

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6050230号
(P6050230)

(45) 発行日 平成28年12月21日 (2016.12.21)

(24) 登録日 平成28年12月2日 (2016.12.2)

| | |
|-------------------------|-----------------------|
| (51) Int. Cl. | F 1 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| C O 7 K 19/00 (2006.01) | C O 7 K 19/00 |
| C 1 2 N 9/16 (2006.01) | C 1 2 N 9/16 Z |
| C 1 2 N 5/16 (2006.01) | C 1 2 N 5/16 |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 |

請求項の数 19 (全 56 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2013-520872 (P2013-520872) | (73) 特許権者 | 508241200 |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年7月21日 (2011.7.21) | | サンガモ バイオサイエンスーズ, イン |
| (65) 公表番号 | 特表2013-538562 (P2013-538562A) | | コーポレイテッド |
| (43) 公表日 | 平成25年10月17日 (2013.10.17) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リッ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2011/044902 | | チモンド カナル プールバード 501 |
| (87) 国際公開番号 | W02012/012667 | | ポイント リッチモンド テク センタ |
| (87) 国際公開日 | 平成24年1月26日 (2012.1.26) | | ー スト エー100 |
| 審査請求日 | 平成26年6月30日 (2014.6.30) | (73) 特許権者 | 513013920 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/404,685 | | ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ |
| (32) 優先日 | 平成22年10月6日 (2010.10.6) | | ーシティ オブ テキサス システム |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国, テキサス 77030, |
| (31) 優先権主張番号 | 61/400,009 | | ヒューストン, ホルコム プールバード |
| (32) 優先日 | 平成22年7月21日 (2010.7.21) | | 1515 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100099759 |
| 前置審査 | | | 弁理士 青木 篤 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 H L A 遺伝子座の修飾のための方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非天然存在の亜鉛フィンガーDNA結合ドメインを含む単離されたポリペプチドであって、該亜鉛フィンガーDNA結合ドメインは、F 1、F 2、F 3、F 4、F 5 及び F 6 と標記され、そしてN末端からC末端にF 1 からF 4 又はF 5 又はF 6 と順位付けされる、4、5 又は6 つの亜鉛フィンガーDNA認識領域を含み、

さらに、該亜鉛フィンガーDNA認識領域、及び前記ポリペプチドの結合特性は、以下：

(i) F 1 : Q S S H L T R (配列番号 1) ;
 F 2 : R S D H L T T (配列番号 2) ;
 F 3 : R S D T L S Q (配列番号 3) ;
 F 4 : R S A D L S R (配列番号 4) ;
 F 5 : Q S S D L S R (配列番号 5) ; 及び
 F 6 : R S D A L T Q (配列番号 6)

であり、

ここで、前記ポリペプチドは、ヒト白血球抗原 (H L A) A 2 遺伝子内の配列番号 97 で示される標的配列中の大文字で示される標的部位に結合し；

(ii) F 1 : Q K T H L A K (配列番号 7) ;
 F 2 : R S D T L S N (配列番号 8) ;
 F 3 : R K D V R I T (配列番号 9) ;

10

20

F 4 : R S D H L S T (配列番号 1 0) ; 及び
 F 5 : D S S A R K K (配列番号 1 1) ;
 ここで、前記ポリペプチドは、H L A A 2 遺伝子内の配列番号 9 8 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

(i i i) F 1 : Q N A H R K T (配列番号 : 1 2) ;
 F 2 : R S D S L L R (配列番号 : 1 3) ;
 F 3 : R N D D R K K (配列番号 : 1 4) ;
 F 4 : R S D H L S T (配列番号 : 1 0) ; 及び
 F 5 : D S S A R K K (配列番号 : 1 1) ;

ここで、前記ポリペプチドは、H L A A 2 遺伝子内の配列番号 9 9 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

(i v) F 1 : S S E L L N E (配列番号 : 2 3) ;
 F 2 : T S S H L S R (配列番号 : 2 4) ;
 F 3 : Q S G D R N K (配列番号 : 2 5) ;
 F 4 : R S A N L A R (配列番号 : 2 6) ; 及び
 F 5 : R S D N L R E (配列番号 : 2 7) ;

ここで、前記ポリペプチドは、H L A B 遺伝子内の配列番号 1 0 2 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ; ,

(v) F 1 : Q S G D L T R (配列番号 2 8) ;
 F 2 : R S D D L T R (配列番号 1 6) ;
 F 3 : D Q S T L R N (配列番号 2 9) ;
 F 4 : D R S N L S R (配列番号 3 0) ; 及び
 F 5 : D A F T R T R (配列番号 3 1) ;

ここで、前記ポリペプチドは、H L A B 遺伝子内の配列番号 1 0 3 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

(v i) F 1 : R S D N L S E (配列番号 3 2) ;
 F 2 : A S K T R K N (配列番号 3 3) ;
 F 3 : T S G N L T R (配列番号 3 4) ; 及び
 F 4 : R S D A L A R (配列番号 3 5) ;

ここで、前記ポリペプチドは、H L A B 遺伝子内の配列番号 1 0 4 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

(v i i) F 1 : D R S A L S R (配列番号 : 1 9) ;
 F 2 : Q S G N L A R (配列番号 : 3 6) ;
 F 3 : D R S A L S R (配列番号 : 1 9) ; 及び
 F 4 : Q S G H L S R (配列番号 : 1 8) ;

ここで、前記ポリペプチドは、H L A B 遺伝子内の配列番号 1 0 5 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

(v i i i) F 1 : R S D N L S E (配列番号 : 3 2) ;
 F 2 : A S K T R K N (配列番号 : 3 3) ;
 F 3 : Q S G H L S R (配列番号 : 1 8) ;
 F 4 : T S G H L S R (配列番号 : 3 7) ; 及び
 F 5 : Q S G H L S R (配列番号 : 1 8) ;

ここで、前記ポリペプチドは、H L A B 遺伝子内の配列番号 1 0 6 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

(i x) F 1 : R S A D L T R (配列番号 : 3 8) ;
 F 2 : Q S G D L T R (配列番号 : 2 8) ;
 F 3 : Q S G N L A R (配列番号 : 3 6) ; 及び
 F 4 : Q S G D L T R (配列番号 : 2 8) ;

ここで、前記ポリペプチドは、H L A B 遺伝子内の配列番号 1 0 7 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

10

20

30

40

50

(x) F 1 : Q S G H L S R (配列番号 : 1 8) ;
 F 2 : R S D H L S T (配列番号 : 1 0) ;
 F 3 : Q S A D R T K (配列番号 : 3 9) ;
 F 4 : T S G S L S R (配列番号 : 4 0) ; 及び
 F 5 : Q S A D R T K (配列番号 : 3 9) 、

ここで、前記ポリペプチドは、H L A C 遺伝子内の配列番号 1 0 8 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

(xi) F 1 : Q S G D L T R (配列番号 : 2 8) ;
 F 2 : R S D H L S T (配列番号 : 1 0) ;
 F 3 : Q S A D R T K (配列番号 : 3 9) ;
 F 4 : R S D N L S A (配列番号 : 4 1) ; 及び
 F 5 : R S D N R T T (配列番号 : 4 2) 、

ここで、前記ポリペプチドは、H L A C 遺伝子内の配列番号 1 0 9 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ;

(xii) F 1 : Q R S N L V R (配列番号 : 4 3) ;
 F 2 : D R S A L A R (配列番号 : 4 4) ;
 F 3 : Q S S D L R R (配列番号 : 2 0) ;
 F 4 : R S D D L T R (配列番号 : 1 6) ; 及び
 F 5 : R S D D L T R (配列番号 : 1 6) 、

ここで、前記ポリペプチドは、H L A C 遺伝子内の配列番号 1 1 0 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合し ; 又は

(xiii) F 1 : R S D D L T R (配列番号 : 1 6) ;
 F 2 : D R S D L S R (配列番号 : 1 7) ;
 F 3 : Q S G H L S R (配列番号 : 1 8) ;
 F 4 : R S D H L S A (配列番号 : 4 5) ; 及び
 F 5 : E S R Y L M V (配列番号 : 4 6) 、

ここで、前記ポリペプチドは、H L A C 遺伝子内の配列番号 1 1 1 で示される標的配列
 中の大文字で示される標的部位に結合する、

である、ポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド、及び活性化ドメイン、リプレッションドメ
 イン及びヌクレアーゼドメインから成る群より選ばれる機能性ドメインを含む融合蛋白質
 。

【請求項 3】

機能性ドメインが H L A A、H L A B、又は H L A C 遺伝子の 1 つ以上の発現を
 調節する、請求項 2 に記載の融合蛋白質。

【請求項 4】

請求項 2 又は 3 に記載の融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 2 又は 3 に記載の融合蛋白質、又は請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含む単
 離された細胞。

【請求項 6】

細胞が幹細胞、前駆細胞、T細胞、NK細胞、幹細胞の部分分化子孫細胞又は幹細胞の
 完全分化子孫細胞よりなる群から選択される、請求項 5 に記載の単離された細胞。

【請求項 7】

エキスピボで細胞における H L A クラス 1 遺伝子の 1 つ以上を不活性化する方法であっ
 て、

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを細胞に導入し、それによって請求項 2 又は 3 に記
 載の融合蛋白質を発現し ;

請求項 2 又は 3 に記載の融合蛋白質を用いて H L A クラス 1 遺伝子を切断し、ここで機

10

20

30

40

50

能性ドメインはHLAクラス1遺伝子1つ以上が不活性化されるようにヌクレアーゼを含むものであること、
を含む、方法。

【請求項8】

切断がHLAクラス1遺伝子1つ以上の内部に欠失をもたらす、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

請求項5に記載の細胞を含む、対象におけるHLA関連障害を治療するための医薬組成物であって、

該単離された細胞中の内在性HLAクラス1遺伝子が、HLA又はHLA調節遺伝子が不活性化されるように請求項7記載の方法に従って切断され；及び

対象に該細胞が導入され、それによってHLA関連障害が治療又は予防される、医薬組成物。

【請求項10】

対象に導入される単離された細胞が更に、細胞のゲノム内への外因性配列の組み込み、追加の1つ以上の遺伝子の不活性化、及びこれらの組み合わせよりなる群から選択される追加的ゲノム修飾を含む、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

追加のゲノム修飾が外因性配列の組み込みを含み、そして更に、切断されたHLAクラス1遺伝子内に外因性配列が組み込まれる、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

追加のゲノム修飾が外因性配列の組み込みを含み、そして更に外因性配列がポリペプチドである、癌マーカーに対して特異的なキメラ抗原受容体(CAR)をコードする、請求項10又は11記載の医薬組成物。

【請求項13】

追加のゲノム修飾が、TCR及び/又はTCR鎖をコードする遺伝子から選択される1つ以上の内在性TCR遺伝子の不活性化を含む、請求項10～12のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項14】

障害が対宿主性移植片病(GVHD)である、請求項9～13のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項15】

ポリヌクレオチドがmRNA又はDNAである、請求項9～14のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項16】

細胞がT細胞又は幹細胞である、請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】

幹細胞が誘導多能性幹細胞(iPSC)、ヒト胚性幹細胞(hES)、間葉性幹細胞(MSC)又はニューロン幹細胞よりなる群から選択される、請求項16に記載の医薬組成物。

【請求項18】

請求項5に記載の細胞を含む、細胞移植片を必要とする患者を治療するための医薬組成物であって、

該細胞中のHLAクラスI遺伝子の1つ以上が不活性化され；及び、

該細胞又は細胞のフラグメントが、それを必要としている患者内に移植される、医薬組成物。

【請求項19】

細胞又は細胞フラグメントがT細胞、幹細胞及び血小板よりなる群から選択される、請求項18に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

技術分野

本開示は遺伝子発現、ゲノム工学及び遺伝子療法の分野にある。

【背景技術】

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2010年7月21日出願の米国特許仮出願61/400,009号及び2010年10月6日出願の米国特許仮出願61/404,685号の利益を請求し、それらの開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0003】

連邦支援研究下に行った発明の権利に関する陳述

適応なし。

【0004】

背景

MHC抗原は、最初は移植反応において主要な役割を果たす蛋白として特徴付けされた。拒絶は移植された組織の表面上の組織適合性抗原に対して反応するT細胞により媒介され、そしてこれらの抗原の最大の群は腫瘍組織適合性抗原(MHC)である。これらの蛋白は全ての高等脊椎動物の表面で発現され、そしてマウスにおいてはH-2抗原(組織適合性-2抗原を意味する)及びヒト細胞においてはHLA抗原(ヒト白血球抗原を意味する)と称される。

20

【0005】

MHC蛋白はT細胞刺激において重要な役割を果たしている。抗原提示細胞(頻繁には樹状細胞)はMHC上の細胞表面上の外来性蛋白の分解性生物であるペプチドを提示する。同時刺激シグナルの存在下においては、T細胞が活性化され、そしてそれと同じペプチド/MHC複合体をやはり提示する標的細胞に作用することになる。例えば、刺激されたTヘルパー細胞は自身のMHCと共に抗原を提示するマクロファージを標的とすることになるか、又は、細胞傷害性T細胞(CTL)が外来性ウィルスペプチドをディスプレイしているウィルス感染細胞に対して作用することになる。

【0006】

30

MHC蛋白には2つのクラス、即ちIとIIがある。クラスIのMHC蛋白は2つの蛋白、即ち、MHC1遺伝子によりコードされる膜貫通蛋白である鎖、及び、MHC遺伝子クラスター内部には存在しない遺伝子によりコードされる小型細胞外蛋白である2ミクログロブリン鎖のヘテロ2量体である。鎖は3つの球状のドメインに折り畳まれ、そして2ミクログロブリン鎖が会合すると、球状構造の複合体は抗体複合体と同様となる。外来性ペプチドは最も可変でもある2つの最N末端側ドメイン上に存在する。クラスIIのMHC蛋白もまたヘテロ2量体であるが、そのヘテロ2量体はMHC複合体内部の遺伝子によりコードされる2つの膜貫通蛋白を含む。クラスIMHC:抗原複合体は細胞傷害性T細胞と相互作用し、クラスIIMHCはヘルパーT細胞に対する抗原を提示する。更に又、クラスIのMHC蛋白は殆ど全ての有核細胞及び血小板(及びマウスにおける赤血球)において発現される傾向があるが、クラスIIのMHC蛋白はより選択的に発現される。典型的には、クラスIIのMHC蛋白はB細胞、いくつかのマクロファージ及び単球、ランゲルハンス細胞、及び樹状細胞の上に発現される。

40

【0007】

ヒトにおけるクラスIのHLA遺伝子クラスターは3つの主要な遺伝子座、即ちB、C及びA、並びに数個の副次的な遺伝子座を含む。クラスIIのHLAクラスターもまた、3つの主要な遺伝子座、即ちDP、DQ及びDRを有し、そしてクラスI及びクラスIIの遺伝子クラスターは両方とも、集団内においてクラスI及びクラスIIの遺伝子の両方の数種の異なる対立遺伝子が存在する点において多形である。更に又HLA機能における役割を果たす幾つかのアクセサリー蛋白が存在する。Tap1及びTap2サブユニット

50

はクラスⅠのHLA複合体上にペプチド抗原を負荷する場合に必須であるTAPトランスポーター複合体の部分であり、そしてLMP2及びLMP7プロテオソームサブユニットはHLA上のディスプレイのための抗原からペプチドへの蛋白分解性の分解において役割を果たしている。LMP7の低下は、恐らくは安定化の欠如を介して細胞表面におけるMHCクラスⅠの量を低下させる (Fehling等、(1999)Science 265:1234-1237参照)。TAP及びLMPのほかに、タパシン遺伝子も有り、その産物はTAP複合体とHLAクラスⅠ鎖の間の架橋を形成し、そしてペプチドの負荷を増強する。タパシンの低下は障害を有するMHCクラスⅠアセンブリを有する細胞、低下したMHCクラスⅠの細胞表面発現、及び、障害を有する免疫応答をもたらす (Grande等、(2000)Immunity vol 13:213-222 及びGarbi等、(2000)Nat Immunol 1:234-238参照)。

10

【0008】

クラスⅠの発現の調節は一般的に転写レベルにおいてであり、そして数種の刺激、例えばウイルス感染等が転写の変化を起こし得る。クラスⅠ遺伝子はいくつかの特定の組織においてはされ、そしてこの下方調節の原因はプロモーター及び3'遺伝子間配列の内部にあると考えられる (Cohen等、(2009)PLoS ONE 4(8):e6748参照)。更に又、マイクロRNAがいくつかのクラスⅠMHC遺伝子を調節することができる証拠も存在する (Zhu等、(2010)Am.J.Obstet Gynecol 202(6):592参照)。

【0009】

クラスⅡのMHC発現の調節はMHCⅡエンハンセオソーム複合体の活性に依存している。エンハンセオソームの成分 (エンハンセオソーム複合体の最も高度に研究されている成分の1つはRFX5遺伝子産物である (Villard等、(2000)MCB 20(10):3364-3376参照)) はほぼ普遍的に発現され、そしてこれらの成分の発現はMHCクラスⅡ遺伝子の組織特異的発現又はそれらのIFN- γ 誘導上方調節を制御していないと考えられる。それよりは寧ろ、非DNA結合蛋白質であるCIITA (クラスⅡトランスアクチベーター) として知られる蛋白質がMHCⅡ発現のマスター制御因子として作用していると考えられる。他のエンハンセオソームメンバーとは対照的に、CIITAは組織特異的発現を呈し、IFN- γ により上方調節され、そしてMHCクラスⅡ発現の下方調節を起こすことができる数種の細菌及びウイルスにより阻害されることがわかっている (免疫監視を免れようとする細菌の試行の部分と考えられる (LeibundGut-Landmann等、(2004)Eur.J. Immunol 34:1513-1525参照))。

20

30

【0010】

クラスⅠ又はⅡの遺伝子の調節は一部の腫瘍の存在下において攪乱される場合があり、そしてそのような攪乱は患者の予後の結果に影響する場合がある。例えば、いくつかの黒色腫において、Tap1、Tap2及びHLAクラスⅠ抗原の低下が観察されることは、原発腫瘍の場合よりも転移黒色腫においてより一般的である ($p < 0.05$) ことがわかっている (例えばKagashita等、(1999)Am Jour of Pathol 154(3):745-754参照)。

【0011】

ヒトにおいては、数種の疾患への易罹患性はHLAハプロタイプと関連することが疑われている。これらの疾患にはとりわけ、アジソン病、強直性脊椎炎、ベーチェット病、パーカー病、セリアック病、慢性活動性肝炎、グレーブズ病、若年性慢性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び全身エリテマトーデスが挙げられる。

40

【0012】

HLAハプロタイプは又、移植片拒絶において主要な役割を果たす。移植片拒絶の急性期は約1~3週間以内に生じ得、そして通常はドナーのクラスⅠ及びクラスⅡのHLA分子に対する宿主系の感作が原因のドナー組織に対する宿主Tリンパ球の作用が関与している。大部分の場合においては、トリガーする抗原はクラスⅠのHLAである。最良の結果のためにはドナーをHLAハプロタイプに関して分類し、そして可能な限り完全に患者レシピエントに対してマッチさせる。しかしながら、高パーセントのHLAハプロタイプ同一性を共有することができるファミリーメンバーの間の提供でさえも、なお、良好に行

50

えない場合が多い。したがって、レシピエント内部の移植片組織を温存するためには、拒絶を防止するための徹底した免疫抑制療法に患者を付さなければならない場合が多い。そのような療法は患者が克服困難である日和見感染による合併症及び顕著な罹患率をもたらす場合がある。

【0013】

細胞療法はある特定の型の細胞（例えば腫瘍抗原に反応性のT細胞又はB細胞）がレシピエントに与えられる移植の特殊な型である。細胞療法は自系（レシピエントから誘導）又は同種異系（ドナーから誘導）の何れかである細胞を用いて行うことができ、そして細胞は非成熟細胞、例えば幹細胞、又は完全成熟の機能性の細胞、例えばT細胞であってよい。実際、ある特定の癌のようないくつかの疾患においては、T細胞は、腫瘍を根絶する試みにおいて、特定の腫瘍抗原に対するそれらのアビディティーを増大させるためにエキスピボで操作され、増殖させ、そしてその癌の型に罹患している患者内に導入され得る。これは、内因性T細胞応答が腫瘍自身により抑制される場合に特に有用である。しかしながら、同じ注意事項が、拒絶に関して更に良く知られた固形臓器移植片に対して適用されるように細胞療法に対しても適用される。ドナーのT細胞はクラスIのHLA抗原を発現し、そしてこのため、レシピエントの内因性免疫系から拒絶応答を引き出すことができる。

10

【0014】

したがって、HLA遺伝子及び細胞における遺伝子発現の操作のための組成物及び方法がなおも必要とされている。

20

【発明の概要】

【0015】

HLA遺伝子複合体又はHLA遺伝子発現を操作するための方法及び組成物を本明細書において開示する。特に本発明はHLA関連障害、例えば個人のHLAハプロタイプに関連するヒトの障害を治療するためにHLA遺伝子の発現を調節するための方法及び組成物を提供する。更に又、HLA遺伝子を欠失させるか抑制することによりHLAヌル細胞、細胞フラグメント（例えば血小板）、組織又は完全生物を作成するための方法及び組成物を提供する。更に又、これらの方法及び組成物は、1つのみのHLA遺伝子、又は1つより多いHLA遺伝子に関してヌルであるか、又は全てのHLA遺伝子に対して完全にヌルである細胞、細胞フラグメント、組織又は生物を作成するために使用し得る。ある特定の実施形態において、HLAヌル細胞又は組織は移植における使用のために好都合であるヒトの細胞又は組織である。

30

【0016】

即ち、1つの態様において、HLA対立遺伝子の発現を調節する操作されたDNA結合ドメイン（例えば亜鉛フィンガー蛋白質又はTALE DNA結合ドメイン蛋白質）を提供する。ある特定の実施形態において、DNA結合ドメインは非天然存在の操作された亜鉛フィンガー蛋白質並びに予備選択標的部位に結合するように自身の認識ヘリックスが改変（例えば選択及び/又は合理的設計による）されている亜鉛フィンガー蛋白質を含む。本明細書に記載する亜鉛フィンガー蛋白質の何れも、亜鉛フィンガー蛋白質1、2、3、4、5、6つ以上を包含し得、各々亜鉛フィンガーは選択された配列（例えば遺伝子）における標的サブ部位に結合する認識ヘリックスを有する。いくつかの実施形態においては、亜鉛フィンガー蛋白質の亜鉛フィンガードメインの認識ヘリックス1つ以上は非天然存在である。ある特定の実施形態において、亜鉛フィンガー蛋白質は表1に示す認識ヘリックスを有する。他の実施形態において、亜鉛フィンガー蛋白質は表2に示す標的部位に結合する。他の実施形態において、DNA結合ドメインはTALE DNA結合ドメイン（例えば天然に存在する、及び/又は非天然存在のTALE DNA結合ドメイン）を含む。

40

【0017】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載するDNA結合蛋白質（例えば亜鉛フィンガー蛋白質（ZFP）又はTALE DNA結合蛋白質）は融合蛋白質の部分として調

50

節ドメイン(又は機能性ドメイン)との作動可能な連結関係に置かれることができる。ある特定の実施形態において、調節ドメインはDNA結合ドメインとの融合のための活性化ドメイン又は抑制ドメインであり、そしてそのような融合蛋白質(例えばZEP-又はTALE-転写因子融合物すなわちそれぞれZFP-TF及びTALE-TF)を遺伝子発現の活性化又は抑制の何れかのために使用できる。いくつかの実施形態においては、HLA遺伝子又はHLA遺伝子発現のモジュレーターに優先的に結合できるリプレッサーが提供される。ある特定の実施形態において、調節ドメインの活性は、細胞の転写機序との相互作用が外因性リガンドの非存在下に起こらないように外因性の小分子又はリガンドにより調節される。そのような外部リガンドは転写機序とのZFP-TF又はTALE-TFの相互作用の程度を制御する。

10

【0018】

1つの実施形態において、リプレッサーは特定のHLA A、HLA B又はHLA C転写調節領域に結合することができ、そして、上記遺伝子の1つのみにおける発現を抑制することができる。別の態様においては、HLA A、HLA B又はHLA Cに共通の転写調節領域と、3遺伝子全てが1つのDNA結合ドメイン(例えばZFP-TF又はTALE-TF)で調節されるように、相互作用することができるリプレッサーが提供される。別の実施形態においては、リプレッサーはHLAクラスIIの発現又は機能のレギュレーター(例えばCIITA又はRF5)に結合することによりその活性を抑制し、そしてこれにより、HLAクラスIIの発現又は機能を抑制することができる。

【0019】

20

他の実施形態において、既知のHLAハプロタイプに優先的に結合することにより1つのみの対立遺伝子の発現を抑制する抑制性DNA結合ドメイン-転写因子融合物を提供する。

【0020】

別の態様において、HLA遺伝子の発現を特異的に活性化するDNA結合ドメイン-転写因子融合物を提供する。そのような融合物はレギュレーターの発現を増大させることにより、あるクラスのHLA遺伝子を上方調節し得、又は、これらの遺伝子が通常では発現されない組織において、そのようなクラスの発現を誘発し得る。別の実施形態においては、所望に応じて特定のHLA遺伝子を活性化するDNA結合ドメイン-転写因子融合物(例えばZEP-TF又はTALE-TF)を提供する。

30

【0021】

別の態様において、融合蛋白質はヌクレアーゼ(例えばZFN又はTALEN)を含む機能性ドメインとの作動可能な連結関係にある本明細書に記載するDNA結合蛋白質(例えばZFP又はTALE)を含む。ある特定の実施形態において、1つのHLA遺伝子を切断する、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)又はヌクレアーゼ(TALEN)に融合したTALE DNA結合ドメインを提供する。ある特定の実施形態において、ZFN及び/又はTALENはヒトHLAクラスI遺伝子における標的部位及び/又はヒトHLAクラスII遺伝子における標的部位に結合する。いくつかの実施形態においては、これらのヌクレアーゼによるHLA遺伝子内部の切断はHLA遺伝子の永久攪乱(例えば突然変異)をもたらす。ある特定の実施形態において、ZFN及び/又はTALENの2対を用いてより大きい欠失を誘発してよい。欠失は1つのHLA遺伝子又はHLAレギュレーター遺伝子の小型部分を含むか、又はより大きいセグメントを含んでよい。いくつかの実施形態において、ZFN又はTALENにより誘発された欠失はHLA遺伝子1つ以上を欠失させ得、又は、全HLA遺伝子複合体(即ちクラスIHLA遺伝子の全て、又はHLAクラスII遺伝子の全て)を欠失させ得る。欠失はまた、HLA遺伝子のあるクラスのサブセットの欠失も包含し得る。亜鉛フィンガーDNA結合蛋白質は、1、2、3、4、5、6、またはそれ以上の亜鉛フィンガーを包含し得、各亜鉛フィンガーは、標的遺伝子中の標的サブ部位に結合する認識ヘリックスを有する。ある特定の実施形態において、亜鉛フィンガー蛋白質は4又は5又は6つのフィンガーを含み(この場合、フィンガーはF1、F2、F3、F4、F5及びF6と標記され、そしてN末端からC末端にF1からF

40

50

4 又は F 5 又は F 6 と順位付けされる)、そしてフィンガーは表 1 に示す認識領域のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 2 】

本明細書に記載する Z F N 又は T A L R E N 蛋白質のいずれも更に切断ドメイン及び / 又は切断ハーフトドメイン (例えば野生型又は操作された F o k I 切断ハーフトドメイン) を含んでよい。したがって、本明細書に記載する Z F N 又は T A L E N の何れにおいても、ヌクレアーゼドメインは野生型のヌクレアーゼドメイン又はヌクレアーゼハーフトドメイン (例えば F o k I 切断ハーフトドメイン) を含んでよい。他の実施形態において、Z F N 又は T A L E N は操作された (非天然存在の) ヌクレアーゼドメイン又はハーフトドメイン、例えば必然的にヘテロ 2 量体を形成する操作された F o k I 切断ハーフトドメインを含む。例えば米国特許公開番号 2 0 0 8 0 1 3 1 9 6 2 を参照のこと。

10

【 0 0 2 3 】

別の態様において、本開示は本明細書に記載する蛋白質のいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。本明細書に記載するポリヌクレオチドの何れも又、H L A 遺伝子内への標的化された挿入のための配列 (ドナー又はパッチ配列) を含んでよい。

【 0 0 2 4 】

更に別の態様において、本明細書に記載するポリヌクレオチドの何れかを含む遺伝子送達ベクターを提供する。ある特定の実施形態において、ベクターはアデノウィルスベクター (例えば A d 5 / F 3 5 ベクター)、レンチウィルスベクター (L V)、例えば組み込みコンピテント又は組み込み欠損性のレンチウィルスベクター、又はアデノ関連ウィルスベクター (A A V) である。したがって、本明細書に記載するヌクレアーゼ少なくとも 1 つ (例えば Z F N 又は T A R E N) をコードする配列、及び / 又は、標的遺伝子内への標的化された組み込みのためのドナー配列を含むアデノウィルス (A d) ベクター、L V 又はアデノ関連ウィルスベクター (A A V) も提供される。ある特定の実施形態において、A d ベクターはキメラ A d ベクター、例えば A d 5 / F 3 5 ベクターである。ある特定の実施形態において、レンチウィルスベクターはインテグラーゼ欠損レンチウィルスベクター (I D L V) 又は組み込みコンピテントレンチウィルスベクターである。ある特定の実施形態において、ベクターは V S V - G エンベロープを有するか、他のエンベロープを有する擬似型である。

20

【 0 0 2 5 】

追加の実施形態において、標的遺伝子は H L A 発現を調節する (例えばヒト細胞中の) 遺伝子である (H L A レギュレーター遺伝子)。ある特定の実施形態において、C T I I A、R F X 5 遺伝子、T A P 1、T A P 2 又はタパシン遺伝子、又はこれらの組み合わせを調節 (例えば活性化、抑制及び / 又は不活性化) のために標的とする。いくつかの実施形態においては、標的とされる遺伝子は H L A 遺伝子を調節することができるマイクロ R N A をコードする。本明細書に記載するベクターは又、ドナー配列を含んでよい。追加の実施形態において、ドナー配列は宿主細胞にとって内 在 性ではないヒト H L A 遺伝子又は H L A レギュレーター遺伝子を含む。いくつかの実施形態においては、目的の H L A 遺伝子又は H L A レギュレーター遺伝子は内 在 性の H L A 遺伝子又は H L A レギュレーター遺伝子の箇所に挿入され、他の実施形態においては、目的の H L A 遺伝子又は H L A レギュレーター遺伝子は無作為に選択された遺伝子座内に、又はゲノムワイドの送達の後、別個の遺伝子座内に挿入される。いくつかの実施形態においては、H L A 導入遺伝子又は H L A レギュレーター導入遺伝子の挿入のための別個の遺伝子座は P P P 1 R 1 2 C 遺伝子座である (米国特許公開番号 2 0 0 8 0 2 9 9 5 8 0 参照)。他の実施形態において、H L A 導入遺伝子又は H L A レギュレーター導入遺伝子は C C R - 5 遺伝子座内に挿入される。いくつかの態様において、ドナーは目的の別の核酸を含む。例示に過ぎないが、このドナーは目的のポリペプチドをコードする遺伝子を含み得、又は、構造 R N A (s h R N A、m i R N A、R N A i 等) をコードする配列を含み得る。いくつかの実施形態において、目的の H L A 遺伝子又は H L A レギュレーター遺伝子が所望の様式 (例えばノックアウト、補正等) に操作されており、そしてドナー及び 1 つ以上の追加の Z F N 及び / 又

30

40

50

はT A L E Nが別の遺伝子座（例えばA A V S 1）内にドナーを挿入するために与えられている細胞が提供される。

【0026】

ある特定の実施形態において、単一のベクターが本明細書に記載するヌクレアーゼ（例えばZ F N及び／又はT A L E N）1つ以上をコードする配列及びドナー配列を含む。他の実施形態において、ドナー配列は第1のベクターに含有され、そしてヌクレアーゼコード配列は第2のベクターに存在する。

【0027】

更に別の態様において、本開示は本明細書に記載する蛋白質、ポリヌクレオチド及び／又はベクターのいずれかを含む細胞（例えば単離された細胞）を提供する。ある特定の
10 実施形態において、細胞は幹／前駆細胞、リンパ球、B細胞、又はT細胞（例えばC D 4 + T細胞）よりなる群から選択される。他の実施形態において、細胞は、血小板を包含するがこれに限定されない細胞フラグメントである。

【0028】

別の態様において、本明細書に記載する蛋白質、ポリヌクレオチド及び／又はベクターの1つ以上を導入することにより細胞におけるH L A遺伝子又はH L Aレギュレーター遺伝子を不活性化する方法を本明細書に記載する。これらの方法の何れにおいても、ヌクレ
20 アーゼは細胞性D N A配列の標的化された突然変異誘発、標的化された欠失、標的化された挿入を誘発、及び／又は、既定の染色体遺伝子座における標的化された組み換えを促進し得る。したがって、ある特定の実施形態において、ヌクレアーゼ（例えばZ F N及び／
又はT A L E N）は標的とする遺伝子においてヌクレオチド1つ以上の欠失及び／又は挿入を行う。いくつかの実施形態において、H L A遺伝子はヌクレアーゼ（Z F N及び／又はT A L E N）切断により、そしてその後の非同末端接合により、不活性化される。他の
30 実施形態において、標的遺伝子中のゲノム配列を、例えば、本明細書に記載するZ F N（又は該Z F Nをコードするベクター）の1対以上、及び／又は、T A L E N 1つ以上、及び、Z F N及び／又はT A K E Nを用いた標的化された切断の後に遺伝子内に挿入される「ドナー」配列を用いて置き換える。ドナー配列はヌクレアーゼ融合ベクター中に存在するか、別個のベクター（例えばA d、A A V又はL Vベクター）中に存在してよく、或いは、異なる核酸送達機序を用いて細胞内に導入してよい。いくつかの実施形態において、
Z F N及び／又はT A L E Nはそれらをコードするm R N Aを用いて送達される。いくつかの実施形態において、エレクトロポレーション又はネイキッド核酸の送達に適する他の手法により核酸を送達してよい。

【0029】

別の態様において、細胞又は細胞系統においてH L A遺伝子を突然変異するため、及び／又はH L A機能を不活性化するための、D N A結合蛋白質及びその融合物を用いる方法を提供する。したがって、ヒト細胞においてH L A遺伝子を不活性化するための方法を提供し、その方法は本明細書に記載する蛋白質又はポリヌクレオチドの何れかを細胞に投与
40 することを含む。何れかのモデル生物体においてM H C機能を改変するための方法も本明細書に記載する。

【0030】

別の態様において、本明細書に記載する組成物及び方法は、例えば、何れかのH L A関連障害（即ちH L Aハプロタイプに関連するもの）の治療又は防止又は改善において使用できる。方法は典型的には、（a）H L A又はH L Aレギュレーター遺伝子が不活性化されるようにヌクレアーゼ（例えばZ F N又はT A L E N）を用いて単離された細胞（例えばT
50 細胞又はリンパ球）中の内在性H L A遺伝子又はH L Aレギュレーターを切断すること；及び（b）対象内に細胞を導入することによりH L A関連障害を治療又は防止することを含む。ある特定の実施形態において、H L A関連障害は対宿主性移植片病（G V H D）である。ヌクレアーゼはm R N Aとして、蛋白質形態において、及び／又はヌクレアーゼをコードするD N A配列として導入することができる。ある特定の実施形態において、対象に導入される単離された細胞は更に、追加的なゲノム修飾、例えば組み込まれた外因性配

列（例えば切断されたHLA又はHLA調節遺伝子又は異なる遺伝子、例えばセーフハーバー遺伝子内に）及び/又は追加の遺伝子、例えば1つ以上のTCR遺伝子の不活性化（例えばヌクレアーゼ媒介）を含む。外因性配列はベクター（例えばAd、AAV、LV）を介して、又はエレクトロポレーションのような手法を用いることにより、導入してよい。いくつかの態様において、組成物は単離された細胞フラグメント及び/又は分化した細胞を含んでよい。

【0031】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するヌクレアーゼ融合物は、誘導多能性幹細胞（iPSC）、ヒト胚性幹細胞（hES）、間葉性幹細胞（MSC）、造血幹細胞（HSC）又はニューロン幹細胞のような幹細胞を標的とするために利用してよく、これらにおいては、ヌクレアーゼ融合物の活性は欠失を含有するHLA対立遺伝子をもたらすことになる。いくつかの実施形態において、方法は1つより多いHLA遺伝子が改変されている幹細胞を作成するために使用してよい。他の実施形態において、本発明はHLAヌル表現型を有する幹細胞を生産するための方法を提供する。いくつかの態様において、幹細胞は1つ以上、又はすべてのHLAクラスII遺伝子発現に関してヌルであり得る。別の態様において、幹細胞は1つ以上、又はすべてのHLAクラスI遺伝子発現に関してヌルであり得る。いくつかの態様において、幹細胞はすべてのHLA遺伝子発現に関してヌルである。他の実施形態において、HLA遺伝子座において修飾されている幹細胞は、その後分化される。

【0032】

修飾された幹細胞を含む医薬組成物も提供される。そのような医薬組成物は予防的又は施療的に使用してよく、iPSCs、hES、MSCs、HSCs又はこれらの組み合わせ及び/又は誘導体を含んでよい。他の実施形態において、そのような修飾された幹細胞から誘導された細胞、細胞フラグメント（例えば血小板）又は組織は、そのような組織が所望に応じてHLA遺伝子座において修飾されるように提供される。いくつかの態様において、そのような細胞は部分的に分化し（例えば造血幹細胞）、他の態様においては、完全に分化した細胞が提供され（例えばリンパ球又はメガカリオサイト）、そして更に別の態様においては、分化した細胞のフラグメントが提供される。他の実施形態において、改変されたHLA又はHLAレギュレーター遺伝子を含有する幹細胞及び/又はその分化した子孫が提供され、そしてそれらは又、目的の別の遺伝子座におけるドナーDNAの欠失、改変又は挿入を包含する追加的遺伝子修飾を含有することができる。

【0033】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するDNA結合ドメイン又は融合蛋白質（例えばZFP-TF、TALE DNA結合ドメインTF、ZFN及び/又はTALEN）で処理される細胞はCD4+T細胞又はNK細胞のような成熟細胞であってよい。そのような細胞はHLA遺伝子又はHLAレギュレーター遺伝子の調節のために本明細書に記載するDNA結合ドメインを含む蛋白質を含んでよく、又、HLA遺伝子内への欠失及び/又は挿入の導入のためのヌクレアーゼ融合物（例えばZFN又はTALEN）を含んでよい。いくつかの態様において、そのようなZFN又はTALENを含む細胞は更に、外因性DNA配列を含んでよい。いくつかの態様において、細胞療法のため、例えばT細胞移植のために成熟細胞を使用してよい。他の実施形態において、T細胞移植において使用する細胞は目的の別の遺伝子修飾を含有する。1つの態様において、T細胞は癌マーカーに特異的な挿入されたキメラ抗原受容体（CAR）を含有する。更なる態様において、挿入されたCARはB細胞悪性疾患に特徴的なCD19マーカーに対して特異的である。そのような細胞はHLAハプロタイプにマッチさせる必要なく患者を治療するための治療用組成物中で有用であり、そしてそのため、「既製」の治療薬として、それを要する何れの患者のためにも使用できるであろう。いくつかの態様において、TCR及び/又はTCR鎖をコードする遺伝子が操作されているか、又は、所望の特異性及び親和性を有するTCR鎖をコードする遺伝子が導入されている細胞を提供する。他の実施形態において、血小板減少症又は他の出血障害のような障害の治療における施療的用途のためのHL

A 修飾血小板を提供する。

【0034】

更なる他の態様において、本発明はHLA障害の研究のための特定のモデル系の作成のための方法及び組成物を提供する。ある特定の実施形態において、細胞及び動物系統の作成のために胚性幹細胞中で突然変異体HLA対立遺伝子を作成したモデルを提供する。ある特定の実施形態において、モデル系はインビトロの細胞系統を含み、他の実施形態においては、モデル系はトランスジェニック動物を含む。他の実施形態において、本発明は突然変異したHLA遺伝子又はHLAレギュレーターを補正するための方法及び組成物を提供し、そして又、あるHLA対立遺伝子を別のもの置き換えるための方法及び組成物を提供する。

10

【0035】

いくつかの実施形態において、標的対立遺伝子（例えば特異的HLAハプロタイプ）を発現マーカーでタグ付けしたHLA障害に関するモデル系を提供する。ある特定の実施形態において、突然変異体対立遺伝子（例えば突然変異体HLA又はHLAレギュレーター）をタグ付けする。ある特定の実施形態において、モデル系はインビトロの細胞系統を含み、他の実施形態においては、モデル系はトランスジェニック動物を含む。

【0036】

更に又、核酸及び／又はDNA結合ドメイン（又はDNA結合ドメインを含む融合蛋白質）を含有する医薬組成物も提供される。例えばある特定の組成物は、製薬上許容しうる担体又は希釈剤と組み合わせて調節配列に作動可能に連結した本明細書に記載するZFP及び／又はTALEDNA結合ドメインの1つをコードする配列を含む核酸を包含し、その場合、その調節配列は細胞中での核酸の発現又は抑制を可能にする。ある特定の実施形態において、コードされるZFP及び／又はTALEDNA結合ドメインはHLA対立遺伝子に対して特異的である。蛋白質系組成物は本明細書に記載するZFP TALEDNA結合ドメインの1つ及び製薬上許容しうる担体又は希釈剤を包含する。

20

【0037】

本明細書に記載する方法の何れもインビトロ、インビボ及び／又はエクスビボで実施できる。ある特定の実施形態において、方法はエクスビボにおいて、例えば、それを要する対象を治療するために使用する前にT細胞又はNK細胞を修飾するために使用される。

【0038】

以上及び他の態様は全体として開示を参照すれば当業者には自明であるはずである。

30

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】MHCクラスI及びクラスIIのクラスターの遺伝子のいくつかの模式図である。

【図2】パネルA及びBは、HLAA3（図2A）及びHLAA2（図2B）を標的とするZFNに関するCel-I mismatches assay（SurveyorTM、Transgenomics）の結果を示すゲルを示す。アッセイは増幅されたゲノムDNAフラグメントとの mismatches rate（%）を分析するものであり、それにより、ZFN形成DSBのNH₂修復後に生じたDNA配列における改変の量（%）の定量を可能にする。両方のゲルはHEK293細胞内への各ゲルのレーンの下に示す擬似トランスフェクション、GFPコードプラスミドによるトランスフェクション、及びZFN対をコードするプラスミドによるトランスフェクションに関する結果を示している。遺伝子修飾率はレーン下部に示す。

40

【図3】パネルA～Dは、HEK293細胞のFACS分析の結果を示しており、ここでは、HLAA2、HLAA3のいずれか、又はHLAA2とA3の両方が特定のZFN投与の後に攪乱されている。図3A（「親」）は如何なるZFN投与も欠いている親HEK293細胞を示す。左カラムはHLAA2対立遺伝子に関する染色を示し、右カラムはHLAA3対立遺伝子に関する染色を示す。各パネルの最も左のピークはアイソタイプ対照（バックグラウンド）を示す。親細胞において、最も左側のピークはB-LCLクローン

50

(陽性対照)を染色している抗体に関する結果を示す。左から2番目のピークはサイトカイン(I F Nガンマ)投与の前のA 2又はA 3陽性細胞の量を示し、右から2番目のピークはサイトカイン投与後のH L A A 2又はA 3の発現に関する結果を示す。細胞クローン1 8 - 1 (A 2 + A 3 -) (図3 B)、8 . 1 8 (A 2 - A 3 +) (図3 C)及び8 3 (A 2 - A 3 -) (図3 D)に相当する図3 B ~ 3 Dは図3 Aに示すものと同じ分析を含む(ただし、親パネルにおいて最も右側のラインを染色している陽性B細胞は図示しない)。したがって、これらのデータは目的の対立遺伝子が攪乱されるとサイトカイン刺激時においても細胞マーカーの発現は観察されないことを示している。

【図4 A - B】パネルA及びBは、それぞれH L A A 2又はH L A A 3を標的とする特異的C T LによるH L A - A ノックアウトH E K 2 9 3クローン、1 8 - 1、8 . 1 8及びB細胞クローン(図3に関して上記)の細胞溶解の分析を示すグラフである。この実験において、H L A複合体上にディスプレイされればC T L作用を刺激する特異的ペプチドエピトープ(配列番号1 3 5及び配列番号1 3 6)と組み合わせてH L A A 2又はH L A A 3の何れかに限定したC T Lを使用した。図4 AはH L A A 3特異的C T L及びH E K 2 9 3標的細胞を、それらのペプチド抗原の濃度を上昇させながら使用した場合の結果を示す。未修飾のA 3 H L A遺伝子産物を含有する細胞は溶解される(親、8 . 1 8及びB - L C L)。図4 Bにおいて、特異的ペプチド抗原と組み合わせてH L A A 2に特異的なC T Lを用いて溶解実験を実施した。漸増濃度のペプチドを使用する場合、C T Lは未損傷のH L A A 2遺伝子産物を含有する細胞(親H E K 2 9 3、1 8 - 1及びB - L C L)を溶解することができる。したがって、C T Lにより標的とされたH L A A遺伝子の発現が攪乱されると、細胞はもはやC T L指向溶解に対して感受性ではなくなる。

【図5 A - B】パネルA及びBは、H L A A 2染色のF A C S分析の結果を示す。この実験において、H L A A 2特異的Z F Nをコードするm R N Aの種々の量(左パネルに示す2 . 5 μ g、中央パネルに示す5 . 0 μ g、及び右パネルに示す1 0 μ g)を用いたヌクレオフェクションに一次T細胞を付した。図5 Aはトランスフェクションの後に標準的細胞培養条件を用いた場合の結果を示し、図5 Bは「一過性コールドショック」法を用いた場合の結果を示す。細胞のほぼ4 2 %までが「コールドショック」法を用いた場合にH L A A 2攪乱特性を示すことができる。

【図6】図5において分析した一次T細胞に関するC e l - I mismatchesの結果を示すゲルを示す。レーンは野生型F o k I触媒ドメインを有するZ F N対(「w t」)、及び「E L D / K K R」ヘテロ2量体ドメインを有するZ F N対(「m u t」)を、記載されたZ F N濃度(左パネルに示す2 . 5 μ g、中央パネルに示す5 . 0 μ g、及び右パネルに示す1 0 μ g)で用いた場合の結果を示す。このアッセイにより検出された遺伝子修飾率(「標的化された攪乱(%)」)は各レーンの下部に示す通りであり、そして結果はF A C S分析と整合している。

【図7 A - B】パネルA及びBは、H L A C (図7 A)及びH L A B (図7 B)遺伝子に特異的なZ F Nに関するC e l - I mismatches分析の結果を示す。矢印は遺伝子修飾を示すゲル上のバンドを示す。

【図8 A】パネルAは、H L A C遺伝子の下流の標的配列(「H L A C - d o w n」)及びH L A B遺伝子の上流の標的配列(「H L A C - u p」)に対して特異的なZ F Nに関するC e l - I mismatches分析の結果を示すゲルを示す。図8 AはH L A C - d o w n特異的Z F N対に関する結果を示しており、ここでは野生型F o k I触媒ドメインを含有するZ F N(w t)及びE L / K Lヘテロ2量体F o k Iドメインを含有するZ F N対(m u t)を示す。矢印は、ミスマッチを示すバンドを示す。検出された遺伝子修飾率は各レーンの下部に示す(「% N H E J」)。図8 Bは2つのH L A B - u p Z F N対に関する結果を示し、ここでは矢印は遺伝子修飾を示すバンドを指している。

【図8 B】パネルBは、H L A C遺伝子の下流の標的配列(「H L A C - d o w n」)及びH L A B遺伝子の上流の標的配列(「H L A C - u p」)に対して特異的なZ F Nに関するC e l - I mismatches分析の結果を示すゲルを示す。図8 AはH L A C - d o w n特異的Z F N対に関する結果を示しており、ここでは野生型F o k I触媒ドメインを含有す

10

20

30

40

50

る Z F N (w t) 及び E L / K L ヘテロ 2 量体 F o k I ドメインを含有する Z F N 対 (m u t) を示す。矢印は、ミスマッチを示すバンドを示す。検出された遺伝子修飾率は各レーンの下部に示す (「 % N H E J 」) 。図 8 B は 2 つの H L A B - u p Z F N 対に関する結果を示し、ここでは矢印は遺伝子修飾を示すバンドを指している。

【図 9 A】パネル A は、H L A B 及び H L A C の遺伝子座の両方を包含する大型の欠失をもたらすように設計された実験を示す。図 9 A は H L A B 及び H L A C の領域における H L A 遺伝子複合体の模式図であり、そして H L A B - u p 及び H L A C - d o w n の Z F N により標的とされた領域を示す。欠失を可視化するために P C R で使用されたプライマーの箇所もまた示されている。図 9 B は K 5 6 2 細胞における H L A B - u p 及び H L A C - d o w n の Z F N を用いた切断の後の欠失特異的 P C R の結果を示す。ゲルの左側のレーンは P C R からのシグナルを定量するためにプラスミド内に本発明者等が挿入した欠失 P C R 産物の連続希釈物である。欠失 P C R はヌクレオフェクション後 3 日及び 10 日に単離した D N A に対して実施し、そして使用した Z F N は野生型 (「 w t 」) 又は突然変異体 (「 m u t 」) の F o k I 触媒ドメインの何れかを含有していた (図 8 において記載したとおり) 。結果は第 3 日において対立遺伝子の約 5 % が H L A B 及び H L A C の欠失を含有していたことを示している。

【図 9 B】パネル B は、H L A B 及び H L A C の遺伝子座の両方を包含する大型の欠失をもたらすように設計された実験を示す。図 9 A は H L A B 及び H L A C の領域における H L A 遺伝子複合体の模式図であり、そして H L A B - u p 及び H L A C - d o w n の Z F N により標的とされた領域を示す。欠失を可視化するために P C R で使用されたプライマーの箇所もまた示されている。図 9 B は K 5 6 2 細胞における H L A B - u p 及び H L A C - d o w n の Z F N を用いた切断の後の欠失特異的 P C R の結果を示す。ゲルの左側のレーンは P C R からのシグナルを定量するためにプラスミド内に本発明者等が挿入した欠失 P C R 産物の連続希釈物である。欠失 P C R はヌクレオフェクション後 3 日及び 10 日に単離した D N A に対して実施し、そして使用した Z F N は野生型 (「 w t 」) 又は突然変異体 (「 m u t 」) の F o k I 触媒ドメインの何れかを含有していた (図 8 において記載したとおり) 。結果は第 3 日において対立遺伝子の約 5 % が H L A B 及び H L A C の欠失を含有していたことを示している。

【図 10 A - B】パネル A 及び B は、H E K 2 9 3 細胞における H L A 調節遺伝子を標的とする Z F N を用いた切断の結果を示すゲルを示す。図 10 A は T A P 1 遺伝子を標的とする Z F N を用いた C e l I ミスマッチアッセイの結果を示し、図 10 B は Z F N が T A P 2 遺伝子を標的とした場合の結果を示す。使用した Z F N は適切なレーンの上部に示す。これらの結果は Z F N が標的 D N A を切断する活性を有することを示している。

【図 11】H E K 2 9 3 細胞におけるタパシン遺伝子を標的とする Z F N (Z F N の番号はレーン 1 及び 2 の上部に示す) を用いた C e l I ミスマッチアッセイの結果を示す。遺伝子修飾率を各レーンの下部に示す。これらのデータはこの Z F N 対がこの標的に対して活性であることを明らかにしている。

【図 12】K 5 6 2 細胞における D P B 2 遺伝子の上流 (D P B 2 u p) 又は D R A 遺伝子の下流 (D R A d o w n) の標的箇所のいずれかを標的とする Z F N を用いた C e l I ミスマッチアッセイの結果を示すゲルを示す。トランスフェクションでは野生型 F o k I 触媒ドメイン (「 w t 」) 、及び E L / K K ヘテロ 2 量体 F o k I 触媒ドメイン (「 m u t 」) をの何れかを含有する記載された Z F N を用いた。このアッセイにより計測した場合の遺伝子修飾率を各レーンの下部に示す。 「 w t 」 レーンは 2 つの異なるトランスフェクション日付において実施された 2 連のトランスフェクションを示す。

【図 13】図 9 において実施したものと同様の欠失 P C R の結果を示すゲルを示す。図 9 に関して記載したとおり、ゲルの左側のレーンは欠失を含有する対立遺伝子の頻度の定量において使用するためのサブクロニングされた P C R 産物の連続希釈物を含有している。欠失 P C R はトランスフェクション後 3 日及び 10 日に細胞から単離下 D N A に対して実施し、そして使用した Z F N は 野生型 F o k I 触媒ドメイン (「 w t 」) 、及び E L / K K ヘテロ 2 量体 F o k I 触媒ドメイン (「 m u t 」) をの何れかを含有していた。結

果は対立遺伝子の約 0.04% が大型の欠失を含有していたことを示している。

【図 14】図 13 に示した欠失 PCR 産物の配列決定により得られた配列決定結果を示す。1 ~ 4 行 (配列番号 137) は PCR による個々の核酸であり、5 行 (配列番号 138) は 15909ZF N 標的部位を包囲するゲノム配列及びその下流の配列を示す。6 行 (配列番号 139) は 15873 標的部位を包囲するゲノム配列及びその上流の配列を示す。7 行 (配列番号 137) は 1 ~ 4 行からのコンセンサス配列を示す。これらの結果は、DBP2up 及び DRAdown の ZF N による切断の後、結果として生じる DNA が各 ZF N 対の遠位の標的部位を含有するような末端の再接合により、大型の欠失が形成されていることを示している。

【図 15】上記の Cell - I ミスマッチアッセイの後の結果を示すゲルを示す。HLA クラス II レギュレーター遺伝子 CIIITA 又は RF X5 の何れかを標的とする ZF N を K562 細胞において使用し、そして遺伝子修飾率 (%) をレーンの下部に示す。ZF N 無添加 (「擬似」) 又は GFP コードプラスミドトランスフェクション (「gfp」) の何れかをを用いて実施した実験の結果を含む対照レーンも示す。

【図 16】上記の Cell - I ミスマッチアッセイの後の結果を示すゲルを示す。K562 細胞 (「K」) 又は RAJI 細胞 (「R」) の何れかにおいて CIIITA ターゲティング ZF N を使用した。このアッセイにより検出された遺伝子修飾率 (%) をレーンの下部に示し、そして矢印は修飾活性を示すバンドを示す。これらの結果は CIIITA を標的とする ZF N が RAJI 細胞並びに K562 細胞で機能できることを示している。「n.c.」はトランスフェクションの間、如何なる ZF N コード DNA も用いることなく実施した陰性対照を示す。

【図 17】パネル A ~ D は、CD19 を標的とするキメラ抗原受容体 (CD19CAR) に関して予めトランスジェニックにされている T 細胞に対して実施した FACS 分析の結果を示す。これらの CD19CAR 修飾 T 細胞を HLA A2 遺伝子を標的とする ZF N をコードする mRNA によるヌクレオフェクションに付し、そして HLA - A2 陰性細胞を HLA - A2 抗体を用いた陰性ビーズソーティングにより富化し、そして HLA A2 特異的抗体を用いて FACS 分析を実施した。結果は、HLA A2 ノックアウト細胞は、その集団が 95.3% の HLA A2 ノックアウトを含有するように富化されていたことを示している。

【図 18】HLA A2 特異的 ZF N を投与され (A2neg CD19RCAR - T 細胞) 、そして HLA - A2 特異的抗体を用いて富化されるか、又は擬似トランスフェクトされている (A2pos CD19RCAR - T 細胞) かの何れかである HLA A2 特異的 CD19CAR 含有 T 細胞を用いた溶解アッセイの結果を示すグラフである。特異的ペプチドエピトープの漸増量と共に細胞をインキュベートした。陽性対照として A2pos B 細胞を使用した。結果は、HLA A2 遺伝子産物を欠損している細胞は HLA A2 特異的 CTL 誘導溶解に対して耐性であることを示している。

【図 19】パネル A ~ G は幾つかの FACS 分析の結果を示す。TCR (「TRBC」、図 19A ~ 図 19D) 又は TCR (「TRAC」、図 19E ~ 19G) の何れかに特異的な ZF N をコードする mRNA を、上記 FACS で示したとおり、2.5 µg ~ 10 µg の範囲で使用した。アッセイは TCR の存在に依存する複合体である細胞表面上の CD3 を採点するように設計されている。結果は、TCR 特異的 ZF N は集団の約 9% の細胞が CD3 マーカーを消失するように誘導できるのに対し、TCR 特異的 ZF N は約 28% の細胞が CD3 マーカーを消失するように誘導できることを示している。

【図 20A - B】パネル A 及び B は、TCR 特異的 ZF N (TRBC、図 20A) をコードするか又は TCR 特異的 ZF N (TRAC、図 20B) をコードする mRNA の何れかを使用する場合の、存在する遺伝子修飾の量を評価するための上記の Cell - I アッセイの結果を示すゲルを示す。この例において、mRNA をヌクレオフェクトし、そして標準的な条件によるか、又は「一過性コールドショック」条件を用いて培養した。結果は、図 19 の結果と全般的に合致しており、そして両方の ZF N のセットがそれらの意図する標的を切断できることを示している。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0040】

H L A 遺伝子又はH L A レギュレーターを標的とするための、D N A 結合ドメイン(例えばZ F P 及び/又はT A L E D N A 結合蛋白質)及びこれらのD N A 結合ドメインを含む融合蛋白質(例えばZ F N、T A L E N、Z F P - T F 及びT A L E - T F)を開示する。本明細書に記載する蛋白質は特定のH L A 遺伝子を抑制又は活性化し、そしてその発現を変化させることができる。同様に、本明細書に記載するD N A 結合蛋白質はH L A レギュレーターを標的とすることができ、そしてその発現を調節することを介してH L A 発現を変化させることができる。Z F N 及び/又はT A L E N を包含する組成物及びH L A 遺伝子を改変するための方法も開示し、提供する。これらは、操作されたD N A 結合ドメイン、即ち所定の核酸標的配列に結合する非天然存在の蛋白質を使用した組成物及び方法を包含する。本明細書に記載するD N A 結合ドメイン及びこれらのD N A 結合ドメインを含む融合蛋白質は所望のH L A 遺伝子に対して効率的及び特異的に作用することができ、特定の遺伝子の欠失及び/又は標的とされる遺伝子座内への目的の代替遺伝子の導入をもたらすことができる。この態様において標的化された細胞は治療薬、例えば移植片として使用することができ、又は、H L A 遺伝子機能を研究するためのインビトロ又はインビボの何れかのモデル系を作成するために使用できる。そのような細胞は又、H L A 発現に対して作用することになる化合物を求めるための、小分子又は他の型の治療薬を単離して特性化するための薬物スクリーニングツールとしても使用できる。所望のH L A 遺伝子のノックアウトの後に細胞表面上で発現されるH L A 遺伝子産物を変化させるために他のH L A 遺伝子を挿入してよい細胞もまた作成できる。更に又、H L A 遺伝子が操作されている細胞内に他の目的の遺伝子を挿入しても良い。

【0041】

したがって、本明細書に記載する方法及び組成物はH L A 関連障害の治療のための方法を提供し、そしてこれらの方法及び組成物は標的遺伝子を調節することができる亜鉛フィンガー転写因子並びに操作された亜鉛フィンガーヌクレアーゼを含むことができる。

全般

【0042】

本明細書に開示した方法の実施、並びに組成物の調製及び使用は、特段の記載が無い限り、当該分野で知られている通り、分子生物学、生化学、クロマチン構造及び分析、コンピューター化学、細胞培養、組み換えD N A 及び関連の分野における従来の手法を使用する。これらの手法は文献において十分に説明されている。例えばSambrook等、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989及びThird edition, 2001; Ausubel等、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987及び定期的更新; シリーズ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; 及びMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999を参照のこと。

定義

【0043】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、線状又は環状の構造における、そして1本鎖又は2本鎖の形態における、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを指す。本開示の目的のためには、これらの用語は重合体の長さに関して限定的であるとは解釈されない。これらの用語は天然のヌクレオチドの知られている類似体、並びに塩基、糖及び/又はホスフェート部分(例えばホスホロチオエート骨格)において修飾されているヌクレオチドを包含することができる。一般的に、特定のヌクレオチドの類似体は同じ塩基対形成特異性を有し; 即ち、Aの類似体はTと塩基対形成することになる。

【 0 0 4 4 】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「蛋白質」という用語はアミノ酸残基の重合体を指すために互換的に使用される。この用語はまた、アミノ酸の1つ以上が相当する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体又は修飾された誘導体であるアミノ酸重合体にも適用される。

【 0 0 4 5 】

「結合」とは巨大分子間（例えば蛋白質と核酸の間）の配列特異的、非共有結合的な相互作用を指す。全体としての相互作用が配列特異的である限り、結合相互作用の全ての成分が配列特異的（例えばDNA骨格中のホスフェート残基と接触する）である必要は無い。そのような相互作用は一般的に 10^{-6}M^{-1} 以下の解離定数（ K_d ）により特徴付けられる。「親和性」とは、結合の強度を指し：より高い結合親和性は、より低い K_d と関連する。

10

【 0 0 4 6 】

「結合蛋白質」とは別の分子に非共有結合的に結合できる蛋白質である。結合蛋白質は例えばDNA分子（DNA結合蛋白質）、RNA分子（RNA結合蛋白質）及び/又は蛋白質分子（蛋白質結合蛋白質）に結合できる。蛋白質結合蛋白質の場合、それは自身に結合（ホモ2量体、ホモ3量体等）することができ、及び/又は、それは異なる蛋白質の分子1つ以上に結合できる。結合蛋白質は1つより多い種類の結合活性を有することができる。例えば、亜鉛フィンガー蛋白質はDNA結合、RNA結合及び蛋白質結合活性を有する。

20

【 0 0 4 7 】

「亜鉛フィンガーDNA結合蛋白質」（又は結合ドメイン）は亜鉛イオンの配位を介して自身の構造が安定化する結合ドメイン内部のアミノ酸配列の領域である亜鉛フィンガー1つ以上を介して配列特異的態様においてDNAに結合する蛋白質又はより大きな蛋白質内部のドメインである。亜鉛フィンガーDNA結合蛋白質という用語は頻繁に亜鉛フィンガー蛋白質又はZFPと略記される。

【 0 0 4 8 】

「T A L E DNA結合ドメイン」又は「T A L E」とはT A L Eリピートドメイン/単位1つ以上を含むポリペプチドである。リピートドメインはT A L Eのその同族体標的DNA配列への結合に関与している。単一の「リピート単位」（「リピート」とも称する）は典型的には33~35アミノ酸長であり、そして天然に存在するT A L E蛋白質内部の他のT A L Eリピート配列と少なくともある程度の配列相同性を呈する。

30

【 0 0 4 9 】

亜鉛フィンガー結合ドメインは例えば天然に存在する亜鉛フィンガー蛋白質の認識ヘリックス領域の操作（アミノ酸1つ以上の改変）を介して、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」されることができる。同様に、T A L Eは例えばDNA結合に関与するアミノ酸（リピート可変ジ残基、即ちRVD残基）の操作により所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」されることができる。従って操作された亜鉛フィンガー蛋白質又はT A L E蛋白質は非天然存在の蛋白質である。亜鉛フィンガー蛋白質及びT A L Eを操作するための非限定的な例は設計及び選択である。設計された蛋白質は自身の設計/組成が主に合理的な基準から生じている非天然存在の蛋白質である。設計の合理的な基準は置換規則及び既存のZFP又はT A L Eの設計及び結合データの情報を保存しているデータベース中の情報を処理するためのコンピューター化されたアルゴリズムの適用を包含する。例えば米国特許6,140,081;6,453,242;及び6,534,261を参照でき;又、WO98/53058;WO98/53059;WO98/53060;WO02/016536及びWO03/016496も参照のこと。

40

【 0 0 5 0 】

「選択された」亜鉛フィンガー蛋白質又はT A L Eは、自身の生産が主に実験的プロセス、例えばファージディスプレイ、相互作用トラップ又はハイブリッド選択から生じる天然には存在しない蛋白質である。例えばUS5,789,538;US5,925,52

50

3 ; US 6 , 0 0 7 , 9 8 8 ; US 6 , 0 1 3 , 4 5 3 ; US 6 , 2 0 0 , 7 5 9 ; WO 9 5 / 1 9 4 3 1 ; WO 9 6 / 0 6 1 6 6 ; WO 9 8 / 5 3 0 5 7 ; WO 9 8 / 5 4 3 1 1 ; WO 0 0 / 2 7 8 7 8 ; WO 0 1 / 6 0 9 7 0 WO 0 1 / 8 8 1 9 7 及び WO 0 2 / 0 9 9 0 8 4 を参照のこと。

【 0 0 5 1 】

「組み換え」とは2つのポリヌクレオチドの間の遺伝子情報の交換のプロセスを指す。本開示の目的のためには、「相同組み換え(HR)」とは例えば相同性指向型修復機序を介した細胞中の2本鎖切断の修復中に起こ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必要とし、「標的」分子(即ち2本鎖切断を経験したもの)の鋳型修復のために「ドナー」分子を使用し、そして「非クロスオーバー遺伝子変換」又は「ショートトラクト遺伝子変換」として多様に知られているが、その理由はそれがドナーから標的への遺伝子情報の転移をもたらすからである。特定の理論に制約することを望むのではないが、そのような転移には破壊された標的とドナーとの間に形成されるヘテロデュプレックスDNAのミスマッチ補正、及び/又は標的の部分になる遺伝子情報を再合成するためにドナーが使用される「合成依存性鎖アニーリング」及び/又は関連プロセスが関与している場合がある。そのような特殊化されたHRはしばしば、ドナーポリヌクレオチドの配列の部分又は全てが標的ポリヌクレオチド内に取り込まれるような標的分子の配列の改変をもたらす。

【 0 0 5 2 】

本開示の方法においては、本明細書に記載する標的化ヌクレアーゼの1つ以上が所定の部位において標的配列(例えば細胞クロマチン)中に2本鎖破壊をもたらし、そして破壊領域のヌクレオチド配列と相同性を有する「ドナー」ポリヌクレオチドが細胞内に導入されることができる。2本鎖破壊の存在はドナー配列の組み込みを促進することがわかっている。ドナー配列は物理的に組み込まれて良く、或いは、ドナーポリヌクレオチドは相同組み換えを介した破壊の修復のための鋳型として用いられることにより、ドナー中にある状態でヌクレオチド配列の全て又は部分の細胞クロマチン内への導入がもたらされる。したがって、細胞クロマチンの第1の配列を改変することができ、そしてある特定の実施形態において、ドナーポリヌクレオチド中に存在する配列に変換することができる。したがって、「置き換える」又は「置き換え」という用語の使用はあるヌクレオチド配列の別のものによる置き換え(即ち情報的意味においての配列の置き換え)を示すと理解することができ、必ずしもあるヌクレオチドの別のものによる物理的又は化学的な置き換えを必要としない。

【 0 0 5 3 】

本明細書に記載する方法の何れにおいても、細胞内部の追加的標的部位の追加的2本鎖切断のために、亜鉛フィンガー蛋白質の追加的対を用いることができる。

【 0 0 5 4 】

細胞クロマチン中の目的の領域における配列の標的化された組み換え及び/又は置き換え及び/又は改変のための方法のある特定の実施形態において、染色体配列を外因性の「ドナー」ヌクレオチド配列との相同組み換えにより改変する。そのような相同組み換えは、破壊領域に相同である配列が存在すれば、細胞クロマチン中の2本鎖破壊の存在により刺激される。

【 0 0 5 5 】

本明細書に記載する方法の何れにおいても、第1のヌクレオチド配列(「ドナー配列」)は目的の領域のゲノム配列と相同であるが同一ではない配列を含有することができ、それにより目的の領域中に非同一配列を挿入するための相同組み換えを促進することができる。したがって、ある特定の実施形態において、目的の領域の配列に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と約80~90%(又はその間の何れかの整数)の配列同一性を呈する。他の実施形態において、ドナーとゲノム配列の間の相同性は、例えばドナーと100超の連続塩基対のゲノム配列のものとして僅か1ヌクレオチドのみが異なる場合に、99%より高値となる。ある特定の場

10

20

30

40

50

領域内に導入されるように、ドナー配列の非相同部分は目的の領域中には存在しない配列を含有することができる。これらの場合において、非相同配列は一般的に、50～1000塩基対（又はその間の何れかの整数）の配列、又は目的の領域中の配列と相同又は同一である1000個より多い塩基対の何れかの数に隣接して配置される。他の実施形態において、ドナー配列は第1の配列と非相同であり、そして非相同組み換え機序によりゲノム内に挿入される。

【0056】

本明細書に記載する方法の何れをも、目的の遺伝子の発現を攪乱させるドナー配列の標的化された組み込みにより細胞中の標的配列1つ以上の部分的又は完全な不活性化のために使用できる。部分的又は完全に不活性化された遺伝子を有する細胞系統もまた提供される。

10

【0057】

更に又、本明細書に記載する標的化された組み込みの方法は外因性配列1つ以上を組み込むためにも使用できる。外因性核酸配列は例えば1つ以上の遺伝子又はcDNA分子、又は何れかの型のコーディング又は非コーディング配列、並びに1つ以上の制御エレメント（例えばプロモーター）を含むことができる。更に又、外因性核酸配列は1つ以上のRNA分子（例えば小型ヘアピンRNA（shRNA）、阻害RNA（RNAi）、マイクロRNA（miRNA）等）を生成し得る。

【0058】

「切断」とは、DNA分子の共有結合骨格の破壊を指す。切断はホスホジエステル結合の酵素的又は化学的加水分解を包含するがこれらに限定されない種々の方法により開始することができる。1本鎖切断及び2本鎖切断の両方が可能であり、そして、2本鎖切断は2つの区別可能な1本鎖切断事象の結果として起こることができる。DNA切断は平滑末端又は互い違いの末端の何れかの生成をもたらす場合がある。ある特定の実施形態において、融合ポリペプチドは標的化された2本鎖DNA切断のために使用される。

20

【0059】

「切断ハーフドメイン」は、第2のポリペプチド（同じか又は異なる）と一緒に切断活性（好ましくは2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。「第1及び第2の切断ハーフドメイン」、「+及び-切断ハーフドメイン」、及び「右及び左切断ハーフドメイン」という用語は互換的に使用され、2量体化する切断ハーフドメインの対を指す。

30

【0060】

「操作された切断ハーフドメイン」とは、別の切断ハーフドメイン（例えば他の操作された切断ハーフドメイン）と強制的ヘテロ2量体を形成するように修飾されている切断ハーフドメインである。例えば参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開2005/0064474、20070218528及び2008/0131962を参照のこと。

【0061】

「配列」という用語は任意の長さのヌクレオチド配列を指し、これはDNA又はRNAであることができ；線状、環状又は分枝鎖であることができ、そして1本鎖又は2本鎖であることができる。「ドナー配列」という用語はゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は任意の長さ、例えば2～1000ヌクレオチド長（又はその間又はその上の何れかの整数値）、好ましくは約100～1000ヌクレオチド長（又はその間の何れかの整数）、より好ましくは約200～500ヌクレオチド長であることができる。

40

【0062】

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核蛋白質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主にDNA、及び蛋白質、例えばヒストン及び非ヒストン染色体蛋白質を含む。真核生物細胞クロマチンの大部分はヌクレオソームの形態で存在し、そこでは、ヌクレオソームのコアはヒストンH2A、H2B、H3及びH4の各々2つを含む8量体と会合したDNA

50

の約 150 塩基対を含み；そしてリンカー DNA（生物に応じて種々の長さ）がヌクレオソームとコアの間に伸長している。ヒストン H1 の分子は一般的にリンカー DNA と会合している。本開示の目的のために、「クロマチン」という用語は原核生物及び真核生物の両方の細胞核蛋白質の全ての型を包含することが意図される。細胞クロマチンは染色体及びエピソームのクロマチンの両方を包含する。

【0063】

「染色体」は、細胞のゲノムの全て又は一部分を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムはしばしばその核型により特性化され、それは細胞のゲノムを含む染色体の全ての集合である。細胞のゲノムは染色体 1 つ以上を含むことができる。

【0064】

「エピソーム」とは、複製する核酸、核蛋白質複合体又は細胞の染色体核型の部分ではない核酸を含む他の構造である。エピソームの例はプラスミド及びある特定のウィルスゲノムを包含する。

【0065】

「標的部位」又は「標的配列」は、結合のための十分な条件が存在すれば結合分子が結合することになる核酸の一部分を画定する核酸配列である。例えば配列 5' G A A T T C 3' は EcoRI 制限エンドヌクレアーゼに対する標的部位である。種々の標的化された ZFP に対する例となる標的部位を表 2 に示す。

【0066】

「外因性」分子は、細胞内に通常は存在しないが、遺伝子的、生化学的又は他の方法の 1 つ以上により細胞内に導入できる分子である。「細胞中の通常の存在」は細胞の特定の発生段階及び環境条件に対して決定される。したがって、例えば筋肉の胚性発生の間のみ存在する分子は成熟筋細胞に対しては外因性分子である。同様に、熱ショックにより誘導される分子は非熱ショック細胞に対しては外因性分子である。外因性分子は例えば機能不全の内因性分子の機能性のバージョン又は正常機能の内因性分子の機能不全バージョンを含むことができる。

【0067】

外因性分子は特に小分子、例えばコンビナトリアル化学プロセスにより形成されるもの、又は、巨大分子、例えば蛋白質、核酸、炭水化物、脂質、糖蛋白質、リボ蛋白質、多糖類、上記分子の何れかの修飾された誘導体、又は上記分子の 1 つ以上を含む何れかの複合体であることができる。核酸は DNA 及び RNA を包含し、1 本鎖又は 2 本鎖であることができ；直鎖、分枝鎖又は環状であることができ；そして任意の長さであることができる。核酸は二重鎖並びに三重鎖形成核酸を形成することができるものを包含する。例えば米国特許 5,176,996 及び 5,422,251 号を参照のこと。蛋白質は、DNA 結合蛋白質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化 DNA 結合蛋白質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジラーゼ及びヘリカーゼを包含するが、これらに限定されない。

【0068】

外因性分子は内因性分子と同じ型の分子、例えば外因性蛋白質又は核酸であることができる。例えば、外因性核酸は細胞内に導入された感染性のウィルスゲノム、プラスミド又はエピソーム、又は通常は細胞内に存在しない染色体を含むことができる。細胞内に外因性分子を導入するための方法は当該分野で知られており、脂質媒介転移（即ちリボソーム、例えば中性及びカチオン性の脂質）、エレクトロポレーション、直接の注入、細胞融合、粒子衝突、リン酸カルシウム同時沈殿、DEAE デキストラン媒介転移及びウィルスベクター媒介転移を包含するがこれらに限定されない。外因性分子はまた、内因性分子と同じ型の分子であるが、細胞の誘導元とは異なる種から誘導されることができる。例えば、ヒト核酸配列をマウス又はハムスターから元々誘導された細胞系統内に導入してよい。

【0069】

一方、「内因性」分子は特定の環境条件下の特定の発生段階における特定の細胞中を通

10

20

30

40

50

常は存在するものである。例えば内因性核酸は染色体、ミトコンドリア、クロロプラスト又は他のオルガネラのゲノム、又は天然に存在するエピソーム核酸を含むことができる。追加的な内因性分子は例えば転写因子及び酵素を包含し得る。

【 0 0 7 0 】

「融合」分子は2つ以上のサブユニット分子が好ましくは共有結合的に連結されている分子である。サブユニット分子は同じ化学的な型の分子であることができ、又は、異なる化学的な型の分子であることができる。融合分子の第1の型の例は、融合蛋白質(例えば Z F P D N A 結合ドメインと1つ以上の活性化ドメインの間の融合物)及び融合核酸(例えば上記融合蛋白質をコードする核酸)を包含するがこれらに限定されない。融合分子の第2の型の例は三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合物及びマイナーグループバインダーと核酸の間の融合物を包含するがこれらに限定されない。

10

【 0 0 7 1 】

細胞中での融合蛋白質の発現は、細胞への融合蛋白質の送達に起因するか、又は細胞への融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドの送達によるものであって、その場合、ポリヌクレオチドは転写され、そして転写物が翻訳されて融合蛋白質を形成する。トランススプライシング、ポリペプチド切断及びポリペプチドのライゲーションもまた細胞中での蛋白質の発現に関与している。細胞へのポリヌクレオチド及びポリペプチドの送達のための方法は本開示において別途記載する。

【 0 0 7 2 】

「遺伝子」は、本開示の目的のためには、遺伝子産物(下記参照)をコードするDNA領域、並びに遺伝子産物の生産を調節する全てのDNA領域を包含し、そのような調製配列がコーディング及び/又は転写された配列であるか否かに関わらない。従って、遺伝子はプロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列、例えばリボソーム結合部位及び内部リボソームエントリー部位、エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス結合部位及び遺伝子座制御領域を包含するが、必ずしもこれらに限定されない。

20

【 0 0 7 3 】

「遺伝子発現」とは、遺伝子に含有される情報の遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は遺伝子の直接の転写産物(例えばmRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA又は何れかの他の型のRNA)又はmRNAの翻訳により生産された蛋白質であることができる。遺伝子産物は又、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、及び編集のようなプロセスにより修飾されたRNA、及び例えばメチル化、アセチル化、ホスホリル化、ユビキチン化、ADPリボシル化、ミリスチル化及びグリコシル化により修飾された蛋白質を包含する。

30

【 0 0 7 4 】

遺伝子発現の「調節」とは遺伝子の活性の変化を指す。発現の調節は遺伝子活性化及び遺伝子抑制を包含するがこれらに限定されない。ゲノムエディティング(例えば切断、改変、不活性化、ランダム突然変異)を用いて発現をモジュレートできる。遺伝子不活性化は本明細書に記載するZFPを包含しない細胞と比較した場合の遺伝子発現の低下を指す。即ち、遺伝子不活性化は部分的又は完全であってよい。

40

【 0 0 7 5 】

「目的の領域」とは、例えば外因性分子に結合することが望まれる遺伝子、又は、遺伝子内部又はそれに隣接する非コーディング配列のような、細胞クロマチンの何れかの領域である。結合は標的化されたDNA切断及び/又は標的化された組み換えを目的とすることができる。目的の領域は染色体、エピソーム、オルガネラゲノム(例えばミトコンドリア、クロロプラスト)、又は例えば感染性ウィルスゲノム中に存在できる。目的の領域は遺伝子のコーディング領域の内部、転写された非コーディング領域、例えばリーダー配列、トレーラー配列又はイントロンの内部、又は非転写領域の内部であって、コーディング領域の上流又は下流の何れかにあることができる。目的の領域は1ヌクレオチド対のように短いか、又は2000ヌクレオチド対の長さまで、又は何れかの整数値のヌクレオチド

50

対であることができる。

【 0 0 7 6 】

「真核生物」細胞はカビ細胞（例えばコウボ）、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞及びヒト細胞（例えばT細胞）を包含するがこれらに限定されない。

【 0 0 7 7 】

「作動可能な連結」及び「作動可能に連結した」という用語は2つ以上の成分（例えば配列エレメント）の並置に言及して互換的に使用され、この場合、成分は両方の成分が正常に機能し、そして成分の少なくとも一方が他の成分の少なくとも1つに対して発揮される機能を媒介することができる可能性を与えるように配置される。説明すれば、転写調節配列、例えばプロモーターは、転写調節配列が転写調節因子1つ以上の存在又は非存在に
10 応答してコード配列の転写のレベルを制御する場合に、コード配列に作動可能に連結している。転写調節配列は一般的に、コード配列とはシスで作動可能に連結しているが、それに直接隣接している必要はない。例えば、エンハンサーはコード配列に作動可能に連結している転写調節配列であるが、それらが連続していなくてもよい。

【 0 0 7 8 】

融合ポリペプチドに関しては、「作動可能に連結」という用語は、成分の各々が、それらがそのように連結していない場合と同様の機能を他成分との連結において各成分が行うという事実を指す場合がある。例えば、ZFP DNA結合ドメインが活性化ドメインに融合している融合ポリペプチドに関しては、融合ポリペプチドにおいて、ZFP DNA結合
20 ドメイン部分はその標的部位及び/又はその結合部位に結合することができ、活性化ドメインが遺伝子発現を上方調節できる場合に、ZFP DNA結合ドメインと活性化ドメインは作動可能な連結にある。ZFP DNA結合ドメインが切断ドメインに融合している融合ポリペプチドの場合、融合ポリペプチドにおいて、ZFP DNA結合ドメイン部分はその標的部位及び/又はその結合部位に結合することができ、切断ドメインが標的部位の近接部のDNAを切断できる場合に、ZFP DNA結合ドメインと切断ドメインは作動可能な連結にある。

【 0 0 7 9 】

蛋白質、ポリペプチド又は核酸の「機能性フラグメント」は、自身の配列が完全長の蛋白質、ポリペプチド又は核酸とは同一ではないが、なお、完全長の蛋白質、ポリペプチド
30 又は核酸と同じ機能を保持している蛋白質、ポリペプチド又は核酸である。機能性フラグメントは相当する自然の分子より多い、少ない、又は同じ数の残基を保有することができ、及び/又は、1つ以上のアミノ酸又はヌクレオチドの置換を含有できる。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）を測定するための方法は当該分野で良く知られている。同様に蛋白質機能を測定するための方法も良く知られている。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、電気泳動の運動性のシフト、又は免疫沈降アッセイにより測定できる。DNA切断はゲル電気泳動により試験できる。上出のAusubel等を参照のこと。ある蛋白質が別の蛋白質と相互作用する能力は例えば、同時免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイ又は遺伝子的及び生化学的な相補により測定できる。例えばFields等、(1989)Nature 340:245-246; 米国特許 5, 585, 245
40 及びPCTWO 98/44350を参照のこと。

【 0 0 8 0 】

「ベクター」は遺伝子配列を標的細胞に転移させることができる。典型的には、「ベクターコンストラクト」、「発現ベクター」及び「遺伝子転移ベクター」は目的の遺伝子の発現を指向することができ、そして遺伝子配列を標的細胞に転移することができる任意の核酸を意味する。即ち、この用語はクローニング、及び発現ベヒクル、並びに組み込みベクターを包含する。

【 0 0 8 1 】

「レポーター遺伝子」又は「レポーター配列」とは好ましくは必ずしも定型的なアッセイにおいてではないが、容易に計測できる蛋白質産物を生産する何れかの配列を指す。適当なレポーター遺伝子は抗生物質耐性（例えばアンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、G
50

４１８耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介する蛋白質をコードする配列、着色又は蛍光又はルミネセント蛋白質（例えば緑色蛍光蛋白質、増強緑色蛍光蛋白質、赤色蛍光蛋白質、ルシフェラーゼ）をコードする配列、及び増強された細胞成長及び／又は遺伝子増幅を媒介する蛋白質（例えばジヒドロフォレート還元酵素）を包含するがこれらに限定されない。エピトープタグは例えばFLAG、His、myc、Tap、HA又は何れかの検出可能なアミノ酸配列のコピー１つ以上を包含する。「発現タグ」は目的の遺伝子の発現をモニタリングするために所望の遺伝子配列に作動可能に連結して良いレポーターをコードする配列を包含する。

DNA結合ドメイン

【００８２】

HLA遺伝子又はHLAレギュレーターを含む何れかの遺伝子における標的部位に特異的に結合するDNA結合ドメインを含む組成物を提供する。何れかのDNA結合ドメインをも本明細書に開示した組成物及び方法において使用できる。

【００８３】

ある特定の実施形態において、DNA結合ドメインは亜鉛フィンガー蛋白質を含む。好ましくは、亜鉛フィンガー蛋白質は選択された標的部位に結合するように操作されるといふ点において非天然存在である。例えば全て参照により全体が本明細書に組み込まれるBerli等、(2002)Nature Biotechnol.20:135-141;Pabo等、(2001)Ann.Rev.Biochem.70:313-340;Isalan等、(2001)Nature Biotechnol.19:656-660;Segal等、(2001)Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637;Choo等、(2000)Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416;米国特許6,453,242;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,030,215;6,794,136;7,067,317;7,262,054;7,070,934;7,361,635;7,253,273;及び米国特許公開番号2005/0064474;2007/0218528;2005/0267061を参照のこと。

【００８４】

操作された亜鉛フィンガー結合ドメインは天然に存在する亜鉛フィンガー蛋白質と比較して新規の結合特異性を有することができる。操作方法は合理的設計及び種々の型の選択を包含するがこれらに限定されない。合理的設計は例えばトリプレット(又はクアドルプレット)のヌクレオチド配列及び個々の亜鉛フィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを用いることを包含し、その場合、各トリプレット又はクアドルプレットのヌクレオチド配列は特定のトリプレット又はクアドルプレットの配列に結合する亜鉛フィンガーのアミノ酸配列１つ以上と会合している。例えば参照により全体が本明細書に組み込まれる共有米国特許6,453,242及び6,534,261を参照のこと。

【００８５】

例となる選択方法、例えばファージディスプレイ及びツ－ハイブリッドシステムは米国特許5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,410,248;6,140,466;6,200,759;及び6,242,568;並びにWO98/37186;WO98/53057;WO00/27878;WO01/88197及びGB2,338,237に開示されている。更に又、亜鉛フィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば共有されているWO02/077227に記載されている。

【００８６】

更に又、上記及び他の参考文献に開示されている通り、亜鉛フィンガードメイン及び／又はマルチフィンガーの亜鉛フィンガー蛋白質は、例えば5アミノ酸長以上のリンカーを包含する何れかの適当なリンカー配列を使用して連結してよい。また6アミノ酸長以上のリンカー配列の例については例えば、米国特許6,479,626;6,903,185;及び7,153,949を参照のこと。本明細書に記載する蛋白質は、蛋白質の個々の亜鉛フィンガーの間の適当なリンカーの何れかの組み合わせを包含してよい。更に又、亜鉛フィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は例えば共有しているWO02/0

10

20

30

40

50

7 7 2 2 7 に記載されている。

【 0 0 8 7 】

標的部位の選択；ZFP及び融合蛋白質（及びそれをコードするポリヌクレオチド）の設計及び構築のための方法は当該分野で知られており、米国特許6,140,0815；789,538；6,453,242；6,534,261；5,925,523；6,007,988；6,013,453；6,200,759；WO95/19431；WO96/06166；WO98/53057；WO98/54311；WO00/27878；WO01/60970WO01/88197；WO02/099084；WO98/53058；WO98/53059；WO98/53060；WO02/016536及びWO03/016496に詳述されている。

10

【 0 0 8 8 】

更に又、上記及び他の参考文献に開示されている通り、亜鉛フィンガードメイン及び/又はマルチフィンガーの亜鉛フィンガー蛋白質は、例えば5アミノ酸長以上のリンカーを包含する何れかの適当なリンカー配列を使用して連結してよい。また6アミノ酸長以上のリンカー配列の例については例えば、米国特許6,479,626；6,903,185；及び7,153,949を参照のこと。本明細書に記載する蛋白質は、蛋白質の個々の亜鉛フィンガーの間の適当なリンカーの何れかの組み合わせを包含してよい。

【 0 0 8 9 】

或いは、DNA結合ドメインはヌクレアーゼから誘導してよい。例えばI-SceI,I-CeuI,PI-PspI,PI-Sce,I-SceIV,I-CsmI,I-PanI,I-SceII,I-PpoI,I-SceIII,I-CreI,I-TevI,I-TevII and I-TevIIIのようなホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼの認識配列が知られている。更に又、米国特許5,420,032；米国特許6,833,252；Belfort等、(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388；Dujon等、(1989)Gene 82:115-118；Perler等、(1994)Nucleic Acids Res.22,1125-1127；Jasin(1996)Trends Genet.12:224-228；Gimble等、(1996)J.Mol.Biol.263:163-180；Argast等、(1998)J.Mol.Biol.280:345-353及びNew England Biolabs catalogueも参照のこと。更に又、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼのDNA結合特異性を、非天然存在の標的部位に結合するように操作できる。例えばChevalier等、(2002)Molec.Cell 10:895-905；Epinat等、(2003)Nucleic Acids Res.31:2952-2962；Ashworth等、(2006)Nature 441:656-659；Paques等、(2007)Current Gene Therapy 7:49-66；米国特許公開20070117128号を参照のこと。

20

30

【 0 0 9 0 】

ある特定の実施形態において、DNA結合ドメインは、HLA遺伝子又はHLA調節遺伝子における標的部位に結合（配列特異的な態様において）してHLAの発現を調節する、操作された亜鉛フィンガー蛋白質である。ZFPは目的の特定のハプロタイプに特異的に結合することができる。米国の集団において発見されたHLAハプロタイプ及び種々の人種によるそれらの頻度の考察に関しては、参照により本明細書に組み込まれるMajers等、(2007)Human Immunology 68:779-788を参照のこと。更に又、Tap1、Tap2、タパシン、CTFIIA、及びRFX5を包含するがこれらに限定されない機能性HLAレギュレーター遺伝子に結合するZFPを提供する。HLA標的部位は典型的には少なくとも1つの亜鉛フィンガーを包含するが、複数の亜鉛フィンガー（例えば2,3,4,5,6つ以上のフィンガー）を包含できる。通常は、ZFPは少なくとも3つのフィンガーを包含する。ZFPのある特定のものは4,5又は6つのフィンガーを包含する。3つのフィンガーを包含するZFPは典型的には9又は10ヌクレオチドを包含する標的部位を認識し；4つのフィンガーを包含するZFPは典型的には12～14ヌクレオチドを包含する標的部位を認識し；6つのフィンガーを有するZFPは18～21ヌクレオチドを包含する標的部位を認識することができる。ZFPは又、調節ドメイン1つ以上を含む融合蛋白質であることもでき、そのドメインは転写活性化又は抑制ドメインであることができる。

40

【 0 0 9 1 】

標的化されるZFPの特定の例を表1に開示する。この表の第1の列はZFPに関する

50

内部の参照名称（番号）であり、表 2 の列 1 の同じ名称に対応する。「F」はフィンガーを指し、そして「F」の後の数はどの亜鉛フィンガーであるかを指している（例えば「F1」はフィンガー 1 を指す）。

【 0 0 9 2 】

【表 1】

表 1：亜鉛フィンガー蛋白質

| 標的 | SBS # | 設計 | | | | | |
|--------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| クラス I | | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
| HLA A2 | 18889 | QSSHLTR (配列番号1) | RSDHLLT (配列番号2) | RSDTLSQ (配列番号3) | RSADLSR (配列番号4) | QSSDLSR (配列番号5) | RSDALTQ (配列番号6) |
| HLA A2 | 18881 | QKTHLAK (配列番号7) | RSDTLSN (配列番号8) | RKDVRIT (配列番号9) | RSDHLST (配列番号10) | DSSARKK (配列番号11) | NA |
| HLA A2 | 24859 | QNAHRKT (配列番号12) | RSDSLLR (配列番号13) | RNDDRKK (配列番号14) | RSDHLST (配列番号10) | DSSARKK (配列番号11) | NA |
| HLA A3 | 25191 | DRSHLSR (配列番号15) | RSDDLTR (配列番号16) | DRSDLSR (配列番号17) | QSGHLSR (配列番号18) | NA | NA |
| HLA A3 | 25190 | DRSALSR (配列番号19) | QSSDLRR (配列番号20) | DRSALSR (配列番号19) | DRSHLAR (配列番号21) | RSDDLK (配列番号22) | DRSHLAR (配列番号21) |
| HLA B | 25316 | SSELLNE (配列番号23) | TSSHLSR (配列番号24) | QSGDRNK (配列番号25) | RSANLAR (配列番号26) | RSDNLRE (配列番号27) | NA |

【 0 0 9 3 】

【表 2】

| 標的 | SBS # | 設計 | | | | | |
|------------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----|
| クラス I | | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
| HLA B | 25317 | QSGDLTR (配列番号28) | RSDDLTR (配列番号16) | DQSTLRN (配列番号29) | DRSNLSR (配列番号30) | DAFTRTR (配列番号31) | NA |
| HLA B-up | 15267 | RSDNLSE (配列番号32) | ASKTRKN (配列番号33) | TSGNLTR (配列番号34) | RSDALAR (配列番号35) | NA | NA |
| HLA B-up | 15265 | DRSALSR (配列番号19) | QSGNLAR (配列番号36) | DRSALSR (配列番号19) | QSGHLSR (配列番号18) | NA | NA |
| HLA B-up | 17454 | RSDNLSE (配列番号32) | ASKTRKN (配列番号33) | QSGHLSR (配列番号18) | TSGHLSR (配列番号37) | QSGHLSR (配列番号18) | NA |
| HLA B-up | 17456 | RSADLTR (配列番号38) | QSGDLTR (配列番号28) | QSGNLAR (配列番号36) | QSGDLTR (配列番号28) | NA | NA |
| HLA C-down | 15296 | QSGHLSR (配列番号18) | RSDHLST (配列番号10) | QSADRTK (配列番号39) | TSGLSR (配列番号40) | QSADRTK (配列番号39) | NA |
| HLA C-down | 15298 | QSGDLTR (配列番号28) | RSDHLST (配列番号10) | QSADRTK (配列番号39) | RSDNLSA (配列番号41) | RSDNRTT (配列番号42) | NA |
| HLA C | 25588 | QRSNLVR (配列番号43) | DRSALAR (配列番号44) | QSSDLRR (配列番号20) | RSDDLTR (配列番号16) | RSDDLTR (配列番号16) | NA |
| HLA C | 25589 | RSDDLTR (配列番号16) | DRSDLSR (配列番号17) | QSGHLSR (配列番号18) | RSDHLSA (配列番号45) | ESRYLMV (配列番号46) | NA |

【 0 0 9 4 】

【表 3】

| 標的 | SBS # | 設計 | | | | | |
|----------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----|
| クラスII | | | | | | | |
| DBP2-up | 15872 | RSDHLST (配列番号10) | DNANRTK (配列番号47) | QSGDLTR (配列番号28) | RSDALST (配列番号48) | ASSNRKT (配列番号49) | NA |
| DBP2-up | 15873 | TSGNLTR (配列番号34) | DRSDLSR (配列番号17) | RSDNLSE (配列番号32) | RSANLTR (配列番号50) | QSGHLSR (配列番号18) | NA |
| DRA-down | 15909 | RSDNLSE (配列番号32) | TSGSLTR (配列番号51) | TSGHLSR (配列番号37) | RSDNLSQ (配列番号52) | ASNDRKK (配列番号53) | NA |
| DRA-down | 15910 | RSDNLSR (配列番号54) | DNNARIN (配列番号55) | RSDSLSV (配列番号56) | QNRHRIN (配列番号57) | RSDHLSR (配列番号58) | NA |

10

【 0 0 9 5 】

【表 4】

| レギュレーター | | | | | | | |
|---------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TAP1 | 28386 | DSSDRKK (配列番号59) | DRSHLTR (配列番号60) | RSDALAR (配列番号35) | QSSDLSR (配列番号5) | RSDNLTT (配列番号61) | NA |
| TAP1 | 28385 | RSANLAR (配列番号26) | QSGHLSR (配列番号18) | TSGNLTR (配列番号34) | QSGALVI (配列番号62) | RSDHLE (配列番号63) | RKHDRTK (配列番号64) |
| TAP2 | 28394 | QSSDLSR (配列番号5) | QSGDLTR (配列番号28) | QSSHLTR (配列番号1) | RSDDRKT (配列番号65) | TSGNLTR (配列番号34) | RSDDLTR (配列番号16) |
| TAP2 | 28393 | RSDNLST (配列番号66) | RSDALAR (配列番号35) | RSDVLSA (配列番号67) | DRSNRIK (配列番号68) | RREDLIT (配列番号69) | TSSNLSR (配列番号70) |
| タバシン | 28406 | RSDNLSE (配列番号32) | KRCNLRC (配列番号71) | DRSDLSR (配列番号17) | QTTHNR (配列番号72) | DRSDLSR (配列番号17) | QSSTRAR (配列番号73) |
| タバシン | 28405 | QSSDLSR (配列番号5) | RSDNLTR (配列番号74) | QSSHLTR (配列番号1) | QSSDLTR (配列番号75) | RSDNLAR (配列番号76) | QKVNLMs (配列番号77) |
| タバシン | 28404 | TSGNLTR (配列番号34) | LSQDLNR (配列番号78) | RSDLSA (配列番号79) | DRSHLAR (配列番号21) | RSDHLST (配列番号10) | QSGHLSR (配列番号18) |
| タバシン | 28403 | RSDDLTR (配列番号16) | SSSNLTK (配列番号80) | TSGSLSR (配列番号40) | QSGDLTR (配列番号28) | RSDHLE (配列番号63) | RNRDRIT (配列番号81) |
| CT11A | 15486 | RSDDLTR (配列番号16) | RSDHLE (配列番号63) | NSNRKT (配列番号82) | RSDNLSQ (配列番号52) | ASNDRKK (配列番号53) | NA |
| CT11A | 15487 | RSDDLTR (配列番号83) | RNDRKK (配列番号14) | DRSDLSR (配列番号17) | RSDHLE (配列番号63) | ARSTRTN (配列番号84) | NA |
| RFX5 | 15506 | TSGNLTR (配列番号34) | QSGNLAR (配列番号36) | RSDHLTQ (配列番号85) | ASMALNE (配列番号86) | TSSNLSR (配列番号70) | NA |
| RFX5 | 15507 | RSDVLE (配列番号87) | RNQHRKT (配列番号88) | RSDHLST (配列番号10) | QSSDLRR (配列番号20) | RSDNLST (配列番号66) | RSADRKN (配列番号89) |

20

30

40

【 0 0 9 6 】

【表 5】

| その他 | | | | | | | |
|------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TRAC | 25539 | QSGDLTR (配列番号28) | QWGTRYR (配列番号90) | ERGTLAR (配列番号91) | RSDNLRE (配列番号27) | QSGDLTR (配列番号28) | TSGSLTR (配列番号51) |
| TRAC | 25540 | QSGDLTR (配列番号28) | WRSSLAS (配列番号92) | QSGDLTR (配列番号28) | HKWVLRQ (配列番号93) | DRSNLTR (配列番号94) | NA |
| TRBC | 16783 | RSDVLSA (配列番号67) | DRSNRIK (配列番号68) | RSDVLSE (配列番号87) | QSGNLAR (配列番号36) | QSGSLTR (配列番号95) | NA |
| TRBC | 16787 | RSDHLST (配列番号10) | RSDNLTR (配列番号74) | DRSNLSR (配列番号30) | TSSNRKT (配列番号96) | RSANLAR (配列番号26) | RNDDRKK (配列番号14) |

10

【 0 0 9 7 】

これらの蛋白質の標的部位に関する配列を表 2 に開示する。表 2 は記載の亜鉛フィンガー蛋白質に関する標的配列を示す。ZFP 認識ヘリックスが接触す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。

【 0 0 9 8 】

【表 6】

表 2：亜鉛フィンガー標的部位

20

| 標的 | SBS # | 標的部位 |
|------------|-------|--|
| クラス I | | |
| HLA A2 | 18889 | gtATGGCTGCGACGTGGGGTcggacggg (配列番号97) |
| HLA A2 | 18881 | ttATCTGGATGGTGTGAgacactggccc (配列番号98) |
| HLA A2 | 24859 | tcCTCTGGACGGTGTGAgacactggccc (配列番号99) |
| HLA A3 | 25191 | atGGAGCCGCGGGCgccgtggatagagc (配列番号100) |
| HLA A3 | 25190 | ctGGCTCGcGGCGTCGCTGTGgaaccgc (配列番号101) |
| HLA B-up | 25316 | tcCAGGAGcTCAGGTCCTcgttcagggc (配列番号102) |
| HLA B-up | 25317 | cgGCGGACACCGCGGCTcagatcaccca (配列番号103) |
| HLA B-up | 15267 | agGTGGATGCCAGgacgagctttgagg (配列番号104) |
| HLA B-up | 15265 | agGGAGCAGAAGCAgcccagcagcgcca (配列番号105) |
| HLA B-up | 17454 | ctGGAGGTGGAtGCCAGgacgagcttt (配列番号106) |
| HLA B-up | 17456 | gaGCAGAAGCAGCGcagcagcgccacct (配列番号107) |
| HLA C-down | 15296 | ccTCAGTTTCATGGGAttcaagggaac (配列番号108) |
| HLA C-down | 15298 | ccTAGGAGgTCATGGGCAtttgccatgc (配列番号109) |
| HLA C-down | 25588 | tcGCGGCGtcGCTGTGGAaccgcacgaa (配列番号110) |
| HLA C-down | 25589 | ccAAGAGGGGAGCCGCGgagaccgtggg (配列番号111) |
| クラス II | | |
| DBP2-up | 15872 | gaAATAAGGCATACTGGtattactaatg (配列番号112) |
| DBP2-up | 15873 | gaGGAGAGCAGGCCGAttacctgaccca (配列番号113) |
| DRA-down | 15909 | tcTCCAGGGTgGTTCAgtggcagaatt (配列番号114) |
| DRA-down | 15910 | gcGGGGAAAGaGAGGAGgagagaagga (配列番号115) |

30

40

【 0 0 9 9 】

【表 7】

| 標的 | SBS # | 標的部位 |
|---------|-------|--|
| レギュレーター | | |
| TAP1 | 28386 | agAAGGCTGTGGGCTCctcagagaaaat (配列番号116) |
| TAP1 | 28385 | acTCTGGGGTAGATGGAGAGcagtacct (配列番号117) |
| TAP2 | 28394 | ttGCGGATCCGGGAGCAGCTtttctcct (配列番号118) |
| TAP2 | 28393 | ttGATTcGaGACATGGTGTAGgtgaagc (配列番号119) |
| タバシン | 28406 | ccACAGCCAGAGCCtCAGCAGgagcctg (配列番号120) |
| タバシン | 28405 | cGCAAGAGGCTGGAGAGGCTgaggactg (配列番号121) |
| タバシン | 28404 | ctGGATGGGGCTTGGCTGATggtcagca (配列番号122) |
| タバシン | 28403 | gcCCGCGGGCAGTTcTGGCGgggggtca (配列番号123) |
| CTIIA | 15486 | gcTCCcAGcCAGCGGGCGggaggctgga (配列番号124) |
| CTIIA | 15487 | ctACTCGGCCCaTCGGCGgctgcctcgg (配列番号125) |
| RFX5 | 15506 | ttGATGTCAGGGAAGATctctctgatga (配列番号126) |
| RFX5 | 15507 | gcTCGAAGGCTTGGTGGCCGgggccagt (配列番号127) |
| その他 | | |
| TRAC | 25539 | ttGTTGCTcCAGGCCACAGCActgttgc (配列番号128) |
| TRAC | 25540 | ctGACTTTGCATGTGCAaacgccttcaa (配列番号129) |
| TRBC | 16783 | ccGTAGAACTGGACTTGacagcggaagt (配列番号130) |
| TRBC | 16787 | tcTCGGAGAATGACGAGTGgaccagga (配列番号131) |

【 0 1 0 0 】

いくつかの実施形態において、DNA結合ドメインは植物病原体 *Xanthomonas* (Boch等、(2009)Science 326:1509-1512及びMoscou and Bogdanove, (2009)Science326:1501参照) 及び *Ralstonia* (Heuer等、(2007)Applied and Environmental Microbiology 73(13):4379-4384); 米国特許出願 13 / 068,735 及び米国特許公開 20110145940 参照) から誘導したものと同様の TALEエフェクターに由来する操作されたドメインである。

【 0 1 0 1 】

融合蛋白質

本明細書に記載するDNA結合蛋白質(例えばZFP又はTALE)及び非相同の調節(機能性)ドメイン(又はその機能性フラグメント)を含む融合蛋白質も提供される。共通ドメインは例えば転写因子ドメイン(アクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー)、サイレンサー、癌遺伝子(例えばmyc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mosファミリーメンバー等); DNA修復酵素及びその関連因子及びモディファイアー; DNA再配列酵素及びその関連因子及びモディファイアー; クロマチン関連蛋白質及びそれらのモディファイアー(例えばキナーゼ、アセチラーゼ及びデアセチラーゼ); 及びDNA修飾酵素(例えばメチル転移酵素、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ)及びその関連因子及びモディファイアーを包含する。DNA結合ドメイン及びヌクレアーゼ切断ドメインの融合に関する詳細は参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開 20050064474; 20060188987 及び 2007 / 0218528 を参照のこと。

【 0 1 0 2 】

活性化を達成するために適するドメインはHSV VP16活性化ドメイン(例えばHagmann等、J.Virol.71,5952-5962(1997)参照)核ホルモン受容体(例えばTorchia等、Curr.Opin.Ce

10

20

30

40

50

ll.Biol.10:373-383(1998)参照) ; 核因子カッパBのp65サブユニット(Bitko & Barik, J.Virol.72:5610-5618(1998)及びDoyle&Hunt,Neuroreport 8:2937-2942(1997)) ;Liu等、Cancer Gene Ther.5:3-28(1998))、又は人工キメラ機能性ドメイン、例えばVP64(Beerli等、(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:14623-33)、及びデグロン(Molinari等、(1999)EMBO J.18,6439-6447)を包含する。追加の例となる活性化ドメインはOct1、Oct-2A、Sp1、AP-2及びCTF1(Seipel等、EMBO J.11,4961-4968(1992))並びにp300、CBP、PCAF、SRC1PvALF、AtHD2A及びERF-2を包含する。例えば、Robyr等、(2000)Mol.Endocrinol.14:329-347;Collingwood等、(1999)J.Mol.Endocrinol.23:255-275;Leo等、(2000)Gene 245:1-11;Manteuffel-Cymborowska(1999)Acta Biochim.Pol.46:77-89;McKenna等、(1999)J.Steroid Biochem.Mol.Biol.69:3-12;Malik等、(2000)Trends Biochem.Sci.25:277-283;及びLemon等、(1999)Curr.Opin.Genet.Dev.9:499-504を参照のこと。追加の例となる活性化ドメインは、OSGAI、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、-6、-7及び-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP及びTRAB1を包含するがこれらに限定されない。例えばOgawa等、(2000)Gene 245:21-29;Okanami等、(1996)Genes Cells 1:87-99;Goff等、(1991)Genes Dev.5:298-309;Cho等、(1999)Plant Mol.Biol.40:419-429;Ulmason等、(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:5844-5849;Sprenger-Hausseis等、(2000)Plant J.22:1-8;Gong等、(1999)Plant Mol.Biol.41:33-44;及びHobo等、(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:15,348-15,353を参照のこと。

10

【0103】

20

当業者には明白であるように、DNA結合ドメインと機能性ドメインとの間の融合蛋白質(又はそれをコードする核酸)の形成においては、活性化ドメイン又は活性化ドメインと相互作用する分子の何れかが機能性ドメインとして適している。活性化複合体及び/又は活性化活性(例えばヒストンアセチル化)を標的遺伝子まで動員できる本質的に如何なる分子も、融合蛋白質の活性化ドメインとして有用である。融合分子における機能性ドメインとしての使用に適するインシュレータードメイン、局在化ドメイン及びクロマチンリモデリング蛋白質、例えばISWI含有ドメイン及び/又はメチル結合ドメイン蛋白質は例えば共有米国特許出願2002/0115215及び2003/0082552及び共有WO02/44376に記載されている。

【0104】

30

例となる抑制ドメインはKRABA/B、KOX、TGF-ベータ-誘導初期遺伝子(TIEG)、v-erbA、SID、MBD2、MBD3、DNMTファミリーのメンバー(例えばDNMT1、DNMT3A、DNMT3B)、Rb及びMeCP2を包含するがこれらに限定されない。例えばBird等、(1999)Cell 99:451-454;Tyler等、(1999)Cell 99:443-446;Knoepfler等、(1999)Cell 99:447-450;及びRobertson等、(2000)Nature Genet.25:338-342を参照のこと。追加の例となる抑制ドメインはROM2及びAtHD2Aを包含するがこれらに限定されない。例えばChem等、(1996)Plant Cell 8:305-321;及びWu等、(2000)Plant J.22:19-27を参照のこと。

【0105】

40

融合分子は当該分野で良く知られているクローニング及び生化学的コンジュゲーションの方法により構築される。融合分子はDNA結合ドメイン及び機能性ドメイン(例えば転写活性化又は抑制ドメイン)を含む。融合分子は又、場合により、核局在化シグナル(例えばSV40medium T抗原)及びエピトープタグ(例えばFLAG及びヘマグルチニン)を含む。融合蛋白質(及びそれをコードする核酸)は翻訳読み枠が融合物の成分間で温存されるように設計される。

【0106】

一方では機能性ドメインのポリペプチド成分(又はその機能性フラグメント)、そして他方では非蛋白質DNA結合ドメイン(例えば抗生物質、インターカレーター、マイナーグループバインダー、核酸)との間の融合物は当該分野で知られている生化学的コンジュゲーションの方法により構築される。例えばPierce Chemical Company(Rockford,IL)Cata

50

logueを参照のこと。マイナーグループバインダーとポリペプチドの間の融合物を作成するための方法及び組成物はMapp等、(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:3930-3935に記載されている。

【 0 1 0 7 】

ある特定の実施形態において、亜鉛フィンガー蛋白質により結合される標的部位は細胞クロマチンの接触可能な領域中に存在する。接触可能な領域は例えば共有の国際公開WO 0 1 / 8 3 7 3 2に記載される通り測定できる。標的部位が細胞クロマチンの接触可能な領域中に存在しない場合は1つ以上の接触可能な領域を共有のWO 0 1 / 8 3 7 9 3に記載される通り作成できる。追加の実施形態において、融合分子のDNA結合ドメインは、その標的部位が接触可能な領域にあるか否かに関わらず、細胞クロマチンと結合することができる。例えば、そのようなDNA結合ドメインはリンカーDNA及び/又はヌクレオソームDNAに結合できる。「パイオニア」DNA結合ドメインのこの型の例は特定のステロイド受容体中、及び、肝細胞核因子3 (HNF3)中に存在する。Cordingley等、(1987)Cell 48:261-270;Pina等、(1990)Cell 60:719-731;及びCirillo等、(1998)EMBO J.17:244-254。

10

【 0 1 0 8 】

融合分子は当該分野で知られる通り、製薬上許容しうる担体と共に製剤してよい。例えばRemington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.,1985;及び共有のWO 0 0 / 4 2 2 1 9を参照のこと。

【 0 1 0 9 】

融合分子の機能性成分/ドメインは、融合分子がそのDNA結合ドメインを介して標的配列に結合すれば、遺伝子の転写に影響できる種々異なる成分の何れかから選択できる。従って、機能性成分は、種々の転写因子ドメイン、例えばアクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー及びサイレンサーを包含することができるがこれらに限定されない。

20

【 0 1 1 0 】

追加の例となる機能性ドメインは例えば共有の米国特許6,534,261及び米国特許出願公開2002/0160940に開示されている。

【 0 1 1 1 】

外因性の小分子又はリガンドにより調節される機能性ドメインもまた選択してよい。例えばRheoSwitch(商標登録)技術を用いてよく、その場合、機能性ドメインは、外部のRheoChemTMリガンドの存在下のみで、その活性な構造を呈する(例えばUS20090136465参照)。したがって、ZFPは調節可能な機能性ドメインに作動可能に連結して良く、その場合、結果として生じるZFP-TFの活性は外部リガンドにより制御される。

30

【 0 1 1 2 】

ヌクレアーゼ

ある特定の実施形態において、融合蛋白質はDNA結合ドメイン及び切断(ヌクレアーゼ)ドメインを含む。したがって、遺伝子修飾はヌクレアーゼ、例えば操作されたヌクレアーゼを用いて活性化できる。操作ヌクレアーゼ技術は天然に存在するDNA結合蛋白質の操作に基づいている。例えばテーラードDNA結合特異性を有するホーミングエンドヌクレアーゼの操作が記載されている。Chames等、(2005)Nucleic Acids Res 33(20):e178;Arnould等、(2006)J.Mol.Biol.355:443-458を参照のこと。更に又、ZFPの操作も記載されている。例えば米国特許6,534,261;6,607,882;6,824,978;6,979,539;6,933,113;7,163,824;及び7,013,219を参照のこと。

40

【 0 1 1 3 】

更に又、ZFP及び/又はTALEをヌクレアーゼドメインに融合することによりZF N及びTALE Nが作成されており、これは、自身の操作された(ZFP又はTALE)DNA結合ドメインを介して自身の意図する核酸標的を認識し、そしてヌクレアーゼ活性

50

を介してDNA結合部位近傍でDNAが切断されるようにすることができる機能性の実体である。例えばKim等、(1996)Proc Nat'l Acad Sci USA 93(3):1156-1160を参照のこと。より最近では、そのようなヌクレアーゼは種々の生物のゲノムの修飾のために使用されている。例えば米国特許公開20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; 及び国際公開WO07/014275を参照のこと。

【0114】

したがって、本明細書に記載する方法及び組成物は広範に適用でき、そして目的の如何なるヌクレアーゼも関与してよい。ヌクレアーゼの非限定的な例はメガヌクレアーゼ、TALLEN及び亜鉛フィンガーヌクレアーゼを包含する。ヌクレアーゼは非相同DNA結合及び切断ドメイン(例えば亜鉛フィンガーヌクレアーゼ; 非相同切断ドメインを有するメガヌクレアーゼDNA結合ドメイン)を含み得、又は、天然に存在するヌクレアーゼのDNA結合ドメインを選択された標的部位に結合するように改変してよい(例えば同族体結合部位とは異なる部位に結合するように操作されているメガヌクレアーゼ)。

【0115】

ある特定の実施形態において、ヌクレアーゼはメガヌクレアーゼ(ホーミングエンドヌクレアーゼ)である。天然に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、一般的には4つのファミリー、即ちLAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cysボックスファミリー及びHNHファミリーにグループ分けされる。例となる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及びI-TevIIIを包含する。それらの認識部位は既知である。米国特許5,420,032; 米国特許6,833,252; Belfort等、(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388; Dujon等、(1989)Gene 82:115-118; Perler等、(1994)Nucleic Acids Res.22,1125-1127; Jasin(1996)Trends Genet.12:224-228; Gimble等、(1996)J.Mol.Biol.263:163-180; Argast等、(1998)J.Mol.Biol.280:345-353及びNew England Biolabs catalogueを参照のこと。

【0116】

主にLAGLIDADGファミリーに属する天然に存在するメガヌクレアーゼに由来するDNA結合ドメインは、植物、コウボ、ショウジョウバエ、哺乳類細胞及びマウスにおける部位特異的ゲノム修飾を促進するために使用されてきたが、この研究法はメガヌクレアーゼ認識配列を保存している相同遺伝子の修飾(Monet等、(1999),Biochem.Biophysics Res.Common.255:88-93)又は認識配列が導入されている操作前ゲノム(Route等、(1994),Mol.Cell.Biol.14:8096-106; Chilton等、(2003),Plant Physiology.133:956-65; Puchta等、(1996),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:5055-60; Rong等、(2002),Genes Dev.16:1568-81; Gouble等、(2006),J.Gene Med.8(5):616-622)のいずれかに限定されてきた。従って、医学的又は生物工学的に適切な部位において新規な結合特異性を呈するようにメガヌクレアーゼを操作しようとする試みが行われてきた(Porteus等、(2005),Nat.Biotechnol.23:967-73; Sussman等、(2004),J.Mol.Biol.342:31-41; Epinat等、(2003),Nucleic Acids Res.31:2952-62; Chevalier等、(2002)Molec.Cell 10:895-905; Epinat等、(2003)Nucleic Acids Res.31:2952-2962; Ashworth等、(2006)Nature 441:656-659; Paques等、(2007)Current Gene Therapy 7:49-66; 米国特許公開20070117128; 20060206949; 20060153826; 20060078552; 及び20040002092)。更に又、天然に存在する又は操作されたメガヌクレアーゼ由来のDNA結合ドメインも又、非相同ヌクレアーゼ(例えばFokI)由来の切断ドメインに作動可能に連結されている。

【0117】

他の実施形態において、ヌクレアーゼは亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)又はTALLENのDNA結合ドメインヌクレアーゼ融合物(TALLEN)である。ZFN及びTA

10

20

30

40

50

L E Nは選択された遺伝子の標的部位及び切断ドメイン又は切断ハーフトドメインに結合するように操作されているD N A結合ドメイン（亜鉛フィンガー蛋白質又はT A L E D N A結合ドメイン）を含む。

【0118】

上記詳述した通り、亜鉛フィンガー結合ドメイン及びT A L E D N A結合ドメインは、選択された配列に結合するように操作されることができる。例えばBeerli等、(2002)Nature Biotechnol.20:135-141;Pabo等、(2001)Ann.Rev.Biochem.70:313-340;Isalan等、(2001)Nature Biotechnol.19:656-660;Segal等、(2001)Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637;Choo等、(2000)Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416を参照のこと。操作された亜鉛フィンガー結合ドメイン又はT A L E蛋白質は天然に存在する蛋白質と比較して新しい結合特異性を有することができる。操作方法は合理的設計及び種々の型の選択を包含するがこれらに限定されない。合理的設計は例えばトリプレット(又はクアドルプレット)のヌクレオチド配列及び個々の亜鉛フィンガー又はT A L Eアミノ酸配列を含むデータベースを用いることを包含し、その場合、各トリプレット又はクアドルプレットのヌクレオチド配列は特定のトリプレット又はクアドルプレットの配列に結合する亜鉛フィンガー又はT A L Eリピート単位のアミノ酸配列1つ以上と会合している。例えば参照により全体が本明細書に組み込まれる共有米国特許6,453,242及び6,534,261を参照のこと。

10

【0119】

例となる選択方法、例えばファージディスプレイ及びツーマイブリッド系は米国特許5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,410,248;6,140,466;6,200,759;及び6,242,568;並びにWO98/37186;WO98/53057;WO00/27878;WO01/88197及びGB2,338,237に開示されている。更に又、亜鉛フィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば共有されているWO02/077227に記載されている。

20

【0120】

標的部位の選択;及び融合蛋白質(及びそれをコードするポリヌクレオチド)の設計及び構築のための方法は当該分野で知られており、そして参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願20050064474及び20060188987に詳述されている。

30

【0121】

更に又、上記及び他の参考文献に開示されている通り、亜鉛フィンガードメイン、T A L E及びマルチフィンガーの亜鉛フィンガー蛋白質は、例えば5アミノ酸長以上のリンカーを包含する何れかの適切なリンカー配列を用いて共に連結してよい。(例えばT G E K P(配列番号131)、T G G Q R P(配列番号132)、T G Q K P(配列番号133)及び/又はT G S Q K P(配列番号134))。6アミノ酸長以上の例となるリンカー配列は例えば米国特許6,479,626;6,903,185;及び7,153,949を参照のこと。本明細書に記載する蛋白質は、蛋白質の個々の亜鉛フィンガーの間の適当なリンカーの何れの組み合わせも包含してよい。また、米国特許暫定出願61/343,729も参照のこと。

40

【0122】

Z F N、T A L E N及び/又はメガヌクレアーゼのようなヌクレアーゼは又、ヌクレアーゼ(切断ドメイン、切断ハーフトドメイン)を含む。上記の通り、切断ドメインはD N A結合ドメイン、例えば亜鉛フィンガーD N A結合ドメイン及びヌクレアーゼ由来の切断ドメイン又はメガヌクレアーゼD N A結合ドメイン及び異なるヌクレアーゼ由来の切断ドメインに対して非相同であってよい。非相同切断ドメインは何れのエンドヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼからも得ることができる。切断ドメインの誘導元となり得る例となるエンドヌクレアーゼは制限エンドヌクレアーゼ及びホーミングエンドヌクレアーゼを包含するがこれらに限定されない。例えば2002-2003 Catalogue,New England Biolabs,Beverly,MA;and Belfort等、(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388を参照のこと。D N Aを切

50

断する追加的酵素も知られている（例えばS 1ヌクレアーゼ；大豆ヌクレアーゼ；膵臓DNase I；マイクロコッカスヌクレアーゼ；コウボHOエンドヌクレアーゼ；同様にLinn等、(eds.)Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993も参照のこと）。これらの酵素（又はその機能性フラグメント）の1つ以上を切断ドメイン及び切断ハーフドメインの原料として使用できる。

【0123】

同様に、切断活性のためには2量体化を必要とする上記の様な何れのヌクレアーゼ又はその部分からも、切断ハーフドメインを誘導することができる。一般的に、融合蛋白質が切断ハーフドメインを含む場合には、2つの融合蛋白質が切断のために必要になる。或いは、2つの切断ハーフドメインを含む単一の蛋白質を使用できる。2つの切断ハーフドメインを同じエンドヌクレアーゼ（又はその機能性フラグメント）から誘導することができ、又は、各切断ハーフドメインを異なるエンドヌクレアーゼ（又はその機能性フラグメント）から誘導できる。更に又、2つの融合蛋白質に関する標的部位は、2つの融合蛋白質のそれらのそれぞれの標的部位への結合が、切断ハーフドメインが例えば2量体化により機能性切断ドメインを形成できるようになる空間的方向に切断ハーフドメインを配するように、相互に対して好ましく配置される。したがって、ある特定の実施形態において、標的部位の近接端部は5～8ヌクレオチドにより、又は15～18ヌクレオチドにより隔てられている。しかしながら、何れかの整数個数のヌクレオチド又はヌクレオチド対が2つの標的部位の間に介在することができる（例えば2～50ヌクレオチド対以上）。一般的に切断部位は標的部位の間に存在する。

【0124】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は多くの種に存在し、DNAに配列特異的に結合（認識部位において）すること、及び結合部位又はその近傍において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た部位においてDNAを切断し、そして分離可能な結合と切断のドメインを有する。例えばISS型酵素であるFokIは、1つの鎖上ではその認識部位から9ヌクレオチド、そして他方の上ではその認識部位から13ヌクレオチドにおいて、DNAの2本鎖切断を触媒する。例えば米国特許5,356,802；5,436,150及び5,487,994；並びにLi等、(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279；Li等、(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2764-2768；Kim等、(1994a)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887；Kim等、(1994b)J. Biol.Chem.269:31,978-31,982を参照のこと。したがって、1つの実施形態において、融合蛋白質は少なくとも1つのIIS型制限酵素に由来する切断ドメイン（又は切断ハーフドメイン）及び操作されていてもされていなくてもよい1つ以上の亜鉛フィンガー結合ドメインを含む。

【0125】

切断ドメインが結合ドメインから分離可能である、例となるIIS型制限酵素はFokIである。この特定の酵素は2量体として活性である。Bitinaite等、(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:10,570-10,575。従って、本開示の目的のために、開示した融合蛋白質において使用されるFokI酵素の部分が切断ハーフドメインとみなされる。したがって、亜鉛フィンガー-FokI融合物を用いた細胞配列の標的化された2本鎖切断及び/又は標的化された置き換えのためには、各々がFokI切断ハーフドメインを含む2つの融合蛋白質を使用することにより触媒的に活性な切断ドメインを再建することができる。或いは、亜鉛フィンガー結合ドメイン及び2つのFokI切断ハーフドメインを含有する単一のポリペプチド分子も使用できる。亜鉛フィンガー-FokI融合物を用いた標的化された切断及び標的化された配列改変のためのパラメーターは本開示において別途記載する。

【0126】

切断ドメイン又は切断ハーフドメインは切断活性を保持しているか、又は、多量体化（例えば2量体化）することにより機能性切断ドメインを形成する能力を保持している蛋白質の何れの部分でもあることができる。

【0127】

例となる I I S 型の制限酵素は参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開 W O 0 7 / 0 1 4 2 7 5 に記載されている。追加の制限酵素もまた、分離可能な結合と切断のドメインを含有し、そしてこれらは本開示の企図するものである。例えば Roberts 等、(2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420 を参照のこと。

【 0 1 2 8 】

ある特定の実施形態において、切断ドメインは、例えば全ての開示が参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開 2 0 0 5 0 0 6 4 4 7 4、2 0 0 6 0 1 8 8 9 8 7 及び 2 0 0 8 0 1 3 1 9 6 2 に記載されている通り、ホモ 2 量体化を最小限にするか防止する操作された切断ハーフドメイン (2 量体化ドメイン突然変異体とも称する) 1 つ以上を含む。F o k I の 4 4 6、4 4 7、4 7 9、4 8 3、4 8 4、4 8 6、4 8 7、4 9 0、4 9 1、4 9 6、4 9 8、4 9 9、5 0 0、5 3 1、5 3 4、5 3 7 及び 5 3 8 位のアミノ酸残基は、全て F o k I 切断ハーフドメインの 2 量体化に影響するための標的である。

【 0 1 2 9 】

強制的にヘテロ 2 量体を形成する、例となる F o k I の操作された切断ハーフドメインは、第 1 の切断ハーフドメインが F o k I の 4 9 0 及び 5 3 8 位のアミノ酸残基における突然変異を包含し、そして第 2 の切断ハーフドメインがアミノ酸残基 4 8 6 及び 4 9 9 における突然変異を含む対を包含する。

【 0 1 3 0 】

したがって、1 つの実施形態において、4 9 0 における突然変異は G l u (E) を L y s (K) で置き換え ; 5 3 8 における突然変異は (I) を L y s (K) で置き換え ; 4 8 6 における突然変異は (Q) を G l u (E) で置き換え ; そして 4 9 9 における突然変異は I s o (I) を L y s (K) で置き換える。具体的には、本明細書に記載する操作された切断ハーフドメインは、1 つの切断ハーフドメインにおいて 4 9 0 (E K) 及び 5 3 8 (I K) を突然変異させて “ E 4 9 0 K : I 5 3 8 K ” と標記される操作された切断ハーフドメインを形成することにより、及び、もう 1 つの切断ハーフドメインにおいては 4 8 6 (Q E) 及び 4 9 9 (I L) を突然変異させて “ Q 4 8 6 E : I 4 9 9 L ” と標記される操作された切断ハーフドメインを形成することにより調製した。本明細書に記載する操作された切断ハーフドメインは、異常な切断が最小限とされるか根絶される強制的ヘテロ 2 量体突然変異体である。例えば参照により開示全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開 2 0 0 8 / 0 1 3 1 9 6 2 を参照のこと。ある特定の実施形態において、操作された切断ハーフドメインは、4 8 6、4 9 9 及び 4 9 6 位 (野生型 F o k I に対して付番) における突然変異、例えば 4 8 6 位の野生型 G l n (Q) 残基を G l u (E) 残基で、4 9 9 位の野生型 I s o (I) 残基を L e u (L) 残基で、そして 4 9 6 位の野生型 A s n (N) 残基を A s p (D) 又は G l u (E) 残基 (それぞれ 「 E L D 」 及び 「 E L E 」 ドメインと称する) で置き換える突然変異を含む。他の実施形態において、操作された切断ハーフドメインは、4 9 0、5 3 8 及び 5 3 7 位 (野生型 F o k I に対して付番) における突然変異、例えば 4 9 0 位の野生型 G l u (E) 残基を L y s (K) 残基で、5 3 8 位の野生型 I s o (I) 残基を L y s (K) 残基で、そして 5 3 7 位の野生型 H i s (H) 残基を L y s (K) 残基又は A r g (R) 残基 (それぞれ 「 K K K 」 及び 「 K K R 」 ドメインと称する) で置き換える突然変異を含む。他の実施形態において、操作された切断ハーフドメインは、4 9 0 及び 5 3 7 位 (野生型 F o k I に対して付番) における突然変異、例えば 4 9 0 位の野生型 G l u (E) 残基を L y s (K) 残基で、そして 5 3 7 位の野生型 H i s (H) 残基を L y s (K) 残基又は A r g (R) 残基 (それぞれ 「 K I K 」 及び 「 K I R 」 ドメインと称する) で置き換える突然変異を含む。(米国特許出願 1 2 / 9 3 1, 6 6 0 を参照)。

【 0 1 3 1 】

本明細書に記載する操作された切断ハーフドメインは何れかの適当な方法、例えば米国特許 2 0 0 5 0 0 6 4 4 7 4 及び 2 0 0 8 0 1 3 1 9 6 2 に記載されるような野生型切断ハーフドメイン (F o k I) の部位指向性突然変異誘発により調製できる。

【0132】

或いは、ヌクレアーゼはいわゆる「スプリット酵素」技術を用いて核酸標的部位においてインビボで組み立ててよい（例えば米国特許公開20090068164参照）。そのようなスプリット酵素の成分は別個の発現コンストラクト上で発現させてよく、又は、1つのオープンリーディングフレーム中で連結させることができ、その場合、個々の成分は例えば自己切断2Aペプチド又はIRES配列により分離される。成分は個々の亜鉛フィンガー結合ドメイン又はメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであってよい。

【0133】

ヌクレアーゼ（例えばZFN及び/又はTALEN）は例えばWO2009/042163及び20090068164に記載の通りコウボ系の染色体系において使用前に活性に関してスクリーニングできる。ヌクレアーゼ発現コンストラクトは当該分野で知られている方法を用いながら容易に設計できる。例えば米国特許公開20030232410；20050208489；20050026157；20050064474；20060188987；20060063231；及び国際公開WO07/014275を参照のこと。ヌクレアーゼの発現は構成プロモーター又は誘導プロモーター、例えばラフィノース及び/又はガラクトースの存在下で活性化（脱抑制）され、そしてグルコースの存在下で抑制されるガラクトキナーゼプロモーターの制御下にあってよい。

【0134】

送達

本明細書に記載する蛋白質（例えばZFP、TALE、ZFN及び/又はTALEN）、これらをコードするポリヌクレオチド、及び蛋白質及び/又はポリヌクレオチドを含む組成物は例えば蛋白質又はmRNAの注射を包含する何れかの適当な手段により標的細胞に送達してよい。適当な細胞は真核生物及び原核生物の細胞及び/又は細胞系統を包含するがこれらに限定されない。そのような細胞又はそのような細胞から形成される細胞系統の非限定的な例はT-cells、COS、CHO（例えばCHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293（例えばHEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、及びperC6細胞並びに昆虫細胞、例えばSpodoptera fugiperda（Sf）、又はカビ細胞、例えばSaccharomyces、Pichia及びSchizosaccharomycesを包含する。ある特定の実施形態において、細胞系統はCHO-K1、MDCK又はHEK293細胞系統である。適当な細胞は又、幹細胞、例えば、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞（iPS細胞）、造血幹細胞、ニューロン幹細胞及び間葉系幹細胞を包含する。

【0135】

本明細書に記載するDNA結合ドメインを含む蛋白質を送達する方法は例えば全て参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許6,453,242；6,503,717；6,534,261；6,599,692；6,607,882；6,689,558；6,824,978；6,933,113；6,979,539；7,013,219；及び7,163,824に記載されている。

【0136】

本明細書に記載するDNA結合ドメイン及びこのようなDNA結合ドメインを含む融合蛋白質はまた、DNA結合蛋白質1つ以上をコードする配列を含有するベクターを用いて送達してよい。更に又、ドナー核酸もまたこれらのベクターを介して送達してよい。プラスミドベクター、レトロウィルスベクター、レンチウィルスベクター、アデノウィルスベクター、ポックスウィルスベクター；ヘルペスウィルスベクター及びアデノ関連ウィルスベクターを包含するがこれらに限定されない何れかのベクター系を使用してよい。例えば参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許6,534,261；6,607,882；6,824,978；6,933,113；6,979,539；7,013,219；及び7,163,824も参照のこと。更に当然ながら、これらのベクターの何れ

も1つ以上のDNA結合蛋白質コード配列及び/又はドナー核酸を適宜含んでよい。したがって、本明細書に記載するDNA結合蛋白質1つ以上及び適宜ドナーDNAを細胞内に導入する場合、それらは同じベクター上、又は異なるベクター上に担持されていてよい。多数のベクターを使用する場合、各ベクターは所望に応じて1つ又は多数のDNA結合蛋白質をコードする配列及びドナー核酸を含んでよい。

【0137】

従来のウイルス及び非ウイルス系の遺伝子転移方法を用いて、細胞（例えば哺乳類細胞）及び標的組織中に操作されたDNA結合蛋白質をコードする核酸を導入し、そして所望によりドナーを同時導入することができる。そのような方法は又、インビトロで細胞にDNA結合蛋白質をコードする核酸を投与するためにも使用できる。ある特定の実施形態において、DNA結合蛋白質をコードする核酸をインビボ又はエキスピボの遺伝子療法用途において投与する。非ウイルスベクター送達系はDNAプラスミド、ネイキッド核酸及びリポソーム又はポロキサマーのような送達ベヒクルと複合体化した核酸を包含する。ウイルスベクター送達系はDNA及びRNAウイルスを包含し、これらは細胞への送達後はエピソーム又は組み込まれたゲノムの何れかを有する。遺伝子療法の操作法の考察に関してはAnderson, Science 256:808-813(1992); Nabel & Felgner, TIBTECH 11:211-217(1993); Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166(1993); Dillon, TIBTECH 11:167-175(1993); Miller, Nature 357:455-460(1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154(1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36(1995); Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44(1995); Haddada等, Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm(eds.)(1995); 及びYu等, Gene Therapy 1:13-26(1994)を参照のこと。

【0138】

核酸の非ウイルス送達の方法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ウィロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン又は脂質；核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ビリオン、及びDNAの剤増強取り込みを包含する。例えばSonitron 2000システム(Rich-Mar)を用いたソノポレーションもまた核酸の送達のために使用できる。

【0139】

追加の例となる核酸送達系はAmamax Biosystems (Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA)及びCopernicus Therapeutics Inc. (例えばUS 6008336 参照)により提供されるものを包含する。リポフェクションは例えば米国特許5,049,386、4,946,787及び4,897,355に記載されており、そしてリポフェクション試薬は市販されている(例えばTransfectam™及びLipofectin™)。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するカチオン性及び中性の脂質はFelgner, WO 91/17424、WO 91/16024に記載のものを包含する。送達は細胞に対して(エキスピボ投与)又は標的組織に対して(インビボ投与)行うことができる。

【0140】

イムノ脂質複合体のような標的化されたリポソームを包含する脂質；核酸複合体の調製は当該分野で良く知られている(例えばCrystal, Science 270:404-410(1995); Blaese等, Cancer Gene Ther. 2:291-297(1995); Behr等, Bioconjugate Chem. 5:382-389(1994); Remy等, Bioconjugate Chem. 5:647-654(1994); Gao等, Gene Therapy 2:710-722(1995); Ahmad等, Cancer Res. 52:4817-4820(1992); 米国特許4,186,183号、4,217,344号、4,235,871号、4,261,975号、4,485,054号、4,501,728号、4,774,085号、4,837,028号及び4,946,787を参照のこと)。

【0141】

送達のさらなる方法はE n G e n e I C送達ベヒクル(E D V) 内に送達すべき核酸をパッケージングする使用法を包含する。これらのE D V は、抗体の1つのアームが標的組織に対する特異性を有し、そして他方がE D V に対する特異性を有している二重特異性抗体を用いて標的組織に特異的に送達される。抗体は標的細胞表面にE D V を運び、そして次にE D V がエンドサイトーシスにより細胞内に持ち込まれる。細胞内に入ると、内容物が放出される(MacDiarmid等、(2009)Nature Biotechnology vol 27(7)p.643参照)。

【 0 1 4 2 】

操作されたD N A 結合蛋白質をコードする核酸及び所望によりドナーの送達のためのR N A 又はD N A ウィルスに基づく系の使用は、身体の特定の細胞にウィルスを標的化し、そしてウィルス担持物を核に輸送するための高度に進化したプロセスを利用している。ウィルスベクターは患者に直接投与されることができ(インビボ)、又は、それらはインビトロで細胞を処理して、修飾された細胞を患者に投与するために使用されることもできる(エクスビボ)。D N A 結合蛋白質及びドナーの送達のための従来のウィルスに基づく系は、遺伝子転移用の、レトロウィルス、レンチウィルス、アデノウィルス、アデノ関連、ワクシニア及び単純疱疹ウィルスのベクターを包含するがこれらに限定されない。宿主ゲノム中の組み込みはレトロウィルス、レンチウィルス、及びアデノ関連ウィルスの遺伝子転移方法を用いて可能となり、しばしば、挿入された導入遺伝子の長期間の発現がもたらされる。更に又、高い形質導入効率が多くの種々異なる細胞型及び標的組織において観察されている。

【 0 1 4 3 】

レトロウィルスの向性を外来性のエンベロープ蛋白質を取り込むことにより改変し、標的細胞の可能性のある標的集団を拡大させることができる。レンチウィルスベクターは非分裂細胞に形質導入又は感染し、そして典型的には高いウィルス力価をもたらすことができるレトロウィルスベクターである。レトロウィルス遺伝子転移系の選択は標的組織に依存する。レトロウィルスベクターは外来性の配列6 ~ 1 0 k b までのパッケージング容量を有するシス作用の長末端リピートを含む。最小のシス作用L T R が、後に治療遺伝子を標的細胞に組み込んで永久的な導入遺伝子発現をもたらすために使用されるベクターの複製及びパッケージングのために十分である。広範に使用されているレトロウィルスベクターはネズミ白血病ウィルス(M u L V)、テナガザル白血病ウィルス(G a L V)、サル免疫不全ウィルス(S I V)、ヒト免疫不全ウィルス(H I V)、及びこれらの組み合わせに基づくものを包含する(例えばBuchscher等、J.Virol.66:2731-2739(1992);Johann等、J.Virol.66:1635-1640(1992);Sommerfelt等、Virol.176:58-59(1990);Wilson等、J.Virol.63:2374-2378(1989);Miller等、J.Virol.65:2220-2224(1991);P C T / U S 9 4 / 0 5 7 0 0 参照)。

【 0 1 4 4 】

一過性の発現が好ましい用途においては、アデノウィルスに基づく系を使用できる。アデノウィルス系ベクターは多くの細胞型において極めて高い形質導入効率を示すことができ、そして細胞分裂を要しない。そのようなベクターを使用して、高い力価及び高い発現レベルが得られている。このベクターは比較的簡素な系において大量に生産できる。アデノ関連ウィルス(「A A V」)ベクターもまた例えば、核酸及びペプチドのインビトロの生産において、および、インビボ及びエクスビボの遺伝子療法のための、標的核酸を有する細胞を形質導入するために使用される(例えばWest等、Virology 160:38-47(1987);米国特許4,797,368;W O 9 3 / 2 4 6 4 1;Kotin,Human Gene Therapy 5:793-801(1994);Muzyczka,J.Clin.Invest.94:1351(1994)を参照のこと)。組み換えA A V ベクターの構築は多くの公開文献、例えば米国特許5,173,414;Tratschin等、Mol.Cell.Biol.5:3251-3260(1985);Tratschin,等、Mol.Cell.Biol.4:2072-2081(1984);Herm onat & Muzyczka,PNAS 81:6466-6470(1984);及びSamulski等、J.Virol.63:03822-3828(1989)に記載されている。

【 0 1 4 5 】

少なくとも6種のウィルスベクターの手順が臨床試験において遺伝子転移のために使用

可能であり、これらは形質導入剤を形成するためにヘルパー細胞系統に挿入された遺伝子による欠損ベクターの相補が関与する手順を利用している。

【 0 1 4 6 】

p L A S N 及び M F G - S は臨床治験において使用されているレトロウィルスベクターの例である (Dunbar 等、Blood 85:3048-305(1995);Kohn 等、Nat.Med.1:1017-102(1995);M alech 等、PNAS 94:22 12133-12138(1997))。P A 3 1 7 / p L A S N 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る (Blaese 等、Science 270:475-480(1995))。5 0 % 以上の形質導入効率が M F G - S パッケージベクターで観察されている (Ellem 等、Immunol Immunother.44(1):10-20(1997);Dranoff 等、Hum.Gene Ther.1:111-2(1997))。

10

【 0 1 4 7 】

組み換えアデノ関連ウィルスベクター (r A A V) は欠損性及び非病原性のパルボウィルスアデノ関連 2 型ウィルスに基づく有望な代替遺伝子送達系である。全てのベクターは導入遺伝子発現カセットに隣接する A A V 1 4 5 b p 逆位末端リピートのみを保有しているプラスミドから誘導される。形質導入された細胞のゲノム内への組み込みによる効率的な遺伝子転移及び安定な導入遺伝子送達がこのベクター系の重要な特徴である (Wagner 等、Lancet 351:9117 1702-3(1998),Kearns 等、Gene Ther.9:748-55(1996))。他の A A V 血清型、例えば 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 及び A A V 1 0 もまた本発明に従って使用できる。

【 0 1 4 8 】

複製欠損組み換えアデノウィルスベクター (A d) は高い力価で生産することができ、そして多くの異なる種類の細胞型に容易に感染する。大部分のアデノウィルスベクターは導入遺伝子が A d E 1 a、E 1 b、および / または E 3 遺伝子を置き換えるように操作されており ; その後、欠失した遺伝子機能をトランスで供給するヒト 2 9 3 細胞中で複製欠損ベクターを増殖させる。A d ベクターは肝臓、腎臓及び筋肉中に検出されるもののような非分裂性の分化した細胞を包含するインビボの組織の多数の方を形質導入することができる。従来の A d ベクターは大量の担持容量を有する。臨床治験における 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療法に関与した (Sterman 等、Hum.Gene Ther.7:1083-9(1998))。臨床治験における遺伝子転移のためのアデノウィルスベクターの使用の追加の例は Rosenecker 等、Infection 24:1 5-10(1996); Sterman 等、Hum.Gene Ther.9:7 1083-1089(1998);Welsh 等、Hum.Gene Ther.2:205-18(1995);Alvarez 等、Hum.Gene Ther.5:597-613(1997);Topf 等、Gene Ther.5:507-513(1998);Sterman 等、Hum.Gene Ther.7:1083-1089(1998) を包含する。

20

30

【 0 1 4 9 】

宿主細胞に感染できるウィルス粒子を形成するためにパッケージング細胞を使用する。そのような細胞はアデノウィルスをパッケージする 2 9 3 細胞、及びレトロウィルスをパッケージする 2 細胞又は P A 3 1 7 細胞を包含する。遺伝子療法に使用されるウィルスベクターは通常はウィルス粒子内に核酸ベクターをパッケージするプロデューサー細胞系統により形成される。ベクターは典型的にはパッケージング及びその後の宿主への組み込み (適宜) のために必要な最小限のウィルス配列を含有し、その他のウィルス配列は発現すべき蛋白質をコードする発現カセットにより置き換えられている。失われたウィルス機能はパッケージング細胞系統によりトランスに供給される。例えば遺伝子療法において使用される A A V は典型的には、パッケージング及び宿主ゲノム内への組み込みのために必要な A A V ゲノム由来の逆位末端リピート (I T R) を保有するのみである。ウィルス D N A は、他の A A V 遺伝子、即ち r e p 及び c a p をコードするヘルパープラスミドを含有するが I T R 配列を欠いている細胞系統中にパッケージされる。細胞系統は又ヘルパーとしてのアデノウィルスによっても感染される。ヘルパーウィルスは A A V ベクターの複製及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 配列を欠いているために意味のある量ではパッケージされない。アデノウィルスの夾雑は例えば A A V よりもアデノウィルスがより感受性である熱処理により低減できる。

40

50

【 0 1 5 0 】

多くの遺伝子療法用途において、遺伝子療法ベクターは特定の組織型に対して高度な特異性を持って送達されることが望ましい。従って、ウィルスベクターはウィルスの外表面上のウィルス皮膜蛋白質との融合蛋白質としてリガンドを発現す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修飾できる。リガンドは目的の細胞型の上に存在することがわかっている受容体に対する親和性を有するように選択される。例えばHan等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751(1995)は、モロニーネズミ白血病ウィルスはg p 70に融合したヒトヘレグリンを発現するように修飾でき、そして組み換えウィルスは、ヒト表皮成長因子受容体を発現している特定のヒト乳癌細胞に感染すると報告している。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、そしてウィルスが細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合蛋白質を発現する他のウィルス - 標的細胞の対にも拡張することができる。例えば、実質的に如何なる選択された細胞受容体に対しても特異的結合親和性を有する抗体フラグメント（例えばF A B又はF v）をディスプレイするように系状ファージを操作することができる。上記は主にウィルスベクターに適用されるが、同じ原理を非ウィルスベクターに対しても適用できる。そのようなベクターは、特定の標的細胞による取り込みに好都合である特異的取り込み配列を含有するように操作されることができる。

10

【 0 1 5 1 】

遺伝子療法ベクターは典型的には、後述するとおり、全身投与（例えば静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、又は頭蓋内の注入）又は局所適用による個別の患者への投与によりインビボで送達できる。或いは、ベクターは個別患者から体外移植された細胞（例えばリンパ球、骨髓吸引物、組織生検物）、又は、ユニバーサルドナーの造血幹細胞のようなエキスピボの細胞に送達することができ、その後、通常はベクターを組み込んだ細胞を選択した後に、患者内に細胞を再移植する。

20

【 0 1 5 2 】

診断、研究、移植又は遺伝子療法のためのエキスピボの細胞トランスフェクション（例えば宿主生物内へのトランスフェクトされた細胞の再注入を介する）は当該分野で良く知られている。好ましい実施形態においては、細胞を対象生物から単離し、DNA結合蛋白質核酸（遺伝子又はcDNA）でトランスフェクトし、そして対象生物（例えば患者）内に再注入により戻す。エキスピボトランスフェクションに適する種々の細胞型は当該分野で良く知られている（患者由来の細胞をどのように単離して培養するかに関する考察については例えばFreshney等、Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique(3rd ed. 1994)及びその引用文献を参照）。

30

【 0 1 5 3 】

1つの実施形態においては、細胞トランスフェクション及び遺伝子療法のためのエキスピボの操作法において幹細胞を使用する。幹細胞を使用することの利点は、それらがインビトロで他の細胞型に分化することができる、又は、それらが哺乳類（例えば細胞のドナー）内に導入され、そこでそれらが骨髓中に定着することになることである。GM-CSF、IFN- 及びTNF- のようなサイトカインを用いた臨床上重要な免疫細胞型にインビトロのCD34+細胞を分化させるための方法は知られている（例えばInaba等、J. Exp. Med. 176:1693-1702(1992)参照）。

40

【 0 1 5 4 】

幹細胞は知られた方法を用いて形質導入及び分化のために単離できる。例えば幹細胞はCD4+及びCD8+（T細胞）、CD45+（pan B細胞）、GR-1（顆粒球）、及びIa d（分化した抗原提示細胞）のような望ましくない細胞に結合する抗体を用いて骨髓細胞をパニングすることにより骨髓細胞から単離される（Inaba等、J. Exp. Med. 176:1693-1702(1992)参照）。

【 0 1 5 5 】

修飾されている幹細胞もまたいくつかの実施形態において使用され得る。例えば、アポトーシスに対して耐性とされているニューロン幹細胞を治療用組成物として使用してよく、その場合、幹細胞も本発明のZFP TFを含有している。アポトーシスに対する耐性は

50

例えば、幹細胞において B A X - 又は B A K - 特異的 Z F N を用いて B A X 及び / 又は B A K をノックアウトすること（米国特許出願 1 2 / 4 5 6 , 0 4 3 参照）により生じさせるか、又は例えばここでもカスパーゼ - 6 特異的 Z F N を用いてカスパーゼを攪乱させたものであってよい。このような細胞は H L A を調節することがわかっている Z F P T F でトランスフェクトすることができる。

【 0 1 5 6 】

治療用 D N A 結合蛋白質（又はそのような蛋白質をコードする核酸）を含有するベクター（例えばレトロウィルス、アデノウィルス、リポソーム等）は又、インビボの細胞の形質導入のために生物に直接投与できる。或いは、ネイキッド D N A を投与できる。投与は注射、注入、局所適用及びエレクトロポレーションを包含するがこれらに限定されない血液又は組織細胞との究極的接触に分子を導くために通常使用される経路の何れかによる。そのような核酸を投与する適当な方法は当業者が使用でき、そして良く知られているものであり、そして特定の組成物を投与するために 1 つより多い経路を使用できるが、特定の経路が別の経路よりも迅速で効果的な反応を可能にする場合が多い。

10

【 0 1 5 7 】

造血幹細胞に D N A を導入するための方法は、例えば米国特許 5 , 9 2 8 , 6 3 8 に開示されている。造血幹細胞、例えば C D 3 4 + 細胞内への導入遺伝子の導入に適するベクターはアデノウィルス 3 5 型を包含する。

【 0 1 5 8 】

免疫細胞（例えば T 細胞）内への導入遺伝子の導入に適するベクターは非組み込みレンチウィルスベクターを包含する。例えば Ory 等、(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11382-11388; Dull 等、(1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zuffery 等、(1998) J. Virol. 72:9873-9880; Follenzi 等、(2000) Nature Genetics 25:217-222 を参照のこと。

20

【 0 1 5 9 】

製薬上許容しうる担体は部分的には投与される特定の組成物により、並びに組成物を投与するために使用される特定の方法により決定される。従って、後述する通り使用可能な医薬組成物の適当な製剤は広範な種類が存在する（例えば Remington ' s Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989 を参照のこと）。

【 0 1 6 0 】

上記の通り、開示した方法及び組成物は、原核生物細胞、カビ細胞、古細菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳類細胞及びヒト細胞、例えば T 細胞及び何れかの型の幹細胞を包含するがこれらに限定されない細胞の何れかの型においても使用できる。蛋白質発現のための適当な細胞系統は当該分野で知られており、C O S、C H O（例えば、C H O - S、C H O - K 1、C H O - D G 4 4、C H O - D U X B 1 1）、V E R O、M D C K、W I 3 8、V 7 9、B 1 4 A F 2 8 - G 3、B H K、H a K、N S 0、S P 2 / 0 - A g 1 4、H e L a、H E K 2 9 3（例えば、H E K 2 9 3 - F、H E K 2 9 3 - H、H E K 2 9 3 - T）、p e r C 6、昆虫細胞、例えば S p o d o p t e r a f u g i p e r d a (S f)、及びカビ細胞、例えば S a c c h a r o m y c e s、P i c h i a 及び S c h i z o s a c c h a r o m y c e s を包含するがこれらに限定されない。これらの細胞系統の子孫、変異体及び誘導体もまた使用できる。

30

40

【 0 1 6 1 】

用途

開示された組成物及び方法は H L A 遺伝子及び / 又は H L A レギュレーターを調節することが望ましい何れの用途のためにも使用できる。特に、これらの方法及び組成物は、治療及び研究用途を包含するがこれらに限定されない H L A 対立遺伝子の調節又は修飾が望ましい場合に使用できる。

【 0 1 6 2 】

H L A に関連する疾患及び状態は、特にアジソン病、強直性脊椎炎、ベーチェット病、バーガー病、セリアック病、慢性活動性肝炎、グレーブズ病、若年性慢性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び全身エリテマト

50

ーデスを包含する。更に又、H L A 遺伝子の修飾は目的の細胞の他の遺伝子修飾と組み合わせることで有用である場合がある。例えば標的細胞、例えばC T Lの、キメラ抗原受容体を用いたC T Lの特異性を変化させるための修飾は、大部分の必要患者で使用し得る細胞治療薬を開発するためにエキスピボのH L A 修飾と組み合わせることでよい。

【 0 1 6 3 】

更に又、本発明の物質及び方法は対宿主性移植片病の治療、予防又は改善において使用できる。対宿主性移植片病（G V H D）は同種異系T細胞（例えば骨髄及び/又は血液の輸液）を患者に投与する場合の一般的な合併症である。注入された物質中の機能性免疫細胞はレシピエントを「外来性」と認識し、免疫学的攻撃を仕掛ける。同種異系T細胞におけるH L A 及び/又はT C Rの発現を調節することにより、対宿主性移植片病の危険性が低減又は排除されるため、「薬物」として「既製」のT細胞（例えばC D 1 9 - 特異的T細胞）を要時投与できる。

10

【 0 1 6 4 】

方法及び組成物は又、幹細胞内部のH L A 対立遺伝子のコピーがH L A 特異的又はH L A レギュレーター特異的なZ F Nを用いて修飾されている幹細胞組成物を包含する。例えば、H L A 修飾された造血幹細胞を骨髄剥離後の患者内に導入できる。これらの改変されたH S Cは拒絶に起因する移植片の損失を伴うことなく患者の再コロニー化を可能にする。導入された細胞は又、後の療法（例えば化学療法耐性）の間、伏在する疾患を治療するために役立つ他の改変も有してよい。

【 0 1 6 5 】

20

本発明の方法及び組成物は又、例えば治療薬として使用するためのH L A 修飾血小板の開発のためにも有用である。したがって、H L A 修飾血小板は血小板減少性の障害、例えば特発性血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病及び薬物誘導性血小板減少性紫斑病（例えばヘパリン誘導性血小板減少症）を治療するために使用してよい。本発明のH L A 修飾血小板で治療してよい他の血小板障害はゴシェ病、再生不良性貧血、オニアライ、胎児母体同種異型免疫性血小板減少症、ヘルプ症候群、癌及びいくつかの化学療法剤の副作用を包含する。H L A 修飾血小板は又、外傷患者の緊急救命室状況における「既製」治療として使用される。

【 0 1 6 6 】

本発明の方法及び組成物は異種移植において使用できる。とりわけ、例示に過ぎないが、ブタM H C 遺伝子が欠失及び/又はヒトH L A 遺伝子で置き換えられているブタの臓器をヒトへの移植に使用することができる。有用な遺伝子突然変異を含有するブタの系統を発生させることができ（内因性M H C 遺伝子が攪乱するように自身内に注入されているm R N AによりコードされるH L A ターゲティングZ F Nを有していたブタ胚から、又は、自身のH L A 遺伝子を良好にターゲティングされている細胞の核を用いたブタ胚内への体細胞核転移により）、これらの動物を最終的臓器採取のために育成してよい。これはヒトにおけるこれらの臓器の拒絶を予防し、そして移植成功の可能性を高めることになる。

30

【 0 1 6 7 】

本発明の方法及び組成物はまた、インビトロ及びインビボのモデル、例えばH L A 又は他の障害の研究を可能にするそのような障害の動物モデルの設計及び実施のためにも有用である。

40

【 実施例 】

【 0 1 6 8 】

実施例 1：亜鉛フィンガー蛋白質ヌクレアーゼ（Z F N）の設計、構築及び一般の特徴付け

本質的にUrnov等、(2005)Nature 435(7042):646-651, Perez等、(2008) Nature Biotechnology 26(7):808-816に記載の通り、そして米国特許 6, 5 3 4, 2 6 1 に記載の通り、亜鉛フィンガー蛋白質を設計し、そしてプラスミド又はアデノウィルスベクターに取り込んだ。更に又、T R A C 及びT R B C に標的化されたZ F N に関しては米国特許仮出願 6 1 / 2 8 0, 8 6 3 を参照のこと。表 1 は例となるZ F P のD N A 結合ドメイン内部の認

50

識ヘリックスを示し、表 2 はこれらの Z F P に関する標的部位を示す。Z F P 認識ヘリックスにより接触される標的部位中の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。

【 0 1 6 9 】

実施例 2：H L A クラス I 遺伝子に特異的な Z F N

H L A 複合体はゲノムの同じ一般的区域内部に同時局在化する数種のファミリーメンバーを含有する場合が多い。図 1 は H L A クラス I の主な遺伝子の配置及び染色体 6 上に観察されるクラス I の遺伝子座の模式図である。

H L A 遺伝子座に対して指向された Z F N

【 0 1 7 0 】

H L A A 遺伝子座を標的とするために Z F N 対を作成し、いくつかは A 2 対立遺伝子に対して特異的に作成し、他は A 3 遺伝子座又は両方を標的とするように作成した。A 2 及び A 3 対立遺伝子に関して、Z F N 1 8 8 8 9 が 1 8 8 8 1 と対になり、そして 1 8 8 8 9 もまた 2 4 8 5 9 と対になるように 2 つの対を試験した。Z F N の対形成の成功により所望の箇所において D S B が形成されれば、その部位は非相同末端連結 (N H E J) を用いて頻繁に修復される。このプロセスは頻繁には修復された接合の部位におけるヌクレオチドの少数の挿入又は欠失をもたらし、そのため、接合部周辺の D N A を P C R により増幅し、そして次にそれぞれのプライマーで増幅された産物を用いて例えば米国特許公開 2 0 0 8 0 0 1 5 1 6 4 ; 2 0 0 8 0 1 3 1 9 6 2 及び 2 0 0 8 0 1 5 9 9 9 6 (S u r v e y o r TM、T r a n s g e n o m i c) に記載の通り C e l - I ミスマッチアッセイに付した場合、これらの挿入又は欠失 (まとめて「 i n d e l 」と称する) の頻度は、アッセイの産物をゲル電気泳動に付せば計算することができる。したがって、A 2 / A 3 特異的対をそれらの標的に対する活性に関して C e l - I アッセイを用いて検査した。示すように細胞を G F P 対照又は Z F N の対の各々によりトランスフェクトした。D N A はトランスフェクション一日後に細胞から調製し、結果を図 2 に示す。矢印は、Z F N 対を含有する試料のみにおいて切断が観察され、G F P に対して特異的な Z F N で細胞をトランスフェクトした対照試料では観察されなかったことを示している。遺伝子修飾率を各レーン下部に示す。

【 0 1 7 1 】

H E K 2 9 3 細胞内に Z F N をコードするプラスミドをトランスフェクトした場合、1 8 8 8 9 / 1 8 8 8 1 対は約 3 % の遺伝子修飾を示したのに対し、1 8 8 8 9 / 2 4 8 5 9 対は H L A A 2 遺伝子に対して約 6 % の N H E J を示した。A 3 対立遺伝子に関しては、1 8 8 8 9 / 1 8 8 8 1 対は 9 % を示し、そして 1 8 8 8 9 / 2 4 8 5 9 対は 1 0 % N H E J 活性を示した。これらの対は A 2 及び A 3 対立遺伝子の両方を切断することができるため、A 2 / A 3 ダブルロックアウト細胞系統を形成することが可能である。

【 0 1 7 2 】

細胞表面上の H L A A マーカーの存在を標準的な F A C S 分析により分析した。要するに、A 2、A 3 又は A 2、A 3 が攪乱される H E K 2 9 3 細胞は染色された。H L A - A 2 染色は抗 H L A - A 2 P E (B D B i o S c i e n c e s、クローン B B 7 . 2) により実施した。マウス I g G 2 b k P E (B D B i o S c i e n c e s) をアイソタイプ対照のために使用した。H L A - A 3 に関しては、本発明者等は先ずこれらの細胞をビオチニル化抗 H L A - A 3 A b (A b c a m、クローン 4 i 5 3) で、次に S A - P E (B D) で染色した。各実験の陰性対照は、H L A - A 3 A b 非存在での H L A - A 2 - i g G 2 b K P E、H L A - A 3 - S A - P E 染色とした。

【 0 1 7 3 】

これらの実験において、全試料で一定である黒線として図中に結果を示した上記アイソタイプ対照抗体を用いて陽性対照を実施した。次に 4 8 時間 I F N ガンマ (6 0 0 I U / m L) + T N F (1 0 m g / m L) を添加することにより培養物の H L A 発現を刺激するか、又は刺激非存在下に使用した。

【 0 1 7 4 】

10

20

30

40

50

図3に示す通り、アイソタイプ対照ピークに最も近い線は刺激を欠く試料であり、シフトしたピークはIFN γ 及びTNFの存在下のものである(図の凡例参照)。左側のコラムの図のセットは全て、抗HLA A2抗体でプローブし、右側コラムのものは抗HLA A3抗体でプローブされている。示すとおり、示されているHLAマーカーは相当するHLA遺伝子が機能的に攪乱されている場合にはもはや検出不可能である。

【0175】

次に、HLA AノックアウトHEK293細胞系統を分析することにより、それらがHLA-A制限CTL細胞系統により溶解できるか調べた。これらの実験のための方法は以下の通りである。標的細胞を2時間0.1mCiの ^{51}Cr で標識した。10%FBS添加氷冷RPMI1640で3回洗浄した後、標識細胞を希釈し、そして96穴のv底プレート中ウェル当たり 1×10^3 標的細胞/ $100 \mu\text{L}$ で分注した。ペプチドの10倍連続希釈物と共に室温で30分間インキュベートした後、示すエフェクター標的比でCTLを添加した。37 $^{\circ}\text{C}$ の5%CO $_2$ インキュベーターで4時間インキュベートした後、 $50 \mu\text{L}$ の上澄みを収集し、TopCount(Perkin Elmer)上で計数した。全てのアッセイを3連で実施した。親HEK293細胞系統及びHLAノックダウンHEK293クローンに、アッセイ前48時間、600IU/mLのインターフェロン- γ (IFN- γ ; R&D Systems(商標登録))及び10ng/mLの組織壊死因子- α (TNF- α ; R&D Systems(商標登録))を投与した。特異的溶解率(%)を以下の通り計算した: $(\text{実験cpm} - \text{自発的cpm}) / (\text{最大cpm} - \text{自発的cpm}) \times 100$ 。これらの例においては、ペプチド抗原標的を添加することにより、何れかの機能性のHLAクラスI複合体によるディスプレイを行い、そして機能性のHLA A-ペプチド複合体の存在下においては、CTLクローンは細胞を攻撃して溶解を誘発することができる。

【0176】

図4に示す通り、A2又はA3HLAマーカーを欠失しているHEK293クローンは、それらの同族体ペプチド抗原の存在下で、7A7PANE1/A3CTLクローン(パネルA)又はGAS2B3-5C19ORF48/A2CTLクローン(パネルB)の何れかにより誘導される溶解に対して耐性であった。

【0177】

ZFN媒介HLAノックアウトを一次T細胞において反復した。18889(KKR FokI変異体含有)及び24859(ELD FokI変異体含有)ZFNをコードするmRNAを以下の通りホモ接合のHLA A2遺伝子型の一次T細胞内にヌクレオフェクトした。製造元(Lonza)により供給された $100 \mu\text{L}$ 中反応当たり各mRNA 2.5~10 μg を用い、ZFNコードmRNAでAmamx Nuclease(商標登録)システム(プログラムT20)を使用して、 5×10^6 の一次T細胞(標準的方法により単離)をヌクレオフェクトした。これらの細胞を次にFACS分析することにより、HLA A2マーカーが細胞表面上に存在するかどうか、標準的方法により分析した。

【0178】

図5に示す通り、HLA-A発現を欠失している細胞のパーセントはこの投与の後に約19~42%の範囲となった。図5Aは標準的投与条件下のHLA-A2欠失細胞のパーセントを示し、図5Bは「一過性コールドショック」投与条件を用いたHLA-A2欠失細胞のパーセントを示す(共有米国特許出願12/800,599参照)。

【0179】

更に又、本発明者等はHLA-A2発現の消失は、HLA-A2遺伝子のZFN媒介修飾により誘発されたことを、前述のCel-I分析により確認した。図6はCel-Iのデータを示しており、ここではZFN標的部位で決定されたパーセントNHEJ活性は3~28%の範囲であった。この図において、「wt」は野生型FokIドメインを指し、「mut」は上記のEL/KK FokI突然変異体対を指す。これらのデータは、本発明の方法及び組成物を、HLA-A発現を欠失させ、そしてHLA-Aヌル細胞系統及び一

次 T 細胞を作成するために使用できることを明らかにしている。

【 0 1 8 0 】

H L A A ノックアウト細胞を富化することにより存在する H L A A ヌル細胞の比率を上昇させることができる。細胞の低比率が H L A A ヌルである Z F N により処理した T 細胞の集団を、フィコエリスリン (P E) をタグ付け下抗 H L A - A 2 抗体 (B D B i o S c i e n c e s クローン 7 . 2) で処理した。次に抗 P E 抗体 (M i l t e n y i) をタグ付けしたビーズを用いて、製造元の指示に従って H L A - A 2 を発現する細胞に結合させ、これにより H L A - A 2 ヌル細胞から分離した。この手法を用いると、細胞集団は、F A C S 分析でアッセイした場合に、5 . 1 ~ 3 4 % H L A A ヌル細胞の範囲から 9 2 ~ 9 5 % H L A A 2 ヌルの範囲となった。

10

H L A B 及び C 遺伝子座に指向された Z F N

【 0 1 8 1 】

H L A B 及び C の遺伝子座を標的とするために Z F N を構築し、そして上記の通り C e l - I アッセイを用いて試験した。

【 0 1 8 2 】

図 7 に示す通り、これらの Z F N はこれらの遺伝子の両方の内部において遺伝子修飾を良好に誘導することができた (Z F N 2 5 5 8 8 / 2 5 5 8 9 を用いた H L A C ノックアウトはパネル A に示し、パネル B の H L A B ノックアウトは Z F N 対 2 5 3 1 6 / 2 5 3 1 7 を用いて作成した) 。これらの標的は遺伝子配列の内部に所在し、そのため、H L A B 及び H L A C ノックアウトクローンを作成するために使用できる。

20

【 0 1 8 3 】

M H C クラス I 複合体の大型欠失

Z F N はまた、H L A B 及び H L A C 遺伝子を同時に欠失させる H L A クラス I 遺伝子座による大型欠失を可能にするように設計した。Z F N のこれらのセットは、H L A B 遺伝子上流 (H L A B - u p) 及び H L A C 遺伝子下流 (H L A C - d o w n) を切断するように設計した。これらの Z F N 対は、N H E J 活性によりアッセイした場合の切断の程度を調べるために、上記の通り C e l - I アッセイを用いて個別に試験した。

【 0 1 8 4 】

図 8 A は w t F o k I ドメイン (w t) 及び E L / K K F o k I ドメイン (m u t) の両方について、対 1 5 2 9 6 / 1 5 2 9 8 に関する H L A C - d o w n の結果を示す。図 8 B は K 5 6 2 細胞における H L A B - u p 対 1 5 2 6 7 / 1 5 2 6 5 及び 1 7 4 5 4 / 1 7 4 5 6 に関する同様のセットのデータを示す。遺伝子修飾率をレーン下部に示す (「 % N H E J 」) 。これらの Z F N を次に使用して、Z F N、これらの 2 つのセットの組み合わせにより H L A B 及び H L A C 遺伝子を欠失させることができるかどうかを試験した。図 9 は使用したアッセイのダイアグラムを示し (パネル A) 、そして又、P C R の結果を示す (パネル B) 。K 5 6 2 細胞を 2 つのセットの Z F N でトランスフェクトし、そして示すようにトランスフェクション後 3 ~ 1 0 日に細胞から D N A を単離した。

30

【 0 1 8 5 】

図 9 A に示す通り H L A - B 及び H L A - C の間の領域に隣接するプライマーを用いて P C R を実施した。良好な二重欠失により大量の D N A (約 1 0 0 K b) が欠失するはずであるため、P C R 反応は欠失が生じている場合にのみ成功することとなる。図 9 B は 2 つの Z F N 対で処理した後の P C R 反応によるゲルを示す。ゲルの左側はゲルの右側に存在する欠失 P C R 産物の量の大きな定量のために使用するプラスミドの連続希釈物を示す。この図において、「w t」は野生型の F o k I ドメインを指し、「m u t」は E L / K K F o k I 突然変異体対を指す。結果は存在する D N A の約 5 % が欠失を含有していたことを示している。

40

【 0 1 8 6 】

この実験から誘導されたクローンを、クラス I 複合体全体、及び特に H L A B 及び C の遺伝子に特定して発現を観察するために、F A C S 分析に付した。これはクラス I の発現を分析するためには抗クラス I 抗体を、そして H L A B C を分析するためには抗 H L A B

50

C抗体を用いて上記の通り実施した。結果によれば、親K562細胞系統においては、細胞の9.02%が全般的にクラスI複合体を発現しており、そして細胞の15.98%がHLA B及びCを発現していた。1つのロックアウト系統においては、クラスI発現レベルは3.88%であり、そしてHLA B C発現は7.82%であった。この系統はHLA B C対立遺伝子の両方に関してロックアウトを含有しているのではない可能性が高く、従って、発現が消失するのではなく単に減少するということは意外ではない。

【0187】

実施例3：HLAクラスIレギュレーター遺伝子に特異的なZFN

クラスIHLA遺伝子に特異的なZFNの作用を検討することに加えて、本発明者等は、可能性のあるクラスIレギュレーター、即ちTAP1、TAP2及びタパシンに指向したZFNの作用も試験した。これらの遺伝子標的に対してZFNを作成し、そしてそれらの設計の詳細を表1及び2に示す。

【0188】

ZFNをHEK293細胞にトランスフェクトし、そして上記のCel-Iアッセイにより遺伝子修飾活性に関して試験した。

【0189】

図10及び11に示す通り、ZFN対はそれらの標的を修飾した、図10Aはデータが約39%の遺伝子修飾活性を示しているTAP1に特異的なZFN(対28386/28385)の結果を示す。図10BはZFN対28394/28393が約49%の効率でTap2を修飾することを示している。図11はタパシン遺伝子に対して特異的なZFN(対28406/28405及び対28404/28403)に関する同様の結果を示しており、ここではデータはそれぞれ約34%及び64%の遺伝子修飾を示している。

【0190】

実施例4：HLAクラスII遺伝子に対して特異的なZFN

クラスII遺伝子に関して上の実施例2で記載した通り、クラスII遺伝子クラスターにおいても大型欠失を作成した。それぞれDBP2遺伝子の上流(15872及び15873)及びDRA遺伝子の下流(15909及び15910)の標的DNAを切断する2つのZFN対を特定した。各対を上記の通りK562細胞におけるCel-I分析により分析した。図12に示すCel-I分析によれば、15872/15873対に関しては、野生型(wt)FokIドメインを含有するZFNバージョンを用いた場合に13%のNHEJが観察されたのに対し、前述の通りEL/KKFokI対(mut)を用いて対を作成した場合にはNHEJ活性は約28%であった。15909/15910対に関しては、野生型(wt)FokIドメインを含有するZFNを用いた場合に6%及び11%NHEJ活性が観察されたのに対し、EL/KKFokIドメイン対(mut)の場合は14%のNHEJ活性が観察された。

【0191】

2つのZFN対を共に用いながらDBP2及びDRAの間のDNAのセクションを欠失させ、そして次に上の実施例2において記載した通り欠失に隣接するプライマーによるPCRを実施した。PCR産物を分析し、連続希釈物と比較することにより存在する欠失のパーセントを推定した。図13に示す通り、存在する対立遺伝子の約0.04%が欠失の証拠を示していた。

【0192】

接合セクションに渡る接合を配列決定し、そして結果を図14に示す。6行はDPB2の上流のZFN15873の標的部位におけるゲノム参照配列を示す(ZFN結合部位そのものは下線)。5行はDRAの下流のZFN15909の結合部位付近のゲノム参照配列を示す(ZFN結合部位そのものは下線)。1~4行は上記のPCR産物の4つの別個のサブクローンの配列を示し、両方の標的配列が存在することを明らかにしており、欠失後にZFN切断部位において2末端が接合していることを示している。7行は欠失産物のコンセンサスを示す。

【0193】

10

20

30

40

50

これらの結果は、HLAクラスII複合体の部分を欠失させるために大型欠失（約70 K b）を生じさせることができることを示している。

実施例5：HLAクラスIIレギュレーター遺伝子に対して特異的なZFN

【0194】

前述の通り、クラスII複合体はマスター調節分子CIIITAにより調節されると考えられる。したがって、CIIITA遺伝子を攪乱又は操作した場合、全体としてHLAクラスII発現を攪乱又は改変する可能性があり得る。したがって、CIIITA遺伝子を標的とするようにZFN対を作成した。更に又、RFX5遺伝子産物はクラスIIエンハンスソームの部分であると考えられ、そのため、この遺伝子の攪乱もまたHLAクラスII発現を攪乱又は改変し得る。従って、この遺伝子を標的とするZFN対も作成して試験した。ZFNの両方のセットをK562細胞において上記の通りCel-Iアッセイを用いて試験した。

10

【0195】

図15に示す通り、Cel-Iミスマッチアッセイの結果は、CIIITAを標的とするZFN対(15486/15487)が対立遺伝子の約15%において遺伝子修飾を誘発することができ、RFX5を標的とするZFN対(15506/15507)は対立遺伝子の約2%において遺伝子修飾を誘発したことを示している。対照反応はDNA無添加の擬似トランスフェクション及びGFP発現プラスミドを用いたトランスフェクションを包含する。

【0196】

次に、CIIITAターゲティングZFN対をRAJI細胞内へのトランスフェクションにより試験した。これらの細胞はHLAクラスIIを発現することがわかっているリンパ芽球様細胞系統である。

20

【0197】

図16に示したゲルはK562細胞とRAJI細胞のCel-I活性を対比させたものである。「K」はK562細胞における結果を示し、「R」はRAJI細胞における結果を示す。「n.c.」はトランスフェクション中に如何なるZFNも添加しなかった細胞における陰性対照を示す。結果によれば、K562細胞においては約12~15%の遺伝子修飾活性が観察され、そしてRAJI細胞においては約1%であり、RAJI細胞におけるトランスフェクション効率が乏しいことを反映していると考えられた。

実施例6：別の一般的に修飾と組み合わせたHLAノックアウト細胞の使用

30

【0198】

CD19マーカーは全てのB細胞悪性疾患の95%上で発現される細胞表面マーカーである。これは造血幹細胞上やB直系外の正常組織上では発現されず、B細胞から成熟プラズマ細胞への分化時に消失する。したがって、CD19はB細胞リンパ腫及びB-ALL細胞の治療のための標的化免疫療法のための興味深い標的となっている。CD19に特異的なキメラ抗原受容体(CAR)を含有するT細胞が、トランスポゾン支援ゲノム挿入を介して作成されている(Davies等、(2010)Cancer Res 70(10):3915-24参照)。HLAマーカーの欠失は、そのような細胞療法製品を、マッチしたHLAハプロタイプを有する者のみではなく多くの患者のために使用可能とする。したがって、実施例2において上記の通りCAR-19修飾T細胞をHLA A特異的ZFNで処理した。次に細胞を上記の通りFACS分析により分析した。

40

【0199】

図17に示す通り、陰性(アイソタイプ)対照抗体(マウス抗IgG2(BD Bioscience))を用いた細胞の分析によれば、HLA-A2(上記)発現に関しては0.3%の陰性(非特異的結合)シグナルが観察された。擬似トランスフェクト細胞をHLA-A2抗体を用いて分析した場合(mRNA非存在)、細胞の1.6%がHLA-A2を発現しなかった。ZFN処理したT細胞のバルク集団が、細胞の17.6%がHLA-A2ヌルであることを示していたが、上の実施例2に記載のHLA-A2非発現体に関して富化した後は、細胞の95.3%が図17においてHLA-A2ヌル(「富化」を「HLA-A.ZFNバルクと比較)であった。

50

【0200】

次にHLA-A2ヌルT細胞をHLA-A2特異的CTLで処理した。図18に示す通り、HLA-A2ヌルであった細胞はCTLによる溶解に対して耐性であった。これらの実験は前述したとおり実施した。使用したCTLは前述の通りGAS2B3-5C19ORF48/A2細胞(CIIPDSSLFP Aエピトープ)であり(実施例2参照)、そして、HLA-A2に対して特異的なものである。

【0201】

これらのデータによれば、ZFP媒介HLAノックアウトは別の有用な遺伝子修飾を担持している細胞においてもたらしことができ、そしてそのため、これらの治療薬の広範な使用を可能にする。

10

【0202】

実施例7：TCRノックアウト

上の実施例6において記載のCAR-19修飾T細胞の使用は、内在性TCR発現のため、同種異系の状況においては妨害される可能性があり得る。したがって、TCR又はTCR定常鎖の何れかを攪乱するように設計されたZFN試薬を一次T細胞において試験した。ZFN対25539/25540をTCRノックアウトのために使用し、そしてZFN対16783/16787をTCRノックアウトのために使用した。これらの実験において、百万個の一次T細胞を上記の通りZFNコードmRNAを用いてAmmaxa系を用いたヌクレオフェクションに付した。次に細胞をFACS及びCell-I分析の両方に付した。

20

【0203】

図19に示す通り、CD3発現を欠失する細胞は、ヌクレオフェクトTCRZFNmRNAの非存在下の2.4%から10µgTCR特異的ZFNmRNAの存在下では9.4%まで増大する。10µgのTCR特異的ZFNmRNAの存在下では、CD3陰性細胞のパーセントは28.1%まで上昇する。FACSデータは、TRCデータを上部(「TRBCターゲティングZFN」)、そしてTCRデータを下部(「TRACターゲティングZFN」)として示す。TCR又はTCR鎖の何れかの発現の欠失を、細胞表面上の安定な提示のためには機能性TCRが必要になるCD3複合体の存在によりアッセイする。

【0204】

30

図20は一過性の低温又は標準的条件下にインキュベートした試料に対して上記の通り実施したCell-I分析の結果と共にゲルを示しており、遺伝子修飾活性パーセントデータ(各レーンの下部に示す)は、37でインキュベートした細胞に対して実施したFACS分析と概ね合致している。

【0205】

本明細書において言及した全ての特許、特許出願及び公開は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0206】

開示は理解の明確化を目的として説明及び例示により幾分詳細に提示したが、当業者の知る通り、開示の精神又は範囲から外れることなく種々の変化及び変更を行うことができる。従って、上記説明及び例は限定的と捉えてはならない。

40

【 図 1 】

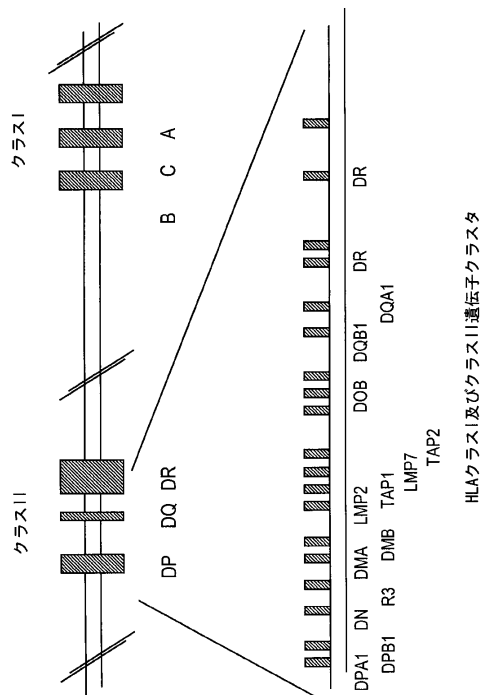


FIG. 1

【 図 2 】

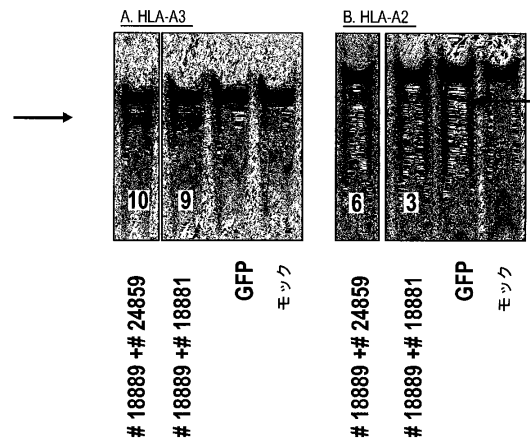


FIG. 2

【 図 3 】

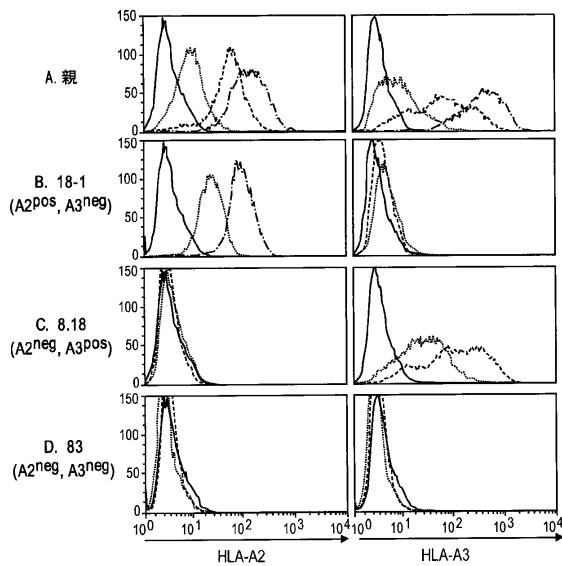


FIG. 3

【 図 4 A - B 】

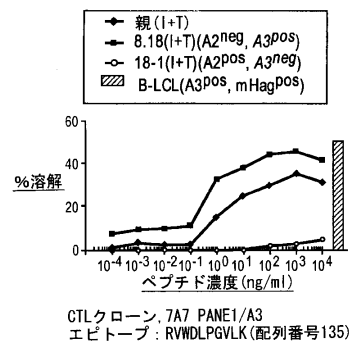


FIG. 4A

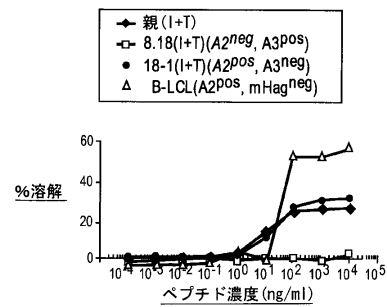
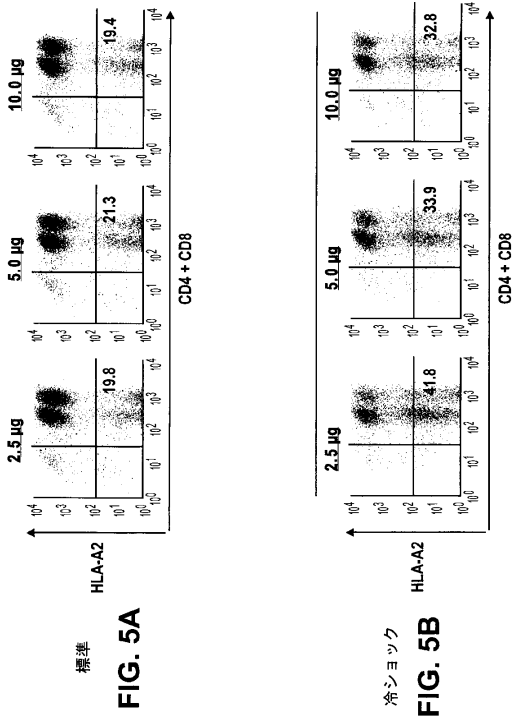
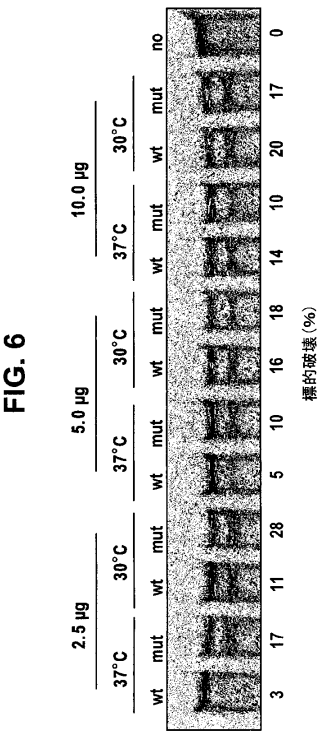


FIG. 4B

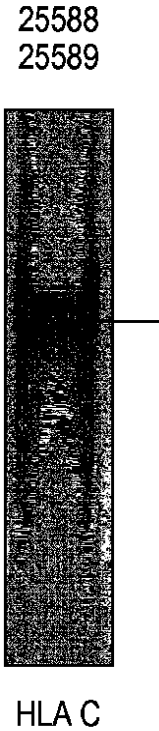
【 図 5 A - B 】



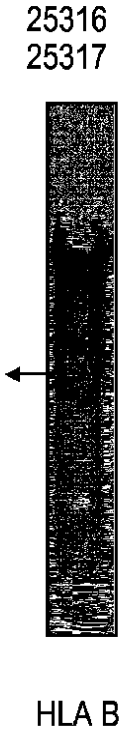
【 図 6 】



【 図 7 A 】

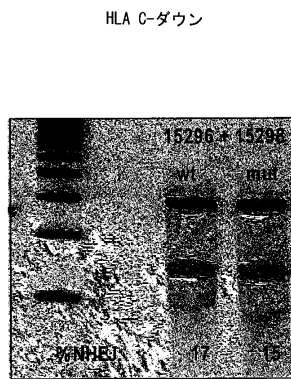


【 図 7 B 】



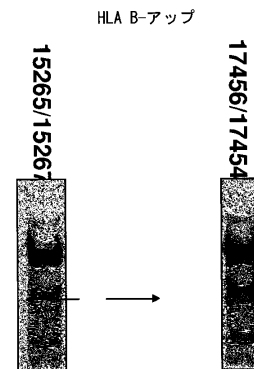
【図 8 A】

FIG. 8A



【図 8 B】

FIG. 8B



【図 9 A】

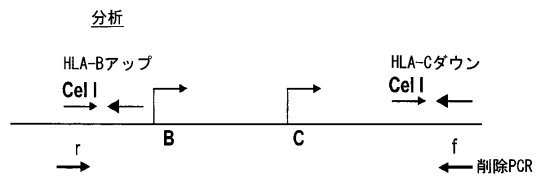


FIG. 9A

【図 9 B】

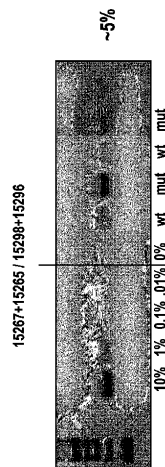


FIG. 9B

【図 10 A】

TAP1

28386
28385 GFP



FIG. 10A

【図 10 B】

TAP2

28394
28393 GFP



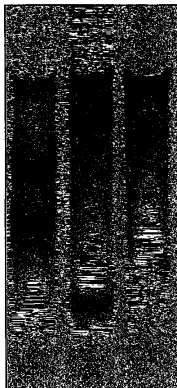
FIG. 10B

【図 11】

FIG. 11

タパシン

28404/28403
28406/28405 GFP



【図 12】

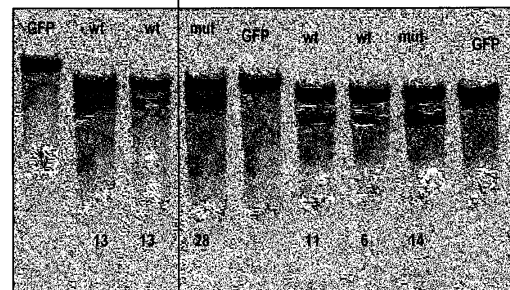
FIG. 12

DPB2アップ

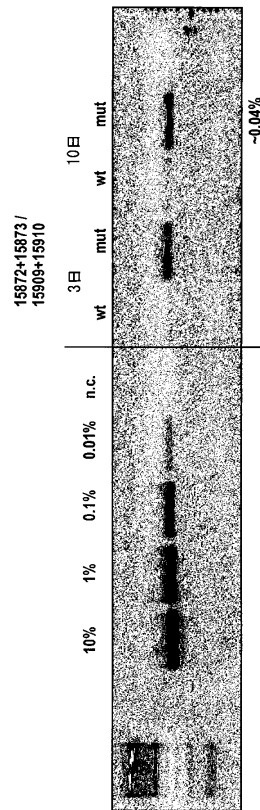
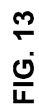
DRAダウン

15872+
15873

15909+
15910

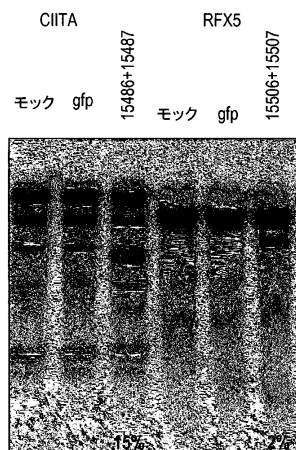


【 図 1 3 】



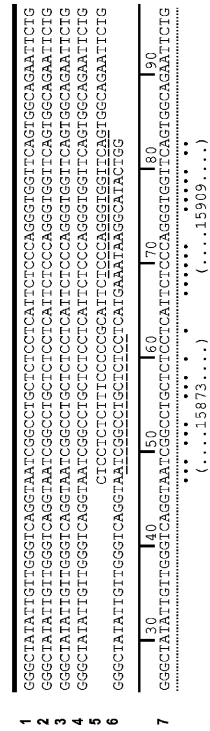
【 図 1 5 】

FIG. 15



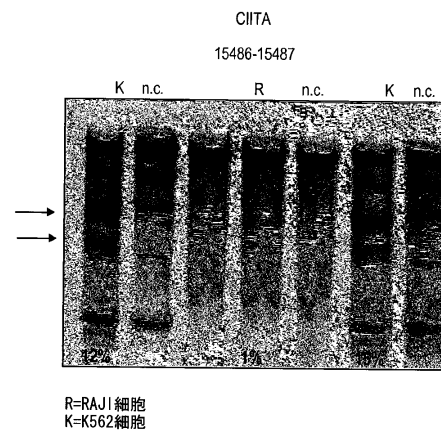
【 図 1 4 】

FIG. 14



【 図 1 6 】

FIG. 16



【 図 1 7 】

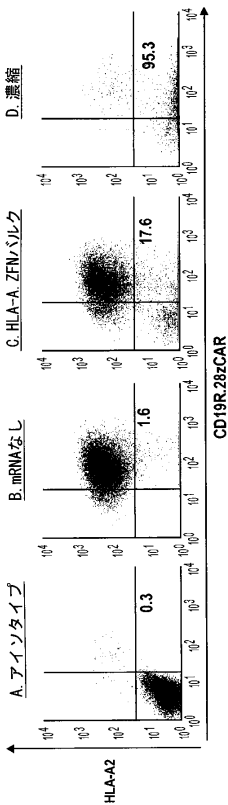


FIG. 17

【 図 1 8 】

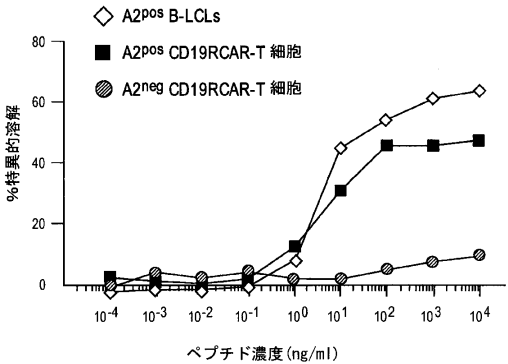


FIG. 18

【 図 1 9 】

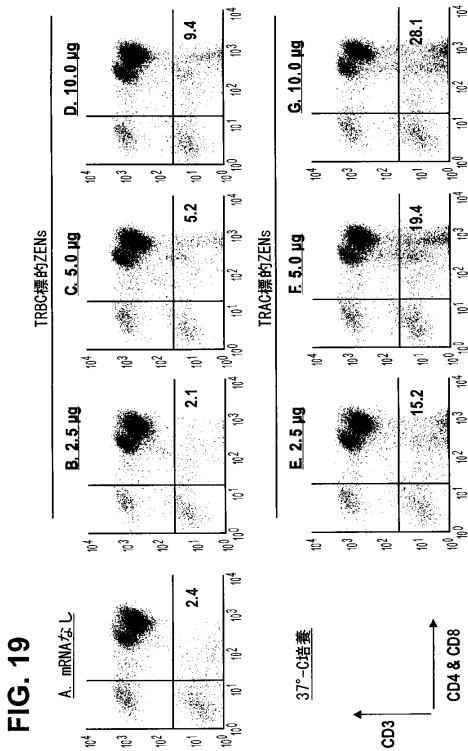
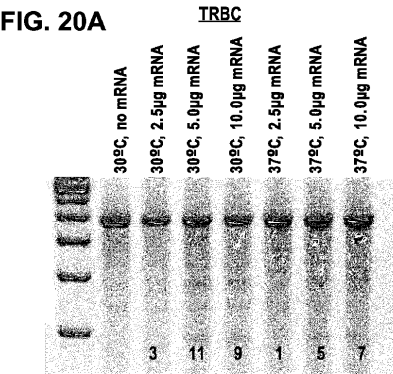


FIG. 19

【 図 2 0 A 】



【 図 2 0 B 】

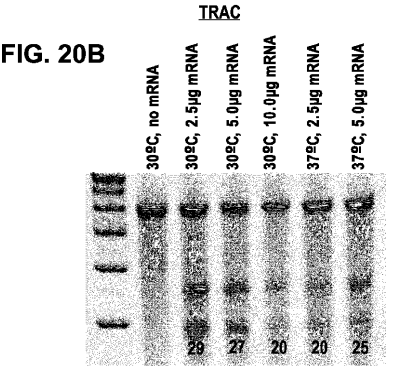


FIG. 20B

【配列表】

0006050230000001.app

フロントページの続き

| | | |
|---------------|-----------|---------------|
| (51)Int.Cl. | | F I |
| A 6 1 K 38/46 | (2006.01) | A 6 1 K 37/54 |
| A 6 1 P 37/06 | (2006.01) | A 6 1 P 37/06 |
| A 6 1 K 35/12 | (2015.01) | A 6 1 K 35/12 |
| A 6 1 K 35/17 | (2015.01) | A 6 1 K 35/17 |
| A 6 1 K 35/19 | (2015.01) | A 6 1 K 35/19 |

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 トレバー コリンウッド

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

(72)発明者 ローレンス ジェイ. エヌ. クーパー

アメリカ合衆国, テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515, シー/オー ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム

(72)発明者 フィリップ ディー. グレゴリー

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

(72)発明者 マイケル シー. ホームズ

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

(72)発明者 ジェフリー シー. ミラー

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

(72)発明者 エドワード ジェイ. レバー

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

(72)発明者 アンドレアズ レイク

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

(72)発明者 フォードル ウルノブ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501,

ポイント リッチモンド テク センター, スイート エー 100, サンガモ バイオサイエンス
ーズ, インコーポレイテッド

審査官 佐藤 巖

(56)参考文献 特表 2009-502170 (JP, A)

MAEDER, M.L. et al., Mol. Cell., 2008年, Vol.31, pp.294-301

生物学辞典, 2010年12月10日, 第1版, 第1刷, 第86頁

LAMPTON, P.W. et al., J. Reprod. Immunol., 2008年, Vol.78, No.1, pp.28-39

"Homo sapiens HLA-A gene for MHC class I antigen, HLA-A*0201 allele, exons 1-8", GenBank, Accession code: AJ555412, 2008年 6月17日, [retrieved on 2015-06-18], Retrieved from the Internet, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ555412.1?report=girevhist>

"ZiFiT: software for engineering zinc finger proteins (V3.3)", ZINC FINGER CONSORTIUM, [retrieved on 2015-06-18], Retrieved from the Internet, URL, http://zifit.partners.org/ZiFiT_v3.3/

COFFMAN, T. et al., J. Immunol., 1993年, Vol.151, No.1, pp.425-435

TORIKAI, H. et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2010年, Vol.116, Abstract 3766

RAMIREZ, C.L. et al., Nature Methods, 2008年, Vol.5, No.5, pp.374-375

JAMIESON ANDREW C, NATURE REVIEWS.DRUG DISCOVERY., 2003年 5月, V2 N5, P361-368

MOORE, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001年, Vol.98, No.4, pp.1437-1441

BHAKTA, M. and SEGAL, D.J., Methods Mol. Biol., 2010年, Vol.649, pp.3-30

URNOV, F.D. et al., Nature, 2005年, Vol.435, pp.646-651

MOEHLE, E.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007年, Vol.104, No.9, pp.3055-3060

MANDELL, J.G. and BARBAS III, C.F., Nucl. Acid. Res., 2006年, Vol.34, W516-W523

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

MEDLINE / CAPLUS / BIOSIS / WPIDS (STN)