

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月19日(19.12.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/257844 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01) *C12N 15/63* (2006.01)

神戸市中央区港島南町二丁目1番8 Hyogo (JP). 国立大学法人広島大学 (HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 Hiroshima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021600

(22) 国際出願日: 2024年6月14日(14.06.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-098875 2023年6月16日(16.06.2023) JP

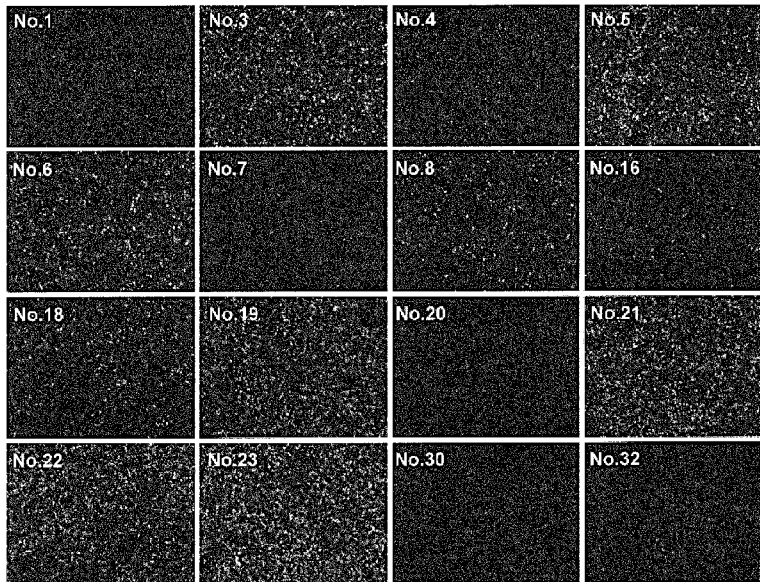
(71) 出願人: 株式会社 V C G e n e T h e r a p y (VCGT INC.) [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県

(72) 発明者: 大西 暁士 (ONISHI Akishi); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町二丁目1番8 株式会社 V C G e n e T h e r a p y 内 Hyogo (JP). 安田 和史 (YASUDA Kazushi); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町二丁目1番8 株式会社 V C G e n e T h e r a p y 内 Hyogo (JP). 石丸 藍子 (ISHIMARU Aiko); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町二丁目1番8 株式会社 V C G e n e T h e r a p y 内 Hyogo (JP). 佐久間 哲史 (SAKUMA Tetsushi); 〒7398511 広島県東広島

(54) Title: ZINC FINGER NUCLEASE, VECTOR, AND METHOD FOR GENOME EDITING AND METHOD FOR VISUAL CELL PRODUCTION USING SAID NUCLEASE AND VECTOR

(54) 発明の名称: ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ベクター並びにこれらを用いたゲノム編集方法及び視細胞製造方法

[図1]



(57) Abstract: Provided is a technique useful for genome editing for rhodopsin (RHO) gene locus using a zinc finger nuclease (ZFN), which is a ZFN pair combination for genome editing for the RHO gene locus, the ZFN combination having a zinc finger array that recognizes a specific nucleic acid sequence.

(57) 要約: ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用いたロドプシン (RHO) 遺伝子座のゲノム編集に有用な技術として、RHO遺伝子座のゲノム編集のための、1対のZFNの組み合わせであって、特定の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNの組み合わせが提供される。

[続葉有]

WO 2024/257844 A1

市鏡山一丁目3番2号 国立大学法人広島
大学内 Hiroshima (JP). 山本 卓(YAMAMOTO
Takashi); 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁
目3番2号 国立大学法人広島大学内 Hiroshima
(JP). 野村 渉(NOMURA Wataru); 〒7398511 広
島県東広島市鏡山一丁目3番2号 国立大
学法人広島大学内 Hiroshima (JP).

(74) 代理人: 梅 田 慎 介 (UMEDA Shinsuke);
〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目
6番5号 丸の内北口ビル21階 大野
総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ベクター並びにこれらを用いたゲノム編集方法及び視細胞製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ベクター並びにこれらを用いたゲノム編集方法及び細胞製造方法に関する。より詳しくは、ロドプシン（RH0）遺伝子座のゲノム編集のためのジンクフィンガーヌクレアーゼ等に関する。

背景技術

[0002] ヒトロドプシントタンパク質は、約348アミノ酸から構成される、杆体視細胞に特異的な光感受性G蛋白質共役受容体（GPCR）である。ロドプシントタンパク質をコードしているロドプシン（RH0）遺伝子座は、5つのエキソンから構成され、イントロン領域を含めると約6.7kb長（chr3:129,528,639-129,535,344）である。ロドプシン遺伝子の変異は網膜色素変性の原因となり、これまでに110種類程度の遺伝子変異が報告されている。特許文献1には、TALEヌクレアーゼ（TALEN）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Zinc-finger nuclease；ZFN）及びCasヌクレアーゼなどのデザイナー・ヌクレアーゼを用いたゲノム編集によりロドプシン遺伝子の変異を原因とする網膜色素変性を治療する技術が提案されている。

[0003] ZFNは、核酸切断ドメインであるFokI-ND、核酸結合ドメインであるジンクフィンガータンパク質（Zinc-finger protein；ZFP）及びそれらをつなぐリンカーからなる。特許文献2には、FokI-NDに替えてヌクレアーゼドメイン1（ND1）及びヌクレアーゼドメイン2（ND2）と称される核酸切断ドメインを含むZFNが開示されている。ND1はバチルス属SGD-V-76由来のヌクレアーゼドメイン、ND2はボツリヌス菌由来のヌクレアーゼドメインとされている。ND1及びND2は、従来のFokI-NDよりも、切断活性や特異性、標的配列の選択性等

の機能性において優れるとされている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2021/010303号

特許文献2：国際公開第2020/045281号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：“Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly”, Wright et al., Nature Protocols, 2006, Vol.1, No.3, p.1637-52

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本開示は、ZFNを用いたRH0遺伝子座のゲノム編集に有用な技術を提供することを主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題解決のため、本開示は、以下の[1]－[12]を提供する。

[1] ロドプシン（RH0）遺伝子座のゲノム編集のための、1対のジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）の組み合わせであって、以下の群から選択される組み合わせ。

（1）配列番号1の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号2の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（2）配列番号5の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号6の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（3）配列番号7の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号8の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(4) 配列番号9の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号10の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(5) 配列番号11の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号12の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(6) 配列番号13の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号14の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(7) 配列番号15の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号16の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(8) 配列番号31の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号32の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(9) 配列番号35の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号36の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(10) 配列番号37の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号6の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(11) 配列番号38の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号8の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(12) 配列番号7の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号10の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(13) 配列番号11の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有す

るZFNと、配列番号１４の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（１４）配列番号１５の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号１８の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（１５）配列番号４５の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号３２の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（１６）配列番号４７の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号３６の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

[２] 以下の群から選択される、[１]の組み合わせ。

（２）配列番号５の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号６の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（４）配列番号９の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号１０の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（５）配列番号１１の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号１２の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（１０）配列番号３７の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号６の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（１２）配列番号７の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号１０の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（１３）配列番号１１の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有す

るZFNと、配列番号14の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(14) 配列番号15の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号18の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

[3] 2つのジンクフィンガーアレイが認識する核酸配列間のスペーサーが5 b p s又は6 b p sである、[1]又は[2]の組み合わせ。

[4] ZFNの核酸切断ドメインが、ND1である、[1]－[3]のいずれかの組み合わせ。

[5] ZFNの核酸切断ドメインが、
配列番号52の391～585位のアミノ酸配列、
配列番号57のアミノ酸配列、又は、
配列番号58のアミノ酸配列、
を含んでなる、[4]の組み合わせ。

[6] RH0遺伝子座が、ヒトRH0遺伝子座である、[1]－[4]のいずれかの組み合わせ。

[0008] [7] [1]－[6]のいずれかの1対のZFNをコードする核酸配列を含むベクター。

[8] バイディレクショナル発現ベクターであり、
センス鎖ZFNをコードする核酸配列と該核酸配列の転写を制御するプロモーター配列と、

アンチセンス鎖ZFNをコードする核酸配列と該核酸配列の転写を制御するプロモーター配列と、を含み、
前記2つのプロモーター配列が、それらの間にスペーサー配列を有さずに連続して配列する、[7]のベクター。

[9] 2つのプロモーターが、CMVプロモーターとヒトEF1a (Elongation Factor alpha-1) プロモーターである、[8]のベクター。

[0009] [10] [7]－[9]のいずれかのベクターを含む、RH0遺伝子に由来す

る疾患の治療剤。

[0010] [11] [7] – [9] のいずれかのベクターをin vivo又はin vitroで、好ましくはin vitroで、視細胞に導入する手順を含む、RH0遺伝子座のゲノム編集方法。

[12] [7] – [9] のいずれかのベクターをin vivo又はin vitroで、好ましくはin vitroで、視細胞に導入する手順を含む、RH0遺伝子がゲノム編集された視細胞の製造方法。

発明の効果

[0011] 本開示により、ZFNを用いたRH0遺伝子座のゲノム編集に有用な技術が提供される。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]ZF-ND1発現プラスミドと、ZF結合標的候補配列を挿入したEGFP断片発現プラスミドとを導入したHEK293細胞のEGFP蛍光像である。EGFPの蛍光は、ZF-ND1によるZF結合標的候補配列の切断を示す。

[図2]Bicistronic、Dual promoter及びBidirectional promoterの各プラスミドベクターの構成を示す。

[図3]Bicistronic、Dual promoter又はBidirectional promoterと、ZF結合標的候補配列を挿入したEGFP断片発現プラスミドとを導入したHEK293細胞におけるEGFP蛍光像である。EGFPの蛍光は、ZF-ND1によるZF結合標的候補配列の切断を示す。positive controlは、ZF-ND1発現プラスミド (5461S, 5562AS) を導入した。

[図4]Bicistronic又はBidirectional promoterをトランスフェクションしたHEK293細胞の標的RH0配列のCel-I解析の結果を示す。220bp及び130bpのバンドがInDel (Insertion and Deletion)を示す。positive controlには、ZF-ND1発現プラスミド (5461S, 5562AS) を用いた。

[図5]Bicistronic又はBidirectional promoterをトランスフェクションしたHEK293細胞の標的RH0配列のTide (Tracking of Indels by DEcomposition)解析の結果を示す。ヒストグラムのX軸の0はWTと同じ配列 (InDel無し)、正方

向はInsertion塩基数、負方向はDeletion塩基数を示し、Y軸はその頻度（百分率）を表す。Total effはInDelの頻度の合計（%）を示す。positive controlには、ZF-ND1発現プラスミド（5461S, 5562AS）を用いた。

発明を実施するための形態

[0013] 1. ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）

本開示に係るZFNは、ロドプシン（RH0）遺伝子座のゲノム編集のために用いられ得るものであり、特定の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNの組み合わせである。ジンクフィンガーアレイは、3塩基配列を認識する1つのジンクフィンガー（ZF）が複数配列されてなる。ジンクフィンガーアレイは、2個以上のZFを含んでいてよく、例えば3-9個、好ましくは4-8個、より好ましくは5-7個、典型的には6個のZFからなるものであってよい。

ZFのアミノ酸配列とZFが認識する3塩基配列との関係は公知であり、ZFのアミノ酸配列には、認識対象とする3塩基配列に応じて例えば非特許文献1のSupplemental Table 1に記載のアミノ酸配列を用いることができる。同一の3塩基配列に対して当該配列を認識するZFのアミノ酸配列は複数存在するため、同一の3塩基配列を認識するこれらのZFは互換的に用いられ得る。

[0014] 本開示に係るZFNは、以下の組み合わせから選択されるジンクフィンガーアレイを有する（後掲表1参照）。

（1）配列番号1の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号2の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（2）配列番号5の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号6の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（3）配列番号7の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号8の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（4）配列番号9の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFN

と、配列番号 10 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(5) 配列番号 11 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 12 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(6) 配列番号 13 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 14 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(7) 配列番号 15 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 16 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(8) 配列番号 31 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 32 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(9) 配列番号 35 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 36 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(10) 配列番号 37 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 6 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(11) 配列番号 38 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 8 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(12) 配列番号 7 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 10 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN との組み合わせ。

(13) 配列番号 11 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する ZFN と、配列番号 14 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有する

るZFNとの組み合わせ。

(14) 配列番号15の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号18の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(15) 配列番号45の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号32の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(16) 配列番号47の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号36の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

[0015] それぞれのZFNのジンクフィンガーアレイの認識配列とその配列番号、及びジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列を表1に示す。

例えば、上記(1)の1対のZFNは、配列番号1の核酸配列(ATTCTTGGGTGGGAGCAG)を認識するジンクフィンガーアレイを有するセンス鎖ZFN 4350Sと、配列番号2の核酸配列(AAGGCCTGAGCTCAGCCA)を認識するジンクフィンガーアレイを有するアンチセンス鎖ZFN 4350ASの組み合わせである。ZFN 4350Sは配列番号59のアミノ酸配列からなり、ZFN 4350ASは配列番号60のアミノ酸配列からなる。

例えばZFN 4350Sのジンクフィンガーアレイは、CAG, GAG, TGG, GGG, CTT及びATTをそれぞれ認識するZF91, ZF62, ZF106, ZF58, ZF103, ZF88(非特許文献1、Supplemental Table 1参照)をN末端側から順に連結したアミノ酸配列を有する。

[0016] 本開示に係るZFNは、切断活性の高さから、上記(2)(4)(5)(10)(12)(13)(14)のいずれかの組み合わせであることがより好ましい。

[0017] 本開示に係るZFNは、RH0遺伝子座において、RH0遺伝子のエキソン1の開始コドンよりも上流(RH0遺伝子座5'UTR)の核酸配列をジンクフィンガーアレイにて認識して結合し、核酸切断ドメインによるDNA二本鎖の切断(DNA do

uble-strand break ; DSB) をもたらす。

[0018] 本開示に係るZFNの2つのジンクフィンガーアレイが認識する核酸配列間のスペーサーの長さは、特に限定されないが、例えば、1-20bp、好ましくは3-8bp、5bps又は6bpsの長さである。スペーサーの核酸配列は、1のジンクフィンガーアレイが認識する核酸配列と、他の1のジンクフィンガーアレイが認識する核酸配列との間の核酸配列として一義的に定まるものである。ZFNは、スペーサー配列中でDNA二本鎖を切断する。

[0019] 例えば、上記(1)の1対のZFNは、センス鎖ZFNの結合配列である配列番号1の核酸配列(ATTCTTGGGTGGGAGCAG)と、アンチセンス鎖ZFNの結合配列である配列番号2の核酸配列(AAGGCCTGAGCTCAGCCA)との間のスペーサー配列(CGCAGC)中でDNA二本鎖を切断する。

[0020] 本開示に係るZFNの核酸切断ドメインは、特に限定されず、FokI-NDや、特許文献2に記載されるND1及びND2並びにこれらの改変体であってよい。ND1を含む全長タンパク質(バチルス属SGD-V-76由来)のアミノ酸配列を配列番号52に、その塩基配列を配列番号53に示す。ND2を含む全長タンパク質(ボツリヌス菌由来)のアミノ酸配列を配列番号54に、その塩基配列を配列番号55に示す。ND1は、典型的には、配列番号52の391~585位に相当する部分ペプチドであり、ND2は、典型的には、配列番号54の389~579位に相当する部分ペプチドである。核酸切断ドメインは、ND1とされることが好ましい。

[0021] ND1及びND2の改変体は、配列番号52の391~585位または配列番号54の389~579位に示されるアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されているアミノ酸配列を含み、かつ、ヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドであり得る。ここで、「1ないし数個」とは、例えば1~10個、好ましくは1~6個であり、例えば、1個、2個、3個、4個または5個である。

[0022] ND1及びND2の改変体は、配列番号52の391~585位または配列番号54の389~579位に示されるアミノ酸配列に対し、少なくとも70%、少なくとも75%

、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、ヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドであってもよい。ここで、アミノ酸配列の「配列同一性」とは、配列の一致が最大となる状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。配列同一性の数値(%)を求める方法は、当業者に公知である。最適なアラインメントおよび配列同一性を得るためのアルゴリズムとしては、当業者に既知のいずれかのアルゴリズム(例えば、BLASTアルゴリズム、FASTAアルゴリズム等)を利用すればよい。アミノ酸配列の配列同一性は、例えば、BLASTP、FASTA等の配列解析ソフトウェアを用いて決定される。

[0023] ND1及びND2の改変体として、具体的には、FokIのアミノ酸配列における483位、487位及び496位に相当する位置にアスパラギン酸(D483、D487及びD496)を含む改変体(DDD型変異体)、又はFokIのアミノ酸配列における483位、487位及び537位に相当する位置にアルギニン(R483、R487及びR537)を含む改変体(RRR型変異体)が挙げられる。ND1のDDD型変異体(ND1DDD)は、配列番号52の391~585位に相当する部分ペプチドにおいて103番目及び113番目のアミノ酸がアスパラギン酸に置換されたアミノ酸配列を有する(配列番号57)。また、ND1のRRR型変異体(ND1RRR)は、配列番号52の391~585位に相当する部分ペプチドにおいて100番目及び154番目のアミノ酸がアルギニンに置換されたアミノ酸配列を有する(配列番号58)。

