

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-517250

(P2017-517250A)

(43) 公表日 平成29年6月29日(2017.6.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10 ZNA	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B065
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045
CO7K 7/06 (2006.01)	CO7K 7/06	
CO7K 7/08 (2006.01)	CO7K 7/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-564960 (P2016-564960)	(71) 出願人	311016949
(86) (22) 出願日	平成27年4月24日 (2015.4.24)		シグマ-アルドリッチ・カンパニー・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成28年12月16日 (2016.12.16)		Sigma-Aldrich Co.,
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/027541		LLC
(87) 国際公開番号	W02015/167959		アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプリング・ストリート3050番
(87) 国際公開日	平成27年11月5日 (2015.11.5)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	61/985,205		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成26年4月28日 (2014.4.28)	(74) 代理人	100062144
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 青山 稜
		(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的エンドヌクレアーゼを用いる哺乳類ゲノムのエピジェネティック修飾

(57) 【要約】

本開示は、所定のエピジェネティック修飾を有する染色体に組み込まれた合成配列を含む遺伝的に操作された細胞株を提供するものであり、所定のエピジェネティック修飾は、既知の診断、予後、または疾病治療への感受性のレベルに関連する。また、前記エピジェネティック修飾合成核酸を含むキット、または、治療処置への反応性を予測すること、疾病を診断すること、または疾病予後を予測することに対する参照標準として用いることが可能な、前記エピジェネティック修飾合成核酸を含む細胞を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

所定のシトシン修飾を有する、少なくとも1つの染色体に組み込まれた核酸を含む、遺伝子改変細胞株であって、前記シトシン修飾は、既知の診断、予後、または疾病治療に対する感受性のレベルに関連する、遺伝子改変細胞株。

【請求項 2】

前記シトシン修飾が、5 - メチルシトシン (5 m C)、3 - メチルシトシン (3 m C)、5 - ヒドロキシメチルシトシン (5 h m C)、5 - フォルミルシトシン (5 f C) または 5 - カルボキシルシトシン (5 c a C) から選択される、請求項 1 に記載の遺伝子改変細胞株。

10

【請求項 3】

前記染色体に組み込まれた核酸が、疾病に関連する遺伝子の制御エレメント、制御エレメントの一部、コード領域、またはコード領域の一部のものと実質的配列同一性を有する配列を有する、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 4】

前記遺伝子が、表 1 に列挙される遺伝子である、請求項 3 に記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 5】

前記遺伝子が、M G M T、B R C A 1、B R C A 2、P I T X 2、G S T P 1、A P C、R A S S F 1 または H E R 2 から選択される、請求項 4 に記載の遺伝子改変細胞株。

20

【請求項 6】

前記染色体に組み込まれた核酸が、標的エンドヌクLEASEを用いて、前記細胞内の染色体位置に挿入される、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 7】

前記標的エンドヌクLEASEが、ジンクフィンガーヌクLEASE、C R I S P R ベースエンドヌクLEASE、メガヌクLEASE、転写活性化因子様エフェクターヌクLEASE (T A L E N)、I - T e v I ヌクLEASE若しくは関連モノマーハイブリッド、または、人工標的 D N A 二本鎖切断誘発剤から選択される、請求項 6 に記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 8】

前記染色体に組み込まれた核酸が、前記染色体に組み込まれた核酸が由来する内因性染色体配列を置き換える、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変細胞株。

30

【請求項 9】

前記染色体に組み込まれた核酸が、前記染色体に組み込まれた核酸の元のシトシン修飾状態を保持することを支援する隣接インスレーティングエレメントまたは他のエレメントを所有する遺伝子座で挿入される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 10】

前記遺伝子座が、A A V S 1、C C R 5、H P R T または R O S A 2 6 から選択される、請求項 9 に記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 11】

前記染色体に組み込まれた核酸に対応する内因性染色体配列が、不活性化される、または欠失される、請求項 9 に記載の遺伝子改変細胞株。

40

【請求項 12】

組換えタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列をさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 13】

前記細胞株がヒト細胞株である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 14】

前記所定のシトシン修飾が安定性である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変細胞株。

50

【請求項 15】

前記所定のシトシン修飾が準安定性である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変細胞株。

【請求項 16】

対象内の疾病の治療処置に対する反応性を予測するためのキットであって、前記キットは、参照標準としての使用のための所定のシトシン修飾を有する少なくとも 1 つの核酸を含み、前記シトシン修飾は、既知の診断、予後、または、疾病治療への感受性のレベルに関連する、キット。

【請求項 17】

対象内での疾病を診断するためのキットであって、前記キットは、参照標準としての使用のための所定のシトシン修飾を有する少なくとも 1 つの核酸を含み、前記シトシン修飾は、既知の診断、予後、または疾病治療への感受性のレベルに関連する、キット。

10

【請求項 18】

対象内の疾病の予後を予測するためのキットであって、前記キットは、参照標準としての使用のための所定のシトシン修飾を有する少なくとも 1 つの核酸を含み、前記シトシン修飾は、既知の診断、予後、または疾病治療への感受性のレベルに関連する、キット。

【請求項 19】

少なくとも 2 つの核酸を含み、各核酸は、異なる所定のシトシン修飾を有する、請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 20】

前記シトシン修飾が、5 - メチルシトシン (5 m C)、3 - メチルシトシン (3 m C)、5 - ヒドロキシメチルシトシン (5 h m C)、5 - フォルミルシトシン (5 f C) または 5 - カルボキシルシトシン (5 c a C) から選択される、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のキット。

20

【請求項 21】

前記核酸が、疾病に関連する遺伝子の制御エレメント、制御エレメントの一部、コード領域、またはコード領域の一部のものと実質的配列同一性を有する配列を有する、請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 22】

前記遺伝子が、表 1 に列挙される遺伝子である、請求項 21 に記載のキット。

30

【請求項 23】

前記遺伝子が、MGMT、BRCA1、BRCA2、PITX2、GSTP1、APC、RASSF1 または HER2 から選択される、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 24】

前記核酸が、細胞の染色体内に位置する、請求項 16 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 25】

前記細胞が、固定細胞である、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

前記核酸が、前記細胞から単離されるゲノム DNA 内に存在する、請求項 24 に記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、ゲノム配列のエピジェネティック修飾に関する。特に、本開示は、所定のエピジェネティック修飾を有する、染色体に組み込まれた核酸配列を含む、遺伝的に操作された細胞株に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子発現の異常な遺伝子機能及びパターン変化は、多数の疾病及び条件の重要な特徴

50

である。エピジェネティック変化が遺伝子異常に関与して、調節不全を引き起こすことを示す証拠が、増加している。ゲノムDNAにおけるエピジェネティック修飾の検出及び定量化が、近年進歩し、数多くの疾病、例えば、癌に対する診断及び予測の分析の新世代を導いている。さらに、所定の疾病治療計画に対する感受性のレベルに対して、エピジェネティック変化が相関することが示され、その結果、これは処理決定に用いられる。

【0003】

エピジェネティック修飾に基づいた、診断及び予測の分析ならびに処理手順の発展の進歩にもかかわらず、エピジェネティック変化状態の判断に利用可能な細胞比較基準が、現在、存在しない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

近年、ゲノム編集技術の進歩を用いて、ヒト細胞のゲノムを組み換え、臨床サンプル内で観測される遺伝子型を反映する疾病モデルを作成することに関心がもたれている。研究目的のためのフェノタイプの分析に加えて、臨床分析のための遺伝子型比較または基準として、遺伝的にまたはエピジェネティックに操作された細胞をさらに用いることも可能である。その組換え比較細胞株の利益において、以下である。(1)これらは、天然細胞及びゲノム状況の範囲で、細胞溶解の全てのその後の診断処理工程(またはホルマリン固定、パラフィン埋設(F F P E)抽出)、DNA隔離及び拡大を経るDNA分析テンプレートを提供し、及び(2)遺伝的なまたはエピジェネティックな変更により、安定かつ大量のゲノムDNAを提供する細胞型にモデル化することが可能である。

【0005】

本開示の1つの態様では、所定のエピジェネティック修飾を有する、少なくとも1つの染色体に組み込まれた核酸を含む、遺伝的に操作された細胞株であって、所定のエピジェネティック修飾は、既知の診断、予後、及び/または疾病治療に対する感受性のレベルに関連する、細胞株を提供するものである。ある態様では、エピジェネティック修飾は、シトシンの修飾、例えばシトシンのメチル化である。特定の態様では、エピジェネティック修飾核酸は、疾病に関連する遺伝子の制御エレメントまたは制御エレメントの一部のものと、実質的に配列が同一である。他の態様では、エピジェネティック修飾核酸は、疾病に関連する遺伝子のコード領域または遺伝子の一部のコード領域のものと、実質的に配列が同一である。疾病及び/または疾病処理予後に関連するエピジェネティック変化を有する遺伝子の例が、ここに提供される。ある態様では、エピジェネティック修飾核酸は、エピジェネティック修飾核酸が由来する内因性染色体配列を置き換えることが可能である。したがって、内因性染色体配列の天然エピジェネティック状態を、挿入した合成核酸の所定のエピジェネティック状態に変えることが可能である。あるいは、所定のエピジェネティック修飾を有している核酸を、挿入した核酸の所定のエピジェネティック修飾状態の保持を支援する隣接インスレーティングエレメントまたは他のエレメントを含む遺伝子座、例えばAAVS1、CCR5またはSOXA26、で挿入することが可能である。この例では、合成エピジェネティック修飾配列に対応した内因性染色体配列を、不活性化することが可能であり、または欠失することが可能である。組み込まれた核酸のエピジェネティック修飾状態を、安定性(stable)とすることができ、または準安定性(meta stable)とすることができる。標的とするエンドヌクレアーゼを用いて、エピジェネティック修飾を有する核酸を、関心の染色体場所に挿入することが可能である。標的エンドヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、I-TevIヌクレアーゼ若しくは関連モノマーハイブリッド、または人工標的DNA二本鎖切断誘発剤とすることができる。任意に、組み込まれたエピジェネティック修飾配列を含む細胞は、組換えタンパク質をコードする核酸を少なくとも1つ、さらに含むことが可能である。組換え細胞株は、ヒト細胞株を含む哺乳類の細胞株とすることができる。

【0006】

10

20

30

40

50

所定のエピジェネティック修飾を有する組み込まれた核酸を含む組換え細胞または細胞株は、数個の用途を有している。特定の態様では、調節領域のエピジェネティック状態を変更する合成配列の挿入を保有する改変細胞を用いて、遺伝子発現を支配または変更することができる。例えば、通常は修飾でない（すなわち通常はメチル化ではなくまたは高メチル化ではない）内因性調節染色体配列に加えて、またはこの代わりに、エピジェネティック修飾合成配列（例えばメチル化配列）の挿入を有する細胞を用いて、遺伝子発現を変更することが可能である。逆に、エピジェネティック修飾を有すると知られる内因性調節配列をエピジェネティック修飾が欠ける合成配列に置換すること、または、エピジェネティック修飾が欠ける合成配列を挿入することを用いて、遺伝子発現を変更することが可能である。別の態様では、エピジェネティック修飾配列の挿入を有する組換え細胞を用いて、エピジェネティック修飾パターンについての推測的な知識または挿入された配列の状態に基づき、細胞内での修飾配列のエピジェネティック安定性を分析することが可能である。他の態様では、エピジェネティック修飾配列の挿入を有する組換え細胞を、それらの既知または所定のエピジェネティック修飾状態の理由により、比較細胞株として、診断及び/または予測の分析に用いることが可能であり、これにより、この分析の診断及び/または予測の基準として役に立つ。さらなる態様では、エピジェネティック修飾配列の挿入を有する細胞を、分析に用いて、ドラッグ治療計画の適合性を判断することが可能である（図3を参照）。したがって、前記配列を含むエピジェネティック修飾配列及び細胞を、（癌などの）疾病診断の分析での参照規格として用いて、疾病予後を予測し、疾病挙動を監視し、そして標的治療への応答を測定することが、可能である。

【0007】

本開示は、対象での疾病の治療処置への反応性を予測するための、対象での疾病を診断するための、または、対象での疾病の予後を予測するための、キットをさらに提供するものであり、ここで、キットは、既知の診断、予後、または疾病処理に対する感受性のレベルに関連する所定のエピジェネティック修飾を有する少なくとも1つの核酸を含んでいる。

【0008】

本開示の追加の態様及び繰り返しを、以下でさらに詳細に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1Aは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）技術を用いて合成メチル化DNAの標的組み込みを図解する図である。標的ZFNによるAAVS1標的部位の開裂、及び、細胞DNA修復プロセスによる19bpのMGMT遺伝子断片を含む供与体配列のターゲット場所への組み込みを、図解する。図1Bは、3つの異なる所定のメチル化パターン化を図解する。*シンボルは、MGMT遺伝子断片内での4つのCpGサイト（すなわち、1、2、3、4）のことをいう。

【図2】合成メチル化パターンの安定性を経時的に示す。培養の49日後または80日後の、コロニー#1またはコロニー#7のMGMT遺伝子断片における各CpGサイトのメチル化割合をプロットする。

【図3】神経膠芽腫を処理するためにテモゾロマイドを処方するか否かを決定するための、MGMTプロモーターメチル化状態の用途を示す概略図を提示する。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本開示は、エピジェネティック修飾を含む合成核酸と、ここに詳述する前記合成配列を含む組換え細胞または細胞株とを提供する。疾病フェノタイプ、特に癌に関しての、それらの影響のため、エピジェネティック修飾はますます評価されている。本開示に従ってエピジェネティック修飾を有する合成配列を含む細胞を、安定かつ研究及び臨床目的で利用可能な大量のゲノムDNAを提供する細胞型にモデル化してもよい。本開示の細胞は、哺乳動物細胞内でエピジェネティック修飾を伴う、生理的に適切かつ強力な分析のための細胞参照規格として、さらに用いることが可能である。この基準は、診断及び予測の分析に

10

20

30

40

50

において、及び個々の対象の治療計画の評価において、有用である。

【0011】

I. 所定のエピジェネティック修飾を有する核酸

(a) エピジェネティック修飾

本開示は、所定のエピジェネティック修飾を有する核酸を提供し、ここで、所定のエピジェネティック修飾は、既知の診断、予後または疾病処理に対する感受性のレベルに関連する。一般に、エピジェネティック修飾核酸は、エピジェネティック修飾が化学的に生成される合成核酸である。一つの態様では、エピジェネティック修飾は、シトシン修飾である。シトシン修飾は、当業者に知られる前述の任意の修飾であってもよく、これは例えば、5 - メチルシトシン (5 mC)、3 - メチルシトシン (3 mC) 及び 5 - ヒドロキシメチルシトシンを含むシトシンのメチル化、5 - フォルミルシトシン (5 fC)、ならびに 5 - カルボキシルシトシン (5 caC) である。一実施形態では、エピジェネティック修飾は、例えば 5 - メチルシトシン (5 mC)、3 - メチルシトシン (3 mC) 及び 5 - ヒドロキシメチルシトシンを含むシトシンのメチル化である。1つの例では、修飾シトシンは、5 - メチルシトシンである。一実施形態では、メチル化シトシンが CpG に存在し、個々の CpG サイトに存在できるか、または CpGs のクラスターにグループ化でき、CpG アイランドと呼ばれる。

10

【0012】

一つの態様では、シトシン修飾は、メチル化及びヒドロキシメチル化の両方を含むメチル化状態シトシンの修飾である。メチル化状態は、配列内のメチル化シトシン残基の数または割合、すなわちメチル化量、または、配列内のメチル化残基のパターンなどの、特徴のことをいう。対象とする遺伝子ならびに出力の使用目的に基づき、所定のメチル化状態を調整してもよい。ある態様では、細胞参照規格はメチル化量が高いことを示すことが望ましく、またあるいは、メチル化が低いまたは不在であることを好んでもよい。メチル化の量を計算するための、当該技術分野の通常知識を有する者に知られる異なる数個の基準が、理解されよう。例えば、メチル化量は、特定の CpG アイランドのメチル化残基の割合でもよく、または、数個の CpG アイランドにおけるメチル化の平均でもよい。一般に形態 CHG 及び CHH を有する配列等の H が A、C または T である (例えば CAG、CTG、CAA、CAT 等の) ような、CpG アイランド以外の特徴もまたメチル化してもよいことが、当業者により理解される。また、メチル化量を、染色体配列全体にわたって包括的に測定してもよい。

20

30

【0013】

任意の適切な規則を用いて、メチル化または非メチル化であるように、核酸を記載してもよい。例えば、当業者は、CpG 残基の少なくとも 10% が特定のアイランドでメチル化される場合、メチル化核酸を考慮してもよく、そして、CpG 残基の 10% 未満がメチル化される場合は、非メチル化を考慮してもよい。もちろん、CpG 残基以外の特徴がメチル化される場合は、必要に応じて、前述のメチル化を計算にさらに含んでもよい。あるいは、核酸は、所定の割合のメチル化量を有するように記載されてもよく、例えば、シトシン残基の約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または 100% が、メチル化である。介在値が想定されることが、さらに理解される。メチル化が 0% または約 0% である核酸が、さらに想定される。質的にメチル化量を同定すること、例えば「高い」、「適度」、または、「低い」等は、当業者にさらに好都合であってよい。前述の用語は、(1) 通常または健康な細胞の内因性染色体配列に見出されるメチル化の量、(2) 特定のフェノタイプを有する細胞の内因性染色体配列に見出されるメチル化の量であって、異常若しくは疾病フェノタイプ及び/またはドラッグ処理感度若しくは耐性のフェノタイプを含むが限定されない、(3) 通常遺伝子発現レベルに対応する内因性染色体配列に見出されるメチル化の量; 及び、(4) 異常遺伝子発現レベル (すなわち過剰発現または過小発現) に対応する内因性染色体配列に見出されるメチル化の量、を参照して、必要に応じて容易に定義されてもよい。

40

50

【0014】

メチル化状態とは、単独で、またはメチル化残基の割合と組み合わせで、対象となる核酸のメチル化の特定のパターンを指してもよい。しかしながら、当業者は、本開示の核酸のメチル化と、対象から取得したサンプルで検出した内因性染色体配列のメチル化との間、ならびに以前に知られたまたは確立されたメチル化量及び/またはパターンとの間の、類似点及び差を解釈することができることを、理解するだろう。

【0015】

メチル化の量及び/またはパターンを決定する方法は、当該技術分野で知られており、例えば、デジタル定量化 (Li et al., *Nature Biotechnology*, 27: 858 - 863 (2009) 及び補助材料 (doi: 10.1038/nbt.1559)); 染色体配列を亜硫酸水素ナトリウムと反応させた後PCRが続くことが関与するメチル化特定PCR (MSP) (Herman et al., *PNAS*, 93: 9821 - 9826 (1996); Gonzalgo et al., *Cancer Res.*, 57: 594 - 599 (1997); Hegi et al., *Clin. Cancer Res.*, 10: 1871 - 1874 (2004)); 全ゲノム重硫酸塩配列決定 (BS-Seq); (メチル化過敏制限酵素またはメチル化依存制限酵素を用いた)メチル化及び非メチル化DNAを特異的に開裂する制限酵素の能力が関与するHELP分析; DNA-メチル化-関連タンパク質に結合する抗体の能力に基づくChIP-on-chip分析; HELP分析に類似した制限酵素ランダムマークゲノムスキニング法 (Hayashizaki et al., *Electrophoresis*, 14: 251 - 258 (1993); Costello et al., *Nat Genet*, 24: 132 - 138 (2000)); メチル化DNA断片を単離するために用いられるメチル化DNA免疫沈降 (MeDIP); 重硫酸塩処理したDNAのパイロシーケンス (Tost et al., *BioTechniques*, 35: 152 - 156 (2003)); MS-qFRET (Bailey et al., *Genome Res*, 19: 1455 - 1461 (2009)); 定量的な特異的メチル化領域 (QDMR); メチル過敏サザンプロットティング (HELP分析に類似); メチルライト、MS HRM、メチルメーター (商標) (McCarthy et al., 「メチルメーター (商標): DNAメチル化の分析のための、定量、過敏及び重硫酸塩フリーな方法」、*Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*の第5章中の、「DNAメチル化 - ゲノミクスから技術まで; eds T. Tatarinova and O. Kerton, *In-Tech*, March 2012, pp. 93 - 116); GLIB (Pastor et al., *Nature*, 473: 394 - 397 (2011)); 抗CMS (Pastor et al., *Nature*, 473: 394 - 397 (2011)); 及び、天然DNAの、メチル化及び非メチル化フラクションへの分離に用いられる、メチルCpG結合タンパク質の利用、が挙げられる。5-ヒドロキシメチルシトシンを含むDNAメチル化を検出する他の方法が、記載される (Szwagierczak et al., *Nuc. Acids Res.* 38: e181 (2010))。

【0016】

(b) 所定のエピジェネティック修飾を有する核酸の配列

ここに開示される所定のエピジェネティック修飾による核酸は一般に、対象とする遺伝子の、転写調節因子、一部の転写調節因子、コード領域、または一部のコード領域、のものとの実質的配列同一性を有するヌクレオチド配列を有しており、対象とする遺伝子は、疾病または疾患と関連する。ここに用いられる場合において、「実質的配列同一性」という語句とは、少なくとも約75%の配列同一性を有する配列のことをいう。様々な態様では、エピジェネティック修飾を有する合成染色体配列は、対象とする遺伝子に対して、約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の、配列同一性を有すること

ができる。

【0017】

ある態様では、所定のエピジェネティック修飾を有する核酸は、対象とする遺伝子に関連する転写調節因子のものと実質的配列同一性を有している。制御エレメントは、遺伝子の転写を調節するプロモーター、エンハンサー、サイレンサー、遺伝子座制御エレメントまたは任意の配列とすることができる。転写調節因子は、対象とする遺伝子のコードまたは非コード（例えばイントロン）領域の上流、下流、またはその領域内に位置することができる。特定の態様では、制御エレメントは、その対象とする遺伝子の、転写開始部位の上流のまたは5'領域内の、プロモーターまたはプロモーターの部分である。ある態様では、制御エレメントのエピジェネティック修飾（例えば、シトシンメチル化）は、遺伝子の転写を、完全にまたは部分的に抑制する。

10

【0018】

他の態様では、所定のエピジェネティック修飾を有する核酸は、疾病に関連した遺伝子のコード領域（すなわち1つ以上のエキソン）またはコード領域の一部のものと、実質的配列同一性を有している。一実施形態では、所定のエピジェネティック修飾を有する核酸は、対応する天然のまたは内因性染色体配列（すなわち通常若しくは無病の細胞の対応する内因性配列または通常遺伝子発現中に見出される対応する内因性配列（過剰発現または過小発現とは対照的に））と比較して、高メチル化である。別の実施形態では、所定のエピジェネティック修飾を有する核酸は、対応する天然のまたは内因性染色体配列と比較して、低メチル化である。エキソン及びイントロンを含む染色体領域は、CpG位置（CpGアイランドとして存在してもよい、または存在しなくてもよい）のメチル化を通して、遺伝子発現を調節することが、知られている。既知のエキソン及びイントロンのメチル化応答による遺伝子の例は、MGMT及びCXCR4をはじめとして、この他にここに定める多数の物が含まれる。

20

【0019】

ある態様では、所定のエピジェネティック修飾を有する核酸は、疾病に関連する遺伝子に由来する。対象とする遺伝子は、エピジェネティック修飾配列を有することが知られる遺伝子及び疾病に関連する遺伝子を含むものであり、この疾病は、例えば癌、自己免疫性疾患（例えば1型糖尿病、炎症性腸疾患）、炎症疾病（例えば喘息）、代謝性疾患、自閉症スペクトラム疾患、及び異常な遺伝子発現に関連する他の条件等である。対象とする特定の遺伝子は、MGMT、BRCA1、BRCA2、セブチン9、PITX2、GSTP1、APC、RASSF1、HER2、P15INK4B、p16INK4A、Rb、E-cad、ならびにこの部分に記載される他の遺伝子を含む。さらに、対象とする遺伝子の非限定的なリストが、下記の表Aに提供される。

30

【0020】

ここに記載される遺伝子は、異常なDNAメチル化による等のプロモーター領域内でのエピジェネティック修飾により、完全にまたは部分的に抑制されることが知られている遺伝子を含む（Jones et al., Cell, 128: 683-692 (2007) ; Jones et al., Nat. Genet. 21: 163-167 (1999) ; Jones et al., Nat. Rev. Genet. 3, 415-428 (2002)）。例えば、ハイパーメチル化は、5-メチルシトシンの量が非常に高い場合は、プロモーター領域を介して転写を抑制してこれにより疾患遺伝子の発現を防止する、主要エピジェネティック修飾の1つである。所定の癌が、遺伝子の高メチル化プロモーター領域に関連することが周知であり、この遺伝子は例えば、癌抑制遺伝子（例えばRb、p16ink4a、p15ink4b、p73、APC及びVHL）、転写因子遺伝子（例えばGATA-4、GATA-5、HIC1及びE-カドヘリン）、DNA修復遺伝子（例えばBRCA1、WRN、FANCF、RAD51C、MGMT、MLH1、MSH2、NEIL1、FANCB、MSH4、ATM及びGSTP1）、細胞サイクル調節に係る遺伝子（例えばp16ink4a、p15ink4b、p14arf及びCDKN2B）、アポトーシスに関する遺伝子、転移及び侵入に関する遺伝子（例えばCDH1、

40

50

TIMP3及びDAPK)、及び、代謝酵素遺伝子が挙げられる。例えば、胸、卵巣、消化管(胃及び結腸)、膵臓、肝臓、腎臓、結腸直腸、肺、膀胱、頸部、脳、神経膠腫、白血病、メラノーマ、前立腺、及び頭頸部の癌は、BRCA1、WRN、FANCF、RAD51C、MGMT、MLH1、MSH2、NEIL1、FANCB、MSH4、Rb、p16ink4a、p15ink4b、p73、APC、VHL、GATA-4、GATA-5、HIC1、E-カドヘリン、p14arf、CDH1、TIMP3、DAPK及びATM(すなわち、胸-GSTP1、BRCA1、p16ink4a、WRN;卵巣-BRCA1、WRN、FANCF、GSTP1、p16ink4a、RAD51C;結腸直腸-MGMT、APC、WRN、MLH1、p16ink4a、p14arf、MSH2;頭頸部-MGMT、MLH1、NEIL1、FANCB、MSH4、p16ink4a、DAPK、ATM;膀胱-p16ink4a、DAPK;頸部-p16ink4a;メラノーマ-p16ink4a;神経膠腫-p16ink4a;消化管-p16ink4a、p14arf、MLH1、MGMT、APC;肝臓-GSTP1;前立腺-GSTP1;肺-DAPK、MGMT、p16ink4a)の高メチル化プロモーター領域に関連する。数多くのヒト腫瘍型にわたるいくつかの異なる遺伝子の遺伝子プロモーターハイパーメチル化のプロファイルは、Esteller et al., Cancer Res, 61:3225-3229(2001)、及びそこに引用された多くの文献に報告される。Baylor, Nature Clinical Practice Oncology, 2:S4-S11(2005)を、さらに参照されたい。

10

20

30

40

50

【0021】

ここに記載される遺伝子は、異常なDNAメチル化等のプロモーター領域のエピジェネティック修飾が、所定の化学療法剤等の所定の治療計画に対する特定の予後または感受性に関連するように示された遺伝子を、さらに含んでいる。例えば、mgmtのプロモーターのメチル化が、テモゾロマイドへの反応性に関連した。例えば、Hegi et al., Clin. Cancer Res. 10(6):1871-4(2004);Hegi et al., New England J. Med. 352(10):997-1003(2005);Boots-Sprenger et al., Modern Pathol. 26(7):922-9(2013)を参照されたい。同様に、brca1及びbrca2プロモーターのメチル化が、乳癌予後を決定するために確立した診断手順の一部として、検討された。例えば、Abkevich et al., Br. J. Cancer, 107(10):1776-82(2012)を参照されたい。さらに、セブチン9のためのメチル化分析が、結腸直腸がんの病理評価に採用された。例えば、Grutzmann et al., PLoS one, 3(11):e3759(2008)を参照されたい。また、E-カドヘリンプロモーターのメチル化は、腫瘍抑制能力の低下及び転移可能性の増加に関連する。例えば、Graff et al., Cancer Res. 55(22):5195-9(1995)を参照されたい。

【0022】

ここに提供される他の遺伝子は、包括的な低メチル化が癌の発展及び進行に関連する遺伝子を含んでいる。例えば、5-ヒドロキシメチルシトシンの喪失が、メラノーマのエピジェネティックの特質であり(Lian et al., 2012, Cell, 150:1135-1146);包括的な低メチル化が、乳癌において抑制クロマチン領域及び遺伝子サイレンシングの生成に関連づけられ(Hon et al., 2012, Genome Res 22(2):246-58);包括的な低メチル化が、ヒト結腸癌組織で観測される(Hernandez-Blazquez et al., 2000, Gut 47:689-93)。

【0023】

また、対象とする遺伝子は、自閉症スペクトラム疾患(ASD)の発生及び/または重症度に関連する遺伝子を含んでいる。ASDの遺伝性評価は高いものの、ASDが一致する一卵性双生児間における症状の重症度の明白な差が、ASD病因論における非遺伝的なエピジェネティック因子の役割を示唆している(C. Wong et al., Mol.

Psychiatry, 2013(1-9), 先行オンライン出版 2013年4月23日; doi:10.1038/mp.2013.41を参照)。このような遺伝子は、例えば、MBD4、AUTS2、MAP2、GABRB3、AFF2、NLGN2、JMJD1C、SNRPN、SNURF、UBE3A、KCNJ10、NFYC、PTPRCAP、RNF185、TINF2、AFF2、GNB2、GRB2、MAP4、PDHX、PIK3C3、SMEK2、THEX1、TCP1、ANKS1A、APXL、BPI、EFTUD2、NUDCD3、SOCS2、NUP43、CCT6A、CEP55、FCJ12505、SRF、DNPEP、TSNAX、FERD3L、RCN2、MBTPS2、PKIA、DAPP1、CCDC41、HOXC5、RPL14、PSMB7、TAF7、INHBB、HNRPA0、MC3R20、BDKRB1、FDFT1、RAD50、21cg03660451、RECQL5、ZNF499、ARHGAP15、PTPRCAP、C18orf22、RAFTLIN、C14orf143、SUPT5H、ANXA1、C16orf46、GAPDH、FKBP4、LOC112937、SLC30A3、ZNF681、SELENBP1、ELA2、DUSP2、CDC42SE1、PNMA2、POU4F3、DIDO1、SCUBE3、CASP8、THRAP5、ETS1、PXDN、TMEM161A、HOXA9、C11orf1、MGC3207、OR2L13、C19orf33、P2RY11、NRXN1及びISL1を含んでいる。

10

【0024】

表Aは、例示的な遺伝子を列挙する。

20

表A．対象とする遺伝子

【表1-1】

21cg03660451	ABCB	ABCD1	ABCG2	ABHD16A	ACSL5
ACTA2	ADH1B	ADM	ADRB2	AFF2	AFF2
AGT	AGTR1	AK2	ALCAM	ALDH1A3	ALDH7A1
ANKS1A	ANXA1	AOX1	APC	ApoE	APXL
AR	AREG	ARHGAP15	ATG7	ATM	ATP1B1
AUTS2	AX2R	AXIN1	AXIN2	BACH1	BAK1
BAP1	BAX	BCAS1	BCL2L14	BDKRB1	BDNF
BECN1	BIRC5	BLT1	BMP4	BNC1	BPI

30

40

【表 1 - 2】

BRCA1	BRCA2	BRMS1	BTG2	BTK	C10orf99
C14orf143	C16orf46	C18orf22	C1GALT1C	C21orf56	CA9
CACNA1C	CADM4	CALCA	CALCR	CASP8	CCDC41
CCDC88C	CCR5	CCT6A	CD11a	CD177	CD31
CD68	CDC42SE1	CDH1/E CAD	CDH13	CDH5	CDKN1C
CDS1	CDS2	CDX2	CEBPa	CELF2	CEP55
CETP	CHD5	CHFR	CHGA	CIP29	CITED2
CLDN4	CLOCK	C-Myc	C-myc	COASY	COL14A1
COL18A1	COL1A1	COL1A2	COL6A1	CRBP	CREB3L3

10

20

【表 1 - 3】

CRYA1	CSPG2	DAPK	DAPP1	DAXX	DBC1
DCC	DDIT4L	DDK2	DDK4	DEAF-1	DGKZ
DHCR7	DIDO1	DIF2	Dio3	DIRAS3	DKK3
DLC1	DNAJC24	DNAPKC	DND1	DNMT3A	DNMT3B
DOA	DPH1	DUOX2	DUSP2	ECAD	ECRG4
EDG1	EFEMP1	EFNB3	EFS	EFTUD2	EGR
EGR4	EHF	EIF4E	ELA2	EPHB1	EPHB2
ERAP1	ERBB2	EREG	ERVWE1	ESO	ESR1
ESR2	ETS1	EZH2	Fact2	FAM62C	FANCB

30

40

【表 1 - 4】

FANC F	FBXO32	FCJ125 05	FDFT1	FKBP4	FMR1
FOL2	FOXE1	FOXI1	FOXP3	FRK	FRM1
FTO	FYN	FZD9	G6PD	GABRB 3	GAD1
GADD 45A	GAPDH	GAS	GATA1	GATA2	GATA 3
GATA 4	GATA6	GC-1	GCR	GLI2	GLS2
GNAS	GNB2	GNB3	GNPAT	GPMB	GPNM B
GRB2	GRIK2	GRS16	GSTM1	GSTM2	GSTP 1
GUL1	H19	HAND1	HCG25	HER2	HERV E
HES4	HLA-DR 51	HLA-DR A	HLADRB 1*1501	HMGCS 2	HNRPA A0

10

20

【表 1 - 5】

HOXA 4	HOXA9	HOXB3	HOXB4	HOXC5	HOXD 10
HRES 1	HSD17B 10	HSPA9B	HSPB6	HTR2A	HUMA RA
IFI2 7	IG-DMR	IGF1	IGF2	IGF2D MR0	IGF2 R
IGFA S	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP 6	IGFB P7
IL-1 0	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17 a	IL-1 8
IL-1 B	IL-2	IL-27R A	IL-4	IL-6	IL-7 R
IL-8	IL-8RA	INCA1	INFG	INFGR 2	ING4
INH B	INSR	IRF8	ISL1	ITGB3	JMJD 1C
JPH4	KCNJ10	KCNMA1	KCNQ1	KIR18	KIR2 DL4

30

40

【表 1 - 6】

KITLG	KLF4	KLHL3	KLK2	Kl o t h o	KRT13
KYNU	L a c t o f e r i n	LAG3	LCN2	LDHA	LDHC
LEP	LET-7A -3	LGAL	L i n 2 8 A	LINE1	LLGL2
LOC112937	LOX	LTA	LTA	LTA4H	LTC4S
LXN	LY86	MAGE-3	MAGEA1	MAGEL2	MAGEL3
Ma o A	MAP2	MAP4	MBD4	MBTPS2	MC3R20
Me g 3	MGMT	MLH1	MN1	MOBKL2B	MSF
MSH2	MSH4	MSX1	MT1G	MTHFR	NANO G
NAT1	NAT2	NBL2	NDN	NEFL	NEIL1

10

20

【表 1 - 7】

NFIB	NFIX	NFYC	NID1	NLGN2	NLRP1
NNAT	NOLA1	NOS2A	NOTCH1	NOXA1	NPFFR2
NPM2	NR1I3	NRG1	NUDCD3	NUP43	OAS2
OBFC2B	OCT4	OFD1	ORAI2	OTOS	OXTR
P14ARF	P14ARF	P15	P15INK4B	P16	p16INK4A
P21	P21 (CDKN1A)	P73	PAD	PAI-1 (SERPINE1)	PAWR
PAX6	PCDH7	PDCD5	PDE11A	PDGFR A	PDHX
PDK1	PDLIM4	PDX1	PER1	PER2	PGF
PGR	PHF11	PIGR	PIK3C3	PIK3R1	PITX1

30

40

【表 1 - 8】

PITX2	PKIA	PLCB1	PLS3	PNLIPRP3	PNMA2
PNPLA1	PNPLA3	POMC	POU4F3	PPARGC1A	PPAR γ
PRCH	PRF1	PRRC2A	PSMB7	PTEN	PTGER2
PTGS2	PTH	PTPN6	PTPRCAP	RAD15C	RAD50
RAFTLIN	RARA	RARB	RARRES1	RASGRF	RASSF1
Rb	RBL2	RCN2	RECQL5	REELIN	REST
RGS5	RIMBP2	RNF185	RPL14	SCUBE3	SELEBNP1
Septin9	SFRP1	SFRP2	SFRP4	SFRP5	SGCE
SH3BP2	SIX3	SLC17A6	SLC2A3	SLC30A3	SLC39A5

10

20

【表 1 - 9】

SLC4A3	SLC5A1	SLC6A3	SLC6A4	SLC9A1	SMEK2
SNCA	SNRPN	SNTB1	SNURF	SOCS2	SOD1
SOD2	SOX1	SOX2	SOX9	SP140	SPARC
SPI1	SPRY4	SRFTSNAXFERD3L	STAT1	STAT3	STAT4
SULF1	SUMO3	SUPT5H	TAF7	TAGLN3	TCF7
TCF7L2	TCP1	TEPP	TERC	TERT	TF
TFPI2	TGFA-308	TGFBI	THEX1	THRAP5	THY
TIMP3	TINF2	TMCO3	TMEM18	TMEM212	TMS
TNFA	TNFRSF10C	TNFRSF10D	TNFRSF25	TNFSF15	TNFSF6 (FAS)

30

40

【表 1 - 10】

TNFS F7	TPH2	TRIM29	TRIM3	TRIM3 1	TRIM 71
TRPA 1	TRPV1	TRPV3	TSP50	TUBB2	TUSC 1
TWIS T	UBA7	UBE3A	UBE4A	UBE4A	UCP2
UGT1 5MP	UGT17M P	UHRF1	UMPK	UQCRH	UST
VAV1	VDR	VEGRA	VHL	VLDLR	WDFY 1
WRN	ZNF499	ZNF681			

10

【0025】

(c) 核酸の型

ここに開示される所定のエピジェネティック修飾を有する核酸は、RNA、DNA、一本鎖、二本鎖、直鎖、または環状とすることができる。エピジェネティック修飾核酸が二本鎖である反復では、エピジェネティック修飾パターンは、二本の鎖上で同じものまたは異なるものとしてすることができる。ある実施形態では、両方の鎖が、エピジェネティック修飾を欠如していてもよい。他の実施形態では、二本鎖の一方が、エピジェネティック修飾を有していてもよい(すなわち半修飾(hemi-modified))。さらなる実施形態様では、両方の鎖が、エピジェネティック修飾を有していてもよい(すなわち二本鎖修飾(duplex-modified))。一部の例では、所定のエピジェネティック修飾を有する核酸は、一本鎖の直鎖分子、例えばオリゴヌクレオチドなど、とすることができる。他の例では、エピジェネティック修飾核酸は、二本鎖の直鎖分子とすることができる。2つの補完的な一本鎖核酸をアニールすることにより、二本鎖の直鎖核酸を調製することができる。または、長い二本鎖核酸の酵素の開裂を通じて、前述の核酸を調製することができる。ある態様では、二本鎖の直鎖核酸は、標的エンドヌクレアーゼにより作成される突出部と両立する突出部を有することができる。(以下に詳述するように、細胞のゲノムの特定の標的位置に所定のエピジェネティック修飾を有する核酸を挿入するため、標的エンドヌクレアーゼを用いることができる。)突出部は、長さで1、2、3、4、5またはそれ以上のヌクレオチドとすることができる。他の反復では、エピジェネティック修飾を有する直鎖(一本鎖または二本鎖)核酸内でのヌクレオチドの一部または全部は、ホスホリチオ酸結合により関連づけることができる。例えば、一方の末端または両方の末端上の終末の2、3、4またはそれ以上のヌクレオチドは、ホスホリチオ酸結合を有することができる。他の態様では、エピジェネティック修飾核酸は、環状とすることができる。例えば、所定のエピジェネティック修飾を有する核種酸は、以下に詳細に説明するように、例えばプラスミドベクトルのように、大きなポリヌクレオチドの部分とすることができる。

20

30

40

【0026】

エピジェネティック修飾を有する核酸の長さを、変えることが可能である。一般に、エピジェネティック修飾核酸の長さを、約5ヌクレオチド(nt)または塩基対(bp)から約200,000nt/bpまで変化させることができる。特定の実施形態では、エピジェネティック修飾核酸の長さを、約5nt/bpから約200nt/bpまで、約200nt/bpから約1000nt/bpまで、約1000nt/bpから約5000nt/bpまで、約5,000nt/bpから約20,000nt/bpまで、または、約20,000nt/bpから約200,000nt/bpまで、変化させることが可能である。

【0027】

50

ある態様では、エピジェネティック修飾核酸は、少なくとも1つの隣接配列をさらに含んでいてもよい。隣接配列は、上流、下流、またはこれら両方であってもよい。一つの態様では、エピジェネティック修飾核酸は、制限エンドヌクレアーゼ部位を含む上流及び/または下流配列に隣接することができる。上記のように、エピジェネティック修飾核酸は、標的エンドヌクレアーゼにより作成された突出部と適合性がある突出部に（上流、下流、またはこれら両方に）隣接することができる。追加の態様では、エピジェネティック修飾核酸は、エピジェネティック修飾核酸のエピジェネティック修飾を安定させることができる少なくとも1つのインスレーティングエレメントに（上流、下流、またはこれら両方に）隣接することができる。インスレーティングエレメントは、当該技術分野で知られており、West et al. *Genes & Dev.* 16: 271 - 88 (2002) ; Barkess et al., *Epigenomics* 4 (1) : 67 - 80 (2012) を参照されたい。

10

【0028】

さらなる態様では、エピジェネティック修飾核酸は、標的エンドヌクレアーゼにより認識されるターゲット部位の一方上にある配列と、実質的配列同一性を有する配列に（上流、下流、またはこれら両方に）隣接することができる。例えば、エピジェネティック修飾核酸は、上流配列及び下流配列に隣接することができ、この上流配列及び下流配列のそれぞれは、標的エンドヌクレアーゼにより認識されるターゲット部位の上流または下流にそれぞれに位置する配列と、実質的配列同一性を有している。このような場合、エピジェネティック修飾核酸は、相同性指向プロセスにより、標的染色体位置に挿入することが可能である。上記のように、「実質的配列同一性」という語句は、少なくとも約75%の配列同一性を有する配列のことをいう。したがって、エピジェネティック修飾核酸に隣接する上流及び下流配列は、標的部位に対する上流または下流の配列に対して、約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の、配列同一性を有することができる。非限定的な例では、エピジェネティック修飾核酸に隣接する上流及び下流配列は、標的部位の染色体配列上流または下流それぞれと、約95%または100%の配列同一性を有することができる。

20

【0029】

ある態様では、上流配列は、標的部位のすぐ上流に位置（すなわち標的部位に隣接）する染色体配列と、実質的配列同一性を共有してもよい。他の態様では、上流配列は、標的部位からの約百（100）個のヌクレオチドだけ上流に位置する染色体配列と、実質的配列同一性を共有する。したがって、例えば、上流配列は、約1～約20個、約21～約40個、約41～約60個、約61～約80個、または約81～約100個のヌクレオチドだけ、標的部位から上流の染色体配列と、実質的配列同一性を共有することができる。一実施形態では、下流配列は、標的部位のすぐ下流に位置（すなわち標的部位に隣接）する染色体配列と、実質的配列同一性を共有する。他の態様では、下流配列は、約百（100）個のヌクレオチドだけ標的部位から下流に位置する染色体配列と、実質的配列同一性を共有する。したがって、例えば、下流配列は、約1～約20個、約21～約40個、約41～約60個、約61～約80個、または約81～約100個のヌクレオチドだけ、標的部位から下流に位置する染色体配列と、実質的配列同一性を共有することができる。各上流または下流配列は、約10個のヌクレオチドから約5000個のヌクレオチドまで、長さを変化できる。ある態様では、上流及び下流配列は、約10～約50個、約50～約100個、約100～約500個、約500～約1000個、約1000～約2000個、または約2000～のヌクレオチドを含むことができる。特定の態様では、上流及び下流配列は、約20～約500個のヌクレオチドで長さを変化させることが可能である。

30

40

【0030】

さらに他の態様では、エピジェネティック修飾核酸は、標的エンドヌクレアーゼにより認識される（そして開裂される）少なくとも1つの配列に（上流、下流、またはこれら両

50

方に隣接することが可能である。特定の態様では、エピジェネティック修飾核酸は、標的エンドヌクレアーゼにより認識されるターゲット部位に両側で隣接することができる。この例では、標的エンドヌクレアーゼは、エピジェネティック修飾核酸を含む大きなポリヌクレオチドを開裂することもでき、これにより、エピジェネティック修飾核酸を、標的エンドヌクレアーゼにより生成される染色体DNAの突出部と適合性を持つ突出部を有する直鎖分子として、解放する。その結果、エピジェネティック修飾核酸を含む解放配列を、直接ライゲーションにより、望ましい染色体位置に挿入することができる。したがって、ライゲーションされる配列の末端を、平滑末端または粘着性末端とすることができる。

【0031】

エピジェネティック修飾核酸が、上述したような、少なくとも1つのさらなる配列に隣接する実施形態では、エピジェネティック修飾核酸を、大型ポリヌクレオチドの部分とすることができる。一部の例では、エピジェネティック修飾核酸と、さらなる配列とを含む大型ポリヌクレオチドを、直鎖とすることができる。他の例では、エピジェネティック修飾核酸と、さらなる配列とを含むポリヌクレオチドを、環状とすることができる。例えば、それはベクターの部分であってもよい。

【0032】

エピジェネティック修飾核酸がベクターの部分である実施形態では、様々なベクターを用いることができる。適切なベクターとしては、制限なしに、プラスミドベクトル、ファージミド、コスミド、人工/小型染色体、トランスポゾン及びウイルスベクターを含む。一実施形態では、エピジェネティック修飾核酸は、プラスミドベクター内に存在する。適切なプラスミドベクターの非限定的な例としては、pUC、pBR322、pET、pBluescript、及びそれらの変異株を含む。ベクターは、例えば複製起点、選択可能マーカー配列（例えば抗生物質耐性遺伝子）等の、さらなる配列を含んでいてもよい。さらなる情報は、“Current Protocols in Molecular Biology” Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003、または、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3rd edition, 2001で見出すことが可能である。

【0033】

ある実施形態では、エピジェネティック修飾核酸を含むベクターは、マーカータンパク質をコードする配列をさらに含むことができる。一つの態様では、マーカータンパク質は、蛍光タンパク質である。適切な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質（例えばGFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、EGFP、Emerald（エメラルド）、AzamiGreen（アザミグリーン）、Monomeric AzamiGreen（アザミグリーン単量体）、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1）、黄色蛍光タンパク質（例えばYFP、EYFP、Citrine（シトリン）、Venus（ビーナス）、YPet、PhiYFP、ZsYellow1）、青色蛍光タンパク質（例えばEBFP、EBFP2、Azurite（アジュライト）、mKalama1、GFPUV、Sapphire（サファイヤ）、T-sapphire（T-サファイヤ）、）、青緑色蛍光タンパク質（例えばECFP、Cerulean（セルリアン）、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan（ミドリイシシアン））、赤色蛍光タンパク質（mKate、mKate2、mPlum、DsRed monomer（DsRed単量体）、mCherry、mRFP1、DsRed-Express（DsRedエクスプレス）、DsRed2、DsRed-Monomer（DsRed-単量体）、HcRed-Tandem（HcRedタンデム）、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry（mラズベリー）、mStrawberry（mストロベリー）、Jred（Jレッド））、及び、橙色蛍光タンパク質（mOrange（mオレンジ）、mKO、Kusabira-Orange（クサビラ-オレンジ）、Monomeric Kusabira-Orange

10

20

30

40

50

(クサビラオレンジ単量体)、mTangerine (mタンジェリン)、tdTomato (tdトマト))を含む。

【0034】

(d) エピジェネティック修飾核酸の生成

エピジェネティック修飾核酸は、従来のホスホラミダイト固相オリゴヌクレオチド合成法を用いて合成することができるが、ここでは、標準シトシンホスホラミダイトは、適切な位置で修飾シトシンホスホラミダイトに置換される。例えば5 - メチルシトシンホスホラミダイト、5 - ヒドロキシメチルシトシンホスホラミダイト、5 - フォルミルシトシンホスホラミダイト、5 - カルボキシルシトシンホスホラミダイト、3 - メチルシトシンホスホラミダイト等の修飾シトシンホスホラミダイトは、商業的に入手可能である。当業者は、標準合成を組み換えるための適切な手段、及び、修飾シトシンホスホラミダイトを用いる際の脱保護ステップに、精通している。

10

【0035】

II. エピジェネティック修飾を有する核酸を含む細胞

また、上記セクションIに詳述するように、本開示は、所定のエピジェネティック修飾を有する少なくとも1つの合成核酸を含む、遺伝的に操作された細胞または細胞株を提供する。一般に、遺伝的に操作された細胞または細胞株は、染色体に組み込まれたエピジェネティック修飾核酸を、少なくとも1つ含み、ここで、エピジェネティック修飾は、既知の診断、予後、または疾病処理に対する感受性のレベルに関連する。染色体に組み込まれたエピジェネティック修飾核酸を含む細胞または細胞株は、当業者に知られる任意の方法により調製されてもよい。例えば、遺伝子発現を制御する、診断及び予測の分析の参照標準として役に立つ、及び/または、治療計画を判断する等、細胞または細胞株がここに記載される利用のいずれかに対して確実に用いてもよくなるよう、エピジェネティック修飾が安定であることが好ましい。安定な修飾は、細胞成長及び培養の間の全てで保持されることが望ましく、安定なエピジェネティック修飾を有する染色体に組み込まれた核酸を含む細胞は、当業者に知られる技術を用いて、細胞株として調製されてもよい。しかしながら、一部の態様では、エピジェネティック修飾は準安定性でもよい。エピジェネティック修飾核酸に対応する内因性染色体配列におけるエピジェネティック修飾パターンまたは状態についての推測的な知識に基づき、準安定性修飾を保有する細胞を用いて、エピジェネティック安定性を正確に分析してもよい。下に記載される標的エンドヌクレアーゼ介在ゲノム編集を用いて、細胞のゲノムを修飾して、核酸に所定の修飾を含んでもよい。

20

30

【0036】

ここに開示される細胞または細胞株では、未修飾のまたは天然のエピジェネティック状態を有した対応する内因性染色体配列の遺伝子座に、エピジェネティック修飾核酸を挿入することができる。ここでは、内因性染色体配列は欠失または不活性化されたものである。例えば、エピジェネティック修飾核酸を、エピジェネティック修飾核酸が由来する相同的内因性染色体配列に置き換えることができる。あるいは、エピジェネティック修飾が安定な遺伝子座、例えばAAVS1、ROSA26、HPRT及びCCR5の遺伝子座のようなゲノム安全領域のような隣接インスレーティングエレメントを所有する遺伝子座に、エピジェネティック修飾核酸を挿入することができる。この実施形態では、エピジェネティック修飾合成配列に対応する内因性染色体配列を、任意に不活性化または欠失させることが可能である。ここにさらに詳細に議論するように、エピジェネティック修飾合成核酸は、対象とする遺伝子の調節配列(すなわち調節エレメント)またはコード配列と、実質的配列同一性を有している。

40

【0037】

(a) 細胞型

本開示で想定される細胞を変化させることが可能であり、または変化する。一般に、細胞は真核生物の細胞である。様々な態様では、細胞は、ヒト細胞、非ヒト哺乳類細胞、非哺乳類脊椎動物細胞、無脊椎細胞、昆虫細胞、植物細胞、イースト細胞、または単一細胞真核生物であってもよい。細胞は、成体細胞または胎生期細胞(例えば、胚)であっても

50

よい。さらに他の態様では、細胞は、幹細胞でもよい。適切な幹細胞は、胚幹細胞、ES類似幹細胞、胎児幹細胞、成体幹細胞、多能性幹細胞、誘導多能性幹細胞、多能性幹細胞、少能性幹細胞、分化単能幹細胞などを、制限なしに含む。例示的な態様では、細胞は、哺乳類細胞である。

【0038】

一部の態様では、細胞は細胞株細胞である。適切な哺乳類細胞の非限定的な例としては、チャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞；マウス骨髄腫NS0細胞、マウス胎生期繊維芽細胞3T3細胞（NIH3T3）、マウスBリンパ腫A20細胞；マウスメラノーマB16細胞；マウス筋芽細胞C2C12細胞；マウス骨髄腫SP2/0細胞；マウス胚間充織C3H-10T1/2細胞；マウス癌腫CT26細胞、マウス前立腺DuCuP細胞；マウス胸EMT6細胞；マウス肝癌Hepa1c1c7細胞；マウス骨髄腫J5582細胞；マウス上皮MTD-1A細胞；マウス心筋MyEnd細胞；マウス腎臓RenCa細胞；マウス膵臓RIN-5F細胞；マウスメラノーマX64細胞；マウスリンパ腫YAC-1細胞；ラット神経膠芽腫9L細胞；ラットBリンパ腫RBL細胞；ラット神経芽B35細胞；ラット肝癌細胞（HTC）；バッファローラット肝臓BRL3A細胞；イヌ腎臓細胞（MDCK）；イヌ乳房（CMT）細胞；ラット骨肉腫D17細胞；ラット単核細胞/マクロファージDH82細胞；サル腎臓SV-40形質転換線維芽（COS7）細胞；サル腎臓CVI-76細胞；アフリカミドリザル腎臓（VERO-76）細胞；ヒト胚腎臓細胞（HEK293、HEK293T）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝細胞（Hep G2）；ヒトU2-OS骨肉腫細胞、ヒトA549細胞、ヒトA-431細胞、ヒトSW48細胞、ヒトHCT116細胞、及び、ヒトK562細胞、を含んでいる。哺乳類の細胞株の大規模なリストは、米国菌培養収集所カタログ（ATCC、マナサス、ヴァージニア州）で見出されてもよい。特定の実施形態では、細胞はヒト細胞株細胞である。

10

20

【0039】

（b）任意の核酸

ある態様では、ここに開示されるエピジェネティック修飾核酸を含む細胞は、組換えタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を、さらに含むことが可能である。組換えタンパク質をコードする核酸は、細胞の染色体内に位置することができ、または、それは染色体外とすることができる。一般に、コードされた組換えタンパク質は異種であり、これは、タンパク質が細胞に天然ではないことを意味する。ある態様では、組換えタンパク質は、治療的なタンパク質であってもよい。典型的な組換え型治療タンパク質は、抗体、抗体断片、モノクローナル抗体、ヒト型抗体、ヒト型モノクローナル抗体、キメラ抗体、IgG分子、IgG重鎖、IgG軽鎖、IgA分子、IgD分子、IgE分子、IgM分子、ワクチン、成長因子、サイトカイン、インターフェロン、インターロイキン、ホルモン、凝固（または、凝結）因子、血液成分、酵素、機能性食品タンパク質、前述のいずれかの機能的断片若しくは機能的変異株、または、前述のタンパク質のいずれかを含む融合タンパク及び/若しくは機能的断片またはその変異株、を制限なしに含む。

30

【0040】

他の態様では、組換えタンパク質は、改良された特性を細胞に、または改良された特性を第1の組換えタンパク質に与える、タンパク質であってもよい。改良された特性の非限定的な例は、ロバスト性増加、生存度増加、生残性増加、増殖増加、細胞サイクル進行増加（すなわちG1からS期への進行増加）、細胞成長増加、細胞サイズ増加、内因性タンパク質の生成増加、異種のタンパク質の生成増加、組換えタンパク質の安定性増加、組換えタンパク質の翻訳後プロセッシング変化、及び、上記のいずれかの併用を含んでいる。ある態様では、細胞特性を改良するタンパク質が、過剰発現してもよい。適切なタンパク質の非限定的な例としては、セルピタンパク質（例えばSerpinB1）、細胞調節タンパク質、細胞サイクル制御タンパク質、アポトーシス阻害剤、代謝経路タンパク質、ポスト翻訳修飾タンパク質、人工転写因子、転写活性化因子、転写阻害因子、及びエンハンサータンパク質を含んでいる。

40

50

【0041】

さらなる実施態様では、組換えタンパク質は、蛍光タンパク質（例を上記に詳述する）等のマーカータンパク質、または、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T）、ジヒドロ葉還元酵素（D H F R）、及び/またはグルタミン合成酵素（G S）、または、抗生物質耐性遺伝子によりコードされるタンパク質などの、選択可能なマーカータンパク質とすることができる。

【0042】

I I I . 標的エンドヌクレアーゼを用いた、所定のエピジェネティック修飾を有する染色体に組み込まれた核酸を含む細胞の生成

本開示の他の態様として、セクション I I で上記に詳述した細胞を調製する方法を提供する。この方法は、所定のエピジェネティック修飾を有する合成核酸を細胞のゲノムに挿入すること、及び、対応する内因性配列を任意に抑制（不活性化）することまたは欠失させること、を含んでいる。エピジェネティック修飾核酸は、メチル化（5 - メチルシトシン（5 m C）、3 - メチルシトシン（3 m C）及び5 - ヒドロキシメチルシトシンを含む）、5 - フォルミルシトシン（5 f C）及び、5 - カルボキシルシトシン（5 c a C）等の、シトシン修飾を有することができる。特定の態様では、修飾はシトシンメチル化である。合成核酸は、正常細胞または特定のフェノタイプを有する細胞の対応する内因性配列内に見出されるメチル化量、または、通常の遺伝子発現レベル若しくは異常遺伝子発現レベル（すなわち過剰発現または過小発現）に対応する配列に見出されるメチル化の量と比較して、高メチル化または低メチル化を行うことができる。

10

20

【0043】

エピジェネティック修飾核酸は、対応する内因性配列の遺伝子座で、または、異なる遺伝子座、例えばエピジェネティック修飾核酸に安定性をもたらす遺伝子座で、挿入することができる。

【0044】

エピジェネティック修飾核酸は、例えば、対応する内因性染色体配列を、完全に置換することができる。この置換（内因性配列の欠失及び合成エピジェネティック修飾配列の挿入）は、標的エンドヌクレアーゼの利用等の、当該技術分野で知られる方法を用いて完了してもよい。あるいは、エピジェネティック修飾核酸は、染色体組み込みの前にエピジェネティック修飾核酸のエピジェネティック修飾状態（またはパターン）の保持を促進する隣接インスレーティングエレメントまたは他の遺伝因子を、所有する遺伝子座等、ゲノムの範囲内の好ましい遺伝子座で、挿入することができる。安定効果を所有する遺伝子座は、ゲノムのセーフハーバー部位として知られており、A A V S 1、C C R 5、H P R T 及び R O S A 2 6 等の遺伝子座を含んでいる。また、外因性インスレーティングエレメントを、エピジェネティック修飾核酸の近接に配置して、望ましい修飾状態の保持を援助してもよい。したがって、一つの態様では、エピジェネティック修飾核酸及びインスレーティングエレメントの両方を、対応する内因性染色体配列の遺伝子座に配置することができる。上記のように、標的エンドヌクレアーゼを、対象とするゲノム遺伝子座にエピジェネティック修飾核酸を組み込むために、用いることができる。

30

40

【0045】

任意の適切な標的エンドヌクレアーゼを用いて、対応する内因性配列の遺伝子座または他の好ましい遺伝子座で、エピジェネティック修飾核酸を挿入してもよい。例えば、標的エンドヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、C R I S P R ベースエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、I - T e v I ヌクレアーゼ若しくは関連モノマーハイブリッド、または、人工標的DNA二本鎖切断誘発剤であってもよい。例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼの対は、同時に対象とするエピジェネティック修飾核酸を挿入しつつ、非相同性末端結合（N H E J）を達成する。例えば、O r l a n d o e t a l . , N u c . A c i d R e s . 3 8 (1 5) : e 1 5 2 (2 0 1 0) を参照されたい。あるいは、改変RNA誘導型エンドヌクレアーゼまたは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）を用い

50

てもよい。I - T e v I の触媒領域を用いて生成された T A L E N を調製してもよく、B e u r d e l e y e t a l . , N a t . C o m m u n . 4 : 1 7 6 2 d o i : 1 0 . 1 0 3 8 / n c o m m s 2 7 8 2 (2 0 1 3) に記載のように用いてもよい。また、K l e i n s t i v e r e t a l . , P N A S 1 0 9 (2 1) : 8 0 6 1 - 6 (2 0 1 2) に記載のように、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼまたは L A G L I D A D G ホーミングエンドヌクレアーゼ骨格に融着される I - T e v ヌクレアーゼ領域等、ハイブリッドエンドヌクレアーゼを用いてもよいことを、当業者は理解する。また、K a t a d a e t a l . , N u c . A c i d R e s . 4 0 (1 1) : e 8 1 (2 0 1 2) に記載のように、人工標的 DNA 二本鎖切断誘発剤を用い、A R C U T (人工制限 DNA カッター) 等、現在の方法で相同組み換えを促進してもよい。

10

【0046】

本開示は、ここに記載する標的エンドヌクレアーゼのいずれか等の標的エンドヌクレアーゼを用いて、所定のエピジェネティック修飾を有する合成核酸を真核細胞に挿入する方法を包含する。この方法は、(i) 少なくとも1つの標的エンドヌクレアーゼまたは少なくとも1つの標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸、ここで、各標的エンドヌクレアーゼは、細胞の内因性染色体配列内の部位を標的とする、及び、(i i) 所定のエピジェネティック修飾を有する少なくとも1つの合成核酸を、細胞に導入することを含む。ある態様では、エピジェネティック修飾核酸は、標的エンドヌクレアーゼにより生成されるものと適合性がある突出部を含む直鎖配列であってもよい。他の態様では、エピジェネティック修飾核酸は、細胞のゲノムの標的開裂部位の両側における配列と実質的配列同一性を有する上流及び下流配列に隣接することができる。さらなる態様では、エピジェネティック修飾核酸は、標的エンドヌクレアーゼにより認識される標的部位に隣接することができる。この方法はさらに、エピジェネティック修飾核酸の標的部位への挿入、及び/または、標的部位での内因性染色体配列の失活に導く DNA 修復プロセスにより、修復される少なくとも1つの二本鎖切断を、標的エンドヌクレアーゼが導入するよう、細胞の培養を含む。例えば、標的エンドヌクレアーゼを用いて、1つの二本鎖切断を標的遺伝子座に作成することができ、ここでは、適合性がある突出部を含むエピジェネティック修飾核酸が、内因性染色体配列でライゲーションされ、それにより標的遺伝子座でエピジェネティック修飾核酸を挿入し、及び、内因性染色体配列を中断/不活性化する。標的遺伝子座は、エピジェネティック修飾核酸が由来する内因性染色体配列に対応することができ、または、標的遺伝子座は、ゲノムのセーフハーバー部位とすることができる。あるいは、標的エンドヌクレアーゼを用いて、1つの二本鎖切断を作成することができ、ここでは、相同上流及び下流配列を含むエピジェネティック修飾核酸は、相同性指向修復プロセスにより開裂部位に挿入される。別の態様では、2つの標的エンドヌクレアーゼを用いて、対象とする遺伝子座内の標的部位で2つの二本鎖切断を作成することができ、ここでは、エピジェネティック修飾核酸を、二本鎖切断の修復の間、内因性染色体配列と交換する。さらに別の特徴では、第1の標的エンドヌクレアーゼを用いて、二本鎖切断をエピジェネティック修飾核酸が挿入される第1の遺伝子座に作成することができ、第2の標的エンドヌクレアーゼを用いて、二本鎖切断を、第2の遺伝子座で不活性化変異を導入するよう、その破壊が誤りがちな DNA 修復プロセスにより修復される第2の遺伝子座に作成することができる。例えば、第1の遺伝子座は、エピジェネティック修飾核酸に安定性をもたらす部位とすることができ、第2の遺伝子座は、エピジェネティック修飾核酸が由来する内因性染色体配列に対応することができる。

20

30

40

【0047】

(a) 標的エンドヌクレアーゼ

ここに開示される方法で用いられる種類の標的エンドヌクレアーゼは、変化することが可能であり、または変化する。上記のように、標的エンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) 、 I - T e v I ヌクレアーゼまたは関連モノマーハイブリッド、及び、人工標的 DNA 二本鎖切断誘発剤、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) 、または C R I S P R ベースのエンドヌクレアーゼ

50

とすることができる。標的エンドヌクレアーゼは、天然に存在するタンパク質または組換えタンパク質とすることができる。

【0048】

ある態様では、標的エンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼとすることができる。メガヌクレアーゼは、大型の認識部位を特徴とするエンドデオキシリボヌクレアーゼであり、すなわち、認識部位は約12塩基対から約40塩基対まで一般に変化する。この要件の結果、認識部位は一般に、一回のみ、いずれかの所与のゲノムに生じる。メガヌクレアーゼの間、LAGLIDADGと名付けられたホーミングエンドヌクレアーゼのファミリーは、ゲノム及びゲノム工学の研究に対して価値のあるツールになった (Chevalier et al., Nuc Acids Mol Biol. 16:33-27 (2005))。メガヌクレアーゼは、当業者に知られる技術を用いてそれらの認識配列を修飾することにより、特定の染色体配列に対するターゲットとすることができる。例えば、Silva et al., Curr. Gene Ther. 11(1):11-27 (2011); Baxter et al., Nuc. Acids Res. 40(16):7985-8000 (2012) を、参照されたい。

10

【0049】

他の態様では、標的エンドヌクレアーゼは、転写活性化因子様エフェクター (TALE) ヌクレアーゼとすることができる。TALEは、容易に操作して新DNA標的を結合してもよい植物病原菌キサントモナス属からの転写因子である。TALEまたはその切断版を、FokI等のエンドヌクレアーゼの触媒領域に結合して、TALEヌクレアーゼまたはTALENと呼ばれる標的エンドヌクレアーゼを作成してもよい。さらなる情報について、Joung et al., Nature Rev. Mol. Cell Biol. 14:49-55 (2013) を参照されたい。Beurdeley et al., Nat. Commun. 4:1762 doi:10.1038/ncomms2782 (2013) に記載されるように、I-TevIの触媒領域を用いて生成されたTALENを調製及び使用してもよい。

20

【0050】

さらなる態様では、標的エンドヌクレアーゼは、Kleinstiver et al., PNAS (109(21)):8061-6 (2012) に記載のように、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼまたはLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼ骨格に融着されるI-Tevヌクレアーゼ領域等の、I-TevIヌクレアーゼまたは関連モノマーハイブリッドとしてもよい。

30

【0051】

さらに他の態様では、標的ヌクレアーゼは、人工標的DNA二本鎖切断誘発剤とすることができる。人工標的DNA二本鎖切断誘発剤を用いて、Katada et al., Nuc. Acid Res. 40(11):e81 (2012) に記載のようなARCU (人工限定DNAカッター) 等の相同遺伝子組換えを、本方法では推進する。

【0052】

(i) ジンクフィンガーヌクレアーゼ

さらなる態様では、標的エンドヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) とすることができる。典型的には、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、DNA結合ドメイン (すなわちジンクフィンガー) 及び開裂ドメイン (すなわち、ヌクレアーゼ) を含むものであり、これら両方とも以下に記載される。

40

【0053】

ジンクフィンガー結合ドメイン。

ジンクフィンガー結合ドメインを操作して、選択される任意の核酸配列を認識しかつこれに結合してもよい。例えば、Beerli et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19:656-660; Segal et

50

al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12: 632 - 637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10: 411 - 416; Zhang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275 (43): 33850 - 33860; Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26: 702 - 708; 及び、Santiago et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 5809 - 5814 を参照されたい。操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、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、新規な結合特異性を有することができる。操作方法は、合理的設計及びさまざまな選択を含むが、これに限定されるものではない。合理的設計は、例えば、二重、三重、及び/または四重ヌクレオチド配列及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を使用することを含み、ここでは、各二重、三重または四重ヌクレオチド配列は、特定の三重または四重配列を結合するジンクフィンガーの1つ以上のアミノ酸配列に関連する。例えば、米国特許第6,453,242号及び第6,534,261号を参照されたい。これらの開示は、参照によりここにその全体が組み込まれる。一例として、米国特許第6,453,242号に記載されるアルゴリズムを用いて、ジンクフィンガー結合ドメインを設計し、あらかじめ選択された配列を対象としてもよい。また、非縮重認識コード表を用いた合理的設計等の選択的方法を用いて、ジンクフィンガー結合ドメインを設計して特定の配列を対象としてもよい (Sera et al. (2002) Biochemistry 41: 7074 - 7081)。DNA配列内の可能性のある標的部を同定するため、及び、ジンクフィンガー結合ドメインを設計するための、一般公開されるウェブベースのツールは、www.zincfingertools.org、及び、zifit.partners.org/ZiFiT/ でそれぞれ見出される (Mandell et al. (2006) Nuc. Acid Res. 34: W516 - W523; Sander et al. (2007) Nuc. Acid Res. 35: W599 - W605)。

【0054】

ジンクフィンガー結合ドメインは、長さ約3個のヌクレオチドから約21個のヌクレオチドまでの範囲、例えば長さ約9個から約18個までのヌクレオチドの、DNA配列を認識及び結合するように設計されていてもよい。各ジンクフィンガー認識領域 (すなわちジンクフィンガー) は、3個のヌクレオチドを認識し、かつ結合する。一般に、ここに開示されるジンクフィンガーヌクレアーゼのジンクフィンガー結合ドメインは、少なくとも3つのジンクフィンガー認識領域 (すなわちジンクフィンガー) を含む。ジンクフィンガー結合ドメインは、例えば、4つのジンクフィンガー認識領域を含んでもよい。あるいは、ジンクフィンガー結合ドメインは、5つまたは6つのジンクフィンガー認識領域を含んでもよい。ジンクフィンガー結合ドメインは、任意の適切なターゲットDNA配列に結合するように設計されてもよい。例えば参照、米国特許第6,607,882号; 第6,534,261号及び第6,453,242号を参照されたい。これらの開示は、参照によりここにその全体が組み込まれる。

【0055】

ジンクフィンガー認識領域を選択する典型的な方法は、ファージディスプレイ及びツートハイブリッドシステムを含んでおり、これらは、米国特許第5,789,538号; 第5,925,523号; 第6,007,988号; 第6,013,453号; 第6,410,248号; 第6,140,466号; 第6,200,759号; 及び、第6,242,568号; ならびに、WO98/37186号; WO98/53057号; WO00/27878号; WO01/88197号、及び、GB2,338,237号に開示される。これらの各開示は、参照によりここにその全体が組み込まれる。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインのための結合特異性エンハンスメントは、例えば、WO02/077227号で記載されており、この開示は、参照によりここに組み込まれる。

【0056】

融合タンパク (及びそれをコードするポリヌクレオチド) の設計及び構造のためのジン

10

20

30

40

50

クフィンガー結合ドメイン及び方法は、当業者に知られており、そして米国特許出願公開公報第20050064474号及び第20060188987号に詳細が記載されており、この開示は、参照によりここにその全体が組み込まれる。ジンクフィンガー認識領域及び/またはマルチフィンガー型ジンクフィンガータンパク質は共に、例えば長さ5つまたはそれ以上のアミノ酸のリンカー等の、適切なリンカー配列を用いて、結合されてもよい。米国特許第6,479,626号;第6,903,185号;及び、第7,153,949号を参照されたい。これらの開示は、長さ6つ以上のアミノ酸のリンカー配列の非限定的な例として、参照によりここにその全体が組み込まれる。ここに記載されるジンクフィンガー結合ドメインは、タンパク質の個々のジンクフィンガー(及びさらなるドメイン)の間で、適切なリンカーの併用を含んでもよい。

10

【0057】

開裂ドメイン。

ジンクフィンガーヌクレアーゼは、また、開裂ドメインを含んでいる。ジンクフィンガーヌクレアーゼの開裂ドメイン部分は、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼのいずれから得られてもよい。開裂ドメインが由来してもよいエンドヌクレアーゼの非限定的な例は、制限エンドヌクレアーゼ及びホーミングエンドヌクレアーゼを含むが、これに限定されるものではない。例えば、New England Biolabs Catalog (www.neb.com)及びBelfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388を参照されたい。DNAを開裂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DNアーゼI;球菌ヌクレアーゼ;イーストHOエンドヌクレアーゼ)。Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993を参照されたい。これらの酵素(または、その機能的断片)の1つ以上を、開裂ドメインのソースとして用いてもよい。

