

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6225182号
(P6225182)

(45) 発行日 平成29年11月1日(2017.11.1)

(24) 登録日 平成29年10月13日(2017.10.13)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761

請求項の数 27 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願2015-521603 (P2015-521603)	(73) 特許権者	508241200
(86) (22) 出願日	平成25年3月15日(2013.3.15)		サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-527881 (P2015-527881A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リッチモンド カナル プールバード 501
(43) 公表日	平成27年9月24日(2015.9.24)		ポイント リッチモンド テク センター スト エー100
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/032381	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02014/011237		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成26年1月16日(2014.1.16)	(74) 代理人	100113413
審査請求日	平成28年2月8日(2016.2.8)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/670,463	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成24年7月11日(2012.7.11)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100181641
(31) 優先権主張番号	61/704,072		弁理士 石川 大輔
(32) 優先日	平成24年9月21日(2012.9.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リソソーム貯蔵疾患の処置のための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リソソーム貯蔵疾患で欠損しているタンパク質をコードする導入遺伝子の細胞内のアルブミン遺伝子への標的化組み込みのための組成物であって、

少なくとも1つの非天然ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドであって、ここで、該ヌクレアーゼは、該細胞内で発現され、そして、該アルブミン遺伝子が切断される、ポリヌクレオチドと、

リソソーム貯蔵疾患で欠損している該タンパク質をコードする導入遺伝子であって、ここで、該導入遺伝子は、該ヌクレアーゼによる切断に続いて、該アルブミン遺伝子に組み込まれ、さらに、該導入遺伝子が発現される、導入遺伝子とを含む、組成物。

【請求項2】

前記リソソーム貯蔵疾患が、ゴーシェ病、ファブリー病、ハンター病、ハーラー病およびニーマン・ピック病からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記導入遺伝子が、グルコセレブロシダーゼ、ガラクトシダーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、-Lイズロニダーゼおよびスフィンゴミエリンホスホジエステラーゼからなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項1または請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

前記導入遺伝子の発現が内因性プロモーターによって駆動される、請求項1から3のい

10

20

ずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

前記導入遺伝子が、該導入遺伝子、および該導入遺伝子が組み込まれている前記内因性アルブミン遺伝子によりコードされているアミノ酸を含む融合タンパク質をコードしている、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

発現の際、膜タンパク質の細胞外ドメインを含む融合タンパク質が前記細胞の表面上に局在するように、前記導入遺伝子が該融合タンパク質をコードする、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

発現の際、受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質が血液脳関門を通過するように、前記導入遺伝子が該融合タンパク質をコードする、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

前記細胞が、脳細胞、赤血球、肝臓細胞、筋細胞および幹細胞からなる群から選択される、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 9】

前記幹細胞が造血幹細胞または人工多能性幹細胞である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

リソソーム貯蔵疾患を処置するための組成物であって、

該組成物は、該リソソーム貯蔵疾患で欠損しているタンパク質をコードする導入遺伝子を含む細胞を含み、ここで、該導入遺伝子は、アルブミン遺伝子座に位置しており、

該組成物は、該処置を必要とする患者に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 11】

前記細胞は、ヒト細胞またはハムスター細胞である、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 12】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の組成物であって、前記 1 つ以上のヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALEヌクレアーゼ (TALEN)、および/または CRISPR/Cas 系である、組成物。

【請求項 13】

前記導入遺伝子および/または前記ポリヌクレオチドがウイルスベクターを使用して前記細胞に送達される、請求項 1 から 9 または 12 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

前記ウイルスベクターが AAV ベクターである、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

リソソーム貯蔵疾患で欠損しているタンパク質を産生する細胞をインビトロで生成する方法であって、

該細胞がリソソーム貯蔵疾患で欠損している該タンパク質を産生するように、1 つ以上の非天然ヌクレアーゼを使用して、該タンパク質をコードする導入遺伝子を該細胞の内因性アルブミン遺伝子座に組み込むことを含む方法。

【請求項 16】

前記リソソーム貯蔵疾患が、ゴーシェ病、ファブリー病、ハンター病、ハーラー病およびニーマン・ピック病からなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記導入遺伝子が、グルコセレブロシダーゼ、ガラクトシダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、 - L イズロニダーゼおよびスフィンゴミエリンホスホジエステラーゼからなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項 15 または請求項 16 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

前記導入遺伝子の発現が内因性プロモーターによって駆動される、請求項 15 から 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

前記導入遺伝子が、該導入遺伝子、および該導入遺伝子が組み込まれる前記内因性アルブミン遺伝子によりコードされているアミノ酸を含む融合タンパク質をコードする、請求項 15 から 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

発現の際、膜タンパク質の細胞外ドメインを含む融合タンパク質が前記細胞の表面上に局在するように、前記導入遺伝子が該融合タンパク質をコードする、請求項 15 から 19 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 21】

発現の際、受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質が血液脳関門を通過するように、前記導入遺伝子が該融合タンパク質をコードする、請求項 15 から 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

前記細胞が、脳細胞、赤血球、肝臓細胞、筋細胞および幹細胞からなる群から選択される、請求項 15 から 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

前記幹細胞が造血幹細胞または人工多能性幹細胞である、請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記 1 つ以上のヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALEヌクレアーゼ (TALEN)、および/または CRISPR/Cas 系である、請求項 15 から 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

前記導入遺伝子がウイルスベクターを使用して前記細胞に送達される、請求項 15 から 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

前記ウイルスベクターが AAV ベクターである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記細胞は、ヒト細胞またはハムスター細胞である、請求項 15 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2012年7月11日に出願された米国仮特許出願第 61/670,463 号および 2012年9月21日に出願された米国仮特許出願第 61/704,072 号の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

技術分野

本開示は、リソソーム貯蔵疾患 (LSD) の処置および遺伝子治療の分野にある。

40

【背景技術】

【0003】

背景

遺伝子治療は、ヒト治療の新時代に対する非常に大きな潜在性を有している。これらの方法は、標準の医療行為によってこれまで対処することができなかった状態の処置を可能にする。特に有望視されている領域の 1 つは、導入遺伝子を細胞に加えて、先にはその細胞内で産生されていない産物をその細胞に発現させることができることである。この技術を使用する例としては、治療用タンパク質をコードする遺伝子の挿入、細胞でまたは個体

50

で何らかの理由により欠損しているタンパク質をコードするコード配列の挿入、およびマイクロRNA等の構造核酸をコードする配列の挿入が挙げられる。

【0004】

導入遺伝子が細胞自体のゲノムへ組み込まれ、そこで維持されるように、導入遺伝子は様々な方法によって細胞に送達することができる。近年、部位特異的ヌクレアーゼでの切断を使用して、選択されたゲノム遺伝子座への標的挿入を行う、導入遺伝子組み込みの戦略が開発されている（例えば、共有の米国特許第7,888,121号を参照のこと）。ヌクレアーゼ、例えば、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）、またはヌクレアーゼ系、例えば、（操作されたガイドRNAを利用する）CRISPR/Cas系は標的化遺伝子に特異的であり、導入遺伝子構築物が相同組換え修復（homology directed repair）（HDR）によるか、非相同末端連結（NHEJ）駆動プロセス中の末端捕捉によるかのいずれかによって挿入されるように利用することができる。

10

【0005】

標的化遺伝子座としては「セーフハーバー（safe harbor）」遺伝子座、例えば、ヒト細胞内のAAVS1、HPRTおよびCCR5遺伝子、ならびにマウス細胞内のRosa26が挙げられる（例えば、共有の米国特許公開第20080299580号；同第20080159996号および同第201000218264号、ならびに米国特許出願第13/660,821号を参照のこと）。ヌクレアーゼ媒介性組み込みによって、それが遺伝子サイレンシングまたは近くの癌遺伝子の活性化のリスクを最小にするための正確な導入遺伝子の位置決定を可能にするので、導入遺伝子のランダム組み込みに依存する古典的な組み込み方法と比べて、導入遺伝子の発現の改善、安全性および発現の持続性の増大が見込まれる。

20

【0006】

標的細胞への導入遺伝子の送達は、この技術を完全実施するために克服しなければならない課題の1つである一方、克服しなければならない別の課題は、導入遺伝子を細胞に挿入し、それが発現した後に、そのようにコードされている遺伝子産物が生物体の必要な位置に到達し、有効であるのに十分な局所濃度にすべきであることを確実にすることである。タンパク質の不足を特徴とする、または異常な非機能性タンパク質の存在を特徴とする疾患に対して、導入遺伝子がコードする野性型タンパク質の送達は非常に有用となり得る。

30

【0007】

リソソーム貯蔵疾患（LSD）は、通常、不要な脂質、糖タンパク質、およびムコ多糖の分解に関与する個々の機能的リソソームタンパク質の欠損を特徴とする稀な代謝性単一遺伝子疾患の一群である。これらの疾患は、特異的酵素の機能不全に起因してこれらの化合物を処理して再利用することが不可能であるため、細胞内でのそれらの蓄積を特徴とする。最も一般的な例は、ゴーシェ病（グルコセレブロシダーゼ欠損 - 遺伝子名：GBA）、ファブリー病（ガラクトシダーゼ欠損 - GLA）、ハンター病（イズロン酸 - 2 - スルファターゼ欠損 - IDS）、ハーラー病（ - イズロニダーゼ欠損 - IDUA）、およびニーマン・ピック病（スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1欠損 - SMPD1）である。これらをすべてまとめると、LSDは、7000人の出生に約1人の割合で発生する。これらの疾患は、それらの罹患者に破壊的な影響を及ぼす。これらは、通常、乳児において最初に診断され、該乳児では、特徴的な顔面および身体発育パターンを有し得、かつ中度から重度の精神発達遅滞を有し得る。処置の選択肢には、不足した酵素が通常大用量の静脈内注射によって患者に与えられる酵素補充療法（ERT）が挙げられる。そのような処置は、症状のみを処置するものであって治癒的ではなく、したがって、患者は、これらのタンパク質の投薬を生涯繰り返し受けなければならない。潜在的に、注射されたタンパク質に対する中和抗体が発生し得る。多くの場合、これらのタンパク質は短い血清半減期を有するため、患者は、タンパク質の頻繁な注入にも耐えなければならない。例えば、Cerezyme（登録商標）製品（イミグルセラゼ）を投与されるゴーシェ病患

40

50

者は、週に3回注入されなければならない。酵素の産生および精製にも問題があるため、処置には非常に費用がかかる（1患者当たり1年に100,000ドル超）。

【0008】

したがって、ゲノム編集による単一遺伝子疾患（例えば、リソソーム貯蔵疾患）の処置に使用可能なさらなる方法および組成物、ならびに治療に関連したレベルで発現した導入遺伝子コード遺伝子産物を送達する方法に関する必要性が依然として存在している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許第7,888,121号明細書

10

【特許文献2】米国特許出願公開第20080299580号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第20080159996号明細書

【特許文献4】米国特許出願公開第201000218264号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

要旨

本明細書には、単一遺伝子疾患を処置するための方法および組成物が開示されている。本発明は、適切な標的細胞へ導入遺伝子配列を挿入するための方法であって、導入遺伝子が疾患を処置するタンパク質をコードする方法を記載する。治療用タンパク質は、導入遺伝子を有していない他の細胞に影響を及ぼすかそれらによって取り込まれ得るように、標的細胞から放出させることができる。本発明はまた、高レベルの治療薬を産生する細胞（例えば、成熟細胞または未分化細胞）を産生するための方法であって、これらの改変された細胞の集団を患者に導入することにより疾患または状態の処置に必要なとされる治療薬を供給する方法を提供する。

20

【0011】

一態様において、ゲノム中の目的とする領域（例えば、疾患関連遺伝子、高度発現遺伝子、アルブミン遺伝子または他の遺伝子もしくはセーフハーバー遺伝子）の標的部位に結合するジンクフィンガータンパク質（ZFP）であって、1つまたは複数の操作されたジンクフィンガー結合ドメインを含むジンクフィンガータンパク質が本明細書に記載されている。一実施形態において、ZFPは、目的とする標的ゲノム領域を切断するジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）であって、1つまたは複数の操作されたジンクフィンガー結合ドメイン、ヌクレアーゼ切断ドメインまたは切断ハーブドメインを含むジンクフィンガーヌクレアーゼである。切断ドメインおよび切断ハーブドメインは、例えば、様々な制限エンドヌクレアーゼおよび/またはホーミングエンドヌクレアーゼから得ることができる。一実施形態において、切断ハーブドメインはIIS型制限エンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）由来である。ある実施形態において、ジンクフィンガードメインは、疾患関連遺伝子またはセーフハーバー遺伝子、例えば、アルブミン内の標的部位（例えば、表3の1つの行に示した認識ヘリックス領域を有する5または6つのフィンガーを有するジンクフィンガータンパク質）を認識する。

30

40

【0012】

別の態様において、ゲノム中の目的とする領域（例えば、高度発現遺伝子、疾患関連遺伝子またはセーフハーバー遺伝子）の標的部位に結合するTALEタンパク質（転写活性化因子様）であって、1つまたは複数の操作されたTALE結合ドメインを含むTALEタンパク質が本明細書に記載されている。一実施形態において、TALEは、目的とする標的ゲノム領域を切断するヌクレアーゼ（TALEN）であって、1つまたは複数の操作されたTALE DNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ切断ドメインまたは切断ハーブドメインを含むヌクレアーゼである。切断ドメインおよび切断ハーブドメインは、例えば、様々な制限エンドヌクレアーゼおよび/またはホーミングエンドヌクレアーゼから得ることができる。一実施形態において、切断ハーブドメインは、IIS型制限エンドヌクレ

50

アーゼ（例えば、FokI）に由来する。ある実施形態において、TALE DNA 結合ドメインは、高度発現遺伝子、疾患関連遺伝子、またはセーフハーバー遺伝子内の標的部位を認識する。

【0013】

別の態様において、ゲノム中の目的とする領域（例えば、高度発現遺伝子、疾患関連遺伝子またはセーフハーバー遺伝子）の標的部位に結合するCRISPR/Cas系であって、CRISPR/Casヌクレアーゼと、操作されたcrRNA/tracrRNA（または単鎖ガイドRNA）とを含む、CRISPR/Cas系が本明細書に記載されている。ある実施形態において、CRISPR/Cas系は、高度発現遺伝子、疾患関連遺伝子またはセーフハーバー遺伝子内の標的部位を認識する。

10

【0014】

本明細書に記載のZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系は、例えば、リーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロン等の遺伝子内または遺伝子に隣接したコード領域または非コード領域内の目的とする領域、あるいはコード領域の上流または下流のいずれかの非転写領域内の目的とする領域に結合し、かつ/または目的とする領域を切断することができる。ある実施形態において、ZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系は、高度発現遺伝子、例えば、赤血球（RBC）中のグロビン遺伝子に結合し、かつ/または切断する。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2012年7月11日出願の発明の名称が「Methods and Compositions for Delivery of Biologics」である米国出願第61/670,451号を参照されたい。他の実施形態において、ZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系は、セーフハーバー遺伝子、例えば、CCR5遺伝子、PPP1R12C(AAV S1としても公知である)遺伝子、アルブミン、HPRTまたはRosa遺伝子に結合し、かつ/または切断する。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第20080299580号；同第20080159996号および同第201000218264号、ならびに米国出願第61/537,349号、同第61/560,506号、同第13/660,821号、および2012年7月11日出願の発明の名称が「Methods and Compositions for Regulation of Transgene Expression」である米国出願第61/670,451号を参照されたい。さらに、選択の一助として、HPRT遺伝子座を使用することができる（米国特許出願第13/660,821号および同第13/660,843号を参照されたい）。他の実施形態において、ZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系は、疾患関連遺伝子（例えば、ファブリー病と関係する、リソソームヒドロラーゼ - ガラクトシダーゼA (AGA) をコードする遺伝子）に結合し、かつ/または切断することができる。別の態様において、本明細書に記載の1つまたは複数のジンクフィンガーおよび/またはTALEヌクレアーゼまたはCRISPR/Cas系を含む組成物が本明細書に記載されている。さらに、1つまたは複数のこれらのヌクレアーゼおよびドナー核酸を含む組成物も本明細書に記載されている。一部の態様において、疾患関連異常調節遺伝子を切断することが可能な操作されたヌクレアーゼまたはCRISPR/Cas系、および異常遺伝子産物の発現を低減または除去することによる疾患の処置にこれらのヌクレアーゼを使用する方法が記載されている。

20

30

40

【0015】

一態様において、本発明は、修正導入遺伝子 (corrective transgene) によってコードされている産物が発現されるように、適切な標的細胞（例えば、血液細胞、肝臓細胞、脳細胞、幹細胞、前駆細胞等）に該修正導入遺伝子を挿入することにより、リソソーム貯蔵疾患を処置する方法を記載する。一実施形態において、修正導入遺伝子は、補充タンパク質 (replacement protein) をインビトロ産生する細胞系に挿入される。導入遺伝子を含む細胞または前記細胞によって産生されるタンパク質は、例えば、産生されるタンパク質を精製した後に、それを必要とする患者を処置するために使用することができる。別の実施形態において、補充タンパク質がインビボで

50

産生されるように、修正導入遺伝子は身体内の標的組織に挿入される。一部の態様において、発現タンパク質は細胞から放出され、（例えば、血液への輸出を介して）導入遺伝子が存在していない他の細胞で作用するか、他の細胞に取り込まれる。一部の例において、標的組織は肝臓である。他の例において、標的組織は脳である。他の例において、標的は血液（例えば、血管系）である。他の例において、標的は骨格筋である。一実施形態において、修正遺伝子は、機能的遺伝子の野生型配列を含むが、他の実施形態においては、修正導入遺伝子の配列はいくつかの方法で改変され、増強された生物活性が得られる。一部の態様において、修正導入遺伝子は、生物活性を高めるように最適化されたコドンを含むが、他の態様においては、配列は改変され、得られたタンパク質により望まれる機能（例えば、安定性の改善、基質結合を改変するための電荷の改変等）を付与する。一部の実施形態において、導入遺伝子は免疫原性を低減するために改変される。他の場合には、導入遺伝子は、コードされているタンパク質が特定の組織、例えば脳においてトランスポーター媒介送達のための基質になるように改変される（G a b a t h u l e r ら（2010年）Neurobiology of Disease 37巻：48～57頁を参照のこと）。

10

【0016】

別の態様において、本発明は、所望の導入遺伝子を導入するための幹細胞または前駆細胞（例えば、血液細胞前駆体、肝臓幹細胞等）のゲノムを切断（編集）することが可能な、操作されたヌクレアーゼタンパク質を提供する。一部の態様において、その後、編集された幹細胞または前駆細胞を増殖させ、エクスピボで編集された成熟細胞へと分化するように誘導することができ、次いで、この細胞が患者に投与される。他の態様において、編集前駆体（例えば、CD34+幹細胞）は骨髓移植で投与され、それは、移植が成功した後、増殖して編集細胞を生成し、その後これは分化し、インピボで成熟し、導入遺伝子から発現される生物学的薬物（biologic）を含有する。他の態様において、編集幹細胞は筋肉幹細胞であり、これはその後、筋組織へ導入される。一部の態様において、操作されたヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）であり、他の態様において、ヌクレアーゼはTALENヌクレアーゼ（TALEN）であり、他の態様において、CRISPR/Cas系が使用される。ヌクレアーゼは、セーフハーバー遺伝子座、疾患関連遺伝子に対して、または細胞での高度発現遺伝子に対して特異性を有するように操作され得る。単なる非限定的な例として、セーフハーバー遺伝子座は、AAVS1部位、CCR5遺伝子、アルブミンまたはHPRT遺伝子であってもよく、一方、疾患関連遺伝子は、リソソームヒドロラーゼ - ガラクトシダーゼAをコードするGLA遺伝子であってもよい（表2を参照のこと）。単なる非限定的な例として、赤血球（RBC）での高度発現遺伝子は - グロビンである。別の態様において、トランスジェニック細胞は、電気的増感（electrosensitization）によってエクスピボで増感し、エネルギー源（例えば、超音波）への曝露後の破壊に対するそれらの感受性を高める（WO2002007752号を参照のこと）。

20

30

【0017】

別の態様において、本明細書に記載の1つまたは複数のZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系をコードするポリヌクレオチドが本明細書に記載されている。ポリヌクレオチドは、例えば、mRNAであってもよい。一部の態様において、mRNAは化学的に修飾されていてもよい（例えば、Kormannら、（2011年）Nature Biotechnology 29巻（2号）：154～157頁を参照のこと）。

40

【0018】

別の態様において、プロモーターに作動可能に連結した、本明細書に記載の1つまたは複数のZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系をコードするポリヌクレオチドを含むZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系の発現ベクターが本明細書に記載されている。一実施形態において、発現ベクターはウイルスベクターである。

50

【 0 0 1 9 】

別の態様において、本明細書に記載の1つまたは複数のZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系の発現ベクターを含む宿主細胞が本明細書に記載されている。宿主細胞は、1つまたは複数のZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系の発現ベクターで安定的に形質転換されてもよいし、一時的にトランスフェクトされていてもよいが、またはそれらの組み合わせであってもよい。一部の実施形態において、宿主細胞は肝臓細胞である。

【 0 0 2 0 】

別の態様において、細胞において高度発現遺伝子座、疾患関連遺伝子座および/またはセーフハーバー遺伝子座を切断するための方法であって、ZFN(複数可)、TALEN(複数可)またはCRISPR/Cas系が発現され、かつ1つまたは複数の遺伝子座が切断されるような条件下で、1つまたは複数の標的遺伝子座内の標的部へ結合する1つまたは複数のZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを細胞に導入することを含む方法が本明細書に記載されている。高度発現遺伝子座および/またはセーフハーバー遺伝子座に結合するZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系の非限定的な例は、米国公開第20080299580号;同第20080159996号;および同第20100021826号、ならびに米国出願第13/660,821号、同第13/660,843号、同第13/624,193号および同第13/624,217号、ならびに、発明の名称が「Methods and Compositions for Delivery of Biologics」である、米国出願第61/670,451号に開示されており、これらの文献はすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 2 1 】

他の実施形態において、任意の標的遺伝子におけるゲノムの配列は、例えば、本明細書に記載したようなZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系(または、前記ZFN、TALENおよび/もしくはCRISPR/Cas系をコードするベクター)、ならびにZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系による標的切断後に遺伝子に挿入される「ドナー」配列または導入遺伝子を使用する治療用の導入遺伝子で置き換えられる。ドナー配列は、個別のベクター(例えば、Ad、AAVまたはLVベクター)に存在する、ZFNまたはTALENベクターに存在し得るか、あるいは、異なる核酸送達機構を使用して細胞に導入され得る。ドナーヌクレオチド配列のこうした標的遺伝子座(例えば、高度発現遺伝子、疾患関連遺伝子、他のセーフハーバー遺伝子等)への挿入は、標的遺伝子座(例えば、アルブミン、グロビン等)の内因的遺伝子制御エレメントの制御下で導入遺伝子を発現させる。一部の態様において、目的とする導入遺伝子の、例えば標的遺伝子(例えばアルブミン)への挿入は、無傷の外因性タンパク質配列を発現させ、標的(例えばアルブミン)によってコードされているいかなるアミノ酸も欠いている。他の態様において、発現された外因性タンパク質は融合タンパク質であり、導入遺伝子によりコードされているアミノ酸と、導入遺伝子が挿入される内因的遺伝子座によりコードされているアミノ酸(例えば、内因性標的遺伝子座由来、あるいは、標的遺伝子座の配列をコードする、導入遺伝子上の配列由来)とを含む。標的は、任意の遺伝子、例えば、セーフハーバー遺伝子、例えば、アルブミン遺伝子、AAVS1遺伝子、HPRT遺伝子;CCR5遺伝子;または高度発現遺伝子、例えば、RBC(例えば、グロビンまたはグロビンの)グロビン遺伝子であり得る。一部の例において、内因性配列は外因性タンパク質のアミノ(N)末端部分に存在し、一方、他の例において、内因性配列は外因性タンパク質のカルボキシ(C)末端部分に存在する。他の例において、内因性配列は、外因性タンパク質のN末端部分およびC末端部分の両方に存在する。内因性配列は、完全長の野生型または変異型の内因性配列を含んでいてもよく、あるいは、部分的内因性アミノ酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態において、内因性遺伝子-導入遺伝子融合物は、細胞内の内因性遺伝子座に位置するが、一方、他の実施形態においては、内因性配列-導入遺伝子コード配列は、ゲノム内の別の遺伝子座に挿入される(例えば、アルブミ

10

20

30

40

50

ン、HPRTまたはCCR5遺伝子座に挿入されるIDUA-導入遺伝子配列)。一部の態様において、セーフハーバーは、AAVS1、Rosa、アルブミン、HPRTまたはCCR5遺伝子座から選択される(共有の米国公開第20080299580号;同第20080159996号;および同第201000218264号、ならびに米国出願第13/660,821号、同第13/660,843号、同第13/624,193号および同第13/624,217号、ならびに2011年7月11日に出願の、発明の名称が「Methods and Compositions for Regulation of Transgene Expression」である米国出願第61/670,451号を参照のこと)。他の実施形態において、疾患関連遺伝子は、GLA(リソソームヒドロラーゼ - ガラクトシダーゼA)、または表2に列記した1つもしくは複数の遺伝子から選択される。

10

【0022】

一部の実施形態において、導入遺伝子は、治療用タンパク質産物が細胞(例えば、前駆体または成熟細胞)内に保持されるように発現される。他の実施形態において、導入遺伝子は、発現の際、導入遺伝子融合物が治療用タンパク質の表面に局在するように、膜タンパク質の細胞外ドメインに融合されている。一部の態様において、細胞外ドメインは、表1に列記したタンパク質から選択される。一部の態様において、編集細胞は、特定の組織のタイプに細胞を輸送するための膜貫通型タンパク質をさらに含む。一態様において、膜貫通型(transmembrane)タンパク質は抗体であるが、他の態様において、膜貫通型タンパク質は受容体である。ある実施形態において、細胞は、前駆体(例えば、CD34+または造血幹細胞)または成熟RBCである。一部の態様において、導入遺伝子にコードされている治療用タンパク質産物は、細胞から輸出されて、導入遺伝子を欠く細胞に影響を及ぼすか、それによって取り込まれる。ある実施形態において、細胞は、血流へ治療用タンパク質を放出し、遠位組織(例えば、脳)で作用する肝臓細胞である。

20

【0023】

また本発明は、同種産物(allogenic product)としてすべての患者に普遍的に使用することができる、LSDに対する治療用タンパク質を運ぶ細胞(例えば、RBC)を産生するための方法および組成物を提供する。これにより、例えば、特定のLSD患者を処置するための単一産物を開発することができる。これらのキャリアは、細胞の輸送が容易になるように膜貫通型タンパク質を含んでいてもよい。一態様において、膜貫通型タンパク質は抗体であるが、一方、他の態様においては、膜貫通型タンパク質は受容体である。

30

【0024】

一態様において、本発明は、疾患関連遺伝子をノックアウトするための方法および組成物を提供する。一部の実施形態において、これらの遺伝子は、その産物が前駆体または成熟細胞の遺伝子の発現を調節することができる遺伝子である。一部の態様において、ノックアウトは、こうしたタンパク質に関するDNA上の調節標的部位に向けてである。一部の態様において、遺伝子のノックアウトが正常機能を回復するように、調節遺伝子は異常である。他の態様において、この疾患対立遺伝子のノックアウトが野生型対立遺伝子からの発現を可能にし、正常機能を回復させることができるように、ノックアウトされる遺伝子は疾患関連対立遺伝子である。

40

【0025】

一実施形態において、導入遺伝子は、アルブミン遺伝子座への挿入後にアルブミンプロモーターから発現される。導入遺伝子がインビボで肝細胞に挿入される場合、導入遺伝子によってコードされている生物学的薬物は、その後、血流へ放出され得る。一部の態様において、導入遺伝子は、静脈内注射によりウイルスベクターにおいてインビボの肝臓に送達される。

【0026】

別の実施形態において、導入遺伝子は非コードRNA、例えばshRNAをコードする。細胞成熟前の導入遺伝子が発現することにより、目的とする非コードRNAを含有する

50

細胞が得られる。

【0027】

別の実施形態において、本発明は、前駆体由来の成熟細胞が導入遺伝子によりコードされている高レベルの産物を含むように導入遺伝子が挿入された、前駆細胞（造血幹細胞、筋肉幹細胞またはCD34+造血幹細胞（HSC）細胞）を記載する。一部の実施形態において、これらの前駆体は、人工多能性幹細胞（iPSC）である。

【0028】

一部の実施形態において、本発明の方法は、トランスジェニック動物系においてインビボで使用することができる。一部の態様において、トランスジェニック動物は、導入遺伝子がヒト遺伝子をコードするモデル開発において使用することができる。一部の例において、トランスジェニック動物は、対応する内因性遺伝子座でノックアウトさせることができ、ヒトタンパク質が単離で研究され得るインビボ系の開発を可能にする。こうしたトランスジェニックモデルは、目的とするヒトタンパク質と相互作用し得るか、それを修飾し得る小分子、大型生体分子、または他の実体を同定するためのスクリーニング目的で使用することができる。一部の態様において、導入遺伝子は、選択された遺伝子座（例えば、高度発現遺伝子座またはセーフハーバー遺伝子座）、幹細胞（例えば、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、肝幹細胞、神経幹細胞等）、または本明細書に記載の方法のいずれかによって得られる動物胚に組み込まれ、次いで、この胚は、生きた動物が生まれるように移植される。この動物は、次いで性的成熟まで成長させ、繁殖させ、その子孫のうち少なくとも一部が組み込まれた導入遺伝子を含む。

【0029】

またさらなる態様において、染色体の内因性遺伝子座（例えば、疾患関連遺伝子、高発現遺伝子、例えば、RBCのグロビン、またはセーフハーバー遺伝子、例えば、アルブミン、CCR5、HPRTもしくはRosa遺伝子）に、例えば、胚の染色体に、核酸配列を部位特異的に組み込むための方法を本明細書で提供する。ある実施形態において、本方法は、（a）胚に、（i）組み込まれる核酸配列に隣接する上流配列および下流配列を含む少なくとも1つのDNAベクターと、（ii）ジンクフィンガーをコードする少なくとも1つのRNA分子、標的遺伝子座における組み込み部位を認識するTALEヌクレアーゼまたはCRISPR/Cas系とを注射することと、（b）胚を培養してZFN、TALEN、および/またはCRISPR/Cas系の発現を可能にすることとを含み、ZFN、TALEN、および/またはCRISPR/Cas系によって組み込み部位に導入される二本鎖切断は、核酸配列を染色体に組み込むように、DNAベクターとの相長的組換えによって修復される。

【0030】

先に記載のいずれかの実施形態において、本発明の方法および化合物は、リソソーム貯蔵疾患の被験体を処置するための他の治療剤と組み合わせることができる。一部の態様において、本方法および組成物は、血液脳関門を通過させることができる方法および組成物と組み合わせ使用される。他の態様において、本方法および組成物は、被験体の免疫応答を抑制することが公知である化合物と組み合わせ使用される。

【0031】

本発明のZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系を含むキットも提供される。本キットは、ZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系をコードする核酸（例えば、好適な発現ベクターに含有されているRNA分子またはZFN、TALENおよび/もしくはCRISPR/Cas系をコードする遺伝子）、ドナー分子、単鎖ガイドRNAをコードする発現ベクター 好適な宿主細胞系、本発明の方法を実施するための指示等を含むことができる。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

（項目1）

リソソーム貯蔵疾患を処置するタンパク質を産生する細胞を生成する方法であって、該細胞がリソソーム貯蔵疾患を処置する該タンパク質を産生するように、非天然ヌクレオ

10

20

30

40

50

ーゼを使用して、該タンパク質をコードする導入遺伝子を該細胞の内因性遺伝子座に組み込むことを含む方法。

(項目 2)

前記リソソーム貯蔵疾患が、ゴーシェ病、ファブリー病、ハンター病、ハーラー病およびニーマン・ピック病からなる群から選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記導入遺伝子が、グルコセレブロシダーゼ、ガラクトシダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ欠損、 - L イズロニダーゼ欠損およびスフィンゴミエリンホスホジエステラーゼからなる群から選択されるタンパク質をコードする、項目 1 または項目 2 に記載の方法。

10

(項目 4)

前記内因性遺伝子座が、アルブミン遺伝子、AAVS1 遺伝子、HRPT 遺伝子、CCR5 遺伝子、Rosa 遺伝子およびグロビン遺伝子からなる群から選択される、項目 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 5)

前記導入遺伝子の発現が内因性プロモーターによって駆動される、項目 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 6)

前記導入遺伝子が、該導入遺伝子、および該導入遺伝子が組み込まれている前記内因性遺伝子座によりコードされているアミノ酸を含む融合タンパク質である、項目 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 7)

発現の際、膜タンパク質の細胞外ドメインを含む融合タンパク質が前記細胞の表面上に局在するように、前記導入遺伝子が該融合タンパク質をコードする、項目 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 8)

発現の際、受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質が血液脳関門を通過するように、前記導入遺伝子が該融合タンパク質をコードする、項目 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

前記細胞が、赤血球、肝臓細胞、筋細胞および幹細胞からなる群から選択される、項目 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 10)

前記幹細胞が造血幹細胞または人工多能性幹細胞である、項目 9 に記載の方法。

(項目 11)

リソソーム貯蔵疾患を処置する方法であって、項目 1 から 10 のいずれかに記載の方法によって生成される前記細胞によって産生される前記タンパク質を単離することと、該タンパク質を、それを必要とする患者に投与することとを含む方法。

40

(項目 12)

リソソーム貯蔵疾患を処置する方法であって、項目 1 から 10 のいずれかに記載の方法によって生成される前記細胞を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法。

(項目 13)

リソソーム貯蔵疾患を処置する方法であって、項目 1 から 10 のいずれかに記載の方法に従って生成される細胞が被験体内で生成されるように、1 つまたは複数のヌクレアーゼおよび 1 つまたは複数の導入遺伝子を、それを必要とする該被験体に投与することを含む方法。

(項目 14)

50

前記細胞が単離された幹細胞または前駆細胞であり、投与前に該幹細胞または前駆細胞を増殖および分化させることをさらに含む、項目12に記載の方法。

(項目15)

前記導入遺伝子がウイルスベクターを使用して前記細胞に送達される、項目1から14のいずれかに記載の方法。

(項目16)

前記ウイルスベクターがAAVベクターである、項目15に記載の方法。

【0032】

これらの態様および他の態様は、全体としての本開示を考慮することにより当業者には容易に明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1のパネルAおよびBは、ヌクレアーゼ対による目的とする位置での切断と、その後のNHEJ事象を測定するCell-1ミスマッチアッセイ(Surveyor(商標)、Transgenomic)の結果を示すゲルの複合セットである。NHEJは、ヌクレオチド塩基の挿入または欠失「インデル(indel)」をもたらし、次いで、これは、DNA鎖が野生型のDNA鎖とアニールされた場合にミスマッチを引き起こす。図1Aは、Neuro2A細胞へのアルブミン特異的ヌクレアーゼ対のトランスフェクションを37で実施した場合に測定された結果を示し、図1Bは、低体温ショック(30)下でのヌクレアーゼ対が形質導入された場合の結果を示す。ミスマッチのパーセント、またはインデル%は、各条件下での各対のヌクレアーゼ活性の尺度である。

【図2】図2は、ファブリー病、ゴーシェ病、ハーラー病およびハンター病を処置する治療用導入遺伝子を提供するために設計された4種類のAAVドナーの構造を示す概略図である。各ドナー構築物は、相同依存的機構によってドナーをアルブミン遺伝子座に挿入するための相同アームに隣接するAAV配列(5'ITRおよび3'ITR)、スプライスアクセプター部位、補充酵素をコードするDNA、および組み込まれたドナーの識別を可能にするためのMYC-Flagタグを含有する。

【図3】図3のパネルAおよびBは、インビボにおけるマウスアルブミンZFNの活性を示す図である。正常な雄マウス(n=6)に、マウス特異的ZFN対のSBS30724およびSBS30725をコードするAAV2/8またはAAV2/8.2のいずれかの 1.0×10^{11} 全ベクターゲノムを200マイクロリットルの単回用量を投与し、正常マウスにおけるAAVベクターゲノムコピーを検出することによる肝臓感染性と、インビボにおけるNHEJ活性を評価した。ベクターは記載したようにマウスに尾静脈注射により投与し、投与14日後に、マウスを屠殺し、肝臓を回収し、DNAまたは全タンパク質を定量するために処理した。AAVベクターゲノムコピーの検出は定量PCRによって実施し、ZFNの切断活性はCell-1(Surveyor、Transkaryotic)アッセイを使用して測定した。図3Aは、GFP発現カセットを含有するAAV2/8またはZFNを含むAAV2/8が投与されたマウスから得たCell-1の結果のゲルを示すが、この場合、AAVは293発現系またはバキュロウイルス系によって産生されたものである。図3Bはゲルのレーンの定量を示し、アルブミン特異的ZFNを含有するAAVによるマウスの感染によって、ほぼ30%の定量化可能なNHEJ活性が得られることが明らかである。

【図4】図4のパネルAおよびBは、マウスのアルブミン遺伝子座へのhuGLA導入遺伝子ドナー(ファブリー病に罹患している患者で欠損)の挿入を示す。図4Aは、導入遺伝子によってコードされているhuGLAタンパク質に対するウェスタンブロットを示しており、矢印は推定タンパク質を示す。ZFNおよびドナーの両方が投与されたこれらのマウスから得たマウス試料(試料1-1、1-2および1-3)と、ZFN単独が投与された試料(4-1、4-2、4-3)またはhuGLAドナー(「huFabryドナー」)単独が投与された試料、試料5-1および5-2とを比較することにより、ヒト肝臓溶解物の対照と一致するバンドが同定される。図4BはhuGLA特異的ELISAキ

10

20

30

40

50

ットを使用するE L I S Aの結果を示したものであり、試料はウイルス導入の14日後または30日後のマウスから分析した。誤差バーは標準偏差(n = 3)を表す。結果から明らかのように、Z F Nおよびドナー(丸印)の両方を投与されたマウスでは、Z F N単独(四角印)またはドナー単独(三角印)を投与されたマウスよりも多量のh u G L aシグナルがあった。

【図5】図5のパネルA~Dは、マウスのアルブミン遺伝子座に挿入されたL S Dドナー導入遺伝子の肝臓ホモジェネートにおける発現を表すウェスタンブロットを示す。図5AはI D U Aをコードする導入遺伝子を使用した結果を示し、図5BはG L A導入遺伝子を使用した結果を示し、図5CはI D S導入遺伝子を使用した結果を示し、図5DはG B A導入遺伝子を使用した結果を示す。

10

【図6】図6は、Z F N媒介性切断後に生じ得る2種類のタイプのドナー挿入を示す概略図である。N H E J媒介性ドナー挿入によって、組み込まれた完全L S Dドナー構築物が得られるが、H D R媒介性挿入では、F 9スプライスアクセプター部位を含むc D N Aだけが組み込まれる。また図6は、生じた組み込みのタイプの検出に使用される2種類のP C Rプライマー(「m A L B - O O F 1」および「A c c 6 5 1 - S A - r e v - s h」)の位置も示す。

【図7】図7のパネルA~Cは、処置の30日後に組み込まれたL S D導入遺伝子を含有するマウスの肝臓ホモジェネートに対して実施した³²P放射標識P C Rの結果を示す。図7AはI D U A導入遺伝子を含むマウスを示し、図7BはG L A導入遺伝子を含むマウスを示し、図7CはI D S導入遺伝子を含むマウスを示す。すべての場合において、バンドは、導入遺伝子の挿入がN H E J媒介性組み込みおよびH D R媒介性組み込みの両方によって生じたことを示している。

20

【図8】図8は、エピトープタグを含有するL S Dドナーの設計を説明する概略図である。M y cタグおよびF l a gタグの位置および配列を示す。

【図9】図9のパネルAおよびBは、エピトープタグを含有する組み込まれたL S Dドナーを含むマウスから得られた肝臓ホモジェネートに対して、上記のように行った³²P放射標識P C Rのゲルを示す。図9Aは、組み込みが、標的化G L A、I D U AおよびI D S導入遺伝子に対するN H E J媒介性組み込み、およびH D R媒介性組み込みの両方によって生じたことを示す。図9Bは、G B A導入遺伝子に関する同様の内容を示す。

【発明を実施するための形態】

30

【0034】

詳細な説明

本明細書には、リソソーム貯蔵疾患(L S D)を処置または予防するための方法および組成物が開示されている。本発明は、遺伝子が肝臓で発現され、治療用の(補充)タンパク質が発現されるように、L S Dの被験体で欠損または発現が不十分であるタンパク質をコードする遺伝子を挿入するための方法および組成物を供給する。また本発明は、細胞が高レベルの治療薬を産生し、かつ改変されたこれらの細胞の集団を患者に導入することで、その必要とされるタンパク質を提供するように、細胞(例えば、前駆体または成熟R B C、i P S Cもしくは肝臓細胞)を改変することを記載する。導入遺伝子は、それを必要とする患者において治療上有益である所望のタンパク質または構造R N Aをコードし得る。

40

【0035】

したがって、本発明の方法および組成物は、導入遺伝子から任意の遺伝子座(例えば、高発現アルブミン遺伝子座)由来の治療上有益なタンパク質を発現させ、リソソーム貯蔵疾患で欠損している酵素を補充するために使用することができる。さらに、本発明は、細胞、例えば肝臓細胞内の高発現遺伝子座に上記配列を挿入することにより、これらの疾患を処置するための方法および組成物を提供する。

【0036】

さらに、導入遺伝子は、最終的な移植での使用のために、患者由来の細胞、例えば、患者由来の人工多能性幹細胞(i P S C)、または別の種類の幹細胞(胚性幹細胞または造

50

血幹細胞)に導入することができる。それを必要とする患者への移植用の造血幹細胞に疾患関連導入遺伝子を挿入することが特に有用である。幹細胞が成熟細胞に分化するにつれて、それらは組織へ送達するための高レベルの補充タンパク質を含有する。

【0037】

概要

方法の実践、ならびに本明細書に開示の組成物の調製および使用は、別途示されない限り、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算化学、細胞培養、組換えDNA、および当分野の技術の範囲内の関連分野における従来の技法を用いる。これらの技法は、文献内で十分に説明される。例えば、Sambrookら MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989およびThird edition, 2001; Ausubelら, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987および定期的最新版; METHODS IN ENZYMOLOGYのシリーズ, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A.P. Wolffe, 編), Academic Press, San Diego, 1999; ならびに METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Beckerら) Humana Press, Totowa, 1999を参照されたい。

【0038】

定義

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用され、線状または環状構造であり、かつ一本鎖または二本鎖形態のいずれかである、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを指す。本開示の目的のために、これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定的であると解釈されるべきではない。これらの用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体、ならびに塩基部分、糖部分、および/またはリン酸部分において修飾されるヌクレオチド(例えば、ホスホロチオエート骨格)を包含することができる。概して、特定のヌクレオチドの類似体は、同一の塩基対合特異性を有し、すなわち、Aの類似体は、Tと塩基対合する。

【0039】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために交換可能に使用される。この用語は、1つ以上のアミノ酸が対応する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体または修飾誘導体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

【0040】

「結合」とは、高分子間(例えば、タンパク質と核酸との間)の配列特異的かつ非共有結合的な相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異的である限り、結合相互作用のすべての構成要素が配列特異的である(例えば、DNA骨格におけるリン酸残基と接触する)必要はない。そのような相互作用は、概して、 10^{-6} M^{-1} 以下の解離定数(K_d)を特徴とする。「親和性」は、結合の強度を指し、結合親和性の増加は、 K_d の低下と相関性がある。

【0041】

「結合タンパク質」は、別の分子に非共有結合的に結合することができるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、DNA分子(DNA結合タンパク質)、RNA分子(RNA結合タンパク質)、および/またはタンパク質分子(タンパク質結合タンパク質)に結合し得る。タンパク質結合タンパク質の場合、それは、それ自身に結合してホモ二量

体、ホモ三量体等を形成することができ)、かつ/または、異なるタンパク質(単数または複数)の1つ以上の分子に結合し得る。結合タンパク質は、2つ以上の種類の結合活性を有し得る。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、DNA結合、RNA結合、およびタンパク質結合活性を有する。

【0042】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」(または結合ドメイン)は、亜鉛イオンの配位によってその構造が安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である、1つ以上のジンクフィンガーを介して配列特異的な様式でDNAに結合するタンパク質またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略される。

10

【0043】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つ以上のTALE反復ドメイン/単位を含むポリペプチドである。反復ドメインは、TALEの、その同族の(cognate)標的DNA配列への結合に関与する。単一の「反復単位」(「反復」とも称される)は、典型的には、33~35アミノ酸長であり、天然に存在するTALEタンパク質内の他のTALE反復配列に少なくともある程度の配列相同性を示す。

【0044】

ジンクフィンガーおよびTALE結合ドメインは、例えば、天然に存在するジンクフィンガーまたはTALEタンパク質の認識ヘリックス領域を操作する(1つ以上のアミノ酸を改変する)ことによって、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」され得る。したがって、操作されたDNA結合タンパク質(ジンクフィンガーまたはTALE)は、非天然タンパク質である。DNA結合タンパク質を操作するための方法の非限定的な例には、設計および選択がある。設計されたDNA結合タンパク質は、その設計/組成が主に合理的判定基準によってもたらされる非天然タンパク質である。設計のための合理的判定基準は、置換規則の適用、ならびに既存のZFPおよび/またはTALE設計ならびに結合データの情報を格納するデータベース内の情報を処理するためのコンピュータ化アルゴリズムの適用を含む。例えば、米国特許第6,140,081号、同第6,453,242号、および同第6,534,261号を参照されたく、国際公開第WO98/53058号、同第WO98/53059号、同第WO98/53060号、同第WO02/016536号、および同第WO03/016496号、ならびに米国公開第20110301073号も参照されたい。

20

30

【0045】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはTALEは、その生成が主にフェージディスプレイ、相互作用トラップ、またはハイブリッド選択等の実験によるプロセスからもたらされる天然には見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第5,789,538号、米国特許第5,925,523号、米国特許第6,007,988号、米国特許第6,013,453号、米国特許第6,200,759号、国際公開第WO95/19431号、同第WO96/06166号、同第WO98/53057号、同第WO98/54311号、同第WO00/27878号、同第WO01/60970号、同第WO01/88197号、同第WO02/099084号、および米国公開第20110301073号を参照されたい。

40

【0046】

「組換え」とは、2つのポリヌクレオチド間における遺伝子情報の交換のプロセスを指す。本開示の目的のために、「相同組換え(HR)」とは、例えば、相同組換え修復機構を介して細胞における二本鎖切断(double-strand break)の修復中に生じるような交換の特殊な形態を指す。このプロセスは、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、「標的」分子(すなわち、二本鎖切断を経験した分子)の鋳型修復のために「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝子情報の伝達をもたらすことから、「非交叉遺伝子変換」または「ショートトラクト(short tract)遺伝子変換」として広く知られている。任意の特定の理論によって拘束されることを望むものではないが、

50

そのような伝達は、切断された標的 (broken target) とドナーとの間に形成するヘテロ二重鎖DNAのミスマッチ修正、および/または標的の一部になる遺伝子情報を再合成するためにドナーが使用される「合成依存的鎖アニーリング (synthetic is-dependent strand annealing)」、および/または関連プロセスを含み得る。そのような特殊なHRは、多くの場合、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部またはすべてが標的ポリヌクレオチドに組み込まれるように、標的分子の配列の改変をもたらす。

【0047】

本開示の方法において、本明細書に記載の1つ以上の標的化されたヌクレアーゼは、標的配列 (例えば、細胞クロマチン) の所定の部位で二本鎖切断を生じ、この切断領域内のヌクレオチド配列と相同性を有する「ドナー」ポリヌクレオチドが細胞に導入され得る。二本鎖切断の存在は、ドナー配列の組み込みを促進することが示されている。ドナー配列は、物理的に組み込まれ得るか、またはあるいは、ドナーポリヌクレオチドは、相同組換えによる切断の修復用の鋳型として使用され、その結果、ドナーにおいて見られるようなヌクレオチド配列のすべてまたは一部を細胞クロマチンに導入する。したがって、細胞クロマチン内の第1の配列を改変することができ、ある実施形態において、ドナーポリヌクレオチドに存在する配列に変換することができる。したがって、「置き換える (replace)」または「置き換え (replacement)」という用語の使用が、あるヌクレオチド配列の、別のヌクレオチド配列による置き換え (すなわち、情報の意味において、配列の置き換え) を表し、かつあるポリヌクレオチドの別のポリヌクレオチドによる物理的または化学的置き換えは必ずしも必要としないことが理解され得る。

【0048】

本明細書に記載の方法のいずれかにおいて、ジンクフィンガーまたはTALENタンパク質のさらなる対が、細胞内のさらなる標的部位のさらなる二本鎖切断 (double-stranded cleavage) のために使用され得る。

【0049】

細胞クロマチンにおける目的とする領域内の配列の標的組換えおよび/または置き換えおよび/または改変のための方法のある実施形態において、染色体配列は、外因性「ドナー」ヌクレオチド配列との相同組換えによって改変される。切断領域に対する配列相同性が存在する場合、そのような相同組換えは、細胞クロマチンにおける二本鎖切断の存在によって促進される。

【0050】

本明細書に記載の方法のいずれかにおいて、第1のヌクレオチド配列 (「ドナー配列」) は、目的とする領域のゲノム配列と相同であるが同一ではない配列を含み得、それによって、相同組換えを促進して目的とする領域内に非同配列を挿入する。したがって、ある実施形態において、目的とする領域内の配列と相同であるドナー配列の一部は、置き換えられるゲノム配列に約80~99% (またはそれらの間の任意の整数) の配列同一性を示す。他の実施形態では、例えば、100を超える連続した塩基対のドナー配列とゲノム配列との間で1つのヌクレオチドのみが異なる場合、ドナー配列とゲノム配列との間の相同性は99%よりも高い。ある場合において、新しい配列が目的とする領域に導入されるように、ドナー配列の非同部分は、目的とする領域に存在しない配列を含み得る。これらの例において、非同配列は、概して、50~1,000個の塩基対 (もしくはそれらの間の任意の整数値) または目的とする領域内の配列と相同もしくは同一である1,000を超える任意の数の塩基対の配列が隣接している。他の実施形態において、ドナー配列は、第1の配列と非同であり、非同組換え機構によってゲノムに挿入される。

【0051】

本明細書に記載の方法のいずれかは、目的とする遺伝子 (複数可) の発現を妨害するドナー配列の標的組み込みによる細胞における1つ以上の標的配列の部分的または完全な不活性化のために使用され得る。部分的または完全に不活性化された遺伝子を有する細胞系も提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

さらに、本明細書に記載の標的組み込みの方法を用いて、1つ以上の外因性配列を組み込むこともできる。外因性核酸配列は、例えば、1つ以上の遺伝子もしくはcDNA分子、または任意の種類のコッド配列もしくは非コード配列、ならびに1つ以上の制御エレメント（例えば、プロモーター）を含み得る。加えて、外因性核酸配列は、1つ以上のRNA分子（例えば、スモールヘアピンRNA（shRNA）、阻害RNA（RNAi）、マイクロRNA（miRNA）等）を生成し得る。

【 0 0 5 3 】

「切断（cleavage）」とは、DNA分子の共有結合の骨格の切断（breakage）を指す。切断は、リン酸ジエステル結合の酵素加水分解または化学的加水分解を含むが、これらに限定されない様々な方法によって開始され得る。一本鎖切断も二本鎖切断もいずれも可能であり、二本鎖切断は、2つのはっきりと異なる一本鎖切断事象の結果として生じ得る。DNA切断は、平滑末端または付着末端のいずれかの生成をもたらし得る。ある実施形態において、融合ポリペプチドは、標的化二本鎖DNA切断に用いられる。

10

【 0 0 5 4 】

「切断ハーフドメイン」は、第2のポリペプチド（同一または異なる）とともに、切断活性（好ましくは、二本鎖切断活性）を有する複合体を形成するポリペプチド配列である。「第1および第2の切断ハーフドメイン」、「+および-切断ハーフドメイン」、ならびに「右および左切断ハーフドメイン」という用語は、二量体化する切断ハーフドメインの対を指すために交換可能に使用される。

20

【 0 0 5 5 】

「操作された切断ハーフドメイン」は、別の切断ハーフドメイン（例えば、別の操作された切断ハーフドメイン）を有する偏性ヘテロ二量体を形成するように修飾された切断ハーフドメインである。参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第2005/0064474号、同第2007/0218528号、同第2008/0131962号、および同第2011/0201055号も参照されたい。

【 0 0 5 6 】

「配列」という用語は、任意の長さのヌクレオチド配列を指し、DNAまたはRNAであってもよく、線状、環状、または分岐状であってもよく、一本鎖または二本鎖のいずれかであってもよい。「ドナー配列」という用語は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、任意の長さであってもよく、例えば、2~10,000ヌクレオチド長（またはそれらの間もしくはそれらを超える任意の整数値）、好ましくは、約100~1,000ヌクレオチド長（またはそれらの間の任意の整数）、より好ましくは、約200~500ヌクレオチド長であってもよい。

30

【 0 0 5 7 】

「疾患関連遺伝子」は、単一遺伝子疾患において幾分欠陥のあるものである。単一遺伝子疾患の非限定的な例としては、重症複合免疫不全症、嚢胞性線維症、リソソーム貯蔵疾患（例えば、ゴーシェ病、ハーラー病、ハンター病、ファブリー病、ニーマン・ピック病、テイ・サックス病（Tay-Sachs）等）、鎌状赤血球貧血、およびサラセミアが挙げられる。

40

【 0 0 5 8 】

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主にDNA、ならびにヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。真核細胞クロマチンの大半は、ヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、ヒストンH2A、H2B、H3、およびH4をそれぞれ2つ含む八量体と会合した約150個の塩基対のDNAを含み、（生物に応じて多様な長さの）リンカーDNAは、ヌクレオソームコアの間に広がって存在する。ヒストンH1の分子は、概して、リンカーDNAと会合している。本開示の目的のために、「クロマチン」という用語は、すべての種類の細胞核タンパク質（原核および真核の両方）を包含することを意味する。細胞ク

50

ロマチンは、染色体クロマチンおよびエピソームクロマチンの両方を含む。

【0059】

「染色体」は、細胞のゲノムのすべてまたは一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、多くの場合、その核型を特徴とし、これは、この細胞のゲノムを含むすべての染色体の集合である。細胞のゲノムは、1つ以上の染色体を含み得る。

【0060】

「エピソーム」は、複製核酸、核タンパク質複合体、または細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む他の構造物である。エピソームの例として、プラスミドおよびあるウイルスゲノムが挙げられる。

【0061】

「標的部位」または「標的配列」は、結合分子が結合する核酸の一部を定義する核酸配列であるが、但し、結合に十分な条件が存在することを条件とする。

【0062】

「外因性」分子は、通常は細胞に存在しないが、1つ以上の遺伝学的方法、生化学的方法、または他の方法によって細胞内に導入され得る分子である。「細胞における通常の存在」については、細胞の特定の発達段階および環境条件に対して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生の間にのみ存在する分子は、成人筋肉細胞に対して外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、非熱ショック細胞に対して外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全型内因性分子の機能バージョン、または正常機能型内因性分子の機能不全バージョンを含み得る。

【0063】

外因性分子は、とりわけ、小分子（コンビナトリアルケミストリープロセスによって生成される小分子等）、または高分子（タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上記の分子の任意の修飾誘導体）、または上記の分子のうちの1つ以上を含む任意の複合体であり得る。核酸は、DNAおよびRNAを含み、一本鎖または二本鎖であってもよく、線状、分岐状、または環状であってもよく、任意の長さであってもよい。核酸には、二重鎖を形成することができる核酸、ならびに三重鎖形成核酸が含まれる。例えば、米国特許第5,176,996号および同第5,422,251号を参照されたい。タンパク質には、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、およびヘリカーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【0064】

外因性分子は、内因性分子と同一の種類の子、例えば、外因性タンパク質または核酸であってもよい。例えば、外因性核酸は、感染ウイルスゲノム、細胞に導入されるプラスミドもしくはエピソーム、または通常は細胞に存在しない染色体を含み得る。外因性分子を細胞に導入するための方法は、当業者に既知であり、脂質媒介導入（すなわち、中性脂質および陽イオン性脂質を含むリポソーム）、電気穿孔、直接注入、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介導入、およびウイルスベクター媒介導入を含むが、これらに限定されない。外因性分子は、内因性分子と同一の種類の子でもあり得るが、細胞が由来するものとは異なる種に由来し得る。例えば、ヒト核酸配列は、本来はマウスまたはハムスターに由来する細胞系に導入され得る。

【0065】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下で特定の発達段階にある特定の細胞に通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、クロロプラスト、もしくは他の細胞小器官のゲノム、または天然に存在するエピソーム核酸を含み得る。さらなる内因性分子は、タンパク質、例えば、転写因子および酵素を含み得る。

【0066】

「融合」分子は、2つ以上のサブユニット分子が好ましくは共有結合的に連結した分子

10

20

30

40

50

である。サブユニット分子は、同一の化学的種類の分子であり得るか、または異なる化学的種類の分子であり得る。第1の種類の融合分子の例として、融合タンパク質（例えば、ZFPまたはTALE DNA結合ドメインと1つ以上の活性化ドメインとの間の融合物）および融合核酸（例えば、上記の融合タンパク質をコードする核酸）が挙げられるが、これらに限定されない。第2の種類の融合分子の例として、三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝結合剤と核酸との間の融合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0067】

細胞における融合タンパク質の発現は、融合タンパク質の細胞への送達から、または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの細胞への送達によって生じ得、ここで、ポリヌクレオチドが転写され、転写物が翻訳されて、融合タンパク質を生成する。トランススプライシング、ポリペプチド切断、およびポリペプチド連結も、細胞におけるタンパク質の発現に関与し得る。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを細胞に送達するための方法は、本開示の他の個所で示される。

10

【0068】

本開示の目的のために、「遺伝子」は、遺伝子産物（以下を参照のこと）をコードするDNA領域、ならびに遺伝子産物の産生を調節するすべてのDNA領域（そのような調節配列がコード配列および/または転写配列に隣接しているか否かに関わらず）を含む。したがって、遺伝子は、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列（リボソーム結合部位および内部リボソーム進入部位等）、エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス結合部位、および遺伝子座制御領域を含むが、必ずしもこれらに限定されない。

20

【0069】

「遺伝子発現」とは、遺伝子内に含まれる情報の遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA、もしくは任意の他の種類のRNA）、またはmRNAの翻訳によって産生されるタンパク質であり得る。遺伝子産物は、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集等のプロセスによって修飾されたRNA、ならびに、例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADPリボシル化、ミリスチル化（myristylation）、およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質も含む。

30

【0070】

遺伝子発現の「調整（modulation）」は、遺伝子の活性の変化を指す。発現の調整は、遺伝子活性化および遺伝子抑制を含み得るが、これらに限定されない。ゲノム編集（例えば、切断、改変、不活性化、ランダム変異）を用いて発現を調整することができる。遺伝子の不活性化とは、本明細書に記載のZFPまたはTALENを含まない細胞と比較して遺伝子発現における任意の低下を指す。したがって、遺伝子の不活性化は、部分的または完全であり得る。

【0071】

「目的とする領域」は、細胞クロマチンの任意の領域であり、例えば、遺伝子、または遺伝子内もしくは遺伝子に隣接する非コード配列等であり、そこで外因性分子に結合することが望ましい。結合は、標的DNA切断および/または標的組換えの目的のためであり得る。目的とする領域は、例えば、染色体、エピソーム、細胞小器官のゲノム（例えば、ミトコンドリア、クロロプラスト）、または感染ウイルスゲノムに存在し得る。目的とする領域は、遺伝子のコード領域内、転写された非コード領域（例えば、リーダー配列、トレーラー配列、もしくはイントロン等）内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内に存在し得る。目的とする領域は、単一のヌクレオチド対と同程度に小さいか、または最大2,000ヌクレオチド対の長さであるか、またはヌクレオチド対の任意の整数値であり得る。

40

【0072】

50

「真核」細胞には、真菌細胞（酵母等）、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞（例えば、T細胞）が含まれるが、これらに限定されない。

【0073】

「赤血球（Red Blood Cell）」（RBC）または赤血球（erythrocyte）は、造血幹細胞に由来する最終分化細胞である。これらはヌクレアーゼとほとんどの細胞オルガネラを欠いている。RBCはヘモグロビンを含有しており、肺から末梢組織に酸素を運ぶ。実際、個々のRBCの33%はヘモグロビンである。さらに、RBCは、組織から代謝中の細胞によって産生されるCO₂を運び、肺に戻り呼吸の間に放出する。RBCは、血液低酸素に反応して骨髄で産生され、それは、腎臓によるエリトロポイエチン（EPO）の放出によって媒介される。EPOは、前赤芽球数を増加させ、完全なRBC成熟に必要なとされる時間を短縮する。約120日後、RBCには核または他の再生機能が含まれていないことから、これらの細胞は、肝臓、脾臓およびリンパ節のマクロファージの食細胞活動によるか（およそ90%）、血漿での溶血によって（およそ10%）循環から除去される。マクロファージによる貪食後、RBCの化学成分は、リソソーム酵素の作用によりマクロファージの液胞内で分解される。

10

【0074】

「分泌組織」は、典型的には上皮に由来するいくつかのタイプのルーメンに個別の細胞から産物を分泌する、動物内の組織である。胃腸管に局在している分泌組織の例としては、腸、膵臓および胆嚢を覆っている細胞が挙げられる。他の分泌組織としては、肝臓、眼に関連する組織ならびに粘膜、例えば、唾液腺、乳腺、前立腺、下垂体および内分泌系の他のメンバーが挙げられる。さらに、分泌組織としては、分泌可能な組織タイプの個々の細胞が挙げられる。

20

【0075】

「作用的連結」および「作用的に連結した」（または「作動可能に連結した」という用語は、2つ以上の構成要素（配列エレメント等）の並列に関して交換可能に使用され、これらの構成要素は、両方の構成要素が正常に機能し、構成要素のうちの少なくとも1つが他の構成要素のうちの少なくとも1つに及ぼす機能を媒介し得ることを可能にするように配置される。例として、プロモーター等の転写調節配列は、その転写調節配列が1つ以上の転写調節因子の存在または不在に反応してコード配列の転写レベルを制御する場合にコード配列に作用的に連結される。転写調節配列は、概して、コード配列とシスに作用的に連結されるが、それに直接隣接している必要はない。例えば、エンハンサーは、たとえそれらが隣接していなくても、コード配列に作用的に連結される転写調節配列である。

30

【0076】

融合ポリペプチドに関して、「作用的に連結した」という用語は、構成要素の各々が、そのように連結されていない場合に実行したであろう機能と同一の機能を、他の構成要素と連結して実行するという事実を指し得る。例えば、ZFPまたはTALE DNA結合ドメインが活性化ドメインに融合された融合ポリペプチドに関して、融合ポリペプチドにおいて、ZFPまたはTALE DNA結合ドメイン部分とその標的部位および/またはその結合部位に結合することができる場合、ZFPまたはTALE DNA結合ドメインおよび活性化ドメインが作用的に連結している一方で、活性化ドメインは、遺伝子発現を上方制御することができる。ZFPまたはTALE DNA結合ドメインが切断ドメインに融合される融合ポリペプチドである場合、融合ポリペプチドにおいて、ZFPまたはTALE DNA結合ドメイン部分とその標的部位および/またはその結合部位に結合することができる場合、ZFPまたはTALE DNA結合ドメインおよび切断ドメインが作用的に連結している一方で、切断ドメインは、標的部位の近傍でDNAを切断することができる。

40

【0077】

タンパク質、ポリペプチド、または核酸の「機能的断片」は、その配列が、完全長のタンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一ではないが、完全長のタンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一の機能を保持するタンパク質、ポリペプチド、または核酸である

50

。機能的断片は、対応する天然の分子よりも多いか、少ないか、もしくは同一の数の残基を有することができ、かつ/または1つ以上のアミノ酸もしくはヌクレオチド置換を含有することができる。核酸の機能(例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力)を決定するための方法は、当技術分野において周知である。同様に、タンパク質の機能を決定するための方法も周知である。例えば、ポリペプチドのDNA結合機能は、例えば、フィルター結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、または免疫沈降アッセイによって決定することができる。DNA切断は、ゲル電気泳動によって評価することができる。上記のA u s u b e lら(1989) Nature 340:245-246、米国特許第5,585,245号およびPCT国際公開第WO98/44350号を参照されたい。

10

【0078】

「ベクター」は、遺伝子配列を標的細胞に導入することができる。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、および「遺伝子導入ベクター」は、目的とする遺伝子の発現を指示することができ、かつ遺伝子配列を標的細胞に導入し得る任意の核酸構築物を意味する。したがって、この用語は、クローニング、および発現ベヒクル、ならびに組み込みベクターを包含する。

【0079】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」とは、日常的なアッセイにおいて必ずしも測定されないが、好ましくは容易に測定されるタンパク質産物を産生する任意の配列を指す。好適なレポーター遺伝子には、抗生物質耐性(例えば、アンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、G418耐性、ピューロマイシン耐性)を媒介するタンパク質をコードする配列、有色または蛍光または発光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質、高感度緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ)をコードする配列、および強化された細胞増殖および/または遺伝子増幅を媒介するタンパク質(例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素)が含まれるが、これらに限定されない。エピトープタグは、例えば、FLAG、His、myc、Tap、HA、または任意の検出可能なアミノ酸配列の1つ以上のコピーを含む。「発現タグ」は、目的とする遺伝子の発現を監視するために所望の遺伝子配列に作動可能に連結され得るレポーターをコードする配列を含む。

20

30

【0080】

「被験体」および「患者」という用語は交換可能に使用され、哺乳動物、例えば、ヒト患者および非ヒト霊長類、ならびに、実験動物、例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウスおよび他の動物を指す。したがって、本明細書で使用する場合の用語「被験体」または「患者」とは、本発明の改変された細胞および/または本発明の改変された細胞によって産生されるタンパク質が投与され得る、任意の哺乳動物の患者または被験体を意味する。本発明の被験体としては、LSDの被験体が挙げられる。

【0081】

ヌクレアーゼ

本明細書には、導入遺伝子を挿入するための遺伝子の標的化に有用である組成物、特にヌクレアーゼ、例えば、アルブミン等のセーフハーバー遺伝子に特異的なヌクレアーゼが記載されている。ある実施形態において、ヌクレアーゼは天然に存在する。他の実施形態において、ヌクレアーゼは天然に存在しない、すなわち、DNA結合ドメインおよび/または切断ドメインにおいて操作されたものである。例えば、天然に存在するヌクレアーゼまたはヌクレアーゼ系のDNA結合ドメインは、選択された標的部位(例えば、同族の結合部位とは異なる部位に結合するように操作されたメガヌクレアーゼ、または操作された単鎖ガイドRNAを利用するCRISPR/Cas系)に結合するように改変され得る。他の実施形態において、ヌクレアーゼは、異種のDNA結合および切断ドメイン(例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ; TALEエフェクターヌクレアーゼ; 異種の切断ドメインを有するメガヌクレアーゼDNA結合ドメイン)を含む。

40

50

【 0 0 8 2 】

A . DNA 結合ドメイン

ある実施形態において、ヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）である。天然に存在するメガヌクレアーゼは、15～40個の塩基対切断部位を認識し、一般に、4つのファミリー、すなわち、LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cystボックスファミリー、およびHNHファミリーに分類される。例示のホーミングエンドヌクレアーゼには、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII、およびI-TevIIIが含まれる。これらの認識配列は既知である。米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Belfortら(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388、Dujonら(1989) *Gene* 82:115-118、Perlerら(1994) *Nucleic Acids Res.* 22,1125-1127、Jasin(1996) *Trends Genet.* 12:224-228、Gimbleら(1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180、Argastら(1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353、およびthe New England Biolabsカタログも参照されたい。

10

【 0 0 8 3 】

ある実施形態において、ヌクレアーゼは、操作された（天然には存在しない）ホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）を含む。I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevIIおよびI-TevIII等のホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼ認識配列が既知である。米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Belfortら(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388、Dujonら(1989) *Gene* 82:115-118、Perlerら(1994) *Nucleic Acids Res.* 22,1125-1127、Jasin(1996) *Trends Genet.* 12:224-228、Gimbleら(1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180、Argastら(1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353、およびthe New England Biolabsカタログも参照されたい。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合特異性は、非天然標的的部位に結合するように操作され得る。例えば、Chevalierら(2002) *Molec. Cell* 10:895-905、Epinatら(2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962、Ashworthら(2006) *Nature* 441:656-659、Paquesら(2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66、米国特許公開第20070117128号を参照されたい。ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、全体としてのヌクレアーゼという文脈において改変され得るか（すなわち、ヌクレアーゼが同族の切断ドメインを含むように）、または異種の切断ドメインに融合され得る。

20

30

40

【 0 0 8 4 】

他の実施形態では、DNA結合ドメインは、天然に存在するか、または操作された（天然には存在しない）TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第20110301073号を参照されたい。キサントモナス属の植物病原性細菌は、重要な作物に多くの病害を引き起こすことで知られている。キサントモナスの病原性は、25個を超える異なるエフェクタータンパク質を植物細胞に注入する保存III型分泌(T3S)系に依存する。これらの注入されるタンパク質の中には、植物の転写活性化因子を模倣し、かつ植物のトランスクリプトームを操る転写活性化因子様エフェクター(TALE)がある(Kayら(2007) *Sc*

50

ience 318:648-651を参照のこと)。これらのタンパク質は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含む。最もよく特徴付けられたT A L Eのうちの1つに、キサントモナス・カンペストリス病原型ベシカトリア由来のA v r B s 3がある(Bonasら(1989)Mol Gen Genet 218:127-136および国際公開第WO2010079430号を参照のこと)。T A L Eは、タンデム反復の集中ドメイン(centralized domain)を含み、それぞれの反復は、これらのタンパク質のDNA結合特異性に重要な約34個のアミノ酸を含有する。加えて、これらは、核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含む(概説については、Schornack S,ら(2006)J Plant Physiol 163(3):256-272を参照のこと)。加えて、植物病原性細菌である青枯病菌において、brg 11およびhpx17と称される2つの遺伝子は、青枯病菌の次亜種1株GMI1000および次亜種4株RS1000において、キサントモナスのA v r B s 3ファミリーと相同であることが見出されている(Heuerら(2007)Appl and Env Micro 73(13):4379-4384を参照のこと)。これらの遺伝子は、ヌクレオチド配列において互いに98.9%同一であるが、hpx17の反復ドメインにおいて1,575bpの欠失分だけ異なる。しかしながら、両方の遺伝子産物は、キサントモナスのA v r B s 3ファミリータンパク質と40%未満の配列同一性を有する。

【0085】

したがって、一部の実施形態において、標的遺伝子座(例えば、アルブミンまたは他のセーフハーバー)の標的部位に結合するDNA結合ドメインは、植物病原菌Xanthomonas(Bochら、(2009年)Science 326巻:1509~1512頁、およびMoscouおよびBogdanove、(2009年)Science 326巻:1501頁を参照のこと)と、Ralstonia(Heuerら(2007年)Applied and Environmental Microbiology 73巻(13号):4379~4384頁)を参照のこと);米国特許公開第20110301073号および同第20110145940号に由来するものに類似のT A L Eフェクター由来の操作されたドメインである。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国出願第13/624,193号および同第13/624,217号のアルブミンT A L E Nを参照されたい。

【0086】

ある実施形態において、DNA結合ドメインは、ジンクフィンガータンパク質(例えば、アルブミンまたは他のセーフハーバー遺伝子内の標的部位に結合するジンクフィンガータンパク質)を含む。好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、選択した標的部位に結合するように操作されるという点で非天然である。例えば、例えば、Beerliら(2002)Nature Biotechnol. 20:135-141、Paboら(2001)Ann. Rev. Biochem. 70:313-340、Isalanら(2001)Nature Biotechnol. 19:656-660、Segalら(2001)Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637、Chooら(2000)Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416、米国特許第6,453,242号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,503,717号、同第6,689,558号、同第7,030,215号、同第6,794,136号、同第7,067,317号、同第7,262,054号、同第7,070,934号、同第7,361,635号、同第7,253,273号、および米国特許公開第2005/0064474号、同第2007/0218528号、同第2005/0267061号を参照されたく、これらすべては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0087】

操作されたジンクフィンガー結合ドメインまたはT A L Eドメインは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質と比較して新規の結合特異性を有し得る。操作方法には、合理的設計および種々の種類の選択が含まれるが、これらに限定されない。合理的設計には

10

20

30

40

50

、例えば、三重鎖 (t r i p l e t) (または四重鎖 (q u a d r u p l e t)) ヌクレオチド配列および個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースの使用が含まれ、各三重鎖または四重鎖ヌクレオチド配列は、特定の三重鎖または四重鎖配列に結合するジンクフィンガーの1つ以上のアミノ酸配列と会合している。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、共有の米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたい。

【0088】

ファージディスプレイおよびツーマイブリッドシステムを含む例示の選択方法は、米国特許第5,789,538号、同第925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,410,248号、同第6,140,466号、同第6,200,759号、および同第6,242,568号、ならびに国際公開第WO98/37186号、同第WO98/53057号、同第WO00/27878号、同第WO01/88197号、および英国特許第2,338,237号に開示されている。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、共有の国際公開第02/077227号に記載されている。

10

【0089】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、DNAドメイン(例えば、マルチフィンガージンクフィンガータンパク質またはTALドメイン)は、例えば、5アミノ酸長以上のリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を用いてともに連結され得る。例示の6アミノ酸長以上のリンカー配列については、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号も参照されたい。本明細書に記載のDNA結合タンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、共有の国際公開第WO02/077227号に記載されている。

20

【0090】

標的部位の選択、DNA結合ドメイン、および融合タンパク質(およびそれをコードするポリヌクレオチド)を設計および構築するための方法は、当業者に知られており、米国特許第6,140,0815号、同第789,538号、同第6,453,242号、同第6,534,261号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,200,759号、国際公開第WO95/19431号、同第WO96/06166号、同第WO98/53057号、同第WO98/54311号、同第WO00/27878号、同第WO01/60970号、同第WO01/88197号、同第WO02/099084号、同第WO98/53058号、同第WO98/53059号、同第WO98/53060号、同第WO02/016536号、および同第WO03/016496、ならびに米国公開第20110301073号に詳細に記載されている。

30

【0091】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示されるように、DNA結合ドメイン(例えば、マルチフィンガージンクフィンガータンパク質)は、例えば、5アミノ酸長以上のリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を用いてともに連結され得る。例示の6アミノ酸長以上のリンカー配列については、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号も参照されたい。本明細書に記載のタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。

40

【0092】

B. 切断ドメイン

任意の好適な切断ドメインをDNA結合ドメインに作用的に連結して、ヌクレアーゼを形成することができる。例えば、ZFP DNA結合ドメインをヌクレアーゼドメインに融合させてZFNを生じさせており、これは、その操作された(ZFP)DNA結合ドメ

50

インを介してその意図する核酸標的を認識し、かつヌクレアーゼ活性を介してZFP結合部位付近でのDNAの切断を引き起こすことができる機能的実体である。例えば、Kimら(1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(3):1156-1160を参照されたい。最近になって、ZFNは、様々な生物におけるゲノム修飾のために使用されている。例えば、米国特許公開第20030232410号、同第20050208489号、同第20050026157号、同第20050064474号、同第20060188987号、同第20060063231号、および国際公開第WO07/014275号を参照されたい。同様に、TALE DNA結合ドメインをヌクレアーゼドメインに融合させてTALENを生じさせている。例えば、米国公開第20110301073号を参照されたい。

10

【0093】

上記のように、切断ドメインは、DNA結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ由来の切断ドメイン、またはTALEN DNA結合ドメインおよび切断ドメイン、またはメガヌクレアーゼDNA結合ドメインおよび異なるヌクレアーゼ由来の切断ドメインに対して異種であり得る。異種切断ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得られ得る。切断ドメインが由来し得る例示のエンドヌクレアーゼには、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼが含まれるが、これらに限定されない。例えば、2002-2003カタログ、New England Biolabs, Beverly, MA、およびBelfortら(1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388を

20

参照されたい。DNAを切断するさらなる酵素が知られている(例えば、S1ヌクレアーゼ、マングベーンヌクレアーゼ、膵臓DNase I、マイクロコッカスヌクレアーゼ、酵母HOエンドヌクレアーゼがあり、Linnら(編) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 1993も参照のこと)。これらの酵素(またはその機能的断片)のうちの1つ以上を切断ドメインおよび切断ハーフドメインの源として用いることができる。

【0094】

同様に、上記のように、切断活性のために二量体化を必要とする切断ハーフドメインは、任意のヌクレアーゼまたはその一部に由来し得る。概して、融合タンパク質が切断ハーフドメインを含む場合、2つの融合タンパク質が切断に必要とされる。あるいは、2つの切断ハーフドメインを含む単一のタンパク質が用いられ得る。2つの切断ハーフドメインは同一のエンドヌクレアーゼ(もしくはその機能的断片)に由来し得るか、または各切断ハーフドメインが異なるエンドヌクレアーゼ(もしくはその機能的断片)に由来し得る。加えて、2つの融合タンパク質のそれらの各標的部位への結合が、互いに空間的定位置でこれらの切断ハーフドメインを配置して、例えば二量体化によって切断ハーフドメインが機能的切断ドメインを形成することを可能にするように、2つの融合タンパク質の標的部位は、好ましくは、互いに対して配置される。したがって、ある実施形態において、標的部位の近端は、5~8個のヌクレオチドまたは15~18個のヌクレオチド分だけ離れている。しかしながら、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対は、2つの標的部位の間に介在してもよい(例えば、2~50個以上のヌクレオチド対)。概して、切断部位は、標的部位の間に存在する。

30

40

【0095】

制限エンドヌクレアーゼ(制限酵素)は、多くの種に存在し、DNAに配列特異的に結合し(認識部位で)、かつ結合部位でまたはその付近でDNAを切断することができる。ある制限酵素(例えば、IIS型)は、認識部位から除去された部位でDNAを切断し、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを有する。例えば、IIS型酵素Fok Iは、一方の鎖上でその認識部位から9ヌクレオチド離れた位置で、他方の鎖上でその認識部位から13ヌクレオチド離れた位置でDNAの二本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許5,356,802号、同第5,436,150号、および同第5,487,994、ならびにLiら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4

50

275-4279、Liら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768、Kimら(1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887、Kimら(1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982を参照されたい。したがって、一実施形態において、融合タンパク質は、少なくとも1つのIIS型制限酵素由来の切断ドメイン(または切断ハーフドメイン)および1つ以上のジンクフィンガー結合ドメイン(操作され得るか否かに関わらず)を含む。

【0096】

その切断ドメインが結合ドメインから分離可能である例示のIIS型制限酵素は、Fok Iである。この特定の酵素は、二量体として活性である。Bitinaiteら(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570-10,575。したがって、本開示の目的のために、開示される融合タンパク質において使用されるFok I酵素の一部は、切断ハーフドメインと見なされる。したがって、ジンクフィンガー-Fok I融合物を用いた細胞配列の標的二本鎖切断および/または標的置き換えのために、それぞれFok I切断ハーフドメインを含む2つの融合タンパク質を用いて、触媒的に活性な切断ドメインを再構築することができる。あるいは、DNA結合ドメインおよび2つのFok I切断ハーフドメインを含む単一のポリペプチド分子を用いることもできる。

10

【0097】

切断ドメインまたは切断ハーフドメインは、切断活性を保持するか、または多量体化(例えば、二量体化)して機能的切断ドメインを形成する能力を保持するタンパク質の任意の部分であり得る。

20

【0098】

例示のIIS型制限酵素は、その全体が本明細書に組み込まれる国際公開第WO07/014275号に記載されている。さらなる制限酵素も分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを含み、これらは、本開示によって企図される。例えば、Robertsonら(2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420を参照されたい。

【0099】

ある実施形態において、切断ドメインは、例えば、すべての開示が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第20050064474号、同第20060188987号、および同第20080131962号に記載されるように、ホモ二量体化を最小限に抑えるか、または阻止する1つ以上の操作された切断ハーフドメイン(二量体化ドメイン変異体とも称される)を含む。Fok Iの446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537、および538位のアミノ酸残基は、すべてFok I切断ハーフドメインの二量体化に影響を与える標的である。

30

【0100】

偏性ヘテロ二量体を形成するFok Iの例示の操作された切断ハーフドメインには、第1の切断ハーフドメインがFok Iの490位および538位のアミノ酸残基に変異を含み、かつ第2の切断ハーフドメインが486位および499位のアミノ酸残基に変異を含む対が含まれる。

40

【0101】

したがって、一実施形態において、490位における変異は、Glu(E)をLys(K)で置き換え、538位における変異は、Iso(I)をLys(K)で置き換え、486位における変異は、Gln(Q)をGlu(E)で置き換え、499位における変異は、Iso(I)をLys(K)で置き換える。具体的には、本明細書に記載の操作された切断ハーフドメインを1つの切断ハーフドメインにおいて490位での変異(E-K)および538位での変異(I-K)によって調製して「E490K:I538K」と称される操作された切断ハーフドメインを生成し、別の切断ハーフドメインにおいて486位

50

での変異 (Q E) および 499 での変異 (I L) によって調製して「Q486E : I499L」と称される操作された切断ハーフドメインを生成した。本明細書に記載の操作された切断ハーフドメインは、異常な切断が最小限に抑えられるか、または無効にされる偏性ヘテロ二量体変異体である。例えば、米国特許公開第 2008/0131962 号を参照されたく、この開示は、参照によりその全体がすべての目的のために組み込まれる。

【0102】

ある実施形態において、操作された切断ハーフドメインは、486、499、および 496 位 (野生型 FokI に対して番号付けられた) での変異、例えば、486 位の野生型 Glu (Q) 残基を Glu (E) 残基で、499 位の野生型 Iso (I) 残基を Leu (L) 残基で、かつ 496 位の野生型 Asn (N) 残基を Asp (D) または Glu (E) 残基で置き換える (それぞれ、「ELD」および「ELE」ドメインとも称される) 変異を含む。他の実施形態において、操作された切断ハーフドメインは、490、538、および 537 位 (野生型 FokI に対して番号付けられた) での変異、例えば、490 位の野生型 Glu (E) 残基を Lys (K) 残基で、538 位の野生型 Iso (I) 残基を Lys (K) 残基で、かつ 537 位の野生型 His (H) 残基を Lys (K) 残基または Arg (R) 残基で置き換える (それぞれ、「KKK」および「KKR」ドメインとも称される) 変異を含む。他の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、490 および 537 位 (野生型 FokI に対する番号付け) での変異、例えば、490 位の野生型 Glu (E) 残基を Lys (K) 残基で、かつ 537 位の野生型 His (H) 残基を Lys (K) 残基または Arg (R) 残基で置き換える (それぞれ、「KIK」および「KIR」ドメインとも称される) 変異を含む (米国特許公開第 20110201055 号を参照のこと)。本明細書に記載の操作された切断ハーフドメインは任意の好適な方法を用いて、例えば、米国特許公開第 20050064474 号、同第 20080131962 号、および同第 20110201055 号に記載の野生型切断ハーフドメイン (FokI) の部位特異的変異誘発によって調製され得る。

【0103】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「スプリット酵素」技術を用いて、核酸標的部位においてインピボで組み立てられ得る (例えば、米国特許公開 20090068164 号を参照のこと)。そのようなスプリット酵素の構成要素は、別個の発現構築物のいずれかで発現され得るか、または個々の構成要素が例えば自己切断 2A ペプチドもしくは IRES 配列によって分離される 1 つのオープンリーディングフレームにおいて連結され得る。構成要素は、個々のジンクフィンガー結合ドメインであり得るか、またはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであり得る。

【0104】

ヌクレアーゼは、例えば、国際公開第 WO2009/042163 号および同第 20090068164 号に記載の酵母ベースの染色体系において、使用前に活性についてスクリーニングすることができる。ヌクレアーゼ発現構築物は、当技術分野で既知の方法を用いて容易に設計することができる。例えば、米国特許公開第 20030232410 号、同第 20050208489 号、同第 20050026157 号、同第 20050064474 号、同第 20060188987 号、同第 20060063231 号、および国際公開第 WO07/014275 号を参照されたい。ヌクレアーゼの発現は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば、ラフィノースおよび/またはガラクトースの存在下で活性化 (脱抑制) され、かつグルコースの存在下で抑制されるガラクトキナーゼプロモーターの制御下にある。

【0105】

CRISPR (規則的な間隔でクラスター化された短鎖反復回文配列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)) / Cas (CRISPR 関連) ヌクレアーゼ系は、ゲノム操作で使用可能なバクテリア系に基づいている、近年操作されたヌクレアーゼ系である。これは、多数の細菌および古細菌の獲得免疫応答の一部に基づいている。ウイルスまたはプラ

10

20

30

40

50

スミドが細菌に侵入した場合、侵入物のDNAセグメントは「免疫」応答によってCRISPR RNA (crRNA) に変換される。次いで、このcrRNAは、tracrRNAと呼ばれる別のタイプのRNAと、部分的な相補性の領域を介して会合し、「プロトスペーサー」と呼ばれる標的DNA内のcrRNAに相同な領域にCas9ヌクレアーゼを誘導する。Cas9は、crRNA転写物内に含有されている20個のヌクレオチドのガイド配列によって特定される部位のDSBでDNAを切断し、平滑末端を生じる。Cas9は、部位特異的DNA認識と切断を行うためのcrRNAおよびtracrRNAの両方が必要である。この系は、現在、crRNAおよびtracrRNAを1つの分子へ合わせることができるよう操作されており(「単鎖ガイドRNA」)、単鎖ガイドRNAのcrRNAの同等部分が任意の所望配列を標的とするCas9ヌクレアーゼを誘導するように操作することもできる(Jinekら(2012年)Science 337巻、p. 816~821、Jinekら、(2013年)、eLife 2巻:e00471、およびDavid Segal、(2013年)eLife 2巻:e00563を参照のこと)。したがって、CRISPR/Cas系を操作してゲノム内の所望する標的でDSBを生じさせることができ、またDSBの修復は修復阻害剤を使用することによって影響を受け、エラーが起こりやすい修復の増加を招く可能性がある。

10

【0106】

標的部位

上で詳細に記載されるように、DNAドメインは、遺伝子座、例えば、アルブミンまたはセーフハーバー遺伝子における任意の選択した配列に結合するように操作され得る。操作されたDNA結合ドメインは、天然に存在するDNA結合ドメインと比較して新規の結合特異性を有し得る。操作方法には、合理的設計および種々の種類の選択が含まれるが、これらに限定されない。合理的設計は、例えば、三重鎖(または四重鎖)ヌクレオチド配列および個々の(例えば、ジンクフィンガー)アミノ酸配列を含むデータベースの使用を含み、各三重鎖または四重鎖ヌクレオチド配列は、特定の三重鎖または四重鎖配列に結合するDNA結合ドメインの1つ以上のアミノ酸配列と会合している。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、共有の米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたい。TALエフェクタードメインの合理的設計も実行され得る。例えば、米国特許公開第20110301073号を参照されたい。

20

【0107】

ファージディスプレイおよびツーハイブリッドシステムを含むDNA結合ドメインに適用可能な例示の選択方法は、米国特許第5,789,538号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,410,248号、同第6,140,466号、同第6,200,759号、および同第6,242,568号、ならびに国際公開第WO98/37186号、同第WO98/53057号、同第WO00/27878号、同第WO01/88197号、そして英国特許第GB2,338,237号に開示されている。

30

【0108】

標的部位の選択、ヌクレアーゼ、および融合タンパク質(およびそれをコードするポリヌクレオチド)を設計および構築するための方法は、当業者に知られており、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号および同第20060188987号に詳細に記載されている。

40

【0109】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示されるように、DNA結合ドメイン(例えば、マルチフィンガージンクフィンガータンパク質)は、例えば、5アミノ酸以上のリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を用いてともに連結され得る。例示の6アミノ酸長以上のリンカー配列については、例えば、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号を参照されたい。本明細書に記載のタンパク質は、タンパク質の個々のDNA結合ドメイン間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。米国公開第20110301073号も参照されたい。

50

【0110】

ドナー

上記のように、例えば、変異体遺伝子の修正のためまたは野生型遺伝子の発現の増大のための外因性配列（「ドナー配列」または「ドナー」とも称される）の挿入。ドナー配列は、典型的には、それが配置されるゲノム配列と同一ではないことは容易に明らかになる。ドナー配列は、目的とする位置で効率的なHDRを可能にするために、2つの相同性領域に隣接した非相同配列を含み得る。さらに、ドナー配列は、細胞クロマチン内の目的とする領域と相同ではない配列を含むベクター分子を含み得る。ドナー分子は、細胞クロマチンに対していくつかの不連続な相同性の領域を含み得る。例えば、通常は目的とする領域に存在しない配列の標的挿入の場合、この配列は、ドナー核酸分子に存在し得、目的とする領域内の配列に対して相同性の領域が隣接し得る。

10

【0111】

ドナーポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAであってもよく、線状または環状形態で細胞に導入され得る。線状形態で導入される場合、ドナー配列の末端は、当業者に既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ（*exonuclease*）分解から）保護され得る。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基は、線状分子の3'末端に付加され、かつ/または自己相補的オリゴヌクレオチドは、一方の末端もしくは両方の末端に連結される。例えば、Changら（1987）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4959-4963、Nehlsら（1996）*Science* 272:886-889を参照されたい。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するためのさらなる方法は、末端アミノ基（複数可）の付加、および修飾ヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、およびO-メチルリボースまたはデオキシリボース残基等の使用を含むが、これらに限定されない。

20

【0112】

ポリヌクレオチドは、例えば、複製起点、プロモーター、および抗生物質耐性をコードする遺伝子等のさらなる配列を有するベクター分子の一部として細胞に導入され得る。さらに、ドナーポリヌクレオチドは、裸の核酸として、リボソームもしくはポロキサマー等の作用物質（*agent*）との複合型の核酸として導入され得るか、またはウイルス（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、およびインテグラーゼ欠損レンチウイルス（*IDLV*））によって送達され得る。

30

【0113】

ドナーは、一般に、その発現が組み込み部位で内因性プロモーター、すなわち、ドナーが挿入される内因性遺伝子（例えば、高発現の、アルブミン、AAVS1、HPRT等）の発現を駆動するプロモーターによって駆動されるように挿入される。しかし、ドナーがプロモーターおよび/またはエンハンサー、例えば、構成的プロモーターまたは誘導性もしくは組織特異的プロモーターを含んでいてもよいことは明白である。

【0114】

ドナー分子は、内因性遺伝子の全部もしくは一部が発現されるか、または内因性遺伝子が全く発現されないように、内因性遺伝子に挿入させることができる。例えば、本明細書に記載の導入遺伝子は、内因性アルブミン配列の一部（リソソーム酵素をコードする導入遺伝子に対するN末端および/またはC末端）が発現されるか、内因性アルブミン配列が全く発現されないように、例えば、リソソーム配列をコードする導入遺伝子との融合物として、アルブミンまたは他の遺伝子座に挿入させることができる。他の実施形態において、導入遺伝子（例えば、アルブミンに対する等の追加のコード配列を有するか、または有していないもの）は、任意の内因性遺伝子座、例えば、セーフハーバー遺伝子座へ組み込まれる。例えば、米国特許公開第20080299580号；同第20080159996号および同第201000218264号を参照されたい。

40

【0115】

内因性配列（内因性、または導入遺伝子の一部）が導入遺伝子と共に発現される場合、

50

内因性配列（例えば、アルブミン等）は完全長の配列（野生型または変異型）または部分配列であり得る。好ましくは、内因性配列は機能性である。これらの完全長配列または部分配列（例えば、アルブミン）の機能の非限定的な例としては、導入遺伝子（例えば、治療用遺伝子）によって発現されるポリペプチドの血清半減期の延長および/またはキャリアとしての作用が挙げられる。

【0116】

さらに、発現に必要なではないが、外因性配列は転写調節配列または翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インシュレーター、内部リボソーム侵入部位、2Aペプチドおよび/またはポリアデニル化シグナルをコードする配列を挙げることできる。

【0117】

ある実施形態において、外因性配列（ドナー）は、目的とするタンパク質と、その融合パートナーとしての膜タンパク質の細胞外ドメインとの融合物を含み、細胞の表面に位置する融合タンパク質が得られる。これは、導入遺伝子によってコードされているタンパク質が血清中で潜在的に作用することを可能にする。LSDに対する処置の場合には、導入遺伝子融合物によってコードされている酵素は、細胞（例えば、RBC）の表面上のその位置から血清中に蓄積している代謝産物に作用することができる。さらに、分解の正常過程として、RBCが脾性マクロファージによって包み込まれる場合、マクロファージがその細胞を包み込む際に形成されるリソソームは、その酵素にとって天然で一層有利であるpHで、リソソーム内の高濃度の代謝産物に膜結合融合タンパク質を曝露する。潜在的な融合パートナーの非限定的な例を下記の表1に示す。

【0118】

【表1】

表1:潜在的な融合パートナーの例

名称	活性
バンド3	アニオントランスポーター、RBC膜表面タンパク質の25%以下を構成する。
アクアポリン1	水トランスポーター
Glut1	グルコースおよびL-デヒドロアスコルビン酸トランスポーター
Kidd抗原タンパク質	尿素トランスポーター
RhAG	ガストランスポーター
ATP1A1, ATP1B1	Na ⁺ /K ⁺ -ATPアーゼ
ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4	Ca ²⁺ -ATPアーゼ
NKCC1, NKCC2	Na ⁺ K ⁺ 2Cl ⁻ -コトランスポーター
SLC12A3	Na ⁺ -Cl ⁻ -コトランスポーター
SLC12A1, SLA12A2	Na-K-コトランスポーター
KCC1	K-Clコトランスポーター
KCNN4	ガルドスチャネル

【0119】

リソソーム貯蔵疾患は、典型的には、5つのクラスに分けられる。これらのクラスは、その疾患の具体的な例と共に下記の表2に示す。したがって、本明細書に記載のドナー分子は、限定するものではないが、表2に示すタンパク質をはじめとする、リソソーム貯蔵疾患のある被験体で欠損しているか不足している1つまたは複数の酵素をコードする配列を含み得る。

【 0 1 2 0 】

【 表 2 - 1 】

表2:リソソーム貯蔵疾患

1.グリカン分解の欠損			
タンパク質	疾患	疾患関連遺伝子	蓄積産物
I.糖タンパク質分解の欠損			
α -シアリダーゼ(ノイラミニダーゼ)	シアリドーシス	NEU1	シアリル化 (sialidated) グリコペプチドおよびオリゴサッカライド
カテプシンA	ガラクトシアリドーシス	CTSA	多糖類
リソソーム α -マンノシダーゼ	α -マンノシドーシス	MAN2B1	マンノースリッチ糖タンパク質およびオリゴサッカライド
リソソーム β -マンノシダーゼ	β -マンノシドーシス	MANBA	
グリコシルアスパラギナーゼ	アスパルチルグルコサミン尿症(Aspartylglucosaminuria)	AGA	グリコアスパラギン
α Lフコシダーゼ	フコシドーシス	FUCA1	フコース
α -N-アセチルグルコサミニダーゼ	サンフィリップ症候群B	NAGLU	グリコサミノグリカン
II.糖脂質分解の欠損			
A.GM1ガングリオシド			
β -ガラクトシダーゼ	GM1ガングリオシドーシス /MPS IVB	GLB1	ケラタン硫酸
β -ヘキソサミニダーゼ α -サブユニット	GM2-ガングリオシドーシス(テイ・サックス病)	HEXA	GM2ガングリオシド
β -ヘキソサミニダーゼ β -サブユニット	GM2-ガングリオシドーシス(サンドホフ)	HEXB	GM2ガングリオシド
GM2活性化因子タンパク質	GM2ガングリオシドーシス	GM2A	GM2ガングリオシド
グルコセレブロシダーゼ	ゴーシェ病	GBA	グルコセレブロシド
サポシンC	ゴーシェ病(非定型)	PSAP	グルコセレブロシド
B.スルファチド(sulfatide)分解の欠損			
アリルスルファターゼA	異染性白質萎縮症	ARSA	スルファチド (sulphatide)
サポシンB	異染性白質萎縮症	PSAP	スルファチド (sulphatide)
ホルミル-グリシン生成酵素	多発性スルファターゼ欠損症	SUMF1	硫酸化脂質

10

20

30

40

【 0 1 2 1 】

【表 2 - 2】

β-ガラクトシルセラミダーゼ(クラッペ)	球様細胞白質萎縮症	GALC	ガラクトセレブロシド	
C.グロボトリアオシルセラミド分解の欠損				
α-ガラクトシダーゼA	ファブリー	GLA	グロボトリアオシルセラミド	
III.グリコサミノグリカン分解の欠損(ムコ多糖症)				
A.ヘパラン硫酸の分解				
イズロン酸スルファターゼ	MPS II(ハンター)	IDS	デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸	10
イズロニダーゼ	MPS 1(ハーラー、シャイエ)	IDUA	デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸	
ヘパランN-スルファターゼ	MPS IIIa(サンフィリップA)	SGSH	ヘパラン硫酸	
アセチル-CoAトランスフェラーゼ	MPS IIIc(サンフィリップC)	HGSNAT	ヘパラン硫酸	
N-アセチルグルコサミニダーゼ	MPS IIIb(サンフィリップB)	NAGLU	ヘパラン硫酸	20
β-グルクロニダーゼ	MPS VII(スライ)	GUSB		
N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ	MPS IIId(サンフィリップD)	GNS	ヘパラン硫酸	
B.他のムコ多糖類の分解				
β-ガラクトシダーゼ(B-galactosidase)	MPS VI(B(モルキオB))	GLB1	ケラタン硫酸	
ガラクトース6-スルファターゼ	MPS IVA(モルキオA)	GALNS	ケラタン硫酸、コンドロイチン6-硫酸	
ヒアルロニダーゼ	MPS IX	HYAL1	ヒアルロン酸	30
C.グリコーゲン分解の欠損				
α-グルコシダーゼ	ポンペ	GAA	グリコーゲン	
2.脂質分解の欠損				
I.スフィンゴミエリン分解の欠損				
酸性スフィンゴミエリナーゼ	ニーマン・ピック病A型	SMPD1	スフィンゴミエリン	
酸性セラミダーゼ	ファーバー脂肪性肉芽腫症	ASAH1	非硫酸化酸性ムコ多糖	
II.トリグリセリドとコレステロールエステルの分解の欠損				
酸性リパーゼ	ウォルマンおよびコレステロールエステル貯蔵疾患	LIPA	コレステロールエステル	40
3.タンパク質分解の欠損				
カテプシンK	濃化異骨症	CTSK		
トリペプチジルペプチダーゼ	セロイドリポフスチノーシス	PPT2		
パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ	セロイドリポフスチノーシス	PPT1		

【表 2 - 3】

4.リソソームトランスポーターの欠損			
シスチノシン (Cystinosin)(シスチン輸 送)	シスチン蓄積症	CTNS	
シアリン(シアル酸輸送)	サラ病	SLC17A5	N-アセチルノイラミン 酸
5.リソソーム輸送タンパク質の欠損			
ホスホトランスフェラ ーゼ α -サブユニット	ムコリピドーシスIII(I-細胞)	GNPTG	
ムコリピン-1(カチオン チャネル)	ムコリピドーシス	MCOLN1	
リソソーム関連膜タン パク質2	ダノン	LAMP2	
ニーマン・ピック病、 C1型	ニーマン・ピックC型	NPC1	LDLコレステロール
パルミトイルタンパク 質チオエステラーゼ-1	セロイドリポフスチノーシス(バッテン病)	CLN3	自家蛍光脂肪色素貯蔵 材料
神経セロイドリポフス チノーシス-6	セロイドリポフスチノーシス6	CLN 6	
神経セロイドリポフス チノーシス-8	セロイドリポフスチノーシス8	CLN 8	
リソソーム輸送調節因 子	チェディアック・東	LYST	
ミオシリン	グリセリ1型	MYOC	
RAS関連タンパク質27A	グリセリ2型	RAB27A	
メラノフィリン	グリセリ3型	MLPHまたは MYO5A	
AP3 β -サブユニット	ヘルマンスキー・パドラック (P u d l i a k)	AP3B1	セロイド

【 0 1 2 3 】

一部の場合では、ドナーは修飾された内因性遺伝子であってもよい。酵素補充療法への抗体応答は、問題の特定の治療用酵素に関して、また個々の患者に関して異なるが、有意な免疫応答は酵素補充によって処置されている多くのLSD患者で確認されている。さらに、処置の効果に対するこれらの抗体の関連性も変わり得る(Katherine Ponder、(2008年)J Clin Invest 118巻(8号):2686頁を参照のこと)。したがって、本発明の方法および組成物は、内因性の免疫応答に対するエピトープを刺激することが公知である部位でサイレントアミノ酸を機能的に変化させることによりその配列が改変されているドナー分子の使用を含み得、その結果、かかるドナーによって産生されるポリペプチドは免疫原性が低くなる。

【 0 1 2 4 】

LSD患者は、脳内の欠損酵素の欠如により神経学的な後遺症がある場合が多い。残念なことに、多くの場合、血液脳関門が不透過性であることから、血液を介して脳に治療薬を送達するのは困難である。したがって、本発明の方法および組成物は、脳への治療薬の送達を増強する方法と併用して使用することができる。脳毛細血管での細胞間の密着結合を一時的に開放させるいくつかの方法が存在する。例としては、高張マンニトール溶液の

頸動脈内投与を使用することによる一時的な浸透圧破壊、集束超音波の使用、およびラジキニン類似体の投与が挙げられる。あるいは、脳への特異的輸送を行うための受容体または輸送機構を利用するように、治療薬を設計することができる。使用可能な特異的受容体の例としては、トランスフェリン受容体、インスリン受容体または低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1および2(LRP-1およびLRP-2)が挙げられる。LRPは、一連の分泌タンパク質、例えば、apoE、tPA、PAI-1等と相互作用することが公知であり、したがって、LRPに対するこれらのタンパク質の1つに由来する認識配列を融合させると、脳への酵素の輸送と、その後の治療用タンパク質の肝臓における発現および血流への分泌が促進され得る(Gabathuler、(2010年)同文献を参照のこと)。

10

【0125】

送達

ヌクレアーゼ、これらのヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド、ならびに本明細書に記載のタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含む組成物は、任意の好適な手段によってインビボまたはエクスピボで送達され得る。

【0126】

本明細書に記載のヌクレアーゼを送達する方法は、例えば、米国特許第6,453,242号、同第6,503,717号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,607,882号、同第6,689,558号、同第6,824,978号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、および同第7,163,824号に記載されており、これらのすべての開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0127】

本明細書に記載のヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物も、ジンクフィンガーまたはTALENタンパク質(複数可)のうちの1つ以上をコードする配列を含むベクターを用いて送達され得る。プラスミドベクター、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、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター等を含むが、これらに限定されない任意のベクター系を用いてもよい。米国特許第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,824,978号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、および同第7,163,824号も参照されたく、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。さらに、これらのベクターのいずれも処置に必要とされる配列のうちの1つ以上を含み得ることは明らかである。したがって、1つ以上のヌクレアーゼおよびドナー構築物が細胞に導入される場合、ヌクレアーゼおよび/またはドナーポリヌクレオチドは、同一のベクター上または異なるベクター上に担持され得る。複数のベクターが使用される場合、各ベクターは、1つまたは複数のヌクレアーゼおよび/もしくはドナー構築物をコードする配列を含み得る。

30

【0128】

従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子導入方法を用いて、ヌクレアーゼおよびドナー構築物をコードする核酸を細胞(例えば、哺乳類細胞)および標的組織に導入することができる。非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、裸の核酸、およびリポソームまたはポロキサマー等の送達ビヒクルとの複合型の核酸を含む。ウイルスベクター送達系は、細胞への送達後にエピソームゲノムまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有するDNAウイルスおよびRNAウイルスを含む。遺伝子治療手順の概説について、Anderson, Science 256:808-813(1992)、Nabel & Felgner, TIBTECH 11:211-217(1993)、Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166(1993)、Dillon, TIBTECH 11:167-175(1993)、Miller, Nature 357:455-460(1992)、Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154(1988)、Vigne, Restorat

40

50

ive Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995)、Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995)、Haddadā, in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Boehm(編)(1995)、および Yuō, Gene Therapy 1:13-26 (1994)を参照されたい。

【0129】

核酸の非ウイルス送達の方法は、電気穿孔、リポフェクション、マイクロインジェクション、パイオリスティック、ピロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、または脂質：核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、および作用物質によって強化されたDNAの取り込みを含む。例えば、Sonitron 2000システム(Rich-Mar)を用いたソノレーションも、核酸の送達のために使用され得る。

10

【0130】

さらなる例示の核酸送達系は、Amamax Biosystems(Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc(Rockville, Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems(Holliston, MA)、およびCopernicus Therapeutics Incによって提供されるものを含む(例えば、米国特許第6008336号を参照のこと)。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、および同第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている(例えば、Transfectam(商標)およびLipofectin(商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適なカチオン性脂質および中性脂質は、Felgner、国際公開第WO91/17424号、同第WO91/16024号に記載のものを含む。

20

【0131】

免疫脂質複合体等の標的化リポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である(例えば、Crystal, Science 270:404-410(1995)、Blaeseō, Cancer Gene Ther. 2:291-297(1995)、Behrō, Bioconjugate Chem. 5:382-389(1994)、Remyō, Bioconjugate Chem. 5:647-654(1994)、Gao etō, Gene Therapy 2:710-722(1995)、Ahmadō, Cancer Res. 52:4817-4820(1992)、米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,774,085号、同第4,837,028号、および同第4,946,787号を参照のこと)。

30

【0132】

さらなる送達方法は、送達される核酸のEnGeneIC送達ビヒクル(EDV)へのパッケージングの使用を含む。これらのEDVは、二重特異性抗体を用いて標的組織に特異的に送達され、この抗体の一方のアームは、標的組織に対する特異性を有し、他方のアームは、EDVに対する特異性を有する。この抗体は、EDVを標的細胞表面に運び、その後、EDVは、エンドサイトーシスによって細胞内に運び込まれる。一旦細胞内に運び込まれると、その内容物は放出される(MacDiarmidō(2009)Nature Biotechnology 27(7):643を参照のこと)。

40

【0133】

操作されたZFPをコードする核酸を送達するためのRNAウイルスベースのまたはDNAウイルスベースの系の使用は、ウイルスを体内の特定の細胞に標的化し、ウイルス負荷量を核に輸送するための高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、被験体に直接投与され得るか(インビボ)、またはインビトロで細胞を処置するために使用され得、修飾細胞が被験体に投与される(エクスビボ)。ZFPを送達するための従来の

50

ウイルスベースの系は、遺伝子導入用の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、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、および単純ヘルペスウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。宿主ゲノムへの組み込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入方法を用いて可能であり、多くの場合、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。さらに、高い形質導入効率が多くの異なる細胞型および標的組織において観察されている。

【0134】

レトロウイルスの向性を、外来性エンベロープタンパク質を組み込むことによって変化させ、標的細胞の潜在的な標的集団を拡張することができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入するか、または感染させることができ、かつ典型的には高いウイルス力価を生成するレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6~10 kbの外来配列のパッケージング能力を有する、シス作用性の長い末端反復配列からなる。最小のシス作用LTRは、ベクターの複製およびパッケージングに十分であり、これはその後、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで恒久的な導入遺伝子の発現を提供するために用いられる。一般に用いられているレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびこれらの組み合わせに基づくベクターを含む(例えば、Buchschera, J. Virol. 66: 2731-2739 (1992)、Johanna, J. Virol. 66: 1635-1640 (1992)、Sommerfeld, Virol. 176: 58-59 (1990)、Wilson, J. Virol. 63: 2374-2378 (1989)、Miller, J. Virol. 65: 2220-2224 (1991)、PCT/US94/05700を参照のこと)。

【0135】

一過性の発現が好ましい用途において、アデノウイルスベースの系を用いることができる。アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において極めて高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターを用いて、高力価かつ高レベルの発現が得られている。このベクターは、比較的単純なシステムにおいて大量に生成することができる。アデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターも、細胞を標的核酸で形質導入するために、例えば、核酸およびペプチドのインビトロ生成において、かつインビボおよびエクスピボ遺伝子治療手順のために用いられる(例えば、West, Virology 160: 38-47 (1987)、米国特許第4,797,368号、国際公開第WO93/24641号、Kotin, Human Gene Therapy 5: 793-801 (1994)、Muzyczka, J. Clin. Invest. 94: 1351 (1994)を参照のこと)。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号、Tratschin, Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260 (1985)、Tratschin, Mol. Cell. Biol. 4: 2072-2081 (1984)、Hermonat & Muzyczka, PNAS 81: 6466-6470 (1984)、およびSamulski, J. Virol. 63: 03822-3828 (1989)を含むいくつかの出版物に記載されている。

【0136】

少なくとも6つのウイルスベクターのアプローチが、臨床試験における遺伝子導入に現在利用可能であり、それらは、形質導入剤を生成するためにヘルパー細胞系に挿入される遺伝子による欠損ベクターの補完に関与するアプローチを利用する。

【0137】

pLASNおよびMFG-Sは、臨床試験に使用されているレトロウイルスベクターの例である(Dunbar, Blood 85: 3048-305 (1995)、Kohn, Nat. Med. 1: 1017-102 (1995)、Malech, PNA

10

20

30

40

50

S 94:22 12133-12138 (1997))。PA317/pLASNは、遺伝子治療試験で使用された最初の治療用ベクターであった (Blause et al., *Science* 270:475-480 (1995))。50%以上の形質導入効率が、MFG-Sパッケージングベクターにおいて観察されている (Ellem et al., *Immunol Immunother* 44(1):10-20 (1997)、Drano et al., *Hum. Gene Ther* 1:111-2 (1997))。

【0138】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) は、欠損性および非病原性パルボウイルスアデノ随伴2型ウイルスに基づく有望な代替の遺伝子送達系である。すべてのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するAAVの145bpの逆方向末端反復のみを保持するプラスミドに由来する。形質導入された細胞のゲノムへの組み込みに起因した効率的な遺伝子導入および安定した導入遺伝子送達は、このベクター系の重要な特徴である (Wagner et al., *Lancet* 351:9117-1702-3 (1998)、Kearns et al., *Gene Ther* 9:748-55 (1996))。他のAAV血清型 (AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAVrh10、ならびにシュドタイプAAV (AAV2/8、AAV2/5、およびAAV2/6) の例が挙げられるが、これらに限定されない) も本発明に従って使用することができる。

【0139】

複製欠損組換えアデノウイルスベクター (Ad) は、高力価で生成することができ、いくつもの異なる細胞型を容易に感染させる。ほとんどのアデノウイルスベクターは、導入遺伝子がAdE1a、E1b、および/またはE3遺伝子を置き換えるように操作され、その後、複製欠損ベクターは、欠失した遺伝子機能をトランスで供給するヒト293細胞において増幅する。Adベクターは、肝臓、腎臓、および筋肉に見出されるもの等の非分裂の分化細胞を含む複数の種類の組織をインビボで形質導入することができる。従来のAdベクターは、高い輸送能力を有する。臨床試験におけるAdベクターの使用の例は、筋肉内注射での抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド治療を含んだ (Stermann et al., *Hum. Gene Ther* 7:1083-9 (1998))。臨床試験における遺伝子導入のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる例として、Rosenecker et al., *Infection* 24:15-10 (1996)、Stermann et al., *Hum. Gene Ther* 9:71083-1089 (1998)、Welsh et al., *Hum. Gene Ther* 2:205-18 (1995)、Alvarez et al., *Hum. Gene Ther* 5:597-613 (1997)、Topf et al., *Gene Ther* 5:507-513 (1998)、Stermann et al., *Hum. Gene Ther* 7:1083-1089 (1998) が挙げられる。

【0140】

宿主細胞を感染させることができるウイルス粒子を形成するために、パッケージング細胞が使用される。そのような細胞は、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、およびレトロウイルスをパッケージングする2細胞またはPA317細胞を含む。遺伝子治療に用いられるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケージングする生産細胞系によって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージングおよびその後の宿主への組み込み (適切な場合) に必要な最小限のウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現されるタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられる。失われたウイルス機能は、パッケージング細胞系によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療に用いられるAAVベクターは、典型的には、パッケージングおよび宿主ゲノムへの組み込みに必要なAAVゲノムからの逆方向末端反復 (ITR) 配列のみを有する。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、すなわち、repおよびcapをコードするが、ITR配列を欠くヘルパープラスミドを含む細胞系内にパッケージングされる。細胞系は、ヘルパーとしてのアデノウイルスにも感染する。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。

このヘルパープラスミドは、I T R 配列の欠如のため、相当な量でパッケージングされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスが A A V よりも感受性の高い熱処理によって減少させることができる。

【 0 1 4 1 】

多くの遺伝子治療の用途において、特定の組織型に対して高度の特異性を有する遺伝子治療ベクターが送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外表面上のウイルスのコートタンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現させることにより、所与の細胞型に対して特異性を有するように改変され得る。リガンドは、目的とする細胞型上に存在することが知られている受容体に対する親和性を有するように選択される。例えば、Hanra, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 9747 - 9751 (1995) は、モロニーマウス白血病ウイルスを、gp70 に融合されたヒトヘレグリンを発現するように改変することができ、その組換えウイルスが、ヒト上皮成長因子受容体を発現するあるヒト乳がん細胞を感染させることを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、かつ、ウイルスが細胞表面受容体のリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルスと標的細胞とのペアにまで拡張することができる。例えば、繊維状ファージは、実質的に任意の選択された細胞受容体に対する特異的結合親和性を有する抗体断片（例えば、F A B または F v）を提示するように操作され得る。上記の説明は、主としてウイルスベクターに適用されるが、同一の原理が非ウイルスベクターにも適用され得る。そのようなベクターは、特定の標的細胞による取り込みを好む特定の取り込み配列を含むように操作され得る。

10

20

【 0 1 4 2 】

遺伝子治療ベクターは、以下に記載されるように、典型的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、もしくは頭蓋内注入）または局所適用による個々の患者への投与によってインビボで送達することができる。あるいは、ベクターは、細胞、例えば、個々の患者から移植された細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検）または万能ドナーの造血幹細胞等にエクスピボで送達することもでき、その後、該細胞が、通常はベクターを組み込んだ細胞の選択後に、患者に再移植される。

【 0 1 4 3 】

ヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソーム等）は、インビボでの細胞の形質導入のために生物に直接投与することもできる。あるいは、裸の D N A は投与され得る。投与は、注射、注入、局所適用、および電気穿孔を含むが、これらに限定されない、通常、血液または組織細胞との最終的な接触へと分子を導入するために用いられる経路のうちのいずれかによる。そのような核酸を投与する好適な方法は、利用可能であって、かつ当業者に周知であり、特定の組成物を投与するために2つ以上の経路が用いられてもよいが、特定の経路は、多くの場合、別の経路よりも即時的かつより効果的な反応を提供することができる。

30

【 0 1 4 4 】

本明細書に記載のポリヌクレオチドの導入に好適なベクターは、非組み込み型レンチウイルスベクター（I D L V）を含む。例えば、Ory (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 11382 - 11388、Dull (1998) J. Virol. 72 : 8463 - 8471、Zuffery (1998) J. Virol. 72 : 9873 - 9880、Follenzi (2000) Nature Genetics 25 : 217 - 222、米国特許公開第2009/054985号を参照されたい。

40

【 0 1 4 5 】

薬学的に許容されるキャリアは、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によっても部分的に決定される。したがって、以下に記載されるように、多種多様な薬学的組成物の好適な製剤が利用可能である（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17版, 1989を参照のこと）。

50

【0146】

ヌクレアーゼコード配列およびドナー構築物が同一または異なる系を用いて送達され得ることは明らかである。例えば、ドナーポリヌクレオチドは、プラスミドによって運ばれてもよく、1つ以上のヌクレアーゼは、AAVベクターによって運ばれてもよい。さらに、同一または異なる経路（筋肉内注射、尾静脈注射、他の静脈内注射、腹腔内投与および/または筋肉内注射）によって異なるベクターが投与されてもよい。ベクターは、同時にまたは任意の逐次的順序で送達されてもよい。

【0147】

エクスピボ投与用の製剤およびインピボ投与用の製剤は両方ともに、液体中の懸濁液または乳化液を含む。有効成分は、多くの場合、薬学的に許容され、かつ有効成分と相溶性のある賦形剤と混合される。好適な賦形剤は、例えば、水、食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノール等、およびそれらの組み合わせを含む。加えて、組成物は、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、または医薬組成物の有効性を増強する他の試薬等の少量の補助物質を含有してもよい。

10

【0148】

適用

本発明の方法は、単一遺伝子疾患（例えば、リソソーム貯蔵疾患）の処置を意図する。処置は、必要とされる酵素を発現させ、血流へ放出させるように、セーフハーバー遺伝子座（例えば、アルブミン）内に修正疾患関連遺伝子を挿入することを含むことができる。産物の血流への放出のための、分泌細胞、例えば肝臓細胞への挿入は、特に有用である。また本発明の方法および組成物は任意の状況において使用することができ、この場合、造血幹細胞由来の成熟細胞（例えば、RBC）が治療薬を含有するように、1つまたは複数の治療薬をコードする導入遺伝子を造血幹細胞に提供することが望ましい。これらの幹細胞はインピボで、またはインピボで分化可能であり、またすべての患者に使用することができる万能ドナー型の細胞に由来し得る。さらに、細胞は、該細胞を身体に輸送するための膜貫通型タンパク質を含有し得る。また処置は、治療用導入遺伝子を含有する患者細胞の使用であって、細胞をエクスピボで成長させ、次いで、患者に導入して戻す使用も含み得る。例えば、適切な導入遺伝子を含有するHSCは、骨髄移植によって患者に挿入することができる。あるいは、幹細胞、例えば筋肉幹細胞または治療用導入遺伝子と共に使用して編集されたiPSCもまた、筋組織に注射することができる。

20

30

【0149】

したがって、この技術は、問題（例えば、発現レベルにおける問題、または正常未満の機能でもしくは機能せずに発現されるタンパク質に関する問題）が原因で、患者のいくつかのタンパク質が欠損している条件下で有益であり得る。本発明で特に有用であるのは、リソソーム貯蔵障害における機能性を修正または回復させる導入遺伝子の発現である。

【0150】

非限定的な例として、欠損タンパク質または欠落タンパク質の産生を行って、および使用して、リソソーム貯蔵疾患を処置する。タンパク質をコードする核酸ドナーは、外因性プロモーターを使用するかセーフハーバーに存在するプロモーターを使用して、セーフハーバー遺伝子座（例えば、アルブミンまたはHPRT）に挿入し、発現させることができる。あるいは、ドナーを使用して、インサイチュで欠損遺伝子を修正することができる。所望の導入遺伝子をCD34+幹細胞に挿入し、骨髄移植中に患者へ戻すことができる。最終的に、核酸ドナーをグロビン遺伝子座でCD34+幹細胞に挿入することができ、その結果、この細胞由来の成熟赤血球は、核酸ドナーによりコードされている生物学的薬物を高濃度で有する。次いで、RBCを含有する該生物学的薬物は、膜貫通型タンパク質（例えば、受容体または抗体）を介して適切な組織に対して標的化することができる。さらに、RBCは、電氣的増感によってエクスピボで増感し、エネルギー源への曝露後に破壊に対してより感受性にするすることができる（WO2002007752号を参照のこと）。

40

【0151】

50

一部の適用において、内因性遺伝子は、本発明の方法および組成物を使用することによってノックアウトされ得る。この態様の例としては、異常な遺伝子調節因子または異常な疾患関連遺伝子をノックアウトすることが挙げられる。一部の適用において、異常な内因性遺伝子は、機能的に、またはインサイチュで、遺伝子の野性型バージョンで置き換えられ得る。また挿入遺伝子は、発現タンパク質の機能性を改善するか、その免疫原性を低減させるように改変させることができる。一部の適用において、挿入遺伝子は、脳等の選択組織へのその輸送を増加させる融合タンパク質である。

【0152】

以下の実施例は、ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）またはTALENを含む本開示の例示的な実施形態に関する。これは単なる例示的であり、他のヌクレアーゼまたはヌクレアーゼ系、例えば、操作されたDNA結合ドメインを有するホームイングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）および/または天然に存在する操作されたホームイングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）DNA結合ドメインと異種切断ドメインとの融合物および/または操作された単鎖ガイドRNAを含むCRISPR/Cas系を使用することができることは理解されよう。

10

【実施例】

【0153】

（実施例1）

アルブミン特異的ヌクレアーゼの設計、構築および一般的な特徴付け

ジンクフィンガータンパク質は、基本的に、Urnovら、（2005年）Nature 435巻（7042号）：646～651頁、Perezら（2008年）Nature Biotechnology 26巻（7号）：808～816頁、および米国特許第6,534,261号に記載されているようにして設計し、プラスミド、AAVまたはアデノウイルスベクターに組み込んだ。表3は、例示のアルブミン特異的ZFPのDNA結合ドメイン内の認識ヘリックスを示し、一方、表4はこれらのZFPの標的部位を示す（共有の米国仮出願第61/537,349号および同第61/560,506号を参照のこと）。ZFP認識ヘリックスが接触している標的部位のヌクレオチドは大文字で示す；接触していないヌクレオチドは小文字で示す。またアルブミン特異的TALENも設計し、これらは米国出願第13/624,193号および同第13/624,217号に記載されており、これらの文献は参照によりその全体が組み込まれる。

20

30

【0154】

【表3 - 1】

表3:マウスアルブミン特異的ジंकフィンガーヌクレアーゼヘリックス設計

標的	SBS番号	設計					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
イントロン 1	30724	TSGSLTR (配列番号 1)	RSDALST (配列番号 2)	QSATRT K (配列 番号3)	TSGHLS R (配列 番号4)	QSGNLAR (配列番号 5)	NA
イントロン 1	30725	RSDHLSA (配列番号 6)	TKSNRTK (配列番号 7)	DRSNLS R (配列 番号8)	WRSSLR A (配列 番号9)	DSSDRKK (配列番号 10)	NA
イントロン 1	30732	TSGNLTR (配列番号 11)	DRSTRRQ (配列番号 12)	TSGSLT R (配列 番号1)	ERGTLA R(配列番 号13)	TSANLSR (配列番号 14)	NA
イントロン 1	30733	DRSALAR (配列番号 15)	RSDHLE (配列番号 16)	HRSDRT R (配列 番号17)	QSGALA R (配 列番号 18)	QSGHLSR (配列番号 19)	NS
イントロン 13	30759	RSDNLST (配列番号 20)	DRSALAR (配列番号 15)	DRSNLS R (配列 番号8)	DGRNLR H (配列 番号21)	RSDNLAR (配列番号 22)	QSNALNR (配列番号 23)
イントロン 13	30761	DRSNLSR (配列番号 8)	LKQVLVR (配列番号 24)	QSGNLA R (配列 番号5)	QSTPLF A (配列 番号25)	QSGALAR (配列番号 18)	NA
イントロン 13	30760	DRSNLSR (配列番号 8)	DGRNLRH (配列番号 21)	RSDNLA R (配列 番号22)	QSNALN R (配列 番号23)	NA	NA
イントロン 13	30767	RSDNLSV (配列番号 26)	HSNARKT (配列番号 27)	RSDSLS A (配列 番号28)	QSGNLA R (配列 番号5)	RSDSLSV (配列番号 29)	QSGHLSR (配列番号 19)
イントロン 13	30768	RSDNLSE (配列番号 30)	ERANRNS (配列番号 31)	QSANRT K (配列 番号32)	ERGTLA R (配列 番号13)	RSDALTQ (配列番号 33)	NA
イントロン 13	30769	TSGSLTR (配列番号 1)	DRSNLSR (配列番号 8)	DGRNLR H (配列 番号21)	ERGTLA R (配列 番号13)	RSDALTQ (配列番号 33)	NA
イントロン 12	30872	QSGHLAR (配列番号 34)	RSDHLTQ (配列番号 35)	RSDHLS Q (配列 番号36)	WRSSLV A (配列 番号37)	RSDVLSE (配列番号 38)	RNQRKT (配列番号 39)

10

20

30

40

【表3 - 2】

イントロン 12	30873	QSGDLTR (配列番号 40)	RSDALAR (配列番号 41)	QSGDLT R (配列 番号40)	RRDPLIN (配列番 号42)	RSDNLSV (配列番号 26)	IRSTLRD (配列番号 43)
イントロン 12	30876	RSDNLSV (配列番号 26)	YSSTRNS (配列番号 44)	RSDHLS A (配列 番号6)	SYWSRT V (配列 番号45)	QSSDLSR (配列番号 46)	RTDALRG (配列番号 47)
イントロン 12	30877	RSDNLST (配列番号 20)	QKSPLNT (配列番号 48)	TSGNLT R (配列 番号11)	QAENLK S (配列 番号49)	QSSDLSR (配列番号 46)	RTDALRG (配列番号 47)
イントロン 12	30882	RSDNLSV (配列番号 26)	RRAHLNQ (配列番号 50)	TSGNLT R (配列 番号11)	SDTNRF K (配列 番号51)	RSDNLST (配列番号 20)	QSGHLSR (配列番号 19)
イントロン 12	30883	DSSDRKK (配列番号 10)	DRSALSR (配列番号 52)	TSSNRK T (配列 番号53)	QSGALA R (配列 番号18)	RSDHLSR (配列番号 54)	NA

10

20

【0156】

【表4】

表4:マウスアルブミン特異的ZFNの標的部位

標的	SBS番号	標的部位
イントロン 1	30724	ctGAAGGTgGCAATGGTTcctctctgct (配列番号55)
イントロン 1	30725	ttTCCTGTAACGATCGGgaactggcatc (配列番号56)
イントロン 1	30732	aaGATGCCaGTTCCCGATcgttacagga (配列番号57)
イントロン 1	30733	agGGAGTAGCTTAGGTCagtgaaagaaa (配列番号58)
イントロン 13	30759	acGTAGAGAACAACATCTAGattggtgg (配列番号59)
イントロン 13	30761	ctGTAATAGAACTGACTtagcttagctt (配列番号60)
イントロン 13	30760	acGTAGAGAACAACatctagattggtgg (配列番号59)
イントロン 13	30767	agGGAATGtGAAATGATTcAGatata (配列番号61)
イントロン 13	30768	ccATGGCCTAACAACAGtttatcttctt (配列番号62)
イントロン 13	30769	ccATGGCCTAACAACaGTTtatcttctt (配列番号62)
イントロン 12	30872	ctTGGCTGTGTAGGAGGGGAgtagcagt (配列番号63)
イントロン 12	30873	ttCCTAAGTTGGCAGTGGCAtgcttaat (配列番号64)
イントロン 12	30876	ctTTGGCTTTGAGGATTAAGcatgccac (配列番号65)
イントロン 12	30877	acTTGGCTcCAAGATTTATAGccttaaa (配列番号66)
イントロン 12	30882	caGGAAAGTAAGATAGGAAGgaatgtga (配列番号67)
イントロン 12	30883	ctGGGGTAAATGTCTCcttcttctt (配列番号68)

30

40

50

【0157】

(実施例2)

マウスアルブミン特異的ヌクレアーゼの活性

マウスアルブミン遺伝子を標的とするZFN対を使用し、これらのZFNが特異的標的部位でDSBを誘導する能力を試験した。表記のZFNの認識ヘリックス領域のアミノ酸配列を下記の表3に示し、それらの標的部位を表4に示す(DNA標的部位は大文字で示す; 接触されていないヌクレオチドは小文字で示す)。

【0158】

Perezら、(2008年)Nat. Biotechnol. 26巻: 808~816頁、およびGuschinら、(2010年)Methods Mol Biol. 649巻: 247~56頁)に記載されているCel-Iアッセイ(Surveyor(商標)、Transgenomics)を使用し、ZFN誘導性の修飾を検出した。このアッセイでは、標的部位をPCR増幅し、続いて、ミスマッチ検出酵素Cel-Iを使用して挿入および欠失(インデル)を定量し(Yangら、(2000年)Biochemistry 39巻、3533~3541頁)、それはDSB頻度の下限推定値(lower-limit estimate)を提供した。標準条件(37℃)で、または低体温ショック(30℃、共有の米国公開第20110041195号を参照のこと)を使用するかのいずれかでZFN発現ベクターをトランスフェクトした、3日後、ゲノムDNAは、DNeasy(商標)キット(Qiagen)を使用し、ZFN(複数可)をトランスフェクトしたNeuro2A細胞から単離した。これらの実験において、すべてのZFN対は、(上記の)ELD/KKR FokI変異対であった。

【0159】

Cel-Iアッセイから得られた結果を合わせたものを図1に示し、これは、下に示したZFNが、それらのそれぞれの標的部位で切断を誘導し得ることを明らかにしている。レーンの下に示したインデルパーセントは、切断後にNHEJによって改変されたゲノムの量を示す。またデータは、形質導入手順に低体温ショックを組み入れた場合、活性が増加することを明らかにしている。

【0160】

(実施例3)

アルブミン遺伝子座のインビボにおける切断

イントロン1内の配列を標的とするマウスアルブミン特異的ZFNのSBS30724およびSBS30725をインビボで試験した。ZFNは、既に記載されているようにして(Liら(2011年)Nature 475巻(7355号): 217頁)、AAV2/8ベクターに導入した。バキュロウイルス系での産生を促進するため、ベクターAAV2/8.2をバキュロウイルス産生が予定された調製に使用した。AAV2/8.2は、AAV8キャプシドの一部が除去され、キメラキャプシドを生じるAAV2キャプシド由来の同一領域で置き換えられているという点で、AAV2/8ベクターとは異なる。この領域は、VP1のホスホリパーゼA2ドメインである。ウイルス粒子を含有するZFNの産生は、当技術分野での標準方法を使用し、HEK293系またはバキュロウイルス系のいずれかを使用する調製によって実施した(Liら、同文献を参照のこと、例えば、US6723551を参照のこと)。次いで、ウイルス粒子を、マウスアルブミン特異的ZFNをコードするAAV2/8またはAAV2/8.2のいずれかの1.0e11の全ベクターゲノム、200マイクロリットルの単一用量を用いて正常雄マウス(n=6)に投与した。rAAVベクターを投与した14日後にマウスを屠殺し、肝臓を回収し、当技術分野で公知の標準方法を使用してDNAまたは総タンパク質について処理した。AAVベクターゲノムコピーの検出は、定量PCRによって実施した。簡単に説明すると、qPCRプライマーを以下のようにAAV内のbGHPA配列に特異的であるように作製した:

Oligo200(フォワード)5'-GTTGCCAGCCATCTGTTGTTT-3'(配列番号69)

Oligo201(リバース)5'-GACAGTGGGAGTGGCACCTT-3'

10

20

30

40

50

(配列番号70)

O l i g o 2 0 2 (プ ロ ー プ) 5 ' - C T C C C C C G T G C C T T C C T T G A C C -
3 ' (配 列 番 号 7 1)

ZFNの切断活性を、製造業者のプロトコールに従って、LC-GX装置(Perkin Elmer)を使用して実施するCell-Iアッセイを使用して測定した。ZFNのインビボにおける発現は、標準方法に従って、FLAG-Tagシステムを使用して測定した。結果(図3)から明らかなように、ZFNが発現され、ZFNはマウス肝臓遺伝子中の標的の切断に活性を示す。本試験における各マウスのCell-IのNHEJ結果をその図に示す。ベクターのタイプとそれらの含量をレーンの上に示す。ZFN切断後のミスマッチ修復(インデル%で示す)は、一部のマウスにおいてほぼ16%で検出された。

10

【0161】

アルブミン特異的TALENも、参照によりその全体が組み込まれる、米国出願第13/624,193号および同第13/624,217号に記載のようにして試験した。

【0162】

(実施例4)

修正疾患関連遺伝子のインビボにおける挿入

次いで、マウス特異的アルブミンZFNまたはTALENを使用し、発現のためにアルブミン遺伝子座へ治療用遺伝子産物をコードする導入遺伝子を導入する。ドナーは、アルブミン遺伝子座にファブリー病(GLA)、ゴーシェ病(GBA)、ハーラー病(IDUA)およびハンター病に関する修正遺伝子が挿入されるように設計した。これらのドナー構築物において、治療用遺伝子は、アルブミン遺伝子に相同な配列が隣接していた。導入遺伝子の5'では、ドナー構築物はすべてマウスアルブミンイントロン1に相同な配列を含有しており、一方、その遺伝子の3'では、構築物はマウスアルブミンイントロン1-エクソン2境界域に相同な配列を含有する。

20

【0163】

次いで、ドナー構築物をAAVゲノムへ組み込み、次いで、ドナーを含有する得られたAAV粒子を当技術分野で公知の方法を使用して精製する。この材料を使用し、HEK293T細胞へのトリプルトランスフェクション方法を使用してAAVドナーゲノムを含有するAAVウイルスを産生し、記載されているように(Ayusoら(2010年)Gene Ther 17巻(4号)、503~510頁を参照のこと)CsCl密度勾配で精製する。AAVベクターは、注射前にPBSで希釈する。野性型マウスもしくは疾患モデルマウスにおいて、5e9から5e13の範囲のv.g. AAV-ドナーベクター粒子は、1e9から1e12 v.g.のAAV-ZFNベクター粒子と共に尾静脈を介して使用するか、または、上記ウイルスを腹腔内注射に使用する。マウスアルブミン特異的ZFNを含有する、先に記載のAAV-ZFNゲノムは、GLA、GBA、IDUAおよびIDS AAVドナーと組み合わせて使用される。Cell-IアッセイおよびPCRアッセイを様々な時点で単離された肝臓DNAに対して実施し、NHEJおよびZFN誘導ドナーの挿入頻度を決定する。サザンブロットも使用することができる。標準プロトコールにより、血漿中のヒトGLA、GBA、IDUAおよびIDSの定量はヒトGLA、GBA、IDUAおよびIDS ELISAキットを使用するか、FLAG Tag ELISA

30

40

【0164】

例えば、ヒトガラクトシダーゼ(galactosidase)をコードする遺伝子(ファブリー病患者において欠損)をマウスアルブミン遺伝子座に挿入した。ZFN対の30724/30725を、ガラクトシダーゼ導入遺伝子を使用して上記のように使用した。この実験では、3匹のマウスを、マウス1匹当たり3.0e11ウイルスゲノムの用量のZFN対を含有するAAV2/8ウイルスで、およびマウス1匹当たり1.5e12ウイルスゲノムのhuGLAドナーを含有するAAV2/8ウイルスで処置した。対照動

50

物には、ZFN含有ウイルス単独、またはh u G L aドナーウイルス単独のいずれかを与えた。肝臓ホモジネートに対して行ったウェスタンブロットからは、ガラクトシダーゼ特異的シグナルの増加が示され、これはガラクトシダーゼ遺伝子が組み込まれ、発現されていることを示唆していた(図4A)。さらに、ELISAを、製造業者のプロトコルに従い、ヒトガラクトシダーゼアッセイキット(Sino)を使用し肝臓溶解物に対して実施した。図4Bに示した結果から明らかなように、ZFNおよびh u G L aドナーの両方で処置したマウスにおいてシグナルの増加が示された。

【0165】

(実施例5)

ヒトアルブミン特異的ZFNの設計。

10

【0166】

ヒトアルブミン遺伝子に対する特異性を有するZFNを設計するため、ヒトアルブミンイントロン1のDNA配列を既に記載されている方法を使用して分析し、ZFN結合に関して最良の可能性のある標的配列を同定した(詳細については、共有の米国特許出願第13/624,193号および同第13/624,217号を参照のこと)。標的およびヘリックスは、表5および表6に示す。

【0167】

【表 5 - 1】

表5:ヒトアルブミン特異的ジंकフィンガーヌクレアーゼヘリックス設計

標的	SBS番号	設計					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
イントロ ン1	35393	QSSDLSR (配列番号46)	LRHNLRA (配列番号72)	DQSNLRA (配列番号73)	RPYTLRL (配列番号74)	QSSDLSR (配列番号46)	HRSNLNK (配列番号75)
イントロ ン1	35394	QSSDLSR (配列番号46)	HRSNLNK (配列番号75)	DQSNLRA (配列番号73)	RPYTLRL (配列番号74)	QSSDLSR (配列番号46)	HRSNLNK (配列番号75)
イントロ ン1	35396	QSSDLSR (配列番号46)	LKWNLRT (配列番号76)	DQSNLRA (配列番号73)	RPYTLRL (配列番号74)	QSSDLSR (配列番号46)	HRSNLNK (配列番号75)
イントロ ン1	35398	QSSDLSR (配列番号46)	LRHNLRA (配列番号72)	DQSNLRA (配列番号73)	RPYTLRL (配列番号74)	QSSDLSR (配列番号46)	HRSNLNK (配列番号75)
イントロ ン1	35399	QSSDLSR (配列番号46)	HRSNLNK (配列番号75)	DQSNLRA (配列番号73)	RPYTLRL (配列番号74)	QSSDLSR (配列番号46)	HRSNLNK (配列番号75)
イントロ ン1	35405	QSSDLSR (配列番号46)	WKWNLRA (配列番号77)	DQSNLRA (配列番号73)	RPYTLRL (配列番号74)	QSSDLSR (配列番号46)	HRSNLNK (配列番号75)
イントロ ン1	35361	QSGNLAR (配列番号5)	LMQNRNQ (配列番号78)	LKQHLNE (配列番号79)	TSGNLTR (配列番号11)	RRYYLRL (配列番号80)	N/A
イントロ ン1	35364	QSGNLAR (配列番号5)	HLGNLKT (配列番号81)	LKQHLNE (配列番号79)	TSGNLTR (配列番号11)	RRDWRRD (配列番号82)	N/A
イントロ ン1	35370	QSGNLAR (配列番号5)	LMQNRNQ (配列番号78)	LKQHLNE (配列番号79)	TSGNLTR (配列番号11)	RRDWRRD (配列番号82)	N/A
イントロ ン1	35379	QRSNLVR (配列番号83)	TSSNRKT (配列番号53)	LKHHLTD (配列番号84)	TSGNLTR (配列番号11)	RRDWRRD (配列番号82)	N/A

10

20

30

40

【表 5 - 2】

イントロ ン1	35458	DKSYLRP (配列番号 85)	TSGNLTR (配列番 号11)	HRSARKR (配列番号 86)	QSSDLSR (配列番号 46)	WRSSLKT (配列番 号87)	N/A
イントロ ン1	35480	TSGNLTR (配列番 号11)	HRSARKR (配列番 号86)	QSGDLTR (配列番 号40)	NRHHLKS (配列番号 88)	N/A	N/A
イントロ ン1	35426	QSGDLTR (配列番号 40)	QSGNLHV (配列番 号89)	QSAHRKN (配列番号 90)	STAALSY (配列番 号91)	TSGSLSR (配列番 号92)	RSDALAR (配列番号 41)
イントロ ン1	35428	QSGDLTR (配列番号 40)	QRSNLNI (配列番 号93)	QSAHRKN (配列番号 90)	STAALSY (配列番号 91)	DRSALSR (配列番 号52)	RSDALAR (配列番号 41)
イントロ ン1	34931	QRTHLTQ (配列番号 94)	DRSNLTR (配列番 号95)	QSGNLAR (配列番号 5)	QKVNRAQ (配列番号 96)	N/A	N/A
イントロ ン1	33940	RSDNLSV (配列番 号26)	QANRIT (配列番 号97)	DQSNLRA (配列番号 73)	QSAHRIT (配列番号 98)	TSGNLTR (配列番 号11)	HRSARKR (配列番号 86)

10

20

30

【 0 1 6 9 】

【表 6】

表6:ヒトアルブミン特異的ZFNの標的部位

標的	SBS番号	標的部位	
イントロン1 (遺伝子座 2)	35393	<u>ccTATCCATTGCACTATGCTttatttaa</u> (配列番号99)	
イントロン1 (遺伝子座 2)	35394	<u>ccTATCCATTGCACTATGCTttatttaa</u> (配列番号99)	10
イントロン1 (遺伝子座 2)	35396	<u>ccTATCCATTGCACTATGCTttatttaa</u> (配列番号99)	
イントロン1 (遺伝子座 2)	35398	<u>ccTATCCATTGCACTATGCTttatttaa</u> (配列番号99)	
イントロン1 (遺伝子座 2)	35399	<u>ccTATCCATTGCACTATGCTttatttaa</u> (配列番号99)	
イントロン1 (遺伝子座 2)	35405	<u>ccTATCCATTGCACTATGCTttatttaa</u> (配列番号99)	20
イントロン1 (遺伝子座 2)	35361	<u>ttTGGGATAGTTATGAAttcaatcttca</u> (配列番号100)	
イントロン1 (遺伝子座 2)	35364	<u>ttTGGGATAGTTATGAAttcaatcttca</u> (配列番号100)	
イントロン1 (遺伝子座 2)	35370	<u>ttTGGGATAGTTATGAAttcaatcttca</u> (配列番号100)	
イントロン1 (遺伝子座 2)	35379	<u>ttTGGGATAGTTATGAAttcaatcttca</u> (配列番号100)	30
イントロン1 (遺伝子座 3)	35458	<u>ccTGTGCTGTTGATCTCataaatagaac</u> (配列番号101)	
イントロン1 (遺伝子座 3)	35480	<u>ccTGTGCTGTTGATctcataaatagaac</u> (配列番号101)	
イントロン1 (遺伝子座 3)	35426	<u>ttGTGGTTTTTAAAtAAAGCAtagtgca</u> (配列番号102)	
イントロン1 (遺伝子座 3)	35428	<u>ttGTGGTTTTTAAAtAAAGCAtagtgca</u> (配列番号102)	40
イントロン1 (遺伝子座 4)	34931	<u>acCAAGAAGACAGActaaaatgaaaata</u> (配列番号103)	
イントロン1 (遺伝子座 4)	33940	<u>ctGTTGATAGACACTAAAAGagtattag</u> (配列番号104)	

【 0 1 7 0 】

これらのヌクレアーゼを対で試験し、最大活性を有する対を決定した。試験した対の得られたマトリックスを以下の表 7 および表 8 に示すが、二量体の右側に関して使用した Z

F Nは、各マトリックスの上部にわたって示しており、二量体の左側に使用したZ F Nは、各マトリックスの左側に列記している。C e l - I アッセイを使用して検出されるミスマッチのパーセントにより決定した活性の結果を両マトリックスの本体に示す。

【 0 1 7 1 】

【表 7】

表7:ヒトアルブミン特異的ZFNの活性(変異標的%)

	35393	35394	35396	35398	35399	35405	平均
35361	18	19	25	22	23	21	21
35364	n.d.	24	23	19	21	21	22
35370	21	19	22	n.d.	22	23	21
35379	21	21	n.d.	19	19	21	20

10

【 0 1 7 2 】

【表 8】

表8:ヒトアルブミン特異的ZFNの活性(変異標的%)

	35458	35480	平均
35426	4.5	7	3
35428	4.9	6	3.6

20

【 0 1 7 3 】

(注:「n.d.」とは、この対に対してアッセイが行われなかったことを意味する)したがって、ヒトアルブミンのイントロン1内の標的配列を認識する高活性のヌクレアーゼが開発された。

【 0 1 7 4 】

(実施例6)

アルブミン特異的T A L E Nの設計

ヒトアルブミンイントロン1内の配列を標的とするようにT A L E Nを設計した。塩基の認識は、正準R V D - 塩基一致(c a n o n i c a l R V D - b a s e c o r r e s p o n d e n c e)を使用して行った(「T A L Eコード」: Aに対してN I、Cに対してH D、Gに対してN N(ハーフリピートにおいてはN K)、Tに対してN G)。T A L E Nを、既に記載されているようにして(共有の米国特許公開第2 0 1 1 0 3 0 1 0 7 3号を参照のこと)構築した。T A L E Nのサブセットに対する標的は、カニクイザルアルブミン遺伝子およびアカゲザルアルブミン遺伝子に保存した(詳細に関しては、共有の米国特許出願第1 3 / 6 2 4 , 1 9 3号および同第1 3 / 6 2 4 , 2 1 7等を参照のこと)。T A L E Nは、U S 2 0 1 1 0 3 0 1 0 7 3号に記載されているようにして「+ 1 7」および「+ 6 3」T A L E N骨格に構築した。試験したT A L E Nに対する標的および数値識別子を以下の表9に示す。

30

40

【 0 1 7 5 】

【表 9】

表9:アルブミン特異的TALEN

SBS番号	部位	RVDの数	配列番号
102249	gtTGAAGATTGAATTCAta	15	105
102250	gtTGAAGATTGAATTCATAac	17	106
102251	gtGCAATGGATAGGCTTt	15	107
102252	atAGTGCAATGGATAGGtc	15	108
102253	attGAATTCATAACTATcc	15	109
102254	attGAATTCATAACTATCCca	17	110
102255	ataAAGCATAGTGCAATGGat	17	111
102256	ataAAGCATAGTGCAATgg	15	112
102257	ctATGCTTTATTTAAAac	15	113
102258	ctATGCTTTATTTAAAACca	17	114
102259	atTTATGAGATCAACAGCaca	17	115
102260	ctATTTATGAGATCAACAGca	17	116
102261	ttCATTTTAGTCTGTCTTctt	17	117
102262	atTTTAGTCTGTCTTcttg	15	118
102263	ctAATACTCTTTTAGTGtct	16	119
102264	atCTAATACTCTTTTAGTGtc	17	120
102265	ataATTGAACATCATCctg	15	121
102266	ataATTGAACATCATCCTGag	17	122
102267	atATTGGGCTCTGATTCTac	17	123
102268	atATTGGGCTCTGATTCTct	15	124
102269	ttTTTCTGTAGGAATCaga	15	125
102270	ttTTTCTGTAGGAATCAGag	16	126
102271	ttATGCATTTGTTTCAaaa	15	127
102272	atTATGCATTTGTTTCAaaa	15	128

10

20

【 0 1 7 6 】

次いで、内因性染色体標的での修飾を誘導する能力について、TALENをHepG2細胞において対で試験したところ、結果からは、+17切断点(truncation point)を有する多数のタンパク質が活性であることが示された。同様に、+63切断点を有する多数のTALENもまた活性であった(表10を参照のこと)。3つの組の非最適化アルブミンZFNの並列比較により(表10を参照のこと)、TALENおよびZFNはほぼ同一の範囲の活性を有することが明らかであった。

【 0 1 7 7 】

30

【表 10】

表10:HepG2-C3a細胞におけるTALEN誘導性標的修飾

試料対	TALEN C17	修飾%、C17	TALEN C63	修飾%、C63	ギャップ
1	102251:102249	15	102251:102249	0	12
2	102251:102250	0	102251:102250	0	10
3	102252:102249	0	102252:102249	8.3	15
4	102252:102250	32	102252:102250	8.0	13
5	102255:102253	38	102255:102253	21	13
6	102255:102254	43	102255:102254	0	11
7	102256:102253	0	102256:102253	23	15
8	102256:102254	28	102256:102254	16	13
9	102259:102257	18	102259:102257	15	13
10	102259:102258	15	102259:102258	0	11
11	102260:102257	15	102260:102257	13	15
12	102260:102258	24	102260:102258	11	13
13	102263:102261	0	102263:102261	16	17
14	102263:102262	0	102263:102262	15	16
15	102264:102261	0	102264:102261	22	18
16	102264:102262	0	102264:102262	17	17
20	102267:102265	47	102267:102265	9.8	13
21	102267:102266	4.7	102267:102266	0	11
22	102268:102265	4.2	102268:102265	7.9	15
23	102268:102266	10	102268:102266	0	13
24	102271:102269	14	102271:102269	0	12
25	102271:102270	0	102271:102270	0	11
26	102272:102269	0	102272:102269	0	13
27	102272:102270	0	102272:102270	0	12
ZFNs					
17	35361:35396	31	35361:35396	29	6
18	35426:35458	10	35426:35458	7	6
19	34931:33940	7.3	34931:33940	7	6

10

20

30

40

【0178】

先に示したように（共有の米国特許公開第20110301073号を参照のこと）、C17 TALENは、2つのTALEN標的部位の間のギャップサイズが約11~15bpである場合により高い活性を有するが、C63 TALENは、最大18bpまでのギャップサイズで活性を維持する（表10を参照のこと）。

【0179】

（実施例7）

インビボにおけるLSDドナー導入遺伝子の検出

4種類のリソソーム貯蔵疾患導入遺伝子のためのドナーを、イントロン1内のマウスアルブミン遺伝子に組み込むことを目的として構築した。導入遺伝子は - ガラクトシダー

50

ゼA (GLA)、酸性 - グルコシダーゼ (GBA)、 - L - イズロニダーゼ (IDUA) およびイズロン酸 - 2 - スルファターゼ (IDS) であり、それぞれ、ファブリー病、ゴーシェ病、ハーラー病およびハンター病で欠損している遺伝子である。例えば、図8を参照されたい。

【0180】

次いで、これらのドナーをインビボ試験に使用し、導入遺伝子の組み込みを観察した。マウスアルブミン特異的ZFNおよびドナーは、実施例4に記載のようにしてAAV2/8ウイルスにすべて挿入し、その後、マウスに注射した。これらの実験において、ウイルスは、注射前に、D - P B S + 35 m M NaCl、5%グリセロール中で注射用に製剤化し、凍結した。ドナー含有およびヌクレアーゼ含有ウイルスは、凍結前に一緒に混合した。0日目に、ウイルス調製物を解凍し、尾静脈注射によってマウスに投与したが、注射総容量は200μLであった。示した時間に、マウスを屠殺し、次いで、血清、肝臓および脾臓を標準プロトコールによりタンパク質およびDNAの分析のため回収した。投与群を下記の表11に示す。

10

【0181】

【表11】

表11:LSD導入遺伝子組み込みに対する処置群

群	処置	N/群/時点
1	マウス Alb イントロン 1+ファブリー@比率 1:5;ZFN@3.0e11、ドナー@1.5e12	3
2	マウス Alb イントロン 1+ハンタードナー@比率 1:5;ZFN@3.0e11、ドナー@1.5e12	3
3	マウス Alb イントロン 1+ハーラードナー@比率 1:5;ZFN@3.0e11、ドナー@1.5e12	3
4	マウス Alb イントロン 1	3
5	ファブリードナー単独	2
6	ハンタードナー単独	2
7	ハーラードナー単独	2

20

30

40

【0182】

30日目に、ドナーによりコードされているLSDタンパク質の存在に関して、肝臓ホモジェネートをウェスタンブロット解析により分析した。肝臓ホモジェネートは、標準方法を使用してウェスタンブロットにより、次の一次抗体を使用して分析した： - ガラクトシダーゼA (ファブリー) - 特異的ウサギモノクローナル抗体は、Sino Biological, Inc. から購入した；ヒト - L - イズロニダーゼ (ハーラー) - 特異的マウスモノクローナル抗体は、R & D Systems から購入した；ヒトイズロン酸 2 - スルファターゼ (ハンター) - 特異的マウスモノクローナルは、R & D Systems から購入した。結果 (図5を参照のこと) からは、特に、ZFN含有ウイルスおよび

50

導入遺伝子ドナー含有ウイルスの両方が投与されたマウスにおいて、発現が明らかである。

【0183】

またアルブミン遺伝子座へのドナーDNAの組み込み方法も調べた。アルブミン遺伝子座での切断後、ドナー導入遺伝子は、導入遺伝子ドナーに隣接する相同の領域を利用して相同組換え(HDR)を介して潜在的に組み込まれるか(図2)、または、導入遺伝子は、誤りがちな非相同性末端接合プロセス(NHEJ)の間に捕捉される可能性がある。これらの2つの選択肢の結果は、すべてのLSDドナー構築物内のF9スプライスアクセプター部位に結合するAcc651-SA-rev-shプライマー(5' AAG AAT AAT TCT TTA GTG GTA 3'、配列番号129)と、ZFN切断部位の上流のマウスアルブミンエクソン1に結合するmALB-OOF1プライマー(5' ATGAAGTGGGTAACCTTTCTC 3'、配列番号130)のいずれかを使用してPCRに供した場合に異なるサイズの挿入が生じ(図6を参照のこと)、この場合、HDRによる導入遺伝子の組み込みによって約680bpの挿入が生じ、一方、NHEJによる組み込みによって約1488bpの組み込みが生じる。こうして、処置マウスの肝臓ホモジェネートから単離されたゲノムDNAは、³²P-放射標識ヌクレオチドの存在下でPCRに供され、ゲル電気泳動を行った。3つのすべての導入遺伝子組み込みにおいて、両機構による組み込みが観察された(図7を参照のこと)。

10

【0184】

またドナーDNAも、タグ特異抗体を使用するその後のタンパク質認識用のタグ配列を含むように設計した。タグは、Mycタグ(EQKLISEEDL、配列番号131)およびFlagタグ(DYKDDDD、配列番号132)をコードする異なる2種の配列を組み込むように設計した。ドナー設計の概略図を図8に示す。ドナーは上記のように組み込み、そのすべてはPCRによって証明されたとおり組み込みが可能であった(図9を参照のこと)。

20

【0185】

本明細書において言及されるすべての特許、特許出願、および出版物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0186】

理解の明瞭化のために図解および例を用いてある程度詳しく開示を提供しているが、本開示の精神または範囲から逸脱することなく様々な変更および修正を行うことができることは当業者には明らかである。したがって、上記の記載および実施例は、限定的であると解釈されるべきではない。

30

【 図 5 】

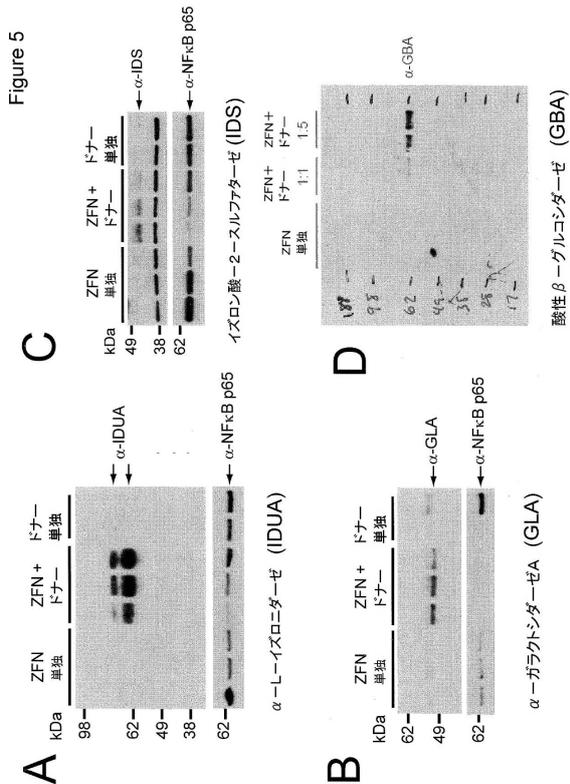


Figure 5

【 図 6 】

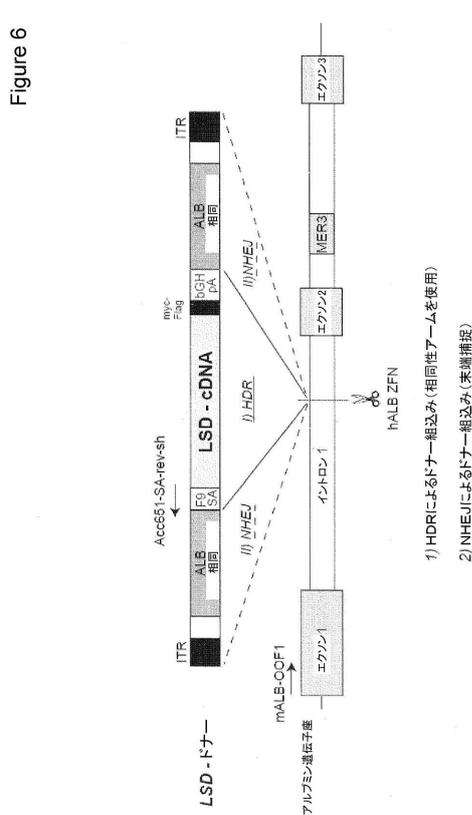


Figure 6

1) HDRによるドナー組み込み(相性アームを使用)
2) NHEJによるドナー組み込み(乗換え)

【 図 7 】

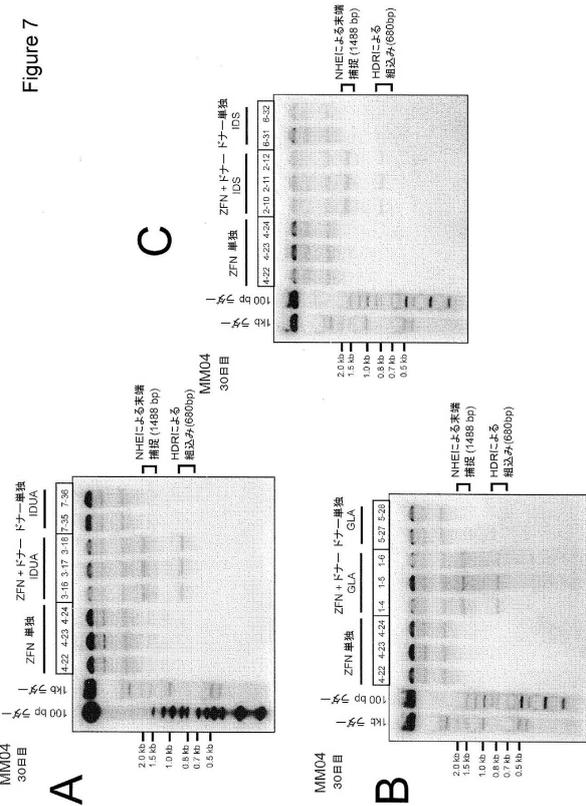


Figure 7

【 図 8 】

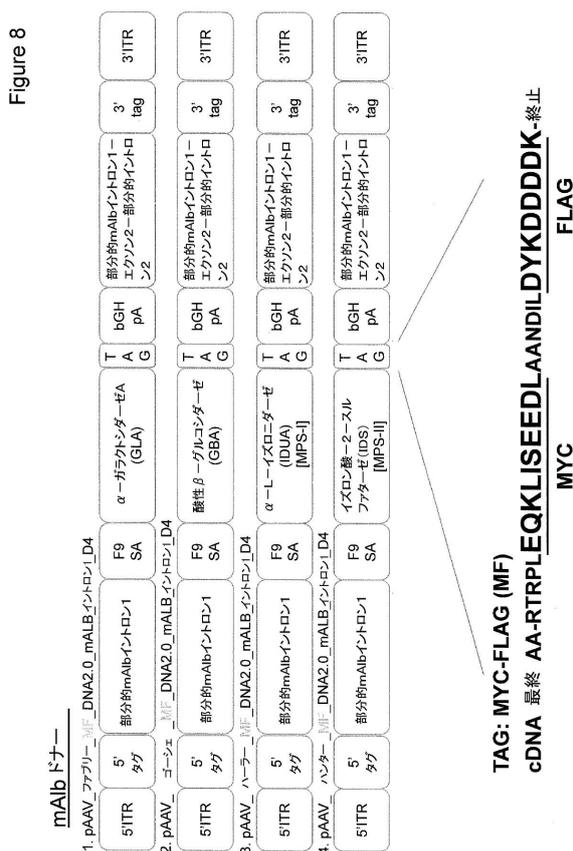


Figure 8

TAG: MYC-FLAG (MF)
cDNA 最終 AA-RT**RPL**E**Q**K**L**I**S**E**E**D**L**A**N**D**I**L**D**Y**K**D**D**D**D**K-終止
MYC FLAG

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リーバー, エドワード ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 50
1, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサ
イエンスーズ, インコーポレイテッド 気付

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 国際公開第2011/100058(WO, A1)

国際公開第2011/097036(WO, A1)

Lancet, 2008, 372(9645):1263-71

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

A61K 35/00 - 35/768

A61K 38/00 - 38/58

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