

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7275152号

(P7275152)

(45)発行日 令和5年5月17日(2023.5.17)

(24)登録日 令和5年5月9日(2023.5.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

C 1 2 N 15/55

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 9/16

Z Z N A

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864

1 0 0 Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

1 0 0

請求項の数 35 (全106頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-542727(P2020-542727)

(86)(22)出願日 平成31年2月8日(2019.2.8)

(65)公表番号 特表2021-513338(P2021-513338
A)

(43)公表日 令和3年5月27日(2021.5.27)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/017273

(87)国際公開番号 WO2019/157324

(87)国際公開日 令和1年8月15日(2019.8.15)

審査請求日 令和4年1月11日(2022.1.11)

(31)優先権主張番号 62/628,016

(32)優先日 平成30年2月8日(2018.2.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/728,226

(32)優先日 平成30年9月7日(2018.9.7)

最終頁に続く

(73)特許権者 508241200

サンガモ セラピューティクス, インコ
ーポレイテッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4

0 0 5 プリズベン マリーナ ブール

バード 7 0 0 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 操作された標的特異的なヌクレアーゼ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1 Z F N および第2の Z F N のヘテロ二量体を含むジंकフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) であって、ここで:

(a) 前記第1の Z F N が:

(i) F 1 から F 5 の順の5つのジंकフィンガードメインであって、ここで、F 1 が Q S G N L A R (配列番号19) であり、F 2 が L K Q N L C M (配列番号15) であり、F 3 が W Q S N L Q N (配列番号20) であり、F 4 が T S G N L T R (配列番号17) であり、そして、F 5 が R R S H L T S (配列番号21) である、F 1 から F 5 の順の5つのジंकフィンガードメイン、および、

(i i) 第1の操作された F o k I 切断ドメイン
を含み、そして、

(b) 前記第2の Z F N が:

(i) F 1 から F 6 の順の6つのジंकフィンガードメインであって、ここで、F 1 が Q S S D L S R (配列番号30) であり、F 2 が L K H N L L T (配列番号25) であり、F 3 が D Q S N L R A (配列番号31) であり、F 4 が R N F S L T M (配列番号27) であり、F 5 が L R H D L E R (配列番号32) であり、F 6 が H R S N L N K (配列番号29) である、F 1 から F 6 の順の6つのジंकフィンガードメイン、および、

(i i) 第2の操作された F o k I 切断ドメイン
を含む、Z F N。

【請求項 2】

必要に応じて A A V ベクターに担持される、請求項 1 に記載の第 1 および第 2 の Z F N をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記第 1 の Z F N をコードする第 1 のポリヌクレオチドが、表 4 に示される配列を含む A A V ベクターを含み、前記第 2 の Z F N をコードする第 2 のポリヌクレオチドが、表 5 に示される配列を含む A A V ベクターを含み、請求項 2 に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記第 1 の Z F N をコードする前記 A A V ベクターが、配列番号 4 3 に示される配列を含む、請求項 2 または 3 に記載の A A V ベクター。

10

【請求項 5】

前記第 2 の Z F N をコードする前記 A A V ベクターが、配列番号 5 6 に示される配列を含む、請求項 2 または 3 に記載の A A V ベクター。

【請求項 6】

必要に応じて幹細胞もしくは前駆細胞である、請求項 1 に記載の 1 つもしくは複数の Z F N、請求項 2 から 3 のいずれかに記載の 1 つもしくは複数のポリヌクレオチド、ならびに／または請求項 4 および 5 に記載の 1 つもしくは複数の A A V ベクターを含む細胞。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の 1 つもしくは複数の Z F N、請求項 2 から 3 のいずれかに記載の 1 つもしくは複数のポリヌクレオチド、請求項 4 および 5 に記載の 1 つもしくは複数の A A V ベクター、ならびに／または請求項 6 に記載の 1 つもしくは複数の細胞を含む医薬組成物。

20

【請求項 8】

対象において内因性アルブミン遺伝子を切断するための、請求項 1 に記載の 1 つもしくは複数の Z F N、請求項 2 または 3 に記載の 1 つもしくは複数のポリヌクレオチド、請求項 4 または 5 に記載の 1 つもしくは複数の A A V ベクター、請求項 6 に記載の 1 つもしくは複数の細胞を含む組成物、ならびに／または請求項 7 に記載の 1 つもしくは複数の医薬組成物。

【請求項 9】

前記対象に、必要に応じて A A V ベクターに担持されるドナーと組み合わせて投与されることを特徴とし、それにより前記ドナーが、前記対象において切断された前記アルブミン遺伝子に組み込まれる、請求項 8 に記載の組成物または医薬組成物。

30

【請求項 10】

対象の細胞において内因性アルブミン遺伝子を切断するための、請求項 1 に記載の 1 つもしくは複数の Z F N、請求項 2 または 3 に記載の 1 つもしくは複数のポリヌクレオチド、請求項 4 または 5 に記載の 1 つもしくは複数の A A V ベクター、請求項 6 に記載の 1 つもしくは複数の細胞を含む組成物、ならびに／または請求項 7 に記載の 1 つもしくは複数の医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の 1 つもしくは複数の Z F N、請求項 2 から 3 のいずれかに記載の 1 つもしくは複数のポリヌクレオチド、請求項 4 および 5 に記載の 1 つもしくは複数の A A V ベクター、請求項 6 に記載の 1 つもしくは複数の細胞ならびに／または請求項 7 に記載の 1 つもしくは複数の医薬組成物を含むキット。

40

【請求項 12】

組成物であって、以下：

(a) 第 1 のジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) をコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、前記第 1 の Z F N が：

(i) F 1 から F 5 の順の 5 つのジンクフィンガードメインであって、ここで、F 1 が Q S G N L A R (配列番号 1 9) であり、F 2 が L K Q N L C M (配列番号 1 5) であり、F 3 が W Q S N L Q N (配列番号 2 0) であり、F 4 が T S G N L T R (配列番号 1 7)

50

）であり、そして、F 5がRRSHLTS（配列番号21）である、F 1からF 5の順の5つのジंकフィンガードメイン、および、

（i i）第1の操作されたF o k I切断ドメイン

を含み、そして、必要に応じて、前記第1のポリヌクレオチドが、表4または配列番号43に示される配列を含むAAVベクターを含む、第1のポリヌクレオチド；

（b）第2のZFNをコードする第2のポリヌクレオチドであって、前記第2のZFNが：

（i）F 1からF 6の順の6つのジंकフィンガードメインであって、ここで、F 1がQSSDL SR（配列番号30）であり、F 2がLKHNLLT（配列番号25）であり、F 3がDQSNLRA（配列番号31）であり、F 4がRNFS LTM（配列番号27）であり、F 5がLRHDLER（配列番号32）であり、F 6がHRSN LNK（配列番号29）である、F 1からF 6の順の6つのジंकフィンガードメイン、および、

（i i）第2の操作されたF o k I切断ドメイン

を含み、そして、必要に応じて、前記第2のポリヌクレオチドが、表5または配列番号56に示される配列を含むAAVベクターを含む、第2のポリヌクレオチド；ならびに、

（c）第IX因子（FIX）配列をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチドを含む組成物。

【請求項13】

前記ドナーポリヌクレオチドが、表6に示される配列、必要に応じて配列番号59に示される配列を含むAAVベクターである、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

前記第1の、第2の、およびドナーポリヌクレオチドが、別々のAAVベクターに担持される、請求項12または13に記載の組成物。

【請求項15】

それを必要とする対象においてFIX導入遺伝子を発現させるための請求項12から14のいずれかに記載の組成物であって、前記ZFNが前記対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、前記FIXの配列が切断された前記アルブミン遺伝子に組み込まれ、FIXタンパク質が前記対象において発現されるように、前記組成物が前記対象に投与されるものである、組成物。

【請求項16】

前記FIXタンパク質の発現の後、前記対象において血友病が処置される、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

それを必要とする対象においてFIXタンパク質を発現させるための、請求項12から14のいずれかに記載の1つまたは複数の組成物。

【請求項18】

前記対象が、血友病を有し、前記FIXタンパク質の発現が、前記疾患を処置および／または防止する、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

請求項12から14のいずれかに記載の1つまたは複数の組成物を含むキット。

【請求項20】

組成物であって、以下：

（a）第1のジंकフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）をコードする第1のポリヌクレオチドであって、前記第1のZFNが：

（i）F 1からF 5の順の5つのジंकフィンガードメインであって、ここで、F 1がQSGN LAR（配列番号19）であり、F 2がLKQN LCM（配列番号15）であり、F 3がWQSN LQN（配列番号20）であり、F 4がTSGN LTR（配列番号17）であり、そして、F 5がRRSHLTS（配列番号21）である、F 1からF 5の順の5つのジंकフィンガードメイン、および、

（i i）第1の操作されたF o k I切断ドメイン

を含み、そして、必要に応じて、前記第1のポリヌクレオチドが、表4または配列番号

10

20

30

40

50

4 3 に示される配列を含む A A V ベクターを含む、第 1 のポリヌクレオチド；

(b) 第 2 の Z F N をコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、前記第 2 の Z F N が：

(i) F 1 から F 6 の順の 6 つのジンクフィンガードメインであって、ここで、F 1 が Q S S D L S R (配列番号 3 0) であり、F 2 が L K H N L L T (配列番号 2 5) であり、F 3 が D Q S N L R A (配列番号 3 1) であり、F 4 が R N F S L T M (配列番号 2 7) であり、F 5 が L R H D L E R (配列番号 3 2) であり、F 6 が H R S N L N K (配列番号 2 9) である、F 1 から F 6 の順の 6 つのジンクフィンガードメイン、および、

(ii) 第 2 の操作された F o k I 切断ドメイン

を含み、そして、必要に応じて、前記第 2 のポリヌクレオチドが、表 5 または配列番号 5 6 に示される配列を含む A A V ベクターを含む、第 2 のポリヌクレオチド；ならびに、

(c) イズロン酸-2-スルファターゼ (I D S) 配列をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチド

を含む組成物。

【請求項 2 1】

前記ドナーポリヌクレオチドが、表 7 に示される配列、必要に応じて配列番号 6 5 に示される配列を含む A A V ベクターである、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記第 1 の、第 2 の、およびドナーポリヌクレオチドが、別々の A A V ベクターに担持される、請求項 2 0 または 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

それを必要とする対象において I D S 導入遺伝子を発現させるための請求項 2 0 から 2 2 のいずれかに記載の組成物であって、前記 Z F N が前記対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、前記 I D S 配列が切断された前記アルブミン遺伝子に組み込まれ、I D S タンパク質が前記対象において発現されるように、前記組成物が前記対象に投与されるものである、組成物。

【請求項 2 4】

前記 I D S 配列の発現の後、前記対象において M P S I I が処置される、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

それを必要とする対象において I D S タンパク質を発現させるための、請求項 2 0 から 2 2 のいずれかに記載の 1 つまたは複数の組成物。

【請求項 2 6】

前記対象が、M P S I I 疾患を有し、前記 I D S タンパク質の発現が、前記疾患を処置および／または防止する、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

請求項 2 0 から 2 2 のいずれかに記載の 1 つまたは複数の組成物を含むキット。

【請求項 2 8】

組成物であって、以下：

(a) 第 1 のジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) をコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、前記第 1 の Z F N が：

(i) F 1 から F 5 の順の 5 つのジンクフィンガードメインであって、ここで、F 1 が Q S G N L A R (配列番号 1 9) であり、F 2 が L K Q N L C M (配列番号 1 5) であり、F 3 が W Q S N L Q N (配列番号 2 0) であり、F 4 が T S G N L T R (配列番号 1 7) であり、そして、F 5 が R R S H L T S (配列番号 2 1) である、F 1 から F 5 の順の 5 つのジンクフィンガードメイン、および、

(ii) 第 1 の操作された F o k I 切断ドメイン

を含み、そして、必要に応じて、前記第 1 のポリヌクレオチドが、表 4 または配列番号 4 3 に示される配列を含む A A V ベクターを含む、第 1 のポリヌクレオチド；

(b) 第 2 の Z F N をコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、前記第 2 の Z F N が：

(i) F 1 から F 6 の順の 6 つのジンクフィンガードメインであって、ここで、F 1 が

10

20

30

40

50

Q S S D L S R (配列番号 30)であり、F2が L K H N L L T (配列番号 25)であり、F3が D Q S N L R A (配列番号 31)であり、F4が R N F S L T M (配列番号 27)であり、F5が L R H D L E R (配列番号 32)であり、F6が H R S N L N K (配列番号 29)である、F1からF6の順の6つのジンクフィンガードメイン、および、(i i) 第2の操作された F o k I 切断ドメイン

を含み、そして、必要に応じて、前記第2のポリヌクレオチドが、表5または配列番号56に示される配列を含む A A V ベクターを含む、第2のポリヌクレオチド；ならびに、(c) アルファールイズロニダーゼ (I D U A) 配列をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチドを含む組成物。

10

【請求項 29】

前記ドナーが、表8に示される配列、必要に応じて配列番号72に示される配列を含む、請求項28に記載の組成物。

【請求項 30】

前記第1の、第2の、およびドナーポリヌクレオチドが、別々の A A V ベクターに担持される、請求項28または請求項29に記載の組成物。

【請求項 31】

それを必要とする対象において I D U A 導入遺伝子を発現させるための請求項28から30のいずれかに記載の組成物であって、前記 Z F N が前記対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、前記 I D U A 配列が切断された前記アルブミン遺伝子に組み込まれ、I D U A タンパク質が前記対象において発現されるように、前記組成物が前記対象に投与されるものである、組成物。

20

【請求項 32】

前記 I D U A 配列の発現の後、前記対象において M P S I が処置される、請求項31に記載の組成物。

【請求項 33】

それを必要とする対象において I D U A タンパク質を発現させるための、請求項28から30のいずれかに記載の1つまたは複数の組成物。

【請求項 34】

前記対象が、M P S I 疾患を有し、前記 I D U A タンパク質の発現が、前記疾患を処置および／または防止する、請求項33に記載の組成物。

30

【請求項 35】

請求項28から30のいずれかに記載の1つまたは複数の組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年2月8日付けで出願された米国仮出願第62／628,016号；2018年9月7日付けで出願された米国仮出願第62／728,226号；2018年11月12日付けで出願された米国仮出願第62／758,786号；2019年1月23日付けで出願された米国仮出願第62／795,937号；および2019年2月6日付けで出願された米国仮出願第62／802,092号の利益を主張し、これらの開示は、これにより参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究で行われた発明への権利の陳述

該当なし。

【0003】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出され、これにより参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含有する。前記 A S C I I コピーは、2019年2

50

月8日に作成され、8325016940SL.txtと名付けられ、54,302バイトのサイズである。

【0004】

技術分野

本開示は、ポリペプチドおよびゲノム工学および相同組換えの分野にある。

【背景技術】

【0005】

人工ヌクレアーゼ、例えば操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、RNA誘導型ヌクレアーゼとも称される操作されたcrRNA/tracrRNA(「単一ガイドRNA」)を有するCRISPR/Cas系、および/またはアルゴノート系に基づくヌクレアーゼ(例えば、「TtAgo」として公知のT. thermophilus由来(Swartz et al (2014) Nature 507(7491):258-261)は、切断ドメインと会合するかまたはそれに作動可能に連結したDNA結合ドメイン(ヌクレオチドまたはポリペプチド)を含み、ゲノム配列の標的化された変更で使用されてきた。例えば、ヌクレアーゼは、外因性配列を挿入する、1つまたは複数の内因性遺伝子を不活性化し、遺伝子発現パターンが変更された生物(例えば、作物)および細胞系を作り出すことなどに使用されてきた。例えば、米国特許第9,255,250号;同第9,200,266号;同第9,045,763号;同第9,005,973号;同第8,956,828号;同第8,945,868号;同第8,703,489号;同第8,586,526号;同第6,534,261号;同第6,599,692号;同第6,503,717号;同第6,689,558号;同第7,067,317号;同第7,262,054号;同第7,888,121号;同第7,972,854号;同第7,914,796号;同第7,951,925号;同第8,110,379号;同第8,409,861号;米国特許公報第20030232410号;同第20050208489号;同第20050026157号;同第20050064474号;同第20060063231号;同第20080159996号;同第201000218264号;同第20120017290号;同第20110265198号;同第20130137104号;同第20130122591号;同第20130177983号および同第20130177960号および同第20150056705号を参照されたい。例えば、ヌクレアーゼの対(例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、dCas-Fok融合体)は、ゲノム配列を切断するのに使用することができる。対の各メンバーは、一般的に、ヌクレアーゼの1つまたは複数の切断ドメイン(またはハーブドメイン)に連結された操作された(天然に存在しない)DNA結合タンパク質を含む。DNA結合タンパク質がその標的部位に結合すると、そのDNA結合タンパク質に連結されている切断ドメインは、二量体化とそれに続くゲノムの切断を起こすことができるように配置される。

【0006】

ジンクフィンガータンパク質に関して、標的DNA配列へのZFPの特異性は、ジンクフィンガードメインと特異的なDNA塩基との配列特異的な接触に依存する。加えて、ジンクフィンガードメインは、DNA主鎖のリン酸との非特異的なイオン対相互作用に関与するアミノ酸残基も含む。Elrod-Erickson et al ((1996) Structure 4:1171)は、ジンクフィンガータンパク質とそのコグネートDNA標的との共結晶化によって、水素結合の形成を介してDNA主鎖上のリン酸と相互作用することが可能な特異的なアミノ酸が存在することを実証した。周知のZif268主鎖を用いるジンクフィンガータンパク質は、典型的には、β-シートのその第2の鎖のアミノ末端残基としてアルギニンを有し、この残基は、第2の不変システインからカルボキシル末端側に2番目の位置でもある。この位置は、各ジンクフィンガードメイン内の(-5)と称することができ、これは、この位置が、α-ヘリックスの開始に先行する5番目の残基であるためである。この位置のアルギニンは、その側鎖のグアニジニウム基との電荷を有する水素結合の形成によりDNA主鎖上のリン酸と相互作用することができる。Zif268主鎖中のジンクフィンガー

10

20

30

40

50

タンパク質は、第1の不変システインから4残基アミノ末端側の位置にリシンを有することも多い。この位置は、各フィンガー内の(−14)と称することができ、これは、この位置が、亜鉛が配位しているシステイン残基間に2つの残基を有するジンクフィンガーの α -ヘリックスの開始に先行する14番目の残基であるためである。リシンは、その側鎖アミノ基との、水媒介性の電荷を有する水素結合の形成によりDNA主鎖上のリン酸と相互作用することができる。リン酸基は全てDNA主鎖に沿って見出されることから、このタイプのジンクフィンガーとDNA分子との相互作用は、一般的に、非配列特異的とみなされる(J. Miller, Massachusetts Institute of Technology Ph.D. Thesis, 2002)。

【0007】

オフターゲット切断事象を減少させるために、操作された絶対ヘテロ二量体(obligate heterodimer)の切断ハーフドメインが開発された。例えば、米国特許第7,914,796号;同第8,034,598号;同第8,961,281号および同第8,623,618号;米国特許公報第20080131962号および同第20120040398号を参照されたい。これらの絶対ヘテロ二量体は、異なる操作された切断ドメインがZFPによって適切な標的部位に配置された場合にのみ、二量体化しその標的を切断し、それによって、単量体のオフターゲット切断を低減および/または消失させる。

最も効率的な人工ヌクレアーゼを産生するために調査され得る別のエリアは、人工ヌクレアーゼをコードする遺伝子に含まれ得る非コード配列中にある。例えば、mRNA分子中の3'非翻訳領域(「UTR」)は、転写後レベルで遺伝子発現の調節において重要な役割を果たし得る。3'UTRは、mRNAの構造的成分と、特異的なトランス作用性RNA結合タンパク質および非コードRNAとの間の組織化された相互作用によって、mRNAの発現を制御し(Vislovukh et al (2014) World J Biol Chem 5(1):40-57)、ポリアデニル化配列も含む。一般的に使用される3'UTRの例は、SV40ウイルスポリA断片、ウシ成長ホルモン(BGH)遺伝子由来のポリA領域、およびウサギベータグロビンUTRである(Ludwig, Dale (2006) BioProcess International supplement)。5'UTRは、高等真核生物において100~200bpの長さであり、高いGC含量(しばしば>60%)を含み得る。これらの配列は、リボソーム結合のためのコザックコンセンサス配列、およびキャップ結合のための配列などのエレメントを含んでいてもよい。高いGC含量は、翻訳効率に影響を与えることができ、内部リボソーム進入部位(IRES)として公知の複雑なヘアピン構造(シス作用性調節配列として公知)をもたらすことができる。5'UTRは、発現を調節するための遺伝子特異的な調節タンパク質(例えば鉄調節タンパク質)に結合するための配列を有することもでき、翻訳機構との相互作用を提供することなどの他の機能において役割を果たすこともできる(Araujo et al (2012) Comp and Funct Genom (2012) doi:10.1155/2012/475731)。一般的に使用される5'UTR配列の例は、ベータグロビン5'UTRである。UTRは、しばしば3'UTRにおけるシス作用性エレメントによって媒介される転写後レベルでの遺伝子調節の空間的な制御において役割を有することもできる(Mignone et al (2002) Genome Biol 3(3):PMCID:PMC139023)。

しかしながら、強化された転写/翻訳効率を提供するため、ならびにヌクレアーゼの活性および/または特異性を増加させるための、操作されたヌクレアーゼ切断システムへの追加の方法および組成物の必要が依然としてある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】米国特許第9,255,250号明細書

米国特許第9,200,266号明細書

米国特許第9,045,763号明細書

米国特許第9,005,973号明細書

米国特許第8,956,828号明細書

米国特許第 8, 9 4 5, 8 6 8 号明細書
 米国特許第 8, 7 0 3, 4 8 9 号明細書
 米国特許第 8, 5 8 6, 5 2 6 号明細書
 米国特許第 6, 5 3 4, 2 6 1 号明細書
 米国特許第 6, 5 9 9, 6 9 2 号明細書
 米国特許第 6, 5 0 3, 7 1 7 号明細書
 米国特許第 6, 6 8 9, 5 5 8 号明細書
 米国特許第 7, 0 6 7, 3 1 7 号明細書
 米国特許第 7, 2 6 2, 0 5 4 号明細書
 米国特許第 7, 8 8 8, 1 2 1 号明細書
 米国特許第 7, 9 7 2, 8 5 4 号明細書
 米国特許第 7, 9 1 4, 7 9 6 号明細書
 米国特許第 7, 9 5 1, 9 2 5 号明細書
 米国特許第 8, 1 1 0, 3 7 9 号明細書
 米国特許第 8, 4 0 9, 8 6 1 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 2 3 2 4 1 0 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 0 8 4 8 9 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 2 6 1 5 7 号明細書
 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 0 6 3 2 3 1 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 1 5 9 9 9 6 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 1 7 2 9 0 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 6 5 1 9 8 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 3 7 1 0 4 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 2 2 5 9 1 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 7 9 8 3 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 7 9 6 0 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 0 5 6 7 0 5 号明細書
 米国特許第 8, 0 3 4, 5 9 8 号明細書
 米国特許第 8, 9 6 1, 2 8 1 号明細書
 米国特許第 8, 6 2 3, 6 1 8 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 1 3 1 9 6 2 号明細書
 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 4 0 3 9 8 号明細書

10

20

30

【非特許文献】

【0 0 0 9】

【文献】 Swarts et al (2014) Nature 507(7491):258-261

Elrod-Erickson et al ((1996) Structure 4:1171)

J. Miller, Massachusetts Institute of Technology Ph.D. Thesis, 2002

Vislovukh et al (2014) World J Biol Chem 5(1):40-57

Ludwig, Dale (2006) BioProcess International supplement

Araujo et al (2012) Comp and Funct Genom (2012) doi:10.1155/2012/475731

Mignone et al (2002) Genome Biol 3(3):PMCID:PMC139023

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 0】

本開示は、人工ヌクレアーゼの発現を増加させる、ならびにその意図した標的に対する
 ヌクレアーゼ（例えば、ヌクレアーゼ対）の効率（活性）および／または特異性を増加さ
 せるための方法および組成物を提供する。したがって、人工ヌクレアーゼの発現を強化す
 る 5' および／または 3' 非翻訳配列におけるエレメントを含む操作されたプロモーターを
 含む、人工ヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALE

50

N、CRISPR/Casヌクレアーゼ)を発現させるためのポリヌクレオチド(例えば、DNA発現ベクターまたはmRNA)が本明細書に記載される。必要に応じて、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、低分子ペプチド(これらに限定されないが、ペプチドタグおよび/または核局在化配列などのポリカチオン性ペプチドを含む)をコードする配列をさらに含む、ならびに/あるいはDNA結合ドメイン領域(例えば、ジンクフィンガータンパク質の主鎖またはTALE)における1つもしくは複数の変異、および/またはFokIヌクレアーゼ切断ドメインもしくは切断ハーフドメインにおける1つもしくは複数の変異を含む。これらのポリヌクレオチド成分が、個々に、または任意の組合せで(例えば、任意の組合せでの、FLAG(例えば、3×FLAG)、NLS、WPREおよび/またはポリAシグナルなどのペプチド配列)使用される場合、本発明の方法および組成物は、導入遺伝子の切断および/もしくは標的化組込みの効率を増加させた、*in vitro*もしくは*in vivo*での人工ヌクレアーゼの発現(例えば、本明細書に記載される配列/改変を有さないヌクレアーゼと比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍、またはそれよりも多い切断)、ならびに/または標的化特異性(オフターゲット効果の低減)の驚くべき、かつ予想外の増加を提供する。本開示は、目的の領域における細胞クロマチンの標的化された切断、および/または細胞中の所定の目的の領域での標的化組込みを介した導入遺伝子の組み込みのために、これらの組成物を使用する方法も提供する。

【0011】

したがって、ヌクレアーゼ(例えば、ZFN、TALEN、CRISPR/Casヌクレアーゼなど)をコードするポリヌクレオチド(mRNA、プラスミド、ウイルスベクター、例えばAAV)、以下のエレメント：(i)必要に応じてヌクレアーゼをコードする配列に対して5'の、ポリカチオン性配列(例えば、3×FLAG配列)をコードする配列；(ii)必要に応じてヌクレアーゼをコードする配列に対して5'の、5'UTR配列(例えば、Xenopusのベータグロビン配列、例えば配列番号1に示される)；(iii)ヌクレアーゼコード配列に対して3'および/もしくは5'の、WPRE配列；(iv)ヌクレアーゼドメイン(例えば、ZFNのリン酸主鎖残基)の主鎖(非DNA結合残基)をコードする配列への改変；(v)ヌクレアーゼの切断ドメイン配列への改変(例えば、操作されたFokIドメイン)；(vi)必要に応じてヌクレアーゼをコードする配列に作動可能に連結した、組織特異的プロモーターおよび/もしくはエンハンサー(例えば、hAAT、ApoEなど)；(vii)NLS配列(ヌクレアーゼをコードする配列に対して5'または3')；ならびに/または(viii)ポリA配列の任意の組合せの少なくとも1、2、3、4、5、6、7または8つをさらに含むポリヌクレオチドが本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、mRNAである。他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、さらに必要に応じてITRを含むAAVベクター、例えば、添付の図面および/または表中の構築物のいずれかで示されるAAVベクターである。単一のポリヌクレオチドが、ヌクレアーゼの一部または全部の成分、例えば、ZFNの対、単一ガイドRNAなどをコードしていてもよい。あるいは、別々のポリヌクレオチド(同一または異なるタイプの)が、ヌクレアーゼの成分、例えば、それぞれ1種のZFNをコードする別々のヌクレオチド、またはZFNのTALENもしくはTALEN対をコードしていてもよい。したがって、1つまたは複数のヌクレアーゼ(例えば、ZFN)をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド(例えば、AAVベクター)が本明細書で提供される。本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、少なくとも1つのドナーの標的化された切断および/または組み込みのための*in vitro*、*ex vivo*および/または*in vivo*の方法のために使用でき、ヌクレアーゼ活性(切断および/または組み込み)および/または特異性(オフターゲット活性と比較したオンターゲット活性)を、1~50倍(またはそれらの間の、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍などを含む任意の値)増加させることができる。

【0012】

一態様では、本発明は、所望の組織で人工ヌクレアーゼを発現させるための組織特異的プロモーターを含むポリヌクレオチドを記載している。一部の実施形態では、組織特異的プロモーターは、肝臓特異的プロモーターである。さらなる実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、ヒト- $\alpha 1$ 抗トリプシンプロモーター (hAAT) またはトランスチレチン最小プロモーター (米国特許公報第20170119906号を参照) である。一部の 경우에는、肝臓特異的プロモーターは、ApoEエンハンサー配列を含む (Shachter et al. (1993) J. Lipid Res 34(10):1699-707)。一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、1つまたは複数のApoEエンハンサー配列を含む (例えば、1、2、3および/または4つ; Okuyama et al. (1996) Hum Gen Ther 7(5):637-45を参照)。さらなる実施形態では、プロモーターは、イントロンに連結されている。好ましい実施形態では、イントロンは、ヒト β -グロビン遺伝子の第1のイントロン由来の5'ドナー部位およびブランチ、ならびに免疫グロブリン遺伝子の重鎖可変領域のイントロン由来の3'アクセプター部位を含むHGG-I GGキメライントロンである。本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、cDNA構築物 (例えばAAVなどのウイルスベクターに担持される)、mRNA、プラスミドDNA、またはゲノムへの挿入のための発現カセットの一部であり得る。

【0013】

したがって、一態様では、ヌクレアーゼをコードするmRNAまたはAAVベクターであって、転写および翻訳効率を増加させるためのエレメントを含む、mRNAまたはAAVベクターが本明細書に記載される。一部の実施形態では、エレメントは、天然または人工の5'および/または3'UTR配列などの非翻訳配列を含む。一部の態様では、5'UTR配列は、発現カセット中に含まれ、一方で他の態様では、3'UTR配列が使用される。好ましい実施形態では、人工ヌクレアーゼをコードするmRNAまたはAAVは、5'UTRおよび3'UTRの両方を含む。一実施形態では、5'UTRは、Xenopusの β -グロビンUTRである (Falcone and Andrews (1991) Mol Cell Bio 11(5):2656-2664; Krieg and Melton (1994) Nuc Acid Res 12(18):7057を参照)。好ましい実施形態では、Xenopusの β -グロビンUTRをコードするDNA配列は、5' [TG] CTTGTTCTTTTTCAGAAAGCTCAGAAATAAACGCTCAACTTTTGGCAGAT (配列番号1) である (TGは、必要に応じたものである)。一部の態様では、ヌクレアーゼをコードするmRNAまたはAAVは、3'WPRE配列を含む (米国特許公報第20160326548号を参照)。さらなる実施形態では、WPREエレメントは、タンパク質Xの発現を防止するように「X」領域で変異している (米国特許第7, 419, 829号を参照)。一部の実施形態では、変異したWPRE配列は、トランケート型のWPREエレメントである。一部の実施形態では、変異したWPRE配列は、J02442またはJ04514ウッドチャック肝炎ウイルスのX領域中で変異している (Galibert et al (1982) J. Virol 41(1):51-65; Zanta-Boussif et al. (2009) Gene Ther 16(5):605-619)。本明細書に記載されるポリヌクレオチドで 사용할 ことができるWPRE配列の非限定的な例は、以下の実施例で示される。さらなる態様では、3'UTRは、ポリAシグナル配列を含む。これらのエレメントが組み合わせて使用される場合、ポリAシグナルは、WPRE配列に対して3'または5'であり得る。好ましい実施形態では、ポリAシグナル配列は、ウシ成長ホルモンシグナル配列である (Woychik et al (1984) Proc Natl Acad Sci 81(13):3944-8を参照)。本明細書に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 (mRNA、AAVベクター) は、ヌクレアーゼをコードする配列への改変、例えばヌクレアーゼのZFP DNA-結合ドメインの主鎖領域への改変、および/またはヌクレアーゼ (複数可) の切断ドメイン (または切断ハーフドメイン) への改変をさらに含んでもよい。

【0014】

別の態様では、これらの変異体が由来する親の (例えば、野生型) 切断ドメインおよび/またはこれらの切断ドメインを含むポリヌクレオチド (mRNA) と比較して1つまたは複数の変異を含む操作されたヌクレアーゼ切断ハーフドメインが本明細書に記載される

。本明細書に記載される変異としては、これらに限定されないが、切断ドメインの電荷を変化させる変異、例えば正電荷を有する残基から正電荷を有さない残基への変異（例えば、KおよびR残基の変異（例えば、Sへ変異している）；N残基の変異（例えば、Dへの）、およびQ残基の変異（例えば、Eへの）；分子モデリングに基づきDNA主鎖に近いと予測され、FokI相同体において変動を示す残基への変異；ならびに／または他の残基における変異（例えば、米国特許第8,623,618号およびGuo et al, (2010) J. Mol. Biol. 400(1):96-107)が挙げられる。

【0015】

ある特定の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、FokIまたはFokI相同体由来であり、配列番号2に示される野生型全長FokIに対して番号付けしたアミノ酸残基416、422、447、448、および／もしくは525の1つもしくは複数、またはFokI相同体における対応する残基に変異を含む。他の実施形態では、FokI由来の切断ハーフドメインは、野生型FokIに対して番号付けした、387、393、394、398、400、416、418、422、427、434、439、441、442、444、446、448、472、473、476、478、479、480、481、487、495、497、506、516、523、525、527、529、534、542、559、569、570、および／もしくは571の1つもしくは複数を含むアミノ酸残基414～426、443～450、467～488、501～502、および／または521～531の1つまたは複数、または任意のFokI相同体における対応する残基に変異を含む。変異は、対応する位置におけるFokIに相同な天然制限酵素に見出される残基への変異を含み得る。ある特定の実施形態では、変異は、置換、例えば、野生型残基の、任意の異なるアミノ酸、例えばアラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、ヒスチジン（H）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、アスパラギン（N）、セリン（S）またはスレオニン（T）での置換である。ある特定の実施形態では、FokIヌクレアーゼドメインは、416、422、447、479および／または525（野生型、配列番号2に対して番号付けした）の1つまたは複数に変異を含む。ヌクレアーゼドメインは、418、432、441、448、476、481、483、486、487、490、496、499、523、527、537、538および559位にも1つまたは複数の変異を含んでいてもよく、これらに限定されないが、ELD、KKR、ELE、KKSが挙げられる。例えば、米国特許第8,623,618号を参照されたい。よりさらなる実施形態では、切断ドメインは、残基（例えば、419、420、425、446、447、470、471、472、475、478、480、492、500、502、521、523、526、530、536、540、545、573および／または574）の1つまたは複数における変異を含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるバリエーション切断ドメインは、ヌクレアーゼ二量体化に関与する残基への変異（二量体化ドメインの変異）、および1つまたは複数の追加の変異；例えば、リン酸接触残基への変異、例えば、二量体化ドメインの外側のアミノ酸位置での、例えばリン酸接触に参加し得るアミノ酸残基における、1、2、3、4、5、6つまたはそれよりも多くの変異と組み合わせた、二量体化変異体（例えばELD、KKR、ELE、KKSなど）を含む。好ましい実施形態では、416、422、447、448および／または525位における変異は、荷電を有さない、または負電荷を有するアミノ酸での正電荷を有するアミノ酸の置き換えを含む。他の実施形態では、446、472および／または478位（必要に応じて例えば二量体化または触媒ドメインにおける追加の残基）における変異が行われる。ある特定の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、542位における変異（例えば、N542D）および／または478位における変異（例えば、P478S）を含む。例えば、第1の（左の）ヌクレアーゼが1つの操作された切断ドメイン（例えば、N542D）を含み、第2のヌクレアーゼが異なる操作された切断ドメイン（例えば、P478S）を含む、操作された切断ドメインのヘテロ二量体も記載される。

【0016】

上述した操作された切断ハーフドメインのいずれも、例えばそれらをDNA結合ドメインと会合させることによって、人工ヌクレアーゼ（およびこれらの人工ヌクレアーゼを発現するポリヌクレオチド）に取り入れることができ、その例としては、これらに限定されないが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、CRISPR/Casヌクレアーゼなどが挙げられる。ジンクフィンガーヌクレアーゼのジンクフィンガータンパク質は、非正準亜鉛配位残基（例えば、正準C₂H₂立体配置ではなくCCHC、米国特許第9,234,187号を参照）を含んでいてもよい。

【0017】

別の態様では、本明細書に記載される、DNA結合ドメイン、および操作されたFokIまたはその相同体の切断ハーフドメインを含み、人工ヌクレアーゼを生じる融合分子が提供される。ある特定の実施形態では、融合分子のDNA結合ドメインは、ジンクフィンガー結合ドメイン（例えば、操作されたジンクフィンガー結合ドメイン）である。他の実施形態では、DNA結合ドメインは、TALE DNA結合ドメインである。よりさらなる実施形態では、DNA結合ドメインは、DNA結合分子（例えばガイドRNA）および触媒的に不活性なCas9またはCfp1タンパク質（dCas9またはdCfp1）を含む。一部の実施形態では、操作された融合分子は、二量体のヌクレアーゼが、二本鎖DNA分子の1つの鎖のみを切断し、ニックアーゼを形成することのみが可能になるように、触媒的に不活性な操作された切断ハーフドメインとヌクレアーゼ複合体を形成する（米国特許第9,200,266号を参照）。

【0018】

本発明の方法および組成物は、DNA主鎖上のリン酸と非特異的に相互作用することができる、標的配列のヌクレオチドを認識する残基の外側のDNA結合ドメイン内の1つまたは複数のアミノ酸への変異（例えば、「ZFP主鎖」（DNA認識ヘリックス領域の外側）へのまたは「TALE主鎖」（RVDの外側）への1つまたは複数の変異）も含んでいてもよい。したがって、ある特定の実施形態では、本発明は、ヌクレオチドの標的特異性に必要ではないZFP主鎖におけるカチオン性アミノ酸残基の変異を含む。一部の実施形態では、ZFP主鎖におけるこれらの変異は、カチオン性アミノ酸残基を、中性またはアニオン性アミノ酸残基に変異させることを含む。一部の実施形態では、ZFP主鎖におけるこれらの変異は、極性アミノ酸残基を中性または非極性アミノ酸残基に変異させることを含む。好ましい実施形態では、変異は、DNA結合ヘリックスに対して（-5）、（-9）位および／または（-14）位で行われる。一部の実施形態では、ジンクフィンガーは、（-5）、（-9）および／または（-14）における1つまたは複数の変異を含んでいてもよい。さらなる実施形態では、マルチフィンガージンクフィンガータンパク質における1つまたは複数のジンクフィンガーは、（-5）、（-9）および／または（-14）に変異を含んでいてもよい。一部の実施形態では、（-5）、（-9）および／または（-14）におけるアミノ酸（例えばアルギニン（R）またはリシン（K））は、アラニン（A）、ロイシン（L）、Ser（S）、Asp（N）、Glu（E）、Tyr（Y）および／またはグルタミン（Q）に変異している。例えば、米国公報第US-2018-0087072号を参照されたい。

【0019】

別の態様では、本明細書に記載される操作された切断ハーフドメインまたは融合分子（人工ヌクレアーゼを含む）のいずれかをコードするポリヌクレオチドが提供される。好適なポリヌクレオチドの非限定的な例としては、mRNA、cDNA、ウイルスベクター（AAV、Ad、LV）、および／または非ウイルスベクター（プラスミドベクター）が挙げられる。

【0020】

一部の態様では、本発明の方法および組成物は、真核性導入遺伝子配列に融合した外因性ペプチド配列をコードする配列の使用を含む。一部の実施形態では、外因性ペプチドは、翻訳後修飾によってタンパク質配列に融合されており、他の実施形態では、外因性ペプチドをコードする配列は、インフレーン（3'および／または5'）で人工ヌクレアーゼ（

10

20

30

40

50

例えば、融合タンパク質)をコードする配列に連結されている。外因性ペプチドは、精製または標識付け、例えば親和性精製または免疫組織化学に有用な配列をコードしていてもよい。このようなペプチドの例は、ポリヒスチジンタグ(「Hisタグ」、Hochuli et al (1988), Bio/Technol 6(11):1321-5)またはカチオン性ペプチドタグ、例えばFLAGタグ(Hopp et al (1988) Bio/Technol 6(10):1204-10; Hernan et al. (2000) BioTechniques 28(4), 789-793)である。これらのペプチドタグ配列の1種または複数(1、2、3、4、5種またはそれよりも多く)は、任意の組合せで使用することができる。一部の実施形態では、配列N末端DYKDDDK(配列番号3)を含む外因性FLAGペプチドをコードする配列は、人工ヌクレアーゼをコードする配列のC末端またはN末端においてインフレームで融合されている。好ましい実施形態では、3つのFLAG配列(3×FLAGペプチド)をコードする配列が使用され(米国特許第6,379,903号を参照)、アミノ酸配列は、N末端(M)DYKDHDG-DYKDHD E-DYKDDDDK(配列番号4)であり、N末端メチオニン(M)は、必要に応じたものである。このようなペプチド配列(例えば、3×FLAGなどのポリカチオン性配列)の1つまたは複数を含むことは、そのペプチド配列を有さないヌクレアーゼと比較して、ヌクレアーゼ(切断)活性を、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11倍、またはそれよりも多く増加させることができる。

【0021】

一部の態様では、人工ヌクレアーゼをコードするmRNAは、核局在化ペプチド配列(NLS)を含む。一部の実施形態では、NLSは、SV40ウイルスラージT遺伝子由来の配列PKKKRKV(配列番号5)を含み(Kalderon et al (1984) Nature 311(5981):33-8を参照)、一方で他の実施形態では、NLSは、c-mycタンパク質由来の配列PAAKRVKLD(配列番号6)を含む(Dang and Lee (1988) Mol Cell Biol 8(10):4048-54を参照)。一部の実施形態では、NLSは、デルタ型肝炎ウイルス由来の配列EGAPPAKRAR(配列番号7)(Alves et al (2008) Virology 370:12-21を参照)またはポリオーマタンパク質由来のVSRKRPRP(配列番号8)(Richardson et al (1986) Cell 44(1):77-85)を含む。他の実施形態では、NLSは、ヌクレオプラスミンカルボキシ尾部由来の配列KRPAATKKAGQAKKKKLD(配列番号9)を含み(Dingwall (1988) J Cell Biol 107:841-849およびRobbins et al (1991) Cell 64(3):615-23を参照)、一方で一部の実施形態では、NLSは、最初にSiomiおよびDreyfussによって記載された配列NQSSNFGPMKG GNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(配列番号10)(Siomi and Dreyfus (1995) J Cell Biol 129(3):551-560)を含む。さらなる実施形態では、NLSは、HTLV-1におけるRexタンパク質由来の配列PKTRRRPRRS QKRKPPT(配列番号11)を含む(Siomi et al (1988) Cell 55(2):197-209)。本明細書に記載されるNLS配列の1種または複数を含むことは、ペプチド配列を有さないヌクレアーゼと比較して、ヌクレアーゼ(切断)活性を、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11倍、またはそれよりも多く増加させることができる。

【0022】

さらに別の態様では、本明細書に記載されるヌクレアーゼ、ポリペプチド(例えば、融合分子または融合ポリペプチド)および／またはポリヌクレオチドのいずれかを含む細胞も提供される。一実施形態では、細胞は、融合ポリペプチドの対を含み、1つの融合ポリペプチドは、アミノ酸残基393、394、398、416、421、422、442、444、447、448、473、480、530および／または525における1つまたは複数の変異に加えて、ELDまたはELE切断ハーフドメインを含み、1つの融合ポリペプチドは、残基393、394、398、416、421、422、442、444、446、447、448、472、473、478、480、530および／または525における1つまたは複数の変異に加えて、KKKまたはKKR切断ハーフドメインを含む(米国特許第8,962,281号を参照)。一部の実施形態では、1つの融合タンパク質は、FokIの残基542(切断ドメインの残基159)に変異、例えばN542

Dを含み、1つの融合ポリペプチドは、F o k Iの残基478（切断ドメインの残基95）に変異例えばP478Sを含む。

【0023】

本明細書に記載されるこれらの融合ポリペプチドのいずれかでは、ZFPパートナーは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインにおいて、（-5）、（-9）および／または（-14）位に変異をさらに含んでもよい。一部の実施形態では、-5位におけるArg（R）は、Tyr（Y）、Asp（N）、Glu（E）、Leu（L）、Gln（Q）、またはAla（A）に変更されている。他の実施形態では、（-9）位におけるArg（R）は、Ser（S）、Asp（N）、またはGlu（E）で置き換えられている。さらなる実施形態では、（-14）位におけるArg（R）は、Ser（S）またはGln（Q）で置き換えられている。他の実施形態では、融合ポリペプチドは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインに変異を含んでもよく、（-5）、（-9）および／または（-14）位におけるアミノ酸は、任意の組合せで、上で列挙したアミノ酸のいずれかに変更されている。

10

【0024】

本明細書に記載される1つまたは複数の人工ヌクレアーゼを含む細胞由来の、および／またはそれから分化した細胞を含む、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドによって改変された細胞も本明細書で提供される。一部の実施形態では、細胞は、ヌクレアーゼ媒介性の導入遺伝子挿入、またはヌクレアーゼ媒介性の遺伝子ノックアウトを含む。改変された細胞、および改変された細胞由来の任意の細胞は、必ずしも一過性にとどまらずに本発明のヌクレアーゼを含むとは限らないが、このようなヌクレアーゼによって媒介されるゲノム改変は依然として存在する。

20

【0025】

さらに別の態様では、目的の領域における細胞クロマチンの標的化された切断のための方法；細胞中で相同組換えを起こさせる方法；感染を処置する方法；および／または疾患を処置する方法が提供される。これらの方法は、in vitro、ex vivoもしくはin vivoで、またはそれらの組合せで実施してもよい。方法は、本明細書に記載される1種または複数の人工ヌクレアーゼを使用して、細胞クロマチンを、細胞中の所定の目的の領域で切断することを含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される融合ポリペプチドの対（すなわち、一方または両方の融合ポリペプチドが本明細書に記載される操作された切断ハーフドメインを含む融合ポリペプチドの対）。ある特定の実施形態では、オンターゲット部位の標的化された切断は、本明細書に記載される変異を有さない切断ドメインと比較して、50%～60%（またはそれらの間の任意の値）、60%～70%（またはそれらの間の任意の値）、70%～80%（またはそれらの間の任意の値）、80%～90%（またはそれらの間の任意の値）、90%～200%（またはそれらの間の任意の値）を含む、少なくとも50～200%（またはそれらの間の任意の値）またはそれよりも多く増加する。同様に、本明細書に記載される方法および組成物を使用して、オフターゲット部位切断は、これらに限定されないが、1～50倍（またはそれらの間の任意の値）を含む、1～100倍またはそれよりも多い倍数まで低減される。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ活性の標的化された切断は、本明細書に記載されるヌクレアーゼをコードする構築物が改変（強化）を含まない場合と比較して、50%～60%（またはそれらの間の任意の値）、60%～70%（またはそれらの間の任意の値）、70%～80%（またはそれらの間の任意の値）、80%～90%（またはそれらの間の任意の値）、90%～200%（またはそれらの間の任意の値）を含む、少なくとも50～200%（またはそれらの間の任意の値）もしくはそれよりも多く、またはこれらに限定されないが、1～50倍（またはそれらの間の任意の値）を含む、1～100倍もしくはそれよりも多い倍数まで増加する。

30

40

【0026】

本明細書に記載される人工ヌクレアーゼ（およびそれをコードするポリヌクレオチド）は、目的の領域における細胞クロマチンの標的化された切断のための方法および／または

50

細胞中の所定の目的の領域における相同組換えで使用する事ができる。細胞としては、培養細胞、細胞系、生物中の細胞、細胞および／またはその子孫が処置後に生物に戻される場合における処置のために生物から取り出された細胞、ならびに生物から取り出され、本発明の融合分子を使用して改変され、次いで処置方法（細胞療法）において生物に戻される細胞が挙げられる。細胞クロマチンにおける目的の領域は、例えば、ゲノム配列またはその一部であってもよい。組成物は、記載されたDNA結合分子（例えば、操作されたジンクフィンガーまたはTALE結合ドメインまたは操作されたCRISPRガイドRNA）および切断ハーフドメインを含む、融合分子または融合分子をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0027】

融合分子は、例えば、細胞に融合分子をポリペプチドとして送達することによって、または細胞に融合分子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、細胞で発現させることができ、ポリヌクレオチドは、DNAの場合、転写され、翻訳されて、融合分子を生成する。さらに、ポリヌクレオチドが融合分子（またはその成分）をコードするmRNAである場合、細胞へのmRNAの送達の後、mRNAは翻訳され、したがって融合分子が生成される。

【0028】

本発明の他の態様では、操作されたヌクレアーゼ特異性を増加させるための方法および組成物が提供される。一態様では、オフターゲット切断活性を減少させることによって全体的なオンターゲット切断の特異性を増加させるための方法が提供される。一部の実施形態では、操作されたヌクレアーゼ複合体の成分である操作された切断ハーフドメイン含有パートナーは、細胞と接触するのに使用され、複合体の各パートナーは、1対1以外の他のパートナーに対する比率になる。一部の実施形態では、2つのパートナー（ハーフ切断ドメイン）の比率は、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：8、1：9、1：10または1：20の比率、またはそれらの間の任意の値になる。他の実施形態では、2つのパートナーの比率は、1：30よりも大きい。他の実施形態では、2つのパートナーは、1：1と異なるように選択された比率で配置される。一部の態様では、各パートナーは、mRNAとして細胞に送達されるか、またはウイルスまたは非ウイルスベクターで送達され、各パートナーをコードする異なる量のmRNAまたはベクターが送達される。さらなる実施形態では、ヌクレアーゼ複合体の各パートナーは、単一のウイルスまたは非ウイルスベクターに含まれていてもよいが、一方のパートナーが他方よりも大きいまたは小さい値で発現されるように計画的に発現され、最終的に1対1以外の切断ハーフドメインの比率で細胞に送達される。一部の実施形態では、各切断ハーフドメインは、異なる発現効率を有する異なるプロモーターを使用して発現される。他の実施形態では、2つの切断ドメインは、ウイルスまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に送達され、両方とも、同じオープンリーディングフレームから発現されるが、2つのパートナーをコードする遺伝子は、2つのパートナーの比率が1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：8、1：9、1：10もしくは1：20の比率、またはそれらの間の任意の値になるように3、パートナーをより低い割合で発現させる配列（例えば自己切断2A配列またはIRES）によって分離される。他の実施形態では、2つのパートナーは、1：1と異なるように選択された比率で配置される。

【0029】

したがって、別の態様では、目的の領域における細胞クロマチンを切断するための方法は、（a）目的の領域における第1の配列を選択するステップ；（b）第1のDNA結合分子を、第1の配列に特異的に結合するように操作するステップ；（c）細胞中で第1の融合分子を発現させるステップであって、第1の融合分子が、第1のDNA結合分子（例えば、ジンクフィンガー、TALE、sgRNA）、および切断ドメイン（またはハーフドメイン）を含む、ステップ；ならびに（d）細胞中で第2の融合タンパク質を発現させるステップであって、第2の融合分子が、第2のDNA結合ドメイン、および第2の切断ドメイン（またはハーフドメイン）を含む、ステップを含んでもよく、融合分子の少

10

20

30

40

50

なくとも1つが、本明細書に記載されるリンカーを含み、さらに、第1の融合分子が、第1の配列に結合し、第2の融合分子が、活性なヌクレアーゼ複合体を形成することができ、細胞クロマチンが目的の領域で切断されるように、第1の配列から2～50ヌクレオチドの間に位置する第2の配列に結合する。ある特定の実施形態では、両方の融合分子は、DNA結合ドメインと触媒性のヌクレアーゼドメインとの間に本明細書に記載されるリンカーを含む。

【0030】

例えば標的化された変異を導入するために、細胞クロマチンの領域（例えば、内因性遺伝子）を変更する方法も提供される。ある特定の実施形態では、細胞クロマチンを変更する方法は、細胞に、1つまたは複数の標的化されたヌクレアーゼ（所定の部位で細胞クロマチン中に二本鎖切断を作り出すため）、および切断の領域における細胞クロマチンのヌクレオチド配列への相同性を有するドナーポリヌクレオチドを導入することを含む。細胞のDNA修復プロセスは、二本鎖切断の存在によって活性化され、ドナーポリヌクレオチドは、切断の修復のための鋳型として使用され、結果として細胞クロマチンへのドナーのヌクレオチド配列の全部または一部の導入が起こる。したがって、細胞クロマチン中の配列は、変更することができ、ある特定の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド中に存在する配列に変換することができる。1つまたは複数の標的は、本明細書に記載される方法および組成物を使用して変更されてもよい。

【0031】

標的化された変異としては、これらに限定されないが、点変異（すなわち、単一の塩基対の異なる塩基対への変換）、置換（すなわち、複数の塩基対の、同一な長さの異なる配列への変換）、1つまたは複数の塩基対の（or）挿入、1つまたは複数の塩基対の欠失、および上述の配列変更の任意の組合せが挙げられる。変更はまた、コードされたアミノ酸が変更されるように、コード配列の一部である塩基対の変換を含んでいてもよい。

【0032】

ドナーポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAであってもよく、直鎖状または環状であってもよく、一本鎖または二本鎖であってもよい。これは、裸の核酸として、1つもしくは複数の送達剤（例えば、リポソーム、ナノ粒子、ポロキサマー）との複合体として、またはウイルス送達ビヒクル、例えば、アデノウイルス、レンチウイルスもしくはアデノ随伴ウイルス（AAV）などに含有されて送達されてもよい。ドナー配列は、10～1,000ヌクレオチドの長さの範囲（またはそれらの間のヌクレオチドの任意の整数値）またはそれよりも長くてもよい。一部の実施形態では、ドナーは、標的化された切断部位との相同性を有する領域に挟まれた全長遺伝子を含む。一部の実施形態では、ドナーは、相同な領域を欠いており、相同性と無関係のメカニズム（すなわちNHEJ）を介して標的遺伝子座に組み込まれている。他の実施形態では、ドナーは、細胞での使用のために（すなわち遺伝子修正のために）相同な領域に挟まれた核酸のより小さい一片を含む。一部の実施形態では、ドナーは、機能的または構造的な成分、例えばshRNA、RNAi、miRNAなどをコードする遺伝子を含む。他の実施形態では、ドナーは、目的の遺伝子に結合するおよび／またはその発現をモジュレートする調節エレメントをコードする配列を含む。他の実施形態では、ドナーは、目的の遺伝子に結合するおよび／またはその発現をモジュレートする目的の調節タンパク質（例えばZFP TF、TALE TFまたはCRISPR/Cas TF）である。

【0033】

本明細書に記載されるある特定の方法および組成物では、ヌクレアーゼおよびドナーは、1つまたは複数のmRNAおよび／またはAAVベクターを使用して送達される。任意の用量のmRNA（ng）またはAAVベクター（vg／用量）を使用することができる。mRNAがヌクレアーゼ（複数可）および／または必要に応じたドナーを送達する実施形態では、mRNAの投薬量は、典型的には、細胞または対象あたり10～5000ngの間の範囲である（例えば、2000ng、62.5ng、31.3ng、15.6ng）。AAVベクターがヌクレアーゼおよび／または必要に応じたドナーを運ぶのに使用さ

れる実施形態では、投薬量は、典型的には、各ヌクレアーゼ（例えば、左および右の ZFN）について、対象または細胞あたり $1.00E+9 \sim 1.00E+13$ v g の間の範囲であり、必要に応じたドナーは、 $1.00E+10 \sim 1.00E+13$ で与えられる。ある特定の実施形態では、対の各ヌクレアーゼは別々の AAV ベクターに担持され、細胞もしくは対象あたり $2.00E+10$ 、 $6.00E+10$ または $2.00E+11$ v g で与えられ、ドナーは、別の AAV ベクターに担持され、細胞もしくは対象あたり $1.60E+11$ 、 $4.8E+11$ または $1.6E+12$ v g で与えられる。

【0034】

上述の方法のいずれについても、細胞クロマチンは、染色体、エピソームまたは細胞小器官のゲノム中であってもよい。細胞クロマチンは、これらに限定されないが、原核および真核細胞、真菌細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、霊長類細胞およびヒト細胞を含む任意のタイプの細胞中に存在していてもよい。

【0035】

一態様では、第1および第2の（左および右の、または ZFN パートナーとも称される）ZFN を含むジンクフィンガーヌクレアーゼであって、第1の ZFN が、71557 と名付けられた ZFN（SBS42875 に関して表1に示される認識ヘリックス領域を有する ZFP を含み、表3および表4に示される追加の特色（例えば、FokI 配列および ZFP 主鎖における変異、5' UTR 配列など）を有する）を含み、第2の ZFN が、71728 と名付けられたもの（SBS47874 に関して表1に示される認識ヘリックス領域を有する ZFP、および表3および表5に示される他の特色（例えば、FokI 配列および ZFP 主鎖における変異、5' UTR 配列など）を含む）ならびに／または左および右の ZFN の一方もしくは両方をコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、ジンクフィンガーヌクレアーゼが本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、第1および第2の（左および右の）ZFN は、別々のポリヌクレオチドによってコードされ、この別々のポリヌクレオチドは、同一または異なるタイプのものであってもよい（例えば、1つの AAV が左の ZFN をコードする配列を含み、1つの AAV が右の ZFN をコードする配列を含む2つの AAV ベクター、一方の mRNA が左の ZFN をコードし、他方が右の ZFN をコードする2つの mRNA、自己切断ペプチド配列（例えば2A）によって互いに連結された両方の ZFN を含む1つの AAV、および他方の ZFN をコードする配列を含む1つの AAV と共に使用される一方の ZFN をコードする1つの mRNA など）。ある特定の実施形態では、ベクターは、表4および／または表5に示されるエレメント（配列）を含む AAV ベクターであり、本明細書で示される「71557 AAV」または「SB71557 AAV」（配列番号43）および「71728 AAV」または「SB71728 AAV」（配列番号56）と名付けられた完全 AAV 配列を含む。他の実施形態では、表4および5に示されるエレメントの1つまたは複数は、任意の類似の配列で置き換えられ、例えばこれらの表の WPRE 配列は、当業界において公知の、または本明細書の実施例4に記載の WPRE 配列（例えば、配列番号53の代わりに、配列番号68もしくは配列番号69、または他の WPRE 配列）で置き換えられていてもよい。一部の実施形態では、ZFN に多くのアミノ酸改変を行うことができる。一部の実施形態では、3、6、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 またはそれよりも多くのアミノ酸置換が行われる。一部の実施形態では、右および左側におけるフィンガーのうち6つに対して13の組み合わせられたアミノ酸置換が行われる。

【0036】

したがって、第1および第2の ZFN を含むジンクフィンガーヌクレアーゼであって、第1の ZFN が、71557 と名付けられた ZFN を含み、第2の ZFN が、71728 と名付けられた ZFN を含む、ジンクフィンガーヌクレアーゼが本明細書に記載される。本明細書に記載される第1および第2の ZFN をコードする配列を含む1つまたは複数のポリヌクレオチドも提供される。ある特定の実施形態では、単一のポリヌクレオチドが、第1および第2の ZFN をコードし、他の実施形態では、2つの別々のポリヌクレオチドが、第1および第2の ZFN をコードする配列を含む。ZFN をコードする1つまたは複

10

20

30

40

50

数のポリヌクレオチドは、同一または異なる A A V ベクターに担持され得る。ある特定の
実施形態では、第 1 のポリヌクレオチド（例えば、A A V ベクター）が、表 4 に示される
配列または配列番号 4 3 に示される配列を含み、第 2 のポリヌクレオチド（例えば、A A
V ベクター）が、表 5 に示される配列または配列番号 5 6 に示される配列を含む、2 つの
ポリヌクレオチドが本明細書で提供される。一部の実施形態では、左の Z F N（S B - 7
1 5 5 7）を含む A A V は、S B - A 6 P - Z L 2 と称される。一部の実施形態では、右
の Z F N（S B - 7 1 7 2 8）を含む A A V は、S B - A 6 P - Z R 2 と称される。

【0037】

別の態様では、本明細書に記載される 1 つまたは複数の Z F N および／またはポリヌク
レオチド（例えば、A A V ベクター）を含む細胞（例えば、対象の幹細胞、前駆体細胞ま
たは肝細胞）が本明細書に記載される。これらに限定されないが、幹細胞、前駆体細胞、
肝臓細胞、血液細胞などを含むあらゆる細胞または細胞系を使用することができる。細胞
は、ドナーポリヌクレオチド、典型的には治療用タンパク質をコードする導入遺伝子など
の外因性配列をコードするポリヌクレオチドまたはその断片をさらに含んでもよく、
外因性配列は、内因性アルブミン遺伝子の切断後に細胞のゲノムに組み込まれる。ドナー
は、Z F N パートナーの一方もしくは両方と同じベクターに担持されてもよく、あるいは
、別々のベクターを使用して投与されてもよく、ベクターは、Z F N パートナーの一方ま
たは両方を担持するベクター（複数可）と同一または異なるタイプであってもよい。ある
特定の実施形態では、細胞は、3 つの別々の A A V ベクターを含み、第 1 の A A V ベク
ターは、左の Z F N をコードする配列を含み、第 2 の A A V ベクターは、右の Z F N をコー
ドする配列を含み、第 3 の A A V ベクターは、ドナーポリヌクレオチドを含む。Z F N お
よびドナーポリヌクレオチドを含む細胞由来の娘細胞も記載され、この娘細胞は、Z F N
によって行われた遺伝子改変（例えば、組み込まれたドナーポリヌクレオチド）を含む。
このような遺伝子改変は、娘細胞のゲノム DNA の次世代シーケンシングを含む、当業界
において公知の標準的な方法により同定することができ、このようなシーケンス結果は、
Z F N およびドナーポリヌクレオチドで処置されていない野生型細胞と比較される。

【0038】

別の態様では、本明細書に記載される 1 つもしくは複数の Z F N、1 つもしくは複数の
ポリヌクレオチド（例えば、A A V ベクター）、および／または 1 つもしくは複数の細胞
を含む医薬組成物が本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、3
つの別々の A A V ベクターを含み、第 1 の A A V は、Z F N 7 1 5 5 7（例えば、「7 1
5 5 7 A A V」）を含み、第 2 の A A V は、Z F N 7 1 7 2 8（例えば、「7 1 7 2 8 A
A V」）を含み、第 3 の A A V は、ドナーポリヌクレオチドを含む。

【0039】

別の態様では、内因性アルブミン遺伝子を切断するための、本明細書に記載される Z F
N の 1 つもしくは複数、ポリヌクレオチド（例えば、A A V ベクター）の 1 つもしくは複
数、細胞の 1 つもしくは複数、および／または医薬組成物の 1 つもしくは複数（例えば、
3 つの別々の A A V ベクターを含む医薬組成物）を使用する方法であって、必要に応じて
方法（使用）は、外因性配列が単離された細胞または対象の細胞中の切断されたアルブミ
ン遺伝子に組み込まれるように、外因性配列（例えば、A A V ベクターによって運ばれる
）を含むドナーポリヌクレオチドを投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では
、このような本明細書に記載される Z F N の 1 つもしくは複数、ポリヌクレオチドの 1 つ
もしくは複数、細胞の 1 つもしくは複数および／または医薬組成物の 1 つもしくは複数
は、ヒト疾患を防止または処置するのに使用される。

【0040】

本明細書に記載される 1 つもしくは複数のジンクフィンガーヌクレアーゼ、1 つもしくは
複数のポリヌクレオチド、1 つもしくは複数の細胞および／または 1 つもしくは複数の
医薬組成物、ならびに必要に応じたそれらの使用のための指示を含むキットも提供される。

【0041】

さらに別の態様では、（a）7 1 5 5 7 と名付けられた第 1 の Z F N をコードする配列

10

20

30

40

50

を含む第1のポリヌクレオチド（例えば、AAV）であって、必要に応じて、表4に示される配列またはSB71557AAVと名付けられた配列（配列番号43）を含む、第1のポリヌクレオチド；（b）71728と名付けられた第2のZFNをコードする配列を含む第2のポリヌクレオチド（例えば、AAV）であって、必要に応じて、表5に示される配列またはSB71728AAVと名付けられた配列（配列番号56）を含む、第2のポリヌクレオチド；および（c）第IX因子（FIX）タンパク質をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチド（例えば、AAV）を含む組成物（「FIX組成物」とも称される）が本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、ドナーは、表6に示される配列を、必要に応じて配列番号59に示される配列を含む。本明細書に記載されるFIX組成物のいずれかでは、第1の、第2の、およびドナーポリヌクレオチドは、3つの別々のAAVベクターに担持され得る。それを必要とする対象においてFIXを発現させるための本明細書に記載される組成物を使用する方法も提供される。ある特定の実施形態では、ZFN（71557および71728）が対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、FIXの配列が切断されたアルブミン遺伝子に組み込まれ、FIXタンパク質が対象において発現されるように、組成物が対象に投与される。本明細書に記載される方法および組成物は、それを必要とする対象において血友病を処置および／または防止するのに使用することができる。FIX組成物の1つまたは複数および必要に応じてその使用のための指示を含むキットも提供される。

10

【0042】

よりさらなる態様では、（a）71557と名付けられた第1のZFNをコードする配列を含む第1のポリヌクレオチド（例えば、AAV）であって、必要に応じて、表4に示される配列またはSB71557AAVと名付けられた配列（配列番号43）を含む、第1のポリヌクレオチド；（b）71728と名付けられた第2のZFNをコードする配列を含む第2のポリヌクレオチド（例えば、AAV）であって、必要に応じて、表5に示される配列またはSB71728と名付けられた配列（配列番号56）を含む、第2のポリヌクレオチド；および（c）イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）配列をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチド（例えば、AAV）を含む組成物（「MPS II組成物」または「IDS組成物」とも称される）が本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、ドナーは、表7に示される配列、必要に応じて配列番号65に示される配列を含む。本明細書に記載されるMPS II組成物のいずれかでは、第1の、第2の、およびドナーポリヌクレオチドは、3つの別々のAAVベクターに担持され得る。それを必要とする対象においてIDSを発現させるための本明細書に記載される組成物を使用する方法も提供される。ある特定の実施形態では、ZFN（71557および71728）が対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、IDS配列が切断されたアルブミン遺伝子に組み込まれ、IDSタンパク質が対象において発現されるように、組成物が対象に投与される。本明細書に記載される方法および組成物は、それを必要とする対象においてMPS IIを処置および／または防止するのに使用することができる。MPS II組成物の1つまたは複数、および必要に応じてその使用のための指示を含むキットも提供される。

20

30

【0043】

よりさらなる態様では、（a）71557と名付けられた第1のZFNをコードする配列を含む第1のポリヌクレオチド（例えば、AAV）であって、必要に応じて、表4に示される配列またはSB71557AAVと名付けられた配列（配列番号43）を含む、第1のポリヌクレオチド；（b）71728と名付けられた第2のZFNをコードする配列を含む第2のポリヌクレオチド（例えば、AAV）であって、必要に応じて、表5に示される配列またはSBと名付けられた配列、配列番号56を含む、第2のポリヌクレオチド；および（c）アルファー-1-イズロニダーゼ（IDUA）配列をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチド（例えば、AAV）を含む組成物（「MPS I組成物」または「IDUA組成物」とも称される）が本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、ドナーは、表8に示される配列、必要に応じて配列番号72に示される配列を含む。本明細書に記載されるMPS I組成物のいずれかでは、第1の、第2の、およびドナーポリヌ

40

50

クレオチドは、3つの別々のAAVベクターに担持され得る。それを必要とする対象においてIDUAを発現させるための本明細書に記載される組成物を使用する方法も提供される。ある特定の実施形態では、ZFN(71557および71728)が対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、IDUA配列が切断されたアルブミン遺伝子に組み込まれ、IDUAタンパク質が対象において発現されるように、組成物が対象に投与される。本明細書に記載される方法および組成物は、それを必要とする対象においてMPS Iを処置および／または防止するのに使用することができる。MPS I組成物の1つまたは複数、および必要に応じてその使用のための指示を含むキットも提供される。

【0044】

一部の実施形態では、本明細書で開示された組成物のいずれかは、それを必要とする対象に単回用量で投与される。他の実施形態では、組成物は、1つよりも多い用量で投与される。一部の実施形態では、組成物は、1つよりも多い用量で、用量間に期間を設けて投与される。一部の実施形態では、期間は、1、2、3、4、5、または6ヶ月を含む。一部の実施形態では、期間は、半年、1年、2年、3年、4年、5年またはそれよりも長い期間を含む。

【0045】

さらに別の態様では、本明細書に記載されるポリペプチド(例えば、融合分子)および／またはポリヌクレオチドのいずれかを含む細胞も提供される。一実施形態では、細胞は、それぞれ本明細書で開示される切断ドメインを含む融合分子の対を含む。細胞としては、培養細胞、生物中の細胞、ならびに処置後に細胞および／またはその子孫が生物に戻される場合、処置のために生物から取り出された細胞が挙げられる。細胞クロマチンにおける目的の領域は、例えば、ゲノム配列またはその一部であってもよい。

【0046】

別の態様では、本明細書に記載される融合タンパク質、または1つもしくは複数のジンクフィンガータンパク質、本明細書に記載される切断ドメインおよび／もしくは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド；補助的な試薬；ならびに必要に応じて指示および好適な容器を含むキットが本明細書に記載される。キットはまた、1つもしくは複数のヌクレアーゼまたはこのようなヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0047】

これらのおよび他の態様は、全体として開示を考慮すれば当業者に容易に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1A】図1Aおよび1Bは、ヒトアルブミンのゲノム配列の部分配列(配列番号41)を描写し、例示的なZFN47171-FLAGおよび47898-FLAGの結合部位(下線または上線により示される標的部位)を示す。図1Aは、個体のおよそ20%で生じるA/TからG/Cへの(ボックスで囲った)一塩基多型(SNP)も示す。図1Bは、左および右のZFNが標的アルブミン配列と会合する方式を描写する概略図である。

【図1B】同上。

【0049】

【図2】図2は、示された例示的なヌクレアーゼおよび示された用量によるゲノム改変(%インデル)を示すグラフである。各条件下の左のバーは、野生型A/T配列の改変を示し、右のバーは、G/C SNPの改変を示す。

【0050】

【図3A】図3A～3Hは、本明細書に記載されるZFNをコードするベクターを使用したゲノム改変の例示的な結果を示す。図3Aは、本明細書に記載される改変を含まないヌクレアーゼ(「親」と比較して、本明細書に記載される例示的な人工ヌクレアーゼ(名称で示された改変)を使用した、示された条件下でのオフターゲット部位(SMCHD1)の改変と比較した、意図した標的(アルブミン)における改変の結果を示す。示した通り、本明細書に記載されるヌクレアーゼは、親ヌクレアーゼと比較して活性および特異性

10

20

30

40

50

の増加を示す。図3Bは、意図した標的（「アルブミン-オンターゲット」）（2000 ng、62.5 ng、31.3 ng、15.6 ng）に対してまたはオフターゲット部位（「オフターゲット」）（2000 ng）に対して示された投薬量での、示された親または最適化されたZFNを使用したディープシーケンシングによって測定された切断活性（%インデル）を示す。図に示される操作されたFokIドメインN159Dは、N542Dとも称され、P95Sと名付けられたFokIドメインは、P478Sとも称される。図3Bは、改善されたバージョンで行われた改変を有するZFN発現カセットの概略図も示す。図3Cは、本明細書に記載されるZFNで処置したK562およびHepG2細胞における示されたオンターゲット部位（アルブミン）およびオフターゲット部位（1～26行）における活性の結果（%インデルによって示される切断活性および「捕捉事象」と名付けられた標的化組込み）を示す。「ns」は、有意ではないことを指し；「ns*」は、ZFN切断と一致しないインデルを指し；「^」は、ZFN切断と一致するインデルおよび有意ではないp値を指し；「ND」は、データがないことを指す。図3Dは、親47171/47898 ZFN対（「ZFN標準」、各条件の左のバー）または最適化された71557/71728 ZFN対（「ZFN2.0」、各条件の右のバー）を使用した、AAVベクターによって担持されるアルブミンZFNおよびIDS導入遺伝子を担持するAAVドナーの示された投薬量（低=30/240のZFN/ドナーMOI；中=100/800のZFN/ドナーMOI；および高=300/2400のZFN/ドナーMOI）における切断（%インデル）を示すグラフである。この実験で使用された71557/71728 ZFNをコードするAAV構築物は、5'β-グロビン非翻訳領域（UTR）、3×FLAGおよびウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）転写後調節エレメント変異体6（WPREmut6）を含んでいた。図3E（i）は、親（「ZFN標準」、各条件の左のバー）または最適化されたZFN（「ZFN2.0」、各条件の右のバー）を使用した、AAVベクターによって担持されるアルブミンZFNおよびIDS導入遺伝子を担持するAAVドナーの示された投薬量（低=30/240のZFN/ドナーMOI；中=100/800のZFN/ドナーMOI；および高=300/2400のZFN/ドナーMOI）におけるドナー導入遺伝子によってコードされたタンパク質（IDS）の活性を示すグラフである。図3E（ii）は、示された投薬量におけるIDS活性を示すグラフである。各条件下の左から右に、（左から右に）：5日目における標準ZFN；7日目における標準ZFN；5日目におけるZFN2.0、および7日目におけるZFN2.0が示される。図3F（i）および3F（ii）は、47171/47898対と71557/47898対との比較からの結果を描写する。ZFNをコードするmRNAの示された量を、WT（A:T）およびSNP（G:C）含有ZFN標的部位についてヘテロ接合型の初代ヒト肝細胞に3つ組でトランスフェクトした。この実験で使用された71557 ZFNをコードするmRNAは、5'β-グロビン非翻訳領域（UTR）およびウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）転写後調節エレメント（WPRE）を含んでいた。トランスフェクションの24時間後に、ディープシーケンシングによってZFN活性のレベルを決定した。図3F（i）は、A:T WT対立遺伝子（濃い灰色）およびG:C SNP対立遺伝子（薄い灰色）標的部位におけるZFN活性（%インデルとして提示される）を示す。図3F（ii）は、A:T WT対立遺伝子標的部位対G:C SNP対立遺伝子標的部位におけるZFN活性の比率を示し、1.0の値は、各対立遺伝子（薄い灰色における47171/47898 ZFN対、濃い灰色における71557/47898 ZFN対）における切断が等しいことを示す。図3Gは、47171/47898および71557/71728 ZFN対の初代ヒト肝細胞における切断動態を描写するグラフであり、ZFNは、AAVによって細胞に送達された。この実験で使用された71557/71728 ZFNをコードするAAV構築物は、5'β-グロビン非翻訳領域（UTR）、3×FLAGおよびウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）転写後調節エレメント変異体6（WPREmut6）を含んでいた。図3Hは、初代ヒト肝細胞における47171/47898および71557/71728 ZFN対のオンターゲットおよびオフターゲット切断データの比較を示す。この実験で使用された71557/71728 ZFNをコードするAAV構

10

20

30

40

50

築物は、5'β-グロビン非翻訳領域(UTR)、3×FLAGおよびウッドチャック肝炎ウイルス(WHV)転写後調節エレメント変異体6(WPREmut6)を含んでいた。上の行は、3K~600KのMOI濃度でのアルブミン遺伝子座およびSMCHD1遺伝子座における71557/71728ZFN対の活性を示す。左上のグラフには、予想される臨床用量範囲も示される。第2世代ZFNをコードするAAV2/6で形質導入されたヒト初代肝細胞を、MiSeqディープシーケンシングによって評価した。NS-両側t検定により統計学的に有意ではない、*-両側t検定によりp値<0.05。下の行は、SMCHD1遺伝子座に対する別々の実験と比較した、アルブミン遺伝子座に対する第1および第2世代ZFN対の両方の100Kおよび600KのMOI用量の引き伸ばし図を示す。100KのMOI用量において、第1世代ZFNは、平均して17%インデルのオンターゲット活性および0.11%インデルのオフターゲット活性を示し、第2世代ZFNは、平均して35%のオンターゲット活性および0.08%のオフターゲット活性を示した。2つのオンターゲットのオフターゲットに対する比率を比較すると、第2世代ZFNは、第1世代ZFNよりも約2.8倍選択的である。600KのMOI用量において、第1世代ZFNは、平均して25%インデルのオンターゲット活性および0.36%インデルのオフターゲット活性を示し；第2世代ZFNは、平均して44%のオンターゲット活性および0.34%のオフターゲット活性を示した。2つの比率を比較すると、第2世代ZFNは、第1世代ZFNよりも約1.9倍選択的である。100Kおよび600KのMOIにおいて、47171/47898および71557/71728ZFN対の%インデルは、それぞれ17%および35%、ならびに25%および44%であり、これは、71557/71728ZFN対が、47171/47898ZFN対よりも約2倍強力であることを示唆している。

【図3B】同上。

【図3C】同上。

【図3D】同上。

【図3E】同上。

【図3F】同上。

【図3G】同上。

【図3H】同上。

【0051】

【図4A】図4A~4Cは、ヌクレアーゼが、1つまたは複数のFLAG配列をさらに含むポリヌクレオチドから発現される場合のヌクレアーゼ活性の増加(%インデル、次世代シーケンシングによって決定された)を示す。図4Aは、3×FLAG配列を有する(y軸)または有さない(x軸)での人工ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドの導入後の活性(%インデル)を示すグラフである。対角線の右のデータポイントが、3×FLAG配列が有害であった場所を示すのに比べて、対角線の左のデータポイントは、3×FLAGがヌクレアーゼ活性に対して有益であった場所を示す。図4Bは、FLAG配列を有さないポリヌクレオチドと比較して、平均で4倍を超える活性の増加を示す。図4Cは、示されたmRNA量で、FLAGペプチドを有する(「+ペプチド」として示される薄い影を付けた丸)、または有さない(「ペプチドなし」として示される濃い影を付けた丸)アルブミン標的化ZFNをコードするmRNAをトランスフェクトされたK562細胞におけるヌクレアーゼ活性(%インデル、ディープシーケンシングによって決定された)を示すグラフである。トランスフェクションの24時間後に、細胞をZFN活性に関して査定した。薄い影を付けた丸の上の数(5'ペプチドを含むmRNA)は、5'ペプチドを有さないmRNAと比較した増加倍率を示す。

【図4B】同上。

【図4C】同上。

【0052】

【図5A】図5A~5Cは、ヌクレアーゼが、改変されていない3'UTRと比較して、改変された3'UTR(例えば、WPRE配列)をさらに含むポリヌクレオチドから発現され

る場合のヌクレアーゼ活性の増加（%インデル、次世代シーケンシングによって決定された）を描写するグラフである。図5Aは、人工ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド（mRNA）が3'UTR中にWP REを含んでいた場合の、単離された細胞における切断活性の増加を示す。図5Bは、示されたmRNAの（LNPを使用して）マウスへの投与後の、*in vivo*（マウス肝臓）においてWP REを含むZF Nを使用した活性の増加を示した。図5Bは、示されたAAVのマウスへの投与後の、*in vivo*（マウス肝臓）においてWP REを含むZF Nを使用した切断活性の増加を示した。

【図5B】同上。

【図5C】同上。

【0053】

【図6】図6は、示されたMOIでポリヌクレオチド成分の示された組合せを使用した、ヌクレアーゼ活性の増加（%インデル、次世代シーケンシングによって決定された）を示すグラフである。各条件下の最も左のバー（「標準」）は、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが3×FLAG、WP RE配列およびポリA配列を含んでいなかった場合の結果を示す。左から2番目のバー（「3×FLAG、WP RE」）は、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが3×FLAGペプチド配列およびWP RE配列を含んでいた場合の結果を示す。右から2番目のバー（「5'XBG、WP RE」）は、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドがウシ成長ホルモン（「BG」）ポリA配列およびWP RE配列を含んでいた場合の結果を示す。最も右のバー（「5XBG、3×FLAG、WP RE」）は、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドがBGポリA配列、3×FLAGペプチド配列およびWP RE配列を含んでいた場合の結果を示す。各条件（MOI）の上に、観察されたヌクレアーゼ活性の増加倍率を示す。

【0054】

【図7A】図7Aおよび7Bは、作製およびテストされた例示的な異なるバリエーション構築物の図解である。図7Aは、初期の発現構造であるV1を描写しており、V2～V8は、様々なバリエーション構造を描写する。略語は、以下の通りである：「Ap o E」は、アポEエンハンサーであり；「hAAT」は、ヒトα1抗トリプシンプロモーターであり；「HBB-IGG」は、ヒトβ-グロビン遺伝子の第1のイントロン由来の5'ドナー部位およびブランチ、ならびに免疫グロブリン遺伝子の重鎖可変領域のイントロン由来の3'アクセプター部位を含むヒトベータキメライントロンであり；「NLS」は、核局在化配列であり；「ポリA」は、ポリA配列であり；「WP RE」は、ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節因子エレメントであり；「3×FLAG」は、配列番号4および／または配列番号71として記載されたペプチドであり；ならびに「β-glb」は、Xenopusのベータ-グロビン遺伝子の5'非翻訳領域である。図7Bは、ZF N47171、47898、71557および71728をコードする配列を含むAAVの概略図を示す。

【図7B】同上。

【0055】

【図8】図8は、示されたMOIでポリヌクレオチド成分の示された組合せを使用した、ヌクレアーゼ活性（%インデル、次世代シーケンシングによって決定された）を示すグラフである。各条件下の最も左のバー（「標準（V1）」）は、バリエーション1（V1）または親とも称される、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが3×FLAG、WP RE配列およびポリA配列を含んでいなかった場合の結果を示す。左から2番目のバー（「WP RE（V2）」）は、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドがWP RE配列を含んでいた場合の結果を示す。中央のバー（「3×FLAG、WP RE（V4）」）は、3×FLAG配列およびWP RE配列を含んでいたバリエーション（V4と名付けられた）での結果を示す。右から2番目のバー（「5'XBG、WP RE（V6）」）は、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド（バリエーション6またはV6と名付けられた）がウシ成長ホルモン（「BG」）ポリA配列およびWP RE配列を含んでいた場合の結果を示す。最も右のバー（「5XBG、3×FLAG、WP RE」）は、ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド（バリエーション8またはV8と名付けられた）がBGポリA配列、3×FL

A G ペプチド配列およびW P R E 配列を含んでいた場合の結果を示す。

【0056】

【図9】図9は、示されたmRNA量で、5'UTR配列（配列番号1に示されるXenopusのβ-グロビンUTR）を有する（「+新規の5'UTR」として示される薄い影を付けた丸）または有さない（「5'UTRなし」として示される濃い影を付けた丸）アルブミン標的化ZFNをコードするmRNAをトランスフェクトされたK562細胞における、ヌクレアーゼ活性（%インデル、ディープシーケンシングによって決定された）を示すグラフである。トランスフェクションの24時間後に、細胞をZFN活性に関して査定した。薄い影を付けた丸の上の数（5'UTRを含むmRNA）は、5'UTRを有さないmRNAと比較した増加倍率を示す。

10

【0057】

【図10A】図10A~10Cは、in vivoまたはin vitroでの切断効率およびZFN発現を示すグラフである。図10Aは、示されたZFN構築物の注射から56日後のマウス肝臓細胞における%インデルによって決定されたin vivoでの切断を示すグラフであり、図10Bは、ZFNの発現レベルを示す。野生型雄マウスに、5'UTR、FLAGペプチドおよびWPRE配列を有さない（「ZFN標準」）または有する（「ZFN改善」または「ZFP2.0」）アルブミンZFNをコードするAAV6構築物ならびにIDSドナーを、3種の用量：2.0E+11vg/マウス（低用量）、6.0E+11vg/マウス（中用量）および/または2.0E+12vg/マウス（高用量）で静脈注射した。肝臓試料を注射から56日後に収集した。左から右へ、製剤緩衝液、低用量の改変されていない（標準）ZFNをコードするベクター、低用量の本明細書に記載されるように改変されたAAV ZFNをコードするベクター、改変されていない（標準）中用量、本明細書に記載されるように改変された中用量のAAV ZFNをコードするベクターZFN、改変されていない（標準）高用量、および本明細書に記載されるように改変された高用量のAAV ZFNをコードするベクターZFNの投与後のインデルが示される。示した通り、本明細書に記載される改変（5'UTR、5'ペプチド、WPRE）を含むAAVベクターは、改変されていないAAVベクターと比較して、切断効率において7倍の増加をもたらした。両側スチューデントt検定により、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。図10Cは、71557/71728または47171/47898 ZFN対を使用したFIXドナーの発現の増加を実証する。1日目に、ZFN対を使用してHepG2細胞を処置し、次いで2日目に（one day 2）、FIX導入遺伝子を使用した。9日目に、培地をELISAに供して、発現されたFIXタンパク質の量を決定した。データから、71557/71728 ZFN対の使用が、47171/47898対と比較して、培地中においてほぼ3倍多くのFIXの発現をもたらしたことが実証される。

20

30

【図10B】同上。

【図10C】同上。

【0058】

【図11A】図11A~11Cは、これらの研究で使用されたドナー設計を描写する。図11Aは、ドナーAAVに含まれるエレメントおよび導入遺伝子を示す3つのドナーの図式的な描写である。図11Bは、初代ヒト肝細胞で編集するための改変の結果（左のグラフ）、および改善されたZFN（「ZFN2.0」、示された用量のもとの右のバーとして示される）と比較した、標準（「現行」、示された用量のもとの左のバーとして示される）ZFN対を使用した、ZFN駆動型の標的化組込みに供された肝細胞の上清で検出された活性の増加を示す。図11Cは、図10および実施例7に記載された通りに処置されたマウス対象のin vivoでの導入遺伝子発現（IDS）を示すグラフである。野生型雄マウスに、5'UTR、FLAGペプチドおよびWPRE配列を有さない（「ZFN標準」）または有する（「ZFN改善」）アルブミンZFNをコードするAAV6構築物ならびにIDSドナーを、3種の用量：2.0E+11vg/マウス（低用量）、6.0E+11vg/マウス（中用量）および/または2.0E+12vg/マウス（高用量）で静脈注射した。肝臓試料を注射から56日後に収集し、相対的な導入遺伝子発現を、実

40

50

施例に記載された通りに測定した。左から右へ、製剤緩衝液、低用量の改変されていない（標準）ZFNをコードするベクター、低用量の本明細書に記載されるように改変されたAAV ZFNをコードするベクター、改変されていない（標準）中用量、本明細書に記載されるように改変された中用量のAAV ZFNをコードするベクターZFN、改変されていない（標準）高用量、および本明細書に記載されるように改変された高用量のAAV ZFNをコードするベクターZFNの投与後の結果が示される。示した通り、本明細書に記載される改変（5' UTR、5' ペプチド、WPRE）を含むAAVベクターは、ドナー（IDS）発現において、改変されていないAAVベクターと比較して18倍の増加をもたらした。

【図11B】同上。

【図11C】同上。

【0059】

【図12】図12は、実施例7ならびに図10および11に記載された通りに処置された対象の肝臓試料におけるIDS発現のウェスタンブロット解析の結果を示す。

【0060】

【図13】図13は、標的化組込みのための、改変されたおよび改変されていないZFN（低、中および用量）と共に投与されたドナーによってコードされたIDSタンパク質の酵素活性を示すグラフである（実施例7を参照）。酵素活性を、実施例に記載された通りに測定した。左から右へ、製剤緩衝液、低用量の改変されていない（標準）ZFNをコードするベクター、低用量の本明細書に記載されるように改変されたAAV ZFNをコードするベクター、改変されていない（標準）中用量、本明細書に記載されるように改変された中用量のAAV ZFNをコードするベクターZFN、改変されていない（標準）高用量、および本明細書に記載されるように改変された高用量のAAV ZFNをコードするベクターZFNの投与後の結果が示される。