[0024] 本開示に係るZFNの核酸切断ドメインは、修飾アミノ酸および／または非天然アミノ酸を含むポリペプチドであってもよい。修飾アミノ酸としては、限定するものではないが、例えば、メチル化、エステル化、アミド化、アセチル化、アルキル化、ハロゲン化等が挙げられる。該修飾アミノ酸および非天然アミノ酸は、公知の方法によって導入することができる。

[0025] 核酸切断ドメインと、ジンクフィンガーアレイを含むジンクフィンガープロテイン(ZFP)は、直接連結されていてもよく、またはリンカーを介して連結されていてもよい。リンカーは、例えば、2以上のアミノ酸残基からなり

、長さは特に限定されないが、例えば、2～20アミノ酸長、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、14個、16個、17個、18個、19個または20個のアミノ酸長であってよい。リンカーの種類もまた特に限定されないが、例えば、TGS（配列番号56）が挙げられる。リンカーの有無およびリンカーの長さおよび種類は、核酸結合ドメインの種類等を考慮して当業者によって適宜選択される。

[0026] 本開示に係るZFNは、核酸切断ドメインに替えて、他のエフェクタードメインを有していてもよい。このようなエフェクタードメインとしては、Cytosine base editor (UGI, APOBEC)、Adenine base editor (TadA)、transcriptional activator (VP16)/repressor (SID)、epigenomic editor (DNMT3A, TET1)、imaging protein (Dye, fluorescent protein)、transposase (PiggyBac)、recombinase (Flippase)等が挙げられる。

[0027] 本開示に係るZFNは、当該分野で既知の方法によってin vitro又はin vivoで製造することができる。例えば、アミノ酸配列情報を基に人工合成する方法や、ZFNをコードする核酸を人工合成し、適当な発現ベクター中に挿入し、次いで適当な宿主細胞中に導入して、該細胞内でZFNを発現させる方法が挙げられる。

[0028] 2. ベクター

本開示に係るベクターは、上述の1対のZFNをコードする核酸配列を含む。本開示に係るベクターは、一実施形態においてバイディレクショナル発現ベクターとされ、1対のZFNのうちセンス鎖ZFNとアンチセンス鎖ZFNとが別個のプロモーターの制御下で発現され、かつ、それら2つのプロモーターが逆向きに配列される。より具体的には、本開示に係るバイディレクショナル発現ベクターは、センス鎖ZFNをコードする核酸配列と該核酸配列の転写を制御するプロモーター配列と、アンチセンス鎖ZFNをコードする核酸配列と該核酸配列の転写を制御するプロモーター配列と、を含み、前記2つのプロモーター配列が、それらの間にスペーサー配列を有せずに連続して配列することが好ましい。

[0029] 本開示に係るベクターにおいて、2つのプロモーターには、従来公知のプロモーターを用いることができ、例えばCMVプロモーターやヒトEF1a (Elongation Factor alpha-1) プロモーター、PGK (phosphoglycerate kinase) プロモーター等を用いることができる。2つのプロモーターは、CMVプロモーターとヒトEF1aであることが好ましい。

[0030] 本開示に係るベクターは、ZFNをコードする核酸配列とプロモーター配列に加えて、従来の遺伝子発現ベクターが備える要素を含んでいてもよい。このような要素として、例えばpolyA付加配列 (SV40 pA, HGH pA、ウサギグロビン pA等) が挙げられる。

[0031] ベクターとしては、特に限定されず、当該分野で使用されるベクターから選択すればよい。ベクターの具体例としては、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、染色体ベクター、エピソードベクター、ウイルス由来ベクター (細菌プラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソードなど)、酵母染色体エレメント、ウイルス (バキュロウイルス、パポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、トリボックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスなど)、これらの組み合わせに由来するベクター (コスミド、ファージミドなど) などが挙げられる。上述した中でも、汎用性の高さと言う観点からはプラスミドベクターが好ましい。また、臨床応用が進んでいるという観点からは、ウイルスベクターが好ましく、アデノ随伴ウイルスベクター (AAVベクター) がより好ましい。

[0032] 3. ゲノム編集方法等

本開示は、上述のベクターをin vivo又はin vitroで、好ましくはin vitroで、視細胞に導入する手順を含む、視細胞のRH0遺伝子座のゲノム編集方法、並びに、ゲノム編集された視細胞の製造方法をも提供する。ZFNによるゲノム編集システムでは、gRNAのユビキタスな発現を伴うCasヌクレアーゼによるゲノム編集システムとは異なり、タンパク質にのみにより構成される。このため、ZFNによるゲノム編集システムでは、組織特異的プロモーターや薬剤応答

型プロモーター等を利用することで目的とする組織特異的なゲノム編集を実現し易い。

[0033] 視細胞へのベクターの導入は、従来公知の手法によって行うことができる。導入方法としては、限定するものではないが、例えば、エレクトロポレーション法、パーティンクルガン法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、プロテイントランスダクション法等が挙げられる。

[0034] ゲノム編集の目的に応じて、ベクターとともに、ドナーDNAが細胞に導入されてもよい。ドナーDNAは、例えば、正常なRH0遺伝子をコードするドナーDNAであってよい。ドナーDNAは、ZFNによるDNA二本鎖の切断部位における非相同末端連結修復（nonhomologous endjoining；NHEJ）あるいは相同組換え修復（homologous recombination；HR）等の修復機構を利用して正常RH0遺伝子を遺伝子座に導入し得るように構成されたものとする。

[0035] ドナーDNAを用いないゲノム編集の場合、切断部位は、主にNHEJにより修復される。NHEJはエラーが発生しやすいため、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、挿入、または置換、あるいはそれらの組み合わせが該切断の修復中に起こりうる。このようにして、RH0遺伝子座が切断部位において改変される。

[0036] 視細胞は、ヒト又は非ヒト動物由来のものであってよい。非ヒト動物は、偶蹄類（ウシ、イノシシ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）、奇蹄類（ウマなど）、齧歯類（マウス、ラット、ハムスター、リスなど）、ウサギ目（ウサギなど）、食肉類（イヌ、ネコ、フェレットなど）などが挙げられる。

[0037] 4. 治療剤

本開示は、上述のベクターを含む、RH0遺伝子に由来する疾患の治療剤をも提供する。治療剤は、上述した正常なRH0遺伝子をコードするドナーDNAを含み得る。

また、上述のゲノム編集方法により得られたゲノム編集された視細胞は、細胞医薬として製剤化され得る。このような細胞医薬も、RH0遺伝子に由来する疾患の治療剤となり得る。

[0038] 治療剤は、常法に従って製剤することができる。具体的には、上述のベクター及び任意に上述のドナーDNAを医薬品添加物と調合することによって、あるいは、ゲノム編集された視細胞を医薬品添加物と調合することによって、製剤することができる。

[0039] 医薬品添加物とは、製剤に含まれる有効成分以外の物質を意図する。医薬品添加物は、製剤化を容易にする、品質の安定化を図る、有用性を高めるなどの目的のために、製剤に含まれている。医薬品添加物の例としては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動化剤（固形防止剤）、着色剤、カプセル被膜、コーティング剤、可塑剤、矯味剤、甘味剤、着香剤、溶剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤（粘着剤）、粘稠剤、pH調整剤（酸性化剤、アルカリ化剤、緩衝剤）、湿潤剤（可溶化剤）、抗菌性保存剤、キレート剤、坐剤基材、軟膏基剤、硬化剤、軟化剤、医療用水、噴射剤、安定剤、保存剤等が挙げられる。これらの医薬品添加物は、意図された剤型および投与経路、ならびに標準的な薬学的慣行に従って、当業者によって容易に選択される。

[0040] 治療剤は、任意の剤型を取り得る。剤型の例としては、点眼剤、錠剤、カプセル剤、内用剤、外用剤、坐剤、注射剤、吸入剤が挙げられる。

[0041] 治療剤は、医師または医療従事者の判断により、適宜処方されうる。また、治療剤の投与量および投与計画も、医師または医療従事者の判断により、適宜決定されうる。

[0042] 治療剤の投与経路は、治療剤の剤型、処置しようとする疾患の種類および重篤度などの要素により、適宜選択される。投与経路の例としては、網膜下投与（Subretinal injection）、硝子体投与（Vitreous injection）および上脈絡膜腔投与（Suprachoroidal injection）が好適に採用される。

実施例

[0043] [実施例1：ZFの標的配列の同定]

1. 候補配列の検索

RHO遺伝子のエキソン1の開始コドンよりも上流に位置する100bpの領域において、ZFNによる2本鎖DNA切断を生じ得る領域を検索した。100bpの領域は、

進化的な配列保存性が低い領域として選択した。

ZFNが結合し得る候補配列の検索にはScripps研究所Barbas研究室より公開されているZFFinger Tools (<https://www.scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php>)を用いた。ZFN2量体のそれぞれのジンクフィンガーアレイの結合標的配列は18bp（6個のZFで構成）である。結合標的配列間（スペーサー）の塩基長を6bpもしくは5bpとした場合、34ペアの結合標的候補配列が提示された（表1参照）。

[0044] 各ZFのアミノ酸配列には、文献（“Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly”, Wright et al., Nature Protocols, 2006, Vol.1, No.3, p.1637-52, Supplemental Table 1）に記載のアミノ酸配列を用いた。標的配列の3'末端側の3塩基配列毎に1個のZFを連結（合計6個）させてジンクフィンガーアレイとした。例えば、配列番号1の核酸配列（ATTCTTGGGTGGGAGCAG）を認識するジンクフィンガーアレイを有するセンス鎖ZFN 4350Sは、CAG, GAG, TGG, GGG, CTT及びATTをそれぞれ認識するZF91, ZF62, ZF106, ZF58, ZF103, ZF88（上記文献、SupplementalTable 1参照）をN末端側から順に連結したアミノ酸配列を有する。

[0045]

[表1]

ペア番号	ZFN名	認識配列	認識配列 配列番号	ZFアレイ アミノ酸配列 配列番号
1	4350S センス鎖	5'- ATT CTT GGG TGG GAG CAG -3'	1	59
	4350AS アンチセンス鎖	5'- AAG GCC TGA GCT CAG CCA -3'	2	60
2	4653S センス鎖	5'- CTT GGG TGG GAG CAG CCA -3'	3	61
	4653AS アンチセンス鎖	5'- GCG AAG GCC TGA GCT CAG -3'	4	62
3	4956S センス鎖	5'- GGG TGG GAG CAG CCA CGG -3'	5	63
	4956AS アンチセンス鎖	5'- GCT GCG AAG GCC TGA GCT -3'	6	64
4	5158S センス鎖	5'- GTG GGA GCA GCC ACG GGT -3'	7	65
	5158AS アンチセンス鎖	5'- ATG CTG CGA AGG CCT GAG -3'	8	66
5	5259S センス鎖	5'- TGG GAG CAG CCA CGG GTC -3'	9	67
	5259AS アンチセンス鎖	5'- AAT GCT GCG AAG GCC TGA -3'	10	68
6	5461S センス鎖	5'- GGA GCA GCC ACG GGT CAG -3'	11	69
	5461AS アンチセンス鎖	5'- AGA ATG CTG CGA AGG CCT -3'	12	70
7	5562S センス鎖	5'- GAG CAG CCA CGG GTC AGC -3'	13	71
	5562AS アンチセンス鎖	5'- AAG AAT GCT GCG AAG GCC -3'	14	72
8	5764S センス鎖	5'- GCA GCC ACG GGT CAG CCA -3'	15	73
	5764AS アンチセンス鎖	5'- CCA AGA ATG CTG CGA AGG -3'	16	74
9	5865S センス鎖	5'- CAG CCA CGG GTC AGC CAC -3'	17	75
	5865AS アンチセンス鎖	5'- CCC AAG AAT GCT GCG AAG -3'	18	76
10	6067S センス鎖	5'- GCC ACG GGT CAG CCA CAA -3'	19	77
	6067AS アンチセンス鎖	5'- CAC CCA AGA ATG CTG CGA -3'	20	78
11	6168S センス鎖	5'- CCA CGG GTC AGC CAC AAG -3'	21	79
	6168AS アンチセンス鎖	5'- CCA CCC AAG AAT GCT GCG -3'	22	80
12	7178S センス鎖	5'- GCC ACA AGG GCC ACA GCC -3'	23	81
	7178AS アンチセンス鎖	5'- GTG GCT GCT CCC ACC CAA -3'	24	82
13	7481S センス鎖	5'- ACA AGG GCC ACA GCC ATG -3'	25	83
	7481AS アンチセンス鎖	5'- CCC GTG GCT GCT CCC ACC -3'	26	84
14	7784S センス鎖	5'- AGG GCC ACA GCC ATG AAT -3'	27	85
	7784AS アンチセンス鎖	5'- TGA CCC GTG GCT GCT CCC -3'	28	86
15	8087S センス鎖	5'- GCC ACA GCC ATG AAT GGC -3'	29	87
	8087AS アンチセンス鎖	5'- GGC TGA CCC GTG GCT GCT -3'	30	88
16	8289S センス鎖	5'- CAC AGC CAT GAA TGG CAC -3'	31	89
	8289AS アンチセンス鎖	5'- GTG GCT GAC CCG TGG CTG -3'	32	90
17	8592S センス鎖	5'- AGC CAT GAA TGG CAC AGA -3'	33	91
	8592AS アンチセンス鎖	5'- CTT GTG GCT GAC CCG TGG -3'	34	92
18	8895S センス鎖	5'- CAT GAA TGG CAC AGA AGG -3'	35	93
	8895AS アンチセンス鎖	5'- GCC CTT GTG GCT GAC CCG -3'	36	94
19	4955S センス鎖	5'- TGG GTG GGA GCA GCC ACG -3'	37	95
	4956AS アンチセンス鎖	5'- GCT GCG AAG GCC TGA GCT -3'	6	64
20	5157S センス鎖	5'- GGT GGG AGC AGC CAC GGG -3'	38	96
	5158AS アンチセンス鎖	5'- ATG CTG CGA AGG CCT GAG -3'	8	66
21	5158S センス鎖	5'- GTG GGA GCA GCC ACG GGT -3'	7	65
	5259AS アンチセンス鎖	5'- AAT GCT GCG AAG GCC TGA -3'	10	68
22	5461S センス鎖	5'- GGA GCA GCC ACG GGT CAG -3'	11	69
	5562AS アンチセンス鎖	5'- AAG AAT GCT GCG AAG GCC -3'	14	72
23	5764S センス鎖	5'- GCA GCC ACG GGT CAG CCA -3'	15	73
	5865AS アンチセンス鎖	5'- CCC AAG AAT GCT GCG AAG -3'	18	76
24	6067S センス鎖	5'- GCC ACG GGT CAG CCA CAA -3'	19	77
	6168AS アンチセンス鎖	5'- CCA CCC AAG AAT GCT GCG -3'	22	80
25	6874S センス鎖	5'- GTC AGC CAC AAG GGC CAC -3'	39	97
	6874AS アンチセンス鎖	5'- GCT GCT CCC ACC CAA GAA -3'	40	98
26	7177S センス鎖	5'- AGC CAC AAG GGC CAC AGC -3'	41	99
	7178AS アンチセンス鎖	5'- GTG GCT GCT CCC ACC CAA -3'	24	82
27	7480S センス鎖	5'- CAC AAG GGC CAC AGC CAT -3'	42	100
	7481AS アンチセンス鎖	5'- CCC GTG GCT GCT CCC ACC -3'	26	84
28	7783S センス鎖	5'- AAG GGC CAC AGC CAT GAA -3'	43	101
	7784AS アンチセンス鎖	5'- TGA CCC GTG GCT GCT CCC -3'	28	86
29	8086S センス鎖	5'- GGC CAC AGC CAT GAA TGG -3'	44	102
	8087AS アンチセンス鎖	5'- GGC TGA CCC GTG GCT GCT -3'	30	88
30	8288S センス鎖	5'- CCA CAG CCA TGA ATG GCA -3'	45	103
	8289AS アンチセンス鎖	5'- GTG GCT GAC CCC TGG CTG -3'	32	90

31	8591S	センス鎖	5'-	CAG CCA TGA ATG GCA CAG	-3'	46	104
	8592AS	アンチセンス鎖	5'-	CTT GTG GCT GAC CCG TGG	-3'	34	92
32	8892S	センス鎖	5'-	CCA TGA ATG GCA CAG AAG	-3'	47	105
	8895AS	アンチセンス鎖	5'-	GCC CTT GTG GCT GAC CCG	-3'	36	94
33	9197S	センス鎖	5'-	TGA ATG GCA CAG AAG GCC	-3'	48	106
	9197AS	アンチセンス鎖	5'-	GTG GCC CTT GTG GCT GAC	-3'	49	107
34	9410S	センス鎖	5'-	ATG GCA CAG AAG GCC CTA	-3'	50	108
	9410AS	アンチセンス鎖	5'-	GCT GTG GCC CTT GTG GCT	-3'	51	109

[0046] 2. 結合標的候補配列に対するZFNの切断活性の評価

ヌクレアーゼとして、ND1のDDD型変異体（ND1DDD、配列番号57）及びRRR型変異体（ND1RRR、配列番号58）を用いて、SSA(Single strand annealing)解析により各結合標的候補配列に対する切断活性を評価した。

SSA解析は、細胞内のDNA切断が起きた場合の遺伝子修復機構である遺伝子相同組換えやシングルストランドアニーリング（SSA）を利用して、結合標的配列に対するZFNの切断活性を定量評価するものである。解析には、HEK293細胞と、以下の発現ベクターを用いた。

[0047] (1) ZF-ND1発現プラスミド（pCMV-ZF-ND1DDD, pCMV-ZF-ND1RRR）

CMVプロモーターの制御下に「ZF-ND1」を発現するプラスミドである。

「ZF-ND1」との表記において、「ZF」は表1に掲げる34組のZFNペアのセンス鎖及びアンチセンス鎖のZFNの一方を示し、「ND1」はND1ヘテロ2量体のサブユニット（ND1DDD及びND1RRR）の一方を示す。センス鎖ZFNにはND1DDDを用い、アンチセンス鎖ZFNにはND1RRRを用いた。「ZF」の5'側には核移行シグナル（NLS）を結合し、「ZF」と「ND1」はリンカー配列（Thr-Gly- Gly -Ser：配列番号56）で連結した。「ND1」の3'側にはpolyA配列を付加した。polyA配列には、ウサギbeta-globinのpolyA配列を用いた。

[0048] (2) EGFP断片発現プラスミド（pCAG-EGxxFP）

CAGプロモーターの制御下にEGFPを発現するプラスミドである。

EGxxFPは、EGFP遺伝子の1-600bpの断片、停止コドン、マルチクローニングサイト、及びEGFP遺伝子の120-720bpの断片で構成され、マルチクローニングサイトに結合標的候補配列が挿入される。

pCAG-EGxxFPプラスミドは、結合標的候補配列がZF-ND1で切断されない場合はEGFP遺伝子の1-600bpの断片直後の停止コドンにより不完全なGFPを発現す

る。一方、結合標的候補配列がZF-ND1で切断させる場合は、EGFP遺伝子の120-720bpの断片の重複配列間で遺伝子相同組換えやシングルストランドアニーリング（SSA）が起き、完全なEGFP遺伝子が発現し、EGFP蛍光を生じる。

[0049] トランスフェクション試薬（FuGene6（Promega）もしくはViafect（Promega））を使用し添付プロトコルに準拠して、pCMV-ZF-ND1DDD、pCMV-ZF-ND1RRR及びpCAG-EGxxFPをHEK293細胞に導入した。トランスフェクション48時間後に蛍光像を撮影した。結果を図1に示す。34組の結合標的候補配列のうち16ペア（1, 3-8, 16, 18-23, 30, 32番）でEGFPの緑色蛍光を認め、結合標的配列においてZF-ND1による切断が生じていることが確認された。3, 5, 6, 19, 21-23番のペアでは高い蛍光強度を認め、特に高い切断活性が確認された。

[0050] [実施例2：高発現ベクターコンストラクトの検討]

ZFNの高発現プラスミドベクターを検討した。

一般に、2種類の遺伝子を発現させる手法として、1つのプロモーターで2種類の遺伝子を発現させる手法（Bicistronic発現）と、異なる2つのプロモーターでそれぞれの遺伝子を発現させる手法がある。

本実施例では、前者の例としてCMVプロモーターの制御下にZF-S-ND1DDD及びZF-AS-ND1RRRを自己消化ペプチド（Furin-P2A）で連結して組み込んだプラスミドベクター（以下「Bicistronic」と称する）を作成した。また、後者の例として、CMVプロモーターとヒトEF1a（Elongation Factor alpha-1）プロモーターを同一方向（Dual promoter）に配列したプラスミドベクター（以下「Dual promoter」と称する）と、逆方向に配列したプラスミドベクター（以下「Bidirectional promoter」と称する）を作成した。各プラスミドベクターの構成を図2に示す。Dual promoter及びBidirectional promoterは、EF1aプロモーターの制御下にZF-S-ND1DDDを発現し、CMVプロモーターの制御下にZF-AS-ND1RRRを発現する。ZFの標的結合配列（ZF-S, ZF-AS）には、表1の22番のペア（5461S, 5562AS）を用いた。Dual promoterでは、2つの遺伝子発現の干渉を防ぐためのインスレーター配列を配置した。

[0051] Bicistronic、Dual promoter及びBidirectional promoterの各プラスミド

ベクターを用いて、実施例1と同様にしてSSA解析を実施した。ポジティブコントロールとして、実施例1の22番のペアのZF-ND1発現プラスミド (positive control) を用いた。

[0052] 結果を図3に示す。Dual promoterではEGFP発現がほとんど認められなかった。また、Bicistronicではpositive controlに比してEGFPシグナルの減弱を認めた。一方、Bidirectional promoterではpositive controlと同等のEGFP発現が認められた。

[0053] Bicistronic及びBidirectional promoterの各プラスミドベクターを用いて、Cel-I解析より標的RH0配列におけるInDel (Insertion and Deletion)頻度を比較した。ポジティブコントロールとして、実施例1の22番のペアのZF-ND1発現プラスミド (positive control) を用いた。各プラスミドコンストラクトをトランスフェクションしたHEK293細胞のゲノムDNAを用い、GeneArt Genomic Cleavage Detection kit (ThermoFisher Scientific)の推奨プロトコールによりCel-I解析を実施した。PCRにより増幅した標的RH0配列をCel-Iヌクレアーゼにより処理し、電気泳動した結果を図4に示す。また、PCR増幅産物をダイレクトシーケンスし、得られたElectrophenogramをTide (Tracking of Indels by DEcomposition)解析サイト (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>)で定量した結果を図5に示す。図5はInDelのヒストグラムを示し、X軸の0はWTと同じ配列 (InDel無し)、正方向はInsertion塩基数、負方向はDeletion塩基数を示し、Y軸はその頻度 (百分率)を表す。Total effはInDelの頻度の合計 (%)を示す。

[0054] 非トランスフェクション細胞のゲノムDNAでは、345bpにバンドが確認される (図4レーン2参照)。positive controlでは、InDelが起きているためCel-Iヌクレアーゼによる切断に起因する2本のバンド (220bp, 130bp) が認められ (図4レーン3, 5参照)、InDelの頻度は25.7%であった (図5参照)。Bicistronicでは、positive controlに比して切断DNA量が減少し (図4レーン4参照)、InDelの頻度も4.6%と低かった (図5参照)。一方、Bidirectional promoterでは、positive controlと同量の切断DNA量 (図4レーン6参照)と

、同等頻度のInDelが認められた（図5参照）。

[0055] 本実施例の結果から、Bidirectional promoterによれば、2種類の遺伝子を1つのコンストラクトに統合でき、AAV遺伝子治療製剤等の産業利用に有用であることが示された。

配列表フリーテキスト

[0056] 配列番号1：ZFN 4350Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号2：ZFN 4350ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号3：ZFN 4653Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号4：ZFN 4653ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号5：ZFN 4956Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号6：ZFN 4956ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号7：ZFN 5158Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号8：ZFN 5158ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号9：ZFN 5259Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号10：ZFN 5259ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号11：ZFN 5461Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号12：ZFN 5461ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号13：ZFN 5562Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号14：ZFN 5562ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号15：ZFN 5764Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号16：ZFN 5764ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号17：ZFN 5865Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号18：ZFN 5865ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号19：ZFN 6067Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号20：ZFN 6067ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号21：ZFN 6168Sのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号22：ZFN 6168ASのジンクフィンガーアレイの認識配列
配列番号23：ZFN 7178Sのジンクフィンガーアレイの認識配列

配列番号 2 4 : ZFN 7178ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 2 5 : ZFN 7481Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 2 6 : ZFN 7481ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 2 7 : ZFN 7784Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 2 8 : ZFN 7784ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 2 9 : ZFN 8087Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 0 : ZFN 8087ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 1 : ZFN 8289Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 2 : ZFN 8289ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 3 : ZFN 8592Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 4 : ZFN 8592ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 5 : ZFN 8895Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 6 : ZFN 8895ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 7 : ZFN 4955Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 8 : ZFN 5157Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 3 9 : ZFN 6874Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 0 : ZFN 6874ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 1 : ZFN 7177Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 2 : ZFN 7480Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 3 : ZFN 7783Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 4 : ZFN 8086Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 5 : ZFN 8288Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 6 : ZFN 8591Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 7 : ZFN 8892Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 8 : ZFN 9197Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 4 9 : ZFN 9197ASのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 5 0 : ZFN 9410Sのジंकフィンガーアレイの認識配列
配列番号 5 1 : ZFN 9410ASのジंकフィンガーアレイの認識配列

配列番号 5 2 : ND1を含む全長タンパク質（バチルス属SGD-V-76由来）のアミノ酸配列

配列番号 5 3 : ND1を含む全長タンパク質（バチルス属SGD-V-76由来）のヌクレオチド配列

配列番号 5 4 : ND 2 を含む全長タンパク質（ボツリヌス菌由来）のアミノ酸配列

配列番号 5 5 : ND 2 を含む全長タンパク質（ボツリヌス菌由来）のアミノ酸配列のヌクレオチド配列

配列番号 5 6 : ペプチドリッカーのアミノ酸配列

配列番号 5 7 : ND1DDDのアミノ酸配列

配列番号 5 8 : ND1RRRのアミノ酸配列

配列番号 5 9 : ZFN 4350Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 0 : ZFN 4350ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 1 : ZFN 4653Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 2 : ZFN 4653ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 3 : ZFN 4956Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 4 : ZFN 4956ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 5 : ZFN 5158Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 6 : ZFN 5158ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 7 : ZFN 5259Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 8 : ZFN 5259ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 6 9 : ZFN 5461Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 7 0 : ZFN 5461ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 7 1 : ZFN 5562Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 7 2 : ZFN 5562ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 7 3 : ZFN 5764Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 7 4 : ZFN 5764ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 7 5 : ZFN 5865Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 7 6 : ZFN 5865ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 7 7 : ZFN 6067Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 7 8 : ZFN 6067ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 7 9 : ZFN 6168Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 0 : ZFN 6168ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 1 : ZFN 7178Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 2 : ZFN 7178ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 3 : ZFN 7481Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 4 : ZFN 7481ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 5 : ZFN 7784Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 6 : ZFN 7784ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 7 : ZFN 8087Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 8 : ZFN 8087ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 8 9 : ZFN 8289Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 0 : ZFN 8289ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 1 : ZFN 8592Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 2 : ZFN 8592ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 3 : ZFN 8895Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 4 : ZFN 8895ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 5 : ZFN 4955Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 6 : ZFN 5157Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 7 : ZFN 6874Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 8 : ZFN 6874ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 9 9 : ZFN 7177Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 1 0 0 : ZFN 7480Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 1 0 1 : ZFN 7783Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 1 0 2 : ZFN 8086Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列
配列番号 1 0 3 : ZFN 8288Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 1 0 4 : ZFN 8591Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 1 0 5 : ZFN 8892Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 1 0 6 : ZFN 9197Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 1 0 7 : ZFN 9197ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 1 0 8 : ZFN 9410Sのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

配列番号 1 0 9 : ZFN 9410ASのジンクフィンガーアレイのアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1]

ロドプシン（RH0）遺伝子座のゲノム編集のための、1対のジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）の組み合わせであって、以下の群から選択される組み合わせ。

（1）配列番号1の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号2の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（2）配列番号5の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号6の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（3）配列番号7の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号8の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（4）配列番号9の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号10の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（5）配列番号11の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号12の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（6）配列番号13の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号14の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（7）配列番号15の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号16の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

（8）配列番号31の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号32の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(9) 配列番号 3 5 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号 3 6 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(1 0) 配列番号 3 7 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号 6 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(1 1) 配列番号 3 8 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号 8 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(1 2) 配列番号 7 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号 1 0 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(1 3) 配列番号 1 1 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号 1 4 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(1 4) 配列番号 1 5 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号 1 8 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

(1 5) 配列番号 4 5 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号 3 2 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

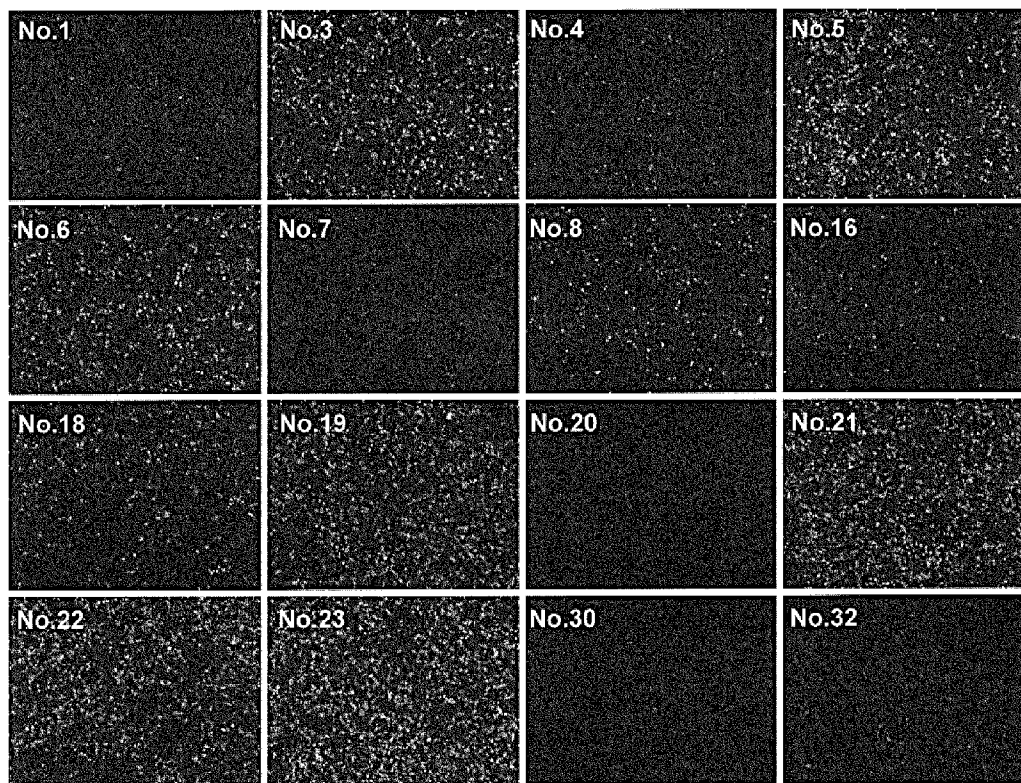
(1 6) 配列番号 4 7 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号 3 6 の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。

[請求項2] ZFNの核酸切断ドメインが、ND1である、請求項 1 に記載の組み合わせ。

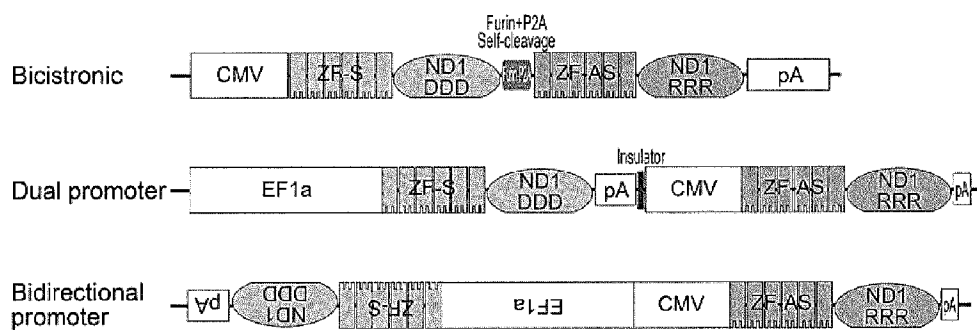
[請求項3] 請求項 1 に記載の 1 対のZFNをコードする核酸配列を含むベクター。

- [請求項4] バイディレクショナル発現ベクターであり、
 センス鎖ZFNをコードする核酸配列と該核酸配列の転写を制御する
 プロモーター配列と、
 アンチセンス鎖ZFNをコードする核酸配列と該核酸配列の転写を制
 御するプロモーター配列と、を含み、
 前記2つのプロモーターが、それらの間にスペーサー配列を有せずに
 連続して配列する、請求項3に記載のベクター。
- [請求項5] 請求項3又は4に記載のベクターを含む、RH0遺伝子に由来する疾
 患の治療剤。
- [請求項6] 請求項3又は4に記載のベクターを視細胞に導入する手順を含む、
 RH0遺伝子座のゲノム編集方法。
- [請求項7] 請求項3又は4に記載のベクターを視細胞に導入する手順を含む、
 RH0遺伝子がゲノム編集された視細胞の製造方法。

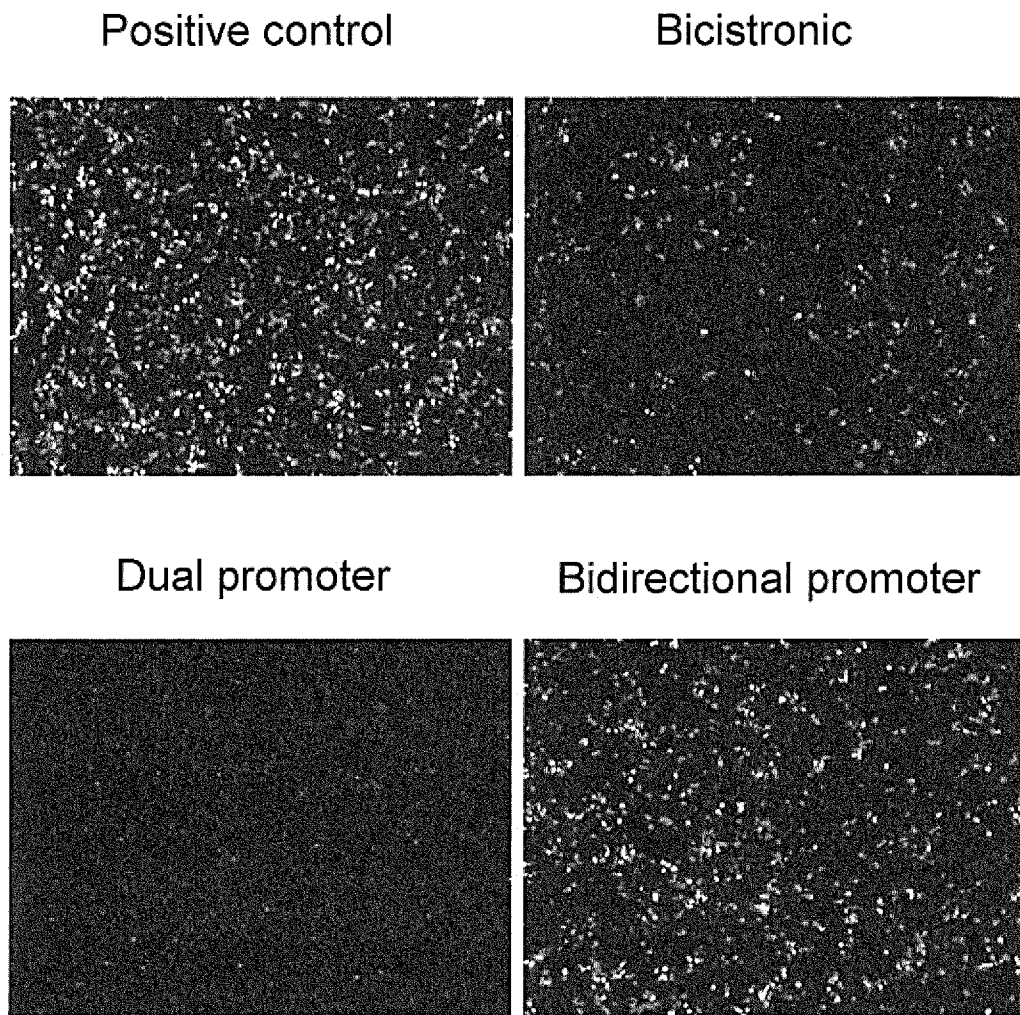
[図1]



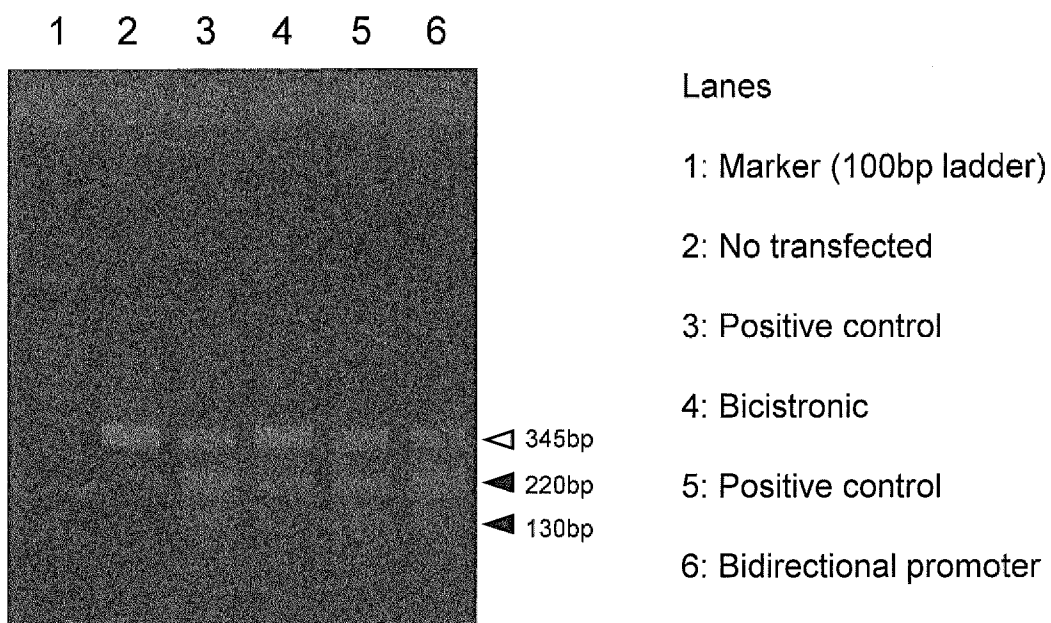
[図2]



[図3]

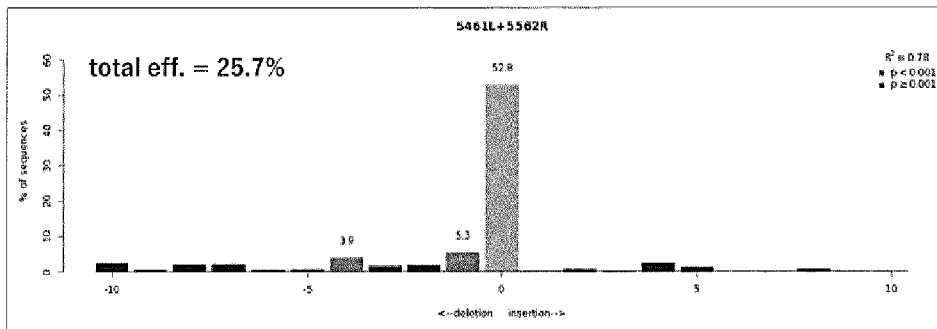


[図4]

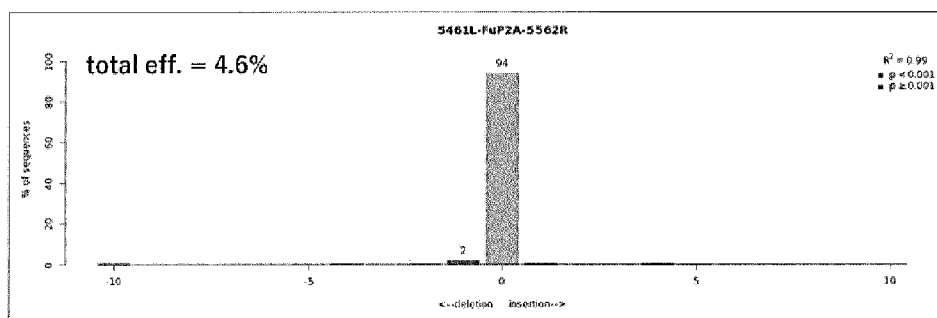


[図5]

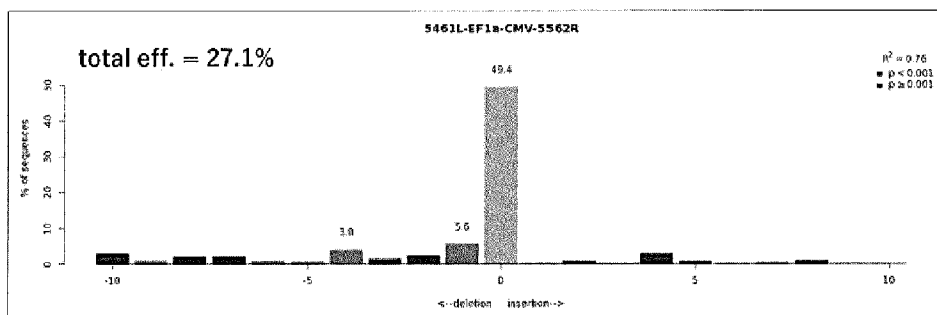
Positive control



Bicistronic



Bidirectional promoter



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021600

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)i; <i>A61K 35/12</i> (2015.01)i; <i>A61K 35/76</i> (2015.01)i; <i>A61K 48/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 27/02</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/63</i> (2006.01)i FI: C12N15/09 100; C12N5/10; A61P27/02; A61K35/12; A61K35/76; A61K48/00; A61K31/7088; C12N15/63 Z ZNA According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09; A61K31/7088; A61K35/12; A61K35/76; A61K48/00; A61P27/02; C12N5/10; C12N15/63 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/010303 A1 (RIKEN) 21 January 2021 (2021-01-21) claims 1, 5, 6, paragraphs [0019], [0020], example 5, in particular, paragraphs [0166], [0174], fig. 17	1-7
Y	US 2012/0204282 A1 (ZHANG, H. S.) 09 August 2012 (2012-08-09) claims, tables 1, 3	1-7
Y	WRIGHT A David et al., Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly, Nature Protocols, 2006, vol. 1, no. 3, pp. 1637-1652, supplemental table 1 abstract, fig. 3, supplemental table 1	1-7
Y	WO 2020/045281 A1 (HIROSHIMA UNIVERSITY) 05 March 2020 (2020-03-05) claims 1-3, example 11, SEQ ID NO: 1, fig. 1B	2
A		1, 3-7
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 August 2024		Date of mailing of the international search report 03 September 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021600

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VOGL Thomas et al., Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization, Nature Communications, 2018, vol. 9, article number: 3589, pp. 1-13 abstract, fig. 5	4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021600

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

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

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

Document 2: US 2012/0204282 A1 (ZHANG, H. S.) 09 August 2012 (2012-08-09), claims, tables 1, 3 & WO 2012/106725 A2

The claims are classified into the following 16 inventions.

Invention 1: The portion pertaining to claim 1 (1) and claims 2-7 referring back to said portion

The portion pertaining to claim 1 (1) and claims 2-7 referring back to said portion have the special technical feature of being "a combination of one pair of zinc finger nucleases (ZFNs) for genomic editing of the rhodopsin (RHO) gene site," wherein the combination is "a combination of a ZFN having a zinc finger array that recognizes the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1 with a ZFN having a zinc finger array that recognizes the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 2," and thus are classified as invention 1.

Invention 2: The portion pertaining to claim 1 (2) and claims 2-7 referring back to said portion

The portion pertaining to claim 1 (2) and claims 2-7 referring back to said portion share the common technical feature of being "a combination of one pair of zinc finger nucleases (ZFNs) for genomic editing of the rhodopsin (RHO) gene site" with the portion pertaining to claim 1 (1) and claims 2-7 referring back to said portion classified as invention 1.

However, in view of the disclosures in document 2 (in particular, see the claims, tables 1 and 3), said technical feature does not make a contribution over the prior art, and thus cannot be said to be a special technical feature.

There also are no other same or corresponding special technical features between the portion pertaining to claim 1 (2) and claims 2-7 referring back to said portion and the portion pertaining to claim 1 (1) and claims 2-7 referring back to said portion classified as invention 1.

Moreover, the portion pertaining to claim 1 (2) and claims 2-7 referring back to said portion do not depend from the portion pertaining to claim 1 (1) and claims 2-7 referring back to said portion. Furthermore, the portion pertaining to claim 1 (2) and claims 2-7 referring back to said portion are not substantially identical to or similarly closely related any of the claims classified as invention 1.

Accordingly, the portion pertaining to claim 1 (2) and claims 2-7 referring back to said portion cannot be classified as invention 1.

The portion pertaining to claim 1 (2) and claims 2-7 referring back to said portion have the special technical feature of being "a combination of a ZFN having a zinc finger array that recognizes the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 5 with a ZFN having a zinc finger array that recognizes the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 6," and are thus classified as invention 2.

Furthermore, making determinations similar to those for invention 2, inventions 3-16 are classified as follows.

Invention 3: The portion pertaining to claim 1 (3) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 4: The portion pertaining to claim 1 (4) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 5: The portion pertaining to claim 1 (5) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 6: The portion pertaining to claim 1 (6) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 7: The portion pertaining to claim 1 (7) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 8: The portion pertaining to claim 1 (8) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 9: The portion pertaining to claim 1 (9) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 10: The portion pertaining to claim 1 (10) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 11: The portion pertaining to claim 1 (11) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 12: The portion pertaining to claim 1 (12) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 13: The portion pertaining to claim 1 (13) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 14: The portion pertaining to claim 1 (14) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 15: The portion pertaining to claim 1 (15) and claims 2-7 referring back to said portion

Invention 16: The portion pertaining to claim 1 (16) and claims 2-7 referring back to said portion

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021600

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **The portion pertaining to claim 1 (1) and claims 2-7 referring back to said portion**

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/021600

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2021/010303	A1	21 January 2021	US 2022/0249698 A1 claims 1, 5, 6, paragraphs [0053], [0054], example 5, in particular, paragraphs [0290], [0300], fig. 17 EP 3998086 A1	
US	2012/0204282	A1	09 August 2012	WO 2012/106725 A2	
WO	2020/045281	A1	05 March 2020	US 2021/0332339 A1 claims 1-3, example 11, SEQ ID NO: 1, fig. 1B EP 3845651 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 15/09(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i
FI: C12N15/09 100; C12N5/10; A61P27/02; A61K35/12; A61K35/76; A61K48/00; A61K31/7088; C12N15/63 Z ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12N15/09; A61K31/7088; A61K35/12; A61K35/76; A61K48/00; A61P27/02; C12N5/10; C12N15/63

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2021/010303 A1 (国立研究開発法人理化学研究所) 21.01.2021 (2021 - 01 - 21) 請求項1, 5, 6, [0019], [0020], 実施例5, 特に[0166], [0174], 図17	1-7
Y	US 2012/0204282 A1 (ZHANG H. Steve) 09.08.2012 (2012 - 08 - 09) 特許請求の範囲、Table 1, 3	1-7
Y	WRIGHT A David et al., Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly, Nature Protocols, 2006, Vol.1, No.3, p.1637-1652, Supplemental Table 1 抄録, Fig.3, Supplemental Table 1	1-7
Y	WO 2020/045281 A1 (国立大学法人広島大学) 05.03.2020 (2020 - 03 - 05) 請求項1-3, 実施例11, 配列番号1, 図1B	2
A		1, 3-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“I” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 22.08.2024

国際調査報告の発送日 03.09.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

松村 真里 4B 5375

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献2：

US 2012/0204282 A1 (ZHANG H. Steve) 09.08.2012(2012-08-09) , 特許請求の範囲、Table 1,3
& WO 2012/106725 A2

請求の範囲は、以下の16個の発明に区分される。

（発明1） 請求項1（1）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

請求項1（1）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7は、「ロドプシン（RH0）遺伝子座のゲノム編集のための、1対のジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）の組み合わせ」であって、「配列番号1の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号2の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

（発明2） 請求項1（2）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

請求項1（2）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7は、発明1に区分された請求項1（1）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7と、「ロドプシン（RH0）遺伝子座のゲノム編集のための、1対のジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）の組み合わせ」という共通の技術的特徴を有している。

しかしながら、当該技術的特徴は、文献2の開示内容（特に特許請求の範囲、Table 1、3参照）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。

また、請求項1（2）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7と発明1に区分された請求項1（1）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項1（2）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7は請求項1（1）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7の従属請求項ではない。また、請求項1（2）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1（2）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7は発明1に区分できない。

そして、請求項1（2）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7は、「配列番号5の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNと、配列番号6の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを有するZFNとの組み合わせ。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

さらに、発明2と同様の判断を行い、発明3～16を以下のとおり区分する。

（発明3） 請求項1（3）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明4） 請求項1（4）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明5） 請求項1（5）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明6） 請求項1（6）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明7） 請求項1（7）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明8） 請求項1（8）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明9） 請求項1（9）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明10） 請求項1（10）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明11） 請求項1（11）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明12） 請求項1（12）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明13） 請求項1（13）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明14） 請求項1（14）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明15） 請求項1（15）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

（発明16） 請求項1（16）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2-7

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。請求項1（1）に係る部分、及び、当該部分を引用する請求項2－7

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	VOGL Thomas et al., Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization, Nature Communications, 2018, Vol.9, Article number: 3589, p.1-13 抄録、Fig. 5	4

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/021600

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2021/010303	A1	21.01.2021	US	2022/0249698	A1	
				請求項1, 5, 6, [0053], [0054], 実施例5, 特に [0290], [0300], Fig. 17			
				EP	3998086	A1	
US	2012/0204282	A1	09.08.2012	WO	2012/106725	A2	
WO	2020/045281	A1	05.03.2020	US	2021/0332339	A1	
				請求項1-3, 実施例11, 配列番 号1, 図1B			
				EP	3845651	A1	