(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-529400
(P2024-529400A)
(43)公表日　令和6年8月6日(2024.8.6)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	ＺＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*7/04 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/04		４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全34頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-503721(P2024-503721)
(86)(22)出願日　令和4年7月21日(2022.7.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月19日(2024.3.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/073981
(87)国際公開番号　WO2023/004375
(87)国際公開日　令和5年1月26日(2023.1.26)
(31)優先権主張番号　63/224,581
(32)優先日　令和3年7月22日(2021.7.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　521476126
エメンドバイオ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、デラウェア州　１９８０５、ウィルミントン、センター・ロード　１０１３、スイート　４０３－ビー
(74)代理人　110003708
弁理士法人鈴榮特許綜合事務所
(72)発明者　エマニュエル、ラフィ
イスラエル国、７２３６７１０　ラムラ、イスラエル・フレンケル　１７

Ｆターム（参考）　4B065　AA96X AA96Y AB01 BA01 BA30
4C084　AA02 AA13 DC22 NA13 NA14 ZA75 ZB33 ZC75
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）ノックアウト

(57)【要約】
配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含むＲＮＡ分子、並びにその組成物、方法及び使用。

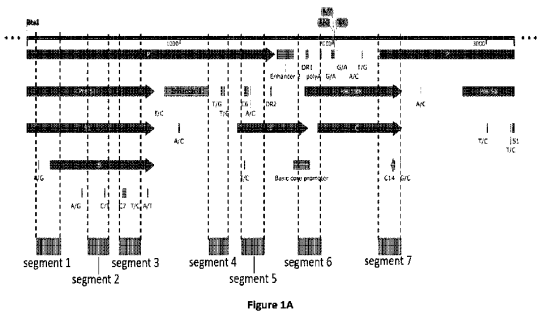


Figure 1A

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞においてＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）配列を改変する方法であって、
少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、又はＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列；及び
１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む第１のＲＮＡ分子、又は前記第１のＲＮＡ分子をコードするヌクレオチド配列
を含む組成物を前記細胞へ導入することを含み、
前記ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと前記第１のＲＮＡ分子の複合体が前記ＨＢＶ配列を二本鎖切断する、方法。
【請求項２】
前記第１のＲＮＡ分子のガイド配列部分が、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記二本鎖切断が、ＨＢＶ遺伝子若しくはその一部分、ＨＢＶコード配列若しくはその一部分、ＨＢＶ制御配列若しくはその一部分、及び／又は保存ＨＢＶ配列の配列にもたらされる、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む第２のＲＮＡ分子、又は前記第２のＲＮＡ分子をコードするヌクレオチド配列を前記細胞へ導入することを更に含み、前記第２のＲＮＡ分子とＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼの複合体がＢ型肝炎ウイルス配列を更に二本鎖切断する、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記第２のＲＮＡ分子のガイド配列部分が、前記第１のＲＮＡ分子の配列以外の、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドを含む、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
ヌクレオチドの配列が、前記ＨＢＶ配列を含む分子から切除される、請求項４又は５に記載の方法。
【請求項７】
前記ＨＢＶ配列から切除されるヌクレオチドの配列が、ＨＢＶ遺伝子若しくはその一部分、ＨＢＶコード配列若しくはその一部分、ＨＢＶ制御配列若しくはその一部分、及び／又は保存ＨＢＶ配列を含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記第１又は第２のＲＮＡ分子が、前記第１及び第２のＲＮＡ分子によって切除されるＨＢＶ遺伝子、ＨＢＶコード配列、ＨＢＶ制御配列、及び／又は保存ＨＢＶ配列から５００塩基対までに位置する配列を標的とするガイド配列部分を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記細胞が肝臓細胞又は肝実質細胞である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記細胞がヒト対象内にある、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ヒト対象が、慢性又は急性Ｂ型肝炎にり患している、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＨＢＶ配列が、ＨＢＶ共有結合閉環ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）分子に位置する、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ＨＢＶ配列が、ＨＢＶ配列が組み込まれたゲノムＤＮＡ分子に位置する、請求項１

～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
第１のＲＮＡ分子を含む組成物であって、前記第１のＲＮＡ分子が、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む、組成物。
【請求項１５】
少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを更に含む、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む第２のＲＮＡ分子を更に含み、前記第２のＲＮＡ分子がＨＢＶ遺伝子を標的とし、かつ前記第２のＲＮＡ分子のガイド配列部分が、前記第１のＲＮＡ分子のガイド配列部分の配列とは異なる配列である、請求項１４又は１５に記載の組成物。
【請求項１７】
前記第２のＲＮＡ分子のガイド配列部分が、前記第１のＲＮＡ分子の配列以外の、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドを含む、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物を細胞へ送達することを含む、前記細胞においてＢ型肝炎ウイルスを不活性化する方法。
【請求項１９】
請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物を、Ｂ型肝炎を有する対象の細胞へ送達することを含む、Ｂ型肝炎を治療する方法。
【請求項２０】
請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物を細胞へ送達することを含む、前記細胞においてＢ型肝炎ウイルスを不活性化するための、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【請求項２１】
細胞においてＢ型肝炎ウイルスの不活性化に使用する、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物を含む医薬であって、前記医薬は、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞へ送達することにより投与される、医薬。
【請求項２２】
Ｂ型肝炎を有する又は有するリスクがある対象の細胞へ請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物を送達することを含む、Ｂ型肝炎の治療、寛解又は予防のための、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【請求項２３】
Ｂ型肝炎の治療、寛解又は予防に使用する、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物を含む医薬であって、前記医薬は、Ｂ型肝炎を有する又は有するリスクがある対象の細胞へ請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物を送達することにより投与される、医薬。
【請求項２４】
細胞においてＢ型肝炎ウイルスの不活性化に使用する、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５】
Ｂ型肝炎の治療、寛解又は予防に使用する、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
この出願は、2021年7月22日に出願された米国仮出願第63/224,581号の恩恵を主張し、その米国仮出願の内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【０００２】
この出願全体で、括弧に入れて参照したものを含む、さまざまな刊行物を参照する。この出願において全体として言及された全ての刊行物の開示は、この発明が属する技術分野及びこの発明と共に使用される技術分野における特徴の追加の説明を提供するために、参照によりこの出願に組み入れられる。
【０００３】
配列表への言及
この出願は、「220721_91770-A-PCT_Sequence_Listing_AWG.xml」と名付けられたファイルに存在するヌクレオチド配列を参照により組み入れ、そのファイルは、サイズが２３，８５０ｋｂであり、MS-Windows（登録商標）とのシステム互換性を有するＩＢＭ－ＰＣ機フォーマットで2022年7月19日に作成され、この出願の一部として、2022年7月21日に出願されたＸＭＬファイルに含まれている。
【背景技術】
【０００４】
Ｂ型肝炎ウイルス及び肝臓感染症
Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）は、Ｂ型肝炎肝臓感染症（「Ｂ型肝炎」とも呼ばれる）の原因物質である。ＣＤＣによれば、Ｂ型肝炎は、多くの人にとって短期間の病気であるが、肝硬変又は肝臓がんのような深刻な健康問題に繋がる可能性がある長期間の慢性感染となる可能性がある。慢性感染のリスクは、感染時の年齢に関係している：Ｂ型肝炎の乳児の約９０％は慢性化し、一方、成人でＢ型肝炎にり患した人で慢性化するのは２％～６％のみである。慢性ＨＢＶ感染症の効率的な治癒は、ＨＢＶ複製と持続のための鋳型である長寿命のウイルスゲノム中間体であるＨＢＶ共有結合閉環ＤＮＡ（covalently closed circular DNA、ｃｃｃＤＮＡ）の排除を必要とする。
【発明の概要】
【０００５】
細胞においてＨＢＶゲノムＤＮＡ分子を破壊するためのアプローチを開示する。本発明のいくつかの側面で、このアプローチの結果、ＨＢＶ遺伝子の発現がノックアウトされる。いくつかの態様では、本開示は、ＨＢＶ配列の保存領域又はその一部分を破壊する方法を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ＨＢＶ配列の制御エレメント又はその一部分を破壊する方法を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ＨＢＶ配列のコード配列又はその一部分を破壊する方法を提供する。いくつかの態様では、ＨＢＶ共有結合閉環ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）分子内及び／又は哺乳動物宿主ゲノムＤＮＡ分子内で、ＨＢＶ配列が標的化され、改変される。いくつかの側面では、この開示は、ＨＢＶ共有結合閉環ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）分子の配列を標的とし、改変する方法を提供する。
【０００６】
本開示は、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）を含有する細胞においてＨＢＶ遺伝子を改変する方法であって、
少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、又はＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列；及び
１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む第１のＲＮＡ分子、又は当該第１のＲＮＡ分子をコードするヌクレオチド配列
を含む組成物を細胞へ導入することを含み、
ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと第１のＲＮＡ分子の複合体がＨＢＶ遺伝子を二本鎖切断する、方法も提供する。
【０００７】
本発明のいくつかの態様では、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む第１のＲＮＡ分子を提供する。
【０００８】
本発明のいくつかの態様では、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含むＲＮＡ分子、及びＣＲＩＳＰＲ

ヌクレアーゼを含む組成物を提供する。
【０００９】
本発明のいくつかの態様では、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含むＲＮＡ分子、及びＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを含む組成物を、Ｂ型肝炎を有する対象の細胞へ送達することを含む、Ｂ型肝炎を治療する方法を提供する。
【００１０】
本発明のいくつかの態様では、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含むＲＮＡ分子、及びＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを含む組成物を、Ｂ型肝炎ウイルスを含有する細胞へ送達することを含む、細胞においてＢ型肝炎ウイルスを不活性化する方法を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１Ａ】図１Ａは、（直線化された）ＨＢＶ ｃｃｃＤＮＡ（直線化された）分子の概略図を示す。
【図１Ｂ】図１Ｂは、ＨｅＬａ細胞の次の感染に使用するために、どのようにＨＢＶセグメントがレンチウイルスベクターにクローニングされたかを示す。
【図２】図２は、ＨｅＬａ細胞におけるＨＢＶを標的とするガイド分子の活性を示す。特定のガイド分子を、野生型ＯＭＮＩ－７９（ＷＴ）ヌクレアーゼ又はＯＭＮＩ－７９ Ｖ５５７０バリアントヌクレアーゼと同時トランスフェクトして、ガイド分子のオンターゲット活性を決定した。ＤＮＡトランスフェクションの７２時間後に細胞を収集し、ゲノムＤＮＡを抽出し、ヌクレアーゼ切断部位を含む領域を増幅し、次いで、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）により分析した。グラフは、感染多重度（ＭＯＩ）２でレンチウイルスをトランスフェクトした細胞における３つの独立したトランスフェクションの編集率（％）±ＳＴＤＶを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
詳細な説明
別段の定義がある場合を除き、この明細書で用いる全ての技術的及び／又は科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されているのと同じ意味をもつ。この明細書に記載したものと類似又は等価の方法及び材料は、本発明の態様の実施又は試験に用いることができるが、代表的な方法及び／又は材料を以下に記載する。矛盾する場合、定義を含めて、この明細書が優先する。加えて、材料、方法及び実施例は例証となるのみであり、必ずしも限定することを意図するものではない。
【００１３】
用語「１つの（ａ、ａｎ）」は、列挙された成分の「１つ以上」を指すことが理解される。単数形の使用は、具体的に別段の説明がある場合を除き、複数形を含むことは当業者に明らかである。したがって、用語「１つの（ａ、ａｎ）」及び「少なくとも１つの」は、この出願では同じ意味である。
【００１４】
この教示をより良く理解することを目的として、かつ教示の範囲を決して限定することなく、別段の指示がある場合を除き、この明細書及び特許請求の範囲で用いられる、量、パーセンテージ又は割合を表す全ての数及び他の数値は、あらゆる場合において、用語「約」により修飾されていると理解される。したがって、反する指示がある場合を除き、明細書及び特許請求の範囲に示した数的パラメータは、得ようとする所望の性質に依存して変動してもよい近似値である。最低でも、各数的パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の数を考慮しかつ通常の丸め技術を適用することによって解釈される。
【００１５】
別段の説明がある場合を除き、形容詞、例えば、本発明の態様の特徴を示す状態又は関係を修飾する「実質的に」及び「約」は、その状態又は特性が、それが意図される適用に

ついての態様の運用に受け入れられる許容範囲内までで定義されることを意味すると理解される。別段の指示がある場合を除き、この明細書及び特許請求の範囲における用語「又は」は、排他的な「又は」というよりむしろ、包含的な「又は」であると見なされ、それが結びつける項目の少なくとも１つ又は任意の組合せを示す。

