

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-518142

(P2016-518142A)

(43) 公表日 平成28年6月23日 (2016.6.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16 Z	4 B O 5 O
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁)		

(21) 出願番号 特願2016-513016 (P2016-513016)
(86) (22) 出願日 平成26年5月6日 (2014.5.6)
(85) 翻訳文提出日 平成27年12月25日 (2015.12.25)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/036972
(87) 国際公開番号 W02014/182700
(87) 国際公開日 平成26年11月13日 (2014.11.13)
(31) 優先権主張番号 61/821, 872
(32) 優先日 平成25年5月10日 (2013.5.10)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508241200
サンガモ バイオサイエンシース, 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 リッ
チモンド カナル プールバード 501
ポイント リッチモンド テク センタ
ー スト エー100

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヌクレアーゼ媒介ゲノム遺伝子操作のための送達方法および組成物

(57) 【要約】

細胞のゲノム中への遺伝子操作されたヌクレアーゼおよびドナー分子の送達のための方法および組成物が、本明細書に開示される。具体的には、記載されている方法および組成物は、DNAミニサークル組成物および細胞への核酸（例えば、治療核酸）の送達のためのDNAミニサークル（「MC」）の使用に関する。これらのDNA MCによって改変された細胞もまた提供される。本明細書に記載されるDNA MCは、1種もしくは複数の外因性配列（例えば、導入遺伝子）および/または1種もしくは複数のヌクレアーゼコード配列を含み得る。

Plasmid donor pSU
5.2kb




Figure 1 A.

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞のゲノム中の選択された遺伝子中への導入遺伝子の標的化された組込みのための方法であって、

前記細胞に少なくとも 1 種のヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを投与するステップであって、前記ヌクレアーゼが前記細胞中で発現される場合、前記選択された遺伝子が開裂される、ステップと、

外因性配列を含む DNA ミニサークル (DNA MC) を前記細胞に投与するステップであって、前記ヌクレアーゼによる開裂後、前記外因性配列が、前記選択された遺伝子中に組み込まれる、ステップと

を含む方法。

【請求項 2】

前記 DNA MC が、前記外因性配列に隣接する、前記選択された遺伝子に対して相同性の領域をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 種のヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALE エフェクタードメインヌクレアーゼ (TALEN) および / または CRISPR / Cas ヌクレアーゼ系からなる群から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記外因性配列が、タンパク質コード配列、shRNA 配列、RNAi 配列または miRNA 配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記タンパク質コード配列が、抗体、抗原、酵素、増殖因子、細胞表面受容体、核受容体、ホルモン、リンホカイン、サイトカイン、レポーターまたはそれらの組合せをコードする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 DNA MC が、前記外因性配列の発現を駆動するプロモーターを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 種のヌクレアーゼをコードする前記ポリヌクレオチドが、mRNA、DNA MC、プラスミドベクターまたはウイルスベクターを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記選択された遺伝子がセーフハーバー遺伝子である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞が、哺乳動物細胞または植物細胞である、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞が幹細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法によって作製された細胞または細胞株。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の細胞から作製された遺伝子導入生物。

【請求項 13】

外因性配列のヌクレアーゼ媒介性の組込みを介した改変を受けている細胞において、毒性効果を低下させるための方法であって、請求項 1 に記載の方法に従って前記外因性配列を組み込むステップを含み、それによって、前記毒性効果が、前記外因性配列がプラスミドまたはウイルスベクターを使用して送達される細胞と比較して低下される、方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

対象において外因性配列を発現させる方法であって、
外因性配列を、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法に従って細胞中に組み込むステップと、

前記細胞が前記対象において前記外因性配列を発現するように、前記対象に前記細胞を投与するステップと
を含む方法。

【請求項 15】

前記細胞が幹細胞である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記幹細胞が造血幹細胞（HSC）であり、前記細胞が骨髓移植において投与される、
請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記対象が、前記細胞を投与する前に、骨髓破壊的前処理を受ける、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法を実施するためのキットであって、前記外因性配列を含む前記 DNA MC を含むキット。

【請求項 19】

少なくとも 1 種のヌクレアーゼをコードする 1 種または複数のポリヌクレオチド、細胞、試薬およびそれらの組合せをさらに含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

タンパク質コード配列、shRNA 配列、RNAi 配列および miRNA 配列からなる群から選択される配列を含む、DNA ミニサークル（DNA MC）であって、前記配列には、内因性遺伝子に対して相同性の領域が隣接する、DNA ミニサークル。

【請求項 21】

少なくとも 1 種のヌクレアーゼをコードする配列を含む DNA MC。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2013 年 5 月 10 日に出版された米国仮特許出願第 61/821,872 号の利益を主張し、その開示はその全体が本明細書に参考として援用される。

【0002】

技術分野

本開示は、ゲノム遺伝子操作、特に、細胞のゲノムの標的化された改変の分野にある。

【背景技術】

【0003】

ゲノム DNA の標的化された開裂のための種々の方法および組成物が説明されてきた。かかる標的化された開裂事象を使用して、例えば、標的化された突然変異誘発を誘導し、細胞 DNA 配列の標的化された欠失を誘導し、所定の染色体遺伝子座における標的化された組換えを容易にすることができる。例えば、あらゆる目的でその開示が参照によりその全体が組み込まれる、米国特許第 7,888,121 号；第 7,972,854 号；第 7,914,796 号；第 7,951,925 号；第 8,110,379 号；第 8,409,861 号；第 8,586,526 号；米国特許出願公開第 20030232410 号；第 20050208489 号；第 20050026157 号；第 20050064474 号；第 20060063231 号；第 201000218264 号；第 20120017290 号；第 20110265198 号；第 20130137104 号；第 20130122591 号；第 20130177983 号および第 20130177960 号ならびに米国仮特許出願第 61/823,689 号を参照されたい。これらの方法は、多くの場合、非相同末端結合（NHEJ）等、エラープロードン過程による切断の修復または修復鋳型

10

20

30

40

50

を使用した修復（相同組換え修復またはHDR）が、遺伝子のノックアウトまたは目的の配列の挿入（標的化組込み）をもたらし得るような、標的DNA配列に二本鎖切断（DSB）またはニックを誘導するための遺伝子操作された開裂系の使用に關与する。遺伝子操作されたジンク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）等、特異的ヌクレアーゼの使用により、あるいは特異的開裂をガイドするための遺伝子操作されたcrRNA/tracrRNA（「単一ガイドRNA」）によるCRISPR/Cas系を使用して、開裂を生じることができる。遺伝子操作されたヌクレアーゼを使用して改変された細胞を使用する臨床試験は、治療的有用性を実証している（例えば、Tebasら（2014年）New Eng J Med 370巻（10号）：901頁を参照されたい）。

10

上述のヌクレアーゼ系の1つを使用する標的化された開裂は、HDRまたはNHEJ媒介性の過程のいずれかを使用して、特異的標的位置に核酸を挿入するために利用できる。しかし、細胞にヌクレアーゼ系およびドナーの両方を送達することは、問題であり得る。例えば、細胞中へのプラスミドの形質導入によるドナーまたはヌクレアーゼの送達は、レシピエント細胞、特に、初代細胞であり、したがって細胞株由来の細胞ほどには頑強でない細胞に対して、毒性であり得る。プラスミドDNAは、細菌におけるその産生に必要ないくつかの要素を含有し、哺乳動物細胞にとって外来であるとしてこのプラスミドをマークする修飾に供される。したがって、プラスミドDNAのヒト細胞中へのトランスフェクションまたはヌクレオフェクションは、毒性を引き起こし得る。実際、ゲノムの遺伝子操作およびトランスジェニック挿入は、多くの場合、DNA構築物の毒性に少なくとも一部起因して、不十分な過程である。

20

DNAミニサークル（MC）は、複製起点も抗生物質選択マーカ어도有さない、非ウイルス性遺伝子移入に使用され得るスーパーコイルDNA分子である。これらのDNAは、細菌DNAを欠き、したがって、細菌DNAにおいて見出される非メチル化CpGモチーフを欠く。これらのCpGモチーフは、抗原提示細胞上のToll様受容体9受容体に結合することによって、哺乳動物において自然免疫応答を活性化することが示されている。したがって、細菌由来のDNA配列を含有する遺伝子療法のためのDNAの使用は、細菌配列を欠くDNAよりも炎症性であり得る。MCは、一部の遺伝子療法適用において使用される標準的なプラスミドよりも小さく、標準的なプラスミド（Darquetら（1999年）Gene Therapy 6巻：209～218頁）およびT細胞（Sharmaら（2013年）Molecular Therapy - Nucleic Acids 2巻 e74頁）よりも、両方の細胞株中により効率的にトランスフェクトされる。さらに、DNA MCは、植物細胞による直接的DNA取り込み、またはAgrobacterium媒介性の形質転換もしくは受動的取り込み；エレクトロポレーションの使用；ポリエチレングリコールによる処理；電気泳動；リボソームまたはスフェロプラストとの細胞融合；マイクロインジェクション、シリコンカーバイドウィスカーおよび微粒子銃等の標準的な技術の使用のいずれかによる、植物細胞形質転換に有用である（米国特許出願公開第20120042409号）。MCは、attB部位とattF部位との間のファージインテグラーゼC31媒介性の部位特異的組換えの利用によって作製され得（Darquet、同書を参照されたい）、大規模で産生され得る。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許第7,888,121号明細書

【特許文献2】米国特許第7,972,854号明細書

【特許文献3】米国特許第7,914,796号明細書

【特許文献4】米国特許第7,951,925号明細書

【特許文献5】米国特許第8,110,379号明細書

【特許文献6】米国特許第8,409,861号明細書

【特許文献7】米国特許第8,586,526号明細書

50

【特許文献 8】米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 2 3 2 4 1 0 号明細書
 【特許文献 9】米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 0 8 4 8 9 号明細書
 【特許文献 1 0】米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 2 6 1 5 7 号明細書
 【特許文献 1 1】米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 6 4 4 7 4 号明細書
 【特許文献 1 2】米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 6 3 2 3 1 号明細書
 【特許文献 1 3】米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 2 1 8 2 6 4 号明細書
 【特許文献 1 4】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 1 7 2 9 0 号明細書
 【特許文献 1 5】米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 6 5 1 9 8 号明細書
 【特許文献 1 6】米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 3 7 1 0 4 号明細書
 【特許文献 1 7】米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 2 2 5 9 1 号明細書
 【特許文献 1 8】米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 7 9 8 3 号明細書
 【特許文献 1 9】米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 7 9 6 0 号明細書
 【特許文献 2 0】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 4 2 4 0 9 号明細書

10

【非特許文献】

【0 0 0 5】

【非特許文献 1】T e b a s ら (2 0 1 4 年) N e w E n g J M e d 3 7 0 巻 (1 0 号) : 9 0 1 頁

【非特許文献 2】D a r q u e t ら (1 9 9 9 年) G e n e T h e r a p y 6 巻 : 2 0 9 ~ 2 1 8 頁

【非特許文献 3】S h a r m a ら (2 0 1 3 年) M o l e c u l a r T h e r a p y - N u c l e i c A c i d s 2 巻 e 7 4 頁

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

したがって、毒性が低く、現在利用可能な方法よりも効率的な、細胞へのヌクレアーゼ媒介性のゲノム遺伝子操作に必要な核酸の送達のための組成物および方法が、いまだ必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 7】

本発明は、遺伝子療法およびゲノム遺伝子操作における使用のための組成物および方法を記載する。具体的には、記載されている方法および組成物は、DNA ミニサークル組成物および細胞への核酸（例えば、治療核酸）の送達のための DNA ミニサークル（「MC」）の使用に関する。これらの DNA MC によって改変された細胞もまた提供される。本明細書に記載される DNA MC は、1 種もしくは複数の外因性配列（例えば、導入遺伝子）および / または 1 種もしくは複数のヌクレアーゼコード配列を含み得る。任意選択で、相同性の領域が、外因性配列（複数可）および / またはヌクレアーゼコード配列と隣接する。DNA MC によって送達される核酸は、宿主細胞における標的 DNA の部位特異的開裂のためのヌクレアーゼ系を含み得る。DNA MC を使用して標的細胞に送達され得るドナー（外因性）核酸、およびこれらの DNA MC ドナーを使用してゲノム中に組み込まれた配列を含む細胞もまた、本発明によって想定される。

30

40

【0 0 0 8】

一部の態様では、本発明は、標的遺伝子座において開裂を生じるための、標的細胞へのヌクレアーゼの送達を含む。一部の実施形態では、本発明は、DNA MC を使用した、1 種または複数のヌクレアーゼ（例えば、ジンク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）および / または CRISPR / Cas 系）をコードする核酸の送達を含む。適切な標的細胞との接触の際に、この DNA MC は、その細胞によって取り込まれ、標的 DNA が、発現されたヌクレアーゼによって開裂される。

【0 0 0 9】

他の態様では、本発明は、標的細胞への送達のためのドナー核酸を含む。ドナー核酸は

50

、細胞のゲノム、例えば内因性遺伝子座中に組み込まれる外因性配列（導入遺伝子）を含む。ある特定の態様では、ドナーは、任意の細菌プラスミドDNA骨格のほとんどまたは全てを欠く（例えば、欠如する）ミニサークルDNA（DNA MC）、即ち、環状発現カセット上に保有される。一部の実施形態では、ドナーは、標的化された開裂部位との相同性の領域（相同性アーム）が隣接する、全長遺伝子を含む。一部の実施形態では、ドナーは、相同な領域を欠き、相同性非依存的機構（即ち、NHEJ）によって標的遺伝子座中に組み込まれる。他の実施形態では、ドナーは、細胞における使用のため（即ち、遺伝子補正のため）の相同な領域が隣接する、核酸のより小さい一片を含む。一部の実施形態では、ドナーは、機能的または構造的構成成分、例えば、shRNA、RNAi、miRNAなどをコードする遺伝子を含む。ヌクレアーゼを使用して標的部位中に組み込まれた導入遺伝子を含む細胞もまた、提供される。

10

【0010】

ドナー分子の目的の配列は、プロモーターありまたはなしで、機能的ポリペプチドをコードする1種または複数の配列（例えば、cDNA）を含み得る。ある特定の実施形態では、核酸配列は、抗体、抗原、酵素、増殖因子、受容体（細胞表面または核）、ホルモン、リンホカイン、サイトカイン、レポーター、上記のいずれかの機能的断片、および上記の組合せをコードする配列を含む。機能的ポリペプチドコード配列がプロモーターなしである実施形態では、組み込まれた配列の発現は、次いで、目的の領域中の内因性プロモーターまたは他の制御エレメントによって駆動される転写によって確実にされる。他の実施形態では、「タンデム」カセットが、選択された部位中にこの様式で組み込まれ、カセットの第1の構成成分は、上記のようにプロモーターなし配列を含み、その後転写終結配列、および自律的発現カセットをコードする第2の配列が続く。2Aペプチド、SA部位、IRES等をコードする配列が含まれるがこれらに限定されないさらなる配列（コード配列または非コード配列）が、相同性アーム間で、ドナー分子中に含まれ得る。

20

【0011】

別の態様では、相同性非依存的機構によって細胞のゲノム中にドナー核酸を組み込む方法が、本明細書に記載される。これらの方法は、細胞のゲノム中に二本鎖切断（DSB）を生じるステップと、ヌクレアーゼを使用してドナー分子を開裂させるステップとを含み、その結果、ドナー核酸は、DSBの部位において組み込まれる。ある特定の実施形態では、ドナー核酸は、相同性非依存的な方法（例えば、NHEJ）によって組み込まれる。上述のように、*in vivo*開裂の際に、これらのドナー配列は、DSBの位置において、細胞のゲノム中に標的化された様式で組み込まれ得る。ドナー配列は、DSBを生じさせるために使用される1種または複数のヌクレアーゼと同じ1つまたは複数の標的部位を含み得る。したがって、ドナー配列は、組込みが望まれる内因性遺伝子を開裂させるために使用されるのと同じ1種または複数のヌクレアーゼによって開裂され得る。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、DSBを誘導するために使用されるヌクレアーゼとは異なるヌクレアーゼ標的部位を含む。標的細胞のゲノム中のDSBは、任意の機構によって生じ得る。ある特定の実施形態では、DSBは、1種または複数のジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、目的の領域内の配列に結合するように遺伝子操作されたジンクフィンガー結合ドメインを含む融合タンパク質、および開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインによって生じる。他の実施形態では、DSBは、ヌクレアーゼドメインに融合された1つまたは複数のTALE DNA結合ドメイン（天然起源または非天然起源）（TALEN）によって生じる。なおさらなる実施形態では、DSBは、遺伝子操作された単一ガイドRNAまたはその機能的相当部分がゲノム中の標的化された部位にこのヌクレアーゼをガイドするために使用される、CRISPR/Casヌクレアーゼ系を使用して生じる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼ（複数可）および/またはドナーは、DNA MCを使用して細胞に送達される。

30

40

【0012】

他の態様では、ヌクレアーゼ（複数可）は、セーフハーバー遺伝子、例えば、哺乳動物細胞におけるCCR5遺伝子、Hprt遺伝子、PPP1R12C（AAVS1としても

50

公知) 遺伝子または R o s a 遺伝子、および植物における Z p 1 5 遺伝子座に結合および / またはそれらを開裂する。例えば、米国特許第 7 , 9 5 1 , 9 2 5 号 ; 第 8 , 1 1 0 , 3 7 9 号および第 8 , 3 2 9 , 9 8 6 号 ; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 1 5 9 9 9 6 号 ; 第 2 0 1 0 0 0 2 1 8 2 6 4 号 ; 第 2 0 1 0 0 2 9 1 0 4 8 号 ; 第 2 0 1 2 0 0 1 7 2 9 0 号 ; 第 2 0 1 1 0 2 6 5 1 9 8 号 ; 第 2 0 1 3 0 1 3 7 1 0 4 号 ; 第 2 0 1 3 0 1 2 2 5 9 1 号 ; 第 2 0 1 3 0 1 7 7 9 8 3 号および第 2 0 1 3 0 1 7 7 9 6 0 号ならびに米国仮特許出願第 6 1 / 8 2 3 , 6 8 9 号を参照されたい。一部の実施形態では、ヌクレアーゼ (複数可) は、導入遺伝子 (例えば、アルブミン) の発現を指向するための部位に結合および / またはそれを標的化する。例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 3 0 1 7 7 9 8 3 号および第 2 0 1 3 0 1 7 7 9 6 0 号を参照されたい。

10

【 0 0 1 3 】

一態様では、DNA MC は、目的の遺伝子に結合、および / またはその発現をモジュレートするために、目的の調節タンパク質 (例えば、ZFP TF、TALE TF または CRISPR / Cas TF) を送達するために使用される。一実施形態では、調節タンパク質は、DNA 配列に結合し、他の調節因子の結合を防止する。別の実施形態では、調節タンパク質の結合は、標的 DNA の発現をモジュレート (即ち、誘導または抑制) し得る。

【 0 0 1 4 】

別の態様では、外因性配列 (ドナー) のヌクレアーゼ媒介性の組込みによって改変された細胞における毒性効果 (毒性) を低下させるための方法であって、DNA MC を使用してヌクレアーゼコード配列および / または外因性配列 (ドナーまたは導入遺伝子) を投与するステップであって、それによって、細胞における毒性は、外因性配列がプラスミドベクターまたはウイルスベクターを使用して導入される細胞と比較して、低下されるステップを含む方法が、本明細書に記載されている。一部の実施形態では、ドナー配列は、DNA MC 上に保有され、ヌクレアーゼ (複数可) は、mRNA 形態で送達される。他の実施形態では、ドナー配列は、DNA MC 上に保有され、ヌクレアーゼは、プラスミドまたはウイルスベクター (例えば、アデノウイルス、AAV 等) 上に保有される。なおさらなる実施形態では、ヌクレアーゼ (複数可) およびドナーの両方が、DNA MC 上に保有される。

