

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-153824

(P2023-153824A)

(43)公開日 令和5年10月18日(2023.10.18)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55		Z N A	
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16			
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z		
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 38/46			
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00			
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全75頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2023-115696(P2023-115696)	(71)出願人	508117721
(22)出願日	令和5年7月14日(2023.7.14)		プレシジョン バイオサイエンシズ, インク.
(62)分割の表示	特願2021-120133(P2021-120133)の分割		アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27701, ダーラム, スイート エー - 100, ディブルルビルディング, イースト ペティグリューストリート 302
原出願日	平成29年10月13日(2017.10.13)	(74)代理人	110000659
(31)優先権主張番号	62/452,506		弁理士法人広江アソシエイツ特許事務所
(32)優先日	平成29年1月31日(2017.1.31)	(72)発明者	ジャンツ, デレック
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27701, ダーラム, グロリア アベニユー 1011
(31)優先権主張番号	62/408,356	(72)発明者	スミス, ジェームス, ジェファーソン
(32)優先日	平成28年10月14日(2016.10.14)		最終頁に続く
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/527,159		
(32)優先日	平成29年6月30日(2017.6.30)		
	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 B型肝炎ウイルスゲノムの認識配列に特異的な遺伝子操作メガヌクレアーゼ

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 B型肝炎ウイルスゲノムの認識配列に特異的な遺伝子操作メガヌクレアーゼを提供する。

【解決手段】 B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのオープンリーディングフレーム(ORF)内の認識配列を認識して切断する、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼであって、第1のサブユニット及び第2のサブユニットを含み、前記第1のサブユニットが前記認識配列の第1の認識した半分の部位に結合し、第1の超可変(HVR1)領域を含み、前記第2のサブユニットは、前記認識配列の第2の認識した半分の部位に結合し、第2の超可変(HVR2)領域を含む、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのオープンリーディングフレーム（ORF）内の認識配列を認識して切断する、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼであって、

第1のサブユニット及び第2のサブユニットを含み、

前記第1のサブユニットが前記認識配列の第1の認識した半分の部位に結合し、第1の超可変（HVR1）領域を含み、

前記第2のサブユニットは、前記認識配列の第2の認識した半分の部位に結合し、第2の超可変（HVR2）領域を含む、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

10

## 【請求項 2】

前記認識配列が、遺伝子型 A（配列番号 3）並びに遺伝子型 B（配列番号 4）、遺伝子型 C（配列番号 5）、遺伝子型 D（配列番号 6）、遺伝子型 E（配列番号 7）、遺伝子型 F（配列番号 8）、及び遺伝子型 G（配列番号 9）の 1 以上の ORF 内にある、請求項 1 に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 3】

前記認識配列が、ポリメラーゼ（P）タンパク質、大表面（preS1/preS2/S）タンパク質、中表面（preS2/S）タンパク質、及び小表面（S）タンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする、少なくとも1つのORF内にある、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

20

## 【請求項 4】

前記認識配列が配列番号 1 2 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 5】

前記 HVR 1 領域が、配列番号 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 つの残基 2 1 5 ~ 2 7 0 又は配列番号 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 つの残基 2 4 ~ 7 9 に対応するアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 6】

前記 HVR 1 領域が、配列番号 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 つの残基 2 1 5、2 1 7、2 1 9、2 2 1、2 2 3、2 2 4、2 2 9、2 3 1、2 3 3、2 3 5、2 3 7、2 5 9、2 6 1、2 6 6、及び 2 6 8 に対応する残基、又は配列番号 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 つの残基 2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 3、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、6 8、7 0、7 5、及び 7 7 に対応する残基を含む、請求項 4 又は 5 に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

30

## 【請求項 7】

前記 HVR 1 領域が、配列番号 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 つの残基 2 1 5 ~ 2 7 0 又は配列番号 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 つの残基 2 4 ~ 7 9 を含む、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 8】

前記 HVR 2 領域が、配列番号 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 つの残基 2 4 ~ 7 9 又は配列番号 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 つの残基 2 1 5 ~ 2 7 0 に対応するアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

40

## 【請求項 9】

前記 HVR 2 領域が、配列番号 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 つの残基 2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 3、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、6 8、7 0、7 5、及び 7 7 に対応する残基、又は配列番号 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 つの残基 2 1 5、2 1 7、2 1 9、2 2 1、2 2 3、2 2 4、2 2 9、2 3 1、2 3 3、2 3 5、2 3 7、2 5 9、2 6 1、2 6 6、及び 2 6 8 に対応する残基を含む、請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作さ

50

れたメガヌクレアーゼ。

【請求項 10】

前記 H V R 2 領域が、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 24 ~ 79、または配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 215 ~ 270 を含む、請求項 4 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 11】

前記第 1 のサブユニットが、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 198 ~ 344 又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 7 ~ 153 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記第 2 のサブユニットが、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 7 ~ 153 又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 198 ~ 344 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 4 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

10

【請求項 12】

前記第 1 のサブユニットが、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 198 ~ 344 又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 7 ~ 153 を含む、請求項 4 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 13】

前記第 2 のサブユニットが、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 7 ~ 153 又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 198 ~ 344 を含む、請求項 4 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

20

【請求項 14】

リンカーを含み、前記リンカーが前記第 1 のサブユニットと前記第 2 のサブユニットとを共有結合で結合させる、請求項 4 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 15】

配列番号 22 ~ 28 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 4 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 16】

前記認識配列が配列番号 16 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

30

【請求項 17】

前記 H V R 1 領域が、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 215 ~ 270 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 18】

前記 H V R 1 領域が、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266、及び 268 に対応する残基を含む、請求項 16 又は 17 に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 19】

前記 H V R 1 領域が、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 215 ~ 270 を含む、請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

40

【請求項 20】

前記 H V R 2 領域が、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 24 ~ 79 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 21】

前記 H V R 2 領域が、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75、及び 77 に対応する残基を含む、請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレア

50

ーゼ。

【請求項 22】

前記 H V R 2 領域が、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 24 ~ 79 を含む、請求項 16 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 23】

前記第 1 のサブユニットが、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 198 ~ 344 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記第 2 のサブユニットが、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 7 ~ 153 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 16 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

10

【請求項 24】

前記第 1 のサブユニットが、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 198 ~ 344 を含む、請求項 16 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 25】

前記第 2 のサブユニットが、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 7 ~ 153 を含む、請求項 16 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 26】

リンカーを含み、前記リンカーが前記第 1 のサブユニットと前記第 2 のサブユニットとを共有結合で結合させる、請求項 16 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

20

【請求項 27】

配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 16 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 29】

前記ポリヌクレオチドが mRNA である、請求項 28 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 30】

前記 mRNA が、請求項 1 ~ 27 に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの 1 以上をコードするポリシストロニック mRNA である、請求項 29 に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 31】

前記ポリシストロニック mRNA が、

(a) 配列番号 12 を含む認識配列を認識し切断する遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ；及び

(b) 配列番号 16 を含む認識配列を認識し切断する遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする、請求項 30 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 32】

前記ポリシストロニック mRNA が、

(a) 請求項 4 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ；及び

(b) 請求項 16 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ

をコードする、請求項 30 又は 31 に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 33】

前記ポリシストロニック mRNA が、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードし、且つ配列番号 33 のアミノ酸配列を含む遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする、請求項 30 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 34】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードす

50

る核酸配列を含む、組換えDNA構築物。

【請求項35】

プロモータと請求項1～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むカセットを含む、請求項34に記載の組換えDNA構築物。

【請求項36】

2以上のカセットを含み、前記カセットの各々が、プロモータと、請求項1～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含み、前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの各々が、異なるHBV認識配列に対して特異性を有する、請求項34に記載の組換えDNA構築物。

10

【請求項37】

プロモータと、請求項1～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの1以上をコードするポリシストロニック核酸配列と、を含むカセットを含み、前記プロモータが、前記ポリシストロニック核酸配列の発現を駆動して、標的細胞においてポリシストロニックmRNAを生成する、請求項34に記載の組換えDNA構築物。

【請求項38】

前記ポリシストロニックmRNAが、請求項30～33のいずれか1項に記載のポリシストロニックmRNAである、請求項36に記載の組換えDNA構築物。

【請求項39】

請求項1～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする前記核酸配列を含むウイルスベクターをコードする、請求項34に記載の組換えDNA構築物。

20

【請求項40】

前記ウイルスベクターが組換えAAVベクターである、請求項39に記載の組換えDNA構築物。

【請求項41】

請求項1～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む、ウイルスベクター。

【請求項42】

前記ウイルスベクターが組換えAAVベクターである、請求項41に記載のウイルスベクター。

30

【請求項43】

前記ウイルスベクターが、プロモータと請求項1～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むカセットを含む、請求項41に記載のウイルスベクター。

【請求項44】

2以上のカセットを含み、前記カセットの各々が、プロモータと、請求項1～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列と、を含み、前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの各々が、異なるHBV認識配列に対して特異性を有する、請求項41に記載のウイルスベクター。

40

【請求項45】

プロモータと、請求項1～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの1以上をコードするポリシストロニック核酸配列と、を含むカセットを含み、前記プロモータが、前記ポリシストロニック核酸配列の発現を駆動して、標的細胞においてポリシストロニックmRNAを生成する、請求項41に記載のウイルスベクター。

【請求項46】

前記ポリシストロニックmRNAが、請求項30～33のいずれか1項に記載の前記ポリシストロニックmRNAである、請求項45に記載のウイルスベクター。

【請求項47】

B型肝炎ウイルス(HBV)又はHBVに起因する肝細胞がんを有する対象を治療する

50

ための医薬組成物であって、医薬的に許容される担体、及び

( a ) 請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸；又は

( b ) 請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ；  
を含む、医薬組成物。

【請求項 4 8】

前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする前記核酸が、請求項 2 9 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の前記 mRNA である、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 9】

請求項 3 4 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の組換え DNA 構築物を含む、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。 10

【請求項 5 0】

請求項 4 1 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載のウイルスペクターを含む、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 1】

請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを含む、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 2】

請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの 2 以上を含み、前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、異なる HBV 認識配列に対して特異性を有する、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。 20

【請求項 5 3】

請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの 2 以上をコードする 2 以上の核酸を含み、前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、異なる HBV 認識配列に対して特異性を有する、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 4】

脂質ナノ粒子内に封入されている請求項 2 9 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の前記 mRNA の 1 以上を含む、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 5】

HBV を有する対象を治療する方法であって、前記対象の標的細胞に、 30

( a ) 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードし、前記標的細胞においてインピボで発現される核酸；又は

( b ) 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ；

を送達することを含み、

前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、B 型肝炎ウイルスの少なくとも 2 つの遺伝子型のゲノムの ORF 中の認識配列に対する特異性を有し、前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、前記標的細胞中の前記認識配列を認識し切断し、前記対象における HBV の感染及び / 又は増殖が減少又は排除される方法。

【請求項 5 6】

前記認識配列が、遺伝子型 A、並びに遺伝子型 B ( 配列番号 4 )、遺伝子型 C ( 配列番号 5 )、遺伝子型 D ( 配列番号 6 )、遺伝子型 E ( 配列番号 7 )、遺伝子型 F ( 配列番号 8 )、及び遺伝子型 G ( 配列番号 9 ) の 1 以上の ORF 内にある、請求項 5 5 に記載の方法。 40

【請求項 5 7】

前記認識配列が、B 型肝炎ウイルスの少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、又は少なくとも 6 つの遺伝子型の ORF 内に見出される、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記認識配列が、ポリメラーゼ ( P ) タンパク質、大表面 ( p r e S 1 / p r e S 2 / S ) タンパク質、中表面 ( p r e S 2 / S ) タンパク質、及び小表面 ( S ) タンパク質が 50

らなる群から選択されるタンパク質をコードする、少なくとも1つのORF内にある、請求項55～57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】

前記認識配列が配列番号12、配列番号16、配列番号10、又は配列番号14を含む、請求項55～58のいずれか1項に記載の方法。

【請求項60】

前記認識配列が配列番号12を含む、請求項55～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項61】

前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、請求項4～15のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼである、請求項55～59のいずれか1項に記載の方法

10

【請求項62】

前記認識配列が配列番号16を含む、請求項55～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、請求項16～27のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼである、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

前記対象に請求項47～54のいずれか1項に記載の医薬組成物を投与することを含む、請求項55～63のいずれか1項に記載の方法。

【請求項65】

前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ又は前記遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする前記核酸が、標的肝細胞に送達される、請求項55～64のいずれか1項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍学、分子生物学、及び組換え核酸技術の分野に関する。特に、本発明は、B型肝炎ウイルスゲノムの少なくとも2つの遺伝子型の中の認識配列に対する特異性を有する遺伝子操作されたメガヌクレアーゼに関する。そのような遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、B型肝炎ウイルスの感染及びB型肝炎ウイルスによって引き起こされる肝細胞がんを治療するための方法において有用である。

30

【0002】

EFS-WEBを介したテキストファイルとして提出された配列表への言及

本願は、EFS-Webを介してASCIIのフォーマットで提出された配列表を含み、その全体は参照により本明細書に組み入れられる。2017年10月13日に作成された上記のASCIIのコピーは、P109070018WO00-SEQ-MJT.txtという名前で、サイズは169,011バイトである。

【背景技術】

【0003】

B型肝炎ウイルス(HBV)は世界的に大きな健康問題であり、3億5千万人を超える人々が慢性的なキャリアである。HBV感染症は、肝臓の深刻且つ一般的な感染症である。慢性感染症は、肝硬変及びヒトのがんの最も一般的な形態の1つである肝細胞がん(HCC)を含む、重篤な肝疾患を発症するリスクの増大と関連している。慢性HBVキャリアにおけるHCCの推定のリスクは、感染していない個人におけるよりも約100倍大きい。世界の人口の約3分の1が、生きている一時点で感染しており、それは2億4千万人から3億5千万人の慢性感染症を含んでいる。毎年75万人を超える人々がB型肝炎で死亡している。これらのうち約30万人が肝がんによる。現在入手可能な抗HBV薬には限界がある。例えば、インターフェロナルファの投与は重篤な有害反応と関連している。ヌクレオシド類似体は、静ウイルス性であり、長期の投与が必要となる。

40

【0004】

50

HBVゲノムは、1つの部位あたり1年につき $1.4 \sim 3.2 \times 10^{-5}$ ヌクレオチド置換という推定速度での遺伝的多様性を示す。ウイルスのポリメラーゼによるいずれかのブルーフリーディング能力の不在でヌクレオチドを誤った取り込んだ結果として、複製している間、多数のウイルス変異体が生じる。その多様性により、ウイルスのよく認識されている亜型が生じた。HBVは、完全なゲノムの配列における8%以上の群間の相違に基づいた明確な遺伝子型に分類されており、それぞれ異なる地理的分布を有する。例えば、遺伝子型Aは、サハラ以南のアフリカ、北ヨーロッパ、及び西アフリカで広く見られる。遺伝子型BとCはアジアで一般的である。遺伝子型Cは主に東南アジアで観察される。遺伝子型Dは、アフリカ、ヨーロッパ、地中海諸国、及びインドで優勢である。遺伝子型Gはフランス、ドイツ、アメリカ合衆国で報告されている。また、遺伝子型Hは中南米でよく見られる。遺伝子型Iは最近ベトナムとラオスで報告されている。最新のHBV遺伝子型、遺伝子型Jは、日本の琉球諸島で確認されている。

10

## 【0005】

HBVは、ヘパドナウイルス科に属するエンベロープDNAウイルスである。それは、RNA中間体、プレゲノムRNA (pgRNA)の逆転写によって複製する、小さい、部分的に二本鎖(DS)の、弛緩型環状DNA (rcDNA)ゲノムを含む。HBVの環状DNAゲノムは珍しい。DNAが完全に二本鎖であるわけではないからである。全長の鎖の一端が、ウイルスDNAポリメラーゼに結合している。ゲノムは約3020~3320ヌクレオチド長(全長の鎖)、1700~2800ヌクレオチド長(長さの短い鎖)である。ネガティブセンス(非コード)は、ウイルスmRNAに相補的である。

20

## 【0006】

C、X、P、及びSと呼ばれる、ゲノムによってコードされる4つの既知の遺伝子がある。コアタンパク質は遺伝子C (HBcAg)によってコードされ、その開始コドンは上流のフレーム内AUG開始コドンが先行し、そこからプレコアタンパク質が産生される。HBsAgはプレコアタンパク質のタンパク質分解処理によって産生される。DNAポリメラーゼは、表面抗原(HBsAg)に対する遺伝子P・Gene Sコードによりコードされる。HBsAg遺伝子は1つの長いオープンリーディングフレームであるが、遺伝子を3つの部分、即ちpre-S1、pre-S2、及びSに分割する3つのインフレームの「開始」(ATG)コドンを含む。複数の開始コドンにより、大(表面から内側への順序で、pre-S1/pre-S2/S)、中(pre-S2/S)、及び小(S)と呼ばれる3つの異なる大きさのポリペプチドが生成される。遺伝子Xによってコードされるタンパク質の機能は完全には理解されていないが、それは肝がんの発症と関連している。それは細胞の増殖を促進する遺伝子を刺激して、増殖調節分子を不活化する。

30

## 【0007】

ウイルスのDNAは、細胞の感染直後、核にて見出される。部分的に二本鎖のDNAは、(+ )センスの鎖の完成及び(- )のセンスの鎖からのタンパク質分子の除去、並びに(+ )センスの鎖からの短いRNA配列の除去によって完全に二本鎖にされる。非コードの塩基が(- )センスの鎖の末端から除去され、末端は再結合される。

## 【0008】

HBVのライフサイクルは、ウイルスが宿主細胞に付着して、内在化すると始まる。最近の研究は、タウロコール酸ナトリウム共輸送ポリペプチド(NTCP)がHBVの感染における機能的受容体であることを証明している。ビリオン弛緩型環状DNA (rcDNA)は核に送達され、そこでそれは修復されて共有結合閉環状DNA (cccDNA)を形成する。エピソームcccDNAは、宿主RNAポリメラーゼIIによるプレゲノムRNA (pgRNA)及び他のウイルスmRNAの転写のための鋳型として機能する。転写物は次に細胞質に輸送され、そこでウイルスタンパク質の翻訳が起こる。逆転写酵素(RT)はpgRNAに結合し、コアタンパク質の未成熟なRNA含有ヌクレオカプシドへの集合を引き起こす。未成熟なヌクレオカプシドは次に成熟の過程を経る。それによってpgRNAがRTによって逆転写されて、成熟rcDNAが作られる。ヘパドナウイルス逆転写の独特の特徴は、マイナス鎖DNA合成のRTにプライミングされた開始であり、こ

40

50



れはマイナス鎖DNAの5'末端へのRTの共有結合をもたらす。

【0009】

次いで、成熟したrcDNA含有ヌクレオカプシドは、ウイルス表面タンパク質によってエンベロープされ、ピリオンとして分泌される（分泌経路）か、別法として、cccDNAのプールを更に増幅するために核に再循環される（再循環経路）。肝細胞におけるcccDNAの持続性は、ウイルスの持続性、抗ウイルス療法の中止後のウイルス複製の再活性化、及び治療に対する抵抗性において、重要な役割を果たす。

【0010】

ホーミングエンドヌクレアーゼは、植物及び真菌のゲノムに一般的に見られる15~40塩基対の切断部位を認識する一群の天然のヌクレアーゼである。それらは、グループ1自己スプライシングイントロンやインティン等の寄生のDNAの要素と関連していることが多い。それらは、染色体にて二本鎖の切断を生じさせることによって宿主ゲノムの特定の位置で相同組換え又は遺伝子挿入を自然に促進し、これは細胞のDNA修復機構を動員する（非特許文献1）。ホーミングエンドヌクレアーゼは一般に4つのファミリーに分類される：LAGLIDADG（配列番号2）ファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cysボックスファミリー及びHNHファミリーである。これらのファミリーは、触媒の活性及び認識配列に影響を及ぼす構造モチーフによって特徴付けられる。例えば、LAGLIDADG（配列番号2）ファミリーのメンバーは、保存されたLAGLIDADG（配列番号2）モチーフの1つ又は2つのコピーを有することを特徴とする（非特許文献2を参照）。単一コピーのLAGLIDADG（配列番号2）モチーフを有するLAGLIDADG（配列番号2）ホーミングエンドヌクレアーゼはホモ二量体を形成し、一方、2コピーのLAGLIDADG（配列番号2）モチーフを有するメンバーは単量体として見出される。ホーミングエンドヌクレアーゼを産生する方法は、当技術分野において公知である。

【0011】

I-CreI（配列番号1）は、緑藻クラミドモナスの葉緑体染色体にある22塩基対の認識配列を認識し切断する、ホーミングエンドヌクレアーゼのLAGLIDADG（配列番号2）ファミリーのメンバーである。遺伝的選択技術を用いて、野生型I-CreI切断部位選択性を改変した（非特許文献3~6）。哺乳動物、酵母、植物、細菌、及びウイルスゲノムの部位を含む、広範囲に異なるDNAの部位を標的とするためにI-CreI及び他のホーミングエンドヌクレアーゼを包括的に再設計することができる、モノ-LAGLIDADG（配列番号2）ホーミングエンドヌクレアーゼを合理的に設計する方法が記載された（特許文献1）。

【0012】

特許文献2に最初に記載されているように、I-CreI及びその遺伝子操作された誘導体は、通常二量体であるが、第1のサブユニットのC末端を第2のサブユニットのN末端に結合する短いペプチドリンカーを用いて、単一ポリペプチドに融合できる（非特許文献7、非特許文献8）。従って、機能的な「一本鎖」メガヌクレアーゼは、単一の転写物から発現させることができる。

【0013】

HBV感染の治療のために遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを使用することが、示されている。例えば、特許文献3は、非ゲノム組み込み型ウイルスのゲノムを切断するための遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの使用を示唆している。そのようなメガヌクレアーゼは、I-CreIの変異体を含む。特許文献3は、1つのHBV株のゲノムに存在する多数の22塩基対メガヌクレアーゼ認識配列を開示している。しかし、特許文献3は、HBVゲノムの複数の遺伝子型の中に存在するいずれの認識配列も同定しない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】国際公開第2007/047859号パンフレット

10

20

30

40

50

【特許文献2】国際公開第2009/059195号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2010/136841号パンフレット

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49 - 95

【非特許文献2】Chevalier et al. (2001), Nucleic Acids Res. 29 (18): 3757 - 3774

【非特許文献3】Sussman et al. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31 - 41

【非特許文献4】Chames et al. (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178

【非特許文献5】Seligman et al. (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870 - 9

【非特許文献6】Arnould et al. (2006), J. Mol. Biol. 355: 443 - 58

【非特許文献7】Li et al. (2009), Nucleic Acids Res. 37: 1650 - 62

【非特許文献8】Grizot et al. (2009), Nucleic Acids Res. 37: 5405 - 19

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、部分的には、HBVゲノムの少なくとも1つのオープンリーディングフレーム(ORF)内及びHBVのゲノムの少なくとも2つの異なる遺伝子型内のDNA配列を認識するように遺伝子操作される部位特異的な希少切断エンドヌクレアーゼの開発に依存する。本発明者らは、ウイルスの複数の遺伝子型を不活化するために、組換えメガヌクレアーゼによって標的とされ得る遺伝子型にわたって保存されている特定の認識配列を同定した。

【0017】

本発明はいくつかの態様で従来技術を改良する。本発明者らは驚くべきことに、認識配列がHBVゲノムのいくつかの遺伝子型のORF内で同定され得ることを見出した。ウイルスのいくつかの遺伝子型を標的とすることによって、世界の局所的な領域に存在する異なる遺伝子型に対して使用することができる単一の医薬組成物を調製することができる。従って、本明細書に開示されている方法及び組成物は、世界中の感染した個人におけるHBVの増殖を治療又は低減するのに有用である。肝臓におけるHBVの複製の抑制又は根絶は、肝病理の改善、及び肝硬変や肝細胞がんへの進行の減少をもたらす。従って、本発明は、HBV感染に対する更なる遺伝子治療アプローチに対する当技術分野における必要性を満たすものである。更に、本発明は、HCC細胞のHBVゲノムへの「自殺遺伝子」の相同組換えによる挿入を標的とする手段を提供することによって肝細胞がんを治療する方法を提供する。自殺遺伝子は、がん細胞を直接死滅させる毒素若しくはアポトーシス促進タンパク質、又はがん細胞を死滅させるように対象自身の免疫系に指示する細胞表面抗原若しくはMHCクラスI抗原ポリペプチドをコードすることができる。

【0018】

本発明は、B型肝炎ウイルス(HBV)感染の治療に有用な遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを提供する。本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、少なくとも2つのB型肝炎ウイルスの遺伝子型のゲノムのオープンリーディングフレーム(ORF)内の認識配列を認識して切断する。本明細書において開示される遺伝子操作されたメガヌクレアーゼによるそのような認識配列での切断は、切断部位での非相同末端結合(NHEJ)に起因して、1以上のウイルスタンパク質の発現を乱し得る。NHEJは、挿入、欠失を引

10

20

30

40

50

き起こす可能性がある、又は遺伝子の発現を妨げる可能性のあるフレームシフト突然変異を引き起こす可能性がある。従って、正常な遺伝子発現を妨害することによって、HBVの感染及び増殖は、本明細書に開示されている方法に従って、減少又は排除することができる。本発明はまた、B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのORF内に位置する認識配列に対する特異性を有する遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを利用するHBVの治療のための医薬組成物及び方法を提供する。本発明は更に、HBVのレベルを低下させる、及び/又はHBVの感染に関連する症状を低下させるために、本明細書に開示される遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをHBVに感染した対象に送達する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

10

【0019】

従って、一態様において、本発明は、少なくとも2つのB型肝炎ウイルスの遺伝子型のゲノムのオープンリーディングフレーム(ORF)内の認識配列を認識して切断する、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを提供する。遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、第1のサブユニット及び第2のサブユニットを含み、第1のサブユニットが認識配列の第1の認識した半分の部位に結合し、第1の超可変(HVR1)領域を含み、第2のサブユニットは、認識配列の第2の認識した半分の部位に結合し、第2の超可変(HVR2)領域を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、認識配列は、B型肝炎ウイルスの少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は少なくとも6つの遺伝子型のORF内に見出される。そのような一実施形態では、認識配列はB型肝炎ウイルスの遺伝子型A(配列番号3)のORF内にある。そのような実施形態は、配列番号3と異なるが本明細書に記載の1又は複数のHBVメガヌクレアーゼ認識配列を含む、遺伝子型AのB型肝炎ウイルス単離体を含む。更なるそのような態様において、認識配列は遺伝子型AのORF並びに遺伝子型B、C、D、E、F、及びG(それぞれ配列番号4~9)の1又は複数のORF内にある。そのような実施形態は、配列番号3~9と異なるが本明細書に記載の1又は複数のHBVメガヌクレアーゼ認識配列を含む、遺伝子型A、B、C、D、E、F、及びGのB型肝炎ウイルス単離体を含む。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、認識配列は、ポリメラーゼ(P)タンパク質、大表面(pres1/pres2/S)タンパク質、中表面(pres2/S)タンパク質、及び小表面(S)タンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする、少なくとも1つのORF内にある。いくつかの実施形態において、認識配列は、配列番号10(即ち、HBV1-2認識配列)、配列番号12(即ち、HBV5-6認識配列)、配列番号14(即ち、HBV7-8認識配列)、又は配列番号16(即ち、HBV11-12認識配列)を含み得る。

30

【0022】

いくつかの実施形態では、認識配列が配列番号10を含み、HVR1領域は、配列番号18若しくは19の残基24~79、又は配列番号20若しくは21の残基215~270に対応するアミノ酸配列に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかのこのような実施形態において、HVR1領域は、配列番号18若しくは19の残基24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75、及び77に対応する残基、又は配列番号20若しくは21の残基215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266、及び268に対応する残基を含み得る。特定の実施形態において、HVR1領域は、配列番号18若しくは19の残基24~79、又は配列番号20若しくは21の残基215~270を含み得る。

40

【0023】

50

いくつかのこのような実施形態では、認識配列が配列番号 10 を含み、HVR 2 領域は、配列番号 18 若しくは 19 の残基 215 ~ 270、又は配列番号 20 若しくは 21 の残基 24 ~ 79 に対応するアミノ酸配列に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかのこのような実施形態において、HVR 2 領域は、配列番号 18 若しくは 19 の残基 215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266、及び 268 に対応する残基、又は配列番号 20 若しくは 21 の残基 24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75、及び 77 に対応する残基を含み得る。特定の実施形態において、HVR 2 領域は、配列番号 18 若しくは 19 の残基 215 ~ 270、又は配列番号 20 若しくは 21 の残基 24 ~ 79 を含み得る。 10

#### 【0024】

このような実施形態では、認識配列が配列番号 10 を含み、第 1 のサブユニットは、配列番号 18 若しくは 19 の残基 7 ~ 153、又は配列番号 20 若しくは 21 の残基 198 ~ 344 に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、第 2 のサブユニットは、配列番号 18 若しくは 19 の残基 198 ~ 344、又は配列番号 20 若しくは 21 の残基 7 ~ 153 に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、第 1 のサブユニットは、配列番号 18 若しくは 19 の残基 7 ~ 153、又は配列番号 20 若しくは 21 の残基 198 ~ 344 を含み得る。同様に、いくつかの実施形態において、第 2 のサブユニットは、配列番号 18 若しくは 19 の残基 198 ~ 344、又は配列番号 20 若しくは 21 の残基 7 ~ 153 を含み得る。 20

#### 【0025】

このような特定の実施形態では、認識配列が配列番号 10 を含み、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼはリンカーを含むことができ、リンカーは第 1 のサブユニットと第 2 のサブユニットを共有結合で結合させる。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号 18 ~ 21 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み得る。