【００１６】

本出願の説明及び特許請求の範囲において、動詞「含む」、「含有する」及び「有する」並びにそれらの活用形は、その動詞の目的語が、必ずしも、その動詞の主語の成分、要素又は部分の完全な列挙とは限らないことを示すために用いられる。この明細書では他の用語は、当技術分野におけるそれらの周知の意味により定義されることを意図する。

【００１７】

本発明のいくつかの態様では、ＤＮＡヌクレアーゼは、標的部位でＤＮＡを切断し、細胞修復機構、例えば限定するものではないが非相同末端結合（ＮＨＥＪ）、を誘導するために利用される。古典的ＮＨＥＪでは、二本鎖切断（ＤＳＢ）部位の２つの末端は、迅速であるが、不正確でもある様式で共にライゲーションされ（すなわち、小さな挿入又は欠失の形態の切断部位におけるＤＮＡの変異を頻繁に生じる）、ＨＤＲでは、無傷の相同ＤＮＡドナーを使用して、切断部位を囲むＤＮＡを正確な様式で置き換える。ＨＤＲは、切断部位における外因性ＤＮＡの正確な挿入を媒介することもできる。したがって、用語「相同組換え修復」又は「ＨＤＲ」は、細胞内で、例えばＤＮＡの二本鎖及び一本鎖切断の修復中に、ＤＮＡ損傷を修復する機構を指す。ＨＤＲは、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、二本鎖又は一本鎖切断された配列（例．ＤＮＡ標的配列）を修復するために「核酸鋳型」（この明細書では、核酸鋳型とドナー鋳型は同じ意味である）を用いる。これは、例えば核酸鋳型から、ＤＮＡ標的配列への遺伝子情報の移動が生じる。ＨＤＲは、核酸鋳型の配列がＤＮＡ標的の配列と異なり、かつ、核酸鋳型ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの一部又は全部がＤＮＡ標的配列へ組み入れられる場合には、ＤＮＡ標的の配列が変化（例．挿入、欠失、変異）する可能性がある。いくつかの態様では、核酸鋳型ポリヌクレオチド全体、核酸鋳型ポリヌクレオチドの一部分又は核酸鋳型のコピーが、ＤＮＡ標的配列に組み込まれる。

【００１８】

この明細書では、用語「標的化配列」又は「標的化分子」は、特定の標的配列とハイブリダイズできるヌクレオチド配列、又はヌクレオチド配列を含む分子を指し、例えば、標的化配列は、標的となる配列と少なくとも部分的に相補的であるヌクレオチド配列を有する。標的化配列又は標的化分子は、単独で、又は他のＲＮＡ分子と組み合わせて、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと複合体を形成できるＲＮＡ分子の一部であってもよく、標的化配列が、ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的化部分としての役割を果たす。標的化配列を有する分子がＣＲＩＳＰＲ分子と同時に存在する場合、ＲＮＡ分子は、単独で又は他の１つ以上のＲＮＡ分子（例．ｔｒａｃｒＲＮＡ分子）と組み合わせて、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼの標的を特定の標的配列とする能力がある。限定するものではない例として、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ分子のガイド配列部分又は単一ガイドＲＮＡ分子は、標的化分子としての役割を果たしてもよい。それぞれの実現可能性は、個別の態様である。標的化配列は、所望の配列を標的とするようにカスタムデザインできる。

【００１９】

この明細書では、用語「標的とする」は、標的化分子の標的化配列を、標的化されるヌクレオチド配列を有する核酸へ優先的にハイブリダイズさせることを指す。用語「標的化する」は、可変性のハイブリダイゼーション効率を包含し、したがって、標的となるヌクレオチド配列を有する核酸の優先的な標的化があるが、オンターゲットハイブリダイゼーションに加えて、意図しないオフターゲットハイブリダイゼーションも生じる可能性があることは理解されている。ＲＮＡ分子が配列を標的とする場合、ＲＮＡ分子とＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ分子の複合体は、ヌクレアーゼ活性のためにその配列を標的とすることは理解されている。

【００２０】

ＲＮＡ分子の「ガイド配列部分」は、特定の標的ＤＮＡ配列とハイブリダイズできるヌクレオチド配列を指し、例えば、ガイド配列部分は、ガイド配列部分に沿って標的化されるＤＮＡ配列と部分的に又は完全に相補的であるヌクレオチド配列を有する。いくつかの態様では、ガイド配列部分のヌクレオチドの長さは、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９若しくは５０、又は、およそ１７～５０、１７～４９、１７～４８、１７～４７、１７～４６、１７～４５、１７～４４、１７～４３、１７～４２、１７～４１、１７～４０、１７～３９、１７～３８、１７～３７、１７～３６、１７～３５、１７～３４、１７～３３、１７～３１、１７～３０、１７～２９、１７～２８、１７～２７、１７～２６、１７～２５、１７～２４、１７～２２、１７～２１、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～２２、１８～２０、２０～２１、２１～２２若しくは１７～２０である。好ましくは、ガイド配列部分の全長は、ガイド配列部分に沿って標的化されるＤＮＡ配列と完全に相補的である。ガイド配列部分は、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと複合体を形成できるＲＮＡ分子の一部であってもよく、ガイド配列部分がＣＲＩＳＰＲ複合体のＤＮＡ標的化部分としての役割を果たす。ガイド配列部分を有するＤＮＡ分子が、ＣＲＩＳＰＲ分子と同時に存在する場合、ＲＮＡ分子は、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼの標的を特定の標的ＤＮＡ配列とする能力がある。それぞれの実現可能性は、個別の態様である。ＲＮＡ分子は、所望の配列を標的とするようにカスタムデザインできる。したがって、「ガイド配列部分」を含む分子は一種の標的化分子である。いくつかの態様では、ガイド配列部分は、この明細書に記載したガイド配列部分、例えば、配列番号１～１８９３６のいずれかに示すガイド配列と同じ配列、又は１、２、３、４若しくは５ヌクレオチド以下の異なる配列を含む。それぞれの実現可能性は、個別の態様である。これらの態様の一部では、ガイド配列部分は、標的配列と完全に相補的であり、配列番号：１～１８９３６のいずれかに示す配列と同じである配列を含む。この出願全体で、用語「ガイド分子」、「ＲＮＡガイド分子」、「ガイドＲＮＡ分子」及び「ｇＲＮＡ分子」は、ガイド配列部分を含む分子と同義であり、用語「スペーサー」は、「ガイド配列部分」と同義である。

【００２１】

本発明のいくつかの態様では、ＲＮＡ分子は、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む。

【００２２】

ＲＮＡ分子及び／又はＲＮＡ分子のガイド配列部分は、修飾ヌクレオチドを有してもよい。ヌクレオチド／ポリヌクレオチドへの代表的な修飾は、合成であってもよく、天然に存在するアデニン、シトシン、チミン、ウラシル又はグアニン塩基以外の塩基を含むヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを包含してもよい。ポリヌクレオチドへの修飾には、合成で、天然に存在しないヌクレオシド、例えば、ロックド核酸を有するポリヌクレオチドが挙げられる。ＲＮＡの安定性を増加又は減少させるために、ポリヌクレオチドを修飾してもよい。修飾ポリヌクレオチドの例は、１－メチルプソイドウリジンを有するｍＲＮＡである。例えば、修飾ポリヌクレオチドとその使用の例は、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第8,278,036号、国際公開第2015/006747号及びWeissman and Kariko (2015)を参照。

【００２３】

この明細書では、配列番号で示す「連続するヌクレオチド」は、ヌクレオチドの介入を一切含まない、配列番号に示した順序での配列のヌクレオチドを指す。

【００２４】

本発明のいくつかの態様では、ガイド配列部分は、２５ヌクレオチド長であってもよく、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する２０～２２ヌクレオチドを含有してもよい。本発明のいくつかの態様では、ガイド配列部分は、２２ヌクレオチド長未満であってもよい。例えば、本発明のいくつかの態様では、ガイド配列部分は、１

７、１８、１９、２０又は２１ヌクレオチド長であってもよい。そのような態様では、ガイド配列部分は、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す連続する１７～２２ヌクレオチドの配列における、それぞれ１７、１８、１９、２０又は２１ヌクレオチドからなってもよい。例えば、配列番号１８９３７に示す連続する１７ヌクレオチドの配列のガイド配列部分は、以下のヌクレオチド配列のいずれか１つからなってもよい（連続する配列から排除されたヌクレオチドには、取り消し線が引かれている）：

【００２５】

【化１】

	AAAAAAAUGUACUUGGUUCC	（配列番号18937）
17ヌクレオチドガイド配列部分1:	~~AAA~~AAAAAUGUACUUGGUUCC	（配列番号18938）
17ヌクレオチドガイド配列部分2:	~~AA~~AAAAAUGUACUUGGUUC~~C~~	（配列番号18939）
17ヌクレオチドガイド配列部分3:	~~A~~AAAAAAUGUACUUGGUU~~CC~~	（配列番号18940）
17ヌクレオチドガイド配列部分4:	AAAAAAAUGUACUUGGU~~UCC~~	（配列番号18941）

【００２６】

本発明のいくつかの態様では、ガイド配列部分のヌクレオチドの長さは、２０を超えてもよい。例えば、本発明のいくつかの態様では、ガイド配列部分のヌクレオチド長は、２１、２２、２３、２４又は２５であってもよい。そのような態様では、ガイド配列部分は、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す連続する２０、２１又は２２ヌクレオチドの配列を含有する１７～５０ヌクレオチド、及び、標的配列の３’末端、５’末端、又は両者に隣接するヌクレオチド（の配列）に完全に相補的なヌクレオチドを含む。

【００２７】

本発明のいくつかの態様では、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、及びガイド配列部分を含むＲＮＡ分子は、標的ＤＮＡ配列と結合して、標的ＤＮＡ配列を切断するＣＲＩＳＰＲ複合体を形成する。ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、例えば、Ｃｐｆ１は、追加のｔｒａｃｒＲＮＡ分子なしで、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ及びＲＮＡ分子を含むＣＲＩＳＰＲ複合体を形成してもよい。あるいは、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９は、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼとＲＮＡ分子とｔｒａｃｒＲＮＡ分子の間でＣＲＩＳＰＲ複合体を形成してもよい。特定の標的ＤＮＡ配列とハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含むガイド配列部分と、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ結合に関与する配列部分、例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ配列部分は、同じＲＮＡ分子中に存在できる。あるいは、ガイド配列部分は１つのＲＮＡ分子に存在し、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ結合に関与する配列部分、例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ部分は、別のＲＮＡ分子に存在してもよい。ガイド配列部分（例．ＤＮＡ標的化ＲＮＡ配列）及び少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲタンパク質結合ＲＮＡ配列部分（例．ｔｒａｃｒＲＮＡ配列部分）を含む単一のＲＮＡ分子が、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと複合体を形成し、ＤＮＡ標的化分子としての役割を果たすことができる。いくつかの態様では、ガイド配列部分を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ部分を含む第１のＲＮＡ分子と、ＣＲＩＳＰＲタンパク質結合ＲＮＡ配列を含む第２のＲＮＡ分子は、塩基対形成により相互作用して、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼの標的をＤＮＡ標的部位とするＲＮＡ複合体を形成し、あるいは、融合してＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと複合体化し、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼの標的をＤＮＡ標的部位とするＲＮＡ分子を形成する。

【００２８】

本発明のいくつかの態様において、ガイド配列部分を含むＲＮＡ分子は、ｔｒａｃｒＲＮＡ分子の配列を更に含んでいてもよい。そのような態様は、ＲＮＡ分子のガイド部分とトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）の合成的融合体としてデザインされてもよい（Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ., ２０１２参照）。そのような態様では、ＲＮＡ分子は単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）分子である。本発明のいくつかの態様は、個々のｔｒａｃｒＲＮＡ分子及びガイド配列部分を含む個々のＲＮＡ分子を利用するＣＲＩＳＰＲ複合体も形成してもよい。そのような態様では、ｔｒａｃｒＲＮＡは、塩基対形成を介してＲＮＡ分子とハイブリダイズしてもよく、この明細書に記載した発明のある特定の適用において有利である

可能性がある。
【００２９】
用語「ｔｒａｃｒメイト配列」は、塩基対形成を介してｔｒａｃｒＲＮＡとハイブリダイズし、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するように、ｔｒａｃｒＲＮＡ分子に対して十分に相補的な配列を指す（米国特許第8,906,616号参照）。本発明のいくつかの態様では、ＲＮＡ分子はｔｒａｃｒメイト配列を有する部分を更に含んでいてもよい。
【００３０】
本発明では、「遺伝子」は、遺伝子産物をコードするＤＮＡ領域、及び、遺伝子産物の産生を制御する全てのＤＮＡ領域を含み、前記制御領域の配列は、コード配列及び／又は転写配列と隣接しているか、していないかを問わない。したがって、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳制御配列、例えば、リボソーム結合部位及び配列内リボソーム進入部位、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス付着部位、並びに遺伝子座調節領域が挙げられるが、必ずしもそれらに限定されるものではない。
【００３１】
「真核」細胞には、真菌細胞（例．酵母）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、及びヒト細胞が挙げられるが、それらに限定されるものではない。
【００３２】
この明細書では、用語「ヌクレアーゼ」は、核酸のヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を切断する能力がある酵素を指す。ヌクレアーゼは、天然物から単離してもよく、又は天然物に由来するものであってもよい。天然物は、生きている生物体であってもよい。あるいは、ヌクレアーゼは、ホスホジエステル結合切断活性を保持する、改変された又は合成されたタンパク質であってもよい。遺伝子改変は、ヌクレアーゼ、例えばＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを用いて実現できる。
【００３３】
この明細書では、用語「保存領域」は、いくつかの異なる種又は株にわたる配列同一性を有する、ヌクレオチド分子又はアミノ酸分子の領域を指す。同様に、本明細書では、用語「保存配列」は、いくつかの異なる種又は株にわたる配列同一性を有する配列を指す。例えば、ＨＢＶ ＤＮＡの保存配列は、ＨＢＶのいくつかの異なる株、バリアント、又は血清型にわたる配列同一性を有するＨＢＶ ＤＮＡ配列である。配列同一性は、例えば、いくつかのＨＢＶ株、バリアント、又は血清型にわたる、少なくとも７０％配列同一性、８０％配列同一性、８１％配列同一性、８２％配列同一性、８３％配列同一性、８４％配列同一性、８５％配列同一性、８６％配列同一性、８７％配列同一性、８８％配列同一性、８９％配列同一性、又は９０％配列同一性であってもよい。
【００３４】
本発明のいくつかの態様では、細胞においてＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）配列を改変する方法であって、
少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、又はＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列；及び
１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む第１のＲＮＡ分子、又は当該第１のＲＮＡ分子をコードするヌクレオチド配列
を含む組成物を細胞へ導入することを含み、
ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと第１のＲＮＡ分子の複合体がＨＢＶ配列を二本鎖切断する、方法を提供する。
【００３５】
いくつかの態様では、第１のＲＮＡ分子のガイド配列部分は、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドを含む。
【００３６】
いくつかの態様では、二本鎖切断は、Ｂ型肝炎ウイルスＤＮＡ配列にもたらされる。いくつかの態様では、二本鎖切断は、ＨＢＶ遺伝子若しくはその一部分、ＨＢＶコード配列

若しくはその一部分、ＨＢＶ制御配列若しくはその一部分、及び／又は保存ＨＢＶ配列にもたらされる。

【００３７】

いくつかの態様では、二本鎖切断は、ＨＢＶコード配列、ＨＢＶ制御配列、及び／又は保存ＨＢＶ配列の上流又は下流５００ヌクレオチドまでにもたらされる。それぞれの実現可能性は、個別の態様である。いくつかの態様では、ＨＢＶ保存領域が標的化される。

【００３８】

いくつかの態様では、この方法は、１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む第２のＲＮＡ分子、又は当該第２のＲＮＡ分子をコードするヌクレオチド配列を細胞へ導入することを更に含み、第２のＲＮＡ分子とＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼの複合体がＢ型肝炎ウイルス配列を更に二本鎖切断する。

【００３９】

いくつかの態様では、第２のＲＮＡ分子のガイド配列部分は、第１のＲＮＡ分子の配列以外の、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドを含む。

【００４０】

いくつかの態様では、ヌクレオチドの配列が、ＨＢＶ配列を含む分子から切除される。

【００４１】

いくつかの態様では、ＨＢＶ配列から切除されたヌクレオチドの配列は、ＨＢＶ遺伝子若しくはその一部分、ＨＢＶコード配列若しくはその一部分、ＨＢＶ制御配列若しくはその一部分、及び／又は保存ＨＢＶ配列を含む。

【００４２】

いくつかの態様では、ＨＢＶ遺伝子又はその一部分が切除される。いくつかの態様では、ＨＢＶ制御配列又はその一部分が切除される。いくつかの態様では、ＨＢＶ非コード配列又はその一部分が切除される。

【００４３】

いくつかの態様では、第１又は第２のＲＮＡ分子は、第１及び第２のＲＮＡ分子によって切除されるＨＢＶ遺伝子、ＨＢＶコード配列、ＨＢＶ制御配列、及び／又は保存ＨＢＶ配列から５００塩基対までに位置する配列を標的とするガイド配列部分を含む。

【００４４】

いくつかの態様では、ＨＢＶ配列は、ＨＢＶ ｃｃｃＤＮＡ分子から切除される。

【００４５】

いくつかの態様では、ＨＢＶ配列は、ＨＢＶ配列が組み込まれているゲノムＤＮＡ分子から切除される。

【００４６】

いくつかの態様では、細胞は肝臓細胞又は肝実質細胞である。

【００４７】

いくつかの態様では、細胞はヒト対象内にある。

【００４８】

いくつかの態様では、ヒト対象は、慢性又は急性Ｂ型肝炎にり患している。

【００４９】

いくつかの態様では、ＨＢＶ配列は、ＨＢＶ共有結合閉環ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）分子に位置する。

【００５０】

いくつかの態様では、ＨＢＶ配列は、ＨＢＶ配列が組み込まれているゲノムＤＮＡ分子に位置する。

【００５１】

本発明のいくつかの態様では、第１のＲＮＡ分子を含む組成物であって、前記第１のＲＮＡ分子が、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む、組成物を提供する。

【００５２】
いくつかの態様では、組成物は少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを更に含む。
【００５３】
いくつかの態様では、組成物は、連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含む第２のＲＮＡ分子を更に含み、第２のＲＮＡ分子はＨＢＶ遺伝子を標的とし、前記第２のＲＮＡ分子のガイド配列部分は、第１のＲＮＡ分子のガイド配列部分の配列とは異なる配列である。
【００５４】
いくつかの態様では、第２のＲＮＡ分子のガイド配列部分は、第１のＲＮＡ分子の配列以外の、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドを含む。
【００５５】
本発明のいくつかの態様では、細胞においてＢ型肝炎ウイルスを不活性化する方法であって、上記態様のいずれか１つの組成物を細胞へ送達することを含む方法を提供する。
【００５６】
本発明のいくつかの態様では、Ｂ型肝炎を有する対象の細胞へ上記態様のいずれか１つの組成物を送達することを含むＢ型肝炎を治療する方法を提供する。
【００５７】
本発明のいくつかの態様では、細胞においてＢ型肝炎ウイルスを不活性化するための、上記態様のいずれか１つの組成物の使用であって、細胞へ前記組成物を送達することを含む、使用を提供する。
【００５８】
本発明のいくつかの態様では、細胞においてＢ型肝炎ウイルスの不活性化に使用する、上記態様のいずれか１つの組成物を含む医薬を提供し、前記医薬は、前記組成物を細胞へ送達することにより投与される。
【００５９】
本発明のいくつかの態様では、Ｂ型肝炎の治療、寛解又は予防のための、上記態様のいずれか１つの組成物の使用であって、Ｂ型肝炎を有する又は有するリスクがある対象の細胞へ組成物を送達することを含む、使用を提供する。
【００６０】
本発明のいくつかの態様では、Ｂ型肝炎の治療、寛解又は予防に使用する、上記態様のいずれか１つの組成物を含む医薬を提供し、前記医薬は、前記組成物を、Ｂ型肝炎を有する又は有するリスクがある対象の細胞へ送達することにより投与される。
【００６１】
本発明のいくつかの態様では、細胞においてＢ型肝炎ウイルスの不活性化に使用する、上記態様のいずれか１つの組成物を提供する。
【００６２】
本発明のいくつかの態様では、Ｂ型肝炎の治療、寛解又は予防に使用する、上記態様のいずれか１つに記載の組成物を提供する。
【００６３】
本発明のいくつかの態様では、この明細書に示した態様のいずれか１つのＲＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡ分子；並びに、ＲＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡを細胞へ送達することについての使用説明書を含む、細胞においてＢ型肝炎ウイルスを不活性化するキットを提供する。
【００６４】
本発明のいくつかの態様では、この明細書に示した態様のいずれか１つのＲＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡ分子；並びに、ＲＮＡ分子；ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡを、Ｂ型肝炎を有する又は有するリスクがある対象の細胞へ送達することについての使用説明書を含む、対象においてＢ型

肝炎を治療するためのキットを提供する。
【００６５】
本発明のいくつかの態様では、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含むＲＮＡ分子を含むＨＢＶ遺伝子編集組成物を提供する。いくつかの態様では、ＲＮＡ分子は、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと結合する配列を有する部分を更に含む。いくつかの態様では、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと結合する配列はｔｒａｃｒＲＮＡ配列である。
【００６６】
いくつかの態様では、ＲＮＡ分子はｔｒａｃｒメイト配列を有する部分を更に含む。
【００６７】
いくつかの態様では、ＲＮＡ分子は１つ以上のリンカー部分を更に含んでいてもよい。
【００６８】
本発明のいくつかの態様では、ＲＮＡ分子のヌクレオチド長は、１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４５０、４００、３５０、３００、２９０、２８０、２７０、２６０、２５０、２４０、２３０、２２０、２１０、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、又は１００までであってもよい。それぞれの実現可能性は、個別の態様である。本発明のいくつかの態様では、ＲＮＡ分子のヌクレオチドの長さは、１７～３００、１００～３００、１５０～３００、１００～５００、１００～４００、２００～３００、１００～２００又は１５０～２５０であってもよい。それぞれの実現可能性は、個別の態様である。
【００６９】
本発明のいくつかの態様では、組成物はｔｒａｃｒＲＮＡ分子を更に含む。
【００７０】
本発明のいくつかの態様では、細胞においてＢ型肝炎ウイルスを不活性化する方法であって、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含むＲＮＡ分子、及びＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを含む組成物を細胞へ送達することを含む方法を提供する。
【００７１】
本発明のいくつかの態様では、Ｂ型肝炎を治療する方法であって、配列番号１～１８９３６のいずれか１つに示す配列内の連続する１７～５０ヌクレオチドのガイド配列部分を含むＲＮＡ分子、及びＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを含む組成物を、Ｂ型肝炎を有する対象の細胞へ送達することを含む方法を提供する。
【００７２】
本発明のいくつかの態様では、少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ及びＲＮＡ分子が、対象及び／又は細胞へ、実質的に同時に又は異なる時点で送達される。
【００７３】
いくつかの態様では、ｔｒａｃｒＲＮＡ分子が、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ及びＲＮＡ分子と、実質的に同時に又は異なる時点で、対象及び／又は細胞へ送達される。
【００７４】
本発明のいくつかの態様では、ＨＢＶゲノムＤＮＡ分子（例．ＨＢＶ ｃｃｃＤＮＡ）、又はＨＢＶ配列が組み込まれている宿主ゲノム分子から配列を除去することを含む方法であって、第１のＲＮＡ分子、又は第１及び第２のＲＮＡ分子が、除去される配列に隣接する領域を標的とする、方法を提供する。
【００７５】
本発明のいくつかの態様では、ＨＢＶゲノムＤＮＡ分子、又はＨＢＶ配列が組み込まれている宿主ゲノム分子から配列を除去することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、配列は遺伝子又はその一部分である。いくつかの態様では、配列は、タンパク質をコードする配列又はその一部分である。いくつかの態様では、この方法は、ＨＢＶゲノムＤＮＡ分子のオープンリーディングフレーム全体、又はＨＢＶゲノムＤＮＡ分子の遺伝子全体を除去することを目的とする。いくつかの態様では、配列は、ＨＢＶの非コード配列又

はその一部分である。いくつかの態様では、配列は、制御エレメント又はその一部分である。いくつかの態様では、切除される配列のサイズは、１０塩基対（ｂｐ）～１００ｂｐ、１０ｂｐ～３０００ｂｐ、１００ｂｐ～３００ｂｐ、１００ｂｐ～６００ｂｐ、１００ｂｐ～８００ｂｐ、１００ｂｐ～１０００ｂｐ、２５０ｂｐ～３００ｂｐ、２５０ｂｐ～６００ｂｐ、２５０ｂｐ～８００ｂｐ、２５０ｂｐ～１０００ｂｐ、又は２５０ｂｐ～３０００ｂｐである。それぞれの実現可能性は、個別の態様である。

【００７６】

本開示の組成物及び方法は、Ｂ型肝炎の治療、予防、寛解又はその進行を遅くするために利用してもよい。

【００７７】

いくつかの態様では、Ｂ型肝炎ウイルスを不活性化する方法は、２つのＲＮＡガイド分子を細胞へ送達して、ＨＢＶ遺伝子を標的とし、不活性化することを含む。

【００７８】

本発明では、Ｂ型肝炎ウイルスを不活性化するためのこれまでに説明したストラテジーのいずれか１つ又は組合せを使用してもよい。

【００７９】

本発明の態様では、ＲＮＡガイド分子は、二本鎖切断（ＤＳＢ）を生じさせ、誤りがちな非相同末端結合（ＮＨＥＪ）機構及びフレームシフト変異の形成を誘導することによりヌクレオチドの挿入又は欠失をもたらすために、ｃｃｃＤＮＡ分子又は宿主ゲノムにおけるＨＢＶ配列内の部位へＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを方向づけるために用いられる。フレームシフト変異は、例えば、早期終止コドンの生成により、ＨＢＶ遺伝子を不活性化し、又はノックアウトする可能性があり、短縮型タンパク質を生成し、又はＨＢＶ転写産物のナンセンスコドン介在的ｍＲＮＡ分解を引き起こす可能性がある。

【００８０】

いくつかの態様では、本開示は、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと結合若しくは会合し、及び／又はそれをＨＢＶゲノム若しくは宿主ゲノム内の標的配列へ方向づける、ＲＮＡガイド配列（「ＲＮＡ分子」とも呼ばれる）を提供する。

【００８１】

いくつかの態様では、この方法は、ＨＢＶゲノムＤＮＡ分子における部位をＲＮＡガイド分子及びＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９タンパク質と接触させることを含み、ＲＮＡガイド分子及びＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼは、ＨＢＶゲノムＤＮＡにおける部位のヌクレオチド配列と会合し、それにより、ＨＢＶゲノムによりコードされる産物の発現を改変又はノックアウトする。

【００８２】

いくつかの態様では、ＲＮＡ分子及びＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼが、Ｂ型肝炎ウイルスを有する細胞へ導入される。いくつかの態様では、細胞はヒト対象内にある。

【００８３】

いくつかの態様では、この方法は、ＨＢＶ感染に起因する疾患表現型を有する対象を治療するために利用される。そのような態様では、この方法は、疾患表現型を改善、寛解又は予防する。

【００８４】

この明細書に記載した組成物の態様は、少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、ＲＮＡ分子及びｔｒａｃｒＲＮＡ分子を含み、ｔｒａｃｒＲＮＡ分子は、対象又は細胞において同時に有効である。少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、ＲＮＡ分子及びｔｒａｃｒＲＮＡは、実質的に同時に送達されてもよく、又は、異なる時点に送達できるが、効果は同時に生じる。例えば、これは、ＲＮＡ分子及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡが対象又は細胞中に実質的に存在する前に、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを対象又は細胞へ送達することを含む。

【００８５】

いくつかの態様では、細胞は肝実質細胞又は肝臓細胞である。

【００８６】

ＨＢＶノックアウトストラテジーには、（１）例えば、ＨＢＶゲノム分子における配列を１つのガイドＲＮＡ分子で標的として、フレームシフト又はナンセンスコドン介在的分解を誘導することによる短縮、及び（２）例えば２つのガイドＲＮＡ分子を用いる、ＨＢＶ配列の切除、又はＨＢＶ遺伝子の大部分の切除が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【００８７】

短縮は、いくつかのアプローチで実現してもよい。例えば、短縮は、単一ガイドＲＮＡ分子（例．単一ガイドＲＮＡ分子又は「ｓｇＲＮＡ」）を用いて、ＨＢＶゲノム分子のコード配列を標的とすることで実現してもよい。あるいは、切除は、２つの異なるＲＮＡ分子によってＨＢＶゲノム分子を標的とすることで実現してもよい。

【００８８】

いくつかの態様では、この明細書に記載した編集組成物のいずれも、クロマチンを改変する低分子、例えば限定するものではないがメチル化阻害剤及び脱アセチル化阻害剤、を伴ってもよく、低分子は、編集組成物のＤＮＡヌクレアーゼの、ＨＢＶミニ染色体への到達可能性を増加させることにより切除を増加させることができる。

【００８９】

あるいは、クロマチンモディファイヤー、例えば限定するものではないがデメチラーゼ又はヒストンアセチルトランスフェラーゼ、と融合したヌクレアーゼ（例．触媒活性を失ったＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ）を含む編集組成物は、前記ヌクレアーゼのＨＢＶミニ染色体への到達を増加させる可能性がある。

【００９０】

編集組成物は、例えば、ＨＢＶ配列から、制御エレメントの切除を媒介し、又はＨＢＶ遺伝子をノックアウトするために、ＨＢＶ配列における異なる部位を標的とする複数のガイドＲＮＡ分子を含んでもよい。

【００９１】

ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ及びＰＡＭ認識

いくつかの態様では、ヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ又はその機能性バリアントから選択される。いくつかの態様では、ヌクレアーゼはＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼである。そのような態様では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼ（例．Ｃａｓ９又はＣｐｆ１）をガイドするＲＮＡ配列は、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼと結合し、及び／又はそれをＨＢＶゲノム内の配列へ方向づける。いくつかの態様では、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、ｔｒａｃｒＲＮＡを更に含まない。ＲＮＡ分子は、当技術分野において一般的に知られた方法により、ゲノム内の選択した標的と結合するように操作できることを、当業者は理解する。

【００９２】

この明細書では、用語「ＰＡＭ」は、標的化されるＤＮＡ配列の近傍に位置し、かつＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ複合体により認識される標的ＤＮＡのヌクレオチド配列を指す。ＰＡＭ配列は、ヌクレアーゼの種類によって異なっていてもよい。加えて、ほとんど全てのＰＡＭを標的にできるＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼがある。本発明のいくつかの態様では、ＣＲＩＳＰＲシステムは、ガイド配列部分と、標的を認識するための追加の要件であるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の隣にある標的ＤＮＡ部位のプロトスペーサーとの間で、ワトソン・クリック塩基対を形成することにより、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを標的ＤＮＡ部位へ誘導するガイド配列部分を有する１つ以上のＲＮＡ分子を利用する。その後、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼは、標的ＤＮＡ部位を切断し、プロトスペーサー内に二本鎖切断を生じる。限定するものではない例において、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムは、ｃｒＲＮＡのガイド配列部分と、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の隣の標的ＤＮＡ上のプロトスペーサーとの間で、ワトソン・クリック塩基対を形成することにより、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ（例．Ｃａｓ９）を標的ＤＮＡへ誘導する成熟ｃｒＲＮＡ：

ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体を利用する。本発明の操作されたＲＮＡ分子が、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）、例えば、利用するＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼに関連する配列に対応するＰＡＭ、の隣の目的の標的ゲノムＤＮＡ配列と会合するように更にデザインされることを、当業者は理解する。そのＰＡＭは、例えば限定するものではない例として、化膿性連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）Ｃａｓ９ ＷＴ（ＳｐＣＡＳ９）ではＮＧＧ若しくはＮＡＧ（Ｎは任意の核酸塩基）；黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＳａＣａｓ９）ではＮＮＧＲＲＴ；Jejuni Ｃａｓ９ ＷＴではＮＮＮＶＲＹＭ；ＳｐＣａｓ９－ＶＱＲバリアントではＮＧＡＮ若しくはＮＧＮＧ；ＳｐＣａｓ９－ＶＲＥＲバリアントではＮＧＣＧ；ＳｐＣａｓ９－ＥＱＲバリアントではＮＧＡＧ；ＳｐＣａｓ９－ＮＲＲＨバリアントではＮＲＲＨ（Ｎは任意の核酸塩基であり、ＲはＡ又はＧであり、ＨはＡ、Ｃ又はＴである）；ＳｐＣａｓ９－ＮＲＴＨバリアントではＮＲＴＨ（Ｎは任意の核酸塩基であり、ＲはＡ又はＧであり、ＨはＡ、Ｃ又はＴである）；ＳｐＣａｓ９－ＮＲＣＨバリアントではＮＲＣＨ（Ｎは任意の核酸塩基であり、ＲはＡ又はＧであり、ＨはＡ、Ｃ又はＴである）；ＳｐＣａｓ９のＳｐＧバリアントではＮＧ（Ｎは任意の核酸塩基）；ＳｐＣａｓ９のＳｐＣａｓ９－ＮＧバリアントではＮＧ若しくはＮＡ（Ｎは任意の核酸塩基）；ＳｐＣａｓ９のＳｐＲＹバリアントではＮＲ若しくはＮＲＮ若しくはＮＹＮ（Ｎは任意の核酸塩基であり、ＲはＡ又はＧであり、ＹはＣ又はＴである）；ストレプトコッカス・カニス（Streptococcus canis）Ｃａｓ９バリアント（ＳｃＣａｓ９）ではＮＮＧ（Ｎは任意の核酸塩基）；黄色ブドウ球菌のＳａＫＫＨ－Ｃａｓ９バリアント（ＳａＣａｓ９）ではＮＮＮＲＲＴ（Ｎは任意の核酸塩基であり、ＲはＡ又はＧである）；髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）（ＮｍＣａｓ９）ではＮＮＮＮＧＡＴＴ（Ｎは任意の核酸塩基）；アリサイクロバチルス・アシドフィルス（Alicyclobacillus acidiphilus）Ｃａｓ１２ｂ（ＡａｃＣａｓ１２ｂ）ではＴＴＮ（Ｎは任意の核酸塩基）；又はＣｐｆ１ではＴＴＴＶ（ＶはＡ、Ｃ又はＧである）である。本発明のＲＮＡ分子は、１つ以上の異なるＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと共に複合体を形成するようにそれぞれデザインされ、かつ前記ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼに対応する１つ以上の異なるＰＡＭ配列を利用して、目的のポリヌクレオチド配列を標的とするようにデザインされる。

【００９３】

いくつかの態様では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼ、例えばＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼは、事実上、二本鎖又は一本鎖のいずれかで、細胞のゲノムにおける所望の位置に、ＤＮＡ切断を引き起こすために用いてもよい。最も一般的に用いられるＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼはＣＲＩＳＰＲシステムに由来するが、他のＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼも、この明細書に記載したゲノム編集組成物及びゲノム編集方法における使用のために企図される。例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2015/0211023号を参照。

【００９４】

本発明の実施に使用できるＣＲＩＳＰＲシステムは非常にさまざまである。ＣＲＩＳＰＲシステムは、Ｉ型、ＩＩ型又はＩＩＩ型のシステムであってもよい。適切なＣＲＩＳＰＲタンパク質の限定するものではない例には、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ５ｅ（又はＣａｓＤ）、Ｃａｓ６、Ｃａｓ６ｅ、Ｃａｓ６ｆ、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８ａｌ、Ｃａｓ８ａ２、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９、ＣａｓｌＯ、ＣａｓｌＯｄ、ＣａｓＦ、ＣａｓＧ、ＣａｓＨ、Ｃｓｙｌ、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅｌ（又はＣａｓＡ）、Ｃｓｅ２（又はＣａｓＢ）、Ｃｓｅ３（又はＣａｓＥ）、Ｃｓｅ４（又はＣａｓＣ）、Ｃｓｃｌ、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒｌ、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂｌ、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３，Ｃｓｘｌ７、Ｃｓｘｌ４、Ｃｓｘｌ０、Ｃｓｘｌ６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｚｌ、Ｃｓｘｌ５、Ｃｓｆｌ、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４及びＣｕｌ９６６が挙げられる。

【００９５】

いくつかの態様では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステ

ムに由来したＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ（例．Ｃａｓ９）である。ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼは、化膿性連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Streptococcus thermophilus）、ストレプトコッカス種（Streptococcus sp.）、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）、トレポネーマ・デンティコラ（Treponema denticola）、ノカルディオプシス・ダッソンビレイ（Nocardiopsis dassonvillei）、ストレプトマイセス・プリスチナエスピラリス（Streptomyces pristinaespiralis）、ストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス（Streptomyces viridochromogenes）、ストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス、ストレプトスポランジウム・ロゼウム（Streptosporangium roseum）、ストレプトスポランジウム・ロゼウム、アリサイクロバチルス・アシドカルダリウス（Alicyclobacillus acidocaldarius）、バチルス・シュードマイコイデス（Bacillus pseudomycoides）、バチルス・セレニティレデュセンス（Bacillus selenitireducens）、エキシグオバクテリウム・シビリクム（Exiguobacterium sibiricum）、ラクトバチルス・デルブレッキイ（Lactobacillus delbrueckii）、ラクトバチルス・サリバリウス（Lactobacillus salivarius）、ミクロシラ・マリナ（Microscilla marina）、バークホルデリアレス・バクテリウム（Burkholderiales bacterium）、ポラロモナス・ナフタレニボランス（Polaromonas naphthalenivorans）、ポラロモナス種（Polaromonas sp.）、クロコスファエラ・ワトソニー（Crocosphaera watsonii）、シアノセイス種（Cyanothece sp.）、ミクロキスティス・エルギノーサ（Microcystis aeruginosa）、シネココッカス種（Synechococcus sp.）、アセトハロビウム・アラビティカム（Acetohalobium arabaticum）、アンモニフェツクス・デゲンシイ（Ammonifex degensii）、カルディセルロシロプトル・ベスキー（Caldicellulosiruptor bescii）、キャンディダトゥス・デスルフォルディス（Candidatus Desulforudis）、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）、クロストリジウム・ディフィシレ（Clostridium difficile）、フィネゴルディア・マグナ（Finegoldia magna）、ナトラネロビウス・サーモフィルス（Natranaerobius thermophilus）、ペロトマクルム・サーモプロピオニカム（Pelotomaculum thermopropionicum）、アシディチオバチルス・カルダス（Acidithiobacillus caldus）、アシディチオバチルス・フェロオキシダンス（Acidithiobacillus ferrooxidans）、アロクロマチウム・ビノスム（Allochromatium vinosum）、マリノバクター種（Marinobacter sp.）、ニトロソコッカス・ハロフィルス（Nitrosococcus halophilus）、ニトロソコッカス・ワッソニ（Nitrosococcus watsoni）、シュードアルテロモナス・ハロプランクティス（Pseudoalteromonas haloplanktis）、クテドノバクテル・ラセミファー（Ktedonobacter racemifer）、メタノハロビウム・エベスチガータム（Methanohalobium evestigatum）、アナベナ・バリアビリス（Anabaena variabilis）、ノジュラリア・スプミゲナ（Nodularia spumigena）、ノストック種（Nostoc sp.）、アルスロスピラ・マキシマ（Arthrospira maxima）、アルスロスピラ・プラテンシス（Arthrospira platensis）、アルスロスピラ種（Arthrospira sp.）、リングビア種（Lyngbya sp.）、ミクロコレウス・クソノプラステス（Microcoleus chthonoplastes）、オシラトリア種（Oscillatoria sp.）、ペトロトガ・モビリス（Petrotoga mobilis）、サーモシフォ・アフリカヌス（Thermosipho africanus）、アカリオクロリス・マリーナ（Acaryochloris marina）、又は既知のＰＡＭ配列を有するＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼをコードする種に由来してもよい。非培養性細菌によりコードされるＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼも、本発明に関連して使用してもよい（Burstein et al. Nature, 2017参照）。既知のＰＡＭ配列を有するＣＲＩＳＰＲタンパク質のバリアント、例えば、ＳｐＣａｓ９ Ｄ１１３５Ｅバリアント、ＳｐＣａｓ９ ＶＱＲバリアント、ＳｐＣａｓ９ ＥＱＲバリアント又はＳｐＣａｓ９ ＶＲＥＲバリアントも、本発明に関連して使用してもよい。

【００９６】

したがって、Ｃａｓ９タンパク質若しくは改変されたＣａｓ９、若しくはＣａｓ９のホ

モログ若しくはオルソログといったＣＲＩＳＰＲシステムのＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼ、又は、Ｃｐｆ１とそのホモログ及びオルソログといった他のＣＲＩＳＰＲシステムに属する他のＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼを、本発明の組成物に使用してもよい。別のＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、例えば、参照により本明細書に組み入れられる国際公開第2020/223514号及び同第2020/223553号に記載されたヌクレアーゼも使用してもよい。

【００９７】

ある特定の態様では、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼは、天然に存在するＣａｓタンパク質の「機能性誘導体」であってもよい。天然配列ポリペプチドの「機能性誘導体」は、天然配列ポリペプチドと質的に共通した生物学的性質を有する化合物である。「機能性誘導体」には、天然配列の断片、並びに天然配列ポリペプチド及びその断片の誘導体（ただし、それらは対応する天然配列ポリペプチドと共通の生物学的活性を有する）が挙げられるが、それらに限定されるものではない。ここで企図される生物学的活性は、ＤＮＡ基質を加水分解して断片にする能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリアントと、その共有結合性改変体及び融合体の両者を包含する。Ｃａｓポリペプチド又はその断片の適切な誘導体には、Ｃａｓタンパク質又はその断片の変異体、融合体、共有結合性改変体が挙げられるが、それらに限定されるものではない。Ｃａｓタンパク質又はその断片、加えてＣａｓタンパク質又はその断片の誘導体を含むＣａｓタンパク質は、細胞から取得可能なものであってもよく、若しくは化学的に合成されるものであってもよく、又はこれらの方法の組合せにより得られるものであってもよい。細胞は、天然でＣａｓタンパク質を産生する細胞、又は、天然でＣａｓタンパク質を産生し、かつ、内因性Ｃａｓタンパク質をより高い発現レベルで産生するように、若しくは、内因性Ｃａｓと同じ若しくは異なるＣａｓをコードする外因的に導入された核酸からＣａｓタンパク質を産生するように、遺伝子操作された細胞であってもよい。場合によっては、細胞は、天然ではＣａｓタンパク質を産生せず、Ｃａｓタンパク質を産生するように遺伝子操作されている。

【００９８】

いくつかの態様では、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼはＣｐｆ１である。Ｃｐｆ１は、Ｔリッチなプロトスペーサー隣接モチーフを利用する単一のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼである。Ｃｐｆ１は、ねじれ型ＤＮＡ二本鎖切断によってＤＮＡを切断する。アシダミノコッカス属（Acidaminococcus）及びラクノスピラ科（Lachnospiraceae）に由来する２つのＣｐｆ１酵素が、ヒト細胞において効率的にゲノム編集を行うことが示されている（Zetsche et al., 2015参照）。

【００９９】

したがって、Ｃａｓ９タンパク質若しくは改変されたＣａｓ９、若しくはＣａｓ９のホモログ、オルソログ若しくはバリアントといったＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼ、又は、Ｃｐｆ１及びそのホモログ、オルソログ若しくはバリアントといった他のＣＲＩＳＰＲシステムに属する他のＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼを、本発明で使用してもよい。

【０１００】

いくつかの態様では、ガイド分子は、新しい性質又は向上した性質（例．分解に対する安定性、ハイブリダイゼーションエネルギー又はＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼとの結合性）を付与する１つ以上の化学修飾を含む。適切な化学修飾には、修飾塩基、修飾糖、又は修飾されたヌクレオシド間結合が挙げられるが、それらに限定されるものではない。適切な化学修飾の限定するものではない例には、４－アセチルシチジン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、２’－Ｏ－メチルシチジン、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、２’－Ｏ－メチルプソイドウリジン、「β，Ｄ－ガラクトシルキューオシン」、２’－Ｏ－メチルグアノシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、１－メチルアデノシン、１－メチルプソイドウリジン、１－メチルグアノシン、１－メチルイノシン、「２，２－ジメチルグアノシン」、２－メチルアデノシン、２－メチルグアノシン、３

－メチルシチジン、５－メチルシチジン、Ｎ６－メチルアデノシン、７－メチルグアノシン、５－メチルアミノメチルウリジン、５－メトキシアミノメチル－２－チオウリジン、「β，Ｄ－マンノシルキューオシン」、５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウリジン、５－メトキシカルボニルメチルウリジン、５－メトキシウリジン、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、Ｎ－（（９－β－Ｄ－リボフラノシル－２－メチルチオプリン－６－イル）カルバモイル）スレオニン、Ｎ－（（９－β－Ｄ－リボフラノシルプリン－６－イル）Ｎ－メチルカルバモイル）スレオニン、ウリジン－５－オキシ酢酸－メチルエステル、ウリジン－５－オキシ酢酸、ワイブトキソシン、キューオシン、２－チオシチジン、５－メチル－２－チオウリジン、２－チオウリジン、４－チオウリジン、５－メチルウリジン、Ｎ－（（９－β－Ｄ－リボフラノシルプリン－６－イル）－カルバモイル）スレオニン、２’－Ｏ－メチル－５－メチルウリジン、２’－Ｏ－メチルウリジン、ワイブトシン、「３－（３－アミノ－３－カルボキシ－プロピル）ウリジン、（ａｃｐ３）ｕ」、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）、プソイドウリジン又は１－メチルプソイドウリジンが挙げられる。それぞれの実現可能性は本発明の個別の態様である。

【０１０１】

細胞への送達

この明細書に記載した組成物は、適切な手段により標的細胞へ送達してもよい。本発明の組成物は、ＨＢＶを含有し及び／又はＨＢＶ産物を発現する細胞へ標的化してもよい。例えば、一態様では、ＲＮＡ分子は、ＨＢＶゲノムにおける部位を特異的に標的とし、標的細胞は、ＨＢＶを有する肝実質細胞である。細胞への送達は、in vitro、ex vivo又はin vivoで実施してもよい。さらに、この明細書に記載した核酸組成物は、ＤＮＡ分子、ＲＮＡ分子、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）、核酸ベクター又はそれらの組合せのうちの１つ以上として送達してもよい。

【０１０２】

いくつかの態様では、この明細書に記載した組成物の１つが、in vivoで細胞へ送達される。いくつかの態様では、細胞は肝実質細胞である。いくつかの態様では、組成物は対象の肝臓へ送達される。組成物は、公知のin vivo送達方法により細胞へ送達されてもよく、in vivo送達方法には、例えばレンチウイルス又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を用いるウイルス形質導入、ナノ粒子送達などが挙げられるが、それらに限定されるものではない。追加の詳細な送達方法は、この項全体に記載されている。適切なＡＡＶ血清型の限定するものではない例として、ＡＡＶ８、肝臓指向性ＡＡＶ　ＬＫ０３が挙げられる。

【０１０３】

いくつかの態様では、この明細書に記載した組成物のいずれか１つが、ex vivoで細胞へ送達される。いくつかの態様では、細胞は肝実質細胞である。
組成物は、公知のex vivo送達方法により細胞へ送達されてもよく、そのex vivo送達方法には、ヌクレオフェクション（nucleofection）、電気穿孔、例えばレンチウイルス又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を用いるウイルス形質導入、ナノ粒子送達、リポソームなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。追加の詳細な送達方法は、この項全体に記載されている。

【０１０４】

いくつかの態様では、組成物におけるＲＮＡ分子は、化学修飾を含む。適切な化学修飾の限定するものではない例には、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル、３’ホスホロチオエート（ＭＳ）、又は２’－Ｏ－メチル、３’チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）、プソイドウリジン及び１－メチルプソイドウリジンが挙げられる。それぞれの実現可能性は本発明の個別の態様である。

【０１０５】

適切なウイルスベクター系を、核酸組成物、例えば本発明の組成物に含まれるＲＮＡ分子を送達するために用いてもよい。核酸を導入し、組織を標的とするために、通常のウイルス及び非ウイルスに基づく遺伝子移入を行うことができる。ある特定の態様では、in

vivo又はex vivo遺伝子治療のために核酸が投与される。非ウイルスベクター送達系には、裸の核酸、及び送達媒体（例．リポソーム又はポロキサマー）と複合体化した核酸が挙げられる。ＨＤＲ中に使用される、送達される鋳型分子は、例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）に基づいたベクター、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）、又はＰＣＲ産生二本鎖ＤＮＡ分子であってもよい。そのような鋳型は、例えば、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）により送達されてもよい。あるいは、ＲＮＡ鋳型分子は、例えばレンチウイルスに基づいた送達系により、送達されてもよい。

【０１０６】

遺伝子治療の手順の総説は、Anderson (1992)；Nabel & Felgner (1993)；Mitani & Caskey (1993)；Dillon (1993)；Miller (1992)；Van Brunt (1988)；Vigne (1995)；Kremer & Perricaudet (1995)；Haddada et al. (1995)及びYu et al. (1994)を参照。

