

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5898179号  
(P5898179)

(45) 発行日 平成28年4月6日 (2016.4.6)

(24) 登録日 平成28年3月11日 (2016.3.11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 13 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-509041 (P2013-509041)  
 (86) (22) 出願日 平成23年5月2日 (2011.5.2)  
 (65) 公表番号 特表2013-527765 (P2013-527765A)  
 (43) 公表日 平成25年7月4日 (2013.7.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/000758  
 (87) 国際公開番号 W02011/139349  
 (87) 国際公開日 平成23年11月10日 (2011.11.10)  
 審査請求日 平成26年4月10日 (2014.4.10)  
 (31) 優先権主張番号 61/343,729  
 (32) 優先日 平成22年5月3日 (2010.5.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508241200  
 サンガモ バイオサイエンス、 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 プールバード 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 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジンクフィンガーモジュールを連結するための組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の非天然ジンクフィンガーモジュールを含むジンクフィンガータンパク質であって、非天然ジンクフィンガーDNA結合モジュールの少なくとも2つは、N-末端ジンクフィンガーモジュールの最後の残基とC-末端ジンクフィンガーモジュールの最初の残基との間に5～20個のアミノ酸残基のアミノ酸リンカー配列で接続され、前記リンカーが、N末端ジンクフィンガーモジュールに隣接したN末端アミノ酸残基と、C末端ジンクフィンガーモジュールに隣接したC末端アミノ酸残基と、N-及びC-末端アミノ酸リンカー残基の内部にあるアミノ酸残基を含み、並びに

(i) 前記アミノ酸リンカーのN末端アミノ酸残基又は内部にあるアミノ酸残基は、少なくとも1個のプロリン残基を含み、

(ii) 前記ジンクフィンガータンパク質は、各フィンガーモジュールによって結合された標的サブサイトを含む標的部位に結合し、

(iii) 前記アミノ酸リンカーによって接続されたジンクフィンガーDNA-結合モジュールによって結合された標的サブサイト間に0、1、2又は3個の塩基対のギャップが存在する、

ジンクフィンガータンパク質。

【請求項 2】

前記リンカーが、少なくとも2個の塩基性アミノ酸残基を更に含む、請求項1に記載のジンクフィンガータンパク質。

10

20

## 【請求項 3】

前記塩基性アミノ酸残基が、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 2 に記載のジンクフィンガータンパク質。

## 【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のジンクフィンガータンパク質及び調節ドメインを含む、融合タンパク質。

## 【請求項 5】

前記調節ドメインが、転写モジュレートドメインである、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

10

## 【請求項 6】

前記調節ドメインが、活性化ドメイン又は抑制ドメインである、請求項 5 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 7】

前記調節ドメインが、開裂ドメイン又は開裂ハーフドメインである、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 8】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のタンパク質のいずれかをコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 9】

20

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のタンパク質のいずれか及び / 又は請求項 8 に記載のポリヌクレオチドを含む細胞。

## 【請求項 10】

請求項 1 ～ 7 に記載のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 8 に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞中の遺伝子の発現をモジュレートするための組成物であって、前記細胞に投与される、組成物。

## 【請求項 11】

前記モジュレーターが、前記遺伝子の上方制御又は下方制御を含む、請求項 10 に記載の組成物。

## 【請求項 12】

30

前記モジュレーターが、前記遺伝子の開裂を含む、請求項 10 に記載の組成物。

## 【請求項 13】

前記遺伝子が内因性細胞遺伝子である、請求項 10 ～ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

技術分野

本発明の開示は、ゲノム及びタンパク質工学の分野に関する。

## 【背景技術】

40

## 【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示を本明細書にそれらの全体を参照として援用する、2010年5月3日に提出された米国特許仮出願第61/343,729号の利益を主張するものである。

## 【0003】

連邦政府の委託研究下でなされる発明に対する権利についての記述

適用せず。

## 【0004】

背景

50

選択された標的部位に結合するように操作された認識領域を有するジンクフィンガータンパク質は、他のジンクフィンガータンパク質並びに調節ドメインに規則的に連結され、遺伝子発現及びゲノム標的部位を改変するために使用される。例えば、開裂ドメインに操作可能となるように連結されたDNA結合ドメインを含む人工ヌクレアーゼは、外因性配列の挿入、1つ以上の内因性遺伝子の不活性化、生物体の作製（例えば、動物又は穀物）並びに変更された遺伝子発現パターンを有する細胞系などが挙げられるゲノム配列の標的化変更に使用されてきた。例えば、米国特許公開第20050064474号、同第20060063231号、同第20070134796号、及び同第20080015164号、並びに国際特許公開第2007/139982号を参照されたい。

【0005】

ジンクフィンガータンパク質モジュール（例えば、1つ以上のフィンガーの操作されたジンクフィンガー）は、典型的には、TGEKP（配列番号1）などの5個のアミノ酸の「カノニカル」リンカー配列又はより長い可撓性リンカーを使用して、互いに対して連結される。米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、及び同第7,153,949号並びに米国特許公開第20030119023号を参照されたい。しかしながら、これらのカノニカルリンカーを介して連結されたジンクフィンガータンパク質モジュールは、標的核酸分子内の連結したモジュール標的サブサイト間にギャップがない場合にのみ最も効果的に結合する。更には、連結されたモジュールが1、2又は3個の塩基対ギャップを有する標的部位に結合することができるように設計された、先に述べられた長い可撓性リンカーは、結合に関して、これらの異なる塩基対ギャップ間を識別しない。米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、及び同第7,153,949号、並びに米国特許公開第20030119023号を参照されたい。したがって、1、2、又は3塩基対モジュール間ギャップにまたがるタンパク質の双方の親和性を改善し、同様に所望の長さのギャップにまたがり、またその所望の長さのギャップを持たない他の標的に対しては非選択的に結合しない標的を結合するためのこれらのタンパク質の選択性を改善する、ジンクフィンガーモジュールを互いに対して連結させるための方法又は組成物が望まれている。隣接するモジュールサブサイト間の0、1、2、3個又はそれより多くの塩基対間を識別するジンクフィンガーモジュールに対するリンカーは、ジンクフィンガー転写因子（ZFP-TF）及びジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を含む任意のジンクフィンガー融合タンパク質のより大きな設計機能を可能にする。

【発明の概要】

【0006】

#### 概要

本明細書には、DNA-結合モジュール（例えば、ジンクフィンガーモジュール）の互いに対する連結において使用されるリンカーが開示される。更に、例えば、転写調節ドメインなどの調節ドメインに又はヌクレアーゼに順番に融合されるこれらのリンカーを含むジンクフィンガータンパク質などの融合タンパク質が記載される。本開示はまた、これらの融合タンパク質及びその組成物を、遺伝子発現のモジュレーション、対象のある領域内での細胞DNA（例えば内因性細胞クロマチン）の標的開裂及び/又は細胞内の対象のある所定領域にての相同組換えのために使用する方法を更に提供する。

【0007】

したがって、一態様では、本明細書には、アミノ（N）-末端フィンガーの最後の残基（典型的には、カルボキシ（C）末端亜鉛配位結合残基）とC末端フィンガーの最初の残基（典型的には、最初の（N末端）保存芳香族残基）との間に5個又はそれ以上のアミノ酸を含む、例えば7～17個のアミノ酸を含むリンカーが記載される。ある実施形態では、このリンカーは、N末端残基と、C末端残基と、これらの末端残基の内部の残基とを含み、更にここにおいて、N末端残基又は内部残基が少なくとも1個のプロリン残基を含み、例えば、リンカーは、アミノ酸配列 $X^{N末端} - X_n - X^{C末端}$ を含み、式中のXは任意のアミノ酸残基であり、 $X_n$ は少なくとも3個のアミノ酸残基と少なくとも1個の $X^{N末端}$ とを含み、並びに $X_n$ はプロリン残基を含む。ある実施形態では、このリンカーは、少なく

とも2個のプロリン残基（例えば2、3、4個又はそれ以上）を含む。他の実施形態では、このリンカーは少なくとも1個のプロリン残基と少なくとも1個の塩基性残基（例えば、Arg、His又はLys）とを含む。他の実施形態では、このリンカーは少なくとも2個の塩基性残基（例えば、Arg、His又はLys）を含む。ある実施形態では、このリンカーは、表4、5、6、9、10、11又は13のいずれかに示されるリンカーである。

#### 【0008】

別の態様では、本明細書に記載のリンカーを含む融合ポリペプチドを提供する。

#### 【0009】

別の態様では、本明細書に記載のリンカー又は融合タンパク質のいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。

10

#### 【0010】

更に別の態様では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）及び/又はポリヌクレオチドのいずれかを含む細胞もまた提供する。

#### 【0011】

更に他の態様では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）及び/又はポリヌクレオチドを含む生物体（例えば、哺乳類、菌類及び植物）をもまた提供する。

#### 【0012】

融合タンパク質は、例えば、この融合タンパク質を細胞へ送達することによって又はこの融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを細胞に送達することによって、細胞内で発現され得る。このポリヌクレオチドがDNAである場合、転写かつ翻訳され、融合タンパク質を生成する。RNA分子として送達される場合、即時に翻訳され、その結果、融合タンパク質を生成する。ポリヌクレオチド及びポリペプチドの細胞への送達のための方法は、本開示の別の箇所て提示される。

20

#### 【0013】

これらの態様及び他の態様は、本明細書の開示に照らして、当業者には全体として容易に明らかであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

30

【図1A - B】図1のパネルA及びBは、本発明の例示的ジンクフィンガータンパク質及びリンカーのアミノ酸配列を示す。図1Aは、これらの研究で使用されるそれぞれのホストZFPのアミノ酸配列を示している（ZFP 8196のF1～F4は、配列番号130；配列番号131；配列番号132及び配列番号133で示され、ZFP 7263のF1～F4は、配列番号134；配列番号135；配列番号136及び配列番号137で示され、ZFP 7264のF1～F4は、配列番号138；配列番号139；配列番号140及び配列番号141で示されている）。アミノ酸は1つの文字コードによって示されている。各々の配列は、アミノ末端 カルボキシ末端方向に表示され、これによって各タンパク質のアミノ末端はフィンガー1の最初のメチオニンであり、またカルボキシ末端は、フィンガー4の最後のセリンとなる。「F1」、「F2」、「F3」及び「F4」は、各タンパク質の第1、第2、第3及び第4番目のフィンガーをそれぞれ示している。下線部は、リンカー配列であると便宜上考えられるフィンガー接合部にてのアミノ酸残基を意味する。認識ヘリックスは枠で囲まれている。図1Bは、リンカーライブラリーデザインを示していて、その中で各々のライブラリーは、中心リンカー内の2個又は3個の残基についてのコドン、2個～12個の完全無作為割付されたコドンの混合物で置き換えることによって生成されたものである。ライブラリーコドンは、(NNS)<sub>2-12</sub>によって示されている。

40

【図2A - D】図2のパネルA～Dは、本発明の表示されたジンクフィンガータンパク質及びリンカーによるファージプールのギャップ選択性を示す。図2Aは、表2Cで各ZFP 8196 標的への結合をテストされたものである1塩基対挿入塩基 (A T A A A C T G

50

d C A A A A G G C (配列番号 33) (表 2 A)) を有する標的を使用する Z F P 8 1 9 6 ライブラリーから選択されたファージプールを示している。図 2 B は、表 2 C で各 Z F P 7 2 6 3 標的への結合をテストされたものである 1 塩基対挿入塩基 (C C A C T C T G h T G G A A G T G (配列番号 43) (表 2 A)) を有する標的を使用する Z F P 7 2 6 3 ライブラリーから選択されたファージプールを示している。図 2 C は、表 2 C で各 Z F P 7 2 6 4 標的への結合をテストされたものである 1 塩基対挿入塩基 (T T A A A G C G h G C T C C G A A (配列番号 38) (表 2 A)) を有する標的を使用する Z F P 7 2 6 4 ライブラリーから選択されたファージプールを示している。図 2 D は、表 2 C の各 Z F P 8 1 9 6 への結合をテストされたものである 2 塩基対挿入塩基 (A T A A A C T G d b C A A A A G G C (配列番号 34)) を有する標的を使用する Z F P 8 1 9 6 ライブラリーから選択されたファージプールを示している。各々のテストはまた、DNA への非特異的結合を除外するための他の 2 つのホスト Z F P に対する 2 つの対照標的、並びに標的部位を含有しない陰性対照試料も包含した。各標的への結合に成功したファージの % が示されている。各ファージプールは、選択の第 5 ラウンドからのものであった。保持効率は、以前の記載 (Rebar 著、Method in Enzymology, 1996 年 (267): 129-149 頁) のように実質的に決定された。

【図 3 A - B】図 3 のパネル A 及び B は、本発明の表示されたギャップを封入する標的部位に対して選択されたリンカーを示す。図 3 A は、Z F P 8 1 9 6、Z F P 7 2 6 3、及び Z F P 7 2 6 4 (配列番号 142 ~ 166) における 1 塩基対ギャップを読み飛ばす (スキッピングする) ために選択されたリンカー配列を示している。図 3 B は、Z F P 8 1 9 6 における 2 塩基対ギャップを読み飛ばすためのリンカー配列 (配列番号 167 ~ 174) を示している。選択されたリンカーは、プロリン及びアルギジンを豊富に含む (隈取りされ表示)。長さ優先性もまた明らかであり、これは読み飛ばした塩基の数に依存する。

【図 4 A - E】図 4 のパネル A ~ E は、本発明の Z F P 8 1 9 6 と称されたジンクフィンガータンパク質内の 1 塩基対を読み飛ばすように選択されたリンカーについてのギャップ選択性を示すグラフである。各々のパネルにおいて、E L I S A スコアが、親の非スキッピングリンカーにそのギャップ非形成部位上で正規化された。「ギャップ配列」とは、(-) がギャップ非形成標的を示しているところのモジュールサブサイト間の塩基 (複数可) の同一性を指す。図 4 A ~ 4 C は、3 つの 1 塩基対ギャップスキッピングリンカー (1 f (配列番号 54)、1 d (配列番号 56) 及び 1 c (配列番号 55) と称されるリンカー) からの結果を示している。図 4 D は、ヒト細胞内の内因性遺伝子座の改変が可能であることが先に示されている標準可撓性リンカーでの結果を示し (T G G G G S Q K P、配列番号 2) (Hockemeyer 著、(2009 年) Nature biotechnology 27: 851 ~ 857 ページを参照)、並びに図 4 E は、先に公開された可撓性リンカーでの結果を示している (L R Q K D E R P、配列番号 3) (Kim JS 及び Pabo CO (1998 年) Proc Natl Acad Sci USA 95 (6): 2812 ~ 2817 頁を参照)。これらの選択されたリンカー 1 c、1 d 及び 1 f (図 4 A ~ 4 C) は、単一の塩基対ギャップを有する 4 つの標的部位に対して全て明白な優先性を示すが、一方図 4 D 及び 4 E 中の対照リンカーは、有効性で劣る全体の結合を示し、並びにギャップ選択性がほとんどないことを示している。

【図 5 A - D】図 5 のパネル A ~ D は、本発明の Z F P 7 2 6 4 内の 1 塩基対を読み飛ばすように選択されたリンカーについてのギャップ選択性を示すグラフである。図 5 A ~ 5 C は、Z E P 7 2 6 4 のバックグラウンド内の 1 e リンカー (配列番号 12) の E L I S A テストからの結果を示している。図 5 A は、モジュールサブサイト間の 1 塩基対ギャップを読み飛ばすように選択された 1 e リンカーに関する結果を示している。図 5 B は、標準可撓性リンカー (T G G G G S Q K P、配列番号 2) に関する結果を示し、並びに図 5 C は、可撓性リンカー (L R Q K D E R P、配列番号 3) に関する結果を示している。E L I S A スコアは、親の非スキッピングリンカー Z F P 7 2 6 4 に、そのギャップ非形成部位上で正規化された。「ギャップ配列」とは、(-) がギャップ非含有標的を示すモジ

10

20

30

40

50

ジュールサブサイト間の読み飛ばされた塩基（複数可）と同一であることを指す。図 5 D は、E L I S A スコア範囲が、他のパネルでは 0 ~ 5 であるものと比較すると 0 ~ 0 . 6 である図 5 B からのデータの拡大版を示している。

