

(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 2024/257843 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021599

(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 2023-098848 2023年6月16日(16.06.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社 V C Gene Therapy (VCGT INC.) [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県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).

(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 Gene Therapy 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 Gene Therapy 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 Gene Therapy 内 Hyogo (JP). 佐久間 哲史

(SAKUMA Tetsushi); 〒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). 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).

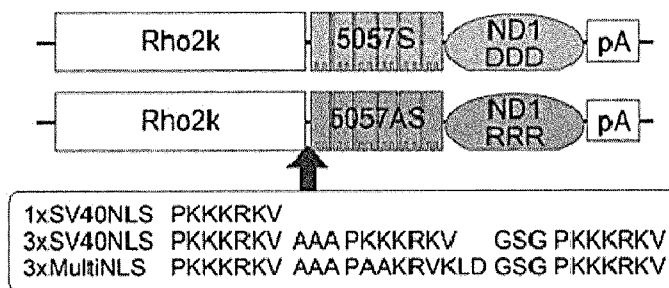
(74) 代理人: 梅田 慎介 (UMEDA Shinsuke); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(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,

(54) Title: ZINC FINGER PROTEIN, ZINC FINGER NUCLEASE, VECTOR, AND GENOME EDITING METHOD USING SAID SUBSTANCES

(54) 発明の名称: ジンクフィンガータンパク質、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



(57) Abstract: As a technique that can be used to improve the efficiency of genome editing with zinc finger nucleases (ZFNs), particularly in non-dividing cells, the present invention provides a ZFN having three or more nuclear localization signals (NLSs) at the N-terminus thereof.

(57) 要約: ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) によるゲノム編集の効率を特に非分裂細胞において向上させるために利用可能な技術として、N末端に3以上の核移行シグナル (NLS) を有する、ZFNが提供される。



WO 2024/257843 A1

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：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 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：

ジンクフィンガータンパク質、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

技術分野

[0001] 本開示は、ジンクフィンガータンパク質、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に関する。より詳しくは、N末端に3以上の核移行シグナルが付加されたジンクフィンガータンパク質等に関する。

背景技術

[0002] ジンクフィンガーヌクレアーゼ (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1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。

[0003] 本開示に関連して、非特許文献1には、培養細胞 (分裂細胞) において、ZF-FokI-NDに核移行シグナル (NLS) を複数付加することで、ゲノム編集効率が向上することが報告されている。また、非特許文献2は、CasヌクレアーゼのN末端及びC末端にNLSを1つずつ付加することで、非分裂細胞におけるHITI (Homology-independent Targeted Integration) 法の効率的な実施が可能となることを報告している。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2020/045281号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：“Improved Cell-Penetrating Zinc-Finger Nuclease Proteins for Precision Genome Engineering Molecular Therapy”, Jia Liu et al., Nucleic Acids, 2015, 4, e232

非特許文献2：“In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homolog y-independent targeted integration”, Keiichiro Suzuki et al., Nature, 2016, 540, 144-149

非特許文献3：“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によるゲノム編集の効率を特に非分裂細胞において向上させるために利用可能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] - [13] を提供する。

[1] N末端に3以上の核移行シグナル (NLS) を有する、ジンクフィンガータンパク質 (ZFP)。

[2] NLSがSV40 T抗原NLS及び／又はc-myc NLSである、[1]のZFP。

[3] 交互に配列した、SV40 T抗原NLS及びc-myc NLSを有する [2] のZFP

。

[4] SV40 T抗原NLSを2つ、c-myc NLSを1つ有する、[3]のZFP。

[0008] [5] [1] - [4] のいずれかのZFPをコードする核酸配列を含むベクター。

[0009] [6] [1] - [4] のいずれかのZFPと核酸切断ドメインとからなるジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)。