20

【0058】

また、開裂ドメインは、開裂活性のために二量体化を必要とする、上記のような、酵素またはその部分に由来してもよい。各ヌクレアーゼが活性酵素二量体のモノマーを含むよう、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼを、開裂のために必要としてもよい。あるいは、単一のジンクフィンガーヌクレアーゼが両方のモノマーを含むことで、活性酵素二量体を作成することもできる。ここに用いられる場合において、「活性酵素二量体」は、核酸分子を開裂することができる酵素二量体である。2つの開裂モノマーが、同じエンドヌクレアーゼ(またはその機能的断片)に由来してもよく、または、各モノマーが、異なるエンドヌクレアーゼ(またはその機能的断片)に由来してもよい。

30

【0059】

2つの開裂モノマーを用いて活性酵素二量体を形成する際、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼのそれらの各認識部位との結合が、開裂モノマーが例えば二量体化等により活性酵素二量体を形成できるように、空間的定位置で相互に開裂モノマーを配置するよう、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼに対する認識部位が配置されることが好ましい。その結果、認識部位の近端部は、約5個~約18個のヌクレオチドで分離されてもよい。例えば、近端部が、約5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個または18個のヌクレオチドにより分離されてもよい。しかしながら、いくつかの整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの認識部位の間に介在することができる(例えば約2個から約50までのヌクレオチド対またはそれ以上)ことを理解するだろう。ジンクフィンガーヌクレアーゼの認識部位の近端部、例えばここに詳細に記載される部分が、6個のヌクレオチドにより分離されてもよい。一般に、開裂の部位が、認識部位の間に存在する。

40

【0060】

制限エンドヌクレアーゼ(制限酵素)が、多くの種に存在すると共に、(認識部位で)DNAへ配列特異的に結合させること、及び、結合の部位でまたはその近くでDNAを開

50

裂することが可能である。所定の制限酵素（例えばタイプ I I S）は、認識部位から除去される部位で DNA を開裂すると共に、分離できる結合及び開裂ドメインを有している。例えば、タイプ I I S 酵素 F o k I は、1鎖上のその認識部位から9個のヌクレオチド及び他の部分上のその認識部位から13個のヌクレオチドで、DNAの二本鎖開裂を引き起こす。例えば、米国特許第5,356,802号；第5,436,150号及び第5,487,994号；ならびに、L i e t a l . (1 9 9 2) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 4 2 7 5 - 4 2 7 9 ; L i e t a l . (1 9 9 3) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 2 7 6 4 - 2 7 6 8 ; K i m e t a l . (1 9 9 4 a) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 1 : 8 8 3 - 8 8 7 ; K i m e t a l . (1 9 9 4 b) J . B i o l . C h e m . 2 6 9 : 3 1 0 1 0 - 3 1 0 1 4 ; K i m e t a l . (1 9 9 4 c) J . B i o l . C h e m . 2 6 9 : 3 1 0 1 5 - 3 1 0 2 0 を参照されたい。したがって、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、少なくとも1つのタイプ I I S 制限酵素由来の開裂ドメイン、及び、操作されてもよい、または操作されなくてもよい、1つ以上のジンクフィンガー結合ドメインを含むことができる。例えば、例示的なタイプ I I S 制限酵素は、国際公開 W O 0 7 / 0 1 4 , 2 7 5 号に記載され、その開示は参照によりここにその全体が組み込まれる。また、さらなる制限酵素は、分離可能な結合及び開裂ドメインを含み、また、これらは本開示により想定される。例えば、R o b e r t s e t a l . (2 0 0 3) N u c l e i c A c i d s R e s . 3 1 : 4 1 8 - 4 2 0 を参照されたい。

【0061】

開裂ドメインが結合ドメインと分離可能である例示的なタイプ I I S 制限酵素は、F o k I である。この特定の酵素は、二量体としての活性を有している (B i t i n a i t e e t a l . (1 9 9 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 5 : 1 0 5 7 0 - 1 0 5 7 5) 。したがって、本開示の目的で、ジンクフィンガーヌクレアーゼに用いられる F o k I 酵素の部分は、開裂モノマーと考えられる。したがって、F o k I 開裂ドメインを用いた標的二本鎖開裂のため、それぞれが F o k I 開裂モノマーを含む2つのジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて、活性酵素二量体を再組成してもよい。あるいは、ジンクフィンガー結合ドメイン及び2つの F o k I 開裂モノマーを含む単一のポリペチド分子も、用いることができる。

【0062】

開裂ドメインは、ホモ二量体化を最小にするまたは防止する、1つ以上の操作された開裂モノマーを含んでもよく、これは例えば、米国特許出願公開第20050064474号、第20060188987号及び第20080131962号に記載され、これらのそれぞれが、参照によりここにその全体が組み込まれる。非限定的な例として、F o k I の位置446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537及び538のアミノ酸残基は、F o k I 開裂ハーフ領域の二量体化に影響するための全ての標的である。必須のヘテロダイマーを形成する F o k I の例示的な操作された開裂モノマーは、対を含み、その対では、第1の開裂モノマーが F o k I のアミノ酸残基位置490及び538に変異を含み、第2の開裂モノマーがアミノ酸残基位置486及び499に変異を含む (M i l l e r e t a l . , 2 0 0 7 , N a t . B i o t e c h n o l . , 2 5 : 7 7 8 - 7 8 5 ; S z c z p e k e t a l . , 2 0 0 7 , N a t . B i o t e c h n o l . , 2 5 : 7 8 6 - 7 9 3) 。例えば、位置490の G l u (E) は、L y s (K) に変更されてもよく、位置538の I l e (I) は、1つの領域 (E 4 9 0 K , I 5 3 8 K) で、K に変更されてもよく、位置486の G l n (Q) は、E に変更されてもよく、位置499の I は、他の開裂ドメイン (Q 4 8 6 E , I 4 9 9 L) で、L e u (L) に変更されてもよい。他の態様では、改変 F o k I 開裂ドメインは、3つのアミノ酸変化を含むことができる (D o y o n e t a l . 2 0 1 1 , N a t . M e t h o d s , 8 : 7 4 - 8 1) 。例えば、1つの改変 F o k I 領域 (E L D と呼ばれる) は、Q 4 8 6 E , I 4 9 9 L , N 4 9 6 D の変異を含むことができ、他の改変 F o k I 領域 (K K R と呼ばれる) は、E 4 9 0 K , I 5 3 8 K , H 5 3 7 R の変異を含むことができる。

【0063】

さらなるドメイン。

ある態様では、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、少なくとも1つの核移行シグナルまたは配列(NLS)をさらに含んでいる。NLSは、ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質の真核細胞の核内への輸送を容易にするアミノ酸配列である。一般に、NLSは塩基性アミノ酸の伸長を含んでいる。核移行シグナルは、当該技術分野で知られている(Makkerh et al., 1996, Current Biology 6:1025-1027; Lange et al. J. Biol. Chem. 2007, 282:5101-5105を参照されたい)。例えば一実施形態では、NLSは、PKKKRKV(配列番号:1)またはPKKKRRV(配列番号:2)等の単分裂配列とすることができる。別の実施形態では、NLSは、二分分裂配列とすることができる。さらに別の実施形態では、NLSは、KRPAATKKAGQAKKKK(配列番号:3)とすることができる。NLSは、N末端、C末端、または、ジンクフィンガーヌクレアーゼの内部位置内に、位置することができる。

10

【0064】

他の態様では、また、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、少なくとも1つの膜透過性領域を含むことができる。一実施形態では、膜透過性領域は、HIV-1 TATタンパク質に由来する膜透過性ペプチド配列とすることができる。一例として、TAT膜透過性配列は、GRKKRRQRPRPPQPKKKRKV(配列番号:4)とすることができる。別の実施形態では、膜透過性領域は、TLM(PLSSIIFSRIGDPPKKRKV;配列番号:5)、ヒトB型肝炎ウイルスに由来する膜透過性ペプチド配列、とすることができる。さらに別の実施形態では、膜透過性領域は、MPG(GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRKV;配列番号:6またはGALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV;配列番号:7)とすることができる。さらなる実施形態では、膜透過性領域は、Pep-1(KETWWETWTEWSQPKKKRKV;配列番号:8)、VP22、単純ヘルペスウイルスからの膜透過性ペプチド、または、ポリアルギニンペプチド配列とすることができる。膜透過性領域は、N末端に、C末端に、または、タンパク質の内部位置内に、位置することができる。

20

【0065】

さらに他の態様では、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、少なくとも1つのマーカー領域をさらに含むことができる。マーカー領域の非限定的な例としては、蛍光タンパク質、精製用タグ及びエピトープタグを含んでいる。一実施形態では、マーカー領域は、蛍光タンパク質とすることができる。適切な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質(例えばGFP、GFP-2、tagGFP、ターボGFP、EGFP、エメラルド、アザミグリーン、単量体のアザミグリーン、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黄色蛍光タンパク質(例えばYFP、EYFP、シトリン、ビーナス、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、青色蛍光タンパク質(例えばEBFP、EBFP2、アジュライト、mKalama1、GFPuv、サファイヤ、T-サファイヤ)、青緑色蛍光タンパク質(例えばECFP、Cerulean(セルリアン)、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan(ミドリイシシアン))、赤色蛍光タンパク質(mKate、mKate2、mPlum、DsRed monomer(DsRed単量体)、mCherry、mRFP1、DsRed-Express(DsRedエクспレス)、DsRed2、DsRed-Monomer(DsRed-単量体)、HcRed-Tandem(HcRedタンデム)、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry(mラズベリー)、mStrawberry(mストロベリー)、Jred(Jレッド))、及び、橙色蛍光タンパク質(mOrange(mオレンジ)、mKO、Kusabira-Orange(クサビラ-オレンジ)、Monomeric Kusabira-Orange(クサビラオレンジ単量体)、mTangerine(mタンジェリン)、tdTomato(tdトマト))、または他のいずれの適切な蛍光タンパク質を含んでいる。別の実施形態では、マーカー領

30

40

50

域は、精製用タグ及び/またはエピトープタグとすることができる。適切なタグは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、キチン結合タンパク質 (CBP)、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン (TRX)、ポリ (NANP)、タンデムアフィニティ精製 (TAP) タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、HA、nus、Softag 1、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、ピオチンカルボキシルキャリアタンパク質 (BCCP)、及び、カルモジュリンを含むが、これに限定されるものではない。マーカ領域は、N末端に、C末端に、または、ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質の内部位置内に、位置することができる。

【0066】

(ii) CRISPRベースのエンドヌクレアーゼ

さらに他の態様では、標的エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの真核細胞の核への侵入を可能にする核移行シグナルを少なくとも1つ含むCRISPRベースのエンドヌクレアーゼとすることができる。CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、少なくとも1つのヌクレアーゼ領域を含むRNA誘導型エンドヌクレアーゼ、及び、ガイドRNAに相互作用する少なくとも1つの領域である。ガイドRNAは、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼを核酸内の標的部位に向け、その部位では、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、標的核酸配列の少なくとも1つの鎖で開裂する。ガイドRNAが標的開裂に対する特異性を提供するため、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは自在であり、異なるガイドRNAで用いて異なる標的核酸配列を開裂してもよい。

【0067】

CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、CRISPR/Casシステムに由来するRNA誘導型エンドヌクレアーゼである。細菌及び古細菌は、CRISPR (規則的な間隔をもってクラスタ化された短鎖反復回文配列) 及びCas (CRISPR関連) タンパク質を利用したRNAベースの適応免疫系を進化させて、ウイルスまたはプラスミドの侵略を検出及び破壊した。CRISPR/Casエンドヌクレアーゼをプログラムして、ターゲット特定の合成ガイドRNAを提供することにより、標的部位特異的二本鎖切断を導入することができる (Jinek et al., 2012, Science, 337: 816-821)。

【0068】

CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、CRISPR/CasタイプI、タイプIIまたはタイプIIIシステムに由来することができる。適切なCRISPR/Casタンパク質の非限定的な例は、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (またはCasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1 (またはCasA)、Cse2 (またはCasB)、Cse3 (またはCasE)、Cse4 (またはCasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4及びCu1966を含む。

【0069】

一実施形態では、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、タイプII CRISPR/Casシステムに由来する。例示的な実施形態では、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、Cas9タンパク質に由来する。Cas9タンパク質は、化膿レンサ球菌、ストレプトコッカス好熱性、ストレプトコッカス sp. ノカルジオブシスダッソソビエイ、ストレプトマイセスプリスチナスピラリス、ストレプトマイセスピリドクロモゲネス、ストレプトマイセスピリドクロモゲネス、ストレプトスポランギウム属ロセウム、ストレプトスポランギウム属ロセウム、アリサイクロパチルスアシドカルダリウス、バシラスシュードマイコイデス、バシラスセレニティレドセンス、イグジォバクテリウムシビリ

10

20

30

40

50

カム、ラクトバチスルデルブルエッキ、ラクトバシラスサリヴァリウス、マイクロシラマリナ、パークホルデア目バクテリア、ポラロモナスナフタレニボランス、ポラロモナス *sp.*、クロコスファエラワトソニー、海産単細胞窒素固定シアノバクテリア、マイクロキスティスエルギノーサ、シネココッカス種、アセトハロビウムアラビティカム、アモニフェクスデゲンシイ、カルディセルロシルプターベシイ、キャンディディタスデスルフォルディス、ボツリヌス菌、クロストリジウムディフィシレ、フィネゴルディアマグナ、ナトラナエロビウスサーモフィラス、ペロトマキュラムサーモプロビオニカム、アシドチオバシラスカルダス、鉄硫黄酸化細菌、アロクロマチウムピノスム、マリノバクター *sp.*、ニトロソココッカスハロフィルス、ニトロソココッカスワツソニ、スードアルテロモナスハロブランクティス、クテドノバクテルラセミファ、メタノハロビウムエベスチガータム、アナベナバリアピリス、ノデュラリアスプミゲナ、アシツキ、アルスロスピラマキシマ、アルスロスピラプラテンシス、アルスロスピラ *sp.*、リングビア *sp.*、マイクロコレスクソノプラステス、藍藻ユレモ属、ペトロトーガモピリス、テルモシポアフリカヌスまたはアカリオクロリスマリナに由来することができる。1つの特定の形態では、CRISPRベースのヌクレアーゼは、化膿レンサ球菌由来のCas9タンパク質に由来する。

10

20

30

40

50

【0070】

一般に、CRISPR/Casタンパク質は、少なくとも1つのRNA認識及び/またはRNA結合ドメインを含んでいる。RNA認識及び/またはRNA結合ドメインは、CRISPR/Casタンパク質が特定のゲノムまたはゲノム配列に向けられるよう、ガイドRNAと相互作用する。また、CRISPR/Casタンパク質は、ヌクレアーゼ領域（すなわちDNアーゼ酵素またはRNアーゼ領域）、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼ領域、タンパク質-タンパク質相互作用領域、二量体化領域、ならびに他の領域を含むことができる。

【0071】

ここに用いられるCRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、野生型CRISPR/Casタンパク質、改変CRISPR/Casタンパク質、または、野生型または改変CRISPR/Casタンパク質の断片とすることができる。CRISPR/Casタンパク質を改変することにより、核酸結合親和性や特異性を増加させ、酵素活性を変更し、及び/または、タンパク質の他の特性を変更することができる。例えば、CRISPR/Casタンパク質のヌクレアーゼ（すなわち、DNアーゼ、RNアーゼ）領域を、改変、欠失、または不活性化することができる。CRISPR/Casタンパク質を切断して、タンパク質の機能に必須ではない領域を除去することができる。また、CRISPR/Casタンパク質を、切断または改変して、タンパク質の活性またはCRISPR/Casタンパク質に融合するエフェクター領域を、最適化することができる。

【0072】

ある形態では、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、野生型Cas9タンパク質またはその断片に由来することができる。他の形態において、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、改変Cas9タンパク質に由来することができる。例えば、Cas9タンパク質のアミノ酸配列を改変して、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、安定性等）を変更することができる。あるいは、改変Cas9タンパク質が野生型Cas9タンパク質より小さくなるよう、RNA誘導型開裂に関係しないCas9タンパク質の領域を、タンパク質から排除することができる。

【0073】

一般に、Cas9タンパク質は、少なくとも2つのヌクレアーゼ（すなわちDNアーゼ）領域を含んでいる。例えば、Cas9タンパク質は、RuvC類似ヌクレアーゼ領域及びHNH類似ヌクレアーゼ領域を含むことができる。RuvC及びHNH領域は、一本鎖を切断してDNAで二本鎖切断を作製するためには、共に有効である（Jinek *et al.*, 2012, *Science*, 337: 816-821）。一形態では、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、Cas9タンパク質に由来し、かつ、2つの機能ヌクレアーゼ領域を含んでおり、それらは共に二本鎖切断を標的部位に導入する。

【0074】

標的部位は、典型的には約14～15bpの長さを有する天然に生じるCRISPR/Casシステムにより認識される(Cong et al., 2013, Science, 339: 819-823)。ターゲット部位は、ガイドRNAの5'末端に相補的な配列(すなわちプロトスペーサー配列と呼ぶ)の直後に(3'または下流の)共通配列が続く以外は、配列限定を有しない。また、この共通配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ(またはPAM)として知られている。PAMの例は、NGG、NGNG及びNNA GAAWを含むが、これに限定されるものではない(ここで、Nは任意のヌクレオチドとして定義され、WはAまたはTのいずれかとして定義される)。主要長さでは、標的部位の5～7%についてのみ、ターゲットゲノム内でユニークであり、オフターゲット効果を顕著とすることができる事を示唆している。ターゲット部位の長さは、結合現象を2回必要とすることにより、増殖することができる。例えば、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、それらが二本鎖配列の1つの鎖を開裂する(すなわちニッカーゼに変換される)のみであるよう、改変することができる。したがって、2本の異なるガイドRNAとの併用でのCRISPRベースのニッカーゼの利用は、二本鎖切断を今もなお生じさせつつ、ターゲット部位の長さを本質的に二倍にする。

10

【0075】

ある実施形態では、Cas9由来エンドヌクレアーゼを改変して、機能的ヌクレアーゼ領域(RuvC類似またはHNH類似ヌクレアーゼ領域)を1つのみ有することができる。例えば、Cas9由来タンパク質は、ヌクレアーゼ領域の一方が、もはや機能的ではない(すなわちドメインがヌクレアーゼ活性を欠く)ように欠失または変異する方法で、改変することができる。ヌクレアーゼ領域の一方が不活発である一部の実施形態では、Cas9由来タンパク質は、ニックを二本鎖核酸に導入することができる(このタンパク質は「ニッカーゼ」と呼ばれる)が、二本鎖DNAを開裂しない。例えば、RuvC類似領域内でのアスパルテートからアラニン(D10A)への変換は、Cas9由来タンパク質を「HNH」ニッカーゼに変換する。同様に、HNH領域内でのヒスチジンからアラニン(H840A)への変換(一部の例においてヒスチジンは位置839に位置される)は、Cas9由来タンパク質を「RuvC」ニッカーゼに変換する。したがって、例えば、一実施形態では、Cas9由来ニッカーゼは、RuvC類似領域内でのアスパルテートからアラニン(D10A)への変換を有している。別の実施形態では、Cas9由来ニッカーゼは、HNH領域でのヒスチジンからアラニン(H840AまたはH839A)への変換を有している。Cas9由来ニッカーゼのRuvC類似またはHNH類似ヌクレアーゼ領域は、部位特異的突然変異、PCR介在突然変異誘発、及び全遺伝子合成等の周知の方法、ならびに当該技術分野で知られる他の方法を用いて、改変することができる。

20

30

【0076】

さらに他の実施形態では、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼの両方のヌクレアーゼ領域は、変異、不活性化、または、欠失することができ、また、得られたタンパク質を異種の開裂ドメインと併用して、CRISPRベースの融合タンパクを作成することができる。したがって、結果として生じる融合タンパクを、ガイドRNAによりターゲット部位に案内し、異種の開裂ドメインにより開裂が媒介される。特定の実施形態では、異種の開裂ドメインは、タイプII-Sエンドヌクレアーゼに由来することができる。タイプII-Sエンドヌクレアーゼは、典型的に認識部位から離れた数個の塩基対である部位でDNAを開裂し、このように、分離可能な認識領域及び開裂ドメインを有している。これらの酵素は、一般にモノマーであり、これらモノマーは、一時的に関係して二量体を形成し、互い違いの位置でDNAの各鎖を開裂する。適切なタイプII-Sエンドヌクレアーゼの非限定的な例は、BfiI、BpmI、BsaI、BsgI、BsmBI、BsmI、BspMI、FokI、MboII及びSapIを含んでいる。例示的な態様では、融合タンパクの開裂ドメインは、FokI開裂ドメインまたはその誘導体であり、これらは上記セクション(III)(a)(i)に詳述される。

40

【0077】

50

一般に、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、少なくとも1つの核移行シグナルまたは配列(NLS)を含んでいる。適切なNLSは、制限なしに、PKKKRKV(配列番号:1)、PKKKRRV(配列番号:2)及びKRPAATKKAGQAKKKK(配列番号:3)を含んでいる。NLSは、N末端に、C末端に、または、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼの内部位置に、位置することができる。

【0078】

さらなるドメイン。

他の態様では、また、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、少なくとも1つの膜透過性領域を含むことができる。一実施形態では、膜透過性領域は、HIV-1 TATタンパク質に由来する膜透過性ペプチド配列とすることができる。一例として、TAT膜透過性配列は、GRKKRRQRPPQPKKRKV(配列番号:4)とすることができる。別の実施形態では、膜透過性領域は、TLM(PLSSIFSRIGDPPKKRKV;配列番号:5)、ヒトB型肝炎ウイルスに由来する膜透過性ペプチド配列、とすることができる。さらに別の実施形態では、膜透過性領域は、MPG(GALFLGWLGAAGSTMGAPKKRKV;配列番号:6またはGALFLGFLGAAAGSTMGAWSPKKRKV;配列番号:7)とすることができる。さらなる実施形態では、膜透過性領域は、Pep-1(KETWWETWTEWSQPKKRKV;配列番号:8)、VP22、単純ヘルペスウイルスからの膜透過性ペプチド、または、ポリアルギニンペプチド配列、とすることができる。膜透過性領域は、N末端に、C末端に、または、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼの内部位置に位置することができる。

10

20

【0079】

さらに他の実施形態では、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、少なくとも1つのマーカー領域を含むことができる。マーカー領域の非限定的な例は、蛍光タンパク質、精製用タグ及びエピトープタグを含む。一実施形態では、マーカー領域は、蛍光タンパク質とすることができる。適切な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質(例えばGFP、GFP-2、tagGFP、ターボGFP、EGFP、エメラルド、アザミグリーン、単量体のアザミグリーン、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黄色蛍光タンパク質(例えばYFP、EYFP、シトリン、ビーナス、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、青色蛍光タンパク質(例えばEBFP、EBFP2、アジュライト、mKalama1、GFPUV、サファイヤ、T-サファイヤ)、青緑色蛍光タンパク質(例えばECFP、Cerulean(セルリアン)、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan(ミドリイシシアン))、赤色蛍光タンパク質(mKate、mKate2、mPlum、DsRed monomer(DsRed単量体)、mCherry、mRFP1、DsRed-Express(DsRedエキスプレス)、DsRed2、DsRed-Monomer(DsRed-単量体)、HcRed-Tandem(HcRedタンデム)、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry(mラズベリー)、mStrawberry(mストロベリー)、Jred(Jレッド))、及び、橙色蛍光タンパク質(mOrange(mオレンジ)、mKO、Kusabira-Orange(クサビラ-オレンジ)、Monomeric Kusabira-Orange(クサビラオレンジ単量体)、mTangerine(mタンジェリン)、tdTomato(tdトマト))、または他のいずれの適切な蛍光タンパク質を、含んでいる。別の実施形態では、マーカー領域は、精製用タグ及び/またはエピトープタグとすることができる。適切なタグは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、キチン結合タンパク質(CBP)、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン(TRX)、ポリ(NANP)、タンデムアフィニティ精製(TAP)タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、HA、nus、Softag1、Softag3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、ピオチンカルボキシルキャリアタンパク質(BCCP)、及び、カルモジュリンを含むが、これ

30

40

50

に限定されるものではない。マーカー領域は、N末端に、C末端に、または、タンパク質の内部位置に位置することができる。

【0080】

ガイドRNA。

CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、また、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼをCRISPRベースのエンドヌクレアーゼが標的配列の少なくとも1つの鎖を開裂する特定のターゲット部位に向ける、少なくとも1つのガイドRNAを必要とする。ターゲット部位は、配列に共通配列がすぐに続く(下流)場合を除き、配列限定を有しない。この共通配列はまた、プロトスペサ隣接モチーフ(PAM)として知られている。PAMの例は、NGG、NGGNG及びNNAGAAWを含むが、これに限定されるものではない(ここで、Nは任意のヌクレオチドとして定義され、WはAまたはTのいずれかとして定義される)。ターゲット部位は、遺伝子のコード領域内、遺伝子のプロモーター制御エレメント、遺伝子のイントロン内、遺伝子間の制御領域内等であってもよい。

10

【0081】

ガイドRNAは、3つの領域を含む: ターゲット部位の配列に相補的な5'末端の第1の領域、ステムループ構造を形成する第2の内部領域、及び、本質的に一本鎖を残存する第3の3'領域である。各ガイドRNAが特定のターゲット部位にCRISPRベースのエンドヌクレアーゼを誘導するよう、各ガイドRNAの第1の領域は異なっている。各ガイドRNAの第2および第3の領域は、全てのガイドRNAの同じとすることができる。

【0082】

ガイドRNAの第1の領域がターゲット部位の配列との塩基となるよう、ガイドRNAの第1の領域はターゲット部位で配列に相補的である。様々な実施形態において、ガイドRNAの第1の領域は、約10のヌクレオチドから約26以上のヌクレオチドまでを含むことができる。例えば、ガイドRNAの第1の領域とゲノム配列のターゲット部位と間の塩基対の領域は、長さで約10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、22個、23個、24個、25個、または26個以上のヌクレオチド、とすることができる。典型的な実施形態では、ガイドRNAの第1の領域は、長さ約20個のヌクレオチドである。

20

【0083】

ガイドRNAはまた、二次構造を形成する第2の領域を含んでいる。ある実施形態では、二次構造は、ステム(または、ヘアピン)及びループを含んでいる。ループ及びステムの長さを、変化させることができる。例えば、ループは、長さで、約3個から約10個までのヌクレオチドまで変化させることができ、ステムは、長さで、約6から約20までの塩基対まで変化させることができる。ステムは、1個から約10個までのヌクレオチドの1つ以上のバルジ(bulge)を含むことができる。したがって、第2の領域の全体の長さは、長さで、約16個から約60個のヌクレオチドまで変化させることができる。例示的な実施形態では、ループは長さ約4個のヌクレオチドであり、ステムは約12の塩基対を含む。

30

【0084】

ガイドRNAはまた、本質的に一本鎖を残存する第3の領域を3'末端に含んでいる。したがって、第3の領域は、対象とする細胞内の任意のゲノム配列内に相補性を有しないととも、他のガイドRNAに相補性を有しない。第3の領域の長さを、変化させることができる。一般に、第3の領域は、約4個のヌクレオチドによりも長さが長い。例えば、第3の領域の長さは、約5個から約30個までのヌクレオチドの長さで変化させることができる。

40

【0085】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、1つの分子を含んでいる。他の実施形態では、ガイドRNAは、2つの別々の分子を含むことができる。第1のRNA分子は、ガイドRNAの第1の領域と、ガイドRNAの第2の領域の「ステム」の半分とを、含むことができる。第2のRNA分子は、ガイドRNAの第2の領域の「ステム」の他の半分と、ガイ

50

ドRNAの第3の領域とを含むことができる。したがって、この実施形態では、第1及び第2のRNA分子は、相互に相補的である一連のヌクレオチドを各々有している。例えば、一実施形態では、第1及び第2のRNA分子は、他の配列へ塩基対合させる(約6個から約20個までのヌクレオチドの)配列を各々含むことにより、機能的ガイドRNAを形成する。

【0086】

(b) 標的エンドヌクレアーゼ及び合成DNAの細胞への送達

本方法は、少なくとも1つの標的エンドヌクレアーゼまたは少なくとも1つの標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸を、細胞に導入することを含む。適切な細胞は、上記のセクション(II)(a)に詳述される。ある態様では、標的エンドヌクレアーゼは、精製された単離タンパク質として細胞に導入することができる。この例では、標的エンドヌクレアーゼは、少なくとも1つの膜透過性領域をさらに含むことができる。膜透過性領域の例は、上記のジンクフィンガーヌクレアーゼ及びCRISPRベースのエンドヌクレアーゼを記載するセクションに詳述される。標的エンドヌクレアーゼは、当該技術分野で周知の技術を用いて、細菌細胞または真核生物細胞の中に発現することができ、及び、それらから精製できる。

10

【0087】

他の態様では、標的エンドヌクレアーゼを核酸として細胞に導入することができる。核酸は、DNAまたはRNAとすることができる。コードする核酸がmRNAである態様では、mRNAは、5'キャップ及び/または3'ポリアデニル化であってもよい。標的エンドヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼである実施形態において、コードする核酸は、mRNAとすることができる。ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードするmRNAは、5'キャップ及び3'ポリアデニル化とすることができる。RNAを調製する方法、ならびにmRNAをキャッピング及びポリアデニル化するための方法は、当該技術分野で知られている。

20

【0088】

さらなる態様では、標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸は、DNAとすることができる。DNAは直鎖でもよく、または環状でもよい。特定の態様では、標的エンドヌクレアーゼをコードするDNAは、ベクターの部分とすることができる。適切なベクターとしては、プラスミドベクター、ファージミド、コスミド、人工/小型染色体、トランスポゾン及びウイルスベクターを含む。非限定的な例では、標的エンドヌクレアーゼをコードするDNAが、プラスミドベクター内に存在する。適切なプラスミドベクターの非限定的な例としては、pUC、pBR322、pET、pBluscript及びその変異株を含む。標的エンドヌクレアーゼをコードするDNAは一般に、少なくとも1つの発現調節配列に操作可能に結合される。特に、DNAコード配列は、対象とする細胞での発現のため、プロモーター制御配列に操作可能に結合することができる。プロモーター制御配列は構成的、調節的、または組織特異的とすることができる。適切な構成的プロモーター制御配列は、サイトメガロウイルス最初期プロモーター(CMV)、シミアンウイルス(SV40)プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター、伸長因子(ED1)-アルファプロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チュープリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、それらの断片、または、前述のいずれかの併用を含むが、これに限定されるものではない。適切な調節プロモーター制御配列の例としては、熱ショック、金属、ステロイド、抗生物質またはアルコールにより調節されるものを制限なしに含む。組織特異プロモーターの非限定的な例では、B29プロモーター、CD14プロモーター、CD43プロモーター、CD45プロモーター、CD68プロモーター、デスミンプロモーター、エラスターゼ-1プロモーター、エンドグリンプロモーター、フィブロネクチンプロモーター、Flt-1プロモーター、GFAPプロモーター、GP11bプロモーター、ICAM-2プロモーター、INF-プロモーター、Mbプロモーター、NphsIプロ

30

40

50

モーター、OG-2プロモーター、SP-Bプロモーター、SYN1プロモーター、及び、WASPプロモーターを含む。プロモーター配列は、野生型とすることができ、または、より有効なまたは効果的な発現のために改変することができる。ベクターは、さらなる発現制御配列（例えばエンハンサー配列、コザック配列、ポリアデニル化配列、転写終了配列等）、選択可能なマーカー配列（例えば抗生物質耐性遺伝子）、複製起点等を含むことができる。当業者は、適切なベクター、プロモーター、他のベクター制御エレメントに精通している。

【0089】

標的エンドヌクレアーゼが、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼであり、かつ、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼが核酸として細胞に導入される態様では、コードする核酸は、真核生物の対象とする細胞内でタンパク質への有効な翻訳のために最適化されるコドンとすることができる。例えば、コドンは、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウシ、ブタ、ネコ、イヌ、魚、両生類、植物、イースト、昆虫等の発現のために、最適化することができる（www.kazusa.or.jp/codonにおけるコドン使用率データベースを参照）。コドン最適化のためのプログラムは、無料ソフトとして利用可能である（例えば、genomes.urv.es/OPTIMIZERのOptimiser；www.genscript.com/codon_opt.htmlにおけるGenScriptからのOptimumGene（商標））。商用コドン最適化プログラムもまた、利用可能である。

10

【0090】

さらに、標的エンドヌクレアーゼがCRISPRベースのエンドヌクレアーゼである場合は、本方法は、少なくとも1つのガイドRNAを細胞に送達することをさらに含む。一般に、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼ対ガイドRNAの比は、約1：1である。ある態様では、ガイドRNAを、RNA分子として導入することができる。例えば、エンドヌクレアーゼがタンパク質として導入される場合、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼ及びガイドRNAを、タンパク質/RNA複合体として導入することができる。他の態様では、ガイドRNAを、DNA分子として細胞に導入することができる。この実施形態では、真核細胞のガイドRNAの発現のため、ガイドRNAコード配列を、プロモーター制御配列に操作可能に結合することができる。例えば、RNAコード配列を、RNAポリメラーゼIII（PolIII）により認識されるプロモーター配列に、操作可能に結合することができる。適切なPolIIIプロモーターの例は、哺乳類U6またはH1プロモーターを含むが、これに限定されるものではない。したがって、場合によっては、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼ及びガイドRNAを、DNA配列として細胞に導入することができる。一部の反復では、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼ及びガイドRNAをコードするDNA配列を、同じベクターの部分とすることができる。

20

30

【0091】

本方法はまた、所定のエピジェネティック修飾を有する少なくとも1つの合成DNA配列を、細胞に導入することを含む。エピジェネティック修飾核酸は、上記セクション（I）に詳述される。ある態様では、エピジェネティック修飾核酸は、さらなる配列（例えば、終末の突出部、標的ゲノム遺伝子座近傍の配列と実質的に配列同一性の隣接配列、側面標的エンドヌクレアーゼ認識部位、制限エンドヌクレアーゼ部位、インスレーターエレメント等）を含むことができ、それらは上記セクション（I）に詳述される。

40

【0092】

標的エンドヌクレアーゼ分子及びエピジェネティック修飾合成核酸は、様々な手段で細胞に送達することができる。一つの態様では、分子を、トランスフェクション方法で送達することができる。適切なトランスフェクション方法は、ヌクレオフェクション（またはエレクトロポレーション）、リン酸カルシウム介在トランスフェクション、カチオンポリマートランスフェクション（例えばDEAE-デキストランまたはポリエチレンジアミン）、ウイルス形質導入、ウィロゾームトランスフェクション、ウィリオントランスフェクション、リボソームトランスフェクション、カチオンリボソームトランスフェクション、

50

免疫リポソームトランスフェクション、非リポソーム型脂質トランスフェクション、デンドリマトランスフェクション、熱ショックトランスフェクション、マグネトフェクション、リポフェクション、遺伝子銃送、インペールフェクション、ソノレーション、光トランスフェクション、及び、専用薬剤増強の核酸の摂取を含んでいる。トランスフェクション方法は、当該技術分野で周知である（例えば、“Current Protocols in Molecular Biology” Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003、または、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3rd edition, 2001、を参照されたい）。別の態様では、マイクロインジェクションにより分子を細胞に送達することができる。例えば、分子を、細胞の核または原形質に微量注入することができる。

10

【0093】

標的エンドヌクレアーゼ分子及びエピジェネティック修飾合成核酸を、同時にまたは順に、細胞に送達することができる。標的エンドヌクレアーゼ分子のエピジェネティック修飾合成核酸に対する比は、約1:10から約10:1まで変化することができる。様々な態様では、標的エンドヌクレアーゼ分子のエピジェネティック修飾合成核酸に対する比は、約1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、または10:1、とすることができる。非限定的な典型的比は、約1:1である。

20

【0094】

(C) ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた修飾

エピジェネティック修飾合成核酸を、ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて、細胞のゲノムに組み込むことができる。上記に詳述するように、本方法は、(a)(i)ジンクフィンガーヌクレアーゼまたは少なくとも1つのジンクフィンガーをコードする少なくとも1つの核酸、ここで各ジンクフィンガーは、細胞のゲノムの標的部位に二本鎖切断を認識及び導入するように操作されている、及び、(ii)ゲノムへの挿入のための少なくとも1つの合成エピジェネティック修飾合成核酸を、細胞に導入すること、ならびに、(b)ジンクフィンガーヌクレアーゼにより作成される二本鎖切断の修復において、エピジェネティック修飾合成配列が細胞のゲノムに挿入されるように、細胞を培養することを含んでいる。

30

【0095】

一つの態様では、エピジェネティック修飾合成核酸は、ジンクフィンガーヌクレアーゼによって生成するものと適合性がある突出部に隣接される。例えば、突出部を含むエピジェネティック修飾合成核酸を、直鎖オリゴヌクレオチドとして導入することができ、または、エピジェネティック修飾合成核酸が、ジンクフィンガーヌクレアーゼにより認識される標的部位に隣接されるよう、エピジェネティック修飾合成核酸が大型のポリヌクレオチドの部分であるときにはそれを *in situ* で生成することができる。いずれの場合も、1つのジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて、ゲノム内の標的部位で1本の二本鎖切断を導入することができ、及び、非相同の末端結合DNA修復プロセスにより媒介される直接ライゲーションにより、エピジェネティック修飾合成核酸を、部位に挿入することができる。エピジェネティック修飾合成核酸の遺伝子位置への挿入は、内因性染色体配列を中断させまたは不活性化させる。あるいは、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて2本の二本鎖切断をゲノムに導入することができ、また、エピジェネティック修飾合成核酸は、(切除及び欠失される)内因性染色体配列と交換されることができる。

40

【0096】

別の態様では、エピジェネティック修飾合成核酸は、標的開裂部位の上流及び下流配列とそれぞれ実質的配列同一性を有する上流及び下流配列に隣接される。例えば、1つのジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて、1つの二本鎖切断をゲノム内の標的部位に導入することができ、ここで、相同性指向DNA修復プロセスによる二本鎖切断の修復では、エ

50

ピジェネティック修飾合成核酸は、内因性染色体配列の一部に挿入され、またはこれと交換される。あるいは、直上に詳述されるように、第1のジungkフィンガーヌクレアーゼを用いて、相同性指向プロセスにより第1の遺伝子座でエピジェネティック修飾合成核酸を挿入することができ、また、そして、第2のジungkフィンガーヌクレアーゼを用いて、第2の遺伝子座で二本鎖切断を導入することができ、ここで、第2の遺伝子座の破壊を、第2の遺伝子座で不活性化変異が導入される変異性の非相同末端結合修復プロセスにより修復することができる。不活性化変異は、少なくとも1つのヌクレオチドの、少なくとも1つのヌクレオチドの挿入の、少なくとも1つのヌクレオチドの置換の、または、これらの組み合わせの欠失とすることができる。

【0097】

上記の反復のいずれかでは、エピジェネティック修飾合成核酸が、対応する内因性染色体配列を置き換えることができる。あるいは、エピジェネティック修飾合成核酸は、安全な領域遺伝子座で、またはエピジェネティック修飾に安定性をもたらす部位で、挿入することができる。この反復では、エピジェネティック修飾合成核酸に対応する内因性染色体配列は（ここに詳述されるように）、欠失または不活性化が可能である。

【0098】

(d) CRISPRベースのエンドヌクレアーゼを用いた修飾

エピジェネティック修飾合成核酸はまた、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼを用いて、細胞のゲノムに挿入することができる。本方法は、(a)(i)少なくとも1つのCRISPRベースのエンドヌクレアーゼまたは少なくとも1つのCRISPRベースのエンドヌクレアーゼをコードする核酸、ここで各CRISPRベースのエンドヌクレアーゼが、標的ゲノム配列の少なくとも1つの鎖を開裂することができる、(ii)少なくとも1つのガイドRNAまたは少なくとも1つのガイドRNAをコードするDNA、ここで各ガイドRNAは、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼをゲノム内の標的部位に向ける、及び、(iii)ゲノム内への挿入のための少なくとも1つのエピジェネティック修飾合成核酸を、細胞に導入すること、ならびに、(b)DNA修復の間、エピジェネティック修飾合成核酸がゲノムに挿入されるよう、細胞を培養することを含んでいる。

【0099】

ある態様では、それが二本鎖配列の両方の鎖を開裂するよう、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼは、2つの機能的ヌクレアーゼ領域を含んでいる。例えば、1つのCRISPRベースのヌクレアーゼ（またはコード核酸）及び1つのガイドRNA（またはコードするDNA）を、（エピジェネティック修飾合成核酸とともに）細胞に導入することができる。CRISPRベースのヌクレアーゼにより生成されるものと適合性がある突出部に、エピジェネティック修飾合成核酸が隣接する場合において、エピジェネティック修飾合成核酸は、非相同ベースの修復プロセスにより、染色体DNAと直接ライゲーションすることができる。エピジェネティック修飾によるエピジェネティック修飾合成核酸が、標的開裂部位の上流及び下流配列それぞれと実質的配列同一性を共有する上流及び下流配列に隣接される場合において、エピジェネティック修飾合成核酸は、相同性指向修復プロセスにより、内因性染色体配列の一部内に挿入することができ、またはそれと交換される。

【0100】

他の態様では、二本鎖配列の1つの鎖（したがってそれはニッカーゼである）を開裂するよう、CRISPRベースのエンドヌクレアーゼを改変して、1つの機能的ヌクレアーゼ領域を含有することができる。CRISPRベースのニッカーゼを、2つの異なるガイドRNAと共に用いて、ニックを二本鎖配列の逆の鎖に導入することができ、ここでは、この2つのニックは、二本鎖切断を構成するために、十分に近接している。この開裂を媒介するため、この2つのガイドRNAは、5'-対向-5'設定で配向される（すなわち、上流ガイドRNAは、ゲノム標的のセンス鎖に結合し、下流ガイドRNAは、ゲノム標的のアンチセンス鎖に結合する）。したがって、本方法は、1つのCRISPRベースのニッカーゼ（またはコードする核酸）、2つのガイドRNA（またはコードするDNA）

10

20

30

40

50

、及び、エピジェネティック修飾合成核酸を、細胞内に導入することを含むことができる。エピジェネティック修飾合成核酸が、CRISPRベースのニッカーゼシステムにより生成するものと適合性のある突出部に隣接する場合は、エピジェネティック修飾合成核酸を、非相同ベースの修復プロセスにより、染色体DNAに直接ライゲーションすることができる。エピジェネティック修飾合成核酸は、標的開裂部位の上流及び下流配列のそれぞれと実質的配列同一性を共有する上流及び下流配列に隣接するケースでは、エピジェネティック修飾合成核酸は、相同性指向修復プロセスにより、一部の内因性染色体配列内に挿入することができ、またはこれと交換される。

【0101】

さらに他の態様では、CRISPRベースのヌクレアーゼ（またはコードする核酸）及び2つのガイドRNA（またはコードするDNA）を、細胞内に導入して、2つの二本鎖切断をゲノム配列内に媒介することができる。同様に、CRISPRベースのニッカーゼ（またはコードする核酸）及び4つのガイドRNAを細胞内に導入して、2つの二本鎖切断をゲノム配列内に媒介することができる。エピジェネティック修飾合成核酸が、CRISPRベースのタンパク質により生成されるものと適合性のある突出部に隣接する例では、エピジェネティック修飾合成核酸を、染色体配列に直接ライゲーションすることにより、内因性染色体配列をエピジェネティック修飾合成配列に置換することができる。エピジェネティック修飾合成核酸が、標的開裂部位の上流及び下流配列とそれぞれ実質的配列同一性を有する上流及び下流配列に隣接する反復では、エピジェネティック修飾合成核酸は、相同性指向修復プロセスにより、染色体配列内に挿入することができ、または交換することができる。あるいは、相同性指向修復プロセスにより、エピジェネティック修飾合成配列を二本鎖切断部位の1つに挿入することができ、また、不活性化変異（すなわち欠失、挿入、置換または少なくとも1つのヌクレオチド）の導入により、非相同修復プロセスにより二本鎖切断の他の部位を変異することができ、またはこれを不活性化することができる。

10

20

【0102】

CRISPRベースのエンドヌクレアーゼ介在反復のいずれかでは、エピジェネティック修飾合成核酸は、対応する内因性染色体配列を置き換えることができる。あるいは、エピジェネティック修飾合成核酸は、安全な領域遺伝子座で、または、エピジェネティック修飾に安定性をもたらす部位で、挿入することができる。この反復では、エピジェネティック修飾合成核酸に対応する内因性染色体配列を、（ここに詳述するように）欠失することができ、または不活性化することができる。

30

【0103】

IV. 利用

所定のエピジェネティック修飾を有する合成核酸及び前記核酸を含む細胞は、数個の使用を有している。特定の態様では、調節領域のエピジェネティック状態を修飾するエピジェネティック修飾核酸の挿入を保有する操作された細胞を用いて、遺伝子発現を支配することができ、または変更することができる。例えば、通常修飾されない（すなわち通常はメチル化されないまたは高メチル化でない）調節染色体配列に加えて、または、その代わりに、エピジェネティック修飾核酸の挿入を有する細胞（メチル化核酸等）を用いて、遺伝子発現を変更することができる。逆に、エピジェネティック修飾を欠く合成核酸を有するエピジェネティック修飾、またはエピジェネティック修飾を欠く合成核酸の挿入を有することが知られる内因性調節配列の置換を用いて、遺伝子発現を変更することができる。

40

【0104】

別の態様では、エピジェネティック修飾が安定なエピジェネティック修飾合成配列を含む細胞は、診断または遺伝子型決定の標準として役立つことができる。例えば、エピジェネティック修飾合成核酸、または前記核酸を含む細胞を、疾病（癌等の）を診断するための分析の参照標準として用いることにより、疾病の予後を予測し、疾病挙動を監視し、疾病の適切な治療を決定し、及び、標的治療への応答を測定することが可能である。操作された細胞株におけるこの参照標準の供給は、（1）細胞溶解、（またはFFPE抽出）、

50

DNA分離及び増幅の全ての二次的な診断処理工程を経る天然細胞環境及びゲノム環境の範囲内で、DNA分析テンプレートを提供すること、及び、(2) 遺伝子変化またはエピジェネティック変化を、安定かつ大量のゲノムDNAを提供する細胞タイプにモデル化されることができるといふ点で、有利である。

【0105】

例えば、アルキル化剤による処理につき、神経膠芽腫患者には予測および/または予測マーカーとして有用であるMGMT発現が、示された。MGMT酵素がアルキル化剤により引き起こされるDNAの損傷に対抗するため、MGMTの発現は、テモゾロマイド等のアルキル化剤による治療による予後不良と相関性がある。MGMTプロモーターのメチル化パターンは、MGMT発現の指標として用いることができる。したがって、MGMTプロモーターのメチル化の量が多い患者は、テモゾロマイド治療から利益を得てもよく、一方、MGMTプロモーターメチル化の量の低い患者は、テモゾロマイドに反応しないかもしれない(図3)。Hegi et al., 2004, Clin. Cancer Res. 10(6):1871-4; Hegi et al., 2005, New England J. Med. 352(10):997-1003; Boots-Sprenger et al., 2013, Modern Pathol. 26(7):922-9を参照されたい。さらに別の場合は、ヘテロ接合性(LOH)測定をしないまま、BRCA1遺伝子のメチル化を用いて、所定の卵巣癌がPARP阻害剤または白金塩による処理の候補であるか否かを予測した(Abkevich et al., 2012, Br J Cancer 107(10):1776-82)。したがって、過剰-または低-メチル化MGMTまたはBRCA1配列を含む操作された細胞を、メチル化状態を判断するために参照標準として用いることができる。さらに、特徴の十分にある量のメチル化物を有する患者のサンプルがない場合、標的メチル化パターンを有する操作された細胞は、新検出分析を開発及び特性化するコントロール試料として、または研究または診断研究室の配置または維持における品質管理処置として、有用とすることができる。

10

20

【0106】

さらなる態様では、エピジェネティック修飾が準安定性であるエピジェネティック修飾配列を含む操作された細胞を用いて、エピジェネティック修飾パターンの推測的な知識または挿入された配列の状態に基づいて、細胞内での修飾配列のエピジェネティック安定性を分析することができる。例えば、前記配列を用いて、薬品、環境または食事要因に応じて、遺伝子座のエピジェネティック安定性を分析することができる。特に、人工的にメチル化した遺伝子座は、メチル化パターンを「リセットする」出発点としての機能を果たすことができ、かつ、何の生体因子が二次的なメチル化及び遺伝子発現変化をもたらすかの検討を行うことができる。一例として、重量とコート体色変化の間のよく知られた関連、及び、食事の補充の後のマウスアグーチ遺伝子のメチル化状態が存在する(Dolinoy et al., 2007, Pediatric Research, 61:30R)。標的エンドヌクレアーゼを(上記に詳述するように)用いて化学修飾配列を厳密な位置に挿入することができるため、該修飾配列は、天然染色体環境内に配置することができ、これは、依然として、対象とする染色体領域に固有になりうる任意の遺伝子座特異的エピジェネティック調節因子下にある。異所性メチル化DNA配列を用いたこのような遺伝子座特定実験は、可能ではない。

30

40

【0107】

さらに別の特徴では、エピジェネティック修飾合成配列を含む操作された細胞を、エピジェネティック修飾配列を含むゲノムDNAのソースとして、用いることができる。例えば、DNAは、標準技術を用いて、生きた細胞または固定細胞からの抽出ができ、増幅ができ、及び、分析ができる。あるいは、エピジェネティック修飾を有する合成染色体配列は、細胞内で*in situ*で、例えば*in situ* PCR、*in situ* ウェスタン、免疫組織化学、及び、他の適切な手順を介して、分析することができる。

【0108】

V. キット

50

本発明は、エピジェネティック修飾合成配列、及び/または、ここに記載される前記配列を含む細胞を含むキットを、さらに提供する。一実施形態では、キットは、対象内での疾病の癌治療等の治療処置または投薬計画への反応性を予測するために提供され、このキットは、対象から取得したサンプルと共に、参照標準（すなわちエピジェネティック修飾合成配列）の比較の解釈のための文書に加えて、既知の治療成果に関連する所定のシトシン修飾を有する少なくとも1つの合成核酸を含んでいる。キットは、制御染色体配列をさらに含んでいてもよい。別の実施形態では、キットは、対象サンプルでの疾病を診断するために提供され、このキットは、対象から取得されるサンプルとの参照標準と比較の解釈のための文書とともに、既知の病態に関連がある所定のシトシン修飾を有する少なくとも1つの合成核酸を含む。キットは、制御染色体配列をさらに含んでいてもよい。別の実施形態では、キットは、対象サンプル内の疾病の予後または重症度を予測するために提供され、このキットは、対象から取得したサンプルと共に、参照標準の比較の解釈のための文書に加えて、疾病の既知の予後に関連する所定のシトシン修飾を有する少なくとも1つの合成核酸を含んでいる。キットは、制御染色体配列をさらに含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0109】

他の実施形態において、キットは、多数のエピジェネティック修飾合成配列のパネルを含んでおり、ここでキットの各合成配列は、異なる既知である（1）疾病処理に対する感受性のレベル、（2）疾病の診断、または、（3）疾病の予後、に関連する異なる所定のシトシン修飾を有している。このパネルは、多数の標準を提供するものであり、これに対し、対象のサンプルのシトシン修飾は、（1）疾病の診断を決定すること、または、（2）疾病の予後を決定すること、または、（3）治療計画の予後を判断すること、と比較することができる。これらの異なるキットのいずれかでは、キットは、1つ以上の制御染色体配列と、参照標準と対象から取得されるサンプルとの比較の解釈のための文書とを、さらに含んでいてもよい。

【0110】

ある態様では、エピジェネティック修飾合成配列またはこの複数の配列は、1つ以上の固定細胞内で提供される。多数のシトシン修飾を有する合成配列が提供される際、サンプルは、これらが細胞内で組み込まれるか否かを問わず、別個の、明確にラベルの付いた包装内で提供される。

【0111】

定義

他の定義がなされない限り、ここに用いられる全ての技術的用語及び科学用語は、本発明が属する当業者により共通して理解される意味を有している。以下の参照は、本発明に用いられる用語の多くの一般的な定義を有する技術の1つを提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed., 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 及び、Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。ここに用いられる場合において、以下の用語は、特に明記しない限りこれらの用語に付与された意味を有する。

【0112】

本開示またはその好ましい態様の要素を導入する場合、単語「a」、「an」、「the」及び「said」は、これらの要素の1つ以上があることを意味することを目的とする。用語、「comprising」、「including」及び「having」は、包括的なことを目的とするものであり、また、列挙された要素以外のさらなる要素があってもよいことを意味するものである。

【0113】

ここに互換可能に用いられるように、用語「CpG位置」及び「CpG部位」は、その長さに沿った塩基の直鎖配列内でシトシンヌクレオチドがグアニンヌクレオチドの隣に発生するDNAの領域のことをいい、ここで「CpG」は「-C-リン酸塩-G-」結合の略語であり、すなわち、シトシン及びグアニンは、単一のリン酸塩により分離される。用語「CpGアイランド」は、CpG部位のクラスタのことをいう。

【0114】

ここに用いられる場合において、用語「内因性配列」は、細胞にとって天然の染色体配列のことをいう。

【0115】

用語「外因性配列」とは、ここに用いられる場合、細胞にとって天然ではない配列、または、細胞のゲノムの天然の位置が異なる染色体位置である、染色体配列のことをいう。

10

【0116】

「遺伝子」とは、ここに用いられる場合、遺伝子産物をコードするDNA領域（エキソン及びイントロンを含む）、及び、遺伝子産物の生成を調節する全てのDNA領域のことをいい、いずれにせよこれらの調節配列は、コード及び/または転写された配列に隣接する。したがって、遺伝子は、必ずしもこれに限定されないものの、プロモーター配列、ターミネーター、リボソーム結合部位及び内部リボソーム導入部位等の翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界線エレメント、複製起点、マトリックス付着部位、及び、遺伝子座制御領域を含んでいる。

20

【0117】

用語「異種」は、対象とする細胞に対して内在性でないまたは天然でない実体のことをいう。例えば、異種タンパク質は、外因的に導入された核酸配列等の外因性ソースに由来する、または元来由来する、タンパク質のことをいう。場合によっては、異種タンパク質は通常、対象とする細胞により生成されるものではない。

【0118】

用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、直鎖または環状の配座での、及び一本鎖または二本鎖形態での、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のことをいう。本開示において、これらの用語は、ポリマーの長さに関して制限するとは解釈すべきでない。用語は、自然のヌクレオチドならびに塩基、糖及び/またはリン酸塩部分（例えばホスホリチオ酸骨格鎖）内で修飾されるヌクレオチドの、既知の類似体を含むことができる。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対合特異性を有する；すなわち、Aの類似体はTを有する塩基対になりうる。

30

【0119】

用語「ヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのことをいう。ヌクレオチドは、標準ヌクレオチド（すなわちアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジン及びウリジン）またはヌクレオチド類似体であってもよい。ヌクレオチド類似体は、修飾プリンまたはピリミジン塩基または修飾リボース部分を有するヌクレオチドのことをいう。ヌクレオチド類似体は、自然発生的なヌクレオチド（例えばイノシン）または非自然発生的なヌクレオチドであってもよい。ヌクレオチドの糖または塩基部分上の修飾の非限定的な例としては、アセチル基の付加（または除去）、アミノ基、カルボキシル基、カルボキシメチル基、水酸基、メチル基、ホスホリル基、及び、チオール基、ならびに塩基の炭素及び窒素原子の他の原子（例えば7-デアザプリン）との置換を含んでいる。また、ヌクレオチド類似体は、ジデオキシヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、固定核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、及び、モルホリノを含んでいる。

40

【0120】

用語「ポリペチド」及び「タンパク質」は、互換可能に用いられ、アミノ酸残基のポリマーのことをいう。

【0121】

核酸及びアミノ酸配列の同一性を決定するための技術は、当該技術分野で知られている。典型的には、この技術は、遺伝子に対してmRNAのヌクレオチド配列を決定すること

50

、及び/または、それによりコードされるアミノ酸配列を決定すること、及び、これらの配列を第2のヌクレオチドまたはアミノ酸配列と比較することを含んでいる。また、ゲノム配列はこの形態で決定することができ、比較することができる。一般に、同一性は、2つのポリヌクレオチドまたはポリペチド配列それぞれの対応に対する、正確なヌクレオチド-ヌクレオチド、または、アミノ酸-アミノ酸のことをいう。2以上の配列(ポリヌクレオチドまたはアミノ酸)は、これらのパーセント同一性を決定することにより、比較してもよい。2つの配列のパーセント同一性は、核酸かアミノ酸配列かにせよ、短い配列の長さで分割される2つの調製された配列の間に100を掛けた完全一致の数である。核酸配列のための概算のアラインメントは、Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USAにより開発され、Gribskov *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763 (1986)により正規化される、重み行列を用いることにより、アミノ酸配列に適用されてもよい。配列のパーセント同一性を決定するこのアルゴリズムの例示的な実施態様は、「BestFit」 utility applicationにおけるGenetics Computer Group (Madison, Wis.)により提供される。パーセント同一性または配列間の類似性を計算する他の適切なプログラムは、当該技術分野で一般に知られており、例えば、他のアラインメントプログラムは、デフォルトパラメータに用いられるBLASTである。例えば、BLASTN及びBLASTPは、以下のデフォルトパラメータを使用して用いてもよい: 遺伝コード=標準; フィルタ=なし; 鎖=両方; 分離=60; 予想=10; マトリックス=BLOSUM62; 記載=50の配列; 仕分け=高スコア; データベース=非冗長、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻訳+Swissタンパク質+Spupdate+PIR。これらのプログラムの詳細は、GenBankウェブサイトに見出されてもよい。

【0122】

様々な変化が、本発明の要旨を逸脱しない範囲で、上記の動物、細胞及び方法で作製可能であるが、上記の記載及び以下の実施例に含まれる全ての物質が、例示的であるように、かつ、限定的にでないように、解釈されることが意図される。

【実施例】

【0123】

以下の実施例は、本発明の所定の態様を例示する。

【0124】

実施例1: 合成メチル化DNAの安定な組み込み

この研究の目的は、ZFN標的ゲノム修飾を用いて、合成的にメチル化したDNAを、細胞の染色体に安定的に組み込むことができるか否かを決定することであった。異なるメチル化パターンを有するヒトO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)遺伝子の断片が、ヒト細胞の19番染色体上のAAVS1遺伝子座の標的部位に挿入された。図1Aは、この方策を図解する。

【0125】

ヒトMGMT遺伝子(すなわち、

【化1】

5'-CGACGCCCGCAGGTCCTCG-3'

、配列番号: 9) から19番目の配列を含む2つの一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド(ssODN)、及び、コロニースクリーニングのためのHindIII制限エンドヌクレ

アーゼ部位 (5' - A A G C T T - 3') を、合成した。1 から 4 まで (5' から 3' ま
で) 指定される C p G 部位が、配列番号 : 9 で明白に示される。1 つの s s O D N は、C
p G 部位で 5 - メチルシトシンを含んでいた。また、2 つの補完的な (メチル化及び非メ
チル化) s s O D N を、合成した。s s O D N の様々な組み合わせを、5 m M T r i s
. H C l、p H 8 . 0 , 0 . 5 m M E D T A、p H 8 . 0 , 5 0 m M N a C l を含
むアニールバッファ内で 9 5 の μ M の終末濃度でアニールし、非メチル化、半メチル化及
び二本鎖メチル化二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (d s O D N) を形成した (図 1 B
を参照)。d s O D N の上の突出部を、ヒト A A V S 1 遺伝子座をターゲットするジンク
フィンガーヌクレアーゼの開裂の部位で F o k I 酵素により作成される 5' - G C C A -
3' 突出部と適合性があるように設計した。

10

【 0 1 2 6 】

容量 1 0 0 μ l のヒト K 5 6 2 細胞 1 0 0 万個に対して、3 倍の実験での A A V S 1
Z F N R N A 5 . 0 μ g とともに、9 5 μ M の d s O D N 3 . 2 μ l でヌクレオフェク
ションを行った。ヌクレオフェクション後 2 日、6 日、8 日及び 1 0 日に、細胞の均等量
を採取し、P C R を用いて組み込まれた配列を保有する領域を増幅し、P C R 製品の H i
n d I I I 消化を行った。2 6 4 b p 及び 1 8 0 b p の断片を、各条件 (すなわち非メチ
ル化 d s O D N + Z F N、半メチル化 d s O D N + Z F N 及び二本鎖メチル化 d s O D N
+ Z F N) の下、各日に検出した。

【 0 1 2 7 】

培養の 2 0 日後に、ヌクレオフェクションを行った細胞に対して、単一の生細胞のため
に F A C 分類を行い、9 6 - ウエルプレート上に接種した。ヌクレオフェクションの 3 5
日後、各単一細胞コロニーに由来する細胞を、2 つの部分に分割し : 一方の部分で冷凍し
、他方の部分を、d s O D N 配列の組み込みのため、スクリーンした。ゲノム D N A を抽
出し、組み込まれた配列を保有する A A V S 1 領域を P C R 増幅し、P C R 製品を H i n
d I I I 酵素消化により R F L P 分析した。約 1 3 0 0 のコロニーを H i n d I I I 消化
によりスクリーニングし、正確なサイズの H i n d I I I 断片によるそれらに、定期的な
D N A 塩基配列決定を行った。合計 1 8 の単細胞クローンを、2 5 b p 断片 (すなわち 1
9 b p M G M T 断片及び H i n d I I I 部位) の正しい挿入で、A A V S 1 遺伝子座の
3 つの対立遺伝子のうちの 1 つに同定した。具体的に、5 コロニーは、非メチル化挿入の
正しい組み込みを有し ; 4 コロニーは、半メチル化挿入の正しい組み込みを有し ; 9 コロ
ニーは、二本鎖メチル化挿入の正しい組み込みを有している。修飾 A A V S 1 遺伝子座の
配列は、

20

30

【 化 2 】

5'-

```
CCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCATGGCATCTTCCAGG
GGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCCTCCAACCCGGGCCCTATGTCCACTTCA
GGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTT
ATATTCCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCCTC
CACCCACAGTGGGGCCACGACGCCCGCAGGTCTCGAAGCTTGCCACTAGGGA
CAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTTAGGCCTCCTCCTTCTAGTCTCCTGA
TATTGGGTCTAACCCCCACCTCCTGTTAGGCAGATTCCCTTATCTGGTGACACACCCC
CATTTCTGGAGCCATCTCTCTCCTTGCCAGAACCTCTAAGGTTTGCTTACG-3'
```

40

(配列番号 : 1 0 ; 太字体で示される 2 5 b p 挿入物、イタリックで示される H i n d I
I I 部位) であった。合成メチル化 D N A をヒト細胞のゲノムと安定的に組み込むことが
できることを、これらのデータは示している。

【 0 1 2 8 】

実施例 2 : 合成メチル化 D N A の安定維持

この研究の目的は、ゲノムに組み込まれた合成メチル化 D N A のメチル化状態を、安定

50

的に保持することができるか否かを、決定することであった。MGMT断片の正しい挿入による9つの細胞コロニーを、AAVS1遺伝子座（実施例1を参照）の3つの対立遺伝子の各々において、2週間、再成長させた。各コロニーのメチル化状態を、パイロシーケンスにより決定した（EpigenDx, Hopkinton, マサチューセッツ州）。ヌクレオフェクション後49日のメチル化分析を、表1に示す。

【表2】

表1. ヌクレオフェクション49日後のメチル化分析。

ID #	メチル化状態	メチル化割合 (%)				全体領域	
		CpG #1	CpG #2	CpG #3	CpG #4	平均	SD
1	なし-	0.0	0.0	3.9	0.0	1.0	1.9
2	なし-	2.7	4.6	7.8	3.8	4.7	2.2
3	なし-	0.0	3.8	8.5	3.3	3.9	3.5
4	半-	0.0	2.9	8.0	2.5	3.4	3.4
5	半-	0.0	0.0	7.1	2.8	2.5	3.4
6	半-	3.2	6.6	17.7	4.7	8.0	6.6
7	二本鎖-	15.3	28.4	35.8	21.8	25.3	8.8
8	二本鎖-	0.0	2.6	9.2	5.1	4.2	3.9
9	二本鎖-	4.0	3.1	11.4	3.3	5.5	4.0

10

20

【0129】

コロニー#1（非メチル化）及びコロニー#7（二本鎖メチル化）の繰り返し（A、B）を、さらに31日間成長させた。各コロニーのメチル化状態（ヌクレオフェクション後80日）をパイロシーケンスにより決定し、表2に示す。図2は、トランスフェクション後49日及び80日のこれらの2つの異なる対立遺伝子における各CpG部位でのメチル化状態を要約する。これらのデータは、メチル化状態を、合成DNAからゲノム遺伝子座まで伝えることができる点と、DNAメチル化の所定のパターンを、世代ごとに大部分保持することができる点とを示す。

【表3】

表2. ヌクレオフェクション後の80日のメチル化分析。

ID #	メチル化状態	メチル化状態 (%)				全体領域	
		CpG #1	CpG #2	CpG #3	CpG #4	平均	SD
1A	なし-	2.3	0.0	0.0	2.0	1.1	1.2
1B	なし-	3.3	0.0	0.0	2.6	1.5	1.7
7A	二本鎖-	10.0	17.8	19.1	16.8	15.9	4.1
7B	二本鎖-	9.5	16.4	21.2	18.3	16.4	5.0

30

40

【0130】

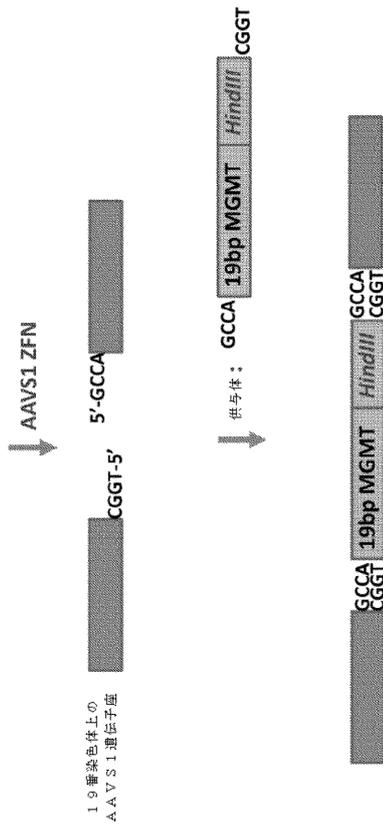
実施例3：安定なMGMTメチル化パターンを有する細胞の使用

安定なMGMTメチル化パターン（上記に調製されるもののような）を有する細胞を、神経膠芽腫に罹患する患者のために適切な治療経過を決定するための分析の診断制御として、用いることができる。患者の腫瘍サンプルのMGMTプロモーターメチル化の量を、安定なMGMTを用いた制御（参照）細胞のものと、分析及び比較することができる。例えば、DNAを、標準手順を用いて、腫瘍及びコントロール試料から抽出することができる。抽出されたDNAを、亜硫酸水素塩で処理し、メチル化特定のPCRを用いて増幅し、そして、配列することができる。あるいは、抽出されたDNAのメチル化状態を、パイロシーケンスを用いて決定することができる。あるいは、MGMTプロモーターのメチル

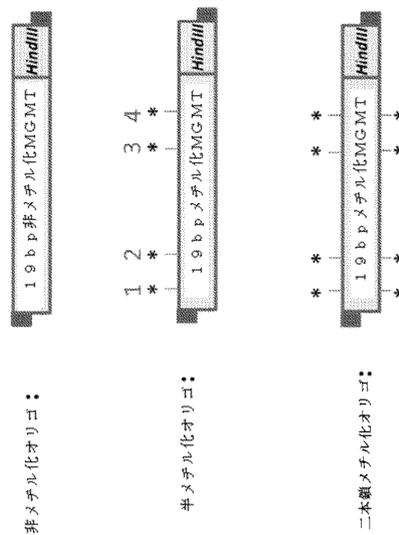
50

化状態を、MGMTに対して増加するメチル化特異抗体を用いて、固定細胞の免疫組織化学により分析することができる。患者のサンプルのメチル化状態をその後、対照細胞のものと比較することができる。患者から取得されるサンプルのメチル化量が対照細胞のものより低い場合は、その場合、腫瘍はMGMTメチル化に対して負であると考えられ、テモゾロマイドは投与されない。患者から取得されるサンプルのメチル化量が対照細胞のものと同じ、またはそれよりも大きい場合は、その場合、腫瘍はMGMTメチル化に対して陽性であると考えられ、テモゾロマイドが投与される（図3を参照）。

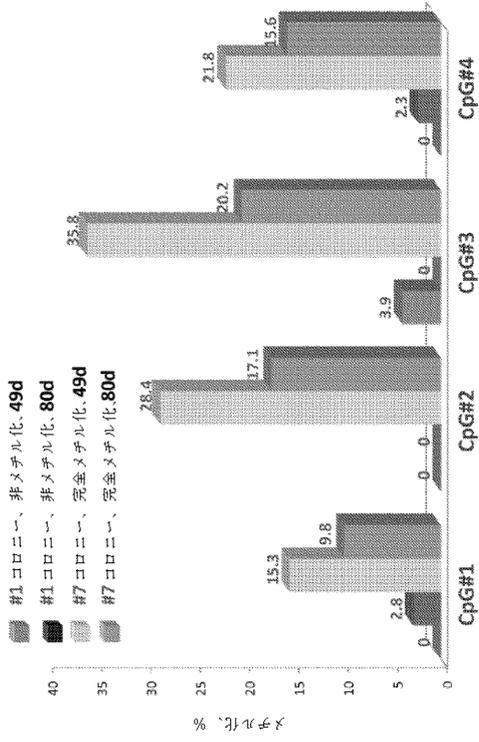
【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



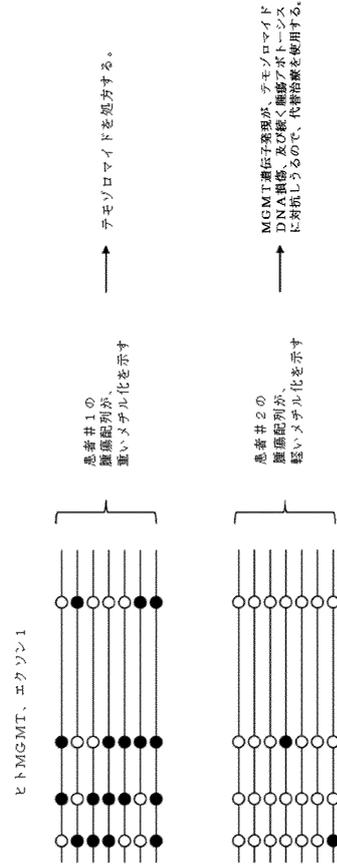
【 図 2 】



【 配列表 】

2017517250000001.app

【 図 3 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/27541
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68, C12Q 1/02 (2015.01) CPC - C12Q 2600/154, C12Q 1/02 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12Q 1/68, C12Q 1/02 (2015.01) CPC - C12Q 2600/154, C12Q 1/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12Q 2600/106, C12Q 2600/112, C12Q 2600/118 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubWEST (USPT,PGPB,EPAB,JPAB), Google Scholar Search terms: cytosine, methylation, methylated, epigenetic, 5-methylcytosine, 5mC, 3-methylcytosine, 3mC, 5-hydroxymethylcytosine, 5hmC, 5-formylcytosine, 5-carboxylcytosine, 5caC, zinc finger nuclease, CRISPR, meganuclease, transcription activator-like effector nucl		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2009/0289736 A1 (NIMMRICH et al.) 29 October 2009 (29.10.2009) para [0128], [0147], [0158]-[0159], [0164], [0184]-[0185], [0202], [0287]	16, 18, 19/(16,18) 1-7
X	US 2004/0076956 A1 (OLEK et al.) 22 April 2004 (22.04.2004) para [0030], [0037], [0041], [0054], [0059]	17, 19/17
Y	US 2007/0134796 A1 (HOLMES et al.) 14 June 2007 (14.06.2007) para [0002], [0008], [0010], [0015]	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 July 2015 (21.07.2015)		Date of mailing of the international search report 05 AUG 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/27541

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/27541

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 8-15, 20-26
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 0 7 K 14/00 (2006.01) C 0 7 K 14/00

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

(72) 発明者 グレゴリー・ディ・デイビス
 アメリカ合衆国 6 3 1 0 3 ミズーリ州セントルイス、スプリース・ストリート 3 0 5 0 番、シグマ
 - アルドリッチ・カンパニー・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72) 発明者 チャオホア・カン
 アメリカ合衆国 6 3 1 0 3 ミズーリ州セントルイス、スプリース・ストリート 3 0 5 0 番、シグマ
 - アルドリッチ・カンパニー・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32
 QR35 QR55 QR62 QS25
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA01 BD44 CA46
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 EA50