【０１０７】

核酸及び／若しくはタンパク質の非ウイルス性送達の方法には、電気穿孔、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、パーティクルガン加速、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、ポリカチオン若しくは脂質：核酸コンジュゲート、人工ビリオン、及び促進剤による核酸の取込みが挙げられ、又は、核酸及び／若しくはタンパク質は、細菌若しくはウイルス（例．アグロバクテリウム属（Agrobacterium）、リゾビウム種（Rhizobium sp.）ＮＧＲ２３４、シノリゾビウム・メリロティ（Sinorhizobium meliloti）、メソリゾビウム・ロティ（Mesorhizobium loti）、タバコモザイクウイルス（tobacco mosaic virus）、ジャガイモウイルスＸ（potato virus X）、カリフラワーモザイクウイルス（cauliflower mosaic virus）、及びキャッサバ葉脈モザイクウイルス（cassava vein mosaic virus））により植物細胞へ送達できる（例えばChung et al., 2006参照）。例えばSonitron 2000システム（Rich-Mar）を用いるソノポレーションも、核酸の送達に用いることができる。タンパク質及び／又は核酸のカチオン性脂質媒介性送達も、in vivo、ex vivo又はin vitro送達として企図される。（Zuris et al. (2015)を参照；Coelho et al. (2013)；Judge et al. (2006)及びBasha et al. (2011)も参照）。

【０１０８】

トランスポゾンに基づく系（例．組換えスリーピングビューティトランスポゾン系又は組換えＰｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン系）のような非ウイルスベクターを、標的細胞に送達してもよく、標的細胞において、組成物の分子のポリヌクレオチド配列又は組成物の分子をコードするポリヌクレオチド配列の転位に利用してもよい。

【０１０９】

他の代表的な核酸送達系には、Amaxa Biosystems（Cologne, Germany）、Maxcyte, Inc.（Rockville, Md.）、BTX Molecular Delivery Systems（Holliston, Mass.）及びCopernicus Therapeutics Inc.が提供するもの（例えば米国特許第6,008,336号参照）が含まれる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、米国特許第4,946,787号及び米国特許第4,897,355号で説明されており、リポフェクション試薬は市販されている（例．Transfectam（登録商標）、Lipofectin（登録商標）及びLipofectamine（登録商標）RNAiMAX）。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適したカチオン性脂質及び中性脂質には、国際公開第91/17424号及び国際公開第91/16024号に開示されているものが含まれる。細胞（ex vivo投与）又は標的組織（in vivo投与）への送達が可能である。

【０１１０】

免疫脂質複合体といった標的化リポソームを含む脂質：核酸複合体の製造は、当業者によく知られている（例えば、Crystal, Science (1995)；Blaese et al., (1995)；Behr et al., (1994)；Remy et al. (1994)；Gao and Huang (1995)；Ahmad and Allen (1992)；米国特許第4,186,183号；同第4,217,344号；同第4,235,871号；同第4,261,975号；同第4,485,054号；同第4,501,728; 4,774,085号；同第

4,837,028号及び同第4,946,787号を参照）。

【０１１１】

送達の別の方法には、送達する核酸をEnGeneIC送達媒体（ＥＤＶ）へパッケージングすることが含まれる。ＥＤＶは、抗体の一方のアームが標的組織に対する特異性を有し、他方がＥＤＶに対する特異性を有する二重特異性抗体を用いて、標的組織へ特異的に送達する。抗体は、ＥＤＶを標的細胞表面に運び、ＥＤＶがエンドサイトーシスによって細胞内に運ばれる。細胞内に入った後に、内容物が放出される（MacDiarmid et al., 2009参照）。

【０１１２】

ウイルスによる核酸の送達のためのＲＮＡ又はＤＮＡウイルス系の使用は、ウイルスの標的を体内の特定の細胞とし、ウイルスペイロードを核へ輸送する高度に進化した方法を活用する。ウイルスベクターは、患者へ直接投与でき（in vivo）、又は、in vitroで細胞を処理するために使用でき、改変された細胞を患者へ投与する（ex vivo）。核酸を送達する従来のウイルス系には、遺伝子移入のための、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス及び単純ヘルペスウイルスのベクターが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【０１１３】

レトロウイルスのトロピズムは、外来エンベロープタンパク質を組み入れることにより変化させることができ、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大する。レンチウイルスベクターは、分裂していない細胞に形質導入又は感染できるレトロウイルスベクターであり、通常、ウイルス力価が高い。レトロウイルスの遺伝子移入系の選択は標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、シス作用性末端反復配列で構成され、最大６～１０ｋｂの外来配列をパッケージングする能力がある。最小限のシス作用性ＬＴＲは、ベクターの複製及びパッケージングに十分であり、治療用遺伝子を標的細胞へ組み込み、導入遺伝子を永続的に発現させるために用いられる。広く用いられるレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）及びそれらの組合せに基づくものが挙げられる（例えば、Buchschacher et al. (1992)；Johann et al. (1992)；Sommerfelt et al. (1990)；Wilson et al. (1989)；Miller et al. (1991)；国際公開第1994/026877号を参照）。

【０１１４】

臨床試験における遺伝子移入のために、現在、少なくとも６つのウイルスベクターが利用でき、それらは、ヘルパー細胞株へ挿入された遺伝子による欠損ベクターの相補性を含むアプローチを利用して、形質導入剤を生成する。

【０１１５】

ｐＬＡＳＮ及びＭＦＧ－Ｓは、臨床試験で使用されたことがあるレトロウイルスベクターの例である（Dunbar et al., 1995；Kohn et al., 1995；Malech et al., 1997参照）。ＰＡ３１７／ｐＬＡＳＮは、遺伝子治療の治験で使用された初めての治療用ベクターであった（Blaese et al., 1995）。ＭＦＧ－Ｓパッケージングベクターの形質導入効率は、５０％以上であった（Ellem et al., (1997)；Dranoff et al., 1997）。

【０１１６】

パッケージング細胞は、宿主細胞に感染する能力があるウイルス粒子を形成するために用いられる。そのような細胞には、アデノウイルス、ＡＡＶをパッケージングする２９３細胞、及びレトロウイルスをパッケージングするＰｓｉ－２細胞又はＰＡ３１７細胞が挙げられる。遺伝子治療に用いられるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子へパッケージングする産生細胞株により生成される。ベクターは、通常、パッケージング及び（該当する場合は）その後の宿主への組込みに必要とされる最小限のウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現されるタンパク質をコードする発現カセットで置換されている。欠損したウイルス機能は、パッケージング細胞株によりトランスで供給される。例えば、遺伝子治療に用いられるＡＡＶベクターは、通常、パッケージング及び宿

主ゲノムへの組込みに必要とされるＡＡＶゲノム由来の末端逆位配列（ＩＴＲ）のみを有する。ウイルスＤＮＡは、細胞株においてパッケージングされ、その細胞株は、他のＡＡＶ遺伝子、つまり、ＩＴＲ配列を欠くが、ｒｅｐ及びｃａｐをコードするヘルパープラスミドを含有する。その細胞株は、ヘルパーとしてのアデノウイルスにも感染する。ヘルパーウイルスは、ＡＡＶベクターの複製及びヘルパープラスミドからのＡＡＶ遺伝子の発現を促進する。ＩＴＲ配列の欠損のため、ヘルパープラスミドは大量にはパッケージングされない。アデノウイルスの混入は、例えば、アデノウイルスがＡＡＶより感受性が高い熱処理によって軽減できる。さらに、バキュロウイルス系を用いて臨床スケールでＡＡＶを産生できる（米国特許第7,479,554号参照）。

【０１１７】

多くの遺伝子治療において、遺伝子治療ベクターは、特定の組織に対して高度の特異性で送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外表面のウイルス被覆タンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現させることによって、所定の細胞に対する特異性を有するように改変できる。そのリガンドは、目的の細胞に存在することが知られた受容体に対して親和性を有するように選択される。例えば、Hanら(1995)は、モロニーマウス白血病ウイルスが、ｇｐ７０と融合したヒトヘレグリンを発現するように改変でき、その組換えウイルスが、ヒト上皮増殖因子受容体を発現する特定のヒト乳がん細胞に感染することを報告した。この原理は、他のウイルス－標的細胞の組合せに拡張でき、その組合せでは、標的細胞は受容体を発現し、ウイルスは細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質を発現する。例えば、繊維状ファージは、事実上、選択されたいかなる細胞受容体に対しても特異的な結合親和性を有する抗体断片（例．ＦＡＢ又はＦｖ）を提示するように操作できる。この説明は、主にウイルスベクターに当てはまるが、同じ原理が非ウイルスベクターに適用できる。そのようなベクターは、特定の標的細胞による取込みを優先する特定の取込み配列を含むように操作できる。

【０１１８】

遺伝子治療ベクターは、以下で説明するように、個々の患者への投与により、通常、全身投与（例．硝子体内、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下又は頭蓋内注入）又は局所適用により、in vivoで送達できる。あるいは、ベクターは、細胞、例えば、個々の患者から外植された細胞（例．リンパ球、骨髄穿刺、組織生検）又はユニバーサルドナー造血幹細胞へ、ex vivoで送達され、続いて、その細胞を患者へ、ベクターを組み入れている細胞の選択後に、再移植できる。限定するものではない代表的なex vivoアプローチは、培養のために患者から組織（例．末梢血、骨髄及び脾臓）を取り出し、培養細胞（例．造血幹細胞）に核酸を移入し、次いで、細胞を、患者の標的組織（例．骨髄及び脾臓）に移植することを含んでいてもよい。いくつかの態様では、幹細胞又は造血幹細胞は、生存率増強剤で更に処理してもよい。

【０１１９】

診断、研究のための、又は（例えばトランスフェクト細胞の宿主への再注入による）遺伝子治療のためのex vivoでの細胞トランスフェクションは、当業者によく知られている。好ましい態様において、対象から細胞が単離され、核酸組成物がトランスフェクトされ、対象（例．患者）へ再注入される。ex vivoトランスフェクションに適したさまざまな細胞型は、当業者によく知られている（例えば、Freshney, "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (6th edition, 2010)と、患者から細胞を単離し、培養する方法の考察において引用されている文献を参照）。

【０１２０】

適切な細胞には、真核細胞及び／又は細胞株が挙げられるが、それらに限定されるものではない。そのような細胞、又はそのような細胞から発生した細胞株の限定するものではない例には、ＣＯＳ、ＣＨＯ（例．ＣＨＯ－Ｓ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－ＤＧ４４、ＣＨＯ－ＤＵＸＢ１１、ＣＨＯ－ＤＵＫＸ、ＣＨＯＫ１ＳＶ）、ＶＥＲＯ、ＭＤＣＫ、ＷＩ３８、Ｖ７９、Ｂ１４ＡＦ２８－Ｇ３、ＢＨＫ、ＨａＫ、ＮＳＯ、ＳＰ２／０－Ａｇ１４、

ＨｅＬａ、ＨＥＫ２９３（例．ＨＥＫ２９３－Ｆ、ＨＥＫ２９３－Ｈ、ＨＥＫ２９３－Ｔ）、ｐｅｒＣ６細胞、植物細胞（分化型又は未分化型）、加えて、昆虫細胞、例えば、ツマジロクサヨトウ（Spodoptera fugiperda）（Ｓｆ）、又は真菌細胞、例えば、サッカロミセス属（Saccharomyces）、ピキア属（Pichia）、及びシゾサッカロミセス属（Schizosaccharomyces）が挙げられる。ある特定の態様では、細胞株は、ＣＨＯ－Ｋ１、ＭＤＣＫ又はＨＥＫ２９３細胞株である。さらに、初代細胞を単離し、誘導型ヌクレアーゼシステム（例．ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ）で処理した後に治療する対象に再導入するために、ex vivoで使用してもよい。適切な初代細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）及び他の血液細胞サブセット、例えば限定するものではないがＣＤ４＋ Ｔ細胞又はＣＤ８＋ Ｔ細胞、が挙げられる。また、適切な細胞には、例として、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、造血幹細胞（ＣＤ３４＋）、神経幹細胞及び間葉系幹細胞といった幹細胞が挙げられる。

【０１２１】

ある態様では、細胞トランスフェクション及び遺伝子治療のために、幹細胞がex vivoで処理される。幹細胞を使用する利点は、in vitroで他の細胞に分化でき、又は、（細胞のドナーなどの）哺乳動物に導入して骨髄に移植できることである。サイトカイン、例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αを用いて、ＣＤ３４＋細胞をin vitroで臨床的に重要な免疫細胞型へ分化させる方法は知られている（限定するものではない例として、Inaba et al., 1992を参照）。

【０１２２】

幹細胞は、公知の方法で、形質導入及び分化のために単離される。例えば、幹細胞は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋（Ｔ細胞）、ＣＤ４５＋（ｐａｎＢ細胞）、ＧＲ－１（顆粒球）並びにＩａｄ（分化型抗原提示細胞）といった不要な細胞と結合する抗体で骨髄細胞をパニングすることにより、骨髄細胞から単離される（限定するものではない例として、Inaba et al., 1992を参照）。改変された幹細胞も、いくつかの態様で使用してもよい。

【０１２３】

治療用核酸組成物を有するベクター（例．レトロウイルス、リポソーム）は、in vivoで細胞に形質導入するためにも、生物体へ直接投与できる。投与は、注射、注入及び電気穿孔を含むが、それらには限定されない、分子を血液又は組織細胞と最終的に接触するように導入するために通常使用される経路による。そのような核酸を投与する適切な方法が利用でき、当業者によく知られており、特定の組成物を投与する複数の経路が使用できるが、特定の経路が、別の経路より迅速かつ効果的な反応を提供できる場合が多い。いくつかの態様では、組成物はＩＶ注射で送達される。

【０１２４】

導入遺伝子の免疫細胞（例．Ｔ細胞）への導入に適したベクターには、非組込み型レンチウイルスベクターが挙げられる（例えば米国特許出願公開第2009/0117617号を参照）。

【０１２５】

薬学的に許容される担体は、部分的には、投与する組成物によって、加えて、組成物の投与に用いる方法によって、決まる。したがって、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989に記載されているように、利用できる医薬組成物の幅広い種類の適切な製剤がある。

【０１２６】

また、本発明の組成物及び方法は、患者におけるＢ型肝炎を治療するための医薬の製造に用いてもよい。

【０１２７】

<u>ＨＢＶノックアウト方法についての作用機構</u>

いかなる理論及び機構に拘束されるものではないが、本発明は、Ｂ型肝炎を予防又は治療するために、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼを適用して、ＨＢＶゲノムＤＮＡ分子を切断し、その複製を阻止し、かつＨＢＶゲノムＤＮＡ分子からの発現を阻止するために利用して

もよい。特異的なガイド部分配列は、標的となるＨＢＶ配列及び用いるＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼの型（必要とされるＰＡＭ配列）に基づいて表１から選択してもよい。あるいは、宿主ゲノムに組み込まれたＨＢＶ配列は、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼが宿主ゲノムをＤＮＡ切断するように、標的化されてもよい。

【０１２８】

ＨＢＶ遺伝子をノックアウトするための一つのストラテジーは、短縮又はナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）を媒介するために１つのＲＮＡ分子を用いてＨＢＶ配列を標的とすることである。限定するものではない例として、ＨＢＶにおけるフレームシフトは、１つのＲＮＡ分子を利用して、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼをＨＢＶコード配列へ標的化し、二本鎖切断を媒介することにより、導入してもよく、その二本鎖切断が、フレームシフト変異の発生、及び短縮型タンパク質の発現又はＨＢＶ転写産物のナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）をもたらす。

【０１２９】

あるいは、ＨＢＶ遺伝子は、２つのＲＮＡ分子を利用する切除ストラテジーによりノックアウトされてもよい。同じストラテジーは、ＨＢＶゲノムの複製を阻止するだろう制御エレメントを切除するために実行されてもよい。

【０１３０】

クロマチンモディファイヤー、例えば限定するものではないがデメチラーゼ又はヒストンアセチルトランスフェラーゼ、と融合したヌクレアーゼ（例．触媒活性を失ったＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ）を含む編集組成物は、ヌクレアーゼのＨＢＶミニ染色体への到達を増加させる可能性がある。

【０１３１】

あるいは、この明細書に記載した編集組成物のいずれも、クロマチンを改変する低分子、例えば限定するものではないがメチル化阻害剤及び脱アセチル化阻害剤、を伴ってもよく、その低分子は、編集組成物のＤＮＡヌクレアーゼのＨＢＶミニ染色体への到達可能性を増加させることにより切除を増加させることができる。

【０１３２】

ＨＢＶ配列における複数の部位を標的とする複数のガイドＲＮＡ分子を含む１つ以上の編集組成物が、例えば、ＨＢＶ配列の一部分（例．制御エレメント）の切除を媒介し、又はＨＢＶ配列からＨＢＶ遺伝子をノックアウトするために利用されてもよい。

【０１３３】

いくつかの態様では、１つ以上の編集組成物が、１つ以上の送達媒体により細胞へ送達される。限定するものではない例として、第１の部位を標的とする第１のガイドＲＮＡ分子が第１の送達媒体（例．第１のＡＡＶ粒子）により送達され、第２の部位を標的とする第２のガイドＲＮＡ分子が第２の送達媒体（例．第２のＡＡＶ粒子）により送達されるような、異なるガイド配列部分を有する２つのガイドＲＮＡ分子及び少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼが細胞へ送達されてもよい。別の例では、異なるガイド配列部分を有するガイドＲＮＡ分子が細胞へ第１の送達媒体により送達され、少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ又は前記少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼをコードする核酸が前記細胞へ第２の媒体により送達される。さらに、第１のＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ－ＲＮＡガイド複合体を含む第１の編集組成物が、細胞へ第１の送達媒体により送達されてもよく、第２のＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ－ＲＮＡガイド複合体を含む第２の編集組成物が、細胞へ第２の送達媒体により送達されてもよい。

【０１３４】

ＨＢＶを特異的に標的とするＲＮＡガイド配列の例

表１は、ＨＢＶゲノムを特異的に標的とするようにデザインされたガイド配列部分を示す。操作された各ガイド分子は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）（例．配列ＮＧＧ又はＮＡＧ（配列中、Ｎは任意の核酸塩基）に対応するＰＡＭ）の隣に位置する目的の標的ゲノムＤＮＡ配列と結合するように更にデザインされる。ガイド配列は、１つ以上の異なるＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと共に働くようにデザインされ、そのＣＲＩＳＰＲヌ

クレアーゼには、例えば、ＳｐＣａｓ９ＷＴ（ＰＡＭ配列：ＮＧＧ）、ＳｐＣａｓ９．ＶＱＲ．１（ＰＡＭ配列：ＮＧＡＮ）、ＳｐＣａｓ９．ＶＱＲ．２（ＰＡＭ配列：ＮＧＮＧ）、ＳｐＣａｓ９．ＥＱＲ（ＰＡＭ配列：ＮＧＡＧ）、ＳｐＣａｓ９．ＶＲＥＲ（ＰＡＭ配列：ＮＧＣＧ）、ＳａＣａｓ９ＷＴ（ＰＡＭ配列：ＮＮＧＲＲＴ）、ＳｐＲＹ（ＰＡＭ配列：ＮＲＮ又はＮＹＮ）、ＮｍＣａｓ９ＷＴ（ＰＡＭ配列：ＮＮＮＮＧＡＴＴ）、Ｃｐｆ１（ＰＡＭ配列：ＴＴＴＶ）、又はＪｅＣａｓ９ＷＴ（ＰＡＭ配列：ＮＮＮＶＲＹＭ）が挙げられるが、それらに限定されるものではない。本発明のＲＮＡ分子はそれぞれ、１つ以上の異なるＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと共に複合体を形成するようにデザインされ、かつ使用するＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、それぞれの１つ以上の異なるＰＡＭ配列を利用して、目的のポリヌクレオチド配列を標的とするようにデザインされる。

【０１３５】

【表１】

表1　特定のHBV標的と結合するように設計されたガイド配列部分

標的	20塩基長のｶﾞｲﾄﾞ配列部分の配列番号	21塩基長のｶﾞｲﾄﾞ配列部分の配列番号	22塩基長のｶﾞｲﾄﾞ配列部分の配列番号
HBVｹﾞﾉﾑ 位置 1-3182	1-6314	6315-12626	12627-18936

【０１３６】

本発明のより完全な理解を促進するために実施例を以下に示す。以下の実施例は、本発明を構築しかつ実施する代表的な様式を示す。しかし、本発明の範囲は、これらの実施例に開示した特定の態様に限定されず、これらの態様は例証のみを目的とする。

【実施例】

【０１３７】

実験の詳細

実施例１　ＨＢＶガイド配列部分のスクリーニング

保存ＨＢＶ配列を標的とする最適なガイド分子を特定するために、ＨｅＬａ細胞に、ＨＢＶゲノムの関連領域の合成配列を有するレンチウイルスを安定的に感染させた（図１）。肝実質細胞核では、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）ゲノムは、共有結合閉環ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）の形でエピソームとして存在する。細胞ごとにＨＢＶ　ｃｃｃＤＮＡ分子のコピー数が異なるため（通常、細胞あたり最高１０コピー）、ＨｅＬａ細胞に、ＨＢＶの合成配列を有するレンチウイルスを、３つの異なる感染多重度（ＭＯＩ）、すなわち、細胞あたり２、５又は１０コピーで感染させた。安定的に感染した細胞を、ピューロマイシン抵抗性に基づいて選択した。

【０１３８】

ＨＢＶ　ＤＮＡの別々の領域を標的とする４つの異なるガイド分子（表２）の、ＷＴ　ＯＭＮＩ－７９ヌクレアーゼ及びＯＭＮＩ－７９　Ｖ５５７０バリアントヌクレアーゼによる高オンターゲット活性について、ＨＢＶ感染ＨｅＬａ細胞でスクリーニングした。簡潔に説明すると、ＪｅｔＯＰＴＩＭＵＳ試薬（Polyplus）を用いて、ＷＴ　ＯＭＮＩ－７９又はＯＭＮＩ－７９　Ｖ５５７０ヌクレアーゼ（６４ｎｇ）とそれぞれのガイド（２０ｎｇ）を同時トランスフェクトし、９６ウェル形式でスクリーニングした。ＤＮＡトランスフェクションから７２時間後に細胞を収集した。オンターゲット活性を次世代シーケンシング（ＮＧＳ）で測定するために、細胞溶解及びゲノムＤＮＡ抽出をＱｕｉｃｋ抽出（Lucigen）で行い、特異的なプライマーを用いて内因性ゲノム領域を増幅した（図２、表２）。

【０１３９】

【表２】

表２ HBV標的化ガイド配列部分

標的位置	ｶﾞｲﾄ配列名	配列	PAM
ｾｸﾞﾒﾝﾄ2	s48	CAGAAGAACCAACAAGAAGAUG（配列番号14469）	AGGCAT
ｾｸﾞﾒﾝﾄ3	s38	GCCAUUUGUUCAGUGGUUCGUA（配列番号16323）	GGGCTT
ｾｸﾞﾒﾝﾄ3	s46	GCCCUACGAACCACUGAACAAA（配列番号16342）	TGGCAC
ｾｸﾞﾒﾝﾄ4	s50	CUAGGAGUUCCGCAGUAUGGAU（配列番号15393）	CGGCAG

【０１４０】

【表３】

表３ OMNI CRISPRヌクレアーゼ及び互換性のあるsgRNA足場配列

OMNI CRISPR ﾇｸﾚｱｰｾﾞ名称	OMNI CRISPRﾇｸﾚｱｰｾﾞのｱﾐﾉ酸配列	PAM配列	互換性のあるsgRNA足場配列
WT OMNI-79	配列番号18943	NGG	GUUGCCGCUGGAGAAAUCCAGUUGUUAACAAGCAGCUUGACUGCACCAAAUAAGGCGGGGGCUGCGGCCCUCGCUUUUUU（配列番号18945）
OMNI-79 V5570ﾊﾞﾘｱﾝﾄ	配列番号18944	NGG	GUUGCCGCUGGAGAAAUCCAGUUGUUAACAAGCAGCUUGACUGCACCAAAUAAGGCGGGGGCUGCGGCCCUCGCUUUUUU（配列番号18945）

【０１４１】

参考文献

1. Ahmad and Allen (1992) "Antibody-mediated Specific Binging and Cytotoxicity of Lipsome-entrapped Doxorubicin to Lung Cancer Cells in Vitro", Cancer Research 52:4817-20.
2. Anderson (1992) "Human gene therapy", Science 256:808-13.
3. Agulo (2013) "Phosphoinositide 3‐kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage", Science 342:866‐8671.
4. Basha et al. (2011) "Influence of Cationic Lipid Composition on Gene Silencing Properties of Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA in Antigen-Presenting Cells", Mol. Ther. 19(12):2186-200.
5. Behr (1994) Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: Prospects for gene therapy", Bioconjuage Chem 5:382-89.
6. Blaese (1995) "Vectors in cancer therapy: how will they deliver", Cancer Gene Ther. 2:291-97.
7. Blaese et al. (1995) "T lympocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years", Science 270(5235):475-80.
8. Buchschacher and Panganiban (1992) "Human immunodeficiency virus vectors for inducible expression of foreign genes", J. Virol. 66:2731-39.
9. Burstein et al. (2017) "New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes", Nature 542:237-41.
10. Chang and Wilson (1987) "Modification of DNA ends can decrease end-joining relative to homologous recombination in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963.
11. Chung et al. (2006) "Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria", Trends Plant Sci. 11(1):1-4.
12. Coelho et al. (2013) "Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis" N. Engl. J. Med. 369, 819-829.

13. Collias and Beisel (2021) "CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease", Nature Communications 12, 555.
14. Crystal (1990) "Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphasema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy." J. Clin. Invest. 85(5): 1343-1352.
15. Crystal (1995) "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success", Science 270(5235):404-10.
16. Dillon (1993) "Regulation gene expression in gene therapy" Trends in Biotechnology 11(5):167-173.
17. Dranoff et al. (1997) "A phase I study of vaccination with autologous, irradiated melanoma cells engineered to secrete human granulocyte macrophage colony stimulating factor", Hum. Gene Ther. 8(1):111-23.
18. Dunbar et al. (1995) "Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation", Blood 85:3048-57.
19. Ellem et al. (1997) "A case report: immune responses and clinical course of the first human use of ganulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-tranduced autologous melanoma cells for immunotherapy", Cancer Immunol Immunother 44:10-20.
20. Gao and Huang (1995) "Cationic liposome-mediated gene transfer" Gene Ther. 2(10):710-22.
21. Haddada et al. (1995) "Gene Therapy Using Adenovirus Vectors", in: The Molecular Repertoire of Adenoviruses III: Biology and Pathogenesis, ed. Doerfler and Boehm, pp. 297-306.
22. Han et al. (1995) "Ligand-directed retro-viral targeting of human breast cancer cells", Proc Natl Acad Sci U.S.A. 92(21):9747-51.
23. Hu et al. (2018) "Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity", Nature 556(7699):57-63.
24. Inaba et al. (1992) "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor", J Exp Med. 176(6):1693-702.
25. Jinek et al. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity," Science 337(6096):816-21.
26. Johan et al. (1992) "GLVR1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of Neurospora crassa and is expressed at high levels in the brain and thymus", J Virol 66(3):1635-40.
27. Judge et al. (2006) "Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo", Mol Ther. 13(3):494-505.
28. Kohn et al. (1995) "Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adnosine deaminase deficiency", Nature Medicine 1:1017-23.
29. Kremer and Perricaudet (1995) "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer", Br. Med. Bull. 51(1):31-44.
30. Macdiarmid et al. (2009) "Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug", Nat Biotehcnol. 27(7):643-51.
31. Malech et al. (1997) "Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocyes after gene therapy of chronic granulomatous disease", PNAS 94(22):12133-38.
32. Miller et al. (1991) "Construction and properties of retrovirus pac

kaging cells based on gibbon ape leukemia virus", J Virol. 65(5):2220-24.
33. Miller (1992) "Human gene therapy comes of age", Nature 357:455-60.
34. Mitani and Caskey (1993) "Delivering therapeutic genes - matching approach and application", Trends in Biotechnology 11(5):162-66.
35. Nabel and Felgner (1993) "Direct gene transfer for immunotherapy and immunization", Trends in Biotechnology 11(5):211-15.
36. Nishimasu et al. (2018) "Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space", Science 361(6408):1259-1262.
37. Remy et al. (1994) "Gene Transfer with a Series of Lipphilic DNA-Binding Molecules", Bioconjugate Chem. 5(6):647-54.
38. Sentmanat et al. (2018) "A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing", Scientific Reports 8:888, doi:10.1038/s41598-018-19441-8.
39. Sommerfelt et al. (1990) "Localization of the receptor gene for type D simian retroviruses on human chromosome 19", J. Virol. 64(12):6214-20.
40. Van Brunt (1988) "Molecular framing: transgenic animals as bioactors" Biotechnology 6:1149-54.
41. Vigne et al. (1995) "Third-generation adenovectors for gene therapy", Restorative Neurology and Neuroscience 8(1,2): 35-36.
42. Walton et al. (2020) "Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants", Science 368(6488):290-296.
43. Weissman and Kariko (2015) "mRNA:Fulfilling the promise of gene therapy", Molecular Therapy (9):1416-7.
44. Wilson et al. (1989) "Formation of infectious hybrid virion with gibbon ape leukemia virus and human T-cell leukemia virus retroviral envelope glycoproteins and the gag and pol proteins of Moloney murine leukemia virus", J. Virol. 63:2374-78.
45. Yu et al. (1994) "Progress towards gene therapy for HIV infection", Gene Ther. 1(1):13-26.
46. Zetsche et al. (2015) "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRIPSR-Cas system" Cell 163(3):759-71.
47. Zuris et al. (2015) "Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein based genome editing in vitro and in vivo" Nat Biotechnol. 33(1):73-80.

【図面】

【図１Ａ】

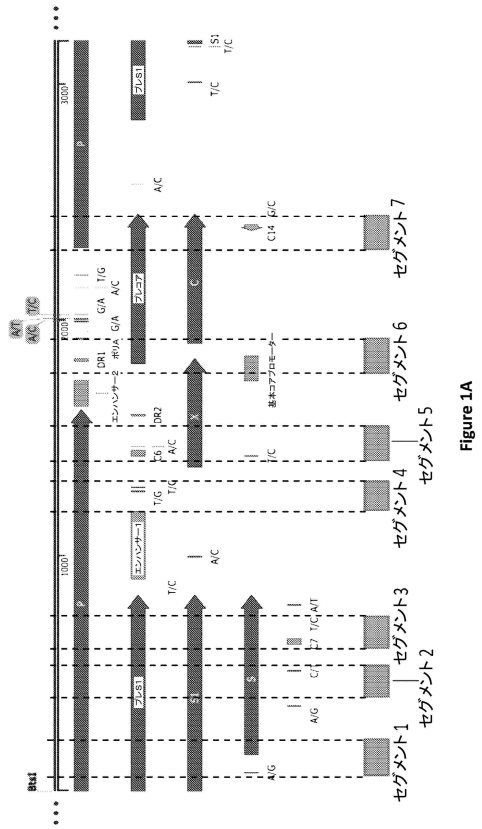


Figure 1A

【図１Ｂ】

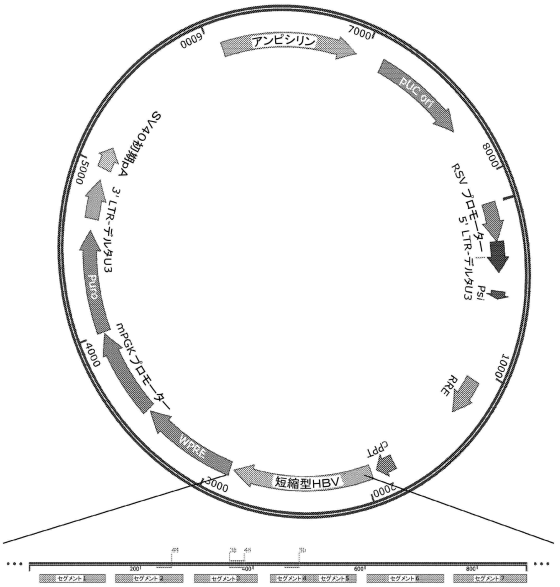


Figure 1B

【図２】

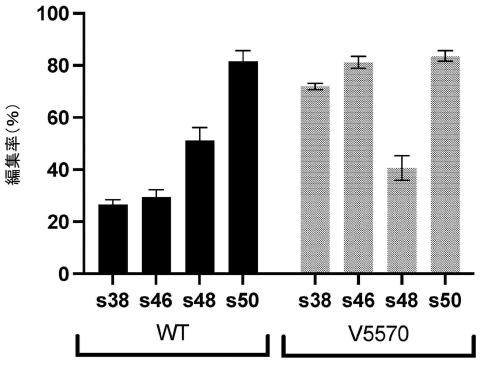


Figure 2

【配列表】
20245294000000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073981

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - A61K 38/46; C12N 15/113; A61K 48/00 (2022.01)
ADD. - C12N 9/22; C12N 15/63 (2022.01)

CPC - INV. - A61K 38/465; C12N 15/113; C12N 9/22; C12N 15/63 (2022.08)
ADD. - A61K 48/00 (2022.08)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2020/231863 A1 (BEAM THERAPEUTICS INC.) 19 November 2020 (19.11.2020) entire document	14, 15 --- 1-3, 16, 17
Y	KR 10-1842131 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 27 March 2018 (27.03.2018) entire document	1-3, 16, 17
A	WO 2015/089465 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al) 18 June 2015 (18.06.2015) entire document	1-3, 14-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 December 2022	FEB 14 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073981

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☐ forming part of the international application as filed.
   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073981

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-13, 18-25
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 14-17

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073981

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-3 and 14-17 are drawn to methods for modifying a hepatitis B virus (HBV) sequence in a cell, and compositions thereof.

The first invention of Group I+ is restricted to a guide sequence portion having 17 contiguous nucleotides selected to be nucleotides 1-17 of SEQ ID NO: 1, methods for modifying a hepatitis B virus (HBV) sequence in a cell thereof, and compositions thereof. It is believed that claims 1-3 and 14-17 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on a first RNA molecule, the first RNA molecule comprising a guide sequence portion having 17-50 contiguous nucleotides containing nucleotides in the sequence selected to be SEQ ID NO: 1.

Applicant is invited to elect additional guide sequence portions to be searched by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a guide sequence portion having 17 contiguous nucleotides selected to be nucleotides 1-17 of SEQ ID NO: 2, methods for modifying a hepatitis B virus (HBV) sequence in a cell thereof, and compositions thereof. Additional guide sequence portions will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element requiring the selection of alternative guide sequence portions where "the guide sequence portion of the first RNA molecule comprises 17-50 contiguous nucleotides containing nucleotides in the sequence set forth in any one of SEQ ID NOs: 1-18936."

Additionally, even if Groups I+ was considered to share the technical features of a method for modifying a hepatitis B virus (HBV) sequence in a cell, the method comprising introducing to the cell a composition comprising: at least one CRISPR nuclease or a nucleotide sequence encoding a CRISPR nuclease; and a first RNA molecule comprising a guide sequence portion, wherein a complex of the CRISPR nuclease and the first RNA molecule affects a double strand break in the HBV sequence; and a composition comprising a first RNA molecule, the first RNA molecule comprising a guide sequence portion, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art as disclosed by WO 2020/231863 to Beam Therapeutics Inc. (hereinafter, "Beam"), and KR 10-1842131 to Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University (hereinafter, "Yonsei").

Specifically Beam discloses a method for modifying a hepatitis B virus (HBV) sequence in a cell(Pg. 1, Lns. 29-31 a base editor system (e.g., a fusion protein comprising a programable DNA binding protein, a nucleobase editor and gRNA) for modifying the HBV genome; Pg. 2, Lns. 8 and 9, the contacting is in a eukaryotic cell, a mammalian cell, or a human cell), the method comprising introducing to the cell a composition comprising: at least one CRISPR nuclease or a nucleotide sequence encoding a CRISPR nuclease (Pg. 3, Lns.1 and 2, the polynucleotide programmable DNA binding domain provided herein is a Cas9; Pg. 12, Lns. 19 and 20, a vector suitable for expression in a mammalian cell, wherein the vector comprises a polynucleotide encoding the base editor); and a first RNA molecule comprising a guide sequence portion (Pg. 2, Lns. 3 and 4, the method comprises contacting the HBV genome with one or more guide RNAs and a base editor; Pg. 402, Lns. 1 and 2, Table 25 is a list of sequences targeted by guide RNAs in the HBV genome. Table 25: gRNAs for targeting the HBV genome), and composition comprising a first RNA molecule, the first RNA molecule comprising a guide sequence portion (Pg. 3, Ln. 4, one or more guide RNAs; Pg. 402, Lns. 1 and 2, Table 25 is a list of sequences targeted by guide RNAs in the HBV genome. Table 25: gRNAs for targeting the HBV genome).

Yonsei discloses a method for modifying a hepatitis B virus (HBV) sequence in a cell (Abstract, a gene scissor targeting hepatitis B virus (HBV). Specifically, the present invention relates to a polynucleotide encoding a guide RNA targeting HBV ... remove HBV in the human body; Para. [0029], the vector construct can be used to express the polynucleotide in a cell), wherein a complex of the CRISPR nuclease and the first RNA molecule affects a double strand break in the HBV sequence (Para. [0031], xpression vector can additionally be one encoding a Cas9 nuclease or Cas9 nicase. That is, when Cas9 protein and guide RNA are present together, the DNA of HBV can be cleaved).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61K	*38/46*	*(2006.01)*	A61K	38/46		
A61P	*31/20*	*(2006.01)*	A61P	31/20		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

Fターム（参考） 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA13 NA14 ZA75 ZB33 ZC75