#### 【0026】

他の実施形態では、認識配列が配列番号 12 を含み、HVR 1 領域は、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 215 ~ 270、又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 24 ~ 79 に対応するアミノ酸配列に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかのこのような実施形態において、HVR 1 領域は、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266、及び 268 に対応する残基、又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75、及び 77 に対応する残基を含み得る。特定の実施形態において、HVR 1 領域は、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 215 ~ 270、又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 24 ~ 79 を含み得る。 30 40

#### 【0027】

いくつかのこのような実施形態では、認識配列が配列番号 12 を含み、HVR 2 領域は、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 24 ~ 79、又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 215 ~ 270 に対応するアミノ酸配列に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかのこのような実施形態において、HVR 2 領域は、配列番号 22 ~ 24 のいずれか 1 つの残基 24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75、及び 77 に対応する残基、又は配列番号 25 ~ 28 のいずれか 1 つの残基 215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266、及び 268 に対応する 50

残基を含み得る。特定の実施形態において、HVR2領域は、配列番号22～24のいずれか1つの残基24～79、又は配列番号25～28のいずれか1つの残基215～270を含み得る。

**【0028】**

いくつかのこのような実施形態では、認識配列が配列番号12を含み、第1のサブユニットは、配列番号22～24のいずれか1つの残基198～344又は配列番号25～28のいずれか1つの残基7～153に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、第2のサブユニットは、配列番号22～24のいずれか1つの残基7～153又は配列番号25～28のいずれか1つの残基198～344に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、第1のサブユニットは、配列番号22～24のいずれか1つの残基198～344又は配列番号25～28のいずれか1つの残基7～153を含み得る。同様に、いくつかの実施形態において、第2のサブユニットは、配列番号22～24のいずれか1つの残基7～153又は配列番号25～28のいずれか1つの残基198～344を含み得る。

10

**【0029】**

このような特定の実施形態では、認識配列が配列番号12を含み、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼはリンカーを含むことができ、リンカーは第1のサブユニットと第2のサブユニットとを共有結合で結合させる。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号22～28のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含み得る。

20

**【0030】**

いくつかの実施形態では、認識配列が配列番号14を含み、HVR1領域は、配列番号29～32のいずれか1つの残基215～270に対応するアミノ酸配列に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかのこのような実施形態において、HVR1領域は、配列番号29～32のいずれか1つの残基215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266、及び268に対応する残基を含み得る。特定の実施形態において、HVR1領域は、配列番号29～32のいずれか1つの残基215～270を含み得る。

30

**【0031】**

いくつかのこのような実施形態では、認識配列が配列番号14を含み、HVR2領域は、配列番号29～32のいずれか1つの残基24～79に対応するアミノ酸配列に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかのこのような実施形態において、HVR2領域は、配列番号29～32のいずれか1つの残基24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75、及び77に対応する残基を含み得る。特定の実施形態において、HVR2領域は、配列番号29～32のいずれか1つの残基24～79を含み得る。

**【0032】**

いくつかのこのような実施形態では、認識配列が配列番号14を含み、第1のサブユニットは、配列番号29～32のいずれか1つの残基198～344に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、第2のサブユニットは、配列番号29～32のいずれか1つの残基7～153に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、第1のサブユニットは、配列番号29～32のいずれか1つの残基198～344を含み得る。同様に、いくつかの実施形態において、第2のサブユニットは、配列番号29～32のいずれか1つの残基7～153を含み得る。

40

**【0033】**

50

このような特定の実施形態では、認識配列が配列番号 14 を含み、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼはリンカーを含むことができ、リンカーは第 1 のサブユニットと第 2 のサブユニットとを共有結合で結合させる。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号 29 ~ 32 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み得る。

**【0034】**

いくつかの実施形態では、認識配列が配列番号 16 を含み、HVR1 領域は、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 215 ~ 270 に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかのこのような実施形態において、HVR1 領域は、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266、及び 268 に対応する残基を含み得る。特定の実施形態において、HVR1 領域は、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 215 ~ 270 を含み得る。

10

**【0035】**

いくつかのこのような実施形態では、認識配列が配列番号 16 を含み、HVR2 領域は、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 24 ~ 79 に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかのこのような実施形態において、HVR2 領域は、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75、及び 77 に対応する残基を含み得る。特定の

20

**【0036】**

このような実施形態では、認識配列が配列番号 16 を含み、第 1 のサブユニットは、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 198 ~ 344 に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、第 2 のサブユニットは、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 7 ~ 153 に対する少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、第 1 のサブユニットは、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 198 ~ 344 を含み得る。同様に、いくつかの実施形態において、第 2 のサブユニットは、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つの残基 7 ~ 153 を含み得る。

30

**【0037】**

特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼはリンカーを含むことができ、リンカーは第 1 のサブユニットと第 2 のサブユニットとを共有結合で結合させる。特定の

**【0038】**

別の態様において、本発明は、本明細書に開示されている任意の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。特定の

40

**【0039】**

更なる実施形態では、mRNA は、本明細書に記載の 1 又は複数の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするポリシストロニック mRNA であり得る。特定の実施形態において、本発明のポリシストロニック mRNA は、限定するものではなく、本明細書に記載の 2 つの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするバイシストロン mRNA、本明細書に記載の 3 つの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするトリシストロン mRNA、又は本明細書に記載の 4 つの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするクアドシストロン mRNA であり得る。そのような実施形態において、2 以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼがポリシストロニック mRNA によってコードされ、それぞれの

50

コードされた遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、異なるHBV認識配列に対する特異性を有する。更に、そのような実施形態では、本発明のポリシストロニックmRNAは、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの任意の組み合わせをコードし得る。特定の実施形態において、ポリシストロニックmRNAは、HBV1-2メガヌクレアーゼ、HBV5-6メガヌクレアーゼ、HBV7-8メガヌクレアーゼ、及びHBV11-12メガヌクレアーゼをコードし得る。別の特定の実施形態では、ポリシストロニックmRNAは、HBV5-6メガヌクレアーゼ及びHBV11-12メガヌクレアーゼをコードするバイシストロンmRNAであり得る。

【0040】

更なる実施形態において、本発明のポリシストロニックmRNAは、本明細書に記載の1以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ、並びにHBV感染細胞及び/又はHBV感染対象において治療上有益な効果を誘導する1以上の更なるタンパク質をコードし得る。

【0041】

別の態様において、本発明は、本発明の任意の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む組換えDNA構築物を提供する。いくつかの実施形態では、組換えDNA構築物は、プロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むカセットを含む。他の実施形態では、組換えDNA構築物は、2以上のカセットを含み、各カセットがプロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含み、各遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、本明細書に開示の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する。特定の実施形態において、組換えDNA構築物は、2つのカセット、3つのカセット、4つのカセット、又はそれ以上を含み得る。

【0042】

他の実施形態において、組換えDNA構築物は、プロモータ及びポリシストロニック核酸配列を含むカセットを含み、プロモータが、ポリシストロニック核酸配列の発現を駆動して、標的細胞において本明細書に記載のポリシストロニックmRNAを生成する。

【0043】

特定の実施形態では、組換えDNA構築物は、本明細書に開示されている任意の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含むウイルスベクターをコードする。そのような実施形態では、ウイルスベクターはレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、又はアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり得る。特定の実施形態では、ウイルスベクターは組換えAAVベクターであり得る。

【0044】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、プロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むカセットとを含む。他の実施形態では、ウイルスベクターは、2つ以上のカセットを含み、各カセットがプロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含み、各遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、本明細書に開示の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する。

【0045】

他の実施形態では、ウイルスベクターは、プロモータ及びポリシストロニック核酸配列を含む1つのカセットを含み、プロモータが、ポリシストロニック核酸配列の発現を駆動して、標的細胞において本明細書に記載のポリシストロニックmRNAを生成する。

【0046】

別の態様において、本発明は、本発明の任意の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含むウイルスベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターはレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、又はアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり得る。特定の実施形態では、ウイルスベクターは組換えAAVベクターであり得る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、プロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むカセ

10

20

30

40

50

ットを含む。他の実施形態では、ウイルスベクターは、2以上のカセットを含み、各カセットがプロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含み、各遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、本明細書に開示の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する。

【0047】

更なる実施形態においてウイルスベクターは、プロモータ及びポリシストロニック核酸配列を含む1つのカセットを含み、プロモータが、ポリシストロニック核酸配列の発現を駆動して、標的細胞において本明細書に記載のポリシストロニックmRNAを生成する。

【0048】

別の態様では、本発明は、HBVによって引き起こされるB型肝炎ウイルス(HBV)又は肝細胞がんを有する対象を治療するための医薬組成物であって、医薬的に許容される担体と、(a)本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸、又は(b)本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質とを含む医薬組成物を提供し、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのオープンリーディングフレーム(ORF)内の認識配列に対する特異性を有する。いくつかの実施形態では、認識配列は、B型肝炎ウイルスの少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は少なくとも6つの遺伝子型のORF内にある。そのような一実施形態では、認識配列は、HBV遺伝子型A(配列番号3)のORF内にあるか、認識配列、及びHBVの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は少なくとも6つの他の遺伝子型を含むその単離体である。様々な実施形態において、更なるHBV遺伝子型は、遺伝子型B、C、D、E、F、及び/若しくはG(それぞれ配列番号4~9)、又は本明細書に記載の1以上のHBV認識配列を含むその単離体を含み得る。

10

20

【0049】

いくつかの実施形態において、医薬組成物の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ又は医薬組成物の核酸配列によってコードされるものは、ポリメラーゼ(P)タンパク質、大表面(pres1/pres2/S)タンパク質、中表面(pres2/S)タンパク質、及び小表面(S)タンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする、少なくとも1つのORF内の認識配列に対する特異性を有する。いくつかの実施形態では、認識配列は配列番号10、12、14、又は16を含み得る。

30

【0050】

一実施形態において、本明細書に開示されている遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする医薬組成物の核酸配列は、本明細書に記載されているmRNAであり得る。いくつかのそのような実施形態において、mRNAは、本明細書に記載のポリシストロニックmRNAであり得、その結果、本明細書に記載の2以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、インビボで標的細胞において発現される。

【0051】

別の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に開示されている遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む本明細書に記載される組換えDNA構築物を含む。いくつかのそのような実施形態では、組換えDNA構築物は、プロモータと、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むカセットを含む。他の実施形態では、医薬組成物の組換えDNA構築物は、2以上のカセットを含み、各カセットがプロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含み、各遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、本明細書に開示の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する。特定の実施形態において、医薬組成物の組換えDNA構築物は、2つのカセット、3つのカセット、4つのカセット、又はそれ以上を含み得る。

40

【0052】

他の実施形態では、医薬組成物の組換えDNA構築物は、プロモータ及びポリシストロニック核酸配列を含むカセットを含み、プロモータが、ポリシストロニック核酸配列の発

50



現を駆動して、標的細胞においてインビボで本明細書に記載のポリシストロニック mRNA を生成し、本明細書に記載の 2 以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが標的細胞において発現されるようにする。

【 0 0 5 3 】

別の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に開示されている遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含むウイルスベクターを含む。そのような一実施形態では、ウイルスベクターはレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、又は AAV であり得る。特定の実施形態では、ウイルスベクターは組換え AAV ベクターであり得る。

【 0 0 5 4 】

いくつかのそのような実施形態では、ウイルスベクターは、プロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むカセットを含む。他の実施形態では、ウイルスベクターは、2 以上のカセットを含み、各カセットがプロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含み、各遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、本明細書に開示の異なる HBV 認識配列に対する特異性を有する。

【 0 0 5 5 】

他のそのような実施形態では、ウイルスベクターは、プロモータ及びポリシストロニック核酸配列を含む 1 つのカセットを含み、プロモータが、ポリシストロニック核酸配列の発現を駆動して、標的細胞においてインビボで、本明細書に記載のポリシストロニック mRNA を生成し、本明細書に記載の 2 以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが標的細胞において発現されるようにする。

【 0 0 5 6 】

そのような一実施形態では、医薬組成物は、配列番号 10 を認識して切断する、本明細書に開示の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（又はそれをコードする核酸）を含むことができる。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号 18 ~ 21 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み得る。

【 0 0 5 7 】

別の実施形態では、医薬組成物は、配列番号 12 を認識して切断する、本明細書に開示の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（又はそれをコードする核酸）を含むことができる。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号 22 ~ 28 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み得る。

【 0 0 5 8 】

別の実施形態では、医薬組成物は、配列番号 14 を認識して切断する、本明細書に開示の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（又はそれをコードする核酸）を含むことができる。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号 29 ~ 32 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み得る。

【 0 0 5 9 】

別の実施形態では、医薬組成物は、配列番号 16 を認識して切断する、本明細書に開示の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（又はそれをコードする核酸）を含むことができる。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号 33 ~ 39 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み得る。

【 0 0 6 0 】

様々な実施形態において、医薬組成物は、本明細書に記載の 2 以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質を含むことができ、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書に記載の異なる HBV 認識配列に対する特異性を有する。他の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする 2 以上の核酸を含むことができ、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書に記載の異なる HBV 認識配列に対する特異性を有する。そのような実施形態では、2 以上の核酸は、本明細書に記載の mRNA、本明細書に記載の組換え DNA 構築物、及び / 又は本明細書に

10

20

30

40

50

記載のウイルスベクターに含まれ得る。他の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の1以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質、及び本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする1以上の核酸（即ち、mRNA、組換えDNA構築物、又はウイルスベクター）を含み得、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ及びコードされる遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書に記載された異なるHBV認識配列に対して特異性を有する。

【0061】

更なる実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質の組み合わせ、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸の組み合わせ（即ち、mRNA、組換えDNA構築物、ウイルスベクター）、又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質と遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質をコードする核酸の組み合わせを含み得、医薬組成物の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ及び/又はコードされた遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの組み合わせは、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、F、及びG（配列番号3～9）のそれぞれにおける認識配列、並びに本明細書に記載のHBV認識配列を含む各遺伝子型の単離体を認識して切断することができる。

【0062】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、脂質ナノ粒子内に封入された本明細書に記載の1又は複数のmRNAを含むことができる。特定の実施形態において、医薬組成物の脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをそれぞれコードする、本明細書に記載の2以上のmRNAを含み得る。特定の実施形態で、脂質ナノ粒子は、それぞれが異なるHBV認識配列に対して特異性を有する本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする、本明細書に記載の2つ、3つ、又は4つのmRNAを含み得る。他の実施形態では、医薬組成物の脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する本発明の2以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをそれぞれコードする、本明細書に記載の1以上のポリシストロニックmRNAを含み得る。特定の実施形態で、脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の2つ、3つ、又は4つの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするポリシストロニックmRNAを含むことができる。他の特定の実施形態で、脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の2以上のポリシストロニックmRNAを含むことができ、各々本発明の2以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、肝臓、特に肝細胞内での送達及び取り込みを増強する組成を有する。

【0063】

別の態様において、本発明は、HBVを有する対象を治療するための方法を提供する。同様に、本明細書で提供されるのは、HBVのレベル及び/又は増殖を減少させるため、あるいはHBVに関連する症状を減少させるための方法である。方法は、対象の標的細胞に、(a) 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸であって、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが標的細胞においてインピボで発現される核酸、又は(b) 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質を送達することを含み、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのORF中の認識配列に対する特異性を有し、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、認識配列を認識して切断し、そのため標的細胞のHBVゲノムを切断する。この方法は、対象におけるHBVの感染及び/又は増殖を減少又は排除することができる。

【0064】

別の態様において、本発明は、HBVによって引き起こされたHCCを有する対象を治療するための方法を提供する。方法は、対象の標的細胞に、(1) (a) 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸であって、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが標的細胞においてインピボで発現される核酸、又は(b) 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質、及び(2) 自殺遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列及びメガヌクレ

10

20

30

40

50

アーゼ切断部位に隣接する配列と相同な配列を含む核酸を送達することを含み、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのORF中の認識配列に対する特異性を有し、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、認識配列を認識して切断し、そのため標的細胞のHBVゲノムを切断し、自殺遺伝子は、相同組換えによって切断されたHBVゲノムに挿入され、自殺遺伝子の発現は標的細胞を死滅させる。

**【0065】**

いくつかの実施形態では、自殺遺伝子は標的細胞に対して直接致死性である。いくつかのそのような態様において、直接致死性な自殺遺伝子は、毒性ポリペプチド又はアポトーシス促進タンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、自殺遺伝子は標的細胞に対して間接致死性であり、標的細胞を死滅させるように対象自身の免疫系に指示する。いくつかのそのような態様において、間接致死性な自殺遺伝子は、対象の免疫系によって異物であると認識され、体液性又は細胞性免疫応答によって標的化される細胞表面タンパク質をコードする。他のそのような実施形態において、間接致死性な自殺遺伝子は、MHCクラスI分子によって提示され、対象の免疫系によって異物であると認識され、細胞傷害性免疫応答によって標的化されるポリペプチドをコードする。

10

**【0066】**

HBV感染又はHCCの治療方法のいくつかの実施形態では、認識配列は少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は少なくとも6つの遺伝子型のB型肝炎ウイルスのORF内に見られる。そのような一実施形態では、認識配列はB型肝炎ウイルスの遺伝子型A（配列番号3）のORF内にある。そのような実施形態は、配列番号3と異なるが本明細書に記載の1又は複数のHBVメガヌクレアーゼ認識配列を含む、遺伝子型AのB型肝炎ウイルス単離体を含む。更なるそのような態様において、認識配列は遺伝子型AのORF並びに遺伝子型B、C、D、E、F、及びG（それぞれ配列番号4～9）の1又は複数のORF内にある。そのような実施形態は、配列番号3～9と異なるが本明細書に記載の1又は複数のHBVメガヌクレアーゼ認識配列を含む、遺伝子型A、B、C、D、E、F、及びGのB型肝炎ウイルス単離体を含む。

20

**【0067】**

HBV感染又はHCCの治療方法のそのような実施形態において、認識配列は、ポリメラーゼ（P）タンパク質、大表面（preS1/preS2/S）タンパク質、中表面（preS2/S）タンパク質、及び小表面（S）タンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする、少なくとも1つのORF内にあってよい。いくつかの実施形態において、認識配列は、配列番号10（即ち、HBV1-2認識配列）、配列番号12（即ち、HBV5-6認識配列）、配列番号14（即ち、HBV7-8認識配列）、又は配列番号16（即ち、HBV11-12認識配列）を含み得る。

30

**【0068】**

HBV感染症又はHCCの治療方法の特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質又はコードされた遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼである。

**【0069】**

更なる実施形態において、HBV感染又はHCCの治療方法は、少なくとも、医薬的に許容される担体、及び（a）本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸であって、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが標的細胞においてインピボで発現される核酸、又は（b）本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼタンパク質を含む本明細書に記載の本発明の任意の医薬組成物を対象に投与することを含む。

40

**【0070】**

HBV感染又はHCCの治療方法のいくつかの実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸を標的肝細胞の細胞に送達することができる。特定の実施形態では、有効量の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸を、標的肝細胞の細胞に送

50

達することができる。

【0071】

特定の実施形態では、肝細胞の細胞への送達はエクスピボで生じ、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸が送達された有効量の肝細胞の細胞が、対象に投与される。

【0072】

いくつかの実施形態では、肝毒性タンパク質、又は肝毒性タンパク質をコードする核酸若しくはAAVが、本明細書に開示されている医薬組成物と共に投与される。

【0073】

本方法の特定の実施形態では、第1の認識配列は配列番号10を含み得る。いくつかのそのような実施形態において、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号10を認識し切断する本発明のいずれかの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号18～21のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含み得る。

10

【0074】

方法の別の実施形態では、第1の認識配列は配列番号12を含み得る。いくつかのそのような実施形態において、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号12を認識し切断する本発明のいずれかの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号22～28のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含み得る。

20

【0075】

方法の他の実施形態では、第1の認識配列は配列番号14を含み得る。いくつかのそのような実施形態において、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号14を認識し切断する本発明のいずれかの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号29～32のいずれか1つのアミノ酸配列を含み得る。

【0076】

方法の他の実施形態では、第1の認識配列は配列番号16を含み得る。いくつかのそのような実施形態において、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号16を認識し切断する本発明のいずれかの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、配列番号33～39のいずれか1つのアミノ酸配列を含み得る。

30

【0077】

本方法の特定の実施形態では、対象はヒト等の哺乳動物であり得る。

【0078】

別の態様では、本発明は医薬品として使用するための本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを提供する。本発明は更に、HBVを治療するため、HBVのレベル若しくは増殖を減少させるため、HBVに関連する症状を減少させるため、又はHCCを治療するための医薬品の製造において、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを使用することを提供する。

40

【0079】

別の態様では、本発明は医薬品として使用するための単離されたポリヌクレオチドを提供し、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書に開示されている遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む。本発明は更に、HBVを治療するため、HBVのレベル若しくは増殖を減少させるため、HBVに関連する症状を減少させるため、又はHCCを治療するための医薬品の製造において、単離されたポリヌクレオチドを使用することを提供する。

【0080】

別の態様では、本発明は、医薬品として使用するための組換えAAVベクターを提供し、組換えAAVベクターは単離されたポリヌクレオチドを含み、単離されたポリヌクレオ

50

チドは本明細書に開示の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む。本発明は更に、HBVを治療するため、HBVのレベル若しくは増殖を減少させるため、HBVに関連する症状を軽減するため、又はHCCを治療するための医薬品の製造において組換えAAVベクターを使用することを提供し、組換えAAVベクターは、単離されたポリヌクレオチドを含み、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書に開示されている遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む。

#### 【0081】

本発明の前述及び他の態様及び実施形態は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲を参照することによって、より十分に理解することができる。明確にするために別々の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴は、単一の実施形態において組み合わせて提供することもできる。実施形態の全ての組み合わせは、本発明によって具体的に包含され、あたかもそれぞれの、また全ての組み合わせが個別に且つ明示的に開示されているかのように、本明細書に開示されている。逆に、簡潔にするために、単一の実施形態の文脈で説明されている本発明の様々な特徴は、別々に又は任意の適切なサブコンビネーションで提供することもできる。実施形態に列挙された特徴の全てのサブコンビネーションはまた、本発明によって具体的に包含され、あたかもそれぞれの、また全てのそのようなサブコンビネーションが本明細書に個々にそして明示的に開示されたかのように、本明細書に開示される。本明細書に開示された本発明の各態様の実施形態は、必要な変更を加えて本発明の他の各々の態様に適用される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0082】

【図1】HBVゲノムのゲノム地図を示し、全てのORFを同定する。ウイルス粒子は、各鎖の5'領域にまたがって、直接反復配列(DR1及びDR2)が隣接している凝集性の重複を有する、部分的に二本鎖のゲノム(破線で示す)を有する。遺伝子Sは、ウイルスエンベロープ内の膜貫通タンパク質である主要B型肝炎表面抗原(HBsAg)タンパク質及びそのグリコシル化パートナーをコードする。S遺伝子の上流のインフレーム配列はpre-Sドメインをコードし、これはS配列と共に翻訳されて、肝細胞感染のためのウイルス受容体を含むpre-S及びSポリペプチド(中型及び大型タンパク質)を作る。遺伝子Cはウイルスのヌクレオカプシドを形成するB型肝炎コア抗原(HBcAg)をコードする。P領域は、ウイルスの複製に必要なDNA依存性DNAポリメラーゼ活性及びRNase H活性も有するウイルス逆転写酵素をコードする。HBVはDNAウイルスであるが、プレゲノムRNA中間体を介して複製する。最後に、X遺伝子はウイルスの小さな調節タンパク質、B型肝炎x(HBx)抗原をコードする。HBxは、ウイルス遺伝子の発現及び複製を刺激し、ウイルス感染細胞を免疫介在性の破壊から保護し、肝細胞がんの発症に寄与するトランス活性化タンパク質である。

【図2】HBVゲノムの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ認識配列。A)本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼによって標的化された各認識配列は、2つの認識した半分の部位を含む。各々の認識した半分の部位は、4塩基対の中央配列によって分離された9塩基対を含む。HBV1-2認識配列(配列番号10)は、HBV1及びHBV2と呼ばれる2つの認識した半分の部位を含む。HBV5-6認識配列(配列番号12)は、HBV5及びHBV6と呼ばれる2つの認識した半分の部位を含む。HBV7-8認識配列(配列番号14)は、HBV7及びHBV8と呼ばれる2つの認識した半分の部位を含む。HBV11-12認識配列(配列番号16)は、HBV11及びHBV12と呼ばれる2つの認識した半分の部位を含む。

【図3】HBV遺伝子型Aのゲノム並びにゲノム内のHBV1-2、HBV5-6、HBV7-8、及びHBV11-12の認識配列の位置の図解。HBV1-2及びHBV5-6認識配列は両方とも、HBVゲノムの4つのORF内、P、preS1/preS2/S、preS2/S、及びSに位置している。HBV7-8及びHBV11-12認識配列はそれぞれ、ポリメラーゼをコードするORF内に位置する。

【図4】HBV遺伝子型A~GにおけるHBV認識配列のアラインメント。本発明の標的

となる認識配列は、複数のHBV遺伝子型にわたって保存されている。HBV 1 - 2 認識配列は、配列番号3に示されるHBV遺伝子型Aの残基185 ~ 206にわたり、この認識配列は遺伝子型B、C、E、F、及びGにおいて完全に保存されている。遺伝子型Dは、第1の半分の部位の-4位におけるGとTの単一ヌクレオチドの相違を含む。HBV 5 - 6 認識配列は、配列番号3に示されるHBV遺伝子型Aの残基742 ~ 763にわたり、この認識配列は遺伝子型B、C、D、E、及びGにおいて完全に保存されている。遺伝子型Fは、第1の半分の部位の-3位におけるGとCの単一ヌクレオチドの相違を含む。HBV 7 - 8 認識配列は、配列番号3に示されるHBV遺伝子型Aの残基1183 ~ 1204にわたり、この認識配列は遺伝子型B、C、D、F、及びGにおいて完全に保存されている。遺伝子型Eは、第1の半分の部位の-1位におけるGとCの単一ヌクレオチドの相違を含む。HBV 11 - 12 認識配列は、配列番号3に示されるHBV遺伝子型Aの残基1259 ~ 1280にわたり、この認識配列は遺伝子型B、C、D、E、F、及びGにおいて完全に保存されている。

10

【図5】本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは2つのサブユニットを含み、HVR 1領域を含む第1のサブユニットは第1の認識した半分の部位（例えばHBV 1、HBV 5、HBV 7、又はHBV 11）に結合し、HVR 2領域を含む第2のサブユニットは第2の認識した半分の部位（例えば、HBV 2、HBV 6、HBV 8、又はHBV 12）に結合する。遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが一本鎖メガヌクレアーゼである実施形態では、HVR 1領域を含む第1のサブユニットは、N末端又はC末端サブユニットのいずれかとして位置付けることができる。同様に、HVR 2領域を含む第2のサブユニットは、N末端又はC末端サブユニットのいずれかとして位置付けることができる。

20

【図6】B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのORFを標的とする遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを評価するためのCHO細胞におけるレポーターアッセイの概略図。本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼについて、レポーターカセットが細胞のゲノムに安定的に組み込まれているCHO細胞株が産生された。レポーターカセットは、5'から3'への順序で、SV 40早期プロモータ；GFP遺伝子の5'2/3；本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの認識配列（例えば、HBV 1 - 2 認識配列）；CHO - 23 / 24メガヌクレアーゼの認識配列（国際公開第2012 / 167192号パンフレット）；及びGFP遺伝子の3'2/3を含んだ。このカセットで安定に形質移入された細胞は、DNA切断誘導剤の非存在下ではGFPを発現しなかった。メガヌクレアーゼは、各メガヌクレアーゼをコードするプラスミドDNA又はmRNAの形質導入によって導入された。メガヌクレアーゼ認識配列のいずれかにおいてDNAの切断が誘導された場合、GFP遺伝子の重複領域は互いに組換えられて機能的GFP遺伝子を生成した。次に、メガヌクレアーゼによるゲノム切断の頻度の間接的な尺度として、GFP発現細胞の割合をフローサイトメトリーによって判定することができた。

30

【図7】CHO細胞レポーターアッセイにおける遺伝子、少なくとも2つの遺伝子型のB型肝炎ウイルスのゲノムのORF中の認識配列を認識して切断するための遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの効率。配列番号18 ~ 39に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、HBV 1 - 2 認識配列（配列番号10）、HBV 5 - 6 認識配列（配列番号12）、HBV 7 - 8 認識配列（配列番号14）又はHBV 11 - 12 認識配列（配列番号16）を標的とするように遺伝子操作され、CHO細胞レポーターアッセイにおける有効性についてスクリーニングした。示された結果は、各アッセイにおいて観察されたGFP発現細胞の割合を提供し、これは標的認識配列又はCHO - 23 / 24 認識配列を切断するための各メガヌクレアーゼの有効性を示す。陰性対照（bs）を各アッセイに更に含めた。図7A；HBV 1 - 2 認識配列を標的とするメガヌクレアーゼを示す。図7B；HBV 5 - 6 認識配列を標的とするメガヌクレアーゼを示す。図7C；HBV 7 - 8 認識配列を標的とするメガヌクレアーゼを示す。図7D；HBV 11 - 12 認識配列を標的とするメガヌクレアーゼを示す。

40

【図8】CHO細胞レポーターアッセイにおける遺伝子、少なくとも2つの遺伝子型のB型肝炎ウイルスのゲノムのORF中の認識配列を認識して切断するための遺伝子操作され

50

たメガヌクレアーゼの効率。配列番号18～39に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、HBV1-2認識配列(配列番号10)、HBV5-6認識配列(配列番号12)、HBV7-8認識配列(配列番号14)又はHBV11-12認識配列(配列番号16)を標的とするように遺伝子操作され、ヌクレオフェクション後12日にわたる複数の時点でCHO細胞レポーターアッセイにおける有効性についてスクリーニングした。示された結果は、12日間の分析期間にわたって各アッセイにおいて観察されたGFP発現細胞のパーセンテージを提供し、これは時間の関数として標的認識配列又はCHO-23/24認識配列を切断するための各メガヌクレアーゼの有効性を示す。図8A; HBV1-2認識配列を標的とするメガヌクレアーゼを示す。図8B; HBV5-6認識配列を標的とするメガヌクレアーゼを示す。図8C; HBV7-8認識配列を標的とするメガヌクレアーゼを示す。図8D; HBV11-12認識配列を標的とするメガヌクレアーゼを示す。

10

【図9】HBVメガヌクレアーゼの、大腸菌レポーターシステムにおいてエピソームDNAプラスミド内の認識配列を認識して切断する能力についての評価。図9A; プラスミドpARCUS及びプラスミドpHBVaを示す。図9B; 各選択プレートに存在するコロニーの数を示しており、HBVメガヌクレアーゼがpHBVaプラスミドを切断し得る証拠が得られた。

【図10】AD38細胞におけるHBVメガヌクレアーゼの評価。HBVゲノムを発現し、HBsAgを分泌するAD38細胞を、HBV5-6x.33又はHBV11-12x.26メガヌクレアーゼをコードするプラスミドDNAで形質移入した。この実験では、対照として、赤色蛍光タンパク質をコードするプラスミドDNAを使用した。形質移入後3日目及び7日目に、細胞の上清を回収し、ELISAによってHBsAgの存在についてアッセイした。

20

【図11】AD38細胞におけるHBVメガヌクレアーゼの評価。HBVゲノムを発現し、HBsAgを分泌するAD38細胞を、HBV5-6x.33メガヌクレアーゼ又はHBV11-12x.26メガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスで形質導入するか、その2つの組み合わせで形質導入した。この実験では、対照として、赤色蛍光タンパク質をコードするレンチウイルスを使用した。1、2、及び4のMOIを調べた。形質導入後7日目に、細胞の上清を回収し、ELISAによりHBsAgの存在についてアッセイした。

30

【図12】AD38細胞におけるHBVメガヌクレアーゼの評価。HBVゲノムを発現し、HBsAgを分泌するAD38細胞を、HBV5-6x.33メガヌクレアーゼ(LV224)、HBV11-12x.26メガヌクレアーゼ(LV225)、又は赤色蛍光タンパク質(LV212)をコードするレンチウイルスで形質導入した。4のMOIを調べ、形質導入後7日目に細胞上清を回収し、HBsAgの存在及び細胞外HBVDNAのコピー数についてアッセイした。更に、細胞溶解物を形質導入後7日目に得て、HBVcccDNAの細胞内のコピー数について分析した。図12A; 細胞培養培地中のHBsAg濃度を示す。図12B; 細胞培養培地中の細胞外HBVDNAのコピー数を示す。図12C; 細胞溶解物中の細胞内HBVcccDNAコピー数を示す。

【図13】HBV感染初代ヒト肝細胞におけるHBVメガヌクレアーゼの評価。RFP、HBV5-6x.33又はHBV11-12x.26を発現するレンチウイルスを作製し、HBV感染初代ヒト肝細胞を形質導入して、HBsAg及びHBeAgの産生に対するメガヌクレアーゼの影響を判定した。初代ヒト肝細胞を播種し、24時間後にHBVに感染させた。感染後1日目に細胞を洗浄し、24時間後(感染後2日目)に、RFP、HBV5-6x.33、HBV11-12x.26をコードするレンチウイルス、又はHBVメガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスの1:1の混合物のいずれかで形質導入した。更なる対照として、感染させた細胞をDMSOで処理した。細胞の上清を回収し、形質導入後4日目、8日目、11日目、及び13日目に培地を交換した。各時点で、HBsAg及びHBeAgをELISAにより細胞の上清で測定した。また、上清の中の細胞外DNAを感染後13日目に測定した。一般に、レンチウイルス形質導入がHBsAg又は

40

50

H B e A g のいずれかの分泌に影響を及ぼすかどうかを判断するために、R F P をコードするレンチウイルスで形質導入した細胞から得た細胞の上清を、D M S O で処理した細胞と比較した。図 1 3 A ; R F P をコードするレンチウイルスによる形質導入が、M O I 又は 1 . 2 5、2 . 5、若しくは 5 で H B s A g の発現にほとんど影響を及ぼさなかったことを示す。図 1 3 B ; R F P をコードするレンチウイルスによる形質導入が、M O I 又は 1 . 2 5、2 . 5、若しくは 5 で H B e A g の発現にほとんど影響を及ぼさなかったことを示す。図 1 3 C ; R F P をコードするレンチウイルスによる形質導入が、M O I 又は 1 . 2 5、2 . 5、若しくは 5 で H B V D N A の発現にほとんど影響を及ぼさなかったことを示す。

【図 1 4】H B V 感染初代ヒト肝細胞における H B V メガヌクレアーゼの評価。R F P、H B V 5 - 6 x . 3 3 又は H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 を発現するレンチウイルスを作製し、H B V 感染初代ヒト肝細胞を形質導入して、H B s A g 及び H B e A g の産生に対するメガヌクレアーゼの影響を判定した。初代ヒト肝細胞を播種し、2 4 時間後に H B V に感染させた。感染後 1 日目に細胞を洗浄し、2 4 時間後（感染後 2 日目）に、R F P、H B V 5 - 6 x . 3 3、H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 をコードするレンチウイルス、又は H B V メガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスの 1 : 1 の混合物のいずれかで形質導入した。更なる対照として、感染させた細胞を D M S O で処理した。細胞の上清を回収し、形質導入後 4 日目、8 日目、1 1 日目、及び 1 3 日目に培地を交換した。各時点で、H B s A g 及び H B e A g を E L I S A により細胞の上清で測定した。図 1 4 A ; 2 . 5 の M O I での形質導入後の細胞培養培地における H B s A g を示す。図 1 4 B ; 1 . 2 5 の M O I での形質導入後の細胞培養培地における H B s A g を示す。図 1 4 C ; 2 . 5 の M O I での形質導入後の細胞培養培地における H B e A g を示す。図 1 4 D ; 1 . 2 5 の M O I での形質導入後の細胞培養培地における H B e A g を示す。

【図 1 5】脂質ナノ粒子封入 m R N A の肝臓への送達。マウスの肝臓で発現されるマウス C M P - N e u A c ヒドロラーゼ ( C m a h ) 遺伝子の認識配列に対して特異性を有する遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを発現させた。C m a h メガヌクレアーゼをコードする A R C A でキャップされた m R N A を、3 つの異なる市販の L N P 製剤に封入した。L N P 封入 m R N A を、I V 注射により C D - 1 マウスに投与し、6 日後に肝臓を採取した。全肝臓ゲノム D N A ( g D N A ) を単離し、C m a h 遺伝子における挿入 / 欠失 ( インドル ) 突然変異の頻度を、T 7 エンドヌクレアーゼ I ( T 7 E ) アッセイ及びディープシーケンシングを用いて判定した。

【 0 0 8 3 】

配列の簡単な説明

配列番号 1 は、緑藻クラミドモナスからの野生型 I - C r e I メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 4 】

配列番号 2 は、L A G L I D A D G のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 5 】

配列番号 3 は、H B V 遺伝子型 A のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 6 】

配列番号 4 は、H B V 遺伝子型 B のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 7 】

配列番号 5 は、H B V 遺伝子型 C のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 8 】

配列番号 6 は、H B V 遺伝子型 D のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 9 】

配列番号 7 は、H B V 遺伝子型 E のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 9 0 】

配列番号 8 は、H B V 遺伝子型 F のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50



- 配列番号 9 は、HBV 遺伝子型 G のアミノ酸配列を示す。
- 【0092】
- 配列番号 10 は、HBV 1 - 2 認識配列（センス）のアミノ酸配列を示す。
- 【0093】
- 配列番号 11 は、HBV 1 - 2 認識配列（アンチセンス）のアミノ酸配列を示す。
- 【0094】
- 配列番号 12 は、HBV 5 - 6 認識配列（センス）のアミノ酸配列を示す。
- 【0095】
- 配列番号 13 は、HBV 5 - 6 認識配列（アンチセンス）のアミノ酸配列を示す。
- 【0096】
- 配列番号 14 は、HBV 7 - 8 認識配列（センス）のアミノ酸配列を示す。
- 【0097】
- 配列番号 15 は、HBV 7 - 8 認識配列（アンチセンス）のアミノ酸配列を示す。
- 【0098】
- 配列番号 16 は、HBV 11 - 12 認識配列（センス）のアミノ酸配列を示す。
- 【0099】
- 配列番号 17 は、HBV 11 - 12 認識配列（アンチセンス）のアミノ酸配列を示す。
- 【0100】
- 配列番号 18 は、HBV 1 - 2 x . 2 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0101】
- 配列番号 19 は、HBV 1 - 2 x . 14 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0102】
- 配列番号 20 は、HBV 1 - 2 x . 68 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0103】
- 配列番号 21 は、HBV 1 - 2 x . 93 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0104】
- 配列番号 22 は、HBV 5 - 6 x . 33 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0105】
- 配列番号 23 は、HBV 5 - 6 x . 84 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0106】
- 配列番号 24 は、HBV 5 - 6 x . 90 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0107】
- 配列番号 25 は、HBV 5 - 6 x . 4 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0108】
- 配列番号 26 は、HBV 5 - 6 x . 5 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0109】
- 配列番号 27 は、HBV 5 - 6 x . 68 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0110】
- 配列番号 28 は、HBV 5 - 6 x . 79 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0111】
- 配列番号 29 は、HBV 7 - 8 x . 2 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0112】
- 配列番号 30 は、HBV 7 - 8 x . 9 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0113】
- 配列番号 31 は、HBV 7 - 8 x . 17 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0114】
- 配列番号 32 は、HBV 7 - 8 x . 44 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0115】
- 配列番号 33 は、HBV 11 - 12 x . 26 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。
- 【0116】

10

20

30

40

50

- 配列番号 34 は、HBV 11 - 12 x . 9 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。  
【0117】
- 配列番号 35 は、HBV 11 - 12 x . 13 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。  
【0118】
- 配列番号 36 は、HBV 11 - 12 x . 16 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。  
【0119】
- 配列番号 37 は、HBV 11 - 12 x . 27 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。  
【0120】
- 配列番号 38 は、HBV 11 - 12 x . 41 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。  
【0121】
- 配列番号 39 は、HBV 11 - 12 x . 48 メガヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。  
【0122】
- 配列番号 40 は、HBV 1 - 2 x . 2 メガヌクレアーゼ HBV 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0123】
- 配列番号 41 は、HBV 1 - 2 x . 14 メガヌクレアーゼ HBV 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0124】
- 配列番号 42 は、HBV 1 - 2 x . 68 メガヌクレアーゼ HBV 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0125】
- 配列番号 43 は、HBV 1 - 2 x . 93 メガヌクレアーゼ HBV 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0126】
- 配列番号 44 は、HBV 1 - 2 x . 2 メガヌクレアーゼ HBV 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0127】
- 配列番号 45 は、HBV 1 - 2 x . 14 メガヌクレアーゼ HBV 2 - 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0128】
- 配列番号 46 は、HBV 1 - 2 x . 68 メガヌクレアーゼ HBV 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0129】
- 配列番号 47 は、HBV 1 - 2 x . 93 メガヌクレアーゼ HBV 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0130】
- 配列番号 48 は、HBV 5 - 6 x . 33 メガヌクレアーゼ HBV 5 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0131】
- 配列番号 49 は、HBV 5 - 6 x . 84 メガヌクレアーゼ HBV 5 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0132】
- 配列番号 50 は、HBV 5 - 6 x . 90 メガヌクレアーゼ HBV 5 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0133】
- 配列番号 51 は、HBV 5 - 6 x . 4 メガヌクレアーゼ HBV 5 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。  
【0134】
- 配列番号 52 は、HBV 5 - 6 x . 5 メガヌクレアーゼ HBV 5 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

10

20

30

40

50

## 【0135】

配列番号53は、HBV5-6x.68メガヌクレアーゼHBV5結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0136】

配列番号54は、HBV5-6x.79メガヌクレアーゼHBV5結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0137】

配列番号55は、HBV5-6x.33メガヌクレアーゼHBV6結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0138】

配列番号56は、HBV5-6x.84メガヌクレアーゼHBV6結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0139】

配列番号57は、HBV5-6x.90メガヌクレアーゼHBV6結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0140】

配列番号58は、HBV5-6x.4メガヌクレアーゼHBV6結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0141】

配列番号59は、HBV5-6x.5メガヌクレアーゼHBV6結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0142】

配列番号60は、HBV5-6x.68メガヌクレアーゼHBV6結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0143】

配列番号61は、HBV5-6x.79メガヌクレアーゼHBV6結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0144】

配列番号62は、HBV7-8x.2メガヌクレアーゼHBV7結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0145】

配列番号63は、HBV7-8x.9メガヌクレアーゼHBV7結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0146】

配列番号64は、HBV7-8x.17メガヌクレアーゼHBV7結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0147】

配列番号65は、HBV7-8x.44メガヌクレアーゼHBV7結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0148】

配列番号66は、HBV7-8x.2メガヌクレアーゼHBV8結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0149】

配列番号67は、HBV7-8x.9メガヌクレアーゼHBV8結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0150】

配列番号68は、HBV7-8x.17メガヌクレアーゼHBV8-結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

## 【0151】

配列番号69は、HBV7-8x.44メガヌクレアーゼHBV8結合サブユニットの

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を示す。

【 0 1 5 2 】

配列番号 7 0 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 2 6 メガヌクレアーゼ HBV 1 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 5 3 】

配列番号 7 1 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 9 メガヌクレアーゼ HBV 1 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 5 4 】

配列番号 7 2 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 1 3 メガヌクレアーゼ HBV 1 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 5 5 】

配列番号 7 3 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 1 6 メガヌクレアーゼ HBV 1 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 5 6 】

配列番号 7 4 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 2 7 メガヌクレアーゼ HBV 1 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 5 7 】

配列番号 7 5 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 4 1 メガヌクレアーゼ HBV 1 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 5 8 】

配列番号 7 6 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 4 8 メガヌクレアーゼ HBV 1 1 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 5 9 】

配列番号 7 7 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 2 6 メガヌクレアーゼ HBV 1 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 0 】

配列番号 7 8 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 9 メガヌクレアーゼ HBV 1 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 1 】

配列番号 7 9 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 1 3 メガヌクレアーゼ HBV 1 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 2 】

配列番号 8 0 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 1 6 メガヌクレアーゼ HBV 1 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 3 】

配列番号 8 1 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 2 7 メガヌクレアーゼ HBV 1 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 4 】

配列番号 8 2 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 4 1 メガヌクレアーゼ HBV 1 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 5 】

配列番号 8 3 は、HBV 1 1 - 1 2 x . 4 8 メガヌクレアーゼ HBV 1 2 結合サブユニットのアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 6 】

配列番号 8 4 は、第 1 の半分の部位の - 4 位での G から C への置換を伴う HBV 遺伝子型 A の HBV 1 - 2 認識配列に対応する、HBV 遺伝子型 D に存在する認識配列の核酸配列を示す。

【 0 1 6 7 】

配列番号 8 5 は、第 1 の半分の部位の - 3 位にて G から C への置換を伴う HBV 遺伝子型 A の HBV 5 - 6 認識配列に対応する、HBV 遺伝子型 F に存在する認識配列の核酸配

10

20

30

40

50

列を示す。

【 0 1 6 8 】

配列番号 8 6 は、第 1 の半分の部位の - 1 位にて C から T への置換を伴う H B V 遺伝子型 A の H B V 7 - 8 認識配列に対応する、H B V 遺伝子型 E に存在する認識配列の核酸配列を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 1 6 9 】

1 . 1 基準及び定義

【 0 1 7 0 】

本明細書で言及している特許及び科学文献は、当業者に利用可能な知識を確立する。本明細書に引用されている、発行された米国特許、許可出願、公開された外国出願、及び GenBank データベースの配列を含む参考文献は、あたかも各々が具体的且つ個別に参照により組み込まれることが示されているような程度で、参照により本明細書に組み込まれる。 10

【 0 1 7 1 】

本発明は様々な形で具現化することができ、本明細書に記載の実施形態に限定されるものと解釈されるべきではない。むしろ、本開示が徹底的且つ完全なものであり、本発明の範囲を当業者に十分に伝えるようにするために、これらの実施形態が提供されている。例えば、一実施形態に関して例示した特徴を他の実施形態に組み込むことができ、特定の実施形態に関して例示した特徴を、当該の実施形態から削除することができる。更に、本明細書で示唆している実施形態に対する多数の変形及び追加は、本開示からみて当業者には明らかであり、それらは本発明から逸脱しない。 20

【 0 1 7 2 】

他に定義されない限り、本明細書で使用している全ての専門用語及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。本明細書の本発明の説明で使用している専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、本発明を限定することを意図してはいない。

【 0 1 7 3 】

本明細書に記載の全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。 30

【 0 1 7 4 】

本明細書で使用しているとき、「a」、「an」、又は「the」は、1 又は複数を意味し得る。例えば、「a cell (細胞)」は、単一の細胞又は多数の細胞を意味し得る。

【 0 1 7 5 】

本明細書で使用しているとき、他に具体的に示されない限り、「又は」という語は、「及び / 又は」の包括的な意味で使用しており、「いずれか / 又は」の排他的な意味では使用していない。

【 0 1 7 6 】

本明細書で使用しているとき、「ヌクレアーゼ」及び「エンドヌクレアーゼ」の用語は、ポリヌクレオチド鎖内のホスホジエステル結合を切断する天然に存在する又は遺伝子操作された酵素について言及するために、互換的に使用されている。 40

【 0 1 7 7 】

本明細書で使用しているとき、「メガヌクレアーゼ」の用語は、1 2 塩基対より大きい認識配列で二本鎖 DNA に結合するエンドヌクレアーゼのことを示す。好ましくは、本発明のメガヌクレアーゼの認識配列は 2 2 塩基対である。メガヌクレアーゼは、I - Cre I に由来するエンドヌクレアーゼであり得、例えば、DNA の結合特異性、DNA の切断活性、DNA の結合親和性、又は二量体化の特性に関して、天然の I - Cre I に対して改変されている I - Cre I の遺伝子操作された変異体を示すことができる。そのような改変された I - Cre I の変異体を産生するための方法は、当技術分野において公知であ 50

る（例えば、国際公開第2007/047859号パンフレット）。本明細書で使用しているとき、メガヌクレアーゼは、ヘテロ二量体として二本鎖DNAに結合する。メガヌクレアーゼはまた、ペプチドリンカーを用いて一对のDNA結合ドメインが単一のポリペプチドに結合されている「一本鎖メガヌクレアーゼ」であってもよい。「ホーミングエンドヌクレアーゼ」の用語は、「メガヌクレアーゼ」という用語と同義である。本発明のメガヌクレアーゼは、細胞内で発現したとき細胞の生存率に対する有害な影響を観察せずに実質的に無毒であるか、本明細書に記載の方法を用いて測定したときにメガヌクレアーゼ切断活性の顕著な低下がある。

**【0178】**

本明細書で使用しているとき、「一本鎖メガヌクレアーゼ」の用語は、リンカーによって結合された一对のヌクレアーゼサブユニットを含むポリペプチドをいう。一本鎖メガヌクレアーゼは、N末端サブユニット-リンカー-C末端サブユニットという構成を有する。2つのメガヌクレアーゼサブユニットは一般にアミノ酸配列において同一ではなく、非同ーDNA配列を認識する。従って、一本鎖メガヌクレアーゼは、典型的には、擬似パリンδροーム認識配列又は非パリンδροーム認識配列を切断する。一本鎖メガヌクレアーゼは実際には二量体ではないが、「一本鎖ヘテロ二量体」又は「一本鎖ヘテロ二量体メガヌクレアーゼ」と呼ばれることがある。明確にするために、特に明記しない限り、「メガヌクレアーゼ」の用語は、二量体又は一本鎖メガヌクレアーゼを示すことができる。

**【0179】**

本明細書で使用しているとき、「リンカー」の用語は、2つのメガヌクレアーゼサブユニットを単一のポリペプチドに結合するために使用する外因性ペプチド配列をいう。リンカーは、天然タンパク質に見られる配列を有しても、いかなる天然タンパク質にも見られない人工的な配列であってもよい。リンカーは柔軟で二次構造を欠いていることがあり、又は生理学的条件下で特定の三次元構造を形成する傾向を有していることがある。リンカーとしては、米国特許第8,445,251号及び米国特許第9,434,931号に包含されるものを挙げることができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、リンカーは、配列番号18~39のいずれか1つの残基154~195を含むアミノ酸配列を有し得る。

**【0180】**

本明細書で使用しているとき、タンパク質に関する、「組換え」又は「遺伝子操作された」の用語は、タンパク質をコードする核酸、及びタンパク質を発現する細胞又は生物へ遺伝子工学技術を適用した結果として、改変させたアミノ酸配列を有することを意味する。核酸に関する、「組換え」又は「遺伝子操作された」の用語は、遺伝子工学技術を適用した結果として、改変させた核酸配列を有することを意味する。遺伝子工学技術としては、PCR及びDNAクローニング技術；形質移入、形質転換、及び他の遺伝子導入技術；相同組換え；部位特異的変異誘発；並びに遺伝子融合が挙げられるが、これらに限定されない。この定義によれば、天然に存在するタンパク質と同一のアミノ酸配列を有するが、異種の宿主におけるクローニング及び発現によって産生されるタンパク質は、組換えとは見なされない。

**【0181】**

本明細書で使用しているとき、「野生型」の用語は、同じ型の遺伝子の対立遺伝子集団において最も一般的な、天然に存在する対立遺伝子（即ち、ポリヌクレオチド配列）をいい、この場合野生型対立遺伝子によってコードされるポリペプチドは、その本来の機能を有する。「野生型」の用語はまた、野生型対立遺伝子によってコードされるポリペプチドも示す。野生型対立遺伝子（即ち、ポリヌクレオチド）及びポリペプチドは、野生型配列に対して1又は複数の突然変異及び/又は置換を含む突然変異型又は変異型の対立遺伝子及びポリペプチドと、区別可能である。野生型対立遺伝子又はポリペプチドは生物に正常な表現型を付与することができるが、突然変異型又は変異型の対立遺伝子又はポリペプチドは、場合によっては、変化した表現型を付与することができる。野生型ヌクレアーゼは、組換えヌクレアーゼ又は天然に存在しないヌクレアーゼと区別可能である。「野生型」

10

20

30

40

50

の用語はまた、特定の遺伝子の野生型対立遺伝子を有する細胞、生物、及び/又は対象、あるいは比較する目的のために使用する細胞、生物、及び/又は対象を示すことができる。

【0182】

本明細書で使用しているとき、「遺伝子改変」の用語は、細胞又は生物において、あるいはその先祖において、ゲノムDNA配列が組換え技術によって意図的に改変されている細胞又は生物をいう。本明細書で使用しているとき、「遺伝子改変」の用語は、「トランスジェニック」という用語を包含する。

【0183】

組換えタンパク質に関して本明細書で使用しているとき、「改変」の用語は、参照配列（例えば、野生型又は天然の配列）に対する組換え配列のアミノ酸残基の任意の挿入、欠失、又は置換を意味する。

【0184】

本明細書で使用しているとき、「認識配列」の用語は、エンドヌクレアーゼによって結合及び切断されるDNA配列をいう。メガヌクレアーゼの場合、認識配列は、4塩基対によって分離されている一对の反転した9塩基対の「半分の部位」を含む。一本鎖メガヌクレアーゼの場合、タンパク質のN末端ドメインが第1の半分の部位と接触し、タンパク質のC末端ドメインが第2の半分の部位と接触する。メガヌクレアーゼによる切断は、4塩基対の3'の「オーバーハング」を生じる。「オーバーハング」又は「粘着性の末端」は、二本鎖DNA配列のエンドヌクレアーゼの切断によって産生され得る短い一本鎖DNAセグメントである。I-CreI由来のメガヌクレアーゼ及び一本鎖メガヌクレアーゼの場合、オーバーハングは22塩基対認識配列の10~13塩基を含む。

【0185】

本明細書で使用しているとき、「標的部位」又は「標的配列」の用語は、ヌクレアーゼの認識配列を含む細胞の染色体DNAの領域をいう。

【0186】

本明細書で使用しているとき、「DNA結合親和性」又は「結合親和性」の用語は、メガヌクレアーゼが参照DNA分子と非共有結合で会合する傾向（例えば、認識配列又は任意の配列）を意味する。結合親和性は解離定数 $K_d$ によって測定される。本明細書で使用しているとき、参照認識配列に対するヌクレアーゼの $K_d$ が、参照ヌクレアーゼに対して統計的に有意な（ $p < 0.05$ ）量だけ増加又は減少する場合、ヌクレアーゼは「変化した」結合親和性を有する。

【0187】

本明細書で使用しているとき、「特異性」の用語は、認識配列と呼ばれる特定の塩基対の配列においてのみ、又は特定の認識配列の組においてのみ、メガヌクレアーゼが二本鎖DNA分子を認識して切断できることを意味する。認識配列の組は、特定の保存された位置又は配列のモチーフを共有するが、1以上の位置で変性している場合もある。非常に特異的なメガヌクレアーゼは、1つのみ又はごく少数の認識配列を切断することができる。特異性は当技術分野において公知の任意の方法により判断することができる。本明細書で使用しているとき、メガヌクレアーゼが、生理学的条件下で参照メガヌクレアーゼ（例えば野生型）に結合せずまた切断されない認識配列に、結合及び切断する場合、又は認識配列の切断の速さが、参照メガヌクレアーゼと比較して生物学的に顕著な量（例えば、少なくとも2倍、又は2倍~10倍）増加又は減少する場合、メガヌクレアーゼは「改変した」特異性を有する。

【0188】

本明細書で使用しているとき、「相同組換え」又は「HR」の用語は、修復テンプレートとして相同DNA配列を使用して二本鎖DNAの切断が修復される自然の細胞のプロセスをいう（例えば、Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976を参照）。相同DNA配列は、内因性染色体配列又は細胞に送達された外因性核酸であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0189】

本明細書で使用しているとき、「非相同末端結合」又は「NHEJ」の用語は、二本鎖DNAの切断が2つの非相同DNAセグメントの直接的な結合によって修復される自然の細胞のプロセスをいう（例えば、Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976を参照）。非相同末端結合によるDNAの修復には誤りがありがちで、修復部位でのDNA配列の非鋳型化（untemplated）付加又は欠失が頻繁にもたらされる。いくつかの例において、標的認識配列での切断が、標的認識部位でのNHEJを生じている。遺伝子のコード配列中の標的部位のヌクレアーゼ誘導性の切断、続くNHEJによるDNAの修復は、遺伝子の機能を破壊するフレームシフトの突然変異などの突然変異を、コード配列に導入することができる。従って、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、細胞集団の遺伝子を効果的にロックアウトするために使用できる。

10

## 【0190】

アミノ酸の配列と核酸の配列の両方に関して本明細書で使用しているとき、「パーセントの同一性」、「配列同一性」、「パーセントの類似性」、「配列の類似性」等の用語は、整列したアミノ酸の残基又はヌクレオチド間の類似性を最大限にする配列の整列、同一又は類似している残基又はヌクレオチドの数、全体の残基又はヌクレオチドの数、並びに配列の整列における空隙の存在及び長さの関数である配列の整列に基づいた、2つの配列の類似性の程度の尺度を示す。標準的なパラメータを使用して配列の類似性を判断するための様々なアルゴリズム及びコンピュータプログラムが利用可能である。本明細書で使用しているとき、配列の類似性は、アミノ酸の配列についてのBLASTpプログラム、及び核酸の配列についてのBLASTnプログラムを使用して測定され、これらは両方とも、国立生物工学情報センター（www.ncbi.nlm.nih.gov/）を通して利用でき、例えば、Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish and States (1993), Nature Genet. 3:266-272; Madden et al. (1996), Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang et al. (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2):203-14に記載されている。本明細書で使用しているとき、2つのアミノ酸配列のパーセントの類似性は、BLASTpアルゴリズムについての、ワードサイズ=3、ギャップオープニングペナルティ=-11、ギャップエクステンションペナルティ=-1、スコアリングのマトリックス=BLOSUM62というパラメータに基づくスコアである。本明細書で使用しているとき、2つの核酸配列のパーセントの類似性は、BLASTnアルゴリズムについての、ワードサイズ=11、ギャップオープニングペナルティ=-5、ギャップエクステンションペナルティ=-2、マッチした報酬=1、及び mismatches のペナルティ=-3というパラメータに基づくスコアである。

20

30

## 【0191】

2つのタンパク質又はアミノ酸の配列の改変に関して本明細書で使用している場合、「対応する」の用語は、第1のタンパク質における特定の改変が第2のタンパク質における改変と同じアミノ酸残基の置換であること、及び第1のタンパク質における改変のアミノ酸の位置が、2つのタンパク質が標準的な配列の整列に曝されたとき（例えば、BLASTpプログラムを使用したとき）に、第2のタンパク質の改変のアミノ酸の位置と対応しているか整列していることを示すために使用される。従って、残基X及びYが配列の整列において互いに対応している場合、XとYが異なる数であり得るという事実にもかかわらず、第1のタンパク質における残基「X」のアミノ酸「A」への改変は、第2のタンパク質におけるアミノ酸「A」への残基「Y」の改変に対応している。

40

## 【0192】

本明細書で使用しているとき、「認識した半分の部位」、「認識配列の半分の部位」又は単に「半分の部位」の用語は、ホモ二量体又はヘテロ二量体のメガヌクレアーゼの単量

50



体によって、あるいは一本鎖メガヌクレアーゼの1つのサブユニットによって認識される二本鎖DNA分子の核酸の配列を意味する。

【0193】

本明細書で使用しているとき、「超可変領域」の用語は、比較的高い可変性を有するアミノ酸を含む、メガヌクレアーゼの単量体又はサブユニット内の局在化された配列をいう。超可変領域は、約50～60の隣接残基、約53～57の隣接残基、又は好ましくは約56の残基を含み得る。いくつかの実施形態では、超可変領域の残基は、配列番号18～39のいずれか1つの24～79位又は215～270位に対応し得る。超可変領域は、認識配列におけるDNA塩基と接触する1以上の残基を含むことができ、単量体又はサブユニットの塩基の選択性を変えるために改変することができる。超可変領域はまた、メガヌクレアーゼが二本鎖DNA認識配列と会合するときに、DNA骨格に結合する1以上の残基を含み得る。そのような残基は、DNA骨格及び標的認識配列に対するメガヌクレアーゼの結合親和性を変えるために改変することができる。本発明の異なる実施形態では、超可変領域は、1～20個の残基を含むことができ、それは可変性を示し、塩基の選択性及び/又はDNA結合親和性に影響を及ぼすように改変することができる。いくつかの実施形態において、超可変領域内の可変残基は、配列番号18～39のいずれか1つの24位、26位、28位、30位、32位、33位、38位、40位、42位、44位、46位、49位、50位、54位、64位、68位、70位、75位、及び77位の1以上に対応する。他の実施形態では、超可変領域内の可変残基は、配列番号18～39のいずれか1つの215位、217位、219位、221位、223位、224位、229位、231位、233位、235位、237位、240位、241位、245位、255位、259位、261位、266位、及び268位の1以上に対応する。

10

20

【0194】

「組換えDNA構築物」、「組換え構築物」、「発現カセット」、「発現構築物」、「キメラ構築物」、「構築物」、及び「組換えDNA断片」の用語は、本明細書で互換的に用いられ、核酸の断片である。組換え構築物は、天然には一緒に見出さない調節及びコード配列を含むがこれらに限定されない、核酸断片の人工的な組み合わせを含む。例えば、組換えDNA構築物は、異なる供給源に由来する調節配列及びコード配列、又は同じ供給源に由来して天然に見出せる様式とは異なる様式で配置されている調節配列及びコード配列を含み得る。そのような構築物はそれ自体で使用しても、ベクターと共に使用してもよい。

30

【0195】

本明細書で使用しているとき、「ベクター」又は「組換えDNAベクター」は、複製のシステム、及び所与の宿主細胞におけるポリペプチドコード化配列の転写及び翻訳が可能である配列を含む構築物であり得る。ベクターが使用される場合、ベクターの選択は、当業者に周知のように、宿主細胞を形質転換するために使用する方法に依拠する。ベクターは、制限なく、プラスミドベクター及び組換えAAVベクター、又は本発明のメガヌクレアーゼをコードする遺伝子を標的細胞に送達するのに適した、当技術分野で公知の他の任意のベクターを含み得る。当業者は、本発明の単離されたヌクレオチド又は核酸配列のいずれかを含む宿主細胞を首尾よく形質転換、選択及び増殖させるために、ベクターに存在していなければならない遺伝的な要素を十分に知っている。

40

【0196】

本明細書で使用しているとき、「ベクター」はまた、ウイルスベクターを示すことができる。ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を含み得るが、これらに限定されない。

【0197】

本明細書で使用しているとき、「ポリシストロニック」mRNAとは、2つ以上のコード配列(即ち、シストロン)を含み、2以上のタンパク質をコードする単一のメッセンジャーRNAをいう。ポリシストロニックmRNAは、IRES要素、T2A要素、P2A

50

要素、E2A要素、及びF2A要素を含むがこれらに限定されない、同じmRNA分子に由来する2つ以上の遺伝子の翻訳を可能にする、当技術分野において公知の任意の要素を含み得る。

【0198】

本明細書で使用しているとき、「対照」又は「対照細胞」とは、遺伝子改変細胞の遺伝子型又は表現型の変化を測定するための基準点を提供する細胞をいう。対照細胞は、例えば、(a)野生型細胞、即ち、遺伝子変化細胞をもたらした遺伝子改変用の出発材料と同じ遺伝子型のもの；(b)遺伝子改変細胞と同じ遺伝子型であるが、ヌルの構築物（即ち、対象となる形質に既知の効果を及ぼさない構築物）で形質転換された細胞；又は(c)遺伝子改変細胞と遺伝的に同一であるが、改変した遺伝子型又は表現型の発現を誘導する条件又は刺激又は更なる遺伝子改変に曝されない細胞を含み得る。

10

【0199】

2つのタンパク質又はアミノ酸の配列の改変に関して本明細書で使用している場合、「対応する」の用語は、第1のタンパク質における特定の改変が第2のタンパク質における改変と同じアミノ酸残基の置換であること、及び第1のタンパク質における改変のアミノ酸の位置が、2つのタンパク質が標準的な配列の整列に曝されたとき（例えば、BLASTpプログラムを使用したとき）に、第2のタンパク質の改変のアミノ酸の位置と対応しているか整列していることを示すために使用される。従って、残基X及びYが配列の整列において互いに対応している場合、XとYが異なる数であり得るという事実にもかかわらず、第1のタンパク質における残基「X」のアミノ酸「A」への改変は、第2のタンパク質におけるアミノ酸「A」への残基「Y」の改変に対応している。

20

【0200】

本明細書で使用しているとき、「治療」又は「対象を治療する」の用語は、少なくとも1つのHBV粒子のゲノムを切断することによってウイルスのHBV増殖速度を緩徐化又は停止させる目的で、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ、又は本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸を、HBVに感染した対象へ投与することをいう。そのような治療は、対象におけるHBVの形質移入及び複製を低減又は防止し、対象におけるHBVの1又は複数の症状を部分的又は完全に取り除く。HBV感染の症状の軽減を評価するための手段は、酵素アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)のレベルを判定すること、又は血清の転換、即ちHbeAgの消失を測定することによる、肝機能の測定を含み得る。更に、HBVの症状の軽減又は低減は、肝生検で検査し、当技術分野で周知の方法で組織線維症のレベルを測定することによって判断できる。循環ウイルス粒子の数は、例えば、PCRを用いてHBVDNAのレベルを測定することによって、又は血中のHBsAgレベルを検出することによって、判断することができる。「治療」又は「対象を治療する」の用語は更に、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸を含む細胞（例えば肝細胞）の投与を示すことができ、この場合細胞は標的組織（例えば肝臓）に送達され、対象においてHBVの感染を治療するのに十分な量で遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを産生し、それによりHBVの1以上の症状の部分的又は完全な軽減をもたらす。いくつかの態様では、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ、それをコードする核酸、又は本発明の遺伝子改変細胞は、本発明の医薬組成物の形態で、治療中に投与される。

30

40

【0201】

「B型肝炎ウイルス感染」の用語は、慢性肝疾患/障害、炎症、線維症の状態、及び肝がんをはじめとした増殖性障害等の、B型肝炎ウイルスによる感染に関連する、又は感染に起因するいずれかの状態を示す。持続性の慢性HBV感染は、疲労、肝障害、肝硬変、及び原発性肝がんである肝細胞がんを引き起こし得る。

【0202】

本明細書で使用しているとき、「増殖する」及び「増殖」の用語は、活発に分裂してヒト細胞に感染するHBV細胞を示す。従って、増殖の減少は、本明細書に開示の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ、又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸を

50

投与していない適切な対照と比較したとき少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%の減少を含む、HBVの増殖の任意の減少を示す。本願を通して、「増殖性障害」の用語は、組織の望まれない又は異常な増殖によって特徴付けられるいずれかの疾患/障害を示す。また、本明細書で使用しているとき、「増殖性障害」の用語は、細胞の調節されていない及び/又は異常な増殖が、がん性又は非がん性であり得る望まれない状態又は疾患の発症をもたらし得る状態をいう。

#### 【0203】

「有効量」又は「治療有効量」の用語は、有益な又は望ましい生物学的及び/又は臨床的な結果をもたらすのに十分な量を示す。治療有効量は、メガヌクレアーゼ製剤又は組成物、疾患及びその重症度、並びに治療される対象の年齢、体重、健康状態、及び反応性に依りて変わる。特定の実施形態では、本明細書に開示される有効量の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ又は医薬的組成物は、HBVに感染している対象におけるHBVのレベル又は増殖を減少させるか、HBVの少なくとも1つの症状を低減させる。

10

#### 【0204】

「脂質ナノ粒子」の用語は、平均直径が10~1000ナノメートルの典型的には球形の構造を有する脂質組成物を示す。いくつかの製剤において、脂質ナノ粒子は、少なくとも1つのカチオン性脂質、少なくとも1つの非カチオン性脂質、及び少なくとも1つの複合脂質を含み得る。mRNA等の核酸を封入するのに適している、当技術分野において公知の脂質ナノ粒子が、本発明にて使用するために企図される。

20

#### 【0205】

本明細書で使用するとき、変数に対する数値範囲の記載は、その範囲内の任意の値に等しい変数で本発明を実施できることを伝えることを意図している。従って、本質的に離散的な変数については、その変数は、範囲の端点を含んだ数値範囲内の任意の整数の値に等しくなり得る。同様に、本質的に連続的な変数については、その変数は、範囲の端点を含んだ数値範囲内の任意の実数の値に等しくなり得る。限定するものではなく例として、0~2の値を有すると記載された変数は、その変数が本質的に離散的である場合には0、1又は2の値を取り得、変数が本質的に連続的である場合には、0.0、0.1、0.01、0.001の値、又は0以上2以下の他のいずれかの実数の値を取り得る。

30

#### 【0206】

### 2.1 発明の原理

#### 【0207】

本発明は、部分的に、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、HBVゲノム内のORFを切断することによってHBVのレベルを低下させる、又はHBVの増殖を遅くするために使用され得るといふ仮説に基づく。より具体的には、メガヌクレアーゼは、複数のHBV遺伝子型のゲノム内に存在する認識配列を認識して切断するように遺伝子操作することができる。従って、単一の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを利用して、HBVのレベル又は増殖を減少させたり、B型肝炎ウイルスの複数の遺伝子型のHBV感染の症状を低減させたりすることができる。

40

#### 【0208】

従って、本発明は、HBVゲノムの少なくとも2つの遺伝子型のORF内の認識配列を認識して切断する遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを包含する。また、本発明は、そのような遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを、医薬組成物中で、及びHBV感染を治療するための方法において使用する方法を包含する。更に、本発明は、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼのタンパク質、又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸を含む医薬組成物、及びHBVの感染を治療するためのそのような組成物を使用することを包含する。

#### 【0209】

### 2.2 HBVのゲノム内の認識配列を認識して切断するためのメガヌクレアーゼ

#### 【0210】

50

部位特異的ヌクレアーゼを使用してウイルスのゲノムにてDNAを切断することは可能であるという点、及びそのようなDNAの切断がNH<sub>2</sub>EJを介したゲノムの永続的な改変をもたらすことができ、その結果HBVビリオンがヒトの細胞を分裂させたり感染させることはもはやできなくなるという点は、当技術分野において公知である。従って、一実施形態では、本発明は、遺伝子操作された組換えメガヌクレアーゼを使用して実施することができる。

#### 【0211】

好ましい実施形態では、本発明を実施するために使用されるヌクレアーゼは一本鎖メガヌクレアーゼである。一本鎖メガヌクレアーゼは、リンカーペプチドによって結合されたN末端サブユニット及びC末端サブユニットを含む。2つのドメインのそれぞれは、認識配列の半分（即ち、認識した半分の部位）を認識し、DNA切断の部位は、2つのサブユニットの界面付近の認識配列の中にある。DNA鎖の切断は、4塩基対によって相殺させて、メガヌクレアーゼによるDNAの切断が一对の4塩基対、3'一本鎖オーバーハングを生成するようにする。

#### 【0212】

いくつかの例において、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、HBV1-2認識配列（配列番号10）を認識し切断するように遺伝子操作されている。HBV1-2認識配列は、複数のHBV遺伝子型のPタンパク質、S、preS2/S、及びpreS1/preS2のORFの中に位置している。HBV1-2認識配列は、遺伝子型A、B、C、E、F、及びGを含む複数のHBV遺伝子型（例えば、それぞれ配列番号3~5及び7~9）のゲノムに少なくとも見出すことができる。そのような遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書において集合的に「HBV1-2メガヌクレアーゼ」と呼ばれる。例示的なHBV1-2メガヌクレアーゼは、配列番号18~21に提供されている。

#### 【0213】

更なる例では、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、HBV5-6認識配列（配列番号12）を認識し切断するように遺伝子操作されている。HBV5-6認識配列は、複数のHBV遺伝子型のPタンパク質、S、preS2/S、及びpreS1/preS2のORFの中に位置している。HBV5-6認識配列は、遺伝子型A、B、C、D、E、及びGを含む複数のHBV遺伝子型（例えば、それぞれ配列番号3~7及び9）のゲノムに少なくとも見出すことができる。そのような遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書において集合的に「HBV5-6メガヌクレアーゼ」と呼ばれる。例示的なHBV5-6メガヌクレアーゼは、配列番号22~28に提供されている。

#### 【0214】

更なる例では、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、HBV7-8認識配列（配列番号14）を認識し切断するように遺伝子操作されている。HBV7-8認識配列は、複数のHBV遺伝子型のPタンパク質のORFの中に位置している。HBV7-8認識配列は、遺伝子型A、B、C、D、F、及びGを含む複数のHBV遺伝子型（例えば、それぞれ配列番号3~6、8、及び9）のゲノムに少なくとも見出すことができる。そのような遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書において集合的に「HBV7-8メガヌクレアーゼ」と呼ばれる。例示的なHBV7-8メガヌクレアーゼは、配列番号29~32に提供されている。

#### 【0215】

更なる例では、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、HBV11-12認識配列（配列番号16）を認識し切断するように遺伝子操作されている。HBV11-12認識配列は、複数のHBV遺伝子型のPタンパク質ORFの中に位置している。HBV11-12認識配列は、遺伝子型A、B、C、D、E、F、及びGを含む複数のHBV遺伝子型（例えば、それぞれ配列番号3~9）のゲノムに少なくとも見出すことができる。そのような遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書において集合的に「HBV11-12メガヌクレアーゼ」と呼ばれる。例示的なHBV11~12メガヌクレアーゼは、配列番号34~40に提供されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 1 6 】

本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、第1の超可変（HVR1）領域を含む第1のサブユニット及び第2の超可変（HVR2）領域を含む第2のサブユニットを含む。更に、第1のサブユニットは認識配列の第1の認識した半分の部位（例えば、HBV1、HBV5、HBV7、又はHBV11の半分の部位）に結合し、第2のサブユニットは認識配列の第2の認識した半分の部位（例えば、HBV2、HBV6、HBV8、又はHBV12の半分の部位）に結合する。遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが一本鎖メガヌクレアーゼである実施形態では、第1及び第2のサブユニットは、HVR1領域を含み第1の半分の部位と結合する第1のサブユニットが、N末端サブユニットとして位置し、HVR2領域を含み第2の半分の部位と結合する第2のサブユニットが、C末端サブユニットとして位置するように配向できる。別の実施形態では、第1及び第2のサブユニットは、HVR1領域を含み第1の半分の部位と結合する第1のサブユニットが、C末端サブユニットとして位置し、HVR2領域を含み第2の半分の部位と結合する第2のサブユニットが、N末端サブユニットとして位置するように配向できる。本発明の例示的なHBV1-2メガヌクレアーゼを表1に提示する。本発明の例示的なHBV5-6メガヌクレアーゼを表2に提示する。本発明の例示的なHBV7-8メガヌクレアーゼを表3に提示する。本発明の例示的なHBV11-12メガヌクレアーゼを表4に提示する。

10

## 【 0 2 1 7 】

表1；HBV1-2認識配列（配列番号10）を認識し切断するように遺伝子操作された例示的な遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ

20

## 【表1】

メガヌクレアーゼ	AAの配列番号	HBV1サブユニット残基	HBV1サブユニット配列番号	*HBV1サブユニット(%)	HBV2サブユニット残基	HBV2サブユニット配列番号	*HBV2サブユニット(%)
HBV 1-2x.2	18	7-153	40	100	198-344	44	100
HBV 1-2x.14	19	7-153	41	93.2	198-344	45	91.16
HBV 1-2x.68	20	198-344	42	93.2	7-153	46	91.16
HBV 1-2x.93	21	198-344	43	100	7-153	47	95.92

30

## 【 0 2 1 8 】

\*「HBV1サブユニット(%)」及び「HBV2サブユニット(%)」は、各メガヌクレアーゼのHBV1結合及びHBV2結合サブユニット領域と、HBV1-2x.2メガヌクレアーゼの各HBV1結合及びHBV2結合サブユニット領域との間のアミノ酸の配列の同一性を表す。

## 【 0 2 1 9 】

表2；HBV5-6認識配列（配列番号12）を認識し切断するように遺伝子操作された例示的な遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ

40

50

【表 2】

メガヌクレアーゼ	AA の 配列 番号	HBV サブユニット 残基	HBV5 サブユニット 配列番号	*HBV5 サブユニット (%)	HBV6 サブユニット 残基	HBV6 サブユニット 配列番号	*HBV6 サブユニット (%)
HBV5-6x.33	22	198-344	48	100	7-153	55	100
HBV5-6x.84	23	198-344	49	93.2	7-153	56	92.52
HBV5-6x.90	24	198-344	50	91.84	7-153	57	93.2
HBV5-6x.4	25	7-153	51	92.52	198-344	58	95.92
HBV5-6x.5	26	7-153	52	92.52	198-344	59	93.88
HBV5-6x.68	27	7-153	53	91.16	198-344	60	93.88
HBV5-6x.79	28	7-153	54	93.2	198-344	61	93.88

10

## 【0220】

\*「HBV5サブユニット(%)」及び「HBV6サブユニット(%)」は、各メガヌクレアーゼのHBV5結合及びHBV6結合サブユニット領域と、HBV5-6x.33メガヌクレアーゼの各HBV5結合及びHBV6結合サブユニット領域との間のアミノ酸の配列の同一性を表す。

## 【0221】

表3；HBV7-8認識配列(配列番号14)を認識し切断するように遺伝子操作された例示的な遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ

20

【表 3】

メガヌクレアーゼ	AA の 配列 番号	HBV7 サブユニット 残基	HBV7 サブユニット 配列番号	*HBV7 サブユニット (%)	HBV8 サブユニット 残基	HBV8 サブユニット 配列番号	*HBV8 サブユニット (%)
HBV7-8x.2	29	198-344	62	100	7-153	66	100
HBV7-8x.9	30	198-344	63	98.64	7-153	67	99.32
HBV7-8x.17	31	198-344	64	98.64	7-153	68	99.32
HBV7-8x.44	32	198-344	65	96.6	7-153	69	99.32

30

## 【0222】

\*「HBV7サブユニット(%)」及び「HBV8サブユニット(%)」は、各メガヌクレアーゼのHBV7結合及びHBV8結合サブユニット領域と、HBV7-8x.2メガヌクレアーゼの各HBV7結合及びHBV8結合サブユニット領域との間のアミノ酸の配列の同一性を表す。

## 【0223】

表4；HBV11-12認識配列(配列番号16)を認識し切断するように遺伝子操作された例示的な遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ

40

50

【表 4】

メガヌクレアーゼ	AA の 配列 番号	HBV11 サブユニット 残基	HBV11 サブユニット 配列番号	*HBV11 サブユニット (%)	HBV12 サブユニット 残基	HBV12 サブユニット 配列番号	*HBV12 サブユニット (%)
HBV11-12x.26	33	198-344	70	100	7-153	77	100
HBV11-12x.9	34	198-344	71	93.2	7-153	78	93.88
HBV11-12x.13	35	198-344	72	93.88	7-153	79	93.88
HBV11-12x.16	36	198-344	73	95.92	7-153	80	95.92
HBV11-12x.27	37	198-344	74	100	7-153	81	93.2
HBV11-12x.41	38	198-344	75	95.92	7-153	82	93.2
HBV11-12x.48	39	198-344	76	93.88	7-153	83	93.2

10

## 【0224】

\*「HBV11サブユニット(%)」及び「HBV12サブユニット(%)」は、各メガヌクレアーゼのHBV11結合及びHBV12結合サブユニット領域と、HBV11-12x.26メガヌクレアーゼの各HBV11結合及びHBV12結合サブユニット領域との間のアミノ酸の配列の同一性を表す。

## 【0225】

20

## 2.3 エンドヌクレアーゼの送達及び発現方法

## 【0226】

本明細書に開示されているのは、対象のHBV感染又はHCCを治療するための方法である。同様に、対象におけるHBV感染の症状の軽減及びHBVの量の減少、HBVの増殖速度の低下又はHCCの治療の方法が提供されており、医薬的に許容される担体及び本明細書に開示される遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸）を含む医薬組成物を投与することを含む。本発明の方法において、本明細書に開示されている遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをHBVゲノムに与えることができる標的細胞のDNA/RNAに送達され、及び/又はそれから発現され得る。

30

## 【0227】

本明細書に開示される遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、タンパク質の形態で、又は好ましくは遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸として、細胞内に送達され得る。そのような核酸は、DNA（例えば、環状又は線状化プラスミドDNA又はPCR産物）又はRNA（例えばmRNA）であり得る。遺伝子操作されたメガヌクレアーゼコード配列がDNAの形態で送達される実施形態について、それはヌクレアーゼ遺伝子の転写を促進するためにプロモータに作動可能に連結させるべきである。本発明に適した哺乳動物プロモータには、サイトメガロウイルス初期（CMV）プロモータ（Thomsen et al. (1984), Proc Natl Acad Sci USA. 81(3): 659-63）、又はSV40初期プロモータ（Benoit and Chambon (1981), Nature. 290(5804): 304-10）、並びに誘導性プロモータ、例えばテトラサイクリン誘導性プロモータ（Dingermann et al. (1992), Mol Cell Biol. 12(9): 4038-45）等の構成的プロモータが含まれる。また、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、合成プロモータに作動可能に連結され得る。合成プロモータは、限定することなく、Jetプロモータを挙げることができる（国際公開第2002/012514号パンフレット）。特定の実施形態では、本明細書に開示される場合の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列は、肝特異的プロモータに作動可能に連結され得る。肝特異的プロモータの例としては、限定することなく、ヒト-1アンチトリプシンプロモータ及びアポリポタンパク質A-Iプロモータが挙げられる。

40

50

## 【 0 2 2 8 】

特定の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列が、組換えDNA構築物又は発現カセットに送達される。例えば、組換えDNA構築物は、プロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含む発現カセット（即ち、「カセット」）を含むことができる。他の実施形態では、組換えDNA構築物は、2以上のカセットを含み、各カセットがプロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含み、各遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、本明細書に開示の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する。特定の実施形態において、組換えDNA構築物は、2つのカセット、3つのカセット、4つのカセット、又はそれ以上を含み得る。例えば、カセット又はカセットの組み合わせは、HBV1-2メガヌクレアーゼ、HBV5-6メガヌクレアーゼ、HBV7-8メガヌクレアーゼ、及びHBV11-12メガヌクレアーゼの任意の数又は組み合わせをコードすることができる。いくつかの実施形態において、単一のカセットは、HBV1-2メガヌクレアーゼ、HBV5-6メガヌクレアーゼ、HBV7-8メガヌクレアーゼ、及びHBV11-12メガヌクレアーゼをコードし得る。別の特定の実施形態では、カセット又はカセットの組み合わせは、HBV5-6メガヌクレアーゼ及びHBV11-12メガヌクレアーゼをコードし得る。

10

## 【 0 2 2 9 】

他の実施形態において、組換えDNA構築物は、プロモータ及びポリシストロニック核酸配列を含むカセットを含み、プロモータが、ポリシストロニック核酸配列の発現を駆動して、標的細胞において本明細書に記載のポリシストロニックmRNAを生成する。

20

## 【 0 2 3 0 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするmRNAが細胞に送達されるが、その理由は、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする遺伝子が、細胞のゲノムに組み込まれる可能性を低下させるためである。遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするそのようなmRNAは、インビトロでの転写といった、当技術分野において公知の方法を利用して産生され得る。いくつかの実施形態において、mRNAは7-メチル-グアノシンを用いてキャップされている。いくつかの態様において、mRNAはポリアデニル化されていてもよい。

## 【 0 2 3 1 】

特定の実施形態では、本発明の遺伝子操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、細胞内で同時に発現される2以上のヌクレアーゼをコードするポリシストロニックmRNAであってよい。いくつかの実施形態において、ポリシストロニックmRNAは、HBVゲノムが複数の部位で切断されるように、HBVゲノムの異なる認識配列を標的とする、本明細書に記載の2以上のメガヌクレアーゼをコードし得る。いくつかの実施形態において、ポリシストロニックmRNAは、本明細書に記載されている2以上のメガヌクレアーゼ、及び細胞において治療上有益な効果を誘導する少なくとも1つの更なるタンパク質をコードし得る。本発明のポリシストロニックmRNAは、IRES要素、T2A要素、P2A要素、E2A要素、及びF2A要素を含むがこれらに限定されない、同じmRNA分子に由来する2以上の遺伝子の翻訳を可能にする、当技術分野において公知の任意の要素を含み得る。特定の実施形態において、ポリシストロニックmRNAは、本明細書に記載の2つのメガヌクレアーゼをコードするバイシストロンmRNA、本明細書に記載の3つのメガヌクレアーゼをコードするトリシストロンmRNA、又は本明細書に記載の4つのメガヌクレアーゼをコードするクアドシストロンmRNAであり、この場合、各mRNAによってコードされるヌクレアーゼは、HBVゲノムの異なる認識配列に対して特異性を有する。例えば、ポリシストロニックmRNAは、HBV1-2メガヌクレアーゼ、HBV5-6メガヌクレアーゼ、HBV7-8メガヌクレアーゼ、及びHBV11-12メガヌクレアーゼの任意の数又は組み合わせをコードすることができる。いくつかの実施形態において、ポリシストロニックmRNAは、HBV1-2メガヌクレアーゼ、HBV5-6メガヌクレアーゼ、HBV7-8メガヌクレアーゼ、及びHBV11-12メガヌク

30

40

50



レアーゼをコードし得る。別の特定の実施形態では、ポリシストロニック mRNA は、HBV 5 - 6 メガヌクレアーゼ及び HBV 11 - 12 メガヌクレアーゼをコードするバイシストロン mRNA であり得る。

【0232】

別の特定の実施形態では、本発明のエンドヌクレアーゼをコードする核酸は、一本鎖 DNA の鋳型を用いて細胞に導入することができる。一本鎖 DNA は、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする配列の上流及び/又は下流に 5' 及び/又は 3' AAV 逆方向末端反復 (ITR) を更に含み得る。他の実施形態では、一本鎖 DNA は、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする配列の上流及び/又は下流に 5' 及び/又は 3' 相同性アームを更に含み得る。

【0233】

別の特定の実施形態では、本発明のエンドヌクレアーゼをコードする遺伝子は、線状化 DNA の鋳型を用いて細胞に導入することができる。いくつかの例では、エンドヌクレアーゼをコードするプラスミド DNA は、1 以上の制限酵素により消化させることができ、環状プラスミド DNA が細胞に導入される前に線状化されるようにする。

【0234】

精製されたヌクレアーゼタンパク質は、本明細書において以下に更に詳述されるものを含む、当技術分野において公知の様々な異なるメカニズムによってゲノム DNA を切断するために、細胞内に送達し得る。

【0235】

本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを送達するための標的組織は、限定することなく肝臓の細胞、例えば肝細胞、又は好ましくは初代肝細胞、より好ましくはヒト肝細胞又はヒト初代肝細胞、HepG2.2.15 又は HepG2-hNTCP 細胞を含む。論じたように、本発明のメガヌクレアーゼは、精製タンパク質として、又はメガヌクレアーゼをコードする RNA 若しくは DNA として送達することができる。一実施形態では、メガヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードする mRNA、又は DNA ベクターは、標的組織への直接的な注入によって、標的細胞 (例えば、肝臓の細胞) に供給される。あるいは、エンドヌクレアーゼタンパク質、mRNA、又は DNA を、循環系を介して全身的に送達することができる。

【0236】

いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードする DNA / mRNA は、全身投与、又は標的組織への投与のために、公知の技術に従って、医薬的に許容される担体用に処方される。例えば、Remington, The Science And Practice of Pharmacy (21st ed., 2005) を参照されたい。本発明による医薬製剤の製造において、タンパク質 / RNA / mRNA は、典型的には医薬的に許容される担体と混合される。担体は当然、製剤の他のいずれかの成分と相溶性であるという意味で許容されなければならない。担体は、固体又は液体、あるいはその両方であり得、単位用量の製剤として化合物と共に製剤化できる。

【0237】

いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードする DNA / mRNA は、細胞の取り込みを容易にするために細胞透過性ペプチド又は標的化リガンドに結合する。当技術分野において公知の細胞透過性ペプチドの例には、ポリアルギニン (Jearawiriyapaisarn, et al. (2008) Mol Ther. 16: 1624 - 9)、HIV ウイルス由来の TAT ペプチド (Hudecz et al. (2005), Med. Res. Rev. 25: 679 - 736)、MPG (Simeoni, et al. (2003) Nucleic Acid Res. 31: 2717 - 2724)、Pep-1 (Deshayes et al. (2004) Biochemistry 43: 7698 - 7706、及び HSV-1 VP-22 (Deshayes et al. (2005) Cell Mol Lif

10

20

30

40

50

e Sci. 62:1839-49)が含まれる。別の実施形態において、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、標的細胞にて発現される特定の細胞表面の受容体を認識する抗体に共有結合又は非共有結合で結合させて、エンドヌクレアーゼタンパク質/DNA/mRNAが標的細胞に結合し、標的細胞によって内在化されるようにする。あるいは、エンドヌクレアーゼタンパク質/DNA/mRNAを、そのような細胞表面の受容体の天然のリガンド(又は天然のリガンドの一部)に共有結合又は非共有結合で結合させることができる(McCall, et al. (2014) Tissue Barriers. 2(4):e944449; Dinda, et al. (2013) Curr Pharm Biotechnol. 14:1264-74; Kang, et al. (2014) Curr Pharm Biotechnol. 15(3):220-30; Qian et al. (2014) Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10(11):1491-508)。

