

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5841996号  
(P5841996)

(45) 発行日 平成28年1月13日(2016.1.13)

(24) 登録日 平成27年11月20日(2015.11.20)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)  
C 12 N 5/10 (2006.01)C 12 N 15/00 Z N A A  
C 12 N 5/00 1 O 2

請求項の数 13 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2013-505077 (P2013-505077)  
 (86) (22) 出願日 平成23年4月13日 (2011.4.13)  
 (65) 公表番号 特表2013-523180 (P2013-523180A)  
 (43) 公表日 平成25年6月17日 (2013.6.17)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2011/032216  
 (87) 國際公開番号 WO2011/130345  
 (87) 國際公開日 平成23年10月20日 (2011.10.20)  
 審査請求日 平成26年3月20日 (2014.3.20)  
 (31) 優先権主張番号 61/431,957  
 (32) 優先日 平成23年1月12日 (2011.1.12)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/408,856  
 (32) 優先日 平成22年11月1日 (2010.11.1)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 311016949  
 シグマーアルドリッヂ・カンパニー・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー Sigma-Aldrich Co., LLC  
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スブルース・ストリート3050番  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】異種タンパク質を発現するための内因性プロモーターの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも一つの異種タンパク質の発現が内因性調節系により調節されるように、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列を細胞の染色体内にインテグレートするための方法であって、該方法が：

a) (i) 少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼあるいは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸、該標的エンドヌクレアーゼは標的配列に結合することができ、かつアクチン、チューブリン、またはラミンから選択される内因性タンパク質をコードする標的とされる染色体配列における切断部位を切斷することができるものである；および (ii) 異種タンパク質コード配列を形成するために 2 A ペプチドをコードする配列に連結される、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列を含み、該異種タンパク質コード配列が切断部位の両側と実質的な配列同一性を有する上流配列および下流配列に挟まるものである、少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを、細胞内に導入すること；および

b) 標的エンドヌクレアーゼにより標的とされる染色体配列内に導入された二本鎖切断が、該ドナーポリヌクレオチドにおける異種タンパク質コード配列が、標的とされる染色体配列内にインフレームでインテグレートされ、それにより少なくとも一つの異種タンパク質の発現が、該内因性タンパク質の発現を調節する内因性調節系により調節されるよう、相同性指向修復過程により修復されるような条件下で、細胞を維持すること、を含む方法。

10

20

**【請求項 2】**

標的エンドヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

2 A ペプチドをコードする配列が異種タンパク質をコードする配列に 5' または 3' で連結される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

異種タンパク質コード配列が、標的とされる染色体配列のタンパク質コード配列の開始付近または終止付近にインテグレートされる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

少なくとも一つの異種タンパク質が抗体の重鎖または軽鎖である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

細胞がヒト細胞またはほ乳類細胞である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

標的エンドヌクレアーゼが、配列番号 1 および 2 、配列番号 3 および 4 、配列番号 5 および 6 、または配列番号 7 および 8 と少なくとも 80% の配列同一性を有する一対の配列に結合する一対のジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

配列同一性が 85% 、 90% 、 95% 、 99% 、または 100% である、請求項 7 に記載の方法。

10

**【請求項 9】**

細胞がチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞であり、標的とされる染色体配列がアクチンタンパク質をコードし、かつジンクフィンガーヌクレアーゼが配列番号 7 および配列番号 8 から選択される配列に結合する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 10】**

少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含み、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列が、少なくとも一つの異種タンパク質の発現が、アクチン、チューブリン、またはラミンから選択される内因性タンパク質の発現と協調的に制御されるように、該内因性タンパク質をコードする染色体配列とインフレームでインテグレートされるものである、細胞。

30

**【請求項 11】**

内因性タンパク質および異種タンパク質のそれぞれが個別の構成要素として生成される、請求項 10 に記載の細胞。

**【請求項 12】**

少なくとも一つの異種タンパク質の発現を調節するために、内因性調節系を使用するための方法であって、該方法が：

(a) 2 A ペプチドをコードする配列に連結された少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含み、異種タンパク質および 2 A ペプチドをコードする配列が、アクチン、チューブリン、またはラミンから選択される内因性タンパク質をコードする染色体配列とインフレームでインテグレートされるものである、細胞を提供すること；および

40

(b) 内因性調節系の活性化が、異種タンパク質、 2 A ペプチド、および内因性タンパク質をコードする 1 つの転写産物を生成し、ここに 2 A ペプチドが、異種タンパク質および内因性タンパク質のそれぞれが個別の構成要素として生産されるように翻訳を分断させるものであるような条件下で、細胞を維持すること、を含む方法。

**【請求項 13】**

細胞がチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞であり、染色体配列がアクチンタンパク質をコードし、かつ異種タンパク質が抗体の重鎖または軽鎖である、請求項 12 に記

50

載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、2010年4月13日に出願された米国仮特許出願第61/323,702号、2010年4月13日に出願された米国仮特許出願第61/323,719号、2010年4月13日に出願された米国仮特許出願第61/323,698号、2010年7月23日に出願された米国仮特許出願第61/367,017号、2010年10月7日に出願された米国仮特許出願第61/390,668号、2010年11月1日に出願された米国仮特許出願第61/408,856号、および2011年1月12日に出願された米国仮特許出願第61/431,957号の利益を主張する。 10

【0002】

発明の分野

本発明は一般に、異種タンパク質の発現を調節するための、内因性転写制御経路の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

ほ乳類細胞内で組換えタンパク質を発現することにはいくつかの課題がある。第一に、異種DNAがほ乳類ゲノム内に安定に組み込まれる必要がある。ウイルス性および非ウイルス性トランスクレオニクション法などの多数の方法は、DNAをランダムにゲノムにインテグレートし、オフターゲット効果(off-target effect)および発現のばらつき(variable expression)を作りだす。組換えをベースとする戦略(例えば、Cre-loxPまたはFlp-FRT)は、確定した位置への異種DNAの挿入を可能にするが、第一に、特定の組換え部位を含む細胞株を作りだし、特徴付けなければならない。これは時間のかかる過程であるだけでなく、リコンビナーゼ部位がランダムに配置されるものである。第二に、異種DNAが強力なプロモーターに連結される必要がある。一般に、ウイルス起源のプロモーターが用いられるが、これらはサイレンシングの影響を受けやすい。異種DNAを、それが強力な内因性プロモーターから発現されるように、ほ乳類ゲノム内へ正確に標的化およびインテグレートできることが望ましいだろう。 20 30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書では、内因性調節系が異種タンパク質の発現を調節するように、ゲノムにおいて標的とされる位置内へ異種タンパク質をコードする配列をインテグレートするための方法が提供される。

【0005】

本開示の一つの態様は、少なくとも一つの異種タンパク質の発現が内因性調節系により調節されるように、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列を細胞の染色体にインテグレートするための方法を包含する。該方法は、(i)少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼあるいは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸、ここに該標的エンドヌクレアーゼは標的配列に結合することができ、かつ内因性タンパク質をコードする染色体配列における切断部位を切断することができるものである；および(ii)異種タンパク質コード配列を形成するために2Aペプチドをコードする配列に連結される、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列を含む、少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを、細胞内に導入することを含む。ドナーポリヌクレオチドにおける異種タンパク質コード配列は、染色体配列における切断部位の両側と実質的な配列同一性を有する上流配列および下流配列に挟まれる。該方法はさらに、標的エンドヌクレアーゼにより染色体配 40 50

列内に導入された二本鎖切斷が、該ドナーポリヌクレオチドにおける異種タンパク質コード配列が、標的とされる染色体配列内にインフレームでインテグレートされ、それにより少なくとも一つの異種タンパク質の発現が、内因性タンパク質の発現を調節する内因性調節系により調節されるように、相同性指向修復過程 (homology-directed repair process) により修復されるような条件下で、細胞を維持すること、を含む。

#### 【0006】

別の態様では、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列が内因性タンパク質をコードする染色体配列とインフレームでインテグレートされる、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含む細胞を提供する。少なくとも一つの異種タンパク質の発現は、細胞において内因性タンパク質の発現と協調的に制御される。10

#### 【0007】

本開示のまた別の態様はドナーポリヌクレオチドを包含する。該ドナーポリヌクレオチドは、異種タンパク質コード配列を形成するために2Aペプチドをコードする配列に連結される、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列を含む。さらに、該ドナーポリヌクレオチドにおける異種タンパク質コード配列は、標的細胞の染色体配列における切断部位の両側と実質的な配列同一性を共有する上流配列および下流配列に挟まれる。

#### 【0008】

さらなる態様は、内因性タンパク質をコードする染色体配列内に、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列をインテグレートするためのキットを提供する。該キットは、ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする少なくとも一つの核酸を含み、ここに該ジンクフィンガーヌクレアーゼは標的配列に結合することができ、かつ染色体配列における切断部位を切斷することができるものである。該キットはさらに、少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを含む。該ドナーポリヌクレオチドは、異種タンパク質コード配列を形成するために2Aペプチドをコードする配列に連結される、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列を含み、ここに該異種タンパク質配列は、細胞の染色体配列における切断部位の両側と実質的な配列同一性を有する上流配列および下流配列に挟まるものである。20

#### 【0009】

また別の態様は、少なくとも一つの異種タンパク質の発現を調節するために、内因性調節系を使用するための方法を提供する。該方法は、2Aペプチドをコードする配列に連結された少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含む細胞を提供することを含み、ここに異種タンパク質および2Aペプチドをコードする配列は内因性タンパク質をコードする染色体配列とインフレームでインテグレートされるものである。該方法はさらに、内因性調節系の活性化が、異種タンパク質、2Aペプチド、および内因性タンパク質をコードする1つの転写産物を生成し、ここに2Aペプチドが、異種および内因性タンパク質のそれぞれが個別の構成要素 (discrete entity) として生産されるように翻訳を分断させる (disrupt) ものであるような条件下で、細胞を維持すること、を含む。30

#### 【0010】

本開示の他の態様および特徴は、以下に、より詳細に記載される。

#### 【0011】

##### カラー図面の参照

本願は、カラーで制作された少なくとも一つの写真を含む。カラー写真付きの本特許出願公報の写しは、請求および必要手数料の支払いにより、特許庁から提供されるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1】図1は、ヒトTUBA1B遺伝子座 (locus) での標的化インテグレーション40

50

ンを表す。(A)は、異種コード配列のインテグレーションのための標的領域、染色体標的領域上のZFN結合部位(囲まれた領域)、ZFN切断部位(黄色の矢印)、およびインテグレーション部位(緑色の矢印)での染色体配列(配列番号9)を示す概略図である。インテグレーション部位は切断部位の7bp下流であった。(B)は、TUBA1B遺伝子座、インテグレーション部位、SH2バイオセンサーの設計、およびインテグレーション成功後に発現されるタンパク質の概略図を示す。

## 【0013】

【図2】図2は、標的領域でTUBA1A配列に挟まれるSH2バイオセンサー配列を含むドナープラスミドのマップを表す。

## 【0014】

【図3】図3は、野生型および標的化インテグレーションを備える細胞のウェスタンプロットの画像を示す。

## 【0015】

【図4】図4は、GFP-2×SH2(Grb2)-2Aタンパク質を発現する、個々の単離された細胞クローニングの微分干渉コントラスト(DIC)顕微鏡画像および蛍光顕微鏡画像を示す。蛍光画像は、100ng/mLのEGFへの暴露後のバイオセンサー移行(biosensor translocation)の時間経過を示す。

## 【0016】

【図5】図5は、ヒトACTB遺伝子座での標的化インテグレーションを表す。異種コード配列のインテグレーションのための標的領域、染色体標的領域におけるZFN結合部位(黄色の配列)、ZFN切断部位(上部、黄色の矢印)、およびタグ配列インテグレーション部位(下部、緑/黄色の矢印)での染色体配列(配列番号10)が示される。

## 【0017】

【図6】図6は、標的領域でACTB配列に挟まれるSH2バイオセンサー配列を含むドナープラスミドのマップを表す。

## 【0018】

【図7】図7は、GFP-2×SH2(Grb2)-2A(上部パネル)およびRFP-アクチン(下部パネル)を発現する個々の単離された細胞クローニングの蛍光顕微鏡画像を表す。100ng/mLのEGFへの暴露後の時間経過が示される。

## 【0019】

【図8】図8は、LMNB1遺伝子座での標的化インテグレーションを表す。異種コード配列のインテグレーションのための標的領域、染色体標的領域におけるZFN結合部位(黄色の配列)、ZFN切断部位(黄色の矢印)、およびタグ配列インテグレーション部位(緑色の矢印)での染色体配列(配列番号11)が示される。

## 【0020】

【図9】図9は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞のACTB遺伝子座における標的化インテグレーションの部位を示す。異種コード配列のインテグレーションのための標的領域、ZFN結合部位(囲まれた領域)、ZFN切断部位、および標的化インテグレーション部位での染色体配列(配列番号12)が示される。

## 【0021】

【図10】図10は、ZFN切断部位の上流および下流の、CHOのACTB配列に挟まれるSEAP-2A-GFP配列を含むドナープラスミドのマップを表す。

## 【0022】

【図11】図11は、CHO細胞のACTB遺伝子座内へのSEAP-2A-GFP配列の標的化インテグレーションのジャンクションPCR解析を表す。増幅された断片は予想されるサイズである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0023】

発明の詳細な説明

異種タンパク質の発現が内因性転写制御系により調節されるように、少なくとも一つの

10

20

30

40

50

異種タンパク質をコードする配列を、細胞染色体において標的とされる位置内にインテグレートするための方法が、本明細書で開示される様々な態様のうちの一つである。それゆえ、外因性（例えば、ウイルス性）プロモーターを使用するよりも、プロモーター配列だけでなく、転写開始部位の上流および下流に位置する他のシス調節因子（*c i s r e g u l a t o r y element*）を含む内因性の系により、発現が調節される。有利なことに、内因性の系はサイレンシング効果の影響を受けにくい。さらに、2 Aペプチドコード配列に異種コード配列を連結することにより、翻訳の間、個々の異種タンパク質および内因性タンパク質が作られる。異種タンパク質をコードする配列は、標的エンドヌクレアーゼゲノム改変（*g e n o m e e d i t i n g*）過程により、標的とされる染色体位置内にインテグレートされる。本明細書では、内因性調節系に作動可能なように連結された（*o p e r a b l y l i n k e d*）少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含む細胞、および異種タンパク質を発現するために内因性調節系を用いるための方法もまた提供される。

#### 【0024】

##### (I) 発現が内因性調節系により調節される異種配列を含む細胞

本開示の一つの態様は、発現が内因性調節系により調節される、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含む細胞を包含する。特に、異種タンパク質をコードする配列が、内因性タンパク質をコードする内因性染色体配列とインフレームでインテグレートされる。標的エンドヌクレアーゼゲノム改変を介する過程を用いて、異種コード配列を対象の内因性染色体配列に標的化およびインテグレートさせる。さらに、異種コード配列は2 Aペプチドコード配列に連結される。転写の活性化により、異種および内因性配列は単一の転写産物として転写される。翻訳の間、異種タンパク質が内因性タンパク質から「切断」され、それによって1つのオープンリーディングフレームから二以上のタンパク質の協調した合成を可能にするように、2 Aペプチドが翻訳を分断させる。

#### 【0025】

##### (a) 異種配列

異種タンパク質（单数または複数）の同一性（*i d e n t i t y*）は変化でき、変化するであろう。一般的に、任意のタンパク質をコードする配列が、標的とされる染色体位置内にインテグレートされてもよい。異種タンパク質は、天然に存在するタンパク質またはそれらの断片、組換えタンパク質、融合タンパク質、レポータータンパク質、タグ付きタンパク質、野生型タンパク質、治療用タンパク質、診断用タンパク質、抗体などであってもよい。例えば、異種タンパク質は抗体の重鎖あるいは軽鎖とすることができます。異種タンパク質は、種々の供給源に由来することができ、例えば、ほ乳類、脊椎動物、無脊椎動物、植物、微生物（*m i c r o b e*）、細菌、および原始細菌が挙げられる。

#### 【0026】

いくつかの実施形態では、二以上の異種タンパク質をコードする配列が染色体配列内へインテグレートされ得る。例えば、2、3、4、またはそれより多い異種タンパク質をコードする配列が、内因性調節系が2、3、4、またはそれより多い異種タンパク質の発現を調節するように、染色体配列内へインテグレートされてもよい。

#### 【0027】

一般的に、異種タンパク質をコードする配列は、対象の細胞における最適な発現のために最適化されたコドンであるだろう。異種タンパク質をコードする配列は、エキソンの（あるいはタンパク質をコードする）配列を含んでもよい。あるいは、エキソンの配列と同様にイントロンの配列を含んでもよい。

#### 【0028】

上述のように、異種タンパク質をコードする配列は2 Aペプチドに連結される。本明細書で用いる場合、用語「2 Aペプチド」とは、任意の2 Aペプチドもしくはそれらの断片、任意の2 A様ペプチドもしくはそれらの断片、または必要なアミノ酸を含む人工ペプチドをさす。2 Aペプチドは当初、翻訳の間に成熟した個々のタンパク質へ「切断」される

10

20

30

40

50

ポリタンパク質を生成する、プラス鎖RNAウイルスにおいて特徴づけられた。より具体的には、2Aペプチド領域(～20アミノ酸)は、ポリタンパク質の2B領域からそれ自身を放出するために、それ自身のC末端での切断を介在する。2Aペプチド配列は、グリシンおよびプロリン残基で終結する。2Aペプチドの翻訳の間、リボソームはグリシン残基の後で一時停止し、新生ポリペプチド鎖の放出をもたらす。下流タンパク質の第一アミノ酸となる2A配列のプロリン残基を備え、翻訳が再開する。

#### 【0029】

異種コード配列に連結する2Aペプチドコード配列は、全長2Aペプチドをコードしてもよい。あるいは、2AペプチドのC末端断片をコードしてもよい。該C末端断片は、C末端終端の約19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5または4アミノ酸を含み得る。10

#### 【0030】

2Aペプチドをコードする配列は、異種タンパク質をコードする配列の5'末端または3'末端に連結され得る。異種配列が内因性コード配列の開始付近にインテグレートされる実施形態では、2Aペプチド配列は異種タンパク質をコードする配列の3'末端に連結されるだろう。従って、結果として得られたmRNAは以下の配向(*orientation*)：5'-(異種タンパク質-2Aペプチド)<sub>n</sub>-内因性タンパク質-3'、ここにnは異種タンパク質の数を表すものである、を有する。異種配列が内因性コード配列の終止付近にインテグレートされる実施形態では、2Aペプチド配列は異種タンパク質をコードする配列の5'末端に連結されるだろう。それゆえ、結果として得られたmRNAは以下の配向：5'内因性タンパク質-(2Aペプチド-異種タンパク質)<sub>n</sub>-3'、ここにnは上記に定義される通りのものである、を有する。20

#### 【0031】

##### (b) 内因性調節系

一般的に、異種配列のインテグレーションのために選ばれる内因性染色体配列は、所望の発現特性(*expression property*)に依存する。本明細書で用いる場合、用語「内因性調節系」とは、染色体配列(すなわち、プロモーター、エンハンサー等の転写制御因子)、および、染色体配列の転写を調節するために共に働く、調節制御タンパク質(すなわち、一般的および特異的な転写因子)をさす。標的配列は、転写制御配列因子(例えば、プロモーターおよび他の制御因子)、ならびに、転写される染色体配列(すなわち、非翻訳および翻訳配列)を含む。タンパク質コード配列の発現は種々の配列因子により制御され得るが、以下、議論しやすいように用語「プロモーター」が用いられる。30

#### 【0032】

いくつかの実施形態では、構成的プロモーターを利用する内因性標的配列を標的とすることが望ましい。構成的プロモーターは、多くの種類の細胞で活性である傾向にある。適した構成的プロモーターの非限定的な例には、-チューブリン、-チューブリン、アルファ-アクチン、ベータ-アクチン等の、細胞骨格タンパク質；ヒストンタンパク質、リボソームタンパク質、翻訳因子、転写因子、細胞周期タンパク質、プロテアソームタンパク質等の、ユビキタスな細胞タンパク質；アミノ酸、糖質、または脂質代謝、ケン酸回路、ミトコンドリア機能等に関連する酵素の発現を調節するものが挙げられる。いくつかの構成的プロモーターはまた、その活性化が高レベルの遺伝子産物をもたらすという点で、強力なプロモーターと称することができる。40

#### 【0033】

他の実施形態では、発現が、例えば、筋肉細胞、神経細胞、肝細胞、臍ベータ細胞、心臓細胞、乳腺細胞等の特定の細胞型にあるのが望ましい。当業者は、細胞特異的あるいは組織特異的な発現のため用いることができる、適切な細胞特異的プロモーターを熟知している。また別の実施形態では、調節可能または誘導性の発現が望ましい。適した誘導性プロモーターには、ステロイドホルモン、成長因子、金属イオン、熱ショックなどにより調節されるものが挙げられる。50

## 【0034】

ヒトまたはほ乳類の発現調節系の非限定的な例には、チューブリン、アクチン、またはラミンタンパク質の発現をコードし、調節するものが挙げられる。

## 【0035】

一般的に、異種タンパク質をコードする配列は、対象のタンパク質をコードする内因性配列とインフレームでインテグレートされる。該異種配列は、内因性コード配列の開始コドンの後にインフレームでインテグレートされてもよい。あるいは、該異種配列は、内因性コード配列の終止コドンの前にインフレームでインテグレートされてもよい。

## 【0036】

## (c) 細胞

上述の、異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含む細胞の種類は、変化でき、変化するであろう。一般的に、細胞は真核細胞であろう。場合によつては、該細胞は初代細胞 (primary cell)、培養細胞、または不死化細胞株細胞とすることができる。適した細胞には、ピキア (Pichia)、サッカロミセス (Saccharomyces) もしくはシゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces) などの、真菌または酵母；スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 由来の SF9 細胞もしくはドロソフィア・メラノガスター (Drosophila melanogaster) 由来の S2 細胞などの、昆虫細胞；マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、非ヒト靈長類細胞、もしくはヒト細胞などの、動物細胞が挙げられる。例示的な細胞はほ乳類である。ほ乳類細胞は、初代細胞 (primary cell) であつてもよい。一般的に、二本鎖切断に感受性である任意の初代細胞を用いることができる。細胞は、例えば、線維芽細胞、筋芽細胞、T もしくはB 細胞、マクロファージ、上皮細胞など、様々な細胞型であつてもよい。

10

## 【0037】

ほ乳類細胞株が用いられる場合、細胞株は任意の樹立された細胞株、またはまだ記載されていない初代細胞株であつてもよい。細胞株は接着性もしくは非接着性であつてもよく、あるいは、細胞株は、当業者に知られた標準的な技術を使用して、接着性、非接着性もしくは器官型の生育を促す条件下で成長させてもよい。適したほ乳類細胞株の非限定的な例には、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、SV40 により形質転換されたサル腎臓 CVI 株 (COS7)、ヒト胎児腎臓株 293、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスセルトリ細胞 (TM4)、サル腎臓細胞 (CVI-76)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO)、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa)、イヌ腎臓細胞 (MDCK)、バッファローラット肝細胞 (BRL 3A)、ヒト肺細胞 (W138)、ヒト肝細胞 (Hep G2)、マウス乳癌細胞 (MMT)、ラット肝臓癌細胞 (HTC)、HIH/3T3 細胞、ヒトU2-OS 骨肉腫細胞株、ヒトA549 細胞株、ヒトK562 細胞株、ヒトHEK293 細胞株、ヒトHEK293T 細胞株、およびTRI 細胞が挙げられる。ほ乳類細胞株の広範なリストに関して、当業者は、アメリカンタイプカルチャコレクションカタログ (ATCC 登録商標、Massachusetts、VA) を参照することができる。

20

## 【0038】

さらに他の実施形態では、細胞は幹細胞であつてもよい。適した幹細胞には、胚性幹細胞、ES 様幹細胞、胎児幹細胞、成体幹細胞、多能性 (pluripotent) 幹細胞、人工多能性幹細胞、複能性 (multipotent) 幹細胞、少能性 (oligopotent) 幹細胞、単能性 (unipotent) 幹細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

## 【0039】

さらなる実施形態では、細胞は一細胞胚 (one-cell embryo) であつてもよい。胚は、脊椎動物または無脊椎動物であつてもよい。適した脊椎動物には、ほ乳類、鳥類、爬虫類、両生類および魚類が挙げられる。適したほ乳類の例には、齶歯類、コンパニオンアニマル、家畜、および非靈長類が挙げられるが、これらに限定されるものではない。齶歯類の非限定的な例には、マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ、および

40

50

モルモットが挙げられる。適したコンパニオンアニマルには、ネコ、イヌ、ウサギ、ハリネズミおよびフェレットが挙げられるが、これらに限定されるものではない。家畜の非限定的な例には、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ラマおよびアルパカが挙げられる。適した非霊長類には、オマキザル、チンパンジー、キツネザル、マカク、マーモセット、タマリン、クモザル、リスザルおよびオナガザルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。鳥類の非限定的な例には、鶏、七面鳥、アヒルおよびガチョウが挙げられる。あるいは、動物は、昆虫、線虫等などの無脊椎動物であってもよい。昆虫の非限定的な例には、ショウジョウバエ (Drosophila) および蚊が挙げられる。

## 【0040】

## (I I ) 異種コード配列をインテグレートするための方法

10

本開示の別の態様は、異種タンパク質の発現が内因性調節系により制御されるように、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする核酸を、細胞染色体において標的とされる位置内へインテグレートするための方法を提供する。該方法は、内因性コード配列とのインフレームでの異種コード配列のインテグレーションを介在するために、標的エンドヌクレアーゼを用いることを含む。より具体的には、該方法は、少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼまたは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸、および異種コード配列を含む少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを細胞内に導入することを含む。該方法はさらに、該標的エンドヌクレアーゼにより内因性染色体配列内に導入された二本鎖切断が、該ドナーポリヌクレオチドにおける異種配列が、標的とされる染色体配列のコード配列とインフレームでインテグレートされ、それによって異種コード配列を内因性調節系に連結するように、相同性指向修復過程により修復されるような条件下で、細胞を維持すること、を含む。該方法の構成要素は、以下に詳述される。

20

## 【0041】

## (a) 標的エンドヌクレアーゼ

本方法は、一つには、少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼまたは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸を細胞内に導入することを含む。標的エンドヌクレアーゼは、天然に存在するタンパク質または人工タンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、標的エンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼまたはホーミングエンドヌクレアーゼとすることができます。他の実施形態では、標的エンドヌクレアーゼは、転写活性化物質様エフェクター (TALE) - ヌクレアーゼであってもよい。好ましい実施形態では、標的エンドヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼとすることができます。典型的に、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、以下に記載される、DNA結合ドメイン（すなわち、ジンクフィンガー）および切断ドメイン（すなわち、ヌクレアーゼ）を含む。

30

## 【0042】

## (i) ジンクフィンガー結合ドメイン

ジンクフィンガー結合ドメインは、任意の最適な核酸配列を認識し、結合するように操作されてもよい。例えば、Beerli et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; Zhang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(43):33850-33860; Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:702-708; および Santiago et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:5809-5814 を参照されたい。操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質に比べて、新規の結合特異性を有してもよい。操作方法は、合理的設計および様々な型の選択が挙げられるが、これらに限定されるものではない。合理的設計に

40

50

は、例えば、二重鎖、三重鎖、および／または四重鎖又クレオチド配列ならびに個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含み、ここに各二重鎖、三重鎖、および／または四重鎖又クレオチド配列は、特定の三重鎖または四重鎖配列に結合するジンクフィンガーの一以上のアミノ酸配列と会合されるものである、データベースを使用することが挙げられる。例えば、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたい。例として、米国特許第6,453,242号において記載されるアルゴリズムを使用して、事前に選択された配列を標的とするためのジンクフィンガー結合ドメインを設計することができる。また、非縮重認識コード表を使用する合理的な設計などの代替方法を使用して、特定の配列を標的とするためのジンクフィンガー結合ドメインを設計することができる (Sera et al. 10  
 (2002) Biochemistry 41:7074-7081)。

DNA配列における標的部位候補を同定し、ジンクフィンガー結合ドメインを設計するための、公的に利用可能なウェブをベースとするツールが、<http://www.zincfingertools.org>および<http://bindr.gdcbiastate.edu/ZifFit/>にそれぞれ見つかり得る (Mandell et al. (2006) Nuc. Acid Res. 34:W516-W523; Sander et al. (2007) Nuc. Acid Res. 35:W599-W605)。

#### 【0043】

ジンクフィンガー結合ドメインは、約3ヌクレオチドから約21ヌクレオチド長、または約8から約19ヌクレオチド長の範囲であるDNA配列を認識し、結合するように設計することができる。一般的に、本明細書に開示されるジンクフィンガーヌクレアーゼのジンクフィンガー結合ドメインは、少なくとも3つのジンクフィンガー認識領域（すなわち、ジンクフィンガー）を含む。一つの実施形態では、ジンクフィンガー結合ドメインは4つのジンクフィンガー認識領域を含んでもよい。別の実施形態では、ジンクフィンガー結合ドメインは5つのジンクフィンガー認識領域を含んでもよい。また別の実施形態では、ジンクフィンガー結合ドメインは6つのジンクフィンガー認識領域を含んでもよい。ジンクフィンガー結合ドメインは、任意の適した標的DNA配列に結合するように設計されてもよい。例えば、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,607,882号、同第6,534,261号および同第6,453,242号を参考されたい。 20  
 30

#### 【0044】

ジンクフィンガー認識領域を選択するための例示的な方法には、ファージディスプレイおよびツーハイブリッドシステムが挙げられ、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、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98/37186号；国際公開第98/53057号；国際公開第00/27878号；国際公開第01/88197号、および英国特許第2,338,237号に開示される。さらに、ジンクフィンガー認識領域に対する結合特異性の増強が、例えば、国際公開第02/077227号に記載される。 40

#### 【0045】

ジンクフィンガー結合ドメイン、ならびに融合タンパク質（および同一物をコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための方法は当業者に知られており、その全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号および同第20060188987号に詳しく記載される。ジンクフィンガー認識領域および／またはマルチ-フィンガー型ジンクフィンガータンパク質は、例えば5以上のアミノ酸長のリンカーを含む、適したリンカー配列を使用して、共に結合することができる。6以上のアミノ酸長のリンカー配列の非限定的な例に関して、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,479,626号、同第6,903,150

85号、および同第7, 153, 949号を参照されたい。本明細書に記載されるジンクフィンガー結合ドメインは、タンパク質の個々のジンクフィンガーの間に適したリンカーの組み合わせを含むことができる。

#### 【0046】

いくつかの実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼはさらに核局在化シグナルまたは配列(NLS)を含んでもよい。NLSは、染色体における標的配列で二本鎖切断を導入するために、ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質を核内に標的化させることを促進する、アミノ酸配列である。核局在化シグナルは当分野において知られている。例えば、Makkerh et al. (1996) Current Biology 6:1025-1027を参照されたい。10

#### 【0047】

例示的なジンクフィンガーダーNA結合ドメインは、配列番号1、2、3、4、5、6、8および9から選択される配列と、少なくとも約80%の配列同一性を有する配列を認識し、結合する。他の実施形態では、配列同一性は、約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

#### 【0048】

##### (i) 切断ドメイン

ジンクフィンガーヌクレアーゼは切断ドメインも含有する。本明細書で開示されるジンクフィンガーヌクレアーゼの切断ドメイン部分は、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得ることができる。切断ドメインが由来し得るエンドヌクレアーゼの非限定的な例には、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、2002-2003 Catalog, New England Biolabs, Beverly, Mass. ; およびBelfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388またはwww.neb.comを参照されたい。DNAを切断するさらなる酵素が知られている(例えば、S1ヌクレアーゼ；マンゴ・ビーン・ヌクレアーゼ；胰臓DNase I；ミクロコッカス・ヌクレアーゼ；酵母HOエンドヌクレアーゼ)。Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993も参照されたい。これらの酵素(またはそれらの機能的断片)の一以上を、切断ドメインの供給源として使用してもよい。2030

#### 【0049】

切断ドメインはまた、上述のような、切断活性のために二両体化を必要とする、酵素またはその部分であってもよい。2つのジンクフィンガーヌクレアーゼが、活性酵素二量体の単量体を含む各ヌクレアーゼとして、切断のために必要とされてもよい。あるいは、単一のジンクフィンガーヌクレアーゼが、活性酵素二量体を構築するための両方の単量体を含んでもよい。本明細書で用いる場合、「活性酵素二量体」とは核酸分子を切断することができる酵素二量体である。2つの切断単量体が同一のエンドヌクレアーゼ(あるいはその機能的な断片)に由来してもよく、または、各単量体が異なるエンドヌクレアーゼ(あるいはその機能的な断片)に由来してもよい。40

#### 【0050】

2つの切断単量体を使用して活性酵素二量体を形成する場合、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼのための認識部位は、それら各々の認識部位との2つのジンクフィンガーヌクレアーゼの結合が、例えば二量体化によって、切断単量体に活性酵素二両体を形成させる、互いに対する空間的配向で切断単量体を設置するように、配置されるのが好ましい。結果として、認識部位の近端は、約5から約18ヌクレオチドにより分離され得る。例えば、近端は、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18ヌクレオチドにより分離され得る。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が、2つの認識部位の間に介入し得ることが認識される(例えば

1020304050

、約2から約50ヌクレオチド対以上）。例えば、本明細書で詳細に記載されるものなど、ジンクフィンガーヌクレアーゼの認識部位の近端は、6ヌクレオチドにより分離され得る。一般的に、切断部位は認識部位の間に位置する。

#### 【0051】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は多数の種に存在し、かつ、DNAに配列特異的に（認識部位で）結合し、結合部位またはその付近で、DNAを切断することが可能である。特定の制限酵素（例えば、タイプIIS）は、認識部位から移動した部位でDNAを切断し、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを有する。例えば、タイプIIS酵素Fok Iは、一方の鎖のその認識部位から9ヌクレオチド、他方のその認識部位から13ヌクレオチドのところで、DNAの二本鎖切断を触媒する。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. 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を参照されたい。それゆえ、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、操作されてもされなくてもよいが、少なくとも一つのタイプIIS制限酵素由来の切断ドメインおよび一以上のジンクフィンガー結合ドメインを含むことができる。例示的なタイプIIS制限酵素は、例えば、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、国際公開第07/014,275号に記載される。さらなる制限酵素はまた、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを含有し、これらもまた本開示によって企図される。例えば、Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420を参照されたい。

#### 【0052】

切断ドメインが結合ドメインから分離可能である、例示的なタイプIIS制限酵素は、Fok Iである。この特定の酵素は、二量体として活性である(Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10, 570-10, 575)。したがって、本開示の目的のため、ジンクフィンガーヌクレアーゼにおいて使用されるFok I酵素の部分は、切断単量体であるとみなされる。それゆえ、Fok I切断ドメインを使用する標的化二本鎖切断のために、各々がFok I切断単量体を含む、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して、活性酵素二量体を再構成することができる。あるいは、ジンクフィンガー結合ドメインおよび2つのFok I切断単量体を含有する单一のポリペプチド分子が用いられてもよい。

#### 【0053】

特定の実施形態では、切断ドメインは、例えば、各々の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号、同第20060188987号および同第20080131962号に記載されるように、ホモ二量体化を最小化するまたは防ぐ、一以上の操作された切断単量体を含むことができる。非限定的な例として、Fok Iの446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537、および538位のアミノ酸残基は、全て、Fok I切断ハーフ-ドメインの二量体化に影響を与えるための標的である。強制的なヘテロ二量体を形成する、例示的なFok Iの操作された切断単量体には、第一の切断単量体がFok Iのアミノ酸残基490位および538位での変異を含み、第二の切断単量体がアミノ酸残基486位および499位での変異を含むものである、ペアが挙げられる。

#### 【0054】

それゆえ、一つの実施形態では、アミノ酸490位での変異はGlu(E)をLys(K)で置換し；アミノ酸538位での変異はIso(I)をLys(K)で置換し；アミノ酸486位での変異はGln(Q)をGlu(E)で置換し；かつ、アミノ酸499位

10

20

30

40

50

での変異は I s o ( I ) を L y s ( K ) で置換する。特に、操作された切断単量体は、「E 4 9 0 K : I 5 3 8 K」で示される操作された切断単量体を生成するために、一つの切断単量体において、4 9 0 位を E から K へ、5 3 8 位を I から K へ変異させること、および、「Q 4 8 6 E : I 4 9 9 L」で示される操作された切断単量体を生成するために、別の切断単量体において、4 8 6 位を Q から E へ、4 9 9 位を I から L へ変異させることにより、調製され得る。上述の操作された切断単量体は、異常な切断が最小化または撤廃された、強制されたヘテロ二量体変異体である。操作された切断単量体は、例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 0 6 4 4 7 4 号に記載されるような、野生型切断単量体 (F o k I) の部位特異的変異導入 (site-directed mutagenesis) により、適した方法を用いて調製されてもよい(実施例 5 を参照されたい)。

10

#### 【0055】

上述のジンクフィンガーヌクレアーゼは、インテグレーションの標的化部位で二本鎖切断を導入するように操作されてもよい。二本鎖切断はインテグレーションの標的化部位であってもよく、インテグレーションの部位から最大 1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、または 1 0 0 0 ヌクレオチド離れてよい。いくつかの実施形態では、二本鎖切断はインテグレーションの部位から最大 1、2、3、4、5、10、15、または 2 0 ヌクレオチド離れてもよい。他の実施形態では、二本鎖切断はインテグレーションの部位から最大 10、15、20、25、30、35、40、45、または 5 0 ヌクレオチド離れてもよい。さらに他の実施形態では、二本鎖切断はインテグレーションの部位から最大 5 0、1 0 0 、または 1 0 0 0 ヌクレオチド離れてもよい。

20

#### 【0056】

##### (iii) 標的化切断のためのさらなる方法

染色体配列における標的部位を有する任意のヌクレアーゼが、本明細書に開示される方法において用いられてもよい。例えば、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、そのうちのいくつかは、統計的に、ヒトサイズのゲノムにおいて一度ぐらい、存在する可能性がある。細胞内ゲノムにおいて固有の標的部位を有する任意のこののようなヌクレアーゼを、細胞染色体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、または、加えて、使用してもよい。

#### 【0057】

30

ホーミングエンドヌクレアーゼの非限定的な例には、I - S c e I、I - C e u I、P I - P s p I、P I - S c e 、I - S c e I V、I - C s m I、I - P a n I、I - S c e l l、I - P p o I、I - S c e I I I、I - C r e I、I - T e v I、I - T e v I l および I - T e v I I I が挙げられる。これらの酵素の認識配列は当分野において知られている。米国特許第 5,420,032 号；米国特許第 6,833,252 号；Bell fort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3379-3388；Dujon et al. (1989) Gene 82: 115-118；Perler et al. (1994) Nucleic Acid 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。

40

#### 【0058】

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、それらの認識部位に対して絶対的ではないが、その部位は、ほ乳類サイズのゲノムあたり単一の切断事象が、単コピーのその認識部位を含有する細胞においてホーミングエンドヌクレアーゼを発現することにより得られる、十分な長さである。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の特異性を、非天然標的部位に結合するよう操作してもよいということもまた、報告されている。例えば、Chevalier et al. (2002) Molec.

50

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。

#### 【0059】

(i v) ジンクフィンガースクレアーゼをコードする核酸

ジンクフィンガースクレアーゼは、ジンクフィンガースクレアーゼをコードする核酸として細胞内に導入されてもよい。ジンクフィンガースクレアーゼをコードする核酸は、DNAまたはRNAとすることができます。一つの実施形態では、ジンクフィンガースクレアーゼをコードする核酸はDNAとすることができます。例えば、ジンクフィンガースクレアーゼコード配列を含むプラスミドDNAが、細胞内に導入されてもよい。別の実施形態では、ジンクフィンガースクレアーゼをコードする核酸は、RNAまたはmRNAであってもよい。ジンクフィンガースクレアーゼをコードする核酸がmRNAである場合、該mRNA分子は5'キャップされてもよい。同様に、ジンクフィンガースクレアーゼをコードする核酸がmRNAである場合、該mRNA分子はポリアデニル化されてもよい。それゆえ、本方法による核酸は、ジンクフィンガースクレアーゼをコードする、キャップされ、ポリアデニル化されたmRNAとすることができます。mRNAをキャップする方法およびポリアデニル化する方法は当分野において知られている。

#### 【0060】

##### (b) ドナーポリヌクレオチド

標的とされる染色体配列内に異種コード配列をインテグレートするための方法は、異種コード配列を含む少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを細胞内に導入することをさらに含む。ドナーポリヌクレオチドは、上記(I)(a)節に詳述されるように異種コード配列を含むだけでなく、上流配列および下流配列も含む。該上流および下流配列は、ドナーポリヌクレオチドにおいて異種コード配列を挟む。さらに、該上流および下流配列は、染色体におけるインテグレーション部位の両側と実質的な配列同一性を共有する。

#### 【0061】

ドナーポリヌクレオチドにおける上流および下流配列は、標的とされる染色体配列およびドナーポリヌクレオチドの間の組換えを促進するように選択される。上流配列とは、本明細書で用いられる場合、インテグレーションの標的化部位の上流の染色体配列と配列類似性を共有する核酸配列をいう。同様に、下流配列とは、インテグレーションの標的化部位の下流の染色体配列と配列類似性を共有する核酸配列をいう。ドナーポリヌクレオチドにおける上流および下流配列は、標的とされる染色体配列と約75%、80%、85%、90%、95%または100%配列同一性を有してもよい。他の実施形態では、ドナーポリヌクレオチドにおける上流および下流配列は、標的とされる染色体配列と約95%、96%、97%、98%、99%、または100%配列同一性を有してもよい。例示的な実施形態では、ドナーポリヌクレオチドにおける上流および下流配列は、標的とされる染色体配列と約99%または100%配列同一性を有してもよい。

#### 【0062】

上流または下流配列は、約20bpから約2500bpを含んでもよい。一つの実施形態では、上流または下流配列は、約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、または2500bpを含んでもよい。例示的な上流または下流配列は、約200bpから約2000bp、約600bpから約1000bp、またはより具体的には約700bpから約1000bpを含んでもよい。

#### 【0063】

典型的には、ドナーポリヌクレオチドはDNAであるだろう。ドナーポリヌクレオチドは、DNAプラスミド、細菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)、ウイル

10

20

30

40

50

スペクター、線状断片 (linear piece) DNA、PCR断片、ネイキッドな(naked)核酸、またはリポソームあるいはポロキサマー(polloxamer)などの送達媒体(delivery vehicle)と複合体化された核酸であってもよい。一つの実施形態では、異種コード配列を含むドナーポリヌクレオチドは、DNAプラスミドとすることができます。別の実施形態では、異種コード配列を含むドナーポリヌクレオチドは、BACとすることができます。

#### 【0064】

当業者は、周知の標準的な組換え技術を使用して、本明細書に記載されるようなドナーポリヌクレオチドを構築できるであろう(例えば、Sambrook et al., 2001およびAusubel et al., 1996を参照されたい)。

10

#### 【0065】

##### (c) 細胞への送達

上記(II)(a)節および(II)(b)節に詳述される、ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする核酸、およびドナーポリヌクレオチドは細胞内に導入される。適した送達方法には、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微粒子銃(biolistics)、リン酸カルシウム介在トランスフェクション(calcium phosphate-mediated transfection)、陽イオントランスフェクション、リポソームトランスフェクション、デンドリマートランスフェクション、熱ショックトランスフェクション、ヌクレオフェクショントランスフェクション、マグネットフェクション、リポフェクション、インペールフェクション(impalerection)、オプティカルトランスフェクション(optical transfection)、専売薬剤(proprietary agent)で促進された核酸の取り込み、およびリポソーム、免疫リポソーム、ビロソーム、あるいは人工ビリオンを介する送達、が挙げられる。一つの実施形態では、分子はヌクレオフェクションにより細胞内に導入することができる。別の実施形態では、分子はマイクロインジェクションにより細胞内に導入することができる。分子は、細胞の核内あるいは細胞質内にマイクロインジェクションすることができる。

20

#### 【0066】

ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする核酸に対する、異種コード配列を含むドナーポリヌクレオチドの割合は、変化でき、変化するであろう。一般的に、ジンクフィンガーヌクレアーゼ分子に対するドナーポリヌクレオチドの割合は、約1:10から約10:1の範囲であってもよい。様々な実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼ分子に対するドナーポリヌクレオチドの割合は、約1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、または10:1であってもよい。一つの実施形態では、割合は約1:1であってもよい。

30

#### 【0067】

二以上のジンクフィンガーヌクレアーゼ分子および二以上のドナーポリヌクレオチドが細胞内に導入される実施形態では、分子は同時にあるいは順に導入されてもよい。例えば、各々異なる認識配列に特異的であるジンクフィンガーヌクレアーゼ分子、ならびに、対応するドナーポリヌクレオチドを、同時に導入してもよい。あるいは、各ジンクフィンガーヌクレアーゼ分子、ならびに、対応するドナーポリヌクレオチドを順に導入してもよい。

40

#### 【0068】

##### (d) 細胞培養

本方法はさらに、ジンクフィンガーヌクレアーゼ介在インテグレーションが起こり得るような、適切な条件下で細胞を維持することを含む。必要であれば、細胞は、ジンクフィンガーヌクレアーゼの発現を可能とする標準手順を使用して、培養することができる。標準的な細胞培養技術は、例えば、Santiago et al. (2008) PNAS 105:5809-5814; Moehle et al. (2007) P N

50

A S 1 0 4 : 3 0 5 5 - 3 0 6 0 ; Urnov et al. ( 2 0 0 5 ) N a t u r e 4 3 5 : 6 4 6 - 6 5 1 ; および Lombardo et al ( 2 0 0 7 )

N a t . B i o t e c h n o l o g y 2 5 : 1 2 9 8 - 1 3 0 6 に記載される。当業者は、細胞を培養するための方法が当分野において知られ、かつ、細胞型によって変化でき、変化するであろうことを十分理解している。いかなる場合でも、特定の細胞型のための最良の技術を決定するために、所定の最適化を用いることができる。

#### 【 0 0 6 9 】

細胞が一細胞胚である実施形態では、胚をインビトロで培養することができる（例えば、細胞培養）。典型的には、胚は、ジンクフィンガーヌクレアーゼの発現を可能とする、必須の O<sub>2</sub> / C O<sub>2</sub> 比を備える、適切な温度かつ適切な培地で培養される。培地の適した非限定的な例には、M 2 、 M 1 6 、 K S O M 、 B M O C 、および H T F 培地が挙げられる。当業者は、培養条件が、胚の種類によって変化でき、変化するであろうことを十分理解しているであろう。いかなる場合でも、特定の胚の種類のための最良の培養条件を決定するために、所定の最適化を用いることができる。場合によっては、胚は、メス宿主の子宮内に胚を移植する ( t r a n s f e r ) ことにより、インビオで培養することができる。一般的に言えば、メス宿主は、胚と同種または類似種に由来する。好ましくは、メス宿主は偽妊娠である。偽妊娠メス宿主の調製方法は当分野において知られている。さらに、胚をメス宿主に移植する方法も知られている。インビオで胚を培養することは胚の発生 ( d e v e l o p ) をもたらし、その胚に由来する動物の生児出生 ( l i v e b i r t h ) を引き起こす。

#### 【 0 0 7 0 】

過程のこの段階の間、（場合によっては、導入された核酸から発現した）ジンクフィンガーヌクレアーゼは、染色体内の標的配列を認識し、結合し、切断する。ジンクフィンガーヌクレアーゼにより導入された二本鎖切断は、ドナーポリヌクレオチドの異種コード配列が染色体位置内にインフレームでインテグレートされるように、ドナーポリヌクレオチドとの相同組換えを介して、修復される。ドナーポリヌクレオチドは物理的に ( p h y s i c a l l y ) インテグレートされてもよく、またあるいは、染色体内へのドナーポリヌクレオチドの異種コード配列ならびに上流および下流配列の全部または一部のインテグレーションを引き起こす、切斷の修復のための錫型として、ドナーポリヌクレオチドを使用してもよい。

#### 【 0 0 7 1 】

( I I I ) 異種タンパク質の発現を調節するために内因性調節系を使用するための方法

また別の態様は、異種タンパク質の発現を調節するために内因性調節系を使用するための方法を提供する。該方法は、上記 ( I ) 節に詳述される、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含む細胞を利用すること、または、上記 ( I I ) 節に詳述されるような、標的とされる染色体位置内に少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列をインテグレートすること、を含む。該方法はさらに、内因性調節系が活性化され、内因性および異種コード配列が单一の転写産物へと転写されるような条件下で、細胞を維持することを含む。分離した内因性および異種タンパク質が、2 A ペプチドの存在のため、翻訳の間に生成される。それゆえ、異種タンパク質の発現は、内因性転写調節機構により制御される。

#### 【 0 0 7 2 】

( I V ) 応用

本明細書において開示される方法は、様々な商業的用途、研究用途および臨床用途のために用いることができる。内因性および異種配列が一つのオープンリーディングフレームで転写産物へと転写されるので、生成される各タンパク質の量は実質的に同様である。それゆえ、細胞内で生成された異種タンパク質のレベルは、適した内因性調節系を選択することにより制御することができる。またさらに、内因性調節系がそれらの発現を調節するために用いられるので、異種配列は典型的にサイレンシング効果に供されない。

#### 【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

本明細書において提供される方法および細胞を使用して、様々な商業的適用を有する大量の組換えタンパク質を生成することができる。該組換えタンパク質は、抗体、抗体の断片、モノクローナル抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、糖タンパク質、酵素、治療用タンパク質、栄養補給タンパク質、ワクチン、および血液因子、血栓溶解剤、抗凝血剤、ホルモン、成長因子、インターフェロンまたはインターロイキンとして機能するタンパク質とすることができます。さらに、本明細書において開示される方法および細胞を使用して、細胞が適したレベルで継続的に治療用タンパク質を生成するように、治療用タンパク質を細胞へ送達することができる。

## 【0074】

定義

10

別段の定めがない限り、本明細書で用いられるすべての技術用語および科学用語は、この発明の属する分野における当業者により通常理解される意味を有する。以下の参考文献は、この発明で用いられる用語の多くの一般的な定義を当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); およびHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で用いられる場合、特に指定がない限り、以下の用語はそれらに与えられた意味を有する。

20

## 【0075】

本開示またはその好ましい実施形態の要素を導入する場合、冠詞「a」、「an」、「the」および「said」は、一以上の要素が存在するということを意味することを目的としている。用語「含む（comprising）」、「含む（including）」、および「有する（having）」は、包括的であり、記載された要素以外のさらなる要素が存在してもよいということを意味することを目的としている。

## 【0076】

本明細書で用いられる「遺伝子」は、遺伝子産物をコードする（エキソンおよびインtronを含む）DNA領域、ならびに、そのような調節配列が、コード配列および／または転写配列に隣接しているか否かを問わず、遺伝子産物の生成を調節する、全てのDNA領域をさす。従って、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネーター、リボソーム結合部位および内部リボソーム侵入部位（internal ribosome entry site）などの翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、バウンダリーエレメント（boundary element）、複製起点、マトリックス付着部位（matrix attachment site）、および遺伝子座制御領域が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

30

## 【0077】

「異種タンパク質」とは、対象の細胞または生命体に対して天然でない（例えば、外来性の）タンパク質である。

40

## 【0078】

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、線状または環状構造で、かつ、一本鎖または二本鎖形態の、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのポリマーをさす。本開示のため、これらの用語は、ポリマーの長さに関する制限と解釈されることはない。該用語は、天然のヌクレオチドの公知のアナログ、ならびに、塩基、糖、および／またはリン酸部分において修飾された（例えば、ホスホロチオエート骨格）ヌクレオチドを包含し得る。一般的に、特定のヌクレオチドのアナログは、同一の塩基対合特異性を有する；すなわち、AのアナログはTと塩基対合するであろう。

## 【0079】

50

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーをさすために区別しないで用いられる。

#### 【0080】

用語「組換え」は、2つのポリヌクレオチド間での、遺伝情報の交換過程をさす。本開示のため、「相同組換え」は、例えば、細胞における二本鎖切断の修復の間で起こる、そのような交換の特殊な形態をさす。この過程は、2つのポリヌクレオチド間の配列相同性 (sequence similarity) を必要とし、「標的」分子(すなわち、二本鎖切断を経験したもの)の鋳型修復に対し「ドナー」または「交換」分子を使用し、かつ、「非クロスオーバー (non-crossover) 遺伝子変換」または「ショートトラクト (short tract) 遺伝子変換」として、さまざまに知られている、というのも、ドナーから標的への遺伝情報の移動を導くからである。特定の理論に拘束されるつもりはないが、このような移動は、切断された標的とドナー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、標的の一部分となる遺伝情報の再合成のためにドナーが使用される「合成依存鎖アニーリング (synthesis-dependent strand annealing)」、および/または関連過程を伴うことができる。そのような特殊な相同組換えは、しばしば、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全部が標的ポリヌクレオチドに組み込まれるような、標的分子配列の変更をもたらす。

#### 【0081】

本明細書で用いられる場合、用語「標的部位」または「標的配列」は、改変 (edit) される染色体配列の部分を定義する核酸配列であって、結合のために十分な条件が存在するという条件で、ジンクフィンガーヌクレアーゼが認識かつ結合するために操作されるものをさす。

#### 【0082】

核酸およびアミノ酸配列同一性を決定するための技術は当分野において知られている。典型的にそのような技術には、ある遺伝子のためのmRNAのヌクレオチド配列を決定すること、および/または、それによりコードされるアミノ酸配列を決定すること、ならびにこれらの配列を第二のヌクレオチドもしくはアミノ酸配列と比較すること、が含まれる。ゲノム配列もまたこの方法で決定され、比較され得る。一般的に同一性とは、それぞれ、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の、正確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の対応をさす。二以上の配列 (ポリヌクレオチドまたはアミノ酸) を、そ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は、核酸配列であるかアミノ酸配列であるかを問わず、2つの整列された配列間の正確な合致数をより短い方の配列の長さで割り、100をかけたものである。核酸配列の近似アラインメントは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482 - 489 (1981) の局所相同性アルゴリズムにより提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353 - 358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, より開発され、Gribskov, Nucl. Acids Res. 14 (6): 6745 - 6763 (1986) により規格化されたスコアリング行列を用いて、アミノ酸配列に適用することができる。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例示的な実施態様は、Genetics Computer Group (Madison, Wisc.) により、「Best Fit」ユーティリティアプリケーションによって提供されている。配列間の同一性パーセントまたは類似性パーセントを算出するための他の適したプログラムは、当分野において広く知られており、例えば、別のアラインメントプログラムは、デフォルトパラメータで使用される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用いて使用することができる：遺伝コ-

10

20

30

40

50

ド(g e n e t i c c o d e) = 標準(s t a n d a r d); フィルター(f i l t e r) = なし(n o n e); 鎖(s t r a n d) = 両方(b o t h); カットオフ(c u t o f f) = 60; 期待数(e x p e c t) = 10; 行列(M a t r i x) = B L O S U M 62; 表示(D e s c r i p t i o n s) = 50配列; 分類方法(s o r t b y) = 高スコア(H I G H S C O R E); データベース(D a t a b a s e s) = 非重複(n o n - r e d u n d a n t)、GenBank+EMBL+D D B J + P D B + GenBank C D S t r a n s l a t i o n s + S w i s s p r o t e i n + S p u p d a t e + P I R。これらのプログラムの詳細はGenBankウェブサイト上に見出すことができる。本明細書に記載する配列に関して、望ましい配列同一性の度合の範囲は約80%から100%およびその間の任意の整数値である。典型的に、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%、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。  
10

#### 【0083】

あるいは、ポリヌクレオチド間の配列類似性の度合いは、配列類似性の度合いを共有する領域間で安定な二重鎖を形成させるような条件下での、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続く一本鎖特異的ヌクレアーゼによる消化、ならびに消化された断片のサイズ決定により、決定することができる。2つの核酸配列、または2つのポリペプチド配列は、配列が、上記の方法を用いて決定して、規定された長さの分子にわたって、少なくとも約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%の配列同一性を示す場合に、実質的に互いに相同である。本明細書で用いる場合、実質的に相同というのはまた、特定のDNAまたはポリペプチド配列に対して完全な同一性を示す配列をさす。実質的に相同なDNA配列は、例えば、その特定の系に対して規定されるようなストリングエントな条件下での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。適当なハイブリダイゼーション条件の規定は、当分野の技術の範囲内にある。例えば、S a m b r o o k et al., supra; N u c l e i c A c i d H y b r i d i z a t i o n : A P r a c t i c a l A p p r o a c h , e d i t o r s B . D . H a m e s a n d S . J . H i g g i n s , ( 1 9 8 5 ) O x f o r d ; W a s h i n g t o n , D C ; I R L P r e s s を参照されたい。  
20

#### 【0084】

2つの核酸断片の選択的ハイブリダイゼーションは、次のように決定することができる。2つの核酸分子間の配列同一性の度合いは、そのような分子間のハイブリダイゼーション事象の効率および強さに影響する。部分的に同一な核酸配列は、少なくとも部分的に、標的分子への完全に同一な配列のハイブリダイゼーションを阻害する。完全に同一な配列のハイブリダイゼーションの阻害は、当分野においてよく知られたハイブリダイゼーションアッセイを用い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、溶液ハイブリダイゼーションなど、S a m b r o o k et al., M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n , ( 1 9 8 9 ) , C o l d S p r i n g Harbor, N . Y . を参照されたい)。そのようなアッセイは、さまざまな度合いの選択性を使用して、例えば低から高ストリンジエンシーへと変化する条件を使用して実施することができる。低ストリンジエンシー条件を使用する場合、非特異的結合が存在しないことは、部分的な度合いの配列同一性さえ失った第2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)を用いて評価することができ、そのため、非特異的結合事象が存在しないと、第2プローブは標的にハイブリダイズしない。  
40

#### 【0085】

ハイブリダイゼーションに基づく検出系を利用する場合は、参照核酸配列に相補的な核酸プローブが選ばれ、次に適当な条件を選択することにより、プローブと参照配列とが互いに選択的にハイブリダイズし、または結合し、二本鎖分子を形成する。適度にストリン  
50

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ことができる核酸分子は、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ヌクレオチドの長さを有する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。ストリンジエ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に役立つハイブリダイゼーション条件は、プローブおよび参照配列が特定の配列同一性の度合いを有する場合、当分野で公知であるように決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を参照されたい）。ハイブリダイゼーションのための条件は当業者には周知である。

#### 【0086】

ハイブリダイゼーションストリンジエンシーとは、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有するハイブリッドの形成を嫌う度合いをさし、より高いストリンジエンシーはミスマッチしたハイブリッドに対する許容度がより低いことと相關する。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を及ぼす因子は当業者によく知られており、温度、pH、イオン強度、および有機溶媒、例えば、ホルムアミドおよびジメチルスルホキシドなどの濃度が挙げられるが、これらに限定されるものではない。当業者に知られているように、ハイブリダイゼーションストリンジエンシーは、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り増大する。ハイブリダイゼーションのストリンジエ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、さまざまな配列の塩基組成、塩類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プロッキング剤（例えば、デキストラン硫酸およびポリエチレングリコール）の有無、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を変化させると共に、洗浄条件を変化させることにより、数多くの等価な条件を使用して、ある特定のストリンジエンシーを確立することができることが、当分野においてよく知られている。特定のハイブリダイゼーション条件の組の選択は、当分野の標準的方法に従って選択することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.を参照されたい）。

#### 【実施例】

#### 【0087】

以下の実施例は、本発明を説明するために含まれる。

#### 【実施例1】

#### 【0088】

異種タンパク質を発現するためのTUBA1Bプロモーターの使用

以下の実施例は、異種タンパク質の発現を調節するためのチューブリンプロモーターの使用を詳述する。チューブリンアルファ-1Bをコードする、TUBA1Bが、標的染色体配列として選択された。一対のジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）が、ヒトTUBA1B遺伝子座における位置を標的とするように設計された。ZFNおよび染色体領域を改変するための使用方法に関してのより詳細については、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、PCT/US2010/43167を参照されたい。一方のZFNは配列5' CTTCGCCCTCCTAAATC 3'（配列番号1）に結合するように設計され、他方のZFNは配列5' CACTATGGTGAGTAA 3'（配列番号2）に結合するように設計された（図1A）。結合するとすぐに、ZFNペアは、2つのZFN認識配列間に位置する配列5' CCTAGC 3'において二本鎖切断を導入する。ZFNペアをコードする、キャップされポリアデニル化されたmRNAは公知

10

20

30

40

50

の分子生物学的手法を用いて生成された。

#### 【0089】

対象の遺伝子（すなわち、SH2バイオセンサー）は、2つのSH2ドメイン（Grb2アダプタータンパク質由来）および2Aペプチドドメインに連結されたGFPをコードする配列を含んだ（図1Bを参照されたい）。ヒト細胞株のTUBA1B遺伝子座内へのSH2バイオセンサー配列の標的化インテグレーションのためのドナーポリヌクレオチドとして供給する（serve）ために、プラスミド（図2）が構築された。該プラスミドは、1Kbおよび700bpの、ZFNペアにより導入される切断部位の上流および下流のTUBA1B遺伝子座配列に挟まれる、SH2バイオセンサーコード配列を含んだ。該プラスミドは、SH2バイオセンサーコード配列がチューブリン開始コドンのちょうど下流の内因性配列とインフレームでインテグレートされるように、設計された。TUBA1B遺伝子座の活性化により、図1Bに表されるように、2つの分離したタンパク質が作られる。  
10

#### 【0090】

ドナープラスミドおよびZFNをコードするRNAのペアを、U2OS、A549、K562、HEK293、またはHEK293T細胞にトランスフェクトした。該核酸混合物は、一部のZFN-RNAに対し、一部のドナーDNAを含んだ。トランスフェクトされた細胞は次いで標準的な条件下で培養された。個々の細胞クローニングの解析で、異種バイオセンサーの発現を示すGFP蛍光が明らかとなった。ウェスタン解析で、-チューブリンの発現が標的化インテグレーションにより影響を受けなかったことを確認した（図3）。

#### 【0091】

SH2(Grb2)含有バイオセンサーは、EGFにより活性化され、核移行（nuclear translocation）を受ける。A549細胞は該核酸でトランスフェクトされ、インテグレーションおよびTUBA1B遺伝子座の発現を可能とするよう培養された。細胞は100ng/mLのEGFにさらされ、撮像された。図4は、SH2バイオセンサーの核移行の時間経過を示す。

#### 【実施例2】

#### 【0092】

異種タンパク質を発現するためのACTBプロモーターの使用  
30

以下の実施例は、より強力なプロモーターの使用を試験するために設計された。よく知られた強力なプロモーターは、-アクチンをコードするACTB遺伝子座内にある。一对のZFNが、ヒトACTB遺伝子座を標的とするように設計された（図5）。一方のZFNは配列5' GTCGTCGACAAAGGGCTCC 3'（配列番号3）に結合するように設計され、他方のZFNは配列5' TGCAGGGCGGCTTCTGGCGG 3'（配列番号4）に結合するように設計された。結合するとすぐに、ZFNペアは、2つのZFN認識配列間に位置する配列5' GGCAATG 3'において二本鎖切断を導入した。

#### 【0093】

ドナープラスミドは、SH2バイオセンサー配列ならびにタグ、内因性に生成される-アクチン（すなわち、GFP-2x-SH2(Grb2)-2A-RFP）を提供するように設計された（図6）。該核酸は細胞内に導入され、2つの蛍光タンパク質が作られた（すなわち、GFP-SH2バイオセンサーおよびRFP-アクチン）。各タンパク質の蛍光は蛍光顕微鏡を用いて観察された。

#### 【0094】

A549細胞は該核酸でトランスフェクトされ、インテグレーションおよびACTB遺伝子座の発現を可能とするよう培養された。細胞は100ng/mLのEGFにさらされ、撮像された。図7は、GFP-Grb2バイオセンサーの移行およびRFP-アクチンの位置の時間経過を示す。生成されたバイオセンサーの量は非常に高く、高レベルの非結合性または「遊離の」バイオセンサーが存在し、それによりバックグラウンドの蛍光の  
40  
50

量が大幅に増加した。

**【実施例 3】**

**【0095】**

異種タンパク質を発現するためのLMNB1プロモーターの使用

ラミンB1タンパク質をコードする、LMNB1遺伝子座を標的とするために、別のZFNのペアが作製された(図8)。一方のZFNは配列5' CCTCGCCGCC 10 GCT 3'(配列番号5)に結合するように設計され、他方のZFNは配列5' GCGCCGCCGCCC ATGGCG 3'(配列番号6)に結合するように設計された。結合するとすぐに、ZFNペアは、2つの認識配列間に位置する配列5' GTCTCC 3'において二本鎖切断を導入する。

**【0096】**

ドナープラスミドは、ZFN切断部位の上流および下流のLMNB1配列に挟まれる異種タンパク質をコードする配列を含むように構築することができる。ZFNをコードする核酸およびドナープラスミドは細胞内に導入することができ、該細胞は上記に詳述されるように観察することができる。

**【実施例 4】**

**【0097】**

2つの異種タンパク質を発現するためのACTBプロモーターの使用

本実施例は、2つの異種タンパク質が同一の内因性プロモーターから同時に発現され得るかどうかを決定するために設計された。分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP:~56kD)およびGFP(~27kD)をコードする配列のインテグレーションのため、ACTB遺伝子座が選択された。抗体の軽鎖および重鎖とほぼ同じ大きさであるので、これらのタンパク質が選択された。

**【0098】**

ZFNが、異種配列が開始コドンのちょうど下流でインテグレートされるように、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞のACTB遺伝子座を標的とするように設計された(図9を参照されたい)。一方のZFNは配列5' CT TTTGTGCCCTGAT A 3'(配列番号7)に結合するように設計され、他方のZFNは配列5' GCCATGGATGACGATATC 3'(配列番号8)に結合するように設計された。結合するとすぐに、ZFNペアは、2つの認識配列間に位置する配列5' TAGTTT C 3'において二本鎖切断を導入した。ZFN切断部位の上流および下流のCHOのACTB配列に挟まれる、インテグレートされる予定の配列(すなわち、SEAP-2A-GFP)を含むドナープラスミドが構築された(図10)。ZFNをコードする核酸および(低濃度あるいは高濃度の)ドナープラスミドをCHO細胞内へ又クレオトランスクレオトロトシ、上記に詳述されるように細胞が維持された。標的化インテグレーションは、HAdet + 2プライマーおよびSEAP-500プライマーを用いる、ジャンクションPCR解析により確認され、予想通り1232塩基対の断片を増幅した(図11)。

**【0099】**

CHO細胞の特徴は、ドナーDNAのランダムインテグレーションの比率(rate)が高いことである。これを検証するために、GFPを使用して、ランダム挿入に対する標的化挿入を追跡した。ACTB遺伝子座での標的化インテグレーションは、緑色のマイクロフィラメントとして細胞内で視覚化できる、GFP-アクチンタンパク質を生じさせた。ランダムインテグレーションは、局在したGFPタンパク質が無く、均一に緑色の細胞を生じさせた。U2OS細胞のACTB遺伝子座内へのSEAPおよびGFPをコードする配列のインテグレーションは(上記実施例2に詳述されるように)、しかしながら、ランダムインテグレーションに対する標的化インテグレーションのより高い比率をもたらした。

**【0100】**

ドナープラスミドに自殺遺伝子を組み込むことにより、CHOにおけるランダムインテ

10

20

30

40

50

グレーシヨンを除去することが可能であろう。自殺遺伝子の組み込みは、ランダムインテグレーションによってのみ起こるだろう。自殺遺伝子の活性に起因して、ランダムインテグレーションの場合、生存細胞は存在しないだろう。結果的に、標的化組み込み体（*in integrant*）クローニングが単離され得る。

【実施例 5】

【0101】

抗体を発現するための A C T B プロモーターの使用

C H O 細胞は抗体などの治療用タンパク質の生成のために頻繁に使用される。上記に詳述されるC H O ドナープラスミドにおけるS E A P コード配列は、抗体の軽鎖および重鎖をコードする配列と交換されてもよい。該ドナープラスミドにおける配列は、上記に詳述されるように、C H O 細胞のA C T B 遺伝子座内にインテグレートすることができる。発現された抗体分子は、標準的な手法を用いてC H O 紹介細胞から精製することができる。

10

【図 1 A】

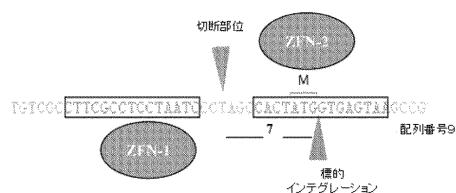


図1A

【図 1 B】

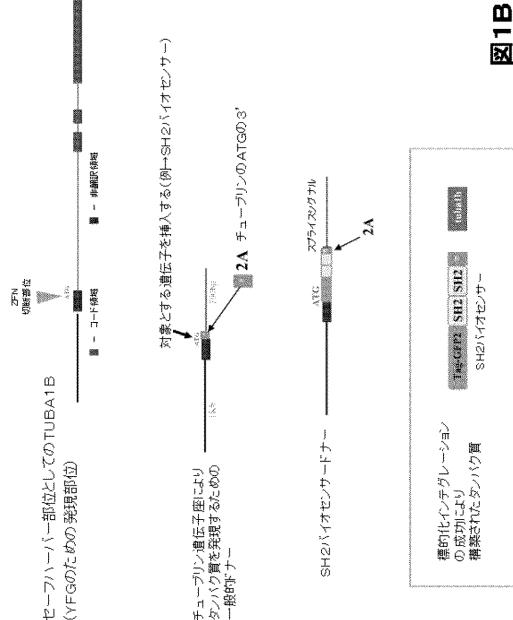


図1B

【図2】

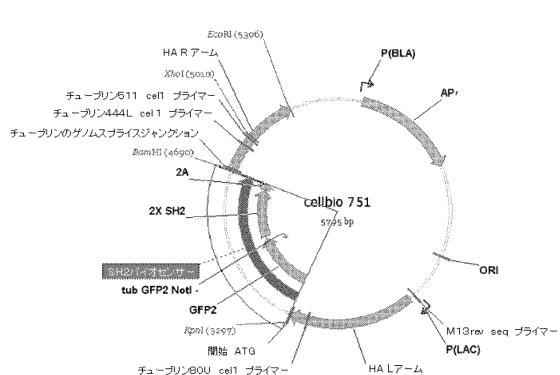


図2

【図3】

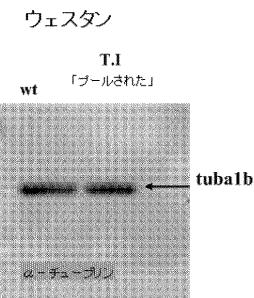


図3

【図4】

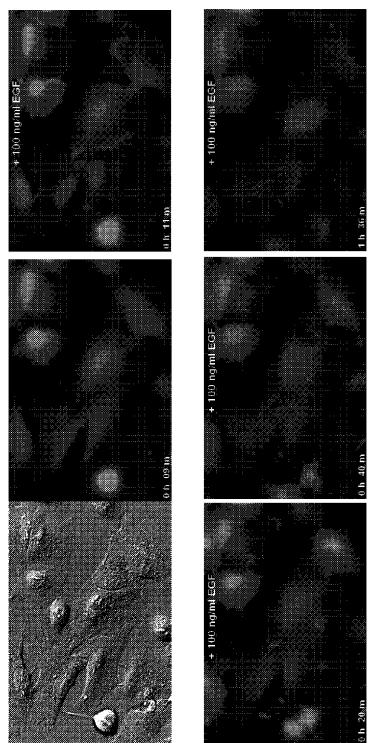


FIG.4

【図5】

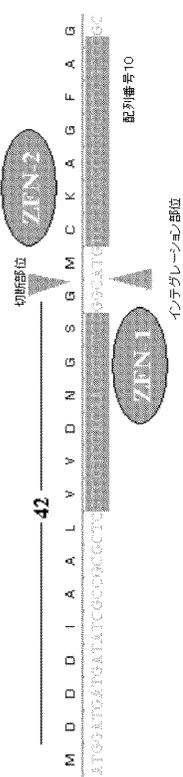
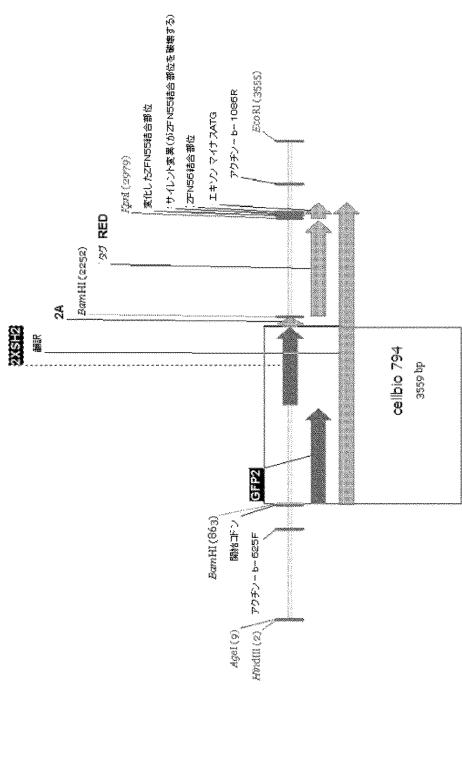
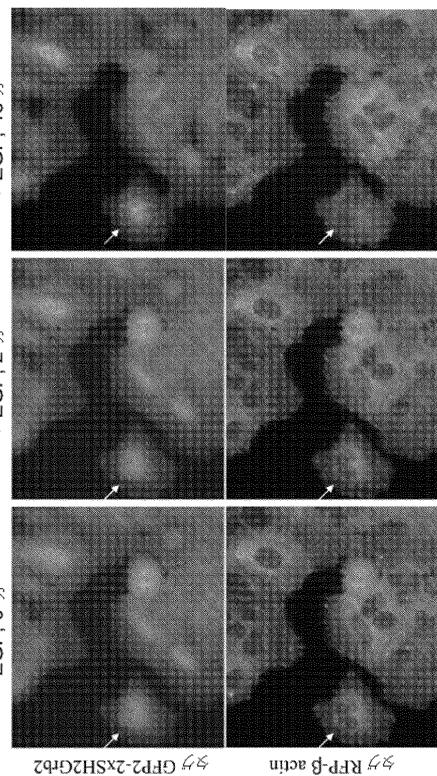


図5

【図6】

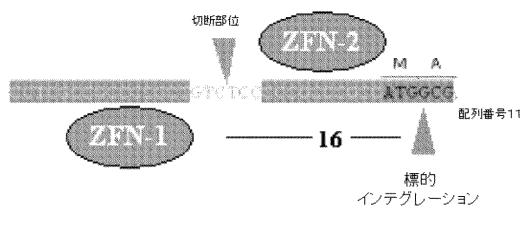


【図7】



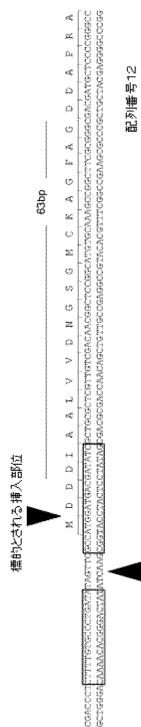
1

【 図 8 】



8

【 四 9 】



1

【図10】

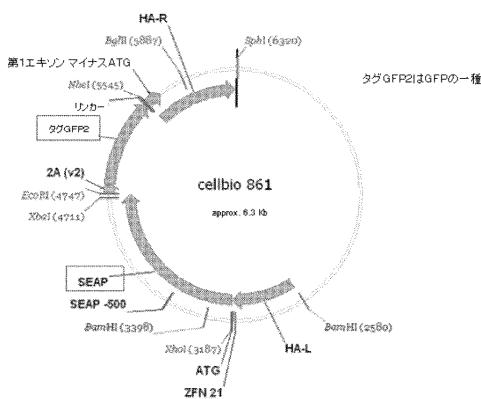


図10

【図11】

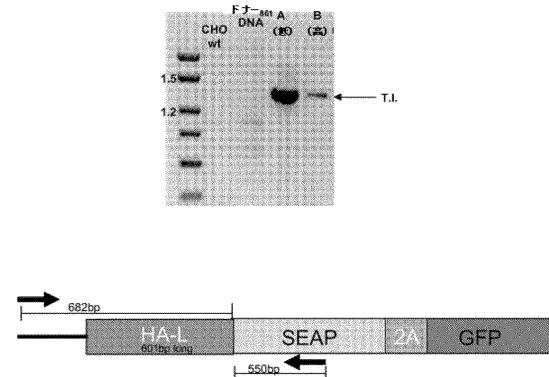


図11

## 【配列表】

[0005841996000001.app](#)

---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/390,668  
(32)優先日 平成22年10月7日(2010.10.7)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/367,017  
(32)優先日 平成22年7月23日(2010.7.23)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/323,698  
(32)優先日 平成22年4月13日(2010.4.13)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/323,719  
(32)優先日 平成22年4月13日(2010.4.13)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/323,702  
(32)優先日 平成22年4月13日(2010.4.13)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100170520  
弁理士 笹倉 真奈美  
(72)発明者 グレッグ・デイビス  
アメリカ合衆国 6 3 1 0 3 ミズーリ州セント・ルイス、スブルース・ストリート 3 0 5 0 番  
(72)発明者 ドミトリー・マルコフ  
アメリカ合衆国 6 3 1 0 3 ミズーリ州セント・ルイス、スブルース・ストリート 3 0 5 0 番  
(72)発明者 ネイサン・ゼンサー  
アメリカ合衆国 6 3 1 0 3 ミズーリ州セント・ルイス、スブルース・ストリート 3 0 5 0 番

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 0 5 4 9 8 5 (WO , A 1 )  
国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 1 6 9 2 (WO , A 1 )  
国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 1 6 3 2 (WO , A 1 )  
Nature Biotechnology , 2 0 0 9 年 , Vol.27, No.9 , pp.851-857  
Nature , 2 0 0 9 年 , Vol.459 , pp.437-441

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C a p l u s / W P I D S / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )