

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7399876号
(P7399876)

(45)発行日 令和5年12月18日(2023.12.18)

(24)登録日 令和5年12月8日(2023.12.8)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 38/46	Z N A	
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14		
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16		

請求項の数 13 (全52頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-557252(P2020-557252)	(73)特許権者	520145551
(86)(22)出願日	平成31年4月15日(2019.4.15)		ジョージア テック リサーチ コーポレーション
(65)公表番号	特表2021-522178(P2021-522178 A)		アメリカ合衆国 3 0 3 1 8 ジョージア州 アトランタ ダルニー ストリート ノースウエスト 9 2 6
(43)公表日	令和3年8月30日(2021.8.30)	(74)代理人	100102978
(86)国際出願番号	PCT/US2019/027493		弁理士 清水 初志
(87)国際公開番号	WO2019/204210	(74)代理人	100160923
(87)国際公開日	令和1年10月24日(2019.10.24)		弁理士 山口 裕孝
審査請求日	令和4年3月1日(2022.3.1)	(74)代理人	100119507
(31)優先権主張番号	62/658,046		弁理士 刑部 俊
(32)優先日	平成30年4月16日(2018.4.16)	(74)代理人	100142929
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 井上 隆一
		(74)代理人	100148699

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 病態治療のためのRNAエディターのmRNA駆動型発現

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

RNAウイルスを*in vitro*または*in vivo*で不活性化するための組成物であって、

RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸コンストラクトと、
RNAウイルスゲノム内の標的核酸配列に相補的な少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) コンストラクトと
を含み、

該単離核酸コンストラクトがSEQ ID NO: 1に記載の配列を有する、組成物。

【請求項2】

RNAウイルスを*in vitro*または*in vivo*で不活性化するための組成物であって、

RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸コンストラクトと、
RNAウイルスゲノム内の標的核酸配列に相補的な少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) コンストラクトと
を含み、

該単離核酸コンストラクトがSEQ ID NO: 2に記載の配列を有する、組成物。

【請求項3】

前記単離核酸コンストラクトが核局在化配列をさらに含む、請求項1または請求項2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記RNAウイルスがインフルエンザウイルスまたは呼吸器合胞体ウイルスである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記RNAウイルスがマイナス鎖RNAウイルスである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記RNAウイルスがプラス鎖RNAウイルスである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物と、医薬的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 8】

少なくとも、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸コンストラクトと、RNAウイルスゲノム内の標的核酸配列に相補的な少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) コンストラクトとを含む、その必要のある対象におけるウイルス感染症を治療するための医薬組成物であって、

該単離核酸コンストラクトがSEQ ID NO : 1 に記載の配列を有する、医薬組成物。

【請求項 9】

少なくとも、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸コンストラクトと、RNAウイルスゲノム内の標的核酸配列に相補的な少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) コンストラクトとを含む、その必要のある対象におけるウイルス感染症を治療するための医薬組成物であって、

該単離核酸コンストラクトがSEQ ID NO : 2 に記載の配列を有する、医薬組成物。

【請求項 10】

ガイドRNAコンストラクトがウイルス遺伝子を標的とする、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記ウイルス遺伝子が、ノイラミニダーゼ (NA)、ヘマグルチニン (HA)、イオンチャネル (M2)、マトリックスタンパク質 (M1)、ヌクレオカプシドタンパク質 (NP)、核外輸送タンパク質 (NS1 及び NS2)、またはRNAポリメラーゼ PB1、PB2、もしくはPAである、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記RNAウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記RNAウイルスが呼吸器合胞体ウイルスである、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年4月16日出願の米国仮特許出願第62/658,046号の恩典及び優先権を主張し、当該出願の全体は、許容される限りにおいて、参照により本明細書に援用される。

【0002】

連邦政府の助成による研究に関する記載

本発明は、DARPAの認可を受けたW911NF-15-0609の下、政府支援によって行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

10

20

30

40

50

配列表の参照

2019年4月15日に提出された配列表(2019年4月15日作成、ファイル名「064489046PCT_ST25」、サイズ30,123バイトのテキストファイル)は、米国特許法施行規則(37 C.F.R.)1.52条(e)(5)に従って、参照により本明細書に援用される。

【0004】

発明の分野

本発明は概して、ウイルス(例えば、RNAウイルス)における標的配列を特異的に切断する組成物に関する。

【背景技術】

【0005】

発明の背景

ヒトに感染することが知られているウイルスは219種存在し(Woolhouse, M., et al., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367:2864-2871(2012)(非特許文献1))、このうち214種がRNAウイルスである(Woolhouse, M.E.J. and Brierley, L., *Sci Data*, 5:180017(2018)(非特許文献2))。ウイルス感染症は、世界全体における死亡数のおよそ6.6%を占めると推定されている(Lozano, R., et al., *Lancet*, 380:2095-2128(2012)(非特許文献3))。ウイルス種を治療する薬物が(1963~2016年にかけて)約90種しか存在せず、治療対象のウイルス種が9種に過ぎないことは、憂慮すべき問題である(De Clercq, E. and Li, G., *Clin Microbiol Rev*, 29:695-747(2016)(非特許文献4))。また、承認済みワクチンについても、対象となるのはわずか15種のウイルス種である。再集合、抗原シフト、及びドリフトは、ワクチン開発の障害となり、様々な抗ウイルス薬に対する耐性をもたらす(Kimberlin, D.W. and Whitley, R.J., *J Antimicrob Chemother*, 37:403-421(1996)(非特許文献5); Irwin, K.K., et al., *Virus Evol*, 2:vev014(2016)(非特許文献6))。これらの要因が、エピデミックやパンデミックの一因となる。このように、ヒトの健康は、新興及び再興のウイルス感染症によって絶えず脅威にさらされている(Marston, H.D., et al., *Sci Transl Med*, 6:253ps210(2014)(非特許文献7))。近年、ニパ(World Health Organization, *Disease outbreak news: Nipah virus - India*(2018)(非特許文献8))、ジカ(Baud, D., et al., *Lancet*, 390:2099-2109(2017)(非特許文献9))、及びエボラ(Gire, S.K., et al., *Science*, 345:1369-1372(2014)(非特許文献10))が発生していること、ならびに今後インフルエンザのパンデミックが生じる可能性があること(Neumann, G., et al., *Nature*, 459:931-939(2009)(非特許文献11))は、新たなクラス抗ウイルス薬を開発する正当な根拠となる(De Clercq, E. and Li, G., *Clin Microbiol Rev*, 29:695-747(2016)(非特許文献12))。

【0006】

現在の創薬は、小分子及び中和抗体に焦点が絞られているが、これらが機能的アウトカムを得るには高用量や頻回の再投薬が必要となる(Kamath, A.V., *Drug Discov Today Technol*, 21-22:75-83(2016)(非特許文献13); Bai, S., et al., *Clin Pharmacokinet*, 51:119-135(2012)(非特許文献14))。したがって、広スペクトルかつ柔軟で、複数のウイルス種または系統にわたって有効な抗ウイルス薬のニーズに応えることは極めて重要である。このような属性は、遺伝子ツールを用いた抗ウイルス剤の設計によ

10

20

30

40

50

り達成することができる。遺伝子ツールには、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Wayengera, M., *Theor Biol Med Model*, 8: 23 (2011)) (非特許文献15))、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (Khalili, K., et al., *J Neurovirol*, 21: 310-321 (2015)) (非特許文献16))、メガヌクレアーゼ (Grosse, S., et al., *Mol Ther*, 19: 694-702 (2011)) (非特許文献17))、及びCRISPR-Cas9 (Soppe, J. A., and Lebbink, R. J., *Trends Microbiol*, 25: 833-850 (2017)) (非特許文献18))があり、これらはウイルス感染病原体に対して使用されている。これらの遺伝子エディターは、DNAウイルスを直接的に標的としたり、ウイルス宿主を間接的に標的としてウイルスにとって不可欠な宿主遺伝子を抑制または修飾したりするのに用いられている。また、これらのツールは、宿主ゲノム内で一体化している潜伏ウイルスを活性化または不活性化するためにも使用されている (Soppe, J. A., and Lebbink, R. J., *Trends Microbiol*, 25: 833-850 (2017)) (非特許文献19))。これらの分子ツールはDNAウイルスには適しているが、RNAウイルスに対して利用する場合は効果が小さい。

10

【0007】

そのため、本発明の目的は、ウイルス複製を阻害するための組成物及びそれを使用する方法を提供することにある。

【0008】

本発明のもう1つの目的は、宿主細胞または対象におけるウイルスを治療または不活性化するための組成物及びそれを使用する方法を提供することにある。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【文献】Woolhouse, M., et al., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367: 2864-2871 (2012)

【文献】Woolhouse, M. E. J. and Brierley, L., *Sci Data*, 5: 180017 (2018)

【文献】Lozano, R., et al., *Lancet*, 380: 2095-2128 (2012)

30

【文献】De Clercq, E. and Li, G., *Clin Microbiol Rev*, 29: 695-747 (2016)

【文献】Kimberlin, D. W. and Whitley, R. J., *J Antimicrob Chemother*, 37: 403-421 (1996)

【文献】Irwin, K. K., et al., *Virus Evol*, 2: vew014 (2016)

【文献】Marston, H. D., et al., *Sci Transl Med*, 6: 253 ps 210 (2014)

【文献】World Health Organization, *Disease outbreak news: Nipah virus - India* (2018)

40

【文献】Baud, D., et al., *Lancet*, 390: 2099-2109 (2017)

【文献】Gire, S. K., et al., *Science*, 345: 1369-1372 (2014)

【文献】Neumann, G., et al., *Nature*, 459: 931-939 (2009)

【文献】De Clercq, E. and Li, G., *Clin Microbiol Rev*, 29: 695-747 (2016)

【文献】Kamath, A. V., *Drug Discov Today Technol*

50

, 21 - 22 : 75 - 83 (2016)

【文献】Bai, S., et al., Clin Pharmacokinetics, 51 : 119 - 135 (2012)

【文献】Wayengera, M., Theor Biol Med Model, 8 : 23 (2011)

【文献】Khalili, K., et al., J Neurovirol, 21 : 310 - 321 (2015)

【文献】Grosse, S., et al., Mol Ther, 19 : 694 - 702 (2011)

【文献】Soppe, J. A., and Lebbink, R. J., Trends Microbiol, 25 : 833 - 850 (2017) 10

【文献】Soppe, J. A., and Lebbink, R. J., Trends Microbiol, 25 : 833 - 850 (2017)

【発明の概要】

【0010】

本明細書では、宿主細胞または対象からのウイルスを治療及び不活性化するための組成物及び方法が提供される。当該組成物及び方法は、宿主生物から、宿主の遺伝物質の完全性を妨害することなく、ウイルスまたは他の外来遺伝物質を除去するのに使用することができる。

【0011】

20

RNAウイルスを *in vitro* または *in vivo* で不活性化するための例示的な組成物は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸配列と、RNAウイルスゲノム内の標的核酸配列に相補的な少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) とを含む。1つの実施形態において、単離核酸コンストラクトは、mRNAコンストラクトである。mRNAコンストラクトは修飾を含むことができ、例えば、核局在化配列、5'キャップ、3'ポリ(A)テール、あるいは修飾核酸塩基、例えば、N1-メチルプソイドウリジン-5'-三リン酸、2'-O-メチルアデノシン-5'-三リン酸、もしくは2'-O-メチルウリジン-5'-三リン酸、またはこれらの組合せを含むことができる。いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、RNA誘導型RNaseである。RNA誘導型RNaseは、Casヌクレアーゼ、例えば、Cas13aであり得る。 30

【0012】

1つの実施形態において、本開示の組成物は、インフルエンザウイルスまたは呼吸器合胞体ウイルスなどのRNAウイルスの治療に使用することができる。RNAウイルスは、マイナス鎖RNAウイルスまたはプラス鎖RNAウイルスであり得る。

【0013】

いくつかの実施形態において、単離核酸配列はSEQ ID NO : 1に記載の配列を有する。別の実施形態において、単離核酸配列はSEQ ID NO : 2に記載の配列を有する。

【0014】

また、本開示のRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸配列と、少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) と、医薬的に許容される担体とを含む、医薬組成物も提供される。 40

【0015】

また、本開示の組成物を使用する方法も提供される。1つの実施形態は、その必要のある対象におけるウイルス感染症を治療する方法であって、少なくとも、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸配列と、RNAウイルスゲノム内の標的核酸配列に相補的な少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) とを含む、医薬組成物を、対象におけるウイルス複製を阻害するのに有効な量で、対象に投与することによって治療する、方法を提供する。RNA誘導型エンドヌクレアーゼはCas13aであることができ、ガイドRNAコンストラクトは、ウイルス遺伝子を標的とすることができる。1つの実施形態 50

において、ウイルス遺伝子は、ノイラミニダーゼ (NA)、ヘマグルチニン (HA)、イオンチャネル (M2)、マトリックスタンパク質 (M1)、ヌクレオカプシドタンパク質 (NP)、核外輸送タンパク質 (NS1及びNS2)、またはRNAポリメラーゼPB1、PB2、もしくはPAである。

[本発明1001]

RNAウイルスをin vitroまたはin vivoで不活性化するための組成物であって、

RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸配列と、

RNAウイルスゲノム内の標的核酸配列に相補的な少なくとも1つのガイドRNA (gRNA)と

を含む、組成物。

10

[本発明1002]

単離核酸コンストラクトがmRNAコンストラクトである、本発明1001の組成物。

[本発明1003]

前記単離核酸コンストラクトが核局在化配列をさらに含む、本発明1001または本発明1002の組成物。

[本発明1004]

前記単離核酸コンストラクトが5'キャップ及び3'ポリ(A)テールをさらに含む、本発明1001~1003のいずれかの組成物。

[本発明1005]

前記単離核酸コンストラクトが修飾核酸塩基をさらに含む、本発明1001~1004のいずれかの組成物。

20

[本発明1006]

前記修飾核酸塩基が、N1-メチルプソイドウリジン-5'-三リン酸、2'-O-メチルアデノシン-5'-三リン酸、もしくは2'-O-メチルウリジン-5'-三リン酸、またはこれらの組合せである、本発明1005の組成物。

[本発明1007]

前記ヌクレアーゼがRNA誘導型RNaseである、本発明1001~1006のいずれかの組成物。

[本発明1008]

前記ヌクレアーゼがCasヌクレアーゼである、本発明1001~1006のいずれかの組成物。

30

[本発明1009]

前記CasヌクレアーゼがCas13aである、本発明1008の組成物。

[本発明1010]

前記RNAウイルスがインフルエンザウイルスまたは呼吸器合胞体ウイルスである、本発明1001~1008のいずれかの組成物。

[本発明1011]

前記RNAウイルスがマイナス鎖RNAウイルスである、本発明1001の組成物。

[本発明1012]

前記RNAウイルスがプラス鎖RNAウイルスである、本発明1001の組成物。

40

[本発明1013]

前記単離核酸配列がSEQ ID NO:1に記載の配列を有する、本発明1001の組成物。

[本発明1014]

前記単離核酸配列がSEQ ID NO:2に記載の配列を有する、本発明1001の組成物。

[本発明1015]

本発明1001の組成物と、医薬的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

[本発明1016]

その必要のある対象におけるウイルス感染症を治療する方法であって、少なくとも、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸配列と、RNAウイルスゲノム内の

50

標的核酸配列に相補的な少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) とを含む医薬組成物を、前記対象におけるウイルス複製を阻害するのに有効な量で、前記対象に投与することを含む、方法。

[本発明1017]

前記RNA誘導型エンドヌクレアーゼがCas13aである、本発明1016の方法。

[本発明1018]

ガイドRNAコンストラクトがウイルス遺伝子を標的とする、本発明1016の方法。

[本発明1019]

前記ウイルス遺伝子が、ノイラミニダーゼ (NA)、ヘマグルチニン (HA)、イオンチャネル (M2)、マトリックスタンパク質 (M1)、ヌクレオカプシドタンパク質 (NP)、核外輸送タンパク質 (NS1及びNS2)、またはRNAポリメラーゼPB1、PB2、もしくはPAである、本発明1018の方法。

10

[本発明1020]

前記RNAウイルスがインフルエンザウイルスである、本発明1016の方法。

[本発明1021]

前記RNAウイルスが呼吸器合胞体ウイルスである、本発明1020の方法。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】図1Aは、Cas13a及びCas13a-NLSの*in vitro*翻訳を用いたRNA切断アッセイの概略図である。Cas13aまたはCas13a-NLSを発現する*in vitro*転写mRNAを、ウサギ網状赤血球翻訳系を用いて*in vitro*で翻訳した。*in vitro*翻訳産物を、crRNA、その対応する標的RNA、及び、RNase活性により切断時に蛍光を発するRNase alert基質と共に混合した。

20

【図1B】図1B及び1Cは、インフルエンザウイルスのPB1遺伝子を標的とするcrRNA (CR) (gPB1) 及びその特異的標的RNA (TR) を用いた、Cas13a (図1B) 及びCas13a-NLS (図1C) の標的特異的RNA切断を示す棒グラフである。非標的crRNA (NT-CR) を陰性対照として使用した。Cas13aのRNA切断活性は室温で90分間測定し、ブランク対照としてmock翻訳産物を使用した。平均RFUは、3連の平均として表されている。

30

【図1C】図1Bの説明を参照。

【図1D】図1D及び1Eは、対応するCR及びTRの存在下または不在下におけるPB1遺伝子に対するCas13a (図1D) 及びCas13a-NLS (図1E) のRNA切断活性を示す、変性ゲルの代表的画像である。

【図1E】図1Dの説明を参照。

【図2-1】図2A~2Kは、gPB1 (図2A)、PB1__4.1 (図2B)、HA1.1 (図2C)、NA1.1 (図2D)、NP1.1 (図2E)、PB2__1.1 (図2F)、NN2__1.1 (図2G)、MM1.1 (図2H)、PB1__2.1 (図2I)、PB1__3.1 (図2J)、及び非標的対照 (図2K) についての、インフルエンザ遺伝子に対するCas13aのRNA切断活性を示す折れ線グラフである。

40

【図2-2】図2-1の説明を参照。

【図2-3】図2-1の説明を参照。

【図2-4】図2-1の説明を参照。

【図3-1】図3A~3Hは、対応するtrRNAの存在下または不在下における様々なIVA遺伝子フラグメントに対するcrRNAのRNA切断活性を示す、変性ゲルの代表的画像である。四角枠及び矢印は、分解されたRNAを表す。

【図3-2】図3-1の説明を参照。

【図4-1】図4Aは、Cas13a及び/またはCas13a-NLSによるIVARN切断の機序の概略図である。

【図4-2】図4B~図4Kは、Viromer Redを用いたA549細胞内のCa

50

s 13 及び Cas 13 a - NLS の発現動態を示す蛍光顕微鏡画像である。Cas 13 は V5 タグを用いて染色し、核は DAPI を用いて染色している。

【図 5 - 1】図 5 A ~ 図 5 I I は、Neon エレクトロポレーション (図 5 A ~ 5 L)、Viromer Red (図 5 M ~ 5 X)、及び Lipofectamine 3000 (図 5 Y ~ 5 I I) を用いた場合の、MDC K 細胞及び A549 細胞における Cas 13 a の発現動態を示す蛍光顕微鏡画像である。細胞に 1 μ g の Cas 13 a mRNA を形質移入した。細胞を 2、4、6、16、または 24 時間時に固定し、抗 V5 及び DAPI 核染色で染色した。スケールバー = 20 μ m。

【図 5 - 2】図 5 - 1 の説明を参照。

【図 5 - 3】図 5 - 1 の説明を参照。

【図 6 A】図 6 A は、図 6 B ~ 6 E の A549 細胞における IVA 阻害を試験するための実験設定の概略図である。図 6 B は、in vitro (A549 細胞) において PB1 IVA 遺伝子を標的とする様々な crRNA (gPB1、PB1__2.1、PB1__3.1、及び PB1__4.1) を用いた場合の Cas 13 a 及び Cas 13 a - NLS の RNA 切断活性を決定するために定量化された PB1 遺伝子コピーを示す棒グラフである。図 6 C は、PB1 遺伝子を標的としない crRNA (HA1.1、NA1.1、NP1.1、NN2.1、及び MM2.1) を用いた場合の、PB1 遺伝子に対する Cas 13 a 及び Cas 13 a - NLS の RNA 切断活性を示す棒グラフである。図 6 D ~ 6 E は、異なる IVA 分節を標的とする全 crRNA の比較を示す棒グラフであり、標的指向性 crRNA について、それぞれの IVA 遺伝子に対する比較による減少率 (%) として表されている。全てのデータポイントは 3 連 (n = 3) の平均であり、エラーバーは標準偏差を表す (* p 0.05、** p 0.005、*** p 0.001、または **** p 0.0001)。多重比較については、チューキーの多重比較検定 (図 6 B 及び 6 C) またはシダックの多重比較検定 (図 6 D 及び 6 E) を適用した。

【図 6 B】図 6 A の説明を参照。

【図 6 C】図 6 A の説明を参照。

【図 6 D】図 6 A の説明を参照。

【図 6 E】図 6 A の説明を参照。

【図 7 - 1】図 7 A ~ 7 H は、Cas 13 a 及び Cas 13 a - NLS が、いずれかのタンパク質をコードする mRNA ならびに IVA 遺伝子 PB1 のゲノム用の crRNA (gPB1) 及びメッセンジャー RNA 用の crRNA (mPB1) を感染前に 4 時間形質移入した細胞において IVA 感染を阻害することを示す、代表的な蛍光顕微鏡画像である。形質移入し感染させた細胞の IVA M2 タンパク質、IVA を標的とする FISH、Cas 13 a V5、及び核について染色した。

【図 7 - 2】図 7 - 1 の説明を参照。

【図 8 A】図 8 A は、Cas 13 a : crRNA 用量及びウイルス感染を最適化するための実験設定の概略図である。

【図 8 B】図 8 B は、IVA 力価に対する Cas 13 a 及び crRNA の用量応答アッセイを示す棒グラフである。

【図 8 C】図 8 C 及び 8 D は、MOI 0.01 (図 8 C) 及び MOI 0.1 (図 8 D) における Cas 13 a 及び gPB1 が IVA に及ぼす効果を示す棒グラフである。

【図 8 D】図 8 C の説明を参照。

【図 9】図 9 は、ヒト初代気管支 / 気管上皮細胞において、Cas 13 a (1 μ g) ならびに crRNA gPB1 及び / または mPB1 (100 nM) を形質移入し、次に IVA を感染させた場合の PB1 コピー数を示す棒グラフである。

【図 10 A】図 10 A は、A549 細胞における IVA 阻害を試験するための実験設定の概略図である。図 10 B ~ 10 C は、Cas 13 a (図 10 B) または Cas 13 a - NLS (図 10 C) と、IVA PB1 遺伝子を標的とする crRNA (gPB1 及び mPB1) とを形質移入した細胞における経時的な PB1 遺伝子コピー数を示す棒グラフである。図 10 D は、感染 A549 細胞における IVA 阻害を試験するための実験設定の概略

10

20

30

40

50

図である。図10E～10Fは、Cas13a(図10E)またはCas13a-NLS(図10F)と、IVAPB1遺伝子を標的とするcrRNA(gpB1及びmpB1)とを形質移入した細胞における経時的なPB1遺伝子コピー数を示す棒グラフである。図10Gは、遅延感染アッセイの実験設定の概略図である。図10Hは、遅延感染モデルにおけるPB1遺伝子コピー数を示す棒グラフである。Cas13とCR gpB1及びmpB1とを細胞に24時間形質移入し、次いでIVAPB1を8時間感染させた。図10Iは、A549細胞をIVAPB1(MOI 0.01)に24時間感染させ、その後Cas13aとcrRNA(gpB1及びmpB1)とを形質移入した場合の実験設定の概略図である。図10Jは、IVAPB1(MOI 0.01)に24時間感染させ、その後Cas13aとcrRNA(gpB1及びmpB1)とを形質移入した細胞におけるPB1遺伝子コピー数を示す棒グラフである。全てのデータポイントは3連(n=3)の平均であり、エラーバーは標準偏差を表す。全ての統計解析は、適切な試験後測定値との多重比較による分散分析を用いて実施した(b～c及びe～fについてはチューキー多重比較検定による通常の二元配置ANOVA、H及びJについてはダネット多重比較検定による一元配置ANOVA)。(* p 0.05、 ** p 0.005、 *** p 0.001、または **** p 0.0001)。

10

【図10B】図10Aの説明を参照。

【図10C】図10Aの説明を参照。

【図10D】図10Aの説明を参照。

【図10E】図10Aの説明を参照。

20

【図10F】図10Aの説明を参照。

【図10G】図10Aの説明を参照。

【図10H】図10Aの説明を参照。

【図10I】図10Aの説明を参照。

【図10J】図10Aの説明を参照。

【図11A】図11Aは、A549細胞における予防的RSV阻害を試験するための実験設定の概略図である。図11Bは、Cas13a形質移入後のRSVに感染した細胞におけるプラーク形成を示す棒グラフである。図11Cは、A549細胞における感染後RSV阻害を試験するための実験設定の概略図である。図11Dは、Cas13a形質移入前にRSVに感染させた細胞におけるプラーク形成を示す棒グラフである。全てのデータポイントは3連(n=3)の平均であり、エラーバーは標準偏差を表す。統計解析は、チューキー多重比較検定による分散分析を用いて実施した(* p 0.05、 ** p 0.005、 *** p 0.001、または **** p 0.0001)。

30

【図11B】図11Aの説明を参照。

【図11C】図11Aの説明を参照。

【図11D】図11Aの説明を参照。

【発明を実施するための形態】

【0017】

発明の詳細な説明

I. 定義

40

本開示は、本明細書で説明される組成物及び方法ならびに説明される実験条件に限定されるものではなく、そのためこれらは変化し得るということを理解されたい。また、本明細書で使用する用語は、ある特定の形態を説明するためのものに過ぎず、また、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、このような用語が限定的であるようには意図されていないことも理解されたい。

【0018】

別途定義されない限り、本明細書で使用する全ての技術的用語及び科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。ただし、本明細書に記載のものと同様または同等である任意の組成物、方法、及び物質は、本発明の実施または試験で使用することができる。言及される全ての刊行物は、その全

50

体が参照により本明細書に援用される。

【0019】

本明細書において、「1つの(a)」及び「1つの(an)」及び「当該(the)」という用語、ならびに本発明を説明する文脈における(特に、以下の請求項の文脈における)同様の指示語は、本明細書で別段の指示がない限り、または文脈上明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方を網羅するものと解釈されるべきである。

【0020】

本明細書における値範囲の記載は、単に、範囲内に収まる個々の値を個別に言及する簡略的方法として供するように意図されており、本明細書で別段の指示がない限り、個々の値は、本明細書で個別に記載されているかのように本明細書に援用される。

10

【0021】

「約(about)」という用語の使用は、記載された値をおよそ+/-10%の範囲で上回るまたは下回る値を説明するように意図されている。他の実施形態において、値は、記載された値をおよそ+/-5%の範囲で上回るまたは下回る値を範囲とし得る。他の実施形態において、値は、記載された値をおよそ+/-2%の範囲で上回るまたは下回る値を範囲とし得る。他の実施形態において、値は、記載された値をおよそ+/-1%の範囲で上回るまたは下回る値を範囲とし得る。前述の範囲は、文脈によって明確にされるように意図されており、さらなる限定を意味するものではない。本明細書で説明されている全ての方法は、本明細書で別段の指示がない限り、または別段に文脈により明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施することができる。あらゆる例、または本明細書で示される例示的な言葉(例えば、「~などの(such as)」)の使用は、本明細書をより良好に明らかにすることを意図したものに過ぎず、別の形で特許請求されない限り、本発明の範囲に限定をもたらすものではない。本明細書中のいかなる語も、本明細書の実施に不可欠な任意の特許請求されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

20

【0022】

本明細書で使用する場合、「RNA」とは、天然であっても非天然であってもよいリボ核酸を意味する。例えば、RNAには、修飾されたかつ/または非天然の成分、例えば、1つ以上の核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、またはリンカーが含まれ得る。RNAには、キャップ構造、鎖終結ヌクレオシド、ステムループ、ポリA配列、及び/またはポリアデニル化シグナルが含まれ得る。RNAは、目的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有し得る。例えば、RNAはメッセンジャーRNA(mRNA)であり得る。特定のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳、例えば、哺乳類細胞内でのmRNAのin vivo翻訳は、コードされたポリペプチドをもたらすことができる。

30

【0023】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、互換的に使用することができ、ペプチド結合によって互いに連結した少なくとも3個のアミノ酸の連なりを意味する。ペプチドとは、個別のペプチドもペプチドの集合も意味し得る。ペプチドには、天然アミノ酸、非天然アミノ酸(すなわち、自然界には存在しないが、ポリペプチド鎖に組み込むことができる化合物)、及び/またはアミノ酸類似体が含まれ得る。また、ペプチド内のアミノ酸のうち1つ以上は、化学的実体(例えば、炭水化物基、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基;結合、官能化、またはその他の修飾のためのリンカーなど)の付加によって修飾されてもよい。修飾には、ペプチドの環化、D-アミノ酸の組み込みなどが含まれ得る。

40

【0024】

「配列同一性パーセント(%)」という用語は、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大のパーセント配列同一性を達成した後、参照核酸配列内のアミノ酸核酸と同一である候補配列内のヌクレオチドまたはアミノ酸のパーセンテージとして定義される。パーセント配列同一性を決定することを目的としたアラインメントは、当業者の技量範囲内の様々な方法で、例えば、公的に入手可能なコンピューターソフトウェア(

50

例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、またはMegaalign (DNASTAR) を使用して、達成することができる。アラインメントを測定するための適切なパラメーターは、比較対象配列の全長にわたる最大アラインメントの達成に必要な任意のアルゴリズムも含めて、公知の方法によって決定することができる。

【0025】

本明細書の目的において、所与の核酸配列Dに対する、所与のヌクレオチドまたはアミノ酸配列Cの配列同一性% (これは代替的に、所与の配列Dに対して特定の配列同一性%を有するまたは含む所与の配列C、と表現することができる) は、以下のように計算される：

$$100 \times \text{分数 } W / Z$$

(式中、Wは、配列アラインメントプログラムにより、当該プログラムのC及びDについてのアラインメントにおいて同一の一致としてスコア付けされたヌクレオチドまたはアミノ酸の数であり、Zは、Dにおけるヌクレオチドまたはアミノ酸の総数である)。配列Cの長さが配列Dの長さに等しくない場合、Dに対するCの配列同一性%は、Cに対するDの配列同一性%に等しくないことが理解されよう。

【0026】

「ゲノム編集」とは、生物のゲノム内でDNAが挿入、欠失、修飾、または置換される遺伝子工学の1つのタイプを意味する。これは、細胞または生物のDNAに特定の変化をもたらす方法である。最も広く使用されているゲノム編集の1つは、改変ヌクレアーゼゲノム編集である。改変ヌクレアーゼは、DNA配列の特定の部位で切断する酵素であり、この切断が細胞によって修復されると、ある変化が配列に導入される。改変ヌクレアーゼの例示的なタイプとしては、限定されるものではないが、CRISPR/Cas、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) が挙げられる。

【0027】

本明細書で使用する場合、「CRISPR」または「クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)」という用語は、塩基配列の複数の短い直接反復を含むDNA座位の頭字語を意味する。各反復は、一連の塩基及びそれに続く逆の一連の塩基、次いで「スペーサーDNA」として知られているおよそ30塩基対を含む。スペーサーはDNAの短いセグメントであり、しばしば細菌ウイルスやその他の外来の遺伝因子に由来し、将来の侵入に対する適応防御を促進するために過去の曝露の「記憶」として機能し得る。

【0028】

「CRISPR関連ヌクレアーゼ」または「Cas」とは、ヌクレオチド塩基を付加または欠失できるようにゲノム内の特定の位置でDNAを切断する酵素を意味する。

【0029】

「ガイドRNA」または「gRNA」とは、目的の標的DNA領域を認識し、編集するためにCasヌクレアーゼをその領域に導く、特定のRNA配列を意味する。

【0030】

本明細書で使用する場合、「治療する」、「治療すること」、「治療」、及び「治療的使用」という用語は、疾患または障害の1つ以上の症状の消失、減少、または緩和を意味する。本明細書で使用する場合、「治療有効量」とは、このような症状の臨床的に意義のある消失、減少、または緩和を媒介するのに十分な治療剤の量を意味する。効果は、その大きさがレシピエント対象の健康または予後に影響を及ぼすのに十分である場合、臨床的に意義のあるものとする。治療有効量とは、疾患の発症の遅延または最小化、例えば、癌の拡散の遅延または最小化に十分な治療剤の量を意味し得る。また、治療有効量は、疾患の治療または管理において治療的利益をもたらす治療剤の量も意味し得る。

【0031】

本明細書で使用する場合、「予防剤」という用語は、障害または疾患の任意の症状を検

10

20

30

40

50

出する前に、障害または疾患の予防で使用され得る薬剤を意味する。「予防有効」量とは、このような保護を媒介するのに十分な予防剤の量である。また、予防有効量は、疾患の防止において予防的利益をもたらす予防剤の量も意味し得る。

【0032】

本明細書で使用する場合、「個体」、「宿主」、「対象」、及び「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用され、限定されるものではないが、ヒト、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）、ならびにその他の実験動物を含めた哺乳類を意味する。

【0033】

本明細書で使用する場合、「医薬的に許容される担体」という用語は、任意の標準的な医薬担体、例えば、リン酸緩衝食塩液、水、及び乳濁液（例えば、油/水または水/油乳濁液）、ならびに様々なタイプの湿潤剤を包含する。

10

【0034】

本明細書で使用する場合、「プラス鎖RNAウイルス」または「センス鎖RNAウイルス」とは、遺伝子情報が、mRNA（メッセンジャーRNA）及びタンパク質をコードするプラス（またはセンス）鎖である1本鎖RNAからなる、ウイルスである。

【0035】

本明細書で使用する場合、「マイナス鎖RNAウイルス」または「アンチセンス鎖RNAウイルス」とは、遺伝子情報が、mRNA（メッセンジャーRNA）をコードしないマイナスまたはアンチセンス鎖である1本鎖RNAからなる、ウイルスである。

【0036】

本明細書で使用する場合、ウイルスの「不活性化」という用語は、そのウイルスが複製できないこと、ゲノムが欠失、断片化、分解、遺伝子的に不活性化していること、あるいは、ウイルスが伝達可能であること、または他の任意の細胞もしくは対象に感染することを防止し、その結果 *in vivo* でのウイルスのクリアランスをもたらす、他の任意の物理的、生物学的、化学的、または構造的な徴候を意味する。場合によっては、ウイルスゲノムのフラグメントは検出可能であり得るが、そのウイルスは複製も感染も不可能である。

20

【0037】

「標的核酸」配列という用語は、オリゴヌクレオチドが特異的にハイブリダイズするように設計された核酸を意味する。検出されるべきなのは標的核酸の有無であり、定量化されるべきなのは標的核酸の量である。標的核酸は、標的に向けられた対応するオリゴヌクレオチドの核酸配列に相補的な配列を有する。

30

【0038】

II. ウイルス複製を阻害するための組成物

本明細書では、宿主細胞または対象におけるウイルスを治療または不活性化するための組成物が提供される。例示的な組成物には、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸と、ウイルスにおける標的配列に相補的なガイドRNAとが含まれる。1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、宿主細胞内のウイルスを *in vitro* または *in vivo* で破壊及び抑制するために、ウイルス核酸配列を特異的に標的とする。任意の好適なヌクレアーゼ系を使用することができ、例えば、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、その他のエンドもしくはエキソヌクレアーゼ、またはこれらの組合せが挙げられる。1つの実施形態において、ヌクレアーゼ系はCRISPR/Casである。

40

【0039】

A. RNA誘導型エンドヌクレアーゼ

本開示の組成物は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトを含む。1つの実施形態において、核酸コンストラクトは、mRNAコンストラクトである。いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、CRISPR関

50

連エンドヌクレアーゼである。CRISPR系は、CRISPR関連(Cas)と呼ばれるヌクレアーゼを用いており、このヌクレアーゼはガイドとしての低分子RNA(gRNA)と複合体化し、任意のゲノム位置におけるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の上流で配列特異的にDNAを切断する。CRISPRは、crRNA及びtracrRNAとして知られている別々のガイドRNAを使用してもよい。これら2つの別々のRNAは、短いガイドRNAの設計による部位特異的な哺乳類ゲノム切断を可能にするために、組み合わせて1つのRNAとなっている。Cas及びガイドRNA(gRNA)は、公知の方法によって合成することができる。Cas/ガイドRNA(gRNA)は、非特異的DNA切断タンパク質Casと、標的とハイブリダイズするためのRNAオリゴヌクレオチドとを使用して、Cas/gRNA複合体を動員する(Chang et al., Cell Res. 23:465-472(2013); Hwang et al., Nat. Biotechnol., 31:227-229(2013))。

10

【0040】

CRISPR系は2つのクラスを含み、これらは5つの型と16の亜型とに細分される。いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas系は、II型またはIV型系とすることができる。好適なCRISPR/Casタンパク質の非限定的な例としては、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(またはCasD)、CASH、Case、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(またはCasA)、Cse2(またはCasB)、Cse3(またはCasE)、Cse4(またはCasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csfi、Csfi2、Csfi3、Csfi4、及びCu1966が挙げられる。

20

【0041】

1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、II型CRISPR/Cas系に由来する。CRISPR関連エンドヌクレアーゼCas9は、II型CRISPR/Cas系に属し、標的DNAを切断するエンドヌクレアーゼ活性が強力である。Cas9は、約20塩基対(bp)のユニークな標的配列(スペーサーと呼ばれる)を含む成熟crRNAと、プレcrRNAのリボヌクレアーゼIII支援プロセシングのガイドとして機能するトランス活性化したスモールRNA(tracrRNA)とによって誘導される。crRNA:tracrRNA二重鎖は、crRNA上のスペーサーと標的DNA上の相補的配列(プロトスペーサーと呼ばれる)との間の相補的塩基対を介して、Cas9を標的DNAに導く。Cas9は、トリヌクレオチド(NGG)プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識して切断部位(PAMから3番目のヌクレオチド)を特定する。crRNA及びtracrRNAは、別々に発現させてもよく、天然のcrRNA/tracrRNA二重鎖を模倣するように合成ステムループ(AGAAAU)を介し操作して人工的融合スモールガイドRNA(sgRNA)にしてもよい。このようなsgRNAは、shRNAと同様に、合成しても、直接のRNA形質移入用にin vitro転写しても、U6またはH1促進RNA発現ベクターから発現させてもよいが、人工的sgRNAの切断効率は、crRNA及びtracrRNAを別々に発現させた系の切断効率よりも低い。

30

40

【0042】

1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、Cas13a、Cas13b、Cas13cまたはCas13dなどのVI型RNaseである。1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼはCas13aである。Cas13酵素は、原核生物のCRISPR適応免疫系に関連するRNA誘導型RNAエンドヌクレアーゼである。Cas13ヌクレアーゼはCas9と同様に機能し、約64ntのガイドRNAを使用して標的特異性をコードする。Cas13タンパク質は、crRNA内の短いヘア

50

ピンを認識することによりガイドRNAと複合体を形成し、標的特異性は、標的領域に対して相補的な28~30ntのスペーサーによってコードされる。プログラム可能なRNase活性に加えて、全てのCas13ヌクレアーゼは、標的転写物を認識及び切断した後副次的活性を示し、スペーサーに対する相補性にかかわらず、付近の任意の転写物を非特異的に分解する。Cas13ヌクレアーゼを発現する例示的なバクテリアとしては、限定されるものではないが、*Leptotrichia wadei*、*Leptotrichia shahii*、*Leptotrichia oral taxon*、*Leptotrichia buccalis*、*Lachnospiraceae bacterium*、*Eubacterium rectale*、*Clostridium aminophilum*、*Herbinix hemicellulosilytica*、*Rhodobacter capsulatus*、*Paludibacter propionigenes*、*Carnobacterium gallinarum*、*Listeria seeligeri*、及び*Listeria newyorkensis*が挙げられる。1つの実施形態において、Cas13酵素は、*Leptotrichia wadei*、*Leptotrichia shahii*、*Leptotrichia oral taxon*、または*Leptotrichia buccalis*由来のCas13aである。

10

【0043】

ある特定の実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、少なくとも1つのRNA認識ドメイン及び/またはRNA結合ドメインを含む。RNA認識ドメイン及び/またはRNA結合ドメインは、ガイドRNAと相互作用する。また、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、ヌクレアーゼドメイン(すなわち、DNaseまたはRNaseドメイン)、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、RNaseドメイン、タンパク質間相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、及びその他のドメインも含むことができる。

20

【0044】

いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、野生型RNA誘導型エンドヌクレアーゼ、修飾RNA誘導型エンドヌクレアーゼ、または野生型もしくは修飾RNA誘導型エンドヌクレアーゼのフラグメントであり得る。RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、核酸結合親和性及び/もしくは特異性を増加させ、酵素活性を改変し、かつ/またはタンパク質の別の特性を変化させるように修飾することができる。例えば、RNA誘導型エンドヌクレアーゼのヌクレアーゼ(すなわち、DNase、RNase)ドメインは、修飾、欠失、または不活性化することができる。代替的に、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、融合タンパク質の機能に必須でないドメインを除去するように切断してもよい。また、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、融合タンパク質のエフェクタードメインの活性を最適化するように切断または修飾してもよい。