【図 6 A - F】図 6 のパネル A ~ F は、本発明の Z F P 8 1 9 6 内の 2 塩基対を読み飛ばすように選択されたリンカーについてのギャップ選択性を示しているグラフである。図 6 A ~ 6 E は、Z F P 8 1 9 6 のバックグラウンド内のモジュールサブサイト間の 2 塩基対ギャップを読み飛ばすように選択されたリンカーの E L I S A テストからの結果を示している。図 6 A ~ 6 C は、選択されたリンカー 2 f（配列番号 6 9）、2 d（配列番号 7 0）及び 2 e（配列番号 7 1）に関する結果を示し、一方図 6 D は、先に公開された可撓性リンカー（L R Q K D G G G S E R P（配列番号 6 8））に関する結果を示し、並びに図 6 E は、標準可撓性リンカー（T G G G G S G G S Q K P（配列番号 1 4））に関する結果を示している。図 6 F は、E L I S A スコア範囲が、他のパネルでは 0 ~ 1 であるのに比較して 0 ~ 0 . 1 である図 6 E で示されたデータの拡大版を示している。「ギャップ配列」とは、（ - ）がギャップ非形成標的を示すモジュールサブサイト間の塩基（複数可）の同一性である。選択されたリンカー（図 6 A ~ 6 C）は、1 塩基対ギャップ又はギャップがない場合と比較しての 2 塩基対ギャップに対する明らかな優先性を立証したが、一方図 6 D 及び 6 E 中の対照リンカーは、有効性の劣った全体の結合を示し、並びにギャップ選択性がほとんどないことを示した。

【図 7 A - B】図 7 のパネル A 及び B は、本発明の異なる Z F P のバックグラウンドに対する 1 塩基対スキッピングリンカーの可搬性を分析するように設計された研究からの E L I S A データの概要を示すパネルである。1 2 個の異なる Z F P がテストされた（Z F P 1, Z F P 2 等として表示）。図 7 A は、Z F N として使用される場合、内因性 I L 2 R 遺伝子座を効果的に改変することが示された（U r n o v ら著（2 0 0 5 年）N a t u r e 4 3 5（7 0 4 2）：6 4 6 ~ 6 5 1 頁）標準陽性対照 Z F P に正規化された E L I S A スコアを示している。図 7 B は、標準可撓性リンカー T G G G G Q K P（配列番号 2）を有する各々の親 Z F P に更に正規化された全てのスコアを示している。図 7 B 中の下線が施された数値は、可撓性リンカー T G G G G Q K P（配列番号 2）を有する同一の宿主 Z F P と比較して、選択されたリンカー（1 e（配列番号 1 2）、1 f（配列番号 5 4）、1 d（配列番号 5 6）、及び 1 c（配列番号 5 5））を有する Z F P についての E L I S A スコアでの 4 倍を超える改善を示している。全体として、リンカー 1 e、1 f、1 d 及び 1 c は、可撓性リンカーを超える 3 ~ 5 倍の E L I S A スコアでの一般的増大へと誘導する。

【図 8 A - B】図 8 のパネル A 及び B は、本発明の異なる Z F P のバックグラウンドに対する 2 塩基対スキッピングリンカーの可搬性を分析するように設計された研究からの E L I S A データの概要を示すパネルである。6 種の異なる Z F P がテストされた（Z F P 1 3、Z F P 1 4 等として表示）。図 8 A は、Z F N として使用された場合、内因性 I L 2 R 遺伝子座を効果的に改変することが示された（U r n o v ら著（2 0 0 5 年）N a t u r e 4 3 5（7 0 4 2）：6 4 6 ~ 6 5 1 頁）標準陽性対照 Z F P に正規化された E L I S A スコアを示している。図 8 B は、標準可撓性リンカー T G G G G S G G S Q K P（配列番号 1 4）を有する各々の親 Z F P に更に正規化された全てのスコアを示している。図 8 B 中の下線が施された数値は、可撓性リンカー T G G G G S G G S Q K P（配列番号 1 4）を有する同一の宿主 Z F P と比較して、選択されたリンカー（2 f（配列番号 6 9）、2 d（配列番号 7 0）及び 2 e（配列番号 7 1））を有する Z F P についての E L I S A スコアでの 2 倍を超える改善を示している。全体として、リンカー 2 f（配列番号 6 9）、2 d（配列番号 7 0）及び 2 e（配列番号 7 1）は、可撓性リンカーを超える 1 . 9 ~ 2 . 4 倍の E L I S A スコアでの一般的増大へと誘導した。

【図 9 A - B】図 9 のパネル A 及び B は、本発明の選択されたリンカーを含有する Z F N を使用した、C E L - I アッセイによって決定されるような、内因性遺伝子改変研究の結果を示すパネルである。図 9 A 及び 9 B は、異なる Z F N において本明細書に記載のようなリンカーが使用され得るかどうかを決定するために、C E L - I アッセイ（非相同末端

10

20

30

40

50

結合 (NHEJ) 活性を測定すること、Surveyor (商標)、Transkaryotic社) によって、内因性遺伝子座にてのZFNスクリーニング活性を決定するために使用される実施例のゲルを示している。図9Aに示されるゲルは、ZFN3及びZFN4バックグラウンド中の1e (配列番号12)、1f (配列番号54)、1d (配列番号56)、及び1c (配列番号55) リンカーからの結果を示している。図9Bに示されるゲルは、ZFN14バックグラウンド中の2f、2d及び2eからの結果を示している。NHEJによる遺伝子改変%である「Gene mod. (%)」が、レーンの下に表示されている。陰性対照「neg」は、GFPを有するプラスミドでトランスフェクトされた試料である。標準可撓性リンカー (図9Aに関してはTGGGGSQKP (配列番号2) 及び図9Bに関してはTGGGSGGSQKP (配列番号14)) を使用するZFNからの結果が、「C」のラベルを付けたレーンで示されている。ラベル付けされていないレーンは、これらの研究では更には展開されなかった他のリンカーを有するZFNの試料を含有する。ゲル中のデータは、本明細書に記載のようなリンカーが、可撓性リンカーと比較して、遺伝子改変のレベルを著しく増大させることを立証している。

【図10A - B】図10のパネルA及びBは、1塩基対を読み飛ばすために選択された表示されたリンカーを含有する、本発明の図9に関して上述されたような、ZFNに対する遺伝子改変研究の概要を示すパネルである。図10Aは、テストされる5つのリンカーのセット (可撓性、1e (配列番号12)、1f (配列番号54)、1d (配列番号56)、及び1c (配列番号55)) を有する各々のZFNについての遺伝子改変%の定量結果である。図10Bは、可撓性リンカー (TGGGGSQKP、配列番号2) に正規化された、この同一のデータを示し、並びに全ての活性ZFN対全体にわたる遺伝子改変における平均増加も示している。高発現条件 (実施例3を参照) を使用して生成された試料は、灰色で強調されている。遺伝子改変のレベルを2倍を超えるまで改善した例示的リンカーを有するZFNは、図10Bで下線が施されている。全体として、リンカー1e (配列番号12)、1f (配列番号54)、1d (配列番号56)、及び1c (配列番号55) を有するZFNは、可撓性リンカーを有するそれらの各宿主ZFNを超える1.8~2.8倍の遺伝子改変における平均増加へと導く。

【図11A - B】図11のパネルA及びBは、6つの宿主ZFNのモジュールサブセット間の2塩基対を読み飛ばすように選択された表示されたリンカーを含有するZFNについての、本発明の図9について記載されたような遺伝子改変研究の概要を示すパネルである。図11Aは、テストされる4つのリンカーのセット (可撓性、2f (配列番号69)、2d (配列番号70)、及び2e (配列番号71)) を有する各々のZFNについての遺伝子改変%の定量結果である。図11Bは、可撓性リンカー (TGGGSGGSQKP、配列番号14) に正規化された、この同一のデータを示し、並びに活性ZFN対の全体にわたる遺伝子改変における平均増加も示している。高発現条件 (実施例3を参照) を使用して生成された試料は、灰色で強調されている。遺伝子改変のレベルを2倍を超えるまで改善した例示的リンカーを有するZFNは、図11Bで下線が施されている。リンカー2f (配列番号69)、2d (配列番号70)、及び2e (配列番号71) を有するZFNは、可撓性リンカーを有するそれらの各宿主ZFNを超える1.5~2.0倍の遺伝子改変における平均増加へと導いた。

【図12】本発明の2塩基対ギャップをスパンするリンカーについての二次選択のために使用された宿主ZFP8196のアミノ酸配列を示す図である。アミノ酸配列は、単一文字コードで示されている。この配列は、アミノ末端 カルボキシ末端方向で表示されていて、これによって、タンパク質のアミノ末端が、図1の最初のメチオニンであり、並びにカルボキシ末端が、図4の最後のセリンとなる。「F1」 (配列番号130)、「F2」 (配列番号131)、「F3」 (配列番号132) 及び「F4」 (配列番号133) は、タンパク質の第1、第2、第3及び第4番目のフィンガーをそれぞれ示す。認識ヘリックスは四角で囲まれている。リンカーライブラリは、中心リンカー中の2つの残基に関するコドンを、5~7個の完全に無作為割付されたコドンの混合物で置き換えることによって、次に、得られたフェニルアラニン (F)、リジン (L)、又はチロシン (Y) 残基

10

20

30

40

50

のいずれかに1個のコドンが無作為割付することによって、並びに最後に、3個のコドン  
をアルギニン(R)、プロリン(P)、及びプロリン(P)に固定させることによって生  
成された。ライブラリーコドンは、(NNS)<sub>5-7</sub>及び(F/L/Y)によって示されて  
いる。

【図13A-B】本発明の2塩基対ギャップをスパンするリンカーに関する二次選択から  
のファージプールのギャップ選択性及びこの選択で取得されたクローンの結果的に得られ  
たアミノ酸配列を示すパネルである。図13Aは、表2C中の各ZFP8196標的への  
結合についてテストされた、2塩基対挿入ギャップ(ATAACTGdbCAAAAG  
GC(配列番号34)(表2))を有する標的を使用して、ZFP8196ライブラリー  
から選択されたファージプールを示している。各々のテストはまた、DNAへの非特異的  
結合並びに標的部位を包含しない陰性対照試料を除外するために、1つの他のホストZFP  
についての対照標的を包含する。各標的に結合されることに成功したファージの%が示  
されている。ファージプールは、選択の6ラウンドから取得されたものであった。保持効  
率が、先に記載されたように(Rebarら著、Method in Enzymology, 1996年(267):127~149頁)、実質的に決定された。図13Bは、  
2ZFP8196における二次選択からの塩基対ギャップを読み飛ばすように選択された  
リンカーのアミノ酸配列(配列番号175~210)を示している。選択されたリンカー  
は、プロリン及びアルギニンを豊富に含む(隈取りされて表示)。

【発明を実施するための形態】

【0015】

#### 詳細な説明

本明細書には、DNA結合ドメイン、特にジンクフィンガーモジュールを、他のジンク  
フィンガーモジュール連結させるための組成物が記載される。先に記載されたリンカーと  
は異なり、本明細書に記載のリンカーにより、1塩基対又は2塩基対のモジュールサブサ  
イト間にギャップを有する標的の優先的及び/又は選択的結合が可能となる。このリンカー  
はまた、現行のリンカー設計よりもより高い親和性で、1塩基対又は2塩基対ギャップ  
を有する標的を結合することが可能である。例示的リンカーが表11及び13に示されて  
いる。したがって、本明細書に記載のあるリンカーは、特異的標的部位に結合するジンク  
フィンガータンパク質を設計するための上記能力を著しく高め、これによって、これらの  
リンカーを含む融合タンパク質(例えば、ZFP-TF又はZFN)の活性を増加させる

【0016】

#### 概要

本明細書に開示された方法の実行、並びに組成物の調製及び使用は、特記されない限り  
、当業者の技術内であるような分子生物学、バイオ化学、クロマチン構造及び分析、計算  
化学、細胞培養、組換え体DNA及び関連分野の慣用的技術を採用する。これらの技法は  
、文献に完全な形で説明されている。例えば、Sambrookら著、MOLECULAR  
CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989年及び第3版  
、2001年; Ausubelら著、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987年及び定期的更新; METHOD IN ENZYMOLOGYシリー  
ズ、Academic Press, San Diego, 1998年; Wolffe  
著、CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, 第3版、Academic Press, San Diego, 1998年; METHOD IN  
ENZYMOLOGY, 第304巻、「Chromatin」(P.M. Wassarman及びA.P. Wolffe編集), Academic Press, San Diego, 1999年; 並びにMETHOD IN MOLECULAR BIOLOGY, 第119巻, 「Chromatin Protocols」(P.B. Becker  
編集) Humana Press, Totowa, 1999年を参照されたい。



## 【 0 0 1 7 】

## 定義

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、及び「オリゴヌクレオチド」は、互換的に用いられ、線状若しくは環状構造の、及び単鎖形若しくは二重鎖形のいずれかのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを指す。本開示の目的のために、これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定するものとみなされるべきではない。この用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体、並びに塩基、糖及び/又はリン酸部分（例えば、ホスホロオチオエート骨格）で改変されているヌクレオチドを包含し得る。概して、特定のヌクレオチドの類似体（analogue）は、同じ塩基対特異性をもつ、すなわちAの類似体はTと塩基対合する。

10

## 【 0 0 1 8 】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に用いられる。この用語はまた、その1つ以上のアミノ酸が、対応する天然発生型アミノ酸の化学的類似体又は改変された誘導体であるアミノ酸ポリマーに適用される。

## 【 0 0 1 9 】

例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、典型的には、1つのポリペプチドは第2のポリペプチドと実質的に同一である。タンパク質を説明する場合、「保存的置換」とは、そのタンパク質の活性を実質的に変更しないタンパク質のアミノ酸組成物での変化を指す。したがって、特定のアミノ酸配列の「保存的に改変された変形形態」とは、タンパク質活性に関して重要ではないようなアミノ酸の配列のアミノ酸置換を指すか、又は重要なアミノ酸の置換でさえも実質的に活性を変更しないように、同様な特性（例えば、酸性の、塩基性の、負荷電又は正荷電の、極性又は非極性のなど）を有する他のアミノ酸でのアミノ酸の置換を指す。機能的に同様なアミノ酸をもたらす保存的置換表は、当該分野で周知である。例えば、Creighton (1984年) Protein, W. H. Freeman and Companyを参照されたい。更には、コード化された配列内の単一のアミノ酸又はアミノ酸の少ない割合を変更、付加、又は欠失する個々の置換、欠失又は付加もまた、「保存的に改変された変形形態」である。

20

## 【 0 0 2 0 】

「結合」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、非共有結合的相互作用を指す。その相互作用が全体として配列特異的である限りにおいて、結合相互作用の全ての成分が配列特異的である（例えば、DNA骨格中のリン酸塩基と接触すること）必要はない。このような相互作用は、 $10^{-6} \text{M}^{-1}$ 又はそれ以下の解離定数（ $K_d$ ）によって概ね特徴付けられる。「親和性」は、結合の強度を指し、増大した結合親和性は、より低い $K_d$ によって定義される。

30

## 【 0 0 2 1 】

「結合タンパク質」は、別の分子に非共有結合的に結合することが可能なタンパク質である。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）及び/又はタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合し得る。タンパク質結合タンパク質の場合、結合タンパク質はそれ自体に結合し得（ホモ二量体、ホモ三量体などを形成するために）及び/又は1つの異なるタンパク質又はタンパク質（複数）の1つ以上の分子に結合し得る。結合タンパク質は、結合活性の1つ以上の型を有することができる。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、DNA結合活性、RNA結合活性及びタンパク質結合活性を有する。

40

## 【 0 0 2 2 】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」（又は結合ドメイン）は、1つ以上のジンクフィンガーにより配列特異的様式でDNAを結合するタンパク質、又はより大きなタンパク質内のドメインであり、このジンクフィンガーとは、その構造が亜鉛イオンの配位を通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。用語ジンクフィンガーDNA結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質又はZFPとしてしばしば略記さ

50

れる。

#### 【0023】

ジンクフィンガー結合ドメイン（例えば、ジンクフィンガーの認識領域）は、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作され」得る。ジンクフィンガータンパク質を操作するための方法の非限定的例は、設計及び選択である。設計されたジンクフィンガータンパク質は、その設計／組成物が、原則的に合理的な基準から生じる天然に存在しないタンパク質である。設計のための合理的基準は、現存するZFP設計及び結合データの情報を保存するデータベース内の処理情報に関する置換規則及びコンピュータ処理アルゴリズムの適用を包含する。例えば、米国特許第6,140,081号、同第6,453,242号、及び同第6,534,261号を参照されたく、並びに国際公開第98/53058号、同第98/53059号、同第02/016536号及び同第03/016496号もまた参照されたい。

10

#### 【0024】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質とは、その生成がファージ提示、相互作用捕捉又はハイブリッド選択などの経験的過程から主にもたらされる天然で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、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号及び同第6,200,759号、並びに国際公開第95/19431号、同第96/06166号、同第98/53057号、同第98/54311号、同第00/27878号、同第01/60970号、同第01/88197号及び同第02/099084号を参照されたい。

20

#### 【0025】

「調節ドメイン」又は「機能ドメイン」とは、DNA結合ドメイン、すなわちZFPに連結された場合、転写モジュレーション活性を有するタンパク質又はタンパク質ドメインを指す。典型的には、調節ドメインは、転写モジュレーションをもたらすために、ZFPに共有結合的に又は非共有結合的に連結されている（例えば、融合分子を形成するために）。調節ドメインは、活性化ドメイン又は抑制ドメインであり得る。活性化ドメインとしては、限定されるものではないが、VP16、VP64及び核因子カッパBのp65サブユニットが挙げられる。抑制ドメインとしては、限定されるものではないが、KRX、KRAB、MBD2B及びv-ErbAが挙げられる。追加的な調節ドメインとしては、例えば転写因子及びコファクター（例えば、MAD、ERD、SID、初期成長応答因子1、及び核ホルモンレセプター）、エンドヌクレアーゼ、インテグラーゼ、レコンビナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなどが挙げられる。アクチベーター及びリプレッサーには、コアクチベーター及びコリプレッサー（例えば、Utleeyら著、Nature 394:498~502頁（1998年））を含める。あるいは、ZFPは、転写モジュレーションをもたらすために、調節ドメインを有せずに単独で作用することができる。調節ドメインはまた、開裂ドメイン又は開裂ハーフドメインなどのヌクレアーゼであり得る。

30

#### 【0026】

「開裂」とは、DNA分子の共有結合骨格の切断を指す。開裂は、限定されるものではないが、ホスホジエステル結合の酵素的又は化学的加水分解が挙げられる種々の方法によって開始され得る。単鎖開裂及び二重鎖開裂の双方ともに可能であり、並びに二重鎖開裂は、2本の別個の単鎖開裂事象の結果として生じ得る。DNA開裂は、平滑末端又は付着末端のいずれかの生成をもたらすことができる。ある実施形態では、融合ポリペプチドは、標的二重鎖DNA開裂のために用いられる。

40

#### 【0027】

「開裂ハーフドメイン」とは、ポリペプチド配列であり、これは第2のポリペプチド（同一又は異なるポリペプチドのいずれか）と併せて、開裂活性（好ましくは二重鎖開裂活性）を有する複合体を形成する。用語「第1及び第2の開裂ハーフドメイン」、「+及び-開裂ハーフドメイン」、並びに「右及び左開裂ハーフドメイン」は、二量体化された開裂ハーフドメインの対を指すように互換的に使用される。

50

## 【 0 0 2 8 】

「操作された開裂ハーフドメイン」とは、別の開裂ハーフドメイン（例えば、別の操作された開裂ハーフドメイン）と共に絶対的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。その全体が参照により本明細書に組み込まれた、米国特許公開第 2 0 0 5 0 0 6 4 4 7 4 号及び国際公開第 2 0 0 7 / 1 3 9 8 9 号もまた参照されたい。

## 【 0 0 2 9 】

「クロマチン」とは、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、一次 DNA、並びにヒストン及び非ヒストン染色体タンパク質を包含するタンパク質を含む。真核細胞クロマチンの大部分は、ヌクレオソームの形で存在し、その中でヌクレオソーム核は、それぞれのヒストン H 2 A、H 2 B、H 3 及び H 4 の 2 つを含む八量体に結合された DNA の約 1 5 0 個の塩基対を含み、並びにリンカー DNA（生物体に依存して種々の長さの）が、ヌクレオソーム核の間に延びている。ヒストン H 1 の 1 つの分子は、一般的にリンカー DNA と結びついている。本開示の目的のために、用語「クロマチン」は、原核細胞及び真核細胞の双方で、細胞ヌクレオソームの全ての型を包含することを意味する。細胞クロマチンには、染色体クロマチン及びエピソームクロマチンの両方を含める。

10

## 【 0 0 3 0 】

「染色体」とは、細胞のゲノムの全て又はその一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、その核型によってしばしば特性評価され、これは、細胞のゲノムを含む全ての染色体の集合体である。細胞のゲノムは、1 つ以上の染色体を含むことができる。

20

## 【 0 0 3 1 】

「エピソーム」とは、複製する核酸、核タンパク質複合体又は細胞の染色体の核型の一部ではない核酸を含む他の構造である。エピソームの例としては、プラスミド及び特定のウィルスゲノムが挙げられる。

## 【 0 0 3 2 】

「アクセス可能な領域」とは、細胞染色体内にある部位であり、核酸内に存在する標的部位が、その標的部位を認識する外因性分子によって結合され得る。いかなる特定の理論によって束縛されることは望まないが、アクセス可能な領域は、ヌクレオソーム構造中に収容されていない領域であると考えられる。アクセス可能な領域の明確な構造は、例えば、ヌクレアーゼなどの化学的及び酵素的プローブに対する感応性によって頻繁に検出され得る。

30

## 【 0 0 3 3 】

「標的部位」又は「標的配列」とは、結合のための十分な条件が存在するならば、結合分子がそれに結合するであろう核酸の一部を画定する核酸配列である。例えば、配列 5' - G A A T T C - 3' は、E c o R I 制限エンドヌクレアーゼのための標的部位である。

## 【 0 0 3 4 】

「モジュールサブサイト」とは、結合のための十分な条件がもたらされた場合、それにより大きなジンクフィンガー DNA 結合タンパク質内のジンクフィンガーモジュール（例えば、1、2、3 個又はそれ以上のジンクフィンガー）が結合するであろう核酸の一部を画定する核酸配列である。

40

## 【 0 0 3 5 】

「外因性」分子とは、細胞内に通常存在しないが、1 つ以上の遺伝的方法、生化学的方法又は他の方法によって細胞内に導入され得る分子である。「細胞内に通常存在する」は、細胞の特定の発生段階及び環境条件に関して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生中にだけ存在する分子は、成人筋肉細胞に関しては外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導された分子は、非熱ショック細胞に関しては外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不良な内因性分子の機能する変型、正常に機能する内因性分子の機能不良変型又はオルソローグ（異種からの内因性分子の機能する変型）を含むことが

50

できる。

【0036】

外因性分子は、とりわけ、組み合わせ化学プロセスによって生成されるような小分子、又はタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖類、上記分子の任意の改変誘導体、又は1つ以上の上記分子を含む任意の複合体などの巨大分子であり得る。DNA及びRNAを含める核酸は、単鎖又は二重鎖であり得、線状、分岐状又は環状であり得、又、任意の長さであり得る。核酸としては、二重鎖を形成可能な核酸、並びに三重鎖形成核酸が挙げられる。例えば、米国特許第5,176,996号及び同第5,422,251号を参照されたい。タンパク質としては、限定されるものではないが、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチン再構成因子、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、インテグラーゼ、レコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ギラーゼ及びヘリカーゼが挙げられる。

10

【0037】

外因性分子は、内因性分子、例えば外因性タンパク質又は核酸などの、内因性分子と同一型であり得る。例えば、外因性核酸は、感染ウィルスゲノム、細胞内に導入されたプラスミド若しくはエピソーム、又は細胞内に通常存在しないような染色体を含み得る。外因性分子の細胞内への導入方法は当業者に既知であり、限定されるものではないが、脂質仲介輸送（すなわち、天然脂質及びカチオン性脂質を含めるリポソーム）、電気穿孔法、直接注入法、細胞融合、粒子照射、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン仲介輸送及びウィルスベクター仲介輸送が挙げられる。

20

【0038】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下、特定の発生段階にて特定の細胞内に通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリアのゲノム、葉緑体若しくは他の細胞内小器官、又は天然発生型エピソーム核酸を含むことができる。追加的な内因性分子としては、例えば、転写因子及び酵素を挙げることができる。

【0039】

「融合」分子とは、その中で2つ以上のサブユニット分子が、好ましくは共有結合で連結されている分子である。このサブユニット分子は、分子の同一の化学的型であり得、又は分子の異なる化学的型であり得る。融合分子の第1の型としては、限定されるものではないが、融合タンパク質（例えば、ZEP DNA結合ドメインと開裂ドメインとの間の融合）及び融合核酸（例えば、前述の融合タンパク質をコードする核酸）が挙げられる。融合分子の第2の型の例としては、限定されるものではないが、三重鎖形成核酸と1つのポリペプチドとの間の融合、及び小溝結合剤と核酸との間の融合が挙げられる。

30

【0040】

細胞内での融合タンパク質の発現は、この融合タンパク質の細胞への送達による、又はこ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る結果生じ得、ここにおいて、このポリヌクレオチドが転写され、次いで転写物が翻訳され、融合タンパク質を生成する。トランススプライシング、ポリペプチド開裂及びポリペプチド連結もまた、細胞内でのタンパク質の発現に含まれ得る。細胞へのポリヌクレオチド及びポリペプチド送達に関する方法は、本開示の別の箇所にて提示されている。

40

【0041】

本開示の目的のために、「遺伝子」とは、遺伝子産物（以下を参照）をコードするDNA領域、並びに遺伝子産物の生成を調節する全てのDNA領域（このような調節配列が、コード化配列及び/又は転写された配列に隣接していようがいまいが）が挙げられる。したがって、遺伝子としては、限定されるものではないが、プロモーター配列、ターミネーター、リボソーム結合部位及び内部リボソーム侵入部位などの翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター、境界因子、複製開始点、マトリックス付着部位及び遺伝子座制御領域が挙げられる。

【0042】

50

「遺伝子発現」とは、遺伝子内に封入された情報の遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA又はRNAの任意の他の型）又はmRNAの翻訳によって生成されたタンパク質であり得る。遺伝子産物はまた、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、及びエディティングによって改変されるRNA、並びに、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、ミリスチル化、及びグリコシル化によって改変されたタンパク質が挙げられる。

【0043】

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とは、限定されるものではないが、遺伝子活性化及び遺伝子抑制が挙げられ得る。遺伝子不活性化とは、本明細書に記載のZFPを含まない細胞と比較した場合の遺伝子発現における任意の減少を指す。したがって、遺伝子不活性化は、部分的又は完全

10

【0044】

「真核」細胞とは、限定されるものではないが、菌類細胞（酵母など）、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞及びヒト細胞（例えば、T細胞）が挙げられる。

【0045】

「対象領域」とは、例えば、外因性分子に結合することが望ましいような、遺伝子内又はその遺伝子に隣接する遺伝子又は非コード化配列などの細胞クロマチンの任意の領域である。結合は、標的DNA開裂及び/又は標的組換えのためであり得る。対象領域は、例えば、染色体、エピソーム、細胞内小器官ゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）、又は感染ウィルスゲノム中に存在し得る。対象領域は、遺伝子のコード化領域内、例えば先導配列、トレーラー配列若しくはイントロンなどの転写された非コード領域内、又はコード領域の上流若しくは下流のいずれかの非転写領域内であり得る。対象領域は、長さで20,000ヌクレオチド対までの単ヌクレオチド対、又はヌクレオチド対の任意の整数値、又は最大で染色体の長さほどであり得る。対象領域は、連続的核酸配列だけを含む必要はない。

20

【0046】

用語「作動可能な連結（operative linkage）」及び「作動可能に連結された（operatively linked）」（「作動可能に連結された（operably linked）」）とは、両構成要素が正常に機能し、又、その構成要素の少なくとも1つが、他の構成要素の少なくとも1つに及ぼされる機能を仲介し得るように構成要素が配置されている、2つ以上の構成要素（配列要素など）の並置に関して互換的に用いられる。実例として、1つ以上の転写調節因子の存在又は不在にตอบสนองして、転写調節配列がコード化配列の転写のレベルを制御する場合、プロモーターなどの転写調節配列が、コード化配列に作動可能に連結される。転写調節配列は、コード化配列と概ねシスで作動可能に連結されるが、これに直接的に隣接する必要はない。例えば、エンハンサーは、それらが連続的でなくとも、コード化配列に作動可能に連結される転写調節配列である。

30

【0047】

融合ポリペプチドに関して、用語「作動可能に連結された」とは、構成要素のそれぞれが、このように連結されなかった場合と同様に、他の構成要素への連結において同一の機能を実行する。例えば、ZEP DNA結合ドメインが開裂ドメインに融合されているような融合ポリペプチドに関して、この融合ポリペプチドにて開裂ドメインが標的部位の近くでDNAを開裂させることが可能であると同時に、このZFP DNA結合ドメイン部分がその標的部位及び/又はその結合部位に結合することができる場合、このZEP DNA結合ドメイン及び開裂ドメインは、作動可能な連結の状態にある。

40

【0048】

タンパク質、ポリペプチド又は核酸の「機能的断片」とは、その配列が完全長のタンパク質、ポリペプチド又は核酸に同一ではないが、完全長のタンパク質、ポリペプチド又は核酸の1つ以上の機能を維持しているタンパク質、ポリペプチド又は核酸である。機能的

50

断片は、対応する天然分子よりも多い、少ない、又は同一の数の残基を所有し得、及び／又は1つ以上のアミノ酸置換若しくはヌクレオチド置換を含有し得る。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、当該技術分野では周知である。同様に、タンパク質機能を決定する方法も周知である。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、電気泳動移動シフト、又は免疫沈降アッセイによって決定される。DNA開裂は、ゲル電気泳動によって検定される。上記のAusubelら著の文献を参照されたい。別のタンパク質と相互作用するタンパク質の能力は、例えば、遺伝的又は生化学的方法の双方で、共免疫沈降法、2種ハイブリッドアッセイ又は相補性によって決定され得る。例えば、Fieldsら著（1989年）Nature 340:245~246頁、米国特許第5,585,245号及びPCT国際公開第98/44350号を参照されたい。

10

## 【0049】

## リンカー

本明細書に記載されたものは、DNA結合モジュール（例えば、ジンクフィンガーモジュール）を互いに対して融合（連結）させるアミノ酸配列である。本明細書に記載のリンカーを使用して融合されたジンクフィンガーモジュールは、1、2、3、4つ又はそれ以上のジンクフィンガーを含有してよい。ある実施形態において、ジンクフィンガーモジュールは、1、2、又は3つのジンクフィンガーを含有し、一緒に連結される場合、それらは3つまたはそれ以上のフィンガーのジンクフィンガータンパク質を形成する。

## 【0050】

20

本明細書に記載のリンカー配列は、ジンクフィンガー中のヘリックスの最後の残基と次のジンクフィンガー中のシートの最初の残基との間に延びている。したがって、このリンカー配列は、2つのジンクフィンガーを一緒に連結する。典型的には、ジンクフィンガー中の最後の（C末端）アミノ酸は、C末端亜鉛配位残基であり、一方芳香族残基（例えばPhe）は、典型的には次のジンクフィンガーの最初のアミノ酸である。したがって、「野生型」ジンクフィンガーでは、スレオニンがリンカーの最初の残基であり、プロリンがリンカーの最後の残基である。故に、例えば、Zif268に対するカノニカルリンカー配列は、TG(E/Q)(K/R)P（配列番号129）である。例えば、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号及び同第7,153,949号を参照されたい。

30

## 【0051】

更なるリンカーが、例えば米国特許公開第20030119023号に記載され、複数のグリシン残基（例えば、TGGGGSQKP（配列番号2）、TGGGGSGGSQKP（配列番号14）及びTGGGGSGGSQKP（配列番号15）、TGGGSKP（配列番号16）、TGGQKP（配列番号17）、TGGSGGSKP（配列番号18）、TGGSGQKP（配列番号19）、TGGSGGSGGSKP（配列番号20）、及びTGGSGGSGGQKP（配列番号21）を含むリンカーが記載されている。

## 【0052】

典型的には、リンカーは、そのリンカーをコードする組換え体核酸と、そのリンカーアミノ酸配列により融合されている核酸結合モジュールとを使用して作製される。リンカーはまた、ペプチド合成を用いて作られ、次いで核酸結合モジュールに連結されてもよい。核酸の操作法及びペプチド合成法は、当該技術分野で既知である（例えば、Maniatisら著、1991年、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照）。

40

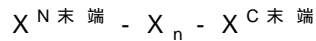
## 【0053】

本明細書に記載のリンカーは、先に使用されたリンカーよりもより厳密（rigid）であり、サブサイトが特定数の塩基対によって分離される場合だけに、各ジンクフィンガーとその標的部位とが効率的に結合することが可能となる。

## 【0054】

50

したがって、先行のリンカーとは異なり、本明細書に記載のリンカーは、少なくとも1つの内部残基又はN末端プロリン残基、すなわち、リンカーのC末端ではないプロリン残基を含む。本明細書に記載のリンカーは、次の一般アミノ酸構造：



(式中、Xは任意のアミノ酸残基であり、 $X_n$ は少なくとも3個のアミノ酸残基と少なくとも1個の $X^{N\text{末端}}$ を含み、並びに $X_n$ はプロリン残基を含む)

を有する。このようなリンカーの非限定的例が、表4、5、6、9、10、11又は13中に示されている。更には、本明細書に記載のリンカーはまた、少なくとも2個の塩基残基、例えば1個以上のアルギニン残基、1個以上のヒスチジン残基、1個以上のリジン残基又はこれらの組み合わせを典型的に含む。

10

#### 【0055】

本発明のリンカーは、典型的には、長さで5個又はそれ以上のアミノ酸の、任意の長さであり得る。ある実施形態では、このリンカーは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上の個数のアミノ酸長である。

