(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5932632号
(P5932632)

(45)発行日　平成28年6月15日(2016.6.15)　(24)登録日　平成28年5月13日(2016.5.13)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | A |
| C07K 14/705 | (2006.01) | C07K | 14/705 | ZNA |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N | 1/15 | |
| C12N 1/19 | (2006.01) | C12N | 1/19 | |
| C12N 1/21 | (2006.01) | C12N | 1/21 | |

請求項の数 15　(全 44 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-500787 (P2012-500787)
(86)(22)出願日　平成22年3月18日 (2010.3.18)
(65)公表番号　特表2012-520675 (P2012-520675A)
(43)公表日　平成24年9月10日 (2012.9.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/000807
(87)国際公開番号　WO2010/107493
(87)国際公開日　平成22年9月23日 (2010.9.23)
審査請求日　平成25年2月19日 (2013.2.19)
(31)優先権主張番号　61/210,636
(32)優先日　平成21年3月20日 (2009.3.20)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/273,861
(32)優先日　平成21年8月10日 (2009.8.10)
(33)優先権主張国　米国 (US)

前置審査

(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　スート　エー１００
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(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】改変された亜鉛フィンガータンパク質を使用したＣＸＣＲ４の修飾

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
４又は５個の亜鉛フィンガーＤＮＡ結合ドメインを含む亜鉛フィンガータンパク質であって、
該亜鉛フィンガーＤＮＡ結合ドメインが、（１）Ｎ末端からＣ末端の順に並べられた配列番号２～５のアミノ酸配列のドメイン、（２）Ｎ末端からＣ末端の順に並べられた配列番号７～１０のアミノ酸配列のドメイン、（３）Ｎ末端からＣ末端の順に並べられた配列番号１２～１５のアミノ酸配列のドメイン、（４）Ｎ末端からＣ末端の順に並べられた配列番号１７、５、１８、１９及び２０のアミノ酸配列のドメイン、（５）Ｎ末端からＣ末端の順に並べられた配列番号２２、２３、１７及び２４のアミノ酸配列のドメイン、又は（６）Ｎ末端からＣ末端の順に並べられた配列番号８、９、２６及び２７のアミノ酸配列のドメインである認識ヘリックス領域を含み、上記ドメイン（１）、（２）、（３）、（４）、（５）又は（６）を含む該亜鉛フィンガータンパク質が、それぞれ、配列番号１、６、１１、１６、２１又は２５のヌクレオチド配列の標的部位に結合し、該標的部位がＣＸＣＲ４遺伝子内に存在する、亜鉛フィンガータンパク質。
【請求項２】
請求項１に記載の亜鉛フィンガータンパク質と、少なくとも１つの開裂ドメインまたは少なくとも１つの開裂ハーフドメインとを含む、融合タンパク質。
【請求項３】
前記開裂ハーフドメインは、野生型または改変されたＦｏｋＩ開裂ハーフドメインであ

る、請求項２に記載の融合タンパク質。
【請求項４】
請求項１から３のいずれか１項に記載の亜鉛フィンガーＤＮＡ結合ドメインをコードする、ポリヌクレオチド。
【請求項５】
請求項４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６】
前記ベクターは、アデノウイルスベクターを含む、請求項５に記載の遺伝子送達ベクター。
【請求項７】
請求項１から３のいずれか１項に記載のタンパク質、請求項４に記載のポリヌクレオチド、または請求項５もしくは請求項６に記載の遺伝子送達ベクターを含む、単離細胞。
【請求項８】
インビトロで細胞内の内因性細胞ＣＸＣＲ４遺伝子を不活性化する方法であって、
（ａ）請求項２に記載の第１の融合タンパク質をコードする第１の核酸を、細胞内に導入すること、
を含み、前記融合タンパク質が前記細胞内で発現され、前記標的部位に結合して前記ＣＸＣＲ４遺伝子を開裂する、方法。
【請求項９】
第２の融合タンパク質をコードする核酸を導入することをさらに含み、前記第２の融合タンパク質が前記細胞内で発現され、前記第１および第２の融合タンパク質が、それらのそれぞれの標的部位に結合して前記ＣＸＣＲ４遺伝子を開裂する、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記第１および第２の融合タンパク質は、同じ核酸によって、または異なる核酸によってコードされる、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
ポリヌクレオチドを前記細胞内に導入することをさらに含み、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖切断の上流の配列と相同性のある第１の領域と、二本鎖切断の下流の配列と相同性のある第２の領域とを含む、請求項８から１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記核酸は、遺伝子送達ベクター上に担持される、請求項８から１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記遺伝子送達ベクターは、アデノウイルスベクターである、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記細胞は、造血幹細胞、Ｔ細胞、マクロファージ、樹枝状細胞、および抗原提示細胞から成る群から選択される、請求項８から１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
ＨＩＶ感染症を治療または予防するための、請求項８から１４のいずれか１項に記載の方法によって、内因性細胞のＣＸＣＲ４遺伝子が不活性化された単離細胞を含む医薬組成物であって、
前記医薬組成物が、被験者に導入され、任意には、前記被験者に前記医薬組成物が導入される前に、ヌクレアーゼをコードする配列によって前記細胞内の内因性ＣＣＲ５遺伝子が不活性化される、医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照

本願は、２００９年3月２０日に出願された米国仮出願第６１／２１０，６３６号、および２００９年８月１０日に出願された米国仮出願第６１／２７３，８６１号の利益を主張し、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００２】

連邦政府支援の研究から創出された発明に対する権利の陳述

該当なし。

【０００３】

本開示は、リンパ球および幹細胞を含む、ヒト細胞のゲノム修飾の分野に存する。

【背景技術】

【０００４】

ゲノムＤＮＡの標的開裂のための、さまざまな方法および組成物が説明されている。そのような標的開裂の事象は、例えば、標的突然変異誘発の誘発、細胞ＤＮＡ配列の標的欠失の誘発、および所定の染色体座での標的組換えの促進に使用することができる。例えば、米国特許公開第２００３０２３２４１０号、同第２００５０２０８４８９号、同第２００５００２６１５７号、同第２００５００６４４７４号、同第２００６０１８８９８７号、同第２００８０１５９９６号、および国際公開第ＷＯ２００７／０１４２７５号を参照されたく、それらの開示は、すべての目的のために参照によりその全体が組み込まれる。また、Ｓａｎｔｉａｇｏ ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｐｒｏｃ Ｎａｔ’ｌ Ａｃｅｄ Ｓｉｃ ＵＳＡ１０５：５８０９～５８１４、Ｐｅｒｅｚ ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ２６：８０８～８１６（２００８）も参照されたい。

【０００５】

ＨＩＶについて、インビボでの最も重要な共受容体は、７回膜貫通型ケモカイン受容体であるＣＣＲ５、およびＣＸＣＲ４（ＣＸＣケモカイン受容体）である。例えば、Ｆｅｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７２：８７２～８７７、Ｄｅｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ３８１：６６１～６６６、Ｓｃｈｕｉｔｅｍａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７３：５３７３～５３８０を参照されたい。ＣＣＲ５（Ｒ５ウイルス）のみを用いるＨＩＶ１型（ＨＩＶ－１）株が、感染の初期段階に優勢であり、伝染に重要な役割をもつ（Ｓｃｈｕｉｔｅｍａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１３５４～１３６０、ｖａｎ’ｔ Ｗｏｕｔ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：２０６０～２０６７）。Ｒ５ウイルスは、一般に、後期疾患において存続するが、ＣＸＣＲ４を用いることのできるウイルスは、単独で（Ｘ４ウイルス）、またはＣＣＲ５に加えて（Ｒ５Ｘ４ウイルス）のいずれかで、サブタイプＢの感染者の約５０％に現れる（Ｃｏｎｎｏｒ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８５：６２１～６２８、Ｋａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３２：３６４～３７０）。この共受容体の切り替わりは、末梢血ＣＤ４＋Ｔ細胞のより急激な低下、およびＡＩＤＳへのより急速な進行に関連する（Ｒｉｃｈｍａｎ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．１６９：９６８～９７４）。

【０００６】

したがって、ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ感染症の治療および予防のための、ＣＸＣＲ４をノックアウトする組成物の必要性が残されている。

【発明の概要】

【０００７】

ＣＸＣＲ４を、部分的または完全に不活性化するための組成物および方法を本明細書に開示する。特に、ＣＸＣＲ４を不活性化するために用いることのできるヌクレアーゼ（例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ）を、本明細書に説明する。本明細書に説明するＣＸＣＲ４ヌクレアーゼは、細胞株（ＣＸＣＲ４細胞株）の生成に有用であり、この細胞株は、生理的条件下または病的条件下にあるＣＸＣＲ４の機能（複数可）を研究するのに使用することができる。さらに、本明細書に説明するヌクレアーゼは、ＨＩＶ－１感染を含む特定の疾患の治療のための治療用試薬として、エクスビボで、またはインビボで使用する

こともできる。

【０００８】

一態様において、ヒトのＣＸＣＲ４遺伝子内に標的部位を有する亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を本明細書に提供する。いくつかの実施形態において、これらのヌクレアーゼを用いるＣＸＣＲ４遺伝子内の開裂は、ＣＸＣＲ４遺伝子の永久的な破壊（例えば、変異）をもたらす。ある特定の実施形態では、亜鉛フィンガードメイン（複数可）は、ＣＸＣＲ４遺伝子のＥＣＬ－２ドメイン内の標的部位に結合するように改変される。亜鉛フィンガータンパク質は、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つ以上の亜鉛フィンガーを含むことができ、各亜鉛フィンガーは、標的遺伝子内の標的サブサイトに結合する認識ヘリックスを有する。ある特定の実施形態では、亜鉛フィンガータンパク質は、４つまたは５つのフィンガー（Ｆ１、Ｆ２、Ｆ３、Ｆ４、およびＦ５で示され、Ｎ末端からＣ末端にかけて、Ｆ１からＦ４、またはＦ１からＦ５の順に並ぶ）を含み、これらのフィンガーは、表１に示す認識領域のアミノ酸配列を含む。

【０００９】

本明細書に説明するタンパク質のいずれも、開裂ドメインおよび／または開裂ハーフドメイン（例えば、野生型または改変されたＦｏｋＩ開裂ハーフドメイン）をさらに含んでもよい。したがって、本明細書に説明するＺＦＮのいずれにおいても、ヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインまたはヌクレアーゼハーフドメイン（例えば、ＦｏｋＩ開裂ハーフドメイン）を含む場合がある。他の実施形態では、ＺＦＮは、例えば、偏性ヘテロ二量体を形成する改変されたＦｏｋＩ開裂ハーフドメイン等の、改変ヌクレアーゼドメインまたは改変ヌクレアーゼハーフドメインを含む。例えば、米国特許公開第２００８０１３１９６２号を参照されたい。

【００１０】

別の態様において、本開示は、本明細書に説明するいずれのタンパク質もコードするポリヌクレオチドを提供する。本明細書に説明するポリヌクレオチドのいずれも、ＣＸＣＲ４遺伝子内への標的挿入のための配列（ドナー配列またはパッチ配列）を含んでもよい。

【００１１】

さらに別の態様では、本明細書に説明する任意のポリヌクレオチドを含む遺伝子送達ベクターを提供する。ある特定の実施形態では、ベクターは、アデノウイルスベクター（例えば、Ａｄ５／Ｆ３５ベクター）である。したがって、少なくとも１つの亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）をコードする配列、および／または標的遺伝子内への標的組み込みのためのドナー配列を含むアデノウイルス（Ａｄ）ベクターも、本明細書に提供する。ある特定の実施形態では、Ａｄベクターは、例えばＡｄ５／Ｆ３５ベクターである、キメラＡｄベクターである。追加の実施形態では、標的遺伝子は、ヒトのＣＸＣＲ４遺伝子である。本明細書に説明するベクターはまた、ドナー配列を含む場合もある。ある特定の実施形態では、単一ベクターは、１つまたは複数のＺＦＮをコードする配列と、ドナー配列（複数可）とを含む。他の実施形態では、ドナー配列（複数可）は第１のベクター内に含まれ、ＺＦＮをコードする配列は第２のベクター内に存在する。

【００１２】

さらなる別の態様において、本開示は、本明細書に説明するタンパク質、ポリヌクレオチド、および／またはベクターのうちのいずれかを含む単離細胞を提供する。ある特定の実施形態では、細胞は、造血幹細胞、Ｔ細胞（例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞）、マクロファージ、樹枝状細胞、および抗原提示細胞からなる群から選択される。細胞は、例えば、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、マクロファージ、間葉幹細胞、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳ細胞）、造血幹細胞（例えば、ＣＤ３４＋細胞）、Ｔ細胞（例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞）、樹枝状細胞もしくは抗原提示細胞を含み、または、Ｋ５６２（慢性骨髄性白血病）、ＨＥＫ２９３（胚腎臓）、ＰＭ－１（ＣＤ４＋Ｔ細胞）、Ｓｕｐ－Ｔ１（リンパ芽球性白血病）、ＴＨＰ－１（単球性白血病）、もしくはＧＨＯＳＴ（骨肉腫）などの細胞株を含む。別の態様では、ＣＸＣＲ４が不活性化された細胞株を提供する。

【００１３】

別の態様において、１つまたは複数のタンパク質、ポリヌクレオチド、および／またはベクターを、本明細書に説明する細胞内に導入することによって、細胞内のＣＸＣＲ４遺伝子を不活性化する方法を、本明細書に説明する。本明細書に説明する方法のいずれかにおいて、ＺＦＮは、標的突然変異誘発、細胞ＤＮＡ配列の標的欠失、および／または所定の染色体座での標的組換えの促進を誘発することができる。したがって、ある特定の実施形態では、ＺＦＮは、標的遺伝子の１つまたは複数のヌクレオチドを除去する。いくつかの実施形態では、ＣＸＣＲ４遺伝子は、ＺＦＮ開裂に続く非相同末端連結の後で、不活性化される。他の実施形態では、標的遺伝子内のゲノム配列は、例えば、本明細書に説明するＺＦＮ（または前記ＺＦＮをコードするベクター）、およびＺＦＮを用いた標的開裂後の遺伝子内に挿入される「ドナー」配列を用いて置換される。ドナー配列は、ＺＦＮベクター内に存在することができ、別個のベクター（例えば、Ａｄベクター）内に存在することもでき、あるいは、異なる核酸送達機構を用いて、細胞内に導入することもできる。

【００１４】

別の態様において、亜鉛フィンガータンパク質と、その融合物とを用いて、細胞内または細胞株内のＣＸＣＲ４遺伝子を変異させる、および／またはＣＸＣＲ４の機能を不活性化させるための方法を提供する。このように、ヒトの細胞内のＣＸＣＲ４遺伝子を不活性化するための方法を提供し、方法は、本明細書に説明するタンパク質またはポリヌクレオチドのうちのいずれかを細胞に投与することを含む。

【００１５】

さらに別の態様において、本開示は、被験者におけるＨＩＶ感染症の治療または予防のための方法を提供し、この方法は、（ａ）細胞内に、第１のポリペプチドをコードする第１の核酸を導入することを含み、第１のポリペプチドは、（ｉ）ＣＸＣＲ４内の第１の標的部位に結合するように改変される、亜鉛フィンガーＤＮＡ結合ドメインと、（ｉｉ）開裂ドメインとを含み、ポリペプチドが細胞内に発現されるような条件下で、ポリペプチドは標的部位に結合してＣＸＣＲ４遺伝子を開裂し、さらに、（ｂ）被験者に細胞を導入することを含む。ある特定の実施形態では、細胞は、造血幹細胞、Ｔ細胞、マクロファージ、樹枝状細胞または抗原提示細胞からなる群から選択される。核酸は、本明細書に説明されるポリヌクレオチドのうちのいずれかを含むことができる。方法のうちのいずれかにおいて、第１の核酸は、さらに第２のポリペプチドをコードすることができ、ここで、第２のポリペプチドは、（ｉ）ＣＸＣＲ４遺伝子内の第２の標的部位に結合するように改変される、亜鉛フィンガーＤＮＡ結合ドメインと、（ｉｉ）開裂ドメインとを含み、第２のポリペプチドが細胞内に発現され、それにより、第１および第２のポリペプチドが、それらのそれぞれの標的部位に結合してＣＸＣＲ４遺伝子を開裂する。同様に、これらの方法のうちのいずれかは、第２の核酸を細胞内に導入するステップをさらに含むことができ、ここで、第２の核酸は、ＣＸＣＲ４遺伝子に非相同性である配列を隣接する、ＣＸＣＲ４遺伝子に相同性である２つの領域を含む。これらの方法は、ＣＸＣＲ４をコードする遺伝子配列内に変化をもたらすために使用することができる。すなわち、ＣＸＣＲ４遺伝子内に組み込まれる第２の核酸内に、所望の変化を含むことによってなし得る。これらの方法を使用して、１ヌクレオチドへの修飾（変異または欠失）を含む、遺伝子配列内の大きなおよび小さな修飾。いくつかの態様において、本発明は、ＣＣＲ５特異的ＺＦＮＳとの組み合わせでＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮを使用する方法および組成物を提供する（例えば、米国特許出願第２００８０１５９９９６号を参照されたい）。ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮおよびＣＣＲ５特異的ＺＦＮは、単一の送達媒体（ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｖｅｈｉｃｌｅ）上に、ともに供給してもよく、個別に供給することもできる。同様に、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮおよびＣＣＲ５特異的ＺＦＮは、連続的に同時に供給することができる。

【００１６】

本明細書に説明する方法および組成物のうちのいずれかにおいて、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、樹枝状細胞もしくは抗原提示細胞であり得、または、Ｋ５６２（慢性骨髄性白血病）、ＨＥＫ２９３（胚腎臓）、ＰＭ－１（ＣＤ４＋Ｔ細胞）、Ｓｕｐ－Ｔ１（リンパ芽球性

白血病）、ＴＨＰ－１（単球性白血病）、もしくはＧＨＯＳＴ（骨肉腫）などの細胞株であり得る。

【００１７】

さらに、本明細書に説明する方法のうちのいずれかは、インビトロ、インビボおよび／またはエクスビボで実施することができる。ある特定の実施形態では、例えば、Ｔ細胞を、ＣＸＣＲ４の破壊によってＨＩＶ感染症に抵抗性をもたらせるなど、例えば、ＰＢＭＣを修飾するには、方法はエクスビボで実施される。ある特定の実施形態では、例えば、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮを、ＨＩＶに苦しむ患者に投与することによって、方法はインビボで実施される。他の態様では、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮおよびＣＣＲ５特異的ＺＦＮの両方を、ＨＩＶに苦しむ患者に投与することによって、方法はインビボで実施される。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】パネルＡ～Ｃは、設計されたＺＦＮを用いたＣＸＣＲ４遺伝子の標的を示す。図１Ａ～１Ｃは、ＺＦＮ結合部位および認識ヘリックス配列を示す。各ＺＦＮについて、主結合部位（下線）のＤＮＡ配列を含む、ＣＸＣＲ４遺伝子の切片を示す。－１から＋６位の、各ＺＦＮの認識ヘリックスのアミノ酸配列を、その標的ＤＮＡ三重項の下に記載する。図１Ｄは、Ｓｕｒｖｅｙｏｒ（登録商標）ヌクレアーゼアッセイで測定された、設計されたＺＦＮを用いた処理の後で、破壊されたＣＸＣＲ４対立遺伝子が非相同末端連結（ＮＨＥＪ）によって修飾された百分率を示す。１００ｂｐ位のＤＮＡラダー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を、各ゲルの左に表す。開裂されたＣＸＣＲ４ＰＣＲの産物は、矢印で示す。各列の下部の数字は、計算された、ＮＨＥＪによる修飾の頻度（％）を示す。

【図２Ａ】パネル２Ａは、ＺＦＮによるＣＸＣＲ４の修飾を示す。図２Ａは、ＺＦＮ濃縮細胞プール（Ｘ４－）および野生型（ＺＦＮ未処理）細胞（「ＷＴ」）から得られる、およびＤＮＡミスマッチ感受性（ｍｉｓｍａｔｃｈ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ）Ｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼ酵素（Ｃｅｌ－１アッセイ）を用いて処理をした後の、ＺＦＮによって標的とされるＣＸＣＲ４遺伝子のＰＣＲ増幅された領域を表すゲルである。ＣＸＣＲ４遺伝子座で、ＺＦＮによって修飾された対立遺伝子の百分率を最右２列の下に示す。

【図２Ｂ】パネル２Ｂは、ＺＦＮによるＣＸＣＲ４の修飾を示す。図２Ｂは、示される単一細胞クローンの、遺伝子型配列分析を示す。１２２７３／１２２７０ＺＦＮのための、主結合部位（下線）のＤＮＡ配列を含むＣＸＣＲ４遺伝子の切片は、整合のための参照配列として使用される。ダッシュ（「－」）は欠失を示し、太字は挿入を示す。

【図２Ｃ】パネル２Ｃは、ＺＦＮによるＣＸＣＲ４の修飾を示す。図２Ｃは、示される単一細胞クローンの、遺伝子型配列分析を示す。１２２７３／１２２７０ＺＦＮのための、主結合部位（下線）のＤＮＡ配列を含むＣＸＣＲ４遺伝子の切片は、整合のための参照配列として使用される。ダッシュ（「－」）は欠失を示し、太字は挿入を示す。

【図２Ｄ】パネル２Ｄは、ＺＦＮによるＣＸＣＲ４の修飾を示す。図２Ｄは、示される単一細胞クローンの、遺伝子型配列分析を示す。１２２７３／１２２７０ＺＦＮのための、主結合部位（下線）のＤＮＡ配列を含むＣＸＣＲ４遺伝子の切片は、整合のための参照配列として使用される。ダッシュ（「－」）は欠失を示し、太字は挿入を示す。

【図３】パネルＡ～Ｃは、野生型ＳｕｐＴ１およびＣＸＣＲ４　ＳｕｐＴ１修飾されたクローンＢ１３およびＡ６６の感染を示すグラフである。図３Ａおよび３Ｂは、Ｒ５／Ｘ４指向性ウイルスＨＩＶ－１のＲ３Ａ（図３Ａ）およびＳＦ２（図３Ｂ）は、Ｓｕｐ－Ｔ１細胞を生産的に感染させることができるが、Ｓｕｐ　Ｔ１クローンＢ１３またはＡ６６には生産的に感染させることができないことを表している。図３Ｃは、厳密にＸ４指向性ＨＩＶ－１のＢＫ１３２ウイルスのための、同じ選択性を示す。

【図４】示す細胞の種類に対する、Ｒ３Ａ（ＣＣＲ５／ＣＸＣＲ４、また、Ｒ５／Ｘ４とも称する、指向性ＨＩＶ－１ウイルス）の攻撃後の逆転写酵素（ＲＴ）活性を示すグラフである。最左の棒は、攻撃から６日後のＲＴ活性を示し、中央の棒は、攻撃から１３日後のＲＴ活性を示し、また、右の棒は、攻撃から２０日後のＲＴ活性を示す。これは、Ｂ１３細胞は、Ｒ５／Ｘ４指向性ＨＩＶ株を使用する場合に、ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４のい

ずれかを再導入すると感染力は野生型のレベルまで修復されるため、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮによるＣＸＣＲ４の破壊によってＨＩＶに対する抵抗性を有することを表す。
【図５】Ｓｕｒｖｅｙｏｒ（登録商標）ヌクレアーゼアッセイによって測定された、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮで処理された主Ｔ細胞内における非相同末端連結（ＮＨＥＪ）事象の頻度を表すゲルを示す。
【図６】パネルＡ～Ｄは、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮを用いる主Ｔ細胞の処理によってもたらされる保護効果を表すグラフである。細胞は、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮまたはＣＣＲ５特異的ＺＦＮで処理され、次いで、さまざまな度合いのＣＸＣＲ４指向性をもつＨＩＶ株で感染させた。図６Ａは、模擬ＨＩＶ－１感染された細胞の増殖曲線を表す。図６Ｂ、６Ｃ、および６Ｄは、それぞれＢＫ１３２細胞、ＨｘＢ細胞およびＲ３Ａ細胞の、示される形質導入後の時間での増殖曲線を表す。ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮで処理された細胞は、ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株の致死影響に対して、より抵抗性を示した。
【図７】パネルＡ～Ｄは、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮを用いる主Ｔ細胞の処理によってもたらされる保護効果を表すグラフである。細胞は、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮまたはＣＣＲ５特異的ＺＦＮで処理され、次いで、ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株またはＲ５／Ｘ４指向性ＨＩＶ株で感染させた。図７Ａは、模擬ＨＩＶ－１感染された細胞の増殖曲線を表す。図７Ｂ、７Ｃ、および７Ｄは、それぞれＢＫ１３２細胞、ＨｘＢ細胞およびＲ３Ａ細胞の、示される形質導入後の時間での増殖曲線を表す。ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮで処理された細胞は、ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株またはＲ５／Ｘ４指向性ＨＩＶ株の致死影響に対して、より抵抗性を示した。
【図８】ＨＩＶ株へのインビトロ暴露後の、主Ｔ細胞内で測定可能なＣＸＣＲ４遺伝子破壊の百分率を示すグラフである。ＨＩＶ暴露（模擬）の不在下では、ＣＸＣＲ４遺伝子修飾の割合は、ほぼ一定に保たれる。細胞がＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ（天然ＣＸＣＲ４株、Ｂｋ１３２もしくは実験用に修飾されたＣＸＣＲ４株、ＨｘＢのいずれか）に暴露されると、ＣＸＣＲ４修飾の割合は増加し、これは、ＣＸＣＲ４修飾が、ＣＸＣＲ４修飾された細胞に延命効果をもたらすことを表す。直接配列決定によって検出された破壊のレベルが、細胞集団におけるすべての対立遺伝子の７５％を超えるようにすると、ＣＸＣＲ４破壊された両方のコピーをもつ細胞が選択され、かつＨＩＶに対する最も強固な保護であると確定された。
【図９】パネルＡ～Ｃは、逆転写酵素（ＲＴ）活性により測定された、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮまたはＣＣＲ５特異的ＺＦＮのいずれかで処理されたサンプル内における、ウイルス量を示すグラフである。示される細胞は、ＺＦＮで処理され、次いで、ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株（図９Ａに示されるＢｋ１３２、図９Ｂに示されるＨｘＢ）またはＣＣＲ５およびＣＸＣＲ４の両方について二重指向性を示すＨＩＶ株（図９Ｃに示されるＲ５Ｘ４）のうちのいずれかに暴露された。提示するすべてのデータにおいて、ＲＴ活性の量は、未処理のサンプル（ＮＴＤ）内、またはＣＣＲ５特異的ＺＦＮで処理されてからＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株に暴露されたサンプル内のいずれにおいても、最も多かった。
【図１０】パネルＡおよびＢは、ＮＳＧマウス内の、ＺＦＮで処理されたヒトＴ細胞の生着、およびＺＦＮ処理細胞におけるＣＸＣＲ４表面発現の割合を表すグラフである。図１０Ａは、マウス内のＴ細胞の生着を示し、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮ処理細胞（Ｘ４ＺＦＮ）およびＣＣＲ５特異的ＺＦＮ処理細胞（Ｒ５ＺＦＮ）の両方が同等に良好に生着したことを表している。図１０Ｂは、生着の前にＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮまたはＣＣＲ５特異的ＺＦＮのいずれかで処理された移植細胞の表面上のＣＸＣＲ４発現の量を示す。予想通り、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮ（Ｘ４ＺＦＮ）で処理された細胞は、ＣＣＲ５特異的ＺＦＮ（Ｒ５ＺＦＮ）で処理された細胞よりも、より低いＣＸＣＲ４発現の度合いを示した。
【図１１】Ｓｕｒｖｅｙｏｒ（登録商標）ヌクレアーゼアッセイによって測定された、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮおよびＣＣＲ５特異的ＺＦＮで共処理された主Ｔ細胞内における非相同末端連結（ＮＨＥＪ）事象の頻度を表すゲルを示す。上のパネル（Ｒ５）は、ＣＣＲ５修飾のために測定された細胞を示し、さらに下のパネル（Ｘ４）は、ＣＸＣＲ４修飾のために測定された細胞を示す。非相同末端連結（ＮＨＥＪ）による修飾の割合は、各列の

下部に示す。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

ＣＸＣＲ４遺伝子を標的とする亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）（ＣＸＣＲ４－ＺＦＮ）を本明細書に開示する。これらのＺＦＮは、例えば、ＣＸＣＲ４コード領域における所定の部位で、二本鎖切断（ＤＳＢ）を効果的に生成する。部位は、例えば、ＣＸＣＲ４遺伝子（ヒト遺伝子など）のＥＣＬ－２ドメイン内とすることができる。ＣＸＣＲ４における、部位特異的二本鎖切断（ＤＳＢ）のＺＦＮ媒介導入は、ヒトリンパ細胞株内の標的ＣＸＣＲ４遺伝子の特異的かつ永久的な破壊をもたらす結果となった。

【００２０】

概要

本明細書に開示する、方法の実践、ならびに組成物の調製および使用は、別段の指示がない限り、当該分野の技術範囲内である、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算化学、細胞培養、組換えＤＮＡ、ならびに関連分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献に完全に説明されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９ ａｎｄ Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７および定期改訂、ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｗｏｌｆｆｅ，ＣＨＲＯＭＡＴＩＮ ＳＴＲＵＣＴＵＲＥ ＡＮＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，１９９８、ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ，Ｖｏｌ．３０４，「Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ」（Ｐ．Ｍ．Ｗａｓｓａｒｍａｎ ａｎｄ Ａ．Ｐ．Ｗｏｌｆｅｅ，ｅｄｓ．），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，１９９９、およびＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｖｏｌ．１１９，「Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ」（Ｐ．Ｂ．Ｂｅｃｋｅｒ，ｅｄ）Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，１９９９を参照されたい。

【００２１】

定義

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、線状または環状配座であり、一本鎖または二本鎖形態のいずれかである、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを指す。本開示については、これらの用語は、ポリマーの長さに関して制限するものとして解釈されるものではない。用語は、天然ヌクレオチドの公知の類似体、ならびに塩基部分、糖部分、および／またはリン酸部分において修飾されるヌクレオチド（例えば、ホスホロチエート骨格）を包含する。一般に、特定ヌクレオチドの類似体は、同一の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。

【００２２】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。用語はまた、１つもしくは複数のアミノ酸が、天然に存在する対応アミノ酸の化学的類似体、または修飾誘導体である、アミノ酸ポリマーに適用される。

【００２３】

「結合」は、高分子間（例えば、タンパク質と核酸との間）の配列特異的で非共有結合的な相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異性である限り、結合相互作用のすべての構成要素が配列特異的である必要はない（例えば、ＤＮＡ主鎖のリン酸残基との接触）。そのような相互作用は、一般に、$10^{-6}M^{-1}$またはそれ以下の解離定数（$K_d$）を特

徴とする。「親和性」は、結合強度を指し、結合親和性の増加は、$K_d$の低下と相関する。

【００２４】

「結合タンパク質」は、別の分子に非共有結合的に結合することが可能なタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、ＤＮＡ分子（ＤＮＡ結合タンパク質）、ＲＮＡ分子（ＲＮＡ結合タンパク質）、および／またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合することができる。タンパク質結合タンパク質の場合では、それは、それ自身に結合することができる（ホモ二量体、ホモ三量体等を形成するため）、および／または、それは、１つもしくは複数の分子の異なるタンパク質またはタンパク質群に結合することができる。結合タンパク質は、１種類以上の結合活性を有することができる。例えば、亜鉛フィンガータンパク質は、ＤＮＡ結合活性、ＲＮＡ結合活性、およびタンパク質結合活性を有する。

【００２５】

「亜鉛フィンガーＤＮＡ結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、亜鉛イオンの配位を介して安定化される構造を有する結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である、１つもしくは複数の亜鉛フィンガーを介する配列特異的方法でＤＮＡを結合するタンパク質、またはより大きなタンパク質内のドメインである。亜鉛フィンガーＤＮＡ結合タンパク質という用語は、しばしば、亜鉛フィンガータンパク質またはＺＦＰとして略記される。

【００２６】

亜鉛フィンガー結合ドメイン（例えば、認識ヘリックス領域）は、所定のヌクレオチド配列に結合するように、「改変」することができる。亜鉛フィンガーの改変された領域は、典型的には認識ヘリックス、特に、アルファヘリックス領域の－１から＋６と番号が付けられている部分である。改変された認識ヘリックスの骨格配列は、当該技術分野において知られている。例えば、Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２５，７７８－７８５を参照されたい。亜鉛フィンガータンパク質を改変するための方法の非制限的な例は、設計および選択である。設計された亜鉛フィンガータンパク質は、その設計／組成が、主に、合理的基準によってもたらされる、天然に存在しないタンパク質である。設計のための合理的基準は、置換規則の適用、ならびに既存のＺＦＰ設計および結合データの情報を記憶するデータベース内の情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムの適用を含む。例えば、米国特許第６，１４０，０８１号、同第６，４５３，２４２号、および同第６，５３４，２６１号を参照し、また、国際公開第ＷＯ９８／５３０５８号、同第ＷＯ９８／５３０５９号、同第ＷＯ９８／５３０６０号、同第ＷＯ００２／０１６５３６号、および同第ＷＯ０３／０１６４９６号を参照されたい。

【００２７】

「選択された」亜鉛フィンガータンパク質は、その産生が、主に、ファージ提示法、相互作用トラップ、またはハイブリッド選択等の実験的プロセスからもたらされる、天然には見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第５，７８９，５３８号、同第５，９２５，５２３号、同第６，００７，９８８号、同第６，０１３，４５３号、同第６，２００，７５９号、国際公開第ＷＯ９５／１９４３１号、同第ＷＯ９６／０６１６６号、同第ＷＯ９８／５３０５７号、同第ＷＯ９８／５４３１１号、同第ＷＯ００／２７８７８号、同第ＷＯ０１／６０９７０号、同第ＷＯ０１／８８１９７号、および同第ＷＯ０２／０９９０８４号を参照されたい。

【００２８】

「配列」という用語は、任意の長さのヌクレオチド配列を指し、ＤＮＡまたはＲＮＡである可能性があり、線状、環状、または分岐状である可能性があり、一本鎖または二本鎖のいずれかである可能性がある。「ドナー配列」という用語は、ゲノム内に挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、任意の長さ、例えば、２～１０，０００ヌクレオチド長（または、そ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ヌクレオチド長（または、その間の任意の整数）、より好ましくは、約２００～５００ヌクレオチド長である可能性がある。

【００２９】
「相同非同一配列」は、第２の配列とある程度の配列同一性を共有するが、その配列は、第２の配列と同一ではない、第１の配列を指す。例えば、突然変異遺伝子の野生型配列を含むポリヌクレオチドは、突然変異遺伝子の配列に対して相同的かつ非同一である。ある実施形態では、２つの配列の間の相同性の度合いは、通常の細胞機構を用いて、それらの間で相同組換えを可能にするために十分である。２つの相同非同一配列は、任意の長さである可能性があり、非相同性の度合いは、１ヌクレオチドほど小さいか（例えば、標的相同組換えによるゲノム点突然変異の補正のため）、または１０キロベース以上ほど大きい（例えば、染色体内の所定の異所性部位における遺伝子の挿入のため）可能性がある。相同非同一配列を含む２つのポリヌクレオチドは、同一の長さである必要はない。例えば、２０～１０，０００ヌクレオチド、また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。
【００３０】
核酸およびアミノ酸配列同一性を判定するための技術は、当該技術分野において知られている典型的には、そのような技術は、遺伝子のためのｍＲＮＡのヌクレオチド配列を判定すること、および／または、それによってコードされたアミノ酸配列を判定すること、ならびにそれらの配列を、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む。ゲノム配列はまた、この方法で、判定し、比較することができる。一般に、同一性は、それぞれ、２つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対応する、完全なヌクレオチド対ヌクレオチド、またはアミノ酸対アミノ酸を指す。２つもしくはそれ以上の配列（ポリヌクレオチドまたはアミノ酸）は、それらの同一性百分率を判定することによって比較することができる。核酸またはアミノ酸であれ、２つの配列の同一性百分率は、より短い配列の長さで割り、１００を乗じた、２つの整合配列の間の厳密な合致数である。核酸配列の近似整合は、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃｓ ２：４８２－４８９（１９８１）の局所性相同性アルゴリズムによって提供される。このアルゴリズムは、Ｄａｙｈｏｆｆ，Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｍ．Ｏ．Ｄａｙｈｏｆｆ ｅｄ．，５ ｓｕｐｐｌ．３：３５３－３５８，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．，ＵＳＡ、によって開発され、Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４（６）：６７４５－６７６３（１９８６）によって標準化されたスコアリングマトリックスを使用することによって、アミノ酸配列に適用することができる。配列の同一性百分率を判定するためのこのアルゴリズムの例示的実施は、「ＢｅｓｔＦｉｔ」実用用途において、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）によって提供される。この方法のデフォルトパラメータは、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ Ｐｒｏｇｒａｍ Ｍａｎｕａｌ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ８（１９９５）（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩから入手可能）に説明されている。本開示に関連して、同一性百分率を確立する好ましい方法は、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｅｄｉｎｂｕｒｇｈが著作権を有し、Ｊｏｈｎ Ｆ．ＣｏｌｌｉｎｓおよびＳｈａｎｅ Ｓ．Ｓｔｕｒｒｏｋによって開発され、ＩｎｔｅｌｌｉＧｅｎｅｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ）から販売される、ＭＰＳＲＣＨプログラムパッケージを使用することである。このパッケージ一式から、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムを使用することができ、デフォルトパラメータは、スコアリング表に使用される（例えば、ギャップオープンペナルティー１２、ギャップエクステンションペナルティー１、およびギャップ６）。生成されたデータからの「マッチ」値は、配列同一性を反映する。配列の間の同一性百分率または類似性を計算するための他の好適なプログラムは、当該技術分野において一般に公知であり、例えば、別の整合プログラムは、デフォルトパラメータとともに使用されるＢＬＡＳＴである。例えば、ＢＬＡＳＴＮおよびＢＬＡＳＴＰ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＝なし、鎖＝両

方、カットオフ＝６０、期待数＝１０、マトリックス＝ＢＬＯＳＵＭ６２、表示＝５０配列、分類＝高スコア、データベース＝非重複、ＧｅｎＢａｎｋ＋ＥＭＢＬ＋ＤＤＢＪ＋ＰＤＢ＋ＧｅｎＢａｎｋ ＣＤＳ ｔｒａｎｌｓａｔｉｏｎｓ＋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：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｇｏｖ／ｃｇｉ‐ｂｉｎ／ＢＬＡＳＴで確認することができる。本明細書に説明する配列に関して、望ましい配列同一性の度合いの範囲は、約８０％～１００％、およびそれらの間の任意の整数値である。典型的には、配列の間の同一性百分率は、少なくとも７０～７５％、好ましくは、８０～８２％、より好ましくは、８５～９０％、さらに好ましくは、９２％、より一層好ましくは、９５％、最も好ましくは、９８％の配列同一性である。

【００３１】

代替的には、ポリヌクレオチドの間の配列類似性の度合いは、相同領域間で安定した二重鎖の形成を可能にする条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション後に、一本鎖特異的ヌクレアーゼでの消化、および消化された断片の寸法決定によって判定することができる。２つの核酸または２つのポリペプチド配列は、配列が、上記の方法を使用して判定されるように、分子の定義された長さにわたって、少なくとも７０％～７５％、好ましくは、８０％～８２％、より好ましくは、８５％～９０％、さらに好ましくは、９２％、より一層好ましくは、９５％、および最も好ましくは、９８％の配列同一性を呈する時に、互いに実質的に相同的である。本明細書に使用するとき、実質的に相同的はまた、特異的ＤＮＡまたはポリペプチド配列に完全な同一性を示す配列を指す。実質的に相同的であるＤＮＡ配列は、例えば、サザンハイブリダイゼーション実験において、その特定のシステムのために定義される、緊縮条件下で、特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を定義することは、当該技術分野の技術範囲内である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，ｓｕｐｒａ；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ｅｄｉｔｏｒｓ Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｓ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ，（１９８５） Ｏｘｆｏｒｄ；Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ；ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ）を参照されたい。

【００３２】

２つの核酸断片の選択的ハイブリダイゼーションは、以下のように判定することができる。２つの核酸分子の間の配列同一性の度合いは、そのような分子の間のハイブリダイゼーション事象の効率および強度に影響する。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、当該技術分野において周知である、ハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、サザン（ＤＮＡ）ブロット、ノーザン（ＲＮＡ）ブロット、溶液ハイブリダイゼーション、または同等物、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，（１９８９） Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．を参照）を使用して評価することができる。そのようなアッセイは、異なる度合いの選択性を使用して、例えば、低ストリンジェンシーから高いストリンジェンシーまで異なる条件を使用して、実施することができる。低ストリンジェンシーの条件を使用する場合では、非特異性結合の不在は、非特異性結合事象の不在下で二次プローブが標的にハイブリダイズしないようにするように、部分的な配列同一性の度合いさえ持たない二次プローブ（例えば、標的分子との配列同一性が約３０％未満であるプローブ）を使用して、評価することができる。

【００３３】

ハイブリダイゼーションベースの検出システムを使用する時、参相補的である核酸プローブが選択され、次いで、適切な条件の選択によって、プローブおよび参照配列が二重鎖分子を形成するように、互いに選択的にハイブリダイズする、または結合する。中等度にストリンジェントな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能力を有する核酸分子は、典型的には、選択された核酸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ヌクレオチド長の標的核酸配列の検出を可能にするような条件下でハイブリダイズする。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、典型的には、選択された核酸プローブの配列と少なくとも約９０～９５％を上回る配列同一性を有する、少なくとも約１０～１４ヌクレオチド長の標的核酸配列の検出を可能にする。プローブおよび参照配列が、特異的な配列同一性の度合いを有する、プローブ／参照配列ハイブリダイゼーションに有用なハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野において公知のとおり判定することができる（例えば、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄａｚａｔｉｏｎ ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ, ｅｄｉｔｏｒｓ Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｓ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ, （１９８５）Ｏｘｆｏｒｄ；Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ, ＤＣ；ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ参照）。

【００３４】

ハイブリダイゼーションの条件は、当業者に周知である。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション条件が、ミスマッチしたヌクレオチドを含むハイブリッドの形成を嫌う度合いを指し、より高いストリンジェンシーは、ミスマッチしたハイブリッドに対する許容性の低さに相関する。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を及ぼす因子は、当業者に周知であり、温度、ｐＨ、イオン強度、および、例えば、ホルムアミドおよびジメチルスルホキシド等の有機溶媒の濃度を含むが、それらに限定されない。当業者に公知のように、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、より高い温度、より低いイオン強度、およびより低い溶媒濃度によって増大する。

【００３５】

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー条件に関して、例えば、以下の因子：配列の長さおよび性質、種々の配列の塩基組成、塩およ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遮断薬（例えば、硫酸デキストランおよびポリエチレングリコール）の存否、ハイブリダイゼーション反応温度および時間パラメータ、ならびに洗浄条件を変化させることによって、特定のストリンジェンシーを確立するために数々の等価条件を使用可能であることは、当該技術分野において周知である。特定の一連のハイブリダイゼーション条件の選択は、当該技術分野における標準方法に従い選択される（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．, Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ, Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ, （１９８９）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ, Ｎ．Ｙ．を参照）。

【００３６】

「組換え」は、２つのポリヌクレオチドの間の遺伝情報の交換のプロセスを指す。この開示に関して、「相同組換え（ＨＲ）」は、例えば、細胞内の二本鎖切断の修復中に行われる、そのような交換の特殊な形態を指す。このプロセスは、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を経験するもの）のテンプレート修復に「ドナー」分子を使用し、かつ、それがドナーから標的への遺伝子情報の移動をもたらすため、「非交差遺伝子変換」または「ショートトラクト遺伝子変換」としてさまざまな名称で公知である。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、そのような移動は、切断された標的とドナーとの間に形成されるヘテロ二重鎖ＤＮＡのミスマッチ修正、および／または、標的の一部になる遺伝子情報を再合成するためにドナーが使用される、「合成依存性鎖アニーリング」、および／または関連プロセスを伴う可能性がある。そのような特殊なＨＲは、しばしば、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部またはすべてが、標的ポリヌクレオチド内に組み込まれるような、標的分子の配列の変化をもたらす。

【００３７】

「開裂」は、ＤＮＡ分子の共有結合主鎖の切断を指す。開裂は、リン酸ジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を含むが、それらに限定されない、種々の方法によって開始される可能性がある。一本鎖開裂および二本鎖開裂の両方が考えられ、二本鎖開裂は、２つの異なる一本鎖開裂事象の結果として生じる可能性がある。ＤＮＡ開裂は、平滑末端または互い違いの末端のいずれかの産生をもたらす可能性がある。ある実施形態では、融合ポリペプチドは、標的二本鎖ＤＮＡ開裂に使用される。

【００３８】
「開裂ハーフドメイン」は、第２のポリペプチド（同一または異なる）と共同して、開裂活性（好ましくは、二本鎖開裂活性）を有する複合体を形成するポリペプチド配列である。「第１および第２の開裂ハーフドメイン」、「＋および－開裂ハーフドメイン」、および「右および左開裂ハーフドメイン」という用語は、二量体化する開裂ハーフドメインの対を指すために、互換的に使用される。
【００３９】
「改変開裂ハーフドメイン」は、別の開裂ハーフドメイン（例えば、別の改変開裂ハーフドメイン）を用いて偏性ヘテロ二量体を形成するように、修飾されている開裂ハーフドメインである。米国特許公開第２００５００６４４７４号および同２００６０１８８９８７号、ならびに米国仮出願６０／８０８，４８６号（２００６年５月２５日出願）もまた参照されたく、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。
【００４０】
「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主に、ＤＮＡ、ならびにタンパク質（ヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含む）を含む。真核性細胞クロマチンの大半は、ヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、それぞれ２つのヒストンＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３およびＨ４を含む八量体と会合した約１５０塩基対のＤＮＡを含み、（有機体によって異なる長さの）リンカーＤＮＡは、ヌクレオソームコアの間に延在する。１分子のヒストンＨ１は、一般に、リンカーＤＮＡと会合している。本開示に関して、「クロマチン」という用語は、すべての種類の細胞核タンパク質、原核および真核の両方を含有することを意味する。細胞クロマチンは、染色体クロマチンおよびエピソームクロマチンの両方を含む。
【００４１】
「染色体」は、細胞のゲノムのすべてまたは一部分を含む、クロマチン複合体である。細胞のゲノムは、しばしば、細胞のゲノムを含む染色体すべての集合であるその核型を特徴とする。細胞のゲノムは、１つもしくは複数の染色体を含むことができる。
【００４２】
「エピソーム」は、細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む、複製する核酸、核タンパク質複合体、または他の構造である。エピソームの例は、プラスミドおよびあるウイルスゲノムを含む。
【００４３】
「到達可能領域」は、核酸内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って結合され得る、細胞クロマチン内の部位である。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、到達可能領域は、ヌクレオソーム構造にパッケージングされないものと考えられる。到達可能領域の独自の構造は、それ自体の、化学的および酵素的プローブ、例えば、ヌクレアーゼへの感受性によって、しばしば検出され得る。
【００４４】
「標的部位」または「標的配列」は、結合するための十分な条件が存在する時に、結合分子が結合する核酸の一部分を画定する、核酸配列である。例えば、配列５′－ＧＡＡＴＴＣ－３′は、Ｅｃｏ　ＲＩ制限エンドヌクレアーゼの標的部位である。
【００４５】
「外因性」分子は、通常は細胞内に存在しないが、１つもしくは複数の遺伝学的方法、生化学的方法、または他の方法によって、細胞中に導入することができる分子である。「通常は細胞内に存在」は、細胞の特定の発生段階および環境条件に関して判定される。したがって、例えば、筋の胚発生中のみに存在する分子は、成体筋細胞については外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘発される分子は、非熱ショック細胞については外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全型内因性分子の機能型、または正常機能型内因性分子の機能不全型を含むことができる。
【００４６】
外因性分子は、とりわけ、コンビナトリアル化学プロセスによって生成されるもの等の

小分子か、またはタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上記の分子の任意の修飾誘導体、または１つもしくは複数の上記の分子を含む任意の複合体等の高分子である可能性がある。核酸は、ＤＮＡおよびＲＮＡを含み、一本鎖または二本鎖である可能性があり、線状、分岐状、または環状である可能性があり、任意の長さである可能性がある。核酸は、二重鎖を形成することが可能な核酸ならびに三重鎖形成核酸を含む。例えば、米国特許第５，１７６，９９６号、および同第５，４２２，２５１号を参照されたい。タンパク質は、ＤＮＡ結合タンパク質、転写因子、クロマチン再構成因子、メチル化ＤＮＡ結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、およびヘリカーゼを含むが、それらに限定されない。

【００４７】

外因性分子は、内因性分子と同一の種類、例えば、外因性タンパク質または核酸である可能性がある。例えば、外因性核酸は、感染ウイルスゲノム、細胞内に導入されたプラスミドもしくはエピソーム、または細胞内に通常存在しない染色体を含むことができる。細胞内への外因性分子の導入のための方法は、当業者に公知であり、脂質媒介導入（すなわち、中性および陽イオン性脂肪を含む、リポソーム）、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、粒子衝撃、リン酸カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン－媒介導入、およびウイルスベクター媒介導入を含むが、それらに限定されない。

【００４８】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下で、特定の発生段階にある特定の細胞中に通常存在するものである。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、クロロプラスト、もしくは他の細胞小器官のゲノム、または天然に存在するエピソーム核酸含むことができる。付加的な内因性分子は、タンパク質、例えば、転写因子および酵素を含むことができる。

【００４９】

「融合」分子は、２つもしくはそれ以上のサブユニット分子が、好ましくは共有結合的に連結された分子である。サブユニット分子は、同一の化学型分子である可能性がある、または異なる化学型分子である可能性がある。第１の種類の融合分子の例は、融合タンパク質（例えば、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメインと開裂ドメインとの間の融合物）および融合核酸（例えば、上述の融合タンパク質をコードする核酸）を含むが、それらに限定されない。第２の種類の融合分子の例は、三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝統合剤と核酸との間の融合物を含むが、それらに限定されない。

【００５０】

細胞における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から、または細胞内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って、生じる可能性があり、ポリヌクレオチドは、融合タンパク質を生成するために、転写され、転写物が翻訳される。トランススプライシングポリペプチド開裂およびポリペプチドライゲーションはまた、細胞内のタンパク質の発現に関与することができる。細胞へのポリヌクレオチドおよびポリペプチド送達の方法については、本開示の他所に提示する。

【００５１】

本開示に関して、「遺伝子」は、そのような調節配列がコード配列および／または転写配列に隣接するか否かに関わらず、遺伝子産物（以下を参照）をコードするＤＮＡ領域、ならびに遺伝子産物の産生を調節するすべてのＤＮＡ領域を含む。故に、遺伝子は、プロモータ配列、ターミネータ、翻訳調節配列（リボソーム結合部位および内部リボソーム侵入部位等）、エンハンサ、サイレンサ、絶縁体、境界要素、複製起点、マトリックス付着部位、および遺伝子座制御領域を含むが、必ずしもそれらに限定されない。

【００５２】

「遺伝子発現」は、遺伝子内に含まれる情報の、遺伝子産物内への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（例えば、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、アンチセンス

ＲＮＡ、リボソーム、構造ＲＮＡ、または任意の他の種類のＲＮＡ）、またはｍＲＮＡの翻訳によって産生されるタンパク質である可能性がある。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、および編集等のプロセスによって修飾されたＲＮＡ、および、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、ミリスチン化、およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質を含む。

【００５３】

遺伝子発現の「調整」は、遺伝子活性の変化を指す。発現の調整は、遺伝子活性化および遺伝子抑制を含むことができるが、それらに限定されない。

【００５４】

「真核性」細胞は、真菌細胞（酵母など）、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞（例えば、Ｔ細胞）を含むが、それらに限定されない。

【００５５】

「対象領域」は、例えば、その中で外因性分子を結合することが望まれる、遺伝子または遺伝子内の、またはそれに隣接する非コード配列等の細胞クロマチンの任意の領域である。結合の目的は、標的ＤＮＡ開裂および／または標的組換えである。対象領域は、例えば、染色体、エピソーム、細胞小器官ゲノム（例えば、ミトコンドリア、クロロプラスト）、または感染ウイルスゲノム内に存在することができる。対象領域は、遺伝子のコード領域内、例えば、リーダー配列、トレーラー配列、またはイントロン等の転写された非コード領域内、またはコード領域の上流または下流のいずれかの非転写領域内である可能性がある。対象領域は、１ヌクレオチド対ほど小さいか、または最大２，０００ヌクレオチド長、またはヌクレオチド対の任意の整数値である可能性がある。

【００５６】

「動作的に連結（ｏｐｅｒａｔｉｖｅ　ｌｉｎｋａｇｅ）」および「動作的に連結（ｏｐｅｒａｔｉｖｅｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」（または「動作可能に連結（ｏｐｅｒａｂｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」という用語は、構成要素が、両方の構成要素が正常に機能し、構成要素のうちの少なくとも１つが他の構成要素のうちの少なくとも１つの上に発揮される機能を媒介することが可能な状態を許すような形で配置される、２つもしくはそれ以上の構成要素（配列要素等）の並列を指し、互換的に使用される。例証として、プロモータ等の転写調節配列は、転写調節配列が、１つもしくは複数の転写調節因子の存在または不在に応じて、コード配列の転写レベルを制御する場合に、コード配列に動作的に連結される。転写調節配列は、一般に、コード配列で、シスに、直接動作的に連結されるが、それに直接隣接している必要はない。例えば、エンハンサは、それらが連続していなくても、コード配列に動作的に連結される転写調節配列である。

【００５７】

融合ポリペプチドに関して言えば、「動作的に連結」という用語は、構成要素のそれぞれが、動作的に連結されていない場合に果たすであろう機能と同一の機能を、他の構成要素に連動して実行するという事実を指すことができる。例えば、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメインが開裂ドメインに融合されている融合ポリペプチドに関して言えば、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメインおよび開裂ドメインは、融合ポリペプチドにおいて、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメイン部分が、その標的部位および／またはその結合部位に結合することが可能であり、開裂ドメインが、標的部位の近傍でＤＮＡを開裂することが可能である場合に、動作的連結状態にある。

【００５８】

タンパク質、ポリペプチド、または核酸の「機能的断片」は、その配列が、完全長タンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一ではないが、完全長タンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一の機能を保持するタンパク質、ポリペプチド、または核酸である。機能的断片は、対応する天然分子より多い、少ない、または同数の残基を有することができ、および／または１つもしくは複数のアミノ酸またはヌクレオチド置換を含むことができる。核酸の機能（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力）を判定するための方法は、当該技術において周知である。同様に、タンパク質の機能を判定するため

の方法は、周知である。例えば、ポリペプチドのＤＮＡ結合機能は、例えば、フィルター結合アッセイ、電気泳動移動度のシフトアッセイ、または免疫沈降アッセイによって判定することができる。ＤＮＡ開裂は、ゲル電気泳動によって評価することができる。上記のＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，を参照されたい。別のタンパク質と相互作用するタンパク質の能力は、例えば、免疫共沈降、２ハイブリッドアッセイまたは相補性（遺伝子的または生化学的の両方）によって判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、およびＰＣＴ国際公開第ＷＯ９８／４４３５０号を参照されたい。

【００５９】

亜鉛フィンガーヌクレアーゼおよび亜鉛フィンガー転写因子

ＣＸＣＲ４遺伝子の発現の不活性化および／または調製のために使用することのできる、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）および亜鉛フィンガー転写因子（ＺＦ－ＴＦ）を、本明細書に説明する。ＺＦＮは、亜鉛フィンガータンパク質（ＺＦＰ）およびヌクレアーゼ（開裂）ドメインを含む。ＺＦ－ＴＦは、亜鉛フィンガータンパク質（ＺＦＰ）および機能的な転写制御ドメインを含む。

【００６０】

Ａ．亜鉛フィンガータンパク質

亜鉛フィンガー結合ドメインは、選択される配列に結合するように改変することができる。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を参照されたい。改変された亜鉛フィンガー結合ドメインは、天然に存在する亜鉛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。改変方法は、合理的設計および種々の種類の選択を含むが、それらに限定されない。合理的設計は、例えば、三重項（または四重項）ヌクレオチド配列、および個々の亜鉛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、各三重項または四重項ヌクレオチド配列は、特定の三重項または四重項配列を結合する、亜鉛フィンガーの１つもしくは複数のアミノ酸配列と会合する。例えば、参照することによってその全体が組み込まれる、共同所有の米国特許第６，４５３，２４２号および６，５３４，２６１号を参照されたい。

【００６１】

ファージ提示法および２ハイブリッドシステムを含む、例示的選択方法は、米国特許第５，７８９，５３８号、同第５，９２５，５２３号、同第６，００７，９８８号、同第６，０１３，４５３号、同第６，４１０，２４８号、同第６，１４０，４６６号、同第６，２００，７５９号、および同第６，２４２，５６８号、ならびに、国際公開第ＷＯ９８／３７１８６号、同第ＷＯ９８／５３０５７号、同第ＷＯ００／２７８７８号、同第ＷＯ０１／８８１９７号、および英国特許第２，３３８，２３７号に開示されている。

【００６２】

亜鉛フィンガー結合ドメインに対する結合特異性の向上は、例えば、共同所有の国際公開第０２／０７７２２７号に説明されている。

【００６３】

標的部位の選択、融合タンパク質の設計と構成（およびポリヌクレオチドによるコード）のためのＺＦＰおよび方法は、当業者には公知であり、米国特許第２００３０２３２４１０号、同第２００５０２０８４８９号、同第２００５０６４４７４号、同第２００５００２６１５７号、同第２００６０１８８９８７号、国際公開第ＷＯ０７／０１４２７５号、米国特許出願第１０／５８７，７２３号（２００６年７月２７日出願）、同第１１／４９３，４２３号（２００６年７月２６日出願）に関連して詳細に記載されており、それらの開示は、すべての目的のために参照によりその全体が組み込まれる。

【００６４】
本明細書に説明する亜鉛フィンガータンパク質は、ＣＸＣＲ４遺伝子内の標的部位に結合する。ヒトＣＸＣＲ４遺伝子内のヌクレオチド配列に結合するために改変された、複数の亜鉛フィンガー結合ドメインを、表１（実施例１参照）に記載する。１列目に、それぞれのドメインのためのＤＮＡ標的配列を示し（ＤＮＡ標的配列を大文字で示し、未接触のヌクレオチドを小文字で示す）、２列目から５列目に、タンパク質内の各亜鉛フィンガー（Ｆ１からＦ４またはＦ５）の認識領域のアミノ酸配列（ヘリックスの開始に関して、アミノ酸－１から＋６）を示す。１列目には、各タンパク質について、認識番号も提供する。

【００６５】
下記に説明するように、ある特定の実施形態では、表１に示される４、５フィンガー結合ドメインは、機能ドメインに融合される。機能ドメインは、例えば、活性化ドメイン、または、例えば、ＦｏｋＩ等のＩＩ型制限エンドヌクレアーゼの開裂ドメイン等の開裂ハーフドメインである。そのような亜鉛フィンガー／ヌクレアーゼハーフドメイン融合の対は、例えば、米国特許公開第２００５００６４４７４号（出願番号第１０／９１２，９３２号）に開示される、標的開裂のために使用される。

【００６６】
ＺＦＮを使用する標的開裂では、結合部位の近傍端は、５もしくはそれ以上のヌクレオチド対によって分離することができ、融合タンパク質のそれぞれは、ＤＮＡ標的の反対側の鎖に結合することができる。

【００６７】
本明細書に説明するＣＸＣＲ４－ＺＦＰは、いずれのＣＸＣＲ４ゲノム配列中のいずれの配列も標的とすることができる。

【００６８】
Ｂ．開裂ドメイン
ある実施形態では、ＺＦＰおよびＺＦＮは、ヌクレアーゼ（開裂ドメイン、開裂ハーフドメイン）を含む。本明細書に開示する、融合タンパク質の開裂ドメイン部分は、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから取得することができる。開裂ドメインがそこから得ることができる例示的エンドヌクレアーゼは、制限エンドヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼを含むが、それらに限定されない。例えば、２００２－２００３ Ｃａｔａｌｏｇｕｅ，Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ、およびＢｅｌｆｏｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．２５：３３７９～３３８８を参照されたい。ＤＮＡを開裂する付加的な酵素は、公知である（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ、マングビーンヌクレアーゼ、膵ＤＮａｓｅＩ、ミクロコッカスヌクレアーゼ、酵母菌ＨＯエンドヌクレアーゼ、Ｌｉｎｎ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ）Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９３も参照）。これらの酵素（またはその機能的断片）のうちの１つもしくは複数は、開裂ドメインおよび開裂ハーフドメインの源として使用することができる。

【００６９】
同様に、上記に説明するように、開裂ハーフドメインは、開裂活性のために二量体化を必要とする、任意のヌクレアーゼまたはその部分から得ることができる。一般に、融合タンパク質が開裂ハーフドメインを含む場合には、２つの融合タンパク質が開裂に必要とされる。代替的には、２つの開裂ハーフドメインを含む、単一のタンパク質を使用することができる。２つの開裂ハーフドメインは、同一のエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）から得ることができるか、または各開裂ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）から得ることができる。加えて、２つの融合タンパク質のための標的部位は、それらの各標的部位への２つの融合タンパク質の結合が、互いに対して空間的配向に開裂ハーフドメインを定置し、例えば、二量体化することによって、開裂ハーフドメインに機能的開裂ドメインを形成させるように、互いに対して、好ましくは配

置される。したがって、ある実施形態では、標的部位の近傍端は、５～８個のヌクレオチドによって、または１５～１８個のヌクレオチドによって分離される。しかしながら、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対は、２つの標的部位（例えば、２～５０対もしくは複数のヌクレオチド）の間に介入することができる。一般に、開裂部位は、標的部位の間に位置する。

【００７０】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は、多くの種に存在し、（認識部位において）ＤＮＡへの配列特異性結合、および結合部位において、またはその近傍でＤＮＡの開裂が可能である。ある制限酵素（例えば、ＩＩＳ型）は、認識部位から除去された部位でＤＮＡを開裂し、別個の結合および開裂ドメインを有する。例えば、ＩＩＳ型酵素ＦｏｋＩは、一方の鎖上のその認識部位から９番目のヌクレオチド、および他方上のその認識部位から１３番目のヌクレオチドにおいて、ＤＮＡの二本鎖開裂を触媒する。例えば、米国特許第５，３５６，８０２号、同第５，４３６，１５０号、および同第５，４８７，９９４号、ならびに、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：４２７５～４２７９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：２７６４～２７６８、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９４ａ）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９１：８８３～８８７、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９４ｂ）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：３１，９７８～３１，９８２を参照されたい。したがって、一実施形態では、融合タンパク質は、改変されてもよく、または改変されなくてもよい、少なくとも１つのＩＩＳ型制限酵素および１つもしくは複数の亜鉛フィンガー結合ドメインからの開裂ドメイン（または開裂ハーフドメイン）を含む。

【００７１】

その開裂ドメインが結合ドメインから分離される、例示的ＩＩＳ型制限酵素は、ＦｏｋＩである。この特定の酵素は、二量体として活性である（Ｂｉｔｉｎａｉｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９５：１０，５７０～１０，５７５）。故に、本開示については、開示した融合タンパク質に使用するＦｏｋＩ酵素の部分は、開裂ハーフドメインと見なされる。したがって、亜鉛フィンガーとＦｏｋＩの融合物を使用する細胞配列の標的二本鎖開裂および／または標的置換では、ＦｏｋＩ開裂ハーフドメインをそれぞれ含む２つの融合タンパク質を、触媒的に活性開裂ドメインを再構成するために使用することができる。代替的には、亜鉛フィンガー結合ドメインおよび２つのＦｏｋＩ開裂ハーフドメインを含む、単一のポリペプチド分子もまた、使用することができる。亜鉛フィンガーとＦｏｋＩの融合物を使用する標的開裂および標的配列変異のためのパラメータを、本開示の他所において提供する。

【００７２】

開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインは、開裂活性を保持する、または機能的開裂ドメインを形成するために多量体化（例えば、二量体化）する能力を保持するタンパク質の任意の部分である可能性がある。

【００７３】

例示的ＩＩＳ型制限酵素は、その全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ０７／０１４２７５号に説明されている。付加的な制限酵素はまた、分離可能な結合および開裂ドメインを含み、これらは、本開示によって検討される。例えば、Ｒｏｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：４１８～４２０を参照されたい。

【００７４】

ある実施形態では、開裂ドメインは、例えば、米国特許公開第２００５００６４４７４号、同第２００６０１８８９８７号、同第２００８０１３１９６２号に説明されるように、ホモ二量体化を最小限化する、または防止する１つもしくは複数の改変開裂ハーフドメイン（二量体ドメイン変異体とも称される）を含み、それらのすべての開示は、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。ＦｏｋＩの４４６、４４７、４７９、

４８３、４８４、４８６、４８７、４９０、４９１、４９６、４９８、４９９、５００、５３１、５３４、５３７、および５３８位におけるアミノ酸残基はすべて、ＦｏｋＩ開裂ハーフドメインの二量体化に影響を及ぼすための標的である。

【００７５】

偏性ヘテロ二量体を形成するＦｏｋＩの例示的改変開裂ハーフドメインは、一対（第１の開裂ハーフドメインが、ＦｏｋＩの４９０および５３８位でアミノ酸残基において突然変異を含み、第２の開裂ハーフドメインが、４８６および４９９位でアミノ酸残基において突然変異を含む）を含む。

【００７６】

したがって、ある実施形態では、４９０における突然変異は、Ｇｌｕ（Ｅ）をＬｙｓ（Ｋ）で置換し、５３８における突然変異は、Ｉｓｏ（Ｉ）をＬｙｓ（Ｋ）で置換し、４８６における突然変異は、Ｇｌｎ（Ｑ）をＧｌｕ（Ｅ）で置換し、４９９位における突然変異は、Ｉｓｏ（Ｉ）をＬｙｓ（Ｋ）で置換する。具体的には、本明細書に説明する改変開裂ハーフドメインは、「Ｅ４９０Ｋ：Ｉ５３８Ｋ」と指定される改変開裂ハーフドメインを産生するために、１つの開裂ハーフドメイン内の４９０位（Ｅ→Ｋ）および５３８位（Ｉ→Ｋ）を変異させることによって、および「Ｑ４８６Ｅ：Ｉ４９９Ｌ」と指定される改変開裂ハーフドメインを産生するために、別の開裂ハーフドメイン内の４８６位（Ｑ→Ｅ）および４９９位（Ｉ→Ｌ）を変異させることによって調製された。一実施形態では、４９０における突然変異は、Ｇｌｕ（Ｅ）をＬｙｓ（Ｋ）で置換し、５３８における突然変異は、Ｉｌｅ（Ｉ）をＬｙｓ（Ｋ）で置換し、５３７位における突然変異は、Ｈｉｓ（Ｈ）をＬｙｓ（Ｋ）またはＡｒｇ（Ｒ）で置換し、４８６における突然変異は、Ｇｌｎ（Ｑ）がＧｌｕ（Ｅ）で置換され、４９９位における突然変異は、Ｉｌｅ（Ｉ）をロイシン（Ｌ）で置換し、ならびに４９６における突然変異は、Ａｓｎ（Ｎ）をＡｓｐ（Ｄ）またはＧｌｕ（Ｅ）で置換する。具体的には、本明細書に説明する改変開裂ハーフドメインは、「Ｅ４９０Ｋ：Ｉ５３８Ｋ：Ｈ５３７Ｋ」（ＫＫＫ）または「Ｅ４９０Ｋ：Ｉ５３８Ｋ：Ｈ５３７Ｒ」（ＫＫＲ）指定の改変開裂ハーフドメインを産生するために、１つの開裂ハーフドメイン内の４９０位（Ｅ→Ｋ）、５３８位（Ｉ→Ｋ）、ならびに５３７位（Ｈ→ＫまたはＨ→Ｒ）を変異させることによって、および「Ｑ４８６Ｅ：Ｉ４９９Ｌ：Ｎ４９６Ｅ」（ＥＬＥ）または「Ｑ４８６Ｅ：Ｉ４９９Ｌ：Ｎ４９６Ｄ」（ＥＬＤ）指定の別の改変開裂ハーフドメインを産生するために、別の開裂ハーフドメイン内の４８６位（Ｑ→Ｅ）、４９９位（Ｉ→Ｌ）、ならびに４９６位（Ｎ→ＤまたはＮ→Ｅ）を変位させることによって調製された。本明細書に説明する改変開裂ハーフドメインは、異常な開裂が最小限化されるか、または廃止される、偏性ヘテロ二量体突然変異体である。例えば、米国特許公開第２００８／０１３１９６２号の実施例１を参照されたく、その開示は、すべての目的のために参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。また、米国特許仮出願第６１／３３７，７６９号も参照されたい。また、Ｓｚｃｚｅｐｅｋ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２５：７８６－７９３も参照されたい。

【００７７】

本明細書に説明する改変開裂ハーフドメインは、任意の好適な方法を使用して、例えば、米国特許公開第２００５００６４４７４号および同第２００８０１３１９６２号に説明する、野生型開裂ハーフドメイン（ＦｏｋＩ）の部位特異的突然変異誘発法によって調製することができる。

【００７８】

他の実施形態では、開裂ドメインは、天然に存在する、または改変されたメガヌクレアーゼ開裂ドメインを含む。例えば、適合ＤＮＡ結合特異性への、ホーミングエンドヌクレアーゼの改変は、説明されており、Ｃｈａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ３３（２０）：ｅ１７８、Ａｒｎｏｕｌｄ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３５５：４４３～４５８、およびＧｒｉｚｏｔ ｅｔ ａｌ（２００９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ Ｊｕｌｙ ７ｅ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎを参照されたい。さらに、ＺＦＰの改変も説明されている。例えば、米国特許

第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，８２４，９７８号、同第６，９７９，５３９号、同第６，９３３，１１３号、同第７，１６３，８２４号、および同第７，０１３，２１９号を参照されたい。

【００７９】

天然に存在するメガヌクレアーゼは、１５～４０塩基対の開裂部位を認識し、一般に、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリー、ＧＩＹ－ＹＩＧファミリー、Ｈｉｓ－Ｃｙｓｔボックスファミリー、およびＨＮＨファミリーの、４つのファミリーに分類される。例示的ホーミングエンドヌクレアーゼは、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、ＰＩ－Ｓｃｅ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、およびＩ－ＴｅｖＩＩＩを含む。それらの認識配列は、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、およびＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓカタログも参照されたい。

【００８０】

主に、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリーの、天然に存在するメガヌクレアーゼからのＤＮＡ結合ドメインは、植物、酵母、ショウジョウバエ、哺乳類細胞、およびマウスの部位特異的ゲノム修飾を促進するために使用されてきたが、この手法は、メガヌクレアーゼ認識配列を保存する相同遺伝子（Ｍｏｎｅｔ ｅｔ ａｌ．（１９９９），Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｏｎ．２５５：８８～９３）、または、認識配列が導入された、あらかじめ改変されたゲノム（Ｒｏｕｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９４），Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１４：８０９６～１０６、Ｃｈｉｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００３），Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ．１３３：９５６～６５、Ｐｕｃｈｔａ ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９３：５０５５～６０、Ｒｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１６：１５６８～８１、Ｇｏｕｂｌｅ ｅｔ ａｌ．（２００６），Ｊ．Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．８（５）：６１６～６２２）のいずれかの修飾に限られている。故に、医学的または生物学的に関連する場において、メガヌクレアーゼを改変して、新規な結合の特異性を呈する試みがなされてきた（Ｐｏｒｔｅｕｓ ｅｔ ａｌ．（２００５）、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：９６７～７３、Ｓｕｓｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２００４），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３４２：３１～４１、Ｅｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．（２００３），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１： ２９５２～６２、Ｃｈｅｖａｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ１０：８９５～９０５、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、米国特許公開第２００７０１１７１２８号、同第２００６０２０６９４９号、同第２００６０１５３８２６号、同第２００６００７８５５２号、および同第２００４０００２０９２号）。さらに、メガヌクレアーゼからの、天然に存在する、または改変されたＤＮＡ結合ドメインはまた、非相同のヌクレアーゼ（例えば、ＦｏｋＩ）からの開裂ドメインに、動作可能に結合されている。

【００８１】

Ｃ．付加的亜鉛フィンガー融合タンパク質

別の実施形態において、本明細書に説明するＤＮＡ結合タンパク質（例えば、ＺＦＰ）および非相同の調整（機能）ドメイン（または、その機能的断片）を含む融合タンパク質

も提供する。共通ドメインは、例えば、転写因子ドメイン（活性化因子、リプレッサー、活性化補助因子、補リプレッサー）、サイレンサ、癌遺伝子（例えば、ｍｙｃ、ｕｎ、ｆｏｓ、ｍｙｂ、ｍａｘ、ｍａｄ、ｒｅｌ、ｅｔｓ、ｂｃｌ、ｍｙｂ、ｍｏｓファミリーメンバー等）、ＤＮＡ修復酵素およびそれらに関連した因子と修飾因子、クロマチン結合タンパク質およびそれらの修飾因子（例えば、キナーゼ、アセチラーゼ、およびデアセチラーゼ）、ならびにＤＮＡ修飾酵素（例えば、メチルトランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ）およびそれらの関連した因子と修飾因子を含む。ＤＮＡ結合ドメインおよびヌクレアーゼ開裂ドメインの融合についての詳細は、米国特許出願公開第２００５００６４４７４号、同第００６０１８８９８７号、および同第２００７／０２１８５２８号を参照されたく、それらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００８２】

活性化を達成するための好適なドメインは、ＨＳＶ ＶＰ１６活性化ドメイン（例えば、Ｈａｇｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７１，５９５２～５９６２（１９９７）参照）、核ホルモン受容体（例えば、Ｔｏｒｃｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０：３７３～３８３（１９９８）参照）、核因子カッパＢのｐ６５サブユニット（Ｂｉｔｋｏ＆ Ｂａｒｉｋ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：５６１０～５６１８（１９９８）およびＤｏｙｌｅ＆Ｈｕｎｔ，Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ ８：２９３７～２９４２（１９９７））、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：３～２８（１９９８））、またはＶＰ６４（Ｂｅｅｒｌｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：１４６２３～３３）等の人工キメラの機能ドメイン、およびデグロン（Ｍｏｌｉｎａｒｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）ＥＭＢＯ Ｊ．１８，６４３９～６４４７）を含む。付加的な例示的活性化ドメインは、Ｏｃｔ１、Ｏｃｔ－２Ａ、Ｓｐ１、ＡＰ－２、およびＣＴＦ１（Ｓｅｉｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１１，４９６１～４９６８（１９９２）ならびにｐ３００、ＣＢＰ、ＰＣＡＦ、ＳＲＣ１ＰｖＡＬＦ、ＡｔＨＤ２Ａ、およびＥＲＦ－２を含む。例えば、Ｒｏｂｙｒ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１４：３２９～３４７、Ｃｏｌｌｉｎｇｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２３：２５５～２７５、Ｌｅｏ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｇｅｎｅ ２４５：１～１１、Ｍａｎｔｅｕｆｆｅｌ－Ｃｙｍｂｏｒｏｗｓｋａ（１９９９）Ａｃｔａ Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｐｏｌ．４６：７７～８９、ＭｃＫｅｎｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｓｔｅｒｏｉｄ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．６９：３～１２、Ｍａｌｉｋ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．２５：２７７～２８３、およびＬｅｍｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．９：４９９～５０４を参照されたい。付加的な例示的活性化ドメインは、ＯｓＧＡＩ、ＨＡＬＦ－１、Ｃ１、ＡＰ１、ＡＲＦ－５、－６、－７、および－８，ＣＰＲＦ１、ＣＰＲＦ４、ＭＹＣ－ＲＰ／ＧＰ、ならびにＴＲＡＢ１を含むが、それらに限定されない。例えば、Ｏｇａｗａ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｇｅｎｅ ２４５：２１～２９、Ｏｋａｎａｍｉ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｇｅｎｅｓ Ｃｅｌｌｓ １：８７～９９、Ｇｏｆｆ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．５：２９８～３０９、Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４０：４１９～４２９、Ｕｌｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：５８４４～５８４９、Ｓｐｒｅｎｇｅｒ－Ｈａｕｓｓｅｌｓ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｊ．２２：１～８、Ｇｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４１：３３～４４、およびＨｏｂｏ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：１５，３４８～１５，３５３を参照されたい。

【００８３】

ＤＮＡ結合ドメイン（ＺＦＰ）と機能ドメインとの間の、融合タンパク質（または、上述の融合タンパク質をコードする核酸）の形成では、活性化ドメイン、または活性化ドメ

インと相互作用する分子のいずれかが、機能ドメインとして好適であることが、当業者には明らかとなるであろう。実質的に、標的遺伝子に、活性化複合体および／または活性化作用（例えば、ヒストンのアセチル化等）を採用することのできる任意の分子は、融合タンパク質の活性化ドメインとして有用である。絶縁ドメイン（ｉｎｓｕｌａｔｏｒ ｄｏｍａｉｎ）、局在化ドメイン、ならびに、融合分子の機能ドメインとして使用するのに好適である、ＩＳＷＩ含有ドメインおよび／またはメチル結合ドメインタンパク質等のクロマチン再構築タンパク質は、例えば、共同所有の米国特許出願第２００２／０１１５２１５号および同第２００３／００８２５５２号、ならびに共同所有の国際公開第ＷＯ０２／４４３７６号に記載されている。

【００８４】

例示的な抑制ドメインは、ＫＲＡＢ Ａ／Ｂ、ＫＯＸ、ＴＧＦβ誘導初期遺伝子（ＴＩＥＧ）、ｖ－ｅｒｂＡ、ＳＩＤ、ＭＢＤ２、ＭＢＤ３、ＤＮＭＴファミリーのメンバー（例えば、ＤＮＭＴ１、ＤＮＭＴ３Ａ、ＤＮＭＴ３Ｂ）、Ｒｂ、およびＭｅＣＰ２を含むが、それらに限定されない。例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ ９９：４５１～４５４、Ｔｙｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ ９９：４４３～４４６、Ｋｎｏｅｐｆｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ ９９：４４７～４５０、およびＲｏｂｅｒｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．２５：３３８～３４２を参照されたい。付加的な、例示的な抑制ドメインは、ＲＯＭ２およびＡｔＨＤ２Ａを含むが、それらに限定されない。例えば、Ｃｈｅｍ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ８：３０５～３２１、およびＷｕ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｊ．２２：１９～２７を参照されたい。

【００８５】

融合分子は、当業者には周知の、クローン化および生化学的な複合化の方法によって構築される。融合分子は、ＤＮＡ結合ドメインおよび機能ドメイン（例えば、転写活性化ドメインまたは抑制ドメイン）を含む。融合分子はまた、核局在化シグナル（例えば、ＳＶ４０中型Ｔ抗原からのもの等）およびエピトープ標識（例えば、ＦＬＡＧおよび血球凝集素等）を任意に含む場合もある。融合タンパク質（および上述の融合タンパク質をコードする核酸）は、翻訳リーディングフレームが融合物の構成要素の中に保たれるように設計される。

【００８６】

一方に、機能ドメイン（または、その機能断片）を含み、かつ他方に、非タンパク質ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、抗生剤、挿入剤、小溝結合剤、核酸）を含むポリペプチド成分の間の融合物は、当業者に知られている生化学的な複合化の方法で構築される。例えば、ｔｈｅ Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）Ｃａｔａｌｏｇｕｅを参照されたい。小溝結合剤とポリペプチドとの間の融合物を作製するための方法および組成物は、Ｍａｐｐ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：３９３０～３９３５に説明される。

【００８７】

ある特定の実施形態では、亜鉛フィンガータンパク質に結合される標的部位は、クロマチン細胞の到達可能領域に存在する。到達可能領域は、例えば、共同所有の国際公開第ＷＯ０１／８３７３２号に記載されているようにして判定することができる。クロマチン細胞の到達可能領域内に標的部位が存在しない場合は、共同所有の国際公開第ＷＯ０１／８３７９３に記載されているようにして、１つまたは複数の到達可能領域を生成することができる。付加的な実施形態では、融合分子のＤＮＡ結合ドメインは、その標的部位が到達可能領域内にあるか否かにかかわらず、クロマチン細胞に結合することができる。例えば、そのようなＤＮＡ結合ドメインは、リンカーＤＮＡおよび／またはヌクレオソームＤＮＡに結合することができる。このタイプの「パイオニア（ｐｉｏｎｅｅｒ）」ＤＮＡ結合ドメインの例は、特定のステロイド受容体内および幹細胞核因子３（ＨＮＦ３）内に見られる。Ｃｏｒｄｉｎｇｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｃｅｌｌ ４８：２６１～２７０、Ｐｉｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｃｅｌｌ ６０：７１９～７３１、およびＣｉ

ｒｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ．（１９９８）ＥＭＢＯ Ｊ．１７：２４４～２５４。

【００８８】

融合分子は、当業者には知られているとおり、薬学的に許容されるキャリアで配合することができる。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ ｅｄ．，１９８５、および共同所有の国際公開第ＷＯ００／４２２１９号を参照されたい。

【００８９】

融合分子の機能構成要素／ドメインは、融合分子が遺伝子のＤＮＡ結合ドメインを介して標的配列に結合すると、遺伝子の転写に影響を及ぼすことのできる、任意のさまざまな異なる構成要素から選択することができる。したがって、機能構成要素は、活性化因子、リプレッサー、活性化補助因子、補リプレッサー、およびサイレンサ等の、さまざまな転写因子ドメインを含むが、それらに限定されない。

【００９０】

付加的な、例示的機能ドメインは、例えば、共同所有の米国特許第６，５３４，２６１号および米国特許出願公開第２００２／０１６０９４０号に開示されている。

【００９１】

外因性小分子またはリガンドによって調節される機能ドメインも、選択することができる。例えば、機能ドメインが、外部ＲｈｅｏＣｈｅｍ（登録商標）リガンドの存在下のみ、活性立体配座をとるＲｈｅｏＳｗｉｔｃｈ（登録商標）技術を採用することができる（例えば、米国特許第２００９０１３６４６５号参照）。そのようにして、ＺＦＰは、調節可能な機能ドメインに動作可能に連結することができ、ＺＦ－ＴＦの、結果として得られる活性は、外部リガンドによって制御される。

【００９２】

Ｄ．ＣＸＣＲ４の標的修飾のための付加的方法

本明細書に開示する方法では、任意のヌクレアーゼを使用することができる。例えば、天然に存在するホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼは、非常に長い認識配列を有し、そのいくつかは、統計的基礎において、ヒトサイズのゲノム内に一度存在する可能性が高い。例示的ホーミングエンドヌクレアーゼは、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、ＰＩ－Ｓｃｅ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、およびＩ－ＴｅｖＩＩＩを含む。それらの認識配列は、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、およびｔｈｅ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ ｃａｔａｌｏｇｕｅも参照されたい。

【００９３】

ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼの特異性は、天然に存在しない標的部位に結合するように改変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を参照されたい。

【００９４】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、植物病原菌のキサントモナスから得

られるＴＡＬエフェクタからの改変ドメインである（Ｂｏｃｈ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００９　Ｄｅｃ　１１；３２６（５９５９）：１５０９～１２．およびＭｏｓｃｏｕ　ａｎｄ　Ｂｏｇｄａｎｏｖｅ，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００９　Ｄｅｃ　１１；３２６（５９５９）：１５０１を参照）。

【００９５】

したがって、一意の標的部位を有する、任意の、天然に存在するヌクレアーゼまたは改変ヌクレアーゼは、系統特異的レポーターを肝細胞内へ、等の配列の標的組み込みのための亜鉛フィンガーヌクレアーゼの代わりとして、または、亜鉛フィンガーヌクレアーゼに追加して使用することができる。さらに、これらの天然に存在するヌクレアーゼまたは改変ヌクレアーゼのドメインは、単離してさまざまな組み合わせで使用することもできる。例えば、天然に存在するホーミングエンドヌクレアーゼ、天然に存在するメガヌクレアーゼ、改変ホーミングエンドヌクレアーゼ、または改変メガヌクレアーゼからのＤＮＡ結合ドメインは、非相同の開裂ドメインまたはハーフドメイン（例えば、別のホーミングエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはＩＩＳ型エンドヌクレアーゼからの）に融合することができる。これらの融合タンパク質は、上述の亜鉛フィンガーヌクレアーゼとの組み合わせで使用することもできる。

【００９６】

送達

本明細書に説明するＺＦＮは、任意の好適な手段によって、ＣＸＣＲ４遺伝子を含む標的細胞に送達することができる。亜鉛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、同第６，５０３，７１７号、同第６，５３４，２６１号、同第６，５９９，６９２号、同第６，６０７，８８２号、同第６，６８９，５５８号、同第６，８２４，９７８号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、および同第７，１６３，８２４号に記載されており、それらの開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００９７】

本明細書に説明するＺＦＮはまた、１つまたは複数のＺＦＮをコードする配列を含むベクターを使用して送達することもできる。プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター等を含むが、それらに限定されない、任意のベクター系を使用することができる。また、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，８２４，９７８号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、および同第７，１６３，８２４号も参照されたい。

【００９８】

ある特定の実施形態では、ベクターはアデノウイルスベクターである。本出願で使用することのできる、Ａｄベクターの非制限的な例は、組換え（Ｅ１欠失等）、選択的に増殖する成分（腫瘍溶解性等）および／またはヒトもしくはヒト以外の血清型由来の増殖コンピテントＡｄベクター（例えば、Ａｄ５、Ａｄ１１、Ａｄ３５、または豚アデノウイルス－３）、および／またはキメラＡｄベクター（Ａｄ５／Ｆ３５等）もしくは改変ファイバー（ノブまたはシャフト等）タンパク質の指向性変異Ａｄベクター（ノブタンパク質のＨＩループ内へのペプチド挿入）を含む。同様に有用なのは、免疫原性を低減し、かつＤＮＡペイロードの大きさを増大させるために、すべてのアデノウイルス遺伝子が除去された「ガッドレス（ｇｕｔｌｅｓｓ）」Ａｄベクターである。これは、例えば、ＺＦＮおよびドナー配列をコードする配列を同時に送達することを可能にする。そのようなガットレスベクターは、ドナー配列が標的組み込みを介して組み込まれる大きなトランス遺伝子を含む場合に、特に有用である。

【００９９】

複製欠損組換えアデノウイルス（Ａｄ）は、高力価で産生し得、これらは、多数の異なる細胞型に容易に感染する。大半のアデノウイルスベクターは、トランス遺伝子がＡｄ

Ｅ１ａ、Ｅ１ｂ、および／またはＥ３遺伝子を置換するように改変され、次いで、複製欠損ベクターは、１つまたは複数の除去された遺伝子機能をトランス内にもたらす細胞内で増殖する。例えば、ヒト２９３細胞は、Ｅ１機能を供給する。Ａｄベクターは、肝臓内、腎臓内、および筋肉内に見られるような、分化した非分裂細胞を含む、インビボの複数の種類の組織を形質導入することができる。従来のＡｄベクターは、高い運搬能力を有する。臨床試験におけるＡｄベクターの使用の例は、筋肉内注射を用いる抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド治療に関連した（Ｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：１０８３～１０８９（１９９８））。

【０１００】

臨床試験における遺伝子導入のための、アデノウイルスベクターの使用の付加的な例は、Ｒｏｓｅｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ２４：１ ５～１０（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）を含む。

【０１０１】

ある特定の実施形態では、Ａｄベクターは、２つ以上の異なるアデノウイルスゲノムからの配列を含む、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／Ｆ３５ベクターである可能性がある。Ａｄ５／Ｆ３５は、Ａｄ５の１つまたは複数のファイバータンパク質（ノブ、シャフト、テール、ペントン）を、例えば、Ａｄ３５等のＢグループアデノウイルスからの、対応するファイバータンパク質に置換することによって作製される。Ａｄ５／Ｆ３５ベクターおよびこのベクターの特性は、例えば、Ｎｉ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １６：６６４～６７７、Ｎｉｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ９：３７７～３８８、Ｎｉｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｊ Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ ６：６３１～６４１、Ｓｃｈｒｏｅｒｓ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｅｘｐ Ｈｅｍａｔｏｌ ３２：５３６～５４６、Ｓｅｓｈｉｄｈａｒ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ３１１：３８４～３９３、Ｓｈａｙａｋｈｍｅｔｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｊ Ｖｉｒｏｌ ７４：２５６７～２５８３、およびＳｏｖａ ｅｔ ａｌ．（２００４），Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ９：４９６～５０９に説明されている。

【０１０２】

上記に記載するように、ＺＦＮおよびこれらのＺＦＮ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、遺伝子の不活性化のための細胞は、例えば、リンパ球（Ｂ細胞、ヘルパーＴ細胞（$Ｔ_{Ｈ}$）ならびに細胞傷害性Ｔ細胞（$Ｔ_{Ｃ}$）等のＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞等のヌル細胞）、単核細胞（単球、マクロファージ）、顆粒球細胞（顆粒球、好中球、好酸球、好塩基球）、マスト細胞、および／または樹枝状細胞（ランゲルハンス細胞、間質性樹状細胞、指状嵌入樹状細胞、環状樹状細胞）である。マクロファージ、Ｂリンパ球、および樹枝状細胞は、$Ｔ_{Ｈ}$細胞活性に関与する例示的な抗原提示細胞である。ある特定の実施形態では、標的細胞は$Ｔ_{Ｈ}$細胞であり、表面上のＣＤ４の発現を特徴とする。標的細胞は、任意の免疫細胞を生じさせ得る、造血幹細胞であってもよい。

【０１０３】

用途

開示した方法および組成物は、ＣＸＣＲ４ゲノム配列の不活性化のために使用することができる。上記に記載するように、不活性化は細胞内でのＣＸＣＲ４遺伝子発現の、部分的または完全な抑制を含む。ＣＸＣＲ４遺伝子の不活性化は、例えば、単一の開裂事象によって、開裂後の非相同末端連結によって、２つの開裂部位の間の配列を削除するように、２つの部位における開裂後の連結によって、コード領域内へのミスセンスまたはノンセンスコドンの標的組換えによって遺伝子または調節領域を妨害するように、遺伝子またはその調整領域内への不適切な配列（すなわち、「スタッファー」配列）の標的組換えによ

って、または、転写物のミススプライシングをもたらすために、イントロン内へのスプライス受容体配列の標的組換えによって、達成することができる。

【０１０４】

ＣＸＣＲ４のＺＦＮ媒介不活性化（ノックアウトまたはノックダウン）には、さまざまな用途がある。例えば、本明細書に説明する方法および組成物は、細胞株（治療上の使用または治療以外の使用のための）の生成および／または修飾を可能にする。通常、ヒト細胞の表面上に発現するＣＸＣＲ４遺伝子をノックアウトする能力は、共受容体機能およびＨＩＶ相互作用の研究のための機会を提供する。さらに、将来の研究は、免疫不全マウスでの研究において、主Ｔ細胞機能におけるＣＸＣＲ４遺伝子ノックアウトの結果、および、インビボのＨＩＶ－１感染に対する感受性を評価できるようになった。また、本明細書に記載する方法および組成物は、宿主のＨＩＶ感染症の治療および／または予防のために使用することができる（例えば、ＣＸＣＲ４の発現をブロックすることによって、それにより、宿主生物内における感染症および／または蔓延を予防する）。例えば、ＨＩＶ感染症の治療および／または予防のために、本発明のＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮにＣＣＲ５特異的ＺＦＮを供給して、ＣＸＣＲ４およびＣＣＲ５ＨＩＶ共受容体の両方の発現を同時に遮断する方法および組成物も、本発明によって構想される。これらの一連のＺＦＮは、個別に供給し得、または１つの送達媒体内に組み込まれてもよい。ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮおよびＣＣＲ５特異的ＺＦＮは、同時に、または個別に供給することができる。さらに、ＣＸＣＲ４は、腫瘍学および転移過程にも関係があるとされている（例えば、Ｖａｎｄｅｒｃａｐｐｅｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ Ｌｅｔｔ．２００８ Ａｕｇ ２８；２６７（２）：２２６～４４を参照）。したがって、本明細書に記載する方法および組成物は、癌および癌に関連した転移の治療においても有用である可能性がある。

【０１０５】

ＣＸＣＲ４は、骨髄内に、造血幹細胞を保持する役割を有することもでき、ＣＸＣＲ４の遮断は、末梢での幹細胞動員の増加に導き得ることが示されている（Ｆｌｏｍｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ，Ａｃｔａ Ｈａｅｍａｔｏｌ．２００５；１１４（４）：１９８～２０５を参照）。したがって、本発明の方法（例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼまたは阻害転写因子を含む融合タンパク質）は、幹細胞の、血流内に動員する能力を増加させて、体の末梢での組織損傷を修復するために使用することができる。さらに、ＣＸＣＲ４軸の遮断は、骨髄移植後に前駆細胞および成熟骨髄細胞が放出される速度を増加し得ることが示されており（Ａｂｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ，Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２００９ Ａｕｇ；２３（８）：１３７８～８８を参照）、本発明の方法もまた同様に、亜鉛フィンガータンパク質を使用してＣＸＣＲ４の発現を調整することによって、骨髄移植の成功を増加するために使用することができる。また、本発明の方法（例えば、亜鉛フィンガー刺激転写因子を含む融合タンパク質）を使用する、ＣＸＣＲ４発現の一過性のアップレギュレーションは、幹細胞の、骨髄へのホーミングを生じさせるために使用することができ、骨髄移植の初期の生着を向上させ得る。

【０１０６】

本明細書に言及したすべての特許、特許出願、および刊行物は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１０７】

より明確な理解を目的として、例証および実施例によって開示を一部詳細に提供するが、本開示の精神または範囲から逸脱することなく、種々の変更および修正を実施することができることは、当業者には明らかであろう。故に、前述の説明および以下の実施例は、制限するものと解釈されてはならない。

【実施例１】

【０１０８】

ＣＸＣＲ４標的ＺＦＮの調製

ヒト第２染色体に位置するＣＸＣＲ４遺伝子は、２つのスプライス変異をコードする、２つのエクソン、アイソフォームａおよびアイソフォームｂを有する。ＣＸＣＲ４は、主

にアイソフォームｂとして細胞上に発現する。ＣＸＣＲ４遺伝子のエクソン１の長さが、わずか１５ｂｐであるため、ＣＸＣＲ４のエクソン２を標的としたＺＦＮを、実質的に、Ｕｒｎｏｖ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｎａｔｕｒｅ ４３５（７０４２）：６４６～６５１、Ｐｅｒｅｚ ｅｔ ａｌ（２００８）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２６（７）：８０８～８１６、および米国特許公開第２００８／０１３１９６２号に説明されるように設計し、プラスミド内またはアデノウイルスベクター内に組み込んだ。

【０１０９】

代表的なＣＸＣＲ４亜鉛フィンガー設計のための認識ヘリックスを、以下の表１に示す。例示的ＺＦＮは、例えば、ヒト第２染色体のＣＸＣＲ４対立遺伝子のプロリン－１９１である、ヒトＣＸＣＲ４遺伝子のエクソン２を標的とした。ＣＸＣＲ４亜鉛フィンガー設計の標的部位を１列目に示す。ＺＦＰ認識ヘリックスによって接触させられる標的部位内のヌクレオチドを大文字で示し、未接触のヌクレオチドを小文字で示す。各ＺＦＮのための主結合部位のＤＮＡ配列、ならびに各ＺＦＮの認識ヘリックス配列を示す図１Ａ～Ｃも参照されたい。

【０１１０】

【表１】

表１：ＣＸＣＲ４亜鉛フィンガー設計

| ZFN名 | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 |
|---|---|---|---|---|---|
| ZFN 12270 atGACTTGTGGGTGg ttgtgttccagtt (配列番号1) | RSDSLLR (配列番号2) | RSDHLTT (配列番号3) | RSDSLSA (配列番号4) | DRSNLTR (配列番号5) | |
| ZFN 12273 ggGTAGAAGCGGTC acagatatatctgt (配列番号6) | DRSALSR (配列番号7) | RSDDLTR (配列番号8) | QSGNLAR (配列番号9) | QSGSLTR (配列番号10) | |
| ZFN 12257 agTCAGAGGCCAAG gaagctgttggctg (配列番号11) | RSDTLSV (配列番号12) | DNSTRIK (配列番号13) | RSDNLAR (配列番号14) | QSADRTK (配列番号15) | |
| ZFN 12329 ttGGTGGCGTGGAC GATggccaggtagc (配列番号16) | TSGNLTR (配列番号17) | DRSNLTR (配列番号5) | RSDALAR (配列番号18) | DRSHLSR (配列番号19) | TSGHLSR (配列番号20) |
| ZFN 12281 caGTTGATGCCGTGg caaactggtactt (配列番号21) | RSDALSR (配列番号22) | DRSDLSR (配列番号23) | TSGNLTR (配列番号17) | TSGSLTR (配列番号24) | |
| ZFN 12290 ccAGAAGGGAAGCG tgatgacaaagagg (配列番号25) | RSDDLTR (配列番号8) | QSGNLAR (配列番号9) | RSDHLSA (配列番号26) | QSAHRIT (配列番号27) | |

【０１１１】

Ｋ５６２細胞は、ＧＦＰ、または、示される２Ａ－ＺＦＮコンストラクトのいずれかに、Ａｍａｘａ ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ）を用いて野生型ＦｏｋＩをトランスフェクトして、３日間培養した。次いで、細胞をゲノムＤＮＡ調製のために収集し、修飾されたＣＸＣＲ４対立遺伝子（プール内に存在するＮＨＥＪの量によって判定される）および１０％ＴＢＥポリアクリルアミドゲルで分析された産物の百分率を測定するため

にｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイにかけた。３対のＺＦＮ（野生型ＦｏｋＩをもつ２Ａ－ＺＦＮ）のすべてが、相対的に高効率で（＞２０％ＮＨＥＪ）ヒトＣＸＣＲ４遺伝子を修飾することができる（図１Ｄ）。

【実施例２】

【０１１２】

ＣＸＣＲ４のＺＦＮ媒介修飾

実施例１に説明する、ＣＸＣＲ４を標的とする改変された亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）は、新規なＣＸＣＲ４-ＳｕｐＴ１細胞株（ＳｕｐＸ４-）を生成するために使用された。上記に記載するように、ＺＦＮは、ヒトリンパ球内のＣＣＲ５を含む、哺乳類細胞の内因性遺伝子を安定的に破壊して、Ｒ５ＨＩＶ－１単離体による感染に抵抗性である状態にするために使用される（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２５：７７８～７８５、Ｐｅｒｅｚ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２６：８０８～８１６および米国特許公開第２００８０１３１９６２号）。

【０１１３】

ＣＸＣＲ４標的ＺＦＮの対（１２２７３／１２２７０対、改変されたＦｏｋＩ開裂ハーフドメインをもつ２Ａ－ＺＦＮ）をコードするコンストラクトを、Ｓｕｐ－Ｔ１内に電気穿孔して２週間培養した。表面のＣＸＣＲ４発現を伴わずに細胞を濃縮するために、最初に抗ＣＸＣＲ４ｍＡｂ（１２Ｇ５）を用いて培養して、洗浄し、その後、ＣＥＬＬｅｃｔｉｏｎ　Ｐａｎ　ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ　ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に含まれる磁気ビーズと抱合したヤギ抗マウスＩｇＧを用いて培養し、次いで磁場を通した。濃縮されたＣＸＣＲ４Ｓｕｐ－Ｔ１プールは、ＲＰＭＩ完全培地に維持し、細胞の一部分は、後のゲノムＤＮＡ調製のために採取した。ゲノムＤＮＡを、例えば、米国特許公開第２００８００１５１６４号、同第２００８０１３１９６２号、および同第２００８０１５９９９６号に説明されるように、Ｓｕｒｖｅｙｏｒ（登録商標）ヌクレアーゼにかけると、プールはＣＸＣＲ４対立遺伝子内の３４．６％の破壊を示した（図２Ａ）。

【０１１４】

次いで、濃縮されたＣＸＣＲ４Ｓｕｐ－Ｔ１プールを、限界希釈法による単一細胞由来のクローンの生成に使用した。ＰＣＲに基づいたスクリーニングを用いて、いくつかの単一細胞由来クローンがＣＸＣＲ４ノックアウト細胞株であると特定され、後にフローサイトメトリー分析によって、ＣＸＣＲ４表面発現の欠如が確認された。フローサイトメトリーは、次のように実施した。最初に細胞を、望ましい抗体を用いて培養して、洗浄し、次いでフローサイトメトリー分析の前にＲフィコエリスリン（ＰＥ）結合抗マウスＩｇＧで培養した。

【０１１５】

下の表２に示されるように、ＣＸＣＲ４　ＺＦＮ修飾されたクローンは、ＣＸＣＲ４細胞表面発現が除去されたＳｕｐ－Ｔ１すなわち親系統と同様のプロフィールを示した。Ｘ４細胞外ループ２（ＥＣＬ２）に対する抗体すなわち１２Ｇ５、またはＸ４アミノ末端基（ＮＴ）抗体すなわち４Ｇ１０のいずれも反応性を示さない。

【０１１６】

【表２】

表２：ＣＸＣＲ４標的ＺＦＮで処理されたＳｕｐＴ１クローンのＦＡＣＳ評価

| SangamoのZFN-CXCR4 SUP1クローンのFACS評価 (平均チャネル蛍光) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 陰性 (P3) | 抗CD4 (#19) | 抗CXCR4 ECL2 (12G5) | 抗CXCR4 NT (4G10) | 抗HLA CI-I W6/32 |
| SupT1 | 2 | 62 | 35 | 136 | 83 |
| クローンB4 | 2 | 114 | 2 | - | 152 |
| クローンB13 | 2 | 102 | 2 | 4 | 170 |
| クローンA66 | 4 | 92 | 3 | 7 | 189 |

【０１１７】

このように、Ａ６６、Ｂ４、およびＢ１３で示すＳｕｐＴ１単一細胞由来のクローンは、ＣＸＣＲ４の細胞表面発現の欠如に基づいて、ＣＸＣＲ４（－）であると特定された。

【０１１８】

さらに、ＰＣＲ増幅およびゲノムＤＮＡの配列決定によって判定されるように、得られた細胞（クローン）は、図２Ｂおよび下の表３に示されるように、すべてのＣＸＣＲ４対立遺伝子がＮＨＩＪによって破壊されたことが確認された。示されるように、クローンＡ６６のうち一方の対立遺伝子は７ｂｐの欠失および２ｂｐの挿入（正味５ｂｐの欠失）を有し、他方の対立遺伝子は８ｂｐの欠失を有する。クローンＢ４のうち一方の対立遺伝子は１２ｂｐの欠失を有し、他方の対立遺伝子は１９ｂｐの欠失を有する。Ｂ１３クローンは、異なる種類の配列、９ｂｐの欠失、２９ｂｐの欠失、および５４ｂｐの欠失を有する。

【０１１９】

【表３】

表３：ＣＸＣＲ４におけるＺＦＮ修飾

| クローン番号 | CXCR4における修飾 |
|---|---|
| A66 | 5bp欠失 (7bp欠失および2bp挿入)<br>8bp欠失 |
| B4 | 12bp欠失<br>19bp欠失 |
| B13 | 9bp欠失<br>29bp欠失<br>54bp欠失 |

【０１２０】

それぞれのクローンの遺伝子型に基づく、ＳｕｐＴ１細胞／クローン上に発現したＣＸＣＲ４の予測アミノ酸配列を下に示す（野生型からの変化は太字で示す）。

【０１２１】

【表４－１】

CXCR4：アイソフォームb, WT(352 a.a.)(配列番号28)

```
  1   MEGISIYTSD NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL
 51   TGIVGNGLVI LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA
101   NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL
151   LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA DDRYICDRFY PNDLWVVVFQ
201   FQHIMVGLIL PGIVILSCYC IIISKLSHSK GHQKRKALKT TVILILAFFA
251   CWLPYYIGIS IDSFILLEII KQGCEFENTV HKWISITEAL AFFHCCLNPI
301   LYAFLGAKFK TSAQHALTSV SRGSSLKILS KGKRGGHSSV STESESSSFH
351   SS*
```

クローン番号A66-配列1：7bp欠失及び2bp挿入(272 a.a.)(配列番号29)

```
  1   MEGISIYTSD NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL
 51   TGIVGNGLVI LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA
101   NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL
151   LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA DDRYICDRFY PSVGGCVPVS
201   AHHGWPYPAW YCHPVLLLHY HLQAVTLQGP PEAQGPQDHS HPHPGPLRLL
251   AALLHWDQHR LLHPPGNHQA RV*
```

【表４－２】

クローン番号A66-配列2：8bp欠失(189 a.a.)(配列番号30)

```
  1   MEGISIYTSD NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL
 51   TGIVGNGLVI LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA
101   NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL
151   LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA DDRYICDRF*
```

クローン番号B4-配列1：12bp欠失(348 a.a.)(配列番号31)

```
  1   MEGISIYTSD NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL
 51   TGIVGNGLVI LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA
101   NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL
151   LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA DDRYICDRFY PVVVFQFQHI
201   MVGLILPGIV ILSCYCIIIS KLSHSKGHQK RKALKTTVIL ILAFFACWLP
251   YYIGISIDSF ILLEIIKQGC EFENTVHKWI SITEALAFFH CCLNPILYAF
301   LGAKFKTSAQ HALTSVSRGS SLKILSKGKR GGHSSVSTES ESSSFHSS*
```

クローン番号B4-配列3：19bp欠失(283 a.a.)(配列番号32)

```
  1   MEGISIYTSD NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL
 51   TGIVGNGLVI LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA
101   NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL
151   LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA DDRYILTCGW LCSSFSTSWL
201   ALSCLVLSSC PAIALSSPSC HTPRATRSAR PSRPQSSSSW LSSPVGCLTT
251   LGSASTPSSS WKSSSKGVSL RTLCTSGFPS PRP*
```

クローン番号B13：9bp欠失(349 a.a.)(配列番号33)

```
  1   MEGISIYTSD NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL
 51   TGIVGNGLVI LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA
101   NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL
151   LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA DDRYICDRFY LWVVVFQFQH
201   IMVGLILPGI VILSCYCIII SKLSHSKGHQ KRKALKTTVI LILAFFACWL
251   PYYIGISIDS FILLEIIKQG CEFENTVHKW ISITEALAFF HCCLNPILYA
301   FLGAKFKTSA QHALTSVSRG SSLKILSKGK RGGHSSVSTE SESSSFHSS*
```

クローン番号B13-配列2：29bp欠失(264 a.a.)(配列番号34)

```
  1   MEGISIYTSD NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL
 51   TGIVGNGLVI LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA
101   NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL
151   LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA DDRYICGCVP VSAHHGWPYP
201   AWYCHPVLLL HYHLQAVTLQ GPPEAQGPQD HSHPHPGFLR LLAALLHWDQ
251   HRLLHPPGNH QARV*
```

クローン番号B13-配列3：54bp欠失(334 a.a.)(配列番号35)

```
  1   MEGISIYTSD NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL
 51   TGIVGNGLVI LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA
101   NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL
151   LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA VQFQHIMVGL ILPGIVILSC
201   YCIIISKLSH SKGHQKRKAL KTTVILILAF FACWLPYYIG ISIDSFILLE
251   IIKQGCEFEN TVHKWISITE ALAFFHCCLN PILYAFLGAK FKTSAQHALT
301   SVSRGSSLKI LSKGKRGGHS SVSTESESSS FHSS*
```

【０１２２】

ＳｕｐＴ１細胞の染色体の数は４本であるが、一般には、第２および第９染色体コピーの２本のみを有する。したがって、クローンＢ１３における３つの異なる配列の存在は、クローンＢ１３が３つのＣＸＣＲ４対立遺伝子を有するか、クローンＢ１３が混合クローンであるかのいずれかであることを示唆する。いずれの場合においても、ＣＸＣＲ４表面染色および配列分析の両方が、クローンＢ１３はＣＸＣＲ４ノックアウトクローンであることを示した。

【実施例３】

【０１２３】

ＣＸＣＲ４のＺＦＮ媒介修飾は、ＣＸＣＲ４指向性および二重指向性ＨＩＶ株の感染を

予防する
ウイルス攻撃に対する反応を評価するために、ＳｕｐＴ１、Ｂ１３、およびＡ６６を１．０×１０$^{6}$細胞／ｍｌで播種し、１，５００ｒｐｍで１時間スピン感染させた。ＨＩＶ－１逆転写酵素（ＲＴ）活性を測定するために、３週間にわたって細胞培養上清を収集した。
【０１２４】
図３Ａ～３Ｃに示すように、ＣＣＲ５／ＣＸＣＲ４（Ｒ５／Ｘ４）二重向性ウイルスＨＩＶ－１のＲ３ＡおよびＳＦ２は、親ＳｕｐＴ１細胞を生産的に感染させることができたが、ＳｕｐＴ１のクローンＢ１３またはＡ６６を感染させることはできなかった（図３Ａおよび３Ｂ）。ＳｕｐＴ１細胞は、通常ＣＣＲ５を発現しないため、ＣＣＲ５を利用して侵入するＲ５指向性ＨＩＶ株またはＲ５／Ｘ４指向性ウイルスの影響を受けにくい。図３Ｃは、厳密にＸ４指向性ＨＩＶ－１のＢＫ１３２ウイルスのための、同じ選択性を示す。
【０１２５】
したがって、Ｂ１３クローンおよびＡ６６クローンにおけるＣＸＣＲ４遺伝子のＺＦＮ破壊は、ＣＸＣＲ４指向性ウイルス感染に対して抵抗性を有する状態にする。
【０１２６】
さらに、上記のフローサイトメトリー分析が示すように（表２）、クローンＡ６６およびクローンＢ１３のＨＩＶ－１感染症に対する抵抗性は、内因性ＣＸＣＲ４遺伝子のＺＦＮ媒介修飾によるものである。表２に示すように、クローンＡ６６およびクローンＢ１３の、ＣＤ４およびＨＬＡクラスＩの細胞表面発現を調べたところ、クローンＡ６６およびクローンＢ１３において、わずかに高いレベルのＣＤ４およびＨＬＡ発現が検出された。これは、クローンＡ６６およびクローンＢ１３の、ＨＩＶ－１感染症に対する抵抗性は、これらの細胞上のＣＤ４およびＨＬＡクラスＩ発現に関係しないことを示す。
【０１２７】
Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２：１１１１７～１１１２８）にすでに記載されるように生成したＣＸＣＲ４またはＣＣＲ５含有ｐＥＬＮＳ複製欠如レンチウイルスベクターで、クローンＢ１３およびクローンＡ６６を形質導入することによって、ＨＩＶ－１感染症に対するＳｕｐ１クローンの抵抗性がＣＸＣＲ４遺伝子座でのＺＦＮ媒介ゲノム修飾によるものだという、さらなる確認が得られた。これらの形質導入された細胞集団を、安定した細胞株を生成するために使用し、次いで、これらの細胞の、ＨＩＶ－１感染症に対する感受性が復元され得るか否かを検証するためにＨＩＶ－１で攻撃した。示される抗体で細胞を染色し、フローサイトメーターを使用して分析した。表５に示されるように、示される数字は、状態ごとの平均蛍光強度（ＭＦＩ）である。
【０１２８】
【表５】

**表５：ＳｕｐＴ１細胞およびＺＦＮ修飾ＳｕｐＴ１クローンのフローサイトメトリー分析**

| 抗CXCR4 | SupT1 | B13 | B13-X4 | A66-X4 |
|---|---|---|---|---|
| | 78.7 | 4.4 | 33.7 | 105.5 |
| 抗CCR5 | SupT1-R5 | B13 | B13-R5 | A66-R5 |
| | 30.8 | 8.1 | 22.6 | 29.6 |

【０１２９】
このように、ＣＣＲ５発現ベクターを用いる形質導入は、Ｂ１３細胞株およびＡ６６細胞株の表面にＣＣＲ５の発現を生じさせ得る（Ｂ１３Ｒ５およびＡ６６Ｒ５のそれぞれを参照）。
【０１３０】

さらに、ＣＣＲ５を安定的に発現させるＳｕｐＴ１（ＳｕｐＴ１－Ｒ５）、Ｂ１３、Ｂ１３－Ｘ４は、１×１０$^{6}$細胞／ｍｌで播種し、１，５００ｒｐｍで、Ｒ５／Ｘ４二重指向性ＨＩＶ－１株Ｒ３Ａに１時間スピン感染させた。培地におけるＨＩＶ－１逆転写酵素（ＲＴ）活性の度合いを測定することによって、培養中のＨＩＶ－１複製の相対量を測定するために、３週間にわたって細胞培養上清を収集した。

【０１３１】

図４に示されるように、二重指向性（Ｒ５／Ｘ４）ＨＩＶ－１のＲ３Ａは、両方のＢ１３トランスフェクタント上にＣＸＣＲ４（Ｂ１３－Ｘ４）またはＣＣＲ５（Ｂ１３－Ｒ５）のいずれかを安定的に発現させたが、親Ｂ１３クローンには発現しなかった。したがって、ウイルス複製の不在は、もっぱら細胞表面上のＣＸＣＲ４の不在によるものであって、ＳｕｐＴ１のＢ１３クローン内の一般的欠損によるものではない。

【実施例４】

【０１３２】

主Ｔ細胞のＣＸＣＲ４特異的修飾

ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮが、主Ｔ細胞にも同様の保護効果を有するか否かを調査するために、以下の実験がなされた。

【０１３３】

Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ ＰｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａのＨｕｍａｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｃｏｒｅから、ヒトドナーからの新鮮ＣＤ４＋Ｔ細胞を得た。２，５００万個のＣＤ４＋Ｔ細胞を、１０％のウシ胎仔血清、１％のペニシリン／ストレプトマイシン、および１００Ｕ／ｍｌのインターロイキン－２を含むＲＰＭＩに０．８×１０$^{6}$の密度で播種した。細胞を、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８で被覆した磁気ビーズ（例えば、Ｄｙｎａｌ）を用いて、ビーズと細胞の比率３：１で刺激した。刺激から約１８時間後、実施例２に記載するようにＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮ対を、またはＣＣＲ５特異的ＺＦＮ対を（米国特許公開第２００８０１５９９９６号を参照）、それぞれコードするＡｄ５／Ｆ３５ベクターを用いて、感染多重度（ｍｏｉ）６００で、細胞を形質導入させた。対照として、未形質導入の培養物は、終始維持された。

【０１３４】

刺激から７２時間後に開始して、４８時間ごとに、細胞の数をＣｏｕｌｔｅｒ Ｃｏｕｎｔｅｒ Ｍｕｌｔｉｓｉｚｅｒ３ を用いて数え、１００Ｕ／ｍｌのＩＬ－２を含む新鮮な培地で０．８×１０$^{6}$に分割した。ＣＸＣＲ４－ＺＦＮ処理プールをＳｕｒｖｅｙｏｒ（登録商標）ヌクレアーゼアッセイで、例えば、米国特許公開第２００８００１５１６４号、同第２００８０１３１９６２号、および同第２００８０１５９９９６号に記載されるように分析した。得られたデータを図５に提示する（模擬感染サンプル）。これらのデータは、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮがＣＸＣＲ４遺伝子座を、４０パーセント超の効率で明確に修飾し得たのに対して、予測通り、ＣＣＲ５特異的ＺＦＮで処理された細胞は、ＣＸＣＲ４遺伝子座における修飾を見せなかったことを示す。

【０１３５】

刺激から５日後、３つの培養物（ＮＴＤ、ＡｄＸ４－ＺＦＮ、およびＡｄＲ５－ＺＦＮ）のそれぞれから、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８被覆磁気ビーズを除去し、２，５００万個の細胞を４つの培地のそれぞれに播種し、次いでこれらの培地に種々のＨＩＶ株を感染させた。使用した株は、それぞれＢｋ１３２（主ＣＸＣＲ４指向性単離株）、ＨｘＢ２（実験室適合（ｌａｂ－ａｄａｐｔｅｄ）ＣＸＣＲ４指向性単離株）、およびＲ３Ａ（ＣＣＲ５／ＣＸＣＲ４二重指向性単離株）である。また、模擬感染培養も維持された。１００万個の細胞につき、１００ｎｇ ｐ２４のＨＩＶの投与量を使用した。データを図６に提示する。このデータは、ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株が、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮで処理された細胞に対して非致命的であることを顕著に表す。培養物を追加の１５日間監視し、合計で３０日間監視した。これらのデータを図７に提示する。

【０１３６】

異なるＨＩＶ株での感染から８日後、細胞を採取し、ＦＡＣＳによってＣＸＣＲ４の発

現を分析した。簡潔に、１５００ｒｐｍで５分間の遠心分離によって細胞を採取して、ＦＡＣＳバッファー（ＦＢ：１ＬのＰＢＳ、２５ｍＬのＦＣＳ（ＧＩＢＣＯ）、２ｍＬの０．５Ｍ　ＥＤＴＡ）で洗浄した。次いで細胞を、１００万個の細胞につき、１００ｕＬのＦＢ中で、５ｕＬの抗ＣＸＣＲ４－ＡＰＣモノクローナル抗体（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を使用して、室温で２０分間染色した。細胞をＦＢで洗浄し、次いで、１００ｕＬのＣａｌｔａｇ　Ａ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、室温で透過処理した。細胞をＦＢで再度洗浄した。次いで細胞を、１００ｕＬのＣａｌｔａｇ　Ｂ（登録商標）中で、２ｕＬ／１００万個の細胞のＫＣ５７－ＲＤ１（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて、室温でＨＩＶ　Ｇａｇで３０分間染色した。細胞を洗浄し、２５０ｕＬのＦＢ内で再懸濁した。すべてのサンプルにＬＳＲＩＩ（ＢＤ）を行い、ＦｌｏｗＪｏ　８．０．１ソフトウェアで分析した。ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮで処理された細胞は、ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株に対してかなりの耐性があった。さらに、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮ修飾細胞の強化（生存率および／または増殖の増加）は、ＢＫ１３２およびＲ３Ａを感染させたＡｄ－Ｘ４ＺＦＮ処理サンプルにおいて、図５に示されるように、未感染の対照サンプル（模擬）と比較すると、これらのサンプル内のＮＨＥＪによって修飾されたＣＸＣＲ４対立遺伝子の頻度の百分率がさらに高いことに基づいて、すでに顕著であった。

【０１３７】

さらに、これらの細胞について、ＨＩＶ暴露の存在下または不在下で、４５４の大規模シーケンスによる分析をした。ゲノムＤＮＡを、ＱＩＡａｍｐ　ＤＮＡ　ＭｉｃｒｏＫｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、ＣＤ４＋Ｔ細胞から単離した。次いで、それぞれの条件のために、Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ　Ｈｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、２００ｎｇのゲノムＤＮＡをＰＣＲ増幅した。次のプライマーに４５４アダプター配列および８文字のＤＮＡバーコードを足したものを使用した。ＣＡＡＣＣＴＣＴＡＣＡＧＣＡＧＴＧＴＣＣＴＣＡＴＣ（順方向）（配列番号３６）およびＧＧＡＧＴＧＴＧＡＣＡＧＣＴＴＧＧＡＧＡＴＧ（逆方向）（配列番号＊３７）９５℃で５分、次いで、９５℃で３０秒を３０サイクル、５５℃で３秒、６８℃で３０秒、続いて、６８℃で２分。

【０１３８】

ＰＣＲ増幅に続いて、ＰＣＲの産生物を２％のアガロースゲルで分析し、次いで抽出して、Ｗｉｚａｒｄ　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－Ｕｐ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用してゲル精製した。次いで、Ｑｕａｎｔ－ｉＴ　ｄｓＤＮＡ　Ｈｉｇｈ－Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、それぞれのバーコード化されたアンプリコンの濃度を測定した。次いで、ＤＮＡサンプルは等モル比でプールさせ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　ＰｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａのＤＮＡ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｆａｃｉｌｉｔｙで、標準的な化学を用いてＲｏｃｈｅ／４５４　ＧＳ　ＦＬＸ　ＤＮＡにかけた。得られた結果を、最初に配列リードをバーコードによって分離し、次いでそれぞれの配列リードを、期待される野生型ゲノム配列に整合することによって分析した。ＺＦＮ誘発ＮＨＥＪ事象と一致する挿入または欠失は、自動的にフラグが付けられ、手動の検査で確認された。

【０１３９】

図８に示されるように、ＨＩＶ暴露（図８では「模擬」と表示される）の不在下では、破壊ＣＸＣＲ４対立遺伝子の百分率は、経時的に安定している。それに対して、天然ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株（Ｂｋ１３２）または、実験室適合ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株（ＨｘＢ）のいずれかの存在下では、集団におけるＣＸＣＲ４遺伝子破壊の割合は増加しており、これは恐らく、ＣＸＣＲ４の破壊によって、Ｘ４指向性ウイルスがこれらの細胞に感染するのを阻害して、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮによって修飾された細胞集団に延命効果をもたらすためである。

【０１４０】

また、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮまたはＣＣＲ５特異的ＺＦＮのそれぞれで処理された後

の培養物における、経時的に存在するウイルス量も判定するために、これらの主Ｔ細胞を分析した。Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ ＰｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａのＨｕｍａｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｃｏｒｅから、生きているヒトドナーからの、負の選択によって精製した新鮮ＣＤ４＋Ｔ細胞を得た。２，５００万個のＣＤ４＋Ｔ細胞を、１０％のウシ胎仔血清、１％のペニシリン／ストレプトマイシン、および１００Ｕ／ｍｌのインターロイキン－２を含むＲＰＭＩに０．８×$10^6$の密度で播種した。細胞を、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８で被覆した磁気ビーズを用いて、ビーズと細胞の比率３：１で刺激した。

【０１４１】

刺激から約１８時間後、上記の実施例４に記載するようにＣＸＣＲ４－ＺＦＮまたはＲ５－ＺＦＮのそれぞれをコードするＡｄ５／Ｆ３５ベクターを用いて、感染多重度（ｍｏｉ）６００で、細胞を形質導入させた。未形質導入の培養物は、終始維持された。刺激から７２時間後に開始して、４８時間ごとに、細胞の数を自動血球計（Ｃｏｕｎｔｅｓｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）上でトリパンブルー色素排除試験法を用いて数え、１００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２を含む新鮮な培地で０．８×$10^6$に分割した。

【０１４２】

刺激から５日後、３つの培養物（ＮＴＤ、ＡｄＸ４－ＺＦＮ、およびＡｄＲ５－ＺＦＮ）のそれぞれから、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８被覆磁気ビーズを除去し、２，５００万個の細胞を４つの培地のそれぞれに播種し、次いでこれらの培地にＢｋ１３２（主Ｘ４単離株）、ＨｘＢ２（実験室適合Ｘ４単離株）、Ｒ３Ａ（Ｒ５／Ｘ４主単離株）を感染させ、または、培養液のみとした（模擬）。１００万個の細胞につき、１００ｎｇ ｐ２４のＨＩＶの投与量を使用した。その後、細胞を、増殖が停滞するまで増大させ、次いで抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズで追加の３日間再刺激した。次いで、培養物は再度増殖が停滞するまで、最初の刺激後およそ２６日間維持された。

【０１４３】

それぞれの培養物について、ＨＩＶ感染後約２日おきに逆転写酵素活性を測定した。それぞれの細胞培養の１．２５ｍＬのアリコットを、滅菌ＦＡＣＳ管内で、１５００ｒｐｍで５分間スピンさせた。次いで、１ｍＬの無細胞の上清を１．５ｍＬ超遠心分離機管に移し、４５，０００ｒｐｍで、３０分間、４度でペレット状にした。上清を吸引して、ウイルスペレットを５０ｕＬの０．２５Ｍのトリス、ｐＨ８．０で再懸濁した。５０ｕＬの可溶化バッファー（０．８ＭのＮａＣｌ、０．５％のＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、２０％のグリセロール、０．０５Ｍのトリス、ｐＨ７．９、１ｍＭのＤＴＴ）を加え、次いで１０分間培養した。２０ｕＬを２つのガラス管のそれぞれに分割し、７９．２ｕＬのＲＴカクテル（６７．５ｍＭのトリス、ｐＨ７．５、１．３５ｍＭのＤＴＴ、１．０８ｍＭのＡＴＰ、１３．５ｍＭのＭｇＣｌ２）、５ｕＬのポリｒ（Ａ）（１０単位／ｍＬ）、０．３ｕＬの３ＨｄＴＴＰ（１ｍＣｉ）、および０．１２５ｕＬのｃｏｌｄ ｄＴＴＰを、それぞれの管に加えた。次いで、３７度でゆっくりと震盪して１時間培養した。管を氷の上に置き、２０ｕＬのｔＲＮＡ（１１．３ｍｇ／ｍＬ）および２ｍＬのピロリン酸塩を用いるｃｏｌｄ １０％ＴＣＡを加えた。次いで、それぞれのサンプルを、真空マニホールドを通してガラスフィルターに注いだ。その後フィルターを、５％のＴＣで３回洗浄し、１００％のエタノールで１回洗浄した。次いでフィルターを、シンチレーションバイアル内に３ｍＬのシンチレーションカクテルと共に入れた。シンチレーションカウンターで活性を測定した。次いで、逆転写酵素活性を、それぞれの時点で生細胞数へと正常化させた。

【０１４４】

図９に示されるように、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮで処理され（図９、「Ｘ４ＺＦＮ」を参照）、かつ天然ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ（Ｂｋ１３２）もしくは実験室適合ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株（ＨｘＢ）にさらされた主Ｔ細胞は、ＣＣＲ５特異的ＺＦＮで処理された細胞または模擬感染細胞と比較して、少ない数のウイルス量を有した。

【実施例５】

【０１４５】

ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞を移植したマウスのインビボの攻撃

インビボでの、ＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株に対する、ＺＦＮ処理されたＴ細胞の抵抗性を測定するために、ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞をＮＳＧマウスに移植した。２，５００万個のヒトＣＤ４＋Ｔ細胞を上記に説明するように刺激し、次いでＡｄＲ５－ＺＦＮまたはＡｄＸ４－ＺＦＮを用いて（実施例４に説明するように）感染多重度（ｍｏｉ）６００で、形質導入させた。細胞を、インビトロでの増殖の１０日間にわたって、上記に説明するように維持した。注入の当日、細胞を１５００ｒｐｍで５分間ペレット状にして、次いでＰＢＳ中１０＾８細胞／ｍＬで再懸濁した。

【０１４６】

次いで、１００ｕＬの細胞（マウスごとに$10^6$）を、尾静脈を介してそれぞれのＮＳＧマウスに注入した。２３匹のマウスがＸ４－ＺＦＮ処理細胞の注入を受け、２２匹のマウスがＲ５－ＺＦＮ細胞の注入を受けた。注入後２７日目に、診断的眼窩採血（ｒｅｔｒｏｏｒｂｉｔａｌ　ｂｌｅｅｄｓ）を、それぞれのマウスに実施した。次いで、ＣＤ４の総数を判定するために、全血の５０ｕＬをＴｒｕｃｏｕｎｔ　ｔｕｂｅ（ＢＤ）内で、２．５ｕＬの抗ＣＤ４５　ＦＩＴＣ（ＢＤ）、０．５ｕＬの抗ＣＤ３　Ｑｄｏｔ６５５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、２．５ｕＬの抗ＣＤ４　ａｌｅｘａ　ｆｌｕｏｒ　７００（ＢＤ）、１ｕＬの抗ＣＤ８　ｐａｃｉｆｉｃ　ｂｌｕｅ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、および５ｕＬの抗ＣＸＣＲ４　ＰＥ（ＢＤ）で、室温で２０分間染色した。次いで赤血球を溶解して、サンプルを１ｘ　ＦＡＣＳ溶解溶液（ＢＤ）で固着させた。次いで細胞を、ＬＳＲＩＩフローサイトメーターにかけた。次いでデータを、ＦｌｏｗＪｏ　８．０．１ソフトウェアで分析した。ＣＸＣＲ４通門を、ヒト全血上の１対照除外蛍光（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ｍｉｎｕｓ　ｏｎｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ）を用いて判定した。次いで、生着およびＣＸＣＲ４発現を集団間で比較するために、独立スチューデントのｔ検定を実施した。すべての統計的分析に、プリズムを使用した（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．）。

【０１４７】

図１０に示されるように、移植後２７日目の測定において、それぞれ、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮ、またはＣＣＲ５特異的ＺＦＮで処理された細胞の生着に差異はなかった（図１０Ａを参照）。さらに、生着した細胞における、ＣＸＣＲ４発現の度合いをＦＡＣＳ分析（上記に説明される）によって測定し、予測通り、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮで処理された細胞を受け取ったマウスにおけるＣＸＣＲ４発現の量は、より少なかった（図１０Ｂ）。

【０１４８】

マウスにＨＩＶ感染させるために、$10^5$の自己ＨＩＶ感染ＣＤ４＋Ｔ細胞を、総体積が１００ｕＬである、それぞれのマウスの尾静脈内に注入した。細胞は、予め抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８ビーズを用いて５日間刺激し、次いで４日間にわたって１００万個につき１００ｎｇ　ｐ２４　Ｂｋ１３２でＨＩＶ感染、または模擬感染させた。あるいは、ＨＩＶ感染させたＰＢＭＣをマウスに注入することによって、マウス内にＨＩＶ感染症を起こさせた。ＨＩＶ感染の４日後に、細胞を凍結させ、注入の４時間前に解凍するまで、液体窒素内に保存した。Ｒ５－ＺＦＮおよびＸ４－ＺＦＮの両方の群について、１１匹のマウスはＨＩＶ感染された細胞を受け、１１匹のマウスは模擬感染された細胞を受けた。注目すべきことに、Ｘ４－ＺＦＮ修飾された細胞を注入された１匹のマウスは、生着＞平均からの４標準偏差を有し、したがって実験のＨＩＶ攻撃の段階に含まれなかった。

【０１４９】

ＨＩＶ感染後、診断的採血を７日おきに導入して、ＣＤ４数、ウイルス量、およびＣＸＣＲ４発現を分析した。脾臓組織および骨髄組織を、ＣＸＣＲ４の分析のために採取した。さらに、ＣＸＣＲ４遺伝子修飾の百分率は、Ｓｕｒｖｅｙｏｒ（登録商標）アッセイを上記に説明するように使用して、Ｃｅｌ－１分析によって分析され、予備データは下の表６に提示する。表内の、数匹のマウスにおいて見られるように、ＨＩＶ感染症の存在は、組織内におけるＣＸＣＲ４修飾の百分率の増加をもたらし得る（例えば、マウス６０７３をマウス６０６９と比較されたい）。

【０１５０】

【表６】

表６：ＨＩＶ攻撃されたマウスにおけるＣＸＣＲ４の予備分析

| マウス | ウイルス感染に使用した細胞 | HIV攻撃 | 組織型 | CXCR4修飾% |
|---|---|---|---|---|
| 6075 | PBMC | 模擬 | 血液 | 18.60 |
| 6075 | PBMC | 模擬 | 脾臓 | 20.20 |
| 6075 | PBMC | 模擬 | 骨髄 | NC |
| 6081 | PBMC | HIV | 血液 | 15.30 |
| 6081 | PBMC | HIV | 脾臓 | 2.50 |
| 6081 | PBMC | HIV | 骨髄 | NC |
| 6073 | CD4 | HIV | 血液 | 37.70 |
| 6073 | CD4 | HIV | 脾臓 | 59.90 |
| 6073 | CD4 | HIV | 骨髄 | 59.50 |
| 6069 | CD4 | 模擬 | 血液 | 36.00 |
| 6069 | CD4 | 模擬 | 脾臓 | 24.90 |
| 6069 | CD4 | 模擬 | 骨髄 | 29.70 |
| 6079 | CD4 | HIV | 血液 | 18.20 |
| 6079 | CD4 | HIV | 脾臓 | 8.50 |
| 6079 | CD4 | HIV | 骨髄 | NC |

注：「ＮＣ」は非決定であった結果を示す。

【０１５１】

要するに、すべてのＺＦＮ修飾された細胞株におけるＣＸＣＲ４の配列決定は、フレームシフト、未完熟終了、およびアミノ酸突然変異をもたらす、種々の欠失または挿入を特徴とする、ＺＦＮ標的部位でのＤＮＡの破壊を明示した。対照ＳｕｐＴ１細胞株は、ＣＸＣＲ４指向性およびＲ５Ｘ４指向性ＨＩＶに対して高い感受性を保ったが、その一方で、ＺＦＮ修飾された株は、ＲＴ活性、ＰＣＲ、および免疫蛍光顕微鏡検査法によって判定されたように、ＨＸＢおよびＲ３Ａを含む、いくつかのＨＩＶ－１単離体による感染に対して完全に抵抗性であった。さらに、ＺＦＮ処理された細胞および対照ＳｕｐＴ１細胞の、１：１０００のように低い比率の混合物を含む培養物において、ＺＦＮ処理された細胞は、細胞変性Ｘ４ウイルス感染の状況において、優先的な生存を示した。ＺＦＮ修飾された細胞は、増殖速度論において差異を呈さず、安定的にＣＣＲ５を発現するように再改変されると、Ｒ５指向性ＨＩＶ感染症に対して完全に許容状態となった。さらに、データは、ＣＸＣＲ４特異的ＺＦＮが、主Ｔ細胞内にＣＸＣＲ４指向性ＨＩＶ株に対する保護をもたらし得ることを、明示する。

【０１５２】

これらのデータは、ＣＸＣＲ４を破壊するように、ＺＦＮを首尾よく設計することができ、ＣＸＣＲ４依存性ＨＩＶ感染症に対する抵抗性をもたらすことを明示する。

【実施例６】

【０１５３】

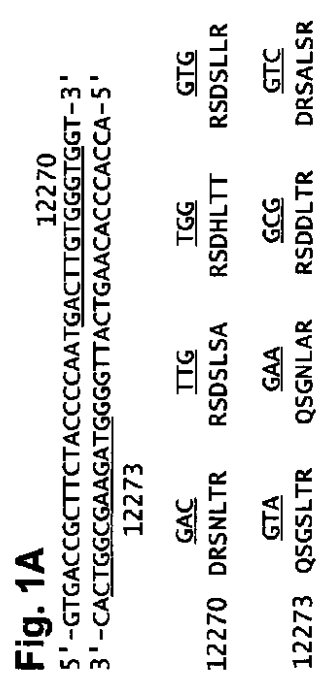
主Ｔ細胞におけるＣＸＣＲ４およびＣＣＲ５のＺＦＮ修飾

負の選択によって単離された、新鮮ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞を、Ａｄ５／Ｆ３５　Ｘ４およびＡｄ５／Ｆ３５　Ｒ５ＺＦＮを使用した（ｍｏｉ　６００）ことを除いて、上記の実施例４に説明するように処理した。上記に説明した、Ｓｕｒｖｅｙｏｒ（登録商標）を使用した形質導入後１４日目に、ＣＸＣＲ４遺伝子配列およびＣＣＲ５配列の両方の修飾のために、細胞を分析した。図１１に示される、得られた結果は、両方の配列が二重処置によって修飾されたことを示す。いくつかの条件下において、両方の標的遺伝子は修飾された（行６および７参照）。

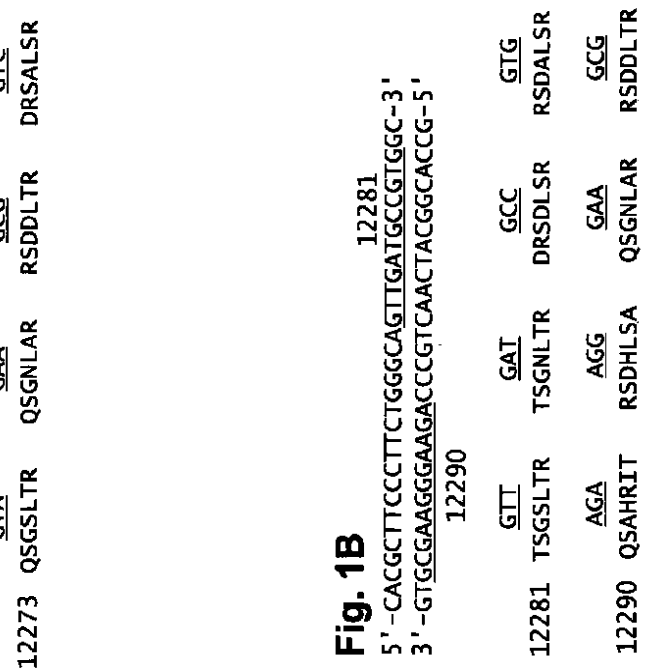
【０１５４】

攻撃後の、細胞増殖、共受容体破壊、およびＨＩＶ転写酵素活性を評価するために、新鮮ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞を負の選択によって単離し、それらをおよそ０．８×１０$^{6}$細胞／ｍＬの密度で播種し、１０％のＦＣＳ、１％のペニシリン／ストレプトマイシン、および１００単位／ｍＬのＩＬ－２を含むＲＰＭＩにおいて、３：１の比率の抗ＣＤ３－抗ＣＤ２８被覆磁気ビーズで刺激した。細胞を１８時間培養し、次いでＡｄ５／Ｆ３５　Ｘ４ＺＦＮを用いて形質導入させ（ｍｏｉ　６００）、媒体容量は倍になるであろう。５日後、ビーズを除去し、細胞は、Ａｄ５／Ｆ３５　ＣＣＲ５－ＺＦＮ（ＭＯＩ　６００）を用いて形質導入される。好適なＣＣＲ５ＺＦＮは、例えば米国特許出願第２００８０１５９９９６号に記載される。およそ６日後に、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８被覆磁気ビーズを用いて細胞を再刺激し、ＨＩＶ株ＹＵ２、ＢＫ１３２、ＨｘＢ、およびＲ３Ａ（１００ｎｇ　ｐ２４）に感染させた。細胞増殖、共受容体破壊、およびＨＩＶ逆転写酵素活性を、ＨＩＶ感染後から２日おきに評価した。

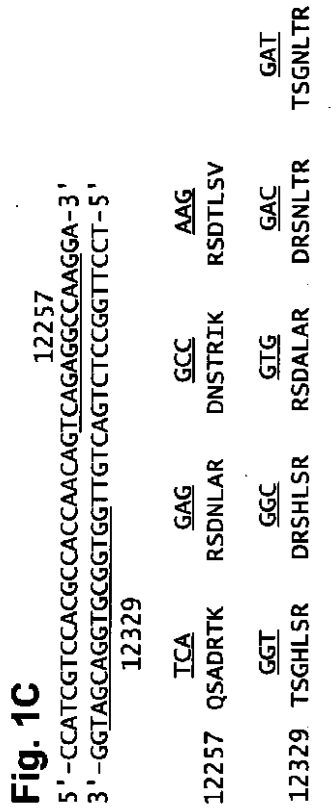
【図１Ａ】



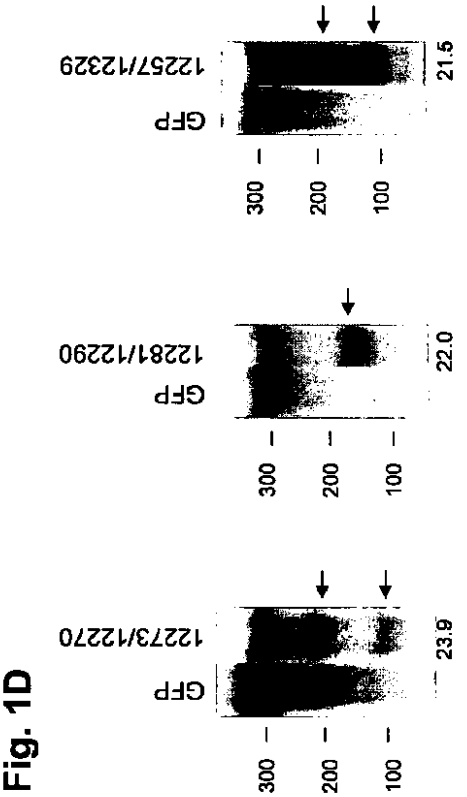

【図１Ｂ】



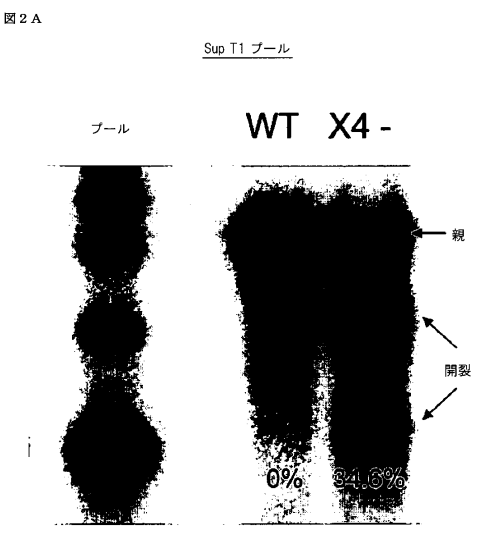
【図１Ｃ】




【図１Ｄ】




【図２Ａ】




【図２Ｂ】

【図２Ｃ】

**Figure 2C**

```
WT:       ATATCTGTGACCGCTTCTACCCCAATGACTTGTGGGTGGT
B4-seq1:  ATATCTGTGACCGCTTCTACCC----------GGTGGT
B4-seq2:  ATATCT----------TGACTTGTGGGTGGT
```

【図２Ｄ】

**Figure 2D**

```
WT:       AGGCAGATGACAGATATATCTGTGACCGCTTCTACCCCAATGACTTGTGGG
TGGTTGTGTTCCAGTTTCAGCA
B13-seq1: AGGCAGATGACAGATATATCTGTGACCGCTTCTACC----------TGTGGG
TGGTTGTGTTCCAGTTTC
B13-seq2: AGGCAGATGACAGATATATCTG----------
TGGTTGTGTTCCAGTTTC
B13-seq3: AGGCAG----------
--------TCCAGTTTC
```

【図３】

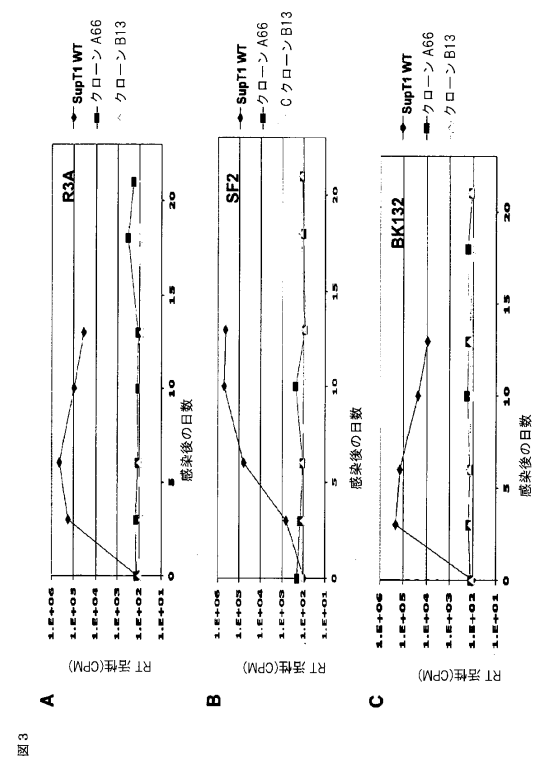



図３

【図４】

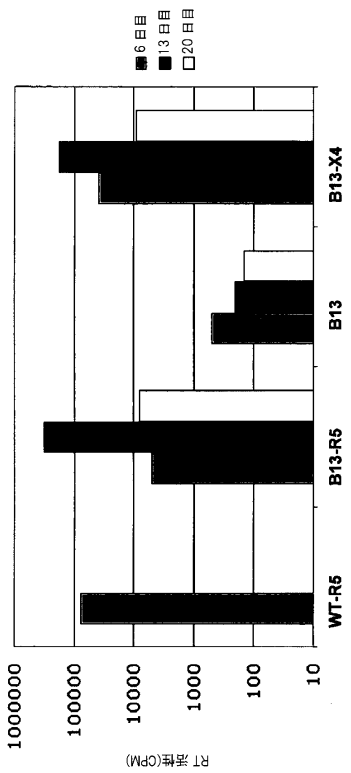
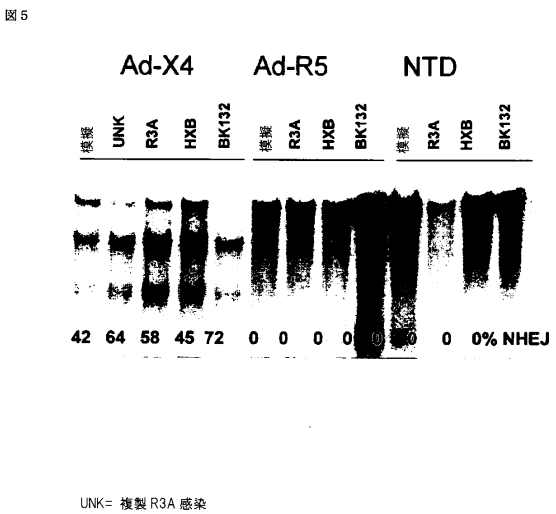
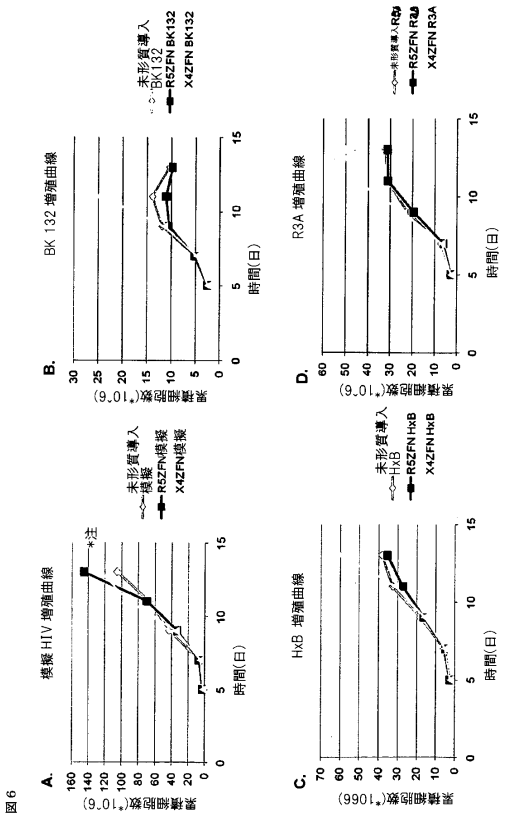



図４

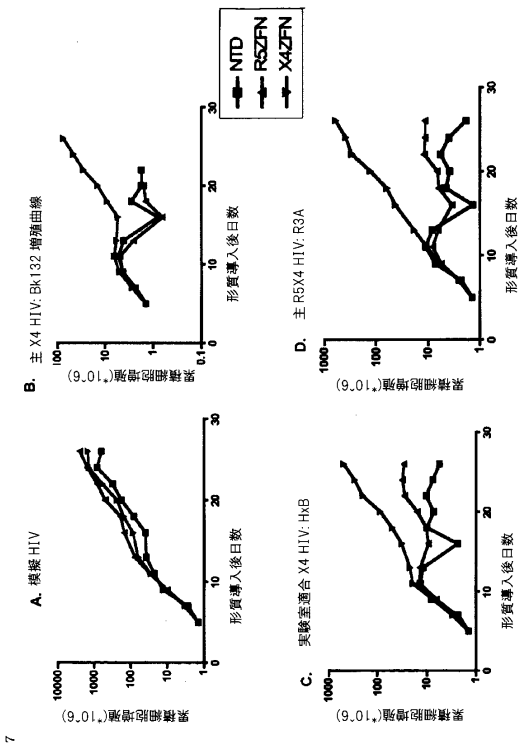
【図５】


Ad-X4
Ad-R5
NTD
模擬
UNK
R3A
HXB
BK132
42 64 58 45 72 0 0 0 0 0 0 0% NHEJ
UNK= 複製 R3A 感染

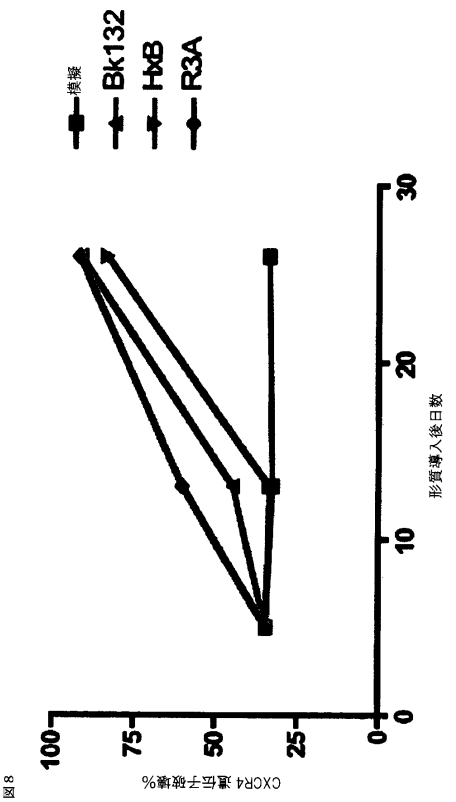
【図６】


A. 模擬 HIV 増殖曲線
B. BK 132 増殖曲線
C. HxB 増殖曲線
D. R3A 増殖曲線
累積細胞数(*10^6)
時間(日)
未形質導入
模擬
R5ZFN模擬
X4ZFN模擬
未形質導入
HxB
R5ZFN HxB
X4ZFN HxB
未形質導入
BK132
R5ZFN BK132
X4ZFN BK132
未形質導入
R3A
R5ZFN R3A
X4ZFN R3A

【図７】


A. 模擬 HIV
B. 主 X4 HIV: BK132 増殖曲線
C. 実験室適合 X4 HIV: HxB
D. 主 R5X4 HIV: R3A
累積細胞増殖(*10^6)
形質導入後日数
NTD
R5ZFN
X4ZFN

【図８】


模擬
Bk132
HxB
R3A
CXCR4 遺伝子破壊%
形質導入後日数

【図９】

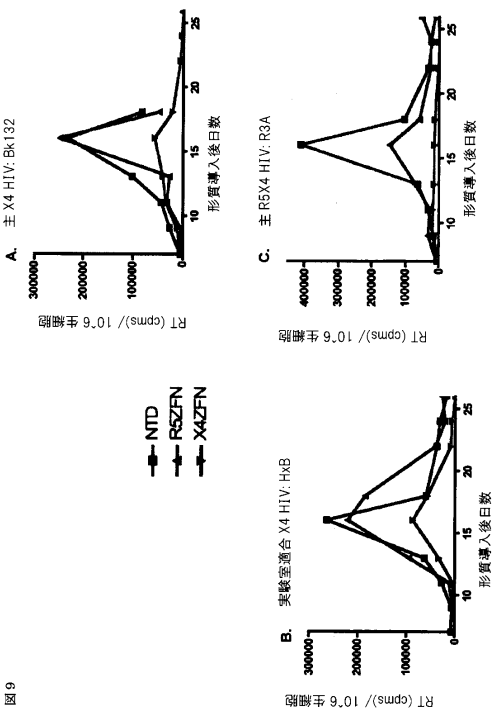



図９

【図１０】

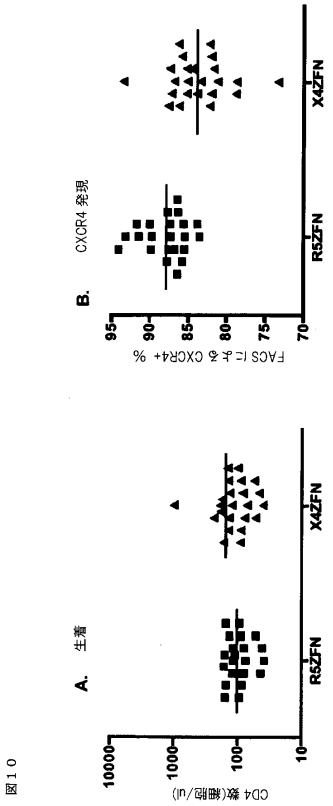



図１０

【図１１】

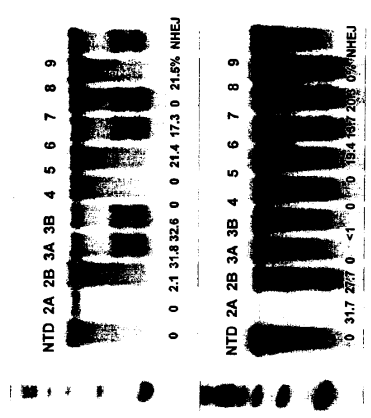



図１１

R5/X4 二重形質導入－形質導入後 14 日目

| # | 条件 | 加えた Ad ベクター |
|---|---|---|
| 1 | NTD | |
| 2a | 600 X4+600GFP | 1 日目 X4XFN, 7 日目 GFP |
| 2b | 600 X4+500 R5 | 1 日目 X4, 7 日目 R5 |
| 3a | 600 R3+600 GFP | 1 日目 R5, 7 日目 GFP |
| 3b | 600 R3 +600X4 | 1 日目 R5, 7 日目 X4 |
| 4 | 600 GFP | 1 日目 GFP |
| 5 | 1200 GFP | 1 日目 GFP |
| 6 | 600X4/600R5 | 1 日目 X4 および R5 |
| 7 | 300X4/300R5 | 1 日目 X4 および R5 |
| 8 | 300X4/300GFP | 1 日目 X4 および GFP |
| 9 | 300R5/300GFP | 1 日目 R5 および GFP |

【配列表】
0005932632000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | |
|---|---|---|---|---|
| ***C12N*** | ***5/10*** | ***(2006.01)*** | C12N | 5/10 |
| ***A61K*** | ***48/00*** | ***(2006.01)*** | A61K | 48/00 |
| ***A61P*** | ***31/18*** | ***(2006.01)*** | A61P | 31/18 |
| ***A61K*** | ***38/46*** | ***(2006.01)*** | A61K | 37/54 |

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(72)発明者 マイケル シー. ホームズ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４８０４, リッチモンド, カナル ブールバード ５０１, ポイント リッチモンド テク センター スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド
(72)発明者 ジェフリー シー. ミラー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４８０４, リッチモンド, カナル ブールバード ５０１, ポイント リッチモンド テク センター スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド
(72)発明者 ワン チャンビン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４８０４, リッチモンド, カナル ブールバード ５０１, ポイント リッチモンド テク センター スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 米国特許出願公開第２００４／０１１０９２３（ＵＳ, Ａ1）
国際公開第２００７／１３９９８２（WO, Ａ2）
特表２００７－５０１６２６（ＪＰ, Ａ）
米国特許出願公開第２００８／０１３１９６２（ＵＳ, Ａ1）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）