

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6722176号  
(P6722176)

(45) 発行日 令和2年7月15日(2020.7.15)

(24) 登録日 令和2年6月23日(2020.6.23)

(51) Int.Cl.

F 1

**C 12 N** 5/10 (2006.01)  
**C 12 N** 5/0789 (2010.01)  
**C 12 N** 5/078 (2010.01)  
**A 61 K** 35/28 (2015.01)  
**A 61 K** 35/18 (2015.01)

C 12 N 5/10 Z N A  
C 12 N 5/0789  
C 12 N 5/078  
A 61 K 35/28  
A 61 K 35/18 Z

請求項の数 10 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-514521 (P2017-514521)  
(86) (22) 出願日 平成27年9月16日 (2015.9.16)  
(65) 公表番号 特表2017-532955 (P2017-532955A)  
(43) 公表日 平成29年11月9日 (2017.11.9)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2015/050411  
(87) 國際公開番号 WO2016/044416  
(87) 國際公開日 平成28年3月24日 (2016.3.24)  
審査請求日 平成30年7月6日 (2018.7.6)  
(31) 優先権主張番号 62/051,159  
(32) 優先日 平成26年9月16日 (2014.9.16)  
(33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 508241200  
サンガモ セラピューティクス, インコ  
ーポレイテッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リッ  
チモンド カナル ブールバード 501  
ポイント リッチモンド テク センタ  
ー スト エー 100  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策  
(74) 代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹  
(74) 代理人 100181674  
弁理士 飯田 貴敏  
(74) 代理人 100181641  
弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】造血幹細胞におけるヌクレアーゼ媒介性ゲノム工学および補正のための方法および組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

遺伝子改変された細胞であって、  
配列番号23および配列番号24に結合し、かつ、変異を含む内在性ヒトベータ-ヘモグロビン(Hb<sub>b</sub>)遺伝子に二本鎖切断を生じる、1対のジンクフィンガーヌクレアーゼと；

前記1対のジンクフィンガーヌクレアーゼによる二本鎖切断後の前記Hb<sub>b</sub>遺伝子のゲノム改変と

を含み、前記対が、表1において33488と33501；33488と47817；47773と33501；または、47773と47817と指定されるジンクフィンガータンパク質を含み、前記ゲノム改変が、前記変異が補正され、前記細胞が野生型のHb<sub>b</sub>を発現するような、ドナーポリヌクレオチドの挿入を含む、遺伝子改変された細胞。

## 【請求項2】

幹細胞である、請求項1に記載の遺伝子改変された細胞。

## 【請求項3】

前記幹細胞が、造血幹細胞である、請求項2に記載の遺伝子改変された細胞。

## 【請求項4】

前記造血幹細胞が、CD34+細胞である、請求項3に記載の遺伝子改変された細胞。

## 【請求項5】

請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞と、請求項1～4のいずれかに

記載の遺伝子改変された細胞に由来する細胞とを含む、組成物。

**【請求項 6】**

請求項 1～4 のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞に由来する前記細胞が赤血球細胞 (RBC) である、請求項 5 に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記ドナーポリヌクレオチドが、镰状赤血球変異を補正する、請求項 1～4 のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞または請求項 5 もしくは 6 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

請求項 1～4 のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞または請求項 5～7 のいずれかに記載の組成物を含む医薬組成物。

10

**【請求項 9】**

- サラセミアを有する患者を処置するための請求項 8 に記載の医薬組成物であって、前記患者における Hb b 遺伝子発現を増加させるのに十分な量で投与されることを特徴とする、医薬組成物。

**【請求項 10】**

镰状赤血球貧血のような異常ヘモグロビン症の処置に使用するための請求項 1～4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞を含む組成物または請求項 5～7 のいずれかに記載の組成物であって、該細胞が、造血幹細胞、赤血球前駆体細胞または赤血球細胞であり、かつ、患者に生着させられることを特徴とする、組成物。

**【発明の詳細な説明】**

20

**【技術分野】**

**【0001】**

関連出願への相互参照

この出願は、2014年9月16日に出願された米国仮出願第 62/051,159 号（この開示は、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

**【0002】**

本開示は、ゲノム工学の分野、特に、造血細胞のゲノムの標的化された改変の分野にある。

**【背景技術】**

**【0003】**

30

多数の疾患のための遺伝子療法における最も有望なアプローチの 1 つは、幹細胞の *in vitro* 遺伝子改変の使用と、その後の患者における改変された細胞の移植および生着に関与する。導入された幹細胞が、長期持続および多系列分化を呈する場合が特に有望である。最も一般的には CD34 細胞表面マーカーの発現に基づき濃縮される細胞の形態である造血幹細胞は、容易に得ることができ、移植後に全造血系列を再構築することができる長期造血幹細胞 (LT-HSC) を含有するため、特に有用な細胞集団である。

**【0004】**

ゲノム DNA の標的化された開裂のための種々の方法および組成物が説明してきた。かかる標的化された開裂事象を使用して、例えば、標的化された変異誘発を誘導し、細胞 DNA 配列の標的化された欠失を誘導し、任意の生物由来の細胞中の所定の染色体遺伝子座における標的化された組換えを容易にすることができる。例えば、あらゆる目的でその開示が参照によりその全体が組み込まれる、米国特許第 9,045,763 号；同第 9,005,973 号；同第 8,956,828 号；同第 8,945,868 号；同第 8,586,526 号；同第 6,534,261 号；同第 6,599,692 号；同第 6,503,717 号；同第 6,689,558 号；同第 7,067,317 号；同第 7,262,054 号；同第 7,888,121 号；同第 7,972,854 号；同第 7,914,796 号；同第 7,951,925 号；同第 8,110,379 号；同第 8,409,861 号；米国特許出願公開第 20030232410 号；同第 20050208489 号；同第 20050026157 号；同第 20050064474 号；同第 20060063231 号；同第 20080159996 号；同第 201000218264 号；同第 2

40

50

0120017290号；同第20110265198号；同第20130137104号；同第20130122591号；同第20130177983号および同第20130177960号、および同第20150056705号ならびに米国出願第14/706,747号を参照されたい。これらの方法は、多くの場合、非相同末端結合（NHEJ）等、エラーボーン過程による切断の修復または修復錆型を使用した修復（相同性誘導型修復（homology directed repair）またはHDR）が、遺伝子のノックアウトまたは目的の配列の挿入（標的化組込み）をもたらし得るような、標的DNA配列に二本鎖切断（DSB）またはニックを誘導するための操作された開裂系の使用に関与する。続いて起こる修復経路（NHEJ対HDRまたはその両方）は典型的に、修復錆型の存在および数種類の競合する修復経路の活性に依存する。

10

#### 【0005】

外部から供給される修復錆型（例えば、ドナー）の非存在下における二本鎖切断の導入は、細胞NHEJ経路により導入された変異による、標的化された遺伝子の不活性化のために一般的に使用される。NHEJ経路は、標準的なKu依存性経路、および開裂部位付近の直列反復配列の短いひとつながりを活用するマイクロホモロジー媒介末端結合に基づく代替的なKu非依存性経路に分けることができる。これら2種のNHEJ経路による遺伝子編集後の挿入および/または欠失（「インデル」）のパターンは異なり、これにより、適用に応じて変異の機能的意義に差を生じ得る。

#### 【0006】

二本鎖切断に隣接する配列に対し相同性を有する区間を保有する外部から供給されるドナーの存在下で、ドナー分子を使用した相同性誘導型遺伝子修復（HDR）を使用して、DNAの单一塩基または小区間の配列を変化させることができる（「遺伝子補正」）、あるいはその一方で、所定のゲノム位置への発現カセット全体の標的化挿入（「遺伝子付加」）のために使用することができる。

20

#### 【0007】

操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）等の特異的ヌクレアーゼの使用により、または特異的開裂をガイドするための操作されたc r R N A / t r a c r R N A（「単一ガイドRNA」）によるC R I S P R / C a s 系を使用して、開裂を生じることができる。例えば、米国特許第8,697,359号および第8,932,814号ならびに米国特許公開第20150056705号を参照のこと。さらに、標的化ヌクレアーゼは、ゲノム編集および遺伝子療法における使用の可能性も有し得るアルゴノート（Argonaut）系（例えば、T. thermophilus由来、「TtAgo」として公知、Swartsら（2014年）Nature 507巻（7491号）：258～261頁を参照）に基づき開発されている。

30

#### 【0008】

上述のヌクレアーゼ系のうち1種を使用した標的化開裂を開発して、HDRまたはNHEJ媒介性過程のいずれかを使用して特異的標的位置へと核酸を挿入することができる。しかし、細胞へのヌクレアーゼ系およびドナーの両方の送達が問題となる場合がある。例えば、細胞へのプラスミドの形質導入によるドナーまたはヌクレアーゼの送達は、レシピエント細胞、特に、初代細胞であるため細胞株由来の細胞ほど頑強ではない細胞にとって有毒性となり得る。

40

#### 【0009】

C D 3 4 + 幹または前駆細胞は、自己再生するその能力、および/またはリンパ系列（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞）および骨髄系列（例えば、単球、赤血球、好酸球、好塩基球および好中球）の細胞に分化するその能力によって特徴付けられる、不均一な細胞セットである。これらの不均一な性質は、C D 3 4 + 幹細胞集団内には、特異的な群の多分化能（系列が拘束されているか否か）を反映することが多い複数の亜群が存在するという事実に起因する。例えば、C D 3 8 - であるC D 3 4 + 細胞は、より始原的で未熟なC D 3 4 + 前駆細胞（長期造血前駆細胞とも称される）である一方、C D 3 4 + C D 3 8

50

+ である細胞（短期造血前駆細胞）は、系列が拘束されている（Stellala (1995年) *Hematologica* 80巻: 367~387頁を参照）。続いてこの集団が、分化経路を下ってさらに進行すると、CD34マーカーは失われる。CD34+幹細胞は、臨床細胞療法における莫大な潜在力を有する。

#### 【0010】

赤血球細胞（RBC）または赤血球は、血液の主要な細胞構成成分である。実際に、RBCは、ヒトにおける細胞の4分の1を占める。成熟RBCは、核およびヒトにおける多くの他の細胞小器官を欠き、組織へと酸素を運搬し、組織から二酸化炭素を運び出し、除去のために肺に戻すように機能する、RBC中に存在する金属結合タンパク質であるヘモグロビンに満ちている。このタンパク質は、RBCの乾燥重量のおよそ97%を構成し、血液の酸素運搬能力を約70倍増加させる。ヘモグロビンは、2本の様グロビン鎖および2本の様グロビン鎖ならびに4個のヘム基を含むヘテロ四量体である。成体では、22四量体は、ヘモグロビンA（HbA）または成体ヘモグロビンと称される。典型的には、アルファおよびベータグロビン鎖は、およそ1:1の比で合成され、この比は、ヘモグロビンおよびRBC安定化の観点から重大な意味を持つと思われる。実際に、ある1種類のグロビン遺伝子が不適切に発現される事例において（後述を参照）、この1:1の比を回復させるような他の種類のグロビンの発現の低下（例えば、特異的s i RNAを使用）は、変異体細胞表現型のある側面を軽減する（Voonら(2008年) *Hematologica* 93巻(8号): 1288頁を参照）。胎児の発達において、異なる型のヘモグロビンである胎児性ヘモグロビン（HbF）が産生され、このヘモグロビンは、母親の血流を経て胎児の系へと酸素を送達することができるよう、ヘモグロビンAよりも高い酸素に対する結合親和性を有する。胎児性ヘモグロビンは、2本のグロビン鎖も含有するが、成体 - グロビン鎖の代わりに、2本の胎児 - グロビン鎖を有する（すなわち、胎児性ヘモグロビンは 2 2）。妊娠のおよそ30週目に、胎児におけるグロビンの合成が降下し始める一方、グロビンの産生が増加する。およそ10ヶ月齢までに、新生児のヘモグロビンは、ほとんど全て 2 2 であるが、一部のHbFは成人期まで存続する（総ヘモグロビンのおよそ1~3%）。からへの産生の切り換えの調節は極めて複雑であり、グロビンの発現下方調節と同時のグロビン発現の上方調節に主に関与する。

#### 【0011】

ヘモグロビン鎖をコードする配列における遺伝的欠損は、鎌状赤血球貧血およびサラセニアを含む、異常ヘモグロビン症として公知の多数の疾患の原因となり得る。異常ヘモグロビン症患者の大部分において、グロビンをコードする遺伝子は存在し続けるが、上述の通り分娩前後に生じる正常遺伝子抑制のため、発現は相対的に低くなる。

#### 【0012】

その大部分はサハラ以南のアフリカ系の人々であるが、米国における5000名に1名が、鎌状赤血球症（SCD）を有することが推定される。鎌状赤血球ヘテロ接合性には、マラリアからの保護に対して利益があると思われるため、サハラ以南のアフリカでは集団の3分の1が鎌状赤血球の形質を有すると推定されるように、この形質は、長い時間選択されてきた可能性がある。鎌状赤血球症は、アミノ酸番号6のグルタミン酸の代わりにバリンが使用された（DNAレベルではGAGからGTG）、- グロビン遺伝子における変異に起因し、その結果得られるヘモグロビンは、「ヘモグロビンS」または「HbS」と称される。より低酸素の条件下では、デオキシ型のHbSのコンフォメーションシフトは、EおよびFヘリックスの間のタンパク質における疎水性パッチを露出させる。ヘモグロビンのベータ鎖の6位の疎水性残基のバリンは、疎水性パッチと会合することができ、HbS分子を凝集させ、線維性沈殿物を形成する。このような凝集物は続いて、RBCの異常または「鎌状化」を引き起こし、細胞の柔軟性の損失を生じる。鎌状化RBCは、毛細血管床に押し込むことができなくなり、鎌状赤血球患者における血流閉塞発作を生じ得る。加えて、鎌状化したRBCは、正常RBCよりも脆弱であり、溶血する傾向があり、最終的に、患者に貧血を引き起こす。

10

20

30

40

50

鐮状赤血球患者の処置および管理は、急性エピソードにおける抗生物質処置、疼痛管理および輸血に関する一生の命題である。アプローチの1つは、一部には グロビンの產生を増加させることによりその効果を発揮する、ヒドロキシ尿素の使用である。慢性ヒドロキシ尿素療法の長期副作用は未だ不明であるが、処置は、望まれない副作用を生じ、患者毎に可変的な有効性を有する場合がある。鐮状赤血球処置の有効性の増加にもかかわらず、患者の平均余命は依然として、50代半ばから後半でしかなく、疾患の関連する罹患率は、患者のクオリティオブライフに著明な影響を有する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

10

【特許文献1】米国特許第9,045,763号明細書

【特許文献2】米国特許第9,005,973号明細書

【特許文献3】米国特許第8,956,828号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

20

よって、ゲノム編集に使用して、異常遺伝子を補正またはその他の発現を変更し、例えば、鐮状赤血球症等の異常ヘモグロビン症を処置することができる、追加的な方法および組成物の必要が依然としてある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

20

鐮状赤血球症等、遺伝性疾患に関するタンパク質をコードする1種または複数の遺伝子の発現を変更するため、またはそれらの遺伝子を補正するための（例えば、疾患において欠如する、欠乏するもしくは異常なタンパク質および／またはこれらのタンパク質を調節するタンパク質を産生する）方法および組成物が、本明細書に開示されている。本発明は、遺伝子療法およびゲノム工学における使用のための組成物および方法について記載する。

【0016】

30

このようなタンパク質の変更は、これらの遺伝性疾患の処置をもたらすことができる。特に、ゲノム編集は、異常遺伝子の補正、野生型遺伝子の挿入または内在性遺伝子の発現変化に使用される。アプローチの1つは、欠陥のある内在性 グロビン遺伝子が標的化され、変異体配列が置き換えられる遺伝子補正の使用に関する。アプローチの1つは、幹細胞（例えば、造血幹細胞またはRBC前駆体）の変更の使用にさらに関与し、この幹細胞は次に、異常ヘモグロビン症の処置のために、患者への生着に使用することができる。

【0017】

30

一態様では、例えば、同じ種類の細胞または細胞株の野生型ゲノム配列と比較して、遺伝子変更された細胞または細胞株が、本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、細胞は、遺伝子変更されたRBC前駆体（「HSC」として公知の造血幹細胞）を含む。細胞または細胞株は、変更についてヘテロ接合またはホモ接合となることができる。変更は、挿入、欠失および／またはこれらの組合せを含むことができる。ある特定の実施形態では、HSCは、野生型遺伝子（例えば、グロビン遺伝子）が挿入および発現されるように、ならびに／または内在性異常遺伝子が補正されるように、操作されたヌクレアーゼおよびドナー核酸により変更される。ある特定の実施形態では、変更（例えば、挿入）は、ヌクレアーゼ結合および／もしくは開裂部位においてまたはその付近のものであり、開裂および／もしくは結合部位の部位の上流もしくは下流の1～300（もしくはその間のいずれかの数の塩基対）塩基対以内の配列に対する変更；結合および／もしくは開裂部位のいずれか一方の側の1～100塩基対（もしくはその間のいずれかの数の塩基対）以内の変更；結合および／もしくは開裂部位のいずれか一方の側における1～50塩基対（もしくはその間のいずれかの数の塩基対）以内の変更；ならびに／またはヌクレアーゼ結合部位および／もしくは開裂部位の1もしくは複数塩基対に対する変更が挙げられるがこ

40

50

れらに限定されない。ある特定の実施形態では、改変は、配列番号 23 もしくは 24 においてまたはその付近（例えば、1～300 塩基対もしくはその間のいずれかの数の塩基対）のものである。他の実施形態では、改変は、配列番号 23 または 24 の 1～100 塩基対（またはその間のいずれかの数の塩基対）である。ある特定の実施形態では、改変は、配列番号 23 および / または配列番号 24 内にあり、例えば、配列番号 23 または 24 のいずれかにおける 1 または複数塩基対の改変である。一部の事例において、挿入のための野生型遺伝子配列は、野生型 グロビンをコードする。他の事例において、内在性異常遺伝子は、グロビン遺伝子であり、例えば、内在性異常ヒトベータ-ヘモグロビン (Hb b) 遺伝子における少なくとも 1 個の変異を補正する 1 個または複数のゲノム改変がなされる。一部の態様では、ベータグロビン遺伝子の改変は、転写された RNA の適切なスプライシングを可能にする。他の態様では、ポリペプチド配列の第 6 位における不正確なバリンアミノ酸をコードするコドン G T G が、野生型ポリペプチドに存在するグルタミン酸をコードする G A G に変更されるように、ベータグロビン遺伝子の改変は、鎌状アレルにおける変異を補正する。本明細書に記載されている遺伝子改変された幹細胞に由来する、部分的にまたは完全に分化した細胞も提供される（例えば、RBC または RBC 前駆体細胞）。本明細書に記載されている遺伝子改変された細胞を含む医薬組成物等、組成物も提供される。

#### 【0018】

別の態様において、ゲノムにおける目的の領域（例えば、グロブリン遺伝子）における標的部位に結合するジンクフィンガータンパク質 (ZFP) であって、1 個または複数個の操作されたジンクフィンガー結合ドメインを含む ZFP が、本明細書に記載されている。一実施形態において、ZFP は、目的の標的ゲノム領域を開裂させるジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) であって、1 個または複数個の操作されたジンクフィンガー結合ドメインおよびヌクレアーゼ開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインを含む ZFN である。開裂ドメインおよび開裂ハーフドメインは、例えば、種々の制限エンドヌクレアーゼおよび / またはホーミングエンドヌクレアーゼから得ることができる。一実施形態において、開裂ハーフドメインは、IIS 型制限エンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）に由来する。ある特定の実施形態では、ジンクフィンガードメインは、グロビンまたはセーフハーバー遺伝子における標的部位を認識する。ある特定の実施形態では、ジンクフィンガードメインは、5 または 6 個のジンクフィンガードメインを含み、グロビン遺伝子における標的部位を認識する（例えば、表 1 に示す認識ヘリックス領域を有する 5 または 6 個のフィンガーを有するジンクフィンガータンパク質）。

#### 【0019】

別の態様において、ゲノムにおける目的の領域（例えば、グロブリン遺伝子）における標的部位に結合する TALE タンパク質（転写活性化因子様）であって、TALE が、1 個または複数個の操作された TALE 結合ドメインを含む TALE タンパク質が、本明細書に記載されている。一実施形態において、TALE は、目的の標的ゲノム領域を開裂するヌクレアーゼ (TALEN) であって、1 個または複数個の操作された TALE-DNA 結合ドメインおよびヌクレアーゼ開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインを含む TALEN である。開裂ドメインおよび開裂ハーフドメインは、例えば、種々の制限エンドヌクレアーゼおよび / またはホーミングエンドヌクレアーゼから得ることができる。一実施形態において、開裂ハーフドメインは、IIS 型制限エンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）に由来する。

#### 【0020】

別の態様では、ゲノム中の目的の領域（例えば、疾患関連遺伝子）における標的部位に結合する CRISPR/Cas または TtAgO 系が、本明細書に記載されており、この CRISPR/Cas 系は、CRIPSR/Cas ヌクレアーゼおよび操作された crRNA / tracrRNA（または単一ガイド RNA）を含む。ある特定の実施形態では、CRISPR/Cas または TtAgO 系は、グロビン遺伝子における標的を認識する。

#### 【0021】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、細胞のゲノム工学を容易にするヌクレアーゼは、ペプチドとして送達されるが、他方では、ヌクレアーゼをコードする核酸として送達される。一部の実施形態では、1種より多くのヌクレアーゼが使用され、核酸形態、タンパク質形態またはこれらの組合せで送達することができる。一部の好まれる実施形態では、ヌクレアーゼをコードする核酸は、mRNAであり、一部の事例において、mRNAは、保護されている。さらに好まれる実施形態では、mRNAは、ARCAキャップを含むことができる、および/または改変されたおよび改変されていないヌクレオチドの混合物を含むことができる。ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、TAL-E-ヌクレアーゼ(TALEN)、TtAgもしくはCRISPR/Casヌクレアーゼ系またはこれらの組合せを含むことができる。好まれる実施形態では、ヌクレアーゼをコードする核酸は、エレクトロポレーションにより送達される。別の態様では、細胞におけるヌクレアーゼ媒介性開裂後に標的化組込み(例えば、HDRによる)を増加させるための方法が、本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、本方法は、(i)1種または複数のドナー分子と共に1種または複数のヌクレアーゼ(および/またはヌクレアーゼを発現するmRNAもしくは発現構築物と、必要に応じて1種または複数の单一ガイドRNA)を宿主細胞に導入するステップと、(ii)ヌクレアーゼの導入の前、その間および/またはその後に、幹細胞性(stemness)または分化に損失を与えることなく幹細胞増大に影響するおよび/またはこれを増加させる1種または複数の因子を細胞および/または細胞を含有する培養培地に導入するステップとを含む。ドナーは、ヌクレアーゼをコードする核酸に先立ち、その後にまたはそれと共に送達することができる。

10

20

#### 【0022】

ドナーは、ウイルスおよび/または非ウイルス性遺伝子移入方法によって送達することができる。他の実施形態では、ドナーは、アデノ随伴ウイルス(AAV)により細胞に送達される。一部の事例において、AAVは、カプシド血清型と比較して異種血清型のものであるLTRを含む。他の実施形態では、ドナーは、レンチウイルスにより細胞に送達される。一部の事例において、レンチウイルスは、インテグラーゼ欠損レンチウイルス(IDLV)である。

#### 【0023】

ある特定の実施形態では、ドナー核酸は、非相同性依存的方法(例えば、NHEJ)により組み込まれる。上に記す通り、in vivo開裂の際に、ドナー配列は、細胞のゲノムのDSB位置に標的化様式で組み込むことができる。ドナー配列は、DSB作製に使用されるヌクレアーゼのうち1種または複数のための同じ標的部位のうち1種または複数を含むことができる。よって、ドナー配列は、組込みが所望される内在性遺伝子の開裂に使用される同じヌクレアーゼのうち1種または複数によって開裂され得る。ある特定の実施形態では、ドナー配列は、DSB誘導に使用されるヌクレアーゼとは異なるヌクレアーゼ標的部位を含む。標的細胞のゲノム中のDSBは、いずれかの機構によって作製することができる。ある特定の実施形態では、DSBは、1種または複数のジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、目的の領域内の配列に結合するように操作されたジンクフィンガーリンクドメインを含む融合タンパク質、および開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインによって作製される。他の実施形態では、DSBは、ヌクレアーゼドメイン(TALEN)に融合された1種または複数のTAL-E-DNA結合ドメイン(天然起源または非天然起源)によって作製される。なおさらなる実施形態では、DSBは、操作された单一ガイドRNAまたはその機能的等価物が、ゲノム中の標的化部位へのヌクレアーゼのガイドに使用される、CRISPR/Casヌクレアーゼ系を使用して作製される。なおさらなる実施形態では、DSBは、TtAg系を使用して作製される。

30

40

#### 【0024】

別の態様では、本発明は、細胞のゲノムのヌクレアーゼ媒介性開裂後の遺伝子破壊および/または標的化組込み(例えば、遺伝子補正)の増加に有用なキット(例えば、ZFN、TAL-Eフェクタードメインヌクレアーゼ融合タンパク質、TtAg系または操作されたホーミングエンドヌクレアーゼまたはCRISPR/Cas系を有する操作された

50

ガイドRNA)を提供する。キットは、典型的に、標的部位に結合する1種または複数のヌクレアーゼ、幹細胞増大および/または分化に影響する1種または複数の因子、ならびにヌクレアーゼ媒介性遺伝子破壊および/または標的化組込みが増強されるように、細胞にヌクレアーゼおよび幹細胞に影響を与える因子を導入するための指示を含む。任意選択で、ヌクレアーゼの標的部位を含有する細胞も、本明細書に記載されているキットに含まれてよい。ある特定の実施形態では、キットは、標的遺伝子を有する少なくとも1種の構築物および標的遺伝子内において開裂することができる公知ヌクレアーゼを含む。このようなキットは、種々の変動する宿主細胞型における開裂条件の最適化に有用である。本発明によって企図される他のキットは、ゲノム内の公知標的遺伝子座内において開裂することができる公知ヌクレアーゼを含むことができ、その上、ドナー核酸を含むことができる。  
10

一部の態様では、ドナーDNAは、ポリペプチド、調節領域または構造的核酸をコードすることができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子(例えば、GFP)である。このようなキットは、ドナー組込みのための条件の最適化に、または、遺伝子破壊もしくは標的化挿入を含有する特異的に改変された細胞、細胞株および動物の構築に有用である。

#### 【0025】

他の態様では、本明細書に記載されている遺伝子改変された幹細胞を被験体に投与する方法が記載される。本明細書に記載されている遺伝子改変された血液細胞前駆体(「HSC/PC」)は、典型的に、骨髄移植片において与えられ、HSC/PCは、in vivoで分化および成熟する。一部の実施形態では、HSC/PCは、G-CSF誘導性動員後に単離され、他方では、細胞は、ヒト骨髄または臍帯から単離される。一部の態様では、HSC/PCは、特異的遺伝子または調節配列をノックアウトするように設計されたヌクレアーゼによる処理により編集される。他の態様では、HSC/PCは、野生型遺伝子または他の目的の遺伝子が挿入され発現されるように、および/または内在性異常遺伝子が補正されるように、操作されたヌクレアーゼおよびドナー核酸により改変される。一部の実施形態では、改変されたHSC/PCは、軽度骨髄破壊的プレコンディショニング後に患者に投与される。他の態様では、生着後に、造血細胞の100%が、改変されたHSC/PCに由来するように、HSC/PCは、完全な骨髄破壊後に投与される。さらに、細胞は、細胞周期のG2期で停止されていてよい。

#### 【0026】

一部の実施形態では、トランスジェニックHSC/PC細胞および/または動物は、ヒト遺伝子をコードする導入遺伝子を含む。一部の事例において、トランスジェニック動物は、外因性導入遺伝子に相当する内在性遺伝子座にノックアウトを含み、これにより、ヒトタンパク質を隔離された状態で研究することができるin vivo系の開発を可能にする。このようなトランスジェニックモデルは、目的のヒトタンパク質と相互作用するまたはこれを改変することができる小分子または大型の生体分子または他の実体を同定するためのスクリーニング目的で使用することができる。一部の態様では、導入遺伝子は、本明細書に記載されている方法のいずれかによって得られる幹細胞(例えば、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞等)または動物胚中の選択された遺伝子座(例えば、セーフハーバー)に組み込まれ、続いて生きた動物が生まれるように、この胚を着床させる。続いて、性的に成熟するまで動物を育て、子孫の少なくとも一部が、編集された内在性遺伝子配列または組み込まれた導入遺伝子を含む子孫を産生させる。

#### 【0027】

上述および他の態様は、開示を全体として踏まえることにより、当業者であれば容易に明らかとなるであろう。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

#### (項目1)

内在性ヒトベータ-ヘモグロビン(Hbb)遺伝子の配列番号23または配列番号24にまたはその付近にゲノム改変を含む、遺伝子改変された細胞であって、前記ゲノム改変が、挿入、欠失およびこれらの組合せからなる群から選択される、遺伝子改変された細胞

10

20

30

40

50

。

(項目2)幹細胞である、項目1に記載の遺伝子改変された細胞。(項目3)前記幹細胞が、造血幹細胞である、項目2に記載の遺伝子改変された細胞。(項目4)前記造血幹細胞が、CD34+細胞である、項目3に記載の遺伝子改変された細胞。(項目5)項目1~4のいずれかに記載の幹細胞に由来する遺伝子改変された分化細胞。(項目6)赤血球細胞(RBC)である、項目5に記載の遺伝子改変された細胞。

10

(項目7)前記遺伝子改変が、ヌクレアーゼを使用してなされる、項目1~6のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞。(項目8)前記ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼである、項目7に記載の遺伝子改変された細胞。(項目9)前記ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼを含み、前記ジンクフィンガーヌクレアーゼが、認識ヘリックスを含む5または6個のジンクフィンガードメインを含み、さらに、前記ジンクフィンガータンパク質が、表1の単一の行に示す順序で前記認識ヘリックス領域を含む、項目8に記載の遺伝子改変された細胞。

20

(項目10)前記挿入が、導入遺伝子をコードするドナーポリヌクレオチドの組込みを含む、項目1~9のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞。(項目11)前記ドナーポリヌクレオチドが、鎌状赤血球変異を補正する、項目10に記載の遺伝子改変された細胞。(項目12)項目1~11のいずれかに記載の遺伝子改変された細胞を含む医薬組成物。

30

(項目13)認識ヘリックス領域を含む5または6個のジンクフィンガードメインを含むジンクフィンガータンパク質であって、表1の単一の行に示す順序で前記認識ヘリックス領域を含む、ジンクフィンガータンパク質。(項目14)項目13に記載のジンクフィンガータンパク質と、野生型または操作された開裂ハーフドメインとを含む融合タンパク質。(項目15)項目13または項目14に記載の1種または複数のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

40

(項目16)項目14に記載の1種もしくは複数の融合タンパク質または項目15に記載の1種もしくは複数のポリヌクレオチドを含む単離された細胞。(項目17)赤血球細胞(RBC)または前駆体細胞(例えば、CD4+造血幹細胞)からなる群から選択される、項目16に記載の細胞。(項目18)i) 項目15に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはii) 項目13もしくは項目14に記載のタンパク質のうち少なくとも1種を含むキット。(項目19)

50

細胞におけるH b b 発現を変更する方法であって、

項目15に記載の1種または複数のポリヌクレオチドを、1種または複数のタンパク質が発現され、H b b 遺伝子の発現が変更されるような条件下で、前記細胞に導入するステップを含む、方法。

(項目20)

前記H b b 遺伝子の発現が増加される、項目19に記載の方法。

(項目21)

前記細胞のゲノムにドナー配列を組み込むステップをさらに含む、項目19または項目20に記載の方法。

(項目22)

前記細胞が、赤血球細胞(RBC)前駆体細胞および造血幹細胞からなる群から選択される、項目19~21のいずれかに記載の方法。

(項目23)

前記ドナー配列が、前記H b b 遺伝子のmRNAプロセシングのためのスプライスドナーポジションを変更する変異を補正するオリゴヌクレオチドを含む、項目19~22のいずれかに記載の方法。

(項目24)

内在性H b b 遺伝子内にゲノム改変を含む遺伝子改変された細胞を産生する方法であつて、

a) 項目14に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドと細胞を接触させるステップと、

b) 前記ポリヌクレオチドからの前記融合タンパク質の発現を促進する条件に前記細胞を供するステップと、

c) 前記遺伝子改変された細胞の産生に十分な発現された前記融合タンパク質により前記内在性H b b 遺伝子を改変するステップとを含む、方法。

(項目25)

少なくとも1種のサイトカインで前記細胞を刺激するステップをさらに含む、項目24に記載の方法。

(項目26)

- サラセニアを有する患者を処置する方法であつて、前記患者におけるH b b 遺伝子発現を増加させるのに十分な量の項目12に記載の医薬組成物を前記患者に投与するステップを含む、方法。

**【図面の簡単な説明】**

**【0028】**

**【図1A】**図1A~図1Eは、IDLVドナーを使用した、CD34+細胞のベータ-グロビン遺伝子座における開裂および補正を示す。図1A(配列番号3)は、開始コドン(太字)の上のZFN標的部位(下線)および鎌状変異(太字、イタリック体)を示す、ベータ-グロビンのエクソンI-DNA配列の部分を示す。図1Bは、ヒト臍帯血CD34+細胞のベータ-グロビン遺伝子座における標的化開裂を示すゲルである。ZFNをコードするin vitro転写されたmRNAによるエレクトロポレーションの3日後に、細胞を解析した。「偽」は、未処理CD34+細胞を表す。矢印は、PCR增幅およびSurveyor(登録商標)ヌクレアーゼ(Transgenomic(登録商標))による消化後のカットされたバンドを示す。図1Cは、エクソン1および2と比べた、ベータグロビン遺伝子における鎌状変異における部位特異的遺伝子補正の模式図である。ドナー構築物ならびにZFNによる開裂およびHDRによる修復の結果得られるゲノムDNAに関する詳細も図解されている。鎌状変異およびHhaI RFLP(星印)の位置が示されている。SurveyorヌクレアーゼおよびRFLPアッセイのためのプライマー位置を下に示す。エクソンは一定の拡大比であり；斜めのハッシュマークは、一定の拡大比ではない区画を示す。図1Dは、ZFNおよびドナーの存在下におけるベータ-グロビ

10

20

30

40

50

ンの標的化遺伝子改変のための R F L P ゲルである。臍帯血 ( C B ) C D 3 4 + 細胞に、ゲルの上部に示されている通りに、 *i n v i t r o* 転写された Z F N m R N A をエレクトロポレーションした、および / または I D L V を含むドナーを形質導入した。処理の 4 日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側から P C R 増幅し、 H h a I 酵素で消化し、アガロースゲルにおいて分離した。矢印は、開裂した産物を示し、ゲノムの標的部位への R F L P の取込みを示す。図 1 E は、表示条件下の C D 3 4 + 細胞における遺伝子改変パーセンテージを示すグラフである。 C B C D 3 4 + 細胞に、 *i n v i t r o* 転写された Z F N m R N A をエレクトロポレーションし、ドナー I D L V を形質導入した。処理の 3 日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側から P C R 増幅し、 H h a I R F L P を生成するサイレントな塩基変化の取込みを特異的に検出するように設計されたプライマーにより q P C R を完了し、アンブリコンにおけるベータ - グロビン遺伝子座のエクソン 2 におけるプライマー結合に対し正規化した ( 全条件に対し  $n = 4$  ) 。遺伝子改変は、 Z F N およびドナーの両方で処理した細胞のおよそ 18 % に見出された。

【図 1 B】図 1 A ~ 図 1 E は、 I D L V ドナーを使用した、 C D 3 4 + 細胞のベータ - グロビン遺伝子座における開裂および補正を示す。図 1 A ( 配列番号 3 ) は、開始コドン ( 太字 ) の上の Z F N 標的部位 ( 下線 ) および鎌状変異 ( 太字、イタリック体 ) を示す、ベータ - グロビンのエクソン I D N A 配列の部分を示す。図 1 B は、ヒト臍帯血 C D 3 4 + 細胞のベータ - グロビン遺伝子座における標的化開裂を示すゲルである。 Z F N をコードする *i n v i t r o* 転写された m R N A によるエレクトロポレーションの 3 日後に、細胞を解析した。「偽」は、未処理 C D 3 4 + 細胞を表す。矢印は、 P C R 増幅および Surveyor ( 登録商標 ) ヌクレアーゼ ( Transgenomic ( 登録商標 ) ) による消化後のカットされたバンドを示す。図 1 C は、エクソン 1 および 2 と比べた、ベータグロビン遺伝子における鎌状変異における部位特異的遺伝子補正の模式図である。ドナー構築物ならびに Z F N による開裂および H D R による修復の結果得られるゲノム D N A に関する詳細も図解されている。鎌状変異および H h a I R F L P ( 星印 ) の位置が示されている。 Surveyor ヌクレアーゼおよび R F L P アッセイのためのプライマー位置を下に示す。エクソンは一定の拡大比であり ; 斜めのハッシュマークは、一定の拡大比ではない区画を示す。図 1 D は、 Z F N およびドナーの存在下におけるベータ - グロビンの標的化遺伝子改変のための R F L P ゲルである。臍帯血 ( C B ) C D 3 4 + 細胞に、ゲルの上部に示されている通りに、 *i n v i t r o* 転写された Z F N m R N A をエレクトロポレーションした、および / または I D L V を含むドナーを形質導入した。処理の 4 日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側から P C R 増幅し、 H h a I 酵素で消化し、アガロースゲルにおいて分離した。矢印は、開裂した産物を示し、ゲノムの標的部位への R F L P の取込みを示す。図 1 E は、表示条件下の C D 3 4 + 細胞における遺伝子改変パーセンテージを示すグラフである。 C B C D 3 4 + 細胞に、 *i n v i t r o* 転写された Z F N m R N A をエレクトロポレーションし、ドナー I D L V を形質導入した。処理の 3 日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側から P C R 増幅し、 H h a I R F L P を生成するサイレントな塩基変化の取込みを特異的に検出するように設計されたプライマーにより q P C R を完了し、アンブリコンにおけるベータ - グロビン遺伝子座のエクソン 2 におけるプライマー結合に対し正規化した ( 全条件に対し  $n = 4$  ) 。遺伝子改変は、 Z F N およびドナーの両方で処理した細胞のおよそ 18 % に見出された。

【図 1 C】図 1 A ~ 図 1 E は、 I D L V ドナーを使用した、 C D 3 4 + 細胞のベータ - グロビン遺伝子座における開裂および補正を示す。図 1 A ( 配列番号 3 ) は、開始コドン ( 太字 ) の上の Z F N 標的部位 ( 下線 ) および鎌状変異 ( 太字、イタリック体 ) を示す、ベータ - グロビンのエクソン I D N A 配列の部分を示す。図 1 B は、ヒト臍帯血 C D 3 4 + 細胞のベータ - グロビン遺伝子座における標的化開裂を示すゲルである。 Z F N をコードする *i n v i t r o* 転写された m R N A によるエレクトロポレーションの 3 日後に、細胞を解析した。「偽」は、未処理 C D 3 4 + 細胞を表す。矢印は、 P C R 増幅および Surveyor ( 登録商標 ) ヌクレアーゼ ( Transgenomic ( 登録商標 ) ) による消化後のカットされたバンドを示す。図 1 C は、エクソン 1 および 2 と比べた、ベー

10

20

30

40

50

タグロビン遺伝子における鎌状変異における部位特異的遺伝子補正の模式図である。ドナー構築物ならびにZFNによる開裂およびHDRによる修復の結果得られるゲノムDNAに関する詳細も図解されている。鎌状変異およびHhaI RFLP(星印)の位置が示されている。SurveyorヌクレアーゼおよびRFLPアッセイのためのプライマー位置を下に示す。エクソンは一定の拡大比であり；斜めのハッシュマークは、一定の拡大比ではない区画を示す。図1Dは、ZFNおよびドナーの存在下におけるベータ-グロビンの標的化遺伝子改変のためのRFLPゲルである。臍帯血(CB)CD34+細胞に、ゲルの上部に示されている通りに、*in vitro*転写されたZFN mRNAをエレクトロポレーションした、および/またはIDLVを含むドナーを形質導入した。処理の4日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側からPCR增幅し、HhaI酵素で消化し、アガロースゲルにおいて分離した。矢印は、開裂した産物を示し、ゲノムの標的部位へのRFLPの取込みを示す。図1Eは、表示条件下のCD34+細胞における遺伝子改変パーセンテージを示すグラフである。CB CD34+細胞に、*in vitro*転写されたZFN mRNAをエレクトロポレーションし、ドナーIDLVを形質導入した。処理の3日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側からPCR增幅し、HhaI RFLPを生成するサイレントな塩基変化の取込みを特異的に検出するように設計されたプライマーによりqPCRを完了し、アンプリコンにおけるベータ-グロビン遺伝子座のエクソン2におけるプライマー結合に対し正規化した(全条件に対しn=4)。遺伝子改変は、ZFNおよびドナーの両方で処理した細胞のおよそ18%に見出された。

【図1D】図1A～図1Eは、IDLVドナーを使用した、CD34+細胞のベータ-グロビン遺伝子座における開裂および補正を示す。図1A(配列番号3)は、開始コドン(太字)の上のZFN標的部位(下線)および鎌状変異(太字、イタリック体)を示す、ベータ-グロビンのエクソン1 DNA配列の部分を示す。図1Bは、ヒト臍帯血CD34+細胞のベータ-グロビン遺伝子座における標的化開裂を示すゲルである。ZFNをコードする*in vitro*転写されたmRNAによるエレクトロポレーションの3日後に、細胞を解析した。「偽」は、未処理CD34+細胞を表す。矢印は、PCR増幅およびSurveyor(登録商標)ヌクレアーゼ(Transgenomic(登録商標))による消化後のカットされたバンドを示す。図1Cは、エクソン1および2と比べた、ベータグロビン遺伝子における鎌状変異における部位特異的遺伝子補正の模式図である。ドナー構築物ならびにZFNによる開裂およびHDRによる修復の結果得られるゲノムDNAに関する詳細も図解されている。鎌状変異およびHhaI RFLP(星印)の位置が示されている。SurveyorヌクレアーゼおよびRFLPアッセイのためのプライマー位置を下に示す。エクソンは一定の拡大比であり；斜めのハッシュマークは、一定の拡大比ではない区画を示す。図1Dは、ZFNおよびドナーの存在下におけるベータ-グロビンの標的化遺伝子改変のためのRFLPゲルである。臍帯血(CB)CD34+細胞に、ゲルの上部に示されている通りに、*in vitro*転写されたZFN mRNAをエレクトロポレーションした、および/またはIDLVを含むドナーを形質導入した。処理の4日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側からPCR増幅し、HhaI酵素で消化し、アガロースゲルにおいて分離した。矢印は、開裂した産物を示し、ゲノムの標的部位へのRFLPの取込みを示す。図1Eは、表示条件下のCD34+細胞における遺伝子改変パーセンテージを示すグラフである。CB CD34+細胞に、*in vitro*転写されたZFN mRNAをエレクトロポレーションし、ドナーIDLVを形質導入した。処理の3日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側からPCR増幅し、HhaI RFLPを生成するサイレントな塩基変化の取込みを特異的に検出するように設計されたプライマーによりqPCRを完了し、アンプリコンにおけるベータ-グロビン遺伝子座のエクソン2におけるプライマー結合に対し正規化した(全条件に対しn=4)。遺伝子改変は、ZFNおよびドナーの両方で処理した細胞のおよそ18%に見出された。

【図1E】図1A～図1Eは、IDLVドナーを使用した、CD34+細胞のベータ-グロビン遺伝子座における開裂および補正を示す。図1A(配列番号3)は、開始コドン(太字)の上のZFN標的部位(下線)および鎌状変異(太字、イタリック体)を示す、ベ

ータ - グロビンのエクソン I DNA 配列の部分を示す。図 1 B は、ヒト臍帯血 CD34+ 細胞のベータ - グロビン遺伝子座における標的化開裂を示すゲルである。ZFN をコードする *in vitro* 転写された mRNA によるエレクトロポレーションの 3 日後に、細胞を解析した。「偽」は、未処理 CD34+ 細胞を表す。矢印は、PCR 増幅および Surveyor (登録商標) ヌクレアーゼ (Transgenicomic (登録商標)) による消化後のカットされたバンドを示す。図 1 C は、エクソン 1 および 2 と比べた、ベータグロビン遺伝子における鎌状変異における部位特異的遺伝子補正の模式図である。ドナー構築物ならびに ZFN による開裂および HDR による修復の結果得られるゲノム DNA に関する詳細も図解されている。鎌状変異および HhaI RFLP (星印) の位置が示されている。Surveyor ヌクレアーゼおよび RFLP アッセイのためのプライマー位置を下に示す。エクソンは一定の拡大比であり；斜めのハッシュマークは、一定の拡大比ではない区画を示す。図 1 D は、ZFN およびドナーの存在下におけるベータ - グロビンの標的化遺伝子改変のための RFLP ゲルである。臍帯血 (CB) CD34+ 細胞に、ゲルの上部に示されている通りに、*in vitro* 転写された ZFN mRNA をエレクトロポレーションした、および / または IDLV を含むドナーを形質導入した。処理の 4 日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側から PCR 增幅し、HhaI 酵素で消化し、アガロースゲルにおいて分離した。矢印は、開裂した産物を示し、ゲノムの標的部位への RFLP の取込みを示す。図 1 E は、表示条件下の CD34+ 細胞における遺伝子改変パーセンテージを示すグラフである。CB CD34+ 細胞に、*in vitro* 転写された ZFN mRNA をエレクトロポレーションし、ドナー IDLV を形質導入した。処理の 3 日後に細胞を収集し、ドナー領域の外側から PCR 增幅し、HhaI RFLP を生成するサイレントな塩基変化の取込みを特異的に検出するように設計されたプライマーにより qPCR を完了し、アンプリコンにおけるベータ - グロビン遺伝子座のエクソン 2 におけるプライマー結合に対し正規化した (全条件に対し  $n = 4$ )。遺伝子改変は、ZFN およびドナーの両方で処理した細胞のおよそ 18% に見出された。

#### 【0029】

【図 2】図 2 A ~ 図 2 D は、形質導入に使用される ZFN および IDLV 用量の最適化の結果を示す。図 2 A、図 2 B および図 2 C は、ZFN mRNA の用量決定 (titration) 後の結果を示すグラフである。CD34+ 細胞に、増加量の *in vitro* 転写された ZFN mRNA をエレクトロポレーションし、一定量のドナー IDLV を形質導入した。偽は、未処理細胞を示し、ZFN のみの試料は、30 μg / mL の各 ZFN をエレクトロポレーションされ、IDLV のみの試料は、パルスを適用され、2E+07 TU / mL のドナー IDLV を形質導入される。図 2 A は、RFLP の qPCR によって決定される、エレクトロポレーション後 3 日目の遺伝子改変率を示す。図 2 B は、エレクトロポレーション後 1 日目の増大倍率 (fold expansion) を示し、図 2 C は、トリパン色素排除 (trypan exclusion dye) によって決定されるエレクトロポレーション後 1 日目の細胞生存率を示す (全条件に対し  $n = 8$ )。図 2 D は、ドナーインテグラーゼ欠損レンチウイルスベクター (IDLV) の模式図を示す：ベータ - グロビンの 1.1 kb 領域を、3'LTR が、プロウイルス DNA の 5'LTR へ逆転写の際に移入される自己不活性化 (SIN) 欠失を含有するレンチウイルス骨格へと、末端反復配列 (LTR) におけるプロモーターエレメントに関して逆にクローニングした。UTR : 非翻訳領域、RRE : rev 応答エレメント、Int : イントロン。

#### 【0030】

【図 3】図 3 A ~ 図 3 C は、ドナー IDLV の用量決定を示すグラフである。CD34+ 細胞に、一定量の *in vitro* 転写された ZFN mRNA をエレクトロポレーションし、増加量のドナー IDLV を形質導入した。偽は、未処理細胞を示し、ZFN のみの試料は、10 μg / mL の各 ZFN をエレクトロポレーションされ、IDLV のみの試料は、パルスを適用され、6E+07 TU / mL のドナー IDLV を形質導入される。図 3 A は、RFLP の qPCR によって決定される、エレクトロポレーション後 3 日目の遺伝子改変率を示す。図 3 B は、エレクトロポレーション後 1 日目の増大倍率を示し、図 3 C

10

20

30

40

50

は、トリパン色素排除によって決定される、エレクトロポレーション後1日目の細胞生存率を示す(全条件に対し $n = 6$ )。

【0031】

【図4】図4A～図4Fは、オリゴヌクレオチドドナーを使用した、CD34+細胞のベータ-グロビン遺伝子座におけるZFN対33488/33501を使用した補正を示す。図4Aは、オリゴヌクレオチドが導く遺伝子変異の模式図を示す(配列番号4および5)。図4Bは、ベータ-グロビン遺伝子座のAvrII消化されたPCRアンプリコンのゲルである。断片は、ネイティブAvrII部位を含有し、その開裂は、AvrII消化の内部対照として機能する(ゲルの下の方のバンド)。矢印は、AvrII開裂産物を示す。オリゴドナーおよびZFNの存在下では、15%遺伝子補正率が存在する。図4Cは、SBS番号33501のZFN結合部位(WTは配列番号53、SMSは配列番号54)におけるサイレント変異の6個の可能な部位を示す。鎌状変異はイタリック体で書かれ、可能なサイレント変異部位(SMS)は太字で書かれている。図4Dは、サイレント変異が、ベータ-グロビンにおける遺伝子補正を増加させたことを示す。mPB CD34+細胞に、ZFNおよび表示のドナーオリゴヌクレオチドをトランスフェクトした。関連するサイレント変異の導入をハイスループット配列決定によりアッセイした。白色バーは、挿入および欠失(インデル)を示す；灰色バーは、遺伝子補正を示す。図4Eは、サイレント変異が、ZFN再開裂を遮断することを示す。インデルを有するアレルを、相同性媒介性変異の証拠に関して試験した。NHEJ駆動性インデルの証拠も有する遺伝子変異を有するアレルのパーセンテージが示されている。図4Fは、ZFN濃度およびドナー型の最適化を示す。NHEJ駆動インデル(白色バー)および遺伝子補正(灰色バー)をハイスループットDNA配列決定によりアッセイした。ハイスループットDNA配列決定の深さを考慮すると、測定誤差は非常に低いと予想される。WT：野生型；SMS：サイレント変異部位；オリゴ：オリゴヌクレオチド。

10

20

30

【0032】

【図5】図5は、ドナーの長さおよび鎖の最適化を示す。mPB CD34+細胞に、ベータ-グロビン遺伝子座に3塩基対配列を導入するように設計されたZFNおよびオリゴヌクレオチドの組合せをトランスフェクトした。細胞を収集し、この短い配列のNHEJ駆動性インデルおよび標的化組込み(「TI」)のレベルをハイスループットDNA配列決定(HTS)によりアッセイした。試料毎におよそ4～9,000種の配列リードを得た。

30

【0033】

【図6】図6Aおよび図6Bは、部分的HDR事象を描写し、オリゴ媒介性遺伝子変異における合成が、左から右に進むことを明らかにする。図6Aは、部分的HDR産物(SMS1、SMS12、SMS24およびSMS4アレル)の証拠に関してアッセイされた、図3FのZFNプラスSMS124ドナー由来のハイスループットDNA配列決定データを示す。本実験における約41%の遺伝子変異のうち、6%の変異は、SMS12事象に由来した一方、SMS24アレルは、ほとんど完全に存在しなかった(0.03%)。このような非対称性は、DNA合成が、左から右に進むことを暗示する。図6Bは、示されている全3種のZFN濃度のデータの平均を使用してこれを実証し、30および60μg/mlの試料に由来する事象を、上向きに正規化して、15μg/mlの試料に観察される約41%の遺伝子変異をマッチさせる。

40

【0034】

【図7-1】図7A～図7Dは、ベータ-グロビン遺伝子クラスターにおけるオントアゲット開裂解析を示す。図7Aは、次の通りのGFP捕捉の図解である：K562赤白血病細胞に、in vitro転写されたmRNAをエレクトロポレーションし、GFPを発現するIDLVベクターを形質導入した。細胞を60日間培養して、あらゆる非トラップGFPを希釈排除し、その後に蛍光標識細胞分取(FACS)を使用してGFP陽性細胞を選別した。試料に対してnrlAM-PCRを行い、ベクター組込み部位解析を完了した。クラスター解析を使用して決定される、ベータ-グロビンおよびデルタ-グロビンに

50

おける最も一般的な組込み部位の概要を示す。HBB : 野生型ヒトヘモグロビンベータ ; HBD : ヒトヘモグロビンデルタ。図7Bは、第11染色体上のZFNカット部位前後のベータ-グロビン遺伝子クラスターにおける部分的グロビン遺伝子配列のアラインメントを示す（配列番号6～11）。ZFN結合部位に下線を引き、鎌状変異は太字、イタリック体で書く。HBB : 野生型ヒトヘモグロビンベータ ; HBD : ヒトヘモグロビンデルタ ; HBE1 : ヒトヘモグロビンイプシロン ; HBBP1 : ヒトヘモグロビンベータシユードジーン1 ; HBG1 : ヒトヘモグロビンガンマA ; HBG2 : ヒトヘモグロビンガンマG。図7Cは、ZFN in vitro転写されたmRNAで処理したまたは未処理の（偽）CD34+細胞のSurveyor（登録商標）ヌクレアーゼアッセイを示すゲルである。表示のベータグロビンクラスター遺伝子のそれぞれを、標的部位と最高相同性の領域周囲で增幅し、Surveyor（登録商標）ヌクレアーゼにより開裂した。バンドをデンシトメトリーにより定量化した。図7Dは、図7Bと同様のSCD患者骨髄試料のSurveyor（登録商標）ヌクレアーゼアッセイを示すゲルである。ガンマ-グロビン遺伝子における一塩基多型のヘテロ接合性は、ZFNに曝露されていない試料であっても、バックグラウンド開裂を產生した（細い矢印）。 10

【図7-2】図7A～図7Dは、ベータ-グロビン遺伝子クラスターにおけるオントアゲット開裂解析を示す。図7Aは、次の通りのGFP捕捉の図解である：K562赤白血病細胞に、in vitro転写されたmRNAをエレクトロポレーションし、GFPを発現するIDLVベクターを形質導入した。細胞を60日間培養して、あらゆる非トラップGFPを希釈排除し、その後に蛍光標識細胞分取（FACS）を使用してGFP陽性細胞を選別した。試料に対してnrlAM-PCRを行い、ベクター組込み部位解析を完了した。クラスター解析を使用して決定される、ベータ-グロビンおよびデルタ-グロビンにおける最も一般的な組込み部位の概要を示す。HBB : 野生型ヒトヘモグロビンベータ ; HBD : ヒトヘモグロビンデルタ。図7Bは、第11染色体上のZFNカット部位前後のベータ-グロビン遺伝子クラスターにおける部分的グロビン遺伝子配列のアラインメントを示す（配列番号6～11）。ZFN結合部位に下線を引き、鎌状変異は太字、イタリック体で書く。HBB : 野生型ヒトヘモグロビンベータ ; HBD : ヒトヘモグロビンデルタ ; HBE1 : ヒトヘモグロビンイプシロン ; HBBP1 : ヒトヘモグロビンベータシユードジーン1 ; HBG1 : ヒトヘモグロビンガンマA ; HBG2 : ヒトヘモグロビンガンマG。図7Cは、ZFN in vitro転写されたmRNAで処理したまたは未処理の（偽）CD34+細胞のSurveyor（登録商標）ヌクレアーゼアッセイを示すゲルである。表示のベータグロビンクラスター遺伝子のそれぞれを、標的部位と最高相同性の領域周囲で增幅し、Surveyor（登録商標）ヌクレアーゼにより開裂した。バンドをデンシトメトリーにより定量化した。図7Dは、図7Bと同様のSCD患者骨髄試料のSurveyor（登録商標）ヌクレアーゼアッセイを示すゲルである。ガンマ-グロビン遺伝子における一塩基多型のヘテロ接合性は、ZFNに曝露されていない試料であっても、バックグラウンド開裂を產生した（細い矢印）。 20

### 【0035】

【図8】図8は、ZFNおよびオリゴヌクレオチド改変HSPCのコロニー形成能を示すグラフである。mPB CD34+細胞は、偽トランスフェクション、10ug/mL ZFNのトランスフェクション、またはZFNおよびオリゴヌクレオチドドナー3μMのトランスフェクションのいずれかを行った。培養5日後に、細胞をメチルセルロースおよびサイトカイン含有培地に蒔き、分化させた。育成15日後に、コロニー形成単位（CFU）を計数し、赤芽球（erythroid）（E）、バースト形成単位-赤芽球（BFU-E）、顆粒球/マクロファージ（GM）または顆粒球/赤芽球/マクロファージ/巨核球（GEMM）のいずれかとして形態学的に分類した。 40

### 【0036】

【図9】図9Aおよび図9Bは、赤芽球分化における改変された細胞の安定性を示す。図9Aは、mPB CD34+細胞に、0、3.75、7.5、15もしくは30μg/mlのZFNおよび3μMのオリゴヌクレオチドドナーをトランスフェクトした、または才 50

リゴヌクレオチドドナー単独をトランスフェクトしたことを示す。細胞を赤血球細胞へと分化するように誘導し、0、6、12、15および18日後にアリコートを取り出した。細胞からゲノムDNAを調製し、遺伝子改変された細胞の頻度をハイスループット配列決定によりアッセイした。時点毎の試料毎におよそ10~50,000種の配列リードを得た。図9Bは、操作された細胞におけるグロビンタンパク質のHPLC解析を示す。

【0037】

【図10】図10A~図10Eは、NSGマウスへのZFNおよびドナー処理細胞の移植を示す。図10Aは、エレクトロポレーション後7日目のRFLPのqPCRによって決定される、ZFN+IDLVで処理しin vitroで培養したバルク移植された細胞の遺伝子改変率を示す。偽細胞は未処理である(n=3独立実験)。図10Bは、ZFN+IDLV改変CD34+細胞のハイスループット配列決定によって評価される、鎌状塩基における改変を示すグラフである。鎌状塩基(T)へと変化された野生型塩基ならびにカット部位における挿入および欠失(インデル)を含有するアラインメントされた総リードのパーセンテージを示す、ベータ-グロビン遺伝子座の配列決定の結果。図10Aと同じ試料。変化した塩基、白色；インデル、灰色。図10Cは、移植後5週および8週目の移植されたマウスの末梢血における生着を示すグラフである。偽またはZFN+IDLV処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞のフローサイトメトリーによる、総hCD45+およびmCD45+細胞のうちhCD45+細胞のパーセンテージとして決定されたヒト生着。偽、白色菱形；ZFN+IDLV、黒色菱形(n=3独立実験；偽n=5、ZFN+IDLV n=12)。図10Dは、CD34+細胞に、オリゴ、ZFNまたはZFN+オリゴをエレクトロポレーションし、NSGマウスへの移植前にin vitroで培養したことを示すグラフである。鎌状塩基およびインデルにおける改変率(n=1)を図10Cと同様に示す。図10Eは、図10Cと同様に、オリゴ、ZFNまたはZFN+オリゴ処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞の末梢血における生着を示すグラフである。オリゴ、丸形；ZFN、三角形；ZFN+オリゴ、菱形(オリゴ n=8、ZFN n=7、ZFN+オリゴ n=9)、n.s.：有意ではない、\*p<0.05、\*\*p<0.01。

【0038】

【図11】図11Aおよび図11Bは、8週目における移植されたNSGマウスの系列解析を示す。移植後8週目における、偽ならびにZFNおよびドナー処理細胞を移植したNSGマウスの末梢血の免疫表現型解析。B細胞(CD19)、T細胞(CD3)、造血前駆細胞(CD34)、骨髄系前駆細胞(CD33)およびナチュラルキラー細胞(CD56)のマーカーについて陽性であるヒトCD45+細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーを使用して数え上げた。図11Aは、偽またはZFN+IDLV処理細胞を移植したマウス由来の細胞を示すグラフである(n=3独立実験；偽n=5、ZFN+IDLV n=12)。図11Bは、オリゴ、ZFNまたはZFN+オリゴ処理細胞を移植したマウス由来の細胞を示すグラフである(オリゴ n=8、ZFN n=7、ZFN+オリゴ n=9)。n.s.：有意ではない；星印は有意性を示す、\*p<0.05、\*\*p<0.01。

【0039】

【図12】図12A~図12Dは、最終末梢血生着および系列解析を示す。図12Aは、移植後16週目の移植マウスの末梢血における生着を示すグラフである。偽またはZFN+IDLV処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞のフローサイトメトリーにより、総hCD45+およびmCD45+細胞のうちのhCD45+細胞のパーセンテージとして決定されたヒト生着。偽、白色菱形；ZFN+IDLV、黒色菱形。図12Bは、移植後16週目の移植NSGマウスの末梢血の免疫表現型解析を示すグラフである。B細胞(CD19)、T細胞(CD3)、造血前駆細胞(CD34)、骨髄系前駆細胞(CD33)およびナチュラルキラー細胞(CD56)のマーカーについて陽性であるhCD45+細胞のパーセンテージを、偽またはZFN+IDLV処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞のフローサイトメトリーを使用して数え上げた。偽、白色菱形；ZFN+I

10

20

30

40

50

D L V、黒色菱形；(n = 3独立実験；偽 n = 5、Z F N + I D L V n = 12)。図 12 C は、図 12 A と同様の、オリゴ、Z F N または Z F N + オリゴ処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞の、末梢血における生着を示すグラフである。オリゴ、丸形；Z F N、三角形；Z F N + オリゴ、菱形。図 12 D は、図 12 B と同様の、オリゴ、Z F N または Z F N + オリゴ処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞の、末梢血の系列解析を示すグラフである。オリゴ、丸形；Z F N、三角形；Z F N + オリゴ、菱形；(オリゴ n = 8、Z F N n = 7、Z F N + オリゴ n = 9)。n.s.：有意ではない、\* p < 0.05。

#### 【0040】

【図 13】図 13 A～図 13 C は、遺伝子改変された細胞が、N S G マウスにおいて存続することを示す。図 13 A は、偽または Z F N + I D L V 処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞における、16 週目の移植マウスの骨髄および脾臓における遺伝子改変率を示すグラフである。組織を収集し、ゲノム DNA を抽出および増幅し、取り込まれた R F L P の q P C R を解析した。偽、白色菱形；Z F N + I D L V、黒色菱形。図 13 B は、図 13 A に記載されている試料のハイスループット配列決定によって評価される、鎌状変異における補正を示すグラフである。鎌状変異に改変された塩基を含有するアラインメントされた総リードのパーセンテージを示す、ベータ - グロビン遺伝子座の配列決定の結果。偽、白色菱形；Z F N + I D L V、黒色菱形 (n = 3 独立実験；偽 n = 5、Z F N + I D L V n = 12)。図 13 C は、図 13 B に記載されている通り、オリゴ、Z F N または Z F N + オリゴ処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞の鎌状変異における補正を示すグラフである。オリゴ、丸形；Z F N、三角形；Z F N + オリゴ、菱形 (オリゴ n = 8、Z F N n = 7、Z F N + オリゴ n = 9)。n.s.：有意ではない；星印は有意性を示す、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01。

#### 【0041】

【図 14】図 14 A～図 14 D は、最終骨髄生着および系列解析を示す。図 14 A は、移植後 16 週目の移植マウスの骨髄における生着を示すグラフである。偽または Z F N + I D L V 処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞のフローサイトメトリーにより、総 h C D 4 5 + および m C D 4 5 + 細胞のうちの h C D 4 5 + 細胞のパーセンテージとして決定されたヒト生着。偽、白色菱形；Z F N + I D L V、黒色菱形。図 14 B は、移植後 16 週目の移植 N S G マウスの骨髄の免疫表現型解析を示すグラフである。B 細胞 (C D 19)、T 細胞 (C D 3)、造血前駆細胞 (C D 3 4)、骨髄系前駆細胞 (C D 3 3) およびナチュラルキラー細胞 (C D 5 6) のマーカーについて陽性である h C D 4 5 + 細胞のパーセンテージを、偽または Z F N + I D L V 処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞のフローサイトメトリーを使用して数え上げた。偽、白色菱形；Z F N + I D L V、黒色菱形；(n = 3 独立実験；偽 n = 5、Z F N + I D L V n = 12)。図 14 C は、図 14 A と同様の、オリゴ、Z F N または Z F N + オリゴ処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞の、骨髄における生着を示すグラフである。オリゴ、丸形；Z F N、三角形；Z F N + オリゴ、菱形。図 14 D は、図 14 B と同様の、オリゴ、Z F N または Z F N + オリゴ処理細胞のいずれかを与えたマウス由来の細胞の、骨髄の系列解析を示すグラフである。オリゴ、丸形；Z F N、三角形；Z F N + オリゴ、菱形；(オリゴ n = 8、Z F N n = 7、Z F N + オリゴ n = 9)。n.s.：有意ではない、\* p < 0.05。

#### 【0042】

【図 15】図 15 A～図 15 C は、鎌状骨髄 C D 3 4 + 細胞の分化を示す。図 15 A は、in vitro 転写された Z F N m R N A をエレクトロポレーションされ、鎌状位置に W T 塩基を保有するドナー I D L V を形質導入され、赤芽球条件下で育成された S C D 患者骨髄 C D 3 4 + 細胞の増大倍率を示すグラフである。図 15 B は、蒔かれた 200 個の細胞毎に同定された、各種類の造血コロニーの総コロニー形成単位のグラフである。図 15 C は、蒔かれた細胞総数と比べた、形成されたコロニーのパーセンテージを示すグラフである。C F U：コロニー形成単位；B F U：バースト (b l a s t) 形成単位；G E

10

20

30

40

50

MM：顆粒球、赤血球、単球およびマクロファージ；E：赤芽球、GM：顆粒球およびマクロファージ；G：顆粒球；M：単球、星印は有意性を示す、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (n = 2 独立実験；偽 n = 3；ZFNのみ n = 4；IDLVのみ n = 3、ZFN + IDLV n = 6)。

#### 【0043】

【図16】図16A～図16Dは、鎌状骨髄CD34+細胞の機能補正を示す。鎌状赤血球症患者骨髄CD34+細胞に、in vitro転写されたZFN mRNAをエレクトロポレーションし、鎌状位置にWT塩基を保有するドナーIDLVを形質導入し、赤芽球条件下で育成した。図16Aは、エレクトロポレーション後12日目における、取り込まれたRFLPのqPCRによって解析される、遺伝子改変率を示すグラフである。図16Bは、ハイスループット配列決定によって評価される、鎌状変異における補正を示すグラフである。鎌状変異における補正されたWT塩基(A)ならびにカット部位における挿入および欠失(インデル)を含有するアラインメントされた縦リードのパーセンテージを示す、ベータ-グロビン遺伝子座の配列決定の結果。補正された塩基、白色；インデル、灰色。図16Cは、培養終了時の分化した赤芽球細胞のHPLC解析を示す。細胞をペレットにし、溶解し、上清を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により解析した。左パネルは、SCD偽試料を示し、右パネルは、SCD ZFN+IDLV試料を示す。陰影は、HbA:WT成体ヘモグロビンピークを示す。図16Dは、主要ピークによって表される総曲線下面積のうちのHbAのパーセントの定量化のグラフである。HbA:WT成体ヘモグロビン、HbF:胎児性ヘモグロビン、HbS:鎌状ヘモグロビン。n.s.：有意ではない(n = 2 独立実験；偽 n = 3；ZFNのみ n = 4；IDLVのみ n = 3、ZFN + IDLV n = 6)。

10

#### 【0044】

【図17】図17Aおよび図17Bは、オリゴヌクレオチドドナーおよび変動濃度のジンクフィンガーヌクレアーゼ477773/47817を使用した、CD34+細胞のベータ-グロビン遺伝子座における補正を示す。図17Aは、NHEJ DNA修復の頻度を示す。図17Bは、相同性依存性DNA修復の頻度を示す。鎌状赤血球変異に加えて、オリゴヌクレオチドドナーは、図4Cに示すSMS12変異(黒色バー)またはSMS012変異(灰色バー)のいずれかを含む。

20

#### 【発明を実施するための形態】

30

#### 【0045】

遺伝子療法またはゲノム工学における使用のための細胞の形質導入のための組成物および方法が、本明細書に開示されている。特に、外因性配列のヌクレアーゼ媒介性(すなわち、ZFN、TALEN、TTAGoまたはCRISPR/Cas系)標的化組込みまたは標的化開裂によるゲノム変更が、細胞において効率的に達成される。HSC/PCの形質導入および操作に特に有用であるが、本方法および組成物を他の細胞型に使用して、グロビン遺伝子に挿入および/または欠失を含む遺伝子改変された細胞を提供することもできる。特に、本発明の方法および組成物は、鎌状赤血球症の処置および防止のために疾患関連アレルを補正することによる、グロビン遺伝子の編集に有用である。

#### 【0046】

40

##### 概要

本明細書に開示される方法、ならびに組成物の調製および使用の実施は、特に示さない限り、本技術分野の技術範囲内の、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算機化学、細胞培養、組換えDNAならびに関連分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、*SambookらMOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年および第3版、2001年；*Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*、John Wiley & Sons、New York、1987年および定期的更新；シリーズMETHODS IN ENZYM

50

OLOGY, Academic Press, San Diego; Wolff, C H ROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, 第3版, Academic Press, San Diego, 1998年; METHODS IN ENZYMOLOGY, 304巻, 「Chromatin」(P. M. WassermanおよびA. P. Wolff編), Academic Press, San Diego, 1999年; ならびにMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 119巻, 「Chromatin Protocols」(P. B. Becker編) Humana Press, Totowa, 1999年を参照されたい。

## 【0047】

定義

10

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、相互交換可能に使用され、直鎖状または環状コンフォメーションの、一本鎖形態または二本鎖形態のいずれかの、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのポリマーを指す。本開示の目的のため、これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定的であると解釈すべきではない。これらの用語は、天然ヌクレオチドの公知のアナログ、ならびに塩基、糖および/またはリン酸部分(例えば、ホスホロチオエート骨格)において修飾されたヌクレオチドを包含し得る。一般に、特定のヌクレオチドのアナログは、同じ塩基対合特異性を有する; 即ち、Aのアナログは、Tと塩基対合する。

## 【0048】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、相互交換可能に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、1または複数のアミノ酸が、対応する天然起源のアミノ酸の化学的アナログまたは修飾された誘導体である、アミノ酸ポリマーにも適用される。

20

## 【0049】

「結合」とは、巨大分子間(例えば、タンパク質と核酸との間)の配列特異的な非共有結合相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異的である限り、結合相互作用の全ての構成成分が配列特異的である(例えば、DNA骨格中のリン酸残基と接触する)必要はない。かかる相互作用は一般に、 $10^{-6} M^{-1}$ またはそれ未満の解離定数( $K_d$ )を特徴とする。「親和性」とは、結合の強度を指す: 増加した結合親和性は、より低い $K_d$ と相關する。

30

## 【0050】

「結合タンパク質」は、別の分子に結合できるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、DNA分子(DNA結合タンパク質)、RNA分子(RNA結合タンパク質)および/またはタンパク質分子(タンパク質結合タンパク質)に結合できる。タンパク質結合タンパク質の場合、これは、それ自体と結合でき(ホモ二量体、ホモ三量体等を形成する)および/または異なるタンパク質(単数もしくは複数)の1もしくは複数の分子に結合できる。結合タンパク質は、1つよりも多い型の結合活性を有し得る。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、DNA結合活性、RNA結合活性およびタンパク質結合活性を有する。

## 【0051】

40

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」(または結合ドメイン)は、タンパク質、またはより大きいタンパク質内のドメインであり、その構造が亜鉛イオンの配位を介して安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である1または複数のジンクフィンガーを介して配列特異的様式でDNAに結合する。用語、ジンクフィンガーDNA結合タンパク質は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略される。

## 【0052】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1または複数のTALE反復ドメイン/単位を含むポリペプチドである。これらの反復ドメインは、その同族標的DNA配列へのTALEの結合に関与する。単一の「反復単位」(「反復」とも呼ぶ)は、典型的には、33~35アミノ酸長であり、天然起源のTALEタンパク質内の他のTA

50

L E 反復配列と少なくともいくらかの配列相同性を示す。

【0053】

ジンクフィンガーおよびT A L E 結合ドメインは、例えば、天然起源のジンクフィンガーまたはT A L E タンパク質の認識ヘリックス領域の操作（1または複数のアミノ酸を変更する）を介して、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作され」（e n g i n e e r）得る。したがって、操作されたD N A 結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはT A L E）は、非天然起源のタンパク質である。D N A 結合タンパク質を操作するための方法の非限定的な例は、設計および選択である。設計されたD N A 結合タンパク質は、その設計／組成が合理的基準から主に生じる、天然起源でないタンパク質である。設計のための合理的基準には、置換ルールの適用、ならびに既存のZ F P および／またはT A L E の設計および結合データの情報を記憶するデータベース中の情報を処理するためのコンピューターアルゴリズムが含まれる。例えば、米国特許第6,140,081号；同第6,453,242号；同第6,534,261号；および同第8,586,526号を参照されたい；WO 98/53058；WO 98/53059；WO 98/53060；WO 02/016536およびWO 03/016496もまた参照されたい。

【0054】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはT A L E は、その産生がファージディスプレイ、相互作用トラップまたはハイブリッド選択などの実験過程から主に生じる、天然には見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第5,789,538号；第5,925,523号；第6,007,988号；第6,013,453号；第6,200,759号；第8,586,526号；WO 95/19431；WO 96/06166；WO 98/53057；WO 98/54311；WO 00/27878；WO 01/60970 WO 01/88197、WO 02/099084を参照されたい。

【0055】

「T t A g o」は、遺伝子サイレンシングに関与すると考えられる原核生物アルゴノートタンパク質である。T t A g oは、細菌T h e r m u s t h e r m o p h i l u s に由来する。（例えば、S w a r t sら、同書、G. Shengら、（2013年）P r o c. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111巻、652頁を参照されたい）。「T t A g o系」は、例えば、T t A g o酵素による開裂のためのガイドD N A を含めた、必要な構成成分の全てである。

【0056】

「組換え」とは、2つのポリヌクレオチド間の遺伝情報の交換の過程を指し、限定するものではないが、非相同末端結合（N H E J）および相同組み換えによるドナー捕捉を含む。本開示の目的のため、「相同組換え（H R）」とは、例えば、相同性誘導型修復機構を介した細胞における二本鎖切断の修復の間に行われる、かかる交換の特殊化された形態を指す。この過程は、ヌクレオチド配列の相同性を必要とし、「標的」分子（即ち、二本鎖切断を経験したもの）の鋳型修復のために「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝情報の移入をもたらすので、「非乗換え遺伝子変換」または「ショートトラクト（s h o r t t r a c t）遺伝子変換」として様々に公知である。いかなる特定の理論に拘束されることも望まないが、かかる移入は、切断された標的とドナーとの間に形成するヘテロ二重鎖D N A のミスマッチ補正、および／もしくは標的の一部となる遺伝情報を再合成するためにドナーが使用される「合成依存的鎖アニーリング」、ならびに／または関連する過程に関与し得る。かかる特殊化されたH R は、多くの場合、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全てが標的ポリヌクレオチド中に取り込まれるように、標的分子の配列の変更をもたらす。

【0057】

本開示の方法では、本明細書に記載される1または複数の標的化されたヌクレアーゼは、所定の部位において標的配列（例えば、細胞クロマチン）中に二本鎖切断（D S B）を生じる。D S Bは、相同性誘導型修復または非相同性誘導型修復機構による欠失および／または挿入をもたらすことができる。欠失は、いずれかの数の塩基対を含むことができる

10

20

30

40

50

。同様に、挿入は、いずれかの数の塩基対を含むことができ、例えば、切断の領域におけるヌクレオチド配列に対する相同性を任意選択で有する「ドナー」ポリヌクレオチドの組込みを含む。このドナー配列は、物理的に組み込まれ得、またはあるいは、このドナーポリヌクレオチドは、相同組換えによる切断の修復のための鋳型として使用されて、細胞クロマチン中への、ドナーと同様のヌクレオチド配列の全てまたは一部の導入を生じる。したがって、細胞クロマチン中の第1の配列は、変更され得、ある特定の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド中に存在する配列へと変換され得る。したがって、用語「置き換える」または「置き換え」の使用は、別のヌクレオチド配列による1つのヌクレオチド配列の置き換え（即ち、情報的な意味での配列の置き換え）を示すと理解され得、別のポリヌクレオチドによる1つのポリヌクレオチドの物理的または化学的置き換えを必ずしも必要としない。

#### 【0058】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、さらなるジンクフィンガータンパク質の対、T A L E N 、 T t A g o および / または C R I S P R / C a s 系が、細胞内のさらなる標的部位のさらなる二本鎖開裂に使用され得る。

#### 【0059】

本明細書に記載される方法のいずれも、任意のサイズのドナーの挿入ならびに / あるいは目的の遺伝子（複数可）の発現を破壊するドナー配列の標的化された組込みによる細胞中の1種もしくは複数種の標的配列の部分的もしくは完全な不活性化に使用され得る。部分的または完全に不活性化された遺伝子を有する細胞株もまた提供される。

#### 【0060】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、外因性のヌクレオチド配列（「ドナー配列」または「導入遺伝子」）は、目的の領域中のゲノム配列と相同ではあるが同一ではない配列を含み得、それによって、目的の領域において非同一配列を挿入するように相同組換えを刺激する。したがって、ある特定の実施形態では、目的の領域中の配列と相同なドナー配列の一部分は、置き換えられるゲノム配列に対して、約80～99%の間（またはそれらの間の任意の整数）の配列同一性を示す。他の実施形態では、ドナー配列とゲノム配列との間の相同性は、例えば、1ヌクレオチドのみが100個を超える連続する塩基対のドナー配列とゲノム配列との間で異なる場合、99%よりも高い。ある特定の場合、ドナー配列の非相同部分は、新たな配列が目的の領域中に導入されるように、目的の領域中に存在しない配列を含み得る。これらの例では、非相同配列には、一般に、目的の領域中の配列と相同または同一な、50～1,000塩基対（またはそれらの間の任意の整数値）または1,000よりも大きい任意の数の塩基対の配列が隣接する。他の実施形態では、このドナー配列は、第一の配列とは非相同であり、非相同組換え機構によってゲノム中に挿入される。

#### 【0061】

「開裂」とは、DNA分子の共有結合骨格の切断を指す。開裂は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解が含まれるがこれらに限定されない種々の方法によって開始され得る。一本鎖開裂および二本鎖開裂の両方が可能であり、二本鎖開裂は、2つの個別の一本鎖開裂事象の結果として生じ得る。DNA開裂は、平滑末端または付着末端のいずれかの產生を生じ得る。ある特定の実施形態では、融合ポリペプチドが、標的化された二本鎖DNA開裂に使用される。

#### 【0062】

「開裂ハーフドメイン」は、第2のポリペプチド（同一または異なるのいずれか）と協同して、開裂活性（好ましくは二本鎖開裂活性）を有する複合体を形成する、ポリペプチド配列である。用語「第1および第2の開裂ハーフドメイン」；「+および-の開裂ハーフドメイン」ならびに「右および左の開裂ハーフドメイン」は、相互交換可能に使用されて、二量体形成する開裂ハーフドメインの対を指す。

#### 【0063】

「操作された開裂ハーフドメイン」は、別の開裂ハーフドメイン（例えば、別の操作さ

10

20

30

40

50

れた開裂ハーフドメイン)と偏性ヘテロ二量体を形成するように改変された開裂ハーフドメインである。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第7,888,121号；同第7,914,796号；同第8,034,598号；および同第8,823,618号もまた参照されたい。

【0064】

用語「配列」とは、DNAまたはRNAであり得；直鎖状、環状または分枝状であり得、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る、任意の長さのヌクレオチド配列を指す。用語「ドナー配列」とは、ゲノム中に挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、任意の長さ、例えば、2ヌクレオチド長と100,000,000ヌクレオチド長との間(またはそれらの間もしくはそれらを上回る任意の整数値)、好ましくは約100ヌクレオチド長と100,000ヌクレオチド長との間(またはそれらの間の任意の整数)、より好ましくは約2000ヌクレオチド長と20,000ヌクレオチド長との間(またはそれらの間の任意の値)、さらにより好ましくは約5kbと15kbとの間(またはそれらの間の任意の値)のものであり得る。

【0065】

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主にDNA、ならびにヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。真核生物細胞クロマチンの大部分は、ヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、各々2つのヒストンH2A、H2B、H3およびH4を含む八量体と会合したおよそ150塩基対のDNAを含む：リンカーDNA(生物に依存して変動する長さのもの)が、ヌクレオソームコア間に延びる。1分子のヒストンH1が、一般に、リンカ-DNAと会合する。本開示の目的のため、用語「クロマチン」は、原核生物および真核生物の両方の、全ての型の細胞核タンパク質を包含することを意味する。細胞クロマチンには、染色体クロマチンおよびエピソームクロマチンの両方が含まれる。

【0066】

「染色体」は、細胞のゲノムの全てまたは一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、多くの場合、細胞のゲノムを構成する全ての染色体のコレクションであるその核型によって特徴付けられる。細胞のゲノムは、1または複数の染色体を含み得る。

【0067】

「エピソーム」は、細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む、複製性の核酸、核タンパク質複合体または他の構造である。エピソームの例には、プラスミドおよびある特定のウイルスゲノムが含まれる。

【0068】

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

【0069】

「標的部位」または「標的配列」は、結合のための十分な条件が存在する場合に、結合分子が結合する核酸の一部分を規定する核酸配列である。

【0070】

「外因性」分子は、細胞中に通常は存在しない分子であるが、1または複数の遺伝学的方法、生化学的方法または他の方法によって細胞中に導入され得る。「細胞中での通常の存在」は、特定の発生段階または細胞の環境条件に関して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生の間にのみ存在する分子は、成人筋肉細胞に関して外因性分子である。同様に、ヒートショックによって誘導される分子は、ヒートショックされていない細胞に関して、外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能障害性内因性分子の機能性バージョン、または正常に機能する内因性分子の機能障害性バージョンを含み得る。

【0071】

10

20

30

40

50

外因性分子は、とりわけ、例えば、コンビナトリアルケミストリー過程によって生成されるような小分子、または巨大分子、例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上記分子の任意の修飾された誘導体、あるいは上記分子のうちの1または複数を含む任意の複合体であり得る。核酸には、DNAおよびRNAが含まれ、一本鎖または二本鎖であり得；直鎖状、分枝状または環状であり得；任意の長さのものであり得る。核酸には、二重鎖を形成することが可能な核酸、ならびに三重鎖形成性核酸が含まれる。例えば、米国特許第5,176,996号および同第5,422,251号を参照されたい。タンパク質には、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレースおよびヘリカーゼが含まれるがこれらに限定されない。10

#### 【0072】

外因性分子は、内因性分子と同じ型の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸であり得る。例えば、外因性核酸は、細胞中に導入された感染性ウイルスゲノム、プラスミドもしくはエピソーム、または細胞中に通常は存在しない染色体を含み得る。細胞中への外因性分子の導入のための方法は、当業者に公知であり、脂質媒介性移入（即ち、中性およびカチオン性脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラノン媒介性移入およびウイルスベクター媒介性移入が含まれるがこれらに限定されない。外因性分子はまた、内因性分子と同じ型の分子であり得るが、細胞が由来するのとは異なる種に由来し得る。例えば、ヒト核酸配列は、マウスまたはハムスターに元々由来する細胞株中に導入され得る。植物細胞への外因性分子の導入のための方法は、当業者に公知であり、その例として、プロトプラスト形質転換、シリコンカーバイド（例えば、WHISKERS（商標））、Agrobacterium媒介性形質転換、脂質媒介性移入（すなわち、中性およびカチオン性脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、微粒子銃（例えば、「遺伝子銃」を使用）、リン酸カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラノン媒介性移入およびウイルスベクター媒介性移入が挙げられるがこれらに限定されない。20

#### 【0073】

対照的に、「内因性」分子は、特定の発生段階で特定の環境条件下で特定の細胞中に通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、葉緑体もしくは他のオルガネラのゲノム、または天然起源のエピソーム核酸を含み得る。さらなる内因性分子には、タンパク質、例えば、転写因子および酵素が含まれ得る。30

#### 【0074】

本明細書において、用語「外因性核酸の産物」は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド産物の両方、例えば、転写産物（RNA等、ポリヌクレオチド）および翻訳産物（ポリペプチド）を含む。

#### 【0075】

「融合」分子は、2つまたはそれ超のサブユニット分子が、好ましくは共有結合によって連結された分子である。これらのサブユニット分子は、同じ化学型の分子であり得るか、または異なる化学型の分子であり得る。第1の型の融合分子の例には、融合タンパク質（例えば、ZFPまたはTAL-EのDNA結合ドメインと1または複数の活性化ドメインとの間の融合物）および融合核酸（例えば、上記融合タンパク質をコードする核酸）が含まれるがこれらに限定されない。第2の型の融合分子の例には、三重鎖形成性核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝結合剤と核酸との間の融合物が含まれるがこれらに限定されない。40

#### 【0076】

細胞における融合タンパク質の発現は、細胞への融合タンパク質の送達から、または細胞への融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの送達によって生じ得、このポリヌクレオチドは転写され、この転写物は翻訳されて、融合タンパク質を生じる。トランス-50

スプライシング、ポリペプチド開裂およびポリペプチドライゲーションもまた、細胞におけるタンパク質の発現に関与し得る。細胞へのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの送達のための方法は、本開示の他の場所に示される。

【0077】

「遺伝子」には、本開示の目的のために、遺伝子産物をコードするDNA領域（以下を参照）、ならびにかかる調節配列がコード配列および/または転写された配列に隣接してもしなくとも、遺伝子産物の産生を調節する全てのDNA領域が含まれる。したがって、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列、例えばリボソーム結合部位および内部リボソーム進入部位、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス結合部位ならびに遺伝子座制御領域が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0078】

「遺伝子発現」とは、遺伝子中に含まれる情報の、遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接的転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造的RNAまたは任意の他の型のRNA）、またはmRNAの翻訳によって産生されたタンパク質であり得る。遺伝子産物には、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化および編集などの過程によって修飾されたRNA、ならびに例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP-リボシル化、ミリストイル化（myristylation）およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質もまた含まれる。

10

【0079】

遺伝子発現の「モジュレーション」とは、遺伝子の活性における変化を指す。発現のモジュレーションには、遺伝子活性化および遺伝子抑制が含まれ得るが、これらに限定されない。ゲノム編集（例えば、開裂、変更、不活性化、ランダム変異）が、発現をモジュレートするために使用され得る。遺伝子不活性化とは、本明細書に記載されるZFP、TAL-E、TtAgOまたはCRISPR/Cas系を含まない細胞と比較して、遺伝子発現における任意の低下を指す。したがって、遺伝子不活性化は、部分的または完全であり得る。

20

【0080】

「目的の領域」は、外因性分子に結合することが望まれる、細胞クロマチンの任意の領域、例えば、遺伝子または遺伝子内もしくは遺伝子に隣接した非コード配列などである。結合は、標的化されたDNA開裂および/または標的化された組換えを目的とすることができる。目的の領域は、例えば、染色体、エピソーム、オルガネラゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）、または感染性ウイルスゲノム中に存在し得る。目的の領域は、遺伝子のコード領域内、例えばリーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロンなどの転写された非コード領域内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内に存在し得る。目的の領域は、単一のヌクレオチド対ほどの小ささもしくは最大2,000ヌクレオチド対の長さ、または任意の整数値のヌクレオチド対であり得る。

30

【0081】

「真核生物」細胞には、真菌細胞（例えば酵母）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞およびヒト細胞（例えば、T細胞）、例えば幹細胞（多能性（pluripotent）および複能性（multipotent））を含む動物細胞が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0082】

用語「作動可能な連結」および「作動可能に連結した（「operatively linked」または「operably linked」）」は、2つまたはそれ超の構成成分（例えば、配列エレメント）の並置に関して相互交換可能に使用され、ここで、これらの構成成分は、両方の構成成分が正常に機能し、他の構成成分のうちの少なくとも1つに対して発揮される機能をこれらの構成成分のうちの少なくとも1つが媒介し得る可能性を許容するように、配置される。例示として、転写調節配列、例えばプロモーターは、

50

転写調節配列が、1または複数の転写調節因子の存在または非存在に応答してコード配列の転写のレベルを制御する場合、コード配列に作動可能に連結される。転写調節配列は、一般に、コード配列とシスで作動可能に連結されるが、このコード配列に直接隣接する必要はない。例えば、エンハンサーは、エンハンサーとコード配列とが連続していない場合であっても、コード配列に作動可能に連結した転写調節配列である。

#### 【0083】

融合ポリペプチドに関して、用語「作動可能に連結した」とは、構成成分の各々が、他の構成成分と連結して、そのように連結されていない場合にそれが果たすのと同じ機能を果たすという事実を指し得る。例えば、ZFP、TALE、TtAg oまたはCas DNA結合ドメインが活性化ドメインに融合された融合ポリペプチドに関して、このZFP 10、TALE、TtAg oまたはCas DNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、この融合ポリペプチド中で、ZFP、TALE、TtAg oまたはCas DNA結合ドメイン部分がその標的部位および/またはその結合部位に結合できるが、活性化ドメインは遺伝子発現を上方調節できる場合に、作動可能な連結状態にある。ZFP、TALE、TtAg oまたはCas DNA結合ドメインが開裂ドメインに融合した融合ポリペプチドの場合、ZFP、TALE、TtAg oまたはCas DNA結合ドメインおよび開裂ドメインは、この融合ポリペプチド中で、ZFP、TALE、TtAg oまたはCas DNA結合ドメイン部分がその標的部位および/またはその結合部位に結合できるが、開裂ドメインは標的部位の近位においてDNAを開裂できる場合に、作動可能な連結状態にある。 20

#### 【0084】

タンパク質、ポリペプチドまたは核酸の「機能的断片」は、その配列が全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一ではないが、その全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同じ機能を保持する、タンパク質、ポリペプチドまたは核酸である。機能的断片は、対応する天然の分子よりも多い、より少ない、もしくは同じ数の残基を有し得、および/または、1もしくは複数のアミノ酸もしくはヌクレオチド置換を含み得る。核酸の機能(例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力)を決定するための方法は、本技術分野で周知である。同様に、タンパク質機能を決定するための方法は周知である。例えば、ポリペプチドのDNA結合機能は、例えば、フィルター結合、電気泳動移動度シフトまたは免疫沈降アッセイによって、決定され得る。DNA開裂は、ゲル電気泳動によってアッセイされ得る。Ausubelら、上記を参照されたい。タンパク質が別のタンパク質と相互作用する能力は、例えば、共免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイまたは遺伝学的および生化学的の両方の補完によって、決定され得る。例えば、Fieldsら(1989年)Nature 340巻:245~246頁;米国特許第5,585,245号およびPCTWO98/44350を参照されたい。 30

#### 【0085】

「ベクター」は、標的細胞に遺伝子配列を移入させることができる。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子の発現を指向することが可能であり、標的細胞に遺伝子配列を移入させることができる、任意の核酸構築物を意味する。したがって、この用語は、クローニングビヒクルおよび発現ビヒクル、ならびに組込みベクターを含む。 40

#### 【0086】

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

#### 【0087】

「幹細胞性」は、幹細胞様様式で作用するいずれかの細胞の相対的な能力、すなわち、 50

いずれか特定の幹細胞が有し得る全能性、多能性または寡能性および増大または無限の自己再生の程度を指す。

【0088】

幹細胞増大を増強する因子

幹細胞増大および/または分化を増強するいずれかの因子（単数または複数）を、本発明の実施において使用することができる。因子は、細胞へと直接的に導入することができる（例えば、因子をコードする遺伝子として）、および/または周囲の培養培地（フィーダー層および他の固体培養基を含む）へと導入して、細胞に影響を与えることができる。例えば、ヌクレアーゼ媒介性改変が誘導される前、その間またはその後の、培養条件におけるこのような因子の使用は、幹細胞のヌクレアーゼ媒介性改変の率を増加させる。

10

【0089】

使用することができる因子の非限定例として、SR1、アリール炭化水素受容体アンタゴニスト、dmpGЕ2、プロスタグラジン、UM171およびUM729、ライブラリースクリーニングにおいて同定される化合物（Pabstら（2014年）Nat M eth 11巻：436～442頁を参照）、ラパマイシン（Wangら（2014年）Blood. pii：blood-2013-12-546218を参照）、アンジオポエチン様タンパク質（「Angpt1」、例えば、ノッチ/デルタ/ANGPTL5（Zhangら（2008年）Blood. 111巻（7号）：3415～3423頁を参照）、Angpt12、Angpt13、Angpt15、Angpt17およびMfap4）、銅キレート剤テトラエチレンペニタミン（tetraethylenetetraamine）（TEPA、de Limaら（2008年）Bone Mar Trans 41巻：771～778頁を参照）、ヒストンデアセチラーゼ（HPAC）阻害剤、例えば、バルプロ酸（Chaurasiaら（2014年）J Clin Invest 124巻：2378～2395頁を参照）、IGF結合タンパク質2（IGFBP2）、ニコチンアミド（Horwitzら（2014年）J. Clin. Invest 124巻：3121～3128頁を参照）、Tat-myoc（WO2010025421を参照）およびtat-Bcl2（WO2014015312を参照）融合タンパク質、MAPK14/p38a Ly2228820（Baudetら（2012年）Blood 119巻（26号）：6255～6258頁を参照）、HOXB4、OCT3/4等の自己再生遺伝子の産物、E4+E5と呼ばれる臍帯血および/またはMSC由来フィーダー層もしくはex vivo血管微小環境共培養系（Butlerら（2012年）Blood. 120巻（6号）：1344～1347頁を参照）、サイトカイン（非限定例として、Stemspan（商標）CC110、CC100および/またはH3000（Stemcell technologies）、Flt-3リガンド、SCF、TPO）が挙げられる。

20

【0090】

一部の実施形態では、因子は、StemRegenin（SR1、例えば、米国特許第8,741,640号；Boitanoら（2010年）Science 329巻（5997号）：1345～1348頁を参照）を含み、ex vivoでのCD34+細胞の増大を促進するアリール炭化水素受容体（AhR）アンタゴニストが、本明細書に記載されている方法および組成物において使用される。他の実施形態では、因子は、幹細胞再生のアゴニストであるUM171（Faresら（2013年）Blood：122巻（21号）を参照）を含む。さらに他の態様では、因子は、1種または複数のプロスタグラジン、例えば、dmpGЕ2を含む。例えば、米国特許第8,168,428号；Northら（2007年）Nature 447巻（7147号）：1007～1011頁）を参照されたい。一部の態様では、因子は、アンジオポエチン様タンパク質（「Angpt1」、例えば、Angpt12、Angpt13、Angpt15、Angpt17およびMfap4）およびIGF結合タンパク質2（IGFBP2）等、1種または複数のホルモンを含み、これらが使用される。例えば、米国特許第7,807,464号；Zhangら（2008年）111巻（7号）：3415～3423頁）を参照されたい。

30

40

50

他の態様では、因子は、HOXB4またはOCT等、自己再生遺伝子の1種または複数のタンパク質産物を含む。例えば、米国特許第8,735,153号；Wattsら(2012年)Exp Hematol. 40巻(3号)：187～196頁)を参照されたい。あるいは、これらの遺伝子は、培養培地および/または幹細胞において一過的に発現させることができる。

【0091】

幹細胞増大に影響を与える因子は、ストロマ細胞および/またはMSC由来細胞に由来するフィーダー層が挙げられるがこれらに限定されない、細胞支持方法を含むこともできる。例えば、Breemsら(1998年)Blood 91巻(1号)：111～117頁およびMaginら(2009年)Stem Cells Dev. 2009年1～2月；18巻(1号)：173～86頁を参照されたい。

10

【0092】

ヌクレアーゼ活性およびヌクレアーゼ媒介性ゲノム改変の増加に有効である限り、幹細胞増大を増強するいかなる適した量の1種または複数の因子を使用することもできる。使用される特定の濃度は、当業者であれば容易に決定することができる。ある特定の実施形態では、0.1nM～100μMの間が使用され、例えば、0.5μM～25μMの間の濃度が使用され、これは、その間のいずれかの量を含む(例えば、1μM～20μM、3μM～10μM等)。

【0093】

融合分子

20

細胞、特に、幹細胞における選択された標的遺伝子の開裂に有用な組成物、例えば、ヌクレアーゼが、本明細書に記載されている。ある特定の実施形態では、融合分子の1種または複数の構成成分(例えば、ヌクレアーゼ)は、天然起源である。他の実施形態では、融合分子の構成成分のうち1種または複数(例えば、ヌクレアーゼ)は、非天然起源である、すなわち、DNA結合ドメインおよび/または開裂ドメインにおいて操作されている。例えば、天然起源のヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、選択された標的部位に結合するように変更され得る(例えば、同族結合部位とは異なる部位に結合するように操作されたメガヌクレアーゼ)。他の実施形態では、ヌクレアーゼは、異種のDNA結合ドメインおよび開裂ドメイン(例えば、異種開裂ドメインを有する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ；TALエフェクタードメインDNA結合タンパク質；メガヌクレアーゼDNA結合ドメイン)を含む。

30

【0094】

A. DNA結合分子

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている組成物および方法は、ドナー分子に結合するために、および/または細胞のゲノム中の目的の領域に結合するために、メガヌクレアーゼ(ホーミングエンドヌクレアーゼ)DNA結合分子(DNA結合ドメインとも称される)を用いる。天然起源のメガヌクレアーゼは、15～40塩基対の開裂部位を認識し、一般的に、4種のファミリーへとグループ化される：LAGLIDADGファミリー、G I Y - Y I G ファミリー、His - Cyst ボックスファミリーおよびHNHファミリー。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼには、I - SceI、I - CeuI、P I - PspI、P I - Sce、I - SceIV、I - CsmI、I - PanI、I - SceII、I - PpoI、I - SceIII、I - CreI、I - TevI、I - TevIIおよびI - TevIIIが含まれる。それらの認識配列は公知である。米国特許第5,420,032号；米国特許第6,833,252号；Bel fortら(1997年)Nucleic Acids Res. 25巻：3379～3388頁；Dujonら(1989年)Gene 82巻：115～118頁；Perlerら(1994年)Nucleic Acids Res. 22巻、1125～1127頁；Jasin(1996年)Trends Genet. 12巻：224～228頁；Gimbleら(1996年)J. Mol. Biol. 263巻：163～180頁；Argastら(1998年)J. Mol. Biol. 280巻：345～353頁およびN

40

50

ew England Biolabs カタログもまた参照されたい。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合特異性は、非天然標的部位に結合するように操作することができる。例えば、Chevalierら(2002年)Mol. Cell 10巻:895~905頁; Epinatら(2003年)Nucleic Acids Res. 31巻:2952~2962頁; Ashworthら(2006年)Nature 441巻:656~659頁; Paquesら(2007年)Current Gene Therapy 7巻:49~66頁; 米国特許出願公開第20070117128号を参照されたい。ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、全体としてヌクレアーゼに関して変更され得(即ち、ヌクレアーゼが同族開裂ドメインを含むように)、または異種開裂ドメインに融合され得る。

#### 【0095】

他の実施形態では、本明細書に記載されている方法および組成物において使用されるヌクレアーゼのうち1種または複数のDNA結合ドメインは、天然起源のまたは操作された(非天然起源の)TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第8,586,526号を参照されたい。属Xanthomonasの植物病原性細菌は、重要な作物植物において多くの疾患を引き起こすことが公知である。Xanthomonasの病原性は、植物細胞中に25種よりも多い異なるエフェクタータンパク質を注入する、保存されたIII型分泌(T3S)系に依存する。これらの注入されたタンパク質のなかでも、植物転写活性化因子を模倣し、植物トランスクリプトームを操作する、転写活性化因子様(TAL)エフェクターである(Kayら(2007年)Science 318巻:648~651頁を参照されたい)。これらのタンパク質は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含有する。最もよく特徴付けられたTALエフェクターの1つは、Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria由来のAvrBs3である(Bonassら(1989年)Mol Gen Genet 218巻:127~136頁およびWO2010079430を参照されたい)。TALエフェクターは、タンデム反復の集中したドメインを含有し、各反復は、これらのタンパク質のDNA結合特異性にとって重要なおよそ34アミノ酸を含有する。さらに、これらは、核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含有する(概説については、Schornack S.ら(2006年)J Plant Physiol 163巻(3号):256~272頁を参照されたい)。

さらに、植物病原性細菌Ralstonia solanacearumでは、R. s. solanacearum biovar 1株GMI1000およびbiovar 4株RS1000における、brg11およびhpx17と称される2つの遺伝子が、XanthomonasのAvrBs3ファミリーと相同であることが見出されている(Heuerら(2007年)Appl and Environ Microbiol 73巻(13号):4379~4384頁を参照されたい)。これらの遺伝子は、互いにヌクレオチド配列において98.9%同一であるが、hpx17の反復ドメインにおける1,575塩基対の欠失が異なる。しかし、両方の遺伝子産物は、XanthomonasのAvrBs3ファミリータンパク質と40%未満の配列同一性を有する。例えば、その全体が本明細書に参考として援用される米国特許第8,586,526号を参照されたい。

#### 【0096】

これらのTALエフェクターの特異性は、これらのタンデム反復中に見出される配列に依存する。反復される配列は、およそ102塩基対を含み、これらの反復は、典型的には、互いに91~100%相同である(Bonassら、同書)。これらの反復の多型は、12位および13位に通常位置し、12位および13位における超可変二残基(RVD)の正体と、TALエフェクターの標的配列中の連続ヌクレオチドの正体との間には、一対一の相関が存在するようである(MoscouおよびBogdanove、(2009年)Science 326巻:1501頁ならびにBochら(2009年)Science 326巻:1509~1512頁を参照されたい)。実験的に、これらのTALエフ

10

20

30

40

50

エクターのDNA認識のための天然コードは、12位および13位におけるHD配列が、シトシン(C)への結合をもたらし；NGがTに結合し、NIがA、C、GまたはTに結合し、NNがAまたはGに結合し、そしてINGがTに結合するように、決定されている。これらのDNA結合反復は、新たな配列と相互作用でき植物細胞において非内因性レポーター遺伝子の発現を活性化できる人工の転写因子を作製するために、新たな組合せおよび反復数を有するタンパク質へとアセンブルされている(Bochら、同書)。操作されたTALタンパク質は、FokI開裂ハーフドメインに連結されて、TALエフェクタードメインスクレアーゼ融合物(TALEN)を生じている。例えば、米国特許第8,586,526号；Christianら((2010年)<Genetics e pub 10.1534/genetics.110.120717)を参照されたい。ある特定の実施形態では、TALEドメインは、米国特許第8,586,526号に記載されているN-キャップおよび/またはC-キャップを含む。

#### 【0097】

ある特定の実施形態では、細胞のゲノムのin vivo開裂および/または標的化開裂に使用されるスクレアーゼのうち1種または複数のDNA結合ドメインは、ジンクフィンガータンパク質を含む。好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、選択された標的部位に結合するように操作されているという点で、非天然起源である。例えば、全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Beerliら(2002年)Nature Biotechnol. 20巻：135～141頁；Paboら(2001年)Ann. Rev. Biochem. 70巻：313～340頁；Isalanら(2001年)Nature Biotechnol. 19巻：656～660頁；Segalら(2001年)Curr. Opin. Biotechnol. 12巻：632～637頁；Chooら(2000年)Curr. Opin. Struct. Biol. 10巻：411～416頁；米国特許第6,453,242号；同第6,534,261号；同第6,599,692号；同第6,503,717号；同第6,689,558号；同第7,030,215号；同第6,794,136号；同第7,067,317号；同第7,262,054号；同第7,070,934号；同第7,361,635号；同第7,253,273号；および米国特許出願公開第2005/0064474号；同第2007/0218528号；同第2005/0267061号を参照されたい。

#### 【0098】

操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然起源のジンクフィンガータンパク質と比較して、新規結合特異性を有し得る。操作方法には、合理的設計および種々の型の選択が含まれるがこれらに限定されない。合理的設計には、例えば、トリプレット(またはクアドルプレット(quadruplet))スクレオチド配列および個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを使用することが含まれ、ここで、各トリプレットまたはクアドルプレットのスクレオチド配列は、特定のトリプレットまたはクアドルプレット配列に結合するジンクフィンガーの1種または複数種のアミノ酸配列と関連する。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、共有に係る米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたい。

#### 【0099】

ファージディスプレイおよびツーハイブリッドシステムを含む例示的な選択方法は、米国特許第5,789,538号；同第5,925,523号；同第6,007,988号；同第6,013,453号；同第6,410,248号；同第6,140,466号；同第6,200,759号および同第6,242,568号；ならびにWO98/37186；WO98/53057；WO00/27878；WO01/88197およびGB2,338,237中に開示されている。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、共有に係るWO02/077227に記載されている。

#### 【0100】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインお

および/またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば、5またはそれ超のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の適切なリンカー配列を使用して、一緒に連結され得る。6またはそれ超のアミノ酸長の例示的なリンカー配列について、米国特許第6,479,626号；同第6,903,185号；および同第7,153,949号もまた参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間に適切なリンカーの任意の組合せを含み得る。

【0101】

融合タンパク質（およびそれをコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための標的部位の選択および方法は、当業者に公知であり、米国特許第6,140,081号；同第5,789,538号；同第6,453,242号；同第6,534,261号；同第5,925,523号；同第6,007,988号；同第6,013,453号；同第6,200,759号；WO95/19431；WO96/06166；WO98/53057；WO98/54311；WO00/27878；WO01/60970；WO01/88197；WO02/099084；WO98/53058；WO98/53059；WO98/53060；WO02/016536およびWO03/016496に詳細に記載されている。

【0102】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインおよび/またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば、5またはそれ超のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の適切なリンカー配列を使用して一緒に連結され得る。6またはそれ超のアミノ酸長の例示的なリンカー配列については、米国特許第6,479,626号；同第6,903,185号；および同第7,153,949号も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間に適切なリンカーの任意の組合せを含み得る。

【0103】

ある特定の実施形態では、DNA結合ドメインは、例えば、単一ガイドRNA（sgRNA）を含むCRISPR/Casヌクレアーゼ系の一部である。例えば、米国特許第8,697,359号および米国特許出願公開第20150056705号を参照されたい。この系のRNA構成成分をコードするCRISPR（規則的な間隔でクラスター化された短鎖反復回文配列）遺伝子座と、タンパク質をコードするcas（CRISPR関連）遺伝子座（Jansenら、2002年、Mol. Microbiol. 43巻：1565～1575頁；Makarovaら、2002年、Nucleic Acids Res. 30巻：482～496頁；Makarovaら、2006年、Biol. Direct 1巻：7頁；Hafitら、2005年、PLoS Comput. Biol. 1巻：e60頁）は、CRISPR/Casヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主におけるCRISPR遺伝子座は、CRISPR媒介性核酸開裂の特異性をプログラムすることができる、CRISPR関連（cas）遺伝子と非コードRNAエレメントの組み合わせを含有する。

【0104】

II型CRISPRは、最もよく特徴付けられた系の1つであり、連続的4ステップで標的化DNA二本鎖切断を行う。第一に、2種の非コードRNA、プレcrRNAアレイおよびtracrRNAが、CRISPR遺伝子座から転写される。第二に、tracrRNAが、プレcrRNAの反復領域にハイブリダイズし、プレcrRNAのプロセシングを媒介して、個々のスペーサー配列を含有する成熟crRNAとする。第三に、crRNAにおけるスペーサーと、標的認識の追加的な要件であるプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）のとなりの標的DNAにおけるプロトスペーサーとの間のワトソンクリック塩基対形成により、成熟crRNA：tracrRNA複合体が、標的DNAにCas9を方向付ける。最後に、Cas9が、標的DNAの開裂を媒介して、プロトスペーサー内に二本鎖切断を生じる。CRISPR/Cas系の活性は、3ステップからなる：（i）「適応」と呼ばれるプロセスにおける、将来的な攻撃を防止するための、CRISPRア

10

20

30

40

50

レイへの異質 (alien) DNA 配列の挿入、(ii) 関連するタンパク質の発現ならびにアレイの発現およびプロセシングと、続く (iii) 異質核酸の RNA 媒介性干渉。したがって、細菌細胞において、いわゆる「Cas」タンパク質のいくつかは、CRISPR/Cas 系の天然機能に関与し、異質 DNA の挿入等、機能における役割を果たす。

#### 【0105】

ある特定の実施形態において、Cas タンパク質は、天然に存在する Cas タンパク質の「機能的誘導体」であり得る。ネイティブ配列ポリペプチドの「機能的誘導体」は、ネイティブ配列ポリペプチドと共通した定性的生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」として、対応するネイティブ配列ポリペプチドと共通した生物学的活性を有するのであれば、ネイティブ配列の断片ならびにネイティブ配列ポリペプチドおよびその断片の誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書に企図される生物学的活性とは、DNA 基質を断片に加水分解する機能的誘導体の能力である。「誘導体」という用語は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエント、共有結合性修飾物およびこれらの融合物の両方を包含する。Cas ポリペプチドまたはその断片の好適な誘導体として、Cas タンパク質またはその断片の変異体、融合物、共有結合性修飾物が挙げられるがこれらに限定されない。Cas タンパク質またはその断片および Cas タンパク質またはその断片の誘導体を含む Cas タンパク質は、細胞から得ることができるもしくは化学的に合成することができるまたはこれら 2 つの手順の組み合わせによるものであることができる。細胞は、Cas タンパク質を天然に産生する細胞、あるいは Cas タンパク質を天然に産生し、より高い発現レベルで内因性 Cas タンパク質を産生するように、または内因性 Cas と同じもしくは異なる Cas をコードする外因的に導入された核酸から Cas タンパク質を産生するように遺伝子操作された細胞であり得る。場合によっては、細胞は、Cas タンパク質を天然に産生せず、Cas タンパク質を産生するよう遺伝子操作されている。

#### 【0106】

一部の実施形態において、DNA 結合ドメインは TtAgo 系の一部である (Swartsら、同書 ; Sheng ら、同書を参照のこと)。真核細胞において、遺伝子サイレンシングは、アルゴノート (Argo) ファミリーのタンパク質によって媒介される。このパラダイムにおいて、Argo は小さな (19 ~ 31 nt) RNA に結合される。このタンパク質 - RNA サイレンシング複合体は、小さな RNA と標的の間のワトソンクリック塩基対形成を介して標的 RNA を認識し、標的 RNA をエンドヌクレアーゼとして (endo 30 nucleolytically) 開裂する (Vogel (2014 年) Science 344 卷 : 972 ~ 973 頁)。

対照的に、原核細胞 Ago タンパク質は小さな一本鎖 DNA 断片に結合し、外来性 (しばしばウイルス性の) DNA を検出して除去するよう機能するようである (Yuan ら、(2005 年) Mol. Cell 19 卷、405 頁 ; Olovnikov ら、(2013 年) Mol. Cell 51 卷、594 頁 ; Swarts ら、同書)。例示的な原核生物 Ago タンパク質には、*Aquifex aeolicus*、*Rhodobacter sphaeroides* および *Thermus thermophilus* 由来のタンパク質が挙げられる。

#### 【0107】

最もよく特徴付けられた原核生物 Ago タンパク質の 1 つは、*T. thermophilus* 由来のタンパク質である (TtAgo ; Swarts ら、同書)。TtAgo は 5' リン酸基を有する 15 nt または 13 ~ 25 nt の一本鎖 DNA 断片と会合する。TtAgo が結合したこの「ガイド DNA」は、タンパク質 - DNA 複合体が DNA のサードパーティ分子におけるワトソン - クリック相補的 DNA 配列に結合するように方向付けるために役立つ。一旦、これらのガイド DNA における配列情報によって標的 DNA の特定が可能になったら、TtAgo - ガイド DNA 複合体は標的 DNA を開裂する。このような機構はまた、その標的 DNA に結合する間の TtAgo - ガイド DNA 複合体の構造によって支持される (G. Sheng ら、同書)。*Rhodobacter sphaeroides* 由来の Ago (RsAgo) は、類似の特性を有する (Olivnikov ら、同書)。

10

20

30

40

50

## 【0108】

任意のDNA配列の外因性ガイドDNAは、TtAgoタンパク質に負荷することができる(Swartsら、同書)。TtAgo開裂の特異性はガイドDNAによって方向付けられるので、したがって、研究者が特定した外因性ガイドDNAによって形成されるTtAgo-DNA複合体は、TtAgo標的DNA開裂を研究者が特定した相補的な標的DNAに方向付ける。このようにして、DNAにおいて標的化二本鎖切断を作製することができる。TtAgo-ガイドDNA系(または他の生物由来のオルソログであるAgo-ガイドDNA系)の使用によって、細胞内のゲノムDNAの標的化開裂が可能である。このような開裂は、一本鎖または二本鎖であることができる。哺乳動物のゲノムDNAの開裂の場合、哺乳動物細胞における発現のために最適化されたTtAgoコドンのバージョンを使用することが好ましい。さらに、TtAgoタンパク質が細胞貫通ペプチドに融合した、in vitroにおいて形成されたTtAgo-DNA複合体で細胞を処置することが好ましい場合がある。さらに、変異誘発によって摂氏37度で活性が改善するように改変されたTtAgoタンパク質のバージョンを使用することが好ましい場合がある。Ago-RNA媒介性DNA開裂は、DNA切断を活用するために当該分野で標準的な技法を使用する遺伝子ノックアウト、標的化遺伝子付加、遺伝子修正、標的化遺伝子欠失を含む、一連の結果に影響を及ぼすように使用することができた。

## 【0109】

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

## 【0110】

## B. 開裂ドメイン

いずれか適した開裂ドメインをDNA結合ドメインに操作可能に連結して、ヌクレアーゼを形成することができる。例えば、ZFP-DNA結合ドメインがヌクレアーゼドメインに融合されて、ZFN(種々の生物におけるゲノム改変における使用のためを含む、その操作された(ZFP)DNA結合ドメインによりその意図される核酸標的を認識し、ヌクレアーゼ活性によりZFP結合部位付近でDNAをカットすることができる機能的な実体)を作製した。例えば、米国特許出願公開第20030232410号；同第20050208489号；同第20050026157号；同第20050064474号；同第20060188987号；同第20060063231号；および国際公開WO07/014275を参照されたい。同様に、TALE-DNA結合ドメインがヌクレアーゼドメインに融合されて、TALENを作製した。例えば、米国特許第8,586,526号を参照されたい。標的化開裂を誘導するための、DNAに結合し、開裂ドメイン(例えば、Casドメイン)に会合する單一ガイドRNA(sgRNA)を含む、CRISPR/Casヌクレアーゼ系についても記載されている。例えば、米国特許第8,697,359号および同第8,932,814号および米国特許出願公開第20150056705号を参照されたい。

## 【0111】

上に記す通り、開裂ドメインは、DNA結合ドメインに対し異種であり得る：例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ由来の開裂ドメイン；TALEN-DNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ由来の開裂ドメイン；sgRNA-DNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ由来の開裂ドメイン(CRISPR/Cas)；ならびに/またはメガヌクレアーゼDNA結合ドメインおよび異なるヌクレアーゼ由来の開裂ドメイン。異種開裂ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得られる。開裂ドメインが由来し得る例示的なエンドヌクレアーゼには、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼが含まれるがこれらに限定されない。DNAを開裂するさらなる酵素が公知である(例えば、S1ヌクレアーゼ；リヨクトウヌクレアーゼ；臍臓DNase I；小球菌ヌクレアーゼ；酵母HOエンドヌクレアーゼ。これらの酵素(またはその機能的断片)のうちの1または複数は、開裂ドメインおよび開裂ハーフドメインの供給源として使用され得る。

10

20

30

40

50

## 【0112】

同様に、開裂ハーフドメインは、開裂活性のために二量体形成を必要とする、上記のような任意のヌクレアーゼまたはその一部に由来し得る。一般に、融合タンパク質が開裂ハーフドメインを含む場合、2つの融合タンパク質が、開裂に必要とされる。あるいは、2つの開裂ハーフドメインを含む単一のタンパク質が使用され得る。これら2つの開裂ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得、または各開裂ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得る。さらに、2つの融合タンパク質についての標的部位は、好ましくは、互いに關して配置され、その結果、そのそれぞれの標的部位への2つの融合タンパク質の結合は、例えば二量体形成によって開裂ハーフドメインに機能的開裂ドメインを形成させる互いに対する空間的配向に、これらの開裂ハーフドメインを置く。したがって、ある特定の実施形態では、標的部位の近くの端は、5～8ヌクレオチドまたは15～18ヌクレオチド離れている。しかし、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの標的部位間に介在し得る（例えば、2～50ヌクレオチド対またはそれ超）。一般に、開裂の部位は、標的部位間に存在する。

10

## 【0113】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は、多くの種に存在しており、（認識部位における）DNAへの配列特異的結合が可能であり、結合の部位またはその近傍でDNAを開裂させることが可能である。ある特定の制限酵素（例えば、IIS型）は、認識部位から取り出された部位においてDNAを開裂させ、分離可能な結合ドメインおよび開裂ドメインを有する。例えば、IIS型酵素FokIは、一方の鎖上のその認識部位から9ヌクレオチドおよび他方の鎖上のその認識部位から13ヌクレオチドの場所において、DNAの二本鎖開裂を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号；同第5,436,150号および同第5,487,994号；ならびにLiら（1992年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89巻：4275～4279頁；Liら（1993年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻：2764～2768頁；Kimら（1994年a）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻：883～887頁；Kimら（1994年b）J. Biol. Chem. 269巻：31,978～31,982頁を参照されたい。したがって、一実施形態では、融合タンパク質は、操作されてもされなくてもよい、少なくとも1つのIIS型制限酵素および1または複数のジンクフィンガー結合ドメイン由来の開裂ドメイン（または開裂ハーフドメイン）を含む。

20

## 【0114】

その開裂ドメインが結合ドメインから分離可能である例示的なIIS型制限酵素は、FokIである。この特定の酵素は、二量体として活性である。Bittinai et al. (1998年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻：10,570～10,575頁。したがって、本開示の目的のため、開示された融合タンパク質において使用されるFokI酵素の一部は、開裂ハーフドメインとみなされる。したがって、ジンクフィンガー-FokI融合物を使用した細胞配列の標的化された二本鎖開裂および/または標的化された置き換えのために、各々がFokI開裂ハーフドメインを含む2つの融合タンパク質が、触媒的に活性な開裂ドメインを再構成するために使用され得る。あるいは、1つのジンクフィンガー結合ドメインおよび2つのFokI開裂ハーフドメインを含む単一のポリペプチド分子もまた、使用され得る。ジンクフィンガー-FokI融合物を使用した標的化された開裂および標的された配列変更のためのパラメーターは、本開示の別の場所に提供される。

30

## 【0115】

開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインは、機能的開裂ドメインを形成するために、開裂活性を保持するまたは多量体形成する（例えば、二量体形成する）能力を保持する、タンパク質の任意の部分であり得る。

40

## 【0116】

50

例示的な I I S 型制限酵素は、その全体が本明細書に組み込まれる、国際公開 WO 07 / 014275 に記載されている。さらなる制限酵素もまた、分離可能な結合および開裂ドメインを含み、これらは、本開示によって企図される。例えば、Robertsら(2003年) Nucleic Acids Res. 31巻: 418~420頁を参照されたい。

#### 【0117】

ある特定の実施形態では、開裂ドメインは、例えば、その全ての開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第 20050064474 号；同第 20060188987 号；同第 20070305346 号および同第 20080131962 号に記載されるように、ホモ二量体形成を最小化または予防する 1 種または複数種の操作された開裂ハーフドメイン(二量体形成ドメイン変異体とも呼ばれる)を含む。Fok I の 446 位、447 位、479 位、483 位、484 位、486 位、487 位、490 位、491 位、496 位、498 位、499 位、500 位、531 位、534 位、537 位および 538 位におけるアミノ酸残基は、全て、Fok I 開裂ハーフドメインの二量体形成に影響を与えるための標的である。

#### 【0118】

1つより多くの変異を有する開裂ドメインを使用してもよく、例えば、一方の開裂ハーフドメインにおいて 490 位(E-K) および 538 位(I-K) を変異させて、「E 490 K : I 538 K」と称される操作された開裂ハーフドメインを产生し、および別の開裂ハーフドメインにおいて 486 位(Q-E) および 499 位(I-L) を変異させて、「Q 486 E : I 499 L」と称される操作された開裂ハーフドメインを产生する；486 位の野生型 Gln (Q) 残基を Glu (E) 残基で置き換える変異、499 位の野生型 Isoleucine (I) 残基を Leu (L) 残基で置き換える変異、および 496 位の野生型 Asn (N) 残基を Asp (D) または Glu (E) 残基で置き換える変異(それぞれ、「ELD」ドメインおよび「ELE」ドメインとも呼ばれる)；490 位、538 位および 537 位における変異(野生型 Fok I に対して番号を付けた)、例えば、490 位の野生型 Glu (E) 残基を Lys (K) 残基で置き換える変異、538 位の野生型 Isoleucine (I) 残基を Lys (K) 残基で置き換える変異、および 537 位の野生型 His (H) 残基を Lys (K) 残基または Arg (R) 残基で置き換える変異(それぞれ、「KKK」ドメインおよび「KKR」ドメインとも呼ばれる)を含む、操作された開裂ハーフドメイン；ならびに/あるいは操作された開裂ハーフドメインは、490 位および 537 位における変異(野生型 Fok I に対して番号を付けた)、例えば、490 位の野生型 Glu (E) 残基を Lys (K) 残基で置き換える変異、および 537 位の野生型 His (H) 残基を Lys (K) 残基または Arg (R) 残基で置き換える変異(それぞれ、「KIK」ドメインおよび「KIR」ドメインとも呼ばれる)を含む。例えば、その開示全体が全ての目的のために参考として援用される米国特許第 7,914,796 号；同第 8,034,598 号および同第 8,623,618 号を参照されたい。他の実施形態では、操作された開裂ハーフドメインは、「シャーキー」および/または「シャーキー」変異を含む(Gurola (2010 年) J. Mol. Biol. 400巻(1 号): 96~107 頁を参照されたい)。

#### 【0119】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「開裂酵素」技術を使用して、核酸標的部位において in vivo でアセンブルされ得る(例えば、米国特許出願公開第 20090068164 号を参照されたい)。かかる開裂酵素の構成成分は、別々の発現構築物のいずれか上に発現され得るか、または、例えば、自己開裂性 2A ペプチドもしくは IRES 配列によって個々の構成成分が分離されて、1 つのオープンリーディングフレームで連結され得る。構成成分は、個々のジンクフィンガー結合ドメインまたはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであり得る。

#### 【0120】

ヌクレアーゼは、例えば、米国特許第 8,563,314 号に記載される酵母ベースの

10

20

30

40

50

染色体系における使用の前に、活性についてスクリーニングされ得る。

【0121】

Cas9関連CRISPR/Cas系は、同一直列反復配列(DR)によって間を置いたヌクレアーゼガイド配列(スペーサー)を含有する、2種のRNA非コード構成成分: tracrRNAおよびprecrRNAアレイを含む。CRISPR/Cas系を使用してゲノム工学を達成するために、これらのRNAの両方の機能が存在する必要がある(Congら(2013年)Science express 1/10.1126/science 1231143を参照)。一部の実施形態では、tracrRNAおよびprecrRNAは、別々の発現構築物によりまたは別々のRNAとして供給される。他の実施形態では、操作された成熟crRNA(標的特異性を付与)がtracrRNA(Cas9との相互作用を供給)に融合されて、キメラcrRNA-tracrRNAハイブリッド(单一ガイドRNAとも呼ばれる)を作製する、キメラRNAが構築される(Jinek、前記箇所およびCong、前記箇所参照)。

【0122】

標的部位

上で詳細に記載されるように、DNA結合ドメインは、任意の選択した配列に結合するように操作され得る。操作されたDNA結合ドメインは、天然に存在するDNA結合ドメインと比較して新規の結合特異性を有し得る。

【0123】

適した標的遺伝子の非限定例として、ベータ( )グロビン遺伝子(HBB)、ガンマ( )グロビン遺伝子(HBG1)、B細胞リンパ腫/白血病11A(BCL11A)遺伝子、クルッペル様因子1(KLF1)遺伝子、CCR5遺伝子、CXCR4遺伝子、PP1R12C(AAVS1)遺伝子、ヒボキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Hprt)遺伝子、アルブミン遺伝子、第VII因子遺伝子、第IX因子遺伝子、ロイシンリッチリピートキナーゼ2(LRRK2)遺伝子、ハンチンチン(Htt)遺伝子、ロドブシン(RHO)遺伝子、囊胞性線維症膜コンダクタンス調節因子(CFTR)遺伝子、肺サーファクタントタンパク質B遺伝子(SFTPB)、T細胞受容体アルファ(TRAC)遺伝子、T細胞受容体ベータ(TRBC)遺伝子、プログラム細胞死1(PD1)遺伝子、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)遺伝子、ヒト白血球抗原(HLA)A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-C遺伝子、HLA-DPA遺伝子、HLA-DQ遺伝子、HLA-DRA遺伝子、LMP7遺伝子、抗原ペプチド輸送体(TAP)1遺伝子、TAP2遺伝子、タパシン遺伝子(TAPBP)、クラスII主要組織適合遺伝子複合体トランスアクチベーター(CITA)遺伝子、ジストロフィン遺伝子(DMD)、グルココルチコイド受容体遺伝子(GR)、IL2RG遺伝子、Rag-1遺伝子、RFX5遺伝子、FAD2遺伝子、FAD3遺伝子、ZP15遺伝子、KASII遺伝子、MDH遺伝子および/またはEPSPS遺伝子が挙げられる。

【0124】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、ヒト細胞におけるAAVS1、Hprt、アルブミンおよびCCR5遺伝子ならびにマウス細胞におけるRosa26(例えば、米国特許第7,888,121号;同第7,972,854号;同第7,914,796号;同第7,951,925号;同第8,110,379号;同第8,409,861号;同第8,586,526号;米国特許出願公開第20030232410号;同第20050208489号;同第20050026157号;同第20060063231号;同第20080159996号;同第201000218264号;同第20120017290号;同第20110265198号;同第20130137104号;同第20130122591号;同第20130177983号および同第20130177960号を参照)ならびに植物におけるZp15遺伝子座(米国特許U.S.8,329,986を参照)等、「セーフハーバー」遺伝子座を標的化する。

【0125】

ドナー

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、本開示は、幹細胞のゲノムのヌクレアーゼ媒介性改変に関する。上に記す通り、外因性配列（「ドナー配列」または「ドナー」または「導入遺伝子」とも呼ばれる）の挿入は、例えば、指定の領域の欠失のため、および／または変異体遺伝子の補正のため、または野生型遺伝子の発現増加のためになされる。ドナー配列が、典型的には、これが配置されるゲノム配列と同一ではないことが容易に明らかとなるであろう。ドナー配列は、目的の位置における効率的H D Rを可能にするため、2個の相同性領域に挟まれた非相同配列を含有することができる、または非相同性誘導型修復機構により組み込むことができる。その上、ドナー配列は、細胞クロマチンにおける目的の領域と相同ではない配列を含有するベクター分子を含むことができる。ドナー分子は、細胞クロマチンと相同性のいくつかの不連続領域を含有することができる。さらに、目的の領域に通常存在しない配列の標的化挿入のため、前記配列は、ドナー核酸分子に存在して、目的の領域における配列と相同性の領域に挟まれることができる。

## 【0126】

ヌクレアーゼにより、ドナーは、何れかの形態で導入することができる。ある特定の実施形態では、改変された細胞における残渣ウイルスを排除するために、ドナーは、mRNA形態で導入される。他の実施形態では、ドナーは、当該技術分野で公知の方法により、DNAおよび／またはウイルスベクターを使用して導入することができる。例えば、米国特許出願公開第20100047805号および同第20110207221号を参照されたい。ドナーは、環状または直鎖状形態で細胞に導入することができる。直鎖状の形態で導入される場合、当業者に公知の方法によって、ドナー配列の末端を保護する（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）ことができる。例えば、1つまたは複数のジデオキシヌクレオチド残基を直鎖状分子の3'末端に付加する、および／または自己相補的なオリゴヌクレオチドを一端または両端にライゲーションする。例えば、Changら、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84巻：4959～4963頁、Nehlsら、1996年、Science、272巻：886～889頁を参照されたい。分解から外因性ポリヌクレオチドを保護するための追加の方法としては、末端アミノ基（複数可）の付加、および例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミダートやO-メチルリボースもしくはデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間の結合の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0127】

ある特定の実施形態では、ドナーは、1kbを超える長さの、例えば、2～200kbの間、2～10kbの間（またはその間のいずれかの値）の配列（例えば、導入遺伝子とも称されるコード配列）を含む。ドナーは、少なくとも1個のヌクレアーゼ標的部位を含むこともできる。ある特定の実施形態では、ドナーは、例えば、ZFN、TALEN、TTAgOまたはCRISPR/Casヌクレアーゼの対のための、少なくとも2個の標的部位を含む。典型的には、ヌクレアーゼ標的部位は、導入遺伝子の開裂のため、導入遺伝子配列の外側、例えば、導入遺伝子配列に対し5'および／または3'にある。ヌクレアーゼ開裂部位は、あらゆるヌクレアーゼに対するものであってもよい。ある特定の実施形態では、二本鎖ドナーに含有されるヌクレアーゼ標的部位は、開裂されたドナーが相同性非依存的方法により組み込まれる内在性標的の開裂に使用される同じヌクレアーゼに対するものである。

## 【0128】

ドナーは、組込み部位における内在性プロモーター、すなわち、ドナーが挿入される内在性遺伝子の発現を駆動するプロモーターによってその発現が駆動されるように挿入することができる。しかし、ドナーが、プロモーターおよび／またはエンハンサー、例えば、構成的プロモーターまたは誘導性もしくは組織特異的プロモーターを含むことができることが明らかとなるであろう。内在性遺伝子の全てまたは一部が発現されるまたは全く発現されないように、ドナー分子を内在性遺伝子へと挿入することができる。さらに、発現を必要としているとも、外因性配列は、転写調節配列または翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、内部リボソーム進入部位、2Aペプチドをコ

10

20

30

40

50

ードする配列および／またはポリアデニル化シグナルをも含み得る。

【0129】

本明細書に記載されているドナー配列において運ばれる導入遺伝子は、P C R等、当該技術分野で公知の標準技法を使用して、プラスミド、細胞または他の供給源から単離することができる。使用のためのドナーは、環状スーパーコイル、ほどけた環状、直鎖状その他を含む、変動する種類のトポロジーを含むことができる。あるいは、ドナーは、標準オリゴスクレオチド合成技法を使用して化学合成することができる。加えて、ドナーは、メチル化されていても、メチル化を欠いてもよい。ドナーは、細菌または酵母人工染色体（B A CまたはY A C）の形態となることができる。

【0130】

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

【0131】

外因性（ドナー）ポリヌクレオチドは、いずれかの目的の配列（外因性配列）を含むことができる。例示的な外因性配列として、いずれかのポリペプチドコード配列（例えば、c D N A）、プロモーター配列、エンハンサー配列、エピトープタグ、マーカー遺伝子、開裂酵素認識部位および様々な種類の発現構築物が挙げられるがこれらに限定されない。マーカー遺伝子として、抗生物質耐性（例えば、アンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、G 4 1 8耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、有色または蛍光または発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、増強型緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）ならびに増強された細胞成長および／または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターーゼ）をコードする配列が挙げられるがこれらに限定されない。エピトープタグは、例えば、1または複数コピーのF L A G、H i s、m y c、T a p、H Aまたはいずれかの検出可能アミノ酸配列を含む。

【0132】

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

【0133】

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

【0134】

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

【0135】

本明細書の教示に従ったこのような発現カセットの構築は、分子生物学の技術分野で周知の方法論を利用する（例えば、A u s u b e lまたはM a n i a t i sを参照）。トランスジェニック動物を生成するための発現カセットの使用前に、選択された制御エレメントに関連するストレス誘導因子に対する発現カセットの応答性は、適した細胞株（例えば、初代細胞、形質転換細胞または不死化細胞株）へと発現カセットを導入することにより

10

20

30

40

50

検査することができる。

【0136】

さらに、発現には必要とされないが、外因性配列は、転写もしくは翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、2 Aペプチドをコードする配列および／またはポリアデニル化シグナルを含むこともできる。さらに、目的の遺伝子の制御エレメントは、レポーター遺伝子に作動可能に連結して、キメラ遺伝子（例えば、レポーター発現カセット）を作製することができる。例示的なスプライスアクセプター部位配列は、当業者に公知であり、ほんの一例として、C T G A C C T C T T C T C T T C C T C C C A C A G（配列番号1）（ヒトHBB遺伝子由来）およびT T T C T C T C C A C A G（配列番号2）（ヒト免疫グロブリン-ガンマ遺伝子由来）を含む。10

【0137】

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

【0138】

追加的な実施形態では、ドナー核酸は、追加的なヌクレアーゼ設計に特異的な標的部位である非コード配列を含むことができる。その後に、本来のドナー分子が開裂され、別の目的のドナー分子の挿入により改変されるように、細胞において追加的なヌクレアーゼを発現させることができる。このようにして、特定の目的の遺伝子座またはセーフハーバー遺伝子座における形質の積み重ねを可能にする、ドナー分子の反復的組込みを生成することができる。20

【0139】

細胞

よって、本明細書に記載されている方法によって產生される細胞を含む、不活性化された遺伝子および／または導入遺伝子を含む遺伝子改変された細胞、例えば、幹細胞が本明細書に提供される。導入遺伝子は、1種または複数のヌクレアーゼを使用して、細胞のゲノムへと標的化様式で組み込まれる。ランダムな組込みとは異なり、標的化組込みは、導入遺伝子が、指定の遺伝子へと組み込まれることを確実にする。導入遺伝子は、標的遺伝子におけるいずれの箇所にも組み込むことができる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、ヌクレアーゼ結合および／または開裂部位にまたはその付近に、例えば、開裂部位および／または結合部位の上流または下流の1～300（またはその間のいずれかの数の塩基対）塩基対以内に、より好ましくは、開裂および／または結合部位のいずれか一方の側の1～100塩基対（またはその間のいずれかの数の塩基対）以内に、さらにより好ましくは、開裂および／または結合部位のいずれか一方の側の1～50塩基対（またはその間のいずれかの数の塩基対）以内に組み込まれる。ある特定の実施形態では、組み込まれた配列は、いかなるベクター配列（例えば、ウイルスベクター配列）も含まない。ある特定の実施形態では、細胞は、改変が、ベータ-グロブリン遺伝子のエクソン内、例えば、エクソン1、2または3内に存在するような、本明細書に記載されているヌクレアーゼによって作製される改変（例えば、挿入および／または欠失）を含む。ある特定の実施形態では、改変は、ベータグロブリン遺伝子のエクソン1における鎌状赤血球変異を補正する。ある特定の実施形態では、改変は、配列番号23または24にまたはその付近（例えば、1～300塩基対またはその間のいずれかの数の塩基対）に存在する。他の実施形態では、改変は、配列番号23または24の1～100塩基対（またはその間のいずれかの数の塩基対）である。ある特定の実施形態では、改変は、配列番号23および／または配列番号24内に存在する、例えば、配列番号23または24のいずれかにおける1または複数塩基対の改変である。30

【0140】

細胞および細胞株が挙げられるがこれらに限定されない、いかなる細胞型も、導入遺伝子を含むように、本明細書に記載されている通りに遺伝子改変し得る。本明細書に記載さ40

れている遺伝子改変された細胞の他の非限定例として、T細胞（例えば、CD4+、CD3+、CD8+等）；樹状細胞；B細胞；自家（例えば、患者由来）が挙げられる。ある特定の実施形態では、細胞は、異種多能性、全能性または複能性幹細胞（例えば、CD34+細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、胚性幹細胞その他）を含む幹細胞である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている細胞は、患者に由来する幹細胞である。

#### 【0141】

本明細書に記載されている細胞は、例えば、ex vivo治療法による、障害を有する被験体における障害の処置および/または防止において有用である。標準技法を使用して、ヌクレアーゼ改変された細胞を増やしてから、患者に再導入することができる。例えば、Tebasら（2014年）New Eng J Med 370巻（10号）：901頁を参照されたい。幹細胞の場合、被験体への注入後に、これらの前駆体から、（挿入されたドナーから）機能的タンパク質を発現する細胞へのin vivo分化も起こる。本明細書に記載されている細胞を含む医薬組成物も提供される。加えて、細胞は、患者への投与に先立ち凍結保存することができる。

#### 【0142】

##### 送達

ヌクレアーゼ、これらのヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド、ならびに本明細書に記載されているタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含む組成物を、任意の適当な手段によって送達してもよい。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼおよび/またはドナーは、in vivoで送達される。他の実施形態では、ヌクレアーゼおよび/またはドナーは、患者へのex vivo送達において有用な改変された細胞の提供のために、単離された細胞（例えば、自家または異種幹細胞）へと送達される。

#### 【0143】

本明細書に記載されているようなヌクレアーゼの送達方法は、例えば、米国特許第6,453,242号、同第6,503,717号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,607,882号、同第6,689,558号、同第6,824,978号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号および同第7,163,824号に記載されており、それらの全ての開示は、30参照によりその全体が本明細書に組み入れられている。

#### 【0144】

また、本明細書に記載されているようなヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物を、1種または複数種の構成成分をコードする配列を含有する任意の核酸送達機構（ネイキッドDNAおよび/またはRNA（例えば、mRNA）ならびにベクターを含む）を使用して送達してもよい。以下に限定されないが、プラスミドベクター、DNAミニサークル、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクターなどならびにこれらの組み合わせを含めた任意のベクター系を使用してもよい。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,824,978号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号および同第7,163,824号ならびに米国特許出願第14/271,008号も参照されたい。さらに、任意のこれらの系が、処置のために求められる1種または複数種の配列を含んでもよいことは明らかである。そのため、1種または複数種のヌクレアーゼおよびドナー構築物を細胞内に導入する際に、ヌクレアーゼおよび/またはドナー構築物をコードする配列（例えば、1種もしくは複数のヌクレアーゼをコードするmRNAおよび/または1種もしくは複数のドナー構築物を保有するmRNAもしくはAAV）を含むことができる。

10

20

30

40

50

## 【0145】

従来のウイルスおよび非ウイルスに基づく遺伝子移入方法は、細胞（例えば、哺乳動物細胞）および標的組織に、ヌクレアーゼおよびドナー構築物をコードする核酸を導入するために使用することができる。非ウイルスベクター送達系としては、DNAプラスミド、DNAミニサークル、ネイキッド核酸、およびリポソーム、脂質ナノ粒子、ポリ乳酸-グリコール酸ナノ粒子、ポリアミン錯化剤またはポロキサマーなどの送達ビヒクルとの複合体を形成している核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、DNAおよびRNAウイルスが挙げられ、これらは細胞へ送達された後に、エピソームゲノムまたは組み込まれたゲノムのどちらかを有する。遺伝子療法手順の総説については、Anderson、Science、256巻：808～813頁（1992年）、NabelおよびFelgner、TIBTECH、11巻：211～217頁（1993年）、MitanisおよびCaskey、TIBTECH、11巻：162～166頁（1993年）、Dillon、TIBTECH、11巻：167～175頁（1993年）、Miller、Nature、357巻：455～460頁（1992年）、Van Brunt、Biotechnology、6巻（10号）：1149～1154頁（1988年）、Vigne、Restorative Neurology and Neuroscience、8巻：35～36頁（1995年）、KremerおよびPerricaudet、British Medical Bulletin、51巻（1号）：31～44頁（1995年）、Haddadら、Current Topics in Microbiology and Immunology中のDoerflerおよびBoehm著（1995年）ならびにYula、Gene Therapy、1巻：13～26頁（1994年）を参照されたい。  
10

## 【0146】

核酸の非ウイルス送達方法としては、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、または脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、ネイキッドRNA、キャップドRNA（capped RNA）、人工ビリオン、および薬剤で増強されたDNA取り込みが挙げられる。例えば、Sonitron 2000システム（Rich-Marr）を使用するソノポレーションも、核酸の送達に使用することができる。  
20

## 【0147】

追加の例示の核酸送達系としては、Amaxa Biosystems（ケルン、ドイツ）、Maxcyte, Inc.（ロックビル、メリーランド州）、BTX Molecular Delivery Systems（ホリストン、マサチューセッツ州）、およびCopernicus Therapeutics Inc.（例えば、米国特許第6,008,336号を参照されたい）によって提供されるものが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、および同第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、Transfectam（商標）およびLipofection（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適した陽イオン性および中性脂質としては、FelgnerのWO91/17424、WO91/16024の脂質が挙げられる。  
30

## 【0148】

免疫脂質複合体などの標的化されたリポソームを含めた脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Crystal、Science、270巻：404～410頁（1995年）、Blaeseら、Cancer Gene Ther.、2巻：291～297頁（1995年）、Behrら、Bioconjugate Chem.、5巻：382～389頁（1994年）；Remyら、Bioconjugate Chem.、5巻：647～654（1994年）、Gaoら、Gene Therapy、2巻：710～722頁（1995年）、Ahmadら、Cancer Res.、52巻：4817～4820頁（1992年）、ならびに米国特許第4,186,183号、  
40

同第4, 217, 344号、同第4, 235, 871号、同第4, 261, 975号、同第4, 485, 054号、同第4, 501, 728号、同第4, 774, 085号、同第4, 837, 028号および同第4, 946, 787号を参照されたい)。

#### 【0149】

追加の送達方法としては、送達される核酸のEnGeneIC送達ビヒクル(EDV)内へのパッケージングを使用することが挙げられる。これらのEDVは、抗体の1つのアームが標的組織に対する特異性を有し、かつ他方がEDVに対する特異性を有する二重特異性抗体を使用して、標的組織に特異的に送達される。抗体は、EDVを標的細胞の表面に運び、次いでEDVは、エンドサイトーシスにより細胞内に運ばれる。細胞内に取り込まれると、内容物が放出される(MacDiarmidら、(2009年)、Nature Biotechnology、27巻(7号)、643頁を参照されたい)。

#### 【0150】

操作されたCRISPR/Cas系をコードする核酸を送達するためのRNAまたはDNAウイルスに基づく系の使用は、ウイルスに体内の特定の細胞を標的とさせ、ウイルスペイロードを核に輸送するための高度に進化した過程を利用する。ウイルスベクターは、被験体に直接投与(in vivo)することができるか、またはインビトロで細胞を処置するために使用することができ、改変された細胞は被験体に投与される(ex vivo)。CRISPR/Cas系を送達するための従来のウイルスに基づく系としては、遺伝子移入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクチン、および単純ヘルペスウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。宿主ゲノム内の組込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ関連ウイルスの遺伝子移入方法を用いて可能であり、多くの場合、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。さらに、高い形質導入効率が、多くの異なる細胞型および標的組織において観察されている。

#### 【0151】

レトロウイルスの向性は、外来のエンベロープタンパク質を組み入れることによって変更することができ、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大させる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入または感染させることができるレトロウイルスベクターであり、典型的には高ウイルス力価を生じる。レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6~10kbの外来配列に用いるパッケージング能力を有する、シス作用性の長い末端反復からなる。最小限のシス作用性LTRが、ベクターの複製およびパッケージングには十分であり、それらは、次いで、治療遺伝子を標的細胞内に組み込むために使用されて、導入遺伝子の永続的な発現を提供する。広く使用されているレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびそれらの組合せに基づくものが挙げられる(例えば、Buchscherら、J. Virol.、66巻:2731~2739頁(1992年)、Johannら、J. Virol.、66巻:1635~1640頁(1992年)、Sommerfeltら、Virol.、176巻:58~59頁(1990年)、Wilsonら、J. Virol.、63巻:2374~2378頁(1989年)、Millerら、J. Virol.、65巻:2220~2224頁(1991年)、PCT/US94/05700を参照されたい)。

#### 【0152】

一過性発現が好適な用途では、アデノウイルスに基づく系を使用することができる。アデノウイルスに基づくベクターは、多くの細胞型で非常に高い効率で形質移入が可能であり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターを用いて、高力価および高レベルの発現を得ている。このベクターは、比較的単純な系で大量に产生することができる。また、アデノ関連ウイルス(「AAV」)ベクターを使用して、例えば、核酸およびペプチドのin vitro産生において、ならびにin vivoおよびex vivoの遺伝子治療の手順(例えば、Westら、Virology、160巻:38~47頁(1985年)を参照されたい)。

10

20

30

40

50

7年)、米国特許第4,797,368号、WO 93/24641、Kotin、Human Gene Therapy、5巻:793~801頁(1994年)、Muzychuk、J.Clin.Invest. 94巻:1351頁(1994年)を参照されたい)に用いるために、細胞に標的核酸を形質導入することもできる。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号、Tratschinskiら、Mol.Cell.Biol.、5巻:3251~3260頁(1985年)、Tratschinskiら、Mol.Cell.Biol.、4巻:2072~2081頁(1984年)、HermonatおよびMuzychuk、PNAS、81巻:6466~6470頁(1984年)、およびSamulskiら、J.Virology、63巻:03822~3828頁(1989年)を含めた多数の刊行物に記載されている。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6およびAAV8、AAV8.2、AAV9およびAAVrh10、ならびにAAV2/8、AAV2/5およびAAV2/6等のショードタイプ化AAVを含む、いずれかのAAV血清型を使用することができる。  
10

#### 【0153】

少なくとも6つのウイルスベクターアプローチが、現在、臨床試験の遺伝子移入に利用可能であり、それらは、形質導入薬剤を生成するために、ヘルパー細胞株内に挿入された遺伝子による欠損ベクターの相補性を含むアプローチを利用する。

#### 【0154】

pLASNおよびMFG-Sは、臨床試験で使用されているレトロウイルスベクターの例である(Dunbarら、Blood、85巻:3048~305頁(1995年)、Kohnら、Nat.Med.、1巻:1017~102頁(1995年)、Malechら、PNAS、94巻:22号、12133~12138頁(1997年))。PA317/pLASNは、遺伝子治療試験で使用された最初の治療ベクターであった。(Blaiseら、Science、270巻:475~480頁(1995年))。MFG-Sでパッケージされたベクターについて、50%またはそれ超の形質導入効率が観察されている。(Ellemら、Immunol.Immunother.、44巻(1号):10~20頁(1997年)、Dranoffら、Hum.Gene Ther.、1巻:111~2頁(1997年)。)

#### 【0155】

組換えアデノ関連ウイルスベクター(rAAV)は、欠損型および非病原性のパルボウイルスアデノ関連2型ウイルスに基づく有望な代替の遺伝子送達システムである。全てのベクターは、導入遺伝子発現力セットに隣接するAAV145塩基対(bp)の逆方向末端反復のみを保持するプラスミドに由来する。形質導入された細胞のゲノム内への組込みに起因する効率的な遺伝子移入および安定な導入遺伝子送達は、このベクター系の鍵となる特長である(Wagnerら、Lancet 351巻:9117号 1702~3頁(1998年)、Kearnsら、Gene Ther. 9巻:748~55頁(1996年))。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9およびAAVrh10、ならびに全てのそれらのバリエントを含めた他のAAV血清型も、本発明に従って使用することができる。  
30

#### 【0156】

複製欠損性組換えアデノウイルスベクター(Ad)は、高力価で產生することができ、多数の異なる細胞型を容易に感染させる。アデノウイルスベクターのほとんどは、導入遺伝子がAd-E1a、E1b、および/またはE3遺伝子を置き換えて、その後、複製欠損性ベクターが、欠失した遺伝子機能をトランスに供給するヒト293細胞で増殖するように、操作される。Adベクターは、肝臓、腎臓、および筋肉で見出されるものなど非分裂性の分化細胞を含む、複数の種類の組織をin vivoで形質導入することができる。従来のAdベクターは、大きな保有能力を有する。臨床試験でAdベクターを使用する例では、筋肉内注入を用いた抗腫瘍免疫化のポリヌクレオチド治療が含められた(Stermannら、Hum.Gene Ther.、7巻:1083~9頁(1998年))。臨床試験における遺伝子移入に用いるアデノウイルスベクターの使用の追加の例としては  
40

10

20

30

40

50

、Rosenheckerら、Infection、24巻：1号、5～10頁（1996年）、Stermanら、Hum. Gene Ther.、9巻：7号、1083～1089頁（1998年）、Welshら、Hum. Gene Ther.、2巻：205～18頁（1995年）、Alvarezら、Hum. Gene Ther.、5巻：597～613頁（1997年）、Topfら、Gene Ther.、5巻：507～513頁（1998年）、Stermanら、Hum. Gene Ther.、7巻：1083～1089頁（1998年）が挙げられる。

#### 【0157】

パッケージング細胞を使用して、宿主細胞を感染させることができ可能なウイルス粒子を形成する。そのような細胞としては、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、およびレトロウイルスをパッケージングする2細胞またはPA317が含まれる。遺伝子治療で使用されるウイルスベクターは、通常、ウイルス粒子内に核酸ベクターをパッケージングする生産細胞株によって生成される。これらのベクターは、典型的に、パッケージングおよびその後の宿主への組込みに必要とされる最小限のウイルス配列（適用可能な場合）、発現させるタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられている他のウイルス配列を含有する。欠けているウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスに供給される。例えば、遺伝子治療に使用するAAVベクターは、典型的には、宿主ゲノム内へのパッケージングおよび組込みに必要とされるAAVゲノム由来の逆方向末端反復（ITR）配列のみを具える。ウイルスDNAは、細胞株中にパッケージングされ、他のAAV遺伝子即ち、*rep*および*cap*をコードするもののITR配列を欠失したヘルパープラスミドを含有する。細胞株はまた、ヘルパーとしてアデノウイルスに感染する。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製、およびヘルパープラスミド由来のAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列を欠失しているため、有意な量にはパッケージングされない。アデノウイルスによる夾雜は、例えば、AAVよりも感受性があるアデノウイルスに対する熱処理によって低減することができる。

#### 【0158】

多くの遺伝子治療用途では、遺伝子治療ベクターが、高度な特異性で特定の細胞型に送達されることが望ましい。したがって、ウイルスの外表面上でウイルス外被タンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現することによって、ウイルスベクターを所与の細胞型に対する特異性を有するように改変することができる。リガンドは、目的の細胞型上に存在することが公知の受容体に対する親和性を有するように選ばれる。例えば、Hanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92巻：9747～9751頁（1995年）は、モロニーマウス白血病ウイルスを改変して、gp70に融合されたヒトヘレグリンを発現することができ、その組換えウイルスが、ヒト上皮成長因子受容体を発現しているある特定のヒト乳がん細胞を感染させることを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質をウイルスが発現する、他のウイルス-標的細胞の対にまで及び得るものである。例えば、線状ファージを操作して、事実上いかなる選ばれた細胞受容体にも特異的な結合親和性を有する抗体断片（例えば、FABまたはFv）を提示することができる。上記の記載は、主にウイルスベクターに適用されるが、同じ原理を非ウイルスベクターに適用することができる。そのようなベクターを操作して、特異的な標的細胞による取り込みに好都合な特異的な取り込み配列を含有させることができる。

#### 【0159】

遺伝子治療ベクターは、下記に説明するように、個々の被験体への投与によって、典型的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下もしくは頭蓋内注入）または局所適用によって、*in vivo*で送達することができる。あるいは、個々の患者から移植された細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検）や万能ドナーの造血幹細胞などの細胞に、ベクターを*ex vivo*で送達し、続いて、通常はベクターを組み入れた細胞を選択した後に、患者への細胞の再移植を行うことができる。

#### 【0160】

10

20

30

40

50

また、ヌクレアーゼおよび／またはドナー構築物を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソーム等）を、*in vivo*での細胞の形質導入のために、生物に直接投与することもできる。あるいは、ネイキッドDNAを投与することができる。投与は、血液または組織の細胞との最終的な接触の内に分子を導入するために通常使用される経路のいずれかに依り、そのような経路としては、注射、注入、局所適用、およびエレクトロポレーションが挙げられるが、これらに限定されない。そのような核酸を投与する適当な方法は、利用可能であり、当業者に周知であり、そして、1つよりも多い経路を使用して特定の組成物を投与することができるが、多くの場合、特定の経路は、別の経路よりも速やかかつ有効な反応を提供することができる。

## 【0161】

10

本明細書に記載されているポリヌクレオチドの導入に適したベクターとしては、非組込み型レンチウイルスベクター（IDLV）が挙げられる。例えば、Oryら（1996年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻：11382～11388頁、Dul1ら（1998年）、J. Virol.、72巻：8463～8471頁、Zufferyら（1998年）、J. Virol.、72巻：9873～9880頁、Follenziら（2000年）、Nature Genetics、25巻：217～222頁、米国特許出願公開第2009/054985号を参照されたい。

## 【0162】

薬学的に許容される担体は、投与されている特定の組成物によって、および組成物を投与するために使用される特定の方法によって、ある程度は決定される。したがって、下記に記載するように、利用可能な医薬組成物の実に様々な適当な製剤が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17版、1989年を参照されたい）。

20

## 【0163】

ヌクレアーゼをコードする配列とドナー構築物とを、同じまたは異なる系を使用して送達することができることは明らかである。例えば、ドナーポリヌクレオチドをAAVによって保有することができ、一方、1種または複数種のヌクレアーゼを異なるmRNAによって保有することができる。さらに、これらの異なる系を、同じまたは異なる経路（筋肉内注射、尾静脈注射、他の静脈内注射、腹腔内投与および／または筋肉内注射）によって投与することができる。これらのベクターを、同時にまたは任意の順番で、送達することができる。

30

## 【0164】

*ex vivo*と*in vivo*との両方の投与に用いる製剤としては、液体中懸濁液物または乳濁液が挙げられる。多くの場合、活性成分は、薬学的に許容され、かつ活性成分に適合する賦形剤と混合される。適当な賦形剤としては、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどおよびそれらの組合せが挙げられる。さらに、組成物は、湿潤剤もしくは乳濁剤、pH緩衝剤、安定化剤または医薬組成物の効果を高める他の試薬などの微量の補助的な物質を含有していてもよい。

## 【0165】

## キット

40

上述の方法のいずれかを行うためのキットも提供される。キットは、典型的に、1種もしくは複数のヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、幹細胞増大に影響を与える1種もしくは複数の因子、および／または本明細書に記載されているドナーポリヌクレオチド、ならびに幹細胞に影響を与える因子を、ヌクレアーゼおよび／またはドナーポリヌクレオチドが導入される細胞（または周囲の培地）へと投与するための指示を含有する。キットは、細胞、細胞の形質転換のためのバッファー、細胞のための培養培地および／またはアッセイを行うためのバッファーを含有することもできる。典型的には、キットは、キットの他の構成成分に添付または他の仕方で添えられた指示、包装または広告チラシ等、いずれかの材料を含むラベルも含有する。

## 【0166】

50

以下の実施例は、ヌクレアーゼが 1 種もしくは複数種の Z F N または 1 種もしくは複数種の T A L E N を含む、本開示の例示的な実施形態に関する。このことが、実例のみの目的にあること、ならびに他のヌクレアーゼが使用され得ること、例えば、操作された D N A 結合ドメインを有するホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）が使用され得ること、および / または天然起源のもしくは操作されたホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）の D N A 結合ドメインと異種由来開裂ドメインとの融合物、メガ T A L、コンパクト T A L E N および操作された単一ガイド R N A を使用する T t A g o および C R I S P R / C a s などのヌクレアーゼ系が使われ得ることであることは理解されよう。

【実施例】

10

【0167】

（実施例 1：ジンクフィンガータンパク質ヌクレアーゼ（Z F N ）の設計、構築および一般的特徴付け）

基本的に Urnovら（2005年）Nature 435巻（7042号）：646～651頁、Perezら（2008年）Nature Biotechnology 26巻（7号）：808～816頁に記載され、米国特許第6,534,261号に記載されている通りにジンクフィンガータンパク質を設計し、プラスミド、A A V またはアデノウイルスベクターに取り込み、結合に関して検査した。ヒトベータグロビン遺伝子座に特異的な Z F N および T A L E N に関しては、共有の米国特許第7,888,121号ならびに米国特許出願公開第20130137104号および同第20130122591号を参照されたい。

20

【0168】

（実施例 2：グロビン特異的 Z F N の活性）

ヒトグロビン遺伝子座を標的化する Z F N 対を使用して、特異的標的部位において D S B を誘導するこのような Z F N の能力を検査した。示されている Z F N の各フィンガーの認識ヘリックス領域のアミノ酸配列を下表 1 に示す。標的部位（D N A 標的部位を大文字で示し；非接触ヌクレオチドを小文字で示す）を表 2 に示す。

【表 1】

表 1:ヒトベータグロビン特異的ジンクフィンガータンパク質認識ヘリックスの設計

30

SBS 番号	設計					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
33488	LRHHLTR (配列番号 12)	LRHNLRA (配列番 号 13)	DQSNLRA (配列番号 14)	RNASRTR (配列番号 15)	RSDNLSE (配列番号 16)	RSQHRKT (配列番 号 17)
33501	TSGSLSR (配列番号 18)	DRSDLRSR (配列番 号 19)	DRSALAR (配列番号 20)	QSSNLAR (配列番号 21)	QSGHLSR (配列番号 22)	NA
47773	LRHHLTR (配列番号 12)	LKQNLDA (配列番 号 55)	DQSNLRA (配列番号 14)	RNCARLR (配列番号 56)	RSDNLSE (配列番号 16)	RNQTRLN (配列番 号 57)
47817	HHHSLKR (配列番号 58)	DRSDLRSR (配列番 号 19)	TNSELDR (配列番号 59)	QSSNLAR (配列番号 21)	QSGHLSR (配列番号 22)	NA

40

## 【表2】

表2:ヒトベータグロビン特異的ジンクフィンガーの標的部位

SBS番号	標的部位
33488, 47773	ggAGTCAGGTGCACCATGGTgtctgttt (配列番号 23)
33501, 47817	gtGGAGAAGTctGCCGTTactgccctgt (配列番号 24)

## 【0169】

次の通りにヒトCD34+細胞を得て、加工した。全臍帯血(CB)検体は、カリфорニア大学(University of California)によって承認されるガイドラインに従って得られ、IRB審査から免除された匿名医療廃棄物であると考慮された。採取48時間以内に細胞を加工した。UCLA IRBプロトコール番号10-001399に基づくインフォームドコンセントにより、SCDを有するボランティアドナー由来の骨髄(BM)吸引液を得た。Ficoll Hypaque (Stem Cell Technologies)密度遠心分離を使用して、BMおよびCBから単核細胞(MNC)を単離した。次に、免疫磁気カラム分離を使用して、抗CD34マイクロビーズ(Miltenyi Biotec Inc.)と共にMNCを4で30分間インキュベートすることにより、CD34+細胞を濃縮した。次に、磁気カラムを通して細胞を送り、CD34+細胞を採取し、凍結培地(10%ジメチルスルホキシド(Sigma Aldrich)、90%FBS)の入ったクライオバイアルに置き、液体窒素中に凍結保存した。動員されたCD34+細胞(mPB)は、Allcellsから購入した。

## 【0170】

エレクトロポレーションのためのmRNAを产生するために、表1に示すZFNをコードするプラスミドをSpeI(New England Biolabs)で直鎖化し、in vitro転写の鑄型としての使用前に、フェノール：クロロホルム(chloroform)により精製した。message mMachine(登録商標)T7ULTRA転写キット(Life Technologies)をメーカーのプロトコールに従って使用して、in vitro転写されたmRNAを产生し、RNeasy(登録商標)MinElute(登録商標)清浄化キット(Qiagen)により清浄化した。エレクトロポレーションのため、次のプロトコールに従った：CB CD34+細胞を37で解凍し、20%ウシ胎仔血清(Gemin Bioproducts)および(1×グルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシン)を補充したイスコフ(Isco)変法ダルベッコ培地(IMDM; Life Technologies)において洗浄し、グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、50ng/ml SCF、50ng/ml Flt-3および50ng/ml TPO(Peprotech)を含有するX-VIVO15培地(Lonza)において48時間予め刺激した。エレクトロポレーションのため、反応当たり200,000個の細胞を90gで15分間スピinnさせ、100μlのBTXプレスバッファー(Harvard Apparatus)に再懸濁し、表示量のZFN mRNAおよび/または適用できる場合はオリゴヌクレオチドと混合し、BTX ECM 830 Square Wave Electroporator(Harvard Apparatus)において250Vで5ミリ秒のパルスを1回適用した。

## 【0171】

エレクトロポレーション後に、細胞を10分間室温で休ませ、その後、培養培地を添加し、合計500ulにおいてプレートに移した。ドナーIDLVは、適切な試料のために記載されている濃度で最終培養培地において存在した。

## 【0172】

次の通りに遺伝子補正および遺伝子破壊を解析した：Surveyor(登録商標)スクレアーゼアッセイ(Cel-1)を使用して、ZFN誘導性部位特異的アレル破壊を決定した。200ngのゲノムDNAから、Accuprime Taq Hi-Fi(L

10

20

30

40

50

ife Technologies)を使用して、C el 1 F wd (5' - g a c a g g t a c g g c t g t c a t c a - 3' 配列番号25)およびC el 1 R ev (5' - c a g c c t a a g g g t g g g a a a a t - 3' 配列番号26)を使用して、Z FN結合部位周囲の410 bp領域をPCR増幅した。変性、再アニーリング、消化ならびに電気泳動およびデンシティメトリー解析を記載されている通りに完了した(例えば、J o g l e k a t l a (2013年)Mol. Ther: J of the Amer Soc Gene Ther 21巻: 1705~17頁)。部位特異的遺伝子改変を制限断片長多型(RFLP)により検出した。

## 【0173】

プライマーB glo Outer F wd (5' - a t g c t t a g a a c c g a g g t a g a g t t - 3'、配列番号27)およびB glo Outer R ev (5' - c c t g a g a c t t c c a c a c t g a t g - 3'、配列番号28)ならびにA c c u p r i m e T a q H i - F i (Life Technologies)を使用して、Z FN結合部位周囲の1.1 kb領域をPCR増幅した。PCR清浄化キット(Life Technologies)を使用してPCR産物を精製し、10ユニットのH ha I (New England Biolabs)を使用して37で3.5時間消化した。G el G reen (Biotium)で予め染色した1.0%TBE-アガロースゲルにおいて消化産物を分離し、Typhoon F L A 9000 Biomolecular Imager (GE Healthcare)において画像化した。

## 【0174】

遺伝子改変を定量化するために、定量的PCRに基づくアッセイを使用した。上述の1.1 kb PCR産物を鋳型として使用して、2回のPCR反応のセットを行った。未精製のPCR鋳型を1:5,000希釈し、そのうち1 u lを、次の25 u l反応物のそれぞれにおいて使用した。プライマーH ha I F wd (5' - g a a g t c t g c c g t t a c t g c g - 3'、配列番号29)およびH ha I R ev (5' - c c c a g t t t c t a t t g g t c t c c - 3'、配列番号30)を使用して第1のPCRを行って、改変されたゲノムを増幅した。プライマーE x o n I I F wd (5' - c t c g g t g c c t t a g t g a t g g - 3'、配列番号31)およびE x o n I I R ev (5' - g a c t c a c c c t g a a g t t c t c - 3'、配列番号32)を使用して第2のPCRを行って、インプット鋳型を正規化した。Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies)を使用して、これらのPCRの両方は定量的となり、V i i A 7 (Life Technologies)において取得した。2回の反応の間のC t(閾値までのサイクル数)差およびプラスミド検量線を使用して、遺伝子改変の頻度を決定した。全Z FNが活性であることが判明した。

## 【0175】

グロビンパラログをPCR増幅し、Illumina MiSeq機械においてディープシーケンシングして、オフターゲット改変をアッセイした。PCRに使用したプライマーを次に示す: H B B : 5' - a c a c g a c g c t c t t c c g a t c t n n n n g g g c t g g g c a t a a a a g t c a g - 3' (配列番号33)および5' - g a c g t g t g c t c t t c c g a t c t t c c a c a t g c c c a g t t t c t a t t - 3' (配列番号34); H B D : 5' - a c a c g a c g c t c t t c c g a t c t n n n n t a a a a g g c a g g g c a g a g t c g a - 3' (配列番号35)および5' - g a c g t g t g c t c t t c c g a t c a c a t g c c c a g t t t c c a t t t g c - 3' (配列番号36); H B E 1 : 5' - a c a c g a c g c t c t t c c g a t c t n n n n c t g c t t c c g a c a c a g c t g c a a - 3' (配列番号37)および5' - g a c g t g t g c t c t t c c g a t c t c a c c c t t c a t t c c c a t g c a t - 3' (配列番号38); H B G 1 およびH B G 2 : 5' - a c a c g a c g c t c t t c c g a t c t n n n n g g a a c g t c t g a g g t t a t c a a t - 3' (配列番号39)および5' - g a c g t g t g c t c t t c c g a t c t t c c t t c c c t c c t c c t c c t t g t c c - 3' (配列番号40)。H B G 1 およびH B G 2 は同時増幅し、アン

10

20

30

40

50

プリコン内の遺伝子座特異的 SNP を使用して、配列リードを H B G 1 または H B G 2 のいずれかに割り当てた。フォワードプライマー内の混合された塩基は、配列決定の際のクラスターデコンボリューションを可能にする。

【 0 1 7 6 】

ZFN は、細胞型に依存してベータ - グロビン遺伝子座における 35 ~ 65 % アレル破壊 (インデル) を誘導したが、下表 3 に示す通り、ベータグロビンパラログにおいて検出された改変は、より低かった。

【表 3】

表 3:K562 または CD34+ 細胞におけるヒトベータグロビンおよびそのパラログにおける

10

ZFN 関連改変 (33488/33501)

遺伝子	Illumina 配列決定によって検出された NHEJ(%)	
	K562 細胞	ヒト CD34+ 細胞
HBB	66.600	37.500
HBD	34.000	28.600
HBE1	0.000	0.000
HBG1	0.006	0.000
HBG2	0.013	0.005
HBBP1	0.024	0.005

【 0 1 7 7 】

ヒト臍帯血 (CB) および動員末梢血 (mPB) の両方から単離された CD34+ への、ZFN をコードする in vitro 転写された mRNA のエレクトロポレーションは、Surveyor ヌクレアーゼアッセイによって決定される通り、標的遺伝子座の有効な開裂をもたらした (図 1B)。

30

【 0 1 7 8 】

結果は、ZFN が、ベータ - グロビン遺伝子座における高レベルの遺伝子改変を駆動することを示した。

【 0 1 7 9 】

(実施例 4 : 鎌状赤血球塩基における ZFN に駆動された補正)

標的化されたベータ - グロビン遺伝子座における開裂が成功した後に、本発明者らは、相同ドナー鋳型を使用して、この部位における鎌状塩基の補正が可能であるか決定することを試みた。この目的のため、2種類の遺伝子補正鋳型を並行して設計し、検査した：短い DNA オリゴおよび IDLV。IDLV へとクローニングされた 1.1kb のヒトベータ - グロビン遺伝子断片ドナー鋳型は、鎌状変異に補正的変化を含むと共に、相同組換えの代替解析のための HhaI 制限部位を作製するためのサイレント制限断片長多型 (RFLP) を含むように設計した (図 1C)。IDLV によりドナー鋳型を送達し (図 2D を参照)、最小の細胞傷害性での CD34+ HSPC の効率的形質導入を可能にし、最小のゲノム組込みでの高い鋳型コピー数を一過的に產生する。

40

【 0 1 8 0 】

ZFN (対 33488 / 33501) プラス IDLV ドナーで処理した CD34+ 細胞における遺伝子改変レベルを、HhaI RFLP 消化 (図 1D) およびアレルの平均 18.0 ± 2.2 % における定量的 PCR に基づく (qPCR) アッセイ (図 1E) により

50

最初に決定した。ZFN-mRNAおよびIDLVドナー濃度の最適化を行い(図2および図3)、細胞数および生存率を維持しながら高レベル改変を達成するには、目的の細胞型におけるZFN試薬の用量決定が重要であることを実証した。

#### 【0181】

遺伝子改変/補正錠型としてのオリゴヌクレオチドの使用は、スピード、費用、再現性および実験の容易さに関する利点を有するであろう。ベータ-グロビン遺伝子(HBB)にAvrII-RFLPを作製するように設計された3塩基対配列を導入した、mPB由来のHSPCにおいてオリゴヌクレオチド(oligonucleotide)ドナー錠型を使用した最初の実験は、15%遺伝子改変を生じた(図4を参照)。

#### 【0182】

オリゴドナーの使用を緻密化するために、一方または他方の鎖に相当し、ZFN開裂部位に中心を有する対称的に増加する長さのオリゴヌクレオチドのパネルを検査し(下表4を参照)、この表において、太字は、野生型配列に対して変異した塩基を示す。「s」と標識されたオリゴヌクレオチドは、野生型遺伝子へと錠状変異を導入するように設計された配列を含む。表に示す通り、「S」と標識された列において、野生型配列は、この位置にAを含む一方、錠状変異は、Tを含む。

#### 【表4】

表4:オリゴドナー

SMSの位置	S	0	1	2	3	4	5	配列番号
WT	G	A	G	G	A	G	C	60
SMS1	G	A	G	G	<b>A</b>	T	C	61
SMS2	G	A	G	G	A	<b>A</b>	T	62
SMS4	G	A	G	G	A	A	<b>T</b>	63
SMS12	G	A	G	G	<b>A</b>	A	<b>T</b>	64
SMS14	G	A	G	G	<b>A</b>	A	<b>T</b>	65
SMS24	G	A	G	G	A	<b>A</b>	<b>T</b>	66
SMS124	G	A	G	G	<b>A</b>	A	<b>T</b>	67
SMS012	G	A	<b>A</b>	G	A	<b>A</b>	<b>T</b>	68
SMS12s	G	T	G	G	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	69
SMS012s	G	T	<b>A</b>	G	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	70

#### 【0183】

より長い逆向き鎖オリゴヌクレオチドの使用は、最高レベルの遺伝子改変をもたらした(図5を参照)。SCD変異部位における遺伝子改変または補正は、ZFN結合部位の配列またはスペーシングを変化させないため、ドナー錠型にサイレント変異を設計し、染色体へと同時導入して、改変されたアレルのZFN結合および再開裂を防止または低下させた。逆向き鎖ドナーの使用は、3'ZFN結合部位におけるサイレント変異の導入と適合性である(図4C)。

#### 【0184】

サイレント変異の様々な組合せをドナーオリゴへと導入し、遺伝子改変の頻度をアッセイした。サイレント変異部位(SMS)1および2(SMS12)の組合せは、最高レベルのHBB改変を生じ、全部分配列のその後の実験において使用した(図4D)。遺伝子改変されたHBBアレルおよび改変された後に再開裂されたアレルの間の反比例関係は、SMSドナーが、ZFN再開裂を遮断するために実際に機能することを示唆する(図4E)。HSPCプールおよび赤芽球バースト形成細胞コロニー(BFU-E)におけるHBB転写物の試験は、いかなるSMSアレルからもmRNAのスプライシングの変更の証拠を見出さなかった。

#### 【0185】

高いZFN-mRNA(対47773/47817)濃度において、SMS012を含有するドナーオリゴヌクレオチドの使用は、SMS12ドナーの使用よりも多くのHBB改変されたアレルを生じた(図17B)。

#### 【0186】

ZFNおよびSMS124ドナーによる処理後のHBBにおける分子的結果の網羅的解

10

20

30

40

50

析は、相同性誘導型およびNHEJに基づく遺伝子改変の組合せ（1.5%）またはNHEJに基づくオリゴヌクレオチド捕捉（0.4%）に由来する事象等、ごく軽微なレベルの予想外のDNA修復事象を明らかにした（下表5を参照）。

【表5】

表5:ZFNおよびオリゴヌクレオチドドナーによるHSPCの処理の分子的結果

結果	頻度(%)
変化なし	46.1
NHEJ媒介性欠失	30.5
オリゴヌクレオチド鋸型による遺伝子改変	18.8
NHEJ媒介性挿入	2.8
半分遺伝子改変、半分NHEJ	1.5
ドナーオリゴヌクレオチドの捕捉	0.4

【0187】

最後に、部分的相同性誘導型遺伝子改変事象の過多（SMS12対SMS24）は、切除されたDSBの左側3'一本鎖末端を使用して、オリゴヌクレオチド鋸型による遺伝子改変の際に新たなDNA合成が起こるという考えに強い支持を与えた（図6を参照）。ZFN、オリゴヌクレオチドおよびHSPCドナーの最適な組合せは、アレルの30~40%の遺伝子改変を可能にした（図4Fを参照）。

【0188】

よって、ZFNは、相同ドナー鋸型と一緒に送達されると、初代HSPCにおける高レベルの標的化DSBおよび高レベルの部位特異的遺伝子改変の両方を誘導することができる。

【0189】

（実施例5：ZFN特異性）

ベータ-グロビンは、他のグロビン遺伝子（デルタ-、イプシロン-、Aガンマ-、Gガンマ-およびシュード-ベータ-グロビン）に対し高い相同性を有するため、これらの領域における開裂を回避するようにZFNを設計した（図6A）。33488/33501対を使用した相同グロビン遺伝子における開裂率を、Surveyorヌクレアーゼアッセイを使用して、また、ハイスループットDNA配列決定によりアッセイした。これらの領域のそれぞれの解析は、mPB、CBおよびSCD BM CD34+細胞における高度に相同的デルタ-グロビン遺伝子のみにおけるオフターゲット改変を明らかにした（図6B、表3）。本発明者らは、より網羅的な不偏ゲノムワイドアプローチにより、オフターゲットZFN開裂のこのような直接的検査を補完して、オフターゲット部位を同定した。このアッセイは、二本鎖切断の部位において捕捉される非相同IDLVの傾向に基づき、IDLV捕捉に対するその寛容性のために選択されたK562細胞における組込みの下流クラスター化組込み部位解析（CLIS）を使用する。用いた手順について、下に概要を述べる：

【0190】

ベータ-グロビン遺伝子クラスター部位を次のプライマー：HBD：5' - ggttccatttttcatctcaca - 3'（配列番号41）および5' - gtaatctgagggttaggaaaaac - 3'（配列番号42）；HBBP1：5' - cacccttgcaccatagattc - 3'（配列番号52）および5' - gagactgtggatagtcata - 3'（配列番号43）；HBE1：5' - cattatcacaaacttagtgcc - 3'（配列番号44）および5' - agtctatgaaatgacaccat - 3'（配列番号45）；HBG1：5' - gcaaaagg

10

20

30

40

50

c t a t a a a a a a a a t t a g c - 3 ' (配列番号46) および 5 ' - g a g a t c a t c c a g g t g c t t g - 3 ' (配列番号47) ; H B G 2 : 5 ' - g g c a a a g g c t a t a a a a a a a t t a a g c a - 3 ' (配列番号48) および 5 ' - g a g a t c a t c c a g g t g c t t a - 3 ' (配列番号49) により P C R 増幅し、上述の Surveyor (登録商標) ヌクレアーゼによって解析した。

## 【0191】

K 5 6 2 細胞に、15 μg / mL の Z F N mRNA をエレクトロポレーションし、M N D プロモーター (Challita, P. M. ら (1995年) J of Vir 01 69巻、748~55頁を参照) によって駆動される G F P 導入遺伝子を含有し、ベータ - グロビン遺伝子座に対するいかなる相同性も欠く 2 E + 0 8 T U / mL (M O I = 250) の I D L V を形質導入して、二本鎖切断における組込みが、N H E J 媒介性捕捉によるものであることを確実にした (図7Aを参照)。Z F N + I D L V の4種の個々の生物学的複製を完了して、潜在的ゲノムワイドオフターゲット部位に対する高感度を維持した一方で、2種の対照を完了して、バックグラウンド組込みのレベルを決定した。Z F N の作用なしで I D L V を捕捉する天然起源の D S B の部位を検出するために、対照細胞には、G F P I D L V を与えたが、Z F N mRNA は与えなかった。10%ウシ胎仔血清 (Gemini Bio-products) および 1%ペニシリン / ストレプトマイシン / L - グルタミン (Gemini Bio-products) を含有する R P M I 1640 (Cellgro) において、K 5 6 2 細胞を 60 日間培養した。この期間において、G F P 陽性のフローサイトメトリー解析を定期的に行って、あらゆる組み込まれていない I D L V が試料から希釈されていったことを確実にした。60日目に、蛍光標識細胞分取 (FACS) により試料を選別して、G F P + 細胞を単離し、5日間増やし、ゲノムDNAを抽出し、非制限的線形増幅媒介性 P C R 35 によるベクター組込み部位の配列決定のために試料を調製した。以前に概要を述べた通りに (Gabriel, R. ら (2011年) Nat Biotech. 29巻(9号) : 816~23頁) 500 塩基対の C L I S ウィンドウによりクラスター化組込み部位 (C L I S) 解析を行って、Z F N 開裂の部位を明らかにした。全 C L I S を解析して、Z F N 対配列に対する各部位の相同性のレベルを決定した。相同性のパーセンテージは、最大 20 ヌクレオチドのスペーサー長による、Z F N 結合の全反復 (ホモ二量体およびヘテロ二量体) に対する部位におけるマッチする塩基対の数として規定した。C L I S 毎の最高パーセンテージ相同性を下表6に報告する。この表に関して、同定された C L I S は全て、それらの組込み部位の 200 塩基対以内の Z F N 標的部位に対する相同性の最高パーセンテージで収載する。Z F N 結合のあらゆる可能な反復 (ヘテロ二量体およびホモ二量体) を評価し、最大 20 nt のスペーサー長を解析した。開裂の2種のZ F N 部位を太字で強調する。C L I S によって同定された他の脆弱部位は全て、イタリック体で書かれている。Chr、染色体 ; C L I S、クラスター化組込み部位 ; L、「左」Z F N 单量体 (SBS番号33488) ; R、「右」Z F N 单量体 (SBS番号33501) ; ただし、Z F N 二量体における数字は、Z F N 標的部位に対する相同性の最大パーセンテージをもたらしたスペーサーサイズに相当する。この方法を使用して、20,000種のランダムなゲノム部位を解析して、ゲノム全域にわたるZ F N 相同性のバックグラウンドレベルを決定した。

10

20

30

40

## 【表6】

表6:CLISおよびZFN標的部位に対する相同性のパーセンテージ

染色体	位置	最も近接したRefSeq遺伝子 (500kb以内)	同一性(%)	CLISの数	ZFN二量体	試料
11	5248238	HBB	100%	18	L_5_R	ZFN+GFP
11	5255649	HBD	91%	10	L_5_R	ZFN+GFP
7	12238685	TMEM106b	52.94%	3	L_12_R	ZFN+GFP
19	58024409	ZNF773	62.50%	6	L_18_L	ZFN+GFP;GFPのみ
1	121484829	EMBP1	55.88%	6	R_14_L	ZFN+GFP;GFPのみ
10	117392565	ATRNL1	55.88%	3	L_15_R	ZFN+GFP;GFPのみ
19	27733086	-	56.25%	3	L_17_L	GFPのみ
12	112392669	TMEM116	52.94%	2	L_4_R	GFPのみ
12	693139	NINJ2	35.29%	2	L_1_R	GFPのみ
16	46428309	ANKRD26P1	53.12%	2	L_3_L	GFPのみ
5	144123495	KCTD16	53.12%	2	L_4_L	GFPのみ
3	183525263	YEATS2	53.13%	2	L_15_L	GFPのみ
5	53018665	NDUFS4	58.82%	2	R_9_L	GFPのみ
3	19674417	EFHB	56.25%	2	L_9_L	GFPのみ
9	127395708	NR6A1	55.88%	2	L_6_R	GFPのみ
7	137218714	DGKI	52.94%	2	L_12_R	GFPのみ

## 【0192】

予測される通り、CLIS解析は、ベータ-グロビンおよびデルタ-グロビンにおけるトラッピングを明らかにした（図7、表6）。ZFN結合部位に対し有意な相同性を有するCLIS解析における他の推定オフターゲット部位は見出されなかった。

## 【0193】

これらの結果は、ゲノムワイドスケールにおける、その意図される標的部位に対するこのZFN対の高レベルの特異性を実証する。

## 【0194】

（実施例6：改変されたHSPCのin vitro分化）

遺伝子改変されたHSPCが、正常な広範囲の赤芽球および骨髄系分化が可能であることを確実にするために、処理された細胞を単一細胞としておよびバルク培養においての両方でアッセイした。HSPC分化を促進するサイトカインを含有するメチルセルロース培地におけるコロニー形成能に関して単一細胞をモニターした。簡潔に説明すると、エレクトロポレーション1日後に、Methocult（商標）Optimumメチルセルロー

10

20

30

40

50

スに基づく培地 (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s) において、35 mm 細胞培養皿毎に100および300個の生細胞を二連で蒔いた。オリゴヌクレオチドドナーによる実験に関して、エレクトロポレーション5日後に細胞を蒔いた。5% CO<sub>2</sub>、37 °C および加湿雰囲気下の培養における2週間後に、その形態に基づき、異なる種類のコロニーを特徴付け、数え上げた。ZFN単独 (対 33488 / 33501) で処理したまたはZFNおよびオリゴヌクレオチドドナーで処理したHSPCは、同様の数およびパターンの赤芽球および骨髄系クローンを生成した。

## 【0195】

SCD BM試料のためのin vitro赤芽球分化技法は、Giarratanaら((2005年) Nat Biotech 23巻: 69~74頁)から適応させ、RomeroおよびUrbinatil((2013年) J Clin Invest 123巻(8号): 3317~3330頁)に記載されている。エレクトロポレーション1日後に、細胞を赤芽球培養に置いた。下流の解析のために多数の細胞を得るために、赤芽球増大を増加させるための8日目とは対照的に、プロトコールの12日目に細胞を共培養に置いた。実験22日目に細胞を収集し、ペレットとし、HPLC解析に付した(後述を参照)。5'-acatttgcttcgtacacaac-3' (エクソン1、配列番号50) および5'-gaaatttggacagcaagaaaggc-3' (エクソン3、配列番号51)を使用したRT-PCRによりHBBスプライシングのアッセイも行ったところ、エクソンスキッピングもイントロン保持も観察されなかった。

## 【0196】

個々の赤芽球コロニーの遺伝子型判定は、予想される頻度での意図される編集の存在を確認した。加えて、HSPCを誘導して、バルク培養において赤血球細胞に分化させた(Giarratana, M.ら(2011年) Blood 118巻、5071~9頁)。赤血球細胞分化を通して細胞を試料採取し、編集された細胞の頻度をハイスループットDNA配列決定により測定した。メチルセルロースにおいて育成した赤芽球コロニーの本発明者らの単一細胞解析と一致して、プールにおける遺伝子変換の出発レベルに関係なく、バルク培養における赤血球細胞への分化において、変換された細胞の頻度の変化は基本的に見出されなかった(図9A)。

## 【0197】

グロビン鎖の解析のため、HPLCを行った(図9B)。SCD BM試料のため、Willeber, A.ら((2011年) Blood 117巻: 2817~26頁)の記載を一部僅かに修正しつつ、末期赤芽球細胞によって產生されるヘモグロビン(Hb)種のHPLCを行った。赤芽球培養の終わり(22日目)に赤芽球細胞(1-2E+07)を収集し、ペレットとし、溶解するまで-80 °Cで凍結貯蔵した。解凍後に、25uLの溶血血液試薬(Helena Laboratories)に細胞を再懸濁し、一晩冷蔵し、その後、20,800×gで10分間、4 °Cにて遠心分離して、細胞デブリを除去した。カチオン交換カラム(Ultra2 Variant Resolution Analyzer; Primus Diagnostics)を使用したHPLCによるHb產生の特徴付けのために、清澄になった上清を使用し、ヒトヘモグロビンに対して試料を較正した。HPLC機器付属のソフトウェアにより、保持時間に基づきHb種に相当するピークを同定した。主要ヘモグロビンピークのそれぞれの曲線下面積の総計に基づき、試料毎に產生されるHbAの相対的パーセンテージを計算し、これらのピークは、アセチル化胎児性ヘモグロビン、HbFAC; 胎児性ヘモグロビン、HbF; 野生型ヘモグロビン、HbA; および鎌状ヘモグロビン、HbSを含んだ。

## 【0198】

mPB試料のため、赤芽球培養18日目に赤芽球細胞を収集した。細胞をペレットにし、RTで10分間水に溶解した。細胞デブリを除去するための20,000g、5分間の遠心分離後に、細胞溶解物を-80 °Cで凍結貯蔵した。解凍後に、細胞溶解物を移動相Aにおいて1:10希釈し、弱いカチオン交換カラム(PolyCAT ATM、PolyLC INC.)を使用したHPLC(Infinity 1260、Agilent)に

10

20

30

40

50

より特徴付けた。F A S C 参照材料 (Trinity Biotech) を使用して、一般的なヘモグロビン (HbF、HbA、HbS、HbC) の溶出時間を規定した。OpenLAB CDS Chemstation ソフトウェアを使用して、解析およびピーク積分を行った。ヘモグロビンピークのそれぞれの曲線下面積の総計に基づき、試料毎に產生されるHbAの相対的パーセンテージを計算し、これらのピークは、アセチル化胎児性ヘモグロビン、HbF A c；胎児性ヘモグロビン、HbF；野生型ヘモグロビン、HbA；および鎌状ヘモグロビン、HbSを含んだ。

#### 【0199】

並行実験において、本発明者らは、HBBアレルの14%を鎌状型に変換し、18日間の赤芽球分化の後に存在するグロビン鎖をHPLCによりアッセイした。これらの細胞によって產生されるヘモグロビンのおよそ18%は、鎌状ヘモグロビンであり、タンパク質レベルでの遺伝子改変事象の影響を実証した(図9B)。

10

#### 【0200】

(実施例7：マウスへの改変された細胞の生着)

ZFN改変された細胞が、その造血再増殖能を維持するか決定するために、ZFNおよびドナー処理したまたは偽処理したCB由来HSPCを、免疫不全NSGマウスに異種移植した。

#### 【0201】

簡潔に説明すると、複数の健康な個体由来の新鮮CB CD34+細胞を2日間予め刺激し、その後に、ZFN mRNAをエレクトロポレーションし、ドナーIDLV(2E+07TU/mL; MOI=50)を形質導入した。グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、50ng/ml SCF、50ng/ml Flt-3および50ng/ml TPO(Peprotech)を含有するX-VIVO15培地(Lonza)を含む事前刺激培地を使用した。1日間の回復後に、0.1%BSA(Sigma)を有するPBS(Corning)における1E+06生細胞を、尾静脈注射により、250cGyの全身照射後の6~8週齢のNSGマウス(The Jackson Laboratory)に移植した。並行して培養したが、mRNA、エレクトロポレーションまたはIDLVに曝露されていない(偽処理)CD34+細胞の対照試料を使用した。複数の解析のために、少量のアリコートをin vitroで培養した。エレクトロポレーション1日後にmPB試料を凍結し、後日解凍し、上述通り移植前に1日間回復させた。

20

#### 【0202】

V450コンジュゲートされた抗ヒトCD45対APCコンジュゲートされた抗マウスCD45を使用して、移植後5週目に、ヒト細胞の生着をフローサイトメトリーにより評価した。抗体とのインキュベーション後に、BD FACS溶解溶液(BD Bioscience)により赤血球細胞を溶解させた。生着のパーセンテージを%huCD45+/(%huCD45++%muCD45+)として規定した。V450コンジュゲートされた抗ヒトCD45、V500コンジュゲートされた抗マウスCD45、FITCコンジュゲートされた抗ヒトCD33、PerCPコンジュゲートされた抗ヒトCD3、PE-コンジュゲートされた抗ヒトCD56、PE-Cy7コンジュゲートされた抗ヒトCD19およびAPCコンジュゲートされた抗ヒトCD34(全抗体、BD Bioscience)を使用して、移植後8週および16週目に、末梢血およびBMにおける生着および系列分布をフローサイトメトリーにより評価した。

30

#### 【0203】

結果変数の平均および標準偏差を含む記述統計学は両者共に、図表により報告および提示した。遺伝子改変レベル、生着および系列に関する定量的結果のため、独立t検定により、または3群以上が存在する場合は一元配置ANOVAのフレームワーク内で、ペアワイズ比較を行った。用量応答解析を行って、ZFNおよびドナー比最適化を評価した。特に、本発明者らは、線形混合型モデルアプローチを使用したが、連続的および固定された効果として用量を、ランダム効果として実験を処理した。SCD患者BM細胞の経時的な増大倍率を反復測定ANOVAにより評価した。本発明者らの統計学的研究において、仮

40

50

説検定は両側性であり、p値の有意性閾値0.05を使用した。あらゆる統計解析は、SASバージョン9.3 (SAS Institute Inc. 2012)を使用して行った。

#### 【0204】

in vitroにおける細胞の並行培養は、遺伝子改変率が、qPCR RFLP解析による5%~20%に及び、平均値が14.5±6.4%であることを示した(図10)。ハイスループット配列決定は、アレルの10.5±4.0%が、鎌状位置に交換された塩基を含有し、挿入または欠失(インデル)が、32.0±9.9%に観察されたことを明らかにした。加えて、in vitroコロニー形成アッセイにおいてこれらの細胞の造血能を評価した;細胞は、解析可能な系列の全てにおいて、未処理偽試料と比べて、その広範囲のコロニー形成能力を維持した。

10

#### 【0205】

注射後5および8週目に、ヒトおよびマウスの両方の総CD45+細胞のうちのヒトCD45+細胞のパーセンテージとして測定されるヒトHSPCの生着に関して、移植されたマウスを評価した。ZFNおよびIDLV処理HSPCの生着レベルは、未処理対照に匹敵し、5週目に平均14.8±11.4%であり、8週目に45%まで増加した(図10C)。マウスの末梢血の系列解析(T細胞についてはCD3、骨髄系細胞についてはCD33、HSPCについてはCD34、B細胞についてはCD19、NK細胞についてはCD56)は、このモデルにおいて予想通りであった(図11)。ZFNおよびオリゴヌクレオチドドナーの両方で処理した細胞を与えたマウスにおけるヒト細胞の解析は、ZFNおよびIDLV処理HSPCと同様のHSPC分化スペクトルを明らかにした(図10E)。

20

#### 【0206】

移植後16週目にマウスを安楽死させ、ヒト細胞生着および遺伝子改変レベルの評価を可能にした。ZFNおよびIDLV処理細胞を与えたマウスについて、末梢血の評価は、高レベルの生着および予想される系列分布を明らかにした。骨髄(BM)区画の解析は同様であった(図12)。同様に、ZFNおよびオリゴヌクレオチドの両方で処理した細胞を与えたマウスにおいて、生着レベルおよび系列分布は、末梢血およびBMにおけるZFNおよびIDLV処理HSPCを与えたマウスのコホートに観察されるものと同様であった。

30

#### 【0207】

マウスに存在するヒト細胞が、実際にZFN試薬により改変された細胞であるか決定するために、各マウスのBMおよび脾臓組織からゲノムDNAを単離し、ヒトベータ-グロビン遺伝子を調べた。ZFNおよびIDLV処理細胞を与えたマウスの組織におけるqPCRによるHhaI RFLPの解析は、インプット細胞に観察される10.5%の遺伝子改変レベルよりも低い頻度(それぞれBMおよび脾臓で0.14±0.32%および0.16±0.18%)であったが、これらのマウスにおける遺伝子改変の存在を明らかにした(図13)。配列解析は、BMおよび脾臓におけるヒト細胞の鎌状変異における遺伝子改変を確認し、それぞれ0.21±0.39%および0.27±0.31%における匹敵する平均であった(図13B)。カット部位におけるNHEJに起因する挿入および欠失(インデル)の解析は、HDRよりも高レベルの変化を明らかにし、インデルを含有するBM由来の全配列リードの4.8±7.8%および脾臓由来の3.8±3.7%であった(図14)。

40

#### 【0208】

投与に先立つバルク集団における、鎌状塩基に17.3%の遺伝子改変および19.8%のインデルを有する、ZFNおよびオリゴヌクレオチド処理細胞を与えたマウスのBMおよび脾臓のゲノム解析も、遺伝子改変の維持を実証した。これらの組織由来のDNAをハイスループット配列決定に付し、それぞれBMおよび脾臓における0.85±0.81%および2.11±1.19%標的化遺伝子改変を明らかにした(図13C)。これらの組織におけるインデルの評価は、BMにおける3.34±2.65%および脾臓における

50

5.86 ± 2.30 % のレベルを示した (図 14)。

【0209】

これらの結果は、ZFNによる部位特異的DNA開裂および相同性誘導型遺伝子改変を受けたCD34+細胞が、生着し、多系列分化を起こすことができる実証する。

【0210】

(実施例 8 : 鎌状骨髄における遺伝子補正)

鎌状赤血球症患者は、G-CSFによる幹細胞動員の候補ではないため、本発明者らは、これらの患者のBM吸引液からCD34+HSPCを得た。ZFN mRNAおよびIDLVドナーを使用して、部位特異的遺伝子補正を行った。細胞を赤芽球増大培地に置き、その後に確立された方法を使用して分化させた (Romeroら、前記箇所、Giaratanaら、前記箇所)。加えて、細胞の一部をそのコロニー形成能に関して評価した。ZFN+IDLV (対33488/33501) で処理した細胞は、偽、非エレクトロポレーション対照試料と比較して、やや低い (35%) コロニー形成能力を示した (図 15)。

【0211】

初期赤芽球増大後に (ただし脱核前に)、ゲノム解析のために細胞を収集した。これらの試料のqPCRによるRFLP解析は、平均 20.1 ± 8.8 % の遺伝子改変レベルを明らかにした (図 16A)。これらの結果は、ディープシーケンシングにより確認され、リードの 18.4 ± 6.7 % におけるSCD変異の補正を示す (図 16B)。その上、配列決定は、SCD変異の補正を含有する大部分のアレルが、HhaI位置にも塩基変化を含有したことを確認し、HDR駆動事象の大部分が、これら 2 塩基の間に少なくとも 22 bp の距離を包含することを示す。赤芽球培養の終了後に、高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) によるグロビン四量体の解析のために試料を採取した (図 16C)。

【0212】

ZFN および IDLV 処理試料に由来する赤芽球細胞における HbA ピークの存在は、遺伝子補正が、ベータ S アレルからベータ A アレルへの機能的変換をもたらしたことを実証する。このようなピークは、偽処理細胞に由来する赤血球には観察されなかった。HbF ピークは、ZFN 処理試料における HbS ピークの減少により、相対的増加を示した。ZFN および IDLV 処理試料における HbA の相対的誘導は、平均 5.3 ± 0.02 % であり、タンパク質補正レベルは最大 10.0 % であった (図 16D)。

【0213】

これらの結果は、鎌状赤血球症患者の骨髄由来の HSPC の表現型を補正する、IDLV ドナーと組み合わせた ZFN の能力を実証する。

【0214】

本明細書に示されている結果は、in vitro でジンクフィンガーヌクレアーゼを使用した、ヒト造血幹 / 前駆細胞における鎌状赤血球症変異の高レベルの遺伝子補正を実証する。本研究において、本発明者らは、ベータ - グロビン遺伝子座を開裂するための ZFN 対を設計した。相同ドナー錫型 (オリゴヌクレオチドとしてまたはインテグラーゼ欠損レンチウイルスベクターにより送達) と組み合わせて、これらの ZFN は、前駆細胞において高レベルで相同性誘導型修復を誘導することができる。

【0215】

ZFN 開裂部位の解析は、ヌクレアーゼ活性の大多数がベータ - グロビン遺伝子座標的部位で起こり、相同デルタ - グロビン遺伝子での開裂はそれより少ない割合であったことを明らかにした。成体赤芽球細胞における低レベルのデルタ - グロビン発現のため (全グロビンの < 3.5 %) 、細胞のサブセットにおけるこの遺伝子における ZFN 活性が有害である可能性は低い。IDLV 末端捕捉を使用した、K562 細胞における ZFN オフターゲット開裂部位の不偏、ゲノムワイド評価は、ZFN の高い特異性を実証し、天然に脆弱な部位へのバックグラウンド組込みのみが観察された。

【0216】

ZFN およびドナー処理細胞が、マウスに移植されると、細胞の生着および系列分布は

10

20

30

40

50

、偽処理ならびにZFNおよびドナー処理試料の間で同等であった。しかし、移植前のin vitro試料における10～20%の遺伝子改変の平均レベルにもかかわらず、生着16週間後のマウスの脾臓およびBMにおけるヒト細胞における遺伝子補正レベルは、著しくより低かった。これらの知見は、当該分野の近年公表された研究と一致し(Genesら(2014年)Nature 510巻:235～240頁)、より成熟した前駆細胞は、効率的に補正されるが、持続的な利益(例えば、臨床利益)は、より初期の、より始原的な造血幹細胞の改変によってもたらされることを暗示し得る。

#### 【0217】

部位特異的遺伝子破壊(CCR5破壊に関してHoltら(2010年)Nat biotech:839～47頁を参照)の効率と比較した、より始原的なHSPCにおける相同性誘導型遺伝子補正の効率は、同時送達される補正的塩基を含有するドナー鑄型の使用における差によるものである可能性があり、細胞DNA損傷修復経路は、NHEJよりもHDRを使用してDSBを消散させる必要がある。NHEJは、静止状態の始原的HSCで好まれるため(Mohrinら(2010年)Cell stem cell 7巻:174～85頁を参照)、修復経路選択におけるバイアスは、始原的HSCにおける遺伝子補正を限定し得る。よって、ある理論に拘束されることなく、ZFNは、成熟および始原的細胞集団において同様の効率で作用しているが、HDRが、より成熟した細胞においてより活性が高く、始原的HSCにおいてより活性が低くなるように、各細胞型において活性な修復経路が異なる可能性がある。特に、マウスに移植された細胞は、遺伝子改変についてのものよりも優れた程度まで、そのインデルのインプットレベルを維持した(それぞれIDLVおよびオリゴ実験の、遺伝子改変における43.9および11.7倍変化と比較した、インデルにおける7.4および4.3倍変化)。

#### 【0218】

鎌状赤血球症患者由来のBM CD34+細胞における実験は、臨床への転換の見込みをもたらした。正準鎌状変異の補正のレベル(少なくとも赤芽球前駆細胞における)は、これらの実験に対して平均18%であり、分化後に、これらの細胞は、補正された野生型ヘモグロビン(HbA)を産生した。SCDの同種異系造血幹細胞移植由来のデータに基づき、10～30%のドナーキメラ現象は、正常ドナー由来赤血球細胞の選択的利点の結果として有意な臨床改善をもたらし得る(Andreaniら(2011年)Chimerism 2巻(1号):21～22頁およびWaltersら(2001年)Am Soc Blood and Marrow Transpl 7巻:665～73頁を参照)。加えて、SCD変異のヘテロ接合体は通常、疾患の症状を経験しない。よって、各HSCにおける1アレルのみの補正が、SCDに伴う症状の大部分の軽減に十分であることを立証することができる。

#### 【0219】

異常ヘモグロビン症、特にSCDのためのレンチウイルスに基づく遺伝子療法における近年の進歩にもかかわらず(Romeroら、前記箇所ならびにChandrasekaranおよびMalik(2014年)Hematol/oncol Clin of North Amer 28巻:199～216頁を参照)、治療導入遺伝子の長く続き適切に調節される発現が必要であるため、潜在的合併症が残る。標的化ヌクレアーゼを使用した、HSCにおける正準AからTへの疾患を引き起こす鎌状トランスバージョンの部位特異的補正は、その内在性プロモーターおよび遺伝子座制御領域の下で、ベータ-グロビンの発現を維持する特有の能力を提供する。さらに、ゲノム補正試薬は、永続的な補正をもたらすために、細胞の1回きりの一過的なex vivo処置のみを必要とする。

#### 【0220】

まとめると、これらのデータは、SCDの有望な処置としてのHSPCにおけるゲノム編集の継続した開発を支持する。

#### 【0221】

本明細書にて言及されている全ての特許、特許出願および刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

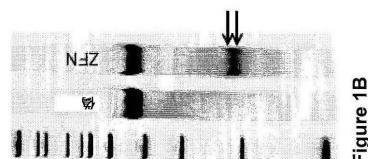
## 【0222】

開示は、理解を明確にする目的で、説明および実施例によっていくらか詳細に提供されているが、本開示の精神または範囲を逸脱することなく様々な変形および改変が実践され得ることは、当業者にとって明らかである。したがって、前出の記載および実施例は、限定として解釈されるべきものではない。

【図1A】

Figure 1A  
5'-TCAAACAGACACCATTGGTGATCTGACTCTGAGGAGAATCTGGCGTTACTGCCCTGTTGGGC

【図1B】



【図 1 C】

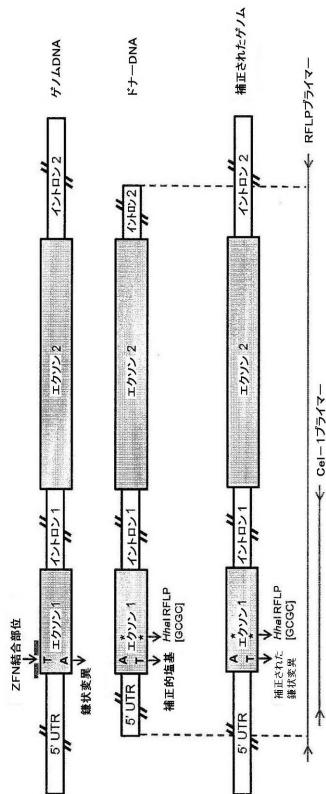


Figure 1C

【図 1 D】

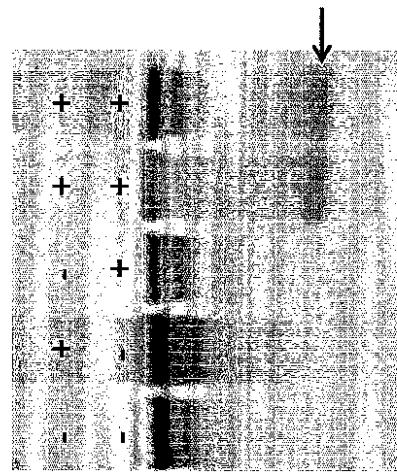


Figure 1D

【図 1 E】

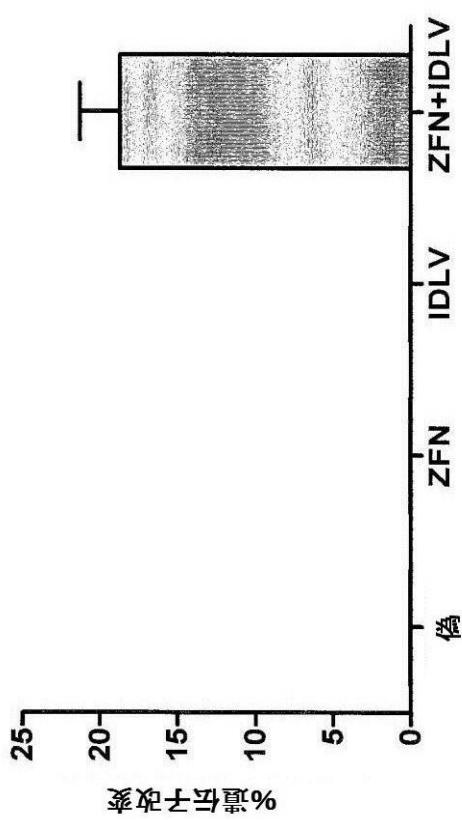


Figure 1E

【図 2】

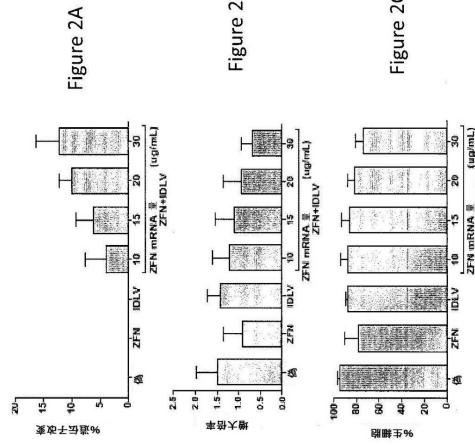


Figure 2A

Figure 2B

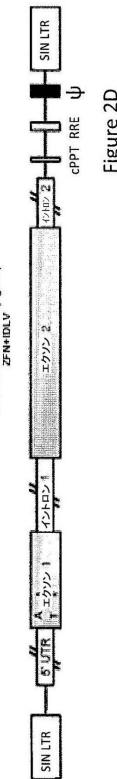
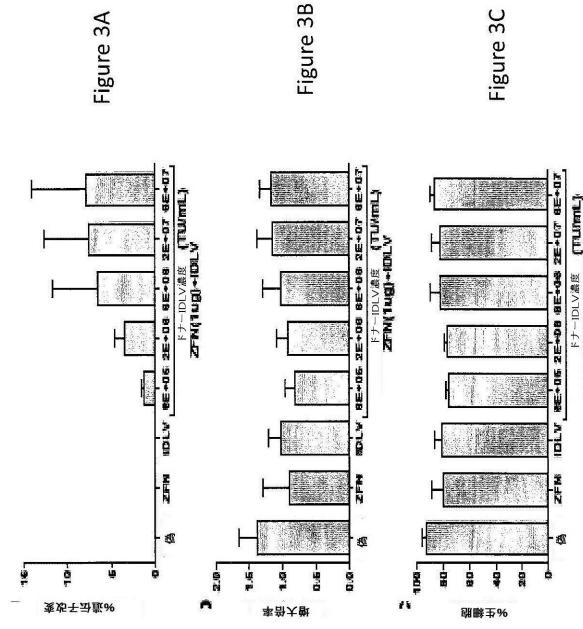


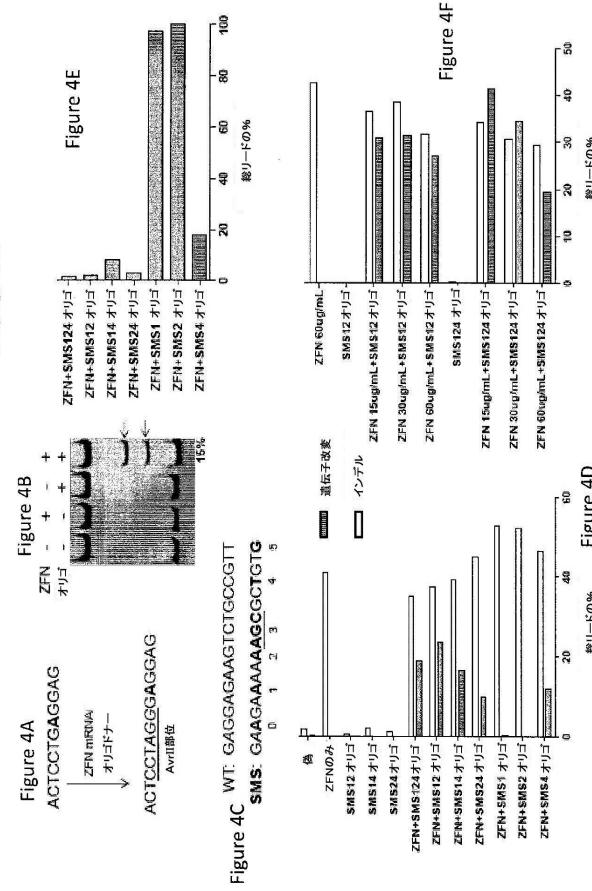
Figure 2C

Figure 2D

【図3】



【図4】



【図5】

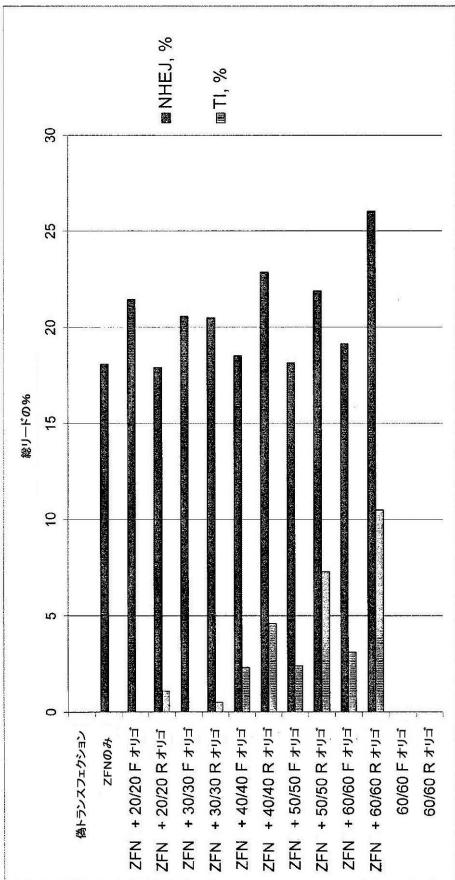


Figure 5

【図6】

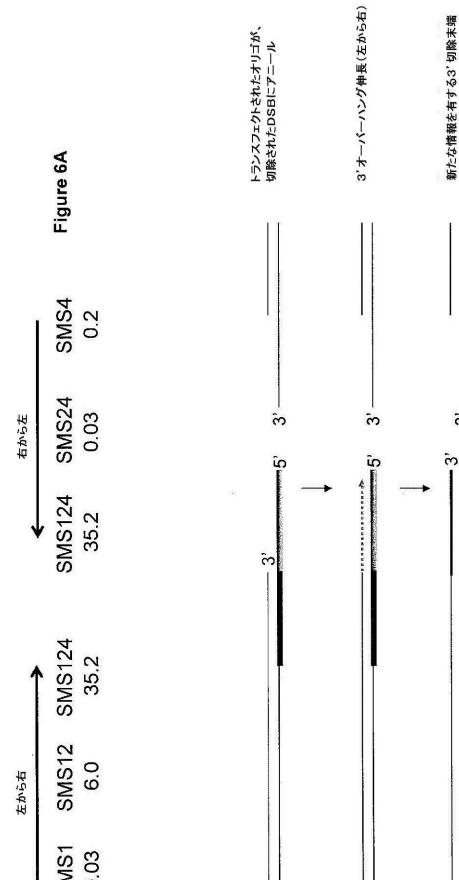


Figure 6B

【図 7-1】

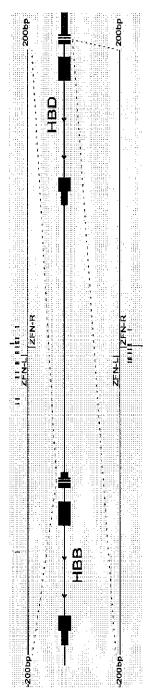


Figure 7A

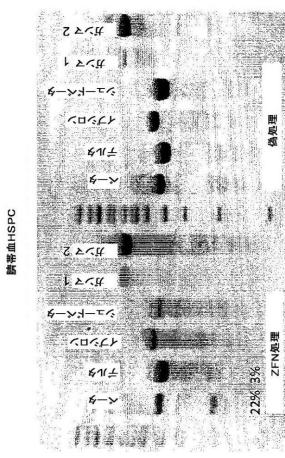
Figure 7B

Figure 7B shows the sequence of the HBB gene. The sequence is as follows:

```

HBB: CACCATGGTGCATCTGACTCCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA
HBD: CACCATGGTGCATCTGACTCCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA
HBE1: CACCATGGTGCATCTGACTCCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA
HBBP1: CACCATGGTGCATCTGACTCCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA
HBG1: CACCATGGTGCATCTGACTCCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA
HBG2: CACCATGGTGCATCTGACTCCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA
  
```

Figure 7C



HSC

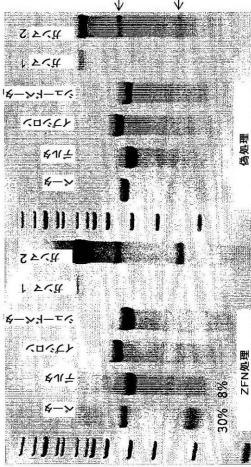


Figure 7D

【図 8】

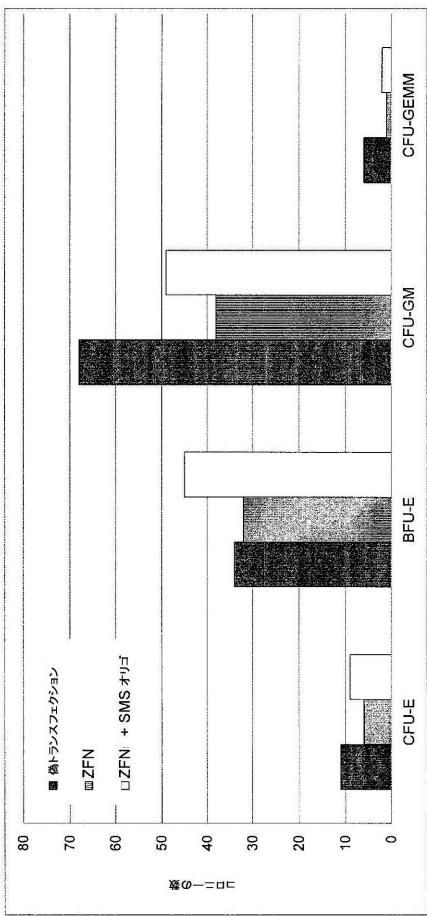


Figure 8

【図 9】

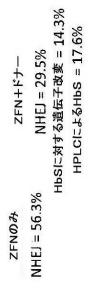
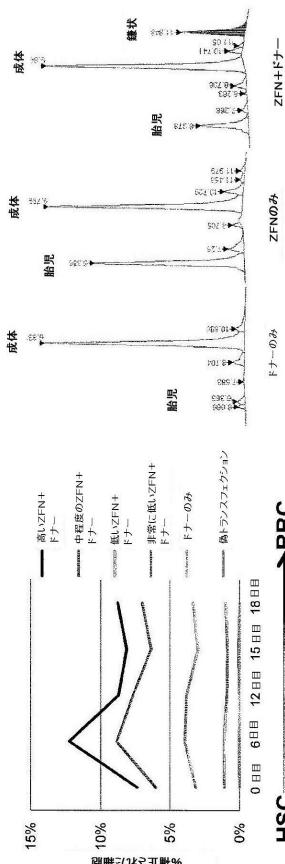


Figure 9A

Figure 9B

HPLC

【図 1 0】

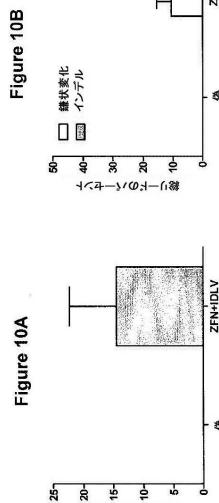
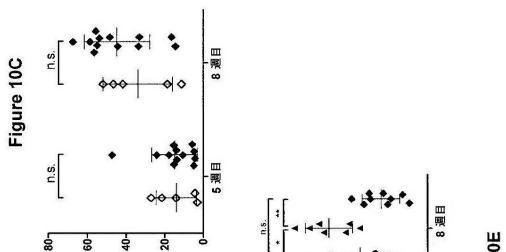


Figure 10E

Figure 10D

(62)

【図 1 1】

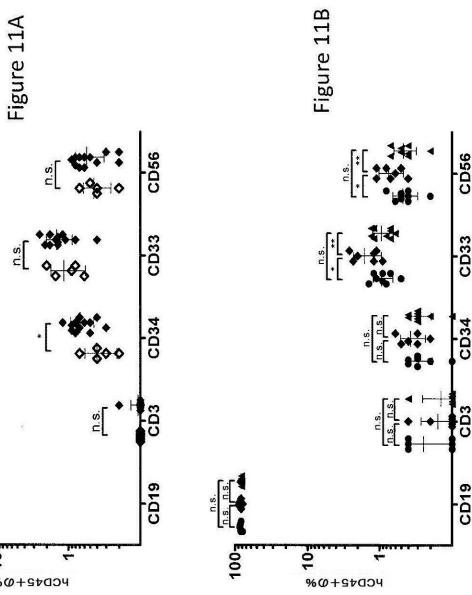
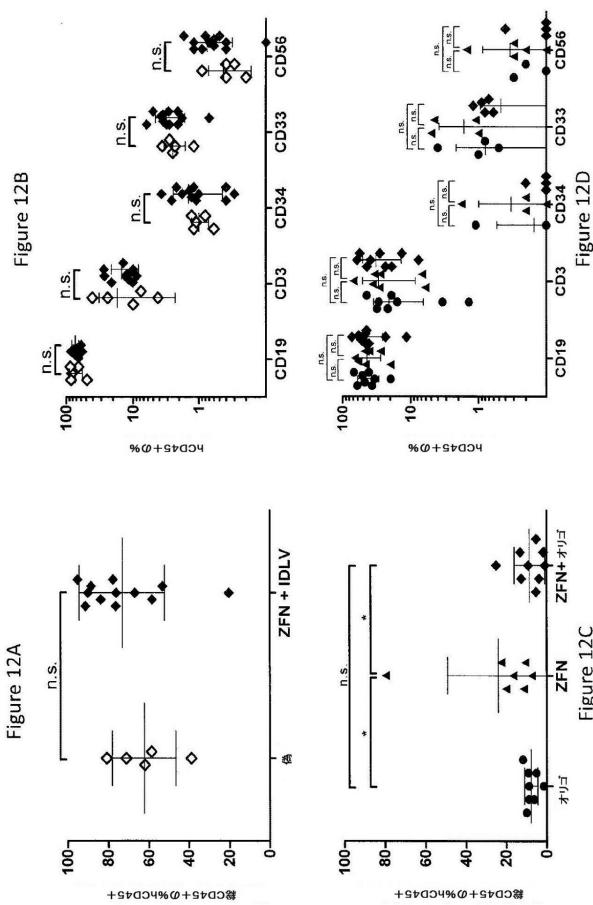


Figure 11B

Figure 11C

【図 1 2】



【図 1 3】

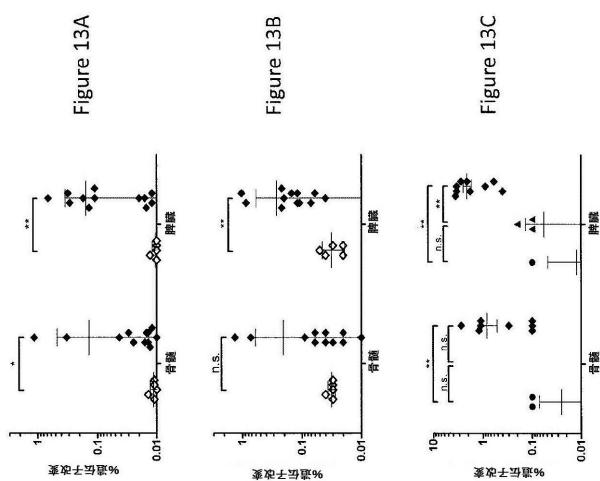
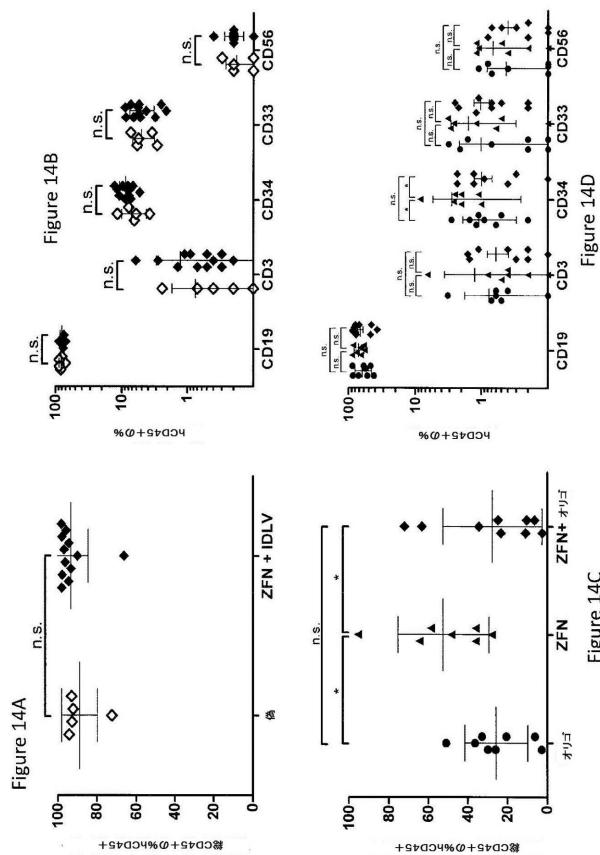


Figure 13A

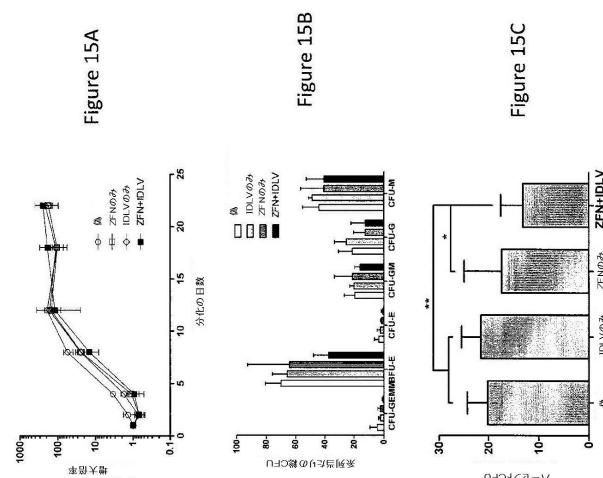
Figure 13B

Figure 13C

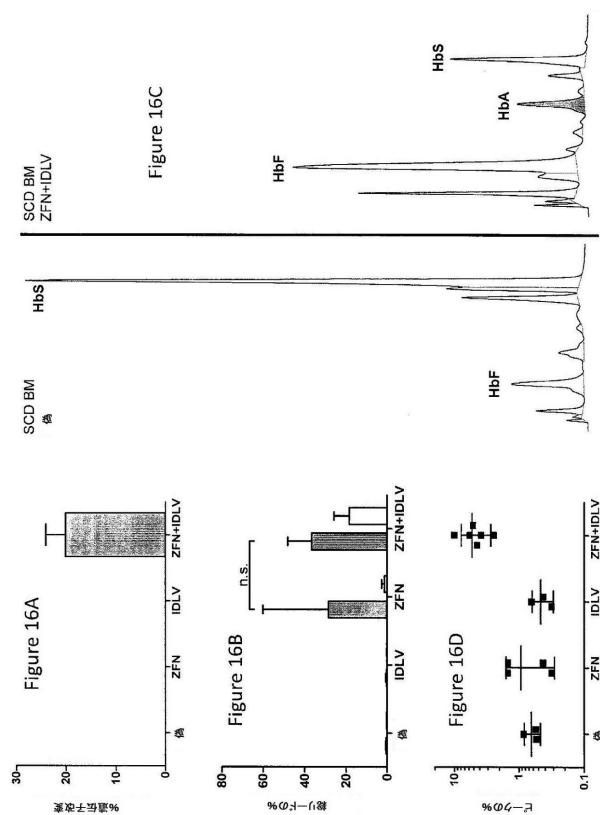
【図14】



【図15】



【図16】



【図17】

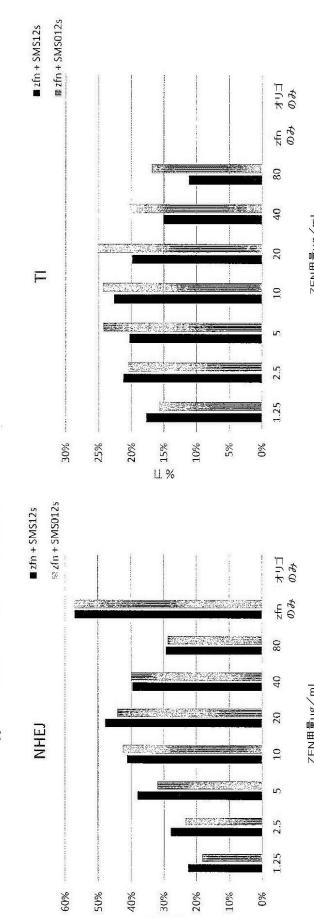


Figure 17A

Figure 17B

【配列表】

0006722176000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I

A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09

1 0 0

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 コスト, グレゴリー ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 50  
1, スート エ-100, サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ミラー, ジェフリー シー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 50  
1, スート エ-100, サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 チャン, レイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 50  
1, スート エ-100, サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 國際公開第2014/036219 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 1 5 / 9 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 / W P I D S ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q