30

【0045】

いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、野生型Cas13タンパク質またはそのフラグメントに由来してもよい。他の実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、修飾Cas13タンパク質に由来してもよい。例えば、タンパク質の1つ以上の特性(例えば、ヌクレアーゼ活性、親和性、安定性など)を改変するようにCas13タンパク質のアミノ酸配列を修飾することができる。代替的に、修飾Cas13タンパク質が野生型Cas13タンパク質よりも小さくなるように、RNA誘導型切断に関与しないCas13タンパク質のドメインをタンパク質から除去してもよい。

40

【0046】

1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトは、mRNAコンストラクトである。

【0047】

1つの実施形態において、Cas13aをコードする核酸コンストラクトは、以下の核酸配列を有する。

50

ttttaagcttTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGA
AGAAATATAAGAGCCACCatgaaagtgcgaaggtaggaggcatttcgcataagaagtacacgtccgaaggccg
cttagtgaagtcagaatcgaagaaaatcgacagacgaacgtctgtcggcgttgcttaatatgcgccftgacatgtatatcaagaatcc
cagcagcacggaaaccaaggaaaatcaaaaacgcattgggaaftaaagaaattcttcaacaaaatggctatcttaagacaata
cttgagttgaagaatgggaaaaaggagaacattgatcgtgagtaftctgagactgacatccttgagagcgatgtccgtgacaagaaa
aacttcgccgtgtgaaaaagatctatctgaatgaaaacgtgaactcggagggaattggaagttttcgtaacgacattaagaagaaactg
aacaaaatcaacagcctgaagtactcattgaaaagaataaggcgaattatcaaaagattaatgagaataacatcgagaaggtggaagg
taagtcaaaagcgtaacattattacgattattatcgtgagtcagcgaaacgtgacgcttatgtaagcaatgtgaagaagccttgataag
cttacaagggaagagacattgcaaaactgttcttgaattgagaacctacgaagttagagaatacaagattcgcgagttctaccac
gaaattattggacgtaagaatgacaaggaaaactttgcaaaaatcatctacgaagaaatccagaatgtaataacatgaaagagttgatc
gagaaggtaccggacatgagtgagttgaaaagagccaagtatttacaagtaftacttagacaagaagagttgaacgacaagaaca
tcaatacgcgtttgtcattcgtggaatcgaatgagtcagttgctgaagaactacgtatataagccttaagtaataatctcgaatgac
aaaattaagcgtatcttgaataccagaactgaaaaaattgatcgaataaagctgttaacaaactgacacgtacgtccgtaattgtg
aaagtataattatttcaagacggcgaatggcacttcagatttcatcgcgccgaaccgtcagaatgaagcgtttcttcgcaacatca
ttgggtgtcatctgtggcctactttctcttcgcaacattctgaaacggagaacgagaatgatattactggcgtatgcgcggcaaaac
agftaagaacaataaaggtgaagagaagtacgtgtccggagaagttgataagatctataatgaaaataagaagaacgaggttaagga
gaacttaaaaatgttctattcgtacgatttcaatggaacaagaatgaaatcgaagatttcttcgccaacatcgacgaggcgatttctt
ccatccgtcacggtattgtccacttcaacttgaatfagaaggtaaggatattcttgcgttcaagaacattgcgccatccgaaatctcaaa
gaagatgttcagaatgagattaacgagaaaaaactgaaattgagatcttctgcaactgaacttccaacgtgttccgctatctcgaa
aagtataaaattctgaattacctaaccgtacacgctcagttgtcaataaaaatatccattcgtcccgtcttaccxaaatattatcgc
gcattgatgacctgaagaatagcttggattfactgaaaactccgaaaacaacgacgacaataagactaaggagattattgatgcc

10

20

30

40

50

caaatctatttgcctaaaaacatctattacggggagttcctgaattatttcatgtcgaacaatggaattctttgagatttctaaagaatcatc
gaattgaacaagaacgataaacgcaacttaagactgggtttacaagctgcaaaagttagagacatccaggagaagattccaagg
aatacttgggaatattccagtcctgtacatgattaatgccgtaatcaggacgaagaagaaaaggacacttatattgatttattcaaaa
gatcttctaaagggtttatgacgtatcttgaataacggctgttaagtctgattfacatcggctcggatgaagaacaataacgtcatt
agcagaaaagaagcaaggtttgacaagttctgaaagtagcagcagaacaataatacaagatcccctatgagatcaatgaattcc
tgctgagatcaaacgggaacatcctgaagtatactgagcgtttaaacatgttctaccttattctaaagctttgaaacacaaggagctg
acaaatctgaagggtagtctgaaaaatcagcttgcgaataaggagaagcgttctctgaccaattggagtttaattaacctgcttaacc
ttgacaacaaccgctgacggaagacttgaattagaggccgacgagattggaaaattcttgattcaatggcaacaagttaaggat
aacaaggactgaaaaagttgatacaacaagatctactttgacggcgagaacattatcaaacacctgccttctacaatattaagaaa
tatggcatgttaacttactggagaaaatgccgacaaggctgatacaagatctcgatcgaagagctgaagaatactccaataaaaa
gaatgagatcgagaagaaccataagatgcaggaaaatctgcaccgcaaatcgcctcgtccccgtaagagcagaagttacagatga
ggactatgaaagttacaagcaagctattgagaatattgaggagtacaccacctaagaacaaggtagaattcaatgagctgaattact
gcaggccctgttgcctgcgcatttacatcgtttagtcggatafacctcaatttgggaacgcgatctgcgctccgcttaagggtgagttcc
cagaaaaccaatacatcgaagagatctcaactttgaaaataagaagaacgtgaagtacaagggggtcagattgtagagaaatacatt
aaattctacaaggaaattacatcaaaatgatgaagttagatcaacaagtagctccgcaaatcaaggtgtgaaagcaagaaaaagaa
ggaccttataattgaaattacatgcccaacttcaattatactctcacgcccagatctcactgctggaagtccttgaaaatttgcgtaattg
ctgtcctacgatcgaactgaaaaatccgtaatgaaatcagtagttgatcttaaggagtagtgttttagccacattcaaaatcgg
ggcggacaagaagatcggtattcagacactggagagcgaaaaaatcgtgcatcttaagaatcttaagaagaagaagttaatgactgac
cgcaattccgaggaaacttgcgaattgtgaagattatgittgaatacaaaatggaagagaaaaagtctgaaaacGGTAAGCCT
 ATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGTGATAAgctgccttctgcggggcttgccttctgg
 ccatgcccttctctccctgcacctgtaccttggctttgaataaagcctgagtaggaaggcggccgcaaaaa (SEQ ID
 NO:1)

10
20
30

下線付きの配列は制限部位を表し、太字かつ大文字の配列は5'UTRを表し、二重下線付きの配列はコード領域を表す。

【0048】

別の実施形態において、Cas13aをコードする核酸コンストラクトは、核局在配列を含み、以下のような核酸配列を有する。

GCGGAAGGCCGTCAAGGCCGATTTTTAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGA
 AATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGCCAAAAA
 AGAAGAGGAAAGTGGGATCCATGAAAGTGACCAAAGTCGGCGGCATCAGCCAC
 AAGAAGTACACCTCTGAGGGCAGACTGGTCAAGAGCGAGAGCGAGGAAAACCG
 GACCGACGAGAGACTGAGCGCCCTGCTGAACATGCGGCTGGACATGTACATCAA
 GAACCCAGCAGCACCGAGACAAAAGAGAACCAGAAGCGGATCGGCAAGCTGA
 AGAAGTTCTTTAGCAACAAGATGGTGTACCTGAAGGACAACACCCTGAGCCTGA
 AGAACGGCAAGAAAGAGAACATCGACCGGAGTACAGCGAGACAGACATCCTG

40
50

GAAAGCGACGTGCGGGACAAGAAAACTTCGCCGTGCTGAAGAAAATCTACCTG
AACGAGAACGTGAACAGCGAGGAACTGGAAGTGTCCGCAACGATATCAAGAA
GAAGCTGAACAAGATCAACAGCCTGAAGTACAGCTTCGAGAAGAACAAGGCCA
ACTACCAGAAGATCAACGAGAACAACATCGAGAAGGTGGAAGGCAAGAGCAAG
CGAACATCATCTACGACTACTACAGAGAGAGCGCCAAGCGGGACGCCTACGTG
TCCAATGTGAAAGAGGCCTTCGACAAGCTGTACAAAGAGGAAGATATCGCCAAG
CTGGTGCTCGAGATCGAGAACCTGACCAAGCTGGAAAAGTACAAGATCCGCGAG
TTCTACCACGAGATCATCGGCCGGAAGAACGACAAAGAGAAGCTTCGCCAAGATC
ATCTATGAAGAGATCCAGAACGTCAACAACATGAAGGAACTGATTGAGAAGGTG
CCCACATGAGCGAGCTGAAAAAGTCCCAGGTGTTCTACAAGTACTACCTGGAC
AAAGAAGAATTGAACGACAAGAATATTAAGTACGCCTTCTGCCACTTCGTGGAA
ATCGAGATGAGCCAGCTGCTGAAAACTACGTGTACAAGCGGCTGAGCAACATC
AGCAACGATAAGATCAAGCGGATCTTCGAGTACCAGAACCTGAAGAAGCTCATT
GAGAACAAGCTGCTCAACAAGCTCGACACCTACGTGCGGAACTGCGGCAAGTAC
AACTACTATCTGCAAGACGGCGAGATCGCCACCAGCGACTTTATCGCCCGGAAC
AGACAGAACGAGGCCTTCCTGAGAAACATCATCGGCGTGTCCAGCGTGGCCTAC
TTCAGCCTGCGGAACATTCTGGAAACCGAGAACGAGAATGACATCACCGGCCGG
ATGAGAGGCAAGACCGTGAAAAACAACAAGGGCGAAGAGAAATACGTGTCCGG
CGAGGTGGACAAGATCTACAATGAGAACAAAAGAACGAAGTGAAAGAAAACC
TCAAGATGTTCTACAGCTACGACTTCAACATGGACAACAAGAATGAGATCGAGG
ACTTCTTCGCCAACATCGACGAGGCCATCAGCAGCATCAGACACGGCATCGTGC
ACTTCAACCTCGAGCTGGAAGGGAAAGACATCTTCGCCTTCAAGAATATCGCCCC
TAGCGAGATCAGCAAGAAGATGTTCCAGAACGAGATCAATGAGAAGAACTGA
AGCTCAAGATCTTCCGGCAGCTGAACAGCGCCAACGTGTTTCAGATACCTCGAGA
AGTATAAGATCCTGAACTACCTGAAGCGGACCCGCTTCGAGTTCGTGAACAAGA
ACATCCCCTTCGTGCCAGCTTCACCAAGCTGTATAGCCGGATCGACGATCTGAA
GAACAGCCTGGGCATCTACTGGAAAACCCCTAAGACCAACGACGATAACAAGAC
CAAAGAGATCATTGACGCCAGATCTACCTCCTCAAGAATATCTACTACGGCGA
GTTCTGAACTTTCATGAGCAACAACGGCAACTTCTTCGAGATCTCCAAAGAA
ATCATCGAACTCAACAAGAACGATAAGCGGAACCTGAAAACCGGCTTCTACAAG
CTGCAGAAATTCGAGGACATCCAAGAGAAGATCCCCAAAGAGTACCTGGCCAAC
ATCCAGAGCCTGTACATGATCAACGCCGGCAACCAGGACGAGGAAGAGAAGGA
CACCTACATCGACTTTATTCAGAAGATTTTCTGAAAGGGCTTCATGACCTACCTG
GCTAACAACGGCCGGCTGTCCCTGATCTACATCGGCAGCGACGAGGAAACAAAC

10

20

30

40

50

ACCAGCCTGGCCGAGAAAAAGCAAGAGTTCGACAAGTTCCTTAAGAAGTACGAG
 CAGAACAACAACATCAAGATCCCGTACGAGATTAACGAGTTCCTCCGCGAGATC
 AAGCTGGGGAACATCCTCAAGTACACCGAGCGGCTGAATATGTTCTACCTGATCC
 TGAAACTGCTGAACCACAAAGAGCTGACCAATCTGAAGGGAAGCCTCGAGAAAT
 ACCAGTCCGCCAACAAAGAAGAGGCCTTTAGCGACCAGCTGGAAGTATCAACC
 TGCTGAATCTCGACAACAACAGAGTGACCGAGGACTTTGAACTCGAGGCCGACG
 AGATCGGAAAGTTCCTGGACTTCAATGGCAACAAAGTGAAGGATAACAAAGAAC
 TCAAGAAGTTCGATACCAACAAAATCTACTTCGACGGGGAGAATATCATCAAGC
 ACCGGGCCTTCTACAACATTAAGAAATACGGCATGCTGAACCTGCTCGAGAAGA
 TCGCCGATAAGGCCGGCTACAAGATCAGCATTGAGGAACTGAAGAAATACTCCA
 ACAAGAAGAACGAGATTGAGAAGAACCACAAGATGCAAGAGAACCTGCACCGG
 AAGTACGCCAGACCTCGGAAGGACGAGAAGTTCACCGACGAGGATTACGAGAG
 CTACAAGCAGGCCATCGAGAATATCGAAGAGTACACCCACCTCAAGAACAAAGT
 GGAATTCAACGAGCTGAATCTGCTGCAGGGCCTGCTGCTGAGAATCCTGCATAG
 ACTCGTGGGCTACACCAGCATCTGGGAGCGCGACCTGAGATTCAGACTGAAGGG
 CGAGTTTCCCGAGAACCAGTACATCGAGGAAATCTTCAACTTCGAAAACAAAA
 AAACGTGAAGTACAAAGGCGGCCAGATCGTTGAGAAGTACATTAAGTTCTACAA
 AGAATTGCACCAGAACGACGAAGTCAAGATTAACAAGTACAGCAGCGCCAATAT
 CAAGGTGCTGAAGCAAGAGAAAAAGGACCTGTACATCCGGAAGTATATCGCCCA
 CTTCAACTACATCCCTCACGCCGAGATTAGCCTGCTGGAAGTGTGGAAAATCTG
 CGGAAGCTGCTGAGCTACGACCGGAAACTGAAAAACGCCGTGATGAAGTCCGTG
 GTGGATATCCTGAAAGAATACGGCTTCGTGGCCACCTTCAAGATCGGAGCCGAC
 AAGAAGATCGGCATCCAGACACTGGAATCCGAAAAGATCGTGCACCTGAAAAAT
 CTGAAAAAGAAAAGCTGATGACCGACCGGAACTCCGAAGAACTGTGCAAGCTC
 GTGAAGATCATGTTGAGTACAAAATGGAAGAAAAGAAATCCGAGAACGGATCC
 GGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGGATCCCCAAGA
 AAAAGCGCAAGGTATGATAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCC
 CTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTTCTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGA
 AGGCGGCCGCAAAAAGTGGGCCTCATG

10

20

30

(SEQ ID NO:2)

40

【 0 0 4 9 】

SEQ ID NO: 2の核酸1~27は5' pMA7ベクター配列を表し、SEQ ID
 NO: 2の核酸28~33はHindIII制限部位を表し、SEQ ID NO: 2の核
 酸34~53はT7プロモーターを表し、SEQ ID NO: 2の核酸54~97は5'
 UTRを表し、SEQ ID NO: 2の核酸101~121はSV40核局在化配列(N
 LS)を表し、SEQ ID NO: 2の核酸122~127はGSリンカーを表し、SE
 Q ID NO: 2の核酸128~3604はLbu Cas13aコドン最適化を表し、
 SEQ ID NO: 2の核酸3605~3610はGSリンカーを表し、SEQ ID
 NO: 2の核酸3611~3652はV5タグを表し、SEQ ID NO: 2の核酸36

50

53～3658はGSリンカーを表し、SEQ ID NO:2の核酸3659～3679はSV40 NLSを表し、核酸3680～33685は終止コドンを表し、核酸3686～3778は3'UTRを表し、核酸3779～3786はNotI制限部位を表し、SEQ ID NO:2の核酸3787～3803は3'pMA7ベクター配列を表す。

【0050】

1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトは、SEQ ID NO:1に対し少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%の配列同一性を有する核酸配列を有する。別の実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトは、SEQ ID NO:2に対し少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%の配列同一性を有する核酸配列を有する。

10

【0051】

1. 修飾

RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする本開示の核酸コンストラクトは、安定性を高め、免疫原性を減少させるように修飾することができる。1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトは、例えば核酸コンストラクトに核局在配列を付加することにより、送達標的を改変するように修飾される。例示的な核局在配列としては、限定されるものではないが、サルウイルス40(SV40)ラージT抗原

(PKKKRKV)(SEQ ID NO:100)

20

、ヌクレオプラスミン

(KRPAATKKAGQAKKKK)(SEQ ID NO:101), SRY (KRPMNAFIVWSRDQRRK)(SEQ ID NO:102)およびRPRRK (SEQ ID NO:103), hnRNP A1 (SSNFGPMKGGNRRFFRSSGPY)(SEQ ID NO:104), Hrp1 (RSGGNHRRNGRGGRRGGYNNRRNNGYHPY)(SEQ ID NO:105), BDV p10 (LRLTLLELVRRLLNGNG)(SEQ ID NO:106), PLSCR1 (GKISKHWTGI)(SEQ ID NO:107), HIV-1 Rev (RQARRNRRRRWR)(SEQ ID NO:108), HIV-1 Tat (GRKKRRQRRRAP)(SEQ ID NO:109), HTLV-1 Rex (MPKTRRRPRRSQRKRPT)(SEQ ID NO:110)

30

が挙げられる。

【0052】

天然のmRNAは、5'末端にキャップ構造、3'末端にポリアデニル酸残基の長い配列(ポリ(A)テール)を有し、これらはDNAの転写後に付加される。修飾を伴わない合成mRNAは、5'末端のキャップも3'末端のポリ(A)テールも有しない。1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトは、安定性を高め免疫原性を減少させるように5'キャップ構造及び3'ポリ(A)テールで修飾される。5'キャップは、7-メチルグアノシンキャップ(例えば、キャップ0、キャップ1、キャップ2、キャップ3、もしくはキャップ4)またはLNA修飾キャップ類似体であり得る。mRNAをヌクレアーゼ分解から保護するために、ポリ(A)テールを3'UTRに付加してもよい。1つの実施形態において、ポリ(A)テールは25～1000ヌクレオチドを有する。別の実施形態において、ポリ(A)テールは、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または1000ヌクレオチドを有する。

40

【0053】

天然のRNAは、4種の塩基性リボヌクレオチド: ATP、CTP、UTP、及びGTPから合成される。1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトは、リボヌクレオチドに対する修飾を含むことができる。適切な

50

修飾としては、コドンが同じアミノ酸をコードし、ただし野生型バージョンの核酸に認められるコドンよりも安定するような、コドンの1つ以上のヌクレオチドの改変が挙げられる。例えば、RNAの安定性と、シチジン(C)及び/またはウリジン(U)残基の数が多きこととの逆比例関係が実証されており、また、C及びU残基がないRNAがほとんどのRNAaseに対して安定していることが分かっている。いくつかの実施形態において、mRNA配列中のC及び/またはU残基の数は減少する。別の実施形態において、C及び/またはU残基の数は、特定のアミノ酸をコードする1つのコドンを、同じまたは関連するアミノ酸をコードする別のコドンで置換することにより、減少する。本発明のmRNA核酸に対し企図されている修飾には、プソイドウリジンの組込みも含まれる。プソイドウリジンをmRNA核酸に組み込むことにより、安定性及び翻訳能力が増強されることに加え、*in vivo*の免疫原性が低下し得る。

10

【0054】

別の実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする本開示の核酸コンストラクトは、翻訳後修飾ヌクレオチドを含む。1つの実施形態において、修飾ヌクレオチドを組み込むことにより、mRNAコンストラクトの安定性が高まり、かつその免疫原性が減少し得る。1つの実施形態において、シチジン及び/またはウリジンは、修飾ヌクレオチドによって置き換えられる。例示的な修飾ヌクレオチド塩基としては、限定されるものではないが、5-メチルシチジン、2'-O-メチルシチジン、プソイドウリジン、N⁶-メチルアデノシン、N⁶, 2'-O-ジメチルアデノシン、N⁶, 2'-O-トリメチルアデノシン、3, 2'-O-ジメチルウリジン、7-メチルグアノシン、2'-O-メチルグアノシン、N², 7-ジメチルグアノシン、N², N², 7-トリメチルグアノシンが挙げられる。1つの実施形態において、合成mRNAは、N¹-メチルプソイドウリジン-5'-三リン酸、2'-O-メチルアデノシン-5'-三リン酸、または2'-O-メチルウリジン-5'-三リン酸と共に組み込まれる。

20

【0055】

1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトは、5'-及び3'-末端側非翻訳領域(UTR)(例えば、アルファ-及びベータ-グロビンUTR)の組込みによって最適化される。末端側UTRは、RNAの安定性及び翻訳能力を増強する。安定している任意のネイティブmRNA分子(例えば、グロビン、アクチン、GAPDH、チューブリン、ヒストン、クエン酸回路酵素)及びウイルスRNA(例えば、アルファウイルスなど)に由来する3'または5'配列は、核酸コンストラクトの安定性を高めるために、核酸分子の3'及び/または5'領域内に組み込むことができる。

30

【0056】

B. ガイドRNA

本発明に従うガイドRNA配列は、センスまたはアンチセンス配列であり得る。ガイドRNA配列は、概してプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を含む。PAMの配列は、使用されるCRISPRエンドヌクレアーゼの特異性要件に応じて変化し得る。S. pyogenes由来のCRISPR-Cas系において、標的DNAは、典型的には5'-NGGプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の直前にある。したがって、S. pyogenes Cas9の場合、PAM配列は、AGG、TGG、CGG、またはGGGであり得る。ガイドRNAの特異的配列は変化し得るが、その配列に関係なく、有用なガイドRNA配列となるのは、オフターゲット効果を最小化すると同時に、高効率及びウイルス(例えば、インフルエンザウイルス)の完全な除去を達成する配列である。ガイドRNA配列の長さは、約20~約60またはそれ以上のヌクレオチド、例えば、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約50、約55、約60またはそれ以上のヌクレオチドに変動し得る。

40

【0057】

ガイドRNA配列は、単一の配列として、または1つ以上の異なる配列の組合せ(例え

50

ば、多重構成)として構成することができる。多重構成は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の異なるガイドRNAの組合せを含むことができる。したがって、いくつかの実施形態において、少なくとも1つのgRNAをコードするポリヌクレオチド配列は、2つの異なるgRNA配列をコードすることができる。他の実施形態において、あるポリヌクレオチドはあるgRNAをコードし、第2のポリヌクレオチドは第2のgRNAをコードし、第3のポリヌクレオチドは第3のgRNAをコードする、などとなり、各gRNAは、標的核酸配列の異なる配列に相補的である。他の実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、2つ以上の異なるgRNA配列をコードする。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、重複する標的核酸配列を有する複数のgRNA配列をコードする。

10

【0058】

本発明のCRISPR/Cas遺伝子編集複合体は、ウイルスゲノムを標的とするガイドRNAと共に最適に作用する。ガイドRNA(gRNA)としては、限定されるものではないが、シングルガイドRNA(sgRNA)、crisprRNA(crRNA)、トランス活性化RNA(tracrRNA)、他の任意の標的指向性オリゴヌクレオチド、またはこれらの任意の組合せを挙げることができる。gRNAは、ウイルスゲノムを破壊させるためにCRISPR/Cas複合体をウイルスゲノムに導く。1つの実施形態において、CRISPR/Cas/gRNA複合体は、細胞内のウイルス(例えばRNAウイルス)を標的とするように設計される。本発明の組成物を用いて任意のウイルスを標的とし得ることを理解されたい。ウイルスゲノムの特異的領域の同定は、CRISPR/Cas/gRNA複合体を開発及び設計する一助となる。1つの実施形態において、CRISPR/Cas/gRNA複合体は、細胞内の活性ウイルスを標的とするように設計される。別の実施形態において、CRISPR/Cas/gRNA複合体は、細胞内の潜伏ウイルスを標的とするように設計される。CRISPR/Cas/gRNA複合体は、ひとたび細胞内に形質移入すると、繰り返し挿入もしくは欠失を引き起こして、ウイルスゲノムを無力化するか、または挿入もしくは欠失の数によって修復の可能性を顕著に減少させる。

20

【0059】

本開示の組成物は、RNAウイルス(例えば、インフルエンザウイルスまたは呼吸器合胞体ウイルス)における標的配列に相補的なガイドRNAをコードする配列を含むことができる。A型インフルエンザ、B型インフルエンザ、及びC型インフルエンザウイルスは、それぞれA型インフルエンザウイルス属、B型インフルエンザウイルス属、及びC型インフルエンザウイルス属の唯一のメンバーである。これらのウイルスは膜に封入されたウイルスであり、そのゲノムは、RNAのネガティブセンス(すなわち、マイナス)鎖((-)RNA)が分節化したものである。10個のインフルエンザウイルス遺伝子が、A株及びB株の1本鎖RNAの8本の分節上に、そしてC株の7本の分節上に存在する。これらの分節のサイズは様々であり(890~2341ヌクレオチド)、各々が異なるmRNA合成の鋳型となる。インフルエンザウイルスピリオンは、これらの鋳型からのmRNA合成に必要なウイルス特異的RNAポリメラーゼを含み、このような特異的ポリメラーゼの不在下では、インフルエンザウイルスRNAのマイナス鎖は感染性を有しない。mRNAの転写開始は、インフルエンザウイルスのmRNAポリメラーゼが細胞のmRNAまたはmRNA前駆体の5'末端から12~15ヌクレオチドを取り込み、借用したオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用するとき生じる。このプロセスは、ウイルスのmRNA上に5'キャップ構造を配置することから、「キャップスナッチング」と称される。概して、このプロセスを通じて作製されるmRNAは、1つのタンパク質のみをコードする。M遺伝子及びNS遺伝子のウイルスRNA分節は、スプライシングされたmRNAもコードし、その結果、これら2つの分節の各々については2つの異なるタンパク質が産生される。インフルエンザウイルスRNAの複製は核内で行われ、3つの異なるRNA種の合成を伴う。

30

40

【0060】

50

ナイーブ細胞の感染後、マイナス鎖ビリオンRNA (VRNA) は核に輸送され、翻訳用のRNA (mRNA) が合成される。このとき、ウイルスがコードする酵素が、キャップの付いている細胞mRNA前駆体分子から切断した、5'末端の10~13ヌクレオチドからなるプライマーが使用される(すなわち、キャップスナッチング)。各mRNAの合成は、ゲノム分節の末端付近まで続き、末端でひと続きのオリゴ(U)に遭遇してポリ(A)テールが付加される。専用のウイルスmRNAは翻訳のために細胞質に輸送され、十分なウイルスタンパク質が核内に輸送された後、新生ウイルス粒子用のVRNAの合成が開始される。VRNAの正確なアンチゲノムコピーが合成される(cRNAと称される)。これはゲノムVRNAの完全な相補配列であり、新たなVRNAを産生するための鋳型として機能する。

10

【0061】

1つの実施形態において、ウイルスはA型インフルエンザである。A型インフルエンザは、負の極性を有する分節化したRNAウイルスである。ゲノム分節は、3つのポリメラーゼポリペプチド(PA、PB1、及びPB2)ならびにNP(核タンパク質)という4つのタンパク質の複合体によって複製される。8本のゲノム分節全ての5'及び3'末端配列領域は、遺伝子型内で高度に保存されている。A型インフルエンザウイルスは、その表面糖タンパク質の抗原性及び遺伝的性質に従って下位分類することができ、これまでに15種のヘマグルチニン(HA)亜型及び9種のノイラミニダーゼ(NA)亜型が同定されている。全ての公知のHA及びNA亜型を有するウイルスが鳥類宿主から単離されているが、ヒトのエピデミックを引き起こしているのはH1N1(1918)、H2N2(1957/58)、及びH3N2のウイルスのみである。

20

【0062】

1つの実施形態において、ガイドRNAは、ウイルス複製に関与する遺伝子を標的とするように設計される。ウイルスのポリメラーゼは、ウイルスゲノムの複製及び転写で中心的役割を果たしている。ウイルス複製に必要な例示的なウイルス成分としては、限定されるものではないが、ウイルス核タンパク質、RNAポリメラーゼ、及びリントタンパク質が挙げられる。1つの実施形態において、ガイドRNAは、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ(NA)、ヘマグルチニン(HA)、イオンチャネル(M2)、マトリックスタンパク質(M1)、ヌクレオカプシドタンパク質(NP)、核外輸送タンパク質(NS1及びNS2)、またはRNAポリメラーゼPB1、PB2、もしくはPAを標的とする。1つの実施形態において、ガイドRNAは、A型インフルエンザウイルスのPB1を標的とする。別の実施形態において、ガイドRNAはhRSVを標的とする。別の実施形態において、ガイドRNAは、任意のRNAウイルス(フィロウイルス、フラビウイルス、ピコルナウイルス、カリシウイルス、トガウイルス、アレナウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、ブニヤウイルス、コロナウイルス、アストロウイルス、レトロウイルスなどを含む)のゲノムを標的とし、また、DNAまたはRNAゲノムを有する任意のウイルス由来のmRNAを標的とすることができる。

30

【0063】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAの混合物を細胞内に導入することができる。当該ガイドRNAは、多数のカテゴリーのウイルスゲノム配列を標的とするように設計されている。ゲノム上のいくつかの領域を標的とすることにより、複数の位置の2本鎖切断がゲノムを断片化し、修復の可能性を低下させる。修復機構を伴う場合であっても、大きな欠失によってウイルスが無力化される。

40

【0064】

いくつかの実施形態において、数種のガイドRNAを添加して、異なるカテゴリーの配列を標的とする混合物を創出する。例えば、3つの異なるカテゴリーの配列を標的とするCRISPR混合物中に2、5、7、または11種のガイドRNAが存在し得る。ただし、複数カテゴリーの配列を標的とするのに任意の数のgRNAを混合物中に導入することができる。好ましい実施形態において、配列のカテゴリーは、ゲノム構造、宿主細胞形質転換、及び感染潜伏期のそれぞれにおいて重要である。

50

【 0 0 6 5 】

C . 医薬組成物

R N A 誘導型エンドヌクレアーゼをコードする本開示の核酸と、ウイルスにおける標的配列に相補的なガイドRNAとを含む、医薬組成物が提供される。本開示の組成物を含む医薬組成物は、非経口（筋肉内、腹腔内、静脈内（IV）、または皮下注射）、経皮（受動的に、またはイオン導入もしくはエレクトロポレーションを用いて）、あるいは経粘膜（経鼻、経膈、経直腸、または舌下）の投与経路または生分解性挿入物の使用による投与向けとすることができ、また、各投与経路に適した剤形で製剤化することができる。1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸及びガイドRNAは、同じ医薬組成物に含まれる。別の実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸及びガイドRNAは、別々の医薬組成物で製剤化される。

10

【 0 0 6 6 】

いくつかの*in vivo*アプローチにおいて、本明細書で開示される組成物は、治療有効量で対象に投与される。的確な用量は、対象依存的な変数（例えば、年齢、免疫系健康状態など）、疾患、及びもたらされる治療などの様々な因子に応じて変動する。

【 0 0 6 7 】

本開示の組成物については、さらなる研究が行われるに伴って、様々な患者における様々な状態の治療のための適切な用量レベルに関する情報が明らかになり、当業者は、治療状況、年齢、及びレシピエントの全般的健康状態を考慮して妥当な投薬を把握することができる。選択される用量は、所望の治療効果、投与経路、及び所望の治療期間に依存する。本開示の活性化可能なヌクレアーゼ組成物については、概して1日に0.001~20mg/kg体重の用量レベルが哺乳類に投与される。概して、静脈内注射または点滴の場合、用量はより少なくてもよい。

20

【 0 0 6 8 】

1 . 非経口投与用製剤

いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸とガイドRNAとを含む、本明細書で開示される組成物は、水溶液で、非経口注射によって投与される。また、製剤は、懸濁液または乳濁液の形態をとってもよい。概して、活性化可能なヌクレアーゼ組成物の有効量を含む医薬組成物が提供され、この医薬組成物は、任意選択で、医薬的に許容される希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、及び/または担体を含む。このような組成物は、任意選択で、以下のうちの1つ以上を含む：希釈剤、滅菌水、様々な緩衝内容物（例えば、トリス-HCl、酢酸、リン酸）やpH及びイオン強度の緩衝食塩水；添加剤、例えば、界面活性剤及び可溶化剤（例えば、TWEEN 20（ポリソルベート20）、TWEEN 80（ポリソルベート80））、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、ならびに防腐剤（例えば、チメロサル（Thimersol）、ベンジルアルコール）、ならびに増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）。非水性溶媒またはビヒクルの例には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油及びトウモロコシ油などの植物油、ゼラチン、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルがある。製剤は、凍結乾燥し、使用直前に再溶解/再懸濁することができる。製剤の滅菌は、例えば、細菌保持フィルターによる濾過、組成物中への滅菌剤の組込み、組成物の照射、または組成物の加熱によって行うことができる。

30

40

【 0 0 6 9 】

2 . 経口投与用製剤

いくつかの実施形態において、組成物は経口送達用に製剤化される。経口用固体剤形は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed. 2006 (Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD)のChapter 45で概説されている。固体剤形としては、錠剤、カプセル、丸薬、トローチもしくはロゼンジ、カシエ剤、ペレット、粉末、または顆粒、あるいはポリマー化合物（例えば、ポリ乳酸、ポリグリ

50

コール酸など)の粒子調製物への材料の組込み、またはリポソームへの材料の組込みが挙げられる。このような組成物は、本開示物の物理的状態、安定性、*in vivo*放出速度、*in vivo*クリアランス速度に影響を及ぼし得る。組成物は、液体形態で調製されてもよく、乾燥粉末(例えば、凍結乾燥)形態をとってもよい。リポソームまたはプロテノイドカプセル化を使用して組成物を製剤化してもよい。リポソームカプセル化を使用することができ、リポソームを様々なポリマーで誘導体化することができる(例えば、米国特許第5,013,556号)。概して、製剤は、ペプチド(またはその化学修飾形態)と、胃環境でペプチドを保護し腸内で生物学的活性物質を放出する不活性成分とを含む。

【0070】

薬剤は、誘導体の経口送達が効果的であるように化学修飾することができる。概して、企図される化学修飾は、成分分子自体に対する少なくとも1つの部分の結合であり、この部分は、胃もしくは腸から血流への取込み、または腸粘膜への直接の取込みを可能にする。また、成分(1つまたは複数)の全体的安定性の増加や体内の循環時間の増加も所望される。PEG化は、医薬使用のための例示的な化学修飾である。使用され得る他の部分としては、プロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリプロリン、ポリ-1,3-ジオキソラン、及びポリ-1,3,6-チオキソカン(tioxocane)が挙げられる[例えば、Abuchowski and Davis (1981) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," *Enzymes as Drugs*, Hochenberg and Roberts, eds. (Wiley-Interscience: New York, N.Y.) pp. 367-383; 及び Newmark, et al. (1982) *J. Appl. Biotech.* 4: 185-189を参照]。

【0071】

別の実施形態は、医薬的に許容される乳濁液、溶液、懸濁液、及びシロップを含めた経口投与用の液体剤形を提供し、このような剤形は、不活性希釈剤;アジュバント、例えば、湿潤剤、乳化剤、及び懸濁化剤;ならびに甘味剤、香味剤、及び芳香剤を含めた他の構成成分を含むことができる。

【0072】

制御放出経口用製剤が望ましい場合がある。薬剤は、拡散または浸出機構による放出を可能にする不活性マトリックス、例えばゴムの中に組み込むことができる。緩やかに変性するマトリックスを製剤に組み込んでよい。制御放出の別の形態は、Oris治療システム(Alza Corp.)に基づくものである。すなわち、薬物は、浸透圧効果によって水が侵入し単一の小開口部から薬物を押し出すことができる半透膜に封入する。

【0073】

経口製剤については、放出の位置は、胃、小腸(十二指腸、空腸、もしくは回腸)、または大腸とすることができる。いくつかの実施形態において、この放出は、薬剤(もしくは誘導体)を保護することにより、または胃環境以外(例えば、腸内)で薬剤(もしくは誘導体)を放出することにより、胃環境の有害な影響を回避する。十分な胃の抵抗性を確保するには、少なくともpH5.0まで不透過性であるコーティングが必須である。腸溶コーティングとして使用される、より一般的な不活性成分の例には、セルロースアセテートトリメリテート(CAT)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート(HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、ポリビニルアセテートフタレート(PVAP)、Eudragit L30D(商標)、Aquateric(商標)、セルロースアセテートフタレート(CAP)、Eudragit L(商標)、Eudragit S(商標)、及びShellac(商標)がある。これらのコーティングは、混合フィルムとして使用することができる。

【0074】

3. 局所投与用製剤

本開示の組成物は、局所適用することができる。局所投与用の製剤としては、限定されるものではないが、エアロゾル送達、皮膚パッチ、局所用ゲルまたはローションが挙げられる。

【0075】

組成物は、約5ミクロン未満の空気力学的直径を有するエアロゾルまたは噴霧乾燥粒子として送達する場合、吸入しながら肺に送達し、肺上皮内層を横断して血流に移動させることができる。

【0076】

治療製品を肺に送達するために設計された広範な機械的デバイスを使用することができ、このようなデバイスとしては、限定されるものではないが、ネブライザー、定量吸入器、及び粉末吸入器が挙げられ、これらの全ては当業者に周知されている。市販されているデバイスのいくつかの具体例としては、Ultraventネブライザー(Mallinckrodt Inc., St. Louis, Mo.); Acorn IIネブライザー(Marquest Medical Products, Englewood, Colo.); Ventolin定量吸入器(Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.); 及びSpinhaler粉末吸入器(Fisons Corp., Bedford, Mass.)がある。Nektar、Alkermes、及びMannkindはいずれも、承認済みまたは臨床試験中の吸入可能なインスリン粉末調製物を有しており、この技術は、本明細書で説明されている製剤に適用できると考えられる。

【0077】

粘膜投与用の製剤は、典型的には噴霧乾燥した薬物粒子であり、錠剤、ゲル、カプセル、懸濁液、または乳濁液に組み込むことができる。標準的な医薬添加物は、任意の製剤業者から入手可能である。

【0078】

経皮用製剤も調製することができる。経皮用製剤は、典型的には、軟膏、ローション、スプレー、またはパッチであり、これらの全ては、標準的な技術を用いて調製することができる。経皮用製剤は、浸透促進剤を含めることが必要となり得る。

【0079】

4. 制御送達ポリマーマトリックス

本明細書で開示される組成物は、制御放出製剤で投与することもできる。制御放出ポリマーデバイスは、ポリマーデバイスの留置(ロッド、シリンダー、フィルム、ディスク)または注射(マイクロ粒子)の後、全身に長期間放出するように作製することができる。マトリックスは、ミクロスフェアなどの微粒子の形態をとることができ、この場合、薬剤は固体ポリマーマトリックスまたはマイクロカプセル内で分散し、コアはポリマーシェルとは異なる材料であり、ペプチドは、事実上液体でも固体でもよいコア内で分散または懸濁している。本明細書で特に定義されない限り、マイクロ粒子、ミクロスフェア、及びマイクロカプセルは互換的に使用される。代替的に、ポリマーは、ナノメートルから4センチメートルの範囲の薄いスラブもしくはフィルムとして、粉碎もしくは他の標準的技術によって産生した粉末として、またはヒドロゲルなどのゲルとしてであっても、流延することができる。

【0080】

非生分解性マトリックスも生分解性マトリックスも、融合ポリペプチドまたは融合ポリペプチドをコードする核酸の送達に使用することができるが、いくつかの実施形態では生分解性マトリックスの方が好ましい。これらは天然ポリマーであっても合成ポリマーであってもよいが、いくつかの実施形態では、分解及び放出プロファイルのキャラクターゼーションがより良好であることにより、合成ポリマーの方が好ましい。ポリマーは、放出が所望される期間に基づいて選択される。いくつかの場合には線形放出が最も有用であり得るが、他の場合にはパルス放出または「バルク放出」がより有効な結果をもたらし得る。ポリマーは、ヒドロゲル(典型的には、最大約90重量%の水を吸収する)の形態をとる

ことができ、また任意選択で、多価イオンまたはポリマーで架橋することができる。

【0081】

マトリックスは、溶媒蒸発、噴霧乾燥、溶媒抽出、及びその他の当業者に知られている方法によって形成することができる。生分解性マイクロフェアは、薬物送達用のマイクロフェアを作製するために開発された方法（例えば、Mathiowitz and Lan ger, J. Controlled Release, 5: 13 - 22 (1987); Mathiowitz, et al., Reactive Polymers, 6: 275 - 283 (1987); 及び Mathiowitz, et al., J. Appl. Polymer Sci., 35: 755 - 774 (1988) で説明されている方法）のいずれかを用いて調製することができる。

10

【0082】

デバイスは、留置領域または注射領域を治療するために局所放出用に製剤化することができ、この場合、典型的には、全身治療（すなわち、全身送達）用の用量よりもはるかに少ない用量を送達する。このような製剤は、皮下、筋肉内、脂肪内に留置または注射しても、嚥下してもよい。

【0083】

III. 使用方法

本開示の組成物及び方法は、宿主細胞または対象からのウイルスの治療及び不活性化に使用することができる。本発明の方法は、宿主生物から、宿主の遺伝物質の完全性を妨害することなく、ウイルスまたはその他の外来遺伝物質を除去するのに使用することができる。ヌクレアーゼを使用してウイルス核酸をターゲティングし、それによってウイルス複製もしくは転写を妨害することができ、またはさらに宿主ゲノムからウイルス遺伝物質を切り取ることもできる。ヌクレアーゼは、ウイルス核酸が細胞内に粒子として存在するとき、またはウイルス核酸が宿主ゲノム内に組み込まれているときに、宿主物質に作用することなくウイルス核酸のみを除去するように特異的に標的とすることができる。ウイルス核酸のターゲティングは、ヌクレアーゼが破壊するウイルスゲノム物質を標的とし、宿主細胞ゲノムを標的としない配列特異的部分（例えば、ガイドRNA）を用いて行われ得る。いくつかの実施形態において、共にウイルスゲノム物質を標的とし、ウイルスゲノム物質を選択的に編集または破壊する、CRISPR/Casヌクレアーゼ及びガイドRNA (gRNA) が使用される。CRISPRは、ファージ感染から細菌を保護する細菌免疫系の天然の要素である。ガイドRNAは、CRISPR/Cas複合体をウイルス標的配列に局在化させる。複合体の結合によって、Casエンドヌクレアーゼがウイルスゲノムの標的配列に局在化され、ウイルスゲノムを切断する。その他のヌクレアーゼ系も使用することができ、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、または宿主の遺伝物質の通常機能を妨害することなくウイルス核酸を分解もしくは妨害するのに使用され得るその他の任意のヌクレアーゼ系がこれに含まれる。

20

30

【0084】

組成物は、ウイルス生活環における任意の形態または任意の段階のウイルス核酸をターゲティングするのに使用することができる。ターゲティングされたウイルス核酸は、宿主細胞内に独立した粒子として存在し得る。好ましい実施形態において、ウイルス感染は潜伏性であり、ウイルス核酸は宿主ゲノム内に組み込まれている。任意の好適なウイルス核酸を切断及び消化の標的にすることができる。

40

【0085】

ある特定の実施形態において、細胞または対象におけるウイルスを治療または不活性化する方法は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトの治療有効量と、ウイルスゲノム内の標的核酸配列に対し相補性を有する少なくとも1つのガイドRNAとを含む医薬組成物を、細胞に接触させることまたは対象に投与することを含む。

【0086】

他の実施形態において、細胞または対象におけるウイルスの複製を阻害する方法は、R

50

RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする単離核酸配列の治療有効量と、ウイルスゲノム内の標的核酸配列に対し相補性を有する少なくとも1つのガイドRNAとを含む医薬組成物を、細胞に接触させることまたは対象に投与することを含む。

【0087】

1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする本開示の核酸コンストラクトは、対象に投与され、核酸がヌクレアーゼに翻訳されるまで活性化されない。1つの実施形態において、核酸はmRNAである。mRNAは、所望のタンパク質の迅速な翻訳や迅速なクリアランスという利点を有すると同時に、ゲノム統合、垂直及び水平伝達、体内での長期間持続性などの安全性上の懸念を回避する。

【0088】

RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクト及びガイドRNAコンストラクトは、同時または順次送達することができる。1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクト及びガイドRNAコンストラクトは、同じ医薬組成物で同時に送達される。別の実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクト及びガイドRNAコンストラクトは、別々の医薬組成物で同時に投与される。また別の実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクト及びガイドRNAコンストラクトは、順次投与される。RNA誘導型エンドヌクレアーゼコンストラクトをコードする核酸コンストラクトは、ガイドRNAコンストラクトの1、2、3、4、5、6、7、8、12、または24時間前に投与することができる。

【0089】

1つの実施形態において、本開示の組成物は、1日1回、1日2回、または1日3回、対象に投与することができる。別の実施形態において、組成物は、1週間に1回、1週間に2回、または1週間に3回、対象に投与される。

【0090】

A. 治療対象となる疾患

1. ウイルス感染

本開示の組成物は、ウイルスに感染した対象におけるウイルス負荷を減少させるのに使用することができる。1つの実施形態において、本開示の組成物は、ウイルス負荷の減少に有効な量で、ウイルス感染を有する対象に投与される。RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクト及びガイドRNAコンストラクトは、同じ医薬組成物で、または2つの別々の組成物で、同時に投与することができる。別の実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクト及びガイドRNAコンストラクトは、2つの別々の組成物で順次投与される。1つの実施形態において、対象は、活性化可能なヌクレアーゼ組成物を1、2、3、4、5、6、7、8週間、または8週間超投与される。対象のウイルス負荷が、もはや対象が感染していないことを示す範囲内であることをウイルス力価が示すまで、対象に活性化可能なヌクレアーゼ組成物を投与することができる。

【0091】

本開示の組成物は、予防的に使用することができる。1つの実施形態において、本開示の組成物は、ウイルスに曝露した可能性があるがウイルスの症状を示さない対象、例えば、ウイルスのアウトブレイクまたはエピソードが発生している地域に居住する対象に投与される。このような実施形態では、対象のウイルス感染を防止するのに有効な量の本開示の組成物を含む医薬組成物が、対象に投与される。1つの実施形態において、組成物は、ウイルスアウトブレイクの期間中、対象に投与される。組成物は、1日1回、1日2回、または1日3回、対象に投与することができる。別の実施形態において、組成物は、1週間に1回、1週間に2回、または1週間に3回、対象に投与される。

【0092】

a. RNAウイルス

1つの実施形態は、その必要のある対象におけるウイルス感染を治療するまたは減少さ

10

20

30

40

50

せる方法を提供する。1つの実施形態において、本開示の組成物は、RNAウイルスを治療するのに使用することができる。例示的な方法は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸コンストラクトと、RNAウイルス遺伝子を標的とする配列を有するガイドRNAとを含む組成物を、その必要のある対象に投与することを含む。ヒトにおける疾患を引き起こす例示的なRNAウイルスとしては、限定されるものではないが、西ナイルウイルス、エボラウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、デングウイルス、黄熱病ウイルス、インフルエンザウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、マールブルグウイルス、ヘンドラウイルス、ニパ(Nipha)ウイルス、チクングニアウイルス、アデノウイルス、ヒトサル痘ウイルス、C型肝炎ウイルス、リフトバレーウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、及びエンテロウイルスが挙げられる。

10

【0093】

1つの実施形態は、プラス鎖RNAでウイルスを治療する方法を提供する。プラス鎖RNAを有するウイルスは、そのゲノムを直接mRNAとして利用することができ、宿主リボソームによる翻訳は、分節化していないウイルスゲノムが細胞に侵入するとすぐに生じる。発現したウイルス遺伝子の1つは、プラス鎖ゲノムからマイナス鎖RNAを創出するRNA依存的RNAポリメラーゼ(またはRNAレプリカーゼ)をもたらす。マイナス鎖RNAは、さらなるプラス鎖RNAの鋳型として使用することができ、このプラス鎖RNAはmRNAとして、または新たに形成されるウイルスのゲノムとして使用することができる。1つの実施形態において、ガイドRNAコンストラクトは、RNAレプリカーゼのウイルス遺伝子を標的とする。

20

【0094】

別の実施形態において、本開示の活性化可能なヌクレアーゼは、マイナス鎖RNAウイルスを治療するのに使用することができる。マイナス鎖RNAウイルスには、インフルエンザウイルス、狂犬病ウイルス、及びエボラウイルスなど多くのメンバーが含まれる。マイナス鎖RNAウイルスのゲノムは直接mRNAとして使用することができないため、ウイルスはカプシド内にRNA依存的RNAポリメラーゼを保有しなければならない。宿主細胞に侵入すると、ポリメラーゼが生成したプラス鎖RNAは、タンパク質産生用のmRNAとして使用される。1つの実施形態において、ガイドRNAは、ウイルスのゲノムRNA(マイナス鎖)、プラス鎖中間体、またはメッセンジャーRNAを標的とするように設計される。

30

【0095】

b. DNAウイルス

別の実施形態において、本開示の組成物は、DNAウイルスを治療または防止するのに使用することができる。例示的なDNAウイルスとしては、限定されるものではないが、ヒトパピローマウイルス(HPV)、B型肝炎、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、及びバルボウイルスが挙げられる。DNAウイルスは、カプシドと呼ばれるタンパク質を含む外殻によって保護された一連のDNA遺伝子から構成される。カプシドは、宿主内に侵入するとDNA遺伝子を保護する。感受性細胞に侵入すると、ピリオンは分解されてウイルスゲノムを細胞内に放出し、その時点でウイルスDNA内の遺伝子が転写され、ウイルスのメッセンジャーリボ核酸(mRNA)が産生される。mRNAは、宿主の正常な細胞機能の改変を担うタンパク質に翻訳される。1つの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする本開示の核酸コンストラクトは、タンパク質に翻訳される前のDNAウイルスのmRNAを標的とする。

40

【実施例】

【0096】

実施例1. Cas13aはcrRNA及び標的RNAが共に存在する場合にRNAを切断する

材料及び方法:

Cas13aコンストラクトの設計及び合成: レプトトリキア・ブッカリス(Leptotrichia buccalis)配列由来のCas13aを、Addgene p2

50

CT-His-MBP-Lbu__C2C2__WT (プラスミド番号83482) から得た。pMA7ベクター (Thermo Scientific, USA) において、野生型 Cas13a を V5 タグと共にクローニングし、マウスアルファグロビン (Genbank アクセッション番号 NM_001083955) 由来の 3' UTR を付加した。また、V5 タグをコードする gBlocks (Integrated DNA technologies) を用いて、Cas13a コンストラクトに核局在化配列 (3' 及び 5') ならびに V5 タグを付加して、Cas13a-V5-NLSバージョンを作成した (図1Aの概略図)。

【0097】

Not-IHF (New England Biolabs) を一晩用いてプラスミドを線状化し、PCR クリーンアップキット (Qiagen) を用いて PCR 精製してから、製造業者の指示に従って T7 mScript (商標) Standard mRNA Production System (Cell Script, WI, USA) を用いて *in vitro* 転写 (IVT) を行った。等モル比の ATP、GTP、及び CTP を、N₁-メチルプソイドウリジン-5'-三リン酸 (TriLink Biotechnologies) と共に使用した。2'-O-メチルトランスフェラーゼを用いて RNA にキャップを付け、続いてポリAテールを付加した (いずれも製造業者の指示に従った)。次いで、RNeasy キット (Qiagen) を用いて mRNA を精製し、Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) で 1 時間処理し、再度精製した。精製した mRNA の RNA 濃度を測定し、さらなる使用まで -80 で保存した。翻訳効率を高めかつ自然免疫応答を軽減するように、*in vitro* 転写プロセス中に mRNA を修飾した。

【0098】

DNA 二重鎖を用いた crRNA 合成: A 型インフルエンザウイルス WSN/33 (IVA) に対応する複数の crRNA (CR) 及び標的 RNA (trRNA または TR) を設計し、合成するか (Integrated DNA Technologies, USA) または施設内で *in vitro* 転写し、精製した (表1)。当該 crRNA は、L. buccalis Cas13a が特異的に認識する保存的なダイレクトリピート (DR) からなる。

【0099】

(表1) インフルエンザウイルス遺伝子由来の crRNA のヌクレオチド配列 (CR) 及びそれぞれの標的 RNA 配列 (TR)。

10

20

30

40

50

crRNA (CR)	配列	SEQ ID NO:	標的 RNA (TR)	配列	SEQ ID NO:
HA_1.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACAAC UACUGGUCCUGUUAUUGCA	3	HA_1.2	GUGCAUUAACAGGACCAG UAGUUUC	14
NP_1.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACAAC UGGAGGACCUAUUACAGGA	4	NP_1.2	GUCCUGUAUAGGUCCUC CAGUUUC	15
NA_1.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACAAG ACAUGGCAUAAAGAAUUGGU	5	NA_1.2	GACCAAUUCUUAUGCCA UUCUUUC	16
MM_2.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACAAC AACAUUGGACAAAGCAGUUA	6	MM_2.2	GUUAAACUGCUUUUGUCC AUGUUUC	17
NN_2.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACAAC UCUACAGAGAUUCGUUGGA	7	NN_2.2	GUCCAAGCGAAUCUCUG UA	18
PB2_1.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACAAG UGGAUUGCAGUUCUCCAU	8	PB2_1.2	GAUGAGGAGAACUGCAU UUC	19
gPBI	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACAAG UGCUGCAACUUAUUUGAAA	9	gPBI-TR	GUUUUCAAAUAAAGUUG CAGCACUUUC	20
PB1_2.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACUUA UACAGAAGACACGUCGGGAU	10	PB1_2.2	GAUCCGACUGGUUCUC GUAUGAAC	21
PB1_3.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACUGAA AAUUCUCCCCAGCAGUUC	11	PB1_3.2	GGAACUGCUGGGGAAGA AUUUUCAC	22
PB1_4.1	GGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACAAC AGAUUGUUAUUGGAAGCAA	12	PB1_4.2	GUUGCUCCAAUACACAA UUCUUUC	23
NT-CR	GGUAGACCAACCCCAAAAUGAAGGGGACUAAAAACA CAAAUUCUGAAUAAACUCUUC	13			

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

NEB HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kitを用いて、DNA二重鎖(表2)をin vitro転写した。RNAは、1 μgのDNA二重鎖鋳型、NTP(ATP、GTP、UTP、CTP各10 mM)、10×反応緩衝液、T7ポリメラーゼを用いて合成し、37 °Cで16時間インキュベートした。この20 μlの反応体積に対し、1 μlのDNase I(New England Biolaboratories)を添加し、37 °Cで15分間インキュベートし、次に75 °Cで10分間熱不活性化した。RNAを等体積の2×RNAローディング色素と混合し、65 °Cで5分間加熱し、直ちに氷上に10分間置いた後、それを電気泳動用に15% TBE

50

- ウレアゲル (Novex (商標) (Invitrogen)) にロードした。ゲルを SYBR (商標) gold 核酸ゲル染色剤 (Invitrogen) で 30 分間染色した。RNAゲルを UV 照射下でゲルから切り取り、1 mL ゲル溶出緩衝液に入れた。切り取ったゲルを -80 で凍結し、次に水浴中 65 (10 分) で解凍し、これをさらに 2 回繰り返した。RNA 洗浄及び濃縮装置 (Zymo Research) を用いてゲル溶出緩衝液から RNA を精製した。

【0101】

(表 2) インフルエンザ及び RSV 遺伝子由来の crRNA (CR) をコードする DNA 二重鎖のヌクレオチド配列

二重鎖の名称	配列	SEQ ID NO:
T7_gPB1	TAATACGACTCACTATAGGACCACCCCAAAAATGAAGGGG ACTAAAACAAAGTGCTGCAACTTATTTGAAAA	24
T7_mPB1	TAATACGACTCACTATAGGACCACCCCAAAAATGAAGGGG ACTAAAACTTTTCAAATAAGTTGCAGCACTTT	25
T7_gRSV	TAATACGACTCACTATAGGACCACCCCAAAAATGAAGGGG ACTAAAACAAACAATTCAAGCCATGGGACAAA	26
T7_RSV-M2	TAATACGACTCACTATAGGACCACCCCAAAAATGAAGGGG ACTAAAACTTTGTCCCATGGCTTGAATTGTTT	27

10

【0102】

in vitro 翻訳された Cas13a の RNA 切断活性:

様々な crRNA 及び trRNA に対する Cas13a 活性を評価するため、ウサギ網状赤血球ライセート系を製造業者 (Promega, WI, USA) の指示に従って用いて、Cas13a mRNA を in vitro 翻訳した。RNaseAlert (登録商標) - 1 基質を、A549 細胞 RNA (100 ng)、20 mM HEPES (pH 6.8)、50 mM KCl、5 mM MgCl₂、BSA (10 µg/ml)、酵母 tRNA (10 µg/ml)、0.01% Igepal CA-630、及び 5% グリセロール 19 からなる RNA 処理緩衝液中の crRNA (500 nM)、trRNA (500 nM) と混合した。この混合物を、96 ウェルプレートウェル中の翻訳された Cas13a ライセート (5 µl) に低温で添加し、ピペットを用いてウェルを混合した。全ての試薬調製及び添加は氷上で行った。蛍光測定値 (励起 485 ± 20 nm / 発光 528 ± 20 nm) を室温で 10 分間隔で 90 分間記録した。次いで、RNA 切断産物 (最終産物) を 15% ウレア TBE ゲルで泳動した。ゲルを SYBR gold で 30 分間染色し、UV 照射下で可視化した。

20

30

【0103】

細胞株及びウイルス: 全ての細胞株及びウイルスは、American Type culture collection (ATCC, Manassas, VA) から購入した。ヒト肺上皮細胞 A549 (CCL185)、MDCK、及び正常ヒト初代気管支/気管上皮細胞 (ATCC (登録商標) PCS-300-010 (商標)) を ATCC 推奨の培地で成長させた。インフルエンザウイルスストックは MDCK 細胞内で調製し、RSV ストックは Hep-2 細胞内で調製した。インフルエンザウイルスについて簡潔に説明すると、MDCK 細胞を 175 mm² 中で 100% コンフルエンスまで成長させ、翌日、細胞を PBS で 2 回洗浄し、ウイルスの 1:1000 希釈物を 5 ml の EMEM に添加した。次いで、細胞をロッカー上で室温で 1 時間、ウイルスと共にインキュベートした。次いで、25 ml の培地を細胞に添加した。細胞を 72 時間、または細胞変性効果が重度になるまで観察した。1000 × g で 10 分間細胞を遠心分離することによってウイルスを回収した。標準的なブランクアッセイによってウイルス力価を決定した。RSV ストック調製については、Hep-2 細胞をコンフルエントになるまで培養し、3 ml のウイルスストックをロッカー上で室温で 1 時間インキュベートした。次いで、7 ml の DMEM を細胞

40

50

に添加し、5～6日間、または完全な細胞変性効果が見られるまでインキュベートした。1000×gで10分間細胞を遠心分離することによって上清からウイルスを回収した。標準的なブランクアッセイによってウイルス力価を決定した。

【0104】

mRNA形質移入の最適化：

Neon (登録商標) Transfection System (Invitrogen, Fisher Scientific)、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)、及びViromer Red (Lipocalyx GmbH)の形質移入法に対し、MDCK及びA549細胞株におけるCas13a mRNAの形質移入をアッセイした。Lipofectamine 3000及びViromer Red形質移入実験については、細胞をカバーガラス(12mm)上に一晚播種し(125,000細胞/ウェル)、翌日、各製造業者のプロトコルに従って1µgのCas13a mRNAを形質移入した。Neon (登録商標) transfection systemについては、Neon (登録商標) Transfection SystemのA549及びMDCK用の組込みプログラムを用いて細胞に1µgのCas13a mRNAをエレクトロポレーションし、培地を含むカバーガラス上に播種した。形質移入細胞を、形質移入から2、4、6、16、及び24時間後に4%パラホルムアルデヒドで固定した(10分)。細胞をトリトンX-100(0.1%)で5分間透過処理した後、5%のBSAで1時間ブロックした。ウサギ抗V5 (Abcam ab9116)一次抗体及びロバ抗ウサギA488 (A21206 Invitrogen)二次抗体を、それぞれ1時間インキュベートした。PerkinElmer Ultraview ERS Spinning Disk顕微鏡で細胞を可視化した。

【0105】

In vitro抗ウイルスアッセイ：24ウェルプレート内で、ダルベッコ最小必須培地中で成長するA549細胞に、Viromer Redを用いて、Cas13aをコードするmRNA(1µg)及びcrRNA(100nM)または非標的crRNA(NT-CR)(100nM)を形質移入した。4時間の形質移入後、0.01のMOIまたは0.1のMOIのA型インフルエンザウイルスWSN/33(H1N1)を細胞に添加した。形質移入の24/48/72時間後にRNeasy mini kitを用いて総RNAを抽出した。high-capacity cDNA reverse transcription kit(The Applied Biosystems(商標), Thermo Fisher Scientific)を用いてcDNAを調製した。Cas13a系の抗ウイルス活性を、全ての処置群のウイルス遺伝子(表3)に対し測定した。また、上記と同じ実験設定でウイルス阻害も顕微鏡的に観察されたが、細胞はカバースリップ上に播種されていた。Cas13a媒介性IVA阻害の活性は、経時的免疫蛍光法及び蛍光in situハイブリダイゼーションのためのBiosearch Technologies推奨のプロトコルを用いて実証した。次いで、細胞に対し、1:250抗V5タグAb(Abcam ab9116)及び1:500抗M2タンパク質Ab(Abcam ab5416)を用いてCas13a-V5及びIVA-M2タンパク質をプローブし、続いてIVAゲノムを標的とするFISHプローブを行った(表4)。

【0106】

(表3)本試験で使用したプライマー及びプローブ(5' 3')。

10

20

30

40

IVa	順方向	SEQ ID NO:	逆方向	SEQ ID NO:	プローブ	SEQ ID NO:
HA	GGAGTGAATTTGGAATCA ATGGG	28	GAACACATCCAGAAACTGA TTGC	36	TTCTGGCGATCTACTC AACTGTCGC	44
M2-M1	AGGTTCTCATGGAATGGC TAAA	29	GGTGAGCGTGAACACAAAAT C	37	ACAAGACC AATCCTGT CACCTCTGAC	45
NA	TTAAGGACAGAAAGCCCTT ATAG	30	GACCAAGCAACCCGATTCA	38	TTAATGAGCTGCCCTG TCGGTGAA	46
NEP	CTACAGAGATTCGCTTGG AGAAG	31	ACCTAATTGTTCCCGCCATT	39	TGAGAATGGGAGACCT CCACTCACT	47
NP	GACCCCTTCAGACTGCTT CA	32	CATCCACACCAGTTGACTC TT	40	AGCCTAATCAGACCAA ATGAGAATCCAGC	48
PA	GGATGGAAGGAACCCAA TGT	33	TTCTCCTCATTTCTCAATGTC CTG	41	CTGTCATGGAAGCAAG TACTGGCAGA	49
PB1	ATCTTTGAGACCCTCGTGT CTTG	34	CAGCAGGCTGGTTCCCTATTT A	42	ACACGAGTGGACAAG CTGACACAA	50
PB2	GTCAGTGA AACACACAGGG AACA	35	CCAACACTGATTCAGGACC ATTA	43	ACTTACTCATCGTCAA TGATGTGGGAGA	51

10

20

30

40

【 0 1 0 7 】

(表4) インフルエンザウイルスA (WSN/33) を標的とする、Quaser (登録商標) 670 色素で標識した蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) Stellaris (登録商標) プローブ

50

プローブ配列の名称	プローブ配列 (5' → 3')	SEQ ID NO:
IVAWSN33_1	AAATGGACAGGGCCAAAGGT	52
IVAWSN33_2	GACGAAATTCAGGTCACCTC	53
IVAWSN33_3	GCTGCGAAGGGAAGAAGTTT	54
IVAWSN33_4	CTGGGTCTTCAGTTAAAGGG	55
IVAWSN33_5	CAGAACTGCGGACTCAACTC	56
IVAWSN33_6	CCCACTTCGTTAGGGAAAAC	57
IVAWSN33_7	ATGGGATTCCTCAAGGAAGG	58
IVAWSN33_8	GTTTCAAGACACGAGGTCTC	59
IVAWSN33_9	GGGTGCATTCACAATCAGAG	60
IVAWSN33_10	CAAATGGGTTTCAGTGGGTTG	61
IVAWSN33_11	CTGTATGAACTGCTGGGGAA	62
IVAWSN33_12	GCTCTTCAATGGTGGAACAG	63
IVAWSN33_13	CTCTCGGACTGACGAAAGGA	64
IVAWSN33_14	AAGTCTAAGTGGTCGTGGTG	65
IVAWSN33_15	CAGAGGACTCAGCTTCAATC	66
IVAWSN33_16	ATTTGGACCGCTGAGAACAG	67
IVAWSN33_17	TCAAGGCTGGAGAAGTTTGG	68
IVAWSN33_18	GCATTAAGCAAAACCCAGGG	69
IVAWSN33_19	GTCTTCGAGCAGGTTAACAG	70
IVAWSN33_20	TGCTAGACGGGTGATGAACA	71
IVAWSN33_21	ACGCGTTTGAGGTGATGATG	72
IVAWSN33_22	TGGCGACAGTTGAGTAGATC	73
IVAWSN33_23	GAGACCAAAAGCACCAAGTGA	74
IVAWSN33_24	TGTGCGAACAAGAGCTCTTG	75
IVAWSN33_25	TTGAACCCTGCATCAGTGAG	76
IVAWSN33_26	AGATCCATACACACAGGCAG	77
IVAWSN33_27	AATGCAGCAGAATGGCATGC	78
IVAWSN33_28	ATGTCAAAGGAGGGCACGAT	79

10

20

30

40

50

IVAWSN33_29	CCACGGATGGGACAAAGAGA	80
IVAWSN33_30	CGACAGGGCAGCTCATTAAG	81
IVAWSN33_31	TTGAATTGTACGGGGACGGA	82
IVAWSN33_32	CGCGGGTTGTCACCGAAAAC	83
IVAWSN33_33	CAAGGCCTCATACAGTCTAG	84
IVAWSN33_34	GTCAATGGTGAACGGCAACT	85
IVAWSN33_35	CGGTATCAGGGTAACAGGAA	86
IVAWSN33_36	GGCGCCTTGAGTCAGAAAAA	87
IVAWSN33_37	CTGACGGGACGATAGAGAGA	88
IVAWSN33_38	CAAGTCTCTGTGCGATCTCG	89
IVAWSN33_39	CACGGTGAGCGTGAACACAA	90
IVAWSN33_40	ACAAAGCGTCTACGCTGCAG	91
IVAWSN33_41	TATGAGACCGATGCTGGGAG	92
IVAWSN33_42	TGCTGCAATGACGAGAGGAT	93
IVAWSN33_43	ATAGACTCTGGCACTCCTTC	94
IVAWSN33_44	GAAGCCGATCAAGGAATGGG	95
IVAWSN33_45	TTCGATGTCCAGACCGAGAG	96
IVAWSN33_46	ACTTTCTGCTTGGGCATGAG	97
IVAWSN33_47	CAACAATTGTCCCCTCTTCG	98
IVAWSN33_48	GAGGGCAGTGGTGAAATTTC	99

10

20

30

【0108】

IVAに対するCas13a-crRNA系を異なる条件下で評価してその有効性を決定した。最初にA549細胞をIVA(MOI 0.01)に4時間感染させ、次いで細胞を洗浄し、その後にViromer Redを用いてCas13a(1 μ g)及びcrRNA(100 nM)を形質移入した。感染から24/48/72時間後にRNAを抽出した。別の実験設定では、細胞にCas13a-crRNAを24時間形質移入し、次いでIVA(MOI 0.01)で8時間感染させ、RNAをこれらの細胞から細胞を抽出した。上述のようにcDNA及びqPCRを実施した。

【0109】

ブランクアッセイ:

Cas13a mRNA及びcrRNA(RSV_1.1及びRSV_m1.1)ならびにRSVで処置した細胞からの上清を14000 \times gで5分間遠心分離した。上清を収集し、24ウェルプレート内のVero細胞単層上に50 μ l/ウェルを1時間(15分毎に断続的に揺動)置いた。単層に、2% FBSならびに100 U mL⁻¹ペニシリン及び100 mg mL⁻¹ストレプトマイシン(Life Technologies)を伴った2 \times DMEM中2.4% Avicel(FMC Biopolymer RC-481)を1:1の比で含むAvicel-DMEMオーバーレイ培地を添加し、6日間インキュベートした。培地を除去し、1 \times PBSで洗浄した後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで10分間固定した。細胞を37 $^{\circ}$ Cで5% BSAで30分間ブロックし、続いて37 $^{\circ}$ Cで抗RSV(ヤギポリクローナル)一次抗体で染色した。30分後、細胞を洗浄し

40

50

、HRP結合体化二次抗体(ロバ抗ヤギ)を37℃で30分間インキュベートした。TrueBlue(商標)ペルオキシダーゼ基質を用いて室温で10分間、プラークを展開した。TrueBlueを除去し、細胞を水ですすぎ、プラークを風乾し、カウントした。

【0110】

IVA感染中のCas13a形質移入細胞のRNAシーケンシング: RNA-Seq実験については、一晚成長させたA549細胞に、Viromer Redを用いたCas13a(1μg)及びcrRNA(100 nM)を形質移入し、4時間後に細胞をIVA(MOI 0.01)に感染させ、対照として、形質移入細胞のセットを非感染のまま維持した。形質移入の8時間後及び24時間後に、RNeasy mini kit(Qiagen)を用いて全ての処置群からRNAを抽出した。gPB1及びmPB1 crRNA処置群におけるIVA PB1コピーの減少を確認した後に、RNA試料をRNA-Seqに使用した。RNAを定量化し、次いでNEBNext(登録商標)rRNA Depletion Kitを用いてrRNAを枯渇させた。NEBNext(登録商標)Ultra(商標)II RNA Library Prep Kit for Illumina(登録商標)を用いてRNAライブラリーを調製した。これらのライブラリーをQubit Fluorimeter(Thermo Fisher Scientific)で定量化し、Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies)上で完全性を満たしたら、Illumina NextSeq 500上で、ペアエンド75、mid outputランで試料をシーケンシングした。Bowtie2を用いてリードを参照ヒトゲノムUCSC(hg38)とアラインメントし、Cufflinksを用いて対照及び処置試料における転写物の差次的遺伝子発現を比較した。重要な遺伝子の差次的発現におけるlog2値を、GraphPad Prismを用いて表した。

【0111】

統計解析: 全ての実験は、生物学的3連の平均として表される。GraphPad Prism 7.04を用いて全てのデータを解析した。統計解析は、適切な仮説検定と共に通常の一元配置または二元配置分散分析(ANOVA)を用いて群間で実施し、個別の図面の見出しで説明されている。

【0112】

結果:

ウサギ網状赤血球ライセートを用いて、Cas13a及びCas13a-NLS(核局在配列を有するバージョン)mRNAをin vitroで翻訳し、これを使用して、IVA crRNA及びtrRNAと連携した発現Cas13aタンパク質のRNA切断活性を評価した(図1A)。crRNA及びtrRNAは、IVAのゲノム分節に由来した(表1)。RNaseAlert(商標)基質蛍光をRNA切断の出力とした。Cas13a及びCas13a-NLSによるRNA切断によって生じた蛍光は、それぞれ最初の10分間及び20分間に最大まで増加し、次いで、標的RNAが枯渇したために経時的に徐々に減少した。RNA切断の全体的な傾向は、Cas13a(図1B)及びCas13a-NLS(図1C)で共に類似した。RNA切断は、15% TBE-ウレアゲルを用いてゲル電気泳動によってライセートを調べたときにも観察された(図1D及び1E)。これらの結果は、in vitro翻訳Cas13a媒介性のRNA切断が特異的であり、crRNA及びtrRNA両方が存在する場合にのみ生じたことを示している。crRNA、NT-CR、またはCas13a mRNAは、単独では標的RNAを切断しない。これらの結果は、精製したCas13aタンパク質を使用したときの特異的活性化という過去の知見(East-Seletsky, A., et al., Nature, 538: 270-273(2016))を確認するものである。Cas13a活性をアッセイするための切断緩衝液中に酵母tRNAまたは細胞RNAが存在した場合、蛍光または切断されたRNA産物が生じず、これにより、標的RNAに対するCas13a: crRNAの特異性が示された。これらの設計されたcrRNAは、対応するtrRNAが存在する場合にのみ、in vitro翻訳されたCas13a及びCas13a-NLSによ

るRNA切断を示した(図2A~2K及び3A~3H)。

【0113】

実施例2．mRNA形質移入の最適化

結果：

次いで、インフルエンザ感染の細胞モデルでCas13a:crRNA系を評価した(図4A)。MDCK及びA549細胞株において、形質移入剤、Viromer(登録商標)Red、及びLipofectamine 3000を用いたmRNA送達、ならびにNeon(登録商標)transfection systemを用いたエレクトロポレーションによるmRNA送達を評価した。Cas13a発現を2、4、6、16、及び24時間時点で評価した(図5A~5I)。

Cas13a発現は、全ての形質移入剤及び細胞タイプにおいて、形質移入から2時間後という早期に観察された。しかし、形質移入から16時間後、Cas13a発現は、Neon及びLipofectamine 3000で形質移入した全ての細胞株で減少した。Viromer(登録商標)Red形質移入細胞は、24時間時にも発現を示した。この結果に基づき、以後の実験にはViromer(登録商標)Red及びA549細胞株を選択した。免疫蛍光法を用いると、Cas13aが主に細胞質内に局在していたのに対し、Cas13a-NLSは細胞質(Cas13aがまだ合成中であるため)と、48時間時には核内と、両方に存在することが観察された(図4B~4K)。

10

【0114】

実施例3．様々なIVA分節を標的とするcrRNAのスクリーニング

結果：

IVAのポリメラーゼ(PB1)、ヘマグルチニン(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)、核タンパク質(NP)、ならびに核外輸送タンパク質(NS1及びNS2)、ならびにM2タンパク質を含めたIVAの様々なゲノム分節を標的とするcrRNAを設計した(図6A~6C)。

Cas13aまたはCas13a-NLSのmRNA及び各crRNAをA549細胞に同時形質移入し、次に当該細胞をインフルエンザウイルスに感染させた(感染多重度MOI 0.01)。ポリメラーゼがIVA複製に不可欠なタンパク質であることを考慮し、ポリメラーゼ構成成分PB1を標的とするいくつかのcrRNAを設計した。最初に、これらのcrRNAをCas13a及びCas13a-NLSの両方で試験した。試験したcrRNAのうち、gPB1が、PB1遺伝子コピー減少に最も効果的であった。他のIVA遺伝子を標的とするcrRNAを試験したところ、PB1遺伝子コピーの有意な減少が観察され、このことからウイルス感染性に対する全体的な効果が示唆された。IVAは核内に局在するため、Cas13aを核局在化シグナル(NLS)ありまたはなしで試験した。

20

30

【0115】

試験した全てのcrRNAのうちgPB1の場合に、最も高い障害がCas13a及びCas13a-NLSの両方において見られ、72.45%及び71.9%の障害が認められた(図6B)。

PB1を標的としない他のcrRNAもPB1コピーを減少させたが、より小さな程度であった。非PB1 crRNAのうち、HA1.1は、Cas13aにおいて27.7%、Cas13a-NLSにおいて49.87%、PB1コピーを減少させた(図6C)。

40

【0116】

Cas13aとCas13-NLSとの間の有意差は、gPB1及びPB1__4.1の場合には観察されなかった。しかし、他の全てのcrRNAでは、Cas13a-NLSの方が有効であった。Cas13aとCas13-NLSとの間の有意差は、ウイルスゲノムが、核内に高度に局在することにより、Cas13a-NLS及びcrRNAによって容易にターゲティングされる、初期感染の間にアッセイが実施されたという事実によって説明される。Cas13aにNLSがある場合もない場合も、全てのcrRNAのうちgPB1が最も有効であった。

【0117】

50

これらのcrRNAがPB1遺伝子に及ぼす影響を評価した後、それらの親遺伝子に及ぼす影響を評価した。このために、Cas13aまたはCas13a-NLS及び様々なcrRNAを細胞に形質移入し、次いでIVAを感染させた。翌日、(crRNAが標的とした)親ウイルス遺伝子のコピー数の減少率(%)を、感染のみの対照と比較して解析した。この場合も、gPB1 crRNAを使用した場合にPB1遺伝子コピー数の最も大きな減少が観察され、75%の減少であったのに対し、他の全てのcrRNAは、それぞれの遺伝子のコピー数においてほぼ50%の減少を示した(図6D及び6E)。

【0118】

これらのcrRNAがその親遺伝子コピー数に影響を及ぼすかどうかをさらに確認するため、図6Aで説明されているように細胞に形質移入し感染させた後にRT-qPCRを実施した。最も効率的なcrRNAはNA1.1であり、特にCas13a-NLSと共に使用したときに効率的であった(図6D)。PB1を標的とするcrRNAの、それらの親遺伝子を阻害する能力を調べた。試験したcrRNAのうち、最も高い阻害は、Cas13a及びCas13a-NLSの両方におけるgPB1(79%)であり、その次がCas13aを用いた場合のPB1_3.1(62.9%)であった。

【0119】

これらの結果から、試験した中ではgPB1配列がIVAに対して最も有効なcrRNAであることが証明され、そのためさらなる実験ではこれを使用した。

【0120】

実施例4. crRNAはIVA mRNAを標的とするようにプログラムできる

結果:

スクリーニングした全てのcrRNAの中で、PB1ゲノム分節を標的とするcrRNA(gPB1)は、ウイルスRNAコピー数を最も効率的に減少させ(図6B及び6E)、他のウイルスタンパク質に影響を及ぼすことが分かった。このことをin situで実証するため、Cas13a、IVA M2タンパク質(ウイルス集合または分解部位24を示す)に対する免疫蛍光法を実施し、次にIVAゲノム可視化のために蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)を実施した。Cas13aまたはCas13a-NLS mRNAのいずれかと、PB1部位を標的とするcrRNA(gPB1、及びPB1 mRNAを標的とするmPB1)とを形質移入した細胞は、IVA感染の減少を示すM2タンパク質の減少(図7A~7H)と、サイトゾル内のウイルス感染部位へのCas13aの局在化とを示した。このデータから、ポリメラーゼ遺伝子を標的とすることにより、他のウイルスタンパク質を阻害し、そのためより高い阻害効果を達成できたことが明らかである。

【0121】

実施例5. in vitroでのCas13a-crRNA用量及びウイルス感染の最適化結果:

Cas13a: crRNAの用量応答アッセイ

細胞におけるIVA阻害に要するRNA用量を決定するため、Cas13a mRNA及びgPB1(crRNA)の濃度を試験した。Cas13a mRNA及びgPB1の濃度を増加して形質移入した細胞は、IVA感染の逆比例を示した。用量依存的IVA阻害は200nMのgPB1まで観察され、crRNAをさらに増加してもIVA感染は減少しなかった。最も低い組合せ(Cas13a mRNA(0.5µg)及びgPB1(25nM))ならびに最も高い組合せ(Cas13a mRNA(3µg)及びgPB1(300nM))において、IVA感染は、それぞれ0.35log(55%)及び0.48log(66%)PB1コピー減少した(図8A~8B)。最も大きな阻害は、2µgのCas13a及び100nMのgPB1で見られた(76.78%)。しかし、適度でありその上効率的なCas13a mRNA(1µg)及びgPB1(100nM)の用量を、以後の全ての細胞におけるIVA実験に使用した。

【0122】

A549細胞におけるウイルス感染の最適化

10

20

30

40

50

次に、Cas13a:crRNA系の性能をキャラクター化するため、多くの実験条件を調べた。MOIの効果の評価し、PB1を標的とするCas13a:crRNAは、形質移入から24時間後にインフルエンザウイルス遺伝子コピーを $0.77 \sim 1.26 \log(21\% \sim 72.4\%)$ 減少できることが示された(図8B)。MOI 0.01(図8C)及び0.1(図8D)(いずれも生理的に適切なMOIである)でgPB1を試験することにより、最適なウイルス力価を評価した。MOI 0.01における阻害は、gPB1、mPB1、及びgPB1+mPB1についてそれぞれ85.8%、86.6%、及び92.5%であった。同様に、MOI 0.1におけるPB1コピー数の減少は、gPB1、mPB1、及びgPB1+mPB1についてそれぞれ86.7%、83.1%、及び94.5%であった。

10

【0123】

実施例6. Cas13a:crRNA形質移入細胞は、用量及び時間依存的にIVA感染を減少させた。

結果:

感染中におけるウイルスRNAの時間依存的分解を調べた(図10A)。gPB1またはmPB1のいずれかを標的とすることにより、Cas13a(図10B)及びCas13a-NLS(図10C)の両方において、ウイルスコピーは24時間時に $0.96 \sim 1.21 \log(89.2\% \sim 93.9\%)$ 、48時間時に $1.88 \sim 2.61 \log(98.6\% \sim 99\%)$ 減少したが、さらに72時間時にウイルスRNAコピーは $3.53 \sim 3.81 \log(99.97\% \sim 99.98\%)$ 減少した。Cas13aの持続的効果はIVA複製を妨げ、ウイルスRNAコピーを最大72時間減少させるため、このデータは注目に値する。

20

【0124】

実施例7. Cas13a:crRNA系は前感染細胞におけるIVA感染を減少させる。

結果:

Cas13a:crRNA系が、シミュレートされた「予防的方式」でIVA感染を軽減することから、既にIVAに感染した細胞の感染を減少させるCas13a:crRNA系の能力を評価した。IVA(MOI 0.01)に4時間感染させた細胞に、その後、Cas13a/Cas13a-NLS mRNA及びcrRNA(gPB1及びmPB1)を形質移入し(図10D)、IVAに対する効果を72時間モニターした。形質移入から48時間後のCas13a(図10E)またはCas13a-NLS(図10F)でIVAコピー数の最大 $0.74 \log(83.3\%)$ の減少が観察され、72時間後には $1.47 \log(93.9\%)$ の減少が観察された。IVA感染に対するCas13a:crRNAの効率は、細胞にCas13a mRNA及びcrRNAを24時間形質移入し(Cas13aの発現減少が予測される)(図10Gに基づく)、次いでインフルエンザウイルスに8時間感染させることによって評価した(図10H)。この条件下では、依然として最大 $0.31 \log(63\%)$ のIVAの減少が観察され、したがって、Cas13a媒介性IVA標的指向性の口バストネスを強調するものであった。同様に、持続的感染がCas13a媒介性RNA標的指向性に及ぼす効果を評価した。ここでは、細胞を24時間感染させ、次に形質移入し、形質移入から8時間後のウイルスコピー数を評価した(図10I)。この場合も、ウイルス力価における最大49%の有意な減少が観察された(図10J)。したがって、これらの実験から、Cas13aが予防的治療及び感染後治療の両方においてIVA阻害に有効であることが示された。また、正常なヒト初代気管支/気管上皮細胞モデルにおいて、Cas13a:crRNA系がIVAを最大62%有効に阻害することも観察された(図9)。形質移入の効率が細胞タイプによって異なることから、Cas13a:crRNAによるIVAの阻害も細胞タイプによって異なる。一次細胞は通常は形質移入が困難であるが、ここでは、このアプローチがヒト一次細胞に適用できるという概念実証が示される。

30

40

【0125】

実施例8. Cas13a:crRNAは、hRSV感染のような他のウイルスを標的とす

50

るようにプログラムできる。

結果：

Cas13a-crRNA系は、特異的crRNAの設計を通じて様々なウイルス性病原体を標的とする可能性をもたらす。これを実証するため、ヒト呼吸器合胞体ウイルス(RSV)のゲノム(gRSV)及びM2 mRNA(RSV-M2)の両方に対してcrRNAを設計した。Cas13a mRNA及び両方のcrRNAを形質移入した細胞は、予防(図11A~11B)及び感染後(図11C~11D)の両方でRSV力価の減少を示した。Cas13a:crRNAを感染前に投与したときには、最大0.55log(71%)の減少が認められた(図10B)。しかし、形質移入前にRSVに感染させた場合、Cas13a:crRNAは、一緒にもたらされたgRSV及びm1.1におけるRSV力価を0.3~0.44log(63.5%)減少させ、一方、個別にもたらされたゲノム(gRSV)及びRSV mRNA(RSV-M2)を標的とするcrRNAの場合、ウイルス力価は、それぞれ51.3%及び49.7%であった(図10D)。hRSVにおいて予防による約71%のロックダウンが観察されたが、これらのデータはM2/L遺伝子末端配列のみに基づく第一世代ガイドで得られたことに注意すべきである。これらの結果は、天然の感染よりも著しく高いMOI 1において阻害が見られるため、有望である。加えて、Cas13a:crRNAを投与した細胞では、プラークの数が減少しただけでなく、プラークのサイズも減少した。このことは、細胞間の拡散が少ないことと、より多くの干渉性欠陥(DI)粒子が生成される可能性を示すものである。全体としては、hRSVゲノム及びmRNAに対する将来的なバイアスなしのガイドスクリーニングはロックダウンの改善をもたらす可能性があるため、この結果単独でも極めて有望である。これらの知見は、いくつかのウイルス性病原体に適用可能な見込みのある、抗ウイルスアプローチとしてのCas13a:crRNAシステムの可能性を示すものである。

【0126】

実施例9. Cas13aが媒介するオフターゲットRNA切断は検出されなかった。

結果：

Cas13a活性は、IVA RNAの切断において特異的であり、いかなる検出可能なオフターゲットRNA切断ももたらさなかった。送達から8及び24時間にCas13a mRNA及びcrRNA(PB1)を形質移入した細胞のトランスクリプトームプロファイルは、IVA感染の有無にかかわらず、mRNAレベルにおける内在性遺伝子発現に有意な変化を示さなかった(図12A~12L)。同様に、オフターゲット活性なしの特異的な内在性mRNAロックダウンは、過去にLeptotrichia wadei Cas13a(Abudayyeh, O. O. et al., Nature, 550:280-284(2107))で報告されている。進行中の転写及びCas13a媒介性分解は、遺伝子発現の有意な変化を推測するのに互いを打ち消す可能性があるため、Cas13aにおける任意の考えられるオフターゲット活性をRNA-Seqによって決定するのは困難であり得るといふ議論も考えられる。しかし、Lbu Cas13aは、RNA結合(crRNA及び標的RNA)ならびにRNase活性という別個の活性を有する。Cas13aはミスマッチのcrRNA-標的に結合することができるが、RNA切断はもたらさない(Tambe, A., et al., Cell Rep, 24:1025-1036(2018))。RNase活性は、crRNA及び標的RNAが相補的であるときにのみ活性化されるため、Cas13aのオフターゲット活性は除外され得る。

【0127】

以上の明細書では、本発明を本発明のある特定の実施形態と関連させて説明し、多くの詳細を例示の目的で示してきたが、本発明には追加の実施形態の余地があること、そして本明細書で説明されている詳細のいくつかは、本発明の基本原則から逸脱することなくかなりの程度で変動し得ることは、当業者にとっては明らかであろう。

【0128】

本明細書で引用されている全ての参考文献は、その全体が参照により援用される。本発明は、その趣旨または本質的な属性から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化する

10

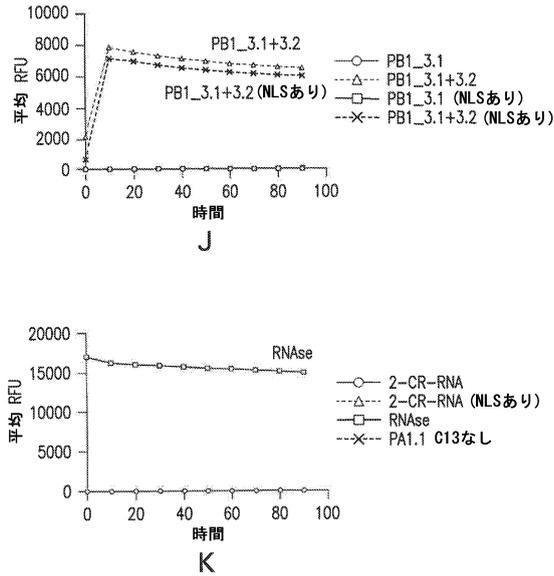
20

30

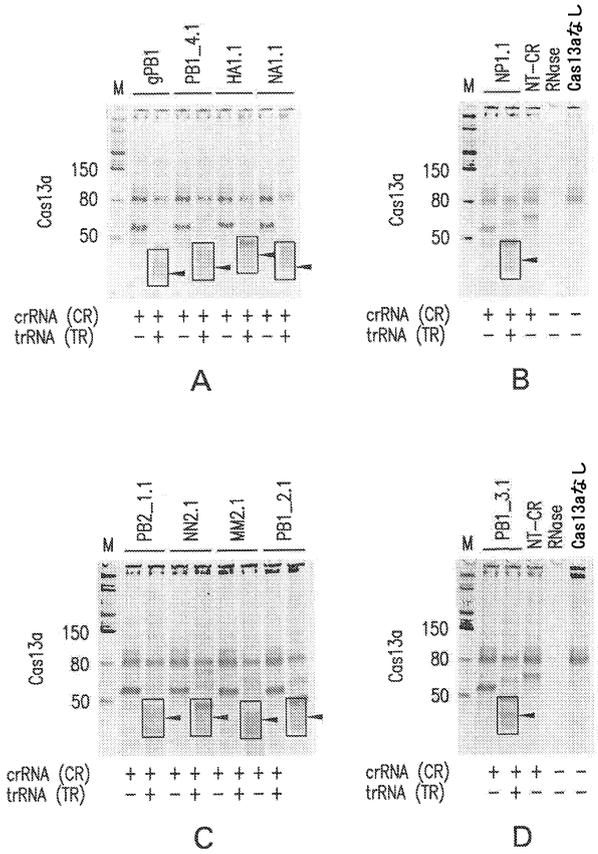
40

50

【 図 2 - 4 】



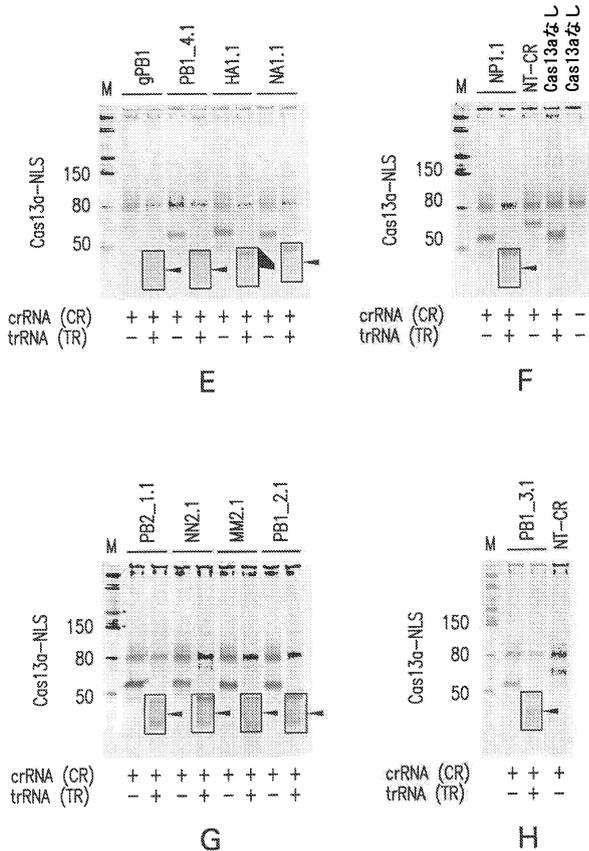
【 図 3 - 1 】



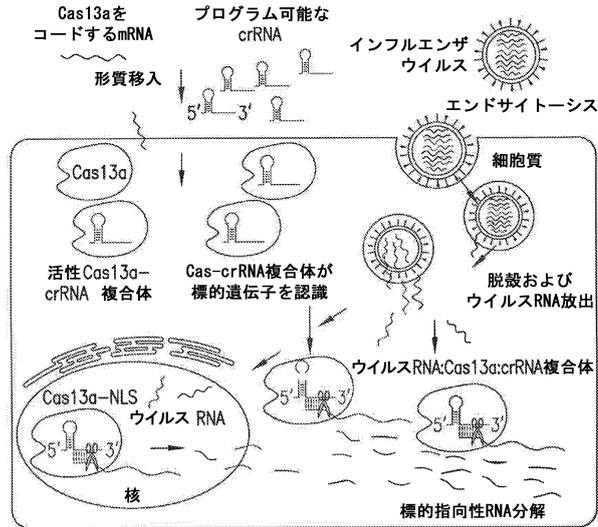
10

20

【 図 3 - 2 】



【 図 4 - 1 】

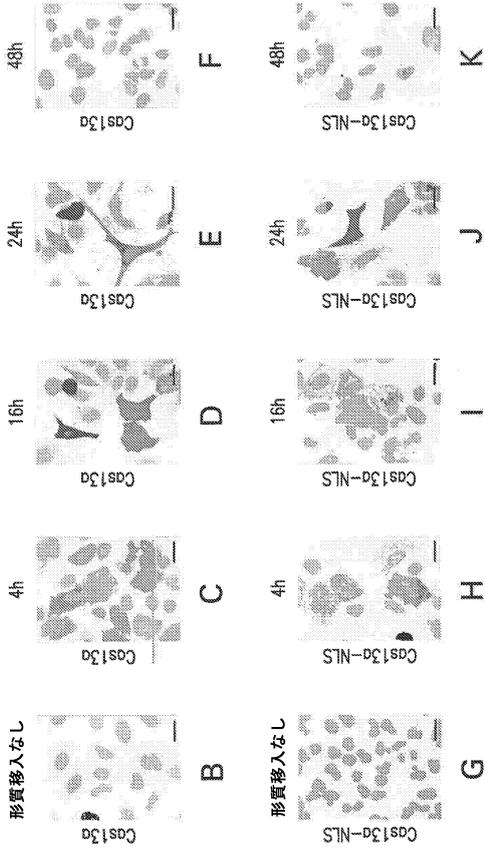


30

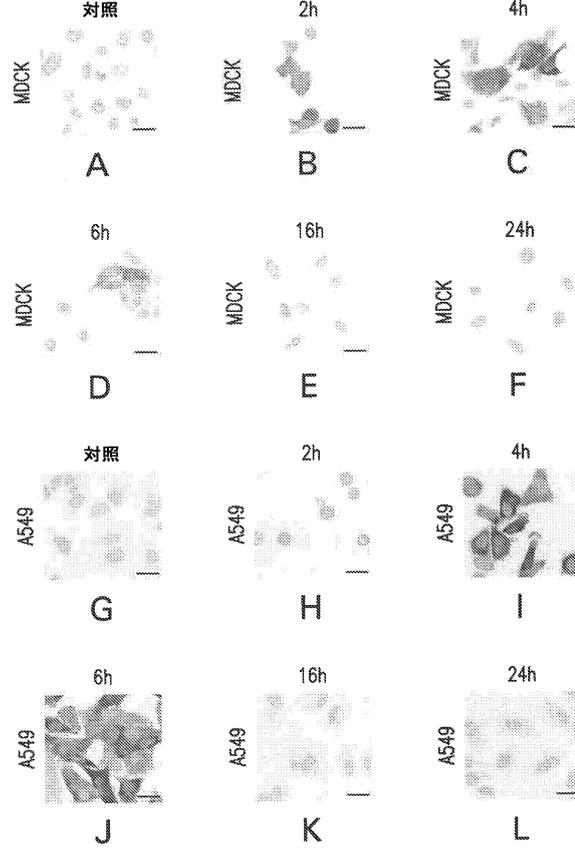
40

50

【 図 4 - 2 】



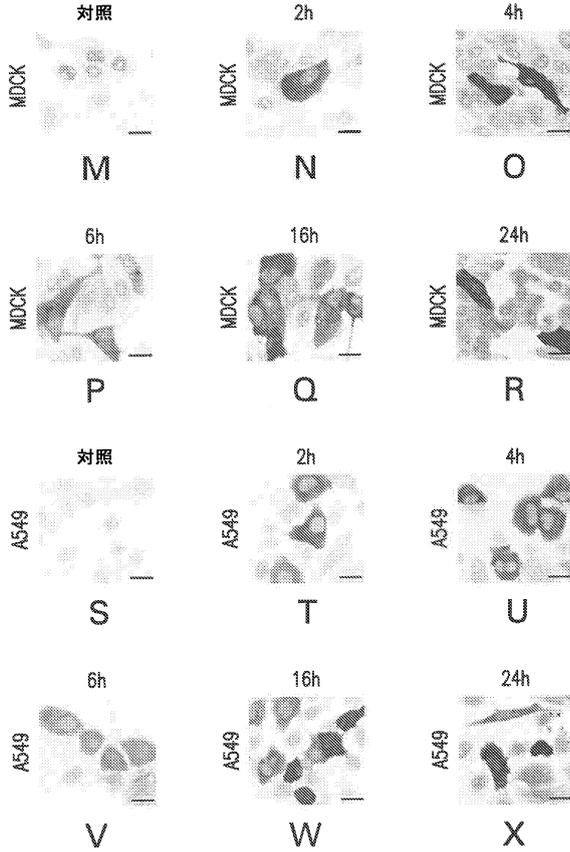
【 図 5 - 1 】



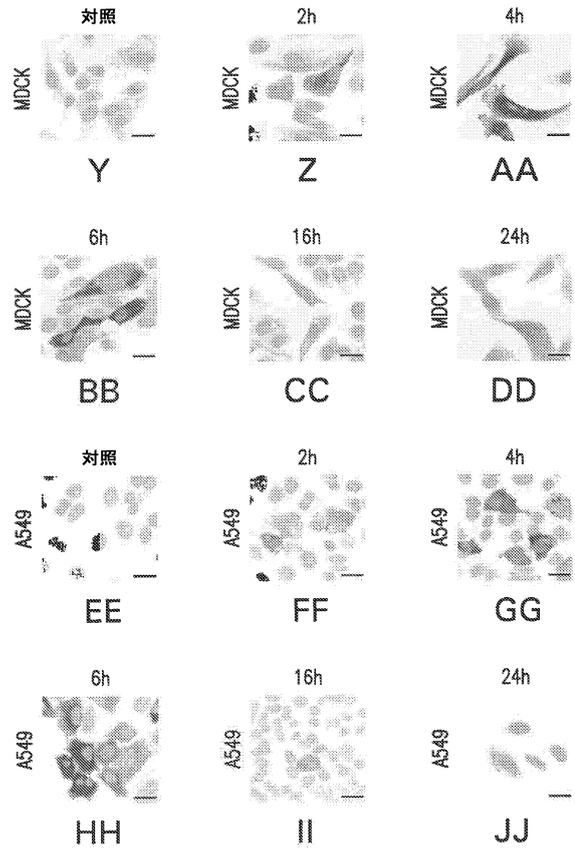
10

20

【 図 5 - 2 】



【 図 5 - 3 】

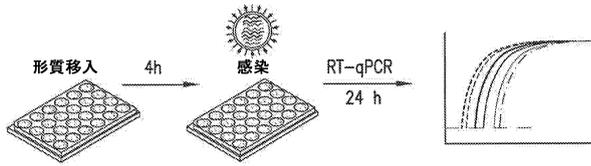


30

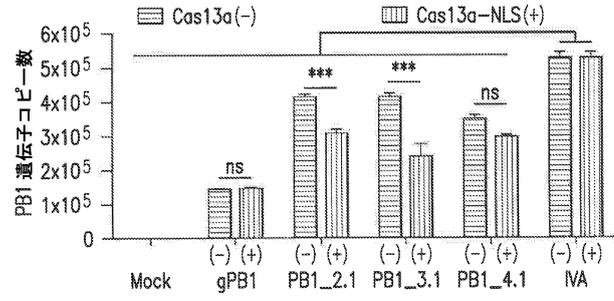
40

50

【図 6 A】

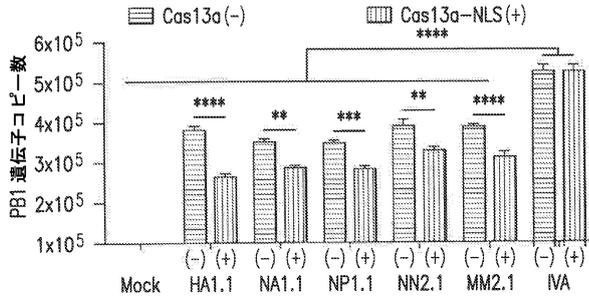


【図 6 B】

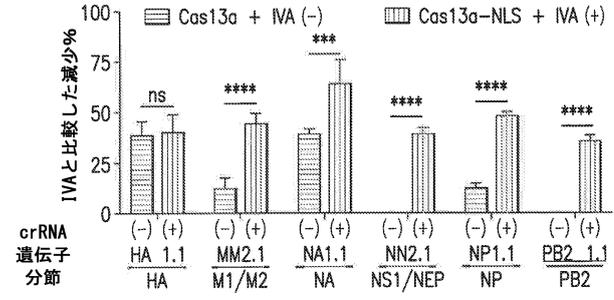


10

【図 6 C】

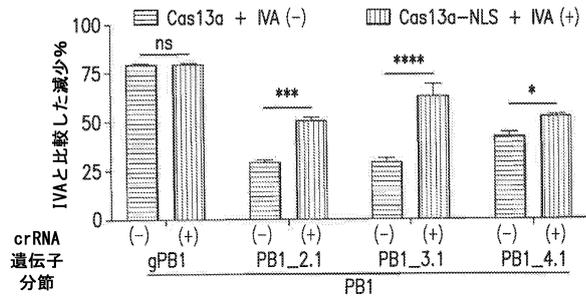


【図 6 D】

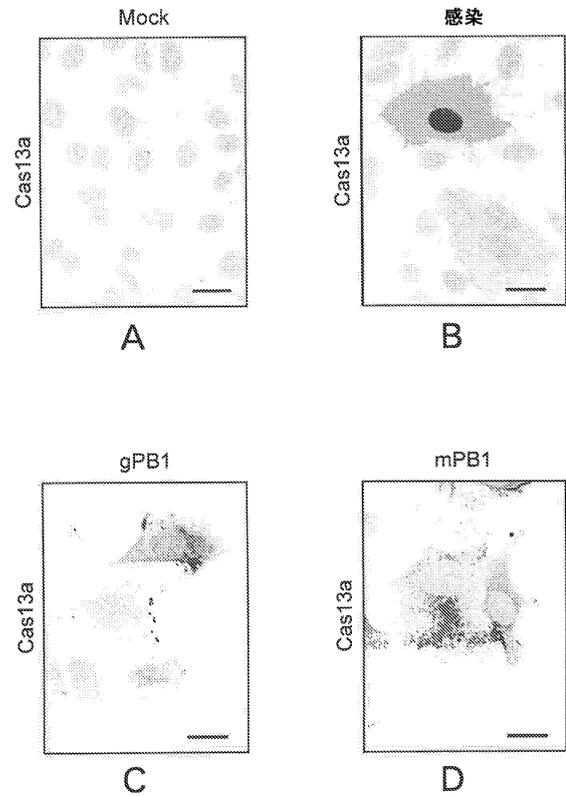


20

【図 6 E】



【図 7 - 1】

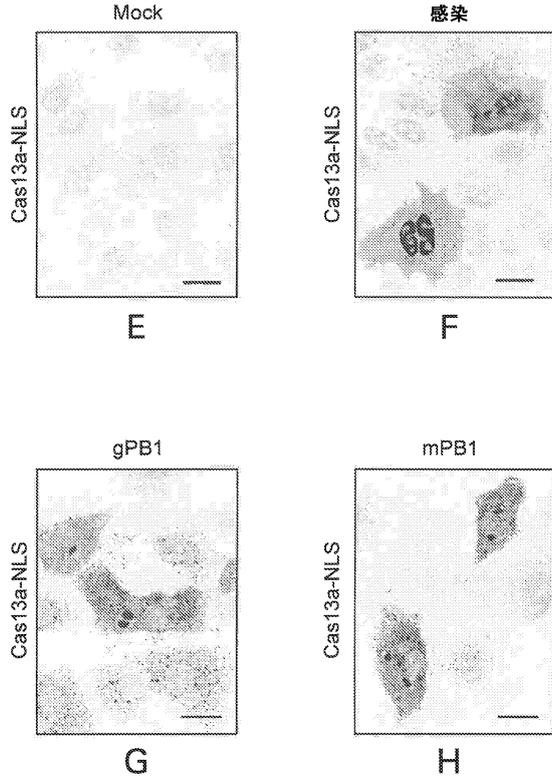


30

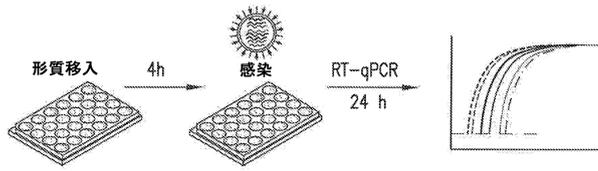
40

50

【 図 7 - 2 】



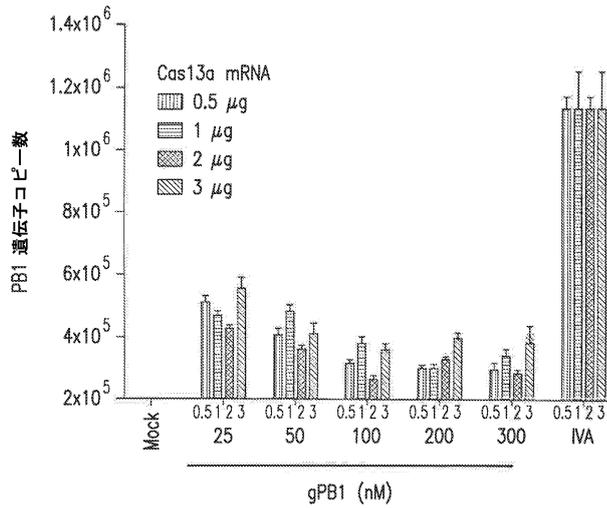
【 図 8 A 】



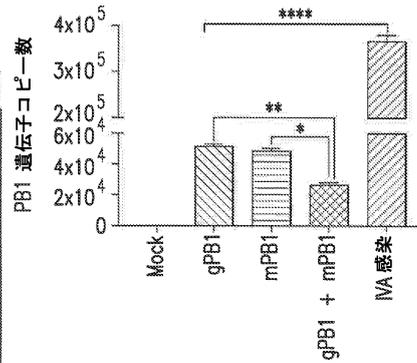
10

20

【 図 8 B 】



【 図 8 C 】

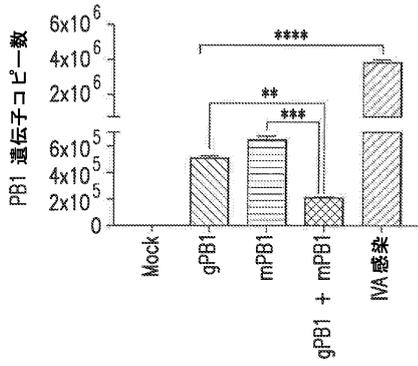


30

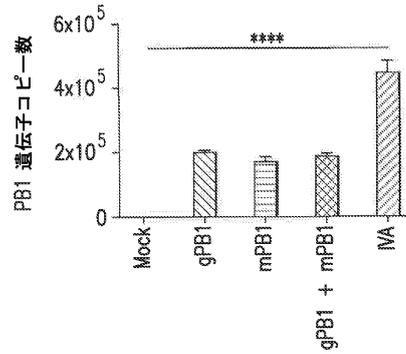
40

50

【図 8 D】

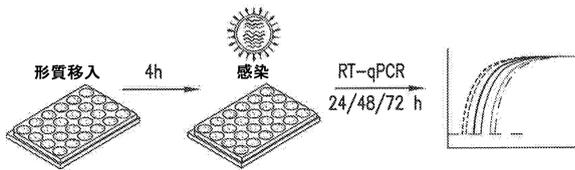


【図 9】

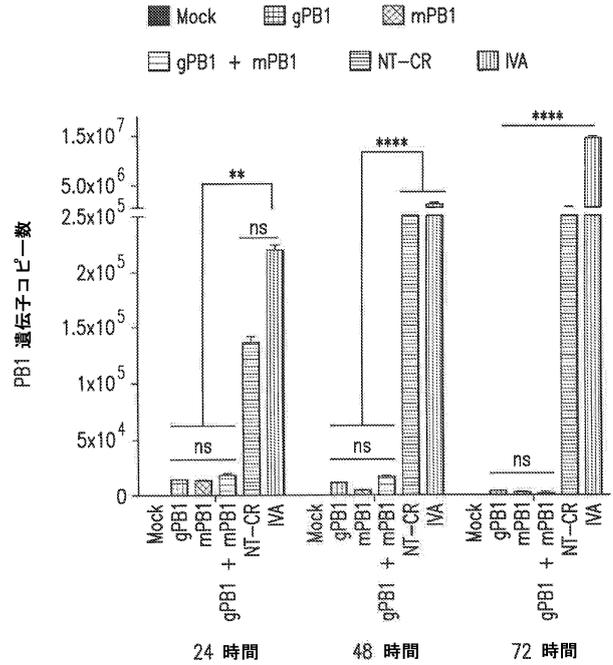


10

【図 10 A】



【図 10 B】



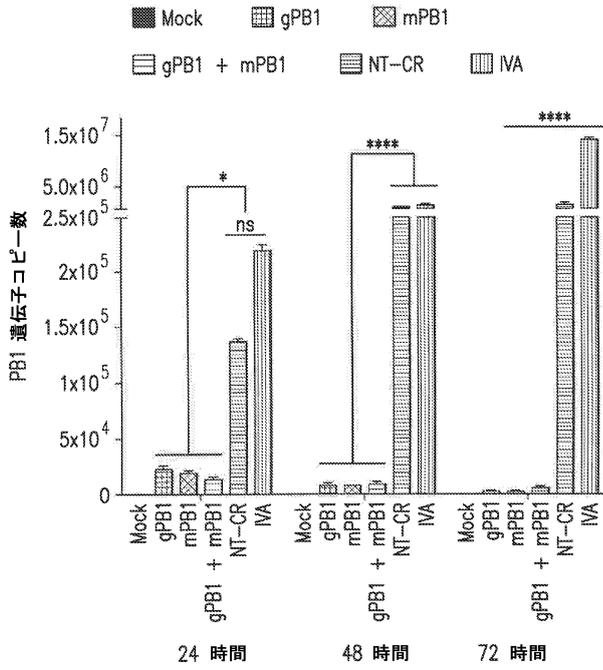
20

30

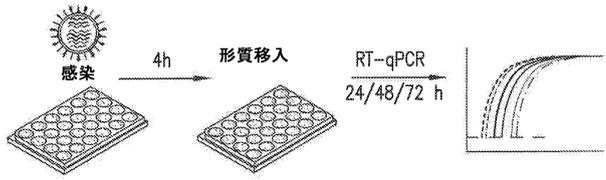
40

50

【図10C】

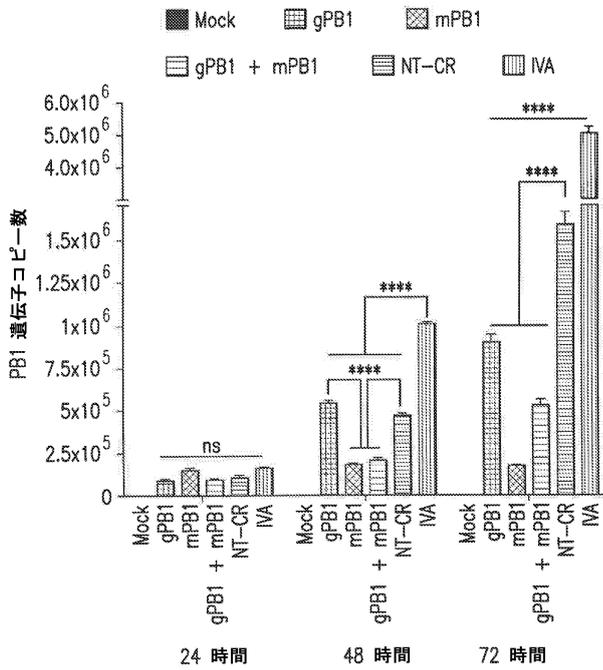


【図10D】

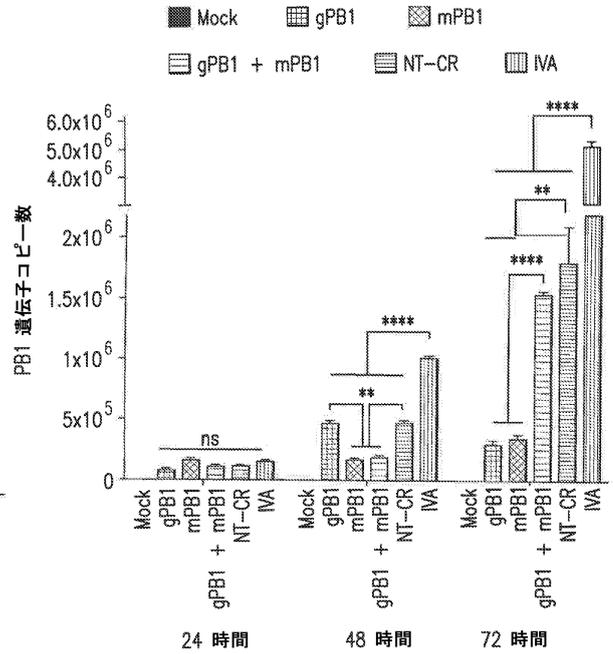


10

【図10E】



【図10F】



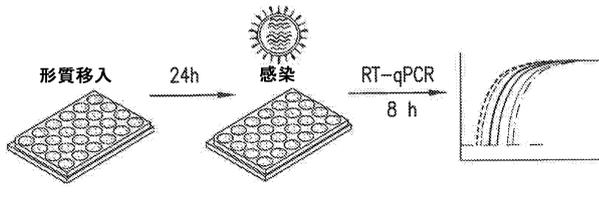
20

30

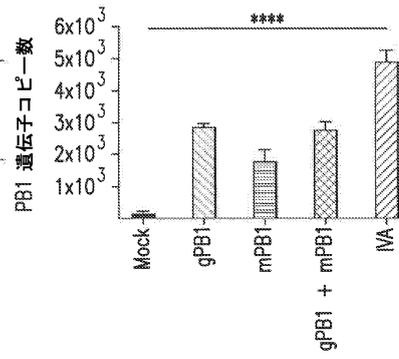
40

50

【図10G】

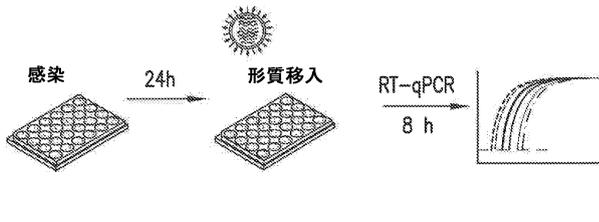


【図10H】

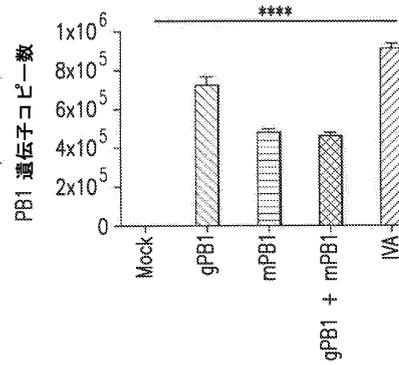


10

【図10I】

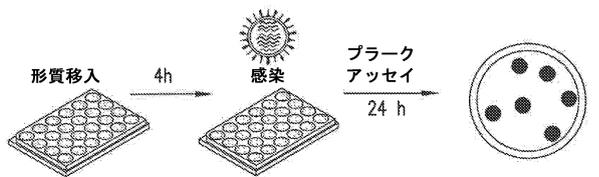


【図10J】

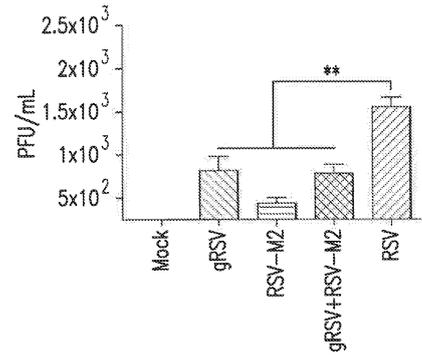


20

【図11A】



【図11B】

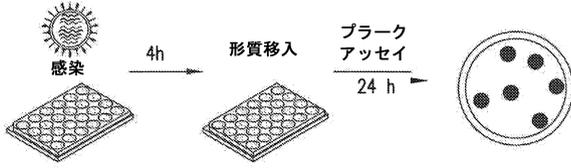


30

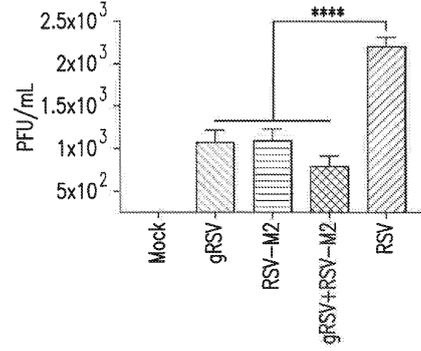
40

50

【図 1 1 C】

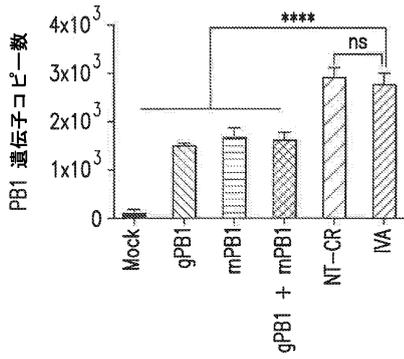


【図 1 1 D】

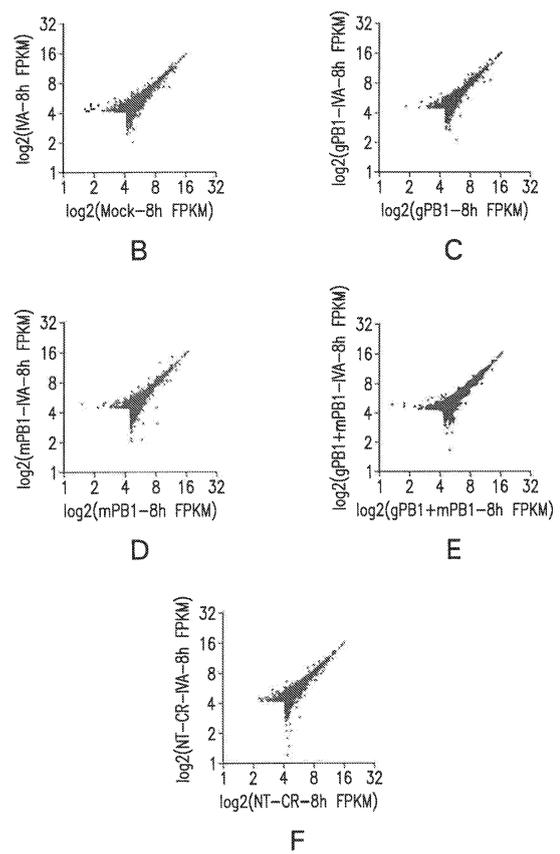


10

【図 1 2 - 1】



【図 1 2 - 2】

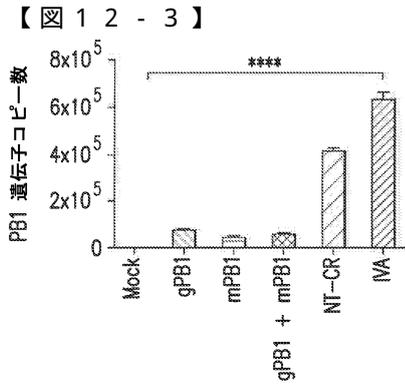


20

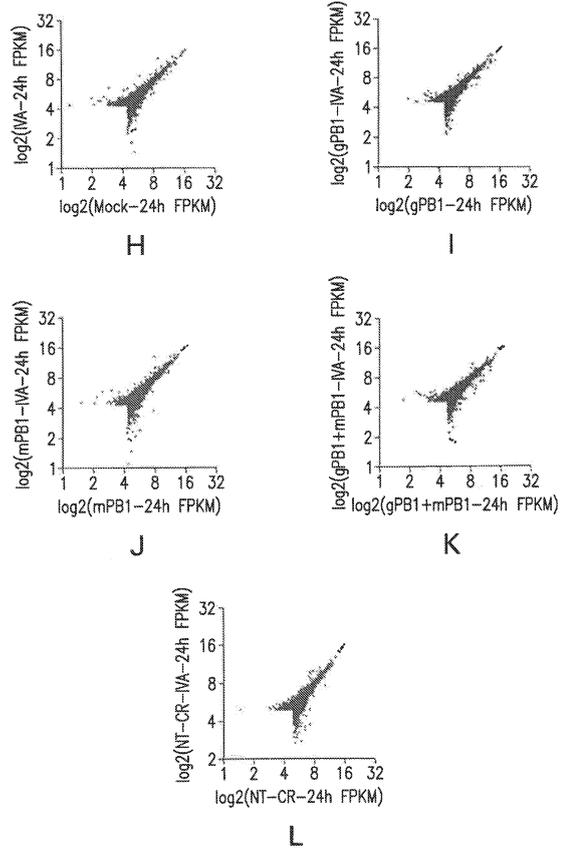
30

40

50



【 1 2 - 4 】



10

20

【 配列表 】

0007399876000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 15/11 (2006.01)
 C 1 2 N 15/55 (2006.01)
 C 1 2 N 9/16 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 1 2 N 15/11 Z
 C 1 2 N 15/55
 C 1 2 N 9/16 Z

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 パワジェ スワブニル

アメリカ合衆国 3 0 3 1 8 ジョージア州 アトランタ ダルニー ストリート ノースウエスト 9
 2 6 ジョージア テック リサーチ コーポレーション内

(72)発明者 ティワリー プージャー エム .

アメリカ合衆国 3 0 3 2 9 ジョージア州 アトランタ ブライヤービスタ ウェイ ノースイースト
 1 8 0 3

(72)発明者 サントンジエロ フィリップ ジェイ .

アメリカ合衆国 3 0 3 1 8 ジョージア州 アトランタ ダルニー ストリート ノースウエスト 9
 2 6 ジョージア テック リサーチ コーポレーション内

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 1 8 3 7 2 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 9 0 2 7 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 6 5 8 8 (W O , A 2)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 8 /

C 1 2 N 1 5 /

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

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q