10

#### 【0238】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、(例えば、肝臓洞壁内皮細胞又は造血内皮細胞、あるいはそれに分化する前駆細胞の近傍において)肝臓の所望の領域内への注射又は移植のために生分解性ヒドロゲル内に封入される。ヒドロゲルは、頻繁な注入を必要とせず標的組織の所望の領域へ治療用ペイロードの持続する調整可能な放出をもたらすことができ、刺激応答材料(例えば温度応答性及びpH応答性ヒドロゲル)は、環境的又は外部から適用された合図に反応してペイロードを放出するように設計され得る(Kang Derwent et al. (2008) Trans Am Ophthalmol Soc. 106:206-214)。

20

#### 【0239】

いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、ナノ粒子に共有結合で、又は好ましくは非共有結合で結合されるか、当技術分野で公知の方法を用いてそのようなナノ粒子内に封入される(Sharma, et al. (2014) Biomed Res Int. 2014)。ナノ粒子は、その長さスケールが $< 1 \mu\text{m}$ 、好ましくは $< 100 \text{nm}$ であるナノスケール送達システムである。そのようなナノ粒子は、金属、脂質、ポリマー、又は生体高分子から構成されるコアを用いて設計することができ、エンドヌクレアーゼタンパク質、mRNA、又はDNAの複数のコピーをナノ粒子コアに付着又は封入することができる。これにより、各細胞に送達されるタンパク質/mRNA/DNAのコピー数が増加し、従って、各エンドヌクレアーゼの細胞内での発現が増加して標的認識配列が切断される可能性が最大になる。そのようなナノ粒子の表面をポリマー又は脂質(例えば、キトサン、カチオン性ポリマー、又はカチオン性脂質)で更に改変して、その表面が細胞の送達及びペイロードの取り込みを増強する追加の機能性を付与するコア-シェルナノ粒子を形成し得る(Jian et al. (2012) Biomaterials. 33(30):7621-30)。ナノ粒子を適切な細胞型に向かわせるために、及び/又は細胞の取り込みの可能性を高めるために、有利にもナノ粒子を更に標的化分子に結合させることができる。そのような標的化分子の例には、細胞表面の受容体に特異的な抗体及び細胞表面受容体に天然のリガンド(又は天然のリガンドの一部)が含まれる。

30

40

#### 【0240】

いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、リポソーム内に封入されるか、カチオン性脂質を用いて複合体化される(例えば、LIPOFECTAMINE transfection reagent, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA; Zuris et al. (2015) Nat Biotechnol. 33:73-80; Mishra et al. (2011) J Drug Deliv. 2011:863734を参照)。リポソーム及びリポプレックス製剤は、ペイロードを分

50

解しないよう保護し、標的部位での蓄積及び保持を増強し、標的細胞の細胞膜との融合及び/又は細胞膜の破壊を介して、細胞の取り込み及び送達の効率を高めることができる。

【0241】

いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、ポリマー足場（例えばPLGA）内に封入されるか、カチオンポリマー（例えばPEI、PLL）を用いて複合体化される（Tamboliet al. (2011) Ther Deliv. 2(4): 523-536）。ポリマー担体は、ポリマーの侵食及び薬物の拡散の制御を通じて調整可能な薬物放出速度をもたらすように設計することができ、また高い薬物封入効率により、所望の標的細胞集団へ細胞内の送達をするまで、治療ペイロードの保護を提供することができる。

10

【0242】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼタンパク質、又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、ミセルに自己集合する両親媒性分子と組み合わせられる（Tong et al. (2007) J Gene Med. 9(11): 956-66）。ポリマーのミセルは、凝集を防ぎ、電荷の相互作用をマスクし、非特異的な相互作用を減少させることができる親水性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）で形成されたミセルのシェルを含み得る。

【0243】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、標的細胞への投与及び/又は送達のために、エマルジョン又はナノエマルジョン（即ち、 $< 1 \text{ nm}$ の平均粒径を有する）に処方される。「エマルジョン」の用語は、限定することなく、水不混和性の相を水相と混合させたときに、無極性残基（例えば炭化水素の長鎖）を水及び極性の頭部の基から水に向けて遠ざける疎水性の力の結果として形成することができる脂質の構造を含んだ、任意の水中油型、油中水型、水中油中水型、又は油中水中油型の分散液又は液滴を示す。これらの他の脂質構造としては、単層、小層、及び多層脂質小胞、ミセル、及びラメラ相が挙げられるが、これらに限定されない。エマルジョンは、水相と親油性相（典型的には油と有機溶媒を含有する）で構成される。また、エマルジョンは、1以上の界面活性剤を頻繁に含有する。ナノエマルジョン配合物は、例えば、米国特許出願公開第2002/0045667号及び第2004/0043041号、並びに米国特許第6,015,832号、第6,506,803号、第6,635,676号、及び第6,559,189号に記載されているように周知であり、その各々は全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

30

【0244】

いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼタンパク質、又はエンドヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、多機能ポリマーコンジュゲート、DNAデンドリマー、及びポリマーデンドリマーに共有結合で接着するか、非共有結合で関連させられる（Mastorakos et al. (2015) Nanoscale. 7(9): 3845-56; Cheng et al. (2008) J Pharm Sci. 97(1): 123-43）。デンドリマーの発生は、ペイロードの容量及びサイズを制御でき、また高い薬物ペイロード容量をもたらすことができる。更に、複数の表面の基の表示を利用して、安定性を向上させ、非特異的な相互作用を低減し、細胞特異的な標的化及び薬物放出を増強することができる。

40

【0245】

いくつかの態様において、エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子はウイルスベクターを用いて送達される。そのようなベクターは当技術分野において公知であり、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが含まれる（Vannucci, et al. (2013) New Microbiol. 36: 1-22に概説）。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは標的組織（例えば、肝組織）に直接注射される。別の実施形態において、ウイルスベクターは循環系を介して全身的に送達される。異なるAAVベクターが異なる組織

50

に位置付けられる傾向があることは、当技術分野において公知である。肝臓標的組織において、肝細胞の効果的な形質導入は、例えば、AAV血清型2、8、及び9で示されている(Sands(2011)Methods Mol.Biol.807:141-157)。また、AAVベクターは、それらが宿主細胞で第二鎖のDNAの合成を必要としないように、自己相補的であり得る(McCarthy, et al.(2001)Gene Ther.8:1248-54)。

#### 【0246】

一実施形態では、エンドヌクレアーゼ遺伝子送達に使用されるウイルスベクターは、自己制限ウイルスベクターである。自己制限ウイルスベクターは、ベクター内の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼについての認識配列の存在に起因して、細胞又は生物において限られた持続時間を有し得る。従って、自己制限ウイルスベクターは、プロモータ、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼ、及びLTR内のエンドヌクレアーゼ認識部位をコードするように遺伝子操作することができる。自己制限ウイルスベクターは、エンドヌクレアーゼが発現され、ゲノム内の内因性認識配列で細胞のゲノムを切断することができるように、エンドヌクレアーゼ遺伝子を細胞、組織、又は生物に送達する。送達されたエンドヌクレアーゼはまた、自己制限ウイルスベクター自体の中で標的部位を見つけて、その標的部位でベクターを切断する。一旦切断されると、ウイルスゲノムの5'及び3'末端が露出されてエキソヌクレアーゼによって分解され、そのためウイルスを死滅させて、エンドヌクレアーゼの産生を止める。

#### 【0247】

エンドヌクレアーゼ遺伝子が、DNAの形態(例えばプラスミド)で、及び/又はウイルスベクター(例えばAAV)を介して送達される場合、それらはプロモータに作動可能に連結されなければならない。いくつかの実施形態において、これは、ウイルスベクター由来の内因性プロモータ(例えば、レンチウイルスベクターのLTR)又は周知のサイトメガロウイルス若しくはSV40ウイルス初期プロモータ等のウイルスプロモータであり得る。好ましい実施形態において、メガヌクレアーゼ遺伝子は、標的細胞において優先的に遺伝子発現を駆動するプロモータに作動可能に連結されている。肝特異的プロモータの例としては、限定することなく、ヒト-1アンチトリプシンプロモータ及びアポリポタンパク質A-IIIプロモータが挙げられる。

#### 【0248】

特定の実施形態では、ウイルスベクターは、プロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むカセットを含む。また、ウイルスベクターは、2以上のカセットを含み得、各カセットがプロモータと、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸配列を含み、各遺伝子操作されたメガヌクレアーゼが、本明細書に開示の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、プロモータ及びポリシストロニック核酸配列を含む1つのカセットを含み、プロモータが、ポリシストロニック核酸配列の発現を駆動して、標的細胞において本明細書に記載のポリシストロニックmRNA、例えば遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするポリシストロニックmRNAを生成する。

#### 【0249】

本明細書に開示のメガヌクレアーゼをHBVに感染した対象の肝臓に送達するための方法及び組成物が提供される。一実施形態では、哺乳動物から取り出された生来の肝細胞は、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするベクターで形質導入することができる。あるいは、HBV感染対象の生来の肝細胞は、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ及び/又は肝の再生を刺激する分子、例えば肝毒素をコードするアデノウイルスベクターで、エキスピボで形質導入され得る。好ましくは、肝毒素はuPAであり、ウイルスベクターによって発現されると、肝細胞からのその分泌を阻害するように改変されている。別の実施形態では、ベクターはtPAをコードし、これは肝細胞の再生をデノボで刺激することができる。哺乳動物から取り出した形質導入された肝細胞は、次いで哺乳動物に戻すことができ、その場合、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの発現に資する条件が付与される

10

20

30

40

50

。典型的には、形質導入された肝細胞は、脾臓又は門脈脈管構造を通して注入することによって患者に戻すことができ、投与は、1～5日以上期間にわたって、単回又は複数回であり得る。

#### 【0250】

本発明の方法のインビボの態様では、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードし、対象に投与されるレトロウイルス、シュードタイプ又はアデノウイルス関連ベクターが構築されている。遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするベクターの投与は、分泌障害の肝毒素をコードする、又はtPAをコードするアデノウイルスベクターの投与と共に起こり得、それは肝毒素として作用することなく肝細胞の再生を刺激する。

#### 【0251】

適切な用量は、他の要因の中でも、選択された任意のAAVベクターの詳細（例えば、血清型等）、投与経路、治療される対象（即ち、年齢、体重、性別、及び対象の全身状態）、及び投与の様式に依存する。従って、適切な投与量は患者ごとに異なり得る。適切な有効量は、当業者が容易に判断することができる。投薬治療は、単回投与計画又は複数回投与計画であり得る。更に、対象は、極力適切な多さの用量を投与され得る。当業者は適切な用量数を容易に判断することができる。投与量は、別の投与経路を考慮に入れるか、治療の利益と任意の副作用とのバランスをとるために調整する必要があり得る。

#### 【0252】

### 2.4 医薬組成物

#### 【0253】

いくつかの実施形態において、本発明は、医薬的に許容される担体及び本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ、又は医薬的に許容される担体及び本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチドを含む医薬組成物を提供する。他の実施形態において、本発明は、医薬的に許容される担体と、本明細書に開示されるような遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを細胞が発現する標的組織に送達することができる本発明の細胞とを含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、HBVを有する対象を治療すること、HBVのレベル若しくは増殖を低減させること、HBVの少なくとも1つの症状を減少させること、又はHCCを治療することに有用であり得る。

#### 【0254】

医薬組成物は、標的HBV株の遺伝子型に従って、設計又は選択することができる。本明細書に詳細に記載されるように、本発明のメガヌクレアーゼは、HBVの特定の遺伝子型における認識配列を認識して切断するように遺伝子操作されている。例えば、HBV 1-2メガヌクレアーゼ（例えば、配列番号18～21）は、少なくともHBV遺伝子型A、B、C、E、F、及びG（例えば、それぞれ配列番号3～5及び7～9）のゲノムに見出されるHBV 1-2認識配列を認識し切断する。更に、本明細書に開示される遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの認識配列は、配列番号3～9において提供される各遺伝子型の例に対して100%の配列同一性を共有してはいないHBV遺伝子型A、B、C、D、E、F、及びGの単離体にて見出すことができる。本明細書で使用しているとき、HBVの「単離体」は、配列番号3～9のいずれかにおいて提供される、対応する遺伝子型の例と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又はそれより多くの配列同一性を共有し得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される医薬組成物は、配列番号10、12、14、又は16に定められる認識配列を含むHBVの任意の遺伝子型を有する対象に投与することができる。

#### 【0255】

そのような医薬組成物は公知の技術に従って調製することができる。例えば、Remington, The Science And Practice of Pharmacy (21sted, 2005)を参照されたい。本発明による医薬製剤の製造において

10

20

30

40

50

、エンドヌクレアーゼポリペプチド（又はそれをコードするDNA/RNA）は、典型的には、医薬上許容される担体と混合され、得られる組成物は対象に投与される。担体は当然、製剤の他のいずれかの成分と相溶性であるという意味で許容されなければならない。また対象にとって有害であってはならない。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、対象における疾患の治療に有用な1又は複数の追加の薬剤又は生体分子を更に含むことができる。同様に、追加の薬剤及び/又は生体分子を別々の組成物として同時投与することができる。

【0256】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（又は遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする核酸）の組み合わせを含むことができ、この場合それぞれの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、異なるHBV認識配列に対する特異性を有し、その結果、単一の医薬組成物が、対象における広範なアレイのHBV遺伝子型及び/又は遺伝子型単離体の治療に広範囲に有用となる。同様に、他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、異なるHBV認識配列に対する特異性を有する本明細書に記載の複数の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするポリシストロニックmRNA（又は発現時にポリシストロニックmRNAを産生するカセットを有する組換えDNA構築物又はウイルスベクター）を含み得る。そのような医薬組成物はまた、対象における広範なアレイのHBV遺伝子型及び/又は遺伝子型単離体の治療に広範囲に有用となる。いずれの場合も、そのような医薬組成物は、特定のHBV遺伝子型又は単離体が対象において既知であるか未知であるときの単一の治療として有用であり得る。

【0257】

例えば、本明細書に開示の複数の異なる組換えメガヌクレアーゼを含む、又は本明細書に開示の複数の異なる組換えメガヌクレアーゼをコードする核酸分子を含む医薬組成物は、HBVの複数の遺伝子型に感染した、又はHBVの未知の遺伝子型に感染した患者に投与できる。従って、複数の異なる組換えメガヌクレアーゼを含む医薬組成物を準備すること、又は複数の異なる組換えメガヌクレアーゼをコードする核酸分子を含むことで、資源によりHBVの正確な遺伝子型判定ができず、また迅速で広い治療の解決が望まれるHBV感染の治療及び制御に対する柔軟な選択肢が得られる。

【0258】

本発明の特定の実施形態では、医薬組成物は、脂質ナノ粒子内に封入された本明細書に記載の1以上のmRNAを含むことができ、それは本明細書の他の箇所に記載されている。特定の実施形態において、脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをそれぞれコードする、本明細書に記載の2以上のmRNAを含み得る。特定の実施形態では、脂質ナノ粒子は、それぞれが異なるHBV認識配列に対して特異性を有する本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする、本明細書に記載の2、3、又は4つのmRNAを含み得る。他の実施形態では、脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の異なるHBV認識配列に対する特異性を有する本発明の2以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをそれぞれコードする、本明細書に記載の1以上のポリシストロニックmRNAを含み得る。特定の実施形態では、脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の2、3、又は4つの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするポリシストロニックmRNAを含むことができる。他の特定の実施形態では、脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の2以上のポリシストロニックmRNAを含むことができ、各々本発明の2以上の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする。

【0259】

本発明での使用が企図されるいくつかの脂質ナノ粒子は、少なくとも1つのカチオン性脂質、少なくとも1つの非カチオン性脂質、及び少なくとも1つの複合脂質を含む。より特定の例では、脂質ナノ粒子は、約50モル%～約85モル%のカチオン性脂質、約13モル%～約49.5モル%の非カチオン性脂質、及び約0.5モル%～約10モル%の脂質コンジュゲートを含み得、非ラメラ（即ち、非二層）の形態を有するような方法で製造される。他の特定の例では、脂質ナノ粒子は、約40モル%～約85モル%のカチオン性

脂質、約 13 モル% ~ 約 49.5 モル% の非カチオン性脂質、及び約 0.5 モル% ~ 約 10 モル% の脂質コンジュゲートを含み得、非ラメラ（即ち、非二層）の形態を有するような方法で製造される。

【0260】

カチオン性脂質は、例えば、以下の 1 以上を含み得る：パルミトイル - オレオイル - ノル - アルギニン (PONA)、MPDACA、GUADACA、((6Z、9Z、28Z、31Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イル 4 - (ジメチルアミノ)ブタン酸) (MC3); LenMC3、CP - LenMC3、LenMC3、CP - LenMC3、MC3MC、MC2MC、MC3エーテル、MC4エーテル、MC3アミド、Pan - MC3、Pan - MC4、及び PanMC5、1, 2 - ジリノレイルオキシ - N, Nジメチルアミノプロパン (DLinDMA) 1, 2 - ジリノレニルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - (2 - ジメチルアミノエチル) - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - C2 - DMA; 「XTC2」)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - C3 - DMA)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - (4 - ジメチルアミノブチル) - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - C4 - DMA)、2, 2 - ジリノレイル - 5 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキサソ (DLin - K6 - DMA)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - N - メチルベジアジノ - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - MPZ)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - DMA)、1, 2 - ジリノレイルカルバモイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - C - DAP)、1, 2 - ジリノレイオキシ - 3 - (ジメチルアミノ)アセトキシプロパン (DLin - DAC)、1, 2 - ジリノレイオキシ - 3 - モルホリノプロパン (DLin - MA)、1, 2 - ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLinDAP)、1, 2 - ジリノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - S - DMA)、1 - リノレオイル - 2 - リノレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - 2 - DMAP)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin - TMA - Cl)、1, 2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin - TAP - Cl)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (N - メチルピペラジノ)プロパン (DLin - MPZ)、3 - (N, N - ジリノレイルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオール (DLinAP)、3 - (N, N - ジオレイルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオ (DOAP)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (2 - N, N - ジメチルアミノ)エトキシプロパン (DLin - EG - DMA)、N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、1, 2 - ジオレオイルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (DODMA)、1, 2 - ジステアリルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (DSDMA)、N - (1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピル) - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N, N - ジステアリル - N, N - ジメチルアンモニウムプロミド (DDAB)、N - (1 - (2, 3 - ジオレオイルオキシ)プロピル) - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、3 - (N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル)コレステロール (DC - Chol)、N - (1, 2 - ジミリスチルオキシプロブ - 3 - イル) - N, N - ジメチル - N - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DMRIE)、2, 3 - ジオレオイルオキシ - N - [2 (スペルミン - カルボキサミド)エチル] - N, N - ジメチル - 1 - プロパンアミニウムトリフルオロ酢酸塩 (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (DOGS)、3 - ジメチルアミノ - 2 - (コレスト - 5 - エン - 3 - ベータ - オキシブタン - 4 - オキシ) - 1 - (cis, cis - 9, 12 - オクタデカジエノキシ)プロパン (CLinDMA)、2 - [5' - (コレスタ - 5 - エン - 3 - ベータ - オキシ) - 3' - オキサペントキシ) - 3 - ジメチル - 1 - (cis, cis - 9', 1 - 2' - オクタデカジエノキシ)プロパン (CpLinDMA)、N, N - ジメチル - 3, 4 - ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1, 2 - N, N' - ジオレイルカルバミ

ル - 3 - ジメチルアミノプロパン ( D O c a r b D A P )、1, 2 - N, N' - ジリノレイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパン ( D L i n c a r b D A P )、又はそれらの混合物。カチオン性脂質はまた、D L i n D M A、D L i n - K - C 2 - D M A (「X T C 2」)、M C 3、L e n M C 3、C P - L e n M C 3、- L e n M C 3、C P - L e n M C 3、M C 3 M C、M C 2 M C、M C 3 エーテル、M C 4 エーテル、M C 3 アミド、P a n - M C 3、P a n - M C 4、P a n M C 5、又はそれらの混合物であってよい。

【0261】

様々な実施形態において、カチオン性脂質は、粒子に存在する総脂質の約 50 mol % ~ 約 90 mol %、約 50 mol % ~ 約 85 mol %、約 50 mol % ~ 約 80 mol %、約 50 mol % ~ 約 75 mol %、約 50 mol % ~ 約 70 mol %、約 50 mol % ~ 約 65 mol %、又は約 50 mol % ~ 約 60 mol % を含み得る。

10

【0262】

他の実施形態では、カチオン性脂質は、粒子に存在する総脂質の約 40 mol % ~ 約 90 mol %、約 40 mol % ~ 約 85 mol %、約 40 mol % ~ 約 80 mol %、約 40 mol % ~ 約 75 mol %、約 40 mol % ~ 約 70 mol %、約 40 mol % ~ 約 65 mol %、又は約 40 mol % ~ 約 60 mol % を含み得る。

【0263】

非カチオン性脂質は、例えば、1 以上のアニオン性脂質及び / 又は中性脂質を含み得る。好ましい実施形態では、非カチオン性脂質は、以下の中性脂質の成分のうちの 1 つを含む：(1) コレステロール若しくはその誘導体；(2) リン脂質；又は(3) リン脂質とコレステロール若しくはその誘導体との混合物。コレステロール誘導体の例には、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル - 2' - ヒドロキシエチルエーテル、コレステリル - 4' - ヒドロキシブチルエーテル、及びそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。リン脂質は、中性脂質、例えば非限定的に、ジパルミトイルホスファチジルコリン ( D P P C )、ジステアロイルホスファチジルコリン ( D S P C )、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン ( D O P E )、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルコリン ( P O P C )、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン ( P O P E )、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルグリセロール ( P O P G )、ジパルミトイル - ホスファチジルエタノールアミン ( D P P E )、ジミリストイル - ホスファチジルエタノールアミン ( D M P E )、ジステアロイル - ホスファチジルエタノールアミン ( D S P E )、モノメチル - ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル - ホスファチジルエタノールアミン、ジエライドイル - ホスファチジルエタノールアミン ( D E P E )、ステアロイルオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン ( S O P E )、卵ホスファチジルコリン ( E P C )、及びそれらの混合物であってよい。ある好ましい態様において、リン脂質は、D P P C、D S P C、又はそれらの混合物である。

20

30

【0264】

いくつかの実施形態において、非カチオン性脂質 (例えば、1 以上のリン脂質及び / 又はコレステロール) は、粒子に存在する総脂質の約 10 mol % ~ 約 60 mol %、約 15 mol % ~ 約 60 mol %、約 20 mol % ~ 約 60 mol %、約 25 mol % ~ 約 60 mol %、約 30 mol % ~ 約 60 mol %、約 10 mol % ~ 約 55 mol %、約 15 mol % ~ 約 55 mol %、約 20 mol % ~ 約 55 mol %、約 25 mol % ~ 約 55 mol %、約 30 mol % ~ 約 55 mol %、約 13 mol % ~ 約 50 mol %、約 15 mol % ~ 約 50 mol %、又は約 20 mol % ~ 約 50 mol % を含み得る。非カチオン性脂質がリン脂質とコレステロール又はコレステロール誘導体との混合物である場合、混合物は粒子に存在する総脂質の最大約 40、50、又は 60 モル % を含んでもよい。

40

【0265】

粒子の凝集を阻害する複合脂質は、例えば、ポリエチレングリコール ( P E G ) - 脂質コンジュゲート、ポリアミド ( A T T A ) - 脂質コンジュゲート、カチオン性ポリマー -

50



脂質コンジュゲート (CPL)、又はそれら混合物の1以上を含み得る。1つの好ましい態様において、核酸-脂質粒子は、PEG-脂質コンジュゲート又はATTA-脂質コンジュゲートのいずれかを含む。特定の実施形態では、PEG-脂質コンジュゲート又はATTA-脂質コンジュゲートはCPLと一緒に使用される。粒子の凝集を阻害する複合脂質は、例えば、PEG-ジアシルグリセロール(DAG)、PEGジアルキルオキシプロピル(DAA)、PEG-リン脂質、PEG-セラミド(Cer)、又はそれらの混合物を含むPEG-脂質を含み得る。PEG-DAAコンジュゲートは、PEG-ジラウリルオキシプロピル(C12)、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(C14)、PEG-ジパルミチルオキシプロピル(C16)、PEG-ジステアリルオキシプロピル(C18)、又はそれらの混合物であり得る。

10

## 【0266】

本発明における使用に適した更なるPEG-脂質コンジュゲートとしては、mPEG2000-1,2-ジ-O-アルキル-sn3-カルボモイルグリセリド(PEG-C-DOMG)が挙げられるが、これらに限定されない。PEG-C-DOMGの合成は、PCT出願第PCT/US08/88676号に記載されている。本発明での使用に適した更に追加のPEG-脂質コンジュゲートとしては、限定されないが、1-[8'-(1,2-ジミリストイル-3-プロパノキシ)-カルボキサミド-3',6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-メチル-ポリ(エチレングリコール)(2KPEG-DMG)が挙げられる。2KPEG-DMGの合成は、米国特許第7,404,969号に記載されている。

20

## 【0267】

場合によっては、粒子の凝集を阻害する複合脂質(例えば、PEG-脂質コンジュゲート)は、粒子に存在する総脂質の約0.1mol%~約2mol%、約0.5mol%~約2mol%、約1mol%~約2mol%、約0.6mol%~約1.9mol%、約0.7mol%~約1.8mol%、約0.8mol%~約1.7mol%、約1mol%~約1.8mol%、約1.2mol%~約1.8mol%、約1.2mol%~約1.7mol%、約1.3mol%~約1.6mol%、約1.4mol%~約1.5mol%、又は約1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、又は2mol%(又はその任意の画分もしくはその範囲)を含むことができる。典型的には、そのような場合、PEG部分は約2,000ダルトンの平均分子量を有する。他の場合において、粒子の凝集を阻害する複合脂質(例えば、PEG-脂質コンジュゲート)は、粒子に存在する総脂質の約5.0mol%~約10mol%、約5mol%~約9mol%、約5mol%~約8mol%、約6mol%~約9mol%、約6mol%~約8mol%、約5mol%、6mol%、7mol%、8mol%、9mol%、10mol%(又はその任意の画分もしくはその範囲)を含むことができる。典型的には、そのような場合、PEG部分は約750ダルトンの平均分子量を有する。

30

## 【0268】

他の実施形態では、組成物は、正電荷とは異なる、少なくとも1つの正電荷担体と少なくとも1つの負電荷担体とを含む両性リポソームを含むことができ、リポソームの等電点は4~8である。この目的は、リポソームをpH依存性の変化する電荷で準備するという事実により達成される。

40

## 【0269】

所望の特性を有するリポソームの構造は、例えば、膜形成又は膜ベースのカチオン電荷担体の量が、低いpHではアニオン電荷担体の量を超え、その比がより高いpHでは逆転するとき形成される。これは、イオン性成分のpKa値が4~9の場合に常に当てはまる。媒体のpHが低下すると、全てのカチオン電荷担体がより荷電し、全てのアニオン電荷担体はその電荷を失う。

## 【0270】

両性リポソームに有用なカチオン性化合物には、本明細書において既に上記したカチオン性化合物が含まれる。限定するものではないが、カチオン性の強い化合物には、例えば

50

、DC-Chol 3 - - [N - (N' , N' - ジメチルメタン)カルバモイル]コレステロール、TC-Chol 3 - - [N - (N' , N' , N' - トリメチルアミノエタン)カルバモイルコレステロール、BGSCビスグアニジニウム - スペルミジン - コレステロール、BGTCビス - グアニジニウム - トレン - コレステロール、DOTAP (1 , 2 - ジオレオイルオキシプロピル) - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド、DOSPER (1 , 3 - ジオレオイルオキシ - 2 - (6 - カルボキシ - スペルミル) - プロピルアミド)、DOTMA (1 , 2 - ジオレオイルオキシプロピル) - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド) (リポフェクチン (登録商標))、DORIE 1 , 2 - ジオレオイルオキシプロピル) - 3 - ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムプロミド、DOSC (1 , 2 - ジオレオイル - 3 - スクシニル - sn - グリセリルコリンエステル)、  
 DOGSDSO (1 , 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - スクシニル - 2 - ヒドロキシエチルジスルフィドオルニチン (omithine))、DDABジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド、DOGS ((C18)2GlySper3+)N , N - ジオクタデシルアミド - グリコール - スペルミン (トランスフェクタム (登録商標)) (C18)2Gly + N , N - ジオクタデシルアミド - グリシン、CTABセチルトリメチルアンモニウムプロミド、CpyCセチルピリジニウムクロリド、DOEPC 1 , 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン又は他のO - アルキル - ホスファチジルコリン又はエタノールアミン、リジンからのアミド、アルギニン又はオルニチン (omithine)、及びホスファチジルエタノールアミンを含むことができる。

10

【0271】

20

カチオン性の弱い化合物の例としては、限定するものではないが、His-Chol (ヒスタミル - コレステロールヘミスクシネート)、Mo-Chol (モルホリン - N - エチルアミノ - コレステロールヘミスクシネート)、又はヒスチジニル - PEが挙げられる。

【0272】

中性化合物の例としては、コレステロール、セラミド、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、テトラエーテル脂質、又はジアシルグリセロールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0273】

両性リポソームに有用なアニオン性化合物には、本明細書において既に記載した非カチオン性化合物が含まれる。限定されないが、弱アニオン性化合物の例には、CHEMS (コレステロールヘミスクシネート)、8 ~ 25個の炭素原子を有するアルキルカルボン酸、又はジアシルグリセロールヘミスクシネートが含まれ得る。追加の弱アニオン性化合物には、アスパラギン酸、又はグルタミン酸とPE及びPSのアミド、並びにグリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、セリン、システイン、トレオニン、チロシン、グルタミン酸、アスパラギン酸若しくは他のアミノ酸、又はアミノジカルボン酸とのそのアミドが含まれ得る。同じ原理に従うと、ヒドロキシカルボン酸又はヒドロキシジカルボン酸とPSとのエステルも弱アニオン性化合物である。

30

【0274】

いくつかの実施形態では、両性リポソームは、本明細書の上記に記したもののなどの複合脂質を含み得る。有用な複合脂質の特定の例には、PEG改変ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、PEG - セラミドコンジュゲート (例えば、PEG - CerC14又はPEG - CerC20)、PEG改変ジアシルアミン及びPEG改変1 , 2 - ジアシルオキシプロパン - 3 - アミンが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましいのは、PEG改変ジアシルグリセロール及びジアシルグリセロールである。

40

【0275】

いくつかの実施形態において、中性脂質は、粒子に存在する総脂質の約10mol% ~ 約60mol%、約15mol% ~ 約60mol%、約20mol% ~ 約60mol%、約25mol% ~ 約60mol%、約30mol% ~ 約60mol%、約10mol% ~ 約55mol%、約15mol% ~ 約55mol%、約20mol% ~ 約55mol%、

50

約 25 mol% ~ 約 55 mol%、約 30 mol% ~ 約 55 mol%、約 13 mol% ~ 約 50 mol%、約 15 mol% ~ 約 50 mol%、又は約 20 mol% ~ 約 50 mol% を含み得る。

【0276】

場合によっては、粒子の凝集を阻害する複合脂質（例えば、PEG-脂質コンジュゲート）は、粒子に存在する総脂質の約 0.1 mol% ~ 約 2 mol%、約 0.5 mol% ~ 約 2 mol%、約 1 mol% ~ 約 2 mol%、約 0.6 mol% ~ 約 1.9 mol%、約 0.7 mol% ~ 約 1.8 mol%、約 0.8 mol% ~ 約 1.7 mol%、約 1 mol% ~ 約 1.8 mol%、約 1.2 mol% ~ 約 1.8 mol%、約 1.2 mol% ~ 約 1.7 mol%、約 1.3 mol% ~ 約 1.6 mol%、約 1.4 mol% ~ 約 1.5 mol%、又は約 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、又は 2 mol%（又はその任意の画分もしくはその範囲）を含むことができる。典型的には、そのような場合、PEG 部分は約 2,000 ダルトンの平均分子量を有する。他の場合において、粒子の凝集を阻害する複合脂質（例えば、PEG-脂質コンジュゲート）は、粒子に存在する総脂質の約 5.0 mol% ~ 約 10 mol%、約 5 mol% ~ 約 9 mol%、約 5 mol% ~ 約 8 mol%、約 6 mol% ~ 約 9 mol%、約 6 mol% ~ 約 8 mol%、約 5 mol%、6 mol%、7 mol%、8 mol%、9 mol%、10 mol%（又はその任意の画分もしくはその範囲）を含むことができる。典型的には、そのような場合、PEG 部分は約 750 ダルトンの平均分子量を有する。

10

【0277】

中性及び複合脂質の総量を考慮すると、両性リポソームの残りの残余は、様々な比率で処方されたカチオン性化合物とアニオン性化合物の混合物を含み得る。カチオン性脂質とアニオン性脂質の比率は、核酸封入の所望の特性、ゼータ電位、pKa、又は荷電脂質成分の存在に少なくとも部分的に依拠する他の物理化学的特性を成し遂げるために選択され得る。

20

【0278】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、肝臓、特に肝細胞内での送達及び取り込みを特異的に増強する組成を有する。

【0279】

2.5 組換え AAV ベクターの作製方法

30

【0280】

いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の方法で使用するための組換え AAV ベクターを提供する。組換え AAV ベクターは、典型的には、HEK-293 等の哺乳動物細胞株において産生される。ウイルスの cap 及び rep 遺伝子は、ベクターから除去されて治療遺伝子（例えばエンドヌクレアーゼ遺伝子）を送達するための空間を設けるために自己複製を防止するので、これらをパッケージングする細胞株にイントランス（in trans）で供給する必要がある。更に、複製を支持するのに必要な「ヘルパー」（例えばアデノウイルス）成分を供給することが必要である（Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) Curr. Gene Ther. 13 (5): 370-81)。多くの場合、組換え AAV ベクターは、「ヘルパー」成分をコードする第 1 のプラスミド、cap 及び rep 遺伝子を含む第 2 のプラスミド、並びにウイルスにパッケージングされる介在する DNA 配列を含むウイルス ITR を含む第 3 のプラスミドで、細胞株を形質移入する、トリプル形質移入を用いて産生される。次いで、カプシドに包まれたゲノム（ITR 及び対象の介在する遺伝子）を含むウイルス粒子を、凍結融解サイクル、超音波処理、界面活性剤、又は当技術分野で公知の他の手段によって細胞から単離する。次いで、粒子を塩化セシウム密度勾配遠心分離又はアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製し、続いて細胞、組織、又はヒトである患者等の生物に対して、目的の遺伝子に送達する。

40

【0281】

組換え AAV 粒子は典型的には細胞で産生（作製）されるので、部位特異的エンドヌク

50

レアーゼがパッケージング細胞にて発現されないことを確実にするために、本発明を実施する際に注意を払わなければならない。本発明のウイルスゲノムはエンドヌクレアーゼの認識配列を含むので、パッケージング細胞株で発現される任意のエンドヌクレアーゼは、ウイルス粒子にパッケージングされ得る前に、ウイルスゲノムを切断することができる。これはパッケージング効率の低下及び/又は断片化したゲノムのパッケージングをもたらす。パッケージング細胞におけるエンドヌクレアーゼの発現を防ぐために、以下のようないくつかのアプローチを用いることができる。

#### 【0282】

エンドヌクレアーゼは、パッケージング細胞で活性ではない組織特異的プロモータの制御下に置くことができる。例えば、ウイルスベクターがエンドヌクレアーゼ遺伝子を筋肉組織に送達するように開発されている場合、筋肉特異的プロモータを使用することができる。筋肉特異的プロモータの例は、C5-12 (Liu, et al. (2004) Hum Gene Ther. 15:783-92)、筋肉特異的クレアチンキナーゼ (MCK) プロモータ (Yuasa, et al. (2002) Gene Ther. 9:1576-88)、又は平滑筋22 (SM22) プロモータ (Haase, et al. (2003) BMC Biotechnol. 13:49-54) を含む。CNS (ニューロン) 特異的プロモータの例には、NSE、シナプシン、及びMeCP2プロモータが含まれる (Lentz, et al. (2012) Neurobiol Dis. 48:179-88)。肝臓特異的プロモータの例には、アルブミンプロモータ (Palb等)、ヒト1-アンチトリプシン (Pa1AT等)、及びヘモベキシン (Phpx等) が含まれる (Kramer, MG et al., (2003) Mol. Therapy 7:375-85)。眼特異的プロモータの例には、オブシン、及び角膜上皮特異的K12プロモータが含まれる (Martin KRG, Klein RL, and Quigley HA (2002) Methods (28):267-75) (Tong Y, et al., (2007) J Gene Med, 9:956-66)。これらのプロモータ又は当技術分野で公知の他の組織特異的プロモータは、HEK-293細胞において高度に活性であるわけではなく、従って、本発明のウイルスベクターに組み込まれた場合、パッケージング細胞において顕著なレベルのエンドヌクレアーゼ遺伝子発現を生じないと予想される。同様に、本発明のウイルスベクターは、不適合な組織特異的プロモータ (即ち、周知のHeLa細胞系 (ヒト上皮細胞) の使用、及び肝臓特異的ヘモベキシンプロモータの使用) を用いる他の細胞系の使用を企図する。組織特異的プロモータの他の例には、滑膜肉腫PDZD4 (小脳)、C6 (肝臓)、ASB5 (筋肉)、PPP1R12B (心臓)、SLC5A12 (腎臓)、コレステロール調節APOM (肝臓)、及びADPRHL1 (心臓)、及び単一遺伝子奇形症候群TP73L (筋肉) が含まれる。 (Jacox E, et al., (2010) PLoS One v. 5 (8): e12274)。

#### 【0283】

あるいは、ベクターは、エンドヌクレアーゼが発現される見込みのない、異なる種由来の細胞にパッケージングされ得る。例えば、ウイルス粒子は、哺乳動物以外のパッケージング細胞では活性ではない、周知のサイトメガロウイルス又はSV40ウイルス初期プロモータ等の哺乳動物のプロモータを用いて、微生物、昆虫、又は植物細胞にて産生することができる。好ましい態様において、ウイルス粒子は、Gaoら (Gao, H., et al. (2007) J. Biotechnol. 131 (2):138-43) によって記載されているように、パキウウイルス系を用いて昆虫細胞にて産生される。哺乳動物のプロモータの制御下にあるエンドヌクレアーゼは、これらの細胞において発現される可能性は低い Airenne, KJ, et al. (2013) Mol. Ther. 21 (4):739-49)。更に、昆虫細胞は哺乳動物細胞とは異なるmRNAスプライシングモチーフを利用する。従って、ヒト成長ホルモン (HGH) のイントロン又はSV40ラージT抗原のイントロン等の哺乳動物のイントロンを、エンドヌクレアーゼのコード配列に組み込むことが可能である。これらのイントロンは昆虫細胞のプレmRNA転写物から効率的にはスプライシングされないため、昆虫細胞は機能的なエンドヌクレアーゼを発

10

20

30

40

50

現せず、ゲノム全長をパッケージングする。対照的に、得られた組換えAAV粒子が送達される哺乳動物の細胞は、プレmRNAを適切にスプライスし、機能的なエンドヌクレアーゼタンパク質を発現する。Haifeng Chenは、昆虫パッケージング細胞における毒性のタンパク質バルナーゼ及びジフテリア毒素フラグメントAの発現を減弱するために、HGH及びSV40ラージT抗原イントロンの使用を報告しており、これらの毒素遺伝子を運ぶ組換えAAVベクターの産生を可能にする(Chen, H (2012) Mol Ther Nucleic Acids. 1 (11) : e57)。

【0284】

エンドヌクレアーゼ遺伝子は、小分子インデューサーがエンドヌクレアーゼの発現に必要とされるように誘導性プロモータに作動可能に連結され得る。誘導性プロモータの例には、Tet-Onシステム(Clontech; Chen H., et al., (2015) BMC Biotechnol. 15 (1) : 4)、及びRheoSwitchシステム(Intrexon; Sowa G., et al., (2011) Spine, 36 (10) : E623-8)が含まれる。両方のシステム及び当技術分野で公知の類似のシステムは、小分子アクチベータ(それぞれ、ドキシサイクリン又はエクジソン)に応答して転写を活性化するリガンド誘導性転写因子(それぞれ、Tetレプレッサー及びエクジソン受容体の変異体)に依存する。このようなりガンド誘導性転写活性化因子を用いて本発明を実施することは、1) 対応する転写因子に応答するプロモータの制御下にエンドヌクレアーゼ遺伝子を配置し、エンドヌクレアーゼ遺伝子は転写因子に対する結合部位を有すること、及び2) パッケージされたウイルスゲノムに転写因子をコードする遺伝子を含むことを含む。転写アクチベータが同様に同じ細胞に提供されない場合、エンドヌクレアーゼは組換えAAV送達後に標的細胞又は組織において発現されないため、後者の工程が必要である。次いで転写アクチベータは、同族の小分子アクチベータで処理された細胞又は組織においてのみ、エンドヌクレアーゼの遺伝子の発現を誘導する。このアプローチは、いつ、どの組織に小分子インデューサーを送達するかを選択することによって、エンドヌクレアーゼの遺伝子の発現を時空間的様式で調節することを可能にするため、有利である。しかし、ウイルスゲノムにインデューサーを含める必要性は、運搬能力を著しく制限するものであり、このアプローチに対する欠点を生み出している。

【0285】

別の好ましい実施形態では、エンドヌクレアーゼの発現を妨げる転写リプレッサを発現する哺乳動物細胞株において、組換えAAV粒子が産生される。転写リプレッサは当技術分野において公知であり、Tetリプレッサ、Lacリプレッサ、Croリプレッサ、及びリプレッサが含まれる。エクジソン受容体等の多くの核ホルモン受容体はまた、それらの同族ホルモンリガンドの非存在下で、転写リプレッサとしても作用する。本発明を実施するために、パッケージングする細胞を、転写リプレッサをコードするベクターで形質移入/形質導入し、ウイルスゲノムのエンドヌクレアーゼ遺伝子(パッケージングベクター)を、リプレッサに対する結合部位を含むように改変したプロモータに作動可能に連結させ、リプレッサはプロモータをサイレンシングするようにする。転写リプレッサをコードする遺伝子は様々な位置に配置することができる。それは、別のベクトルにコードすることができる。それはITR配列の外部でパッケージングベクターに組み込むことができる。それはcap/repベクター又はアデノウイルスヘルパーベクターに組み込むことができる。あるいは、最も好ましくは、それは構成的に発現されるように、パッケージングする細胞のゲノムに安定して組み込むことができる。転写リプレッサ部位を組み込むために一般的な哺乳動物プロモータを改変する方法は、当技術分野において公知である。例えば、Chang及びRoninsonは、強力で構成的なCMV及びRSVプロモータを、Lacリプレッサ用のオペレータを含むように改変し、改変したプロモータによる遺伝子発現が、リプレッサを発現する細胞で非常に減弱されることを示した(Chang BD, and Roninson IB (1996) Gene 183 : 137-42)。非ヒト転写リプレッサを使用することで、エンドヌクレアーゼ遺伝子の転写が、リプレッサを発現するパッケージングする細胞においてのみ抑制され、得られた組換えAAVベ

10

20

30

40

50

ターで形質導入された標的細胞又は組織においては抑制されないことが確実になる。

【0286】

2.6 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ変異体

【0287】

本発明の実施形態は、本明細書に記載の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ及びその変異体を包含する。本発明の更なる実施形態は、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド及びそのようなポリヌクレオチドの変異体を包含する。

【0288】

本明細書で使用しているとき、「変異体」は実質的に類似の配列を意味することを意図している。「変異体」ポリペプチドは、天然タンパク質の1以上の内部の部位における1以上のアミノ酸の欠失若しくは付加、及び/又は天然ポリペプチドの1以上の部位における1以上のアミノ酸の置換によって、「天然」ポリペプチドから誘導されるポリペプチドを意味することを意図している。本明細書で使用しているとき、「天然の」ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、変異体が由来する親の配列を含む。実施形態に包含される変異体ポリペプチドは、生物学的に活性である。即ち、それらは天然のタンパク質の所望の生物学的活性を保有し続けている。即ち、B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのORF内の認識配列、例えばHBV1-2認識配列(配列番号10)、HBV5-6認識配列(配列番号12)、HBV7-8認識配列(配列番号14)、又はHBV11-12認識配列(配列番号16)を認識して切断する能力を保有し続けている。そのような変異体は、例えば、人間の操作から生じ得る。実施形態の天然のポリペプチドの生物学的に活性な変異体(例えば、配列番号18~39)、又は本明細書に記載の認識した半分の部位の結合サブユニットの生物学的に活性な変異体は、本明細書の他の箇所に記載されている配列アラインメントプログラム及びパラメータによって判定されるように、天然のポリペプチド又は天然のサブユニットのアミノ酸配列に対して、少なくとも約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の配列同一性を有する。実施形態のポリペプチド又はサブユニットの生物学的に活性な変異体は、そのポリペプチド又はサブユニットと約1~40程度のアミノ酸残基、約1~20程度、約1~10程度、約5程度、4、3、2、又は1アミノ酸残基程度少なくても、異なることがあり得る。

【0289】

実施形態のポリペプチドは、アミノ酸の置換、欠失、切断、及び挿入を含む様々な方法で改変することができる。そのような操作のための方法は、当技術分野で一般的に知られている。例えば、アミノ酸配列変異体は、DNAの突然変異によって作製することができる。突然変異誘発及びポリヌクレオチドの改変のための方法は、当技術分野において周知である。例えば、Kunkel(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.82:488-492;Kunkel et al.(1987)Methods in Enzymol.154:367-382;米国特許第4,873,192号;Walker and Gastra, eds.(1983)Techniques in Molecular Biology(MacMillan Publishing Company, ニューヨーク州)及びそれに引用されている参考文献を参照されたい。目的のタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸の置換に関する指針は、参照により本明細書に組み入れられる、Dayhoff et al.(1978)Atlas of Protein Sequence and Structure(Natl.Biomed.Res.Found., Washington, D.C.)のモデルに見出すことができる。1つのアミノ酸を類似した特性を有する他のものと交換するといった保存的な置換が最適であり得る。

【0290】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、本明細書に

開示されているHVR1及びHVR2領域の変異体を含み得る。親HVR領域は、例えば、例示の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの残基24～79又は残基215～270を含み得る。従って、変異体HVRは、本明細書に例示の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの残基24～79又は残基215～270に対応するアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができ、その結果変異体HVR領域が、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼの生物学的活性（即ち、認識配列への結合及び切断）を維持するようになる。更に、本発明のいくつかの実施形態では、変異型HVR1領域又は変異型HVR2領域は、親HVR内の特定の位置に見られるアミノ酸残基に対応する残基を含み得る。これに関連して、「に対応する」とは、変異体HVRのアミノ酸残基が、同じ対応する位置で（即ち、親配列の残りのアミノ酸に関連して）親HVR配列に存在する同じアミノ酸残基（即ち、別の同一の残基）であることを意味する。例として、親HVR配列が26位にセリン残基を含む場合、残基26に「対応する残基を含む」変異型HVRはまた、親の26位に対応する位置にセリンを含む。

10

**【0291】**

野生型I-CreIメガヌクレアーゼのDNA認識ドメインに対するかなりの数のアミノ酸の改変が、以前に同定されており（例えば、米国特許第8,021,867号）、それは単独で又は組み合わせて、DNAの認識配列の半分の部位の中の個々の塩基において特異性が改変された、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを生じ、得られた合理的に設計されたメガヌクレアーゼが、野生型酵素とは異なる半分の部位の特異性を有するようにする。表5は、認識した半分の部位の各々の半分の部位の位置（-1～-9）に存在する塩基に基づいて特異性を増強するために遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ単量体又はサブユニットにおいてなされ得る潜在的な置換を提供する。

20

**【0292】**

30

40

50

【表 5】

位置	好まれるセンス鎖の塩基										
	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	R70* H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75* H139 Q46* H46*				T46*			G70 A70 S70 G46*
-2	Q70 T44* A44* V44* I44* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	Q44*	C44*						
-3	Q68 C24* I24*	E68 F68 K24* R24*	R68	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 Q26*			S26*
-5		E42	R42			K28*	C28* Q42				M66 K66
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 I40 V40 C79 I79 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						S40 S28*
-7	N30* Q38	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38			C38				H38 N38 Q30*
-8	F33 Y33	E33 D33	F33 H33	L33 V33 I33 F33 C33		R32*	R33				
-9		E32	R32 K32	L32 V32 A32 C32				D32 I32			S32 N32 H32 Q32 T32

10

20

30

40

## 【0293】

太字のエントリは野生型の接触残基であり、本明細書で使用している「改変」を構成してはいない。アスタリスクは、残基がアンチセンス鎖の塩基と接触していることを示す。

## 【0294】

ポリヌクレオチドの場合、「変異体」は、天然のポリヌクレオチド内の1以上の部位における1以上のヌクレオチドの欠失及び/又は付加を含む。当業者は、実施形態の核酸の変異体が、オープンリーディングフレームを維持するように構築されることを認識する。ポリヌクレオチドに関して、保存的な変異体は、遺伝暗号の縮重のために、実施形態のポリペプチドのうちの1つのアミノ酸配列をコードするそれらの配列を含む。変異体のポリ

50



ヌクレオチドには、例えば部位志向的な突然変異誘発を用いることによって生成されるが、それでも実施形態の遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするもの等の、合成由来のポリヌクレオチドが含まれる。一般に、実施形態の特定のポリヌクレオチドの変異体は、本明細書の他の箇所に記載されている配列アラインメントプログラム及びパラメータによって定まる特定の当該のポリヌクレオチドに少なくとも約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又はそれ以上の配列同一性を有する。実施形態の特定のポリヌクレオチド（即ち、参照ポリヌクレオチド）の変異体はまた、変異体のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドとの間のパーセントの配列同一性の比較によって評価することができる。

【0295】

本明細書に包含されるタンパク質の配列の欠失、挿入、及び置換は、ポリペプチドの特徴に根本的な変化を生じさせるとは予想されない。しかし、置換、欠失、又は挿入の正確な効果を実行する前に予測することが困難である場合、当業者は、その効果が、B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのORF内の認識配列を優先的に認識して切断する能力についてポリペプチドをスクリーニングすることによって評価されるということを確認する。

【実施例】

【0296】

本発明を以下の実施例によって更に説明するが、これらは限定するものとして解釈されるべきではない。当業者は、日常的な実験のみを利用して、本明細書に記載の特定の物質や手順に対する多数の等価物を認識する、又は確認することができる。そのような均等物は、以下の実施例に続く特許請求の範囲に包含されることを意図している。

【0297】

実施例1；HBV認識配列を認識して切断するメガヌクレアーゼの特性決定

【0298】

HBV1-2認識配列を認識し切断するメガヌクレアーゼ

【0299】

本明細書において、まとめて「HBV1-2メガヌクレアーゼ」と呼ばれる遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（配列番号18~21）は、HBV1-2認識配列（配列番号10）を認識して切断するように遺伝子操作され、遺伝子型A、B、C、E、F、及びG（例えば、それぞれ配列番号3~5及び7~9）を含む複数のHBV遺伝子型のPタンパク質、S、preS2/S、及びpreS1/preS2 ORF内に位置付けられる。各HBV1-2遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、SV40由来のN末端ヌクレアーゼ局在化シグナル、第1のメガヌクレアーゼサブユニット、リンカー配列、及び第2のメガヌクレアーゼサブユニットを含む。各HBV1-2メガヌクレアーゼの第1のサブユニットは、配列番号10のHBV1の認識した半分の部位に結合し、一方第2のサブユニットは、HBV2の認識した半分の部位に結合する（図2参照）。

【0300】

HBV1結合サブユニット及びHBV2結合サブユニットはそれぞれ、HVR1及びHVR2とそれぞれ呼ばれる56塩基対の超可変領域を含む。HBV1結合サブユニットはHVR1領域外で高度に保存されている。同様に、HBV2結合サブユニットもまた、HVR2領域外で高度に保存されている。配列番号18~21のHBV1結合領域は、それぞれ配列番号40~43として提供される。配列番号40~43のそれぞれは、メガヌクレアーゼHBV1~2x.2（配列番号18）のHBV1結合領域である配列番号40と少なくとも90%の配列同一性を共有する。配列番号18~21のHBV2結合領域は、それぞれ配列番号44~47として提供されている。配列番号44~47のそれぞれは、メガヌクレアーゼHBV1~2x.2（配列番号18）のHBV2結合領域である配列番号44と少なくとも90%の配列同一性を共有する。

10

20

30

40

50

【 0 3 0 1 】

H B V 5 - 6 認識配列を認識し切断するメガヌクレアーゼ

【 0 3 0 2 】

本明細書において、まとめて「H B V 5 - 6 メガヌクレアーゼ」と呼ばれる遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（配列番号 2 2 ~ 2 8）は、H B V 5 - 6 認識配列（配列番号 1 2）を認識して切断するように遺伝子操作され、遺伝子型 A、B、C、D、E、及び G（例えば、それぞれ配列番号 3 ~ 7 及び 9）を含む複数の H B V 遺伝子型の P タンパク質、S、p r e S 2 / S、及び p r e S 1 / p r e S 2 O R F 内に位置付けられる。各 H B V 5 - 6 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、S V 4 0 由来の N 末端ヌクレアーゼ局在化シグナル、第 1 のメガヌクレアーゼサブユニット、リンカー配列、及び第 2 のメガヌクレアーゼサブユニットを含む。各 H B V 5 - 6 メガヌクレアーゼの第 1 のサブユニットは、配列番号 1 2 の H B V 5 の認識した半分の部位に結合し、一方第 2 のサブユニットは、H B V 6 の認識した半分の部位に結合する（図 2 参照）。

10

【 0 3 0 3 】

H B V 5 結合サブユニット及び H B V 6 結合サブユニットはそれぞれ、H V R 1 及び H V R 2 とそれぞれ呼ばれる 5 6 塩基対の超可変領域を含む。H B V 5 結合サブユニットは H V R 1 領域外で高度に保存されている。同様に、H B V 6 結合サブユニットもまた、H V R 2 領域外で高度に保存されている。配列番号 2 2 ~ 2 8 の H B V 5 結合領域は、それぞれ配列番号 4 8 ~ 5 4 として提供される。配列番号 4 8 ~ 5 4 のそれぞれは、メガヌクレアーゼ H B V 5 ~ 6 x . 3 3（配列番号 2 2）の H B V 5 結合領域である配列番号 4 9 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を共有する。配列番号 2 2 ~ 2 8 の H B V 6 結合領域は、それぞれ配列番号 5 5 ~ 6 1 として提供されている。配列番号 5 5 ~ 6 1 のそれぞれは、メガヌクレアーゼ H B V 5 ~ 6 x . 3 3（配列番号 2 2）の H B V 5 結合領域である配列番号 5 5 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を共有する。

20

【 0 3 0 4 】

H B V 7 - 8 認識配列を認識し切断するメガヌクレアーゼ

【 0 3 0 5 】

本明細書において、まとめて「H B V 7 - 8 メガヌクレアーゼ」と呼ばれる遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（配列番号 2 9 ~ 3 2）は、H B V 7 - 8 認識配列（配列番号 1 4）を認識して切断するように遺伝子操作され、遺伝子型 A、B、C、D、F、及び G（例えば、それぞれ配列番号 3 ~ 6、8、及び 9）を含む複数の H B V 遺伝子型の P タンパク質 O R F 内に位置付けられる。各 H B V 7 - 8 遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、S V 4 0 由来の N 末端ヌクレアーゼ局在化シグナル、第 1 のメガヌクレアーゼサブユニット、リンカー配列、及び第 2 のメガヌクレアーゼサブユニットを含む。各 H B V 7 - 8 メガヌクレアーゼの第 1 のサブユニットは、配列番号 1 4 の H B V 7 の認識した半分の部位に結合し、一方第 2 のサブユニットは、H B V 8 の認識した半分の部位に結合する（図 2 参照）。

30

【 0 3 0 6 】

H B V 7 結合サブユニット及び H B V 8 結合サブユニットはそれぞれ、H V R 1 及び H V R 2 とそれぞれ呼ばれる 5 6 塩基対の超可変領域を含む。H B V 7 結合サブユニットは H V R 1 領域外で高度に保存されている。同様に、H B V 8 結合サブユニットもまた、H V R 2 領域外で高度に保存されている。配列番号 2 9 ~ 3 2 の H B V 7 結合領域は、それぞれ配列番号 6 2 ~ 6 5 として提供される。配列番号 6 2 ~ 6 5 のそれぞれは、メガヌクレアーゼ H B V 7 ~ 8 x . 2（配列番号 2 9）の H B V 7 結合領域である配列番号 6 2 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を共有する。配列番号 2 9 ~ 3 2 の H B V 8 結合領域は、それぞれ配列番号 6 6 ~ 6 9 として提供されている。配列番号 6 6 ~ 6 9 のそれぞれは、メガヌクレアーゼ H B V 7 ~ 8 x . 2（配列番号 2 9）の H B V 8 結合領域である配列番号 6 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を共有する。

40

【 0 3 0 7 】

H B V 1 1 - 1 2 認識配列を認識し切断するメガヌクレアーゼ

50

## 【0308】

本明細書において、まとめて「HBV 11 - 12メガヌクレアーゼ」と呼ばれる遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ（配列番号33～39）は、HBV 11 - 12認識配列（配列番号16）を認識して切断するように遺伝子操作され、遺伝子型A、B、C、D、E、F、及びG（例えば、それぞれ配列番号3～9）を含む複数のHBV遺伝子型のPタンパク質ORF内に位置付けられる。各HBV 11 - 12遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは、SV40由来のN末端ヌクレアーゼ局在化シグナル、第1のメガヌクレアーゼサブユニット、リンカー配列、及び第2のメガヌクレアーゼサブユニットを含む。各HBV 11 - 12メガヌクレアーゼの第1のサブユニットは、配列番号16のHBV 11の認識した半分の部位に結合し、一方第2のサブユニットは、HBV 12の認識した半分の部位に結合する（図2参照）。

10

## 【0309】

HBV 11結合サブユニット及びHBV 12結合サブユニットはそれぞれ、HVR 1及びHVR 2とそれぞれ呼ばれる56塩基対の超可変領域を含む。HBVs 11結合サブユニットはHVR 1領域外で高度に保存されている。同様に、HBV 12結合サブユニットもまた、HVR 2領域外で高度に保存されている。配列番号33～39のHBV 11結合領域は、それぞれ配列番号70～76として提供される。配列番号70～76のそれぞれは、メガヌクレアーゼHBV 11 - 12x . 26（配列番号33）のHBV 11結合領域である配列番号70と少なくとも90%の配列同一性を共有する。配列番号33～39のHBV 12結合領域は、それぞれ配列番号77～83として提供されている。配列番号77～83のそれぞれは、メガヌクレアーゼHBV 11 - 12x . 26（配列番号33）のHBV 12結合領域である配列番号77と少なくとも90%の配列同一性を共有する。

20

## 【0310】

CHO細胞レポーターアッセイにおけるHBV認識配列の切断

## 【0311】

HBV 1 - 2、HBV 5 - 6、HBV 7 - 8、及びHBV 11 - 12メガヌクレアーゼがそれらのそれぞれの認識配列（それぞれ配列番号10、12、14、及び16）を認識し切断することができるかどうかを判断するために、それぞれ遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを、以前に記載したCHO細胞レポーターアッセイを使用して評価した（国際公開第2012/167192号パンフレット、図6を参照）。アッセイを実施するために、細胞のゲノムに組み込まれた非機能的緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子発現カセットを保有するCHO細胞レポーター株を作製した。メガヌクレアーゼによるいずれかの認識配列の細胞内切断が相同組換え事象を刺激して機能的なGFP遺伝子を生じるように、各細胞株のGFP遺伝子を一对の認識配列によって中断した。

30

## 【0312】

この研究のために発現させたCHOレポーター細胞株において、GFP遺伝子に挿入された1つの認識配列は、HBV 1 - 2認識配列（配列番号10）、HBV 5 - 6認識配列（配列番号12）、HBV 7 - 8認識配列（配列番号12）、及びHBV 11 - 12認識配列（配列番号16）であった。GFP遺伝子に挿入された第2の認識配列は、CHO - 23 / 24認識配列であったが、これは「CHO - 23 / 24」と呼ばれる対照メガヌクレアーゼによって認識され切断されるものである。HBV 1 - 2認識配列及びCHO - 23 / 24認識配列を含むCHOレポーター細胞は、「HBV 1 - 2細胞」と呼ばれる。HBV 5 - 6認識配列及びCHO - 23 / 24認識配列を含むCHOレポーター細胞は、「HBV 5 - 6細胞」と呼ばれる。HBV 7 - 8認識配列及びCHO - 23 / 24認識配列を含むCHOレポーター細胞は、「HBV 7 - 8細胞」と呼ばれる。HBV 11 - 12認識配列及びCHO - 23 / 24認識配列を含むCHOレポーター細胞は、「HBV 11 - 12細胞」と呼ばれる。

40

## 【0313】

CHOレポーター細胞を、それらの対応する遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードするプラスミドDNA（例えば、HBV 1 - 2細胞を、HBV 1 - 2メガヌクレアーゼ

50

をコードするプラスミドDNAで形質移入した)、又はCHO-23/34メガヌクレアーゼをコードするプラスミドDNAで、形質移入した。各アッセイにおいて、 $4 \times 10^5$ のCHOレポーター細胞を、製造元の説明書に従ってLipofectamine 2000 (ThermoFisher)を用いて、96ウェルプレートにおける50ngのプラスミドDNAで形質移入した。形質移入の48時間後に、細胞をフローサイトメトリーにより評価して、形質移入されていない陰性の対照(HBVbs)と比較し、GFP陽性細胞の割合を判定した。図7A~図7Dに示しているように、全てのHBVメガヌクレアーゼは、陰性の対照を有意に超える頻度で、それらの対応する認識配列を含む細胞株においてGFP陽性細胞を産生することが見出された。

【0314】

10

また、HBV1-2、HBV5-6、HBV7-8、及びHBV11-12メガヌクレアーゼの有効性は、メガヌクレアーゼをCHOレポーター細胞に導入した後2、5、7、9、及び12日後に時間依存的に判定した。この研究では、製造元の説明書に従ってBioRad Gene Pulser Xcellを使用して、HBV1-2、HBV5-6、HBV7-8、又はHB11-12細胞( $1.0 \times 10^6$ )に1細胞あたり $1 \times 10^6$ コピーのメガヌクレアーゼmRNAをエレクトロポレーションした。形質移入後の指定の時点で、細胞をフローサイトメトリーによって評価して、GFP陽性細胞の割合を判定した。CHO-23/24メガヌクレアーゼもまた、各時点で陽性対照として含めた。

【0315】

20

図8A~図8Dに示すように、異なるHBVメガヌクレアーゼによって産生された%GFPは、経時的に変化した。HBV5-6及びHBV11-12メガヌクレアーゼが、分析した12日間にわたって実質的に一致していた(図8B及び図8D)のに対し、HBV1-2及びHBV7-8メガヌクレアーゼは、実験の過程で減少した初期の時点にて、高レベルのGFP陽性細胞を産生した。

【0316】

結論

【0317】

これらの研究は、本発明に包含されているHBVメガヌクレアーゼが細胞内のそれぞれの認識配列を効率的に標的化して切断することができ、その効果が経時的に一定であるか、一過性であり得ることを示した。

30

【0318】

実施例2; HBV特異的ヌクレアーゼは大腸菌のプラスミドDNAを除去する

【0319】

エピソームDNAを利用した細菌レポーターシステム

【0320】

本実験の目的は、本発明のHBVメガヌクレアーゼを、大腸菌レポーターシステムにおいてエピソームDNAプラスミド内の認識配列を認識して切断する能力について評価することであった。

【0321】

「pARCUS」と呼ばれるプラスミドを、ARCUSヌクレアーゼの誘導性発現を駆動するために作製した(図9A)。pARCUSでは、ARCUSヌクレアーゼ(ここでは、HBV5-6x.33又はHBV11-12xのいずれか)をIPTG誘導性プロモータの制御下に置く。更に、形質転換した細菌の選択を可能にするために、pARCUSはアンピシリン耐性遺伝子をコードする。pARCUSは、低コピーのプラスミドであるので、ARCUSヌクレアーゼの誘導した発現は、過剰な発現を引き起こさない。

40

【0322】

「pHBVa」と呼ばれる追加のプラスミドが生成された(図9A)。pHBVaは、HBV5-6及びHBV11-12の認識配列を含む、HBVゲノムの大きな断片を保有している。このプラスミドはまた、カナマイシン耐性遺伝子及びSacB遺伝子をコードする。カナマイシン耐性遺伝子は、形質転換させた細菌の選択を可能にするものであり、

50

S a c B 遺伝子はスクロースの存在下で活性である毒素である。従って、p H B V a で形質転換された細菌は、培地のカナマイシンの存在下では生存するが、カナマイシン及びスクロースの存在下では生存しない。p H B V a は、H B V ゲノムの多くのコピーがあり得る H B V 感染細胞を複製する試みにおいて、高コピーのプラスミドであるように設計した。重要なことに、p H B V a は、p A R C U S とは異なる複製の起点を利用しており、細菌と両方のプラスミドとの同時の形質転換が可能になる。

#### 【 0 3 2 3 】

細菌をこれらのプラスミドで同時に形質転換し、選択的な圧力の様々な組み合わせを含有する培地において増殖させた（アンピシリン、カナマイシン、又はスクロース）場合、複数の可能な結果が存在している。p A R C U S で形質転換され、アンピシリンの存在下で増殖される細菌は、p A R C U S プラスミドを保有するであろうが、増殖培地が I P T G を補充されないと、コードされたヌクレアーゼを発現しない。I P T G で誘導すると、コードされたヌクレアーゼが発現される。p H B V a で形質転換された細菌はカナマイシンの存在下で増殖するが、カナマイシン及びスクロースの場合は増殖しない。アンピシリン及び / 又はカナマイシンの存在下にて p A R C U S 及び p H B V a で同時に形質転換された細菌は、スクロースに対して感受性がある。p A R C U S 及び p H B V で同時に形質転換された細菌において、I P T G を用いた A R C U S ヌクレアーゼの誘導は、ヌクレアーゼの発現をもたらす、それが次に p H B V a にてコードされた標的部位を切断し得ることが予測された。当該の部位での切断が p H B V a プラスミドの線状化をもたらすと予想したが、それは細菌のヌクレアーゼによって急速に分解されるはずである。p H B V プラスミドの分解は、細菌がカナマイシンに対する耐性を失うこと、その一方でスクロースの存在下で生き残ることができること、という 2 つの結果をもたらすであろう。

10

20

#### 【 0 3 2 4 】

同時の形質転換の結果を検証するために、細菌を p A R C U S 及び p H B V a で（エレクトロポレーションにより）同時に形質転換し、播種前に 3 時間アンピシリンの存在下で培養した。並行する培養において、同時に形質転換させた細胞を I P T G で処理し（3 時間）、ヌクレアーゼの発現を誘導し、p H B V a の切断を可能にした。次いで、細胞を、アンピシリン、アンピシリン及びスクロース、又はアンピシリン及びカナマイシンの存在下で、寒天プレートに蒔いた。プレートを一晚インキュベートし、コロニーを数えて細菌の生存を評価した。

30

#### 【 0 3 2 5 】

結果

#### 【 0 3 2 6 】

各選択プレートに存在するコロニーの数により、A R C U S ヌクレアーゼが p H B V a プラスミドを切断し得ることの劇的な証拠が得られた。対照のアンピシリンプレートでは、非誘導培養物又は I P T G 誘導培養物のいずれかからのコロニー数は、p H B V a 及びいずれかの p A R C U S プラスミドで同時に形質転換された細胞について、同等であった（図 9 B）。H B V 5 - 6 x . 3 3 をコードする p A R C U S で同時に形質転換した細菌と、H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 をコードする p A R C U S で同時に形質転換した細菌との間にコロニー数の差があったが、これは形質転換の効率を反映していると思われる。

40

#### 【 0 3 2 7 】

著しく対照的に、アンピシリンとスクロースの両方を含むプレートでの非 I P T G 誘導培養物からのコロニー数は劇的に少なくなっており、これはスクロースが利用可能である場合に S a c B 遺伝子が細胞殺傷に有効であることを示している（図 9 B）。しかし、I P T G で誘導された培養物は、アンピシリンとスクロースの両方を含有するプレートで非常によく成長しており、このことは、S a c B 遺伝子を除去したことを示している。p H B V a、及び H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 をコードする p A R C U S で同時に形質転換された（しかし I P T G で誘導されていない）細菌のコロニー数は、アンピシリン対照プレートのもと同じであり、p A R C U S 5 - 6 x . 3 3 で同時に形質転換された細菌は、対照プレートと比較して、ほんのわずかに減少した。

50

## 【0328】

非IPTG誘導培養物は、アンピシリンとカナマイシンの両方を含有するプレートで増殖することができた(図9B)。HBV 11-12x.26をコードするpAROUSで同時に形質転換した細菌からのコロニー数は、対照のアンピシリンのみのプレートとほぼ等しく、pAROUS HBV5-6x.33で同時に形質転換した細胞は、対照と比較して、ほんのわずかに減少した。しかし、アンピシリン及びカナマイシンを含有するプレートでIPTG誘導細胞を増殖させた場合、コロニー数はゼロに近く、これはカナマイシン耐性遺伝子を保有するプラスミドの排除を示していた(図9B)。

## 【0329】

結論

10

## 【0330】

これらのデータは、HBVゲノムの部位を認識する本発明のHBVメガヌクレアーゼがpHBVaプラスミドを切断することができ、その結果pHBVaプラスミドが排除されることを明白に実証している。IPTG誘導培養物では、細胞はスクロースの存在下で増殖しており、これはSacB含有プラスミドを効率的に除去したことを示している。同様に、IPTG誘導培養物において、細胞はカナマイシンの存在下で死滅し、これはまた、pHBVaプラスミドを破壊したことを強く示唆している。HBVcccDNAを切断するために本発明のHBVメガヌクレアーゼを使用して、HBV感染哺乳動物細胞において同様の結果が起こり得る可能性がある。細菌では、直鎖状DNAはすぐに除去される。哺乳動物細胞での線状化cccDNAも、細胞のメガヌクレアーゼによって消化されることが考えられる。切断がcccDNAの線状化及び排除につながらないとしても、HBVARCUSメガヌクレアーゼによって引き起こされるインデルの突然変異は、コードする領域を破壊し、cccDNAが機能的HBVタンパク質を産生することを不可能にする見込みがある。従って、HBVゲノムの部位を標的とする本発明のメガヌクレアーゼは、HBVcccDNAを排除又は不活性化するための有効な方法であるはずである。

20

## 【0331】

実施例3；細胞でのHBVウイルスゲノムの標的化

## 【0332】

HBVゲノムを発現するAD38細胞の治療

## 【0333】

これらの実施例の主な目的は、本発明のメガヌクレアーゼがHBV感染哺乳動物細胞のHBVゲノムを不活性化及び/又は排除することができるかどうかを評価することであった。

30

## 【0334】

第1の研究では、メガヌクレアーゼの有効性は、Tetプロモータ下でHBVゲノムを安定的に発現するAD38細胞系において評価された。このAD38細胞系は活性ウイルス粒子を生成しないが、細胞培地で検出可能であるHBVS抗原(HBsAg)を生成する。本研究では、細胞にHBV5-6x.33又はHBV11-12x.26をコードするDNAプラスミドで形質移入した。これらの遺伝子操作されたメガヌクレアーゼは両方とも、重複するS(HBsAg遺伝子)及びP(ポリメラーゼ遺伝子)リーディングフレーム内の配列を標的とするHBV5-6x.33、及びP遺伝子を標的とするHBV11-12x.26を用い、HBVゲノムに特異的な配列を標的とする。対照として、AD38細胞を、赤色蛍光タンパク質(RFP)遺伝子をコードするプラスミドで形質移入した。細胞を播種し、24時間後にリポソームベースの形質移入プロトコルを用いてプラスミドで形質移入した。形質移入の24時間後、AD38細胞を洗浄して、残っているリポソーム複合体を除去した。形質移入後3日目及び7日目に、細胞の上清を回収し、ELISAによってHBsAgの存在についてアッセイした。

40

## 【0335】

結果

## 【0336】

50

E L I S A のデータを、形質移入後 3 日目及び 7 日目に、R F P 形質移入の A D 3 8 細胞の上清に存在する H B s A g の量に対して正規化した。形質移入後 3 日目に、H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 をコードするプラスミドで形質移入した細胞は、R F P 形質移入の細胞と比較して、上清に約 2 5 % 少ない H B s A g を示した ( 図 1 0 ) 。同じ時点で、H B V 5 - 6 x . 3 3 をコードするプラスミドで形質移入した細胞は、R F P 形質移入の細胞と比較して、上清に約 5 0 % 少ない H B s A g を示した ( 図 1 0 ) 。非形質移入の対照細胞は、R F P 形質移入の細胞と本質的に同じであった。H B s A g の減少は形質移入後 7 日目で更に明白であった。H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 で形質移入した A D 3 8 細胞は、R F P で形質移入した細胞よりも約 5 0 % 低い H B s A g のレベルを示し、H B V 5 - 6 x . 3 3 で形質移入した細胞は、R F P 対照より約 7 5 % 低いレベルを示した ( 図 1 0 ) 。形質移入後 7 日目に、R F P で形質移入した細胞は、非形質移入細胞と比較して上清の H B s A g が有意に少なく、これは形質移入のプロセスが細胞の H B s A g 産生能に悪影響を及ぼしたことを示唆している。それにもかかわらず、その影響は、H B V メガヌクレアーゼをコードするプラスミドで形質移入された細胞において、はるかに顕著であり、上清の H B s A g レベルの減少がメガヌクレアーゼの活性によるものであることを強く示唆している。

10

【 0 3 3 7 】

結論

【 0 3 3 8 】

これらのデータは、H B V 5 - 6 x . 3 3 又は H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 のいずれかをコードするプラスミドで形質移入された A D 3 8 細胞が、非形質移入細胞又は R F P レポーター遺伝子で形質移入された細胞と比較して、上清の H B s A g が劇的に減少したことを示している。H B V メガヌクレアーゼのいずれかで形質移入した細胞における上清の H B s A g レベルの減少は、その減少が A D 3 8 細胞の H B V ゲノムに対するメガヌクレアーゼ活性に起因することを強く示唆している。

20

【 0 3 3 9 】

実施例 4 ; 細胞での H B V ウイルスゲノムの標的化

【 0 3 4 0 】

H B V ゲノムを発現する A D 3 8 細胞の治療

【 0 3 4 1 】

上記の実施例 3 の研究は、H B V ゲノム発現 A D 3 8 細胞系からの H B s A g の分泌を減少させることにおけるメガヌクレアーゼの有効性を実証している。H B s A g の分泌の更に大きな減少が、プラスミドの形質移入の代わりにレンチウイルスの送達を用いて達成され得るかどうかを判断するために、H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 及び H B V 5 - 6 x . 3 3 メガヌクレアーゼを個々に又は組み合わせて用いるレンチウイルスの送達で、この研究を繰り返した。

30

【 0 3 4 2 】

R F P 、 H B V 5 - 6 x . 3 3 又は H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 のいずれかを発現するレンチウイルスを作製し、A D 3 8 細胞を形質導入して、H B s A g の産生に対するメガヌクレアーゼの影響を判定した。A D 3 8 細胞を播種し、2 4 時間後に、R F P 、 H B V 5 - 6 x . 3 3 、 H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 をコードするレンチウイルス、又は H B V メガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスの 1 : 1 の混合物のいずれかで形質導入した。細胞に、1、2、又は 4 の M O I で単一のレンチウイルスで形質導入した。H B V メガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスの 1 : 1 の混合物で形質導入された細胞は、2 及び 4 の総 M O I で形質導入された。形質導入細胞の培地は、形質導入後 1 日目及び 3 日目に交換した。形質導入後 7 日目に細胞の上清を回収し、E L I S A により H B s A g の存在についてアッセイした。

40

【 0 3 4 3 】

結果

【 0 3 4 4 】

50

E L I S A のデータを、形質移入後 7 日目に、R F P 形質導入の A D 3 8 細胞の上清に存在する H B s A g の量に対して正規化した。M O I が 1 の場合、H B V 5 - 6 x . 3 3 で形質導入された A D 3 8 細胞は、R F P 発現レンチウイルスで形質導入された A D 3 8 細胞よりも上清に約 6 0 % 少ない H B s A g を示した ( 図 1 1 ) 。また、M O I が 1 の場合、H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 は R F P よりも約 4 0 % 少ない H B s A g を示した。より高い M O I では、H B V メガヌクレアーゼの影響はより顕著であった。M O I が 2 の場合、H B V 5 - 6 x . 3 3 をコードするレンチウイルスで形質導入された細胞は、R F P で形質導入された細胞と比較して約 8 0 % の H B s A g の減少を示し、M O I が 4 の場合、減少は比較すると約 9 0 % であった。同様に、M O I が 2 の場合、H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 をコードするレンチウイルスで形質導入された細胞は、R F P で形質導入された細胞よりも約 7 0 % 少ない H B s A g を示し、M O I が 4 の場合、H B s A g は約 8 0 % 低かった。また最後に、H B V メガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスの 1 : 1 の混合物で形質導入された細胞は、R F P 形質導入の対照の細胞と比較して、上清の H B s A g のレベルが劇的に減少したことを示した ( 図 1 1 ) 。総 M O I が 2 の場合、H B V 発現レンチウイルスは、H B s A g の発現を約 8 0 % 減少させ、総 M O I が 4 の場合、発現は約 9 0 % 減少した。

10

【 0 3 4 5 】

結論

【 0 3 4 6 】

これらのデータは、R F P 発現レンチウイルスで形質導入された細胞と比較して、H B V 5 - 6 x . 3 3 若しくは H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 、又は両方の組み合わせをコードするレンチウイルスで形質導入された A D 3 8 細胞が、上清の H B s A g の劇的な減少を示すことを実証する。H B V メガヌクレアーゼのいずれか又は両方を発現するレンチウイルスで形質導入された細胞における上清の H B s A g のレベルの減少は、その減少が A D 3 8 細胞の H B V ゲノムに対するメガヌクレアーゼの活性に起因することを強く示唆している。更に、これらのデータは、H B V メガヌクレアーゼの共発現が H B s A g の発現を効果的に減少させることを実証し、このことは共発現されたメガヌクレアーゼが H B V ゲノムを効果的にすることができることを強く示唆している。

20

【 0 3 4 7 】

実施例 5 ; 細胞での H B V ウイルスゲノムの標的化

30

【 0 3 4 8 】

H B V ゲノムを発現する A D 3 8 細胞の治療

【 0 3 4 9 】

更なる研究において、H B s A g の分泌に対するメガヌクレアーゼの処理の効果、細胞培養培地に存在する H B V D N A コピー、及び細胞内の H B V c c c D N A コピーを観察するために、A D 3 8 細胞を、H B V 5 - 6 x . 3 3 又は H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 メガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスで形質導入した。

【 0 3 5 0 】

上記の実施例 4 と同様に、R F P ( L V 2 1 2 ) 、H B V 5 - 6 x . 3 3 ( L V 2 2 4 ) 、又は H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 ( L V 2 2 5 ) のいずれかを発現するレンチウイルスを生成し、A D 3 8 細胞を形質導入して、メガヌクレアーゼの各実験結果に与える影響を判定した。A D 3 8 細胞をテトラサイクリンの存在下で播種し、2 4 時間後に、4 の M O I で、R F P 、H B V 5 - 6 x . 3 3 又は H B V 1 1 - 1 2 x . 2 6 をコードするレンチウイルスで形質導入した。形質導入細胞の培地を形質導入 2 4 時間後に交換した。形質導入後 7 日目に、細胞の上清を回収し、E L I S A により H B s A g の存在についてアッセイした。細胞培養液 5 μ L 当たりの細胞外 H B V D N A のコピーを定量的 P C R により判断した。細胞溶解物を得て、5 μ L の細胞溶解物当たりの H B V c c c D N A の細胞内のコピーを、定量的 P C R によって判定した。

40

【 0 3 5 1 】

結果

50



## 【0352】

4のMOIにおいて、HBV5-6x.33及びHBV11-12x.26で形質導入されたAD38細胞は、形質導入後7日で、RFP発現レンチウイルスで形質導入されたAD38細胞よりも、細胞培養培地においてそれぞれ約58%及び25%少ないHBsAgを示した(図12A)。細胞外のHBVDNAのコピー数もまた、RFP発現レンチウイルスによる形質導入と比較した場合、HBV5-6x.33及びHBV11-12x.26メガヌクレアーゼによる形質導入によって、それぞれ約28%及び50%減少した(図12B)。最終的に、細胞内のHBVcccDNAのコピー数もまた、RFP発現レンチウイルスによる形質導入と比較した場合、HBV5-6x.33及びHBV11-12x.26メガヌクレアーゼによる形質導入によって、それぞれ約71%及び60%減少した(図12C)。

## 【0353】

結論

## 【0354】

これらのデータは更に、HBV5-6x.33又はHBV11-12x.26メガヌクレアーゼのいずれかをコードするレンチウイルスで形質導入したAD38細胞が、RFP発現レンチウイルスで形質導入した細胞と比較して、上清のHBsAgの劇的な減少を示すことを実証している。更に、これらのデータは、本発明のHBVメガヌクレアーゼがまた細胞外のHBVDNAのコピー数を減少させ、重要なことに、HBVcccDNAの細胞内のコピー数を有意に減少させることを実証している。

## 【0355】

実施例6；HBV感染初代ヒト肝細胞の治療

## 【0356】

HBV感染初代ヒト肝細胞の治療

## 【0357】

上記の実施例の研究は、HBVゲノム発現AD38細胞系からのHBsAgの分泌を減少させることにおけるメガヌクレアーゼの有効性を実証する。本実施例の研究は、HBV感染初代ヒト肝細胞における本発明のHBVメガヌクレアーゼの有効性を判定するために行われた。

## 【0358】

RFP、HBV5-6x.33又はHBV11-12x.26を発現するレンチウイルスを作製し、HBV感染初代ヒト肝細胞を形質導入して、HBsAg及びHBeAgの産生に対するメガヌクレアーゼの影響を判定した。簡潔には、初代ヒト肝細胞を播種し、24時間後にHBVに感染させた。感染後1日目に細胞を洗浄し、24時間後(感染後2日目)に、RFP、HBV5-6x.33、HBV11-12x.26をコードするレンチウイルス、又はHBVメガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスの1:1の混合物のいずれかで形質導入した。更なる対照として、感染させた細胞をDMSOで処理した。細胞の上清を回収し、形質導入後4日目、8日目、11日目、及び13日目に培地を交換した。各時点で、HBsAg及びHBeAgをELISAにより細胞の上清で測定した。また、上清の中の細胞外DNAを感染後13日目に測定した。

## 【0359】

結果

## 【0360】

一般に、レンチウイルス形質導入がHBsAg又はHBeAgのいずれかの分泌に影響を及ぼすかどうかを判断するために、RFPをコードするレンチウイルスで形質導入した細胞から得た細胞の上清を、DMSOで処理した細胞と比較した(図13)。RFPをコードするレンチウイルスを用いたHBV感染初代ヒト肝細胞の形質導入は、HBsAg又はHBeAgの分泌に対する影響があったとしてもわずかであった(図13A及び図13B)。5又は2.5のMOIでは、HBsAgのレベルはDMSOで処理した細胞と同一であり、1.25のMOIではわずかな減少しかない(図13A)。同様に、RFP-レ

レンチウイルス形質導入細胞の上清のHBsAgのレベルは、DMSOで処理した細胞と比較した場合に、1.25、2.5、又は5のMOIでほんのわずかな減少を示している（図13B）。更に、HBV感染初代ヒト肝細胞の上清にて検出された細胞外のHBVの量は、DMSOで処理した細胞と、RFPをコードするレンチウイルスで形質導入された細胞との間にほとんど差異を示していない（図13C）。

#### 【0361】

レンチウイルス形質導入は、一般に、感染した初代ヒト肝細胞におけるHBV機能に影響を及ぼさないことを示したので、HBVメガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスをRFPレンチウイルスと比較した。HBsAgのELISAのデータを、形質導入後3日目、8日目、11日目、及び13日目に、RFP形質導入HBV感染初代ヒト肝細胞の上清に存在するHBsAgの量に対して正規化した（図14）。2.5及び1.25のMOIの両方で、HBV5-6x.33をコードするレンチウイルスで形質導入した細胞は、実験の経過にわたってHBsAgの着実な減少を示し、RFP対照と比較したときに、3日目にわずかにレベルの減少、8日目までに約50～60%の減少、並びに11日目及び13日目までに約90%の減少を示した（図14A及び14B）。HBV11-12x.26で形質導入した感染細胞は、MOIが2.5と1.25の両方で同様のパターンを示し、3日目の時点でより顕著な減少（約50%の減少）を示し、それでも依然、形質導入後11日目及び13日目までに約90%の減少を達成した（図14A及び図14B）。感染細胞を、HBVメガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスの1:1混合物で形質導入した場合、HBsAgの同様の減少が経時的に観察された。2.5のMOIでは、レベルは形質導入後3日目に約50%減少し、減少は継続して、形質導入後11日目及び13日目までに90%に達した（図14A及び図14B）。

10

20

#### 【0362】

また、HBsAgのELISAのデータを、形質導入後3日目、8日目、11日目、及び13日目に、RFP形質導入HBV感染初代ヒト肝細胞の上清に存在するHBsAgの量に対して正規化した（図14）。2.5及び1.25のMOIの両方で、HBV5-6x.33をコードするレンチウイルスで形質導入した細胞は、実験の経過にわたってHBsAgの着実な減少を示し、RFP対照と比較したときに、3日目に約25%のレベルの減少、8日目までに約50%の減少、並びに11日目及び13日目までに約90%の減少を示した（図14C及び図14D）。HBV11-12x.26で形質導入した感染細胞は、MOIが2.5と1.25の両方で同様のパターンを示し、3日目の時点で類似した減少（約30%の減少）を示し、それでも依然、形質導入後11日目及び13日目までにHBsAgの約90%の減少を達成した（図14C及び図14D）。感染細胞を、HBVメガヌクレアーゼをコードするレンチウイルスの1:1混合物で形質導入した場合、HBsAgの同様の減少が経時的に観察された。2.5及び1.25のMOIでは、レベルは形質導入後3日目に約50%減少し、減少は継続して、形質導入後11日目及び13日目までに90%に達した（図14C及び図14D）。

30

#### 【0363】

結論

#### 【0364】

これらのデータは、RFP発現レンチウイルスで形質導入された細胞と比較して、HBV5-6x.33若しくはHBV11-12x.26、又はその2つの組み合わせをコードするレンチウイルスで形質導入されたHBV感染初代ヒト肝細胞が、上清のHBsAg及びHBsAgの劇的な減少を示すことを実証する。感染させた細胞の上清のHBsAg及びHBsAgのレベルにおける減少は、HBVメガヌクレアーゼのいずれか又は両方を発現するレンチウイルスで形質導入され、その減少が感染性ウイルスに対するメガヌクレアーゼの活性に起因することを強く示唆している。

40

#### 【0365】

実施例7；LNP封入メガヌクレアーゼmRNAの肝臓への送達

#### 【0366】

50

## 脂質ナノ粒子での mRNA の封入とマウスへの送達

## 【0367】

この研究の目的は、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする脂質ナノ粒子 (LNP) 封入 mRNA を作製してインビボで投与でき、肝臓における遺伝子編集が起り、観察され得ることを実証することである。

## 【0368】

マウスの肝臓で発現されるマウス CMP - NeuAc ヒドロラーゼ (Cmah) 遺伝子の認識配列に対して特異性を有する遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを発現させた。Cmah メガヌクレアーゼをコードする ARCA キャップ mRNA を TriLink Bio Technologies LLC (カリフォルニア州サンディエゴ) が作製し、3つの異なる市販の LNP 製剤に封入しており、各々は様々な比率のイオン性カチオン性脂質、PEG 脂質、及びコレステロールを含む。LNP 封入 mRNA を、1.0 mg/kg の用量で、IV 注射により CD-1 マウスに投与した。投与の6日後に肝臓を採取した。臓器採取の前に、動物を食塩水で灌流した。全肝臓ゲノム DNA (gDNA) を単離し、Cmah 遺伝子における挿入/欠失 (インデル) 突然変異の頻度を、T7 エンドヌクレアーゼ I (T7E) アッセイ及びディープシーケンシングを用いて判定した。T7E のアッセイでは、Cmah 認識配列を含むゲノムの領域を PCR 増幅し、その結果、野生型と突然変異の増幅対立遺伝子の異種混合物が得られた。PCR 産物を変性させ、ゆっくりと再アニーリングさせ、野生型と突然変異の対立遺伝子の間のヘテロ二本鎖の形成を可能にした。そのようなヘテロ二本鎖は、ミスマッチで切断する T7 エンドヌクレアーゼ I による切断を受けやすい。T7E 切断産物をゲルで可視化すると、ヘテロ二本鎖の T7E 切断に起因して複数のバンドが存在するが、野生型のサンプルには単一のバンドが存在する。切断されていない産物に対する切断された産物の比率は、ヌクレアーゼ切断活性のレベルの尺度を提供する。

