

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6480874号  
(P6480874)

(45) 発行日 平成31年3月13日(2019.3.13)

(24) 登録日 平成31年2月15日(2019.2.15)

(51) Int.Cl.			F I		
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/09	Z N A Z
<b>C 1 2 N</b>	<b>9/16</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/09	1 0 0
<b>C 0 7 K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	9/16	Z
<b>A 6 1 K</b>	<b>31/713</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	19/00	
<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	31/713	

請求項の数 13 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-560341 (P2015-560341)	(73) 特許権者	513112245
(86) (22) 出願日	平成26年2月28日 (2014.2.28)		リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ ・オブ・ミネソタ
(65) 公表番号	特表2016-512960 (P2016-512960A)		REGENTS OF THE UNIV ERSITY OF MINNESOTA
(43) 公表日	平成28年5月12日 (2016.5.12)		アメリカ合衆国, ミネソタ州・55455 -2020, ミネアポリス, オーク・スト リート・サウスイースト・200, マクナ マラ・アルムニ・センター・600
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/019322	(74) 代理人	100105957
(87) 国際公開番号	W02014/134412		弁理士 恩田 誠
(87) 国際公開日	平成26年9月4日 (2014.9.4)	(74) 代理人	100068755
審査請求日	平成29年2月17日 (2017.2.17)		弁理士 恩田 博宣
(31) 優先権主張番号	61/771, 735	(74) 代理人	100142907
(32) 優先日	平成25年3月1日 (2013.3.1)		弁理士 本田 淳
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TALENに基づく遺伝子修正

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号29および配列番号30からなる群から選択された配列を含む、TALENタンパク質をコードする核酸。

【請求項2】

請求項1に記載の核酸によりコードされるかまたは発現される、タンパク質。

【請求項3】

遺伝子突然変異遺伝子により引き起こされる遺伝性疾患または障害の処置での使用のための組成物であって、

細胞中で標的遺伝子における部位特異的な2本鎖DNA破壊を誘導可能な第1のTALENタンパク質をコードするとともに、配列番号29および配列番号30からなる群から選択された配列を含む核酸と、

前記標的遺伝子における遺伝子突然変異の修正のための鋳型である核酸ドナー配列と、  
を含み、

前記細胞が、線維芽細胞、ケラチン産生細胞、誘導型多能性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞、造血子孫細胞、T細胞、B細胞、グリア細胞、神経細胞、神経膠前駆細胞、神経膠幹細胞、筋肉細胞、肺細胞、膵臓細胞、肝臓細胞および網内系の細胞からなる群から選択され、

前記遺伝性疾患が表皮水疱症であり前記標的遺伝子がCOL7A1である、組成物。

【請求項4】

10

20

前記第1のT A L E Nタンパク質が、左T A L E Nであり、および前記核酸が、前記標的遺伝子において前記部位特異的な2本鎖DNA破壊をなすために前記左T A L E Nと協働する右T A L E Nである第2のT A L E Nをさらにコードする、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記T A L E Nタンパク質をコードする前記核酸または前記核酸ドナー配列がベクターまたはプラスミドの一部である、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記第1のT A L E Nまたは前記第2のT A L E Nが、複数のT A L Eフェクター反復配列およびエンドヌクレアーゼドメインと、前記複数のT A L Eフェクター反復配列の間  
10  
のスペースとを含み、前記エンドヌクレアーゼドメインがスペースを含む、請求項4または請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記スペースが12～30ヌクレオチド長である、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

遺伝子突然変異遺伝子により引き起こされる遺伝性疾患または障害の処置での使用のための、少なくとも1つの核酸を含む組成物であって、

(i) 第1の転写活性化因子様(T A L)エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードするとともに、配列番号29および配列番号30からなる群から選択された配列を含む第1の核酸、  
20

(ii) 第2のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードするとともに、配列番号29および配列番号30からなる群から選択された配列を含む第2の核酸、および

(iii) ドナー配列、  
を含み、

前記第1および第2のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体のそれぞれが、複数のT A L Eフェクター反復配列およびF o k Iエンドヌクレアーゼドメインを含み、前記複数のT A L Eフェクター反復配列のそれぞれが反復可変性二残基を含み、前記第1のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が、細胞内で標的DNAの第1の-halfサイト配列に結合可能であり、前記標的DNAが遺伝子突然変異を有し、かつ、前記第2の  
30  
T A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が前記標的DNAの第2の-halfサイト配列に結合されるときに前記第1のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が前記標的DNAを切断可能であり、前記標的DNAが、スペース配列によって分離される前記第1の-halfサイト配列および前記第2の-halfサイト配列を含み、前記第1および第2の-halfサイトが同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有し、前記ドナー配列が、少なくとも前記標的DNAの5'および3'末端で前記標的DNAと相同である領域を含み、かつ、前記標的DNAにおいて遺伝子突然変異の修正をもたらすDNA修復のための鑄型であり、

前記ドナー配列が前記標的DNAにおける遺伝子突然変異の修正のための鑄型であり、前記遺伝性疾患が表皮水疱症であり、さらに前記標的DNAがC O L 7 A 1である、組成物。  
40

【請求項9】

請求項3～5のいずれか一項に記載の第1のT A L E Nタンパク質をコードする核酸によりコードされるかまたは発現される、タンパク質。

【請求項10】

請求項8に記載の第1の核酸または第2の核酸によりコードされるかまたは発現される、タンパク質。

【請求項11】

請求項3～5のいずれか一項に記載の第1のT A L E Nタンパク質をコードする核酸を含むベクター。  
50

## 【請求項 1 2】

請求項 8 に記載の第 1 の核酸または第 2 の核酸を含むベクター。

## 【請求項 1 3】

第 1 の T A L E N タンパク質をコードするとともに、配列番号 2 9 および配列番号 3 0 からなる群から選択された配列を含む核酸と、

核酸ドナー配列と、を含む組成物であって、

前記第 1 の T A L E N タンパク質は、細胞中で、表皮水疱症を引き起こし得る遺伝子突然変異を有する C O L 7 A 1 遺伝子において部位特異的な 2 本鎖 D N A 破壊を誘導可能であり、

前記ドナー配列は、前記 C O L 7 A 1 遺伝子における前記遺伝子突然変異の修正のための鋳型である、組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本願は、T A L E N に基づく遺伝子修正に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

表皮水疱症 ( E B : E p i d e r m o l y s i s b u l l o s a ) は、皮膚を非常に脆弱にし、容易に水疱形成を引き起こすようにする、一群の遺伝的状況である。水疱および皮膚びらん、擦り合わせまたは引っ掻きなどの軽度損傷または擦過に反応して形成される。この疾患の最も重篤で古典的な形態である劣性栄養障害型表皮水疱症 ( R D E B : R e c e s s i v e d y s t r o p h i c e p i d e r m o l y s i s b u l l o s a ) は、皮膚および粘膜の広範囲の水疱形成および瘢痕化を特徴とする。R D E B と関連する C O L 7 A 1 突然変異は、表皮を真皮に連結させる 7 型コラーゲンの機能を損ない、続いて擦過または軽度損傷の結果として起こる表皮および真皮の分離によって、R D E B に伴う重篤な水疱形成および皮膚の広範囲の瘢痕化が引き起こされる。R D E B を有する者は、不治の、しばしば致命的な皮膚水疱形成を呈し、高悪性度の扁平上皮癌に対するリスクが上昇する 1。遺伝子増強療法 ( g e n e a u g m e n t a t i o n t h e r a p i e s ) は有望であるが、挿入突然変異誘発のリスクがある。最新の遺伝子治療ツール (例えば、ウイルスが介在する遺伝子付加) は、ゲノムに無作為または半無作為に組み込まれる治療用遺伝子の機能的コピーの提供に依存する。無作為組み込みの結果として、カーゴが着地する遺伝子座の攪乱が起こり、遺伝子不活性化または制御不全 ( オフターゲット効果 ) の可能性が生じる。これらの結果、患者に対して生命を脅かす副作用が起こり得る。したがって、例えば R D E B および他の遺伝性障害のある患者の細胞における正確なゲノム編集のための人工転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N : t r a n s c r i p t i o n a c t i v a t o r l i k e e f f e c t o r n u c l e a s e ) を本明細書中で記載する。

## 【0003】

本明細書中で引用される参考文献は全て、それらの全体が参照により組み込まれる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0004】

【図 1】 T A L E N 標的化、ヌクレアーゼ構造および C O L 7 A 1 遺伝子の修飾を示す図。( a ) 3 番染色体上の C O L 7 A 1 標的部位および T A L E N アレイ結合。ヒト 3 番染色体、および標的とされたエクソン 1 3 における領域の概要が示される。矢印は、その後の分析のために使用されるプライマーセットを示し、斑状の灰色のボックス付きの線は、( f ) で使用されるドナーである。( b ) C O L 7 A 1 標的部位およびヌクレアーゼ複合体のコア構成要素。T A L E N は、キサントモナス ( X a n t h o m o n a s ) T A L E の 1 5 2 残基の N 末端欠失と、それに続く反復ドメイン、および F o k I ヌクレアーゼの触媒ドメインに融合される + 6 3 C 末端サブ領域から構成される。(配列番号 3 3 ; 配列番号 3 4 ) ( c ) 反復可変性二残基 ( R V D : R e p e a t V a r i a b l e D i r

10

20

30

40

50

e s i d u e ) 塩基認識。R V D N N、N I、H DおよびN G ( グアニン、アデニン、シトシンおよびチミンにそれぞれ結合 ) は、1 bにおける対応する全長アレイに対してコードされる。( d ) T A L E Nにより生じた ( 稲妻マーク ) 2本鎖DNA破壊 ( D S B : d o u b l e - s t r a n d e d D N A b r e a k ) の略図および破壊修復のために使用される、可能性のある細胞修復機構。( 配列番号35 ; 配列番号36 )。( e ) T A L E N処理細胞のサンガー配列決定によるエラープロード非相同末端結合評価。制限サイクルPCRを行い、続いてショットガンクローニングを行い ; 75クローンの配列決定を行い、64個がゲノムデータベースに対して100%アライメントを示し、11個が、破線として示される非相同末端結合 ( N H E J : n o n - h o m o l o g o u s e n d j o i n i n g ) 誘導性欠失を示した。T A L E N左および右標的部位は、太字の大文字とし、スペース配列は小文字とする。欠失総塩基は右に示し、「d e l」として符号を示し、続いて失われた塩基数を示す。( f ) 相同組み換え修復 ( H D R : H o m o l o g y - d i r e c t e d r e p a i r )。1本鎖オリゴヌクレオチドドナー ( s s O D N : s i n g l e - s t r a n d e d o l i g o n u c l e o t i d e d o n o r ) は、左アーム上に65bpのCOL7A1遺伝子相同性を含有し、右に特有のプライマー部位 ( 斑状、灰色ボックス ) となる短い外来配列がある101bpを含有した。3回のプライマーPCRは、内在性プライマー対 ( i . および i i i . と表示される矢印で示される ) での増幅をもたらす。ODNのT A L E N挿入は、プライマー対 i i . および i i i . により生成される第2のより小さいPCR産物サイズをもたらす。T A L E N処理細胞の下部の数字はデンストメトリーにより決定されるHDRの比率を示す。( 配列番号37 ~ ( 配列番号48 ) )。 10 20

【図2】サーベイヤ ( S u r v e y o r ) ヌクレアーゼアッセイにより評価したCOL7A1遺伝子のT A L E N修飾を示す図。R D E B繊維芽細胞におけるサーベイヤヌクレアーゼによるN H E J評価。約350bp断片の制限サイクルPCRを行い、続いてサーベイヤミスマッチアッセイを行った。T A L E N誘導N H E Jは、約200および300bpの予想可能なバンドパターンにより証明される ( 矢印 )。右は、対照細胞における非修飾COL7A1遺伝子座である。

【図3】T A L E N C O L 7 A 1ドナー設計および相同組み換え修復を示す図。( a ) 星印により示された突然変異があるCOL7A1遺伝子座。下はドナーであって、内在性遺伝子座との関係でアライメントされており、706bp長の左アームのCOL7A1ゲノム配列から構成されるされているとともに該ゲノム遺伝子座に対して100%相同である。左アームと右アームの間には、1 o x Pが導入されたP G Kピューロマイシンカセットが、エクソン12とエクソン13との間のイントロンにノックインされるように設計されている ( ボックス、1 o x p部位は隣接する矢印により示される )。右アームは、806bp長であるとともに5塩基の変化を含有した。これらのうち4個は、HDRに基づく事象の判定のためのマーカとして機能するサイレント点突然変異多型 ( S P M P : s i l e n t p o i n t m u t a t i o n p o l y m o r p h i s m ) であり ( 上流および下流と呼ぶ ) ; 最後のものは、未成熟な終止コドン修正する正常化塩基であった。このボックスは、互いの10bp内に置かれた3個のS P M Pを表す。正常 ( すなわち突然変異復帰 ) 塩基は、ボックスにより示され、A p a I制限酵素部位を除去する末端 ( 下流 ) S P M Pは、黒色のボックスにより表される。稲妻マークは、T A L E N標的部位を示し、PCRプライマー ( 黒色の矢印 ) は、一方がドナーアーム内にあり、他方がその外側にあるように設計されており ; 示されるように分析のために利用される。( 配列番号49 )。R D E B繊維芽細胞におけるS P M P検出。T A L E N処置およびPCR増幅とそれに続くA p a Iでの消化およびサンガー配列決定により、( b ) ドナー由来であるA p a I耐性S P M Pであって、T A L E N切断および鋳型としての外来性ドナーを用いた相同組み換え修飾後にも存在し得る該A p a I耐性S P M Pの存在、( 配列番号50 ) ( c ) ヘテロ接合性HDR事象が起こったことを示す非修飾塩基 ( A p a I感受性 ) ( 配列番号51 ) が示される。 30 40

【図4】P G KピューロマイシンのC r e レコンビナーゼ切断を示す図。( a ) 1 o x P 50

が導入された P G K ピューロマイシンを伴うドナーの概要。ピューロマイシン耐性繊維芽細胞への Cre レコンビナーゼプラスミドの導入は、ピューロマイシン導入遺伝子の除去をもたらした。(b) ゲノム loxP / COL7A1 結合。RDEB TALEN / ドナー処理細胞におけるエクソン 12 とエクソン 13 との間のイントロンにおける loxP フットプリント (三角 / 下の配列) の存在を明らかにするために、PCR を使用した。(配列番号 52)。

【図 5】初期交叉事象配列分析を示す図。(a) ドナーに導入されるマーカ配列に対する凡例。矢印 = 上流 SPMP、線 = RDEB に対する原因となる 1837 塩基、矢印 = 下流 SPMP。(配列番号 53)。上流交叉事象。サンガー配列決定は、(b) 上流 SPMP の組み込み、(c) 塩基 1837 での突然変異の維持 (配列番号 54 ; (配列番号 55) 10、および (d) 下流 SPMP の不存在 (配列番号 56 ; (配列番号 57) を示し、HDR がドナーから生じたが、突然変異を修正できなかったことを示唆する。D (配列番号 58 ; (配列番号 59) を含むために凡例を固定した。

【図 6】推定初期交叉事象の概要を示す図。(a) TALEN アレイが標的配列に結合することが示されるとともに、ドナーが下に示される。(b) 標的部位への結合および TALEN 二量体形成が、2 本鎖 DNA 破壊 (稲妻)、および修復鋳型としてドナーを用いた HDR の刺激に介在する。(c) 理論的交叉事象。内在性 DNA およびドナーのアライメントの結果、上流 SPMP (ボックス) が組み込まれるような態様で遺伝物質が交換される交叉事象 (交叉 # 1) が起こる一方で、第 2 の交叉 (矢印 / 交叉 # 2) 事象が修正塩基 20 の上流および下流 SPMP で起こる。(d) 突然変異塩基 (ボックス) が維持される、部分的ドナー配列 (線およびボックス) を含有する、分割されたゲノム配列。

【図 7】HDR および正常 mRNA 産生の概要を示す図。(a) 稲妻マークにより示される TALEN 標的部位がある、突然変異内在性 COL7A1 遺伝子座。突然変異塩基が示され、下は、(b) エクソン 12 から、エクソン 15 とエクソン 16 との間のイントロンまでのドナー由来配列の永久的存在による遺伝子座の修復をもたらすドナーである。(c) mRNA 分析。表示されるプライマーは、同じアンプリコンで修正塩基 (ボックスおよび ApaI SPMP 黒色ボックス) を含有する生成物を増幅した。

【図 8】ドナーの TALEN 切断の配列分析を示す図。(配列番号 60)。(a) 直接サンガー配列決定によって TALEN 処理 RDEB 繊維芽細胞由来の cDNA を分析した。TALEN 部位に対して赤いボックスで輪郭を描く (部位の残り部分が隣接イントロン内 30 であるため、それが部分的 TALEN 配列であることに留意されたい。矢印はエクソン / エクソン境界を示す)。RDEB 突然変異は下線が付され、野生型状態への復帰を示した (突然変異体 = T、正常 = C)。下流 ApaI SPMP が存在し、それが示されている。配列アライメントは、上がドナーによりコードされると予想される cDNA 配列のもの、および下が回復した配列のものである。破線 / ギャップは、続く NHEJ を誘導した HDR 後 TALEN 切断に起因すると思われる欠失を示す (非相同末端結合)。(配列番号 61 ; 配列番号 62)。

【図 9】HDR を用いた COL7A1 の TALEN 介在遺伝子編集ならびに得られた正常化遺伝子およびタンパク質発現を示す図。(a) 野生型状態への突然変異の変換がある TALEN 修正細胞、(配列番号 64) および (b) 免疫蛍光により評価した V I I 型コラーゲン産生の回復。(c) 同型接合 RDEB 未成熟終止コドン cDNA 配列決定、(配列番号 65) および (d) V I I 型コラーゲンタンパク質産生の欠如。(e) 野生型 COL7A1 遺伝子座のサンガー配列決定、(配列番号 66) および (f) V I I 型コラーゲン発現。同時に細胞を染色し、共焦点顕微鏡露光時間および機器設定は同一であった。DAPI で核を染色し、青色で示す。 40

【図 10】TALEN 修正繊維芽細胞からの mRNA のサンガー配列決定を示す図。(a) 繊維芽細胞クローン 1 ~ 19 (配列番号 67 ; 配列番号 68) および (b) 1 ~ 21 は、修正された塩基 (線) および下流 SPMP (矢印) の存在を示した。(配列番号 69 ; 配列番号 70)。

【図 11】TALEN 組み込みマッピングプロファイルを示す図。(a) ゲノム遺伝子座 50

を永久的にマーキングするGFPカーゴを受容するTALEN誘導性DNA破壊の概要。  
 (b) 293細胞におけるTALENおよびIDLV同時発現の結果、安定したGFP細胞が得られた(TALENおよびIDLV送達から6週間後にフローサイトメトリ分析を行った)。(c)線形増幅が介在するPCRに対する模式図。青色矢印はLAM PCRプライマーを示し、破線は、TALEN誘導性IDLVゲノム融合断片を決定するために続いてクローニングし、マッピングした線形増幅の生成物を表す。(d)(nr)LAMP PCR/PCRにより組み込み体を同定した。LAM PCR配列回収およびゲノムデータベース検索によって、IDLVが組み込まれた5つの部位が明らかになった。COL7A1標的部位および、7、16、1および5番染色体の4つのオフターゲット部位のスペーサ領域に配列がマッピングされた(後者の配列でコーディングエクソン由来のものはなかった)。(配列番号71~75)。

10

【図12】インテグラーゼ欠損型レンチウイルスを示す図。(a)欠損型インテグラーゼを用いて作製されたGFPウイルスカセットの概要。(b)9日間の連続的分析にわたる、TALENの非存在下での293 IDLV GFP発現経時変化から、GFPの急速な喪失が示される。

【図13】コンストラクトを示す図。

【図14】コンストラクトを示す図。

【発明を実施するための形態】

【0005】

(発明の概要)

20

本発明は、突然変異の部位特異的な修正を提供することによって、オフターゲット効果を克服する。突然変異の修正は、細胞の形質転換または遺伝子移入によって遂行され得る。細胞は、繊維芽細胞、ケラチン産生細胞、誘導型多能性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞、造血子孫細胞、T細胞、B細胞、グリア細胞、神経細胞、神経膠前駆細胞、神経膠幹細胞、筋肉細胞、肺細胞、膵臓細胞、肝臓細胞および網内系の細胞からなる群から選択され得る。

【0006】

ある実施形態は、遺伝子突然変異により引き起こされる遺伝性疾患または障害を処置するための方法であって、TALENをコードする1つ以上の核酸および核酸ドナー配列と細胞を接触させることを含み、TALENタンパク質がその細胞中で発現され、標的遺伝子において部位特異的な2本鎖DNA破壊を誘導し、ドナー配列が、遺伝性疾患または障害を処置するために、遺伝子突然変異の修正をもたらすDNA修復のための鋳型であり、正確な遺伝子発現をもたらす、方法を提供する。ある実施形態において、細胞は、繊維芽細胞、ケラチン産生細胞、誘導型多能性、造血、間葉系または胚性幹細胞、造血子孫細胞(T細胞またはB細胞など)、グリアおよび神経細胞、神経膠前駆細胞および幹細胞、筋肉細胞、肺細胞、膵臓および/または肝臓細胞および/または網内系の細胞である。本発明は、遺伝子突然変異により引き起こされる遺伝性疾患または障害を処置するための1つ以上の核酸の使用であって、前記1つ以上の核酸が、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)および核酸ドナー配列をコードし、TALENタンパク質が細胞において発現されて、標的遺伝子において部位特異的な2本鎖DNA破壊を誘導し、ドナー配列が、遺伝性疾患または障害を処置するためにDNA修復のための鋳型であり、その結果、遺伝子突然変異の修正が起こり、正確な遺伝子発現をもたらす、使用をさらに提供する。

30

40

【0007】

この一実施形態において、TALENは左TALENであり、標的遺伝子において2本鎖破壊をなすために左TALENと協働する右TALENをさらに含む。別の実施形態において、TALENをコードする核酸および/または核酸ドナー配列は、ベクターまたはプラスミドの一部である。ある実施形態において、TALENは、スペーサ(例えばスペーサ配列は12~30ヌクレオチド長である)を含む。

【0008】

50

ある実施形態において、標的遺伝子は、遺伝子変化 / 突然変異がある遺伝子である。例えば、ある実施形態において、標的遺伝子はCOL7A1（例えばタンパク質の異常な発現を引き起こす突然変異があるもの）である。

【0009】

ある実施形態において、遺伝性疾患は、表皮水疱症、骨形成不全症、先天性角化不全症、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症（CFTR）、ファンコニ貧血、スフィンゴリピドーシス、リポフスチン沈着症、副腎白質ジストロフィー、重症複合型免疫不全、鎌状赤血球貧血またはサラセミアである。

【0010】

ある実施形態は、遺伝子突然変異により引き起こされる遺伝性疾患または障害を処置するための方法であって、a) 細胞に (i) 第1の転写活性化因子様 (TAL: transcrip-  
t i n a c t i v a t o r - l i k e) エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体  
をコードする第1の核酸、(ii) 第2のTALエフェクターエンドヌクレアーゼ単量  
体をコードする第2の核酸および(iii) およびドナー配列を導入する工程であって、  
前記第1および第2のTALエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体のそれぞれが、複数  
のTALエフェクター反復配列およびFokIエンドヌクレアーゼドメインを含み、前記  
複数のTALエフェクター反復配列のそれぞれが反復可変性二残基 (repeat-  
v a r i a b l e d i r e s i d u e) を含み、前記第1のTALエフェクターエンドヌク  
レアーゼ単量体が、前記細胞内での標的DNAの第1の-halfサイト配列への結合能を含  
むとともに、前記第2のTALエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が標的DNAの第  
2の-halfサイト配列に結合されるときに前記標的DNAを切断する能力を含み、前記標  
的DNAが、スペーサ配列によって分離される第1の-halfサイト配列および第2の-half  
サイト配列を含み、前記第1および第2の-halfサイトが同じヌクレオチド配列または  
異なるヌクレオチド配列を有し、前記ドナー配列が、少なくとも標的配列の5'および3'  
末端で標的に対する相同性および事前に選択された遺伝子変化を含み、かつ、遺伝子突  
然変異の修正をもたらすDNA修復のための鋳型である、該導入工程；および、(b) 突  
然変異を修正し、かつ、正確な遺伝子発現を復元するために、第1および第2のTALエ  
フェクターエンドヌクレアーゼ単量体が発現される条件下で細胞を培養する工程を含む、  
方法を提供する。第1および第2の核酸のそれぞれは、(スペーサ配列とは異なる) スペ  
ーサを含み得る。スペーサ配列は、複数のTALエフェクター反復配列とFokIエンド  
ヌクレアーゼドメインとの間に置かれ得る。スペーサ配列は12~30ヌクレオチドであ  
り得る。さらなる実施形態において、本発明は、遺伝子突然変異により引き起こされる遺  
伝性疾患または障害を処置するための1つ以上の核酸の使用であって、(i) 第1の核酸  
が、第1の転写活性化因子様 (TAL) エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコード  
し、(ii) 第2の核酸が、第2のTALエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコー  
ドし、(iii) およびドナー配列であり、前記第1および第2のTALエフェクターエン  
ドヌクレアーゼ単量体のそれぞれが、複数のTALエフェクター反復配列およびFokI  
エンドヌクレアーゼドメインを含み、前記複数のTALエフェクター反復配列のそれぞ  
れが反復可変性二残基を含み、前記第1のTALエフェクターエンドヌクレアーゼ単量  
体が、前記細胞内での標的DNAの第1の-halfサイト配列への結合能を含み、かつ、前  
記第2のTALエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が標的DNAの第2の-halfサイト  
配列に結合されるときの前記標的DNAに対する切断能を含み、前記標的DNAが、スペ  
ーサ配列によって分離される第1の-halfサイト配列および第2の-halfサイト配列を含  
み、前記第1および第2の-halfサイトが同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチ  
ド配列を有し、前記ドナー配列が、少なくとも標的配列の5'および3'末端で標的に対  
する相同性および事前に選択された遺伝子変化を含み、かつ、遺伝子突然変異の修正を  
もたらすDNA修復のための鋳型であり；および(b) 突然変異を修正し、正確な遺伝子発  
現を修復するために、第1および第2のTALエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が  
発現される条件下で細胞を培養することである、使用を提供する。

【0011】

10

20

30

40

50

別の実施形態は、ドナー配列を含む核酸であって、このドナー配列が遺伝子突然変異の修正をもたらす部位特異的なDNA修復のための鋳型であり、このドナー配列は、少なくとも標的配列の5'および3'末端に対する相同性を含み、このドナー配列の一部分は、T A L E Nタンパク質と併せて使用するための標的配列を修正するための修復配列を含む、核酸を提供する。ある実施形態において、ドナーは配列番号22を含む。別の実施形態において、この標的はC O L 7 A 1 (突然変異がある遺伝子)である。ある実施形態において、ドナーの5'および3'末端はそれぞれ標的に対する少なくとも100塩基の配列同一性を有する。

#### 【0012】

別の実施形態において、核酸は、配列番号29または30を含む。ある実施形態は、T A L E N核酸によりコードされるかまたは発現されるタンパク質を提供する。

ある実施形態は、ドナー配列を含むベクターまたはプラスミドであって、このドナー配列は、遺伝子突然変異の修正をもたらす部位特異的なDNA修復のための鋳型であり、このドナー配列は、少なくとも標的配列の5'および3'末端に対する相同性を含み、このドナー配列の一部分は、T A L E Nタンパク質と併せて使用するための標的配列を修正するための修復配列を含む、ベクターまたはプラスミドを提供する。ある実施形態において、ドナーは配列番号22を含む。ある実施形態において、標的はC O L 7 A 1 (突然変異あり)である。ある実施形態において、ドナーの5'および3'末端はそれぞれ標的に対して少なくとも100塩基の配列同一性を有する。ある実施形態は、配列番号22、31、28、29または30のうち1つ以上を含むベクターまたはプラスミドを提供する。別の実施形態は、外来配列番号22、31、28、29もしくは30のうち1つ以上またはこのような配列から発現されるタンパク質を含む、単離宿主細胞を提供する。別の実施形態は、配列番号22、31、28、29もしくは30またはこのような配列から発現されるタンパク質を含む、遺伝子移入された細胞株を提供する。

#### 【0013】

ある実施形態は、遺伝子突然変異により引き起こされる遺伝性疾患または障害を処置するための方法であって、T A L E Nをコードする核酸と細胞を接触させることを含み、このT A L E Nが突然変異を修正し、例えば、正確な遺伝子発現を修復するかまたは遺伝子発現を促進する、方法を提供する。ある実施形態において、細胞は繊維芽細胞である。別の実施形態において、T A L E Nは左T A L E Nであり、DNA中で2本鎖切断をなすために左T A L E Nと協働する右T A L E Nをさらに含む。ある実施形態において、核酸分子はベクターである。別の実施形態において、核酸分子はプラスミドである。ある実施形態において、T A L E Nはスペーサを含み、例えば12~30ヌクレオチド長などである。ある実施形態において、遺伝性疾患は表皮水疱症である。

#### 【0014】

別の実施形態は、遺伝子突然変異により引き起こされる遺伝性疾患または障害を処置するための方法であって、a) (i) 第1の転写活性化因子様(T A L)エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードする第1の核酸および(ii) 第2のT A Lエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードする第2の核酸を細胞に導入する工程であって、前記第1および第2のT A Lエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体のそれぞれが、複数のT A Lエフェクター反復配列およびF o k Iエンドヌクレアーゼドメインを含み、前記複数のT A Lエフェクター反復配列のそれぞれが反復可変性二残基を含み、第1のT A Lエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が、細胞内での標的DNAの第1のハーフサイト配列への結合能を含み、かつ、第2のT A Lエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が標的DNAの第2のハーフサイト配列に結合されるときに標的DNAの切断能を含み、前記標的DNAが、スペーサ配列によって分離される第1のハーフサイト配列および第2のハーフサイト配列を含み、前記第1および第2のハーフサイトが同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有する、該導入工程；および、(b) 突然変異を修正し、かつ、正確な遺伝子発現を復元するために、第1および第2のT A Lエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が発現される条件下で細胞を培養する工程を含む、方法を提供する。

## 【 0 0 1 5 】

本発明は、T A L E Nをコードする核酸および核酸ドナー配列を提供し、ここで、T A L E Nタンパク質が細胞において発現される場合、T A L E Nタンパク質は標的遺伝子において部位特異的な2本鎖DNA破壊を誘導し、さらに、ドナー配列は、遺伝性疾患または障害を処置するために、遺伝子突然変異の修正をもたらすDNA修復に対する鋳型であり、正確な遺伝子発現をもたらす。本発明は、核酸を提供し、ここで細胞は、繊維芽細胞、ケラチン産生細胞、誘導型多能性、造血、間葉系または胚性幹細胞、造血子孫細胞（T細胞またはB細胞など）、グリアおよび神経細胞、神経膠前駆および幹細胞、筋肉細胞、肺細胞、膵臓および/または肝臓細胞および/または網内系の細胞である。本発明は、核酸を提供し、ここでT A L E Nは左T A L E Nであり、標的遺伝子において2本鎖破壊をなすために左T A L E Nと協働する右T A L E Nをさらに含む。右T A L E Nは、この核酸または第2の核酸によりコードされ得る。左T A L E Nおよび右T A L E Nは、複数のT A L E F E K T A R反復配列およびエンドヌクレアーゼドメインを含み得る。左および右T A L E Nのそれぞれは、スペーサ（スペーサ配列とは異なる）を含み得る。スペーサ配列は、複数のT A L E F E K T A R反復配列とエンドヌクレアーゼドメインとの間に置かれ得る。スペーサ配列は、12～30ヌクレオチドの配列によりコードされ得る。本発明は、核酸を提供し、ここでT A L E Nをコードする核酸および/または核酸ドナー配列は、ベクターまたはプラスミドの一部である。本発明は、核酸を提供し、ここで標的遺伝子は、遺伝子変化/突然変異がある遺伝子である。本発明は、核酸を提供し、ここで標的遺伝子はC O L 7 A 1である。本発明は、核酸を提供し、ここでT A L E Nはスペーサを含む。本発明は、核酸を提供し、ここでスペーサ配列は12～30ヌクレオチド長である。本発明は、核酸を提供し、ここで遺伝性疾患は、表皮水疱症、骨形成不全症、先天性角化不全症、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症（C F T R）、ファンコニ貧血、スフィンゴリピドーシス、リポフスチン沈着症、副腎白質ジストロフィー、重症複合型免疫不全、鎌状赤血球貧血またはサラセミアである。本発明は、核酸を提供し、ここで遺伝性疾患は表皮水疱症である。本発明は、少なくとも1つの核酸であって、（i）第1の転写活性化因子様（T A L）エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードする第1の核酸、（i i）第2のT A L E F E K T A Rエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードする第2の核酸、および（i i i）およびドナー配列を含み、前記第1および第2のT A L E F E K T A Rエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体のそれぞれは、複数のT A L E F E K T A R反復配列およびF o k Iエンドヌクレアーゼドメインを含み、前記複数のT A L E F E K T A R反復配列のそれぞれが反復可変性二残基を含み、前記第1のT A L E F E K T A Rエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体は、前記細胞内での標的DNAの第1のハーフサイト配列への結合能を含み、かつ、前記第2のT A L E F E K T A Rエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が標的DNAの第2のハーフサイト配列に結合されるときの前記標的DNAに対する切断能を含み、前記標的DNAは、スペーサ配列によって分離される第1のハーフサイト配列および第2のハーフサイト配列を含み、前記第1および第2のハーフサイトは同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有し、前記ドナー配列は、少なくとも標的配列の5'および3'末端で標的に対する相溶性および事前に選択された遺伝子変化を含み、かつ、遺伝子突然変異の修正をもたらすDNA修復のための鋳型である、核酸と；（b）突然変異を修正し、かつ、正確な遺伝子発現を復元するために、第1および第2のT A L E F E K T A Rエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が発現される条件下で細胞を培養することとを提供する。本発明は、核酸によりコードされるかまたは発現されるタンパク質を提供する。本発明は、核酸を含むベクターまたはプラスミドを提供する。本発明は、核酸を含む単離宿主細胞を提供する。

## 【 0 0 1 6 】

本発明は、遺伝子突然変異により引き起こされる遺伝性疾患または障害を処置するための、本発明の、核酸、ベクター、宿主細胞およびタンパク質の使用を提供する。

（発明の詳細な説明）

本発明は、易感染性の遺伝性障害がある患者を処置するためのヒトゲノムおよびヒト細胞との関連における、疾患を引き起こす突然変異の、転写活性化因子様エフェクターヌク

10

20

30

40

50

レアーゼ (T A L E N) が介在する D N A 編集を対象とする。これは、無作為または半無作為にゲノムに組み込む治療用遺伝子の機能的コピーの提供に依存する以前の遺伝子治療試行/ツールを上回る進歩である。以前の遺伝子治療法の結果として、カーゴが着地する遺伝子座の攪乱が起り、遺伝子不活性化または制御不全が生じる可能性がある。これらの結果、生命を脅かす副作用が起り得る。本明細書中に記載のアプローチは、例えばゲノムの残りの部分を元の状態に維持しながら突然変異スポットのみを修正する、ヒト遺伝子に対するテーラードの T A L E N を使用することによって、安全性および有効性を最大化し、言い換えると、残りのゲノムを破壊せず、したがって既存の技術に付随するオフターゲット効果 (例えばウイルスが介在する遺伝子付加) を排除する。これは新規アプローチであり、細胞、例えばヒト細胞中での疾患を引き起こす突然変異の、T A L E N が介在する、導入遺伝子を含まない修正による最初の個人向け遺伝子治療である。したがって、この技術は細胞、例えばヒト細胞などにおいて使用され得、正常な細胞機能の回復により機能喪失突然変異が継ぎ目なく修正され得るようになる。他の実施形態において、遺伝子発現が促進され得る。

10

## 【 0 0 1 7 】

## 定義

本発明を記載し、主張することにおいて、下記で示される定義に従い、次の技術用語を使用する。別段の定めがない限り、本明細書中で使用される全ての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本発明の実施または試験において、本明細書中に記載のものと同様または均等な何らかの方法および材料が使用され得る。ラジカル、置換基および範囲に対して下記で列挙される具体的なおよび好ましい値は単なる例示であり、ラジカルおよび置換基に対して定められる他の値または定められる範囲内の他の値を排除するものではない。

20

## 【 0 0 1 8 】

本明細書中で使用される場合、冠詞「1つの ( a ) 」および「1つの ( a n ) 」は、冠詞の文法目的の、1つまたは複数、すなわち少なくとも1つを指す。例として、「1つの要素」は、1つの要素または複数の要素を意味する。

## 【 0 0 1 9 】

「約」という用語は、本明細書中で使用される場合、およそ、その範囲の、おおよそまたはその前後を指す。数値的な範囲と組み合わせて「約」という用語が使用される場合、これは、示される数値の上下で境界を拡大することによってその範囲を修飾する。一般に、「約」という用語は、本明細書中で、20%の変動により述べられる値の上下で数値を修飾するために使用される。

30

## 【 0 0 2 0 】

「単離される」という用語は、因子、1つ以上の因子を伴わない1つまたは複数の細胞、因子を伴う細胞または1つ以上の細胞成分、1つまたは複数のインピボ細胞を指す。

「細胞」は、脊椎動物、例えばヒトを含む哺乳動物からの細胞であり、または「対象」は、脊椎動物、例えばヒトを含む哺乳動物である。哺乳動物としては、ヒト、家畜、競走用の動物および愛玩動物が挙げられるが限定されない。「動物」という用語に含まれるのは、イヌ、ネコ、魚、スナネズミ、モルモット、ハムスター、ウマ、ウサギ、ブタ、マウス、サル (例えば、類人猿、ゴリラ、チンパンジーまたはオランウータン)、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウシおよびトリである。

40

## 【 0 0 2 1 】

「対照」対象は、同様のタイプの疾患など、試験対象と同じ特徴を有する対象である。対照対象は、例えば処置または試験されている試験対象と全く同時にまたは殆ど同時に試験され得る。対照対象はまた、例えば、試験対象が試験される時間と別の時間にも試験され得、対照対象の試験の結果は、記録された結果が試験対象の試験により得られる結果と比較され得るように、記録され得る。

## 【 0 0 2 2 】

「試験」対象は、処置されている対象である。

50

「疾患」は、ホメオスタシスを維持することができない対象の健康状態であり、疾患が改善されない場合、対象の健康が悪化し続ける。対して、対象における「障害」は、対象がホメオスタシスを維持できるが、対象の健康状態が障害がない場合よりも好ましくない健康状態である。しかし、上述のような「疾患」および「障害」の定義は、具体的な習慣性疾患または障害に関連する定義または一般的使用に優先するものではない。

【0023】

疾患、状態または障害は、例えば疾患または障害の症状の重症度、患者にこのような症状が出る頻度、またはその両方が軽減する場合、「改善」されている。

本明細書中で使用される場合、「有効量」は、例えば、疾患または障害の症状の改善など、選択された効果を生じさせるのに十分な量を意味する。

10

【0024】

「発現のレベルを測定する」または「発現のレベルを決定する」という用語は、本明細書中で使用される場合、例えば、関心のある遺伝子またはタンパク質の発現のレベルとアッセイの結果を相互比較するために使用され得る何らかの測定またはアッセイを指す。このようなアッセイには、mRNA、タンパク質レベルなどのレベルを測定することが含まれ、ノーザンおよびウエスタンブロット分析、結合アッセイ、免疫ブロットなどのアッセイによって行われ得る。発現のレベルは発現率を含み得、存在するmRNAまたはタンパク質の実際の量について測定され得る。

【0025】

本明細書中で使用される場合、「医薬的に許容可能な担体」という用語は、例えば標準的な医薬担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水溶液、水、エマルジョン、例えば油/水または水/油エマルジョンなど、および様々なタイプの湿潤剤の何れをも含む。この用語はまた、米国連邦政府の規制官庁により承認されるかまたはヒトを含む動物での使用について米国薬局方で列挙される物質の何れをも包含する。

20

【0026】

「医薬的に許容可能な塩」という用語は、例えば、本発明の化合物の生物学的有効性および特性を保持し、生物学的にまたは他の面で望ましくないものではない塩を指す。多くの場合において、本発明の化合物は、アミノおよび/またはカルボキシル基またはそれらと同様の基の存在によって、酸性および/または塩基性塩を形成可能である。

【0027】

「特異的に結合する」という用語は、本明細書中で使用される場合、例えば、特異的な分子を認識し、それに結合するが、試料中の他の分子を実質的に認識しないかまたはそれに結合しない分子を意味する。

30

【0028】

「症状」という用語は、本明細書中で使用される場合、例えば、患者によって体験されるとともに疾患を示す、何らかの病的な現象、もしくは構造、機能または感覚における正常からの逸脱を指す。

【0029】

本明細書中で使用される場合、「処置する」という用語は、具体的な疾患、障害または状態の予防または具体的な疾患、障害または状態に付随する症状の改善および/または症状の予防もしくは消去を含み得る。「予防的」処置は、例えば、疾患に付随する病態を発現するリスクを低下させる目的のために、疾患の徴候を呈さないかまたは疾患の初期の兆候のみを呈する対象に施される処置である。「処置する (treating)」は、本明細書中で「処置 (treatment)」と交換可能に使用される。

40

【0030】

「治療的」処置は、例えば、症状を軽減するかまたは消去する目的のために、病変の症状を呈する対象に施される処置である。

化合物の「治療的有效量」は、例えば化合物が投与される対象に有益な効果を提供するのに十分な化合物の量である。

【0031】

50

本明細書中で使用される場合、「アミノ酸」は、次の表で示されるように、そのフルネームにより、それに対応する三文字コードにより、またはそれに対応する一文字コードにより、表される。

フルネーム	三文字コード	一文字コード
アスパラギン酸	A s p	D
グルタミン酸	G l u	E
リジン	L y s	K
アルギニン	A r g	R
ヒスチジン	H i s	H
チロシン	T y r	Y
システイン	C y s	C
アスパラギン	A s n	N
グルタミン	G l n	Q
セリン	S e r	S
スレオニン	T h r	T
グリシン	G l y	G
アラニン	A l a	A
バリン	V a l	V
ロイシン	L e u	L
イソロイシン	I l e	I
メチオニン	M e t	M
プロリン	P r o	P
フェニルアラニン	P h e	F
トリプトファン	T r p	W

10

20

「アミノ酸」という表現は、本明細書中で使用される場合、天然および合成アミノ酸の両方ならびにDおよびLアミノ酸の両方を含むものとする。「標準的アミノ酸」は、天然のペプチドで一般に見られる20種類の標準的なL-アミノ酸の何れかを意味する。「非標準的アミノ酸残基」は、それが合成により調製されるかまたは天然源由来であるかにかかわらず、標準的なアミノ酸以外の何らかのアミノ酸を意味する。本明細書中で使用される場合、「合成アミノ酸」はまた、化学的に修飾されたアミノ酸も包含し、塩、アミノ酸誘導体（アミドなど）および置換が挙げられるが限定されない。本発明のペプチド内に含有されるアミノ酸は、特にカルボキシまたはアミノ末端で、メチル化、アミド化、アセチル化またはそれらの活性に悪影響を与えることなくペプチドの循環半減期を変化させ得る他の化学基での置換により修飾され得る。さらに、ジスルフィド結合は、本発明のペプチド中に存在してもよく、または存在しなくてもよい。

30

## 【0032】

「アミノ酸」という用語は、「アミノ酸残基」と交換可能に使用され、遊離アミノ酸およびペプチドのアミノ酸残基を指し得る。この用語が遊離アミノ酸を指すかまたはペプチドの残基を指すかは、用語が使用される文脈から明らかとなる。

## 【0033】

アミノ酸は、側鎖Rに基づき7つの群に分類され得る：(1)脂肪族側鎖；(2)ヒドロキシル(OH)基を含有する側鎖；(3)硫黄原子を含有する側鎖；(4)酸性基またはアミド基を含有する側鎖；(5)塩基性基を含有する側鎖；(6)芳香環を含有する側鎖；および(7)側鎖がアミノ基に融合されるプロリン、イミノ酸。

40

## 【0034】

本明細書中で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」という用語は、次の5つの群のうち1つ内での交換として本明細書中で定義される。

I. 小型、脂肪族、非極性または僅かに極性の残基：

A l a、S e r、T h r、P r o、G l y；

II. 極性、負荷電残基およびそれらのアミド：

50

A s p、A s n、G l u、G l n ;  
 I I I . 極性、正電荷残基 :  
 H i s、A r g、L y s ;  
 I V . 大型、脂肪族、非極性残基 :  
 M e t L e u、I l e、V a l、C y s  
 V . 大型、芳香族残基 :  
 P h e、T y r、T r p

本明細書中で使用される場合、「核酸」という用語は、RNAならびに1本、2本および3本鎖DNAおよびcDNAを包含する。さらに、「核酸」、「DNA」、「RNA」という用語および同様の用語はまた、核酸類似体、すなわちホスホジエステルバックボーン以外を有する類似体も含む。例えば、当技術分野で公知であり、バックボーン中でホスホジエステル結合のかわりにペプチド結合を有する、いわゆる「ペプチド核酸」は、本発明の範囲内とみなされる。「核酸」とはまた、デオキシリボヌクレオシドまたはリボヌクレオシドから構成されるか、およびホスホジエステル結合または修飾結合、例えばホスホトリエステル、ホスホールアミデート、シロキサソ、カルボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホールアミデート、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホールアミデート、架橋ホスホールアミデート、架橋メチレンホスホネート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオエート、架橋ホスホロチオエートまたはスルホン結合およびこのような結合の組み合わせから構成されるかに関わらず、あらゆる核酸も意味する。核酸という用語はまた、具体的に、5種類の生体に存在する塩基（アデニン、グアニン、チミン、シトシンおよびウラシル）以外の塩基から構成される核酸も含む。ポリヌクレオチド配列を記載するために従来の表記法が本明細書中で使用され：1本鎖ポリヌクレオチド配列の左手の末端は5'末端であり；2本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は5'方向と呼ばれる。新生RNA転写産物に対するヌクレオチドの5'から3'の付加方向は、転写方向と呼ばれる。mRNAと同じ配列を有するDNA鎖は「コード鎖」と呼ばれ；DNA上の参照点に対して5'に位置するDNA鎖上の配列は「上流配列」と呼ばれ；DNA上の参照点に対して3'にあるDNA鎖上の配列は「下流配列」と呼ばれる。

#### 【0035】

別段の断りがない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型であり、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含み得る。

#### 【0036】

「相同」とは、本明細書中で使用される場合、2つのポリマー分子間、例えば2つの核酸分子間、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子間または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列類似性を指す。この2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じ単量体のサブユニットにより占有される場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおける位置がアデニンにより占有される場合、これらは、その位置において相同である。2つの配列間の相同性は、一致または相同位置の数の正の関数であり、例えば、2つの化合物配列中の位置の半分（例えば、10サブユニット長のポリマー中の5つの位置）が相同である場合、この2つの配列は50%相同であり、位置の90%、例えば10のうち9が一致するかまたは相同である場合、この2つの配列は90%相同性を共有する。例として、DNA配列3'ATTGCC5'および3'TATGGCは50%相同性を共有する。

#### 【0037】

本明細書中で使用される場合、「相同性」は、「同一性」と同意語として使用される。

2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して遂行され得る。例えば、2つの配列を比較するのに有用な数学的アルゴリズムは、カーリン(Karlin)およびアルトシュル(Altschul)(1990年、米国科学アカデミー紀要(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第

10

20

30

40

50

87巻、p. 2264~2268)のアルゴリズムであり、カーリン(Karlin)およびアルトシュル(Altschul)(1993年、米国科学アカデミー紀要(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第90巻、p. 5873~5877)におけるように改変されている。このアルゴリズムは、アルトシュル(Altschul)ら(1990年、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.))、第215巻、p. 403~410)のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれ、例えば国立生物工学情報センター(NCBI: National Center for Biotechnology Information)のワールドワイドウェブサイトを利用して利用可能である。BLASTヌクレオチド検索は、例えば、本明細書中に記載の核酸と相同であるヌクレオチド配列を得るために、次のパラメータ: ギャップペナルティー=5; ギャップ伸長ペナルティー=2; ミスマッチペナルティー=3; 一致報酬=1; 予想値10.0; およびワードサイズ=11を用いて、NBLASTプログラム(NCBIウェブサイトでは「blastn」と呼ばれる)を用いて行い得る。BLASTタンパク質検索は、本明細書中に記載のタンパク質分子と相同であるアミノ酸配列を得るために、次のパラメータ: 予想値10.0、BLOSUM62スコアリングマトリクスを用いて、XBLASTプログラム(NCBIウェブサイトでは「blastn」と呼ばれる)またはNCBI「blastp」プログラムにより行い得る。比較目的に対してギャップ付きアライメントを得るために、アルトシュル(Altschul)ら(1997年、ヌクレック・アシズ・リサーチ(Nucleic Acid Res.))、第25巻、p. 3389~3402)に記載のようにギャップ付きBLASTを利用し得る。あるいは、分子間の遠縁関係(Id.)および共通パターンを共有する分子間の関係を検出する繰り返し検索を行うために、PSI-BlastまたはPHI-Blastを使用し得る。BLASTを利用する場合、ギャップ付きBLAST、PSI-BlastおよびPHI-Blastプログラム、個々のプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)の初期設定パラメータを使用し得る。

#### 【0038】

2つの配列間のパーセント同一性は、ギャップを許可するか、または許可せずに、上記のものと同様の技術を用いて決定し得る。パーセント同一性の計算において、一般的には完全一致を計数する。

#### 【0039】

「含む(comprises)」、「含むこと(comprising)」などの用語は、米国特許法においてそれらに帰するとみなされる意味を有し得、「含む(includes)」、「含むこと(including)」などを意味し得る。本明細書中で使用される場合、「含むこと(including)」または「含む(includes)」などは、限定なく含むことを意味する。

#### 【0040】

##### TALENS

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)は、TALエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることにより作製される人工的制限酵素である。これらの試薬は、効率的でプログラム可能で特異的なDNA切断を可能にし、インサイチューでのゲノム編集のための強力なツールとなる。転写活性化因子様エフェクター(TALE)は、何らかのDNA配列を実際に結合させるために迅速に設計され得る。TALENという用語は、本明細書中で使用される場合、幅広く、別のTALENなく自力で2本鎖DNAを切断し得る単量体のTALENを含む。TALENという用語はまた、同じ部位でDNAを切断するために一緒に機能するように設計されるTALENのペアの片方または両方のメンバーを指すためにも使用される。一緒に機能するTALENは、DNAの掌性を基準として、左TALENおよび右TALENとも呼ばれ得る。全て参照によりその全体が組み込まれる、米国特許出願第12/965,590号明細書; 米国特許出願第13/426,991号明細書(米国特許第8,450,471号明細書); 米国特許出願第13/427,040号明細書(米国特許第8,440,431号明細書

10

20

30

40

50

); 米国特許出願第 13 / 427, 137 号明細書 (米国特許第 8, 440, 432 号明細書); および米国特許出願第 13 / 738, 381 号明細書を参照されたい。

#### 【0041】

TAL エフェクターは、キサントモナス (*Xanthomonas*) 菌により分泌されるタンパク質である。DNA 結合ドメインは、12 番目および 13 番目のアミノ酸を除き、保存性が高い 33 ~ 34 アミノ酸配列を含有する。これらの 2 つの位置は、非常に可変性であり (反復可変性二残基) (RVD)、特異的なヌクレオチド認識との強い相関を示す。アミノ酸配列と DNA 認識との間のこの単純な関係性によって、適切な RVD を含有する繰り返しセグメントの組み合わせを選択することにより、特異的な DNA 結合ドメインの設計が可能となる。

10

#### 【0042】

酵母アッセイにおいて活性であるハイブリッドヌクレアーゼを構築するために、FokI エンドヌクレアーゼの末端由来の非特異的な DNA 切断ドメインを使用することができる。これらの試薬はまた、植物細胞において、および動物細胞においても活性がある。最初の TALEN 実験は野生型 FokI 切断ドメインが使用されたが、数回のその後の TALEN 実験では、切断特異性および切断活性を向上させるように設計された突然変異がある FokI 切断ドメイン変異体も使用された。FokI ドメインは二量体として機能し、正しい方向およびスペーシングで標的ゲノム中の部位に対する特有の DNA 結合ドメインを有する 2 つのコンストラクトを必要とする。TALEN DNA 結合ドメインと FokI 切断ドメインとの間のアミノ酸残基数および 2 つの個別の TALEN 結合部位間の塩基数の両方が、高い活性レベルを達成するためのパラメータとなる。TALEN DNA 結合ドメインと FokI 切断ドメインとの間のアミノ酸残基数は、複数の TAL エフェクター反復配列と FokI エンドヌクレアーゼドメインとの間へのスペーサ (スペーサ配列とは異なる) の導入によって変更され得る。スペーサ配列は 12 ~ 30 ヌクレオチドであり得る。

20

#### 【0043】

TALEN 結合ドメインのアミノ酸配列と DNA 認識との間の関係によって、設計可能なタンパク質が得られる。この場合、人工的遺伝子合成は、TALE 結合ドメインで見られる反復配列の不正確なアニーリングのために問題となる。これに対するある解決策としては、公開されているソフトウェアプログラム (DNA Works) を使用して 2 段階 PCR においてアセンブリに適切なオリゴヌクレオチドを推定し; オリゴヌクレオチドアセンブリに続き、全遺伝子増幅を行うことである。また、設計された (人工) TALE コンストラクトを作製するための多くのモジュラーアセンブリスキームも報告されている。両方の方法から、ジンクフィンガー DNA 認識ドメインを生成させるためのモジュラーアセンブリ法と概念的に同様の、DNA 結合ドメインを設計することに対する体系的なアプローチが与えられる。

30

#### 【0044】

TALEN 遺伝子がアセンブリされると、それらはプラスミド内に挿入され; 次いで、そうしたプラスミドは、標的細胞に遺伝子移入するために使用され、この標的細胞において、遺伝子産物が発現されて核に侵入しゲノムに接近する。TALEN は、2 本鎖破壊 (DSB) を誘導することによりゲノムを編集するために使用され得、細胞が修復機構によって反応する。このようにして、これらは、例えば疾患を引き起こすゲノム中の突然変異を修正するために使用され得る。

40

#### 【0045】

##### ベクターおよび核酸

遺伝子の発現を得るために、様々な核酸が細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、核酸という用語は、DNA、RNA および核酸類似体ならびに 2 本鎖または 1 本鎖である核酸 (すなわちセンスまたはアンチセンス 1 本鎖) を含む。核酸類似体は、例えば核酸の安定性、ハイブリッド形成または溶解度を改善するために、塩基部分、糖部分またはリン酸バックボーンにおいて修飾され得る。塩基部分での修飾には、デオキシチミジ

50

ンに対するデオキウリジンおよびデオキシシチジンに対する 5 - メチル - 2' - デオキシシチジンおよび 5 - プロモ - 2' - ドキシシチジン (doxycytidine) が含まれる。糖部分の修飾としては、2' - O - メチルまたは 2' - O - アリル糖を形成させるための、リボース糖の 2' ヒドロキシルの修飾が挙げられる。デオキシリボースリン酸バックボーンは、モルホリノ核酸を生成させるために修飾され得、各塩基部分は、6 員の、モルホリノ環またはペプチド核酸に連結され、デオキシリン酸バックボーンはシュードペプチドバックボーンにより置換され、4 個の塩基が保持される。サマートン (Sumerton) およびウェラー (Weller) 著、1997 年、アンチセンス・ヌクレイック・アシッド・ドラッグ・デベロップメント (Antisense Nucleic Acid Drug Dev.)、第 7 巻 (3)、p. 187; およびハイラップ (Hyrap) 著、1996 年、バイオオーガニック・アンド・メディシナル・ケミストリー (Bioorgan. Med. Chem.)、第 4 巻、p. 5 を参照されたい。さらに、デオキシリン酸バックボーンは、例えばホスホロチオエートまたはホスホロジチオエートバックボーン、ホスホロアミダイトまたはアルキルホスホトリエステルバックボーンで置換され得る。

10

## 【0046】

核酸配列は、プロモータなどの制御領域に操作可能に連結され得る。制御領域は、あらゆる種由来であり得る。本明細書中で使用される場合、操作可能に連結されるとは、標的核酸の転写を許可または促進するような核酸配列に対する制御領域の配置を指す。あらゆるタイプのプロモータが核酸配列に操作可能に連結され得る。プロモータの例としては、組織特異的なプロモータ、構成的プロモータおよび特定の刺激に反応性があるかまたは非反応性であるプロモータ (例えば誘導性プロモータ) が挙げられるが限定されない。

20

## 【0047】

核酸コンストラクトにおいて有用であり得るさらなる制御領域としては、ポリアデニル化配列、翻訳調節配列 (例えば、内部リボソーム進入セグメント、IRES: internal ribosome entry segment)、エンハンサー、誘導性エレメントまたはイントロンが挙げられるが限定されない。このような制御領域は必要でない場合があるが、これらは、転写、mRNA の安定性、翻訳効率などに影響を及ぼすことによって発現を向上させ得る。このような制御領域は、細胞における核酸の最適な発現を得るために必要な場合、核酸コンストラクトに含まれ得る。しかし、このようなさらなるエレメントなく、十分な発現を得ることができるともある。

30

## 【0048】

シグナルペプチドまたは選択可能マーカをコードする核酸コンストラクトが使用され得る。コードされるポリペプチドが特定の細胞内の位置 (例えば細胞表面) に向けられるように、シグナルペプチドが使用され得る。選択可能マーカの非限定例としては、ピューロマイシン、ガンシクロビル、アデノシンデアミナーゼ (ADA: adenosine deaminase)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (neo、G418、APH: aminoglycoside phosphotransferase)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR: dihydrofolate reductase)、ハイグロマイシン - B - ホスホトランスフェラーゼ、チミジンキナーゼ (TK: thymidine kinase) およびキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPR: xanthin-guanine phosphoribosyltransferase) が挙げられる。このようなマーカは、培養中で安定な形質転換体を選択するために有用である。他の選択可能マーカとしては、蛍光ポリペプチド、例えば緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質が挙げられる。

40

## 【0049】

様々な技術を用いて、あらゆるタイプの細胞に核酸コンストラクトが導入され得る。技術の非限定例としては、トランスポゾン系、細胞に感染し得る組み換えウイルスもしくはリボソーム、または細胞への核酸送達が可能なる他の非ウイルス法、例えばエレクトロポレーション、マイクロインジェクションまたはリン酸カルシウム沈殿などの使用が挙げられ

50

る。

【0050】

核酸はベクターに組み込まれ得る。ベクターは、担体から標的DNAへ移動するために設計される何らかの特異的なDNAセグメントを含む広義の用語である。ベクターは、発現ベクターまたはベクター系と呼ばれ得、これは、ゲノムまたは他の標的とされるDNA配列へのDNA挿入を引き起こすのに必要とされる一連の要素であり、例えばエピソーム、プラスミド、またはさらにはウイルス/ファージDNAセグメントなどである。ベクターは、多くの場合、1つ以上の発現調節配列を含む1つ以上の発現カセットを含有し、ここで発現調節配列は、それぞれ、別のDNA配列またはmRNAの転写および/または翻訳を調節および制御するDNA配列である。

10

【0051】

多くの異なるタイプのベクターが知られている。例えば、プラスミドおよびウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターが知られている。哺乳動物発現プラスミドは、一般に、複製起点、適切なプロモータおよび任意のエンハンサーを有し、また何らかの必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列および5'フランキング非転写配列も有する。ベクターの例としては、プラスミド(別のタイプのベクターの担体でもあり得る)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV: adeno-associated virus)、レンチウイルス(例えば、改変HIV-1、SIVまたはFIV)、レトロウイルス(例えば、ASV、ALVまたはMoMLV)およびトランスポゾン(例えばスリーピングビューティ(Sleeping Beauty)、P-エレメント、Tol-2、フロッグプリンス(Frog Prince)、ピギーバック(piggyBac))が挙げられる。

20

【0052】

治療用途

TALENに基づく遺伝子修正は、多くの臨床および前臨床(例えば研究)適用を有する。例えば、TALENに基づく遺伝子修正は、突然変異が疾患へとつながる遺伝子を修正するために使用され得る。例えば、表皮水疱症、骨形成不全症、先天性角化不全症、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症(CFTR)、ファンコニ貧血、スフィンゴリピドーシス、リポフスチン沈着症、副腎白質ジストロフィー、重症複合型免疫不全、鎌状赤血球貧血、サラセミアなどであるが限定されない、挿入および欠失を含む小さな塩基変化を特徴とする何らかの疾患である。

30

【0053】

ある実施形態において、疾患は表皮水疱症である。劣性栄養障害型表皮水疱症(RDEB)は、VII型コラーゲン(COL7A1)遺伝子における遺伝子欠損によるVII型コラーゲンタンパク質の機能障害を特徴とする。この遺伝子は、VII型コラーゲンの鎖をコードする。3本の同一のコラーゲン鎖から構成されるVII型コラーゲン原線維は、重層扁平上皮の下の基底ゾーンに限定されている。これは、外側の上皮と下層の基質との間のアンカー原線維として機能する。この遺伝子における突然変異は、栄養障害性表皮水疱症のすべての型に関連する。

【0054】

COL7A1は、3p21.31で示される染色体領域のヒト3番染色体の短腕に位置する(Ensembl番号: ENSG00000114270)。この遺伝子は、およそ31,000塩基対のサイズであり、そのコード配列は、118個のエクソンに断片化されており、配列番号32を参照されたい。

40

【0055】

COL7A1は、9,287塩基対のmRNA(ヒトmRNAおよびタンパク質に対する受入番号はそれぞれNM\_000094およびNP\_000085)に転写される。皮膚において、VII型コラーゲンタンパク質は、ケラチン産生細胞および皮膚繊維芽細胞によって合成される。マウスにおけるオルソログ遺伝子に対するシンボルはCol7a1である(マウスmRNAおよびタンパク質に対する受入番号はそれぞれNM\_0073

50

8 および N P \_ 0 3 1 7 6 4 である)。

【 0 0 5 6 】

R D E B を有する者は、不治の、しばしば致命的な皮膚水疱形成を呈し、高悪性度の扁平上皮癌に対するリスクが上昇する<sup>1</sup>。遺伝子増強療法は有望であるが、挿入突然変異誘発のリスクがある。したがって、R D E B 患者の細胞における正確なゲノム編集のための人工転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N ) を本明細書中で記載する。外来性ドナー鋳型からの相同組み換え修飾 ( H D R ) につながる部位特異的な 2 本鎖 D N A 破壊 ( D S B ) を誘導する T A L E N の能力が本明細書中に記載されている。このプロセスは、C O L 7 A 1 遺伝子突然変異修正ならびに正常遺伝子およびタンパク質発現の復元をもたらした。この試験は、個人向けゲノム薬に対する構想の実証を提供し、これは、繊維芽細胞における内在性ヒト遺伝子の最初の T A L E N 介在性インサイチュー修正である。

10

【 0 0 5 7 】

T A L E N に基づく遺伝子修正により修飾しようとする細胞は、患者から、またはドナーから得ることができる。この細胞は、繊維芽細胞、ケラチン産生細胞、誘導型多能性、造血、間葉系および胚性幹細胞、造血子孫細胞、例えば T 細胞、B 細胞など、グリアおよびニューロン、神経膠前駆および幹細胞、筋肉細胞、肺細胞、膵臓および肝臓細胞および/または網内系の細胞) などのあらゆるタイプであり得る。T A L E N に基づく遺伝子修正により修飾されると、細胞を増大させ、および/または疾患を処置するために患者に投与し得る。

20

【 0 0 5 8 】

マトリクスは、特異的な解剖学的部位に本発明の細胞を送達するために使用され得る。ここで、特定の増殖因子が、マトリクスに組み込まれてもそうでなくともよく、または細胞による取り込みのためにマトリクスに組み込まれるプラスミド上にコードされてもそうでなくともよく、最初の細胞集団の増殖を誘導するために使用され得る。サイトカイン、増殖因子またはホルモンをコードするプラスミド D N A は、ポリマー遺伝子活性化マトリクス担体内に封じ込められ得る。そうした生体分解性ポリマーは、処置が所望される部位の付近にその後移植される。

【 0 0 5 9 】

本明細書中に記載の目的のために、本発明の自己の、同種のまたは異種の ( x e o n g e n i c ) 細胞の何れかが、事前に選択された部位への、全身的または受容可能なマトリクスの表面上もしくはその周囲への直接注射によって、または医薬的に許容可能な担体と組み合わせて、患者に投与され得る。

30

【 0 0 6 0 】

さらに、核酸コンストラクトまたはタンパク質は、例えば医薬的に許容可能な担体とともに、対象に局所的にまたは全身的に投与され得る。

細胞の増殖 / 増大

T A L E N に基づく遺伝子修正により修飾しようとする細胞は、患者から、またはドナーから得ることができる。この細胞は、繊維芽細胞などのあらゆるタイプの細胞であり得る。T A L E N に基づく遺伝子修正により修飾されると、細胞は、疾患を処置すべく、増殖されおよび/または患者に投与され得る。

40

【 0 0 6 1 】

細胞は、当技術分野で確立されており、アメリカ培養細胞系統保存機関 ( A T C C : A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ) 、インビトロジェン ( I n v i t r o g e n ) および他の会社から市販されている培養液中で培養し得る。このような培地としては、ダルベッコ変法イーグル培地 ( D M E M : D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m ) 、D M E M F 1 2 培地、イーグル最小必須培地、F - 1 2 K 培地、イスコブ変法ダルベッコ培地、ノックアウト D - M E M または R P M I - 1 6 4 0 培地が挙げられるが限定されない。使用される細胞に対して必要とされる場合、培地および/または培地サプリメントの濃度を変更するかまたは調

50

整することは、当業者の技術の範囲内である。ビルビン酸ナトリウムを含むかまたは含まない低グルコース処方物として多くの培地が利用可能であることも明らかである。

【0062】

細胞培養液に哺乳動物血清を補給することも企図される。血清は、生存能および増大に必要とされる細胞性因子および成分を含有することが多い。血清の例としては、ウシ胎児血清 (FBS: fetal bovine serum)、ウシ血清 (BS: bovine serum)、仔ウシ血清 (CS: calf serum)、ウシ胎児血清 (FCS: fetal calf serum)、新生仔ウシ血清 (NCS: newborn calf serum)、ヤギ血清 (GS: goat serum)、ウマ血清 (HS: horse serum)、ヒト血清、ニワトリ血清、ブタ血清、ヒツジ血清、ウサギ血清、ラット血清 (RS: rat serum)、血清代替物 (ノックアウト血清代替物 (KSR: KnockOut Serum Replacement、インビトロジェン (Invitrogen)) を含むが限定されない) およびウシ胎児体液が挙げられる。補力スケードの成分を不活性化するために必要とされるとみなされる場合、55~65 で血清を熱不活性化し得ることが理解される。1つ以上の所望の細胞タイプの生存を促進するために、血清濃度の変更または培養液からの血清の除去も使用され得る。ある実施形態において、FBS / または種細胞タイプに特異的な血清の存在下で細胞を培養する。例えば、細胞は、単離され得、および / または約5%~約15%以上、例えば約20%、約25%または約30%などを含む、約0.5%~約5%以上の総血清 (例えばFBS) または血清代替物濃度で増大させられ得る。血清の濃度は経験的に決定され得る。

10

20

【0063】

最適増殖および増大のための微量要素を細胞に補給するために、さらなるサプリメントも使用され得る。このようなサプリメントとしては、インスリン、トランスフェリン、セレン酸ナトリウムおよびそれらの組み合わせが挙げられる。これらの成分は、ハンクス平衡塩類溶液 (商標) (HBSS: Hank's Balanced Salt Solution)、アール塩溶液 (Earle's Salt Solution) (商標)、抗酸化剤サプリメント、MCDB-201 (商標) サプリメント、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: phosphate buffered saline)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-エタンスルホン酸 (HEPES: hydroxyethyl piperazine-N'-ethanesulfonic acid)、ニコチンアミド、アスコルビン酸および / またはアスコルビン酸-2-ホスフェートならびにさらなるアミノ酸などであるが限定されない塩溶液中に含まれ得る。多くの細胞培養液はアミノ酸を既に含有するが、しかし、一部のものは細胞を培養する前に補給を必要とする。このようなアミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-システイン、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イノシトール、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシンおよびL-バリンが挙げられるが限定されない。

30

【0064】

細菌、マイコプラズマおよび真菌混入を減ずるために抗生物質もまた一般に細胞培養中で使用される。一般に、使用される抗生物質または抗真菌性化合物はペニシリン/ストレプトマイシンの混合物であるが、アンホテリシン (ファンギゾン (商標))、アンピシリン、ゲンタマイシン、プレオマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ナリジクス酸、ネオマイシン、ナイスタチン、パロモマイシン、ポリミキシン、ピューロマイシン、リファンピシン、スペクチノマイシン、テトラサイクリン、タイロシンおよびゼオシンも挙げられ得るが限定されない。

40

【0065】

ホルモンもまた、細胞培養において有利に使用され得、D-アルドステロン、ジエチルステルベストロール (DES: diethylstilbestrol)、デキサメタゾ

50

ン、 - エストラジオール、ヒドロコルチゾン、インスリン、プロラクチン、プロゲステロン、ソマトスタチン/ヒト成長ホルモン (HGH: human growth hormone)、甲状腺刺激ホルモン、チロキシンおよびL - チロニンが挙げられるが限定されない。 - メルカプトエタノールも細胞培養液に補給され得る。

【0066】

細胞のタイプおよび分化細胞に応じて、細胞培養液に補給するために脂質および脂質担体も使用され得る。このような脂質および担体としては、とりわけ、サイクロデキストリン(、)、コレステロール、アルブミンに結合されたりノール酸およびオレイン酸、非結合リノール酸、アルブミンに結合されたりノール - オレイン - アラキドン酸、アルブミンに結合されないかまたは結合されたオレイン酸が挙げられ得るが限定されない。アルブミンは、脂肪酸不含処方において同様に使用され得る。

10

【0067】

培養中の細胞は、懸濁液中か、または、細胞外マトリクス成分や合成ポリマーまたはバイオポリマーなどの固体支持体に付着させるかの何れかで維持され得る。細胞は、I型、II型およびIV型コラーゲン、コンカナバリンA、コンドロイチン硫酸、フィブロネクチン、「スーパーフィブロネクチン」および/またはフィブロネクチン様ポリマー、ゼラチン、ラミニン、ポリ - Dおよびポリ - L - リジン、マトリゲル(商標)、トロンボスポンジンおよび/またはピトロネクチンなど、固体支持体へのそれらの付着を促すさらなる因子(例えば付着因子)を必要とすることが多い。

【0068】

様々な密度で細胞を培養し得、例えば、細胞は、様々な密度で培養皿に播種が行われ得るか、または維持され得る。例えば、約2000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも低い濃度(例えば、12ウェル平底増殖面積: 3.8cm<sup>2</sup> ウェル体積: 6.0mLまたはウェルID×深さ(mm)22.1×17.5; ウェル容量(mL)6.5、増殖面積(cm<sup>2</sup>)3.8)を含むが限定されない密度であり、約1500個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも低い濃度、約1,000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも低い濃度、約500個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも低い濃度、または約200個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも低い濃度を含む。細胞はまた、より高密度で播種または維持され得、例えば、約2,000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約2,500個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約3,000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約3,500個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約4,000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約4,500個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約5,000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約5,500個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約6,000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約6,500個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約7,000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度、約7,500個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度または約8,000個細胞/12ウェルプレートのウェルよりも高い濃度である。

20

30

【0069】

[実施例]

次の例は、本発明のある一定の実施形態および態様を明らかにし、さらに説明するために提供されるものであり、その範囲を限定するものと解釈すべきものではない。

【0070】

(実施例1)

材料および方法。

試験対象および細胞株誘導。

【0071】

親権者のインフォームドコンセントを得た後、本発明者らは、同型接合c.1837C>T未成熟終止コドン突然変異を有する男性RDEB患者の皮膚からパンチ生検を得た。

40

50

ミネソタ大学治験審査委員会 ( University of Minnesota Institutional Review Board ) から、ヒト対象における試験に対する承認が得られた。初代繊維芽細胞の細胞株を得て、低酸素濃度条件で維持した。

【 0 0 7 2 】

T A L E N およびドナー構築。

図 1 A に記載の T A L E N 候補を、ゴールデンゲートアセンブリ ( Golden Gate Assembly ) 法を介して作製し、記載されるような C A G G プロモータ駆動性 F o k I エンドヌクレアーゼのホモ二量体に挿入した [ 1、2 ]。表 1 で示される L A F および L A R プライマーを用いて左ドナーアームを増幅させた。記載のように重複オリゴヌクレオチドアセンブリストラテジーを用いて 2 個の断片 ( 内側および外側 ) において

10

【 0 0 7 3 】

【 表 1 】

RDEBのためのTALEN修正

C06	外側フラグメント 1-12	TCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCTTAGGAGAGAAGCGGAGGAATC
C07	C7GT1	Alcgtccacalcccgtctctt
C08	C7APAF	CAAAGGGACCAATGAGGGTA
C09	C7GT2	tctagtgaggagagcaatg
C10	RT1	TCGACTTGGATGACGTTTCA
C11	RT2	GTTCCGAGCCACGATGACTG
C12	サーベイヤF	ttcagccalalcccagctc
D01	サーベイヤR	tgctccagetaalcccgaat
D02	オリゴ二重鎖上	G <sup>+</sup> T <sup>+</sup> CCGTACGGATCCAAGCTTCGTCGACCTAGCC
D03	オリゴ二重鎖下	CATGCCATAGGTTTCAAGCAGCTGGATCGGG <sup>+</sup> A <sup>+</sup> C
D04	リンカーF	GGATCCAAGCTTCGTCGACCTAGCC
D05	ssODNドナー (PAGE精製)	tctgctgccc lgtccalcaac lgtccatgctc ccaacalccc tctctcttctt gaccctgcccacct
D06		agtagtgggcccggctgtgtgtgtctctgglaa cttagag atoocttagaaccttagct actggaglaac gmcaggctg gcttagctca cactgtgag gtygtgctc gtaggggac ccgttagggc a
D07	オフターゲットサーベイヤプライマー	
D08	1q23.3 FWD	TCTCAGGCAAGAAAATTGGA
D09	1q23.3 REV	TGTGCATTTATTCTGTGTCTTGT
D10	5q33.1 FWD	GAGTTCCTTGGGCCTATTC
D11	5q33.1 REV	GGCTGCACTGAGCTATGATG
D12	7q21.3 FWD	ACTCCAAGTCACAGGGGATG
E01	7q21.3 REV	CAGCTCTGACTGCTGTTTGC
E02	16p13.3 FWD	TTGCTCACAGAAGACCACA
E03	16p13.3 REV	ACGTGGGTGTGACGGTTATT

20

遺伝子導入。

30

【 0 0 7 4 】

全ての T A L E N 処置は、次の機器設定 : 1 5 0 0 V、2 0 m s パルス幅および単一パルスでの、ネオン ( Neon ) 遺伝子移入系 ( ライフサイエンス ( Life Sciences ) ) を介した、2 . 5 μ g の各 T A L E N および 1 0 μ g 量のドナーの送達から構成された。遺伝子導入から 4 8 時間後、3 1 C で細胞を温置した [ 5 ]。

【 0 0 7 5 】

細胞培養。

細胞を、2 0 % F B S、1 0 0 U / m L 非必須アミノ酸、並びに各 0 . 1 m g / m L のペニシリンおよびストレプトマイシン ( インビトロジェン ( Invitrogen ) ) がそれぞれ補給された D M E M から構成される増殖培地中に維持し、2 % O <sub>2</sub>、5 % C O <sub>2</sub> および 3 7 C で培養した。

40

【 0 0 7 6 】

サーベイヤヌクレアーゼ。

ゲノム DNA を、T A L E N 遺伝子導入から 4 8 時間後に単離するとともに、サーベイヤ F プライマーおよびサーベイヤ R プライマーを用いて 3 0 サイクル増幅させ、記載のようにサーベイヤヌクレアーゼ処理に供した [ 6 ]。1 0 % T B E P A G E ゲル ( インビトロジェン ( Invitrogen ) ) 上で生成物を分離した。オフターゲットのアンプリコンについて、P C R 反応を 3 5 サイクル進めており、プライマーは全て表 1 に列挙されている。

【 0 0 7 7 】

50

相同組み換え修復分析。

HDRの定量のために、T A L E Nおよび5  $\mu$  Lの40  $\mu$  Mの1本鎖オリゴヌクレオチドドナーを細胞に遺伝子移入し、3種類のプライマー：サーベイヤF、サーベイヤRおよびリンカーフォワードプライマーを用いて、48時間でPCRによりスクリーニングした。記載のように、デンシトメトリーを行った[6]。遺伝子修正のために、各2.5  $\mu$  gのT A L E N DNAとともに10  $\mu$  gのドナープラスミドを導入し、次に記載のように選択を行った。

【0078】

選択。

細胞を、0.2  $\mu$  g/mLピューロマイシンにおいてバルクで選択し、サブプールに分離し、HDRについてスクリーニングし、次いで10  $\text{cm}^2$  皿中に低密度(250~750個の総細胞)で播種した。10 ng/mL上皮増殖因子および0.5 ng/mL繊維芽細胞増殖因子を補給した基礎培地の存在下で、シリコングリース付きのクローニングディスク(全てコーニング(Corning)から)を単一細胞上に置いた。連続的に容器を大きくして、細胞を増大させた。アデノウイルスcreコンビナーゼを20のMOIで添加してPGKピューロマイシンカセット(ベクターバイオラボズ(Vector Biolabs))を除去した。

【0079】

細胞修正分子スクリーニング。

C7GT1およびC7GT2プライマー対を使用して、ドナーからの連結部を内在性遺伝子座へと増幅させた(上流SPMPスクリーニング)。ApaI SPMP領域を、C7APAFおよびC7GT2でのPCR増幅前および後にApaIで処理したゲノムDNA上で評価した。クローン性単離株からのメッセンジャーRNAをcDNAに変換し、RT1およびRT2によりスクリーニングし、次いでApaIで消化した。ApaI耐性アンプリコンをクローニングし、サンガー配列決定を行った。

【0080】

細胞増大分析。

遺伝子修正した繊維芽細胞を、T150フラスコ中で増大させ、トリプシン処理して単一細胞懸濁液を得た。次いで100  $\mu$  L PBS+0.5%BSA+ヨウ化プロピジウム(イーバイオサイエンス(eBiosciences))中で細胞を再懸濁し、続いて等体積のPKH26参照マイクロビーズ(シグマ(SIGMA))を添加した。5000個のビーズ事象を回収し、製造者のプロトコール(シグマ(SIGMA))に従い、明白な生存可能細胞数を算定した。

【0081】

iPSC作製および奇形腫アッセイ。

遺伝子修正された繊維芽細胞(または対照としての未修正細胞)を、[7、8]に記載のようにiPSCに対して再プログラムし、次いで可視的な塊が形成されるまでSCIDマウスの側腹部に入れた。包埋し染色するために塊を切除した。

【0082】

免疫蛍光。

遺伝子修正した細胞を、チャンバースライド上に置き、24時間後に4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.2%TritonXにより浸透処理し、1%BSAでブロック処理し、ポリクローナル抗VII型コラーゲン抗体(1:1500;デビッド・ウッドリー(David Woodley)博士およびメイ・チェン(Mei Chen)博士より厚意で提供された)で染色した。二次抗体染色は、ロバ抗ウサギIgG Cy3(1:500;ジャクソンイムノリサーチ(Jackson ImmunoResearch))で行った。アイソタイプ対照染色は、全分子ウサギIgG(ジャクソンイムノリサーチ(Jackson ImmunoResearch))を用いて行った。4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(ベクター・ラボラトリーズ(Vector Laboratories))で核を染色した。画像は、オリンパスBX61 FV500共焦

10

20

30

40

50

点顕微鏡（オリンパス株式会社）で745のPMT電圧を用いて撮影し、フルオビュー（Fluoview）ソフトウェアバージョン4.3を用いて分析した。ライカ顕微鏡上で光学顕微鏡検査を実施した。

#### 【0083】

IDLVおよびLAM-PCR/nrLAM PCR。

CMV-GFP導入ベクター、D64Vインテグラーゼ突然変異を有するpCMV-R8.2パッケージングプラスミド[9、10]、およびpMD2.VSV-Gエンベロープをコードするプラスミドについての、脂質ベース同時遺伝子導入（リポフェクタミン（Lipofectamine）2000、インビトロジェン（Invitrogen））を介して、インテグラーゼ欠損型レンチウイルス（IDLV: Integrase-defective lentiviral）粒子を293T細胞において生成させた。TALENを用いたHEK293細胞のヌクレオフェクション（nucleofection）によって遺伝子タグ付加を行い、続いて24時間後、7のMOIでGFP IDLVの導入を行った。酵素MseIおよびTsp509Iを用いたLAM-PCR[11]およびnrLAM-PCR[12]によって100ngのゲノムDNAを二重分析し、IDLV組み込み部位のゲノム全域にわたる回復を確認した。（nr）LAM-PCRアンプリコンを、ロシュ（Roche）/454ピロシーケンスプラットフォームによって配列決定し、HISAPパイプラインを用いて組み込み部位データを分析した[13]、[14]、[15]。パターン・マッチャー・スキャン・フォー・マッチーズ（pattern matcher scan-for-matches）を用いて、潜在的TALEN オフターゲット結合部位について、近距離で>1 ISを有するゲノム位置をスキャンした[13]。

#### 【0084】

##### 結果/考察

真皮表皮接合部（DEJ: dermal-epidermal junction）でのVII型コラーゲンタンパク質の喪失は、皮膚の構造完全性の損失をもたらす。同種由来の全身造血細胞または局所繊維芽細胞移植によるDEJでのVII型コラーゲンの蓄積の還元は、症状を改善し得る[16~18]。しかし、毒性、感染および移植失敗のリスクのために同種細胞移植の有効性は最適とは言えないため、新規の自己細胞に基づく治療の開発の推進が急がれる。したがって、本明細書中でTALEN技術に基づくCOL7A1修正に対するゲノム編集ストラテジーを記載する。繊維芽細胞は、その誘導が容易なことおよび培養において増殖停止に対して低感受性であることならびにそれらのDEJでのVII型コラーゲン沈着能ゆえに、理想的な細胞タイプである[18、19]。TALENは、使用者が定めたゲノム遺伝子座で2本鎖DNA破壊を誘導し得、したがってHDRを刺激する人工ヌクレアーゼであり、それらの標的化能および作製が容易なことにおいて他のヌクレアーゼよりも優れている[20、21]。

#### 【0085】

TALエフェクター-ヌクレオチド・ターゲッター（Effector-Nucleotide Targeter）ソフトウェア[22、23]は、ヒトCOL7A1遺伝子座について68個の潜在的TALEN部位を同定し、RDEBおよび突然変異配列の位置および数の不均一性を呈する他の疾患を考慮すると、TALENに対する高い標的化能を強調する大きな一連のヒト遺伝子に関する最近の実験データ[21]を裏付ける。COL7A1遺伝子のエクソン14中の未成熟終止コドンの近位にある患者特異的なヌクレアーゼを作製するために、ゴールドンゲートクロニング法を使用した（図1A）。TALENは、FokIヌクレアーゼドメインに融合される人工TALE反復アレイから構成され（図1B）；アレイにおけるTALE反復の結合特異性は、各反復内の2つの超可変残基の識別により決定される（図1C）。TALEN処理RDEB繊維芽細胞を、誤りがちな（エラープローン）非相同末端結合（NHEJ）およびHDRという2つの主要なDNA修復経路による修復の証明のために分析した。分析した全部で75個のうち11個の突然変異対立遺伝子を示したサーベイヤーヌクレアーゼアッセイおよびサンガー配列決定は、NH

E Jと一致した(図2Aおよび2E)。TALEN切断はまた、DNA破壊部位においてオリゴヌクレオチド二本鎖の捕捉をもたらした(図2B~F)[24]。これらのデータは、標的部位においてヌクレアーゼが活性であることを立証した。次に、TALENおよびオリゴヌクレオチドドナー(ODN: oligonucleotide donor)の同時送達に続いてRDEB細胞がHDRを受け得るか否かを確認した(図1F)。このオリゴヌクレオチドドナーは、短いドナーアームによって挟まれた特有のプライマー配列を含有している。次いで、修飾および非修飾対立遺伝子を同時に検出する3-プライマーPCRアプローチにより、TALENプラスミドおよびODNが遺伝子移入されたRDEB繊維芽細胞を分析した。このアッセイは、ODNドナーからの外来性配列を組み込むためにRDEB細胞中のTALENがHDRを刺激し得ることを示し(図1G)、NHEJ

10

**【0086】**

RDEBを引き起こすCOL7A1突然変異が修正され得るとともに遺伝的に修正された細胞の集団が続いて増大するか否かを決定するために、遺伝子修正細胞の選択的検出および増大を可能にするであろう外来性ドナープラスミドを作製した。このドナーは、エクソン12と16との間のCOL7A1遺伝子座の約1kbにわたる相同性アームから構成された(図3A)。ドナー内で、loxP導入PGKピューロマイシンカセットは、エクソン12とエクソン13との間のイントロンにそれが挿入されるように方向付けられた。フランキングloxP部位により、Creレコンビナーゼでの選択可能マーカの除去が可能となり、イントロン内に小さなloxP「フットプリント」を残す(図4)。右ドナーアーム内で、5個の単一塩基対変化が設計された: すなわち、正常な遺伝子型を回復させる、突然変異部位での正常な塩基および、非修飾型に対するHDR修飾対立遺伝子の正確な位置を表すことを可能にする4個のサイレント点突然変異多型(SPMP)である(図3A)。これらのSPMPのうち3個は標的塩基の上流であり、下流にある1個は、ApaI制限部位を除去する(本明細書中で以後、上流または下流SPMPと呼ばれる変化)

20

**【0087】**

分析した9個のクローンのうち、HDRの証拠を示す4個が得られた。1個のクローンにおいて、上流SPMPの存在が明らかであったが、しかし、RDEB病原性COL7A1突然変異は存続し、下流SPMPは見られなかった(図5)。これらのデータは、HDR交叉事象が、正常遺伝子型を回復させる領域の上流のドナーアーム内で起こったことを示唆する(図6)。しかし、残りの3個のクローンについては、下流ドナー挿入SPMPが検出可能であり、これにより、一方の対立遺伝子がHDRを受け、他方が受けず、その結果、ヘテロ接合性COL7A1遺伝子座が得られることが示された。(図3Bおよび3C)。

30

**【0088】**

HDRは、突然変異塩基を復帰させ、正常遺伝子発現を回復させるはずである。したがって、介在イントロンからのスプライシング後に、同じ転写産物における正常塩基および下流SPMPの検出のためにRT-PCRストラテジーを用いてこれを評価した(図7)。興味深いことに、1つのクローンにおけるcDNAの直接配列決定から、TALEN標的部位での配列の欠失が示された(図8)。これらのデータは、TALENがHDR後に活性を有し、さらなるNHEJ介在性突然変異を誘導したことを示す。ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN: zinc finger endonuclease)での以前の実験から、ドナー配列でのサイレント突然変異が、こうした望ましくない事象の頻度を低下させ得ることが示されているが<sup>1,2</sup>、しかし、これは、TALEN部位がイントロン/エクソン境界にあり、スプライシングを妨害しないようにドナーTALEN配列が攪乱されないようにすることが選択されたため、この実験において可能ではなかった。これは、1個のクローンの回復に負の影響を及ぼしたが、しかし、2個のクローンは、所望のHDRに基づくドナー由来の正常転写産物を呈した(図9A)。異常または正常転写

40

50

産物それぞれを有する未処理 R D E B 突然変異体または野生型細胞と比較して、T A L E N 処置が V I I 型コラーゲンタンパク質発現を回復させたか否かを次に確認した ( 図 9 C および 9 E ) 。 V I I 型コラーゲンの免疫蛍光に基づく検出から、T A L E N 処理細胞における V I I 型コラーゲン産生のレスキューおよび未処理対照 R D E B 繊維芽細胞における完全欠損が明らかになった ( 図 9 B および 9 D ) 。これらの結果から、T A L E N の、正常な m R N A およびタンパク質産生の回復による疾患特異的な標的部位における遺伝子修飾媒介能が確認される。

#### 【 0 0 8 9 】

オフターゲット効果のリスクは、ゲノム編集試薬の臨床使用における検討事項である。遺伝子編集ヌクレアーゼのオフターゲット部位をマッピングするための選択肢としては、次のものが挙げられる：( i ) 各ヌクレアーゼの単量体の DNA 結合タンパク質を一対で用いてインビトロで試験管内進化法 ( S E L E X : S y s t e m a t i c E v o l u t i o n o f L i g a n d s b y E x p o n e n t i a l E n r i c h m e n t ) を行い、次に潜在的オフターゲット部位を予想するためにこのデータを使用すること [ 2 5 ] 、( i i ) 二量体のヌクレアーゼを使用してインビトロ切断部位選択を行い、次にヌクレアーゼ誘導性突然変異についての目的の細胞のゲノムで生じる、この選択由来の部位を調べること、( i i i ) 組み込み欠損型レンチウイルス ( I D L V ) の傾向を利用してヌクレアーゼ誘導性 D S B に組み込み、次いで L A M - P C R によって挿入点を同定すること [ 9 ] 。方法 ( i i ) および ( i i i ) が方法 ( i ) よりもヌクレアーゼオフターゲット部位の同定においてより優れていると思われるものの、前者の方法は、他法により予想されるオフターゲット部位を同定することができず、このことから、そのオフターゲット事象検出において網羅的である方法はないことが示唆される。ヌクレアーゼ生成 D S B に捕捉され得る緑色蛍光タンパク質 ( G F P : g r e e n f l u o r e s c e n t p r o t e i n ) 遺伝子とともに I D L V を用いて、方法 ( i i i ) を利用した ( 図 1 1 A ) [ 9 、 2 6 ] 。ヒト胚性腎臓 ( 2 9 3 ) 細胞を加速的増殖能があるために使用したが、これにより非組み込み I D L V の迅速な希釈が促進され、無作為な組み込みが最小化されるはずである。さらに、2 9 3 細胞のオープンクロマチン構造ゆえに、何らかのオフターゲット効果が初代細胞よりも大きい度合いまで顕在化し、オフターゲット事象のより感度の高いマッピングを可能にするという仮説が立てられた。G F P I D L V のみの導入は、2 9 3 細胞における G F P 発現の急速な喪失をもたらした ( 図 1 2 ) 。I D L V および T A L E N の同時導入は、G F P 細胞の安定な集団をもたらした ( 図 1 1 B ) 、非制限的直線状増幅介在 ( n o n r e s t r i c t i v e l i n e a r a m p l i f i c a t i o n - m e d i a t e d ) P C R ( ( n r ) L A M - P C R ) により組み込み部位をマッピングするためにこれを使用した ( 図 1 1 C ) 。I D L V と隣接ゲノム配列との間の接合部を示す 5 個の部位を回復させた ( 図 1 1 D ) 。これらの事象は、予想外ではなく [ 9 ] 、臨床試験で使用されるヌクレアーゼでさえオフターゲット効果を示し、回復された非コード領域は、この T A L E N が、遺伝子発現に負の影響を与えないと予想される安全性プロファイルを保持することを示唆する。

#### 【 0 0 9 0 】

L A M - P C R 法の分解能において、本明細書中に記載の T A L E N は、高率のオフターゲット活性を示す。さらに、これらの試験は、他と同様に、人工ヌクレアーゼについての潜在的な標的がドナーコンストラクト自体であることを示し、これらの試験により、所望の H D R 事象の選択に役立ち得るマーカ配列を包含することの利点が強調される [ 2 7 ] 。

#### 【 0 0 9 1 】

まとめると、R D E B 患者の皮膚細胞を得て、この特有の突然変異を特異的に標的とするために、ドナーおよび T A L E N 試薬 ( 配列は下記に含まれる ) を設計し、迅速に構築した。遺伝子編集ツールの適用の結果、直接増大または多能性となるように再プログラムし、続いて増大させた後、治療用途に適切な細胞である二倍体ヒト繊維芽細胞において、R D E B 突然変異が修正され [ 7 、 8 ] 、これは、ヒトゲノムにおける疾患遺伝子の T A

10

20

30

40

50

LEN介在修正を初めて実例により示すものである。これらの実験は、臨床的に重要な個別化治療の開発においてTALENが使用され得ることの証拠を提供する。

【0092】

(実施例2)

ドナープラスミド配列の例は配列番号22で示される。ドナー配列の左アームの例は配列番号31で示される。ドナーのLoxp部位の例は配列番号23で示される。ドナーのPGKプロモータの例は配列番号24で示される。ドナー配列のピューロマイシン遺伝子の例は配列番号25で示される。ドナーのウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルの例は配列番号26で示される。ドナーのLoxp部位の例は配列番号27で示される。ドナーの右アームの例は配列番号28で示される。TALEN左(pTAL286)の例は配列番号29で示される。TALEN右(pTAL287)の例は配列番号30で示される。

10

【0093】

参考文献

【表2】

1. Carlson, D. F., et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 17382-17387.
2. Cermak, T., et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research* 39: e82.
3. Osborn, M. J., Defeo, A. P., Blazar, B. R., and Tolar, J. Synthetic Zinc Finger Nuclease Design and Rapid Assembly. *Human gene therapy*.
4. Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd, and Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* 6: 343-345.
5. Doyon, Y., Choi, V. M., Xia, D. F., Vo, T. D., Gregory, P. D., and Holmes, M. C. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nature methods* 7: 459-460.
6. Guschin, D. Y., Waite, A. J., Katibah, G. E., Miller, J. C., Holmes, M. C., and Rebar, E. J. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* 649: 247-256.
7. Tolar, J., et al. Keratinocytes from Induced Pluripotent Stem Cells in Junctional Epidermolysis Bullosa. *The Journal of investigative dermatology*.
8. Tolar, J., et al. Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* 131: 848-856.
9. Gabriel, R., et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nature biotechnology* 29: 816-823.
10. Vargas, J., Jr., Gusella, G. L., Najfeld, V., Klotman, M. E., and Cara, A. (2004). Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Human gene therapy* 15: 361-372.
11. Schmidt, M., et al. (2007). High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nat Methods* 4: 1051-1057.
12. Paruzynski, A., et al. (2010). Genome-wide high-throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing. *Nat Protoc* 5: 1379-1395.
13. Dsouza, M., Larsen, N., and Overbeek, R. (1997). Searching for patterns in genomic data. *Trends Genet* 13: 497-498.
14. Arens, A., et al. Bioinformatic clonality analysis of next-generation sequencing-derived viral vector integration sites. *Human gene therapy methods* 23: 111-118.
15. Arens, A., et al. (2012). Bioinformatic clonality analysis of next-generation sequencing-derived viral vector integration sites. *Hum Gene Ther Methods* 23: 111-118.

20

30

40

16. Wagner, J. E., et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The New England journal of medicine* 363: 629-639.
17. Tolar, J., et al. (2009). Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells. *Blood* 113: 1167-1174.
18. Wong, T., et al. (2008). Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* 128: 2179-2189.
19. Goto, M., et al. (2006). Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* 126: 766-772.
20. Cermak, T., et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*. 10
21. Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D., and Joung, J. K. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature biotechnology* 30: 460-465.
22. Sander, J. D., Zaback, P., Joung, J. K., Voytas, D. F., and Dobbs, D. (2007). Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic acids research* 35: W599-605.
23. Doyle, E. L., et al. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic acids research* 40: W117-122.
24. Orlando, S. J., et al. Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic acids research* 38: e152.
25. Pattanayak, V., Ramirez, C. L., Joung, J. K., and Liu, D. R. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature methods* 8: 765-770. 20
26. Paruzynski, A., et al. Genome-wide high-throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing. *Nature protocols* 5: 1379-1395.
27. Zou, J., et al. (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell stem cell* 5: 97-110.

#### 【 0 0 9 4 】

全ての刊行物、特許および特許出願が参照により本明細書に組み込まれる。前述の明細書において、本発明の特定の好ましい実施形態と関連して本発明を記載し、多くの詳細を説明目的で示してきたが、当業者にとって明らかなように、本発明は、さらなる実施形態を受け入れることができ、本発明の基本的原理から逸脱することなく、本明細書中に記載の特定の詳細が大幅に変更され得る。 30

( 付記 )

好ましい実施形態として、上記実施形態から把握できる技術的思想について、記載する

。

[ 項 1 ]

標的遺伝子における遺伝子突然変異により引き起こされる遺伝性疾患または障害を処置するための方法であって、

複数の T A L エフェクター反復配列およびエンドヌクレアーゼドメインを含む T A L E N タンパク質をコードする 1 つ以上の核酸および 40

核酸ドナー配列

と細胞を接触させることを含み、

前記 T A L E N タンパク質が前記細胞中で発現され、前記標的遺伝子において部位特異的な 2 本鎖 D N A 破壊を誘導し、前記ドナー配列が、前記遺伝性疾患または障害を処置するために、遺伝子突然変異の修正をもたらす D N A 修復のための鋳型であり、正確な遺伝子発現をもたらす、方法。

[ 項 2 ]

前記細胞が、線維芽細胞、ケラチン産生細胞、誘導型多能性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞、造血子孫細胞、T細胞、B細胞、グリア細胞、神経細胞、神経膠前駆細胞、神経膠幹細胞、筋肉細胞、肺細胞、膵臓細胞、肝臓細胞および網内系の細胞か 50

らなる群から選択される、項 1 に記載の方法。

[ 項 3 ]

前記 T A L E N タンパク質が左 T A L E N であり、前記 1 つ以上の核酸が、前記標的遺伝子において前記 2 本鎖破壊をなすために前記左 T A L E N と協働可能な右 T A L E N をコードする核酸をさらに含む、項 1 に記載の方法。

[ 項 4 ]

前記 T A L E N をコードする前記核酸または前記核酸ドナー配列が、ベクターまたはプラスミドの一部である、項 1 に記載の方法。

[ 項 5 ]

前記標的遺伝子が、遺伝子変化または突然変異を有する遺伝子である、項 1 に記載の方法。

10

[ 項 6 ]

前記標的遺伝子が C O L 7 A 1 である、項 5 に記載の方法。

[ 項 7 ]

前記 T A L E N タンパク質をコードする前記核酸が、前記複数の T A L エフェクター反復配列と前記エンドヌクレアーゼドメインとの間にスペースを含む、項 1 に記載の方法。

[ 項 8 ]

前記スペースが、12 ~ 30 ヌクレオチド長である、項 7 に記載の方法。

[ 項 9 ]

前記遺伝性疾患が、表皮水疱症、劣性栄養障害型表皮水疱症 ( R D E B )、骨形成不全症、先天性角化不全症、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症 ( C F T R )、ファンconi貧血、スフィンゴリピドーシス、リポフスチン沈着症、副腎白質ジストロフィー、重症複合型免疫不全、鎌状赤血球貧血およびサラセミアからなる群から選択される、項 1 に記載の方法。

20

[ 項 10 ]

前記遺伝性疾患が表皮水疱症である、項 1 に記載の方法。

[ 項 11 ]

遺伝子突然変異により引き起こされる遺伝性疾患または障害を処置するための方法であって、

a ) 細胞に ( i ) 第 1 の転写活性化因子様 ( T A L ) エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードする第 1 の核酸、( i i ) 第 2 の T A L エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードする第 2 の核酸、および ( i i i ) およびドナー配列を導入する工程であって、前記第 1 および第 2 の T A L エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体のそれぞれが、複数の T A L エフェクター反復配列および F o k I エンドヌクレアーゼドメインを含み、前記複数の T A L エフェクター反復配列のそれぞれが反復可変性二残基を含み、前記第 1 の T A L エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が、前記細胞内での標的 D N A の第 1 のハーフサイト配列への結合能を含むとともに、前記第 2 の T A L エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が前記標的 D N A の第 2 のハーフサイト配列に結合されるときに前記標的 D N A を切断する能力を含み、前記標的 D N A が、スペース配列によって分離される前記第 1 のハーフサイト配列および前記第 2 のハーフサイト配列を含み、前記第 1 および第 2 のハーフサイトが同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有し、前記ドナー配列が、少なくとも前記標的配列の 5 ' および 3 ' 末端で標的に対する相同性および事前に選択された遺伝子変化を含み、かつ、前記遺伝子突然変異の修正をもたらす D N A 修復のための鋳型である、該導入工程；および

30

( b ) 前記突然変異を修正し、かつ、正確な遺伝子発現を復元するために、前記第 1 および第 2 の T A L エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が発現される条件下で前記細胞を培養する工程、を含む方法。

40

[ 項 12 ]

ドナー配列を含む核酸であって、前記ドナー配列が遺伝子突然変異の修正をもたらす部位特異的な D N A 修復のための鋳型であり、前記ドナー配列が、少なくとも標的配列の 5

50

’および3’末端に対する相同性を含み、前記ドナー配列の一部が、T A L E Nタンパク質と併せて使用するための前記標的配列を修正するための修復配列を含む、核酸。

[項13]

ドナーが配列番号22を含む、項12に記載の核酸。

[項14]

標的がC O L 7 A 1である、項12に記載の核酸。

[項15]

ドナーの5’および3’末端がそれぞれ標的に対する少なくとも100塩基の配列同一性を有する、項12に記載の核酸。

[項16]

配列番号29を含む、T A L E Nタンパク質をコードする核酸。

[項17]

配列番号30を含む、T A L E Nタンパク質をコードする核酸。

[項18]

項16に記載の核酸によりコードされるかまたは発現される、タンパク質。

[項19]

項17に記載の核酸によりコードされるかまたは発現される、タンパク質。

[項20]

ドナー配列を含むベクターまたはプラスミドであって、前記ドナー配列が、遺伝子突然変異の修正をもたらす部位特異的なDNA修復のための鋳型であり、前記ドナー配列が、少なくとも標的配列の5’および3’末端に対する相同性を含み、前記ドナー配列の一部が、T A L E Nタンパク質と併せて使用するための前記標的配列を修正するための修復配列を含む、ベクターまたはプラスミド。

[項21]

ドナーが配列番号22を含む、項20に記載のベクターまたはプラスミド。

[項22]

標的がC O L 7 A 1である、項20に記載のベクターまたはプラスミド。

[項23]

ドナーの5’および3’末端がそれぞれ標的に対して少なくとも100塩基の配列同一性を有する、項20に記載のベクターまたはプラスミド。

[項24]

配列番号22、31、28、29または30のうち1つ以上を含む、ベクターまたはプラスミド。

[項25]

外来配列番号22、31、28、29もしくは30のうち1つ以上またはこのような配列から発現されるタンパク質を含む、単離宿主細胞。

[項26]

配列番号22、31、28、29もしくは30またはこのような配列から発現されるタンパク質を含む、遺伝子移入された細胞株。

[項27]

細胞中で標的遺伝子における部位特異的な2本鎖DNA破壊を誘導可能な第1のT A L E Nタンパク質をコードする核酸と、

前記標的遺伝子における遺伝子突然変異の修正のための鋳型である核酸ドナー配列と、を含む組成物。

[項28]

前記細胞が、繊維芽細胞、ケラチン産生細胞、誘導型多能性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞、造血子孫細胞、T細胞、B細胞、グリア細胞、神経細胞、神経膠前駆細胞、神経膠幹細胞、筋肉細胞、肺細胞、膵臓細胞、肝臓細胞および網内系の細胞からなる群から選択される、項27に記載の組成物。

[項29]

10

20

30

40

50

前記第1のT A L E Nタンパク質が、左T A L E Nであり、および前記核酸が、前記標的遺伝子において前記部位特異的な2本鎖DNA破壊をなすために前記左T A L E Nと協働する右T A L E Nである第2のT A L E Nをさらにコードする、項27に記載の組成物。

[項30]

前記T A L E Nタンパク質をコードする前記核酸または前記核酸ドナー配列がベクターまたはプラスミドの一部である、項27に記載の組成物。

[項31]

前記標的遺伝子がC O L 7 A 1である、項27に記載の組成物。

[項32]

前記第1のT A L E Nまたは前記第2のT A L E Nが、複数のT A L Eフェクター反復配列およびエンドヌクレアーゼドメインと、前記複数のT A L Eフェクター反復配列の間のスペースとを含み、前記エンドヌクレアーゼドメインがスペースを含む、項29に記載の組成物。

[項33]

前記スペースが12~30ヌクレオチド長である、項32に記載の組成物。

[項34]

遺伝性疾患が、表皮水疱症、劣性栄養障害型表皮水疱症(R D E B)、骨形成不全症、先天性角化不全症、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症(C F T R)、ファンconi貧血、スフィンゴリピドーシス、リポフスチン沈着症、副腎白質ジストロフィー、重症複合型免疫不全、鎌状赤血球貧血およびサラセミアからなる群から選択される、項27に記載の組成物。

[項35]

前記遺伝性疾患が表皮水疱症である、項34に記載の組成物。

[項36]

少なくとも1つの核酸を含む組成物であって、

(i)第1の転写活性化因子様(T A L)エフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードする第1の核酸、

(ii)第2のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体をコードする第2の核酸、および

(iii)およびドナー配列、を含み、

前記第1および第2のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体のそれぞれが、複数のT A L Eフェクター反復配列およびF o k Iエンドヌクレアーゼドメインを含み、前記複数のT A L Eフェクター反復配列のそれぞれが反復可変性二残基を含み、前記第1のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が、細胞内で標的DNAの第1の-halfサイト配列に結合可能であり、前記標的DNAが遺伝子突然変異を有し、かつ、前記第2のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が前記標的DNAの第2の-halfサイト配列に結合されるときに前記第1のT A L Eフェクターエンドヌクレアーゼ単量体が前記標的DNAを切断可能であり、前記標的DNAが、スペース配列によって分離される前記第1の-halfサイト配列および前記第2の-halfサイト配列を含み、前記第1および第2の-halfサイトが同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有し、前記ドナー配列が、少なくとも前記標的DNAの5'および3'末端で前記標的DNAと相同である領域を含み、かつ、前記標的DNAにおいて遺伝子突然変異の修正をもたらすDNA修復のための鋳型である、組成物。

[項37]

項27に記載の第1のT A L E Nタンパク質をコードする核酸によりコードされるかまたは発現される、タンパク質。

[項38]

項37に記載の第1の核酸または第2の核酸によりコードされるかまたは発現される、

10

20

30

40

50

タンパク質。

[ 項 3 9 ]

項 2 7 に記載の第 1 の T A L E N タンパク質をコードする核酸を含むベクター。

[ 項 4 0 ]

項 3 7 に記載の第 1 の核酸または第 2 の核酸を含むベクター。

[ 項 4 1 ]

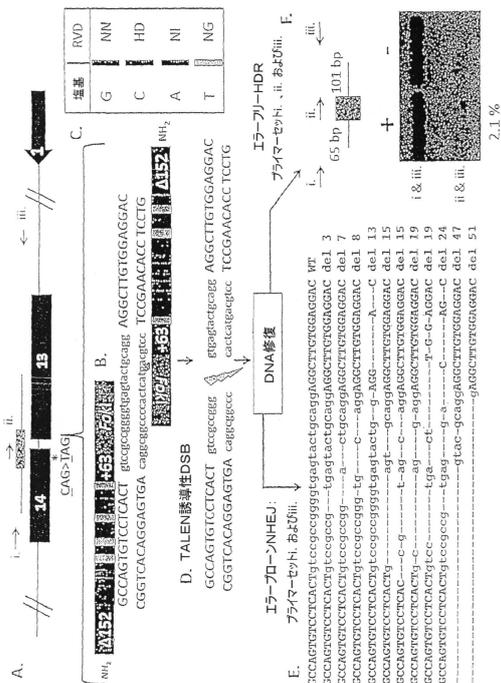
第 1 の T A L E N タンパク質をコードする核酸と、

核酸ドナー配列と、を含む組成物であって、

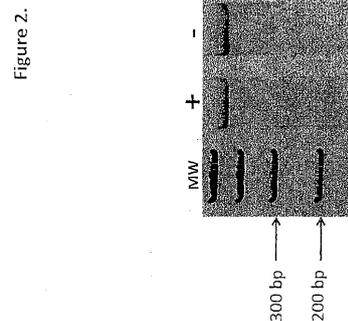
前記第 1 の T A L E N タンパク質は、細胞中で、表皮水疱症を引き起こし得る遺伝子突然変異を有する C O L 7 A 1 遺伝子において部位特異的な 2 本鎖 D N A 破壊を誘導可能であり、

前記核酸ドナー配列は、前記 C O L 7 A 1 遺伝子において前記遺伝子突然変異の修正のための鋳型である、組成物。

【 図 1 】



【 図 2 】









【配列表】

0006480874000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 P 17/00 (2006.01) A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 K 38/16 (2006.01) A 6 1 P 17/00 1 7 1  
 A 6 1 K 38/16

- (72)発明者 オズボーン、マーク ジェイ .  
 アメリカ合衆国 5 5 4 5 5 - 2 0 2 0 ミネソタ州 ミネアポリス オーク ストリート サウ  
 スイースト 2 0 0 マクナマラ アルムニ センター 6 0 0
- (72)発明者 トーラー、ヤクブ  
 アメリカ合衆国 5 5 4 5 5 - 2 0 2 0 ミネソタ州 ミネアポリス オーク ストリート サウ  
 スイースト 2 0 0 マクナマラ アルムニ センター 6 0 0
- (72)発明者 ブレイザー、ブルース  
 アメリカ合衆国 5 5 4 5 5 - 2 0 2 0 ミネソタ州 ミネアポリス オーク ストリート サウ  
 スイースト 2 0 0 マクナマラ アルムニ センター 6 0 0
- (72)発明者 ボイタス、ダニエル エフ .  
 アメリカ合衆国 5 5 4 5 5 - 2 0 2 0 ミネソタ州 ミネアポリス オーク ストリート サウ  
 スイースト 2 0 0 マクナマラ アルムニ センター 6 0 0

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 Mol.BioSyst., 2012, Vol.8, p.1255-1263  
 Molecular Therapy, 2012, Vol.20, Supplement 1, S26-S27  
 Molecular Therapy, 2012, Vol.20, Supplement 1, S110-S111  
 HUMAN MUTATION, 1997, Vol.10, p.338-347  
 Nucleic Acids Research, 2011, Vol.39, e82  
 Nature Biotechnology, 2012, Vol.30, p.460-465, ONLINE METHODS  
 Nucleic Acids Research, 2012, Vol.40, W117-W122  
 Nature Biotechnology, 2011, Vol.29, p.143-148, ONLINE METHODS  
 Nucleic Acids Research, 2011, Vol.39, p.9283-9293

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
 U n i P r o t / G e n e S e q