

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-502085

(P2021-502085A)

(43) 公表日 令和3年1月28日(2021.1.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/85 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/85 Z N A Z	4 B O 5 O
<b>C 1 2 N 15/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/12	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/13	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/62 Z	4 H O 4 5
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/09 1 O O	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-524903 (P2020-524903)  
 (86) (22) 出願日 平成30年11月9日 (2018.11.9)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年7月2日 (2020.7.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/060038  
 (87) 国際公開番号 W02019/094725  
 (87) 国際公開日 令和1年5月16日 (2019.5.16)  
 (31) 優先権主張番号 62/583,724  
 (32) 優先日 平成29年11月9日 (2017.11.9)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/716,002  
 (32) 優先日 平成30年8月8日 (2018.8.8)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

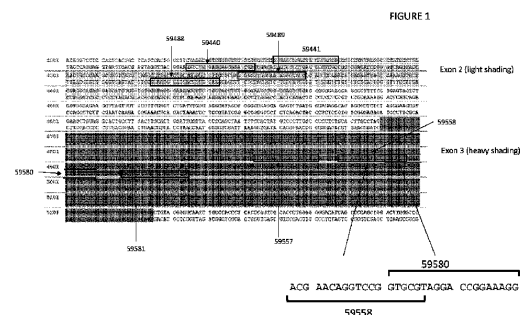
(71) 出願人 508241200  
 サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94005 ブリスベン マリーナ プールバード 7000  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質 (C I S H) 遺伝子の遺伝子改変

## (57) 【要約】

本開示は、ゲノム工学、特に、C I S H遺伝子の標的化された遺伝子改変の分野にある。一局面では、内在性C I S H遺伝子のエクソン2またはエクソン3内にゲノム改変を含む、遺伝子改変された細胞が提供される。別の局面では、上記ゲノム改変は、挿入および/または欠失からなる群より選択される。別の局面では、上記C I S H遺伝子に1個または複数の導入遺伝子が組み込まれている。別の局面では、上記導入遺伝子は、キメラ抗原受容体 (C A R)、免疫調節因子、操作されたまたは外因性のT細胞受容体 (T C R) をコードする。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

内在性 C I S H 遺伝子のエクソン 2 またはエクソン 3 内にゲノム改変を含む、遺伝子改変された細胞。

## 【請求項 2】

前記ゲノム改変が、挿入および/または欠失からなる群より選択される、請求項 1 に記載の遺伝子改変された細胞。

## 【請求項 3】

前記 C I S H 遺伝子に 1 個または複数の導入遺伝子が組み込まれている、請求項 1 または請求項 2 に記載の遺伝子改変された細胞。

10

## 【請求項 4】

前記導入遺伝子が、キメラ抗原受容体 ( C A R )、免疫調節因子、操作されたまたは外因性の T 細胞受容体 ( T C R ) をコードする、請求項 3 に記載の遺伝子改変された細胞。

## 【請求項 5】

前記操作された T C R が、抗体結合 T 細胞受容体 ( A C T R ) である、請求項 4 に記載の遺伝子改変された細胞。

## 【請求項 6】

C I S H 遺伝子が、ヌクレアーゼによる切断後に改変されている、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞。

20

## 【請求項 7】

前記ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、T A L E N および/または C R I S P R / C a s ヌクレアーゼ系からなる群より選択される、請求項 6 に記載の遺伝子改変された細胞。

## 【請求項 8】

前記ヌクレアーゼが、表 2 に示す標的部位に結合する D N A 結合ドメインを含む、請求項 6 または請求項 7 に記載の遺伝子改変された細胞。

## 【請求項 9】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼが、認識ヘリックスを含む 4、5 または 6 個のジンクフィンガードメインを含むジンクフィンガータンパク質を含み、さらに、前記ジンクフィンガータンパク質が、S B S # 5 9 4 8 8、S B S # 5 9 4 8 9、S B S # 5 9 4 4 0、S B S # 5 9 4 4 1、S B S # 5 9 5 5 8、S B S # 5 9 5 5 7、S B S # 5 9 5 8 1 または S B S # 5 9 5 8 0 と命名されたタンパク質の認識ヘリックス領域を含む、請求項 7 または請求項 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

30

## 【請求項 10】

造血幹細胞、エフェクター T 細胞および調節性 T 細胞からなる群より選択される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞、またはその後代である細胞。

## 【請求項 11】

認識ヘリックス領域をそれぞれ含む 6 個のジンクフィンガードメインを含むジンクフィンガータンパク質であって、S B S # 5 9 4 8 8、S B S # 5 9 4 8 9、S B S # 5 9 4 4 0、S B S # 5 9 4 4 1、S B S # 5 9 5 5 8、S B S # 5 9 5 5 7、S B S # 5 9 5 8 1 または S B S # 5 9 5 8 0 と命名されたタンパク質の認識ヘリックス領域を含むジンクフィンガータンパク質。

40

## 【請求項 12】

請求項 11 に記載のジンクフィンガータンパク質と、野生型のもしくは操作された切断ドメインまたは野生型のもしくは操作された切断ハーフトドメインとを含む融合タンパク質。

## 【請求項 13】

請求項 11 または請求項 12 に記載の 1 種または複数のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 14】

50

請求項 1 1 もしくは請求項 1 2 に記載の 1 種もしくは複数のタンパク質、および / または請求項 1 3 に記載の 1 種もしくは複数のポリヌクレオチドを含む、単離された細胞。

【請求項 1 5】

エフェクター T 細胞、調節性 T 細胞および造血幹細胞からなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の単離された細胞、またはその後代である細胞。

【請求項 1 6】

請求項 1 1 もしくは請求項 1 2 に記載の 1 種もしくは複数のタンパク質、請求項 1 3 に記載の 1 種もしくは複数のポリヌクレオチド、および / または請求項 1 4 もしくは請求項 1 5 に記載の 1 種もしくは複数の単離された細胞を含む、キット。

【請求項 1 7】

請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞を生成する方法であって、前記細胞に、C I S H 遺伝子のエクソン 2 またはエクソン 3 における標的部位に結合する DNA 結合ドメインを含む 1 種または複数のヌクレアーゼをコードする、1 種または複数のポリヌクレオチドを導入するステップを含み、前記ヌクレアーゼが、前記 C I S H 遺伝子に結合し、これを切断し、これにより、前記細胞を遺伝子改変する、方法。

【請求項 1 8】

前記遺伝子改変された細胞が、前記 C I S H 遺伝子に組み込まれ、前記細胞において発現される導入遺伝子を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

タンパク質を必要とする被験体に前記タンパク質を提供する方法であって、請求項 3 から 1 5 のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞を投与するステップを含み、前記細胞が、前記被験体において導入遺伝子を発現する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2017 年 11 月 9 日に出願された米国特許仮出願第 62 / 583, 724 号、および 2018 年 8 月 8 日に出願された米国特許仮出願第 62 / 716, 002 号の利益を主張し、これらの出願の開示全体を、参照により本明細書に組み込む。

【0002】

本開示は、ゲノム工学、特に、サイトカイン誘導性 SH2 含有タンパク質 (C I S H または C I S) 遺伝子の標的化された改変の分野にある。

【背景技術】

【0003】

細胞は、直接的接触により、または細胞外空間に分子「メッセージ」を放出することにより、互いに情報伝達して、適切な細胞表面受容体複合体を発現する標的細胞における増殖、遊走、分化を協調させ、遺伝子発現の変化に影響を与える。多くのサイトカインおよび増殖因子に関して、受容体結合は、J A K / S T A T シグナル伝達経路によって標的細胞内にシグナルトランスダクションを惹起する。例えば、A a r o n s o n , e t a l . ( 2 0 0 2 ) S c i e n c e 2 9 6 ( 5 5 7 3 ) : 1 6 5 3 - 5 ; R a w l i n g s , e t a l . ( 2 0 0 4 ) J C e l l S c i 1 1 7 ( P t 8 ) : 1 2 8 1 - 3 ; および J a t i a n i , e t a l . ( 2 0 1 0 ) G e n e s C a n c e r 1 ( 1 0 ) : 9 7 9 - 9 3 を参照されたい。リガンドの非存在下では、受容体の細胞質末端は、ヤヌスチロシンキナーゼファミリーの不活性メンバー ( J A K 1 ~ 3 または T y k 2 ) と会合する。リガンド結合は、2 個またはそれよりも多い受容体サブユニットの間の受容体複合体の形成を誘導し、J A K タンパク質を極めて接近させ、トランスリン酸化を介した活性化を可能にする。次に、活性化された J A K は、受容体の細胞質ドメインにおけるチロシン残基をリン酸化して、シグナル伝達性転写因子 ( S T A T ) タンパク質のうち 1 種のための結合部位を作製することができる。

【0004】

10

20

30

40

50

哺乳動物には7種のSTATタンパク質、STAT1~4、STAT5a、STAT5bおよびSTAT6が存在する。各STATタンパク質の構造内には、受容体におけるホスチロシン含有部位への結合を方向付けるSrc相同性-2(SH2)ドメイン(Sadowski, et al. (1986) Mol Cell Biol 6(12): 4396-408を参照)があり、当該部位において、STATタンパク質は、それ自身がJAKキナーゼによってチロシンリン酸化され得る。リン酸化されると、STATタンパク質は、ホモまたはヘテロ二量体を形成し、核に輸送され、核内で、DNAに結合し、近傍遺伝子の転写を刺激する。JAK/STAT経路は、成長、細胞増殖および免疫応答の調節において鍵となる役割を果たすため、この系の調節不全は、がんまたは炎症性疾患の発症に寄与し得る。

10

#### 【0005】

STAT活性化は、細胞内タンパク質のサイトカインシグナル抑制因子(SOCS)およびサイトカイン誘導SH2(CISH)ドメイン含有ファミリーをコードする遺伝子のセットの発現を急速に誘導する。例えば、Palmer, et al. (2009) 30(12): 592-602; Yoshimura, et al. (2007) Nat Rev Immunol 7(6): 454-65; Trengove, et al. (2013) Am J Clin Exp Immunol 2(1): 1-29を参照されたい。SOCS/CISHタンパク質は、可変的な配列および機能のN末端ドメインと、それに続くSH2ドメインおよびC末端SOCSドメインを含有し、このSOCSドメインは、標的タンパク質をユビキチンで標識するE3ユビキチンリガーゼ複合体のアセンブリを方向付け、プロテアソームによる分解のために標的タンパク質をマークする。SOCS/CISHタンパク質は、受容体におけるホスチロシン部位への結合に関してSTATと競合し、これにより、STAT活性化を阻害することにより、また、様々なタンパク質におけるユビキチン沈着を方向付け、そのターンオーバーを増強することにより、JAK/STATシグナル伝達を阻害する。よって、SOCS/CISHタンパク質は、サイトカインおよび増殖因子シグナル伝達をモジュレートし、リガンドがもはや存在しない場合にシグナルの減衰を増強するための古典的な負のフィードバックループを確立する。一部のSOCSタンパク質は、JAKの直接的阻害、および他のSOCSタンパク質のターンオーバーの増強等、追加的な活性を有し、受容体シグナルトランスダクションの調節に関するさらなる複雑さに寄与する。Kershaw, et al. (2013) Biochem Soc Trans. 41(4): 1042-7を参照されたい。

20

30

#### 【0006】

CISH(CISとしても公知)は、エリスロポエチン(EPO)受容体(EPOR)におけるリガンド結合後に急速に誘導される(30分以内)遺伝子として同定された最初のSOCSタンパク質であった。Yoshimura, et al. (1995) EMBO J 14(12): 2816-26を参照されたい。CISH発現は、適切な細胞型において、インターロイキン-2(IL-2)、IL-3および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によっても誘導された。免疫沈降解析は、CISHタンパク質が、IL-3Rベータ鎖およびEPORに安定して結合したが、これはリガンド結合後のみであることを実証し、受容体のチロシンリン酸化が要求されたことを示唆する。CISHタンパク質の過剰発現は、細胞成長を抑制し、CISHが、シグナルトランスダクションに負の効果をもたらし、その結果、CISH発現は、STAT5活性化に依存性であることが示され、いくつかのSTAT5結合部位が、CISHプロモーター領域において見出された。Matsumoto, et al. (1997) Blood 89(9): 3148-54を参照されたい。さらに、CISHは、STAT5のEPO依存性活性化を阻害し、他のSTAT5依存性受容体の活性を抑制し、CISHが、STAT5のためのフィードバックモジュレーターであることを示す。

40

#### 【0007】

多種多様なSTAT5依存性受容体が、CISH発現を誘導し、これは、成長ホルモン

50

(GH)、プロラクチン(PRL)、トロンボポエチン(TPO)、レプチン、IL-2、IL-5およびIL-9を含む(ただし、これらに限定されない)。Bhattacharya, et al. (2001) Am J Respir Cell Mol Biol 24(3):312-6を参照されたい。CISHは、GH受容体(GHR)、PRL受容体およびIL-2受容体ベータ鎖に結合し、それから生じるシグナル伝達を阻害し、GHRの内部移行および非活性化を促進することが示された。Ram, et al. (1999) Biol Chem 274(50):35553-61; Endo, et al. (2003) J Biochem 133(1):109-13; Aman, et al. (1999) J Biol Chem 274(42):30266-72; Landsman, et al. (2005) J Biol Chem 280(45):37471-80を参照されたい。Cish mRNAの発現は、いくつかの組織(肝臓、腎臓、心臓、胃、肺、卵巣および骨格筋)において見出される。Palmer, et al. (2009) 30(12):592-602; Anderson, et al. (2009) 138(3):537-44; Clasen, et al. (2013) J Lipid Res 54(7):1988-97を参照されたい。非常に多くの重要なサイトカインおよび増殖因子のシグナル伝達装置におけるその明らかな関与にもかかわらず、Cishノックアウトマウスは、欠損が最小であった(免疫応答の僅かな変化を除いて)。Palmer, et al. (2009) Trends Immunol 30(12):592-602; Trengove, et al. (2013) Am J Clin Exp Immunol 2(1):1-29を参照されたい。これは、他のSOCSファミリータンパク質の代償的な活性によって起こる可能性がある。推定標的遺伝子の生物学に対するCISHの効果が、ベータ-アクチンプロモーターから駆動されたCishを構成的に発現するトランスジェニックマウスにおいて観察された。このようなマウスは、Stat5aおよび/またはStat5b欠乏マウスに似た表現型である、低下した体重、乳腺発達の欠損、ならびに低下した数のガンマ/デルタT細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞およびNKT細胞を有した。Matsumoto, et al. (1999) Mol Cell Biol 19(9):6396-407を参照されたい。

#### 【0008】

CISHは、多くのサイトカインおよび増殖因子によるシグナル伝達に潜在的に影響を与えるため、CISH活性およびバリエーションが、感染性疾患およびがんに関連すると判明したことは、驚くには当たらない。いくつかの研究は、ある特定のCISH多型を保有する被験体における、マラリア、レプトスピラ症、B型肝炎ウイルスおよび結核を含む、様々な感染病原体に対する易罹患性増加を示した。Khor, et al. (2010) N Engl J Med 362(22):2092-101; Esteves, et al. (2014) PLoS One 9(9):e108534; Hu, et al. (2014) PLoS One 9(6):e100826; Tong, et al. (2012) Immunogenetics 64(4):261-5; Ji, et al. (2014) Infect Genet Evol 28:240-4; Sun, et al. (2014) PLoS 9(3):e92020を参照されたい。全研究に共通した1種のリスク対立遺伝子(rs414171、転写開始から-292)は、代替対立遺伝子(alternate allele)と比較して、末梢血単核細胞におけるより低いレベルのCISH発現を呈した。Khor and Sun、上記参照を参照されたい。乳がんにおいて、CISHの発現レベルは、正常組織と比較して、乳癌およびがん細胞系において上昇し、CISHが、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)を活性化するその能力により腫瘍形成に寄与し得るという推測を導いた。Raccurt, et al. (2003) Br. J. Cancer 89(3):524-32。CISHバリエーションは、乳牛における乳汁産生形質にも関連する。Arun, et al. (2015) Front Genet 6:342を参照されたい。

## 【0009】

T細胞は、T細胞受容体(TCR)を介して刺激に応答する際に、古典的なJAK/S  
TATシグナル伝達経路を利用しないが、T細胞が、CD3に対する抗体によって活性化  
されると、Cish発現は、急速に誘導される(30分以内)。Ji、上記参照; Chen,  
et al. (2003) Int Immunol 15(3): 403-9  
; Palmer, et al. (2015) J Exp Med 212(12)  
: 2095-113; Yang, et al. (2013) Nat Immunol  
14(7): 732-40を参照されたい。STAT5は、おそらく、TCR関連リ  
ンパ球特異的プロテインチロシンキナーゼ(Lck)によって、TCR刺激後に急速にリン  
酸化される。Welte, et al. (1999) Science 283(10): 5399  
: 222-5を参照されたい。IL-2発現も、TCR刺激によって誘導され  
るが、これは、Cish誘導を説明するには遅すぎる動態である。Yang, et  
al.、上記参照; Li, et al. (2000) J Exp Med 191  
(6): 985-94を参照されたい。In vivoでは、Cish発現は、抗原ナイ  
ーブT細胞において低かったが、ワクチン接種後に収集された抗原を経験したセントラル  
メモリー(TCM)およびエフェクターメモリー(TEM)CD8+T細胞において漸進  
的に増加した。Sallusto, et al. (1999) Nature 401(6754): 708-12を参照されたい。

10

## 【0010】

T細胞応答性におけるCishの役割も試験された。CD4プロモーターからのin  
vivoでのCishのトランスジェニック発現は、CD4+ヘルパーT細胞区画におけ  
る構成的発現を有するマウスを生成した。Li, et al.、上記参照を参照されたい。  
循環T細胞亜集団は、影響されなかったが、予想される抑制された応答性の代わりに  
、CD4+T細胞は、in vitroにおいて、高められたTCR誘導性増殖およびサイ  
トカイン発現ならびに増加した生存を呈した。循環T細胞集団も、Cishノックアウト  
マウスにおいて正常であったが、やはり、TCR刺激に対する増強された応答(増殖お  
よびサイトカイン産生)が、CD4+およびCD8+T細胞サブセットの両方においてin  
vitroで観察された。Palmer and Yang、上記参照を参照されたい。Cishトランス  
ジェニックマウスにおけるCD4+T細胞の増強された応答性は、Cishおよびプロ  
テインキナーゼCシートの間の相互作用に起因した一方、CishによるCD8+T細胞  
活性の阻害は、ホスホリパーゼC-ガンマ1の分解増強に起因したため、Cish作用  
の分子基盤も不明確であった。

20

30

## 【0011】

Cish欠乏マウスにおける増強されたT細胞活性の帰結の1つは、黒色腫モデルにお  
ける確立された腫瘍に対する、養子移入された抗原特異的CD8+T細胞の、耐久性があ  
り、より攻撃的な応答であった。Palmer、上記参照を参照されたい。加えて、ヒト  
T細胞におけるCISH発現の低下は、共形質導入された腫瘍特異的TCRの機能性を増  
強した。これらのデータは、TCRシグナル伝達を抑える負のフィードバック活性の一部  
の軽減が、腫瘍に対するより強力な免疫反応性を産生し得ることを示唆する。しかし、マ  
ウスモデルにおける増加した抗黒色腫活性は、より大きい眼性自己免疫に関連した。同様  
に、Cish欠乏マウスの他の系統において大きな発生上の欠損がなかったとしても、TH2  
およびTH9 CD4+T細胞サブセットの増強された発生に明らかに起因する、年長  
の動物(>6ヶ月)における自発性肺疾患が発症した。これらの研究は、免疫調節に伴  
う共通の課題を説明する; 過大な抑制は、患者を、感染および腫瘍発症に対して脆弱なま  
まにし、過大な刺激は、自己免疫または慢性炎症性疾患をもたらし得る。

40

## 【0012】

ジンクフィンガータンパク質(「ZFP」)またはTALエフェクタードメイン(「T  
ALE」)由来のDNA結合ドメインを含む組換え転写因子、ならびに標的DNA部位に  
特異的に結合するように全て設計された、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(「ZFN」)  
、TALEN、CRISPR/Casヌクレアーゼ系およびホーミングエンドヌクレアー

50

ゼを含む操作されたヌクレアーゼは、内在性遺伝子の遺伝子発現を調節する能力を有し、ゲノム工学、遺伝子療法、ならびにがんおよび炎症等の障害の処置において有用である。例えば、その開示全体があらゆる目的のために参照により組み込まれる、米国特許第9,877,988号；同第9,394,545号；同第9,150,847号；同第9,206,404号；同第9,045,763号；同第9,005,973号；同第8,956,828号；同第8,936,936号；同第8,945,868号；同第8,871,905号；同第8,586,526号；同第8,563,314号；同第8,329,986号；同第8,399,218号；同第6,534,261号；同第6,599,692号；同第6,503,717号；同第6,689,558号；同第7,067,317号；同第7,262,054号；同第7,888,121号；同第7,972,854号；同第7,914,796号；同第7,951,925号；同第8,110,379号；同第8,409,861号；米国特許出願公開第2003/0232410号；同第2005/0208489号；同第2005/0026157号；同第2005/0064474号；同第2006/0063231号；同第2008/0159996号；同第2010/0218264号；同第2012/0017290号；同第2011/0265198号；同第2013/0137104号；同第2013/0122591号；同第2013/0177983号；同第2013/0177960号；および同第2015/0056705号を参照されたい。さらに、ゲノム編集および遺伝子療法における使用のための潜在性を有することもできる、アルゴノート系（例えば、「TtAgo」として公知の、*T. thermophilus* 由来、Swarts, et al. (2014) *Nature* 507(7491): 258-261を参照されたい)に基づく標的化ヌクレアーゼが開発中である。

ヌクレアーゼ媒介性遺伝子療法を使用して、1種もしくは複数の不活性化された遺伝子を有するように、および/または細胞に、当該細胞において以前に産生されたことがない産物を発現させるように（例えば、導入遺伝子挿入により、および/または内在性配列の補正により）、細胞を遺伝子操作することができる。導入遺伝子挿入の使用の例として、1種もしくは複数の新規治療タンパク質をコードする1種もしくは複数の遺伝子の挿入、細胞もしくは個体において欠如しているタンパク質をコードするコード配列の挿入、変異した遺伝子配列を含有する細胞における野生型遺伝子の挿入、および/またはshRNAもしくはsiRNA等の構造的核酸をコードする配列の挿入が挙げられる。内在性遺伝子配列の「補正」の有用な適用の例として、疾患関連遺伝子変異の変更、スプライス部位をコードする配列における変更、調節性配列における変更、およびタンパク質の構造的特徴をコードする配列の標的化された変更が挙げられる。相同組換え修復(HDR)、または非相同末端結合(NHEJ)駆動過程における末端捕捉のいずれかによって、導入遺伝子構築物を挿入することができる。例えば、米国特許第9,045,763号；同第9,005,973号；同第7,888,121号；および同第8,703,489号を参照されたい。

これらの操作された転写因子およびヌクレアーゼを使用した臨床試験は、これらの分子が、がん、HIVおよび/または血液障害（異常ヘモグロビン症および/または血友病等）を含む様々な状態を処置することができることを示した。例えば、Yu, et al. (2006) *FASEB J.* 20:479-481; Tebas, et al. (2014) *New Eng J Med* 370(10):901を参照されたい。よって、これらのアプローチは、疾患の処置に使用することができる。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0013】

【特許文献1】米国特許第9,045,763号明細書

【特許文献2】米国特許第9,005,973号明細書

【特許文献3】米国特許第7,888,121号明細書

【特許文献4】米国特許第8,703,489号明細書

10

20

30

40

50

## 【非特許文献】

## 【0014】

【非特許文献1】Yuら、FASEB J. (2006) 20: 479~481

【非特許文献2】Tebasら、New Eng J Med (2014) 370 (10): 901

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0015】

しかし、依然として、CISH調節が所望されるがん、炎症性障害および他の疾患の処置および/または予防のための、CISH遺伝子補正およびドナー送達のための追加的な方法および組成物の必要がある。

10

## 【0016】

本発明は、遺伝子療法およびゲノム工学における使用のための組成物および方法について記載する。具体的には、記載されている方法および組成物は、内在性CISH遺伝子(変異体または野生型)のヌクレアーゼ媒介性ゲノム改変(例えば、1個または複数の挿入および/または欠失)に関する。ゲノム改変(複数可)は、標的遺伝子を不活性化(例えば、ヌクレアーゼによる遺伝子の切断後のNHEJによる)挿入および/または欠失(「インデル」);例えば、がんもしくは炎症性状態を有する被験体において欠如もしくは欠乏しているタンパク質の、タンパク質コード配列を含む導入遺伝子(ドナー)の標的化された挿入、および/または補正用ドナー(例えば、変異体遺伝子を有する細胞における機能的CISHを回復させる配列)、キメラ抗原受容体(CAR)、および/またはHLA複合体の1種もしくは複数の構成成分もしくは調節因子またはそれを含む融合タンパク質(例えば、B2M-HLA-EまたはB2M-HLA-G融合タンパク質)の標的化された挿入を含むことができる。遺伝子改変および/またはこのような改変を含む細胞は、ex vivoまたはin vivo方法において使用することができる。

20

## 【0017】

ある特定の態様では、内在性CISH遺伝子のエクソン2またはエクソン3内にゲノム改変を含む、遺伝子改変された細胞が、本明細書に提供される。このような遺伝子改変された細胞の集団も提供される。ゲノム改変は、1個または複数の挿入および/または欠失(インデル)、および/またはCISH遺伝子への1個または複数の導入遺伝子の組み込み(例えば、導入遺伝子は、キメラ抗原受容体(CAR)、免疫調節因子(例えば、PD1、CTLA-4等)、操作されたまたは外因性のT細胞受容体(TCR)(例えば、抗体結合T細胞受容体(ACTR)をコードする)を含むことができる。ある特定の態様では、CISH遺伝子は、ヌクレアーゼ(例えば、1種もしくは複数のジンクフィンガーヌクレアーゼ、1種もしくは複数のTALENおよび/または1種もしくは複数のCRISPR/Casヌクレアーゼ系)による切断後に改変される。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、表2に示す標的部位に結合するDNA結合ドメイン、例えば、SBS#59488、SBS#59489、SBS#59440、SBS#59441、SBS#59558、SBS#59557、SBS#59581またはSBS#59580と命名されたタンパク質の認識ヘリックス領域を含むジンクフィンガータンパク質等、認識ヘリックスを含む4、5または6個のジンクフィンガードメインを含むジンクフィンガータンパク質を含むジンクフィンガーヌクレアーゼを含む。本明細書に記載されている細胞のいずれかの後代である遺伝子改変された細胞(および斯かる細胞の集団)も提供される。一部の実施形態では、細胞は、造血幹細胞、エフェクターT細胞および調節性T細胞からなる群より選択される。

30

40

## 【0018】

他の態様では、認識ヘリックス領域をそれぞれ含む6個のジンクフィンガードメインを含む、ジンクフィンガータンパク質であって、SBS#59488、SBS#59489、SBS#59440、SBS#59441、SBS#59558、SBS#59557、SBS#59581またはSBS#59580と命名されたタンパク質の認識ヘリックス

50



ス領域を含むジンクフィンガータンパク質が、本明細書に提供される。野生型のまたは操作された切断ドメインまたは切断ハーフトドメインとジンクフィンガータンパク質との融合を含む、本明細書に記載されているジンクフィンガータンパク質のいずれかを含む融合タンパク質も提供される。本明細書に記載されているZFPおよび/または融合タンパク質のうち1種または複数をコードする1種または複数のポリヌクレオチドも提供される。タンパク質(例えば、ZFPまたは融合タンパク質)のうち1種もしくはは複数をおよび/またはそのようなタンパク質をコードするポリヌクレオチドのうち1種もしくはは複数をを含む、単離された細胞(例えば、エフェクターT細胞、調節性T細胞および/または造血幹細胞)も提供される。本明細書に記載されているタンパク質のうち1種もしくはは複数、ポリヌクレオチドのうち1種もしくはは複数、および/または1種もしくはは複数の単離された細胞を含むキットも提供される。

10

#### 【0019】

他の態様では、本発明は、本明細書に記載されている遺伝子改変された細胞を生成する方法であって、CISH遺伝子のエクソン2またはエクソン3における標的部位に結合するDNA結合ドメインを含む1種または複数のヌクレアーゼをコードする、1種または複数のポリヌクレオチドを細胞に導入するステップを含み、ヌクレアーゼが、CISH遺伝子に結合し、これを切断し、これにより、細胞を遺伝子改変する、方法を提供する。ある特定の実施形態では、遺伝子改変された細胞は、CISH遺伝子に組み込まれ、細胞において発現される、導入遺伝子を含む。それを必要とする被験体にタンパク質を提供する方法であって、本明細書に記載されている遺伝子改変された細胞を投与するステップを含み、細胞が、被験体において導入遺伝子(例えば、CAR、免疫調節因子および/またはACR等)を発現する、方法も提供される。

20

#### 【0020】

一態様では、1種または複数のヌクレアーゼを使用した、CISH遺伝子の標的化された改変のための方法および組成物が、本明細書に開示されている。ヌクレアーゼ、例えば、操作されたメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)(用語「1つのZFN」は、1対のZFNを含む)、TALE-ヌクレアーゼ(制限エンドヌクレアーゼおよび/またはメガヌクレアーゼ由来のヌクレアーゼドメインとTALEエフェクタードメインとの融合を含むTALEN(メガTALEおよびコンパクトTALEN等)(用語「1つのTALEN」は、1対のTALENを含む)、Ttago系および/またはCRISPR/Casヌクレアーゼ系が、細胞におけるCISH遺伝子の遺伝子座におけるDNAの切断に使用される。CISH遺伝子は、切断後に(例えば、挿入および/または欠失(「インデル」)による)、および/またはドナー導入遺伝子の標的化された挿入によって、不活性化することができる。ドナー導入遺伝子は、相同組換え修復(HDR)または非同源性修復機構(例えば、NHEJドナー捕捉)により挿入することができる。本明細書に記載されているヌクレアーゼは、標的DNAに二本鎖切断(DSB)または一本鎖切断(ニック)を誘導することができる。一部の実施形態では、2種のニッカーゼが、2個のニックを導入することにより、DSBの作製に使用される。一部の事例では、ニッカーゼは、ZFNであるが、他の事例では、ニッカーゼは、TALENまたはCRISPR/Casニッカーゼである。本明細書に記載されているヌクレアーゼ(例えば、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas等)のいずれも、CISH遺伝子のイントロンおよび/またはエクソン(例えば、エクソン2または3)(重複するイントロンおよびエクソンの配列を含む)、例えば、表2に示す配列の9~20個またはそれよりも多い(9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれよりも多い)近接または非近接アミノ酸を含む標的部位を含む、例えば、表2に示す標的配列を標的とすることができる。

30

40

#### 【0021】

一態様では、ゲノム内のCISH遺伝子における標的部位に結合する、天然に存在しないジンクフィンガータンパク質(ZFP)であって、1種または複数の操作されたジンクフィンガー結合ドメインを含むZFPが、本明細書に記載されている。一実施形態では、

50

ZFPは、目的の標的ゲノム領域を切断するジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）であり、ZFNは、1種または複数の操作されたジンクフィンガー結合ドメイン、およびヌクレアーゼ切断ドメインまたは切断ハーフドメインを含む。切断ドメインおよび切断ハーフドメインは、例えば、様々な制限エンドヌクレアーゼおよび/またはホーミングエンドヌクレアーゼから得ることができ、野生型であり得るまたは操作されたものであり得る（変異体）。一実施形態では、切断ハーフドメインは、IIS型制限エンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）に由来する。ある特定の実施形態では、ジンクフィンガータンパク質のジンクフィンガードメインは、表1の単一の行に示す通りに順序付けられた認識ヘリックスドメインを有する。このようなジンクフィンガータンパク質を含むヌクレアーゼは、いずれかのリンカー配列（例えば、これを切断ドメインに連結する）およびいずれかの切断ドメイン（例えば、ELD変異体等の二量体形成変異体；416、422、447、448および/または525のうち1種または複数に変異を有するFokIドメイン；および/またはニッカーゼ機能性をもたらす触媒ドメイン変異体）を含むことができる。例えば、米国特許第8,703,489号；同第9,200,266号；同第8,623,618号；および同第7,914,796号；ならびに米国特許出願公開第2018/0087072号を参照されたい。ある特定の実施形態では、ZFNのZFPは、表2に示す配列（配列番号40～47）内の9～18個またはそれよりも多いヌクレオチドの標的部位に結合する。

10

#### 【0022】

別の態様では、ゲノム内のCISH遺伝子における標的部位（例えば、表2に示す標的配列、配列番号40～47の少なくとも9または12個の（例えば、9～20個またはそれよりも多い）ヌクレオチドを含む標的部位）に結合する転写活性化因子様エフェクター（TALE）タンパク質であって、TALEが、1個または複数の操作されたTALE結合ドメインを含む、TALEタンパク質が本明細書に記載されている。一実施形態では、TALEは、目的の標的ゲノム領域を切断するヌクレアーゼ（TALEN）であり、TALENは、1個または複数の操作されたTALE DNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ切断ドメインまたは切断ハーフドメインを含む。切断ドメインおよび切断ハーフドメインは、例えば、様々な制限エンドヌクレアーゼおよび/またはホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）から得ることができる。一実施形態では、切断ハーフドメインは、IIS型制限エンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）に由来する。他の実施形態では、切断ドメインは、メガヌクレアーゼに由来し、このメガヌクレアーゼドメインは、DNA結合機能性を示すこともできる。

20

30

#### 【0023】

別の態様では、ゲノム内のCISH遺伝子における標的部位に結合するCRISPR/Cas系であって、1個または複数の操作されたシングルガイドRNAまたは機能的等価物、およびCas9ヌクレアーゼを含むCRISPR/Cas系が本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、シングルガイドRNA（sgRNA）は、表2に示す標的部位（配列番号40～47）の9、12個またはそれよりも多い近接ヌクレオチドを含む配列に結合する。

40

#### 【0024】

本明細書に記載されているヌクレアーゼ（例えば、ZFN、CRISPR/Cas系、Ttagoおよび/またはTALEN）は、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等、CISH遺伝子内もしくはこれに隣接するコードまたは非コード領域における、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内の、目的の領域に結合することができるおよび/またはこれを切断することができる。

#### 【0025】

別の態様では、1種または複数のヌクレアーゼ（例えば、本明細書に記載されているZFN、CRISPR/Cas系、Ttagoおよび/またはTALEN）をコードするポリヌクレオチドが本明細書に記載されている。ポリヌクレオチドは、例えば、mRNAとすることができる。一部の態様では、mRNAは、化学的に改変されてよい（例えば

50

、Kormann, et al. (2011) Nature Biotechnology 29(2):154-157を参照)。

【0026】

別の態様では、プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載されている1種または複数のヌクレアーゼ(例えば、ZFN、CRISPR/Cas系、Tagoおよび/またはTALEN)をコードするポリヌクレオチドを含む、ZFN、CRISPR/Cas系、Tagoおよび/またはTALEN発現ベクターが本明細書に記載されている。一実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクター(例えば、AAVベクター)である。一態様では、ウイルスベクターは、組織特異的親和性を示す。

【0027】

別の態様では、1種または複数のヌクレアーゼ(例えば、ZFN、CRISPR/Cas系、Tagoおよび/またはTALEN)発現ベクターを含む宿主細胞が本明細書に記載されている。

【0028】

別の態様では、本明細書に記載されている発現ベクターを含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態では、医薬組成物は、2種以上の発現ベクターを含むことができる。一部の実施形態では、医薬組成物は、第1のポリヌクレオチドを含む第1の発現ベクター、および第2のポリヌクレオチドを含む第2の発現ベクターを含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは、異なる。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは、実質的に同じである。医薬組成物は、ドナー配列(例えば、LSDまたは血友病等の疾患または障害において欠如または欠乏しているタンパク質をコードする導入遺伝子)をさらに含むことができる。一部の実施形態では、ドナー配列は、発現ベクターに付随している。

【0029】

一部の実施形態では、CISH DNA結合ドメイン(例えば、ジンクフィンガータンパク質またはTALEまたはsgRNAまたはメガヌクレアーゼ)、および野生型のまたは操作された切断ドメインまたは切断ハーフドメインを含む、融合タンパク質が提供される。

【0030】

本明細書に記載されているヌクレアーゼは、遺伝子のコード領域内で、または例えば、リーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロン等、遺伝子内もしくはこれに隣接する非コード配列において、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内で、CISH遺伝子に結合することができるおよび/またはこれを切断することができる。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、表2に示すCISH配列内の9~20個またはそれよりも多いヌクレオチドの標的部位に結合する。

【0031】

別の態様では、DNA結合分子(例えば、ZFP、TALE、sgRNA等)およびヌクレアーゼ(切断)ドメインを含むヌクレアーゼを含む、本明細書に記載されているヌクレアーゼ(例えば、ZFN、TALEN、Tagoおよび/またはCRISPR/Cas系)のうち1種または複数を含む組成物が本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせた、1種または複数のヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、組成物は、各セットが異なる特異性を有する、2またはそれよりも多いセット(対)のヌクレアーゼを含む。他の態様では、組成物は、異なる型のヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、組成物は、CISH-ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むが、他の実施形態では、組成物は、CISH-特異的ヌクレアーゼタンパク質を含む。またさらなる実施形態では、組成物は、1種または複数のドナー分子、例えば、そのいずれかの機能的断片を含む機能的CISHタンパク質(複数可)をコードするドナーを含む。好ましい実施形態では、ドナーは、操作されたまたは外因性のT細胞受容体(TCR)遺伝子、ACTR配列をコードする遺伝子、ベータ-2-ミクログロブリン(B2M)遺伝子、および/またはB2MおよびHLA-Eおよび

10

20

30

40

50

／またはH L A - Gを含む融合タンパク質等、キメラ抗原受容体（C A R）および／または他の免疫調節性タンパク質（複数可）をコードする配列を含む。他の態様では、ドナーは、細胞が機能的C I S Hを発現するように、細胞における変異体C I S H遺伝子に組み込まれる補正用配列を含む。

#### 【0032】

別の態様では、本明細書に記載されている1種または複数のヌクレアーゼまたはヌクレアーゼ構成成分（例えば、Z F N、T A L E N、T t A g oまたはC R I S P R / C a s系のヌクレアーゼドメイン）をコードするポリヌクレオチドが本明細書に記載されている。ポリヌクレオチドは、例えば、m R N AまたはD N Aとなることができる。一部の態様では、m R N Aは、化学的に改変されていてよい（例えば、K o r m a n n , e t a l . ( 2 0 1 1 ) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 9 ( 2 ) : 1 5 4 - 1 5 7を参照）。他の態様では、m R N Aは、A R C Aキャップを含むことができる（米国特許第7,074,596号；および同第8,153,773号を参照）。さらなる実施形態では、m R N Aは、未改変および改変ヌクレオチドの混合物を含むことができる（米国特許出願公開第2012/0195936号を参照）。別の態様では、プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載されている1種または複数のZ F N、T A L E N、T t A g oまたはC R I S P R / C a s系をコードするポリヌクレオチドを含むヌクレアーゼ発現ベクターが本明細書に記載されている。一実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクター、例えば、A A Vベクターである。

10

#### 【0033】

別の態様では、本明細書に記載されている1種もしくは複数のヌクレアーゼ、1種もしくは複数のヌクレアーゼ発現ベクター、および／または1種もしくは複数のドナーを含む、宿主細胞が本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、C I S H遺伝子を不活性化する挿入および／または欠失、例えば、ヌクレアーゼによる切断後のN H E J（インデル）による不活性化、または切断後の1個もしくは複数の外因性配列（例えば、導入遺伝子）の挿入による不活性化を含む。ある特定の実施形態では、C I S H特異的ヌクレアーゼによって媒介される外因性配列の組み込みが、C I S Hタンパク質の機能的バージョンを提供するように、宿主細胞は、1種または複数の遺伝子（例えば、C I S H遺伝子）の変異体バージョンを含む。宿主細胞を、1種または複数のヌクレアーゼ発現ベクターにより、安定して形質転換するもしくは一過的にトランスフェクトするまたはこれらの組合せを行うことができる。一実施形態では、宿主細胞は、エフェクターT細胞、調節性T細胞または幹細胞、例えば、造血幹細胞または人工多能性幹細胞である。他の実施形態では、1種または複数のヌクレアーゼ発現ベクターは、宿主細胞において1種または複数のヌクレアーゼを発現する。別の実施形態では、宿主細胞は、外因性ポリヌクレオチドドナー配列（例えば、C I S Hタンパク質をコードする）をさらに含むことができる。本明細書に記載されている実施形態のいずれかにおいて、宿主細胞は、胚細胞、例えば、1種または複数のマウス、ラット、ウサギまたは他の哺乳動物の細胞胚（例えば、非ヒト霊長類）を含むことができる。一部の実施形態では、宿主細胞は、組織を構成する。内在性C I S H遺伝子（例えば、内在性C I S H遺伝子のエクソン2または3）に改変（例えば、組み込まれたドナー配列）を含む、多能性、全能性、複能性または分化した細胞を含む、本明細書に記載されている細胞の後代である細胞または細胞系も記載されている。ある特定の実施形態では、内在性C I S H遺伝子（例えば、内在性C I S Hのエクソン2またはエクソン3）に改変（例えば、組み込まれたドナー配列）を含む、本明細書に記載されている分化した細胞が本明細書に記載されており、この分化した細胞は、本明細書に記載されている幹細胞の後代である。

20

30

40

#### 【0034】

別の態様では、細胞におけるC I S H遺伝子を切断するための方法であって、（a）ヌクレアーゼ（複数可）が発現され、1種または複数のC I S H遺伝子が切断されるような条件下で、1種または複数のC I S H遺伝子を標的とする1種または複数のヌクレアーゼをコードする1種または複数のポリヌクレオチドを細胞に導入するステップを含む方法が

50

本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼによる切断後に、標的CISH遺伝子におけるゲノム配列は、例えば、本明細書に記載されているヌクレアーゼ（またはヌクレアーゼをコードするベクター）を使用して切断され、ドナー配列が細胞において発現されるように、「ドナー」配列は、ZFN、TALEN、TtAgoまたはCRISPR/Cas系による標的化された切断後に遺伝子に挿入される。ドナー配列は、機能的CISHタンパク質をコードすることができる。一部の実施形態では、ドナー配列は、部分的CISH遺伝子配列を含む。好ましい実施形態では、ドナーは、キメラ抗原受容体（CAR）等、免疫調節分子を含む。さらに、ドナー配列は、別々の送達機構（例えば、裸のポリヌクレオチドとしてmRNA形態で、またはLNP送達により送達されるヌクレアーゼ、およびAAV等のウイルスベクターを使用して送達されるドナー）に存在するヌクレアーゼ送達系（例えば、非ウイルスベクター、LNPまたはウイルスベクター）に存在することができる、またはその代わりに、別々のおよび/または異なる核酸送達機構を使用して細胞に導入することができる。CISH遺伝子座へのドナーヌクレオチド配列の挿入は、それぞれ内在性CISH遺伝的制御エレメントの制御下における導入遺伝子の発現をもたらすことができる。一部の態様では、目的の導入遺伝子の挿入は、インタクトな外因性タンパク質配列の発現をもたらす、いかなるCISHコードアミノ酸も欠く。他の態様では、発現される外因性タンパク質は、融合タンパク質であり、導入遺伝子およびCISH遺伝子によってコードされるアミノ酸を含む。一部の事例では、CISH配列は、外因性タンパク質のアミノ（N）末端部分に存在するであろうが、他の事例では、CISH配列は、外因性タンパク質のカルボキシ（C）末端部分に存在するであろう。他の事例では、CISH配列は、外因性タンパク質のNおよびC末端部分の両方に存在するであろう。ドナーは、CISHの発現が回復されるように、CISHタンパク質を発現しない（または正常野生型レベルを下回るレベルで発現する）変異体内在性CISH遺伝子に組み込まれる「補正用」配列となることもできる。

10

20

30

40

50

#### 【0035】

一部の実施形態では、本発明は、*in vivo*でのCISHプロモーターの制御下における導入遺伝子の発現に使用することができる方法および組成物について記載する。一部の態様では、導入遺伝子は、目的の治療タンパク質をコードすることができる。本発明の方法をタンパク質置換えに使用することができるように、導入遺伝子は、タンパク質をコードすることができる。一部の態様では、導入遺伝子は、T細胞応答性をモジュレートし、がんまたは免疫関連状態を処置および/または予防するタンパク質をコードする。

#### 【0036】

一部の実施形態では、導入遺伝子（例えば、CAR、野生型および操作されたTCR、例えば、ACTR）が、CISHのエクソン領域、例えば、エクソン2またはエクソン3に組み込まれるように、ヌクレアーゼ標的および/または切断部位は、CISH遺伝子のエクソンに存在する。導入遺伝子は、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*で別の目的の内在性または外因性プロモーターの制御下に置くことができ、この外因性プロモーターは、導入遺伝子の発現を駆動する。よって、（内在性または外因性プロモーターから）発現された導入遺伝子を含む本明細書における遺伝子改変された細胞は、細胞培養における（導入遺伝子からの）タンパク質（このタンパク質は単離することができる）の産生のための*in vitro*方法において、またはそれを必要とする被験体にタンパク質を提供する（例えば、がんを有する被験体にCARを、または被験体において異常に発現されるもしくは発現されないタンパク質を提供する）ための*ex vivo*（細胞療法）方法のために使用することができる。

#### 【0037】

別の態様では、内在性遺伝子を改変する方法が記載されており、この方法は、ドナーが、ヌクレアーゼによって標的化された内在性遺伝子に組み込まれるように、CISHタンパク質をコードする1種または複数のドナー配列の存在下で、1種または複数のヌクレアーゼ（例えば、ZFN、TALEN、TtAgo、CRISPR/Cas系）をコードする1種または複数のポリヌクレオチドを細胞に投与するステップを含む。1個または複数

のドナー分子（複数可）の組込みは、相同組換え修復（H D R）により、または非相同末端結合（N H E J）関連修復によって発生する。ある特定の実施形態では、1または複数対のヌクレアーゼが用いられ、これらのヌクレアーゼは、同じまたは異なる核酸によってコードされ得る。

#### 【0038】

さらに別の態様では、遺伝子改変されたC I S H遺伝子を含む細胞（例えば、エフェクターT細胞、調節性T細胞または幹細胞）が本明細書に提供される。ある特定の実施形態では、遺伝子改変された細胞は、C I S H遺伝子のエクソン2および/またはエクソン3内に遺伝子改変、例えば、ヌクレアーゼによって作製された改変を含む。ある特定の実施形態では、遺伝子改変されたC I S H遺伝子は、C I S H遺伝子における表2に示す配列の9～20塩基対の標的部位に標的化されたヌクレアーゼによる切断後に1個または複数の挿入および/または欠失（インデルとして公知）を含み、遺伝子は、ヌクレアーゼによる切断後に不活性化される。遺伝子改変は、標的部位（複数可）および/または切断部位（複数可）内に、および/または標的部位の縁の1～50塩基対内に存在し得る。他の実施形態では、改変は、本明細書に記載されている通り、ヌクレアーゼによる切断後に外因性配列、例えば、導入遺伝子（例えば、C A R、免疫調節因子、操作されたもしくは外因性のT C RまたはA C T R等）の挿入を含む。ある特定の実施形態では、細胞は、本明細書に記載されている方法によって作製される。他の好ましい実施形態では、導入遺伝子は、C I S Hのエクソン（例えば、表2に示す配列の9～20ヌクレオチドの配列の5～10塩基対中またはその内部が挙げられるがこれらに限定されない、エクソン2または3）に組み込まれる。組み込まれた導入遺伝子を含む細胞は、内在性プロモーター（例えば、それぞれC I S Hプロモーター）から導入遺伝子を発現することができる、またはその代わりに、導入遺伝子は、導入遺伝子の発現を駆動する外因性プロモーター等、調節および制御エレメントを含むことができる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子を含む細胞は、ゲノムに組み込まれたウイルスベクター配列を全く含まない。本明細書に記載されている遺伝子改変された細胞は、タンパク質産生（組み込まれた導入遺伝子からの）等、*i n v i t r o*使用に、および/またはがんもしくは炎症性疾患の処置における使用のための分子のスクリーニングのためを含む、変更されたC I S H遺伝子を有する細胞もしくは動物モデルの提供に使用することができる。加えて、本明細書に記載されている遺伝子改変された細胞は、細胞の提供により、それを必要とする被験体にタンパク質を提供すること（*e x v i v o*細胞療法）が挙げられるがこれに限定されない、*i n v i v o*使用に使用することができる。

#### 【0039】

本明細書に記載されている方法および組成物のいずれかにおいて、細胞は、いずれかの真核細胞となることができる。ある特定の実施形態では、細胞は、エフェクターT細胞、調節性T細胞または幹細胞である。他の実施形態では、細胞は、患者由来、例えば、自家C D 3 4 +（造血）幹細胞（例えば、顆粒球コロニー刺激因子（G C S F）投与により骨髓から末梢血へと患者において動員された）である。C D 3 4 +細胞を採集、精製、培養し、ヌクレアーゼおよび/またはC I S Hドナー（例えば、アデノウイルスベクタードナー）をいずれか適した方法によって細胞に導入することができる。

#### 【0040】

一部の態様では、幹細胞または成熟細胞は、細胞療法に、例えば、成熟細胞を使用したT細胞移植に使用することができる。他の実施形態では、T細胞移植における使用のための細胞は、別の目的の遺伝子改変を含有する。一態様では、T細胞は、がんマーカーに特異的な挿入されたキメラ抗原受容体（C A R）を含有する。さらなる態様では、挿入されたC A Rは、B細胞悪性疾患に特徴的なC D 1 9マーカーに特異的である。一部の実施形態では、T細胞は、自己免疫性疾患に特異的なC A Rを含む。一部の実施形態では、T細胞は、調節性T細胞であり、移植片拒絶の予防に有用なC A Rを含む。

#### 【0041】

別の態様では、本発明の方法および組成物は、例えば、B細胞悪性疾患（例えば、B細胞

10

20

30

40

50

胞急性リンパ芽球性白血病 (B - ALL)、B細胞非ホジキンリンパ腫 (B - NHL)、慢性リンパ球性白血病 (CLL) およびホジキンリンパ腫 (Wang, et al. (2017) J. Hematol Oncol 10 (1): 53) 等のがんの処置または炎症性疾患 (例えば、大腸炎、Blatt, et al. (2014) Mol Ther 22 (5): 1018 - 1028 を参照) の処置における使用のための、本明細書に記載されている組成物 (ヌクレアーゼ、医薬組成物、ポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞、細胞系および / またはトランスジェニック動物等の動物) の使用を提供する。ある特定の実施形態では、このような組成物は、がんまたは炎症性障害の処置における使用のための、薬物ライブラリーおよび / または他の治療組成物 (すなわち、抗体、構造的 RNA 等) のスクリーニングにおいて使用される。斯かるスクリーニングは、マニピュレートされた細胞系または初代細胞を用いて細胞レベルで始めることができ、動物全体の処置 (例えば、獣医学またはヒトの治療法) のレベルまで進めることができる。よって、ある特定の態様では、それを必要とする被験体におけるがんまたは炎症を処置および / または予防する方法であって、本明細書に記載されている 1 種または複数のヌクレアーゼ、ポリヌクレオチドおよび / または細胞を被験体に投与するステップを含む方法が本明細書に記載されている。方法は、ex vivo または in vivo となることができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている細胞 (例えば、CISH 遺伝子に組み込まれた導入遺伝子を含む細胞) は、被験体に投与される。本明細書に記載されている方法のいずれかにおいて、細胞は、被験体に由来する幹細胞 (患者由来の幹細胞) となることができる。

10

20

#### 【0042】

本明細書に記載されている組成物および方法のいずれかにおいて、ヌクレアーゼは、mRNA 形態で、および / または 1 種もしくは複数の非ウイルス、LNP もしくはウイルスベクター (複数可) を使用して導入される。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ (複数可) は、mRNA 形態で導入される。他の実施形態では、導入遺伝子は、ウイルスベクター、例えば、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV8.2、AAV9、AAVrh10、AAV2/8、AAV2/5 および AAV2/6 を含むアデノ随伴ベクター (AAV) を使用して、またはレンチウイルスもしくは組込み欠損レンチウイルスベクターにより導入され、ヌクレアーゼ (複数可) は、mRNA 形態で導入される。またさらなる実施形態では、ヌクレアーゼ (複数可) およびドナーは両者共に、1 種または複数のウイルスまたは非ウイルスベクターを使用して導入される。ヌクレアーゼおよびドナーは、同じベクターで、同じ型の異なるベクターで、または異なる型の異なるベクターで運ぶことができる。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ (複数可) は、mRNA 形態で導入され (例えば、電気穿孔により)、ドナーは、AAV (例えば、AAV2/6)、レンチウイルスまたは組込み欠損レンチウイルスを使用して導入される。ある特定の実施形態では、ドナーは、一本鎖 DNA として導入される。

30

40

#### 【0043】

ヌクレアーゼ (複数可) およびドナーは、同時発生的にまたは順番に導入することができる。逐次に導入される場合、ヌクレアーゼおよびドナーの投与の間に、任意の期間 (例えば、数秒間 ~ 数時間) が経過してよい。ある特定の実施形態では、ドナーが導入され、12 ~ 36 時間 (またはその間のいずれかの時間) 後に、ヌクレアーゼ (複数可) が細胞に導入される。ある特定の実施形態では、改変された細胞は、数時間 ~ 数日間 (またはその間のいずれかの時間) インキュベートされ、次いで、アリコートに分けられ、凍結される。

#### 【0044】

本発明の組成物および方法を使用して、細菌、昆虫、酵母、魚類、哺乳動物 (非ヒト哺乳動物を含む) および植物細胞等の原核または真核細胞が挙げられるがこれらに限定されない、任意の細胞を改変することができる。ある特定の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、T 細胞 (例えば、CD4+、CD3+、CD8+ 等)、樹状細胞、B 細胞その他である。他の実施形態では、細胞は、多能性、全能性または複能性幹細胞、例えば、人

50

工多能性幹細胞 (iPSC)、造血幹細胞 (例えば、CD34+)、胚性幹細胞その他である。本明細書に記載されている方法または組成物のいずれかにおいて、CISHコード導入遺伝子を含む細胞は、幹細胞または前駆細胞となることができる。本発明の方法および組成物と共に使用することができる特異的な幹細胞型は、胚性幹細胞 (ESC)、人工多能性幹細胞 (iPSC) および造血幹細胞 (例えば、CD34+細胞) を含む。iPSCは、患者試料および/または正常対照に由来することができ、患者由来のiPSCは、目的の遺伝子における正常もしくは野生型遺伝子配列へと変異させることができる、または正常細胞は、目的の遺伝子における公知疾患対立遺伝子へと変更することができる。同様に、造血幹細胞は、患者またはドナーから単離することができる。次に、このような細胞は、CAR等の機能的タンパク質 (複数可) を発現するように操作され、拡大増殖され (expand)、次いで、患者に再導入される。ある特定の実施形態では、細胞は、患者由来の造血幹細胞である。他の実施形態では、細胞は、COS、CHO (例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHO-K1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293 (例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T) およびperC6細胞である。

10

#### 【0045】

よって、外因性配列 (CAR等) の発現を伴うまたは伴わないCISHの不活性化を含む、CISH遺伝子発現をモジュレートするための方法および組成物が本明細書に記載されている。組成物および方法は、in vitro、in vivoまたはex vivoでの使用のためのもので有り得、CISH遺伝子に標的化されたDNA結合ドメインを含む人工転写因子またはヌクレアーゼを投与するステップを含み、必要に応じて、ヌクレアーゼの場合、ヌクレアーゼによる切断後にCISH遺伝子に組み込まれるドナーを用いる。ある特定の実施形態では、細胞は、がんまたは炎症性疾患に存在するものである。他の実施形態では、細胞は、本明細書に記載されている方法のいずれかによって改変され、改変された細胞は、それを必要とする被験体 (例えば、がんまたは炎症性障害を有する被験体) に投与される。本明細書に記載されている方法によって作製された細胞を含む、遺伝子改変されたCISH遺伝子 (例えば、外因性配列) を含む遺伝子改変された細胞 (例えば、幹細胞、前駆細胞、T細胞、筋肉細胞等) も提供される。このような細胞を使用して、例えば、それを必要とする被験体に細胞 (複数可) を投与することにより、またはその代わりに、細胞によって産生されたタンパク質を単離し、それを必要とする被験体にタンパク質を投与することにより (酵素補充療法)、がんまたは炎症性疾患を有する被験体に治療タンパク質 (複数可) を提供することができる。

20

30

#### 【0046】

本発明の核酸、タンパク質および/または細胞を含むキットも提供される。キットは、ヌクレアーゼをコードする核酸 (例えば、RNA分子、または適した発現ベクターに含有されたZFN、TALEN、TtAgoもしくはCRISPR/Cas系コード遺伝子)、またはヌクレアーゼタンパク質のアリコート、ドナー分子、適した幹細胞性改変因子、細胞、本発明の方法を行うための指示、その他を含むことができる。

40

#### 【0047】

上述および他の態様は、全体として本開示を踏まえれば、当業者には容易に明らかとなるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0048】

【図1】図1は、CISH遺伝子 (配列番号48) のエクソン2および3 (影付き) を含む部分的配列を示し、また、遺伝子における例示的なヌクレアーゼ標的部位 (囲み枠内) を示す。

#### 【0049】

【図2】図2A~図2Dは、表示条件下における処置に付したT細胞のFACS解析を示

50



す。図2A(「偽(Mock)」)は、細胞をヌクレアーゼ試薬で処置しなかったが、それ以外は他の細胞と同じ仕方で処置した場合の結果を示す。図2B(「AAVのみ」)は、細胞がAAV-GFPドナーのみを受けた結果を示す。図2C(「ZFNのみ」)は、細胞がCISH標的化ヌクレアーゼのみを受けた(mRNAとして投与された)結果を示し;図2D(「ZFN+AAV」)は、細胞がAAV-GFPドナーおよびCISH標的化ZFNの両方による処置に付された結果を示す。図示されている通り、GFPがほとんど(AAVのみ)または全く(偽およびZFNのみ)発現されなかった他の全処置条件と比較して、ヌクレアーゼおよびドナーで処置した細胞の少なくとも75%が、GFPを発現した。

#### 【0050】

【図3】図3は、表示条件下における処置に付したエフェクターT細胞のFACS解析を示す。「ドナー単独」は、AAV-hPGK-GFPドナーのみを受けた細胞を指し、「ZFN+ドナー」は、AAV-hPGK-GFPドナーおよびCISH標的化ZFNの両方による処置に付された細胞を指す。図示されている通り、GFPを全く発現しなかったAAVドナー単独で処置した細胞と比較して、ヌクレアーゼおよびドナーで処置した細胞のほぼ72.6%が、GFPを発現した。

#### 【0051】

【図4】図4は、表示条件下における処置に付したエフェクターT細胞のMiseq遺伝子型解析の結果を示すグラフである。「偽」は、ヌクレアーゼ試薬で処置しなかったが、それ以外は他の細胞と同じ仕方で処置した細胞を指し;「PGK-GFPドナー」は、AAV-hPGK-GFPドナーのみを受けた細胞を指し;「ZFN」は、CISH標的化ヌクレアーゼのみがmRNAとして投与された細胞を指し;「ZFN+PGK-GFPドナー」は、AAV-hPGK-GFPドナーおよびCISH標的化ZFNの両方による処置に付された細胞を指す。図示されている通り、対立遺伝子のほぼ90%が、ヌクレアーゼ(ZFNおよびZFN+ドナー)で処置した細胞において改変されている一方、AAVドナーおよびZFNの両方で処置した細胞のみが、ドナーの高レベル(ほぼ45%)の標的化された組込み(TI)を生じた。AAVドナー単独または偽で処置した群は、検出可能なレベルのゲノム改変がなかった。

#### 【0052】

【図5】図5は、表示条件下における処置に付したエフェクターT細胞のMiseq遺伝子型解析を示すグラフである。「偽」は、ヌクレアーゼ試薬で処置しなかったが、それ以外は他の細胞と同じ仕方で処置した細胞を指し、「ZFN+ドナー」は、対応するAAV-GFPドナーと共に、AAVS1またはCISH標的化ZFNのいずれかによる処置に付された細胞を指す。図示されている通り、対立遺伝子のほぼ50~60%が、ヌクレアーゼ(ZFN+ドナー)で処置した細胞において改変されている一方、偽群は、検出可能なレベルのゲノム改変がなかった。

#### 【0053】

【図6】図6は、Luminex解析により免疫賦活性サイトカイン分泌によって評価された、エフェクターT細胞機能データを示すグラフである。「ZFN+ドナー」は、対応するAAV-GFPドナーと共に、AAVS1またはCISH標的化ZFNのいずれかによる処置に付された細胞を指す。図示されている通り、CISHへの導入遺伝子ドナーのTIは、ゲノムのセーフハーバー(safe harbor)遺伝子座AAVS1へのTIと比較して、エフェクターT細胞の免疫賦活性機能増加(すなわち、TNF 上方調節)をもたらし、これはおそらく、大多数の細胞におけるCISH発現のノックアウトによるものである。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0054】

細胞(例えば、T細胞またはCD34+造血幹細胞等のリンパ球前駆体)のCISH遺伝子への導入遺伝子タンパク質(例えば、CAR、TCR、ACTRおよび/または他のいずれかの治療タンパク質)導入遺伝子の組込みによる改変を含む、CISH遺伝子の標

10

20

30

40

50

的化された改変のための組成物および方法が、本明細書に開示されている。方法および組成物は、エフェクターT細胞(CD4+またはCD8+)および調節性T細胞(CD4+、CD25+、CD127lo、FOXP3+)の改変に使用することができる。このような前駆体から、がん、炎症性障害、自己免疫性疾患または移植片を有する被験体において機能的タンパク質を発現する細胞への、その後のin vivo分化が、細胞によってもたらされ、この細胞が、レシピエント患者において疾患を処置および/または予防することができるように、細胞は患者への注入に適する。このような幹細胞から、機能的CISHタンパク質を発現する細胞への、その後のin vivo分化が、患者における疾患(例えば、がん、炎症性障害等)を処置および/または予防するように、本明細書に記載されている遺伝子改変された細胞(例えば、CISH遺伝子におけるインデルおよび/または導入遺伝子)は患者への注入に適する。加えて、本明細書に記載されている細胞(細胞または細胞系の集団)をin vitroで使用して、スクリーニングのための細胞、細胞系もしくは動物モデルを産生することができる、および/または組み込まれた導入遺伝子からタンパク質を産生することができ、このタンパク質を単離し、被験体の処置に使用することができる。

10

#### 【0055】

本発明は、がん、炎症性障害、自己免疫性疾患または移植片を処置および/または予防するタンパク質、またはT細胞を再び方向付ける(redirect)ための受容体として機能するタンパク質を含む、いずれかの機能的タンパク質をコードする配列を含むドナーの組込みが挙げられるがこれらに限定されない、CISH遺伝子に対するいずれかの遺伝子改変を企図する。

20

#### 【0056】

##### 全般

本明細書に開示されている方法の実施、ならびに本明細書に開示されている組成物の調製および使用は、別段の指示がなければ、当業者の技能範囲内の通りに、分子生物学、生化学、クロマチン構造および解析、計算化学、細胞培養、組換えDNAならびに関連分野における従来技法を用いる。これらの技法は、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 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; および METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999を参照されたい。

30

40

#### 【0057】

##### 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、互換的に使用され、直鎖状または環状コンフォメーションで、一本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、これらの用語は、ポリマーの長さに関する限定として解釈するべきではない。これらの用語は、天然のヌクレオチドの公知アナログ、ならびに塩基、糖および/またはリン酸部分

50

が改変されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート骨格）を包含することができる。一般に、特定のヌクレオチドのアナログは、同じ塩基対形成特異性を有する；すなわち、Aのアナログは、Tと塩基対形成するであろう。

【0058】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すように互換的に使用されている。この用語は、1個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。

【0059】

「結合」は、巨大分子間の（例えば、タンパク質および核酸の間の）配列特異的な、非共有結合性相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異的である限りにおいて、結合相互作用の全ての構成成分が、配列特異的である必要はない（例えば、DNA骨格におけるリン酸残基との接触）。斯かる相互作用は一般に、 $10^{-6} \text{ M}^{-1}$  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、結合の強度を指す：増加した結合親和性は、より低い $K_d$ と相関する。

【0060】

「結合ドメイン」は、別の分子に非共有結合的に結合することができる分子である。結合分子は、例えば、DNA分子（ジンクフィンガータンパク質もしくはTALエフェクタードメインタンパク質等のDNA結合タンパク質、またはシングルガイドRNA）、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。タンパク質結合分子の場合、これは、それ自体と結合（して、ホモ二量体、ホモ三量体等を形成）することができる、および/または異なるタンパク質（単数または複数）の1個または複数の分子に結合することができる。結合分子は、2種類以上の結合活性を有することができる。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、DNA結合、RNA結合およびタンパク質結合活性を有する。よって、人工ヌクレアーゼおよび転写因子のDNA結合構成成分を含むDNA結合分子として、ZFP、TAL EおよびsgRNAが挙げられるがこれらに限定されない。

【0061】

「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、その構造が亜鉛イオンの配位を介して安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である1個または複数のジンクフィンガーを介して配列特異的様式でDNAに結合する、タンパク質、またはより大型のタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと省略される。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的ドメイン（ZFNのためのヌクレアーゼドメインまたはZFP-TFのための転写調節ドメイン）を含むことができる。用語「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」は、1つのZFNと共に、二量体形成して標的遺伝子を切断する、1対のZFN（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。

【0062】

「TAL E DNA結合ドメイン」または「TAL E」は、1個または複数のTAL Eリピートドメイン/単位を含むポリペプチドである。リピートドメインは、その同族標的DNA配列へのTAL Eの結合に関与する。単一の「リピート単位」（「リピート」とも称される）は、典型的に、33~35アミノ酸の長さであり、天然に存在するTAL Eタンパク質内の他のTAL Eリピート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、TAL E DNA結合ドメインおよび機能的ドメイン（TAL ENのためのヌクレアーゼドメインまたはTAL EN-TFのための転写調節ドメイン）を含むことができる。用語「TAL EN」は、1つのTAL ENと共に、二量体形成して標的遺伝子を切断する、1対のTAL EN（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。

10

20

30

40

50

## 【0063】

ジンクフィンガーおよびT A L E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またはT A L Eタンパク質の認識ヘリックス領域の操作（1個または複数のアミノ酸の変更）により、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」することができる。したがって、操作されたDNA結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはT A L E）は、天然に存在しないタンパク質である。DNA結合タンパク質を操作するための方法の非限定的な例は、設計および選択である。設計されたDNA結合タンパク質は、その設計/組成が主に合理的基準に起因する、自然界に発生しないタンパク質である。設計のための合理的基準は、現存するZ F Pおよび/またはT A L E設計および結合データの情報を記憶するデータベースにおける情報を処理するための、置換規則およびコンピュータ処理されたアルゴリズムの適用を含む。例えば、米国特許第6,140,081号；同第6,453,242号；同第6,534,261号；および同第8,585,526号を参照されたい；また、国際特許公開番号WO98/53058；WO98/53059；WO98/53060；WO02/016536；およびWO03/016496を参照されたい。

10

## 【0064】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはT A L Eは、その産生が、主としてファージディスプレイ、相互作用トラップまたはハイブリッド選択等の経験的プロセスに起因する、自然界に見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第5,789,538号；同第5,925,523号；同第6,007,988号；同第6,013,453号；同第6,200,759号；同第8,586,526号；ならびに国際特許公開番号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。

20

## 【0065】

「T t A g o」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。T t A g oは、細菌*Thermus thermophilus*に由来する。例えば、Swarts, et al., *ibid*, G. Sheng, et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 652を参照されたい。「T t A g o系」は、例えば、T t A g o酵素による切断のためのガイドDNAを含む、要求される全ての構成成分である。

30

## 【0066】

「組換え」は、非相同末端結合（NHEJ）によるドナー捕捉、および相同組換えが挙げられるがこれらに限定されない、2つのポリヌクレオチドの間での遺伝情報交換のプロセスを指す。本開示の目的のため、「相同組換え（HR）」は、例えば、相同組換え修復機構による細胞における二本鎖切断の修復中に起こる、斯かる交換の特殊化された形態を指す。このプロセスは、ヌクレオチド配列相同性を要求し、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を経験した分子）の鋳型修復のために「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝情報の移入をもたらすため、「非クロスオーバー遺伝子変換」または「短縮経路（short tract）遺伝子変換」として様々に公知である。いずれか特定の理論に制約されることは望まないが、斯かる移入は、切断された標的およびドナーの間に形成するヘテロ二重鎖DNAのミスマッチ補正、および/またはドナーが、標的の一部になるであろう遺伝情報の再合成に使用される、「合成依存性鎖アニーリング」、および/または関連プロセスが関与し得る。斯かる特殊化されたHRは、多くの場合、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全体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。

40

## 【0067】

本開示の方法において、本明細書に記載されている1種または複数の標的化ヌクレアーゼは、標的配列（例えば、細胞クロマチン）の所定の部位に二本鎖切断（DSB）を作製する。DSBは、相同組換え修復または非相同組換え修復機構により欠失および/または

50

挿入をもたらすことができる。欠失は、いずれかの数の塩基対を含むことができる。同様に、挿入は、例えば、切断領域におけるヌクレオチド配列に対する相同性を必要に応じて有する「ドナー」ポリヌクレオチドの組込みを含む、いずれかの数の塩基対を含むことができる。ドナー配列は、物理的に組み込むことができる、またはその代わりに、ドナーポリヌクレオチドは、相同組換えによる切断の修復のための鋳型として使用され、細胞クロマチンにおけるドナーと同様に、ヌクレオチド配列の全体または一部の導入をもたらす。よって、細胞クロマチンにおける第1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に存在する配列へと変換することができる。よって、用語「置き換える」または「置換え」の使用は、あるヌクレオチド配列の、別のヌクレオチド配列による置換えを表すものと理解することができ（すなわち、情報的な意味での配列の置換え）、あるポリヌクレオチドの、別のポリヌクレオチドによる物理的または化学的な置換えを必ずしも要求するものではない。

10

#### 【0068】

本明細書に記載されている方法のいずれかにおいて、追加的な対のジンクフィンガータンパク質、TALEN、TtAgoまたはCRISPR/Cas系を、細胞内の追加的な標的部位の追加的な二本鎖切断に使用することができる。

#### 【0069】

本明細書に記載されている方法のいずれかを、いずれかのサイズのドナーの挿入に、および/または目的の遺伝子（複数可）の発現を破壊するドナー配列の標的化された組込みによって、細胞における1種もしくは複数の標的配列の部分的もしくは完全な不活性化に使用することができる。部分的にまたは完全に不活性化された遺伝子を有する細胞系も提供される。

20

#### 【0070】

本明細書に記載されている方法のいずれかにおいて、外因性ヌクレオチド配列（「ドナー配列」または「導入遺伝子」）は、目的の領域におけるゲノム配列に対して相同であるが同一ではない配列を含有し、これにより、相同組換えを刺激して、目的の領域に非同配列を挿入することができる。よって、ある特定の実施形態では、目的の領域における配列に対して相同であるドナー配列の部分は、置き換えられるゲノム配列に対して約80～99%の間（またはその間のいずれかの整数）の配列同一性を示す。他の実施形態では、例えば、1個のみのヌクレオチドが、100を超える近接塩基対のドナーおよびゲノム配列の間で異なる場合、ドナーおよびゲノム配列の間の相同性は、99%よりも高い。ある特定の事例では、新たな配列が目的の領域に導入されるように、ドナー配列の非同相部分は、目的の領域に存在しない配列を含有することができる。これらの事例では、非同相配列は一般に、目的の領域における配列に対して相同または同一である、50～1,000塩基対（またはその間のいずれかの整数値）または1,000を超えるいずれかの数の塩基対の配列に挟まれる。他の実施形態では、ドナー配列は、第1の配列に対して非同相であり、非同相組換え機構によってゲノムに挿入される。

30

#### 【0071】

「切断」は、DNA分子の共有結合骨格の破損を指す。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解が挙げられるがこれらに限定されない、種々の方法によって惹起することができる。一本鎖切断および二本鎖切断の両方が可能であり、二本鎖切断は、2回の別個の一本鎖切断事象の結果として発生し得る。DNA切断は、平滑末端または付着末端（*staggered end*）のいずれかの産生をもたらすことができる。ある特定の実施形態では、融合ポリペプチドが、標的化された二本鎖DNA切断に使用される。

40

#### 【0072】

「切断ハーフドメイン」は、第2のポリペプチド（同一または異なるのいずれか）と一緒に、切断活性（好ましくは、二本鎖切断活性）を有する複合体を形成する、ポリペプチド配列である。用語「第1および第2の切断ハーフドメイン」；「+および-切断ハーフドメイン」ならびに「右および左切断ハーフドメイン」は、二量体形成する切断ハ

50

ーフドメインの対を指すように互換的に使用される。

【0073】

「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）と偏性の（oblique）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。それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,623,618号；同第7,888,121号；同第7,914,796号；および同第8,034,598号も参照されたい。

【0074】

用語「配列」は、DNAまたはRNAとなることができ；直鎖状、環状または分枝状となることができ、一本鎖または二本鎖のいずれかとなることができ、いずれかの長さのヌクレオチド配列を指す。用語「ドナー配列」は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、いずれかの長さ、例えば、2~100,000の間のヌクレオチドの長さ（またはその間のもしくはそれを上回る（thereabove）いずれかの整数値）、好ましくは、約100~100,000の間のヌクレオチドの長さ（またはその間のいずれかの整数）、より好ましくは、約2000~20,000の間のヌクレオチドの長さ（またはその間のいずれかの値）、さらにより好ましくは、約5~15 kbの間（またはその間のいずれかの値）となることができ。

【0075】

「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むタンパク質を含む。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、ヌクレオソームにおいて、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個ず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（生物に依存して可変的な長さの）は、ヌクレオソームコアの間に延在する。ヒストンH1の分子は一般に、リンカーDNAと会合する。本開示の目的のため、用語「クロマチン」とは、原核生物および真核生物の両方の、あらゆる種類の細胞核タンパク質を包含することを意図する。細胞クロマチンは、染色体およびエピソームクロマチンの両方を含む。

【0076】

「染色体」は、細胞のゲノムの全体または部分を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは多くの場合、細胞のゲノムを構成する全染色体の集合体である、その核型によって特徴付けされる。細胞のゲノムは、1本または複数の染色体を含むことができる。

【0077】

「エピソーム」は、細胞の染色体核型の一部でない核酸を含む、複製する核酸、核タンパク質複合体または他の構造である。エピソームの例として、プラスミドおよびある特定のウイルスゲノムが挙げられる。

【0078】

「到達可能領域」は、核酸に存在する標的部位が、標的部位を認識する外因性分子によって結合され得る、細胞クロマチンにおける部位である。いずれか特定の理論に制約されることは望まないが、到達可能領域は、ヌクレオソーム構造中にパッケージングされていない領域であることが考えられる。到達可能領域の別個の構造は、多くの場合、化学的および酵素的プローブ、例えば、ヌクレアーゼに対するその感受性によって検出することができる。

【0079】

「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のであれば、結合分子が結合するであろう、核酸の部分を画定する核酸配列である。標的部位は、いずれかの長さ、例えば、9~20またはそれよりも多いヌクレオチドの長さとなることができ、結合したヌクレオチドは、近接または非近接となることができ。

【0080】

「外因性」分子は、細胞に通常存在しないが、1種または複数の遺伝学的、生化学的ま

10

20

30

40

50

たは他の方法によって細胞に導入することができる分子である。「細胞における通常の存在」は、細胞の特定の発生ステージおよび環境条件に関して決定される。よって、例えば、筋肉の胚発生中にのみ存在する分子は、成体筋肉細胞に関して外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、熱ショックを与えていない細胞に関して外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全性内在性分子の機能性バージョン、または正常に機能する内在性分子の機能不全性バージョンを含むことができる。

#### 【0081】

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るもの等の小分子、またはタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リボタンパク質、多糖等の巨大分子、上述の分子のいずれかの改変された誘導体、または上述の分子のうち1個もしくは複数を含みいずれかの複合体となることができる。核酸は、DNAおよびRNAを含み、一本または二本鎖となることができ；直鎖状、分枝状または環状となることができ；いずれかの長さとなることができ。核酸は、二重鎖を形成することができる核酸と共に、三重鎖形成核酸を含む。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、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグララーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ギラーゼおよびヘリカーゼが挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

#### 【0082】

外因性分子は、内在性分子と同じ型の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸となることができる。例えば、外因性核酸は、感染性ウイルスゲノム、細胞に導入されたプラスミドもしくはエピソーム、または細胞に通常存在しない染色体を含むことができる。細胞への外因性分子の導入のための方法は、当業者にとって公知であり、そのようなものとして、脂質媒介性移入（すなわち、中性およびカチオン性脂質を含むリポソーム）、電気穿孔、直接的注射、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈殿、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がこれらに限定されない。外因性分子は、内在性分子と同じ型の分子であるが、細胞が由来する種とは異なる種に由来することもできる。例えば、ヒト核酸配列は、マウスまたはハムスターに本来由来する細胞系に導入することができる。

30

#### 【0083】

対照的に、「内在性」分子は、特定の環境条件下で特定の発生ステージにおいて特定の細胞に通常存在する分子である。例えば、内在性核酸は、染色体、ミトコンドリア、葉緑体もしくは他のオルガネラのゲノム、または天然に存在するエピソーム核酸を含むことができる。追加的な内在性分子は、タンパク質、例えば、転写因子および酵素を含むことができる。

#### 【0084】

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

40

#### 【0085】

「融合」分子は、2個またはそれよりも多いサブユニット分子が、好ましくは共有結合により連結された分子である。サブユニット分子は、同じ化学型の分子となることができる、または異なる化学型の分子となることができる。第1の型の融合分子の例として、融合タンパク質（例えば、ZFPまたはTALE DNA結合ドメインおよび1個または複数の活性化ドメインの間の融合）および融合核酸（例えば、上記に記載の融合タンパク質をコードする核酸）が挙げられるがこれらに限定されない。第2の型の融合分子の例として、三重鎖形成核酸およびポリペプチドの間の融合、ならびに副溝結合剤および核酸の間の融合が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0086】

50

細胞における融合タンパク質の発現は、細胞への融合タンパク質の送達、または細胞への融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの送達に起因することができ、そこで、ポリヌクレオチドが転写され、転写物が翻訳されて、融合タンパク質を生成する。トランスプライシング、ポリペプチド切断およびポリペプチドライゲーションが、細胞におけるタンパク質の発現に関与することもできる。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、本開示の他の箇所に提示されている。

#### 【0087】

「遺伝子」は、本開示の目的のため、遺伝子産物（下記を参照）をコードするDNA領域と共に、遺伝子産物の産生を調節するあらゆるDNA領域を含み、この場合、斯かる調節性配列が、コード配列および/または転写される配列に隣接するか否かを問わない。したがって、遺伝子は、プロモーター配列、ターミネーター、リボソーム結合部位および配列内リボソーム進入部位等の翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリクス付着部位、ならびに遺伝子座制御領域を含むが、必ずしもこれらに限定されない。

10

#### 【0088】

「遺伝子発現」は、遺伝子に含有されている情報から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、構造的RNAまたは他のいずれかの型のRNA）またはmRNAの翻訳によって産生されたタンパク質となることができる。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等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。

20

#### 【0089】

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、遺伝子活性化および遺伝子抑制を挙げることができるがこれらに限定されない。ゲノム編集（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。遺伝子不活性化は、本明細書に記載されているZFP、TALE、TtAgまたはCRISPR/Cas系を含まない細胞と比較した、遺伝子発現の何らかの低下を指す。よって、遺伝子不活性化は、部分的または完全となることができる。

30

#### 【0090】

「目的の領域」は、例えば、外因性分子を結合することが望ましい、遺伝子、または遺伝子内のもしくはそれに隣接する非コード配列等、細胞クロマチンのいずれかの領域である。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となることができる。目的の領域は、例えば、染色体、エピソーム、オルガネラゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）または感染性ウイルスゲノムに存在することができる。目的の領域は、遺伝子のコード領域内、例えば、リーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロン等の転写される非コード領域内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの、非転写領域内となることができる。目的の領域は、単一のヌクレオチド対もの小ささ、または最大2,000ヌクレオチド対の長さ、またはいずれかの整数値のヌクレオチド対となることができる。

40

#### 【0091】

「真核」細胞として、幹細胞（多能性および複能性）を含む、真菌細胞（酵母等）、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）が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0092】

「エフェクターT細胞」（Teff）は、刺激に対して直ちに作用するCD4+またはCD8+T細胞である。このような細胞は、分化後の細胞媒介性免疫における中心的な役割を果たす。T細胞は、抗原提示細胞による刺激後に活性化され、細胞傷害性分子および

50



抗体の産生等の決定的なエフェクター機能を行うエフェクターT細胞へと分化する。エフェクターT細胞は、炎症（例えば、感染）の部位へと遊走し、ケモカインを産生して、追加的な免疫細胞をリクルートする。

【0093】

「調節性T細胞」(Treg)は、サプレッサーT細胞としても公知であり、免疫系をモジュレートし、自家抗原に対する寛容を維持し、自己免疫性疾患を予防するT細胞の亜集団である。Tregは、免疫抑制性であり、一般に、エフェクターT細胞の誘導および増殖を抑制または下方調節する。Tregは、CD4+、CD25+、CD127loかつFOXP3+である。

【0094】

用語「自家」は、材料が後に再導入されることになる個体と同じ個体に由来する任意の材料を指す。

【0095】

用語「同種異系」は、材料が導入される個体と同じ種の異なる個体に由来する任意の材料を指す。1個または複数の遺伝子座における遺伝子が同一でない場合、2つまたはそれよりも多い個体は、互いに同種異系であると言われる。一部の態様では、同じ種の個体由来の同種異系材料は、抗原性に相互作用するには、遺伝的に十分に似ていない場合がある。

【0096】

用語「操作可能な連結」および「操作可能に連結された」（または「作動可能に連結された」）は、2個またはそれよりも多い構成成分（配列エレメント等）の並置に関して互換的に使用され、この並置において、両方の構成成分が正常に機能し、構成成分のうち少なくとも1個が、他の構成成分のうち少なくとも1個により発揮される機能を媒介することができる可能性を認めるように、構成成分が配置されている。説明として、転写調節配列が、1種または複数の転写調節因子の存在または非存在に応答して、コード配列の転写のレベルを制御する場合、プロモーター等の転写調節配列は、コード配列に操作可能に連結されている。転写調節配列は一般に、コード配列とシスで操作可能に連結されているが、それと直接的に隣接している必要はない。例えば、エンハンサーは、近接していないにもかかわらず、コード配列に操作可能に連結された転写調節配列である。

【0097】

融合ポリペプチドに関して、用語「操作可能に連結された」は、構成成分のそれぞれが、他の構成成分に連結した状態で、このように連結されていない場合と同じ機能を行うという事実を指すことができる。例えば、ZFP、TALE、TtAgまたはCas DNA結合ドメインが、活性化ドメインに融合された融合ポリペプチドに関して、融合ポリペプチドにおいて、ZFP、TALE、TtAgまたはCas DNA結合ドメイン部分が、その標的部位および/またはその結合部位に結合することができる一方で、活性化ドメインが、遺伝子発現を上方調節することができる場合、ZFP、TALE、TtAgまたはCas DNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、操作可能な連結状態にある。ZFP、TALE、TtAgまたはCas DNA結合ドメインが、切断ドメインに融合された融合ポリペプチドの場合、融合ポリペプチドにおいて、ZFP、TALE、TtAgまたはCas DNA結合ドメイン部分が、その標的部位および/またはその結合部位に結合することができる一方で、切断ドメインが、標的部位の近傍でDNAを切断することができる場合、ZFP、TALE、TtAgまたはCas DNA結合ドメインおよび切断ドメインは、操作可能な連結状態にある。

【0098】

タンパク質、ポリペプチドまたは核酸の「機能的断片」は、その配列が、全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一ではないが、依然として、全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同じ機能を保持する、タンパク質、ポリペプチドまたは核酸である。機能的断片は、対応するネイティブ分子より多い、より少ないもしくは同じ数の残基を保有することができる、および/または1個もしくは複数のアミノ酸もしくはヌクレオチド置

10

20

30

40

50

換を含有することができる。核酸の機能（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力）を決定するための方法は、本技術分野で周知である。同様に、タンパク質機能を決定するための方法が周知である。例えば、ポリペプチドのDNA結合機能は、例えば、フィルター結合、電気泳動移動度シフトまたは免疫沈降アッセイによって決定することができる。DNA切断は、ゲル電気泳動によってアッセイすることができる。A u s u b e l , e t a l .、上記参照を参照されたい。別のタンパク質と相互作用するタンパク質の能力は、例えば、共免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイまたは相補性によって、遺伝学的および生化学的の両方で、決定することができる。例えば、F i e l d s , e t a l . ( 1 9 8 9 ) N a t u r e 3 4 0 : 2 4 5 - 2 4 6 ; 米国特許第 5 , 5 8 5 , 2 4 5 号および国際特許公開番号 W O 9 8 / 4 4 3 5 0 を参照されたい。

10

#### 【0099】

「ベクター」は、遺伝子配列を標的細胞に移入することができる。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子の発現を方向付けることができ、遺伝子配列を標的細胞に移入することができる、任意の核酸構築物を意味する。よって、この用語は、クローニングおよび発現ビヒクルと共に、組み込みベクターを含む。

#### 【0100】

用語「被験体」および「患者」は、互換的に使用され、ヒト患者および非ヒト霊長類等の哺乳動物、ならびにウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウスおよび他の動物等の実験動物を指す。したがって、用語「被験体」または「患者」は、本明細書で使用される場合、本発明のヌクレアーゼ、ドナーおよび/または遺伝子改変された細胞を投与することができる、いずれかの哺乳動物患者または被験体を意味する。本発明の被験体は、障害を有する被験体を含む。

20

#### 【0101】

「自己免疫性疾患」は、免疫系が自己抗原を攻撃する疾患である。自己免疫性疾患の例として、円板状エリテマトーデス/深在性エリテマトーデス/凍瘡状エリテマトーデス/腫脹性エリテマトーデス腎症(tumidus lupus erythematosus nephropathy)が挙げられ、キメラ受容体は、円板状エリテマトーデス/深在性エリテマトーデス/凍瘡状エリテマトーデス/腫脹性エリテマトーデス腎症に関連する自己抗原(またはそのバリエーションもしくは断片)を含む。円板状エリテマトーデス/深在性エリテマトーデス/凍瘡状エリテマトーデス/腫脹性エリテマトーデス腎症に関連する自己抗原の例として、ANAが挙げられるがこれに限定されない。

30

#### 【0102】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、橋本病であり、キメラ受容体は、橋本病に関連する自己抗原を含む。橋本病に関連する自己抗原の例として、甲状腺ペルオキシダーゼおよびサイログロブリンが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0103】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、NMDAR脳炎であり、キメラ受容体は、NMDAR脳炎に関連する自己抗原(またはそのバリエーションもしくは断片)を含む。NMDAR脳炎に関連する自己抗原の例として、抗N-メチル-D-アスパラギン酸受容体(NR1サブユニット)が挙げられるがこれに限定されない。

40

#### 【0104】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、自己免疫性溶血性貧血であり、キメラ受容体は、自己免疫性溶血性貧血に関連する自己抗原(またはそのバリエーションもしくは断片)を含む。自己免疫性溶血性貧血に関連する自己抗原の例として、Rh式血液型抗原およびI抗原が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0105】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、尋常性天疱瘡であり、キメラ受容体は、尋常性天疱瘡に関連する自己抗原(またはそのバリエーションもしくは断片)を含む。尋常性天疱瘡に関連する自己抗原の例として、D s g 1 / 3 が挙げられるがこれに限定されない。

50

## 【 0 1 0 6 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、水疱性類天疱瘡であり、キメラ受容体は、水疱性類天疱瘡に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。水疱性類天疱瘡に関連する自己抗原の例として、B P 1 8 0 および B P 2 3 0 が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【 0 1 0 7 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、重症筋無力症であり、キメラ受容体は、重症筋無力症に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。重症筋無力症に関連する自己抗原の例として、アセチルコリンニコチン性シナプス後受容体が挙げられるがこれに限定されない。

10

## 【 0 1 0 8 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、グレーブス病であり、キメラ受容体は、グレーブス病に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。グレーブス病に関連する自己抗原の例として、サイロトロピン受容体が挙げられるがこれに限定されない。

## 【 0 1 0 9 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）であり、キメラ受容体は、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。特発性血小板減少性紫斑病に関連する自己抗原の例として、血小板インテグリンおよび G p I I b : I I I a が挙げられるがこれらに限定されない。

20

## 【 0 1 1 0 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、グッドパスチャー症候群であり、キメラ受容体は、グッドパスチャー症候群に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。グッドパスチャー症候群に関連する自己抗原の例として、コラーゲンアルファ - 3（I V）鎖が挙げられるがこれに限定されない。

## 【 0 1 1 1 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、関節リウマチであり、キメラ受容体は、関節リウマチに関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。関節リウマチに関連する自己抗原の例として、リウマチ因子およびカルパスタチンが挙げられるがこれらに限定されない。

30

## 【 0 1 1 2 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、若年性特発性関節炎であり、キメラ受容体は、若年性特発性関節炎に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。若年性特発性関節炎に関連する自己抗原の例として、R F、シトルリン化タンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【 0 1 1 3 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、多発性硬化症であり、キメラ受容体は、多発性硬化症に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。多発性硬化症に関連する自己抗原の例として、ミエリン塩基性タンパク質（M B P）、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（M O G）ペプチドおよびアルファ - ベータ - クリスタリンが挙げられるがこれらに限定されない。

40

## 【 0 1 1 4 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、セリアック病であり、キメラ受容体は、セリアック病に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。セリアック病に関連する自己抗原の例として、組織トランスグルタミナーゼ（T G 2）が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【 0 1 1 5 】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、悪性貧血であり、キメラ受容体は、悪性貧血に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。悪性貧血に関連する自己

50

抗原の例として、胃壁細胞の内因子が挙げられるがこれに限定されない。

【0116】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、白斑症であり、キメラ受容体は、白斑症に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。白斑症に関連する自己抗原の例として、65 kDa 抗原が挙げられるがこれに限定されない。

【0117】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、ベーチェット病であり、キメラ受容体は、ベーチェット病に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。ベーチェット病に関連する自己抗原の例として、ホスファチジルセリン、リボソームリンタンパク質および抗好中球細胞質抗体が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0118】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、強皮症であり、キメラ受容体は、強皮症に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。強皮症に関連する自己抗原の例として、Sc1-70、U1-RNPが挙げられるがこれらに限定されない。

【0119】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、乾癬であり、キメラ受容体は、乾癬に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。乾癬に関連する自己抗原の例として、カルパスタチンが挙げられるがこれに限定されない。

【0120】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、潰瘍性大腸炎（UC）およびクローン病であり、キメラ受容体は、UCおよびクローン病に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。UCおよびクローン病に関連する自己抗原の例として、ANAが挙げられるがこれに限定されない。

20

【0121】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、シェーグレン症候群であり、キメラ受容体は、シェーグレン症候群に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。シェーグレン症候群に関連する自己抗原の例として、SSAおよび抗SSBが挙げられるがこれらに限定されない。

【0122】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、ウェゲナー肉芽腫症であり、キメラ受容体は、ウェゲナー肉芽腫症に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。ウェゲナー肉芽腫症に関連する自己抗原の例として、ANAおよびANCAが挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0123】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、多発性筋炎または皮膚筋炎であり、キメラ受容体は、多発性筋炎または皮膚筋炎に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。多発性筋炎または皮膚筋炎に関連する自己抗原の例として、Jo-1が挙げられるがこれに限定されない。

【0124】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、原発性胆汁性肝硬変であり、キメラ受容体は、原発性胆汁性肝硬変に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。原発性胆汁性肝硬変に関連する自己抗原の例として、抗ミトコンドリア抗体、gp210、p62、sp100が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0125】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、抗リン脂質症候群（APS）であり、キメラ受容体は、抗リン脂質症候群に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。抗リン脂質症候群に関連する自己抗原の例として、抗リン脂質抗体が挙げられるがこれらに限定されない。

【0126】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、混合性結合組織病（MCTD）であり、キメラ受

50

容体は、混合性結合組織病に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。混合性結合組織病に関連する自己抗原の例として、U1-RNP、U1-70 kDa snRNPが挙げられるがこれらに限定されない。

【0127】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、ミラー・フィッシャー症候群であり、キメラ受容体は、ミラー・フィッシャー症候群に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。ミラー・フィッシャー症候群に関連する自己抗原の例として、GQ1bガングリオシドが挙げられるがこれに限定されない。

【0128】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、ギラン・バレー症候群であり、キメラ受容体は、ギラン・バレー症候群に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。ギラン・バレー症候群に関連する自己抗原の例として、GM1、アシアロGM1およびGD1bが挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0129】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、急性運動性軸索性神経障害であり、キメラ受容体は、急性運動性軸索性神経障害に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。急性運動性軸索性神経障害に関連する自己抗原の例として、GM1が挙げられるがこれに限定されない。

【0130】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、自己免疫性肝炎であり、キメラ受容体は、自己免疫性肝炎に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。自己免疫性肝炎に関連する自己抗原の例として、抗核抗体（ANA）および抗平滑筋抗体（ASMA）、抗肝臓・腎臓ミクロソーム-1抗体（ALKM-1）および抗肝臓サイトゾル抗体-1（ALC-1）が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0131】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、疱疹状皮膚炎であり、キメラ受容体は、疱疹状皮膚炎に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。疱疹状皮膚炎に関連する自己抗原の例として、IgA抗筋内膜抗体が挙げられるがこれに限定されない。

【0132】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、チャージ・ストラウス症候群であり、キメラ受容体は、チャージ・ストラウス症候群に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。チャージ・ストラウス症候群に関連する自己抗原の例として、抗好中球細胞質抗体（ANCA）が挙げられるがこれに限定されない。

30

【0133】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、顕微鏡的多発血管炎であり、キメラ受容体は、顕微鏡的多発血管炎に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。顕微鏡的多発血管炎に関連する自己抗原の例として、ANCAが挙げられるがこれに限定されない。

【0134】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、ANCA脈管炎であり、キメラ受容体は、ANCA脈管炎に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。ANCA脈管炎に関連する自己抗原の例として、好中球顆粒タンパク質（neutrophil granule protein）が挙げられるがこれに限定されない。

40

【0135】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、急性リウマチ熱であり、キメラ受容体は、急性リウマチ熱に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。急性リウマチ熱に関連する自己抗原の例として、連鎖球菌細胞壁抗原が挙げられるがこれに限定されない。

【0136】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、1型糖尿病（T1D）であり、キメラ受容体は、

50

T I Dに関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。T I Dに関連する自己抗原の例として、インスリン（I A A）、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（G A AまたはG A D）およびプロテインチロシンホスファターゼ（I A 2またはI C A 5 1 2）が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0137】

一実施形態では、自己免疫性疾患は、膜性腎症であり、キメラ受容体は、膜性腎症に関連する自己抗原（またはそのバリエーションもしくは断片）を含む。膜性腎症に関連する自己抗原の例として、P L A 2 R 1およびT H S D 7 A 1が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0138】

「幹細胞性」は、幹細胞様様式で作用する、いずれかの細胞の相対的能力（すなわち、全能性、多能性または寡能性（*oligopotency*）、およびいずれか特定の幹細胞が有し得る拡大増殖されるまたは無限の自己再生の程度）を指す。「A C T R」は、外因性に供給された抗体に結合することができる操作されたT細胞構成成分である、抗体結合T細胞受容体である。A C T R構成成分への抗体の結合は、抗体によって認識される抗原と相互作用するようにT細胞を武装させ、当該抗原に遭遇すると、T細胞を含むA C T Rが誘発されて、抗原と相互作用する（米国特許出願公開第2015/0139943号を参照）。

#### 【0139】

##### 融合分子

細胞における選択された標的遺伝子（例えば、C I S H）の切断に有用な組成物、例えば、ヌクレアーゼが、本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、融合分子の1種または複数の構成成分（例えば、ヌクレアーゼ）は、天然に存在する。他の実施形態では、融合分子の構成成分のうち1種または複数（例えば、ヌクレアーゼ）は、天然に存在しない、すなわち、D N A結合分子および/または切断ドメイン（複数可）において操作されている。例えば、天然に存在するヌクレアーゼのD N A結合部分は、選択された標的部位に結合するように変更されていてよい（例えば、同族結合部位とは異なる部位に結合するように操作された、C R I S P R / C a s系またはメガヌクレアーゼのシングルガイドR N A）。他の実施形態では、ヌクレアーゼは、異種D N A結合および切断ドメインを含む（例えば、異種切断ドメインを有する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ；T A L E F E K T A R D M E I N D N A結合タンパク質；メガヌクレアーゼD N A結合ドメイン）。よって、少なくとも1つのZ F N、T A L E N、メガヌクレアーゼ、C R I S P R / C a sヌクレアーゼその他が挙げられるがこれらに限定されない、いずれかのヌクレアーゼを本発明の実施において使用することができ、これらのヌクレアーゼは、標的遺伝子を切断し、この切断は、標的遺伝子のゲノム改変（例えば、切断された遺伝子への挿入および/または欠失）をもたらす。

#### 【0140】

ヌクレアーゼ複合体の操作された切断ハーフトドメインパートナーの独立した滴定により切断活性の特異性を増加させる方法も、本明細書に記載されている。一部の実施形態では、2つのパートナー（半分の切断ドメイン）の比は、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：8、1：9、1：10または1：20の比またはその間のいずれかの値で与えられる。他の実施形態では、2つのパートナーの比は、1：30を超える。他の実施形態では、2つのパートナーは、1：1とは異なるように選択される比で配備される。個々にまたは組み合わせて使用される場合、本発明の方法および組成物は、オフターゲット切断活性の低下により、標的化特異性の驚くべきかつ予想外の増加を提供する。これらの実施形態において使用されるヌクレアーゼは、Z F N、T A L E N、C R I S P R / C a s、C R I S P R / d C a sおよびT t A g o、またはこれらのいずれかの組合せを含むことができる。

#### 【0141】

##### A . D N A結合分子

本明細書に記載されている融合分子は、タンパク質ドメインおよび/またはポリヌクレオチドDNA結合ドメインを含む、いずれかのDNA結合分子(DNA結合ドメインとも称される)を含むことができる。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、表2に示す配列(配列番号40~47)の9~12個の近接ヌクレオチドを含む配列に結合する。

#### 【0142】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている組成物および方法は、ドナー分子に結合するためおよび/または細胞のゲノムにおける目的の領域に結合するために、メガヌクレアーゼ(ホーミングエンドヌクレアーゼ)DNA結合ドメインを用いる。天然に存在するメガヌクレアーゼは、15~40塩基対の切断部位を認識し、一般的に、4つのファミリーへとグループ化される:LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-CysボックスファミリーおよびHNHファミリー。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼは、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を含む。これらの認識配列は公知である。米国特許第5,420,032号および同第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カタログも参照されたい。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合特性は、非天然標的部位に結合するように操作することができる。例えば、Chevalier, 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;および米国特許出願公開第2007/0117128号を参照されたい。ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、ヌクレアーゼ全体としての文脈で変更することができる(すなわち、ヌクレアーゼが、同族切断ドメインを含むように)、または異種切断ドメインに融合することができる。

#### 【0143】

他の実施形態では、本明細書に記載されている方法および組成物において使用されるヌクレアーゼのうち1種または複数のDNA結合ドメインは、天然に存在するまたは操作された(天然に存在しない)TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,586,526号を参照されたい。Xanthomonas属の植物病原性細菌は、重要な作物植物において多くの疾患を引き起こすことが公知である。Xanthomonasの病原性は、植物細胞に25種を超える異なるエフェクタータンパク質を注射する、保存されたIII型分泌(T3S)装置に依存する。これらの注射されるタンパク質の中でも、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(TAL)エフェクターが挙げられる(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。最も良く特徴付けされたTAL-エフェクターの1つは、Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria由来のAvrBs3である(Bonas, et al. (1989) *Mol Gen Gen*

et 218:127-136 および国際特許公開番号 WO 2010/079430 を参照)。TAL-エフェクターは、タンデムリピートの中央集中ドメインを含有し、各リピートは、これらのタンパク質の DNA 結合特異性にとって鍵となる、およそ 34 アミノ酸を含有する。加えて、これらは、核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含有する(総説については、Schornack S, et al. (2006) J Plant Physiol 163(3):256-272 を参照)。加えて、植物病原性細菌 *Ralstonia solanacearum* において、*R. solanacearum* 次亜種 1 系統 GMI 1000 および次亜種 4 系統 RS 1000 における *Xanthomonas* の AvrBs3 ファミリーと相同である、brg11 および hpx17 と命名された 2 種の遺伝子が見出された(Heuer, et al. (2007) Appl and Envir Micro 73(13):4379-4384 を参照)。これらの遺伝子は、互いにヌクレオチド配列が 98.9% 同一であるが、hpx17 のリピートドメインにおける 1,575 bp の欠失によって異なる。しかし、両方の遺伝子産物は、*Xanthomonas* の AvrBs3 ファミリータンパク質と 40% 未満の配列同一性を有する。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 8,586,526 号を参照されたい。

#### 【0144】

これらの TAL エフェクターの特異性は、タンデムリピートに見出される配列に依存する。反復した配列は、およそ 102 bp を含み、リピートは典型的に、互いに 91~100% 相同である(Bonas, et al., 同書)。リピートの多型は通常、位置 12 および 13 に設置され、位置 12 および 13 における高頻度可変性二残基(RVD)の同一性と、TAL-エフェクターの標的配列における近接ヌクレオチドの同一性の間には 1 対 1 の対応があると思われる(Moscou and Bogdanove, (2009) Science 326:1501 および Boch, et al. (2009) Science 326:1509-1512 を参照)。実験によると、位置 12 および 13 における HD 配列がシトシン(C)への結合をもたらし、NG が T に結合し、NI が A、C、G または T に、NN が A または G に結合し、ING が T に結合するような、これらの TAL-エフェクターの DNA 認識のための天然コードが決定された。これらの DNA 結合リピートは、リピートの新たな組合せおよび数を有するタンパク質へとアセンブルされて、新たな配列と相互作用し、植物細胞において非内在性レポーター遺伝子の発現を活性化することができる人工転写因子を作製した(Boch, et al., 同書)。操作された TAL タンパク質は、FokI 切断ハーフドメインに連結されて、TAL エフェクタードメインヌクレアーゼ融合体(TALEN)を生じた。例えば、米国特許第 8,586,526 号; Christian, et al. (2010) Genetics 186(2):757-61 epub 10.1534/genetics.110.120717 を参照されたい。ある特定の実施形態では、TALE ドメインは、米国特許第 8,586,526 号に記載されている N-キャップおよび/または C-キャップを含む。

#### 【0145】

ある特定の実施形態では、細胞のゲノムの *in vivo* 切断および/または標的化された切断に使用されるヌクレアーゼのうち 1 種または複数の 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、最適な標的部位に結合するように操作されているという点において、天然に存在しない。例えば、これら全ての全体が参照により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

20

30

40

50



． 10 : 4 1 1 - 4 1 6 ; 米国特許第 6 , 4 5 3 , 2 4 2 号 ; 同第 6 , 5 3 4 , 2 6 1 号 ; 同第 6 , 5 9 9 , 6 9 2 号 ; 同第 6 , 5 0 3 , 7 1 7 号 ; 同第 6 , 6 8 9 , 5 5 8 号 ; 同第 7 , 0 3 0 , 2 1 5 号 ; 同第 6 , 7 9 4 , 1 3 6 号 ; 同第 7 , 0 6 7 , 3 1 7 号 ; 同第 7 , 2 6 2 , 0 5 4 号 ; 同第 7 , 0 7 0 , 9 3 4 号 ; 同第 7 , 3 6 1 , 6 3 5 号 ; 同第 7 , 2 5 3 , 2 7 3 号 ; および米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 6 4 4 7 4 号 ; 同第 2 0 0 7 / 0 2 1 8 5 2 8 号 ; 同第 2 0 0 5 / 0 2 6 7 0 6 1 号を参照されたい。

#### 【 0 1 4 6 】

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することができる。操作方法として、合理的設計と様々な種類の選択が挙げられるがこれらに限定されない。合理的設計は、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の使用を含み、このデータベースにおいて、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 種または複数のアミノ酸配列に関連付けられる。例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、共同所有される米国特許第 6 , 4 5 3 , 2 4 2 号および同第 6 , 5 3 4 , 2 6 1 号を参照されたい。

10

#### 【 0 1 4 7 】

ファージディスプレイおよびツーハイブリッド系を含む例示的な選択方法は、米国特許第 5 , 7 8 9 , 5 3 8 号 ; 同第 5 , 9 2 5 , 5 2 3 号 ; 同第 6 , 0 0 7 , 9 8 8 号 ; 同第 6 , 0 1 3 , 4 5 3 号 ; 同第 6 , 4 1 0 , 2 4 8 号 ; 同第 6 , 1 4 0 , 4 6 6 号 ; 同第 6 , 2 0 0 , 7 5 9 号 ; および同第 6 , 2 4 2 , 5 6 8 号 ; ならびに国際特許公開番号 W O 9 8 / 3 7 1 8 6 ; W O 9 8 / 5 3 0 5 7 ; W O 0 0 / 2 7 8 7 8 ; W O 0 1 / 8 8 1 9 7 ; ならびに英国特許第 2 , 3 3 8 , 2 3 7 号に開示されている。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、共同所有される国際特許公開番号 W O 0 2 / 0 7 7 2 2 7 に記載されている。

20

#### 【 0 1 4 8 】

加えて、上述および他の参考文献に開示されている通り、ジンクフィンガードメインおよび / または多指 ( m u l t i - f i n g e r e d ) ジンクフィンガータンパク質は、例えば、5 個またはそれよりも多いアミノ酸の長さのリンカーを含む、いずれか適したリンカー配列を使用して一体に連結することができる。6 個またはそれよりも多いアミノ酸の長さの例示的なリンカー配列については、米国特許第 6 , 4 7 9 , 6 2 6 号 ; 同第 6 , 9 0 3 , 1 8 5 号 ; および同第 7 , 1 5 3 , 9 4 9 号も参照されたい。本明細書に記載されているタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガーの間に、適したリンカーのいずれかの組合せを含むことができる。

30

#### 【 0 1 4 9 】

Z F P は、1 個または複数のヌクレアーゼ（切断）ドメインに作動可能に会合（連結）して、Z F N を形成することができる。用語「1 つの Z F N」は、二量体形成して標的遺伝子を切断する、1 対の Z F N を含む。方法および組成物を使用して、オフターゲット部位として公知の他の意図されない切断部位と比べて、その意図される標的に対して、ヌクレアーゼ対を含む Z F N の特異性を増加させることもできる（米国特許出願公開第 2 0 1 8 0 0 8 7 0 7 2 号を参照）。よって、本明細書に記載されているヌクレアーゼは、その DNA 結合ドメイン骨格領域のうち 1 個もしくは複数に変異を、および / またはそのヌクレアーゼ切断ドメインに 1 個もしくは複数に変異を含むことができる。このようなヌクレアーゼは、DNA 骨格におけるホスフェートと非特異的に相互作用することができる Z F P DNA 結合ドメイン（「Z F P 骨格」）内のアミノ酸への変異を含むことができるが、DNA 認識ヘリックスに変化を含まない。よって、本発明は、ヌクレオチド標的特異性に要求されない Z F P 骨格におけるカチオン性アミノ酸残基の変異を含む。一部の実施形態では、Z F P 骨格におけるこのような変異は、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、Z F P 骨格におけるこのような変異は、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

40

50

とを含む。好ましい実施形態では、変異は、DNA結合ヘリックスと比べて、位置(-5)、(-9)および/または位置(-14)に作製される。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1個または複数の変異を含むことができる。さらなる実施形態では、多指ジンクフィンガータンパク質における1個または複数のジンクフィンガーは、(-5)、(-9)および/または(-14)に変異を含むことができる。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)へと変異される。

#### 【0150】

一部の態様では、DNA結合ドメイン(例えば、ZFP、TALE、sgRNA等)は、CISH遺伝子を標的とする。ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、CISH遺伝子のエクソン領域、例えばエクソン2またはエクソン3を標的とする。

#### 【0151】

標的部位(例えば、CISH遺伝子のイントロンおよび/またはエクソン内の)の選択; ZFP、ならびに融合タンパク質(およびこ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、当業者にとって公知であり、米国特許第6,140,081号; 同第5,789,538号; 同第6,453,242号; 同第6,534,261号; 同第5,925,523号; 同第6,007,988号; 同第6,013,453号; 同第6,200,759号; ならびに国際特許公開番号WO95/19431; WO96/06166; WO98/53057; WO98/54311; WO00/27878; WO01/60970; WO01/88197; WO02/099084; WO98/53058; WO98/53059; WO98/53060; WO02/016536; およびWO03/016496に詳細に記載されている。

#### 【0152】

加えて、上述および他の参考文献に開示されている通り、ジンクフィンガードメインおよび/または多指ジンクフィンガータンパク質は、例えば、5個またはそれよりも多いアミノ酸の長さのリンカーを含む、いずれか適したリンカー配列を使用して一体に連結することができる。6個またはそれよりも多いアミノ酸の長さの例示的なリンカー配列については、米国特許第6,479,626号; 同第6,903,185号; および同第7,153,949号も参照されたい。本明細書に記載されているタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガーの間に、適したリンカーのいずれかの組合せを含むことができる。

#### 【0153】

ある特定の実施形態では、DNA結合分子は、CRISPR/Casヌクレアーゼ系の一部である。例えば、米国特許第8,697,359号および米国特許出願公開第2015/0056705号を参照されたい。系のRNA構成成分をコードするCRISPR(クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート)遺伝子座、およびタンパク質をコードするcas(CRISPR関連)遺伝子座(Jansen, 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)は、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)遺伝子と共に、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できる非コードRNAエレメントの組合せを含有する。

#### 【0154】

II型CRISPRは、最も良く特徴付けされた系の1つであり、4つの逐次ステップにおいて標的化されたDNA二本鎖切断を実行する。第一に、2種の非コードRNAであ

10

20

30

40

50

る、プレcrRNAアレイおよびtracrRNAが、CRISPR遺伝子座から転写される。第二に、tracrRNAが、プレcrRNAのリピート領域にハイブリダイズし、プレcrRNAから、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する。第三に、成熟crRNA:tracrRNA複合体は、標的認識の追加的な要件である、crRNAにおけるスペーサーおよびプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の隣にある標的DNAにおけるプロトスペーサーの間のワトソン・クリック塩基対形成を介して、Cas9を標的DNAに方向付ける。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製する。CRISPR/Cas系の活性は、3つのステップを含む:(i)「適応」と呼ばれるプロセスにおける、将来の攻撃を予防するための、CRISPRアレイへの外来性DNA配列の挿入、(ii)関連するタンパク質の発現、ならびにアレイの発現およびプロセッシングと、それに続く、(iii)外来性核酸によるRNA媒介性干渉。よって、細菌細胞において、いわゆる「Cas」タンパク質のうちいくつかは、CRISPR/Cas系の天然の機能と関与し、外来性DNA等の挿入等の機能における役割を果たす。

#### 【0155】

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「機能的誘導体」となることができる。ネイティブ配列ポリペプチドの「機能的誘導体」は、ネイティブ配列ポリペプチドと共通した定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」として、対応するネイティブ配列ポリペプチドと共通した生物活性を有することを条件に、ネイティブ配列の断片ならびにネイティブ配列ポリペプチドおよびその断片の誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書で企図される生物活性は、DNA基質を断片へと加水分解する機能的誘導体の能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーション、その共有結合改変、および融合体の両方を包含する。Casポリペプチドまたはその断片の適した誘導体として、Casタンパク質またはその断片の変異体、融合体、共有結合改変が挙げられるがこれらに限定されない。Casタンパク質またはその断片を含むCasタンパク質と共に、Casタンパク質またはその断片の誘導体は、細胞から得ることができるもしくは化学合成することができる、またはこれら2種の手順の組合せによって得ることができる。細胞は、Casタンパク質を天然に産生する細胞、またはCasタンパク質を天然に産生し、より高い発現レベルで内在性Casタンパク質を産生するように、もしくは外因性に導入された核酸からCasタンパク質を産生するように遺伝子操作された細胞となることができ、この核酸は、内在性Casと同じまたは異なるCasをコードする。一部の事例では、細胞は、Casタンパク質を天然に産生せず、Casタンパク質を産生するように遺伝子操作されている。一部の実施形態では、Casタンパク質は、AAVベクターを介した送達のための小型のCas9オルソログである(Ran, et al. (2015) Nature 510:186)。

#### 【0156】

一部の実施形態では、DNA結合分子は、TtAgo系の一部である(Swartz, et al.、同書; Sheng, et al.、同書を参照)。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、小型(19~31nt)RNAに結合されている。このタンパク質-RNAサイレンシング複合体は、小型RNAおよび標的の間のワトソン・クリック塩基対形成を介して標的RNAを認識し、標的RNAをエンドヌクレアーゼ的に(endonucleolytically)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、小型一本鎖DNA断片に結合し、外来性(多くの場合、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.、同書)。例示的な原核生物Agoタンパク質は、Aquifex aeolicus、Rhod

10

20

30

40

50

*obacter sphaeroides* および *Thermus thermophilus* 由来の Ago タンパク質を含む。

#### 【0157】

最も良く特徴付けされた原核生物 Ago タンパク質の1つは、*T. thermophilus* 由来の Ago タンパク質である (*TtAgo*; Swarts, et al., 同書)。TtAgo は、5'リン酸基を有する15ntまたは13~25ntの一本鎖DNA断片のいずれかと会合する。TtAgo によって結合されたこの「ガイドDNA」は、DNAのサードパーティ (*third-party*) 分子におけるワトソン・クリック相補的DNA配列に結合するようにタンパク質-DNA複合体を方向付けるように機能する。このようなガイドDNAにおける配列情報が、標的DNAの同定を可能にしたなら、TtAgo-ガイドDNA複合体は、標的DNAを切断する。斯かる機構は、その標的DNAに結合される際のTtAgo-ガイドDNA複合体の構造によっても支持される (*G. Sheng, et al., 同書*)。Rhodobacter sphaeroides 由来の Ago (*RsAgo*) は、同様の特性を有する (*Olovnikov, et al., 同書*)。

10

#### 【0158】

任意のDNA配列の外因性ガイドDNAを、TtAgoタンパク質にローディングすることができる (*Swarts et al., 同書*)。TtAgo切断の特異性は、ガイドDNAによって方向付けられるため、外因性の研究者指定の (*investigator-specified*) ガイドDNAにより形成されたTtAgo-DNA複合体は、したがって、TtAgo標的DNA切断を、研究者指定の相補的標的DNAに方向付けるであろう。このようにして、DNAに標的化された二本鎖切断を作製することができる。TtAgo-ガイドDNA系 (または他の生物由来のオルソロガス Ago-ガイドDNA系) の使用は、細胞内におけるゲノムDNAの標的化された切断を可能にする。斯かる切断は、一本または二本鎖のいずれかとなることができる。哺乳動物ゲノムDNAの切断のため、哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化されたTtAgoのバージョンを使用することが好ましくなるであろう。さらに、TtAgoタンパク質が細胞膜透過性ペプチドに融合されている、*in vitro*で形成されたTtAgo-DNA複合体で細胞を処置することが好ましくなり得る。さらに、摂氏37度で改善された活性を有するように変異誘発により変更されたTtAgoタンパク質のバージョンを使用することが好ましくなり得る。Ago-RNA媒介性DNA切断を使用して、DNA切断の活用のための技術分野で標準の技法を使用した、遺伝子ノックアウト、標的化された遺伝子付加、遺伝子補正、標的化された遺伝子欠失を含む一式の結果に影響を与えることができる。

20

30

#### 【0159】

よって、ヌクレアーゼは、ドナー (導入遺伝子) を挿入することが望まれるいずれかの遺伝子における標的部位に特異的に結合する、DNA結合分子を含む。

#### 【0160】

##### B. 切断ドメイン

いずれか適した切断ドメインを、DNA結合ドメインに操作可能に連結して、ヌクレアーゼを形成することができる。例えば、ZFP DNA結合ドメインをヌクレアーゼドメインに融合して、ZFN (種々の生物におけるゲノム改変における使用のためを含む、その操作された (ZFP) DNA結合ドメインを介してその意図する核酸標的を認識し、ヌクレアーゼ活性によりZFP結合部位付近でDNAをカットさせることができる機能的実体) を作製した。例えば、米国特許第7,888,121号; 同第8,623,618号; 同第7,888,121号; 同第7,914,796号; および同第8,034,598号; ならびに米国特許出願公開第2011/0201055号を参照されたい。同様に、TALE DNA結合ドメインをヌクレアーゼドメインに融合して、TALENを作製した。例えば、米国特許第8,586,526号を参照されたい。

40

#### 【0161】

上に記す通り、切断ドメインは、DNA結合ドメインにとって異種となることができ、

50

例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ由来の切断ドメイン、またはTALEN DNA結合ドメインおよび切断ドメイン、またはメガヌクレアーゼDNA結合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である。異種切断ドメインは、いずれかのエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインが由来し得る例示的なエンドヌクレアーゼとして、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼが挙げられるがこれらに限定されない。DNAを切断する追加的な酵素が公知である（例えば、S1ヌクレアーゼ；ダイズヌクレアーゼ；膵DNase I；小球菌ヌクレアーゼ；酵母HOエンドヌクレアーゼ）。これらの酵素（またはその機能的断片）のうち1種または複数を、切断ドメインおよび切断ハーフドメインの供給源として使用することができる。

10

#### 【0162】

同様に、切断ハーフドメインは、切断活性のために二量体形成を要求する、上に表記されているいずれかのヌクレアーゼまたはその部分に由来することができる。一般に、融合タンパク質が切断ハーフドメインを含む場合、2つの融合タンパク質が、切断に要求される。その代わりに、2つの切断ハーフドメインを含む単一のタンパク質を使用することができる。2つの切断ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来することができる、または各切断ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来することができる。加えて、それぞれの標的部位への2つの融合タンパク質の結合が、例えば二量体形成によって、切断ハーフドメインに機能的切断ドメインを形成させることが可能な互いに対する空間的配向性で、切断ハーフドメインを置くように、2つの融合タンパク質のための標的部位は、好ましくは、互いに関して配置される。よって、ある特定の実施形態では、標的部位の縁付近は、5～8ヌクレオチドまたは15～18ヌクレオチドによって分離される。しかし、いずれかの整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの標的部位の間に介在し得る（例えば、2～50ヌクレオチド対またはそれよりも多く）。一般に、切断の部位は、標的部位の間に置かれている。

20

#### 【0163】

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（認識部位において）に配列特異的に結合し、結合部位でまたはその付近でDNAを切断することができる。ある特定の制限酵素（例えば、IIS型）は、認識部位から除去される部位で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ヌクレオチドにおいて、また、他方の鎖においてその認識部位から13ヌクレオチドにおいて、DNAの二本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号；同第5,436,150号；および同第5,487,994号；ならびにLi, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 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。よって、一実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも1種の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操作されていなくてもよい、1個または複数のジンクフィンガー結合ドメインを含む。

30

40

#### 【0164】

その切断ドメインが結合ドメインから分離可能な、例示的なIIS型制限酵素は、FokIである。この特定の酵素は、二量体として活性がある。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、開示されている融合タンパク質において使用されるFokI酵素の部分は、切断ハーフドメインと考慮される。よって、ジンクフィンガー-FokI融合体を使用した標的化された二本鎖切断およ

50

び／または細胞配列の標的化された置換えのため、F o k I 切断ハーフドメインをそれぞれ含む2つの融合タンパク質を使用して、触媒活性がある切断ドメインを再構成することができる。その代わりに、ジンクフィンガー結合ドメインおよび2つのF o k I 切断ハーフドメインを含有する単一のポリペプチド分子を使用することもできる。ジンクフィンガー - F o k I 融合体を使用した標的化された切断および標的化された配列変更のためのパラメータは、本開示の他の箇所に提供されている。

#### 【0165】

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、または多量体形成（例えば、二量体形成）して機能的切断ドメインを形成する能力を保持する、タンパク質のいずれかの部分となることができる。

10

#### 【0166】

例示的なIIS型制限酵素は、その全体が本明細書に組み込まれる、国際特許公開番号WO07/014275に記載されている。追加的な制限酵素も、分離可能な結合および切断ドメインを含有し、これは、本開示によって企図される。例えば、Roberts, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420を参照されたい。

#### 【0167】

ある特定の実施形態では、切断ドメインは、例えば、これら全ての開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,623,618号；同第7,888,121号；同第7,914,796号；および同第8,034,598号；ならびに米国特許出願公開第2011/0201055号に記載されている通り、ホモ二量体形成を最小化または防止する、1個または複数の操作された切断ハーフドメイン（二量体形成ドメイン変異体とも称される）を含む。F o k I の位置446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537および538におけるアミノ酸残基は全て、F o k I 切断ハーフドメインの二量体形成に影響を与えるための標的である。

20

#### 【0168】

ある特定の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、F o k I に由来し、下に示す野生型全長F o k I と比べてナンバリングされた、アミノ酸残基416、422、447、448および／または525（例えば、米国特許出願公開第2018/0087072号を参照）のうち1個または複数の1個または複数の変異を含む：

30

#### 【化1】

##### 野生型FokI切断ハーフドメイン(配列番号1)

```
QLVKSELEKKSELRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVGYRG  
KHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNK  
HINPNNEWKVPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHNITNCNGAVLSVEELLIG  
GEMIKAGTLTLEEVRKFPNNGEINF
```

これらの変異は、F o k I ドメインおよびDNA分子の間の非特異的相互作用を減少させる。他の実施形態では、F o k I に由来する切断ハーフドメインは、アミノ酸残基414～426、443～450、467～488、501～502および／または521～531のうち1個または複数の変異を含む。変異は、F o k I と相同の天然の制限酵素に見出される残基への変異を含むことができる。ある特定の実施形態では、変異は、置換、例えば、異なるアミノ酸、例えば、セリン(S)による野生型残基の置換、例えば、R416SまたはK525Sである。好ましい実施形態では、位置416、422、447、448および／または525における変異は、無荷電のまたは負に荷電したアミノ酸による正に荷電したアミノ酸の置換えを含む。別の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、1個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。好ましい実施形態では、本発明は、操作された切断ハーフドメインが、位置416、422、447、448または525における1個または複数の変異に加えて、位置486における野

40

50

生型 G l n ( Q ) 残基が G l u ( E ) 残基に置き換えられ、位置 4 9 9 における野生型 I l e ( I ) 残基が L e u ( L ) 残基に置き換えられ、位置 4 9 6 における野生型 A s n ( N ) 残基が A s p ( D ) または G l u ( E ) 残基に置き換えられたポリペプチド ( 「 E L D 」 または 「 E L E 」 ) を含む、融合タンパク質を提供する。

#### 【 0 1 6 9 】

2 個以上の変異を有する切断ドメインを使用することができ、例えば、「 E 4 9 0 K : I 5 3 8 K 」と命名された操作された切断ハーフトドメインを産生するための、一方の切断ハーフトドメインにおける位置 4 9 0 ( E K ) および 5 3 8 ( I K ) における変異、ならびに「 Q 4 8 6 E : I 4 9 9 L 」と命名された操作された切断ハーフトドメインを産生するための、別の切断ハーフトドメインにおける位置 4 8 6 ( Q E ) および 4 9 9 ( I L ) における変異；位置 4 8 6 における野生型 G l n ( Q ) 残基を G l u ( E ) 残基に、位置 4 9 9 における野生型 I s o ( I ) 残基を L e u ( L ) 残基に、位置 4 9 6 における野生型 A s n ( N ) 残基を A s p ( D ) または G l u ( E ) 残基に置き換える変異（それぞれ「 E L D 」 および 「 E L E 」 ドメインとも称される）；位置 4 9 0、5 3 8 および 5 3 7 ( 野生型 F o k I と比べてナンバリング ) における変異、例えば、位置 4 9 0 における野生型 G l u ( E ) 残基を L y s ( K ) 残基に、位置 5 3 8 における野生型 I s o ( I ) 残基を L y s ( K ) 残基に、位置 5 3 7 における野生型 H i s ( H ) 残基を L y s ( K ) 残基または A r g ( R ) 残基に置き換える変異を含む操作された切断ハーフトドメイン（それぞれ「 K K K 」 および 「 K K R 」 ドメインとも称される）；および / または位置 4 9 0 および 5 3 7 ( 野生型 F o k I と比べてナンバリング ) に変異、例えば、位置 4 9 0 における野生型 G l u ( E ) 残基を L y s ( K ) 残基に、位置 5 3 7 における野生型 H i s ( H ) 残基を L y s ( K ) 残基または A r g ( R ) 残基に置き換える変異を含む、操作された切断ハーフトドメイン（それぞれ「 K I K 」 および 「 K I R 」 ドメインとも称される）が挙げられる。例えば、あらゆる目的のため、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 7 , 9 1 4 , 7 9 6 号；同第 8 , 0 3 4 , 5 9 8 号；および同第 8 , 6 2 3 , 6 1 8 号を参照されたい。他の実施形態では、操作された切断ハーフトドメインは、「シャーキー ( S h a r k e y ) 」 および / または 「シャーキー」 変異を含む ( G u o , e t a l . ( 2 0 1 0 ) J . M o l . B i o l . 4 0 0 ( 1 ) : 9 6 - 1 0 7 を参照 ) 。

#### 【 0 1 7 0 】

その代わりに、ヌクレアーゼは、いわゆる「開裂 ( s p l i t ) 酵素」技術を使用して、核酸標的部位において *i n v i v o* でアセンブルすることができる（例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 6 8 1 6 4 号を参照）。斯かる開裂酵素の構成成分は、別々の発現構築物において発現させることができる、または個々の構成成分が、例えば、自己切断 2 A ペプチドもしくは I R E S 配列によって分離された、1 つのオープンリーディングフレームにおいて連結することができる。構成成分は、個々のジンクフィンガー結合ドメイン、またはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインとなることができる。

#### 【 0 1 7 1 】

ヌクレアーゼは、例えば、米国特許第 8 , 5 6 3 , 3 1 4 号に記載されている酵母に基づく染色体系において、使用に先立ち活性に関してスクリーニングすることができる。

#### 【 0 1 7 2 】

C a s 9 関連の C R I S P R / C a s 系は、2 つの RNA 非コード構成成分 : t r a c r R N A および プレ c r R N A アレイ ( 同一のダイレクトリビート ( D R ) を間に置いたヌクレアーゼガイド配列 ( スペース ) を含有する ) を含む。C R I S P R / C a s 系を使用して、ゲノム工学を達成するために、これらの RNA の両方の機能が存在する必要がある ( C o n g , e t a l . ( 2 0 1 3 ) S c i e n c e e x p r e s s 1 / 1 0 . 1 1 2 6 / s c i e n c e 1 2 3 1 1 4 3 を参照 ) 。一部の実施形態では、t r a c r R N A および プレ c r R N A は、別々の発現構築物を介してまたは別々の RNA として供給される。他の実施形態では、キメラ RNA が構築され、この場合、操作された成熟 c r R N A ( 標的特異性を付与 ) が、t r a c r R N A ( C a s 9 との相互作用を供給 )

に融合されて、キメラ *cr-RNA-tracrRNA* ハイブリッド (シングルガイド RNA とともに命名されている) を作製する (Jinek, et al. (2012) *Science* 337:816-821; Jinek, et al. (2013) *eLife* 2:e00471. DOI: 10.7554/eLife.00471 および Cong、同書を参照)。

#### 【0173】

一部の実施形態では、CRISPR-Cpf1系が使用される。Francisella spp.において同定されたCRISPR-Cpf1系は、ヒト細胞において頑強な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が、Cpf1およびCas9は、そのガイドRNAおよび基質特異性を含む多くの側面で異なる (Fagerlund, et al. (2015) *Genom Bio* 16:251を参照)。Cas9およびCpf1タンパク質の間の主要な差は、Cpf1が、tracrRNAを利用せず、よって、crRNAのみを要求することである。FnCpf1 crRNAは、42~44ヌクレオチド長 (19ヌクレオチドリビートおよび23~25ヌクレオチドスペーサー) であり、二次構造を保持する配列変化を許容する単一のステム-ループを含有する。加えて、Cpf1 crRNAは、Cas9によって要求されるほぼ100ヌクレオチドの操作されたsgRNAよりも有意に短く、FnCpf1のためのPAM要件は、置換鎖における5'-TTN-3'および5'-CTA-3'である。Cas9およびCpf1の両方が、標的DNAに二本鎖切断を作製するが、Cas9は、そのRuvCおよびHNH様ドメインを使用して、ガイドRNAのシード配列内における平滑末端カットを作製する一方、Cpf1は、RuvC様ドメインを使用して、シードの外側に付着カットを産生する。Cpf1は、決定的なシード領域から離れて付着カットを作製するため、NHEJは、標的部位を破壊せず、したがって、所望のHDR組換え事象が起こるまで、Cpf1が同じ部位をカットし続けることができることを確実にするであろう。よって、本明細書に記載されている方法および組成物において、用語「Cas」が、Cas9およびCpf1タンパク質の両方を含むことが理解される。よって、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系の両方をいう。

#### 【0174】

##### 標的部位

上に詳細に記載されている通り、DNA結合ドメインは、選択したあらゆる配列に結合するように操作することができる。操作されたDNA結合ドメインは、天然に存在するDNA結合ドメインと比較して、新規結合特異性を有することができる。

#### 【0175】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ (複数可) は、CISH遺伝子、例えば、遺伝子のイントロンおよび/またはエクソン (例えば、エクソン2または3) を標的とする。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、表2に示す配列内の9~20個またはそれよりも多いヌクレオチド (近接または非近接) の標的部位に結合する。

#### 【0176】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、ヒト細胞におけるAAVS1、HPRT、ALBおよびCCR5遺伝子、ならびにマウス細胞におけるRosa26 (例えば、米国特許第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; 同第8,586,526号; ならびに米国特許出願公開第2003/0232410号; 同第2005/0208489号; 同第2005/0026157号; 同第2006/0063231号; 同第2008/0159996号; 同第2010/00218264号; 同第2012/0017290号; 同第2011/0265198号; 同第2013/0137104号; 同第2013/0122591号; 同第2013/0177983号; および同第2013/0177960号を参照)、ならびに植物におけるZp15遺伝子



座（米国特許第 8, 329, 986 号を参照）等、「セーフハーバー」遺伝子座を標的とする。

#### 【0177】

適した標的遺伝子の追加的な非限定的な例として、ベータ（ $\beta$ ）グロビン遺伝子（HBB）、ガンマ（ $\gamma$ ）グロビン遺伝子（HBG1）、B細胞リンパ腫/白血病11A（BCL11A）遺伝子、クルッペル様因子1（KLF1）遺伝子、CCR5遺伝子、CXCR4遺伝子、PPP1R12C（AAVS1）遺伝子、ヒボキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR1）遺伝子、アルブミン遺伝子、第VII因子遺伝子、第IX因子遺伝子、ロイシンリッチリピートキナーゼ2（LRKK2）遺伝子、ハンチンチン（Huntingtin）（HTT）遺伝子、ロドプシン（RHO）遺伝子、嚢胞性線維症膜コンダクタンス調節因子（CFTR）遺伝子、サーファクタントタンパク質B遺伝子（SFTPB）、T細胞受容体アルファ（TRAC）遺伝子、T細胞受容体ベータ（TRBC）遺伝子、プログラム細胞死1（PDC1）遺伝子、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）遺伝子、ヒト白血球抗原（HLA）A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-C遺伝子、HLA-DPA遺伝子、HLA-DQ遺伝子、HLA-DRA遺伝子、LMP7遺伝子、抗原ペプチド輸送体（TAP）1遺伝子、TAP2遺伝子、タバシン遺伝子（TAPBP）、クラスII主要組織適合複合体トランス活性化因子（CIITA）遺伝子、ジストロフィン遺伝子（DMD）、グルココルチコイド受容体遺伝子（GR）、CISH遺伝子、Rag-1遺伝子、RFX5遺伝子、FAD2遺伝子、FAD3遺伝子、ZP15遺伝子、KASII遺伝子、MDH遺伝子および/またはEPSPS遺伝子が挙げられる。一部の態様では、ヌクレアーゼ（複数可）は、チェックポイント阻害剤遺伝子、例えば、PD-1、CTLA4、阻害性リガンドのB7ファミリーの受容体に結合するおよび/またはこれを切断する、またはLAG3、2B4、BTLA、TIM3、A2aRおよびキラー細胞抑制受容体（KIRおよびC型レクチン受容体）を介したシグナル伝達に關与する受容体もしくはリガンド遺伝子（Pardoll（2012）Nat Rev Cancer 12（4）：252を参照されたい）、HLA複合体遺伝子（クラスI：HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、B2M；クラスII：HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA1、HLA-DQA、HLA-DRA、HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB1、HLA-DQB、HLA-DRB）もしくはTCR；および/またはHLA複合体のためのペプチドローディングプロセスおよび抗原プロセッシングに關与する産物（例えば、TAP、タバシン、カルネキリン、カルネキシン、LMP2、LMP7またはErp57）をコードする遺伝子を切断する。例えば、米国特許第 8, 956, 828 号および同第 8, 945, 868 号を参照されたい。

#### 【0178】

##### ドナー

ある特定の実施形態では、本開示は、細胞のゲノムへの外因性配列（例えば、治療タンパク質をコードする導入遺伝子）のヌクレアーゼ媒介性の標的化された組込みに關する。上に記す通り、例えば、指定の領域の欠失および/または変異体遺伝子の補正のための、または野生型遺伝子の発現増加のための、外因性配列（「ドナー配列」または「ドナー」または「導入遺伝子」とも呼ばれる）の挿入。ドナー配列が、典型的に、これが配置されるゲノム配列と同一でないことが容易に明らかとなるであろう。ドナー配列は、2つの相同性の領域に挟まれた非相同配列（例えば、導入遺伝子）を含有して、目的の場所における効率的なHDRを可能にすることができる、または非相同組換え修復機構により組み込むことができる。例えば、米国特許第 9, 045, 763 号；同第 9, 005, 973 号；および同第 7, 888, 121 号を参照されたい。その上、ドナー配列は、細胞クロマチンにおける目的の領域と相同でない配列を含有するベクター分子を含むことができる。ドナー分子は、細胞DNAに対し相同性の、いくつかの不連続領域を含有することができる。さらに、目的の領域に通常存在しない配列の標的化された挿入のため、前記配列は、ドナー核酸分子に存在し、目的の領域における配列に対し相同性の領域に挟まれることが

10

20

30

40

50

できる。

【0179】

ヌクレアーゼと同様に、ドナーは、いずれかの形態で導入することができる。ある特定の  
の実施形態では、ドナーは、本技術分野で公知の方法によってDNAおよび/またはウイル  
スベクターを使用して導入することができる。例えば、米国特許第9,005,973  
号；同第8,936,936号；および同第8,703,489号を参照されたい。ドナ  
ーは、二本または一本鎖形態で細胞に導入することができる。ドナーは、環状または直鎖  
状態形態で細胞に導入することができる。直鎖状態形態で導入される場合、ドナー配列の末端  
は、当業者に公知の方法によって保護することができる（例えば、エキソヌクレアーゼに  
よる分解から）。例えば、1個または複数のジデオキシヌクレオチド残基が、直鎖状分子  
の3'末端に付加される、および/または自己相補的オリゴヌクレオチドが、一方もしくは  
両方の末端にライゲーションされる。例えば、Chang, et al. (198  
7) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-49  
63; Nehls, et al. (1996) Science 272:886-  
889を参照されたい。分解から外因性ポリヌクレオチドを保護するための追加的な方法  
として、末端アミノ基（複数可）の付加、ならびに例えば、ホスホロチオエート、ホスホ  
ルアミデート（phosphoramidate）、およびO-メチルリボースまたはデ  
オキシリボース残基等の改変されたヌクレオチド間連結の使用が挙げられるがこれらに限  
定されない。

10

【0180】

ある特定の実施形態では、ドナーは、1kbの長さを超える、例えば、2~200kb  
の間、2~10kbの間（またはその間のいずれかの値）の配列（例えば、導入遺伝子と  
も称されるコード配列）を含む。ドナーは、少なくとも1個のヌクレアーゼ標的部  
位を含むこともできる。ある特定の実施形態では、ドナーは、例えば、1対のZFN、TALEN、  
TtAgoまたはCRISPR/Casヌクレアーゼのための、少なくとも2個の標  
的部  
位を含む。典型的には、ヌクレアーゼ標的部  
位は、導入遺伝子の切断のため、導入遺  
伝子配列の外側、例えば、導入遺伝子配列に対して5'および/または3'にある。ヌク  
レアーゼ切断部  
位（複数可）は、いずれかのヌクレアーゼ（複数可）のためのものとなる  
ことができる。ある特定の実施形態では、二本鎖ドナーに含有されるヌクレアーゼ標的部  
位（複数可）は、切断されたドナーが相同性非依存的方法により組み込まれる内在性標的  
の切断に使用される、同じヌクレアーゼ（複数可）のためのものである。

20

30

【0181】

ドナーは、その発現が、組込み部位における内在性プロモーターによって、すなわち、  
ドナーが挿入される内在性遺伝子の発現を駆動するプロモーターによって駆動されるよう  
に、挿入することができる。しかし、ドナーが、プロモーターおよび/またはエンハンサ  
ー、例えば、構成的プロモーターまたは誘導性もしくは組織特異的プロモーターを含むこ  
とができることが明らかであろう。

【0182】

ドナー分子は、内在性遺伝子の全てもしくは一部が発現されるまたは全く発現されない  
ように、内在性遺伝子に挿入することができる。一部の実施形態では、導入遺伝子は、C  
ISH遺伝子の内在性遺伝子座に組み込まれて、変異体バージョン（例えば、CISH遺  
伝子の機能的バージョンを欠如または欠乏している患者由来の細胞において）を補正し、  
例えば、導入遺伝子は、内在性CISH遺伝子、例えば、CISH遺伝子のエクソン（例  
えば、エクソン2またはエクソン3）に組み込まれる。他の実施形態では、導入遺伝子は  
、機能的タンパク質が発現されるように、CISH遺伝子の内在性遺伝子座に組み込まれ  
る。よって、ドナーは、CAR、操作されたもしくは外因性のTCR（米国特許第8,9  
56,828号を参照）および/またはACTR（米国特許出願公開第2017/028  
1682号）ならびにこれらの組合せが挙げられるがこれらに限定されない、機能的タン  
パク質を産生するいずれかのタンパク質コード配列を含むことができる。

40

【0183】

50

さらに、発現に要求されないが、外因性配列は、転写もしくは翻訳調節性または他の配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、2Aペプチドをコードする配列および/またはポリアデニル化シグナルを含むこともできる。その上、スプライスアクセプター配列が含まれてもよい。

#### 【0184】

本明細書に記載されているドナー配列において運ばれる導入遺伝子は、PCR等の本技術分野で公知の標準技法を使用して、プラスミド、細胞または他の供給源から単離することができる。使用のためのドナーは、環状のスーパーコイル、環状のほどけた、直鎖状その他を含む、様々な種類のトポロジーを含むことができる。その代わりに、ドナーは、標準オリゴヌクレオチド合成技法を使用して化学合成することができる。加えて、ドナーは、メチル化されていてもよく、メチル化を欠いていてもよい。ドナーは、細菌または酵母人工染色体(BACまたはYAC)の形態となることができる。

10

#### 【0185】

本明細書に記載されているドナーポリヌクレオチドは、1個または複数の非天然塩基および/または骨格を含むことができる。特に、本明細書に記載されている方法を使用して、メチル化シトシンを有するドナー分子の挿入を実行して、目的の領域における転写静止状態を達成することができる。

#### 【0186】

外因性(ドナー)ポリヌクレオチドは、いずれかの目的の配列(外因性配列)を含むことができる。例示的な外因性配列として、いずれかのポリペプチドコード配列(例えば、cDNA)、プロモーター配列、エンハンサー配列、エピトープタグ、マーカー遺伝子、切断酵素認識部位、および様々な種類の発現構築物が挙げられるがこれらに限定されない。マーカー遺伝子として、抗生物質抵抗性(例えば、アンピシリン抵抗性、ネオマイシン抵抗性、G418抵抗性、ピューロマイシン抵抗性)を媒介するタンパク質をコードする配列、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、増強型緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ)、ならびに増強された細胞成長および/または遺伝子増幅を媒介するタンパク質(例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ)をコードする配列が挙げられるがこれらに限定されない。エピトープタグは、例えば、1または複数コピーのFLAG、His、myc、Tap、HAまたはいずれかの検出可能なアミノ酸配列を含む。

20

30

#### 【0187】

一部の実施形態では、ドナーは、抗体、抗原、酵素、受容体(細胞表面または核またはキメラ抗原受容体(CAR))、ホルモン、リンホカイン、サイトカイン、レポーターポリペプチド、増殖因子、および上述のうちいずれかの機能的断片が挙げられるがこれらに限定されない、細胞におけるその発現が所望されるいずれかのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。コード配列は、例えば、cDNAとなることができる。

#### 【0188】

ある特定の実施形態では、外因性配列は、標的化された組込みを起こした細胞の選択を可能にするマーカー遺伝子(上述)、および追加的な機能性をコードする連結された配列を含むことができる。マーカー遺伝子の非限定的な例として、GFP、薬物選択マーカー(複数可)その他が挙げられる。

40

#### 【0189】

ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、例えば、変異した内在性配列を置き換えるための野生型遺伝子を含むことができる。例えば、野生型(または他の機能的)CISH遺伝子配列は、遺伝子の内在性コピーが変異された幹細胞のゲノムに挿入することができる。導入遺伝子は、内在性遺伝子座に挿入することができる、またはその代わりに、セーフハーバー遺伝子座に標的化することができる。

#### 【0190】

本明細書の教示に従った斯かる発現カセットの構築は、分子生物学の技術分野で周知の方法論を利用する(例えば、AusubelまたはManiatisを参照)。トランス

50

ジェニック動物を生成するための発現カセットの使用前に、適した細胞系（例えば、初代細胞、形質転換細胞または不死化細胞系）に発現カセットを導入することにより、選択された制御エレメントに関連するストレス誘導因子に対する発現カセットの応答性を検査することができる。

#### 【0191】

さらに、発現に要求されないが、外因性配列は、転写または翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、2Aペプチドをコードする配列、および/またはポリアデニル化シグナルとなることもできる。さらに、目的の遺伝子の制御エレメントをレポーター遺伝子に作動可能に連結して、キメラ遺伝子を作製することができる（例えば、レポーター発現カセット）。

10

#### 【0192】

非コード核酸配列の標的化された挿入を達成することもできる。アンチセンスRNA、RNAi、shRNAおよびマイクロRNA（miRNA）をコードする配列を、標的化された挿入に使用することもできる。

#### 【0193】

追加的な実施形態では、ドナー核酸は、追加的なヌクレアーゼ設計のための特異的標的部位である非コード配列を含むことができる。その後、本来のドナー分子が切断され、別の目的のドナー分子の挿入によって改変されるように、追加的なヌクレアーゼを細胞において発現させることができる。このようにして、特定の目的の遺伝子座またはセーフハーバー遺伝子座における形質スタッキングを可能にする、ドナー分子の反復的な組込みを生成することができる。

20

#### 【0194】

##### 細胞

よって、遺伝子改変されたCISH遺伝子を含む遺伝子改変された細胞が本明細書に提供される。遺伝子改変された細胞は、非コードまたはコード領域、例えば、CISH遺伝子のエクソン2および/またはエクソン3内を含む、CISH遺伝子内のどの箇所が改変されていてもよい。ある特定の実施形態では、改変は、本明細書に記載されている方法によって産生された細胞（例えば、T細胞または幹細胞）を含む、細胞における機能的タンパク質を発現する導入遺伝子の組込みを含む。導入遺伝子は、1種または複数のヌクレアーゼを使用して、標的化された様式で、細胞のゲノムに組み込まれる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、例えば、がん患者または炎症性疾患患者において、CISH遺伝子に組み込まれる。導入遺伝子は、CISHのいずれかのイントロンおよび/またはエクソン領域、例えば、エクソン2またはエクソン3に組み込むことができる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、表2に示す少なくとも9塩基対の標的部位に、またはそのいずれかの側の5～10ヌクレオチド以内に組み込まれる。よって、CISH遺伝子のエクソン2または3に組み込まれた導入遺伝子（機能的タンパク質を発現する）を含む遺伝子改変された細胞と共に、遺伝子改変を含むこのような細胞の後代である細胞が本明細書に提供される。

30

#### 【0195】

ランダム組込みとは異なり、標的化された組込みは、導入遺伝子が、指定の遺伝子に組み込まれることを確実にする。導入遺伝子は、標的遺伝子におけるどの箇所にも組み込むことができる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、ヌクレアーゼ切断部位にまたはその付近に、例えば、切断部位の上流または下流の1～300（またはその間の（therebetween）いずれかの値）塩基対以内に、より好ましくは、切断部位のいずれかの側の1～100塩基対（またはその間のいずれかの値）以内に、さらにより好ましくは、切断部位のいずれかの側の1～50塩基対（またはその間のいずれかの値）以内に組み込まれる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子を含む組み込まれる配列は、いかなるベクター配列（例えば、ウイルスベクター配列）も含まない。

40

#### 【0196】

細胞および細胞系が挙げられるがこれらに限定されない、いずれかの細胞型を、導入遺

50

伝子を含むように、本明細書に記載されている通りに遺伝子改変することができる。本明細書に記載されている導入遺伝子含有細胞の他の非限定的な例として、T細胞（例えば、CD4+、CD3+、CD8+等）；樹状細胞；B細胞；自家（例えば、患者由来の）または異種多能性、全能性もしくは複能性幹細胞（例えば、CD34+細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、胚性幹細胞その他）が挙げられる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている細胞は、患者に由来するCD34+細胞である。細胞は、培養において遺伝子改変することができる、またはその代わりに、本明細書に記載されているヌクレアーゼおよび/またはドナーを被験体に提供することにより、in vivoで遺伝子改変することができる。

#### 【0197】

本明細書に記載されている細胞は、例えば、ex vivo治療法による、障害を有する被験体におけるがんまたは炎症性疾患の処置および/または予防において有用である。標準技法を使用して、ヌクレアーゼ改変された細胞を拡大増殖し、次いで患者に再導入することができる。例えば、Tebas, et al. (2014) New Engl J Med 370(10):901を参照されたい。幹細胞の場合、被験体への注入後に、これらの前駆体から、機能的CISHタンパク質を発現する細胞へのin vivo分化も発生する。本明細書に記載されている細胞を含む医薬組成物も提供される。加えて、細胞は、患者への投与に先立ち凍結保存することができる。

#### 【0198】

本明細書に記載されている細胞およびex vivo方法は、被験体（例えば、哺乳動物被験体）における障害（例えば、がんまたは炎症性疾患）の処置および/または予防を提供し、同種異系骨髄移植またはガンマレトロウイルス送達等、継続的な予防的医薬品投与または危険な手順の必要を排除する。そのようなものとして、本明細書に記載されている発明は、免疫調節が望ましいがん、炎症性疾患および他の状態を処置および/または予防する、より安全で、対費用効果が高く、時間効率の良い仕方を提供する。

#### 【0199】

##### 送達

本明細書に記載されているヌクレアーゼ、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、ドナーポリヌクレオチド、ならびにタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含む組成物は、いずれか適した手段によって送達することができる。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼおよび/またはドナーは、in vivoで送達される。他の実施形態では、ヌクレアーゼおよび/またはドナーは、患者へのex vivo送達において有用な改変細胞の提供（細胞療法）のために、単離された細胞（例えば、自家または異種幹細胞）に送達される。

#### 【0200】

本明細書に記載されているヌクレアーゼを送達する方法は、例えば、これら全ての開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる、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号に記載されている。

#### 【0201】

本明細書に記載されているヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物は、構成成分のうち1種または複数をコードする配列を含有する、裸のDNAおよび/またはRNA（例えば、mRNA）ならびにベクターを含む、いずれかの核酸送達機構を使用して送達することもできる。プラスミドベクター、DNAミニサークル、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター；ヘルペスウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクター等、ならびにこれらの組合せが挙げられるがこれらに限定されない、いずれかのベクター系を使用することができる。それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,534,261号；同第6,

10

20

30

40

50

607, 882号;同第6, 824, 978号;同第6, 933, 113号;同第6, 979, 539号;同第7, 013, 219号;および同第7, 163, 824号;ならびに米国特許出願公開第2014/0335063号も参照されたい。さらに、これらの系のいずれかが、処置に必要とされる配列のうち1種または複数を含むことができることが明らかであろう。よって、1種または複数のヌクレアーゼおよびドナー構築物が、細胞に導入される場合、ヌクレアーゼおよび/またはドナーポリヌクレオチドは、同じ送達系または異なる送達機構において運ぶことができる。複数の系が使用される場合、各送達機構は、1種のまたは複数種のヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物(例えば、1種もしくは複数のヌクレアーゼをコードするmRNA、および/または1種もしくは複数のドナー構築物を保有するmRNAもしくはAAV)をコードする配列を含むことができる。

10

#### 【0202】

従来のウイルスおよび非ウイルスに基づく遺伝子移入方法を使用して、細胞(例えば、哺乳動物細胞)および標的組織にヌクレアーゼおよびドナー構築物をコードする核酸を導入することができる。非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、DNAミニサークル、裸の核酸、およびリボソームまたはポロキサマー等の送達ビヒクルと複合体形成した核酸を含む。ウイルスベクター送達系は、細胞への送達後に、エピソーム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ウイルスを含む。遺伝子療法手順の総説については、Anderson (1992) Science 256:808-813; Nabel & Felgner (1993) TIBTECH 11:211-217; Mitani & Caskey (1993) TIBTECH 11:162-166; Dillon (1993) TIBTECH 11:167-175; Miller (1992) Nature 357:455-460; Van Brunt (1988) Biotechnology 6(10):1149-1154; Vigne (1995) Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36; Kremer & Perricaud et (1995) British Medical Bulletin 51(1):31-44; Haddada, et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfle r and Boehm (eds.) (1995); および Yu, et al. (1994) Gene Therapy 1:13-26を参照されたい。

20

30

#### 【0203】

核酸の非ウイルス送達の方法は、電気穿孔、リポフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ピロソーム、リボソーム、イムノリボソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸コンジュゲート、脂質ナノ粒子(LNP)、裸のDNA、裸のRNA、キャッピングされたRNA、人工ピリオン、およびDNAの薬剤増強された取り込みを含む。例えば、Sonitron 2000系(Rich-Mar)を使用したソノポレーション(sonoporation)を、核酸の送達に使用することもできる。

#### 【0204】

追加的な例示的な核酸送達系は、Amixa 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核酸送達系を含む(例えば、米国特許第6,008,336号を参照)。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号;同第4,946,787号;および同第4,897,355号)に記載されており、リポフェクション試薬は、商業販売されている(例えば、Transfectam(商標)およびLipofectin(商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適したカチオン性および中性脂質は、Felgner、国際特許公開番号WO91/17424、WO91/16024の脂質を含む。一部の態様では、ヌクレアーゼは、mRNAとして送達され、導入遺伝子は、ウイルスベクター、ミニサークルDNA、プラスミドDNA、一

40

50

本鎖DNA、直鎖状DNA、リボソーム、ナノ粒子その他等、他のモダリティにより送達される。

#### 【0205】

免疫脂質 (immunolipid) 複合体等の標的化されたりリボソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者にとって周知である (例えば、Crystal (1995) Science 270:404-410; Blaese, et al. (1995) Cancer Gene Ther. 2:291-297; Behr, et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:382-389; Remy, et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:647-654; Gao, et al. (1995) Gene Therapy 2:710-722; Ahmad, et al. (1992) Cancer Res. 52:4817-4820; 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)。

10

#### 【0206】

追加的な送達方法は、送達しようとする核酸の、EnGeneIC送達ビヒクル (EDV) へのパッケージングの使用を含む。このようなEDVは、二特異性抗体を使用して、標的組織に特異的に送達され、この二特異性抗体において、抗体の一方のアームが、標的組織に対する特異性を有し、他方のアームが、EDVに対する特異性を有する。抗体が、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入れられる。細胞の中に入ると、内容物が放出される (MacDiarmid et al. (2009) Nature Biotechnology 27(7):643を参照)。

20

#### 【0207】

操作されたCRISPR/Cas系をコードする核酸の送達のためのRNAまたはDNAウイルスに基づく系の使用は、ウイルスを身体内の特異的細胞に標的化し、ウイルスペイロードを核に輸送するための、高度に進化したプロセスを活用する。ウイルスベクターは、被験体に直接的に投与することができる (in vivo)、またはin vitroでの細胞の処置に使用することができ、改変された細胞が被験体に投与される (ex vivo)。CRISPR/Cas系の送達のための従来のウイルスに基づく系として、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ヘルペスウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない。挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらすことが多い、レトロウイルス、レンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルス遺伝子移入方法により、宿主ゲノムにおける組込みが可能である。その上、高い形質導入効率が、多くの異なる細胞型および標的組織において観察された。

30

#### 【0208】

外来性エンベロープタンパク質を取り込み、標的細胞の潜在的標的集団を拡大増殖させることにより、レトロウイルスの親和性を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または感染し、典型的に、高いウイルス力価を産生することができるレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6~10kbの外來性配列のためのパッケージング容量を有するシス作用性末端反復配列で構成される。最小シス作用性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、標的細胞への治療用遺伝子の組込みに使用されて、永続的な導入遺伝子発現をもたらす。広く使用されているレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) およびこれらの組合せに基づくレトロウイルスベクターを含む (例えば、Buchsc her, et al. (1992) J. Virol. 66:2731-273

40

50

9; Johann, et al. (1992) J. Virol. 66:1635-1640; Sommerfelt, et al. (1990) Virol. 176:58-59; Wilson, et al. (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller, et al. (1991) J. Virol. 65:2220-2224; 国際特許公開番号WO1994/026877を参照)。

#### 【0209】

一過的発現が好ましい適用において、アデノウイルスに基づく系を使用することができる。アデノウイルスに基づくベクターは、多くの細胞型における非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を要求しない。斯かるベクターにより、高価かつ高レベルの発現が得られた。このベクターは、比較的単純な系において多量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターは、例えば、核酸およびペプチドの*in vitro*産生において、ならびに*in vivo*および*ex vivo*遺伝子療法手順のために、標的核酸による細胞の形質導入にも使用される(例えば、West, et al. (1987) *Virology* 160:38-47; 米国特許第4,797,368号; 国際特許公開番号WO93/24641; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351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. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260; Tratschin, et al. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat & Muzyczka (1984) *PNAS* 81:6466-6470; および Samulski, et al. (1989) *J. Virol.* 63:03822-3828を含むいくつかの刊行物に記載されている。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6およびAAV8、AAV8.2、AAV9およびAAVrh10、ならびにAAV2/8、AAV2/5およびAAV2/6等の偽型AAVを含む、いずれかのAAV血清型を使用することができる。

#### 【0210】

臨床試験における遺伝子移入のために、少なくとも6種のウイルスベクターアプローチを現在利用することができ、これは、形質導入剤を生成するためのヘルパー細胞系に挿入された遺伝子による欠損ベクターの補完を伴うアプローチを利用する。

#### 【0211】

pLASNおよびMFG-Sは、臨床試験において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. (1995) *Blood* 85:3048-305; Kohn, et al. (1995) *Nat. Med.* 1:1017-102; Malech, et al. (1997) *PNAS* 94:2212133-12138)。PA317/pLASNは、遺伝子療法治験において使用された最初の治療用ベクターであった(Blaese, et al. (1995) *Science* 270:475-480 (1995))。50%またはそれを超える形質導入効率が、MFG-Sパッケージングベクターに観察された(Ellem, et al. (1997) *Immunol Immunother.* 44(1):10-20; Dranoff et al. (1997) *Hum. Gene Ther.* 1:111-2)。

#### 【0212】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)は、欠損および非病原性パルボウイルスアデノ随伴2型ウイルスに基づく有望な代替遺伝子送達系である。全ベクターが、導入遺伝子発現カセットを挟むAAV145塩基対(bp)逆位末端リピートのみを保持するプラスミドに由来する。形質導入細胞のゲノムへの組込みによる、効率的な遺伝子移入および安定した導入遺伝子送達は、このベクター系のための鍵となる特色である(Wagner, et al. (1998) *Lancet* 351:9117-1702-



3 ; K e a r n s , e t a l . ( 1 9 9 6 ) G e n e T h e r . 9 : 7 4 8 - 5 5 ) 。 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 9 および A A V r h 1 0 、ならびにこれらの全バリエーションを含む他の A A V 血清型を、本発明に従って使用することもできる。

#### 【 0 2 1 3 】

複製欠損組換えアデノウイルスベクター ( A d ) は、高力価で産生することができ、いくつかの異なる細胞型に容易に感染する。大部分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る ; その後、複製欠損ベクターは、欠失された遺伝子機能をトランスで供給するヒト 2 9 3 細胞において繁殖される。 A d ベクターは、肝臓、腎臓および筋肉において見出される細胞等、非分裂の分化した細胞を含む、複数の型の組織に *i n v i v o* で形質導入することができる。従来の A d ベクターは、大きい運搬容量を有する。臨床試験における A d ベクターの使用の例は、筋肉内注射による抗腫瘍免疫化のためのポリヌクレオチド治療法が関与した ( S t e r m a n , e t a l . ( 1 9 9 8 ) H u m . G e n e T h e r . 7 : 1 0 8 3 - 9 ) 。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的な例として、 R o s e n e c k e r , e t a l . ( 1 9 9 6 ) I n f e c t i o n 2 4 : 1 5 - 1 0 ; S t e r m a n , e t a l . ( 1 9 9 8 ) H u m . G e n e T h e r . 9 ( 7 ) : 1 0 8 3 - 1 0 8 9 ; W e l s h , e t a l . ( 1 9 9 5 ) H u m . G e n e T h e r . 2 : 2 0 5 - 1 8 ; A l v a r e z , e t a l . ( 1 9 9 7 ) H u m . G e n e T h e r . 5 : 5 9 7 - 6 1 3 ; T o p f , e t a l . ( 1 9 9 8 ) G e n e T h e r . 5 : 5 0 7 - 5 1 3 ; S t e r m a n , e t a l . ( 1 9 9 8 ) H u m . G e n e T h e r . 7 : 1 0 8 3 - 1 0 8 9 が挙げられる。

#### 【 0 2 1 4 】

パッケージング細胞は、宿主細胞に感染することができるウイルス粒子の形成に使用される。斯かる細胞は、アデノウイルスをパッケージングする 2 9 3 細胞、およびレトロウイルスをパッケージングする 2 細胞または P A 3 1 7 細胞を含む。遺伝子療法において使用されるウイルスベクターは通常、核酸ベクターをウイルス粒子へとパッケージングする産生細胞系によって生成される。ベクターは典型的に、パッケージングおよびその後の宿主への組込み ( 該当する場合 ) に要求される最小ウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現されるべき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。欠損しているウイルス機能は、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、遺伝子療法において使用される A A V ベクターは典型的に、パッケージングおよび宿主ゲノムへの組込みに要求される、 A A V ゲノム由来の逆位末端リピート ( I T R ) 配列のみを保有する。ウイルス DNA は、他の A A V 遺伝子、すなわち、 *r e p* および *c a p* をコードするが I T R 配列を欠くヘルパープラスミドを含有する細胞系においてパッケージングされる。細胞系は、ヘルパーとしてのアデノウイルスにも感染される。ヘルパーウイルスは、 A A V ベクターの複製およびヘルパープラスミドからの A A V 遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、 I T R 配列を欠くため、有意な量でパッケージングされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、 A A V よりもアデノウイルスの感受性が高い加熱処置によって低減させることができる。

#### 【 0 2 1 5 】

多くの遺伝子療法適用において、特定の組織型に対し高度な特異性で遺伝子療法ベクターが送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外表面におけるウイルスコートタンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現させることにより、所与の細胞型に対する特異性を有するように改変することができる。リガンドは、目的の細胞型上に存在することが公知の受容体に対する親和性を有するように選択される。例えば、 H a n , e t a l . ( 1 9 9 5 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 2 : 9 7 4 7 - 9 7 5 1 は、モロニーマウス白血病ウイルスを、 *g p 7 0* に融合され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、この組換

えウイルスが、ヒト上皮増殖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のリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス - 標的細胞対へと拡大することができる。例えば、繊維状ファージは、実質的にあらゆる選択された細胞受容体に対して特異的結合親和性を有する抗体断片（例えば、F A BまたはF v）をディスプレイするように操作することができる。上述は、ウイルスベクターに主として適用されるが、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。斯かるベクターは、特異的標的細胞による取り込みに有利に働く、特異的取り込み配列を含有するように操作することができる。

#### 【0216】

遺伝子療法ベクターは、典型的に、後述する通り、全身性投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、舌下または頭蓋内注入）、局所的適用によって、または肺吸入により、個々の被験体への投与によって *in vivo* で送達することができる。その代わりに、ベクターは、個々の患者から外植された細胞（例えば、リンパ球、骨髓吸引液、組織生検）または普遍的ドナー造血幹細胞等、*ex vivo* で細胞に送達し、続いて、通常、ベクターを取り込んだ細胞の選択後に、患者に細胞を再移植することができる。

#### 【0217】

ヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リボソーム等）は、*in vivo* での細胞の形質導入のため、生物に直接的に投与することもできる。その代わりに、裸のDNAを投与することができる。投与は、注射、注入、局所的適用、吸入および電気穿孔が挙げられるがこれらに限定されない、血液または組織細胞との最終的な接触への分子の導入に通常使用される経路のいずれかによる。斯かる核酸を投与する適した方法は、利用することができ、当業者にとって周知であり、特定の組成物の投与に2種以上の経路を使用することができるが、特定の経路が、多くの場合、別の経路よりも速効性でより有効な反応をもたらすことができる。

#### 【0218】

本明細書に記載されているポリヌクレオチドの導入に適したベクターは、非組込みレンチウイルスベクター（IDLV）を含む。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; 米国特許第8,936,936号を参照されたい。

#### 【0219】

薬学的に許容される担体は、一部には、投与される特定の組成物と共に、組成物の投与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、後述する通り、利用できる医薬組成物の多種多様な適した製剤が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照）。

#### 【0220】

同じまたは異なる系を使用して、ヌクレアーゼコード配列およびドナー構築物を送達することができることが明らかであろう。例えば、ドナーポリヌクレオチドは、AAVによって運ぶことができる一方、1種または複数のヌクレアーゼは、mRNAによって運ぶことができる。さらに、異なる系は、同じまたは異なる経路（筋肉内注射、尾静脈注射、他の静脈内注射、腹腔内投与および/または筋肉内注射）によって投与することができる。複数のベクターは、同時にまたはいずれか逐次の順序で送達することができる。

#### 【0221】

*ex vivo* および *in vivo* 投与の両方のための製剤は、液体中の懸濁物または乳化した液体を含む。活性成分は多くの場合、薬学的に許容され、活性成分と適合性で

10

20

30

40

50

ある賦形剤と混合される。適した賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールその他、およびこれらの組合せを含む。加えて、組成物は、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、安定化剤、または医薬組成物の有効性を増強する他の試薬等、少量の補助的物質を含有することができる。

#### 【0222】

適用

本明細書に開示されている方法および組成物は、例えば、T細胞応答性をモジュレートするタンパク質の提供により、がん、炎症性障害および他の疾患のための治療法を提供するためのものである。細胞は、*in vivo*で改変することができる、または*ex vivo*で改変し、その後、被験体に投与することができる。よって、方法および組成物は、障害の処置および/または予防を提供する。

10

#### 【0223】

導入遺伝子（例えば、CAR導入遺伝子、HLA遺伝子、操作されたもしくは外因性のTCR遺伝子またはACTR）の標的化された組込みを使用して、異常なCISH関連遺伝子を補正する、野生型遺伝子（例えば、治療タンパク質）を挿入する、または内在性遺伝子の発現を変化させることができる。例えば、CARをコードする導入遺伝子を細胞に組み込んで、機能的なCARタンパク質を産生する細胞を提供することができる。ゲノム編集は、欠陥のある内在性遺伝子における変異（例えば、点変異）の補正を含み、これにより、遺伝子の発現を回復させ、障害を処置することもできる。

20

#### 【0224】

ある特定の実施形態では、1種または複数のCARが、CISH遺伝子に組み込まれる。CAR導入遺伝子は、本技術分野で公知であり、共刺激ドメインおよび活性化ドメインを含む細胞内シグナル伝達部分に連結された、特定の抗原に対する特異性を有する細胞外単鎖可変断片（scFv）を含む。共刺激ドメインは、例えば、CD28に由来することができ、活性化ドメインは、例えば、CD3-ゼータに由来することができる。CAR導入遺伝子は、2、3、4個またはそれよりも多い共刺激ドメインを含むことができる。CAR-scFvは、例えば、NHL、CLLおよび非T細胞ALLが挙げられるがこれらに限定されない、全正常B細胞およびB細胞悪性疾患を含むB細胞系列における細胞によって発現される膜貫通タンパク質である、CD19を標的とするように設計することができる。例えば、米国特許第9,855,298号を参照されたい。CAR導入遺伝子（複数可）に加えてまたはその代わりに、2018年8月8日に出願された米国特許出願第16/058,307号に記載されているB2MおよびHLA-Gおよび/またはHLA-Eの融合体が挙げられるがこれらに限定されない、1種または複数のHLA、B2Mおよび/または他の免疫調節性タンパク質をCISH遺伝子に組み込むことができる。

30

#### 【0225】

非限定的な例として、本明細書に記載されている方法および組成物は、B細胞白血病等のがんおよび/または大腸炎等の炎症性疾患の処置および/または予防に使用することができる。

#### 【0226】

次の実施例は、ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を含む、本開示の例示的な実施形態に関する。これは、単なる例証を目的としており、他のヌクレアーゼ、例えば、TALEN、TtAgoおよびCRISPR/Cas系、操作されたDNA結合ドメインを有するホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）、および/または天然に存在するもしくは操作されたホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）DNA結合ドメインおよび異種切断ドメインの融合体、および/またはメガヌクレアーゼおよびTALEタンパク質の融合体を使用することができることが認められるであろう。例えば、追加的なヌクレアーゼは、本明細書（例えば、表2）に開示されている配列の9~12個の近接ヌクレオチドを含む配列に結合するように設計することができる。

40

#### 【実施例】

#### 【0227】

50

(実施例 1 : C I S H に標的化されたジンクフィンガータンパク質ヌクレアーゼ ( Z F N ) )

U r n o v , e t a l . ( 2 0 0 5 ) N a t u r e 4 3 5 ( 7 0 4 2 ) : 6 4 6 - 6 5 1、P e r e z , e t a l . ( 2 0 0 8 ) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 6 ( 7 ) : 8 0 8 - 8 1 6 に基本的に記載され、米国特許第 6 , 5 3 4 , 2 6 1 号に記載されている通りに、C I S H に標的化されたジンクフィンガータンパク質を設計し、m R N A、プラスミド、A A V またはアデノウイルスベクターに取り込んだ。表 1 は、例示的な C I S H Z F P D N A 結合ドメインの D N A 結合ドメイン内の認識ヘリックス、およびこれらの Z F P のための標的部位を示す ( D N A 標的部位は大文字で示し ; 非接触ヌクレオチドは小文字で示す )。Z F P 認識ヘリックスによって接触される標的部位におけるヌクレオチドは大文字で示し ; 非接触ヌクレオチドは小文字で示す。T A L E N および / または s g R N A も、本技術分野で公知の方法に従って、表 2 に示す C I S H 配列に対して設計する (例えば、表 2 に示す標的部位の 9 ~ 2 0 個またはそれよりも多い ( 9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1 個またはそれよりも多くを含む ) ヌクレオチド ( 近接または非近接 ) を含む標的部位 )。例えば、米国特許第 8 , 5 8 6 , 5 2 6 号 ( T A L E N のために正準または非正準 R V D を使用 ) および米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 0 5 6 7 0 5 号を参照されたい。

10

【表 1】

表 1: CISH ジンクフィンガータンパク質認識ヘリックス設計

20

SBS #		設計					
	リンカー	F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	L0	RSDHLSQ (配列番号 2)	QNATRTK (配列番号 3)	RSDNLSE (配列番号 4)	KRCNLRC (配列番号 5)	DRSTRTK (配列番号 6)	RRDNLHS (配列番号 7)
59489	L0	GHTSLKR (配列番号 8)	TSGHLSR (配列番号 9)	RSDNLAR (配列番号 10)	QNVSRPR (配列番号 11)	TSGHLSR (配列番号 9)	QSGHLSR (配列番号 12)
59440	L0	RWQYLPT (配列番号 13)	DRSALAR (配列番号 14)	RSDNLAR (配列番号 10)	DRSNLTR (配列番号 15)	QSGNLAR (配列番号 16)	ATCCLAH (配列番号 17)
59441	L0	RSDDLTR (配列番号 18)	QAATLSR (配列番号 19)	RSDHLSA (配列番号 20)	DRSDLSR (配列番号 21)	RSDDLTR (配列番号 18)	DRSHLAR (配列番号 22)
59558	N6a	QSGDLTR (配列番号 23)	QSGNLHV (配列番号 24)	QSGHLAR (配列番号 25)	NRYDLMT (配列番号 26)	RSDSLLR (配列番号 27)	CREYRGK (配列番号 28)
59557	L0	QSSHLTR (配列番号 29)	QSSDLTR (配列番号 30)	QSGNLAR (配列番号 16)	RLDILQQ (配列番号 31)	RSDNLST (配列番号 32)	DNSYLPR (配列番号 33)
59581	N7a	DRSNLSR (配列番号 34)	LRQDLKR (配列番号 35)	RSDNLST (配列番号 32)	DNSNRIN (配列番号 36)	QSSDLNR (配列番号 37)	WKWNLRA (配列番号 38)
59580	L0	RSDSLLR (配列番号 27)	CREYRGK (配列番号 28)	QSGHLAR (配列番号 25)	QKGTIGE (配列番号 39)	RSDNLST (配列番号 32)	QSGHLSR (配列番号 12)

30

40

【表 2】

表 2: ジンクフィンガータンパク質の標的部位

SBS #	標的部位
59488	5' ggAAGGCCcCAGCAGGCAAGGgctgcat (配列番号 40)
59489	5' gaGGAGGTgGCAGAGGGTACCCcagccc (配列番号 41)
59440	5' ccAGCAAAgGACGAGGTCTAGaaggcag (配列番号 42)
59441	5' gtGGAGCGGACTGGGCGAGCGgcccctgt (配列番号 43)
59558	5' gaTGCGTGgCCTGGACAAGCAgttgag (配列番号 44)
59557	5' gaGTCCAGACGGAAGCTGGAgtcggcat (配列番号 45)
59581	5' atAGTGCTgCACAAGGCTGACcacatcc (配列番号 46)
59580	5' ccGGAAAGgCCAGGATGCGTGgcctgga (配列番号 47)

10

## 【0228】

切断活性に関して、全ての ZFN の対での組合せを検査した。ある範囲の mRNA (100 uL トランスフェクション反応における 3E6 個の T 細胞につき、0.5 μg ~ 6 μg) にわたる CISH 標的化 ZFN をコードする mRNA により、活性化された T 細胞を電気穿孔した。T 細胞をトランスフェクション後 3 ~ 4 日間拡大増殖させ、ゲノム DNA を採集し、CISH 編集効率をディープシーケンシングによって評価する。表 3 (表中、パーセント切断が、表示の投薬量における表示の対により示されており、例えば、6 μg mRNA を使用した対 59488 / 59489 を使用した、CISH 遺伝子の 89 % 切断) に示す通り、全ての対が活性であることが判明した。

20

【表 3】

表 3:ヌクレアーゼ媒介性切断

	ZFN 対		6 μg	2 μg	0.5 μg
エクソン 2	59488	59489	89	84	60
	59440	59441	84	82	59
エクソン 3	59558	59557	84	80	55
	59581	59580	82	83	72

30

## 【0229】

これらの設計が、正準または非正準リンカー (フィンガー間) が挙げられるがこれらに限定されない、フィンガーモジュールのいずれかの間に、および / または ZFP および切断ドメインの間にいずれかのリンカーを、および / または米国特許第 9,394,531 号に記載されている通り ZFP および切断ドメインの間にリンカーを含むことができることが明らかであろう。米国特許第 8,772,453 号および米国特許出願公開第 2015/0064789 号も参照されたい。

40

## 【0230】

さらに、ヌクレアーゼ (ZFN、CRISPR / Cas 系および TALEN) のいずれかは、操作された切断ドメイン、例えば、米国特許第 8,623,618 号に開示されているヘテロ二量体 (例えば、ELD および KKR 操作された切断ドメイン) および / または米国特許出願公開第 2018/0087072 号に記載されている通り位置 416、422、447、448 および / または 525 に 1 個または複数の変異を有する切断ドメインを含むことができる。ZFN は、米国特許出願公開第 2018/0087072 号に記載されている通り、ZFP の骨格残基に 1 個または複数の変異を含むこともできる。これらの変異体は、本明細書に記載されている例示的な DNA 結合ドメインと併せて使用した

50

。

## 【0231】

(実施例2：標的化されたCISHドナー挿入)

AAV GFPドナーを使用したCISH遺伝子座への標的化された組込みも行った。まず、AAV GFPドナーは、CISH切断部位に対して5'および3'で相同性アームに挟まれたGFP発現カセットをコードするように構築した。細胞が、CISH標的化ZFNで処置され、AAVドナーと同時投与される場合、挟んでいる相同性アームは、相同組換え修復経路によるCISH切断部位へのGFP発現カセットの標的化された挿入の媒介に必要である。本実験において、活性化されたT細胞は、CISH mRNAにより電気穿孔され、AAV GFPドナーと同時投与される。%GFP陽性細胞のFACS解析によって、7日後に標的化された組込み効率を評価した。

10

## 【0232】

図2および図3に示す通り、GFP発現のためのFACS解析は、本明細書に記載されているCISH標的化ヌクレアーゼおよびドナーの両方を受けた細胞において、ドナー(GFP)挿入の少なくとも70%の効率が得られたことを示した。

## 【0233】

(実施例3：AAVS1セーフハーバー遺伝子座と比較した、CISHにおけるドナー挿入後の増強された免疫賦活性活性化)

AAV GFPドナーを使用して、CISHまたはAAVS1遺伝子座への標的化された組込みも行った。まず、AAV GFPドナーは、CISHまたはAAVS1切断部位に対して5'および3'で相同性アームに挟まれたGFP発現カセットをコードするように構築した。細胞が、CISHまたはAAVS1標的化ZFN(CISH特異的ZFN：SB59440/SB59441(上の表1に示す通り)；AAVS1特異的ZFN(米国特許第9,957,526号に記載されているSB30054およびSB30035と命名されたZFPを含む)で処置され、対応するAAVドナーと同時投与される場合、挟んでいる相同性アームは、相同組換え修復経路によるCISHまたはAAVS1切断部位へのGFP発現カセットの標的化された挿入の媒介に必要である。本実験において、活性化されたエフェクターT細胞は、CISHまたはAAVS1 ZFN mRNAにより電気穿孔され、対応するAAV GFPドナーと同時投与される。Miseq解析によって、7日後にゲノム改変効率を評価した。

20

30

## 【0234】

図5に示す通り、本明細書に記載されているCISHまたはAAVS1標的化ヌクレアーゼおよびAAV GFPドナーの両方を受けた細胞において、高レベルのゲノム改変率が得られた。図6は、おそらく、サイトカインシグナル抑制因子(SOCS)ファミリーのメンバーであるCISHの発現のノックアウトが原因で、CISHにおけるGFPドナーの標的化された組込みが、TCR媒介性活性化により、エフェクターT細胞免疫賦活性機能を増強することを実証する。

## 【0235】

(実施例4：Ex vivo方法)

CISH遺伝子に組み込まれた導入遺伝子(例えば、CARおよび/または他の治療用導入遺伝子)を含む、本明細書に記載されている遺伝子改変された細胞(例えば、T細胞または造血幹細胞)が、がんまたは炎症性障害患者に投与される。細胞の投与(単一または複数の投薬)は、細胞療法における公知のいずれかの方法によって為される。疾患または障害(またはその症状)は、投与後に改善される。

40

## 【0236】

本明細書で言及されているあらゆる特許、特許出願および刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

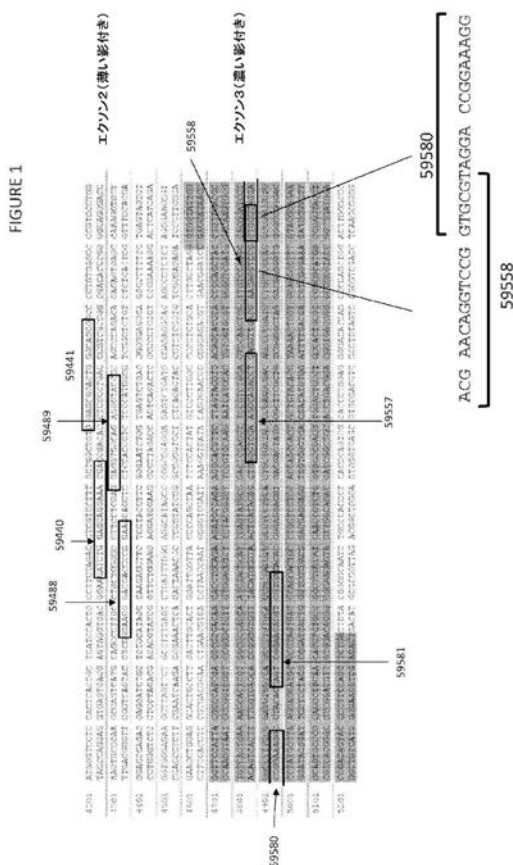
## 【0237】

明瞭な理解を目的として、説明および実施例として少し詳しく開示を提供してきたが、当業者であれば、本開示の精神または範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正

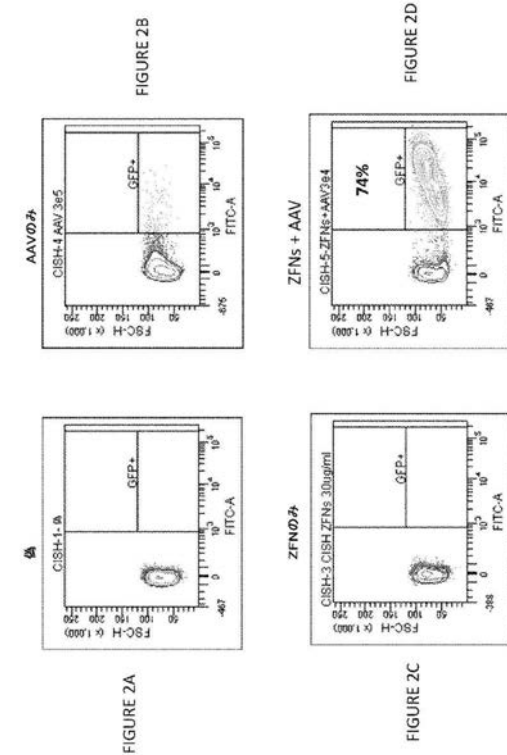
50

を実施できることが明らかであろう。したがって、先の記述および実施例は、限定として解釈するべきではない。

【図 1】



【図 2】



【 図 3 】

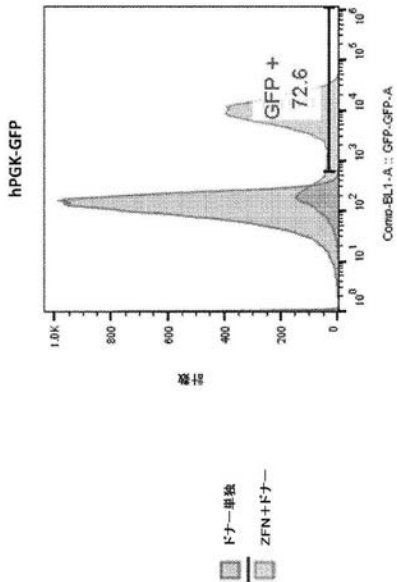


Figure 3

【 図 4 】

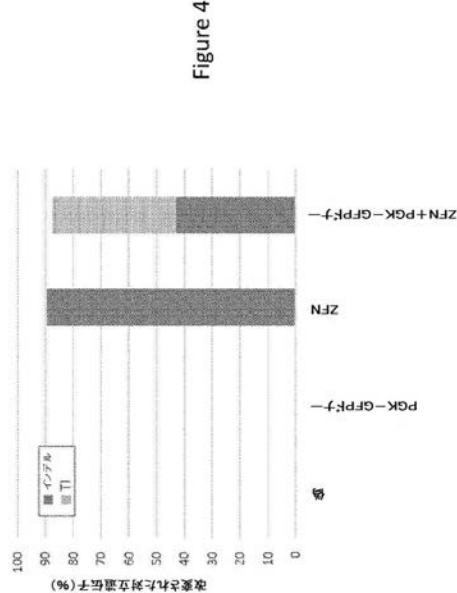


Figure 4

【 図 5 】

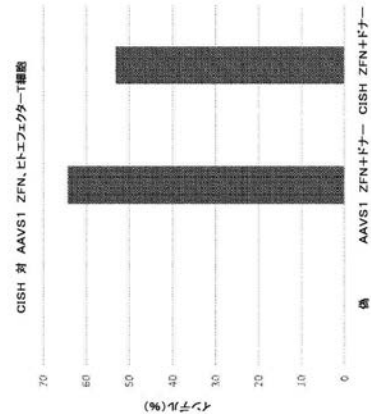


Figure 5

【 図 6 】

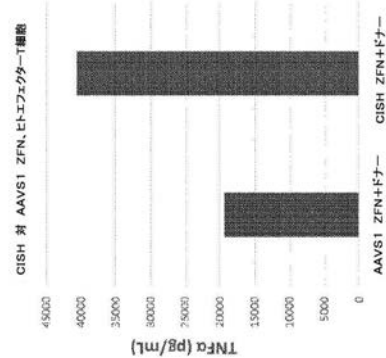


Figure 6



【配列表】

2021502085000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/60038
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 35/17, C07K 14/47, C07K 14/715, C12N 15/90, C12N 15/113 (2019.01) CPC - A61K 35/17, C07K 14/4718, C07K 14/705, C07K 14/7158, C12N 15/113, C12N 15/907, C12N 2310/20, C12N 2510/00, C12N 2800/80  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	WO 2017/023803 A1 (UNIV MINNESOTA et al.,) 8 February 2017 (9.02.2017) Claim 2; para [0045]; para [00108]; para [00119]; para [00128-00130]; para [00169]; para [00270]; para [00491]	1-4 ----- 5
Y	US 2017/0281682 A1 (UNUM THERAPEUTICS, INC.) 5 October 2017 (5.10.2017) Abstract; Claim 12; para [0005]; para [0021]	5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 April 2019		Date of mailing of the international search report 01 MAY 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lea W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/60038

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-10, 14-19  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

— Please see continuation in first extra sheet —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-5

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/60038

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, Claims 1-5, directed to a genetically modified cell comprising a genomic modification within exon 2 or exon 3 of an endogenous CISH gene.

Group II+, claims 11-13, directed to a zinc finger protein comprising 6 zinc finger domains. The zinc finger protein may be searched, for example, to encompass the recognition helix regions of the protein designated SBS#59488 comprising the peptides of SEQ ID NO:2-7, (as shown in Table 1, p66 of the application) for an additional fee and election as such. It is believed that claims 11-13 read on this exemplary invention. Additional protein(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected protein(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be SBS#59489 comprising the peptides of SEQ ID NO:8-12 (claims 11-13).

The inventions listed as Group I and II+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

**Special technical features**

Group I has the special technical feature of a genetically modified cell comprising a genomic modification of an endogenous CISH gene, that is not required by Group II+.

The inventions of Group II+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence. Each amino acid sequence is a unique peptide, and is considered a distinct technical feature. Additionally, Group II+ has the special technical feature of a zinc finger protein comprising 6 zinc finger domains, that is not required by Group I.

**Common technical features**

No technical features are shared between the inventions of Groups I and II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups II+ were considered to share the technical features of including: zinc finger protein comprising 6 zinc finger domains each comprising a recognition helix region, these shared technical features are previously disclosed by US 2014/0030240 A1 to Gregory et al., (hereinafter 'Gregory').

Gregory teaches a zinc finger protein comprising 6 zinc finger domains each comprising a recognition helix region (Claim 1 - 'A method of modifying PD1 expression in a cell of a subject having a disease or disorder characterized by aberrant expression or regulation of a PD1 gene, the method comprising modulating expression of the PD1 in the cell of the subject by administering a polynucleotide encoding a fusion protein comprising a zinc finger protein and a functional domain to the cell, wherein the zinc finger protein comprising four, five or six zinc finger recognition regions ordered from F1 to F4, F1 to F5 or F1 to F6, from N-terminus to C-terminus.'; para [0009] - 'In certain embodiments, the zinc finger domains of the nuclease fusion proteins comprise the non-naturally occurring recognition helices shown in Table 1 and/or bind to the target sites shown in Table 2.').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I and II+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of Item 4 above: claims 6-10, 14-19 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 14/725 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/09 1 1 0	
<b>C 0 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/725	
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>	C 0 7 K 19/00	
<b>C 1 2 N 9/22 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/47	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 9/22	
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	
	C 1 2 P 21/08	

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 コンウェイ, アンソニー

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

(72)発明者 リー, ゲイリー ケー.

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

F ターム(参考) 4B050 CC04 DD02 LL01 LL10

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA27 CA44 CA60

4H045 AA10 AA30 AA50 BA10 BA41 DA50 DA76 EA28 FA74