

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7108608号

(P7108608)

(45)発行日 令和4年7月28日(2022.7.28)

(24)登録日 令和4年7月20日(2022.7.20)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

Z N A

C 1 2 N 5/0789(2010.01)

C 1 2 N 5/0789

A 6 1 K 35/28 (2015.01)

A 6 1 K 35/28

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

請求項の数 14 (全49頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-522537(P2019-522537)

(86)(22)出願日 平成29年10月31日(2017.10.31)

(65)公表番号 特表2019-531754(P2019-531754
A)

(43)公表日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/059197

(87)国際公開番号 WO2018/081775

(87)国際公開日 平成30年5月3日(2018.5.3)

審査請求日 令和2年8月14日(2020.8.14)

(31)優先権主張番号 62/415,056

(32)優先日 平成28年10月31日(2016.10.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 508241200

サンガモ セラピューティクス, 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 9 4
0 0 5 ブリズベン マリーナ ブール
バード 7 0 0 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 造血幹細胞および前駆細胞におけるSCID関連遺伝子の遺伝子修正

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

内因性IL2R-ガンマ(IL2RG)遺伝子に1つまたは複数の挿入および/または欠失を含む、T細胞または幹細胞であって、前記細胞は、第1の亜鉛フィンガーヌクレアーゼと第2の亜鉛フィンガーヌクレアーゼの対を含む亜鉛フィンガーヌクレアーゼを含み、前記第1および第2の亜鉛フィンガーヌクレアーゼは、55629および57618と指定される亜鉛フィンガータンパク質、または57718および57629と指定される亜鉛フィンガータンパク質を含み、各亜鉛フィンガータンパク質が、F1～F6の順序の6つの亜鉛フィンガードメインを含み、各亜鉛フィンガードメインが、以下の表：

【表 1 A】

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
55629	QSGNLAR (配列番号 3)	QSGDLTR (配列番号 4)	RSDHLSQ (配列番号 5)	QSNGLTQ (配列番号 6)	TRTVLMN (配列番号 7)	QNATRIN (配列番号 8)
57618	TSGNLTR (配列番号 9)	QSNDLNS (配列番号 10)	YQGVLTR (配列番号 11)	RTDNLES (配列番号 12)	RSDHLSQ (配列番号 5)	RRDNRDT (配列番号 13)
57718	LQSNLNR (配列番号 14)	QSGDLTR (配列番号 4)	RSDHLSQ (配列番号 5)	RKDALPT (配列番号 15)	TTTVLRN (配列番号 16)	QNATRIN (配列番号 8)
57629	TSGNLTR (配列番号 9)	QSNDLNS (配列番号 10)	YQGVLTR (配列番号 11)	RLDNLHP (配列番号 17)	RSDHLSQ (配列番号 5)	RRDNRDT (配列番号 13)

10

に示すとおりの認識ヘリックス領域を含む、T細胞または幹細胞。

【請求項 2】

前記挿入および/または前記欠失が、前記内因性 I L 2 R G 遺伝子を不活性化させる、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

外因性配列が、前記内因性 I L 2 R G 遺伝子に挿入されている、請求項 1 または 2 に記載の細胞。

20

【請求項 4】

前記外因性配列が、I L 2 R G または R A G ポリペプチドをコードする導入遺伝子を含む、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 5】

前記内因性 I L 2 R G 遺伝子が、変異体遺伝子であり、前記外因性配列が、機能性 I L 2 R G タンパク質が前記細胞から発現されるように、前記内因性 I L 2 R G 遺伝子における変異を修正する配列を含む、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 6】

前記亜鉛フィンガーヌクレアーゼが、ポリヌクレオチドとして前記細胞に導入される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の細胞。

30

【請求項 7】

前記ポリヌクレオチドが、mRNA、ウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項 6 に記載の細胞。

【請求項 8】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)である、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 9】

前記細胞が、幹細胞である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 10】

前記幹細胞が、造血幹細胞または人工多能性幹細胞(iPSC)である、請求項 9 に記載の細胞。

40

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれかに記載の造血幹細胞を作製する方法であって、亜鉛フィンガーヌクレアーゼを、細胞に導入することを含み、切断後に 1 つまたは複数の挿入および/または欠失が内因性 I L 2 R G 遺伝子に導入されるように、前記亜鉛フィンガーヌクレアーゼが、前記内因性 I L 2 R G 遺伝子を切断する、方法。

【請求項 12】

切断後に内因性配列が前記細胞のゲノムに導入されるように、外因性配列を前記細胞に導入することをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

50

【請求項 13】

被験体における S C I D 関連障害を処置または予防するための組成物であって、請求項 3 から 10 のいずれかに記載の造血幹細胞の集団を含む、組成物。

【請求項 14】

前記 S C I D 関連障害が、X - S C I D またはオーメン症候群である、請求項 13 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

10

本出願は、2016 年 10 月 31 日に提出された米国仮出願第 62 / 415,056 号（この開示は、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

【0002】

本開示は、ゲノム操作の分野に関し、特に、I L 2 R - ガンマ (I L 2 R G) 遺伝子の、標的化修飾に関する。

【背景技術】

【0003】

亜鉛フィンガータンパク質（「ZFP」）または T A L エフェクタードメイン（「T A L E」）に由来する D N A 結合ドメインと、すべて標的 D N A 部位に特異的に結合するように設計されている、亜鉛フィンゲルヌクレアーゼ（「ZFN」）、T A L E N、C R I S P R / C a s ヌクレアーゼ系、およびホーミングエンドヌクレアーゼを含む操作されたヌクレアーゼとを含む、組換え転写因子は、内因性遺伝子の遺伝子発現を調節する能力を有し、ゲノム操作および遺伝子療法に有用である。たとえば、米国特許第 9,394,545 号、同第 9,150,847 号、同第 9,206,404 号、同第 9,045,763 号、同第 9,005,973 号、同第 8,956,828 号、同第 8,936,936 号、同第 8,945,868 号、同第 8,871,905 号、同第 8,586,526 号、同第 8,563,314 号、同第 8,329,986 号、同第 8,399,218 号、同第 6,534,261 号、同第 6,599,692 号、同第 6,503,717 号、同第 6,689,558 号、同第 7,067,317 号、同第 7,262,054 号、同第 7,888,121 号、同第 7,972,854 号、同第 7,914,796 号、同第 7,951,925 号、同第 8,110,379 号、同第 8,409,861 号、米国特許公開第 20030232410 号、同第 20050208489 号、同第 20050026157 号、同第 20050064474 号、同第 20060063231 号、同第 20080159996 号、同第 20100218264 号、同第 20120017290 号、同第 20110265198 号、同第 20130137104 号、同第 20130122591 号、同第 20130177983 号、および同第 20130177960 号、ならびに同第 20150056705 号（これらの開示は、あらゆる目的で参照によりその全体が組み入れられる）を参照のこと。さらに、アルゴノート系（たとえば、「T t A g o」として公知の T. thermophilus 由来であり、S w a r t s ら、（2014 年）、Nature、507 巻（7491 号）：258～261 頁を参照されたい）に基づく標的化ヌクレアーゼが開発されており、これもまた、ゲノム編集および遺伝子療法における使用の可能性を有し得る。

20

30

40

【0004】

ヌクレアーゼ媒介型の遺伝子療法は、1 つもしくは複数の不活性化遺伝子を有するように細胞に遺伝子操作を行うため、および / またはその細胞に、これまでにその細胞において産生されていない産物を発現させるために（たとえば、導入遺伝子の挿入および / または内因性配列の修正を通じて）、使用することができる。導入遺伝子挿入の使用の例としては、1 つもしくは複数の新規な治療用タンパク質をコードする 1 つもしくは複数の遺伝子の挿入、細胞もしくは個体において欠如しているタンパク質をコードするコーディング配列の挿入、変異型遺伝子配列を含有する細胞における野生型遺伝子の挿入、ならびに / ま

50

たは構造核酸、たとえば、shRNAもしくはsiRNAをコードする配列の挿入が挙げられる。内因性遺伝子配列の「修正」の有用な適用の例としては、疾患関連遺伝子変異の改変、スプライシング部位をコードする配列における改変、調節配列における改変、およびタンパク質の構造的特徴をコードする配列の標的化改変が挙げられる。導入遺伝子構築物は、相同組換え修復(homology directed repair)(HDR)、または非相同末端結合(NHEJ)により駆動されるプロセス中の末端捕捉のいずれかによって、挿入され得る。たとえば、米国特許第9,045,763号、同第9,005,973号、同第7,888,121号、および同第8,703,489号を参照されたい。

【0005】

これらの操作された転写因子およびヌクレアーゼを使用した臨床試験では、これらの分子により、がん、HIV、および/または血液障害(たとえば、ヘモグロビン異常症および/または血友病)を含む、様々な状態を処置できることが示されている。たとえば、Yura、(2006年)、FASEB J.、20巻:479~481頁、Tebasら、(2014年)、New Eng J Med、370巻(10号):901頁を参照されたい。したがって、これらのアプローチは、疾患の処置に使用することができる。

【0006】

重症複合免疫不全(SCID)は、少なくとも11種類の異なる状態を含む、原発性免疫不全の不均一な群である(Kutukculerら、(2012年)、It J of Ped、38巻:8頁)。SCIDを有するすべての患者は、一般的な細菌およびウイルス、ならびに日和見性および真菌性の病原体に感染しやすい。X連鎖型重症複合免疫不全(X-SCID)は、身体から産生されるT細胞およびナチュラルキラー細胞が非常に少ない、免疫不全障害である。T細胞の補助がない状況では、B細胞に欠陥が生じる(Fisherら、(2002年)、Nature Reviews、2巻:615~621頁)。これは、X連鎖型劣性形質であるため、ほぼすべての患者は男性となり、X染色体のxq13.1に位置するIL2RG遺伝子(「共通ガンマ」遺伝子または「サイトカイン受容体共通ガンマ鎖」とも呼ばれている)の変異バージョンから生じる。共通ガンマタンパク質は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、およびIL-21の受容体間で共通しており、X-SCID患者が、機能性T細胞およびNK細胞を生じることができなくなっている。X-SCIDに罹患した人物は、3ヶ月齢にも満たない非常に若齢の時点で、感染症にかかることが多い。これは、3ヶ月の段階で乳児における免疫グロブリンG(IgG)レベルの量の減少に起因して生じる。これに続いて、咳、発熱、悪寒、および息切れなどの一般的な症状をもたらす肺の炎症である肺炎などのウイルス感染が生じることが多い。再発性の湿疹様の皮疹もまた、一般的な症状である。X-SCIDを有する個体が経験する他の一般的な感染症としては、下痢、敗血症、および中耳炎が挙げられる。X-SCID患者が経験するいくつかの他の一般的な症状としては、成長障害、胃腸の問題、皮膚の問題、および筋緊張低下が挙げられる(Vickers、Severe Combined Immune Deficiency: Early Hospitalisation and Isolation、(2009年)、29~47頁、ISBN 978-0-470-31986-4)。治療的介入および/または環境的介入がなければ、X-SCIDは、典型的に、生まれて1年の間に致命的になる(Hacein-Berg-Abinaら、(2002年)、NEJM、346巻:1185~1193頁)。

【0007】

SCIDの別の種類は、組換え活性化遺伝子(RAG1、RAG2)における欠陥に関連するものであり、すべてのSCID症例のうちのおよそ10%が、RAG1またはRAG2と関係している(Kutukculer、同書)。RAG1またはRAG2遺伝子のタンパク質産物(それぞれ、Rag1およびRag2)は、B細胞受容体およびT細胞受容体におけるV(D)J再配列に必須であり、したがって、B細胞およびT細胞の適正な発生に必要であり、炎症に関与するとも考えられている(たとえば、米国特許公開第201

10

20

30

40

50

10016543号を参照されたい)。まとめると、Rag1およびRag2は、DNAを切断して二本鎖切断を生成することによって、V(D)J組換えを開始し、この切断が、次いで、NHEJ機構によって修復される。

【0008】

オーメン症候群は、明確な臨床特徴として全身性紅皮症、肝脾腫大、およびリンパ節腫脹を有する、SCIDの常染色体性劣性バリエーションである。古典的なSCIDを有する患者とは異なり、オーメン症候群を有する患者は、異常な表現型の循環T細胞を有する。それらは、典型的に、反応性が乏しく、オリゴクローナルであり、以前の活性化の細胞表面マーカーを呈する。B細胞は、典型的に、存在しないかまたは少なく、IgGレベルは、一般に低い、一方でIgEレベルは高い(Matthewsら、(2015年)、PLoS One、10巻(4号):e0121489頁)。オーメン症候群は、典型的に、RAG1またはRAG2における変異によって引き起こされるが、他の遺伝子における変異によっても生じる場合がある。一般に、低形質性RAG変異が、ときにはRAGヌル変異と組み合わせて、オーメン症候群を引き起こす(Matthews、同書)。

【0009】

現在のところ、SCID患者に利用可能な処置は3種類、すなわち、医薬品の使用、滅菌環境、および静脈内免疫グロブリン療法(IVIg)がある。第1には、カンジダ症のためのフルコナゾールおよびヘルペスウイルス感染症を予防するためのアシクロビルなど、抗生物質または抗ウイルス薬を、日和見感染を制御するために投与する(Freemanら、Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology、(2009年)、9巻(6号):525~530頁)。加えて、患者は、静脈内免疫グロブリン(IVIg)補充も受けることができる。しかしながら、IVIgは、時間および金銭の両方の点で、費用がかさむ。さらに、前述の処置は、日和見感染を予防するように機能するだけであり、決して、X-SCIDまたは他のSCID障害を治癒するものではない。

【0010】

現時点では、骨髄移植(BMT)が、標準的な治癒的手技であり、適切なドナーを特定することができ、生着が成功すれば、完全な免疫再構成が得られる。骨髄移植は、ドナーとレシピエントとの間で、許容されるヒト白血球抗原(HLA)一致を必要とする。HLA分子のアレイは、個体間で異なるため、免疫系の細胞は、HLA機構を利用して、自己細胞と外来細胞とを区別することができる。BMTは、同種(ドナーおよびレシピエントが、異なる人物である)または自家(ドナーおよびレシピエントが、同じ人物である)であり得る。自家BMTは、したがって、完全なHLA一致を有するが、一方で、同種BMTの一致は、さらに複雑である。標準的な実施では、公知の主要HLA抗原が6つすべてで同一である - 6分の6一致である場合には、同種移植がよい。6/6一致を有する患者は、移植片対宿主病、移植片拒絶、弱い免疫系を有すること、および重篤な感染症にかかることの可能性がより低い。骨髄移植および末梢血幹細胞移植については、抗原の不一致が1つであるドナー、6分の5一致のドナーが、使用されることがある。そのため、BMTは、完全な免疫再構成をもたらすことができ、したがって、X-SCID患者において治癒的となり得るが、合併症の可能性により、有効性および広範な使用は制限される。オーメン症候群を有する患者については、BMTも処置の好ましい方法ではあるが、オーメン症候群の患者は、他のSCID患者よりも、BMT後の死亡率が高い。

【0011】

X-SCID患者のこれまでの遺伝子療法の臨床試験では、野生型IL2RG遺伝子を含むレトロウイルスベクターが使用されていた(Cavazzana-Calvoら、(2000年)、Science、288巻(5466号):669~72頁)。しかしながら、レトロウイルスベクターは、宿主ゲノムにランダムに組み込まれ、そのため、癌原遺伝子に組み込みが生じた場合には、挿入による腫瘍発生が、患者に生じ得る(Hacein-Bey-Abinaら、(2008年)、J. Clin. Investigation、118巻(9号):3132~42頁)。この治療法を受ける患者の大半は、この挿

10

20

30

40

50

入による腫瘍発生の結果として白血病を発症しており、したがって、この方法は、安全で有効な治療法ではない。

【0012】

インテグラーゼ欠損レンチウイルスベクター (IDLV) (Philippeら、(2006年)、Proc. Nat'l Acad. Sci., 103巻(47号): 17684~9頁)、すなわちIDLVの開発により、それが宿主ゲノムに組み込むことができないことに起因して、X-SCIDに関するIL2RGの遺伝子修正のさらなる調査が促進された。亜鉛フィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、CRISPR/Cas系、ならびにTtAgoが、DNAの特定の領域を標的とし、標的化された二本鎖切断を導入する能力 (これが、次に、導入された導入遺伝子の標的化組み込みを促進する) により、このゲノム編集技術は、可能性のある治癒的な処置の開発において非常に魅力的にしている。

この目的で、研究者らは、造血幹細胞および前駆細胞 (HSPC) における、ZFN切断、ならびにそれに続くIDLVにより送達される修正用IL2RG cDNAのTIのために、内因性IL2RG遺伝子座のエクソン5を標的化した。たとえば、米国特許第7,888,121号および同第7,951,925号、Lombardoら (2007年)、Nat. Biotech., 25巻(11号): 1298~306頁; Genoveseら、(2014年)、Nature, 510巻(7504号): 235~40頁を参照されたい。しかしながら、これらの方法は、導入遺伝子を、エクソンの中央に導入することにより、導入された導入遺伝子上流において、部分的に転写される領域が生じ、これにより、導入された修正用遺伝子の活性が妨害され得るという点で、潜在的な欠点を有し得る。さらに、送達されたエピソーム性導入遺伝子は、別のウイルス性インテグラーゼが細胞内に存在している場合、依然としてランダムにゲノムに組み込まれる可能性がある。免疫抑制患者 (すべてのX-SCID患者など) は、内因性レトロウイルスの活性化を有する場合があり、したがって、HIV陽性でもある患者は、X-SCID処置のためのウイルス送達される遺伝子療法を受けなくなっている。IL2RGおよびRAGを標的とするヌクレアーゼはまた、20160030477に記載されている。

しかしながら、SCIDの処置および/または予防のためのIL2RG遺伝子修正およびドナー送達の追加の方法および組成物に対する必要性が残っている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【文献】米国特許第7,888,121号明細書

米国特許第7,951,925号明細書

【非特許文献】

【0014】

【文献】Lombardoら、Nat. Biotech. (2007年) 25巻(11号): 1298~306頁; Genoveseら、Nature (2014年) 510巻(7504号): 235~40頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、遺伝子療法およびゲノム操作において使用するための組成物および方法について記載する。具体的には、記載される方法および組成物は、ヌクレアーゼにより媒介される、内因性IL2RG遺伝子 (変異体または野生型) のゲノム修飾 (たとえば、1つもしくは複数の挿入および/または欠失) に関する。ゲノム修飾は、(i) 標的遺伝子を不活性化する (たとえば、ヌクレアーゼによる遺伝子の切断後にNHEJを介して)、(ii) タンパク質をコードする配列、たとえば、SCIDを有する被験体において欠如もしくは欠損しているタンパク質を補うための配列を含む、導入遺伝子 (ドナー) の標的化挿入

をもたらす、ならびに／または（*i i i*）修正用ドナー（たとえば、変異体 *IL2RG* 内因性遺伝子における機能性 *IL2RG* 発現を修復する配列）の標的化挿入を行う、挿入および／または欠失（「インデル」）を含み得る。ある特定の実施形態では、高度に *IL2RG* 特異的な DNA 結合タンパク質（*ZFN*、*TALEN*、*CRISPR/Cas* 系）を使用した、修正用 *SCID* 関連遺伝子カセット（たとえば、*SCID* 関連遺伝子の変異体バージョンを有する造血幹細胞）の、*IL2RG* への標的化組み込み。標的とされる *IL2RG* 遺伝子に組み込まれる *SCID* 関連遺伝子カセット（たとえば、機能性 *IL2RG* 導入遺伝子）は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター（たとえば、アデノ随伴ウイルス（*AAV*））で運搬することもでき、および／または 1 つまたは複数のヌクレアーゼを使用して組み込むこともできる。

10

【0016】

一態様では、1 つまたは複数のヌクレアーゼを使用した *IL2RG* 遺伝子の標的化修飾のための方法および組成物が、本明細書に開示される。ヌクレアーゼ、たとえば、操作されたメガヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（*ZFN*）（「*ZFN*」という用語には、*ZFN* の対が含まれる）、*TALE* ヌクレアーゼ（*TALE* エフェクタードメインと、制限エンドヌクレアーゼおよび／もしくはメガヌクレアーゼに由来するヌクレアーゼドメインとの融合体を含む）、*TALEN*（たとえば、メガ *TALE* およびコンパクト *TALEN*）（「*TALEN*」という用語には、*TALEN* の対が含まれる）、*Tago* 系および／または *CRISPR/Cas* ヌクレアーゼ系を使用して、細胞の *IL2RG* 遺伝子座において DNA を切断する。*IL2RG* 遺伝子は、切断後に（たとえば、挿入および／もしくは欠失（「インデル」）によって）および／またはドナー導入遺伝子の標的化挿入によって、不活性化され得る。ドナー導入遺伝子は、相同組換え修復（*HDR*）または非相同修復機序（たとえば、*NHEJ* ドナー捕捉）を介するものであり得る。本明細書に記載されるヌクレアーゼは、標的 DNA に、二本鎖切断（*DSB*）または一本鎖切断（ニック）を誘導し得る。一部の実施形態では、2 つのニッカーゼを使用して、2 つのニックを導入することによって、*DSB* を作製する。一部の事例では、ニッカーゼは、*ZFN* であるが、一方で他の事例では、ニッカーゼは、*TALEN* または *CRISPR/Cas* ニッカーゼである。本明細書に記載されるヌクレアーゼのいずれか（たとえば、*ZFN*、*TALEN*、*CRISPR/Cas* など）により、*IL2RG* 遺伝子のイントロン（たとえば、イントロン 1 または 2）、たとえば、配列番号 1 または 2 の 9 ~ 20 個またはそれよりも多くの（9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個またはそれよりも多くの）連続的または非連続的アミノ酸を含む標的部位を含む、表 2 に示される標的配列を標的とすることができる。

20

30

【0017】

一態様では、ゲノム内の *IL2RG* 遺伝子の標的部位に結合する天然に存在しない亜鉛フィンガータンパク質（*ZFP*）が、本明細書に記載され、ここで、*ZFP* は、1 つまたは複数の操作された亜鉛フィンガー結合ドメインを含む。一実施形態では、*ZFP* は、目的の標的ゲノム領域を切断する亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（*ZFN*）であり、ここで、*ZFN* は、1 つまたは複数の操作された亜鉛フィンガー結合ドメインと、ヌクレアーゼ切断ドメインまたは切断ハーフドメイン（*cleavage half-domain*）とを含む。切断ドメインおよび切断ハーフドメインは、たとえば、様々な制限エンドヌクレアーゼおよび／またはホーミングエンドヌクレアーゼから得ることができ、野生型であっても操作型（変異体）であってもよい。一実施形態では、切断ハーフドメインは、*EIS* 型制限エンドヌクレアーゼ（たとえば、*FokI*）に由来する。ある特定の実施形態では、亜鉛フィンガードメインは、表 1 の単一の行で示されているように、認識ヘリックスドメインを有する亜鉛フィンガータンパク質である。これらの亜鉛フィンガータンパク質を含むヌクレアーゼは、任意のリンカー配列（たとえば、それを切断ドメインに連結させる）ならびに任意の切断ドメイン（たとえば、*ELD* 変異体などの二量体化変異体；416、422、447、448、および／もしくは 525 のうちの 1 つもしくは複数に変異を有する *FokI* ドメイン；および／またはニッカーゼ機能性をもたらす触媒ドメイン変異体

40

50

）を含み得る。たとえば、米国特許第 8,703,489 号、同第 9,200,266 号、同第 8,623,618 号、および同第 7,914,796 号、ならびに米国出願第 15/685,580 号を参照されたい。ある特定の実施形態では、ZFN の ZFP は、配列番号 1 または 2 に示される配列内の 9 ~ 18 個またはそれよりも多くのヌクレオチドの標的部位に結合する。

【0018】

別の態様では、ゲノムの I L 2 R 遺伝子における標的部位（たとえば、表 2 の配列番号 1 または 2 に示される標的配列の少なくとも 9 個または 12 個（たとえば、9 ~ 20 個またはそれよりも多く）のヌクレオチドを含む、標的部位）に結合する、転写活性化因子様エフェクター（T A L E）タンパク質が、本明細書に記載され、ここで、T A L E は、1 つまたは複数の操作された T A L E 結合ドメインを含む。一実施形態では、T A L E は、目的の標的ゲノム領域を切断するヌクレアーゼ（T A L E N）であり、ここで、T A L E N は、1 つまたは複数の操作された T A L E DNA 結合ドメインと、ヌクレアーゼ切断ドメインまたは切断ハーフドメインとを含む。切断ドメインおよび切断ハーフドメインは、たとえば、様々な制限エンドヌクレアーゼおよび / またはホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）から得ることができる。一実施形態では、切断ハーフドメインは、I I S 型制限エンドヌクレアーゼ（たとえば、F o k I）に由来する。他の実施形態では、切断ドメインは、メガヌクレアーゼに由来し、このメガヌクレアーゼドメインはまた、DNA 結合機能性を呈し得る。

【0019】

別の態様では、ゲノムの I L 2 R 遺伝子における標的部位に結合する C R I S P R / C a s 系が、本明細書に記載され、ここで、C R I S P R / C a s 系は、1 つまたは複数の操作された一本鎖ガイド RNA (s i n g l e g u i d e R N A) または機能的同等物、ならびに C a s 9 ヌクレアーゼを含む。ある特定の実施形態では、一本鎖ガイド RNA (s g R N A) は、表 2（配列番号 1 または 2）に示される標的部位の 9 個、12 個、またはそれよりも多くの連続したヌクレオチドを含む配列に結合する。

【0020】

本明細書に記載されるヌクレアーゼ（たとえば、ZFN、C R I S P R / C a s 系、T t a g o、および / または T A L E N）は、I L R 2 遺伝子内またはそれに隣接するコーディング領域または非コーディング領域、たとえば、例として、リーダー配列、トレーラー配列 (t r a i l e r s e q u e n c e) もしくはイントロン、またはコーディング領域の上流または下流のいずれかの非転写領域内の目的の領域に結合し得る、および / またはそれを切断し得る。

【0021】

別の態様では、1 つまたは複数のヌクレアーゼ（たとえば、本明細書に記載される ZFN、C R I S P R / C a s 系、T t a g o、および / または T A L E N）をコードするポリヌクレオチドが、本明細書に記載される。ポリヌクレオチドは、たとえば、mRNA であり得る。一部の態様では、mRNA は、化学的に修飾されていてもよい（たとえば、K o r m a n n ら、(2011 年)、Nature Biotechnology、29 巻 (2 号) : 154 ~ 157 頁を参照されたい)。

【0022】

別の態様では、プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載される 1 つまたは複数のヌクレアーゼ（たとえば、ZFN、C R I S P R / C a s 系、T t a g o、および / または T A L E N）をコードするポリヌクレオチドを含む、ZFN、C R I S P R / C a s 系、T t a g o、および / または T A L E N 発現ベクターが、本明細書に記載される。一実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクター（たとえば、A A V ベクター）である。一態様では、ウイルスベクターは、組織特異的向性を呈する。

【0023】

別の態様では、1 つまたは複数のヌクレアーゼ（たとえば、ZFN、C R I S P R / C a s 系、T t a g o、および / または T A L E N）発現ベクターを含む、宿主細胞が、本明

10

20

30

40

50

細書に記載される。

【 0 0 2 4 】

別の態様では、本明細書に記載される発現ベクターを含む医薬組成物が、提供される。一部の実施形態では、医薬組成物は、1つを上回る発現ベクターを含んでもよい。一部の実施形態では、医薬組成物は、第1のポリヌクレオチドを含む第1の発現ベクター、および第2のポリヌクレオチドを含む第2の発現ベクターを含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは、異なる。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは、実質的に同じである。医薬組成物は、ドナー配列（たとえば、疾患または障害、たとえば、LSDまたは血友病において欠如または欠損しているタンパク質をコードする導入遺伝子）をさらに含み得る。一部の実施形態では、ドナー配列は、発現ベクターに付随する。

10

【 0 0 2 5 】

一部の実施形態では、IL2R DNA結合ドメイン（たとえば、亜鉛フィンガータンパク質、またはTALE、またはsgRNA、またはメガヌクレアーゼ）および野生型または操作型切断ドメインまたは切断ハーフトドメインを含む、融合タンパク質が、提供される。

【 0 0 2 6 】

本明細書に記載されるヌクレアーゼは、IL2RG遺伝子のコーディング領域内、または該遺伝子内もしくはそれに隣接する非コーディング配列、たとえば、例として、リーダー配列、トレーラー配列、もしくはイントロン、またはコーディング領域の上流または下流のいずれかにある非転写領域内で、IL2RG遺伝子に結合し得る、および/またはそれを切断し得る。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、表2に示されるIL2RG配列内の9~20個またはそれよりも多くのヌクレオチドの標的部位に結合する。

20

【 0 0 2 7 】

別の態様では、DNA結合分子（たとえば、ZFP、TALE、sgRNAなど）およびヌクレアーゼ（切断）ドメインを含むヌクレアーゼを含め、本明細書に記載されるヌクレアーゼ（たとえば、ZFN、TALEN、TtAgo、および/またはCRISPR/Cas系）のうちの1つまたは複数を含む、組成物が本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、本組成物は、1つまたは複数のヌクレアーゼを、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて、含む。一部の実施形態では、本組成物は、2つまたはそれよりも多くのヌクレアーゼセット（対）を含み、それぞれのセットが異なる特異性を有する。他の態様では、本組成物は、異なる種類のヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、本組成物は、IL2RGヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含み、他の実施形態では、本組成物は、IL2RG特異的ヌクレアーゼタンパク質を含む。なおもさらなる実施形態では、本組成物は、1つまたは複数のドナー分子、たとえば、機能性IL2RG、Rag1、および/またはRag2タンパク質をコードするドナーを含み、これには、その任意の機能性断片が含まれる。好ましい実施形態では、ドナーは、部分的なIL2RGおよび/またはRAG（たとえば、RAG1もしくはRAG2）遺伝子を含む。野生型IL2RG遺伝子のエクソン2から8を含むcDNAを含むドナーもまた、好ましい。別の好ましいドナーは、野生型RAG（RAG1および/またはRAG2）遺伝子のエクソン3を含むcDNAである。他の態様では、ドナーは、修正用配列を含み、これが、細胞の変異体IL2RGに組み込まれ、その結果、細胞が、機能性IL2RGを発現ようになる。

30

40

【 0 0 2 8 】

別の態様では、本明細書に記載される1つまたは複数のヌクレアーゼまたはヌクレアーゼ構成要素（たとえば、ZFN、TALEN、TtAgo、またはCRISPR/Cas系のヌクレアーゼドメイン）をコードするポリヌクレオチドが、本明細書に記載される。ポリヌクレオチドは、たとえば、mRNAまたはDNAであり得る。一部の態様では、mRNAは、化学的に修飾されていてもよい（たとえば、Kormannら、（2011年）、Nature Biotechnology、29巻（2号）：154~157頁を参照されたい）。他の態様では、mRNAは、ARCAキャップを含み得る（たとえば、米

50

国特許第 7, 0 7 4, 5 9 6 号および同第 8, 1 5 3, 7 7 3 号を参照されたい)。さらなる実施形態では、mRNA は、非修飾ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドの混合物を含み得る（たとえば、米国特許公開第 2 0 1 2 0 1 9 5 9 3 6 号を参照されたい）。別の態様では、プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載される 1 つまたは複数の ZFN、TALEN、TtAgo、または CRISPR/Cas 系をコードするポリヌクレオチドを含む、ヌクレアーゼ発現ベクターが、本明細書に記載される。一実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクター、たとえば、AAVベクターである。

【0029】

別の態様では、本明細書に記載される 1 つもしくは複数のヌクレアーゼ、1 つもしくは複数のヌクレアーゼ発現ベクター、および/または 1 つもしくは複数のドナーを含む、宿主細胞が、本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、IL2RG 特異的ヌクレアーゼによって媒介される SCID 関連遺伝子カセットの組み込みにより、生来の変異体バージョンを修正することによって、細胞において欠如または欠損しているタンパク質の機能性バージョンが得られるように、1 つまたは複数の SCID 関連遺伝子（たとえば、IL2RG 遺伝子）の変異体バージョンを含む。宿主細胞は、1 つまたは複数のヌクレアーゼ発現ベクターで、安定に形質転換されているか、またはそれで一過的にトランスフェクトされているか、またはこれらの組み合わせであってもよい。一実施形態では、宿主細胞は、T 細胞または幹細胞、たとえば、造血幹細胞または人工多能性幹細胞である。他の実施形態では、1 つまたは複数のヌクレアーゼ発現ベクターは、宿主細胞において 1 つまたは複数のヌクレアーゼを発現させる。別の実施形態では、宿主細胞は、外因性ポリヌクレオチドドナー配列（たとえば、IL2RG または Rag タンパク質をコードする）をさらに含み得る。本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、宿主細胞は、胚性細胞、たとえば、1 つまたは複数のマウス、ラット、ウサギ、または他の哺乳動物細胞の胚（たとえば、非ヒト霊長類）を含み得る。一部の実施形態では、宿主細胞は、組織を含む。多能性細胞、全能性細胞、複能性（multipotent）細胞、または分化細胞を含め、内因性 IL2RG 遺伝子のイントロン（たとえば、内因性 IL2RG 遺伝子のイントロン 1）に修飾（たとえば、ドナー配列の組み込み）を含む、本明細書に記載される細胞の子孫である細胞または細胞株もまた、記載される。ある特定の実施形態では、内因性 IL2RG 遺伝子のイントロン（たとえば、内因性 IL2RG のイントロン 1）に修飾（たとえば、ドナー配列の組み込み）を含む、本明細書に記載される分化細胞もまた、本明細書に記載され、この分化細胞は、本明細書に記載される幹細胞の子孫である。

【0030】

別の態様では、細胞において IL2RG 遺伝子を切断するための方法であって、（a）ヌクレアーゼが発現され、1 つまたは複数の IL2RG 遺伝子が切断されるような条件下において、細胞に、1 つまたは複数の IL2RG 遺伝子を標的とする 1 つまたは複数のヌクレアーゼをコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを導入することを含む、方法が、本明細書に記載される。

【0031】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼによる切断の後に、標的 IL2RG 遺伝子のゲノム配列が、たとえば、本明細書に記載されるヌクレアーゼ（またはヌクレアーゼをコードするベクター）を使用して、切断され、ZFN、TALEN、TtAgo、または CRISPR/Cas 系による標的化切断の後に、「ドナー」配列が、遺伝子に挿入され、その結果、ドナー配列が、細胞において発現される。ドナー配列は、機能性 IL2RG または Rag タンパク質をコードし得る。一部の実施形態では、ドナー配列は、部分的な IL2RG および/または RAG（RAG1 または RAG2）遺伝子配列を含む。好ましい実施形態では、ドナーは、エクソン 2 から 8 を含む IL2RG 遺伝子配列の部分的な cDNA、またはエクソン 3 を含む RAG1 遺伝子の全 cDNA、またはエクソン 3 を含む RAG2 遺伝子の全 cDNA を含む。さらに、ドナー配列は、ヌクレアーゼ送達系（たとえば、非ウイルスベクターまたはウイルスベクター）に存在してもよく、別個の送達機序（たとえば、ヌクレアーゼが mRNA の形態で送達され、ドナーが、ウイルスベクター、たと

10

20

30

40

50

ば A A V を使用して送達される) で存在してもよく、または代替として、別個および / もしくは異なる核酸送達機序を使用して細胞に導入されてもよい。I L 2 R G 遺伝子座へのドナーヌクレオチド配列の挿入により、それぞれ、内因性 I L 2 R G 遺伝子制御エレメントの制御下において、導入遺伝子の発現が起こり得る。一部の態様では、目的の導入遺伝子の挿入により、インタクトな外因性タンパク質配列の発現が生じ、あらゆる I L 2 R G によりコードされるアミノ酸は欠如する。他の態様では、発現される外因性タンパク質は、融合タンパク質であり、導入遺伝子および I L 2 R G 遺伝子によってコードされるアミノ酸を含む。一部の事例では、I L 2 R G 配列は、外因性タンパク質のアミノ (N) 末端部分上に存在し、一方で他の事例では、I L 2 R G 配列は、外因性タンパク質のカルボキシ (C) 末端部分上に存在する。他の事例では、I L 2 R G 配列は、外因性タンパク質の N 末端部分および C 末端部分上の両方に存在するであろう。ドナーはまた、I L 2 R G タンパク質を発現しない (または正常な野生型のレベルよりも低いレベルで発現する) 変異体内因性 I L 2 R G 遺伝子に組み込まれる「修正用」配列であり得、結果として、I L 2 R G の発現が修復される。

10

【 0 0 3 2 】

一部の実施形態では、本発明は、*in vivo* で、I L 2 R G プロモーターの制御下において導入遺伝子が発現させるために使用することができる方法および組成物について記載する。一部の態様では、導入遺伝子は、目的の治療用タンパク質をコードし得る。導入遺伝子は、本発明の方法をタンパク質の置換えに使用することができるように、タンパク質をコードし得る。一部の態様では、導入遺伝子は、S C I D またはオーメン症候群を処置および / または予防する I L 2 R G または R a g (たとえば、R a g 1 または R a g 2) タンパク質をコードする。他の態様では、導入遺伝子は、部分的な I L 2 R G および / または R A G (R A G 1 もしくは R A G 2) 遺伝子配列を含む。

20

【 0 0 3 3 】

一部の実施形態では、導入遺伝子 (たとえば、I L 2 R G、R a g 1、または R a g 2 をコードする導入遺伝子) が、I L 2 R G のイントロンの領域、たとえば、それぞれ、イントロン 1、イントロン 2 またはイントロン 2 に組み込まれるように、ヌクレアーゼ標的および / または切断部位は、I L 2 R G 遺伝子のイントロンにある。導入遺伝子は、*in vivo* または *in vitro* で、別の目的とされる内因性または外因性プロモーターの制御下にあってもよく、外因性プロモーターは、導入遺伝子の発現を駆動させる。好ましい実施形態では、I L 2 R G、導入遺伝子は、I L 2 R G のエクソン 2 から 8 を含む c D N A を含み、さらに、スプライシングアクセプター部位を含み、結果として、組み込みおよび発現の際に、内因性 I L 2 R G のエクソン 1 が、導入遺伝子のエクソン 2 ~ 8 の配列に連結され、それによって、野生型 I L 2 R G タンパク質が産生され、X - S C I D またはオーメン症候群が処置または予防される。

30

【 0 0 3 4 】

別の態様では、内因性遺伝子を修飾する方法であって、細胞に、I L 2 R G または R a g タンパク質をコードする 1 つまたは複数のドナー配列の存在下において、1 つまたは複数のヌクレアーゼ (たとえば、Z F N、T A L E N、T t A g o、C R I S P R / C a s 系) をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを投与することを含み、それによって、ドナーが、ヌクレアーゼによって標的とされる内因性遺伝子に組み込まれる、方法が、記載される。1 つまたは複数のドナー分子の組み込みは、相同組換え修復 (H D R) または非相同末端結合 (N H E J) を伴う修復によって、生じる。ある特定の実施形態では、1 つまたは複数のヌクレアーゼ対が用いられ、このヌクレアーゼは、同じかまたは異なる核酸によってコードされ得る。

40

【 0 0 3 5 】

さらに別の態様では、本明細書に記載されるヌクレアーゼを使用して、標的化された様式でゲノムに組み込まれている I L 2 R G、R A G 1、および / または R A G 2 導入遺伝子を含む細胞 (たとえば、T 細胞または幹細胞) が、本明細書に提供される。ある特定の実施形態では、細胞は、本明細書に記載される方法によって作製される。他の好ましい実施

50

形態では、I L 2 R G、R A G 1、またはR A G 2 導入遺伝子は、I L 2 R Gのイントロンの領域に（たとえば、イントロン1、配列番号1または2のいずれかに示される配列の5～10塩基対またはその中のものを含むがこれらに限定されない）組み込まれる。組み込まれたI L 2 R G、および/またはR A G（R A G 1もしくはR A G 2）導入遺伝子を含む細胞は、内因性プロモーター（たとえば、それぞれ、I L 2 R Gプロモーター）から導入遺伝子を発現してもよく、または代替として、導入遺伝子は、調節エレメントおよび制御エレメント、たとえば、I L 2 R G、R A G 1、もしくはR A G 2 導入遺伝子の発現を作動させる外因性プロモーターを含んでもよい。ある特定の実施形態では、I L 2 R G 導入遺伝子を含む細胞は、ゲノムに組み込まれたウイルスベクター配列を一切含まない。

【0036】

本明細書に記載される方法および組成物のいずれかにおいて、細胞は、任意の真核生物細胞であり得る。ある特定の実施形態では、細胞は、T細胞または幹細胞である。他の実施形態では、細胞は、患者由来であり、たとえば、自家CD34+（造血）幹細胞である（たとえば、患者において、顆粒球コロニー刺激因子（GCSF）投与により、骨髓から末梢血に動員されている）。CD34+細胞を採取し、精製し、培養し、ヌクレアーゼおよび/またはI L 2 R Gドナー（たとえば、アデノウイルスベクタードナー）を、任意の好適な方法によって細胞に導入することができる。

【0037】

別の態様では、本発明の方法および組成物は、たとえば、SCID関連障害の処置および/または薬物スクリーニングにおいて使用するための、本明細書に記載される組成物（ヌクレアーゼ、医薬組成物、ポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞、細胞株、および/または動物、たとえば、トランスジェニック動物）の使用を提供する。ある特定の実施形態では、これらの組成物は、X-SCIDまたはオーメン症候群の処置において使用するための薬物ライブラリーおよび/または他の治療用組成物（すなわち、抗体、構造的RNAなど）のスクリーニングに使用される。そのようなスクリーニングは、操作された細胞株または初代細胞を用いて細胞レベルで開始され得、動物全体（たとえば、ヒト）の処置のレベルへと進められ得る。したがって、ある特定の態様では、それを必要とする被験体において、X-SCIDまたはオーメン症候群の処置および/または予防する方法であって、被験体に、本明細書に記載される1つまたは複数のヌクレアーゼ、ポリヌクレオチド、および/または細胞を投与することを含む、方法が、本明細書に記載される。本方法は、*ex vivo*であっても*in vivo*であってもよい。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される細胞（たとえば、I L 2 R G、R A G 1、またはR A G 2 導入遺伝子を含む細胞）が、被験体に投与される。本明細書に記載される方法のいずれかにおいて、細胞は、被験体に由来する幹細胞（患者由来の幹細胞）であり得る。

【0038】

本明細書に記載される組成物および方法のいずれかにおいて、ヌクレアーゼは、mRNAの形態で、および/または1つもしくは複数の非ウイルスもしくはウイルスベクターを使用して、導入される。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、mRNAの形態で導入される。他の実施形態では、I L 2 R Gおよび/またはR A G（R A G 1またはR A G 2）導入遺伝子は、ウイルスベクター、たとえば、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV8.2、AAV9、AAVrh10、AAV2/8、AAV2/5、およびAAV2/6を含む、アデノ随伴ベクター（AAV）を使用して、またはレンチウイルスもしくは組み込み欠損レンチウイルスベクターを介して、導入され、ヌクレアーゼは、mRNAの形態で導入される。なおもさらなる実施形態では、ヌクレアーゼおよびドナーは、いずれも、1つまたは複数のウイルスまたは非ウイルスベクターを使用して導入される。ヌクレアーゼおよびドナーは、同じベクターで運搬されてもよく、同じ種類の異なるベクターで運搬されてもよく、または異なる種類の異なるベクターで運搬されてもよい。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、mRNAの形態で導入され（たとえば、エレクトロポレーションを介して）、ドナーは、AAV（たとえば、AAV2/6）、レンチウイルス、または組み込み欠損レンチウイルスを使用して導入される。

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、ドナーは、一本鎖DNAとして導入される。

【0039】

ヌクレアーゼおよびドナーは、同時に、または順番に、導入され得る。逐次的に導入される場合、ヌクレアーゼの投与とドナーの投与との間に、任意の期間（たとえば、数秒間から数時間）が、経過してもよい。ある特定の実施形態では、ドナーが導入され、12～36時間（またはその間の任意の時間）後に、ヌクレアーゼが、細胞に導入される。ある特定の実施形態では、修飾された細胞を、数時間から数日間（またはその間の任意の時間）インキュベートし、次いでアリコートに分け、凍結させる。

【0040】

原核生物細胞または真核生物細胞、たとえば、細菌、昆虫、酵母、魚、哺乳動物（非ヒト哺乳動物を含む）、および植物細胞を含むがこれらに限定されない任意の細胞を、本発明の組成物および方法を使用して修飾することができる。ある特定の実施形態では、細胞は、免疫細胞、たとえば、T細胞（たとえば、CD4+、CD3+、CD8+など）、樹状細胞、B細胞などである。他の実施形態では、細胞は、多能性幹細胞、全能性幹細胞、または複能性幹細胞、たとえば、人工多能性幹細胞（iPSC）、造血幹細胞（たとえば、CD34+）、胚性幹細胞などである。本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、IL2RGをコードする導入遺伝子を含有する細胞は、幹細胞または前駆細胞であり得る。本発明の方法および組成物に使用され得る具体的な幹細胞の種類としては、胚性幹細胞（ESC）、人工多能性幹細胞（iPSC）、および造血幹細胞（たとえば、CD34+細胞）が挙げられる。iPSCは、患者試料および正常対照に由来するものであり得、ここで、患者由来のiPSCを、目的の遺伝子において、正常または野生型遺伝子配列に変異させてもよく、または正常細胞を、目的の遺伝子における公知の疾患アレルに改変してもよい。同様に、造血幹細胞を、患者（たとえば、IL2RGおよび/またはRAGなどの1つもしくは複数のSCID関連遺伝子の変異体形態を有するSCID患者）またはドナーから単離することができる。これらの細胞は、次いで、機能性SCID関連タンパク質、たとえば、IL2RGまたはRag（たとえば、Rag1またはRag2）を発現するように操作され、拡大増殖（expand）された後、患者に再導入される。ある特定の実施形態では、細胞は、患者由来の造血幹細胞である。他の実施形態では、細胞は、COS、CHO（たとえば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293（たとえば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、およびperC6細胞である。

【0041】

本発明の核酸、タンパク質、および/または細胞を含むキットもまた、提供される。キットは、ヌクレアーゼをコードする核酸、（たとえば、RNA分子、またはZFN、TALEN、TtAgo、もしくはCRISPR/Cas系をコードする遺伝子が、好適な発現ベクターに含まれたもの）、またはヌクレアーゼタンパク質のアリコート、ドナー分子、好適な幹細胞性修飾因子、細胞、本発明の方法を実行するための指示などを含み得る。

【0042】

これらおよび他の態様は、全体として本開示を踏まえると、当業者に容易に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1A】図1Aおよび1Bは、意図される部位（オンターゲット（on target））およびオフターゲット（off target）部位における、二量体化変異体（ELDおよびKKR）、ZFPリン酸接触変異体（nR-5Qabc）、ならびにFokIリン酸接触変異体（R416SおよびK525S）を含む、示される操作されたFokIドメインによる、CD34+細胞におけるIL2RG特異的ZFNの活性の結果を示す図である。たとえば、米国特許第8,623,618号および米国出願第15/685,5

10

20

30

40

50

80号を参照されたい。図1Aは、示される対を使用した、オンターゲット（意図される）部位におけるインデルパーセント（「インデル%」）を示す。図1Bは、示される対を使用した、オンターゲット事象（インデル）のオフターゲット事象に対する比を示す。「57618-ELD」および「57629-ELD」は、表1の57618または57629（それぞれ）と表記されるZFPが、FokI ELD二量体化変異体に融合したものを含み、ZFNを指す。「55629-KKR」および「57718-KKR」は、表1の55629または57718（それぞれ）と表記されるZFPが、FokI KKR二量体化変異体に融合したものを含み、ZFNを指す。「57618-nr-5Qabc-ELD」、「57629-nr-5Qabc-ELD」、「55629-nr-5Qabc-KKR」、および「57718-nr-5Qabc-KKR」は、示されるZFP（それぞれ、57618、57629、55629、および57718）、および示される二量体化変異体（ELDまたはKKR）、なおZFPリン酸接触変異体（nr-5Qabc）を有する、ZFNを指す。「57718-KKR-K525S」、「57629-ELD-K525S」、「55629-KKR-K525S」、および「57618-ELD-K525S」は、示されるZFP（それぞれ、57718、57629、55629、および57618）、および示される二量体化変異体（ELDまたはKKR）、なおFokIリン酸変異体（R416SおよびK525S）を有する、ZFNを指す。「57618-nr-5Qabc-ELD-K525S」、「57692-nr-5Qabc-ELD-K525S」、「55629-nr-5Qabc-KKR-K525S」、および「57718-nr-5Qabc-KKR」は、示されるZFP（それぞれ、57618、57629、55629、および57718）、および示される二量体化変異体（ELDまたはKKR）、なおZFPリン酸接触変異体（nr-5Qabc）とFokIリン酸接触変異体（R416SおよびK525S）との組み合わせを有する、ZFNを指す。

【図1B】図1Aおよび1Bは、意図される部位（オンターゲット）およびオフターゲット部位における、二量体化変異体（ELDおよびKKR）、ZFPリン酸接触変異体（nr-5Qabc）、ならびにFokIリン酸接触変異体（R416SおよびK525S）を含む、示される操作されたFokIドメインによる、CD34+細胞におけるIL2RG特異的ZFNの活性の結果を示す図である。たとえば、米国特許第8,623,618号および米国出願第15/685,580号を参照されたい。図1Aは、示される対を使用した、オンターゲット（意図される）部位におけるインデルパーセント（「インデル%」）を示す。図1Bは、示される対を使用した、オンターゲット事象（インデル）のオフターゲット事象に対する比を示す。「57618-ELD」および「57629-ELD」は、表1の57618または57629（それぞれ）と表記されるZFPが、FokI ELD二量体化変異体に融合したものを含み、ZFNを指す。「55629-KKR」および「57718-KKR」は、表1の55629または57718（それぞれ）と表記されるZFPが、FokI KKR二量体化変異体に融合したものを含み、ZFNを指す。「57618-nr-5Qabc-ELD」、「57629-nr-5Qabc-ELD」、「55629-nr-5Qabc-KKR」、および「57718-nr-5Qabc-KKR」は、示されるZFP（それぞれ、57618、57629、55629、および57718）、および示される二量体化変異体（ELDまたはKKR）、なおZFPリン酸接触変異体（nr-5Qabc）を有する、ZFNを指す。「57718-KKR-K525S」、「57629-ELD-K525S」、「55629-KKR-K525S」、および「57618-ELD-K525S」は、示されるZFP（それぞれ、57718、57629、55629、および57618）、および示される二量体化変異体（ELDまたはKKR）、なおFokIリン酸変異体（R416SおよびK525S）を有する、ZFNを指す。「57618-nr-5Qabc-ELD-K525S」、「57692-nr-5Qabc-ELD-K525S」、「55629-nr-5Qabc-KKR-K525S」、および「57718-nr-5Qabc-KKR」は、示されるZFP（それぞれ、57618、57629、55629、および57718）、および示される二量体化変異体（ELDまたはKKR）、なおZFPリン酸接触変異体（

10

20

30

40

50

n R - 5 Q a b c) と F o k I リン酸接触変異体 (R 4 1 6 S および K 5 2 5 S) との組み合わせを有する、Z F N を指す。

【発明を実施するための形態】

【0044】

修正用 S C I D 関連タンパク質 (たとえば、I L 2 R G、R A G 1、または R A G 2) 導入遺伝子の、細胞 (たとえば、リンパ球前駆体、たとえば、C D 3 4 + 造血幹細胞) の I L 2 R G 遺伝子への組み込みによる修飾を含む、I L 2 R G 遺伝子の標的化修飾のための組成物および方法が、本明細書に開示される。細胞は、重症複合免疫不全 (X - S C I D または S C I D) 患者への注入に好適であり、結果として、注入後に、この細胞によって、これらの前駆体の、S C I D 障害を有する被験体において欠如または欠損している機能性タンパク質を発現する細胞への i n v i v o での分化がもたらされ、この細胞により、レシピエント S C I D 患者における疾患を処置および/または予防することができる。I L 2 R G 導入遺伝子を含む細胞は、X - S C I D 患者への注入に好適であり、結果として、注入後に、これらの幹細胞が、機能性 I L 2 R G タンパク質を発現する細胞に i n v i v o で分化することにより、患者における X - S C I D 疾患が処置および/または予防されることになる。同様に、本明細書に記載される I L 2 R G 遺伝子への標的化組み込みの後の R A G 1 または R A G 2 導入遺伝子を含む幹細胞は、オーメン症候群患者への注入に好適であり、結果として、注入後に、これらの前駆体が、機能性 R a g 1 および/または R a g 2 タンパク質を発現する細胞に i n v i v o で分化することにより、オーメン症候群患者における疾患が処置および/または予防されることになる。加えて、本明細書に記載される細胞 (細胞集団または細胞株) を i n v i t r o で使用して、組み込まれた導入遺伝子からタンパク質を産生させることができ、このタンパク質を、単離し、被験体を処置するために使用することができる。

【0045】

(たとえば、I L 2 R G、R A G 1、および/もしくは R A G 2、ならびに/またはセーフハーバー (s a f e h a r b o r) 遺伝子のイントロン領域への) I L 2 R G、R A G 1、または R A G 2 の標的化組み込みにより、I L 2 R G、R A G 1、または R A G 2 の、ゲノムへのランダムな組み込みを伴う遺伝子療法、ならびに I L 2 R G、R A G 1、または R A G 2 のエクソンへの組み込みを伴う方法に付随する問題が回避される。具体的には、ランダムな組み込みは、遺伝子座の上流の領域が部分的に転写されることに起因して、有害事象を引き起こすことが多く、加えて、I L 2 R G、R A G 1、または R A G 2 遺伝子座でのイントロン挿入は、内因性転写調節エレメント、たとえば、生来の R N A スプライシング、プロモーター、およびエンハンサーを利用するため、これにより、最も低い侵襲性で、欠損した遺伝子座が正しい形態に置き換えられる。

【0046】

本発明は、任意の機能性 I L 2 R G または R a g タンパク質の機能性断片、たとえば、I L 2 R G 遺伝子のエクソン 2 ~ 8、スプライシングアクセプター配列、およびポリアデニル化配列を含む部分的 c D N A を含め、任意の機能性 I L 2 R G または R a g タンパク質を含むドナーの組み込みを企図する。R A G 1 または R A G 2 の完全 c D N A を含む、ドナーの組み込みもまた、企図される。内因性 I L 2 R G のイントロン 1 への I L 2 R G ドナーの標的化組み込みにより、野生型 I L 2 R G または共通ガンマタンパク質の発現がもたらされ、これによって、X - S C I D が処置または予防される。R A G 1 または R A G 2 ドナーの標的化組み込みにより、野生型 R a g 1 または R a g 2 の発現がもたらされ、これによって、オーメン症候群が処置または予防される。

【0047】

概要

本明細書に開示される方法の実施、ならびに組成物の調製および使用は、別途示されない限り、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、コンピュータ化学、細胞培養、組換え D N A、ならびに関連する分野における当業者の技能の範囲内の従来の技法を用いる。これらの技法は、文献において詳細に説明されている。たとえば、S a m b r o o k

10

20

30

40

50

ら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、および第3版2001年；Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、1987年および定期的なアップデート；METHODS IN ENZYMOLOGYシリーズ、Academic Press、San Diego；Wolffe、CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION、第3版、Academic Press、San Diego、1998年；METHODS IN ENZYMOLOGY、第304巻、「Chromatin」(P.M. WassermanおよびA. P. Wolffe編)、Academic Press、San Diego、1999年；およびMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、119巻、「Chromatin Protocols」(P.B. Becker編)、Humana Press、Totowa、1999年を参照されたい。

10

【0048】

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、互換可能に使用され、直鎖状または環状のコンフォメーション、ならびに一本鎖または二本鎖のいずれかの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ポリマーを指す。本開示の目的で、これらの用語は、ポリマーの長さに関する制限として解釈されるものではない。これらの用語は、天然のヌクレオチドの公知の類似体、ならびに塩基、糖、および/またはリン酸部分（たとえば、ホスホロチオエート骨格）に修飾が行われているヌクレオチドを包含し得る。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対合特異性を有する、すなわち、Aの類似体は、Tと塩基対を形成する。

20

【0049】

「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して互換可能に使用される。この用語はまた、1つまたは複数のアミノ酸が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体または修飾された誘導体である、アミノ酸ポリマーにも当てはまる。

【0050】

「結合すること」とは、高分子間（たとえば、タンパク質と核酸との間）における非共有結合による配列特異的な相互作用を指す。結合相互作用の構成要素は、全体としての相互作用が配列特異的である限り、必ずしもすべてが配列特異的である必要はない（たとえば、DNA骨格においてリン酸残基と接触する）。そのような相互作用は、一般に、 10^{-6} M^{-1} またはそれよりも低い解離定数 (K_d) を特徴とする。「親和性」は、結合の強度を指し、結合親和性の増加は、低い K_d と相関する。

30

【0051】

「結合ドメイン」は、非共有結合的に別の分子に結合することができる分子である。結合分子は、たとえば、DNA分子に結合することができる（DNA結合タンパク質、たとえば、亜鉛フィンガータンパク質もしくはTALエフェクタードメインタンパク質または一本鎖ガイドRNA）、RNA分子に結合することができる（RNA結合タンパク質）、および/またはタンパク質分子に結合することができる（タンパク質結合タンパク質）。タンパク質結合分子の事例では、結合分子は、それ自体と結合することができる（ホモ二量体、ホモ三量体などを形成する）、および/または1つもしくは複数の異なるタンパク質分子に結合することができる。結合分子は、1種を上回る結合活性を有し得る。たとえば、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。したがって、人工ヌクレアーゼおよび転写因子のDNA結合構成要素を含め、DNA結合分子としては、ZFP、TALE、およびsgRNAが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0052】

「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、1つまたは複数の

50

亜鉛フィンガーを通じて、配列特異的な様式でDNAに結合する、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り、亜鉛フィンガーとは、亜鉛イオンの配位を通じてその構造が安定化される、結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である。亜鉛フィンガーDNA結合タンパク質という用語は、亜鉛フィンガータンパク質またはZFPと略されることが多い。人工ヌクレアーゼおよび転写因子は、ZFP DNA結合ドメインおよび機能性ドメイン（ZFNについてはヌクレアーゼドメインまたはZFP-TFについては転写調節ドメイン）を含み得る。「亜鉛フィンガーヌクレアーゼ」という用語には、1つのZFN、ならびに二量化して標的遺伝子を切断するZFNの対が含まれる。

【0053】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つまたは複数のTALE反復ドメイン/単位を含む、ポリペプチドである。反復ドメインは、TALEのその同族標的DNA配列への結合に関与する。単一の「反復単位」（「反復」とも称される）は、典型的に、33～35個のアミノ酸の長さであり、天然に存在するTALEタンパク質内の他のTALE反復配列との少なくともいくつかの配列相同性を呈する。たとえば、米国特許8,586,526号を参照されたい。人工ヌクレアーゼおよび転写因子は、TALE DNA結合ドメインおよび機能性ドメイン（TALENについてはヌクレアーゼドメインまたはTALE-TFについては転写調節ドメイン）を含み得る。「TALEN」という用語には、1つのTALEN、ならびに二量化して標的遺伝子を切断するTALENの対が含まれる。

【0054】

亜鉛フィンガーおよびTALE結合ドメインは、たとえば、天然に存在する亜鉛フィンガーまたはTALEタンパク質の認識ヘリックス領域を操作すること（1つまたは複数のアミノ酸を改変すること）によって、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」することができる。したがって、操作されたDNA結合タンパク質（亜鉛フィンガーまたはTALE）は、天然に存在しないタンパク質である。DNA結合タンパク質を操作する方法の非限定的な例は、設計および選択である。設計されたDNA結合タンパク質は、天然には存在しないタンパク質であり、その設計/組成は、主として、合理的基準から生じる。設計の合理的基準としては、置換規則の適用、ならびに既存のZFPおよび/またはTALEの設計および結合データの情報を記憶しているデータベースにおける情報を処理するためのコンピュータによるアルゴリズムが挙げられる。たとえば、米国特許第6,140,081号、同第6,453,242号、同第6,534,261号、および同第8,585,526号；また、WO98/53058、WO98/53059、WO98/53060、WO02/016536、およびWO03/016496も参照されたい。

【0055】

「選択された」亜鉛フィンガータンパク質またはTALEは、自然界では見出されないタンパク質であり、その産生は、主として、ファージディスプレイ、相互作用トラップ、またはハイブリッド選択などの経験的プロセスから生じる。たとえば、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、同第8,586,526号、WO95/19431、WO96/06166、WO98/53057、WO98/54311、WO00/27878、WO01/60970、WO01/88197、WO02/099084を参照されたい。

【0056】

「TtAgo」は、遺伝子サイレンシングに関与すると考えられている原核生物アルゴノートタンパク質である。TtAgoは、細菌 *Thermus thermophilus* に由来する。たとえば、Swartsら、同書；G. Shengら、（2013年）、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、111巻、652頁を参照されたい。「TtAgo系」は、たとえば、TtAgo酵素による切断のためのガイドDNAを含む、必要とされるすべての構成要素である。

【0057】

10

20

30

40

50

「組換え」とは、2つのポリヌクレオチド間での遺伝子情報の交換のプロセスを指し、非相同末端結合（NHEJ）および相同組換えによるドナー捕捉を含むがこれに限定されない。本開示の目的で、「相同組換え（HR）」とは、たとえば、相同組換え修復機序による細胞における二本鎖切断の修復中に生じる、そのような交換の特別な形態を指す。このプロセスは、ヌクレオチド配列の相同性が必要であり、「ドナー」分子を使用して、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を経験したもの）の修復の鋳型とし、「非交叉遺伝子変換」または「ショートトラクト（short tract）遺伝子変換」として様々に公知である。なぜなら、これが、ドナーから標的への遺伝子情報の移行をもたらすためである。いずれの特定の理論にも束縛されることを望むものではないが、そのような移行は、切断された標的とドナーとの間で形成されるヘテロ二重鎖DNAのミスマッチ修正、および/またはドナーを使用して遺伝子情報が再合成され、これが、標的の一部となる、「合成依存性鎖アニーリング」、および/または関連するプロセスを伴い得る。そのような特別なHRは、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に取り込まれるような、標的分子の配列の改変をもたらすことが多い。

【0058】

本開示の方法では、本明細書に記載される1つまたは複数の標的化ヌクレアーゼは、所定の部位において、標的配列（たとえば、細胞クロマチン）に、二本鎖切断（DSB）をもたらす。DSBは、相同組換え修復によって、または非相同組換え修復機序によって、欠失および/または挿入をもたらす得る。欠失には、任意の数の塩基対が含まれ得る。同様に、挿入には、たとえば、必要に応じて切断の領域内のヌクレオチド配列に対して相同性を有する、「ドナー」ポリヌクレオチドの組み込みを含む、任意の数の塩基対が含まれ得る。ドナー配列は、物理的に組み込まれてもよく、または代替として、ドナーポリヌクレオチドが、相同組換えによる切断の修復のための鋳型として使用され、結果として、ドナーにあるヌクレオチド配列のすべてまたは一部が、細胞クロマチンに導入される。したがって、細胞クロマチンにおける第1の配列は、改変され得、ある特定の実施形態では、ドナーポリヌクレオチドに存在する配列に変換され得る。したがって、「置き換える」または「置換え」という用語の使用は、1つのヌクレオチド配列の、別のものとの置換え（すなわち、情報的な意味での配列の置換え）を表すと理解することができ、必ずしも、1つのポリヌクレオチドの別のものとの物理的または化学的置換えを必要とするものではない。

【0059】

本明細書に記載される方法のいずれかにおいて、追加の対の亜鉛フィンガータンパク質、TALEN、TtAgo、またはCRISPR/Cas系を、細胞内の追加の標的部位の追加の二本鎖切断に使用することができる。

【0060】

本明細書に記載される方法のいずれかを、任意のサイズのドナーの挿入、および/または目的の遺伝子の発現を破壊するドナー配列の標的化組み込みによる細胞における1つもしくは複数の標的配列の部分的もしくは完全な不活性化のために使用することができる。部分的または完全に不活性化された遺伝子を有する細胞株もまた、提供される。

【0061】

本明細書に記載される方法のいずれかにおいて、外因性ヌクレオチド配列（「ドナー配列」または「導入遺伝子」）は、目的の領域におけるゲノム配列と相同であるが同一ではない配列を含有し、それによって、目的の領域に非同一配列を挿入するための相同組換えを刺激することができる。したがって、ある特定の実施形態では、目的の領域における配列に相同であるドナー配列の部分は、置き換えられるゲノム配列に対して、約80～99%（またはその間の任意の整数値）の間の配列同一性を呈する。他の実施形態では、ドナーとゲノム配列との間の相同性は、たとえば、100個の連続した塩基対にわたって、1個のヌクレオチドだけがドナーとゲノム配列との間で異なる場合、99%よりも高い。ある特定の事例では、ドナー配列の非相同性部分は、目的の領域には存在しない配列を含有してもよく、結果として、新しい配列が、目的の領域に導入されることになる。これらの事例では、非相同性配列は、一般に、目的の領域の配列と相同または同一である、50～1

10

20

30

40

50

、000塩基対（またはその間の任意の整数値）または1、000よりも多い任意の数の塩基対の配列が、隣接している。他の実施形態では、ドナー配列は、第1の配列に非相同であり、非相同組換え機序によってゲノムに挿入される。

【0062】

「切断」とは、DNA分子の共有結合骨格の切断を指す。切断は、ホスホ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これらに限定されない様々な方法によって、開始され得る。一本鎖切断および二本鎖切断の両方が可能であり、二本鎖切断は、2つの異なる一本鎖切断事象の結果として生じ得る。DNA切断は、平滑末端または付着末端のいずれかの産生をもたらす。ある特定の実施形態では、融合ポリペプチドが、二本鎖DNAの標的化切断に使用される。

10

【0063】

「切断ハーフドメイン」は、ポリペプチド配列であり、第2のポリペプチド（同一であるか異なるかのいずれか）とともに、切断活性（好ましくは二本鎖切断活性）を有する複合体を形成する。「第1および第2の切断ハーフドメイン」、「+および-の切断ハーフドメイン」、ならびに「右および左の切断ハーフドメイン」という用語は、二量体化する切断ハーフドメインの対を指して互換可能に使用される。

【0064】

「操作された切断ハーフドメイン」とは、別の切断ハーフドメイン（たとえば、別の操作された切断ハーフドメイン）と絶対ヘテロ二量体を形成するように、修飾されている、切断ハーフドメインである。第8、623、618号、同第7、888、121号、同第7、914、796号、および同第8、034、598号（これらは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）もまた参照のこと。

20

【0065】

「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、これは、DNAであってもRNAであってもよく、直鎖状であっても、環状であっても、分岐状であってもよく、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。「ドナー配列」という用語は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、任意の長さのもの、たとえば、2~100、000、000ヌクレオチドの長さ（またはその間もしくはそれを上回る任意の整数値）、好ましくは、約100~100、000ヌクレオチドの長さ（またはその間の任意の整数）、より好ましくは、約2000~20、000ヌクレオチドの長さ（またはその間の任意の値）、およびさらに好ましくは、約5~15kb（またはその間の任意の値）のものであってもよい。

30

【0066】

「クロマチン」とは、細胞のゲノムを含む核タンパク質構造体である。細胞クロマチンは、主としてDNAである核酸、およびタンパク質を含み、タンパク質には、ヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質が含まれる。真核生物の細胞クロマチンの大部分は、ヌクレオソームの形態で存在し、ここで、ヌクレオソームコアは、ヒストンH2A、H2B、H3、およびH4を2つずつ含む八量体を伴うおよそ150塩基対のDNAを含み、リンカーDNA（生物に応じて長さは可変のもの）が、ヌクレオソームコアの間に延びている。ヒストンH1分子は、一般に、リンカーDNAと会合している。本開示の目的で、「クロマチン」という用語は、原核生物および真核生物の両方の、すべての種類の細胞核タンパク質を包含することを意味する。細胞クロマチンは、染色体およびエピソームの両方のクロマチンを含む。

40

【0067】

「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、その核型によって特徴付けられることが多く、この核型とは、細胞のゲノムを構成するすべての染色体の集合である。細胞のゲノムは、1つまたは複数の染色体を含み得る。

【0068】

「エピソーム」とは、複製核酸、核タンパク質複合体、または細胞の染色体核型の一部で

50

はない核酸を含む他の構造体である。エピソームの例としては、プラスミドおよびある特定のウイルスゲノムが挙げられる。

【 0 0 6 9 】

「接触可能領域」は、核酸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、細胞クロマチンの部位である。いずれの特定の理論によっても束縛されることを望むものではないが、接触可能領域は、ヌクレオソーム構造にパッケージングされないものであると考えられている。接触可能領域のはっきりとした構造は、化学的および酵素的なプローブ、たとえば、ヌクレアーゼに対するその感受性によって検出することができることが多い。

【 0 0 7 0 】

「標的部位」または「標的配列」とは、結合のための十分な条件が存在する場合に限るが、結合分子が結合する核酸の部分を定める、核酸配列である。標的部位は、任意の長さ、たとえば、9 ~ 20 個またはそれよりも多いヌクレオチドであってよく、長さおよび結合するヌクレオチドは、連続的であっても非連続的であってもよい。

【 0 0 7 1 】

「外因性」分子とは、通常は細胞に存在していないが、1つまたは複数の遺伝的方法、生化学的方法、または他の方法によって、細胞に導入することができる、分子である。「細胞に通常存在している」とは、細胞の特定の発生段階および環境的条件に関して、決定される。したがって、たとえば、筋肉の胚発生中のみ存在する分子は、成体筋肉細胞に関しては、外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、熱ショックを受けていない細胞に関しては、外因性分子である。外因性分子は、たとえば、機能障害性内因性分子の機能性バージョンまたは正常機能性内因性分子の機能障害性バージョンを含み得る。

【 0 0 7 2 】

外因性分子は、とりわけ、小分子、たとえば、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、または高分子、たとえば、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖類、上述の分子の任意の修飾誘導体、もしくは上述の分子のうちの1つもしくは複数を含む任意の複合体であり得る。核酸には、DNAおよびRNAが含まれ、これらは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、直鎖状であっても、分岐状であっても、環状であってもよく、任意の長さのものであってよい。核酸には、二重鎖を形成することができるもの、ならびに三重鎖を形成する核酸が含まれる。たとえば、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。タンパク質としては、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイラーゼ、およびヘリカーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 3 】

外因性分子は、内因性分子と同じ種類の分子、たとえば、外因性タンパク質または核酸であり得る。たとえば、外因性核酸は、感染性ウイルスゲノム、細胞に導入されるプラスミドもしくはエピソーム、または通常は細胞に存在していない染色体を含み得る。外因性分子を細胞に導入する方法は、当業者に公知であり、その方法としては、脂質に媒介される移入（すなわち、中性およびカチオン性脂質を含む、リポソーム）、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、粒子衝突、リン酸カルシウム共沈殿、DEAE-デキストランに媒介される移入、およびウイルスベクターに媒介される移入が挙げられるが、これらに限定されない。外因性分子はまた、内因性分子と同じ種類の分子であるが、細胞が由来するものとは異なる種に由来するものであってもよい。たとえば、ヒト核酸配列を、もともとマウスまたはハムスターに由来する細胞株に、導入してもよい。外因性分子を植物細胞に導入するための方法は、当業者に公知であり、その方法としては、プロトプラスト形質転換、シリコンカーバイド（たとえば、WHISKERS（商標））、Agrobac

10

20

30

40

50

t e r i u mに媒介される形質転換、脂質に媒介される移入（すなわち、中性およびカチオン性脂質を含む、リポソーム）、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、粒子衝突（たとえば、「遺伝子銃」を使用する）、リン酸カルシウム共沈殿、D E A E - デキストランに媒介される移入、ならびにウイルスベクターに媒介される移入が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 4 】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下において、特定の発生段階で、特定の細胞に通常存在しているものである。たとえば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、葉緑体、もしくは他の小器官のゲノム、または天然に存在するエピソーム核酸を含み得る。さらなる内因性分子としては、タンパク質、たとえば、転写因子および酵素を挙げることができる。

10

【 0 0 7 5 】

本明細書において使用されるとき、「外因性核酸の産物」という用語には、ポリヌクレオチド産物およびポリペプチド産物の両方、たとえば、転写産物（ポリヌクレオチド、たとえば、R N A ）および翻訳産物（ポリペプチド）が含まれる。

【 0 0 7 6 】

「融合」分子は、2つまたはそれよりも多くのサブユニット分子が、好ましくは共有結合で連結された、分子である。サブユニット分子は、同じ化学種の分子であってもよく、または異なる化学種の分子であってもよい。第1の種類の融合分子の例としては、融合タンパク質（たとえば、Z F PまたはT A L E D N A 結合ドメインと、1つまたは複数の活性化ドメインとの間の融合体）、および融合核酸（たとえば、上に記載される融合タンパク質をコードする核酸）が挙げられるが、これらに限定されない。第2の種類の融合分子の例としては、三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合体、および副溝結合剤と核酸との間の融合体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 7 7 】

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、または細胞への融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの送達により生じ、ここで、ポリヌクレオチドが転写され、転写産物が翻訳されて、融合タンパク質が生成される。トランススプライシング、ポリペプチド切断、およびポリペプチドライゲーションもまた、細胞におけるタンパク質の発現に関与し得る。細胞へのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの送達の方法は、本開示の別の箇所に提示されている。

30

【 0 0 7 8 】

本開示の目的で、「遺伝子」には、遺伝子産物をコードするD N A 領域（下記参照）、ならびに遺伝子産物の産生を調節するすべてのD N A 領域が含まれ、そのような調節配列が、コーディング配列および/または転写される配列に隣接しているかどうかは関係ない。したがって、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列、たとえば、リボソーム結合部位および内部リボソーム進入部位、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリクス結合部位、ならびに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ない。

【 0 0 7 9 】

「遺伝子発現」とは、遺伝子に含まれている情報の、遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接的な転写の産物（たとえば、m R N A、t R N A、r R N A、アンチセンスR N A、リボザイム、構造R N A、または任意の他の種類のR N A）、またはm R N Aの翻訳によって産生されるタンパク質であり得る。遺伝子産物には、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集などのプロセスによって修飾されているR N A、ならびにたとえば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、A D P - リボシル化、ミリスチル化、およびグリコシル化によって修飾されているタンパク質も含まれる。

40

【 0 0 8 0 】

遺伝子発現の「調節」は、遺伝子の活性における変化を指す。発現の調節としては、遺伝子の活性化および遺伝子の抑制を挙げることができるが、これらに限定されない。ゲノム

50

編集（たとえば、切断、改変、不活性化、ランダム変異）を使用して、発現を調節することができる。遺伝子不活性化は、本明細書に記載される ZFP、TALE、TtAgO、または CRISPR/Cas 系を含まない細胞と比較した場合の、遺伝子発現における任意の低減を指す。したがって、遺伝子不活性化は、部分的であっても完全であってもよい。

【0081】

「目的の領域」とは、外因性分子に結合することが望ましい、細胞クロマチンの任意の領域、たとえば、遺伝子または遺伝子内もしくはそれに隣接する非コーディング配列などである。結合は、標的化 DNA 切断および/または標的化組換えを目的とするものであり得る。目的の領域は、たとえば、染色体、エピソーム、小器官ゲノム（たとえば、ミトコンドリア、葉緑体）、または感染性ウイルスゲノムに存在し得る。目的の領域は、遺伝子のコーディング領域内、転写される非コーディング領域内、たとえば、リーダー配列、トレーラー配列、もしくはイントロンなど、またはコーディング領域の上流または下流のいずれかの非転写領域内などであり得る。目的の領域は、単一のヌクレオチド対ほどの小さなものであってもよく、または最大 2,000 個のヌクレオチド対の長さであってもよく、または任意の整数値のヌクレオチド対であってもよい。

【0082】

「真核生物」細胞としては、幹細胞（多能性および複能性）を含め、真菌細胞（たとえば、酵母）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、およびヒト細胞（たとえば、T 細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

「動作可能な連結」および「動作可能に連結した」（または「作動可能に連結した」という用語は、2 つまたはそれよりも多くの構成要素（たとえば、配列エレメント）の並置に関して互換可能に使用され、ここで、構成要素は、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 つに対して発揮される機能を媒介し得る可能性を許容する。例示の目的で、転写調節配列、たとえば、プロモーターは、転写調節配列が、1 つまたは複数の転写調節因子の存在または非存在にตอบสนองして、コーディング配列の転写のレベルを制御する場合、コーディング配列に動作可能に連結されている。転写調節配列は、一般に、コーディング配列と cis で動作可能に連結しているが、必ずしもそれに直接隣接していなくてもよい。たとえば、エンハンサーは、連続的でなくとも、コーディング配列に動作可能に連結された、転写調節配列である。

【0084】

融合ポリペプチドに関して、「動作可能に連結した」という用語は、構成要素のそれぞれが、他の構成要素と連結した状態で、そのように連結されてない場合に行うであろう機能と同じ機能を行うという事実を指し得る。たとえば、ZFP、TALE、TtAgO、または Cas DNA 結合ドメインが、活性化ドメインに融合されている融合ポリペプチドに関して、ZFP、TALE、TtAgO、または Cas DNA 結合ドメインおよび活性化ドメインは、融合ポリペプチドにおいて、ZFP、TALE、TtAgO、または Cas 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でき、同時に、活性化ドメインが、遺伝子発現を上方調節することができる場合、動作可能な連結状態にある。ZFP、TALE、TtAgO、または Cas DNA 結合ドメインが、切断ドメインに融合されている融合ポリペプチドの場合、ZFP、TALE、TtAgO、または Cas DNA 結合ドメインおよび切断ドメインは、融合ポリペプチドにおいて、ZFP、TALE、TtAgO、または Cas 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でき、同時に、切断ドメインが、標的部位の近傍で、DNA を切断することができる場合、動作可能な連結状態にある。

【0085】

タンパク質、ポリペプチド、または核酸の「機能性断片」は、その配列が、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、依然として、全長タンパク質、ポリペプチド、または核酸と同じ機能を保持する、タンパク質、ポリペプチド、または核酸であ

10

20

30

40

50

る。機能性断片は、対応する天然の分子よりも多いか、少ないか、もしくは同じ数の残基を有し得、および／または1つもしくは複数のアミノ酸もしくはヌクレオチド置換を含み得る。核酸の機能（たとえば、コーディング機能、別の核酸にハイブリダイズする能力）を決定するための方法は、当該技術分野において周知である。同様に、タンパク質の機能を決定するための方法も、周知である。たとえば、ポリペプチドのDNA結合機能は、たとえば、フィルター結合、電気泳動移動度のシフト、または免疫沈降アッセイによって、決定することができる。DNA切断は、ゲル電気泳動によってアッセイすることができる。Ausubelら（上記）を参照されたい。タンパク質が、別のタンパク質と相互作用する能力は、たとえば、共免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイ、または遺伝的および生化学的両方の相補性によって、決定することができる。たとえば、Fieldsら、（1989年）、Nature、340巻：245～246頁、米国特許第5,585,245号、およびPCT WO 98/44350を参照されたい。

10

【0086】

「ベクター」は、遺伝子配列を標的細胞に移入することができる。典型的に、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子の発現を誘導することができ、遺伝子配列を標的細胞に移入することができる、任意の核酸構築物を意味する。したがって、この用語には、クローニング、および発現ビヒクル、ならびに組み込みベクターが含まれる。

【0087】

「被験体」および「患者」という用語は、互換可能に使用され、哺乳動物、たとえば、ヒト患者および非ヒト霊長類、ならびに実験動物、たとえば、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、および他の動物を指す。したがって、「被験体」または「患者」という用語は、本明細書において使用されるとき、本発明のヌクレアーゼ、ドナー、および／または遺伝子修飾された細胞が投与され得る任意の哺乳動物患者または被験体を意味する。本発明の被験体には、障害を有するものが含まれる。

20

【0088】

「幹細胞性（stemness）」とは、任意の細胞が、幹細胞様の様式で機能する相対能力、すなわち、任意の特定の幹細胞が有し得る、全能性、多能性、または少能性（oligopotency）、ならびに拡大したまたは無限の自己複製の程度を指す。

【0089】

融合分子

細胞における選択された標的遺伝子（たとえば、IL2RG）の切断に有用な組成物、たとえば、ヌクレアーゼが、本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、融合分子（たとえば、ヌクレアーゼ）のうちの1つまたは複数の構成要素は、天然に存在する。他の実施形態では、融合分子（たとえば、ヌクレアーゼ）の構成要素のうちの1つまたは複数、天然に存在しない、すなわち、DNA結合分子および／または切断ドメインにおいて、操作されている。たとえば、天然に存在するヌクレアーゼのDNA結合部分を、選択された標的部位に結合するように改変してもよい（たとえば、同族結合部位とは異なる部位に結合するように操作されている、CRISPR/Cas系またはメガヌクレアーゼの一本鎖ガイドRNA）。他の実施形態では、ヌクレアーゼは、異種DNA結合ドメインおよび切断ドメインを含む（たとえば、異種切断ドメインを有する亜鉛フィンガーヌクレアーゼ；TALエフェクタードメインDNA結合タンパク質；メガヌクレアーゼDNA結合ドメイン）。したがって、少なくとも1つのZFN、TALEN、メガヌクレアーゼ、CRISPR/Casヌクレアーゼなどを含むがこれらに限定されない、標的（たとえば、IL2RG、RAGなど）遺伝子を切断し、その切断が、標的遺伝子のゲノム修飾（たとえば、切断された遺伝子への挿入および／または欠失）をもたらす、任意のヌクレアーゼを、本発明の実施に使用することができる。

40

【0090】

ヌクレアーゼ複合体の操作された切断ハーフドメインのパートナーの独立した滴定を通じて、切断活性の特異性を増加させる方法もまた、本明細書に記載される。一部の実施形態

50

では、2つのパートナー（切断ハーフドメイン）の比は、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：8、1：9、1：10、または1：20の比、またはそれらの間の任意の値で提供される。他の実施形態では、2つのパートナーの比は、1：30を上回る。他の実施形態では、2つのパートナーは、1：1とは異なるように選択された比で、展開される。個別または組み合わせて使用する場合、本発明の方法および組成物は、オフターゲット切断活性の低減を通じて、標的化特異性の驚くべきかつ予想外な増加をもたらす。これらの実施形態において使用されるヌクレアーゼは、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas、CRISPR/dCas、およびTtAgo、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。

【0091】

A. DNA結合分子

本明細書に記載される融合分子は、タンパク質ドメインおよび/またはポリヌクレオチドDNA結合ドメインを含む、任意のDNA結合分子（DNA結合ドメインとも称される）を含み得る。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、配列番号1または配列番号2の9～12個の連続したヌクレオチドを含む配列に結合する。

【0092】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法は、ドナー分子への結合および/または細胞のゲノムにおける目的の領域への結合に、メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）DNA結合ドメインを用いる。天然に存在するメガヌクレアーゼは、15～40塩基対の切断部位を認識し、一般に、次の4つのファミリーに分類される：LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cysボックスファミリー、およびHNHファミリー。ホーミングエンドヌクレアーゼの例としては、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が挙げられる。それらの認識配列は、公知である。米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Belfortら、(1997年)、Nucleic Acids Res., 25巻：3379～3388頁；Dujonら、(1989年)、Gene, 82巻：115～118頁；Perlerら、(1994年)、Nucleic Acids Res., 22巻：1125～1127頁；Jasin、(1996年)、Trends Genet., 12巻：224～228頁；Gimbleら、(1996年)、J. Mol. Biol., 263巻：163～180頁；Argastら、(1998年)、J. Mol. Biol., 280巻：345～353頁およびNew England Biolabsのカatalogもまた、参照されたい。加えて、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DNA結合特異性は、非天然の標的部位に結合するように操作することができる。たとえば、Chevalierら、(2002年)、Molec. Cell, 10巻：895～905頁；Epinatら、(2003年)、Nucleic Acids Res., 31巻：2952～2962頁；Ashworthら、(2006年)、Nature, 441巻：656～659頁；Paquesら、(2007年)、Current Gene Therapy, 7巻：49～66頁；米国特許公開第20070117128号を参照されたい。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DNA結合ドメインは、ヌクレアーゼの文脈で全体として改変されてもよく（すなわち、ヌクレアーゼが、同族切断ドメインを含むように）、または異種切断ドメインに融合されてもよい。

【0093】

他の実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物において使用されるヌクレアーゼのうちの1つまたは複数のもののDNA結合ドメインは、天然に存在するまたは操作された（天然に存在しない）TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。たとえば、米国特許第8,586,526号（これは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）を参照のこと。植物病原性細菌であるXanthomonas属は、重要な作物に

10

20

30

40

50

において多数の疾患を引き起こすことが公知である。Xanthomonasの病原性は、25種類を上回る異なるエフェクタータンパク質を植物細胞に注入する、保存されたIII型分泌(T3S)系に依存する。これらの注入されるタンパク質の中には、転写活性化因子様(TAL)エフェクターがあり、これは、植物転写活性化因子を模倣し、植物トランスクリプトームを操作する(Kayら、(2007年)、Science、318巻: 648~651頁を参照されたい)。これらのタンパク質は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含有する。最もよく特徴付けられているTALエフェクターのうちの1つが、Xanthomonas campestris pv. Vesicatoriaに由来するAvrBs3である(Bonasら、(1989年)、Mol Gen Genet、218巻: 127~136頁およびWO2010079430を参照されたい)。TALエフェクターは、タンデム反復の集中ドメインを含有し、それぞれの反復が、これらのタンパク質のDNA結合特異性の鍵となるおよそ34個のアミノ酸を含有する。加えて、これらは、核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含有する(総説については、Schornack Sら、(2006年)J Plant Physiol、163巻(3号): 256~272頁を参照されたい)。加えて、植物病原細菌Ralstonia solanacearumでは、brg11およびhpx17と表記される2つの遺伝子が、R. solanacearum次亜種1株GMI1000および次亜種4株RS1000において、XanthomonasのAvrBs3ファミリーに相同であることが見出されている(Heuerら、(2007)、Appl and Envir Micro、73巻(13号): 4379~4384頁を参照されたい)。これらの遺伝子は、互いに、ヌクレオチド配列が98.9%同一であるが、hpx17の反復ドメインにおける1,575塩基対の欠失が異なる。しかしながら、いずれの遺伝子産物も、XanthomonasのAvrBs3ファミリーのタンパク質と、40%よりも低い配列同一性を有する。たとえば、米国特許第8,586,526号(これは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

【0094】

これらのTALエフェクターの特異性は、タンデム反復に見出される配列に依存する。反復配列は、およそ102塩基対を含み、反復は、典型的に、互いに91~100%相同である(Bonasら、同書)。反復の多型性は、通常、12位および13位に位置し、12位および13位の超可変二残基(hypervariable diresidue)(RVD)の正体と、TALエフェクターの標的配列における連続的なヌクレオチドの正体との間に、1対1対応が存在すると見られる(MoscouおよびBogdanove、(2009年)、Science、326巻: 1501頁、ならびにBochら、(2009年)、Science、326巻: 1509~1512頁を参照されたい)。実験的に、これらのTALエフェクターのDNA認識のための天然のコードは、12位および13位におけるHD配列が、シトシン(C)への結合をもたらし、NGがTに結合し、NIがA、C、G、またはTに結合し、NNがAまたはGに結合し、INGがTに結合するように、決定されている。これらのDNA結合反復は、植物細胞において新しい配列と相互作用し、非内因性レポーター遺伝子の発現を活性化することができる、人工転写因子を作製するために、新しい組み合わせおよび反復の数でタンパク質にアセンブリされている(Bochら、同書)。操作されたTALタンパク質は、FokI切断ハーフドメインに連結され、TALエフェクタードメインヌクレアーゼ融合体(TALEN)が得られている。たとえば、米国特許第8,586,526号、Christianら、((2010年)、Genetics epub 10.1534/genetics.110.120717)を参照されたい。ある特定の実施形態では、TALEドメインは、米国特許第8,586,526号に記載されるように、Nキャップおよび/またはCキャップを含む。

【0095】

ある特定の実施形態では、in vivoでの切断および/または細胞のゲノムの標的化切断に使用されるヌクレアーゼのうちの1つもしくは複数のもののDNA結合ドメインは、亜鉛フィンガータンパク質を含む。好ましくは、亜鉛フィンガータンパク質は、選択し

た標的部位に結合するように操作されているという点で、天然に存在しない。たとえば、Beerliら、(2002年)、Nature Biotechnol.、20巻:135~141頁; Paboら、(2001年)、Ann. Rev. Biochem.、70巻:313~340頁; Isalanら、(2001年)、Nature Biotechnol.、19巻:656~660頁; Segalら、(2001年)、Curr. Opin. Biotechnol.、12巻:632~637頁; Chooら、(2000年)、Curr. Opin. Struct. Biol.、10巻:411~416頁; 米国特許第6,453,242号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,503,717号、同第6,689,558号、同第7,030,215号、同第6,794,136号、同第7,067,317号、同第7,262,054号、同第7,070,934号、同第7,361,635号、同第7,253,273号、および米国特許公開第2005/0064474号、同第2007/0218528号、同第2005/0267061号(これらはすべて、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

【0096】

操作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、新規な結合特異性を有し得る。操作方法としては、合理的な設計および様々な種類の選択が挙げられるが、これらに限定されない。合理的な設計としては、たとえば、三つ組(triplet)(または、四つ組(quadruplet))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が挙げられ、ここで、それぞれの三つ組または四つ組ヌクレオチド配列は、特定の三つ組または四つ組配列に結合する亜鉛フィンガーの1つまたは複数のアミノ酸配列と関連付けられている。たとえば、共同所有の米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号(これらは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

【0097】

ファージディスプレイおよびツーハイブリッド系を含む、例示的な選択方法は、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WO98/37186、WO98/53057、WO00/27878、WO01/88197、ならびにGB2,338,237に開示されている。加えて、亜鉛フィンガー結合ドメインの結合特異性の強化は、たとえば、共同所有のWO02/077227に記載されている。

【0098】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示されているように、亜鉛フィンガードメインおよび/またはマルチフィンガーの亜鉛フィンガータンパク質は、たとえば、5個またはそれよりも多くのアミノ酸の長さのリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を使用して、一緒に連結させることができる。6個またはそれよりも多くのアミノ酸の長さの例示的なリンカー配列については、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号もまた参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々の亜鉛フィンガー間に任意の組み合わせの好適なリンカーを含み得る。

【0099】

ZFPは、1つまたは複数のヌクレアーゼ(切断)ドメインに作動可能に会合(連結)して、ZFNを形成することができる。「ZFN」という用語には、二量体化して標的遺伝子を切断する、ZFNの対が含まれる。意図される標的に対する、ヌクレアーゼ対を含めたZFNの特異性を、オフターゲット部位として公知の他の意図されない切断部位と比べて増加させるための方法および組成物もまた、使用することができる(米国特許出願15/685,580を参照されたい)。したがって、本明細書に記載されるヌクレアーゼは、それらのDNA結合ドメイン骨格領域のうちの1つもしくは複数における変異、ならびに/またはそれらのヌクレアーゼ切断ドメインにおける1つもしくは複数の変異を含み得

10

20

30

40

50

る。これらのヌクレアーゼは、DNA骨格上のホスフェートと非特異的に相互作用し得るZFP-DNA結合ドメイン(「ZFP骨格」)内のアミノ酸に対する変異を含み得るが、それらは、DNA認識ヘリックスには変化を含まない。したがって、本発明は、ヌクレオチド標的特異性には必要でないZFP骨格におけるカチオン性アミノ酸残基の変異を含む。一部の実施形態では、ZFP骨格におけるこれらの変異は、カチオン性アミノ酸残基を、中性またはアニオン性アミノ酸残基に変異させることを含む。一部の実施形態では、ZFP骨格におけるこれらの変異は、極性アミノ酸残基を、中性または非極性アミノ酸残基に変異させることを含む。好ましい実施形態では、変異は、DNA結合ヘリックスに対して、(-5)位、(-9)位、および/または(-14)位に行われる。一部の実施形態では、亜鉛フィンガーは、(-5)、(-9)、および/または(-14)に1つまたは複数の変異を含み得る。さらなる実施形態では、マルチフィンガーの亜鉛フィンガータンパク質における1つまたは複数の亜鉛フィンガーは、(-5)、(-9)、および/または(-14)に変異を含み得る。一部の実施形態では、(-5)、(-9)、および/または(-14)のアミノ酸(たとえば、アルギニン(R)またはリシン(K))は、アラニン(A)、ロイシン(L)、Ser(S)、Asp(N)、Glu(E)、Tyr(Y)、および/またはグルタミン(Q)に変異される。

【0100】

一部の態様では、DNA結合ドメイン(たとえば、ZFP、TALE、sgRNAなど)は、IL2RGまたはRAG遺伝子を標的とする。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、IL2RGまたはRAG遺伝子のイントロン領域、たとえば、イントロン1またはイントロン2を標的とする。

【0101】

標的部位の選択(たとえば、IL2RGまたはRAG遺伝子のイントロン領域内); ZFPならびに融合タンパク質(およびそれをコードするポリヌクレオチド)の設計および構築の方法は、当業者に公知であり、米国特許第6,140,081号、同第5,789,538号、同第6,453,242号、同第6,534,261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、WO95/19431、WO96/06166、WO98/53057、WO98/54311、WO00/27878、WO01/60970、WO01/88197、WO02/099084、WO98/53058、WO98/53059、WO98/53060、WO02/016536、およびWO03/016496に詳細に記載されている。

【0102】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示されているように、亜鉛フィンガードメインおよび/またはマルチフィンガーの亜鉛フィンガータンパク質は、たとえば、5個またはそれよりも多くのアミノ酸の長さのリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を使用して、一緒に連結させることができる。6個またはそれよりも多くのアミノ酸の長さの例示的なリンカー配列については、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号もまた参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々の亜鉛フィンガー間に任意の組み合わせの好適なリンカーを含み得る。

【0103】

ある特定の実施形態では、DNA結合分子は、CRISPR/Casヌクレアーゼ系の一部である。たとえば、米国特許第8,697,359号および米国特許公開第20150056705号を参照されたい。この系のRNA構成要素をコードするCRISPR(クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文構造の繰り返し)遺伝子座、およびタンパク質をコードするcas(CRISPR関連)遺伝子座(Jansenら、2002年、Mol. Microbiol.、43巻:1565~1575頁; Makarovaら、2002年、Nucleic Acids Res.、30巻:482~496頁; Makarovaら、2006年、Biol. Direct、1巻:7頁; Haftら、

10

20

30

40

50

2005年、P L o S C o m p u t . B i o l . 、 1 巻 : e 6 0 頁) により、C R I S P R / C a s システムの遺伝子配列が構成されている。微生物宿主における C R I S P R 遺伝子座は、C R I S P R 関連 (C a s) 遺伝子の組み合わせ、ならびに C R I S P R に媒介される核酸切断の特異性をプログラムすることができる非コーディング RNA エlementを含む。

【 0 1 0 4 】

I I 型 C R I S P R は、最もよく特徴付けられている系の 1 つであり、4 つの逐次的なステップで、標的化 DNA 二本鎖切断を実行する。第 1 に、2 つの非コーディング RNA、pre - cr RNA アレイおよび tracrRNA が、C R I S P R 遺伝子座から転写される。第 2 に、tracrRNA が、pre - cr RNA の反復領域にハイブリダイズし、個々のスペーサー配列を含有する成熟 cr RNA への pre - cr RNA のプロセッシングを媒介する。第 3 に、成熟 cr RNA : tracrRNA 複合体が、Cas9 を、cr RNA 上のスペーサーと、標的認識の追加の要件である標的 DNA 上のプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) に隣接する標的プロトスペーサーとの間のワトソンクリック塩基対合によって、標的 DNA へと指向させる。最後に、Cas9 が、標的 DNA の切断を媒介して、プロトスペーサー内での二本鎖切断が生じる。C R I S P R / C a s システムの活性は、3 つのステップから構成される : (i) 「適応」と称されるプロセスにおける、将来の攻撃を予防するための C R I S P R アレイへの外来 DNA 配列の挿入、(i i) 関連するタンパク質の発現、ならびにアレイの発現およびプロセッシング、続いて (i i i) RNA に媒介される外来核酸の干渉。したがって、細菌細胞では、いわゆる「Cas」タンパク質のいくつかは、C R I S P R / C a s システムの天然の機能に関与し、外来 DNA の挿入などの機能において役割を果たす。

【 0 1 0 5 】

ある特定の実施形態では、Cas タンパク質は、天然に存在する Cas タンパク質の「機能性誘導体」であり得る。天然配列ポリペプチドの「機能性誘導体」は、天然配列ポリペプチドと共通する定性的生物学的特性を有する化合物である。「機能性誘導体」には、限定せずに天然配列の断片、ならびに天然配列ポリペプチドの誘導体およびその断片が含まれる。ただし、対応する天然配列ポリペプチドと共通する生物学的活性を有することを条件とする。本明細書において企図される生物学的活性とは、機能性誘導体が、DNA 基質を加水分解して断片にする能力である。「誘導体」という用語は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーション、共有結合修飾体、およびその融合体を包含する。Cas ポリペプチドまたはその断片の好適な誘導体としては、Cas タンパク質またはその断片の変異体、融合体、共有結合修飾体が挙げられるが、これらに限定されない。Cas タンパク質またはその断片、ならびに Cas タンパク質の誘導体またはその断片を含む、Cas タンパク質は、細胞から得ることができる場合もあり、または化学的に合成され得るか、またはこれらの 2 つの手順の組み合わせによって得ることができる。細胞は、Cas タンパク質を天然に産生する細胞であってもよく、あるいは Cas タンパク質を天然に産生し、内因性 Cas タンパク質をより高い発現レベルで産生するように、または内因性 Cas と同じかもしくは異なる Cas をコードする外因的に導入された核酸から Cas タンパク質を産生するように遺伝子操作されている細胞であってもよい。一部の事例では、細胞は、Cas タンパク質を天然には産生せず、Cas タンパク質を産生するように遺伝子操作されている。一部の実施形態では、Cas タンパク質は、AAV ベクターを介した送達のための小さな Cas9 オルソログである (R a n 等、(2 0 1 5 年)、N a t u r e、5 1 0 巻、1 8 6 頁)。

【 0 1 0 6 】

一部の実施形態では、DNA 結合分子は、T t A g o システムの一部である (S w a r t s 等、同書、S h e n g 等、同書を参照されたい)。真核生物では、遺伝子サイレンシングは、アルゴノート (A g o) ファミリーのタンパク質によって媒介される。このパラダイムにおいて、A g o は、スモール (1 9 ~ 3 1 ヌクレオチド) RNA に結合する。このタンパク質 - RNA サイレncing 複合体は、スモール RNA と標的との間のワトソンクリック

10

20

30

40

50

塩基対合を介して標的RNAを認識し、標的RNAをヌクレオチド鎖分解的 (endonucleolytically) に切断する (Vogel、(2014年)、Science、344巻: 972~973頁)。対照的に、原核生物Agoタンパク質は、小さな一本鎖DNA断片に結合し、外来 (しばしばウイルス) DNAを検出し、それを除去するように機能する可能性が高い (Yuanら、(2005年)、Mol. Cell、19巻、405頁; Olovnikovら、(2013年)、Mol. Cell 51巻、594頁; Swartsら、同書)。例示的な原核生物Agoタンパク質としては、Aquifex aeolicus、Rhodobacter sphaeroides、および Thermus thermophilus に由来するものが挙げられる。

【0107】

最もよく特徴付けられている原核生物Agoタンパク質のうちの1つは、T. thermophilus に由来するものである (TtAgo、Swartsら、同書)。TtAgoは、5'リン酸基を有する、15ヌクレオチドまたは13~25ヌクレオチドのいずれかの一本鎖DNA断片に会合する。TtAgoが結合したこの「ガイドDNA」は、第三者のDNA分子においてワトソンクリック相補性DNA配列に結合するように、タンパク質-DNA複合体を誘導するように働く。これらのガイドDNAにおける配列情報により、標的DNAの特定が可能となると、TtAgo-ガイドDNA複合体は、標的DNAを切断する。このような機序は、その標的DNAに結合している間のTtAgo-ガイドDNA複合体の構造によっても補助される (G. Shengら、同書)。Rhodobacter sphaeroides に由来するAgo (RsAgo) は、同様の特性を有する (Olovnikovら、同書)。

【0108】

任意のDNA配列の外因性ガイドDNAを、TtAgoタンパク質に負荷することができる (Swartsら、同書)。TtAgo切断の特異性は、ガイドDNAによって誘導されるため、外因性のインベスティゲーター (investigator) により指定されたガイドDNAを用いて形成されたTtAgo-DNA複合体は、したがって、TtAgo標的DNA切断を、相補的なインベスティゲーターにより指定された標的DNAへと指向させる。このようにして、DNAに標的化二本鎖切断が生じ得る。TtAgo-ガイドDNA系 (または他の生物に由来するオルソログAgo-ガイドDNA系) の使用により、細胞内でのゲノムDNAの標的化切断が可能となる。そのような切断は、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。哺乳動物ゲノムDNAの切断については、哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化されたバージョンのTtAgoコドンを使用することが好ましいであろう。さらに、TtAgoタンパク質が細胞透過性ペプチドに融合されているin vitroで形成されたTtAgo-DNA複合体で、細胞を処置することが好ましい場合がある。さらに、摂氏37度で改善された活性を有するように変異誘発によって改変されているバージョンのTtAgoタンパク質を使用することが、好ましい場合がある。Ago-RNAに媒介されるDNA切断は、DNA切断の利用の分野における標準的な技法を使用して、遺伝子ノックアウト、標的化遺伝子付加、遺伝子修正、標的化遺伝子欠失を含む多数の結果に影響を与えるために使用することができる。

【0109】

このように、ヌクレアーゼは、ドナー (導入遺伝子)、特に、IL2RGおよび/またはRAG導入遺伝子を挿入することが所望される任意の遺伝子において、標的部位に特異的に結合するDNA結合分子を含む。

【0110】

B. 切断ドメイン

任意の好適な切断ドメインを、DNA結合ドメインに動作可能に連結して、ヌクレアーゼを形成することができる。たとえば、ZFP DNA結合ドメインが、ヌクレアーゼドメインに融合されて、ZFNが作製されており、ZFNは、その操作された (ZFP) DNA結合ドメインを通じてその意図される核酸標的を認識し、ヌクレアーゼ活性を介してDNAをZFP結合部位の近傍で切断させることができる機能性実体であり、これには、様

10

20

30

40

50

々な生物におけるゲノム修飾での使用が含まれる。たとえば、米国特許公開第 7, 888, 121 号、同第 8, 623, 618 号、同第 7, 888, 121 号、同第 7, 914, 796 号、および同第 8, 034, 598 号、並びに米国公開第 20110201055 号を参照されたい。同様に、T A L E DNA 結合ドメインが、ヌクレアーゼドメインに融合されて、T A L E N が作製されている。たとえば、米国特許第 8, 586, 526 号を参照されたい。

【0111】

上述のように、切断ドメインは、DNA 結合ドメインに対して異種であってもよく、たとえば、亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインとヌクレアーゼに由来する切断ドメイン、または T A L E N DNA 結合ドメインと切断ドメイン、またはメガヌクレアーゼ DNA 結合ドメインと異なるヌクレアーゼに由来する切断ドメインであってもよい。異種切断ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエク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例示的なエンドヌクレアーゼとしては、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、これらに限定されない。DNA を切断するさらなる酵素が公知である（たとえば、S1ヌクレアーゼ；リョクトウヌクレアーゼ；脾臓 DNase I；マイクロコッカルヌクレアーゼ；酵母 HO エンドヌクレアーゼ。これらの酵素のうちの 1 つまたは複数（またはその機能性断片）を、切断ドメインおよび切断ハーフドメインの供給源として使用することができる。

【0112】

同様に、切断ハーフドメインは、上述のように、任意のヌクレアーゼまたはその部分に由来し得、切断活性には二量体化が必要である。一般に、融合タンパク質が、切断ハーフドメインを含む場合は、切断に、2 つの融合タンパク質が必要である。あるいは、2 つの切断ハーフドメインを含む単一のタンパク質が、使用され得る。2 つの切断ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能性断片）に由来してもよく、またはそれぞれの切断ハーフドメインが、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能性断片）に由来してもよい。加えて、2 つの融合タンパク質の標的部位は、2 つの融合タンパク質がそれぞれのそれぞれの標的部位に結合することで、切断ハーフドメインが、たとえば二量体化によって機能性切断ドメインを形成することが可能となるような空間的配向に置かれるように、互いに対して配置されることが好ましい。したがって、ある特定の実施形態では、標的部位の近傍端部は、5 ~ 8 ヌクレオチドまたは 15 ~ 18 ヌクレオチドだけ離れている。しかしながら、任意の整数値のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2 つの標的部位の間に介在していてもよい（たとえば、2 ~ 50 個のヌクレオチド対またはそれよりも多く）。一般に、切断の部位は、標的部位の間に存在する。

【0113】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は、多数の種に存在しており、DNA に配列特異的に結合すること（認識部位において）、および結合の部位もしくはその近傍で DNA を切断することが可能である。ある特定の制限酵素（たとえば、IIS 型）は、認識部位から離れた部位で 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。たとえば、IIS 型酵素 F o k I は、一方の鎖上の認識部位から 9 ヌクレオチドで、および他方の鎖の認識部位から 13 ヌクレオチドで、DNA の二本鎖切断を触媒する。たとえば、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 L i ら、(1992 年)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、89 巻：4275 ~ 4279 頁；L i ら、(1993 年)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、90 巻：2764 ~ 2768 頁；K i m ら、(1994 年 a)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、91 巻：883 ~ 887 頁；K i m ら、(1994 年 b)、J . B i o l . C h e m .、269 巻：31, 978 ~ 31, 982 頁を参照されたい。したがって、一実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも 1 つの IIS 型制限酵素に由来する切断ドメイン（または切断ハーフドメイン）、および操作されていても操作されていなくてもよい 1 つまたは複数の亜鉛フィンガー結合ドメインを含む。

10

20

30

40

50

【0114】

その切断ドメインが、結合ドメインから分離可能である、例示的な I I S 型制限酵素は、F o k I である。この特定の酵素は、二量体として活性である。B i t t i n a i t e ら、(1 9 9 8 年)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 5 巻：1 0 , 5 7 0 ~ 1 0 , 5 7 5 頁。したがって、本開示の目的で、本開示の融合タンパク質において使用される F o k I 酵素の部分は、切断ハーフドメインと考えられる。したがって、亜鉛フィンガー - F o k I 融合体を使用する標的化された二本鎖切断および / または標的化された細胞配列の置換えのために、それぞれが F o k I 切断ハーフドメインを含む 2 つの融合タンパク質を使用して、触媒的に活性な切断ドメインを再構築することができる。あるいは、亜鉛フィンガー結合ドメインおよび 2 つの F o k I 切断ハーフドメインを含有する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 - F o k I 融合体を使用した標的化切断および標的化配列改変のためのパラメーターは、本開示の他の箇所に提供されている。

10

【0115】

切断ドメインまたは切断ハーフドメインは、切断活性を保持するか、または多量体化（たとえば、二量体化）して、機能性切断ドメインを形成する能力を保持する、タンパク質の任意の部分であり得る。

【0116】

例示的な I I S 型制限酵素は、国際公開 W O 0 7 / 0 1 4 2 7 5 に記載されており、これは、参照により本明細書に組み入れられる。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、これらは、本開示によって企図される。たとえば、R o b e r t s ら、(2 0 0 3 年)、N u c l e i c A c i d s R e s . 3 1 巻：4 1 8 ~ 4 2 0 頁を参照されたい。

20

【0117】

ある特定の実施形態では、切断ドメインは、たとえば、米国特許公開第 8 , 6 2 3 , 6 1 8 号、同第 7 , 8 8 8 , 1 2 1 号、同第 7 , 9 1 4 , 7 9 6 号、および同第 8 , 0 3 4 , 5 9 8 号、ならびに米国公開第 2 0 1 1 0 2 0 1 0 5 5 号に記載されるように、ホモ二量体化を最小限に抑えるかまたは防止する、1 つまたは複数の操作された切断ハーフドメイン（二量体化ドメイン変異体とも称される）を含み、これらのすべての文献の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。F o k I の 4 4 6 位、4 4 7 位、4 7 9 位、4 8 3 位、4 8 4 位、4 8 6 位、4 8 7 位、4 9 0 位、4 9 1 位、4 9 6 位、4 9 8 位、4 9 9 位、5 0 0 位、5 3 1 位、5 3 4 位、5 3 7 位、および 5 3 8 位のアミノ酸残基は、すべて、F o k I 切断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。

30

【0118】

ある特定の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、F o k I に由来し、以下に示される野生型全長 F o k I に対して付番された 4 1 6、4 2 2、4 4 7、4 4 8、および / または 5 2 5 のアミノ酸残基のうちの 1 つまたは複数に、1 つまたは複数の変異を含む（たとえば、米国出願第 1 5 / 6 8 5 , 5 8 0 号を参照されたい）。

【化 1】

野生型 FokI 切断ハーフドメイン (配列番号 21)

```
QLVKSELEEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRG  
KHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNK  
HINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIG  
GEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINF
```

40

これらの変異は、F o k I ドメインと DNA 分子との間の非特異的な相互作用を減少させる。他の実施形態では、F o k I に由来する切断ハーフドメインは、アミノ酸残基 4 1 4 ~ 4 2 6、4 4 3 ~ 4 5 0、4 6 7 ~ 4 8 8、5 0 1 ~ 5 0 2、および / または 5 2 1 ~ 5 3 1 のうちの 1 つまたは複数における変異を含む。変異は、F o k I に相同な天然の制限酵素において見出される残基に対する変異を含み得る。ある特定の実施形態では、変異

50

は、置換、たとえば、野生型残基と、異なるアミノ酸、たとえば、セリン（S）との置換、たとえば、R 4 1 6 SまたはK 5 2 5 Sである。好ましい実施形態では、4 1 6 位、4 2 2 位、4 4 7 位、4 4 8 位、および/または5 2 5 位における変異は、正に荷電したアミノ酸残基と、荷電していないかもしくは負に荷電したアミノ酸との置換えを含む。別の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、1つまたは複数のアミノ酸残基4 1 6、4 2 2、4 4 7、4 4 8、または5 2 5 における変異に加えて、アミノ酸残基4 9 9、4 9 6、および4 8 6 における変異を含む。好ましい実施形態では、本発明は、操作された切断ハーフドメインが、4 1 6 位、4 2 2 位、4 4 7 位、4 4 8 位、または5 2 5 位における1つまたは複数の変異に加えて、4 8 6 位の野生型G l n（Q）残基が、G l u（E）残基と置き換えられており、4 9 9 位の野生型I l e（I）残基が、L e u（L）残基と置き換えられており、4 9 6 位の野生型A s n（N）残基が、A s p（D）またはG l u（E）残基と置き換えられている（「E L D」または「E L E」）ポリペプチドを含む、融合タンパク質を提供する。

10

【0 1 1 9】

1つを上回る変異、たとえば、一方の切断ハーフドメインにおける「E 4 9 0 K：I 5 3 8 K」と表記される操作された切断ハーフドメインをもたらす4 9 0 位（EからK）および5 3 8 位（IからK）における変異、ならびにもう一方の切断ハーフドメインにおける「Q 4 8 6 E：I 4 9 9 L」変異と表記される操作された切断ハーフドメインをもたらす4 8 6 位（QからE）および4 9 9 位（IからL）の変異；4 8 6 位の野生型G l n（Q）残基がG l u（E）残基と置き換わり、4 9 9 位の野生型I s o（I）残基がL e u（L）残基と置き換わり、4 9 6 位の野生型A s n（N）残基がA s p（D）またはG l u（E）残基と置き換わる変異（それぞれ、「E L D」および「E L E」ドメインとも称される）；4 9 0 位、5 3 8 位、および5 3 7 位（野生型F o k Iに対する付番）に変異、たとえば、4 9 0 位の野生型G l u（E）残基がL y s（K）残基と置き換わり、5 3 8 位の野生型I s o（I）残基がL y s（K）残基と置き換わり、5 3 7 位の野生型H i s（H）残基がL y s（K）残基またはA r g（R）残基と置き換わる変異（それぞれ、「K K K」および「K K R」ドメインとも称される）を含む操作された切断ハーフドメイン；ならびに/または4 9 0 位および5 3 7 位（野生型F o k Iに対する付番）に変異、たとえば、4 9 0 位の野生型G l u（E）残基がL y s（K）残基と置き換わり、5 3 7 位の野生型H i s（H）残基がL y s（K）残基またはA r g（R）残基と置き換わる変異（それぞれ、「K I K」および「K I R」ドメインと称される）を含む操作された切断ハーフドメインを有する切断ドメインを、使用してもよい。たとえば、米国特許第7, 9 1 4, 7 9 6号、同第8, 0 3 4, 5 9 8号、および同第8, 6 2 3, 6 1 8号（これらの開示は、あらゆる目的で、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）を参照のこと。他の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、「S h a r k e y」および/または「S h a r k e y」変異を含む（G u oら、（2 0 1 0年）、J. M o l. B i o l.、4 0 0 巻（1号）：9 6～1 0 7頁を参照されたい）。

20

30

【0 1 2 0】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「スプリット酵素」技術を使用して、核酸の標的部位において、i n v i v oでアセンブルされてもよい（たとえば、米国特許公開第2 0 0 9 0 0 6 8 1 6 4号を参照されたい）。そのようなスプリット酵素の構成要素は、別個の発現構築物に発現されてもよく、または個々の構成要素が、たとえば、自己切断性2 AペプチドもしくはI R E S配列によって分離される1つのオープンリーディングフレームにおいて連結されていてもよいかのいずれかである。構成要素は、個別の亜鉛フィンガー結合ドメインであってもよく、またはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであってもよい。

40

【0 1 2 1】

ヌクレアーゼは、たとえば、米国特許第8, 5 6 3, 3 1 4号に記載されるように、酵母に基づく染色体系において、使用前に活性をスクリーニングすることができる。

【0 1 2 2】

50

Cas9 関連 CRISPR/Cas 系は、2つのRNA非コーディング構成要素を含む：同一の直列反復（DR）が間に入るヌクレアーゼガイド配列（スペーサー）を含有する tracrRNA および pre-crRNA。CRISPR/Cas 系を使用して、ゲノム操作を達成するためには、これらのRNAの両方の機能が存在しなければならない（Congら、（2013年）、Science express 1/10.1126/science.1231143を参照されたい）。一部の実施形態では、tracrRNA および pre-crRNA は、別個の発現構築物を介して、または別個のRNAとして、供給される。他の実施形態では、操作された成熟 crRNA（標的特異性を与える）が、tracrRNA（Cas9 との相互作用をもたらす）に融合されて、キメラ cr-RNA-tracrRNA ハイブリッド（一本鎖ガイドRNAとも称される）が形成された、キメラRNAが構築される。（Jinek、同書；および Cong、同書を参照されたい）。

【0123】

一部の実施形態では、CRISPR-Cpf1系が使用される。Francisella spp.において特定されたCRISPR-Cpf1系は、ヒト細胞において堅固なDNA干渉を媒介する、クラス2のCRISPR-Cas系である。機能的に保存されているが、Cpf1とCas9とは、それらのガイドRNAおよび基質特異性を含め、多くの側面で異なっている（Fagerlundら、（2015年）、Genom Bio、16巻：251頁を参照されたい）。Cas9タンパク質とCpf1タンパク質との間の主要な差異は、Cpf1が、tracrRNAを利用せず、したがって、crRNAのみを必要とすることである。FnCpf1 crRNAは、42～44ヌクレオチドの長さ（19ヌクレオチドの反復および23～25ヌクレオチドのスペーサー）であり、単一のステム-ループを含有し、これにより、二次構造を保持する配列の変化を許容する。加えて、Cpf1 crRNAは、Cas9が必要とする約100ヌクレオチドの操作されたsgRNAよりも著しく短く、FnCpf1のPAM要件は、置換鎖における5'-TTN-3'および5'-CTA-3'である。Cas9およびCpf1のいずれも、標的DNAにおいて二本鎖切断を作製するが、Cas9は、そのRuvC様およびHNH様ドメインを使用して、ガイドRNAのシード配列内に平滑末端切断部を作製し、一方でCpf1は、RuvC様ドメインを使用して、シードの外側に付着切断部を産生する。Cpf1は、重要なシード領域から離れて付着切断部を作製するため、NHEJにより標的部位が破壊されることがなく、したがって、Cpf1は、確実に、所望されるHDR組換え事象が生じるまで、同じ部位を切断し続けることができる。したがって、本明細書に記載される方法および組成物において、「Cas」という用語には、Cas9およびCpf1の両方のタンパク質が含まれることが理解される。したがって、本明細書において使用されるとき、「CRISPR/Cas系」は、ヌクレアーゼ系および/または転写因子系の両方を含む、CRISPR/Cas系および/またはCRISPR/Cpf1系の両方を指す。

【0124】

標的部位

上記で詳細に記載されるように、DNA結合ドメインは、選択される任意の配列に結合するように操作することができる。操作されたDNA結合ドメインは、天然に存在するDNA結合ドメインと比較して、新規な結合特異性を有し得る。

【0125】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、IL2R2遺伝子またはRAG遺伝子（たとえば、RAG1もしくはRAG2）、たとえば、遺伝子のイントロン（たとえば、イントロン1またはイントロン2）またはエクソン（たとえば、エクソン1）を標的とする。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、表2に示される配列内の9～20個またはそれよりも多くのヌクレオチド（連続的または非連続的）の標的部位に結合する。

【0126】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、「セーフハーバー」遺伝子座、たとえば、ヒト細胞におけるAAVS1、HPRT、ALB、およびCCR5遺伝子、ならびにマウス細胞におけるRosa26（たとえば、米国特許第7,888,121号、同第7,97

10

20

30

40

50

2, 854号、同第7, 914, 796号、同第7, 951, 925号、同第8, 110, 379号、同第8, 409, 861号、同第8, 586, 526号、米国特許公開第20030232410号、同第20050208489号、同第20050026157号、同第20060063231号、同第20080159996号、同第201000218264号、同第20120017290号、同第20110265198号、同第20130137104号、同第20130122591号、同第20130177983号、および同第20130177960号を参照されたい)、ならびに植物におけるZp15遺伝子座(米国特許US8, 329, 986を参照されたい)を標的とする。

【0127】

好適な標的遺伝子のさらなる非限定的な例としては、ベータ()グロビン遺伝子(HBB)、ガンマ()グロビン遺伝子(HBG1)、B細胞リンパ腫/白血病11A(BCLL11A)遺伝子、Kruppel様因子1(KLF1)遺伝子、CCR5遺伝子、CXCR4遺伝子、PPP1R12C(AAVS1)遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)遺伝子、アルブミン遺伝子、第VII因子遺伝子、第IX因子遺伝子、ロイシンリッチ反復キナーゼ2(LRRK2)遺伝子、ハンチンチン(Hungtingin)(Htt)遺伝子、ロドプシン(RHO)遺伝子、嚢胞性線維症膜コンダクタンス調節因子(CFTR)遺伝子、サーファクタントタンパク質B遺伝子(SFTPB)、T細胞受容体アルファ(TRAC)遺伝子、T細胞受容体ベータ(TRBC)遺伝子、プログラム細胞死1(PD1)遺伝子、細胞毒性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)遺伝子、ヒト白血球抗原(HLA)A遺伝子、HLA B遺伝子、HLA C遺伝子、HLA-DPA遺伝子、HLA-DQ遺伝子、HLA-DRA遺伝子、LMP7遺伝子、抗原プロセッシング関連トランスポーター(TAP)1遺伝子、TAP2遺伝子、タパシン遺伝子(TAPBP)、クラスII主要組織適合遺伝子複合体トランス活性化因子(CIITA)遺伝子、ジストロフィン遺伝子(DMD)、グルココルチコイド受容体遺伝子(GR)、IL2RG遺伝子、Rag-1遺伝子、RFX5遺伝子、FAD2遺伝子、FAD3遺伝子、ZP15遺伝子、KASII遺伝子、MDH遺伝子、および/またはEPSPS遺伝子が挙げられる。一部の態様では、ヌクレアーゼは、チェックポイント阻害剤遺伝子、たとえば、PD-1、CTLA4、阻害性リガンドのB7ファミリーの受容体に結合する、および/もしくはそれを切断するか、またはLAG3、2B4、BTLA、TIM3、A2aR、およびキラー阻害剤受容体(KIRおよびC型レクチン受容体)を通じたシグナル伝達に関与する受容体もしくはリガンド遺伝子(Pardoll、(2012年)、Nat Rev Cancer、12巻(4号):252頁を参照されたい)、HLA複合体遺伝子(クラスI:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、B2M;クラスII:HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA1、HLA-DQA、HLA-DRA、HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB1、HLA-DQB、HLA-DRB)もしくはTCR;ならびに/またはHLA複合体についてのペプチド負荷プロセスおよび抗原プロセッシングに関与する産物をコードする遺伝子(たとえば、TAP、タパシン、カルレティキュリン、カルネキシン、LMP2、LMP7、またはErp57)を切断する。たとえば、米国特許第8, 956, 828号および同第8, 945, 868号を参照されたい。

【0128】

ドナー

ある特定の実施形態では、本開示は、細胞のゲノムへの、外因性配列(たとえば、IL2RGおよび/もしくはRagタンパク質の任意の機能性断片、ならびに/または変異体野生型IL2RG配列を修正するドナーを含む、IL2RGおよび/またはRagタンパク質をコードする導入遺伝子)の、ヌクレアーゼに媒介される標的化組み込みに関する。上述のように、たとえば、指定される領域の欠失、および/または変異体遺伝子の修正、または野生型遺伝子の発現の増加のため外因性配列(「ドナー配列」または「ドナー」または「導入遺伝子」とも称される)の挿入。ドナー配列が、典型的に、それが配置されるゲノム配列とは同一ではないことは、容易に理解されよう。ドナー配列は、目的の位置にお

10

20

30

40

50

ける効率的なHDRを可能にするために、2つの相同性領域が隣接した非相同性配列（たとえば、導入遺伝子）を含有してもよく、または非相同組換え修復機序を介して組み込まれてもよい。たとえば、米国特許第9,045,763号、同第9,005,973号、および同第7,888,121号を参照されたい。加えて、ドナー配列は、細胞クロマチンにおける目的の領域に相同でない配列を含有するベクター分子を含み得る。ドナー分子は、細胞DNAに相同性の複数の非連続領域を含み得る。さらに、目的の領域には通常存在していない配列の標的化挿入のために、前記配列は、ドナー核酸分子に存在し、目的の領域にある配列に対して相同性の領域が隣接していてもよい。

【0129】

ヌクレアーゼと同様に、ドナーは、任意の形態で導入することができる。ある特定の実施形態では、ドナーは、DNAおよび/またはウイルスベクターを使用して、当該技術分野において公知の方法によって、導入することができる。たとえば、米国特許第9,005,973号、同第8,936,936号、および同第8,703,489号を参照されたい。ドナーは、二本鎖または一本鎖の形態で、細胞に導入することができる。ドナーは、環状または直鎖状の形態で、細胞に導入することができる。直鎖状の形態で導入される場合、ドナー配列の末端は、当業者に公知の方法によって、保護され得る（たとえば、エキソヌクレアーゼ的分解から）。たとえば、1つもしくは複数のジデオキシヌクレオチド残基が、直鎖状分子の3'末端に付加される、および/または自己相補性オリゴヌクレオチドが、一方もしくは両方の末端にライゲーションされる。たとえば、Changら、(1987年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84巻：4959～4963頁；Nehlsら、(1996年)、Science、272巻：886～889頁を参照されたい。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するためのさらなる方法としては、末端アミノ基の付加、ならびに修飾ヌクレオチド間連結、たとえば、例として、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、およびO-メチルリボースまたはデオキシリボース残基の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【0130】

ある特定の実施形態では、ドナーは、長さが1kbを上回る、たとえば、2～200kbの間、2～10kbの間（またはそれらの間の任意の値）の配列（たとえば、コーディング配列、導入遺伝子とも称される）を含む。ドナーはまた、少なくとも1つのヌクレアーゼ標的部位を含み得る。ある特定の実施形態では、ドナーは、少なくとも2つの標的部位、たとえば、ZFN対、TALEN対、TtAgo、またはCRISPR/Casヌクレアーゼを含む。典型的に、ヌクレアーゼ標的部位は、導入遺伝子の切断のために、導入遺伝子配列の外側、たとえば、導入遺伝子配列に対して5'側および/または3'側にある。ヌクレアーゼ切断部位は、任意のヌクレアーゼに対するものであってよい。ある特定の実施形態では、二本鎖ドナーに含有されるヌクレアーゼ標的部位は、同じヌクレアーゼに対するものであり、内因性標的を切断し、そこに、切断されたドナーを、相同性非依存的方法によって組み込むために使用される。

【0131】

ドナーは、その発現が、組み込み部位において、内因性プロモーター、すなわち、ドナーが挿入される内因性遺伝子の発現を駆動させるプロモーターによって、駆動されるように、挿入され得る。しかしながら、ドナーが、プロモーターおよび/またはエンハンサー、たとえば、構成的プロモーターまたは誘導性もしくは組織特異的プロモーターを含んでもよいことが、明らかである。

【0132】

ドナー分子は、内因性遺伝子のすべてが発現されるか、一部が発現されるか、一切発現されないように、内因性遺伝子に挿入することができる。一部の実施形態では、SCID関連導入遺伝子は、変異体バージョンを修正するために、IL2RG遺伝子の内因性遺伝子座に組み込まれる（たとえば、SCID関連遺伝子の機能性バージョンが欠如または欠損しているSCID患者に由来する細胞において）、たとえば、IL2RG導入遺伝子が、内因性IL2RG遺伝子に、たとえば、X-SCIDと関連する変異体IL2RGのイン

10

20

30

40

50

トロン領域（たとえば、イントロン１）に、組み込まれる。他の実施形態では、ＳＣＩＤ関連導入遺伝子は、機能性ＩＬ２ＲＧまたはＲＡＧタンパク質（ＲＡＧ１および／またはＲＡＧ２）が発現されるように、ＩＬ２ＲＧ遺伝子の内因性遺伝子座に組み込まれる。したがって、ドナーは、機能性タンパク質を産生する任意のＳＣＩＤ関連タンパク質コード配列を含み得、これには、全長ＳＣＩＤ関連遺伝子（たとえば、ＩＬ２ＲＧ、ＲＡＧ１、および／またはＲＡＧ２）、ＳＣＩＤ関連遺伝子の部分的（機能性）配列（たとえば、ＩＬ２ＲＧのエクソン２～８、ＲＡＧ１またはＲＡＧ２のエクソン３など）、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０１３３】

さらに、発現には必要とされないが、外因性配列は、転写もしくは翻訳調節配列、または他の配列、たとえば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、内部リボソーム進入部位、２Ａペプチドおよび／またはポリアデニル化シグナルをコードする配列を含み得る。加えて、スプライシングアクセプター配列が、含まれてもよい。例示的なスプライシングアクセプター部位配列は、当業者に公知であり、単なる例として、ＣＴＧＡＣＣＴＣＴＴＣＴＣＴＴＣＣＴＣＣＣＡＣＡＧ（配列番号２２）（ヒトＨＢＢ遺伝子に由来）およびＴＴＴＣＴＣＴＣＣＡＣＡＧ（配列番号２３）（ヒト免疫グロブリンガンマ遺伝子に由来）が挙げられる。

【０１３４】

本明細書に記載されるドナー配列で運搬されるＳＣＩＤ関連導入遺伝子は、当該技術分野において公知の標準的な技法、たとえば、ＰＣＲを使用して、プラスミド、細胞、または他の供給源から単離され得る。使用するためのドナーには、環状スーパーコイル型、ほどけた環状型、直鎖状などを含む、様々な種類のトポロジジーが含まれ得る。あるいは、これらは、標準的なオリゴヌクレオチド合成技法を使用して、化学的に合成してもよい。加えて、ドナーは、メチル化されていてもよく、またはメチル化が欠如していてもよい。ドナーは、細菌または酵母の人工染色体（ＢＡＣまたはＹＡＣ）の形態であってもよい。

【０１３５】

本明細書に記載されるドナーポリヌクレオチドは、１つまたは複数の非天然の塩基および／または骨格を含み得る。具体的には、目的の領域における転写休止の状態を達成するために、本明細書に記載される方法を使用して、メチル化シトシンを有するドナー分子の挿入を実行してもよい。

【０１３６】

外因性（ドナー）ポリヌクレオチドは、任意の目的とされる配列（外因性配列）を含み得る。例示的な外因性配列としては、任意のポリペプチドコーディング配列（たとえば、ｃＤＮＡ）、プロモーター配列、エンハンサー配列、エピトープタグ、マーカー遺伝子、切断酵素認識部位、および様々な種類の発現構築物が挙げられるが、これらに限定されない。マーカー遺伝子としては、抗生物質耐性（たとえば、アンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、Ｇ４１８耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、着色もしくは蛍光もしくは発光タンパク質（たとえば、緑色蛍光タンパク質、強化型緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）をコードする配列、ならびに細胞成長および／または遺伝子増幅の強化を媒介するタンパク質（たとえば、ジヒドロ葉酸還元酵素）が挙げられるが、これらに限定されない。エピトープタグとしては、たとえば、ＦＬＡＧ、Ｈｉｓ、ｍｙｃ、Ｔａｐ、ＨＡ、または任意の検出可能なアミノ酸配列のうちの１つもしくは複数のコピーが挙げられる。

【０１３７】

一部の実施形態では、ドナーは、細胞における発現が所望される任意のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、このポリペプチドとしては、抗体、抗原、酵素、受容体（細胞表面もしくは核内受容体またはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ））、ホルモン、リンホカイン、サイトカイン、レポーターポリペプチド、増殖因子、および上記のもののいずれかの機能性断片が挙げられるが、これらに限定されない。コーディング配列は、たとえば、ｃＤＮＡであり得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 8 】

ある特定の実施形態では、外因性配列は、標的化組み込みを受けた細胞の選択を可能にするマーカー遺伝子（上述）、および追加の機能性をコードする連結配列を含み得る。マーカー遺伝子の非限定的な例としては、GFP、薬物選択マーカーなどが挙げられる。

【 0 1 3 9 】

ある特定の実施形態では、導入遺伝子としては、たとえば、変異型内因性配列を置き換えるための野生型遺伝子を挙げることができる。たとえば、野生型（または他の機能性）IL2RGおよび/またはRAG遺伝子配列が、遺伝子の内因性コピーが変異されている幹細胞のゲノムに挿入され得る。導入遺伝子は、内因性遺伝子座に挿入されてもよく、または代替として、セーフハーバー遺伝子座を標的としてもよい。

10

【 0 1 4 0 】

そのような発現カセットの構築は、本明細書の教示に従い、分子生物学の分野において周知の手法を利用する（たとえば、AusubelまたはManiatisを参照されたい）。発現カセットを使用してトランスジェニック動物を産生する前に、選択された制御エレメントに関連するストレス誘導因子に対する発現カセットの応答性を、発現カセットを好適な細胞株（たとえば、初代細胞、形質転換細胞、または不死化細胞株）に導入することによって、試験することができる。

【 0 1 4 1 】

さらに、発現には必要とされないが、外因性配列は、転写または翻訳調節配列、たとえば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、内部リボソーム進入部位、2Aペプチドおよび/またはポリアデニル化シグナルをコードする配列も含み得る。さらに、目的の遺伝子の制御エレメントを、レポーター遺伝子に作動可能に連結して、キメラ遺伝子（たとえば、レポーター発現カセット）を作製してもよい。

20

【 0 1 4 2 】

非コーディング核酸配列の標的化挿入もまた、達成することができる。アンチセンスRNA、RNAi、shRNA、およびマイクロRNA（miRNA）をコードする配列もまた、標的化挿入に使用することができる。

【 0 1 4 3 】

追加の実施形態では、ドナー核酸は、追加のヌクレアーゼ設計に特異的な標的部位である非コーディング配列を含み得る。続いて、追加のヌクレアーゼが、細胞に発現され得、それによって、元のドナー分子が切断され、別の目的とされるドナー分子の挿入によって修飾される。この様式では、ドナー分子の反復的な組み込みが生じ、特定の目的とされる遺伝子座またはセーフハーバー遺伝子座において形質を重ねることが可能となる。

30

【 0 1 4 4 】

細胞

このように、細胞に、SCID関連導入遺伝子、すなわち、SCIDにおいて欠如または欠損している機能性タンパク質を発現する導入遺伝子を含む、遺伝子修飾された細胞が本明細書に提供され、これには、本明細書に記載される方法によって産生された細胞（たとえば、T細胞または幹細胞）が含まれる。導入遺伝子は、1つまたは複数のヌクレアーゼを使用して、標的化された様式で、細胞のゲノムに組み込まれる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、IL2RG、たとえば、X-SCID患者において見出される変異体IL2RG遺伝子に組み込まれる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、オーメン症候群の患者の処置および/または予防のための機能性RAG遺伝子を含む。導入遺伝子は、IL2RGの任意のイントロン領域またはエクソン領域、たとえば、イントロン1またはイントロン2に組み込まれていてもよい。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、配列番号1または2のいずれかの側の5～10個のヌクレオチドにまたはその中に、組み込まれる。したがって、SCID関連遺伝子のイントロン1またはイントロン2に組み込まれたSCID関連導入遺伝子（SCIDにおいて欠如または欠損している機能性タンパク質を発現する）を含む、遺伝子修飾された細胞、ならびに遺伝子修飾を含むこれらの細胞の子孫である細胞が、本明細書に提供される。

40

50

【 0 1 4 5 】

ランダム組み込みとは異なり、標的化組み込みでは、確実に、導入遺伝子が、指定された遺伝子に組み込まれる。導入遺伝子は、標的遺伝子の任意の箇所に組み込まれていてもよい。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、ヌクレアーゼ切断部位またはその近傍、たとえば、切断の部位の上流または下流の 1 ~ 3 0 0 (またはその間の任意の値)塩基対内、より好ましくは、切断部位のいずれかの側の 1 ~ 1 0 0 (またはその間の任意の値)塩基対内、さらにより好ましくは、切断部位のいずれかの側の 1 ~ 5 0 (またはその間の任意の値)塩基対内に、組み込まれる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子を含む組み込まれる配列は、任意のベクター配列(たとえば、ウィルスベクター配列)を含まない。

【 0 1 4 6 】

細胞および細胞株を含むがこれらに限定されない任意の細胞型を、本明細書に記載されるように、I L 2 R G 導入遺伝子を含むように遺伝子修飾することができる。本明細書に記載される I L 2 R G 導入遺伝子を含む細胞の他の非限定的な例としては、T 細胞(たとえば、C D 4 +、C D 3 +、C D 8 + など)、樹状細胞、B 細胞、自家(たとえば、患者由来)または異種多能性幹細胞、全能性幹細胞、または複能性幹細胞(たとえば、C D 3 4 + 細胞、人工多能性幹細胞(i P S C)、胚性幹細胞など)が挙げられる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される細胞は、X - S C I D 患者に由来する C D 3 4 + 細胞である。

【 0 1 4 7 】

本明細書に記載される S C I D 関連タンパク質を発現する細胞は、障害を有する被験体において、たとえば、e x v i v o 療法によって、S C I D (たとえば、X - S C I D および/またはオーメン症候群)を処置および/または予防するのに有用である。ヌクレアーゼ修飾細胞を、拡大増殖させ、次いで、標準的な技法を使用して患者に再導入することができる。たとえば、T e b a s ら、(2014 年)、New Eng J Med、370 巻(10 号): 901 頁を参照されたい。幹細胞の事例では、被験体に注入した後、これらの前駆体の、機能性 I L 2 R G タンパク質を発現する細胞への i n v i v o での分化も生じる。本明細書に記載される細胞を含む医薬組成物もまた、提供される。加えて、細胞は、患者に投与する前に凍結保存してもよい。

【 0 1 4 8 】

本明細書に記載される細胞および e x v i v o での方法により、被験体(たとえば、哺乳動物被験体)における S C I D の処置および/または予防を提供し、継続的な予防的医薬品投与の必要性または同種骨髄移植もしくはガンマレトロウイルス送達などの危険性のある手順を排除する。そのため、本明細書に記載される本発明は、S C I D を処置および/または予防する安全で費用効果的かつ時間効率の良い手段を提供する。

【 0 1 4 9 】

送達

本明細書に記載されるヌクレアーゼ、これらのヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド、ならびにタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含む組成物は、任意の好適な手段によって送達することができる。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼおよび/またはドナーは、i n v i v o で送達される。他の実施形態では、ヌクレアーゼおよび/またはドナーは、S C I D 患者への e x v i v o 送達に有用な修飾細胞を提供するために、単離細胞(たとえば、自家幹細胞または異種幹細胞)に送達される。

【 0 1 5 0 】

本明細書に記載されるヌクレアーゼを送達する方法は、たとえば、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、これらのすべての開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

10

20

30

40

50

【0151】

本明細書に記載されるヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物はまた、ネイキッドDNAおよび/またはRNA(たとえば、mRNA)、ならびに構成要素の1つもしくは複数をコードする配列を含有するベクターを含む、任意の核酸送達機序を使用して送達することができる。プラスミドベクター、DNAミニサークル、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など、ならびにこれらの組み合わせを含むがこ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。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、ならびに米国特許公開番号US-2014-0335063-A1(これらは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)もまた参照のこと。さらに、これらの系のいずれも、処置に必要とされる配列のうちの1つまたは複数を組み得ることが、明らかであろう。したがって、1つまたは複数のヌクレアーゼおよびドナー構築物が、細胞に導入される場合、ヌクレアーゼおよび/またはドナーポリヌクレオチドは、同じ送達系で運搬されてもよく、または異なる送達機序で運搬されてもよい。複数の系が使用される場合、それぞれの送達機序は、1つもしくは複数のヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物をコードする配列(たとえば、1つもしくは複数のヌクレアーゼをコードするmRNA、および/または1つもしくは複数のドナー構築物を運搬するmRNAもしくはAAV)を組み得る。

10

20

【0152】

従来のウイルスおよび非ウイルスに基づく遺伝子移入方法を使用して、ヌクレアーゼおよびドナー構築物をコードする核酸を、細胞(たとえば、哺乳動物細胞)および標的組織に導入することができる。非ウイルスベクター送達系としては、DNAプラスミド、DNAミニサークル、ネイキッド核酸、およびリポソームもしくはポロキサマーなどの送達ビヒクルと複合体を形成した核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、DNAおよびRNAウイルスが挙げられ、これらは、細胞に送達した後にエピソームゲノムまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有する。遺伝子療法の手順の概説については、Anderson、Science、256巻:808~813頁(1992年); NabelおよびFelgner、TIBTECH、11巻:211~217頁(1993年); MitaniおよびCaskey、TIBTECH、11巻:162~166頁(1993年); Dillon、TIBTECH、11巻:167~175頁(1993年); Miller、Nature、357巻:455~460頁(1992年); Van Brunt、Biotechnology、6巻(10号):1149~1154頁(1988年); Vigne、Restorative Neurology and Neuroscience、8巻:35~36頁(1995年); KremerおよびPerricaudet、British Medical Bulletin、51巻(1号):31~44頁(1995年); Haddadら、Current Topics in Microbiology and Immunology、DoerflerおよびBoehm(編)、(1995年); ならびにYura、Gene Therapy、1巻:13~26頁(1994年)を参照されたい。

30

40

【0153】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃(biolistic)、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸コンジュゲート、脂質ナノ粒子(LNP)、ネイキッドDNA、ネイキッドRNA、キャップされたRNA、人工ビリオン、および薬剤によるDNAの取込み強化が挙げられる。たとえば、Sonitron 2000システム(Rich-Mar)を使用したソノポレーションもまた、核酸の送達に使用することができる。

【0154】

50

追加の例示的な核酸送達系としては、Amaxa Biosystems (Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA)、およびCopernicus Therapeutics Inc. (たとえば、米国特許第6,008,336号を参照されたい)によって提供されているものが挙げられる。リポフェクションは、たとえば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、および同第4,897,355号)に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている(たとえば、Transfectam(商標)およびLipofectin(商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適なカチオン性脂質および中性脂質としては、Felgner、WO91/17424、WO91/16024のものが挙げられる。一部の態様では、ヌクレアーゼは、mRNAとして送達され、導入遺伝子は、他のモダリティ、たとえば、ウイルスベクター、ミニサークルDNA、プラスミドDNA、一本鎖DNA、直鎖状DNA、リポソーム、ナノ粒子などによって送達される。

【0155】

標的化リポソーム、たとえば、免疫脂質複合体を含む、脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である(たとえば、Crystal, Science、270巻：404~410頁(1995年)；Blaeseら、Cancer Gene Ther.、2巻：291~297頁(1995年)；Behrら、Bioconjugate Chem.、5巻：382~389頁(1994年)；Remyら、Bioconjugate Chem.、5巻：647~654頁(1994年)；Gaoら、Gene Therapy、2巻：710~722頁(1995年)；Ahmadら、Cancer Res.、52巻：4817~4820頁(1992年)；米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,774,085号、同第4,837,028号、および同第4,946,787号を参照されたい)。

【0156】

さらなる送達方法としては、送達しようとする核酸のEnGeneIC送達ビヒクル(EDV)へのパッケージングの使用が挙げられる。これらのEDVは、二重特異性抗体を使用して標的組織に特異的に送達されるが、この場合、抗体の一方のアームが、標的組織に対する特異性を有し、他方が、EDVに対する特異性を有する。抗体が、EDVを標的細胞表面へと運び、次いで、EDVが、エンドサイトーシスによって細胞内に入る。細胞内に入ると、内容物が放出される(MacDiarmidら、(2009年)、Nature Biotechnology、27巻(7号)：643頁を参照されたい)。

【0157】

操作されたCRISPR/Cas系をコードする核酸の送達にRNAまたはDNAウイルスに基づく系を使用することは、ウイルスを体内の特定の細胞に標的化させ、ウイルスのペイロードを核へと輸送するための高度に発展したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、被験体に直接的に投与されてもよく(in vivo)、またはウイルスベクターを使用して、細胞をin vitroで処置し、修飾した細胞を被験体に投与することもできる(ex vivo)。CRISPR/Cas系の送達のための従来のウイルスに基づく系としては、遺伝子移入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニア、および単純ヘルペスウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルス遺伝子移入法を用いると、宿主ゲノムへの組み込みが可能であり、挿入された導入遺伝子の長期発現がもたらされることが多い。加えて、多数の異なる細胞型および標的組織において、高い形質導入効率が観察されている。

【0158】

レトロウイルスの向性は、外来エンベロープタンパク質を取り込むことによって改変することができ、標的細胞の潜在的な標的集団が拡大される。レンチウイルスベクターは、非

10

20

30

40

50

分裂細胞に形質導入または感染し、典型的に高いウイルス力価をもたらすことができる、レトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大で6～10 kbの外来配列のパッケージング能力を有するcis作用型の長い末端反復から構成される。ベクターの複製およびパッケージングには、最小限のcis作用型LTRで十分であるため、これが、次に、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで永続的な導入遺伝子の発現をもたらすために使用される。広範に使用されているレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に基づくもの、およびそれらの組み合わせが挙げられる(たとえば、Buchschera、J. Virol.、66巻:2731～2739頁(1992年); Johannra、J. Virol.、66巻:1635～1640頁(1992年); Sommerfeltら、Virol.、176巻:58～59頁(1990年); Wilsonら、J. Virol.、63巻:2374～2378頁(1989年); Millerら、J. Virol.、65巻:2220～2224頁(1991年)、PCT/US94/05700を参照されたい)。

【0159】

一過性発現が好ましい適用では、アデノウイルスに基づく系を使用することができる。アデノウイルスに基づくベクターは、多数の細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターを用いることで、高い力価および高い発現レベルが得られている。このベクターは、比較的単純な系で大量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターもまた、たとえば、核酸およびペプチドのin vitro産生において、ならびにin vivoおよびex vivoでの遺伝子療法手順のために、細胞に標的核酸を形質導入するために使用されている(たとえば、Westら、Virology、160巻:38～47頁(1987年)、米国特許第4,797,368号、WO93/24641; Kotin、Human Gene Therapy、5巻:793～801頁(1994年); Muzyczka、J. Clin. Invest.、94巻:1351頁(1994年)を参照されたい。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号、Tratschinaら、Mol. Cell. Biol.、5巻:3251～3260頁(1985年); Tratschinaら、Mol. Cell. Biol.、4巻:2072～2081頁(1984年); HermonatおよびMuzyczka、PNAS、81巻:6466～6470頁(1984年); およびSamulskiら、J. Virol.、63巻:03822～3828頁(1989年)を含む、多数の刊行物に記載されている。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、およびAAV8、AAV8.2、AAV9、およびAAVrh10、ならびに偽型AAV、たとえば、AAV2/8、AAV2/5、およびAAV2/6を含む、任意のAAV血清型を使用することができる。

【0160】

現在のところ、少なくとも6つのウイルスベクターアプローチが、臨床試験において、遺伝子移入に利用可能であり、これらは、形質導入剤を生成するために、ヘルパー細胞株に挿入された遺伝子によって不完全なベクターを補完することを伴うアプローチを利用する。

【0161】

pLASNおよびMFG-Sは、臨床試験において使用されているレトロウイルスベクターの例である(Dunbarら、Blood、85巻:3048～305頁(1995年); Kohnら、Nat. Med.、1巻:1017～102頁(1995年); Malechら、PNAS、94巻:22号、12133～12138頁(1997年))。PA317/pLASNは、遺伝子療法の試験で使用された初めての治療用ベクターであった。(Blaeseら、Science、270巻:475～480頁(1995年))。MFG-Sパッケージングベクターには、50%またはそれを上回る形質導入効率が観察されている。(Ellemら、Immunol Immunother.、44巻(1号):10～20頁(1997年); Dranoffら、Hum. Gene The

10

20

30

40

50

r.、1巻：111～2頁（1997年）。

【0162】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター（rAAV）は、欠陥非病原性パルボウイルスであるアデノ随伴ウイルス2型に基づく有望な代替的な遺伝子送達系である。すべてのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するAAV145塩基対（bp）の末端逆位反復配列のみを保持するプラスミドに由来する。効率的な遺伝子移入、および形質導入された細胞のゲノムへの組み込みに起因する安定な導入遺伝子送達は、このベクター系の重要な特徴である。（Wagnerら、Lancet、351巻：9117号1702～3頁（1998年）；Kearnsら、Gene Ther.、9巻：748～55頁（1996年））。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、およびAAVrh10、ならびにそれらのすべてのバリエーションを含む、他のAAV血清型を、本発明により使用することができる。

10

【0163】

複製欠損組換えアデノウイルスベクター（Ad）は、高い力価で産生することができ、多数の異なる細胞型に容易に感染し得る。ほとんどのアデノウイルスベクターは、導入遺伝子が、Ad E1a、E1b、および/またはE3遺伝子と置き換わるように操作されており、結果として、複製欠損ベクターが、ヒト293細胞において増殖し、欠失した遺伝子機能がtransで供給される。Adベクターは、非分裂性の分化細胞、たとえば、肝臓、腎臓、および筋肉においてみられるものを含め、in vivoで複数の種類の組織に形質導入することができる。従来のAdベクターは、大きな運搬能力を有する。臨床試験におけるAdベクターの使用の例は、筋肉内注射による抗腫瘍免疫化のためのポリヌクレオチド療法に関係していた（Stermánら、Hum. Gene Ther.、7巻：1083～9頁（1998年））。臨床試験において遺伝子移入にアデノウイルスベクターを使用するさらなる例としては、Roseneckerら、Infection、24巻：1号、5～10頁（1996年）；Stermánら、Hum. Gene Ther.、9巻：7号、1083～1089頁（1998年）；Welshら、Hum. Gene Ther.、2巻：205～18頁（1995年）；Alvarezら、Hum. Gene Ther.、5巻：597～613頁（1997年）；Topfら、Gene Ther.、5巻：507～513頁（1998年）；Stermánら、Hum. Gene Ther.、7巻：1083～1089頁（1998年）が挙げられる。

20

30

【0164】

パッケージング細胞を使用して、宿主細胞に感染する能力のあるウイルス粒子を形成する。そのような細胞としては、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、およびレトロウイルスをパッケージングする2細胞またはPA317細胞が挙げられる。遺伝子療法において使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングする、産生細胞株によって生成される。ベクターは、典型的に、パッケージングおよびその後の宿主への組み込み（該当する場合）に必要な最小限のウイルス配列を含み、他のウイルス配列は、発現させようとするタンパク質をコードする発現カセットで置き換えられている。欠けているウイルス機能は、パッケージング細胞株によって、transで供給される。たとえば、遺伝子療法において使用されるAAVベクターは、典型的に、パッケージングおよび宿主ゲノムへの組み込みに必要な、AAVゲノムに由来する末端逆位反復（ITR）配列だけを有する。ウイルスDNAが細胞株においてパッケージングされるが、これは、他のAAV遺伝子（すなわち、repおよびcap）をコードするヘルパープラスミドを含有するが、ITR配列は欠如している。細胞株はまた、ヘルパーとして、アデノウイルスにも感染する。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列の欠如に起因して、顕著な量ではパッケージングされない。アデノウイルスの混入は、たとえば、熱処理によって低減することができ、熱処理に対しては、AAVよりもアデノウイルスの感受性が高い。

40

【0165】

50

多数の遺伝子療法の適用では、遺伝子療法ベクターを、特定の組織型に対して高い特異性の程度で送達することが望ましい。したがって、ウイルスペクターは、ウイルスの外表面に、ウイルスコートタンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現させることによって、所与の細胞型に対する特異性を有するように修飾され得る。リガンドは、目的の細胞型に存在することが公知の受容体に対する親和性を有するように選択される。たとえば、Hanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92巻：9747～9751頁（1995年）では、モロニー Maus 白血病ウイルスを、gp70に融合したヒトヘレグリンを発現するように修飾することができ、組換えウイルスが、ヒト上皮増殖因子受容体を発現する特定のヒト乳がん細胞に感染することが、報告されている。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスが細胞表面受容体のリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス-標的細胞対に拡張することができる。たとえば、糸状ファージは、事実上あらゆる選択された細胞受容体に対して特異的結合親和性を有する抗体断片（たとえば、FABまたはFv）を呈するように操作することができる。上述の説明は、主として、ウイルスペクターに当てはまるが、同じ原理は、非ウイルスペクターに適用することができる。そのようなベクターは、特定の標的細胞による取込みに好ましい、特定の取込み配列を含有するように操作することができる。

10

【0166】

遺伝子療法ベクターは、典型的に、全身投与（たとえば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、舌下、または頭蓋内注入）、以下に記載されるような局所適用、または肺吸入による、個々の被験体への投与によって、*in vivo*で送達することができる。あるいは、ベクターは、*ex vivo*で、細胞に、たとえば、個々の患者から外植された細胞（たとえば、リンパ球、骨髓吸引液、組織生検材料）または万能ドナーの造血幹細胞に送達され、続いて、通常はベクターを取り込んだ細胞を選択した後に、この細胞が患者に再度埋め込まれる。

20

【0167】

ヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物を含有するベクター（たとえば、レトロウイルス、アデノウイルス、リボソームなど）もまた、*in vivo*での細胞の形質導入のために、生物に直接的に投与され得る。あるいは、ネイキッドDNAを、投与してもよい。投与は、注射、注入、局所適用、吸入、およびエレクトロポレーションを含むがこれらに限定されない、分子を血液または組織細胞との最終的な接触に誘導するために通常使用される経路のいずれかによるものである。そのような核酸を投与する好適な方法が利用可能であり、かつ当業者に周知である。1つを上回る経路を使用して、特定の組成物を投与してもよいが、特定の経路が、別の経路よりも即時かつより有効な反応をもたらすことが多い場合がある。

30

【0168】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドの導入に好適なベクターとしては、非組み込み型レンチウイルスペクター（IDLV）が挙げられる。たとえば、Oryら、（1996年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻：11382～11388頁；Dullら、（1998年）、J. Virol.、72巻：8463～8471頁；Zufferyら、（1998年）、J. Virol.、72巻：9873～9880頁；Follenzら、（2000年）、Nature Genetics、25巻：217～222頁、米国特許第8,936,936号を参照されたい。

40

【0169】

薬学的に許容される担体は、投与される具体的な組成物、ならびに組成物を投与するために使用される具体的な方法によって、部分的に決定される。したがって、以下に記載されるように、利用可能な医薬組成物の様々な好適な製剤が存在する（たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17版、1989年を参照されたい）。

【0170】

ヌクレアーゼをコードする配列およびドナー構築物が、同じ系を使用して送達されてもよ

50

く、または異なる系を使用して送達されてもよいことが、明らかであろう。たとえば、ドナーポリヌクレオチドは、AAVによって運搬されてもよく、一方で1つまたは複数のヌクレアーゼは、mRNAによって運搬されてもよい。さらに、異なる系は、同じかまたは異なる経路（筋肉内注射、尾静脈注射、他の静脈内注射、腹腔内投与、および/または筋肉内注射によって投与され得る。複数のベクターを、同時に送達してもよく、または任意の逐次的順序で送達してもよい。

【0171】

ex vivo投与およびin vivo投与の両方のための製剤としては、液体中の懸濁物または乳化した液体が挙げられる。活性成分は、薬学的に許容され、活性成分と適合性のある賦形剤と混合されることが多い。好適な賦形剤としては、たとえば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの混合物が挙げられる。加えて、組成物は、少量の補助物質、たとえば、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝化剤、安定剤、または医薬組成物の有効性を強化する他の試薬を含有し得る。

10

【0172】

適用

本明細書に開示される方法および組成物は、SCID関連障害（たとえば、X-SCID、オーメン症候群）の治療法を、たとえば、SCID障害において欠如または欠損しているタンパク質の提供を通じて、提供するためのものである。細胞は、in vivoで修飾されてもよく、またはex vivoで修飾された後に、被験体に投与されてもよい。したがって、本方法および組成物は、SCID障害の処置および/または予防を提供する。

20

【0173】

SCID関連導入遺伝子（たとえば、IL2RGおよび/またはRAG導入遺伝子）の標的化組み込みを使用して、異常なSCID関連遺伝子を修正するか、野生型遺伝子を挿入するか、または内因性遺伝子の発現を変化させることができる。たとえば、X-SCID患者において欠損しているIL2RGをコードする野生型導入遺伝子を、細胞に組み込み、機能性タンパク質を産生する細胞を得ることができる。同様に、オーメン症候群SCID患者において欠損しているRAG遺伝子（たとえば、RAG1またはRAG2）をコードする野生型導入遺伝子を、細胞に組み込み、機能性Ragタンパク質を産生する細胞を得ることができる。ゲノム編集にはまた、欠陥のある内因性遺伝子における変異（たとえば、点変異）の修正、それによって、遺伝子の発現を修復し、障害を処置することも含まれ得る。

30

【0174】

非限定的な例として、本明細書に記載される方法および組成物は、SCIDの処置および/または予防に使用することができる。

【0175】

以下の実施例は、本開示の例示的な実施形態に関し、ここで、ヌクレアーゼは、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を含む。これは、単に例示目的のものにすぎず、他のヌクレアーゼ、たとえば、TALEN、TtAgo、およびCRISPR/Cas系、操作されたDNA結合ドメインを有するホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）、および/もしくは天然に存在するもしくは操作されたホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）のDNA結合ドメインと異種切断ドメインとの融合体、ならびに/またはメガヌクレアーゼとTALEタンパク質との融合体を使用してよいことが、理解されるであろう。たとえば、追加のヌクレアーゼは、配列番号1または2の9～12個の連続したヌクレオチドを含む配列に結合するように設計され得る。

40

【実施例】

【0176】

（実施例1：IL2RGに標的化された亜鉛フィンガータンパク質ヌクレアーゼ（ZFN））

IL2RGに標的化された亜鉛フィンガータンパク質を、設計し、Urnovら、（2005年）、Nature、435巻（7042号）：646～651頁；Perezら、

50

(2008年)、Nature Biotechnology、26巻(7号):808~816頁に本質的に記載され、米国特許第6,534,261号に記載されるように、mRNA、プラスミド、AAV、またはアデノウイルスベクターに取り込ませた。表1は、例示的なIL2RG ZFP DNA結合ドメインのDNA結合ドメイン内の認識ヘリックス、およびこれらのZFPの標的部位を示す(DNA標的部位は、大文字で示し、非接触ヌクレオチドは、小文字で示す)。ZFP認識ヘリックスによって接触される標的部位のヌクレオチドは、大文字で示し、非接触ヌクレオチドは、小文字で示す。また、当該技術分野において公知の方法に従って、表2に示されるIL2RG配列に対して、TALENおよび/またはsgRNAも設計する(たとえば、標的部位は、9~20個またはそれよりも多くの(配列番号1または配列番号2の9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、またはそれよりも多くの)ヌクレオチド(連続的または非連続的)を含む)。たとえば、米国特許第8,586,526号(TALENの正準(canonical)または非正準RVDを使用)および米国特許公開第20150056705号を参照されたい。

【表1】

表 1: IL2RG 亜鉛フィンガータンパク質の認識ヘリックスの設計

SBS 番号	設計					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
55629	QSGNLAR (配列番号 3)	QSGDLTR (配列番号 4)	RSDHLSQ (配列番号 5)	QSNGLTQ (配列番号 6)	TRTVLMN (配列番号 7)	QNATRIN (配列番号 8)
57618	TSGNLTR (配列番号 9)	QSNDLNS (配列番号 10)	YQGVLTR (配列番号 11)	RTDNLES (配列番号 12)	RSDHLSQ (配列番号 5)	RRDNRDT (配列番号 13)
57718	LQSNLNR (配列番号 14)	QSGDLTR (配列番号 4)	RSDHLSQ (配列番号 5)	RKDALPT (配列番号 15)	TTTVLRN (配列番号 16)	QNATRIN (配列番号 8)
57629	TSGNLTR (配列番号 9)	QSNDLNS (配列番号 10)	YQGVLTR (配列番号 11)	RLDNLHP (配列番号 17)	RSDHLSQ (配列番号 5)	RRDNRDT (配列番号 13)

【表2】

表 2:亜鉛フィンガータンパク質の標的部位

SBS 番号	標的部位
55629	ttACAATCATGTGGGCAGAAAttgaaaag (配列番号 1)
57618	gcCAGTGGCAGGCACCAGATctctgtac (配列番号 2)
57718	ttACAATCATGTGGGCAGAAAttgaaaag (配列番号 1)
57629	gcCAGTGGCAGGCACCAGATctctgtac (配列番号 2)

【0177】

ZFN対のすべての組み合わせ(55629と57618、57718と57629、55629と57629、および57718と57618)を、切断活性に関して試験し、活性であることが見出された。これらの設計が、フィンガーモジュールのいずれかの間、および/またはZFPと切断ドメインとの間に、正準もしくは非正準リンカー、またはTGEKP(配列番号18)、TGERG(配列番号19)、TGSQKPリンカー(配列番号20)(フィンガー間)などのリンカー、ならびに/または米国特許第9,394,531号に記載されるようなZFPと切断ドメインとの間のリンカーを含むがこれらに限定されない、任意のリンカーを含み得ることが、明らかである。米国特許第8,772,453号および20150064789も参照されたい。

【 0 1 7 8 】

さらに、ヌクレアーゼ（ZFN、CRISPR/Cas系、およびTALEN）のうちのいずれかは、操作された切断ドメイン、たとえば、米国特許第8,623,618号に開示されるヘテロ二量体（たとえば、ELDおよびKKRの操作された切断ドメイン）ならびに／または米国出願第15/685,580号に記載される416位、422位、447位、448位、および／もしくは525位に1つもしくは複数の変異を有する切断ドメインを含み得る。これらの変異体を、本明細書に記載される例示的なZFP-DNA結合ドメインと併せて使用した。

【 0 1 7 9 】

（実施例2：IL2RG標的化ヌクレアーゼの活性および特異性）

10

表1に示されるZFNを、米国出願第15/685,580号に記載されるように、FokI二量体化変異体およびリン酸変異体を使用して、オンターゲットおよびオフターゲットの両方の標的部位を用いて、活性について評価した。

【 0 1 8 0 】

ZFNを、図1に示されるように、様々な組み合わせで、CD34+において試験した。凍結乾燥した動員末梢血(mPB)CD34+細胞を、100ng/mL SCF、Flt3L、およびTPOを含有するX-VIVO 10培地において解凍し、37℃で2日間増殖させた。次いで、細胞を、ZFNをコードするmRNAとともに、20μg/mLまたは40μg/mLの合計濃度で、BTXデバイスを使用してエレクトロポレーションした。細胞を、培養物中でさらに1日間回復させた後、次世代シーケンシングによるゲノムDNAならびにインデル(NHEJによる挿入および／または欠失)の分析のために、採取した。

20

【 0 1 8 1 】

図1に示されるように、すべてのZFNは、意図された標的部位(オンターゲット)で活性であり、すべてが、オンターゲット部位において、オフターゲット部位よりも高い活性を示した。オンターゲット活性のオフターゲット活性に対する比が最も高かった組み合わせは、57718-nR-5Qabc-KKR-K525Sおよび57629-nR-5Qabc-ELDであった。

【 0 1 8 2 】

したがって、IL2RGに標的化されたFokI変異体(二量体化および／またはリン酸接触)を有するヌクレアーゼは、すべてが、高い特異性で標的遺伝子を切断することができる。

30

【 0 1 8 3 】

（実施例3：ヌクレアーゼ修飾CD34+細胞におけるメチルセルロースアッセイ）

実施例2において処置したCD34+細胞の分化を、既述の標準的な手法(Genove-seら、(2014年)、Nature、510巻(7504号)：235～40頁)を使用して、Methocult誘導性分化により生じるコロニー型のアッセイによって分析する：コロニー形成単位、赤血球(「CFU-E」)；バースト形成単位、赤血球(「BFU-E」)；コロニー形成単位、顆粒球/マクロファージ(「CFU-GM」)、およびコロニー形成単位；顆粒球/赤血球/単球/マクロファージ(「CFU-GEMM」)）。簡単に述べると、CD34+細胞を、ゲノム修飾し、in vitroでの回収を可能にし、次いで、メチルセルロース培地に播種し、2週間分化させた後、コロニーを分析する。

40

【 0 1 8 4 】

本明細書に記載されるIL2RG修飾は、CD34+細胞を著しく損傷することはない。

【 0 1 8 5 】

（実施例4：標的化IL2RGドナー挿入）

IL2RG遺伝子座への標的化組み込みもまた、行う。米国特許公開20160030477に示される例示的なIL2RGおよび／またはRAGドナー構築物を、本明細書に記載されるヌクレアーゼを使用して、CD34+細胞のIL2RGに組み込む。

50

【0186】

細胞株におけるIL2RGの発現は、本明細書に記載されるヌクレアーゼを使用した修正用IL2RG導入遺伝子のヌクレアーゼ媒介性導入によってレスキューされるが、これには、内因性レベルに匹敵するレベルまでIL2RG発現をレスキューすることが含まれる。

【0187】

(実施例5: Ex vivo方法)

既述のように(Aiutiら、(2013年)、Science、341巻、1233151頁)、本明細書に記載されるIL2RGまたはRAG1を発現する、X-SCIDまたはオーメン症候群の被験体から取得した遺伝子修飾された細胞、特に、CD34+HSPC(患者由来のCD34+細胞)を、それぞれ、既述のように(Aiutiら、同書)X-SCIDまたはオーメン症候群の患者に、投与する。

10

【0188】

本明細書において言及されるすべての特許、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入れられる。

【0189】

本開示は、理解の明確さの目的で、例証および例を用いていくらか詳細に提供されているが、当業者であれば、様々な変更および修正が、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく実施され得ることを理解するであろう。したがって、前述の説明および実施例は、制限とみなされるべきではない。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

20

(項目1)

内因性IL2RG遺伝子に1つまたは複数の挿入および/または欠失を含む、T細胞または幹細胞であって、前記挿入および/または前記欠失は、切断ドメインと、配列番号1または配列番号2の9個またはそれよりも多くのヌクレオチドを含む標的部位に結合するDNA結合ドメインとを含むヌクレアーゼによって作製されたものである、T細胞または幹細胞。

(項目2)

前記挿入および/または前記欠失が、前記内因性IL2RG遺伝子を不活性化させる、項目1に記載の細胞。

(項目3)

外因性配列が、前記内因性IL2RG遺伝子に挿入されている、項目1または2に記載の細胞。

30

(項目4)

前記外因性配列が、IL2RGまたはRAGポリペプチドをコードする導入遺伝子を含む、項目3に記載の細胞。

(項目5)

前記内因性IL2RG遺伝子が、変異体遺伝子であり、前記外因性配列が、機能性IL2RGタンパク質が前記細胞から発現されるように、前記内因性IL2RG遺伝子における変異を修正する配列を含む、項目3に記載の細胞。

(項目6)

前記ヌクレアーゼが、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、TALE、またはCRISPR/Casヌクレアーゼである、項目1から5のいずれかに記載の細胞。

40

(項目7)

前記ヌクレアーゼが、ポリヌクレオチドとして前記細胞に導入される、項目1から6のいずれかに記載の細胞。

(項目8)

前記ポリヌクレオチドが、mRNA、ウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、項目7に記載の細胞。

(項目9)

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)である、項目1から

50

8のいずれかに記載の細胞。

(項目10)

前記ZFNが、表1の単一の行に示される認識ヘリックス領域を有するZFPを含む、
項目6から9のいずれかに記載の細胞。

(項目11)

前記細胞が、幹細胞である、項目1から10のいずれかに記載の細胞。

(項目12)

前記幹細胞が、造血幹細胞または人工多能性幹細胞(iPSC)である、項目11に記載の細胞。

(項目13)

項目1から12のいずれかに記載の造血幹細胞を作製する方法であって、ヌクレアーゼを、細胞に導入することを含み、切断後に1つまたは複数の挿入および/または欠失が内因性IL2RG遺伝子に導入されるように、前記ヌクレアーゼが、前記内因性IL2RG遺伝子を切断する、方法。

(項目14)

切断後に内因性配列が前記細胞のゲノムに導入されるように、外因性配列を前記細胞に導入することをさらに含む、項目13に記載の方法。

(項目15)

被験体におけるSCID関連障害を処置または予防する方法であって、前記被験体に、項目3から12のいずれかに記載の造血幹細胞の集団を導入することを含む、方法。

(項目16)

前記SCID関連障害が、X-SCIDまたはオーメン症候群である、項目15に記載の方法。

【図面】

【図1A】

	57618-ELD	57618-nR-5Qabc-ELD	57618-ELD-K525S	57618-nR-5Qabc-ELD-K525S
55629-KKR	55.4875	63.7841	60.7967	47.0317
55629-nR-5Qabc-KKR	71.8443	73.5897	72.6714	72.7644
55629-KKR-K525S	72.4655	70.676	50.7455	38.1496
55629-nR-5Qabc-KKR-K525S	74.6047	79.4453	65.6144	51.5974

	57629-ELD	57629-nR-5Qabc-ELD	57629-ELD-R416S	57629-nR-5Qabc-ELD-R416S
57718-KKR	65.7813	72.0865	65.3743	65.9979
57718-nR-5Qabc-KKR	69.3424	78.8872	73.7846	73.8942
57718-KKR-K525S	72.6883	73.3169	69.5977	54.9762
57718-nR-5Qabc-KKR-K525S	74.4166	79.7116	72.9522	56.1722

Figure 1A

【図1B】

	57618-ELD	57618-nR-5Qabc-ELD	57618-ELD-K525S	57618-nR-5Qabc-ELD-K525S
55629-KKR	1.0092068	0.870587288	6.467183644	17.35935481
55629-nR-5Qabc-KKR	5.6880245	1.777644919	37.84574523	112.6383901
55629-KKR-K525S	6.1197767	2.84506634	33.13667233	58.87283951
55629-nR-5Qabc-KKR-K525S	21.007715	25.65399768	143.8596799	155.7422276

	57629-ELD	57629-nR-5Qabc-ELD	57629-ELD-R416S	57629-nR-5Qabc-ELD-R416S
57718-KKR	4.2660558	4.610585225	11.87371499	134.1420732
57718-nR-5Qabc-KKR	43.551313	32.68580899	182.9975198	172.5290684
57718-KKR-K525S	33.694108	22.73674254	150.8729677	323.5797528
57718-nR-5Qabc-KKR-K525S	561.63472	733.9926335	1093.736132	331.7909037

Figure 1B

【配列表】

0007108608000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/864	(2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z

弁護士 山本 健策

(72)発明者 コンウェイ, アンソニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 8 0 4 , リッチモンド, カナル プールバード 5 0 1 ,
 スイート エー 1 0 0 , サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 3 0 4 7 7 (U S , A 1)

Nature , Vol.435 , 2005年 , p.646-651

Nature Biotechnology , 2007年 , Vol.25, No.11 , p.1298-1306

Nature , 2014年 , Vol.510 , p.235-240, Online Content

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

C 1 2 N 5 / 0 7 8 9

A 6 1 K 3 5 / 2 8

A 6 1 K 3 5 / 7 6

A 6 1 P 3 7 / 0 4

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 1 2

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 1 2 N 1 5 / 8 6 4

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 / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)