20

【 0 0 1 5 】

なお別の態様では、本明細書に記載される DNA MC を含む細胞もしくは細胞株、または本明細書に記載される 1 種もしくは複数の DNA MC を使用して作製された遺伝子改変を含むかかる細胞の子孫が、本明細書に記載される。

30

【 0 0 1 6 】

本明細書に記載される方法および組成物 (例えば、細胞) のいずれかでは、細胞は、任意の真核生物細胞、例えば、植物細胞もしくは哺乳動物細胞、または COS、CHO (例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHO-K1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2 / 0-Ag14、HeLa、HEK293 (例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T) および perC6 細胞を含む細胞株、ならびに昆虫細胞、例えば、Spodoptera fugiperda (Sf)、あるいは真菌細胞、例えば、Saccharomyces、Pichia および Schizosaccharomyces であり得る。ある特定の実施形態では、細胞株は、CHO、MDCK または HEK293 細胞株である。適切な細胞には、例として、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、造血幹細胞 (例えば、CD34+)、神経幹細胞および間葉系幹細胞などの幹細胞も含まれる。

40

【 0 0 1 7 】

他の態様では、動物モデルの生成のためおよび / または状態の処置もしくは予防のために本明細書に記載される細胞を使用する方法が、記載される。ある特定の実施形態では、遺伝子改変された血液細胞前駆体 (「HSC」) として公知の造血幹細胞が、骨髓移植に

50

において与えられ、これらのHSCは、対象（例えば、動物モデルまたはヒト）において、*in vivo*で分化および成熟する。一部の実施形態では、これらのHSCは、G-CSF誘導された動員の後に単離され、他の実施形態では、これらの細胞は、ヒト骨髓または臍帯から単離される。一部の態様では、これらのHSCは、特定の遺伝子または調節配列をノックアウトするように設計されたヌクレアーゼによる処理によって編集される。他の態様では、これらのHSCは、野生型遺伝子もしくは他の目的の遺伝子が挿入および発現され、ならびに／または内因性の異常な遺伝子が補正されるように、遺伝子操作されたヌクレアーゼとドナー核酸とで改変される。一部の実施形態では、これらの改変されたHSCは、穏やかな骨髓破壊的前処理の後に対象（患者）に投与される。他の態様では、移植後に、造血細胞の100%が改変されたHSCに由来するように、これらのHSCは、完全な骨髓破壊後に投与される。さらに、細胞は、細胞周期のG2期において停止され得る。

10

【0018】

本明細書に記載される方法および組成物の一部の実施形態では、細胞は、CHO細胞など、効率的な相同性ベースのDNA修復を欠く細胞であり得る。ある特定の実施形態では、これらの細胞は、NHEJ DNA修復経路を優先的に使用する初代細胞または非分裂細胞であり得る。

【0019】

一部の実施形態では、本発明の方法および組成物は、植物細胞を含む。一部の実施形態では、これらの植物細胞は、本発明のヌクレアーゼを含む。他の実施形態では、これらの植物細胞は、導入遺伝子をさらに含む。一部の実施形態では、ヌクレアーゼ（複数可）および／または導入遺伝子は、DNA MCによって植物細胞中に導入される。なお別の態様では、植物細胞のゲノム中に1種または複数の外因性配列を導入するための方法であって、（a）細胞を、1種または複数の外因性配列（ドナーベクター、導入遺伝子またはGOI）と接触させるステップと；（b）本明細書に記載される1種または複数のヌクレアーゼ（例えば、ZFN、TALENまたはCRISPR/Cas系）を細胞において発現させるステップであって、1種または複数のヌクレアーゼは、染色体DNAを開裂するステップとを含み；その結果、ステップ（b）中の染色体DNAの開裂は、相同組換えによるゲノム中へのドナーベクターの取り込みを刺激する方法が本明細書に記載されている。複数の導入遺伝子が、同時に（並行して）組み込まれ得、またはこれらのステップは、導入遺伝子の連続的付加（導入遺伝子スタッキング）のために反復され得る。

20

30

【0020】

本明細書に記載される組成物（細胞または植物）または方法のいずれかでは、植物細胞は、単子葉植物細胞または双子葉植物細胞を含み得る。ある特定の実施形態では、植物細胞は、作物植物、例えば、トマト（または他の果実作物）、ジャガイモ、トウモロコシ、ダイズ、アルファルファ等である。

【0021】

なおさらなる一態様では、本明細書に記載された方法のいずれかに従って得られた動物細胞または植物細胞もまた提供される。

【0022】

別の態様では、本明細書に記載される植物細胞を含む植物が、本明細書で提供される。さらに別の態様では、本明細書に記載される動物細胞を含む動物が、本明細書で提供される。

40

【0023】

別の態様では、本明細書に記載されるように得られた植物細胞を含む植物由来の種子が、本明細書で提供される。

【0024】

別の態様では、本明細書に記載されるように得られた植物細胞を含む植物由来の果実が、本明細書で提供される。

【0025】

50

一部の実施形態では、トランスジェニックの細胞、植物および/または動物は、ヒト遺伝子をコードする導入遺伝子を含む。一部の例では、トランスジェニック動物は、外因性導入遺伝子に対応する内因性遺伝子座においてノックアウトを含み、それによって、ヒトタンパク質が単離状態で研究され得る *in vivo* 系の開発を可能にする。かかるトランスジェニックモデルは、小分子もしくは大きい生体分子または目的のヒトタンパク質と相互作用し得るもしくは目的のヒトタンパク質を改変し得る他の実体を同定するために、スクリーニング目的で使用され得る。一部の態様では、導入遺伝子は、本明細書に記載される方法のいずれかによって得られた幹細胞（例えば、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、造血幹細胞等）または動物胚中に、選択された遺伝子座（例えば、セーフハーバー）中に組み込まれ、次いで、胚は、生きた動物が出生するように移植される。次いで、動物は、性的成熟になるまで育てられ、子孫を生じるようになり、ここで、子孫の少なくとも一部は、編集された内因性遺伝子配列または組み込まれた導入遺伝子を含む。

10

【0026】

本発明の DNA MC 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 DNA MC（例えば、RNA 分子、または適切な発現ベクター中に含有される ZFN、TALEN もしくは CRISPR/Cas 系コード遺伝子）、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、適切な宿主細胞株、本発明の方法を実施するための指示書などを含み得る。これらの DNA MC は、キット中での使用のための目的のドナー分子もまた含み得る。

20

【0027】

これらおよび他の態様は、全体としての開示を踏まえて、当業者に容易に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1のパネルA～Eは、使用したドナー構築物（A～E）の模式図である。構築物を、MCドナーを標準的なプラスミドドナーまたはPCR産物と比較するために作製した。図1Aは、ヒトCCR5遺伝子中の標的化された部位にGFP導入遺伝子（「GFP」）を送達するための、8.2Kbである、「P2U」と称されるプラスミドドナーを示す模式図である。このプラスミドは、ヒトCCR5遺伝子と相同な、CCR5 ZFN対の標的部位に隣接する、2つの領域を有する。GFPの右側の相同性領域は、1.5Kbであるが、GFPの左側の相同性領域は、0.5Kbである。GFPの発現は、UbCプロモーターによって駆動され、この構築物は、ポリアデニル化シグナル配列（「pA」）もまた含む。細菌複製起点およびアンピシリン抵抗性遺伝子を含むプラスミド骨格配列は、実線の曲線によって示される。図1Bは、約4.5Kbである、コンパレーターMCドナーM2Uを示す。このMCは、P2Uプラスミドと同じ導入遺伝子およびCCR5相同性アーム特徴を有するが、最終産物中には細菌プラスミド骨格を欠如する。その代わり、このMCは、破線によって示される、M2Uの構築後に残留するおよそ150塩基対の非細菌起源の残存するプラスミド配列（例えば、およそ36塩基対のattR組換え部位、および特異的MCの構築を促進する「マルチクロニング部位」と呼ばれる変動する長さの配列）を含有する。図1Cは、およそ4.3Kbである、ドナー送達にも使用される直鎖状ドナーPCR産物（「PCR2U」）を示す。PCR2Uは、P2UおよびM2Uについて上記したのと同じ導入遺伝子およびCCR5相同性アーム特徴を有するが、細菌配列も残存するプラスミド配列も含有しない。図1Dは、右の相同性アームがおよそ0.5Kbまで短縮されており、PGKプロモーターがGFPを駆動するために使用されることを除いて、図1Aに示されるプラスミドドナーと類似した、「P1P」と称されるプラスミドドナー構築物（6.1Kb）を示す。図1Eは、細菌骨格配列が除去されており、破線によって示される、およそ150bpのDNAの残存する領域のみがMCを作製する過程から残留する、2.6Kbである「M1P」と称されるP1PのMC相当部分を示す。

30

40

【0029】

【図2-1】図2のパネルA～Cは、MCドナーと比較して、標準的なプラスミドドナー

50

を使用したエレクトロポレーション後のヒトHSCにおける細胞毒性に関する結果を示す。ZFNは、存在する場合、*in vitro*で転写されたmRNAから発現させた。図2Aは、エレクトロポレーション後の毒性に対する標準的なプラスミドドナーP2U対M1Pの比較を示す。示される値は、7-アミノ-アクチノマイシンD(7-AAD)排除によってアッセイした、培養物中に維持された未処理のHSCにおいて生じる細胞死のレベルと比較して、HSC中への示された構築物の導入によって引き起こされる細胞死におけるパーセント増加を示す。7-AADは、二本鎖核酸内にインターカレートし、生細胞によって排除されるが、瀕死または死細胞の細胞膜を浸透し得る。独立した実験の数もまた示される($n =$)。図2Bは、プラスミドドナーP2Uと、M2Uおよび直鎖状PCR産物ドナーPCR2Uとの比較を示す。示される値は、未処理のHSCと比較した細胞死におけるパーセント増加を示す。図2Cは、プラスミドドナーP2UまたはMCドナーM2Uの投与の2時間後の、示された遺伝子(IFN、ISG15、ISG56、ISG54およびCXCL10)の発現の増加倍率を示す。これらの遺伝子の発現の迅速な誘導は、導入された核酸の外来としての感知から生じ、細胞毒性をもたらす。

【図2-2】図2のパネルA~Cは、MCドナーと比較して、標準的なプラスミドドナーを使用したエレクトロポレーション後のヒトHSCにおける細胞毒性に関する結果を示す。ZFNは、存在する場合、*in vitro*で転写されたmRNAから発現させた。図2Aは、エレクトロポレーション後の毒性に対する標準的なプラスミドドナーP2U対M1Pの比較を示す。示される値は、7-アミノ-アクチノマイシンD(7-AAD)排除によってアッセイした、培養物中に維持された未処理のHSCにおいて生じる細胞死のレベルと比較して、HSC中への示された構築物の導入によって引き起こされる細胞死におけるパーセント増加を示す。7-AADは、二本鎖核酸内にインターカレートし、生細胞によって排除されるが、瀕死または死細胞の細胞膜を浸透し得る。独立した実験の数もまた示される($n =$)。図2Bは、プラスミドドナーP2Uと、M2Uおよび直鎖状PCR産物ドナーPCR2Uとの比較を示す。示される値は、未処理のHSCと比較した細胞死におけるパーセント増加を示す。図2Cは、プラスミドドナーP2UまたはMCドナーM2Uの投与の2時間後の、示された遺伝子(IFN、ISG15、ISG56、ISG54およびCXCL10)の発現の増加倍率を示す。これらの遺伝子の発現の迅速な誘導は、導入された核酸の外来としての感知から生じ、細胞毒性をもたらす。

【0030】

【図3-1】図3のパネルA~Dは、ヒトHSCの引き続く生着および*in vivo*でのCD45+白血球への分化に対する、プラスミドおよびMCドナーの影響を示す。図3Aは、NSGマウスにおけるHSCの生着後に生じたヒトCD45+細胞レベルを示し、前駆体HSCは、ZFN mRNA単独、または標準的なプラスミドドナーP2UもしくはMC DNAドナーM1Pと組み合わせたZFN mRNAのいずれかで処理されている。各点は、生着後のNSGマウスの末梢血中のヒトCD45+細胞数を示し、測定値は、生着の4、8、12、16および20週間後の時点で取得し；ならびに20週目の剖検時におけるマウスの骨髄および脾臓において取得した。図3Bは、別々のコホートのマウスを用いた、図3Aで示したのと類似のデータを示す。図3Cは、細胞の導入の8週間後または12週間後のいずれかの時点においてNSGマウスの血液において測定した、P1PまたはM1Pのいずれかと組み合わせてZFN mRNAでヌクレオフェクトされたHSCを用いたマウスの生着から生じたヒトCD45+白血球集団の全体的生着レベルを示す。図3Dは、これらのヒトCD45+細胞集団内の、それぞれ、分化したCD19+B細胞、CD4 T細胞およびCD8 T細胞の頻度を示す。5%よりも高いヒトCD45+細胞を有する血液試料だけが、これらのサブセット分析において合理的に使用されるのに十分な細胞を提供し、図3C中に示されるように、P1P血液試料はこの閾値を満たさない。

【図3-2】図3のパネルA~Dは、ヒトHSCの引き続く生着および*in vivo*でのCD45+白血球への分化に対する、プラスミドおよびMCドナーの影響を示す。図3Aは、NSGマウスにおけるHSCの生着後に生じたヒトCD45+細胞レベルを示し、

前駆体 H S C は、Z F N m R N A 単独、または標準的なプラスミドドナー P 2 U もしくは M C D N A ドナー M 1 P と組み合わせた Z F N m R N A のいずれかで処理されている。各点は、生着後の N S G マウスの末梢血中のヒト C D 4 5 + 細胞数を示し、測定値は、生着の 4、8、12、16 および 20 週間後の時点で取得し；ならびに 20 週目の剖検時におけるマウスの骨髄および脾臓において取得した。図 3 B は、別々のコホートのマウスを用いた、図 3 A で示したのと類似のデータを示す。図 3 C は、細胞の導入の 8 週間後または 12 週間後のいずれかの時点において N S G マウスの血液において測定した、P 1 P または M 1 P のいずれかと組み合わせて Z F N m R N A でヌクレオフェクトされた H S C を用いたマウスの生着から生じたヒト C D 4 5 + 白血球集団の全体的生着レベルを示す。図 3 D は、これらのヒト C D 4 5 + 細胞集団内の、それぞれ、分化した C D 1 9 + B 細胞、C D 4 T 細胞および C D 8 T 細胞の頻度を示す。5 % よりも高いヒト C D 4 5 + 細胞を有する血液試料だけが、これらのサブセット分析において合理的に使用されるのに十分な細胞を提供し、図 3 C 中に示されるように、P 1 P 血液試料はこの閾値を満たさない。

【 0 0 3 1 】

【図 4 - 1】図 4 のパネル A ~ C は、導入遺伝子が M 1 P、P 2 U、P 1 P、M 2 U または P C R 2 U によって提供される場合の、H S C における相同組換えを介した導入遺伝子組込みの比率を示すグラフである。図 4 A は、Z F N の共発現ありおよびなしの両方の、P 2 U プラスミドと M C ドナー M 1 P との比較を示し、G F P を発現する細胞のパーセントを、ヌクレオフェクションの後経時的に F A C S によって測定した。遺伝子付加は非常に稀な事象であるので、Z F N の非存在下では、培養物中で 4 日目までに、背景レベルの G F P 発現のみが存在する。かなり高いレベルの G F P 遺伝子付加は、Z F N もまた存在する場合に生じ、M C ドナー M 1 P は、平均して、プラスミドドナー P 2 U と比較して、3 倍超高い比率を生じる（右側のグラフ）。図 4 B は、P 1 P と M 1 P との比較を示すが、図 4 C は、P 2 U と M 2 U および P C R 2 U との比較を示す。全ての場合において、これらの D N A M C ドナーは、プラスミドまたは P C R ドナーよりも、より良いレベルの標的化された組込みを生じた。

【図 4 - 2】図 4 のパネル A ~ C は、導入遺伝子が M 1 P、P 2 U、P 1 P、M 2 U または P C R 2 U によって提供される場合の、H S C における相同組換えを介した導入遺伝子組込みの比率を示すグラフである。図 4 A は、Z F N の共発現ありおよびなしの両方の、P 2 U プラスミドと M C ドナー M 1 P との比較を示し、G F P を発現する細胞のパーセントを、ヌクレオフェクションの後経時的に F A C S によって測定した。遺伝子付加は非常に稀な事象であるので、Z F N の非存在下では、培養物中で 4 日目までに、背景レベルの G F P 発現のみが存在する。かなり高いレベルの G F P 遺伝子付加は、Z F N もまた存在する場合に生じ、M C ドナー M 1 P は、平均して、プラスミドドナー P 2 U と比較して、3 倍超高い比率を生じる（右側のグラフ）。図 4 B は、P 1 P と M 1 P との比較を示すが、図 4 C は、P 2 U と M 2 U および P C R 2 U との比較を示す。全ての場合において、これらの D N A M C ドナーは、プラスミドまたは P C R ドナーよりも、より良いレベルの標的化された組込みを生じた。

【 0 0 3 2 】

【図 5】図 5 のパネル A ~ C は、「i n - o u t」P C R アッセイによってアッセイした、ドナーが P 2 U、M 1 P、P 2 U または M 2 U を介して送達される場合の、Z F N の存在下での標的化された組込みの量を示し、標的化された組込みは、G F P 導入遺伝子中の 1 つのプライマー、および Z F N 標的部に隣接するが、ドナー中に含有される相同な配列の範囲を超える、ゲノム中の 1 つのプライマーを使用することによって、測定する。結果として、P C R 産物は、導入遺伝子が Z F N によって標的化される遺伝子座において特異的に組み込まれた場合にのみ、生成される。図 5 A および B は、プラスミドドナー P 2 U および M C ドナー M 1 P によって達成される特異的組込みのレベルを比較する。図 5 A は、各ドナーについて検出された P C R 産物のパーセントを示すが、図 5 B は、D N A M C ドナー対プラスミドドナーからの組込みにおける相対的増加倍率を示す。これらの結

果は、標準的なプラスミドドナー送達と比較して、ドナーがDNA MCを介して送達される場合の標的化された組込みにおいて、2.5倍の増加が存在することを実証している。図5Cは、MCドナーM2UをプラスミドドナーP2Uと比較する2つの独立した実験についてのin-out PCR分析の結果を示す。M2Uドナーで観察された産物のより濃いバンドは、標的化されたCCR5遺伝子座におけるより高いレベルの特異的遺伝子付加を示す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

導入遺伝子の、ヌクレアーゼ媒介性の（例えば、NHEJまたはHDR捕捉）標的化された組込みのための組成物および方法が、本明細書に開示される。特に、外因性配列の、ヌクレアーゼ媒介性の（即ち、ZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系）標的化された組込みは、DNA MCを使用して効率的に達成される。これらのより小さいDNAサークルは、細菌配列を本質的に欠如し、したがって、標的細胞に対する毒性が低い。実際、本発明者らは、ドナーがDNA MCによって送達される場合に、組込みがおよそ2.5倍増加することを、本発明で実証している。さらに、ヌクレアーゼおよびドナーの両方が、1種または複数のDNAミニサークルを使用して目的の細胞に送達できる場合、毒性における低下は、ヌクレアーゼをコードするDNAの送達にも同様に拡張される可能性が高い。

【0034】

概要

本明細書に開示される方法、ならびに組成物の調製および使用の実施は、特に示さない限り、本技術分野の技術範囲内の、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算機化学、細胞培養、組換えDNAならびに関連分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、Sambrook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年および定期的更新；シリーズMETHODS IN ENZYMOLOGY、Academic Press、San Diego；Wolffe、CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION、第3版、Academic Press、San Diego、1998年；METHODS IN ENZYMOLOGY、304巻、「Chromatin」（P.M. WassarmanおよびA. P. Wolffe編）、Academic Press、San Diego、1999年；ならびにMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、119巻、「Chromatin Protocols」（P.B. Becker編）Humana Press、Totowa、1999年を参照されたい。

【0035】

定義

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、相互交換可能に使用され、直鎖状または環状コンフォメーションの、一本鎖形態または二本鎖形態のいずれかの、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指す。本開示の目的のため、これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定的であると解釈すべきではない。これらの用語は、天然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（例えば、ホスホロチオエート骨格）において修飾された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アナログは、同じ塩基対合特異性を有する；即ち、Aのアナログは、Tと塩基対合する。

【0036】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、相互交換可能に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、1または複数のアミノ酸が、対応する

天然起源のアミノ酸の化学的アナログまたは修飾された誘導体である、アミノ酸ポリマーにも適用される。

【 0 0 3 7 】

「結合」とは、巨大分子間（例えば、タンパク質と核酸との間）の配列特異的な非共有結合相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異的である限り、結合相互作用の全ての構成成分が配列特異的である（例えば、DNA骨格中のリン酸残基と接触する）必要はない。かかる相互作用は一般に、 10^{-6} M^{-1} またはそれ未満の解離定数（ K_d ）を特徴とする。「親和性」とは、結合の強度を指す：増加した結合親和性は、より低い K_d と相関する。

【 0 0 3 8 】

「結合タンパク質」は、別の分子と結合できるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、DNA分子（DNA結合タンパク質）、RNA分子（RNA結合タンパク質）および/またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合できる。タンパク質結合タンパク質の場合、これは、それ自体と結合でき（ホモ二量体、ホモ三量体等を形成する）および/または異なるタンパク質（単数もしくは複数）の1もしくは複数の分子に結合できる。結合タンパク質は、1つよりも多い型の結合活性を有し得る。例えば、ジンク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。

【 0 0 3 9 】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、タンパク質、またはより大きいタンパク質内のドメインであり、その構造が亜鉛イオンの配位を介して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1または複数のジンクフィンガーを介して配列特異的様式でDNAに結合する。用語、ジンクフィンガーDNA結合タンパク質は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略される。

【 0 0 4 0 】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1または複数のTALEリピートドメイン/単位を含むポリペプチドである。これらのリピートドメインは、その同族標的DNA配列へのTALEの結合に関与する。単一の「リピート単位」（「リピート」とも呼ぶ）は、典型的には、33～35アミノ酸長であり、天然起源のTALEタンパク質内の他のTALEリピート配列と少なくともいくつかの配列相同性を示す。

【 0 0 4 1 】

ジンクフィンガーおよびTALE結合ドメインは、例えば、天然起源のジンクフィンガーまたはTALEタンパク質の認識ヘリックス領域の遺伝子操作（1または複数のアミノ酸を変更する）を介して、所定のヌクレオチド配列に結合するように「遺伝子操作され」得る。したがって、遺伝子操作されたDNA結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはTALE）は、非天然起源のタンパク質である。DNA結合タンパク質を遺伝子操作するための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、その設計/組成が合理的基準から主に生じる、天然起源でないタンパク質である。設計のための合理的基準には、置換ルールの適用、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するデータベース中の情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムが含まれる。例えば、米国特許第8,586,526号、第6,140,081号；第6,453,242号；第6,746,838号；第7,241,573；第6,866,997号；第7,241,574号；および第6,534,261号を参照されたい；WO 03/016496もまた参照されたい。

【 0 0 4 2 】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはTALEは、その産生が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実験過程から主に生じる、天然には見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第8,586,526号；第5,789,538号；第5,925,523号；第6,007,988号；第6,013,453号；第6,200,759号；第6,242,568号；第6,733,97

10

20

30

40

50

0号；第7，297，491号；WO98/53057；WO02/099084を参照されたい。

【0043】

「組換え」とは、2つのポリヌクレオチド間の遺伝情報の交換の過程を指し、限定するものではないが、非相同末端結合（NHEJ）および相同組み換えによるドナー捕捉を含む。本開示の目的のため、「相同組換え（HR）」とは、例えば、相同性指向性の修復機構を介した細胞における二本鎖切断の修復の間に行われる、かかる交換の特殊化された形態を指す。この過程は、ヌクレオチド配列の相同性を必要とし、「標的」分子（即ち、二本鎖切断を経験したもの）の鋳型修復のために「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝情報の移入をもたらすので、「非乗換え遺伝子変換」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。いかなる特定の理論に制約されることも望まないが、かかる移入は、切断された標的とドナーとの間に形成するヘテロ二重鎖DNAのミスマッチ補正、および／もしくはは標的の一部となる遺伝情報を再合成するためにドナーが使用される「合成依存的鎖アニーリング」、ならびに／または関連する過程に参与し得る。かかる特殊化されたHRは、多くの場合、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全てが標的ポリヌクレオチド中に取り込まれるように、標的分子の配列の変更をもたらす。

10

【0044】

本開示の方法では、本明細書に記載される1または複数の標的化されたヌクレアーゼは、所定の部位において標的配列（例えば、細胞クロマチン）中に二本鎖切断を生じ、切断の領域中のヌクレオチド配列に対する相同性を有する「ドナー」ポリヌクレオチドが、細胞中に導入され得る。二本鎖切断の存在は、ドナー配列の組み込みを容易にすることが示されている。このドナー配列は、物理的に組み込まれ得、またはあるいは、このドナーポリヌクレオチドは、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て、細胞クロマチン中への、ドナーと同様のヌクレオチド配列の全てまたは一部の導入を生じる。したがって、細胞クロマチン中の第1の配列は、変更され得、ある特定の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド中に存在する配列へと変換され得る。したがって、用語「置き換える」または「置き換え」の使用は、別のヌクレオチド配列による1つのヌクレオチド配列の置き換え（即ち、情報的な意味での配列の置き換え）を示すと理解され得、別のポリヌクレオチドによる1つのポリヌクレオチドの物理的または化学的置き換えを必ずしも必要としない。

20

30

【0045】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、さらなるヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALENおよび／またはCRISPR/Cas）が、細胞内のさらなる標的部位のさらなる二本鎖開裂に使用され得る。

【0046】

本明細書に記載される方法のいずれかは、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（複数可）の発現を破壊するドナー配列の標的化された組み込みによる細胞中の1種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に使用され得る。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および細胞株もまた提供される。

40

【0047】

さらに、本明細書に記載される標的化された組み込みの方法は、1種または複数の外因性配列を組み込むためにも使用され得る。外因性核酸配列は、例えば、1種もしくは複数の遺伝子もしくはcDNA分子、または任意の型のコード配列もしくは非コード配列、および1種もしくは複数の制御エレメント（例えば、プロモーター）を含み得る。さらに、この外因性核酸配列は、1種または複数のRNA分子（例えば、小ヘアピンRNA（shRNA）、阻害的RNA（RNAi）、microRNA（miRNA）等）を産生し得る。

【0048】

細胞クロマチン中の目的の領域中の配列の標的化された組換えおよび／または置き換え

50

および/または変更のための方法のある特定の実施形態では、染色体配列は、外因性「ドナー」ヌクレオチド配列との相同組換えによって変更される。かかる相同組換えは、切断の領域と相同な配列が存在する場合に、細胞クロマチン中の二本鎖切断の存在によって刺激される。他の実施形態では、標的化された変更は、相同性非依存的機構、例えば、非同末端結合 (NHEJ) を介してである。例えば、米国特許出願公開第 20110207221 号および第 20110287545 号を参照されたい。

【0049】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、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、目的の領域中のゲノム配列と相同ではあるが同一ではない配列を含み得、それによって、目的の領域において非同配列を挿入するように相同組換えを刺激する。したがって、ある特定の実施形態では、目的の領域中の配列と相同なドナー配列の一部分は、置き換えられるゲノム配列に対して、約 80 ~ 99 % の間 (またはそれらの間の任意の整数) の配列同一性を示す。他の実施形態では、ドナー配列とゲノム配列との間の相同性は、例えば、1ヌクレオチドのみが 100 個を超える連続する塩基対のドナー配列とゲノム配列との間で異なる場合、99 % よりも高い。ある特定の場合、ドナー配列の非同部分、新たな配列が目的の領域中に導入されるように、目的の領域中に存在しない配列を含み得る。これらの例では、非同配列には、一般に、目的の領域中の配列と相同または同一な、50 ~ 1,000 塩基対 (またはそれらの間の任意の整数値) または 1,000 よりも大きい任意の数の塩基対の配列が隣接する。他の実施形態では、このドナー配列は、第一の配列とは非同であり、非同組換え機構によってゲノム中に挿入される。

10

20

【0050】

「開裂」とは、DNA 分子の共有結合骨格の切断を指す。開裂は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解が含まれるがこれらに限定されない種々の方法によって開始され得る。一本鎖開裂および二本鎖開裂の両方が可能であり、二本鎖開裂は、2つの個別の一本鎖開裂事象の結果として生じ得る。DNA 開裂は、平滑末端または付着末端のいずれかの産生を生じ得る。ある特定の実施形態では、融合ポリペプチドが、標的化された二本鎖 DNA 開裂に使用される。

【0051】

「開裂ハーフドメイン」は、第 2 のポリペプチド (同一または異なるのいずれか) と協同して、開裂活性 (好ましくは二本鎖開裂活性) を有する複合体を形成する、ポリペプチド配列である。用語「第 1 および第 2 の開裂ハーフドメイン」; 「+ および - の開裂ハーフドメイン」ならびに「右および左の開裂ハーフドメイン」は、相互交換可能に使用されて、二量体形成する開裂ハーフドメインの対を指す。

30

【0052】

「遺伝子操作された開裂ハーフドメイン」は、別の開裂ハーフドメイン (例えば、別の遺伝子操作された開裂ハーフドメイン) と偏性ヘテロ二量体を形成するように改変された開裂ハーフドメインである。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 7,888,121 号; 第 7,914,796 号; 第 8,034,598 号; 第 8,623,618 号および米国特許出願公開第 20110201055 号もまた参照されたい。

40

【0053】

用語「配列」とは、DNA または RNA であり得; 直鎖状、環状または分枝状であり得、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る、任意の長さのヌクレオチド配列を指す。用語「ドナー配列」とは、ゲノム中に挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、任意の長さ、例えば、2ヌクレオチド長と 100,000,000ヌクレオチド長との間 (またはそれらの間もしくはそれらを上回る任意の整数値)、好ましくは約 10ヌクレオチド長と 100,000ヌクレオチド長との間 (またはそれらの間の任意の整数)、より好ましくは約 2000ヌクレオチド長と 20,000ヌクレオチド長との間 (またはそれらの間の任意の値)、より好ましくは、約 5 kb と 15 kb との間、さらにより好ましくは 0.5 kb と 2 kb との間 (またはそれらの間の任意の値) のものであり得る。ドナー

50

配列は、一本鎖および／または二本鎖であり得る。

【 0 0 5 4 】

「相同非同一配列」は、第 2 の配列とある程度の配列同一性を共有するが、その配列が第 2 の配列と同一ではない第 1 の配列を指す。例えば、突然変異体遺伝子の野生型配列を含むポリヌクレオチドは、突然変異体遺伝子の配列と相同かつ非同一である。ある特定の実施形態において、2 種の配列の間の相同性の程度は、正常な細胞機序を利用して、その間の相同組換えを可能にするために十分なものである。2 種の相同非同一配列は、いかなる長さであってもよく、それらの非相同性の程度は、単一のヌクレオチドほどに小さくても（例えば、標的化相同組換えによるゲノム点突然変異の補正のため）、10 キロベースまたはそれを超えるほどに大きくてもよい（例えば、染色体の所定の異所性部位における遺伝子の挿入のため）。相同非同一配列を含む 2 種のポリヌクレオチドは、同じ長さである必要はない。例えば、20 ~ 10 , 000 ヌクレオチドまたはヌクレオチド対の間の外因性ポリヌクレオチド（即ち、ドナーポリヌクレオチド）を使用することができる。

10

【 0 0 5 5 】

核酸およびアミノ酸配列同一性を決定するための技法は、本技術分野において公知である。典型的には、かかる技法は、遺伝子の mRNA のヌクレオチド配列の決定および／またはそれにコードされるアミノ酸配列の決定、ならびに第 2 のヌクレオチドまたはアミノ酸配列とのこのような配列の比較を含む。この様式でゲノム配列を決定および比較することもできる。一般に、同一性は、それぞれ 2 種のポリヌクレオチド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 - アミノ酸の一致を指す。2 種またはそれを超える配列（ポリヌクレオチドまたはアミノ酸）は、それらのパーセント同一性を決定することにより比較することができる。典型的には、配列間のパーセント同一性は、少なくとも 70 ~ 75 %、好ましくは 80 ~ 82 %、より好ましくは 85 ~ 90 %、さらにより好ましくは 92 %、なおより好ましくは 95 %、最も好ましくは 98 % 配列同一性である。

20

【 0 0 5 6 】

あるいは、ポリヌクレオチド間の配列類似性の程度は、相同領域間に安定的二重鎖の形成を可能にする条件下におけるポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションと、続く一本鎖特異的ヌクレアーゼ（複数可）による消化および消化した断片のサイズ決定により決定することができる。当該分野で公知の方法を使用して決定される通り、配列が、定義される長さの分子にわたり少なくとも約 70 % ~ 75 %、好ましくは 80 % ~ 82 %、より好ましくは 85 % ~ 90 %、さらにより好ましくは 92 %、なおより好ましくは 95 %、最も好ましくは 98 % の配列同一性を提示する場合、2 種の核酸または 2 種のポリペプチド配列は、互いに実質的に相同である。ハイブリダイゼーションの条件は、当業者に周知のものである。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション条件が、ミスマッチしたヌクレオチドを含有するハイブリッドの形成を嫌う程度を指し、より高いストリンジェンシーは、ミスマッチしたハイブリッドに対するより低い耐容能と相關する。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える因子は、当業者に周知のものであり、その例として、温度、pH、イオン強度ならびに例えば、ホルムアミドおよびジメチルスルホキシド等の有機溶媒の濃度が挙げられるがこれらに限定されない。当業者に公知の通り、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、より高い温度、より低いイオン強度およびより低い溶媒濃度により増加する。

30

40

【 0 0 5 7 】

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主に DNA、ならびにヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。真核生物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、ヌクレオソームコアは、各々 2 つのヒストン H2A、H2B、H3 および H4 を含む八量体と会合したおよそ 150 塩基対の DNA を含む：リンカー DNA（生物に依存して変動する長さのもの）が、ヌクレオソームコア間に延びる。1 分子のヒストン H1 が、一般に、リンカー DNA と会合する。本開示の目的のため、用語「クロマチン」は、原核生物および真核

50

生物の両方の、全ての型の細胞核タンパク質を包含することを意味する。細胞クロマチンには、染色体クロマチンおよびエピソームクロマチンの両方が含まれる。

【 0 0 5 8 】

「染色体」は、細胞のゲノムの全てまたは一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、多くの場合、細胞のゲノムを構成する全ての染色体のコレクションであるその核型によって特徴付けられる。細胞のゲノムは、1または複数の染色体を含み得る。

【 0 0 5 9 】

「エピソーム」は、細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む、複製性の核酸、核タンパク質複合体または他の構造である。エピソームの例には、プラスミドおよびある特定のウイルスゲノムが含まれる。

10

【 0 0 6 0 】

「到達できる領域」は、核酸に存在する標的部位が、該標的部位を認識する外因性分子に結合され得る、細胞クロマチンにおける部位である。いかなる特定の理論に制約されることも望まないが、到達できる領域が、ヌクレオソーム構造へとパッケージされない領域であることが考えられる。到達できる領域の明確な構造は、多くの場合、化学的および酵素的プローブ、例えば、ヌクレアーゼに対するその感受性により検出することができる。

【 0 0 6 1 】

「標的部位」または「標的配列」は、結合のための十分な条件が存在する場合に、結合分子が結合する核酸の一部を規定する核酸配列である。

【 0 0 6 2 】

「外因性」分子は、細胞中に通常は存在しない分子であるが、1または複数の遺伝学的方法、生化学的方法または他の方法によって細胞中に導入され得る。「細胞中での通常の存在」は、特定の発生段階または細胞の環境条件に関して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生の間にのみ存在する分子は、成人筋肉細胞に関して外因性分子である。同様に、ヒートショックによって誘導される分子は、ヒートショックされていない細胞に関して、外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能障害性内因性分子の機能性バージョン、または正常に機能する内因性分子の機能障害性バージョンを含み得る。

20

【 0 0 6 3 】

外因性分子は、とりわけ、例えば、コンビナトリアルケミストリー過程によって生成されるような小分子、または巨大分子、例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リボタンパク質、多糖、上記分子の任意の修飾された誘導体、あるいは上記分子のうちの1また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、一本鎖または二本鎖であり得；直鎖状、分枝状または環状であり得；任意の長さのものであり得る。核酸には、二重鎖を形成することが可能な核酸、ならびに三重鎖形成性核酸が含まれる。例えば、米国特許第5,176,996号および第5,422,251号を参照されたい。タンパク質には、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、ジャイレースおよびヘリカーゼが含まれるがこれらに限定されない。

30

【 0 0 6 4 】

外因性分子は、内因性分子と同じ型の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸であり得る。例えば、外因性核酸は、細胞中に導入された感染性ウイルスゲノム、プラスミドもしくはエピソーム、または細胞中に通常は存在しない染色体を含み得る。細胞中への外因性分子の導入のための方法は、当業者に公知であり、脂質媒介性移入（即ち、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、直接的注射、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性移入およびウイルスベクター媒介性移入が含まれるがこれらに限定されない。外因性分子はまた、内因性分子と同じ型の分子であり得るが、細胞が由来するのとは異なる種に由来し得る。例えば、ヒト核酸配列は、マウスまたはハムスターに元々由来する細胞株中に導入され得る。植物細胞

40

50

胞中への外因性分子の導入のための方法は、当業者に公知であり、プロトプラスト形質転換、シリコンカーバイド（例えば、WHISKERS（商標））、Agrobacterium媒介性形質転換、脂質媒介性移入（即ち、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、直接的注射、細胞融合、微粒子銃（例えば、「遺伝子銃」を使用する）、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性移入およびウイルスベクター媒介性移入が含まれるがこれらに限定されない。

【0065】

対照的に、「内因性」分子は、特定の発生段階で特定の環境条件下で特定の細胞中に通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、葉緑体もしくは他のオルガネラのゲノム、または天然起源のエピソーム核酸を含み得る。さらなる内因性分子には、タンパク質、例えば、転写因子および酵素が含まれ得る。

10

【0066】

本明細書で使用する場合、用語「外因性核酸の産物」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、例えば、転写産物（RNAなどのポリヌクレオチド）および翻訳産物（ポリペプチド）が含まれる。

【0067】

「融合」分子は、2つまたはそれ超のサブユニット分子が、好ましくは共有結合によって連結された分子である。これらのサブユニット分子は、同じ化学型の分子であり得るか、または異なる化学型の分子であり得る。第1の型の融合分子の例には、融合タンパク質（例えば、ZFPまたはTALEのDNA結合ドメインと1または複数の活性化ドメインとの間の融合物）および融合核酸（例えば、上記融合タンパク質をコードする核酸）が含まれるがこれらに限定されない。第2の型の融合分子の例には、三重鎖形成性核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝結合剤と核酸との間の融合物が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0068】

細胞における融合タンパク質の発現は、細胞への融合タンパク質の送達から、または細胞への融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの送達によって生じ得、このポリヌクレオチドは転写され、この転写物は翻訳されて、融合タンパク質を生じる。トランススプライシング、ポリペプチド開裂およびポリペプチドライゲーションもまた、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ための方法は、本開示の他の場所に示される。

30

【0069】

「遺伝子」には、本開示の目的のために、遺伝子産物をコードするDNA領域（以下を参照）、ならびにかかる調節配列がコード配列および/または転写された配列に隣接してもしなくても、遺伝子産物の産生を調節する全てのDNA領域が含まれる。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、例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、マトリックス結合部位ならびに遺伝子座制御領域が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0070】

「遺伝子発現」とは、遺伝子中に含まれる情報の、遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接的転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造的RNAまたは任意の他の型のRNA）、またはmRNAの翻訳によって産生されたタンパク質であり得る。遺伝子産物には、キャッピング、ポリアダニル化、メチル化および編集などの過程によって修飾されたRNA、ならびに例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP-リボシル化、ミリスチル化（myristylation）およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質もまた含まれる。

40

【0071】

遺伝子発現の「モジュレーション」とは、遺伝子の活性における変化を指す。発現のモ

50

ジュレーションには、遺伝子活性化および遺伝子抑制が含まれ得るが、これらに限定されない。ゲノム編集（例えば、開裂、変更、不活性化、ランダム突然変異）が、発現をモジュレートするために使用され得る。遺伝子不活性化とは、本明細書に記載される ZFP、TALE、または CRISPR/Cas 系を含まない細胞と比較して、遺伝子発現における任意の低下を指す。したがって、遺伝子不活性化は、部分的または完全であり得る。

【0072】

「植物」細胞には、単子葉 (monocotyledonous/monocots) または双子葉 (dicotyledonous/dicots) 植物の細胞が含まれるがこれらに限定されない。単子葉の非限定的な例には、穀物植物、例えば、トウモロコシ、イネ、オオムギ、カラスムギ、コムギ、ソルガム、ライムギ、サトウキビ、パイナップル、タマネギ、バナナおよびココナツが含まれる。双子葉の非限定的な例には、タバコ、トマト、ヒマワリ、ワタ、サトウダイコン、ジャガイモ、レタス、メロン、ダイズ、キャノーラ (ナタネ) およびアルファルファが含まれる。植物細胞は、植物の任意の部分由来および/または植物の任意の発生段階由来であり得る。

10

【0073】

「目的の領域」は、外因性分子に結合することが望まれる、細胞クロマチンの任意の領域、例えば、遺伝子または遺伝子内もしくは遺伝子に隣接した非コード配列などである。結合は、標的化された DNA 開裂および/または標的化された組換えを目的とすることができる。目的の領域は、例えば、染色体、エピソーム、オルガネラゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）、または感染性ウイルスゲノム中に存在し得る。目的の領域は、遺伝子のコード領域内、例えばリーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロンなどの転写された非コード領域内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内に存在し得る。目的の領域は、単一のヌクレオチド対ほどの小ささもしくは最大 2,000 ヌクレオチド対の長さ、または任意の整数値のヌクレオチド対であり得る。

20

【0074】

「真核生物」細胞には、真菌細胞（例えば酵母）、植物細胞、ならびに哺乳動物細胞およびヒト細胞（例えば、幹細胞）を含む動物細胞が含まれるがこれらに限定されない。

【0075】

用語「作動可能な連結」および「作動可能に連結した (operatively linked) または operably linked)」は、2 つまたはそれ超の構成成分（例えば、配列エレメント）の並置に関して相互交換可能に使用され、ここで、これらの構成成分は、両方の構成成分が正常に機能し、他の構成成分のうちの少なくとも 1 つに対して発揮される機能をこれらの構成成分のうちの少なくとも 1 つが媒介し得る可能性を許容するように、配置される。例示として、転写調節配列、例えばプロモーターは、転写調節配列が、1 または複数の転写調節因子の存在または非存在に応答してコード配列の転写のレベルを制御する場合、コード配列に作動可能に連結される。転写調節配列は、一般に、コード配列とシスで作動可能に連結されるが、このコード配列に直接隣接する必要はない。例えば、エンハンサーは、エンハンサーとコード配列とが連続していない場合であっても、コード配列に作動可能に連結した転写調節配列である。

30

【0076】

融合ポリペプチドに関して、用語「作動可能に連結した」とは、構成成分の各々が、他の構成成分と連結して、そのように連結されていない場合にそれが果たすのと同じ機能を果たすという事実を指し得る。例えば、ZFP、TALE または Cas DNA 結合ドメインが活性化ドメインに融合された融合ポリペプチドに関して、この ZFP、TALE または Cas DNA 結合ドメインおよび活性化ドメインは、この融合ポリペプチド中で、ZFP、TALE 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できるが、活性化ドメインは遺伝子発現を上方調節できる場合に、作動可能な連結状態にある。ZFP、TALE または Cas DNA 結合ドメインが開裂ドメインに融合した融合ポリペプチドの場合、ZFP、TALE または Cas DNA 結合ドメインおよび開裂ドメインは、この融合ポリペプチド中で、ZFP、TALE または C

40

50

as 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できるが、開裂ドメインは標的部位の近位においてDNAを開裂できる場合に、作動可能な連結状態にある。

【0077】

タンパク質、ポリペプチドまたは核酸の「機能的断片」は、その配列が全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一ではないが、その全長タンパク質、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る。機能的断片は、対応する天然の分子よりも多い、より少ない、もしくは同じ数の残基を有し得、および/または、1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（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力）を決定するための方法は、本技術分野で周知である。同様に、タンパク質機能を決定するための方法は周知である。例えば、ポリペプチドのDNA結合機能は、例えば、フィルター結合、電気泳動移動度シフトまたは免疫沈降アッセイによって、決定され得る。DNA開裂は、ゲル電気泳動によってアッセイされ得る。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、例えば、共免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイまたは遺伝学および生化学的の両方の補完によって、決定され得る。例えば、Fieldsら（1989年）Nature 340巻：245～246頁；米国特許第5,585,245号およびPCTWO98/44350を参照されたい。

10

【0078】

「ベクター」は、標的細胞に遺伝子配列を移入させることが可能である。典型的には、「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指向することが可能であり、標的細胞に遺伝子配列を移入させることができる、任意の核酸構築物を意味する。したがって、この用語は、クローニングベヒクルおよび発現ベヒクル、ならびに組み込みベクターを含む。

20

【0079】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」とは、好ましくは、慣用的なアッセイにおいてである必要はないが、容易に測定されるタンパク質産物を産生する任意の配列を指す。適切なレポーター遺伝子には、抗生物質抵抗性（例えば、アンピシリン抵抗性、ネオマイシン抵抗性、G418抵抗性、ピューロマイシン抵抗性）を媒介するタンパク質をコードする配列、着色または蛍光もしくは発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、高感度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）ならびに増強された細胞成長および/または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ）をコードする配列が含まれるがこれらに限定されない。エピトープタグには、例えば、FLAG、His、myc、Tap、HAまたは任意の検出可能なアミノ酸配列の1または複数のコピーが含まれる。「発現タグ」には、目的の遺伝子の発現をモニタリングするために、所望の遺伝子配列に作動可能に連結され得るレポーターをコードする配列が含まれる。

30

【0080】

「セーフハーバー」遺伝子座は、遺伝子が宿主細胞に対する任意の有害な影響なしに挿入され得る、ゲノム内の遺伝子座である。挿入された遺伝子配列の発現が隣接する遺伝子からのいずれのリードスルー発現によっても乱されないセーフハーバー遺伝子座が、最も有益である。哺乳動物細胞におけるセーフハーバー遺伝子座の非限定的な例には、例えば、CCR5遺伝子、CXCR4遺伝子、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子、アルブミン遺伝子またはRosa遺伝子が含まれる。例えば、米国特許第7,951,925号および第8,110,379号；米国特許出願公開第201000218264号；第20100291048号；第20120017290号；第20110265198号；第20130137104号；第20130122591号；第20130177983号および第20130177960号を参照されたい。植物細胞における例示的なセーフハーバーは、ZP15遺伝子座である（米国特許第8,329,986号）。

40

50

【0081】

用語「対象」および「患者」は、相互交換可能に使用され、哺乳動物、例えば、ヒト患者および非ヒト霊長類、ならびに実験動物、例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギおよび他の動物を指す。したがって、用語「対象」または「患者」は、本明細書で使用する場合、本発明の幹細胞が投与され得る任意の哺乳動物の患者または対象を意味する。

ヌクレアーゼ

【0082】

導入遺伝子が標的化された様式でゲノム中に組み込まれるように、導入遺伝子と細胞のゲノムの開裂のためのヌクレアーゼとを保有するドナー分子の *in vivo* 開裂に有用な組成物、特にヌクレアーゼが、本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、これらのヌクレアーゼの1種または複数は、天然起源である。他の実施形態では、これらのヌクレアーゼの1種または複数は、非天然起源である、即ち、DNA結合ドメインおよび/または開裂ドメインにおいて遺伝子操作されている。例えば、天然起源のヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、選択された標的部位に結合するように変更され得る（例えば、同族結合部位とは異なる部位に結合するように遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ）。他の実施形態では、ヌクレアーゼは、異種のDNA結合ドメインおよび開裂ドメイン（例えば、異種開裂ドメインを有する、ジンク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）を含む。

A. DNA結合ドメイン

【0083】

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、ドナー分子に結合するためおよび/または細胞のゲノム中の目的の領域に結合するために、メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）DNA結合ドメインを使用する。天然起源のメガヌクレアーゼは、15～40塩基対の開裂部位を認識し、4つのファミリー：LAGLI DADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-CysトボックスファミリーおよびHNHファミリーへと一般に分類される。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼには、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が含まれる。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カタログもまた参照されたい。

【0084】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物は、遺伝子操作された（非天然起源の）ホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）を含むヌクレアーゼを使用する。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などの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号および第8,021,867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、1

125～1127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カタログもまた参照されたい。さらに、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、非天然標的部位に結合するように遺伝子操作され得る。例えば、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、全体としてヌクレアーゼに関して変更され得(即ち、ヌクレアーゼが同族開裂ドメインを含むように)、または異種開裂ドメインに融合され得る。

【0085】

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1種または複数のヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、天然起源のまたは遺伝子操作された(非天然起源の)TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第8,586,526号を参照されたい。属Xanthomonasの植物病原性細菌は、重要な作物植物において多くの疾患を引き起こすことが公知である。Xanthomonasの病原性は、植物細胞中に25よりも多い異なるエフェクタータンパク質を注入する、保存されたIII型分泌(T3S)系に依存する。これらの注入されたタンパク質のなかでも、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、転写活性化因子様(TAL)エフェクターである(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たTALエフェクターの1つは、Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria由来の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、タンデムリピートの集中したドメインを含有し、各リピートは、これらのタンパク質のDNA結合特異性にとって重要なおよそ34アミノ酸を含有する。さらに、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(概説については、Schornack S.ら(2006年)J Plant Physiol 163巻(3号)：256～272頁を参照されたい)。さらに、植物病原性細菌Ralstonia solanacearumでは、R. solanacearum biovar 1株GMI1000およびbiovar 4株RS1000における、brg11およびhpx17と称される2つの遺伝子が、XanthomonasのAvrBs3ファミリーと相同であることが見出されている(Heuerら(2007年)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において98.9%同一であるが、hpx17のリピードドメインにおける1,575bpの欠失が異なる。しかし、両方の遺伝子産物は、XanthomonasのAvrBs3ファミリータンパク質と40%未満の配列同一性を有する。

【0086】

これらのTALエフェクターの特異性は、これらのタンデムリピート中に見出される配列に依存する。リピートされる配列は、およそ102bpを含み、これらのリピートは、典型的には、互いに91～100%相同である(Bonasら、同書)。これらのリピートの多型は、12位および13位に通常位置し、12位および13位における超可変二残基の正体と、TALエフェクターの標的配列中の連続ヌクレオチドの正体との間には、一対一の相関が存在するようである(MoscouおよびBogdanove、(2009年)Science 326巻：1501頁ならびにBochら(2009年)Scie

10

20

30

40

50

n c e 3 2 6 巻：1 5 0 9 ~ 1 5 1 2 頁を参照されたい)。実験的に、これらのT A L エフェクターのD N A 認識のための天然コードは、1 2 位および1 3 位におけるH D 配列が、シトシン(C)への結合をもたらし；N G がT に結合し；N I がA に結合し；H D がC に結合し；N N がA またはG に結合するように、決定されている。これらのD N A 結合リピートは、新たな配列と相互作用でき植物細胞において非内因性レポーター遺伝子の発現を活性化できる人工の転写因子を作製するために、新たな組合せおよびリピート数を有するタンパク質へとアセンブルされている(B o c h ら、同書)。遺伝子操作されたT A L タンパク質は、F o k I 開裂ハーフドメインに連結されて、酵母レポーターアッセイにおいて活性を示すT A L エフェクタードメインヌクレアーゼ融合物(T A L E N)を生じている(プラスミドベースの標的)。例えば、米国特許第8, 586, 526号；Ch r i s t i a n ら((2010年) < G e n e t i c s e p u b 10.1534/g e n e t i c s . 110.120717)を参照されたい。

10

【0087】

ある特定の実施形態では、細胞のゲノムのi n v i v o 開裂および/または標的化された開裂に使用される1種または複数のヌクレアーゼのD N A 結合ドメインは、ジンクフィンガータンパク質を含む。好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、選択された標的部位に結合するように遺伝子操作されているという点で、非天然起源である。例えば、全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、B e e r l i ら(2002年) N a t u r e B i o t e c h n o l . 20巻：135~141頁；P a b o ら(2001年) A n n . R e v . B i o c h e m . 70巻：313~340頁；I s a l a n ら(2001年) N a t u r e B i o t e c h n o l . 19巻：656~660頁；S e g a l ら(2001年) C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . 12巻：632~637頁；C h o o ら(2000年) C u r r . O p i n . S t r u c t . B i o l . 10巻：411~416頁；米国特許第7, 888, 121号；第7, 972, 854号；第6, 453, 242号；第6, 534, 261号；第6, 599, 692号；第6, 503, 717号；第6, 689, 558号；第7, 030, 215号；第6, 794, 136号；第7, 067, 317号；第7, 262, 054号；第7, 070, 934号；第7, 361, 635号；第7, 253, 273号を参照されたい。

20

【0088】

遺伝子操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然起源のジンクフィンガータンパク質と比較して、新規結合特異性を有し得る。遺伝子操作方法には、合理的設計および種々の型の選択が含まれるがこれらに限定されない。合理的設計には、例えば、トリプレット(またはクアドルプレット(q u a d r u p l e t))ヌクレオチド配列および個々のジンク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含まれ、ここで、各トリプレットまたはクアドルプレットのヌクレオチド配列は、特定のトリプレットまたはクアドルプレット配列に結合するジンクフィンガーの1種または複数のアミノ酸配列と関連する。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、共有に係る米国特許第6, 453, 242号および第6, 534, 261号を参照されたい。

30

【0089】

ファージディスプレイおよびツーマイブリッドシステムを含む例示的な選択方法は、米国特許第5, 789, 538号；第5, 925, 523号；第6, 007, 988号；第6, 013, 453号；第6, 410, 248号；第6, 140, 466号；第6, 200, 759号；第6, 242, 568号；第6, 733, 970号；第7, 029, 847号；第7, 700, 523号；および第8, 618, 024号中に開示されている。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、米国特許第6, 794, 136号に記載されている。

40

【0090】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインおよび/またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば、5またはそれ超のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の適切なリンカー配列を使用して一緒に連結され

50

得る。6 またはそれ超のアミノ酸長の例示的なリンカー配列について、米国特許第 6, 479, 626 号; 第 6, 903, 185 号; および第 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ジンクフィンガー間に適切なリンカーの任意の組合せを含み得る。

【0091】

標的部位の選択; 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ための ZFP および方法は、当業者に公知であり、米国特許第 6, 140, 081 号; 第 5, 789, 538 号; 第 6, 453, 242 号; 第 6, 534, 261 号; 第 5, 925, 523 号; 第 6, 007, 988 号; 第 6, 013, 453 号; 第 6, 200, 759 号; 第 6, 733, 970 号; 第 6, 746, 838 号; 第 6, 866, 997 号; 第 7, 029, 847 号; 第 7, 241, 573 号; 第 7, 241, 574 号; 第 7, 700, 523 号; 第 8, 618, 024 号および WO 02 / 099084 に詳細に記載されている。

10

【0092】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインおよび / またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば、5 またはそれ超のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の適切なリンカー配列を使用して、一緒に連結され得る。6 またはそれ超のアミノ酸長の例示的なリンカー配列について、米国特許第 6, 479, 626 号; 第 6, 903, 185 号; および第 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ジンクフィンガー間に適切なリンカーの任意の組合せを含み得る。

20

【0093】

系の RNA 構成成分をコードする CRISPR (クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート) 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、2005 年、PLoS Comput. Biol. 1 巻: e60 頁) が、CRISPR / Cas ヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主中の CRISPR 遺伝子座は、CRISPR 関連 (Cas) 遺伝子および CRISPR 媒介性の核酸開裂の特異性をプログラムすることが可能な非コード RNA エLEMENT の組合せを含有する。

30

【0094】

II 型 CRISPR は、最もよく特徴付けられた系の 1 つであり、4 つの連続的ステップで、標的化された DNA 二本鎖切断を実施する。第 1 に、2 つの非コード RNA、pre-crRNA アレイおよび tracrRNA が、CRISPR 遺伝子座から転写される。第 2 に、tracrRNA は、pre-crRNA のリピート領域にハイブリダイズし、個々のスパーサー配列を含有する成熟 crRNA への pre-crRNA のプロセッシングを媒介する。第 3 に、成熟 crRNA : tracrRNA 複合体は、標的認識のためのさらなる要求、crRNA 上のスパーサーとプロトスパーサー隣接モチーフ (PAM) の隣の標的 DNA 上のプロトスパーサーとの間の Watson-Crick 塩基対合を介して、標的 DNA に Cas9 を指向させる。最後に、Cas9 は、標的 DNA の開裂を媒介して、プロトスパーサー内の二本鎖切断を生じる。CRISPR / Cas 系の活性は、3 つのステップから構成される: (i) 「適応」と呼ばれる過程における、さらなる攻撃を防止するための、CRISPR アレイ中への異質 DNA 配列の挿入、(ii) 関連タンパク質の発現、ならびにアレイの発現およびプロセッシング、その後の、(iii) 異質核酸による RNA 媒介性の干渉。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、CRISPR / Cas 系の天然機能と関連し、異質 DNA などの挿入などの機能において役割を果たす。

40

【0095】

50

ある特定の実施形態では、C a s タンパク質は、天然起源の C a s タンパク質の「機能的誘導体」であり得る。天然配列ポリペプチドの「機能的誘導体」は、天然配列ポリペプチドと共通する定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」には、対応する天然配列ポリペプチドと共通した生物学的活性を有することを条件として、天然配列の断片ならびに天然配列ポリペプチドおよびその断片の誘導体が含まれるがこれらに限定されない。本明細書で企図される生物学的活性は、D N A 基質を断片に加水分解する機能的誘導体の能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーション、共有結合的修飾、およびその融合物の両方を包含する。C a s ポリペプチドまたはその断片の適切な誘導体には、C a s タンパク質またはその断片の突然変異体、融合物、共有結合的修飾が含まれるがこれらに限定されない。C a s タンパク質またはその断片を含む C a s タンパク質、および C a s タンパク質またはその断片の誘導体は、細胞から取得可能であり得るか、もしくは化学的に合成され得るか、またはこれらの2つの手順の組合せによって、取得可能であり得る。細胞は、C a s タンパク質を天然に産生する細胞、または C a s タンパク質を天然に産生し、より高い発現レベルで内因性 C a s タンパク質を産生するように、もしくは外因的に導入された核酸から C a s タンパク質を産生するように遺伝子操作された細胞であり得、この核酸は、内因性 C a s と同じまたは異なる C a s をコードする。一部の場合には、細胞は、C a s タンパク質を天然には産生せず、C a s タンパク質を産生するように遺伝子操作される。

10

【0096】

したがって、ヌクレアーゼは、ドナー（導入遺伝子）を挿入することが望まれる任意の遺伝子中の標的部位に特異的に結合するという点で、D N A 結合ドメインを含む。

20

B．開裂ドメイン

【0097】

任意の適切な開裂ドメインは、D N A 結合ドメインに作動可能に連結されて、ヌクレアーゼを形成し得る。例えば、Z F P D N A 結合ドメインは、ヌクレアーゼドメインに融合されて、Z F N - その遺伝子操作された（Z F P）D N A 結合ドメインを介してその意図した核酸標的を認識でき、ヌクレアーゼ活性を介して Z F P 結合部位の近くで D N A が切断されるようにする、機能的実体 - を生じている。例えば、K i m ら（1996年）P r o c N a t l A c a d S c i U S A 93巻（3号）：1156～1160頁を参照されたい。より最近、Z F N は、種々の生物においてゲノム改変に使用されている。例えば、米国特許第7,888,121号および第8,409,861号；米国特許出願公開第20030232410号；第20050208489号；第20050026157号；第20060063231号；ならびに国際公開第07/014275号を参照されたい。同様に、T A L E D N A 結合ドメインは、ヌクレアーゼドメインに融合されて、T A L E N を生じている。例えば、米国特許第8,586,526号を参照されたい。

30

【0098】

上述のように、開裂ドメインは、D N A 結合ドメインに対して異種であり得る、例えば、ジンクフィンガー D N A 結合ドメインおよびヌクレアーゼ由来の開裂ドメイン、または T A L E N D N A 結合ドメインおよび開裂ドメイン、またはメガヌクレアーゼ D N A 結合ドメインおよび異なるヌクレアーゼ由来の開裂ドメイン。

40

【0099】

他の実施形態では、ヌクレアーゼは、遺伝子操作された T A L E D N A 結合ドメインおよびヌクレアーゼドメイン（例えば、エンドヌクレアーゼドメインおよび/またはメガヌクレアーゼドメイン）を含み、T A L E N とも呼ばれる。使用者が選択する標的配列との頑強な部位特異的相互作用のためにこれらの T A L E N タンパク質を遺伝子操作するための方法および組成物が公開されている（米国特許第8,586,526号を参照されたい）。一部の実施形態では、T A L E N は、エンドヌクレアーゼ（例えば、F o k I）開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインを含む。他の実施形態では、T A L E N ヌクレアーゼは、メガ T A L である。これらのメガ T A L ヌクレアーゼは、T A L E D N A 結合ドメ

50

インおよびメガヌクレアーゼ開裂ドメインを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ開裂ドメインは、一量体として活性であり、活性のために二量体形成を必要としない (Boisselら (2013年) *Nucl Acid Res*: 1~13頁、doi: 10.1093/nar/gkt1224を参照されたい)。さらに、このヌクレアーゼドメインは、DNA結合機能性もまた示し得る。

【0100】

なおさらなる実施形態では、ヌクレアーゼは、コンパクトTALLEN (cTALLEN) を含む。これらは、TALLEN DNA結合ドメインをTevIヌクレアーゼドメインに連結している単鎖融合タンパク質である。TALLEN DNA結合ドメインがメガヌクレアーゼ (例えば、TevI) ヌクレアーゼドメインに対してどこに位置するかに依存して、融合タンパク質は、TALLEN領域によって局在化されたニッカーゼとして作用し得るか、または二本鎖切断を生じ得る (Beurdeleyら (2013年) *Nat Comm*: 1~8頁 DOI: 10.1038/ncomms2782を参照されたい)。任意のTALLENは、さらなるTALLENと組み合わせて使用され得る (例えば、1種または複数のTALLEN (cTALLENまたはFokI-TALLEN) と、1種または複数のメガTALと)。

【0101】

異種開裂ドメインは、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られ得る。開裂ドメインが由来し得る例示的なエンドヌクレアーゼには、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含まれるがこれらに限定されない。例えば、2002~2003年カタログ、New England Biolabs、Beverly, MA; およびBelfortら (1997年) *Nucleic Acids Res*. 25巻: 3379~3388頁を参照されたい。DNAを開裂するさらなる酵素が公知である (例えば、S1ヌクレアーゼ; リョクトウヌクレアーゼ; 脾臓DNase I; 小球菌ヌクレアーゼ; 酵母HOエンドヌクレアーゼ; Linnら (編) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993年もまた参照)。これらの酵素 (またはその機能的断片) のうちの1または複数は、開裂ドメインおよび開裂ハーフドメインの供給源として使用され得る。

【0102】

同様に、開裂ハーフドメインは、開裂活性のために二量体形成を必要とする、上記のような任意のヌクレアーゼまたはその一部に由来し得る。一般に、融合タンパク質が開裂ハーフドメインを含む場合、2つの融合タンパク質が、開裂に必要とされる。あるいは、2つの開裂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。これら2つの開裂ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ (またはその機能的断片) に由来し得、または各開裂ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ (またはその機能的断片) に由来し得る。さらに、2つの融合タンパク質についての標的部位は、好ましくは、互いに関して配置され、その結果、そのそれぞれの標的部位への2つの融合タンパク質の結合は、例えば二量体形成によって開裂ハーフドメインに機能的開裂ドメインを形成させる互いに対する空間的配向に、これらの開裂ハーフドメインを置く。したがって、ある特定の実施形態では、標的部位の近くの端は、5~8ヌクレオチドまたは15~18ヌクレオチド離れている。しかし、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの標的部位間に介在し得る (例えば、2~50ヌクレオチド対またはそれ超)。一般に、開裂の部位は、標的部位間に存在する。

【0103】

制限エンドヌクレアーゼ (制限酵素) は、多くの種に存在しており、(認識部位における) DNAへの配列特異的結合が可能であり、結合の部位またはその近傍でDNAを開裂させることが可能である。ある特定の制限酵素 (例えば、IIS型) は、認識部位から取り出された部位においてDNAを開裂させ、分離可能な結合ドメインおよび開裂ドメインを有する。例えば、IIS型酵素FokIは、一方の鎖上のその認識部位から9ヌクレオチドおよび他方の鎖上のその認識部位から13ヌクレオチドの場所において、DNAの二

本鎖開裂を触媒する。例えば、米国特許第 5,356,802 号；第 5,436,150 号および第 5,487,994 号；ならびに Liら (1992 年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 巻：4275～4279 頁；Liら (1993 年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 巻：2764～2768 頁；Kimら (1994 年 a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 巻：883～887 頁；Kimら (1994 年 b) J. Biol. Chem. 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、遺伝子操作されてもされなくてもよい、少なくとも 1 つの IIS 型制限酵素および 1 または複数のジンクフィンガー結合ドメイン由来の開裂ドメイン (または開裂ハーフドメイン) を含む。

10

【0104】

その開裂ドメインが結合ドメインから分離可能である例示的な IIS 型制限酵素は、FokI である。この特定の酵素は、二量体として活性である。Bitinaiteら (1998 年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 巻：10,570～10,575 頁。したがって、本開示の目的のため、開示された融合タンパク質において使用される FokI 酵素の一部は、開裂ハーフドメインとみなされる。したがって、ジンクフィンガー-FokI 融合物を使用した細胞配列の標的化された二本鎖開裂および/または標的化された置き換えのために、各々が FokI 開裂ハーフドメインを含む 2 つの融合タンパク質が、触媒的に活性な開裂ドメインを再構成するために使用され得る。あるいは、1 つのジンクフィンガー結合ドメインおよび 2 つの FokI 開裂ハーフドメインを含む単一のポリペプチド分子もまた、使用され得る。ジンクフィンガー-FokI 融合物を使用した標的化された開裂および標的化された配列変更のためのパラメーターは、本開示の別の場所に提供される。

20

【0105】

開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインは、機能的開裂ドメインを形成するために、開裂活性を保持するまたは多量体形成する (例えば、二量体形成する) 能力を保持する、タンパク質の任意の部分であり得る。

【0106】

例示的な IIS 型制限酵素は、その全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第 07/014275 号に記載されている。さらなる制限酵素もまた、分離可能な結合および開裂ドメインを含み、これらは、本開示によって企図される。例えば、Roberttsら (2003 年) Nucleic Acids Res. 31 巻：418～420 頁を参照されたい。

30

【0107】

ある特定の実施形態では、開裂ドメインは、例えば、その全ての開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 7,888,121 号および第 8,409,861 号；米国特許出願公開第 20090305346 号および第 20080131962 号に記載されるように、ホモ二量体形成を最小化または防止する 1 種または複数の遺伝子操作された開裂ハーフドメイン (二量体形成ドメイン突然変異体とも呼ばれる) を含む。FokI の 446 位、447 位、479 位、483 位、484 位、486 位、487 位、490 位、491 位、496 位、498 位、499 位、500 位、531 位、534 位、537 位および 538 位におけるアミノ酸残基は、全て、FokI 開裂ハーフドメインの二量体形成に影響を与えるための標的である。

40

【0108】

偏性ヘテロ二量体を形成する FokI の例示的な遺伝子操作された開裂ハーフドメインには、第 1 の開裂ハーフドメインが、FokI の 490 位および 538 位のアミノ酸残基において突然変異を含み、第 2 の開裂ハーフドメインが、アミノ酸残基 486 および 499 において突然変異を含む、対が含まれ、例えば、一方の開裂ハーフドメイン中の 490 位 (E K) および 538 位 (I K) を突然変異させて、「E490K；I538K」と称される遺伝子操作された開裂ハーフドメインを産生し、および別の開裂ハーフドメ

50

ン中の486位(Q E)および499位(I L)を突然変異させて、「Q486E : I499L」と称される遺伝子操作された開裂ハーフドメインを産生する、遺伝子操作された開裂ハーフドメイン。本明細書に記載される遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、異常な開裂が最小化または消失される、偏性ヘテロ二量体突然変異体である。例えば、あらゆる目的でその開示が参照によりその全体が組み込まれる、米国特許出願公開第2008/0131962号を参照されたい。ある特定の実施形態では、遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、486位、499位および496位における突然変異(野生型FokIに対して番号を付けた)、例えば、486位の野生型Gln(Q)残基をGlu(E)残基で置き換える突然変異、499位の野生型Iso(I)残基をLeu(L)残基で置き換える突然変異、および496位の野生型Asn(N)残基をAsp(D)またはGlu(E)残基で置き換える突然変異(それぞれ、「ELD」ドメインおよび「ELE」ドメインとも呼ばれる)を含む。他の実施形態では、遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、490位、538位および537位における突然変異(野生型FokIに対して番号を付けた)、例えば、490位の野生型Glu(E)残基をLys(K)残基で置き換える突然変異、538位の野生型Iso(I)残基をLys(K)残基で置き換える突然変異、および537位の野生型His(H)残基をLys(K)残基またはArg(R)残基で置き換える突然変異(それぞれ、「KKK」ドメインおよび「KKR」ドメインとも呼ばれる)を含む。他の実施形態では、遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、490位および537位における突然変異(野生型FokIに対して番号を付けた)、例えば、490位の野生型Glu(E)残基をLys(K)残基で置き換える突然変異、および537位の野生型His(H)残基をLys(K)残基またはArg(R)残基で置き換える突然変異(それぞれ、「KIK」ドメインおよび「KIR」ドメインとも呼ばれる)を含む(米国特許出願公開第20110201055号を参照されたい)。他の実施形態では、遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、「シャーキー」および/または「シャーキー」突然変異を含む(Guora(2010年)J. Mol. Biol. 400巻(1号):96~107頁を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0109】

本明細書に記載される遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、例えば、米国特許第7,888,121号;第20080131962号;および第20110201055号に記載されるように、野生型開裂ハーフドメイン(FokI)の部位指定突然変異誘発によって、任意の適切な方法を使用して調製できる。

【0110】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「開裂酵素」技術を使用して、核酸標的部位においてin vivoでアセンブルされ得る(例えば、米国特許出願公開第20090068164号を参照されたい)。かかる開裂酵素の構成成分は、別々の発現構築物のいずれか上に発現され得るか、または、例えば、自己開裂性2AペプチドもしくはIRES配列によって個々の構成成分が分離されて、1つのオープンリーディングフレームで連結され得る。構成成分は、個々のジンクフィンガー結合ドメイン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り得る。

【0111】

ヌクレアーゼは、例えば、WO2009/042163および第20090068164号に記載される酵母ベースの染色体系における使用の前に、活性についてスクリーニングされ得る。ヌクレアーゼ発現構築物は、当該分野で公知の方法を使用して容易に設計され得る。例えば、米国特許第7,888,121号および第8,409,861号;米国特許出願公開第20030232410号;第20050208489号;第20050026157号;第20060063231号;および第20070134796号を参照されたい。ヌクレアーゼの発現は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば、ラフィノースおよび/またはガラクトースの存在下で活性化(抑制解除)され、グルコースの存在下で抑制されるガラクトキナーゼプロモーターの制御下にあり得る。

【0112】

Cas9 関連のCRISPR/Cas系は、同一のダイレクトリピート(DR)によって空間が置かれたヌクレアーゼガイド配列(スパーサー)を含有する2種のRNA非コード構成成分: tracrRNAおよびpre-crRNAアレイを含む。ゲノム遺伝子操作を達成するためにCRISPR/Cas系を使用するために、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)Scienceexpress 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、別々の発現構築物を介して、または別々のRNAとして、供給される。他の実施形態では、遺伝子操作された成熟crRNA(標的特異性を付与する)がtracrRNA(Cas9との相互作用を供給する)に融合されてキメラcr-RNA-tracrRNAハイブリッド(単一ガイドRNAとも呼ぶ)を生じる、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)。

10

標的部位

【0113】

上に詳細に記載したように、DNAドメインは、選択された任意の配列に結合するように遺伝子操作され得る。遺伝子操作されたDNA結合ドメインは、天然起源のDNA結合ドメインと比較して、新規結合特異性を有し得る。遺伝子操作方法には、合理的設計および種々の型の選択が含まれるがこれらに限定されない。合理的設計には、例えば、トリプレット(またはクアドルプレット)ヌクレオチド配列および個々のジンク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含まれ、ここで、各トリプレットまたはク

20

【0114】

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を含む、DNA結合ドメインに適用可能な例示的な選択方法は、米国特許第5,789,538号;第5,925,523号;第6,007,988号;第6,013,453号;第6,410,248号;第6,140,466号;第6,200,759号;および第6,242,568号;なら

30

【0115】

標的部位の選択;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ためのヌクレアーゼおよび方法は、当業者に公知であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第7,888,121号および第8,409,861号に詳細に記載されている。

【0116】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、DNA結合ドメイン(例えば、マルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質)は、例えば、5またはそれ超のアミノ酸のリンカーを含む、任意の適切なリンカー配列を使用して一緒に連結され得る。6またはそれ超のアミノ酸長の例示的なリンカー配列について、例えば、米国特許第6,479,626号;第6,903,185号;および第7,153,949号を参照されたい。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DNA結合ドメイン間に適切なリンカーの任意の組合せを含み得る。米国特許第8,586,526号もまた参照されたい。

40

【0117】

上述のように、これらのヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、任意の遺伝子へと標的

50

化され得る。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ（DNA結合ドメイン構成成分）は、例示のみとしてAAVS1遺伝子（米国特許第8,110,379号を参照されたい）、CCR5遺伝子（米国特許出願公開第20080159996号を参照されたい）、RosA遺伝子座（WO2010/065123を参照されたい）および/またはアルブミン遺伝子座（米国特許出願公開第20130177983号および第20130177960号を参照されたい）を含む、「セーフハーバー」遺伝子座を含む、「セーフハーバー」遺伝子座へと標的化される。

ドナー

【0118】

本願の開示は、DNAミニサークル（DNA MC）ベクターを使用した、細胞のゲノムへの外因性配列のヌクレアーゼ媒介性の標的化された組込みに関する。DNA MCは、細菌性プラスミドDNA骨格のほとんどまたは全てを欠く環状発現カセットとして産生される、エピソードDNAベクターである。したがって、DNA MCは、典型的には、プラスミドベクターより小さなサイズを有する。DNA MCは、当技術分野に公知の方法を使用して、例えば、親プラスミドから作製することができる。Mayrhoferら（2008年）、J Gene Med.、10巻（11号）：1253～69頁、doi: 10.1002/jgm.1243を参照されたい。本明細書に記載されているようなDNA MCは、親プラスミド由来のいくつかの残存するプラスミド骨格配列を含むが、これは、残存する配列が細菌を起源としない限りにおいてであって、その結果、DNA MCでは、細菌由来の配列が欠如している。例えば、MCは、特異的なMCの構築を容易にするattR組換え部位および/または「複数のクローニング部位」を保持している。典型的には、本明細書に記載されているようなDNA MCは、300塩基対未満の残存する（非細菌性の）プラスミド配列を含み、このような配列としては、残存するプラスミド骨格の0から300塩基対の間（またはこの間にある任意の塩基対の数）、残存するプラスミド骨格の0から200塩基対の間（またはこの間にある任意の塩基対の数）、または残存するプラスミド骨格の0から100塩基対の間（またはこの間にある任意の塩基対の数）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0119】

上述した通り、例えば、変異遺伝子を補正するための、または野生型遺伝子の発現を増加させるための、外因性配列（「ドナー配列」または「ドナー」または「導入遺伝子」とも言う）の挿入。ドナー配列は、典型的には、それが配置されるゲノム配列と同一ではないことが容易に明らかとなる。ドナー配列は、2つの相同な領域に隣接する非相同配列を含有し、目的の位置での効率的なHDRを可能とする。さらに、ドナー配列は、細胞クロマチン内の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むことができる。ドナー分子は、細胞クロマチンに相同ないいくつかの不連続な領域を含有することができる。例えば、常態では目的の領域に存在しない標的化された配列を挿入するために、前記配列を、ドナー核酸分子中に存在させることができ、目的の領域中の配列に相同な領域を隣接させることができる。

【0120】

本明細書に記載されているのは、選択された位置内へ挿入するための、任意のポリヌクレオチドの標的化された挿入の方法である。挿入に用いるポリヌクレオチドは、「外因性」ポリヌクレオチド、「ドナー」ポリヌクレオチドもしくは分子、または「導入遺伝子」とも呼ばれ得る。ドナーポリヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよく、一本鎖および/または二本鎖であってもよく、直鎖状または環状の形態で細胞内に導入することができる。米国特許第8,623,618号ならびに米国特許出願公開第20100047805号および第2011/0207221号を参照されたい。ドナー配列（複数可）は、好ましくはDNA MC内に含有されており、細胞内へ環状または直鎖状の形態で導入されてもよい。直鎖状の形態で導入される場合、当業者に公知の方法によって、ドナー配列の末端を保護する（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）ことができる。例えば、1つまたは複数のジデオキシヌクレオチド残基を直鎖状分子の3'末端に添加する

、および/または自己相補的なオリゴヌクレオチドを一端または両端にライゲーションする。例えば、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。分解から外因性ポリヌクレオチドを保護するための追加的な方法としては、末端アミノ基（複数可）の追加、および例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミダートやO-メチルリボースもしくはデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間の結合の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

ポリヌクレオチドは、例えば、複製起点、プロモーターや抗生物質耐性をコードしている遺伝子などの追加的な配列を有するベクター分子の部分として、細胞内に導入することができる。さらに、ドナーポリヌクレオチドを、ネイキッド核酸として、リボソームやポリキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として、導入することができ、また、ウイルス（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスおよびインテグラーゼ欠損レンチウイルス（IDLV））によって送達することができる。

10

【0122】

ある特定の実施形態では、二本鎖のドナーは、1 kb 超の長さの配列（例えば、コード配列であり、導入遺伝子とも呼ばれる）、例えば、2 から 200 kb の間、2 から 10 kb の間、.5 から 2 kb の間もしくは、1 から 2 kb の間（またはこれらの間にある任意の値）を含む。二本鎖ドナーもまた、少なくとも1つのヌクレアーゼ標的部位を含む。ある特定の実施形態では、ドナーは少なくとも2つの標的部位を含み、例えば、ZFNまたはTALENの対のためのものである。典型的には、ヌクレアーゼ標的部位は、導入遺伝子の開裂に用いるために、導入遺伝子配列の外側、例えば、導入遺伝子に対して5'および/または3'にある。ヌクレアーゼの開裂部位（複数可）は、任意のヌクレアーゼ（複数可）のためのものである。ある特定の実施形態では、二本鎖ドナーに含有されているヌクレアーゼ標的部位（複数可）は、内因性の標的を開裂するために使用されるのと同じヌクレアーゼ（複数可）のためのものであり、その内因性の標的に、開裂されたドナーが相同性非依存的な方法を介して組み込まれる。

20

【0123】

ドナーは、一般に、組込み部位の内因性プロモーター、即ちドナーが挿入されている内因性遺伝子（例えば、グロビン、アルブミン、AAVS1など）の発現を駆動するプロモーターによって、発現が駆動されるように挿入される。しかし、ドナーが、プロモーターおよび/またはエンハンサー、例えば、構成性のプロモーターまたは誘導可能なもしくは組織特異的なプロモーターを含み得ることは明らかである。

30

【0124】

ドナー分子は、内因性遺伝子の全てもしくはいくつかが発現するか、または発現しないように、内因性遺伝子内に挿入されていてもよい。他の実施形態では、導入遺伝子（グロビンをコードする遺伝子があるものまたはないもの）は、任意の内因性遺伝子座、例えば、セーフハーバー遺伝子座に組み込まれている。例えば、米国特許第8,110,379号、第7,951,925号および米国特許出願公開第201000218264号を参照されたい。

40

【0125】

さらに、発現を必要としていなくとも、外因性配列は、転写調節配列または翻訳調節配列、例えば、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ペプチドをコードする配列および/またはポリアデニル化シグナルをも含み得る。

【0126】

本明細書に記載されているドナー配列に保有されている導入遺伝子は、プラスミド、細胞または他の供給源から、PCRなど当技術分野で公知の標準的な技法を使用して単離され得る。使用するドナーとしては、環状スーパーコイル型、環状リラックス型、線型などを含めて様々な種類のトポロジを挙げることができる。あるいは、それらを、標準的な

50

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。さらに、ドナーをメチル化してもよいし、メチル化を欠いてもよい。ドナーは、細菌または酵母の人工染色体であってもよい（BACまたはYAC）。

【0127】

本明細書に記載されている二本鎖の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/または骨格を含んでもよい。具体的には、本明細書に記載されている方法を使用して、メチル化シトシンを伴うドナー分子の挿入を行い、目的の領域での転写的に静止した状態を達成することができる。

【0128】

外因性の（ドナー）ポリヌクレオチドは、任意の目的の配列（外因性配列）を含んでもよい。例示的な外因性配列としては、任意のポリペプチドをコードする配列（例えば、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、開裂酵素認識部位、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（例えば、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、発色性または蛍光性または発光性のタンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、増強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、ならびに細胞増殖の増強および/または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、デヒドロ葉酸レダクターゼ）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、例えば、1コピーまたは複数のFLAG、His、myc、Tap、HAまたは任意の検出可能なアミノ酸配列が挙げられる。

10

20

【0129】

好適な実施形態では、外因性配列（導入遺伝子）は、細胞での発現が望ましい任意のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、そのようなポリペプチドとしては、抗体、抗原、酵素、受容体（細胞表面のまたは核の）、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、増殖因子および前出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。コード配列は、例えば、cDNAであってもよい。

【0130】

例えば、外因性配列は、遺伝性疾患に罹っている対象内で欠失しているか機能しないポリペプチドをコードする配列を含んでもよく、そのような遺伝性疾患としては、軟骨形成不全、赤緑色覚異常、酸性マルターゼ欠損症、アデノシンデアミナーゼ欠損症（OMIM No. 102700）、副腎白質萎縮症、エカルディ症候群、アルファ-1アンチトリプシン欠損症、アルファ地中海貧血、アンドロゲン不応症候群、アペール症候群、不整脈性右心室異形成、毛細管拡張性運動失調、バルト症候群、ベータ地中海貧血、青色ゴムまり様母斑症候群、キャナヴァン病、慢性肉芽腫性疾患（CGD）、ネコ泣き症候群、嚢胞性繊維症、ダーカム病、外胚葉性異形成、ファンコーニ症候群、進行性骨化性繊維形成異常症、脆弱X染色体症候群、ガラクトース血症、ゴーシェ病、全身性ガングリオシス（例えば、GM1）、血色素症、ベータグロビンの第6コドンのヘモグロビンC突然変異（HbC）、血友病、ハンチントン病、フルラー症候群、低ホスファターゼ血症、クラインフェルター症候群、クラッペ病、ランガー・ギーディオン症候群、白血球粘着不全症（LAD、OMIM No. 116920）、白質ジストロフィー、QT延長症候群、マルファン症候群、メービウス症候群、ムコ多糖沈着症（MPS）、爪膝蓋骨症候群、腎原発性尿崩症、神経繊維症、ニーマン・ピック病、骨形成不全、ボルフィリン症、ブラダー・ウィリー症候群、早老症、プロテウス症候群、網膜芽細胞腫、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、サンフィリップ症候群、重症複合免疫不全症（SCID）、シュバハマン症候群、鎌状赤血球病（鎌状赤血球貧血症）、スミス・マジェニス症候群、スティックラー症候群、テイ・ザックス病、血小板減少性橈骨欠損（TAR）症候群、トリーチャー・コリンズ症候群、トリソミー、結節硬化症、ターナー症候群、尿素回路障害、フォン・ヒッペル・リンドウ病、ワーデンブルグ症候群、ウィリアム症候群、ウィルソン病、ウィスコット・アルドリッチ症候群、X連鎖リンパ球増殖症候群（XLP、O

30

40

50

MIM No. 308240) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0131】

標的組込みによって治療され得る追加的な疾患の例としては、後天性免疫不全症、リソソーム蓄積病（例えば、ゴーシェ病、GM1、ファブリー病およびテイ・ザックス病）、ムコ多糖沈着症（ハンター病、フルー病）、ヘモグロビン症（例えば、鎌状赤血球病、HbC、 - 地中海貧血、 - 地中海貧血）ならびに血友病が挙げられる。

【0132】

ある特定の実施形態では、外因性配列は、標的組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）と、追加的な機能をコードする連結された配列とを含むことができる。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（複数可）などが挙げられる。

10

【0133】

挿入することのできる追加的な遺伝子配列としては、例えば、変異配列を置き換える野生型遺伝子が挙げられ得る。例えば、野生型の第IX因子の遺伝子配列を、内因性の遺伝子コピーが変異している幹細胞のゲノム内へ挿入してもよい。野生型コピーは、内因性遺伝子座へ挿入してもよいし、代替的にセーフハーバー遺伝子座へ標的化してもよい。

【0134】

本願の明細書の教示に従うそのような発現カセットの構築物は、分子生物学の分野で周知の方法論を利用する（例えば、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生成する前に、選択された制御要素に関連があるストレス誘導物質に対する発現カセットを安定な細胞株（例えば、初代細胞、形質転換細胞または不死化細胞株）内へ導入することによって、発現カセットの応答性を試験することができる。

20

【0135】

さらに、発現を必要としていなくとも、外因性配列は、転写調節配列または翻訳調節配列、例えば、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ペプチドをコードする配列および/またはポリアデニル化シグナルをも含み得る。また、目的の遺伝子の制御要素を、レポーター遺伝子へ作動可能に連結して、キメラ遺伝子（例えば、レポーター発現カセット）を作り出すことができる。

【0136】

30

非コード核酸配列の標的挿入も達成され得る。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、標的挿入のために使用され得る。

【0137】

追加的な実施形態では、ドナー核酸は、追加的なヌクレアーゼの設計のために、特異的な標的部位である非コード配列を含んでいてもよい。その後、元のドナー分子が開裂されて、別の目的のドナー分子を挿入されることによって改変されるように、追加的なヌクレアーゼを細胞で発現してもよい。このようにして、ドナー分子の反復的な組込みを生じ、目的の特定の遺伝子座またはセーフハーバー遺伝子座で、形質を積み重ねることを可能とし得る。

40

送達

【0138】

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、ならびに本明細書に記載されているタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含む組成物を、任意の適当な手段によって、任意の細胞型へin vivoまたはex vivoで送達してもよい。

【0139】

適当な細胞としては、真核（例えば、動物または植物）および原核の細胞および/または細胞株が挙げられる。かかる細胞またはかかる細胞から生成される細胞株の非限定的な例としては、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、

50

CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293(例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T)およびperC6細胞、ならびにSpodoptera fugiperda(Sf)などの昆虫細胞、またはSaccharomyces、PichiaおよびSchizosaccharomycesなどの真菌細胞、ならびに単子葉または双子葉植物由来の植物細胞が挙げられる。ある特定の実施形態において、細胞株は、CHO、MDCK、またはHEK293細胞株である。適当な細胞としては、例として、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞および間葉幹細胞などの幹細胞が挙げられる。

【0140】

本明細書に記載されているようなヌクレアーゼの送達方法は、例えば、米国特許第6,453,242号、第6,503,717号、第6,534,261号、第6,599,692号、第6,607,882号、第6,689,558号、第6,824,978号、第6,933,113号、第6,979,539号、第7,013,219号および第7,163,824号に記載されており、それらの全ての開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている。

【0141】

また、本明細書に記載されているようなヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物を、1種または複数のZFN、TALENまたはCRISPR/Cas系(複数可)をコードする配列を含有するベクターを使用して送達してもよい。以下に限定されないが、プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクターなどを含めた任意のベクター系を使用してよい。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第6,534,261号、第6,607,882号、第6,824,978号、第6,933,113号、第6,979,539号、第7,013,219号および第7,163,824号も参照されたい。さらに、任意のこれらのベクターが、処置に求められる1種または複数の配列を含んでもよいことは明らかである。そのため、1種または複数のヌクレアーゼおよびドナー構築物を細胞内に導入する際に、ヌクレアーゼおよび/またはドナーポリヌクレオチドを同じベクターまたは異なるベクターに保有させてもよい(DNA MC)。複数のベクターを使用する際には、各ベクターは、1種または複数種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を含んでもよい。

【0142】

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は、細胞(例えば、哺乳動物細胞)および標的組織に、ヌクレアーゼおよびドナー構築物をコードする核酸を導入するために使用することができる。非ウイルスベクター送達系としては、DNAまたはRNAプラスミド、DNA MC、ネイキッド核酸、およびリポソームまたはポロキサマーなどの送達ビヒクルとの複合体を形成している核酸が挙げられる。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、これらは細胞へ送達された後に、エピソームゲノムまたは組み込まれたゲノムのどちらかを有する。遺伝子操作されたDNA結合タンパク質およびこれらの結合タンパク質を含む融合タンパク質のin vivo送達の総説については、Rebar(2004年)、Expert Opinion Invest. Drugs、13巻(7号):829~839頁、Rossiら(2007年)、Nature Biotech.、25巻(12号):1444~1454頁、ならびに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

10

20

30

40

50

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)、Haddadaら、Current Topics in Microbiology and Immunology中のDoerflerおよびBohm著(1995年)ならびにYura、Gene Therapy、1巻:13~26頁(1994年)などの一般的な遺伝子送達の文献を参照されたい。

【0143】

核酸の非ウイルス送達方法としては、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、遺伝子銃、ピロソーム、リボソーム、免疫リボソーム、ポリカチオン、または脂質:核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ビリオン、および薬剤で増強されたDNA取り込みが挙げられる。例えば、Sonitron 2000システム(Rich-Mar)を使用するソノポレーションも、核酸の送達に使用することができる。

10

【0144】

追加的な例示の核酸送達系としては、Amixa Biosystems(ケルン、ドイツ)、Maxcyte, Inc.(ロックビル、メリーランド州)、BTX Molecular Delivery Systems(ホリストン、マサチューセッツ州)、およびCopernicus Therapeutics Inc.(例えば、米国特許第6,008,336号を参照されたい)によって提供されるものが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、第4,946,787号、および第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(例えば、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適した陽イオン性および中性脂質としては、FelgnerのWO91/17424、WO91/16024の脂質が挙げられる。

20

【0145】

免疫脂質複合体などの標的化されたリボソームを含めた脂質:核酸複合体の調製は、当業者に周知である(例えば、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(1994年)、Gaoら、Gene Therapy、2巻:710~722頁(1995年)、Ahmadら、Cancer Res.、52巻:4817~4820頁(1992年)、ならびに米国特許第4,186,183号、第4,217,344号、第4,235,871号、第4,261,975号、第4,485,054号、第4,501,728号、第4,774,085号、第4,837,028号および第4,946,787号を参照されたい)。

30

【0146】

追加的な送達方法としては、送達される核酸のEnGeneIC送達ビヒクル(EDV)内へのパッケージングを使用することが挙げられる。これらのEDVは、抗体の1つのアームが標的組織に対する特異性を有し、かつ他方がEDVに対する特異性を有する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。抗体は、EDVを標的細胞の表面に運び、次いでEDVは、エンドサイトーシスにより細胞内に運ばれる。細胞内に取り込まれると、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)。

40

【0147】

遺伝子操作されたZFP、TALE、CRISPR/Cas系をコードする核酸を送達するためのRNAまたはDNAウイルスに基づく系の使用は、ウイルスに体内の特定の細胞を標的とさせ、ウイルスペイロードを核に輸送するための高度に進化した過程を利用す

50

る。ウイルスベクターは、患者に直接投与 (in vivo) することができるか、またはインビトロで細胞を処置するために使用することができ、改変された細胞は患者に投与される (ex vivo)。ZFPを送達する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、アデノ関連ウイルス、ワクチン、および単純ヘルペスウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。宿主ゲノム内の組込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ関連ウイルスの遺伝子移入方法を用いて可能であり、多くの場合、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。さらに、高い形質導入効率、多くの異なる細胞型および標的組織において観察されている。

【0148】

レトロウイルスの向性は、外来のエンベロープタンパク質を組み入れることによって変更することができ、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大させる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入または感染させることができるレトロウイルスベクターであり、典型的には高ウイルス力価を生じる。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6~10 kbの外来配列に用いるパッケージング能力を有する、シス作用性の長い末端反復からなる。最小限のシス作用性LTRが、ベクターの複製およびパッケージングには十分であり、それらは、次いで、治療遺伝子を標的細胞内に組み込むために使用されて、導入遺伝子の永続的な発現を提供する。広く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)、およびそれらの組合せに基づくものが挙げられる (例えば、Buchschera、J. Virol.、66巻: 2731~2739頁 (1992年)、Johannら、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/US 94/05700を参照されたい)。

【0149】

一過性発現が好適な用途では、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、多くの細胞型で非常に高い効率で形質移入が可能であり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターを用いて、高力価および高レベルの発現を得ている。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。また、アデノ関連ウイルス (「AAV」) ベクターを使用して、例えば、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 の遺伝子治療の手順 (例えば、Westら、Virology、160巻: 38~47頁 (1987年)、米国特許第4,797,368号、WO 93/24641、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) に用いるために、細胞に標的核酸を形質導入することもできる。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号、Tratschinら、Mol. Cell. Biol.、5巻: 3251~3260頁 (1985年)、Tratschin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)を含めた多数の刊行物に記載されている。

【0150】

少なくとも6つのウイルスベクターアプローチが、現在、臨床試験の遺伝子移入に利用可能であり、それらは、形質導入薬剤を生成するために、ヘルパー細胞株内に挿入された遺伝子による欠損ベクターの相補性を含むアプローチを利用する。

【0151】

10

20

30

40

50

p L A S NおよびM F G - Sは、臨床試験で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/p L A S Nは、遺伝子治療試験で使用された最初の治療ベクターであった。(Blaeseら、Science、270巻：475～480頁 (1995年))。M F G - Sでパッケージされたベクターについて、50%またはそれ超の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)、Dranooffら、Hum. Gene Ther.、1巻：111～2頁 (1997年))。

10

【0152】

組換えアデノ関連ウイルスベクター (r A A V) は、欠損型および非病原性のバルボウイルスアデノ関連2型ウイルスに基づく有望な代替の遺伝子送達システムである。全てのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するA A V 1 4 5 b pの逆方向末端反復のみを保持するプラスミドに由来する。形質導入された細胞のゲノム内への組込みに起因する効率的な遺伝子移入および安定な導入遺伝子送達は、このベクター系の鍵となる特長である (Wagnerら、Lancet 351巻：9117号 1702～3頁 (1998年)、Kearnsら、Gene Ther. 9巻：748～55頁 (1996年))。A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9およびA A V r h 1 0、ならびに任意の新規A A V血清型を含めた他のA A V血清型も、本発明に従って使用することができる。

20

【0153】

複製欠損性組換えアデノウイルスベクター (A d) は、高力価で産生することができ、多数の異なる細胞型を容易に感染させる。アデノウイルスベクターのほとんどは、導入遺伝子がA d E 1 a、E 1 b、および/またはE 3遺伝子を置き換えて、その後、複製欠損性ベクターが、欠失した遺伝子機能をトランスに供給するヒト293細胞で増殖するように、遺伝子操作される。A dベクターは、肝臓、腎臓、および筋肉で見出されるものなど非分裂性の分化細胞を含む、複数の種類の組織をin vivoで形質導入することができる。従来のA dベクターは、大きな保有能力を有する。臨床試験でA dベクターを使用する例では、筋肉内注入を用いた抗腫瘍免疫化のポリヌクレオチド治療が含まれた (Stermannら、Hum. Gene Ther.、7巻：1083～9頁 (1998年))。臨床試験における遺伝子移入に用いるアデノウイルスベクターの使用の追加的な例としては、Roseneckerら、Infection、24巻：1号、5～10頁 (1996年)、Stermann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)、Stermannら、Hum. Gene Ther.、7巻：1083～1089頁 (1998年) が挙げられる。

30

【0154】

パッケージング細胞を使用して、宿主細胞を感染させることが可能な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が含まれる。遺伝子治療で使用するウイルスベクターは、通常、ウイルス粒子内に核酸ベクターをパッケージングする生産細胞株によって生成される。これらのベクターは、典型的に、パッケージングおよびその後の宿主への組込みに必要とされる最小限のウイルス配列 (適用可能な場合)、発現させるタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられている他のウイルス配列を含有する。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トランスに供給される。例えば、遺伝子治療に使用するA A Vベクターは、典型的には、宿主ゲノム内へのパッケージングおよび組込みに必要とされるA A Vゲノム由来の逆方向末

40

50

端反復 (I T R) 配列のみを具える。ウイルス D N A は、細胞株中にパッケージングされ、他の A A V 遺伝子即ち、r e p および c a p をコードするものの I T R 配列を欠失したヘルパープラスミドを含有する。細胞株はまた、ヘルパーとしてアデノウイルスに感染する。ヘルパーウイルスは、A A V ベクターの複製、およびヘルパープラスミド由来の A A V 遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、I T R 配列を欠失しているため、有意な量にはパッケージングされない。アデノウイルスによる夾雑は、例えば、A A V よりも感受性があるアデノウイルスに対する熱処理によって低減することができる。

【 0 1 5 5 】

多くの遺伝子治療用途では、遺伝子治療ベクターが、高度な特異性で特定の細胞型に送達されることが望ましい。したがって、ウイルスの外表面上でウイルス外被タンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現することによって、ウイルスベクターを所与の細胞型に対する特異性を有するように改変することができる。リガンドは、目的の細胞型上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ばれる。例えば、H a n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 9 2 巻 : 9 7 4 7 ~ 9 7 5 1 頁 (1 9 9 5 年) は、モロニー Maus 白血病ウイルスを改変して、g p 7 0 に融合されたヒトヘレグリンを発現することができ、その組換えウイルスが、ヒト上皮成長因子受容体を発現しているある特定のヒト乳がん細胞を感染させることを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質をウイルスが発現する、他のウイルス - 標的細胞の対にまで及び得るものである。例えば、線状ファージを遺伝子操作して、事実上いかなる選ばれた細胞受容体にも特異的な結合親和性を有する抗体断片 (例えば、F A B または F v) を提示することができる。上記の記載は、主にウイルスベクターに適用されるが、同じ原理を非ウイルスベクターに適用することができる。そのようなベクターを遺伝子操作して、特異的な標的細胞による取り込みに好都合な特異的な取り込み配列を含有させることができる。

【 0 1 5 6 】

遺伝子治療ベクターは、下記に説明するように、個々の患者への投与によって、典型的には、全身投与 (例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下もしくは頭蓋内注入) または局所適用によって、i n v i v o で送達することができる。あるいは、個々の患者から移植された細胞 (例えば、リンパ球、骨髓穿刺液、組織生検) や万能ドナーの造血幹細胞などの細胞に、ベクターを e x v i v o で送達し、続いて、通常はベクターを組み入れた細胞を選択した後に、患者への細胞の再移植を行うことができる。

【 0 1 5 7 】

また、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 (例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リボソーム等) を、i n v i v o で細胞の形質導入のために、生物に直接投与することもできる。あるいは、ネイキッド D N A を投与することができる。投与は、血液または組織の細胞との最終的な接触の内に分子を導入するために通常使用される経路のいずれかに依り、そのような経路としては、注射、注入、局所適用、およびエレクトロポレーションが挙げられるが、これらに限定されない。そのような核酸を投与する適当な方法は、利用可能であり、当業者に周知であり、そして、1 つよりも多い経路を使用して特定の組成物を投与することができるが、多くの場合、特定の経路は、別の経路よりも速やかかつ有効な反応を提供することができる。

【 0 1 5 8 】

本明細書に記載されているポリヌクレオチド (例えば、ヌクレアーゼをコードするおよび / または二本鎖のドナー) の導入に適したベクターとしては、非組込み型レンチウイルスベクター (I D L V) が挙げられる。例えば、O r y ら (1 9 9 6 年) 、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 9 3 巻 : 1 1 3 8 2 ~ 1 1 3 8 8 頁、D u l l ら (1 9 9 8 年) 、 J . V i r o l . 、 7 2 巻 : 8 4 6 3 ~ 8 4 7 1 頁、Z u f f e r y ら (1 9 9 8 年) 、 J . V i r o l . 、 7 2 巻 : 9 8 7 3 ~ 9 8 8 0 頁、F o l l e n z i ら (2 0 0 0 年) 、 N a t u r e G e n e t i c s 、 2 5 巻 : 2 1 7 ~ 2 2 2 頁、米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 1 1 1 7 6 1 7 号を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0159】

薬学的に許容される担体は、投与されている特定の組成物によって、および組成物を投与するために使用される特定の方法によって、ある程度は決定される。したがって、下記に記載するように、利用可能な医薬組成物の実に様々な適当な製剤が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17版、1989年を参照されたい）。

【0160】

ヌクレアーゼをコードする配列とドナー構築物とを、同じまたは異なる系を使用して送達することができることは明らかである。例えば、ヌクレアーゼおよびドナーを同じDNA-MCによって保有することができる。あるいは、ドナーポリヌクレオチドをMCによって保有することができ、一方、1種または複数のヌクレアーゼを標準的なプラスミドまたはAAVベクターによって保有することができる。さらに、これらの異なるベクターを、同じまたは異なる経路（筋肉内注射、尾静脈注射、他の静脈内注射、腹腔内注射および/または筋肉内注射）によって投与することができる。これらのベクターを、同時にまたは任意の順番で、送達することができる。

10

【0161】

そのため、本開示は、治療タンパク質をコードする導入遺伝子の挿入に適応し易い疾患および状態のin vivoまたはex vivoでの処置を含み、例えば、第VIII因子（F8）などの凝固因子のヌクレアーゼ媒介性組込みを介した血友病の処置などを含む。組成物は、血清または標的器官もしくは標的細胞で所望の濃度の治療ポリペプチドを得るために、有効量でヒト患者へ投与される。投与は、ポリヌクレオチドが所望の標的細胞に送達される任意の手段に依る。例えば、in vivoおよびex vivoの両方の方法が意図される。門脈への静脈内注射は、好ましい投与方法である。他のin vivo投与の様式としては、例えば、肝動脈を通じることを含めて肝臓葉もしくは胆汁管への直接注射および肝臓遠位への静脈注射、肝実質への直接注射、肝動脈を介した注射ならびに/または胆管を通じた逆行注射が挙げられる。ex vivo投与の様式としては、切除した肝細胞または肝臓の他の細胞をin vitroで形質導入し、続いて形質導入された切除肝細胞をヒト患者の門脈脈管、肝実質または胆汁管へ戻して注入することが挙げられる。例えば、Grossmanら、Nature Genetics、6巻：335～341頁（1994年）を参照されたい。

20

30

【0162】

投与する有効量のヌクレアーゼ（複数可）およびドナーは、患者に応じておよび目的の治療ポリペプチドによって変化することになる。したがって、有効量は、その組成物を投与する臨床医によって最適に決定され、適切な投薬量は、当業者によって容易に決定され得る。十分な時間で組込みおよび発現させた後（例えば、典型的には4～15日間）、治療ポリペプチドの血清または他の組織のレベルの分析、および投与前の初期レベルとの比較によって、投与されている量が少なすぎるのか、適正な範囲内であるか、または多すぎるのかを決定する。また、初期投与およびそれに引き続いての投与に適したレジメンも変化し得るが、初期投与と、必要であればそれに引き続いての投与とを行うのが典型的である。引き続いての投与は、種々の間隔で投与されてもよく、毎日から毎年まで数年に1回までの範囲に及ぶ。当業者は、適切な免疫抑制技法が、送達ベクターの免疫抑制による形質導入の阻害または遮断を回避するために推奨され得ることを理解する。例えば、Vilquinら、Human Gene Ther.、6巻：1391～1401頁（1995年）を参照されたい。

40

【0163】

ex vivoとin vivoとの両方の投与に用いる製剤としては、液体中懸濁液物または乳濁液が挙げられる。多くの場合、活性成分は、薬学的に許容され、かつ活性成分に適合する賦形剤と混合される。適当な賦形剤としては、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどおよびそれらの組合せが挙げられる。さらに、組成物は、湿潤剤もしくは乳濁剤、pH緩衝剤、安定化剤または医薬組成物の効果を

50

高める他の試薬などの微量の補助的な物質を含有していてもよい。

【0164】

上述したように、DNA構築物（例えば、DNA MC）を、種々の従来の技法によって、所望の植物宿主（例えば、そのゲノム）内に導入することができる。そのような技法の総説については、例えば、Weissbach & Weissbach *Methods for Plant Molecular Biology*（1988年、Academic Press、N.Y.）、第8節、421～463頁およびGrierson & Corey, *Plant Molecular Biology*（1988年、第2版）、Blackie、ロンドン、第7～9章を参照されたい。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第8,399,218号、第8,329,986号、第8,329,986号、およびに米国特許出願公開第20110189775号も参照されたい。

10

【0165】

例えば、DNA構築物を、植物プロトプラストのエレクトロポレーションやマイクロインジェクションなどの技法を使用して、植物細胞のゲノムDNAへ直接的に導入することができ、または、DNA構築物を、DNA粒子衝撃などの遺伝子銃法を使用して、植物組織に直接的に導入することができる（例えば、Kleinら（1987年）、*Nature*、327巻：70～73頁を参照されたい）。あるいは、DNA構築物（複数可）を、ナノ粒子形質転換を介して植物細胞内へ導入することができる（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20090104700号を参照されたい）。あるいは、DNA構築物を、適当なT-DNA境界/隣接領域と組み合わせて、従来の*Agrobacterium tumefaciens*宿主ベクターへ導入することができる。*Agrobacterium tumefaciens*媒介性トランスフェクション技法は、癌遺伝子の無害化ならびにバイナリーベクターの開発および使用を含めて、科学文献に詳しく記載されている。例えば、Horschら（1984年）、*Science*、233巻：496～498頁およびFralleyら（1983年）、*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*、80巻：4803頁を参照されたい。

20

【0166】

また、遺伝子移入を、*Rhizobium* sp. NGR234、*Sinorhizobium meliloti*、*Mesorhizobium loti*、ジャガイモXウイルス、カリフラワーモザイクウイルスおよびキャッサバ葉脈モザイクウイルスならびに/またはタバコモザイクウイルスなどの非アグロバクテリウム細菌またはウイルスを使用して達成することができる。例えば、Chungら（2006年）、*Trends Plant Sci.*、11巻（1号）：1～4頁を参照されたい。

30

【0167】

*Agrobacterium tumefaciens*宿主の病原性機能は、バイナリーT-DNAベクター（Bevan（1984年）、*Nuc. Acid Res.*、12巻：8711～8721頁）または共培養手法（Horschら（1985年）、*Science*、227巻：1229～1231頁）を使用して細胞を細菌に感染させる際に、構築物および隣接マーカ含有するT鎖が植物細胞のDNAに挿入されるように誘導する。一般に、アグロバクテリウム形質転換系は、双子葉植物を遺伝子操作するために使用される（Bevanら（1982年）、*Ann. Rev. Genet.*、16巻：357～384頁、Rogersら（1986年）、*Methods Enzymol.*、118巻：627～641頁）。アグロバクテリウム形質転換系はまた、DNAを単子葉植物および植物細胞に形質転換および移入するために使用することができる。米国特許第5,591,616号、Hernalsteenら（1984年）、*EMBO J* 3巻：3039～3041頁、Hooykass-Van Slogterenら（1984年）、*Nature*、311巻：763～764頁、Grimsleyら（1987年）、*Nature*、325巻：1677～179頁、Boultonら（1989年）、*Pl*

40

50

ant Mol. Biol.、12巻：31～40頁およびGouldら(1991年)、Plant Physiol.、95巻：426～434頁を参照されたい。

【0168】

代替的な遺伝子移入および形質転換の方法としては、ネイキッドDNAのカルシウム媒介性、ポリエチレングリコール(PEG)媒介性またはエレクトロポレーション媒介性の取り込みを介したプロトプラストの形質転換(Paszkowskiら(1984年)、EMBOJ3巻：2717～2722頁、Potrykusら(1985年)、Molec. Gen. Genet.、199巻：169～177頁、Frommら(1985年)、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、82巻：5824～5828頁およびShimamoto(1989年)、Nature、338巻：274～276頁を参照のこと)、および植物組織のエレクトロポレーション(D'Halluinら(1992年)、Plant Cell、4巻：1495～1505頁)が挙げられるが、これらに限定されない。植物細胞の形質転換に用いる追加的な方法としては、マイクロインジェクション、炭化ケイ素(例えば、WHISKERS(商標))媒介性DNA取り込み(Kaepplerら(1990年)、Plant Cell Reporter、9巻：415～418頁)および微粒子銃(Kleinら(1988年)、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、85巻：4305～4309頁およびGordon-Kammら(1990年)、Plant Cell、2巻：603～618頁を参照されたい)が挙げられる。

10

【0169】

上記の任意の形質転換技法によって作製された形質転換植物細胞を培養して、形質転換された遺伝子型と、それゆえ所望の表現型とを具えている全植物体を再生することができる。そのような再生技法は、組織培養増殖培地中のある特定の植物ホルモンを操作することに依り、典型的には、所望のヌクレオチド配列と共に導入されている殺生物剤マーカーおよび/または除草剤マーカーに依る。培養プロトプラストからの植物の再生は、Evansら、「Protoplasts Isolation and Culture」、Handbook of Plant Cell Culture、124～176頁、Macmillan Publishing Company、ニューヨーク、1983年、およびBinding、Regeneration of Plants、Plant Protoplasts、21～73頁、CRC Press、Boca Raton、1985年に記載されている。また、再生を、植物のカルス、外植片、器官、花粉、胚またはそれらの一部から得ることもできる。そのような再生技術は、Kleeら(1987年)、Ann. Rev. of Plant Phys.、38巻：467～486頁に概ね記載されている。

20

30

【0170】

植物細胞内へ導入される核酸は、本質的に任意の植物に、所望の形質を付与するために使用することができる。実に様々な植物および植物細胞系を、本開示の核酸構築物および上述の様々な形質転換方法を使用して、本明細書に記載されている所望の生理学的特徴のために遺伝子操作することができる。好適な実施形態では、遺伝子操作のための標的植物および植物細胞としては、穀物作物(例えば、コムギ、トウモロコシ、イネ、アワ、オオムギ)、果実作物(例えば、トマト、リンゴ、ナシ、イチゴ、オレンジ)、飼料作物(例えば、アルファルファ)、根菜作物(例えば、ニンジン、ジャガイモ、サトウダイコン、ヤムイモ)、葉菜作物(例えば、レタス、ホウレンソウ)を含む作物；顕花植物(例えば、ペチュニア、バラ、キク)、針葉樹およびマツ(例えば、マツ、モミ、トウヒ)；ファイトレメディエーションで使用される植物(例えば、重金属蓄積植物)；油料作物(例えば、ヒマワリ、ナタネ)や実験目的のために使用される植物(例えば、アラビドプシス)などの、単子葉植物および双子葉植物が挙げられるが、これらに限定されない。そのため、開示されている方法および組成物は、以下に限定されないが、アスパラガス属(Asparagus)、カラスムギ属(Avena)、アブラナ属(Brassica)、ミカン属(Citrus)、スイカ属(Citrullus)、トウガラシ属(Capsicum)

40

50

Capsicum)、カボチャ属(Cucurbita)、ニンジン属(Daucus)、ムカシヨモギ属(Erigeron)、ダイズ属(Glycine)、ワタ属(Gossypium)、オオムギ属(Hordeum)、アキノノゲシ属(Lactuca)、ドクムギ属(Lolium)、トマト属(Lycopersicon)、リンゴ属(Malus)、キャッサバ属(Manihot)、タバコ属(Nicotiana)、オオアラセイトウ属(Orychophragmus)、イネ属(Oryza)、ワニナシ属(Persea)、インゲンマメ属(Phaseolus)、エンドウ属(Pisum)、ナシ属(Pyrus)、サクラ属(Prunus)、ダイコン属(Raphanus)、ライムギ属(Secale)、ナス属(Solanum)、モロコシ属(Sorghum)、コムギ属(Triticum)、ブドウ属(Vitis)、ササゲ属(Vigna) およびトウモロコシ属(Zea)に由来する種(これらに限定されない)を含めて、広範な植物にわたって使用されている。

10

【0171】

植物細胞への核酸の導入を、本質的に任意の植物に所望の形質を付与するために使用することができる。ある特定の実施形態では、植物細胞中の変更されたMDH発現/機能は、果実の収量の増加、植物(またはその植物の果実)のバイオマスの増加、より高い果肉含量、着果の集中、より大きな植物体、新鮮重の増加、乾燥重の増加、固体肉質の増加、より高い収穫時総重量、作物の色合いの強度および/または均一性の向上、化学物質(例えば、油、脂肪酸、炭水化物、タンパク質)の特性の変更などを有する植物をもたらす。

20

【0172】

当業者は、外因性の配列を植物細胞内へ一過的に組み入れることができることを認識することになる。外因性ポリヌクレオチド配列の導入は、当該配列が導入されている植物細胞の細胞機構を利用することができる。植物細胞内へ一過的に組み入れられたZFNを含む外因性のポリヌクレオチド配列の発現は、標的配列のゲノムDNAを解析することによってアッセイされて、任意のインデル、逆位または挿入を同定し決定することができる。これらの再編成の種類は、ゲノムDNA配列内の標的部位の切断、およびそれに続くDNA修復に起因する。さらに、当業者に公知のマーカー遺伝子発現の試験を可能にする方法を使用して、外因性ポリヌクレオチド配列の発現をアッセイすることができる。種々の植物、組織およびDNA送達系を使用したマーカー遺伝子の一過的発現が、報告されている。一過的解析系としては、目的の任意の植物種を使用した任意の一過的な植物アッセイに際しての、エレクトロポレーションまたは組織の粒子衝撃を介した直接的な遺伝子送達

30

【0173】

当業者は、外因性ポリヌクレオチド配列を形質転換植物に安定に組み入れることができるということを認識する。外因性ポリヌクレオチド配列は、作動可能であることが確認されると、雌雄間交配によって他の植物体へ導入することができる。交配させる種に応じて、多くの任意の標準的な育種技法を使用することができる。

40

【0174】

形質転換した植物細胞、カルス、組織または植物体は、形質転換しているDNA上に存在するマーカー遺伝子によってコードされている形質について、遺伝子操作された植物材料を選択またはスクリーニングすることによって、同定または単離されてもよい。例えば、形質転換している遺伝子構築物が抵抗性を付与する、阻害量の抗生物質または除草剤を含有する培地上に、遺伝子操作した植物材料を増殖させることによって、選択を行うことができる。さらに、形質転換された植物体または植物細胞は、組換え核酸構築物上に存在

50

し得る任意の可視マーカー遺伝子（例えば、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、B または C 1 遺伝子）の活性をスクリーニングすることによって、同定することもできる。そのような選択またはスクリーニングの方法論は、当業者に周知である。

【0175】

また、物理学的または生化学的な方法を、安定に挿入された遺伝子構築物を含有する植物体もしくは植物細胞の形質転換体、または部位特異的なエンドヌクレアーゼ（例えば、ZFN）の一過的発現によって生じる標的遺伝子を変更したゲノムDNAを含有する植物細胞を同定するために、使用することができる。これらの方法としては、1）組換えDNA挿入物の構造を検出して決定するためのサザンブロット解析またはPCR増幅、2）遺伝子構築物のRNA転写物を検出して調べるためのノーザンブロット、S1 RNase 10 保護、プライマー伸長または逆転写酵素-PCR増幅、3）酵素またはリボザイム活性を検出するための、当該遺伝子産物が遺伝子構築物によってコードされている酵素アッセイ、4）遺伝子構築物の産物がタンパク質である、タンパク質ゲル電気泳動、ウェスタンブロット技法、免疫沈降または酵素結合免疫アッセイ（ELISA）が挙げられるが、これらに限定されない。in situハイブリダイゼーション、酵素染色や免疫染色などの追加的な技法もまた、特異的な植物器官および組織での組換え構築物の存在または発現を検出するために、使用することができる。全てのこれらのアッセイを行うための方法は、当業者に周知である。

【0176】

本明細書に開示されている方法を使用した遺伝子操作の効果は、例えば、目的の組織から単離されたRNA（例えば、mRNA）のノーザンブロットによって、観察することができる。典型的には、mRNAが存在するか、またはmRNA量が増える場合に、対応の導入遺伝子が発現していることが推察され得る。遺伝子および/またはコードされたポリペプチドの活性を測定する他の方法を使用することができる。使用された基質に応じて、および、反応産物または副産物の増加または減少を検出する方法に応じて、異なる種類の酵素アッセイを使用することができる。発現されているポリペプチドのレベルを、免疫化学的に、例えば、ELISA、RIA、EIA、および電気泳動検出アッセイによる（または染色もしくはウェスタンブロッティングを用いてのどちらか）などの抗体に基づく当業者に周知の他のアッセイなどで測定することもできる。非限定的な一例として、ELISAアッセイを使用したAAD-1およびPATタンパク質の検出が、参照によりその 30 全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第7,838,733号に記載されている。導入遺伝子は、植物の一部の組織中もしくは一部の生育ステージで選択的に発現するか、または、導入遺伝子は、実質的に全ての植物組織中で、実質的に全ての生活サイクルに合わせて、発現する場合がある。しかし、任意の組合せの発現様式もまた利用可能である。

【0177】

本願の開示は、先に記載されている形質転換植物の種子をも包含し、ここで、種子は導入遺伝子または遺伝子構築物を有する。本開示は、さらに、先に記載されている形質転換植物の子孫、クローン、細胞株または細胞を包含し、ここでは、前記子孫、クローン、細胞株または細胞は、導入遺伝子または遺伝子構築物を有する。

【0178】

融合タンパク質（例えば、ZFN）および融合タンパク質をコードする発現ベクターは、遺伝子調節、標的化された切断および/または組換えに用いる植物に、直接的に投与することができる。ある特定の実施形態では、植物は、複数のパラログスなMDH標的遺伝子を含有する。そのため、植物中のこれらの1種または複数のパラログスな遺伝子を標的化するために、1種または複数の異なる融合タンパク質または融合タンパク質をコードする発現ベクターを、植物に投与することができる。

【0179】

有効量の投与は、処理する植物細胞に最大に接触させるよう融合タンパク質を導入するために通常使用される任意の経路に依る。ZFPは、任意の適当な方式で、好ましくは許容可能な担体を用いて投与される。そのようなモジュレーターを投与する適当な方法は利 50

用可能であり、当業者に周知であり、そして、特定の組成物を投与するために、1種よりも多い経路を利用することができるものの、多くの場合、特定の経路は、別の経路よりも速やかかつ有効な反応を提供する。

【0180】

また、担体が使用されてもよく、投与されている特定の組成物によって、および組成物を投与するために使用する特定の方法によって、ある程度は決定される。したがって、利用可能な担体の実に様々な適当な製剤が存在する。

【0181】

以下の実施例は、ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を含む、本開示の例示的な実施形態に関する。このことが、実例のみの目的にあること、ならびに他のヌクレアーゼが使用され得ること、例えば、遺伝子操作されたDNA結合ドメインと共にTALEN、CRISPR/Cas系、ホーミングエンドヌクレアーゼ(メガヌクレアーゼ)が使用され得ること、および/または天然起源のもしくは遺伝子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)とDNA結合ドメインと異種由来開裂ドメインとの融合物が使われ得ることであることは理解されよう。

10

【実施例】

【0182】

(実施例1): CD34 + HSCのヌクレオフェクション

標準的なプラスミドに比較した場合のDNA MCの毒性を評価するために、GFPをコードするドナーを使用して、ヒトCD34 + HSCにて実験を行った。端的に述べれば、組織の単一細胞の懸濁液を得るステップと、次いでHSCを含有するCD34 + 画分を、磁性ビーズ技術(Miltenyi Biotech)を使用して単離するステップとを含む標準的な方法を使用して、新鮮な胎仔肝のHSCを単離した。HSCのヌクレオフェクションを、Amaxa 4Dヌクレオフェクターを使用し、CD34プログラムを使用して行った。CCR5特異的なZFNをコードするmRNAは、mMessage mMachine T7転写キットなどの標準的な方法を使用して、および製造業者のプロトコール(Ambion)を使用することによって作製し、次いで、プラスミドドナーとMC DNAのどちらかと併せて、細胞内へヌクレオフェクトした。

20

【0183】

プラスミドドナー試料には、3.75 µgの各CCR5 ZFN mRNAを5 µgのプラスミドDNAドナーと共に使用し、一方、DNA MC試料には、3.75 µgの各CCR5 ZFN mRNAを0.5 µgのMCドナーと共に使用した。異なるDNAドナーの使用量は、各種類のドナーに最適化された量に基づいており、MC DNAをより少ない量としたことは、そのドナー配列としてのより大きな活性から実行可能であった。CCR5 ZFNは、米国特許第7,951,925号および第8,524,221号に記載されており、プラスミドおよびDNA MCドナーの地図は、図1に図説されている。

30

【0184】

ヌクレオフェクションに続いて、細胞を30 で一晚回復させて、次いで、Current Protocols in Flow Cytometryに記載されているように、7-AAD排除によって生存率を分析した。

40

【0185】

プラスミドP2UをDNA MC M1Pと比較することによって、ミニサークルは、プラスミドドナーに比べて、細胞に対し毒性が大幅に低いことが示された(図2Aを参照)。この同じ傾向は、プラスミドP2UをDNA MC M2UまたはPCR産物PCR2Uと比べた場合に、ZFNの存在下と非存在下との両方で見出された(図2Bを参照)。

【0186】

さらに、ZFN mRNAを用いて、プラスミドP2UまたはミニサークルM2Uのどちらかと共に、HSCをヌクレオフェクトした。使用した方法は、既出の実験に記載され

50

ている通りである。ヌクレオフェクション後2時間で、IFN、ISG15、ISG54、ISG54またはCXCL10に対応する転写物のレベルを、定量的逆転写酵素PCRによって測定し、その結果を、無処理の対照HSCについて記録したベースラインを超えたレベルにおける増加倍率としてプロットした。

【0187】

図2Cに示すように、プラスミドDNAは、インターフェロン刺激性遺伝子(ISG)と、プラスミドDNAによって引き起こされる毒性全体に寄与し得るIFNとを、高度に誘導した。これに対して、ミニサークルDNAドナーM2Uは、大幅に少ないISGの発現を誘導した。

【0188】

10

(実施例2)：遺伝子操作したCD34+HSCのNSGマウスへの生着

例えば、Holtら、2010年、Nature Biotech.、28巻：839～47頁に記載されているような標準的なプロトコルを使用し、上述のような様々なプラスミドおよびミニサークルドナー構築物を用いてヌクレオフェクトされたヒトCD34+HSCを、NSGマウスに使用して生着させ、「ヒト化マウス」を作製した。生着後4週目、8週目、12週目、16週目および20週目に、標準的な方法論によって、またHoltら、2010年、Nature Biotech.、28巻：839～47頁に記載されているように、試料をマウスの末梢血から採取した。

【0189】

20

マウスに順調に生着し、続いてヒトCD45+子孫血液細胞を生じるためのヒトHSCの能力を、FACS分析により白血球上のヒトCD45の発現を評価することによって、またHoltら、2010年、Nature Biotech.、28巻：839～47頁に記載されているように、分析した。実験によって、DNA MCを用いて形質転換された細胞が生存率の向上を示したことが示された(図3Aを参照)。さらに、20週間で動物を屠殺し、上述のようなFACS分析によって、血液、骨髄および脾臓中のヒトCD45陽性細胞の百分率を決定するために分析を行った。

【0190】

30

その結果、DNA MCを用いてヌクレオフェクトされた細胞は、プラスミドDNAドナーを受けたヒトHSCよりも高い程度にまで、NSGマウスの骨髄や脾臓などの組織中でそれ自体を確立することが可能であったことが示された。図3Aを参照されたい。

【0191】

NSGマウスの第2のコホートを用いて、実験を繰り返したところ、結果は同様であった。図3Bを参照されたい。

【0192】

40

さらに、ZFNと、P1PまたはM1Pのどちらかを用いた、ヒトHSCのヌクレオフェクションとの比較実験を実施したが、この実験では、ヒトHSCを新生仔NSGマウスに注射し、このことによって、HSCがその後異なる系譜のヒト血液細胞、例えば、Cd19+B細胞ならびにCD4+およびCD8+T細胞を分化させて産生する能力を、より良好に分析できるようにした。8週目および12週目に、生着の基準として総ヒトCD45+集団の存在について、血液試料を分析し、ヒトCD45+細胞が5%超であったあらゆる試料については(図3C)、FACSによって、異なる系譜(B細胞、ならびにCD4およびCD8 T細胞)のマーカーに関して細胞をさらに分析することもできた。その結果、MC DNAを用いて処理した細胞は、分化し、これらの異なるサブセットを産生することが示された。図3Dを参照されたい。これに対して、P1Pプラスミドを用いて処理した細胞は、生着レベルが極めて低く(図3Cを参照)、このことは、系譜の分析を実施することができなかったことを意味した。

【0193】

(実施例3)：導入遺伝子の挿入

MC上に保有されたGFP導入遺伝子ドナーが、ヌクレオフェクトされたヒトHSCに

50

組み込まれていることを確認するために、Current Protocols in Flow Cytometryに記載されているものなどの標準的なプロトコールを使用して、ヌクレオフェクション後10日目まで、GFP+細胞を検出するために、FACS分析を用いてGFPの発現を分析した。培養4～10日目までに、ヌクレアーゼ(ZFN)を受けなかった細胞は、GFP発現がバックグラウンドレベルにのみ戻った。一方、ZFNとドナーとの共トランスフェクションは、GFP導入遺伝子の組み込みに起因して、高いレベルでGFPを安定に発現させた。全ての場合において(図4を参照)、DNA MC上のGFP導入遺伝子を用いてトランスフェクトされた細胞は、最も高くGFP導入遺伝子を発現した。

【0194】

10

また、特異的な標的部位での導入遺伝子の組み込み(CCR5遺伝子座でのこれらの例における)を、プライマー5'-GAGGATTGGGAAGACAAATAGCAG-3'(配列番号1)および5'-CCAGCAATAGATGATCCAACTCAAAATTC-3'(配列番号2)ならびに以前に記載されている方法(Lombardoら、Nature Biotech.、2007年)を使用した「イン/アウトPCR」によって測定し、その結果、DNA MCを受けた試料では、ドナープラスミドを受けた試料よりもおよそ2.5倍多くプラスミドが組み込まれたことが示された(図5を参照)。これらの結果は、MCの形状が、プラスミドDNAまたは直鎖状PCR DNA産物のいずれかよりも毒性が少なく、優れたドナー鋳型であることを示す。

【0195】

20

本明細書にて言及されている全ての特許、特許出願および刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0196】

開示は、理解を明確にする目的で、説明および実施例によっていくらか詳細に提供されているが、本開示の精神または範囲を逸脱することなく様々な変形および改変が実践され得ることは、当業者にとって明らかである。したがって、前出の記載および実施例は、限定として解釈されるべきものではない。

【図 1】

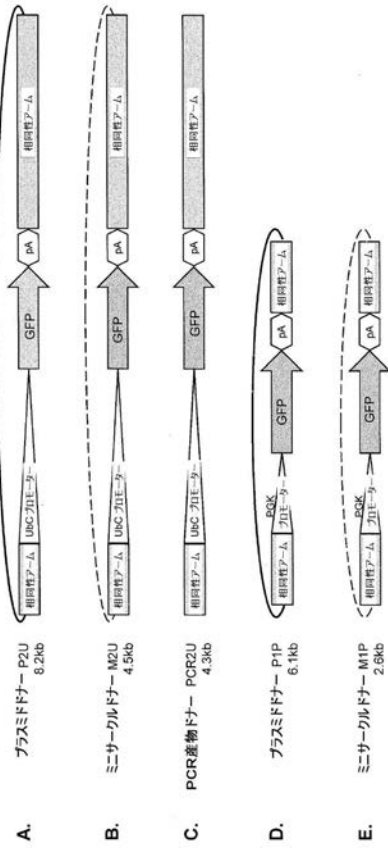
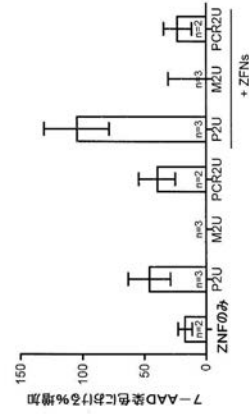


Figure 1

【図 2 - 1】

B. P2U、M2UおよびPCR2Uを比較する



A. P2UをM1Pと比較する

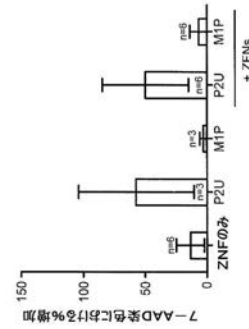


Figure 2

【図 2 - 2】

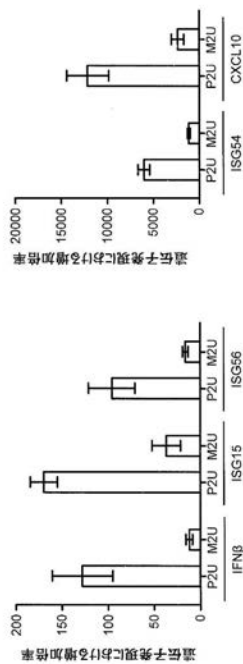
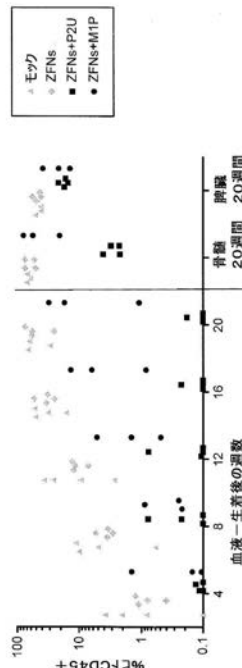


Figure 2C

【図 3 - 1】

A. P2UをM1Pと比較する(実験1)



B. P2UをM1Pと比較する(実験2)

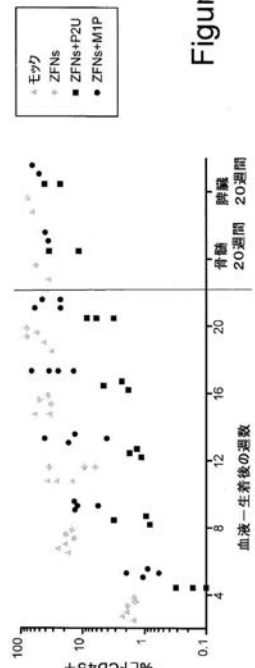


Figure 3

【図 3 - 2】

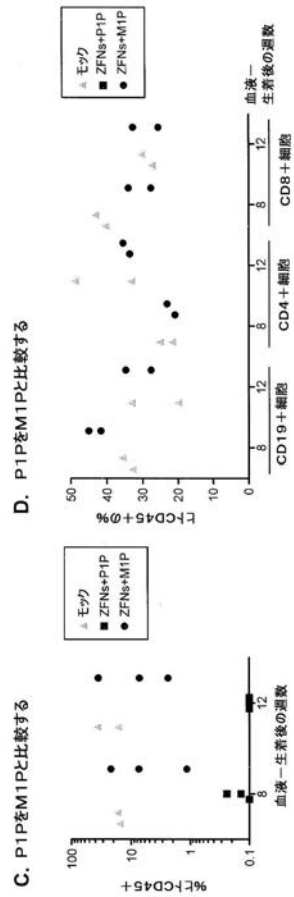


Figure 3

【図 4 - 2】

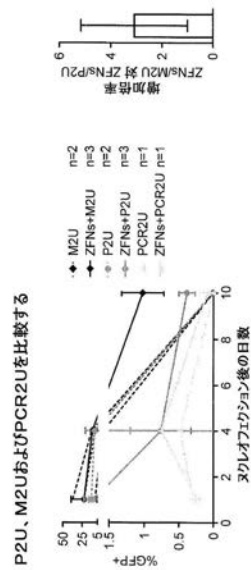


Figure 4C

【図 4 - 1】

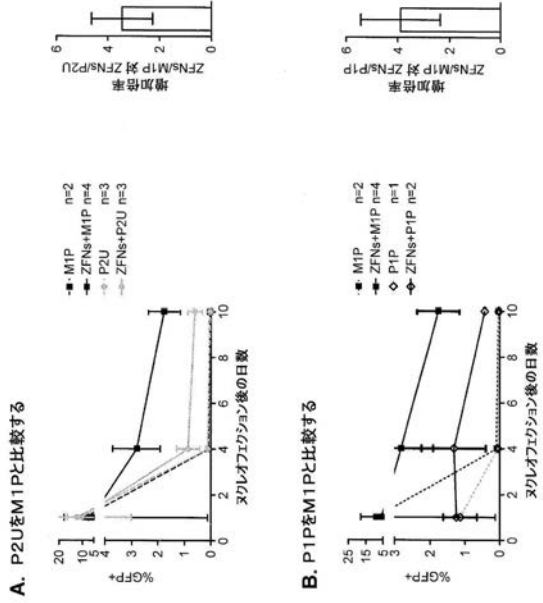


Figure 4

【図 5】

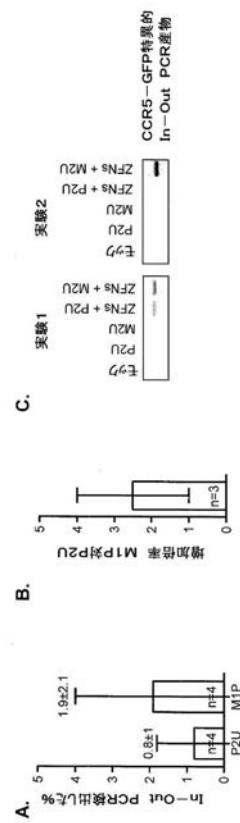


Figure 5

【配列表】

2016518142000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application no.

PCT/US14/36972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/00 (2014.01) CPC - A61K 48/00; C12N 15/87 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N 15/00 (2014.01) CPC: A61K 48/00, 38/00; C12N 15/87; USPC: 435/455, 440, 183, 81.1, 89, 85, 84, 72, 41 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google Scholar; PubMed; ScienceDirect; minicircle, minivector, nuclease, 'zinc finger,' Talen, integration, 'gene therapy'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	URNOV, F et al. Genome Editing With Engineered Zinc Finger Nucleases. Nature Reviews Genetics. September 2010; Vol. 11; page 636-646; page 636, right column, first paragraph; page 638, Box 1; page 638, right column, sixth paragraph; page 642, figure 3.	1-3, 13, 20, 21
Y	US 2011/0160284 A1 (ZECHIEDRICH, LE et al.) June 30, 2011; paragraphs [0010], [0011], [0059]	1-3, 13, 20, 21
P, Y	WO 2013/181440 A1 (ZECHIEDRICH, LE et al.) December 05, 2013; abstract	1-3, 13, 20, 21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 September 2014 (05.09.2014)		Date of mailing of the international search report 19 SEP 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. 2016/020072

PCT/US14/38972

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-12, 14-19
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(71)出願人 510090748

ユニバーシティー オブ サザン カリフォルニア

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1150, スイート 2300, ユーエスシー スティーブズ インスティテュート フォー イノベーション

(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

弁護士 山本 健策

(72)発明者 キャノン, ポーラ エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1150, スイート 2300, ユーエスシー スティーブズ, ユニバーシティー オブ サザン カリフォルニア 気付

(72)発明者 エクスライン, コリン マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1150, スイート 2300, ユーエスシー スティーブズ, ユニバーシティー オブ サザン カリフォルニア 気付

(72)発明者 ホームズ, マイケル シー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル プールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンス, インコーポレイテッド 気付

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA11 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02 EA01 EA02

EA04 GA11 HA08

4B050 CC03 LL10

4B065 AA87X AA90X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA60