

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和3年3月25日(2021.3.25)

【公表番号】特表2020-507342(P2020-507342A)

【公表日】令和2年3月12日(2020.3.12)

【年通号数】公開・登録公報2020-010

【出願番号】特願2019-564394(P2019-564394)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/13	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 1 2 N	15/54	(2006.01)
C 1 2 N	15/864	(2006.01)
C 1 2 N	15/867	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/04	(2006.01)
A 6 1 K	38/46	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2015.01)
A 6 1 K	35/12	(2015.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)
A 6 1 P	35/02	(2006.01)
A 6 1 K	35/17	(2015.01)
A 6 1 K	35/28	(2015.01)
A 6 1 K	35/51	(2015.01)
A 6 1 K	35/26	(2015.01)
A 6 1 K	35/13	(2015.01)
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)

【F I】

C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/54	
C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/12	

A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	35/17	A
A 6 1 K	35/28	
A 6 1 K	35/51	
A 6 1 K	35/26	
A 6 1 K	35/13	
C 1 2 N	5/0783	

**【手続補正書】**

**【提出日】**令和3年2月9日(2021.2.9)

**【手続補正1】**

**【補正対象書類名】**特許請求の範囲

**【補正対象項目名】**全文

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】**

- (a) 第1の標的部位に対する第1の相同アーム対と、
- (b) 第2の標的部位に対する第2の相同アーム対と、
- (c) 1つ以上の導入遺伝子と、

を含む、DNAドナー修復鋳型。

**【請求項2】**

前記第1の相同アーム対が、前記第1の標的部位のDNA配列5'に対して相同である5'相同アームと、前記第1の標的部位のDNA配列3'に対して相同である3'相同アームと、を含む、請求項1に記載のDNAドナー修復鋳型。

**【請求項3】**

前記第2の相同アーム対が、前記第2の標的部位のDNA配列5'に対して相同である5'相同アームと、前記第2の標的部位のDNA配列3'に対して相同である3'相同アームと、を含む、請求項1または請求項2に記載のDNAドナー修復鋳型。

**【請求項4】**

前記第1の標的部位および/または前記第2の標的部位までの前記5'および3'相同アームの長さが独立して、約100塩基対～約500塩基対から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載のDNAドナー修復鋳型。

**【請求項5】**

前記第1の標的部位の前記5'相同アームが、前記第2の標的部位の前記5'相同アームの5'に位置する、請求項1～4のいずれか一項に記載のDNAドナー修復鋳型。

**【請求項6】**

前記第1の標的部位の前記3'相同アームが、前記第2の標的部位の前記3'相同アームの5'に位置する、請求項1～5のいずれか一項に記載のDNAドナー修復鋳型。

**【請求項7】**

前記第1の標的部位の前記3'相同アームが、前記第2の標的部位の前記3'相同アームの3'に位置する、請求項1～5のいずれか一項に記載のDNAドナー修復鋳型。

**【請求項8】**

前記第1の標的部位の前記5'相同アームおよび前記3'相同アームが、第1の導入遺伝子に隣接し、前記第2の標的部位の前記5'相同アームおよび前記3'相同アームが、第2の導入遺伝子に隣接する、請求項1～5のいずれか一項に記載のDNAドナー修復鋳型。

**【請求項9】**

前記第1の標的部位および前記第2の標的部位が、異なる遺伝子中にある、請求項1～

8 のいずれか一項に記載の DNA ドナー修復鑄型。

【請求項 10】

前記第1の標的部位または前記第2の標的部位が、 TCR 遺伝子中または免疫系チェックポイント遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の DNA ドナー修復鑄型。

【請求項 11】

前記第1の標的部位が、 TCR 遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位であり、前記第2の標的部位が、免疫系チェックポイント遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位である、請求項1～9のいずれか一項に記載の DNA ドナー修復鑄型。

【請求項 12】

前記第1の標的部位が、第1の免疫系チェックポイント遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位であり、前記第2の標的部位が、第2の免疫系チェックポイント遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位である、請求項1～9のいずれか一項に記載の DNA ドナー修復鑄型。

【請求項 13】

前記免疫系チェックポイント遺伝子、または第1の免疫系チェックポイント遺伝子および第2の免疫系チェックポイント遺伝子がそれぞれ独立して、プログラム細胞死タンパク質1(PD-1)、リンパ球活性化遺伝子3タンパク質(LAG-3)、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメインタンパク質3(TIM-3)、細胞傷害性Tリンパ球抗原-4(CTLA-4)、バンドTリンパ球アテニュエーター(BTLA)、T細胞免疫グロブリンおよび免疫受容体チロシン系阻害性モチーフドメイン(TIM GIT)、T細胞活性化のVドメインIg抑制因子(VISTA)、ならびにキラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)遺伝子からなる群から選択される、請求項10～12のいずれか一項に記載の DNA ドナー修復鑄型。

【請求項 14】

任意で、組換えアデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)またはレトロウイルスである、請求項1～13のいずれか一項に記載の DNA ドナー修復鑄型を含む、ウイルスベクター。

【請求項 15】

請求項1～13のいずれか一項に記載の DNA ドナー修復鑄型、または請求項14に記載のウイルスベクターを含む、細胞。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

特定の実施形態において、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫である。

[本発明1001]

DNA ドナー修復鑄型であって、

(a) 第1の標的部位に対する第1の相同アーム対と、

(b) 第2の標的部位に対する第2の相同アーム対と、

(c) 1つ以上の導入遺伝子と、を含む、DNA ドナー修復鑄型。

[本発明1002]

前記第1の相同アーム対が、前記第1の標的部位の DNA 配列5'に対して相同である5'相同アームと、前記第1の標的部位の DNA 配列3'に対して相同である3'相同アームと、を含む、本発明1001の DNA ドナー修復鑄型。

[本発明1003]

前記第2の相同アーム対が、前記第2の標的部位の DNA 配列5'に対して相同である5'

相同アームと、前記第2の標的部位のDNA配列3'に対して相同である3'相同アームと、を含む、本発明1001または本発明1002のDNAドナー修復鋳型。

[本発明1004]

前記第1の標的部位および/または前記第2の標的部位までの前記5'および3'相同アームの長さが独立して、約100塩基対～約2500塩基対から選択される、本発明1001～1003のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1005]

前記第1の標的部位および/または前記第2の標的部位までの前記5'および3'相同アームの長さが独立して、約100塩基対～約1500塩基対から選択される、本発明1001～1004のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1006]

前記第1の標的部位および/または前記第2の標的部位までの前記5'および3'相同アームの長さが独立して、約100塩基対～約1000塩基対から選択される、本発明1001～1005のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1007]

前記第1の標的部位および/または前記第2の標的部位までの前記5'および3'相同アームの長さが独立して、約100塩基対～約500塩基対から選択される、本発明1001～1006のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1008]

前記第1の標的部位および/または前記第2の標的部位までの前記5'および3'相同アームの長さが、約500塩基対である、本発明1001～1007のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1009]

前記第1の標的部位および/または前記第2の標的部位までの前記5'および3'相同アームの長さが、約300塩基対である、本発明1001～1008のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1010]

前記第1の標的部位および/または前記第2の標的部位までの前記5'および3'相同アームの長さが、約100塩基対である、本発明1001～1009のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1011]

前記第1の標的部位の前記5'相同アームが、前記第2の標的部位の前記5'相同アームの5'に位置する、本発明1001～1010のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1012]

前記第1の標的部位の前記3'相同アームが、前記第2の標的部位の前記3'相同アームの5'に位置する、本発明1001～1011のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1013]

前記第1の標的部位の前記3'相同アームが、前記第2の標的部位の前記3'相同アームの3'に位置する、本発明1001～1011のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1014]

前記第1の標的部位の前記5'相同アームおよび前記3'相同アームが、第1の導入遺伝子に隣接し、前記第2の標的部位の前記5'相同アームおよび前記3'相同アームが、第2の導入遺伝子に隣接する、本発明1001～1011のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1015]

前記第1の標的部位および前記第2の標的部位が、異なる遺伝子中にある、本発明1001～1014のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1016]

前記第1の標的部位または前記第2の標的部位が、T C R 遺伝子中の操作されたヌクレオゼ切断部位を含む、本発明1001～1015のいずれかのDNAドナー修復鋳型。

[本発明1017]

前記第1の標的部位または前記第2の標的部位が、免疫系チェックポイント遺伝子中または免疫抑制シグナル伝達成分をコードする遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位を含む、本発明1001～1015のいずれかのDNAドナー修復録型。

[本発明1018]

前記第1の標的部位が、TCR遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位であり、前記第2の標的部位が、免疫系チェックポイント遺伝子中または免疫抑制シグナル伝達成分をコードする遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位である、本発明1001～1015のいずれかのDNAドナー修復録型。

[本発明1019]

前記第1の標的部位が、第1の免疫系チェックポイント遺伝子中または免疫抑制シグナル伝達成分をコードする遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位であり、前記第2の標的部位が、第2の免疫系チェックポイント遺伝子中または免疫抑制シグナル伝達成分をコードする遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位である、本発明1001～1015のいずれかのDNAドナー修復録型。

[本発明1020]

前記免疫系チェックポイント遺伝子が独立して、プログラム細胞死タンパク質1(PD-1)、リンパ球活性化遺伝子3タンパク質(LAG-3)、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメインタンパク質3(TIM-3)、細胞傷害性Tリンパ球抗原-4(CTLA-4)、バンドTリンパ球アテニュエーター(BTLA)、T細胞免疫グロブリンおよび免疫受容体チロシン系阻害性モチーフドメイン(TIGIT)、T細胞活性化のVドメインIg抑制因子(VISTA)、ならびにキラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)遺伝子からなる群から選択される、本発明1017～1019のいずれかのDNAドナー修復録型。

[本発明1021]

免疫抑制シグナル伝達成分をコードする前記遺伝子が独立して、インターロイキン受容体10アルファ、形質転換成長因子受容体I(TGF RI)、形質転換成長因子受容体II(TGF RII)、アリール炭化水素受容体(AHR)、血清およびグルココルチコイド制御キナーゼ1(SGK1)、結節性硬化症複合体2(TSC2)、フォンヒッペル・リンダウ腫瘍抑制因子(VHL)、アデノシンA2a受容体(A2AR)、ならびにCb1癌原遺伝子B(CBLB)からなる群から選択される、本発明1017～1019のいずれかのDNAドナー修復録型。

[本発明1022]

前記操作されたヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、メガTAL、TALEN、ZFN、およびCRISPR/Casヌクレアーゼからなる群から選択される、本発明1016～1021のいずれかのDNAドナー修復録型。

[本発明1023]

前記操作されたヌクレアーゼが、I-AabMI、I-AaeMI、I-AniI、I-ApaMI、I-CapIII、I-CapIV、I-CkaMI、I-CpaMI、I-CpaMII、I-CpaMIII、I-CpaMIV、I-CpaMV、I-CpaV、I-CraMI、I-EjeMI、I-GpeMI、I-GpiI、I-GzeMI、I-GzeMII、I-GzeMIII、I-HjeMI、I-LtrII、I-LtrI、I-LtrWI、I-MpeMI、I-MveMI、I-NcrII、I-NcrI、I-NcrMI、I-OheMI、I-OnuI、I-Osomi、I-OsomI、I-OsomII、I-OsomIV、I-PanMI、I-PanMII、I-PanMIII、I-PanMIV、I-PnoMI、I-ScumI、I-SmaMI、I-SscMI、およびI-Vdi141Iからなる群から選択されるLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼ(LHE)から操作されたメガヌクレアーゼである、本発明1016～1022のいずれかのDNAドナー修復録型。

[本発明1024]

前記操作されたヌクレアーゼが、I-CpaMI、I-HjeMI、I-OnuI、I-

- P a n M I 、および S m a M I からなる群から選択される L H E から操作されたメガヌクレアーゼである、本発明1016～1023のいずれかの D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1025]

前記操作されたヌクレアーゼが、 I - O n u I L H E である、本発明1016～1024のいずれかの D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1026]

前記操作されたヌクレアーゼが、 I - S m a M I L H E である、本発明1016～1024のいずれかの D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1027]

前記操作されたヌクレアーゼが、 T A L E D N A 結合ドメインおよび本発明1022～1026のいずれかの操作されたメガヌクレアーゼを含むメガ T A L である、本発明1016～1022のいずれかの D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1028]

前記 T A L E 結合ドメインが、約9.5個の T A L E 反復単位～約15.5個の T A L E 反復単位を含む、本発明1027の D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1029]

前記 T A L E 結合ドメインが、約9.5個の T A L E 反復単位、約10.5個の T A L E 反復単位、約11.5個の T A L E 反復単位、約12.5個の T A L E 反復単位、約13.5個の T A L E 反復単位、約14.5個の T A L E 反復単位、または約15.5個の T A L E 反復単位を含む、本発明1027の D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1030]

前記1つ以上の導入遺伝子が、免疫能エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または操作された抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含む、本発明1001～1029のいずれかの D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1031]

前記1つ以上の導入遺伝子が、前記免疫能エンハンサー、前記免疫抑制シグナルダンパー、または前記操作された抗原受容体をコードする前記ポリヌクレオチドに操作可能に連結した R N A ポリメラーゼ I I プロモーターを更に含む、本発明1001～1030のいずれかの D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1032]

前記1つ以上の導入遺伝子が、1つ以上の C A R をコードする、本発明1030または本発明1031の D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1033]

前記1つ以上の C A R が、抗 B C M A C A R および抗 C D 19 C A R からなる群から選択される、本発明1032の D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1034]

前記 R N A ポリメラーゼ I I プロモーターが、短い E F 1 プロモーター、長い E F 1 プロモーター、ヒト R O S A 26 遺伝子座、ユビキチン C ( U B C ) プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 ( P G K ) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリ - アクチン ( C A G ) プロモーター、 - アクチンプロモーターおよび骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失、 d l 587 r e v プライマー結合部位置換 ( M N D ) プロモーターからなる群から選択される、本発明1031の D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1035]

前記ポリヌクレオチドが、1つ以上の免疫能エンハンサー、免疫抑制シグナルダンパー、または操作された抗原受容体に操作可能に連結した、それらの間に散在した、かつ／またはそれらに隣接する、1つ以上の自己切断ウイルスペプチドを更にコードする、本発明1030の D N A ドナー修復鑄型。

[本発明1036]

前記自己切断ウイルスペプチドが、2 A ペプチドである、本発明1035の D N A ドナー修

復鑄型。

[本発明1037]

前記ポリヌクレオチドが、異種ポリアデニル化シグナルを更に含む、本発明1030～1036のいずれかのDNAドナー修復鑄型。

[本発明1038]

前記1つ以上の免疫抑制シグナルダンパーが、免疫抑制因子に対抗する酵素機能；免疫抑制因子に結合するエキソドメイン（任意で、前記エキソドメインが、抗体もしくはその抗原結合断片である）；免疫抑制因子に結合するエキソドメインおよび膜貫通ドメイン；または免疫抑制因子に結合するエキソドメイン、膜貫通ドメイン、および免疫抑制シグナルを伝達することができない修飾エンドドメインを含む、本発明1030～1037のいずれかのDNAドナー修復鑄型。

[本発明1039]

前記1つ以上の免疫能エンハンサーが独立して、二重特異性T細胞エンゲージャー分子（BiTE）、免疫増強因子、およびフリップ受容体からなる群から選択される、本発明1030～1037のいずれかのDNAドナー修復鑄型。

[本発明1040]

前記1つ以上の免疫能エンハンサーが独立して、サイトカイン、ケモカイン、細胞毒、サイトカイン受容体、およびそれらのバリエントからなる群から選択される、本発明1030～1037のいずれかのDNAドナー修復鑄型。

[本発明1041]

前記1つ以上の操作された抗原受容体が独立して、操作されたTCR、CAR、DAR<sub>I</sub>C、またはゼータカインからなる群から選択される、本発明1030～1035のいずれかのDNAドナー修復鑄型。

[本発明1042]

前記1つ以上の操作された抗原受容体が、CARである、本発明1041のDNAドナー修復鑄型。

[本発明1043]

前記1つ以上のCARが、抗BCMA CARおよび抗CD19 CARからなる群から選択される、本発明1042のDNAドナー修復鑄型。

[本発明1044]

本発明1001～1043のいずれかのDNAドナー修復鑄型を含む、ウイルスベクター。

[本発明1045]

前記ウイルスベクターが、組換えアデノ随伴ウイルスベクター（rAAV）またはレトロウイルスである、本発明1044のウイルスベクター。

[本発明1046]

前記rAAVが、AAV2由来の1つ以上のITRを有する、本発明1045のウイルスベクター。

[本発明1047]

前記rAAVが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAV10からなる群から選択される血清型を有する、本発明1045または本発明1046のウイルスベクター。

[本発明1048]

前記rAAVが、AAV6血清型を有する、本発明1045のウイルスベクター。

[本発明1049]

前記レトロウイルスが、レンチウイルスである、本発明1045のウイルスベクター。

[本発明1050]

前記レンチウイルスが、インテグラーゼ欠損レンチウイルスである、本発明1049のウイルスベクター。

[本発明1051]

本発明1001～1043のいずれかのDNAドナー修復鑄型、または本発明1044～1050のいず

れかのウイルスベクターを含む、細胞。

[本発明1052]

前記1つ以上の導入遺伝子が、相同性指向性修復によって前記第1の標的部位および前記第2の標的部位に挿入されている、本発明1051の細胞。

[本発明1053]

前記細胞が、造血細胞である、本発明1051または本発明1052の細胞。

[本発明1054]

前記細胞が、免疫エフェクター細胞である、本発明1051～1053のいずれかの細胞。

[本発明1055]

前記細胞が、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、またはそれらの組み合わせである、本発明1051～1054のいずれかの細胞。

[本発明1056]

前記細胞が、T細胞である、本発明1051～1055のいずれかの細胞。

[本発明1057]

前記細胞が、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、またはヘルパーT細胞である、本発明1051～1056のいずれかの細胞。

[本発明1058]

前記細胞の供給源が、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、または腫瘍である、本発明1051～1057のいずれかの細胞。

[本発明1059]

本発明1001～1043のいずれかのDNAドナー修復錆型、本発明1044～1050のいずれかのウイルスベクター、または本発明1051～1058のいずれかの細胞を含む、組成物。

[本発明1060]

生理学的に許容される賦形剤と、本発明1001～1043のいずれかのDNAドナー修復錆型、本発明1044～1050のいずれかのウイルスベクター、または本発明1051～1058のいずれかの細胞と、を含む、組成物。

[本発明1061]

癌、感染性疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、および免疫不全、またはそれらに関連する病態の少なくとも1つの症状を治療、予防、または対処する方法であって、有効量の本発明1059または本発明1060の組成物を対象に投与することと、任意で、前記第1の標的部位にDSBを、および前記第2の標的部位にDSBを導入するように設計された、1つ以上の操作されたヌクレアーゼをコードする、有効量の1つ以上のポリヌクレオチドを前記対象に投与することと、を含む、方法。

[本発明1062]

固体癌を治療する方法であって、有効量の本発明1059または本発明1060の組成物を前記対象に投与することと、任意で、前記第1の標的部位および前記第2の標的部位にDSBを導入するように設計された、1つ以上の操作されたヌクレアーゼをコードする、有効量の1つ以上のポリヌクレオチドを前記対象に投与することと、を含む、方法。

[本発明1063]

前記固体癌が、肝臓癌、肺臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、脳癌、肉腫、頭頸部癌、骨癌、甲状腺癌、腎臓癌、または皮膚癌を含む、本発明1062の方法。

。

[本発明1064]

血液学的悪性腫瘍を治療する方法であって、有効量の本発明1059または本発明1060の組成物を前記対象に投与することと、任意で、前記第1の標的部位および前記第2の標的部位にDSBを導入するように設計された、1つ以上の操作されたヌクレアーゼをコードする、有効量の1つ以上のポリヌクレオチドを前記対象に投与することと、を含む、方法。

[本発明1065]

前記血液学的悪性腫瘍が、白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫である、本発明1064

の方法。

[本発明1066]

前記第1の標的部位または前記第2の標的部位が、T C R 遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位を含む、本発明1001～1015のいずれかのDNAドナー修復錆型。

[本発明1067]

前記第1の標的部位または前記第2の標的部位が、B C L 11 A 遺伝子座、K L F 1 遺伝子座、S O X 6 遺伝子座、G A T A 1 遺伝子座、およびL S D 1 遺伝子座を含むがこれらに限定されない、- グロビン遺伝子発現およびH b F の抑圧に寄与する遺伝子、- グロビン遺伝子座のサラセミア対立遺伝子、または - グロビン遺伝子座の鎌状化対立遺伝子中の操作されたヌクレアーゼ切断部位を含む、本発明1001～1015のいずれかのDNAドナー修復錆型。

[本発明1068]

前記操作されたヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、メガT A L、T A L E N、Z F N、およびC R I S P R / C a s ヌクレアーゼからなる群から選択される、本発明1067のDNAドナー修復錆型。

[本発明1069]

前記操作されたヌクレアーゼが、I - A a b M I、I - A a e M I、I - A n i I、I - A p a M I、I - C a p I I I、I - C a p I V、I - C k a M I、I - C p a M I、I - C p a M I I、I - C p a M I I I、I - C p a M I V、I - C p a M V、I - C p a V、I - C r a M I、I - E j e M I、I - G p e M I、I - G p i I、I - G z e M I、I - G z e M I I、I - G z e M I I I、I - H j e M I、I - L t r I I、I - L t r I、I - L t r W I、I - M p e M I、I - M v e M I、I - N c r I I、I - N c r l、I - N c r M I、I - O h e M I、I - O n u I、I - O s o M I、I - O s o M I I、I - O s o M I I I、I - O s o M I V、I - P a n M I、I - P a n M I I、I - P a n M I I I、I - P n o M I、I - S c u M I、I - S m a M I、I - S s c M I、およびI - V d i 141 I からなる群から選択されるL A G L I D A D G ホーミングエンドヌクレアーゼ (L H E) から操作されたメガヌクレアーゼである、本発明1067または1068のDNAドナー修復錆型。

[本発明1070]

前記操作されたヌクレアーゼが、I - C p a M I、I - H j e M I、I - O n u I、I - P a n M I、およびS m a M I からなる群から選択されるL H E から操作されたメガヌクレアーゼである、本発明1067～1069のいずれかのDNAドナー修復錆型。

[本発明1071]

前記操作されたヌクレアーゼが、I - O n u I L H E である、本発明1067～1070のいずれかのDNAドナー修復錆型。

[本発明1072]

前記操作されたヌクレアーゼが、I - S m a M I L H E である、本発明1067～1070のいずれかのDNAドナー修復錆型。

[本発明1073]

前記操作されたヌクレアーゼが、T A L E DNA結合ドメインおよび本発明1068～1072のいずれかの操作されたメガヌクレアーゼを含むメガT A L である、本発明1067～1072のいずれかのDNAドナー修復錆型。

[本発明1074]

前記T A L E 結合ドメインが、約9.5個のT A L E 反復単位～約15.5個のT A L E 反復単位を含む、本発明1073のDNAドナー修復錆型。

[本発明1075]

前記T A L E 結合ドメインが、約9.5個のT A L E 反復単位、約10.5個のT A L E 反復単位、約11.5個のT A L E 反復単位、約12.5個のT A L E 反復単位、約13.5個のT A L E 反復単位、約14.5個のT A L E 反復単位、または約15.5個のT A L E 反復単位を含む、本発明1073のDNAドナー修復錆型。

[本発明1076]

前記1つ以上の導入遺伝子が、 - グロビン、 - グロビン、 - グロビン、 - グロビン A - T 87 Q 、 - グロビン A - T 87 Q / K 120 E / K 95 E 、または - グロビン A - T 87 Q / G 16 D / E 22 A をコードするポリヌクレオチドを含む、本発明1067～1075のいずれかのDNAドナー修復錠型。

[本発明1077]

前記1つ以上の導入遺伝子が、前記グロビンまたは抗錠状化グロビンをコードする前記ポリヌクレオチドに操作可能に連結したRNAポリメラーゼIIプロモーターを更に含む、本発明1067～1076のいずれかのDNAドナー修復錠型。

[本発明1078]

前記RNAポリメラーゼIIプロモーターが、ヒト - グロビンLCRおよびプロモーター、短いEF1プロモーター、長いEF1プロモーター、ヒトROS A26遺伝子座、ユピキチンC(UBC)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ - アクチン(CAG)プロモーター、 - アクチンプロモーターおよび骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失、d1587revプライマー結合部位置換(MND)プロモーターからなる群から選択される、本発明1077のDNAドナー修復錠型。

[本発明1079]

前記ポリヌクレオチドが、1つ以上のグロビンまたは抗錠状化グロビンに操作可能に連結した、それらの間に散在した、かつ/またはそれらに隣接する、1つ以上の自己切断ウイルスベプチドを更にコードする、本発明1078のDNAドナー修復錠型。

[本発明1080]

本発明1067～1079のいずれかのDNAドナー修復錠型を含む、ウイルスベクター。

[本発明1081]

前記ウイルスベクターが、組換えアデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)またはレトロウイルスである、本発明1080のウイルスベクター。

[本発明1082]

前記rAAVが、AAV2由来の1つ以上のITRを有する、本発明1081のウイルスベクター。

[本発明1083]

前記rAAVが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAV10からなる群から選択される血清型を有する、本発明1081または本発明1082のウイルスベクター。

[本発明1084]

前記レトロウイルスが、レンチウイルスである、本発明1081のウイルスベクター。

[本発明1085]

前記レンチウイルスが、インテグラーゼ欠損レンチウイルスである、本発明1081のウイルスベクター。

[本発明1086]

本発明1067～1079のいずれかのDNAドナー修復錠型、または本発明1080～1085のいずれかのウイルスベクターを含む、細胞。

[本発明1087]

前記1つ以上の導入遺伝子が、相同性指向性修復によって前記第1の標的部位および前記第2の標的部位に挿入されている、本発明1086の細胞。

[本発明1088]

前記細胞が、造血細胞である、本発明1086または本発明1087の細胞。

[本発明1089]

前記細胞が、CD34<sup>+</sup>細胞である、本発明1086～1088のいずれかの細胞。

[本発明1090]

前記細胞が、CD133<sup>+</sup>細胞である、本発明1086～1089のいずれかの細胞。

[本発明1091]

本発明1067～1079のいずれかのDNAドナー修復鋳型、本発明1080～1085のいずれかのウイルスベクター、または本発明1086～1090のいずれかの細胞を含む、組成物。

[本発明1092]

生理学的に許容される賦形剤と、本発明1067～1079のいずれかのDNAドナー修復鋳型、本発明1080～1085のいずれかのウイルスベクター、または本発明1086～1090のいずれかの細胞と、を含む、組成物。

[本発明1093]

対象におけるヘモグロビン異常症を治療する方法であって、本発明1086～1090のいずれかの細胞または本発明1091または本発明1092の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

[本発明1094]

対象におけるヘモグロビン異常症の少なくとも1つの症状を寛解する方法であって、本発明1086～1090のいずれかの細胞または本発明1091または本発明1092の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

[本発明1095]

対象におけるサラセミアを治療する方法であって、有効量の本発明1086～1090のいずれかの細胞または本発明1091または本発明1092の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

[本発明1096]

前記サラセミアが、 - サラセミアである、本発明1095の方法。

[本発明1097]

対象における鎌状赤血球症を治療する方法であって、有効量の本発明1086～1090のいずれかの細胞または本発明1091または本発明1092の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

[本発明1098]

対象における - サラセミアを治療する方法であって、有効量の本発明1086～1090のいずれかの細胞または本発明1091または本発明1092の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。