## 【0369】

## 結果

## 【0370】

本研究の結果を図 15 に示す。レーン 1 及び 2 に示されるように、ルシフェラーゼをコードする LNP 封入 mRNA を投与された対照マウスから得られた gDNA は、Cmah 認識配列での切断の証拠を示さなかった。ルシフェラーゼ mRNA 処置動物において観察された切断と非切断の比は、mRNA を投与されていない動物において観察された比に匹敵した (レーン 8)。対照的に、レーン 3 ~ 7 及び 9 ~ 18 はそれぞれ、各レーンに複数のバンドが存在することによって示されるように、動物に、Cmah メガヌクレアーゼをコードする LNP 封入 mRNA を投与した場合の Cmah 認識配列での改変を示す。Cmah 認識配列における遺伝子改変の割合を確認及び定量化するために、各肝臓から得られた gDNA についてディープシーケンシングも行った。ディープシーケンシングによって得られた割合は、% KO として各レーンの下に、図 15 に示されている。レーン 3 ~ 7 は、LNP 製剤 # 1 を投与した複製動物における 3.41% ~ 21.49% の範囲の改変を示す。レーン 9 ~ 13 は、LNP 製剤 # 2 を投与した複製動物における 18.4% から 23.2% の範囲の改変を示す。レーン 14 ~ 18 は、LNP 製剤 # 3 を投与した複製動物における 51.1% ~ 64.8% の範囲の改変を示す。

## 【0371】

## 結論

## 【0372】

この研究は、本発明の HBV 特異的メガヌクレアーゼのような遺伝子操作されたメガヌクレアーゼをコードする mRNA が、LNP にて封入され、インビボで標的肝細胞 (即ち、肝細胞) に送達され得、ゲノムの標的化された認識配列で遺伝子編集を誘導し得ることを明白に示している。

10

20

30

40

【 図 面 】  
【 図 1 】

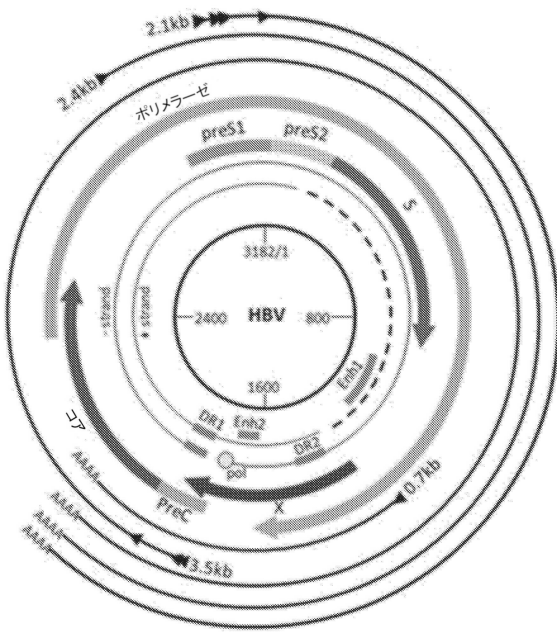


FIGURE 1

【 図 2 】

HBV 1-2 認識配列	<table border="0"> <tr> <td>HBV1 半分の部位</td> <td>CCCCTGCTC</td> <td>HBV2 半分の部位</td> <td>TACAGGGGG</td> <td>SEQ ID NO:10</td> </tr> <tr> <td></td> <td>GGGGACGAG</td> <td></td> <td>ATGTCCGCC</td> <td>SEQ ID NO:11</td> </tr> </table>	HBV1 半分の部位	CCCCTGCTC	HBV2 半分の部位	TACAGGGGG	SEQ ID NO:10		GGGGACGAG		ATGTCCGCC	SEQ ID NO:11
HBV1 半分の部位	CCCCTGCTC	HBV2 半分の部位	TACAGGGGG	SEQ ID NO:10							
	GGGGACGAG		ATGTCCGCC	SEQ ID NO:11							
HBV 5-6 認識配列	<table border="0"> <tr> <td>HBV5 半分の部位</td> <td>GATGATGTG</td> <td>HBV6 半分の部位</td> <td>TGGGGGCCA</td> <td>SEQ ID NO:12</td> </tr> <tr> <td></td> <td>CTACTACAG</td> <td></td> <td>TACCCCGGT</td> <td>SEQ ID NO:13</td> </tr> </table>	HBV5 半分の部位	GATGATGTG	HBV6 半分の部位	TGGGGGCCA	SEQ ID NO:12		CTACTACAG		TACCCCGGT	SEQ ID NO:13
HBV5 半分の部位	GATGATGTG	HBV6 半分の部位	TGGGGGCCA	SEQ ID NO:12							
	CTACTACAG		TACCCCGGT	SEQ ID NO:13							
HBV 7-8 認識配列	<table border="0"> <tr> <td>HBV7 半分の部位</td> <td>TTTGCTGAC</td> <td>HBV8 半分の部位</td> <td>TCCCCACTG</td> <td>SEQ ID NO:14</td> </tr> <tr> <td></td> <td>AAACGACTG</td> <td></td> <td>TGGGGTGAC</td> <td>SEQ ID NO:15</td> </tr> </table>	HBV7 半分の部位	TTTGCTGAC	HBV8 半分の部位	TCCCCACTG	SEQ ID NO:14		AAACGACTG		TGGGGTGAC	SEQ ID NO:15
HBV7 半分の部位	TTTGCTGAC	HBV8 半分の部位	TCCCCACTG	SEQ ID NO:14							
	AAACGACTG		TGGGGTGAC	SEQ ID NO:15							
HBV 11-12 認識配列	<table border="0"> <tr> <td>HBV11 半分の部位</td> <td>TGCCGATCC</td> <td>HBV12 半分の部位</td> <td>TGCGGAACT</td> <td>SEQ ID NO:16</td> </tr> <tr> <td></td> <td>ACGGCTAGG</td> <td></td> <td>TACCCCTTGA</td> <td>SEQ ID NO:17</td> </tr> </table>	HBV11 半分の部位	TGCCGATCC	HBV12 半分の部位	TGCGGAACT	SEQ ID NO:16		ACGGCTAGG		TACCCCTTGA	SEQ ID NO:17
HBV11 半分の部位	TGCCGATCC	HBV12 半分の部位	TGCGGAACT	SEQ ID NO:16							
	ACGGCTAGG		TACCCCTTGA	SEQ ID NO:17							

FIGURE 2

【 図 3 】

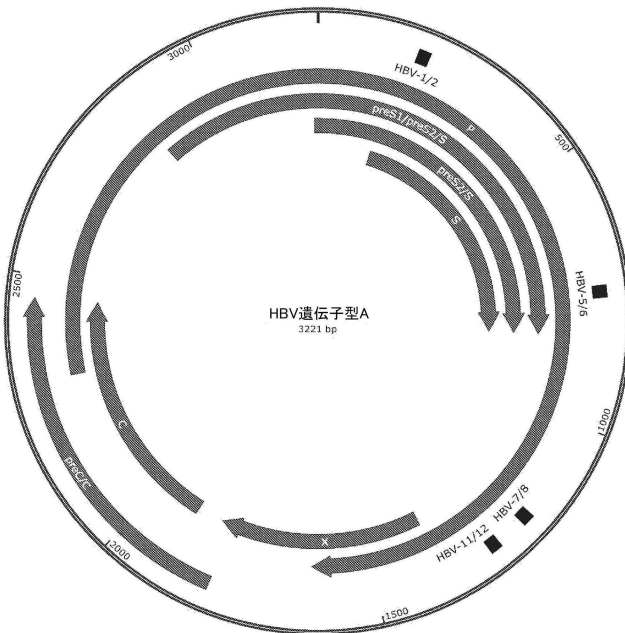


FIGURE 3

【 図 4 】

HBV 1-2	配列番号 3 の 185-206	配列番号
遺伝子型 A	CCCCTGCTCGTGTACAGGGGG	10
遺伝子型 B	CCCCTGCTCGTGTACAGGGGG	10
遺伝子型 C	CCCCTGCTCGTGTACAGGGGG	10
遺伝子型 D	CCCCTGCTCGTGTACAGGGGG	84
遺伝子型 E	CCCCTGCTCGTGTACAGGGGG	10
遺伝子型 F	CCCCTGCTCGTGTACAGGGGG	10
遺伝子型 G	CCCCTGCTCGTGTACAGGGGG	10

HBV 5-6	配列番号 3 の 742-763	配列番号
遺伝子型 A	GATGATGGTATTGGGGGCCA	12
遺伝子型 B	GATGATGGTATTGGGGGCCA	12
遺伝子型 C	GATGATGGTATTGGGGGCCA	12
遺伝子型 D	GATGATGGTATTGGGGGCCA	12
遺伝子型 E	GATGATGGTATTGGGGGCCA	12
遺伝子型 F	GATGATGGTATTGGGGGCCA	85
遺伝子型 G	GATGATGGTATTGGGGGCCA	12

HBV 7-8	配列番号 3 の 1183-1204	配列番号
遺伝子型 A	TTTGCTGACCAACCCCACTG	14
遺伝子型 B	TTTGCTGACCAACCCCACTG	14
遺伝子型 C	TTTGCTGACCAACCCCACTG	14
遺伝子型 D	TTTGCTGACCAACCCCACTG	14
遺伝子型 E	TTTGCTGACCAACCCCACTG	86
遺伝子型 F	TTTGCTGACCAACCCCACTG	14
遺伝子型 G	TTTGCTGACCAACCCCACTG	14

HBV 11-12	配列番号 3 の 1259-1280	配列番号
遺伝子型 A	TGCCGATCCATACTGCGGAACT	16
遺伝子型 B	TGCCGATCCATACTGCGGAACT	16
遺伝子型 C	TGCCGATCCATACTGCGGAACT	16
遺伝子型 D	TGCCGATCCATACTGCGGAACT	16
遺伝子型 E	TGCCGATCCATACTGCGGAACT	16
遺伝子型 F	TGCCGATCCATACTGCGGAACT	16
遺伝子型 G	TGCCGATCCATACTGCGGAACT	16

FIGURE 4

10

20

30

40

50

【 図 5 】

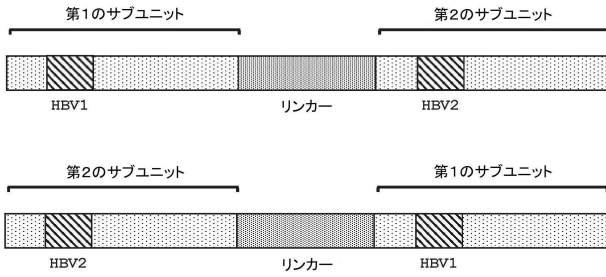


FIGURE 5

【 図 6 】

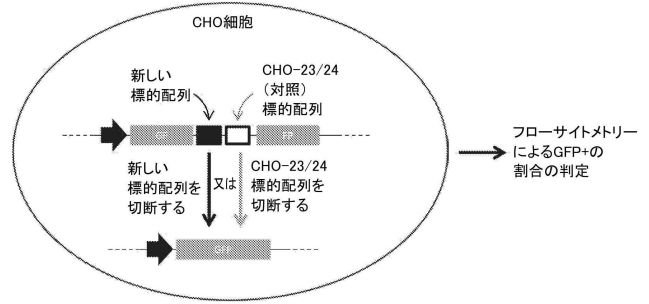


FIGURE 6

10

【 図 7 - 1 】

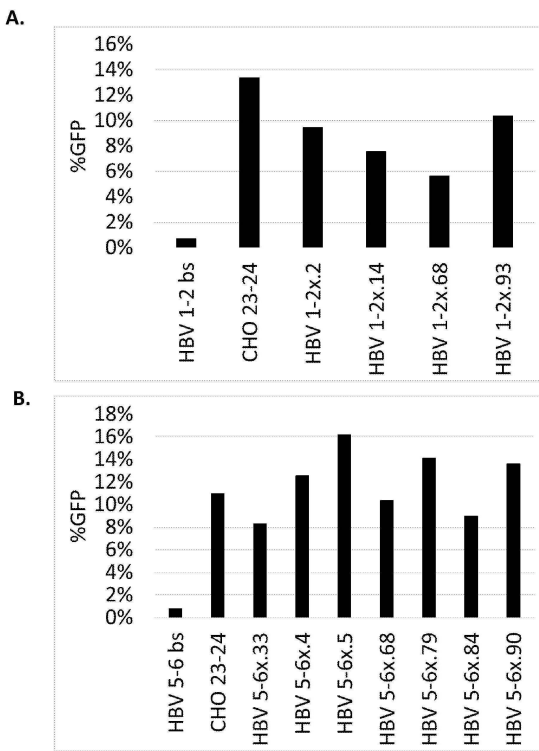


FIGURE 7

【 図 7 - 2 】

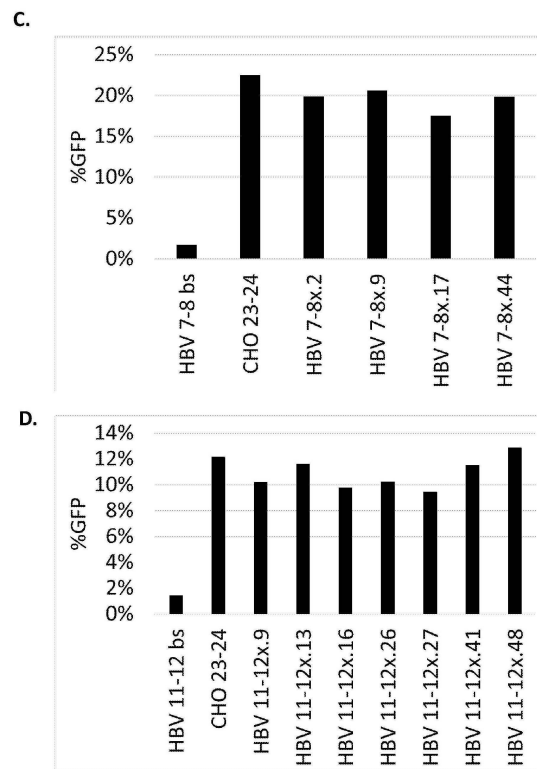


FIGURE 7 (cont.)

20

30

40

50

【 図 8 - 1 】

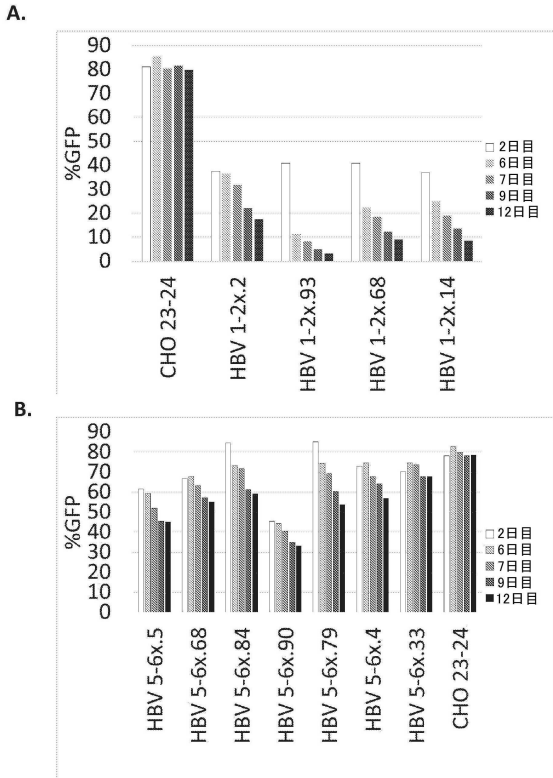


FIGURE 8

【 図 8 - 2 】

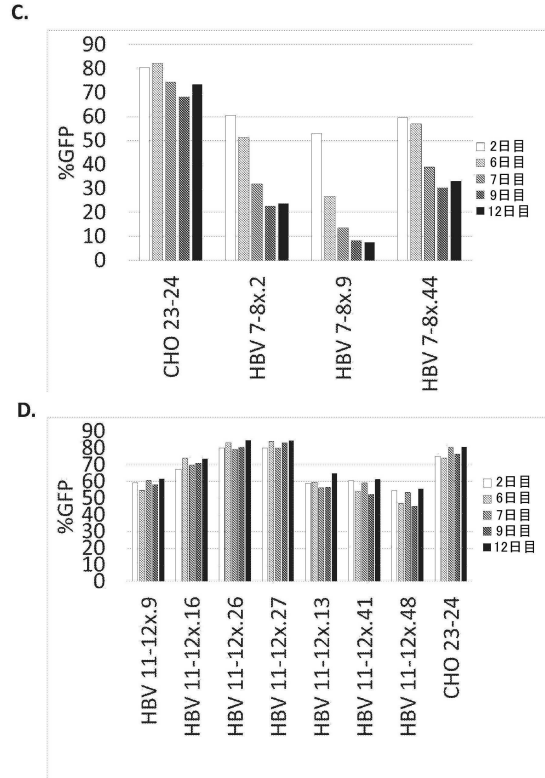


FIGURE 8 (cont.)

10

20

【 図 9 - 1 】

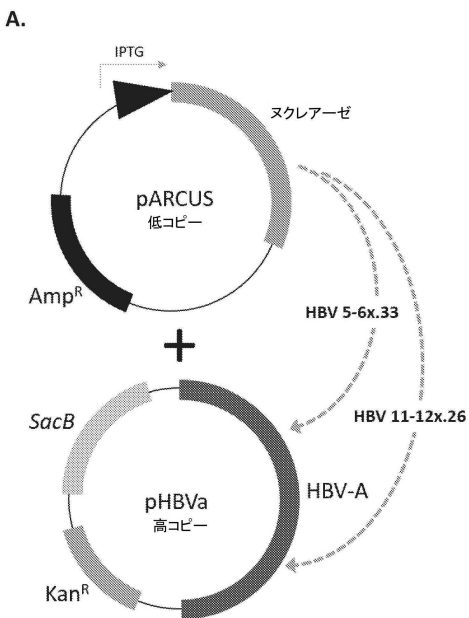


FIGURE 9

【 図 9 - 2 】

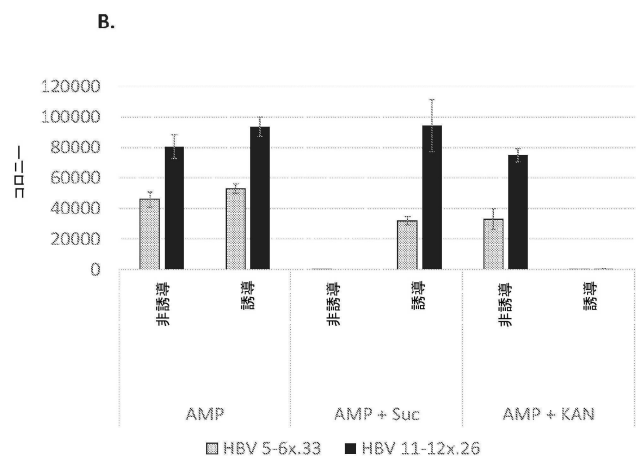


FIGURE 9 (cont.)

30

40

50

【 図 1 0 】

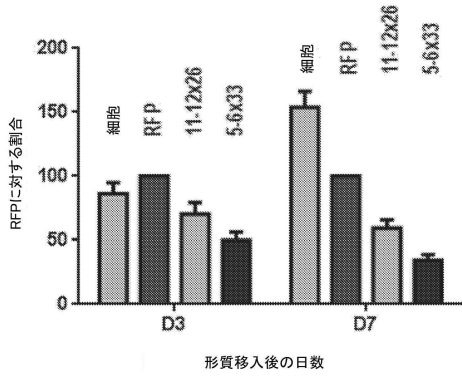


FIGURE 10

【 図 1 1 】

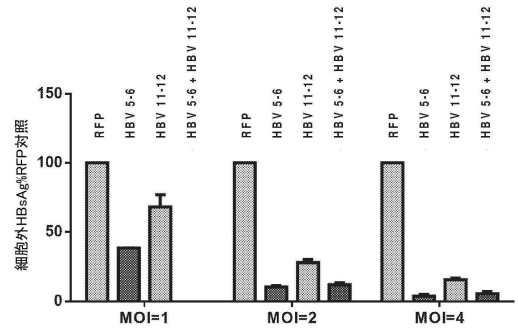


FIGURE 11

10

【 図 1 2 - 1 】

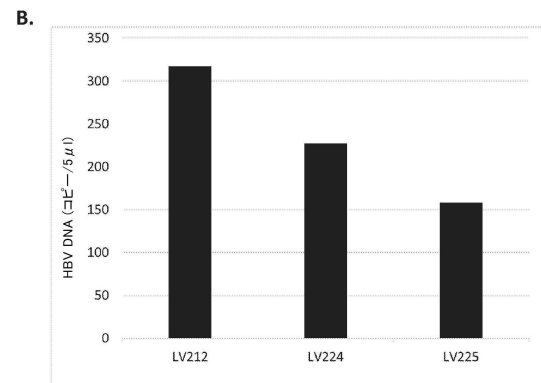
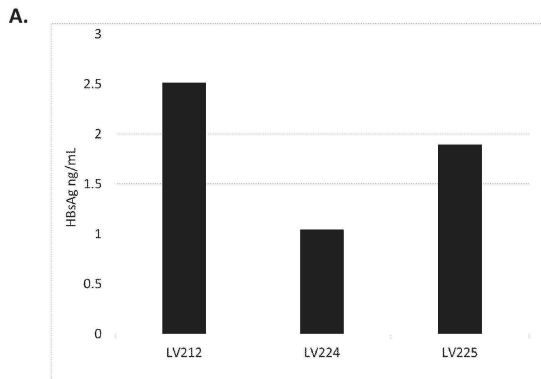


FIGURE 12

【 図 1 2 - 2 】

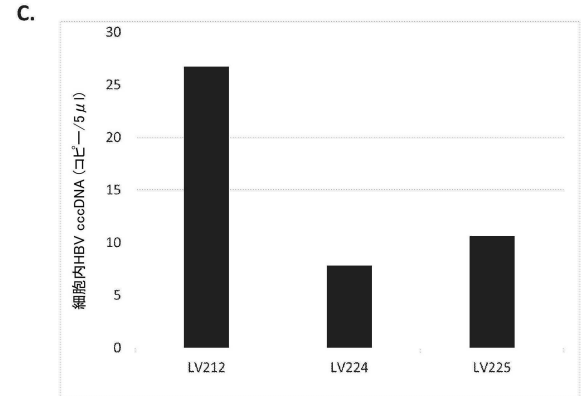


FIGURE 12 (cont.)

20

30

40

50

【 図 13 - 1 】

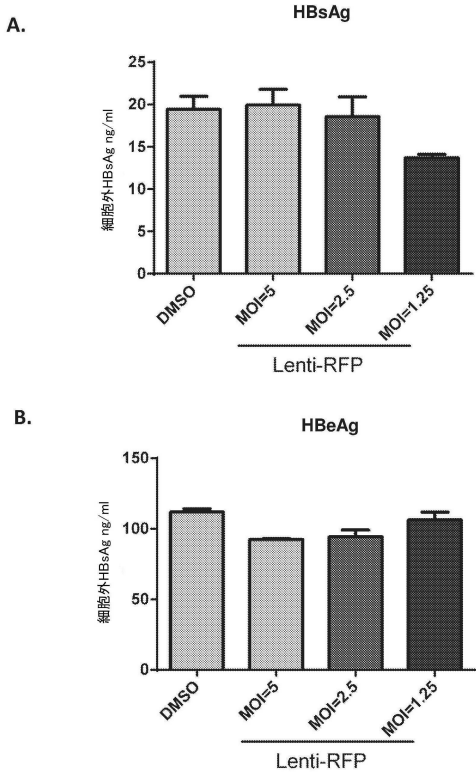


FIGURE 13

【 図 13 - 2 】

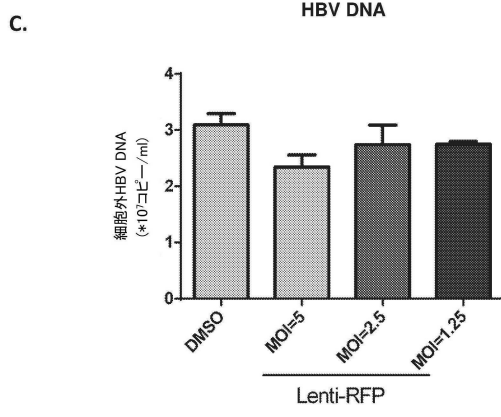


FIGURE 13 (cont.)

10

20

【 図 14 - 1 】

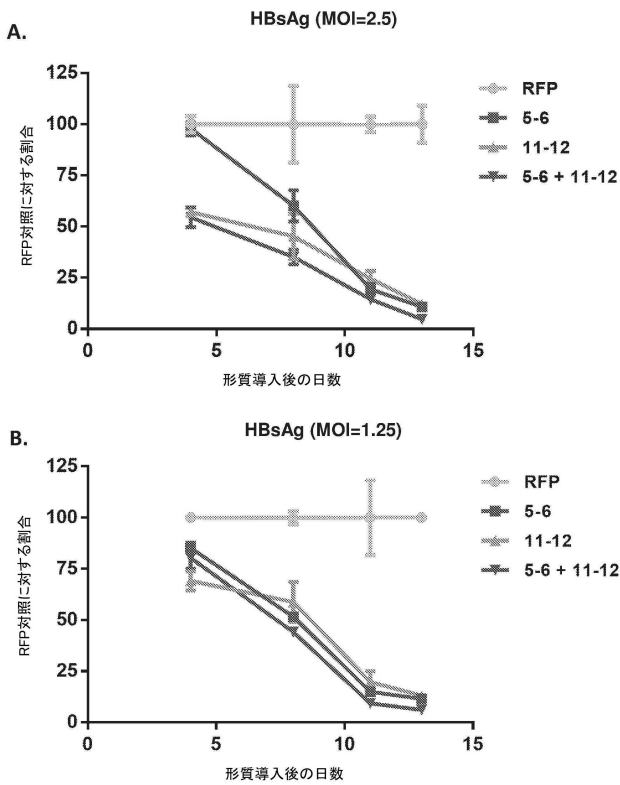


FIGURE 14

【 図 14 - 2 】

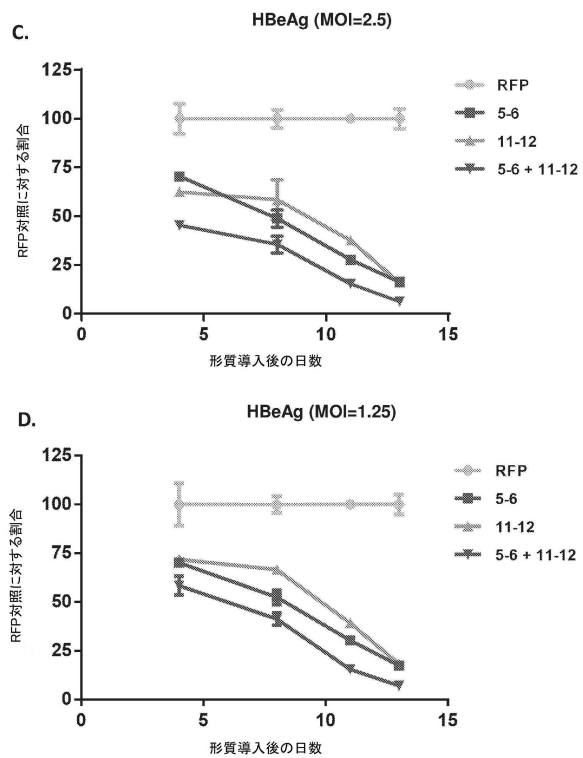


FIGURE 14 (cont.)

30

40

50



【 図 1 5 】

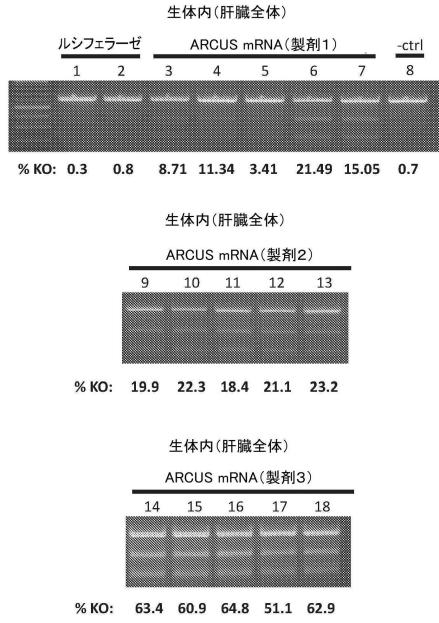


FIGURE 15

10

20

【 配 列 表 】

2023153824000001.xml

30

40

50

## 【手続補正書】

【提出日】令和5年8月9日(2023.8.9)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

B型肝炎ウイルスの少なくとも2つの遺伝子型のゲノムのオープンリーディングフレーム(ORF)内の認識配列を認識して切断する、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼであって、

第1のサブユニット及び第2のサブユニットを含み、

前記第1のサブユニットが前記認識配列の第1の認識した半分の部位に結合し、第1の超可変(HVR1)領域を含み、

前記第2のサブユニットは、前記認識配列の第2の認識した半分の部位に結合し、第2の超可変(HVR2)領域を含む、遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ。

【外国語明細書】

[2023153824000027.pdf](#)

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

<b>A 6 1 P</b>	<b>31/20</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	31/20
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/16</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	1/16
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/29</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/29

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/527,196

(32)優先日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 5 6 0 , モリスビル , ウェイバー フォレスト ウェイ  
1 9 1 6