【0061】

【図14A】図14Aおよび14Bは、標準47171 / 47898 ZFN対または71557 / 71728 ZFN対を使用した、HepG2細胞におけるIDUAドナーの挿入を描写する。図14Aは、ZFNおよびドナーで処置したHepG2細胞の上清における経時的なIDUA活性を描写する。ZFN用量は600KのMOIであり、ドナーは1200KのMOIの用量であった。図14Bは、細胞中の各試験条件に対してインデルのパーセントを描写する。データから、ZFNの両方の対が活性であり、IDUA導入遺伝子のZFN指向性の標的化組込みを引き起こすことが実証される。

【図14B】同上。

【発明を実施するための形態】

【0062】

操作されたヌクレアーゼの発現の効率（切断活性）を増加させるための、ならびにオンターゲットの操作されたヌクレアーゼ切断活性の特異性を増加させるための方法および組成物が本明細書で開示される。方法は、ヌクレアーゼ発現ベクター中の発現エレメントの組合せを最適化するステップ、およびFokI切断ドメインとDNAとの間の非特異的な相互作用を減少させるステップ、およびジンクフィンガー主鎖とDNAとの間の非特異的な相互作用を減少させるステップを含む。さらに、本発明の方法および組成物は、ヒトアルブミン遺伝子座を高い特異性で切断することが可能な最適化されたZFN試薬を提供し、最適化されたアルブミン試薬は、野生型アルブミン標的配列およびSNPを含む同じ標的配列を切断することも可能である。本明細書に記載されるZFN試薬は、アルブミン遺伝子の効率的な高度に標的化された切断のために、例えば、タンパク質（複数可）が対象において発現され、対象における疾患または障害を低減、防止、および／または処置する（例えば、症状を軽減する）ように、1つまたは複数の治療用タンパク質をコードする配列（例えば、疾患または障害を有する対象において欠けているまたは欠乏しているタンパク質）を、切断されたアルブミン遺伝子へとヌクレアーゼの媒介により組み込むために、使用できる。

10

20

30

40

50

【0063】

血友病Bは、血液凝固第ⅠX因子（FⅠX）をコードする遺伝子における変異によって引き起こされるX連鎖劣性遺伝の出血障害である。これはクリスマス病としても公知であり、血友病Aまたは第ⅤⅠⅠⅠ因子欠乏症に続き血友病の2番目に一般的な形態である。これは、米国において、25,000人の男性のうち約1人で発生し、有病率はおおよそ4,000である。疾患の徴候は、第ⅠX因子の凝固活性のレベルに応じて変化する。血友病Bを有する対象の大部分は、疾患の重度の形態（＜1%のFⅠX活性）を有する。彼らは通常、突発性の関節または深部筋肉の出血を起こしてから最初の2年中に診断される。中等度の疾患を有する者（1～5%のFⅠX活性）は、比較的軽い外傷後に、長期の、または遅延性の出血を呈し、6歳より前に診断される。比較によって、軽症血友病患者（＞5～30%のFⅠX活性）は、人生の後半で診断され、突発性出血を患っていないが、外科手術または抜歯後に多量出血を起こす。最終的に、女性キャリアのおおよそ10%が30%未満のFⅠX活性を有し、大怪我または外科手術の後に多量出血のリスクがある。

10

【0064】

血友病Bの現行処置は、FⅠX濃縮物の使用からなり、1960年代後半、FⅠX濃縮物は当初ドナー血漿由来であった。ウイルス不活性化およびドナーのスクリーニングなどのその後の改善により、さらに精製された濃縮物が得られ、1997年に組換えFⅠXの導入で全盛をきわめた。ごく最近、米国において、毎週または2週に1回の投与を可能にする組換えFⅠX Fc融合タンパク質の販売が承認された。第ⅠX因子のレベルを正常（すなわち約250ng/mL）の約5%に増加させることにより、症状の著しい改善がもたらされ、これは、突発性の生命を脅かす出血事象を防止するのに十分である。（Scriver, CR et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York:McGraw-Hill (2001); Lofqvist, T et al. (1997) J. Intern. Med. 241(5):395-400; Ljung, RC. (1998) Br. J. Haematol. 101(2):215-219）。これらの治療の進歩は、平均余命中央値を、血漿由来FⅠXの導入前の11歳から、組換えタンパク質で63歳に増加させた（Darby, SC et al. (2007) Blood. 110(3):815-25）。

20

【0065】

血友病Bの現行処置は、精製組換え第ⅠX因子の長期にわたる繰り返しの静脈内注入を頼るが、いくつかの欠点に悩まされている。欠点には、繰り返しの静脈内注入の必要性が挙げられ、これは、インヒビターの形成を伴い、治療的というより予防的である。凝固因子送達への代替アプローチは、in situ（対象の肝臓内）での治療的導入遺伝子からの合成に基づき、これらの懸念を排除する見込みを提供する。本明細書で開示される方法および組成物は、矯正的なFⅠX導入遺伝子を、ゲノム中、かつおよび対象自身の内因性アルブミン遺伝子座または高度に発現された外因性プロモーターの制御下に配置することにより、第ⅠX因子の肝臓特異的な合成を生じさせる新規の戦略を介して血友病Bを処置することを記載している。特に、本明細書に記載される操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、in vivoでFⅠX導入遺伝子を対象自身の肝細胞のゲノムに部位特異的に組み込むために用いられる。本明細書に記載されるヌクレアーゼを使用するFⅠX導入遺伝子の組み込みは、対象の血液への、安定な、高いレベルのFⅠXの肝臓特異的な発現および分泌をもたらす。

30

40

【0066】

ムコ多糖症Ⅰ型（MPSⅠ）は、ハーラー／ハーラーシャイエ／シャイエ症候群とも称され、劣性リソソーム蓄積症である。National Institute of Neurological Disorders and Stroke（NINDS）のMPSⅠのファクトシートによれば、推測された発生率は、重度のMPSⅠについて新生児約100,000人に1人、軽症MPSⅠについて新生児約500,000人に1人、および重度と軽症との間の疾患について新生児約115,000人に1人である。

【0067】

MPSⅠは、グリコサミノグリカン（硫酸化炭水化物ポリマー；GAG）を分解する

50

イズロニダーゼ（IDUA）酵素をコードする遺伝子における変異に関連する。IDUA 遺伝子における変異は、IDUA 酵素活性を減らすかまたは消失させ、尿、血漿、および体内組織中における毒性 G A G の蓄積をもたらす。

【0068】

IDUA 変異の特定のタイプ（100 種よりも多くの異なる変異が記載されている）および結果得られた残留 IDUA 酵素のレベルに応じて、患者は、ハーラー症候群（MPS IH）または軽症バリエーション（MPS IH/S および MPS IS）のいずれかを発症する。全ての MPS IH 患者の 50%～80% が重度の形態を呈することが推測されるが、それは、診断が比較的容易であることに一部起因し得る（Muenzer et al. (2009) Pediatrics. 123(1):19-29）。MPS IH 患者は、生後 1 年の終わりまでに発達遅延の症状を、加えて 2 歳～4 歳の間に成長の停止と進行性の精神的退化を示す。他の症状としては、臓器巨大症、角膜混濁、関節硬直および骨格奇形（異常な脊椎の骨を含む）、舌の肥大を伴う粗い顔貌、聴力の喪失ならびにヘルニアが挙げられる。これらの MPS IH 患者の平均余命は、10 歳未満である。軽症型を有する患者は、これらの臨床徴候のほとんどを合わせ持つが、症状はそれほど重度ではない。加えて、CNS の関与はなく、それゆえに彼らは精神遅滞を患わない。

【0069】

これらの患者の多くは、成人期まで生存できるが、罹患率は著しい。MPS I のための現行療法としては、造血幹細胞移植（HSCT）および酵素補充療法（ERT）が挙げられる。重度の MPS I 形態（MPS IH）を患っている患者が早期に（<2.5 歳）診断できる場合、HSCT（骨髄または臍帯幹細胞）による治療的介入が、神経認知（neurocognition）を含むほとんどの臨床的特徴を防止するかまたは好転させることができる。現在、MPS IH を有するほとんど全ての患者は HSCT を受ける。MPS I の場合、HSCT 後の死亡率は 15% であり、生着が成功した生存率は、2003 年から使用されているチャイニーズハムスター卵巣細胞で産生された多型組換えタンパク質である Aldurazyme（登録商標）を用いた ERT で 56% である。この酵素は、肺機能、肝脾腫大、および運動能力を改善することが示されており、改善された健康に関する生活の質をもたらす。ERT は、できるだけ早期に始めるべきである。酵素補充療法の限界としては、生涯にわたる処置の必要性、中和抗体の発生、血液脳関門を通過できないこと、継続的な心臓の、整形外科的な、眼の合併症、および煩わしい毎週の静脈内注入が挙げられる。まとめると、これらの限界により、MPS I のための幅広い根治療法を開発する緊急の必要性が強調される。

【0070】

本明細書で開示される方法および組成物の使用に関する目的と根拠は、in vivo でのゲノム編集によって酵素補充療法への必要性をなくすかまたは減少させることである。特に、本明細書に記載される操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、in vivo でイズロニダーゼ酵素（hIDUA）導入遺伝子の矯正的なコピーを対象自身の肝細胞のゲノムに部位特異的に組み込むために用いられる。hIDUA 導入遺伝子の組み込みは、アルブミン遺伝子座のイントロン 1 に標的化することができ、その結果、血液への、安定な、高いレベルの、イズロニダーゼの肝臓特異的な発現および分泌がもたらされる。高度に発現される内因性アルブミン遺伝子座の制御下に hIDUA 導入遺伝子を配置することは、MPS I 患者の寿命にわたり永続的なイズロニダーゼの肝臓特異的な発現を提供することが予想される。

【0071】

ムコ多糖症 II（MPS II）は、ハンター症候群とも称され、主に男性で見られる X 連鎖、劣性遺伝の、リソソーム蓄積症である。MPS II の発生率は、生児出生 100,000 当たり 0.3～0.71 として報告されている（Burton & Giugliani (2012) Eur J Pediatr. 171(4):631-9. doi:10.1007/s00431-012-1703-y. Epub 2012 Mar 1.）。疾患の軽症型についての、21.7 歳というより保守的な平均余命中央値（疾患の重度の形態の平均余命は、11.8 歳である）（Burrow & Leslie (200

8) *Biologics*, 2008 Jun; 2(2):311-20; Young & Harper (1982) *J Med Genet*, 19(6):408-11) を、1 年の発生率に適用すると、米国で現在生存している約 6 2 9 人の MPS II を有する個体の推定有病率が得られる。

【0072】

MPS II は、ムコ多糖類グリコサミノグリカン (GAG) のリソソーム分解に関与する酵素をコードするイズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) 遺伝子における変異によって引き起こされる。これは、尿、血漿および組織中における GAG の蓄積をもたらし、多系統の進行性の疾患を引き起こす。ハンター症候群は、身体および認知への影響を伴う早期発症の重度の疾患 (患者の 3 分の 2) から、身体疾患の遅い発症、および中枢神経系 (CNS) 疾患がほとんどないことによって特徴付けられる軽症 MPS II にわたる疾患スペクトルを表す。IDS 変異の特定のタイプ (> 150 の遺伝子変異が同定されている) および結果得られた残留 IDS 酵素のレベルが、疾患の重症度を決定する可能性が最も高い。軽症型における残留 IDS 活性は、野生型 IDS 活性の 0.2~2.4% で測定されており、重度の表現型を有するものは活性がない (Sukegawa-Hayasaka et al. (2006) *J Inherit Metab Dis* 29(6):755-61)。IDS 遺伝子は、Xq28 にマッピングされ、24 kb にわたり広がる 9 つのエクソンを含有する。主要な欠失および再配列は常に、疾患の重度の形態に関連する。

【0073】

重度の MPS II 患者は、典型的には、18 ヶ月~3 歳の間に言語遅滞および発達の遅延を有することから始まる。疾患は、重度の MPS II 患者において、臓器巨大症、活動過多および攻撃性、神経学的な劣化、関節硬直および骨格奇形 (異常な脊椎の骨を含む)、舌の肥大を伴う粗い顔貌、心臓弁の肥大、聴力の喪失ならびにヘルニアにより特徴付けられる。重度のハンター症候群を有する未処置患者の平均余命は、十代の中ほどまでであり、神経学的な劣化および/または心肺機能障害により死亡する。軽症型を有する患者は、典型的には、重度の患者よりも後に診断される。身体的な臨床的特徴は重度の患者に類似しているが、全体的な疾患の重症度は、より軽度であり、一般的に疾患進行はより遅く、認知機能障害はないか、または軽度にすぎない。未処置の軽症型における死亡は、心臓および呼吸器疾患が原因で 20~30 歳の間であることが多い。

【0074】

唯一の承認された MPS II のための療法が、酵素補充療法 (ERT) である。組換え IDS タンパク質 (イズルスルファターゼ; Elaprase (登録商標)) を用いた静脈内 (IV) ERT は、2006 年から承認されている。イズルスルファターゼを使用した ERT は、肝脾腫大、肺機能 (FVC) および運動能力 (6 分間の歩行) を改善することが示されており、改善された健康に関する生活の質をもたらす。ERT に対する応答は、処置開始時の対象の疾患の重症度に依存する。ERT の限界としては、生涯にわたる処置の必要性、中和抗体の発生、酵素が血液脳関門を通過できないこと、および煩わしい毎週の静脈内注入が挙げられる。ハーラー症候群 (MPS I の重度の形態) とは対照的に、造血幹細胞移植 (HSCT) は、MPS II の重度の形態に推奨されない。まとめると、これらの限界により、MPS II のための幅広い根治療法を開発する緊急の必要性が強調される。

【0075】

したがって、本明細書で開示される方法および組成物は、MPS II を有する対象における *in vivo* のゲノム編集によって酵素補充療法への必要性をなくすかまたは減少させる。特に、本明細書に記載される操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) は、*in vivo* で酵素イズロン酸-2-スルファターゼ (hIDS) 導入遺伝子の矯正的なコピーを対象自身の肝細胞のゲノムに部位特異的に組み込むのに使用される。hIDS 導入遺伝子の組み込みは、アルブミン遺伝子座のイントロン 1 に標的化され、その結果、血液への、安定な、高いレベルの、イズロン酸-2-スルファターゼの肝臓特異的な発現および分泌がもたらされる。高度に発現された内因性アルブミン遺伝子座の制御下に hIDS 導入遺伝子を配置することは、MPS II 患者の寿命にわたり永続的な

イズロン酸-2-スルファターゼの肝臓特異的な発現を提供することが予想される。

総論

【0076】

方法の実施、ならびに本明細書で開示される組成物の調製および使用は、別段の指定がない限り、当業界の技術範囲内ものとして、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算機化学、細胞培養、組換えDNAならびに関連分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献で十分に説明されている。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および定期のアップデート; METHODS IN ENZYMOLOGYのシリーズ、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; ならびに METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999を参照されたい。

10

【0077】

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、同義的に使用され、直鎖状または環状のコンフォメーションの、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またはリボヌクレオチドポリマーを指す。本開示の目的のために、これらの用語は、ポリマーの長さに関する限定と解釈されないものとする。用語は、天然ヌクレオチドの公知のアナログ、ならびに塩基、糖および／またはリン酸部分において改変されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート主鎖）を包含し得る。一般的に、特定のヌクレオチドのアナログは、同じ塩基対形成の特異性を有し、すなわち、Aのアナログは、Tと塩基対を形成する。

20

【0078】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、同義的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。用語は、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アナログまたは改変された誘導体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

30

【0079】

「結合」は、高分子間の（例えば、タンパク質と核酸との間の）配列特異的な非共有結合の相互作用を指す。全体としての相互作用が配列特異的である限り、必ずしも結合相互作用の全ての成分が配列特異的であること（例えば、DNA主鎖中のリン酸残基との接触）を必要としない。このような相互作用は、一般的に 10^{-6} M^{-1} またはそれよりも低い解離定数 (K_d) によって特徴付けられる。「親和性」は、結合の強度を指し、結合親和性の増加は、より低い K_d と相関する。「非特異的な結合」は、オンターゲット配列に依存しない目的の任意の分子（例えば操作されたヌクレアーゼ）と高分子（例えばDNA）との間に生じる非共有結合の相互作用を指す。

40

【0080】

「結合タンパク質」は、非共有結合によって別の分子に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、それは、それ自体に結合することができ（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（単数または複数）の1つもしく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つよりも多くのタイプの結合活性を有していてもよい。例えば、ジンク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

50

る。RNA誘導型ヌクレアーゼ系の場合、RNAガイドは、ヌクレアーゼの成分（Cas9またはCpf1）にとって異種であり、両方とも操作することができる。

【0081】

「DNA結合分子」は、DNAに結合することができる分子である。このようなDNA結合分子は、ポリペプチド、タンパク質のドメイン、より大きいタンパク質またはポリヌクレオチド内のドメインであり得る。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAであり、一方で他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAである。一部の実施形態では、DNA結合分子は、ヌクレアーゼのタンパク質ドメイン（例えばFokIドメイン）であり、一方で他の実施形態では、DNA結合分子は、RNA誘導型ヌクレアーゼのガイドRNA成分（例えばCas9またはCpf1）である。

10

【0082】

「DNA結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、配列特異的な方式で、例えば1つもしくは複数のジンクフィンガーを介して、またはそれぞれジンクフィンガータンパク質もしくはTALEにおける1つもしくは複数のRVDとの相互作用を介してDNAに結合する、タンパク質、またはより大きいタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、しばしばジンクフィンガータンパク質またはZFPと略記される。

【0083】

「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、配列特異的な方式で、構造が亜鉛イオンの配位を介して安定化された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介してDNAに結合する、タンパク質、またはより大きいタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、しばしばジンクフィンガータンパク質またはZFPと略記される。人工ヌクレアーゼおよび転写因子は、ZFP DNA結合ドメインおよび機能性ドメイン（ZFNのためのヌクレアーゼドメインまたはZFPTFのための転写調節ドメイン）を含み得る。用語「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」は、二量体化して標的遺伝子を切断する1つのZFN、ならびにZFNの対（対のメンバーは、「左および右」または「第1および第2」または「対」と称される）を含む。

20

【0084】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つまたは複数のTALE反復ドメイン／単位を含むポリペプチドである。反復ドメインは、TALEのそのコグネート標的DNA配列への結合に関与する。単一の「反復単位」（「反復」とも称される）は、典型的には33～35アミノ酸の長さであり、天然に存在するTALEタンパク質内の他のTALE反復配列と少なくともある程度の配列相同性を示す。例えば、米国特許第8,586,526号および同第9,458,205号を参照されたい。人工ヌクレアーゼおよび転写因子は、TALE DNA結合ドメインおよび機能性ドメイン（TALENのためのヌクレアーゼドメインまたはTALENTFのための転写調節ドメイン）を含み得る。用語「TALEN」は、二量体化して標的遺伝子を切断する1つのTALEN、ならびにTALENの対（対のメンバーは、「左および右」または「第1および第2」または「対」と称される）を含む。

30

【0085】

ジンクフィンガーおよびTALE DNA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の認識ヘリックス領域を操作すること（1つまたは複数のアミノ酸を変更すること）を介して、またはDNA結合に関与するアミノ酸（「反復可変二残基」またはRVD領域）を操作することによって、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」することができる。それゆえに、操作されたジンクフィンガータンパク質またはTALEタンパク質は、天然に存在しないタンパク質である。ジンクフィンガータンパク質およびTALE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。設計されたタンパク質は、その設計／組成が主として合理的な基準に起因する天然に存在しないタンパク質である。設計に関する合理的な基準としては、置換ルールの適用、ならび

40

50

に既存のZFPまたはTALE設計および結合データのデータベース保存情報における情報を処理するためのコンピューター化されたアルゴリズムが挙げられる。例えば、米国特許第8,586,526号；同第6,140,081号；同第6,453,242号；および同第6,534,261号を参照されたい；また、WO98/53058；WO98/53059；WO98/53060；WO02/016536およびWO03/016496も参照されたい。

【0086】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質、TALEタンパク質またはCRISPR/Cas系は、天然に見出されず、それらの産生は主として、実験的なプロセス、例えばファージディスプレイ、相互作用トラップ、合理的設計またはハイブリッド選択に起因する。例えば、US5,789,538；US5,925,523；US6,007,988；US6,013,453；US6,200,759；WO95/19431；WO96/06166；WO98/53057；WO98/54311；WO00/27878；WO01/60970；WO01/88197およびWO02/099084を参照されたい。

【0087】

「TtAgo」は、遺伝子サイレンシングに関与すると考えられる原核生物アルゴノートタンパク質である。TtAgoは、細菌*Thermus thermophilus*由来である。例えば、Swarts et al、同上；G. Sheng et al., (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 652を参照されたい。「TtAgo系」は、例えばTtAgo酵素による切断のためのガイドDNAを含む必要な全ての成分である。

【0088】

「組換え」は、これらに限定されないが、非相同末端結合（NHEJ）による捕捉および相同組換えを含む、2つのポリヌクレオチド間の遺伝情報の交換プロセスを指す。この開示の目的のために、「相同組換え（HR）」は、例えば、相同組換え修復メカニズムを介した細胞における二本鎖切断の修復中に起こる、このような交換の特殊化した形態を指す。このプロセスは、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を経たもの）の鋳型修復に「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝情報の移入をもたらすことから、「非交差遺伝子変換」または「ショートトラクト遺伝子変換」として様々な形で公知である。いかなる特定の理論にも縛られることは望まないが、このような移入は、切断した標的とドナーとの間で形成されるヘテロ二重鎖DNAのミスマッチ修正、ならびに／またはドナーを使用して標的および／もしくは関連プロセスの一部になる遺伝情報を再合成する「合成依存性鎖アニーリング」を含み得る。このような特殊化したHRは、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全部が標的ポリヌクレオチドに取り込まれるような、標的分子の配列の変更をもたらすことが多い。

【0089】

本開示のある特定の方法において、本明細書に記載される1つまたは複数の標的化されたヌクレアーゼは、所定の部位（例えば、目的の遺伝子または遺伝子座）で標的配列（例えば、細胞クロマチン）に二本鎖切断（DSB）を作り出す。DSBは、本明細書に記載される構築物（例えばドナー）の組み込みを媒介する。必要に応じて、構築物は、切断の領域中のヌクレオチド配列への相同性を有する。発現構築物は、物理的に組み込まれてもよく、あるいは、発現カセットは、相同組換えを介して、切断の修復のための鋳型として使用され、結果として、発現カセットの場合と同様にヌクレオチド配列の全部または一部の細胞クロマチンへの導入が起こる。したがって、細胞クロマチン中の第1の配列は、変更されてもよく、ある特定の実施形態では、発現カセット中に存在する配列に変換されてもよい。したがって、用語「置き換える」または「置き換え」の使用は、1つのヌクレオチド配列の別のものによる置き換え（すなわち、情報としての意味での配列の置き換え）を表すと理解することができ、必ずしも1つのポリヌクレオチドの別のものによる物理的または化学的な置き換えを必要としない。

【0090】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、追加の操作されたヌクレアーゼは、細胞内の追加の標的部位の追加の二本鎖切断に使用することができる。

【0091】

細胞クロマチン中の目的の領域における配列の標的化された組換えおよび／または置き換えおよび／または変更のための方法のある特定の実施形態では、染色体配列は、外因性「ドナー」ヌクレオチド配列との相同組換えによって変更される。このような相同組換えは、切断の領域に相同な配列が存在する場合、細胞クロマチン中の二本鎖切断の存在によって刺激される。

【0092】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、第1のヌクレオチド配列（「ドナー配列」）は、目的の領域中のゲノム配列と相同だが同一ではない配列を含有していてもよく、それにより相同組換えを刺激して、目的の領域中の同一ではない配列を挿入する。したがって、ある特定の実施形態では、目的の領域中の配列に相同なドナー配列の部分は、置き換えられるゲノム配列に対して約80～99%の間（またはそれらの間の任意の整数）の配列同一性を示す。他の実施形態では、例えば100個の連続する塩基対にわたりドナーとゲノム配列との間で1つのみヌクレオチドが異なる場合、ドナーとゲノム配列との相同性は99%よりも高い。ある特定の場合では、ドナー配列の非相同部分は、新しい配列が目的の領域に導入されるように、目的の領域中に存在しない配列を含有していてもよい。これらの場合では、非相同配列は、一般的に、目的の領域中の配列に相同または同一な、50～1,000塩基対（またはそれらの間の任意の整数値）の配列、または1,000個よりも大きい任意の数の塩基対に挟まれる。他の実施形態では、ドナー配列は、第1の配列に非相同であり、非相同組換えメカニズムによってゲノムに挿入される。

【0093】

本明細書に記載される方法のいずれかは、ドナー配列の標的化組込みによる、または標的配列の切断とそれに続く目的の遺伝子の発現を破壊するエラーブローンNHEJ媒介性修復を介する、細胞中の1つまたは複数の標的配列の、部分的または完全な不活性化のために使用することができる。部分的または完全に不活性化された遺伝子を含む細胞系も提供される。

【0094】

さらに、本明細書に記載される標的化組込みの方法は、1つまたは複数の外因性配列を組み込むのにも使用できる。外因性核酸配列は、例えば、1つもしくは複数の遺伝子もしくはcDNA分子、または任意のタイプのコードもしくは非コード配列、ならびに1つもしくは複数の制御エレメント（例えば、プロモーター）を含んでいてもよい。加えて、外因性核酸配列は、1つまたは複数のRNA分子（例えば、小ヘアピンRNA（shRNA）、阻害性RNA（RNAi）、マイクロRNA（miRNA）など）を産生することができる。

【0095】

「切断（cleavage）」は、DNA分子の共有結合の主鎖の切断（breakage）を指す。切断は、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な加水分解を含む様々な方法によって開始させることができる。一本鎖切断と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生成をもたらすことができる。ある特定の実施形態では、標的とされた二本鎖DNA切断のために、融合ポリペプチドが使用される。

【0096】

「切断ハーフドメイン」は、第2のポリペプチド（同一または異なる）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」および「右および左の切断ハーフドメイン」は、同義的に使用されて、二量体化する切断ハーフドメインの対を指す。用語「切断ドメイン」は、用語「切断ハーフドメイン」と同義的に使

10

20

30

40

50

用される。用語「F o k I 切断ドメイン」は、配列番号 2 に示される F o k I 配列および任意の F o k I 相同体を含む。

【0097】

「操作された切断ハーフドメイン」は、別の切断ハーフドメイン（例えば、別の操作された切断ハーフドメイン）との絶対ヘテロ二量体を形成するように改変された切断ハーフドメインである。

【0098】

用語「配列」は、DNA または RNA であってもよく、直鎖状、環状または分岐状であってもよく、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい、任意の長さのヌクレオチド配列を指す。用語「導入遺伝子」は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。導入遺伝子は、任意の長さ、例えば、2～100,000、000ヌクレオチドの間の長さ（またはそれらの間の、またはそれらを超える任意の整数値）、好ましくは、約100～100,000ヌクレオチドの間の長さ（またはそれらの間の任意の整数）、より好ましくは、約2000～20,000ヌクレオチドの間の長さ（またはそれらの間の任意の値）、さらにより好ましくは、約5～15kbの間（またはそれらの間の任意の値）のものであってもよい。

【0099】

「染色体」は、細胞のゲノムの全部または一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、その核型によって特徴付けられることが多く、核型は、細胞のゲノムを構成する全ての染色体の集合である。細胞のゲノムは、1つまたは複数の染色体を含んでいてもよい。

【0100】

「エピソード」は、細胞の染色体の核型の一部ではない、複製能のある核酸、核タンパク質複合体または核酸を含む他の構造である。エピソードの例としては、プラスミド、ミニサークルおよびある特定のウイルスゲノムが挙げられる。本明細書に記載される肝臓特異的な構築物は、エピソードにより維持されてもよく、あるいは、細胞に安定して組み込まれていてもよい。

【0101】

「外因性」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学的、生化学的または他の方法によって細胞に導入できる分子である。「細胞中に通常存在すること」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、筋肉の胚発生中にのみ存在する分子は、成体筋肉細胞にとって外因性分子である。同様に、熱ショックにより誘導された分子は、熱ショックを受けていない細胞にとって外因性分子である。外因性分子は、例えば、正常に機能しない内因性分子の機能するバージョン、または正常に機能する内因性分子の正常に機能しないバージョンを含んでいてもよい。

【0102】

外因性分子は、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たなどの小分子、またはタンパク質、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改変された誘導体、または上記の分子の1つもしくは複数を含む任意の複合体であってもよい。核酸としては、DNA および RNA が挙げられ、これらは、一本鎖または二本鎖であってもよく、直鎖状、分岐状または環状であってもよく、任意の長さのものであってもよい。核酸としては、二重鎖を形成することが可能なもの、ならびに三重鎖形成核酸が挙げられる。例えば、米国特許第5,176,996号および同第5,422,251号を参照されたい。タンパク質としては、これらに限定されないが、DNA 結合タンパク質、転写因子、クロマチン再構築因子、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、リガーゼ、デユビキチナーゼ、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挙げられる。

【0103】

外因性分子は、内因性分子と同じタイプの分子、例えば、外因性タンパク質または核酸であってもよい。例えば、外因性核酸は、細胞中に通常存在しない、細胞または染色体に導入される感染性のウイルスゲノム、プラスミドまたはエピソームを含んでいてもよい。外因性分子の細胞への導入のための方法は、当業者に公知であり、これらに限定されないが、脂質媒介性移入（すなわち、中性およびカチオン脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、粒子衝撃、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性移入およびウイルスベクター媒介性移入が挙げられる。また外因性分子は、内因性分子と同じタイプの分子であってもよいが、細胞が由来するものとは異なる種に由来する。例えば、ヒト核酸配列は、元々はマウスまたはハムスター由来の細胞系に導入されてもよい。外因性分子の植物細胞への導入のための方法は、当業者に公知であり、これらに限定されないが、プロトプラスト形質転換、炭化ケイ素（例えば、WHISKERS（商標））、アグロバクテリウム媒介性形質転換、脂質媒介性移入（すなわち、中性およびカチオン脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、粒子衝撃（例えば、「遺伝子銃」を使用する）、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性移入およびウイルスベクター媒介性移入が挙げられる。

【0104】

それに対して、「内因性」分子は、特定の細胞中に、特定の発生段階で、特定の環境条件下で通常存在するものである。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリアのゲノム、葉緑体もしくは他の細胞器官、または天然に存在するエピソームの核酸を含み得る。追加の内因性分子としては、タンパク質、例えば、転写因子および酵素を挙げることができる。

【0105】

用語「外因性核酸の生成物」は、本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド生成物の両方、例えば、転写産物（ポリヌクレオチド、例えばRNA）および翻訳産物（ポリペプチド）を含む。

【0106】

「融合」分子は、2つまたはそれよりも多くのサブユニット分子が好ましくは共有結合によって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であってもよく、異なる化学的タイプの分子であってもよい。融合分子の例としては、これらに限定されないが、融合タンパク質（例えば、タンパク質DNA結合ドメインと、切断ドメイン、例えばZFNまたはTALENとの融合体）、切断ドメインと作用的に会合したポリヌクレオチドDNA結合ドメイン（例えば、sgRNA）の融合体、および融合核酸（例えば、融合タンパク質をコードする核酸）が挙げられる。

【0107】

細胞における融合分子の発現は、細胞への融合分子の成分の送達から、または細胞への融合分子の1つもしくは複数の成分をコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドの送達によって生じてもよく、必須のポリヌクレオチドが転写され、転写物が翻訳されて、融合分子を生成する。また、細胞におけるタンパク質の発現に、トランススプライシング、ポリペプチドの切断およびポリペプチドのライゲーショが含まれていてもよい。細胞へのポリヌクレオチドおよびポリペプチド送達のための方法は、この開示の他所で提示される。

【0108】

「遺伝子」は、本開示の目的に関して、遺伝子産物をコードするDNA領域（下記を参照）、ならびに遺伝子産物の産生を調節する全てのDNA領域を含み、このような調節配列がコード配列および／または転写された配列に隣接しているかどうかは問わない。したがって、遺伝子としては、必ずしもこれらに限定されないが、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列、例えばリボソーム結合部位および内部リボソーム進入部位、エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス結合部位および遺伝子座制御領域が挙げられる。

【0109】

10

20

30

40

50

「遺伝子発現」は、遺伝子に含有される情報の遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接的な転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNAまたは他の任意のタイプのRNA）、またはmRNAの翻訳によって産生されたタンパク質であり得る。遺伝子産物は、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集などのプロセスによって改変されたRNA、ならびに例えばメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP-リボシル化、ミリスチル化（myristylation）、およびグリコシル化によって改変されたタンパク質も含む。

【0110】

遺伝子発現の「モジュレーション」は、遺伝子の活性の変化を指す。発現のモジュレーションとしては、これらに限定されないが、遺伝子の活性化および遺伝子の抑制を挙げることができる。ゲノム編集（例えば、切断、変更、不活性化、ランダム変異）を使用して、発現をモジュレートすることができる。遺伝子の不活性化は、本明細書に記載されるZFP、TALEまたはCRISPR/Cas系を含まない細胞と比較した、遺伝子発現における任意の低減を指す。したがって、遺伝子の不活性化は、部分的であっても、完全であってもよい。

【0111】

「目的の領域」は、外因性分子に結合することが望ましい、細胞クロマチンの任意の領域、例えば、遺伝子、または遺伝子内もしくは遺伝子に隣接する非コード配列などである。結合は、標的化されたDNA切断および／または標的化された組換えの目的のためであり得る。目的の領域は、例えば、染色体、エピソーム、細胞小器官のゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）、または感染性のウイルスゲノム中に存在していてもよい。目的の領域は、遺伝子のコード領域内、例えば、リーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロンなどの転写された非コード領域内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの転写されなかった領域内であってもよい。目的の領域は、単一のヌクレオチド対ほど小さくてもよく、もしくは最長2,000ヌクレオチド対の長さであってもよく、または任意の整数値のヌクレオチド対であってもよい。

【0112】

「セーフハーバー」遺伝子座は、宿主細胞に対していかなる有害効果もなく遺伝子を挿入することができるゲノム内の遺伝子座である。最も有益なものは、挿入された遺伝子配列の発現が、隣接遺伝子からの任意のリードスルー発現によって攪乱されないセーフハーバー遺伝子座である。ヌクレアーゼ（複数可）によって標的化されるセーフハーバー遺伝子座の非限定的な例としては、CCR5、HPRT、AAVS1、Rosaおよびアルブミンが挙げられる。例えば、米国特許第7,951,925号；同第8,771,985号；同第8,110,379号；同第7,951,925号；米国公報第20100218264号；同第20110265198号；同第20130137104号；同第20130122591号；同第20130177983号；同第20130177960号；同第20150056705号および同第20150159172号を参照されたい。

【0113】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」は、必ずしもそうでなくてもよいが、好ましくは慣例的なアッセイで容易に測定されるタンパク質生成物を産生する任意の配列を指す。好適なレポーター遺伝子としては、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、有色または蛍光または発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、強化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）、ならびに強化された細胞成長および／または遺伝子増幅（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ）を媒介するタンパク質をコードする配列が挙げられる。エピトープタグとしては、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が挙げられる。「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し得るレポーターをコードする配列を含む。

【0114】

「WPRE」配列は、ウッドチャック肝炎ウイルス由来のウッドチャック肝炎転写後調節エレメントである。WPREは、600bpの長さの、所与の順番でガンマ、アルファ、およびベータエレメントを含有する三分節系エレメントであり (Donello et al (1992) J Virol 72:5085-5092)、AAV系における導入遺伝子の強い発現に寄与する (Loeb et al (1999) Hum Gene Ther 10:2295-2305)。これは、イントロンを欠く導入遺伝子の発現も強化する。その天然形態において、WPREは、WHV-Xタンパク質のための部分的なオープンリーディングフレーム (ORF) を含有する。WHV (We2) エンハンサーのような他のウイルスエレメントとの関連で、完全に発現されたWHV-Xタンパク質は、ウッドチャックおよびマウスにおいて肝細胞癌のより高いリスクと関連していた (Hohne et. al (1990) EMBO J 9(4):1137-45; Flajolet et. al (1998) J Virol 72(7):6175-80)。WHV-Xタンパク質は、直接的に腫瘍形成性ではないようであるが、一部の研究は、ある特定の状況下で、WHV-Xタンパク質が、ヘパドナウイルス (人間の場合はB型肝炎ウイルス; ウッドチャックの場合はウッドチャック肝炎ウイルス) による感染に関連する肝臓がんの発生に関する弱い補因子として作用し得ることを示唆する。「野生型」WPREへの言及は、多くの場合、その3'領域にWHV-Xタンパク質のオープンリーディングフレーム (ORF) の一部を含有する591bpの配列 (GenBank受託番号J02442のヌクレオチド1094~1684) を指す。このエレメントには、1502位にWHV-Xのための最初のATG開始コドン、および1488位に配列GCTGAを有するプロモーター領域が存在する。Zantaa-Boussif (同上) において、mut6WPRE配列が開示されたが、1488位におけるプロモーター配列はATCATに改変され、1502位における開始コドンはTTGに改変され、効果的にWHV-Xの発現を妨げている。J04514.1 WPREバリエーションにおいて、ATG WHV Xの開始部位は、1504位であり、mut6型のバリエーションは、このJ04514.1株で作製することができる。別のWPREバリエーションは、野生型WPRE由来の最小のガンマおよびアルファエレメントのみを含む247bpのWPRE3バリエーションであり (Choi et al (2014) Mol Brain 7:17)、これは、WHV X配列を欠く。

【0115】

「真核」細胞としては、これらに限定されないが、真菌細胞 (例えば酵母)、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞およびヒト細胞 (例えば、T細胞)、例えば幹細胞 (多能性および複能性) などが挙げられる。

【0116】

用語「作用的な連結」および「作用的に (operatively) 連結した」 (または「作動可能に (operably) 連結した」) は、両方の成分が正常に機能し、成分の少なくとも1つが、他の成分の少なくとも1つで発揮される機能を媒介し得る可能性をもたらすように成分が配列されている2つまたはそれよりも多くの成分 (例えば配列エレメント) の並置に関連して、同義的に使用される。例証として、プロモーターなどの転写調節配列が、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答してコード配列の転写レベルを制御する場合、転写調節配列は、コード配列に作用的に連結している。転写調節配列は、一般的に、コード配列とシスで作用的に連結しているが、必ずしもそれと直接隣接していなくてもよい。例えば、エンハンサーは、それらが連続していないとしても、コード配列に作用的に連結した転写調節配列である。

【0117】

タンパク質、ポリペプチドまたは核酸の「機能的な断片」は、その配列が全長のタンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一ではないが、全長のタンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同じ機能を依然として保持している、タンパク質、ポリペプチドまたは核酸である。機能的な断片は、対応するネイティブの分子よりも多くの、それよりも少ない、もしくはそれと同じ数の残基を有していてもよいし、および/または1つもしくは複数のアミノ酸もしくはヌクレオチド置換を含有していてもよい。核酸またはタンパク質の機能を決

定するための方法（例えば、コード化機能、別の核酸にハイブリダイズする能力、酵素活性のアッセイ）は、当業界において周知である。

【0118】

ポリヌクレオチド「ベクター」または「構築物」は、遺伝子配列を標的細胞に移入させることが可能である。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、「発現構築物」、「発現カセット」、および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子の発現を指示することが可能な、遺伝子配列を標的細胞に移入させることができる任意の核酸構築物を意味する。したがって、用語は、クローニング、および発現ビヒクル、ならびに組み込み型ベクターを含む。

【0119】

用語「対象」および「患者」は、同義的に使用され、哺乳動物、例えばヒト患者および非ヒト霊長類、ならびに実験動物、例えばウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、および他の動物を指す。したがって、用語「対象」または「患者」は、本明細書で使用される場合、本発明の発現カセットを投与することができる任意の哺乳動物患者または対象を意味する。本発明の対象としては、障害を有する対象が挙げられる。

【0120】

用語「処置すること」および「処置」は、本明細書で使用される場合、症状の重症度および／または頻度における低減、症状および／または根本的な原因の消失、症状および／またはその根本的な原因の出現の防止、ならびに損傷の改善または回復を指す。がん、単一遺伝子疾患および移植片対宿主病は、本明細書に記載される組成物および方法を使用して処置され得る状態の非限定的な例である。

【0121】

「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めたタンパク質を含む。真核細胞クロマチンの大部分はヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、ヒストンH2A、H2B、H3およびH4をそれぞれ2つ含む八量体と会合したおよそ150塩基対のDNAを含み、リンカーDNA（生物に応じて様々な長さの）は、ヌクレオソームコア間に伸長する。ヒストンH1の分子は、一般的に、リンカーDNAと会合する。本開示の目的のために、用語「クロマチン」は、原核および真核両方の全てのタイプの細胞核タンパク質を包含することが意図される。細胞クロマチンは、染色体およびエピソームのクロマチンの両方を含む。

【0122】

「接近可能な領域」は、核酸中に存在する標的部位が、標的部位を認識する外因性分子が結合することができる細胞クロマチン中の部位である。いかなる特定の理論にも縛られることは望まないが、接近可能な領域は、ヌクレオソーム構造にパッケージングされていないものであると考えられる。接近可能な領域の他と異なる構造は、化学的および酵素プローブ、例えば、ヌクレアーゼに対するその感受性によって検出できることが多い。

【0123】

「標的部位」または「標的配列」は、結合に十分な条件が存在するという条件で結合分子が結合する核酸の部分を定義する核酸配列である。例えば、配列5'-GAATTC-3'は、EcoRI制限エンドヌクレアーゼのための標的部位である。「意図した」または「オンターゲット」配列は、結合分子が結合することが意図される配列であり、「意図しない」または「オフターゲット」配列は、意図した標的ではない、結合分子が結合する任意の配列を含む。

【0124】

DNA結合分子／ドメイン

目的の任意の遺伝子または遺伝子座における標的部位に特異的に結合するDNA結合分子／ドメインを含む組成物が本明細書に記載される。任意のDNA結合分子／ドメインを本明細書で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、これらに限定されないが、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、TALE DNA結合ドメイン、CRI

10

20

30

40

50

S P R / C a s ヌクレアーゼのDNA結合部分（ガイドまたはs g R N A）、またはメガヌクレアーゼ由来のDNA結合ドメインが挙げられる。

【0125】

ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、ジンクフィンガータンパク質を含む。好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、選択された標的部位に結合するように操作されているという点で、天然に存在しない。例えば、全て参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、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；および米国特許公報第2005/0064474号；同第2007/0218528号；同第2005/0267061号を参照されたい。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第2012/0060230号（例えば、表1）で開示されたジンクフィンガータンパク質を含む。

10

【0126】

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て新規の結合特異性を有していてもよい。操作方法としては、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が挙げられる。合理的設計としては、例えば、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が挙げられ、その場合、各三つ組または四つ組ヌクレオチド配列は、特定の三つ組または四つ組配列に結合する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付けられる。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたい。

20

【0127】

ファージディスプレイおよびツーハイブリッドシステムを含む例示的な選択方法は、米国特許第5,789,538号；同第5,925,523号；同第6,007,988号；同第6,013,453号；同第6,410,248号；同第6,140,466号；同第6,200,759号；および同第6,242,568号；ならびにWO98/37186；WO98/53057；WO00/27878；WO01/88197およびGB2,338,237に開示されている。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに関する結合特異性の強化は、例えば、米国特許第6,794,136号に記載されている。

30

【0128】

加えて、これらのおよび他の参考文献で開示されたように、ジンクフィンガードメインおよび／または複数のフィンガーを有するジンクフィンガータンパク質は、例えば、5つまたはそれよりも多くのアミノ酸の長さのリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を使用して互いに連結されていてもよい。6つまたはそれよりも多くのアミノ酸の長さの例示的なリンカー配列について、米国特許第6,479,626号；同第6,903,185号；および同第7,153,949号も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間に、好適なリンカーの任意の組合せを含んでいてもよい。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインの結合特異性の強化は、例えば米国特許第6,794,136号に記載されている。

40

【0129】

標的部位の選択；融合分子（およびそれをコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のためのZFPおよび方法は、当業者に公知であり、米国特許第6,140,081

50

号；同第5，789，538号；同第6，453，242号；同第6，534，261号；同第5，925，523号；同第6，007，988号；同第6，013，453号；同第6，200，759号；WO95/19431；WO96/06166；WO98/53057；WO98/54311；WO00/27878；WO01/60970 WO01/88197；WO02/099084；WO98/53058；WO98/53059；WO98/53060；WO02/016536およびWO03/016496で詳細に記載されている。

【0130】

加えて、これらのおよび他の参考文献で開示されたように、ジンクフィンガードメインおよび／または複数のフィンガーを有するジンクフィンガータンパク質は、例えば、5つまたはそれよりも多くのアミノ酸の長さのリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を使用して互いに連結されていてもよい。6つまたはそれよりも多くのアミノ酸の長さの例示的なリンカー配列について、米国特許第6，479，626号；同第6，903，185号；および同第7，153，949号も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間に好適なリンカーの任意の組合せを含んでいてもよい。

10

【0131】

通常、ZFPは、少なくとも3つのフィンガーを含む。ZFPのある特定のものは、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、典型的には、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、典型的には、12～14ヌクレオチドを含む標的部位を認識し；一方で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であってもよく、このドメインは、転写活性化または抑制ドメインであってもよい。

20

【0132】

一部の実施形態では、DNA結合ドメインは、ヌクレアーゼ由来であってもよい。例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼの認識配列、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が公知である。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) 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のカatalog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結合特異性は、非天然の標的部位に結合するように操作することができる。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；米国特許公開第20070117128号を参照されたい。

30

【0133】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるジンクフィンガータンパク質（例えば、野生型または変異切断ドメインとの融合分子で使用された）は、主鎖領域（例えば、-1～6に番号付けされる7アミノ酸の認識ヘリックス領域の外側の領域）に、例えば-14、-9および／または-5位の1つまたは複数において、1つまたは複数の変異（置換、欠失、および／または挿入）を含む（例えば、図5Aを参照）。1つまたは複数のこれらの位置における野生型残基は、欠失していても、任意のアミノ酸残基で置き換えられていても、および／または1つもしくは複数の（on or more）追加の残基を含んでいてもよい。一部の実施形態では、-5位におけるArg（R）は、Tyr（Y）、Asp（N

40

50

)、G l u (E)、L e u (L)、G l n (Q)、またはA l a (A)に変更されている。他の実施形態では、(- 9) 位におけるA r g (R) は、S e r (S)、A s p (N)、またはG l u (E) で置き換えられている。さらなる実施形態では、(- 1 4) 位におけるA r g (R) は、S e r (S) またはG l n (Q) で置き換えられている。他の実施形態では、融合ポリペプチドは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインに変異を含んでもよく、(- 5)、(- 9) および／または(- 1 4) 位におけるアミノ酸は、任意の組合せの上で列挙したアミノ酸のいずれかに変更されている。

【0134】

ある特定の実施形態では、Z F N は、添付の表または図のいずれかに記載される第1および第2の(左および右の)Z F N を含む。ある特定の実施形態では、第1のZ F N は、7 1 5 5 7 と名付けられたZ F N を含む、第2のZ F N は、7 1 7 2 8 と名付けられたZ F N を含む。ある特定の実施形態では、7 1 5 5 7 と名付けられたZ F N は、A A V ベクター、例えば表4に示される配列および／または配列番号43に示される配列を含むA A V ベクターに担持される。他の実施形態では、7 1 7 2 8 と名付けられたZ F N は、A A V ベクター、例えば表5および／または配列番号56に示される配列を含むA A V ベクターに担持される。

【0135】

他の実施形態では、DNA結合ドメインは、植物病原体である、*Xanthomonas* (Boch et al, (2009) Science 326:1509-1512およびMoscou and Bogdanove, (2009) Science 326:1501を参照) および*Ralstonia* (Heuer et al (2007) Applied and Environmental Microbiology 73(13):4379-4384; 米国特許公報第20110301073号および同第20110145940号を参照) 由来のものに類似した転写活性化因子様(TAL)エフェクター(TALE)由来の操作されたドメインを含む。*Xanthomonas* 属の植物病原菌は、重要な穀物植物において多くの疾患を引き起こすことが公知である。*Xanthomonas* の病原性は、25個よりも多くの異なるエフェクタータンパク質を植物細胞に注入する保存されたIII型分泌(T3S)系に依存する。これらの注入されたタンパク質のなかでも、植物転写活性化因子を模倣し、植物トランスクリプトームをマニピュレートする転写活性化因子様エフェクター(TALE)がある(Kay et al (2007) Science 318:648-651を参照)。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1つは、*Xanthomonas campestris* p v. *Vesicatoria* 由来のAvrBs3である(Bonas et al (1989) Mol Gen Genet 218:127-136およびWO2010079430を参照)。TALEは、タンデム反復の集中型ドメインを含有し、各反復は、これらのタンパク質のDNA結合特異性にとって重要なおよそ34アミノ酸を含有する。加えて、それらは、核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含有する(総説に関して、Schornack S, et al (2006) J Plant Physiol 163(3):256-272を参照)。加えて、植物病原性細菌である*Ralstonia solanacearum* において、*R. solanacearum* bio var 1株GMI1000およびbio var 4株RS1000において*Xanthomonas* のAvrBs3ファミリーに相同な、brg11およびhpx17と名付けられた2つの遺伝子が見出されている(Heuer et al (2007) Appl and Envir Micro 73(13):4379-4384を参照)。これらの遺伝子は、ヌクレオチド配列において互いに98.9%同一であるが、hpx17の反復ドメインにおける1,575塩基対の欠失により異なる。しかしながら、両方の遺伝子産物は、*Xanthomonas* のAvrBs3ファミリータンパク質と40%未満の配列同一性を有する。

【0136】

これらのTALエフェクターの特異性は、タンデム反復に見出される配列に依存する。繰り返しの配列は、およそ102塩基対を含み、反復は、典型的には、互いに91~100%相同である(Bonas et al、同上)。反復の多型は通常、12および13位に位置し、TAL-エフェクターの標的配列における連続するヌクレオチドの同一性と、12およ

10

20

30

40

50

び13位における高度可変二残基（反復可変二残基またはRVD領域）の同一性と間に1対1の対応が存在すると考えられる（Moscou and Bogdanove, (2009) Science 326:1501およびBoch et al (2009) Science 326:1509-1512を参照）。実験的に、これらのTAL-エフェクターのDNA認識に関する天然コードは、12および13位におけるHD配列（反復可変二残基またはRVD）により、シトシン（C）への結合が起こり、NGがTに、NIがA、C、GまたはTに結合し、NNがAまたはGに結合し、INGがTに結合すると決定された。これらのDNA結合反復が、新しい組合せおよび多数の反復を有するタンパク質に組み立てられて、植物細胞において新しい配列と相互作用し、非内因性レポーター遺伝子の発現を活性化することができる人工転写因子が作製された（Boch et al, 同上）。操作されたTALタンパク質をFokI切断ハーフドメインに連結して、非定型的なRVDを有するTALENを含むTALEエフェクタードメインヌクレアーゼ融合体（TALEN）が得られた。例えば、米国特許第8,586,526号を参照されたい。

【0137】

一部の実施形態では、TALENは、エンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）切断ドメインまたは切断ハーフドメインを含む。他の実施形態では、TALE-ヌクレアーゼは、メガTALである。これらのメガTALヌクレアーゼは、TALE DNA結合ドメインおよびメガヌクレアーゼ切断ドメインを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ切断ドメインは、単量体として活性であり、活性のために二量体化を必要としない。（Boissel et al., (2013) Nucl Acid Res:1-13, doi:10.1093/nar/gkt1224を参照）。

【0138】

よりさらなる実施形態では、ヌクレアーゼは、コンパクトTALENを含む。これらは、TALE DNA結合ドメインをTevIヌクレアーゼドメインに連結する単鎖の融合タンパク質である。融合タンパク質は、TALE DNA結合ドメインがTevIヌクレアーゼドメインに対してどこに位置するかに応じて、TALE領域によって局在化されたニッカーゼとして作用することができるか、または二本鎖切断を作り出すことができる（Beurdeley et al (2013) Nat Comm:1-8 DOI:10.1038/ncomms2782を参照）。加えて、ヌクレアーゼドメインは、DNA結合機能性を示すこともあり得る。任意のTALENを、1つまたは複数のメガTALを有する追加のTALEN（例えば、1つまたは複数のTALEN（cTALENまたはFokI-TALEN）と組み合わせて使用してもよい。

【0139】

加えて、これらのおよび他の参考文献で開示されたように、ジンクフィンガードメインおよび／または複数のフィンガーを有するジンクフィンガータンパク質またはTALEは、例えば、5つまたはそれよりも多くのアミノ酸の長さのリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を使用して互いに連結されていてもよい。6つまたはそれよりも多くのアミノ酸の長さの例示的なリンカー配列について、米国特許第6,479,626号；同第6,903,185号；および同第7,153,949号も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間に好適なリンカーの任意の組合せを含んでいてもよい。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに関する結合特異性の強化は、例えば、米国特許第6,794,136号に記載されている。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、DNAに結合する単一ガイドRNA（sgRNA）DNA結合分子を含むCRISPR/Casヌクレアーゼ系の一部である。例えば、米国特許第8,697,359号および米国特許公報第20150056705号および同第20150159172号を参照されたい。系のRNA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（Jansen et al., 2002. Mol. Microbiol. 43:1565-1575；Makarova et al., 2002. Nucleic Acids Res. 30:482-496；Makarova et al., 2006. Biol. Direct 1:7；Haft et al., 2005. PLoS Comput. Biol. 1:e6

0) が、CRISPR/Casヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主におけるCRISPR遺伝子座は、CRISPR関連(Cas)遺伝子およびCRISPR媒介性核酸切断の特異性をプログラミングすることが可能な非コードRNAエレメントの組合せを含有する。

【0140】

一部の実施形態では、DNA結合ドメインは、TtAgo系の一部である(Swartz et al、同上; Sheng et al、同上を参照)。真核生物において、遺伝子サイレンシングは、タンパク質のアルゴノート(Ago)ファミリーによって媒介される。このパラダイムにおいて、Agoは、小さい(19~31ntの)RNAに結合する。このタンパク質-RNAサイレンシング複合体は、小さいRNAと標的との間でワトソン-クリック塩基対形成を介して標的RNAを認識し、エンドヌクレアーゼとして標的RNAを切断する(Vogel (2014) Science 344:972-973)。対照的に、原核生物Agoタンパク質は、小さい一本鎖DNA断片に結合し、外来性(しばしばウイルス)DNAを検出および除去するように機能する可能性がある(Yuan et al., (2005) Mol. Cell 19, 405; Olovnikov, et al. (2013) Mol. Cell 51, 594; Swartz et al、同上)。例示的な原核生物Agoタンパク質としては、Aquifex aeolicus、Rhodobacter sphaeroides、およびThermus thermophilus由来のものが挙げられる。

【0141】

最もよく特徴付けられた原核生物Agoタンパク質の1つは、T. thermophilusに由来するもの(TtAgo; Swartz et al、同上)である。TtAgoは、5'リン酸基を用いて15ntまたは13~25ntの一本鎖DNA断片のいずれかと会合する。このTtAgoが結合した「ガイドDNA」は、タンパク質-DNA複合体を、DNAの第三者の分子においてワトソン-クリック相補的DNA配列に結合するように導くのに機能する。これらのガイドDNAにおける配列の情報により標的DNAが確認されると、TtAgo-ガイドDNA複合体は、標的DNAを切断する。このようなメカニズムは、その標的DNAに結合した状態のTtAgo-ガイドDNA複合体の構造によっても裏付けられる(G. Sheng et al、同上)。Rhodobacter sphaeroides由来のAgo(RsAgo)は、類似の特性を有する(Olovnikov et al、同上)。

【0142】

任意のDNA配列の外因性ガイドDNAをTtAgoタンパク質上にロードすることができる(Swartz et al、同上)。TtAgo切断の特異性はガイドDNAによって指示されるため、外因性の、研究者によって特定されたガイドDNAと共に形成されたTtAgo-DNA複合体は、それゆえに、相補的な、研究者によって特定された標的DNAにTtAgo標的DNA切断を導く。このように、DNA中に標的化された二本鎖切断を作り出すことができる。TtAgo-ガイドDNA系(または他の生物由来のオーソロガスなAgo-ガイドDNA系)の使用は、細胞内のゲノムDNAの標的化された切断を可能にする。このような切断は、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。哺乳動物ゲノムDNAの切断に関して、哺乳動物細胞での発現に最適化されたTtAgoコドンのバージョンの使用が好ましい場合がある。さらに、TtAgoタンパク質が、細胞透過性ペプチドに融合されている場合、in vitroで形成されたTtAgo-DNA複合体で細胞を処置することが好ましい場合がある。さらに、37℃で改善された活性を有するように変異誘発を介して変更されたTtAgoタンパク質のバージョンを使用することが好ましい場合がある。Ago-RNA媒介性DNA切断(cleavage)は、DNA切断(break)の利用のために当業界において標準的な技術を使用する、遺伝子ノックアウト、標的化された遺伝子付加、遺伝子修正、標的化された遺伝子欠失を含む一連の結果に影響を与えるのに使用することができる。

【0143】

したがって、任意のDNA結合分子/ドメインを使用することができる。

【0144】

融合分子

本明細書に記載されるDNA結合ドメイン（例えば、ZFPまたはTALE、CRISPR/Casの成分、例えば単一ガイドRNA）および異種調節（機能性）ドメイン（またはその機能的な断片）を含む融合分子も提供される。共通のドメインとしては、例えば、転写因子ドメイン（活性化因子、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー）、サイレンサー、発癌遺伝子（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の関連因子および調節因子；DNA再構成酵素ならびにその関連因子および調節因子；クロマチン関連タンパク質およびその調節因子（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を改変する酵素（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）ならびにその関連因子および調節因子が挙げられる。参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる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の、米国特許公報第2005006474号；同第20060188987号および同第2007/0218528号。

【0145】

活性化を達成するための好適なドメインとしては、HSV VP16活性化ドメイン（例えば、Hagmann et al., J. Virol. 71, 5952-5962 (1997)を参照）、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）；核内因子カッパ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)）、または人工キメラ機能性ドメイン、例えばVP64（Beerli et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14623-33）、およびデグロン（Molinari et al., (1999) EMBO J. 18, 6439-6447）が挙げられる。追加の例示的な活性化ドメインとしては、Oct1、Oct2A、Sp1、AP-2、およびCTF1（Seipel et al., EMBO J. 11, 4961-4968 (1992)）、ならびにp300、CBP、PCAF、SRC1 P v A L F、AtHD2AおよびERF-2が挙げられる。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。追加の例示的な活性化ドメインとしては、これらに限定されないが、OSGAI、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、-6、-7、および-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP、ならびにTRAB1が挙げられる。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。

【0146】

DNA結合ドメインと機能性ドメインとの融合分子（またはそれをコードする核酸）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、機能性ドメインとして好適であることは、当業者には明らかである。活性化複合体および／または活性化している活性（例えば、ヒストンのアセチル化など）を標的遺伝子に補充することが可能な本質的にあらゆる分子が、融合タンパク質の活性化しているドメインとして有用である。融合分子における機能性ドメインとしての使用に好適な、インシュレータードメイン、局在化ドメイン、ならびにクロマチン再構築タンパク質、例えばISWI

を含有するドメインおよび／またはメチル結合ドメインタンパク質は、例えば、米国特許公報第2002/0115215号および同第2003/0082552号ならびにWO 02/44376に記載されている。

【0147】

例示的な抑制ドメインとしては、これらに限定されないが、KRAB A/B、KRX、TGF- β 誘導性初期遺伝子 (TIEG)、*verba*、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が挙げられる。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。追加の例示的な抑制ドメインとしては、これらに限定されないが、ROM2およびAtHD2Aが挙げられる。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。

【0148】

融合分子は、当業者に周知のクローニングおよび生化学的なコンジュゲーションの方法によって構築される。融合分子は、DNA結合ドメインおよび機能性ドメイン（例えば、転写活性化または抑制ドメイン）を含む。融合分子は、必要に応じて、核局在化シグナル（例えば、SV40中型T抗原由来のものなど）およびエピトープタグ（例えば、FLAGおよびヘマグルチニンなど）も含む。融合分子（およびそれをコードする核酸）は、融合体の成分のなかでも翻訳リーディングフレームが保存されるように設計される。

【0149】

一方の機能性ドメイン（またはその機能的な断片）のポリペプチド成分と、他方の非タンパク質DNA結合ドメイン（例えば、抗生物質、インターカレーター、副溝結合剤、核酸）との融合体は、当業者に公知の生化学的なコンジュゲーションの方法によって構築される。例えば、Pierce Chemical Company (Rockford, IL) のカタログを参照されたい。副溝結合剤とポリペプチドとの融合体を作製する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。さらに、CRISPR/Cas系の単一ガイドRNAは、機能性ドメインと会合して、活性な転写調節因子およびヌクレアーゼを形成する。

【0150】

ある特定の実施形態では、標的部位は、細胞クロマチンの接近可能な領域中に存在する。接近可能な領域は、例えば、米国特許第7,217,509号および同第7,923,542号に記載されるようにして決定することができる。細胞クロマチンの接近可能な領域中に標的部位が存在しない場合、1つまたは複数の接近可能な領域は、米国特許第7,785,792号および同第8,071,370号に記載されるようにして生成することができる。追加の実施形態では、融合分子のDNA結合ドメインは、その標的部位が接近可能な領域中にあるかないかに関係なく、細胞クロマチンに結合することが可能である。例えば、このような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に結合することが可能である。このタイプの「パイオニア」DNA結合ドメインの例は、ある特定のステロイド受容体および肝細胞核内因子3 (HNF3) に見出される (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)。本明細書に記載される融合分子（例えば、人工ヌクレアーゼ）のための標的部位は、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、またはそれよりも多くの連続する、または連続しない塩基対の長さであってもよい。

【0151】

融合分子は、当業者に公知の通りに薬学的に許容される担体と共に製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985; ならびに米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたい。

【0152】

融合分子の機能的な成分／ドメインは、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与えることが可能な多種多様の成分のいずれかから選択することができる。したがって、機能的な成分としては、これらに限定されないが、様々な転写因子ドメイン、例えば活性化因子、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー、およびサイレンサーを挙げることができる。

【0153】

追加の例示的な機能性ドメインは、例えば、米国特許第6,534,261号および同第6,933,113号に開示されている。

【0154】

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性ドメインも、選択することができる。例えば、機能性ドメインが外部のRheoChem（商標）リガンドの存在下におけるその活性なコンフォメーションのみを想定しているRheoSwitch（登録商標）技術を用いてもよい（例えばUS20090136465を参照）。したがって、ZFPは、調節可能な機能性ドメインに作動可能に連結することができ、その結果得られるZFP-TFの活性は、外部のリガンドによって制御される。

【0155】

ヌクレアーゼ

ある特定の実施形態では、融合分子は、人工ヌクレアーゼを形成するためのDNA結合ドメインおよび切断（ヌクレアーゼ）ドメインを含む。そのようなものとして、遺伝子改変は、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することができる。操作されたヌクレアーゼ技術は、天然に存在するDNA結合タンパク質の操作に基づく。例えば、目的に合わせた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いる。Chames et al. (2005) Nucleic Acids Res 33(20):e178; Arnould et al. (2006) J. Mol. Biol. 355:443-458。加えて、ZFPの操作も記載されている。例えば、米国特許第6,534,261号；同第6,607,882号；同第6,824,978号；同第6,979,539号；同第6,933,113号；同第7,163,824号；および同第7,013,219号を参照されたい。

【0156】

加えて、ZFPおよび／またはTALEをヌクレアーゼドメインに融合して、ZFNおよびTALEN、すなわち、その操作された（ZFPまたはTALE）DNA結合ドメインを介してその意図した核酸標的を認識し、DNA結合部位の近傍でヌクレアーゼ活性によるDNAの切断を引き起こすことができる機能的な実体を作り出されている。例えば、Kim et al. (1996) Proc Nat'l Acad Sci USA 93(3):1156-1160を参照されたい。ごく最近、このようなヌクレアーゼは、様々な生物におけるゲノム改変に使用されている。例えば、米国特許公報第20030232410号；同第20050208489号；同第20050026157号；同第20050064474号；同第20060188987号；同第20060063231号；および国際公報WO07/014275号を参照されたい。

【0157】

したがって、本明細書に記載される方法および組成物は、広範囲に適用可能であり、目的の任意のヌクレアーゼを含み得る。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、TALENおよびジンク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結合および切断ドメイン（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ；異種切断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、選択された標的部位（例えば、コグネート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てもよい。

【0158】

ある特定の実施形態では、ZFNは、添付の表または図のいずれかに記載される第1お

10

20

30

40

50

よび第2の（左および右の）ZFNを含む。ある特定の実施形態では、第1のZFNは、71557と名付けられたZFNを含み、第2のZFNは、71728と名付けられたZFNを含む。ある特定の実施形態では、71557と名付けられたZFNは、AAVベクター、例えば表4に示される配列および／または配列番号43に示される配列を含むAAVベクターに担持される。他の実施形態では、71728と名付けられたZFNは、AAVベクター、例えば表5および／または配列番号56に示される配列を含むAAVベクターに担持される。

【0159】

本明細書に記載されるヌクレアーゼのいずれかでは、ヌクレアーゼは、操作されたTALE DNA結合ドメインおよびTALENとも称されるヌクレアーゼドメイン（例えば、エンドヌクレアーゼおよび／またはメガヌクレアーゼドメイン）を含んでいてもよい。使用者が選択する標的配列とのロバストな部位特異的な相互作用のためにこれらのTALEN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（米国特許第8,586,526号を参照）。一部の実施形態では、TALENは、エンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）切断ドメインまたは切断ハーフドメインを含む。他の実施形態では、TALE-ヌクレアーゼは、メガTALである。これらのメガTALヌクレアーゼは、TALE DNA結合ドメインおよびメガヌクレアーゼ切断ドメインを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ切断ドメインは、単量体として活性であり、活性のために二量体化を必要としない。（Boissel et al., (2013) Nucl Acid Res:1-13, doi:10.1093/nar/gkt1224を参照）。加えて、ヌクレアーゼドメインは、DNA結合機能性を示す

【0160】

よりさらなる実施形態では、ヌクレアーゼは、コンパクトTALEN（cTALEN）を含む。これらは、TALE DNA結合ドメインをTevIヌクレアーゼドメインに連結する単一鎖の融合タンパク質である。融合タンパク質は、TALE DNA結合ドメインがTevIヌクレアーゼドメインに対してどこに位置しているかに応じて、TALE領域によって局在化されたニッカーゼとして作用できるか、または二本鎖切断を作り出すことができる（Beurdeley et al (2013) Nat Comm:1-8 DOI:10.1038/ncomms2782を参照）。任意のTALENを、追加のTALEN（例えば、1つまたは複数のメガTALを有する1つまたは複数のTALEN（cTALENまたはFokI-TALEN））または他のDNA切断酵素と組み合わせて使用することができる。

【0161】

ある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）またはその切断活性を示す部分を含む。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、一般的に4つのファミリー：LAGLIDADGファミリー（配列番号70として開示された「LAGLIDADG」）、GIY-YIGファミリー、His-CysボックスファミリーおよびHNHファミリーにグループ分けされる。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼとしては、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevIIおよびI-TevIIIが挙げられる。それらの認識配列は、公知である。米国特許第5,420,032号；米国特許第6,833,252号；Belfort 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のカatalogも参照されたい。

【0162】

主としてLAGLIDADGファミリー（配列番号70として開示された「LAGLIDADG」）由来の天然に存在するメガヌクレアーゼ由来のDNA結合ドメインが、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改変を促進するの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な遺伝子 (Monet et al. (1999), Biochem. Biophysics. Res. Commun. 255:88-93) または認識配列が導入された前もって操作されたゲノム (Route et al. (1994), Mol. Cell. Biol. 14:8096-106; Chilton et al. (2003), Plant Physiology. 133:956-65; Puchta et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5055-60; Rong et al. (2002), Genes Dev. 16:1568-81; Gouble et al. (2006), J. Gene Med. 8(5):616-622) のいずれかの改変に限定されていた。したがって、医学的に、または生物工学的に関連する部位において新規の結合特異性を示すようにメガヌクレアーゼを操作する試みが行われてきた (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. 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; 米国特許公報第 2 0 0 7 0 1 1 7 1 2 8 号; 同第 2 0 0 6 0 2 0 6 9 4 9 号; 同第 2 0 0 6 0 1 5 3 8 2 6 号; 同第 2 0 0 6 0 0 7 8 5 5 2 号; および同第 2 0 0 4 0 0 0 2 0 9 2 号)。加えて、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、異種ヌクレアーゼ由来の切断ドメイン (例えば、FokI) と作動可能に連結していてもよく、および/またはメガヌクレアーゼ由来の切断ドメインは、異種 DNA 結合ドメイン (例えば、ZFP または TALE) と作動可能に連結していてもよい。

【0163】

他の実施形態では、ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) または TALE DNA 結合ドメイン-ヌクレアーゼ融合体 (TALEN) である。ZFN および TALEN 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 DNA 結合ドメイン (ジンクフィンガータンパク質または TALE DNA 結合ドメイン)、および切断ドメインまたは切断ハーフトドメイン (例えば、本明細書に記載される制限および/またはメガヌクレアーゼ由来) を含む。

【0164】

上で詳細に記載したように、ジンクフィンガー結合ドメインおよび TALE DNA 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 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。操作されたジンクフィンガー結合ドメインまたは TALE タンパク質は、天然に存在するタンパク質と比較して新規の結合特異性を有していてもよい。操作方法としては、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が挙げられる。合理的設計としては、例えば、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または TALE アミノ酸配列を含むデータベースを使用することが挙げられ、その場合、各三つ組または四つ組ヌクレオチド配列は、特定の三つ組または四つ組配列に結合するジンクフィンガーまたは TALE 反復単位の 1 つまたは複数のアミノ酸配列に関連付けられる。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 6, 453, 242 号および同第 6, 534, 261 号を参照されたい。

【0165】

標的部位の選択; ならびに融合分子 (およびそれをコードするポリヌクレオチド) の設計および構築のための方法は、当業者に公知であり、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 7, 888, 121 号および同第 8, 409, 861 号で詳細に記載されている。

【0166】

加えて、これらのおよび他の参考文献で開示されたように、ジンクフィンガードメイン、T A L Eおよび／または複数のフィンガーを有するジンクフィンガータンパク質は、例えば、5つまたはそれよりも多くのアミノ酸の長さのリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を使用して互いに連結されていてもよい。6つまたはそれよりも多くのアミノ酸の長さの例示的なリンカー配列について、例えば、米国特許第6,479,626号；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ジンクフィンガー間に、および／またはDNA結合ドメインとヌクレアーゼドメインとの間に、好適なリンカーの任意の組合せを含んでいてもよい。米国特許第8,772,453号および同第9,567,609号も参照されたい。

10

【0167】

したがって、Z F N、T A L E Nおよび／またはメガヌクレアーゼなどのヌクレアーゼは、任意のDNA結合ドメインおよび任意のヌクレアーゼ（切断）ドメイン（切断ドメイン、切断ハーフドメイン）を含んでいてもよい。上述したように、切断ドメインは、DNA結合ドメイン、例えばジンクフィンガーまたはT A L EエフェクターDNA結合ドメイン、およびヌクレアーゼまたはメガヌクレアーゼDNA結合ドメイン由来の切断ドメイン、および異なるヌクレアーゼ由来の切断ドメインに対して異種であってもよい。異種切断ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインの由来となり得る例示的なエンドヌクレアーゼとしては、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が挙げられる。例えば、2002～2003年カタログ、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を切断する追加の酵素が公知である（例えば、S1ヌクレアーゼ；マングベーンヌクレアーゼ；臍臓DNA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 et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993も参照されたい）。これらの酵素（またはその機能的な断片）の1つまたは複数は、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。

20

【0168】

同様に、切断ハーフドメインは、切断活性のために二量体化を必要とする上記したような任意のヌクレアーゼまたはその部分由来であってもよい。一般的に、融合分子が切断ハーフドメインを含む場合、2つの融合分子が切断に必要である。あるいは、2つの切断ハーフドメインを含む単一のタンパク質を使用してもよい。2つの切断ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能的な断片）由来であってもよく、各切断ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的な断片）由来であってもよい。加えて、2つの融合分子のための標的部位は、好ましくは、2つの融合分子のそれぞれそれぞれの標的部位への結合によって、切断ハーフドメインが例えば二量体化により機能的な切断ドメインを形成することが可能な空間的な配向で互いに切断ハーフドメインが配列されるように互いに配置される。したがって、ある特定の実施形態では、対を形成した標的部位の近端は、5～10ヌクレオチドまたは15～18ヌクレオチド間をあけている。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入していてもよい（例えば、2～50ヌクレオチド対またはそれよりも多く）。一般的に、切断部位は、標的部位間にある。

30

40

【0169】

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、またはその近傍でDNAを切断することが可能である。ある特定の制限酵素（例えば、IIS型）は、認識部位から離れた部位でDNAを切断し、分離可能な結合および切断ドメインを有する。例えば、IIS型酵素のFokIは、一方の鎖においてその認識部位から9ヌクレオチドで、および他方の鎖においてその認識部位から13ヌクレオチドで、DNAの二本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,

50

356, 802号; 同第5, 436, 150号および同第5, 487, 994号; ならびにLi et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982を参照されたい。したがって、一実施形態では、融合分子は、少なくとも1つのIIS型制限酵素由来の切断ドメイン（または切断ハーフドメイン）、および操作されていてもされていなくてもよい1つまたは複数のジンクフィンガー結合ドメインを含む。

【0170】

その切断ドメインが結合ドメインから分離可能である例示的なIIS型制限酵素は、FokIである。この特定の酵素は、二量体として活性である。Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570-10,575。したがって、本開示の目的のために、開示された融合分子において使用されたFokI酵素の部分は、切断ハーフドメインとみなされる。したがって、ジンクフィンガー-FokI融合体を使用する標的化された二本鎖切断および／または標的化された細胞配列の置き換えのために、それぞれFokI切断ハーフドメインを含む2つの融合分子を使用して、触媒活性切断ドメインを再構成することができる。あるいは、ジンクフィンガー結合ドメインおよび2つのFokI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を使用することもできる。ジンクフィンガー-FokI融合体を使用する標的化された切断および標的化された配列変更のパラメーターは、この開示の他所で提供される。

【0171】

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、または多量体化して（例えば、二量体化して）機能的な切断ドメインを形成する能力を保持するタンパク質の任意の部分であってもよい。

【0172】

例示的なIIS型制限酵素は、本明細書にその全体が組み込まれる国際公報WO 07/014275に記載されている。追加の制限酵素は、分離可能な結合および切断ドメインも含有し、これらは、本開示により企図される。例えば、Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420を参照されたい。

【0173】

ある特定の実施形態では、切断ドメインは、結晶構造1FOK.pdbおよび2FOK.pdbを生成するのに使用されるFokI切断ドメインを含む（Wah et al (1997) Nature 388:97-100を参照）。全長FokIの配列を以下に示す。本明細書に記載されるヌクレアーゼで使用される切断ドメインは、イタリックとアンダーラインで示され（全長タンパク質の384～579位）、ホロタンパク質配列は、後述される（配列番号2）：

【化1】

MVSKIRTFGWVQNPGKFENLKRVVQVFDNRNSKVHNEVKNIKIPTLVKESKIQ
KELVAIMNQHDLIYTYKELVGTGTSIRSEAPCDAIQATIADQGNKKGYIDNW
SSDGFLRWAHALGFIEYINKSDSFVITDVGLAYSADGSAIEKEILIEAISSYPP
AIRILTLLEDGQHLLTKFDLGKNLGFSGESGFTSLPEGILLDTLANAMPKDKGEI
RNNWEGSSDKYARMIGGWLDKLGKLVKQGGKEFIPTLGKPDNKEFISHAFKIT
GEGKVLRRAKGSTKFTRVPKRVYWEMLATNLTDKEYVRTRRALILEILIKA
GSLKIEQIQDNLKKLGFDEVETIENDIKGLINTGIFIEIKGRFYQLKDHLQFVIP
NRGVTK~~QLVKSELEKKSEL~~RHKLKYVP~~HEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFM~~
~~KVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLP~~IGQADEMORYV
~~EENQTRNKHINPNEWKVPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGA~~
~~VLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF~~ (配列番号 2)

【0174】

FokI由来の切断ハーフドメインは、配列番号2に示されるアミノ酸残基の1つまた

は複数における変異を含んでいてもよい。変異は、（異なる残基での野生型アミノ酸残基の）置換、（1つまたは複数のアミノ酸残基の）挿入および／または（1つまたは複数のアミノ酸残基の）欠失を含む。ある特定の実施形態では、残基414～426、443～450、467～488、501～502、および／または521～531（配列番号2に対して番号付けした）の1つまたは複数が、変異しており、これは、これらの残基が、Miller et al. (2007) Nat Biotechnol 25:778-784に記載されるその標的部位に結合したZFNの分子モデルにおいてDNA主鎖の近くに位置しているためである。FokI変異体の非限定的な例としては、本明細書、米国特許公開第20180087072号に記載される1つまたは複数の変異が挙げられ、例えば、これらに限定されないが、416、421、422、424、472、478、480、525または542位における1つまたは複数の残基が変異している。ある特定の実施形態では、変異は、任意の異なる残基、例えばアラニン（A）残基、システイン（C）残基、アスパラギン酸（D）残基、グルタミン酸（E）残基、ヒスチジン（H）残基、フェニルアラニン（F）残基、グリシン（G）残基、アスパラギン（N）残基、セリン（S）残基またはスレオニン（T）残基での野生型残基の置換を含む。他の実施形態では、416、418、421、422、424、446、448、472、476、478、479、480、481、525および／または542位の1つまたは複数における野生型残基が、例えば、これらに限定されないが、R416D、R416E、S418E、S418D、R422H、S446D、K448A、N476D、P478S、I479Q、I479T、G480D、Q481A、Q481E、K525S、K525A、N527D、N542D、R416E+R422H、R416D+R422H、R416E+K448A、R416D+R422H、K448A+I479Q、K448A+Q481A、K448A+K525A、R416E、R416D、R416H、R416N、S418D、S418E、D421S、L424F、S446D、K448A、S472D、N476E、N476G、N476K、P478D、I479Q、I479T、G480D、Q481A、Q481C、Q481D、Q481S、Q481E、Q481H、K525A、K525C、K525AE、K525I、K525S、K525T、K525V、および／またはN542Dを含む他の任意の残基で置き換えられている。

【0175】

ある特定の実施形態では、切断ドメインは、例えば、これらの全ての開示が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第7,914,796号；同第8,034,598号および同第8,623,618号；ならびに米国特許公開第20110201055号に記載されるような、ホモ二量体化を最小化または防止する1つまたは複数の操作された切断ハーフドメイン（二量体化ドメイン変異体とも称される）を含む。FokIの446、447、478、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537、538および542位におけるアミノ酸残基（配列番号2に対して番号付けした）は全て、FokI切断ハーフドメインの二量体化に影響を与えるための標的である。変異は、FokIに相同な天然制限酵素に見出される残基への変異を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、416、422、447、448、478、525および／または542位における変異（配列番号2に対して番号付けした）は、正電荷を有するアミノ酸の、荷電を有さない、または負電荷を有するアミノ酸での置き換えを含む。別の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、全て配列番号2に対して番号付けされた、1つまたは複数のアミノ酸残基416、422、447、448、または525における変異に加えて、アミノ酸残基499、496および486に変異を含む。

【0176】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、例えば、米国特許第7,914,796号；同第8,034,598号；同第8,961,281号および同第8,623,618号；米国特許公報第20080131962号および同第20120040398号に記載されるような、絶対ヘテロ二量体を形成するFokIの操作された切断

10

20

30

40

50

ハーフトメインを含む。したがって、好ましい実施形態では、本発明は、操作された切断ハーフトメインが、416、422、447、448、または525位における1つまたは複数の変異に加えて、486位における野生型Gln(Q)残基がGlu(E)残基で置き換えられ、499位における野生型Ile(I)残基がLeu(L)残基で置き換えられ、496位における野生型Asn(N)残基がAsp(D)またはGlu(E)残基で置き換えられているポリペプチド(「ELD」または「ELE」)(配列番号2に対して番号付けした)を含む、融合分子を提供する。別の実施形態では、操作された切断ハーフトメインは、野生型FokI切断ハーフトメイン由来であり、アミノ酸残基416、422、447、448、または525における1つまたは複数の変異に加えて、野生型FokI(配列番号2)に対して番号付けされたアミノ酸残基490、538および537に変異を含む。好ましい実施形態では、本発明は、操作された切断ハーフトメインが、416、422、447、448、または525位における1つまたは複数の変異に加えて、490位における野生型Glu(E)残基がLys(K)残基で置き換えられ、538位における野生型Ile(I)残基がLys(K)残基で置き換えられ、537位における野生型His(H)残基がLys(K)残基またはArg(R)残基で置き換えられているポリペプチド(「KKK」または「KKR」)を含む、融合分子を提供する(参照により本明細書に組み込まれるU.S. 8,962,281を参照)。例えば、これらの開示があらゆる目的のために参照によりその全体が組み込まれる米国特許第7,914,796号;同第8,034,598号および同第8,623,618号を参照されたい。他の実施形態では、542位における野生型Asn(N)残基は、Asp(D)残基で置き換えられているか、または478位における野生型Pro(P)残基は、Ser(S)残基で置き換えられている。他の実施形態では、操作された切断ハーフトメインは、「シャークキー(Shark key)」および/または「シャークキーの」変異を含む(Guo et al, (2010) J. Mol. Biol. 400(1):96-107を参照)。

【0177】

別の実施形態では、操作された切断ハーフトメインは、野生型FokI切断ハーフトメイン由来であり、アミノ酸残基416、422、447、448、または525における1つまたは複数の変異に加えて、野生型FokIまたはFokI相同体に対して番号付けされたアミノ酸残基490、および538に変異を含む。好ましい実施形態では、本発明は、操作された切断ハーフトメインが、416、422、447、448、または525位における1つまたは複数の変異に加えて、490位における野生型Glu(E)残基がLys(K)残基で置き換えられ、538位における野生型Ile(I)残基がLys(K)残基で置き換えられているポリペプチド(「KK」)を含む、融合分子を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、操作された切断ハーフトメインが、416、422、447、448、または525位における1つまたは複数の変異に加えて、486位における野生型Gln(Q)残基がGlu(E)残基で置き換えられ、499位における野生型Ile(I)残基がLeu(L)残基で置き換えられているポリペプチド(「EL」)を含む、融合分子を提供する(参照により本明細書に組み込まれるU.S. 8,034,598を参照)。

【0178】

一態様では、本発明は、操作された切断ハーフトメインが、FokI触媒ドメインにおける387、393、394、398、400、402、416、422、427、434、439、441、447、448、469、478、487、495、497、506、516、525、529、534、542、559、569、570、571位の1つまたは複数における野生型アミノ酸残基が変異しているポリペプチドを含む、融合分子を提供する。添付の表および図のいずれかで示される1つまたは複数の変異を含むヌクレアーゼドメインが提供される。一部の実施形態では、1つまたは複数の変異は、野生型アミノ酸を、正電荷を有する残基から中性残基または負電荷を有する残基に変更する。これらの実施形態のいずれかでは、記載された変異体はまた、1つまたは複数の追加の変異を含むFokIドメインに作製されてもよい。好ましい実施形態では、これらの追加の変異

は、二量体化ドメイン中、例えば418、432、441、481、483、486、487、490、496、499、523、527、537、538および／または559位にあってもよい。変異の非限定的な例としては、任意の切断ドメイン（例えば、FokIまたはFokIの相同体）の、393、394、398、416、421、422、442、444、472、473、478、480、525または530位における野生型残基の、任意のアミノ酸残基での変異（例えば、置換）（例えば、K393X、K394X、R398X、R416S、D421X、R422X、K444X、S472X、G473X、S472、P478X、G480X、K525X、A530Xおよび／または、N542X、ここで最初の残基は、野生型を表し、Xは、野生型残基が置換される任意のアミノ酸を指す）が挙げられる。一部の実施形態では、Xは、E、D、H、A、K、S、T、DまたはNである。他の例示的な変異としては、S418E、S418D、S446D、K448A、P478S、I479Q、I479T、Q481A、Q481N、Q481E、A530E、A530Kおよび／またはN542Dが挙げられ、アミノ酸残基は、全長FokI野生型切断ドメインおよびその相同体に対して番号付けされている。ある特定の実施形態では、組合せは、416および422、416位における変異、およびK448A、K448AおよびI479Q、K448AおよびQ481A、ならびに／またはK448A、および525位における変異を含んでいてもよい。一実施形態では、416位における野生型残基は、Glu（E）残基で置き換えられていてもよく（R416E）、422位における野生型残基は、His（H）残基で置き換えられ（R422H）、525位における野生型残基は、Ala（A）残基で置き換えられている。本明細書に記載される切断ドメインは、これらに限定されないが、432、441、483、486、487、490、496、499、527、537、538および／または559位におけるものを含む追加の変異、例えば二量体化ドメイン変異体（例えば、ELD、KKR）および／またはニッカーゼ変異体（触媒ドメインへの変異）をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載される変異を有する切断ハーフトドメインは、当業界で公知のようにヘテロ二量体を形成する。

【0179】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「スプリット酵素」技術を使用して、*in vivo*において核酸標的部位で組み立てられてもよい（例えば米国特許公開第20090068164号を参照）。このようなスプリット酵素の成分は、別々の発現構築物で発現させてもよく、または例えば自己切断2AペプチドまたはIRES配列によって個々の成分が離れている1つのオープンリーディングフレーム中で連結させることができる。成分は、個々のジンクフィンガー結合ドメインまたはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであり得る。

【0180】

ヌクレアーゼ（例えば、ZFNおよび／またはTALEN）は、例えば米国特許第8,563,314号に記載されたような酵母ベースの染色体系で、使用前に、活性に関してスクリーニングすることができる。

【0181】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、CRISPR/Cas系を含む。系のRNA成分をコードするCRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）遺伝子座、およびタンパク質をコードするCas（CRISPR関連）遺伝子座（Jansen et al., 2002. Mol. Microbiol. 43:1565-1575; Makarova et al., 2002. Nucleic Acids Res. 30:482-496; Makarova et al., 2006. Biol. Direct 1:7; Haft et al., 2005. PLoS Comput. Biol. 1:e60）が、CRISPR/Casヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主におけるCRISPR遺伝子座は、CRISPR関連（Cas）遺伝子およびCRISPR媒介性核酸切断の特異性をプログラミングすることが可能な非コードRNAエレメントの組合せを含有する。

【0182】

II型CRISPRは、最もよく特徴付けられた系の1つであり、4つの逐次ステップ

で標的化されたDNA二本鎖切断を実行する。第1に、CRISPR遺伝子座から、2つの非コードRNA、pre-crRNAアレイおよびtracrRNAが転写される。第2に、tracrRNAをpre-crRNAの反復領域にハイブリダイズさせ、pre-crRNAの、個々のスペーサー配列を含有する成熟crRNAへのプロセッシングを媒介させる。第3に、成熟crRNA:tracrRNA複合体が、Cas9を、crRNA上のスペーサーと標的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標的DNAに、次に、標的認識のための追加の必要条件であるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に向ける。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り出す。CRISPR/Cas系の活性は、3つのステップ:(i)「適合」と呼ばれるプロセスにおける将来的な攻撃を防止するための外来のDNA配列のCRISPRアレイへの挿入、(ii)関連タンパク質の発現、ならびにアレイの発現およびプロセッシング、それに続く(iii)外来の核酸でのRNA媒介性干渉を含む。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系の天然の機能に関連し、例えば外来のDNAの挿入などの機能における役割を担う。

【0183】

一部の実施形態では、CRISPR-Cpf1系が使用される。CRISPR-Cpf1系は、Francisella sppで同定されており、ヒト細胞においてロバストなDNA干渉を媒介するクラス2 CRISPR-Cas系である。機能的に保存されているにもかかわらず、Cpf1およびCas9は、それらのガイドRNAおよび基質特異性を含む多くの態様において異なる(Fagerlund et al, (2015) Genom Bio 16:251を参照)。Cas9とCpf1タンパク質との主要な差は、Cpf1はtracrRNAを利用しないことであり、したがってcrRNAのみを必要とする。FnCpf1 crRNAは、42~44ヌクレオチドの長さ(19ヌクレオチドの反復および23~25ヌクレオチドのスペーサー)であり、単一のステムループを含有し、これが2次構造を保持する配列の変化を許容する。加えて、Cpf1 crRNAは、Cas9が必要とする約100ヌクレオチドの操作されたsgRNAよりも著しく短く、FnCpf1のPAMの必要条件は、置き換えられた鎖における5'-TTN-3'および5'-CTA-3'である。Cas9およびCpf1の両方が標的DNA中に二本鎖切断を生じるが、Cas9は、ガイドRNAのシード配列内に平滑末端化された切断を生じるのに、そのRuvCおよびHNH様ドメインを使用し、それに対してCpf1は、シードの外側に付着切断を生じるのに、RuvC様ドメインを使用する。Cpf1は、重要なシード領域から離れて付着切断を生じるため、NH₂は、標的部位を破壊せず、それゆえに、Cpf1は、所望のHDR組換え事象が起こるまで同じ部位を確実に切り続けることができる。したがって、本明細書に記載される方法および組成物では、用語「Cas」は、Cas9およびCpf1タンパク質の両方を含むことが理解される。したがって、本明細書で使用される場合、「CRISPR/Cas系」は、ヌクレアーゼおよび/または転写因子系の両方を含む、CRISPR/Casおよび/またはCRISPR/Cpf1系の両方を指す。

【0184】

ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、天然に存在するCasタンパク質の「機能的な誘導体」であってもよい。ネイティブ配列のポリペプチドの「機能的な誘導体」は、ネイティブ配列のポリペプチドと共通の定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的な誘導体」としては、これらに限定されないが、対応するネイティブ配列のポリペプチドと共通の生物学的活性をそれらが有するという条件で、ネイティブ配列の断片、ならびにネイティブ配列のポリペプチドの誘導体およびその断片が挙げられる。本明細書において企図される生物学的活性は、DNA基質を断片に加水分解する機能的な誘導体の能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーション、共有結合による改変体の両方、およびそれらの融合体、例えば誘導体Casタンパク質を包含する。Casポリペプチドまたはその断片の好適な誘導体としては、これらに限定されないが、Casタンパク質またはその断片の、変異体、融合体、共有結合による改変体が挙げられ

10

20

30

40

50

る。C a s タンパク質は、C a s タンパク質またはその断片、ならびにC a s タンパク質またはその断片の誘導体を含み、これらは、細胞から得ることができる、または化学的に合成される、またはこれらの2つの手順の組合せによってであり得る。細胞は、天然にC a s タンパク質を産生する細胞、または天然にC a s タンパク質を産生し、内因性C a s タンパク質をより高い発現レベルで産生するように、もしくは内因性C a s と同じもしくは異なるC a s をコードする外因的に導入された核酸からC a s タンパク質を産生するように遺伝子操作された細胞であってもよい。一部の 경우에는、細胞は、天然にC a s タンパク質を産生せず、C a s タンパク質を産生するように遺伝子操作されている。一部の実施形態では、C a s タンパク質は、A A V ベクターを介した送達のための小さいC a s 9 オーソログである (Ran et al (2015) Nature 510, p.186)。

10

【0185】

ヌクレアーゼ（複数可）は、標的部位において1つまたは複数の二本鎖および／または一本鎖の切断を生じることができる。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、触媒的に不活性な切断ドメイン（例えば、F o k I および／またはC a s タンパク質）を含む。例えば、米国特許第9, 200, 266号；同第8, 703, 489号およびGuillinger et al. (2014) Nature Biotech.32(6):577-582を参照されたい。触媒的に不活性な切断ドメインは、触媒活性ドメインと組み合わせて、ニッカーゼとして作用して、一本鎖の切断を生じることができる。それゆえに、2種のニッカーゼを組み合わせて使用して、特定の領域において二本鎖の切断を生じることができる。追加のニッカーゼも当業界、例えば、McCaffery et al. (2016) Nucleic Acids Res. 44(2):e11. doi:10.1093/nar/gkv878. Epub 2015 Oct 19で公知である。

20

【0186】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、それぞれジンクフィンガーDNA結合ドメインおよび切断ドメイン（例えば、操作されたF o k I）を含む第1および第2の（「左および右」および「パートナー」とも称される）ジンクフィンガーヌクレアーゼを含むジンクフィンガーヌクレアーゼである。Z F Nは、1つまたは複数のA A V ベクターによって担持され得る。ある特定の実施形態では、別々のA A V ベクターは、ヌクレアーゼの左および右のZ F Nを担持する。A A V ベクター（複数可）は、これらに限定されないが、5' I T R、1つもしくは複数のエンハンサー配列（例えば、A p o E エンハンサー）、1つもしくは複数のプロモーター配列（例えば、h A A T プロモーター）、5' U T R、1つもしくは複数のイントロン配列（例えば、ヒトβグロビン／I g G キメライントロン）、N末端ペプチドコード配列、N L S シグナル、1つもしくは複数のW P R E 配列（例えば、W P R E m u t 6）、ポリAシグナルおよび／または3' I T Rを含む追加のコードおよび／または非コード配列を含んでいてもよい。以下の表4および5に、例示的なヌクレアーゼA A Vを示す。列挙したエレメントの1つまたは複数（Z F Nをコードする配列は除く）は、省略され；類似の配列（例えば、異なるプロモーター配列、異なるW P R E 配列、例えば当業界において公知の、または実施例4に記載されるもの）、異なるイントロン配列など）で置き換えられている場合があり；および／または追加のエレメントが追加される場合があることが明らかである。ヌクレアーゼをコードするA A V ベクター（複数可）は、系において、ドナーと共に、例えば2つのZ F N A A V（例えば、表4および5で開示される左および右のZ F N A A V）を、典型的には治療用ペプチドをコードするドナーA A Vと組み合わせて使用することができる。A A Vドナーは、以下のエレメント：任意の供給源由来の5' および／もしくは3' I T R；任意の長さの導入遺伝子（任意のタンパク質またはその機能的な断片をコードする、任意の長さの治療用タンパク質をコードする配列）に隣接する左および／もしくは右の相同性アーム（アルブミンに対して）；スプライスアクセプター配列；ならびに／またはポリアデニル化（ポリA）シグナルの1つまたは複数を含んでいてもよい。ある特定の実施形態では、A A Vドナーは、第I X 因子、I D S またはI D U A タンパク質、例えば以下の表6～8で示されるドナーをコードする。

30

40

【0187】

50

送達

本明細書に記載されるタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ）、ポリヌクレオチドならびに／またはタンパク質および／もしくはポリヌクレオチドを含む組成物は、任意の好適な手段によって、例えばタンパク質および／またはmRNA成分の注射などによって、標的細胞に送達することができる。

【0188】

好適な細胞としては、これらに限定されないが、真核および原核の細胞および／または細胞系が挙げられる。このような細胞またはこのような細胞から生成した細胞系の非限定的な例としては、T細胞、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHO-K1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/O-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、およびperC6細胞、ならびに昆虫細胞、例えばSpodoptera fugiperda (Sf)、または真菌細胞、例えばSaccharomyces、PichiaおよびSchizosaccharomycesが挙げられる。あ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。好適な細胞としては、幹細胞、例えば、一例として、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、造血幹細胞、神経幹細胞および間葉幹細胞も挙げられる。

【0189】

本明細書に記載されるDNA結合ドメイン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、これらの全ての開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0190】

本明細書に記載されるDNA結合ドメインおよびこれらのDNA結合ドメインを含む融合分子もまた、DNA結合タンパク質（複数可）の1つまたは複数をコードする配列を含むベクターを使用して送達することができる。加えて、追加の核酸（例えば、ドナー）も、これらのベクターを介して送達することができる。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随伴ウイルスベクターなどを含む任意のベクター系を使用することができる。参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第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号も参照されたい。さらに、これらのベクターのいずれも、必要に応じて1つまたは複数のDNA結合タンパク質をコードする配列および／または追加の核酸を含んでもよいことが明らかである。したがって、本明細書に記載される1つまたは複数のDNA結合タンパク質および必要な場合に追加のDNAが細胞に導入されるとき、それらは、同じベクターに、または異なるベクターに担持されてもよい。複数のベクターが使用される場合、各ベクターが、1つのまたは複数のDNA結合タンパク質をコードする配列および所望の場合、追加の核酸を含んでもよい。

【0191】

従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子移入方法を使用して、細胞（例えば、哺乳動物細胞）および標的組織中に操作されたDNA結合タンパク質をコードする核酸を導入し、所望の場合、追加のヌクレオチド配列を共導入することができる。このような方法は、in vitroで核酸（例えば、DNA結合タンパク質および／またはドナーをコードする）を細胞に投与することにも使用できる。ある特定の実施形態では、核酸は、in vivoまたはex vivoでの遺伝子療法での使用のために投与される。非ウイ

10

20

30

40

50

ルスベクター送達系としては、DNAプラスミド、裸の核酸、およびリポソームまたはポロキサマーなどの送達ビヒクルと複合体化した核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、細胞への送達後にエピソームのまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有するDNAおよびRNAウイルスが挙げられる。遺伝子療法手順の総説については、Anderson, Science 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, TIBTECH 11:211-217 (1993); Mitani & 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 & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Boehm (eds.) (1995); および Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)を参照されたい。

10

【0192】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、裸のDNA、mRNA、人工ビリオン、およびDNAの作用物質増強取り込み (agent-enhanced uptake) が挙げられる。例えば、Sonitron 2000システム (Rich-Mar) を使用するソノポレーションも核酸の送達に使用することができる。好ましい実施形態では、1つまたは複数の核酸は、mRNAとして送達される。翻訳効率および／またはmRNA安定性を増加させるためのキャップされたmRNAの使用も好ましい。特に好ましくは、ARCA (anti-reverse cap analog; アンチリバースキャップアナログ) キャップまたはそれらのバリエーションである。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,074,596号および同第8,153,773号を参照されたい。

20

【0193】

追加の例示的な核酸送達系としては、Amaxa Biosystems (Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) および Copernicus Therapeutics Inc. によって提供されるものが挙げられる (例えばUS6008336を参照)。リポフェクションは、例えば、US5,049,386、US4,946,787; およびUS4,897,355に記載されており、リポフェクション試薬は、商業的に販売されている (例えば、Transfectam (商標)、Lipofectin (商標)、およびLipofectamine (商標) RNAiMAX)。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適なカチオン性および中性脂肪としては、Felgner、WO91/17424、WO91/16024のものが挙げられる。送達は、細胞 (ex vivo 投与) または標的組織 (in vivo 投与) への送達であってもよい。

30

【0194】

標的化されたリポソームを含む脂質：核酸複合体、例えばイムノリピド (immunolipid) 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 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号を参照)。

40

【0195】

追加の送達方法としては、送達しようとする核酸のEnGene IC送達ビヒクル (EDV) へのパッケージングの使用が挙げられる。これらのEDVは、二重特異性抗体を使

50

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、他方のアームは、EDVに対する特異性を有する。抗体は、EDVを標的細胞表面に運び、次いでEDVがエンドサイトーシスによって細胞に持ち込まれる。細胞中に入ると、内容物が放出される (MacDiarmid et al (2009) Nature Biotechnology 27 (7) p. 643を参照)。

【0196】

操作されたDNA結合タンパク質、および／または所望の場合、ドナー（例えばCARまたはACTR）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、ウイルスを体内の特定の細胞に標的化する、およびウイルスペイロードを核にトラフィッキング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、患者に直接投与してもよく (in vivo)、ウイルスベクターを使用して、in vitroで細胞を処置してもよく、改変された細胞が患者に投与される (ex vivo)。核酸の送達のための従来のウイルスベースの系としては、これらに限定されないが、遺伝子移入のための、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴、ワクシニアおよび単純疱疹ウイルスベクターが挙げられる。宿主ゲノム中での組み込みは、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移入方法を用いて可能であり、これは、挿入された導入遺伝子の長期にわたる発現をもたらすことが多い。加えて、高い形質導入効率が多くの変種な細胞型および標的組織で観察された。

【0197】

レトロウイルスの向性は、外来性エンベロープタンパク質を取り入れ、標的細胞の潜在的な標的集団を拡張することによって変更することができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入するかまたは感染す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、高いウイルス力価を生じる。レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6~10 kbの外來性配列のためのパッケージング能力を有するシス作用性長末端反復で構成される。最小限のシス作用性LTRが、ベクターの複製およびパッケージングに十分であり、これは次いで、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで永続的な導入遺伝子発現を提供するのに使用される。広く使用されるレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に基づくもの、およびそれらの組合せが挙げられる (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)。

【0198】

一過性発現が好ましい適用において、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ベクターは、多くの細胞型で非常に高い形質導入効率を可能にし、細胞分裂を必要としない。このようなベクターを用いて、高い力価および高いレベルの発現が得られている。このベクターは、比較的単純な系で大量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、例えば、核酸およびペプチドの in vitroの産生において、ならびに in vivoおよび ex vivoでの遺伝子療法手順のために細胞を標的核酸で形質導入することにも使用される (例えば、West et al., Virology 160:38-47 (1987); 米国特許第4,797,368号; WO93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)を参照。組換え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 USA 81:6466-6470 (1984); および Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989)を含むいくつかの出版物に記載されている。

【0199】

臨床試験における遺伝子移入のために、少なくとも6つのウイルスベクターアプローチが現在利用可能であり、これらは、ヘルパー細胞系に挿入された遺伝子によって不完全なベクターを補完し、形質導入剤を生成することを含むアプローチを利用する。

【0200】

p L A S NおよびM F G - Sは、臨床試験で使用されてきたレトロウイルスベクターの例である (Dunbar et al., Blood 85:3048-305 (1995); Kohn et al., Nat. Med. 1:1017-102 (1995); Malech et al., PNAS USA 94:22 12133-12138 (1997))。P A 3 1 7 / p L A S Nは、遺伝子療法試験で使用された最初の治療用ベクターであった。(Blaese et al., Science 270:475-480 (1995))。M F G - Sをパッケージングしたベクターの場合、50%またはそれよりも大きい形質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))。

10

【0201】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター (r A A V) は、不完全で非病原性のパルボウイルスアデノ随伴2型ウイルスに基づく有望な代替遺伝子送達系である。全てのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するA A Vの145bpの逆位末端反復のみを保持するプラスミド由来である。形質導入される細胞のゲノムへの組み込みによる効率的な遺伝子移入および安定な導入遺伝子送達が、このベクター系の主要な特色である。(Wagner et al., Lancet 351:9117 1702-3 (1998), Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1996))。A A V 1、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 8、A A V 8. 2、A A V 9およびA A V r h 1 0ならびにシュードタイプA A V、例えばA A V 2 / 8、A A V 2 / 5およびA A V 2 / 6を含む他のA A V血清型も、本発明に従って使用することができる。

20

【0202】

複製欠損型組換えアデノウイルスベクター (A d) を高い力価で産生し、いくつかの異なる細胞型に容易に感染させることができる。ほとんどのアデノウイルスベクターは、導入遺伝子がA d E 1 a、E 1 b、および/またはE 3 遺伝子を置き換えるように操作されており、その後、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細胞中で増える。A dベクターは、in vivoで、非分裂性の分化細胞、例えば肝臓、腎臓および筋肉に見出されるものを含むなどの複数のタイプの組織に形質導入することができる。従来のA dベクターは、大きい運搬能力を有する。臨床試験におけるA dベクターの使用の例は、筋肉内注射での抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド療法を伴うものであった (Stermann et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998))。臨床試験における遺伝子移入のためのアデノウイルスベクターの使用の追加の例としては、Ro senecker et al., Infection 24:1 5-10 (1996); Stermann 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); Stermann et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998)が挙げられる。

30

【0203】

パッケージング細胞は、宿主細胞に感染することが可能なウイルス粒子を形成するのに使用される。このような細胞としては、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、およびレトロウイルスをパッケージングするψ2細胞またはP A 3 1 7細胞が挙げられる。遺伝子療法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にパッケージングするプロデューサー細胞系によって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージングおよびそれに続く宿主への組み込み (適切な場合) に必要な最小のウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現させようとするタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられている。失われたウイルス機能は、パッケージング細胞系によってトランスで供給される。例えば、遺伝子療法で使用されるA A Vベクターは、典型的には、パッケージングおよび宿主ゲノムへの組み込みに必要なA A Vゲノム由来の逆

40

50

位末端反復（ITR）配列のみを有する。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中にパッケージングされる。細胞系も、ヘルパーとしてのアデノウイルスで感染させる。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列の欠如のために相当量でパッケージングされない。アデノウイルスでの汚染は、例えば、AAVよりもアデノウイルスが感受性を示す熱処理によって低減することができる。

【0204】

多くの遺伝子療法適用において、遺伝子療法用ベクターが特定の組織タイプに対して高度な特異性で送達されることが望ましい。したがって、ウイルスの外面上のウイルスコートタンパク質との融合体としてリガンドを発現することによって所与の細胞型に対して特異性を有するように、ウイルスベクターを改変してもよい。リガンドは、目的の細胞型に存在することがわかっている受容体に対して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、モロニー Maus 白血病ウイルスは、gp70に融合したヒトヘレグリンを発現するように改変することができ、組換えウイルスは、ヒト上皮成長因子受容体を発現するある特定のヒト乳がん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分子を発現する他のウイルス標的細胞の対に拡張することができる。例えば、線状ファージは、実質的に全ての選択さ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、FABまたはFv）を提示するように操作することができる。上の記載は主としてウイルスベクターに適用されるが、同じ原理を非ウイルスベクターに適用することができる。このようなベクターは、特定の標的細胞による取込みに有利な特定の取り込み配列を含有するように操作することができる。

【0205】

CRISPR/Cas系の送達方法は、上述した方法を含んでもよい。例えば、動物モデルにおいて、in vitroで転写されたCasをコードするmRNAまたは組換えCasタンパク質は、ゲノム編集動物の1細胞期胚に、ガラス針を使用して直接注射することができる。in vitroにおいて細胞中でCasおよびガイドRNAを発現するために、典型的には、それらをコードするプラスミドは、リポフェクションまたはエレクトロポレーションを介して細胞にトランスフェクトされる。また組換えCasタンパク質は、in vitroで転写されたガイドRNAと複合体化することもでき、Cas-ガイドRNAリボ核タンパク質は、目的の細胞によって取り込まれる（Kim et al (2014) Genome Res 24(6):1012）。治療目的で、CasおよびガイドRNAは、ウイルスおよび非ウイルス技術の組合せによって送達することができる。例えば、CasをコードするmRNAは、ナノ粒子送達を介して送達してもよく、一方でガイドRNAおよび任意の所望の導入遺伝子または修復鋳型は、AAVを介して送達される（Yin et al (2016) Nat Biotechnol 34(3) p. 328）。

【0206】

遺伝子療法用ベクターは、典型的には、後述するように、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内注入）または局所的適用による個々の患者への投与によって、in vivoで送達することができる。あるいは、ベクターは、ex vivoで、個々の患者からの体外培養した細胞（例えば、リンパ球、骨髓穿刺液、組織生検）またはユニバーサルドナー造血幹細胞などの細胞に送達することができ、続いて細胞は、通常ベクターを取り込んだ細胞の選択の後に、患者に再び埋め込まれる。

【0207】

診断、調査、移植または遺伝子療法のためのex vivoでの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への再注入を介した）は、当業者に周知である。好ましい実施形態では、細胞は、対象生物から単離され、DNA結合タンパク質核酸（遺伝子またはcDNA）をトランスフェクトされ、再び対象生物（例えば、

患者)に注入し戻される。ex vivoでのトランスフェクションに好適な様々な細胞型が当業者に周知である(例えば、どのように患者から細胞を単離および培養するかの考察に関して、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た文献を参照)。

【0208】

一実施形態では、細胞トランスフェクションおよび遺伝子療法のためのex vivoの手順で、幹細胞が使用される。幹細胞を使用する利点は、それらがin vitroで他の細胞型に分化することができる、または哺乳動物(例えば細胞のドナー)に導入することができることであり、それらは骨髄に移植される。GM-CSF、IFN-γおよびTNF-αなどのサイトカインを使用してin vitroでCD34+細胞を臨床的に重要な免疫細胞型に分化させるための方法が公知である(Inaba et al., J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)を参照)。

10

【0209】

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、幹細胞は、望まれない細胞、例えばCD4+およびCD8+(T細胞)、CD45+(pan B細胞)、GR-1(顆粒細胞)、ならびにIad(分化した抗原提示細胞)に結合する抗体で骨髄細胞をパニングすることによって、骨髄細胞から単離される(Inaba et al., J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)を参照)。

【0210】

一部の実施形態では、改変された幹細胞も使用することができる。例えば、アポトーシスに対する耐性が付与された神経幹細胞が、治療用組成物として使用することができ、幹細胞も本発明のZFP-TFを含有する。アポトーシスに対する耐性は、例えば、幹細胞においてBAXもしくはBAK特異的ZFNを使用してBAXおよび/もしくはBAKをノックアウトすることによって(米国特許第8,597,912号を参照)、またはここでも例えばカスパーゼ6特異的なZFNを使用してカスパーゼにおいて破壊されているものによって、生じ得る。

20

【0211】

治療用DNA結合タンパク質(またはこれらのタンパク質をコードする核酸)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)は、in vivoでの細胞の形質導入のために、生物に直接投与することもできる。あるいは、裸のDNAを投与してもよい。投与は、これらに限定されないが、注射、注入、局所的適用およびエレクトロポレーションを含む、最終的な血液または組織細胞との接触に分子を導くのに通常使用される経路のいずれかによる。このような核酸を投与する好適な方法は利用可能で、当業者に周知であり、特定の組成物を投与するのに1つよりも多くの経路を使用することができるが、特定の経路が、別の経路よりも即時かつ有効な反応を提供できることが多い。

30

【0212】

造血幹細胞へのDNAの導入のための方法は、例えば、米国特許第5,928,638号に開示されている。造血幹細胞、例えばCD34+細胞に導入遺伝子を導入するのに有用なベクターとしては、アデノウイルス35型が挙げられる。

40

【0213】

免疫細胞(例えば、T細胞)への導入遺伝子の導入に好適なベクターとしては、非組み込み型レンチウイルスベクターが挙げられる。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。

【0214】

薬学的に許容される担体は、部分的に、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するのに使用される特定の方法によって決定される。したがって、後述するように、利用可能な医薬組成物の多種多様の好適な製剤がある(例えば、Remington's Ph

50

armaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照)。

【0215】

上述したように、開示された方法および組成物は、これらに限定されないが、任意のタイプのT細胞および幹細胞を含む、原核細胞、真菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞およびヒト細胞を含む任意のタイプの細胞で使用する事ができる。タンパク質発現のための好適な細胞系は、当業者に公知であり、これらに限定されないが、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/O-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、perC6、昆虫細胞、例えばSpodoptera fugiperda (Sf)、ならびに真菌細胞、例えばSaccharomyces、PichiaおよびSchizosaccharomycesが挙げられる。これらの細胞系の後代、変種および派生物も使用することができる。

10

【0216】

適用

疾患の処置および防止における操作されたヌクレアーゼの使用は、今後数年間の最も重要な薬の開発の1つである。本明細書に記載される方法および組成物は、所望の標的部位が確実に主要な切断場所になるように、これらの新規のツールの特異性を増加させるのに役立つ。オフターゲット切断を最小化または消去することが、in vitro、in vivoおよびex vivoでの適用のためにこの技術の潜在性を十分に実現するのに必要と予想される。

20

【0217】

例示的な遺伝性疾患としては、これらに限定されないが、軟骨形成不全、色覚異常、酸性マルターゼ欠乏症、アデノシンデアミナーゼ欠乏症（OMIM番号102700）、副腎白質ジストロフィー、アイカルディ症候群、アルファー1抗トリプシン欠乏症、アルファーサラセミア、アンドロゲン不感性症候群、アペール症候群、不整脈原性右心室、異形成、毛細血管拡張性失調症（ataxia telangiectasia）、バース症候群、ベーターサラセミア、青色ゴムまり様母斑症候群、カナバン病、慢性肉芽腫性疾患（CGD）、猫鳴き症候群、嚢胞性線維症、ダーカム病、外胚葉異形成、ファンコニ貧血、進行性骨化性線維形成異常（fibrodysplasia ossificans progressive）、脆弱X症候群、ガラクトース血症（galactosemia）、ゴーシェ病、全身性ガングリオシドーシス（例えば、GM1）、ヘモクロマトーシス、ベーターグロビンの第6コドンにおけるヘモグロビンC変異（HbC）、血友病、ハンチントン病、ハーラー症候群、低ホスファターゼ症、クライنفレター症候群（Klinefelter syndrome）、クラッペ病、ランガーギーディオン症候群、白血球接着不全症（LAD、OMIM番号116920）、白質ジストロフィー、QT延長症候群、マルファン症候群、メビウス症候群、ムコ多糖症（MPS）、爪膝蓋骨症候群、腎性尿崩症（nephrogenic diabetes insipidus）、神経線維腫症、ニーマンピーク病（Neimann-Pick disease）、骨形成不全症、フェニルケトン尿症（PKU）、ポリフィリン症、ブラダーウィリー症候群、早老症、プロテウス症候群、網膜芽細胞腫、レット症候群、ルビンシュタインテイビ症候群、サンフィリップ症候群、重症複合免疫不全（SCID）、シュワックマン症候群、鎌状赤血球症（鎌状赤血球貧血）、スミスマゲニス症候群、スティックラー症候群、テイサックス病、血小板減少橈骨欠損（TAR）症候群、トリーチャーコリンズ症候群、トリソミー、結節性硬化症、ターナー症候群、尿素サイクル異常症、フォンヒッペルランダウ病（von Hippel-Landau disease）、ワーデンプルグ症候群、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、ウィスコットアルドリッチ症候群、X連鎖リンパ増殖症候群（XLP、OMIM番号308240）が挙げられる。

30

40

【0218】

標的化されたDNA切断および／または相同組換えによって処置することができる追加

50

の例示的な疾患としては、後天性免疫不全症、リソソーム蓄積症（例えば、ゴーシェ病、GM1、ファブリー病およびテイーサックス病）、ムコ多糖症（mucopolysaccharidosis）（例えばMPS II（ハンター病）、MPS I（ハーラー病）、異常ヘモグロビン症（例えば、鎌状赤血球症、HbC、 α -サラセミア、 β -サラセミア）および血友病が挙げられる。例えば、米国特許第9,877,988号および同第9,956,247号を参照されたい。特に、グルコセレブロシダーゼ（GBA）は、ゴーシェ病で欠乏しており、アルファーガラクトシダーゼ（GLA）は、ファブリー病で欠乏しており、イズロン酸-2-スルファターゼ欠乏（IDS）は、MPS II（ハンター病）で欠乏しており、アルファー-イズロニダーゼ欠乏（IDUA）は、MPS I（ハーラー病）で欠乏しており、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1欠乏（SMPD1）は、ニーマン-ピック病で欠乏している。それゆえに、これらの疾患において欠けているまたは欠乏しているタンパク質の1つまたは複数を発現するドナーを本明細書に記載されるヌクレアーゼを使用して導入して、これらの疾患の処置および／または防止を提供することができる。

【0219】

このような方法は、遺伝性疾患を処置するために、宿主における（ウイルスまたは細菌）感染の処置も可能にする（例えば、ウイルスまたは細菌の受容体の発現をブロックし、それにより宿主生物における感染および／または蔓延を防止することによって）。

【0220】

感染性の、または組み込まれたウイルスゲノムの標的化された切断は、宿主におけるウイルス感染を処置するのに使用することができる。加えて、ウイルスに対する受容体をコードする遺伝子の標的化された切断は、このような受容体の発現をブロックし、それにより宿主生物におけるウイルス感染および／またはウイルスの蔓延を防止するのに使用することができる。ウイルス受容体（例えば、HIVに対するCCR5およびCXCR4受容体）をコードする遺伝子の標的化された変異誘発は、受容体をウイルスに結合することができなくし、それにより新たな感染を防止し、既存の感染の蔓延をブロックするのに使用することができる。米国特許公開第2008/015996号を参照されたい。標的化することができるウイルスまたはウイルス受容体の非限定的な例としては、単純疱疹ウイルス（HSV）、例えばHSV-1およびHSV-2、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタイン-バーウイルス（EBV）ならびにサイトメガロウイルス（CMV）、HHV6およびHHV7が挙げられる。肝炎ウイルスファミリーとしては、A型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、デルタ肝炎ウイルス（HDV）、E型肝炎ウイルス（HEV）およびG型肝炎ウイルス（HGV）が挙げられる。これらに限定されないが、Picornaviridae（例えば、ポリオウイルスなど）；Caliciviridae；Togaviridae（例えば、風疹ウイルス、デング熱ウイルスなど）；Flaviviridae；Coronaviridae；Reoviridae；Birnaviridae；Rhabdoviridae（例えば、狂犬病ウイルスなど）；Filoviridae；Paramyxoviridae（例えば、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルスなど）；Orthomyxoviridae（例えば、インフルエンザウイルスA型、B型およびC型など）；Bunyaviridae；Arenaviridae；Retroviridae；レンチウイルス（例えば、HTLV-I；HTLV-II；HIV-1（HTLV-IIII、LAV、ARV、hTLRなどとしても公知）HIV-II）；サル免疫不全ウイルス（SIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、インフルエンザウイルスおよびダニ媒介性脳炎ウイルスを含む他のウイルスまたはそれらの受容体を標的化することができる。これらおよび他のウイルスの記載に関して、例えば、Virology, 3rd Edition (W. K. Joklik ed. 1988)；Fundamental Virology, 2nd Edition (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds. 1991)を参照されたい。HIVに対する受容体としては、例えば、CCR-5およびCXCR-4が挙げられる。

【0221】

したがって、本明細書に記載されるヘテロ二量体切断ドメインバリエーションは、遺伝子改

10

20

30

40

50

変適用における ZFN 特異性を改善するための広範な有用性を提供する。これらのバリエーション切断ドメインは、*in vivo* における任意の ZFN 二量体の特異性を改善するために、部位特異的変異誘発またはサブクロニングのいずれかによって任意の既存の ZFN に容易に取り込むことができる。

【0222】

上述したように、本明細書に記載される組成物および方法は、遺伝子改変、遺伝子修正、および遺伝子破壊に使用することができる。遺伝子改変の非限定的な例としては、相同組換え修復 (HDR) ベースの標的化組込み；HDR ベースの遺伝子修正；HDR ベースの遺伝子改変；HDR ベースの遺伝子破壊；NHEJ ベースの遺伝子破壊ならびに／または HDR、NHEJ、および／もしくは一本鎖アニリング (SSA) の組合せが挙げられる。一本鎖アニリング (SSA) は、2つの相補的領域を露出させるための 5' - 3' エキソヌクレアーゼによる DSB の切除による、同じ方向の2つの繰り返しの配列間の二本鎖切断の修復を指す。次いで2つのダイレクトリピートをコードする一本鎖が互いにアニールし、アニールした中間体は、一本鎖テール (いずれの配列にもアニールされていない一本鎖 DNA の部分) が消化により除去されるようにプロセッシングされ、ギャップが DNA ポリメラーゼによって満たされ、DNA 末端が再結合され得る。これは、ダイレクトリピート間に位置する配列の欠失をもたらす。

【0223】

本明細書に記載される切断ドメイン (例えば、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas 系) を含む組成物および方法は、様々な遺伝性疾患および／または感染性疾患の処置にも使用することができる。

【0224】

組成物および方法は、幹細胞ベースの療法にも適用することができ、そのような療法の例としては、これらに限定されないが、単一遺伝子の遺伝子療法 (monogenic gene therapy) のための短いパッチ遺伝子の変換または標的化組込みによる体細胞変異の修正；優性阻害対立遺伝子の破壊；細胞への病原体の侵入または増殖性感染に必要な遺伝子の破壊；例えば、機能的な組織の分化または形成を促進するために遺伝子活性を改変することによる、強化された組織操作；ならびに／あるいは機能的な組織の分化または形成を促進するために遺伝子活性を破壊すること；例えば、幹細胞の具体的な系統経路への分化を促進するために分化をブロックする遺伝子を破壊すること、幹細胞分化を刺激することができる遺伝子または siRNA 発現カセットの標的化された挿入、幹細胞分化をブロックでき、より優れた拡張および多能性の維持を可能にする遺伝子または siRNA 発現カセットの標的化された挿入、および／または簡単なマーカーによって、幹細胞の分化状況、およびどのように培地、サイトカイン、成長条件、遺伝子の発現、siRNA、shRNA もしくは miRNA 分子の発現、抗体の細胞表面マーカーへの曝露、または薬物がこの状況を変更するかをスコア付けすることを可能し得る多能性または分化状況のマーカーである内因性遺伝子を伴うフレーム内のレポーター遺伝子の標的化された挿入によって、分化をブロックまたは誘導すること；例えば、患者自身の体細胞を単離し、意図した標的遺伝子を適切な方式で改変し、細胞クローンを生成し (かつ品質を、ゲノムの安全性を確実にするように制御し)、これらの細胞から核を単離し、未受精卵に移入して、患者特異的な hES 細胞を生成することができ、hES 細胞を患者に直接注射するか、または患者に生着させる前に分化させ、それにより、組織の拒絶を低減するかまたは消去することができる、体細胞核移入；MHC 受容体をノックアウトすることによる万能幹細胞 (例えば、免疫学的アイデンティティを減らしたかまたは全体的に消滅させた細胞を生成するため) が挙げられる。この手順のための細胞型としては、これらに限定されないが、T 細胞、B 細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられる。加えて、患者自身の体細胞から生成され得る人工多能性幹細胞 (iPSC) も使用することができる。それゆえに、これらの幹細胞またはそれらの誘导体 (分化細胞型または組織) は、起源または組織適合性に関係なくあらゆる人へ潜在的に生着し得る。

【0225】

組成物および方法は、体細胞療法にも使用することができ、それによってその生物学的な特性を強化するように改変された細胞のストックの産生を可能にする。このような細胞は、細胞のドナーの供給源およびレシピエントに対するその組織適合性と関係なく、様々な患者に注入することができる。

【0226】

治療適用に加えて、本明細書に記載されるバリエーションによって提供される特異性の増加は、操作されたヌクレアーゼで使用される場合、作物の操作、細胞系の操作および疾患モデルの構築に使用することができる。絶対ヘテロ二量体切断ハーフトドメインは、ヌクレアーゼ特性を改善するための直接的な手段を提供する。

【0227】

記載された操作された切断ハーフトドメインは、介在領域を欠失させるか、または2つの特定の遺伝子座を一度に変更するかのいずれかのための、複数の標的における同時の切断を必要とする遺伝子改変プロトコールにも使用することができる。2つの標的における切断は、4種のZFNまたはTALENの細胞発現を必要とし得、それにより、潜在的に、10種の異なる活性なZFNまたはTALENの組合せが生じ得る。このような適用の場合、野生型ヌクレアーゼドメインのためのこれらの新規のバリエーションの置換は、望まれない組合せの活性を消失させ、オフターゲット切断の機会を低減し得る。ある特定の所望のDNA標的における切断がヌクレアーゼの対A+Bの活性を必要とし、第2の所望のDNA標的における同時の切断がヌクレアーゼの対X+Yの活性を必要とする場合には、本明細書に記載される変異の使用は、AとA、AとX、AとYなどの対形成を防止することができる。したがって、これらのFokI変異は、「変則的な」対形成の結果としての非特異的な切断活性を減少させ、ヌクレアーゼのより効率的な直交性の変異体対の生成を可能にする（共同所有の特許である米国特許公報第20080131962号および同第20090305346号を参照）。

【実施例】

【0228】

（実施例1）

ZFNの調製

本質的にUrnov et al. (2005) Nature 435(7042):646-651; Perez et al (2008) Nature Biotechnology 26(7):808-816、および米国特許第9,394,545号に記載された通りに、ヒトアルブミン遺伝子に標的化されたZFNを設計し、プラスミドベクターに取り込んだ。

【0229】

（実施例2）

アルブミン特異的なZFNの最適化

左側のZFNパートナーの結合部位（SBS47171-FLAG、表1を参照）は、ヒトの20%においてSNPを含む（図1を参照）。野生型配列において、配列は、AT塩基対（卵形により示される）を含むが、SNPを含む配列において、この位置にはGC塩基対が存在する（配列の上の長方形で示される）。野生型およびSNPアルブミン配列についてヘテロ接合型であるヒト肝細胞において、47171-FLAG/47898-FLAG対は、野生型配列に3~4倍の優先性を有する（図2を参照）。野生型アルブミン配列およびSNP含有配列を等しい活性で切断することが見出された第2の左側のパートナーが同定されたが（42875）、42875/47898対もSMCHD1オフターゲット部位においてある程度の切断活性を示した。

【0230】

したがって、ZFP主鎖内のリン酸接触アミノ酸に改変を作製した追加の候補ZFNを用いて研究を実行した。以下の表1に使用されるタンパク質を示す。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1: アルブミン特異的なZFNの設計

ZFN 名称 標的配列	F1	F2	F3	F4	F5	F6	ドメイン リンカー	その他
SBS47171 -FLAG tttGGGAT AGTTATGA Attcaatc ttca (配列番号 14)	QSGNLSR (配列番号 14)	LKQNLCM (配列番号 15)	WADNLQN (配列番号 16)	TSGNLTR (配列番号 17)	RQSHLCL (配列番号 18)	N/A	5, 6	N- 末端 3x FLAG

10

【表 1 - 2】

12)								
SBS42875 -FLAG tttGGGAT AGTTATGA Attcaatc ttca (配列番号 12)	QSGNLAR (配列番号 19)	LKQNLCM (配列番号 15)	WQSNLQN (配列番号 20)	TSGNLTR (配列番号 17)	RRSHLTS (配列番号 21)	N/A	5, 6	N- 末端 3x FLAG
42877- FLAG tttGGGAT AGTTATGA Attcaatc ttca (配列番号 12)	QSGNLAR (配列番号 19)	LKQNLCM (配列番号 15)	LITTLRN (配列番号 22)	TSGNLTR (配列番号 17)	RQSHLCL (配列番号 18)	N/A	5, 6	N- 末端 3x FLAG
42908- FLAG tttGGGAT AGTTATGA Attcaatc ttca (配列番号 12)	QSGNLAR (配列番号 19)	LKQNLCM (配列番号 15)	WASNLQN (配列番号 23)	TSGNLTR (配列番号 17)	RQSHLCL (配列番号 18)	N/A	5, 6	N- 末端 3x FLAG
47898- FLAG ccTATCCA TTGCACTA TGCTttat ttaa (配列番号 13)	TPQLLDR (配列番号 24)	LKHNLIT (配列番号 25)	DQSNLNA (配列番号 26)	RNFSLTM (配列番号 27)	LRHDLDR (配列番号 28)	HRSNLNK (配列番号 29)	5, 6	N- 末端 3x FLAG
47874- FLAG ccTATCCA TTGCACTA TGCTttat ttaa (配列番号 13)	QSSDLAR (配列番号 30)	LKHNLIT (配列番号 25)	DQSNLRA (配列番号 31)	RNFSLTM (配列番号 27)	LRHDLER (配列番号 32)	HRSNLNK (配列番号 29)	5, 6	N- 末端 3x FLAG
47931- FLAG ccTATCCA TTGCACTA TGCTttat ttaa (配列番号 13)	TPQLLDR (配列番号 24)	LKWNLRT (配列番号 33)	DQSNLNA (配列番号 26)	RNFSLTM (配列番号 27)	LRHDLDR (配列番号 28)	HRSNLNK (配列番号 29)	5, 6	N- 末端 3x FLAG

20

30

40

50

【0231】

次いで、上で列挙したZFNを、それらのZFP主鎖において、ZFPとDNAリン酸主鎖との間のあらゆる潜在的な非特異的な接触を低減するために変更が含まれるように改変した（米国特許公開US-2018-0087072-A1号を参照）。以下の表2Aおよび2Bにおいて、例示的なZFP主鎖の変化を、各バリエーションに割り当てられた新しいSBSに固有の数値識別子と共に、表1からの親ZFNの項目の下に示す。

【表2】

表2: リン酸接触バリエーションZFN

表2A: 左のパートナー

m5Q バリエーション					47171-FLAG	42875-FLAG	42877-FLAG	42908-FLAG
F1	F2	F3	F4	F5	SBS#	SBS#	SBS#	SBS#
					70949	70957	70965	70973
Q					70950	70958	70966	70974
		Q			70951	70959	70967	70975
			Q		70952	70960	70968	70976
Q		Q			70953	70961	70969	70977
Q			Q		70954	70962	70970	70978
		Q	Q		70955	70963	70971	70979
Q		Q	Q		70956	70964	70972	70980

表2B: 右のパートナー

m5Q バリエーション					47898-FLAG	47874-FLAG
F1	F2	F3	F4	F5	SBS#	SBS#
					70981	70989
Q					70982	70990
		Q			70983	70991
				Q	70984	70992
Q		Q			70985	70993
Q				Q	70986	70994
		Q		Q	70987	70995
Q		Q		Q	70988	70996

【0232】

次いでこれらのタンパク質を、アルブミン遺伝子座（ALB）またはSMCHD1オフターゲットのいずれかに対する活性に関して試験し、バリエーションを、元の右側（47898-FLAG）または左側のパートナー（47171-FLAG）と対にした。K562細胞を、Amxaエレクトロポレーションにより、製造元の指示に従って、ZFN mRNAでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの16時間後に細胞を回

収した。QuickExtract（商標）DNA抽出溶液（Lucigen）を製造元の指示に従って使用してgDNAを抽出した。アルブミンZFN切断部位またはSMCHD1オフターゲットを取り囲むプライマーを用いて得られたPCR産物のMiSeqシーケンシングによってインデルのパーセンテージを測定した。全てのバリエーションにおいて高い活性が見られ、特異性の増加（オフターゲット部位と比較）がほとんどのバリエーションで、特にF1およびF3バリエーションで観察された（図3A）。

【0233】

次に、ELD/KKR FokIヌクレアーゼドメインに作製されたリン酸接触アミノ酸側鎖の変異（米国特許第8,962,281号を参照）を、上述したZFP主鎖変異と対にした。これらの実験において、親ZFNは、表1に示され、主鎖およびヌクレアーゼドメインの両方における変異を含み、それぞれに新しい固有の数値識別子（numeric identified）を付与したことが要約される（表3を参照）。

【表3】

表3: アルブミン特異的なZFNバリエーション

SBS 番号	ZFN 親	主鎖変異	Fok*
71545	42875-FLAG	F1m5Q, F3m5Q	ELD-R416H
71557	42875-FLAG	F1m5Q, F3m5Q	ELD-N542D
71673	47898-FLAG	F3m5Q	KKR-R416H
71721	47874-FLAG	F3m5Q	KKR-R416H
71739	47874-FLAG	F1m5Q, F3m5Q	KKR-S418P
71741	47874-FLAG	F1m5Q, F3m5Q	KKR-L424F
71721	47874-FLAG	F3m5Q	KKR-R416H
71728	47874-FLAG	F3m5Q	KKR-P478S
71639	42908-FLAG	F1m5Q, F3m5Q	ELD
71641	42908-FLAG	F1m5Q, F3m5Q	ELD-R416H
71653	42908-FLAG	F1m5Q, F3m5Q	ELD-N542D
71696	47898-FLAG	F1m5Q, F3m5Q	KKR-P478S

*FokIドメインは、表で示されるように全長に対して、またはFokIの切断ドメインのみに関して番号付けされ得る（例えば、N542DおよびN159Dは、同じように操作されたFokIドメインを指し、P478SおよびP95Sは、同じように操作されたFokIドメインを指す）

【0234】

次いでこれらのZFNを含む対をK562細胞において試験して、アルブミン遺伝子座およびオフターゲット部位SMCHD1におけるZFN活性を観察した。簡単に言えば、K562細胞に、示された通りのアルブミン標的化ZFNをトランスフェクトした。細胞を、上述したようにトランスフェクションの24時間後にディープシーケンシングによってZFN活性（%インデル）に関して査定した。

【0235】

結果（図3A～3Cに示される）は、オフターゲット活性がバックグラウンドレベルに低下する一方でアルブミン特異的な活性を大幅に改善したことを実証する。図3Aおよび3Bは、オフターゲット部位SMCHD1における結果を示す。不偏の捕捉アッセイも使用して、K562細胞およびHepG2細胞の両方においてこれらのZFN対に関する潜在的なオフターゲット遺伝子座を同定したところ（米国仮特許出願第62/675,435号を参照）、示された通り（図3Cを参照）、改変されたZFN対は、これらの部位において検出可能な活性をほとんど有していなかった。

【0236】

したがって、アルブミン遺伝子座において高いレベルのオンターゲット切断を維持し、同時にAからGのSNPに耐容性であり、高度な特異性を有する、最適化されたヒトアルブミン特異的なZFNが設計された。

【0237】

また最適化されたZFNも、iPS由来ヒト肝細胞における活性（ドナーの切断および標的化組込み）に関して試験した。簡単に言えば、iPS由来ヒト肝細胞をCellular Dynamics internationalから購入し、製造元のプロトコールに従ってプレーティングおよび培養した。プレーティング後の4日目に、細胞に、ヒトZFN AAVで、以下の用量：低— 30 MOI、中— 100 MOIおよび高— 300 MOIで形質導入した。次の日、細胞に、ヒトドナーAAVで、低— 240 MOI、中— 800 MOIおよび高— 2400 MOIで形質導入した。ZFN AAV形質導入後の7日目に、分析のために細胞および条件付き培地を回収した。

【0238】

図3Dおよび3E(i)で示されるように、最適化されたZFNは、親ZFNと比較して、最大12倍高いレベルの切断効率、および最適化されたZFNを使用して組み込まれた導入遺伝子からの13倍高いレベルの導入遺伝子(IDS)産生を示した。

【0239】

2つのZFN対での切断後に捕捉された導入遺伝子の経時的な発現を評価するための研究を行った。簡単に言えば、ヒトiPSC由来肝細胞に、ヒトIDS導入遺伝子ドナー(SB-IDS)と組み合わせた、第1世代(47171:47898)または第2世代(71557:71728)ZFNをコードするrAAV2/6ベクターで、3つ組で形質導入した。形質導入後5日目および7日目におけるIDS酵素活性(細胞培養上清の1mL当たりの、時間当たりの生成物のnmol[nmol/時間/mL]として表される)を、IDS酵素活性アッセイによって決定した。1:1:2の左のZFN:右のZFN:ドナーの比率でZFNおよびSB-IDSドナーを送達した。100:100:200(ZFN:ZFN:ドナーのMOI)の用量で、第2世代ZFN対での細胞の処置は、それぞれ5日目および7日目に、細胞上清中で、第1世代の対での処置よりも2倍および5倍多くのIDSをもたらした。300:300:600の用量で、第2世代ZFN対での細胞の処置は、それぞれ5日目および7日目に、上清中で、第1世代の対よりも7倍および21倍多くのIDSをもたらした(図3E(ii)を参照)。

【0240】

次に、左のZFN結合部位内のAからGのSNPについてヘテロ接合型の初代ヒト肝細胞に、47171/47898または71557/47898対をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)を、ZFN当たり10または50 ngのmRNAの濃度でトランスフェクトした。野生型(A:T)またはSNP(G:C)オンターゲット部位における遺伝子改変のレベル(%挿入および欠失[インデル])について、ゲノムDNAをMiSeqディープシーケンシングによって評価した。結果(図3F(i)および3F(ii)を参照)から、71557/47898対は、SNP含有およびSNP非含有対立遺伝子の両方において等しい活性を有していたことが実証された。

【0241】

in vitroでの細胞における遺伝子改変の速度も分析した。細胞へのZFN(100 Kおよび600 KのMOI)のAAV2/6媒介性送達後の遺伝子改変レベルを、3つの生物学的複製物で、ヒト初代肝細胞での10日の曝露にわたり査定した。1、3、5および10日目に細胞を回収し、ゲノムDNAを単離し、PCR増幅し、MiSeqディープシーケンシングを行った。71557/71728 ZFN対は、10日にわたり、47171/47898 ZFN対と比較してより速い反応速度を示した(図3G)。71557/71728 ZFN対の両方の用量レベルに対するより速い反応速度は、3日目もの早い時期に明らかであり、47171/47898 ZFN対での2.2%および3.0%インデルと比較して、100 Kおよび600 K用量レベルに対してそれぞれ8.3%および17.8%インデルを生じた。71557/71728 ZFN対は、10日目に40%

を超えるインデルの効果の飽和に達したようであった。71557/71728 ZFN対での処置は、47171/47898 ZFN対と比較して、経時的により高いレベルの遺伝子改変をもたらした。47171/47898 ZFN対の投与は、それぞれ100Kおよび600KのMOI用量レベルに対して16.9%および25.4%インデルの遺伝子改変レベルをもたらすが、71557/71728 ZFN対は、それぞれ35.1%および44.2%インデルを生じた。10日で、71557/71728 ZFN対の活性は、それぞれ低および高用量の群に対して47171/47898 ZFN対の活性よりも2.1および1.7倍高かった。10日の細胞培養実験中に完全な用量応答曲線が得られなかったことから、真のEC50値を計算および比較することができなかった。しかしながら上の結果は、第2世代ZFNを用いた10日にわたるZFN活性におけるおよそ2倍の増加の合理的な推測を提供する。

10

【0242】

第2世代ZFN対に関する任意のオフターゲット切断事象を特徴付けるために、ヒト初代肝細胞における評価研究も行った。オフターゲット切断を、以前に開示された方法によって決定した(PCT公報WO2018039440を参照)。QuickExtract(商標)DNA抽出溶液(Lucigen)を製造元の条件に従って使用してゲノムDNAを抽出した。

【0243】

SMCHD1は、ZFNの検出されたオフターゲット部位として同定されている。47171/47898または71557/71728 ZFN対をコードするAAV2/6で形質導入されたヒト初代肝細胞をMiSeqディープシーケンシングによって評価した。ヒト初代肝細胞を、以下のMOI: 3K、10K、30K、100K、300K、600Kで第2世代ZFN対を含むAAVおよび偽(Mock)で10日間処置した。用量応答を、オンターゲットアルブミン部位におけるZFN改変に関して観察した。10日目におけるアルブミン遺伝子座での平均%インデルは、71557/71728 ZFN対での処置後、0.16、7、15、15、21、30および44%であった(図3H、上の行を参照)。NS-両側t検定により統計学的に有意ではない、*-両側t検定によりp値<0.05。100KのMOI用量において、47171/47898 ZFNは、平均して17%インデルのオンターゲット活性および0.11%インデルのオフターゲット活性(17/0.11の比率=154)を示し; 71557/71728 ZFNは、平均して35%のオンターゲット活性および0.08%のオフターゲット活性(35/0.08の比率=438)を示した。2つの比率を比較すると、第2世代ZFNは、第1世代ZFNよりも約2.8倍選択的である。600KのMOI用量において、47171/47898 ZFNは、平均して25%インデルのオンターゲット活性および0.36%インデルのオフターゲット活性(25/0.36の比率=69)を示し; 71557/71728 ZFNは、平均して44%のオンターゲット活性および0.34%のオフターゲット活性(44/0.34の比率=130)を示した。2つの比率を比較すると、第2世代ZFNは、第1世代ZFNよりも約1.9倍選択的である。100Kおよび600KのMOIにおいて、第1および第2世代ZFNの%インデルは、それぞれ17%および35%、ならびに25%および44%であり、これは、第2世代ZFN(ZFN2.0)が第1世代ZFNよりも約2倍強力であることを示す(図3Hを参照)。

20

30

40

【0244】

第1世代の左のZFN(47171)で処置した細胞において、SNP含有対立遺伝子におけるZFN活性は、野生型対立遺伝子における活性のわずか39~44%の高さであった。比較において、第2世代の左のZFN(71557)で処置した細胞では、SNP含有対立遺伝子におけるZFN活性は、野生型対立遺伝子における活性の91~108%の高さであった。

【0245】

(実施例3)

ポリカチオン性ペプチドタグの使用はZFN活性を増加させる

50

ポリカチオン性ペプチドタグを含むZFNを、切断活性について検査した。使用されたペプチドは、アミノ酸配列N末端-DYKDHDG-DYKDHD E-DYKDDDDK（配列番号71）を含む3×Flagタグ（PCT公報WO2001027293号を参照）であった。3×Flagタグをコードする配列は、ZFN融合タンパク質に、タンパク質のN末端で融合されている（表1を参照）。

【0246】

この研究のためのZFNを、マウス、NHPおよびヒト間で保存されている7つの超保存DNA標的に対して作製し（Bejerano et al (2004) Science 302(5675):1321-1325を参照）、試験される細胞の細胞起源を確認した。超保存DNA標的に対して74個のZFN対を作製し、3×Flagタグを有するかまたは有さないかのいずれかでK562細胞における活性について試験した。

【0247】

結果（図4A）から、ポリカチオン性3×Flagタグの存在は、ZFN切断活性にとって非常に有益であったこと（%インデルを測定するための細胞アッセイによって決定した場合）、およびこれらの3×Flagタグを含むZFN対において、活性が、Flagタグを欠くZFNと比較して平均4.1倍増加したことが実証される（図4B）。図4Cで示されるように、3×FLAGタグの付加は、ZFN活性における2～3倍の増加をもたらした。

【0248】

（実施例4）

WPRE調節エレメントの付加

WPREは、LNP（図5B、米国特許公開US-2018-0185516-A1号を参照）によるまたはAAV（図5C、米国特許公報第2016-0326548号を参照）による送達のために、in vitro（図5A、米国特許公報第2016-0326548号を参照）およびin vivoの両方でZFNの活性を増加させることが見出されている。

【0249】

その天然形態において、WPREは、WHV-Xタンパク質のための部分的なオープンリーディングフレーム（ORF）を含有する。WHV（We2）エンハンサーのような他のウイルスエレメントとの関連で、十分に発現されたWHV-Xタンパク質は、ウッドチャックおよびマウスにおいて肝細胞癌のより高いリスクと関連していた（Hohne et. al (1990) EMBO J 9(4):1137-45; Flajolet et. al (1998) J Virol 72(7):6175-80）。WHV-Xタンパク質は、直接的に腫瘍形成性ではないようであるが、一部の研究は、ある特定の状況下で、WHV-Xタンパク質が、ヘパドナウイルス（人間の場合はB型肝炎ウイルス；ウッドチャックの場合はウッドチャック肝炎ウイルス）による感染に関連する肝臓がんの発生に関する弱い補因子として作用し得ることを示唆する。使用されるWPRE配列は、WHV-Xタンパク質のための部分的なオープンリーディングフレームを含有するが、WHV-Xタンパク質の発現を増幅すると考えられるWe2エンハンサーを含有しない。さらに、WPRE配列は、終止コドンの3'ならびにプロモーターおよび治療的導入遺伝子を含むフレームの外側に置かれ、したがって、終止コドンのリードラムが起ったとしても、この配列の翻訳は予想されない。

【0250】

したがって、WPREエレメントを、典型的にはヌクレアーゼコード配列に対して3'に、本明細書に記載されるポリヌクレオチドに付加した（図7）。使用されるWPREエレメントは、以下に示すJ02442バリエーション由来のWPREmut6（Zanta-Boussif、同上）であり得る：

J02442 WPREmut6：

【0251】

10

20

30

40

50

【化 2】

5' AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG
ATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAAT
GCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTG
TATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGT
CAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGG
GGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCC
CGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACA
GGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTCGGGGAAATC
ATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCAACTGGATCCTGCGCGG
GACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAATCCAGCGGACCTCCCTTC
CCGAGGCCTTCTGCCGGTTCTGCGGCCTCTCCCGCGTCTTCGCTTTCGGCC
TCCGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG (配列番号 42)

10

【 0 2 5 2】

20

一部の実施形態では、WPRE エLEMENT は、ガンマおよびアルファELEMENT のみを
含むトランケート型の構築物である。WPRE 3 の配列を以下に示す：

【化 3】

WPRE3:

GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTT
AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGT
ATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATC
CTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTG
CTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGG (配列番号 68)

30

【 0 2 5 3】

一部の実施形態では、J04514.1 バリエントが使用され、以下に示すようにして
mut6 バリエントが配列に付加される：

【化 4-1】

J04514.1 WPREmut6:

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAA
CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGT

40

【化 4 - 2】

ATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAA
TCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACG
TGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCA
TTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCT
ATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG
GGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCAT
CGTCCTTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGG
ACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTC
CCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCC
TCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCCGCCTG (配列番号 69)

10

【 0 2 5 4】

WPRE バリエントの 3 つ全てが、WHV X 遺伝子を発現する能力を欠いており、本明細書に記載される発現構築物において交換可能に使用することができる。

【 0 2 5 5】

20

(実施例 5)

5' UTR の付加

1994 年に、Krieg および Melton (Nucl. Acid. Res 12(18):7057) は、Xenopus のベータグロビン遺伝子の 5' 非翻訳領域を記載しており、mRNA を安定化する配列としてのその潜在性を認めた。したがって、ヌクレアーゼをコードする発現カセットの 5' 非翻訳領域におけるこのエレメントの配列 ([TG] CTTGTTCTTTTTCAGAAAGCTCAGAAATAAACGCTCAACTTTGGCAGAT (配列番号 1)、TG は、オプションの略記された β glob である) を試験した。構築物を、細胞をトランスフェクションの 24 時間後にアッセイしたことを除き上述した通りに K562 細胞で試験した。

30

【 0 2 5 6】

図 9 で示されるように、新規の 5' UTR の付加は、ZFN 活性の 2 ~ 3 倍の増加をもたらした。

【 0 2 5 7】

(実施例 6)

強化の組合せ

iPSC 由来ヒト肝細胞において、3xFlag タグ (「3xFlag」)、Xenopus の β -glob (「XBG」) および／または WPRE エレメントを含む ZFN を様々な組合せで試した。使用された ZFN は 42877 / 47931 であり、それを AAV6 を介して送達した。形質導入の 6 日後に細胞を回収し、アルブミン標的に対する活性を測定した。

40

【 0 2 5 8】

結果から、初期のベクターとの比較において、3 つ全てのエレメントの存在下における ZFN 活性の強化が実証された (図 6 を参照)。

【 0 2 5 9】

さらに、そのようにして、ZFN を含む一連の 8 つの発現構築物を、上述した全ての異なるエレメントの様々な組合せを含めず、または含めて構築した (バリエント V1 ~ V8 を示す図 7A を参照)。全てのバリエントを AAV6 ベクターにおいて使用し、APOE-hAAT プロモーターと共に使用した (Okuyama et al (1996) Hum Gene Ther 7(5):637-45)。これらのベクターは、ヒト β -グロビン遺伝子の第 1 のイントロ

50

ン由来の5' -ドナー部位およびブランチ、ならびに免疫グロブリン遺伝子の重鎖可変領域のイントロン由来の3' -アクセプター部位で構成されるキメライントロンとして記載されたヒトベーターグロビン-免疫グロブリンキメライントロン配列 (Promega) も含んでいた。これらの構築物で使用されたNLSはSV40由来であった。

【0260】

次いで送達されたZFN対 (42877 / 47931) の切断活性についてベクターを試験し、同じバリエーション構造中に両方のZFNが送達された。

【0261】

図8で示されるように、バリエーション構造の2つ、バリエーション4およびバリエーション8は、両方ともFLAG配列を含んでおり (表1)、現在使用されているベクター構造を含む他のバリエーションと比較して優れた結果を提供した。これらの実験は、異なるベクターを含む300,000のMOIのAAVを使用してHepG2細胞で行った。

【0262】

様々な強化の組合せを含むように作製された1つのアルブミン特異的なZFN対は、上述した71557 / 71728対である。図7Bは、これらのZFNをコードするAAVの概略図を描写する。対の要素は表に示し、配列は以下に示す。要素のいずれも、以下のWPRE配列の代わりに、類似の配列、例えば当業界において公知の、または上の実施例4で示されるWPRE配列で置換できることは明らかである。

【表4-1】

表4: SB71557AAVの要素 (配列番号43)

ヌクレオチド位置 -注釈	特色/説明	配列 番号	配列
1-130	5' ITR [括弧内の プレーン テキスト]	44	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC T

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

ヌクレオチド位置 - 注釈	特色/説明	配列 番号	配列
156-476	ApoE (エンハンサー) <u>下線</u>	45	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCA GAGACCTCTCTGGGCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCTTGGAATTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTCCTGGCGTGTTTAGGTAGTGTGAGAGGG
485-877	hAAT (プロモーター) イタリック	46	GATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGA GAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAA GCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGACAGT
886-933	5' UTR 太字	47	CTTGTTCTTTTTCGAGAAGCTCAGAATAAACGCTCACTTTGGCA GAT
943-1075	ヒトβ グロビン/ IgG キメラ イントロン (イントロン) <u>二重下線</u>	48	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG
1086-1154	N- 末端ペプチド	49	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAG
1161-1181	核局在化 シグナル 太字の イタリック	50	CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTC
1200-1631	ZFP 71557 DNA- 結合ドメイン 小文字	51	GCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCAAGCTTCACTCAGTCCGGCAACCTGGCCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCTGAAGCAGAACCTGTGTATGCATACCAAGATACACACGGGCGAGAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCAGAA GTTTGCCTGGCAGTCCAACCTGCAGAACCATAACCAAGATACACACGGGCGAGAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCGTAACTCAGTACCTCCGGCAACCTGACCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCGCTCCACCTGACCTCCCATACCAAGATACACCTGCGG
1638-2237	FokI- ELD ヌクレアーゼ ドメイン <u>破線の下線</u>	52	CAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGCACAAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCAGGACCGCATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATTACGGCGTGATCGTGACACAAAG

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

ヌクレオチド位置 - 注釈	特色/説明	配列 番号	配列
			GCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGCCTATCGGCCAGGCCGACG AGATGGAGAGATACGTGGAGGAGAACCAGACCCGGGATAAGCA CCTCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCTAGCAGCGTG ACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTGAGCGGCCACTTCAAGGGCA ACTACAAGGCCAGCTGACC AGGCTGAACCACATCACCAACTGCGACGGCGCCGTGCTGAGCG TGGAGGAGCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCCGGCAC CCTGACACTGGAGGAGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAG ATCAACTTCAGATCTTGATAA
2250-2841	WPREmu t6 3'UTR 点線の下線	53	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATA TTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGC TTTAATGCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTC GTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATG AGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTC TGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACC ACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCGA TCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTG GACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTG TCGGGGAAATCATCGTCTTTCCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTG CCAACTGGATCCTGCGCGGG ACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAATCCAGCGGACC TCCCTTCCCGAGGCCTTCTGCCGGTCTGCGGCCTCTCCCGCG TCTTCGCTTTCGGCCTCCGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCC GCCTCCCCGCCTG
2848-3070	ポリアデニル化 シグナル	54	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCC CGTGCCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTT TCCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTTGCTGAGTAGGT GTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG GGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTG GGCTCTAT
3088-3195	3' ITR [括弧内 の太字]	55	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

10

20

30

【化 5 - 1】

71557 AAVの完全配列：

[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCC 50
 GCGGACCTTT GGTGCCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG 100
 GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCCT] GCGGCCTAAG CTTGAGCTCT 150
 TCGAAAGGCT CAGAGGCACA CAGGAGTTTC TGGGCTCACC CTGCCCCCTT 200
 CCAACCCCTC AGTTCCCATC CTCCAGCAGC TGTGTTGTGTG CTGCTCTGA 250
 AGTCCACACT GAACAACTT CAGCCTACTC ATGTCCCTAA AATGGGCAAA 300
 CATTGCAAGC AGCAAACAGC AAACACACAG CCCTCCCTGC CTGCTGACCT 350
 TGGAGCTGGG GCAGAGGTCA GAGACCTCTC TGGGCCCATG CCACCTCCAA 400
 CATCCACTCG ACCCCTTGGA ATTTCCGTGG AGAGGAGCAG AGGTTGTCCT 450
 GCGTGGTTT AGGTAGTGTG AGAGGGGTCC CGGGGATCTT GCTACCAGTG 500
 GAACAGCCAC TAAGGATTCT GCAGTGAGAG CAGAGGGCCA GCTAAGTGGT 550
 ACTCTCCAG AGACTGTCTG ACTCAGCCA CCCCCTCCAC CTTGGACACA 600

40

50

【化 5 - 2】

GGACGCTGTG GTTCTGAGC CAGGTACAAT GACTCCTTTC GGTAAGTGCA 650
GTGGAAGCTG TACACTGCCC AGGCAAAGCG TCCGGGCAGC GTAGGCGGGC 700
GACTCAGATC CCAGCCAGTG GACTTAGCCC CTGTTTGCTC CTCCGATAAC 750
TGGGGTGACC TTGGTTAATA TTCACCAGCA GCCTCCCCCG TTGCCCTCT 800
GGATCCACTG CTAAATACG GACGAGGACA GGGCCCTGTC TCCTCAGCTT 850
CAGGCACCAC CACTGACCTG GGACAGTCCT AGGTGCTTGT **TCTTTTTCGA** 900
GAAGCTCAGA ATAAACGCTC AACTTTGGCA GATACTAGTC AGGTAAGTAT 950
CAAGGTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAACTG GGCTTGTCGA 1000
GACAGAGAAG ACTCTTGCGT TTCTGATAGG CACCTATTGG TCTTACTGAC 1050
ATCCACTTTG CCTTTCTCTC CACAGGACCG GTGCCATGGA CTACAAAGAC 1100
CATGACGGTG ATTATAAGA TCATGACATC GATTACAAGG ATGACGATGA 1150
CAAGATGGCC **CCCAAGAAGA AGAGGAAGGT** CGGCATTTCAT GGGGTACCCg 1200
ccgctatggc tgagagggcc ttcagtgtc gaatctgcat gcagaacttc 1250
agtcatgccg gcaacctggc ccgccacatc cgcaccaca ccggcgagaa 1300
gccttttgcc tgtgacattt gtgggaggaa atttgccctg aagcagaacc 1350
tgtgtatgca taccaagata cacacggcg agaagccctt ccagtgctga 1400
atctgcatgc agaagtttgc ctggcagtc aacctgcaga accataccaa 1450
gatacacacg ggcgagaagc ccttcagtg tcgaatctgc atgcgtaact 1500
tcagtacctc cggcaacctg acccgccaca tccgcacca caccggcgag 1550
aagccttttg cctgtgacat ttgtgggagg aaatttgccc gccgctccca 1600
cctgacctcc cataccaaga tacacctgcg gGGATCCCAG CTGGTGAAGA 1650
GCGAGCTGGA GGAGAAGAAG TCCGAGCTGC GGCACAAGCT GAAGTACGTG 1700
CCCCACGAGT ACATCGAGCT GATCGAGATC GCCAGGAACA GCACCCAGGA 1750
CCGCATCCTG GAGATGAAGG TGATGGAGTT CTTTCATGAAG GTGTACGGCT 1800
ACAGGGGAAA GCACCTGGGC GGAAGCAGAA AGCCTGACGG CGCCATCTAT 1850
ACAGTGGGCA GCCCCATCGA TTACGGCGTG ATCGTGGACA CAAAGGCCTA 1900
CAGCGGCGGC TACAATCTGC CTATCGGCCA GGCCGACGAG ATGGAGAGAT 1950
ACGTGGAGGA GAACCAGACC CGGGATAAGC ACCTCAACCC CAACGAGTGG 2000
TGGAAGGTGT ACCCTAGCAG CGTGACCGAG TTCAAGTTCC TGTTCGTGAG 2050
CGGCCACTTC AAGGGCAACT ACAAGGCCCA GCTGACCAGG CTGAACCACA 2100
TCACCAACTG CGACGGCGCC GTGCTGAGCG TGGAGGAGCT GCTGATCGGC 2150
GGCGAGATGA TCAAAGCCGG CACCCTGACA CTGGAGGAGG TGCGGCGCAA 2200
GTTCAACAAC GGCGAGATCA ACTTCAGATC TTGATAACTC GAGTCTAGAA 2250
ATCAACCTCT GGATTACAAA ATTTGTGAAA GATTGACTGA TATTCTTAAC 2300
TATGTTGCTC CTTTTACGCT GTGTGGATAT GCTGCTTAA TGCTCTGTA 2350
TCATGCTATT GCTTCCCGTA CGGCTTTCGT TTTCTCCTCC TTGTATAAAT 2400
CCTGGTTGCT GTCTCTTTAT GAGGAGTTGT GGCCCGTTGT CCGTCAACGT 2450
GGCGTGGTGT GCTCTGTGTT TGCTGACGCA ACCCCCACTG GCTGGGGCAT 2500
TGCCACCACC TGTCAACTCC TTTCTGGGAC TTTGCTTTC CCCCTCCCGA 2550
TCGCCACGGC AGAACTCATC GCCGCCTGCC TTGCCCCTG CTGGACAGGG 2600
GCTAGGTTGC TGGGCACTGA TAATTCCGTG GTGTTGTCGG GGAAATCATC 2650

10

20

30

40

50

【化 5 - 3】

GTCCTTTCCT TGGCTGCTCG CCTGTGTTGC CAACTGGATC CTGCGCGGGA 2700
 CGTCCTTCTG CTACGTCCCT TCGGCTCTCA ATCCAGCGGA CCTCCCTTCC 2750
 CGAGGCCTTC TGCCGGTTCT GCGGCCTCTC CCGCGTCTTC GCTTTCGGCC 2800
 TCCGACGAGT CGGATCTCCC TTTGGGCCGC CTCCCCGCCT GGCTAGCCTG 2850
 TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC 2900
 TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGTC CTTTCCTAAT AAAATGAGGA 2950
 AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG 3000
 TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT 3050
 GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GCGGCCGCGT CGAGCGC [AGG AACCCCTAGT 3100
 GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG 3150
 CCGGGGCTTT GCGGGGCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAG 3195
 (配列番号 43)

10

【表 5 - 1】

表5: SB71728AAVのエLEMENT(配列番号56)

ヌクレオチド 位置-注釈	特色/説明	配列番号	配列
1-130	5' ITR [括弧内の プレーン テキスト]	44	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGT CG GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
156-476	ApoE (エンハンサー) 下線	45	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCCTGCCCCCTTCCA AC CCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGT CC ACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACAT TG CAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGG AG CTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACAT CC ACTCGACCCCTTGAATTTCTGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTTGGC GT GGTTAGGTAGTGTGAGAGGG
485-877	hAAT (プロモーター) イタリック	46	GATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCA GA GGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACC CC CTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGA CT CCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTC CG GGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCT GT TTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTACACAGCAGC CT CCCCCGTTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGG GC CCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGT
886-933	5' UTR 太字	47	CTTGTTCTTTTGCAGAAGCTCAGAAATAAACGCTCAACTTTGGCAGAT

20

30

40

50

【表 5 - 2】

ヌクレオチド 位置-注釈	特色/説明	配列番号	配列
943-1075	ヒトβ グロビン / IgG キメラ イントロン (イントロン) <u>二重下線</u>	48	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTG GG CTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGG TC TTACTGACATCCACTTGCCTTTCTCTCCACAG
1086-1154	<u>N末端</u> <u>ペプチド</u>	49	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTAC AA GGATGACGATGACAAG
1161-1181	核局在化 シグナル 太字の イタリック	50	CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTC
1200-1715	ZFP 71728 DNA結合 ドメイン 小文字	57	GCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGTAAC TT CAGTCAGTCCTCCGACCTGTCCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGA GA AGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCTGAAGCACA AC CTGCTGACCCATACCAAGATACACACGGGCGAGAAGCCCTTCCAGTGT CG AATCTGCATGCAGAACTTCAGTGACCACTGCGCGCCACAT CC GCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCTGTGACATTTGTGGGAGGA AA TTTGCCCGCAACTTCTCCCTGACCATGCATACCAAGATACACACCGGA GA GCGCGGCTTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGTAACTTCAGTCTGCGCCA CG ACCTGGAGCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCT GT GACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCACCGCTCCAACCTGAACAAGCAT AC CAAGATACACCTGCGG
1722-2315	FokI-KKR ヌクレアーゼ ドメイン <u>破線の下線</u>	58	CAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCAC AA GCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAG GA ACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCA TG AAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAGCCT GA CGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATTACGGCGTGATCGT GG ACACAAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGAGCATCGGCCAGGCCG AC GAGATGCAGAGATACGTGAAGGAGAACCAGACCCGGAATAAGCACATC AA CCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCTAGCAGCGTGACCGAGTTCAA GT TCCTGTTCGTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGA CC

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

ヌクレオチド 位置-注釈	特色/説明	配列番号	配列
			AGGCTGAACCGCAAAACCAACTGCAATGGCGCCGTGCTGAGCGTGGAG GA GCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCCGGCACCCCTGACACTGGA GG AGGTGCGGCGCAAGTTCACAACGGCGAGATCAACTTCTGATAA
2328-2919	WPREmut 6'3'UTR 点線の下線	53	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTT AA CTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCT GT ATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGATA AA TCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAA CG TGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGCTGGGG CA TTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCC CG ATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACA GG GGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAATC AT CGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTGCCAACTGGATCCTGCGCG GG ACGTCCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAATCCAGCGGACCTCCCT TC CCGAGGCCTTCTGCCGGTTCTGCGGCCTCTCCCGCGTCTTCGCTTTCG GC CTCCGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCCTCCCCGCCTG
2926-3148	ポリアデニル化 シグナル	54	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTGC CT TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAAT GA GGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGG TG GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGC AT GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
3166-3273	3' ITR [括弧内の 太字]	55	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CG CTCACTGAGGCCCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGC GA GCGCGCAG

【化 6 - 1】

71728 AAVの完全配列：

[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG	50
GGCGACCTTT GGTGCCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG	100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCT] GCGGCCTAAG CTTGAGCTCT	150
TCGAAAGGCT CAGAGGCACA CAGGAGTTTC TGGGCTCACC CTGCCCCCTT	200
CCAACCCCTC AGTTCCCATC CTCCAGCAGC TGTTTGTGTG CTGCCTCTGA	250
AGTCCACACT GAACAACTT CAGCCTACTC ATGTCCCTAA AATGGGCAAA	300
CATTGCAAGC AGCAAACAGC AAACACACAG CCCTCCCTGC CTGCTGACCT	350
TGGAGCTGGG GCAGAGGTCA GAGACCTCTC TGGGCCCATG CCACCTCCAA	400

10

20

30

40

50

【化 6 - 2】

CATCCACTCG	ACCCCTTGGA	ATTTTCGGTG	AGAGGAGCAG	AGGTTGTCCT	450
GGCGTGTTT	AGGTAGTGTG	AGAGGGGTCC	CGGGGATCTT	GCTACCACTG	500
GAACAGCCAC	TAAGGATTCT	GCAGTGAGAG	CAGAGGGCCA	GCTAAGTGGT	550
ACTCTCCAG	AGACTGTCTG	ACTCACGCCA	CCCCCTCCAC	CTTGGACACA	600
GGACGCTGTG	GTTTCTGAGC	CAGGTACAAT	GACTCCTTTC	GGTAAGTGCA	650
GTGGAAGCTG	TACACTGCCC	AGGCAAAGCG	TCCGGGCAGC	GTAGGCGGGC	700
GACTCAGATC	CCAGCCAGTG	GACTTAGCCC	CTGTTTGCTC	CTCCGATAAC	750
TGGGGTGACC	TTGGTTAATA	TTCACCAGCA	GCCTCCCCCG	TTGCCCTCT	800
GGATCCACTG	CTTAAATACG	GACGAGGACA	GGGCCCTGTC	TCCTCAGCTT	850
CAGGCACCAC	CACTGACCTG	GGACAGTCCT	AGGTGCTTGT	TCTTTTTCGA	900
GAAGCTCAGA	ATAAACGCTC	AACTTTGSCA	GATACTAGTC	AGGTAAGTAT	950
CAAGGTTACA	AGACAGGTTT	AAGGAGACCA	ATAGAAACTG	GGCTTGTCGA	1000
GACAGAGAAG	ACTCTTGCGT	TTCTGATAGG	CACCTATTGG	TCTTACTGAC	1050
ATCCACTTTG	CCTTTCTCTC	CACAGGACCG	GTGCCATGGA	CTACAAAGAC	1100
CATGACGGTG	ATTATAAAGA	TCATGACATC	GATTACAAGG	ATGACGATGA	1150
CAAGATGGCC	CCCAAGAAGA	AGAGGAAGGT	CGGCATTTCAT	GGGGTACCCg	1200
ccgctatggc	tgagaggccc	ttccagtgtc	gaatctgcat	gcgtaacttc	1250
agtcagtctc	ccgacctgtc	ccgccacatc	cgcaccacaca	ccggcgagaa	1300
gccttttgcc	tgtgacattt	gtgggaggaa	atttgccctg	aagcacaacc	1350
tgctgaccca	taccaagata	cacacgggcg	agaagccctt	ccagtgtcga	1400
atctgcatgc	agaacttcag	tgaccagtcc	aacctgcgcg	cccacatccg	1450
caccacaccc	ggcgagaagc	cttttgccctg	tgacatttgt	gggaggaaat	1500
ttgcccgcaa	cttctccctg	accatgcata	ccaagataca	caccggagag	1550
cgcggcttcc	agtgtcgaat	ctgcatgcgt	aacttcagtc	tgcgccacga	1600
cctggagcgc	cacatccgca	cccacaccgg	cgagaagcct	tttgccctgtg	1650
acatttgtgg	gaggaaatth	gcccaccgct	ccaacctgaa	caagcatacc	1700
aagatacacc	tgccggGGATC	CCAGCTGGTG	AAGAGCGAGC	TGGAGGAGAA	1750
GAAGTCCGAG	CTGCGGCACA	AGCTGAAAGTA	CGTGCCCCAC	GAGTACATCG	1800
AGCTGATCGA	GATCGCCAGG	AACAGCACCC	AGGACCGCAT	CCTGGAGATG	1850
AAGGTGATGG	AGTTCTTCAT	GAAGGTGTAC	GGCTACAGGG	GAAAGCACCT	1900
GGGCGGAAGC	AGAAAGCCTG	ACGGCGCCAT	CTATACAGTG	GGCAGCCCCA	1950
TGGATTACGG	CGTGATCGTG	GACACAAAGG	CCTACAGCGG	CGGCTACAAT	2000
CTGAGCATCG	GCCAGGCCGA	CGAGATGCAG	AGATACGTGA	AGGAGAACCA	2050
GACCCGGAAT	AAGCACATCA	ACCCCAACGA	GTGGTGGAAG	GTGTACCCTA	2100
GCAGCGTGAC	CGAGTTCAAG	TTCTGTTCG	TGAGCGGCCA	CTCAAGGGC	2150
AACTACAAGG	CCCAGCTGAC	CAGGCTGAAC	CGCAAAACCA	ACTGCAATGG	2200
CGCCGTGCTG	AGCGTGGAGG	AGCTGCTGAT	CGGCGGCGAG	ATGATCAAAG	2250
CCGGCACCCCT	GACACTGGAG	GAGGTGCGGC	GCAAGTTCAA	CAACGGCGAG	2300
ATCAACTTCT	GATAACTCGA	GTCTAGAAAT	CAACCTCTGG	ATTACAAAAT	2350
TTGTGAAAGA	TTGACTGATA	TTCTTAACTA	TGTTGCTCCT	TTTACGCTGT	2400
GTGGATATGC	TGCTTTAATG	CCTCTGTATC	ATGCTATTGC	TTCCCGTACG	2450

10

20

30

40

50

【化 6 - 3】

GCTTTCGTTT TCTCCTCCTT GTATAAATCC TGGTTGCTGT CTCTTTATGA 2500
 GGAGTTGTGG CCCGTTGTCC GTCAACGTGG CGTGGTGTGC TCTGTGTTTG 2550
 CTGACGCAAC CCCCCTGGC TGGGGCATTG CCACCACCTG TCAACTCCTT 2600
 TCTGGGACTT TCGCTTTCCC CCTCCCGATC GCCACGGCAG AACTCATCGC 2650
 CGCCTGCCTT GCCCGCTGCT GGACAGGGGC TAGGTTGCTG GGCCTGATA 2700
 ATTCCGTGGT GTTGTGCGGG AAATCATCGT CCTTTCCTTG GCTGCTCGCC 2750
 TGTGTTGCCA ACTGGATCCT GCGCGGGACG TCCTTCTGCT ACGTCCCTTC 2800
 GGCTCTCAAT CCAGCGGACC TCCCTTCCCG AGGCCTTCTG CCGGTTCTGC 2850
 GGCTCTCCC GCGTCTTCGC TTTCGGCCTC CGACGAGTCG GATCTCCCTT 2900
 TGGGCCGCTT CCCCCTGG CTAGCCTGTG CCTTCTAGTT GCCAGCCATC 2950
 TGTGTTTGC CCCTCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3000
 CCACGTGCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT 3050
 AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA 3100
 GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGC 3150
 GGCCGCGTCG AGCGC [AGGAA CCCCTAGTGA TGGAGTTGGC CACTCCCTCT 3200
 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCTTTGC CCGGGCGGCC 3250
 TCAGTGAGCG AGCGAGCGC CAG] (配列番号 56) 3273

10

20

【 0 2 6 3】

一連の導入遺伝子ベクター（F 9、I D SおよびI D U A）を作製して、上で示した Z F N対（7 1 5 5 7 / 7 1 7 2 8）を使用してアルブミン遺伝子に挿入した。h I D S挿入に関する結果を描写する図 1 1を参照されたい。ベクターはA A Vベクターであり、全てZ F N切断部位に隣接する相同性の領域（左の相同性アーム：L A、および右の相同性アーム：R A）を含んでいた。ベクターは、スプライスアクセプター配列（S A）およびポリAシグナル配列（ポリA）をさらに含んでいた。最終的に、全てが、5'および3' A A V I T R配列を含んでいた。第9因子エクソン2～9 A A V導入遺伝子ドナーのエレメントおよび配列を以下に示す。

30

【表 6 - 1】

表6: 第9因子AAVのエレメント(配列番号59)

位置	特色の説明	配列番号	配列
1-130	5' ITR [括弧内の プレーンテキスト]	44	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCG GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
271-550	LA: Left 左の相同性アーム イタリック	60	TTTATTCTATTTTCCAGTAAAATAAAGTTTGTAGTAACTCTGCATCTTT AAAGAATTATTTTGGCATTTATTTCTAAAATGGCATAGTATTTTGTATTT GTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAATTCAAACATCCTAGGTA AAAAAAAAAAGGTCAGAAATTGTTTAGTGACTGTAATTTTCTTTTGCGC ACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAACTTCACAGAATAG GGTTGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAA

40

50

【表 6 - 2】

557-584	SA: スプライス アクセプター 太字	61	ACTAAAGAATTATTCTTTTACATTTTCAG
585-1882	コドンが 最適化された hF9 エクソン2～ 8 <u>下線</u>	62	TTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATCCTGAACCGGCCCAAGCGG TACAACCTCAGGCAAGCTGGAAGAGTTTCGTGCAGGGCAACCTGGAACGGGA GTGCATGGAAGAGAAGTGCAGCTTCGAGGAAGCCCGGGAGGTGTTTCGAGA ACACCGAGCGGACCACCGAGTTCTGGAAGCAGTACGTGGACGGCGACCAG TGCGAGTCAAACCCCTGCCTGAACGGCGGCAGCTGCAAGGACGATATCAA CAGCTACGAGTGCTGGTGCCCCCTTCGGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGC TGGACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGCTGCGAGCAGTTCTGCAAG AACAGCGCCGACAACAAGGTGGTGTGCTCATGCACCTGAGGGCTACCGGCT GGCCGAGAACCAGAAGAGCTGCGAGCCCCGCCGTGCCCTTCCCCCTGCGGCA GAGTGTCCGTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCAGGGCCGAGGCCGTGTTTC CCTGACGTGGACTACGTGAACTCAACCGAGGCCGAGACAATCCTGGACAA CATCACCAGAGCAGCCAGTCTTCAACGACTTCACCCGGGTGGTGGGCG GCGAGGACGCCAAGCCCGGCCAGTTCCCTTGGCAGGTGGTGTGAACGGC AAGGTGGACGCCCTTCTGCGGCGGCTCAATCGTGAACGAGAAGTGGATCGT GACAGCCGCCCACTGCGTGGAGACAGGCGTGAAGATCACCGTGGTGGCCG GCGAACACAATATCGAGGAAACCGAGCACACCGAGCAGAAACGGAACGTG ATCCGGATTATCCCCCACCACAACCTACAACGCCGCCATCAACAAGTACAA CCACGATATCGCCCTGCTGGAACCTGGACGAGCCTCTGGTGTGAATTCAT ACGTGACCCCCATCTGTATCGCCGACAAAGAGTACACCAACATCTTTCTG AAGTTCCGCGAGCGGCTACGTGTCCGGCTGGGGCAGGGTGTTCACAAGGG CCGCGAGCGCCCTGGTGTGCTGAGTACCTGCGGGTGGCCCTGGTGGACAGAG CCACCTGCCTGCGGTCAACCAAGTTACCATCTACAACAACATGTTCTGC GCCGGCTTCCACGAGGGCGGCGAGGGACAGCTGCCAGGGCGACAGCGGCGG ACCCACGTGACCGAGGTGGAGGGCACCAGCTTCTGACCGGCATCATCT CATGGGGCGAGGAATGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGAATCTACACTAAG GTGTCAAGATACGTGAACTGGATCAAAGAGAAAACCAAGCTGACCTGA
1890-2114	ポリA 小文字	63	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCT TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTTAATAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTTCTATTCTGGGGGGTG GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAT GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
2121-2220	RA: 右の 相同性アーム <u>二重下線</u>	64	CTATCCATTGCACTATGCTTTATTTAAAAACCACAAAACCTGTGCTGTTG ATCTCATAAATAGAAGTTGTATTTATATTTATTTTATTTTAGTCTGTCT
2367-2474	3' ITR [括弧内の太字]	55	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCCGGGCTTTGCCCCGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAG

【化 7 - 1】

F9 AAV の配列：

[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTGC
 50
 GGCGACCTTT GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG
 100
 GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCCT] GCGGCCTAAG CTTGAGCGGA
 150
 GTTCCAATTG TACTGTACAG AACCATGGTC ACATGTTTAA CGCTAGCGTG
 200

10

20

30

40

50

【化 7 - 2】

CCGACCTGGT AACTGATCA GTGGGTGCAC TTAGGACTGC GTCTTACGCT
 250
 AATCACATGC GTGCGGCCGC TTTATTCTAT TTTCCCAGTA AAATAAAGTT
 300
 TTAGTAAACT CTGCATCTTT AAAGAATTAT TTTGGCATT TTTTCTAAAA
 350
 TGGCATAGTA TTTTGTATTT GTGAAGTCTT ACAAGGTTAT CTTATTAATA
 400
 AAATTCAAAC ATCCTAGGTA AAAAAAAAAA AAGGTCAGAA TTGTTTAGTG
 450
 ACTGTAATTT TCTTTTGCGC ACTAAGGAAA GTGCAAAGTA ACTTAGAGTG
 500
 ACTGAAACTT CACAGAATAG GGTGAAGAT TGAATTCATA ACTATCCCAA
 550
 GGTACCACTA AAGAATTATT CTTTTACATT TCAGTTTTTC TTGATCATGA
 600
 AAACGCCAAC AAAATCCTGA ACCGGCCCAA GCGGTACAAC TCAGGCAAGC
 650
 TGGAAGAGTT CGTGCAAGGC AACCTGGAAC GGGAGTGCAT GGAAGAGAAG
 700
 TGCAGCTTCG AGGAAGCCCG GGAGGTGTTT GAGAACACCG AGCGGACCAC
 750
 CGAGTTCTGG AAGCAGTACG TGGACGGCGA CCAGTGCGAG TCAAACCCCT
 800
 GCCTGAACGG CGGCAGCTGC AAGGACGATA TCAACAGCTA CGAGTGCTGG
 850
 TGCCCTTCG GCTTCGAGG CAAGAACTGC GAGCTGGACG TGACCTGCAA
 900
 CATCAAGAAC GGCCGCTGCG AGCAGTTCTG CAAGAACAGC GCCGACAACA
 950
 AGGTGGTGTG CTCATGCACT GAGGGCTACC GGCTGGCCGA GAACCAGAAG
 1000
 AGCTGCGAGC CCGCCGTGCC CTTCCCCTGC GGCAGAGTGT CCGTGAGCCA
 1050
 GACCAGCAAG CTGACCAGG CCGAGGCCGT GTTCCCTGAC GTGGACTACG
 1100
 TGAACCTAAC CGAGGCCGAG ACAATCCTGG ACAACATCAC CCAGAGCACC
 1150
 CAGTCCTTCA ACGACTTCAC CCGGGTGGTG GCGGCGGAGG ACGCCAAGCC
 1200
 CGGCCAGTTC CCTTGGCAGG TGGTGCTGAA CGGCAAGGTG GACGCCTTCT
 1250
 GCGGCGGCTC AATCGTGAAC GAGAAGTGA TCGTGACAGC CGCCCACTGC
 1300
 GTGGAGACAG GCGTGAAGAT CACCGTGGTG GCCGGCGAAC ACAATATCGA
 1350
 GGAAACCGAG CACACCGAGC AGAAACGGAA CGTGATCCGG ATTATCCCCC
 1400
 ACCACAATA CAACGCCGCC ATCAACAAGT ACAACCACGA TATCGCCCTG
 1450

10

20

30

40

50

【化 7 - 3】

CTGGAACTGG ACGAGCCTCT GGTGCTGAAT TCATACGTGA CCCCCATCTG
 1500
TATCGCCGAC AAAGAGTACA CCAACATCTT TCTGAAGTTC GGCAGCGGCT
 1550
ACGTGTCCGG CTGGGGCAGG GTGTTCCACA AGGGCCGCAG CGCCCTGGTG
 1600
CTGCAGTACC TGCGGGTGCC CCTGGTGGAC AGAGCCACCT GCCTGCGGTC
 1650
AACCAAGTTC ACCATCTACA ACAACATGTT CTGCGCCGGC TTCCACGAGG
 1700
GCGGCAGGGA CAGCTGCCAG GGCGACAGCG GCGGACCCCA CGTGACCGAG
 1750
GTGGAGGGCA CCAGCTTTCT GACCGGCATC ATCTCATGGG GCGAGGAAATG
 1800
CGCCATGAAG GGCAAGTACG GAATCTACAC TAAGGTGTCA AGATACGTGA
 1850
ACTGGATCAA AGAGAAAACC AAGCTGACCT GAGTTTAAAc tgtgccttct
 1900
agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct
 1950
ggaaggtgcc actcccactg tcctttctta ataaaaatgag gaaattgcat
 2000
cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tggggggtgg ggtggggcag
 2050
gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc
 2100
ggtgggctct atggACCGT CTATCCATTG CACTATGCTT TATTTAAAAA
 2150
CCACAAAACC TGTGCTGTTG ATCTCATAAA TAGAACTTGT ATTTATATTT
 2200
ATTTICATTT TAGTCTGTCT GGATCCACAA ATTAATCGAA CCTGCAGCTG
 2250
ATATCGACGC TTAAGTAGGG CTTAGCAAAC GCGTCTCCAA CGTTTCGCCG
 2300
TTAACACCCC ACATAGTGAG TGGTCTTAGT AGTCCGGGTG TTTAAACTGA
 2350
AAGATAACTC GAGCGC [AGGA ACCCCTAGTG ATGGAGTTGG
CCACTCCCTC2400
TCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCTTTG CCCGGGCGGC
 2450
CTCAGTGAGC GAGCGAGCGC GCAG] (配列番号 59)
 2474

【0 2 6 4】

I D S A A V 導入遺伝子ドナーのエレメントおよび配列を以下に示す：

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表7: IDS AAVのエLEMENT(配列番号65)

位置	特色の説明	配列番号	配列
1-130	5' ITR [括弧内の プレーンテキスト]	44	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG GGCGACCTTTGGTCCGCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT
271-550	LA: 左の 相同性アーム イタリック	60	TTTATTTCTATTTTCCAGTAAAATAAAGTTTGTAGTAACTCTGCATCTTT AAAGAATTATTTTGGCATTTATTTCTAAAATGGCATAGTATTTTGTATTT GTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAATTCAAACATCCTAGGTA AAAAAAAAAAAAAGGTGAGAATTGTTTGTAGTGACTGTAATTTCTTTTTCGC ACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAAACTTCACAGAATAG GGTTGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAA
557-584	SA: スプライス アクセプター 太字	61	ACTAAAGAATTATTTCTTTTACATTTTCAG
587-2161	コドンが最適化 された hIDS 下線	66	AGCGAAACCCAGGCCAACTCAACTACAGATGCGCTTAACGTCCTGCTCAT CATCGTGGACGATTTGCGGCCGTCGCTTGGCTGCTATGGAGATAAGCTCG TCCGCTCGCCGAACATCGATCAGTTGGCCTCACACTCACTGCTTTTCCAA AATGCGTTTGGCGCAGCAGGCTGTCTGTGCACCTTCAAGAGTCTCATTTCTT GACCGGGCGACGCCCTGACACAACGCGGCTGTACGACTTCAACAGCTACT GGAGAGTCCACGCGGGTAACTTTCAACTATCCACAGTACTTTAAGAG AACGGATACGTGACAATGAGCGTGGGAAAGGTCCTTACCCCGGCATCTC CTCGAATCACACCGACGATTCGCCCTACTCGTGGTCTTTTCCCTCCCTACC ATCCTTTCGAGCGAGAAGTATGAGAACACGAAAACCTTGTGCGGACCCGAC GGAGAGCTGCACGCTAATCTGCTGTGTCCGGTGGATGTCTTGGACGTGCC CGAGGGAACGTCCTCCGACAAGCAGTCAACGGAGCAGGCATTGAGTTGC TGGAGAAGATGAAAACAAGCGCGCTCGCCTTTCTTCTCGCGTGGGGTAT CACAAGCCCCATATTCCTTTCGCTACCCGAAGGAGTTCCAGAACTTTA TCCTTTGGAAAACATCACTTTGGCACCGGACCCGGAAGTCCCCGACGGTC TGCCACCCGTGGCCTACAATCCCTGGATGGATATCAGGCAGAGGGAAGAT GTGCAGGCACTCAACATCTCAGTCCCTACGGGCCTATTCAGTCGATTT TCAACGCAAGATTCGGCAGTCGTATTTTGCCTCGGTGTCTACCTCGATA CGCAAGTAGGTCGACTTCTGAGCGCGCTTGATGACCTTCAGCTGGCAAT TCCACAATCATCGCCTTTACGTTCGGACCATGGGTGGGCGTTGGGAGAGCA TGGAGAGTGGGCAAAGTATAGCAATTTTGATGTAGCAACGCACGTGCCCC TGATTTTCTACGTGCCGGGTAGAACGGCCTCGCTTCCCGAGGCAGGCGAA AACTTTTTTCCCTATCTCGATCCATTCGACTCGGCGAGCCAGCTTATGGA ACCGGGCAGACAATCCATGCACTTGCTAGAAATGGTGTCCCTTTTTCCGA CCCTCGCCGGGTTGGCGGGCTTGCAAGTACCCCTAGATGCCCTGTACCG AGCTTCCATGTGGAACCTGCGCGGAAGGGAAAAACCTCCTCAAACACTT TCGGTTCAGGGACCTTGAGGAGGACCCCTATCTGCCAGGGAATCCGCGAG AGTTGATTGCCTATTTCCAGTATCCGCGACCCAGCGATATTCCTCAATGG AACTCCGATAAGCCCTCCCTCAAAGACATCAAGATTATGGGGTACTCGAT CAGGACCATCGACTATCGCTACACAGTGTGGGTAGGGTTCAATCCTGACG AATTCCTCGCGAACTTTTCGGACATCCACGCTGGTGAGCTGTATTTTCGTA GACTCGGACCCGTTGCAAGATCACAATATGTATAATGATTCCCAAGGAGG AGATTTGTTCCAGCTGCTCATGCCG
2174-2398	ポリA 小文字	63	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCT TCCTTGACCTTGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTG GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAT GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

2405- 2504	RA: 右の 相同性アーム <u>二重下線</u>	64	CTATCCATTGCACTATGCTTTATTTAAAAACCACAAAACCTGTGCTGTTG ATCTCATAAATAGAACTTGTATTTATATTTATTTTCATTTTAGTCTGTCT
2651- 2758	3' ITR [括弧内の太字]	55	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAG

10

【化 8 - 1】

hIDS AAV の配列：

[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG 50
GGCGACCTTT GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG 100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTTCT] GCGGCCTAAG CTTGAGCGGA 150
GTTCCAATTG TACTGTACAG AACCATGGTC ACATGTTTAA CGTAGCGTG 200
CCGACCTGGT AAAGTGATCA GTGGGTGCAC TTAGGACTGC GTCTTACGCT 250
AATCACATGC GTGCGGCCGC *TTTATTCTAT TTTCCAGTA AAATAAAGTT* 300
TTAGTAAACT CTGCATCTTT AAAGAATTAT TTTGGCATT *ATTTCTAAAA* 350
TGGCATAGTA TTTTGTATTT GTGAAGTCTT ACAAGGTTAT CTTATTAATA 400
AAATTCAAAC ATCCTAGGTA AAAAAAAAAA AAGGTCAGAA TTGTTTAGTG 450
ACTGTAATTT TCTTTTGGCG ACTAAGGAAA GTGCAAAGTA ACTTAGAGTG 500
ACTGAACTT CACAGAATAG GGTTGAAGAT TGAATTCATA ACTATCCCAA 550
GGTACC**ACTA** **AAGAATTATT** **CTTTTACATT** **TCAGTTAGCG** **AAACCCAGGC** 600
CAACTCAACT ACAGATGCGC TTAACGTCCT GCTCATCATC GTGGACGATT 650
TGCGGCCGTC GCTTGGCTGC TATGGAGATA AGCTCGTCCG CTCGCCGAAC 700
ATCGATCAGT TGGCCTCACA CTCACTGCTT TTCCAAAATG CGTTTGCGCA 750
GCAGGCTGTC TGTGCACCTT CAAGAGTCTC ATTCTTGACC GGGCGACGCC 800
CTGACACAAC GCGGCTGTAC GACTTCAACA GCTACTGGAG AGTCCACGCG 850
GGTAACCTTT CAACTATCCC ACAGTACTTT AAAGAGAACG GATACGTGAC 900
AATGAGCGTG GGAAAGGTCT TTCACCCCGG CATCTCCTCG AATCACACCG 950
ACGATTCGCC CTACTCGTGG TCGTTTCCTC CCTACCATCC TTCGAGCGAG 1000
AAGTATGAGA ACACGAAAAC TTGTCGCGGA CCCGACGGAG AGCTGCACGC 1050
TAATCTGCTG TGTCCGGTGG ATGTCCTTGA CGTGCCCGAG GGAACGCTCC 1100
CCGACAAGCA GTCAACGGAG CAGGCGATTC AGTTGCTGGA GAAGATGAAA 1150
ACAAGCGCGT CGCCTTTCTT CCTCGCCGTG GGGTATCACA AGCCCATAT 1200
TCCTTTCCGC TACCCGAAGG AGTTCCAGAA ACTTTATCCT TTGGAAAACA 1250
TCACTTTGGC ACCGGACCCG GAAGTCCCCG ACGGTCTGCC ACCCGTGGCC 1300
TACAATCCCT GGATGGATAT CAGGCAGAGG GAAGATGTGC AGGCACTCAA 1350
CATCTCAGTC CCCTACGGGC CTATTCCAGT CGATTTTCAA CGCAAGATTC 1400
GGCAGTCGTA TTTTGGCTCG GTGTCCTACC TCGATACGCA AGTAGGTCGA 1450
CTTCTGAGCG CGCTTGATGA CCTTCAGCTG GCAAATTCCA CAATCATCGC 1500
CTTTACGTCG GACCATGGGT GGGCGTTGGG AGAGCATGGA GAGTGGGCAA 1550
AGTATAGCAA TTTTGATGTA GCAACGCACG TGCCCCTGAT TTTCTACGTG 1600
CCGGGTAGAA CGGCCTCGCT TCCCGAGGCA GGCGAAAAAC TTTTTCCTA 1650
TCTCGATCCA TTCGACTCGG CGAGCCAGCT TATGGAACCG GGCAGACAAT 1700
CCATGGACTT GGTAGAATTG GTGTCCCTTT TTCCGACCTT CGCCGGGTTG 1750
GCGGGCTTGC AAGTACCCCC TAGATGCCCT GTACCGAGCT TCCATGTGGA 1800
ACTCTGCCGC GAAGGGAAAA ACCTCCTCAA ACACTTTCGG TTCAGGGACC 1850
TTGAGAGGA CCCCTATCTG CCAGGGAATC CGCGAGAGTT GATTGCCTAT 1900
TCCCAGTATC CGCAGCCAG CGATATTCCT CAATGGAAT CCGATAAGCC 1950
CTCCCTCAA GACATCAAGA TTATGGGGTA CTCGATCAGG ACCATCGACT 2000
ATCGCTACAC AGTGTGGGTA GGGTTCAATC CTGACGAATT CCTCGCGAAC 2050
TTTTCGGACA TCCACGCTGG TGAGCTGTAT TTCGTAGACT CGGACCCGTT 2100
GCAAGATCAC AATATGTATA ATGATTCCCA AGGAGGAGAT TTGTTCCAGC 2150
TGCTCATGCC GTGATAAAGA TCTctgtgcc ttctagttgc cagccatctg 2200
ttgtttgccc ctccccgtg ccttccctga ccctggaagg tgccactccc 2250
actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag 2300

20

30

40

50

【化 8 - 2】

gtgtcattctt attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg 2350
 attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggAC 2400
 CGGTCTATCC ATTGCACTAT GCTTTATTTA AAAACCACAA AACCTGTGCT 2450
 GTTGATCTCA TAAATAGAAC TTGTATTTAT ATTTATTTTC ATTTTAGTCT 2500
 GTCTGGATCC ACAAATTAAT CGAACCTGCA GCTGATATCG ACGCTTAAGT 2550
 AGGGCTTAGC AAACGCGTCT CCAACGTTTC GCCGTTAACA CCCCACATAG 2600
 TGAGTGGTCT TAGTAGTCCG GGTGTTTAAA CTGAAAGATA ACTCGAGCGC 2650
 [AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG 2700
 CTCCTGAGG CCGCCCGGGC TTTGCCCGGG CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA 2750
 GCGCGCAG] (配列番号 65) 2758

10

【 0 2 6 5】

I D U A A A V 導入遺伝子ドナーのエLEMENTおよび配列を以下に示す：

【表 8 - 1】

表8: IDUA AAVのエLEMENT(配列番号72)

位置	特色の説明	配列番号	配列
1-130	5' ITR [括弧内の プレーンテキスト]	44	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCTG GGCGACCTTTGGTCCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT
271-550	LA: 左の 相同性アーム イタリック	60	TTTATTCTATTTTCCAGTAAAAATAAAGTTTTAGTAAACTCTGCATCTTT AAAGAATTATTTTGGCATTTATTTCTAAAAATGGCATAGTATTTTGTATTT GTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAATTCAAACATCCCTAGGTA AAAAAAAAAAAAAGGTCGAAATTGTTTAGTGACTGTAAATTTTCTTTTGCGC ACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAACTTCACAGAATAG GGTTGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAA
557-584	SA: スプライス アクセプター 太字	61	ACTAAAGAATTATTCTTTTACATTTTCAG
587- 2458	コドンが 最適化された hIDUA 下線	67	CACTTGGTCCACGTCGACGCTGCCAGAGCCCTGTGGCCGCTTCGAAGATT TTGGAGGTCAACGGGTTTCTGTCTCCCTTCCCCACTCGCAAGCAGATC AGTATGTAAGTGTCAAGGATCAACAGCTTAACCTCGCCTATGTCTGGAGCA GTGCCTCACCAGCGGGATCAAGCAAGTAAGGACACATTGGCTCCTTGAAGT CGTCACCACGAGAGGATCGACGGGAAGGGGGCTTTCTGTAACCTTCACTC ATCTCGATGGCTATTTGGATCTCCTCCGCGAGAATCAGTTGTTGCCAGGC TTCGAATTGATGGGATCGGCGAGCGGGCACTTTACAGACTTCGAGGACAA GCAGCAAGTGTGTGAGTGGAAGGACCTCGTGTCTGCTCGCTCGCGAGGAGAT ACATTGGTCTGCTACGGTTTGGCGCATGTGTCAAAGTGGAACCTTCGAAACG TGGAACGAGCCCGATCATCACGATTTTGACAACGTGTCAATGACCATGCA GGGTTTCTTAACTATTACGACGCTGTTCGAGGGAATTGAGGGCAGCAT CACCAGCGCTTCGGCTGGGAGGGCTGGTGATAGCTTTTCATACACCACCT CGATCGCCACTTTCTGTGGGGGCTGCTGCGCCATTGTCTACGATGGTACGAA CTTCTTCACCAGGGGAAGCGGGGGTACGGCTTGATTACATCAGCCTCCACC GAAAGGGAGCGCGGTCAAGCATCTCGATTCTGGAGCAGGAGAAGGTAGTC GCTCAGCAGATCCGGCAACTCTTTCCCAAGTTTCGAGACACACCTATCTA CAATGATGAGGCAGACCCACTTGTGGGATGGTCCCTTCCGCACCATGGC GCGCAGATGTGACTTATGCCGCGATGGTAGTGAAAGTCATCGCCAGCAC CAGAATCTGCTTCTTGCGAATACGACACGCGCTTTCTTTACGCGCTTTT GTCGAACGATAATGCCTTCCTGTCTATATCACCCCATCCGTTTGCGCAGA GGACTCTTACGGCGCGATTCCAAGTGAATAACACCAGACCGCGCACGTG CAGCTGTTGCGAAAACCGGTGTGACTGCGATGGGGCTTCTGGCGTTGCT TGATGAGGAACAACCTCTGGGCTGAAGTGTCCAGGCGGGGACAGTACTTG ATAGCAATCATACAGTAGGCGTGTGGCGTCGGCGCACCGACCGCAGGGA

20

30

40

50

【表 8 - 2】

			CCCGCGGATGCTTGGAGGGCAGCGGTCTGATCTACGCCTCGGACGATAC TAGGGCACATCCCAACAGATCGGTGCTGTCACCCCTCGCCTCAGAGGGG TCCCGCTGGTCCCGGCTTGGTATACGTCACTAGATATCTCGACAATGGA CTGTGCAGCCCCGACGGAGAGTGGCGGAGGCTGGGACGGCCGGTGTTC GACAGCCGAGCAGTTTAGACGGATGAGGGCCGCTGAGGACCCCGTGGCAG CGGCACCGAGGCCCCCTCCCGGAGGAGGTCGCCCTCACTCTTCGACCGGCA CTGCGGCTGCCGTCCCTTCTGCTCGTACACGTCTGCGCGCGACCCGAAAA GCCGCTGGACAGGTAACCAGGCTCAGGGCGCTCCCTTGACGCAGGGGC AGTTGGTACTTGTCTGGTCGGACGAACACGTGGGGTCCAAATGCTTGTGG ACGTATGAAATTCACTTTTCCCAAGACGGGAAAGCGTACACTCCGGTGTC GCGCAAACCTCCACGTTCAACCTCTTCGTCTTTTCCCCAGACACGGGAG CCGTATCAGGGTCGTACCGAGTCAGAGCCCTCGATTATTGGGCGAGGCCT GGGCGCTTCTCGGACCCCTGTACCATACTTGGAAAGTGCCGGTGCCAGGGG ACCGCCCTCGCCTGGTAATCCT
2471- 2695	ポリA 小文字	63	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCT TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTTAATAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTATTCTATTCTGGGGGGTG GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAT GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
2702- 2801	RA: 右の 相同性アーム <u>二重下線</u>	64	CTATCCATTGCACTATGCTTTATTTAAAAACCACAAAACCTGTGCTGTTG ATCTCATAAATAGAACTTGATTTATATTTATTTTCATTTTAGTCTGTCT
2948- 3055	3' ITR [括弧内の太字]	55	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAG

10

20

【化 9 - 1】

IDUA AAV の配列：

[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG 50
 GGCGACCTTT GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG 100
 GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCCT] GCGGCCTAAG CTTGAGCGGA 150
 GTTCCAATTG TACTGTACAG AACCATGGTC ACATGTTTAA CGCTAGCGTG 200
 CCGACCTGGT AAAGTGATCA GTGGGTGCAC TTAGGACTGC GTCTTACGCT 250
 AATCACATGC GTGCGGCCGC TTTATTCTAT TTTCCAGTA AAATAAAGTT 300
 TTAGTAAACT CTGCATCTTT AAAGAATTAT TTTGGCATT TTTCTAAAA 350
 TGGCATAGTA TTTTGTATTT GTGAAGTCTT ACAAGGTAT CTTATTAATA 400
 AAATTCAAAC ATCCTAGGTA AAAAAAAAAA AAGGTCAGAA TTGTTTAGTG 450
 ACTGTAATTT TCTTTTGCGC ACTAAGGAAA GTGCAAAGTA ACTTAGAGTG 500
 ACTGAACTT CACAGAATAG GGTTGAAGAT TGAATTCATA ACTATCCAA 550
 GGTACCACTA **AAGAATTATT** **CTTTTACATT** **TCAGCGCACT** TGGTCCACGT 600
 CGACGCTGCC AGAGCCCTGT GGCCGCTTCG AAGATTTTGG AGGTCAACGG 650
 GTTTCTGTCC TCCCTTCCC CACTCGCAAG CAGATCAGTA TGTACTGTCA 700
 TGGGATCAAC AGCTTAACCT CGCCTATGTC GGAGCAGTGC CTCACCGCGG 750
 GATCAAGCAA GTAAGGACAC ATTGGCTCCT TGAAGTCTG ACCACGAGAG 800
 GATCGACGGG AAGGGGGCTT TCGTACAAC TCACTCATCT CGATGGCTAT 850
 TTGGATCTCC TCCGCGAGAA TCAGTTGTTG CCAGGCTTCG AATTGATGGG 900
 ATCGGCGAGC GGGCACTTTA CAGACTTCGA GGACAAGCAG CAAGTGTTTG 950
 AGTGAAGGA CCTCGTGTCTG TCGCTCGCGA GGAGATACAT TGGTCGCTAC 1000
 GGTTTGGCGC ATGTGTCAAA GTGGAACCTC GAAACGTGGA ACGAGCCCGA 1050
 TCATCACGAT TTTGACAACG TGTCAATGAC CATGCAGGGT TTCCTTAACT 1100
 ATTACGACGC CTGTTCCGAG GGATTGAGGG CAGCATCACC GGCGCTTCGG 1150
 CTGGGAGGGC CTGGTGATAG CTTTCATACA CCACCTCGAT CGCCACTTTC 1200
 GTGGGGGGCTG CTGCGCCATT GTCACGATGG TACGAACTTC TTCACCGGGG 1250
 AAGCGGGGGT ACGGCTTGAT TACATCAGCC TCCACCGAAA GGGAGCGCGG 1300
 TCAAGCATCT CGATTCTGGA GCAGGAGAAG GTAGTCGCTC AGCAGATCCG 1350

30

40

50

【化 9 - 2】

GCAACTCTTT CCCAAGTTCG CAGACACACC TATCTACAAT GATGAGGCAG 1400
 ACCCACTTGT GGGATGGTCC CTTCCGCAGC CATGGCGCGC AGATGTGACT 1450
 TATGCCGCGA TGGTAGTGAA AGTCATCGCC CAGCACCAGA ATCTGCTTCT 1500
 TGCGAATACG ACCAGCGCGT TTCCTTACGC GCTTTTGTCTG AACGATAATG 1550
 CCTTCCTGTC ATATCACCCC CATCCGTTTG CGCAGAGGAC TCTTACGGCG 1600
 CGATTCCAAG TGAATAACAC CAGACCGCCG CACGTGCAGC TGTGCGGAAA 1650
 ACCCGTGTG ACTGCGATGG GGCTTCTGGC GTTGCTTGAT GAGGAACAAC 1700
 TCTGGGCTGA AGTGTCCCAG GCGGGGACAG TACTTGATAG CAATCATACA 1750
 GTAGGCCTGT TGGCGTCGGC GCACCGACCG CAGGGACCCG CGGATGCTTG 1800
 GAGGGCAGCG GTCCTGATCT ACGCCTCGGA CGATACTAGG GCACATCCCA 1850
 ACAGATCGGT CGCTGTCACC CTTCCGCTCA GAGGGGTCCC GCCTGGTCCC 1900
 GGCTTGGTAT ACGTCACTAG ATATCTCGAC AATGGACTGT GCAGCCCCGA 1950
 CGGAGAGTGG CGGAGGCTGG GACGGCCGGT GTTTCCGACA GCCGAGCAGT 2000
 TTAGACGGAT GAGGGCCGCT GAGGACCCCG TGGCAGCGGC ACCGAGGCCC 2050
 CTCCCGGCAG GAGGTGCGCT CACTCTTCGA CCGGCACTGC GGCTGCCGTC 2100
 CCTTCTGCTC GTACACGTCT GCGCGCGACC CGAAAAGCCG CCTGGACAGG 2150
 TAACCAGGCT CAGGGCGCTC CCCTTGACGC AGGGGCAGTT GGTACTTGTC 2200
 TGGTCGGACG AACACGTGGG GTCCAAATGC TTGTGGACGT ATGAAATTCA 2250
 GTTTTCCCAA GACGGGAAAG CGTACACTCC GGTGTCGCGC AAACCCTCCA 2300
 CGTTCAACCT CTTCGTCTTT TCCCCAGACA CGGGAGCCGT ATCAGGGTCG 2350
 TACCGAGTCA GAGCCCTCGA TTATTGGGCG AGGCCTGGGC CGTTCTCGGA 2400
 CCCTGTACCA TACTTGGAAG TGCCGGTGCC CAGGGGACCG CCCTCGCCTG 2450
 GTAATCCTTG ATAAAGATCT ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg 2500
 tttgccccctc ccccgctgcct tccttgacct tgggaaggtgc cactccact 2550
 gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg 2600
 tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 2650
 gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatggACCGG 2700
 TCTATCCATT GCACTATGCT TTATTTAAAA ACCACAAAAC CTGTGCTGTT 2750
 GATCTCATAA ATAGAACTTG TATTTATATT TATTTTCATT TTAGTCTGTC 2800
 TGGATCCACA AATTAATCGA ACCTGCAGCT GATATCGACG CTTAAGTAGG 2850
 GCTTAGCAAA CGCGTCTCCA ACGTTTCGCC GTTAACACCC CACATAGTGA 2900
 GTGGTCTTAG TAGTCCGGGT GTTTAACTG AAAGATAACT CGAGCGC [AGG 2950
 AACCCCTAGT GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC 3000
 ACTGAGGCCG CCCGGGCTTT GCCCGGGCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG 3050
 CGCAG] (配列番号 72) 3055

10

20

【0 2 6 6】

アルブミン特異的な 7 1 5 5 7 / 7 1 7 2 8 対を使用して、導入遺伝子ドナー A A V (A A V - F . I X 、 A A V - I D S 、 A A V - I D U A) の 1 つの存在下で、相同組換え標的化組込みを介して導入遺伝子がアルブミン遺伝子座に組み込まれるように、標的ヒト細胞中でアルブミン遺伝子座を切断する。組み込まれると、導入遺伝子の発現は、アルブミンプロモーターによって調節される。

30

【0 2 6 7】

標準的なプロトコールに従って、Hep G 2 細胞におけるアルブミン遺伝子座の切断および F I X 導入遺伝子の挿入に関して、7 1 5 5 7 / 7 1 7 2 8 Z F N を 4 7 1 7 1 / 4 7 8 9 8 Z F N 対と比較した。簡単に言えば、Hep G 2 細胞に、5 0 0 μ L の総体積で、それぞれ 1.25×10^6 v g / 細胞の M O I の Z F N のロットで形質導入した。細胞を、3 7 ° C / 5 % C O 2 のインキュベーターで一晩 (1 2 ~ 2 4 時間) インキュベートした。次の日、F I X ドナーを、5 0 0 μ L の総体積で、 2.5×10^6 v g / 細胞の M O I の F I X ドナーで形質導入した。9 日目に、V i s u L i z e F I X 抗原キット (A f f i n i t y B i o l o g i c a l s) を製造元の指示に従って使用した E L I S A によって、培地を F I X タンパク質に関して試験した。

40

【0 2 6 8】

結果 (図 1 0 C を参照) から、このアッセイにおいて、7 1 5 5 7 / 7 1 7 2 8 Z F N を使用した F I X ドナーの挿入は、4 7 1 7 1 / 4 7 8 9 8 対を使用した場合よりも、ほぼ 3 倍多くの F I X 産生をもたらしたことが示される。

【0 2 6 9】

50

同様にして、標準的なプロトコールに従って、HepG2細胞におけるアルブミン遺伝子座の切断およびIDUA導入遺伝子の挿入に関して71557/71728ZFNを47171/47898ZFN対と比較した。結果(図14)から、両方の対が、IDUA導入遺伝子の、アルブミン遺伝子座へのZFN組換え標的化組込みを生じさせることができ、IDUA活性が細胞上清中に存在するように、導入遺伝子を発現させることができることが実証される。

【0270】

(実施例7)

in vivoでの切断および標的化組込み

本明細書に記載される構築物をin vivoでも試験した。

【0271】

動物実験設計

少なくとも6~8週齢の42匹の雄野生型C57BL/6マウスを、Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MAから購入した。マウスの取り扱い、注射および試料収集は、家畜学に関する標準的なプロトコールに従ってExperimur (Chicago IL) により行った。マウスを処置開始前の少なくとも1週間Experimurに隔離して保持した。

【0272】

AAVは、Sangamo Therapeuticsによって調製され、これを受け取ったままの状態、-70℃で使用するまで貯蔵した。この研究に、5つの操作されたAAV2/6ベクター；標準的な構造を有する2つのZFNをコードする2つのAAVベクター(「ZFN標準」)；改善された構造を有する2つのZFNをコードする2つのAAVベクター(「ZFN改善」、例えばZFN標準+5'UTR、3×FLAGおよびWPREmut6)；およびマウスアルブミンイントロン1相同性アームに挟まれたプロモーターを有さないhIDS導入遺伝子DNA鋳型(ドナー)をコードする1つのAAVベクターを使用した。

【0273】

AAV2/6ベクターを製剤緩衝液(35mMのNaClおよび5%グリセロールが補充されたPBS[pH7.1])で表1に示される用量に希釈した。6~9週齢のマウスを群1~7にランダムに割り当てた。群1のマウスには、ビヒクル、すなわち製剤緩衝液をi.v.注射し、群2~7のマウスには、ベクターの組合せを以下の表9に示される異なる用量でi.v.注射した。注射の総投与体積はマウス1匹当たり200μLであった。

10

20

30

40

50

【表 9】

表9: 群の名称および用量

群	群の名称	動物数	各ZFN用量レベル (vg/ マウス)	ドナー用量レベル (vg/ マウス)
1	製剤緩衝液	6	0	0
2	ZFN 標準 低用量	6	2.00E+10	1.60E+11
3	ZFN 標準 中用量	6	6.00E+10	4.80E+11
4	ZFN 標準 高用量	6	2.00E+11	1.60E+12
5	ZFN 改善 低用量	6	2.00E+10	1.60E+11
6	ZFN 改善 中用量	6	6.00E+10	4.80E+11
7	ZFN 改善 高用量	6	2.00E+11	1.60E+12

【0274】

AAVベクター構築物およびパッケージング

FokIドメイン1における絶対ヘテロ二量体ELD/KKR変異を含有するマウスアルブミン遺伝子座のイントロン1を標的化するヘテロ二量体ZFN。マウスの*in vivo*の研究のために、標準ZFN（48641および31523）または改善されたZFN（5'UTR、N末端3×FLAGおよび3'WPREmut6を有する48641および31523）を使用した。ヒトの*in vitro*の研究のために、標準ZFN（47171および47898）またはZFN2.0（5'UTR、N末端3×FLAGおよび3'WPREmut6を有する71557および71728）を使用した。hIDSドナー構築物は以前に記載されている（Sharma et al (2015) Blood 126, 1777-1784）。hIDSドナー構築物は、内因性IDSシグナルペプチドを欠くhIDS cDNA、hF9スプライスアクセプター配列、および合計で長さがおよそ600bpのマウスまたはヒトアルブミン標的的部位への相同性を有するアームを含有する。組換えAAV2/6ベクター（AAV2 ITRおよびAAV6キャプシドで構成される）を、10チャンバーのCELLSTACK培養チャンバー（Corning）での293細胞の三つ組のトランスフェクションによって産生し、塩化セシウム密度勾配遠心分離とそれに続く透析によって精製し、以前に記載されたようにして力価測定した（Sharma、同上）。

【0275】

組織の収集

56日目に、2L/分の流速で3分のCO₂ヒュームチャンバー中でマウスを安楽死させた。肝臓試料を収集し、3つの部分に切り分け、1つの部分を10%中性緩衝ホルマリン中での組織病理学的分析用にし、残りの部分を急速冷凍し、IDS酵素活性の査定、RNA抽出、ウェスタンブロッティングおよび遺伝子改変のための処理まで-70℃で貯蔵した。

【0276】

次世代シーケンシングによる肝臓におけるインデル検出

AllPrep DNA/RNA/タンパク質ミニキット（Qiagen）を製造元のプロトコールに従って使用して、マウス肝臓試料からのゲノムDNAを抽出した。QIAamp DNAマイクロキット（Qiagen）を製造元のプロトコールに従って使用し

て、i P S由来肝細胞のg D N Aを抽出した。表10に記載されるプライマーを使用したP C Rによって、Z F N標的部位を増幅した。M i S e q (I l l u m i n a) を使用してP C R産物をシーケンシングし、以前に記載されたようにして分析した (Laoharawee, K. et al. (2018) Mol. Ther. 26, 1127-1136)。

【表10】

表10: MiSeq分析のためのプライマー

名称	配列	配列番号
マウスアルブミン フォワード	ACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTGAGTTTGAATGCACAGAT	34
マウスアルブミン リバー	GACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNGAAACAGGGAGAGAAAAACC	35
ヒトアルブミン フォワード	ACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGCACTAAGGAAAGTGCAAAG	36
ヒトアルブミン リバー	GACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNAACCAAGAAGACAGACTAAAATG	37

10

【0277】

R T - q P C R

A l l P r e p D N A / R N A / タンパク質ミニキット (Q i a g e n) を製造元のプロトコルに従って使用して、肝臓試料からの全RNAを抽出した。S u p e r S c r i p t (商標) I I I F i r s t - S t r a n d S y n t h e s i s S u p e r M i x (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を製造元のプロトコルに従って使用して、c D N Aを生成した。T a q M a nユニバーサルP C Rマスターミックス (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を利用して、q P C Rを実行した。プライマーおよびプローブ配列について、表11を参照されたい。データをアクチンに対して正規化した。

20

【表11】

表11: RT-qPCRプライマーおよびプローブ

名称	配列	配列番号
マウスアルブミンエクソン1 フォワード	CAGGGGTGTGTTTCGTCGAG	38
ヒトIDS リバー	ATGAGCAGGACGTTAAGCGC	39
ヒトIDS TaqMan	FAM-AAACCCAGGCCAACTCAACT-BHQ	40
マウスアクチン	NA (Thermo Fisher, Mm01205647_g1)	NA

30

【0278】

ウェスタンブロッティング

総タンパク質抽出物を、以前に記載されたようにして、肝臓試料から調製した3。ウェスタンブロットによるIDS検出の前に、P i e r c eピシニコニン酸 (B C A) タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を使用してタンパク質濃度を決定した。使用された抗体は、IDS (A F 2 4 4 9 ; R & D S y s t e m s) およびグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H) (A O O 1 9 1 - 4 0、G e n e S c r i p t) であった。

40

【0279】

I D S アッセイ

1 u gの総肝臓タンパク質抽出物またはi P S由来肝細胞条件付き培地の1:3希釈物を、以前に記載されたようにしてアッセイに使用した (Laoharawee, K. et al., 同上)。

【0280】

注射から56日後に、肝臓試料を処置した動物から収集し、アルブミンの切断活性を上

50

述したようにして測定した。加えて、肝臓mRNAを逆転写し、生成物を、内因性マウスアルブミンエクソン1とトランスジェニックヒトIDSとのジャンクションをカバーするTaqManプライマー-プローブ対を使用してqPCRに供することによって、導入遺伝子発現を分析した。IDSのウェスタンブロットも実行し、肝臓の総タンパク質抽出物を、ヒト特異的なIDS抗体とハイブリダイズさせた（GAPDHがローディング対照として役立つ）。

【0281】

図10Aおよび10Bで示されるように、本明細書に記載される改変を含むAAVベクター（5'UTR、FLAG、mut6WPRE）は、*in vivo*でアルブミン遺伝子を、改変を含まないAAVベクターと比較して最大7倍多く切断した。同様に、改変されたZFNは、F.IXドナーの組み込みの増加をもたらすことができた（図10Cを参照）。

【0282】

さらに、図11～13のドナーIDS導入遺伝子で示されるように、改変されたZFNをコードするAAVベクターを標的化組み込みに使用した場合、ドナー導入遺伝子（IDS）の発現は、改変されていないZFNをコードするAAVベクター（図11および12）によって媒介される組み込みと比較して、*in vivo*で18倍増加し、血漿における酵素活性（IDSの）も増加した。図11Aは、この研究で使用された3つの異なるドナー：SB-IDS、SB-F9およびSB-IDUAの概略図を示す。改変されたZFNは、図11Bで示されるように、初代肝細胞においてアルブミン標的に対する活性の増加をもたらし、改善されたZFN（「ZFN2.0」）は、元のZFN対（「現行」）と比較して、中用量でのインデルパーセントにおける34倍の増加、および高用量での活性における22倍の増加をもたらした。これらのZFNがIDSドナーと対になっている場合、細胞上清において、標準ZFN（「現行」）と比較して、改善された（「ZFN2.0」）ZFNの中用量で5倍、およびより高い用量で21倍のIDS活性における増加が検出された。

【0283】

IDUA活性アッセイ

IDUA活性は、当業界において公知の方法に従って測定される。例えば、1つの例示的なアッセイは、以下の通りである： α -レイズロニダーゼの活性を、確立されたアッセイ条件に従って、基質として4-メチルウンベリフェリル α -レイズロニド（Glycosynth）を使用する蛍光定量アッセイによって決定した（Whitley 1987、同上（Whitley 1986、同上）。4MU-レイズロニド基質を、狭い十分に確立された最適なpH範囲の、ギ酸ナトリウム緩衝液、0.4M、pH3.5（Hopwood et al (1979), Clin Chim Acta.92:257-265, Whitley 1986、同上）を用いて、選択された基質濃度に希釈した。次いで、基質の25 μ Lのアリコート、25 μ Lの生物学的試料（例えば血漿、白血球、組織ホモジネート）と混合した。混合物を37℃で30分間インキュベートし、200 μ Lのグリシン炭酸緩衝液（pH10.4）を添加して反応をクエンチした。 α -レイズロニダーゼは、非蛍光基質（4MU-レイズロニド）の蛍光生成物（4-MU）への切断を触媒した。4-メチルウンベリフェロン（4-MU、Sigma）を使用して、標準曲線を作成した。得られた蛍光を、355nmでの励起および460nmでの放射でBio-Tekプレートリーダーを使用して測定した。 α -レイズロニダーゼ酵素活性を、Pierceタンパク質アッセイキット（Fisher）を用いて決定した場合のタンパク質1mg当たりの単位（nmol、1時間当たりの生成物に変換）で表した。全ての反応を3連で行った。

【0284】

データから、AAV-ZFN発現構築物の最適化は、単一遺伝子疾患の修正のための*in vitro*および*in vivo*のゲノム編集構築物の両方におけるゲノム編集において、驚くべき、かつ予想外の利点をもたらす（切断における最大7倍の増加、および導入遺伝子発現における最大18倍の増加を含む）ことが実証される。したがって、ZFN発

10

20

30

40

50

現ベクターを構成するエレメントを最適化することによって、全体的なZFN活性および／または特異性における強化が*in vitro*および*in vivo*で実現される。これらの方法は、アルブミン遺伝子座への挿入のための任意の導入遺伝子ドナー（例えば、IDS、IDUAおよびF.IX）と共に使用することができる。導入遺伝子によってコードされたタンパク質の発現および分泌は、それを必要とする対象にとって*in vivo*での産生を可能にする。

【0285】

本明細書で述べられた全ての特許、特許出願および刊行物は、これにより参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0286】

理解を明確にする目的のために図解と実施例によってある程度詳細に開示を提供したが、本開示の趣旨または範囲から逸脱することなく様々な変更や改変を実施することができる。したがって、前述の記載および実施例は、限定として解釈されるべきではない。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目1）

第1および第2のZFNを含むジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）であって、前記第1のZFNが、71557と名付けられたZFNを含み、前記第2のZFNが、71728と名付けられたZFNを含む、ZFN。

（項目2）

必要に応じてAAVベクターに担持される、項目1に記載の第1および第2のZFNをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド。

（項目3）

前記第1のZFNをコードする第1のポリヌクレオチドが、表4に示される配列を含むAAVベクターを含み、前記第2のZFNをコードする第2のポリヌクレオチドが、表5に示される配列を含むAAVベクターを含む、項目2に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド。

（項目4）

前記第1のZFNをコードする前記AAVベクターが、配列番号43に示される配列を含む、項目2または3に記載のAAVベクター。

（項目5）

前記第2のZFNをコードする前記AAVベクターが、配列番号56に示される配列を含む、項目2または3に記載のAAVベクター。

（項目6）

必要に応じて幹細胞もしくは前駆細胞である、項目1に記載の1つもしくは複数のZFN、項目2から3のいずれかに記載の1つもしくは複数のポリヌクレオチド、ならびに／または項目4および5に記載の1つもしくは複数のAAVベクターを含む細胞。

（項目7）

項目1に記載の1つもしくは複数のZFN、項目2から3のいずれかに記載の1つもしくは複数のポリヌクレオチド、項目4および5に記載の1つもしくは複数のAAVベクター、ならびに／または項目6に記載の1つもしくは複数の細胞を含む医薬組成物。

（項目8）

対象において内因性アルブミン遺伝子を切断するための、前記項目のいずれかに記載の、1つもしくは複数のZFN、1つもしくは複数のポリヌクレオチド、1つもしくは複数のAAVベクター、1つもしくは複数の細胞および／または1つもしくは複数の医薬組成物の使用。

（項目9）

前記対象に、必要に応じてAAVベクターに担持されるドナーを投与することをさらに含み、それにより前記ドナーが、前記対象において切断された前記アルブミン遺伝子に組み込まれる、項目8に記載の使用。

10

20

30

40

50

(項目 1 0)

対象の細胞において内因性アルブミン遺伝子を切断する方法であって、前記対象に、項目 1 に記載の 1 つもしくは複数の Z F N、項目 2 から 3 のいずれかに記載の 1 つもしくは複数のポリヌクレオチド、項目 4 および 5 に記載の 1 つもしくは複数の A A V ベクター、項目 6 に記載の 1 つもしくは複数の細胞ならびに／または項目 7 に記載の 1 つもしくは複数の医薬組成物を投与するステップを含む方法。

(項目 1 1)

項目 1 に記載の 1 つもしくは複数の Z F N、項目 2 から 3 のいずれかに記載の 1 つもしくは複数のポリヌクレオチド、項目 4 および 5 に記載の 1 つもしくは複数の A A V ベクター、項目 6 に記載の 1 つもしくは複数の細胞ならびに／または項目 7 に記載の 1 つもしくは複数の医薬組成物を含むキット。

10

(項目 1 2)

(a) 7 1 5 5 7 と名付けられた第 1 の Z F N をコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、必要に応じて、表 4 または配列番号 4 3 に示される配列を含む A A V ベクターを含む、第 1 のポリヌクレオチド；

(b) 7 1 7 2 8 と名付けられた第 2 の Z F N をコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、必要に応じて、表 5 または配列番号 5 6 に示される配列を含む A A V ベクターを含む、第 2 のポリヌクレオチド；および

(c) 第 I X 因子 (F I X) 配列をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチドを含む組成物。

20

(項目 1 3)

前記ドナーポリヌクレオチドが、表 6 に示される配列、必要に応じて配列番号 5 9 に示される配列を含む A A V ベクターである、項目 1 2 に記載の組成物。

(項目 1 4)

前記第 1 の、第 2 の、およびドナーポリヌクレオチドが、別々の A A V ベクターに担持される、項目 1 2 または 1 3 に記載の組成物。

(項目 1 5)

それを必要とする対象において F I X 導入遺伝子を発現させるための項目 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の組成物の使用であって、前記 Z F N が前記対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、前記 F I X の配列が切断された前記アルブミン遺伝子に組み込まれ、F I X タンパク質が前記対象において発現されるように、前記組成物が前記対象に投与される、使用。

30

(項目 1 6)

前記 F I X タンパク質の発現の後、前記対象において血友病が処置される、項目 1 5 に記載の使用。

(項目 1 7)

それを必要とする対象において F I X タンパク質を発現させる方法であって、前記 F I X タンパク質が細胞中で発現されるように、前記対象に、項目 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の 1 つまたは複数の組成物を投与するステップを含む方法。

(項目 1 8)

前記対象が、血友病を有し、前記 F I X タンパク質の発現が、前記疾患を処置および／または防止する、項目 1 7 に記載の方法。

40

(項目 1 9)

項目 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の 1 つまたは複数の組成物を含むキット。

(項目 2 0)

(a) 7 1 5 5 7 と名付けられた第 1 の Z F N をコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、必要に応じて、表 4 または配列番号 4 3 に示される配列を含む A A V ベクターを含む、第 1 のポリヌクレオチド；

(b) 7 1 7 2 8 と名付けられた第 2 の Z F N をコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、必要に応じて、表 5 または配列番号 5 6 に示される配列を含む A A V ベクターを

50

含む、第2のポリヌクレオチド；および

（c）イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）配列をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチドを含む組成物。

（項目21）

前記ドナーポリヌクレオチドが、表7に示される配列、必要に応じて配列番号65に示される配列を含むAAVベクターである、項目19に記載の組成物。

（項目22）

前記第1の、第2の、およびドナーポリヌクレオチドが、別々のAAVベクターに担持される、項目20または21に記載の組成物。

（項目23）

それを必要とする対象においてIDS導入遺伝子を発現させるための項目20から22のいずれかに記載の組成物の使用であって、前記ZFNが前記対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、前記IDS配列が切断された前記アルブミン遺伝子に組み込まれ、IDSタンパク質が前記対象において発現されるように、前記組成物が前記対象に投与される、使用。

（項目24）

前記IDS配列の発現の後、前記対象においてMPS IIが処置される、項目23に記載の使用。

（項目25）

それを必要とする対象においてIDSタンパク質を発現させる方法であって、前記IDSタンパク質が細胞中で発現されるように、前記対象に、項目20から22のいずれかに記載の1つまたは複数の組成物を投与するステップを含む方法。

（項目26）

前記対象が、MPS II疾患を有し、前記IDSタンパク質の発現が、前記疾患を処置および／または防止する、項目25に記載の方法。

（項目27）

項目20から22のいずれかに記載の1つまたは複数の組成物を含むキット。

（項目28）

（a）71557と名付けられた第1のZFNをコードする第1のポリヌクレオチドであって、必要に応じて、表4または配列番号43に示される配列を含むAAVベクターを含む、第1のポリヌクレオチド；

（b）71728と名付けられた第2のZFNをコードする第2のポリヌクレオチドであって、必要に応じて、表5または配列番号56に示される配列を含むAAVベクターを含む、第2のポリヌクレオチド；および

（c）アルファー-レイズロニダーゼ（IDUA）配列をコードする配列を含むドナーポリヌクレオチドを含む組成物。

（項目29）

前記ドナーが、表8に示される配列、必要に応じて配列番号72に示される配列を含む、項目28に記載の組成物。

（項目30）

前記第1の、第2の、およびドナーポリヌクレオチドが、別々のAAVベクターに担持される、項目28または項目29に記載の組成物。

（項目31）

それを必要とする対象においてIDUA導入遺伝子を発現させるための項目28から30のいずれかに記載の組成物の使用であって、前記ZFNが前記対象において内因性アルブミン遺伝子を切断し、前記IDUA配列が切断された前記アルブミン遺伝子に組み込まれ、IDUAタンパク質が前記対象において発現されるように、前記組成物が前記対象に投与される、使用。

10

20

30

40

50

(項目 3 2)

前記 I D U A 配列の発現の後、前記対象において M P S I が処置される、項目 3 1 に記載の使用。

(項目 3 3)

それを必要とする対象において I D U A タンパク質を発現させる方法であって、前記 I D U A タンパク質が細胞中で発現されるように、前記対象に、項目 2 8 から 3 0 のいずれかに記載の 1 つまたは複数の組成物を投与するステップを含む方法。

(項目 3 4)

前記対象が、M P S I 疾患を有し、前記 I D U A タンパク質の発現が、前記疾患を処置および／または防止する、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

項目 2 8 から 3 0 のいずれかに記載の 1 つまたは複数の組成物を含むキット。

【図面】

【図 1 A】

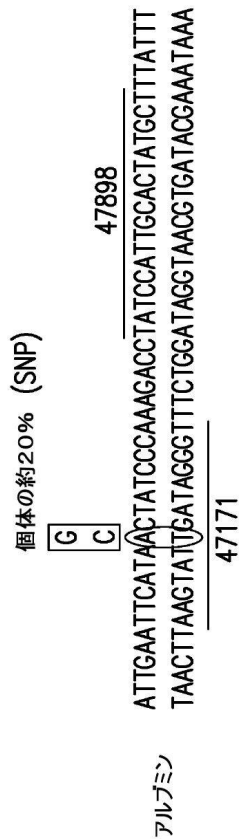


FIG. 1A

【図 1 B】

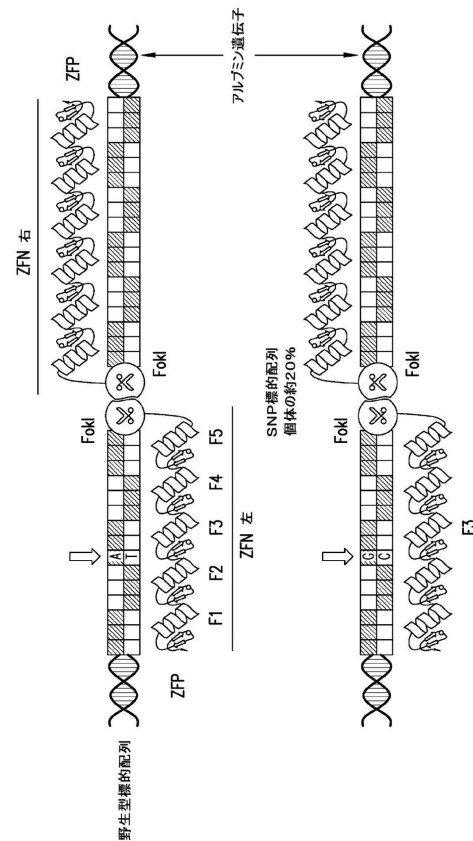


FIG. 1B

【圖 2】

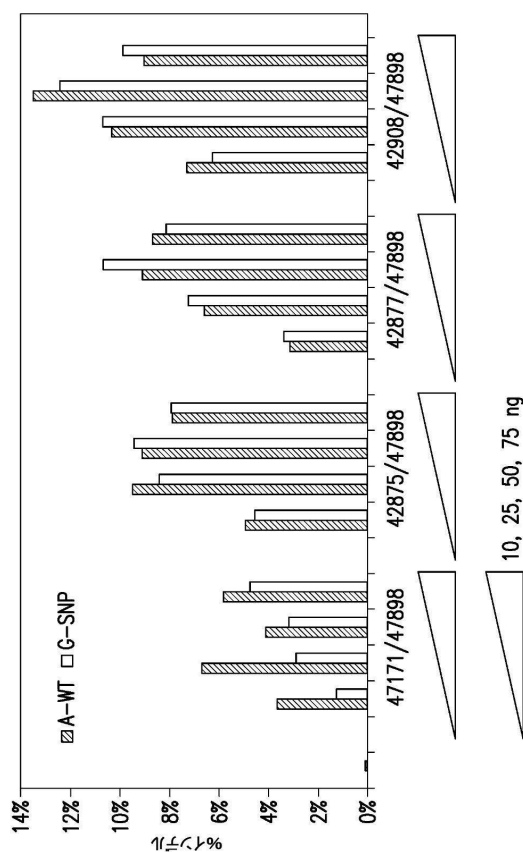


FIG. 2

【図 3 A】

	ZFN1	ZFN2	アルブミン				%インデル				SMCHD1
			2000 ng	62.5 ng	31.25 ng	15.6 ng	2000 ng	62.5 ng	31.25 ng	15.6 ng	
	71545	42875-F1F3Q-R416H	71673	47898-F3Q-R416H	82.4	39.8	6.1	0.8	0.017		
	71545	42875-F1F3Q-R416H	71721	47874-F3Q-R416H	82.7	44.5	9.2	2.0	0.018		
	71545	42875-F1F3Q-R416H	71729	47874-F1F3Q-S418P	84.2	63.3	19.6	2.8	0.011		
	71545	42875-F1F3Q-R416H	71741	47874-F1F3Q-L424F	85.1	61.1	23.9	4.5	0.017		
	71557	42875-F1F3Q-N542D	71721	47874-F3Q-R416H	80.8	46.8	8.9	1.8	0.018		
	71557	42875-F1F3Q-N542D	71728	47874-F3Q-P478S	80.9	53.9	20.6	4.6	0.012		
	71639	42908-F1F3Q-WT	71696	47898-F1F3Q-P478S	70.3	16.6	1.0	0.1	0.012		
	71641	42908-F1F3Q-R416H	71673	47898-F3Q-R416H	72.6	12.9	0.8	0.1	0.008		
	71641	42908-F1F3Q-R416H	71741	47874-F1F3Q-L424F	69.3	38.3	6.5	0.5	0.009		
	71653	42908-F1F3Q-N542D	71673	47898-F3Q-R416H	67.4	11.5	0.8	0.0	0.014		
	71653	42908-F1F3Q-N542D	71721	47874-F3Q-R416H	86.4	19.9	2.5	0.2	0.018		
	71653	42908-F1F3Q-N542D	71741	47874-F1F3Q-L424F	87.7	37.9	4.8	0.3	0.011		
	47171 類		47898 類		78.9	21.1	1.9	0.2	1.225		

FIG. 3A

GFP	アルブミン	プレート1
0.098	アルブミン	プレート2
0.033	SMCHD1	
0.008		

【図 3 B】

ZFN		ZFN		オフターゲット	
左	右	標準	親	標準	親
最適化	最適化	F1F3Q(ZFN) + N1S9Q(fork)	F3Q(ZFN) + P9S5 (fork)	2000 ng	2000 ng
				62.5 ng	62.5 ng
				31.3 ng	31.3 ng
				1.9	0.2
				78.9	21.1
				80.9	53.9
				20.6	4.6
				1.23	0.01

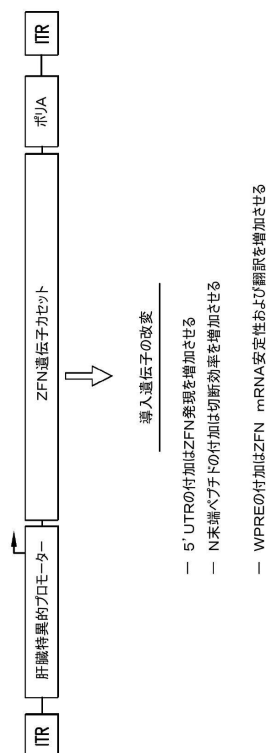


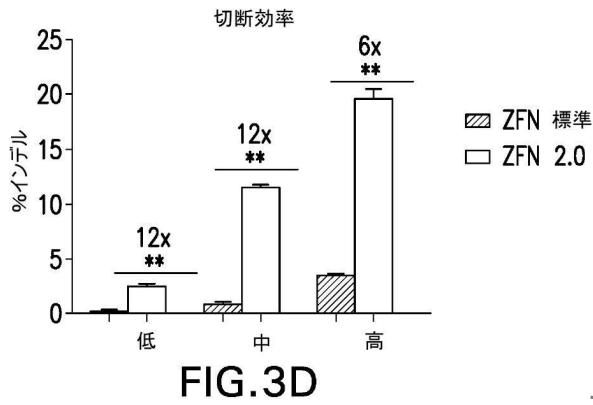
FIG. 3B

【図 3 C】

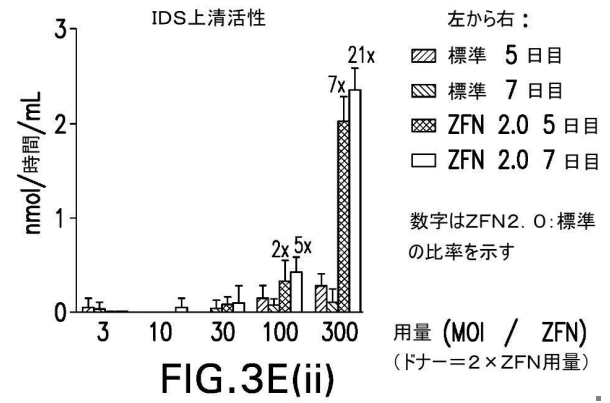
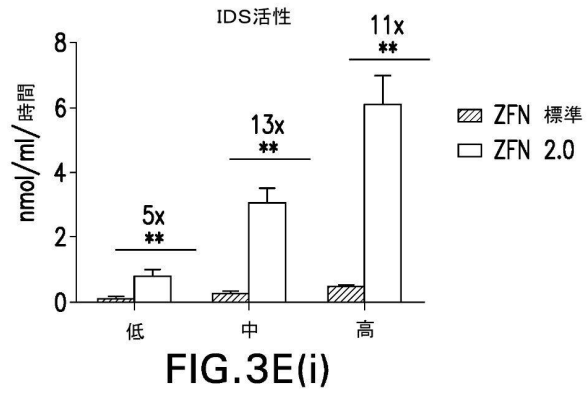
	遺伝子／配置	捕捉事象	K562 %インデル	HepG2 %インデル
	ALB（オンターゲット）	3498	87.7%	98.2%
1	SKA2	18	ns	ns
2	Chr5（遺伝子間）	12	ns	ns
3	Chr9（遺伝子間）	11	ns	ns
4	AC079807.4	10	ns	ns
5	Chr1（遺伝子間）	9	ns	ns
6	CSMD3	9	ns	ns
7	Chr18（遺伝子間）	9	ns	ns
8	Chr19（遺伝子間）	9	ns	ns
9	Chr1（遺伝子間）	8	ns	0.08 [^]
10	HECTD4	8	ns*	ns
11	Chr17（遺伝子間）	8	ns	ns
12	Chr4（遺伝子間）	8	ND	ND
13	CSMD3	8	ns	ns
14	Chr11（遺伝子間）	8	ns	ns
15	Chr1（遺伝子間）	7	ns	ns
16	AKAP6	7	ND	ND
17	Chr19（遺伝子間）	7	ns	ns
18	OSBPL6	7	ns	ns
19	QPCT	7	ns	ns
20	RP11-269F21.3	7	ns	ns
21	LPHN3	7	ns	ns
22	CYFIP2	7	ns	ns
23	AUTS2	7	ns	ns
24	COL4A6	7	ns	ns
25	ChrX（遺伝子間）	7	ns	ns
26	ACAN	7	ns	ns

FIG.3C

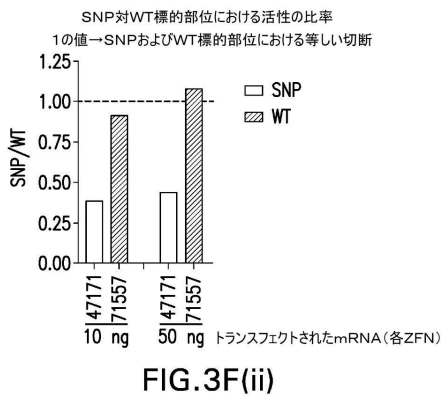
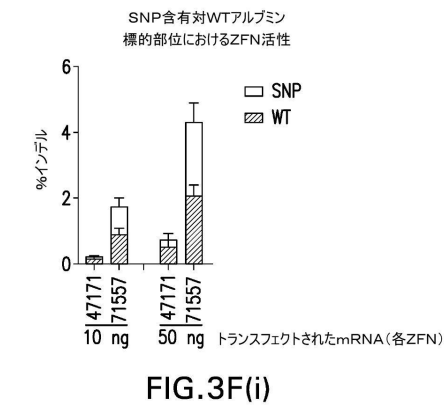
【図 3 D】



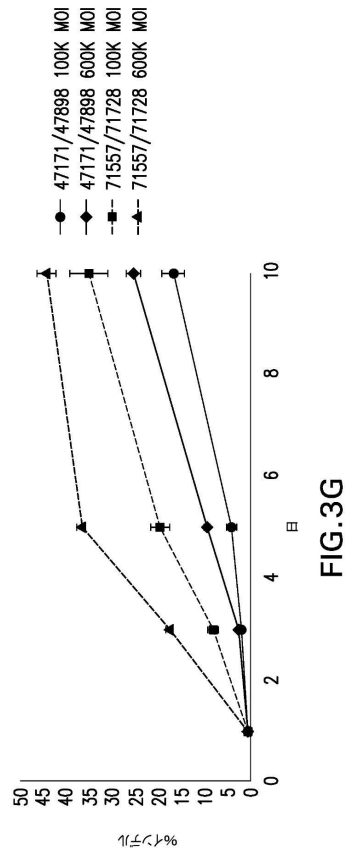
【図 3 E】



【図 3 F】



【図 3 G】



10

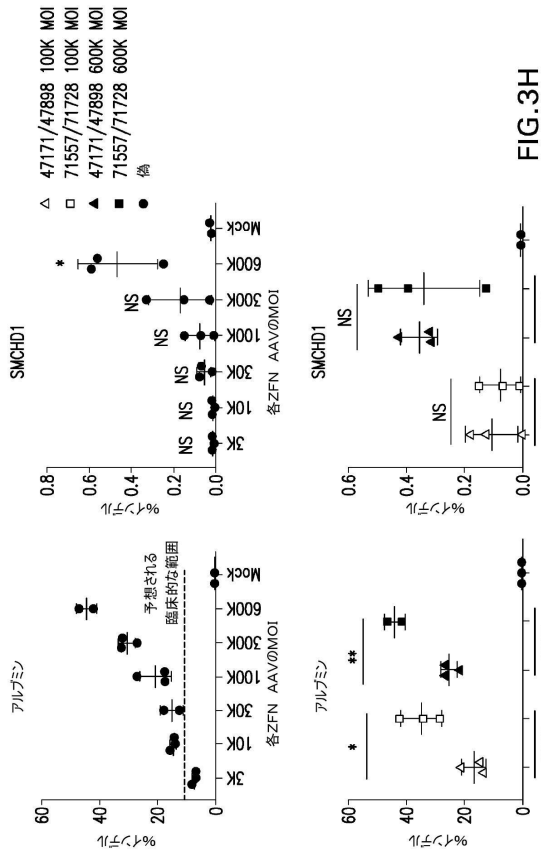
20

30

40

50

【図 3 H】



【図 4 A】

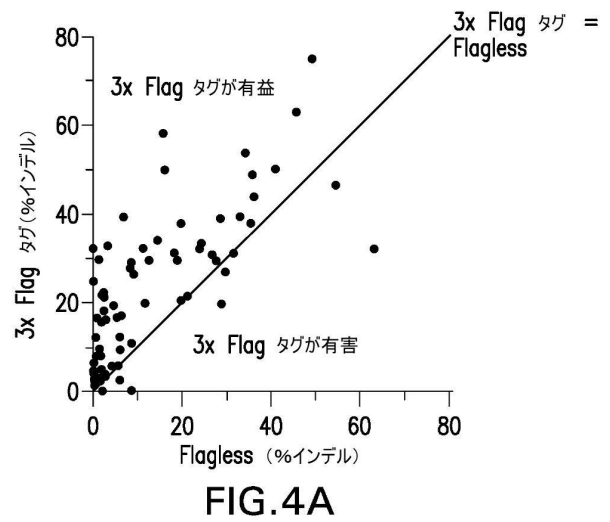


FIG.4A

【図 4 B】

	3xFlag/Flagless
正の効果 >10%	61
中間(10%以内) 10%)	7
負の効果 >10%	6

平均 n=74 4.1x

FIG.4B

【図 4 C】

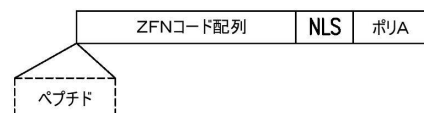
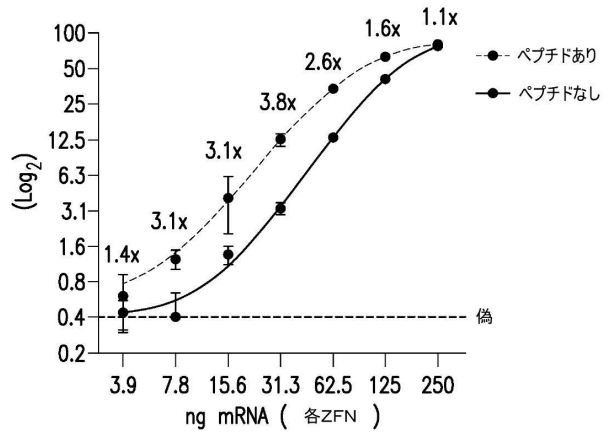


FIG.4C

【図 5 A】

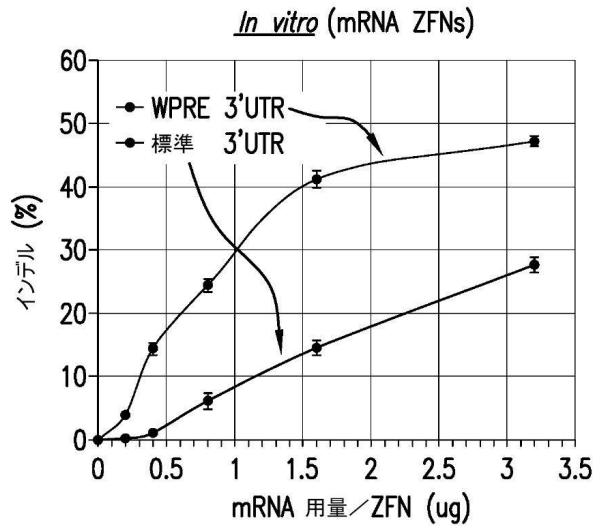


FIG.5A

【図 5 B】

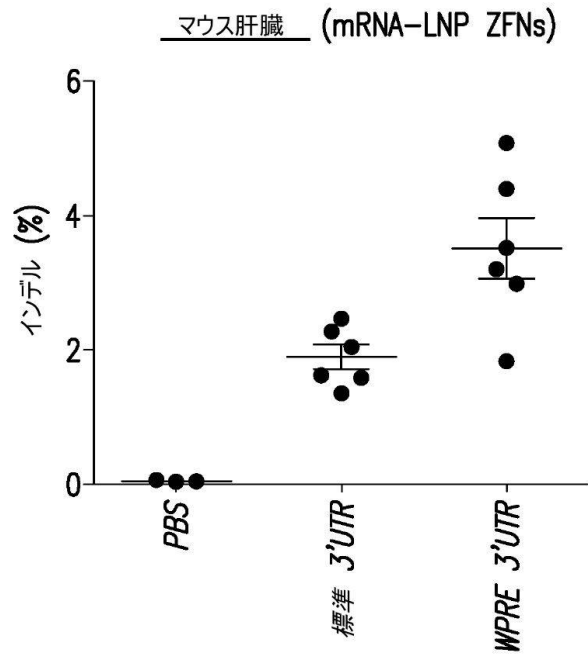


FIG.5B

【図 5 C】

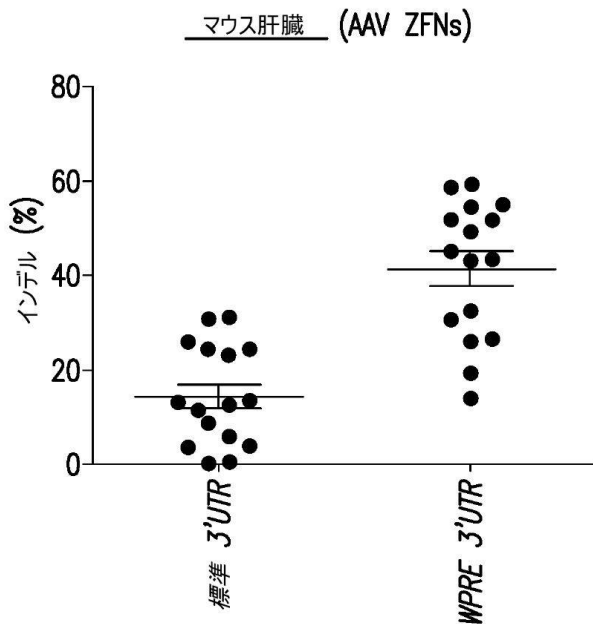


FIG.5C

【図 6】

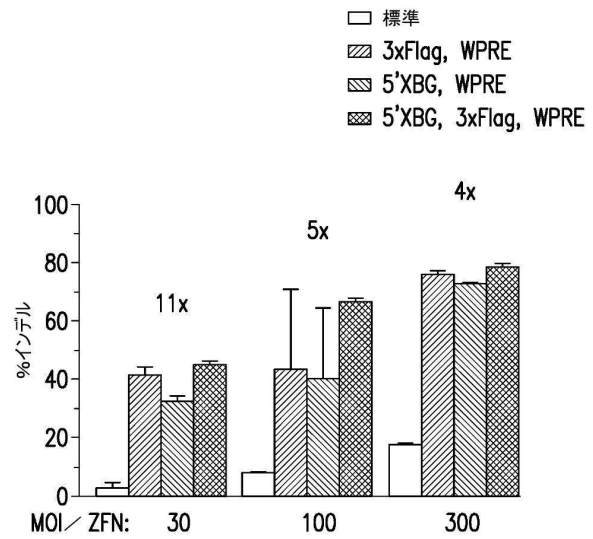


FIG.6

10

20

30

40

50

【図 7 A】

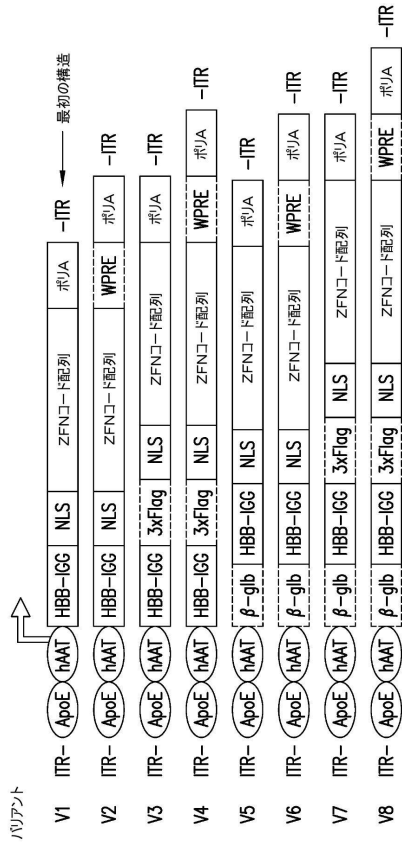
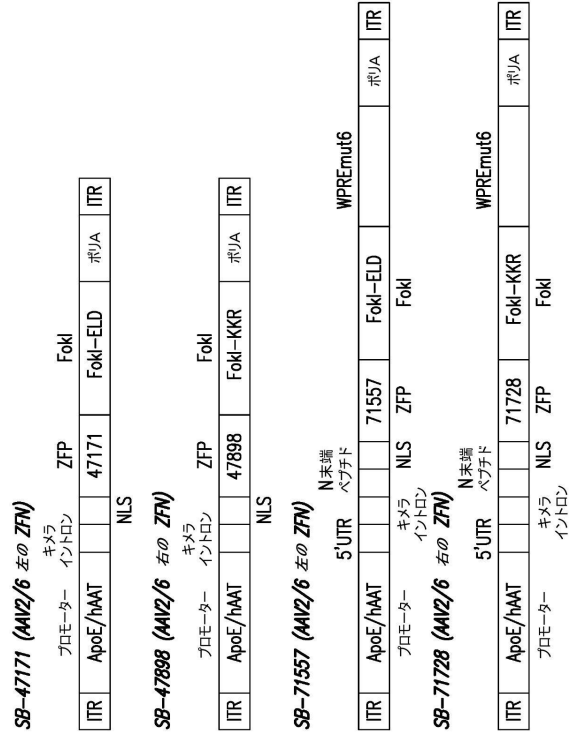


FIG.7A

【図 7 B】



【図 8】

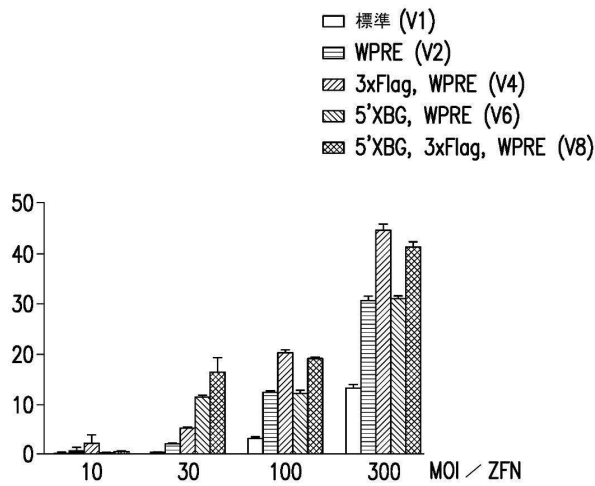


FIG.8

【図 9】

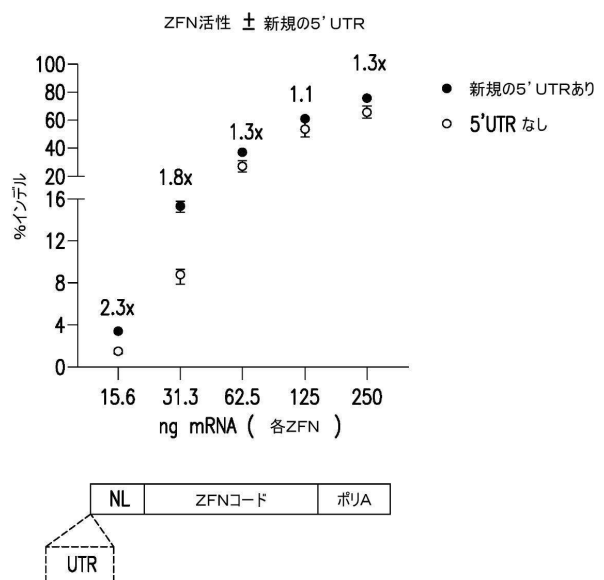


FIG.9

10

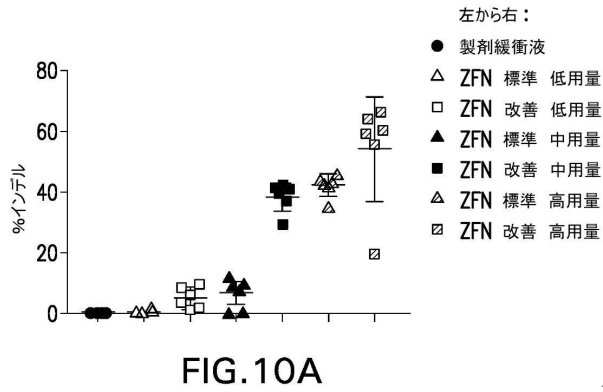
20

30

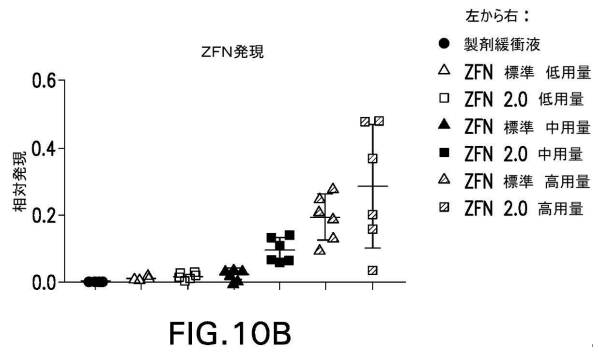
40

50

【図 10 A】

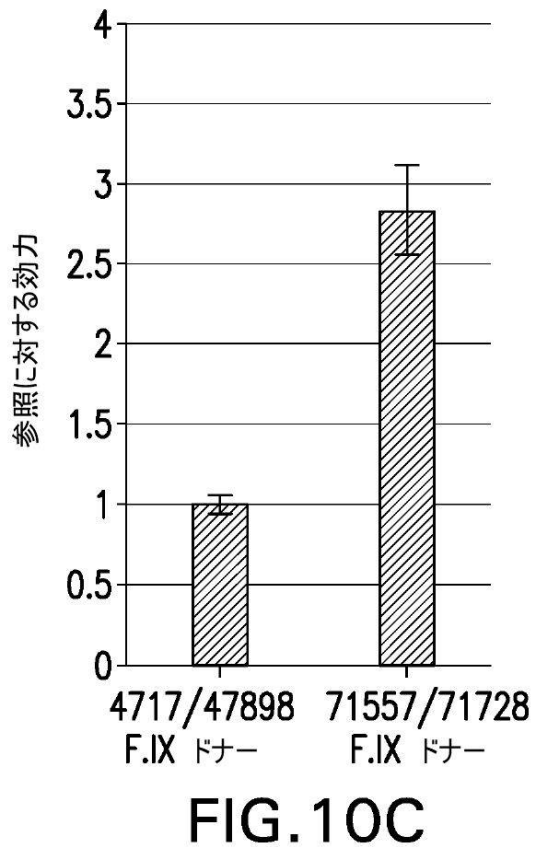


【図 10 B】



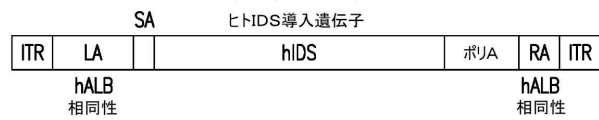
10

【図 10 C】

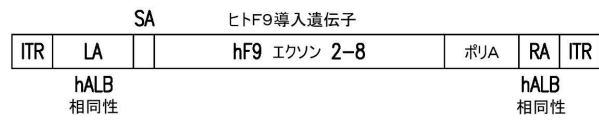


【図 11 A】

SB-IDS 導入遺伝子ドナー (AAV2/6 ドナー)



SB-F9 導入遺伝子ドナー (AAV2/6 ドナー)



SB-IDUA ドナー (hIDUA ドナー - AAV2/6)



FIG.11A

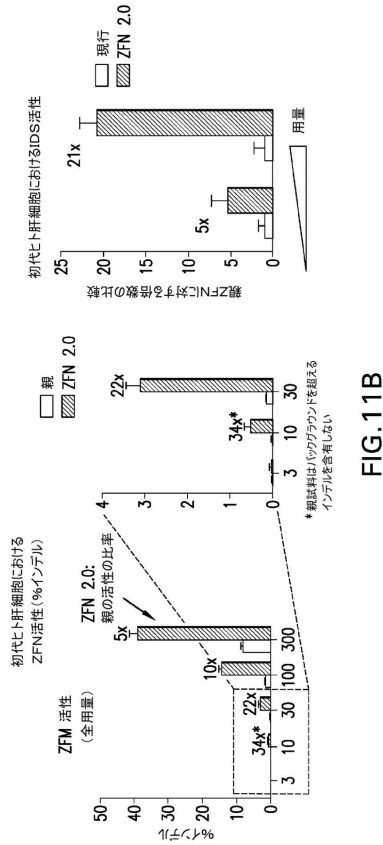
20

30

40

50

【図 1 1 B】



【図 1 1 C】

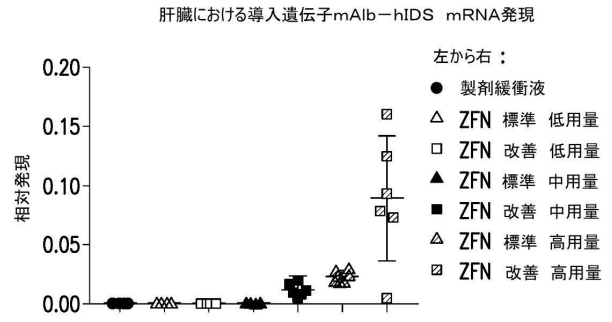


FIG.11C

【図 1 2】

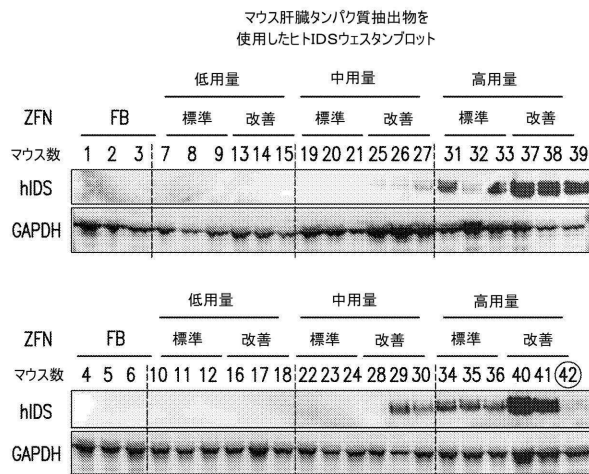


FIG.12

【図 1 3】

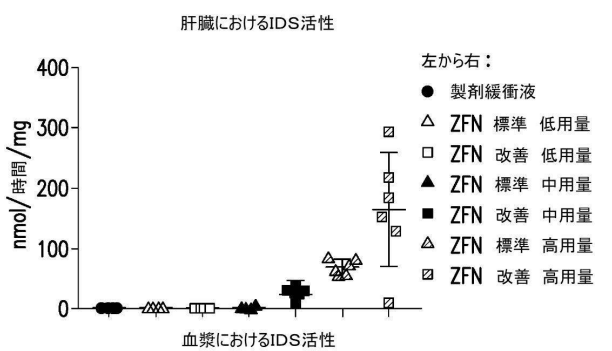


FIG.13

10

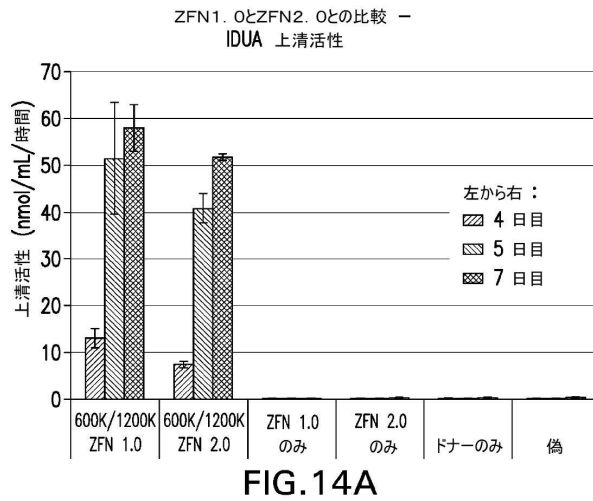
20

30

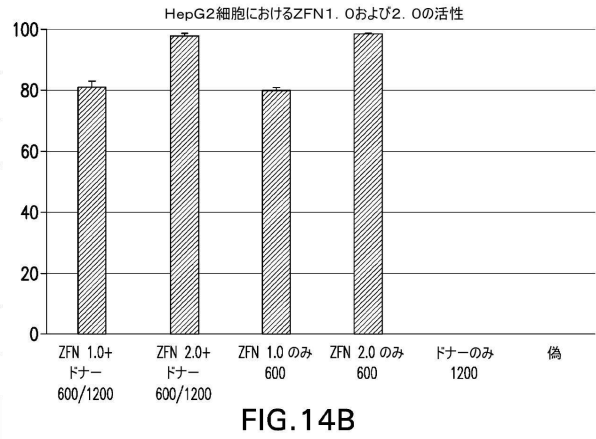
40

50

【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



【配列表】

0007275152000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/56	(2006.01)	C 1 2 N	15/56	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	38/47	(2006.01)	A 6 1 K	38/47	
A 6 1 K	38/46	(2006.01)	A 6 1 K	38/46	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/758,786

(32)優先日 平成30年11月12日(2018.11.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/795,937

(32)優先日 平成31年1月23日(2019.1.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/802,092

(32)優先日 平成31年2月6日(2019.2.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ディケルバー, ラッセル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005, ブリスベン, マリーナ ブールバード 7000,
 サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 クリベガ, アイバン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005, ブリスベン, マリーナ ブールバード 7000,
 サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ミラー, ジェフリー シー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005, ブリスベン, マリーナ ブールバード 7000,
 サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ジャン, レイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005, ブリスベン, マリーナ ブールバード 7000,
 サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 特表2017-504354 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90
 A 6 1 K 35/00-35/768
 C 1 2 N 1/00- 7/08
 C 1 2 N 9/00- 9/99
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 38/00-38/58
 GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq