

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-523860

(P2015-523860A)

(43) 公表日 平成27年8月20日 (2015. 8. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 6
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-515201 (P2015-515201)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月30日 (2013. 5. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年1月27日 (2015. 1. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/043433
 (87) 国際公開番号 W02013/181440
 (87) 国際公開日 平成25年12月5日 (2013. 12. 5)
 (31) 優先権主張番号 61/653, 279
 (32) 優先日 平成24年5月30日 (2012. 5. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 597050174
 ベイラー カレッジ オブ メディシン
 BAYLOR COLLEGE OF M
 E D I C I N E
 アメリカ合衆国, テキサス 77030,
 ヒューストン, ワン ベイラー プラザ
 (番地なし)
 (71) 出願人 500093498
 ユニバーシティ・オブ・ワシントン
 アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
 スイート 500 イレブンス アベニ
 ュー エヌイー 4311
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAの修復、変更および置き換えのための道具としてのスーパーコイルMiniVector

(57) 【要約】

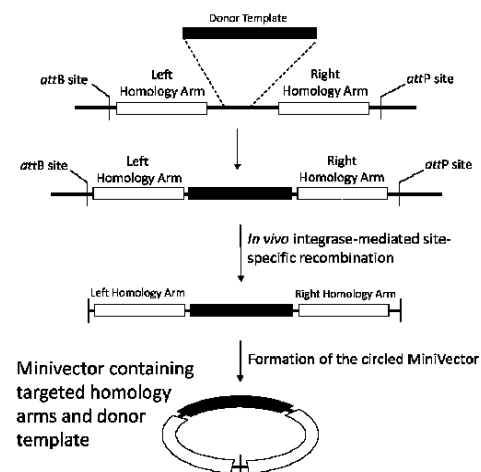
一部の態様において、本開示はDNA配列の標的化された変更のための組成物およびその組成物を用いて標的DNA配列を変更する方法を提供する。一部の態様において、そのような組成物はインピボまたはインピトロにおける細胞内での標的とされるDNA配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための核酸配列鋳型を含むMiniVectorを含み、ここでそのMiniVectorは細菌の複製起点および抗生物質選択遺伝子の両方を欠いており、ここでそのMiniVectorは約2,500塩基対までの大きさを有する。

【選択図】図1

Fig. 1 Preparation of MiniVector containing a template for DNA alteration

pMV-Donor1 plasmid

The donor template directs the insertion, deletion, point mutation, inversion, translocation, or other DNA sequence alteration



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

インビボまたはインビトロにおける細胞内での標的とされる DNA 配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための核酸配列鋳型を含む Mini Vector、ここで該 Mini Vector は細菌の複製起点および抗生物質選択遺伝子の両方を欠いており、かつここで該 Mini Vector は約 2,500 塩基対までの大きさを有する；

を含む、標的化された DNA 配列の変更のための組成物。

【請求項 2】

標的とされる DNA 配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための核酸配列鋳型が以下：

変更されるべき標的とされる DNA 配列の付近の核酸配列に相補的な該鋳型の少なくとも 1 つの部分；および

変更されるべき標的とされる DNA 配列に相補的ではない該鋳型の少なくとも 1 つの部分；

を含み、該核酸鋳型の非相補的部分が該標的とされる DNA 配列中で所望される変更を含有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

変更されるべき標的とされる DNA 配列が細胞内のゲノム、ミトコンドリア、またはプラスチド DNA である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

さらに少なくとも 1 種類の部位特異的ヌクレアーゼを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

部位特異的ヌクレアーゼが Mini Vector の核酸配列鋳型の一部によりコードされる、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

部位特異的ヌクレアーゼが別々の Mini Vector、プラスミド、メッセンジャー RNA、もしくはウイルスによりコードされているか、またはタンパク質として送達される、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

部位特異的ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、および CRISPR (クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文状の反復) / CAS (CRISPR 会合) 系からなる群から選択される、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 8】

部位特異的ヌクレアーゼが標的 DNA 配列中の 1 以上の一本鎖破断を誘導する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 9】

部位特異的ヌクレアーゼが標的 DNA 配列中の 1 以上の二本鎖破断を誘導する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 10】

相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えが sleeping beauty トランスポゾン系が含まれるがそれに限定されないトランスポザーゼまたはリコンビナーゼにより媒介される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

Mini Vector がさらに化学的部分、修飾オリゴヌクレオチド、および / または修飾主鎖を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

細胞が哺乳類細胞、原核細胞、真核細胞、古細菌、または植物細胞である、請求項 1 に記

10

20

30

40

50

載の組成物。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の組成物を含む細胞。

【請求項 14】

細胞が哺乳類細胞、原核細胞、真核細胞、古細菌、または植物細胞である、請求項 13 に記載の細胞。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の組成物を含むキット。

【請求項 16】

請求項 4 に記載の組成物を含むキット。

10

【請求項 17】

以下の工程：

a) 核酸配列鋳型を含む Mini Vector のトランスフェクション、ここで該核酸配列鋳型は、標的 DNA 配列付近の核酸配列に相補的な少なくとも 1 つの部分；および該標的 DNA 配列に相補的ではない少なくとも 1 つの部分を含み、ここで該核酸鋳型の非相補的部分は所望される変更を含有する；

b) 該核酸配列鋳型の相補的領域の、該非相補的部分を除いた標的 DNA 配列付近の核酸配列との塩基対合；ならびに

c) 該所望の変更の該標的 DNA 配列中への配列特異的様式での組み込み；

を含む、細胞中の標的 DNA 配列を変更する方法であって、該 Mini Vector が細菌の複製起点および抗生物質選択遺伝子の両方を欠いており、かつ該 Mini Vector が約 2,500 塩基対までの大きさを有する、前記方法。

20

【請求項 18】

方法がさらに少なくとも 1 種類の部位特異的ヌクレアーゼを提供することを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

部位特異的ヌクレアーゼが Mini Vector の核酸鋳型の一部によりコードされる、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

部位特異的ヌクレアーゼの提供が部位特異的ヌクレアーゼをコードする別個の Mini Vector、プラスミド、メッセンジャー RNA、もしくはウイルス、またはタンパク質を同時トランスフェクションすることを含む、請求項 18 に記載の方法。

30

【請求項 21】

部位特異的ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、および CRISPR (クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文状の反復) / CAS (CRISPR 会合) 系からなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

部位特異的ヌクレアーゼが標的 DNA 配列中の 1 以上の一本鎖破断を誘導する、請求項 18 に記載の方法。

40

【請求項 23】

部位特異的ヌクレアーゼが標的 DNA 配列中の 1 以上の二本鎖破断を誘導する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 24】

標的 DNA の変更が sleeping beauty トランスポゾン系が含まれるがそれに限定されないトランスポザーゼまたはリコンビナーゼにより媒介される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

Mini Vector がさらに化学的部分、修飾オリゴヌクレオチド、および / または修飾主鎖を含む、請求項 17 に記載の方法。

50

【請求項 26】

それを必要とする対象において標的DNA配列の変更が所望される遺伝性障害または他の病気を処置する方法であって、以下の工程：

a) 対象への療法上有効量の核酸配列鋳型を含むMini Vectorの投与、ここで該核酸配列鋳型は、標的DNA配列付近の核酸配列に相補的な少なくとも1つの部分；および該標的DNAに相補的ではない少なくとも1つの部分を含み、ここで該核酸鋳型の非相補的部分は所望される変更を含有する；

b) 該核酸配列鋳型の相補的領域の、該非相補的部分を除いた標的DNA配列付近の核酸配列との塩基対合；ならびに

c) 該所望の変更の該標的DNA配列中への配列特異的様式での組み込み；

を含み、該Mini Vectorが細菌の複製起点および抗生物質選択遺伝子の両方を欠いており、かつ該Mini Vectorが約2,500塩基対までの大きさを有する、前記方法。

10

【請求項 27】

さらに少なくとも1種類の部位特異的ヌクレアーゼを同時投与することを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

部位特異的ヌクレアーゼがMini Vectorの核酸鋳型の一部によりコードされる、請求項26に記載の方法。

【請求項 29】

同時投与が部位特異的ヌクレアーゼをコードする別個のMini Vector、プラスミド、メッセンジャーRNA、もしくはウイルス、またはタンパク質を提供することを含む、請求項27に記載の方法。

20

【請求項 30】

部位特異的ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、およびCRISPR(クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文状の反復)/CAS(CRISPR会合)系からなる群から選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項 31】

部位特異的ヌクレアーゼが標的DNA配列中の1以上の一本鎖破断を誘導する、請求項27に記載の方法。

30

【請求項 32】

部位特異的ヌクレアーゼが標的DNA配列中の1以上の二本鎖破断を誘導する、請求項27に記載の方法。

【請求項 33】

標的DNAの変更がsleeping beautyトランスポゾン系が含まれるがそれに限定されないトランスポザーゼまたはリコンビナーゼにより媒介される、請求項26に記載の方法。

【請求項 34】

Mini Vectorがさらに化学的部分、修飾オリゴヌクレオチド、および/または修飾主鎖を含む、請求項26に記載の方法。

40

【請求項 35】

対象が哺乳類または植物である、請求項26に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

[0001] この出願は、2012年5月30日に提出された米国仮出願第61/653,279号に対する優先権を主張する。前記の出願の全体を本明細書に援用する。

【0002】

50

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する記載

[0002] 本発明は、全部または部分的に、国立衛生研究所からの助成金番号R01-AI054830およびRL1-GM084434により支援された。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

[0003] この発明は、DNAの修復、変更、または置き換えのための道具としての核酸配列を含むMiniVector（商標）を用いる遺伝子療法の組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0004】

[0004] 標的化ゲノム工学は、内在性DNAを細胞内のDNAに沿った特定の部位において方向付けられた様式で編集または変更することを含む。遺伝子修復および相同性に方向付けられた遺伝子変更の莫大な可能性にもかかわらず、現在のゲノム工学のアプローチは非常に低い修復または編集の効率を提供し、そして有害な、または望ましくないDNA配列および結果を導入する可能性を有する。従って、生物学的環境において安定であり、より大きい細胞トランスフェクションおよび導入遺伝子発現を可能にする、より有効な標的化ゲノム工学の方法を開発する必要性が存在する。

【発明の概要】

【0005】

[0005] 一部の態様において、本開示は標的とされるDNA配列の変更のための組成物を提供する。例えば、限定的でない態様において、そのような組成物はインビボまたはインビトロにおける細胞内での標的とされるDNA配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための核酸配列鋳型を含むMiniVectorを含み、ここでそのMiniVectorは細菌の複製起点および抗生物質選択遺伝子の両方を欠いており、ここでそのMiniVectorは約2,500塩基対までの大きさを有する。本開示のさらなる態様において、標的とされるDNA配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための核酸配列鋳型はその標的とされるDNA配列付近の核酸配列に相補的な鋳型の少なくとも1つの部分；およびその標的とされるDNAに相補的ではない鋳型の少なくとも1つの部分を含み、ここでその核酸鋳型の非相補的部分はその標的とされるDNA配列において所望される変更を含有する。一部の態様において、その組成物はさらに、少なくとも1種類の部位特異的ヌクレアーゼを含む。

【0006】

[0006] 別の態様において、本開示は細胞中の標的DNA配列を変更する方法に関する。一部の態様において、そのような方法は核酸配列鋳型を含むMiniVectorをトランスフェクションすることを含む。一部の態様において、その核酸配列鋳型はその標的DNA配列付近の核酸配列に相補的な少なくとも1つの部分；およびその標的DNA配列に相補的ではない少なくとも1つの部分を含む。本開示の関連する態様において、その核酸鋳型の非相補的部分は所望の変更を含有する。さらなる態様において、その方法は、その核酸配列鋳型の相補的領域の、非相補的部分を除いたその標的DNA配列付近の核酸配列との塩基対合を含む。さらなる態様において、その方法は所望の変更をその標的DNA配列中に配列特異的様式で組み込むことを含む。その方法の関連する態様において、そのMiniVectorは細菌の複製起点および抗生物質選択遺伝子の両方を欠いている。一部の態様において、そのMiniVectorは約2,500塩基対までの大きさを有する。

【0007】

[0007] 一部の態様において、本開示はそれを必要とする対象において標的DNA配列の変更が所望される遺伝性障害または他の病気を処置する方法に関する。一部の態様において、そのような方法は、対象に療法上有効量の核酸配列鋳型を含むMiniVectorを投与することを含む。関連する態様において、その核酸配列鋳型はその標的DNA配列付近の核酸配列に相補的な少なくとも1つの部分；およびその標的DNA配列に相補的ではない少なくとも1つの部分を含み、ここでその核酸鋳型の非相補的領域はその所望の

変更を含有する。追加の態様において、その方法は、その核酸配列鋳型の相補的領域の、非相補的部分を除いたその標的DNA配列付近の核酸配列との塩基対合を含む。その方法のさらなる態様は、所望の変更をその標的DNA配列中に配列特異的様式で組み込むことを含む。その方法の関連する態様において、そのMini Vectorは細菌の複製起点および抗生物質選択遺伝子の両方を欠いている。一部の態様において、そのMini Vectorは約2,500塩基対までの大きさを有する。

【0008】

【0008】 本開示の上記の目的および他の目的、特徴、および利点は、添付の図面と合わせて受け取られた場合、本発明を実施するための最高の方式の以下の詳細な記載から容易に明らかである。

10

【0009】

【0009】 本発明の上記で列挙された、および他の利点および目的が得られる方法のため、上記で簡潔に記載された本発明のより詳細な記載はその具体的な態様への参照により与えられると考えられ、それは添付された図において図説されている。これらの図は本発明の典型的な態様のみを示しており、従ってその範囲を限定するものと考えられるべきではないことを理解し、本発明は添付の図の使用によりさらに具体的かつ詳細に記載され则认为られ、ここで：

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】 【0010】 図1はDNA変更のための鋳型をコードするMini Vectorの調製を示し；

20

【図2】 【0011】 図2はMini Vector鋳型を用いた標的化されたゲノム編集を示し；

【図3】 【0012】 図3はIL2R γ 遺伝子の改変のための修復鋳型としてのMini Vectorを用いたジンクフィンガーに媒介される遺伝子編集の典型的な態様を示す。野生型の内在性IL2R γ 遺伝子の初期配列を、コザック配列および開始コドンの位置を示すために標識する(labeled)。その修復鋳型の非相補的部位は、制限部位のIL2R γ 遺伝子中への挿入に関する付加された配列を示す。示したように、このXho部位はその遺伝子に関する開始コドンの直前にコードされている。供与鋳型上で、挿入されるべきXhoI部位を有する配列は2個の相同性の腕により隣接されている。これらの相同性の腕は、編集に関して標的とされてきた細胞のゲノム中の部位の左側および右側のDNA配列に相補的である。Mini Vectorはその供与鋳型の完全長を含めて生成される。

30

【図4】 【0013】 図4A~4Bは、PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)分析の結果を示す。左の3つのレーンは、3種類の供与鋳型(等質量でのMini Vector、プラスミド、または等モルでのMini Vectorのいずれか)のそれぞれをZFN一切なしで細胞に送達した対照である(図4A)。次のレーンは、ZFNをプラスミドに基づく供与鋳型または等質量もしくは等モル量のどちらかでのMini Vectorに基づく供与鋳型と共に送達した際の、送達されたプラスミドの量と比較した実験結果を示す(図4A)。上部の未切断のバンドの密度に対する2つのより低い位置のバンドの密度の決定は、うまく修復されたアレル全体の百分率の尺度を提供する。ゲルの分析は、Mini Vectorがアレルの標的化および制限部位の挿入に成功したことを示し(図4B)；そして

40

【図5】 【0014】 図5A~5Cは、Mini Vector供与体による標的化された遺伝子修正を示す。Mini Vector供与鋳型は、GFP遺伝子の完全な3'領域を、上流の機能するP_{PGK}プロモーター(図5A)(左)または同じプロモーターの切り詰められた形態(図5A)(右)と共に有する。修復に関する染色体上の標的は、I-Anil部位(黄色の三角形)およびGFPの発現を妨げるための2個のインフレームN末端停止コドン(赤線)を有する転写されるGFP遺伝子であった(図5B)(上)。このDNA標的はHEK293T細胞の染色体中に組み込まれている。相同性に方向付けられる修

50

復の成功は G F P 遺伝子を修正し、それらの染色体中に G F P 遺伝子の機能するコピーを含有する G F P + 細胞を生成する (図 5 B) (下) 。フローサイトメトリー分析をその H E K 2 9 3 細胞においてトランスフェクションの 3 日後に実施した。B F P + 細胞 (図 5 C) (上の横列) および同定された B F P + 細胞集団の中の G F P + 細胞 (図 5 C) (下の横列) を定量化するデータを示す。トランスフェクションされた B F P + 細胞の百分率を上を示す (B F P + 細胞、I - A n i l を発現している) 。G F P + (H D R によりうまく修正された) としても同定された B F P + 細胞の百分率を示す (図 5 C) (下) 。I - A n i l を形質導入されなかった対照からのデータは、ここで B F P 発現が予想されることを示している (図 5 C) (左) 。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 1 】

[0015] 前記の一般的な記述および以下の詳細な記述は両方とも典型的かつ説明的なものでしかなく、特許請求されるような本発明を制限するものではないことは理解されるべきである。この出願において、別途明確に記載しない限り、単数形の使用には複数形が含まれ、用語 “ a ” または “ a n ” は “ 少なくとも 1 ” を意味し、“ または ” の使用は “ および / または ” を意味する。さらに、用語 “ 含まれること ” ならびに他の形態、例えば “ 含まれる ” および “ 含まれた ” の使用は限定的ではない。また、“ 要素 ” または “ 構成要素 ” のような用語は、別途明確に記載しない限り、1 つの単位を含む要素または構成要素および 1 より多くの単位を含む要素または構成要素の両方を包含する。

【 0 0 1 2 】

[0016] 本明細書で用いられる節の見出しは組織化の目的のためだけのものであり、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。特許、特許出願、論文、書籍、および専門書が含まれるがそれらに限定されないこの出願において引用される全ての文書または文書の一部は、あらゆる目的に関して本明細書により明確にそのまま本明細書に援用される。援用される文献および類似の資料の 1 以上が用語をこの出願におけるその用語の定義と矛盾する様式で定義している場合、この出願が統制する。

【 0 0 1 3 】

[0017] 本開示は、内在性の細胞 D N A 修復機序を用いて D N A を編集または変更するための標的化された D N A 工学に関する方法および組成物を提供する。本明細書で開示される方法は、標的 D N A 配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための鑄型として M i n i V e c t o r を利用する。本明細書で開示される方法および組成物を用いて、インビボまたはインビトロにおいて、あらゆる植物または動物細胞、例えば哺乳類細胞が含まれるがそれらに限定されないあらゆる細胞中のあらゆる D N A 配列を標的とすることができる。本明細書で開示される方法および組成物は、体細胞および幹細胞が含まれるがそれらに限定されないあらゆる細胞型で用いることができる。

【 0 0 1 4 】

[0018] 標的化された D N A 工学は、細胞内の D N A に沿った特定の部位において方向付けられた様式で細胞内の内在性 D N A を編集または改変することを含む。ゲノムの編集または標的化された D N A の編集は、少数を例に挙げると、酵母、昆虫、無脊椎動物、哺乳類、魚、齧歯類、ヒト、植物、細菌、および昆虫が含まれるあらゆる生物または細胞において実施することができる^{1, 2, 8, 12}。さらに、標的化された D N A 編集は、幹細胞および体細胞が含まれるがそれらに限定されないあらゆる細胞型において実施することができる。編集されるべき内在性 D N A は、ゲノム D N A、ミトコンドリア D N A、またはプラスチド D N A であることができる¹³。

【 0 0 1 5 】

[0019] ゲノム編集または標的化された D N A 工学は、療法目的のために、例えば遺伝子変異を修復するために用いることができ、または基礎研究において、例えば特定の遺伝子の機能を研究するために用いることができる^{9, 11}。加えて、植物、藻類、細菌、および古細菌のゲノム編集は、食品およびバイオ燃料の開発のための新規のアプローチとして探求されている。標的化された D N A 編集または変更によるゲノム改変は、通常はそれ

らの作物において見られない特徴、例えば除草剤もしくは害虫に対する耐性、または栄養的にバランスの取れた食物もしくは飼料製品が含まれる、1種類以上の所望の特徴を有する植物を生成するための効率的かつ制御された方法を提供する。

【0016】

[0020] 遺伝子療法は、疾患に関わっていることが示されている欠陥遺伝子または他のDNA配列を修正する、修復する、置き換える、または変更するためのDNAまたはRNAの所望の器官または細胞への送達を含む。これはいくつかの異なるアプローチにより達成することができる。その疾患状態が、欠損した、または機能しない遺伝子または他のDNA配列の結果である場合、その遺伝子の機能するコピーをその疾患座位に送達することができる。遺伝子発現は、RNA干渉(RNAi)およびRNA活性化技術、例えば低分子干渉RNA(sRNA)、低分子活性化RNA(sRNA)、低分子ヘアピンRNA(shRNA)、およびマイクロRNA(miRNA)を用いて制御することができる。一部の態様において、本開示は対象の配列を修復する、変更する、置き換える、付加する、削除する、重複させる、または反転させるための標的化されたDNA工学のためのDNA Mini Vectorを用いる方法に関する。

10

【0017】

DNA修復機序

[0021] 細胞はあらゆる二本鎖または一本鎖DNAの損傷を修復することを試みるための内在性の機序を有する。その細胞性修復機序は、天然の原因の結果であるあらゆるDNA損傷を修復するために進化した。ゲノム、ミトコンドリア、葉緑体、または過剰染色体のDNA配列を、変更する、修復する、置き換える、付加する、削除する、重複させる、および反転させるためのいくつかの方法が存在する。全てのこれらの方法はDNAの相同性に依存している。

20

【0018】

[0022] 1つの方法は、細胞にDNA相同組み換えにおいて用いられ得る鋳型を供給することを含む。このタイプの組み換えは、相同性を有するDNAの区間に依存する。その事象の頻度はその欠陥配列付近のDNA損傷(典型的には二本鎖の破断またはニック)の誘導により増大し、従ってその鋳型はその欠陥配列において組み替えて、そうしてそれを直して、または変更して、その鋳型によりコードされる所望の配列にするために用いられるであろう。二本鎖の破断は配列特異的エンドヌクレアーゼ、例えばメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはTALヌクレアーゼにより誘発され得る。ニックは配列特異的ニックングエンドヌクレアーゼにより生成され得る。

30

【0019】

[0023] DNA配列を修復または変更するための別の方法は、その鋳型に関するゲノム、ミトコンドリア、葉緑体、または過剰染色体配列をその鋳型と交換するであろう酵素を用いることである。第1の方法のように鋳型をコピーするのではなく、この方法では、酵素、例えばDRAPはその鋳型を用いてゲノム、ミトコンドリア、葉緑体、または過剰染色体(単数または複数)を相同性領域に関して検索するであろう。相同性領域がマッチした場合、DRAPは2セットの二本鎖破断を鋳型および標的配列の両方において生成し、その鋳型に関するそのゲノム、ミトコンドリア、葉緑体、または過剰染色体の配列を“フリップイン(flip-in)”機序で取り替える(swap out)であろう。

40

【0020】

[0024] 他のDNA修復系には、トランスポザーゼ、リコンビナーゼまたはインテグラーゼが含まれる。トランスポゾン系、例えばSleeping Beautyトランスポザーゼもカットアンドペースト機序により相同組み換えを成し遂げることができる。インテグラーゼ系、例えばHIVインテグラーゼは、配列を相同組み換えにより付加する、削除する、重複させる、または反転させることができる。これらの細胞性修復機序を利用して、反転、挿入、削除、点変異、重複、または転座が含まれるがそれらに限定されない内在性DNA配列の標的化された所望のDNA変更を方向付けることができる。

【0021】

50

修復鋳型の送達

[0025] 遺伝子療法の莫大な療法的可能性および遺伝子療法に関する良好な候補として同定された多数の疾患にもかかわらず、その分野は今のところほとんどうまくいっていない。これらの失敗はDNA送達と関係する厄介な問題の結果である。修復鋳型を導入するためのいくつかのアプローチが評価されてきた。修復鋳型は、一本鎖線状DNA、二本鎖線状DNA、二本鎖プラスミド、または一本鎖プラスミドとして導入することができる。さらに、その修復鋳型は裸のDNAまたはウイルス送達媒体内にパッケージングされたDNAとして送達することができる。^{1, 4}

[0026] ほとんどの一般的なDNA送達法はウイルスベクターを利用する。送達効率はウイルスベクターに関して高い。しかし、ウイルスベクターは、毒性、免疫および炎症反応ならびに標的化および用量の制御における困難が含まれる、臨床試験において観察された問題のため、限られた療法的可能性を有する。加えて、そのベクターはゲノム中に組み込まれて未知の長期の作用を有するであろうというもっともな懸念およびそのウイルスが疾患を引き起こすその能力を回復し得る可能性が存在する。

【0022】

[0027] 従って、多くの努力が非ウイルスベクター系、例えばプラスミドDNAに向けられてきた。線状DNA鋳型はプラスミドを用いて送達することができる。これらのベクターは、それらは生成および保管が簡単であり、それらは細胞において安定して存続し得るため、魅力的である。しかし、相同性の腕または供与修復鋳型の構成要素ではないそのプラスミドベクターのかなりの部分が存在する。これは、プラスミドは細菌株中で増殖し、従って細菌のDNA配列、特にプラスミドの維持のための原核生物の複製起点および抗生物質耐性マーカール含有する必要があるためである。これらの細菌の配列の存在は、いくつかの非常に深刻かつ有害な結果を有する。最も顕著であるのは、それがどれだけそのプラスミドを小さく作ることができるかを制限することである。数千塩基対の大きいプラスミドは非常に低い効率でトランスフェクションされる。それらの大きい大きさはまた、それらを送達（例えばエアロゾル化）と関係する、または静脈内送達により導入した場合血流中での水力学的剪断力の影響を受けやすくする。剪断に誘導される分解は生物学的活性の喪失をもたらす、それは少なくとも部分的に現在の遺伝子療法に関する非ウイルスベクターの使用における成功の欠如の原因である。トランスフェクションに関するこれらの問題に挑戦し、それを緩和するために、様々な陽イオン性およびリポソーム性トランスフェクション試薬がデザインされてきたが、これらは細胞毒性に関する問題に悩まされている。加えて、樹状細胞およびT細胞が含まれる多くのヒト細胞は、現行のプラスミドベクターでは効率的にトランスフェクションすることができない。

【0023】

[0028] DNAベクターの大きさの低減は、細胞トランスフェクション効率を増大させるための合理的なアプローチであるようである。そのプラスミド上の細菌の配列を物理的に除去することができ、結果として得られた療法的配列のみを含有する短い線状DNA断片は従来のプラスミドベクターよりも容易に細胞中に導入され得るであろうと想像するかもしれない。しかし、線状DNA鋳型は不安定であり、細胞により急速に分解される。さらに、線状DNAの末端は高度に反応性であり、制御されないDNA修復および組み替えプロセスを誘発し、加えて内因性免疫応答および細胞毒性またはアポトーシスを誘発する。

【0024】

[0029] 従って、遺伝子修復および相同性に方向付けられた遺伝子変更の莫大な可能性にもかかわらず、現行のアプローチは修復または編集事象の非常に低い効率を提供し、有害な、または望まれないDNA配列および結果を導入する可能性を有する。従って、生物学的環境中で安定であり、より大きな細胞トランスフェクションおよび導入遺伝子発現を可能にする遺伝子標的化療法に関する必要性が存在する。

【0025】

[0030] ミニベクター

[0031] 本開示は、相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための鑄型としての使用のためのMiniVectorに関する。DNA MiniVector (約250bpほどの小ささ)は、典型的にはプラスミドを用いたトランスフェクションに抵抗する懸濁細胞、T細胞、樹状細胞のような細胞型が含まれる試験した全ての細胞型において、注目に値するトランスフェクション効率を示す。遺伝子置き換え療法におけるこの発明の使用に関する、そしてヒトの疾患細胞の遺伝子再プログラミングに関する大きな可能性が存在する。変異した、修復を必要とする、変更される、または置き換えられる必要がある、付加される、削除される、重複させる、または反転させる必要があるゲノム、ミトコンドリア、葉緑体、または過剰染色体配列を、MiniVectorをDNA修正のための鑄型として、または遺伝子置換として知られるプロセスの間に挿入される(“フリップインされる(flipped in)”)、もしくは組み込まれるDNAの部品として用いてインピボで直すことができる。

10

【0026】

[0032] スーパーコイル状MiniVectorおよびそのMiniVectorを生成するための方法は、Zechiedrichらによる米国出願一連番号11/448,590(米国公開番号:US 20070020659 A1);表題:“Generation of Minicircle DNA with Physiological Supercoiling”において記載されており、それを本明細書にそのまま援用する。さらに、本明細書で用いられる際、“MiniVector”またはスーパーコイル状DNAベクター系は以前にZechiedrichらによる米国出願一連番号12/905,612(米国公開番号:US 20110160284 A1);表題:“Supercoiled MiniVectors for Gene Therapy Applications”

20

【0027】

[0033] 本開示の態様は、相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための鑄型としての使用のための、非ウイルス性遺伝子療法ベクターであり細菌の配列をほぼ完全に欠いている小さいスーパーコイル状DNA MiniVectorを提供する。それらの小さい大きさのため、これらのMiniVectorは高い効率でトランスフェクションされる。細菌の配列の欠如は、二本鎖のスーパーコイル状の生理活性形態の所望のDNA配列のみを含有する最適な供与鑄型デザインを可能にする。

【0028】

[0034] 1態様において、本開示はインピボまたはインピトロでの細胞内の標的とされるDNA配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための核酸配列鑄型を含むMiniVectorに関する。本開示の一部の態様において、上記で記載された組成物の核酸配列鑄型は、標的とされるDNA配列付近の核酸配列に相補的な鑄型の少なくとも1つの部分;およびその標的とされるDNA配列に相補的ではない鑄型の少なくとも1つの部分を含んでいてよい。関連する態様において、その核酸鑄型の非相補的部分はその標的とされるDNA配列において所望される変更を含有してよい。本明細書で記載される発見は、そのMiniVectorが標的化されたゲノム編集または修復のための利点を有することを実証している。

30

【0029】

[0035] MiniVectorは大腸菌においてインピボでのインテグラーゼに媒介される部位特異的組み換えにより得ることができる。それは例えば導入遺伝子発現カセットのみを有する核酸分子を含有する(プロモーターおよび核酸配列のみが含まれ、ここでその核酸配列は例えば相同性に方向付けられる標的とされるDNA配列の修復、変更、または置き換えのための鑄型であることができ、そして重要なことだが、細菌由来の配列であってはならない(Mali et al., 2013; Alexander BL et al., 2007; Alton et al., 2007)。

40

【0030】

[0036] 標的化されたDNA変更のために用いられるMiniVectorは、約100塩基対(bp)から約2.5キロ塩基(kb)まで、例えば約200bpから約2.2kbまで、例えば約300bpから約2.0kbまで、例えば約400bpから約1.9

50

k b まで、例えば約 500 b p から約 1.8 k b まで、例えば約 600 b p から約 1.7 k b まで、例えば約 700 b p から約 1.6 k b まで、例えば約 800 b p から約 1.5 k b まで、例えば約 900 b p から約 1.4 k b まで、例えば約 1 k b から約 1.3 k b まで、例えば約 1.1 k b から約 1.2 k b までの大きさの二本鎖の環状 DNA 分子であることができる。Mini Vector は約 100 b p 以下の大きさの増分で作製することができる。

【0031】

[0037] 本開示の 1 態様において、上記で記載した組成物の Mini Vector は、細菌の複製起点および抗生物質選択遺伝子の両方を欠いていてよい。関連する態様において、その Mini Vector は約 2,500 塩基対までの大きさのものであることができる。一部の態様において、その Mini Vector はさらに、化学的部分、修飾オリゴヌクレオチド、および/または修飾主鎖を含んでいてよい。

10

【0032】

[0038] その Mini Vector は、所望される場合、例えば化学的部分を用いて標識することができる。代表的な標識には、フルオレセイン、ビオチン、コレステロール、色素、修飾塩基および修飾主鎖が含まれる。代表的な色素には以下の色素が含まれる：6 - カルボキシフルオレセイン、5 - / 6 - カルボキシローダミン、5 - / 6 - カルボキシテトラメチルローダミン、6 - カルボキシ - 2' - , 4' - , 4' - , 5' - , 7' - , 7' - ヘキサクロロフルオレセイン)、6 - カルボキシ - 2' - , 4' - , 7' - , 7' - テトラクロロフルオレセイン)、6 - カルボキシ - 4' - , 5' - ジクロロ - 2' - , 7' - ジメトキシフルオレセイン、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン - 3 - 酢酸)、Cascade Blue、Marina Blue、Pacific Blue、Cy3、Cy5、Cy3.5、Cy5.5、IRDye700、IRDye800、BODIPY 色素、Texas Red、Oregon Green、Rhodamine Red、Rhodamine Green。追加の修飾には、修飾塩基（例えば 2 - アミノプリン、メチル化塩基）、または修飾主鎖（例えば、ホスホロチオエート類、ここでその非架橋酸素の 1 つが硫黄で置換されている；2' - O - メチル - RNA - オリゴヌクレオチド類；メチル - ホスフェートオリゴヌクレオチド類）も含まれ得る。所望であれば、化学的部分および/または修飾塩基および/または修飾主鎖が含まれる多数の標識を同時に用いることができる。ヌクレオチドを標識する方法は、例えば Robert E. Farrell による “Nucleic Acid Probe Technology” ; RNA Methodologies (第 3 版), 2005, pp. 285-316” ; ならびに Current Protocols in Immunology 2001 May 中の Stanley Tabor および Ann Boyle による “Enzymatic Labeling of Nucleic Acids” ; 第 10 章：単位 10.10 において記載されている。これらの参考文献の教示を本明細書にそのまま援用する。

20

30

【0033】

ヌクレアーゼ類

[0039] 上記で言及したように、標的化された DNA 工学は、いくつかの異なる意図された結果、例えば変異を修復すること、変異を導入すること、新しい遺伝子を導入すること、細胞を再プログラミングすること、DNA 配列の一部を削除すること、遺伝子の発現パターンを変更すること等に関して望ましい可能性がある (Perez-Pinera et al., 2012)。このプロセスは典型的には操作された部位特異的ヌクレアーゼの使用を含むことができる。本開示の典型的な態様において、その部位特異的ヌクレアーゼは上記で記載した Mini Vector の核酸配列鋳型の一部によりコードされていてよい。

40

【0034】

[0040] これらの操作されたヌクレアーゼは、それぞれが別個の機能を有する 2 個の融合したドメインを含有することができる。第 1 ドメインである DNA 結合ドメインは、特定の DNA 配列を認識して結合するように操作することができる。第 2 ドメインはヌクレアーゼまたは DNA 中に二本鎖もしくは一本鎖の破断を作ることができる酵素からなることができる。細胞中に導入された際、その操作されたヌクレアーゼは、標的化された配列が存在する場合、細胞の DNA に結合することができる。結合すると、そのヌクレアーゼ

50

はそのDNAの主鎖において切断または破断を引き起こすことができる。従って、その切断は、そのヌクレアーゼドメインの操作された活性に基づいて、その二重らせんの両方の鎖に影響を及ぼすようにデザインすることができ(二本鎖破断、DSB)、またはそれは1本の鎖のみに影響を及ぼすようにデザインすることができ(一本鎖破断、SSB)。そのヌクレアーゼ自体はDNAを非特異的に切断するであろうが、DNA結合ドメインに融合させた場合、そのヌクレアーゼ活性は特定の部位に向けられるであろう。従って、これらの操作されたヌクレアーゼは、部位特異的ヌクレアーゼとも呼ばれる(Jensen et al., 2011; Joung and Sander, 2013; Perez-Pinera et al., 2012)。組み換えによる相同性修復は操作されたヌクレアーゼが一切存在しないでも起こる可能性もあり、または非特異的ヌクレアーゼを用いて実施することができ得ることは特筆すべきである(Jensen et al., 2011)。しかし、部位特異的ヌクレアーゼを用いない相同組み換えに媒介される遺伝子編集の速度は非常に低い(Mali & Cheng, 2012; Parekh-Olmedo et al., 2005; Perez-Pinera et al., 2012)。

10

20

30

40

50

【0035】

[0041] 多数のタイプの操作されたヌクレアーゼが開発されてきた。例えば、最初の、そして最も研究されたものはヌクレアーゼに融合したジンクフィンガー結合ドメインに基づいており、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)と呼ばれる(Carroll, 2008; Jensen et al., 2011; Joung & Sander, 2013; Perez-Pinera, 2012)。別のアプローチは、ヌクレアーゼを転写活性化因子様エフェクター(TALE)に由来するDNA結合ドメインに融合させてTALENまたは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをもたらしたものを利用する(Joung & Sander, 2013; Perez-Pinera, 2012)。追加のアプローチは、哺乳類および他の非細菌生物におけるゲノム編集を改めて目的とした(repurposed)細菌系を利用する。この系では、クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文状の反復(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)(CRISPR)RNAが、CRISPR会合(Cas)タンパク質との複合体で、そのCRISPR RNA配列とマッチするDNA配列の切断を方向付けるように作用する。1つの例において、そのCas9タンパク質を切断されるべき所望のDNA配列を標的とするCRISPR RNAに融合させる(Mali et al., 2013)。これらの部位特異的ヌクレアーゼ系のいずれか1つまたは組み合わせを、供与体またはDNA鋳型と組み合わせて、所望されるようなそれに続く修復を方向付けることができる。

【0036】

[0042] 人為的な破断が操作されたヌクレアーゼにより引き起こされる場合、これらの細胞性修復機序を利用して、反転、挿入、削除、点変異、重複、または転座が含まれるがそれらに限定されない、内在性DNA配列に対するあらゆる数の変更を引き起こすためにその修復プロセスを方向付けることができる(Joung and Sander, 2013; Perez-Pinera et al., 2012; Parekh-Olmedo, Ferrara, Brachman, & Kmiec, 2005)。修復事象を所望の結果へと方向付けるため、鋳型DNA鎖を操作されたヌクレアーゼと共に細胞中に導入することもできる。この鋳型鎖は一本鎖または二本鎖であることができ、部位特異的ヌクレアーゼにより媒介される誘導されたDNA切断事象の部位の、またはその付近の細胞DNAに相補的または相同性である部分を有するであろう。1つの例において、その鋳型鎖は、二本鎖破断の両側のDNA配列に相補的である2つの相同性の領域を有することができる。これらの相同性の腕の間に、修復後の細胞DNAの所望の最終的な配列に対応する鋳型領域が存在することができる。その鋳型領域は、1つの例において、その内在性DNA中に挿入されるべき核酸配列をコードすることができる。それは、あるいは核酸配列に対する単一の点変異またはあらゆる数の他の変更をコードすることができるであろう(Joung and Sander, 2013; Perez-Pinera et al., 2012; Jensen et al., 2011)。

【0037】

[0043] 操作されたヌクレアーゼに加えて、DNA結合ドメインをあるいは修復鋳型の部位特異的組み換えを方向付けるためにインテグラーゼまたはリコンビナーゼドメインに融合させることができる(Perez-Pinera et al., 2012)。別の態様において、トランス

ボザーゼまたはリコンビナーゼに媒介される遺伝子変更を、sleeping beautyトランスポゾンのような系を用いることにより、修復鋳型を用いて実施することができるであろう(Richardson et al., 2002)。

【0038】

[0044] 1 態様において、この開示は、インビボまたはインビトロでの細胞内の標的とされるDNA配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための核酸配列鋳型を含むMini Vectorを含むDNA配列の標的化された変更のための組成物を提供する。典型的な態様において、変更されるべき標的とされるDNA配列は、細胞内のゲノム、ミトコンドリア、またはプラスチドDNAであってよい。一部の態様において、その細胞は哺乳類細胞、原核細胞、真核細胞、古細菌、または植物細胞であることができる。別の態様において、その細胞は体細胞、生殖細胞、または幹細胞であることができる。

10

【0039】

[0045] 本開示の一部の態様において、上記で記載した組成物の核酸配列鋳型は、その標的とされるDNA配列付近の核酸配列に相補的な鋳型の少なくとも1つの部分；およびその標的とされるDNA配列に相補的でない鋳型の少なくとも1つの部分を含むことができる。関連する態様において、その核酸鋳型の非相補的部分は、その標的とされるDNA配列において所望される変更を含有することができる。

【0040】

[0046] 一部の態様において、本開示は、インビボまたはインビトロでの細胞内の標的とされるDNA配列の相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えのための核酸配列鋳型を含むMini Vectorを含むキットに関する。

20

【0041】

[0047] さらに態様において、上記で記載される組成物はさらに少なくとも1種類の部位特異的ヌクレアーゼを含む。一部の態様において、本開示は前記の組成物を含むキットに関する。本開示の典型的な態様において、その部位特異的ヌクレアーゼはそのMini Vectorの核酸配列鋳型の一部によりコードされていてよい。別の態様において、その部位特異的ヌクレアーゼは別々のMini Vector、プラスミド、メッセンジャーRNA、もしくはウイルスによりコードされていてよく、またはタンパク質として送達されていてよい。その部位特異的ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、およびCRISPR(クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文状の反復)/CAS(CRISPR会合)系からなる群から選択することができる。

30

【0042】

[0048] 1 態様において、その部位特異的ヌクレアーゼはその標的DNA配列中の1つ以上の一本鎖破断を誘導することができる。別の態様において、その部位特異的ヌクレアーゼはその標的DNA配列中の1つ以上の二本鎖破断を誘導することができる。本開示の1 態様において、その相同性に方向付けられる修復、変更、または置き換えは、sleeping beautyトランスポゾン系が含まれるがそれに限定されないトランスボザーゼまたはリコンビナーゼにより媒介されてよい。

40

【0043】

[0049] 本開示の別の態様は、上記で記載した組成物(単数または複数)を用いて細胞中の標的DNA配列を変更する方法に関する。そのような方法は、核酸配列鋳型を含むMini Vectorをトランスフェクションすることを含んでいてよい。一部の態様において、その核酸配列鋳型はその標的DNA配列付近の核酸配列に相補的な少なくとも1つの部分；およびその標的DNA配列に相補的でない少なくとも1つの部分を含んでいてよい。関連する態様において、その核酸鋳型の非相補的部分は所望の変更を含有する。そのような方法はさらに、その核酸配列鋳型の相補的領域の、非相補的部分を除いたその標的DNA配列付近の核酸配列との塩基対合；およびその所望の変更のその標的DNA配列中への配列特異的様式での組み込みを含む。

50

【0044】

[0050] 追加の態様において、そのような方法はさらに、少なくとも1種類の部位特異的ヌクレアーゼを提供する工程を含むことができる。その部位特異的ヌクレアーゼは、Mini Vectorの核酸鋳型の一部によりコードされていてよい。典型的な態様において、部位特異的ヌクレアーゼを提供する工程は、部位特異的ヌクレアーゼをコードする別個のMini Vector、プラスミド、メッセンジャーRNA、もしくはウイルス、またはタンパク質を同時トランスフェクションすることを含むことができる。その部位特異的ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、およびCRISPR(クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文状の反復)/CAS(CRISPR会合)系からなる群から選択することができる。1態様において、その部位特異的ヌクレアーゼはその標的DNA配列中の1個以上の一本鎖破断を誘導することができる。別の態様において、その部位特異的ヌクレアーゼはその標的DNA配列中の1個以上の二本鎖破断を誘導することができる。一部の態様において、その標的DNAの変更は、sleeping beautyトランスポゾン系が含まれるがそれに限定されないトランスポザーゼまたはリコンビナーゼにより媒介される。

10

【0045】

[0051] さらに別の態様において、本開示はそれを必要とする対象において標的DNA配列の変更が望まれる遺伝子障害または他の病気を処置する方法に関する。1態様において、その対象は哺乳類または植物であることができる。一部の態様において、そのような方法は、対象に療法上有効量の上記で記載した組成物(単数または複数)を投与することを含む。別の態様において、その方法は、さらに少なくとも1種類の部位特異的ヌクレアーゼを同時投与することを含むことができる。一部の態様において、その部位特異的ヌクレアーゼはMini Vectorの核酸鋳型の一部によりコードされている。別の態様において、その同時投与はその部位特異的ヌクレアーゼをコードする別個のMini Vector、プラスミド、メッセンジャーRNA、もしくはウイルスを提供する、またはタンパク質を提供することを含むことができる。

20

【0046】

[0052] その部位特異的ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、およびCRISPR(クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文状の反復)/CAS(CRISPR会合)系からなる群から選択することができる。1態様において、その部位特異的ヌクレアーゼはその標的DNA配列中の1個以上の一本鎖破断を誘導することができる。別の態様において、その部位特異的ヌクレアーゼはその標的DNA配列中の1個以上の二本鎖破断を誘導することができる。一部の態様において、その標的DNAの変更は、sleeping beautyトランスポゾン系が含まれるがそれに限定されないトランスポザーゼまたはリコンビナーゼにより媒介される。

30

【0047】

[0053] 本明細書で開示される方法および組成物に対する可能な変更および改変が想像されてよい。例えば、細胞での位置(例えば核に対してミトコンドリア、葉緑体、または過剰染色体)を制御するため、そのMini Vectorを“タグ付けする”、または所望の細胞での位置に方向付ける特別なDNA配列が含まれていてよい。細胞の混合集団(例えば生きたマウスにおける肺の線維芽細胞)中の特定の細胞を標的化するため、様々な部分(エピトープ、脂肪酸、特別なタンパク質配列等)をMini Vectorに付けてそれらを例えばその部分に結合する受容体を有する細胞に標的化することができ、またはそれはDNAをその部分に結合させた際にDNA取り込みをより受けやすい。Mini Vectorは、送達ビヒクル、例えばトランスフェクション剤または標的化部分、例えばポリマーもしくはタンパク質と非共有結合的に複合体形成させることもできる。

40

【0048】

適用および利点

50

[0054] 現行のプラスミドベクターはかなり大きく (> 5 kb)、従って以下の理由のため、新規の適用には適していない：(i) 大きさ：そのベクターは対象の配列を含むとさらに大きくなる；(ii) トランスフェクション効率：プラスミドは、鋳型 DNA が修復のために細胞の内部にほとんど～全く送達されない不十分なトランスフェクションを有する；そして (iii) 非特異的 DNA：細菌配列は問題があり、その導入遺伝子のサイレンシングを引き起こし得る。DNA Mini Vector は遥かに小さく、サイレンシングされる可能性がより低い DNA 修復鋳型のより高いトランスフェクション、増大した安定性、および向上した送達の利点を与える。

【0049】

[0055] 療法的適用に加えて、遺伝子または DNA の置き換え、修復、および変更を非療法的適用において適用することもできる。例えば、それを用いてトランスジェニック生物、例えばノックアウトマウスを生成することができ、またはそれを用いて例えば細胞株の不死化のために細胞を変化させることができる。これらのトランスジェニック細胞および生物は疾患モデルとしての、そして DNA 機能の研究における有用性を有する可能性がある。さらに、トランスジェニック生物は、例えば、遺伝子の変更、修復、挿入、削除、重複、または反転が新規の有益な特徴、例えば疾患または害虫耐性を提供し得る農業において商業的有用性を有する可能性がある。これらの適用の全てに関して、Mini Vector は、それらの向上したトランスフェクションの効率および合成の容易さのため、伝統的なプラスミドまたはウイルスベクターを超える向上したプラットフォームを提供する。さらに、Mini Vector は、全ての関連のない配列（細菌の起点および抗生物質耐性）が除去されていると考えられ、従って宿主の DNA への相溶性結合に干渉することができないため、より優れた修復鋳型を提供するであろうと予想することができる。

【0050】

追加の態様

[0056] ここで、本開示の様々な態様およびそのような態様に関する支持を提供する実験結果に対して参照を行うであろう。出願者らは、本明細書における開示は説明的な目的のためだけのものであり、特許請求される主題の範囲を限定することを決して意図していないことを特筆する。

【実施例】

【0051】

実施例 1

ミニベクターを用いた Nucleofection および標的化された遺伝子編集

[0057] Mini Vector が ZFN に媒介される標的化された遺伝子編集のための供与鋳型の役目を果たすことができることを実証するため、細胞のゲノム DNA において容易に検出されて定量化可能な変化をもたらすような改変がデザインされた実験を実施した。その供与鋳型は、IL2R γ 遺伝子の第 1 部分に相補的な 2 個の相溶性領域を有するようにデザインされている。その 2 個の相溶性領域の間に、XhoI 制限酵素により認識され得る部位を含有する鋳型配列がある。最初の概念実証実験は、DNA を送達するために Lonza、Nucleofector (商標) トランスフェクションシステムを用いて、K562 細胞（非接着性の白血病細胞株）を用いて実施された。しかし、あらゆるアプローチ（トランスフェクション剤、電気穿孔法等）を細胞への DNA 送達のために用いることができるであろうことは特筆すべきである。DNA および ZFN の nucleofection の後、その細胞のゲノム DNA を回収し、分析した。XhoI 部位の挿入を検出するため、適切なプライマーを PCR で用いて編集に関して標的化された DNA 配列を含有するゲノム DNA の区間を増幅した。次いでこの増幅された PCR 産物に対して XhoI 酵素を用いた制限消化を行った（図 3）。ゲル上で泳動した際、その PCR 産物は単一のより大きいバンド（未切断、従って未編集）として残るか、または 2 個のより小さいバンド（切断、従ってその供与鋳型によりうまく編集された）として泳動するかのどちらかであろう。その大きいバンドのその 2 個のより小さいバンドに対する比率は、遺伝子標的化の成功の定量的評価を可能にした。その実験において、その供与鋳型は伝統的なブ

ラスミド上またはMini Vector上のどちらかで送達された。そのはるかに小さいMini Vectorは、より大きいプラスミドに対して等しい質量の量で用いられた場合、遥かに多くの鑄型分子を提供するであろう。従って、2種類の用量のMini Vector：等しい質量の量のMini Vectorおよび等しいモル量のMini Vectorを送達すると計算されたより低い用量をプラスミド鑄型に対して比較した。

【0052】

細胞培養の方法

[0058] K562細胞（ヒト不死化骨髓性白血病細胞株、ATCC）を37 °Cおよび5%CO₂において保温されるRPMI培地中で維持した。培地を2～3日ごとに交換し、細胞濃度が 1×10^6 細胞/mLに達した際に継代培養を実施した。その実験に備えるため、細胞を200,000細胞/mLに分割し、200,000～500,000細胞/mLで3日間、細胞がその期間の間対数増殖期にあるように維持した。

10

【0053】

Mini VectorおよびプラスミドDNAのNucleofectionのための方法

[0059] 6ウェルプレート中で、ウェルあたり3mLのRPMI培地を37 °Cに予め温めた。それぞれの試料に関して、 1×10^6 個の細胞を800RPMおよび500gで遠心沈殿させた。Nucleofection溶液を、1mLのNucleofection溶液II（Lonza）を1分割量のNucleofection溶液I（Lonza）と組み合わせることにより調製した。細胞のペレットを 1×10^6 個の細胞あたり100μLのnucleofection溶液中で再懸濁した。その再懸濁した細胞に、Mini VectorまたはプラスミドDNAのどちらかの試料を添加し、十分に混合した。細胞およびDNAの最終的な混合物（約100～110μLの量）を、blue-topトランスフェクションキュベット（Lonza）に入れた。Nucleofectionを、2D Nucleofector（商標）（Lonza）により、プログラム2～16を用いて実施した。そのキュベットを、開始前にその試料が完全にそのキュベットの底部にあるように作業台の上で軽く叩いたことを特筆する。nucleofectionが完了した直後に、500μLの温かい培地をそのキュベットに添加した。最終的に試料をそのキュベットから予め温めた6ウェルプレートに移した。また、キュベットを500μLの培地ですすぎ、それをそのウェルに添加した。プレートをインキュベーター中で37 °Cおよび5%CO₂において3から14日間まで培養した。

20

30

【0054】

[0060] nucleofection後3日目に、細胞をFACSにより分析してトランスフェクション効率を測定した。nucleofection後14日目に、gDNAをその細胞から公開された方法を用いて回収した（Urnov et al., 2005; Zou et al., 2009）。対象のゲノム座位を適切にデザインされたプライマーを用いたPCRにより標的とし、増幅した。次いでそのPCR産物を、ゲノム編集が成功である場合その挿入された制限部位を切断するであろう制限酵素XhoI（NEB）により消化した。それぞれの試料に関する消化されたPCR産物を最終的にPAGEにより分析して標的化されたアレルの百分率を決定した。標的化されたアレルの百分率を、その切断されたバンドの密度対未切断のバンドの密度を比較することにより計算した。

40

【0055】

Mini Vectorおよびプラスミドを用いた標的化された遺伝子編集の結果

[0061] PAGEを用いてその細胞集団内の標的化されたアレルの百分率を決定した。標的化されたゲノム編集が成功した場合、XhoI制限酵素に関する制限部位が標的とされるIL2Ry遺伝子のDNA内に作り出された。このDNAの標的とされた領域を適切なプライマーを用いたPCRにより増幅し、次いでそれに対してXhoI酵素による制限消化を行った。ゲル上で泳動した際、改変されなかったそれらのアレルのPCR産物は、それらはその制限部位を含有せず、その酵素により切断されないため、単一のより大きいバンドとして泳動した。対照的に、供与鑄型により標的とされ修復されたあらゆるアレル

50

は、そのPCR産物はその酵素により認識されて切断されたため、2個のより短いバンドとして泳動した。そのMini Vectorはそのドナー鑄型を提供するのに成功し、アレルの6%~7%がその制限部位を有するように改変されることを可能にした(図4)。

【0056】

実施例2

Mini Vectorに基づく供与鑄型およびメガヌクレアーゼを用いた標的化された遺伝子修正

[0062] 標準的なアッセイを用いて、Mini Vectorの標的化された遺伝子修正(TGC)に関してホーミングエンドヌクレアーゼ(レアカットメガヌクレアーゼ)との組み合わせで供与鑄型の役目を果たす能力を実証した(Humbert and Maizels, 2012)。遺伝子修正は、PGK(ホスホグリセリン酸キナーゼ)プロモーターの制御下の高感度緑色蛍光タンパク質(eGFP)遺伝子の安定して組み込まれているが変異型を有するように操作してあったHEK293T細胞(ヒト胎児性腎臓細胞)を用いた細胞培養系において達成された。このeGFP遺伝子の変異型は、その細胞株中での蛍光レポータータンパク質(GFP)の発現を妨げるように2個のインフレームのN末端停止コドン(10)を有する。完全に機能するeGFP発現カセット(PGKプロモーターおよびその停止コドンを欠いたeGFP遺伝子の両方)のための鑄型を提供するMini Vectorを生成した。従って、このMini Vectorは、細胞のゲノム中のその発現カセットに相補的なDNAの領域、およびそれがその2個の停止コドン(20)を含有しないため相補的ではない細胞中の標的とされたDNA配列に対応するより小さい領域を含有していた。その供与鑄型Mini Vectorの2つの形態をここで試験し、1つはPGKプロモーターの完全長(より長い左側の相同性の腕)を有し、1つは切り詰められたPGKプロモーター配列(より短い左側の相同性の腕)を有していた。両方の形態をHEK293細胞の培養物中に別々にトランスフェクションした。同時に、その細胞に、そのeGFP遺伝子中の2個の停止コドンの部位付近の20bpの標的(20)部位において二本鎖破断を生成するレアカットヌクレアーゼ(メガヌクレアーゼファミリーのI-Anil)を送達するための組み込み欠陥レンチウイルスベクターを用いて形質導入した。うまく相同性に方向付けられる修復(HDR)が起こると、そのeGFP遺伝子が修正され、その細胞はGFPレポーターを発現し始める(GFP+)。

【0057】

[0063] 別個の蛍光タンパク質レポーター系を用いて、そのウイルスによりうまく形質導入された細胞およびI-Anilヌクレアーゼを生成している細胞を同定した。この系に関して、そのI-AnilヌクレアーゼはT2Aペプチド翻訳リンカーを介してmTagBFP(単量体性青色蛍光タンパク質)に連結されていた。これは、I-Anilタンパク質およびmTagBFPレポータータンパク質の両方が同じオープンリーディングフレームから同時に発現することを可能にした。その2種類のタンパク質は翻訳後にT2Aペプチドにおける切断事象により分離され、正しいタンパク質の折り畳みおよび機能性を可能にした。従って、青色蛍光タンパク質を発現している細胞(BFP+)はI-Anilヌクレアーゼも発現していることを確認することができた。全ての実験に関して、その細胞集団はフローサイトメトリーにより分析された。プロトコルは以前に記載された通りに従った(Humbert and Maizels, 2012)。(40)

【0058】

方法

[0064] HEK293細胞を、ウシ胎児血清(FBS)を10%で補ったイーグル最小必須培地(EMEM)中で接着集団として培養し、37°Cおよび5%CO₂で保温した。培地を2~3日ごとに補充し、培養密度が80%近くなった際に細胞を継代した。細胞にMini Vector供与鑄型をトランスフェクションし、同時にI-AnilメガヌクレアーゼおよびmTagBFPレポーターをコードする組み込み欠陥レンチウイルスベクターを用いて形質導入した。トランスフェクションの3日後において細胞を収集し、フローサイトメトリーにより分析してどの集団がその蛍光レポータータンパク質に関して陽性(50)

であるか決定した。

【 0 0 5 9 】

結果

[0065] 予想されたように、I - A n i l 発現の非存在下では修復は存在しないことが示された（図 5 C、左上）。I - A n i l を発現している細胞（B F P + ）において、完全な P G K プロモーターを有する M i n i V e c t o r は、トランスフェクションされた細胞の 3 . 9 % において標的化された遺伝子修正を支持した。これは、伝統的なプラスミド供与体による修復の頻度に匹敵する。標的化された遺伝子修正の頻度は、P G K プロモーターの切り詰められた形態を有する M i n i V e c t o r 供与体を用いると 1 0 倍低く（0 . 4 % ）；伝統的なベクターは完全長プロモーターへの類似の依存を示す（図 5 C ）。

10

【 0 0 6 0 】

[0066] 本明細書で記載される態様は説明的なものとして解釈されるべきであり、決して何であれその開示の残りの部分を限定するものとして解釈されるべきではない。その態様を示し、記載してきたが、当業者は本発明の精神および教示から逸脱することなくその多くの変動および修正を行うことができる。従って、保護の範囲は上記で述べた記載によっては限定されず、特許請求の範囲の主題の全ての均等物を含め、特許請求の範囲によってのみ限定される。本明細書で引用される全ての特許、特許出願および刊行物の開示を、それらが本明細書で述べた手順または他の詳細と一致する、およびそれを補う手順または他の詳細を提供する程度まで、本明細書により本明細書に援用する。

20

【 0 0 6 1 】

参考文献

【 0 0 6 2 】

【化 1】

1. Alexander, B. L., Ali, R. R., Alton, E. W. F., Bainbridge, J. W., Braun, S., Cheng, S. H., Flotte, T. R., et al. (2007). Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 1). *Gene therapy*, 14(20), 1439–47. doi:10.1038/sj.gt.3303001
2. Alton, E., Ferrari, S., Griesenbach, U., Aiuti, A., Bachoud-Lévi, a C., Blesch, A., Brenner, M. K., et al. (2007). Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 2). *Gene therapy*, 14(22), 1555–63. doi:10.1038/sj.gt.3303033
3. Carroll, D. (2008). Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene therapy*, 15(22), 1463–8. doi:10.1038/gt.2008.145 10
4. Jensen, N. M., Dalsgaard, T., Jakobsen, M., Nielsen, R. R., Sørensen, C. B., Bolund, L., & Jensen, T. G. (2011). An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms. *Journal of biomedical science*, 18(1), 10. doi:10.1186/1423-0127-18-10
5. Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(1), 49–55. doi:10.1038/nrm3486
6. Kyriakouli, D. S., Boesch, P., Taylor, R. W., & Lightowlers, R. N. (2008). Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene therapy*, 15(14), 1017–23. doi:10.1038/gt.2008.91 20
7. Mali, P., & Cheng, L. (2012). Concise review: Human cell engineering: cellular reprogramming and genome editing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(1), 75–81. doi:10.1002/stem.735
8. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., et al. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823–6. doi:10.1126/science.1232033
9. Nakayama, M. (2010). Homologous recombination in human iPS and ES cells for use in gene correction therapy. *Drug discovery today*, 15(5-6), 198–202. doi:10.1016/j.drudis.2010.01.006 30

【 0 0 6 3 】

【化 2】

10. Parekh-Olmedo, H., Ferrara, L., Brachman, E., & Kmiec, E. B. (2005). Gene therapy progress and prospects: targeted gene repair. *Gene therapy*, 12(8), 639–46. doi:10.1038/sj.gt.3302511
12. Perez-Pinera, P., Ousterout, D. G., & Gersbach, C. a. (2012). Advances in targeted genome editing. *Current opinion in chemical biology*, 16(3-4), 268–77. doi:10.1016/j.cbpa.2012.06.007
13. Porteus, M. (2011). Homologous recombination-based gene therapy for the primary immunodeficiencies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1246, 131–40. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06314.x 10
14. Richardson, P.D., Augustine, L.B., Kren, B.T. and Steer, C.B., Gene Repair and Transposon-mediated gene repair. *Stem Cells (Dayton, OH)* 30, 75-81 (2002).
15. Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y.-L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., et al. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435(7042), 646–51. doi:10.1038/nature03556
16. Zou, J., Maeder, M. L., Mali, P., Pruett-Miller, S. M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B.-K., Chen, G., et al. (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 5(1), 97–110. doi:10.1016/j.stem.2009.05.023 20
17. Smith, A. M. Takeuchi, R., Pellenz, S., Davis, L., Maizels, N., Monnat, Jr., R. J., and Stoddard, B.L. (2009). Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the IAniI LAGLIDADG homing endonuclease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 106: 5099-5104.
18. Davis, L., and Maizels, N. (2011). DNA nicks promote efficient and safe targeted gene correction. *PLoS ONE*, 6: e23981. 30
19. Fogg, J. M., Kolmakova, N., Rees, I., Magonov, S., Hansma, H., Perona, J. J., and Zechiedrich, E. L. (2006). Exploring writhe in supercoiled minicircle DNA. *J Phys: Condens Matter* 18: S145-S159.
20. Zhao, N., Fogg, J. M., Zechiedrich, L., and Zu, Y. (2011). Transfection of shRNA-encoding Minivector DNA of a few hundred base pairs to regulate gene expression in lymphoma 40

【 0 0 6 4 】

【化 3】

cells. *Gene Ther* 18: 220-224.

21. Catanese, D. J., Jr., Fogg, J. M., Schrock, D. E., II, Gilbert, B. E., and Zechiedrich, L. (2012). Supercoiled Minivectors DNA resist shear forces associated with gene therapy delivery. *Gene Ther.* 19: 94-100.
22. Humbert, O. and Maizels, N. 2012. Epigenetic modification of the repair donor regulates targeted gene correction. *Mol. Therapy Nucleic Acids* 1:e49.

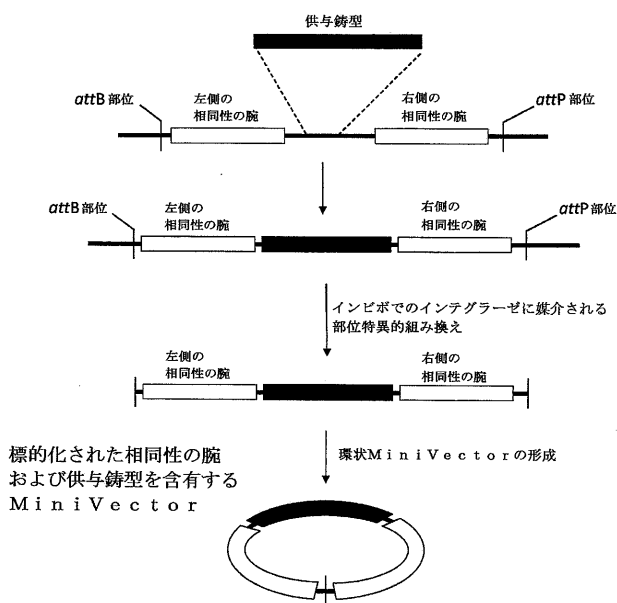
10

【図 1】

図1 DNA変更のための鋳型を含有する
MiniVectorの調製

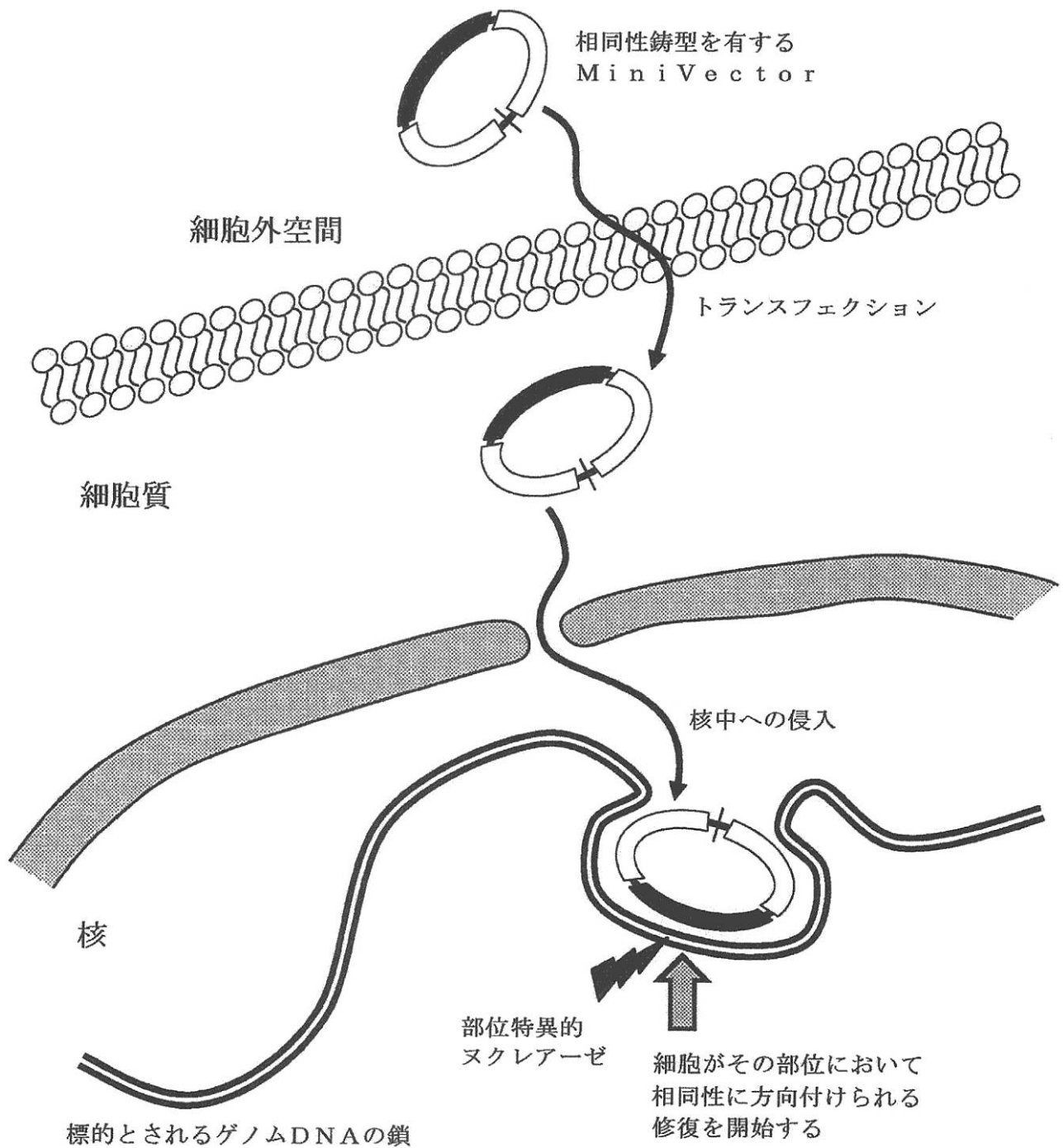
pMV-Donor1 プラスミド

供与鋳型は挿入、削除、点変異、反転、転座、または他のDNA配列の変更を方向付ける



【図2】

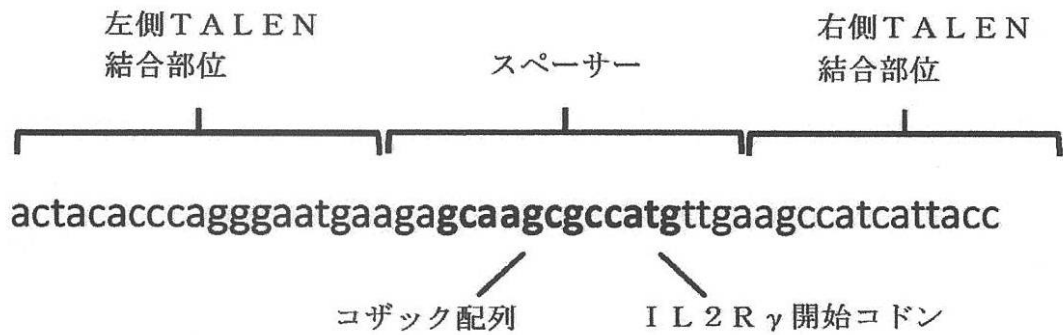
図2 MiniVector鋳型を用いた標的化されたゲノム編集



【図 3】

図 3. IL2R γ のエキソン 1 への標的化された制限部位の挿入

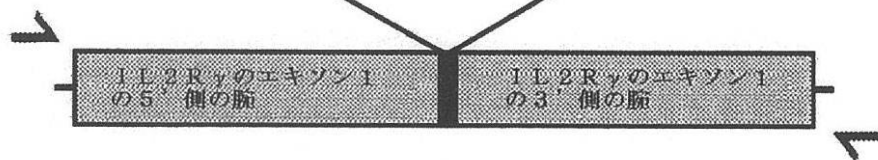
標的化された内在性遺伝子配列（野生型）：



供与体 1 鋳型配列：



完全な供与体 1：



供与体 1 MiniVector：

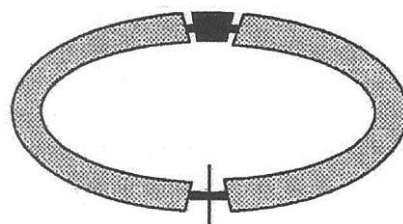


図4. Mini Vectorおよびプラスミドを用いた遺伝子標的化の分析

← 標的化された
← アレル

	MiniVector (等質量)	プラスミド	MiniVector (等モル)
標的化されたアレルの 平均%	7 %	10 %	6 %
標準偏差	± 2 %	± 4 %	± 2 %

【図 5】

図 5 A

MiniVector 供与鋳型

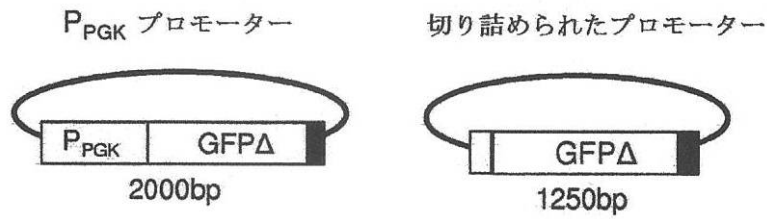


図 5 B

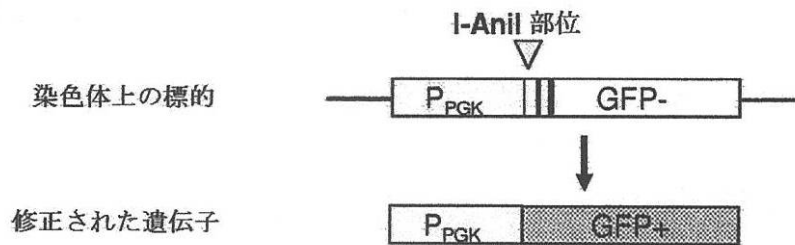
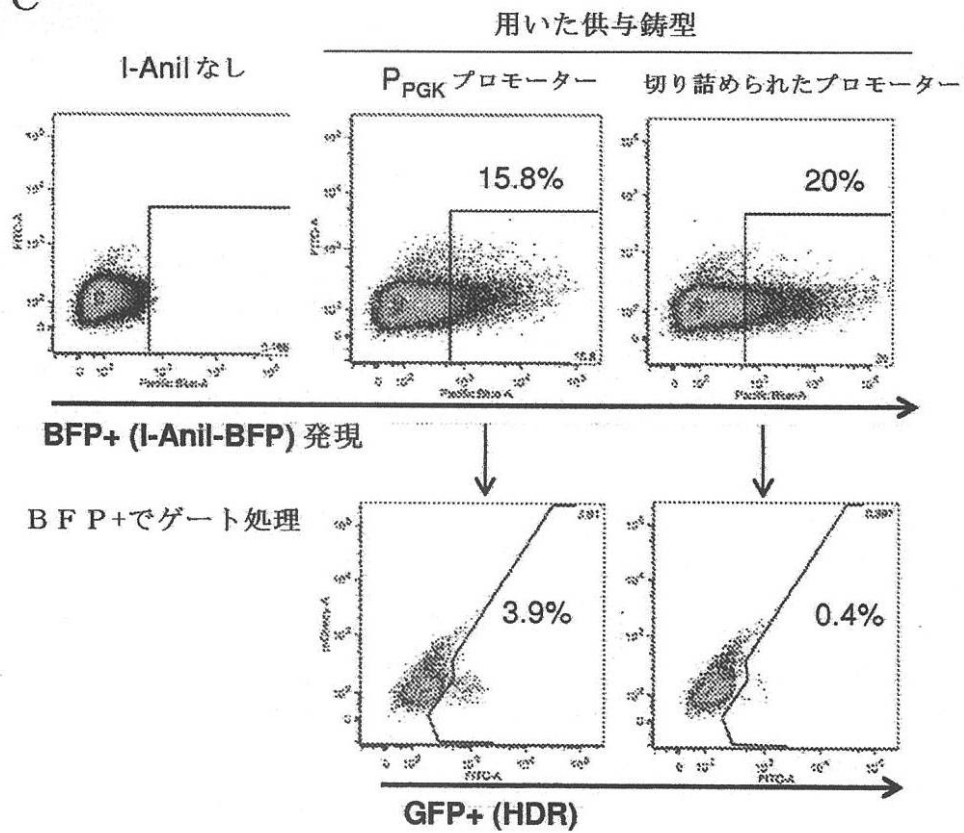


図 5 C



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/043433																					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 48/00 (2013.01) USPC - 435/455 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 31/7115, 48/00; C07H 21/04; C12N 5/04, 5/071, 15/63, 15/85; C12P 19/34 (2013.01) USPC - 435/41, 91.1, 91.4, 320.1, 325, 366, 440, 455, 465; 514/44R; 536/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 35/12, 38/00, 48/00; C12N 15/10, 15/52, 15/85, 15/86, 15/102 (2013.01) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2011/0160284 A1 (ZECHIEDRICH et al) 30 June 2011 (30.06.2011) entire document</td> <td>1, 4, 6, 8, 11-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2, 3, 5, 7, 9, 10, 17-35</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>URNOV et al. "Genome editing with engineered zinc finger nucleases" Nature Reviews Genetics Vol. 11, pp. 636-646. September 2010. entire document</td> <td>2, 3, 5, 7, 9, 17-35</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2004/0092471 A1 (KAY et al) 13 May 2004 (13.05.2004) entire document</td> <td>10, 24, 33</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>OSBORN et al. "Minicircle DNA-based Gene Therapy Coupled With Immune Modulation Permits Long-term Expression of α-L-Iduronidase in Mice With Mucopolysaccharidosis Type I" Molecular Therapy 19(03): pp. 450-460. March 2011. entire document</td> <td>1-35</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ARONOVICH et al. "The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy" Human Molecular Genetics 20(1): pp. r14-r20. 01 April 2011. entire document</td> <td>1-35</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2011/0160284 A1 (ZECHIEDRICH et al) 30 June 2011 (30.06.2011) entire document	1, 4, 6, 8, 11-16	Y		2, 3, 5, 7, 9, 10, 17-35	Y	URNOV et al. "Genome editing with engineered zinc finger nucleases" Nature Reviews Genetics Vol. 11, pp. 636-646. September 2010. entire document	2, 3, 5, 7, 9, 17-35	Y	US 2004/0092471 A1 (KAY et al) 13 May 2004 (13.05.2004) entire document	10, 24, 33	A	OSBORN et al. "Minicircle DNA-based Gene Therapy Coupled With Immune Modulation Permits Long-term Expression of α -L-Iduronidase in Mice With Mucopolysaccharidosis Type I" Molecular Therapy 19(03): pp. 450-460. March 2011. entire document	1-35	A	ARONOVICH et al. "The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy" Human Molecular Genetics 20(1): pp. r14-r20. 01 April 2011. entire document	1-35
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	US 2011/0160284 A1 (ZECHIEDRICH et al) 30 June 2011 (30.06.2011) entire document	1, 4, 6, 8, 11-16																					
Y		2, 3, 5, 7, 9, 10, 17-35																					
Y	URNOV et al. "Genome editing with engineered zinc finger nucleases" Nature Reviews Genetics Vol. 11, pp. 636-646. September 2010. entire document	2, 3, 5, 7, 9, 17-35																					
Y	US 2004/0092471 A1 (KAY et al) 13 May 2004 (13.05.2004) entire document	10, 24, 33																					
A	OSBORN et al. "Minicircle DNA-based Gene Therapy Coupled With Immune Modulation Permits Long-term Expression of α -L-Iduronidase in Mice With Mucopolysaccharidosis Type I" Molecular Therapy 19(03): pp. 450-460. March 2011. entire document	1-35																					
A	ARONOVICH et al. "The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy" Human Molecular Genetics 20(1): pp. r14-r20. 01 April 2011. entire document	1-35																					
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 15 October 2013		Date of mailing of the international search report 31 OCT 2013																					
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/043433

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☐

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

ISA/225 mailed on 06 June 2013. The sequence listing filed on 05 July 2013 was not a proper electronic sequence listing submission.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

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

(74) 代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74) 代理人 100101373

弁理士 竹内 茂雄

(74) 代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74) 代理人 100187540

弁理士 國枝 由紀子

(72) 発明者 ゼチードリッチ, イー・リン

アメリカ合衆国テキサス州 77025, ヒューストン, ダーネス・ウェイ 3807

(72) 発明者 フォグ, ジョナサン

アメリカ合衆国テキサス州 77035, ヒューストン, クリークベンド・ドライブ 4815

(72) 発明者 カタニーズ, ジュニア, ダニエル・ジェームズ

アメリカ合衆国テキサス州 77082, ヒューストン, マークスコット・ドライブ 3107

(72) 発明者 マイゼル, ナンシー

アメリカ合衆国ワシントン州 98112, シアトル, トゥエンティセカンド・アベニュー・イースト 2303

(72) 発明者 ハンバート, オリヴィエ

アメリカ合衆国ワシントン州 98126, シアトル, ベルヴィデア・アベニュー・サウスウエスト 3422

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA08 AA10 AA20 BA79 BA80 CA01 DA01 DA02 DA05

DA11 DA12 EA04 GA11 GA25 GA30 HA17 HA20

4B065 AA01X AA01Y AA58X AA58Y AA72X AA72Y AA87X AA87Y AB01 BA02

CA44 CA53 CA60

4C084 AA02 AA13 BA03 CA62 DC22 MA02 NA03 NA06

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA03 NA06

4C087 AA01 BC83 CA12 MA02 NA03 NA06