[7] 核酸切断ドメインが、ND1である、[6]のZFN。

[8] 核酸切断ドメインが、
配列番号 9 の391～585位のアミノ酸配列、
配列番号 14 のアミノ酸配列、又は、
配列番号 15 のアミノ酸配列、
を含んでなる、[7] のZFN。

[0010] [9] [6] - [8] のいずれかのZFNをコードする核酸配列を含むベクター。

[0011] [10] [9] のベクターを細胞に導入する手順を含む、ゲノム編集方法。

[11] *in vitro*方法である、[10] のゲノム編集方法。

[12] 前記細胞が、非分裂細胞である、[10] 又は [11] のゲノム編集方法。

[13] 前記非分裂細胞が、視細胞である、[12] の方法。

発明の効果

[0012] 本開示により、ZFNによるゲノム編集の効率を特に非分裂細胞において向上させるために利用可能な技術が提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]マウスRho遺伝子のエキソン1開始コドンの上流配列と、ZF-ND1発現ベクターにより発現されるZF-ND1に含まれるZFP (ZF-5057S、ZF5057AS) の認識配列を示す。

[図2]ZF-ND1発現ベクター (pRho2k-ZF-ND1DDD、pRho2k-ZF-ND1RRR) の構成を示す。

[図3]ドナー遺伝子ベクター (mRho-ZF-HITI-Donor) の構成を示す。

[図4]3種類の核移行シグナル配列 (1xSV40NLS、3xSV40NLS、3xMultiNLS) を挿入したZF-ND1発現ベクターを用いたHITI (Homology-independent Targeted Integration) 法により杆体視細胞のゲノム編集を行った結果を示す。上段は、出生直後 (P0~2) のマウス網膜の杆体視細胞のロドプシン遺伝子座に蛍光タンパク質 (AcGFP) 遺伝子を導入し、P21に回収した網膜組織 (eyecup)

の蛍光像である。下段は、網膜組織の抗GFP抗体による蛍光染色像である。緑はAcGFP、赤はポジティブコントロールのmCherryの蛍光を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 1. ジンクフィンガータンパク質 (ZFP)

本開示に係るZFPは、核酸結合ドメインを含んでなり、核酸結合ドメインのN末端に3以上の核移行シグナル (NLS) を有することを特徴とする。本開示に係るZFPは、N末端に3以上のNLSを有することにより、エフェクタードメインと結合されて向上されたゲノム編集効率を示し得る。ゲノム編集効率の向上は、特に非分裂細胞において奏され得る。

[0015] 本開示に係るZFPの核酸結合ドメインは、特定の核酸配列を認識するジンクフィンガーアレイを含んでなる。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。ジンクフィンガーアレイが認識する核酸配列は、ゲノム編集の対象となる目的核酸鎖の核酸配列、及び該目的核酸鎖中の編集標的部位の核酸配列に応じて適宜設定され得る。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。

[0016] 本開示に係るZFPが有するNLSは、3以上であればよく、好ましくは3-5個、特には3又は5個とされ得る。

本開示に係るZFPが有するNLSには、SV40 T抗原NLS (PKKKRKV : 配列番号6)、c-myc NLS (PAAKRVKLD : 配列番号7)、Nucleoplasmin NLS (KRXXXXXXXXXXKKKLD : 配列番号8。Xは任意のアミノ酸を示す) 及びこれらの配列から誘導されるアミノ酸配列を有するNLS等の従来公知のNLSを特に限定されずに用

いることができる。

NLSは、SV40 T抗原NLS又はc-myc NLSであることが好ましく、SV40 T抗原NLS及びc-myc NLSであることがより好ましい。

NLSがSV40 T抗原NLS及びc-myc NLSである場合、それらは交互に配列してよく、特に「SV40 T抗原NLS、c-myc NLS、SV40 T抗原NLS」の順に3つのNLSが配列してよい。

[0017] 各NLSは、直接配列してよく、あるいはペプチドリンカーにより連結され配列していてもよい。ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、任意であるが、例えばAAA及びGSGとすることができる。

[0018] 2. ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)

