

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5551432号
(P5551432)

(45) 発行日 平成26年7月16日(2014.7.16)

(24) 登録日 平成26年5月30日(2014.5.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K 19/00	
C 12 N 9/16	(2006.01)	C 12 N 9/16	A
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N 1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19	

請求項の数 15 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-512175 (P2009-512175)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月23日 (2007.5.23)
 (65) 公表番号 特表2009-538141 (P2009-538141A)
 (43) 公表日 平成21年11月5日 (2009.11.5)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2007/012588
 (87) 國際公開番号 WO2007/139982
 (87) 國際公開日 平成19年12月6日 (2007.12.6)
 審査請求日 平成22年4月15日 (2010.4.15)
 (31) 優先権主張番号 60/808,501
 (32) 優先日 平成18年5月25日 (2006.5.25)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/847,269
 (32) 優先日 平成18年9月26日 (2006.9.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 508241200
 サンガモバイオサイエンシーズ, イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リッ
 チモンド カナル ブールバード 501
 ポイント リッチモンド テク センタ
 ー スト エー 100
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敏
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】遺伝子不活性化のための方法と組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホスホジエステル結合の酵素的加水分解を行う切断ドメインと、遺伝子操作されたジンクフィンガータンパク質DNA結合ドメインとを含み、CCR-5遺伝子に特異的に結合する、融合タンパク質であって、当該DNA結合ドメインが、N末端からC末端の順にF1からF4と名付けられた4のジンクフィンガー認識領域を含み、ここでF1～F4は、以下の：

- (1) F 1 : D R S N L S R (配列番号 2)
 F 2 : I S S N L N S (配列番号 5)
 F 3 : R S D N L A R (配列番号 4)
 F 4 : T S G N L T R (配列番号 8) ; 又は
- (2) F 1 : D R S N L S R (配列番号 2)
 F 2 : V S S N L T S (配列番号 6)
 F 3 : R S D N L A R (配列番号 4)
 F 4 : T S G N L T R (配列番号 8) ;

10

である、前記融合タンパク質。

【請求項 2】

前記切断ドメインが、切断半ドメインである、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 3】

前記切断半ドメインが、野生型FoxI切断半ドメインである、請求項1又は2に記載

20

のタンパク質。

【請求項 4】

前記切断半ドメインが、遺伝子操作された F o k I 切断半ドメインである、請求項 3 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載されるタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含む、遺伝子送達ベクター。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含む、単離された細胞。 10

【請求項 8】

前記細胞が、造血幹細胞、T 細胞、マクロファージ、樹状細胞、及び抗原提示細胞からなる群から選択される、請求項 7 に記載の細胞。

【請求項 9】

前記 T 細胞が、CD 4⁺細胞である、請求項 8 に記載の細胞。

【請求項 10】

前記細胞が、K 5 6 2 細胞、HEK 2 9 3 細胞、PM - 1 細胞、THP - 1 細胞、及び GHOST 細胞からなる群から選択される、請求項 8 に記載の細胞。

【請求項 11】

エクス・ビボで、ヒト細胞においてCCR - 5 遺伝子を不活性化する方法であって、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のタンパク質；請求項 5 に記載のポリヌクレオチド、又は請求項 6 に記載の遺伝子送達ベクターを、当該細胞に投与することを含む、前記方法。 20

【請求項 12】

前記細胞が、造血幹細胞、T 細胞、マクロファージ、樹状細胞、及び抗原提示細胞からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 T 細胞が、CD 4⁺細胞である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記細胞が、K 5 6 2 細胞、HEK 2 9 3 細胞、PM - 1 細胞、THP - 1 細胞、及び GHOST 細胞からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。 30

【請求項 15】

対象において HIV 感染を治療または予防するために有用な細胞を製造する方法であつて、当該方法が、請求項 11 に記載の方法に従つて細胞において CCR 5 遺伝子を不活性化することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、ポリペプチドとゲノム工学及び相同的組換えの分野である。

【0002】

関連出願の相互参照

本発明は、米国仮特許出願第60/808,501号（2006年5月25日出願）；米国仮特許出願第60/847,269号（2006年9月26日出願）；米国仮特許出願第60/926,911号（2007年4月30日出願）（これらの開示内容のすべては参考することによりその全体が本明細書に援用される）の利益を請求する。 40

【0003】

連邦政府に支援された研究でなされた発明に対する権利の陳述

該当せず。

【背景技術】

【0004】

背景

ゲノムDNAの標的化切断のための種々の方法と組成物が記載される。かかる標的化切断は、例えば標的化突然変異誘発を誘導し、細胞DNA配列の標的化欠失を誘導し、所定の染色体遺伝子座での標的化組換えを促進するのに使用することができる。例えば米国特許公報第20030232410号、20050208489号、20050026157号、20050064474号、20060188987号、及び国際特許公報WO07/014275号（これらの開示内容は参考することによりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【0005】

CCR5（7-膜貫通ケモカイン受容体）は、HIV-1がCD4 T細胞に侵入するための主要な共同受容体である（Samson et al. (1996) Nature 382:722-725; Deng et al. (1996) Nature 381:661-666; Alkhatib (1996) Science 272:1955-1958）。CCR5遺伝子におけるHIV-1耐性付与ホモ接合性32欠失の発見以来、CCR5はHIV治療法の主要な標的として盛んに研究されている。小分子は受容体のインターナリゼーションを誘導するか又はCCR5-HIV相互作用を阻止することが証明されている（Fathenheuer et al. (2005) Nat. Med. 11:1170-1172）が、これらの小分子アプローチにより、興味深いことにウイルス侵入のためにCCR5を使用し続けるエスケープ変異体の選択を介して抵抗性が出現した（Kuhmann et al. (2004) J. Virol. 78:2790-2807）。同様にイントラボディ、アンチセンス、及びRNAiベースのアプローチは今日まで、CCR5発現をほんのわずかしか阻止しない。

【0006】

すなわち表現型浸透性とHIV感染への長期抵抗性のために、CCR5を完全にノックアウトする組成物に対するニーズがある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

要約

標的遺伝子の部分的又は完全な不活性化のための組成物と方法が開示される。また例えば治療目的で細胞内の遺伝子を不活性化するために及び／又は標的遺伝子が不活性化されている細胞株を产生するために、これらの組成物（試薬）の製造法と使用法が開示される。

【課題を解決するための手段】

【0008】

ある態様において、ヒトCCR-5遺伝子中に標的部位を有するジンクフィンガーヌクレアーゼ（zinc finger nuclease）（ZFN）が提供される。ある実施態様においてこれらのヌクレアーゼによるCCR-5遺伝子内の切断により、CCR5遺伝子が永久に破壊（例えば変異）される。ある実施態様において、天然に存在するCCR-5 32変異の上流の標的部位に結合するように、ジンクフィンガードメインが遺伝子操作される。ジンクフィンガータンパク質は、1、2、3、4、5、6、又はそれ以上のジンクフィンガーを含有し、それぞれのジンクフィンガーは、標的遺伝子中の標的サブサイトに結合する認識らせんを有する。ある実施態様において標的遺伝子はCCR-5であり、ジンクフィンガータンパク質は4つのフィンガー（F1、F2、F3、及びF4と呼ばれ、N末端からC末端にF1からF4の順に並んでいる）を含み、表1に示す認識領域のアミノ酸配列を含む。

【0009】

すなわちある態様において、遺伝子操作されたジンクフィンガータンパク質DNA結合ドメインが提供され、ここでDNA結合ドメインは、N末端からC末端にF1からF4の順に並んだ4つのジンクフィンガー認識領域を含み、F1、F3、及びF4は以下のアミノ酸配列を含む：F1：DRSNLSR（配列番号2）；F3：RSNDLAR（配列番号4）；及びF4：TSGNLTR（配列番号8）。ある実施形態においてF2は、アミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列 I S S N L N S (配列番号 5) を含む。あるいは F 2 は、アミノ酸配列 V S S N L T S (配列番号 6) を含む。

【 0 0 1 0 】

本明細書に記載のタンパク質は、切断ドメイン及び / 又は切断半ドメインをさらに含んでよい (例えば、野生型又は遺伝子操作された F o k I 切断半ドメイン)。すなわち本明細書に記載の任意の Z F N において、ヌクレアーゼドメインは野生型ヌクレアーゼドメイン又はヌクレアーゼ半ドメイン (例えば F o k I 切断半ドメイン) を含んでよい。別の実施態様において Z F N は、遺伝子操作されたヌクレアーゼドメイン又は半ドメイン、例えば真性 (obligate) ヘテロダイマーを形成する遺伝子操作された F o k I 切断半ドメインを含む。例えば米国仮特許出願第 6 0 / 8 0 8 , 4 8 6 号 (2006 年 5 月 2 5 日出願) を参照のこと。10

【 0 0 1 1 】

別の態様において本開示は、本明細書に記載の任意のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。本明細書に記載の任意のポリヌクレオチドはまた、標的遺伝子 (例えば C C R - 5) への標的化挿入のための配列 (ドナー又はパッチ配列) を含んでよい。

【 0 0 1 2 】

別の態様において本明細書に記載の任意のポリヌクレオチドを含む遺伝子送達ベクターが提供される。ある実施態様においてベクターはアデノウイルスベクター (例えば A d 5 / 3 5 ベクター) である。すなわちまた、標的遺伝子への標的化組み込みのための少なくとも 1 つのジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) をコードする配列及び / 又はドナー配列を含む、アデノウイルス (A d) ベクターが提供される。ある実施態様において A d ベクターはキメラ A d ベクター、例えば A d 5 / 3 5 ベクターである。さらなる態様において標的遺伝子は、ヒト C C R - 5 遺伝子である。本明細書に記載のベクターはドナー配列を含んでよい。ある実施態様において 1 つのベクターが、1 つ又はそれ以上の Z F N をコードする配列及びドナー配列を含む。別の態様においてドナー配列が第 1 のベクターに含有され、Z F N コード配列が第 2 のベクター中に存在する。20

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載のベクター (例えば A d ベクター) の Z F N 配列は典型的には、ジンクフィンガータンパク質 (Z F P) と切断ドメインもしくは切断半ドメイン (すなわちヌクレアーゼドメイン) の融合体をコードする。Z E N のジンクフィンガータンパク質部分は、標的遺伝子中の標的部位に結合するように遺伝子操作される。ジンクフィンガータンパク質は 1、2、3、4、5、6、又はそれ以上のジンクフィンガーを含有し、それぞれのジンクフィンガーは、標的遺伝子中の標的サブサイトに結合する認識らせんを有する。ある実施態様において標的遺伝子は C C R - 5 であり、ジンクフィンガータンパク質は 4 つのフィンガー (F 1、F 2、F 3、及び F 4 と呼ばれる) を含み、表 1 に示す認識領域のアミノ酸配列を含む。30

【 0 0 1 4 】

本明細書に記載の任意のポリヌクレオチド又はタンパク質において、切断ドメインは少なくとも 1 つの切断ドメイン又は少なくとも 1 つの切断半ドメインを含んでよい。ある実施態様において切断ドメイン又は切断半ドメインは、野生型切断ドメイン (例えば、F o k I 野生型切断半ドメイン) である。別の実施態様において切断ドメイン又は切断半ドメインは遺伝子操作される。40

【 0 0 1 5 】

さらに別の態様において本開示は、本明細書に記載のタンパク質、ポリヌクレオチド、及び / 又はベクターを含む単離された細胞を提供する。ある実施態様において細胞は、造血幹細胞、T 細胞 (例えば C D 4⁺ T 細胞)、マクロファージ、樹状細胞、及び抗原提示細胞よりなる群から選択される。別の態様において本明細書に記載の 1 つ又はそれ以上の A d ベクターを含む細胞 (A d - Z F N、A d - Z F N - ドナー、及び / 又は A d - ドナーベクター) もまた記載される。細胞には、例えば末梢血単核細胞 (P B M C)、マクロファージ、間葉系幹細胞、ヒト胚幹細胞 (h E S 細胞)、造血幹細胞 (例えば、C D 3 450

⁺細胞)、T細胞(例えばCD4⁺細胞)、樹状細胞、又は抗原提示細胞；又は細胞株、例えばK562(慢性骨髓性白血病)、HEK293(胚腎臓)、PM-1(CD4⁺T細胞)、THP-1(单球性白血病)、又はGHOST(骨肉腫)がある。

【0016】

別の態様において、1つ又はそれ以上のタンパク質、ポリヌクレオチド、及び／又はベクターを本明細書に記載の細胞に導入することにより、細胞中の標的遺伝子を不活性化する方法が記載される。本明細書に記載の方法においてZFNは、細胞DNA配列の標的化突然変異誘発、標的化欠失を含み、及び／又は所定の染色体遺伝子座における標的化組換えを促進する。すなわちある実施態様においてZFNは標的遺伝子の1つ又はそれ以上のヌクレオチドを欠失させる。別の実施態様において標的遺伝子中のゲノム配列は、例えば本明細書に記載のAd-ZFN及びZFNで標的化切断後に遺伝子中に挿入される「ドナー配列」を使用して置換される。ドナー配列は、Ad-ZFNベクター中に存在するか、別のAdベクター中に存在するか、又は異なる核酸送達機構を使用して細胞中に導入してもよい。ある実施態様において標的遺伝子はCCR-5遺伝子である。

【0017】

別の態様において細胞又は細胞株中のCCR-5遺伝子を変異するための及び／又はCCR-5機能を不活性化させるためのジンクフィンガータンパク質及びその融合体の使用法が提供される。すなわちヒト細胞中のCCR-5遺伝子を不活性化する方法が提供され、この方法は、本明細書に記載の任意のタンパク質又はポリヌクレオチドを細胞に投与することを含む。

【0018】

さらに別の態様において本開示は、被験体のHIV感染を治療または予防する方法であって、(a)ポリペプチドが細胞内で発現されるような条件下で、第1のポリペプチドをコードする第1の核酸を細胞に導入し(ここで、第1のポリペプチドは、(i)CCR5遺伝子内の第1の標的部位に結合するように遺伝子操作されたジンクフィンガー-DNA結合ドメインと、(ii)切断ドメインとを含む)(こうしてポリペプチドは標的部位に結合し、CCR5遺伝子を切断する)；そして(b)細胞を被験体に導入する、ことを含んでなる方法を提供する。ある実施態様において細胞は、造血幹細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、及び抗原提示細胞よりなる群から選択される。核酸は、本明細書に記載の任意のポリヌクレオチドを含んでよい。いずれの方法でも、第1の核酸はさらに第2のポリペプチドをコードし、ここで第2のポリペプチドは、第2のポリペプチドが細胞内で発現されるように、(i)CCR5遺伝子内の第2の標的部位に結合するように遺伝子操作されたジンクフィンガー-DNA結合ドメインと、(ii)切断ドメインとを含み、こうして第1及び第2のポリペプチドは各標的部位に結合し、CCR5遺伝子を切断する。同様にこれらの方法のいずれもさらに、第2の核酸を細胞に導入する工程を含み、ここで第2の核酸は、CCR-5遺伝子と相同的ではない配列にフランクするCCR-5遺伝子に対する2つの相同性領域を含む。

【0019】

本明細書に記載の任意の方法と組成物において、細胞は例えば造血幹細胞(例えば、CD34⁺細胞)、T細胞(例えばCD4⁺細胞)、マクロファージ、樹状細胞、又は抗原提示細胞；又は細胞株、例えばK562(慢性骨髓性白血病)、HEK293(胚腎臓)、PM-1(CD4⁺T細胞)、THP-1(单球性白血病)、又はGHOST(骨肉腫)でもよい。

【0020】

さらに本明細書に記載の任意の方法を、インビトロ、インビボ、及び／又はエクスピボで実施することができる。ある実施態様において方法は、例えばPBM C、例えばT細胞を修飾して、CCR-5の破壊によりこれらをHIV感染に対して抵抗性にするように、エクスピボで実施される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、Ad5/35ベクターの略図であり、ここでE1をコードする配列は欠失され、トランス遺伝子発現力セット（例えば、GFP、ZFN、及び/又はドナー配列をコードする）で置換される。

【0022】

【図2】図2は、野生型FokI切断半ドメインのアミノ酸配列（配列番号33）を示す。遺伝子操作された切断半ドメインを生成するために配列を改変できる位置（486、490、499、及び538）を太字と下線で示す。

【0023】

【図3】図3は、図4に示す遺伝子操作された切断半ドメインとヘテロダイマーを形成する遺伝子操作された切断半ドメイン例のアミノ酸配列（配列番号34）を示す。野生型と比較して配列を改変できる位置（アミノ酸残基486と499に対応する）を下線で示す。
10

【0024】

【図4】図4は、本明細書に記載のZFNで使用できる別の例の遺伝子操作された切断半ドメインのアミノ酸配列（配列番号35）を示す。野生型と比較して配列を改変できる位置（アミノ酸残基490と538に対応する）を下線で示す。

【0025】

【図5】図5は、CCR-5相同性アームを有するドナー（パッチ）配列を作成するために使用されるCCR5遺伝子の一部のヌクレオチド配列（配列番号36）を示す。実施例1を参照のこと。
20

【0026】

【図6】図6は、CCR-5遺伝子への挿入のために使用される47bpの「パッチ」配列のヌクレオチド配列（配列番号37）を示す。実施例1を参照のこと。

【0027】

【図7】図7は、CCR-5遺伝子への標的化挿入のために使用されるドナー配列のヌクレオチド配列（配列番号38）を示す。5'CCR-5相同性アームはヌクレオチド1～471に対応する；CCR-5への標的化挿入のための「パッチ」配列は下線を付けてあり、これはヌクレオチド472～518に対応する；及び3'CCR-5相同性アームはヌクレオチド519～1928に対応する。実施例1を参照のこと。
30

【0028】

【図8】図8は、Ad5/35-ZFNを用いて形質導入された細胞中のCCR-5遺伝子の位置の配列（配列番号54～66）を示す。細胞タイプはカラム3に示す。野生型CCR-5配列と比較して欠失している塩基を点で示す。

【0029】

【図9】図9（配列番号43、44、46～50）は、Ad5/35-ZFNを用いて形質導入された細胞中のCCR-5遺伝子の一部の配列解析を示す。細胞タイプをカラム3に示す。図に示した修飾ゲノムはCCR5遺伝子中の種々の小さい挿入部（下線の塩基）を有し、ある場合には、点で示す欠失を有した。

【0030】

【図10】図10（配列番号51～53）は、Ad5/35-ZFNを用いて形質導入された細胞中のCCR-5遺伝子の一部の配列解析を示す。図に示した修飾ゲノムはCCR-5遺伝子中に種々の長い挿入部（下線の塩基）を有した。
40

【0031】

【図11】図11のパネルAとBは、野生型HIV又はモック感染で暴露後の、Ad5/35-ZFN215（パネルA）とAd5/35-ZFN224（パネルB）で形質導入したT細胞中のCCR-5修飾T細胞の割合の経時変化を示す。

【0032】

【図12】図12（配列番号67及び68）は、CCR5-ZFN対215と224のCCR5遺伝子中の標的部位を示す略図である。

【0033】

10

20

30

40

50

【図13】図13は、CCR5又はIL2-Rを標的とする記載のZFNをコードするAd5/35ベクターで形質導入したHOST-CCR5細胞中の標的遺伝子破壊のレベルを示す。実施例13を参照のこと。下の移動産物(矢印で示す)は、ZFN介在遺伝子破壊の直接の尺度である。「NTD」は非形質導入細胞を示す。

【0034】

【図14】図14のパネルAとBは、ZFN215又はZFN224をコードするAd5/35ベクターで形質導入したHOST-CCR5細胞のCCR5表面発現(図14A)又はGFP発現(図14B)のフローサイトメトリー測定を示すグラフである。図14Aは、記載のベクターで形質導入したHOST-CCR5細胞中のフローサイトメトリーで測定した低下したCCR5表面発現を示す。NTDは非形質導入を示す; IL2Rは、IL2R-標的化ZFNを含有する細胞を示す; 215と224は、それぞれZFN対215又は224を含有する細胞を示す。「MFI」は平均蛍光強度を示す。図14Bは、IL-2r ZFN及び対照HOST-CCR5細胞と比較した、CCR5-ZFN215とCCR5-ZFN224修飾細胞のHIV暴露後48時間のフローサイトメトリーで測定したHIV-1_{BAL}による暴露からの防御を示す。GFP蛍光はHIV侵入を示し、陽性対照に対して感染された平均パーセントとしてプロットされる。棒グラフは三重測定の平均を示す。

10

【0035】

【図15】図15は、R5向性HIV-1_{BAL}でHIV-1暴露後、又はモックHIV感染後、3、10、21、31、42、及び52日目にCell-1アッセイにより測定したZFN破壊CCR対立遺伝子のレベルを示す。破壊したCCR5対立遺伝子を有する細胞はモック感染培養物中で安定レベルで存在したが、HIV-1の存在下では増加した。

20

【0036】

【図16】図16は、HIV暴露の52日後のZFN処理PM1細胞中のCCR5対立遺伝子の配列を示す。

【0037】

【図17】図17は、CCR5-ZFN215、CCR5-ZFN224、又はGFPを発現するAd5/35ベクター(Surveyor(登録商標)ヌクレアーゼアッセイ)で測定するとMOIは30又は100で形質導入した匿名の健常ドナーの初代CD4⁺T細胞中のZFN破壊CCR5対立遺伝子のレベルを示す。破壊されたCCR5対立遺伝子に対応するバンドを矢印で示す。破壊されたCCR5対立遺伝子のパーセントを各レーンの下に示す。

30

【0038】

【図18】図18は、そのゲノムがCCR5-ZFN又はGFP(対照細胞)をコードするAd5/35ベクターで形質導入したCD4⁺T細胞の集団倍加速度を示す。細胞を0日にAd5/35ベクターで形質導入した。三角で示す点をつなぐ線は、非形質導入細胞の倍加速度を示す; 四角で示す点をつなぐ線は、Ad5/35CCR5ZFN224形質導入細胞の倍加速度を示す; 及び、菱形で示す点をつなぐ線は、Ad5/35GFP形質導入細胞の倍加速度を示す。

40

【0039】

【図19】図19は、モック感染培養物と比較した、CCR5向性HIV-1_{US1}でインピトロ暴露後の経時的なZFN215形質導入CD4⁺T細胞中のZFN破壊CCR5対立遺伝子の濃縮を示す。CCR5破壊はSurveyor(登録商標)ヌクレアーゼ(Cell-1アッセイ)を使用して測定した。四角をつなぐ線はHIV感染細胞を示し、三角をつなぐ線はモック感染細胞を示す。Ad5/35形質導入CD4⁺T細胞を非修飾CD4⁺T細胞(1:3)と混合することにより、ZFN破壊CCR5対立遺伝子の約10%出発レベルが得られた。

【0040】

【図20】図20は、CCR5ZFN対215又は224を発現するAd5/35ベクターで形質導入後24時間に測定した、初代CD4⁺T細胞中の平均核内P53BP1免疫

50

染色巣を示すグラフである。核内巣は、Velocity（登録商標）ソフトウェアを使用して1条件当たり少なくとも100個の核から計測した。エトボシドで処理した陽性対照細胞と対照細胞（非形質導入）から得られた結果も示す。

【0041】

【図21】図21は、対照（モック感染）マウス又はHIV感染マウスの脾臓から40日目に単離したCD4細胞中の、Surveyor（登録商標）ヌクレアーゼ（C el - 1）アッセイを使用して測定したインビボCCR5破壊頻度を示すグラフである。各群の結果を平均し、対応の無いt-検定を使用して解析した。

【発明を実施するための形態】

【0042】

詳細な説明

ヒトCCR5遺伝子を標的化するジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）（CCR5-ZFN）が本明細書に記載される。これらのZFNは、例えばCCR5コード領域中の所定の部位で2本鎖ブレーク（DSB）を効率的に生成する。この部位は例えばCCR5 32変異の上流にある。本明細書に記載のZFNの一過性発現は、ヒト細胞（初代ヒトCD4Tリンパ球を含む）中のCCR5遺伝子の高度に効率的で永久的な破壊を促進し、HIV-1感染に対する強固な防御を付与し、そしてインビトロとインビボの両方でこれらの細胞に対する強力な選択的利点を提供する。

【0043】

特にCCR5-ZFNの一過性送達は、初代ヒトCD4T細胞中の50%を超える効率を有するヒトCCR5遺伝子の永久的破壊を引き起こす。CCR5-ZFN作用は極めて特異的であり、充分許容され、これは、(i)選択の非存在下でZFN改変細胞の安定性、増殖、及び移植特性を検査すること、(ii)核内DSB誘導性53BP1巣を直接染色すること、及び(iii)最も類似した推定の標的ではないゲノム部位での切断を試験すること、により証明される。さらに活性HIV-1感染の形の選択的圧力の存在下で、ZFN改変は、インビトロのCCR5向性（しかしCXCR4向性ではない）HIV-1暴露アッセイ中に、ヒト化CCR5 32細胞で得られるものと匹敵するレベルまで、大きな延命効果を付与する。

【0044】

本明細書に記載のCCR5-ZFN介在ゲノム編集は、初代ヒト細胞でCCR5ヌル遺伝子型を作成するのに使用される。さらに遺伝的に決定された形質について予測されるように、ZFN改変細胞は、インビトロとインビボの両方でHIV-1感染に対する安定で遺伝性の抵抗性を示した。

【0045】

CCR5破壊を介するHIV治療に対する小分子、イントラボディ、及びアンチセンス又はRNAiベースのアプローチは、mRNA又はタンパク質レベルでCCR5を不完全に抑制又は阻止する。Levine et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17372-17377; Trkola et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:395-400を参照のこと。すなわち他のアプローチとは異なり、本明細書に記載のCCR5-ZFNは真のCCR5ヌル細胞を生成し、これは自然選択されるCCR5 32のように永久かつ完全にCCR5陰性であり、HIV-1感染から優先的に生き延び、HIV-1感染に対して等しく抵抗性娘細胞を生成する。一過性ZFN遺伝子送達と発現はCCR5発現を排除するのに充分であるため、CCR5-ZFNによる永久的な遺伝子改変は、外来DNAをゲノムに組み込む必要無くウイルス侵入を阻止する。

【0046】

またZFNを含むアデノウイルス（Ad）ベクター及び/又はこれらのAdベクターを含むドナー配列と細胞も、本明細書に記載される。これらのAdベクターは、例えば標的化切斷後に非相同的末端結合により、又は標的化切斷後に外因性ポリヌクレオチド（細胞ヌクレオチド配列との1つ又はそれ以上の相同性領域を含む）とゲノム配列の間の相同的組換えにより、細胞クロマチンの標的化切斷及び細胞ヌクレオチド配列の標的化改変の方

10

20

30

40

50

法において有用である。

【0047】

概論

【0048】

本発明の方法の実施、ならびに本明細書で開示される組成物の調製と使用は、特に明記しない場合は、当業者の技術範囲内である分子生物学、生物学、生化学、クロマチン構造と分析、コンピューター化学、細胞培養、組換えDNA、及び関連分野の従来の技術を利用する。これらの技術は文献で充分説明されている。例えば、Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989、及び第3版, 2001; Ausubel et al, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987、及び定期的最新版; METHODS IN ENZYMOLOGYシリーズ, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, 第3版, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe編), Academic Press, San Diego, 1999; and METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker編) Humana Press, Totowa, 1999を参照のこと。10

【0049】

定義

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、及び「オリゴヌクレオチド」は同義に使用され、線状又は環状コンフォメーション、及び1本鎖もしくは2本鎖型のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを意味する。本発明の開示目的のために、これらの用語はポリマーの長さについて決して制限的ではない。この用語は、天然のヌクレオチドならびに塩基、糖、及び/又はリン酸成分が修飾されているヌクレオチド（例えばホスホロチオエート骨格）の既知の類似体を包含する。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と塩基対合する。20

【0050】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は同義に使用され、アミノ酸残基のポリマーを意味する。この用語はまた、1つ又はそれ以上のアミノ酸が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学類似体又は修飾誘導体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。30

【0051】

「結合する」は、巨大分子間（例えばタンパク質と核酸間）の配列特異的非共有結合的相互作用を意味する。相互作用全体が配列特異的である限り、必ずしもすべての結合性相互作用が配列特異的である必要は無い（例えば、DNA骨格中のリン酸残基との接触）。かかる相互作用は一般に、解離定数（ K_d ）が $10^{-6} M^{-1}$ 又はそれ以下が特徴である。「親和性」は結合の強さを意味し、結合親和性の上昇は低い K_d と相関する。

【0052】

「結合タンパク質」は、他の分子に非共有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）、及び/又はタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合することができる。タンパク質結合タンパク質の場合、これは自体に結合できる（ホモダイマー、ホモトリマーなどを形成する）か、及び/又は1つ又はそれ以上の異なるタンパク質に結合することができる。結合タンパク質は2つ以上のタイプの結合活性を有することができる。例えばジンクフィンガータンパク質はDNA結合、RNA結合、及びタンパク質結合活性を有する。40

【0053】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」（又は結合ドメイン）は、タンパク質であるか又はより大きなタンパク質内のドメインであり、1つ又はそれ以上のジンクフィンガー（これは、その構造が亜鉛イオンの配位により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）を介して配列特異的にDNAに結合する。ジンクフィンガーDNA結50

合タンパク質という用語は、しばしばジンクフィンガータンパク質又はZFPと省略される。

【0054】

ジンクフィンガー結合ドメインは、所定のヌクレオチド配列に結合するように「遺伝子操作」することができる。ジンクフィンガータンパク質を遺伝子操作する方法の非限定例は設計と選択である。設計されたジンクフィンガータンパク質は、その設計／組成が主に合理的基準により起きる天然には存在しないタンパク質である。設計の合理的基準は、既存のZFP設計と結合データの情報を保存しているデータベース中の情報を加工する置換規則とコンピューターアルゴリズムとの適用を含む。例えば米国特許第6,140,081号；6,453,242号；及び6,534,261号を参照；またWO98/53058号；WO98/53059号；WO98/53060号；WO02/016536号、及びWO03/016496号を参照のこと。10

【0055】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質は、天然には存在しなくて、その產生は主にファージ表示、相互作用捕捉、又はハイブリッド選択のような経験的方法によるタンパク質である。例えばUSS5,789,538号；USS5,925,523号；USS6,007,988号；USS6,013,453号；USS6,200,759号；WO95/19431号；WO96/06166号；WO98/53057号；WO98/54311号；WO00/27878号；WO01/60970号；WO01/88197号、及びWO02/099084号を参照のこと。20

【0056】

用語「配列」は、任意の長さのヌクレオチド配列を意味し、これはDNAでもRNAでもよい；これは、線状、環状、又は分岐型でもよく、1本鎖でも2本鎖でもよい。用語「ドナー配列」は、ゲノム中に挿入されるヌクレオチド配列を意味する。ドナー配列は任意の長さ、例えば2～10,000ヌクレオチドの長さ（又はこの間もしくはそれ以上の任意の整数値）、好ましくは約100～1,000ヌクレオチドの長さ（又はこの間の整数）、さらに好ましくは約200～500ヌクレオチドの長さでもよい。

【0057】

「相同的非同一配列」は、第2の配列とある程度の配列同一性を共有するが、その配列が第2の配列とは同一ではない第1の配列を意味する。例えば変異遺伝子の野生型配列を含むポリヌクレオチドは、変異遺伝子の配列と相同的であり非同一である。ある実施態様において2つの配列間の相同性の程度は、通常の細胞機構を利用してその間の相同的組換えを行うのに充分である。2つの相同的非同一配列は任意の長さでよく、その非相同性の程度は単一のヌクレオチドの小ささ（例えば、標的化相同的組換えによるゲノム点突然変異の補正のため）、又は10キロ塩基又はそれ以上の大きさ（例えば、染色体中の所定の異所への遺伝子の挿入のため）でもよい。相同的非同一配列を含む2つのポリヌクレオチドは同じ長さでなくてもよい。例えば20～10,000ヌクレオチド又はヌクレオチド対の外因性ポリヌクレオチド（すなわちドナーポリヌクレオチド）を使用することができる。

【0058】

核酸配列及びアミノ酸配列の同一性を測定する方法は当該分野で公知である。典型的にはかかる方法は、ある遺伝子のmRNAのヌクレオチド配列を決定し、及び／又はこれにコードされるアミノ酸配列を決定し、これらの配列を第2のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列と比較することを含む。ゲノム配列もこの方法で決定し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配列又はポリペプチド配列のそれぞれ正確なヌクレオチド対ヌクレオチドの一一致又はアミノ酸対アミノ酸の一一致を意味する。2つまたはそれ以上の配列（ポリヌクレオチド又はアミノ酸）は、これらの同一性パーセントを決定することにより比較することができる。2つの配列の同一性パーセント（核酸配列でもアミノ酸配列でも）は、2つの整列した配列間の正確な一致の数をより短い配列の長さで割って、100を掛けた数である。核酸配列の適切な整列は、Smith and Waterman, Advances40

in Applied Mathematics 2:482-489 (1981) の局所的相同意性アルゴリズムにより与えられる。このアルゴリズムは、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff編, 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)により標準化されたスコア化マトリックスを使用することにより、アミノ酸配列に適用することができる。ある配列の同一性パーセントを決定するためのこのアルゴリズムの実施例は、Genetics Computer Group (Madison, WI)により「ベストフィット (BestFit)」ユーザィリティアプリケーションにより与えられる。この方法のデフォルトパラメータは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual）、バージョン 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, WIから利用できる) に記載されている。本開示における同一性パーセントを確立するための好適な方法は、University of Edinburghが著作権を有し、John F. Collins and Shane S. Sturrokにより開発され、IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA)により配布されている M P S R C H パッケージを使用することである。このパッケージ群から Smith-Watermanアルゴリズムを使用することができ、ここでスコア化表のためにデフォルトパラメータが使用される（例えば、ギャップオープニングペナルティ (gap opening penalty) が 12、ギャップエクステンションペナルティ (gap extension penalty) が 1、及びギャップ (gap) が 6）。得られたデータから「Match」値は配列同一性を反映する。配列間の同一性パーセント又は類似性を計算するための他の適切なプログラムは当該分野で公知であり、例えば別の整列プログラムは B L A S T であり、デフォルトパラメータを用いて使用される。例えば B L A S T N と B L A S T P は以下のデフォルトパラメータを使用して使用することができる：遺伝コード = 標準；フィルター = 無し；鎖 = 兩方；カットオフ = 60；予測 = 10；マトリックス = BLOSUM62；記述 = 50 配列；分類法 = H I G H S C O R E；データベース = 重複無し、GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR。これらのプログラムの詳細は以下のインターネットアドレスに存在する：<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>。本明細書に記載の配列について、配列同一性の所望の程度の範囲は約 80% ~ 100% 及びこれらの間の任意の整数である。典型的には配列間の同一性パーセントは、少なくとも 70 ~ 75%、好ましくは 80 ~ 82%、さらに好ましくは 85 ~ 90%、さらに好ましくは 92% であり、さらに好ましくは 95% であり、最も好ましくは 98% の配列同一性である。

【0059】

あるいはポリヌクレオチド間の配列類似性の程度は、相同領域間の安定な 2 本鎖の形成を可能にする条件下でポリヌクレオチドをハイブリダイズさせ、次に 1 本鎖特異的ヌクレアーゼで消化し、消化した断片のサイズ測定により決定することができる。2 つの核酸又は 2 つのポリペプチド配列は、上記方法を使用して測定した時、分子の規定の長さにわたって、配列が少なくとも約 70% ~ 75%、好ましくは 80 ~ 82%、さらに好ましくは 85 ~ 90%、さらに好ましくは 92%、さらに好ましくは 95%、最も好ましくは 98% の配列同一性を有する時、互いに実質的に相同的である。本明細書において特定の DNA 又はポリペプチド配列と完全な同一性を示す配列も実質的に相同的である。実質的に相同的な DNA 配列は、例えば特定の系について規定される厳密性条件下でサザンハイブリダイゼーション実験により同定することができる。適切なハイブリダイゼーション条件の規定は当該分野の技術範囲内である。例えば Sambrook et al., 前述; Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, 編者 B.D. Hames and SJ. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press 参照のこと。

【0060】

2 つの核酸断片の選択的ハイブリダイゼーションは以下のように測定することができる。2 つの核酸分子間の配列同一性の程度は、かかる分子間のハイブリダイゼーションの効率と強度に影響を与える。部分的に同一な核酸配列は、完全に同一な配列の標的分子へのハイブリダイゼーションを少なくとも部分的に阻害する。完全に同一な配列のハイブリダ

イゼーションの阻害は、当該分野で公知のハイブリダイゼーションアッセイを使用して評価することができる〔例えば、サザン(DNA)プロット、ノーザン(RNA)プロット、サザンハイブリダイゼーションなど、Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.を参照〕。かかるアッセイは、種々の程度の選択性を使用して、例えば低～高厳密性までの条件を使用して行うことができる。低厳密性条件が使用される場合、非特異結合の欠如は、非特異結合が欠如する場合は2次プローブが標的に結合しないように、部分的な配列同一性程度さえ欠如した2次プローブ(例えば標的分子と約30%未満の配列同一性を有するプローブ)を使用して評価することができる。

【0061】

10

ハイブリダイゼーションベースの検出系を使用する時、参照核酸配列に相補的な核酸プローブが選択され、次に適切な条件の選択により、プローブと参照配列は互いに選択的にハイブリダイズするか又は結合して2本鎖分子を形成する。中程度の厳密ハイブリダイゼーション条件下で参照配列に選択的にハイブリダイズすることができる核酸分子は典型的には、選択された核酸分子プローブの配列と少なくとも約70%の配列同一性を有する少なくとも約10～14ヌクレオチドの長さの標的核酸配列の検出を可能にする条件下でハイブリダイズする。厳密性ハイブリダイゼーション条件は典型的には、選択された核酸分子プローブの配列と約90～95%以上の配列同一性を有する少なくとも約10～14ヌクレオチドの長さの標的核酸配列の検出を可能にする。プローブ/参照配列ハイブリダイゼーション(ここでプローブと参照配列は特定の配列同一性の程度を有する)に有用なハイブリダイゼーション条件は、当該分野で公知のように測定することができる(例えば、*Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, editors B.D. Hames and S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Pressを参照)。

【0062】

20

ハイブリダイゼーションの条件は当業者に公知である。ハイブリダイゼーションの厳密性は、ミスマッチヌクレオチドを含むハイブリッドの形成に不利なハイブリダイゼーション条件の程度を意味し、高厳密性はミスマッチハイブリッドの低許容性に相關する。ハイブリダイゼーションの厳密性に影響を与える因子は当業者に公知であり、特に限定されないが、温度、pH、イオン強度、及び有機溶媒(例えばホルムアミド及びジメチルスルホキシド)の濃度がある。当業者に公知のように、ハイブリダイゼーション厳密性は、高温、低イオン強度、及び低溶媒濃度により上昇する。

【0063】

30

ハイブリダイゼーションの厳密性条件について、例えば以下の因子を変化させることにより特定の厳密性を確立するのに無数の同等の条件を使用できることは公知である:配列の長さと性質、種々の配列の塩基組成、塩及び他のハイブリダイゼーション溶液成分の濃度、ハイブリダイゼーション溶液中のプロッキング剤の有無(例えば、デキストラン硫酸、及びポリエチレングリコール)、ハイブリダイゼーション反応温度、時間パラメータ、ならびに変化する洗浄条件。ハイブリダイゼーション条件の特定の設定の選択は、当該分野の標準的方法に従って選択される(例えば、Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N. Y.を参照)。

【0064】

40

「組換え」は、2つのポリヌクレオチド間の遺伝情報の交換過程を意味する。本開示の目的において「相同的組換え(HR)」は、細胞内の2本鎖ブレークの修復中に起るかかる交換の特殊な型を意味する。この過程は、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、「標的」分子(すなわち、2本鎖ブレークを経験した分子)の鑄型修復のために「ドナー」分子を使用し、「非クロスオーバー遺伝子変換」又は「短い遺伝子変換」などと種々に呼ばれ、これは遺伝子情報がドナーから標的に移動するためである。特定の理論に拘束されるつもりはないが、かかる移動は、破壊された標的とドナー間に形成される2本鎖DNAのミスマッチ補正、及び/又は「合成依存性鎖アニーリング」(ここでドナーは、標的の一部となる遺伝情報を再合成するのに使用される)、及び/又は関連プロセスを含むこ

50

とがある。かかる特殊な H R はしばしば、標的分子の配列の改変を引き起こし、従ってドナーポリヌクレオチドの一部又はすべての配列が標的ポリヌクレオチド中に取り込まれる。

【 0 0 6 5 】

「切斷」は、D N A 分子の共有結合骨格の破壊を意味する。切斷は、特に限定されないが、ホスホジエステル結合の酵素的又は化学的加水分解を含む種々の方法により開始することができる。1本鎖切斷と2本鎖切斷の両方が可能であり、2本鎖切斷は2つの1本鎖切斷の結果として起きる。D N A 切斷は、平滑末端又はずれ末端の產生を引き起こす。ある実施態様において、標的化D N A 切斷のために融合ポリペプチドが使用される。

【 0 0 6 6 】

「切斷半ドメイン」は、第2のポリペプチド（同一であるか又は異なる）と共同して、切斷活性（好ましくは2本鎖切斷活性）を有する複合体を形成するポリペプチド配列である。用語「第1及び第2の切斷半ドメイン」、「+及び-切斷半ドメイン」、及び「右及び左切斷半ドメイン」は同義に使用されて、ダイマー化する切斷半ドメインの対を意味する。

【 0 0 6 7 】

「遺伝子操作された切斷半ドメイン」は、他の切斷半ドメイン（例えば他の遺伝子操作された切斷半ドメイン）と真性（obligate）ヘテロダイマーを形成するように修飾されている。例えば米国特許公報第20050064474号と20060188987号、及び米国仮特許出願第60/808,486号（2006年5月25日出願）（これらの開示内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【 0 0 6 8 】

「クロマチン」は、細胞性ゲノムを含む核タンパク質構造体である。細胞クロマチンは、核酸（主にD N A）とタンパク質（ヒストン及び非ヒストン染色体タンパク質を含む）とを含む。真核生物細胞のクロマチンの大部分はヌクレオソームの形で存在し、ここではヌクレオソームコアは、ヒストンH 2 A、H 2 B、H 3、及びH 4 のそれぞれ2つを含む8量体に結合した150塩基対のD N Aを含み、ヌクレオソームコア間にリンカーD N A（生物により種々の長さ）が延びている。ヒストンH 1 の分子は一般にリンカーD N Aと結合している。本発明の目的において用語「クロマチン」は、すべてのタイプの細胞性核タンパク質（原核生物も真核生物も）を包含する。細胞クロマチンは染色体性クロマチンとエピソーム性クロマチンの両方を含む。

【 0 0 6 9 】

「染色体」は、細胞のゲノムのすべて又は一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムはしばしばその核型を特徴とし、これは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つ又はそれ以上の染色体を含むことができる。

【 0 0 7 0 】

「エピソーム」は複製性核酸、核タンパク質複合体、又は細胞の染色体性核型の一部ではない核酸を含む他の構造体である。エピソームの例にはプラスミド及びいくつかのウイルスゲノムがある。

【 0 0 7 1 】

「アクセス可能領域」は、核酸中に存在する標的部位が、標的部位を認識する外因性分子により結合することができる細胞クロマチン中の部位である。特定の理論に拘束されるつもりはないが、アクセス可能領域はヌクレオソーム構造中にパッケージされない領域であると考えられる。アクセス可能領域のこの明確な構造は、しばしば化学的及び酵素的プローブ（例えばヌクレアーゼ）に対する感受性により検出することができる。

【 0 0 7 2 】

「標的部位」又は「標的配列」は、結合が存在するための充分な条件がある場合に結合分子が結合する核酸の一部を規定する核酸配列である。例えば配列5' - G A A T T C - 3' はE c o R I 制限エンドヌクレアーゼの標的部位である。

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

「外因性」分子は通常は細胞中に存在しないが、1つ又はそれ以上の遺伝的、生化学的、又は他の方法により細胞中に導入することができる分子である。「細胞中の正常な存在」は、細胞の特定の成長段階及び環境条件により決定される。例えば、筋肉の胚成長中のみ存在する分子は、成体筋肉細胞にとって外因性分子である。同様に熱ショックにより誘導される分子は、非熱ショック細胞にとって外因性分子である。外因性分子は、例えば機能不全の内因性分子の機能性型又は通常は機能性である内因性分子の機能不全型を含むことがある。

【0074】

外因性分子は、特に小分子、例えばコンビナトリアル化学法により生成されるもの、又は巨大分子、例えばタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上記分子の任意の修飾誘導体、又は1つ又はそれ以上の上記分子を含む任意の複合体でもよい。核酸にはDNA、RNAがあり、1本鎖でも2本鎖でもよく、線状でも、分岐状、又は環状でもよく、任意の長さでよい。核酸には、2本鎖を形成できるもの、ならびに3本鎖を形成できる核酸がある。例えば米国特許第5,176,996号及び5,422,251号を参照のこと。タンパク質には、特に限定されないが、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、ジャイロース、及びヘリカーゼがある。

【0075】

外因性分子は、内因性分子と同じタイプの分子、例えば外因性タンパク質もしくは核酸でもよい。例えば外因性核酸には、細胞内に導入される感染性ウイルスゲノム、プラスミド、又はエピソーム、又は通常細胞内に存在しない染色体がある。外因性分子の細胞内への導入法は当業者に公知であり、特に限定されないが、脂質介在輸送（すなわち、リボソーム、例えば中性及び陽イオン性脂質を含む）、電気穿孔法、直接注入法、細胞融合、粒子衝撃法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAE-デキストラン介在輸送、及びウイルスベクター介在輸送がある。

【0076】

これに対して「内因性」分子は、特定の細胞中に特定の成長段階で特定の環境条件下で存在する分子である。例えば内因性核酸は、染色体、ミトコンドリアのゲノム、葉緑体もしくは他の細胞小器官、又は天然に存在するエピソーム性核酸がある。追加の内因性分子には、タンパク質、例えば転写因子や酵素がある。

【0077】

「融合」分子は、2つ又はそれ以上のサブユニット分子が好ましくは共有結合で結合している分子である。サブユニット分子は同じ化学タイプの分子でも、又は異なる化学タイプの分子でもよい。第1のタイプの融合分子の例には、特に限定されないが、融合タンパク質（例えば、ZFP-DNA結合ドメインと切断ドメインとの融合体）、及び融合核酸（例えば、上記融合タンパク質をコードする核酸）がある。第2のタイプの融合分子の例には、特に限定されないが、3本らせん形成核酸とポリペプチドとの融合体、及び小くぼみ結合体と核酸との融合体がある。

【0078】

細胞中の融合タンパク質の発現は、細胞への融合タンパク質の送達又は細胞への融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの送達により生じる（ここでポリヌクレオチドは転写され、転写体は翻訳される）。トランススプライシング、ポリペプチド切断、及びポリヌクレオチド連結はまた、細胞中のタンパク質の発現に関与している。細胞へのポリヌクレオチド及びポリペプチド送達の方法は、本開示の別のところで提示される。

【0079】

本発明の目的において「遺伝子」は、遺伝子産物（後述）をコードするDNA領域、ならびに遺伝子産物の產生を制御するすべてのDNA領域（制御配列がコード配列及び／又は転写配列に隣接しているかどうかにかかわらず）を含む。従って遺伝子は、特に限定さ

10

20

30

40

50

れないが、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳制御配列、例えばリボゾーム結合部位及び内部リボゾーム侵入部位、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界要素、複製開始点、マトリックス結合部位、及び遺伝子座制御領域を含む。

【0080】

「遺伝子発現」は、遺伝子内に含まれる情報の遺伝子産物への変換を意味する。遺伝子産物は、遺伝子の直接の転写産物（例えばmRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA、又は任意の他のタイプのRNA）、又はmRNAの翻訳により產生されるタンパク質でもよい。遺伝子産物はまた、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、及びエディッティングのような方法により修飾されるRNA、及び例えばメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP-リボシル化、ミリストチル化、及びグリコシリ化により修飾されるタンパク質を含む。10

【0081】

遺伝子発現の「調節」は、遺伝子の活性の変化を意味する。発現の調節には、特に限定されないが、遺伝子活性化と遺伝子抑制がある。

【0082】

「真核生物」細胞には、特に限定されないが、真菌細胞（例えば酵母）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、及びヒト細胞（例えばT細胞）がある。

【0083】

「目的の領域」は、細胞クロマチンの任意の領域、例えば遺伝子又は遺伝子内もしくは隣接する非コード配列（これは外因性分子に結合することが好ましい）でもよい。結合は、標的化DNA切断及び/又は標的化組換えのためでもよい。目的の領域は、染色体中、エピソーム中、細胞小器官ゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）中、又は感染性ウイルスゲノム中に存在してもよい。目的の領域は、遺伝子のコード領域内、転写非コード制御内、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でも、又は非転写領域内、例えばコード領域の上流もしくは下流でもよい。目的の領域は、1つのヌクレオチド対の小ささでも又は最大2,000ヌクレオチド対の長さ、又は任意の整数値のヌクレオチド対でもよい。20

【0084】

用語「作用可能な結合」と「作用可能なように結合した」は、2つまたはそれ以上の成分（例えば配列要素）について同義で使用され、ここで成分は、2つの成分が正常に機能しあつ少なくとも1つの成分が少なくとも1つの他の成分に発揮される機能を仲介することを可能にするように、構成される。例えば転写制御配列（例えばプロモーター）が1つ又はそれ以上の転写制御因子の有無に応答してコード配列の転写レベルを制御する場合は、転写制御配列はコード配列に作用可能なように結合している。転写制御配列は一般にコード配列とシスで作用可能なように結合しているが、必ずしも直接隣接している必要はない。例えばエンハンサーは、連続的ではなくてもコード配列に作用可能なように結合した転写制御配列である。30

【0085】

融合ポリペプチドについて用語「作用可能なように結合した」は、各成分があたかもそのような結合をしていないように、他の成分と連結して同じ機能を果たすことを意味する場合がある。例えばZFP-DNA結合ドメインが切断ドメインに融合している融合ポリペプチドについて、もし融合ポリペプチド中でZFP-DNA結合ドメインがその標的部位及び/又はその結合部位に結合でき、切断ドメインが標的部位の近傍のDNAを切断することができるなら、ZFP-DNA結合ドメインと切断ドメインは作用可能なように結合している。40

【0086】

タンパク質、ポリペプチド、又は核酸の「機能性断片」は、その配列が完全長タンパク質、ポリペプチド、又は核酸と同じではないが、完全長タンパク質、ポリペプチド、又は核酸と同じ機能を保持しているタンパク質、ポリペプチド、又は核酸である。機能性断片は、対応する未変性の分子より多くの、少ない、又は同じ数の残基を有するか、及び/又50

は1つ又はそれ以上のアミノ酸もしくはヌクレオチド置換を含んでよい。核酸の機能（例えばコーディング機能、他の核酸にハイブリダイズする能力）を測定するための方法は当該分野で公知である。同様にタンパク質の機能を測定するための方法は公知である。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、電気泳動移動度シフト、又は免疫沈降アッセイにより測定することができる。DNA切断はゲル電気泳動により測定することができる。Ausubel et al.（前述）を参照のこと。タンパク質が他のタンパク質と相互作用する能力は、例えば同時免疫沈降、2ハイブリッドアッセイ、又は相補性（遺伝的及び生化学的）により測定することができる。例えばFields et al. (1989) Nature 340:245-246；米国特許第5,585,245号、及びPCTWO98/44350号を参考のこと。

10

【0087】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ

遺伝子不活性化、例えばCCR5遺伝子の不活性化に使用できるジンクフィンガーヌクレアーゼ(zinc finger nuclease)が本明細書に記載される。ZFNはジンクフィンガータンパク質(ZFP)とヌクレアーゼ(切断)ドメインとを含む。

【0088】

A. ジンクフィンガータンパク質

ジンクフィンガー結合ドメインは選択された配列に結合するように遺伝子操作することができる。例えば、Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416を参照のこと。遺伝子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結合特異性を有することができる。遺伝子操作法には、特に限定されないが、合理的設計と種々のタイプの選択がある。合理的設計は、例えばトリプレット（又はクアドルプレット）ヌクレオチド配列と個々のジンクフィンガーミノ酸配列とを使用し、ここで各トリプレット又はクアドルプレットは、特定のトリプレット又はクアドルプレット配列に結合するジンクフィンガーの1つ又はそれ以上のアミノ酸配列と結合している。例えば本出願人の米国特許第6,453,242号及び6,534,261号を参照（これらは参考することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。

20

【0089】

ファージ表示と2ハイブリッドシステムとを含む選択法の例は、米国特許第5,789,538号；5,925,523号；6,007,988号；6,013,453号；6,410,248号；6,140,466号；6,200,759号；及び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号に開示されている。

30

【0090】

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、例えば本出願人のWO02/077227号に記載されている。

40

【0091】

標的部位の選択；ZFP、及び融合タンパク質（及びこれをコードするポリヌクレオチド）の設計と構築法は当該分野で公知であり、米国特許公報第20030232410号；20050208489号；2005064474号；20050026157号；20060188987号；国際公報WO07/014275号；米国特許出願第10/587,723号（2006年7月27日出願）；11/493,423号（2006年7月26日出願）（これらの開示内容は参考することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に関連して詳細に説明されている。

【0092】

ある実施態様において本明細書に記載のAd-ZFNベクターのジンクフィンガーヌクレアーゼはCCR5遺伝子内に結合する。表1は、ヒトCCR5遺伝子中のヌクレオチド

50

配列に結合するように遺伝子操作された多くのジンクフィンガー結合ドメインを示す。各行は、別のジンクフィンガーDNA結合ドメインを示す。各ドメインのDNA標的配列は、第1列(DNA標的部位は大文字で示す；非接触ヌクレオチドは小文字で示す)に示され、第2～第5の列は、タンパク質中のジンクフィンガー(F1～F4)の認識領域(らせんのそれぞれの開始点についてアミノ酸-1～+6)を示す。また各タンパク質について識別番号が第1のカラムに示される。

【0093】

【表1】

表1：ヒトCCR-5遺伝子に標的化されたジンクフィンガーヌクレアーゼ

r162デザイン

標的配列	F 1	F 2	F 3	F 4
GATGAGGATGAC (配列番号1) 7296	DRSNLSR (配列番号2)	TSANLSR (配列番号3)	RSDNLAR (配列番号4)	TSANLSR (配列番号3)
GATGAGGATGAC (配列番号1) 8181	DRSNLSR (配列番号2)	ISSNLNS (配列番号5)	RSDNLAR (配列番号4)	TSANLSR (配列番号3)
GATGAGGATGAC (配列番号1) 8182	DRSNLSR (配列番号2)	VSSNLTS (配列番号6)	RSDNLAR (配列番号4)	TSANLSR (配列番号3)
GATGAGGATGAC (配列番号1) 8262	DRSNLSR (配列番号2)	ISSNLNS (配列番号5)	RSDNLAR (配列番号4)	NRDNLSR (配列番号7)
GATGAGGATGAC (配列番号1) 8266	DRSNLSR (配列番号2)	ISSNLNS (配列番号5)	RSDNLAR (配列番号4)	TSGNLTR (配列番号8)
GATGAGGATGAC (配列番号1) 8267	DRSNLSR (配列番号2)	VSSNLTS (配列番号6)	RSDNLAR (配列番号4)	TSGNLTR (配列番号8)
GATGAGGATGAC (配列番号1) 7741	DRSNLSR (配列番号2)	TSGNLTR (配列番号8)	RSDNLAR (配列番号4)	TSGNLTR (配列番号8)

168デザイン

標的配列	F 1	F 2	F 3	F 4
AAACTGCAAAAG (配列番号9) 7745	RSDNLSV (配列番号10)	QANRIT (配列番号11)	RSDVLSE (配列番号12)	QRNHRTT (配列番号13)
AAACTGCAAAAG (配列番号9) 8165	RSDNLSN (配列番号14)	QANRIT (配列番号11)	RSDVLSE (配列番号12)	QRNHRTT (配列番号13)
AAACTGCAAAAG (配列番号9) 8191	RSDNLSV (配列番号10)	QRVNLT (配列番号15)	RSDVLSE (配列番号12)	QRNHRTT (配列番号13)
AAACTGCAAAAG (配列番号9) 8196	RSDNLGV (配列番号16)	QKINLQV (配列番号17)	RSDVLSE (配列番号12)	QRNHRTT (配列番号13)
AAACTGCAAAAG (配列番号9) 8196z	RSDNLSV (配列番号10)	QKINLQV (配列番号17)	RSDVLSE (配列番号12)	QRNHRTT (配列番号13)
AAACTGCAAAAG (配列番号9) 8196zg	RSDNLGV (配列番号16)	QKINLQV (配列番号17)	RSDVLSE (配列番号12)	QRNHRTT (配列番号13)
AAACTGCAAAAG (配列番号9) 7568	RSDHLSE (配列番号18)	QANRIT (配列番号11)	RSDVLSE (配列番号12)	QRNHRTT (配列番号13)

r627デザイン

標的配列	F 1	F 2	F 3	F 4
GACAAGCAGCGG (配列番号19) 7524	RSAHLSE (配列番号20)	RSANLSE (配列番号21)	RSANLSV (配列番号22)	DRANLSR (配列番号23)

633デザイン

標的配列	F 1	F 2	F 3	F 4
CATCTGcTACTCG (配列番号24) 8040	RSDSLSK (配列番号25)	DNSNRIK (配列番号26)	RSAVLSE (配列番号27)	TNSNRIT (配列番号28)

【0094】

後述するようにある実施態様において、表1に示す4フィンガー結合ドメインが切断半ドメイン、例えばIIS型制限エンドヌクレアーゼの切断ドメイン（例えばF o K I）に融合される。一对のかかるジンクフィンガー／ヌクレアーゼ半ドメイン融合体は、例えば米国特許公報第20050064474号（出願第10/912,932号）に開示されているように、標的化切断のために使用される。例えばZFN-215は、8267（これ

10

20

30

40

50

は配列番号 1 に示す標的配列を認識し、配列番号 2、6、4、及び 8 で示される 4 つの認識らせんを含む) と 8 1 9 6 z (これは配列番号 9 に示す標的配列を認識し、配列番号 1 0、1 7、1 2、及び 1 3 で示される 4 つの認識らせんを含む) と呼ぶジンクフィンガー結合ドメインを含有する一対の融合タンパク質を示す。Z F N - 2 0 1 は、8 2 6 6 (これは配列番号 1 に示す標的配列を認識し、配列番号 2、2、4、及び 8 で示される 4 つの認識らせんを含む) と 8 1 9 6 z (これは配列番号 9 に示す標的配列を認識し、配列番号 1 0、1 7、1 2、及び 1 3 で示される 4 つの認識らせんを含む) と呼ぶジンクフィンガーリー結合ドメインを含有する一対の融合タンパク質を示す。

【0095】

標的化切断のために、結合部位の近くの端は 5 又はそれ以上の対により分離することができる、融合タンパク質のそれぞれは D N A 標的の向かい合う鎖に結合することができる。従って表 1 中の「r 1 6 2 設計」として特定されるタンパク質の 1 つ(これは、逆鎖に結合し、結合部位の下流の端がヌクレオチド 1 6 2 にあることを示す)は、「1 6 8 設計」(これは、r 1 6 2 設計により結合されるものと反対の鎖に結合し、結合部位の上流の端がヌクレオチド 1 6 8 にあることを示す)として特定されるタンパク質と対合することができる。例えばタンパク質 8 2 6 7 はタンパク質 8 1 9 6 、又はタンパク質 8 1 9 6 z 又は他の 1 6 8 設計の任意のものと対合するし、タンパク質 8 2 6 6 はタンパク質 8 1 9 6 又は 8 1 9 6 z 又は他の 1 6 8 設計の任意のものと対合することができる。r 1 6 2 と 1 6 8 設計のすべての対の組合せは、C C R - 5 遺伝子の標的化切断と突然変異誘発のために使用することができる。同様に 7 5 2 4 タンパク質(又は任意の他の r 6 2 7 設計)は 20 8 0 4 0 タンパク質(又は任意の他の 6 3 3 設計)と共同して使用して、C C R - 5 遺伝子の標的化切断と突然変異誘発を得ることができる。

【0096】

本明細書に記載の C C R 5 - Z F N は、C C R 5 ゲノム中の任意の配列に標的化することができる。例えば C C R 5 ゲノム配列(C C R 5 - 3 2 のような対立遺伝子変種を含む)は当該分野で公知であり、C C R 5 - 3 2 にホモ接合性である個体(例えば、Liu et al. (1996) Cell 367-377 を参照)は、H I V - 1 感染に対して抵抗性である。

【0097】

B . 切断ドメイン

Z F N はまた、ヌクレアーゼ(切断ドメイン、切断半ドメイン)を含む。本明細書に開示された融合タンパク質の切断ドメイン部分は、任意のエンドヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼから得ることができる。そこから切断ドメインが得られるエンドヌクレアーゼの例には、特に限定されないが、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がある。例えば、2002-2003 カタログ, New England Biolabs, Beverly, MA; 及び Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388 を参照のこと。D N A を切断する追加の酵素は公知である(例えば、S 1 ヌクレアーゼ; 大豆ヌクレアーゼ; 膵臓 D N a s e I ; ミトコンドリアヌクレアーゼ; 酵母 H O エンドヌクレアーゼ; また Linn et al. (編) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993 を参照のこと。これらの酵素(又はその機能性断片)の 1 つ又はそれ以上は、切断ドメイン及び切断半ドメインの供給源として使用することができる。

【0098】

同様に切断半ドメインは、上記したように任意のヌクレアーゼ又はその一部から得られ、これは切断活性のためにダイマー化を必要とする。一般に融合タンパク質が切断半ドメインを含むなら切断のために 2 つの融合タンパク質が必要である。あるいは 2 つの切断半ドメインを含む 1 つのタンパク質を使用することができる。2 つの切断半ドメインは同じエンドヌクレアーゼ(又はその機能性断片)から得られるか、又は各切断半ドメインは異なるエンドヌクレアーゼ(又はその機能性断片)から得ることができる。さらに好ましくは、これらの各標的部位に対する 2 つの融合タンパク質の結合が、切断半ドメインが例えばダイマー化により機能性切断ドメインを形成することを可能にする互いに空間的配置に切断半ドメインを置くように、2 つの融合タンパク質の標的部位は配置される。すなわち

10

20

30

40

50

ある実施態様において、標的部位の近くの端は5～8ヌクレオチド又は15～18ヌクレオチドだけ離れている。しかし2つの標的部位の間に任意の整数のヌクレオチド又はヌクレオチド対が介在してもよい(例えば、2～50ヌクレオチド対又はそれ以上)。一般に切斷の部位は標的部位の間にある。

【0099】

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への配列特異的結合(認識部位での)及び結合の部位又はその近くでDNAを切斷することができる。いくつかの制限酵素(例えばIIS型)は、認識部位から離れた部位でDNAを切斷し、結合ドメインと切斷ドメインが離れている。例えばIIS型酵素であるFok Iは、1つの鎖ではその認識部位から9ヌクレオチドの位置で、別の鎖ではその認識部位から13ヌクレオチドの位置でDNAの2本鎖切斷を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号; 5,436,150号、及び5,487,994号; ならびにLi et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2764- 2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31, 978-31, 982を参照のこと。すなわちある実施態様において融合タンパク質は、少なくとも1つのIIS型制限酵素からの切斷ドメイン(又は切斷半ドメイン)と、1つ又はそれ以上のジンクフィンガー結合ドメインとを含み、これは遺伝子操作されてもされなくてもよい。

【0100】

その切斷ドメインが結合ドメインから分離しているIIS型制限酵素の例はFok Iである。この特定の酵素はダイマーとして活性である。Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570-10575。従って本開示の目的において、開示された融合タンパク質で使用されるFok I酵素の部分は切斷半ドメインと考えられる。すなわちジンクフィンガー-Fok I融合体を使用する細胞性配列の標的化2本鎖切斷及び/又は標的化置換について、それがFok I切斷半ドメインを含む2つの融合タンパク質を、触媒活性のある切斷ドメインを再構成するために使用することができる。改変ジンクフィンガー結合ドメインを含む1つのポリペプチド分子と2つのFok I切斷半ドメインを使用することもできる。ジンクフィンガー-Fok I融合体を使用する標的化切斷と標的化配列改変のためのパラメータは、本開示の別のところに提供される。

【0101】

切斷ドメイン又は切斷半ドメインは、機能的切斷ドメインを形成するために、切斷活性を保持するか、又はマルチマー化(例えばダイマー化)する能力を保持するタンパク質の任意の部分でよい。

【0102】

IIS型制限酵素の例は、国際公報WO 07 / 014275号(これは参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている。追加の制限酵素もまた、分離可能な結合ドメインと切斷ドメインとを含み、これらは本開示により企図される。例えばRoberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420を参照のこと。

【0103】

米国特許公報第20050064474号及び20060188987号(それぞれ特許出願第10/912,932及び11/304,981号)、及び米国仮特許出願第60/808,486号(2006年5月25日出願)(その開示内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載のように、ある実施態様において切斷ドメインは、ホモダイマー化を最小にするか又は妨害する1つ又はそれ以上の遺伝子操作された切斷半ドメイン(ダイマー化ドメイン変異体とも呼ぶ)を含む。Fok Iの446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537、及び538位のアミノ酸残基はすべて、Fok I切斷半ドメインのダイマー化に影響を与えるための標的である。

【0104】

真性(obligate)ヘテロダイマーを形成Fok Iの遺伝子操作された切斷半ドメインの

例には、第1の切断半ドメインがF o k Iの490位と538位のアミノ酸残基の変異を含み、第2の切断半ドメインがアミノ酸残基486位と499位で変異を含む対がある。図2、3、及び4を参照のこと。

【0105】

すなわちある実施態様において図3と4に示すように、490位の変異はG l u (E)をL y s (K)で置換する；538位の変異はI s o (I)をL y s (K)で置換する；486位の変異はG l n (Q)をG l u (E)で置換する；499位の変異はI s o (I)をL y s (K)で置換する。特に本明細書に記載の遺伝子操作された切断半ドメインは、1つの切断半ドメイン中の490位(E-K)と538位(I-K)を変異させ、別の切断半ドメイン中の486位(Q-K)と499位(I-L)を変異させることにより、「Q 486 E : I 499 L」と呼ぶ遺伝子操作された切断半ドメインを产生することにより調製した。本明細書に記載の遺伝子操作された切断半ドメインは、異常切断が最小化されたか又は排除された真性(obligate)ヘテロダイマー変異体である。例えば米国仮特許出願第60/808,486号(2006年5月25日出願)(その開示内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる)の実施例1を参照のこと。10

【0106】

本明細書に記載の切断半ドメインの例は、任意の適切な方法を使用して、例えば米国特許公報第20050064474号(第10/912,932号、実施例5)及び米国仮特許出願第60/721,054号(実施例38)に記載のように、野生型切断半ドメイン(F o k I)の部位特異的突然変異誘発により調製することができる。20

【0107】

C . C C R 5における標的化切断のための追加の方法

C C R 5 遺伝子中に標的部位を有する任意のヌクレアーゼを本明細書に記載の方法で使用することができる。例えばホーミングエンドヌクレアーゼとメガヌクレアーゼは非常に長い認識配列を有し、その一部は統計的にヒトサイズのゲノム中で1回存在しているようである。C C R 5 遺伝子中にユニークな標的部位を有するかかるヌクレアーゼは、C C R 5 遺伝子中の標的化切断のためにジンクフィンガーヌクレアーゼの代わりに、又は追加的に使用することができる。

【0108】

ホーミングエンドヌクレアーゼの例には、I - S c e I、I - C e u I、P I - P s p I、P I - S c e I V、I - C s m I、I - P a n I、I - S c e I I I、I - P p o I、I - S c e I I I I、I - C r e I、I - T e v I、I - T e v I I I 及びI - T e v I I I I がある。これらの認識配列は公知である。また米国特許第5,420,032号；米国特許第6,833,252号；Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388；Dujon et al. (1989) Gene 82:115-118；Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127；Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228；Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180；Argast et al. (1998) J. Mol Biol. 280:345-353 及び New England Biolabs カタログも参照のこと。30

【0109】

ほとんどのホーミングエンドヌクレアーゼの切断特異性はその認識部位について絶対的ではないが、その部位は、その認識部位の1つのコピーを含有する細胞中でホーミングエンドヌクレアーゼを発現することにより、哺乳動物サイズのゲノムについて1回の切断が得るのに充分な長さである。ホーミングエンドヌクレアーゼとメガヌクレアーゼの特異性は、天然に存在しない標的部位に結合するように遺伝子操作することができることも報告されている。例えば、Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905；Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962；Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659；Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66を参照のこと。40

【0110】

送達

本明細書に記載のZ F Nは、任意の適切な方法により標的細胞に送達することができる50

。ジンクフィンガーを含むタンパク質を送達する方法は、例えば米国特許第6,453,242号；6,503,717号；6,534,261号；6,599,692号；6,607,882号；6,689,558号；6,824,978号；6,933,113号；6,979,539号；7,013,219号；及び7,163,824号に記載されている（これらの開示内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0111】

本明細書に記載のZFNはまた、1つ又はそれ以上のZFNをコードする配列を含有するベクターを使用して送達してもよい。特に限定されないが、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、及びアデノ関連ウイルスベクターなどを含む任意のベクター系が使用される。また米国特許第6,534,261号；6,607,882号；6,824,978号；6,933,113号；6,979,539号；7,013,219号；及び7,163,824号に記載されている（これらの開示内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0112】

ある実施態様においてベクターはアデノウイルスベクターである。すなわち異種配列（例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN））を細胞に導入するためのアデノウイルス（Ad）ベクターが本明細書に記載される。

【0113】

本出願で使用できるAdベクターの非限定例には、組換え（例えばE1欠失）、条件的複製可能（例えば腫瘍崩壊性）、及び／又は非ヒト血清型から得られる複製可能Adベクター（例えば、Ad5、Ad11、Ad35、又はブタアデノウイルス-3）、及び／又は遺伝子操作したファイバー（例えばノブ又はシャフト）タンパク質（例えばノブタンパク質のHILープ内のペプチド挿入のような）を有するキメラAdベクター（例えばAd5/35）又は向性改変Adベクターがある。また「gutless」Adベクター（例えば、免疫原性を低下させDNA負荷のサイズを増加させるためにすべてのアデノウイルス遺伝子が除去されているAdベクター）も有用である。これは例えば、ZFNをコードする配列とドナー配列の同時送達を可能にする。かかるgutlessベクターは、ドナー配列が標的化組み込みにより組み込まれる大きなトランス遺伝子を含む時、特に有用である。

【0114】

複製欠損組換えアデノウイルスベクター（Ad）は高力価で産生することができ、これらは多くの異なる細胞タイプに容易に感染する。ほとんどのアデノウイルスベクターは、トランス遺伝子がAdE1a、E1b、及び／又はE3遺伝子を置換し、次に1つ又はそれ以上の欠失遺伝子機能をトランスで提供する細胞中で複製欠陥ベクターが増殖される。例えばヒト293細胞はE1機能を供給する。Adベクターは、非分裂性の分化細胞（例えば肝臓、腎臓、及び筋肉中に存在するもの）を含む複数のタイプの組織にインビボで形質導入することができる。従来のAdベクターは大きな運搬能力を有する。臨床治験におけるAdベクターの使用例は、筋肉内注入による抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド療法である（Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998)）。

【0115】

臨床治験における遺伝子輸送のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる例は、Rosenecker et al., Infection 24:15-10 (1996); 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) がある。

【0116】

ある実施態様においてAdベクターは、2つまたはそれ以上の異なるアデノウイルスゲノムからの配列を含有するキメラアデノウイルスベクターである。例えばAdベクターはAd5/35ベクターでもよい。Ad5/35は、Ad5のファイバータンパク質遺伝子の1つ又はそれ以上（ノブ、シャフト、テイル、ペントン）を、B群アデノウイルスから

10

20

30

40

50

の対応するファイバーゼロタンパク質遺伝子（例えば A d 3 5 ）で置換することにより作成される。A d 5 / 3 5 ベクター及びこのベクターの特徴は、例えば Ni et al. (2005)、「ヒビに静脈内注射後の B 群ファイバーを含有するアデノウイルスベクターの生体分布と安全性の評価」、Hum Gene Ther 16:664-677; Nilsson et al. (2004)、「臍帯血 C D 3 4 + 細胞の機能的に明瞭な亜集団は血清型 5 又は 3 5 向性を有するアデノウイルスベクターにより形質導入される」、Mol Ther 9:377- 388; Nilsson et al. (2004)、「アデノウイルス血清型 3 5 向性を有するアデノウイルスベクター系の開発；初代悪性腫瘍造血細胞への効率的な一過性遺伝子輸送」、J Gene Med 6:631-641; Schroers et al. (2004)、「A d 5 / 3 5 キメラアデノウイルスベクターによるヒトリンパ球及びナチュラルキラー細胞への遺伝子輸送」、Exp Hematol 32:536-546; Seshidhar et al. (2003)、「遺伝子輸送ベクターとしてのアデノウイルス血清型 3 5 の開発」、Virology 311 :384-393; Shayakhmetov et al. (2000)、「再標的化アデノウイルスベクターによるヒト C D 3 4 (+) 細胞への効率的遺伝子輸送」、J Virol 74:2567-2583; 及び Sova et al. (2004)、「肝臓転移の治療のための T R A I L を発現する腫瘍標的化及び条件的複製性腫瘍崩壊性アデノウイルスベクター」、Mol Ther 9:496-509 に記載されている。
10

【 0 1 1 7 】

上記したように、Z F N とこれらの Z F N をコードするポリヌクレオチドは任意の標的細胞に送達することができる。一般に遺伝子 C C R - 5 を不活性化するために、細胞は免疫細胞、例えばリンパ球（B 細胞、T 細胞、例えば T ヘルパー（T_H）、及び T 細胞毒性細胞（T_C）、ヌル細胞、例えばナチュラルキラー（N K ）細胞）、单核細胞（单球、マクロファージ）、顆粒細胞（顆粒球、好中球、好酸球、好塩基球）、肥満細胞、及び / 又は樹状細胞（ランゲルハンス細胞、間質性樹状細胞、趾間樹状細胞、循環樹状細胞）である。マクロファージ、B リンパ球、及び樹状細胞は、T_H 細胞活性化に関する抗原提示細胞である。ある実施態様において標的細胞は、表面上の C D 4 の発現を特徴とする T_H 細胞である。標的細胞はまた造血幹細胞でもよく、これは任意の免疫細胞を与える。
20

【 0 1 1 8 】

用途

開示された方法と組成物は、細胞クロマチン中の目的の領域（例えばゲノム、例えば変異体又は野生型の遺伝子中の所望の位置又は所定の位置）で D N A を切断するために；ゲノム配列（例えば、細胞クロマチン中の目的の領域、また後述の実施例 5 も参照）を相同的な非同一配列で置換するために（すなわち標的化組換え）；ゲノム中の 1 つ又はそれ以上の部位で D N A を切断することによりゲノム配列を欠失させるために（この切断部位は次に非相同的末端結合（N H E J ）により結合される）；相同的組換えを促進する細胞因子をスクリーニングするために；野生型配列を変異配列で置換するために；及び / 又は 1 つの対立遺伝子を異なる対立遺伝子に変換するために、使用することができる。かかる方法はまた遺伝疾患を治療するために、細胞株の作成及び / 又は修飾（治療及び非治療用途）、宿主の感染症（ウイルス性又は細菌性）の治療（ウイルス又は細菌受容体の発現を阻止し、こうして宿主生物中の感染及び / 又は拡散を防ぐ）を可能にする。
30

【 0 1 1 9 】

すなわち本明細書に記載の組成物と方法は、遺伝子修飾、遺伝子修正、及び遺伝子破壊のために使用することができる。遺伝子修飾の非限定例には、相同的指向性修復（H D R ）ベースの標的化組み込み；H D R ベースの遺伝子修正；H D R ベースの遺伝子修飾；H D R ベースの遺伝子破壊；N H E J ベースの遺伝子破壊、及び / 又は H D R 、N H E J 、及び / 又は 1 本鎖アニーリング（S S A ）の組合せがある。1 本鎖アニーリング（S S A ）は、5' - 3' エキソヌクレアーゼにより D S B を切断して 2 つの相補的領域を露出させることにより、同じ配向で存在する 2 つの繰り返し配列間の 2 本鎖ブレークの修復を意味する。次に 2 つの直接繰り返し配列をコードする 1 本鎖は互いにアニーリングし、アニーリングした中間体は、1 本鎖テイル（D N A 配列にもアニーリングしない 1 本鎖 D N A の部分）を消化して除去し、ギャップを D N A ポリメラーゼにより埋め、D N A 末端を再結合させるように処理される。これは、直接繰り返し配列間に存在する配列を欠失させる
40

。

【 0 1 2 0 】

本明細書に記載の組成物（例えば A d - Z F N ベクター）と方法はまた、種々の遺伝疾患及び / 又は感染性疾患の治療に使用することができる。

【 0 1 2 1 】

この組成物と方法はまた、特に限定されないが、以下のものを含む幹細胞ベースの治療に適用することもできる：

(a) 単一遺伝子の遺伝子治療のためのショートパッチ遺伝子変換又は標的化組み込みによる体細胞変異の修正

(b) 優性陰性対立遺伝子の破壊

10

(c) 細胞内への病原体の侵入又は生産性感染に必要な遺伝子の破壊

(d) 例えば以下の：

(i) 機能的組織の分化又は形成を促進するために遺伝子活性を修飾し；及び / 又は

(ii) 機能的組織の分化又は形成を促進するために遺伝子活性を破壊することによる組織遺伝子操作の増強

(e) 例えば以下の：

(i) 分化を阻止する遺伝子を破壊して、幹細胞が特定の系統経路に分化することを促進し

(ii) 幹細胞分化を刺激することができる遺伝子又は s i R N A 発現力セットを標的化挿入し

20

(iii) 幹細胞分化を刺激することができ、多能性の良好な拡張と維持を可能にする遺伝子又は s i R N A 発現力セットを標的化挿入し

(iv) 簡単なマーカーが、幹細胞の分化状態をスコア化し、かつ培地、サイトカイン、増殖条件、遺伝子発現、 s i R N A 分子の発現、細胞表面マーカーへの抗体の暴露、又は薬剤の変化が如何にこの状態を変化させるかをスコア化することを可能にする、多能性又は分化状態のマーカーである内因性遺伝子のフレーム内のレポーター遺伝子の標的化挿入すること

による分化の阻止又は誘導：

(f) 体細胞核移植、例えば患者自身の体細胞を単離することができ、目的の標的遺伝子を適切な方法で修飾し、細胞クローンを作成し（及びゲノム安全性を確保するために品質管理をする）、そしてこれらの細胞から核を単離し未受精卵中に移して患者特異的 h E S 細胞し、これを直接注入するか又は分化した後患者に移植し、こうして組織拒絶を低減又は排除

30

(g) M H C 受容体をノックアウトすることによる万能幹細胞 - (このアプローチは、免疫学的個性が低下したか又は完全に除去された細胞を作成するのに使用されるであろう。この方法のための細胞タイプには、特に限定されないが、 T 細胞、 B 細胞、造血幹細胞、及び胚幹細胞がある。従ってこれらの幹細胞又はその誘導体（分化細胞タイプ又は組織）は、その起源又は組織適合性に関係なく、任意のヒトに移植できるであろう。)

【 0 1 2 2 】

40

この組成物と方法はまた、体細胞治療（例えば、自己由来細胞治療法及び / 又は M H C 受容体をノックアウトすることによる万能 T 細胞、上記セクション (g) を参照）に使用することができ、こうしてその生物学的性質を増強するように修飾された T 細胞ストックの產生を可能にする。かかる細胞は、 T 細胞のドナー供給源及び受容者への組織適合性に依存せずに、種々の患者に注入することができる。

【 0 1 2 3 】

さらに Z F N を送達するための本明細書に記載の A d ベクターの使用は、 N H E J の速度を増強する。理論に拘束されるつもりはないが、この作用は E 4 タンパク質（ E 4 O R F 6 (E 4 3 4 k) 、 E 4 O R F 3) が D S B 修復に対して有する阻害作用によるようである。

50

【0124】

本明細書に記載したすべての特許、特許出願、及び刊行物は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0125】

明瞭さと理解を目的とする例示と例により本開示をある程度詳細に説明したが、本開示の精神又は範囲を逸脱することなく種々の変更及び修飾が可能であることは当業者に明らかであろう。従って前記開示と以下の例は決して限定的なものではない。

【実施例】

【0126】

実施例1：ベクター構築

10

A . A d 5 / 3 5 - G F P と A d 5 / 3 5 - Z F N ベクターの構築

【0127】

キメラ A d 5 / 3 5 ベクター (Nilsson et al. (2004) Mol Ther 9:377-388; Nilsson et al (2004) J Gene Med 6:631-641) を、図 1 に模式的に示すように構築した。簡単に説明すると、G F P の発現力セットをコードする配列（上の線）、内因性 C C R 5 遺伝子座を標的とする一対の遺伝子操作 Z F N (Z F N 1 と Z F N 2) の発現力セット（中央の線）、又は C C R 5 遺伝子座中の 4 7 b p パッチ配列を標的とする相同的ドナー配列（下の線）を、A d E a s y 細菌組換え系 (Stratagene) を使用して E 1 遺伝子の代わりに挿入した。

【0128】

20

A d - 2 1 5 と A d - 2 0 1 ベクター構築体はそれぞれ、L e u 5 5 をコードする配列で内因性 C C R 5 遺伝子を切断する 2 つの Z F N をコードする配列を含む。両方の Z F N とも、2 A 融合体を介して単一のプロモーターの制御下で発現される。上記表 1 に示すように、A d - 2 1 5 構築体によりコードされる Z F N 2 1 5 対は、それぞれ r 1 6 2 と 1 6 8 設計からのジンクフィンガー結合ドメイン 8 2 6 7 と 8 1 9 6 z を含み、一方 A d - 2 0 1 ベクターによりコードされる Z F N 2 0 1 対は、それぞれ r 1 6 2 と 1 6 8 設計からのジンクフィンガー結合ドメイン 8 2 6 6 と 8 1 9 6 z を含む。A d - 2 1 5 と A d - 2 0 1 ベクターによりコードされる Z F N は、野生型 F o k I 切断半ドメインに融合される。図 2 を参照のこと。

【0129】

30

A d - 2 2 4 構築体によりコードされる Z F N 2 2 4 対は、それぞれ r 1 6 2 と 1 6 8 設計からのジンクフィンガー結合ドメイン 8 2 6 7 と 8 1 9 6 z を含む。すなわち A d - 2 2 4 構築体は A d - 2 1 5 と同じジンクフィンガータンパク質を有する。しかし A d - 2 2 4 構築体によりコードされる Z F N は、米国仮特許出願第 6 0 / 8 0 8 , 4 8 6 号 (2 0 0 6 年 5 月 2 5 日出願) (参考することによりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載のように変異体 F o k I 切断半ドメインを含有する。特に 8 2 6 7 ジンクフィンガードメインは、Q 4 8 6 E と I 4 9 9 L 変異を含有する F o k I 切断半ドメインに融合され(図 3)、8 1 9 6 z ジンクフィンガードメインは、E 4 9 0 K と I 5 3 8 K 変異を含有する F o k I 切断半ドメインに融合される(図 4)。

【0130】

40

B . 標的化挿入のためのドナーベクター

ドナーベクター (A d 5 / 3 5 P o r i 、図 1 の下の線) を作成するために、C C R 5 遺伝子座に対応するヒトゲノムの 1 8 8 1 b p 断片を P C R 増幅し、P C R 4 - T O P O ベクター (Invitrogen) 中にクローン化した。この断片の配列を図 5 に示す(配列番号 3 6)。

【0131】

「パッチ」配列を挿入すべきクローニング部位を作成するために、図 5 に示す配列の 2 つのヌクレオチドを変化させて X b a I 認識部位を作成した。特にヌクレオチド配列「a t c c t g a t a a」(配列番号 3 9) (ドナー断片中のヌクレオチド 4 7 0 ~ 4 7 9) を、QuickChange 部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene) により「a t c t a g a

50

t a a」(配列番号40)(変化させた2つの塩基に下線を引いた)に変化させた。

【0132】

生じたDNA配列を次にXbaIで消化し、図6に示す47bpの「パッチ」配列(配列番号37)をXbaI部位に挿入した。

【0133】

図7に示す生じた配列(配列番号38)を、GFPとZFN発現カセットについて説明したようにAd5/35ベクター中に挿入した。図7に示す配列について、5'相同性アームはヌクレオチド1~471に対応し、CCR-5への標的化挿入のための「パッチ」配列は、下線を引いてあり、ヌクレオチド472~518に対応する、そして3'相同性アームはヌクレオチド519~1928に対応する。

10

【0134】

実施例2：Ad5/35-GFPベクターによるhES細胞の形質導入

実施例1に記載したAd5/35-GFPベクターを以下のようにヒト胚幹細胞(hES)中に導入した。

【0135】

400,000個の細胞と25μl、5μl、又は0.5μlのAd5/35-GFPベクター(MOIはそれぞれ8200、1640、及び164)を使用して、500μl容量でhES細胞の感染を行った。4時間後、細胞を洗浄し、新鮮なマウス胚纖維芽細胞(MEF)フィーダー細胞上に蒔いた。感染の約20時間後に得られた生きている細胞の蛍光顕微鏡は、5μlと25μlのウイルスで感染させた幹細胞コロニー中で蛍光を示し、フィーダー細胞中には蛍光は無かった。感染の約22時間後にGFP蛍光のFACS解析を行った。結果を表2に示す。

20

【0136】

【表2】

表2

感染	蛍光T細胞の割合(%)
モック感染	0.74%
Ad5/35-GFP 0.5μl	39.4%
Ad5/35-GFP 5μl	91%
Ad5/35-GFP 25μl	95%

30

【0137】

これらの結果は、Ad5/35ベクターが高効率でヒト胚幹細胞に感染できることを示す。

【0138】

実施例3：Ad5/35-ZFNを使用するCCR-5遺伝子の修飾

CD4⁺T細胞とPBMCはAllCellsから得た。細胞を、RPMI+10%FBS+1%L-グルタミン(30mg/ml)+IL-2(1ng/ml、Sigma)で培養し、製造業者のプロトコール(Dynal)に従って抗CD3-CD28ビーズで活性化した。24ウェルプレート中に1ml容量で細胞を3×10⁵細胞/mlで接種した。

40

【0139】

実施例1に記載したアデノウイルスベクター(Ad5/35GFP、Ad5/35215、又はAd5/35224)を2日後に、MOIが10、30、又は100(MOIは感染力価に基づいて計算した)で加えた。

【0140】

ウイルスに暴露した2日後に細胞を採取し、Cell-1アッセイ(国際特許公報WO07/014275号に記載のように行った)を使用して遺伝子修飾効率を測定した。また

50

Olejowski et al. (1998) Nucleic Acids res. 26:4597-4602; Qui et al. (2004) BioTechniques 36:702-707; Yeung et al. (2005) BioTechniques 38:749-758を参照のこと。

【0141】

結果を表3に示す：

【表3】

表3

	CCR-5アレル改変割合 (%)	
	PBMCs	CD4+T細胞
対照	未検出	未検出
MOI 10におけるAd5/35-ZFN215	6.1	6.7
MOI 30におけるAd5/35-ZFN215	14.0	16.5
MOI 100におけるAd5/35-ZFN215	31.2	32.3
MOI 10におけるAd5/35-ZFN224	3.6	1.8
MOI 30におけるAd5/35-ZFN224	7.4	9.0
MOI 100におけるAd5/35-ZFN224	15.0	14.9
MOI 10におけるAd5/35-GFP	未検出	未検出
MOI 30におけるAd5/35-GFP	未検出	未検出

10

20

【0142】

これらの結果は、ZFN215スクレアーゼ対（野生型Fok I切断半ドメインを含む）とZFN224スクレアーゼ対（実施例1Aに記載の変異体Fok I切断半ドメインを含む）の両方をコードするAd5/35ベクターで細胞を感染後に、遺伝子修飾が観察されたことを示す。さらに結果は、遺伝子修飾レベルが用量依存的に上昇することを示す。

【0143】

ZFNに誘導された遺伝子修飾の持続を調べるために、感染細胞をさらに8日間培養して維持した（以前と同じ培地を使用した）。細胞を計測し、新鮮な培地で2日毎に希釈した。次に細胞を採取（ウイルス形質導入の10日後）し、Cell-1アッセイを繰り返した。さらに7日目に一部のCD4+T細胞集団を抗CD3/CD28ビーズ（Dynal）で再活性化した。結果を表4に示す。

30

【0144】

【表4】

表4

	感染細胞割合 (%)	
	再活性化CD4	未活性化CD4
対照	未検出	未検出
MOI 30におけるAd5/35-ZFN215	10.1	10.9
MOI 100におけるAd5/35-ZFN215	29.0	28.2
MOI 30におけるAd5/35-ZFN224	6.7	6.4
MOI 100におけるAd5/35-ZFN224	16.1	16.6
MOI 100におけるAd5/35-GFP	未検出	未検出

40

【0145】

これらの結果は、CD4+T細胞が拡張されて、遺伝子修飾の程度が維持されることを示す。さらに再活性化は、非修飾細胞と比較して修飾細胞の増殖に対して明らかな影響は

50

無かった。

【0146】

実施例4：C D 3 4 +細胞中のA d 5 / 3 5 - Z F Nを使用するC C R - 5遺伝子の修飾

C D 4 +T細胞とC D 3 4 +細胞はAllCellsから得た。0日目にC D 4 +T細胞をR P M I + 1 0 % F B S + 1 % L - グルタミン(3 0 m g / m l) + I L - 2 (1 n g / m l、Sigma)で培養し、製造業者のプロトコール(Dynal)に従って抗C D 3 - C D 2 8ビーズで活性化した。C D 3 4 +細胞を無血清培地(Stemspan H3000, Stem Cell Technologies)で培養し、サイトカイン(Stemspan CC100, Stem Cell Technologies)を補足した。24ウェルプレート中に1m l容量で細胞を 6×10^5 細胞/m lで接種した。翌日(1日目)アデノウイルスベクター(A d 5 / 3 5 G F又はA d 5 / 3 5 2 2 4)を、異なるM O I(M O Iは感染力価に基づいて計算した)で加えた。
10

【0147】

4日目に細胞を採取し、C e 1 - 1アッセイを使用して遺伝子修飾効率を測定した。

【0148】

C D 4 +T細胞について、A d 5 / 3 5 2 2 4は、M O Iが2 5、5 0、及び1 0 0で効率がそれぞれ1 8 . 0 %、3 4 . 5 %、及び4 8 . 4 %でC C R - 5遺伝子修飾を誘導した。

【0149】

同様にC D 3 4 +細胞について、A d 5 / 3 5 2 2 4は、M O Iが1 0及び5 0で効率がそれぞれ1 0 . 9 %及び1 1 . 1 %でC C R 5遺伝子修飾を誘導した。
20

【0150】

実施例5：A d 5 / 3 5 - Z F Nを使用するC C R - 5遺伝子への外因性配列の標的化挿入

【0151】

0日目に、C D 4 +T細胞をR P M I + 1 0 % F B S + 1 % L - グルタミン(3 0 m g / m l) + I L - 2 (1 n g / m l、Sigma)で培養し、製造業者のプロトコール(Dynal)に従って抗C D 3 - C D 2 8ビーズで活性化した。24ウェルプレート中に1m l容量で細胞を 3×10^5 細胞/m lで接種した。2日後(2日目)、異なる組合せのA d 5 / 3 5 2 2 4とA d 5 / 3 5 P o r iドナー(図1と7)で同時形質導入した。A d 5 / 3 5 2 2 4をM O Iが0、2 5、5 0、及び1 0 0で加え、A d 5 / 3 5 P o r iドナーをM O Iが0、1 0 0、及び3 0 0(M O Iは感染力価に基づいて計算した)で加えた。感染の2日後(4日目)細胞を採取し、標的化組み込み効率を以下のようにR F L Pアッセイにより測定した。
30

【0152】

形質導入細胞からゲノムD N Aを単離し、ドナー相同性領域の外のプライマーを用いてP C R增幅した。次に増幅した断片を制限酵素B g 1 I(この認識部位はP o r iドナー(パッチ)配列内に含有される)とインキュベートした。パッチ配列の標的化挿入の頻度を、切断生成物と非切断生成物の比を測定することにより計算した。細胞を、M O Iが5 0のA d 5 / 3 5 2 2 4とM O Iが3 0 0のA d 5 / 3 5 P o r iで同時形質導入した時、パッチ配列の標的化挿入の頻度は3 . 1 %であった。
40

【0153】

実施例6：A d 5 / 3 5 - Z F Pを使用して誘導された非相同的末端結合

標的化切断に続いて非相同的末端結合(N H E J)により作成したZ F N介在変異のタイプを調べるために、修飾細胞のゲノムC C R - 5配列を配列決定し解析した。簡単に説明すると、実施例3に記載したものと同じ方法でA d 5 / 3 5 Z F N 2 1 5で形質導入したP B M CとC D 4 +T細胞を採取し、これらの細胞からゲノムD N Aを抽出した。次にC C R 5遺伝子座をP C R増幅し、P C R 4 - T O P Oベクター(Invitrogen)中にT o p oクローン化し、細菌クローンを配列決定し、野生型C C R 5遺伝子座と比較した。

【0154】

標的化Z F N切断により誘導された変異は欠失と挿入とを含み、かかる変化の大きさは
50

広範囲にわたって変化した。単一のヌクレオチド対のように小さい欠失と挿入が観察され、ほとんど 100 ヌクレオチド対までの大きさの挿入も観察された。標的化 ZFN 介在切断により誘導されたいくつかの変異例の配列を図 8 ~ 10 に示す。

【0155】

図 8 は、解析中に同定されたいくつかの欠失の配列を示す。欠失している塩基対を点で示す。

【0156】

5 塩基対の挿入が ZFN 处理細胞中で高頻度で起きた。5 塩基対挿入は、ZFN 結合部位間の 5 塩基対配列の複製であり、配列 G T C A T C C T C A T C C T G A T A A A C T G C A A A A G (配列番号 41) を G T C A T C C T C A T C C T G A T C T G A T A A A C T G C A A A A G (配列番号 42) (挿入配列に下線を引いてある) に変換する。

10

【0157】

別のしばしば観察される変異は、2つの ZFN 結合部位の間の 4 塩基対合挿入であり、配列 G T C A T C C T C A T C C T G A T A A A C T G C A A A A G (配列番号 41) を G T C A T C C T C A T C C T T C T A G A T A A A C T G C A A A A G (配列番号 45) (挿入配列に下線を引いてある) に変換する。

【0158】

図 9 は、追加の変異のヌクレオチド配列を示す。ある場合に、1 ヌクレオチド欠失と 5 ヌクレオチド挿入の組合せが観察された。

【0159】

20

図 10 は、標的化 ZFN 切断から生じるいくつかのより長い挿入の配列を示す。

【0160】

C CR - 5 遺伝子座への配列修飾の要約を以下の表 5 に示す。

【表 5】

表5

変異のタイプ	各細胞型の数		合計
	PBMCs	CD4+T 細胞	
欠失	10	8	18
挿入	5bp	11	14
	4bp	8	2
	それ以外	3	3
	長い挿入	1	3
野生型	10	14	24
合計	43	44	87

30

【0161】

実施例 7 : Ad5 / 35 - ZFN 形質導入後の細胞生存活性

40

Ad5 / 35 - ZFN 構築体で形質導入後の細胞生存活性も評価した。簡単に説明すると、CD4+T 細胞と PBMC は AllCells から得た。0 日目に細胞を RPMI + 10% FBS + 1% L - グルタミン (30 mg / ml) + IL - 2 (1 ng / ml, Sigma) で培養し、製造業者のプロトコール (Dynal) に従って抗 CD3 - CD28 ビーズで活性化した。24 ウェルプレート中に 1 ml 容量で細胞を 3×10^5 細胞 / ml で接種した。2 日後 (2 日目)、アデノウイルスベクター (Ad5 / 35 GFP, Ad5 / 35215、又は Ad5 / 35224) を MOI が 10、30、及び 100 (MOI は感染力値に基づいて計算した) で加えた。GUAVA 分析フローサイトメーターで提供された VACOUNT プロトコールを使用して、製造業者の説明書 (Guava Technologies) に従って、4、6、8、10、及び 12 日目に細胞数と細胞生存活性を測定した。

50

【0162】

A d 5 / 3 5 Z F N は一般に充分に許容され、少なくとも 7 5 % の細胞（低い M O I で最大 9 0 %）がすべての時点で生存活性があった。すなわち最小の毒性が観察された。

【0163】実施例 8 : A d 5 / 3 5 - Z F N 形質導入後の細胞増殖

A d 5 / 3 5 - Z F N 構築体で形質導入後の細胞増殖（倍加）も評価した。

【0164】

0 日目に、C D 4⁺T 細胞と P B M C を R P M I + 1 0 % F B S + 1 % L - グルタミン（3 0 m g / m l）+ I L - 2（1 n g / m l、Sigma）で培養した。0 日目と 6 日目に製造業者のプロトコール（Dynal）に従って抗 C D 3 - C D 2 8 ビーズで細胞を活性化した。2 4 ウェルプレート中に 1 m l 容量でまず細胞を 3×10^5 細胞 / m l で接種した。2 日目に、アデノウイルスベクター（A d 5 / 3 5 G F P、A d 5 / 3 5 2 1 5、又は A d 5 / 3 5 2 2 4）を M O I が 1 0 、 3 0 、 及び 1 0 0（M O I は感染力価に基づいて計算した）で加えた。G U A V A 分析フローサイトメーターで提供された V I A C O U N T プロトコールを使用して、実施例 7 に記載のように細胞数と細胞生存活性を測定した。

【0165】

細胞増殖又は倍加はアデノウイルス（M O I が 1 0 0 の A d 5 / 3 5 2 1 5 を除く）により最小の影響を受けた。1 4 日間で C D 4⁺T 細胞と P B M C の両方で、全体に少なくとも 8 倍加（すなわち > 1 0 0 倍の拡張）が達成された。

【0166】実施例 9 : C D 4⁺T 細胞中のアデノウイルスゲノムの持続の測定

C D 4⁺T 細胞を R P M I + 1 0 % F B S + 1 % L - グルタミン（3 0 m g / m l）+ I L - 2（1 n g / m l、Sigma）で培養し、製造業者のプロトコール（Dynal）に従って抗 C D 3 - C D 2 8 ビーズで活性化した。2 4 ウェルプレート中に 1 m l 容量で細胞を 6×10^5 細胞 / m l で接種した。翌日アデノウイルスベクター（A d 5 / 3 5 2 1 5、又は A d 5 / 3 5 2 2 4）を M O I が 1 0 、 3 0 、 及び 1 0 0（M O I は感染力価に基づいて計算した）で加えた。細胞を 4 日目と 1 4 日目に採取した。D N A を Masterpureキット（Epicenter Biotechnologies）を用いて抽出した。アデノウイルスゲノムの持続を、Taq Man（登録商標）P C R（Applied Biosystem）により A d ゲノム D N A の存在により定量した。細胞当たりのアデノウイルスゲノムの E 4 領域を標的し検出するために、プライマー / プローブを設計した。TaqMan（登録商標）P C R プロトコールの検出限界は、約 10^{-4} アデノウイルスゲノム / 細胞である。

【0167】

全体に、形質導入の 2 ~ 1 2 日間に細胞当たりのアデノウイルスゲノムのレベルは 1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍低下した。細胞当たり 10^{-2} ゲノム未満が、形質導入の 1 2 日までに最も高い M O I（1 0 0）で検出された。

【0168】実施例 1 0 : C D 4⁺T 細胞中のタンパク質発現の持続の測定

0 日目に、C D 4⁺T 細胞を実施例 9 に記載のように培養し活性化した。活性化の翌日（1 日目）にアデノウイルスベクター（A d 5 / 3 5 G F P）を M O I が 5 0 、 1 0 0 、 2 5 0 、 及び 5 0 0（M O I は感染力価に基づいて計算した）で加えた。G U A V A 分析フローサイトメーターにより 2 ~ 3 日毎に、G F P 陽性細胞パーセントと平均蛍光強度（M F I）を測定した。

【0169】

最初（3 日目）に顕著な G F P 発現がすべての M O I で観察された。G F P 蛍光は 1 3 日目まで続き、3 日目に 8 0 ~ 1 0 0 % の細胞が G F P 陽性から 1 3 日目に 3 0 ~ 6 0 % の細胞が G F P 陽性になった。しかし同じ期間内に M F I は大きく低下し（ほとんど 1 0 0 倍）、これは、1 3 日目の細胞がフローサイトメーターにより G F P 陽性とスコア化されたが、顕著に少ない G F P タンパク質を含有することを示唆する。さらに、G F P は比較的長い半減期（> 2 4 時間）を有することが知られている。

10

20

30

40

50

【0170】

実施例11：Ad5/35-ZFNベクターで形質導入したCD4⁺T細胞中のZFN mRNAの測定

0日目に、CD4⁺T細胞を実施例9に記載したように培養し活性化した。翌日（1日目）アデノウイルスベクター（Ad5/35215又はAd5/35224）をMOIが30及び100（MOIは感染力価に基づいて計算した）で加えた。3日目と9日目（すなわち形質導入後2日目と8日目）に細胞を採取し、RNAをHigh Pure（登録商標）RNA単離キット（Roche）を用いて抽出した。ZFN mRNAをRT-TaqMan（登録商標）PCR（Applied Biosystems）により定量した。プライマー／プローブセットを設計し、最適化して、Fok I切断半ドメインをコードする配列にアニーリングさせた。

10

【0171】

形質導入の2日後に多量のZFN mRNAが検出された（MOIに依存して 1×10^5 ～ 1×10^6 コピー／細胞）。しかし形質導入後8日目までに、1つのみの試料（MOIが100のAd5/35215）を除いてZFN mRNAレベルはアッセイの検出限界以下であった。Ad5/35215 MOI 100試料で約100コピー／細胞が検出され、形質導入後2～8日目にmRNAレベルは1000倍低下した。

【0172】

実施例12：Ad5/35-ZFNベクターを使用する初代ヒトCD4⁺T細胞中のCCR5遺伝子の破壊

初代ヒトCD4⁺T細胞（Univ. of Pennsylvaniaから得た）をモック形質導入したか、又はAd5/35GFP、Ad5/35215、又はAd5/35224で形質導入した。

20

【0173】

1日目にT細胞をペレット化し、10%胎児牛血清と1%L-グルタミンを補足したXvivo15（BioWhittaker, Walkersville, MD）中 1×10^6 /mlの濃度に再懸濁した。1mlの細胞を抗CD3/CD28ビーズ（Levine et al. (1997) J. Immunol. 159:5921-5930に記載されたように調製した）に接触させた。翌日（2日目） 1×10^6 細胞を、MOIが30又は100のAd5/35GFP、Ad5/35215、又はAd5/35224ベクターで形質導入した。翌日10%胎児牛血清、1%L-グルタミン、0.9%N-アセチルシスティン、及び300IU/mlのヒト組換えIL-2を含有するXvivo15で培地の容量を2倍にした。各条件について細胞を2日毎にコールターカウンターで計測し、試料を分析のためにペレット化し、残りの培養物を接種し、 1×10^6 細胞/mlで加えた。6日目に磁石を使用してビーズを取り出し、細胞を上記のXvivo15/FCS/L-Glut/NAC/IL2培地で培養した。8日目に各試料の細胞の一部をCell-1による分析のためにペレット化し、各試料中の残りの細胞（ 1×10^6 細胞/mlの濃度）にCCR5指向性HIV-1株USS1をMOI 0.1で感染させた（実施例13参照）。

30

【0174】

2日毎に細胞を計数し、ペレット化し、少量をCell-1による分析のために集め、残りの細胞を接種し、同じXvivo15/FCS/L-Glut/NAC/IL2含有培地を加えた。

40

【0175】

13日目にCD4⁺T細胞培養物を、CD32とOKT3（抗CD3）と抗CD28を発現する放射線照射（3000rad）同種異系PBMCと放射線照射（10,000rad）K562細胞の混合物で再刺激した。

【0176】

形質導入後13日目にゲノムDNAを採取し、CCR5破壊効率をCell-1アッセイにより測定した。結果を表6に示す。

【0177】

【表6】

表6

MOI	対照	GFP		Ad/ZFN215		Ad/ZFN224	
		30	100	30	100	30	100
改变されたアレルの割合	0	0	0	54	44	44	30

10

【0178】

実施例13：HIV暴露

さらに実施例12に記載のようにAd5/35ベクターで形質導入した初代ヒトCD4⁺T細胞を非形質導入細胞で1:3希釈し、モック感染したか又は複製可能HIV株U51で感染させた(MOIは0.1)。次にこれらの細胞を継代して、HIV感染と複製を複数回行った。感染後それぞれ0、5、11、及び17日目に、モック感染及びHIV感染培養物の両方から少量の細胞を単離して、破壊したCCR5遺伝子を含有する細胞のパーセントを追跡した。ゲノムDNAを各細胞試料から単離し、変異CCR5対立遺伝子の存在をCle - 1アッセイを使用して測定した。

【0179】

20

結果を図11のパネルA(Ad5/35215形質導入細胞)とB(Ad5/35224形質導入細胞)に示し、AdZFNベクターでトランスフェクトした細胞では、そのCCR5遺伝子中に配列変化を含む細胞の数はHIV感染(ZFN-HIV)後に増加したが、HIVで感染しなかった細胞(ZFNモック)では増加しなかった。

【0180】

実施例14：GHOST-CCR5細胞中のCCR5のZFN破壊A. GHOST-CCR5細胞中のZFN誘導変異の測定

GHOST-CCR5細胞[HIV-2LTRの制御下で自己由来CCR5発現力セレクトと誘導性GFPマーカー遺伝子の複数の(約4)のコピーを含むHIV-1感染のレポーター細胞株(Morner et al. (1999) J. Virol. 73:2343-2349)]をNIH AIDS Research and Reference Reagent Programから得て、CCR5-ZFN対215(表1についての上記本文参照)と224(表1で8196zと8266として示したZFNを含有する)をコードするアデノウイルス(Ad5/35)ベクター(Schroers et al. (2004) Experimental Hematology 32:536-546)で形質導入した。これらのZFN対の両方の結合部位は同じであり、図12に示す。

30

【0181】

標的部位におけるZFN介在変異の誘導を、Surveyor(登録商標)スクレアーゼ(Transgenomic)(Cle - 1としても知られている、ZFN誘導性変異の部位でDNAを切断するミスマッチ感受性酵素)に基づくアッセイを使用して測定した。簡単に説明するとゲノムDNAを修飾細胞及び対照細胞から、MasturePure(登録商標)DNA精製キット(Epicentre Biotechnologies)を使用して抽出し、放射性PCRのために5μCiの-³²dATPと5μCiの-³²dCTPを補足した。

40

【0182】

修飾細胞及び対照細胞から抽出したゲノムDNAの100ngについて、放射性PCR(50μl反応)を行った(AccuPrime(登録商標)PCRキット(Invitrogen))。簡単に説明するとCCR5-ZFN標的部位を含むCCR5遺伝子座の292bp断片を、プライマー-C5_Cle1_160_F1:AAGATGGATTATCAAGTGTCAAGTCC(配列番号29)とC5_Cle1_160_R1:CAAAGTCCCCACTGGGCG(配列番号30)を使用して、30サイクル(95℃-30秒、60℃-30秒、及び68℃-30秒)増幅した。

50

【0183】

P C R 産物を G - 5 0 カラム (GE Healthcare) で遠心分離し、 $1 \mu l$ の精製産物を $1 \mu l$ の $10 \times$ アニーリング緩衝液 ($1 \times$ アニーリング緩衝液 - 10 mM トリス、 100 mM NaCl) 及び水と混合して、最終容量を $10 \mu l$ とした。D N A を変性させ、ヘテロ 2 本鎖の形成を可能にするプログラム (95° - 10 分、 -2° / s で 95° から 85° へ、及び -0.1° / s で 85° から 25° へ) を使用して P C R ブロック中で再アニーリングした。再アニーリング後、 $1 \mu l$ の Surveyor (登録商標) ヌクレアーゼ (Transgenomics)、 $1 \mu l$ の $10 \times$ AccuPrime (登録商標) P C R 緩衝液 II、及び水を、最終容量 $20 \mu l$ になるように加えた。反応物を 42° で 20 分インキュベートしてヘテロ 2 本鎖を消化し、切断生成物を非変性 10% T B E ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad) で分離した。ゲルを乾燥させ、Phosphoimager (登録商標) を使用して分析した。切断されていない親断片と 2 つの速く泳動する切断生成物の比を求めることにより、Z F N 誘導性標的遺伝子破壊のレベルを測定した。元々の試料中の Z F N 破壊 C C R 5 対立遺伝子の比率は、式 ($1 - (\text{親画分}) \times 100$) を使用して計算した。アッセイは単一ヌクレオチド変化に感受性であり、検出限界は約 1% Z F N 改変対立遺伝子である。10

【0184】

図 13 に示す結果は、本明細書に記載の C C R 5 - Z F N が G H O S T - C C R 5 細胞 (レーン 3 と 4) 中の C C R 5 を変異させるのに非常に効率的 ($50 \sim 80\%$) であることを証明した。形質導入しなかった対照細胞 (レーン 1) と I L - 2 R 特異的 Z F N をコードする A d 5 / 3 5 ベクターで形質導入した細胞 (Urnov et al. (2005) Nature 435 : 646-651 : レーン 2) は、検出可能な C C R 5 修飾を示さず、結果が C C R 5 - Z F N 特異的であることを示している。20

【0185】**B . H I V 暴露**

さらに形質導入細胞集団を培養で維持し、1週間後に H I V - 1_{BAL} (プロトタイプ C C R 5 向性 H I V - 1 分離株) を感染させた。暴露ウイルスは、NIH ADDS Research and Reference Reagent Program から得て、C D 8 枯渇 P B M C 中で増殖させて使用ストックを作成した。

【0186】

H I V - 1 感染の直前に、C C R 5 表面発現を分析し、I L 2 R - Z F N で処理した対照細胞と比較して C C R 5 - Z F N 形質導入細胞のプールでは > 10 倍低下していることが証明された (図 14 A)。30

【0187】

H I V - 1_{BAL} 暴露の結果は、感染後 48 時間の H I V L T R 指令 G F P 誘導の喪失により測定すると、C C R 5 - Z F N 処理試料で 1 週間後に H I V - 1 感染の顕著な低下を示した (図 14 B)。C C R 5 内の目的の標的部位での遺伝子修飾は、C C R 5 - Z F N 処理 G H O S T - C C R 5 細胞からのゲノム D N A の配列決定により確認された。

【0188】

さらに C C R 5 - Z F N 形質導入 G H O S T - C C R 5 細胞から単離した単一細胞由来クローニングを数週間かけて拡張した。C C R 5 トランス遺伝子を遺伝子型判定し、破壊した C C R 5 対立遺伝子のみを有するクローニングを試験し、H I V - 1_{BAL} により H I V 感染に対して耐性であることを証明した。これらの細胞への C C R - 5 トランス遺伝子の導入は H I V による感染性を回復し、これは、H I V - 1 感染に対する耐性が、Z F N 介在 C C R 5 破壊によるウイルス侵入の欠陥によってのみ仲介されることを証明している。40

【0189】

これらの結果は、C C R 5 - Z F N が C C R 5 遺伝子内のこれらの D N A 標的部位を効率的に切断することを示し、高率の Z F N 誘導性変異が C C R 5 細胞表面発現を妨害し、C C R 5 向性 H I V - 1 感染に対して完全に耐性になることを確認している。

【0190】

実施例 15 : C C R 5 - Z F N 改変は延命効果を付与する

CCR5のZFN介在破壊が永久的遺伝的变化から予測されるHIV-1に対する長期耐性を付与するかどうかを評価するために、以下の実験を行った。

【0191】

A. 長期培養後のCCR5破壊

PM1細胞（CCR5発現レベルが初代CD4⁺T細胞に似ているCD4⁺T細胞株）を、ZFN201対をコードするCCR5-ZFN発現プラスミドを用いて電気穿孔して、2.45%の対立遺伝子の内因性CCR5破壊レベルを得た。

【0192】

次にこのZFN処理細胞集団を7日目にHIV-1_{BAL}感染又はモック感染し、細胞を連続培養で70日間拡張し、ZFN改変対立遺伝子の比率を、感染前と感染後3、10、21、31、42、及び52日目のDNA分析により測定した。 10

【0193】

図15に示すように感染の52日目までに、HIV-1感染PM1培養物はZFN改変CCR5対立遺伝子が約30倍濃縮された（約73%）。これに対してモック感染集団はZFN破壊CCR5対立遺伝子の安定した存続（約2.3%）を示し、選択圧力の非存在下でZFN改変対立遺伝子を有する細胞の増殖速度に悪影響が無いことを示した。対照（非CCR5標的）ZFN発現プラスミドで電気穿孔したPM1細胞はHIV-1感染に対して感受性であり、CCR5破壊を示さなかった。

【0194】

これらの結果は、HIV-1感染がCCR5-ZFN改変細胞に対して強力な選択的利点を与えること、及び選択的利点は培養物中で長期間維持されることを証明している。 20

【0195】

B. ZFN介在変異

PM1細胞中のCCR5遺伝子のZFN介在変異の分子的本体をまた、感染後52日目にCCR5の標的化領域のPCR增幅と配列決定により測定した。

【0196】

配列読み取りの78%（81配列中の63）中の多くの分子的に明瞭な短い欠失と挿入が観察され（図16）、HIVの存在下での修飾CCR5対立遺伝子の存続は1つのまれなイベントに起因するものではないことを示した。 30

【0197】

CCR5遺伝子配列の永久的修飾を示唆するZFN認識部位又はその近傍にマッピングされるすべての変異は、ZFN切断とNHEJを介するその後の修復に起因する。広範囲の異なる欠失と挿入変異が観察されたが、特異的5bp挿入（56位のイソロイシンコドンのすぐ下流の2つの停止コドンの導入を引き起こすZFP結合部位間の配列の複製）はすべての修飾配列の>30%であった（図16）。

【0198】

C. 重感染

CCR5-ZFN改変PM1細胞がCXCR4向性HIV-1に対する感受性を維持し、CCR5向性ウイルスで再感染した時選択的利点を維持していることを確認するために、重感染実験も行った。 40

【0199】

簡単に説明するとPM1細胞をモックトランスフェクトしたか、又はCCR5-ZFN201対をコードするプラスミドもしくは上記の対照ZFN対（GR）でトランスフェクトした。これらの細胞集団をHIV-1_{BAL}で暴露し、感染の59日後に各試料の一部を親の非トランスフェクトPM1細胞と混合し、CXCR4向性HIV-1_{BK132}又はCCR5向性HIV-1_{BAL}で再感染させた。これらの再感染培養物を経時的に追跡し、再感染後21日目（最初の感染後80日目）に遺伝子破壊頻度を測定した。HIV-1_{BAL}で感染した細胞は、PM1細胞で希釈後にZFN改変細胞が再濃縮され（64%）、一方モック感染又はCXCR4向性HIV-1_{BK132}で感染した細胞集団では、CCR5破壊細胞について選択的利点はほとんど又は全く観察されなかった。 50

【0200】

GHOST - CXCR4 細胞はまた、早期（3日目）及び後期（56日目）時点で取り出した HIV-1 暴露CCR5 - ZFN トランスフェクト PM1 細胞からの上清（5 μl）に暴露した。これらの培養物は CXCR4 依存性感染を示さなかった。GHOST - CCR5 細胞に適用した同じ上清は程度は小さかったが感染性を維持し（ただし CCR5 - ZFN トランスフェクト試料を除いて）、CCR5 ヌル PM1 細胞の > 30 倍濃縮によりウイルス感染性が培養の 56 日目までに大幅に低下することを示唆した。すなわち、CXCR4 共同受容体の使用へのウイルスの進化は、CCR5 - ZFN 処理し HIV-1 感染培養物からの早期及び後期時点で採取した上清では検出されなかった。

【0201】

さらに、ウイルス向性に対する ZFN 生成 CCR5 ヌル細胞濃縮の経時的影響を調べるために、CCR5 - ZFN 又は GFP 対照を発現するプラスミドでトランスフェクトした HIV-1 暴露 PM - 1 細胞の上清から V3 ループ配列を得た。HIV-1_{BAL} 感染 CCR5 ZFN 处理 PM - 1 細胞の長期培養物から、150 個のプロウイルス HIV DNA 配列を単離した。これらのうち 88 個は 3 日目に単離し、62 個は感染後 52 日目に単離した。対照として 78 個の HIV DNA 配列を HIV 感染 GFP 处理 PM - 1 細胞から単離した（3 日目に 45 個、52 日目に 33 個）。Hung et al. (199) J. Virol. 73:8216-8226 により開示された R5、R5X4、又は X4 コンセンサス V3 ループ配列を一致させることにより、向性の変化について配列を評価した。3 日目と 52 日目に GFP と CCR5 - ZFN 处理した試料からのすべての V3 ループ配列は、CCR5 コンセンサス配列に最もよく一致し、共同受容体使用への切り替えへの進行は迅速ではないことを示唆しており、CCR5 - GHOST レポーター細胞株のみでの感染性を示す上記データと一致した。

10

【0202】

これらの結果は、天然に存在する CCR5 32 変異を有する個体で観察されるのと同様に、CCR5 - ZFN の一過性発現が、CCR5 向性 HIV-1 に対する安定で選択的な耐性を樹立することを証明している。

【0203】実施例 16：CCR5 - ZFN 改変初代 CD4 T 細胞のインビトロ選択A. ZFN による CCR5 の破壊

30

初代ヒト細胞中の CCR5 - ZFN の効力を調べるために、野生型 CCR5 遺伝子を有する健常ドナーからの CD4⁺ T 細胞を、CCR5 - ZFN 215 又は CCR5 - ZFN 224 をコードする Ad5 / 35 ベクターで形質導入して、一過性の高効率 ZFN 送達を得た。異なるドナーから単離された細胞を使用する多重実験で、ZFN 介在 CCR5 破壊の感染多密度（MOI）依存性レベル（CCR5 対立遺伝子の 40 ~ 60 % に達する）が観察された。例を図 17 に示す。

【0204】

図 18 に示すように、修飾初代 CD4 T 細胞の集団倍加速度は非形質導入細胞の速度と区別できず、CCR5 修飾対立遺伝子の比率は少なくとも 1 ヶ月間インビトロ培養の間安定であった。

40

【0205】B. HIV 暴露

インビトロの HIV 感染に対するバルク ZFN 改変 CD4 T 細胞の抵抗性も評価した。

【0206】

天然に存在する CCR5 32 変異を有する人は、HIV 感染と進行から防御されることが証明されている。例えば Samson et al. (1996) Nature 382:722-725 (1996); Huang (1996) Nat Med. 2:1240-1243 (1996); Berger et al. (1999) Annu. Rev. Immunol. 17: 657-700 を参照のこと。対照実験で CCR5 32 がホモ接合性のドナーからの CD4⁺ T 細胞を、CCR5 野生型ドナーからの CD4⁺ T 細胞と指定された比率で混合し、HIV

50

- 1_{BAL}に暴露した。暴露後、平行のモック感染試料と比較して C C R 5 3 2 C D 4 T 細胞の約 2 倍の濃縮が観察された。

【 0 2 0 7 】

バルク C C R 5 - Z F N 形質導入 C D 4⁺ T 細胞集団の C C R 5 向性 H I V - 1_{US1} による感染も、17日間の培養にわたって、Z F N 破壊 C C R 5 対立遺伝子を含有する遺伝子編集細胞の 2 倍濃縮（上記の Surveyor（登録商標）ヌクレアーゼ（C e l - 1）アッセイを使用して測定した）が得られ、モック感染対照集団は Z F N 破壊 C C R 5 対立遺伝子の安定なレベルを維持した（図 19）。平行実験で H I V - 1_{US1} で暴露させた C C R 5 - Z F N 形質導入細胞は、対照より有意に低いレベルの可溶性 p 2 4 を產生し、これは集団中の C C R 5 破壊頻度と一致した。Ad 5 / 3 5 G F P 対照ベクターで形質導入した C D 4 T 細胞は、その C C R 5 遺伝子の検出可能な破壊を示さなかった。
10

【 0 2 0 8 】

すなわち Z F N 形質導入により C C R 5 ヌルにされた C D 4⁺ T 細胞が、H I V - 1 感染中に天然に存在する C C R 5 3 2 対立遺伝子がホモ接合性の C D 4 T 細胞と同様の効率で選択された。

【 0 2 0 9 】

実施例 1 7：初代 C D 4 T 細胞中の C C R 5 - Z F N の特異性

A . 2 本鎖ブレーク

Z F N 発現後に生成された 2 本鎖ブレーク（D S B）の数を定量するために、我々は核内の Z F N 作用の偏りの無い尺度として P 5 3 B P 1 の免疫検出によりゲノム全体 D S B の核内染色を行った。P 5 3 B P 1 は修復応答の早期に D S B の部位に動員され、N H E J に必要である（Schultz et al. (2000) J Cell Biol. 151:1381-1390）。簡単に説明すると、C C R 5 標的化 Z F N を発現する Ad 5 / 3 5 ベクターで C D 4⁺ T 細胞を形質導入後の 2 4 時間目に、C D 4 T 細胞の核当たりの 5 3 B P 1 免疫反応性巣の数を測定した。
20

【 0 2 1 0 】

メタノール又はパラホルムアルデヒドで固定後 0 . 5 % トリトンで核浸透性化を使用して、P 5 3 B P 1 の核内染色を行った。アフィニティ精製したウサギ抗 P 5 3 B P 1 (Bethel Laboratories) と 2 次 Alexa Fluor (登録商標) 4 8 8 F (a b') 2 ヤギ抗ウサギ Ig G (H + L) 抗体を Invitrogen から得た。抗体は 2 ~ 5 μg / ml の最終濃度で使用した。開口数 1 . 4 の Zeiss 63x Plan Apo 対物レンズを有する Zeiss Axioplan-II (Thorn wood NY) を使用して、落射蛍光顕微鏡観察を行った。
30

【 0 2 1 1 】

Improvision Velocity (登録商標) ソフトウェアパッケージ (Lexington MA) 取得及び分類モジュールを使用して、画像を取得し分析した。露出時間と閾値を調整して自己蛍光を最小にし、強度ゲーティングを上の 4 0 % の蛍光を含むようにして、P 5 3 B P 1 蛍光の不連続な領域の分析を行った。次に同定した個々の領域を数え測定した。D A P I 蛍光で同時局在化された緑色の蛍光領域のみを最終解析に含めた。

【 0 2 1 2 】

結果を図 2 0 に示す。非形質導入及び Z F N 2 2 4 形質導入 C D 4 T 細胞を比較すると、核内 P 5 3 B P 1 巣の平均数に有意差はなかった。これに対してエトポシド処理陽性対照細胞（p = 0 . 0 0 4）又は Z F N 2 1 5 を発現する Ad 5 / 3 5 ベクターで形質導入した細胞（p = 0 . 0 0 3）は、非形質導入細胞と比較すると P 5 3 B P 1 核内巣の統計的に有意な上昇を示した。さらにすべての条件で P 5 3 B P 1 巣の周囲の長さの平均有意差は観察されなかった。D N A 解析は、C C R 5 遺伝子中の目的の標的部位での Z F N 2 1 5 と Z F N 2 2 4 による切断の同等の程度を確認した。
40

【 0 2 1 3 】

B . コンセンサス Z F N 結合部位の測定

Z F N 2 2 4 作用の特異性を確認するために、コンセンサス Z F N 結合部位を測定し、C C R 5 中のユニークな目的の標的配列と一致することがわかった。Z F N 2 2 4 を含む

2つのジンクフィンガータンパク質のそれぞれの結合部位選択性を以下の部位選択性を使用して測定した：(1)まず、目的のZFPのHAタグ体をTnTクリック結合転写・翻訳システム(Promega)により発現させ、ビオチン化抗HAFab断片(Roche)及びポリdIdC競合DNA(Sigma)との存在下で、部分的ランダム化DNA配列のプールとインキュベートした；(2)タンパク質(任意の生産的に結合したDNA配列とともに)をストレプトアビジン被覆磁性ビーズ(Dynal)上に捕捉した；(3)適切なプライマーを含有するRochePCRマスターMix中に磁性ビーズを入れ、次に結合DNAを放出させ、PCR増幅した。次にこのDNAの増幅プールを以後のラウンドのZFP結合、濃縮、及び増幅のための出発DNAプールとして使用した。工程(1)～(3)を含むサイクルを全部で4回の選択ラウンドで繰り返した。最後のラウンド後に増幅されたDNA断片をクローニ化し、配列決定した。各DNA配列のランダム化領域を整列させて、ジンクフィンガーダNA結合ドメインについてコンセンサス結合部位配列を測定した。この方法により測定したコンセンサス結合部位は、表1で特定された結合部位と一致した。10

【0214】

上記したように測定したZFN224対(8196zと8266、表1)の2つのCCR5ZFNの標的配列選択性を使用して、ヒトゲノム中の上の15のオフ標的部位候補のゲノム全体のバイオインフォマティック予測を行った。このバイオインフォマティック分析は、以下のようにオフ標的部位候補を検索しランク付けした：

【0215】

ZFN224対(8196zと8266、表1)の2つのメンバーのすべてのDNA結合部位候補を、上記のように測定した各標的部位のコンセンサス配列から最大2つの塩基対ミスマッチを考慮して、ヒトゲノム中で同定した。20

【0216】

任意の2つのZFNがヌクレアーゼ活性の適切な配置(すなわち、間に5又は6bpのスペースを置いてDNAの向かい合う側で結合するZFN)で結合することを可能にする結合部位(前段落に記載したように同定される)の完全なリストを使用して、すべての可能な切断位置を同定した。

【0217】

次に切断部位候補の得られたリストをランク付けして、上記の部位選択性により規定される各ZFNのコンセンサスと最も高い類似性を有する部位を優先した。簡単に説明すると部位選択性データを使用して、各ZFNの結合部位の12の位置のそれぞれにおける4つのすべてのヌクレオチド(A、C、G、又はT)の認識の確率を作成した。各推定ZFN結合部位を、これらの12の確率の積としてスコア化した(ゼロのスコア又は確率を排除するために、確率表中でどの入力もゼロでは無いことを確実にするために標準化の前にすべての位置に各ヌクレオチド(A、C、G、又はT)について1を加えた)。同様にあるオフターゲット切断部位のスコア(そのようなZFN部位の2つが占有される必要がある)は、推定切断部位を含む2つのZFN結合部位のそれぞれに与えられた2つのスコアの積として計算した。同定された15の部位のうち7つは記載の遺伝子内に入り、これらの2つはエキソン配列内に入る。これらの7つの遺伝子は以下の特徴を共有する：(i)これらの変異又は破壊は、公知の病理とは関連が無い；及び(ii)CCR2を除いて、CD4-T細胞に記載されている機能が無い。3040

【0218】

Surveyor(登録商標)ヌクレアーゼアッセイは、CCR2(ヒトゲノム中でCCR5遺伝子に最も近い)を除いて、これらのいずれの部位でも検出可能なZFN活性を示さなかつた(1%検出限界)。我々は、35.6%のZFN改変CCR5対立遺伝子を示す条件下で、集団中のCCR2対立遺伝子の4.1%修飾を観察した。しかしCCR2マウスは主に遅延マクロファージ移動と動員(Peters et al. (2000) J. Immunol. 16:7072-7077)に関連する無数のゆるい表現型を示すため、CD4-T細胞中のCCR2の喪失は充分に許容される。CCR2の変異対立遺伝子は、HIV感染個体中のAIDSの遅延進展に相關しているが、HIV-1感染の頻度に対する影響は観察されていない(Smith et

al. (1997) Nat. Med. 3:1052-1053）。すなわちCCR2の平行変異が有害である可能性は低く、HIV感染に対する修飾CD4 T細胞の防御を増強するかも知れない。

【0219】

ゲノム中の最も類似しているオフターゲット部位のZFPコンセンサス結合部位特異的分析と、ゲノム全体のDSB生成のための偏りの無い核内染色との組合せは、ZFN224がCCR5遺伝子でのみ測定可能な活性（CCR5同族体であるCCR2では約10倍低い）を有する高度に特異的な遺伝子操作されたヌクレアーゼであることを示す。

【0220】

実施例18：CCR5-ZFN改変初代CD4 T細胞のインビボ選択

HIV感染のNOG/SCIDマウスモデルを使用して、インビボでZFN改変CD4 T細胞の養子免疫細胞移入とHIV感染からの防御を試験した。Schultz et al. (2007) Nat. Rev. Immunol. 7:118を参照のこと。

10

【0221】

初代CD4⁺T細胞をAd5/35ベクターで形質導入し、IL-2の存在下で抗CD3/抗CD28被覆磁性ビーズを使用して培養で拡張した。NOG/SCIDマウス（7～9週齢）をランダムに2処理群（1群当たりn=8マウス）に割り当てて、各群でオスとメスを等しく混合した。これらのマウスを菌叢確定動物施設で維持した。両方の群に、750万個のCCR5-ZFNエクスピボ拡張初代ヒトCD4 T細胞と100万個の休止自己由来PBMCを含有する100μlのPBSを腹腔内注射して、組合せの移植を促進した。さらにモック処理動物に100万個の非感染PHA活性化自己由来PBMCを投与し、一方感染群の動物に、100万個のCCR5向性HIV-1_{US1}感染PHA活性化PBMCを投与した。

20

【0222】

移植を評価するために、養子免疫細胞移入の3週間後と4週間後に末梢血サンプリングを行い、CD45、CD4、及びCD8のフローサイトメトリーにより移植について分析した。4.5週間後マウスを屠殺し、脾臓CD4 Tリンパ球をMiltenyi MACS分離キットを使用して精製した。75%を超える純度を有する試料のみを最終分析に使用した。CCR5破壊頻度を測定するために、ネステッドPCRアプローチを使用して修飾Surveyor（登録商標）ヌクレアーゼアッセイを行って、混入マウスゲノムDNAを完全に除去した。精製した脾臓CD4細胞からのDNAを、まず50ピコモルの外部プライマー（R5-d_{ext-out}-F1: CTGCCCTCATAAAGGTTGCCCTAAG（配列番号31）；C5_HDR_R: CCAGCAATAGATGATCCAACTCAAATTCC（配列番号32））を使用して25サイクル（95℃-30秒、58℃-30秒、及び68℃-3分）增幅し、生じた物質をゲル精製し、精製産物について製造業者の薦めに従つてSurveyor（登録商標）ヌクレアーゼアッセイを行った。

30

【0223】

インビボでHIV感染の1ヶ月後、マウスを屠殺し、脾臓から精製したヒトCD4 Tリンパ球からのゲノムDNAを、上記Surveyor（登録商標）ヌクレアーゼアッセイを使用してZFN介在CCR5破壊を分析した。2匹のマウス（1匹はHIV感染、1匹はモック感染）からの試料は、CD4細胞精製が不充分であったため、分析から除外した。

40

【0224】

すべての群が同等の移植を示したが、HIV感染群はCD4対CD8比が低下しており、HIV感染CD4 T細胞枯渇に一致していた。

【0225】

さらに図21は、HIV感染が無い場合のZFN処理CD4 T細胞の同じ出発集団を投与した動物（モック群、8.5%の平均CCR5破壊、p=0.008）と比較して、HIV感染群は、ZFP破壊CCR5対立遺伝子の約3倍の増強（27.5%の平均CCR5破壊）が観察されたことを示す。

【0226】

これらのデータは、(i)インビボでHIV-1の存在下でのZFN形質導入初代ヒト

50

C D 4⁺ T 細胞の選択的利点と、(ii) この選択圧力の非存在下でさえ、これらの同じ Z F N 形質導入細胞の正常な移植と増殖とを証明する。これらのデータは、遺伝子操作 Z F N の一過性送達により、C C R 5 3 2 ヌル遺伝子型（及びその結果生じる表現型）の再生に成功したことを見た。

【図 1】

すなわち本明細書に記載のZ F NはC C R 5 遺伝子内で特異的に切断し、初代ヒトC D 4⁺ T 細胞のバルク集団においてC C R 5 対立遺伝子の50%を超える永久的破壊を引き起こす。さらにZ F NによるC C R 5の遺伝子破壊は、インビトロとインビボでH I V - 1 感染に対して強固で安定かつ遺伝可能な防御を提供する。Z F N 改変C D 4⁺ T 細胞は、刺激により移植され正常に増殖する。

10

【図 1】

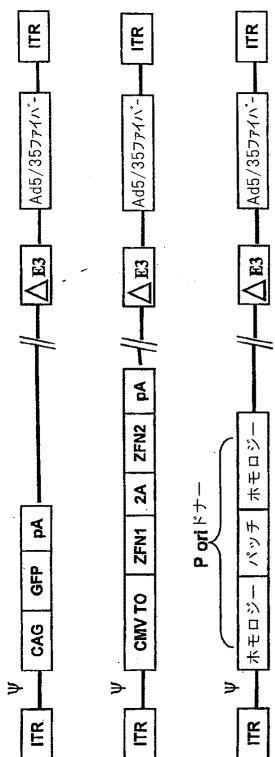


FIG. 1

Ad5/35ベクター：導入遺伝子発現カセット(GFP及びZFN)又はE1領域に挿入されたドナーパレル

【図 2】

FIG. 2: 野生型Fok1切断ハーフドメイン
QLVKSELKKSELSRHLKLVPHHEYIEIETIARNSTODTLEMKYMEFPKMYCYGRGKHLGSRKPDGAATYVGSPIDKXVIVDTKASGGYNYPIGOADE
MORYV₂ENNTNKHINPNEWKVKYFSSVTEPKFLVSGHPGKVKAAQ-LTRAHHT₁NCNGAVLSEELIGENIKAASTLTLEVRKFNGEINP
(配列番号33)

【図3】

〔 4 〕

FIG. 3: Q486E : 1499L 量化突然変異体
 QLVKSELLEKKSELRHKLVPHETELJELARNSTODR
 MERTVEENQNTTRKHLLNPNEWMKVPPSSVTEKFLEVSGH
 (配列番号 34)

【 义 5 】

【図6】

FIG. 4 E490 : 1538K 二量化突然変異体
OLVSELEEKSELURKLKTVPHYEIEIETARNSTODR
MORYVKENOPENKNTINNEWMKVPPSVTTEKFJ-FVSS
(配列番号35)

FIG. 6 (配列番号37) : 47bp CCR5パッチ配

ctagatcagttagtatgccctgatggcgctggactggatgcctcg

【図7】

配列番号	配列
ys18	挿入 PBMC TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys14	挿入 PBMC TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys14	挿入 T細胞 TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys21	挿入 PBMC TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys25	挿入 PBMC TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys29	挿入 PBMC TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys57	挿入 T細胞 TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys9	挿入 PBMC TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys9	挿入 T細胞 TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys28	挿入 PBMC TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys97	挿入 PBMC TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys94	挿入 T細胞 TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys35	挿入 T細胞 TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys933	挿入 T細胞 TTTTGCGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC

FIG. 9

【図8】

配列番号	配列
ys24	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys12	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys14	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys19	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys58	欠失 T細胞 TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys34	欠失 T細胞 TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys45	欠失 T細胞 TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys37	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys59	欠失 T細胞 TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys20	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys95	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys970	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys13	欠失 PBMC TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys51	欠失 T細胞 TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys938	挿入 T細胞 AAAGGCGAATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys56	挿入 T細胞 TTTCCTGGACACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
ys61	挿入 T細胞 ACTCGAAAATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC
1ysy3	挿入 C ACCACCCGAGACATGGCTGCATCCTCCATCTTGTAACTGCAAAAGCTGAGACATGACGATCTACGCTC

FIG. 10

FIG. 8

【図 1 1】

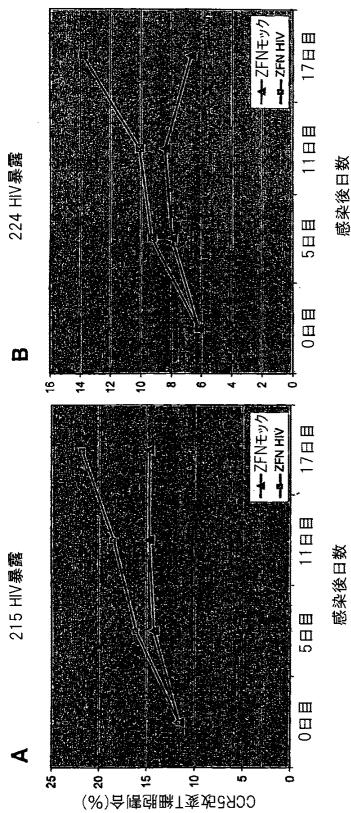


FIG. 11

【図 1 2】

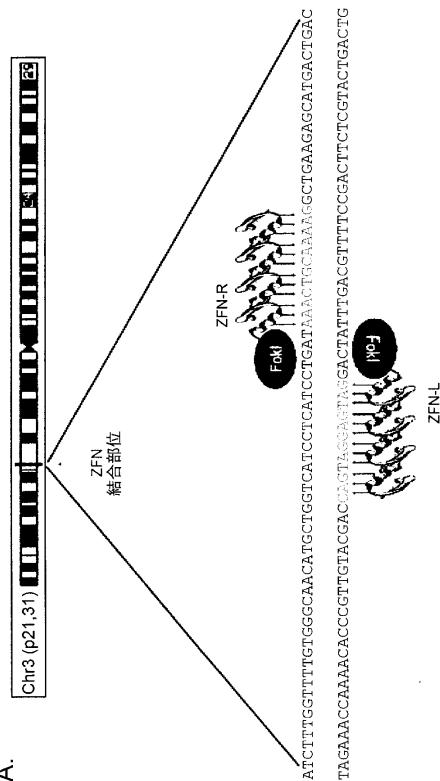


FIG. 12 (重列番号67及U68)

【図 1 3】

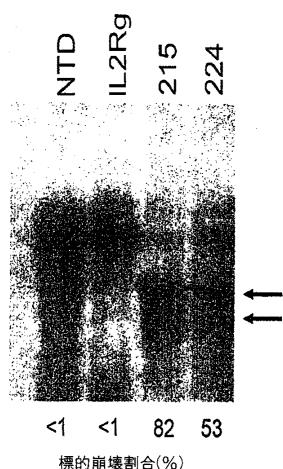


FIG. 13

【図 1 4 A】

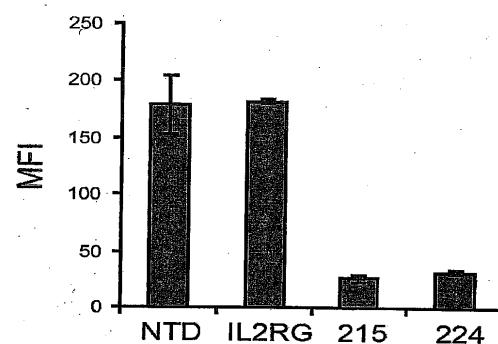


FIG. 14A

【図 1 4 B】

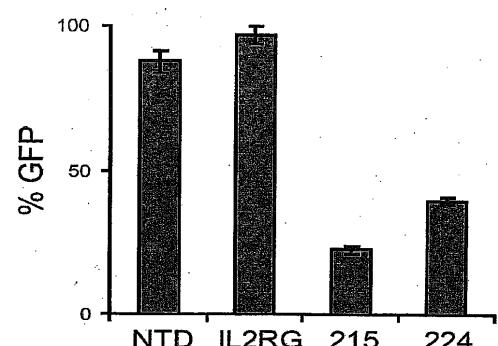


FIG. 14B

【図15】

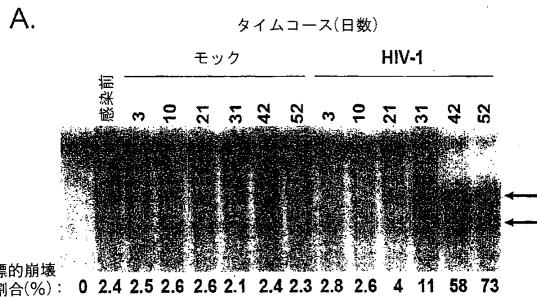


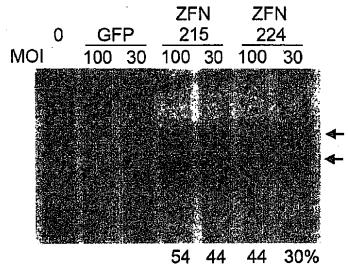
FIG. 15

【図16】

FIG. 16

【図17】

FIG. 17



【图 18】

【図19】

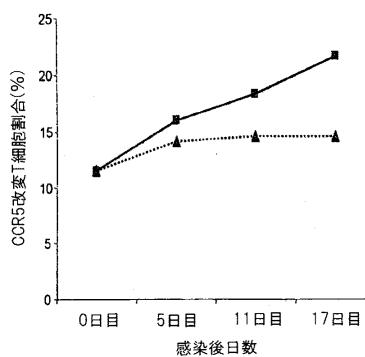
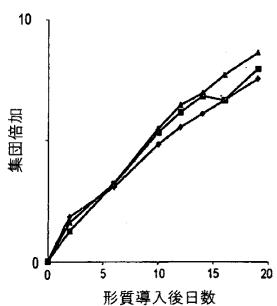


FIG. 19

FIG. 18



【 図 20 】

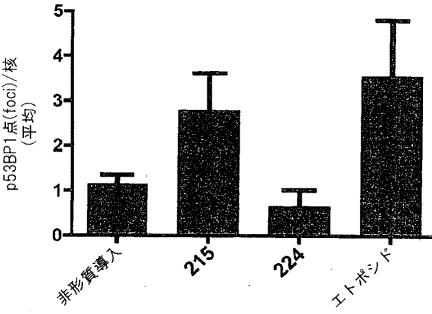


FIG. 20

【図21】

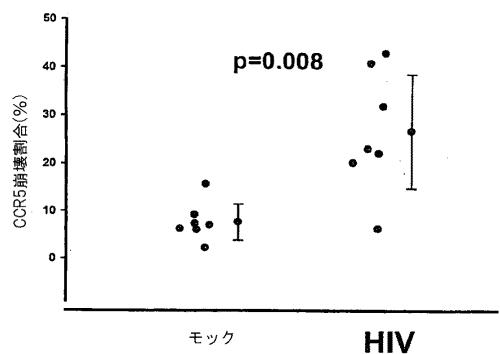


FIG. 21

フロントページの続き

(51) Int.CI.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	

(31) 優先権主張番号 60/926,911

(32) 優先日 平成19年4月30日(2007.4.30)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(74) 代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72) 発明者 アンドー, デール

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94958, ウォールナット クリーク, ベナド コルテ 1
59

(72) 発明者 ホームズ,マイケル クリストファー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94602, オークランド, グレン パーク ロード 393
4

(72) 発明者 リー, ゲアリー カ レオン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94577, サンリアンドロ, シーゲート ドライブ 142
71

審査官 佐藤 巍

(56) 参考文献 米国特許出願公開第2006/0188987(US, A1)

特許第4555292(JP, B2)

特表2007-501626(JP, A)

米国特許出願公開第2003/0104526(US, A1)

緒方宣邦, 野島博, 遺伝子工学キーワードブック, 2000年, 改訂第2版, 第84頁

KANDAELOU KARTHIKEYAN, NATURE BIOTECHNOLOGY, 米国, NATURE PUBLISHING GROUP, 2005
年 6月, V23 N6, P686-687

DURAI, S. et al., Nucleic Acids Res., 2005年, Vol.33, No.18, pp.5978-5990

MANI, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005年, Vol.335, pp.447-457

LIU, Q. et al., J. Biol. Chem., 2002年, Vol.277, No.6, pp.3850-3856

URNOV, F.D. et al., Nature, 2005年, Vol.435, pp.646-651

PORTEUS, M.H. and CARROLL, D., Nature Biotechnol., 2005年, Vol.23, No.8, pp.967-97
3DRAGIC T, NATURE, 英国, NATURE PUBLISHING GROUP, 1996年 6月20日, V381 N6584, P
667-673

(58) 調査した分野(Int.CI., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 1 5 / 9 0

UniProt/GenSeq

MEDLINE/CAPplus/BIOSIS/WPI/IDS(STN)

REGISTRY(STN)