(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5976661号
(P5976661)

(45)発行日　平成28年8月24日(2016.8.24)　(24)登録日　平成28年7月29日(2016.7.29)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61P 37/06	(2006.01)	A61P	37/06	

請求項の数 15　(全 46 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2013-540017(P2013-540017)
(86)(22)出願日	平成23年11月17日(2011.11.17)
(65)公表番号	特表2014-501506(P2014-501506A)
(43)公表日	平成26年1月23日(2014.1.23)
(86)国際出願番号	PCT/US2011/061201
(87)国際公開番号	WO2012/068380
(87)国際公開日	平成24年5月24日(2012.5.24)
審査請求日	平成26年10月20日(2014.10.20)
(31)優先権主張番号	12/927,557
(32)優先日	平成22年11月17日(2010.11.17)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　508241200
サンガモ　バイオサイエンシーズ，　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　ブールバード　５０１　ポイント　リッチモンド　テク　センター　スート　エー１００
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＰＤ１を調節するための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＰＤ１遺伝子の標的部位に結合する亜鉛フィンガータンパク質であって、Ｎ-末端からＣ-末端までＦ１～Ｆ５又はＦ１～Ｆ６～F4の順で５つまたは６つの亜鉛ジンクフィンガー認識領域を含み、該認識領域が、以下のアミノ酸配列：

（ｉ）　Ｆ１：ＲＳＳＡＬＳＲ（配列番号２３）；
Ｆ２：ＲＰＬＡＬＫＨ（配列番号２４）；
Ｆ３：ＲＮＤＨＲＫＮ（配列番号１２）；
Ｆ４：ＴＲＰＶＬＫＲ（配列番号２５）；および
Ｆ５：ＤＲＳＡＬＡＲ（配列番号９）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号６０に示される標的部位に結合する；

（ｉｉ）　Ｆ１：ＲＰＳＴＬＨＲ（配列番号２７）；
Ｆ２：ＲＳＤＥＬＴＲ（配列番号２８）；
Ｆ３：ＲＮＮＮＬＲＴ（配列番号２９）、ＴＮＷＨＬＲＴ（配列番号３０）、ＲＴＰＨＬＴＬ（配列番号３１）、ＲＳＡＱＬＡＴ（配列番号３２）、ＲＣＴＨＬＹＬ（配列番号３３）、ＲＰＴＱＲＹＳ（配列番号３４）、ＲＡＮＨＲＥＣ（配列番号３５）、ＲＭＧＲＬＳＴ（配列番号３９）、ＲＡＮＨＲＶＣ（配列番号４２）、またはＲＳＴＨＬＬＧ（配列番号４３）；
Ｆ４：ＴＲＰＶＬＫＲ（配列番号２５）；および
Ｆ５：ＤＲＳＡＬＡＲ（配列番号９）、ここで、該亜鉛フィンガータン

パク質は配列番号６０に示される標的部位に結合する
（iii）Ｆ１：ＲＰＳＴＬＨＲ（配列番号２７）；
Ｆ２：ＲＳＤＥＬＴＲ（配列番号２８）；
Ｆ３：ＲＨＳＲＬＴＴ（配列番号４０）；
Ｆ４：ＴＲＰＶＬＭＲ（配列番号４１）；および
Ｆ５：ＤＲＳＡＬＡＲ（配列番号９）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号６０に示される標的部位に結合する；
（iv）Ｆ１：ＲＮＡＡＬＴＲ（配列番号４５）；
Ｆ２：ＲＳＤＥＬＴＲ（配列番号２８）；
Ｆ３：ＲＳＣＧＬＷＳ（配列番号４４）、ＲＰＭＨＬＴＮ（配列番号４９）、ＲＳＰＨＬＹＨ（配列番号５０）、またはＲＬＰＡＬＬＳ（配列番号５３）　Ｆ４：ＴＲＰＶＬＫＲ（配列番号２５）；および
Ｆ５：ＤＲＳＡＬＡＲ（配列番号９）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号６０に示される標的部位に結合する；
（v）Ｆ１：ＣＮＡＡＬＴＲ（配列番号４６）；
Ｆ２：ＲＳＤＥＬＴＲ（配列番号２８）；
Ｆ３：ＲＥＥＨＲＡＴ（配列番号４７）；
Ｆ４：ＴＲＰＶＬＫＲ（配列番号２５）；および
Ｆ５：ＤＲＳＡＬＡＲ（配列番号９）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号６０に示される標的部位に結合する；
（vi）Ｆ１：ＲＮＡＡＬＴＲ（配列番号４５）；
Ｆ２：ＲＳＤＥＬＴＲ（配列番号２８）；
Ｆ３：ＲＣＥＡＬＨＨ（配列番号５１）；
Ｆ４：ＴＲＰＶＬＫＲ（配列番号２５）；および
Ｆ５：ＤＲＳＡＱＡＲ（配列番号５２）またはＤＲＳＡＬＡＲ（配列番号９）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号６０に示される標的部位に結合する；
（vii）Ｆ１：ＨＮＡＡＬＴＲ（配列番号５４）；
Ｆ２：ＲＳＤＥＬＴＲ（配列番号２８）；
Ｆ３：ＲＴＹＮＲＴＱ（配列番号５５）；
Ｆ４：ＴＲＰＶＬＫＲ（配列番号２５）；および
Ｆ５：ＤＲＳＡＬＡＲ（配列番号９）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号６０に示される標的部位に結合する；
（viii）Ｆ１：ＤＤＷＮＬＳＱ（配列番号２２）；
Ｆ２：ＲＳＡＮＬＴＲ（配列番号１７）；
Ｆ３：ＴＳＧＳＬＳＲ（配列番号６１）；
Ｆ４：ＱＳＧＤＬＴＲ（配列番号６２）；および
Ｆ５：ＱＳＳＤＬＲＲ（配列番号６３）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号７５に示される標的部位に結合する；
（vix）Ｆ１：ＱＳＳＨＬＴＲ（配列番号６４）；
Ｆ２：ＲＳＤＮＬＲＥ（配列番号６５）；
Ｆ３：ＤＲＳＮＬＳＲ（配列番号２０）；
Ｆ４：ＴＳＳＮＲＫＴ（配列番号１９）；
Ｆ５：ＲＳＤＳＬＳＫ（配列番号６６）；および
Ｆ６：ＱＳＡＮＲＴＴ（配列番号８０）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号７６に示される標的部位に結合する；
（x）Ｆ１：ＱＳＧＤＬＴＲ（配列番号６２）；
Ｆ２：ＲＳＤＮＬＳＥ（配列番号６７）；
Ｆ３：ＥＲＡＮＲＮＳ（配列番号６８）；
Ｆ４：ＤＲＳＤＬＳＲ（配列番号６９）；および

Ｆ５：ＱＳＳＤＬＲＲ（配列番号６３）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号７７に示される標的部位に結合する；あるいは、

（xi）Ｆ１：ＤＲＳＨＬＡＲ（配列番号７０）；
Ｆ２：ＲＳＤＤＬＳＲ（配列番号７１）；
Ｆ３：ＱＳＡＮＲＴＫ（配列番号７２）；
Ｆ４：ＲＳＤＴＬＳＥ（配列番号７３）；および
Ｆ５：ＡＮＳＮＲＩＫ（配列番号７４）、ここで、該亜鉛フィンガータンパク質は配列番号７８に示される標的部位に結合する、

を含む、亜鉛フィンガータンパク質。

【請求項２】

請求項１に記載の亜鉛フィンガータンパク質と、機能ドメインとを含む、融合タンパク質。

【請求項３】

前記機能ドメインは、転写調節ドメインを含む、請求項２に記載の融合タンパク質。

【請求項４】

前記転写調節ドメインは、活性化ドメインまたは抑制ドメインである、請求項３に記載の融合タンパク質。

【請求項５】

前記機能ドメインは、開裂ドメインまたは開裂半ドメインを含む、請求項２に記載の融合タンパク質。

【請求項６】

請求項１に記載の亜鉛フィンガータンパク質または請求項２～５のいずれか１項に記載の融合タンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項７】

請求項２～５のいずれか１項に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、細胞におけるＰＤ１遺伝子の発現を調節するための医薬組成物であって、前記ＰＤ１遺伝子の発現が調節されるような条件下で、前記細胞内に導入される、医薬組成物。

【請求項８】

前記調節は、前記ＰＤ１遺伝子の開裂による活性化、抑制、または不活性化を含む、請求項７に記載の医薬組成物。

【請求項９】

不活性化は、前記ＰＤ１遺伝子の開裂後、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を介して生じる、請求項８に記載の医薬組成物。

【請求項１０】

前記調節は、開裂による不活性化を含み、さらに、前記ＰＤ１遺伝子に対して相同性を有する配列に隣接する外因性配列が前記細胞に導入され、前記外因性配列は、相同組み換えによって前記ＰＤ１遺伝子内に組み込まれる、請求項８に記載の医薬組成物。

【請求項１１】

前記細胞は、ＰＤ１遺伝子の異常な発現または調節を特徴とする疾患または障害を有する患者から単離された細胞または幹細胞である、請求項８～１０のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項１２】

前記一次細胞が末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、ＣＤ４＋Ｔ細胞、またはＣＤ８＋Ｔ細胞であるか、あるいは前記幹細胞が胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、血液幹細胞、神経幹細胞、または間葉系幹細胞である、請求項１１に記載の医薬組成物。

【請求項１３】

請求項６に記載のポリヌクレオチドを含む、ＰＤ１遺伝子の異常な発現または調節を特徴とする疾患または障害を有する対象を治療するための医薬組成物であって、ＰＤ１遺伝子の発現が調節されるような条件下で、該対象に投与される、医薬組成物。

【請求項１４】

前記疾患または障害は、癌である、請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
追加の抗癌療法を前記対象に施すことをさらに含む、請求項１３または１４に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
連邦支援による研究下でなされた発明に対する権利の記載
非適用。
【０００２】
本開示は、ゲノム操作およびヌクレアーゼ同定の分野においてである。
【背景技術】
【０００３】
標的部位に特異的に結合するように操作されるＳｃｅＩ等の亜鉛フィンガー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ヌクレアーゼは、ゲノム操作に有用であることが示されている。例えば、亜鉛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した操作された部位特異的亜鉛フィンガーを含むタンパク質である。そのようなＺＦＮは、様々な異なる種におけるゲノム修飾にうまく使用されている。例えば、米国特許公開第２００３０２３２４１０号、第２００５０２０８４８９号、第２００５００２６１５７号、第２００５００６４４７４号、第２００６０１８８９８７号、第２００６００６３２３１号、および国際公開ＷＯ第０７／０１４２７５号を参照されたく、それらの開示は、全ての目的において参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。これらのＺＦＮは、標的遺伝子座で相同組み換えの頻度を１０００倍超増加させる、標的ヌクレオチド配列に二本鎖破断（ＤＳＢ）を作製するために使用することができる。加えて、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）による部位特異的ＤＳＢの不正確な修復もまた、遺伝子破壊をもたらすことができる。２つのそのようなＤＳＢの作製は、任意の大きな領域の欠失をもたらす。
【０００４】
プログラムされた細胞死受容体（ＰＤ１、ＰＤＣＤ１としても知られる）は、慢性抗原に応答して、Ｔ細胞活性化とＴ細胞寛容との間の平衡の調節に関与していることが示されている。ＨＩＶ１の感染中、ＰＤ１の発現は、ＣＤ４＋Ｔ細胞において増加することが分かっている。ＰＤ１上方調節は、ＨＩＶ感染の場合のように、Ｔ細胞機能不全が慢性抗原露出の存在下で観察されるとき、何らかの形でＴ細胞枯渇（主要エフェクター機能の進行性損失として定義される）に関係していると思われる。ＰＤ１上方調節は、慢性ウイルス感染中に、これらの同じ組の細胞でのアポトーシスの増加とも関連する可能性がある（Ｐｅｔｒｏｖａｓ ｅｔ ａｌ，（２００９）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８３（２）：１１２０－３２を参照されたい）。ＰＤ１は、免疫監視からの腫瘍特異的回避にも関与する場合がある。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、ＰＤ１が腫瘍特異的細胞毒性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）で高度に発現することが示されている。ＰＤ１は、Ｔリンパ球（ＴＩＬ）を浸潤するメラノーマにおいても上方調節される（Ｄｏｔｔｉ（２００９）Ｂｌｏｏｄ１１４（８）：１４５７－５８を参照されたい）。腫瘍はＰＤ１配位子（ＰＤＬ）を発現することが分かっており、これは、ＣＴＬにおいてＰＤ１の上方調節と組み合わされるとき、Ｔ細胞の機能性の損失およびＣＴＬが有効な抗腫瘍応答を媒介することができない一因である可能性がある。
【０００５】
研究者は、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抗体を投与することによりＰＤ１－ＰＤＬ相互作用が遮断され、いくつかのＴ細胞の機能性（増殖およびサイトカイン分泌）を回復することができ、ウイルス量の減少をもたらすことを示している（Ｂａｒｂｅｒ ｅｔ ａｌ（２００６）Ｎａｔｕｒｅ４３９（９）：６８２－６８７）。ＰＤ１の異常調節は、自己免疫疾患にも関与する場合

がある。ＰＤ１（特にＰＤ１．３）のＳＮＰは、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）のリスクの増加にも関連している。ＳＬＥ患者は、高頻度のＰＤ１．３　ＰＤ１対立遺伝子を有し、これらの患者は、その活性化されたＣＤ４＋Ｔ細胞上でＰＤ１の発現が減少することを示すことが示されている（Ｂｅｒｔｓｉａｓ　ｅｔ　ａｌ，（２００９）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍ．６０（１）：２０７－１８を参照されたい）。

【０００６】

よって、研究および治療用途に使用することができるさらなるＰＤ１標的修飾因子、例えばＰＤ１標的ヌクレアーゼまたは転写因子が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本開示は、ＰＤ１標的ヌクレアーゼ、例えば操作されたメガヌクレアーゼおよび亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）の開発に関する。

【０００８】

本開示は、ヒトおよびげっ歯類ＰＤ１に特異的な活性亜鉛フィンガータンパク質ならびに融合タンパク質を示し、これらのＰＤ１特異的亜鉛フィンガータンパク質を含む亜鉛フィンガータンパク質転写因子（ＺＦＰ－ＴＦ）または亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を含む。本発明のＰＤ１特異的亜鉛フィンガータンパク質を含むタンパク質は、ＰＤ１が異常に発現する、またはＰＤ１経路がＰＤ１配位子の過剰発現により異常に利用される任意の疾患もしくは障害の治療を含む、研究および治療目的のために使用され得る。例えば、Ｔ細胞内のＰＤ１遺伝子座を標的とする亜鉛フィンガーヌクレアーゼは、慢性感染性疾患および悪性腫瘍の両方においてＰＤ１依存免疫抑制を遮断するために使用され得る。あるいは、欠損ＰＤ１遺伝子座は、野生型配列のＺＦＮ依存標的挿入を使用して治療されるか、または亜鉛フィンバータンパク質転写因子（ＺＦＰ　ＴＦ）は、欠損ＰＤ１発現を調節する（例えば、上方調節または下方調節する）ために使用され得る。さらに、ＰＤ１遺伝子座を標的とするＺＦＰ　ＴＦは、野生型ＰＤ１遺伝子を調節するために使用され得る。

【０００９】

本発明の別の態様では、融合タンパク質は、ヒトＰＤ１遺伝子に特異的である亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を含む。特定の実施形態では、ヌクレアーゼ融合タンパク質の亜鉛フィンガードメインは、表１に示される非天然に生じるおよび／または表２に示される標的部位に結合する認識らせん体を含む。

【００１０】

また別の態様では、ＰＤ１遺伝子の発現を調節することができるＺＦＰ－ＴＦを本明細書において提供する。特定の実施形態では、ＺＦＰ－ＴＦの亜鉛フィンガードメインは、表１または５に示される非天然に生じるおよび／または表２または６に示される標的部位に結合する認識らせん体を含む。

【００１１】

別の態様では、ＰＤ１遺伝子を調節するための方法および組成物を本明細書において提供する。特定の実施形態では、方法は、ＰＤ１遺伝子において標的部位に結合するように操作される亜鉛フィンガー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）を、疾患または障害がＰＤ１配位子の過剰発現により生じるＰＤ１の異常な発現および／またはＰＤ１経路の望ましくない使用を特徴とする疾患または障害に罹患する患者からの細胞に導入することを含む。本方法は、ＨＩＶおよびＨＣＶ等の慢性感染の治療および／または防止に利用され得る。同様に、本方法および組成物は、癌および悪性疾患の治療および／または防止に利用され得る。治療および／または防止され得る癌の非限定的な例としては、肺癌、膵臓癌、肝臓癌、骨癌、乳癌、結腸直腸癌、白血病、卵巣癌、リンパ腫、脳癌等が挙げられる。

【００１２】

本明細書に記載される方法および組成物は、単独治療として使用されるか、または他の

抗ウイルスもしくは抗癌療法と併用して使用され得る。これらの方法および組成物は、連続様式で抗ウイルスもしくは抗癌療法と共に提供されるか、または同時に施すことができる。提供される方法および組成物は、自己免疫疾患に罹患する患者においてＰＤ１発現を調節するためにも使用されるか、またはこの患者が欠損もしくは望ましくない対立遺伝子を保有する場合、野生型ＰＤ１対立遺伝子もしくは特徴を変更したＰＤ１対立遺伝子に組み込むことによって、そのような患者を治療するために使用され得る。細胞系は、ＰＤ１遺伝子の調節または機能性を変更し得る治療用化合物のスクリーニングシステムを作製するために、そのＰＤ１遺伝子配列を特異的に変更するように構築され得る。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】示されるＺＦＮがこれらの細胞に導入されるときに誘導される非相同末端結合（ＮＨＥＪ）により挿入される突然変異のパーセンテージを測定するＣｅｌ－１に基づくＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイにより判定されるように、ＰＤ１特異的亜鉛フィンガーヌクレアーゼを使用した、ヒトＰＢＭＣにおけるＰＤ１遺伝子の破壊を示すグラフである。細胞は、それぞれ、ＺＦＮ　１２９４２をＤＮＡの反対側の鎖上に結合した異なるＺＦＮ変異型と組み合わせ、１２９４２を伴う標的遺伝子座に結合するときに機能ヌクレアーゼを形成するＺＦＮ対で処理された。この対の第２のＺＦＮにおけるＳＢＳ数は、各グラフの下に示される。各対の最も左側の棒は、３７℃でインキュベートした細胞のヌクレオフェクション（ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ）３日後のＮＨＥＪのパーセンテージを示す。それぞれの示される対の左から２番目の棒は、３７℃でインキュベートした細胞のヌクレオフェクション１０日後のＮＨＥＪのパーセンテージを示す。それぞれの示される対の右から２番目の棒は、３０℃でインキュベートした細胞のヌクレオフェクション３日後のＮＨＥＪのパーセンテージを示し、それぞれの示される対の最も右側の棒は、３０℃でインキュベートした細胞のヌクレオフェクション１０日後のＮＨＥＪのパーセンテージを示す。

【図２】エキソン１を標的とするＰＤ１特異的ＺＦＮ対１２９４２および１２９４７で処理した後の、ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＰＤ１遺伝子座の配列を決定する分析の結果を示す。挿入は、太字の大文字で示される。欠失は（－）で表される。図からわかるように、いくつかの挿入および欠失は、ＮＨＥＪを介したＤＳＢ修復の結果として、ＺＦＮ切断部位付近で観察された。

【図３】Ｐｍｅｌ　ＴＣＲ遺伝子導入／Ｒａｇ１－／－マウスに由来する脾細胞にマウスＰＤ１特異的ＺＦＮを遺伝子導入した後の結果を示す。細胞を抗ＣＤ３抗体で刺激し、次いでＰＤ１について染色した。プロットは、各群のパーセントＰＤ１陽性ＣＤ３＋ＣＤ８＋細胞および各群の中央値のＰＤ１蛍光を示し、データは下に表形式で表される。図からわかるように、ＰＤ１の発現は、ＣＤ３刺激の存在下でもＰＤ１特異的ＺＦＮを受けた細胞において減少する。

【図４】ＰＤ１発現の減少が後の時間点で明白であったことを示す。細胞はＣＤ３刺激の７２時間後にも収集され、ＰＤ１について染色された。上のヒストグラムは、各群のパーセントＰＤ１陽性ＣＤ３＋ＣＤ８＋細胞および各群の中央値のＰＤ１蛍光を示す。下のプロットは、ＰＤ１／ＣＦＳＥ発現細胞の頻度を示す。この図は、ＰＤ１発現がＣＤ３刺激の７２時間後でもＰＤ１特異的ＺＦＮで処理された細胞においてなお減少することを示す。

【図５】ＣＤ４＋Ｔ細胞において試験され、Ｃｅｌ－Ｉアッセイを使用してゲノム編集活性について分析されたＰＤ１特異的ＺＦＮ対の結果を示す。これらの細胞において、最大４４％の編集がいくつかの対で観察された。

【図６】ＰＤ１特異的ＺＦＮ対をＣＤ４＋Ｔ細胞内に処理した後のＰＤ１（－）細胞の精製を示す。パーセント編集またはＮＨＥＪは、上述のようにＣｅｌ－Ｉアッセイにより測定され、最大４４％の編集がＰＤ１特異的ＺＦＮ対のいくつかで観察された。処理後、細胞は、最初に、ＺＦＮ導入遺伝子を誘導するために抗ＣＤ３／ＣＤ８ビーズに露出され、次いで再刺激され、ＦＡＣまたは親和性クロマトグラフィーのいずれかによる精製手順を

受けた。細胞を収集し、（ｉ）最初の刺激後、（ｉｉ）第２の刺激後だが、任意の精製前、（ｉｉｉ）ＣＤ２５＋（活性化のマーカー）、ＰＤ１（－）の細胞選別後、または（ｉｖ）親和性クロマトグラフィー後、Ｃｅｌ－Ｉアッセイ（上述の）によりＰＤ１編集について分析した。示されるように、細胞選別法の使用により、最大５６％の回収された細胞が修飾されたことが分かった。親和性クロマトグラフィーにより精製されたＰＤ１（－）細胞は、Ｃｅｌ－Ｉ分析によりアッセイされるように、最大４２％の全体的なＰＤ１修飾を示した。

【図７】ＣＤ８＋Ｔ細胞において試験されたＰＤ１特異的ＺＦＮの結果を示すグラフである。この実験では、ＰＤ１特異的ＺＦＮをコードするｍＲＮＡがＣＤ８＋Ｔの中に形質導入され、パーセントＰＤ１修飾がＣｅｌ　Ｉアッセイにより分析された。観察された修飾の量は、使用されたｍＲＮＡの量に関連し、入力されたｍＲＮＡの量が少ないと、標的修飾のパーセンテージが低かった。これらの結果は、本明細書に記載されるＰＤ１特異的ＺＦＮが細胞系および一次Ｔ細胞内のＰＤ１遺伝子座を修飾することができることを示す。

【発明を実施するための形態】

【００１４】

機能ヌクレアーゼを同定するための、高処理インビボスクリーニングシステムのための組成物および方法を本明細書において説明する。特に、アッセイは、ヌクレアーゼがその標的部位で二本鎖の破断を誘導する能力を監視するためのリポーターシステムを使用する。加えて、アッセイは、細胞成長（毒性）に対するヌクレアーゼの作用を判定するために使用され得る。

【００１５】

操作されたヌクレアーゼ技術は、天然に生じるＤＮＡ結合タンパク質の操作に基づく。例えば、調整された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説明されてきた。Ｃｈａｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ３３（２０）：ｅ１７８、Ａｒｎｏｕｌｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３５５：４４３－４５８。加えて、ＺＦＰの操作も説明されてきた。例えば、米国特許第６，５３４，２６１号、第６，６０７，８８２号、第６，８２４，９７８号、第６，９７９，５３９号、第６，９３３，１１３号、第７，１６３，８２４号、および第７，０１３，２１９号を参照されたい。

【００１６】

加えて、ＺＦＰは、ＺＦＮ、即ちその操作された（ＺＦＰ）ＤＮＡ結合ドメインを通してその意図される遺伝子標的を認識することができ、ヌクレアーゼが遺伝子をＺＦＰ結合部位付近で切断させる機能実体を作製するために、ヌクレアーゼドメインに結合されてきた。例えば、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔ'ｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ９３（３）：１１５６－１１６０を参照されたい。最近では、ＺＦＮは、様々な生物におけるゲノム修飾において使用されてきた。例えば、米国特許公開第２００３０２３２４１０号、第２００５０２０８４８９号、第２００５００２６１５７号、第２００５００６４４７４号、第２００６０１８８９８７号、第２００６００６３２３１号、および国際公開ＷＯ第０７／０１４２７５号を参照されたい。

【００１７】

特定のＤＮＡ配列に結合するためのＺＦＰの操作を可能にする基準は、明確に特徴付けられ、特定のＺＦＰを正確に同定するが、これらの同じＺＦＰは、ＺＦＮの中に組み込まれるとき、等しい親和性および／または特異性で結合しない場合がある。例えば、染色体基質は、生体細胞におけるヌクレアーゼドメインの正確な二量体化に影響を及ぼし、したがって、開裂の可能性を減少させることができ、所与のゲノム遺伝子座上の正確なクロマチン構造は、ＺＦＮがその意図される標的配列に結合し、開裂する能力に差次的に影響を及ぼす可能性がある。加えて、インビトロアッセイにおいて不可能ではない場合、クロマチン化（ｃｈｒｏｍａｔｉｎｉｚｅｄ）形態で細胞ゲノムを提示するとき、設計されたＤＮＡ結合ドメインが受ける検索パラメータを模倣することは困難である。結果として、遺伝子修飾において最適な特徴を表示するＺＦＮを同定するために、関連する生物または細

胞系譜において多数の変異型を試験することが必須である。

【００１８】

さらに、全てのインビボアッセイは、その独自の特殊性を有するため、ＺＦＮの活動を判断するための特定の検出アッセイを開発することが必要である。よって、天然に生じるホーミングエンドヌクレアーゼと異なる結合特異性を有するホーミングエンドヌクレアーゼについてスクリーニングする前述のインビボスクリーニング法と異なり、本明細書に記載される方法は、そのインビボ機能性ならびに宿主細胞に対するヌクレアーゼの毒性を予測することにより、特定の標的部位に結合することが既に知られているヌクレアーゼをランク付けする迅速かつ効率的な方法を提供する。

【００１９】

よって、本明細書に記載される方法および組成物は、インビボにおいて生物学的に活性であるヌクレアーゼを同定するための高度に効率的かつ迅速な方法を提供する。インビボでのヌクレアーゼの機能性を正確に予測することに加え、本明細書に記載されるアッセイは、ヌクレアーゼの毒性を判定するためにも使用され得、それによって、最も安全かつ機能的に活性なタンパク質の同定を可能にする。

【００２０】

一般

本明細書で開示される方法の実践、ならびに組成物の調製と使用は、特に指示がない限り、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、ＤＮＡ、および関連分野における従来の技術において、当技術分野の技術範囲内である。これらの技術は、文献で完全に説明される。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９ ａｎｄ Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７ ａｎｄ ｐｅｒｉｏｄｉｃ ｕｐｄａｔｅｓ、ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｗｏｌｆｆｅ，ＣＨＲＯＭＡＴＩＮ ＳＴＲＵＣＴＵＲＥ ＡＮＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，１９９８、ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ，Ｖｏｌ．３０４，“Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ”（Ｐ．Ｍ．Ｗａｓｓａｒｍａｎ ａｎｄ Ａ．Ｐ．Ｗｏｌｆｆｅ，ｅｄｓ．），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，１９９９、およびＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｖｏｌ．１１９，“Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ”（Ｐ．Ｂ．Ｂｅｃｋｅｒ，ｅｄ．）Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，１９９９を参照されたい。

【００２１】

定義

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用され、線状または環状コンフォメーションで、一本鎖または二本鎖形態の、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。本開示については、これらの用語をポリマーの長さに関する限定と解釈すべきではない。これらの用語は、天然ヌクレオチドの公知の類似体、ならびに塩基、糖、および／またはリン酸（ホスホロチオエート主鎖）部分内で修飾される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、同一の塩基対形成特異性を有し、すなわち、Ａの類似体は、Ｔと塩基対を形成する。

【００２２】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために交換可能に使用される。この用語は、１つ以上のアミノ酸が、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誘導体である、アミノ酸ポリマ

ーにも適用される。

【００２３】

「結合」は、高分子間（例えば、タンパク質と核酸との間）の配列特異的で非共有結合的な相互作用を指す。結合相互作用の全ての構成要素は、相互作用が全体として配列特異的である限り（例えば、ＤＮＡ主鎖中のリン酸残基との接触する）、配列特異的である必要はない。そのような相互作用は、一般に、$１０^{-6}M^{-1}$以下の解離定数（K_d）によって特徴付けられる。「親和性」は、結合の強さを指す。高い結合親和性は、低いK_dと関連している。

【００２４】

「結合タンパク質」は、別の分子に非共有結合的に結合することが可能なタンパク質である。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おいては、それは、それ自体に結合する（その結果、ホモ二量体、ホモ三量体等を形成する）ことができる、および／または異なるタンパク質または複数のタンパク質の１つ以上の分子に結合することができる。結合タンパク質は、２種類以上の結合活性を有することができる。例えば、亜鉛フィンガータンパク質は、ＤＮＡ結合、ＲＮＡ結合、およびタンパク質結合活性を有する。

【００２５】

「亜鉛フィンガーＤＮＡ結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、タンパク質、または構造が亜鉛イオンの配位によって安定化される結合ドメイン内のアミノ配列の領域である、１つ以上の亜鉛フィンガーによって配列特異的な様式でＤＮＡを結合するより大きなタンパク質内のドメインである。亜鉛フィンガーＤＮＡ結合タンパク質という用語は、しばしば、亜鉛フィンガータンパク質またはＺＦＰとして略記される。

【００２６】

亜鉛フィンガー結合ドメインは、所定のヌクレオチド配列に結合されるように「改変」することができる。亜鉛フィンガータンパク質を改変するための方法の非制限的な例は、設計および選択である。設計された亜鉛フィンガータンパク質は、天然に存在しないタンパク質であり、その設計／組成物は、主として合理的基準によってもたらされる。設計のための合理的基準には、置換規則の適用、ならびに既存のＺＦＰ設計および結合データの情報を格納したデータベース中の情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムの適用が含まれる。例えば、米国特許第６，１４０，０８１号、同第６，４５３，２４２号、および同第６，５３４，２６１号明細書を参照されたく、国際公開第９８／５３０５８号、国際公開第９８／５３０５９号、国際公開第９８／５３０６０号、国際公開第０２／０１６５３６号、および国際公開第０３／０１６４９６も参照されたい。

【００２７】

「選択された」亜鉛フィンガータンパク質は、天然には見出されないタンパク質であり、その産生は、ファージディスプレイ、相互作用トラップ、またはハイブリッド選択等の実験的プロセスによって主にもたらされる。例えば、米国特許第５，７８９，５３８号、米国特許第５，９２５，５２３号、米国特許第６，００７，９８８号、米国特許第６，０１３，４５３号、米国特許第６，２００，７５９号明細書、国際公開第９５／１９４３１号、国際公開第９６／０６１６６号、国際公開第９８／５３０５７号、国際公開第９８／５４３１１号、国際公開第００／２７８７８号、国際公開第０１／６０９７０号、国際公開第０１／８８１９７号、および国際公開第０２／０９９０８４を参照されたい。

【００２８】

「開裂」とは、ＤＮＡ分子の共有結合性主鎖の破断を指す。開裂は、これらに限定されないが、リン酸ジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を含む様々な方法により誘導され得る。一本鎖開裂および二本鎖の開裂の両方が可能であり、二本鎖の開裂は、２つの異なる一本鎖の開裂事象の結果として生じ得る。ＤＮＡ開裂は、平滑末端または付着末端のいずれかの産生をもたらすことができる。特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、標的となる二本鎖ＤＮＡ開裂に使用される。

【００２９】
「開裂半ドメイン」とは、第２のポリペプチド（同一または異なるのいずれか）と共に、開裂活性を有する錯体（好ましくは二本鎖開裂活性）を形成するポリペプチド配列である。「第１および第２の開裂半ドメイン」、「＋－半ドメイン」、および「右左開裂半ドメイン」という用語は、二量体化する開裂半ドメインの対を指すために互換的に使用される。
【００３０】
「操作された開裂半ドメイン」とは、別の開裂半ドメイン（例えば別の操作された開裂半ドメイン）と偏性ヘテロ二量体を形成するように修飾された開裂半ドメインである。米国特許出願第１０／９１２，９３２号および第１１／３０４，９８１号ならびに米国仮出願第６０／８０８，４８６号（２００６年５月２５日に出願）も参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【００３１】
「配列」という用語は、任意の長さのヌクレオチド配列を指し、それは、ＤＮＡもしくはＲＮＡであってもよく、線状、環状、または分岐状であってもよく、一本鎖もしくは二本鎖のいずれか一方であってもよい。「ドナー配列」という用語は、ゲノム内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（またはそれらの間もしくはそれらを超える任意の整数）長のヌクレオチド、好ましくは、約１００～１，０００（またはそれらの間の任意の整数）長のヌクレオチド、より好ましくは、約２００～５００長のヌクレオチドであってもよい。「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主にＤＮＡ、ならびに、ヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。真核細胞クロマチンの大半は、ヌクレオソームの形態で存在し、そこでは、ヌクレオソームコアが、それぞれ２つのヒストンＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、およびＨ４を含む八量体と会合した約１５０塩基対のＤＮＡを含み、リンカーＤＮＡ（生物に応じて変化する長さ）がヌクレオソームコアの間に延在する。１分子のヒストンＨ１は、一般にリンカーＤＮＡと会合する。本開示に関して、「クロマチン」という用語は、原核性および真核性の両方の全ての種類の細胞核タンパク質を包含するように意図されている。細胞クロマチンは、染色体およびエピソームクロマチンの両方を含む。
【００３２】
「染色体」は、細胞のゲノムの全てまたは一部を含むクロマチン錯体である。細胞のゲノムは、しばしば、その細胞のゲノムを含む全染色体の集合である、その核型によって特徴付けられる。細胞のゲノムは、１つ以上の染色体を含むことができる。
【００３３】
「エピソーム」は、細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む、複製する核酸、核タンパク質錯体、または他の構造である。エピソームの例には、プラスミドおよびある特定のウイルスゲノムが挙げられる。
【００３４】
「標的部位」または「標的配列」は、結合にとって十分な条件が存在すれば、結合分子が結合する核酸の一部を規定する核酸配列である。例えば、配列５’－ＧＡＡＴＴＣ－３’は、Ｅｃｏ　ＲＩ制限エンドヌクレアーゼの標的部位である。
【００３５】
「慢性感染性疾患」とは、感染が持続した感染病原体により生じる疾患である。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）、およびＨＩＶ／ＡＩＤＳを含んでもよい。非ウイルス性の例としては、アスペルギルス症、カンジダ症、コクシジオイデス症等の慢性真菌症、ならびにクリプトコッカスおよびヒストプラズマ症に関連する疾患が挙げられてもよい。慢性細菌感染病原体の非限定的な例としては、肺炎クラミジア、リステリア・モノサイトゲネス、および結核菌であってもよい。「癌」という用語は、器官または体内組織内のいずれかで無制限に細胞が増殖する任意の疾患を指す。よって、本

用語は、これらに限定されないが、卵巣癌、白血病、肺癌、結腸直腸／結腸癌、ＣＮＳ癌、メラノーマ、腎細胞癌、形質細胞腫／骨髄腫、前立腺癌、乳癌等を含む、任意の種類の癌または悪性腫瘍を含む。本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、特に具体的に記載されない限り、悪性型の細胞または組織の異常成長を指し、良性型組織を含まない。本明細書で使用される「阻害する、または阻害」という用語は、成長／複製を減少させることを意味する。

【００３６】

「自己免疫疾患」という用語は、対象がその自身の組織に対して破壊的免疫応答を開始する任意の疾患を指す。自己免疫障害は、これらに限定されないが、神経、胃腸、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、対象（例えばヒト）のほぼ全ての器官系に影響を及ぼすことができる。自己免疫疾患の例としては、これらに限定されないが、橋本甲状腺炎、全身性紅斑性狼瘡、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、および糖尿病が挙げられる。

【００３７】

「外来」分子は、通常は細胞内に存在しないが、１つ以上の遺伝学的、生化学的、または他の方法によって細胞内に導入することができる分子である。「通常は細胞内に存在」は、細胞の特定の発生段階および環境条件に対して決定される。したがって、例えば、筋の胚発生中のみ存在する分子は、成体筋細胞に関しては外来分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、非熱ショック細胞に対して外来分子である。外来分子は、例えば、機能不全型内在性分子の機能型または正常機能型内在性分子の機能不全型を含むことができる。

【００３８】

外来分子は、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もの等の小分子、または、タンパク質、核酸、糖質、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上記の分子の任意の修飾誘導体、または上記の分子の１つ以上を含む任意の錯体等の高分子であってもよい。核酸にはＤＮＡおよびＲＮＡが含まれ、それは一本または二本鎖であってもよく、線状、分岐状、または環状であってもよく、任意の長さであってもよい。核酸には、二重鎖を形成する能力のあるもの、ならびに三重鎖形成核酸が含まれる。例えば、米国特許第５，１７６，９９６号および同第５，４２２，２５１号明細書を参照されたい。タンパク質には、ＤＮＡ結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化ＤＮＡ結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、およびヘリカーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【００３９】

外来分子は、内在性分子と同一の種類の分子、例えば、外来タンパク質または核酸であってもよい。例えば、外来核酸は、感染ウイルスゲノム、細胞中に導入されたプラスミドもしくはエピソーム、または細胞内に通常存在しない染色体を含むことができる。細胞中に外来分子を導入するための方法が当業者に知られており、脂質媒介導入（すなわち、中性およびカチオン性脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介導入、およびウイルスベクター媒介導入を含むが、これらに限定されない。

【００４０】

対照的に、「内在性」分子は、特定の環境条件下で特定の発生段階にある特定の細胞内に通常存在するものである。例えば、内在性核酸は、染色体、ミトコンドリア、クロロプラスト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。さらなる内在性分子には、タンパク質、例えば、転写因子および酵素が含まれてもよい。

【００４１】

「融合」分子は、２つ以上のサブユニット分子が、好ましくは共有結合的に連結された分子である。サブユニット分子は、同一の化学種類の分子であってもよいか、または異なる化学種類の分子であってもよい。第１の種類の融合分子の例には、融合タンパク質（例えば、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメインと開裂ドメインとの間の融合物）、および融合核酸（例えば、上記に記載される融合タンパク質をコードする核酸）が挙げられるが、これらに限定されない。第２の種類の融合分子の例には、三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝結合剤と核酸との間の融合が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４２】

細胞中の融合タンパク質の発現は、細胞に融合タンパク質を送達すること、または細胞に融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを送達することによってもたらされてもよく、ポリヌクレオチドが転写され、転写物が翻訳されて、融合タンパク質を生成する。トランススプライシング、ポリペプチド開裂、およびポリペプチド連結はまた、細胞中のタンパク質の発現に関与することができる。細胞へのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの送達の方法が本開示の他所で提示される。

【００４３】

本開示に関して、「遺伝子」は、そのような調節配列がコードおよび／または転写配列に隣接しているかに関わらず、遺伝子産物（以下を参照されたい）をコードするＤＮＡ領域、ならびに遺伝子産物の産生を調節する全てのＤＮＡ領域を含む。したがって、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネータ、リポソーム結合部位および内部リポソーム侵入部位等の翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサ、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス付着部位、ならびに遺伝子座制御領域が含まれるが、これらに限定されない。

【００４４】

「遺伝子発現」は、遺伝子産物への遺伝子に含まれる情報の変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（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種類のＲＮＡ）、またはｍＲＮＡの翻訳によって産生されるタンパク質であってもよい。遺伝子産物には、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集等のプロセスによって修飾されたＲＮＡ、および、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、ミリスチリル化、およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質も含まれる。

【００４５】

遺伝子発現の「調節」は、遺伝子の発現レベルの変化を指す。発現の調節には、遺伝子活性化および遺伝子抑制が含まれてもよいが、これらに限定されない。調節は、完全であってもよい、即ち、遺伝子発現が完全に不活性化されるか、または野生型レベルもしくはそれを超えるレベルに活性化されるか、あるいは部分的であってもよく、遺伝子発現は、ある程度の野生型レベルの画分に部分的に減少するか、または部分的に活性化される。「真核」細胞には、真菌細胞（酵母等）、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞（例えば、Ｔ－細胞）が含まれるが、これらに限定されない。

【００４６】

「作動的連結」および「作動的に連結」（または「作動可能に連結」という用語は、２つ以上の構成要素（配列要素等）の並列に関連して交換可能に使用され、その中で両方の構成要素が正常に機能し、かつ構成要素の少なくとも１つが、他の構成要素の少なくとも１つに対して発揮される機能を媒介することができる可能性を許すように各構成要素が配置される。図示として、プロモーター等の転写調節配列は、転写調節配列が１つ以上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レベルを制御する場合に、コード配列に作動的に連結される。転写調節配列は、一般的に、コード配列とシスで作動的に連結されるが、それに直接隣接している必要はない。例えば、エンハンサーは、それらが隣接していなくても、コード配列に作動的に連結される転写調節配列である。

【００４７】

融合ポリペプチドに関して、「作動的に連結」という用語は、構成要素の各々が、その

ように連結されていない場合に、それが果たすであろう他の構成要素に連動して同一の機能を実行するという事実を指すことができる。例えば、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメインが開裂ドメインに融合される融合ポリペプチドに関して、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメインおよび開裂ドメインは、融合ポリペプチドにおいて、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメイン部分がその標的部位および／またはその結合部位に結合できる一方で、開裂ドメインが標的部位近辺のＤＮＡを開裂することができる場合に、作動的連結状態にある。同様に、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメインが活性化または抑制ドメインに融合される融合ポリペプチドに関して、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメインおよび活性化または抑制ドメインは、融合ポリペプチドにおいて、ＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメイン部分がその標的部位および／またはその結合部位に結合できる一方で、活性化ドメインが遺伝子発現を上方調節することができるか、または抑制ドメインが遺伝子発現を下方調節することができる場合に、作動的連結状態にある。

【００４８】

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、完全長タンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一でないが、完全長タンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一の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、対応する天然分子より多い、少ない、または同一の残基数を有することができる、および／または１つ以上のアミノ酸またはヌクレオチド置換を含有することができる。核酸（例えば、コード機能、別の核酸をハイブリッド形成する能力）の機能を決定するための方法が、当技術分野でよく知られている。同様に、タンパク質機能を決定するための方法がよく知られている。例えば、ポリペプチドのＤＮＡ結合機能を、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開裂を、ゲル電気泳動によってアッセイすることができる。上記のＡｕｓｕｂｅｌらを参照されたい。別のタンパク質と相互作用するタンパク質の能力を、例えば、共免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイ、または遺伝的相補性および生化学的相補性の両方の相補性によって決定することができる。例えば、Ｆｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ　３４０：２４５－２４６、米国特許第５，５８５，２４５号、およびＰＣＴ国際公開第９８／４４３５０号を参照されたい。

【００４９】

「ベクター」は、遺伝子配列を標的細胞に導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」とは、関心の遺伝子の発現を指向することができ、遺伝子配列を標的細胞に導入することができる任意の核酸構築物を意味する。よって、本用語は、クローン化、および発現ビヒクル、ならびに組み込みベクターを含む。

【００５０】

「リポーター遺伝子」または「リポーター配列」とは、必ずしも日常的なアッセイでなくてもよいが、好ましくは容易に測定され得るタンパク質産生物を産生する任意の配列を指す。好適なリポーター遺伝子は、これらに限定されないが、抗生物質耐性（例えば、アンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、Ｇ４１８耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、色付きまたは蛍光もしくは発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、増強型緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）をコードする配列、ならびに増強型細胞成長および／または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えばジヒドロ葉酸還元酵素）が挙げられる。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つ以上の複写を含む。「発現タグ」は、関心の遺伝子の発現を監視するために、所望の遺伝子配列に操作可能に連結され得るリポーターをコードする配列を含む。

【００５１】

概説

ＰＤ１遺伝子を標的とする亜鉛フィンガータンパク質転写因子（ＺＦＰ－ＴＦ）および／またはヌクレアーゼ（例えばＺＦＮ）、ならびにＰＤ１が異常に、もしくは望ましくなく発現する、またはＰＤ１経路がＰＤ１配位子の過剰により異常に、もしくは望ましくな

く利用される疾患もしくは障害（例えば、慢性感染性疾患、癌、および／または自己免疫疾患を含む）の治療ために、これらのＺＦＰ－ＴＦおよび／またはヌクレアーゼを含む組成物およびその使用方法を本明細書で説明する。ＰＤ１発現の調節により寛解される疾患または障害に罹患する対象を治療するために、本明細書に記載されるＺＦＰ－ＴＦおよび／またはヌクレアーゼが、インビボまたはエクスビボで細胞内（例えばそのような疾患に罹患する患者から単離された一次細胞）に導入され得る。ＺＦＰ－ＴＦおよび／またはＺＦＮ治療後、細胞は、慢性感染性疾患または癌の治療において薬剤として使用するために、患者の中に再導入することができる。同様に、ＰＤ１特異的ＺＦＮおよび／またはＺＦＰ－ＴＦで処理された幹細胞を使用することができる。そのような医療状態の治療のために、これらの細胞は罹患した患者に注入することができる。

【００５２】

よって、本明細書に記載される組成物および方法は、ＰＤ１遺伝子の調節を可能にする。ＰＤ１発現は、必要に応じてＰＤ１特異的ＺＦＰ　ＴＦまたはＺＦＮを使用して、ノックアウト、ノックダウン、上方調節、または下方調節することができる。ＰＤ１発現は、例えば慢性感染性疾患もしくは癌に罹患する患者において、ＺＦＰ－ＴＦまたは１つ以上のＰＤ１特異的ＺＦＮにより下方調節することができ、患者（例えば自己免疫疾患に罹患する患者）において上方調節することができる。本発明の方法および組成物は、ＰＤ１特異的ＺＦＰ　ＴＦおよび／またはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む治療薬も提供し、ポリヌクレオチドは、患者に直接投与される。さらに、本発明は、ＺＦＰ　ＴＦおよび／またはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、罹患した患者に治療薬として全身投与するために、ウイルス性送達ビヒクル等のベクター内に組み込むことができる方法および組成物を提供する。

【００５３】

ＤＮＡ結合ドメイン

ＰＤ１遺伝子の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記載される。本明細書で開示される組成物および方法では、亜鉛フィンガーＤＮＡ結合ドメインまたはメガヌクレアーゼからの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結合ドメインを使用することができる。

【００５４】

ある特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、亜鉛フィンガータンパク質を含む。好ましくは、亜鉛フィンガータンパク質は天然に存在せず、それは選択する標的部位に結合するように改変される。例えば、Ｂｅｅｒｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１３５－１４１、Ｐａｂｏ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７０：３１３－３４０、Ｉｓａｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：６５６－６６０、Ｓｅｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：６３２－６３７、Ｃｈｏｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：４１１－４１６、米国特許第６，４５３，２４２号、同第６，５３４，２６１号、同第６，５９９，６９２号、同第６，５０３，７１７号、同第６，６８９，５５８号、同第７，０３０，２１５号、同第６，７９４，１３６号、同第７，０６７，３１７号、同第７，２６２，０５４号、同第７，０７０，９３４号、同第７，３６１，６３５号、同第７，２５３，２７３号明細書、ならびに米国特許出願公開第２００５／００６４４７４号、同第２００７／０２１８５２８号、同第２００５／０２６７０６１号明細書を参照されたく、これらは全て、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００５５】

改変された亜鉛フィンガー結合ドメインは、天然に存在する亜鉛フィンガータンパク質と比較して、新規の結合特異性を有することができる。改変方法には、合理的設計および多様な種類の選択が含まれるが、これらに限定されない。合理的設計には、例えば、三重（または四重）ヌクレオチド配列および個々の亜鉛フィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを使用することが含まれ、各三重または四重ヌクレオチド配列は、特定の三重また

は四重配列と結合する亜鉛フィンガーの１つ以上のアミノ酸配列に関連する。例えば、譲受人共通の米国特許第６，４５３，２４２号および同第６，５３４，２６１号明細書を参照されたく、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００５６】

ファージディスプレイおよび２ハイブリッド法を含む例示的な選択方法は、米国特許第５，７８９，５３８号、同第５，９２５，５２３号、同第６，００７，９８８号、同第６，０１３，４５３号、同第６，４１０，２４８号、同第６，１４０，４６６号、同第６，２００，７５９号、および同第６，２４２，５６８号明細書、ならびに国際公開第９８／３７１８６号、国際公開第９８／５３０５７号、国際公開第００／２７８７８号、国際公開第０１／８８１９７号、および英国第２，３３８，２３７号に開示される。加えて、亜鉛フィンガー結合ドメインに対する結合特異性の強化は、例えば、譲受人共通の国際公開第０２／０７７２２７号に記載されている。

【００５７】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示される、亜鉛フィンガードメインおよび／または多フィンガーの亜鉛フィンガータンパク質は、例えば、５個以上のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を使用して共に連結され得る。また、６個以上のアミノ酸長の例示的なリンカー配列に関して、米国特許第６，４７９，６２６号、同第６，９０３，１８５号、および同第７，１５３，９４９号明細書も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々の亜鉛フィンガー間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。加えて、亜鉛フィンガー結合ドメインに対する結合特異性の強化は、例えば、譲受人共通の国際公開第０２／０７７２２７号に記載されている。

【００５８】

標的部位の選択、融合タンパク質（および同一物をコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のためのＺＦＰおよび方法が当業者に知られており、米国特許第６，１４０，０８１５号、同第７８９，５３８号、同第６，４５３，２４２号、同第６，５３４，２６１号、同第５，９２５，５２３号、同第６，００７，９８８号、同第６，０１３，４５３号、同第６，２００，７５９号明細書、国際公開第９５／１９４３１号、国際公開第９６／０６１６６号、国際公開第９８／５３０５７号、国際公開第９８／５４３１１号、国際公開第００／２７８７８号、国際公開第０１／６０９７０号、国際公開第０１／８８１９７号、国際公開第０２／０９９０８４号、国際公開第９８／５３０５８号、国際公開第９８／５３０５９号、国際公開第９８／５３０６０号、国際公開第０２／０１６５３６号、および国際公開第０３／０１６４９６号に詳しく記載される。

【００５９】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示される、亜鉛フィンガードメインおよび／または多フィンガーの亜鉛フィンガータンパク質は、例えば、５個以上のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を使用して共に連結し得る。また、６個以上のアミノ酸長の例示的なリンカー配列に関して、第６，４７９，６２６号、米国特許同第６，９０３，１８５号、および同第７，１５３，９４９号明細書も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々の亜鉛フィンガー間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。

【００６０】

あるいは、ＤＮＡ結合ドメインは、ヌクレアーゼに由来し得る。例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ，ＰＩ－Ｓｃｅ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、およびＩ－ＴｅｖＩＩＩ等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知られている。また、米国特許第５，４２０，０３２号、米国特許第６，８３３，２５２号明細書、Ｂｅｌｆｏｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３７９－３３８８、Ｄｕｊｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅ ８２：１１５－１１８、Ｐｅｒｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２，１１２５－１１２７、Ｊａｓｉｎ

（１９９６）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．１２：２２４－２２８、Ｇｉｍｂｌｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６３：１６３－１８０、Ａｒｇａｓｔ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８０：３４５－３５３、およびＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社のカタログも参照されたい。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのＤＮＡ結合特異性を、非天然の標的部位に結合するよう改変することができる。例えば、Ｃｈｅｖａｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ １０：８９５－９０５、Ｅｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：２９５２－２９６２、Ａｓｈｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｎａｔｕｒｅ ４４１：６５６－６５９、Ｐａｑｕｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：４９－６６、米国特許出願公開第２００７０１１７１２８号明細書を参照されたい。

【００６１】

特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ＰＤ１遺伝子内の標的部位に結合し（配列特異的様式で）、ＰＤ１の発現を調節する操作された亜鉛フィンガータンパク質である。ＺＦＰは、突然変異ＰＤ１対立遺伝子または野生型ＰＤ１配列のいずれかに選択的に結合することができる。ＰＤ１標的部位は、典型的に少なくとも１個の亜鉛フィンガーを含むが、複数の亜鉛フィンガー（例えば、２個、３個、４個、５個、６個以上のフィンガー）が含まれてもよい。通常ＺＦＰは、少なくとも３個のフィンガーを含む。ある特定のＺＦＰは、４個、５個、または６個のフィンガーを含む。３個のフィンガーを含むＺＦＰは、典型的に９個または１０個のヌクレオチドを含む標的部位を認識し、４個のフィンガーを含むＺＦＰは、典型的に１２～１４個のヌクレオチドを含む標的部位を認識し、一方で、６個のフィンガーを有するＺＦＰは、１８～２１個のヌクレオチドを含む標的部位を認識する。ＺＦＰはまた、１つ以上の調節ドメインを含む融合タンパク質であってもよく、これらの調節ドメインは転写活性化または抑制ドメインであり得る。

【００６２】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、植物病原菌であるキサントモナスに由来するＴＡＬエフェクターからの操作されたドメインである（Ｂｏｃｈ ｅｔ ａｌ，（２００９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９ Ｏｃｔ ２００９（１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．１１７８８１）およびＭｏｓｃｏｕ ａｎｄ Ｂｏｇｄａｎｏｖｅ，（２００９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９ Ｏｃｔ ２００９（１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．１１７８８１７を参照されたい）。米国特許出願第１３／０６８，７３５号も参照されたい。

【００６３】

融合タンパク質

本明細書に記載されるＤＮＡ結合タンパク質（例えば、ＺＦＰ）を含む融合タンパク質および異種調節（機能的）ドメイン（またはその機能的フラグメント）も提供される。一般的なドメインには、例えば、転写因子ドメイン（活性化剤、リプレッサー、共活性化剤、コリプレッサー）、サイレンサ、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等）、ＤＮＡ修復酵素ならびにそれらの関連する因子および修飾因子、ＤＮＡ再構築酵素ならびにそれらの関連する因子および修飾因子、クロマチン結合性タンパク質およびそれらの修飾因子（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する因子および修飾因子が含まれる。ＤＮＡ結合ドメインならびにヌクレアーゼ開裂ドメインの融合に関する詳細ついて、米国特許出願公開第２００５００６４４７４号、同第２００６０１８８９８７号、および同第２００７／０２１８５２８号明細書を参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００６４】

活性化を達成するための好適なドメインには、ＨＳＶ ＶＰ１６活性化ドメイン（例えば、Ｈａｇｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７１，５９５２－５９６２（１９

９７）を参照されたい）、核ホルモン受容体（例えば、Ｔｏｒｃｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０：３７３－３８３（１９９８）を参照されたい）、核因子カッパＢのｐ６５サブユニット（Ｂｉｔｋｏ ＆ Ｂａｒｉｋ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：５６１０－５６１８（１９９８）およびＤｏｙｌｅ ＆ Ｈｕｎｔ，Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ ８：２９３７－２９４２（１９９７））、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：３－２８（１９９８））、またはＶＰ６４等の人工キメラ機能ドメイン（Ｂｅｅｒｌｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：１４６２３－３３）、ならびにデグロン（Ｍｏｌｉｎａｒｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）ＥＭＢＯ Ｊ．１８，６４３９－６４４７）が含まれる。さらなる例示的な活性化ドメインには、Ｏｃｔ １、Ｏｃｔ－２Ａ、Ｓｐ１、ＡＰ－２、およびＣＴＦ１（Ｓｅｉｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１１，４９６１－４９６８（１９９２）、ならびにｐ３００、ＣＢＰ、ＰＣＡＦ、ＳＲＣ１ ＰｖＡＬＦ、ＡｔＨＤ２Ａ、およびＥＲＦ－２が含まれる。例えば、Ｒｏｂｙｒ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１４：３２９－３４７、Ｃｏｌｌｉｎｇｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２３：２５５－２７５、Ｌｅｏ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｇｅｎｅ ２４５：１－１１、Ｍａｎｔｅｕｆｆｅｌ－Ｃｙｍｂｏｒｏｗｓｋａ（１９９９）Ａｃｔａ Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｐｏｌ．４６：７７－８９、ＭｃＫｅｎｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｓｔｅｒｏｉｄ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．６９：３－１２、Ｍａｌｉｋ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．２５：２７７－２８３、およびＬｅｍｏｎ ｅｔ ａｌ．（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には、ＯｓＧＡＩ、ＨＡＬＦ－１、Ｃ１、ＡＰ１、ＡＲＦ－５、－６、－７、および－８、ＣＰＲＦ１、ＣＰＲＦ４、ＭＹＣ－ＲＰ／ＧＰ、ならびにＴＲＡＢ１が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Ｏｇａｗａ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｇｅｎｅ ２４５：２１－２９、Ｏｋａｎａｍｉ ｅｔ ａｌ．（１９９６） Ｇｅｎｅｓ Ｃｅｌｌｓ １：８７－９９、Ｇｏｆｆ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．５：２９８－３０９、Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４０：４１９－４２９、Ｕｌｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：５８４４－５８４９、Ｓｐｒｅｎｇｅｒ－Ｈａｕｓｓｅｌｓ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｊ．２２：１－８、Ｇｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４１：３３－４４、およびＨｏｂｏ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：１５，３４８－１５，３５３を参照されたい。

【００６５】

ＤＮＡ結合ドメインと機能ドメインとの間の融合タンパク質（または同一物をコードする核酸）の形成において、活性化ドメインと相互作用する活性化ドメインまたは分子のいずれか一方が、機能ドメインとして好適であることが、当業者には明らかである。基本的に、標的遺伝子に活性化錯体および／または活性化活性（例えば、ヒストンアセチル化等）を補充する能力のある任意の分子が、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ドメインとしての使用に好適な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等の絶縁体ドメイン、局在化ドメイン、ならびにクロマチンリモデリングタンパク質が、例えば、譲受人共通の米国特許出願第２００２／０１１５２１５号および同第２００３／００８２５５２号明細書、ならびに譲受人共通の国際公開第０２／４４３７６号に記載される。

【００６６】

例示的な抑制ドメインには、ＫＲＡＢ Ａ／Ｂ、ＫＯＸ、ＴＧＦ－β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が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ ９９：４５１－４５４、Ｔｙｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ ９９：

４４３－４４６、Ｋｎｏｅｐｆｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ　９９：４４７－４５０、およびＲｏｂｅｒｔｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（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には、ＲＯＭ２およびＡｔＨＤ２Ａが含まれるが、これらに限定されない。例えば、Ｃｈｅｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　８：３０５－３２１、およびＷｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ　Ｊ．２２：１９－２７を参照されたい。

【００６７】

融合分子は、当業者によく知られているクローニング法および生化学的接合によって構築される。融合分子には、ＤＮＡ結合ドメインおよび機能ドメイン（例えば、転写活性化または抑制ドメイン）が含まれる。融合分子には、核局在化シグナル（例えば、ＳＶ４０媒体Ｔ抗原由来等）およびエピトープタグ（例えば、ＦＬＡＧおよび血球凝集素等）も任意的に含まれる。融合タンパク質（およびそれらをコードする核酸）は、翻訳リーディングフレームが融合の成分間で維持されるように設計される。

【００６８】

一方において機能ドメイン（またはその機能的フラグメント）のポリペプチド成分と、他方において非タンパク質ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、抗生物質、挿入剤、副溝結合剤、核酸）との間の融合は、当業者に知られている生化学的接合の方法によって構築される。例えば、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）Ｃａｔａｌｏｇｕｅを参照されたい。副溝結合剤とポリペプチドとの間に融合を起こすための方法および組成物が記載されている。Ｍａｐｐ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：３９３０－３９３５。

【００６９】

ある特定の実施形態では、亜鉛フィンガータンパク質によって結合される標的部位は、細胞クロマチンの到達可能領域に存在する。例えば、同所有の国際公開０１／８３７３２に記載されるように、到達可能領域を決定することができる。標的部位が細胞クロマチンの到達可能領域に存在しない場合、譲受人共通の国際公開第０１／８３７９３号に記載されるように、１つ以上の到達可能領域を生成することができる。さらなる実施形態では、融合分子のＤＮＡ結合ドメインは、その標的部位が到達可能領域にあるかに関わらず、細胞クロマチンに結合する能力がある。例えば、そのようなＤＮＡ結合ドメインは、リンカーＤＮＡおよび／またはヌクレオソームＤＮＡに結合する能力がある。「パイオニア」ＤＮＡ結合ドメインのこの型の例は、ある特定のステロイド受容体および肝細胞核因子３（ＨＮＦ３）で見出される。Ｃｏｒｄｉｎｇｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｃｅｌｌ　４８：２６１－２７０、Ｐｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｃｅｌｌ　６０：７１９－７３１、およびＣｉｒｉｌｌｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）ＥＭＢＯ　Ｊ．１７：２４４－２５４。

【００７０】

融合分子は、当業者に知られているように、医薬的に許容可能な担体で製剤化され得る。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ　ｅｄ．，１９８５、および譲受人共通の国際公開第００／４２２１９を参照されたい。

【００７１】

融合分子の機能的成分／ドメインは、いったん融合分子がそのＤＮＡ結合ドメインを介して標的配列に結合すると、遺伝子の転写に影響を及ぼす能力のある多種多様の異なる成分のいずれかから選択されてもよい。したがって、機能的成分には、活性化剤、リプレッサー、共活性化剤、コリプレッサー、およびサイレンサ等の多様な転写因子ドメインが含まれてもよいが、これらに限定されない。

【００７２】

さらなる例示的な機能ドメインは、例えば、譲受人共通の米国特許第６，５３４，２６１号明細書および米国特許出願公開第２００２／０１６０９４０号明細書に開示される。

【００７３】

外因性の小分子または配位子により調節される機能ドメインも選択され得る。例えば、機能ドメインのみが外部ＲｈｅｏＣｈｅｍ（商標）配位子の存在下でその活性コンフォメーションをとるＲｈｅｏＳｗｉｔｃｈ（登録商標）技術が利用され得る（例えばＵＳ第２００９０１３６４６５号を参照されたい）。よって、ＺＦＰは、得られるＺＦＰ－ＴＦの活性が外部配位子によって制御される調節可能な機能ドメインに操作可能に連結され得る。特定の実施形態では、融合タンパク質は、ＤＮＡ結合の結合ドメインおよび開裂（ヌクレアーゼ）ドメインを含む。そのように、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）を使用して達成され得る。操作されたヌクレアーゼ技術は、天然に生じるＤＮＡ結合タンパク質の操作に基づく。本明細書に記載される方法および組成物は、広範に適用可能であり、関心の任意のヌクレアーゼを伴ってもよい。ヌクレアーゼの非限定的な例としては、メガヌクレアーゼおよび亜鉛フィンガーヌクレアーゼが挙げられる。ヌクレアーゼは、異種ＤＮＡ結合および開裂ドメイン（例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、異種開裂ドメインを有するメガヌクレアーゼＤＮＡ結合ドメイン）を含むか、あるいは、天然に生じるヌクレアーゼのＤＮＡ結合ドメインが、選択された標的部位（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）に結合するように変更され得る。例えば、調整された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説明されており、Ｃｈａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ３３（２０）：ｅ１７８、Ａｒｎｏｕｌｄ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３５５：４４３－４５８、およびＧｒｉｚｏｔ ｅｔ ａｌ（２００９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ Ｊｕｌｙ ７ｅ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎを参照されたい。加えて、ＺＦＰの操作も説明されている。例えば、米国特許第６，５３４，２６１号、第６，６０７，８８２号、第６，８２４，９７８号、第６，９７９，５３９号、第６，９３３，１１３号、第７，１６３，８２４号、および第７，０１３，２１９を参照されたい。

【００７４】

特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、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。天然に生じるメガヌクレアーゼは、１５～４０の塩基対開裂部位を認識し、通常ＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリー、ＧＩＹ－ＹＩＧファミリー、Ｈｉｓ－Ｃｙｓｔ ｂｏｘファミリー、およびＨＮＨファミリーの４つのファミリーに分類される。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼには、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、ＰＩ－Ｓｃｅ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、およびＩ－ＴｅｖＩＩＩが含まれる。それらの認識配列は公知である。米国特許第５，４２０，０３２号、米国特許第６，８３３，２５２号、Ｂｅｌｆｏｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３７９-３３８８、Ｄｕｊｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅ８２：１１５－１１８、Ｐｅｒｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２，１１２５-１１２７、Ｊａｓｉｎ（１９９６）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．１２：２２４－２２８、Ｇｉｍｂｌｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６３：１６３－１８０、Ａｒｇａｓｔ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８０：３４５－３５３およびＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ ｃａｔａｌｏｇｕｅも参照。

【００７５】

主としてＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリーからである天然に生じるメガヌクレアーゼからのＤＮＡ結合ドメインは、植物、酵母、ドロソフィラ、哺乳類細胞、およびマウスにおいて部位特異的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 ｅｔ ａｌ．（１９９９），Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｏｎ．２５５：８８－９３）または認識配列が導入される前操作されたゲノム（Ｒｏｕｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９４），Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１４：８０９６－１０６、Ｃｈｉｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００３），Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ．１３３：９５６－６５、Ｐｕｃｈ

ｔａ ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９３：５０５５－６０、Ｒｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１６：１５６８－８１、Ｇｏｕｂｌｅ ｅｔ ａｌ．（２００６），Ｊ．Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．８（５）：６１６－６２２）のいずれかの修飾に制限されてきた。したがって、医学的または生物工学的に適切な部位で新規結合特異性を呈するようにメガヌクレアーゼを操作する試みがなされてきた（Ｐｏｒｔｅｕｓ ｅｔ ａｌ．（２００５），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：９６７－７３、Ｓｕｓｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２００４），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３４２：３１－４１、Ｅｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．（２００３），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：２９５２－６２、Ｃｈｅｖａｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ１０：８９５－９０５、Ｅｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：２９５２－２９６２、Ａｓｈｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｎａｔｕｒｅ４４１：６５６－６５９、Ｐａｑｕｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ７：４９－６６、米国特許公開第２００７０１１７１２８号、第２００６０２０６９４９号、第２００６０１５３８２６号、第２００６００７８５５２号、および第２００４０００２０９２号）。加えて、メガヌクレアーゼからの天然に生じるまたは操作されたＤＮＡ結合ドメインはまた、異種のヌクレアーゼ（例えばＦｏｋＩ）からの開裂ドメインとも操作可能に連結されてきた。

【００７６】

他の実施形態では、ヌクレアーゼは、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）である。ＺＦＮは、選択した遺伝子および開裂ドメインまたは開裂半ドメイン内の標的部位に結合するように操作された亜鉛フィンガータンパク質を含む。

【００７７】

上述にように、亜鉛フィンガー結合ドメインは、選択した配列に結合するように操作され得る。例えば、Ｂｅｅｒｌｉ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１３５－１４１、Ｐａｂｏ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７０：３１３－３４０、Ｉｓａｌａｎ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：６５６－６６０、Ｓｅｇａｌ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：６３２－６３７、Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：４１１－４１６を参照されたい。操作された亜鉛フィンガー結合ドメインは、天然に生じる亜鉛フィンガータンパク質と比較して、新規結合特異性を有することができる。操作方法は、これらに限定されないが、合理的設計および様々な種類の選択を含む。合理的設計は、例えば、各３つ組または４つ組ヌクレオチド配列が特定の３つ組または４つ組配列に結合する亜鉛フィンガーの１つ以上のアミノ酸配列と関連する３つ組（または４つ組）ヌクレオチド配列および個々の亜鉛フィンガーアミノ酸配列を含むデータベースの使用を含む。例えば、譲受人共通の米国特許第６，４５３，２４２号および同第６，５３４，２６１号を参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００７８】

ファージ提示およびツーハイブリッドシステムを含む例示的な選択方法は、米国特許第５，７８９，５３８号、同第５，９２５，５２３号、同第６，００７，９８８号、同第６，０１３，４５３号、同第６，４１０，２４８号、同第６，１４０，４６６号、同第６，２００，７５９号、および同第６，２４２，５６８号、ならびに国際公開第９８／３７１８６号、国際公開第９８／５３０５７号、国際公開第００／２７８７８号、国際公開第０１／８８１９７号、および英国第２，３３８，２３７号に開示されている。加えて、亜鉛フィンガー結合ドメインの結合特異性の強化は、例えば譲受人共通の国際公開第０２／０７７２２７号に記載されている。

【００７９】

標的部位ＺＦＮの選択および融合タンパク質（およびそれをコードするポリヌクレオチド）の設計および構築方法は、当業者に公知であり、米国特許出願公開第２００５００６

４４７４号および同第２００６０１８８９８７号に詳細に説明されており、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００８０】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示されるように、亜鉛フィンガードメインおよび／または多指亜鉛フィンガータンパク質は、例えば長さが５つ以上のアミノ酸のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を使用して一緒に連結され得る。長さが６つ以上のアミノ酸の例示的なリンカー配列については、例えば、米国特許第６，４７９，６２６号、同第６，９０３，１８５号、および同第７，１５３，９４９号を参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々の亜鉛フィンガー間に任意の組み合わせの好適なリンカーを含む。

【００８１】

ＺＦＮおよび／またはメガヌクレアーゼ等のヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ（開裂ドメイン、開裂半ドメイン）も含む。上述のように、開裂ドメインは、ＤＮＡ結合ドメイン、例えばヌクレアーゼからの亜鉛フィンガーＤＮＡ結合ドメインおよび開裂ドメイン、または異なるヌクレアーゼからのメガヌクレアーゼＤＮＡ結合ドメインおよび開裂ドメインと異種であってもよい。異種開裂ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。開裂ドメインが由来し得る例示的なエンドヌクレアーゼは、これらに限定されないが、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。例えば、２００２－２００３ Ｃａｔａｌｏｇｕｅ，Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡおよびＢｅｌｆｏｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３７９－３３８８を参照されたい。ＤＮＡを開裂するさらなる酵素が公知である（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ、緑豆ヌクレアーゼ、膵臓ＤＮａｓｅ Ｉ、小球菌ヌクレアーゼ、酵母ＨＯエンドヌクレアーゼ、Ｌｉｎｎ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９３も参照されたい）。これらの酵素（またはその機能断片）の１つ以上は、開裂ドメインおよび開裂半ドメインの供給源として使用され得る。

【００８２】

同様に、開裂半ドメインは、上述されるように、開裂活性のために二量体化を必要とする任意のヌクレアーゼまたはその一部に由来し得る。一般に、融合タンパク質が開裂半ドメインを含む場合、２つの融合タンパク質が開裂に必要である。あるいは、２つの開裂半ドメインを含む単一タンパク質が使用され得る。２つの開裂半ドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能断片）に由来するか、またはそれぞれの開裂半ドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能断片）に由来することができる。加えて、２つの融合タンパク質の標的部位は、好ましくは、２つの融合タンパク質をそれらのそれぞれの標的部位に結合することにより、開裂半ドメインを、相互に対して、例えば二量体化により、開裂半ドメインに機能開裂ドメインを形成させる空間的配向に置くように相互に対して配置される。よって、特定に実施形態では、標的部位の端部付近は、５～８ヌクレオチドまたは１５～１８ヌクレオチドで分離される。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は、２つの標的部位（例えば、２～５０以上のヌクレオチド対）間に介在することができる。一般に、開裂部位は、標的部位間に介在する。

【００８３】

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（認識部位で）配列特異的に結合し、結合部位でまたはその付近でＤＮＡを開裂することができる。特定の制限酵素（例えばＩＩＳ型）は、認識部位から除去された部位でＤＮＡを開裂し、分離可能な結合および開裂ドメインを有する。例えば、ＩＩＳ型酵素であるＦｏｋＩは、一方の鎖上のその認識部位から９ヌクレオチドで、およびもう一方のその認識部位から１３ヌクレオチドでＤＮＡの二本鎖開裂を触媒する。例えば、米国特許第５，３５６，８０２号、同第５，４３６，１５０号、および同第５，４８７，９９４号、ならびにＬｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：４２７５－４

２７９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：２７６４－２７６８、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９４ａ）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９１：８８３－８８７、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９４ｂ）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：３１，９７８－３１，９８２を参照されたい。よって、一実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも１つのＩＩＳ型制限酵素からの開裂ドメイン（または開裂半ドメイン）と、１つ以上の亜鉛フィンガー結合ドメインとを含み、これらは操作されても、操作されなくてもよい。

【００８４】

開裂ドメインが結合ドメインから分離可能である例示的なＩＩＳ型制限酵素は、ＦｏｋＩである。この特殊な酵素は、二量体として活性である。Ｂｉｔｉｎａｉｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９５：１０，５７０－１０，５７５。したがって、本開示の目的において、開示される融合タンパク質に使用されるＦｏｋＩ酵素の一部は、開裂半ドメインと見なされる。よって、亜鉛フィンガー－ＦｏｋＩ融合を使用する標的二本鎖開裂および／または細胞配列の標的置換において、それぞれＦｏｋＩ開裂半ドメインを含む２つの融合タンパク質は、触媒的に活性の開裂ドメインを再構成するために使用され得る。あるいは、亜鉛フィンガー結合ドメインおよび２つのＦｏｋＩ開裂半ドメインを含む単一ポリペプチドも使用され得る。亜鉛フィンガーＦｏｋＩ融合を使用する標的開裂および標的配列改変のパラメータは、本開示の別の箇所で提供される。

【００８５】

開裂ドメインまたは開裂半ドメインは、機能開裂ドメインを形成するために、開裂活性を維持する、または多量体化（例えば二量体化）する能力を維持するタンパク質の任意の一部であり得る。

【００８６】

例示的なＩＩＳ型制限酵素は、国際公開第ＷＯ０７／０１４２７５号に記載されており、その全体が本明細書に組み込まれる。さらなる制限酵素は、分離可能な結合および開裂ドメインも含み、これらは、本開示で想定される。例えば、Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：４１８－４２０を参照されたい。

【００８７】

特定の実施形態では、開裂ドメインは、例えば、その全ての開示が参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる米国特許公開第２００５００６４４７４号および同第２００６０１８８９８７号ならびに米国出願第１１／８０５，８５０（２００７年５月２３日）に記載されるように、ホモ二量体化を最小限に抑えるまたは防止する１つ以上の操作された開裂半ドメイン（二量体化ドメイン突然変異体とも称される）を含む。ＦｏｋＩの位置４４６、４４７、４７９、４８３、４８４、４８６、４８７、４９０、４９１、４９６、４９８、４９９、５００、５３１、５３４、５３７、および５３８のアミノ酸残基は全て、ＦｏｋＩ開裂半ドメインの二量体化に影響を与えるための標的である。

【００８８】

偏性ヘテロ二量体を形成するＦｏｋＩの例示的な操作された開裂半ドメインは、第１の開裂半ドメインがＦｏｋＩの位置４９０および５３８でアミノ酸残基に突然変異体を含み、第２の開裂半ドメインがアミノ酸残基４８６および４９９で突然変異体を含む対を含む。

【００８９】

よって、一実施形態では、４９０での突然変異はＧｌｕ（Ｅ）をＬｙｓ（Ｋ）で置換し、５３８での突然変異はＩｓｏ（Ｉ）をＬｙｓ（Ｋ）で置換し、４８６での突然変異はＧｌｎ（Ｑ）をＧｌｕ（Ｅ）で置換し、位置４９９での突然変異はＩｓｏ（Ｉ）をＬｙｓ（Ｋ）で置換する。具体的には、本明細書に記載される操作された開裂半ドメインは、「Ｅ４９０Ｋ：Ｉ５３８Ｋ」と称される操作された開裂半ドメインを産生するために、１つの開裂半ドメインの位置４９０（Ｅ→Ｋ）および５３８（Ｉ→Ｋ）を突然変異させることに

より、そして「Ｑ４８６Ｅ：Ｉ４９９Ｌ」と称される操作された開裂半ドメインを産生するために、別の開裂半ドメインの位置４８６（Ｑ→Ｅ）および４９９（Ｉ→Ｌ）を突然変異させることにより調製された。本明細書に記載される操作された開裂半ドメインは、異常な開裂が最小限に抑えられるまたは消失する偏性ヘテロ二量体突然変異体である。例えば、米国仮出願第６０／８０８，４８６号（２００６年５月２５日に出願された）の実施例１を参照されたく、その開示は、全ての目的において参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００９０】

本明細書に記載される操作された開裂半ドメインは、米国特許公開第２００５００６４４７４号の実施例５ならびに米国特許公開第２００７／０３０５３４６号および同第２００８／０１３１９６２号の実施例３８ならびに米国特許仮出願第６１／３３７，７６９号（２０１０年２月８日に出願された）および同第６１／４０３，９１６号（２０１０年９月２３日に出願された）に記載されるように、例えば、野生型開裂半ドメイン（ＦｏｋＩ）の部位特異的突然変異により任意の好適な方法を使用して調製され得る。

【００９１】

ヌクレアーゼ発現構築物は、当該技術分野に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、米国特許公開第２００３０２３２４１０号、同第２００５０２０８４８９号、同第２００５００２６１５７号、同第２００５００６４４７４号、同第２００６０１８８９８７号、同第２００６００６３２３１号、および国際公開第ＷＯ０７／０１４２７５号を参照されたい。特定の実施形態では、ヌクレアーゼの発現は、誘導性プロモーター、例えばラフィノースおよび／またはガラクトースの存在下で活性化され（抑制解除される）、グルコースの存在下で抑制されるガラクトキナーゼプロモーターの制御下にある。特に、ガラクトキナーゼプロモーターが誘導され、ヌクレアーゼ（複数可）が炭素源の遂次変化時（例えばグルコースからラフィノース、そしてガラクトース）に発現する。誘導性プロモーターの他の非限定的な例としては、ＣＵＰ１、ＭＥＴ１５、ＰＨＯ５、およびｔｅｔ－応答性プロモーターが挙げられる。

【００９２】

送達

本明細書に記載されるタンパク質（例えばＺＦＰ）、それをコードするポリヌクレオチド、ならびにタンパク質および／またはポリヌクレオチドを含む組成物は、任意の好適な手段により標的細胞に送達され得る。好適な細胞には、これらに限定されないが、真核生物および原核生物細胞ならびに／または細胞系が含まれる。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の非限定的な例としては、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、ならびにヨトウガ（Ｓｆ）等の昆虫細胞、またはサッカロミセス、ピチア、およびシゾサッカロミセス等の真菌細胞が挙げられる。特定の実施形態では、細胞系は、ＣＨＯ－Ｋ１、ＭＤＣＫ、またはＨＥＫ２９３細胞系である。好適な一次細胞には、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、これらに限定されないが、ＣＤ４＋Ｔ細胞またはＣＤ８＋Ｔ細胞等の他の血液細胞サブセットが含まれる。好適な細胞には、例として、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉幹細胞等の幹細胞も含まれる。

【００９３】

本発明に記載される亜鉛フィンガータンパク質を含むタンパク質を送達する方法は、例えば、米国特許第６，４５３，２４２号、同第６，５０３，７１７号、同第６，５３４，２６１号、同第６，５９９，６９２号、同第６，６０７，８８２号、同第６，６８９，５５８号、同第６，８２４，９７８号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、および同第７，１６３，８２４号に記載されており、その全ての開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００９４】
本明細書に記載されるように、亜鉛フィンガータンパク質は、亜鉛フィンガータンパク質（複数可）の１つ以上をコードする配列を含有するベクターを使用しても送達され得る。任意のベクター系が使用され得、これらに限定されないが、プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ関連ウイルスベクター等が含まれる。米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，８２４，９７８号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、および同第７，１６３，８２４号も参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。さらに、これらのベクターのいずれも１つ以上の亜鉛フィンガータンパク質コード配列を含んでもよいことは明らかである。よって、１つ以上のＺＦＰが細胞の中に導入されるとき、ＺＦＰは、同じベクターまたは異なるベクター上に保有され得る。複数のベクターが使用されるとき、それぞれのベクターは、１つまたは複数のＺＦＰをコードする配列を含んでもよい。

【００９５】
従来のウイルスおよび非ウイルスに基づく遺伝子導入法は、細胞（例えば哺乳類細胞）および標的組織内に操作されたＺＦＰをコードする核酸を導入するために使用され得る。そのような方法は、ＺＦＰをコードする核酸をインビトロで細胞に投与するためにも使用され得る。特定の実施形態では、ＺＦＰをコードする核酸は、インビボまたはエクスビボ遺伝子療法の使用のために投与される。非ウイルスベクター送達系には、ＤＮＡプラスミド、裸核酸、およびリポソームまたはポロキサマー等の送達ビヒクルと複合される核酸が含まれる。ウイルスベクター送達系には、エピソームまたは細胞に送達された後の統合ゲノムのいずれかを有するＤＮＡおよびＲＮＡウイルスが含まれる。遺伝子療法手順の概説については、Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ２５６：８０８－８１３（１９９２）、Ｎａｂｅｌ＆Ｆｅｌｇｎｅｒ，ＴＩＢＴＥＣＨ１１：２１１－２１７（１９９３）、Ｍｉｔａｎｉ＆Ｃａｓｋｅｙ，ＴＩＢＴＥＣＨ１１：１６２－１６６（１９９３）、Ｄｉｌｌｏｎ，ＴＩＢＴＥＣＨ１１：１６７－１７５（１９９３）、Ｍｉｌｌｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ３５７：４５５－４６０（１９９２）、Ｖａｎ Ｂｒｕｎｔ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ６（１０）：１１４９－１１５４（１９８８）、Ｖｉｇｎｅ，Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｖｅ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ８：３５－３６（１９９５）、Ｋｒｅｍｅｒ＆Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ５１（１）：３１－４４（１９９５）、Ｈａｄｄａｄａ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｄｏｅｒｆｌｅｒ ａｎｄ Ｂｏｈｍ（ｅｄｓ．）（１９９５）、およびＹｕ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ１：１３－２６（１９９４）を参照されたい。

【００９６】
核酸の非ウイルス送達の方法には、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、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、または脂質：核酸複合体、ネイキッドＤＮＡ、人工ビリオン、および薬剤により強化されたＤＮＡの取り込みが含まれる。例えば、Ｓｏｎｉｔｒｏｎ ２０００ ｓｙｓｔｅｍ（Ｒｉｃｈ－Ｍａｒ）を使用するソノポレーションも、核酸の送達に使用することができる。

【００９７】
さらなる例示的な核酸送達システムには、Ａｍａｘａ（登録商標） Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｃｏｌｏｇｎｅ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｍａｘｃｙｔｅ，Ｉｎｃ．（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）、ＢＴＸ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ，ＭＡ）、およびＣｏｐｅｒｎｉｃｕｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ Ｉｎｃ，（例えば、米国特許第６００８３３６号明細書を参照されたい）により提供されるものが含まれる。リポフェクションは、例えば、米国特許第５，０４９，３

８６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号明細書に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（登録商標）およびＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（登録商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適な陽イオン性および中性脂肪には、Ｆｅｌｇｎｅｒのそれら、国際公開第９１／１７４２４号、国際公開第９１／１６０２４号が含まれる。細胞（エクスビボ投与）または標的組織（インビボ投与）に送達することができる。

【００９８】

免疫脂質錯体等の標的リポソームを含む脂質：核酸錯体の調製は、当業者によく知られている（例えば、Ｃｒｙｓｔａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４０４－４１０（１９９５）、Ｂｌａｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：２９１－２９７（１９９５）、Ｂｅｈｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：３８２－３８９（１９９４）、Ｒｅｍｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：６４７－６５４（１９９４）、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７１０－７２２（１９９５）、Ａｈｍａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：４８１７－４８２０（１９９２）、米国特許第４，１８６，１８３号、同第４，２１７，３４４号、同第４，２３５，８７１号、同第４，２６１，９７５号、同第４，４８５，０５４号、同第４，５０１，７２８号、同第４，７７４，０８５号、同第４，８３７，０２８号、および同第４，９４６，７８７号明細書を参照されたい）。

【００９９】

さらなる送達の方法には、送達される核酸のＥｎＧｅｎｅＩＣ送達ビヒクル（ＥＤＶ）の中へのパッケージングの使用が含まれる。これらのＥＤＶは、抗体の１つのアームが標的組織に対して特異性を有し、もう一方がＥＤＶに対して特異性を有する二重特異性抗体を使用して、標的組織に特異的に送達される。抗体は、ＥＤＶを標的細胞の表面に運び、次いでＥＤＶは、エンドサイトーシスにより細胞内に運ばれる。細胞内に取り込まれたら、内容物が放出される（ＭａｃＤｉａｒｍｉｄ ｅｔ ａｌ（２００９）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｖｏｌ２７（７）ｐ．６４３を参照されたい）。

【０１００】

改変されたＺＦＰをコードする核酸の送達のためのＲＮＡまたはＤＮＡウイルスに基づくシステムの使用は、ウイルスに体内の特定の細胞を標的とさせ、ウイルスペイロードを核に輸送するための高度に進化した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（インビボ）することができるか、またはインビトロで細胞を治療するために使用することができ、修飾された細胞が患者に投与される（エクスビボ）。ＺＦＰの送達のための従来のウイルスに基づくシステムには、遺伝子送達のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクチン、および単純ヘルペスウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。宿主ゲノム内の組込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ関連ウイルス遺伝子送達方法を使用して可能であり、しばしば、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。さらに、高い導入効率が、多くの異なる細胞型および標的組織で観察されている。

【０１０１】

レトロウイルスの向性は、外来のエンベロープタンパク質を組み込むことによって変更することができ、標的細胞の潜在的な標的群を拡張する。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入または感染させることができるレトロウイルスベクターであり、典型的には高ウイルス価を産生する。レトロウイルス遺伝子送達システムの選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大６～１０ｋｂの外来配列のパッケージング能力を有する、シス作用の長い末端反復から成る。最小限のシス作用ＬＴＲは、ベクターの複製およびパッケージングに十分であり、それらは、次いで、恒久的な導入遺伝子発現を提供するように治療遺伝子を標的細胞内に組み込むために使用される。広範囲にわたって使用されるレトロウイルスベクターには、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が含まれる。（例えば、Ｂｕｃｈｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：２７３１－２７３９（１９９２）、Ｊｏｈａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１６３５－１６４０（１９９２）、Ｓｏｍｍｅｒｆｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．１７６：５８－５９（１９９０）、Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：２３７４－２３７８（１９８９）、Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：２２２０－２２２４（１９９１）、ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５７００を参照されたい）。

【０１０２】

一過性発現が好ましい用途では、アデノウイルスに基づくシステムを使用することができる。アデノウイルスに基づくベクターは、多くの細胞型において非常に高い導入効率があり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターを使用して、高力価および高レベルの発現が得られている。比較的単純なシステムにおいて、このベクターを多量に産生することができる。アデノ関連ウイルス（「ＡＡＶ」）ベクターを使用して、例えば、核酸およびペプチドのインビトロ産生において、およびインビボおよびエクスビボ遺伝子治療手順（例えば、Ｗｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６０：３８～４７（１９８７）、米国特許第４，７９７，３６８号、国際公開第９３／２４６４１号、Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３～８０１（１９９４）、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：１３５１（１９９４）を参照されたい）のために、細胞に標的核酸を形質導入することもできる。ＡＡＶベクターの構築は、米国特許第５，１７３，４１４号、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１～３２６０（１９８５）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２～２０８１（１９８４）、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ＆ Ｍｕｚｙｃｚｋａ，ＰＮＡＳ ８１：６４６６～６４７０（１９８４）、およびＳａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：０３８２２－３８２８（１９８９）を含む、多数の刊行物に記載される。

【０１０３】

現在、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に使用可能であり、それらは形質導入剤を生成するためにヘルパー細胞株に挿入された遺伝子による欠損ベクターの相補性を含むアプローチを利用する。

【０１０４】

ｐＬＡＳＮおよびＭＦＧ－Ｓは、臨床試験で使用されているレトロウイルスベクターの例である（Ｄｕｎｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ８５：３０４８－３０５（１９９５）、Ｋｏｈｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１：１０１７－１０２（１９９５）、Ｍａｌｅｃｈ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ９４：２２ １２１３３－１２１３８（１９９７））。ＰＡ３１７／ｐＬＡＳＮは、遺伝子治療試験で使用された最初の治療ベクターであった。（Ｂｌａｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４７５－４８０（１９９５））。ＭＦＧ－Ｓパッケージされたベクターに対して、５０％またはそれより大きい導入効率が観察されている。（Ｅｌｌｅｍ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．４４（１）：１０－２０（１９９７）、Ｄｒａｎｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１：１１１－２（１９９７）。

【０１０５】

アデノ関連ウイルスベクター（ｒＡＡＶ）は、欠損および非病原性パルボウイルスアデノ関連２型ウイルスに基づく有望な代替遺伝子送達システムである。全てのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するＡＡＶ１４５ｂｐ逆方向末端反復のみを保持するプラスミドに由来する。形質導入細胞のゲノム内への組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、このベクター系の重要な特長である。（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ３５１：９１１７ １７０２－３（１９９８），Ｋｅａｒｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．９：７４８－５５（１９９６））。ＡＡＶ１、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、およびＡＡＶ８を含む他のＡＡＶ血清型も本発明に従って使用することができる。

【０１０６】
複製欠損性アデノウイルスベクター（Ａｄ）を高力価で産生することができ、多数の異なる細胞型を容易に感染させる。アデノウイルスベクターの大半は、導入遺伝子がＡｄＥ１ａ、Ｅ１ｂ、および／またはＥ３遺伝子を置換し、その後、複製欠損性ベクターが、トランス内の消失遺伝子機能を供給するヒト２９３細胞で増殖するように改変される。Ａｄベクターは、肝臓、腎臓、および筋肉で見出されるもの等の非分裂の分化した細胞を含む、複数の種類の組織をインビボで形質転換することができる。従来のＡｄベクターは、大きな担持能力を有する。臨床試験におけるＡｄベクターの使用の例には、筋肉内注入を用いる抗腫瘍免疫のポリヌクレオチド治療が挙げられた（Ｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，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には、Ｒｏｓｅｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔｏｎ ２４：１ ５－１０（１９９６）、Ｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．９：７ １０８３－１０８９（１９９８）、Ｗｅｌｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：２０５－１８（１９９５）、Ａｌｖａｒｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：５９７－６１３（１９９７）、Ｔｏｐｆ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：５０７－５１３（１９９８）、Ｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：１０８３－１０８９（１９９８）が挙げられる。

【０１０７】
パッケージング細胞を使用して、宿主細胞を感染させることが可能なウイルス粒子を形成する。そのような細胞には、アデノウイルスをパッケージングする２９３細胞、およびレトロウイルスをパッケージングするψ２細胞またはＰＡ３１７が含まれる。遺伝子治療で使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケージングする産出細胞株によって生成される。これらのベクターには、典型的には、パッケージングおよびその後の宿主への組込みに必要とされる最小限のウイルス配列（適用可能な場合）、発現されるように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ている他のウイルス配列が含まれる。欠損しているウイルス機能は、パッケージングする細胞株によってトランスで提供される。例えば、遺伝子治療に使用するＡＡＶベクターは、典型的には、宿主ゲノム内へのパッケージングおよび組込みに必要とされるＡＡＶゲノムからの逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列のみを所有する。ウイルスＤＮＡは、細胞株内にパッケージングされ、他のＡＡＶ遺伝子すなわち、ｒｅｐおよびｃａｐをコードするが、ＩＴＲ配列を欠失するヘルパープラスミドを含有する。この細胞株はまた、ヘルパーとしてアデノウイルスに感染する。このヘルパーウイルスは、ヘルパープラスミドから、ＡＡＶベクターの複製、およびＡＡＶ遺伝子の発現を促進する。このヘルパープラスミドは、ＩＴＲ配列の欠失の結果、相当な量でパッケージングされない。アデノウイルスの汚染は、例えば、ＡＡＶよりも敏感であるアデノウイルスに対する熱処理によって減少することができる。

【０１０８】
多くの遺伝子治療用途において、遺伝子治療ベクターが高度の特異性で特定の細胞型に送達されることが望ましい。したがって、ウイルスの外表面上でウイルス外被タンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現することによって、ウイルスベクターを所定の細胞型に対する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、関心の細胞型上に存在することで知られている受容体に対する親和性を有するように選択される。例えば、Ｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：９７４７－９７５１（１９９５）は、ｇｐ７０に融合されたヒトヘレグリンを発現するように、モロニーマウス白血病ウイルスを修飾することができ、そのウイルスが、ヒト上皮成長因子受容体を発現するある特定のヒト乳癌細胞を感染させることを報告した。この原理は、細胞表面受容体に対して、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスがリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス標的細胞対にまで及ぶことができる。例えば、実質的に任意の選択された細胞受容体に特異的結合親和性を有する抗体断片（例えば、ＦＡ

ＢまたはＦｖ）を表示するように、線状ファージを改変することができる。上記の説明は、主にウイルスベクターに適用されるが、同一の原理を非ウイルスベクターに適用することができる。特異的標的細胞による取り込みを好む特異的な取り込み配列を含有するように、そのようなベクターを改変することができる。

【０１０９】

遺伝子治療ベクターは、下で説明するように、個々の患者への投与、典型的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、もしくは頭蓋内注入）または局所投与によって、インビボで送達することができる。あるいは、個々の患者から移植された細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検）または万能ドナーの造血幹細胞等の細胞に、ベクターをエクスビボで送達することができ、その後、ベクターを組み込んだ細胞の選択後に、患者への細胞の再移植が続く。

【０１１０】

診断、研究のため、または遺伝子治療のためのエクスビボ細胞トランスフェクション（例えば、宿主生物にトランスフェクトした細胞の再注入を介して）が当業者によく知られている。好ましい実施形態では、細胞は、対象生物から単離され、ＺＦＰ核酸（遺伝子またはｃＤＮＡ）をトランスフェクトし、対象生物（例えば、患者）内に戻って再注入される。エクスビボのトランスフェクションに好適な多様な細胞型は、当業者によく知られている（患者からの細胞の単離および培養方法についての説明は、例えば、Ｆｒｅｓｈｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ，Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ（３ｒｄ ｅｄ．１９９４）、およびそこで引用される参考文献を参照されたい）。

【０１１１】

好適な細胞には、これらに限定されないが、真核生物および原核生物細胞ならびに／または細胞系が含まれる。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の非限定的な例としては、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、ならびにヨトウガ（Ｓｆ）等の昆虫細胞またはサッカロミセス、ピチアおよびシゾサッカロミセス等の真菌細胞が挙げられる。特定の実施形態では、細胞系は、ＣＨＯ－Ｋ１、ＭＤＣＫ、またはＨＥＫ２９３細胞系である。加えて、一次細胞は、ＺＦＮで処理した後、治療される対象に再導入するために単離され、エクスビボで使用され得る。好適な一次細胞には、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、およびこれらに限定されないが、ＣＤ４＋Ｔ細胞またはＣＤ８＋Ｔ細胞等の他の血液細胞サブセットが含まれる。好適な細胞には、例として、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉幹細胞が含まれる。

【０１１２】

一実施形態では、幹細胞は、細胞トランスフェクションおよび遺伝子治療のためのエクスビボ処置で使用される。幹細胞を使用する利点は、それらがインビトロで他の細胞型に分化することができるか、または、それらが骨髄に生着する哺乳動物（幹細胞のドナー等）に導入し得ることである。ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－γ、およびＴＮＦ－α等のサイトカインを使用して、ＣＤ３４＋細胞を臨床的に重要な免疫細胞型にインビトロで分化するための方法が知られている（Ｉｎａｂａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６：１６９３－１７０２（１９９２）を参照されたい）。

【０１１３】

幹細胞は、周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、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（分化された抗原提示細胞）等の不要な細胞を結合する抗体を有する骨髄細胞をパンニングすることによって骨髄から単離される（Ｉｎａｂａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６：１６９３－１７０２（１９９２）を参照されたい

）。

【０１１４】

修飾された幹細胞もいくつかの実施形態において使用され得る。例えば、アポトーシスに耐性をつけた幹細胞は、幹細胞が本発明のＺＦＰ　ＴＦも含有する治療用組成物として使用され得る。アポトーシスに対する耐性は、例えばＢＡＸ－またはＢＡＫ特異的ＺＦＮ（米国特許出願第１２／４５６，０４３号）を使用して幹細胞内のＢＡＸおよび／もしくはＢＡＫを、または例えば同様にカスパーゼ－６特異的ＺＦＮを使用して、カスパーゼ内で破壊されたものをノックアウトすることにより生じてもよいこれらの細胞は、突然変異体または野生型ＰＤ１を調節することが知られているＺＦＰ　ＴＦを用いてトランスフェクトされ得る。

【０１１５】

治療的ＺＦＰ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、リポソーム等）を、細胞の形質導入のために、生物にインビボで直接投与することもできる。あるいは、ネイキッドＤＮＡを投与することができる。投与は、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、血液細胞または組織細胞との最終的な接触内に分子を導入するために通常使用される経路のいずれかによる。そのような核酸を投与する好適な方法は、使用可能であり、かつ当業者にも知られており、１つ以上の経路を使用して特定の組成物を投与することができるが、特定の経路は、しばしば、別の経路よりも即時かつ有効な反応を提供することができる。

【０１１６】

造血幹細胞にＤＮＡを導入するための方法が、例えば、米国特許第５，９２８，６３８号明細書に開示される。導入遺伝子の造血幹細胞、例えば、ＣＤ３４$^{+}$細胞への導入に有用なベクターには、アデノウイルス３５型が含まれる。

【０１１７】

導入遺伝子の免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）への導入に好適なベクターには、非組込みレンチウイルスベクターが含まれる。例えば、Ｏｒｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１１３８２－１１３８８、Ｄｕｌｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：８４６３－８４７１、Ｚｕｆｆｅｒｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：９８７３－９８８０、Ｆｏｌｌｅｎｚｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　２５：２１７－２２２を参照されたい。

【０１１８】

医薬的に許容可能な担体は、投与されている特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によってある程度決定される。したがって、下で説明するように、使用可能な医薬組成物の多種多様の好適な製剤が存在する（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ‘ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ　ｅｄ．，１９８９を参照されたい）。

【０１１９】

用途

開示される組成物および方法は、１つ以上のＰＤ１遺伝子の発現を調節することが望ましい任意の用途に使用され得る。特に、これらの方法および組成物は、ＰＤ１対立遺伝子の調節が望ましい場合に使用され得、これには治療用途および研究用途が含まれるが、これらに限定されない。本方法および組成物は、ＨＩＶ／ＡＩＤＳおよびＨＣＶ等の慢性感染性疾患を治療するために使用され得る。加えて、本方法および組成物は、メラノーマ、卵巣癌、結腸直腸／結腸癌、腎細胞癌、形質細胞腫／骨髄腫、乳癌、および肺癌等の癌を治療するために使用され得る。

【０１２０】

ＰＤ１抑制ＺＦＰ　ＴＦまたはＺＦＮが治療剤として使用され得る疾患および状態には、これらに限定されないが、慢性感染性疾患および癌が含まれる。ＰＤ１遺伝子の活性化が治療上の処置として有用である疾患および状態には、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）等の

自己免疫疾患が含まれる。ＺＦＰ　ＴＦまたはＺＦＮをコードするポリヌクレオチドは、それ自体が治療薬として使用されるか、または送達のためにベクター内に組み込まれる。

【０１２１】

ＰＤ１対立遺伝子を抑制するＺＦＰ－ＴＦおよび／またはＰＤ１特異的ＺＦＮを含む方法および組成物はまた、慢性感染性疾患または癌を治療するように設計された他の治療薬と共に使用され得る。これらのＺＦＰまたはＺＦＮ（またはこれらのＺＦＰもしくはＺＦＮをコードするポリヌクレオチド）は、同時に（例えば同じ薬学的組成物で）投与されるか、または任意の順序で順次投与され得る。任意の種類の癌が治療され得、これらに限定されないが、これには、肺癌、膵臓癌、肝臓癌、骨癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、白血病、リンパ腫、脳癌等が含まれる。同様に、ＰＤ１対立遺伝子を活性化するように設計されたＺＦＰ　ＴＦは、自己免疫疾患を治療するように設計された他の治療薬と共に使用され得る。

【０１２２】

治療のための方法および組成物は、患者から単離された細胞内のＰＤ１対立遺伝子の突然変異体複写物がＰＤ１特異的ＺＦＮを使用して、野生型ＰＤ１対立遺伝子に修飾された細胞組成物も含む。これらのエクスビボ修飾された細胞は、次いで患者に再導入される。加えて、修飾された幹細胞を含む方法および組成物も想定される。例えば、幹細胞内のＰＤ１対立遺伝子の突然変異複写物は、ＰＤ１特異的ＺＦＮを使用して、野生型ＰＤ１対立遺伝子に修飾された。他の実施形態では、幹細胞内の野生型ＰＤ１対立遺伝子がＰＤ１特異的ＺＦＮを使用して修飾された幹細胞組成物が提供される。これらの組成物は、他の治療薬と共に使用され得る。これらの組成物は、同時に（例えば同じ薬学的組成物で）投与されるか、または任意の順序で順次投与され得る。

【０１２３】

本発明の方法および組成物は、例えば、慢性感染、癌、または自己免疫の動物モデルなどの、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インビトロおよびインビボモデルの設計および実装にも有用である。

【０１２４】

以下の実施例は、ヌクレアーゼがＺＦＮを含む本開示の例示的な実施形態に関する。これは、単に例示の目的のためであり、他のヌクレアーゼ、例えば操作されたＤＮＡ結合ドメインならびに／または操作されたホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）ＤＮＡ結合ドメインおよび異種開裂ドメインの天然に生じる融合物を伴うホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）が使用されることを理解されたい。

【実施例】

【０１２５】

実施例１：持続的に生物学的に活性なＰＤ１特異的ＺＦＮの同定

ＺＦＮはヒトＰＤ１遺伝子に対して組み立てられ、Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２５：７７８－７８５および米国特許公開第２００５００６４４７４号ならびに国際公開第ＷＯ２００５／０１４７９１号に記載されるように、ＥＬＩＳＡおよびＣＥＬ１アッセイにより試験された。

【０１２６】

ＺＦＰの具体的な例を表１に開示する。本表の最初のコラムは、ＺＦＰの内部参照名（数字）である。表２は、ＰＤ１上の標的結合部位を列挙する。「Ｆ」は、フィンガーを指し、「Ｆ」に続く数字は、どの亜鉛フィンガーであるかを指す（例えば、「Ｆ１」はフィンガー１を指す）。

【０１２７】

表１：ヒトＰＤ１標的亜鉛フィンガータンパク質

【０１２８】

【表１－１】

SBS #	設計					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
12942	QSGHLSR (配列番号1)	RSDSLSV (配列番号2)	HNDSRKN (配列番号3)	RSDDLTR (配列番号4)	RSDHLTQ (配列番号5)	該当なし
12946	RSAALSR (配列番号6)	RSDDLTR (配列番号4)	RSDHLTT (配列番号7)	DRSALSR (配列番号8)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
12947	RSAALAR (配列番号10)	RSDDLSK (配列番号11)	RNDHRKN (配列番号12)	DRSALSR (配列番号8)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
12934	RSDHLSE (配列番号13)	TSSDRTK (配列番号14)	RSDHLSE (配列番号13)	QSASRKN (配列番号15)	該当なし	該当なし
12971	RSDVLSE (配列番号16)	RSANLTR (配列番号17)	RSDHLSQ (配列番号18)	TSSNRKT (配列番号19)	DRSNLSR (配列番号20)	RSDALAR (配列番号21)
12972	DDWNLSQ (配列番号22)	RSANLTR (配列番号17)	RSDHLSQ (配列番号18)	TSSNRKT (配列番号19)	DRSNLSR (配列番号20)	RSDALAR (配列番号21)
18759	RSSALSR (配列番号23)	RPLALKH (配列番号24)	RNDHRKN (配列番号12)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
22237	QSGHLSR (配列番号1)	RSDSLSV (配列番号2)	HNDSRKN (配列番号3)	RANSLLR (配列番号26)	RSDHLTQ (配列番号5)	該当なし

【表１－２】

25005	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RNNNLRT (配列番号29)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25006	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	TNWHLRT (配列番号30)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25010	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RTPHLTL (配列番号31)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25011	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RSAQLAT (配列番号32)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25012	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RCTHLYL (配列番号33)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25013	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RPTQRYS (配列番号34)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25014	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RANHREC (配列番号35)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25015	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RANHREC (配列番号35)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25016	RKFARPS (配列番号36)	RNFSRSD (配列番号37)	HPHHRMC (配列番号38)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25017	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RMGRLST (配列番号39)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25022	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RHSRLTT (配列番号40)	TRPVLMR (配列番号41)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25023	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RANHRVC (配列番号42)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25025	RPSTLHR (配列番号27)	RSDELTR (配列番号28)	RSTHLLG (配列番号43)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25027	RNAALTR (配列番号45)	RSDELTR (配列番号28)	RSCGLWS (配列番号44)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25028	CNAALTR (配列番号46)	RSDELTR (配列番号28)	REEHRAT (配列番号47)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25029	RNAALTR (配列番号45)	RSDELTR (配列番号28)	RHHHLAA (配列番号48)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25030	RNAALTR (配列番号45)	RSDELTR (配列番号28)	RPMHLTN (配列番号49)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし

【表１－３】

25031	RNAALTR (配列番号45)	RSDELTR (配列番号28)	RSPHLYH (配列番号50)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25032	RNAALTR (配列番号45)	RSDELTR (配列番号28)	RCEALHH (配列番号51)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSAQAR (配列番号52)	該当なし
25034	RNAALTR (配列番号45)	RSDELTR (配列番号28)	RCEALHH (配列番号51)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25036	RNAALTR (配列番号45)	RSDELTR (配列番号28)	RSPHLYH (配列番号50)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25040	RNAALTR (配列番号45)	RSDELTR (配列番号28)	RLPALLS (配列番号53)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし
25041	HNAALTR (配列番号54)	RSDELTR (配列番号28)	RTYNRTQ (配列番号55)	TRPVLKR (配列番号25)	DRSALAR (配列番号9)	該当なし

【０１２９】

表２：ヒトＰＤ１遺伝子におけるＺＦＮ標的部位

【０１３０】

【表２】

SBS#	標的部位
12942	ccAGGGCGCCTGTGGGAtctgcatgcct（配列番号56）
12946	caGTCGTCTGGGCGGTGctacaactggg（配列番号57）
12947	caGTCGTCTGGGCGGTGctacaactggg（配列番号57）
12934	gaACACAGGCACGGctgaggggtcctcc（配列番号58）
12971	ctGTGGACTATGGGGAGCTGgatttcca（配列番号59）
12972	ctGTGGACTATGGGGAGCTGgatttcca（配列番号59）
18759	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
22237	ccAGGGCGCCTGTGGGAtctgcatgcct（配列番号56）
25005	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25006	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25010	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25011	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25012	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25013	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25014	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25015	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25016	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25017	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25022	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25023	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25025	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25027	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25028	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25029	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25030	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25031	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25032	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25034	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25036	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25040	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）
25041	caGTCGTCTGGGCGGTGct（配列番号60）

【０１３１】

最初のインビトロ活性アッセイは、上述のようにヌクレオフェクト（ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｅｄ）された細胞サンプル上で行われた。簡潔に、製造者により指定されたようにＡｍａｘａ（商標）Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎキットを使用して、トランスフェクションにより、ＺＦＰ－ＦｏｋＩ融合物をコードするプラスミドをＫ５６２細胞に導入した。トランスフェクションにおいて、それぞれの亜鉛フィンガーヌクレアーゼ発現プラスミドおよび１００μＬのＡｍａｘａ（商標）溶液Ｖの量を変更しながら、２００万のＫ５６２細胞を混合した。Ｔ－１６プログラムを使用して、Ａｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　ＩＩ（商標）に細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション直後、細胞を２つの異なるフラスコに分け、３０℃または３７℃のいずれかで４日間、５％CO_2中で１０％のＦＢＳで補充されたＲＰＭＩ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で成長させた。

【０１３２】

この初期のインビトロスクリーニングから、２つの主要なＺＦＮ対を同定し、それらの

効率の改善を図るために精錬に供された。これらの対は、それぞれ、ＰＤ１遺伝子のエキソン１および５を標的とする。精錬された（改善された）タンパク質は、基本的に上述のように、時間経過実験で再度試験された。結果を下の表３に要約する。

【０１３３】

表３：ＰＤ１　ＮＨＥＪ

【０１３４】

【表３】

		NHEJ%		
標的	ZFN対	3日目	7日目	9日目
エキソン1	12942/12946	8	7	5
エキソン1	12942/12947	10	6	6
エキソン5	12934/12971	11	6	1.5
エキソン5	12934/12972	11	7.5	2

【０１３５】

表３に示されるように、エキソン５に対して細胞をＺＦＮで処理することにより、集団から大半のゲノム編集細胞を損失させることができ、一方、エキソン１に対して設計されたＺＦＮで処理された細胞におけるゲノム編集シグナルは、より安定している。

【０１３６】

ＰＤ１遺伝子座でのＺＦＮ活性を判定するために、基本的に製造者の指示通りに（Ｔｒａｎｇｅｎｏｍｉｃ　ＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標））、Ｃｅｌ－１に基づくＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイを行った。細胞を収集し、製造者の指示（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ（登録商標））に従い、Ｑｕｉｃｋｅｘｔｒａｃｔ（商標）Ｋｉｔを使用して、染色体ＤＮＡを調製した。Ａｃｃｕｐｒｉｍｅ（商標）高忠実度ＤＮＡポリメラーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、ＰＤ１遺伝子座の適切な領域をＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ反応物を９４℃に加熱し、徐々に室温に冷却した。約２００ｎｇのアニールされたＤＮＡを０．３３μＬのＣｅｌ－Ｉ酵素と混合し、４２℃で２０分間、インキュベートした。１Ｘのトリス－ホウ酸塩－ＥＤＴＡ緩衝液中で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、反応産物を分析した。

【０１３７】

３または１０日間のいずれかで、３０℃または３７℃のいずれかに保たれた一次ＰＢＭＣサンプルにおいても、構築物を試験した（表４を参照されたい）。簡潔に、ＡｌｌＣｅｌｌｓからＰＢＭＣを購入し、製造者のプロトコル（Ｄｙｎａｌ）に従い、ＲＰＭＩ＋１０％のＦＢＳ＋１％のＬ－グルタミン（３０ｍｇ／ｍＬ）＋ＩＬ－２（１ｎｇ／ｍＬ、Ｓｉｇｍａ）中で培養し、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで活性化した。細胞を２４ウェルプレートの１ｍＬ容量に３Ｅ５細胞／ｍＬで播種した。

【０１３８】

記載されるように（米国特許公開第２００８０１５９９９６号を参照されたい）関心のＺＦＮ対を含有するアデノウイルスベクターを構築し、２日後に１０、３０、または１００のＭＯＩ（ＭＯＩは感染力価に基づき計算された）で添加された。

【０１３９】

ウイルスに露出させた３または１０日後に細胞を収集し、国際特許公開第ＷＯ０７／０１４２７５号に記載されるように行われたＣｅｌ－Ｉに基づくＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイを使用して、遺伝子修飾効率を判定した。Ｏｌｅｙｋｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２６：４５９７－４６０２、Ｑｕｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ３６：７０２－７０７、Ｙｅｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ３８：７４９－７５８も参照されたい。

【０１４０】
表４に示されるＺＦＮ対において、それぞれのＺＦＮは、ＺＦＮ１２９４２と共に試験された。上述のＣｅｌ－１に基づくＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイにより測定されるように、活性はパーセントＮＨＥＪ活性により測定される。
【０１４１】
ＰＤ１特異的ＺＦＮのさらなる対は、上述のように、一次ＰＢＭＣにおける活性についても試験され、結果を表４に示す。表４に示されるデータにおいて、ＰＤ１特異的単量体１２９４２は、表４に列挙される第２のＺＦＮと常に対合され、活性対（即ちＺＦＮ１２９４２はＺＦＮ１２９４７～２５０４１のそれぞれと対合される）を形成する。図１も参照されたい（サンプルは表４に示される通りである）。
【０１４２】
表４：ＰＤ１　ＺＦＮの活性
【０１４３】
【表４】

	37℃	37℃	30℃	30℃	
12942+	3日目（パーセントNHEJ）	10日目（パーセントNHEJ）	3日目（パーセントNHEJ）	10日目（パーセントNHEJ）	図1におけるサンプル
12947	2.1	1.6	4.2	2.3	1
18759	4.7	2.2	4.9	4.3	2
25005	4.4	2.3	4.5	2.4	3
25006	2.9	8.1	5.2	9.9	4
25010	4.9	1.8	5.0	2.8	5
25011	3.1	9.2	3.1	12.8	6
25012	5.9	8.5	8.2	14.7	7
25013	3.7	0.6	4.0	1.8	8
25014	10.7	6.6	8.3	9.6	9
25015	3.9	3.9	5.3	7.3	10
25016	7.3	12.8	7.7	13.6	11
25017	7.7	9.6	6.1	15.0	12
25022	3.6	5.2	4.2	9.0	13
25023	3.1	8.3	7.1	7.8	14
25025	8.8	10.6	6.5	7.6	15
25027	6.0	9.5	5.9	6.6	16
25028	4.3	5.2	4.8	6.2	17
25029	8.1	12.8	7.6	14.3	18
25030	7.6	9.6	5.4	10.7	19
25031	9.4	14.5	3.8	15.3	20
25032	6.7	4.2	6.6	6.0	21
25034	4.9	4.7	6.2	4.1	22
25036	8.3	4.2	6.9	9.7	23
25040	6.1	3.6	3.6	4.6	24
25041	7.9	11.2	5.2	4.5	25

【０１４４】
分子レベルでのＺＦＮ誘導ＮＨＥＪ活性の局所作用をアッセイするために、ＣＤ８＋細胞をエキソン１特異的ＺＦＮ対１２９４２および１２９４７で処理した。簡潔に、ＣＤ８

＋細胞をＡｌｌＣｅｌｌｓから購入し、ＲＰＭＩ＋１０％のＦＢＳ＋１％のＬ－グルタミン（３０ｍｇ／ｍＬ）＋ＩＬ－２（３０μｇ／ｍＬ、Ｓｉｇｍａ）中で培養し、４～２４時間静置した。

【０１４５】

上述のように関心のＺＦＮ対を含有するプラスミドを構築し、製造者により指定されるように、Ａｍａｘａ（商標）Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎキットを用いて、１ｅ６細胞／ヌクレオフェクションが使用された。製造者のプロトコル（Ｄｙｎａｌ）に従い、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズでヌクレオフェクション後、細胞を１２～２４時間活性化した。

【０１４６】

ヌクレオフェクションの３または１０日後に細胞を収集し、国際特許公開第ＷＯ０７／０１４２７５号に記載されるように行われたＣｅｌ－１に基づくＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイを使用して、遺伝子修飾効率を判定した。Ｏｌｅｙｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ｒｅｓ．２６：４５９７－４６０２、Ｑｕｉ ｅｔ ａｌ．（２００４）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ３６：７０２－７０７、Ｙｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．（２００５）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ３８：７４９－７５８も参照されたい。

【０１４７】

ＰＣＲ産物をクローン化し、大腸菌にトランスフェクトした。抗生物質耐性のサブクローンを成長させ、プラスミドを単離し、次いでＮＨＥＪの結果として生じた任意の配列変化を観察するために、配列分析を受けた（図２を参照されたい）。図からわかるように、様々な挿入および欠失がＺＦＮ開裂部位付近で観察された。

【０１４８】

これらのＺＦＮは、米国特許公開第２００９０１１１１１９号に記載されるように、酵母系においても試験された。

【０１４９】

実施例２：マウスにおけるＰＤ１特異的ＺＦＮのエクスビボ活性

インビボでＰＤ１の欠失の概念を試験するために、マウスＰＤ１特異的ＺＦＮを上述のように作製し、次いでエクスビボで試験した。亜鉛フィンガードメインの配列特徴ならびにそれらの結合特異性を下の表５および６に示す。

【０１５０】

表５：マウスＰＤ１特異的亜鉛フィンガー設計

【０１５１】

【表５】

SBS #	設計					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
14534	DDWNLSQ (配列番号22)	RSANLTR (配列番号17)	TSGSLSR (配列番号61)	QSGDLTR (配列番号62)	QSSDLRR (配列番号63)	該当なし
14534-FokI KK	DDWNLSQ (配列番号22)	RSANLTR (配列番号17)	TSGSLSR (配列番号61)	QSGDLTR (配列番号62)	QSSDLRR (配列番号63)	該当なし
14536	QSSHLTR (配列番号64)	RSDNLRE (配列番号65)	DRSNLSR (配列番号20)	TSSNRKT (配列番号19)	RSDSLSK (配列番号66)	QSANRTT (配列番号)
14536-Fok1 EL	QSSHLTR (配列番号64)	RSDNLRE (配列番号65)	DRSNLSR (配列番号20)	TSSNRKT (配列番号19)	RSDSLSK (配列番号66)	QSANRTT (配列番号)
14545	QSGDLTR (配列番号62)	RSDNLSE (配列番号67)	ERANRNS (配列番号68)	DRSDLSR (配列番号69)	QSSDLRR (配列番号63)	該当なし
14545-FokI KK	QSGDLTR (配列番号62)	RSDNLSE (配列番号67)	ERANRNS (配列番号68)	DRSDLSR (配列番号69)	QSSDLRR (配列番号63)	該当なし
14546	DRSHLAR (配列番号70)	RSDDLSR (配列番号71)	QSANRTK (配列番号72)	RSDTLSE (配列番号73)	ANSNRIK (配列番号74)	該当なし
14546-FokI EL	DRSHLAR (配列番号70)	RSDDLSR (配列番号71)	QSANRTK (配列番号72)	RSDTLSE (配列番号73)	ANSNRIK (配列番号74)	該当なし

【０１５２】
表６：マウスＰＤ１特異的亜鉛フィンガー設計における結合特異性
【０１５３】
【表６】

SBS#	標的部位
14534	gtGCTGCAGTTGAGCTGgcaatcagggt (配列番号75)
14534- FokI KK	gtGCTGCAGTTGAGCTGgcaatcagggt (配列番号75)
14536	ccCAAGTGAATGACCAGGGTacctgccg (配列番号76)
14536-FokI EL	ccCAAGTGAATGACCAGGGTacctgccg (配列番号76)
14545	caGCTGCCCAACAGGCAtgacttccaca (配列番号77)
14545- FokI KK	caGCTGCCCAACAGGCAtgacttccaca (配列番号77)
14546	atGATCTGGAAGCGGGCatcctggacgg (配列番号78)
14546- FokI EL	atGATCTGGAAGCGGGCatcctggacgg (配列番号78)

【０１５４】
１日目に、Ｐｍｅｌ　ＴＣＲ遺伝子導入／Ｒａｇ１－／－マウスから収集した脾細胞を単一細胞懸濁液の中で処理し、２５μｌのＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｍｏｕｓｅ　Ｔ－Ａｃｔｉｖａｔｏｒ　ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ／10^6細胞と共に完全培地（ＲＰＭＩ－１６４０、１０％のウシ胎児血清、０．１ｍＭの非必須アミノ酸、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、２ｍＭのＬ－グルタミン、５０μｇ／ｍｌの硫酸ゲンタマイシン、５０μＭの２－メルカプトエタノール）に再懸濁した。細胞を2×10^6細胞／ｍｌ（２ｍｌ／ウェル）で、２４ウェルプレートで平板培養した。３日目に、細胞を収集し、磁石を用いてビーズから分離し、数えた。Ａｍａｘａ（商標）Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎキットと共に提供されたプロトコルに従い、脾細胞のトランスフェクションを行った。簡潔に、$1\times10e^7$生細胞を１００μｌのＡｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ溶液に再懸濁し、Ａｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（プログラムＸ－０１）を使用して、４

μｇのＺＦＮ対１４５４６および１４５４５含有プラスミド、または４μｇのＺＦＮ対１４５４６－ＦｏｋＩ　ＥＬおよび１４５４５－Ｆｏｋ　Ｉ　ＫＫ含有、２．５μｇのＡｍａｘａ　ｐｍａｘ　ＧＦＰベクター含有、もしくはＤＮＡ対照を含まないｍｕｔ　ＰＤ１　Ｆｏｋ１プラスミドのいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクション後、３０℃で、２ｍｌの完全補充されたＡｍａｘａ　Ｍｏｕｓｅ　Ｔ細胞Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ培地で細胞を培養した。翌日、１ｍｌのＡｍａｘａ　Ｍｏｕｓｅ　Ｔ細胞Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ培地を取り除き、１０Ｕ／ｍｌのＩＬ－２で補充された１ｍｌの完全培地と交換した。２日後、細胞を収集し、数えた。それぞれの群からの２００万の細胞を２４ウェルプレート上の抗ＣＤ３コーティングされたウェルで平板培養した。翌日、細胞を収集し、抗ＰＤ１　ＰＥ、抗ＣＤ３　ＰＥ－Ｃｙ７、および抗ＣＤ８　ＡＰＣで染色した。細胞をＢＤ　ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ上で分析した。プロットは、それぞれの群におけるＰＤ１陽性ＣＤ３＋ＣＤ８＋細胞％およびそれぞれの群の中央値のＰＤ１蛍光を示す（図３を参照されたい）。データは、抗ＣＤ３刺激の存在下でも、ＰＤ１特異的ＺＦＮを受けた細胞においてＰＤ１発現が減少することを示す。

【０１５５】

ＰＤ１発現の減少が後の時間点で明白であることを検証するために、上述に記載される２４時間ではなく、抗ＣＤ３刺激の７２時間後にも細胞を収集した。細胞を収集し、抗ＰＤ１　ＰＥ、抗ＣＤ３　ＰＥ－Ｃｙ７、および抗ＣＤ８　ＡＰＣで染色した。細胞をＢＤ　ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ上で分析した。データを図４に表す。上のヒストグラムは、それぞれの群におけるＰＤ１陽性ＣＤ３＋ＣＤ８＋細胞％およびそれぞれの群の中央値のＰＤ１蛍光を示す。下のプロットは、ＰＤ１／ＣＦＳＥ発現細胞の頻度を示す。重要なことは、ｍｕｔ　ＰＤ１　Ｆｏｋ１およびｗｔ　ＰＤ１　Ｆｏｋ１が対照群より高頻度のＰＤ１^{neg}　ＣＦＳＥ^{dim}（分裂細胞）を示し、抗ＣＤ３刺激の７２時間後でも、ＰＤ１発現がＰＤ１特異的ＺＦＮで処理された細胞においてなお減少することを示した。

【０１５６】

実施例３：ＴＩＬにおけるヒトＰＤ１特異的ＺＦＮの活性

腫瘍の存在下で、ヒトＰＤ１特異的ＺＦＮをヒト腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬｓ）において試験し、基本的に上述および当該技術分野において公知の方法を使用してアッセイした（例えば、Ｙｏｓｈｉｎｏ　ｅｔ　ａｌ，（１９９２）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５２：７７５－７８１を参照されたい）。上述のように、抗ＣＤ３抗体を用いてＰＤ１特異的ＺＦＮを活性化し、次いで細胞をＡｄ５／Ｆ３５アデノウイルス発現ＰＤ１特異的ＺＦＮで形質導入した。ＩＬ２で細胞を拡張し、次いで抗ＣＤ３抗体または腫瘍で再刺激し、刺激の２４時間後にアッセイした。結果を下の表７に示す。

【０１５７】

表７：ＴＩＬにおけるＰＤ１発現および生存率

【０１５８】

【表７】

	CD3刺激			腫瘍抽出物		
	GFP	12942 EL /12947 KK	12942 /12947	GFP	12942 EL /12947 KK	12942 /12947
PD1発現	32.2%	31.5%	14.1%	22.9%	13.8%	7.5%
%生存率TIL	30.3%	34.2%	45.6%	18%	32%	47.9%
腫瘍細胞の %生存率	該当なし	該当なし	該当なし	45.7%	33.1%	19.6%
%PD1+分裂細胞	1.6%	0.9%	0.3%	1.1%	0.3%	0.1%
%PD1-分裂細胞	3.9%	3.0%	2.1%	3.0%	1.4%	0.8%

【０１５９】
表７のデータは、細胞が抗ＣＤ３抗体によって刺激されるとき、ＰＤ１特異的ＺＦＮの活動を通してＰＤ１発現を減少させ、細胞の生存率の増加をもたらすことを示す。形質導入された細胞が腫瘍で処理されるとき、同じ減少が観察される、即ち、ＰＤ１においてＺＦＮ媒介される減少は、ＴＩＬ生存率の増加をもたらす。また、データは、形質導入されたＴＩＬにおけるＰＤ１発現の減少が腫瘍細胞の生存率の減少をもたらすことを示す。
【０１６０】
実施例４：ＰＤ１編集された一次ヒトＴ細胞の精製
実施例１で上述されるように、さらに精錬されたＰＤ１特異的ＺＦＮ対がＣＤ４＋Ｔ細胞において試験された。図５に見られるように、最大４４％の編集がいくつかの対で観察された。この実験において、「陽性対照」は、異なる実験条件下で前に行われたＣＤ８＋Ｔ細胞において２５０２５／１２９４２ＺＦＮ対を使用する切断を示す。
【０１６１】
単離ＰＤ１修飾細胞にさらに使用するために、主要対の１つである２５０２９／１２９４２が選択された。簡潔に、これらの実験において、ＣＤ４＋Ｔ細胞を、ＰＤ１特異的ＺＦＮをコードするｍＲＮＡで処理し、「３０℃」条件下で培養し、次いで実施例１に上述されるように、ＺＦＮ導入遺伝子の強い発現を刺激し、ＰＤ１遺伝子座での開裂を促進する抗ＣＤ３／ＣＤ８ビーズ（Ｄｙｎａｌ）に最初に露出することにより刺激した（米国特許公開第２００８０３１１０９５号を参照されたい）。この最初の刺激後、細胞は、再刺激され、ＦＡＣまたは親和性クロマトグラフィーのいずれかによる精製手順を受けた。
【０１６２】
簡潔に、ＣＤ４＋Ｔ細胞をＣＣＲ５－特異的ＺＦＮ（米国特許公開第２００８０１５９９９６号）またはＰＤ１特異的ＺＦＮのいずれかで処理した。細胞を回収し、（ｉ）最初の刺激後、（ｉｉ）第２の刺激後だが、任意の精製前、（ｉｉｉ）標準的な方法論を使用して、ＣＤ２５＋（活性化のマーカー）、ＰＤ１（－）の細胞選別後、または（ｉｖ）抗ＰＤ１抗体または抗ＣＤ２５抗体のいずれかで作製されたマトリクスを使用した、親和性クロマトグラフィー後、Ｃｅｌ－Ｉアッセイ（上述）によりＰＤ１編集について分析した。
【０１６３】
図６に示されるように、細胞選別法を使用して（ＣＤ２５に対して陽性であるが、ＰＤ１に対して陰性である細胞を単離した）、最大５６％の回復した細胞がＣｅｌ－Ｉアッセイによってアッセイされるように修飾されることが分かった。親和性クロマトグラフィー法（細胞は、抗ＰＤ１抗体、抗ＣＤ２５抗体、またはその両方のいずれかを使用して作製された親和性マトリクスを受けた）により精製されたＰＤ１（－）細胞は、Ｃｅｌ－Ｉ分析によりアッセイされるように、最大４２％の全体的なＰＣ１修飾を示した。
【０１６４】
細胞選別により精製された細胞も、配列決定によりそのＰＤ１遺伝子座で分析され、結果を下の表８に表す。表からわかるように、Ｃｅｌ－Ｉ分析により予測されるパーセント標的修飾（「ＮＨＥＪ％」）は、配列決定分析によって見出されたものと類似する。この表において、「サンプル」のラベルは、図６に示されるものに相当する。
【０１６５】
表８：ＣＤ２５＋細胞におけるパーセントＰＤ１修飾
【０１６６】

【表８】

サンプル	Cel Ｉによる NHEJ%	配列決定による NHEJ%	修飾された数*	挿入	欠失
4	43	62	87のうち54	54のうち3	54のうち51
8	56	81	80のうち65	65のうち4	65のうち61
13	42	59	73のうち43	43のうち1	43のうち42

【０１６７】
＊「修飾された数」は、修飾されたことが観察された配列決定基における配列の数を示す。例えば、サンプル４では、分析された８７のうち５４の配列が修飾された。

【０１６８】
ＰＤ１特異的ＺＦＮもＣＤ８＋Ｔ細胞において試験された。この実験において、ＰＤ１特異的ＺＦＮをコードするｍＲＮＡは、Ｒｉｂｏｍａｘ Ｌａｒｇｅ Ｓｃａｌｅ ＲＮＡ ＰｒｏｄｕｃｔｉｏｎＴ７キット（Ｐｒｏｍｅｇａ）、続いてＲＮｅａｓｙ ｍｉｎｉ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して産生され、両方とも製造者のプロトコルに従った。上述のように、Ａｍａｘａ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ送達系を使用して細胞を形質導入するために、様々な量のｍＲＮＡを使用し、パーセントＰＤ１修飾は、Ｃｅｌ Ｉアッセイにより分析された。

【０１６９】
図７に示されるように、「ＮＨＥＪ％」として記載される、観察された修飾の量は、使用されたｍＲＮＡの量に関連し、ｍＲＮＡの入力量が少ないと、標的修飾のパーセンテージが小さくなる。

【０１７０】
これらの結果は、本明細書に記載されるＰＤ１特異的ＺＦＮが細胞系および一次Ｔ細胞においてＰＤ１遺伝子座を修飾することができることを示す。

【０１７１】
本明細書に記述される全ての特許、特許出願、および刊行物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０１７２】
開示は、理解を明確にする目的のために図示および例としてある程度詳細に提供されてきたが、様々な変更および修正が本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく実践され得ることは当業者に明らかであろう。したがって、前述の説明および実施例は、制限されるものと解釈されるべきではない。

【図１】

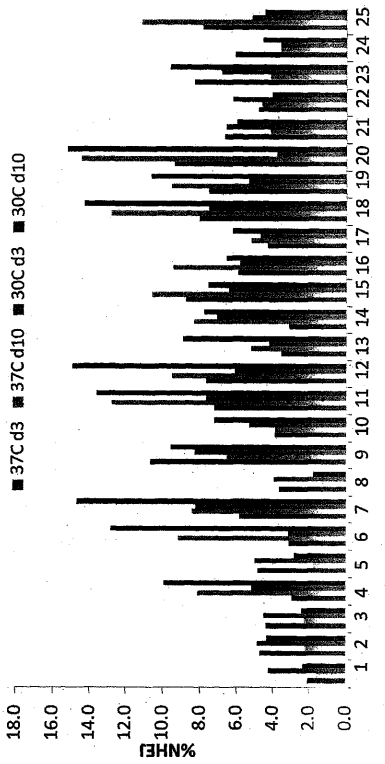
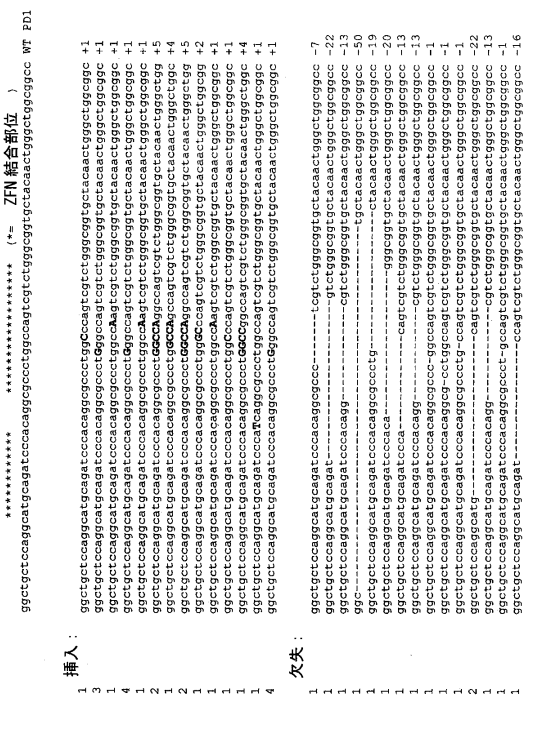


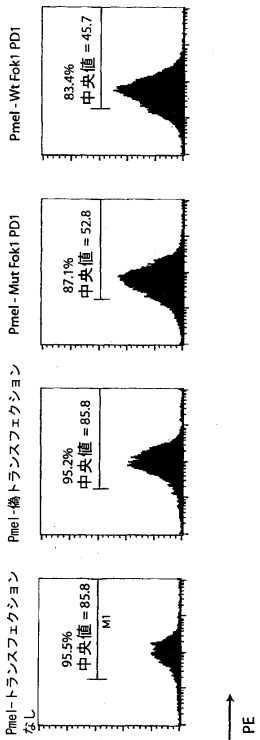
Figure 1

【図２】



【図３】

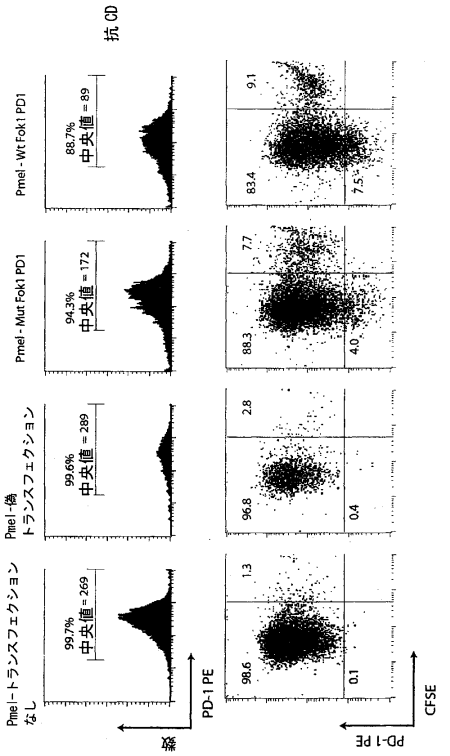
図３　Mut FokI または WT FokI DNA のいずれかを用いた PmeI T 細胞のトランスフェクションは抗 CD3 刺激後の PD1 の発現を減少させる



	トランスフェクション なし	偽トランスフェクション	14546 FokI EL, +14545 FokI KK	14546 + 14545
PD1 の発現%	95.5%	95.2%	87.1%	83.4%

【図４】

図４　Mut FokI または WT FokI DNA のいずれかを用いてトランスフェクトされた PmeI T 細胞において PD1 発現は 72 時間の時点でなお減少する



【図５】

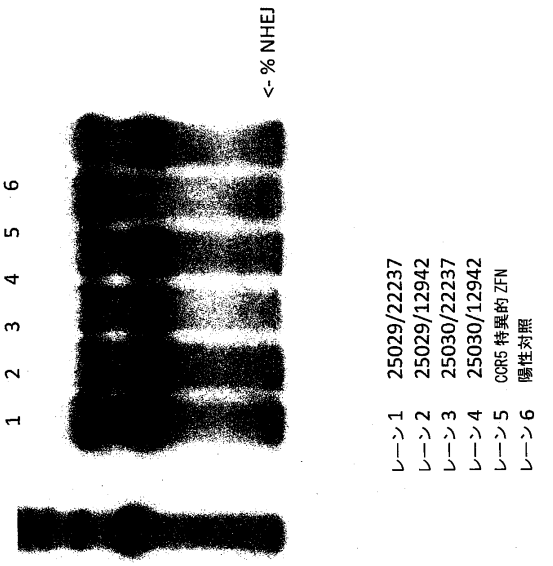
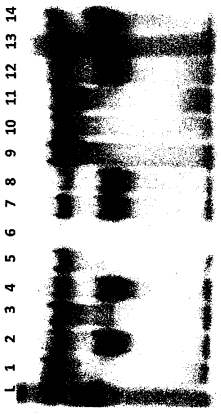


図５

【図６】



サンプル#	サンプルの内容	% NHEJ
1	CCR5 ZFN、最初の刺激	0
2	PD1 ZFN、最初の刺激	41.8
3	CCR5 ZFN、選別前の第２の刺激	0
4	PD1 ZFN、選別前の第２の刺激	42.6
5	CCR5 ZFN、PD1+ CD25+について選別した後の第２の刺激	0
6	CCR5 ZFN、PD1- CD25+について選別した後の第２の刺激	0
7	PD1 ZFN、PD1+ CD25+について選別した後の第２の刺激	36.6
8	PD1 ZFN、PD1- CD25+について選別した後の第２の刺激	56.4
9	CCR5 ZFN、第２の刺激、PD1+ビーズ精製	0
10	CCR5 ZFN、第２の刺激、PD1-、CD25 ビーズ精製	0
11	CCR5 ZFN、第２の刺激、PD1-、CD25+ビーズ精製	0
12	PD1 ZFN、第２の刺激、PD1+ビーズ精製	29.6
13	PD1 ZFN、第２の刺激、PD1-、CD25+ビーズ精製	42
14	PD1 ZFN、第２の刺激、PD1-、CD25- ビーズ精製	48

図６

【図７】

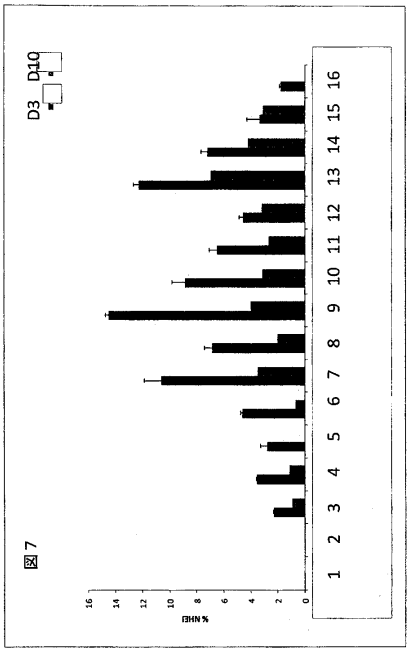


図７

【配列表】
0005976661000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
Ａ６１Ｐ	***35/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/02
Ａ６１Ｋ	***45/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	45/00
Ｃ１２Ｎ	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/10

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(72)発明者 フィリップ ディー. グレゴリー
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, スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド
(72)発明者 マイケル シー. ホームズ
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, スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド
(72)発明者 マシュー シー. メンデル
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, スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド
(72)発明者 メン シャンドン
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, スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド
(72)発明者 デイビッド パッション
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, スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド
(72)発明者 アンドレアス ライク
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, スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド
(72)発明者 フョードル ウルノフ
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, スート エー１００, シー／オー サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド

審査官 水野 浩之

(56)参考文献 国際公開第２００９／０４２１６３（WO, Ａ１）
特表２００５－５００６６８（ＪＰ, Ａ）
特表２００３－５０７４９１（ＪＰ, Ａ）
Shinohara,T.et al., "Accession:U64863.1[gi:2149002],Definition:Human hPD-1 (hPD-1) mRNA, complete cds.", NCBI Entrez Nucleotide[online];12-OCT-2005 uploaded,NCBI, [retrieved on 20 August 2015],Retrieved from the Internet, ＵＲＬ, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

nuccore/2149002
Int Immunol.,2007 Jul,19(7),p.813-24,Epub 2007 Jul 2
Methods Mol Biol.,2010 Jan 21;623,p.325-39
Blood,2009 Aug 20,114(8),p.1457-8
FEBS Lett.,2005 Feb 7,579(4),p.892-4
Nucleic Acids Res.,2005 Oct 26,33(18),p.5978-90

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＣＡｐｌｕｓ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）