本開示に係るZFPが結合されるエフェクタードメインは、特に限定されないが、例えば、核酸切断ドメインであってよい。他の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。

エフェクタードメインは、単独で機能するもの（モノマー型）であっても、多量体により機能するもの（スプリット型）であってもよい。

[0019] ZFPとエフェクタードメインは、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、TGGS（配列番号13）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、エフェクター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。

[0020] 本開示に係るZFPは核酸切断ドメインと結合されて、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) として構成されることが好ましい。本開示に係るZFNは、特

定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 double-strand break ; DSB）をもたらす。

[0021] 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9に、その塩基配列を配列番号10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11に、その塩基配列を配列番号12に示す。ND1は、典型的には、配列番号9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11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。

[0022] ND1及びND2の改変体は、配列番号9の391～585位または配列番号11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。

[0023] ND1及びND2の改変体は、配列番号9の391～585位または配列番号11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。

[0024] 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9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14）。また、ND1のRRR型変異体（ND1RRR）は、配列番号9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15）。

[0025] 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。

[0026] 本開示に係るZFP及び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。

[0027] 3. ベクター

本開示は、上述のZFP又はZFNをコードする核酸配列を含むベクターをも提供する。

ベクターは、ZFP又はZFNをコードする核酸配列に加えて、従来の遺伝子発現ベクターが備える要素を含んでもよい。このような要素として、例えばプロモーター（CMVプロモーターやヒトEF1a（Elongation Factor alpha-1）プロモーター等）、polyA付加配列（SV40 pA, HGH pA、ウサギグロビン pA等）が挙げられる。

[0028] 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、エピソームベクター、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、酵母エピソームなど）、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、トリポックスウイルス、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。

[0029] 4. ゲノム編集方法

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、細胞に導入する手順を含むゲノム編集方法をも提供する。

[0030] 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。

[0031] 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 end joining；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。

[0032] 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、目的の遺伝子座が切断部位において改変される。

[0033] 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。

[0034] 細胞は、分裂細胞であっても非分裂細胞であってもよいが、本開示においては特に非分裂細胞を好適に選択し得る。非分裂細胞としては、例えば視細胞、リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、心筋細胞、ニューロン、網膜細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、精母細胞、卵母細胞、及び膵臓 β 細胞等が挙げられる。

実施例

[0035] [実施例 1 : ZF-ND1を用いたHITI法による非分裂細胞への外来遺伝子挿入におけるNLSの効果検証]

HITI (Homology-independent Targeted Integration) 法は、非分裂細胞において、外来遺伝子（ドナー遺伝子）を高効率にかつ正確な方向でゲノムに挿入する技術である。本実施例ではゲノム編集因子にZF-ND1を用いたHITI法におけるNLSの有効性を検討した。

[0036] 以下のプラスミドベクターを作製し、*in vivo*エレクトロポレーション法によるマウス杆体視細胞（非分裂細胞）への遺伝子導入を行った。

[0037] (1) ZF-ND1発現ベクター

ゲノムDNA切断に用いるND1は2量体で切断活性を示すため、切断標的となる配列に対してセンス鎖とアンチセンス鎖に対応する2つのZFP（ペアのZFP）を設計した。具体的には、マウスRho遺伝子のエキソン1開始コドンより上流に位置する18塩基の配列をそれぞれ認識するZFPペアを設計した。マウスRho遺伝子のエキソン1開始コドン上流の配列と、ZFPペアの認識配列を図1に示す。ND1のDDD型変異体（ND1DDD、配列番号14）に、センス鎖の配列CTACGAAGA

GCCCGTGGG (配列番号 1) を認識して結合するジンクフィンガーアレイを有するセンス鎖ZFP (ZF-5057 S) を連結し、ZF-5057S-ND1DDDとした。ZF-5057S-ND1DDDのアミノ酸配列を配列番号1_6に示す。ND1のRRR型変異体(ND1RRR、配列番号 1 5) に、アンチセンス鎖の配列ACCAAGGCT GCTTGCGA (配列番号 2) を認識して結合するジンクフィンガーアレイを有するアンチセンス鎖ZFP (ZF-5057AS) を連結し、ZF-5057AS-ND1RRRとした。ZF-5057AS-ND1RRRのアミノ酸配列を配列番号1_7に示す。ND1とZFPとの間の連結にはペプチドリンカー (配列Thr-Gly-Gly-Ser : 配列番号 1 3) を用いた。

[0038] ZF-5057AS-ND1RRR及びZF-5057S-ND1DDDをコードする核酸配列をそれぞれプラスミドベクターに組み込んで、発現ベクターpRho2k-ZF-ND1DDD及びpRho2k-ZF-ND1RRRを作製した。

プロモーターにはウシ由来のRhoプロモーター (2174bp) を用い、polyA付加配列にはウサギbeta-globin polyAを用いた。発現ベクターの構成を図2に示す。各発現ベクターには、ZFのN末端に以下の3種類のいずれかの核移行シグナル配列を挿入した。

A) SV40 NLS 1配列 (1xSV40NLS) : PKKKRKV (配列番号 3)

B) SV40 NLS 3配列 (3xSV40NLS) : PKKKRKV AAA PKKKRKV GSG PKKKRKV (配列番号 4)

C) SV40 NLS, c-Myc NLS, SV40 NLSの順に並べた配列 (3xMultiNLS) : PKKKRKV AAA PAA KRVKLD GSG PKKKRKV (配列番号 5)

(下線アミノ酸配列がNLS配列、AAA及びGSGはリンカー配列を示す)

[0039] (2) ドナー遺伝子ベクター

ドナー遺伝子には、マウスRho遺伝子のcDNAに蛍光タンパク質GFPをコードする核酸配列を付加したものとした。キメライントロン配列、マウスロドプシンcDNA (Rho cDNA)、自己消化ペプチド配列 (Furin+Spacer+P2A)、AcGFP、及びマウスRho遺伝子座由来の3' UTR 配列を順に連結したコンストラクトをpLeaklessIIIプラスミドに導入し、さらにこのコンストラクトの両端にZFの認識配列を逆転させた配列 (ZF-ND1 target) を挿入した。得られた遺伝子カ

セットをmRho-ZF-HITI-Donorと命名した（図3参照）。

[0040] (3) mCherry発現ベクター

CAGプロモーターの制御下でmCherry赤色蛍光蛋白質を発現させるプラスミドを作製した。

[0041] 5~7ug/ μ Lの濃度に調整したベクター溶液0.3~0.4 μ Lを出生直後（P0~2）の Maus 網膜下に注入した。ピンセット電極（Nepagene CUY650-7）で網膜側を陽極側して頭部を挟み、電気パルスを与えることにより遺伝子導入を行った。ベクター溶液の混合比率は百分率で下記のとおりとした。

pRho2k-ZF-ND1DDD 15%

pRho2k-ZF-ND1RRR 15%

mRho-ZF-HITI-Donor 60%

pCAG-mCherry 10%

[0042] pRho2k-ZF-ND1DDD及びpRho2k-ZF-ND1RRRのRhoプロモーターは杆体視細胞が分化した後

のP7~10以降から活性化するため、ZF-ND1DDD, ZF-ND1RRRは分化後（すなわち細胞分裂停止後）の杆体視細胞で発現が開始される。網膜の細胞分化が概ね完了したP21に眼球を回収した。外側の強膜部分を剥がして除去し、残存組織（eyecup）を4%パラホルムアルデヒド溶液（Nacalai）で固定し、蛍光実態顕微鏡でGFPとmCherryの蛍光像を撮影した。また、組織切片を作製して、抗GFP抗体で蛍光免疫染色を行った。

[0043] 3種類の核移行シグナル配列（1xSV40NLS、3xSV40NLS、3xMultiNLS）を挿入したpRho2k-ZF-ND1DDD及びpRho2k-ZF-ND1RRRを用いた場合のeyecupの蛍光像を図4上段（緑はAcGFP、赤はmCherryの蛍光を示す）に示す。

NLSを1配列導入したコンストラクト（1xSV40NLS）では緑色蛍光をほとんど認めず、ZF-ND1ベクターを導入しないネガティブコントロール群（No ZF）と同程度であった。NLSを3配列導入したコンストラクトでは、3xSV40NLS、3xMulti40NLSの順で緑色蛍光の増加を認めた。

[0044] 3種類の核移行シグナル配列（1xSV40NLS、3xSV40NLS、3xMultiNLS）を挿入

したpRho2k-ZF-ND1DDD及びpRho2k-ZF-ND1RRRを用いた場合の抗GFP抗体による蛍光染色像を図4下段に示す。

AcGFP陽性細胞は視細胞が局在する網膜外顆粒層 (ONL)のみに認められ、mCherry陽性細胞は水平細胞、双極細胞及びアマクリン細胞が局在する網膜内顆粒層 (INL)にも認められることから、mRho-ZF-HITI-Donorカセットのノックインは視細胞限定的に起きていることが確認できる。AcGFP陽性視細胞は、1xSV40NLS, 3xSV40NLS, 3xMulti40NLSの順で増加を認めた。

[0045] 以上の結果から、ZFPに複数個 (3個) のNLSを付加することにより、視細胞 (非分裂細胞) での効率的なゲノム編集が可能であることが示された。

配列表フリーテキスト

[0046] 配列番号1 : ZF-5057Sの認識配列

配列番号2 : ZF-5057ASの認識配列

配列番号3 : SV40 NLS 1配列 (1xSV40NLS) のアミノ酸配列

配列番号4 : SV40 NLS 3配列 (3xSV40NLS) のアミノ酸配列

配列番号5 : SV40 NLS, c-Myc NLS, SV40 NLSの順に並べた配列 (3xMultiNLS) のアミノ酸配列

配列番号6 : SV40 T抗原NLSのアミノ酸配列

配列番号7 : c-myc NLSのアミノ酸配列

配列番号8 : Nucleoplasmin NLSのアミノ酸配列

配列番号9 : 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10 : 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11 : 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

配列番号12 : ND2を含む全長タンパク質 (ボツリヌス菌由来) のアミノ酸配列のヌクレオチド配列

配列番号13 : ペプチドリンカーのアミノ酸配列

配列番号 1 4 : ND1DDDのアミノ酸配列

配列番号 1 5 : ND1RRRのアミノ酸配列

配列番号 1 6 : ZF-5057S-ND1DDDのアミノ酸配列

配列番号 1 7 : ZF-5057AS-ND1RRRのアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] N末端に3以上の核移行シグナル（NLS）を有する、ジンクフィンガータンパク質（ZFP）。
- [請求項2] NLSがSV40 T抗原NLS及び／又はc-myc NLSである、請求項1に記載のZFP。
- [請求項3] 交互に配列した、SV40 T抗原NLS及びc-myc NLSを有する、請求項2に記載のZFP。
- [請求項4] SV40 T抗原NLSを2つ、c-myc NLSを1つ有する、請求項3に記載のZFP。
- [請求項5] 請求項1－4のいずれか一項に記載のZFPをコードする核酸配列を含むベクター。
- [請求項6] 請求項1－4のいずれか一項に記載のZFPと核酸切断ドメインとからなるジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）。
- [請求項7] 核酸切断ドメインが、ND1である、請求項6に記載のZFN。
- [請求項8] 請求項6に記載のZFNをコードする核酸配列を含むベクター。
- [請求項9] 請求項8に記載のベクターを細胞に導入する手順を含む、ゲノム編集方法。
- [請求項10] 前記細胞が、非分裂細胞である、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記非分裂細胞が、視細胞である、請求項10に記載の方法。

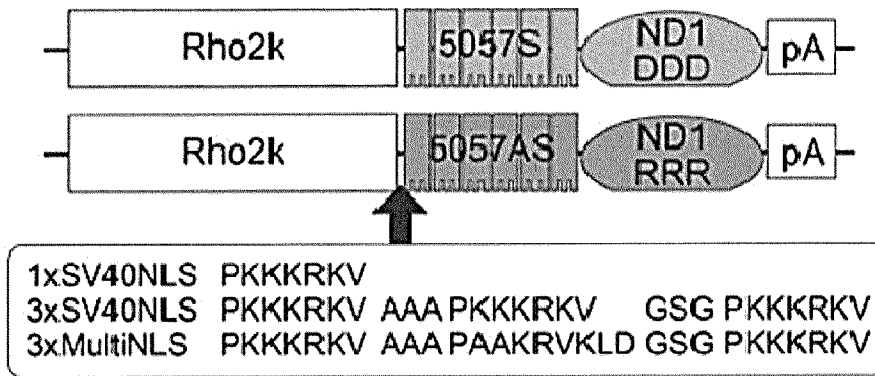
[1]

CCTGGAGTTGGGCTGTGGAGCCGTCAGTGGCTGAGCTCGCCAAAGCAGCCCTGGTCTCTGTCTACGAAAGAGCCCGTGGGCCAGCCCTCGAGAGCCCGCAGCC
 GGACCTCAACGGGACACCCCTCGGCAGTCAACCGACTCGAGCGGTTTCGTCGGAACCCAGAGACAGATGCTTCTCGGGCACCCCGTGGAGCTCTCGGCCTGGG

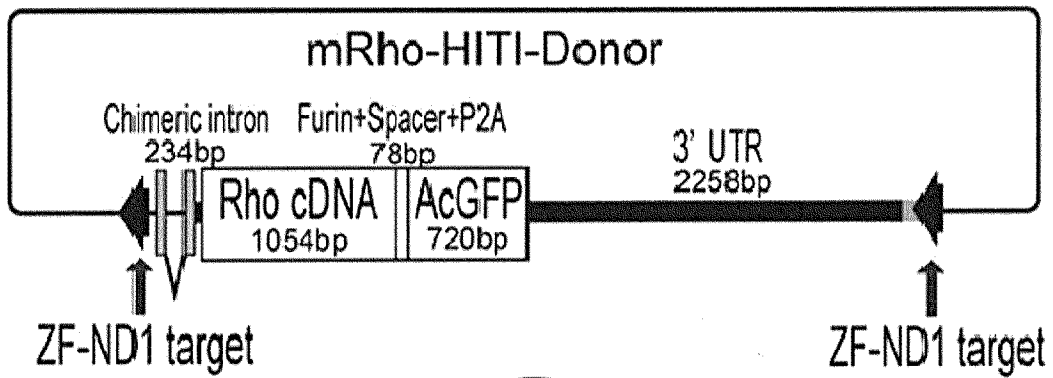
NDI DDD ZF-5057S mRho cds

NDI RRR ZF-5057AS

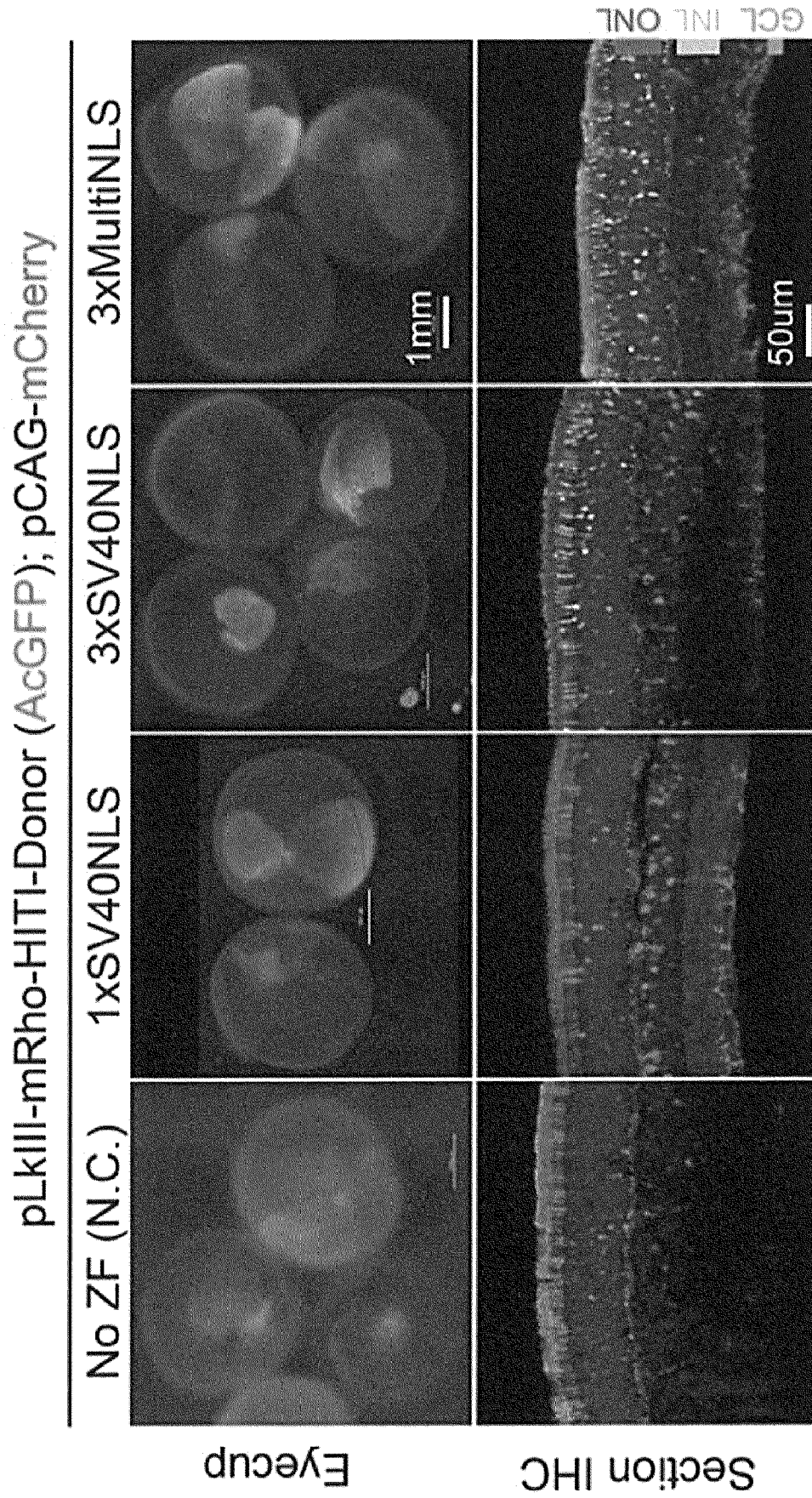
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 19/00(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i FI: C07K19/00 ZNA; C12N15/63 Z; C12N9/10; C12N15/09 100		
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) C07K19/00; C12N9/10; C12N15/09; 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); CAlus/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.
X	LIU, Jia et al. Improved Cell-Penetrating Zinc-Finger Nuclease Proteins for Precision Genome Engineering. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2015, vol. 4, p. e232 (pp. 1-9) abstract, p. 2, left column, 2nd paragraph to p. 4, right column, 1st paragraph, fig. 1, 3	1-2, 5-6, 8-11
Y		1-2, 5-11
A		3-4
Y	WO 2020/045281 A1 (HIROSHIMA UNIVERSITY) 05 March 2020 (2020-03-05) example 3	1-2, 5-11
A		3-4
Y	WO 2023/049872 A2 (SCRIBE THERAPEUTICS INC.) 30 March 2023 (2023-03-30) claims, paragraphs [0964], [0976], p. 394, tables 64, 7, SEQ ID NO: 2564, 2582	1-2, 5-11
A		3-4
A	CN 115716880 A (YUNZHOU BIOTECHNOLOGY (GUANGZHOU) CO., LTD.) 28 February 2023 (2023-02-28) paragraph [0076], table 1	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 14 August 2024		Date of mailing of the international search report 27 August 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/JP2024/021599

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2022-534809 A (SCRIBE THERAPEUTICS INC.) 03 August 2022 (2022-08-03) example 10	1-11
A	US 2020/0224194 A1 (HELIX NANOTECHNOLOGIES, INC.) 16 July 2020 (2020-07-16) example 6	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021599

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/021599

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/045281	A1	05 March 2020	US 2021/0332339 A1 example 3	
				EP 3845651 A1	
				KR 10-2021-0062639 A	
				CN 112930398 A	

WO	2023/049872	A2	30 March 2023	CA 3231019 A1	

CN	115716880	A	28 February 2023	(Family: none)	

JP	2022-534809	A	03 August 2022	US 2022/0081681 A1 example 10	
				WO 2020/247882 A1	
				EP 3980533 A1	
				KR 10-2022-0032050 A	
				CN 114375334 A	

US	2020/0224194	A1	16 July 2020	WO 2019/060631 A1	
				EP 3841114 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 19/00(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i FI: C07K19/00 ZNA; C12N15/63 Z; C12N9/10; C12N15/09 100		
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）） C07K19/00; C12N9/10; C12N15/09; 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/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
X Y A	LIU, Jia et al., Improved Cell-Penetrating Zinc-Finger Nuclease Proteins for Precision Genome Engineering, Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2015, Vol. 4, p. e232 (pp. 1-9) 要約、2ページ左欄第2段落-4ページ右欄第1段落、図1、3	1-2, 5-6, 8-11 1-2, 5-11 3-4
Y A	WO 2020/045281 A1 (国立大学法人広島大学) 05.03.2020 (2020-03-05) 実施例3	1-2, 5-11 3-4
Y A	WO 2023/049872 A2 (SCRIBE THERAPEUTICS INC.) 30.03.2023 (2023-03-30) 特許請求の範囲、[0964]、[0976]、394ページ表64、表7、配列番号2564、2582	1-2, 5-11 3-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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 “L” 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	14. 08. 2024	国際調査報告の発送日 27. 08. 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） 三谷 直也 4I 2564 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
A	CN 115716880 A (YUNZHOU BIOTECHNOLOGY (GUANGZHOU) CO., LTD.) 28.02.2023 (2023 - 02 - 28) [0 0 7 6]、表 1	1-11
A	JP 2022-534809 A (スクライブ・セラピューティクス・インコーポレイテッド) 03.08.2022 (2022 - 08 - 03) 実施例 1 0	1-11
A	US 2020/0224194 A1 (HELIX NANOTECHNOLOGIES, INC.) 16.07.2020 (2020 - 07 - 16) 実施例 6	1-11

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：

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/JP2024/021599

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2020/045281	A1	05.03.2020	US	2021/0332339	A1	
				実施例 3			
				EP	3845651	A1	
				KR	10-2021-0062639	A	
				CN	112930398	A	

WO	2023/049872	A2	30.03.2023	CA	3231019	A1	

CN	115716880	A	28.02.2023	(ファミリーなし)			

JP	2022-534809	A	03.08.2022	US	2022/0081681	A1	
				実施例 10			
				WO	2020/247882	A1	
				EP	3980533	A1	
				KR	10-2022-0032050	A	
				CN	114375334	A	

US	2020/0224194	A1	16.07.2020	WO	2019/060631	A1	
				EP	3841114	A1	