#### 【0056】

#### DNA結合モジュール

本明細書に記載のリンカー配列は、DNA結合モジュールを連結させるために好都合に用いられる。

#### 【0057】

任意のDNA結合ドメインが、本明細書で開示された方法で使用され得る。ある実施形態では、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、選択の標的部位に結合するよう操作されているという点で、非天然発生型である。例えば、Beerliら著、(2002年) Nature Biotechnol. 20:135~141頁; Paboら著(2001年) Ann. Rev. Biochem. 70:313~340頁; Isalanら著(2001年) Nature Biotechnol. 19:656~660頁; Segalら著(2001年) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632~637頁; Choら著(2000年) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411~416頁を参照されたい。操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然発生型ジンクフィンガータンパク質に比べて、新規の結合特異性を有し得る。操作法としては、限定されるものではないが、合理的設計及び選択の種々の型が挙げられる。合理的設計としては、例えば、三重鎖(又は四重鎖)ヌクレオチド配列と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ものが挙げられ、そこにおいて、それぞれの三重鎖又は四重鎖ヌクレオチド配列は、特定の三重鎖又は四重鎖配列を結合するジンクフィンガーの1個以上のアミノ酸配列に関連付けられている。例えば、それらの全体を参照により本明細書に組み込んだ、共同所有の米国特許第6,453,242号及び同第6,534,261号を参照されたい。

20

30

#### 【0058】

例示的选择方法としては、ファージディスプレイ及び2種ハイブリッドシステムが挙げられ、これらは、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号及び同第6,242,568号、並びに国際公開第98/37186号、同第98/53057号、同第00/27878号、同第01/88197号及び英国特許第2,338,237号に開示されている。更には、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の強化が、例えば共同所有の国際公開第02/077227号に記載されている。

40

#### 【0059】

標的部位、すなわちZFPの選択並びに融合タンパク質(及び融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド)の設計及び構築のための方法は、当業者に既知であり、本明細書

50

にその全体を参照として組み込んだ、米国特許出願公開第20050064474号及び同第20060188987号に詳しく記載されている。

【0060】

更には、これらの参照及び他の参照に開示されているように、ジンクフィンガードメイン及び/又は複数フィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば、長さが5個又はそれ以上のアミノ酸のリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を使用して、一緒に連結されてもよい。長さが6個又はそれ以上のアミノ酸の例示的リンカー配列に関しては、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、及び同第7,153,949号もまた参照されたい。本明細書に記載のタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間で、好適なリンカーの任意の組み合わせを含んでもよい。

10

【0061】

あるいは、DNA結合ドメインは、ヌクレアーゼから誘導され得る。例えばI-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII及びI-TevIIIなどの、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼの認識配列が既知である。米国特許第5,420,032号、同第6,833,252号、Belfortら著(1997年)Nucleic Acids Res. 25:3379~3388頁、Dujonら著(1989年)Gene 82:115-118頁、Perlerら著(1994年)Nucleic Acids Res. 22:1125~1127頁、Jasin著(1996年)Trends Genet. 12:224-228頁、Gimbleら著(1996年)J. Mol. Biol. 263:163-180頁、Argastら著(1998年)J. Mol. Biol. 280:345-353頁及びNew England Biolabsカタログもまた参照されたい。更に、ホーミングエンドヌクレアーゼ及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操作され得る。例えば、Chevalierら著(2002年)Molec. Cell 10:895-905頁、Epinatら著(2003年)Nucleic Acids Res. 31:2952-2962頁、Ashworthら著(2006年)Nature 441:656-659頁、Paquesら著(2007年)Current Gene Therapy 7:49-66頁、及び米国特許出願公開第20070117128号を参照されたい。

20

30

【0062】

いくつかの実施形態において、DNA結合ドメインは、植物病原菌キサントモナス(Xanthomonas)由来のTALエフェクター(TALE)からの操作されたドメインであり(Millerら著(2010年)Nature Biotechnology, 12月22日、22[印刷に先駆け電子書籍公開]、Bochら著(2009年)Science 29、2009年10月(10.1126/science.117881)及びMoscou及びBogdanove著(2009年)Science 29、2009年10月(10.1126/science.1178817)を参照)、また更に、その開示が参照としてその全体が本明細書に組み込まれた、2010年5月17日に出願された米国特許仮出願第61/395,836号、2010年8月21日に提出された同第61/409,421号、2010年10月13日に提出された同第61/45,121号、2010年12月20日に提出された同第61/459,891号、2011年2月2日に提出された米国特許出願第61/462,482号、2011年3月24日に提出された同第61/465,869号を参照されたい。

40

【0063】

調節ドメイン

本明細書に記載の連結されたジンクフィンガーモジュールは、融合タンパク質としての外因性ドメイン(又はその機能的断片)でしばしば発現される。ZFPに付加するための通常の調節ドメインとしては、例えば、転写因子ドメイン(アクチベーター、レプレッサー、コアクチベーター、コレプレッサー)サイレンサー、癌遺伝子(例えば、myc、j

50



un、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、mos 族のメンバーなど)、DNA 修復酵素及びそれらに関連する因子及び修飾子、DNA 再構成酵素及びそれらに関連する因子及び修飾子、クロマチン関連タンパク質及びそれらの修飾子(例えばキナーゼ、アセチラーゼ及びデアセチラーゼ)、及びDNA 修飾酵素(例えば、メチルトランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ)並びにそれらに関連する因子及び修飾子が挙げられる。

#### 【0064】

遺伝子の発現を抑制するために使用される、例えばZFPなどのDNA結合ドメインと融合するための例示的な機能ドメインは、ヒトKRX-1タンパク質からのKRAB抑制ドメインである(例えば、Thiesenら著、New Biologist 2:363-374頁(1990年)、Margolinら著、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4509~4513頁(1994年)、Pengueら著、Nucl. Acids Res. 22:2908-2914頁(1994年)、Witzgallら著、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4514~4518頁(1994年)を参照されたい)。別の好適な抑制ドメインは、メチル結合ドメインタンパク質2B(MBD-2B)である(MBDタンパク質の記載に関しては、Hendrichら著(1999年)Mamm. Genome 10:906~912頁をまた参照されたい)。別の有用な抑制ドメインは、v-ErbAタンパク質に関連するものである。例えば、Dammら著(1989年)Nature 339:593~597頁、Evans著(1989年)Int. J. Cancer Suppl. 4:26~28頁、Painら著(1990年)New Biol. 2:284~294頁、Sapら著(1989年)Nature 340:242~244頁、Zenkeら著(1988年)Cell 52:107~119、及びZenkeら著(1990年)Cell 61:1035~1049頁を参照されたい。

#### 【0065】

更なる例示的抑制ドメインとしては、限定されるものではないが、KRAB(「KRX」としても呼ばれる)、SID、MBD2、MBD3、DNMT族のメンバー(例えば、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B)、Rb、MeCP2が挙げられる。例えば、Birdら著(1999年)Cell 99:451~454頁、Tylerら著(1999年)Cell 99:443~446、Knoepflerら著(1999年)Cell 99:447~450頁、及びRobertsonら著(2000年)Nature Genet. 25:338~342頁を参照されたい。追加の例示的抑制ドメインとしては、限定されるものではないが、ROM2及びAtHD2Aが挙げられる。例えば、Chemら著(1996年)Plant Cell 8:305~321頁及びWuら著(2000年)Plant J. 22:19~27頁を参照されたい。

#### 【0066】

活性化を達成するための好適なドメインとしては、HSV VP16活性化ドメイン(例えば、Hagmannら著、J. Virol. 71:5952~5962頁(1997年)を参照)核ホルモンレセプター(例えばTorchiaら著、Curr. Opin. Cell Biol. 10:373~383頁(1998年)を参照)、核因子カッパBのp65サブユニット(Bitko及びBarik著、J. Virol. 72:5610~5618頁(1998年)及びDoyle及びHunt著、Neuroreport 8:2937~2942頁(1997年)、Liuら著、Cancer Gene Ther. 5:3~28頁(1998年))、又はVP64などの人工キメラ型機能ドメイン(Seifpalら著、EMBO J. 11:4961~4968頁(1992年))が挙げられる。更なる例示的活性化ドメインとしては、限定されるものではないが、VP16、VP64、p300、CBP、PCAF、SRC1、PvALF、AtHD2A及びERF-2が挙げられる。例えば、Robyrら著(2000年)

10

20

30

40

50

Mol. Endocrinol. 14:329~347頁、Collingwoodら著(1999年)J. Mol. Endocrinol. 23:255~275、Leoら著(2000年)Gene 245:1-11頁、Manteuffel-Cymborowska著(1999年)Acta Biochim. Pol. 46:77-89頁、McKennaら著(1999年)J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69:3-12頁、Malikら著(2000年)Trends Biochem. Sci. 25:277~283頁、及びLemonら著(1999年)Curr. Opin. Genet. Dev. 9:499~504頁を参照されたい。更なる例示的活性化ドメインとしては、OSGAI、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、-6、-7、及び-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP / GP、及びTRAB1が挙げられるが、限定されるものではない。例えば、Ogawaraら著(2000年)Gene 245:21~29頁、Okunamiら著(1996年)Genes Cells 1:87~99頁、Goffら著(1991年)Genes Dev. 5:298~309頁、Choら著(1999年)Plant Mol. Biol. 40:419~429頁、Ulmasonら著(1999年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5844~5849頁、Sprenger-Hausseelsら著(2000年)Plant J. 22:1~8頁、Gongら著(1999年)Plant Mol. Biol. 41:33~44頁、及びHoboら著(1999年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15,348~15,353頁を参照されたい。

10

20

#### 【0067】

ある実施形態では、調節ドメインは、ヌクレアーゼ(例えば、開裂ドメイン)を含む。このような操作されたヌクレアーゼは、標的ヌクレオチド配列で二重鎖切断を作り出すよう使用され得、これは、1000倍を超える標的遺伝子座(標的組み込み)での相同組換えを介するドナー核酸導入の頻度を増大させる。更には、非相同末端結合(NHEJ)による部位特異的DSBの不正確な複製はまた、遺伝子破壊をもたらす。ヌクレアーゼは、細胞系工学並びに治療的用途のような広範な種々の目的のために使用され得る。

#### 【0068】

本明細書に開示された融合タンパク質の開裂ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼから得られ得る。開裂ドメインがそれから誘導され得る例示的エンドヌクレアーゼとしては、制限エンドヌクレアーゼ及びホーミングエンドヌクレアーゼが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、2002~2003年カタログ、New England Biolabs、Beverly, MA及びBelfortら著(1997年)Nucleic Acids Res. 25:3379~3388頁を参照されたい。DNAを開裂させる更なる酵素は既知である(例えば、S1ヌクレアーゼ、大豆ヌクレアーゼ、脾臓DNase I、小球菌ヌクレアーゼ、酵母HOエンドヌクレアーゼなどで、Linnら著(編集)Nuclease, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1993年)もまた参照されたい)。これらの酵素(又はその機能的断片)の1つ以上は、開裂ドメイン及び開裂ハーフドメインの供給源として使用され得る。

30

40

#### 【0069】

同様に、開裂ハーフドメインは、上述したように、開裂活性のために二量体化が必要とされる任意のヌクレアーゼ又はその一部から誘導され得る。一般的に、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のために必要である。あるいは、2つの開裂ハーフドメインを含む単一タンパク質が使用され得る。この2つの開裂ドメインは、同一のエンドヌクレアーゼ(又はその機能的断片)から誘導され得るか、又は各開裂ハーフドメインが、異なるエンドヌクレアーゼ(又はその機能的断片)から誘導され得る。

#### 【0070】

更には、2つの融合タンパク質のための標的部位が、互いに対して配置されることが好

50

ましく、これによって、2つの融合タンパク質のそれらの各標的部位への結合が、例えば二量体化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ように、互いに対して空間的配向で開裂ハーフドメインを配置させることになる。したがって、ある実施形態では、標的部位の端部付近が5～8個のヌクレオチド又は15～18個のヌクレオチドによって分離されている。しかしながら、いかなる整数のヌクレオチド又はヌクレオチドも、2つの標的部位間に介在することができる（例えば2～50個のヌクレオチド対またはそれ以上）。概して、開裂の部位は、標的部位間にある。

#### 【0071】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は、多くの種で存在し、DNAへの配列特異的結合（認識部位にての）及び結合の部位又はその付近でDNAを開裂させることが可能である。ある制限酵素（例えば、IIS型）は、認識部位から取り除かれた部位にてDNAを開裂し、また分離可能な結合ドメイン及び開裂ドメインを有する。例えば、IIS型酵素FokIは、1つの鎖上でその認識部位から9ヌクレオチドの位置で、またもう一方の鎖上でその認識部位から13ヌクレオチドの位置で、DNAの二重鎖開裂を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号、同第5,436,150号及び同第5,487,994号、並びにLiら著（1992年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275～4279頁、Liら著（1993年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764～2768頁、Kimら著（1994a）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883～887、Kimら著（1994b）J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982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、少なくとも1つのIIS型制限酵素からの開裂ドメイン（又は開裂ハーフドメイン）と、操作されても操作されなくともよい1つ以上のジンクフィンガー結合ドメインとを含む。

#### 【0072】

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IIS型制限酵素は、FokIである。この特別な酵素は、二量体として活性である（Bitinaiteら著（1998年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570～10,575頁を参照）。したがって、本開示の目的のために、開示された融合タンパク質で使用されるFokI酵素の一部が、開裂ハーフドメインであると考えられる。このようなことから、ジンクフィンガー-FokI融合を用いる細胞配列の標的二重鎖開裂及び/又は標的置換については、それぞれがForkI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。別の方法としては、1つのジンクフィンガー結合ドメインと2つのFokI開裂ハーフドメインとを含有する単一のポリペプチド分子がまた使用され得る。ジンクフィンガー-FokI融合を使用する標的開裂及び標的配列変更に関するパラメータは、本開示の別の箇所提供される。

#### 【0073】

開裂ドメイン又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、又は多量体化（例えば二量体化）のため能力を保持するタンパク質の任意の部分であり得る。

#### 【0074】

例示的IIS型制限酵素は、その全体を参照により本明細書に組み込んだ、国際公開第07/014275号に記載されている。更なる制限酵素は、分離可能な結合及び開裂ドメインも含有し、これらは本開示によって意図されたものである。例えば、Robertssら著（2003年）Nucleic Acids Res. 31:418～420頁を参照されたい。

#### 【0075】

ある実施形態において、それらの全ての開示を参照としてその全体を本明細書に組み込んだ、例えば米国特許公開第20050064474号及び同第20060188987号、並びに米国特許出願第11/805,850号（2007年5月23日出願）に記載

10

20

30

40

50

されているように、ホモ二量体化を最小化又は防止するために、開裂ドメインは、1つ以上の操作された開裂ハーフドメイン（二量体化ドメイン変異体とも呼ばれる）を含む。F o k I の 4 4 6、4 4 7、4 7 9、4 8 3、4 8 4、4 8 6、4 8 7、4 9 0、4 9 1、4 9 6、4 9 8、4 9 9、5 0 0、5 3 1、5 3 4、5 3 7、及び 5 3 8 位のアミノ酸残基は、F o k I 開裂はハーフドメインの二量体化に影響を及ぼす全ての標的である。

#### 【0076】

例示的な絶対ヘテロ二量体を形成する F o k I の操作された開裂ハーフドメインは、その中で第1の開裂ハーフドメインが、F o k I の 4 9 0 位と 5 3 8 位のアミノ酸残基で突然変異を含み、第2の開裂ハーフドメインが、4 8 6 位と 4 9 9 位のアミノ酸残基で突然変異を含む1つの対を含有する。

#### 【0077】

したがって、一実施形態において、4 9 0 位での突然変異は G l u ( E ) を L y s ( K ) で置き換え、5 3 8 位での突然変異は I s o ( I ) を L y s ( K ) で置き換え、4 8 6 位での突然変異は G l n ( Q ) を G l u ( E ) で置き換え、また 4 9 9 位での突然変異は I s o ( I ) を L y s ( K ) で置き換える。特に、本明細書に記載された操作された開裂ハーフドメインは、「E 4 9 0 K : I 5 3 8 K」で示される操作された開裂ハーフドメインを生成するために、1つの開裂ハーフドメイン中の 4 9 0 位 ( E K ) 及び 5 3 8 位 ( I K ) を突然変異させることによって、及び「Q 4 8 6 E : I 4 9 9 L」で示される操作された開裂ハーフドメインを生成するために、別の開裂ハーフドメイン中の 4 8 6 位 ( Q E ) 及び 4 9 9 位 ( I L ) を突然変異させることによって調製された。本明細書に記載された操作された開裂ハーフドメインは、その中で異常な開裂が最小化又は消失されている絶対ヘテロ二量体変異体である。例えば、国際公開第 0 7 / 1 3 9 8 9 8 号の実施例 1 を参照されたい。ある実施形態では、操作された開裂ハーフドメインは、4 8 6、4 9 9 及び 4 9 6 位（野生型 F o k I に関して番号付けされた）での突然変異を含み、例えば、4 8 6 位の野生型 G l n ( Q ) 残基を G l u ( E ) 残基で置き換え、4 9 9 位の野生型 I s o ( I ) 残基を L e u ( L ) 残基で置き換え、並びに 4 9 6 位の A s n ( N ) 残基を A s p ( D ) 又は G l u ( E ) 残基で置き換えたものである（それぞれ「E L D」及び「E L E」ドメインとも呼ばれる）。他の実施形態では、操作された開裂ハーフドメインは、4 9 0、5 3 8 及び 5 3 7 位（野生型 F o k I に関して番号付けされた）にての突然変異を含み、例えば、4 9 0 位の野生型 G l u ( E ) 残基を L y s ( K ) 残基で置き換え、5 3 8 位の野生型 I s o ( I ) 残基を L y s ( K ) 残基で置き換え、及び 5 3 7 位の H i s ( H ) 残基を L y s ( K ) 残基又は A r g ( R ) 残基で置き換えたものである（それぞれ「K K K」及び「K K R」ドメインとも呼ばれる）。他の実施形態では、操作された開裂ハーフドメインは、4 9 0 及び 5 3 7 位（野生型 F o k I に関して番号付けされた）にての突然変異を含み、例えば、4 9 0 位での野生型 G l u ( E ) 残基を L y s ( K ) 残基で置き換え、並びに 5 3 7 位の H i s ( H ) 残基を L y s ( K ) 残基又は A r g ( R ) 残基で置き換えたものである（それぞれ「K I K」及び「K I R」ドメインとも呼ばれる）（米国特許出願第 1 2 / 9 3 1 , 6 6 0 号を参照されたい）。

#### 【0078】

本明細書に記載の操作された開裂ハーフドメインは、例えば、米国特許公開第 2 0 0 5 0 0 6 4 4 7 4 号（例えば実施例 5 を参照）及び国際公開第 0 7 / 1 3 9 8 9 8 号に記載されているような、野生型開裂ハーフドメイン（F o k I）の位置指示突然変異生成によるような、任意の好適な方法を用いて調製され得る。

#### 【0079】

あるいは、いわゆる「スプリット酵素」技術（米国特許公開第 2 0 0 9 0 0 6 8 1 6 4 号を参照）を使用して、核酸標的部位にてインビボでヌクレアーゼが組み立てられてもよい。このようなスプリット酵素の構成成分は、別個の発現構成上のいずれかで発現されてもよく、又は、例えば自己開裂 2 A ペプチド若しくは I R E S 配列によって個々の構成成分が分離されているところの1つのオープンリーディングフレーム内に連結され得る。構成成分は、個々のジンクフィンガー結合ドメイン又はメガヌクレアーゼ核酸結合ドメイン

10

20

30

40

50

のドメインであってよい。

#### 【0080】

融合分子は、当業者に周知であるクローニング及び生化学的接合の方法によって構築される。融合タンパク質は、DNA結合ドメインと機能ドメイン（例えば転写活性化又は抑制ドメイン）とを含む。融合分子は、必要に応じて、核局在化シグナル（例えば、SV40メディウムT抗原からのシグナルなど）とエピトープタグ（例えば、FLAG及びヘマグルチニンなど）とを更に含む。融合タンパク質（及びそれらをコードする核酸）は、翻訳リーディングフレームが融合の構成成分中に保存されるように設計される。

#### 【0081】

このような用途では、当業者に既知のように、融合分子は薬学的に許容可能なキャリアで典型的に製剤化される。例えばRemingtonのPharmaceutical Sciences, 第17版、(1985年)及び共同所有の国際公開第00/42219号を参照されたい。

#### 【0082】

キット

本明細書に記載のリンカーのいずれかを含み及び/又は上記の方法のいずれかを実施するキットもまた提供する。このキットは、本明細書に記載のリンカー配列（又は本明細書に記載のリンカーをコードするポリヌクレオチド）を典型的に含有する。このキットは、リンカー単独を供給してもよく、又はDNA結合ドメイン及び/又は選択のヌクレアーゼが容易にその中に挿入されるようなベクター供給してもよい。このキットはまた、細胞、細胞の形質転換のための緩衝液、細胞のための培養基、及び/又はアッセイを実行するための緩衝液を具備することができる。典型的には、このキットはまた、キットの他の構成成分に貼付されるか又は別様に添付する取扱説明書、包装材料又は製品宣伝リーフレットなどの任意の材料を含むラベルも具備する。

#### 【0083】

用途

開示されたリンカーは、操作されたジンクフィンガータンパク質のための標的部位の許容範囲を増強させるために有効に用いられる。例えば、本明細書に記載のリンカーは、モジュールサブサイトが隣接していない場合、所望の標的部位への結合を促進する。したがって、所定の許容サイズに関して、所定の核酸配列を標的化するように構築され得たZFPの数の増加が効果的に存在する。また、記載されたリンカーは種々のモジュールサブサイト分離（例えば0、1及び2塩基対ギャップ）間を識別するために、それらはZFPの不適切な標的部位への結合を減少させる。例えば、2塩基対（例えば、TGGGGSGGSSQKP（配列番号14））を読み飛ばすように設計された可撓性リンカーを有するZFPは、モジュールサブサイト間の0、1、又は2塩基対のいずれかを有する標的部位に結合することが可能である。本明細書に記載の2塩基スキッピングリンカーを有するこの同じZFPは、モジュールサブサイト間の2塩基対を有する標的に良好に結合するはずであるが、モジュールサブサイト間0又は1塩基対を有する標的（不適切または意図されない標的部位）には効果的に結合しないはずである。

#### 【0084】

したがって、本明細書に記載のリンカーは、ジンクフィンガーが現在使用されているいかなる用途でも使用され得、これらは、限定されるものではないが、遺伝子発現のモジュレーションのためのジンクフィンガー転写因子（ZFP-TF）への用途及び/又は開裂のためのジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）での用途が挙げられる。例えば、参照によりその全体を本明細書に組み込んだ、米国特許第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,689,558号、同第7,067,317号、同第7,262,054号及び同第7,253,273号、並びに米国特許公開第20050064474号、同第2006/0063231号、同第2007/0134796号、同第2007/0218528号、同第2008/0015164号、同第2008/0188000号、同第2008/0299580号及び同第2008/0159996号を参照さ

りたい。

#### 【0085】

したがって、開示されたリンカーは、特異的に標的化されたモジュレーション又は開裂が望ましいような任意の方法のために任意のZFP又はZFNで使用され得る。例えば、ZFP-TF及びZFNは、遺伝性疾患、感染症（ウイルス又は細菌）を治療するために、相同組換え及び/又はノックイン若しくはノックアウトによって所望の遺伝子が活性化され、抑制され、標的化されている細胞系、動物及び/又は植物を産生するために使用され得る。したがって、本明細書に記載のリンカーはまた、より有効にDNAをクローンするために使用され得、並びにZFNによって促進されるゲノム改変で使用され得、これは、バイオテクノロジー及び基礎科学の多くの領域で広範囲で適用可能である。

10

#### 【実施例】

#### 【0086】

##### 実施例1：リンカーの選択

リンカー選択を、それぞれが4つのフィンガーを含有する、3つの異なるホストZFP「ZFP7263」、「ZFP7264」及び「ZFP8196」において実施し（7263及び7264については米国特許公開第20050064474号、並びに8196については同第20080159996号を参照されたい）。各ホストZFPについての各フィンガーの認識ヘリックスが、表1に提供されていて、一方、各ホストZFPの完全長配列を図1Aに提供する。選択を次のように実行し、(i)初めに、中心リンカー中のコドンを2~12個の完全無作為割付されたコドンの混合物で置き換える各ホストZFP内でライブラリーを産生し（図1B）、未処置ライブラリーの配列決定は、一度より多く確認されたクローンがなく、良好な配列の多様性を示した；(ii)次に、このライブラリーを、糸状バクテリオファージの表面で発現させた；(iii)ファージ発現されたZFPライブラリーを、次いでホストタンパク質結合部位の中心で（すなわち、無作為割付されたリンカーによってスパンされた領域内で）1塩基対又は2塩基対挿入物を含有するビオチニル化標的変異体に結合するように選択した（表2A）。各々の挿入物は、効率的な結合を可能にするために、より長いリンカーによって架橋されねばならないホストタンパク質の第2のフィンガーと第3のフィンガーのための結合配列の間にギャップを具備した（表2A）。固有塩基特異性を有さないリンカーの選択を有効にするために、挿入物は塩基の混合物から構成された。5つの選択サイクルが実施された。最後の4サイクル中に、ビオチニル化されておらず、並びに非標的ギャップ長を含有する結合部位の1000倍モル過剰で、対抗選択を採用した（すなわち、1塩基対ギャップ長を有する標的配列を用いてファージが選択された場合、対抗選択は0、2、3及び4塩基対ギャップを有する標的を含み、2塩基対ギャップ長を有する標的配列を用いてファージが選択された場合、対抗選択は、0、1及び3並びに4塩基対ギャップを有する標的を含んだ。表2B参照）。

20

30

#### 【0087】

選択の第5ラウンドからのファージプールを、標的ギャップ長を有する配列を選択的に結合させるための能力について評価し、これらの研究がギャップ選択的結合を明らかにした（図2）。特に、ZFP8196において1塩基対を読み飛ばすように選択されたファージプールは、ギャップを持たない標的と比べて、1塩基対ギャップを有する標的に対して25倍の優先性を示した。ZFP7263において1塩基対を読み飛ばすように選択されたファージプールは、ギャップを持たない標的と比べて、1塩基対ギャップを有する標的に対して26倍の優先性を示した。ZFP7264において1塩基対を読み飛ばすように選択されたファージプールは、ギャップを持たない標的と比べて、1塩基対ギャップを有する標的に対して5.5倍の優先性を示した。これらのプールのそれぞれはまた、より長いギャップ長（2、3又は4塩基対）を有する標的へほとんど結合しないこと又は全く結合しないことも認められた。

40

#### 【0088】

ZFP8196において2塩基対を読み飛ばすように選択されたファージプールは、1塩基対ギャップの標的に比べて2塩基対ギャップを有する標的に対して7倍の優先性を示

50

し、並びに 0、3 及び 4 塩基対ギャップを有する標的全体にわたって 30 倍を超える優先性を示した。

【表 1】

表 1：ホスト ZFP 認識ヘリックス

ZFP	フィンガー1	フィンガー2	フィンガー3	フィンガー4
8196	RSDNLSV (配列番号22)	QKINLQV (配列番号23)	RSDVLSE (配列番号24)	QRNHR TT (配列番号25)
7264	RSDTLSE (配列番号26)	ARSTR TT (配列番号27)	RSDSLSK (配列番号28)	QRSNLKV (配列番号29)
7263	RSDNLSV (配列番号22)	RNAHRIN (配列番号30)	RSDTLSE (配列番号26)	ARSTR TN (配列番号31)

10

【0089】

【表 2】

表 2 A：選択のために使用された標的部位

ZFPw/ 無作為割付リンカー	標的部位
8196	ATAAACTGdCAAAAGGC (配列番号33) ATAAACTGdbCAAAAGGC (配列番号34)
7264	TTAAAGCGhGCTCCGAA (配列番号38) TTAAAGCGhdGCTCCGAA (配列番号39)
7263	CCACTCTGhTGGAAGTG (配列番号43) CCACTCTGhhTGGAAGTG (配列番号44)

20

表 2 A：選択のために使用された標的部位。ファージ研究で使用された二重鎖 DNA 標的部位は、TATAAT(X)<sub>17-18</sub>TTTCACAGTCAGTCCACACGTC (配列番号67) の一般形を有し、式中の (X)<sub>17-18</sub> は、表中に表示された配列で置き換えられた。DNA 二重鎖は、イタリック体で表された配列にアニーリングされ、またその 5' 末端でピオチニル化されたプライマーを伸長することによって生成された。下線が施された塩基は、各ホスト ZFP の 4 つのフィンガーに対する結合配列を示し、一方小文字の塩基は、選択されたリンカーによってスパンされるべきである挿入されたヌクレオチド (又は「ギャップ」塩基) を示している。ギャップ塩基についての縮重コードは次のようである：「d」は A、G、及び T の混合を示し、「b」は C、G、及び T の混合を示し、「h」は A、C、及び T の混合を示し、並びに「v」は A、C、及び G の混合を示す。

30

【0090】

40

## 【表 3】

表 2 B : 選択中に使用された競合部位

ZFPw/ 無作為割付リンカー	競合部位
8 1 9 6	ATAAACTGCAAAAGGC (配列番号 3 2) ATAAACTGdCAAAAGGC (配列番号 3 3) ATAACTGdbCAAAAGGC (配列番号 3 4) ATAAACTGdbbCAAAAGGC (配列番号 3 5) ATAACTGdbbbCAAAAGGC (配列番号 3 6)
7 2 6 4	TTAAAGCGGCTCCGAA (配列番号 3 7) TTAAAGCGhGCTCCGAA (配列番号 3 8) TTAAAGCGhdGCTCCGAA (配列番号 3 9) TTAAAGCGhdvGCTCCGAA (配列番号 4 0) TTAAAGCGhdvdGCTCCGAA (配列番号 4 1)
7 2 6 3	CCACTCTGTGGAAGTG (配列番号 4 2) CCACTCTGhTGAAGTG (配列番号 4 3) CCACTCTGhhTGAAGTG (配列番号 4 4) CCACTCTGhhhTGAAGTG (配列番号 4 5) CCACTCTGhhhbTGAAGTG (配列番号 4 6)

表 2 B : 選択中に使用された競合部位。二重鎖 DNA 競合部位は、T A T A A T ( X )<sub>16-20</sub> T T C A C A G T C A G T C C A C A C G T C (配列番号 6 7) の一般形を有し、式中の ( X )<sub>16-20</sub> は、表中に表示されている配列で置き換えられた。DNA 二重鎖は、イタリック体の配列部分にアニーリングされた (非ビオチニル化) プライマーを伸長することによって生成された。下線が施された塩基は、各宿主 ZFP の 4 つのフィンガーに対する結合配列を示し、一方小文字の塩基は、挿入されたヌクレオチド (又は「ギャップ」塩基) を示している。ギャップ塩基についての縮重コードは次のようである: 「d」は A、G、及び T の混合を示し、「b」は C、G、及び T の混合を示し、「h」は A、C、及び T の混合を示し、並びに「v」は A、C、及び G の混合を示す。

【0091】



【表 4】

表 2 C : ファージプールギャップ選択性研究のために使用された標的

ZFPw/ 無作為割付リンカー	ギャップ	Target sites
8 1 9 6	0 ギャップ	ATAAACTGCAAAAGGC (配列番号 3 2)
	1 ギャップ	ATAAACTGdCAAAAGGC (配列番号 3 3) ATAAACTGdbCAAAAGG
	2 ギャップ	C (配列番号 3 4)
	3 ギャップ	ATAAACTGdbbCAAAAGGC (配列番号 3 5)
	4 ギャップ	ATAAACTGdbbbCAAAAGGC (配列番号 3 6)
7 2 6 4	0 ギャップ	TTAAAGCGCTCCGAA (配列番号 3 7) TTAAAGCGhGCTCCGAA
	1 ギャップ	(配列番号 3 8)
	2 ギャップ	TTAAAGCGhdGCTCCGAA (配列番号 3 9)
	3 ギャップ	TTAAAGCGhdvGCTCCGAA (配列番号 4 0)
	4 ギャップ	TTAAAGCGhdvdGCTCCGAA (配列番号 4 1)
7 2 6 3	0 ギャップ	CCACTCTGTGGAAGTG (配列番号 4 2) CCACTCTGhTGGAAGTG
	1 ギャップ	(配列番号 4 3)
	2 ギャップ	CCACTCTGhhTGGAAGTG (配列番号 4 4)
	3 ギャップ	CCACTCTGhhhTGGAAGTG (配列番号 4 5) CCACTCTGhhhbTGG
	4 ギャップ	AAGTG (配列番号 4 6)

表 2 C : ファージプールギャップ選択性研究で使用された標的。ファージプールギャップ選択性研究で使用された二重鎖 DNA 部位は、T A T A A T ( X )<sub>16-20</sub> T T C A C A G T C A G T C C A C A C G T C (配列番号 6 7) の一般形を有し、式中 ( X )<sub>16-20</sub> は、表中に表示されている配列で置き換えられた。DNA 二重鎖は、イタリック体の配列部分にアニーリングされた、ピオチニル化プライマーを伸長することによって生成された。下線が施された塩基は、各宿主 ZFP の 4 本のフィンガーに対する結合配列を示し、一方小文字の塩基は、挿入されたヌクレオチド (又は「ギャップ」塩基) を示している。ギャップ塩基についての縮重コードは次のようである: 「d」は A、G、及び T の混合を示し、「b」は C、G、及び T の混合を示し、「h」は A、C、及び T の混合を示し、並びに「v」は A、C、及び G の混合を示す。

## 【0092】

## 配列決定

選択された ZFP をコードする遺伝子を、サブクローン化して配列決定した。図 3 A は、全ての 3 つのホストタンパク質において 1 塩基対ギャップを読み飛ばすように選択されたリンカーを提示していて、一方図 3 B は、「ZFP 8 1 9 6」ホストにおいて 2 塩基対のスキッピングのために選択されたリンカーを示している。配列決定結果は、選択されたリンカーでのプロリン及びアルギニンを豊富に含む配列に向けられる強い組成上の偏りを明らかにした。明確なリンカー長傾向もまた明らかとなり、開始ライブラリーが 11 種の異なるリンカー長 (2 ~ 12 個の残基) のほぼ等しい比率をコード化したが、選択されたリンカーは、5 ~ 8 個の残基 (1 塩基対ギャップに関して) 又は 9 ~ 11 個の残基 (2 塩基対ギャップに関して) のより狭い分布を特徴とした。

## 【0093】

## 実施例 2 : 選択された ZFP の初期特性

1 塩基対を読み飛ばすように選択されたリンカーの初期機能的評価として、図 3 A で表示されたリンカーを有する ZFP をサブクローンし、インピトロ転写 - 翻訳キットを使用して遊離タンパク質として発現し、選択されたリンカーと反対側の 0、1 又は 2 塩基対の挿入物を有する標的への結合について、ELISA によって評価した。これらの研究のための標的は、表 3 に表示されている。各宿主 ZFP の中心リンカーを、1 塩基対のスパ

ンのための最新技術を集散的に表わす3つの代替物である、先に特性評価されたリンカー配列で置き換えることによって、9つの追加の対照タンパク質を生成した。これらの対照リンカーの配列は、LRQKDERP（配列番号3）（米国特許第6,479,626号を参照）、TGE G G K P（配列番号48）、TGGGGSQKP（配列番号2）であった。これらの対照タンパク質、並びにホストZFPは、ELISA研究にも含められた。

#### 【0094】

表3は、1塩基対を読み飛ばすように選択されたZFPのELISA研究で使用された標的を示している。これらの研究で使用された二重鎖DNA部位は、TTAG(X)<sub>16-18</sub>。TATC（配列番号94）の一般形を有し、式中の(X)<sub>16-18</sub>は表中に表示された配列で置き換えられた。各二重鎖DNA標的を、その5'末端にビオチンを有する相補的オリゴヌクレオチドをアニーリングすることによって生成した。下線部は、各ホストZFPの4つのフィンガーについての結合配列を示し、一方で小文字は、挿入されたヌクレオチド（又は「ギャップ」塩基）を示している。

#### 【0095】

これらの研究の結果は、表4、5及び6に提供されていて、各表は、異なるホストZFPから誘導されたタンパク質に関するデータを表示している。表4は、ZFP8196由来のタンパク質に関するデータを提供し、表5は、ZFP7263由来のタンパク質に関するデータを提供し、また表6は、ZFP7264由来のタンパク質に関するデータを提供している。それぞれの表において、ホストZFPに関する結合データが最上段に表示され、3つの対照タンパク質に関する結合データが2～4段に続き、ファージディスプレイライブラリーから選択されたZFPに関するデータが続く。この数値は、親ZFPのその非改変標的への結合から得られたELISAシグナルに正規化されている。

#### 【0096】

タンパク質の各セットは、3つの重要な観点で、結合挙動の同様なパターンを示し、これらの観点は、第1に、各親ZFPはその非改変標的（表4、5及び6中の「0塩基対ギャップ」標的）には良好に結合したが、1又は2塩基対の挿入物を有するいかなる変異体にも結合しなかったことである。親リンカー（TGEKP（配列番号1）（ZFP8196に関して）又はTGSQKP（配列番号72）（ZFP7263及びZFP7264に関して）のいずれか）がいずれかの追加的に挿入された塩基をスパンするには短すぎるために、これは予期されたことである。

#### 【0097】

第2に、ほとんどすべての場合で、対照タンパク質は、1塩基対挿入物を有する標的にほとんど十分に結合しなかったことである（正規化ELISA値は、36個の測定値の31個が0.10又はそれ以下であった）。このことは、これらの研究前での利用可能なリンカーの性能不良を示唆している。更には、これらのタンパク質によって使用されたリンカーは、1塩基対挿入物を有する標的に対して一貫した優先性を示さなかった（0塩基対挿入物に対して）。

#### 【0098】

第3には、対照タンパク質の挙動とは対照的に、ファージ選択されたZFPは、1塩基対挿入物を有する標的に対して非常に高い親和性で、並びに挿入された塩基を含有しない結合標的に対して高レベルの識別性で結合した。これらのタンパク質は、2塩基対挿入物を有する標的に対して、1塩基対を有する結合標的に関してもまた非常に選択性であった。

#### 【0099】

## 【表 5】

表 3 : 1 塩基対ギャップを読み飛ばすように選択された Z F P の E L I S A 研究のために使用された標的

Z F P w / 無作為割付リンカー	ギャップ 配列	標的部位
8 1 9 6	-	ATAAACTGCAAAAGGC (配列番号 3 2) ATAACTGaCAAAAGGC (配列番号 7 3)
	A	ATAAACTGcCAAAAGGC (配列番号 7 4)
	C	ATAAACTGgCAAAAGGC (配列番号 7 5) ATAACTGtCAAAAGGC (配列番号 7 6) ATAACTGtcCAAAAGGC (配列番号 7 7)
	G	ATAAACTGacCAAAAGGC (配列番号 7 8) ATAACTGtgCAAAAGGC (配列番号 7 9)
	T	
	TC	
	AC	
	TG	
7 2 6 4	-	TTAAAGCGCTCCGAA (配列番号 3 7)
	A	TTAAAGCGaGCTCCGAA (配列番号 8 0)
	C	TTAAAGCGcGCTCCGAA (配列番号 8 1) TTAAAGCGgGCTCCGAA (配列番号 8 2) TTAAAGCGtGCTCCGAA (配列番号 8 3) T
	G	TAAAGCGttGCTCCGAA (配列番号 8 4) TTAAAGCGtaGCTCCGA
	T	A (配列番号 8 5)
	TT	TTAAAGCGctGCTCCGAA (配列番号 8 6)
	TA	
	CT	
7 2 6 3	-	CCACTCTGTGGAAGTG (配列番号 4 2)
	A	CCACTCTGaTGGAAGTG (配列番号 8 7)
	C	CCACTCTGcTGGAAGTG (配列番号 8 8)
	G	CCACTCTGgTGGAAGTG (配列番号 9 9)
	T	CCACTCTGtTGGAAGTG (配列番号 9 0)
	AC	CCACTCTGacTGGAAGTG (配列番号 9 1)
	AT	CCACTCTGatTGGAAGTG (配列番号 9 2) CCACTCTGctTGGAAG
	CT	TG (配列番号 9 3)

10

20

30

【 0 1 0 0 】

【表 6】

表 4：異なる中心リンカーを有する ZFP「8196」の変異体についての ELISA 結果

中心リンカーの 配列	表示されたギャップを有する標的への結合に関する ELISA スコア [スコアは、そのギャップ非形成標的（下線が施された項目）に結合した 8196 に正規化されている]								
	0 塩基対 ギャップ	1 塩基対ギャップ					2 塩基対ギャップ		
	-	A	C	G	T	1bp:0bp スコアの 平均比	TC	AC	TG
TGEKP (配列番号 1)	<u>1.00</u>	0.01	0.01	0.03	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
TGGGSQKP (配列番号 2)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.20	0.00	0.00	0.00
LRQKDERP (配列番号 3)	0.01	0.01	0.01	0.04	0.08	3.49	0.00	0.00	0.00
TGEGGKP (配列番号 4 8)	0.10	0.00	0.00	0.03	0.03	0.15	0.00	0.00	0.00
TPDAPKPKP (配列番号 4 9)	0.02	0.16	0.13	0.68	0.95	23.75	0.01	0.00	0.01
TPGLHRPKP (配列番号 5 0)	0.04	0.19	0.10	0.65	0.81	10.94	0.01	0.00	0.01
TEPRAKPPKP (配列番号 5 1)	0.01	0.39	0.17	0.78	0.93	70.72	0.02	0.01	0.01
TPSHTPRPKP (配列番号 5 2)	0.02	0.30	0.13	0.84	0.80	25.10	0.02	0.01	0.01
TGYSIPRPKP (配列番号 5 3)	0.01	0.13	0.06	0.43	0.55	44.57	0.01	0.00	0.01
TYPRPIAAKP (配列番号 5 4) (1 f と命名)	0.01	0.41	0.14	0.65	0.64	82.25	0.01	0.00	0.01
THRAPIPKP (配列番号 5 5) (1 c と命名)	0.00	0.20	0.09	0.57	0.60	78.86	0.01	0.00	0.00
TPNRRPAPKP (配列番号 5 6) (1 d と命名)	0.00	0.23	0.09	0.52	0.52	90.27	0.01	0.01	0.01
TSPRLPAPKP (配列番号 5 7)	0.01	0.26	0.14	0.62	0.81	67.95	0.01	0.00	0.01
TCPRPPTKPK (配列番号 5 8)	0.00	0.18	0.05	0.48	0.62	70.16	0.01	0.00	0.01
TSSPRNAKP (配列番号 5 9)	0.01	0.05	0.02	0.20	0.25	20.85	0.01	0.00	0.01
TVSPAPCRSKP (配列番号 6 0)	0.01	0.03	0.01	0.14	0.19	11.52	0.02	0.00	0.01
TPDRPISTCKP (配列番号 6 1)	0.01	0.11	0.05	0.29	0.47	15.41	0.03	0.01	0.02

【0101】

【表 7】

表 5：異なる中心リンカーを有する ZFP「7263」の変異体についての ELISA 結果

中心リンカーの 配列	表示されたギャップを有する標的への結合に関する ELISA スコア [スコアは、そのギャップ非形成標的（下線が施された項目）に結合した 7263 に正規化されている]								
	0 塩基対 ギャップ	1 塩基対ギャップ					2 塩基対ギャップ		
	-	A	C	G	T	1bp:0bp スコアの 平均比	AC	AT	CT
TGSQKP (配列番号 72)	<u>1.00</u>	0.01	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00
TGGGSQKP (配列番号 2)	0.51	0.06	0.05	0.41	0.39	0.44	0.01	0.01	0.02
LRQKDERP (配列番号 3)	0.25	0.03	0.02	0.18	0.13	0.36	0.01	0.01	0.01
TGEGCKP (配列番号 48)	1.30	0.02	0.02	0.05	0.04	0.03	0.01	0.01	0.01
TPRPPIPKP (配列番号 4)	0.14	0.97	0.67	1.85	2.09	10.20	0.02	0.01	0.01
TQRPQIPPKP (配列番号 62)	0.15	1.66	1.00	2.86	3.05	14.68	0.03	0.02	0.01
TPNRCPTKP (配列番号 63)	0.31	1.68	1.13	2.62	3.16	7.53	0.03	0.02	0.01
TYPRLLAKP (配列番号 7)	0.29	1.95	1.27	3.88	3.97	10.08	0.03	0.01	0.01
TPLCQRPMQKP (配列番号 8)	0.28	1.82	1.28	3.44	4.00	10.88	0.08	0.05	0.02

【0102】

【表 8】

表 6：異なる中心リンカーを有する ZFP「7264」の変異体についての ELISA 結果

中心リンカーの 配列	表示されたギャップを有する標的への結合に関する ELISA スコア [スコアは、そのギャップ非形成標的（下線が施された項目）に結合した 7264 に正規化されている]								
	0 塩基対 ギャップ	1 塩基対ギャップ					2 塩基対ギャップ		
	-	A	C	G	T	1bp:0bp スコアの 平均比	TT	TA	CT
TGSQKP (配列番号 7 2)	<u>1.00</u>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TGGGGSQKP (配列番号 2)	0.46	0.07	0.04	0.08	0.17	0.19	0.03	0.03	0.07
LRQKDERP (配列番号 3)	0.26	0.05	0.03	0.06	0.10	0.22	0.02	0.02	0.02
TGEGGKP (配列番号 4 8)	1.39	0.02	0.03	0.05	0.08	0.03	0.03	0.02	0.03
TGLPKPKP (配列番号 6 4)	0.14	0.19	0.11	0.38	0.86	2.84	0.03	0.02	0.02
TSRPRPKP (配列番号 1 1)	0.18	0.52	0.22	0.77	2.07	4.93	0.03	0.03	0.03
TLPLPRPKP (配列番号 6 5)	0.25	0.58	0.25	0.85	1.36	3.01	0.04	0.03	0.03
TVPRPTPPKP (配列番号 1 2) (1 e と命名)	0.16	2.35	1.02	1.58	2.55	11.71	0.05	0.05	0.06
TLPPCFRPKP (配列番号 6 6)	0.36	0.72	0.25	0.77	2.72	3.11	0.06	0.06	0.05
TKHGTPKHREDKP (配列番号 1 3)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.79	0.00	0.00	0.00

## 【0103】

ELISA 研究で得られた結果を裏付けかつ展開するために、選択されたリンカーを有する ZFP を、国際公開第 2009/042163 号に記載されている酵母スクリーニングアッセイを用いて、種々の標的部位にて、インビボ開裂活性について評価した。これらの実験は、多大の労力を要するために、より少ない ZFP で実施した。これらの研究のために、表 5 からの 6 個の ZFP 及び表 6 からの 5 個の ZFP を、国際公開第 2007/139982 号に記載されているようなジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) としての発現を可能にする構成に組み立てた。次いで、種々の標的部位を有する酵母菌種からの MEL-1 分泌を評価することによって、インビボ活性を測定した。これらの研究のために使用された標的配列が、表 7 及び 8 に提供されていて、0、1 又は 2 塩基対の中心挿入物を有する 7263 及び 7264 結合部位の変型も含められている。

## 【0104】

## 【表 9】

表 7：ZFP7263中の1塩基対ギャップを読み飛ばすように選択されたZFPの酵母スクリーニングアッセイで使用された標的

ZFPw/ 無作為割付リンカー	ギャップ 配列	標的部位
7263	—	ACTCTGTGAAG (配列番号 95) ACTCTGaTGAAG (配列番号 96)
	A	
	C	ACTCTGcTGAAG (配列番号 97)
	G	ACTCTGgTGAAG (配列番号 98)
	T	ACTCTGtTGAAG (配列番号 99)
	AC	ACTCTGacTGAAG (配列番号 100) ACTCTGatTGAAG (配列番号 101)
	AT	ACTCTGctTGAAG (配列番号 102)
	CT	

10

## 【0105】

ヌクレアーゼ標的的部位を有するレポータープラスミドを、ヌクレアーゼ標的カセットが、GATCTGTTCGGAGCCGCTTTAAACCC(X)<sub>12-14</sub>TGCTCGCG (配列番号 103) の一般式を有する以外は、実質的に国際公開第 2009/042163 号で記載されているように構築し、式中、(1) 両端の 4 個の下線が施された塩基は、BamHI / BssHII 消化レポータープラスミド中へのクローニングのために使用されるオーバーハングを表し、(2) イタリック体の配列は、アンチセンス鎖に結合し、これらのスクリーンに対して不変異体であった 7264 ZFN に関する結合部位を表し、並びに (3) (X)<sub>12-14</sub> は、表中に表示された配列で置き換えられた。大文字の塩基は、各宿主 ZFP の 4 つのフィンガーについての結合配列を示し、一方で小文字は、挿入されたヌクレオチド (又は「ギャップ」塩基) を示している。

20

## 【0106】

## 【表 10】

30

表 8：ZFP7264中の1塩基対ギャップを読み飛ばすように選択されたZFPの酵母スクリーニングアッセイで使用された標的

ZFPw/ 無作為割付リンカー	ギャップ 配列	標的部位
7264	—	AAAGCGCTCCG (配列番号 104)
	A	AAAGCGaGCTCCG (配列番号 105)
	C	AAAGCGcGCTCCG (配列番号 106)
	G	AAAGCGgGCTCCG (配列番号 107)
	T	AAAGCGtGCTCCG (配列番号 108)
	TT	AAAGCGttGCTC (配列番号 109) AAAGCGtaGCTCCG (配列番号 110)
	TA	AAAGCGctGCTCCG (配列番号 111)
	CT	

40

## 【0107】

ヌクレアーゼ標的的部位を有するレポータープラスミドを、ヌクレアーゼ標的カセットが、GATCTGTTC(X)<sub>12-14</sub>AAACCCACTCTGTGGAAAGTGCTCGCG (配列番号 112) の一般式を有する以外は、実質的に国際公開第 2009/042163 号で記載されているように構築し、式中、(1) 両端の 4 個の下線が施された塩基は、BamHI / BssHII 消化レポータープラスミド中へのクローニングで使用されるオ

50

ーバーハングを表し、(2)イタリック体の配列は、これらのスクリーンに対して不変異体であった7263ZFNに関する結合部位を表し、並びに(3)(X)<sub>12-14</sub>は、表中に表示された配列で置き換えられた。大文字の塩基は、各ホストZFPの4つのフィンガーについての結合配列を示し、一方小文字は、挿入されたヌクレオチド(又は「ギャップ」塩基)を示している。表中に表示された標的部位は、7264ZFNがアンチセンス鎖に結合するので、標的カセット中に存在するものの逆相補体であることに注意されたい。

【0108】

これらの実験のデータは、表9及び10に示され、各表は、異なるホストZFNから誘導されたタンパク質に関するデータを表示している。表9は、7263由来のZFNに関するデータを提供し、また表10は、7264由来のZFNに関するデータを提供している。それぞれの表において、ホストZFPに関するヌクレアーゼ活性データが最上段に表示され、1つの対照タンパク質に関するヌクレアーゼ活性データが2段目に続き、ファージディスプレイライブラリーから選択されたZFPに関するデータが続く。ZFP7263とZFP7264は、同じジンクフィンガーヌクレアーゼ二量体の二等分であるために、ホストZFNに関するデータは、それぞれの表で同じである。これらの研究の結果は、ファージ選択されたリンカーを有するZFNが、対照リンカーを有するZFPよりも1塩基対挿入物を有する標的に対して、より高い活性並びにより良好な優先性の両方を示したELISA研究で観測されたパターンと概ね合致した。

【0109】

【表11】

表9：異なる中心リンカーを有するZFP7263の変異体についての酵母スクリーニング結果

中心リンカーの配列	表示されたギャップを有する標的でのヌクレアーゼ活性に関するMEL-1スコア [スコアは、そのギャップ非形成標的(下線が施された項目)に結合したZFP7263に正規化されている]								
	0塩基対ギャップ	1塩基対ギャップ					2塩基対ギャップ		
	-	A	C	G	T	1bp:0bp スコアの 平均比	AC	AT	CT
TGSQKP (配列番号72)	<u>1.00</u>	0.05	0.05	0.09	0.06	0.06	0.09	0.02	0.08
TGGGSQKP (配列番号2)	0.11	0.14	0.04	0.60	0.31	2.57	0.04	0.02	0.04
TPRPPIPKP (配列番号4)	0.04	1.30	1.41	2.18	1.40	35.90	0.05	0.03	0.04
TQRPQIPKP (配列番号62)	0.04	1.05	0.43	2.18	1.19	34.18	0.03	0.02	0.03
TPNRCPTKP (配列番号63)	0.05	1.30	0.34	2.85	1.59	33.22	0.04	0.03	0.06
TYRPLLAKP (配列番号7)	0.05	0.69	0.37	2.21	1.06	20.15	0.10	0.05	0.05
TPLCQRPMQKP (配列番号8)	0.04	0.97	0.30	1.52	1.19	27.52	1.05	0.01	0.03

【0110】



## 【表 1 2】

表10：異なる中心リンカーを有するZFP7264の変異体についての酵母スクリーニング結果

中心リンカーの配列	表示されたギャップを有する標的にてのヌクレアーゼ活性に関するMELE-1スコア [スコアは、そのギャップ非形成標的（下線が施された項目）に結合したZFP7264に正規化されている]								
	0塩基対ギャップ	1塩基対ギャップ					2塩基対ギャップ		
	-	A	C	G	T	1bp:0bp スコアの 平均比	TT	TA	CT
TGSQKP (配列番号72)	<u>1.00</u>	0.05	0.05	0.09	0.06	0.06	0.09	0.02	0.08
TGGGGSQKP (配列番号2)	0.28	0.08	0.07	0.14	0.34	0.57	0.12	0.09	0.15
TGLPKPKP (配列番号64)	0.04	0.08	0.07	0.42	0.79	8.03	0.11	0.08	0.09
TSRPRPKP (配列番号11)	0.08	0.18	0.08	0.61	3.38	13.33	0.03	0.07	0.10
TVPRPTPPKP (配列番号12) (1eと命名)	0.08	1.24	0.14	1.40	2.34	20.28	0.12	0.09	0.11

## 【0111】

ELISAが、酵母スクリーニングデータと緊密に一致したために、発明者らはELISAアッセイで最良のものの中で性能を発揮した例示的な1塩基対スキッピングリンカーのセットを選択した。これらは表11中表示され、「1c」、「1d」、「1e」及び「1f」と命名されている。これらの記号は、表4、6、及び10で表されたデータでも含まれている。これらの例示的リンカーに関するELISAデータはまた、図4及び5にも示されている。

## 【0112】

## 【表 1 3】

表11：例示的リンカーデザイン

リンカー配列	リンカー記号	読み飛ばされる塩基の数
THPRAPIPKP (配列番号55)	1c	1
TPNRRPAPKP (配列番号56)	1d	1
TVPRPTPPKP (配列番号12)	1e	1
TYPRPIAAKP (配列番号54)	1f	1

## 【0113】

実施例1で先に述べたように、選択のために使用された標的部位（表2a）は、特定の

ギャップ配列に対して固有の優先性を示さなかったリンカーの選択を導くために、ギャップ中に変性した塩基を含有した。図4及び5に示されるデータは、この選択法が成功を収めたことを示唆し、なぜなら、例示的リンカーを有するタンパク質が、A、G、C又はTのギャップ塩基を有する標的間での結合でほとんど変化を示さないからである。更に、観測される少量の変化が、フィンガー周辺部分の特性であることを示唆している対照可撓性リンカーで得られた結果（例えば、可撓性リンカー（TGGGGSQKP）（配列番号2）に関する図5Dを参照）で写し出されている。

【0114】

類似のELISA実験を、ZFP8196における2塩基対ギャップを読み飛ばすように選択されたリンカーについて実施した。各宿主ZFPの中心リンカーを、2塩基対の10スパンニングに関する最新技術を集合的に表した、2つの代替的な先に特性評価されたリンカー配列で置き換えることによって、2つの追加的な対照タンパク質を生成した。これらの対照リンカーの配列は、TGGGGSGGGSQKP（配列番号14）及びLRQKDGGGSERP（配列番号68）であった。これらの対照タンパク質、並びに宿主ZFPもまた、ELISA研究に含められた。ギャップがない、4つの可能な1塩基対ギャップのそれぞれ、及び16個の可能な2塩基対ギャップのそれぞれのいずれかを含有する標的部位への結合について、ZFPをテストした。標的部位は、表12に表示されている。ELISAスコアは、そのギャップ非形成標的部位に結合された8196ZFPのスコアに正規化された。例示的リンカーは、1塩基対スキッピングリンカーと同様な様式で、それらのELISA挙動に基づいて選択された。これらの例示的リンカーは、20「2d」、「2e」、及び「2f」と命名された。8196ZFP及び対照ZFP内の例示的リンカーに関するELISA結果が、図6に示されている。図6に見られるように、対照リンカーを有するZFPのいずれも2塩基対ギャップを有する標的部位に対する優先性を示さなかった。しかしながら、選択されたリンカーを有するZFPは、1塩基対及びギャップ非形成標的部位の双方を超える2塩基対ギャップに対する明確な優先性を示した。

【0115】

## 【表 1 4】

表 1 2 : 2 塩基対スキッピングリンカーの E L I S A 特性評価のために使用された標的部

Z F P w / 無作為割付リンカー	ギャップ 配列	標的配列
8 1 9 6	-	ATAAACTGCAAAAGGC (配列番号 3 2)
	A	ATAAACTGaCAAAAGGC (配列番号 7 3)
	C	ATAAACTGcCAAAAGGC (配列番号 7 4)
	G	ATAAACTGgCAAAAGGC (配列番号 7 5)
	T	ATAAACTGtCAAAAGGC (配列番号 7 6)
	AA	ATAAACTGaaCAAAAGGC (配列番号 1 1 3)
	AC	ATAAACTGacCAAAAGGC (配列番号 1 1 4)
	AG	ATAAACTGagCAAAAGGC (配列番号 1 1 5)
	AT	ATAAACTGatCAAAAGGC (配列番号 1 1 6)
	CA	ATAAACTGcaCAAAAGGC (配列番号 1 1 7)
	CC	ATAAACTGccCAAAAGGC (配列番号 1 1 8) ATAAACTGcgCAAAA
	CG	GGC (配列番号 1 1 9)
	CT	ATAAACTGctCAAAAGGC (配列番号 1 2 0) ATAAACTGgaCAAAA
	GA	GGC (配列番号 1 2 1)
	GC	ATAAACTGgcCAAAAGGC (配列番号 1 2 2)
	GG	ATAAACTGggCAAAAGGC (配列番号 1 2 3) ATAAACTGgtCAAAA
	GT	GGC (配列番号 1 2 4)
	TA	ATAAACTGtaCAAAAGGC (配列番号 1 2 5) ATAAACTGtcCAAAA
	TC	GGC (配列番号 1 2 6) ATAAACTGtgCAAAAGGC (配列番号 1
	TG	2 7) ATAAACTGttCAAAAGGC (配列番号 1 2 8)
	TT	

表 1 2 : E L I S A 特性評価研究で使用された二重鎖 D N A 標的部

位は、T T A G ( X )  
<sub>16-18</sub> T A T C (配列番号 9 4) の一般形を有し、式中の X )<sub>16-18</sub> は、表中に配列で置き  
 換えられた。D N A 二重鎖は、相補的オリゴヌクレオチドをアニーリングすることで生成  
 された。表中に表示された配列に対する相補的オリゴヌクレオチドは、5' ビオチンを含  
 有した。下線が施された塩基は、各ホスト Z F P の 4 つのフィンガーについての結合配列  
 を示し、一方小文字の塩基は挿入されたヌクレオチド (又は「ギャップ」塩基) を示して  
 いる。

## 【0 1 1 6】

実施例 1 に先に述べられたように、選択のために用いられた標的部

位 (表 2 a) は、特  
 定のギャップ配列に対する固有の優先性を示さなかったリンカーの選択を誘導するた

めに、ギャップ内に変性塩基を含有した。図 6 に示されているものは、可撓性リンカー (T G  
 G G G S G G S Q K P (配列番号 1 4)) のうちの 1 つについてのスケールの拡大である

。この可撓性リンカーは、標的部

位とのいかなる相互作用も有するべきではなく、したが  
 って見られるパターンは、ジンクフィンガータンパク質の結合によるものである可能性が  
 高い。例示的リンカーが、2 塩基対ギャップ標的部

位への結合の同様なパターンを示す  
 という事実は、選択されたリンカーがまた、Z F P 結合においていかなるギャップ組成上の  
 偏りも課せられるべきではないことを示唆している。

## 【0 1 1 7】

このデータのより簡潔な概要を、表 1 3 に表し、ここでは、E L I S A スコアは、1 又  
 は 2 塩基対ギャップ組成物の全てで平均値となった。更に報告されていることは、1 塩基  
 対ギャップ及びギャップ非形成標的に勝る 2 塩基対ギャップに対する倍増した優先性であ  
 る。最も選択的なリンカー (T P N P H R R T D P S H K P (配列番号 6 8)、「2 f」  
 ) は、対照リンカーと比較して、0 塩基対ギャップでは 1 0 0 倍を超えて勝る、並びに 1

塩基対ギャップでは20倍を超えて勝る2塩基対ギャップ選択性での改善を示している。

【0118】

【表15】

表13：2塩基対スキッピングリンカーについてのELISAデータの概要

リンカー配列	記号	平均正規化ELISAスコア (ギャップ)			2塩基対 ギャップ選択性 vs:	
		0塩基対	1塩基対	2塩基対	0塩基対	1塩基対
TCGGGSGGSQKP (配列番号14)	可撓性	0.019	0.041	0.010	0.6	0.2
LRQKDGGGSERP (配列番号68)	Kim, Pabo	0.010	0.047	0.003	0.4	0.1
TPNPHRRTPSHKP (配列番号69)	2f	0.003	0.046	0.219	64.6	4.7
TLAPRPYRPPKP (配列番号70)	2d	0.005	0.035	0.127	24.4	3.6
TPGGKSSRTDRNKP (配列番号71)	2e	0.005	0.099	0.100	22.0	1.0

【0119】

実施例3：種々の宿主ZFP中のリンカーのELISA特性評価

例示的リンカーの一般性を立証するために、表11に表示された4つの1塩基対スキッピングリンカー(1c~1f)を、12個の異なる宿主ZFP中にクローンした。この宿主ZFPは、ZFP1、ZFP2などとして示された。得られたタンパク質を、上記のようにインビトロ転写及び翻訳を介して発現し、並びにELISAを介してテストした。比較のために、可撓性リンカー(TGGGGSQKP)(配列番号2)を有する宿主ZFPもテストし、結果が図7に表示されている。このデータは、アッセイを飽和させる(ZFP1及びZFP2)か又はその結合が検出不能なほど低い(ZFP11及びZFP12)のいずれかであるZFPだけを除いて、標準可撓性リンカーに対して、新しいリンカーが、ほとんどの宿主ZFPのELISAスコアを著しく増加させたことを立証している。宿主ZFP全体のELISAスコアでの平均増倍数は、3~5であった。

【0120】

同様な研究において、表13中表示された2塩基対ギャップを読み飛ばすように選択された3個の例示的リンカー(2d~2f)が、上記のように異なる6個の宿主ZFP(ZFP13、ZFP14など)でテストされ、これらの結果が図8に示されている。これらの実験では、宿主ZFP全体にわたるELISAスコアでの平均増倍数は、1.9~2.4の範囲であった。

実施例4：哺乳類細胞中の内因性遺伝子座にての例示的リンカーを有するZFNの特性評価

【0121】

次いで、ZFNを、内因性遺伝子座にて二重鎖切断を誘導するそれらの能力についてテストした。簡単に言うと、上記(実施例3)の18個のZFNをコードするプラスミドを、それらの適切なパートナーZFNと対にして、Amxa(商標)ヌクレオフェクションキットを製造業者によって指示されたように使用するトランスフェクションによって、K562細胞に導入した。標的遺伝子座でのZFN活性を、非相同末端結合(NHEJ)のレベルによって測定されたものとして決定するために、CEL-I mismatchesアッセイを、基本的に製造業者の使用説明書(transgenomic SURVEYOR(商標))通りに実行した。細胞を収穫し、製造業者の説明書(Epicentre(登録商標

))に従って、Quickextract(商標)キットを使用して染色体DNAを調製した。標的遺伝子座の適切な領域を、Accuprime(商標)Taq高性能再現性DNAポリメラーゼ(Invitrogen)を用いてPCR増幅し、続いてCEL-I酵素で処理した。

#### 【0122】

CEL-1アッセイで生成された実施例のゲルが図9に示されている。図9Aは、ホストZFNとしてのZFN3及びZFN4(1塩基対をスキッピングするZFN)についてのスクリーニングデータを示し、一方で図9Bは、ホストZFNとしてのZFN14(2塩基対をスキッピングするZFN)についてのスクリーニングデータを示している。1塩基対をスキッピングする例示的リンカーの全てについてのデータは、図10に概説されている(ZFN1~ZFN12)。ZFNのいくつかは、高発現条件を用いて発現された。この高発現は、ゲノムDNAを単離する前に、細胞を37℃で24時間インキュベートし、次いで30℃で48時間インキュベートすることによるトランスフェクション後に取得される。この条件を用いるZFNは、図10で強調表現されている。注目すべきことに、TGGGGSQKP(配列番号2)リンカー(「可撓性リンカー」)で不活性化された3個のZFN(ZFN4、9及び10)は、本明細書に記載のリンカーを使用する場合に活性化した。このような場合について、1.0%改変率の数値が、正規化の目的で、可撓性リンカーに割り当てられた(このアッセイの検出限界)。新しいリンカーでテストされたZFNの85%において、9個の活性ZFN対全体で約1.8~2.8倍での平均増加を伴い、遺伝子改変のレベルでの増加が観測された。

#### 【0123】

同様に、2塩基対をスキッピングする例示的リンカーを含有する上記(実施例3)のZFN(ZFN13~ZFN18)を、内因性遺伝子座でテストし、その結果が図11に概説されている。この研究では、本明細書に記載のリンカーの置換は、可撓性リンカーに比べて、4個の活性ZFNのうちの3個について活性を改善し、平均改善率は、活性ZFN対全体で1.5~2倍であった。

#### 【0124】

実施例5: 2塩基対スキッピングリンカーの二次選択

ライブラリーの二次セットを、2塩基スキッピングリンカーについての初期選択から得られた情報(実施例3及び図3)に基づいて構築した。これらのライブラリーは、RPP(リジン、プロリン、プロリン)などのリンカーの3個のカルボキシ末端残基を固定化し、残りのアミノ末端残基を無作為割付した。ライブラリーデザインは、図12に示されている。

#### 【0125】

ZFP8196をホストタンパク質として使用して、実施例1と同じ方法で選択を実施した。選択されたファージプールのギャップ選択性が図13Aに示され、また個々のクローンからのリンカーの配列が図13Bに示されている。

#### 【0126】

実施例2で示されたものと同様に、二次選択からの個々のクローン(図13B)のそれぞれで、ELISA実験を実施した。ギャップを含まない、4個の可能な1塩基対ギャップのプール、及び16個の可能な2塩基対ギャップのプールのいずれかを含む標的部位への結合について、ZFPをテストした。標的部位は、表12に表示されている。ELISAスコアは、そのギャップ非形成標的部位に結合されたホストZFP8196のスコアに正規化された。2塩基対ギャップ標的部位への良好な正規化ELISAスコア及び良好な選択性を示したリンカーを有するZFPに関するELISAの結果が、表14に示されている。

#### 【0127】

## 【表 16】

表 14：2塩基対スキッピングリンカーについてのELISAデータの概要

リンカー配列	平均正規化ELISAスコア (ギャップ)			2塩基対 ギャップ選択性 vs:	
	0塩基対	1塩基対	2塩基対	0塩基対	1塩基対
TETTRPFRPPKP (配列番号183)	0.001	0.001	0.570	570.0	570.0
TGSLRPYRRPKP (配列番号177)	0.001	0.010	0.310	310.0	31.0
TSINRPFRPPKP (配列番号184)	0.010	0.020	0.570	57.0	28.5
TNTRPYRPPKP (配列番号175)	0.001	0.010	0.410	410.0	41.0
TASCPFRPPKP (配列番号194)	0.010	0.020	0.370	37.0	18.5
TGEARPYRPPKP (配列番号178)	0.001	0.010	0.610	610.0	61.0

## 【0128】

表示されたように、選択されたリンカーを有するZFPは、1塩基対及びギャップ非形成標的部位に勝る、2塩基対ギャップに対する明確な優先性を示した。

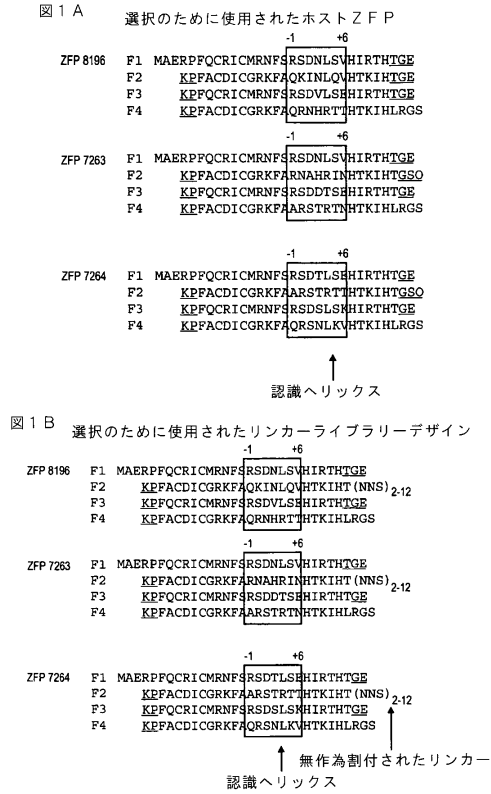
## 【0129】

本明細書で記載した全ての特許、特許出願及び公開は、それらの全体を参照により本明細書に組み込む。

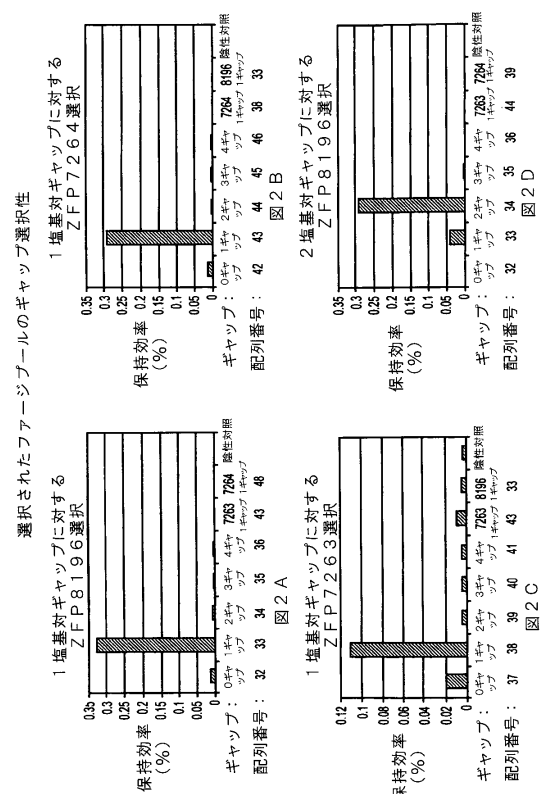
## 【0130】

本開示が、理解を明確にする目的で、図面及び実施例によって若干の詳細をもって示されてきたが、本開示の精神及び範囲を逸脱しない限りにおいて、種々の変更及び修正が実行され得ることが当業者には明らかであろう。したがって、上記説明及び実施例は、制限するものと解釈されるべきではない。

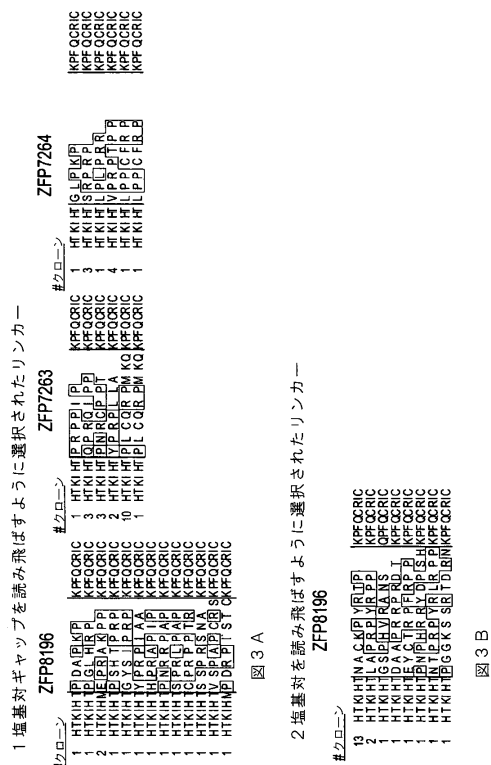
## 【図 1 A - B】



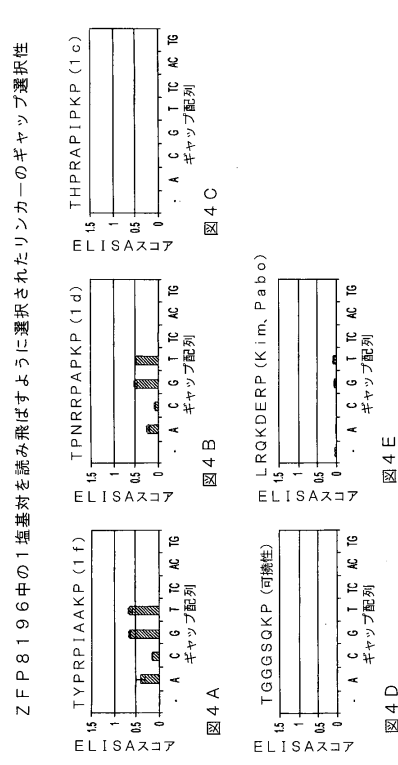
## 【図 2 A - D】



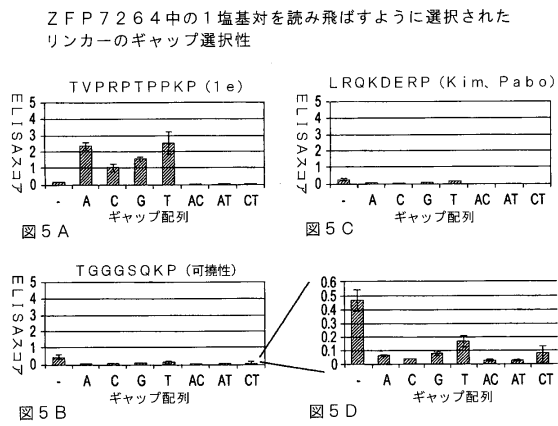
## 【図 3 A - B】



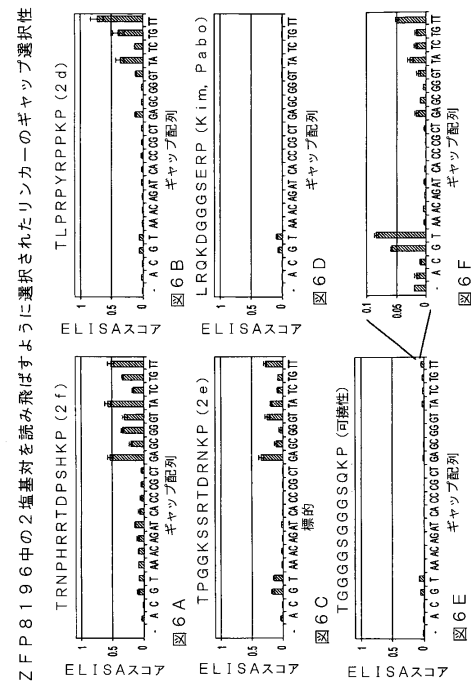
## 【図 4 A - E】



【図 5 A - D】



【図 6 A - F】



【図 7 A - B】

図 7

1 塩基対を読み飛ばすように選択されたリンカーによる可換性研究

リンカー	ELISAスコア															
	記号	ZFP1	ZFP2	ZFP3	ZFP4	ZFP5	ZFP6	ZFP7	ZFP8	ZFP9	ZFP10	ZFP11	ZFP12	平均		
A	可換性	0.75	1.08	0.21	0.26	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06		
	1e	1.19	1.30	1.06	1.10	0.75	0.29	0.48	0.38	0.50	0.18	0.05	0.05	0.06		
	1f	1.25	1.35	1.03	0.94	0.96	0.30	0.33	0.12	0.30	0.11	0.05	0.05	0.06		
	1d	1.20	1.08	1.04	0.83	0.85	0.25	0.39	0.28	0.24	0.12	0.05	0.05	0.06		
	1c	0.92	1.18	0.66	0.56	0.91	0.23	0.21	0.26	0.18	0.05	0.05	0.05	0.06		
B	可換性	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
	1e	1.6	1.2	4.9	4.1	9.2	5.9	3.6	7.6	10.1	3.6	1.0	1.0	5.0		
	1f	1.7	1.2	4.9	3.5	11.7	5.9	6.5	2.3	6.0	2.2	1.0	1.0	4.0		
	1d	1.6	1.0	4.9	3.1	10.4	4.9	7.8	5.7	4.8	2.4	1.0	1.0	4.0		
	1c	1.2	1.1	3.1	2.1	11.2	4.7	4.3	5.3	3.6	1.0	1.0	1.0	3.3		

下線を施した数値は、4倍より大きな改善を示す

【図 8 A - B】

図 8

2 塩基対を読み飛ばすように選択されたリンカーによる可換性研究

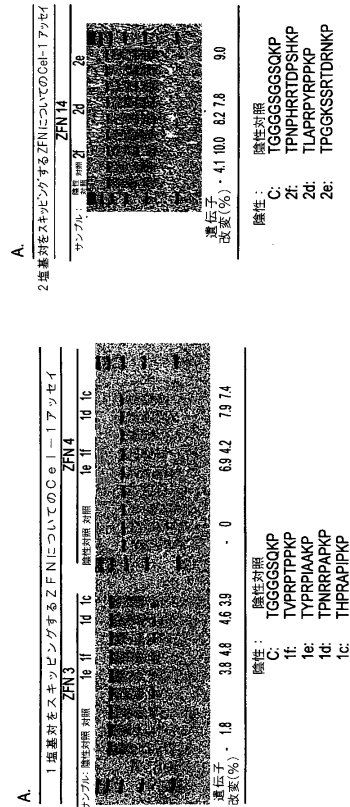
リンカー	ELISAスコア									
	記号	ZFP13	ZFP14	ZFP15	ZFP16	ZFP17	ZFP18	平均		
A	可換性	0.25	0.61	0.05	0.13	0.35	0.51			
	2f	0.48	1.13	0.27	0.31	0.79	0.47			
	2d	0.44	1.13	0.11	0.34	0.82	0.43			
	2e	0.42	0.75	0.17	0.27	0.88	0.52			
B	可換性	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
	2f	1.9	1.9	5.1	2.3	2.3	0.9	2.4		
	2d	1.7	1.9	2.1	2.5	2.4	0.8	1.9		
	2e	1.7	1.2	3.3	2.0	2.0	1.0	1.9		

下線を施した数値は、2倍より大きな改善を示す



【図 9 A - B】

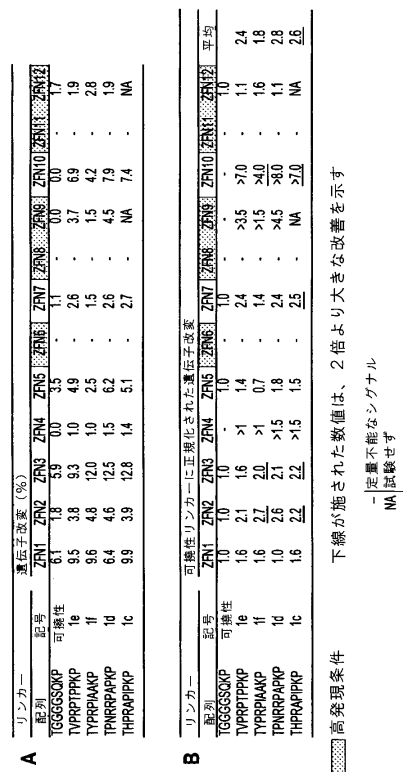
図 9  
実施例アッセイのゲル



【図 10 A - B】

図 10

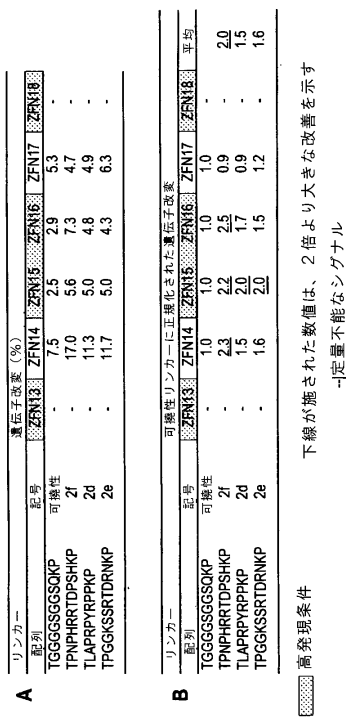
1塩基対をスキッピングする新しいリンカーを含有するZFNについての遺伝子改変



【図 11 A - B】

図 11

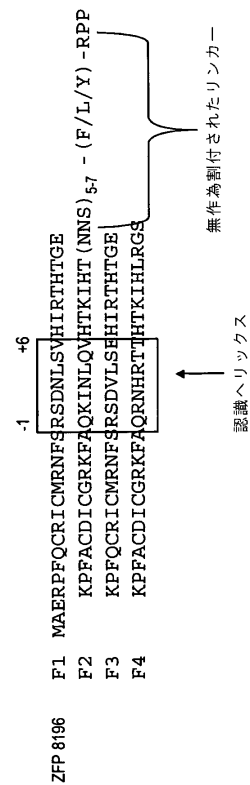
2塩基対をスキッピングする新しいリンカーを含有するZFNについての遺伝子改変



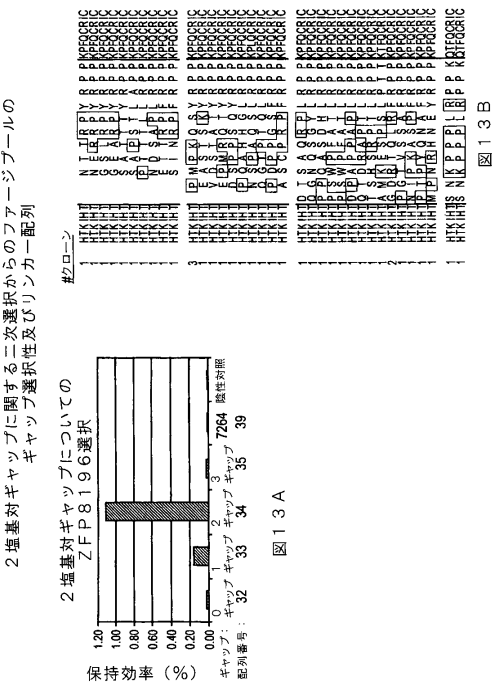
【図 12】

図 12

2塩基対ギャップに関する二次選択で使用された  
リンカーライブラリデザイン



【図 13 A - B】



【配列表】

0005898179000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00

(74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810  
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784  
弁理士 中村 和美

(72)発明者 デイビッド パスチョン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 8 0 4 , リッチモンド, カナル ブールバード 5 0 1 ,  
ポイント リッチモンド テク センター, スート エー 1 0 0 , シーノオー サンガモ バイオ  
サイエンシーズ インコーポレイテッド

(72)発明者 エドワード ジェイ・リバー  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 8 0 4 , リッチモンド, カナル ブールバード 5 0 1 ,  
ポイント リッチモンド テク センター, スート エー 1 0 0 , シーノオー サンガモ バイオ  
サイエンシーズ インコーポレイテッド

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 5 3 4 8 0 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 0 6 - 5 1 3 6 9 4 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 0 5 / 0 6 1 7 0 5 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8  
M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )