

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6401704号
(P6401704)

(45) 発行日 平成30年10月10日 (2018. 10. 10)

(24) 登録日 平成30年9月14日 (2018. 9. 14)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006. 01)	C 1 2 N	5/10	Z N A
C 1 2 N	5/0783	(2010. 01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0
A 6 1 P	35/00	(2006. 01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	35/17	(2015. 01)	A 6 1 K	35/17	

請求項の数 21 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2015-536901 (P2015-536901)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月10日 (2013. 10. 10)
 (65) 公表番号 特表2015-531242 (P2015-531242A)
 (43) 公表日 平成27年11月2日 (2015. 11. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/064384
 (87) 国際公開番号 W02014/059173
 (87) 国際公開日 平成26年4月17日 (2014. 4. 17)
 審査請求日 平成28年8月15日 (2016. 8. 15)
 (31) 優先権主張番号 61/712, 028
 (32) 優先日 平成24年10月10日 (2012. 10. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(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 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
 (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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞を修飾する化合物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体 (CAR) を発現する遺伝子修飾 T 細胞であって、CAR をコードする外因性の配列が、1 つまたは複数のヌクレアーゼを使用して、該 T 細胞のゲノムの中に組み込まれ、さらに、少なくとも 1 つの内因性の免疫学的チェックポイント遺伝子の発現が、該 T 細胞において該免疫学的チェックポイント遺伝子を遺伝子修飾することによって抑制され、該免疫学的チェックポイント遺伝子がプログラム死受容体 PD CD 1 (PD 1) 遺伝子または CTL A - 4 遺伝子であり、該免疫学的チェックポイント遺伝子が、配列番号 2 1 ~ 3 3 または 1 1 6 ~ 1 2 0 のいずれかに示される標的部位に結合するヌクレアーゼを使用して修飾される、遺伝子修飾 T 細胞。

【請求項 2】

前記免疫学的チェックポイント遺伝子が、CTL A - 4 遺伝子である、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 3】

前記免疫学的チェックポイント遺伝子が、PD 1 遺伝子である、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 4】

前記 T 細胞が、CD 4 + 細胞、CD 8 + 細胞、および腫瘍浸潤細胞 (TIL) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 5】

前記 C A R をコードする外因性の配列が、セーフハーバー遺伝子座で T 細胞ゲノムの中に組み込まれる、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 6】

前記 C A R をコードする外因性の配列が、T 細胞ゲノムの中にランダムに組み込まれる、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 7】

前記 C A R が、T 細胞受容体 (T C R) のシグナル伝達ドメインを含む、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 8】

前記 C A R が、s c F v 特異性ドメインを含む、請求項 7 に記載の T 細胞。

10

【請求項 9】

前記 T 細胞が、刺激される、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 10】

前記 T 細胞が、抗 C D 3 / C D 2 8 ピーズにより刺激される、請求項 9 に記載の T 細胞。

【請求項 11】

少なくとも 1 つのさらなる導入遺伝子をさらに含む、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つのさらなる導入遺伝子が、T A A 特異的 T 細胞受容体 (T C R) をコードする、請求項 11 に記載の T 細胞。

20

【請求項 13】

請求項 5 および 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の T 細胞を作製する方法であって、前記 C A R をコードする外因性の配列が前記セーフハーバー遺伝子の中に組み込まれるように、少なくとも 1 つのヌクレアーゼを使用して、前記 T 細胞におけるセーフハーバー遺伝子を切断するステップを含む、方法。

【請求項 14】

前記セーフハーバー遺伝子が、A A V S 1、C C R 5、H P R T および R o s a からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 C A R をコードする外因性の配列が、プラスミドベクターまたはウイルスベクターによって運ばれる、請求項 13 または請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つのヌクレアーゼが、m R N A として前記細胞の中に導入される、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 T 細胞を刺激するステップをさらに含む、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 T 細胞が、抗 C D 3 / C D 2 8 ピーズにより刺激される、請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 19】

前記 T 細胞ゲノムの中に少なくともさらなる導入遺伝子を組み込むステップをさらに含む、請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記少なくとも 1 つのさらなる導入遺伝子が、T A A 特異的 T 細胞受容体 (T C R) をコードする、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の遺伝子修飾 T 細胞を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年10月10日に出願された米国仮特許出願第61/712,028号の優先権の利益を請求し、その開示は、その全体が本明細書によって参照により組み込まれる。

本開示は、ゲノム編集および治療薬の分野におけるものである。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

標的DNA部位に特異的に結合するように設計されたジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、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は、ゲノム工学において有用である。例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)は、ヌクレアーゼドメインに融合された、操作された部位特異的なジンクフィンガーを含むタンパク質である。そのようなZFNおよびTALENは、様々な異なる種におけるゲノム修飾の使用に成功してきた。例えば、米国特許出願公開第20030232410号明細書；米国特許出願公開第20050208489号明細書；米国特許出願公開第20050026157号明細書；米国特許出願公開第20050064474号明細書；米国特許出願公開第20060188987号明細書；米国特許出願公開第20060063231号明細書；米国特許出願公開第20110301073号明細書；米国特許出願公開第20130177983号明細書；米国特許出願公開第20130177960号明細書；米国仮特許出願第61/823,689号明細書、および国際公開第07/014275号パンフレットを参照されたい。これらの開示は、すべての目的に対して、それらの全体が参照によって組み込まれる。これらの操作されたヌクレアーゼは、特定のヌクレオチド配列で二本鎖切断(DSB)を作ることができ、これは、1000倍超まで、標的遺伝子座での相同組換えの頻度を増加させる。したがって、操作されたヌクレアーゼは、相同組換え修復(homology-directed repair)(HDR)系を活用し、細胞のゲノムの中への導入遺伝子の標的組み込みを容易にするために使用することができる。そのうえ、非相同的末端結合(non-homologous end joining)(NHEJ)による部位特異的DSBの不正確な修復はまた、遺伝子破壊をもたらし得る。

【 0 0 0 3 】

プログラム死受容体(PD1またはPD-1、PDCD1としても知られている)は、慢性抗原に応じてT細胞活性化およびT細胞寛容の間のバランスを調節することに関与することが示され、免疫学的チェックポイント遺伝子として公知の遺伝子のグループのうちの1つによってコードされる。これらの遺伝子によってコードされるタンパク質は、免疫応答の大きさの調節に関与する。T細胞活性化に際して、PD1発現は、T細胞において誘導される。PD1受容体に対するリガンドは、PD1リガンド(B7-H1およびCD272としても知られているPDL1)ならびにPDL2(B7-DCおよびCD273としても知られている)であり、通常、抗原提示細胞において発現される。PD1-PDL(PD1リガンド)カップリングは、T細胞の非活性化を引き起こし、T細胞寛容の誘導に関与する(Pardoll(2012)Nat Rev 12:252を参照されたい)。HIV1感染症の間に、PD1の発現は、CD4+T細胞において増加されることが分かっており、PDL1発現はAPCにおいて増加し、T細胞阻害およびT細胞刺激の間のバランスをT細胞阻害の方へ傾ける(Freemanら(2006)J Exp Med 203(10):2223-2227を参照されたい)。HIV感染症における場合のようにT細胞機能不全が慢性抗原曝露の存在下において観察される場合、PD1アップレギュレーションはT細胞枯渇(鍵となるエフェクター機能の進行性の損失として定義される)になんらかの形で結び付けられると考えられる。PD1アップレギュレーションはまた、慢性ウイルス感染症の間にこれらの同じ一連の細胞におけるアポトーシスの増加にも関連し得る(Petrovasら(2009)J Immunol. 183(2):1120-32を参照されたい)。PD1はまた、免疫監視からの腫瘍特異的な回避に

10

20

30

40

50

においても役割を果たし得る。PD1は、慢性骨髄性白血病(CML)および急性骨髄性白血病(AML)の両方において腫瘍特異的な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)において高度に発現されることが実証された。PD1はまた、黒色腫浸潤Tリンパ球(TIL)においてもアップレギュレートされる(Dotti(2009)Blood 114(8): 1457-58を参照されたい)。腫瘍は、PD1リガンドPD-L1またはよりまれにはあるがPD1リガンドPDL2を発現することが分かっており、これは、CTLにおけるPD1のアップレギュレーションと組み合わせられる場合、T細胞機能性における損失およびCTLが有効な抗腫瘍応答を媒介することができないことの要因となり得る。研究者らは、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に慢性的に感染したマウスにおいて、抗PD1抗体の投与がPD1-PDL相互作用を遮断し、いくらかのT細胞機能性(増殖およびサイトカイン分泌)を回復させることができ、ウイルスの負荷の減少に至ったことを示した(Barberら(2006)Nature 439(9): 682-687)。そのうえ、完全ヒトPD-1特異的IgG4モノクローナル抗体は、様々な疾患のバックグラウンド(進行型黒色腫、腎細胞癌、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、または前立腺癌)を有する患者に対して、がん医療(oncology setting)における臨床において試験された。臨床活性は、黒色腫、腎細胞癌および非小細胞肺癌の患者において観察され、予備データは、処置前の腫瘍によるPD1リガンド発現の検出が臨床の転帰と相関することを示唆した(Wolfe(2012)Oncology Business Review、7月;およびPardoll、同書を参照されたい)。

10

【0004】

20

T細胞活性の他の調節因子は、CTLA-4受容体であり、それもまた、免疫学的チェックポイント遺伝子と考えられる。T細胞受容体共刺激分子CD28と同様に、CTLA-4は、抗原提示細胞上のCD80リガンドおよびCD86リガンドと相互作用する。しかし、CD28とのこれらの抗原の相互作用はT細胞の活性化を引き起こすが、CD80またはCD86のCTLA-4との相互作用は、IL-2分泌およびIL-2受容体発現を妨げることによって、および重要な細胞周期構成成分の発現を阻害することによって、T細胞活性化をアンタゴナイズする。CTLA-4は、ほとんどの休止T細胞の表面上に見られないが、T細胞活性化の後に一時的にアップレギュレートされる。したがって、CTLA-4もまた、T細胞活性の活性化および阻害のバランスに関与する(Attiaら(2005)J Clin Oncol. 23(25): 6043-6053を参照されたい)。転移性黒色腫を有する対象におけるCTLA-4抗体の使用を伴う最初の臨床研究は、疾患の後退を発見したが(Attia、同書)、後の研究で、抗体により処置された対象が、自己寛容の中断に関係するようになると思われる、治療の副作用(免疫関連性の有害事象:発疹、大腸炎、肝炎など)を示すことが分かった。このデータの分析は、抗CTLA-4抗体の結果としてのより大きな腫瘍後退が、免疫関連性の有害事象のより重大な重症度と直接相関することを示唆した(Weber(2007)Oncologist 12(7): 864-872)。

30

【0005】

キメラ抗原受容体(CAR)は、細胞表面上に発現される特異的な分子標的を免疫細胞が標的にするように設計された分子である。それらの最も基本的な形態において、それらは、特異性ドメインがその標的と相互作用する場合に、細胞が活性化されるように、細胞の外側に発現された特異性ドメインを細胞の内部のシグナル伝達経路に関連する、細胞に導入された受容体である。多くの場合、CARは、T細胞受容体(TCR)の変異体から作製され、scFvまたはいくつかのタイプの受容体などのような特異性ドメインは、TCRのシグナル伝達ドメインに融合される。これらの構築物は、次いで、T細胞の中に導入され、標的抗原を発現する細胞の存在下においてT細胞が活性化されるようになるのを可能にし、非MHC依存性の形で、活性化されたT細胞による標的細胞に対する攻撃をもたらす(Chicaybamら(2011)Int Rev Immunol 30: 294-311を参照されたい)。現在、様々な腫瘍抗原を標的にする腫瘍特異的なCARは、様々な異なる癌の処置のために臨床において試験されている。標的にされているこれ

40

50

らの癌およびそれらの抗原の例は、濾胞性リンパ腫（CD20またはGD2）、神経芽細胞腫（CD171）、非ホジキンリンパ腫（CD20）、リンパ腫（CD19）、膠芽腫（IL13R2）、慢性リンパ性白血病またはCLL、および急性リンパ性白血病またはALL（両方ともCD19）を含む。ウイルス特異的なCARもまた、HIVなどのようなウイルスを持つ細胞を攻撃するために開発されてきた。例えば、HIVの処置のためにGp100に対して特異的なCARを使用する臨床試験が開始された（Chicaybam、同書）。

養子細胞治療（ACT）は、送達された細胞が患者の癌を攻撃し、取り除くために、患者に腫瘍特異的な免疫細胞を送達することに基づく、癌治療の開発中の形態である。ACTは、多くの場合、患者自身の腫瘍の塊から単離され、患者の中に再注入して戻すためにエクスピボにおいて増やされたT細胞である腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の使用を伴う。このアプローチは、転移性黒色腫の処置において有望とされてきており、ある研究において、>50%の長期応答率が観察された（例えばRosenbergら（2011）Clin Canc Res 17（13）：4550を参照されたい）。TILは、それらが、腫瘍上に存在する腫瘍関連抗原（TAA）に対して特異的なT細胞受容体（TCR）を有する患者自身の混合された一連の細胞であるので、細胞の有望な供給源となる（Wuら（2012）Cancer J 18（2）：160）。しかしながら、上記に述べられるように、TILは、おそらく腫瘍におけるPD1発現のために、多くの場合、PD1発現についてアップレギュレートされ、特異的な癌細胞を標的にし、腫瘍に浸潤することができるが、一方では、がん細胞を死滅させることができない細胞の集団をもたらす。インビトロ研究は、抗PD1抗体の非存在下における刺激と比較して、抗PD1抗体の存在下においてそれらの同種の腫瘍抗原に応じてTIL増殖の著しい増加を示した（Wuら、同書）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第20030232410号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第20050208489号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第20050026157号明細書

【特許文献4】米国特許出願公開第20050064474号明細書

【特許文献5】米国特許出願公開第20060188987号明細書

【特許文献6】米国特許出願公開第20060063231号明細書

【特許文献7】米国特許出願公開第20110301073号明細書

【特許文献8】米国特許出願公開第20130177983号明細書

【特許文献9】米国特許出願公開第20130177960号明細書

【特許文献10】国際公開第07/014275号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Petrovasら（2009）J Immunol. 183（2）：1120-32

【非特許文献2】Dotti（2009）Blood 114（8）：1457-58

【非特許文献3】Barberら（2006）Nature 439（9）：682-687

【非特許文献4】Wolfe（2012）Oncology Business Review、7月

【非特許文献5】Attiaら（2005）J Clin Oncol. 23（25）：6043-6053

【非特許文献6】Weber（2007）Oncologist 12（7）：864-872

【非特許文献7】Chicaybamら（2011）Int Rev Immunol

10

20

30

40

50

30 : 294 - 311

【非特許文献8】Rosenbergら(2011)Clin Canc Res 17 (13) : 4550

【非特許文献9】Wuら(2012)Cancer J 18(2) : 160

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

T細胞に、癌細胞などのような特異的な細胞に対してその注意を再度向けさせるであろう技術を開発するのは有用であるが、これらの標的細胞が多くの場合PD-1リガンドを発現するという問題が残る。そのため、PD1-PD-L1/PD-L2相互作用は、T細胞を不活性化し、アポトーシスおよび細胞枯渇を増加させることによって、腫瘍が、CAR標的T細胞による作用を回避するのを可能にする。そのうえ、PD1-PDL相互作用はまた、HIVに対するT細胞応答の抑制にも関与し、PD1およびPDLの両方の発現の増加により、T細胞枯渇に至る。活性化されたT細胞上のCTLA-4発現の誘導もまた、免疫応答を減退させることに対する第1のステップのうちの1つであり、したがって、CARを持つT細胞は、T細胞阻害とT細胞活性化とのバランスを保つように設計されたこの系の関与のために、不活性になり得る。

10

【0009】

したがって、研究および治療上の適用において使用することができるPD1標的および/またはCTLA-4調節因子、例えばPD1および/またはCTLA-4-標的ヌクレアーゼまたは転写抑制因子の必要性が残っている。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示は、T細胞阻害を予防するまたは低下させるための、必要に応じて、操作されたキメラ抗原受容体(CAR)および/または操作されたT細胞受容体(TCR)と組み合わせた、PD1および/またはCTLA-4の不活性化のための免疫学的チェックポイント標的ヌクレアーゼ、例えば、操作されたメガヌクレアーゼ、CRISPR/Casヌクレアーゼ系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、およびTALE-ヌクレアーゼ(TALEN)の開発に関する。本開示はまた、T細胞阻害を予防するまたは低下させるための、必要に応じて、操作されたキメラ抗原受容体(CAR)および/または操作されたT細胞受容体(TCR)と組み合わせた、PD1および/またはCTLA-4の不活性化のための転写抑制因子、例えばCRISPR/Casベースの融合タンパク質、ジンクフィンガーベースの融合タンパク質、およびTALEベースの融合タンパク質の開発にも関する。

30

【0011】

本開示は、ヒトおよびげっ歯動物PD1に対して特異的なジンクフィンガータンパク質ならびにこれらのPD1特異的ジンクフィンガータンパク質を含むジンクフィンガータンパク質転写因子(ZFP-TF)またはジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を含む融合タンパク質を提供する。本開示はまた、ヒトCTLA-4に対して特異的なジンクフィンガータンパク質およびこれらのCTLA-4特異的ジンクフィンガータンパク質を含むジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を含む融合タンパク質をも提供する。本開示はまた、ヒトPD1に対して特異的な活性TALEタンパク質、およびこれらのPD1特異的TALE DNA結合ドメインを含むTALEヌクレアーゼ(TALEN)を含む融合タンパク質をも提供する。ある実施形態では、ジンクフィンガータンパク質が、N-末端からC-末端にF1からF5に並べられた5つのジンクフィンガー認識領域を含み、認識領域は、表2aまたは表2cの一行に示される下記のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、TAL-エフェクタードメイン(TALE)が、複数のTALE反復単位を含み、それぞれの反復単位が、標的配列中の核酸に結合する反復可変二残基(Repeat Variable Di-residue)(RVD)領域を含み、TALEは、示される配列番号：29~34(表5に示される)のような標的配列に結合する。

40

50

【0012】

本発明のPD1および/もしくはCTLA-4特異的ジnkフィンガー、CRISPR/Cas、またはTALEタンパク質を含むタンパク質は、PD1が発現され(例えば過剰発現され)、標的細胞によるPDLの過剰発現のために、活性化されたT細胞の不活性化もしくは枯渇をもたらす、任意の疾患もしくは障害、および/またはCTLA-4の関与の予防が有益になるであろう疾患もしくは障害の処置を含む、研究および治療目的に使用されてもよい。例えば、T細胞におけるPD1遺伝子座のジnkフィンガー、TALE、および/またはCRISPR/Casヌクレアーゼターゲティングは、慢性感染症および悪性腫瘍の両方におけるPD1依存性免疫抑制を遮断するために使用することができる。同様に、T細胞におけるジnkフィンガー、CRISPR/Cas TALEヌクレアーゼ、および/またはCTLA-4のターゲティングは、例えば癌の処置において、CTLA-4媒介性のT細胞阻害を予防するために使用することができる。TALE DNA結合ドメインおよびメガヌクレアーゼの結合から誘導された融合タンパク質もまた、類似する遺伝子ノックダウンまたはノックアウトのためにPD1および/またはCTLA-4に指向させることができる。転写抑制因子ドメインに融合された操作されたジnkフィンガータンパク質、TALE、およびCRISPR/Cas由来の転写抑制因子タンパク質はまた、PD1またはCTLA-4媒介性のT細胞阻害を予防するために使用することができる。

10

【0013】

本発明の他の態様では、融合タンパク質が、ヒトPD1またはCTLA-4遺伝子に対して特異的であるジnkフィンガー(ZFN)、CRISPR/Cas、またはTALE(TALEN)ヌクレアーゼを含む。ある実施形態では、PD-1に対して特異的なヌクレアーゼ融合タンパク質のジnkフィンガードメインが、天然に存在しない認識ヘリックスを含み、および/または米国特許出願公開第20110136895号明細書において開示される標的部位に結合し(表2aおよび2bを参照されたい)、TALEタンパク質が、表5aおよび5bにおいて示されるPD1における標的部位に結合する。他の実施形態では、CTLA-4に対して特異的な融合タンパク質のジnkフィンガードメインが、表2cにおいて示される天然に存在しない認識ヘリックスを含む、および/または表3において示される標的部位に結合する。

20

【0014】

他の態様では、ゲノム中のPD1またはCTLA-4遺伝子における目的の領域における標的部位に結合するCRISPR/Cas系が、本明細書において記載され、CRISPR/Cas系が、CRISPR/Casヌクレアーゼおよび操作されたcrRNA/tracrRNA(または単鎖ガイドRNA(single guide RNA))を含む。米国仮特許出願第61/823,689号明細書もまた参照されたい。

30

【0015】

他の態様では、本明細書において記載されるヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、例えば、1つまたは複数のジnkフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、1つまたは複数のTALEN、1つまたは複数のメガヌクレアーゼ、および/または1つまたは複数のCRISPR/Casヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、提供される。ポリヌクレオチドは、DNA、RNA、またはその組み合わせを含むことができる。ある実施形態では、ポリヌクレオチドが、プラスミドを含む。他の実施形態では、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、mRNAを含む。

40

【0016】

一態様では、本発明の方法および組成物が、操作された(遺伝子修飾された)T細胞を含む。T細胞は、ヘルパーT細胞(例えばCD4+細胞)、細胞傷害性T細胞(例えばCD8+)、記憶T細胞、調節性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL、CD3+)などを含むが、これらに限定されない。ある実施形態では、T細胞が、PD-1特異的ヌクレアーゼ(例えば細胞におけるPD1の不活性化のための)を含み、他方で、さらなる実施形態では、T細胞が、PD-1特異的ヌクレアーゼおよび少なくとも1つの導入遺伝子ドナー

50

を含む。ある実施形態では、T細胞が、CTLA-4特異的ヌクレアーゼ（例えば細胞におけるCTLA-4の不活性化のための）を含み、他方で、さらなる実施形態では、T細胞が、CTLA-4特異的ヌクレアーゼおよび少なくとも1つの導入遺伝子ドナーを含む。他の実施形態では、遺伝子修飾されたT細胞が、内因性PD1遺伝子および内因性CTLA-4遺伝子の両方でヌクレアーゼによって修飾される。さらなる実施形態では、遺伝子修飾されたT細胞が、内因性TCRならびに内因性PD1およびCTLA-4遺伝子で少なくとも1つのヌクレアーゼによって修飾される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの導入遺伝子ドナーが、キメラ抗体受容体（CAR）をコードする。ある実施形態では、CARDドナーが、内因性PD1および/またはCTLA-4遺伝子の中に組み込まれる。いくつかの実施形態では、CARDドナーが、セーフハーバー位置（safe harbor location）の中への標的組み込みによって組み込まれる。他の実施形態では、CARをコードする外因性配列が、レンチウイルス送達系を使用して、ランダムな組み込みによって導入される。他の実施形態では、CARDドナーが、トランスポゾンベースの送達系を使用して、ランダムな組み込みによって導入される。

10

【0017】

他の実施形態では、T細胞が、少なくとも2つの導入遺伝子ドナーを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも2つの導入遺伝子ドナーが、T細胞受容体（TCR）、例えばTRACおよびTRBCのサブユニットをコードする（参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20110158957号明細書を参照されたい）。いくつかの例では、TCRサブユニットは、ドナーから発現された場合に、TAAに対する特異性を有するTCRを含む。いくつかの実施形態は、内因性TCRとの関連を最小限にするように設計された、操作されたTCR鎖を含む。他の実施形態では、内因性TCRが、操作されたヌクレアーゼ媒介性の遺伝子破壊によって非機能的にされる。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子ドナーは、導入遺伝子が発現され、PD1またはCTLA-4発現が破壊されるようにPD-1および/またはCTLA-4遺伝子座の中に挿入される。他の実施形態では、操作されたT細胞は、標的組み込みによってセーフハーバー（safe harbor）の遺伝子座（例えばAAVS1、CCR5、またはHPR1）の中に導入遺伝子が挿入されるように、PD1またはCTLA-4特異的ヌクレアーゼ、セーフハーバーに対して特異的な第2のヌクレアーゼ、および導入遺伝子を含む。例えば米国特許第7,951,925号明細書ならびに米国特許出願公開第20080159996号明細書；米国特許出願公開第201000218264号明細書；米国特許出願公開第20130177983号明細書；米国特許出願公開第20130177960号明細書；米国特許出願公開第20130137104号明細書；および米国特許出願公開第20130122591号明細書を参照されたい。他の実施形態では、T細胞が、PD1および/またはCTLA-4特異的ヌクレアーゼ、CARをコードする導入遺伝子、ならびに他のオープンリーディングフレームをコードする第2の導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、第2の導入遺伝子が、自殺遺伝子をコードする。いくつかの実施形態では、T細胞が、PD1および/またはCTLA-4特異的ヌクレアーゼ、CARをコードする導入遺伝子、およびTAA特異的TCRをコードする一連の導入遺伝子を含む。他の態様では、ヌクレアーゼが組み込まれる前に、ドナー導入遺伝子が、T細胞の中に組み込まれ、他方で、いくつかの態様では、ドナー導入遺伝子およびヌクレアーゼの両方が、T細胞の中に一緒に導入される。

30

40

【0019】

他の態様では、T細胞を修飾する方法が、本明細書において記載される。ある実施形態では、T細胞におけるPD1および/またはCTLA-4発現が、例えば、ジंकフィンガーもしくはTAL E転写因子、ジंकフィンガーヌクレアーゼおよび/もしくはTAL EN、ならびに/またはCRIPSR/Cas系を使用して低下させられるまたは不活性化される。ある実施形態では、方法が、本明細書において記載されるPD1修飾細胞および/またはCTLA-4修飾細胞のいずれかの中に1つまたは複数の外因性配列（例えば

50

導入遺伝子)、例えば、CARをコードする導入遺伝子および/またはTAA特異的TCRをコードする一連の導入遺伝子を導入するステップをさらに含む。ある実施形態では、T細胞が、例えば、米国特許出願公開第20080311095号明細書において記載されるピーズ活性化により活性化される。他の実施形態では、T細胞が、休止している。いくつかの態様では、T細胞が、TILである。他の態様では、T細胞が、TILに由来するT細胞系統を含む。いくつかの実施形態では、TILが、そのHLAサブタイプについて特徴付けられ、他の実施形態では、TILが、特異的に操作されたHLAロックアウトおよび/またはロックインを持つ(本明細書において参照によって組み込まれる、米国特許出願公開第20120060230号明細書を参照されたい)。

【0020】

他の態様では、本発明の方法が、治療上の処置の必要がある対象の治療上の処置のための組成物を含む。いくつかの実施形態では、組成物が、PD1またはCTLA-4特異的ヌクレアーゼ、セーフハーバー特異的ヌクレアーゼ、CARをコードする少なくとも1つの導入遺伝子ドナー、第2の導入遺伝子ドナー、ならびにそのヌクレアーゼおよびドナーの任意の組み合わせを含む、操作されたT細胞またはTILを含む。いくつかの態様では、導入遺伝子ドナーが、TAA特異的TCRをコードする。他の実施形態では、組成物が、PD1またはCTLA-4特異的ヌクレアーゼおよびCARをコードする導入遺伝子ドナーを含む、操作されたT細胞またはTILを含む。

【0021】

他の態様では、PD1またはCTLA-4遺伝子の調節のための方法および組成物が、本明細書において提供される。ある実施形態では、方法が、PD1またはCTLA-4の遺伝子に結合し、修飾するヌクレアーゼ(例えばZFN、TALEN、CRISPR/Cas、メガヌクレアーゼ、TALEメガヌクレアーゼ融合物など)を導入するステップを含む。ある実施形態では、ヌクレアーゼが、疾患または障害を予防するまたは処置するための、疾患または障害を有する対象由来の細胞の中への、PD1またはCTLA-4遺伝子座の標的部位に結合するように操作されたジンクフィンガーもしくはTALE融合タンパク質を含む融合タンパク質(または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド)である。いくつかの実施形態では、方法が、PD1またはCTLA-4遺伝子に結合し、その発現を抑制する、転写調節因子(例えばZFP-TF、TALE-TF、CRISPR/Cas-TFなど)を細胞の中に導入するステップを含む。いくつかの実施形態では、疾患または障害が、癌または悪性腫瘍であり、ジンクフィンガーまたはTALE融合タンパク質が、ヌクレアーゼまたは転写抑制ドメインを含む融合タンパク質である。他の実施形態では、ヌクレアーゼが、CRISPR/Casヌクレアーゼ系を含む。処置するおよび/または予防することができる癌の非限定的な例は、肺癌、膵癌、肝臓癌、黒色腫、骨肉腫、乳癌、結腸直腸癌、白血病、卵巣癌、リンパ腫、脳癌などを含む。

【0022】

本発明のZFN、TALENおよび/またはCRISPR/Cas系を含むキットもまた、提供される。キットは、ZFN、TALENまたはCRISPR/Cas系をコードする核酸(例えば、適した発現ベクター中に含有されるRNA分子またはZFP、TALEN、もしくはCas9コード遺伝子)および必要であれば操作されたsgRNAまたは一定分量のヌクレアーゼタンパク質、ドナー分子、適した宿主細胞系統、本発明の方法を実行するための説明書などを含んでいてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、Cell-Iアッセイ(本文中に記載)を使用する、K562細胞におけるPD1特異的TALENの活性(インデル検出%によって測定)を示すゲルを示すグラフである。レーン名称は本文中のとおりであり、検出されたインデル%は、それぞれのレーンの下に示す。

【0024】

【図2】図2は、示されるヌクレアーゼおよび条件を使用して、Cell-1アッセイによ

10

20

30

40

50

って決定された非相対的末端結合事象 (NHEJ) パーセントを示す図ある。「R5」は、CCR5 特異的 ZFN mRNA によりエレクトロポレーションされた細胞を指す (例えば米国特許第 7,951,925 号明細書を参照されたい)。「PD1」は、PD1 特異的 ZFN mRNA によりエレクトロポレーションされた細胞を指す (例えば米国特許出願公開第 20110136895 号明細書を参照されたい)。「C1」および「C3」は、エレクトロポレーション条件を指す。それぞれの対の左の棒は、mRNA エレクトロポレーションの 3 日後 (EPD3) の、示される条件での NHEJ % を示し、右の棒は、mRNA エレクトロポレーションの 5 日後 (EPD5) の、示される条件での NHEJ % を示す。

【発明を実施するための形態】

10

【0025】

(詳細な説明)

PD1 および / または CTLA-4 の調節のための組成物および方法が、本明細書において記載される。これらの組成物および方法は、研究および治療上の適用に有用であり、PD1 および / または CTLA-4 遺伝子を破壊するための、操作されたヌクレアーゼを介してのゲノム編集の使用を伴う。本発明の方法はまた、PD1 または CTLA-4 遺伝子の発現を予防するために、転写抑制因子に融合された PD1 もしくは CTLA-4 特異的ジंकフィンガーまたは TALE DNA 結合ドメインを含む。含まれる方法および組成物はまた、PD1 および / または CTLA-4 破壊と共に、T 細胞における特異的な細胞標的に対する T 細胞の活性化のためのキメラ抗原受容体の使用を示す。

20

【0026】

T 細胞上に発現される PD1 の、PD1 リガンドとの相互作用は、T 細胞の非活性化を引き起こし得る。いくつかの癌細胞は、PD1 リガンドを発現し、このようにして、免疫監視を回避することができ、PD-1 リガンドの非存在下においてその癌細胞を破壊することができる T 細胞が存在するにもかかわらず増殖することができる。さらに、たとえ T 細胞が、その T 細胞を活性化し、かつ特定のマーカーを持つ細胞に再度指向させる CAR を発現するように、T 細胞が修飾されていたとしても、その標的細胞による PD1 リガンドの発現は、活性化された T 細胞の脱感作を引き起こし得、次いで、脱感作された T 細胞は、もはや標的細胞に作用しないであろう。

【0027】

30

CTLA-4 発現は、活性化された T 細胞上で T 細胞活性化に際して誘導され、抗原提示細胞活性化抗原 CD80 および CD86 と結合について競合する。CD80 または CD86 との CTLA-4 の相互作用は、T 細胞阻害を引き起こし、免疫応答のバランスを維持する役割を果たす。しかしながら、CD80 または CD86 との CTLA-4 相互作用の阻害は、T 細胞活性化を延長し、したがって、癌抗原に対する免疫応答のレベルを増加させ得る。本発明は、ジंकフィンガーもしくは TALE-転写因子融合物による、または遺伝子をノックアウトするための CTLA-4 特異的ヌクレアーゼによる T 細胞の処理を介しての、CTLA-4 の発現の遮断を介した CTLA-4 相互作用の阻害を記載する。

【0028】

40

CAR 技術は、特異的な細胞を攻撃するデザイナー T 細胞 (designer T cell) の可能性を提示し、それらの T 細胞の標的は、研究者によって選ばれる。医学研究者たちは、長い間、T 細胞は、当然のことながら悪性細胞または異常な細胞を定期的に除去するが、おそらく、PD-1 リガンドにより駆動される免疫応答の減退の使用を通して回避することができるいくつかの癌があることを示唆してきた。したがって、CAR の使用は有望であるように思われるが、それらの同じ細胞における PD1 または CTLA-4 発現を抑制するまたはノックアウトするための転写因子および / またはヌクレアーゼ (例えばジंकフィンガー、TALE、および / または CRISPR/Cas ベースの) と組み合わせた、CAR (T 細胞が特定の腫瘍細胞を標的にするようにする) を発現するように操作された T 細胞の組み合わせは、様々な疾患ならびに障害を研究し、処置するため

50

の新規な細胞および動物モデルならびに方法を提供する。

【0029】

概説

本明細書において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、別段の指示がない限り、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算化学、細胞培養、組換えDNA、ならびに当技術分野の範囲内にある関連する分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献において十分に説明される。例えば Sambrookら MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989および第3版、2001; Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、ニューヨーク、1987および定期的改訂版; the series METHODS IN ENZYMOLOGY、Academic Press、サンディエゴ; Wolffe、CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION、第3版、Academic Press、サンディエゴ、1998; METHODS IN ENZYMOLOGY、第304巻、“Chromatin”(P.M. Wassarman および A. P. Wolffe 編)、Academic Press、サンディエゴ、1999; および METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、第119巻、“Chromatin Protocols”(P.B. Becker 編) Humana Press、トトワ、1999を参照されたい。

10

20

【0030】

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、交換可能に使用され、直鎖または環状コンホメーションで、一本鎖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ポリマーまたはリボヌクレオチドポリマーを指す。本開示の目的について、これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定するものとして解釈されないものとする。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(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することができる。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対形成の特異性を有する、つまり、Aの類似体はTと塩基対形成するであろう。

30

【0031】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために交換可能に使用される。これらの用語はまた、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適用される。

【0032】

「結合(する)」は、高分子間の(例えばタンパク質および核酸の間の)配列特異的な非共有結合による相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異的である限り、結合相互作用のすべての構成要素が配列特異的である必要があるわけではない(例えば、DNA骨格中のリン酸残基と接触する)。そのような相互作用は、 $10^{-6} M^{-1}$ 以下の解離定数(K_d)によって一般に特徴付けられる。「親和性」は、結合の強度を指し、結合親和性の増加は、より低い K_d と相関する。

40

【0033】

「結合タンパク質」は、他の分子に非共有結合で結合することが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)に結合することができる。タンパク質結合タンパク質の場合には、それはそれ自体に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/またはそれは異なるタンパク質(複数可)の1つまたは複数の分子に結合することができる。結合タンパク質は、1つを超えるタイプの結合活性を有することができる。例えば、ジンクフィンガータン

50

パク質は、DNA結合、RNA結合、およびタンパク質結合活性を有する。

【0034】

「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、構造が亜鉛イオンの配位を通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つまたは複数のジンクフィンガーを通して配列特異的な形で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る。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、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。

【0035】

「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、その同種の標的DNA配列へのTALEの結合に参与する。単一の「反復単位」（「リピート」とも呼ばれる）は、典型的に、33~35アミノ酸長であり、天然に存在するTALEタンパク質内の他のTALE反復配列と少なくともいくつかの配列相同性を示す。それぞれのTALE反復単位は、典型的にリピートの12位および/または13位に反復可変二残基（RVD）を構成する、1つまたは2つのDNA結合残基を含む。これらのTALEのDNA認識のための天然の（標準）コードは、12位および13位の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に、NNがGまたはAに結合し、NGがTに結合するように決定され、そして、非標準（非定型的）RVDもまた、知られている。その全体が本明細書において参照によって組み込まれる、米国特許出願公開第20110301073号明細書を参照されたい。

【0036】

「CRISPR/Casヌクレアーゼ」または「CRISPR/Casヌクレアーゼ系」は、DNAに結合する非コードRNA分子（ガイド）RNAおよびヌクレアーゼの機能性（例えば2つのヌクレアーゼドメイン）を有するCasタンパク質（Cas9）を含む。例えば米国特許仮出願第61/823,689号明細書を参照されたい。

【0037】

本明細書において記載される方法のいずれかにおいて、ジンクフィンガータンパク質および/またはTALENタンパク質のさらなるペアは、細胞内のさらなる標的部位のさらなる二本鎖切断に使用することができる。そのうえ、CRISPR/Cas系は、単独でまたはさらなる二本鎖切断を誘導するためにZFNおよび/またはTALENと組み合わせて使用されてもよい。

【0038】

ジンクフィンガーおよびTALE結合ドメインは、例えば、天然に存在するジンクフィンガータンパク質またはTALEタンパク質の認識ヘリックス領域の操作（1つまたは複数のアミノ酸の改変）を介して、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。そのため、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、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/組成が主に合理的な判定基準から結果として生じる、天然に存在しないタンパク質である。設計の合理的な判定基準は、置換規則ならびに既存のZFPおよび/またはTALE設計および結合データの情報を保存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アルゴリズムの適用を含む。例えば米国特許第6,140,081号明細書；米国特許第6,453,242号明細書；および米国特許第6,534,261号明細書を参照されたい；国際公開第98/53058号パンフレット；国際公開第98/53059号パンフレット；国際公開第98/53060号パンフレット；国際公開第02/016536号パンフレット、および国際公開第03/016496号パンフレットならびに米国特許出願公開第20110301073明細書もまた参照されたい。

【0039】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはTALEは、産生が、主として、ファージディスプレイ、相互作用トラップ（interaction trap）、または

10

20

30

40

50

ハイブリッド選択などの経験的なプロセスから結果として生じる、天然に見られないタンパク質である。例えば米国特許第5,789,538号明細書；米国特許第5,925,523号明細書；米国特許第6,007,988号明細書；米国特許第6,013,453号明細書；米国特許第6,200,759号明細書；国際公開第95/19431号パンフレット；国際公開第96/06166号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第98/54311号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/60970号パンフレット、国際公開第01/88197号パンフレット；国際公開第02/099084号パンフレットおよび米国特許出願公開第20110301073号明細書を参照されたい。

【0040】

「切断」は、DNA分子の共有結合の骨格の破損を指す。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することができる。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つの別個の一本鎖切断事象の結果として起こり得る。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ことができる。ある実施形態では、融合ポリペプチドが、標的二本鎖DNA切断に使用される。

【0041】

「切断ハーフドメイン(cleavage half-domain)」は、第2のポリペプチド(同一かまたは異なるかのいずれか)と共に、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ポリペプチド配列である。用語「第1および第2の切断ハーフドメイン」；「+および-切断ハーフドメイン」、ならびに「右および左切断ハーフドメイン」は、交換可能に使用され、二量体化する切断ハーフドメインのペアを指す。「操作された切断ハーフドメイン」は、他の切断ハーフドメイン(例えば他の操作された切断ハーフドメイン)と偏性ヘテロ二量体を形成するように修飾された切断ハーフドメインである。それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号明細書、米国特許出願公開第20070218528号明細書、米国特許出願公開第20080131962号明細書、および米国特許出願公開第20110201055号明細書もまた参照されたい。

【0042】

用語「配列」は、任意の長さのヌクレオチド配列を指し、これは、DNAまたはRNAとすることができ、直鎖、環状、または分岐とすることができ、一本鎖または二本鎖のいずれかとすることができ、用語「ドナー配列」は、ゲノムの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2~10,000ヌクレオチド長(またはその間のもしくはそれを超える任意の整数値)、好ましくは約100~1,000ヌクレオチド長(またはその間の任意の整数)、より好ましくは約200~500ヌクレオチド長とすることができ、「クロマチン」は、細胞のゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞のクロマチンは、核酸、主として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。大多数の真核生物の細胞のクロマチンは、ヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、それぞれ2つのヒストンH2A、H2B、H3、およびH4を含む八量体と関連するおよそ150塩基対のDNAを含み、リンカーDNA(生物に依存する可変長の)は、ヌクレオソームコア間にわたる。ヒストンH1の分子は、一般に、リンカーDNAに関連する。本開示の目的について、用語「クロマチン」は、原核生物および真核生物の両方のすべてのタイプの細胞の核タンパク質を包含することを意味する。細胞のクロマチンは、染色体クロマチンおよびエピソームクロマチンの両方を含む。

【0043】

「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、多くの場合、その核型によって特徴付けられ、これは、細胞のゲノムを含むすべての染色体の集合体である。細胞のゲノムは、1つまたは複数の染色体を含むことができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

「エピソーム」は、細胞の染色体の核型の一部でない核酸を含む、複製する核酸、核タンパク質複合体、または他の構造である。エピソームの例は、プラスミドおよび特定のウイルスゲノムを含む。

【 0 0 4 5 】

「標的部位」または「標的配列」は、結合分子が結合するであろう核酸の一部を規定する核酸配列であるが、ただし、結合のための十分な条件が存在することを条件とする。例えば、配列 5' - G A A T T C - 3' は、E c o R I 制限エンドヌクレアーゼについての標的部位である。

【 0 0 4 6 】

「慢性感染症」は、感染症が持続している、感染病原体によって引き起こされる疾患である。そのような疾患は、肝炎（A、B、またはC）、ヘルペスウイルス（例えばVZV、HSV-1、HSV-6、HSV-II、CMV、およびEBV）、ならびにHIV/AIDSを含み得る。非ウイルスの例は、アスペルギルス症、カンジダ症、コクシジオイデス症、ならびにクリプトコックスおよびヒストプラズマ症に関連する疾患などのような慢性真菌性疾患を含んでいてもよい。慢性細菌感染病原体の非限定的な例は、Chlamydia pneumoniae、Listeria monocytogenes、およびMycobacterium tuberculosisであつてもよい。

【 0 0 4 7 】

用語「自己免疫性疾患」は、対象が自身の組織に対して破壊性免疫応答を開始する、任意の疾患または障害を指す。自己免疫性障害は、対象（例えばヒト）におけるほとんどすべての臓器系に影響を与え得、神経系、胃腸系、および内分泌系ならびに皮膚および他の結合組織、眼、血液、ならびに血管の疾患を含むが、これらに限定されない。自己免疫性疾患の例は、橋本甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、グレーブス病、強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、重症筋無力症、および糖尿病を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 4 8 】

本明細書において使用される用語「癌」は、特有の特徴 - 正常な制御の喪失 - が、無秩序な増殖、分化の欠如、局所的な組織侵潤、および転移をもたらす細胞の過剰増殖として定義される。本発明の方法に関して、癌は、急性リンパ性癌（acute lymphocytic cancer）、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱癌、骨肉腫、脳癌、乳癌、肛門、肛門管、または肛門直腸の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、頸部、胆嚢、または胸膜の癌、鼻、鼻腔、または中耳の癌、口腔癌、外陰部の癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性癌（chronic myeloid cancer）、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病、液性腫瘍、肝臓癌、肺癌、リンパ腫、悪性中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、膵癌、腹膜、網、および腸間膜の癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、皮膚癌、小腸癌、軟組織癌、固形腫瘍、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌、ならびに膀胱癌のいずれかを含む、任意の癌とすることができる。本明細書において使用されるように、用語「腫瘍」は、別段の具体的な指示がない限り、悪性タイプの細胞または組織の異常な増殖を指し、良性タイプの組織を含まない。本明細書において使用される用語「阻害する」または「阻害すること」は、増殖/複製を低下させることを意味する。

【 0 0 4 9 】

用語「免疫学的チェックポイント遺伝子」は、免疫応答の大きさを調節するように作用する阻害性プロセス（例えばフィードバックループ）、例えば有害な免疫応答の制御されていない伝播を緩和する免疫阻害性フィードバックループに関与する任意の遺伝子を指す。これらの応答は、感染症に対する免疫応答の間に起こり得る付随的な組織損傷から保護する分子シールドおよび/または周辺の自己寛容の維持に寄与することを含む。免疫学的チェックポイント遺伝子の非限定的な例は、広範囲のCD28ファミリーの受容体のメン

10

20

30

40

50

パーおよびそれらのリガンドならびに共阻害性 (c o - i n h i b i t o r y) 経路 (例
例えば C T L A - 4 および P D - 1) に関する遺伝子を含む。

【 0 0 5 0 】

「外因性の」分子は、細胞中に通常存在しないが、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の中に導入することができる分子である。「細胞における通常の存在」は、細胞の特定の発生段階および環境条件に関して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生の際にのみ存在する分子は、成人の筋細胞に関して外因性の分子となる。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、非熱ショック細胞に関して外因性の分子となる。外因性の分子は、例えば、機能障害内因性分子の機能的バージョンまたは通常機能する内因性の分子の機能障害的バージョンを含むことができる。

10

【 0 0 5 1 】

外因性の分子は、とりわけ、コンビナトリアルケミストリープロセスによって生成されるような小分子、もしくはタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖などの高分子、上記の分子の任意の修飾された誘導體、または1つまたは複数の上記の分子を含む任意の複合体であり得る。核酸は、DNAおよびRNAを含み、一本鎖または二本鎖とすることができ、直鎖、分岐、または環状とすることができ、任意の長さとするすることができる。核酸は、二本鎖を形成することができるものおよび三重鎖形成核酸を含む。例えば米国特許第 5, 176, 996 号明細書および米国特許第 5, 422, 251 号明細書を参照されたい。タンパク質は、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、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、レコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、およびヘリカーゼを含むが、これらに限定されない。

20

【 0 0 5 2 】

外因性の分子は、内因性の分子と同じタイプの分子、例えば外因性のタンパク質または核酸とすることができる。例えば、外因性の核酸は、感染しているウイルスゲノム、細胞の中に導入されたプラスミドもしくはエピソーム、または細胞中に通常存在しない染色体を含むことができる。細胞の中への外因性の分子の導入のための方法は、当業者らに公知であり、脂質媒介性の移入 (つまり中性脂質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、直接的な注射、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈殿、D E A E - デキストラン媒介性の移入、ならびにウイルスベクター媒介性の移入を含むが、これらに限定されない。

30

【 0 0 5 3 】

対照的に、「内因性の」分子は、特定の環境条件下で特定の発生段階で特定の細胞中に通常存在する分子である。例えば、内因性の核酸は、染色体、ミトコンドリア、葉緑体、もしくは他の細胞小器官のゲノムまたは天然に存在するエピソーム核酸を含むことができる。さらなる内因性の分子は、タンパク質、例えば転写因子および酵素を含むことができる。

【 0 0 5 4 】

「融合」分子は、好ましくは共有結合で2つ以上のサブユニット分子が連結されている分子である。サブユニット分子は、同じ化学的タイプの分子とすることができ、または異なる化学的タイプの分子とすることができる。第1のタイプの融合分子の例は、融合タンパク質 (例えば Z F P DNA結合ドメインおよび切断ドメインの間の融合物) ; 融合核酸 (例えば上に記載される融合タンパク質をコードする核酸)、ならびに核酸およびタンパク質の間の融合物 (例えば C R I S P R / C a s ヌクレアーゼ系) を含むが、これらに限定されない。第2のタイプの融合分子の例は、三重鎖形成核酸およびポリペプチドの間の融合物ならびにマイナーグループバインダー (m i n o r g r o o v e b i n d e r) および核酸の間の融合物を含むが、これらに限定されない。

40

【 0 0 5 5 】

細胞における融合分子の発現は、融合分子の細胞への送達から結果として生じ得、例え

50

ば、融合タンパク質については、融合タンパク質の細胞への送達によるものである、または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの細胞への送達によるものであり、ポリヌクレオチドは転写され、転写物が翻訳されて、融合タンパク質が生成される。トランスプライシング、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/またはポリペプチド送達のための方法は、本開示において別記される。

【0056】

本開示の目的のための「遺伝子」は、遺伝子産物をコードするDNA領域（以下を参照されたい）ならびに遺伝子産物の産生を調節するすべてのDNA領域を含み、これは、そのような調節配列がコード配列および/または転写配列に隣接しているかどうかにかかわらない。したがって、遺伝子は、プロモーター配列、ターミネータ、リボソーム結合部位および配列内リボソーム進入部位などのような翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製開始点、マトリックス付着部位、ならびに遺伝子座制御領域を含むが、必ずしもこれらに限定されない。

10

【0057】

「遺伝子発現」は、遺伝子産物への、遺伝子中に含有される情報の変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接的な転写産物（例えばmRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA、もしくは任意の他のタイプのRNA）またはmRNAの翻訳によって生成されるタンパク質とすることができる。遺伝子産物はまた、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集などのようなプロセスによって修飾される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るタンパク質を含む。

20

【0058】

遺伝子発現の「調節」は、遺伝子の発現レベルにおける変化を指す。発現の調節は、遺伝子活性化および遺伝子抑制を含むことができるが、これらに限定されない。調節はまた、完全であってもよい、すなわち、遺伝子発現は完全に不活性化される、もしくは野生型レベル以上まで活性化される、またはそれは部分的であってもよく、遺伝子発現は部分的に低下させられる、もしくは一部の野生型レベルまで部分的に活性化される。「真核生物」細胞は、真菌細胞（酵母など）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、およびヒト細胞（例えばT細胞）を含むが、これらに限定されない。

30

【0059】

用語「動作可能な連結（operative linkage）」および「動作可能に連結された（operatively linked）」（または「作動可能に連結された（operably linked）」）は、2つ以上の構成成分（配列エレメントなど）の並列に関して交換可能に使用され、構成成分は、両方の構成成分が正常に機能し、少なくとも1つの構成成分が、少なくとも1つの他の構成成分に発揮される機能を媒介することができることを可能にするように配置されている。例として、プロモーターなどの転写調節配列は、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応じてコード配列の転写のレベルを制御する場合、コード配列に動作可能に連結されている。転写調節配列は、一般に、コード配列とシスで動作可能に連結されるが、それに直接隣接している必要はない。例えば、たとえエンハンサーおよびコード配列が連続していなくても、エンハンサーは、コード配列に動作可能に連結されている転写調節配列である。

40

【0060】

融合ポリペプチドに関して、用語「動作可能に連結された」は、構成成分のそれぞれが、別の構成成分と連結して、それがそのように連結されていなかった場合に発揮すると思われる機能と同じ機能を発揮するという事実を指すことができる。例えば、ZFP DNA結合ドメイン、TALE DNA結合ドメイン、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に関して、融合ポリペプチドにおいて、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

50

き、他方で、切断ドメインが標的部位の近くでDNAを切断することができる場合、DNA結合ドメインおよび切断ドメインは、動作可能に連結されている。同様に、ZFP DNA結合ドメイン、TALE DNA結合ドメイン、またはCas DNA結合ドメインが活性化ドメインまたは抑制ドメインに融合されている融合ポリペプチドに関して、融合ポリペプチドにおいて、DNA結合ドメイン部分は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、他方で、活性化ドメインが遺伝子発現をアップレギュレートすることができる、または抑制ドメインが遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる場合、DNA結合ドメインおよび活性化ドメインまたは抑制ドメインは、動作可能に連結されている。遺伝子発現を調節することができるドメインに融合されたZFPは、「ZFP-TF」または「ジンクフィンガー転写因子」と総称して呼ばれるが、遺伝子発現を調節することができるドメインに融合されたTALEは、「TALE-TF」または「TALE転写因子」と総称して呼ばれ、遺伝子発現を調節することができるドメインに連結されたCRISPR/Casタンパク質は、「CRISPR/Cas-TF」と総称して呼ばれる。

10

【0061】

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、全長ポリペプチド、または全長核酸と同一ではないが、全長タンパク質、全長ポリペプチド、または全長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、少ない、もしくはそれと同じ数の残基を持つことができ、および/または1つまたは複数のアミノ酸置換もしくはヌクレオチド置換を含有することができる。核酸の機能（例えばコーディング機能、他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、前掲を参照されたい。タンパク質が他のタンパク質と相互作用する能力は、例えば、免疫共沈降、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。例えばFieldsら(1989) Nature 340: 245-246; 米国特許第5,585,245号明細書および国際公開第98/44350号パンフレットを参照されたい。

20

30

【0062】

「ベクター」は、標的細胞に遺伝子配列を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「遺伝子導入ベクター」は、目的の遺伝子の発現を指向させることができ、標的細胞に遺伝子配列を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を含む。

【0063】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」は、好ましくは必ずというわけではないが常用的なアッセイにおいて、容易に測定されるタンパク質産物を生成する任意の配列を指す。適したレポーター遺伝子は、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、プロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、有色タンパク質または蛍光タンパク質または発光性タンパク質（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（例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ）をコードする配列を含むが、これらに限定されない。エピトープタグは、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つまたは複数のコピーを含む。「発現タグ」は、目的の遺伝子の発現をモニターするために所望の遺伝子配列に作動可能に連結されてもよいレポーターをコードする配列を含む。

40

【0064】

「キメラ抗原受容体」(CAR)は、リンパ球においてシグナル伝達を担う免疫受容体

50

に連結された特異性ドメインまたは認識（すなわち結合）ドメインを含む、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドである。最も一般的には、結合ドメインは、特異性ドメイン内の抗体鎖間の可動性リンカーの導入を介して単鎖 s c F v に作りあげられた F a b 抗体断片に由来する。他の可能な特異性ドメインは、ホルモン分子またはサイトカイン分子のシグナル伝達部分、受容体の細胞外ドメイン、およびライブラリー（例えばファージ）スクリーニングによって単離されたペプチドリガンドまたはペプチドを含むことができる（Ramos および Dotti、（2011）Expert Opin Bio Ther 11（7）：855 を参照されたい）。CAR のシグナル伝達部分および結合部分の間の可動性は、標的ドメインおよび結合ドメインの間のより最適な相互作用を可能にするのに望ましい特質であり得、そのため、多くの場合、ヒンジ領域が含まれる。使用することができる構造の1つの例は、I g G 分子などの免疫グロブリン由来の C H 2 - C H 3 領域である。典型的な CAR のシグナル伝達ドメインは、ゼータ鎖などの T C R - C D 3 複合体の細胞内ドメインを含む。あるいは、F c 受容体の鎖が、使用されてもよい。典型的な CAR の膜貫通部分は、C D 4、C D 8、または C D 2 8 などのタンパク質の膜貫通部分を含むことができる（Ramos および Dotti、同書）。いくつかの CAR の特質は、非 M H C 拘束性の形で、選択される標的に T 細胞特異性および T 細胞反応性を再度指向させるそれらの能力を含む。非 M H C 拘束性標的認識は、CAR を発現する T 細胞に、抗原プロセッシング、したがって、腫瘍回避の主なメカニズムの迂回と無関係に標的を認識する能力を与える。

10

【0065】

20

いわゆる「第一世代」CAR は、多くの場合、C D 3 ゼータ鎖などの単一の内部シグナル伝達ドメインを含み、おそらく不完全な活性化のために、臨床においていくぶん効果のないものと考えられる。これらの CAR を持つ T 細胞の性能を増加させるために、第2世代 CAR は、C D 2 8、C D 1 3 4 / O X 4 0、C D 1 3 7 / 4 - 1 B B、L c k、I C O S、および D A P 1 0 などの他の受容体の細胞間ドメインに多くの場合由来する他の刺激ドメインを含むことによって、T 細胞のさらなる活性化シグナルを証明する能力により、生成された。そのうえ、CAR が3つ以上の刺激ドメインを含有する第3世代 CAR もまた、開発された（Ramos および Dotti、同書）。

【0066】

いくつかの例において、CAR は、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに必要に応じて、C D 8 を含む細胞内ヒンジドメイン、ならびに C D 2 8、4 - 1 B B、および C D 3 . ゼータを含む細胞内 T 細胞受容体シグナル伝達ドメインを含むことができる。C D 2 8 は、T 細胞共刺激において重要な T 細胞マーカーである。C D 8 もまた、T 細胞マーカーである。4 - 1 B B は、T 細胞に強力な共刺激シグナルを伝え、分化を促進し、T リンパ球の長期生存を増強する。C D 3 . ゼータは、T C R に会合してシグナルを産生し、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（I T A M）を含有する。他の例において、CAR は、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに C D 2 8 および C D 3 . ゼータを含む細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインを含むことができる。さらなる例において、CAR は、細胞外ヒンジドメインならびに C D 8 を含む膜貫通ドメインならびに C D 2 8 および C D 3 . ゼータを含む細胞内 T 細胞受容体シグナル伝達ドメインを含むことができる。

30

40

【0067】

概観

D N A 結合分子（例えば、ジンクフィンガー、T A L E および / または C R I S P R / C a s ヌクレアーゼ）および / または P D 1 遺伝子および / または C T L A - 4 遺伝子を標的にする転写因子ならびに疾患もしくは障害、特に、P D 1 もしくは P D 1 リガンドが免疫系の細胞上に望ましくなく発現される障害、癌および / もしくは自己免疫性疾患、ならびに / または C T L A - 4 発現の抑制が有益であると思われる疾患もしくは障害の処置のための、これらのヌクレアーゼおよび人工転写因子を含む組成物ならびにそれらを使用するための方法が、本明細書において記載される。P D 1 / P D 1 リガンド相互作用また

50

はCTLA-4 媒介性のT細胞障害の調節によって改善される疾患または障害を有する対象の処置のために、本明細書において記載されるヌクレアーゼは、インビボまたはエクスピボにて細胞（例えば、そのような疾患に罹患した対象から単離されたT細胞などの初代細胞）の中に導入して、処理された細胞上のPD1またはCTLA-4の発現を予防することができる。ヌクレアーゼ処理後に、PD1またはCTLA-4ノックアウトT細胞は、慢性感染症もしくは癌の処置における医薬として使用するために、対象の中に再導入されてもよく、または再導入の前に増やされてもよい。あるいは、PD1またはCTLA-4の遺伝子座の調節は、対象の中への必要なヌクレアーゼまたは操作された転写因子の導入を通してインビボで行われてもよい。同様に、PD1および/またはCTLA-4 特異的ヌクレアーゼ（例えばZFN、CRISPR/Casヌクレアーゼ系、および/またはTALLEN）により処理された幹細胞が、使用されてもよい。これらの細胞は、そのような医学的状態の処置のために、罹患している対象の中に注入することができる。

10

【0068】

いくつかの例において、PD1またはCTLA-4 特異的ヌクレアーゼまたは転写因子は、キメラ抗原受容体と共に使用されてもよい。したがって、本発明は、例えば、タンパク質腫瘍抗原または非タンパク質腫瘍抗原を特異的に標的にするCARをT細胞の中に導入し、その結果、そのようなCARを持つT細胞が抗原の存在下において活性化されるようになる方法を企図する。PD1またはCTLA-4 遺伝子（複数可）がノックアウトされている、または別の方法で同様に調節されている、PD1および/またはCTLA-4 特異的ヌクレアーゼまたは転写因子によって処理された、または処理されるであろう細胞におけるCARの使用は、癌細胞によって生成されるPD1リガンドに対して抵抗性であり、したがって、PD-1 媒介性のT細胞枯渇にさらされない、および/またはCTLA-4 媒介性のT細胞障害に対して抵抗性である、目的のCARを発現するT細胞をもたらす。

20

【0069】

多数の癌抗原は、当技術分野において公知であり、特異的なCARによって標的にされ得る。非限定的な例として、CARによって標的にされ得る腫瘍関連抗原について表1を参照されたい（RamosおよびDotti、同書およびOrientasら（2012）、Front in Oncol 2:1を参照されたい）。

【表 1 - 1】

表 1 : CAR ターゲティングに適した腫瘍関連抗原

腫瘍タイプ	抗原	説明
胃腸	EGP2/EpCam	上皮糖タンパク質 2 / 上皮細胞接着分子
胃腸	EGP40	上皮糖タンパク質 40
胃腸	TAG72/CA72-4	腫瘍関連糖タンパク質 72 / 癌抗原 72 ~ 4
膠芽腫	IL13R α 2	インターロイキン 13 受容体アルファ 2 サブユニット
腎臓	G250/MN/CA IX	カルボニックアンヒドラーゼ IX
リンパ系腫瘍	CD19	
リンパ系腫瘍	CD52	
リンパ系腫瘍	CD33	
リンパ系腫瘍	CD20	膜貫通 4 - ドメインサブファミリー A メンバー 1
リンパ系腫瘍	TSLPR (CRLF2)	
リンパ系腫瘍	CD22	シアル酸結合 Ig 様レクチン 2
リンパ系腫瘍	CD30	TNF 受容体スーパーファミリーメンバー 8
リンパ系腫瘍	κ	カッパ軽鎖
黒色腫	GD3	GD3 - ガングリオシド
黒色腫	HLA-A1+MAGE-1	ヒト白血球抗原 A1 + 黒色腫抗原 1
神経芽細胞腫 / 神経腫瘍	CD171	L1 細胞接着分子
神経芽細胞腫 / 神経腫瘍	ALK	未分化リンパ腫キナーゼ
神経芽細胞腫 / 神経腫瘍	GD2	GD2 - ガングリオシド
神経芽細胞腫 / 神経腫瘍	CD47	
神経芽細胞腫 / 神経腫瘍	EGFRvIII	
神経芽細胞腫 / 神経腫瘍	NCAM	神経細胞接着分子

10

20

30

40

【表 1 - 2】

卵巣	FBP/ α FR	葉酸結合タンパク質/ α 葉酸受容体	
卵巣	Le(Y)	ルイス-Y抗原	
卵巣	MUC1	ムチン1	
前立腺	PSCA	前立腺幹細胞抗原	
前立腺	PSMA	前立腺特異的膜抗原	
横紋筋肉腫 (Rhabdomyosarcoma)	FGFR4	線維芽細胞増殖因子受容体4	10
横紋筋肉腫	FAR	胎児アセチルコリン受容体	
いくつかの固形腫瘍	CEA	癌胎児性抗原	
いくつかの固形腫瘍	ERBB2/HER2	鳥赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ2 (avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) /ヒト上皮増殖因子受容体2	20
いくつかの固形腫瘍	ERBB3+ERBB4	鳥赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子相同性3+4	
いくつかの固形腫瘍	メソテリン		
様々な腫瘍	CD44v6	ヒアルロン酸受容体変異体6	
様々な腫瘍	B7-H3	接着受容体	
様々な腫瘍	グリピカン-3、5	細胞表面ペプチドグリカン	30
様々な腫瘍	ROR1		
様々な腫瘍	サバイビン	抗アポトーシス性分子	
様々な腫瘍	FOLR1	α 葉酸受容体	
様々な腫瘍	WT1	ウィルムス腫瘍抗原	
様々な腫瘍	CD70		
様々な腫瘍	VEGFR2/FLK/KDR	血管内皮増殖因子2 /胎児肝臓キナーゼ1 /キナーゼドメインインサート	40

【0070】

さらに、組換え発現ベクター、例えば自殺遺伝子を含むベクター、またはそのような遺伝子は、別々に導入されてもよい。本明細書において使用されるように、用語「自殺遺伝子」は、自殺遺伝子を発現する細胞を死滅させる遺伝子を指す。自殺遺伝子は、その遺伝子が発現される細胞に作用する薬剤、例えば薬物に感受性を与え、細胞がその薬剤と接触した、またはその薬剤に曝露された場合に、細胞を死滅させる遺伝子であり得る。自殺遺伝子は、当技術分野において公知であり(例えば Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline

J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research、サットン、サリー、イギリス国)、Humana Press、2004を参照されたい)、例えば、単純ヘルペスウイルス(HSV)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、およびニトロレダクターゼを含む。

【0071】

DNA結合ドメイン

PD1遺伝子座またはCTLA-4遺伝子座における標的部位に特異的に結合するDNA結合ドメインを含む組成物が本明細書において記載される。ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、TALE DNA結合ドメイン、CRISPR/Cas DNA結合ヌクレアーゼ系、またはメガヌクレアーゼ由来のDNA結合ドメインを含むが、これらに限定されない任意のDNA結合ドメインが、本明細書において開示される組成物および方法において使用することができる。

10

【0072】

ある実施形態では、DNA結合ドメインが、ジンクフィンガータンパク質またはTALE DNA結合タンパク質を含む。好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、それが選択された標的部位に結合するように操作されるという点で、天然には存在しない。例えば、すべてそれらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる、Beerliら(2002)Nature Biotechnol. 20:135-141; Paboら(2001)Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalanら(2001)Nature Biotechnol. 19:656-660; Segalら(2001)Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Chooら(2000)Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; 米国特許第6,453,242号明細書; 米国特許第6,534,261号明細書; 米国特許第6,599,692号明細書; 米国特許第6,503,717号明細書; 米国特許第6,689,558号明細書; 米国特許第7,030,215号明細書; 米国特許第6,794,136号明細書; 米国特許第7,067,317号明細書; 米国特許第7,262,054号明細書; 米国特許第7,070,934号明細書; 米国特許第7,361,635号明細書; 米国特許第7,253,273号明細書; および米国特許出願公開第2005/0064474号明細書; 米国特許出願公開第2007/0218528号明細書; 米国特許出願公開第2005/0267061号明細書を参照されたい。他の実施形態では、DNA結合ドメインが、TALE DNA結合ドメインを含む(本明細書においてその全体が参照によって組み込まれる、共有に係る米国特許出願公開第20110301073号明細書を参照されたい)。

20

30

【0073】

操作されたジンクフィンガーまたはTALE DNA結合ドメインは、天然に存在するジンクフィンガーまたはTALEタンパク質と比較して、新規な結合特異性を有することができる。操作方法は、合理的な設計および様々なタイプの選択を含むが、これらに限定されない。合理的な設計は、例えば、それぞれの三つ組または四つ組ヌクレオチド配列が、特定の三つ組または四つ組配列に結合するジンクフィンガーの1つまたは複数のアミノ酸配列に関連している、三つ組(または四つ組)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を含む。例えば、それらの全体が本明細書において参照によって組み込まれる、共有に係る米国特許第6,453,242号明細書および米国特許第6,534,261号明細書を参照されたい。

40

【0074】

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号明細書; 米国特許第5,925,523号明細書; 米国特許第6,007,988号明細書; 米国特許第6,013,453号明細書; 米国特許第6,410,248号明細書; 米国特許第6,140,466号明細書; 米国特許第6,200

50

、759号明細書；および米国特許第6,242,568号明細書；ならびに国際公開第98/37186号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/88197号パンフレット、および英国特許第2,338,237号明細書において開示される。そのうえ、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、共有に係る国際公開第02/077227号パンフレットにおいて記載されている。

【0075】

そのうえ、これらのおよび他の参考文献において開示されるように、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型(multi-fingered)ジンクフィンガータンパク質またはT A L Eは、例えば5以上のアミノ酸長のリンカーを含む任意の適したリンカー配列を使用してともに連結されてもよい。例示的な6以上のアミノ酸長のリンカー配列については、米国特許第6,479,626号明細書；米国特許第6,903,185号明細書；および米国特許第7,153,949号明細書もまた参照されたい。本明細書において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したリンカーの任意の組み合わせを含んでいてもよい。そのうえ、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、共有に係る国際公開第02/077227号パンフレットにおいて記載されている。

【0076】

標的部位の選択；ZFPまたはT A L Eならびに融合タンパク質(および融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド)の設計および構築のための方法は、当業者らに公知であり、米国特許第6,140,081号明細書；米国特許第789,538号明細書；米国特許第6,453,242号明細書；米国特許第6,534,261号明細書；米国特許第5,925,523号明細書；米国特許第6,007,988号明細書；米国特許第6,013,453号明細書；米国特許第6,200,759号明細書；国際公開第95/19431号パンフレット；国際公開第96/06166号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第98/54311号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/60970号パンフレット、国際公開第01/88197号パンフレット；国際公開第02/099084号パンフレット；国際公開第98/53058号パンフレット；国際公開第98/53059号パンフレット；国際公開第98/53060号パンフレット；国際公開第02/016536号パンフレット、および国際公開第03/016496号パンフレットにおいて詳細に記載される。

【0077】

そのうえ、これらのおよび他の参考文献において開示されるように、DNA結合ドメインは、例えば5以上のアミノ酸長のリンカーを含む任意の適したリンカー配列を使用してともに連結されてもよい。例示的な6以上のアミノ酸長のリンカー配列については米国特許第6,479,626号明細書；米国特許第6,903,185号明細書；および米国特許第7,153,949号明細書もまた参照されたい。本明細書において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したリンカーの任意の組み合わせを含んでいてもよい。

【0078】

あるいは、DNA結合ドメインは、ヌクレアーゼに由来してもよい。例えば、I - S c e I、I - C e u I、P I - P s p I、P I - S c e、I - S c e I V、I - C s m I、I - P a n I、I - S c e I I、I - P p o I、I - S c e I I I、I - C r e I、I - T e v I、I - T e v I I、およびI - T e v I I I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が公知である。米国特許第5,420,032号明細書；米国特許第6,833,252号明細書；B e l f o r t ら(1997) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 7 9 - 3 3 8 8 ; D u j o n ら(1989) G e n e 8 2 : 1 1 5 - 1 1 8 ; P e r l e r ら(1994) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 2 , 1 1 2 5 - 1 1 2 7 ; J a s i n (1996) T r e n d s G e n e

10

20

30

40

50

t. 12: 224 - 228; Gimbleら (1996) J. Mol. Biol. 263: 163 - 180; Argastら (1998) J. Mol. Biol. 280: 345 - 353、および New England Biolabs のカタログもまた参照されたい。そのうえ、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操作することができる。例えば Chevalierら (2002) Molec. Cell 10: 895 - 905; Epinatら (2003) Nucleic Acids Res. 31: 2952 - 2962; Ashworthら (2006) Nature 441: 656 - 659; Paquesら (2007) Current Gene Therapy 7: 49 - 66; 米国特許出願公開第 20070117128 号明細書を参照されたい。

10

【0079】

他の実施形態では、DNA 結合ドメインが、例えば RNA 分子によってガイドされる CRISPR/Cas ヌクレアーゼ系におけるものである。

【0080】

ある実施形態では、DNA 結合ドメインが、PD1 または CTLA-4 遺伝子座における標的部位に結合し（配列特異的な形で）、PD1 または CTLA-4 の発現を調節する、操作されたジンクフィンガータンパク質である。PD1 および CTLA-4 標的部位は、典型的に、少なくとも 1 つのジンクフィンガーを含むが、複数のジンクフィンガー（例えば 2、3、4、5、6、またはそれ以上のフィンガー）を含むことができる。通常、ZFP は、少なくとも 3 つのフィンガーを含む。特定の ZFP は、4、5、または 6 つのフィンガーを含む。3 つのフィンガーを含む ZFP は、典型的に、9 または 10 ヌクレオチドを含む標的部位を認識し、4 つのフィンガーを含む ZFP は、典型的に、12 ~ 14 ヌクレオチドを含む標的部位を認識し、他方で、6 つのフィンガーを有する ZFP は、18 ~ 21 ヌクレオチドを含む標的部位を認識することができる。ZFP はまた、1 つまたは複数の調節ドメインを含む融合タンパク質とすることもでき、これらの調節ドメインは、転写活性化ドメインまたは転写抑制ドメインとすることができる。

20

【0081】

他の実施形態では、DNA 結合ドメインが、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。例えば、本明細書においてその全体が参照によって組み込まれる、米国特許出願公開第 20110301073 号明細書を参照されたい。キサントモナス (*Xanthomonas*) 属の植物病原細菌は、重要な作物において多くの疾患を引き起こすことが知られている。キサントモナスの病原性は、植物細胞の中に 25 を超える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。これらの注入されるタンパク質の中には、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あやつる転写活性化因子様エフェクター (TALE) がある (Kayら (2007) Science 318: 648 - 651 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 TALE のうちの 1 つは、*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* 由来の AvrBs3 である (Bonasら (1989) Mol Gen Genet 218: 127 - 136 および国際公開第 2010079430 号パンフレットを参照されたい)。TALE は、タンデムリピートの集中型ドメインを含有し、それぞれのリピートは、およそ 34 のアミノ酸を含有し、これらは、これらのタンパク質の DNA 結合特異性の鍵となる。そのうえ、それらは、核局在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) J Plant Physiol 163 (3): 256 - 272 を参照されたい）。そのうえ、植物病原性細菌 *Ralstonia solanacearum* において、*R. solanacearum* 次亜種 1 株 GM100 および次亜種 4 株 RS1000 において、キサントモナスの AvrBs3 ファミリーと相同である brg11 および hpx17 と称される 2 つの遺伝子が発見された (Heuerら (2007) Appl and Envir Micro 73 (13): 4379

30

40

50

- 4384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、hp x 17のリピードメインにおける1,575bpの欠失によって異なる。しかしながら、両方の遺伝子産物は、キサントモナスのAvrBs3ファミリータンパク質と40%未満の配列同一性しか有していない。

【0082】

CRISPR/Cas系

真核生物のRNAi経路に平行すると仮定されてきた古細菌および多くの細菌におけるRNA媒介性のゲノム防御経路の存在について説得力のある証拠が最近明らかになった(概説については、GoddeおよびBickerton、2006.J.Mol.Evol.62:718-729;Lillestølら、2006.Archaea2:59-72;Makarovaら、2006.Biol.Direct1:7.;Sorekら、2008.Nat.Rev.Microbiol.6:181-186を参照されたい)。CRISPR-Cas系または原核生物RNAi(pRNAi)として知られているように、この経路は、2つの進化的におよび多くの場合、物理的に連結した遺伝子座;その系のRNA構成成分をコードするCRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat、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)遺伝子座から生じることが提唱されている(Jansenら、2002.Mol.Microbiol.43:1565-1575;Makarovaら、2002.Nucleic Acids Res.30:482-496;Makarovaら、2006.Biol.Direct1:7;Haftら、2005.PLoS Comput.Biol.1:e60)。微生物宿主におけるCRISPR遺伝子座は、CRISPR関連(Cas)遺伝子およびCRISPR媒介性の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ドRNAエレメントの組み合わせを含有する。個々のCasタンパク質は、真核生物RNAi機構のタンパク質構成成分と有意な配列類似性を共有しないが、類似する予測される機能(例えばRNA結合、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼなど)を有する(Makarovaら、2006.Biol.Direct1:7)。CRISPR関連(cas)遺伝子は、多くの場合、CRISPRリピート-スパーサーアレイに関連する。40を超える様々なCasタンパク質ファミリーが記載されてきた。これらのタンパク質ファミリーのうち、Cas1は、様々なCRISPR/Cas系の中に広範に分布しているように思われる。cas遺伝子およびリピート構造の特定の組み合わせは、8つのCRISPRサブタイプ(Ecoli、Ypest、Nmeni、Dvulg、Tneap、Hmari、Apern、およびMtube)を規定するために使用され、これらのうちのいくつかは、リピート関連ミステリアスタンパク質(repeat-associated mysterious protein)(RAMP)をコードするさらなる遺伝子モジュールに関連する。1つを超えるCRISPRサブタイプが単一のゲノム中に生じてもよい。CRISPR/Casサブタイプの散在性の分布は、その系が微生物の進化の間に遺伝子水平伝播を受けやすいことを示唆する。

【0083】

3つの型のCRISPR/Cas系があり、これらはすべて、RNAおよびCasタンパク質を組み込む。I型およびIII型は両方とも、pre-crRNAをプロセシングするCasエンドヌクレアーゼを有し、これは、crRNAに完全にプロセシングされた場合、crRNAに相補的な核酸を切断することができるマルチCasタンパク質複合体を構築する。

【0084】

II型CRISPR(Cas9によって例証される)は、最もよく特徴付けられている系のうちの1つであり、4つの連続的なステップにおいて標的DNA二本鎖切断を実行する。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-cr

10

20

30

40

50

RNAのリピート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 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、crRNA 上のスペーサーと、標的認識のためのさらなる必要条件であるプロトスペーサー (protospacer) 隣接モチーフ (PAM) の隣の、標的 DNA 上のプロトスペーサーとの間のワトソン-クリック塩基対形成を介して、Cas9 を標的 DNA に指向させる。最後に、Cas9 は、標的 DNA の切断を媒介して、プロトスペーサー内に二本鎖切断を作る。CRISPR/Cas 系の活性は、3つのステップから構成される：(i) 「適応」と呼ばれるプロセスにおける、今後の攻撃を予防するための CRISPR アレイ中への異質 DNA 配列の挿入、(ii) 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、その後続く (iii) 異質核酸への RNA 媒介性の干渉。したがって、細菌細胞において、いわゆる「Cas」タンパク質のいくつかは、CRISPR/Cas 系の天然の機能と関わりがある。

10

【0085】

CRISPR 遺伝子座の主要な産物は、インベーター標的配列 (invader targeting sequence) を含有し、経路におけるそれらの仮定される役割に基づいてガイド RNA または原核生物サイレンシング RNA (psiRNA) と称される、短い RNA であるように思われる (Makarova ら (2006) Biol. Direct 1:7; Hale ら (2008) RNA 14:2572-2579)。RNA 分析は、CRISPR 遺伝子座転写物が、反復配列内で切断されて、個々のインベーター標的配列およびフランキングリピート断片を含有する約 60~70 nt の RNA 中間体を放出することを示す (Tang ら (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99:7536-7541; Tang ら (2005) Mol. Microbiol. 55:469-481; Liljestrom ら、(2006) Archaea 2:59-72; Brouns ら (2008) Science 321:960-964; Hale ら (2008) RNA 14:2572-2579)。古細菌 *Pyrococcus furiosus* において、これらの中間体 RNA は、大量の安定した約 35~45 nt 成熟 psiRNA にさらにプロセッシングされる (Hale ら (2008) RNA 14:2572-2579)。

20

【0086】

II 型 CRISPR/Cas 系において、crRNA は、pre-crRNA 中のリピート配列に相補的なトランス活性化 RNA (tracrRNA) が、Cas9 タンパク質の存在下において二本鎖特異的 RNA アーゼ III によるプロセッシングを作動させる、種々のメカニズムを使用して産生される。Cas9 は、次いで、成熟 crRNA に相補的な標的 DNA を切断することができるが、Cas9 による切断は、crRNA および標的 DNA の間の塩基対形成ならびに PAM 配列 (プロトスペーサー隣接モチーフ) と呼ばれる、crRNA 中の短いモチーフの存在の両方に依存する (Qi ら (2013) Cell 152:1173 を参照されたい)。そのうえ、tracrRNA はまた、その 3' 末端で crRNA と塩基対形成するように存在していなければならない、この関連により Cas9 活性を作動させる。

30

【0087】

crRNA - tracrRNA 複合体の必要条件是、crRNA および tracrRNA のアニーリングによって通常形成されるヘアピンを含む操作された「単鎖ガイド RNA (sgRNA) の使用によって回避することができる (Jinek ら (2012) Science 337:816 および Cong ら (2013) Science express / 10.1126/science.1231143 を参照されたい)。S. pyrogenes において、操作された tracrRNA : crRNA 融合物または sgRNA は、二本鎖 RNA : DNA ヘテロ二量体が Cas 関連 RNA および標的 DNA の間で形成された場合、標的 DNA を切断するように Cas9 をガイドする。Cas9 タンパク質および PAM 配列を含有する操作された sgRNA を含むこの系は、RNA ガイドゲノム編集に使用されてきており (Ramalingam、同書を参照されたい)、インビボでのゼブ

40

50

ラフィッシュ胚ゲノム編集に有用であり (Hwangら (2013) Nature Biotechnology 31(3):227を参照されたい)、編集効率はZFNおよびTALENと同様であった。

【0088】

Casタンパク質

Cas9タンパク質は、少なくとも2つのヌクレアーゼドメインを有する：一方のヌクレアーゼドメインはHNHエンドヌクレアーゼに類似し、他方はRuvエンドヌクレアーゼドメインに似ている。HNH型ドメインは、crRNAに相補的であるDNA鎖の切断を担うように思われ、他方でRuvドメインは非相補性鎖を切断する。

【0089】

ある実施形態では、Casタンパク質が、天然に存在するCasタンパク質の「機能的誘導体」であってもよい。天然配列のポリペプチドの「機能的誘導体」は、天然配列のポリペプチドと共通した質的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」は、天然配列の断片ならびに天然配列のポリペプチドの誘導体およびその断片を含むが、これらに限定されず、ただし、それらが、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する。本明細書において企図される生物学的活性は、機能的誘導体がDNA基質を断片に加水分解する能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチド、共有結合修飾体の両方のアミノ酸配列変異体、およびその融合物を包含する。

【0090】

「Casポリペプチド」は、全長Casポリペプチド、Casポリペプチドの酵素的に活性な断片、およびCasポリペプチドの酵素的に活性な誘導体またはその断片を包含する。Casポリペプチドの適した誘導体またはその断片は、Casタンパク質の突然変異体、融合物、共有結合修飾体、またはその断片を含むが、これらに限定されない。

【0091】

Casタンパク質およびCasポリペプチドは、細胞から入手可能であるか、または化学的に合成されてもよく、またはこれらの2つの手順の組み合わせによるものであってもよい。細胞は、Casタンパク質を天然に産生する細胞、またはCas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のCasタンパク質を産生するように、または核酸が内因性のCasと同じもしくは異なる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た細胞であってもよい。ある場合では、細胞は、Casタンパク質を天然に産生せず、Casタンパク質を生成するように遺伝子操作される。

【0092】

CRISPR/Cas系はまた、遺伝子発現を阻害するために使用することもできる。Leiら(2013)Cell 152(5):1173-1183)は、エンドヌクレアーゼ活性を欠く触媒として作用しないCas9が、ガイドRNAと同時発現された場合に、転写伸長、RNAポリメラーゼ結合、または転写因子結合に特異的に干渉することができるDNA認識複合体を生成することを示した。CRISPR干渉(CRISPRi)と呼ばれるこの系は、標的遺伝子の発現を効率的に抑制することができる。

【0093】

そのうえ、Casタンパク質の切断ドメインにおいて、それらをDSBを誘導ができないようにし、代わりに標的DNA中にニックを導入する突然変異を含むCasタンパク質が、開発された(「Cas9ニックンク酵素」、Congら、同書を参照されたい)。特に、Casヌクレアーゼは、それぞれ、標的DNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖を切断するための2つのヌクレアーゼドメイン、HNHおよびRuvC様を含む。Casヌクレアーゼは、したがって、ヌクレアーゼドメインのうち的一方のみが機能的となり、したがってCasニッカーゼを作るように、操作することができる。例えばJinekら、同書およびCongら、同書を参照されたい。

【0094】

本発明のCasタンパク質は、機能性を改変するために突然変異させてもよい。ファー

10

20

30

40

50

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号明細書；米国特許第5,925,523号明細書；米国特許第6,007,988号明細書；米国特許第6,013,453号明細書；米国特許第6,410,248号明細書；米国特許第6,140,466号明細書；米国特許第6,200,759号明細書；および米国特許第6,242,568号明細書；ならびに国際公開第98/37186号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/88197号パンフレット、および英国特許第2,338,237号明細書において開示されている。

【0095】

CRISPR/CasのRNA構成成分

Cas9関連CRISPR/Cas系は、2つのRNA非コード構成成分：tracrRNAおよび同一の直列リピート(DR)で間を置かれたヌクレアーゼガイド配列(スペーサー)を含有するpre-crRNAアレイを含む。CRISPR/Cas系を使用してゲノム工学を達成するために、これらのRNAの両方の機能は存在しなければならない(Congら(2013)Scienceexpress 1/10.1126/science.1231143を参照されたい)。いくつかの実施形態では、tracrRNAおよびpre-crRNAが、個別の発現構築物を介してまたは個別のRNAとして供給される。他の実施形態では、キメラRNAが構築され、キメラcr-RNA-tracrRNAハイブリッド(単鎖ガイドRNAとも称される)を作るために、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)に融合される(Jinek、同書およびCong、同書を参照されたい)。

【0096】

キメラRNAまたはsgRNAは、任意の所望の標的に相補的な配列を含むように操作することができる。RNAは、標的に相補性で、形態G[n19]、その後続く、形態NGGのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の22塩基を含む。したがって、ある方法において、sgRNAは、目的の遺伝子における公知のZFN標的の利用によって、(i)関連するゲノム(ヒト、マウス、または特定の植物種のもの)の参照配列とZFNヘテロ二量体の認識配列をアライメントし、(ii)ZFNハーフ部位の間のスペーサー領域を同定し、(iii)スペーサー領域に最も近いモチーフG[N20]GGの位置を同定し(1つを超えるそのようなモチーフがスペーサーとオーバーラップする場合、スペーサーに関して中心にあるモチーフが選ばれる)、(iv)sgRNAのコアとしてそのモチーフを使用することによって、設計することができる。この方法は、有利には、証明されているヌクレアーゼ標的に依存する。あるいは、sgRNAは、単純に、G[n20]GG式に一致する、適した標的配列を同定することによって、目的の任意の領域を標的にするように設計することができる。

【0097】

標的部位

上記に詳細に記載されるように、DNAドメイン(ZFP、TALE、CRISPR RNA、メガヌクレアーゼ)は、遺伝子座における選択された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することができる。操作方法は、合理的な設計および様々なタイプの選択を含むが、これらに限定されない。合理的な設計は、例えば、それぞれの三つ組または四つ組ヌクレオチド配列が、特定の三つ組または四つ組配列に結合するDNA結合ドメインの1つまたは複数のアミノ酸配列に関連している、三つ組(または四つ組)ヌクレオチド配列および個々の(例えばジンクフィンガー)アミノ酸配列を含むデータベースを使用することを含む。例えば、それらの全体が本明細書において参照によって組み込まれる、共有に係る米国特許第6,453,242号明細書および米国特許第6,534,261号明細書を参照されたい。TAL-エフェクタードメインの合理的な設計もまた、実行することができる。例えば米国特許出願公開第20110301073号明細書を参照されたい。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 8 】

ファージディスプレイおよびツートハイブリッド系を含む、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号明細書；米国特許第5,925,523号明細書；米国特許第6,007,988号明細書；米国特許第6,013,453号明細書；米国特許第6,410,248号明細書；米国特許第6,140,466号明細書；米国特許第6,200,759号明細書；および米国特許第6,242,568号明細書；ならびに国際公開第98/37186号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/88197号パンフレット、および英国特許第2,338,237号明細書において開示される。

10

【 0 0 9 9 】

標的部位の選択；ヌクレアーゼならびに融合タンパク質（および融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド）の設計ならびに構築のための方法は、当業者らに公知であり、本明細書においてそれらの全体が参照によって組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号明細書および米国特許出願公開第20060188987号明細書において詳細に記載される。

【 0 1 0 0 】

そのうえ、これらのおよび他の参考文献において開示されるように、DNA結合ドメイン（例えばマルチフィンガー型ジンクフィンガータンパク質）は、例えば5以上のアミノ酸のリンカーを含む任意の適したリンカー配列を使用して互いに連結されてもよい。例示的な6以上のアミノ酸長のリンカー配列については、例えば米国特許第6,479,626号明細書；米国特許第6,903,185号明細書；および米国特許第7,153,949号明細書を参照されたい。本明細書において記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のDNA結合ドメイン間に任意の組み合わせの適したリンカーを含んでいてもよい。米国特許出願公開第20110301073号明細書もまた参照されたい。

20

【 0 1 0 1 】

ドナー

上記に言及されるように、外因性の配列（「ドナー配列」または「ドナー」または「導入遺伝子」とも呼ばれる）の挿入は、例えば、ポリペプチドの発現、突然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のものである。ドナー配列は、それが配置されるゲノム配列と典型的には同一ではないことは容易に明らかであろう。ドナー配列は、目的の位置で効率的なHDRを可能にするために相同性の2つの領域が隣接する非相同的配列を含有することができる。そのうえ、ドナー配列は、細胞の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むことができる。ドナー分子は、細胞のクロマチンに対して相同性のいくつかの非連続的な領域を含有することができる。例えば、目的の領域中に通常存在しない配列の標的挿入については、前記配列は、ドナー核酸分子中に存在し、目的の領域における配列に相同性の領域が隣接することができる。

30

【 0 1 0 2 】

ドナーポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAとすることができる、直鎖または環状の形態で細胞の中に導入することができる。例えば米国特許出願公開第20100047805号明細書；米国特許出願公開第20110281361号明細書；米国特許出願公開第20110207221号明細書、および米国特許出願第13/889,162号明細書を参照されたい。ドナー配列（複数可）は、DNA MC内に含有され得、これは、環状または直鎖の形態で細胞の中に導入されてもよい。直鎖の形態で導入される場合、ドナー配列の末端は、当業者らに公知の方法によって保護することができる（例えばエキソヌクレアーゼ分解から）。例えば、1つまたは複数のジデオキシヌクレオチド残基が、直鎖分子の3'末端に付加される、および/または自己相補的な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。例えばChangら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4959-4963；Nehlsら（1996）Science 272: 886-889を参照されたい。分

40

50

解から外因性のポリヌクレオチドを保護するためのさらなる方法は、末端アミノ基（複数可）の付加ならびに例えばホスホロチオエート、ホスホロアミデート、およびO-メチルリボースまたはデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間結合の使用を含むが、これらに限定されない。

【0103】

ポリヌクレオチドは、例えば複製開始点、プロモーター、および抗生物質耐性をコードする遺伝子などのさらなる配列を有するベクター分子の一部として細胞の中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は、ネイキッド核酸として、リポソームもしくはポロキサマーなどの作用物質と複合体を形成させた核酸として、導入することができる、またはウイルス（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

【0104】

ドナーは、一般に、その発現が組み込み部位で内因性のプロモーター、すなわち、ドナーが挿入される内因性の遺伝子（例えばAAVS1、CCR5、HPRTなど）の発現を駆動するプロモーターによって駆動されるように挿入される（共有に係る米国特許である米国特許第8,110,379号明細書および米国特許第7,9519,25号明細書ならびに米国特許出願公開第20130137104号明細書および米国特許出願公開第20130122591号明細書を参照されたい）。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、例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は明らかであろう。

20

【0105】

非コード核酸配列の標的挿入もまた、実現され得る。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、標的挿入に使用されてもよい。

【0106】

ドナー分子は、内因性の遺伝子のすべて、いくつかが発現されるか、またはどれも発現されないように、内因性の遺伝子の中に挿入されてもよい。例えば、本明細書において記載される導入遺伝子は、例えば導入遺伝子との融合物として、内因性の配列のうちのいくつか（導入遺伝子に対してN-末端および/またはC-末端）が発現されるか、またはどれも発現されないように、内因性の遺伝子座の中に挿入されてもよい。他の実施形態では、導入遺伝子（例えば内因性の遺伝子についてなどのさらなるコード配列を有するか、または有していない）は、任意の内因性の遺伝子座、例えばセーフハーバー遺伝子座の中に組み込まれる。例えば、米国特許出願公開第20080299580号明細書；米国特許出願公開第20080159996号明細書、および米国特許出願公開第201000218264号明細書を参照されたい。

30

【0107】

内因性の配列（内因性または導入遺伝子の一部）が導入遺伝子と共に発現される場合、内因性の配列は、全長配列（野生型もしくは突然変異体）または部分的な配列であってもよい。好ましくは、内因性の配列は、機能的である。これらの全長または部分的な配列の機能の非限定的な例は、導入遺伝子（例えば治療用遺伝子）によって発現される、および/または担体として作用するポリペプチドの血清半減期の増加を含む。

40

【0108】

さらに、発現に必要とされないが、外因性の配列はまた、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、配列内リポソーム進入部位、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含んでいてもよい。

【0109】

ある実施形態では、外因性の配列（ドナー）が、目的のタンパク質、およびその融合パートナーとして、細胞の表面に融合タンパク質を配置させる、膜タンパク質の細胞外ドメ

50

インの融合物を含む。いくつかの例では、ドナーがCARをコードし、CARコード配列は、CARが発現されるように、セーフハーバーの中に挿入される。いくつかの例では、CARコード配列が、PD1遺伝子座および/またはCTLA-4遺伝子座の中に挿入される。他の場合では、CARが、ランダム挿入のためにレンチウイルスにおいて細胞に送達され、他方で、PD1特異的ヌクレアーゼまたはCTLA-4特異的ヌクレアーゼは、mRNAとして供給される。いくつかの例では、CARが、セーフハーバー（例えばAAVS1、CCR5、アルブミン、またはHPRT）に対して特異的なヌクレアーゼをコードするmRNAと共に、AAVまたはアデノウイルスなどのウイルスベクター系を介して送達される。米国特許出願公開第20080299580号明細書；米国特許出願公開第20080159996号明細書；米国特許出願公開第201000218264号明細書；米国特許出願公開第20110301073号明細書；米国特許出願公開第20130177983号明細書、および米国特許出願公開第20130177960号明細書ならびに米国仮特許出願第61/823,689号明細書を参照されたい。細胞はまた、PD1特異的ヌクレアーゼおよび/またはCTLA-4特異的ヌクレアーゼをコードするmRNAにより処理することもできる。ある実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドが、HPRT特異的ヌクレアーゼおよびPD1特異的ヌクレアーゼまたはCTLA-4特異的ヌクレアーゼをコードするmRNAと一緒にウイルス送達系を介して供給される。HPRT遺伝子座に組み込まれたCARコードヌクレオチドを含む細胞は、インタクトなHPRT遺伝子を有する細胞において細胞停止をもたらす、および/またはアポトーシスを開始することができる、グアニンアナログである6-チオグアニンを使用して選択することができる。本発明の方法および組成物と共に使用することができるCARは、第1世代、第2世代、および第3世代の設計を含むすべてのタイプのこれらのキメラタンパク質を含む。受容体、リガンド、および操作されたポリペプチドに由来する特異性ドメインもまた本発明によって想定されるが、抗体に由来する特異性ドメインを含むCARは、特に有用である。細胞間シグナル伝達ドメインは、ゼータなどのTCR鎖ならびに鎖および鎖などのCD3複合体の他のメンバーに由来するものとすることができる。ある場合には、CARが、CD28、CD137（4-1BBとしても知られている）、またはCD134由来の細胞間ドメインなどのさらなる共刺激ドメインを含んでいてもよい。さらなる場合では、2つのタイプの共刺激因子ドメインが、同時に使用されてもよい（すなわちCD3ゼータがCD28+CD137と共に使用される）。

【0110】

融合タンパク質

本明細書において記載されるDNA結合タンパク質（例えばZFPまたはTALE）および異種調節（機能的）ドメイン（またはその機能的断片）を含む融合タンパク質もまた、提供される。一般的なドメインは、例えば転写因子ドメイン（活性化因子、抑制因子、共活性化因子、共抑制因子）、サイレンサー、癌遺伝子（例えばmyc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mosファミリーメンバーなど）；DNA修復酵素ならびにそれらの関連因子および修飾因子；DNA再編成酵素ならびにそれらの関連因子および修飾因子；クロマチン関連タンパク質ならびにそれらの修飾因子（例えばキナーゼ、アセチラーゼ、およびデアセチラーゼ）；ならびにDNA修飾酵素（例えばメチルトランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ）ならびにそれらの関連因子および修飾因子を含む。DNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ切断ドメインの融合に関する詳細については、本明細書においてそれらの全体が参照によって組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号明細書；米国特許出願公開第20060188987号明細書、および米国特許出願公開第2007/0218528号明細書。

【0111】

活性化の実現に適したドメインは、HSV VP16活性化ドメイン（例えばHagmannら、J. Virol. 71, 5952-5962（1997）を参照されたい）、核内ホルモン受容体（例えばTorchiaら、Curr. Opin. Cell. Bio

10

20

30

40

50

1.10:373-383(1998)を参照されたい);核内因子カッパBのp65サブユニット(BitkoおよびBarik、J.Virology 72:5610-5618(1998)およびDoyleおよびHunt、Neuroreport 8:2937-2942(1997));Liuら、Cancer Gene Ther. 5:3-28(1998)、またはVP64などの人工キメラ機能的ドメイン(Beerliら(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:14623-33)およびデグロン(Molinariら(1999)EMBO J. 18,6439-6447)を含む。さらなる例示的な活性化ドメインは、Oct1、Oct-2A、Sp1、AP-2、およびCTF1(Seipelら、EMBO J. 11,4961-4968(1992)ならびにp300、CBP、PCAF、SRC1、PVALF、AtHD2 AおよびERF-2を含む。例えばRobyら(2000)Mol.Endocrinol. 14:329-347;Collingwoodら(1999)J.Mol.Endocrinol. 23:255-275;Leoら(2000)Gene 245:1-11;Manteuffel-Cymborowska(1999)Acta Biochim.Pol. 46:77-89;McKennaら(1999)J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 69:3-12;Malikら(2000)Trends Biochem.Sci. 25:277-283;およびLemonら(1999)Curr.Opin.Genet.Dev. 9:499-504を参照されたい。さらなる例示的な活性化ドメインは、OSGAI、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、ARF-6、ARF-7、およびARF-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP、ならびにTRAB1を含むが、これらに限定されない。例えばOgawaraら(2000)Gene 245:21-29;Okanamiら(1996)Gene Cells 1:87-99;Goffら(1991)Genes Dev. 5:298-309;Chora(1999)Plant Mol.Biol. 40:419-429;Ulmasonら(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:5844-5849;Sprenger-Hausseleら(2000)Plant J. 22:1-8;Gongら(1999)Plant Mol.Biol. 41:33-44;およびHobora(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:15,348-15,353を参照されたい。

【0112】

DNA結合ドメインおよび機能的ドメインの間の融合タンパク質(または融合タンパク質をコードする核酸)の形成において、活性化ドメインまたは活性化ドメインと相互作用する分子のいずれかが機能的ドメインとして適していることは、当業者らに明らかであろう。本質的に、標的遺伝子に活性化複合体を動員するおよび/またはそれに対する活性を活性化する(例えばヒストンアセチル化など)ことができる任意の分子は、融合タンパク質の活性化ドメインとして有用である。融合分子において機能的ドメインとして使用するのに適しているインスレータードメイン、局在化ドメイン、ならびにISWI含有ドメインおよび/またはメチル結合ドメインタンパク質などのクロマチンリモデリングタンパク質は、例えば共有に係る米国特許出願第2002/0115215号明細書および米国特許出願第2003/0082552号明細書ならびに共有に係る国際公開第02/44376号パンフレットにおいて記載されている。

【0113】

例示的な抑制ドメインは、KRAB A/B、KOX、TGF-ベータ誘導性初期遺伝子(TIEG)、v-erbA、SID、MBD2、MBD3、DNMTファミリーのメンバー(例えばDNMT1、DNMT3A、DNMT3B)、Rb、およびMeCP2を含むが、これらに限定されない。例えばBirdら(1999)Cell 99:451-454;Tylerら(1999)Cell 99:443-446;Knoepflerら(1999)Cell 99:447-450;およびRobertsonら(2000)Nature Genet. 25:338-342を参照されたい。さらなる例示的な抑制ドメインは、ROM2およびAtHD2Aを含むが、これらに限定されない。

例えば Chemら (1996) Plant Cell 8:305-321; および Wuら (2000) Plant J. 22:19-27 を参照されたい。

【0114】

融合分子の機能的構成成分/ドメインは、一旦、融合分子がそのDNA結合ドメインを介して標的配列に結合したら、遺伝子の転写に影響を及ぼすことができる様々な異なる構成成分のいずれかから選択することができる。よって、機能的構成成分は、活性化因子、抑制因子、共活性化因子、共抑制因子、およびサイレンサーなどの、様々な転写因子ドメインを含むことができるが、これらに限定されない。

【0115】

さらなる例示的な機能的ドメインは、例えば、共有に係る米国特許第6,534,261号明細書および米国特許出願公開第2002/0160940号明細書において開示されている。

10

【0116】

外因性の小分子またはリガンドによって調節される機能的ドメインもまた、選択されてもよい。例えば、RheoSwitch (登録商標) 技術が、用いられてもよく、機能的ドメインは、外部のRheoChem (商標) リガンドの存在下においてのみその活性なコンホメーションを呈する (例えば米国特許出願公開第20090136465号明細書を参照されたい)。したがって、ZFP、TALE、またはCasは、調節可能な機能的ドメインに作動可能に連結されてもよく、ZFP-TF、TALE-TF、またはCRISPR/Cas TFの結果として生ずる活性は、外部のリガンドによって制御される。

20

【0117】

ヌクレアーゼ

ある実施形態では、融合タンパク質が、DNA結合性結合ドメインおよび切断 (ヌクレアーゼ) ドメインを含む。そのため、遺伝子修飾は、ヌクレアーゼ、例えば操作されたヌクレアーゼを使用して実現することができる。操作されたヌクレアーゼの技術は、天然に存在するDNA結合タンパク質の操作に基づく。本明細書において記載される方法および組成物は、広く適用可能で、目的の任意のヌクレアーゼを含んでいてもよい。ヌクレアーゼの非限定的な例は、メガヌクレアーゼ、TALEN、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、およびCRISPR/Casヌクレアーゼ系を含む。ヌクレアーゼは、異種DNA結合ドメインおよび異種切断ドメイン (例えば異種切断ドメインを有するジンクフィンガーヌクレアーゼ; TALEN、メガヌクレアーゼDNA結合ドメイン) を含んでいてもよく、あるいは、天然に存在するヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、選択される標的部位に結合するように改変されてもよい (例えば、同種の結合部位と異なる部位に結合するように操作されたメガヌクレアーゼ)。例えば、ある目的に合うように作ったDNA結合特異性を有するホーミングエンドヌクレアーゼの操作が記載されており、Chamesら (2005) Nucleic Acids Res 33(20):e178; Arnouldら (2006) J. Mol. Biol. 355:443-458 および Grizotら (2009) Nucleic Acids Res、7月7日 e publication を参照されたい。そのうえ、ZFPの操作もまた、記載されている。例えば米国特許第6,534,261号明細書; 米国特許第6,607,882号明細書; 米国特許第6,824,978号明細書; 米国特許第6,979,539号明細書; 米国特許第6,933,113号明細書; 米国特許第7,163,824号明細書; および米国特許第7,013,219号明細書を参照されたい。ヌクレアーゼは、核酸およびタンパク質の組み合わせを含んでいてもよい (例えばCRISPR/Cas)。

30

40

【0118】

ある実施形態では、ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ (ホーミングエンドヌクレアーゼ) である。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、4つのファミリーにグループ化される: LAGLIDADG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。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼは、I-SceI、I-CeuI、PI-Psp

50

I、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevIIおよびI-TevIIIを含む。それらの認識配列は公知である。米国特許第5,420,032号明細書；米国特許第6,833,252号明細書；Belfortら(1997)Nucleic Acids Res. 25:3379-3388；Dujonら(1989)Gene 82:115-118；Perlerら(1994)Nucleic Acids Res. 22,1125-1127；Jasin(1996)Trends Genet. 12:224-228；Gimbleら(1996)J.Mol.Biol. 263:163-180；Argastら(1998)J.Mol.Biol. 280:345-353、およびNew England Biolabsのカatalogもまた参照されたい。

10

【0119】

主としてLAGLIDADGファミリー由来の天然に存在するメガヌクレアーゼ由来のDNA結合ドメインは、植物、酵母、ショウジョウバエ、哺乳動物細胞、およびマウスにおける部位特異的なゲノム修飾を促進するために使用されてきたが、このアプローチは、メガヌクレアーゼ認識配列を保存する相同遺伝子(Monetら(1999)、Biochem. Biophysics Res. Common. 255:88-93)または認識配列が導入されたあらかじめ操作されたゲノムのいずれかの修飾に限られてきた(Routeら(1994)、Mol. Cell. Biol. 14:8096-106；Chiltonら(2003)、Plant Physiology. 133:956-65；Puchtaら(1996)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5055-60；Rongら(2002)、Genes Dev. 16:1568-81；Goubleら(2006)、J. Gene Med. 8(5):616-622)。したがって、医学的にまたはバイオテクノロジーに関連する部位で新規な結合特異性を示すようにメガヌクレアーゼを操作するための試みがなされてきた(Porteusら(2005)、Nat. Biotechnol. 23:967-73；Sussmanら(2004)、J. Mol. Biol. 342:31-41；Epinatら(2003)、Nucleic Acids Res. 31:2952-62；Chevalierら(2002)Molec. Cell 10:895-905；Epinatら(2003)Nucleic Acids Res. 31:2952-2962；Ashworthら(2006)Nature 441:656-659；Paquesら(2007)Current Gene Therapy 7:49-66；米国特許出願公開第20070117128号明細書；米国特許出願公開第20060206949号明細書；米国特許出願公開第20060153826号明細書；米国特許出願公開第20060078552号明細書；および米国特許出願公開第20040002092号明細書)。そのうえ、メガヌクレアーゼ由来の天然に存在する、または操作されたDNA結合ドメインは、異種ヌクレアーゼ(例えばFokI)由来の切断ドメインと作動可能に連結されてきた。

20

30

【0120】

他の実施形態では、ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)である。ZFNは、選択された遺伝子における標的部位に結合するように操作されたジンクフィンガータンパク質および切断ドメインまたは切断ハーフトドメインを含む。

40

【0121】

上記に言及されるように、ジンクフィンガー結合ドメインは、選択された配列に結合するように操作することができる。例えばBeerliら(2002)Nature Biotechnol. 20:135-141；Paboら(2001)Ann. Rev. Biochem. 70:313-340；Isalanら(2001)Nature Biotechnol. 19:656-660；Segalら(2001)Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637；Chooら(2000)Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416を参照されたい。操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質と比較し

50

て、新規な結合特異性を有することができる。操作方法は、合理的な設計および様々なタイプの選択を含むが、これらに限定されない。合理的な設計は、例えば、それぞれの三つ組または四つ組ヌクレオチド配列が、特定の三つ組または四つ組配列に結合するジンクフィンガーの1つまたは複数のアミノ酸配列に関連している、三つ組（または四つ組）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を含む。例えば、それらの全体が本明細書において参照によって組み込まれる、共有に係る米国特許第6,453,242号明細書および米国特許第6,534,261号明細書を参照されたい。

【0122】

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号明細書；米国特許第5,925,523号明細書；米国特許第6,007,988号明細書；米国特許第6,013,453号明細書；米国特許第6,410,248号明細書；米国特許第6,140,466号明細書；米国特許第6,200,759号明細書；および米国特許第6,242,568号明細書；ならびに国際公開第98/37186号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/88197号パンフレット、および英国特許第2,338,237号明細書において開示されている。そのうえ、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、共有に係る国際公開第02/077227号パンフレットにおいて記載されている。

【0123】

標的部位の選択；ZFNならびに融合タンパク質（および融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための方法は、当業者らに公知であり、本明細書においてそれらの全体が参照によって組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号明細書および米国特許出願公開第20060188987号明細書において詳細に記載されている。

【0124】

そのうえ、これらのおよび他の参考文献において開示されるように、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型ジンクフィンガータンパク質は、例えば5以上のアミノ酸長のリンカーを含む任意の適したリンカー配列を使用して互いに連結されてもよい。例示的な6以上のアミノ酸長のリンカー配列については例えば米国特許第6,479,626号明細書；米国特許第6,903,185号明細書；および米国特許第7,153,949号明細書を参照されたい。本明細書において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したリンカーの任意の組み合わせを含んでいてもよい。

【0125】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、操作されたTALENである。ユーザーが選ぶ標的配列との強い部位特異的な相互作用のためにこれらのタンパク質を操作するための方法および組成物が公開されている（共有に係る米国特許出願第20110301073号明細書を参照されたい）。

【0126】

他の実施形態では、ヌクレアーゼは、本明細書において記載されるCRISPR/Casヌクレアーゼ系である。

【0127】

ZFN、TALEN、CRISPR/Casおよび/またはメガヌクレアーゼなどのヌクレアーゼはまた、ヌクレアーゼ（切断ドメイン、切断ハーフドメイン）をも含む。上記に言及されるように、切断ドメインは、DNA結合ドメインと同種であってもよいまたは異種であってもよい。例えば、切断ドメインは、Casヌクレアーゼ（CRISPR/Cas系中の）またはメガヌクレアーゼDNA結合ドメインを有するメガヌクレアーゼ切断ドメインを含むことができる。あるいは、異種切断ドメインは、ジンクフィンガーもしくはTALE DNA結合ドメインとヌクレアーゼ由来の切断ドメイン、またはメガヌクレ

10

20

30

40

50

アーゼDNA結合ドメインと異なるヌクレアーゼ由来の切断ドメインを含む融合タンパク質を含む。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キソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインが由来し得る例示的なエンドヌクレアーゼは、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を含むが、これらに限定されない。例えば2002-2003 Catalogue、New England Biolabs、ピバリー、マサチューセッツ；およびBelfortら(1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3379-3388を参照されたい。DNAを切断するさらなる酵素は、公知である(例えばS1ヌクレアーゼ；マングベーンヌクレアーゼ；膀胱DNアーゼ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もまた参照されたい)。1つまたは複数のこれらの酵素(またはその機能的断片)は、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。

10

【0128】

同様に、切断ハーフドメインは、切断活性のために二量化を必要とする、上記に示される任意のヌクレアーゼまたはその一部分に由来することができる。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、2つの融合タンパク質が切断に必要とされる。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を使用することができる。2つの切断ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ(もしくはその機能的断片)に由来することができる、またはそれぞれの切断ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ(もしくはその機能的断片)に由来することができる。そのうえ、2つの融合タンパク質に対する標的部位は、好ましくは、切断ハーフドメインが例えば二量化により機能的な切断ドメインを形成するのを可能にする、互いに対して空間的な配向で、2つの融合タンパク質のそれぞれの標的部位への結合が切断ハーフドメインを配置するように、互いに対して並べられる。したがって、ある実施形態では、標的部位の近傍の端が、5~8ヌクレオチドまたは15~18ヌクレオチド隔てられる。しかしながら、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの標的部位の間に介在することができる(例えば2~50ヌクレオチド対またはそれ以上)。一般に、切断の部位は、標的部位の間にある。

20

【0129】

制限エンドヌクレアーゼ(制限酵素)は、多くの種に存在し、DNAに配列特異的な結合をし(認識部位で)、結合の部位またはその近くでDNAを切断することができる。特定の制限酵素(例えば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。例えば、IIS型酵素Fok I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上のその認識部位から13ヌクレオチドのところまでDNAの二本鎖切断を触媒する。例えば米国特許第5,356,802号明細書；米国特許第5,436,150号明細書、および米国特許第5,487,994号明細書；ならびにLira(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4275-4279；Lira(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2764-2768；Kimら(1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 883-887；Kimら(1994b) *J. Biol. Chem.* 269: 31,978-982を参照されたい。したがって、一実施形態では、融合タンパク質が、操作されてもよく、または操作されなくてもよい、少なくとも1つのIIS型制限酵素および1つまたは複数のジンクフィンガー結合ドメイン由来の切断ドメイン(または切断ハーフドメイン)を含む。

30

40

【0130】

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IIS型制限酵素は、Fok Iである。この特定の酵素は、二量体として活性である。Bitinaiteら(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10,570-10,575。したがって、本開示の目的のために、開示される融合タンパク質において使用されるFok I酵素の一部は、切断ハーフドメインと考えられる。したがって、ジンクフィン

50

ガー - F o k I 融合物または T A L E - F o k I 融合物を使用する細胞の配列の標的二本鎖切断および/または標的置換については、それぞれ 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、触媒活性切断ドメインを再構成するために使用することができる。あるいは、ジンクフィンガーまたは T A L E DNA 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。ジンクフィンガー - F o k I 融合物または T A L E - F o k I 融合物を使用する標的切断および標的配列改変のためのパラメーターは、本開示において別記されている。

【 0 1 3 1 】

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、または機能的な切断ドメインを形成するように多量体を形成する（例えば二量体化する）能力を保持するタンパク質の任意の部分とすることができる。

10

【 0 1 3 2 】

例示的な I I S 型制限酵素は、その全体が本明細書において組み込まれる、国際公開第 0 7 / 0 1 4 2 7 5 号パンフレットにおいて記載される。さらなる制限酵素はまた、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを含有し、これらは本開示によって企図される。例えば R o b e r t s ら (2 0 0 3) N u c l e i c A c i d s R e s . 3 1 : 4 1 8 - 4 2 0 を参照されたい。

【 0 1 3 3 】

ある実施形態では、切断ドメインが、例えば、すべての開示について本明細書においてそれらの全体が参照によって組み込まれる、米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 0 6 4 4 7 4 号明細書；米国特許出願公開第 2 0 0 6 0 1 8 8 9 8 7 号明細書、および米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 1 3 1 9 6 2 号明細書において記載されるように、ホモ二量体化を最小限にするかまたは予防する、1つまたは複数の操作された切断ハーフドメイン（二量体化ドメイン突然変異体とも呼ばれる）を含む。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標的である。

20

【 0 1 3 4 】

偏性ヘテロ二量体を形成する F o k I の例示的な操作された切断ハーフドメインは、第 1 の切断ハーフドメインが F o k I の 4 9 0 位および 5 3 8 位のアミノ酸残基で突然変異を含み、第 2 の切断ハーフドメインがアミノ酸残基 4 8 6 および 4 9 9 で突然変異を含むペアを含む。

30

【 0 1 3 5 】

したがって、一実施形態では、4 9 0 での突然変異が、G l u (E) を L y s (K) で置換し、5 3 8 での突然変異が、I s o (I) を L y s (K) で置換し、4 8 6 での突然変異が、G l n (Q) を G l u (E) で置換し、4 9 9 位での突然変異が、I s o (I) を L y s (K) で置換する。詳細には、本明細書において記載される操作された切断ハーフドメインは、「E 4 9 0 K : I 5 3 8 K」と称される、操作された切断ハーフドメインを産生するために、一方の切断ハーフドメインにおいて 4 9 0 位 (E K) および 5 3 8 位 (I K) を突然変異させることによって、ならびに「Q 4 8 6 E : I 4 9 9 L」と称される、操作された切断ハーフドメインを産生するために、他の切断ハーフドメインにおいて、4 8 6 位 (Q E) および 4 9 9 位 (I L) を突然変異させることによって、調製された。本明細書において記載される操作された切断ハーフドメインは、異常な切断が最小限にされるまたは排除される偏性ヘテロ二量体突然変異体である。例えば、その開示がすべの目的についてそれらの全体が参照によって組み込まれる、共有に係る米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 1 3 1 9 6 2 号明細書の実施例 1 および発行された米国特許第 7 , 9 1 4 , 7 9 6 号明細書を参照されたい。

40

【 0 1 3 6 】

ある実施形態では、操作された切断ハーフドメインが、4 8 6 位、4 9 9 位、および 4

50

96位(野生型FokIに関連してナンバリング)に突然変異、例えば486位の野生型Gln(Q)残基をGlu(E)残基で、499位の野生型Iso(I)残基をLeu(L)残基で、および496位の野生型Asn(N)残基をAsp(D)またはGlu(E)残基で置換する突然変異(それぞれ「ELD」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、操作された切断ハーフドメインが、490位、538位、および537位(野生型FokIに関連してナンバリング)に突然変異、例えば490位の野生型Glu(E)残基をLys(K)残基で、538位の野生型Iso(I)残基をLys(K)残基で、および537位の野生型His(H)残基をLys(K)残基またはArg(R)残基で置換する突然変異(それぞれ「KKK」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、操作された切断ハーフドメインが、490位および537位(野生型FokIに関連してナンバリング)に突然変異、例えば、490位の野生型Glu(E)残基をLys(K)残基とおよび537位の野生型His(H)残基をLys(K)残基またはArg(R)残基と交換する突然変異(それぞれ「KIK」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号明細書を参照されたい)。本明細書において記載される操作された切断ハーフドメインは、例えば、米国特許出願公開第20050064474号明細書；米国特許出願公開第20080131962号明細書；および米国特許出願公開第20110201055号明細書において記載されるように、野生型切断ハーフドメイン(FokI)の部位特異的突然変異誘発によって、任意の適した方法を使用して調製することができる。

10

20

【0137】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「スプリット酵素(split-enzyme)」技術を使用して、核酸標的部位でインピボで組み立てられてもよい(例えば米国特許出願公開第20090068164号明細書を参照されたい)。そのようなスプリット酵素の構成成分は、個別の発現構築物上で発現されてもよく、または個々の構成成分が例えば自己切断2AペプチドもしくはIRES配列によって隔てられている1つのオープンリーディングフレーム中で連結することができる。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ってもよい。

【0138】

本明細書において記載される操作された切断ハーフドメインは、例えば、米国特許出願公開第20050064474号明細書；米国特許出願公開第2007/0305346号明細書；米国特許出願公開第2008/0131962号明細書；および米国特許出願公開第20110201055号明細書における野生型切断ハーフドメイン(FokI)の部位特異的突然変異誘発によって、任意の適した方法を使用して調製することができる。

30

【0139】

ヌクレアーゼ発現構築物は、当技術分野において公知の方法を使用して容易に設計することができる。例えば、米国特許出願公開第20030232410号明細書；米国特許出願公開第20050208489号明細書；米国特許出願公開第20050026157号明細書；米国特許出願公開第20050064474号明細書；米国特許出願公開第20060188987号明細書；米国特許出願公開第20060063231号明細書；および国際公開第07/014275号パンフレットを参照されたい。ある実施形態では、ヌクレアーゼの発現が、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において活性化され(抑制解除され)、グルコースの存在下において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る。特に、ガラクトキナーゼプロモーターが誘導され、誘導性であり、ヌクレアーゼ(複数可)は、炭素供給源における連続の変化(例えばグルコースからラフィノース~ガラクトースへ)に際して発現される。誘導性プロモーターの他の非限定的な例は、CUP1、MET15、PHO5、およびtet-反応性プロモーターを含む。

40

【0140】

50

一本鎖切断を生成するヌクレアーゼもまた、使用することができる。ある実施形態では、触媒不活性ヌクレアーゼが、一本鎖切断を生成するため触媒活性ヌクレアーゼ（「ニッカーゼ」とも呼ばれる）と組み合わせて使用される。そのようなニッカーゼは、例えば米国特許出願公開第20100047805号明細書；Jinekら、同書；Congら、同書において記載されている。ニッカーゼは、酵素の触媒ドメイン中のアミノ酸の特定の突然変異またはドメインの一部もしくはすべてのトランケーションによって、それがもはや機能的ではなくなるように生成することができる。したがって、2つのヌクレアーゼ（切断）ドメイン（例えばZFN、TALEN、およびCRISPR/Casヌクレアーゼ系）を含むヌクレアーゼでは、このアプローチは、どちらかのドメインに対して行われてもよい。さらに、二本鎖切断は、2つのそのような一本鎖ニッカーゼの使用によって標的DNAにおいて実現することができる。それぞれのニッカーゼは、DNAの一方の鎖を切断し、2つ以上のニッカーゼの使用は、標的二本鎖配列において二本鎖切断（例えばねじれ型二本鎖切断（staggered double-stranded break））を引き起こすことができる。

10

【0141】

送達

ヌクレアーゼおよび転写因子、ヌクレアーゼおよび転写因子をコードするポリヌクレオチド、ならびに/または任意のドナーポリヌクレオチドならびに本明細書において記載され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は、任意の適した手段によって標的細胞に送達されてもよい。

20

【0142】

適した細胞は、真核生物細胞および原核生物細胞および/または細胞系統を含むが、これらに限定されない。そのような細胞またはそのような細胞から生成された細胞系統の非限定的な例は、COS、CHO（例えば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（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、またはサッカロミセス（Saccharomyces）、ピキア（Pichia）、およびシゾサッカロミセス（Schizosaccharomyces）などのような真菌細胞を含む。ある実施形態では、細胞系統は、CHO-K1細胞系統、MDCK細胞系統、またはHEK293細胞系統である。適した初代細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）およびこれらに限定されないが、CD4+T細胞、CD8+T細胞、腫瘍浸潤細胞（TIL）、または任意の他のタイプのT細胞などの任意のT-細胞などの他の血液細胞サブセットを含む。適した細胞はまた、例として、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉系幹細胞などの幹細胞をも含む。

30

【0143】

本明細書において記載される転写因子およびヌクレアーゼを送達するための方法は、例えば、そのすべての開示はそれらの全体が本明細書において参照によって組み込まれる、米国特許第6,453,242号明細書；米国特許第6,503,717号明細書；米国特許第6,534,261号明細書；米国特許第6,599,692号明細書；米国特許第6,607,882号明細書；米国特許第6,689,558号明細書；米国特許第6,824,978号明細書；米国特許第6,933,113号明細書；米国特許第6,979,539号明細書；米国特許第7,013,219号明細書；および米国特許第7,163,824号明細書において記載される。

40

【0144】

本明細書において記載される転写因子およびヌクレアーゼはまた、例えば1つまたは複数のタンパク質をコードする配列を含有するベクターを使用して送達されてもよい。ポリヌクレオチドをコードするドナーは、同様に送達されてもよい。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、ボックスウ

50

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を含むが、これらに限定されない任意のベクター系が、使用されてもよい。それらの全体が本明細書において参照によって組み込まれる、米国特許第6,534,261号明細書；米国特許第6,607,882号明細書；米国特許第6,824,978号明細書；米国特許第6,933,113号明細書；米国特許第6,979,539号明細書；米国特許第7,013,219号明細書；および米国特許第7,163,824号明細書もまた、参照されたい。さらに、これらのベクターのいずれかが1つまたは複数の転写因子および/またはヌクレアーゼを含んでいてもよいことは明らかであろう。したがって、1つまたは複数のZFP、TALE、CRISPR/Cas分子、および/またはドナーが細胞の中に導入される場合、ZFP、TALE、CRISPR/Cas分子、および/またはドナーは、同じベクター上でまたは異なるベクター上で運ばれてもよい。複数のベクターが使用される場合、それぞれのベクターは、1つまたは複数のZFP、TALE、CRISPR/Cas分子、および/またはドナーをコードする配列を含んでいてもよい。

10

【0145】

従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子導入方法は、操作されたZFP、CRISPR/Cas分子、TALE、および/またはドナーをコードする核酸を細胞（例えば哺乳動物細胞）および標的組織に導入するために使用することができる。そのような方法はまた、ZFP、TALE、CRISPR/Cas分子、および/またはドナーをコードする核酸をインピトロで細胞に投与するために使用することができる。ある実施形態では、ZFP、TALE、CRISPR/Cas分子、および/またはドナーをコードする核酸が、インピボまたはエキスピボ遺伝子治療の使用のために投与される。非ウイルスベクター送達系は、リポソームまた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DNAプラスミド、ネイキッド核酸、および核酸を含む。ウイルスベクター送達系は、DNAウイルスおよびRNAウイルスを含み、これらは、細胞への送達後にエピソームゲノムまたは組み込みゲノムのいずれかを有する。遺伝子治療手順の概説については、Anderson、Science 256:808-813(1992)；NabelおよびFelgner、TIBTECH 11:211-217(1993)；MitaniおよびCaskey、TIBTECH 11:162-166(1993)；Dillon、TIBTECH 11:167-175(1993)；Miller、Nature 357:455-460(1992)；Van Brunt、Biotechnology 6(10):1149-1154(1988)；Vigne、Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36(1995)；KremerおよびPerricaudet、British Medical Bulletin 51(1):31-44(1995)；Haddadā、in Current Topics in Microbiology and Immunology、DoerflerおよびBohm(編)(1995)；およびYura、Gene Therapy 1:13-26(1994)を参照されたい。

20

30

【0146】

核酸の非ウイルス送達の方法は、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(biolistic)、ピロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、または脂質：核酸コンジュゲート、裸のDNA、mRNA、人工ビリオン、およびDNAの取込みが増強された作用物質を含む。例えば、Sonitron 2000系(Rich-Mar)を使用する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。

40

【0147】

さらなる例示的な核酸送達系は、Amaxa(登録商標)Biosystems(ケルン、ドイツ国)、Maxcyte, Inc.(ロックビル、メリーランド)、BTX Molecular Delivery Systems(ホリストン、マサチューセッツ)、およびCopernicus Therapeutics Incによって提供されるものを含む(例えば米国特許第6008336号明細書を参照されたい)。リポフェ

50

クションは、例えば米国特許第5,049,386号明細書、米国特許第4,946,787号明細書；および米国特許第4,897,355号明細書において記載され、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カチオン性脂質および中性脂質は、Felgner、国際公開第91/17424号パンフレット、国際公開第91/16024号パンフレットのものを含む。送達は、細胞（エキスピボ投与）または標的組織（インピボ投与）へのものとする事ができる。

【0148】

免疫脂質（immunolipid）複合体などの標的リポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えばCrystal、Science 270:404-410（1995）；Blaeseら、Cancer Gene Ther. 2:291-297（1995）；Behrら、Bioconjugate Chem. 5:382-389（1994）；Remyら、Bioconjugate Chem. 5:647-654（1994）；Gaoら、Gene Therapy 2:710-722（1995）；Ahmadら、Cancer Res. 52:4817-4820（1992）；米国特許第4,186,183号明細書、米国特許第4,217,344号明細書、米国特許第4,235,871号明細書、米国特許第4,261,975号明細書、米国特許第4,485,054号明細書、米国特許第4,501,728号明細書、米国特許第4,774,085号明細書、米国特許第4,837,028号明細書、および米国特許第4,946,787号明細書を参照されたい）。

【0149】

送達のさらなる方法は、EnGeneIC送達ビヒクル（EDV）中へ送達される核酸のパッケージングの使用を含む。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、抗体の一方のアームは標的組織に対する特異性を有し、他方はEDVに対する特異性を有する。抗体は、標的細胞表面にEDVを運び、次いで、EDVは、エンドサイトーシスによって細胞の中に運ばれる。一旦、細胞中に入ったら、内容物が放出される（MacDiarmidら（2009）Nature Biotechnology 27（7）p.643を参照されたい）。

【0150】

操作されたZFP、TALE、CRISPR/Cas分子、および/またはドナーをコードする核酸の送達のためのRNAまたはDNAウイルスベースの系の使用は、身体における特異的な細胞をウイルスが標的とする、および核にウイルス搭載物（payload）を輸送するための非常に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与することができる（インピボ）またはそれらは、インピトロで細胞を処置するために使用することができる。修飾された細胞は、患者に投与される（エキスピボ）。送達のための従来のウイルスベースの系は、遺伝子導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、ワクシニア、および単純ヘルペスウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。宿主ゲノムにおける組み込みは、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導入方法により可能であり、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。そのうえ、高い形質導入効率は、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きた。

【0151】

レトロウイルスのトロピズムは、外来性エンベロープタンパク質を組み込み、標的細胞の潜在的な標的集団を増やすことによって、改変することができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入または感染することができ、典型的に、高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導入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、6~10kbまでの外来性配列をパッケージする能力を有するシス作用性長末端リピートから構成される。最小限のシス作用性LTRは、ベクターの複製およびパッケージに十分であり、これらは、次いで、持続性の導入遺伝子発現をもたらすために標的細胞の中に治療用遺伝子を組み込むために使

10

20

30

40

50

用される。広く使用されるレトロウイルスベクターは、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)、およびその組み合わせに基づくものを含む (例えば Buchscherら、*J. Virol.* 66:2731-2739 (1992); Johannら、*J. Virol.* 66:1635-1640 (1992); Sommerfeltら、*Virol.* 176:58-59 (1990); Wilsonら、*J. Virol.* 63:2374-2378 (1989); Millerら、*J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700を参照されたい)。

【0152】

一過性の発現が好まれる適用では、アデノウイルスベースの系を使用することができる。アデノウイルスベースのベクターは、多く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により、高力価および高レベルの発現が得られてきた。このベクターは、比較的単純なシステムで多量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス (「AAV」) ベクターはまた、例えば、核酸およびペプチドのインビトロ産生において、細胞に標的核酸を形質導入するため、ならびにインビボおよびエクシボでの遺伝子治療手順のために使用される (例えば Westら、*Virology* 160:38-47 (1987); 米国特許第4,797,368号明細書; 国際公開第93/24641号パンフレット; Kotin、*Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka、*J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994)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号明細書; Tratschinら、*Mol. Cell Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschinら、*Mol. Cell Biol.* 4:2072-2081 (1984); HermonatおよびMuzyczka、*PNAS* 81:6466-6470 (1984); および Samulskiら、*J. Virol.* 63:03822-3828 (1989)を含む、多くの刊行物において記載されている。

【0153】

少なくとも6つのウイルスベクターアプローチが、臨床試験における遺伝子導入のために現在利用可能であり、これは、形質導入剤を生成するためにヘルパー細胞系統の中に挿入された遺伝子による欠損ベクターの補完を含むアプローチを利用する。

【0154】

pLASNおよびMFG-Sは、臨床試験において使用されたレトロウイルスベクターの例である (Dunbarら、*Blood* 85:3048-305 (1995); Kohnら、*Nat. Med.* 1:1017-102 (1995); Malechら、*PNAS* 94:2212133-12138 (1997))。PA317/pLASNは、遺伝子治療の治験において使用された最初の治療用ベクターであった (Blaeseら、*Science* 270:475-480 (1995))。50%以上の形質導入効率は、MFG-Sパッケージベクターについて観察された。 (Ellemら、*Immunol Immunother.* 44(1):10-20 (1997); Dranoffら、*Hum. Gene Ther.* 1:111-2 (1997))。

【0155】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) は、欠損非病原性パルボウイルスアデノ随伴型ウイルスに基づく有望な代替的遺伝子送達系である。ベクターは、導入遺伝子発現カセットの隣接するAAV 145bpの逆方向末端リピート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の中への組み込みによる、効率的な遺伝子導入および安定した導入遺伝子送達は、このベクター系についての重要な特徴である。 (Wagnerら、*Lancet* 351:9117-1702-3 (1998); Kearnsら、*Gene Ther.* 9:748-55 (1996))。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6およびAAV8、AAV8.2、AAV9、ならびにAAVrh10ならびにAAV2/8、AAV2/5、およびAAV2/6などのシュードタ

10

20

30

40

50

イブ AAV を含む他の AAV 血清型もまた、本発明に従って使用することができる。

【0156】

複製欠損組換えアデノウイルスベクター (Ad) は、高力価で産生され、多くの異なる細胞型に容易に感染することができる。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 遺伝子を置換するように操作され、続いて、複製欠損ベクターは、欠失した遺伝子機能をトランスで供給するヒト 293 細胞において増殖される。Ad ベクターは、肝臓、腎臓および筋肉において見られるものなどの非分裂分化細胞を含む、インビボでの複数タイプの組織について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治療を含んだ (Sterman ら、Hum. Gene Ther. 7: 1083-9 (1998))。臨床試験における遺伝子導入のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる例は、Rosenacker ら、Infection 24: 15-10 (1996); Sterman ら、Hum. Gene Ther. 9: 71083-1089 (1998); Welsh ら、Hum. Gene Ther. 2: 205-18 (1995); Alvarez ら、Hum. Gene Ther. 5: 597-613 (1997); Topf ら、Gene Ther. 5: 507-513 (1998); Sterman ら、Hum. Gene Ther. 7: 1083-1089 (1998) を含む。

10

【0157】

パッケージ細胞は、宿主細胞に感染することができるウイルス粒子を形成するために使用される。そのような細胞は、アデノウイルス、AAV をパッケージする 293 細胞およびレトロウイルスをパッケージする 2 細胞または PA317 細胞を含む。遺伝子治療において使用されるウイルスベクターは、ウイルス粒子の中に核酸ベクターをパッケージする産生細胞系統によって通常生成される。ベクターは、典型的に、パッケージおよび宿主 (適用可能な場合) の中への続く組み込みに必要な最小限のウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現されるタンパク質をコードする発現カセットによって置換される。失われたウイルス機能は、パッケージ細胞系統によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療において使用される AAV ベクターは、典型的に、パッケージおよび宿主ゲノムの中への組み込みに必要とされる、AAV ゲノム由来の逆方向末端リピート (ITR) 配列のみを持つ。ウイルス DNA は、他の AAV 遺伝子、すなわち rep および cap をコードするが、ITR 配列を欠くヘルパープラスミドを含有する細胞系統中にパッケージされる。細胞系統はまた、ヘルパーとしてのアデノウイルスにも感染させられる。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由来の 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大量にはパッケージされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスが AAV よりも感受性である熱処理によって低下させることができる。そのうえ、AAV は、バキュロウイルス系を使用して、臨床規模で産生することができる (米国特許第 7,479,554 号明細書を参照されたい)。

20

30

【0158】

多くの遺伝子治療の適用では、特定の組織型に高度の特異性で遺伝子治療ベクターが送達されることは望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外側表面上の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することによって、所定の細胞型に対して特異性を有するように修飾することができる。リガンドは、目的の細胞型上に存在することが知られている受容体に対する親和性を有するように選ばれる。例えば、Han ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9747-9751 (1995) は、モロニーマウス白血病ウイルスが、gp70 に融合され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癌細胞に感染することを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスが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発現する、他のウイルス-標的細胞ペアに広げることができる。例えば、繊維状ファージは

40

50

、事実上任意の選ばれた細胞受容体に対して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）をディスプレイするように操作することができる。上記の記載は主としてウイルスベクターに適用されるが、同じ原理は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は、特定の標的細胞による取込みに好都合である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。

【0159】

遺伝子治療ベクターは、下記に記載されるように、典型的に、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、個々の患者への投与によってインピボで送達することができる。あるいは、ベクターは、個々の患者から外植された細胞（例えばリンパ球、骨髄穿刺液、組織生検材料）または万能ドナー造血幹細胞などの、エキスピボで細胞に送達することができ、その後、通常ベクターを組み込んだ細胞の選択の後に患者の中に細胞が再移植される。

10

【0160】

診断、研究、または遺伝子治療のためのエキスピボ細胞トランスフェクション（例えば、トランスフェクトされた細胞の、宿主生物中への再注入を介して）は、当業者らに周知である。好ましい実施形態では、細胞が、対象生物から単離され、ZFP核酸（遺伝子またはcDNA）によりトランスフェクトされ、対象生物（例えば患者）の中に再注入され戻される。エキスピボでのトランスフェクションに適した様々な細胞型は、当業者らに周知である（患者から細胞を単離し、培養する方法の議論について、例えばFreshneyら、Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique（第3版、1994）およびそこに挙げられる参考文献を参照されたい）。

20

【0161】

適した細胞は、真核生物細胞および原核生物細胞ならびに/または細胞系統を含むが、これらに限定されない。そのような細胞またはそのような細胞から生成された細胞系統の非限定的な例は、COS、CHO（例えば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（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、またはサッカロミセス（Saccharomyces）、ピキア（Pichia）、およびシゾサッカロミセス（Schizosaccharomyces）などの真菌細胞を含む。ある実施形態では、細胞系統が、CHO-K1、MDCK、またはHEK293細胞系統である。そのうえ、初代細胞は、単離され、本明細書において記載される転写因子および/またはヌクレアーゼによる処理後に、処置される対象の中への再導入のためにエキスピボで使用されてもよい。適した初代細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、および限定されないが、腫瘍浸潤細胞（TIL）、CD4+T細胞、またはCD8+T細胞などのT細胞などの他の血液細胞サブセットを含む。適した細胞はまた、例として、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉系幹細胞などの幹細胞を含む。

30

40

【0162】

一実施形態では、幹細胞が、細胞トランスフェクションおよび遺伝子治療のためにエキスピボ手順において使用される。幹細胞の使用の利点は、それらがインピボで他の細胞型に分化することができる、またはそれらが骨髄において生着するであろう哺乳動物（細胞のドナーなど）の中に導入することができるということである。GM-CSF、IFN- γ およびTNF- α などのサイトカインを使用して臨床的に重要な免疫細胞型にインピボでCD34+細胞を分化させる方法が公知である（Inabara、J. Exp. Med. 176:1693-1702（1992）を参照されたい）。

【0163】

幹細胞は、公知の方法を使用して、形質導入および分化のために単離される。例えば、

50

幹細胞は、CD4+およびCD8+(T細胞)、CD45+(panB細胞)、GR-1(顆粒球)、およびIad(分化抗原提示細胞)などの望まれない細胞に結合する抗体により骨髓細胞をパニングする(panning)ことによって、骨髓細胞から単離される。(Inabara, J. Exp. Med. 176: 1693-1702 (1992)を参照されたい)。

【0164】

修飾された幹細胞もまた、いくつかの実施形態で使用されてもよい。例えば、アポトーシスに対して抵抗性にされた幹細胞は、治療用組成物として使用されてもよく、幹細胞はまた、本発明のZFP、TALE、CRISPR/Cas分子、および/またはドナーを含有する。アポトーシスに対する抵抗性は、例えば、幹細胞、またはさらに例えばカスパーゼ-6特異的ZFNを使用してカスパーゼが破壊された細胞において、BAX特異的ZFNまたはBAK特異的ZFNを使用して、BAXおよび/またはBAKをロックアウトすることによって生じてもよい(米国特許出願第12/456,043号明細書を参照されたい)。

10

【0165】

治療用ZFP、TALE、CRISPR/Cas分子、および/またはドナー核酸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、リポソームなど)もまた、インピボでの細胞の形質導入のために生物に直接投与することができる。あるいは、ネイキッドDNAまたはmRNAを投与することができる。投与は、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より、最終的に血液または組織細胞と接触し、これは、注射、注入、局所適用、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。そのような核酸を投与するための適した方法は、利用可能であり、当業者らに周知であり、特定の組成物を投与するために複数の経路を使用することができるが、特定の経路は、多くの場合、他の経路よりも即時的かつ有効な反応をもたらすことができる。

20

【0166】

造血幹細胞の中へのDNAの導入のための方法は、例えば米国特許第5,928,638号明細書において開示される。造血幹細胞、例えばCD34⁺細胞の中への導入遺伝子の導入に有用なベクターは、アデノウイルス35型を含む。

【0167】

免疫細胞(例えばT細胞)の中への導入遺伝子の導入に適したベクターは、非組み込みレンチウイルスベクターを含む。例えばOryら(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11382-11388; Dullら(1998)J. Virol. 72: 8463-8471; Zufferyら(1998)J. Virol. 72: 9873-9880; Follenziら(2000)Nature Genetics 25: 217-222を参照されたい。

30

【0168】

薬学的に許容され得る担体は、投与されている特定の組成物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部分的に決定される。したがって、下記に記載されるように、利用可能な医薬組成物の多種多様の適した製剤がある(例えばRemington's Pharmaceutical Sciences、第17版、1989を参照されたい)。

40

【0169】

適用

開示される組成物および方法は、PD-1および/またはCTLA-4の発現を調節することが所望される、任意の適用に使用することができる。特に、これらの方法および組成物は、PD-1またはCTLA-4の調節が所望される場合に、使用することができ、治療上および研究の適用を含むが、これらに限定されない。本発明はまた、CARおよび/または操作されたTCRをコードするDNA配列の、PD-1調節細胞および/またはCTLA-4調節細胞(例えば、PD1および/またはCTLA-4発現が、操作された転写因子を介して修飾されているか、または操作されたヌクレアーゼを使用してロックア

50

ウトされている細胞)のゲノムの中への挿入をも企図する。いくつかの例では、細胞は、T I LまたはT I Lから増やされた細胞である。本方法および組成物は、H I V / A I D SおよびH C Vなどの慢性感染症ならびに/または癌(例えば黒色腫、卵巣癌、結腸直腸/結腸癌、腎細胞癌、形質細胞腫/骨髄腫、乳癌、および肺癌)を含む様々な疾患ならびに障害を処置するために使用されてもよい。

【0170】

これらのおよび他の疾患もまた、C A Rと組み合わせて、P D 1標的ヌクレアーゼまたはC T L A - 4標的ヌクレアーゼまたは転写因子により処置されてもよく、C A Rが、ウイルス送達系を介して細胞の中に導入される。ある場合には、操作されたT C Rもまた、細胞の中に導入されるか、またはC A Rの代わりに細胞の中に導入されてもよい。操作されたT C Rの作用を容易にするために、内因性のT C Rはまた、破壊されてもよい。

10

【0171】

P D 1特異的ヌクレアーゼまたはC T L A - 4特異的ヌクレアーゼまたは転写因子を含む方法および組成物はまた、慢性感染症または癌を処置するように設計された他の治療薬と共に使用されてもよい。本明細書において記載されるヌクレアーゼ(例えばZ F N、T A L E N、C R I S P R / C a s系もしくはこれらの分子をコードするポリヌクレオチド)または転写因子(もしくはそれらをコードするポリヌクレオチド)は、同時に(例えば同じ医薬組成物中で)投与されてもよく、または任意の順で、順次投与されてもよい。肺癌、膵癌、肝臓癌、骨肉腫、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、白血病、黒色腫、リンパ腫、脳癌などを含むが、これらに限定されない任意のタイプの癌を処置することができる。

20

【0172】

P D 1特異的ヌクレアーゼおよび/またはC T L A - 4特異的ヌクレアーゼまたは転写因子は、C A R T細胞標的系と共に使用されてもよい。C A Rは、腫瘍抗原に対して特異性を有していてもよく、C A R特異性ドメインはs c F vである。あるいは、C A Rは、腫瘍抗原に対して特異的であってもよく、C A R特異性ドメインはリガンドまたはポリペプチドを含む。非限定的な例示的C A Rは、C D 3 3 (D u t o u r ら (2 0 1 2) A d v H e m a t o l 2 0 1 2 ; 2 0 1 2 : 6 8 3 0 6 5 を参照されたい)、G D 2 (L o u i s ら (2 0 1 1) B l o o d 1 1 8 (2 3) : 6 5 0 - 6)、C D 1 9 (S a v o l d o ら (2 0 1 1) J C l i n I n v e s t 1 2 1 (5) : 1 8 2 2 および T o r i k a i ら (2 0 1 2) B l o o d 1 1 9 (2 4) : 5 6 9 7)、I L - 1 1 R (H u a n g ら (2 0 1 2) C a n c e r R e s 7 2 (1) : 2 7 1 - 8 1)、C D 2 0 (T i l l ら (2 0 1 2) B l o o d 1 1 9 (1 7) : 3 9 4 0 - 5 0)、N Y - E S O - 1 (S c h u b e r t h ら (2 0 1 2) G e n e T h e r d o i : 1 0 . 1 0 3 8 / g t 2 0 1 2 . 4 8)、E r b B 2 (Z h a o ら (2 0 0 9) J . I m m u n o l 1 8 3 (9) : 5 5 6 3 - 7 4)、C D 7 0 (S h a f f e r ら (2 0 1 1) B l o o d 1 1 6 (1 6) : 4 3 0 4 - 4 3 1 4)、C D 3 8 (B h a t t a c h a r a y y a ら (2 0 1 2) B l o o d C a n c J 2 (6) p . e 7 5)、C D 2 2 (H a s o ら (2 0 1 2) C a n c R e s 7 2 (8) S 1 , d o i : 1 1 5 8 / 1 1 5 8 - 7 4 4 5 A M 2 0 1 2 - 3 5 0 4)、C D 7 4 (S t e i n ら (2 0 0 4) B l o o d 1 0 4 : 3 7 0 5 - 3 7 1 1)、C A I X (L a m e r s ら (2 0 1 1) B l o o d 1 1 7 (1) : 7 2 - 8 2)、S T E A P 1 (標的の概説についてはK i e s s l i n g ら (2 0 1 2) C a n c e r s 4 : 1 9 3 - 2 1 7 を参照されたい)、V E G F - R 2 (米国特許出願公開第20120213783A1号明細書)、葉酸受容体(P C T特許公開国際公開第2012099973号パンフレット)、ならびにI L - 1 3 R (米国特許第7514537号明細書)を標的にするものを含む。ある場合には、C A Rは、二重特異性であってもよい(米国特許出願公開第2001012967号明細書を参照されたい)。ある場合には、T細胞は、T I Lである。そのうえ、P D 1特異的ヌクレアーゼおよび/またはC T L A - 4特異的ヌクレアーゼまたは転写因子は、操作されたT C Rを含むT細胞またはT I Lと共に使用されてもよい。

30

40

【0173】

50

本発明の方法および組成物はまた、インビトロおよびインビボモデル、例えば慢性感染症、癌、または自己免疫の動物モデルの設計および実現に有用であり、これにより、これらの障害の研究および有用な治療薬のさらなる発見を可能にする。ある場合には、本発明の方法は、操作されたT細胞を必要とする患者において使用されてもよい、操作されたT細胞を産生するのに有用である。いくつかの処置のために、患者は、T細胞の注入の前に部分的なまたは完全な骨髄破壊のための作用物質によりあらかじめ処置される。

【0174】

下記の実施例は、ヌクレアーゼがZFNまたはTALENを含む本開示の例示的な実施形態に関する。これは例証のみの目的のためのものであり、他のヌクレアーゼ、例えばCRISPR/Casヌクレアーゼ系、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/または天然に存在する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）DNA結合ドメインおよび異種切断ドメインの融合物を使用することができることが十分に理解されるであろう。

10

【実施例】

【0175】

実施例1：持続的に生物学的に活性なPD1特異的ZFNまたはCTLA-4特異的ZFNの同定

ZFNは、Millerら(2007)Nat. Biotechnol. 25:778-785ならびに米国特許出願公開第20050064474号明細書および国際特許公開第2005/014791号パンフレットにおいて記載されるように、ヒトPD1またはCTLA-4遺伝子に対して組み立てられ、ELISAおよびCEL1アッセイによって試験された。

20

【0176】

PD1標的ZFPの特定の例は、米国特許出願公開第20110136895号明細書において開示され、表2aおよび2bにおいて示され、CTLA-4標的ZFP設計を、表2cにおいて示す。この表における第1列は、ZFPについての内部参照名(番号)である。「F」はフィンガーを指し、「F」に続く番号は、どのジンクフィンガーかを指す(例えば「F1」はフィンガー1を指す)。これらのCTLA-4特異的ZFNについての標的部位を、表3に示す。

【表 2 a - 1】

表 2 a : ヒト PD 1 標的ジネクフィンガータンパク質

SBS #	設計					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
12942	QSGHLR (配列番号 : 34)	RSDSLV (配列番号 : 35)	HNSRKN (配列番号 : 36)	RDDLTR (配列番号 : 37)	RDHLTQ (配列番号 : 38)	N/A
12946	RSAALR (配列番号 : 39)	RDDLTR (配列番号 : 37)	RDHLETT (配列番号 : 40)	RSALR (配列番号 : 6)	RSALAR (配列番号 : 41)	N/A
12947	RSAALAR (配列番号 : 42)	RDDLK (配列番号 : 3)	RNDHRKN (配列番号 : 43)	RSALR (配列番号 : 6)	RSALAR (配列番号 : 41)	N/A
12934	RDHLE (配列番号 : 44)	TSSDRK (配列番号 : 45)	RDHLE (配列番号 : 44)	QSARK (配列番号 : 46)	N/A	N/A
12971	RDLVLE (配列番号 : 47)	RANLTR (配列番号 : 48)	RDHLSQ (配列番号 : 49)	TSSNRKT (配列番号 : 50)	RSNLR (配列番号 : 9)	RDLAR (配列番号 : 7)
12972	DDNLSQ (配列番号 : 51)	RANLTR (配列番号 : 48)	RDHLSQ (配列番号 : 49)	TSSNRKT (配列番号 : 50)	RSNLR (配列番号 : 9)	RDLAR (配列番号 : 7)
18759	RSALR (配列番号 : 52)	RPLALK (配列番号 : 53)	RNDHRKN (配列番号 : 43)	TRVLKR (配列番号 : 54)	RSALAR (配列番号 : 41)	N/A
22237	QSGHLR (配列番号 : 34)	RSDSLV (配列番号 : 35)	HNSRKN (配列番号 : 36)	RANLLR (配列番号 : 55)	RDHLTQ (配列番号 : 38)	N/A
25005	RPSTLR (配列番号 : 56)	RDELTR (配列番号 : 57)	RNNLRT (配列番号 : 58)	TRVLKR (配列番号 : 54)	RSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25006	RPSTLR (配列番号 : 56)	RDELTR (配列番号 : 57)	TNHLRT (配列番号 : 59)	TRVLKR (配列番号 : 54)	RSALAR (配列番号 : 41)	N/A

10

20

30

40

【表 2 a - 2】

25010	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RTPHLTL (配列番号 : 60)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25011	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RSAQLAT (配列番号 : 61)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25012	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RCTHLYL (配列番号 : 62)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25013	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RPTQRY5 (配列番号 : 63)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25014	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RANHREC (配列番号 : 64)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25015	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RANHREC (配列番号 : 64)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25016	RKFARPS (配列番号 : 65)	RNFSRSD (配列番号 : 66)	HPHHRMC (配列番号 : 67)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25017	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RMGRLST (配列番号 : 68)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25022	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RHSRLTT (配列番号 : 69)	TRPVLKR (配列番号 : 70)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25023	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RANHRVC (配列番号 : 71)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25025	RPSTLHR (配列番号 : 56)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RSTHLLG (配列番号 : 72)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A

10

20

30

40

【表 2 a - 3】

	: 56)	: 57)	: 72)	: 54)	: 41)	
25027	RNAALTR (配列番号 : 73)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RSCGLWS (配列番号 : 74)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25028	CNAALTR (配列番号 : 75)	RSDELTR (配列番号 : 57)	REEHRAT (配列番号 : 76)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25029	RNAALTR (配列番号 : 73)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RHHHLAA (配列番号 : 77)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25030	RNAALTR (配列番号 : 73)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RPMHLTN (配列番号 : 78)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25031	RNAALTR (配列番号 : 73)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RSPHLYH (配列番号 : 79)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25032	RNAALTR (配列番号 : 73)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RCEALHH (配列番号 : 80)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSAQAR (配列番号 : 81)	N/A
25034	RNAALTR (配列番号 : 73)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RCEALHH (配列番号 : 80)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25036	RNAALTR (配列番号 : 73)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RSPHLYH (配列番号 : 79)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25040	RNAALTR (配列番号 : 73)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RLPALLS (配列番号 : 82)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A
25041	HNAALTR (配列番号 : 83)	RSDELTR (配列番号 : 57)	RTYNRTQ (配列番号 : 84)	TRPVLKR (配列番号 : 54)	DRSALAR (配列番号 : 41)	N/A

10

20

30

40

【表 2 b】

表 2 b : ヒト PD1 遺伝子における ZFN 標的的部位

SBS#	標的的部位
12942	ccAGGGCGCCTGTGGGAtctgcatgct (配列番号: 85)
12946	caGTCGTCTGGGCGGTGctacaactggg (配列番号: 86)
12947	caGTCGTCTGGGCGGTGctacaactggg (配列番号: 86)
12934	gaACACAGGCACGGctgaggggtctctcc (配列番号: 87)
12971	ctGTGGACTATGGGGAGCTGgatttcca (配列番号: 88)
12972	ctGTGGACTATGGGGAGCTGgatttcca (配列番号: 88)
18759	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
22237	ccAGGGCGCCTGTGGGAtctgcatgct (配列番号: 85)
25005	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25006	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25010	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25011	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25012	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25013	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25014	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25015	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25016	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25017	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25022	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25023	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25025	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25027	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25028	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25029	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25030	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25031	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25032	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25034	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25036	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25040	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)
25041	caGTCGTCTGGGCGGTGct (配列番号: 89)

10

20

30

40

【表 2 c】

表 2 c : ヒトCTLA-4 標的ジnkフィンガータンパク質

SBS #	設計				
	F1	F2	F3	F4	F5
20186	QSSDLRS (配列番号 : 1)	RSDNLRRE (配列番号 : 2)	RSDDLRSK (配列番号 : 3)	QSSDLRR (配列番号 : 4)	LKQHLNE (配列番号 : 5)
20185	DRSALRS (配列番号 : 6)	RSDALAR (配列番号 : 7)	QSGDRNK (配列番号 : 8)	DRSNLSR (配列番号 : 9)	RSDDRKT (配列番号 : 10)
20190	QSGSLTR (配列番号 : 11)	RSDNLTT (配列番号 : 12)	QNATRIK (配列番号 : 13)	RSDVLSA (配列番号 : 14)	DRSNRIK (配列番号 : 15)
20189	RSANLAR (配列番号 : 16)	TNQNRIT (配列番号 : 17)	TSGHLRS (配列番号 : 18)	RSDSLRL (配列番号 : 19)	RNDDRKK (配列番号 : 20)

10

20

【表 3】

表 3 : ヒトCTLA-4 遺伝子における ZFN 標的的部位

SBS#	標的的部位
20186	acAGTGCTTCGgCAGGCTgacagccagg (配列番号 : 21)
20185	acCCGGACcTCAGTGGCTttgcctggag (配列番号 : 22)
20190	actACCTGgGCATAGGCAacggaaccca (配列番号 : 23)
20189	tgGCGGTGGGTaCATGAGctccaccttg (配列番号 : 24)

30

【0177】

最初のインビトロ活性アッセイは、上記に記載されるように、ヌクレオフェクトした (nucleofect) 細胞サンプルに対して実行した。手短に言えば、ZFP-FokI 融合物をコードするプラスミドを、メーカーによって指定されるように、Amaya (商標) Nucleofection キットを使用するトランスフェクションによって、K562 細胞の中に導入した。トランスフェクションのために、200 万の K562 細胞を、様々な量の各ジnkフィンガーヌクレアーゼ発現プラスミドおよび 100 μ L Amaya (商標) Solution V と混合した。細胞を、プログラム T-16 を使用し、Amaya Nucleofector II (商標) においてトランスフェクトした。トランスフェクションの直後に、細胞を 2 つの異なるフラスコの中に分割し、4 日間、30 または 37 のいずれかで 5% CO₂ 中、10% FBS を補充した RPMI 培地 (Invitrogen) 中で増殖させた。

40

【0178】

そのうえ、PMBC もまた抗 CD23 / CD8 ビーズにより活性化した (例えば米国特許出願公開第 20080311095 号明細書を参照されたい)。活性化の 3 日 (EPD3) または 5 日 (EPD5) 後のいずれかで、細胞を、2 つの異なる MAXCYTE (商標) 条件 (C1 および C3) を使用して、PD1 特異的 ZFN mRNA (PD1、特に

50

ZFN 12942および25029)またはCCR5(R5、米国特許第7,951,925号明細書を参照されたい)を用いてエレクトロポレーションした。次いで、細胞を、下記に記載されるCEL-1アッセイを使用して、標的遺伝子座の遺伝子修飾について分析した。図2において示されるように、高レベルの遺伝子修飾が見られた。

【0179】

CTLA-4遺伝子座でのZFN活性を決定するために、Cel-1ベースのSURVEYOR(商標)ヌクレアーゼアッセイを、基本的にメーカーの指示(Transgenomic SURVEYOR(商標))に従って、および米国特許出願公開第20110136895号明細書においてPD1について記載されるように、実行した。手短に言えば、細胞を回収し、染色体DNAを、メーカーの説明書(Epicentre(登録商標))に従ってQuickextract(商標)キットを使用して調製した。PD1遺伝子座の適切な領域は、Accuprime(商標)High-fidelity DNA polymerase(Invitrogen)を使用してPCR増幅した。PCR反応は94℃まで加熱し、室温まで徐々に冷却した。およそ200ngのアニールしたDNAを、0.33μL Cel-I酵素と混合し、42℃で20分間インキュベートした。反応産物を、1xトリス-硼酸-EDTAバッファー中でポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した。

10

【0180】

細胞は、ウイルスへの曝露の3日または10日後に回収し、遺伝子修飾効率は、国際特許公開第07/014275号パンフレットにおいて記載されるように実行したCel-IベースのSURVEYOR(商標)ヌクレアーゼアッセイを使用して決定した。Oleykowskiら(1998)Nucleic Acids Res. 26:4597-4602; Quiら(2004)BioTechniques 36:702-707; Yeungら(2005)BioTechniques 38:749-758もまた参照されたい。

20

【表4】

表4: CTLA-4 ZFNの活性

ZFNペア	検出されたインデル%
20186/20185	3.3%
20190/20189	1.8%

30

【0181】

実施例2: PD1特異的TALENおよびCTLA-4特異的TALEN

PD1特異的TALENは、以前に記載したように開発され、組み立てられた(米国特許出願公開第20110301073号明細書を参照されたい)。塩基認識は、標準RVD塩基対応を使用して実現した(「TALEコード」: AについてNI、CについてHD、GについてNN(ハーフリピート(half repeat)中NK)、TについてNG)。TALENは、米国特許出願公開第20110301073号明細書において記載されるように「+63」TALEN骨格で構築された。標的および試験したTALENについての数値の識別子を、下記表5aおよび5bにおいて示す。

40

【表 5 a】

表 5 a : PD 1 特異的 TALEN-標的部位

SBS #	部位	RVDの番号	配列番号 :
101621	gtAGCACCGCCCAGACGActg	17	25
101618	gtGCTCCAGGCATGCAGATcc	17	26
101620	atGCAGATCCCACAGGCgc	15	27
101622	gtTGTAGCACCGCCCAGACga	17	28
101623	gtTGTAGCACCGCCCAGAcg	16	29
101624	atGCAGATCCCACAGGCgc	15	27
101625	gtTGTAGCACCGCCCAGACga	17	28
101626	ctTCTCCCCAGCCCTGCTCgt	17	30
101627	gtGAAGGTGGCGTTGTCCCct	17	31
101632	ctACCTCTGTGGGGCCATCtc	17	32
101633	ctCTCTTTGATCTGCGCCTtg	17	33
101638	gtACCGCATGAGCCCCAGCaa	17	34
101639	ctCGGGGAAGGCGGCCAGCtt	17	35
101640	ctACCTCTGTGGGGCCATCtc	17	32
101641	ctCTCTTTGATCTGCGCCTtg	17	33

10

20

【表 5 b】

表 5 b : PD 1 特異的 TALEN-RVD

SBS #	RVDの番号	RVDs (N->C)	配列番号:
101621	17	NI-NN-HD-NI-HD-HD-NN-HD-HD-HD-NI-NN-NI-HD-NN-NI-HD	90
101618	17	NN-HD-NG-HD-HD-NI-NN-NN-HD-NI-NG-NN-HD-NI-NN-NI-NG	91
101620	15	NN-HD-NI-NN-NI-NG-HD-HD-HD-NI-HD-NI-NN-NN-HD	92
101622	17	NG-NN-NG-NI-NN-HD-NI-HD-HD-NN-HD-HD-HD-NI-NN-NI-HD	93
101623	16	NG-NN-NG-NI-NN-HD-NI-HD-HD-NN-HD-HD-HD-NI-NN-NI	94
101624	15	NN-HD-NI-NN-NI-NG-HD-HD-HD-NI-HD-NI-NN-NN-HD	92
101625	17	NG-NN-NG-NI-NN-HD-NI-HD-HD-NN-HD-HD-HD-NI-NN-NI-HD	93
101626	17	NG-HD-NG-HD-HD-HD-HD-NI-NN-HD-HD-HD-NG-NN-HD-NG-HD	95
101627	17	NN-NI-NI-NN-NN-NG-NN-NN-HD-NN-NG-NG-NN-NG-HD-HD-HD	96
101632	17	NI-HD-HD-NG-HD-NG-NN-NG-NN-NN-NN-NN-HD-HD-NI-NG-HD	97
101633	17	HD-NG-HD-NG-NG-NG-NN-NI-NG-HD-NG-NN-HD-NN-HD-HD-NG	98
101638	17	NI-HD-HD-NN-HD-NI-NG-NN-NI-NN-HD-HD-HD-HD-NI-NN-HD	99
101639	17	HD-NN-NN-NN-NN-NI-NI-NN-NN-HD-NN-NN-HD-HD-NI-NN-HD	100
101640	17	NI-HD-HD-NG-HD-NG-NN-NG-NN-NN-NN-NN-HD-HD-NI-NG-HD	97
101641	17	HD-NG-HD-NG-NG-NG-NN-NI-NG-HD-NG-NN-HD-NN-HD-HD-NG	98

10

20

30

【 0 1 8 2 】

次いで、T A L E Nを、内因性のP D 1 染色体標的で修飾を誘導する能力についてK 5 6 2 細胞においてペアで試験し、結果は、ほぼすべてのタンパク質のペアが活性であることを示した。下記表 6 において示される 1 2 9 4 2 / 2 5 0 2 9 Z F N ペアとの活性の対照比較は（米国特許出願公開第 2 0 1 1 - 1 3 6 8 9 5 号明細書を参照されたい）、T A L E N および Z F N が同じ近似範囲にある活性を有することを示した。表 6 において示されるレーン番号が図 1 において示されるレーンに対応することに注意されたい。

40

【表 6】

表 6 : PD1 TALEN活性

レーン	TALENペア	% NHEJ
1	101621/101618	23.5
2	101621/101619	18.1
3	101621/101620	0
4	101622/101618	14.7
5	101622/101619	14.7
6	101622/101620	10.6
7	101623/101618	6.8
8	101623/101619	18.2
9	101623/101620	11.6
10	101625/101624	10.1
11	12942/25029 (ZFN)	14.7
G	GFP	0
12	101627/101626	12.5
13	101633/101632	14.7
14	101639/101638	0
15	101641/101640	23
G	GFP	0

【 0 1 8 3 】

CTLA-4 特異的 TALEN は、上記に記載されるように設計され、組み立てられる。内因性の CTLA-4 染色体標的に対する活性についての試験は、TALEN が活性であることを明らかにする。

【 0 1 8 4 】

実施例 3 : PD1 および / または CTLA-4 もまた欠く、CAR を含む T 細胞の生成
CAR を発現し、PD1 および / または CTLA-4 がノックアウトされている T 細胞集団を生成するために、CAR 含有 T 細胞を生成する。細胞 (例えば PBMC、TIL、CD4+、または CD8+ 細胞などの T 細胞) を天然の供給源、例えば転移性の黒色腫患者から精製し、標準的な手順に従って培養する、および / または増やす。細胞は、例えば、米国特許出願公開第 20080311095 号明細書において記載されるように刺激されてもよい。細胞に CAR、例えば ErbB2 特異的 scFv または VEGFR2 特異的 scFv のいずれかを含む CAR を形質導入する。scFv をコードする核酸は、PCR アプローチを介して最初に構築され、配列を検証する。それらを CD28 および CD3ゼータシグナル伝達部分に連結し、細胞の中に導入する (例えばレトロウイルスまたはレンチウイルスあるいは他の標的 / 送達メカニズムを介して)。

【 0 1 8 5 】

次いで、細胞を、PD1 特異的ヌクレアーゼおよび / または CTLA-4 特異的ヌクレアーゼをコードする mRNA により処理し、集団を、PD1 または CTLA-4 破壊および CAR 挿入について検証するために、Cell-IAッセイによって分析する。次いで、操作された T 細胞を、ErbB2 または VEGFR2 のいずれかを発現する腫瘍細胞系統に対して試験し、これらの標的細胞系統を特異的に溶解することが示される。

【0186】

実施例4：PD1特異的ZFP TF

PD1特異的ZFP TFは、PD1発現の発現を抑制するように設計された。これらのタンパク質を下記表7 aおよび7 bにおいて示す。

【表7 a】

表7 a：ZFP-TFについてのヒトPD1標的ジंकフィンガータンパク質

SBS #	設計					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
22937	RSDTLSV (配列番号 :101)	DNSTRIK (配列番号 :102)	RSDHLSQ (配列番号 :49)	RSDVRKN (配列番号 :103)	DRSHLTR (配列番号 :104)	RSDNLTT (配列番号 :12)
22945	RSDDLTR (配列番号 :37)	RSDHLR (配列番号 :105)	RSDNLAR (配列番号 :106)	QSGNLAR (配列番号 :107)	RSDNLAR (配列番号 :106)	RSDALAR (配列番号 :7)
22954	QSGDLTR (配列番号 :108)	RSDDLTR (配列番号 :37)	RSDNLSV (配列番号 :109)	RSANLTR (配列番号 :48)	RSDVLSK (配列番号 :110)	QNATRIK (配列番号 :13)
22957	RSDVLSE (配列番号 :47)	ARSTRTN (配列番号 :111)	DRSHLTR (配列番号 :104)	DRSHLAR (配列番号 :112)	QSGNLAR (配列番号 :107)	QSGHLR (配列番号 :34)
22959	RSDNLSE (配列番号 :113)	DRSHLAR (配列番号 :112)	DRSHLTR (配列番号 :104)	QSSDLRR (配列番号 :4)	RSDHLST (配列番号 :114)	DRSNRKT (配列番号 :115)

10

20

30

【表7 b】

表7 b：ZFP-TFについてのヒトPD1標的ジंकフィンガータンパク質、標的部位

SBS#	標的部位
22937	ggTAGGGCGTGGGGGCCACGggcccacc (配列番号:116)
22945	atGTGGAGGAAGAGGGGCGggagcaag (配列番号:117)
22954	gaGCAGTGGAGAAGGCGGCActctggtg (配列番号:118)
22957	gtGGAGAAGGCGGCACTCTGgtggggt (配列番号:119)
22959	acAACTGGGCTGGCGGCCAGgatgggttc (配列番号:120)

40

【0187】

次いで、表7 aにおいて示されるPD1特異的DNA結合ドメインを、ヒトKOX1遺伝子由来のKRAB抑制ドメインに融合した。PD1抑制ZFP TFの活性を試験するために、ZFP TFをヒト細胞の中にトランスフェクトし、PD1の発現をリアルタイムRT-PCRを使用してモニターした。具体的には、Jurkat細胞を10% FBSを補充したDMEM中で培養し、 1×10^5 細胞を、メーカーの指示に従って、Amaxa Nucleofector (登録商標)によって、示されるZFP-KOX融合物をコー

50

ドする 1 μg のプラスミド DNA によりトランスフェクトする。

【0188】

トランスフェクトした細胞を 2 日間インキュベートし、内因性のヒト PD1 および標準化コントロール 18S のレベルを正規化プロトコールに従ってリアルタイム PCR (Applied Biosystems) によって分析した。PD1 レベルは、偽トランスフェクトサンプル (1 に設定) に対して正規化した PD1 / 18S 比として表現した。

【0189】

PD1 標的 ZFP は PD1 発現を抑制した。

【0190】

ウエスタンブロット分析は、PD1 タンパク質レベルの低下を確認するために標準的な

10

【0191】

本明細書において挙げられる特許、特許出願、および刊行物はすべて、それらの全体が参照によって本明細書により組み込まれる。

【0192】

本開示は、理解の明瞭さの目的のために例証および実施例として詳細に提供されたが、様々な変化および修飾が本開示の精神または範囲から逸脱することなく実行することができることは当業者らに明らかであろう。したがって、前述の説明および実施例は、限定として解釈されるべきではない。

【図 1】

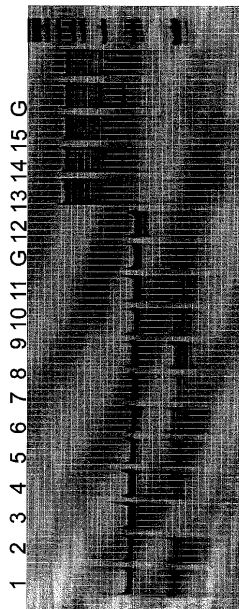


Figure 1

【図 2】

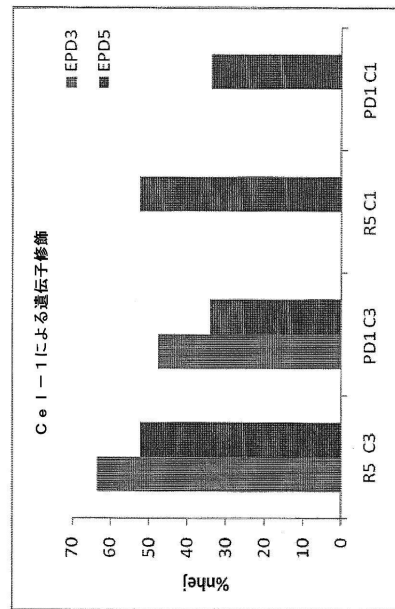


Figure 2

【配列表】

0006401704000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 グレゴリー, フィリップ ディー.

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

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0158957(US, A1)

特開2011-093901(JP, A)

特表2012-500847(JP, A)

国際公開第2012/012667(WO, A2)

特表2010-527606(JP, A)

米国特許出願公開第2011/0136895(US, A1)

Curr. Opin. Immunol., 2012年 7月18日, Vol.24, No.5, p.633-639, Epub

Curr. Opin. Immunol., 2009年 3月21日, Vol.21, No.2, p.224-232, Epub

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

Google Scholar

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)