有および高頻度の変異の点で、臨床 H I V 感染 / 潜伏を繰り返していない。A A V - s g R N A / s a C a s 9 アプローチによる全身の H I V 感染後の H I V - 1 切除の実行可能性および有効性をさらに試験するために、E c o H I V - e L u c レポーターウイルスを、ヌードマウスモデルである従来 N C r 株に感染させるために使用した ( Potash, M. J. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3760-3765 (2005); Kelschenbach, J. L. et al. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 380-387 (2012) )。右眼における眼窩後方注入による E c o H I V - e L u c 接種 ( 全量 2 5 0 n g の H I V p 2 4 / マウス、n = 3 ) 後すぐに、単回投与の A A V - D J / 8 ( 3 . 0 7 × 1 0 <sup>12</sup> G C / マウス ) を、E c o H I V 接種後すぐに同じ注入部位による各マウス ( n = 3 ) に注入した。別の 3 つの N C r マウスには、ネガティブコントロール群として、同じ用量の E c o H I V - e L u c のみを注入した。生きている動物における長期的な生物発光イメージング ( B L I ) を、接種後 6 日目から開始し、E c o H I V - e L u c 接種後 1 9 日間にわたって行った ( 図 8 A ~ 8 D )。A A V D J / 8 感染なしのコントロール群 ( n = 3 ) と比較して、E c o H I V - e L u c レポーター活性の有意な減少が、首リンパ節および注入を行った右眼の周囲組織で観察された ( 図 8 A )。s a C a s 9 処置マウスにおける E c o H I V 感染細胞集団の減少は、マウス全体または右眼領域からのイメージングシグナルのインビボ測定によって、9 日目と 1 9 日目の両方において、統計学的に有意 ( p < 0 . 0 5 ) である ( 図 8 B および 8 C )。統計学的な有意性に対する線形混合モデルを使用して、1 9 日間全体に対する H I V - 1 切除の s a C a s 9 / g R N A の有効性を比較した。ネガティブコントロール群と比較して、A A V - s g R N A / s a C a s 9 処置による E c o H I V - e L u c 感染の減少は、実験全体コース間の、背側 ( p < 0 . 0 1 1 ) および腹側 ( p < 0 . 0 1 4 ) における首リンパ節からの生物発光出力によって測定されるように、統計学的に有意である ( 図 8 D )。

【 0 2 5 7 】

インビボにおける根絶効率を確認するために、実験の最後に示した、確立した P C R 条件を使用して、P C R ジェノタイピングを行った ( S a C a s 9 / g R N A の A A V 導入

後19日目)。AAVDJ/8によるsaCas9、GagDおよびLTR1導入遺伝子の効率的な導入は、主に肝臓で確認されて、他の臓器および組織において少し異なった分布を確認した(図9A~9C)。従来のPCRを使用して、予測された断片の効率的かつ強力な切除が多くの組織/臓器で確認され、注入した右眼領域、心臓、血液、肝臓、脾臓およびリンパ節で最も効果を示した。異なる動物の編集された組織の変動は、eCoHIV-eLuc感染、AAV媒介遺伝子送達およびCas9媒介切除の無作為の細胞/組織分布に起因し得る。再び、いくつかのフラグメント欠失をTAクローニングおよびサンガーシーケンシングによって確認した(図18A~18C)。インビボにおける四重sgRNA/saCas9の切除効率を定量するために、3つの異なるプライマーの組合せ(図19)を用いて切除フラグメントのqPCR分析を行った。融解ピーク曲線分析は、設計したように次の3つのタイプのプロウイルスDNA切除を明らかに特定した: 5'-LTR1~GagD、GagD~3'-LTR1または3'-LTR3。内部標準として、未切断(非標的)領域(両方の標的部位に隣接する)を用いて、選択した組織/臓器で切除効率を評価したが(図9G~I)、切除の様々な組み合わせにより、個々の数字は効率を低く見積もり(underestimate)得る。結果は、切除効率(図9G~9I)がPCRジェノタイピング(図9D~9F)と一致していることを示した。切除タイプおよび効率は異なる臓器/組織で変動した(図9G~9I)。興味深いことに、すべての3つのタイプの切除について、B1M3マウスの肝臓において、GagD/3'-LTR1に関し96%の効率だった(図9I)。これらのデータは、四重saCas9/sgRNA AAV-DJ/8が、インビボにおける全身のHIV感染中の新たに感染した細胞においてさえも、HIVプロウイルスゲノムの切除において効率が高いことを示す。

【0258】

(潜在感染ヒト細胞のHIV-1プロウイルスのインビボ切除を、ヒト化BLTマウスで検出する)

より臨床的に関連がある動物モデルにおいてHIV-1プロウイルスを切除するsaCas9/sgRNAゲノム編集の実行可能性を実証するために、saCas9/sgRNAを保有するAAV-DJ/8を、R5-、M向性HIVNL-BaL-eLucレポーターウイルスを腔粘膜伝播(n=3、マウスID=B5M2、B5M3およびB6M3)または腹腔内注入(n=3、マウスID=B7M2、B7M4およびB10M4)を介して接種したヒト化BLTマウスに投与した。これらのBLTマウスにおけるHIV-1播種の時空間的動態を可視化し、ニッチにおける可視化した5つの単一細胞の感度を用いて、全身BLIから長期的に分析した(Song, J, et al. (2015). J Gen Virol 96: 3131-3142)。これらのBLTマウスは、局所または全身のHIV伝播いずれかについて一定の度合いを示したが、感染は縮小し、最初の60日後には完全になくなり、続く70日以上において全身のBLI調査によって測定されたいかなる目でも分かる感染はなかった。この現象はおそらく、T細胞枯渇、HIV-1潜在またはHIV-1複製中の変異によるeLucレポーターのサイレンシングの可能性に起因し得る。いくつかの組織においてネステッドPCRによって検出されたHIV-1ゲノムがなかった(図7A~7F)、サイレンスレポーター発現への変異の寄与は少ないと考えられる。四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8を、HIV感染BLTマウスであるB5M2およびB5M3に、静脈内経路および腔内経路の両方によって投与した。ネガティブコントロールマウスであるB6M3と併せて、B5M2およびB5M3に腔粘膜を通じてHIV-1を接種し、HIV感染BLTマウスであるB7M2およびB7M4マウスには、AAV-DJ/8の静脈内注入のみを行った。ネガティブコントロールマウスであるB10M4と併せて、B7M2およびB7M4に腹腔内注入によってHIV-1を接種した。AAV送達してから2~4週間後に、BLTマウスを犠牲にし、上述のとおり、PCRジェノタイピング用に、主要な臓器/組織からゲノムDNAサンプルを抽出した。回収した臓器/組織におけるHIV-1プロウイルスDNAの存在を、5'-LTR/Gagプライマー対(T361/T458およびT361/T946)を使用したネステッドPCRによって確認した(図7A~7F)。重要なことは、腔、心臓、肺、右眼(AAV注入部位)、結腸、および残った腎被膜下

のヒト胸腺オルガノイドにおいて、5' - LTR / Gag プライマー対 T361 / T946 および Gag / 3' - LTR プライマー対 T758 / T363 の両方でフラグメント欠失が観察されたことである (図 7A、7B、7D、7E)。特に、完全なプロウイルス DNA と比較して、フラグメント欠失を示すより高い強度のバンドが、B5M3 マウスの心臓および膈管等の、同じ組織で観察された (図 7B)。この結果は、四重 sgRNA / saCas9 AAV - DJ / 8 の単回の i.v. 注入による、固体組織内の潜伏感染ヒト細胞における、HIV - 1 プロウイルス DNA の効率的な切除を明らかに示す。これらの PCR 産物の TA クローニングおよびサンガーシーケンシングによって、フラグメントの欠失が確認された：(図 20A および 20B) プライマー対 T361 / T946 を使用した 5' - ネステッド PCR からの PCR 産物；(図 21A および 21B) プライマー対 T758 / T363 を使用した 3' - ネステッド PCR からの PCR 産物。5' - LTR / Gag 領域 (図 20A、20B) および Gag / 3' - LTR 領域の両方における切断して残留する配列内に、様々な長さの挿入物または欠失物が、標的 sgRNA の PAM から 3 番目のヌクレオチドにおける予測される切断部位間で観察された (図 20A、21A)。前臨床データのこれらのセットは、四重 sgRNA / saCas9 が AAV - DJ 8 によって、ヒト化マウスモデルの多くの組織 / 臓器に残留する HIV - 1 潜伏感染ヒト細胞内に送達されて、組み込み HIV - 1 プロウイルス DNA を切除し得るという概念実証を証明する。

#### 【0259】

##### < 考察 >

本研究において際立った知見は、オールインワン AAV - DJ または AAV - DJ / 8 ベクターにより送達される saCas9 および多重 sgRNA を用いた、動物モデルにおける、宿主ゲノムの HIV - 1 プロウイルス DNA の効果的な根絶である。これらのウイルスは、HIV - 1 Tg26 トランスジェニックマウスおよび EcoHIV - eLuc 急性感染マウスにおいて、インビトロおよびインビボ両方において、効果的な遺伝子送達および HIV - 1 プロウイルス根絶を誘導した。遺伝子治療における AAV の臨床応用を基に、本研究は、HIV - 1 / AIDS 患者を処置する新規の治療方法を提供する。さらに、容易な多重 sgRNA のクローニング、急速なレポータースクリーニング、確実なダイレクト PCR ジェノタイピング、および高効率である AAV ウイルス産生は、個別化医療およびプレジションメディシン (precision medicine) における saCas9 / sgRNA ゲノム編集の臨床応用を提供する。多重 sgRNA を用いて同時に複数の HIV プロウイルス DNA を標的とすることは、同じ HIV プロウイルスゲノムにおいて 2 つの異なる標的配列の二重変異の可能性が比較的低いので、HIV - 1 複製中高い割合の変異による HIV の逃避 (escape) を防ぐのに有益である。最後に、2 つの LTR 標的部位 (5' 末端および 3' 末端の両方) と、2 つの構造標的部位 (Gag および Pol に保存されている) を組み合わせた、四重 sgRNA / saCas9 戦略は、HIV - 1 感染の臨床患者において変異の割合が高いにもかかわらず、HIV - 1 ゲノム全体中の複数の Indel 変異およびフラグメント欠失の可能性を最大化するために、個別化医療において HIV - 1 根絶のための有望な療法の候補である。この四重の戦略 (quadruplex strategy) はさらに、次の利点を提供する：(a) HIV - 1 逃避の可能性を大幅に減少させる、(b) 継続的なプロウイルス変異にかかわらず、臨床 HIV - 1 患者人口における HIV - 1 切除の高確率、(c) 標的遺伝子またはゲノムのかなりの部分の除去による、確実な機能喪失、および (d) 最適な切除効率である。

#### 【0260】

インビボにおける遺伝子編集効率およびその臨床応用は、効率的な遺伝子送達に主に依存する。基礎研究に対して、標準のプラスミドのトランスフェクションおよび様々なウイルスベクター (特に、レンチウイルス、アデノウイルスおよび AAV ベクター) の導入は、Cas9 および sgRNA を別々にまたは組み合わせて送達するのに広く用いられている。多くの標的細胞における高い形質導入効率、および、長期間だが可逆 / 誘導性である遺伝子発現によって、レンチウイルス媒介 Cas9 / sgRNA 送達は、多くの研究室で好

まれ、広く使用されている。しかしながら、レンチウイルスおよびアデノウイルスの安全性および免疫原性によって、臨床における実行可能性が制限されている。インテグラーゼ欠損レンチウイルス (IDLV) は ZFN 送達で試験されている (Cecilia, A. P. et al. *Current Gene Therapy* 14, 365-376 (2014); Pelascini, L. P. et al. *Human Gene Therapy Methods* 24, 399-411 (2013); Lombardo, A. et al. *Nat Biotechnol* 25, 1298-1306 (2007))、そして Cas9 および TALEN 送達でのその応用は問題として残っている (Wang, X. et al. *Nat Biotechnol* 33, 175-178 (2015))。突然変異がなく、毒性が低く、宿主免疫応答が低く、長期間有効であることより、AAV 媒介遺伝子治療は、臨床試験においてとても有望なアプローチになっている (Hastie, E. & Samulski, R. J. *Hum Gene Ther* 26, 257-265 (2015); Mingozzi, F. & High, K. A. *Blood* 122, 23-36 (2013))。いくつかの研究において、インビトロおよびインビボの両方において、AAV 媒介 Cas9 送達の実行可能性および有効性が試験されている。広く使用されている spCas9 (1368aa) は、4.1 kb のサイズであり、効率的にパッケージされ、細胞または組織を効率的に感染し得る AAV ベクターのクローニングに対して、とても小さな空間を有する。それにもかかわらず、最小のプロモーターおよびポリ A 配列を使用した 4 つの研究室において、培養細胞および動物モデルにおいて AAV - spCas9 を応用することに成功したことを報告している (Swiech, L. et al. *Nat Biotechnol* 33, 102-106 (2015); Platt, R. J. et al. *Cell* 159, 440-455 (2014); Senis, E. et al. *Biotechnol J* 9, 1402-1412 (2014); Howes, R. & Schofield, C. *Methods Mol Biol* 1239, 75-103 (2015))。AAV 送達効率を改善するために、機能的な N 末端と C 末端部に分けた spCas9 が最近報告され (Wright, A. V. et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, doi:10.1073/pnas.1501698112 (2015); Zetsche, B., et al. *Nat Biotechnol* 33, 139-142 (2015))、これにより、前臨床動物モデルにおいて spCas9 をより効率的に送達する新規方法を提供する。GyrA インテインシステムを使用した AAV - 分割 spCas9 ニッカーゼベクターはまた、ゲノム編集の特異性を増強することが報告されている (Fine, E. J. et al. *Scientific reports* 5, 10777 (2015))。いくつかの小さな Cas9 オルソログが近年同定されており、その中で saCas9 はよく特徴づけられており、動物実験および臨床応用において有望性が高い。これらの小さな Cas9 は、オールインワンベクターシステムを使用した臨床試験において AAV 遺伝子治療を実行可能にするのみだけでなく、臨床試験について広く引きつける力 (wide attraction) を保持もする IDLV システムにおけるパッケージングおよび形質導入効率を上昇させる (Liu, K. C. et al. *Current gene therapy* 14, 352-364 (2014))。いくつかの動物実験では、オールインワン AAV ベクターにおいて saCas9 および 1 つまたは 2 つの sgRNA が発現しているカセットを使用して、AAV パッケージングおよび遺伝子導入の高効率を証明している。本研究において、オールインワン AAV - DJ ベクターにおける二重の HIV - sgRNA と saCas9 がまた、培養細胞、特に Tg26 トランスジェニックマウスの様々な臓器 / 組織において、導入遺伝子の送達および HIV - 1 ゲノムの根絶を可能にすることを証明した。さらに、初めて、四重 sgRNA および saCas9 をコードする特大のオールインワン AAV ベクターが同様に、培養 HIV 組込み NSC / NPC、ならびに HIV - 1 潜伏 Tg26 トランスジェニックマウスおよび急性感染 EcoHIV - eLuc マウスの様々な臓器 / 組織における、高力価のパッケージングおよび HIV - 1 ゲノムの効果的な根絶を誘導することができることを証明した。これらの新規かつ刺激的な知見は、前臨床および臨床環境において、HIV - 1 根絶の最適な遺伝子治療に関し、HIV - 1 LTR および構造タンパク質領域を標的とする多重 sgRNA のカクテルを開発するための新しい道を開く。

#### 【0261】

オールインワンベクターに多重 sgRNA が発現しているカセットを設置するいくつかのアプローチが報告されている。Csy4 タンパク質またはリボソームの RNA 加工特性を使用して、PolII プロモーター下の単一の転写物が複数の sgRNA に加工され得る (Nissim, L., et al. *Mol Cell* 54, 698-710 (2014); Gao, Y. & Zhao, Y. *J Integ*

10

20

30

40

50

r Plant Biol 56, 343-349 (2014) )。同じU6プロモーター下、7つまでのsgRNAを有する多重ベクターについて、Golden Gateクローニング法を用いた構築に成功しており、その多重標的効果は、複数の遺伝子の多重ゲノム/エピゲノム編集、同時活性化/抑制化について試験されている (Sakuma, T., et al. Scientific reports 4, 5400 (2014) )。繰り返しDNA配列により組換えのリスクの可能性を減少させる、および各sgRNAの発現効率を最大化するために、4つの独立したPolIIIプロモーター (ヒトU6プロモーター、マウスU6プロモーター、7SKおよびH1) により駆動される (driven) 多重sgRNAは、Golden Gate assembly法を用いて試験されている。当該方法は、単一のレンチウイルスベクター内に4つまでのsgRNAを強力かつ急速にクローニングすることができる (Kabadi, A. M., et al. Nucleic Acids Res 42, e147 (2014) )。ここで、新規のIn-Fusionクローニング戦略が、2つの制限酵素の詮索やりとり (interrogated exchange) で開発され、単一のベクター内への任意の数の多重sgRNAを容易かつ迅速なクローニングを提供する。この概念実証は、任意のPolIIIプロモーターおよび様々なウイルス遺伝子の送達システムの下、任意の多重sgRNAに応用可能である。4つの同一のU6プロモーターの下で4つのsgRNAが、標的DNA切断を誘導するのに十分な活性を示した一方、四重sgRNA/saCas9システムにおけるsgRNA LTR1、GagDおよびPolBがHIV-1プロウイルスの切断において最も良かったが、LTR-3は二重sgRNAシステムにおいて高い切断能力を有するが、HIV-1プロウイルスの切断においては弱かった。

10

#### 【0262】

20

本研究は、Tg26トランスジェニックマウスおよびヒト化BLTマウスの両方における組込みHIV-1プロウイルス、ならびに、無細胞EcoHIV-eLucレポーターウイルスを接種した従来のマウスにおける急性感染中のエピソームの可能性のあるHIV-1 DNAの切除において、四重sgRNA/saCas9 AAV遺伝子治療の使用の実行可能性を立証した。そして、sgRNA/saCas9は、暴露前予防投与 (PrEP) として考慮され得る。AAV-DJまたはAAV-DJ/8の静脈内投与によって、多くの組織/臓器、中でも肝臓、脾臓、およびリンパ節で最も高く、大量の遺伝子導入およびHIV-1根絶を達成した。本研究は、HIV感染ヒト化BLTマウスにおいて、単回のAAV-DJ/8投与によって、複数のマウス臓器/組織内の潜伏感染ヒト細胞のGag/3'-LTRおよび5'-LTR/Gagの明らかな切除を証明する。この知見はまた、HIV-1ウイルスを保有する、組織保有体 (tissue reservoir) の範囲の広大さを実証する。ここで報告したこれらの知見は、HIV-1疾患の予防および改善における、HIV-1根絶のためのCas9/sgRNAアプローチのさらなる前臨床開発の正当化 (justification) を提供する。

30

#### 【0263】

結論として、小さなsaCas9タンパク質サイズによって、二重または四重ものsgRNAを発現するカセットが、細胞培養物および動物モデルにおいて、高力価パッケージングおよび強力な遺伝子誘導のために、オールインワンAAVベクターで保有されることを可能にする。5'末端および3'末端LTRならびに構造GagおよびPol領域を標的とする二重sgRNAとsaCas9は、多様なパターンの小さなIndel変異および大きなフラグメント欠失を誘導する。したがってHIV-1ゲノム根絶の最適効率を提供する。AAV遺伝子治療による動物におけるHIV-1根絶の実行可能性および有効性は、近い将来の前臨床研究および臨床試験を可能にする。

40

#### 【0264】

## 【表 2】

表2.HIV-1 LTR、GagおよびPolを標的にするsgRNAに関するオリゴヌクレオチド、  
ならびにPCRプライマー

標の名	方向	配列
オリゴヌクレオチドを標的にするsgRNA		
LTR1	T708: センス	caaccGCAGAACTACACACCAGGGCC (配列番号1)
	T709: アンチセンス	aaacGGCCCTGGTGTGTAGTTCTGC (配列番号2)
LTR2	T710: センス	caaccGTTACACCCTATGAGCCAGCA (配列番号3)
	T711: アンチセンス	aaacTGCTGGCTCATAGGGTGTAAC (配列番号4)
LTR3	T712: センス	caaccGTGTGGCCTGGGCGGGACTG (配列番号5)
	T713: アンチセンス	aaacCAGTCCCGCCCAGGCCACAC (配列番号6)
Gag-B	T714: センス	caaccGCCTTCCCACAAGGGAAGGCCA (配列番号7)
	T715: アンチセンス	aaacTGGCCTTCCCTTGTGGGAAGGC (配列番号8)
Gag-C	T758: センス	caaccGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCG (配列番号9)
	T759: アンチセンス	aaacCGCTTAATACCGACGCTCTCGC (配列番号10)
Gag-D	T760: センス	caaccGGATAGATGTAAAAGACACCA (配列番号11)
	T761: アンチセンス	aaacTGGTGTCTTTTACATCTATCC (配列番号12)
Pol-B	T716: センス	caaccGCATGGGTACCAGCACACAA (配列番号13)
	T717: アンチセンス	aaacTTGTGTGCTGGTACCCATGC (配列番号14)
従来PCRのプライマー		
Gag	T458: アンチセンス	CCCACTGTGTTTAGCATGGTATT (配列番号15)
	T457: センス	AATGGTACATCAGGCCATATCAC (配列番号16)
GagC	T758: センス	CACCGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCG (配列番号17)
GagD	T761: アンチセンス	CACCTGGTGTCTTTTACATCTATCC (配列番号18)
PolA	T689: センス	CACCGCAGGATATGTAAGTACAG (配列番号19)

【 0 2 6 5 】

(続き)

LTR1	T709: アンチセンス	AAACGGCCCTGGTGTGTAGTTCTGC (配列番号20)
LTR2	T710: センス	CACCGTTACACCCTATGAGCCAGCA (配列番号21)
	T711: アンチセンス	AAACTGCTGGCTCATAGGGTGTAAAC (配列番号22)
LTR-E	T361: センス	CACCGATCTGTGGATCTACCACACACA (配列番号23)
LTR-F	T363: アンチセンス	CACCGCTGCTTATATGCAGCATCTGAG (配列番号24)
Cas-hU6	T351: センス	CGCCTCGAGGATCCGAGGGCCTATTCCCATGATTCC (配列番号25)
Tg26-3vector	T645: アンチセンス	TGGAATGCAGTGGCGCGATCTTGGC (配列番号26)
SaCas9	T955: センス	AACAGATTCAAGACCAGCGACTAC (配列番号27)
	T956: アンチセンス	TACCATTCTTTGATGTCCTTCCAG (配列番号28)
GAPDH	T623: アンチセンス	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCAGGA (配列番号29)
	#40: センス	TCACCATCTTCCAGGAGCGA (配列番号30)
β-actin	センス	GGACTTCGAGCAAGAGATGG (配列番号31)
	アンチセンス	ACACTGTGTTGGCGTACAG (配列番号32)
Gag-Nest	T946: アンチセンス	ACCTGGCTGTTGTTTCCTGTGTC (配列番号33)
HIV-U5a	T425: アンチセンス	AAACGAGTCACACAACAGACGGGC (配列番号34)
LTR-1-Off-1	T991: センス	TCAGCCATGAGGAAGAACTTGA (配列番号35)
	T992: アンチセンス	TCTCCAGAGTGCTGGCAAGGTCC (配列番号36)
LTR-1-Off-2	T993: センス	TCACCTGGTGCCAGTGTCTGCGG (配列番号37)
	T994: アンチセンス	TATGAATGAGTTTGGCGTGTATG (配列番号38)
LTR-1-Off-3	T995: センス	ATCGATGAGGCTCTCAGCATCACC (配列番号39)
	T996: アンチセンス	TGGTGAGGCCTCTGGGCCACTTGAG (配列番号40)
LTR-3-Off-1	T1013: センス	AGCCACACTCTGGCACTGAGACAAG (配列番号41)
	T1014: アンチセンス	AGTAAGCATAGGTATGGAGAGGC (配列番号42)
LTR-3-Off-3	T1017: センス	ACAGCCACATGCAGGAGGTGACCAC (配列番号43)
	T1018: アンチセンス	ACATGTGCCTTGGCTTGTATGTGG (配列番号44)
Gag-D-Off-1	T1019: センス	TTGAAGCAGAGTTAAGGAATCTTG (配列番号45)
	T1020: アンチセンス	TGCCATGTTCTTCTGTAATCATAG (配列番号46)
Gag-D-Off-2	T1021: センス	TCTCTATGTAGTCTTGGCTGTCCTG (配列番号47)
	T1022: アンチセンス	ACCATGGCATCTAGCTGTGCTGAC (配列番号48)

10

20

30

40

【 0 2 6 6 】

50

(続き)

リアルタイムPCR用プライマー		
Gag	T760: センス	CACCGGATAGATGTAAAAGACACCA (配列番号 49)
	T946: アンチセンス	ACCTGGCTGTTGTTTCCTGTGTC (配列番号50)
Env	T876: センス	CCGAAGGAATAGAAGAAGAAG (配列番号51)
	T691: アンチセンス	CACCGAGAGTAAGTCTCTCAAGCGG (配列番号 52)
Tat	T1002: センス	TGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCC (配列番号53)
	T1003: アンチセンス	TTCTTCTTCTATTCTTCGGGCC (配列番号54)
マウス Ppia	T979: センス	GCCCAGTATGCTTGGGTATC (配列番号55)
	T980: アンチセンス	TGCTGACTCCCAGAACAGA (配列番号56)
ヒト β2M	センス	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT (配列番号 57)
	アンチセンス	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT (配列番号58)
5'LTR1+gagD 未切断	T872	GGACTCGGCTTGCTGAAG (配列番号59)
	T759	aaacCGCTTAATACCGACGCTCTCGC (配列番号 60)
5'LTR1+gagD 切断	T361	caaccGATCTGTGGATCTACCACACACA (配列番号 61)
	T946	ACCTGGCTGTTGTTTCCTGTGTC (配列番号62)
5'LTR1+gagD 内在	T457	AATGGTACATCAGGCCATATCAC (配列番号63)
	T458	CCCACTGTGTTTAGCATGGTATT (配列番号64)
gagD+3'LTR1 未切断	T873	ATCTCTGCTGTCCCTGTAA (配列番号65)
	T874	AATCCCCAAAGTCAAGGAGTAA (配列番号66)
gagD+3'LTR1 切断	T758	caaccGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCG (配列番号 67)
	T535	AAACAAGGTCAGTGGATATCTGATC (配列番号 68)
gagD+3'LTR1 内在	T872	GGACTCGGCTTGCTGAAG (配列番号69)
	T759	aaacCGCTTAATACCGACGCTCTCGC (配列番号 70)
gagD+3'LTR3 未切断	T873	ATCTCTGCTGTCCCTGTAA (配列番号71)
	T874	AATCCCCAAAGTCAAGGAGTAA (配列番号72)
gagD+3'LTR3 切断	T758	caaccGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCG (配列番号 73)
	T363	caaccGCTGCTTATATGCAGCATCTGAG (配列番号 74)
gagD+3'LTR3 内在	T872	GGACTCGGCTTGCTGAAG (配列番号75)
	T759	aaacCGCTTAATACCGACGCTCTCGC (配列番号 76)

## 【図面の簡単な説明】

【 0 2 6 7 】

【図 1 A】 rAAV<sub>g</sub>:saCas9/gRNA Tg26 MEFによるHIV-1 DNAの切除を示す。【図 1 B】 rAAV<sub>g</sub>:saCas9/gRNA Tg26 MEFによるHIV-1 DNAの切除を示す。【図 2 A】 Tgマウスの様々な組織における、rAAV<sub>g</sub>:saCas9/gRNAによるインビボにおけるHIV-1 DNAの切除を示す。【図 2 B】 Tgマウスの様々な組織における、rAAV<sub>g</sub>:saCas9/gRNAによるインビボにおけるHIV-1 DNAの切除を示す。【図 2 C】 Tgマウスの様々な組織における、rAAV<sub>g</sub>:saCas9/gRNAによるインビボにお



けるH I V - 1 D N Aの切除を示す。

【図2 D】T g マウスの様々な組織における、rAAV<sub>9</sub>:saCas9/gRNAによるインビボにおけるH I V - 1 D N Aの切除を示す。

【図3 A】rAAV<sub>9</sub>:saCas9/gRNA接種後のラット血液細胞の組み込まれたH I V - 1 D N Aのセグメントの除去、およびウイルスR N Aの発現を示す。

【図3 B】図3 A、3 Bは、rAAV<sub>9</sub>:saCas9/gRNA接種後のラット血液細胞の組み込まれたH I V - 1 D N Aのセグメントの除去、およびウイルスR N Aの発現を示す。

【図4 A】s a C a s 9 / s g R N AはH I V - 1 ゲノムを効率的に切除し、H I V - 1 ルシフェラーゼレポーター発現を抑制することを示す。

【図4 B】s a C a s 9 / s g R N AはH I V - 1 ゲノムを効率的に切除し、H I V - 1 ルシフェラーゼレポーター発現を抑制することを示す。

【図4 C】s a C a s 9 / s g R N AはH I V - 1 ゲノムを効率的に切除し、H I V - 1 ルシフェラーゼレポーター発現を抑制することを示す。

【図4 D】s a C a s 9 / s g R N AはH I V - 1 ゲノムを効率的に切除し、H I V - 1 ルシフェラーゼレポーター発現を抑制することを示す。

【図4 E】s a C a s 9 / s g R N AはH I V - 1 ゲノムを効率的に切除し、H I V - 1 ルシフェラーゼレポーター発現を抑制することを示す。

【図5 A】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 B】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 C】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 D】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 E】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 F】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 G】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 H】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 I】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図5 J】オールインワン (all-in-one) A A Vベクターにおける多重 (multiplex) s g R N Aの有効性を示す。

【図6 A】多重s g R N A / s a C a s 9発現ベクターのA A V - D J媒介送達によって、T g 2 6トランスジェニックマウスの神経幹細胞 (N S C) におけるH I V - 1組込みゲノムを効率的に切除することを示す。

【図6 B】多重s g R N A / s a C a s 9発現ベクターのA A V - D J媒介送達によって、T g 2 6トランスジェニックマウスの神経幹細胞 (N S C) におけるH I V - 1組込みゲノムを効率的に切除することを示す。

【図6 C】多重s g R N A / s a C a s 9発現ベクターのA A V - D J媒介送達によって、T g 2 6トランスジェニックマウスの神経幹細胞 (N S C) におけるH I V - 1組込みゲノムを効率的に切除することを示す。

【図6 D】多重s g R N A / s a C a s 9発現ベクターのA A V - D J媒介送達によって、T g 2 6トランスジェニックマウスの神経幹細胞 (N S C) におけるH I V - 1組込みゲノムを効率的に切除することを示す。

【図6 E】多重s g R N A / s a C a s 9発現ベクターのA A V - D J媒介送達によって

10

20

30

40

50

、Tg26トランスジェニックマウスの神経幹細胞（NSC）におけるHIV-1組込みゲノムを効率的に切除することを示す。

【図6F】多重sgRNA/saCas9発現ベクターのAAV-DJ媒介送達によって、Tg26トランスジェニックマウスの神経幹細胞（NSC）におけるHIV-1組込みゲノムを効率的に切除することを示す。

【図6G】多重sgRNA/saCas9発現ベクターのAAV-DJ媒介送達によって、Tg26トランスジェニックマウスの神経幹細胞（NSC）におけるHIV-1組込みゲノムを効率的に切除することを示す。

【図7A】四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8が、Tg26トランスジェニックマウスの多くの器官/組織において、HIV-1プロウイルスDNA切除を誘導したことを示す。

10

【図7B】四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8が、Tg26トランスジェニックマウスの多くの器官/組織において、HIV-1プロウイルスDNA切除を誘導したことを示す。

【図7C】四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8が、Tg26トランスジェニックマウスの多くの器官/組織において、HIV-1プロウイルスDNA切除を誘導したことを示す。

【図7D】四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8が、Tg26トランスジェニックマウスの多くの器官/組織において、HIV-1 RNA転写の強力な減少を誘導したことを示す。

20

【図7E】四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8が、Tg26トランスジェニックマウスの多くの器官/組織において、HIV-1 RNA転写の強力な減少を誘導したことを示す。

【図7F】四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8が、Tg26トランスジェニックマウスの多くの器官/組織において、HIV-1 RNA転写の強力な減少を誘導したことを示す。

【図7G】四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8が、Tg26トランスジェニックマウスの多くの器官/組織において、HIV-1 RNA転写の強力な減少を誘導したことを示す。

【図8A】インビボにおいて四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8がEcoHIV-eLucの切除を誘導したことを示す、生物発光イメージング分析である。

30

【図8B】インビボにおいて四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8がEcoHIV-eLucの切除を誘導したことを示す、生物発光イメージング分析である。

【図8C】インビボにおいて四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8がEcoHIV-eLucの切除を誘導したことを示す、生物発光イメージング分析である。

【図8D】インビボにおいて四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8がEcoHIV-eLucの切除を誘導したことを示す、生物発光イメージング分析である。

【図9A】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器/組織において、四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8による、遺伝子導入およびEcoHIV-eLucの切除効率を確認したことを示す。

40

【図9B】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器/組織において、四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8による、遺伝子導入およびEcoHIV-eLucの切除効率を確認したことを示す。

【図9C】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器/組織において、四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8による、遺伝子導入およびEcoHIV-eLucの切除効率を確認したことを示す。

【図9D】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器/組織において、四重sgRNA/saCas9 AAV-DJ/8による、遺伝子導入およびEcoHIV-eLucの切除効率を確認したことを示す。

【図9E】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器/

50

組織において、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による、遺伝子導入および  $EcoHIV - eLuc$  の切除効率を確認したことを示す。

【図9F】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器 / 組織において、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による、遺伝子導入および  $EcoHIV - eLuc$  の切除効率を確認したことを示す。

【図9G】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器 / 組織において、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による、遺伝子導入および  $EcoHIV - eLuc$  の切除効率を確認したことを示す。

【図9H】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器 / 組織において、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による、遺伝子導入および  $EcoHIV - eLuc$  の切除効率を確認したことを示す。

10

【図9I】PCRジェノタイピングおよびqPCR分析によって、マウスの様々な臓器 / 組織において、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による、遺伝子導入および  $EcoHIV - eLuc$  の切除効率を確認したことを示す。

【図10A】AAV処置後2週目において、 $HIV_{NL} - BaL - eLuc$  を接種したヒト化BLTマウスにおける、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による  $HIV$  プロウイルスDNAの切除を示す。

【図10B】AAV処置後2週目において、 $HIV_{NL} - BaL - eLuc$  を接種したヒト化BLTマウスにおける、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による  $HIV$  プロウイルスDNAの切除を示す。

20

【図10C】AAV処置後2週目において、 $HIV_{NL} - BaL - eLuc$  を接種したヒト化BLTマウスにおける、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による  $HIV$  プロウイルスDNAの切除を示す。

【図10D】AAV処置後3週目において、 $HIV_{NL} - BaL - eLuc$  を接種したヒト化BLTマウスにおける、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による  $HIV$  プロウイルスDNAの切除を示す。

【図10E】AAV処置後4週目において、 $HIV_{NL} - BaL - eLuc$  を接種したヒト化BLTマウスにおける、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による  $HIV$  プロウイルスDNAの切除を示す。

【図10F】AAV処置後4週目において、 $HIV_{NL} - BaL - eLuc$  を接種したヒト化BLTマウスにおける、四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ / 8 による  $HIV$  プロウイルスDNAの切除を示す。

30

【図11A】TAクローニングおよびサンガーシーケンシング分析を使用した、 $EcoHIV - eLuc$  ゲノムの予測されるフラグメント欠失の確認を示す。

【図11B】TAクローニングおよびサンガーシーケンシング分析を使用した、 $EcoHIV - eLuc$  ゲノムの予測されるフラグメント欠失の確認を示す。

【図11C】TAクローニングおよびサンガーシーケンシング分析を使用した、 $EcoHIV - eLuc$  ゲノムの予測されるフラグメント欠失の確認を示す。

【図12A】HEK293T細胞において多重  $sgRNA$  および  $saCas9$  を保有する AAV-DJ の機能的力価を示す。

40

【図12B】HEK293T細胞において多重  $sgRNA$  および  $saCas9$  を保有する AAV-DJ の機能的力価を示す。

【図13A】二重または四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ で感染させた Tg26 トランスジェニックマウスの異なる臓器 / 組織において、導入遺伝子発現および  $HIV - 1$  ゲノム切除について同様の効率を示す。

【図13B】二重または四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ で感染させた Tg26 トランスジェニックマウスの異なる臓器 / 組織において、導入遺伝子発現および  $HIV - 1$  ゲノム切除について同様の効率を示す。

【図13C】二重または四重  $sgRNA / saCas9$  AAV-DJ で感染させた Tg26 トランスジェニックマウスの異なる臓器 / 組織において、導入遺伝子発現および  $HIV$

50

V - 1 ゲノム切除について同様の効率を示す。

【図 1 3 D】二重または四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J で感染させた T g 2 6 トランスジェニックマウスの異なる臓器 / 組織において、導入遺伝子発現および H I V - 1 ゲノム切除について同様の効率を示す。

【図 1 3 E】二重または四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J で感染させた T g 2 6 トランスジェニックマウスの異なる臓器 / 組織において、導入遺伝子発現および H I V - 1 ゲノム切除について同様の効率を示す。

【図 1 4 A】四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J / 8 が、効率的な導入遺伝子の導入を誘導し、R T - q P C R 分析によって、H I V T g 2 6 トランスジェニックマウスの様々な臓器 / 組織の T a t 転写を確認した。

10

【図 1 4 B】四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J / 8 が、効率的な導入遺伝子の導入を誘導し、R T - q P C R 分析によって、H I V T g 2 6 トランスジェニックマウスの様々な臓器 / 組織の T a t 転写を確認した。

【図 1 4 C】四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J / 8 が、効率的な導入遺伝子の導入を誘導し、R T - q P C R 分析によって、H I V T g 2 6 トランスジェニックマウスの様々な臓器 / 組織の T a t 転写を確認した。

【図 1 5 A】四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J / 8 を静脈内注入してから 2 週間後での、T g 2 6 マウスの臓器 / 組織における s a C a s 9 タンパク質の発現を示す。

【図 1 5 B】四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J / 8 を静脈内注入してから 4 週間後での、T g 2 6 マウスの臓器 / 組織における s a C a s 9 タンパク質の発現を示す。

20

【図 1 6 A】四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 を静脈内投与してから 2 週間後での、T g 2 6 トランスジェニックマウスの脳における、H I V - 1 ゲノムの G a g D から 3 ' - L T R 1 のフラグメント欠失の確認を示す。

【図 1 6 B】四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 を静脈内投与してから 2 週間後での、T g 2 6 トランスジェニックマウスの肝臓における、H I V - 1 ゲノムの G a g D から 3 ' - L T R 1 のフラグメント欠失の確認を示す。

【図 1 7 A】T 7 E 1 ミスマッチ切断アッセイの結果を示し、四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 の静脈内への単回注入を行った T g 2 6 マウスの肝臓組織においてオフターゲット効果がなかったことを示す。

【図 1 7 B】T 7 E 1 ミスマッチ切断アッセイの結果を示し、四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 の静脈内への単回注入を行った T g 2 6 マウスの肝臓組織においてオフターゲット効果がなかったことを示す。

30

【図 1 7 C】T 7 E 1 ミスマッチ切断アッセイの結果を示し、四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 の静脈内への単回注入を行った T g 2 6 マウスの肝臓組織においてオフターゲット効果がなかったことを示す。

【図 1 7 D】T 7 E 1 ミスマッチ切断アッセイの結果を示し、四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 の静脈内への単回注入を行った T g 2 6 マウスの肝臓組織においてオフターゲット効果がなかったことを示す。

【図 1 7 E】T 7 E 1 ミスマッチ切断アッセイの結果を示し、四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 の静脈内への単回注入を行った T g 2 6 マウスの肝臓組織においてオフターゲット効果がなかったことを示す。

40

【図 1 7 F】T 7 E 1 ミスマッチ切断アッセイの結果を示し、四重 s g R N A / s a C a s 9 A A V - D J 8 の静脈内への単回注入を行った T g 2 6 マウスの肝臓組織においてオフターゲット効果がなかったことを示す。

【図 1 8 A】N C r スードマウスの心臓および肺組織における四重 s g R N A / s a C a s 9 による E c o H I V - e L u c の切除を示す。

【図 1 8 B】N C r スードマウスの心臓および肺組織における四重 s g R N A / s a C a s 9 による E c o H I V - e L u c の切除を示す。

【図 1 8 C】N C r スードマウスの心臓および肺組織における四重 s g R N A / s a C a s 9 による E c o H I V - e L u c の切除を示す。

50

【図 19】図 19 は、H I V 切除効率を検出する q P C R 戦略を示す。表は、未切断 (un cut)、切断 (cut) および内在 E c o H I V D N A 量を示すためのすべての q P C R プライマー対を示し、模式図はすべてのプライマーの位置を示す。

【図 20 A】s a C a s 9 / s g R N A ゲノム編集後のヒト化 B L T マウスの臓器 / 組織における、5 ' - L T R 1 および G a g D 部位間の H I V - 1 プロウイルス D N A のフラグメント欠失の確認を示す。

【図 20 B】s a C a s 9 / s g R N A ゲノム編集後のヒト化 B L T マウスの臓器 / 組織における、5 ' - L T R 1 および G a g D 部位間の H I V - 1 プロウイルス D N A のフラグメント欠失の確認を示す。

【図 21 A】ゲノム編集後のヒト化 B L T マウスの臓器 / 組織における、G a g D および 3 ' - L T R 1 部位間の H I V - 1 ゲノムのフラグメント欠失の確認を示す。

10

【図 21 B】ゲノム編集後のヒト化 B L T マウスの臓器 / 組織における、G a g D および 3 ' - L T R 1 部位間の H I V - 1 ゲノムのフラグメント欠失の確認を示す。

【図 22 A】H I V N L - B a L - e L u c および E c o H I V - e L u c の模式図である。

【図 22 B】H I V N L - B a L - e L u c および E c o H I V - e L u c の模式図である。

20

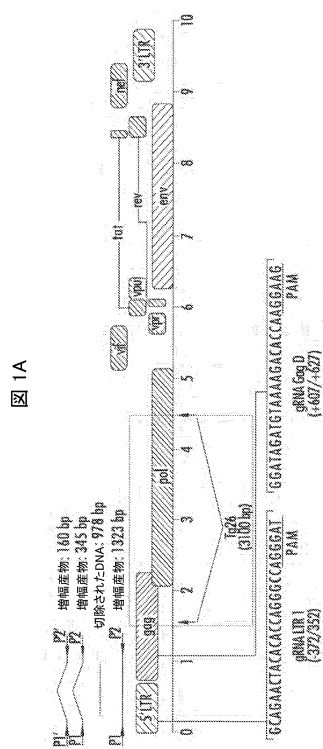
30

40

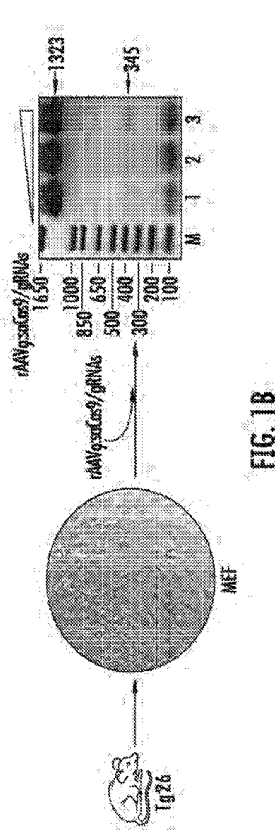
50

【図面】

【 図 1 A 】

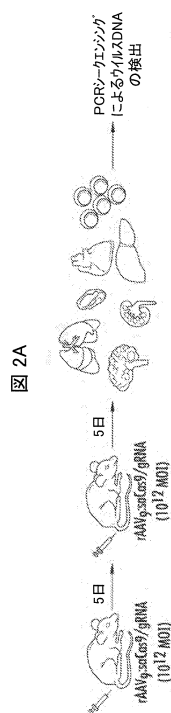


【 図 1 B 】

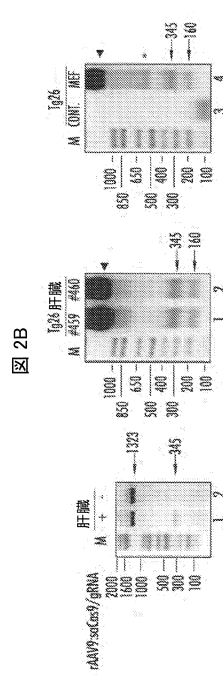


66

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



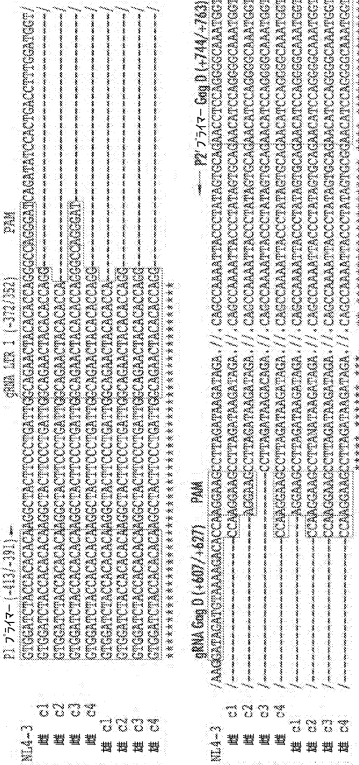
【図 2 C】

図 2C



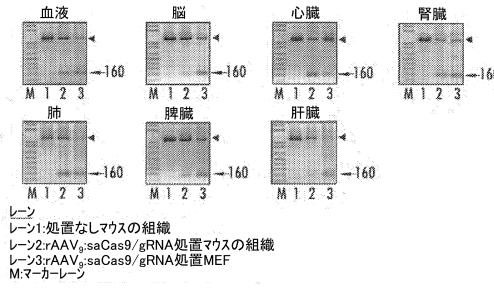
【図 3 A】

図 3A



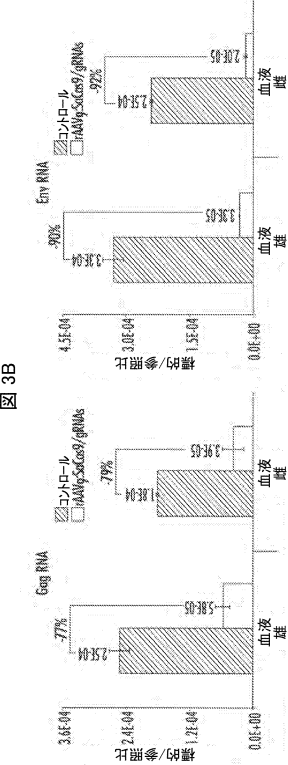
【図 2 D】

図 2D

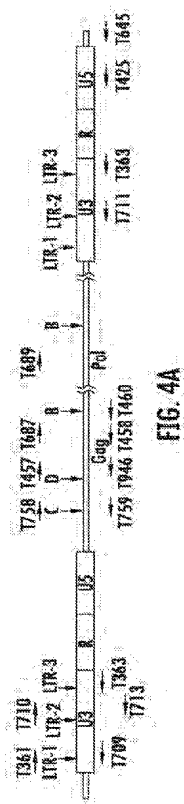


【図 3 B】

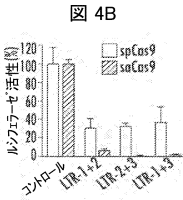
図 3B



【 図 4 A 】



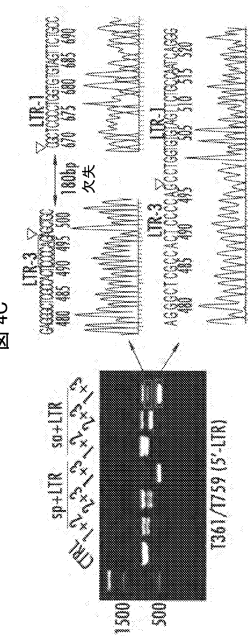
【 図 4 B 】



10

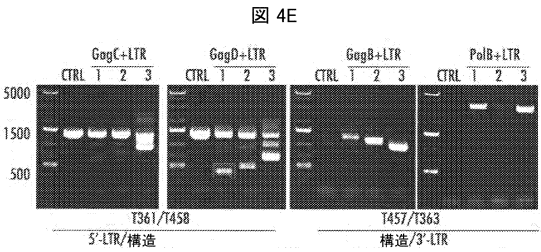
20

【 図 4 C 】

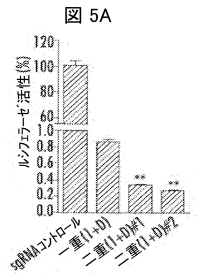




【図 4 E】

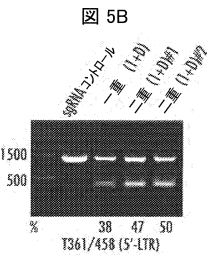


【図 5 A】

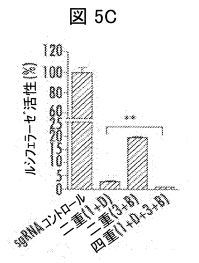


10

【図 5 B】

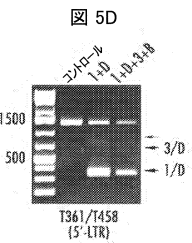


【図 5 C】

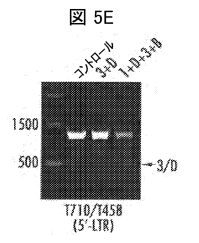


20

【図 5 D】



【図 5 E】

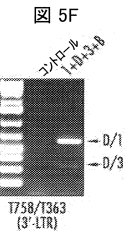


30

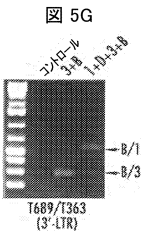
40

50

【図 5 F】



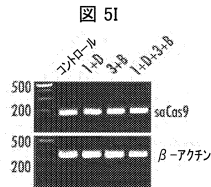
【図 5 G】



【図 5 H】



【図 5 I】



10

【図 6 A】

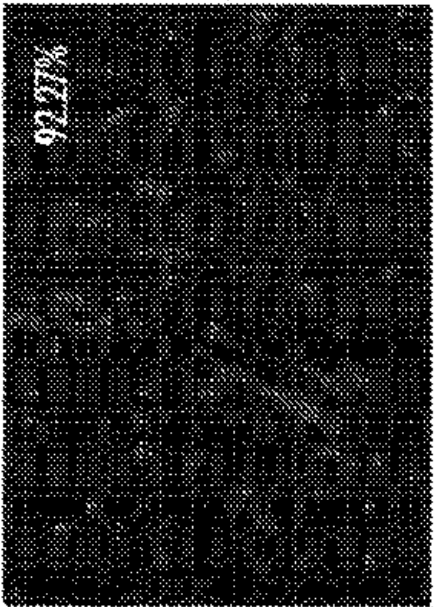


FIG. 6A

【図 6 B】



FIG. 6B

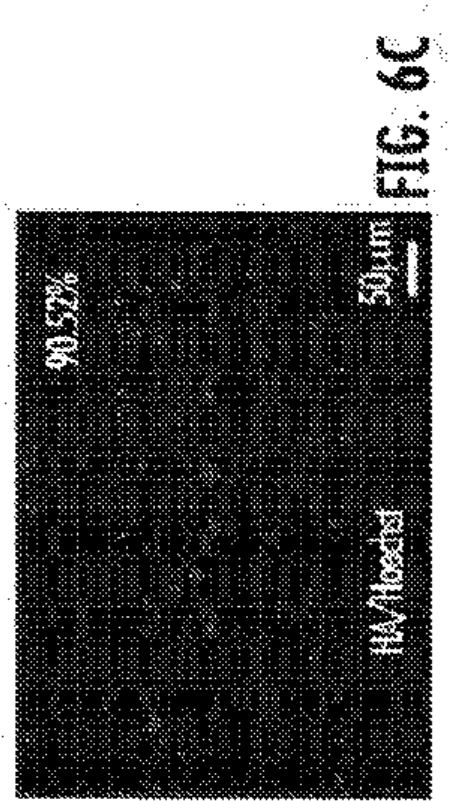
20

30

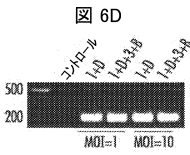
40

50

【図 6 C】



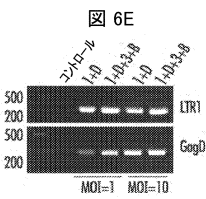
【図 6 D】



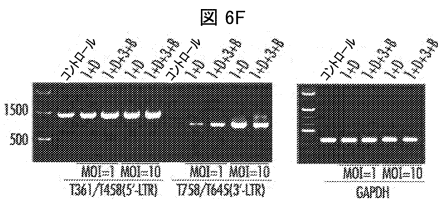
10

20

【図 6 E】



【図 6 F】

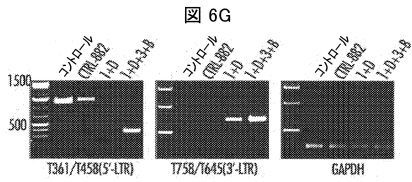


30

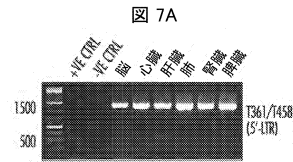
40

50

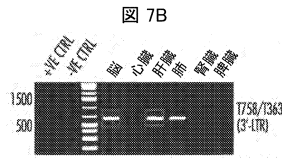
【図 6 G】



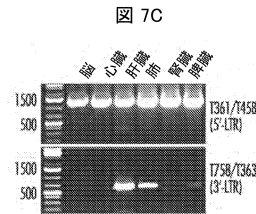
【図 7 A】



【図 7 B】

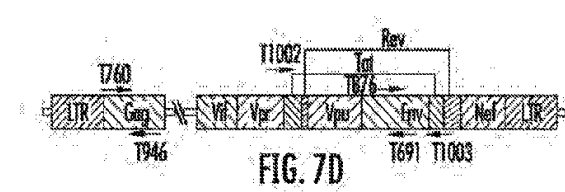


【図 7 C】

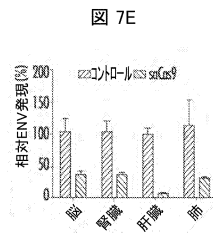


10

【図 7 D】

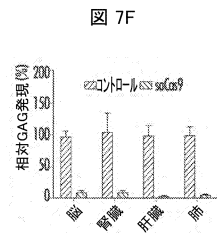


【図 7 E】

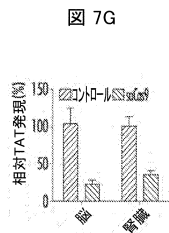


20

【図 7 F】



【図 7 G】

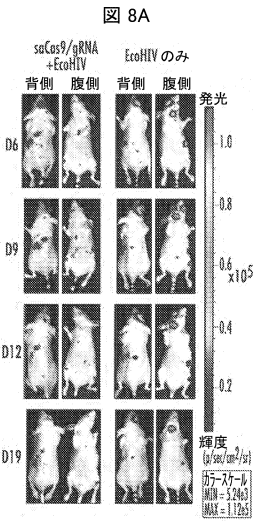


30

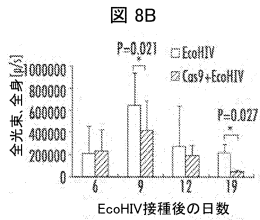
40

50

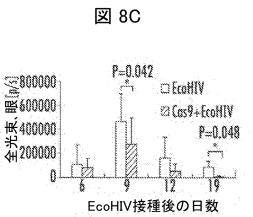
【図 8 A】



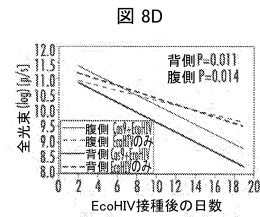
【図 8 B】



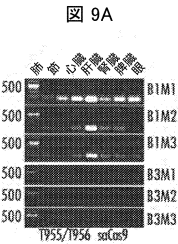
【図 8 C】



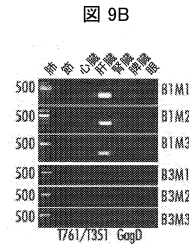
【図 8 D】



【図 9 A】



【図 9 B】



10

20

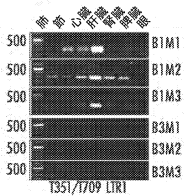
30

40

50

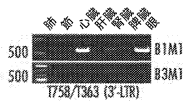
【図 9 C】

図 9C



【図 9 D】

図 9D



【図 9 E】

図 9E



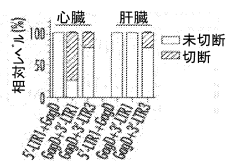
【図 9 F】

図 9F



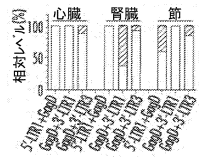
【図 9 G】

図 9G



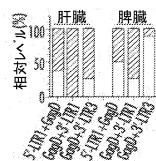
【図 9 H】

図 9H



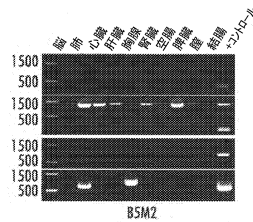
【図 9 I】

図 9I



【図 10 A】

図 10A



10

20

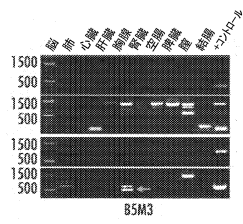
30

40

50

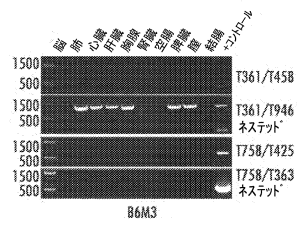
【 図 1 0 B 】

図 10B



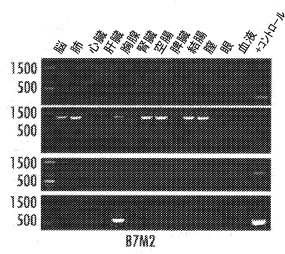
【 図 1 0 C 】

図 10C



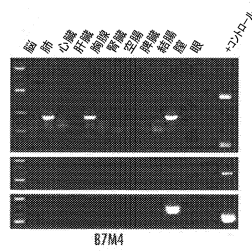
【 図 1 0 D 】

図 10D



【 図 1 0 E 】

図 10E



10

20

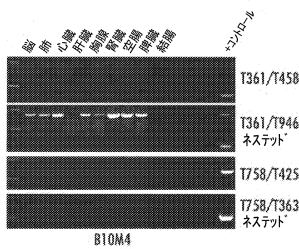
30

40

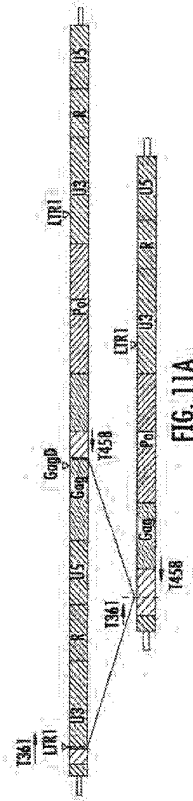
50

【 1 0 F 】

図 10F



【 1 1 A 】



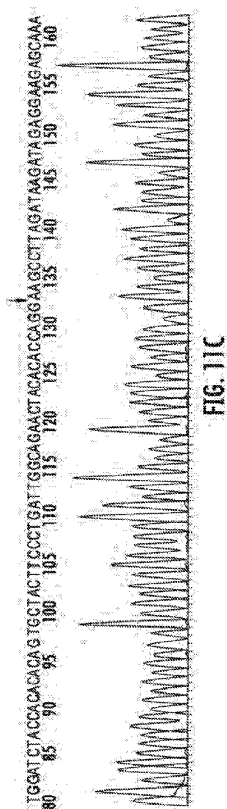
10

20

【 1 1 B 】



【 1 1 C 】



30

40

50



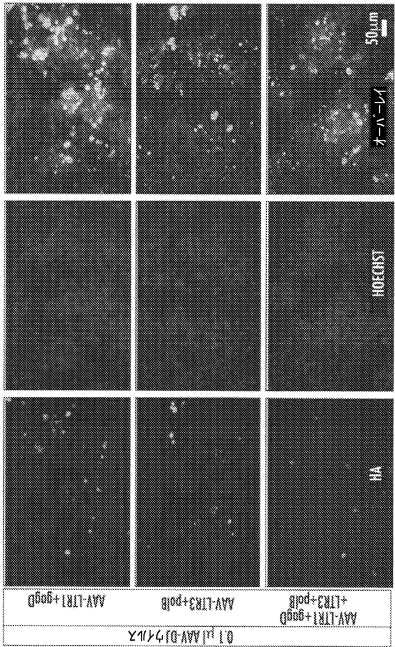
【図 1 2 A】

図 12A

72スト#	72スト名	sgRNA	G/ml	倍	TU/ml	倍
882	AAV-saCas9-sgRNA(TC4)	一重	3.50E+13	0.83	2E+09	8.00
924	AAV-saCas9-sgRNA(LTR1+GagpJ)	一重	4.15E+13	0.99	9.7E+08	3.88
938	AAV-saCas9-sgRNA(LTR3+PolB)	一重	4.30E+13	1.02	4.4E+08	1.76
962	AAV-saCas9-sgRNA(LTR1+GagpJ+LTR3+PolB)	四重	4.20E+13	1.00	2.5E+08	1.00

【図 1 2 B】

図 12B

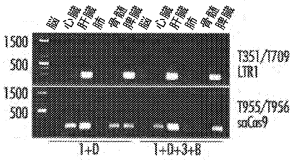


10

20

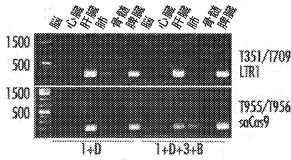
【図 1 3 A】

図 13A



【図 1 3 B】

図 13B

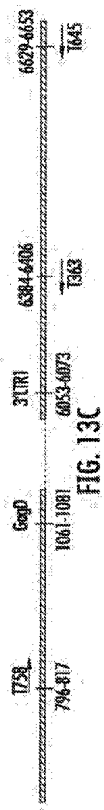


30

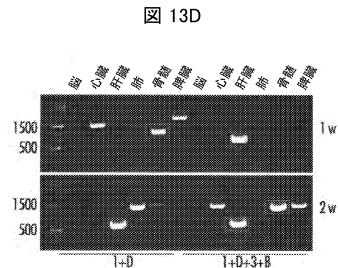
40

50

【図 1 3 C】



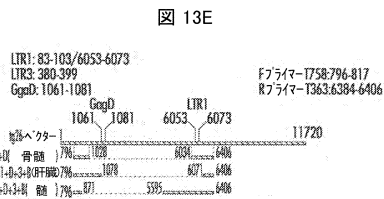
【図 1 3 D】



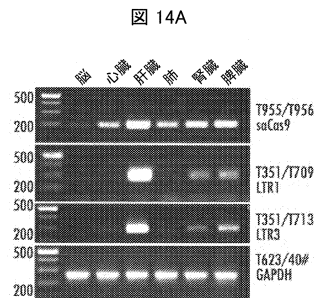
10

20

【図 1 3 E】



【図 1 4 A】



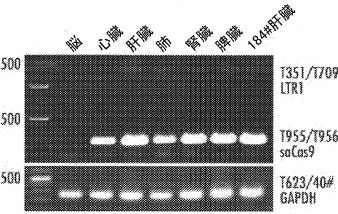
30

40

50

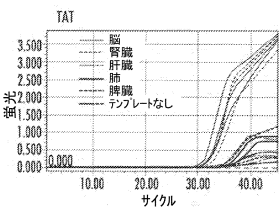
【図 14 B】

図 14B



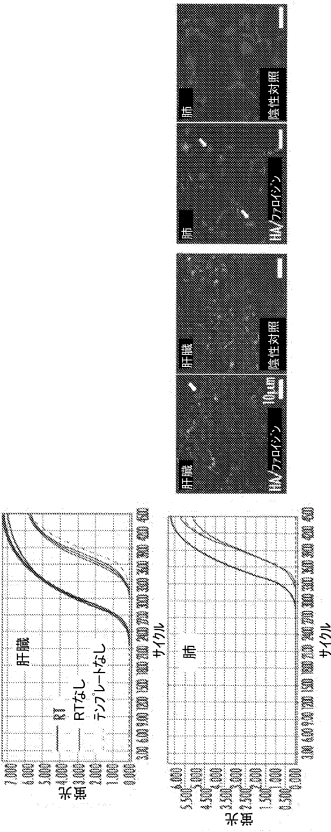
【図 14 C】

図 14C



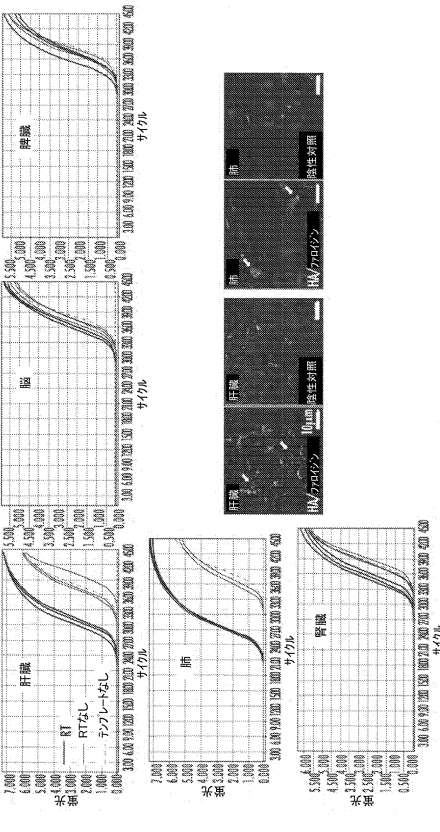
【図 15 A】

図 15A



【図 15 B】

図 15B



10

20

30

40

50



【 図 1 7 C 】

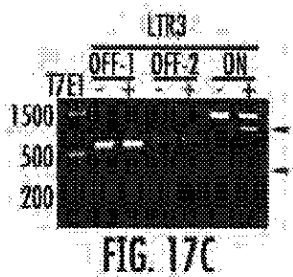


FIG. 17C

【图 17 D】

图 17D

LTR3-OFF-1 (ヌクレオチド'8~23と100%マッチ)

[illegible]

10

【 𢇛 1 7 E 】

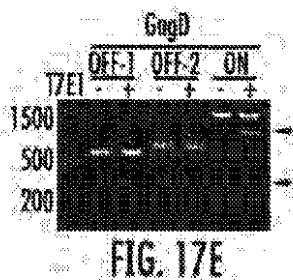


Fig. 17

## 【图 17 F】

图 17F

GagD-Off-1(ヌクレオチド'6~23と100%マッチ)

600bp (UAGT-H) x 800bp (T) 6 ~ 23% (100% マナ)

TTGACGACATGATGATTCAGGCTCTCTGCTGCTGCTCTGCTGACATCATGCG  
 TTATCCATCTCTTCAGCGACTTCACTGCTGTATTAATATGCTGCACATTCATATGAC  
 TCTCTCAGCGACGCTTACGGAGACATTTGGAGAGAGAGAGGCTCTGGACGATG  
 ATGCTCTCTGTCGAGTGCAGGACGACCATCTGGAGCTCTGCTGCTCATTTGTGGAG  
 CTATGCTCTCTCTCAAGATGCTTCATATCTCATTTTCTTCCATCTCTGACATCTGAC  
 TCTATGCTCAGCGAGCTCTATGAGCTTCTACTTCTATCTCTTCTATGAGGCTCTGAC  
 TCTGCTCTGATATCTCTGACATCTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
 TGGAGTCTCATGATCTTACTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
 CTCTGCTCTTATGACCTGCT  
 ATTCAGCTCTTATGACCTGCT

20

30

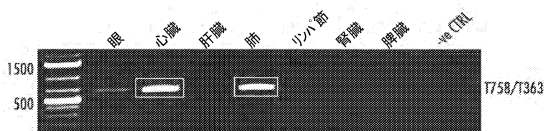
40

50

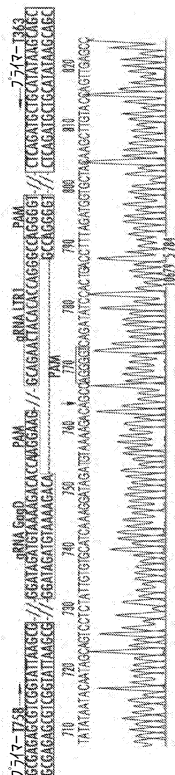
【 図 1 8 A 】

【 図 1 8 B 】

図 18A



18B



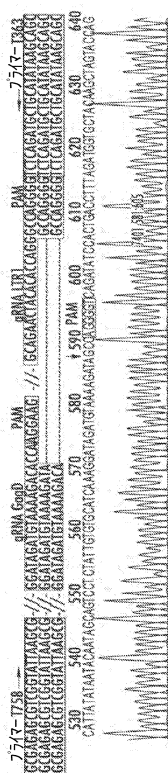
10

20

【 図 1 8 C 】

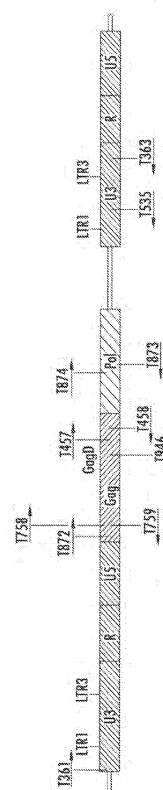
## 【 圖 1 9 】

☒ 18C



☒ 19

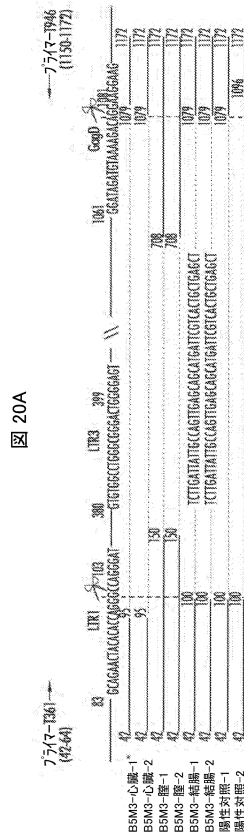
5'-LTR-GagD	未切斷	1872/1759
	切斷	1361/1946
	內在	1457/1458
	未切斷	1873/1874
GagD+3'-LTR	切斷	1758/1535
	內在	1872/1759
	未切斷	1873/1874
GagD+3'-LTR3	切斷	1758/1363
	內在	1872/1759



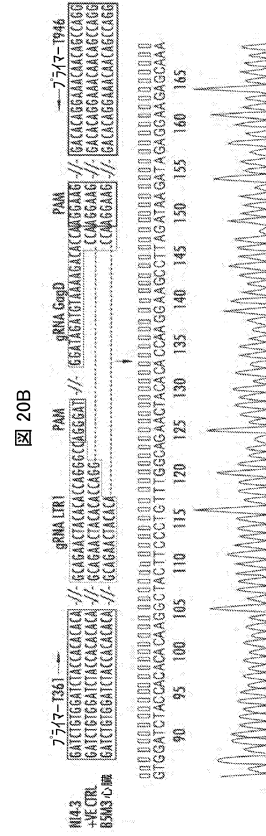
30

40

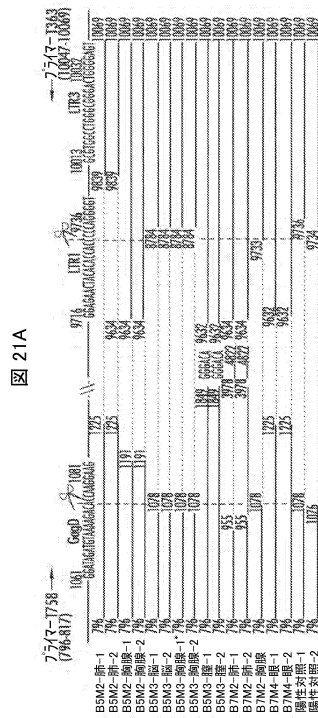
【 図 2 0 A 】



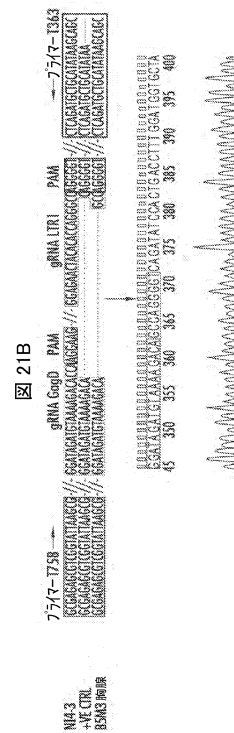
【図 20 B】



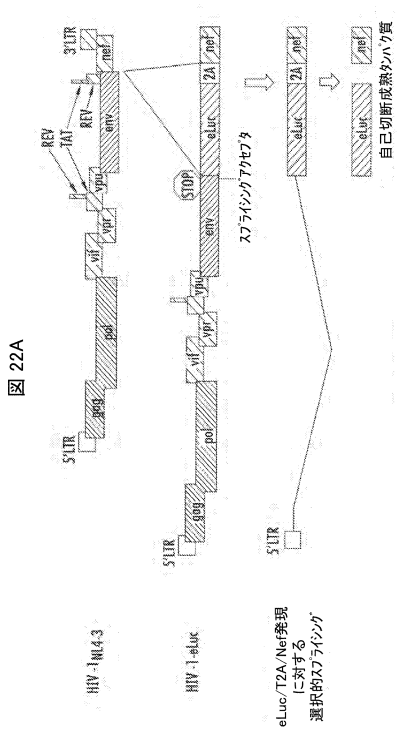
【 図 2 1 A 】



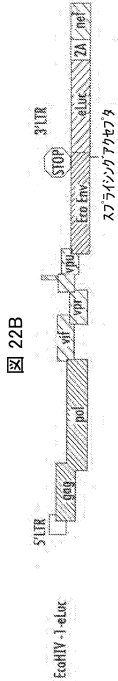
【 図 2 1 B 】



【図 2 2 A】



【図 2 2 B】



【配列表】

0007176737000001.app

10

20

30

40

50



## フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/49 (2006.01)

C 1 2 N 15/49

A 6 1 K 35/761 (2015.01)

A 6 1 K 35/761

C 1 2 N 15/861 (2006.01)

C 1 2 N 15/861 Z

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/298,722

(32)優先日 平成28年2月23日(2016.2.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/345,520

(32)優先日 平成28年6月3日(2016.6.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/410,496

(32)優先日 平成28年10月20日(2016.10.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/363,625

(32)優先日 平成28年7月18日(2016.7.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

シャル ブールバード 1 9 0 , アパートメント 7 1 8

(72)発明者 フ, ウェンファイ

アメリカ合衆国, 0 8 0 0 3 ニュージャージー州, チェリー ヒル, ヨーロッパ コート 2 2 4

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 3 1 7 7 5 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 7 6

A 6 1 K 3 5 / 7 6 1

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 3 1 / 1 4

A 6 1 P 3 1 / 1 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0

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

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