(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7272948号
(P7272948)

(45)発行日　令和5年5月12日(2023.5.12)

(24)登録日　令和5年5月1日(2023.5.1)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 9/22 (2006.01)		C12N	9/22	ZNA
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	

請求項の数　18　（全147頁）　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-510838(P2019-510838)
(86)(22)出願日	平成29年8月24日(2017.8.24)
(65)公表番号	特表2019-528073(P2019-528073A)
(43)公表日	令和1年10月10日(2019.10.10)
(86)国際出願番号	PCT/US2017/048409
(87)国際公開番号	WO2018/039448
(87)国際公開日	平成30年3月1日(2018.3.1)
審査請求日	令和2年7月27日(2020.7.27)
(31)優先権主張番号	62/378,978
(32)優先日	平成28年8月24日(2016.8.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31)優先権主張番号	62/443,981
(32)優先日	平成29年1月9日(2017.1.9)

最終頁に続く

(73)特許権者	508241200 サンガモ セラピューティクス， インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４００５ ブリズベーン マリーナ ブールバード ７０００
(74)代理人	100127926 弁理士　結田 純次
(74)代理人	100140132 弁理士　竹林 則幸
(72)発明者	ジェフリー・シー・ミラー アメリカ合衆国カリフォルニア州９４８０４．リッチモンド．スイート・エー１００．カナル・ブールバード５０１．サンガモ・セラピューティクス，インコー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　操作された標的特異的ヌクレアーゼ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

操作されたＦｏｋＩ切断ハーフドメインであって、前記操作された切断ハーフドメインが、以下から選択される一つの置換変異：

（ｉ）４８１位における野生型のＧｌｎ（Ｑ）残基が、Ａｌａ（Ａ）、Ｃｙｓ（Ｃ）、Ａｓｐ（Ｄ）、Ｇｌｕ（Ｅ）またはＳｅｒ（Ｓ）残基で置換される（Ｑ４８１Ａ、Ｑ４８１Ｃ、Ｑ４８１Ｄ、Ｑ４８１ＥまたはＱ４８１Ｓ）；

（ｉｉ）４１８位における野生型のＳｅｒ（Ｓ）残基が、Ｇｌｕ（Ｅ）またはＡｓｐ（Ｄ）残基で置換される（Ｓ４１８ＥまたはＳ４１８Ｄ）；

（ｉｉｉ）４７９位における野生型のＩｌｅ（Ｉ）残基が、Ｇｌｎ（Ｑ）またはＴｈｒ（Ｔ）残基で置換される（Ｉ４７９ＱまたはＩ４７９Ｔ）；

（ｉｖ）４７８位における野生型のＰｒｏ（Ｐ）残基が、Ａｓｐ（Ｄ）残基で置換される（Ｐ４７８Ｄ）；

（ｖ）５２５位における野生型のＬｙｓ（Ｋ）残基が、Ａｌａ（Ａ）、Ｃｙｓ（Ｃ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｔｈｒ（Ｔ）またはＶａｌ（Ｖ）残基で置換される（Ｋ５２５Ａ、Ｋ５２５Ｃ、Ｋ５２５Ｅ、Ｋ５２５Ｉ、Ｋ５２５Ｓ、Ｋ５２５ＴまたはＫ５２５Ｖ）；

（ｖｉ）４１６位における野生型のＡｒｇ（Ｒ）残基が、Ａｓｐ（Ｄ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｈｉｓ（Ｈ）またはＡｓｎ（Ｎ）残基で置換される（Ｒ４１６Ｄ、Ｒ４１６Ｅ、Ｒ４１６ＨまたはＲ４１６Ｎ）；

（ｖｉｉ）４８０位における野生型のＧｌｙ（Ｇ）残基が、Ａｓｐ（Ｄ）残基で置換される（Ｇ４８０Ｄ）；
（ｖｉｉｉ）４７２位における野生型のＳｅｒ（Ｓ）残基が、Ａｓｐ（Ｄ）残基で置換される（Ｓ４７２Ｄ）；
（ｉｘ）４７６位における野生型のＡｓｎ（Ｎ）残基が、Ｇｌｕ（Ｅ）またはＧｌｙ（Ｇ）残基で置換される（Ｎ４７６ＥまたはＮ４７６Ｇ）；
（ｘ）５３１位における野生型のＧｌｎ（Ｑ）残基が、Ａｒｇ（Ｒ）またはＴｈｒ（Ｔ）残基で置換される（Ｑ５３１ＲまたはＱ５３１Ｔ）；
（ｘｉ）４２２位における野生型のＡｒｇ（Ｒ）残基が、Ｈｉｓ（Ｈ）残基で置換される（Ｒ４２２Ｈ）；
（ｘｉｉ）４４６位における野生型のＳｅｒ（Ｓ）残基が、Ａｓｐ（Ｄ）残基で置換される（Ｓ４４６Ｄ）；
（ｘｉｉｉ）４４８位における野生型のＬｙｓ（Ｋ）残基が、Ａｌａ（Ａ）残基で置換される（Ｋ４４８Ａ）；
（ｘｉｖ）５２３位における野生型のＨｉｓ（Ｈ）残基が、Ｇｌｕ（Ｅ）残基で置換される（Ｈ５２３Ｅ）；
（ｘｖ）４２４位における野生型のＬｅｕ（Ｌ）残基が、Ｐｈｅ（Ｆ）残基で置換される（Ｌ４２４Ｆ）；及び
（ｘｖｉ）５４２位における野生型のＡｓｎ（Ｎ）が、Ａｓｐ（Ｄ）残基で置換される（Ｎ５４２Ｄ）；
を含み、
前記アミノ酸残基が、配列番号１に示される完全長ＦｏｋＩ野生型切断ドメインに対して、完全長ＦｏｋＩタンパク質のアミノ酸残基３８４で開始して、番号付けされ、
そして、前記操作された切断ハーフドメインは、配列番号１に示される完全長ＦｏｋＩ野生型切断ドメインに対して９０％以上の配列同一性を有し、かつ、当該ＦｏｋＩ野生型切断ドメインと比較してオフターゲット切断活性が低減されている、
前記操作されたＦｏｋＩ切断ハーフドメイン。
【請求項２】
４８１位における野生型のＧｌｎ（Ｑ）残基が、Ａｌａ（Ａ）残基で置換される、請求項１に記載の操作された切断ハーフドメイン。
【請求項３】
以下の変異：
Ｒ４１６Ｄ、Ｒ４１６Ｅ、Ｒ４１６Ｈ、もしくはＲ４１６Ｎ変異及びＲ４２２Ｈ変異；Ｒ４１６Ｄ、Ｒ４１６Ｅ、Ｒ４１６Ｈ、もしくはＲ４１６Ｎ変異及びＫ４４８Ａ変異；Ｋ４４８Ａ及びＩ４７９Ｑ変異；Ｋ４４８Ａ及びＱ４８１Ａ変異；ならびに／または、Ｋ４４８Ａ変異及びＫ５２５Ａ、Ｋ５２５Ｃ、Ｋ５２５Ｅ、Ｋ５２５Ｉ、Ｋ５２５Ｓ、Ｋ５２５ＴもしくはＫ５２５Ｖ変異、
を含む、請求項１または２に記載の操作された切断ハーフドメイン。
【請求項４】
さらに、４３２、４４１、４８３、４８６、４８７、４９０、４９６、４９９、５２７、５３７、５３８及び５５９位のうちの１つ以上において追加のアミノ酸変異を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の操作された切断ハーフドメイン。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載の第１の操作された切断ハーフドメインと、第２の切断ハーフドメインとを含む、ヘテロ二量体。
【請求項６】
請求項１～４のいずれか一項に記載の操作された切断ハーフドメインと、ＤＮＡ結合ドメインとを含む、人工ヌクレアーゼ。
【請求項７】
前記ＤＮＡ結合ドメインが、ジンクフィンガータンパク質、ＴＡＬＥエフェクタードメ

インン、またはシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を含む、請求項６に記載の人工ヌクレアーゼ。
【請求項８】
前記ジンクフィンガータンパク質が、３～６個のジンクフィンガードメインを含み、前記ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインの各々が、２つのβ－シート、α－ヘリックス、ヌクレオチド配列に結合する認識ヘリックス領域を含み、さらに、前記ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインの１つ以上が、α－ヘリックス領域の開始に対して番号付けして、（－５）、（－９）及び／または（－１４）位における１つ以上の変異を含む、請求項７に記載の人工ヌクレアーゼ。
【請求項９】
請求項１～４のいずれか一項に記載の前記操作された切断ハーフドメイン、請求項５に記載の前記第１及び第２の操作された切断ドメイン、または請求項６～８のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ、をコードする、１つ以上のポリヌクレオチド。
【請求項１０】
請求項１～４のいずれか一項に記載の前記操作された切断ハーフドメイン、請求項５に記載のヘテロ二量体、請求項６～８のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ、または請求項９に記載のポリヌクレオチド、を含む、単離された細胞。
【請求項１１】
ゲノム細胞クロマチンを対象領域において切断するためのインビトロ方法であって、
前記方法が、請求項６～８のいずれか一項に記載の操作された切断ドメインを含む人工ヌクレアーゼを細胞内で発現させることを含み、
前記ヌクレアーゼが、前記ゲノム細胞クロマチンの前記対象領域内でヌクレオチド配列を部位特異的に切断する、前記インビトロ方法。
【請求項１２】
前記細胞を、ドナーポリヌクレオチドと接触させることをさらに含み、前記細胞クロマチンの切断が、前記ドナーポリペプチドと前記細胞クロマチンとの間の相同組換えを容易にする、請求項１１に記載のインビトロ方法。
【請求項１３】
ゲノム細胞クロマチンにおける少なくとも２つの標的部位を切断するインビトロ方法であって、前記方法が、ゲノム細胞クロマチンにおける少なくとも第１及び第２の標的部位を切断することを含み、各標的部位が、請求項６～８のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼを含む組成物を用いて切断される、前記インビトロ方法。
【請求項１４】
疾患の治療または予防に用いるための、請求項１～４のいずれか一項に記載の前記操作された切断ハーフドメイン、請求項５に記載のヘテロ二量体、請求項６～８のいずれか一項に記載の人工ヌクレアーゼ、または請求項１０に記載の単離された細胞。
【請求項１５】
第１の人工ヌクレアーゼをコードする請求項９に記載の第１のポリヌクレオチド及び第２の人工ヌクレアーゼをコードする請求項９に記載の第２のポリヌクレオチドを含む、組成物であって、前記第１及び第２の人工ヌクレアーゼの比は、１：１ではない、前記組成物。
【請求項１６】
前記第１及び第２の人工ヌクレアーゼの比は、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：８、１：９、１：１０、１：２０または１：３０の比である、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
操作されたヌクレアーゼ切断特異性を増大するためのインビトロ方法であって、前記方法は、細胞を、請求項１～４のいずれか一項に記載の操作された切断ハーフドメインパートナーを含む操作されたヌクレアーゼ複合体と接触させることを含み、前記パートナーの比は、１：１ではない、前記インビトロ方法。

【請求項１８】
（ｉ）前記パートナーの比は、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９もしくは１：２０、もしくは１：３０より大きな比であり；及び／または
（ｉｉ）各パートナーは、ｍＲＮＡとして細胞へ送達されるか、もしくは、各パートナーをコードするｍＲＮＡもしくはベクターの異なる量が送達されるウイルス性もしくは非ウイルス性ベクター中で送達される、
請求項１７に記載のインビトロ方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１６年８月２４日に出願された米国仮出願第６２／３７８，９７８号及び２０１７年１月９日に出願された米国仮出願第６２／４４３，９８１号の利益を主張し、これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
連邦政府による資金提供を受けた研究の下で行われた発明に対する権利の記述
非適用。
【０００３】
本開示は、ポリペプチド及びゲノム工学及び相同組換えの分野にある。
【背景技術】
【０００４】
操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼとしても称される、操作されたｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒ　ＲＮＡ（「シングルガイドＲＮＡ」）を有するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系、及び／またはアルゴノート系に基づくヌクレアーゼ（例えば、「ＴｔＡｇｏ」として知られるＴ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓからのもの（Ｓｗａｒｔｓ　ｅｔ　ａｌ（２０１４）Ｎａｔｕｒｅ　５０７（７４９１）：２５８－２６１）などの人工ヌクレアーゼは、切断ドメインと会合しているか、または作動可能に連結されているＤＮＡ結合ドメイン（ヌクレオチドまたはポリペプチド）を含み、ゲノム配列の標的化された変更に使用されている。例えば、ヌクレアーゼは、外因性配列を挿入し、１つ以上の内因性遺伝子を不活性化し、変更された遺伝子発現パターンを有する生物（例えば、作物）及び細胞株を作成するためなどに使用されている。例えば、米国特許第９，２５５，２５０号、同第９，２００，２６６号、同第９，０４５，７６３号、同第９，００５，９７３号、同第８，９５６，８２８号、同第８，９４５，８６８号、同第８，７０３，４８９号、同第８，５８６，５２６号、同第６，５３４，２６１号、同第６，５９９，６９２号、同第６，５０３，７１７号、同第６，６８９，５５８号、同第７，０６７，３１７号、同第７，２６２，０５４号、同第７，８８８，１２１号、同第７，９７２，８５４号、同第７，９１４，７９６号、同第７，９５１，９２５号、同第８，１１０，３７９号、同第８，４０９，８６１号、米国特許公開第２００３０２３２４１０号、同第２００５０２０８４８９号、同第２００５００２６１５７号、同第２００５００６４４７４号、同第２００６００６３２３１号、同第２００８０１５９９９６号、同第２０１０００２１８２６４号、同第２０１２００１７２９０号、同第２０１１０２６５１９８号、同第２０１３０１３７１０４号、同第２０１３０１２２５９１号、同第２０１３０１７７９８３号及び同第２０１３０１７７９６０号及び同第２０１５００５６７０５号を参照されたい。例えば、一対のヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ、ｄＣａｓ－Ｆｏｋ融合体）は、ゲノム配列を切断するために使用され得る。対の各メンバーは、一般的に、ヌクレアーゼの１つ以上の切断ドメイン（またはハーフドメイン）に連結された、操作された（非天然型の）ＤＮＡ結合タンパク質を含む。ＤＮＡ結合タンパク質がそれらの標的部位に結合

するとき、それらのＤＮＡ結合タンパク質に連結している切断ドメインは、二量体化及びその後のゲノムの切断が起こることができるように配置される。

【０００５】

一般には、分子間イオン対（塩橋）は、多くのＤＮＡタンパク質相互作用に不可欠である。しばしば、荷電アミノ酸側鎖（すなわち、－ＮＨ３＋、＝ＮＨ２＋）は、ＤＮＡ主鎖の負に荷電したリン酸基と相互作用して塩橋を形成する。これらのイオン対は非常に動的であることができ、２つのイオンの直接対形成と、溶媒（例えば、水分子）が２つのイオンの間に挿入されたときの「溶媒－分離イオン対」である対形成とを交互に繰り返すことができる（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ（２０１５）Ｊ Ｐｈｙｓ Ｃｈｅｍ Ｌｅｔｔ ６：２７３３－２７３７）。

【０００６】

ジンクフィンガータンパク質に関して、標的ＤＮＡ配列に対するＺＦＰの特異性は、ジンクフィンガードメインと特定のＤＮＡ塩基との間の配列特異的接触に依存する。加えて、ジンクフィンガードメインはまた、ＤＮＡ主鎖のリン酸との非特異的イオン対相互作用に関与するアミノ酸残基を含む。Ｅｌｒｏｄ－Ｅｒｉｃｋｓｏｎら（（１９９６）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４：１１７１）は、ジンクフィンガータンパク質とその同族ＤＮＡ標的との共結晶化を通して、水素結合の形成を通してＤＮＡ主鎖上のリン酸と相互作用することができる特異的なアミノ酸があることを実証した。周知のＺｉｆ２６８主鎖を使用するジンクフィンガータンパク質は、典型的には、それらのβ－シートの第２の鎖のアミノ末端残基としてアルギニンを有し、これはまた第２の不変システインに対してカルボキシル末端の第２の位置である（図５Ａを参照されたい）。この位置は、α－ヘリックスの開始の前の５番目の残基であるので、各ジンクフィンガードメイン内の（－５）として称することができる（図５Ａ）。この位置のアルギニンは、その側鎖のグアニジニウム基との荷電水素結合の形成を介して、ＤＮＡ主鎖上のリン酸と相互作用することができる。Ｚｉｆ２６８主鎖中のジンクフィンガータンパク質はまた、第１の不変異体システインに対して４つの残基のアミノ末端である位置にリジンをしばしば有する。亜鉛配位システイン残基の間に２残基を有するジンクフィンガーについてのα－ヘリックスの開始の前の１４番目の残基であるために、この位置は各フィンガー内で（－１４）として称することができる（図５Ａ）。リジンは、その側鎖アミノ基との水媒介荷電水素結合の形成を介して、ＤＮＡ主鎖上のリン酸と相互作用することができる。リン酸基はＤＮＡ主鎖全体にわたって見い出されるので、ジンクフィンガーとＤＮＡ分子との間のこの種の相互作用は、一般的に非配列特異的であると見なされる（Ｊ．Ｍｉｌｌｅｒ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｐｈ．Ｄ．Ｔｈｅｓｉｓ，２００２）。

【０００７】

最近の研究は、いくつかのヌクレアーゼ中の非特異的リン酸接触側鎖もまた、それらのヌクレアーゼの非特異的切断活性をある程度説明し得るという仮説を立てた（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ｅｔ ａｌ，（２０１６）Ｎａｔｕｒｅ ５２９（７５８７）：４９０－５；Ｇｕｉｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ（２０１４）Ｎａｔ Ｍｅｔｈ：４２９－４３５）。研究者らは、これらのヌクレアーゼが「過剰なＤＮＡ結合エネルギー」を有し得ることを提唱し、これは、ヌクレアーゼがそれらのＤＮＡ標的に対して、標的部位に実質的に結合し、切断するために必要とされるものよりも大きい親和性を有し得ることを意味する。これにより、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメイン（Ｇｕｉｌｉｎｇｅｒ、同書）またはＣａｓ９ ＤＮＡ結合ドメイン（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ、同書）中のカチオン性電荷を減少させて、これらのヌクレアーゼのＤＮＡ結合エネルギーを低下させる試みがなされ、これはインビトロでの切断特異性の増大をもたらした。しかしながら、追加の研究（Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ（２０１５）Ｎａｔｕｒｅ ５２７（７５７６）：１１０－１１３）は、Ｃａｓ９ ＤＮＡ結合ドメインのＫｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒの研究で変異されたカチオン性アミノ酸のいくつかについて、Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメインの適切な折り畳み及び活性化における役割も示唆している。したがって、Ｃａｓ９活性におけるこれらのアミノ酸の正確な役割は知られていない。

【０００８】
配列選択的（人工）ヌクレアーゼによる最適な切断特異性のためには、オンターゲット結合及び活性が飽和しないように条件を調整することが望ましい。飽和条件下では、定義が示す通り、過剰なヌクレアーゼが、完全なオンターゲット活性を達成するために必要な量を超えて使用される。この過剰量はオンターゲットの利益をもたらさないが、それでもなおオフターゲット部位での切断の増加をもたらし得る。単量体ヌクレアーゼについては、飽和条件は、滴定曲線上の飽和プラトーを特定して回避するために単純な用量反応試験を実施することによって、容易に回避し得る。しかしながら、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮまたはｄＣａｓ－Ｆｏｋなどの二量体ヌクレアーゼについて、個々の単量体の結合親和性が異なる場合に飽和条件を特定して、回避することはより複雑であり得る。そのような場合、単純な１：１ヌクレアーゼ比を用いた用量反応試験は、より弱い結合モノマーの飽和点を明らかにするだけであろう。そのようなシナリオの下では、例えば、モノマー親和性が１０倍異なるならば、１：１滴定試験で特定された飽和点において、より高い親和性の単量体が、必要とされるよりも１０倍高い濃度で存在するであろう。結果として生じる過剰の高親和性モノマーは、意図された標的での切断のいかなる有益な増加ももたらすことなく、オフターゲット活性の増加をもたらし、潜在的に任意の所与のヌクレアーゼ対について全体的な減少した特異性をもたらす可能性がある。

【０００９】
オフターゲット切断事象を低減させるために、操作された偏性ヘテロ二量体切断ハーフドメインが開発されている。例えば、米国特許第７，９１４，７９６号、同第８，０３４，５９８号、同第８，９６１，２８１号及び同第８，６２３，６１８号、米国特許公開第２００８０１３１９６２号及び同第２０１２００４０３９８号を参照されたい。これらの偏性ヘテロ二量体は、様々な操作された切断ドメインがＺＦＰによって適切な標的部位に配置されるときにだけ、それらの標的を二量体化及び切断し、これにより単量体のオフターゲット切断を低減及び／または排除する。

【００１０】
しかしながら、オフターゲット切断活性を低減させるために、操作されたヌクレアーゼ切断系の追加の方法及び組成物が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【００１１】
本開示は、オフターゲット部位としても知られる、他の意図しない切断部位に対して、ヌクレアーゼ（例えば、ヌクレアーゼ対）の、その意図する標的に対する特異性を増加させるための方法及び組成物を提供する。したがって、本明細書には、ＤＮＡ結合ドメイン領域（例えば、ジンクフィンガータンパク質の主鎖またはＴＡＬＥ）のうちの１つ以上において変異及び／またはＦｏｋＩヌクレアーゼ切断ドメインもしくは切断ハーフドメインにおける１つ以上の変異を含む人工ヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ）が記載される。さらに、本明細書には、これらの新規なヌクレアーゼ（例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮなど）を使用することによって、及び／またはヌクレアーゼ複合体の操作された切断ハーフドメインパートナーの独立した漸増を通して、切断活性の特異性を増加させる方法が記載される。本発明の方法及び組成物は、個々にまたは組み合わせて使用されると、標的特異性は、オフターゲット切断活性の低減を介して、驚くべきかつ予想外の増加を提供する。本開示はまた、対象領域における細胞クロマチンの標的化切断及び／または細胞内の所定の対象領域における標的化組み込みを介した導入遺伝子の組み込みのためにこれらの組成物を使用する方法を提供する。

【００１２】
したがって、一態様では、変異体が由来する親（例えば、野生型）切断ドメインと比較して１つ以上の変異を含む操作されたヌクレアーゼ切断ハーフドメインが本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、１つ以上の変異は、添付の表及び図のうちのいずれかに示される１つ以上の変異であり、これらの変異体の互いとの及び他の変異体との任意の

組み合わせ（二量体化及び／または触媒ドメイン変異体ならびにニッカーゼ変異など）が含まれる。本明細書に記載の変異としては、切断ドメインの電荷を変化させる変異、例えば、正に荷電した残基の非正荷電残基への変異（例えば、Ｋ及びＲ残基の（例えば、Ｓへの変異）；Ｎ残基の（例えば、Ｄへの）、及びＱ残基の（例えば、Ｅへの）変異；分子モデリングに基づいてＤＮＡ主鎖に近いと予測され、ＦｏｋＩ相同体中の変異を示す残基への変異；及び／または他の残基における変異（例えば、米国特許第８，６２３，６１８号及びＧｕｏ　ｅｔ　ａｌ，（２０１０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４００（１）：９６－１０７）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００１３】

最も有望な変異は、第２の基準を用いて発見された。最初の有望な変異は、ＦｏｋＩがＤＮＡに結合したときにＤＮＡ主鎖に近いと予測される正に荷電した残基であった。本明細書に記載の切断ドメインは、本明細書に記載の変異のうちの１、２、３、４、５またはそれ以上を含むことができ、さらに追加の既知の変異を含むことができる。したがって、本発明の変異は、単独で使用されるとき、米国特許第８，６２３，６１８号に開示される特異的変異（例えば、Ｎ５２７Ｄ、Ｓ４１８Ｐ、Ｋ４４８Ｍ、Ｑ５３１Ｒなど）を含まないが、米国特許第８，６２３，６１８号の変異体と組み合わせて使用することができる新規な変異体が本明細書で提供される。二量体対中の触媒ヌクレアーゼドメインのうちの１つが、それを触媒的に不活性にする１つ以上の変異を含むニッカーゼ変異体（米国特許第８，７０３，４８９号、同第９，２００，２６６号及び同第９，６３１，１８６号を参照されたい）もまた、本明細書に記載されるいずれの変異体と組み合わせて使用されてもよい。ニッカーゼは、ＺＦＮニッカーゼ、ＴＡＬＥＮニッカーゼ、及びＣＲＩＳＰＲ／ｄＣａｓ系とすることができる。

【００１４】

ある特定の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、ＦｏｋＩまたはＦｏｋＩ相同体に由来し、配列番号１に示されるような野生型完全長ＦｏｋＩまたはＦｏｋＩ相同体中の対応する残基に対して番号付けられたアミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、及び／または５２５のうちの１つ以上に変異を含む（図１７を参照されたい）。他の実施形態では、ＦｏｋＩに由来する切断ハーフドメインは、アミノ酸残基４１４～４２６、４４３～４５０、４６７～４８８、５０１～５０２、及び／または５２１～５３１のうちの１つ以上に変異を含み、３８７、３９３、３９４、３９８、４００、４１６、４１８、４２２、４２７、４３４、４３９、４４１、４４２、４４４、４４６、４４８、４７２、４７３、４７６、４７８、４７９、４８０、４８１、４８７、４９５、４９７、５０６、５１６、５２３、５２５、５２７、５２９、５３４、５５９、５６９、５７０、及び／または５７１のうちの１つ以上が含まれる。変異は、対応する位置でＦｏｋＩと相同な天然制限酵素に見られる残基に対する変異を含み得る（図１７）。ある特定の実施形態では、変異は、置換、例えば、任意の異なるアミノ酸、例えば、アラニン（Ａ）、システイン（Ｃ）、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、ヒスチジン（Ｈ）、フェニルアラニン（Ｆ）、グリシン（Ｇ）、アスパラギン（Ｎ）、セリン（Ｓ）またはスレオニン（Ｔ）による野生型残基の置換である。変異体の任意の組み合わせが企図され、これらとしては、添付の表及び図に示されるものが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、ＦｏｋＩヌクレアーゼドメインは、４１６、４２２、４４７、４７９及び／または５２５（野生型、配列番号１に対して番号付けされる）のうちの１つ以上に変異を含む。ヌクレアーゼドメインはまた、４１８、４３２、４４１、４４８、４７６、４８１、４８３、４８６、４８７、４９０、４９６、４９９、５２３、５２７、５３７、５３８及び５５９位に１つ以上の変異を含むことができ、ＥＬＤ、ＫＫＲ、ＥＬＥ、ＫＫＳが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、米国特許第８，６２３，６１８号を参照されたい。さらに他の実施形態では、切断ドメインは、表１５に示される残基のうちの１つ以上（例えば、４１９、４２０、４２５、４４６、４４７、４７０、４７１、４７２、４７５、４７８、４８０、４９２、５００、５０２、５２１、５２３、５２６、５３０、５３６、５４０、５４５、５７３及び／または５７４）において変異を含む。ある特定の

実施形態では、本明細書に記載の変異型切断ドメインは、ヌクレアーゼ二量体化に関与する残基に対する変異（二量体化ドメイン変異）、及び１つ以上の追加の変異、例えば、リン酸接触残基、例えば、二量体化ドメインの外側のアミノ酸位置に、リン酸との接触に関与している可能性のあるアミノ酸残基において、１、２、３、４、５、６またはそれ以上の変異と組み合わせた二量体化変異体（例えば、ＥＬＤ、ＫＫＲ、ＥＬＥ、ＫＫＳなど）を含む。好ましい実施形態では、４１６、４２２、４４７、４４８及び／または５２５位での変異は、非荷電のまたは負に荷電したアミノ酸での正に荷電したアミノ酸の置換を含む。他の実施形態では、４４６、４７２及び／または４７８位（ならびに任意に、例えば、二量体化または触媒ドメイン中の追加の残基）での変異が行われる。

【００１５】

他の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、二量体化ドメインにおいて、変異、例えば、本明細書に記載される変異に加えて、アミノ酸残基４９０、５３７、５３８、４９９、４９６及び４８６を含む。好ましい実施形態では、本発明は、融合タンパク質を提供し、ここでは、操作された切断ハーフドメインが、本明細書に記載の１つ以上の変異に加えて、４８６位の野生型Ｇｌｎ（Ｑ）残基がＧｌｕ（Ｅ）残基で置換されている、４９９位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｅｕ（Ｌ）残基と置換されている、４９６位の野生型Ａｓｎ（Ｎ）残基がＡｓｐ（Ｄ）またはＧｌｕ（Ｅ）残基で置換されているポリペプチド（「ＥＬＤ」または「ＥＬＥ」）を含む。別の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは野生型ＦｏｋＩまたはＦｏｋＩ相同体切断ハーフドメインに由来し、アミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５の１つ以上の変異に加えて、野生型ＦｏｋＩ（配列番号１）に対して番号付けされた、アミノ酸残基４９０、５３８、及び５３７における変異を含む。好ましい実施形態では、本発明は融合タンパク質を提供し、ここでは、操作された切断ハーフドメインが、本明細書中に記載される１つ以上の変異に加えて、４９０位の野生型Ｇｌｕ（Ｅ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基で置換されている、５３８位のＩｌｅ（Ｉ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基と置換されている、そして５３７位の野生型Ｈｉｓ（Ｈ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基またはＡｒｇ（Ｒ）残基で置換されているポリペプチド（「ＫＫＫ」または「ＫＫＲ」）を含む（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，９６２，２８１号を参照されたい）。

【００１６】

別の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは野生型ＦｏｋＩ切断ハーフドメインまたはその相同体に由来し、アミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５の１つ以上の変異に加えて、野生型ＦｏｋＩに対して番号付けされたアミノ酸残基４９０、及び５３８の変異を含む。好ましい態様では、本発明は融合タンパク質を提供し、ここでは、操作された切断ハーフドメインが、４１６位、４２２位、４４７位、４４８位または５２５位の１つ以上の変異に加えて、４９０位の野生型Ｇｌｕ（Ｅ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基で置換されている、そして５３８位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基（「ＫＫ」）で置換されているポリペプチドを含む。好ましい実施形態では、本発明は融合タンパク質を提供し、ここで、操作された切断ハーフドメインが、４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５位の１つ以上の変異に加えて、４８６位の野生型Ｇｌｎ（Ｑ）残基がＧｌｕ（Ｅ）残基で置換されている、そして４９９位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｅｕ（Ｌ）残基（「ＥＬ」）で置換されているポリペプチドを含む（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，０３４，５９８号を参照されたい）。

【００１７】

一態様では、本発明は融合分子を提供し、ここでは、操作された切断ハーフドメインが、ＦｏｋＩ触媒ドメインの３８７、３９３、３９４、３９８、４００、４０２、４１６、４２２、４２７、４３４、４３９、４４１、４４６、４４７、４４８、４６９、４７２、４７８、４８７、４９５、４９７、５０６、５１６、５２５、５２９、５３４、５５９、５６９、５７０、５７１位のうちの１つ以上における野生型アミノ酸残基が変異しているポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、野生型アミノ酸を、正に荷電した残基から中性の残基または負に荷電した残基に変更する。これらのいずれの

実施形態では、記載された変異体はまた、１つ以上の追加の変異を含むＦｏｋＩドメイン中に作製され得る。好ましい態様では、これらの追加の変異は、二量体化ドメイン内に、例えば、４９９、４９６、４８６、４９０、５３８及び５３７位にある。変異は、１つ以上のアミノ酸残基の置換、挿入及び／または欠失を含む。

【００１８】

さらに別の態様では、上述した操作された切断ハーフドメインのいずれも、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼなどが挙げられるが、これらに限定されないＤＮＡ結合ドメインと会合させることによって、人工ヌクレアーゼに組み込まれ得る。ジンクフィンガーヌクレアーゼのジンクフィンガータンパク質は、非カノニカル亜鉛配位残基（例えば、カノニカルＣ２Ｈ２立体配置よりはむしろＣＣＨＣであり、米国特許第９，２３４，１８７号を参照されたい）を含み得る。

【００１９】

別の態様では、人工ヌクレアーゼを産生する、本明細書に記載されるようなＤＮＡ結合ドメイン及び操作されたＦｏｋＩまたはその相同体切断ハーフドメインを含む融合分子が提供される。ある特定の実施形態では、融合分子のＤＮＡ結合ドメインは、ジンクフィンガー結合ドメイン（例えば、操作されたジンクフィンガー結合ドメイン）である。他の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインである。さらに他の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ＤＮＡ結合分子（例えば、ガイドＲＮＡ）及び触媒的に不活性のＣａｓ９またはＣｆｐ１タンパク質（ｄＣａｓ９またはｄＣｆｐ１）を含む。いくつかの実施形態では、操作された融合分子は、二量体ヌクレアーゼが二本鎖ＤＮＡ分子の一方の鎖のみを切断することができ、ニッカーゼを形成することができるように、触媒的に不活性な操作された切断ハーフドメインとのヌクレアーゼ複合体を形成する（米国特許第９，２００，２６６号を参照されたい）。

【００２０】

本発明の方法及び組成物はまた、ＤＮＡ主鎖上のリン酸と非特異的に相互作用することができる標的配列のヌクレオチドを認識する残基の外側のＤＮＡ結合ドメイン内の１つ以上のアミノ酸への変異（例えば、「ＺＦＰ主鎖」（ＤＮＡ認識ヘリックス領域の外側）または「ＴＡＬＥ主鎖」（ＲＶＤの外側）への１つ以上の変異）を含む。これにより、ある特定の実施形態では、本発明は、ヌクレオチド標的特異性に必要とされないＺＦＰ主鎖中のカチオン性アミノ酸残基の変異を含む。いくつかの実施形態では、ＺＦＰ主鎖中のこれらの変異は、カチオン性アミノ酸残基を中性またはアニオン性アミノ酸残基に変異させることを含む。いくつかの実施形態では、ＺＦＰ主鎖中のこれらの変異は、極性アミノ酸残基を中性または非極性アミノ酸残基に変異させることを含む。好ましい実施形態では、変異は、ＤＮＡ結合ヘリックスに対して（－５）、（－９）及び／または（－１４）の位置で行われる。いくつかの実施形態では、ジンクフィンガーは、（－５）、（－９）及び／または（－１４）に１つ以上の変異を含み得る。さらなる実施形態では、マルチフィンガージンクフィンガータンパク質中の１つ以上のジンクフィンガーは、（－５）、（－９）及び／または（－１４）において変異を含み得る。いくつかの実施形態では、（－５）、（－９）及び／または（－１４）のアミノ酸（例えば、アルギニン（Ｒ）またはリジン（Ｋ））は、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ａｓｐ（Ｎ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｔｙｒ（Ｙ）及び／またはグルタミン（Ｑ）に変異される。

【００２１】

別の態様では、本明細書に記載される操作された切断ハーフドメインまた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が提供される。

【００２２】

さらに別の態様では、本明細書に記載されるヌクレアーゼ、ポリペプチド（例えば、融合分子または融合ポリペプチド）及び／またはポリヌクレオチドのいずれかを含む細胞も提供される。一実施形態では、細胞は一対の融合ポリペプチドを含み、一方の融合ポリペプチドは、アミノ酸残基３９３、３９４、３９８、４１６、４２１、４２２、４４２、４４４、４４７、４４８、４７３、４８０、５３０及び／または５２５における１つ以上の

変異に加えて、ＥＬＤまたはＥＬＥ切断ハーフドメインを含み、及び一方の融合ポリペプチドは、残基３９３、３９４、３９８、４１６、４２１、４２２、４４２、４４４、４４６、４４７、４４８、４７２、４７３、４７８、４８０、５３０及び／または５２５における１つ以上の変異に加えて、ＫＫＫまたはＫＫＲ切断ハーフドメインを含む（米国特許第８，９６２，２８１号を参照されたい）。

【００２３】

本明細書に記載されるこれらの融合ポリペプチドのいずれにおいても、ＺＦＰパートナーは、（－５）、（－９）及び／または（－１４）位にジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインの変異をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、－５位のＡｒｇ（Ｒ）はＴｙｒ（Ｙ）、Ａｓｐ（Ｎ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｇｌｎ（Ｑ）、またはＡｌａ（Ａ）に変更される。他の実施形態では、（－９）位のＡｒｇ（Ｒ）は、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ａｓｐ（Ｎ）、またはＧｌｕ（Ｅ）で置換される。さらなる実施形態では、（－１４）位のＡｒｇ（Ｒ）は、Ｓｅｒ（Ｓ）またはＧｌｎ（Ｑ）で置換される。他の実施形態では、融合ポリペプチドは、（－５）、（－９）及び／または（－１４）位のアミノ酸が任意の組み合わせで上記のアミノ酸のいずれかに変更されているジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインに変異を含むことができる。

【００２４】

本発明のポリペプチド及び／またはポリヌクレオチドによって修飾された細胞もまた本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、導入遺伝子のヌクレアーゼ媒介挿入、または遺伝子のヌクレアーゼ媒介ノックアウトを含む。修飾細胞、及び修飾細胞に由来する任意の細胞は、必ずしも一過性を超えて本発明のヌクレアーゼを含む必要はないが、そのようなヌクレアーゼによって媒介されるゲノム修飾は残る。

【００２５】

さらに別の態様では、対象領域における細胞クロマチンの標的化切断のための方法、細胞内で相同組換えを生じさせる方法、感染症を治療する方法、及び／または疾患を治療する方法が提供される。これらの方法は、インビトロ、エクスビボまたはインビボもしくはそれらの組み合わせで実施することができる。本方法は、本明細書に記載される一対の融合ポリペプチド（すなわち、一方または両方の融合ポリペプチド（複数可）が本明細書に記載される操作された切断ハーフドメインを含む一対の融合ポリペプチド）を発現させることによって細胞の所定の対象領域で細胞クロマチンを切断することを含む。ある特定の実施形態では、オンターゲット部位の標的化された切断は、本明細書に記載される変異を含まない切断ドメインと比較して、５０％～６０％（またはその間の任意の値）、６０％～７０％（またはその間の任意の値）、７０％～８０％（またはその間の任意の値）、８０％～９０％（またはその間の任意の値）、９０％～２００％（またはその間の任意の値）を含む、少なくとも５０～２００％以上（またはその間の任意の値）まで増加する。同様に、本明細書に記載される方法及び組成物を使用することにより、オフターゲット部位の切断は、１～５０倍（またはその間の任意の値）が挙げられるが、これに限定されない、１～１００倍以上まで減少する。

【００２６】

本明細書に記載された操作された切断ハーフドメインは、対象領域における細胞クロマチンの標的化切断及び／または細胞内の所定の対象領域における相同組換えのための方法において使用することができる。細胞としては、培養細胞、細胞株、生物内の細胞、細胞及び／またはそれらの子孫が治療後に生物に戻される場合に治療のために生物から除去された細胞、ならびに生物から取り出し、本発明の融合分子を用いて修飾し、次いで治療方法（細胞療法）において生物に戻す細胞が挙げられる。細胞クロマチン中の対象領域は、例えば、ゲノム配列またはその一部とすることができる。組成物は、ＤＮＡ結合分子（例えば、操作されたジンクフィンガーまたはＴＡＬＥ結合ドメインもしくは操作されたＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ）及び記載されているような切断ハーフドメインを含む融合分子または融合分子をコードするポリヌクレオチドを含む。

【００２７】

融合分子は、例えば、融合分子をポリペプチドとして細胞に送達することによって、または融合分子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、細胞内で発現させることができ、ここでは、ポリヌクレオチドは、ＤＮＡである場合、転写され、翻訳されて融合分子を生成する。さらに、ポリヌクレオチドが融合分子をコードするｍＲＮＡである場合、ｍＲＮＡの細胞への送達後に、ｍＲＮＡが翻訳され、これにより融合分子が生成される。

【００２８】

本発明の他の態様では、操作されたヌクレアーゼ特異性を増加させるための方法及び組成物が提供される。一態様では、オフターゲット切断活性を減少させることによって全体的なオンターゲット切断特異性を増加させるための方法が提供される。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ複合体の操作された切断ハーフドメインパートナーは、細胞と接触させるために使用され、ここでは、複合体の各パートナーが、１対１以外の他のパートナーに対する比で与えられる。いくつかの実施形態では、２つのパートナー（ハーフ切断ドメイン）の比は、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：８、１：９、１：１０または１：２０の比、もしくはそれらの間の任意の値で与えられる。他の実施形態では、２つのパートナーの比は、１：３０より大きい。他の実施形態では、２つのパートナーは、１：１とは異なるように選択された比で展開される。いくつかの態様では、各パートナーは、ｍＲＮＡとして細胞に送達されるか、または各パートナーをコードするｍＲＮＡもしくはベクターの異なる量が送達されるウイルスまたは非ウイルスベクター中で送達される。さらなる実施形態では、ヌクレアーゼ複合体の各パートナーは、単一のウイルスベクターまたは非ウイルスベクター上で構成されてもよいが、一方のパートナーが他方のパートナーよりも高いまたは低い値で発現されるように意図的に発現され、最終的に１対１以外の切断ハーフドメインの比を細胞に送達する。いくつかの実施形態では、各切断ハーフドメインは、異なる発現効率を有する異なるプロモーターを用いて発現される。他の実施形態では、２つの切断ドメインは、両方とも同じオープンリーディングフレームから発現されるウイルス性または非ウイルス性ベクターを使用して細胞に送達されるが、２つのパートナーをコードする遺伝子は、２つのパートナーの比が１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：８、１：９、１：１０または１：２０の比、またはその間の任意の値であるように、３’パートナーがより低い割合で発現される配列（例えば、自己切断型２Ａ配列またはＩＲＥＳ）によって分離されている。他の実施形態では、２つのパートナーは、１：１とは異なるように選択された比で配置される。

【００２９】

２つ以上のヌクレアーゼ複合体が使用される場合、オフターゲットヌクレアーゼ活性を減少させる方法もまた提供される。例えば、本発明は、２つ以上のヌクレアーゼ複合体が使用される場合に、ＤＮＡ結合分子の比を変化させるための方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ結合分子は、ポリペプチドＤＮＡ結合ドメイン（例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ｄＣａｓ－Ｆｏｋ、ｍｅｇａＴＡＬ、メガヌクレアーゼ）であるが、他の実施形態では、ＤＮＡ結合分子は、ＲＮＡ－誘導ヌクレアーゼと共に使用するためのガイドＲＮＡである。好ましい実施形態では、２つ以上のＤＮＡ結合分子の比は、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：８、１：９、１：１０または１：２０の比、もしくはその間の任意の値である。他の実施形態では、２つのＤＮＡ結合分子は、１：１とは異なるように選択される比で展開される。いくつかの態様では、１：１ではない比は、細胞をトランスフェクトするために使用されるガイドＲＮＡの比を変更することによって達成される。他の態様では、対象の細胞を治療するために使用される各Ｃａｓ９タンパク質－ガイドＲＮＡ複合体の比を変化させることによって比率を変更する。さらに他の態様では、細胞の処理のためにガイドＲＮＡ（ウイルス性または非ウイルス性）をコードするＤＮＡの異なる比を使用することによって、または細胞内でＤＮＡ結合分子を差次的に発現するために異なる発現強度を有するプロモーターを使用することによって変更された比が達成される。オフターゲット事象は、少なくとも１０、５０、６０、７０、８０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８

００、９００、１０００倍（その間の任意の値）またはそれ以上の減少が挙げられるが、これらに限定されない、２～１０００倍（またはその間の任意の量）以上に低減させることができる。

【００３０】

したがって、別の態様では、対象領域において細胞クロマチンを切断するための方法は、（ａ）対象領域中の第１の配列を選択することと、（ｂ）第１の配列に特異的に結合するように第１のＤＮＡ結合分子を操作することと、（ｃ）第１の融合分子を細胞内で発現させることと（第１の融合分子が、第１のＤＮＡ結合分子（例えば、ジンクフィンガー、ＴＡＬＥ、ｓｇＲＮＡ）、及び切断ドメイン（またはハーフドメイン）を含む）、（ｄ）第２の融合タンパク質を細胞内で発現させること（第２の融合分子が、第２のＤＮＡ結合ードメイン、及び第２の切断ドメイン（またはハーフドメイン）を含む）と、を含むことができ、融合分子のうちの少なくとも１つは、本明細書に記載されるリンカーを含み、さらに、第１の融合分子は第１の配列に結合し、活性なヌクレアーゼ複合体が形成することができ、細胞クロマチンが対象領域において切断されるように、第２の融合分子は、第１の配列から２～５０個のヌクレオチドの間に位置する第２の配列に結合する。ある特定の実施形態では、両方の融合分子は、ＤＮＡ結合ドメインと触媒ヌクレアーゼドメインとの間に、本明細書に記載されるリンカーを含む。

【００３１】

例えば、標的化された変異を導入するために、細胞クロマチンの領域を変更する方法も提供される。ある特定の実施形態では、細胞クロマチンを変更する方法は、１つ以上の標的化されたヌクレアーゼを所定の部位で細胞クロマチンの二本鎖切断を生じさせるために細胞内に導入すること、及び切断の領域において細胞クロマチンのヌクレオチド配列に対して相同性を有するドナーポリヌクレオチドを細胞に導入することを含む。細胞ＤＮＡ修復プロセスは、二本鎖切断の存在によって活性化され、そしてドナーポリヌクレオチドは切断の修復のための鋳型として使用され、ドナーのヌクレオチド配列の全てまたは一部の細胞クロマチンへの導入をもたらす。これにより、細胞クロマチン中の配列を変更することができ、そしてある特定の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド中に存在する配列に変換することができる。

【００３２】

標的化された変更としては、点変異（すなわち、単一の塩基対から異なる塩基対への変換）、置換（すなわち、複数の塩基対の同一長の異なる配列への変換）、１つ以上の塩基対の挿入、１つ以上の塩基対の欠失、及び前述の配列変更の任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。変更はまた、コードされたアミノ酸が変更されるように、コード配列の一部である塩基対の変換を含むことができる。

【００３３】

ドナーポリヌクレオチドは、ＤＮＡまたはＲＮＡとすることができ、直鎖状または環状とすることができ、そして一本鎖または二本鎖とすることができる。それは、裸の核酸として、１つ以上の送達剤（例えば、リポソーム、ナノ粒子、ポロキサマー）との複合体として細胞に送達することができるか、または、例えば、アデノウイルス、レンチウイルスもしくはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などのウイルス送達媒体に含有されることができる。ドナー配列は、１０～１，０００個のヌクレオチド（またはその間の任意の整数値のヌクレオチド）もしくはそれ以上の長さの範囲とすることができる。いくつかの実施形態では、ドナーは、標的化された切断部位と相同性の領域に隣接する完全長遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ドナーは相同領域を欠き、相同性非依存的機構（すなわち、ＮＨＥＪ）を通して標的遺伝子座に組み込まれる。他の実施形態では、ドナーは、細胞内で使用するために（すなわち、遺伝子修正のために）、相同領域が隣接するより小さな核酸片を含む。いくつかの実施形態では、ドナーは、例えば、ｓｈＲＮＡ、ＲＮＡｉ、ｍｉＲＮＡなどの機能的または構造的成分をコードする遺伝子を含む。他の実施形態では、ドナーは、対象の遺伝子に結合する及び／または対象の遺伝子の発現を調節する調節要素をコードする配列を含む。他の実施形態では、ドナーは、対象の遺伝子に結合する及び／また

は対象の遺伝子の発現を調節する対象の調節タンパク質（例えば、ＺＦＰ　ＴＦ、ＴＡＬＥＴＦまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＴＦ）である。

【００３４】

前述の方法のいずれについても、細胞クロマチンは、染色体、エピソームまたは細胞小器官のゲノムにあることができる。細胞クロマチンは、原核細胞及び真核細胞、真菌細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、霊長類細胞及びヒト細胞が挙げられるが、これらに限定されない、任意の型の細胞に存在することができる。

【００３５】

さらに別の態様では、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、融合分子）及び／またはポリヌクレオチドのうちのいずれかを含む細胞もまた提供される。一実施形態では、細胞は、それぞれが本明細書に開示される切断ドメインを含む、一対の融合分子を含む。細胞としては、培養細胞、生物内の細胞、及び細胞及び／またはそれらの子孫が治療後に生物に戻される場合に治療のために生物から除去された細胞が挙げられる。細胞クロマチン中の対象領域は、例えば、ゲノム配列またはその一部とすることができる。

【００３６】

別の態様では、本明細書に記載される融合タンパク質、または本明細書に記載される１つ以上のジンクフィンガータンパク質、切断ドメイン及び／または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド；補助試薬；及び任意に使用説明書ならびに適切な容器を含むキットが本明細書に記載される。キットはまた、１つ以上のヌクレアーゼまたはそのようなヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドも含んでもよい。

【００３７】

これら及び他の態様は、全体としての本開示に照らして当業者には容易に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１】野生型ＦｏｋＩヌクレアーゼの一部のアミノ酸配列（配列番号１）及びヌクレオチド配列（配列番号２）を描写する。配列はＦｏｋＩ触媒性ヌクレアーゼドメインを示し、番号付けは、結晶構造１ＦＯＫ．ｐｄｂ及び２ＦＯＫ．ｐｄｂを生成するために使用される野生型ＦｏｋＩタンパク質に関する（同書のＷａｈ）（ヌクレアーゼドメインのアミノ酸Ｑは３８４で始まる）。枠で囲った位置は可能性のある変異部位を示す。

【図２Ａ】ＤＮＡ分子と相互作用するＦｏｋＩドメインのモデルを示す概略図である。図２Ａは、アミノ酸Ｒ４２２、Ｒ４１６及びＫ５２５の位置を示す。

【図２Ｂ】ＤＮＡ分子と相互作用するＦｏｋＩドメインのモデルを示す概略図である。アミノ酸Ｒ４４７、Ｋ４４８及びＲ４２２の位置を示す。

【図２Ｃ】ＤＮＡ分子と相互作用するＦｏｋＩドメインのモデルを示す概略図である。ジンクフィンガー主鎖において１、２または３（それぞれ、１×、２×、または３×）の変異（Ｒ→ＱまたはＲ→Ｌのいずれか）を組み込んで作製することができる、異なる種類のＺＦＮのサブセットを示す図である。黒い矢印は変異の位置を示す。

【図３】図３Ａ及び３Ｂは、本明細書に記載される新規のＦｏｋＩ変異を有するＢＣＬ１１Ａ特異的ＺＦＮの活性を示す。図３Ａは、ＢＣＬ１１Ａ同族標的に対するＢＣＬ１１Ａ特異的ＺＦＮ　ＳＢＳ＃５１８５７－ＥＬＤ／ＳＢＳ＃５１９４９－ＫＫＲ（独自の「ナンバープレート」識別子ＰＲＪＩＹＬＦＮ、配列番号１３で示される）に対するＣＤ３４＋細胞における標的化された修飾、及びそれらの「ナンバープレート」識別子ＮＩＦＭＡＥＶＧ（配列番号１４）及びＰＥＶＹＯＨＩＵ（配列番号２０）によっても特定される２つのオフターゲット部位を示す。ＺＦＰは、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０３２０４９に記載される。全ての実験は、ヌクレアーゼ送達のために２μｇの各ＺＦＮ　ｍＲＮＡを用いて行われ、値はヌクレアーゼ活性と一致する挿入及び欠失を含有する配列読み取りのパーセンテージ（インデル％）を表す。図３Ａは、一方または両方のＺＦＮにおいてセリン残基がＦｏｋＩドメインの位置４１６、４２２、４４７、４４８及び５２５に置換されたときの結果を示す。図３Ｂは、ヘテロ二量体の二量体化ドメインＦｏｋＩ主鎖が切り替えられ

ていることを除いて同様のデータセットを示し、すなわち、図３Ａは、ＳＢＳ＃５１８５７－ＥＬＤ／ＳＢＳ＃５１９４９－ＫＫＲの対における変異を用いた結果を示しており、一方、図３Ｂは、ＳＢＳ＃５１８５７－ＫＫＲ／ＳＢＳ＃５１９４９－ＥＬＤの対における変異を用いた結果を示す。

【図４】いくつかのＴＣＲＡ（標的とされた定常領域、ＴＲＡＣとしても知られる）特異的ＺＦＮ　ＦｏｋＩ変異体（ＰＣＴ公開ＷＯ２０１７１０６５２８号）についてのオンターゲット活性及びオフターゲット活性を描写するプロットである。親ＺＦＮ対の２つの複製を除いて、２つのＺＦＮのうちの１つにおけるＦｏｋＩドメインは、正に荷電した残基に変異を有する。ＦｏｋＩ中の変異された残基のアルファ炭素とＺＦＮ－ＤＮＡ分子モデル（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ（２００７）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　２５（７）：７７８－７８５）のＤＮＡ主鎖中の最も近いリン酸酸素との間の距離を計算し、データ点は、この計算された距離に基づいて色分けされている（＜１０オングストローム：灰色、＞１０オングストローム：黒色のいずれか）。各データ点は、対の中の１つのＺＦＮ上にＦｏｋＩ変異を有する異なるＺＦＮ対についてのオンターゲット活性及び組み合わされたオフターゲット活性を表す。親の対を表すデータ点が示されている。

【図５Ａ】Ｚｉｆ２６８タンパク質の第２フィンガー中のアミノ酸（配列番号３）を示しており、ここでは、ベータシート及びアルファヘリックス構造が示されている。特定のＤＮＡ塩基認識に関与するアミノ酸の位置（－１～６）もまた示されている。ＤＮＡ上のリン酸主鎖と相互作用する可能性がある正に荷電した残基が四角で示されている。亜鉛配位に関与する不変異体システイン残基には下線が引かれている。

【図５Ｂ】ジンクフィンガーの主鎖領域を描写する概略図である。単一のフィンガーの、その三次元状態における拡大図であり（黒丸は配位亜鉛イオンを表す）、そして各亜鉛フィンガーの異なる領域がいかにＤＮＡと相互作用する傾向があるかを示す。ＤＮＡは、リン酸が文字Ｐで示され、ＤＮＡ塩基が角の丸い四角で示されている図によって表される。灰色の矢印は四角で囲まれて示した残基位置のおおよその位置を示し、黒い矢印はジンクフィンガータンパク質とＤＮＡとの間の相互作用を示す。

【図６】ジンクフィンガー内の各位置でのアミノ酸の保存を描写する（配列番号４～６）。１行目は、Ｚｉｆ２６８及びＳｐ１由来の周知のジンクフィンガー（Ｚｉｆ２６８由来のフィンガー２（配列番号４）、Ｚｉｆ２６８（配列番号５）由来のフィンガー３、及びＳｐ１のフィンガー２（配列番号６））におけるアミノ酸配列の整列を示す。亜鉛配位システイン及びヒスチジン残基は四角で囲まれており、認識ヘリックスも同様である。ＤＮＡ主鎖リン酸と接触するアルギニン（Ｒ）及びリジン（Ｋ）の正に荷電した残基もまた四角で示されている。最初の３行の下の数字は、４８６７個の異なる天然に存在するジンクフィンガーが分析された各位置での各アミノ酸の頻度である。図の左側の文字は、頻度が表に示されているアミノ酸残基に対応する一文字コードである。３つの非荷電アミノ酸、アラニン、ロイシン及びグルタミン（楕円形で示される）は、リン酸接触位置に、低いがゼロではない頻度で生じることが特定された。

【図７】図７Ａ及び７Ｂ（配列番号７及び８）は、６フィンガージンクフィンガータンパク質（図７Ａ、配列番号７）または５フィンガージンクフィンガータンパク質（図７Ｂ、配列番号８）のいずれかのモジュールを含むＺＦＰ主鎖の図を描写する。いくつかの四角で囲った位置の上の文字は、示された位置で試験された変異を示す。各フィンガーの識別はラベルＦ１からＦ６で与えられる。これらのタンパク質はそれぞれ、「モジュールＡ」、「モジュールＢ」、及び「モジュールＣ」として示される３つの異なる「モジュール」から組み立てられる。各モジュール中のＮ末端フィンガーの－１４、－９、及び－５位への変異は、組み立てプロセス中に使用されるＰＣＲプライマーの配列を変更することによって行うことができる。

【図８－１】図８Ａ～８Ｃは、本発明の新規なジンクフィンガー主鎖変異を含むＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）に特異的なＺＦＮ（ＰＣＴ公開国際特許第２０１７１０６５２８号）についてのオンターゲット及びオフターゲット切断活性を描写するグラフである。ＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）に特異的なＺＦＮは両方とも６個のジンクフィンガーリピートを含有し、実験的

に容易にするために、－５位の変異は各モジュールのＮ末端フィンガーにのみ導入された（例えば、完全長ＺＦＮ中のＦ１、Ｆ３、またはＦ５）。これにより、各個々のＺＦＮは０、１、２、または３個の変異を有することができ、ＺＦＮ対全体は、合計で最大６個の変異（例えば、０、１、２、３、４、５、または６個の変異）を有することができる。プロットされた値は、－５位に示された数及び種類の変異を有する、試験された全てのＺＦＮ対の平均を示す。エラーバーは平均の標準誤差を表す。各ＺＦＮ対について、表３に示す３つのオフターゲットが測定され、プロットされた値を生成するために平均されたオフターゲットの値は、各構築物についてのこれら３つのオフターゲットのそれぞれについての親ＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）ＺＦＮの活性の割合を含む。図８Ａは、親ＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）ＺＦＮの活性の割合を示し、ここで、データセットは対にある２つのＺＦＮのうちの１つのみの１つ以上のジンクフィンガーリピートにおける－５位での示されたアミノ酸の置換による、オンターゲット（黒色バー）またはオフターゲット（灰色バー）活性の変化を示す。図８Ｂは、一方または両方のＺＦＮパートナーにおいて示されたアルギニン－アラニン置換を同時に行うことからの活性の割合を示す。図８Ｂの左半分は、示された数の変異が対の中の１つのＺＦＮだけに生じるＺＦＮ対（及び図８Ａの左３分の１に対応する）を表しており、一方、図８Ｂの右半分は、同数の変異が対の両方のＺＦＮになされたＺＦＮ対を表す（例えば、２は対における各ＺＦＮにおける１つの変異を表し、４は対における各ＺＦＮにおける２つの変異を表し、６は対における各ＺＦＮにおける３つの変異を表す）。図８Ａ及び８Ｂで行われた実験は、実験当たり６μｇの用量でのＣＤ３４＋細胞を用いたものであった。図８Ｃは、ＲＮＡの用量が実験当たり２μｇであった図８Ａの右３分の２と同様のデータを示す。

【図８－２】図８－１の続き。

【図９】本発明の新規なジンクフィンガー主鎖変異を含むＢＣＬ１１Ａ特異的ＺＦＮについてのオフターゲット部位ＮＩＦＭＡＥＶＧでのオンターゲット（黒色バー）及びオフターゲット（灰色バー）切断活性を描写するグラフである（この場合、３文字の略語が使用され、示された残基に変異した－５位のアルギニン残基の数を示しており、例えば、「６Ｇｌｎ」は、６個のアルギニン（ＺＦＮ当たり３個）がＺＦＮ対において６個のグルタミンに変異したことを示す。エラーバーは標準誤差を表す。実験は、実験当たりＺＦＮ毎に２μｇのｍＲＮＡの用量でＣＤ３４＋細胞中で行われた。

【図１０】２Ａ配列（５１８５７－２ａ－５１９４９）によって連結された単一のポリヌクレオチド上で両方のＺＦＮパートナーをコードするｍＲＮＡの、ＺＦＮを別々にコードするｍＲＮＡを投与しての；または示された投与量での、各パートナーをコードする２つのｍＲＮＡの混合物による遺伝子導入後のＣＤ３４＋細胞におけるＢＣＬ１１Ａ特異的ＺＦＮ発現の検出のウエスタンブロットを描写する。タンパク質を抗Ｆｌａｇ抗体によって検出し、ｍＲＮＡ遺伝子導入後に発現されたタンパク質の量が使用されたｍＲＮＡの量と一致することを示す。予想されたとおり、２ａ構築物は３’ＺＦＮのＳＢＳ＃５１９４９と比較してより多くの５’ＺＦＮ　ＳＢＳ＃５１８５７を生成した。

【図１１】２つのＢＣｌ１１Ａ特異的ＺＦＮパートナー５１９４９及び５１８５７の、オンターゲットの位置（ＢＣＬ１１Ａ、左側のパネル）またはオフターゲットの位置ＮＩＦＭＡＥＶＧ（右側のパネル）のいずれかに対する用量の漸増を示す。結果は、ＺＦＮパートナーの比を変えることで、オフターゲット活性を減少させながら、オンターゲット活性を保持することができることを示す（いずれか６０μｇの各ｍＲＮＡでのＢＣＬ１１Ａ標的（オンターゲット活性８５．９２％インデル、または６０μｇの５１９４９、６．６μｇの５１８５７のオンターゲット活性８６．４２％）を、減少されたオフターゲット（６０μｇの５１９４９が６．６μｇの５１８５７と共に使用されるときの４．２１％インデルと比較して、６０μｇの各ｍＲＮＡが使用されるときの２７．３４％のオフターゲット活性）と、を比較する）。

【図１２】ＣＤ３４＋細胞を上記のように両方のＺＦＮパートナー（５１８５７／５１９４９　２ａ）をコードする単一のｍＲＮＡで処理したとき、または一方のパートナー（５１９４９）が４１６位にＦｏｋ　Ｒ→Ｓ変異を含む、漸増用量のＺＦＮパートナーで処理

したときの、ＢＣＬ１１Ａ特異的ＺＦＮについてのオンターゲット及びオフターゲット切断活性を列挙する表である。「ナンバープレート」の識別子は、実施例２の表１に示されている（配列番号１３～５３）。ＰＲＪＩＹＬＦＮに対応するデータは、ＺＦＮ活性と一致するインデルを含有するＢＣＬ１１Ａ中の意図された標的での配列読み取りの割合を表す。一番左の列に列挙されている他の全ての「ナンバープレート」識別子に対応するデータは、５１８５７／５１９４９　ＺＦＮ対の確認済みまたは疑わしいオフターゲット遺伝子座に対応する。右の列に示される比率は、示された遺伝子座において漸増された５１８５７／５１９４９Ｒ４１６Ｓで処理された試料中の活性で除算された５１８５７／５１９４９　２ａで処理された試料中の活性を示す。

【図１３】２つのＺＦＮ対を比較する、無作為なキャプチャーアッセイの結果を示す。左側パネル（「親ＺＦＮ対」）はＳＢＳ５１８５７とＳＢＳ５１９４９の対を使用した結果を示し、右側パネル（「変異体ＺＦＮ対」）はＳＢＳ６３０１４とＳＢＳ６５７２１を使用した結果を示しており、その対は、親の対、及び追加的に、本明細書に記載されるＺＦＰ主鎖変異、ならびにＳＢＳ６５７２１構築物のＦｏｋＩ　Ｒ４１６Ｓ変異を含む。具体的には、変異体対において、対の各ＺＦＮはフィンガー中に３つのＲ→Ｑ変異を含み、そしてＳＢＳ６５７２１構築物はＦｏｋＩ　Ｒ４１６Ｓ変異をさらに含む。データは、変異が、親の対に対する２１の場所から変異体における４に、一意の捕捉事象数を減少することを示す。さらに、ＺＦＮ対のパートナーが等しくない量で与えられるとき、捕捉事象もまた減少する。親の対の場合、捕捉事象は２１（均等投与）から１３（不均等投与）の場所に（それぞれ、２８％～３．４％の総計オフターゲット）減少し、変異体対の場合、捕捉事象は４から２に（それぞれ、０．２６％～０．０８％の総計オフターゲット切断）減少する。これら２つのアプローチの組み合わせにより、親の２１の場所から不均等なパートナー濃度で投与された変異体の２へ全体的に減少し、親の対の総計で２８％のオフターゲット事象から、変異体の総計でオフターゲット事象０．０８％オフに減少した。

【図１４】大規模製造条件で製造された本明細書に記載されるＺＦＮを用いた減少されたオフターゲット切断事象を示す結果を示す。使用されたＺＦＮ対はＳＢＳ６３０１４及びＳＢＳ６５７２２を含んでいた。

【図１５】図１５Ａ～１５Ｄは、本明細書に記載されるＺＦＮ変異体（ＡＡＶＳ１を標的とする）を用いたオフターゲット切断事象の減少を示す結果を示す。図１５Ａは、親ＺＦＮ　３００３５／３００５４からの活性結果を描写する。図１５Ｂは、追加の単一の変異を含むＥＬＤ　ＦｏｋＩ変異体（最も左側のデータセット）、追加の単一の変異を含むＫＫＲ　ＦｏｋＩ変異体（中央のデータセット）、及び　ＥＬＤ及びＫＫＲ　ＦｏｋＩ変異体の両方が同じ追加の単一の変異を含む（最も右側のデータセット）、３組のＦｏｋＩ変異体についてのオンターゲット及びオンターゲット／オフターゲット切断活性の比を描写する。図１５Ｃは、ＥＬＤドメインまたはＫＫＲ　ＦｏｋＩドメインが２つの変異を含む場合のオンターゲット活性のグリッドを示し、図１５Ｄは、図１５Ｃに示されたデータについてのオンターゲット／オフターゲットの比を示す。

【図１６Ａ】本明細書に記載される例示的なＡＡＶＳ１に標的化されたＺＦＮ変異体を用いたオフターゲット切断事象の減少を示す結果を示す。ＥＬＤ及びＫＫＲの文脈における変異体を示しており

【図１６Ｂ】本明細書に記載される例示的なＡＡＶＳ１に標的化されたＺＦＮ変異体を用いたオフターゲット切断事象の減少を示す結果を示す。ＥＬＤ－ＫＫＲの文脈における変異体を示す。

【図１７】ＦｏｋＩ及びＦｏｋＩ相同体（配列番号５４～６４）の整列を示す。網掛けは保存の程度を示す。番号付けは野生型ＦｏｋＩドメイン（配列番号１）に従う。

【図１８】位置が図１７に示されるＦｏｋＩまたはＦｏｋＩ相同体に対応する例示的な変異を示す。

【発明を実施するための形態】

【００３９】

オフターゲット切断を差次的に減少させることを介して、オンターゲットの操作された

ヌクレアーゼ切断の特異性を増加させるための方法及び組成物が本明細書で開示される。本方法は、ＦｏｋＩ切断ドメインとＤＮＡとの間の非特異的相互作用を減少させること、ジンクフィンガー主鎖とＤＮＡとの間の非特異的相互作用を減少させること、及び各ハーフ切断ドメインパートナーの相対比率をデフォルト比１：１から変更することを含む。

【００４０】

概論

本明細書に開示される方法の実施、ならびに本明細書に開示される組成物の調製及び使用は、他に示されない限り、分子生物学、生化学、クロマチン構造及び分析、計算化学、細胞培養、組換えＤＮＡならびに関連分野は当該技術分野の範囲内である。これらの技術は文献に十分に説明されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９ ａｎｄ Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７ ａｎｄ ｐｅｒｉｏｄｉｃ ｕｐｄａｔｅｓ、ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｗｏｌｆｆｅ，ＣＨＲＯＭＡＴＩＮ ＳＴＲＵＣＴＵＲＥ ＡＮＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，１９９８、ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ，Ｖｏｌ．３０４，“Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ”（Ｐ．Ｍ．Ｗａｓｓａｒｍａｎ ａｎｄ Ａ．Ｐ．Ｗｏｌｆｆｅ，ｅｄｓ．），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，１９９９、及びＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｖｏｌ．１１９，“Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ”（Ｐ．Ｂ．Ｂｅｃｋｅｒ， ｅｄ．）Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，１９９９を参照されたい。

【００４１】

定義

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、及び「オリゴヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、直鎖状または環状のコンフォメーションで、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態の、デオキシリボヌクレオチドまた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、これらの用語を、ポリマーの長さに関する限定として解釈されるべきではない。これらの用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体、ならびに塩基、糖、及び／またはリン酸（ホスホロチオエート主鎖）部分内で修飾されるヌクレオチドを包含することができる。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同一の塩基対形成特異性を有し、すなわち、Ａの類似体は、Ｔと塩基対を形成するであろう。

【００４２】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。この用語はまた、１つ以上のアミノ酸が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体または修飾誘導体である、アミノ酸ポリマーにも適用される。

【００４３】

「結合」は、高分子間（例えば、タンパク質と核酸との間）の配列特異的で非共有結合的な相互作用を指す。結合相互作用の全ての構成要素は、相互作用が全体として配列特異的である限り、配列特異的である必要はない（例えば、ＤＮＡ主鎖中のリン酸残基との接触）。そのような相互作用は、一般に、$10^{-6}M^{-1}$以下の解離定数（K_d）によって特徴付けられる。「親和性」は、結合強度を指し、結合親和性の増加は、K_dの低下と相関する。「非特異的結合」は、オンターゲット配列に依存しない任意の対象の分子（例えば、操作されたヌクレアーゼ）と高分子（例えば、ＤＮＡ）との間に生じる非共有相互作用を指す。

【００４４】

「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できるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、ＤＮＡ分子（ＤＮＡ結合タンパク質）、ＲＮＡ分子（

ＲＮＡ結合タンパク質）、及び／またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合することができる。タンパク質結合タンパク質の場合においては、それは、それ自体に結合する（その結果、ホモ二量体、ホモ三量体などを形成する）ことができ、及び／または異なるタンパク質またはタンパク質（複数）のうちの１つ以上のタンパク質の分子に結合することができる。結合タンパク質は、２種類以上の結合活性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、ＲＮＡ結合、及びタンパク質結合活性を有する。ＲＮＡにガイドされたヌクレアーゼ系の場合には、ＲＮＡガイドは、ヌクレアーゼ構成要素（Ｃａｓ９またはＣｆｐ１）に対して異種であり、そして両方とも操作され得る。

【００４５】

「ＤＮＡ結合分子」は、ＤＮＡに結合することができる分子である。そのようなＤＮＡ結合分子は、ポリペプチド、タンパク質のドメイン、より大きなタンパク質内のドメイン、またはポリヌクレオチドとすることができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはＤＮＡであり、一方、他の実施形態では、ポリヌクレオチドはＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ結合分子はヌクレアーゼのタンパク質ドメイン（例えば、ＦｏｋＩドメイン）であり、他の実施形態では、ＤＮＡ結合分子はＲＮＡにガイドされたヌクレアーゼのガイドＲＮＡ構成要素（例えば、Ｃａｓ９またはＣｆｐ１）である。

【００４６】

「ＤＮＡ結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、配列特異的様式で、例えば、それぞれ、１つ以上のジンクフィンガーを通じて、またはジンクフィンガータンパク質もしくはＴＡＬＥ中の１つ以上のＲＶＤとの相互作用を通じて、ＤＮＡと結合するタンパク質、またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーＤＮＡ結合タンパク質という用語は、しばしばジンクフィンガータンパク質またはＺＦＰとして略記される。

【００４７】

「ジンクフィンガーＤＮＡ結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、１つ以上のジンクフィンガー（それは、亜鉛イオンの配位によって安定化される構造を有する結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である）によって配列特異的な形でＤＮＡと結合するタンパク質、またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーＤＮＡ結合タンパク質という用語は、しばしばジンクフィンガータンパク質またはＺＦＰとして略記される。

【００４８】

「ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメイン」または「ＴＡＬＥ」は、１つ以上のＴＡＬＥリピートドメイン／単位を含むポリペプチドである。リピートドメインはＴＡＬＥのその同族の標的ＤＮＡ配列への結合に関与する。単一の「リピート単位」（「リピート」としても称される）は、典型的には３３～３５個のアミノ酸長であり、天然のＴＡＬＥタンパク質内の他のＴＡＬＥリピート配列と少なくともある程度の配列相同性を示す。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，５８６，５２６号を参照されたい。

【００４９】

ジンクフィンガードメイン及びＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインは、例えば、天然に存在するジンクフィンガータンパク質の認識ヘリックス領域の操作（１つ以上のアミノ酸の変更）を介して、またはＤＮＡ結合に関与するアミノ酸の操作（「リピート可変残基」またはＲＶＤ領域）によって、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作する」ことができる。したがって、操作されたジンクフィンガータンパク質またはＴＡＬＥタンパク質は、天然に存在しないタンパク質である。ジンクフィンガータンパク質及びＴＡＬＥを操作するための方法の非限定的な例は、設計及び選択である。設計されたタンパク質は、その設計／組成が主に合理的な基準からもたらされる、天然には存在しないタンパク質である。設計のための合理的な基準は、既存のＺＦＰまたはＴＡＬＥ設計及び結合データの情報を格納するデータベース内の情報を処理するための置換規則及びコンピュータ化されたアルゴリズムの適用を含む。例えば、米国特許第８，５８６，５２６号、同第８，５８６，５２６号、同第６，１４０，０８１号、同第６，４５３，２４２号及び同第６，５３４

，２６１号を参照し、国際公開第９８／５３０５８号、同第WO９８／５３０５９号、同第９８／５３０６０号、同第０２／０１６５３６号、及び同第０３／０１６４９６号もまた参照されたい。

【００５０】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質、ＴＡＬＥタンパク質またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、天然には見い出されないタンパク質であり、その生産は、主にファージディスプレイ、相互作用トラップ、合理的な設計またはハイブリッド選択などの、経験的なプロセスによってもたらされる。例えば、米国特許第５，７８９，５３８号、米国特許第５，９２５，５２３、米国特許第６，００７，９８８号、米国特許第６，０１３，４５３号、米国特許第６，２００，７５９号、国際公開第９５／１９４３１号、国際公開第９６／０６１６６号、国際公開第９８／５３０５７号、国際公開第９８／５４３１１、国際公開第００／２７８７８号、国際公開第０１／６０９７０号、国際公開第０１／８８１９７号及び国際公開第０２／０９９０８４号を参照されたい。

【００５１】

「ＴｔＡｇｏ」は、遺伝子サイレンシングに関与すると考えられる原核生物のアルゴノートタンパク質である。ＴｔＡｇｏは細菌Ｔｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓに由来する。例えば、Ｓｗａｒｔｓ ｅｔ ａｌ（同書）、Ｇ．Ｓｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，（２０１３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１１，６５２）を参照されたい。「ＴｔＡｇｏ系」は、例えば、ＴｔＡｇｏ酵素による切断のためのガイドＤＮＡを含む、必要とされる全ての構成要素である。

【００５２】

「組換え」とは、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）による捕捉及び相同組換えが挙げられるが、これらに限定されない、２つのポリヌクレオチド間で遺伝情報が交換されるプロセスを指す。本開示の目的のために、「相同組換え（ＨＲ）」とは、例えば、相同性指向の修復機構を介して、細胞内の二本鎖切断の修復中に起こる、そのような交換の特殊な形態を指す。このプロセスは、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を起こしたもの）の鋳型修復に「ドナー」分子を使用し、それは、ドナーから標的への遺伝情報の移動をもたらすため、「非交差遺伝子変換」または「ショートトラクト遺伝子変換」として、様々な名称で知られている。いかなる特定の理論にも束縛されることを望むものではないが、そのような移動は、切断された標的とドナーとの間に形成するヘテロ二本鎖ＤＮＡのミスマッチ修正、及び／または、標的の一部になる遺伝子情報の再合成にドナーが使用される「合成依存鎖アニーリング」、及び／または関連プロセスを含み得る。そのような特殊化されたＨＲは、しばしば、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全部が標的ポリヌクレオチドに組み込まれるような、標的分子の配列の変更をもたらす。

【００５３】

本開示のある特定の方法では、本明細書に記載される１つ以上の標的化されたヌクレアーゼは、所定の部位（例えば、対象の遺伝子または遺伝子座）において標的配列（例えば、細胞クロマチン）に二本鎖切断（ＤＳＢ）を作り出す。ＤＳＢは、本明細書中に記載されるように構築物（例えば、ドナー）の組み込みを媒介する。任意に、構築物は、切断領域内のヌクレオチド配列と相同性を有する。発現構築物は物理的に組み込まれてもよく、あるいは、発現カセットが相同組換えを介した切断の修復のための鋳型として使用されて、発現カセット中のようにヌクレオチド配列の全部または一部が細胞クロマチンに導入される。これにより、細胞クロマチン中の第１の配列は変更することができ、そしてある特定の実施形態では、発現カセット中に存在する配列に変換することができる。これにより、「置換する」または「置換」という用語の使用は、あるヌクレオチド配列の別のものによる置換（すなわち、情報的な意味における配列の置換）を表すと理解することができ、あるポリヌクレオチドを別のポリヌクレオチドに物理的または化学的に置換することを必ずしも必要としない。

【００５４】

本明細書に記載される方法のいずれにおいても、細胞内の追加の標的部位の追加の二本鎖切断のために追加の操作されたヌクレアーゼを使用することができる。

【００５５】

細胞性クロマチンの対象領域における配列の標的化された組換え及び／または置換及び／または変更のための方法のある特定の実施形態では、染色体配列が、外因性の「ドナー」ヌクレオチド配列との相同組換えによって変更される。そのような相同組換えは、切断領域に相同な配列が存在する場合、細胞クロマチンにおける二本鎖切断の存在によって刺激される。

【００５６】

本明細書に記載される方法のいずれにおいても、第１のヌクレオチド配列（「ドナー配列」）は、対象領域のゲノム配列に対して相同であるが同一ではない配列を含み、それにより相同組換えを刺激して、対象領域に非同一配列を挿入する。これにより、ある特定の実施形態では、対象領域内の配列と相同なドナー配列の部分は、置換されるゲノム配列に対して約８０～９９％（またはその間の任意の整数）の配列同一性を示す。他の実施形態では、例えば、１００を超える連続塩基対のドナー配列とゲノム配列との間のように１つのヌクレオチドのみが異なる場合、ドナー配列とゲノム配列との間の相同性は９９％より高い。あつ特定の場合では、ドナー配列の非相同部分は、新しい領域が対象領域に導入されるように、対象領域に存在しない配列を含有することができる。これらの例では、非相同配列は、概して、対象領域の配列と相同または同一である、５０～１０００個の塩基対（またはそれらの間の任意の整数値）または１，０００個より大きい任意の数の塩基対の配列に隣接する。他の実施形態では、ドナー配列は第１の配列に対して非相同であり、そして非相同組換え機構によりゲノムに挿入される。

【００５７】

本明細書に記載される方法のいずれも、ドナー配列の標的化された組込みによる、または標的配列（複数可）の切断とそれに続く対象領域の遺伝子（複数可）の発現を妨害するエラーを起こしがちなＮＨＥＪ媒介修復を介した、細胞内の１つ以上の標的配列の部分的または完全な不活性化に使用することができる。部分的または完全に不活性化された遺伝子を有する細胞株もまた提供される。

【００５８】

さらに、本明細書中に記載されるような標的化された組込みの方法はまた、１つ以上の外因性配列を組込むために使用することができる。外因性核酸配列は、例えば、１つ以上の遺伝子またはｃＤＮＡ分子、もしくは任意の種類のコード配列もしくは非コード配列、ならびに１つ以上の調節エレメント（例えば、プロモーター）を含むことができる。加えて、外因性核酸配列は、１つ以上のＲＮＡ分子（例えば、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、阻害性ＲＮＡ（ＲＮＡｉｓ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）など）を産生し得る。

【００５９】

「切断」とは、ＤＮＡ分子の共有結合主鎖の破壊を指す。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解が挙げられるが、これらに限定されない、様々な方法によって開始することができる。一本鎖切断及び二本鎖切断の両方が可能であり、二本鎖切断は、２つの異なる一本鎖切断事象の結果として起こることができる。ＤＮＡ切断は平滑末端または付着末端のいずれかの生成をもたらすことができる。ある特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、標的化二本鎖ＤＮＡ切断に使用される。

【００６０】

「切断ハーフドメイン」は、第２のポリペプチド（同一または異なる）と併せて、切断活性（好ましくは二本鎖切断活性）を有する複合体を形成するポリペプチド配列である。「第１及び第２切断ハーフドメイン」、「＋及び－切断ハーフドメイン」、及び「右及び左の切断ハーフドメイン」という用語が、二量体化する切断ハーフドメインの対を指すために互換的に用いられる。「切断ドメイン」という用語は、「切断ハーフドメイン」という用語と互換的に使用される。「ＦｏｋＩ切断ドメイン」という用語は、配列番号１に示

されるＦｏｋＩ配列、ならびに、図１７に示される配列が挙げられるが、これらに限定されない任意のＦｏｋＩ相同体を含む。

【００６１】

「操作された切断ハーフドメイン」は、別の切断ハーフドメインと偏性ヘテロ二量体を形成するように修飾されている切断ハーフドメイン（例えば、別の操作された切断ハーフドメイン）である。

【００６２】

「配列」という用語は、ＤＮＡまたはＲＮＡとすることができる任意の長さのヌクレオチド配列を指し、直鎖状、環状、または分岐状とすることができ、そして一本鎖または二本鎖のいずれかとすることができる。「導入遺伝子」という用語は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。導入遺伝子は任意の長さ、例えば、２～１００，０００，０００個のヌクレオチド長（またはその間もしくはその上の任意の整数値）、好ましくは約１００～１００，０００個のヌクレオチド長（またはその間の任意の整数）、より好ましくは約２０００～２０，０００個のヌクレオチド長（またはその間の任意の値）、さらにより好ましくは約５～１５ｋｂ個（またはその間の任意の値）とすることができる。

【００６３】

「染色体」は、細胞のゲノムの全部または一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、しばしば、その細胞のゲノムを構成する全染色体の集合である、その核型によって特徴付けられる。細胞のゲノムは、１つ以上の染色体を含むことができる。

【００６４】

「エピソーム」は、細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む、複製する核酸、核タンパク質複合体、または他の構造である。エピソームの例としては、プラスミド、ミニサークル、及びある特定のウイルスゲノムが含まれる。本明細書に記載される肝臓特異的構築物は、エピソーム的に維持されてもよく、あるいは、細胞に安定に組み込まれてもよい。

【００６５】

「外因性」分子は、通常は、細胞内に存在しないが、１つ以上の遺伝学的方法、生化学的方法、または他の方法によって細胞内に導入することができる分子である。「通常は細胞内に存在」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、筋肉の胚発生中にのみ存在する分子は、成体筋細胞に関して外因性分子である。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対して外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全型内在性分子の機能型、または正常機能型内因性分子の機能不全型を含むことができる。

【００６６】

外因性分子は、とりわけ、コンビナトリアルケミストリープロセスによって生成されるような小分子、またはタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖類、上記分子の任意の修飾誘導体、または上記の分子のうちの１つ以上を含む任意の複合体などの高分子とすることができる。核酸としては、ＤＮＡ及びＲＮＡが挙げられ、それは一本鎖または二本鎖とすることができ、直鎖状、分岐状または環状とすることができ、任意の長さとすることができる。核酸には、二本鎖を形成する能力があるもの、なら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。タンパク質には、ＤＮＡ結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化ＤＮＡ結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、リガーゼ、脱ユビキチン化酵素、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース及びヘリカーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【００６７】

外因性分子は、内因性分子と同一の種類の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸とすることができる。例えば、外因性核酸は、感染ウイルスゲノム、細胞中に導入されたプラスミドもしくはエピソーム、または細胞内に通常は存在しない染色体を含むことができる。細胞中に外因性分子の導入のための方法は、当業者に既知であり、脂質媒介導入（

すなわち、中性及びカチオン性脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介導入及びウイルスベクター媒介導入が挙げられるが、これらに限定されない。外因性分子はまた、内因性分子と同一の種類の分子とすることができるが、細胞が由来する種とは異なる種に由来する。例えば、ヒト核酸配列は、マウスまたはハムスターに本来由来する細胞株に導入し得る。植物細胞への外因性分子の導入方法は当業者に既知であり、プロトプラスト形質転換、炭化ケイ素（例えば、ＷＨＩＳＫＥＲＳ（商標））、アグロバクテリウム媒介形質転換、脂質媒介伝達（すなわち、中性及びカチオン性脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、微粒子銃（例えば、「遺伝子銃」を使用する）、リン酸カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介導入及びウイルスベクター媒介導入が挙げられるが、これらに限定されない。

【００６８】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下で特定の発生段階にある特定の細胞内に通常存在するものである。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、クロロプラストもしくは他の細胞小器官のゲノム、または天然に存在するエピソーム核酸を含むことができる。追加の内因性分子は、タンパク質、例えば、転写因子及び酵素を含むことができる。

【００６９】

本明細書中で使用される場合、「外因性核酸の産物」という用語は、ポリヌクレオチド産物及びポリペプチド産物の両方、例えば、転写産物（ＲＮＡなどのポリヌクレオチド）及び翻訳産物（ポリペプチド）を含む。

【００７０】

「融合」分子は、２つ以上のサブユニット分子が、好ましくは共有結合的に連結されている分子である。サブユニット分子は、同一の化学種類の分子であってもよいか、または異なる化学種類の分子であってもよい。融合分子の例としては、融合タンパク質（例えば、タンパク質のＤＮＡ結合ドメインと切断ドメインとの間の融合物）、切断ドメインと作動的に会合したポリヌクレオチドＤＮＡ結合ドメイン（例えば、ｓｇＲＮＡ）間の融合物、及び融合核酸（例えば、融合タンパク質をコードする核酸）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００７１】

細胞内における融合タンパク質の発現は、細胞に融合タンパク質を送達することによって、または細胞に融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを送達し、そこで、ポリヌクレオチドが転写され、転写物が翻訳されて融合タンパク質を生成することによって、生じてもよい。トランススプライシング、ポリペプチド切断及びポリペプチド連結もまた、細胞におけるタンパク質の発現に関与することができる。細胞へのポリヌクレオチド及びポリペプチドの送達の方法は、本開示の他所に提示する。

【００７２】

本開示の目的のための「遺伝子」は、遺伝子産物（下記参照）をコードするＤＮＡ領域、ならびに遺伝子産物の産生を調節する全てのＤＮＡ領域を含み、そのような調節配列がコード及び／または転写配列に隣接しているかどうかは問わない。したがって、遺伝子としては、プロモーター配列、ターミネータ、翻訳調節配列（リボソーム結合部位及び内部リボソーム侵入部位）、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス付着部位及び遺伝子座制御領域が挙げられるが、これらに必ずしも限定されない。

【００７３】

「遺伝子発現」とは、遺伝子産物への遺伝子に含まれる情報の変換を指す。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、または任意の他の種類のＲＮＡ）、またはｍＲＮＡの翻訳によって産生されるタンパク質とすることができる。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、及び編集などのプロセスによって修飾されたＲＮＡ、ならび

に、例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ＡＤＰリボシル化、ミリスチル化、及びグリコシル化によって修飾されたタンパク質を含む。

【００７４】

遺伝子発現の「調節」とは、遺伝子の活性の変化を指す。発現の調節は、遺伝子活性化及び遺伝子抑制を挙げることができるが、これらに限定されない。ゲノム編集（例えば、切断、変更、不活性化、ランダム変異）を用いて発現を調節することができる。遺伝子不活性化とは、本明細書に記載されるＺＦＰ、ＴＡＬＥまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を含まない細胞と比較した場合の遺伝子発現の任意の減少を指す。したがって、遺伝子不活性化は、部分的または完全であり得る。

【００７５】

「対象領域」は、例えば、外因性分子に結合することが望ましい、遺伝子、または遺伝子内もしくは遺伝子に隣接する非コード配列などの細胞クロマチンの任意の領域である。結合は、標的化されたＤＮＡ切断及び／または標的化された組換えの目的のためであり得る。対象領域は、例えば、染色体、エピソーム、細胞内小器官のゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）、または感染性ウイルスゲノム中に存在することができる。対象領域は、遺伝子のコード領域内、例えば、リーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロンなどの転写された非コード領域内、またはコード領域の上流もしくは下流の非転写領域内であり得る。対象領域は、長さが単一ヌクレオチド対のように小さいか、または最大２，０００個のヌクレオチド対、もしくはヌクレオチド対の任意の整数値とすることができる。

【００７６】

「セーフハーバー」遺伝子座は、遺伝子が宿主細胞にいかなる有害な影響も与えることなく挿入され得る、ゲノム内の遺伝子座である。挿入された遺伝子配列の発現が隣接遺伝子からのリードスルー発現によって乱されないセーフハーバー遺伝子座が最も有益である。ヌクレアーゼ（複数可）によって標的化されるセーフハーバー遺伝子座の非限定的な例としては、ＣＣＲ５、ＨＰＲＴ、ＡＡＶＳ１、ローザ及びアルブミンが挙げられる。例えば、米国特許第７，９５１，９２５号、同第８，７７１，９８５号、同第８，１１０，３７９号、同第７，９５１，９２５号、米国特許出願公開第２０１００２１８２６４号、同第２０１１０２６５１９８号、同第２０１３０１３７１０４号、同第２０１３０１２２５９１号、同第２０１３０１７７９８３号、同第２０１３０１７７９６０号、同第２０１５００５６７０５号及び同第２０１５０１５９１７２号を参照されたい。

【００７７】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」とは、好ましくは、必ずしも必要ではないが、日常的なアッセイにおいて容易に測定される、タンパク質産物を産生する任意の配列を指す。好適なレポーター遺伝子としては、抗生物質耐性（例えば、アンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、Ｇ４１８耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、有色または蛍光もしくは発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、高感度緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）をコードする配列、ならびに細胞増殖及び／または遺伝子増幅の増強を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ）が挙げられるが、これらに限定されない。エピトープタグには、例えば、ＦＬＡＧ、Ｈｉｓ、ｍｙｃ、Ｔａｐ、ＨＡまたは任意の検出可能なアミノ酸配列の１つ以上のコピーが挙げられる。「発現タグ」は、対象の遺伝子の発現をモニターするために所望の遺伝子配列に作動可能に結合され得るレポーターをコードする配列を含む。

【００７８】

「真核」細胞としては、真菌細胞（酵母など）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、及び幹細胞（多能性及び多分化能）を含むヒト細胞（例えば、Ｔ細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００７９】

「作動的連結」及び「作動的に連結」（または「作動可能に連結」）は、２つ以上の構成要素（配列要素など）の並列であって、両方固構成要素が正常に機能し、かつ構成要素のうちの少なくとも１つが、他の構成要素のうちの少なくとも１つに対して発揮される機

能を媒介することができる状態を許すように、各構成要素が配置されているものを指して、互換的に使用される。例示として、プロモーターなどの転写調節配列は、転写調節配列が１つ以上の転写調節因子の存在または非存在に応じて、コード配列の転写レベルを制御する場合は、コード配列に作動的に連結結合される。転写調節配列は、一般に、コード配列とはシスに、作動的に連結されているが、それに直接隣接している必要はない。例えば、エンハンサーは、たとえそれらが隣接していなくても、コード配列に作動的に連結される転写調節配列である。

【００８０】

タンパク質、ポリペプチド、または核酸の「機能的断片」は、タンパク質、ポリペプチド、または核酸であり、それらの配列は、完全長タンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一ではないが、完全長タンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一の機能を保持する。機能的断片は、対応する天然分子よりも多い、少ない、または同一の残基数を有することができ、及び／または１つ以上のアミノ酸またはヌクレオチド置換を含むことができる。核酸またはタンパク質の機能（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力、酵素活性アッセイ）を決定するための方法は、当技術分野において周知である。

【００８１】

ポリヌクレオチド「ベクター」または「構築物」は、遺伝子配列を標的細胞に導入することができる。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、「発現構築物」、「発現カセット」、及び「遺伝子導入ベクター」は、対象の遺伝子の発現を誘導することができ、そして遺伝子配列を標的細胞に導入することができる任意の核酸構築物を意味する。したがって、この用語はクローニング、及び発現ビヒクル、ならびに組み込みベクターを含む。

【００８２】

「対象」及び「患者」という用語は互換的に使用され、ヒト患者及び非ヒト霊長類などの哺乳動物、ならびにウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、及び他の動物などの実験動物を指す。したがって、本明細書で使用される場合、「対象」または「患者」という用語は、本発明の発現カセットを投与することができる任意の哺乳動物の患者または対象を意味する。本発明の対象は、障害を有するものを含む。

【００８３】

本明細書で使用される場合、「治療すること」及び「治療」という用語は、症状の重症度及び／または頻度の減少、症状及び／または根本的な原因の排除、症状の発生及び／またはそれらの根本的な原因の防止、ならびに損傷の改善または是正を指す。がん、単遺伝子性疾患及び移植片対宿主病は、本明細書に記載される組成物及び方法を用いて治療され得る状態の非限定的な例である。

【００８４】

「クロマチン」は細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主にＤＮＡ、ならびにヒストン及び非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。真核細胞クロマチンの大部分はヌクレオソームの形態で存在し、ここで、ヌクレオソームコアはヒストンＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３及びＨ４をそれぞれ２個含む八量体と会合した約１５０個の塩基対のＤＮＡを含み、そしてリンカーＤＮＡ（生物に応じて長さが変わる）はヌクレオソームコア間に延在する。ヒストンＨ１分子は、概して、リンカーＤＮＡと会合している。本開示の目的のために、「クロマチン」という用語は、原核生物及び真核生物の両方の、全ての種類の細胞核タンパク質を包含することを意味する。細胞クロマチンは、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む。

【００８５】

「接近可能領域」は、細胞クロマチン中の、核酸中に存在する標的部位が標的部位を認識する外因性分子によって結合され得る部位である。特定の理論に縛られることを望むものではないが、接近可能領域はヌクレオソーム構造にパッケージされていないものであると考えられる。接近可能領域の明確な構造は、化学的及び酵素的プローブ、例えば、ヌクレアーゼに対するその感受性によってしばしば検出することができる。

【００８６】
「標的部位」または「標的配列」は、結合のために十分な条件が存在するという条件で、結合分子が結合することになる核酸の一部を決定する核酸配列である。例えば、５’－ＧＡＡＴＴＣ－３’という配列は、Ｅｃｏ　ＲＩ制限エンドヌクレアーゼの標的部位である。「意図された」または「オンターゲット」配列は、結合分子が結合することが意図される配列であり、「意図されない」または「オフターゲット」配列は、意図された標的ではない結合分子によって結合される任意の配列を含む。
【００８７】
ＤＮＡ結合分子／ドメイン
対象の任意の遺伝子または遺伝子座の標的部位に特異的に結合するＤＮＡ結合分子／ドメインを含む組成物が本明細書に記載される。ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメイン、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓヌクレアーゼのＤＮＡ結合部分（ガイドまたはｓｇＲＮＡ）、またはメガヌクレアーゼ由来のＤＮＡ結合ドメインが挙げられるが、これらに限定されない、任意のＤＮＡ結合分子／ドメインを本明細書に開示される組成物及び方法において使用することができる。
【００８８】
ある特定の実施形態では、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、それが、選択する標的部位に結合するように操作されているという点で天然に存在しない。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Ｂｅｅｒｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１３５－１４１、Ｐａｂｏ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７０：３１３－３４０；Ｉｓａｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：６５６－６６０、Ｓｅｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：６３２－６３７、Ｃｈｏｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：４１１－４１６、米国特許第６，４５３，２４２号、同第６，５３４，２６１号、同第６，５９９，６９２号、同第６，５０３，７１７号、同第６，６８９，５５８号、同第７，０３０，２１５号、同第６，７９４，１３６号、同第７，０６７，３１７号、同第７，２６２，０５４号、同第７，０７０，９３４、同第７，３６１，６３５号、同第７，２５３，２７３号、及び米国特許出願公開第２００５／００６４４７４号、同第２００７／０２１８５２８号、同第２００５／０２６７０６１を参照されたい。ある特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２０１２／００６０２３０号（例えば、表１）に開示されるジンクフィンガータンパク質を含む。
【００８９】
操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質と比較して、新規の結合特異性を有することができる。操作方法には、合理的設計及び様々な種類の選択が挙げられるが、これらに限定されない。合理的設計としては、例えば、三重（または四重）ヌクレオチド配列及び個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを使用することが挙げられ、それぞれの三重または四重ヌクレオチド配列は、特定の三重または四重配列に結合するジンクフィンガーの１つ以上のアミノ酸配列に会合する。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，４５３，２４２号及び同第６，５３４，２６１号を参照されたい。
【００９０】
ファージディスプレイ及びツーハイブリッドシステムを含む、例示的な選択方法は、米国特許第５，７８９，５３８号、同第５，９２５，５２３号、同第６，００７，９８８号、同第６，０１３，４５３号、同第６，４１０，２４８号、同第６，１４０，４６６号、同第６，２００，７５９号、及び同第６，２４２，５６８号、ならびに国際公開第９８／３７１８６号、国際公開第９８／５３０５７号、国際公開第００／２７８７８号、国際公開第０１／８８１９７号及びＧＢ２，３３８，２３７号に開示されている。加えて

、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、米国特許第６，７９４，１３６号に記載されている。

【００９１】

加えて、これら及び他の参考文献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／またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば、５個以上の長さ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用いて互いに連結し得る。６個以上の長さのアミノ酸の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号、同第６，９０３，１８５号及び同第７，１５３，９４９号も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、米国特許第６，７９４，１３６号に記載されている。

【００９２】

標的部位の選択、融合タンパク質（及びそれ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ＺＦＰ及び方法は、当業者に既知であり、米国特許第６，１４０，０８１号、同第５，７８９，５３８号、同第６，４５３，２４２号、同第６，５３４，２６１号、同第５，９２５，５２３号、同第６，００７，９８８号、同第６，０１３，４５３号、同第６，２００，７５９号、国際公開第９５／１９４３１号、国際公開第９６／０６１６６号、国際公開第９８／５３０５７号、国際公開第９８／５４３１１号、国際公開第００／２７８７８号、国際公開第０１／６０９７０号、国際公開第０１／８８１９７号、国際公開第０２／０９９０８４号、国際公開第９８／５３０５８号、国際公開第９８／５３０５９号、国際公開第９８／５３０６０号、国際公開第０２／０１６５３６号及び国際公開第０３／０１６４９号に詳細に記載されている。

【００９３】

加えて、これら及び他の参考文献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／またはマルチフィンガージンクフィンガータンパク質は、例えば、５個以上の長さのアミノ酸のリンカーを含む、任意の適切なリンカー配列を用いて一緒に結合され得る。例示的な６個以上の長さのアミノ酸のリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号、同第６，９０３，１８５号及び同第７，１５３，９４９号もまた参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間の適切なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。

【００９４】

通常、ＺＦＰは少なくとも３本のフィンガーを含む。ある特定のＺＦＰは、４本、５本、または６本のフィンガーを含む。３本のフィンガーを含むＺＦＰは典型的には９個または１０個のヌクレオチドを含む標的部位を認識し、４本のフィンガーを含むＺＦＰは、典型的には１２～１４個のヌクレオチドを含む標的部位を認識し、一方、６本のフィンガーを含むＺＦＰは、１８～２１個のヌクレオチドを含む標的部位を認識することができる。ＺＦＰはまた、１つ以上の調節ドメインを含む融合タンパク質とすることができ、ドメインは転写活性化ドメインまたは抑制ドメインとすることができる。

【００９５】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインはヌクレアーゼに由来し得る。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、米国特許第６，８３３，２５２号、Ｂｅｌｆｏｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３７９－３３８８；Ｄｕｊｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅ ８２：１１５－１１８、Ｐｅｒｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２，１１２５－１１２７、Ｊａｓｉｎ（１９９６）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．１２：２２４－２２８；Ｇｉｍｂｌｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６３：１６３－１８０、Ａｒｇａｓｔ ｅｔ ａｌ．（１９９

８）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８０：３４５－３５３及びＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓカタログもまた参照されたい。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼのＤＮＡ結合特異性は、非天然の標的部位に結合するように操作することができる。例えば、Ｃｈｅｖａｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ １０：８９５－９０５；Ｅｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：２９５２－２９６２、Ａｓｈｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｎａｔｕｒｅ ４４１：６５６－６５９；Ｐａｑｕｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：４９－６６、米国特許公開第２００７０１１７１２８号を参照されたい。

【００９６】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される変異型切断ドメインと共に使用されるジンクフィンガータンパク質は、主鎖領域（例えば、－１～６の番号が付けられた７アミノ酸認識ヘリックス領域の外側の領域）に対して、例えば、－１４、－９、及び／または－５位のうちの１つ以上において１つ以上の変異（置換、欠失、及び／または挿入）を含む（例えば、図５Ａを参照されたい）。１つ以上のこれらの位置における野生型残基は、欠失されてもよく、任意のアミノ酸残基で置換されてもよく、及び／または１つ以上の追加の残基を含んでもよい。いくつかの実施形態では、－５位のＡｒｇ（Ｒ）がＴｙｒ（Ｙ）、Ａｓｐ（Ｎ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｇｌｎ（Ｑ）、またはＡｌａ（Ａ）に変更されている。他の実施形態では、（－９）位のＡｒｇ（Ｒ）がＳｅｒ（Ｓ）、Ａｓｐ（Ｎ）、またはＧｌｕ（Ｅ）で置き換えられている。さらなる実施形態では、（－１４）位のＡｒｇ（Ｒ）が、Ｓｅｒ（Ｓ）またはＧｌｎ（Ｑ）で置き換えられている。他の実施形態では、融合ポリペプチドは、（－５）、（－９）及び／または（－１４）位のアミノ酸が、任意の組み合わせで上記に列挙されるアミノ酸のいずれかに変更されているジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインに変異を含むことができる。

【００９７】

他の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、植物病原体Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属（Ｂｏｃｈ ｅｔ ａｌ，（２００９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２６：１５０９－１５１２及びＭｏｓｃｏｕ ａｎｄ Ｂｏｇｄａｎｏｖｅ，（２００９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２６：１５０１を参照されたい）及びＲａｌｓｔｏｎｉａ属（Ｈｅｕｅｒ ｅｔ ａｌ（２００７）Ａｐｐｌｉｅｄ ａｎｄ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ７３（１３）：４３７９－４３８４、米国特許公開第２０１１０３０１０７３号及び同第２０１１０１４５９４０号を参照されたい）に由来するものと同様の転写アクチベーター様（ＴＡＬ）エフェクター（ＴＡＬＥ）由来の操作されたドメインを含む。Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属の植物病原菌は、重要な作物に多くの病気を引き起こすことが知られている。Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属の病原性は、植物細胞に２５個を超える異なるエフェクタータンパク質を注入する保存されたＩＩＩ型分泌（Ｔ３Ｓ）系に依存する。これらの注入されたタンパク質の中には、植物転写アクチベーターを模倣して植物トランスクリプトームを操作する転写アクチベーター様エフェクター（ＴＡＬＥ）がある（Ｋａｙ ｅｔ ａｌ（２００７）Ｓｃｉｅｎｃｅ３１８：６４８－６５１を参照されたい）。これらのタンパク質はＤＮＡ結合ドメイン及び転写活性化ドメインを含有する。最もよく特徴付けられているＴＡＬＥの１つは、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ ｃａｍｐｅｓｔｇｒｉｓ病原型ＶｅｓｉｃａｔｏｒｉａからのＡｖｒＢｓ３である（Ｂｏｎａｓ ｅｔ ａｌ（１９８９）Ｍｏｌ Ｇｅｎ Ｇｅｎｅｔ ２１８：１２７－１３６及び国際公開第２０１００７９４３０を参照のされたい）。ＴＡＬＥはタンデムリピートの集中ドメインを含み、各リピートは、これらのタンパク質のＤＮＡ結合特異性にとって重要である約３４個のアミノ酸を含む。加えて、それらは核局在化配列及び酸性転写活性化ドメインを含む（総説についてはＳｃｈｏｒｎａｃｋ Ｓ，ｅｔ ａｌ（２００６）Ｊ Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １６３（３）：２５６－２７２を参照されたい）。加えて、植物病原性細菌Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎａｃｅａｒｕｍでは、Ｒ．ｓｏｌａｎａｃｅａｒｕｍ ｂｉｏｖａｒ１株ＧＭＩ１０００及びｂｉｏｖａｒ４株ＲＳ１０００において、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属のＡｖｒＢｓ３フ

ァミリーと相同な２つの遺伝子ｂｒｇ１１及びｈｐｘ１７が見出されている（Ｈｅｕｅｒ ｅｔ ａｌ（２００７）Ａｐｐｌ ａｎｄ Ｅｎｖｉｒ Ｍｉｃｒｏ ７３（１３）：４３７９－４３８４を参照されたい）。これらの遺伝子は、ヌクレオチド配列が互いに９８．９％同一であるが、ｈｐｘ１７のリピートドメインにおける１，５７５個の塩基対の欠失によって異なる。しかしながら、両方の遺伝子産物は、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属のＡｖｒＢｓ３ファミリータンパク質と４０％未満の配列同一性を有する。

【００９８】

これらのＴＡＬエフェクターの特異性は、タンデムリピートに見出される配列に依存する。リピートされる配列は約１０２個の塩基対を含み、リピートは典型的には互いに９１～１００％相同である（Ｂｏｎａｓら、同書）。リピートの多型は通常１２位と１３位にあり、１２位と１３位の超可変残基（繰り返し可変残基またはＲＶＤ領域）の同一性と、ＴＡＬエフェクターの標的配列中の連続したヌクレオチドの同一性との間には１対１の対応関係があるようである（Ｍｏｓｃｏｕ ａｎｄ Ｂｏｇｄａｎｏｖｅ，（２００９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２６：１５０１及びＢｏｃｈ ｅｔ ａｌ（２００９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２６：１５０９－１５１２を参照されたい）。実験的に、１２位及び１３位のＨＤ配列（繰り返し可変方向またはＲＶＤ）がシトシン（Ｃ）への結合をもたらし、ＮＧがＴへ結合し、ＮＩがＡ、Ｃ、ＧまたはＴへ結合し、ＮＮはＡまたはＧに結合し、及びＩＮＧはＴに結合するように、これらのＴＡＬエフェクターのＤＮＡ認識のための天然コードが決定された。これらのＤＮＡ結合リピートは、新しい組み合わせ及びリピート数でタンパク質に組み立てられ、植物細胞中で新しい配列と相互作用し、非内因性レポーター遺伝子の発現を活性化することができる人工転写因子を作製した（Ｂｏｃｈら、同書）。操作されたＴＡＬタンパク質は、非定型ＲＶＤを有するＴＡＬＥＮを含む、ＴＡＬエフェクタードメインヌクレアーゼ融合（ＴＡＬＥＮ）を生じるためにＦｏｋＩ切断ハーフドメインに結合されている。例えば、米国特許第８，５８６，５２６号を参照されたい。

【００９９】

いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮはエンドヌクレアーゼ（例えば、ＦｏｋＩ）切断ドメインまたは切断ハーフドメインを含む。他の実施形態では、ＴＡＬＥヌクレアーゼはメガＴＡＬである。これらのメガＴＡＬヌクレアーゼは、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインとメガヌクレアーゼ切断ドメインとを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ切断ドメインは単量体として活性であり、活性のために二量体化を必要としない（Ｂｏｉｓｓｅｌ ｅｔ ａｌ．，（２０１３）Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ：１－１３，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｔ１２２４を参照されたい）。

【０１００】

さらに他の実施形態では、ヌクレアーゼはコンパクトＴＡＬＥＮを含む。これらは、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインをＴｅｖＩヌクレアーゼドメインに結合する一本鎖融合タンパク質である。融合タンパク質は、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインがＴｅｖＩヌクレアーゼドメインに対してどこに位置するかに応じて、ＴＡＬＥ領域に局在するニッカーゼとして作用するか、または二本鎖切断を生じさせることができる（Ｂｅｕｒｄｅｌｅｙ ｅｔ ａｌ（２０１３）Ｎａｔ Ｃｏｍｍ：１－８ ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ２７８２を参照されたい）。加えて、ヌクレアーゼドメインはまた、ＤＮＡ結合機能性を示し得る。任意のＴＡＬＥＮが、追加のＴＡＬＥＮ（例えば、１つ以上のＴＡＬＥＮ（ｃＴＡＬＥＮまたはＦｏｋＩ－ＴＡＬＥＮ）と１つ以上のメガＴＡＬＥ）と組み合わせて使用され得る。

【０１０１】

加えて、これら及び他の参考文献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／またはマルチフィンガージンクフィンガータンパク質もしくはＴＡＬＥは、例えば、５個以上の長さのアミノ酸のリンカーを含む任意の適切なリンカー配列を用いて一緒に結合され得る。例示的な６個以上の長さのアミノ酸のリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号、同第６，９０３，１８５号及び同第７，１５３，９４９号もまた参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィン

ガー間に適切なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、米国特許第６，７９４，１３６号に記載されている。ある特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ＤＮＡに結合するシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）ＤＮＡ結合分子を含む、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ系の一部である。例えば、米国特許第８，６９７，３５９号、ならびに米国特許公開第２０１５００５６７０５号及び同第２０１５０１５９１７２号を参照されたい。系のＲＮＡ成分をコードするＣＲＩＳＰＲ（クラスター化された規則的に散在した短い回文構造のリピート）遺伝子座、及びタンパク質をコードするｃａｓ（ＣＲＩＳＰＲ関連）遺伝子座（Ｊａｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００２．Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４３：１５６５－１５７５、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．，２００２．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３０：４８２－４９６、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．，２００６．Ｂｉｏｌ Ｄｉｒｅｃｔ １：７、Ｈａｆｔ ｅｔ ａｌ．，２００５．ＰＬｏＳ Ｃｏｍｐｕｔ．Ｂｉｏｌ．１：ｅ６０）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主におけるＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子ならびにＣＲＩＳＰＲ媒介核酸切断の特異性をプログラムすることができる非コードＲＮＡ要素の組み合わせを含有する。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインはＴｔＡｇｏ系の一部である（Ｓｗａｒｔｓら、同書、Ｓｈｅｎｇら、同書を参照されたい）。真核生物では、遺伝子サイレンシングはアルゴノート（Ａｇｏ）ファミリーのタンパク質によって媒介される。この実例では、Ａｇｏは小さな（１９～３１ｎｔの）ＲＮＡに結合している。このタンパク質－ＲＮＡサイレンシング複合体は、小さなＲＮＡと標的との間のワトソン‐クリック型塩基対合を介して標的ＲＮＡを認識し、標的ＲＮＡをエンドヌクレアーゼ的に切断する（Ｖｏｇｅｌ（２０１４）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３４４：９７２－９７３）。対照的に、原核生物のＡｇｏタンパク質は、小さな一本鎖ＤＮＡ断片に結合し、外来の（しばしばウイルスの）ＤＮＡを検出及び除去するように機能する可能性が高い（Ｙｕａｎ ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ １９，４０５、Ｏｌｏｖｎｉｋｏｖ，ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ ５１，５９４、Ｓｗａｒｔｓら、同書）。例示的な原核生物のＡｇｏタンパク質には、Ａｑｕｉｆｅｘ ａｅｏｌｉｃｕｓ、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｓｐｈａｅｒｏｉｄｅｓ、及びＴｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来のものが挙げられる。

【０１０３】

最もよく特徴付けられている原核生物のＡｇｏタンパク質の１つはＴ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来のものである（ＴｔＡｇｏ、Ｓｗａｒｔｓら、同書）。ＴｔＡｇｏは、５’リン酸基を有する１５個の塩基または１３～２５個の塩基の一本鎖ＤＮＡ断片と会合する。ＴｔＡｇｏによって結合されるこの「ガイドＤＮＡ」は、タンパク質－ＤＮＡ複合体を、第三者のＤＮＡの分子中のワトソン－クリック型相補的ＤＮＡ配列と結合させるように誘導する。一旦これらのガイドＤＮＡ中の配列情報が標的ＤＮＡの特定を可能にすると、ＴｔＡｇｏ－ガイドＤＮＡ複合体は標的ＤＮＡを切断する。そのような機構はまた、その標的ＤＮＡに結合している間のＴｔＡｇｏ－ガイドＤＮＡ複合体の構造によっても支持される（Ｇ．Ｓｈｅｎｇら、同書）。Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｓｐｈａｅｒｏｉｄｅｓ由来のＡｇｏ（ＲｓＡｇｏ）も同様の性質を有する（Ｏｌｉｖｎｉｋｏｖら、同書）。

【０１０４】

任意のＤＮＡ配列の外因性ガイドＤＮＡをＴｔＡｇｏタンパク質上にロードすることができる（Ｓｗａｒｔｓら、同書）。ＴｔＡｇｏ切断の特異性はガイドＤＮＡによって誘導されるので、したがって、外因性の研究者指定のガイドＤＮＡと形成されたＴｔＡｇｏ－ＤＮＡ複合体は相補性の研究者指定の標的ＤＮＡにＴｔＡｇｏ標的ＤＮＡ切断を誘導するであろう。このようにして、ＤＮＡにおいて標的化された二本鎖切断を作り出すことができる。ＴｔＡｇｏガイドＤＮＡ系（または他の生物由来のオルソロガスなＡｇｏ‐ガイドＤＮＡ系）の使用は、細胞内のゲノムＤＮＡの標的化された切断を可能にする。そのような切断は、一本鎖または二本鎖のいずれかとすることができる。哺乳動物ゲノムＤＮＡの

切断のためには、哺乳動物細胞における発現に最適化されたバージョンのＴｔＡｇｏコドンの使用が好ましいであろう。さらに、ＴｔＡｇｏタンパク質が細胞透過性ペプチドに融合している場合、インビトロで形成されたＴｔＡｇｏ－ＤＮＡ複合体で細胞を処理することが好ましい可能性がある。さらに、３７℃で活性が改善されるように変異誘発を介して変更されたＴｔＡｇｏタンパク質のバージョンを使用することが好ましい可能性がある。Ａｇｏ－ＲＮＡ媒介ＤＮＡ切断は、ＤＮＡ破壊の利用のための当技術分野において標準的な技術を用いた、遺伝子ノックアウト、標的化された遺伝子の付加、遺伝子修正、標的化された遺伝子の欠失を含む一連の結果に影響を及ぼすために使用され得る。

【０１０５】

したがって、任意のＤＮＡ結合分子／ドメインを使用することができる。

【０１０６】

融合分子

本明細書に記載されるＤＮＡ結合ドメイン（例えば、ＺＦＰまたはＴＡＬＥ、シングルガイドＲＮＡなどのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ成分）及び異種調節（機能）ドメイン（またはその機能的フラグメント）を含む融合分子もまた提供される。一般的なドメインには、例えば、転写因子ドメイン（活性化因子、抑制因子、活性化補助因子、補助抑制因子）、サイレンサー、発癌遺伝子（例えば、ｍｙｃ、ｊｕｎ、ｆｏｓ、ｍｙｂ、ｍａｘ、ｍａｄ、ｒｅｌ、ｅｔｓ、ｂｃｌ、ｍｙｂ、ｍｏｓファミリーメンバーなど）；ＤＮＡ修復酵素とその関連因子及び修飾因子；ＤＮＡ再配列酵素ならびにそれらに関連する因子及び修飾因子；クロマチン関連タンパク質及びそれらの修飾因子（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）ならびにそれらの関連因子及び修飾因子が挙げられる。ＤＮＡ結合ドメインとヌクレアーゼ切断ドメインとの融合に関する詳細については、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２００５００６４４７４号、同第２００６０１８８９８７号及び同第２００７／０２１８５２８号を参照されたい。

【０１０７】

活性化を達成するための適切なドメインには、ＨＳＶ　ＶＰ１６活性化ドメイン（例えば、Ｈａｇｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７１，５９５２－５９６２（１９９７）を参照されたい）、核ホルモン受容体（例えば、Ｔｏｒｃｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０：３７３－３８３（１９９８）を参照されたい）、核因子カッパＢのｐ６５サブユニット（Ｂｉｔｋｏ＆Ｂａｒｉｋ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：５６１０－５６１８（１９９８）ａｎｄ　Ｄｏｙｌｅ　＆　Ｈｕｎｔ，Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ　８：２９３７－２９４２（１９９７））、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．５：３－２８（１９９８））、またはＶＰ６４などの人工キメラ機能的ドメイン（Ｂｅｅｒｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９５：１４６２３－３３）、及びデグロン（Ｍｏｌｉｎａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）ＥＭＢＯ　Ｊ．１８，６４３９－６４４７）が挙げられる。追加の例示的な活性化ドメインには、Ｏｃｔ　１、Ｏｃｔ－２Ａ、Ｓｐ１、ＡＰ２、及びＣＴＦ１（Ｓｅｉｐｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．１１，４９６１－４９６８（１９９２）、ならびにｐ３００、ＣＢＰ、ＰＣＡＦ、ＳＲＣ　１　ＰｖＡＬＦ、ＡｔＨＤ２Ａ及びＥＲＦ－２が挙げられる。例えば、Ｒｏｂｙｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１４：３２９－３４７、Ｃｏｌｌｉｎｇｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２３：２５５－２７５；Ｌｅｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｇｅｎｅ　２４５：１－１１、Ｍａｎｔｅｕｆｆｅｌ－Ｃｙｍｂｏｒｏｗｓｋａ（１９９９）Ａｃｔａ　Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｐｏｌ．４６：７７－８９、ＭｃＫｅｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｓｔｅｒｏｉｄ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．６９：３－１２、Ｍａｌｉｋ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．２５：２７７－２８３及びＬｅｍｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．９：４９９－５０４を参照されたい。追加の例示的な活性化ドメイン

としては、ＯｓＧＡＩ、ＨＡＬＦ－１、Ｃ１、ＡＰ１、ＡＲＦ－５、－６、－７、ならびに－８、ＣＰＲＦ１、ＣＰＲＦ４、ＭＹＣ－ＲＰ／ＧＰ、及びＴＲＡＢ１が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Ｏｇａｗａ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｇｅｎｅ ２４５：２１－２９、Ｏｋａｎａｍｉ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｇｅｎｅｓ Ｃｅｌｌｓ １：８７－９９、Ｇｏｆｆ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．５：２９８－３０９；Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４０：４１９－４２９、Ｕｌｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：５８４４－５８４９、Ｓｐｒｅｎｇｅｒ－Ｈａｕｓｓｅｌｓ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｊ．２２：１－８、Ｇｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４１：３３－４４及びＨｏｂｏ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：１５，３４８－１５，３５３を参照されたい。

【０１０８】

ＤＮＡ結合ドメインと機能的ドメインとの間の融合タンパク質（またはそれをコードする核酸）の形成において、活性化ドメインまたは活性化ドメインと相互作用する分子のいずれかが機能的ドメインとして適切であることは、当業者には明らかであろう。標的遺伝子に対する活性化複合体及び／または活性化活性（例えば、ヒストンアセチル化など）を動員することができる本質的に任意の分子が、融合タンパク質の活性化ドメインとして有用である。融合分子における機能的ドメインとしての使用に適したＩＳＷＩ含有ドメイン及び／またはメチル結合ドメインタンパク質などのインシュレータードメイン、局在化ドメイン、及びクロマチン再構成タンパク質は、例えば、米国特許出願公開第２００２／０１１５２１５号及び同第２００３／００８２５５２号ならびに国際公開第０２／４４３７６号に記載されている。

【０１０９】

例示的な抑制ドメインとしては、ＫＲＡＢ Ａ／Ｂ、ＫＯＸ、ＴＧＦβ誘導性初期遺伝子（ＴＩＥＧ）、ｖ－ｅｒｂＡ、ＳＩＤ、ＭＢＤ２、ＭＢＤ３、ＤＮＭＴファミリーのメンバー（例えば、ＤＮＭＴ１、ＤＮＭＴ３Ａ、ＤＮＭＴ３Ｂ）、Ｒｂ、及びＭｅＣＰ２が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ ９９：４５１－４５４、Ｔｙｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ ９９：４４３－４４６、Ｋｎｏｅｐｆｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｅｌｌ ９９：４４７－４５０及びＲｏｂｅｒｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．２５：３３８－３４２を参照されたい。追加の例示的な抑制ドメインとしては、ＲＯＭ２及びＡｔＨＤ２Ａが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Ｃｈｅｍ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ８：３０５－３２１及びＷｕ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｊ．２２：１９－２７を参照されたい。

【０１１０】

融合分子は、当業者に周知のクローニング及び生化学的複合体化の方法によって構築される。融合分子は、ＤＮＡ結合ドメイン及び機能的ドメイン（例えば、転写活性化ドメインまたは抑制ドメイン）を含む。融合分子はまた、任意に、核局在化シグナル（例えば、ＳＶ４０培地のＴ抗原由来のものなど）及びエピトープタグ（例えば、ＦＬＡＧ及び赤血球凝集素など）もまた含む。融合タンパク質（及びそれらをコードする核酸）は、翻訳読取フレームが融合の成分間で保存されるように設計されている。

【０１１１】

一方の機能的ドメインのポリペプチド成分（またはその機能的断片）と、他方の非タンパク質ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、抗生物質、インターカレーター、マイナーグルーブバインダー、核酸）との間の融合は、当業者に周知の生化学的複合体化の方法によって構築される。例えば、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）のカタログを参照されたい。小溝結合剤とポリペプチドとの間の融合物を作製するための方法及び組成物は、Ｍａｐｐ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：３９３０－３９３５に記載されている。さらに、ＣＲＩ

ＳＰＲ／Ｃａｓ系のシングルガイドＲＮＡは機能的ドメインと会合して活性な転写調節因子及びヌクレアーゼを形成する。

【０１１２】

ある特定の実施形態では、標的部位は細胞クロマチンの接近可能な領域に存在する。接近可能領域は、例えば、米国特許第７，２１７，５０９号及び同第７，９２３，５４２号に記載されているように決定することができる。標的部位が細胞クロマチンの接近可能な領域に存在しない場合、米国特許第７，７８５，７９２号及び同第８，０７１，３７０号に記載されているように、１つ以上の接近可能な領域を生成することができる。追加の態様では、融合分子のＤＮＡ結合ドメインは、その標的部位が接近可能領域にあるか否かにかかわらず、細胞クロマチンに結合することができる。例えば、そのようなＤＮＡ結合ドメインはリンカーＤＮＡ及び／またはヌクレオソームＤＮＡに結合することができる。この種の「パイオニア」ＤＮＡ結合ドメインの例は、ある特定のステロイド受容体及び肝細胞核因子３（ＨＮＦ３）に見出される（Ｃｏｒｄｉｎｇｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｃｅｌｌ ４８：２６１－２７０、Ｐｉｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｃｅｌｌ ６０：７１９－７３１及びＣｉｒｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ．（１９９８）ＥＭＢＯ Ｊ．１７：２４４－２５４）。

【０１１３】

当業者に既知のように、融合分子は薬学的に許容される担体と共に製剤化され得る。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ ｅｄ．，１９８５及び米国特許第６，４５３，２４２号ならびに同第６，５３４，２６１号を参照されたい。

【０１１４】

融合分子の機能的成分／ドメインは、一旦融合分子がそのＤＮＡ結合ドメインを介して標的配列に結合すると、遺伝子の転写に影響を及ぼすことができる任意の様々な異なる成分から選択することができる。したがって、機能的成分としては、活性化因子、抑制因子、活性化補助因子、補助抑制因子、及びサイレンサーなどの様々な転写因子ドメインを挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１１５】

追加の例示的な機能的ドメインは、例えば、米国特許第６，５３４，２６１号及び同第６，９３３，１１３号に開示されている。

【０１１６】

外因性小分子またはリガンドによって調節される機能的ドメインもまた選択され得る。例えば、ＲｈｅｏＳｗｉｔｃｈ（登録商標）技術を使用することができ、ここで、機能的ドメインは外部のＲｈｅｏＣｈｅｍ（登録商標）リガンドの存在下でのみその活性立体配座をとる（例えば、ＵＳ２００９０１３６４６５号を参照されたい）。これにより、ＺＦＰは調節可能な機能的ドメインに機能的に結合されていてもよく、ここで、ＺＦＰ－ＴＦの結果として生じる活性は外部リガンドによって制御される。

【０１１７】

ヌクレアーゼ

ある特定の実施形態では、融合タンパク質はＤＮＡ結合結合ドメイン及び切断（ヌクレアーゼ）ドメインを含む。したがって、遺伝子修飾は、ヌクレアーゼ、例えば、操作されたヌクレアーゼを使用して達成することができる。操作されたヌクレアーゼ技術は、天然に存在するＤＮＡ結合タンパク質の操作に基づく。例えば、目的に合わせたＤＮＡ結合特異性を有するホーミングエンドヌクレアーゼの操作は、Ｃｈａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３３（２０）：ｅ１７８；Ａｒｎｏｕｌｄ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３５５：４４３－４５８に記載されている。加えて、ＺＦＰの操作もまた記載されている。例えば、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，８２４，９７８号、同第６，９７９，５３９号、同第６，９３３，１１３号、同第７，１６３，８２４号及び同第７，０１３，２１９号を参照されたい。

【０１１８】
加えて、ＺＦＰ及び／またはＴＡＬＥは、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮ－その操作された（ＺＦＰまたはＴＡＬＥ）ＤＮＡ結合ドメインを通して意図された核酸標的を認識し、ヌクレアーゼ活性を介してＤＮＡをＤＮＡ結合部位の近くで切断させる機能エンティティーを作り出すためにヌクレアーゼドメインに融合する。例えば、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９３（３）：１１５６－１１６０を参照されたい。より最近、そのようなヌクレアーゼは様々な生物におけるゲノム修飾に使用されている。例えば、米国特許公開第２００３０２３２４１０号、同第２００５０２０８４８９号m同第２００５００２６１５７号、同第２００５００６４４７４号、同第２００６０１８８９８７号、同第２００６００６３２３１号及び国際公開第０７／０１４２７５号を参照されたい。

【０１１９】
したがって、本明細書に記載される方法及び組成物は広く適用可能であり、対象の任意のヌクレアーゼを含み得る。ヌクレアーゼの非限定的な例には、メガヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ及びジンクフィンガーヌクレアーゼが挙げられる。ヌクレアーゼは、異種ＤＮＡ結合ドメイン及び切断ドメイン（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、異種切断ドメインを有するメガヌクレアーゼＤＮＡ結合ドメイン）を含んでもよく、あるいは、天然のヌクレアーゼのＤＮＡ結合ドメインは、選択された標的部位（例えば、同族結合部位とは異なる部位に結合するように操作されたメガヌクレアーゼ）に結合するように変更されてもよい。

【０１２０】
本明細書に記載されるいずれのヌクレアーゼにおいても、ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮとしても称される操作されたＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメイン及びヌクレアーゼドメイン（例えば、エンドヌクレアーゼ及び／またはメガヌクレアーゼドメイン）を含むことができる。これらのＴＡＬＥＮタンパク質を、ユーザーが選択した標的配列との強固な部位特異的相互作用のために操作するための方法及び組成物が公開されている（米国特許第８，５８６，５２６号を参照されたい）。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮはエンドヌクレアーゼ（例えば、ＦｏｋＩ）切断ドメインまたは切断ハーフドメインを含む。他の実施形態では、ＴＡＬＥヌクレアーゼはメガＴＡＬである。これらのメガＴＡＬヌクレアーゼは、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメイン及びメガヌクレアーゼ切断ドメインを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ切断ドメインは単量体として活性であり、活性のために二量体化を必要としない（Ｂｏｉｓｓｅｌ ｅｔ ａｌ．，（２０１３）Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ：１－１３，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｔ１２２４を参照されたい）。加えて、ヌクレアーゼドメインはまた、ＤＮＡ結合機能性を示し得る。

【０１２１】
さらに他の実施形態では、ヌクレアーゼはコンパクトＴＡＬＥＮ（ｃＴＡＬＥＮ）を含む。これらは、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインをＴｅｖＩヌクレアーゼドメインに結合する一本鎖融合タンパク質である。融合タンパク質は、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインがＴｅｖＩヌクレアーゼドメインに対してどこに位置するかに応じて、ＴＡＬＥ領域に局在するニッカーゼとして作用するか、または二本鎖切断を生成することができる（Ｂｅｕｒｄｅｌｅｙ ｅｔ ａｌ（２０１３）Ｎａｔ Ｃｏｍｍ：１－８ ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ２７８２を参照されたい）。任意のＴＡＬＥＮが追加のＴＡＬＥＮ（例えば、１つ以上のメガＴＡＬを有する１つ以上のＴＡＬＥＮ（ｃＴＡＬＥＮまたはＦｏｋＩ－ＴＡＬＥＮ）または他のＤＮＡ切断酵素と組み合わせて使用され得る。

【０１２２】
ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、切断活性を示すメガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）またはその一部分を含む。天然のメガヌクレアーゼは１５～４０個の塩基対の切断部位を認識し、一般に、４つのファミリー、すなわち、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリー、ＧＩＹ－ＹＩＧファミリー、Ｈｉｓ－Ｃｙｓｔボックスファミリー及びＨＮＨファミリーに分類される。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼには、Ｉ－Ｓ

ｃｅＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、及びＩ－ＴｅｖＩＩＩが挙げられる。それらの認識配列は周知である。米国特許第５，４２０，０３２号；米国特許第６，８３３，２５２号、Ｂｅｌｆｏｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３７９－３３８８；Ｄｕｊｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅ ８２：１１５－１１８、Ｐｅｒｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２，１１２５－１１２７、Ｊａｓｉｎ（１９９６）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．１２：２２４－２２８、Ｇｉｍｂｌｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６３：１６３－１８０、Ａｒｇａｓｔ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８０：３４５－３５３及びＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓカタログもまた参照されたい。

【０１２３】

主にＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリー由来である、天然メガヌクレアーゼ由来のＤＮＡ結合ドメインは、植物、酵母、ショウジョウバエ、哺乳動物細胞及びマウスにおける部位特異的ゲノム修飾を促進するために使用されているが、このアプローチは、メガヌクレアーゼ認識配列を保存する相同遺伝子（Ｍｏｎｅｔ ｅｔ ａｌ．（１９９９），Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｏｎ．２５５：８８－９３）または認識配列が導入されている予め操作されたゲノム（Ｒｏｕｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９４），Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１４：８０９６－１０６、Ｃｈｉｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００３），Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ．１３３：９５６－６５；Ｐｕｃｈｔａ ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：５０５５－６０、Ｒｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１６：１５６８－８１、Ｇｏｕｂｌｅ ｅｔ ａｌ．（２００６），Ｊ．Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．８（５）：６１６－６２２）のいずれかの修飾に限定されている。したがって、医学的または生物工学的に関連性のある部位で新規な結合特異性を示すようにメガヌクレアーゼを操作することが試みられている（Ｐｏｒｔｅｕｓ ｅｔ ａｌ．（２００５），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：９６７－７３、Ｓｕｓｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２００４），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３４２：３１－４１、Ｅｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．（２００３），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：２９５２－６２、Ｃｈｅｖａｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ １０：８９５－９０５、Ｅｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：２９５２－２９６２、Ａｓｈｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｎａｔｕｒｅ ４４１：６５６－６５９、Ｐａｑｕｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：４９－６６、米国特許公開第２００７０１１７１２８号、同第２００６０２０６９４９号、同第２００６０１５３８２６号、同第２００６００７８５５２号及び同第２００４０００２０９２号）。加えて、メガヌクレアーゼ由来の天然に存在するまたは操作されたＤＮＡ結合ドメインは、異種ヌクレアーゼ（例えば、ＦｏｋＩ）由来の切断ドメインと作動可能に結合することができ、及び／またはメガヌクレアーゼ由来の切断ドメインは、異種ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、ＺＦＰまたはＴＡＬＥ）と作動可能に結合することができる。

【０１２４】

他の実施形態では、ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）またはＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメイン－ヌクレアーゼ融合（ＴＡＬＥＮ）である。ＺＦＮとＴＡＬＥＮは、選択された遺伝子及び切断ドメインまたは切断ハーフドメイン（例えば、本明細書に記載される制限及び／またはメガヌクレアーゼ由来）の標的部位に結合するように操作されているＤＮＡ結合ドメイン（ジンクフィンガータンパク質またはＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメイン）を含む。

【０１２５】

上記に詳細に記載されているように、ジンクフィンガー結合ドメイン及びＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインは、選択された配列に結合するように操作することができる。例えば、Ｂｅｅｒｌｉ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１

３５－１４１、Ｐａｂｏ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７０：３１３－３４０、Ｉｓａｌａｎ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：６５６－６６０、Ｓｅｇａｌ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：６３２－６３７、Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：４１１－４１６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またはＴＡＬＥタンパク質は、天然に存在するタンパク質と比較して、新規の結合特異性を有することができる。操作方法としては、合理的設計及び様々な種類の選択が挙げられるが、これらに限定されない。合理的設計は、例えば、三重（または四重）ヌクレオチド配列及び個々のジンクフィンガーまたはＴＡＬＥアミノ酸配列を含むデータベースを使用することを含み、ここで、各三重または四重ヌクレオチド配列は、特定の三重または四重配列に結合するジンクフィンガーまたはＴＡＬＥ繰り返し単位の１つ以上のアミノ酸配列と会合している。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第６，４５３，２４２号及び同第６，５３４，２６１号を参照されたい。

【０１２６】

対象部位の選択、及び融合タンパク質（及びそれ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周知であり、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第７，８８８，１２１号及び同第８，４０９，８６１号に詳細に記載されている。

【０１２７】

加えて、これら及び他の参考文献に開示されているように、ジンクフィンガードメイン、ＴＡＬＥ及び／またはマルチフィンガージンクフィンガータンパク質は、任意の適切なリンカー配列を使用して互いに連結されてもよく、例えば、長さ５個以上のアミノ酸のリンカーを含む。（例えば、ＴＧＥＫＰ（配列番号９）、ＴＧＧＱＲＰ（配列番号１０）、ＴＧＱＫＰ（配列番号１１）、及び／またはＴＧＳＱＫＰ（配列番号１２））。例えば、長さ６個以上のアミノ酸の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号、同第６，９０３，１８５号及び同第７，１５３，９４９号を参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間の適切なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。米国特許第８，７７２，４５３号もまた参照されたい。

【０１２８】

したがって、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ及び／またはメガヌクレアーゼなどのヌクレアーゼは、任意のＤＮＡ結合ドメイン及び任意のヌクレアーゼ（切断）ドメイン（切断ドメイン、切断ハーフドメイン）を含み得る。上記のように、切断ドメインは、ＤＮＡ結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガーまたはＴＡＬエフェクターＤＮＡ結合ドメイン及びヌクレアーゼ由来の切断ドメインまたはメガヌクレアーゼＤＮＡ結合ドメイン及び異なるヌクレアーゼ由来の切断ドメインに対して異種であり得る。異種切断ドメインは任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインが由来し得る例示的な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、これらに限定されない。例えば、２００２－２００３ Ｃａｔａｌｏｇｕｅ，Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ及びＢｅｌｆｏｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３７９－３３８８を参照されたい。ＤＮＡを切断する追加の酵素は周知である（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ、緑豆ヌクレアーゼ、膵臓ＤＮアーゼＩ、小球菌ヌクレアーゼ、酵母ＨＯエンドヌクレアーゼであり、Ｌｉｎｎ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９３も参照のこと）。これらの酵素（またはその機能的断片）のうちの１つ以上を、切断ドメイン及び切断ハーフドメインの供給源として使用することができる。

【０１２９】

同様に、切断ハーフドメインは、上記のように、切断活性のために二量体化を必要とする、任意のヌクレアーゼまたはその一部に由来することができる。一般に、融合タンパク

質が切断ハーフドメインを含む場合、２つの融合タンパク質が切断に必要とされる。あるいは、２つの切断ハーフドメインを含む単一のタンパク質を使用することができる。２つの切断ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得るか、または各切断ハーフドメインは異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来することができる。加えて、２つの融合タンパク質の標的部位は、２つの融合タンパク質のそれらのそれぞれの標的部位への結合が、例えば、二量体化によって、切断ハーフドメインが機能的切断ドメインを形成することを可能にする互いに対して空間的配向で切断ハーフドメインを配置するように、互いに配設されていることが好ましい。これにより、ある特定の実施形態では、標的部位の近端部は、５～１０個のヌクレオチドまたは１５～１８個のヌクレオチドだけ離間している。しかしながら、任意の整数個のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が２つの標的部位の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以上）。一般に、切断部位は標的部位間にある。

【０１３０】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は多くの種に存在し、そして（認識部位で）ＤＮＡに配列特異的に結合し、そしてその結合部位またはその近傍でＤＮＡを切断することができる。ある特定の制限酵素（例えば、ＩＩＳ型）は、認識部位から除去された部位でＤＮＡを切断し、そして分離可能な結合及び切断ドメインを有する。例えば、ＩＩＳ型酵素Ｆｏｋ Ｉは、一方の鎖上のその認識部位から９個のヌクレオチド及び他方の上のその認識部位から１３個のヌクレオチドでのＤＮＡの二本鎖切断を触媒する。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、ならびにＬｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：４２７５－４２７９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：２７６４－２７６８、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９４ａ）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：８８３－８８７、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９４ｂ）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：３１，９７８－３１，９８２を参照されたい。これにより、一実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも１つのＩＩＳ型制限酵素由来の切断ドメイン（または切断ハーフドメイン）及び操作されてもされなくてもよい１つ以上のジンクフィンガー結合ドメインを含む。

【０１３１】

切断ドメインが結合ドメインから分離可能である例示的なＩＩＳ型制限酵素は、ＦｏｋＩである。この特定の酵素は二量体として活性がある（Ｂｉｔｉｎａｉｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５： １０，５７０－１０，５７５）。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において使用されるＦｏｋ Ｉ酵素の一部は切断ハーフドメインとみなされる。これにより、ジンクフィンガー－ＦｏｋＩ融合を用いた細胞配列の標的化された二本鎖切断及び／または標的化された置換のために、それぞれがＦｏｋＩ切断ハーフドメインを含む２つの融合タンパク質は触媒活性切断ドメインを再構成するために使用することができる。あるいは、ジンクフィンガー結合ドメイン及び２つのＦｏｋ Ｉ切断ハーフドメインを含有する単一のポリペプチド分子もまた使用することができる。ジンクフィンガー－ＦｏｋＩ融合物を用いた標的化された切断及び標的化された配列変更のためのパラメータは、本開示の他の場所に提供される。

【０１３２】

切断ドメインまたは切断ハーフドメインは、切断活性を保持するか、または多量体化（例えば、二量体化）して機能的切断ドメインを形成する能力を保持するタンパク質の任意の部分とすることができる。

【０１３３】

例示的なＩＩＳ型制限酵素は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、国際公開第０７／０１４２７５に記載されている。追加の制限酵素もまた、分離可能な結合ドメイン及び切断ドメインを含み、そしてこれらは本開示によって企図される。例えば、Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１：４

１８－４２０を参照されたい。
【０１３４】
ある特定の実施形態では、切断ドメインは、以下に示す配列を有する結晶構造１ＦＯＫ．ｐｄｂ及び２ＦＯＫ．ｐｄｂ（Ｗａｈ　ｅｔ　ａｌ（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ　３８８：９７－１００を参照）を生成するために使用されるＦｏｋＩ切断ドメインを含む。
野生型ＦｏｋＩ切断ハーフドメイン（配列番号１）
ＱＬＶＫＳＥＬＥＥＫＫＳＥＬＲＨＫＬＫＹＶＰＨＥＹＩＥＬＩＥＩＡＲＮＳＴＱＤＲＩＬＥＭＫＶＭＥＦＦＭＫＶＹＧＹＲＧＫＨＬＧＧＳＲＫＰＤＧＡＩＹＴＶＧＳＰＩＤＹＧＶＩＶＤＴＫＡＹＳＧＧＹＮＬＰＩＧＱＡＤＥＭＱＲＹＶＥＥＮＱＴＲＮＫＨＩＮＰＮＥＷＷＫＶＹＰＳＳＶＴＥＦＫＦＬＦＶＳＧＨＦＫＧＮＹＫＡＱＬＴＲＬＮＨＩＴＮＣＮＧＡＶＬＳＶＥＥＬＬＩＧＧＥＭＩＫＡＧＴＬＴＬＥＥＶＲＲＫＦＮＮＧＥＩＮＦ
【０１３５】
ＦｏｋＩ由来の切断ハーフドメインは、配列番号１に示されるように１つ以上のアミノ酸残基に変異を含み得る。変異は、（異なる残基に対する野生型アミノ酸残基の）置換、（１つ以上のアミノ酸残基の）挿入及び／または（１つ以上のアミノ酸残基の）欠失を含む。ある特定の実施形態では、残基４１４～４２６、４４３～４５０、４６７～４８８、５０１～５０２、及び／または５２１～５３１のうちの１つまたは複数（配列番号１及び図１７に示される配列に対して番号付けされている）が変異している。これは、これらの残基が、Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（（２００７）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２５：７７８－７８４）に記載されているその標的部位に結合したＺＦＮの分子モデルにおいてＤＮＡ主鎖の近くに位置しているからである。ある特定の実施形態では、４１６、４２２、４４７、４４８、及び／または５２５位のうちの１つ以上の残基が変異している。ある特定の実施形態では、変異は、野生型残基の任意の異なる残基、例えば、アラニン（Ａ）残基、システイン（Ｃ）残基、アスパラギン酸（Ｄ）残基、グルタミン酸（Ｅ）残基、ヒスチジン（Ｈ）残基、フェニルアラニン（Ｆ）残基、グリシン（Ｇ）残基、アスパラギン（Ｎ）残基、セリン（Ｓ）残基またはトレオニン（Ｔ）残基による置換を含む。他の実施形態では、４１６、４１８、４２２、４４６、４４８、４７６、４７９、４８０、４８１、及び／または５２５位のうちの１つ以上の野生型残基が、Ｒ４１６Ｄ、Ｒ４１６Ｅ、Ｓ４１８Ｅ、Ｓ４１８Ｄ、Ｒ４２２Ｈ、Ｓ４４６Ｄ、Ｋ４４８Ａ、Ｎ４７６Ｄ、Ｉ４７９Ｑ、Ｉ４７９Ｔ、Ｇ４８０Ｄ、Ｑ４８１Ａ、Ｑ４８１Ｅ、Ｋ５２５Ｓ、Ｋ５２５Ａ、Ｎ５２７Ｄ、Ｒ４１６Ｅ＋Ｒ４２２Ｈ、Ｒ４１６Ｄ＋Ｒ４２２Ｈ、Ｒ４１６Ｅ＋Ｋ４４８Ａ、Ｒ４１６Ｄ＋Ｒ４２２Ｈ、Ｋ４４８Ａ＋Ｉ４７９Ｑ、Ｋ４４８Ａ＋Ｑ４８１Ａ、Ｋ４４８Ａ＋Ｋ５２５Ａが挙げられるが、これらに限定されない任意の他の残基で置換される。
【０１３６】
ある特定の実施形態では、切断ドメインは、例えば、それらの全ての開示が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第７，９１４，７９６号、同第８，０３４，５９８号及び同第８，６２３，６１８号、ならびに米国特許公開第２０１１０２０１０５５号に記載されるように、ホモ二量体化を最小化または防止する１つ以上の操作された切断ハーフドメイン（二量体化ドメイン変異体としても称される）を含む。ＦｏｋＩの４４６、４４７、４７９、４８３、４８４、４８６、４８７、４９０、４９１、４９６、４９８、４９９、５００、５３１、５３４、５３７、及び５３８位のアミノ酸残基（配列番号１及び図１７に示される配列に対して番号付けされている）は、全て、ＦｏｋＩ切断ハーフドメインの二量化に影響を与えるための標的である。変異は、ＦｏｋＩと相同な天然制限酵素に見出される残基に対する変異を含み得る。好ましい実施形態では、４１６、４２２、４４７、４４８及び／または５２５位での変異（配列番号１及び図１７に示される配列に対して番号付けされている）は、正に荷電したアミノ酸の、非荷電のアミノ酸または負に荷電したアミノ酸との置換を含む。別の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは１つ以上のアミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５における変異に加えて、アミノ酸残基４９９、４９６及び４８６における変異を含み、全ては配列番号１または図１７に示される配列に対して番号付けされている。

【０１３７】
ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、例えば、米国特許第７，９１４，７９６号、同第　８，０３４，５９８号、同第８，９６１，２８１号及び同第８，６２３，６１８号、米国特許公開第２００８０１３１９６２号及び同第２０１２００４０３９８号に記載されているような、絶対ヘテロ二量体を形成するＦｏｋＩの操作された切断ハーフドメインを含む。これにより、好ましい一実施形態では、本発明は融合タンパク質を提供し、ここで、操作された切断ハーフドメインは、４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５位の１つ以上複数の変異に加えて、４８６位の野生型Ｇｌｎ（Ｑ）残基がＧｌｕ（Ｅ）残基で置換され、４９９位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｅｕ（Ｌ）残基で置換され、４９６位の野生型Ａｓｎ（Ｎ）残基が、Ａｓｐ（Ｄ）またはＧｌｕ（Ｅ）残基（「ＥＬＤ」または「ＥＬＥ」）で置換されているポリペプチドを含む（配列番号１及び図１７に示される配列に対して番号付けされている）。別の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは野生型ＦｏｋＩ切断ハーフドメインに由来し、アミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５の１つ以上の変異に加えて、アミノ酸残基４９０、５３８及び５３７に変異を含み、野生型ＦｏｋＩ（配列番号１及び図１７に示される配列）に対して番号付けされている。好ましい実施形態では、本発明は融合タンパク質を提供し、ここで、操作された切断ハーフドメインは、４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５位の１つ以上の変異に加えて、４９０位の野生型Ｇｌｕ（Ｅ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基と置換され、５３８位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基と置換され、５３７位の野生型Ｈｉｓ（Ｈ）残基が、Ｌｙｓ（Ｋ）残基またはＡｒｇ（Ｒ）残基（「ＫＫＫ」または「ＫＫＲ」）と置換されている（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，９６２，２８１号を参照されたい）ポリペプチドを含む。例えば、その開示が、あらゆる目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第７，９１４，７９６号、同第８，０３４，５９８号及び同第８，６２３，６１８号を参照されたい。他の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、「シャーキー」及び／または「シャーキー」変異を含む（Ｇｕｏ　ｅｔ　ａｌ，（２０１０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４００（１）：９６－１０７を参照されたい）。
【０１３８】
別の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは野生型ＦｏｋＩ切断ハーフドメインに由来し、アミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５の１つ以上の変異に加えて、アミノ酸残基４９０、及び５３８に変異を含み、野生型ＦｏｋＩまたはＦｏｋＩ相同体に対して番号付けられている。好ましい実施形態では、本発明は融合タンパク質を提供し、ここで、操作された切断ハーフドメインは、４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５位の１つ以上の変異に加えて、４９０位の野生型Ｇｌｕ（Ｅ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基で置換され、及び５３８位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基（「ＫＫ」）で置換されているポリペプチドを含む。好ましい実施形態では、本発明は融合タンパク質を提供し、ここで、操作された切断ハーフドメインは、４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５位の１つ以上の変異に加えて、４８６位の野生型Ｇｌｎ（Ｑ）残基がＧｌｕ（Ｅ）残基で置換され、及び４９９位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基が、Ｌｅｕ（Ｌ）残基（「ＥＬ」）（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，０３４，５９８号を参照のされたい）で置換されているポリペプチドを含む。
【０１３９】
一態様では、本発明は、操作された切断ハーフドメインが、ＦｏｋＩ触媒ドメインの３８７、３９３、３９４、３９８、４００、４０２、４１６、４２２、４２７、４３４、４３９、４４１、４４７、４４８、４６９、４８７、４９５、４９７、５０６、５１６、５２５、５２９、５３４、５５９、５６９、５７０、５７１の位のうち１つ以上の野生型アミノ酸残基が変異しているポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。添付の表及び図のいずれかに示されるような１つ以上の変異を含むヌクレアーゼドメインが提供される。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、野生型アミノ酸を、正に荷電した残基から中性の残基または負に荷電した残基に変更する。これらの実施形態のいずれでも、記載

された変異体はまた、１つ以上の追加の変異を含むＦｏｋＩドメイン中に作製され得る。好ましい実施形態では、これらの追加の変異は二量体化ドメイン、例えば、４１８、４３２、４４１、４８１、４８３、４８６、４８７、４９０、４９６、４９９、５２３、５２７、５３７、５３８及び／または５５９位にある。変異の非限定的な例には、３９３、３９４、３９８、４１６、４２１、４２２、４４２、４４４、４７２、４７３、４７８、４８０、５２５または５３０位における任意の切断ドメイン（例えば、ＦｏｋＩまたはＦｏｋＩの相同体）の野生型残基の任意のアミノ酸残基（例えば、Ｋ３９３Ｘ、Ｋ３９４Ｘ、Ｒ３９８Ｘ、Ｒ４１６Ｓ、Ｄ４２１Ｘ、Ｒ４２２Ｘ、Ｋ４４４Ｘ、Ｓ４７２Ｘ、Ｇ４７３Ｘ、Ｓ４７２、Ｐ４７８Ｘ、Ｇ４８０Ｘ、Ｋ５２５Ｘ、及びＡ５３０Ｘであって、ここで、最初の残基は野生型を描写し、Ｘは野生型残基を置換する任意のアミノ酸を指す）との変異（例えば、置換）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ＸはＥ、Ｄ、Ｈ、Ａ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、ＤまたはＮである。他の例示的な変異には、Ｓ４１８Ｅ、Ｓ４１８Ｄ、Ｓ４４６Ｄ、Ｋ４４８Ａ、Ｉ４７９Ｑ、Ｉ４７９Ｔ、Ｑ４８１Ａ、Ｑ４８１Ｎ、Ｑ４８１Ｅ、Ａ５３０Ｅ及び／またはＡ５３０Ｋが挙げられ、ここで、アミノ酸残基は、全長のＦｏｋＩ野生型切断ドメイン及びその相同体に対して番号付けされている（図１７）。ある特定の実施形態では、組み合わせは、４１６及び４２２、４１６及びＫ４４８Ａ、Ｋ４４８Ａ及びＩ４７９Ｑ、Ｋ４４８Ａ及びＱ４８１Ａ及び／またはＫ４４８Ａ位における変異ならびに５２５位における変異を含み得る。一実施形態では、４１６位の野生型残基がＧｌｕ（Ｅ）残基（Ｒ４１６Ｅ）と置換されていてもよく、４２２位の野生型残基がＨｉｓ（Ｈ）残基（Ｒ４２２Ｈ）と置換されていてもよく、及び５２５位の型残基がＡｌａ（Ａ）残基と置換されていてもよい。本明細書に記載される切断ドメインとしては、４３２、４４１、４８３、４８６、４８７、４９０、４９６、４９９、５２７、５３７、５３８及び／または５５９位におけるものが挙げられるが、これらに限定されない追加の変異、例えば、二量体化ドメイン変異体（例えば、ＥＬＤ、ＫＫＲ）及び／またはニッカーゼ変異体（触媒ドメインへの変異）含むことができる。本明細書に記載される変異を有する切断ハーフドメインは、当技術分野において周知のようなヘテロ二量体を形成する。

【０１４０】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「分解酵素」技術を用いてインビボで核酸標的部位に組み立てられ得る（例えば、米国特許公開第２００９００６８１６４号を参照されたい）。そのような開裂酵素の成分は、別々の発現構築物上で発現させることができ、または、個々の成分が、例えば、自己切断性２Ａペプチドまたは１ＲＥＳ配列によって分離されている、１つの翻訳領域中で結合することができる。成分は、個々のジンクフィンガー結合ドメインまたはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであり得る。

【０１４１】

ヌクレアーゼ（例えば、ＺＦＮ及び／またはＴＡＬＥＮ）は、例えば、米国特許第８，５６３，３１４号に記載されているように記載されているような酵母ベースの染色体系において、使用前に活性についてスクリーニングすることができる。

【０１４２】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を含む。系のＲＮＡ成分をコードするＣＲＩＳＰＲ（規則的にクラスター化した散在した短い回文構造の繰り返し）遺伝子座、及びタンパク質をコードするＣａｓ（ＣＲＩＳＰＲ関連）遺伝子座（Ｊａｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００２．Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４３：１５６５－１５７５、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．，２００２．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３０：４８２－４９６、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．，２００６．Ｂｉｏｌ．Ｄｉｒｅｃｔ １：７、Ｈａｆｔ ｅｔ ａｌ．，２００５．ＰＬｏＳ Ｃｏｍｐｕｔ．Ｂｉｏｌ．１：ｅ６０）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主におけるＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子ならびにＣＲＩＳＰＲ媒介核酸切断の特異性をプログラムすることができる非コードＲＮＡ要素の組み合わせを含有する。

【０１４３】

ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲは、最もよく特徴付けられている系の１つであり、そして４つの連続したステップで標的化されたＤＮＡ二本鎖切断を実行する。第１に、２つの非コードＲＮＡ、プレｃｒＲＮＡアレイ及びｔｒａｃｒＲＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座から転写される。第２に、ｔｒａｃｒＲＮＡがプレｃｒＲＮＡの繰り返し領域にハイブリダイズし、個々のスペーサー配列を含む成熟型ｃｒＲＮＡへのプレｃｒＲＮＡの処理を媒介する。第３に、成熟したｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体が、Ｃａｓ９を標的認識のための追加要件である、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の隣のｃｒＲＮＡ上のスペーサーと標的ＤＮＡ上のプロトスペーサーとの間のワトソン‐クリック型塩基対合を介した標的ＤＮＡへ向ける。最後に、Ｃａｓ９が標的ＤＮＡの切断を媒介して、プロトスペーサー内に二本鎖切断を作り出す。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の活性は、（ｉ）「適合」と呼ばれるプロセスで、将来の攻撃を防ぐためのＣＲＩＳＰＲ配列への外来ＤＮＡ配列の挿入、（ｉｉ）関連タンパク質の発現、ならびにアレイの発現及び処理、それに続く（ｉｉｉ）外来核酸とのＲＮＡ媒介干渉という３つのステップを含む。これにより、細菌細胞において、いわゆる「Ｃａｓ」タンパク質のいくつかは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の天然機能に関与し、例えば、外来ＤＮＡの挿入などの機能において役割を果たす。

【０１４４】

いつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１系が用いられる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１系は、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ種において同定され、ヒト細胞において強固なＤＮＡ干渉を媒介するクラス２ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系である。Ｃｐｆ１とＣａｓ９は、機能的に保存されているが、それらのガイドＲＮＡ及び基質特異性を含む多くの属性で異なってる（Ｆａｇｅｒｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ，（２０１５）Ｇｅｎｏｍ Ｂｏｉｏ １６：２５１を参照のこと）。Ｃｐｆ１タンパク質とＣａｓ９タンパク質の主要な違いは、Ｃｐｆ１がｔｒａｃｒＲＮＡを利用せず、したがってｃｒＲＮＡのみを必要とすることである。ＦｎＣｐｆ１ ｃｒＲＮＡは４２～４４ヌクレオチド長（１９のヌクレオチドリピートと２３～２５のヌクレオチドスペーサー）であり、単一のステムループを含み、これは二次構造を維持する、配列変化を許容する。さらに、Ｃｐｆ１ ｃｒＲＮＡは、Ｃａｓ９が必要とする約１００ヌクレオチドの操作されたｓｇＲＮＡよりも大幅に短く、ＦｎＣｐｆ１のＰＡＭ要件は、置換される鎖上の５’－ＴＴＮ－３’及び５’ＣＴＡ－３’である。Ｃａｓ９とＣｐｆ１の双方は、標的ＤＮＡで二重鎖切断をもたらすが、Ｃａｓ９は、そのＲｕｖＣ様及びＨＮＨ様ドメインを用いて、ガイドＲＮＡのシード配列内に平滑末端の切断部をもたらすのに対して、Ｃｐｆ１は、ＲｕＶＣ様ドメインを用いて、シードの外部に付着末端部を生成する。Ｃｐｆ１は、不可欠なシード領域から離れて付着切断部をもたらすので、ＮＨＥＪが標的部位をかく乱することはなく、したがって、Ｃｐｆ１が、所望のＨＤＲ組み換え事象が起こるまで、切断を続けることを確実にする。したがって、本明細書に記載する方法と組成物において、「Ｃａｓ」という用語は、Ｃａｓ９タンパク質とＣｆｐ１タンパク質の両方を含むことが理解される。したがって、本明細書で使用される場合、「ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系」は、ヌクレアーゼ及び／または転写因子系の両方を含んで、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系及び／またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｆｐ１系の両方を指す。

【０１４５】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、天然に存在するＣａｓタンパク質の「機能性誘導体」であり得る。天然配列ポリペプチドの「機能性誘導体」は、天然配列ポリペプチドと共通した定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」としては、天然配列の断片及び天然配列ポリペプチドならびにその断片の誘導体が挙げられるが、これらに限定されない（但し、これらが対応する天然配列ポリペプチドと共通する生物学的活性を有することを条件とする）。本明細書で企図される生物学的活性は、機能的誘導体がＤＮＡ基質を断片に加水分解する能力である。「誘導体」という用語は、ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、誘導体Ｃａｓタンパク質などのその共有結合修飾体、及び融合体の両方を包含する。Ｃａｓタンパク質またはその断片の好適な誘導体としては、Ｃａｓタンパク質またはその断片の変異体、融合体、共有結合修飾体が挙げられるが、これらに限定されない。Ｃａｓタンパク質またはその断片、ならびにＣａｓタンパク質または

その断片の誘導体を含むＣａｓタンパク質は、細胞から得ることができるか、または化学的に合成され得るか、もしくはこれらの２つの手法の組み合わせによって得ることができる。この細胞は、Ｃａｓタンパク質を自然に産生する細胞、あるいはＣａｓタンパク質を自然に産生し、内因性Ｃａｓタンパク質をより高い発現レベルで産生するように、または外因的に導入された核酸（この核酸は、内因性Ｃａｓと同じであるか、または異なるＣａｓをコードする）からＣａｓタンパク質を産生するように遺伝子操作されている細胞であり得る。場合によっては、この細胞は自然にはＣａｓタンパク質を産生せず、Ｃａｓタンパク質を産生するように遺伝子操作されている。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、ＡＡＶベクターを介して送達するための小さなＣａｓ９オルソログである（Ｒａｎ ｅｔ ａｌ（２０１５）Ｎａｔｕｒｅ ５１０，ｐ．１８６）。

【０１４６】

ヌクレアーゼ（複数可）は、標的部位において１つ以上の二本鎖及び／または一本鎖切断部を作製することができる。ある特定の実施形態では、このヌクレアーゼは、触媒的不活性化切断ドメイン（例えば、ＦｏｋＩ及び／またはＣａｓタンパク質）を含む。例えば、米国特許第９，２００，２６６号、同第８，７０３，４８９号及びＧｕｉｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．３２（６）：５７７－５８２を参照されたい。触媒不活性化切断ドメインは、触媒活性化ドメインと組み合わせて、ニッカーゼとして作用し、一本鎖切断部を作製することができる。したがって、２つのニッカーゼを、特異的領域内に二本鎖切断部を作製するために組み合わせて使用することができる。追加のニッカーゼもまた当該技術分野において既知であり、例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｙ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．４４（２）：ｅ１１．ｄｏｉ：１０．１０９３．ｎａｒ／ｇｋｖ８７８．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ｏｃｔ １９を参照されたい。

【０１４７】

送達

本明細書に記載のタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ）、ポリヌクレオチド及び／またはタンパク質及び／またはポリヌクレオチドを含む組成物は、例えば、タンパク質及び／またはｍＲＮＡ成分の注入によることを含む、任意の好適な手段によって、標的細胞に送達され得る。

【０１４８】

好適な細胞としては、真核及び原核細胞ならびに／または細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。そのような細胞またはそのような細胞から生成される細胞株の非限定的な例としては、Ｔ細胞、ＣＯＳ、ＣＨＯ（例えば、ＣＨＯ－Ｓ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－ＤＧ４４、ＣＨＯ－ＤＵＸＢ１１、ＣＨＯ－ＤＵＫＸ、ＣＨＯＫ１ＳＶ）、ＶＥＲＯ、ＭＤＣＫ、ＷＩ３８、Ｖ７９、Ｂ１４ＡＦ２８－Ｇ３、ＢＨＫ、ＨａＫ、ＮＳ０、ＳＰ２／０－Ａｇ１４、ＨｅＬａ、ＨＥＫ２９３（例えば、ＨＥＫ２９３－Ｆ、ＨＥＫ２９３－Ｈ、ＨＥＫ２９３－Ｔ）、及びｐｅｒＣ６細胞ならびにＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｕｇｉｐｅｒｄａ（Ｓｆ）などの昆虫細胞またはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃｈｉａ及びＳｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓなどの真菌細胞が挙げられる。ある特定の実施形態では、細胞株は、ＣＨＯ－Ｋ１、ＭＤＣＫまたはＨＥＫ２９３細胞株である。好適な細胞はまた、例として、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）、造血幹細胞、神経幹細胞及び間葉系幹細胞などの幹細胞を含む。

【０１４９】

本明細書に記載されるようなＤＮＡ結合ドメインを含むタンパク質の送達方法は、例えば、米国特許第６，４５３，２４２号、同第６，５０３，７１７号、同第６，５３４，２６１号、同第６，５９９，６９２号、同第６，６０７，８８２号、同第６，６８９，５５８号、同第６，８２４，９７８号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号及び同第７，１６３，８２４号に記載されており、これらの全ての開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１５０】

本明細書に記載されるようなＤＮＡ結合ドメイン及びこれらのＤＮＡ結合ドメインを含む融合タンパク質はまた、ＤＮＡ結合タンパク質（複数可）のうちの１つ以上をコードする配列を含有するベクターを用いて送達されてもよい。さらに、追加の核酸（例えば、ドナー）もまた、これらのベクターを介して送達することができる。プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない、任意のベクター系を使用することができる。また、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，８２４，９７８号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号及び同第７，１６３，８２４号を参照されたい。さらに、これらベクターのいずれも、必要に応じて、１つ以上のＤＮＡ結合タンパク質をコードする配列及び／または追加の核酸を含んでもよいことを理解されたい。したがって、本明細書に記載されるような１つ以上のＤＮＡ結合タンパク質が細胞に導入され、必要に応じて追加のＤＡＮが導入されるとき、これらは、同じベクター上で、または異なるベクター上で運ばれてもよい。複数のベクターが使用される場合、各ベクターは、１つまたは複数のＤＮＡ結合タンパク質をコードする配列、及び所望により追加の核酸を含んでもよい。

【０１５１】

操作されたＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸を細胞（例えば、哺乳動物細胞）及び標的組織内に導入するために、そして所望により追加の核酸を同時導入するために、従来のウイルス及び非ウイルスベースの遺伝子導入法を用いることができる。そのような方法はまた、核酸（例えば、ＤＮＡ結合タンパク質及び／またはドナーをコードする）を、インビトロで細胞に投与するためにも使用することができる。ある特定の実施形態では、核酸は、インビボまたはエクスビボ遺伝子療法応用に投与される。非ウイルスベクター送達系としては、ＤＮＡプラスミド、裸の核酸、及びリポソームまたはポロキサマーなどの送達ビヒクルと複合体化された核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、ＤＮＡ及びＲＮＡウイルスが挙げられ、これらは、細胞への送達後にエピソームまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有する。遺伝子療法手法の検討については、Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：８０８－８１３（１９９２）、Ｎａｂｅｌ ＆ Ｆｅｌｇｎｅｒ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：２１１－２１７（１９９３）、Ｍｉｔａｎｉ ＆ Ｃａｓｋｅｙ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６２－１６６（１９９３）、Ｄｉｌｌｏｎ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６７－１７５（１９９３）、Ｍｉｌｌｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ３５７：４５５－４６０（１９９２）、Ｖａｎ Ｂｒｕｎｔ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６（１０）：１１４９－１１５４（１９８８）、Ｖｉｇｎｅ，Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｖｅ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ８：３５－３６（１９９５）、Ｋｒｅｍｅｒ ＆ Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ ５１（１）：３１－４４（１９９５）、Ｈａｄｄａｄａ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｄｏｅｒｆｌｅｒ ａｎｄ Ｂｏｈｍ（ｅｄｓ．）（１９９５）及びＹｕ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：１３－２６（１９９４）を参照されたい。

【０１５２】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、電気穿孔法、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオンもしくは脂質核酸複合体、裸ＤＮＡ、ｍＲＮＡ、人工ビリオン、及びＤＮＡの薬剤促進取り込みが挙げられる。例えばＳｏｎｉｔｒｏｎ ２０００システム（Ｒｉｃｈ－Ｍａｒ）を用いるソノポレーションもまた、核酸の送達に使用することができる。好ましい実施形態では、１つ以上の核酸は、ｍＲＮＡとして送達される。翻訳効率及び／またはｍＲＮＡ安定性を増加させるために、キャップ化ｍＲＮＡの使用も好ましい。ＡＲＣＡ（アンチリバースキャップアナログ）キャップまたはその変異体が特に好ましい。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，０７４，５９６号及び同第８，１５３，７７３号を参照さ

れたい。
【０１５３】
追加の例示的な核酸送達系としては、Ａｍａｘａ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｃｏｌｏｇｎｅ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｍａｘｃｙｔｅ，Ｉｎｃ．（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）、ＢＴＸ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ，ＭＡ）及びＣｏｐｅｒｎｉｃｕｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ Ｉｎｃによって提供されるものが挙げられる（例えば、米国特許第６００８３３６号を参照されたい)。リポフェクションは、例えば、米国特許第５，０４９，３８６号、米国特許第４，９４６，７８７号及び米国特許第４，８９７，３５５号に記載されており、リポフェクチン試薬は、商業的に販売されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＲＮＡｉＭＡＸ）。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適であるカチオン性及び中性脂質には、Ｆｅｌｇｎｅｒ、国際公開第９１／１７４２４号、国際公開第９１／１６０２４号のものが挙げられる。送達は、細胞に対して（エクスビボ投与）または標的組織に対して（インビボ投与）のものであり得る。
【０１５４】
免疫脂質複合体などの標的化リポソームを含む脂質核酸複合体の調製は、当業者に既知である（例えば、Ｃｒｙｓｔａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４０４－４１０（１９９５）、Ｂｌａｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：２９１－２９７（１９９５）、Ｂｅｈｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：３８２－３８９（１９９４）、Ｒｅｍｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：６４７－６５４（１９９４）、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７１０－７２２（１９９５）、Ａｈｍａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：４８１７－４８２０（１９９２）、米国特許第４，１８６，１８３号、同第４，２１７，３４４号、同第４，２３５，８７１号、同第４，２６１，９７５号、同第４，４８５，０５４号、同第４，５０１，７２８号、同第４，７７４，０８５号、同第４，８３７，０２８号及び同第４，９４６，７８７号を参照されたい）。
【０１５５】
送達の追加の方法としては、ＥｎＧｅｎｅＩＣ送達ビヒクル（ＥＤＶ）中への送達される核酸のパッケージングが挙げられる。これらのＥＤＶは、抗体の一方のアームが標的組織に特異性を有し、他方がＥＤＶに特異性を有する二重特異性抗体を用いて、標的組織に特異的に送達される。抗体がＥＤＶを標的細胞表面に持っていき、次いでＥＤＶがエンドサイトーシスによって細胞中にもたらされる。一旦細胞中に入ると、内容物が放出される（例えば、ＭａｃＤｉａｒｍｉｄ ｅｔ ａｌ（２００９）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２７（７）ｐ。６４３を参照されたい）。
【０１５６】
操作されたＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸、及び／または所望によりドナー（例えば、ＣＡＥまたはＡＣＴＲ）の送達のためのＲＮＡまたはＤＮＡウイルスベースのシステムの使用は、ウイルスを体内の特異的細胞に標的化させ、ウイルスのペイロードを核に輸送するための高度に進化したプロセスをうまく利用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与することができるか（インビボで）、またはこれらはインビトロで細胞を処置するために使用することができ、修飾された細胞が患者に投与される（エクスビボで）。核酸の送達のための従来のウイルスベースの系としては、遺伝子導入のための、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクチニアウイルス及び単純ヘルペスウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。レトロウイルス、レンチウイルス、及びアデノ随伴ウイルス遺伝子導入法を用いて宿主ゲノム中への組み込みも可能であり、これらは挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらすことが多い。さらに、多くの異なる細胞型及び標的組織において、高い導入効率が観察されている。
【０１５７】
レトロウイルスの指向性は、標的細胞の潜在的標的集団を増殖させる外来エンベロープタンパク質を組み込むことによって変更することができる。レンチウイルスベクターは、

非分裂細胞に形質導入または感染することができ、通常、高ウイルス力価を生じることができるレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、外来配列の最大６～１０ｋｂのためのパッケージング能力を備えたシス作用性長鎖末端繰り返しから構成される。最少のシス作用性ＬＴＲが、永続する導入遺伝子発現を提供するために、その後標的細胞中に治療用遺伝子を組み込むために使用される、ベクターの修復及びパッケージングに十分なものである。広く使用されているレトロウイルスベクターとしては、ネズミ白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、及びこれらの組み合わせに基づくものが挙げられる（例えば、Ｂｕｃｈｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：２７３１－２７３９（１９９２）、Ｊｏｈａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１６３５－１６４０（１９９２）、Ｓｏｍｍｅｒｆｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．１７６：５８－５９（１９９０）、Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：２３７４－２３７８（１９８９）、Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：２２２０－２２２４（１９９１）、ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５７００を参照されたい)。

【０１５８】

一過性発現が好ましい応用においては、アデノウイルスベースの系を使用することができる。アデノウイルスベースの系は、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターによって、高力価及び高レベルの発現が得られている。このベクターは、比較的簡単な系で大量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス（「ＡＡＶ」）ベクターもまた、細胞を標的核酸で形質導入するために、例えば、核酸及びペプチドのインビトロ産生において、及びインビボならびにエクスビボ遺伝子療法手法のために使用される（例えば、Ｗｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６０：３８－４７（１９８７）、米国特許第４，７９７，３６８号、国際公開第９３／２４６４１号、Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３－８０１（１９９４）、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：１３５１（１９９４）を参照されたい）。組換えＡＡＶベクターの構築は、米国特許第５，１７３，４１４号、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１－３２６０（１９８５）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２－２０８１（１９８４）、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ＆ Ｍｕｚｙｃｚｋａ，ＰＮＡＳ ＵＳＡ ８１：６４６６－６４７０（１９８４）及びＳａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：０３８２２－３８２８（１９８９）を含むいくつかの刊行物で記載されている。

【０１５９】

少なくとも６つのウイルスベクターアプローチが、臨床試験において遺伝子導入に現在利用可能であり、これらは、形質導入薬剤を生成するためにヘルパー細胞株中に挿入された遺伝子による欠損ベクターの相補を伴う。

【０１６０】

ｐＬＡＳＮ及びＭＦＧ－Ｓは、臨床試験で使用されているレトロウイルスベクターの例である（Ｄｕｎｂａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ８５：３０４８－３０５（１９９５）、Ｋｏｈｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１：１０１７－１０２（１９９５）、Ｍａｌｅｃｈ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ＵＳＡ ９４：２２ １２１３３－１２１３８（１９９７））。ＰＡ３１７／ｐＬＡＳＮは、遺伝子療法の試みにおける最初の治療用ベクターであった（Ｂｌａｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４７５－４８０（１９９５））。ＭＦＧ－Ｓパッケージ化ベクターについては、５０％以上の形質導入効率が観察されている（Ｅｌｌｅｍ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．４４（１）：１０－２０（１９９７）、Ｄｒａｎｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１：１１１－２（１９９７））。

【０１６１】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター（ｒＡＡＶ）は、欠損及び非病原性パルボウイルス

アデノ随伴型２ウイルスに基づく有望な代替遺伝子送達系である。全てのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するＡＡＶ　１４５ｂｐ逆方向末端リピートのみを保持するプラスミドに由来する。形質導入細胞のゲノム中への組み込みに起因する効率的な遺伝子導入及び安定な導入遺伝子送達が、このベクター系の重要な特徴である。（Ｗａｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ　３５１：９１１７　１７０２－３（１９９８）、Ｋｅａｒｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．９：７４８－５５（１９９６））。ＡＡＶ１、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ８．２、ＡＡＶ９及びＡＡＶｒｈ１０を含む他のＡＡＶ血清型ならびにＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／５及びＡＡＶ２／６などのシュードタイプ化ＡＡＶもまた、本発明に従って使用することができる。

【０１６２】

複製不全アデノウイルスベクター（Ａｄ）は、高力価で産生され、多くの異なる細胞株に容易に感染することができる。大部分のアデノウイルスベクターは、導入遺伝子がＡｄＥ１ａ、Ｅ１ｂ、及び／またはＥ３遺伝子に取って代わるように操作され、その後、複製欠損ベクターがトランスでの欠失遺伝子機能を供給するヒト２９３細胞中に伝播させられる。Ａｄベクターは、インビボで、肝臓、腎臓及び筋肉で見出されるものなどの非分裂の分化細胞を含む複数の種類の組織を形質導入することができる。従来のＡｄベクターは、大運搬能力を有する。Ａｄベクターの臨床試験における使用の一例は、ＬＴＲ筋肉内注射による抗腫瘍免疫化のためのポリヌクレオチド療法を伴った（Ｓｔｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．７：１０８３－９（１９９８））。アデノウイルスの遺伝子導入のための使用の追加の例としては、Ｒｏｓｅｎｅｃｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ　２４：１　５－１０（１９９６）、Ｓｔｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．９：７　１０８３－１０８９（１９９８）、Ｗｅｌｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２：２０５－１８（１９９５）、Ａｌｖａｒｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．５：５９７－６１３（１９９７）、Ｔｏｐｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．５：５０７－５１３（１９９８）、Ｓｔｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．７：１０８３－１０８９（１９９８）が挙げられる。

【０１６３】

宿主細胞に感染することができるウイルス粒子を形成するために、パッケージング細胞が用いられる。そのような細胞には、アデノウイルスをパッケージ化する２９３細胞、及びレトロウイルスをパッケージ化するΨ２細胞またはＰＡ３１７細胞が挙げられる。遺伝子療法で使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケージ化するプロデューサー細胞株によって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージング及び後続の宿主中への組み込み（該当する場合）に必要な最小のウイルス配列、発現されるタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられる他のウイルス配列を含有する。失われたウイルス機能は、細胞株をパッケージ化することによってトランスで供給される。例えば、遺伝子療法で使用されるＡＡＶベクターは、典型的には、宿主ゲノムへのパッケージング及び組み込みに必要であるＡＡＶゲノムからの逆方向末端リピート（ＩＴＲ）配列を有するに過ぎない。ウイルスＤＮＡは、他のＡＡＶ遺伝子をコードするヘルパープラスミド、すなわちｒｅｐ及びｃａｐを含有するが、ＩＴＲ配列を欠如する細胞株中にパッケージ化される。この細胞株はまた、ヘルパーとしてのアデノウイルスにより感染される。ヘルパーウイルスは、ＡＡＶベクターの複製及びヘルパープラスミドからのＡＡＶ遺伝子の発現を促進する。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがＡＡＶよりも感受性であるように熱処理することによって、低減することができる。

【０１６４】

多くの遺伝子療法応用において、遺伝子療法ベクターが特定の組織型に対して高度の特異性で送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、リガンドをウイルスの外表面上のウイルスコートタンパク質との融合タンパク質として発現させることによって、所与の細胞型に対する特異性を有するように修飾することができる。リガンドは、

対象の細胞型に存在することが知られている受容体に対する親和性を有するように選択される。例えば、Ｈａｎら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：９７４７－９７５１（１９９５））は、モロニーネズミ白血病ウイルスは、ｇｐ７０に融合されたヒトヘレグリンを発現するように修飾することができ、この組換えウイルスが、ヒト上皮増殖因子受容体を発現するある特定のヒト乳癌細胞に感染することを報告している。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、かつウイルスが細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質を発現するウイルス－標的細胞対に拡大することができる。例えば、繊維状ファージを、実際上任意の選択された細胞受容体に対して特異的結合親和性を有する抗体断片（例えば、ＦＡＢまたはＦｖ）を発現するように操作することができる。上記説明は主としてウイルスベクターに適用されるが、同じ原理を、非ウイルスベクターに適用することができる。そのようなベクターは、特異的標的細胞による取り込みを助ける特異的取込配列を含有するように操作することができる。

【０１６５】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系のための送達方法は、上述したそれらの方法を含み得る。例えば、動物モデルにおいて、ｍＲＮＡをコードするインビトロ転写されたＣａｓまたは組換えＣａｓタンパク質は、ゲノム編集した動物に対して、ガラス針を用いて１細胞期の胚に直接注入することができる。インビトロにおいて細胞中でＣａｓ及びガイドＲＮＡを発現させるために、通常、それらをコードするプラスミドが、リポフェクションまたは電気穿孔法を介して細胞中にトランスフェクトされる。また、組換えＣａｓタンパク質は、インビトロ転写されたガイドＲＮＡと複合体化されることができ、ここでは、Ｃａｓ－ガイドＲＮＡリボ核タンパク質が対象の細胞によって取り込まれる（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ（２０１４）Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ ２４（６）：１０１２）。治療上の目的で、Ｃａｓ及びガイドＲＮＡは、ウイルス及び非ウイルス技法の組み合わせによって送達することができる。例えば、ＣａｓをコードするｍＲＮＡが、ナノ粒子送達を介して送達されてもよく、一方ガイドＲＮＡ及び任意の導入遺伝子または修復テンプレートがＡＡＶを介して送達される（Ｙｉｎ ｅｔ ａｌ（２０１６）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３４（３）ｐ．３２８）。

【０１６６】

遺伝子療法ベクターは、以下に記載されるように、個別の患者への投与によって、典型的には全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内注入）もしくは局所適用によって、インビボで送達することができる。あるいは、ベクターは、エクスビボで細胞に、例えば、個々の患者から外植された細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検）または万能ドナー造血幹細胞に送達され、続いて、通常はベクターを組み込んだ細胞の選択後に、患者への細胞の再移植が行われる。

【０１６７】

診断、研究、移植のための、または遺伝子療法のためのエクスビボの細胞トランスフェクション（例えば、トランスフェクト細胞の宿主生物への再注入を介して）は、当業者に周知である。好ましい実施形態では、細胞を対象生物から単離し、ＤＮＡ結合タンパク質核酸（遺伝子またはｃＤＮＡ）でトランスフェクトし、対象の生物（例えば、患者）に再注入して戻される。エクスビボトランスフェクションに好適な様々な細胞型が当業者に周知である（例えば、Ｆｒｅｓｈｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ，Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ（３ｒｄ ｅｄ．１９９４）及び患者から細胞を単離し培養する方法の説明についてのその中に引用された参考文献を参照されたい）。

【０１６８】

一実施形態では、幹細胞が、細胞トランスフェクション及び遺伝子療法のためのエクスビボ手法で使用される。幹細胞を使用する利点は、それらがインビトロで他の細胞型に分化することができるか、または哺乳動物（細胞のドナーなど）に導入することができる（ここでは、これらが骨髄に生着するであろう）という点にある。インビトロでＣＤ３４＋細胞を、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αなどのサイトカインを用いて、臨床的に重要な免疫細胞型に分化させる方法が既知である（Ｉｎａｂａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘ

ｐ．Ｍｅｄ．１７６：１６９３－１７０２（１９９２）を参照されたい）。
【０１６９】
幹細胞は、既知の方法を用いて、形質導入及び分化のために単離される。例えば、幹細胞は、望ましくない細胞、例えば、ＣＤ４＋ならびにＣＤ８＋（Ｔ細胞）、ＣＤ４５＋（パンＢ細胞）、ＧＲ－１（顆粒球）、及びＩａｄ（分化抗原提示細胞）に結合する抗体で骨髄細胞をパニングすることによって骨髄細胞から単離される。（Ｉｎａｂａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６：１６９３－１７０２（１９９２）を参照されたい）。
【０１７０】
修飾された幹細胞もまた、いくつかの実施形態で使用されてもよい。例えば、アポトーシスに対して抵抗性にされた神経幹細胞は、幹細胞がまた本発明のＺＦＰ　ＴＦを含有する治療用組成物として使用されてもよい。アポトーシスに対する抵抗性は、例えば、幹細胞中でＢＡＸ特異的またはＢＡＫ特異的ＺＦＮを用いてＢＡＸ及び／またはＢＡＫをノックアウトすることによって起こり得るか（米国特許第８，５９７，９１２号を参照されたい）、または、例えばカスパーゼ６特異的ＺＦＮを再び用いて、カスパーゼ中でかく乱されているものであり得る。
【０１７１】
治療用ＤＮＡ結合タンパク質（またはこれらのタンパク質をコードする核酸）を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソームなど）はまた、インビボで細胞の形質導入のために、生物に直接投与することができる。あるいは、裸ＤＮＡを投与することができる。投与は、分子を導入して、血液または組織細胞に最終的に接触させるために通常使用される経路のいずれかにより行われ、これには、注射、注入、局所適用及び電気穿孔法が挙げられるが、これらに限定されない。そのような核酸を投与するのに好適な方法が利用可能であり、当業者には周知であり、２つ以上の経路を特定の組成物を投与するために使用することができるが、特定の経路が、別の経路に比べてより直接的かつより有効な反応を提供できることが多い。
【０１７２】
ＤＮＡの造血幹細胞中への導入のための方法は、例えば、米国特許第５，９２８，６３８号に開示されている。導入遺伝子の造血幹細胞、例えばＣＤ３４＋細胞への導入に有用なベクターとしては、アデノウイルス３５型が含まれる。
【０１７３】
導入遺伝子の免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）への導入に好適なベクターとしては、非組み込みレンチウイルスベクターが含まれる。例えば、Ｏｒｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１１３８２－１１３８８、Ｄｕｌｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：８４６３－８４７１；Ｚｕｆｆｅｒｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：９８７３－９８８０、Ｆｏｌｌｅｎｚｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　２５：２１７－２２２を参照されたい。
【０１７４】
薬学的に許容される担体は、部分的には、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、以下に記載されるように、利用可能な薬学的組成物の多種多様の好適な処方が存在する（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ　ｅｄ．，１９８９）を参照されたい）。
【０１７５】
上述したように、開示された方法及び組成物は、原核細胞、真菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞、及びヒト細胞、例えばＴ細胞及び任意の型の細胞が挙げられるが、これらに限定されない任意の型の細胞で使用することができる。タンパク質発現に好適な細胞株は、当業者に既知であり、ＣＯＳ、ＣＨＯ（例えば、ＣＨＯ－Ｓ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－ＤＧ４４、ＣＨＯ－ＤＵＸＢ１１）、ＶＥＲＯ、ＭＤＣＫ、ＷＩ３８、Ｖ７９、Ｂ１４ＡＦ２８－Ｇ３、ＢＨＫ、ＨａＫ、ＮＳ０

、ＳＰ２／０－Ａｇ１４、ＨｅＬａ、ＨＥＫ２９３（例えば、ＨＥＫ２９３－Ｆ、ＨＥＫ２９３－Ｈ、ＨＥＫ２９３－Ｔ）、ｐｅｒＣ６、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｕｇｉｐｅｒｄａ（Ｓｆ）などの昆虫細胞、及びＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃｈｉａならびに Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓなどの真菌細胞が挙げられるが、これらに限定されない。これらの細胞株の子孫、変異体及び誘導体も使用することができる。

【０１７６】

応用

操作されたヌクレアーゼの疾患の治療及び予防における使用は、今後何年間もの医薬品の最も重要な開発のうちの１つであると期待される。本明細書に記載の方法及び組成物は、所望の標的部位が切断の主たる場所になることを確実にするために、これらの新規ツールの特異性を増大させる働きをする。オフターゲット切断を最小化または排除することが、全てのインビトロ、インビボ及びエクスビボ応用のために、この技術の最大の可能性を実現するために必要であろう。

【０１７７】

例示的な遺伝性疾患としては、軟骨形成不全、色覚以上、酸性マルターゼ欠損、アデノシン・デアミナーゼ欠損（ＯＭＩＮ番号１０２７００）、副腎白質ジストロフィー、アイカルディ症候群、アルファ１抗トリプシン欠乏、アルファサラセミア、アンドロゲン不感性症候群、アペール症候群、催不整脈右室異形成、異形成、毛細血管拡張性運動失調、バース症候群、ベータサラセミア、青色ゴムまり様母斑症候群、カナヴァン病、慢性肉芽腫性疾患（ＣＧＤ）、猫鳴き症候群、嚢胞性線維症、有痛脂肪症、外胚葉異形成症、ファンコニ貧血、進行性骨化性線維形成異常症、脆弱性Ｘ症候群、ガラクトース血症、ゴーシェ病、全身性ガングリオシドーシス（例えば、ＧＭ１）、ヘモクロマトーシス、ベータグロビン（ＨｂＣ）の６番目のコドンにおけるヘモグロビンＣ変異、血友病、ハンチントン病、フルラ―症候群、低ホスファターゼ血症、クラインフェルター症候群、クラッベ病、ランガー・ギーディオン症候群、白血病接着不全症（ＬＡＤ、ＯＭＩＭ番号１１６９２０）、大脳白質萎縮症、ＱＴ延長症候群、マルファン症候群、メビウス症候群、ムコ多糖症（ＭＰＳ）、爪・膝蓋骨症候群、腎性尿崩症、神経線維腫症、ニーマン・ピック病、骨形成不全症、フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）、ポルフィリン症、プラダー・ウィリー症候群、早老症、プロテウス症候群、網膜芽細胞腫、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、サンフィリポ症候群、重度複合免疫不全症（ＳＣＩＤ）、シュバッハマン症候群、鎌状赤血球症（鎌状赤血球貧血）、スミス・マゲニス症候群、スティックラー症候群、テイ・サックス病、血小板減少性橈骨欠損症（ＴＡＲ）症候群、トレチャー・コリンズ症候群、トリソミー、結節硬化症、ターナー症候群、尿素サイクル異常症、フォン・ヒッペル・リンドウ病、ワーデンバーグ症候群、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、ウィスコット。アルドリッチ症候群、Ｘ連鎖リンパ増殖性症候群（ＸＬＰ、ＯＭＩＮ番号３０８２４０）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７８】

標的化ＤＮＡ切断及び／または相同性組換えによって治療することができる追加の例示的な疾患としては、後天性免疫不全症、リソソーム蓄積症（例えば、ゴーシェ病、ＧＭ１、ハーフリ病、及びテイ・サックス病）、ムコ多糖症（例えば、ハンター病、ハーラー病）、異常ヘモグロビン症（例えば、鎌状赤血球病、ＨｂＣ、αサラセミア、βサラセミア）、及び血友病が挙げられる。

【０１７９】

そのような方法はまた、遺伝性疾患を治療するために、宿主内の感染（ウイルスまたは細菌）の治療を可能にする（例えば、ウイルスまたは細菌受容体の発現を阻止し、これによって宿主生物中の感染及び／または拡大を予防することによって）。

【０１８０】

感染するまたは組み込まれたウイルスゲノムの標的化切断を使用して、宿主内のウイルス感染を治療することができる。さらに、ウイルスの受容体をコードする遺伝子の標的化切断を使用して、そのような受容体の発現を阻止することができ、これによって、宿主生

物のウイルス感染及び／またはウイルスの拡大を予防する。ウイルス受容体（例えば、ＨＩＶのＣＣＲ５及びＣＸＣＲ４受容体）をコードする遺伝子の標的変異誘発を使用して、それらの受容体がウイルスに結合できないようにすることができ、これによって、新たな感染を防止し、かつ既存の感染の拡大を阻止する。米国特許公開第２００８／０１５９９６号を参照されたい。標的にされ得るウイルスまたはウイルス受容体の非限定的な例としては、ＨＳＶ－１及びＨＳＶ－２などの単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、水痘帯状ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）及びサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ならびにＨＨＶ６及びＨＨＶ７が挙げられる。ウイルスの肝炎ファミリーとしては、Ａ型肝炎ウイルス（ＨＡＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、デルタ肝炎ウイルス（ＨＤＶ）、Ｅ型肝炎ウイルス（ＨＥＶ）、及びＧ型肝炎ウイルス（ＨＧＶ）が挙げられる。他のウイルスまたはそれらの受容体が標的とされ得、それにはピコナウイルス科（例えば、ポリオウイルスなど）、カリシウイルス科、トガウイルス科（例えば、風疹ウイルス、デングウイルスなど）、コロナウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、ラブドウイルス科（例えば、狂犬病ウイルスなど）、フィロウイルス科、パラミクソウイルス科（例えば、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルスなど）、オルソミクソウイルス科（例えば、インフルエンザウイルスＡ型、Ｂ型、Ｃ型など）、ブンヤウイルス科、アレナウイルス科、レトロウイルス科、レンチウイルス科（例えば、ＨＴＬＶ－Ｉ、ＨＴＩＶ－ＩＩ、ＨＩＶ－１（ＨＴＬＶ－ＩＩＩ、ＬＡＶ、ＡＲＶ、ｈＴＬＲなどとも称される）、ＨＩＶ－ＩＩ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、インフルエンザウイルス、及びダニ媒介性脳炎ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。これら及び他のウイルスの説明については、例えば、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｗ．Ｋ．Ｊｏｋｌｉｋ ｅｄ．１９８８）；Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｂ．Ｎ．Ｆｉｅｌｄｓ ａｎｄ Ｄ．Ｍ．Ｋｎｉｐｅ，ｅｄｓ．１９９１）を参照されたい。ＨＩＶの受容体としては、例えば、ＣＣＲ－５、及びＣＸＣＲ－４が挙げられる。

【０１８１】

したがって、本明細書に記載のヘテロ二量体切断ドメイン変異体は、遺伝子修飾の応用においてＺＦＮ特異性を改善するための広範な有用性を提供する。これらの変異体切断ドメインは、部位特異的変異誘発または任意のＺＦＮ二量体のインビボ特異性を改善するためのサブクローニングのいずれかによって、任意の既存のＺＦＮ中に容易に組み込まれ得る。

【０１８２】

上述したように、本明細書に記載の組成物及び方法は、遺伝子修飾、遺伝子修正、及び遺伝子破壊に使用することができる。遺伝子修飾の非限定的な例としては、相同指向修復（ＨＤＲ）ベースの標的化組み込み、ＨＤＲベースの遺伝子修正、ＨＤＲベースの遺伝子修飾、ＨＤＲベースの遺伝子破壊、ＮＨＥＪベースの遺伝子破壊及び／またはＨＤＲ、ＮＨＥＪの組み合わせ、及び／または一本鎖アニーリング（ＳＳＡ）が挙げられる。一本鎖アニーリング（ＳＳＡ）とは、２つの相補性領域を露出させるために５’－３’エキソヌクレアーゼによるＤＳＢの反応によって同じ配向で生じる２つの繰り返し配列間の二本鎖の分解の修復を指す。次いで、２つのダイレクトリピートをコードする一本鎖は互いにアニールし、アニーリングされた中間体は、一本鎖テール（いかなる配列にもアニーリングされていない一本鎖ＤＮＡの一部）が分解され、ギャップがＤＮＡポリメラーゼによって埋められ、そしてＤＮＡ末端が再結合されるように処理することができる。これは、ダイレクトリピートに位置する配列の欠失をもたらす。

【０１８３】

本明細書に記載の切断ドメイン（例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）を含む組成物及び方法はまた、様々な遺伝性疾患及び／または感染性疾患の治療で使用することができる。

【０１８４】

本組成物及び方法はまた、ショートパッチ遺伝子変換または一遺伝子的遺伝子療法のための標的化組み込みによる体細胞変異の修正；ドミナントネガティブ対立遺伝子の破壊；病原体の細胞への侵入及び増殖感染に必要な遺伝子の破壊；例えば、機能的組織の分化または形成を促進するように遺伝子活性を修飾することによる、ならびに／もしくは機能的組織の分化または形成を促進するように遺伝子活性を破壊することによる、増強された組織エンジニアリング；例えば、幹細胞が特異的系列経路に分化するように促進するために分化を阻止する遺伝子を破壊すること、幹細胞分化を刺激することができる遺伝子またはｓｉＲＮＡ発現カセットの標的化挿入、幹細胞分化を阻止し、より良好な増殖及び多能性の維持を可能にすることができる遺伝子またはｓｉＲＮＡ発現カセットの標的化挿入、及び／または幹細胞の分化状態、及び培地、サイトカイン、増殖条件、遺伝子の発現、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡもしくはｍｉＲＮＡ分子の発現、抗体の細胞表面マーカーへの暴露、またはこの状態を変更する薬剤中でどのように変化するかを採点評価するための容易なマーカーを可能にする多能性または分化状態のマーカーである内因性遺伝子とのフレーム内へのレポーター遺伝子の標的化挿入による、分化の阻止もしくは誘導；体細胞核移植、例えば、患者自身の体細胞を単離し、意図した標的遺伝子を適切な方法で修飾し、細胞クローンを生成し（及びゲノム安全性を確実にするように品質管理し）、そしてこれらの細胞から核を単離し、未受精卵に導入して、患者の体内に移植させる前に直接注入されるか、または分化され得る患者特異的ｈＥＳ細胞を生成し、それによって組織拒絶反応を低減または排除すること；ＭＨＣ受容体をノックアウトする（例えば、免疫学的同一性が減少されるか、または完全に消滅された細胞を生成するために）ことによる、汎幹細胞が挙げられるが、これらに限定されない幹細胞ベース療法にも適用することができる。この手法のための細胞型としては、Ｔ細胞、Ｂ細胞、造血幹細胞、及び胚性幹細胞が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、患者自身の体細胞からも生成されるであろう誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）が使用されてもよい。したがって、これらの幹細胞またはそれらの誘導体（分化細胞型または組織）は、それらの起源または組織適合性とは無関係に、いかなる人にも移植され得る可能性があり得る。

【０１８５】

本組成物及び方法はまた、体細胞療法にも使用することができ、それによって、それらの生物学的特性を増強させるように修飾された細胞のストックの産生を可能にする。そのような細胞は、細胞のドナーソース及びそれらのレシピエントに対する組織適合性とは無関係に、様々な患者に注入することができる。

【０１８６】

治療的応用に加えて、本明細書に記載の変異体によって提供される増加した特異性は、操作されたヌクレアーゼ中で使用される場合、作物エンジニアリング、細胞株エンジニアリング、及び疾患モデルの構築に使用することができる。偏性ヘテロ二量体切断ハーフドメインは、ヌクレアーゼ特性を改善するために平易な手段を提供する。

【０１８７】

記載される操作された切断ハーフドメインはまた、介在領域を欠失させるか、または２つの特異的遺伝子座を一度に変更させるかのいずれかのために、複数の標的における同時切断を必要とする遺伝子修飾プロトコールで使用することができる。２つの標的での切断は、４つのＺＦＮまたはＴＡＬＥＮの細胞発現を必要とすることになり、これは、１０個の異なる活性ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮの組み合わせを潜在的に生じ得る。そのような応用については、これらの新規変異体の野生型ヌクレアーゼドメインに対する置換が、望ましくない組み合わせの活性を排除し、オフターゲット切断の機会を減少させるであろう。ある特定の所望のＤＮＡ標的における切断がヌクレアーゼ対Ａ＋Ｂの活性を必要とし、第２の所望のＤＮＡ標的における同時切断がヌクレアーゼ対Ｘ＋Ｙの活性を必要とするならば、本明細書に記載の変異の使用が、ＡとＡとの、ＡとＸとの、ＡとＹとのなどの対形成を防止することができる。したがって、これらのＦｏｋＩ変異は、「不適正な」対形成の結果としての非特異的切断活性を減少させて、ヌクレアーゼのより効率的な直交的変異体対の生成を可能にする（共有特許の米国特許公開第２００８０１３１９６２号及び同第２０

０９０３０５３４６号を参照されたい）。
【実施例】
【０１８８】
実施例１：ＺＦＮの調製
　ＢＣＬ１１Ａ及びＴＣＲＡ（定常領域を標的化する、ＴＲＡＣとしても知られる）遺伝子を標的とするＺＦＮを、本質的に、Ｕｒｎｏｖ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｎａｔｕｒｅ ４３５（７０４２）：６４６－６５１、Ｐｅｒｅｚ ｅｔ ａｌ（２００８）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２６（７）：８０８－８１６、及びＰＣＴ特許公開第ＷＯ２０１６１８３２９８号ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ２０１７１０６５２８に記載されるように設計し、プラスミドベクターに組み込んだ。ＡＡＶＳ１標的化ＺＦＮも、米国特許公開第２０１５０１１０７６２号に記載されるように使用した。
【０１８９】
実施例２：リン酸との相互作用を標的とするＦｏｋＩ残基中の変異
　ＦｏｋＩ切断ドメインのモデル（Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ（２００７）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈ ２５（７）：７７８－８５）を用いて、正に荷電したアルギニンまたはリジンアミノ酸残基を、ＤＮＡ主鎖上のリン酸と潜在的に相互作用することを特定した（図１）。
【０１９０】
　ＦｏｋＩドメイン内の特定した位置（アミノ酸４１６、４２２、４４７、４４８及び５２５）を、次いでセリン残基に特異的に変更させ（変異させ）、元々の正に荷電したアミノ酸とＤＮＡ上の負に荷電したリン酸との間の相互作用を排除した（図２Ａ及び２Ｂを参照されたい）。両方のＺＦＮパートナーが、これらの変異を含む場合、いくつかの異なる組合せをもたらし得る（図２Ｃの図を参照されたい）。これらの新たなＦｏｋＩ変異体をＥＬＤ／ＫＫＲヘテロ二量体の「ＫＫＲ」ＦｏｋＩパートナーにおいて作製し（米国特許第８．９６２，２８１号を参照されたい）、次いで、ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域に特異的なＺＦＮ対、ＳＢＳ＃５１８５７ ＥＬＤ／ＳＢＳ＃５１９４９ ＫＫＲまたはＳＢＳ＃５１８５７＿ＫＫＲ／ＳＢＳ＃５１９４９＿ＥＬＤに連結させた（「親」タンパク質は、図３において灰色で強調されている）。各パートナーにおいてそれらの変異を作製し、次に、図３に示すように様々な組み合わせで、ＣＤ３４＋Ｔ細胞の元のＢＣＬ１１Ａ標的に対する切断活性について試験した。オフターゲット部位は、無作為なキャプチャー解析によって以前に特定されている（ＰＣＴ特許公開第ＷＯ２０１６／１８３２９８号）。オフターゲット部位が以下の表１に列挙されており、そこでは、各部位が、ユニークかつランダムに生成された「ナンバープレート」識別文字で識別され、ナンバープレートＰＲＪＩＹＬＦＮは、意図された標的ＢＣＬ１１Ａ配列を示している。以下の表では、各部位の遺伝子座も示されている（Ｕ．Ｃ．Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｒｏｗｓｅｒ配列データベースのｈｇ３８アセンブリに該当する座標が列挙されている）（Ｋｅｎｔ ｅｔ ａｌ（２００２）、Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．１２（６）：９９６－１００６）。
【０１９１】

【表１】

表１：ＳＢＳ＃５１８７／ＳＢＳ＃５１９４９の特定された切断部位

ナンバープレート	配列番号	配列（５’－＞３’）	染色体：ｈｇ３８遺伝子座	型
PRJIYLFN（意図された標的）	13	CTAATCAGAGGCCAAACCCTTCCTGGAGCCTGTGATAAAAGCAACTGTTAGCTTGCACTAGACTAGCTTCAAAGTT	Chr2:60495265	イントロン
NIFMAEVG	14	CTTCCTGCGGGGTTTTGTGCAAATAACCCATGCTCGGGAGCGAGGCCCTGGGAAGGAGTATCTCGCTTCTTTGGGT	Chr8:119856440	遺伝子間
GJZEIYTO	15	CCTACCCCCACCACCTCACCTTCCCTCAGCCTTGTGTTTCAGCCCCAGTTAGCTGCCCTTAGTTGCTGATGTATTG	Chr6:53805960	イントロン
RFGIYSHZ	16	AGCACGTTTCTCCAGTTTCCAGCCTGGGGCCTGGCTATAAAGCAAATGCTCAGTCCAGCATTGCGGAATGCAAGGG	Chr2:23702834	イントロン
RFTBCWPJ	17	ACAGCACCGTGCTGCACGGCGTCCTCCGGCCTTGCTGCCTGGCAATGGGTAGCCACCTGGCGTCTGTCTCAGAATA	Chr13:75549354	5’ UTR
XCVJFHOB	18	TTCCCAGAAGGCGATTGAACCTGAAGCTGCGCCTGGCGCGTGAGCCTGTGGGGGGGACGCGGCTGAGGGGCTTTGA	Chr10:132654830	イントロン
ZMIYSTJN	19	TATCCCTTCCCCAAGTGCAACCAACAGTTGCTCTAAAGCTAGGCTGGTGGAGTTGGGGAAAGGGCCAGCAAGTGAG	Chr10:69571178	遺伝子間
PEVYOHIU	20	TCCTCCATGCTCAGAAAGCCTTTCTTGGAGCCAGGCACACAGGAAATGTTAGCTAGTTAGCATTGGCTCTAATACT	Chr2:62164811	遺伝子間
QRMXFJNY	21	TAGCTGGGGAGAGATTGCCTCTCTCAGGGCCTAGCCAGTTCCTAGAAATAGCAAGGGCTCAGCTGAGAGCATGCTT	Chr14:67422067	遺伝子間
QBFUYVGW	22	TCCCCCGGAAGTGTCCGCACCTCCTAGAGCCCAGCGAGCGAGCGTTTGTGCTTTTGTCCTTTGAACCGGGTGTGGT	Chr1:29182166	遺伝子間
ZJCRPAXW	23	GACTCATTCATCCACTCATTCTGAGCACTTGCTGCACACTAGGCCCTGGGCTGGGGCTTCAGCCCAGGAGTTCACT	Chr1:54506813	遺伝子間
LXAFJWRI	24	ATGTAGTCTGACGGCCGCGACTGGTTCGTAGCTTTTGAGTGAGGCGGCGGGAAGGGAGCGAGGGAAGAGCGGCAGT	Chr2:84459584	遺伝子間
EMQNZDWX	25	TCATGTTATGGAAGTGGCTTCTTTCCTTAAGCCTTATGAATAAGCCTCTGCTAGCTTCAAACTTTGTGTGCAGCTT	Chr20:37707468	イントロン
YJRBCUNZ	26	CATAAAGCACTTACAACAGTGCCTGGCAAATGCCTAGTGCACAGCAAGTGTTAGCTATTGTTAATGACTATCCATT	Chr1:19916857	遺伝子間
HBXGRVYT	27	ATTTTTGCCCCTGTCTTCTCTTTTCCTCCTTTGCTGCATCCCAGGCTCCAGCCTTTCAGCCCTATTTGCAGTACCC	Chr1:204975770	イントロニック

【０１９２】

【表２】

ZLRCYHDF	28	ACAAGGGGTTCAAGGTTATGAATAACCTGTG CTAATCCCAGAGGCCCCAGGACAGAGTAAGT GGGAACAAACACTG	Chr7:131503657	3’ UTR
OTHMRBJL	29	CGGAAGTTAATATGATCATTGCTAACATTTG CTGTGTTTCAGGCACTGTAAGCATGTATATG GGTCCTTAAAGGGA	Chr11:108224087	イントロン
RSYQNPLG	30	TGAGCCCAGAAACCCCTTACCCTTCCTCCTG CCTCTTGAGAGGCCAGTGTTAGGTGTTAGCC GGGGTGCAAAGCTC	Chr20:44683649	遺伝子間
SIJYTMVG	31	AACCTGGTGCGAGCAGCCCGGGCTACAGGGT TGCCTGAGGTGTGGGTCCCAGGATGGAGGAG CCCCAGGCCGGCGG	Chr19:45406704	コーディング
BCGJKHUV	32	ACTTCGGTGAAGGAAGTCATCAGTGCAGTTG CCGACAAGCTGGGCTCCGGGGAGGGCCTGAT CATAGTCAAGATGA	Chr2:173018748	コーディング
RDEWOSIT	33	GGGGCCAGGCAGGAAGAACAGCTAACTCTAG CTCACCTGCAAGGCTCAGCACTGGGTTCATT TGAAGTAGTGTCCT	Chr3:47439806	イントロン
YPLXMQCB	34	CTCCTTTGGGTGTGGACGGGACTAACACTTG CTCCATGTCAGGGCTGCAGGACCTCCTGGCT GTTGACAGCAGGCA	Chr16:85317248	遺伝子間
TPHSLVEM	35	GATGTTTGAAAAGCGCTGAGCCTGGCCTGGC ACCTAAACAGCTCAGCAAGTGTTAGCCAGGA TCACTAGCAGTAAT	Chr19:45686044	遺伝子間
WOEIMTLA	36	ACCCTGCCGATTTCCTTCCAGTTGCTCGCTG GGGCAACCGGCTAGGCTGGAGGAAGGGCGAG GACGGTGTCACCCC	ChrX:134914734	イントロン
TBUYJIVX	37	GAACATGGTGAGGACAAAATGATGTCCAGGA GCCTTTTCTTTGGCCATTGCTAGCCTGAGAC GAAAAGTCAGTGGC	Chr17:40557500	イントロン
LPRCNGHU	38	AGTCTGTCAGTCTATCGTCCCTACCTGCAGC CCAAAGCATAAGCAACATCTTGCCCAGCTCA GAGGTGACAACCTC	Chr1:42891189	遺伝子間
AKRHSGPT	39	CACCGACCCAAGGACCACTCCTTCCAGGAAC CTAGCCTAAAGCAAAGGTGCAGACAGCCCGG GGCCACCGCTGACC	Chr17:28854518	遺伝子間
IRSUAEVF	40	TTGCAAAAGGAAGTTTGAAGCTAGCAGAGGC TGATTCATGAGGTTCAAGGAAAGAAGTCATC TCTGTAACATAAAA	ChrX:30280457	遺伝子間
ATWDXHSC	41	CGTCCCCCAGAGTCCTGTTTCCTCTCCTTCA GCCCCCAAATGAGCAAAGGTTAGGCCCCACC CCTGCTGAGTCAGC	Chr12:56636086	イントロニック
QDMBZRWI	42	GTCAGGGGACAGGGTTTCCTAGCATCCGCGA GCCTTACAGAAAGGCAACTGTGCAGTGCTCC AGCTGGCTTTCTCA	Chr10:26734303	イントロン
WBEAFQRU	43	ACCATCAGAGAAGCTAACCTTTCCTGAGGCC TAACTACTTTGCAGGTCCTGTATTATGTCCT CTATAGACATTAGG	Chr12:104048818	イントロン
RXDOKCGI	44	GATCATTTCAAAGAAAACATTCTGGAACAGT TGCCTATGGGCACGGCAGGGTGACGGTGCTG CTTCTGGGTTTGAC	Chr11:11842581	イントロニック

【０１９３】

【表３】

TXHULGPN	45	GAAGGGCAGAGAACTATAATGACACAGTTGC TTTATTGCTGGACCCAGGACAGTTTATACAG CAGTTCGGAAAGGC	Chr11:33894467	遺伝子間
DYNFTSUP	46	ACTTATTGTAAGTGACGCATGTGACCAGTTG CCAATTGTTCAGGCTACAGCTTGGATCTGTT AGCATCCTCATTTA	Chr11:102685873	遺伝子間
XFDECBQY	47	CCCAGGGGCTGTGGGACACTCAGAGAGCCTA TGCCTGTGCCCTGGGCTCCGGGAGGGGAGAG GATCTGGGGGCCAG	Chr16:2122341	イントロン
ZTIFQRKB	48	CCCCAGGGGCTGTGGGACACTCAGAGAGCCT ATGCCTGTGCCCTGGGCTCCGGGAGGGGAGA GGATCTGGGGGCCAG	Chr16:15141541	遺伝子間
ZFUQTLMTFC	49	AgCTTCCTGcAGCCTcCCTCAAAGCAgaTGT TAGCaCTATTA	Chr10:73205435	イントロニック
ZCNLWTPH	50	CCTcaCCTaGAaCCTGGGCCCCtGCAACTGT aAcCTGTGGCA	Chr19:1198151	遺伝子間
QYYPVRQWMN	51	CCAGAGGaagAACAGTTGCTTGGGTCtAGGC ctCAGGAAGGG	Chr10:101133375	イントロン
EKYJXRAHKV	52	CCTgTgCTGGgGCCTGGGAGGCAgGCggCTG cTAGCCATCCTG	Chr6:89888014	遺伝子間
ADWZQXZI	53	TGACTTAGgaAgCAGTTGCTACCTGCCAGGC cCCAGGctAGG	Chr9:128604027	イントロニック

【０１９４】

図３に提示されたデータは、特定の変異が、同族のＢＣＬ１１Ａ標的部位に対するタンパク質の活性を減少させることを示した（例えば、５１８５７－ＥＬＤ／５１９４９－ＫＫＲ＿Ｒ４４７Ｓを参照されたい：オンターゲット切断活性は、親の８０．５９％と比べて１１．６０％インデルまで減少し、ＮＩＦＭＡＥＶＧオフターゲットにおける活性もまた、親の９．０４％の値と比べて、０．０５％まで降下し、ＰＥＶＹＯＨＩＵオフターゲットにおける活性は、親の０．６５％の値から０．０３％まで降下した（図３Ａ））。しかしながら、他の変異については、オンターゲット切断活性は、依然として堅調なままであり、一方両方の測定されたオフターゲット部位は、大いに減少した。例えば、５１８５７－ＥＬＤ／５１９４９－ＫＫＲ＿Ｒ４１６Ｓ対は、親タンパク質と非常に類似しているＢＣＬ１１Ａに対するオンターゲット活性を有し（２μｇの用量（２０μｇ／ｍＬ）において、変異体対では８０．６３％インデルに対し、親では８０．５９％）、一方２つのオフターゲットにおける活性は、大いに減少した（オフターゲット部位ＮＩＦＭＡＥＶＧにおいては、変異体対では０．７５％に対し、親では９．０４％、及びオフターゲット部位ＰＥＶＹＯＨＩＵにおいては、変異体対では０．０８％に対して親では０．６５％）（図３Ａ）。

【０１９５】

変異体タンパク質もまた、ヘテロ二量体ＦｏｋＩドメインを反対の配向で用いて組み立て、すなわち、図３Ａは、５１８５７－ＥＬＤ／５１９４９－ＫＫＲによる結果を示しているが、図３Ｂは、５１８５７－ＫＫＲ／５１９４９－ＥＬＤによる結果を描写している。再び、親対と類似した堅調なオンターゲット活性を維持したいくつかの対が存在したが（例えば、５１８５７－ＫＫＲ／５１９４９－ＥＬＤ＿Ｋ４４８Ｓ）（それぞれ、８３．０２％対８８．２８％）、これらはオフターゲット位置上で減少した活性をさらに示した（ＮＩＦＭＡＥＶＧについては１．００％対９．２６％；ＰＥＶＹＯＨＩＵについては０．３３％対０．８７％）（図３Ｂ）。

【０１９６】

ＴＣＲＡの対（ＴＲＡＣ）特異的ＺＦＮ：ＳＢＳ＃５２７４２＿ＥＬＤ／ＳＢＳ＃５２

７７４＿ＫＫＲを用いての実験も実施した（米国特許公開第ＵＳ－２０１７－０２１１０７５－Ａ１号）。これらの実験は、Ｋ５６２細胞で行われ、ここでは細胞を、各ＺＦＮをコードするｍＲＮＡの１００ｎｇまたは４００ｎｇのいずれかで処理した。ＺＦＮ対は、表２に以下に開示する１つの変異型パートナーと、１つの非変異型パートナーとからなった。これらの実験では、図１で特定された全ての正に荷電したアミノ酸をセリン（Ｓ）に変異させた。簡単に言うと、２×１０ｅ５個の細胞を、トランスフェクションごとに使用し、ここでは、ｍＲＮＡを、Ａｍａｘａ　９６ウェルシャトル系の使用を介して細胞に送達させた。トランスフェクトされた細胞をトランスフェクションから３日後に採取し、標準的な方法によりＭｉＳｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）解析に対して処理した。データを以下の表２に示し、変異のうちのいくつかが、堅調なオンターゲット活性を維持し、一方他のもの（例えば、図１で活性部位残基として特定された５２７４２　ＥＬＤ＿Ｋ４６９Ｓ）は、切断活性をノックアウトした。

【０１９７】

【表４】

表２：ＦｏｋＩ変異を有するＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）ＺＦＮについてのオンターゲットの結果

	%総インデル				%総インデル	
52742 変異体	400ng	100ng		52774 変異体	400 ng	100 ng
ELD	90.72	71.46		KKR	89.08	70.58
Fok_ELD_K387S	92.31	66.35		Fok_KKR_K387S	89.06	62.70
Fok_ELD_K393S	73.06	23.09		Fok_KKR_K393S	65.89	17.98
Fok_ELD_K394S	71.15	21.86		Fok_KKR_K394S	67.44	25.09
Fok_ELD_R398S	86.23	41.21		Fok_KKR_R398S	84.61	42.28
Fok_ELD_K400S	88.16	63.12		Fok_KKR_K400S	83.15	0.13
Fok_ELD_K402S	84.49	40.64		Fok_KKR_K402S	79.76	0.15
Fok_ELD_R416S	92.91	67.06		Fok_KKR_R416S	87.11	45.48
Fok_ELD_R422S	88.98	47.48		Fok_KKR_R422S	69.98	20.95
Fok_ELD_K427S	75.15	25.24		Fok_KKR_K427S	73.51	25.40
Fok_ELD_K434S	88.65	57.40		Fok_KKR_K434S	88.50	64.84
Fok_ELD_R439S	85.58	56.54		Fok_KKR_R439S	88.38	70.39
Fok_ELD_K441S	88.15	61.13		Fok_KKR_K441S	78.26	72.33
Fok_ELD_R447S	70.26	25.74		Fok_KKR_R447S	36.08	15.06
Fok_ELD_K448S	90.95	68.02		Fok_KKR_K448S	91.39	79.43
Fok_ELD_K469S	0.16	0.12		Fok_KKR_K469S	0.52	0.29
Fok_ELD_R487S	0.45	0.21		Fok_KKR_R487S	0.30	0.18
Fok_ELD_R495S	2.52	0.58		Fok_KKR_R495S	5.71	1.15
Fok_ELD_K497S	87.46	54.80		Fok_KKR_K497S	87.18	59.54
Fok_ELD_K506S	85.54	58.14		Fok_KKR_K506S	86.05	62.42
Fok_ELD_K516S	42.50	12.38		Fok_KKR_K516S	0.16	25.48
Fok_ELD_K525S	91.00	60.36		Fok_KKR_K525S	88.31	46.52
Fok_ELD_K529S	85.01	46.71		Fok_KKR_K529S	88.34	64.13
Fok_ELD_R534S	2.23	0.57		Fok_KKR_R534S	87.46	60.69
Fok_ELD_K559S	86.45	47.69		Fok_KKR_K559S	88.27	58.47
Fok_ELD_R569S	22.45	5.20		Fok_KKR_R569S	64.99	18.87
Fok_ELD_R570S	84.97	46.82		Fok_KKR_R570S	89.58	62.32
Fok_ELD_K571S	84.93	44.61		Fok_KKR_K571S	87.75	70.77

【０１９８】

オフターゲット解析もまた実行し、無作為なキャプチャー解析（ＰＣＴ特許公開第ＷＯ２０１６／１８３２９８号）により決定される、トップのオフターゲット切断部位を決定した。無作為のキャプチャーアッセイによりこのＺＦＮ対について特定された４つのゲノム遺伝子座（ＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）中の意図された標的及び３つのオフターゲット）を、以下の表３に提示する。

【０１９９】

【表５】

表３：ＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）特異的ＺＦＮについての切断部位

ナンバープレート	配列番号	配列（５’－＞３’）	染色体：ｈｇ３８遺伝子座	型
JBSCKVMP（意図された標的）	54	TCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCG	Chr14:22550603	コーディング
XSKWTVWD	55	CCATATGCAGAAAACAGAAACTGTACCCCTTCCTTACACC	Chr18:30735897	遺伝子間
XVFENVRX	56	TGGCCCTTTGCAGAAAAGGTTGTTGAACCCTACCGTAAAC	Chr16:4780553	イントロニック
KXWACMTR	57	CCGGAGAGAAGGCTCCGGTTCAGCACTGAGATCAGGACGG	Chr1:53220206	遺伝子間

【０２００】

各ＺＦＮの４００ｎｇのｍＲＮＡ用量での２つのオフターゲット部位（上記表３で示したＯＴ１１またはＸＶＦＥＮＶＲＸ及びＯＴ１６またはＸＳＫＷＴＶＷＤと称された）におけるヌクレアーゼ活性を分析し、ここでは、ＺＦＮ対の１つのパートナーが示された変異を有し、他のものが、非修飾ＥＬＤまたはＫＫＲ　ＦｏｋＩドメインを維持した。示されるこれらのデータ（表４）は、４００ｎｇの各ＺＦＮパートナーを用いて観察されたインデルパーセント（活性）を示している。これらのデータはまた、変異のいくつかが、ほぼ同等のオンターゲット活性を維持したが、オフターゲット活性における減少を示したことも示唆した。例えば、ＳＢＳ＃５２７７４＿ＫＫＲ＿Ｋ３８７Ｓは、４００ｎｇにおいて８９．０６％インデルのオンターゲット活性（５２７７４＿ＫＫＲの親についての８９．０８と比べて）、及び６．３９％インデルのＯＴ１１及びＯＴ１６における組み合わされたオフターゲット活性（５２７７４＿ＫＫＲの親についての１５．０７％と比べて）を示した。これらの結果は、ＢＣＬ１１Ａ特異的ＺＦＮで試験したＦｏｋＩ変異を含み、ここでは、４１６、４２２、４４７、４４８、及び５２５位における正電荷の変更が、オフターゲット活性を低減した。

【０２０１】

【表６】

表４：ＴＲＡＣ　ＺＦＮ　ＦｏｋＩ変異体のオフターゲット切断

	インデル%					インデル%			
52742	オンターゲット	OT16	OT11	OT11+OT16	52774	オンターゲット	OT16	OT11	OT11+OT16
ELD	90.72	7.39	5.82	13.21	KKR	89.08	7.80	7.27	15.07
Fok_ELD_K387S	92.31	13.15	4.32	17.47	Fok_KKR_K387S	89.06	3.12	3.27	6.39
Fok_ELD_K393S	73.06	0.87	0.60	1.47	Fok_KKR_K393S	65.89	1.04	0.71	1.76
Fok_ELD_K394S	71.15	0.79	0.61	1.40	Fok_KKR_K394S	67.44	1.02	0.77	1.79
Fok_ELD_R398S	86.23	2.64	1.86	4.50	Fok_KKR_R398S	84.61	3.10	2.04	5.14
Fok_ELD_K400S	88.16	4.13	2.55	6.68	Fok_KKR_K400S	83.15	2.49	1.60	4.09
Fok_ELD_K402S	84.49	2.10	1.64	3.74	Fok_KKR_K402S	79.76	2.93	1.21	4.13
Fok_ELD_R416S	92.91	6.29	3.08	9.37	Fok_KKR_R416S	87.11	0.74	0.93	1.68
Fok_ELD_R422S	88.98	1.18	1.09	2.27	Fok_KKR_R422S	69.98	0.26	1.07	1.33
Fok_ELD_K427S	75.15	1.18	0.89	2.07	Fok_KKR_K427S	73.51	2.16	1.30	3.46
Fok_ELD_K434S	88.65	5.52	3.50	9.03	Fok_KKR_K434S	88.5	6.76	5.44	12.20
Fok_ELD_R439S	85.58	4.51	2.77	7.29	Fok_KKR_R439S	88.38	7.39	5.62	13.01
Fok_ELD_K441S	88.15	5.96	3.44	9.40	Fok_KKR_K441S	78.26	4.93	3.38	8.30
Fok_ELD_R447S	70.26	0.32	0.14	0.46	Fok_KKR_R447S	36.08	0.11	0.18	0.29
Fok_ELD_K448S	90.95	5.28	1.96	7.24	Fok_KKR_K448S	91.39	2.05	1.12	3.18
Fok_ELD_K469S	0.16	0.18	0.15	0.33	Fok_KKR_K469S	0.52	0.18	0.14	0.32
Fok_ELD_R487S	0.45	0.16	0.12	0.28	Fok_KKR_R487S	0.3	0.17	0.11	0.28
Fok_ELD_R495S	2.52	0.14	0.12	0.26	Fok_KKR_R495S	5.71	0.15	0.13	0.28
Fok_ELD_K497S	87.46	3.56	2.66	6.23	Fok_KKR_K497S	87.18	6.13	6.44	12.57
Fok_ELD_K506S	85.54	4.06	3.05	7.10	Fok_KKR_K506S	86.05	4.22	2.55	6.77
Fok_ELD_K516S	42.5	0.45	0.34	0.79	Fok_KKR_K516S	0.16	0.11	0.15	0.26
Fok_ELD_K525S	91	0.81	2.13	2.94	Fok_KKR_K525S	88.31	0.96	0.79	1.75

【０２０２】

【表７】

Fok_ELD_K529S	85.01	1.99	1.46	3.45	Fok_KKR_K529S	88.34	6.45	4.83	11.27
Fok_ELD_R534S	2.23	0.14	0.15	0.29	Fok_KKR_R534S	87.46	4.44	3.29	7.74
Fok_ELD_K559S	86.45	2.72	1.84	4.56	Fok_KKR_K559S	88.27	4.27	2.61	6.88
Fok_ELD_R569S	22.45	0.25	0.22	0.47	Fok_KKR_R569S	64.99	1.39	1.05	2.45
Fok_ELD_R570S	84.97	2.73	1.96	4.68	Fok_KKR_R570S	89.58	7.98	6.20	14.18
Fok_ELD_K571S	84.93	2.27	1.96	4.23	Fok_KKR_K571S	87.75	8.24	6.11	14.34

【０２０３】

次いで、データを、変異アミノ酸残基とＤＮＡ分子との間の推定距離と比較し、オンターゲット及びオフターゲット切断の両方に及ぼす効果を検討した（図４）。各ＺＦＮ対の活性を単一点として示し、最も望ましいプロファイル（高オンターゲット活性かつ低オフターゲット活性）を有するタンパク質が、それらの変異がＤＮＡ分子から１０オングストロームの範囲内にあるものであることを示した（図４）。１つのＺＦＮが、４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５位におけるＦｏｋＩ変異を保有するＺＦＮ対に一致するデータ点が示されている。

【０２０４】

これらの結果は、残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５のうちの１つ以上への変異が、オフターゲット活性を減少させながらオンターゲット活性を増加することができることを実証した。

【０２０５】

実施例３：新規の操作されたジンクフィンガー主鎖変異の設計

以前の研究は、ジンクフィンガー「主鎖」（ＤＮＡヌクレオチドの部位特異的認識に関与しない構造の領域）中の正に荷電したアミノ酸残基と、ＤＮＡ分子上のリン酸との間になんらかの相互作用があり得ることを示唆している（Ｅｌｒｏｄ－Ｅｒｉｃｋｓｏｎ　ｅｔａｌ、同書）（図５Ａを参照されたい）。－１４、－９、及び－５位におけるアミノ酸（全て、アルファヘリックス領域の従来の番号付けに対して）は、正に荷電することが多く、ＤＮＡ主鎖内の負に荷電したリン酸と相互作用し得る（図５Ｂを参照されたい）。したがって、４８６７個のジンクフィンガー配列を、フィンガー配列内の各位置におけるアミノ酸残基の存在について解析した（図６を参照されたい）。－５位において、中性アミノ酸のアラニン、ロイシン及びグルタミンを、低い頻度であるが、ゼロではない頻度で観察し、したがって、これらのアミノ酸をフィンガー主鎖の修飾において使用した。６位及び５位のフィンガーＺＦＰもまた、潜在的置換と共に特定した（図７Ａ及び７Ｂ）。

【０２０６】

変異を、ＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）特異的ＺＦＮ対ＳＢＳ＃５２７７４／ＳＢＳ＃５２７４２において作製した（ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１７１０６５２８号を参照されたい）。これらのタンパク質について、合計で２１個の変異体が、各パートナーから作製された（（Ｆ１、Ｆ３、Ｆ５、Ｆ１＋Ｆ５、Ｆ３＋Ｆ５、Ｆ１＋Ｆ３＋Ｆ５）×（Ｒ－＞Ａ、Ｒ－＞Ｑ、Ｒ－＞Ｌ））。選択された代表データ（表５）は、対の多くが、解析された３つのオフターゲットに対してオフターゲット活性の減少を示すことを示した。この表では、５２７７４　ＺＦＮを、－５位のフィンガー１（Ｆ１）、フィンガー３（Ｆ３）及びフィンガー５（Ｆ５）で示された変異を保有する５２７７４　ＺＦＮの変異体と組み合わせた。作製された変異の型も示され、このデータセット中の全ての変異体がアルギニン（Ｒ）からグ

ルタミン（Ｑ）への変異体である。例えば、５２７４２－Ｆ１ＲＱと表示されるタンパク質は、フィンガー１の－５位でのアルギニンがグルタミンに変更された変異体を示している。表の最上部は、活性をインデル％として表示し、表の下半分は、活性を親ＺＦＮ対５２７７４／５２７４２の２つの複製物の活性の平均に対する割合として示している。これらの実験は、これらの変異が、オフターゲット切断に及ぼす影響を有し得ることを示した。例えば、オンターゲット切断は、５２７４２－Ｆ１ＲＱ；Ｆ３ＲＱ；Ｆ５ＲＱ変異体について堅調なレベルで維持されたが（６μｇの用量において、親タンパク質についての６２．５９％の活性と比較して、６９．９６％のオンターゲット活性）、オフターゲット切断は低下した（ＯＴ１６は、親タンパク質について１９．１６％、及び三重変異体では１．４３％の切断活性を示した）。

【０２０７】

【表８】

表５：ジンクフィンガー主鎖変異についての例示的なデータ

	TCRA（TRAC）		OT16		OT11		OT3	
ナンバープレート－＞	JBSCKVMP		XSKWTVWD		XVFENVRX		KXWACMTR	
試料	6ug	2ug	6ug	2ug	6ug	2ug	6ug	2ug
52742	62.59	32.08	19.16	6.9	4.32	2.43	1.59	1.21
52742	62.75	25.86	15.26	5.32	4.33	2.61	1.41	1.3
52742-F1RQ	68.58	35.42	14.46	8.26	4.16	2.75	0.64	0.42
52742-F1RQ;F3RQ	65.72	30.07	5.11	1.9	1.09	1.15	0.22	0.22
52742-F1RQ;F3RQ;F5RQ	69.96	36.09	1.43	1.16	0.47	0.43	0.19	0.16
52742	1	1.11	1.11	1.13	1	0.96	1.06	0.97
52742	1	0.89	0.89	0.87	1	1.04	0.94	1.03
52742-F1RQ	1.09	1.22	0.84	1.35	0.96	1.09	0.42	0.34
52742-F1RQ;F3RQ	1.05	1.04	0.3	0.31	0.25	0.46	0.15	0.18
52742-F1RQ;F3RQ;F5RQ	1.12	1.25	0.08	0.19	0.11	0.17	0.13	0.13

【０２０８】

ＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）特異的親ＺＦＮ　５２７４２及び５２７７４で開始して、各モジュールの第１のフィンガーにおけるアルギニン（Ｒ）を、アラニン（Ａ）、グルタミン（Ｑ）、またはロイシン（Ｌ）のいずれかで置き換えた。構築物を、ＣＤ３４＋細胞中で試験し、ここでは、細胞が、６μｇの、各ＺＦＮパートナーをコードするｍＲＮＡで処置された（図８Ａを参照されたい）。これらのデータセットに対して、示される各データバーは、各型の全ての変異についてのデータの平均であり、エラーバーは標準誤差を表す。例えば、図８Ａのオンターゲット活性を示している最も左側の黒色のバーについては、この値は、単一変異を有し得るＺＦＮ対における全ての６つの変異体のオンターゲットの平均値である。図７の図解を参照すると、これらは、したがって、５２７４２のモジュールＡのＮ末端フィンガー（完全長のタンパク質中のＦ１）における単一変異、５２７４２のモジュールＢのＮ末端フィンガー（完全長のタンパク質中のＦ３）における単一変異、５２７４２のモジュールＣのＮ末端フィンガー（完全長タンパク質中のＦ５）における単一変異、及びパートナー５２７７４タンパク質における変異の同様なセットを含む。第２の黒色のバー（オンターゲット活性を示す）については、オンターゲットプールは、全ての２つの変異タンパク質（変異が単一パートナーＺＦＮにおいて作製される場合の６つの可能

性のセット）の平均であり、第３の黒色バーについては、オンターゲットプールは、全ての３つのモジュールが左側または右側ＺＦＮにおいて変異された状態の２つの可能性の平均である。灰色バーによって示されるオフターゲットデータについては、オフターゲットデータセット内の単一または二重変異についてのプールが、それぞれ１８個のデータ点を含むように、３つのオフターゲット部位からのデータが組み合わされた以外は、同様なプールが作製された。これらの変異は、オフターゲット活性における最大４．８倍の減少をもたらした。

【０２０９】

ＺＦＮ対の両方のパートナーが同様な様式で変異される場合の実験も行った（図８Ｂの右半分）。例えば、モジュールＡ内のＮ末端フィンガーをアラニンに変更し、（５２７４２－Ｆ１ＲＡ）、次いでパートナータンパク質もまた、モジュールＡ中のＮ末端フィンガーにおいて変異させて（５２７７４－Ｆ１ＲＡ）、ＺＦＮ二量体中に合計で２つの変異を生じさせた。アラニン置換のみを二量体中の両方のＺＦＮにおいて同時に試験し、このデータを図８Ｂの右半分に示している（２、４、または６で表示）。図８Ａの左側３分の１からの二量体中の１つだけのＺＦＮに対して作製されたＲ－＞Ａ変異（１、２、または３で表示）を、比較の目的で、図８Ｂの左半分に再度示す。図８Ｃは、２μｇ（２０μｇ／ｍＬ）のＲＮＡが使用されたことのみを除いては、図８Ａの右側部分と同様である。これらの実験は、これらの変異が、合計で６つの変異が二量体中の両方のＺＦＮにおいて発生するとき、オフターゲット活性の２７倍の減少を生じさせることができることを示した。

【０２１０】

これらの実験は、上述したＢＣＬ１１Ａ特異的ＺＦＮ対５１８５７－ＥＬＤ／５１９４９－ＫＫＲでも実施した。実験設計は、ＴＣＲＡ（ＴＲＡＣ）特異的ＺＦＮ対について記述されたものと同様であって、これらの結果を図９Ａに示す。提示されたデータは、２μｇ（２０μｇ／ｍＬ）で投与された、Ｒ－＞Ｑ（Ｇｌｎ）またはＲ－＞Ｌ（Ｌｅｕ）のいずれかの変異を含む対についての結果を示し、ここでは、描写されたオフターゲット結果は、１つのみのオフターゲット部位（ＮＩＦＭＡＥＶＧ、表１を参照されたい）についてのものであった。

【０２１１】

－５位における追加のアミノ酸変異体を、ＲをＥ、Ｎ、Ｙ、Ａ、またはＬで置き換えることによって作製した。－５位におけるアミノ酸の変更に加えて、一連の変異を、ＢＣＬ１１Ａ特異的ＺＦＮ対５１８５７／５１９４９の図１における－９位及び－１４位で作製した。これらを、単独で、及びフィンガー２～６中の－５の変更と組み合わせて、上述したように、オン及びオフターゲット活性について試験した。それらのデータを表６に示す。各タンパク質は、上記親タンパク質について記載したものと同じＤＮＡ特異的ヘリックス領域を有したが、ＺＦＰ主鎖変異を反映するために、新たなＳＢＳ識別子が供与された。簡単に言うと、タンパク質のフルネームは、フィンガー中の列挙された変異体を反映する。したがって、フルネームの「ｃＲ」部分は、変更が２フィンガーモジュールのＣ末端フィンガーにおいて行われてことを指し（図７を参照されたい）、「ｎＲ」は、変更が２フィンガーモジュールのＮ末端フィンガーにおいて加えられていることを指す。「ｒＱａ」という記述は、変更がＡモジュール内の－５位において作製されたことを意味し、その中で変更が加えられたフィンガーは、ｃＲまたはｎＲのいずれかによって定義される。したがって、ＳＢＳ＃６５４６１（フルネーム５１８５７－ＮＥＬＤ－ｃＲ－５Ｑａ）は、変更が－５位において、Ｃ末端フィンガー中で加えられているＳＢＳ＃５１８５７誘導体であり、ここではモジュールＡ内でＱがＲに取って代わっている。これはまた、Ｆ２、－５列中にＱが表示されている表でも見ることができる。－１４位で変更が行われた場合、ＳＢＳ＃６５４５９（フルネーム５１８７－ＮＥＬＤ－ｎＲ－１４Ｑ－５Ｑａｂｃ）に関して、これが表示される。したがって、ＳＢＳ＃６５４５９は、変更がモジュール内のＮ末端フィンガーに対して行われているＳＢＳ＃５１８５７誘導体であり、ここではフィンガー１の－１４がＲからＱに変更され、かつモジュールＡ、Ｂ、及びＣのＮ末端フィンガー中の－５位がＲからＱに変更されている。ＳＢＳ＃６５４６０の場合には、フィンガー

１の－１４が、ＲからＳに変更されている。この場合もやはり、表から決定することができる。「ＮＥＬＤ」及び「ＣＫＫＲ」という表示は、ＦｏｋＩヌクレアーゼドメインの型（「ＥＬＤ」または「ＫＫＲ」ＦｏｋＩドメイン変異体のいずれか）及びベクターの他の態様を示す（ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１７／１３６０４９号を参照されたい）。表６Ａは、ＳＢＳ＃５１８５７誘導体パートナー中で作製された変異の、ＳＢＳ＃５１９４９パートナー、またはモジュールＡ、Ｂ、及びＣ内の－５位においてＮ末端フィンガー中のＱに挿入された変更を含むＳＢＳ＃５１９４９パートナー（このパートナーは、ＦｏｋＩドメイン中ｂにＲ４１６Ｓ変異をさらに含む）のいずれかとの対形成を示し、ここでは、実験は、各ＺＦＮをコードするｍＲＮＡの２μｇを用いて行った。これらの実験はまた、ＳＢＳ＃５１９４９タンパク質における変異を用いて行われ（表６Ｂを参照されたい）、ここでは、ＦｏｋＩドメインのアミノ酸と相互作用するリン酸中の変異を、主鎖変異と組み合わせて試験した。これらのデータは、追加の変更が、ＺＦＮ対の特異性に及ぼす影響を有することができることを示した。

【０２１２】

【表９】

表６Ａ：ＺＦＮ　ＳＢＳ＃５１８５７についての主鎖位置における変更

		フィンガー1 (F1)			F2	F3	F4	F5	F6	aa 変化	右側パートナー: 51949-CKKR			右側パートナー: 51949-CKKR-nR-5Qabc-R416S		
SBS#	フルネーム	-14	-9	-5	-5	-5	-5	-5	-5		Bcl11a	OT1	TXHU LGPN	Bcl11a	OT1	TXHU LGPN
51857	51857-NELD (AV-A)									0	70.1	3.83	0.11	59.2	0.15	0.08
65461	51857-NELD_cR-5Qa				Q					1	68.4	2.18	0.11	55.5	0.35	0.07
65462	51857-NELD_cR-5Qb						Q			1	69.2	1.18	0.14	63.4	0.09	0.04
65463	51857-NELD_cR-5Qc								Q	1	59.7	0.85	0.08	55.5	0.20	0.07
65464	51857-NELD_cR-5Qab				Q		Q			2	NA	1.00	0.04	53.7	0.05	0.07
65465	51857-NELD_cR-5Qac				Q				Q	2	62.3	0.74	0.03	55.1	0.13	0.06
65466	51857-NELD_cR-5Qbc						Q		Q	2	62.4	0.38	0.05	57.9	0.15	0.08
65467	51857-NELD_cR-5Qabc				Q		Q		Q	3	59.2	0.27	0.05	53.2	0.08	0.08
63014	51857-NELD_nR-5Qabc (AV-B)			Q		Q		Q		3	55.7	0.73	0.07	55.5	0.15	0.02
65453	51857-NELD_nR-5Eabc			E		E		E		3	41.6	0.20	0.04	44.9	0.04	0.07
65454	51857-NELD_nR-5Nabc			N		N		N		3	7.8	0.13	0.02	48.3	0.08	0.07
65455	51857-NELD_nR-5Yabc			Y		Y		Y		3	42.8	0.50	0.03	42.4	0.09	0.10
65459	51857-NELD_nR-14Q-5Qabc	Q		Q		Q		Q		4	55.9	0.53	0.05	52.9	0.19	0.07
65460	51857-NELD_nR-14S-5Qabc	S		Q		Q		Q		4	54.3	0.66	0.06	53.3	0.07	0.07
65469	51857-NELD_nR-5Qabc, cR-5Qa			Q	Q	Q		Q		4	44.6	0.24	0.06	50.8	0.01	0.08

【０２１３】

【表１０】

65470	51857-NELD_nR-5Qabc, cR-5Qb			Q		Q	Q	Q		4	44.5	0.22	0.07	49.8	0.06	0.02
65471	51857-NELD_nR-5Qabc, cR-5Qc			Q		Q		Q	Q	4	NA	0.09	0.05	53.9	0.05	0.06
65472	51857-NELD_nR-5Qabc, cR-5Qab			Q	Q	Q	Q	Q		5	37.3	0.15	0.04	41.2	0.06	0.08
65473	51857-NELD_nR-5Qabc, cR-5Qac			Q	Q	Q		Q	Q	5	26.9	0.13	0.05	33.2	0.08	0.02
65474	51857-NELD_nR-5Qabc, cR-5Qbc			Q		Q	Q	Q	Q	5	25.2	0.11	0.04	37.4	0.08	0.09
65475	51857-NELD_nR-5Qabc, cR-5Qabc			Q	Q	Q	Q	Q	Q	6	20.1	0.15	0.06	29.1	0.13	0.09
65477	51857-NELD_nR-5Eabc, cR-5Qabc			E	Q	E	Q	E	Q	6	3.3	0.07	0.05	4.5	0.09	0.08
65478	51857-NELD_nR-5Nabc, cR-5Qabc			N	Q	N	Q	N	Q	6	0.1	0.09	0.05	0.2	0.09	0.05
65479	51857-NELD_nR-5Yabc, cR-5Qabc			Y	Q	Y	Q	Y	Q	6	0.2	0.09	0.05	0.1	0.06	0.03
65481	51857-NELD_nR-9Na-5Qabc, cR-5Qabc		N	Q	Q	Q	Q	Q	Q	7	15.1	0.11	0.03	27.3	0.15	0.03
65482	51857-NELD_nR-9Sa-5Qabc, cR-5Qabc		S	Q	Q	Q	Q	Q	Q	7	18.8	0.12	0.05	23.7	0.06	0.07
65483	51857-NELD_nR-14Q-5Qabc, cR-5Qabc	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	7	12.4	0.19	0.07	21.0	0.07	0.07
65484	51857-NELD_nR-14S-5Qabc, cR-5Qabc	S		Q	Q	Q	Q	Q	Q	7	12.5	0.06	0.06	22.5	0.05	0.04

【０２１４】

【表１１】

65468	51857-NELD_nR-14S-5Qabc,cR-5Aabc	Q		Q	A	Q	A	Q	A	7	24.0	0.13	0.04	30.2	0.07	0.02
65476	51857-NELD_nR-14S-5Qabc,cR-5Labc	Q		Q	L	Q	L	Q	L	7	5.4	0.11	0.04	12.9	0.10	0.04

【０２１５】

【表１２】

表６Ｂ：ＺＦＮ　ＳＢＳ＃５１９４９についての他の主鎖位置及びＦｏｋＩにおける変更

		フィンガー1 (F1)			F2	F3	F4	F5	aa 変化	右側パートナー: 51949-CKKR			右側パートナー: 51949-CKKR-nR-5Qabc-R416S		
SBS#	フルネーム	-14	-9	-5	-5	-5	-5	-5		Bcl11a	OT1	TXHULGPN	Bcl11a	OT1	TXHULGPN
51949	51949-CKKR (AV-C)								0	64.3	3.24	0.10	33.1	0.28	0.09
51949-R416S	51949-CKKR-R416S (AV-D)								0	68.8	0.52	0.06	38.7	0.07	0.11
65529	51949-CKKR-R416S_cR-5Qb					Q			1	69.2	0.17	0.08	44.9	0.13	0.10
65530	51949-CKKR-R416S_cR-5Qc							Q	1	67.7	0.20	0.04	56.4	0.08	0.08
65528	51949-CKKR-R416S_cR-5Qbc					Q		Q	2	73.3	0.12	0.06	53.6	0.07	0.06
63022-R416S*	51949-CKKR-R416S_nR-5Qabc (AV-G)			Q	Q		Q		3	71.9	0.18	0.04	50.1	0.15	0.06
65509	51949-CKKR-R416S_nR-5Eabc			E	E		E		3	49.8	0.07	0.04	37.3	0.08	0.04
65510	51949-CKKR-R416S_nR-5Nabc			N	N		N		3	67.6	0.19	0.06	46.7	0.05	0.05
65511	51949-CKKR-R416S_nR-5Yabc			Y	Y		Y		3	64.5	0.17	0.14	41.8	0.10	0.08
65515	51949-CKKR-R416S_nR-14Q-5Qabc	Q		Q	Q		Q		4	66.4	0.15	0.06	47.2	0.15	0.14
65516	51949-CKKR-R416S_nR-14S-5Qabc	S		Q	Q		Q		4	65.1	0.12	0.06	43.4	0.12	0.10
65525	51949-CKKR-R416S_nR-5Qabc,cR-5Qb			Q	Q	Q	Q		4	71.3	0.12	0.07	45.7	0.08	0.06
65526	51949-CKKR-R416S_nR-5Qabc,cR-5Qc			Q	Q		Q	Q	4	69.7	0.08	0.05	53.0	0.18	0.11
65527	51949-CKKR-R416S_nR-5Qabc,cR-5Qbc			Q	Q	Q	Q	Q	5	66.7	0.09	0.06	43.2	0.10	0.07
65517	51949-CKKR-R416S_nR-5Eabc,cR-5Qbc			E	E	Q	E	Q	5	12.9	0.09	0.02	10.6	0.07	0.11

【０２１６】

【表１３】

65518	51949-CKKR-R416S_nR-5Nabc, cR-5Qbc			N	N	Q	N	Q	5	60.6	0.02	0.05	NA	0.07	0.05
65519	51949-CKKR-R416S_nR-5Yabc, cR-5Qbc			Y	Y	Q	Y	Q	5	65.5	0.12	0.04	43.8	0.08	0.03
65521	51949-CKKR-R416S_nR-9N-5Qabc, cR-5Qbc		N	Q	Q	Q	Q	Q	6	70.8	0.09	0.05	51.8	0.12	0.07
65523	51949-CKKR-R416S_nR-14Q-5Qabc, cR-5Qbc	Q		Q	Q	Q	Q	Q	6	61.0	0.10	0.07	42.5	0.10	0.04
65524	51949-CKKR-R416S_nR-14S-5Qabc, cR-5Qbc	S		Q	Q	Q	Q	Q	6	51.9	0.08	0.09	38.8	0.07	0.07
65531	51949-CKKR-R416S_nR-14Q-5Qabc, cR-5Abc	Q		Q	Q	A	Q	A	6	50.7	0.06	0.04	38.7	0.05	0.10
65532	51949-CKKR-R416S_nR-14Q-5Qabc, cR-5Lbc	Q		Q	Q	L	Q	L	6	40.5	0.05	0.07	31.0	0.16	0.05
51949-K525S	51949-CKKR-K525S (AV-E)								0	49.0	0.16	0.05	31.1	0.08	0.05
65554	51949-CKKR-K525S_cR-5Qc							Q	1	35.5	0.10	0.13	37.9	0.10	0.06
65552	51949-CKKR-K525S_cR-5Qbc					Q		Q	2	55.9	0.10	0.05	37.4	0.58	0.02
63022-K525S**	51949-CKKR-K525S_nR-5Qabc (AV-H)			Q	Q		Q		3	59.5	0.04	0.05	44.9	0.14	0.10
65533	51949-CKKR-K525S_nR-5Eabc			E	E		E		3	0.1	0.09	0.04	0.1	0.11	0.08
65534	51949-CKKR-K525S_nR-5Nabc			N	N		N		3	52.8	0.03	0.04	NA	0.06	NA
65535	51949-CKKR-K525S_nR-5Yabc			Y	Y		Y		3	53.1	0.12	0.06	35.6	0.07	0.19
65539	51949-CKKR-K525S_nR-14Q-5Qabc	Q		Q	Q		Q		4	52.1	0.10	0.10	38.1	0.10	0.05
65540	51949-CKKR-K525S_nR-14S-5Qabc	S		Q	Q		Q		4	54.2	0.08	0.10	34.1	0.11	0.06

【０２１７】

【表１４】

65549	51949-CKKR-K525S_nR-5Qabc,cR-5Qb			Q	Q	Q	Q		4	56.7	0.03	0.12	37.3	0.10	0.05
65550	51949-CKKR-K525S_nR-5Qabc,cR-5Qc			Q	Q		Q	Q	4	57.3	0.12	0.09	36.0	0.11	0.00
65551	51949-CKKR-K525S_nR-5Qabc,cR-5Qbc			Q	Q	Q	Q	Q	5	50.8	0.09	0.05	34.5	0.06	0.00
65541	51949-CKKR-K525S_nR-5Eabc,cR-5Qbc			E	E	Q	E	Q	5	2.5	0.09	0.08	1.9	0.18	0.05
65542	51949-CKKR-K525S_nR-5Nabc,cR-5Qbc			N	N	Q	N	Q	5	36.4	0.06	0.02	22.8	0.07	0.03
65543	51949-CKKR-K525S_nR-5Yabc,cR-5Qbc			Y	Y	Q	Y	Q	5	53.1	0.09	0.08	32.0	0.13	0.15
65545	51949-CKKR-K525S_nR-9N-5Qabc,cR-5Qbc		N	Q	Q	Q	Q	Q	6	51.2	0.15	0.07	33.0	0.08	0.13
65547	51949-CKKR-K525S_nR-14Q-5Qabc,cR-5Qbc	Q		Q	Q	Q	Q	Q	6	36.1	0.09	0.05	22.5	0.08	0.02
65548	51949-CKKR-K525S_nR-14S-5Qabc,cR-5Qbc	S		Q	Q	Q	Q	Q	6	28.7	0.06	0.05	20.1	0.09	0.10
65555	51949-CKKR-K525S_nR-14Q-5Qabc,cR-5Abc	Q		Q	Q	A	Q	A	6	36.3	0.14	0.08	21.8	0.10	0.11
65556	51949-CKKR-K525S_nR-14Q-5Qabc,cR-5Lbc	Q		Q	Q	L	Q	L	6	25.0	0.06	0.05	NA	0.10	0.04

*６３０２２－Ｒ４１６Ｓは、ＳＢＳ＃６５７２１としても知られる。

**６３０２２－Ｋ５２５Ｓは、ＳＢＳ＃６５７２２としても知られる。

【０２１８】

ＣＤ３４＋細胞を用いて実験を繰り返し、ここでは、ＢＴＸトランスフェクションシステムを用いて、製造元の指示に従って最適化された条件を使用して、ＲＮＡを細胞に送達させた。ＲＮＡの３つの濃度：６０、２０、及び５μｇ／ｍＬの最終濃度を用いた。データを以下の表６Ｃに示し、堅調なオンターゲット切断が、オフターゲット切断が大いに低減されるように（１００×超）ＺＦＮ　ｍＲＮＡの非常に低いレベルであっても検出され得ることを示している。変異は、図２Ｃに示した命名法で表示されている。実験は、結果の堅牢性を決定するために、親だけの対及び以下の表６Ｃからの３×（Ｒ－＞Ｑ）／３×（Ｒ－＞Ｑ）対を用いて繰り返した。表６Ｄから分かるように、結果は高い再現性があっ

た。

【０２１９】

【表１５】

表６Ｃ：オン及びオフターゲット効果の漸増

ZFN修飾		インデル%								
		BCL11A			NIFMAEVG (OT1)			PEVYOHIU (OT3)		
左側ZFN	右側ZFN	60μg	20μg	5μg	60μg	20μg	5μg	60μg	20μg	5μg
SBS51857	SBS51949	82.7	87.0	76.5	28.0	5.02	0.34	4.77	0.32	(0.03)
3x (R->Q) SBS63014	3x (R->Q)* SBS65721	88.3	86.4	78.0	0.55	0.08	(0.01)	0.04	(0.01)	(0.02)
3x (R->Q) SBS63014	4x (R->Q)* SBS65526	85.4	86.3	73.4	0.17	(0.03)	(0.03)	(0.02)	(0.00)	(0.01)
3x (R->Q) SBS63014	5x (R->Q)* SBS65527	83.6	86.5	71.7	(0.03)	(0.01)	(0.02)	(0.02)	(0.03)	(0.00)

括弧内の数字は、ヌクレアーゼ切断が見られた証拠がない場合の値を示す。*は、右側ＺＦＮが、ＦｏｋＩヌクレアーゼドメイン中に追加のＲ４１６Ｓ変異をさらに含んだことを示す。

【０２２０】

【表１６】

表６Ｄ：オンターゲット活性の繰り返し測定

ZFN修飾		インデル%				
		BCL11Aのインデル%、繰り返し				インデル%、平均
左側ZFN	右側ZFN	#1	#2	#3	#4	
SBS51857	SBS51949	76.8	79.0	82.8	80.1	79.7
3x (R->Q) SBS63014	3x (R->Q)* SBS65721	80.5	81.7	81.0	83.4	81.6

*は、右側ＺＦＮが、ＦｏｋＩヌクレアーゼドメイン中に追加のＲ４１６Ｓ変異をさらに含んだことを示す。

【０２２１】

実施例４：最適なオンターゲット活性のためのＺＦＮパートナーの漸増

ＺＦＮ対の各パートナーを個々に漸増することは、各ＺＦＮパートナーの最適な濃度の決定を可能にし、これによって、オフターゲット修飾を最小化しながら、対による最大のオンターゲット修飾を有すること可能にする。各個々のＺＦＮハーフドメインは、その同族のＤＮＡ標的に結合するその独自の動態を有することができ、そのため、それぞれの別々の漸増を通して、最適な活性を達成することができる。したがって、ＢＣＬ１１Ａ特異的対ＳＢＳ＃５１９４９／ＳＢＳ＃５１８５７を、誘導されるＺＦＮをｍＲＮＡとして用いるＣＤ３４＋細胞における漸増試験に使用し、ここでは、高濃度のＺＦＮを用いて、オフターゲット切断の検出を可能にした。実験（以下の表７）は、ＳＢＳ＃５１８５７パートナーの漸増が、堅牢なオンターゲット切断を維持しながら、オフターゲット切断の減少（およそ８倍）をもたらすことを見出した。例えば、６０μｇ／ｍＬの５１９４９のｍＲＮＡが６．６μｇ／ｍＬの５１８５７のｍＲＮＡと組み合わせて使用するとき、オンター

ゲット修飾は、６０μｇ／ｍＬの各ＺＦＮを使用した場合とほぼ同じままであり（それぞれ６０μｇ／ｍＬを使用するとき７６．１％インデルであり、６０μｇ／ｍＬの５１９４９を６．６μｇ／ｍＬの５１８５７と組み合わせて使用するとき、７８．３％インデルである）、一方、総オフターゲットは、３２．４％インデルから４．０％になった。両方のＺＦＮへのｍＲＮＡ投入を減少させることが、オンターゲット修飾における段階的低下を等しくもたらしたが、一方オフターゲット修飾は、オンターゲット修飾が低減されると実質的に低減したに過ぎないことに留意されたい。

【０２２２】

【表１７】

表７：単一ＺＦＮの漸増

ＲＮＡの μｇ／ｍＬ		各遺伝子座におけるインデル％						
51949	51857	BCL11A	NIFMAEVG OT1	GJZEIYTO OT2	PEVYOHIU OT3	ZJCRPAXW OT4	TXHULGPN OT5	総オフターゲット
60.0	60.0	76.1	24.6	2.81	3.06	1.12	0.79	32.4
40.0	40.0	76.5	14.6	1.69	1.77	0.80	0.43	19.3
20.0	20.0	71.5	4.9	0.62	0.36	0.35	0.08	6.3
10.0	10.0	62.0	1.3	0.10	0.14	0.26	0.08	1.9
60.0	20.0	78.3	11.8	1.38	1.32	0.58	0.40	15.5
60.0	6.6	78.9	2.8	0.27	0.36	0.40	0.19	4.0
60.0	2.2	73.7	0.9	0.15	0.29	0.28	0.10	1.8

【０２２３】

各ＺＦＮパートナーの発現が、送達されるＺＦＮをコードするｍＲＮＡの量と相関することを実証するために、ウェスタン分析も実施した（図１０）。この実験では、ＣＤ３４＋細胞を示されたＺＦＮでトランスフェクトし、発現から２４時間後のＺＦＮタンパク質を、抗Ｆｌａｇ抗体（コード化Ｆｌａｇタグから構成された発現構築物）を用いて検出した。ＺＦＮが、２ａ自己切断ペプチド配列によって分離された単一ＲＮＡとして同時導入された場合の２つのタンパク質の発現も分析した（図１０のレーン２を参照されたい）。

【０２２４】

オンターゲットまたはオフターゲット切断活性の両方に及ぼす任意の効果があるかを見るために、両方のＺＦＮを独立して変化させて漸増を繰り返した。これらの結果（図１１）は、両方のパートナーの漸減が、オフターゲット切断を減少させるが、効果は、ＳＢＳ＃５１８５７で最も強いことを実証した。図１１のＢＣＬ１１Ａオンターゲットチャートのボックスは、６０μｇのＳＢＳ＃５１９４９のｍＲＮＡと、６．６または６０μｇのいずれかのＳＢＳ＃５１８５７のｍＲＮＡとを用いることでの意図したＢＣＬ１１Ａ標的に対する切断活性の維持を、一方では、減少した用量のＳＢＳ＃５１８５７による２７％から４％まで低下した部位ＮＩＦＭＡＥＶＧにおけるオフターゲット活性を示している。

【０２２５】

実施例５：ＺＦＮパートナーの漸増とＦｏｋＩ－リン酸接触変異との組み合わせ

次に、例示的なＦｏｋＩ変異と組み合わされたＺＦＮパートナー漸増の活性を測定するために分析を行った。Ｆｏｋ変異を含むＢＣＬ１１Ａに特異的なＺＦＮを上記に示した比で用いて、オフターゲット切断を減少させながらオンターゲット活性を保持した。実験をＣＤ３４＋細胞において行い、そこでは細胞を、ＺＦＮをコードするｍＲＮＡでトランスフェクトした。データを以下の表８に示す。「オン／オフ比」は、指示され試料についての、オンターゲットの組み合わされた全てのオフターゲット活性に対する比を示す。６．６μｇ／ｍＬのＳＢＳ＃５１８５７と６０μｇ／ｍＬのＳＢＳ＃５１９４９－Ｒ４１６ＳＦｏｋＩ変異体との組み合わせは、全ての５つの監視されたオフターゲット部位における活性を劇的に低下させながらオンターゲット活性の同様なレベルをもたらし（６０μｇの

両方の親ＺＦＮに対して８４．８５％対７８．１７％）、オンターゲット／オフターゲット比における３２倍の改善をもたらした（６０μｇ／ｍＬの各親ＺＦＮに対して８９．５２対２．７６）。

【０２２６】

【表１８】

表８：ＦｏｋＩ変異体及びＺＦＮパートナーの低下された漸増の組み合わせ：ＮＨＥＪ活性％

mRNA1	μg/mL	mRNA2	μg/mL	BCL11A	NIFMAEVG OT1	GJZEIYTO OT2	PEVYOHIU OT3	ZJCRPAXW OT4	TXHULGPN OT5	オン／オフ比
51857	60	51949	60	78.17	21.96	2.09	2.92	0.73	0.61	2.76
51857	60	51949 R416S	60	84.87	6.11	0.31	1.08	0.65	0.12	10.27
51857	60	51949 K448S	60	81.03	8.90	0.72	4.40	1.29	0.64	5.08
51857	60	51949 K525S	60	80.17	0.89	0.09	0.13	0.20	0.04	59.47
51857	6.6	51949	60	85.21	3.39	0.38	0.49	0.14	0.10	18.98
51857	6.6	51949 R416S	60	84.85	0.68	0.06	0.11	0.08	0.03	89.52
51857	6.6	51949 K448S	60	83.46	1.01	0.09	0.34	0.22	0.06	48.55
51857	6.6	51949 K525S	60	67.92	0.14	0.01	0.02	0.04	0.01	292.27

【０２２７】

以前に表１に列挙した全てのオフターゲット部位を、漸増及びＦｏｋＩ変異体アプローチを組み合わせることによって、オフターゲット活性に及ぼす効果について検討した（図１２を参照されたい）。

【０２２８】

データは、およそ３０倍のオフターゲット活性の総減少を示した。

【０２２９】

データを、切断後の上述した無作為のチャプチャーアッセイによって検出されたキャプチャー事象の数に関しても解析した。表６Ｄにおいて上述したＢＣＬ１１Ａに特異的な対、両方の親対（ＳＢＳ５１８５７／ＳＢＳ５１９４９）及び変異体対（ＳＢＳ６３０１４／ＳＢＳ６５７２１）を用いて、オフターゲットキャプチャー事象の数をアッセイした。この実験では、ＺＦＮを、ＣＤ３４＋細胞に対して等量で（６０μｇ／ｍＬの最終濃度）、または親対については６．６μｇ及び６０μｇの最終濃度で、変異体については２０μｇ及び６０μｇの最終濃度でのいずれかで与えた。

【０２３０】

結果が図１３示され、親及び変異体が、両方の濃度条件において堅牢な切断活性を示したが（８０％インデル超）、オフターゲットキャプチャー事象は、特に、等しくない用量で送達されるとき、変異体対について非常に低下したことを示す。ＺＦＮ　ＦｏｋＩ変異及び等しくない濃度のＺＦＮパートナーの組み合わせは、切断特性において３５０倍の増加をもたらした。

【０２３１】

実施例６：ＺＦＰ主鎖変異とＦｏｋＩリン酸接触変異との組み合わせ

我々は、実施例３に記載されたジンクフィンガー主鎖変異を、実施例２に記載されたＦｏｋＩリン酸接触変異と共に含むＺＦＮも生成した。この組み合わせを、ＣＤ３４+細胞中で、ＢＣＬ１１Ａに特異的なＺＦＮ対を２つの用量：６μｇまたは２μｇで用いて試験した。結果が以下の表９に提示され、これらの２つの種類のアプローチを組み合わせると、

オフターゲット活性の量に著しく影響を与えることができることを示している。この表では、主鎖変異は、モジュールごとの変異の種類として示されている（Ａ、Ｂ及び／またはＣ、図７を参照）。例えば、５１９４９ＬｅｕＡＢＣ　Ｒ４１６Ｓと標示された試料では、タンパク質は、フィンガー１（モジュールＡ）、フィンガー３（モジュールＢ）、及びフィンガー５（モジュールＣ）中にＲ－＞Ｌ主鎖置換を含み、Ｒ４１６Ｓ　ＦｏｋＩ変異をさらに保有した。いくつかの例では、完全なオンターゲット活性を保持しながら検出可能なオフターゲット活性を有さないＺＦＮ対が存在した。これらの例を、表９において四角で囲んでいる。

【０２３２】

【表１９】

表９：ＺＦＮ主鎖及びＦｏｋＩリン酸接触変異を含むＺＦＮについての活性（ＮＨＥＪ％）

		BCL11A		NIFMAEVG OT1		TXHULGPN OT5	
mRNA1	mRNA2	6 μg	2 μg	6 μg	2 μg	6 μg	2 μg
51857	51949	84.26	88.68	22.61	7.16	1.47	0.18
51857	51949 R416S	91.99	88.89	5.28	1.07	0.34	0.09
51857	51949 LeuABC	89.95	89.01	3.04	0.56	0.24	ND
51857	51949 LeuABC R416S	92.38	88.70	0.22	0.12	ND	ND
51857	51949 LeuABC K525S	89.01	79.28	ND	0.13	ND	ND
51857	51949 GlnABC	92.04	91.85	9.46	2.01	0.24	ND
51857	51949 GlnABC R416S	94.72	92.14	1.28	0.19	ND	ND
51857	51949 GlnABC K525S	91.08	85.91	0.55	ND	ND	ND
51857 LeuABC	51949 LeuABC	87.07	66.48	0.10	ND	0.06	ND
51857 LeuABC	51949 LeuABC R416S	83.69	69.00	ND	ND	ND	ND
51857 LeuABC	51949 LeuABC K525S	76.25	46.93	0.06	ND	ND	ND
51857 GlnABC	51949 GlnABC	92.98	88.05	0.87	ND	ND	ND
51857 GlnABC	51949 GlnABC R416S	95.01	93.44	0.16	ND	ND	ND
51857 GlnABC	51949 GlnABC K525S	90.79	82.38	ND	ND	ND	ND

ＮＤ：活性が検出されず

【０２３３】

実施例７：パートナー漸増、ＺＦＰ主鎖及びＦｏｋＩリン酸接触変異の組み合わせ

最適なパートナーの漸増を、ＺＦＰ主鎖変異及びＺＦＮ　ＦｏｋＩ変異を含むＺＦＮと組み合わせる場合の活性測定も行う。ＺＦＮを、上述したようにＣＤ３４＋細胞中で試験し、オフターゲット活性の減少レベルを通して、ＺＦＮ対の特異性の増加を示す。

【０２３４】

実施例８：臨床スケールにおけるＣＤ３４＋細胞中のＺＦＮの特異性

ＢＣＬ１１Ａ変異体対ＳＢＳ６３０１４／ＳＢＳ６５７２２の特異性を、臨床試験用に細胞物質を生成するのに好適である大規模な手順においても試験した。簡単に言うと、ロ

ット当たりおよそ９５００万～１億３０００万個のＣＤ３４＋細胞を、Ｍａｘｃｙｔｅデバイスを用いて、製造元の仕様書に従って導入した。８０μｇ／ＬのＳＢＳ６３０１４のｍＲＮＡ及び２０μｇ／ｍＬのＳＢＳ＃６５７２２のｍＲＮＡを使用し、細胞を、２日後に、無作為のキャプチャーアッセイを用いてオフターゲット切断についてアッセイした。

【０２３５】

それらの結果は、４７個の異なる可能性のあるキャプチャー遺伝子座をＰＣＲによって解析したとき（図１４を参照されたい）、７９．５４％インデルが見出された標的位置を除いては、有意な修飾は検出されなかった。このデータは、これらの本明細書に記載のヌクレアーゼが、大規模な製造手順において使用される場合でも、高度に特異的であることを実証している。

【０２３６】

実施例９：さらなる特異性試験

特異性試験を、上述したような様々な変異を有するＡＡＶＳ１標的化ＺＦＮを用いても行った。特に、米国特許公開第２０１５０１１０７６２号に記載されるようなＺＦＮ ＳＢＳ＃３００３５及びＳＢＳ＃３００５４を、二量体化変異体（例えば、ＥＬＤ、ＫＫＲ、及び追加の変異体）、他の変異（例えば、Ｓｈａｒｋｅｙ）ならびに上述したような活性アッセイにおけるリン酸接触変異体を含む様々な変異体の試験し使用した。

【０２３７】

以下の表の結果については、示されたＦｏｋＩ変異体（複数可）を、ＳＢＳ ３００３５のＥＬＤ ＦｏｋＩドメイン（ＥＬＤ＿Ｘと標示され、このＸはＦｏｋＩ変異である）、ＳＢＳ ３００５４のＫＫＲ ＦｏｋＩドメイン（ＫＫＲ＿Ｘと表示され、このＸは、ＦｏｋＩ変異である）のいずれかに導入し、もしくは両方の構築物のＦｏｋＩドメインに導入した（ＥＬＤ＿ＫＫＲ＿Ｘと表示され、このＸは、ＥＬＤ及びＫＫＲ ＦｏｋＩドメインの両方に導入された同じＦｏｋＩ変異である）。未修飾の「親構築物」３００３５及び３００５４の組み合わせについての結果は、「親」、「親（複数）」、「親ＺＦＮ」などと表示される。各親構築物のより低い用量は、しばしば「半分量」と表示される。ヌクレアーゼを含まない陰性対照は、通常、「ＧＦＰ」と表示される。所与の実験において測定されたオフターゲットの全てにおけるインデルの合計％で除算された、意図した遺伝子座（「ＡＡＶＳ１」と表示されることが多い）におけるインデル％の比は、しばしば、「比」、「オン／オフ比」などと表示される。

【０２３８】

ＡＡＶＳ１標的及びオフターゲットの位置を以下に示しており、ここでは「ｈｇ３８」は、ＵＣＳＣゲノムブラウザデータベース、バージョンｈｇ３８に従って組み立てられたゲノムデータを意味する。

【０２３９】

【表２０】

遺伝子座	hg38 座標	
AAVS1	chr19	55115767
OT1	chr3	184229822
OT2	chr1	198172185
OT3	chr3	50189772
OT4	chr20	35020706
OT5	chr1	181141477

【０２４０】

表１０Ａ～１０Ｃは、２つの異なる実験の、オンターゲット（ＡＡＶＳ１）及び３つのオフターゲット（ＯＴ１、ＯＴ２、ＯＴ３）からの切断結果、ならびにＲ４１６またはＫ５２５における追加の置換変異（野生型についての全てのアミノ酸）を有する二量体化変

異体ＥＬＤ、ＫＫＲ、及びＥＬＤ－ＫＫＲのオンターゲットのオフターゲットに対する比を示す。ＥＬＤ＿Ｓ４１８Ｄ、ＥＬＤ＿Ｎ４７６Ｄ、ＥＬＤ＿Ｉ４７９Ｔ、ＥＬＤ＿Ｑ４８１Ｅ、ＥＬＤ＿Ｎ５２７Ｄ、及びＥＬＤ＿Ｑ５３１Ｒ変異体による結果も示している。

【０２４１】

【表２１】

表１０Ａ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	57.77	9.73	1.31	1.67	1.20	4.15
親	55.40	9.06	1.27	1.38	0.98	4.37
親	60.63	11.83	1.81	1.87	1.39	3.59
親	55.39	13.05	2.15	2.26	2.05	2.84
半分量	34.13	2.50	0.23	0.31	0.12	10.81
半分量	36.73	2.67	0.19	0.41	0.23	10.49
半分量	42.08	3.72	0.32	0.51	0.30	8.67
半分量	40.22	3.17	0.47	0.57	0.32	8.87
ELD_R416A	59.22	1.32	0.80	0.70	0.22	19.46
ELD_R416C	61.50	2.50	1.31	1.08	0.27	11.93
ELD_R416D	52.20	0.12	0.61	0.16	0.02	57.66
ELD_R416E	76.17	0.49	1.83	0.24	0.05	29.04
ELD_R416F	75.24	3.87	2.09	1.24	0.24	10.12
ELD_R416G	48.30	0.66	0.90	0.71	0.15	19.98
ELD_R416H	82.77	6.04	4.48	1.81	0.31	6.55
ELD_R416I	28.47	3.86	0.68	0.71	0.50	4.94
ELD_R416K	18.07	0.92	0.33	0.37	0.15	10.14
ELD_R416L	51.90	4.62	1.46	1.22	0.51	6.65
ELD_R416M	60.27	2.91	1.09	0.99	0.29	11.43
ELD_R416N	74.77	0.83	1.12	0.59	0.11	28.19
ELD_R416P	2.10	0.08	0.03	0.02	0.06	10.70
ELD_R416Q	76.84	3.23	3.09	1.30	0.25	9.76
ELD_R416S	58.67	0.61	0.85	0.72	0.06	26.28
ELD_R416T	49.52	1.82	0.93	0.81	0.15	13.37
ELD_R416V	47.52	7.94	1.70	1.36	0.94	3.98
ELD_R416W	54.95	2.33	1.09	1.02	0.36	11.44
ELD_R416Y	81.38	20.16	7.28	3.53	1.44	2.51
ELD_K525A	63.30	0.30	0.12	0.14	0.11	94.56
ELD_K525C	74.28	2.89	0.48	0.80	0.51	15.90
ELD_K525D	41.76	0.11	0.04	0.03	0.07	163.80
ELD_K525E	64.31	0.07	0.08	0.10	0.10	188.65
ELD_K525F	23.10	1.13	0.04	0.18	0.35	13.67
ELD_K525G	54.21	0.34	0.25	0.21	0.08	61.86
ELD_K525H	41.07	0.79	0.17	0.24	0.28	27.65
ELD_K525I	68.23	2.29	0.28	0.47	0.61	18.71
ELD_K525L	27.08	0.48	0.09	0.21	0.20	27.89
ELD_K525M	32.75	0.25	0.08	0.13	0.10	58.51
ELD_K525N	41.84	0.56	0.14	0.30	0.21	34.59
ELD_K525P	8.45	0.02	0.03	0.02	0.03	92.43
ELD_K525Q	47.10	0.48	0.31	0.34	0.11	38.14
ELD_K525R	51.08	10.86	1.17	1.35	1.93	3.34

【０２４２】

【表２２】

ELD_K525S	65.83	0.53	0.22	0.23	0.15	58.28
ELD_K525T	74.60	2.75	0.48	0.94	0.44	16.19
ELD_K525V	72.57	2.82	0.36	0.58	0.40	17.40
ELD_K525W	18.26	0.88	0.06	0.11	0.34	13.16
ELD_K525Y	37.75	2.21	0.14	0.21	0.82	11.17
ELD_S418D	57.94	0.33	0.11	0.21	0.09	77.35
ELD_N476D	70.96	0.10	0.06	0.04	0.03	304.50
ELD_I479T	60.88	0.10	0.11	0.04	0.07	196.27
ELD_Q481E	68.89	0.16	0.07	0.12	0.08	162.31
ELD_N527D	48.34	0.64	0.13	0.29	0.07	42.42
ELD_Q531R	54.06	0.97	0.12	0.13	0.09	41.65
GFP	0.00	0.01	0.02	0.03	0.03	NA
GFP	0.00	0.04	0.01	0.03	0.02	NA
親	1.01	0.89	0.80	0.93	0.85	1.11
親	0.97	0.83	0.78	0.77	0.70	1.17
親	1.06	1.08	1.11	1.04	0.99	0.96
親	0.97	1.20	1.32	1.26	1.46	0.76
半分量	0.60	0.23	0.14	0.17	0.08	2.89
半分量	0.64	0.24	0.12	0.23	0.16	2.81
半分量	0.73	0.34	0.20	0.28	0.21	2.32
半分量	0.70	0.29	0.29	0.32	0.23	2.37
ELD_R416A	1.03	0.12	0.49	0.39	0.15	5.21
ELD_R416C	1.07	0.23	0.80	0.60	0.19	3.19
ELD_R416D	0.91	0.01	0.37	0.09	0.02	15.43
ELD_R416E	1.33	0.05	1.12	0.13	0.04	7.77
ELD_R416F	1.31	0.35	1.28	0.69	0.17	2.71
ELD_R416G	0.84	0.06	0.55	0.39	0.11	5.35
ELD_R416H	1.44	0.55	2.74	1.01	0.22	1.75
ELD_R416I	0.50	0.35	0.42	0.40	0.36	1.32
ELD_R416K	0.32	0.08	0.20	0.21	0.11	2.71
ELD_R416L	0.91	0.42	0.89	0.68	0.36	1.78
ELD_R416M	1.05	0.27	0.67	0.55	0.20	3.06
ELD_R416N	1.30	0.08	0.69	0.33	0.08	7.54
ELD_R416P	0.04	0.01	0.02	0.01	0.04	2.86
ELD_R416Q	1.34	0.30	1.89	0.73	0.18	2.61
ELD_R416S	1.02	0.06	0.52	0.40	0.04	7.03
ELD_R416T	0.86	0.17	0.57	0.45	0.11	3.58
ELD_R416V	0.83	0.73	1.04	0.76	0.67	1.06
ELD_R416W	0.96	0.21	0.67	0.57	0.25	3.06
ELD_R416Y	1.42	1.85	4.46	1.96	1.02	0.67
ELD_K525A	1.10	0.03	0.08	0.08	0.08	25.30
ELD_K525C	1.30	0.26	0.29	0.45	0.36	4.26
ELD_K525D	0.73	0.01	0.02	0.02	0.05	43.83
ELD_K525E	1.12	0.01	0.05	0.05	0.07	50.48

【０２４３】

【表２３】

ELD_K525F	0.40	0.10	0.03	0.10	0.25	3.66
ELD_K525G	0.95	0.03	0.15	0.12	0.05	16.55
ELD_K525H	0.72	0.07	0.11	0.13	0.20	7.40
ELD_K525I	1.19	0.21	0.17	0.26	0.43	5.01
ELD_K525L	0.47	0.04	0.06	0.12	0.14	7.46
ELD_K525M	0.57	0.02	0.05	0.07	0.07	15.66
ELD_K525N	0.73	0.05	0.09	0.17	0.15	9.26
ELD_K525P	0.15	0.00	0.02	0.01	0.02	24.73
ELD_K525Q	0.82	0.04	0.19	0.19	0.08	10.20
ELD_K525R	0.89	0.99	0.72	0.75	1.37	0.89
ELD_K525S	1.15	0.05	0.13	0.13	0.11	15.60
ELD_K525T	1.30	0.25	0.29	0.53	0.31	4.33
ELD_K525V	1.27	0.26	0.22	0.33	0.29	4.66
ELD_K525W	0.32	0.08	0.04	0.06	0.24	3.52
ELD_K525Y	0.66	0.20	0.08	0.11	0.59	2.99
ELD_S418D	1.01	0.03	0.07	0.12	0.06	20.70
ELD_N476D	1.24	0.01	0.04	0.02	0.02	81.48
ELD_I479T	1.06	0.01	0.07	0.02	0.05	52.52
ELD_Q481E	1.20	0.01	0.04	0.06	0.06	43.43
ELD_N527D	0.84	0.06	0.08	0.16	0.05	11.35
ELD_Q531R	0.94	0.09	0.07	0.07	0.06	11.15
GFP	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	ND
GFP	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	ND

【０２４４】

【表２４】

表１０Ｂ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	57.77	9.73	1.31	1.67	1.20	4.15
親	55.40	9.06	1.27	1.38	0.98	4.37
親	60.63	11.83	1.81	1.87	1.39	3.59
親	55.39	13.05	2.15	2.26	2.05	2.84
半分量	34.13	2.50	0.23	0.31	0.12	10.81
半分量	36.73	2.67	0.19	0.41	0.23	10.49
半分量	42.08	3.72	0.32	0.51	0.30	8.67
半分量	40.22	3.17	0.47	0.57	0.32	8.87
KKR_R416A	54.27	3.73	0.13	0.25	0.57	11.60
KKR_R416C	54.00	5.09	0.35	0.41	0.94	7.95
KKR_R416D	44.62	0.27	0.05	0.04	0.12	90.35
KKR_R416E	68.27	1.58	0.03	0.16	0.62	28.47
KKR_R416F	63.29	3.94	0.33	0.38	1.09	11.04
KKR_R416G	48.98	2.04	0.12	0.24	0.55	16.60
KKR_R416H	73.76	9.86	0.52	0.91	2.96	5.18
KKR_R416I	23.42	2.91	0.38	0.61	0.44	5.39
KKR_R416K	25.56	1.96	0.31	0.64	0.30	7.98
KKR_R416L	46.72	6.32	0.47	0.78	0.87	5.53
KKR_R416M	53.48	5.09	0.45	0.64	0.93	7.52
KKR_R416N	69.54	2.49	0.07	0.24	0.75	19.57
KKR_R416P	1.75	0.05	0.02	0.02	0.06	11.88
KKR_R416Q	69.01	6.21	0.13	0.44	2.08	7.79
KKR_R416S	61.68	4.36	0.27	0.32	0.94	10.47
KKR_R416T	55.82	6.64	0.31	0.72	1.18	6.31
KKR_R416V	40.09	4.97	0.79	1.04	0.99	5.15
KKR_R416W	41.18	3.67	0.32	0.40	0.49	8.44
KKR_R416Y	72.44	20.12	1.70	2.41	3.83	2.58
KKR_K525A	61.16	0.92	0.09	0.13	0.21	45.07
KKR_K525C	62.86	3.74	0.13	0.31	0.37	13.80
KKR_K525D	36.17	0.14	0.00	0.03	0.04	168.94
KKR_K525E	52.52	0.24	0.02	0.06	0.07	133.17
KKR_K525F	25.30	0.74	0.58	0.34	0.16	13.86
KKR_K525G	52.93	1.09	0.04	0.13	0.34	33.16
KKR_K525H	41.28	2.61	0.29	0.34	0.24	11.88
KKR_K525I	57.29	2.40	0.16	0.28	0.24	18.57
KKR_K525L	30.26	0.79	0.06	0.15	0.07	28.15
KKR_K525M	46.57	1.29	0.15	0.17	0.19	26.01
KKR_K525N	44.68	1.61	0.15	0.25	0.27	19.51
KKR_K525P	2.44	0.04	0.02	0.01	0.03	25.01
KKR_K525Q	52.58	1.55	0.09	0.12	0.26	25.97
KKR_K525R	52.25	9.51	2.04	1.57	1.18	3.65

【０２４５】

【表２５】

KKR_K525S	63.23	1.06	0.10	0.12	0.33	39.16
KKR_K525T	66.66	5.06	0.24	0.32	0.45	10.97
KKR_K525V	58.68	2.62	0.18	0.18	0.18	18.57
KKR_K525W	17.81	0.52	0.09	0.21	0.05	20.68
KKR_K525Y	35.10	1.42	0.70	0.41	0.15	13.09
KKR_S418D	73.70	1.47	0.19	0.23	0.34	32.91
KKR_N476D	36.23	0.05	0.03	0.06	0.02	230.91
KKR_I479T	67.02	0.76	0.14	0.64	0.12	40.47
KKR_Q481E	66.20	0.25	0.04	0.04	0.03	183.51
KKR_N527D	54.55	1.95	0.37	0.57	0.26	17.27
KKR_Q531R	54.73	2.17	0.78	0.80	0.24	13.73
GFP	0.00	0.01	0.02	0.03	0.03	NA
GFP	0.00	0.04	0.01	0.03	0.02	NA
親	1.01	0.89	0.80	0.93	0.85	1.11
親	0.97	0.83	0.78	0.77	0.70	1.17
親	1.06	1.08	1.11	1.04	0.99	0.96
親	0.97	1.20	1.32	1.26	1.46	0.76
半分量	0.60	0.23	0.14	0.17	0.08	2.89
半分量	0.64	0.24	0.12	0.23	0.16	2.81
半分量	0.73	0.34	0.20	0.28	0.21	2.32
半分量	0.70	0.29	0.29	0.32	0.23	2.37
KKR_R416A	0.95	0.34	0.08	0.14	0.40	3.10
KKR_R416C	0.94	0.47	0.21	0.23	0.67	2.13
KKR_R416D	0.78	0.03	0.03	0.02	0.09	24.18
KKR_R416E	1.19	0.14	0.02	0.09	0.44	7.62
KKR_R416F	1.10	0.36	0.20	0.21	0.78	2.95
KKR_R416G	0.85	0.19	0.07	0.14	0.39	4.44
KKR_R416H	1.29	0.90	0.32	0.51	2.11	1.38
KKR_R416I	0.41	0.27	0.23	0.34	0.31	1.44
KKR_R416K	0.45	0.18	0.19	0.36	0.21	2.13
KKR_R416L	0.82	0.58	0.29	0.44	0.62	1.48
KKR_R416M	0.93	0.47	0.28	0.36	0.66	2.01
KKR_R416N	1.21	0.23	0.04	0.14	0.54	5.24
KKR_R416P	0.03	0.00	0.01	0.01	0.04	3.18
KKR_R416Q	1.20	0.57	0.08	0.24	1.48	2.08
KKR_R416S	1.08	0.40	0.16	0.18	0.67	2.80
KKR_R416T	0.97	0.61	0.19	0.40	0.84	1.69
KKR_R416V	0.70	0.46	0.48	0.58	0.70	1.38
KKR_R416W	0.72	0.34	0.19	0.22	0.35	2.26
KKR_R416Y	1.26	1.84	1.04	1.34	2.73	0.69
KKR_K525A	1.07	0.08	0.06	0.07	0.15	12.06
KKR_K525C	1.10	0.34	0.08	0.17	0.26	3.69
KKR_K525D	0.63	0.01	0.00	0.02	0.03	45.21
KKR_K525E	0.92	0.02	0.01	0.03	0.05	35.63

【０２４６】

【表２６】

KKR_K525F	0.44	0.07	0.36	0.19	0.11	3.71
KKR_K525G	0.92	0.10	0.03	0.07	0.24	8.87
KKR_K525H	0.72	0.24	0.18	0.19	0.17	3.18
KKR_K525I	1.00	0.22	0.10	0.16	0.17	4.97
KKR_K525L	0.53	0.07	0.04	0.08	0.05	7.53
KKR_K525M	0.81	0.12	0.09	0.10	0.13	6.96
KKR_K525N	0.78	0.15	0.09	0.14	0.20	5.22
KKR_K525P	0.04	0.00	0.01	0.01	0.02	6.69
KKR_K525Q	0.92	0.14	0.06	0.07	0.18	6.95
KKR_K525R	0.91	0.87	1.25	0.87	0.84	0.98
KKR_K525S	1.10	0.10	0.06	0.07	0.24	10.48
KKR_K525T	1.16	0.46	0.15	0.18	0.32	2.94
KKR_K525V	1.02	0.24	0.11	0.10	0.13	4.97
KKR_K525W	0.31	0.05	0.05	0.12	0.03	5.53
KKR_K525Y	0.61	0.13	0.43	0.23	0.11	3.50
KKR_S418D	1.29	0.13	0.12	0.13	0.25	8.81
KKR_N476D	0.63	0.00	0.02	0.03	0.01	61.79
KKR_I479T	1.17	0.07	0.09	0.36	0.08	10.83
KKR_Q481E	1.16	0.02	0.02	0.02	0.02	49.10
KKR_N527D	0.95	0.18	0.23	0.32	0.19	4.62
KKR_Q531R	0.96	0.20	0.48	0.44	0.17	3.68
GFP	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	ND
GFP	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	ND

【０２４７】

【表２７】

表１０Ｃ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	57.77	9.73	1.31	1.67	1.20	4.15
親	55.40	9.06	1.27	1.38	0.98	4.37
親	60.63	11.83	1.81	1.87	1.39	3.59
親	55.39	13.05	2.15	2.26	2.05	2.84
半分量	34.13	2.50	0.23	0.31	0.12	10.81
半分量	36.73	2.67	0.19	0.41	0.23	10.49
半分量	42.08	3.72	0.32	0.51	0.30	8.67
半分量	40.22	3.17	0.47	0.57	0.32	8.87
ELD_KKR_R416A	67.11	1.14	0.16	0.37	0.12	37.44
ELD_KKR_R416C	68.42	2.75	0.34	0.72	0.29	16.66
ELD_KKR_R416D	70.61	0.04	0.04	0.05	0.03	457.42
ELD_KKR_R416E	91.13	0.41	0.11	0.19	0.07	116.98
ELD_KKR_R416F	87.13	2.62	0.57	0.81	0.38	19.92
ELD_KKR_R416G	47.93	0.47	0.08	0.17	0.12	57.10
ELD_KKR_R416H	94.25	18.51	3.09	3.36	2.33	3.45
ELD_KKR_R416I	13.03	1.02	0.30	0.33	0.23	6.95
ELD_KKR_R416K	11.52	0.91	0.12	0.23	0.11	8.39
ELD_KKR_R416L	44.91	3.13	0.50	0.74	0.48	9.26
ELD_KKR_R416M	69.25	3.99	0.47	0.85	0.47	11.98
ELD_KKR_R416N	89.31	0.55	0.16	0.35	0.12	76.30
ELD_KKR_R416P	0.11	0.01	0.01	0.01	0.03	1.86
ELD_KKR_R416Q	88.16	7.54	1.10	1.66	0.73	7.99
ELD_KKR_R416S	71.87	0.61	0.22	0.28	0.13	58.20
ELD_KKR_R416T	62.11	3.51	0.50	0.99	0.43	11.45
ELD_KKR_R416V	34.90	4.49	1.08	1.14	0.86	4.62
ELD_KKR_R416W	39.15	1.20	0.21	0.36	0.16	20.34
ELD_KKR_R416Y	85.93	62.16	24.08	16.89	17.97	0.71
ELD_KKR_K525A	73.85	0.07	0.01	0.04	0.03	493.98
ELD_KKR_K525C	82.14	0.55	0.12	0.12	0.19	83.07
ELD_KKR_K525D	5.01	0.02	0.01	0.02	0.04	56.71
ELD_KKR_K525E	23.62	0.02	0.01	0.03	0.02	288.19
ELD_KKR_K525F	12.65	0.28	0.07	0.08	0.04	27.09
ELD_KKR_K525G	56.50	0.07	0.04	0.04	0.02	358.56
ELD_kkR_K525H	36.28	0.27	0.04	0.06	0.07	81.26
ELD_KKR_K525I	80.42	0.51	0.04	0.13	0.12	100.52
ELD_KKR_K525L	14.33	0.02	0.01	0.04	0.04	119.70
ELD_KKR_K525M	27.60	0.09	0.02	0.04	0.03	157.04
ELD_KKR_K525N	36.50	0.23	0.04	0.05	0.04	102.77
ELD_KKR_K525P	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.11
ELD_KKR_K525Q	41.98	0.10	0.03	0.07	0.04	169.31
ELD_KKR_K525R	53.62	14.69	2.18	1.97	2.52	2.51

【０２４８】

【表２８】

ELD_KKR_K525S	77.66	0.11	0.02	0.06	0.05	316.50
ELD_KKR_K525T	84.74	0.68	0.07	0.21	0.21	72.27
ELD_KKR_K525V	83.33	0.48	0.04	0.06	0.09	122.99
ELD_KKR_K525W	8.64	0.10	0.02	0.03	0.05	44.17
ELD_KKR_K525Y	25.83	0.83	0.07	0.11	0.11	23.03
ELD_KKR_S418D	53.46	0.07	0.01	0.01	0.03	442.19
ELD_KKR_N476D	6.29	0.02	0.01	0.02	0.03	77.38
ELD_KKR_I479T	52.47	0.02	0.01	0.02	0.03	730.00
ELD_KKR_Q481E	69.91	0.03	0.02	0.02	0.02	784.97
ELD_KKR_N527D	36.03	0.07	0.02	0.04	0.02	235.36
ELD_KKR_Q531R	63.71	0.91	0.08	0.29	0.08	46.84
GFP	0.00	0.01	0.02	0.03	0.03	NA
GFP	0.00	0.04	0.01	0.03	0.02	NA

親	1.01	0.89	0.80	0.93	0.85	1.11
親	0.97	0.83	0.78	0.77	0.70	1.17
親	1.06	1.08	1.11	1.04	0.99	0.96
親	0.97	1.20	1.32	1.26	1.46	0.76
半分量	0.60	0.23	0.14	0.17	0.08	2.89
半分量	0.64	0.24	0.12	0.23	0.16	2.81
半分量	0.73	0.34	0.20	0.28	0.21	2.32
半分量	0.70	0.29	0.29	0.32	0.23	2.37
ELD_KKR_R416A	1.17	0.10	0.10	0.21	0.08	10.02
ELD_KKR_R416C	1.19	0.25	0.21	0.40	0.21	4.46
ELD_KKR_R416D	1.23	0.00	0.02	0.03	0.02	122.40
ELD_KKR_R416E	1.59	0.04	0.07	0.10	0.05	31.30
ELD_KKR_R416F	1.52	0.24	0.35	0.45	0.27	5.33
ELD_KKR_R416G	0.84	0.04	0.05	0.10	0.08	15.28
ELD_KKR_R416H	1.64	1.70	1.89	1.87	1.66	0.92
ELD_KKR_R416I	0.23	0.09	0.18	0.18	0.16	1.86
ELD_KKR_R416K	0.20	0.08	0.08	0.13	0.08	2.25
ELD_KKR_R416L	0.78	0.29	0.31	0.41	0.34	2.48
ELD_KKR_R416M	1.21	0.37	0.29	0.48	0.34	3.20
ELD_KKR_R416N	1.56	0.05	0.10	0.19	0.08	20.42
ELD_KKR_R416P	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.50
ELD_KKR_R416Q	1.54	0.69	0.67	0.93	0.52	2.14
ELD_KKR_R416S	1.25	0.06	0.14	0.16	0.09	15.57
ELD_KKR_R416T	1.08	0.32	0.31	0.55	0.30	3.06
ELD_KKR_R416V	0.61	0.41	0.66	0.63	0.61	1.24
ELD_KKR_R416W	0.68	0.11	0.13	0.20	0.11	5.44
ELD_KKR_R416Y	1.50	5.69	14.74	9.41	12.79	0.19
ELD_KKR_K525A	1.29	0.01	0.00	0.02	0.02	132.18
ELD_KKR_K525C	1.43	0.05	0.08	0.07	0.14	22.23
ELD_KKR_K525D	0.09	0.00	0.01	0.01	0.03	15.18
ELD_KKR_K525E	0.41	0.00	0.00	0.02	0.02	77.12

【０２４９】

【表２９】

ELD_KKR_K525F	0.22	0.03	0.04	0.05	0.03	7.25
ELD_KKR_K525G	0.99	0.01	0.02	0.02	0.01	95.95
ELD_kkR_K525H	0.63	0.03	0.03	0.03	0.05	21.74
ELD_KKR_K525I	1.40	0.05	0.03	0.07	0.08	26.90
ELD_KKR_K525L	0.25	0.00	0.01	0.02	0.03	32.03
ELD_KKR_K525M	0.48	0.01	0.01	0.02	0.02	42.02
ELD_KKR_K525N	0.64	0.02	0.02	0.03	0.03	27.50
ELD_KKR_K525P	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.03
ELD_KKR_K525Q	0.73	0.01	0.02	0.04	0.03	45.31
ELD_KKR_K525R	0.94	1.35	1.33	1.10	1.80	0.67
ELD_KKR_K525S	1.36	0.01	0.01	0.03	0.04	84.69
ELD_KKR_K525T	1.48	0.06	0.04	0.12	0.15	19.34
ELD_KKR_K525V	1.45	0.04	0.03	0.04	0.07	32.91
ELD_KKR_K525W	0.15	0.01	0.01	0.02	0.03	11.82
ELD_KKR_K525Y	0.45	0.08	0.04	0.06	0.08	6.16
ELD_KKR_S418D	0.93	0.01	0.01	0.01	0.02	118.32
ELD_KKR_N476D	0.11	0.00	0.01	0.01	0.02	20.71
ELD_KKR_I479T	0.92	0.00	0.01	0.01	0.02	195.34
ELD_KKR_Q481E	1.22	0.00	0.01	0.01	0.02	210.05
ELD_KKR_N527D	0.63	0.01	0.01	0.02	0.01	62.98
ELD_KKR_Q531R	1.11	0.08	0.05	0.16	0.06	12.53
GFP	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	ND
GFP	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	ND

【０２５０】

表１１Ａ～１１Ｃは、２つの異なる実験のオンターゲット（ＡＡＶＳ１）及び３つのオフターゲット（ＯＴ１、ＯＴ２、ＯＴ３）からの切断結果、ならびに二量体化変異体ＥＬＤ及び／またはＫＫＲと組み合わせて、４１８、４２２、及び５２５における置換変異体を含む示された変異体のオンターゲットのオフターゲットに対する比を示す。

【０２５１】

【表３０】

表１１Ａ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	63.63	15.40	3.50	3.29	3.11	2.52
親	63.10	18.77	3.50	3.63	3.01	2.18
親	60.00	11.17	2.50	2.92	2.79	3.10
親	56.67	13.75	2.05	2.62	2.28	2.74
半分量	43.53	6.13	0.58	0.98	0.58	5.26
半分量	45.07	6.62	0.81	0.77	0.67	5.08
半分量	36.53	3.47	0.31	0.48	0.30	8.01
半分量	34.68	3.72	0.28	0.68	0.43	6.80
ELD_S418A	64.85	6.75	4.13	3.56	1.13	4.16
ELD_S418C	48.50	6.15	2.17	3.19	1.45	3.74
ELD_S418D	63.65	1.90	1.07	0.93	0.51	14.47
ELD_S418E	80.24	0.52	0.20	0.31	0.16	67.61
ELD_S418F	18.36	6.25	0.52	0.77	0.25	2.35
ELD_S418G	41.80	17.17	1.22	1.15	4.53	1.74
ELD_S418H	52.02	6.20	3.38	3.05	0.97	3.82
ELD_S418I	18.67	0.11	0.18	0.14	0.03	40.45
ELD_S418K	47.05	2.90	4.22	3.37	1.19	4.03
ELD_S418L	11.43	0.23	0.16	0.42	0.05	13.30
ELD_S418M	24.02	0.64	0.50	0.67	0.13	12.39
ELD_S418N	51.08	6.04	3.49	2.41	0.62	4.07
ELD_S418P	85.88	25.87	11.22	5.63	3.90	1.84
ELD_S418Q	49.25	1.33	1.93	1.38	0.21	10.18
ELD_S418R	43.75	3.65	6.46	3.11	0.68	3.15
ELD_S418T	41.87	0.63	0.58	0.56	0.08	22.56
ELD_S418V	32.95	0.21	0.34	0.27	0.04	38.58
ELD_S418W	19.69	1.28	1.00	0.88	0.15	5.95
ELD_S418Y	21.45	1.68	0.57	0.72	0.34	6.47
ELD_R422A	4.83	0.09	0.07	0.09	0.04	16.58
ELD_R422C	29.95	1.75	0.47	0.84	0.31	8.89
ELD_R422D	40.01	0.84	0.50	0.40	0.07	22.15
ELD_R422E	45.73	0.85	0.32	0.38	0.07	28.14
ELD_R422F	39.31	3.33	1.22	2.37	0.62	5.22
ELD_R422G	41.33	1.35	0.43	0.92	0.18	14.32
ELD_R422H	62.83	5.04	1.65	2.12	0.40	6.83
ELD_R422I	35.81	3.13	0.31	1.37	0.43	6.83
ELD_R422K	72.35	21.16	8.36	4.17	2.86	1.98
ELD_R422L	53.80	10.24	0.63	2.14	1.15	3.80
ELD_R422M	40.21	5.14	0.67	1.71	1.00	4.71
ELD_R422N	39.71	2.03	0.80	1.24	0.20	9.30
ELD_R422P	15.62	0.13	0.12	0.11	0.05	37.48
ELD_R422Q	56.20	8.88	0.84	2.12	0.73	4.47

【０２５２】

【表３１】

ELD_R422S	43.70	2.29	0.87	1.55	0.30	8.72
ELD_R422T	50.86	4.10	0.76	1.53	0.31	7.59
ELD_R422V	44.61	4.71	0.43	1.50	0.55	6.21
ELD_R422W	31.71	1.43	1.03	1.61	0.25	7.34
ELD_R422Y	53.71	4.91	2.23	3.44	0.74	4.75
ELD_S418D	63.93	0.40	0.26	0.47	0.15	49.93
ELD_N476D	77.78	0.09	0.06	0.05	0.13	234.74
ELD_I479T	60.14	0.13	0.08	0.02	0.05	219.23
ELD_Q481E	74.06	0.15	0.08	0.22	0.05	149.62
ELD_N527D	50.14	1.36	0.12	0.65	0.11	22.37
ELD_Q531R	64.05	2.11	0.31	0.40	0.18	21.40
ELD_R416D	49.54	0.16	0.42	0.20	0.14	54.16
ELD_R416E	72.49	0.55	1.40	0.29	0.11	30.73
ELD_R416N	72.79	1.18	1.65	1.20	0.16	17.38
ELD_R416S	52.96	1.24	0.96	0.90	0.27	15.67
ELD_K525A	67.68	0.40	0.37	0.32	0.12	55.85
ELD_K525E	55.90	0.08	0.07	0.04	0.14	170.65
ELD_K525G	54.53	0.44	0.21	0.20	0.18	52.62
ELD_K525S	69.63	0.68	0.42	0.44	0.22	39.85
ELD_Q481A	71.88	0.19	0.09	0.13	0.13	132.21
ELD_Q481C	72.36	0.19	0.19	0.43	0.36	61.88
ELD_Q481D	89.61	2.43	0.21	3.17	0.76	13.64
ELD_Q481S	59.95	0.08	0.05	0.16	0.07	168.18
gfp	0.01	0.02	0.00	0.02	0.09	NA
gfp	0.01	0.01	0.01	0.00	0.12	NA

親	1.05	1.04	1.21	1.06	1.11	0.96
親	1.04	1.27	1.21	1.17	1.08	0.83
親	0.99	0.76	0.87	0.94	1.00	1.18
親	0.93	0.93	0.71	0.84	0.81	1.04
半分量	0.72	0.42	0.20	0.32	0.21	2.00
半分量	0.74	0.45	0.28	0.25	0.24	1.93
半分量	0.60	0.23	0.11	0.16	0.11	3.04
半分量	0.57	0.25	0.10	0.22	0.15	2.58
ELD_S418A	1.07	0.46	1.43	1.14	0.41	1.58
ELD_S418C	0.80	0.42	0.75	1.02	0.52	1.42
ELD_S418D	1.05	0.13	0.37	0.30	0.18	5.49
ELD_S418E	1.32	0.03	0.07	0.10	0.06	25.68
ELD_S418F	0.30	0.42	0.18	0.25	0.09	0.89
ELD_S418G	0.69	1.16	0.42	0.37	1.62	0.66
ELD_S418H	0.85	0.42	1.17	0.98	0.35	1.45
ELD_S418I	0.31	0.01	0.06	0.04	0.01	15.36
ELD_S418K	0.77	0.20	1.46	1.08	0.43	1.53
ELD_S418L	0.19	0.02	0.06	0.14	0.02	5.05

【０２５３】

【表３２】

ELD_S418M	0.39	0.04	0.17	0.22	0.05	4.71
ELD_S418N	0.84	0.41	1.21	0.77	0.22	1.54
ELD_S418P	1.41	1.75	3.88	1.81	1.39	0.70
ELD_S418Q	0.81	0.09	0.67	0.44	0.07	3.87
ELD_S418R	0.72	0.25	2.24	1.00	0.24	1.19
ELD_S418T	0.69	0.04	0.20	0.18	0.03	8.57
ELD_S418V	0.54	0.01	0.12	0.09	0.01	14.65
ELD_S418W	0.32	0.09	0.35	0.28	0.05	2.26
ELD_S418Y	0.35	0.11	0.20	0.23	0.12	2.46
ELD_R422A	0.08	0.01	0.02	0.03	0.01	6.30
ELD_R422C	0.49	0.12	0.16	0.27	0.11	3.37
ELD_R422D	0.66	0.06	0.17	0.13	0.02	8.41
ELD_R422E	0.75	0.06	0.11	0.12	0.03	10.69
ELD_R422F	0.65	0.23	0.42	0.76	0.22	1.98
ELD_R422G	0.68	0.09	0.15	0.30	0.07	5.44
ELD_R422H	1.03	0.34	0.57	0.68	0.14	2.59
ELD_R422I	0.59	0.21	0.11	0.44	0.15	2.59
ELD_R422K	1.19	1.43	2.89	1.34	1.02	0.75
ELD_R422L	0.88	0.69	0.22	0.69	0.41	1.44
ELD_R422M	0.66	0.35	0.23	0.55	0.36	1.79
ELD_R422N	0.65	0.14	0.28	0.40	0.07	3.53
ELD_R422P	0.26	0.01	0.04	0.04	0.02	14.24
ELD_R422Q	0.92	0.60	0.29	0.68	0.26	1.70
ELD_R422S	0.72	0.16	0.30	0.50	0.11	3.31
ELD_R422T	0.84	0.28	0.26	0.49	0.11	2.88
ELD_R422V	0.73	0.32	0.15	0.48	0.20	2.36
ELD_R422W	0.52	0.10	0.36	0.52	0.09	2.79
ELD_R422Y	0.88	0.33	0.77	1.10	0.26	1.80
ELD_S418D	1.05	0.03	0.09	0.15	0.06	18.96
ELD_N476D	1.28	0.01	0.02	0.02	0.05	89.15
ELD_I479T	0.99	0.01	0.03	0.01	0.02	83.26
ELD_Q481E	1.22	0.01	0.03	0.07	0.02	56.82
ELD_N527D	0.82	0.09	0.04	0.21	0.04	8.50
ELD_Q531R	1.05	0.14	0.11	0.13	0.07	8.13
ELD_R416D	0.81	0.01	0.15	0.06	0.05	20.57
ELD_R416E	1.19	0.04	0.48	0.09	0.04	11.67
ELD_R416N	1.20	0.08	0.57	0.38	0.06	6.60
ELD_R416S	0.87	0.08	0.33	0.29	0.10	5.95
ELD_K525A	1.11	0.03	0.13	0.10	0.04	21.21
ELD_K525E	0.92	0.01	0.02	0.01	0.05	64.81
ELD_K525G	0.90	0.03	0.07	0.06	0.07	19.99
ELD_K525S	1.14	0.05	0.14	0.14	0.08	15.13
ELD_Q481A	1.18	0.01	0.03	0.04	0.05	50.21
ELD_Q481C	1.19	0.01	0.07	0.14	0.13	23.50
ELD_Q481D	1.47	0.16	0.07	1.02	0.27	5.18

【０２５４】

【表３３】

ELD_Q481S	0.99	0.01	0.02	0.05	0.02	63.87
gfp	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	ND
gfp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	ND

【０２５５】

【表３４】

表１１Ｂ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	63.63	15.40	3.50	3.29	3.11	2.52
親	63.10	18.77	3.50	3.63	3.01	2.18
親	60.00	11.17	2.50	2.92	2.79	3.10
親	56.67	13.75	2.05	2.62	2.28	2.74
半分量	43.53	6.13	0.58	0.98	0.58	5.26
半分量	45.07	6.62	0.81	0.77	0.67	5.08
半分量	36.53	3.47	0.31	0.48	0.30	8.01
半分量	34.68	3.72	0.28	0.68	0.43	6.80
KKR_S418A	56.84	12.20	0.70	0.94	1.88	3.61
KKR_S418C	42.72	6.97	1.14	1.05	1.26	4.10
KKR_S418D	65.24	1.15	0.16	0.14	0.27	37.87
KKR_S418E	72.45	0.34	0.09	0.16	0.11	104.85
KKR_S418F	14.90	1.08	0.23	0.34	0.42	7.19
KKR_S418G	44.80	8.06	7.82	3.45	1.44	2.16
KKR_S418H	55.57	12.98	1.14	1.42	3.65	2.89
KKR_S418I	29.78	0.28	0.06	0.03	0.13	61.12
KKR_S418K	52.01	17.69	1.58	1.17	3.44	2.18
KKR_S418L	10.83	0.41	0.03	0.05	0.14	16.89
KKR_S418M	30.93	1.55	0.19	0.17	0.46	13.08
KKR_S418N	59.19	19.05	1.08	1.70	4.67	2.23
KKR_S418P	79.20	28.77	3.90	3.93	9.53	1.72
KKR_S418Q	55.07	7.54	0.22	0.56	1.94	5.37
KKR_S418R	45.79	19.09	2.31	1.60	5.19	1.62
KKR_S418T	57.23	6.33	0.27	0.54	1.25	6.83
KKR_S418V	44.43	0.40	0.04	0.10	0.23	57.69
KKR_S418W	18.26	1.60	0.15	0.37	0.61	6.71
KKR_S418Y	21.75	2.48	0.48	0.51	0.82	5.07
KKR_R422A	57.41	2.68	0.24	0.61	1.20	12.14
KKR_R422C	31.57	1.22	0.13	0.31	0.34	15.77
KKR_R422D	49.90	0.25	0.03	0.05	0.28	82.29
KKR_R422E	49.76	0.17	0.02	0.08	0.14	120.70
KKR_R422F	39.99	2.29	0.20	0.32	0.48	12.16
KKR_R422G	40.90	1.64	0.20	0.36	0.57	14.79
KKR_R422H	63.43	4.33	0.37	0.72	1.45	9.23
KKR_R422I	35.55	1.97	0.31	0.41	0.33	11.76
KKR_R422K	71.20	22.19	0.97	3.16	6.13	2.19
KKR_R422L	52.15	3.79	0.94	1.36	0.91	7.44
KKR_R422M	39.52	2.40	0.56	0.65	0.46	9.75
KKR_R422N	46.21	1.84	0.15	0.44	0.81	14.23
KKR_R422P	28.51	0.20	0.02	0.03	0.06	92.81
KKR_R422Q	60.24	4.53	0.56	1.63	1.31	7.50

【０２５６】

【表３５】

KKR_R422S	52.09	1.55	0.17	0.63	0.90	16.02
KKR_R422T	54.57	2.99	0.24	0.81	0.91	11.03
KKR_R422V	41.66	1.61	0.24	0.52	0.30	15.58
KKR_R422W	33.25	3.71	0.14	0.47	0.67	6.66
KKR_R422Y	52.98	4.80	0.37	0.74	1.26	7.39
KKR_S418D	70.21	1.58	0.12	0.12	0.20	34.83
KKR_N476D	36.24	0.11	0.04	0.12	0.02	119.52
KKR_I479T	70.33	1.26	0.21	1.21	0.09	25.35
KKR_Q481E	70.45	0.55	0.13	0.05	0.17	78.95
KKR_N527D	57.06	3.84	0.54	1.35	0.71	8.86
KKR_Q531R	58.48	3.90	1.42	1.97	0.82	7.22
KKR_R416D	57.64	0.37	0.04	0.01	0.28	82.22
KKR_R416E	69.37	1.55	0.04	0.14	1.50	21.50
KKR_R416N	70.11	7.61	0.17	0.53	3.59	5.89
KKR_R416S	58.34	5.62	0.24	0.49	1.25	7.68
KKR_K525A	55.21	0.79	0.03	0.14	0.20	47.44
KKR_K525E	49.76	0.25	0.01	0.02	0.11	126.10
KKR_K525G	54.38	1.97	0.08	0.17	0.45	20.33
KKR_K525S	64.03	2.23	0.11	0.12	0.54	21.34
KKR_Q481A	61.41	0.31	0.02	0.03	0.13	123.36
KKR_Q481C	64.51	4.04	0.09	0.02	0.42	14.11
KKR_Q481D	75.10	6.05	0.09	0.13	0.80	10.64
KKR_Q481S	56.88	0.45	0.00	0.00	0.12	98.94
gfp	0.01	0.02	0.00	0.02	0.09	NA
gfp	0.01	0.01	0.01	0.00	0.12	NA

親	1.05	1.04	1.21	1.06	1.11	0.96
親	1.04	1.27	1.21	1.17	1.08	0.83
親	0.99	0.76	0.87	0.94	1.00	1.18
親	0.93	0.93	0.71	0.84	0.81	1.04
半分量	0.72	0.42	0.20	0.32	0.21	2.00
半分量	0.74	0.45	0.28	0.25	0.24	1.93
半分量	0.60	0.23	0.11	0.16	0.11	3.04
半分量	0.57	0.25	0.10	0.22	0.15	2.58
KKR_S418A	0.93	0.83	0.24	0.30	0.67	1.37
KKR_S418C	0.70	0.47	0.39	0.34	0.45	1.56
KKR_S418D	1.07	0.08	0.06	0.05	0.10	14.38
KKR_S418E	1.19	0.02	0.03	0.05	0.04	39.82
KKR_S418F	0.24	0.07	0.08	0.11	0.15	2.73
KKR_S418G	0.74	0.55	2.71	1.11	0.52	0.82
KKR_S418H	0.91	0.88	0.40	0.46	1.31	1.10
KKR_S418I	0.49	0.02	0.02	0.01	0.04	23.21
KKR_S418K	0.85	1.20	0.55	0.38	1.23	0.83
KKR_S418L	0.18	0.03	0.01	0.02	0.05	6.41

【０２５７】

【表３６】

KKR_S418M	0.51	0.10	0.07	0.05	0.16	4.97
KKR_S418N	0.97	1.29	0.37	0.55	1.67	0.85
KKR_S418P	1.30	1.95	1.35	1.26	3.41	0.65
KKR_S418Q	0.90	0.51	0.08	0.18	0.69	2.04
KKR_S418R	0.75	1.29	0.80	0.51	1.86	0.62
KKR_S418T	0.94	0.43	0.09	0.17	0.45	2.60
KKR_S418V	0.73	0.03	0.01	0.03	0.08	21.91
KKR_S418W	0.30	0.11	0.05	0.12	0.22	2.55
KKR_S418Y	0.36	0.17	0.17	0.16	0.29	1.92
KKR_R422A	0.94	0.18	0.08	0.20	0.43	4.61
KKR_R422C	0.52	0.08	0.05	0.10	0.12	5.99
KKR_R422D	0.82	0.02	0.01	0.02	0.10	31.25
KKR_R422E	0.82	0.01	0.01	0.02	0.05	45.84
KKR_R422F	0.66	0.15	0.07	0.10	0.17	4.62
KKR_R422G	0.67	0.11	0.07	0.12	0.20	5.62
KKR_R422H	1.04	0.29	0.13	0.23	0.52	3.51
KKR_R422I	0.58	0.13	0.11	0.13	0.12	4.47
KKR_R422K	1.17	1.50	0.33	1.01	2.19	0.83
KKR_R422L	0.86	0.26	0.33	0.44	0.33	2.83
KKR_R422M	0.65	0.16	0.19	0.21	0.16	3.70
KKR_R422N	0.76	0.12	0.05	0.14	0.29	5.40
KKR_R422P	0.47	0.01	0.01	0.01	0.02	35.25
KKR_R422Q	0.99	0.31	0.19	0.52	0.47	2.85
KKR_R422S	0.86	0.10	0.06	0.20	0.32	6.09
KKR_R422T	0.90	0.20	0.08	0.26	0.32	4.19
KKR_R422V	0.68	0.11	0.08	0.17	0.11	5.92
KKR_R422W	0.55	0.25	0.05	0.15	0.24	2.53
KKR_R422Y	0.87	0.33	0.13	0.24	0.45	2.81
KKR_S418D	1.15	0.11	0.04	0.04	0.07	13.23
KKR_N476D	0.60	0.01	0.01	0.04	0.01	45.39
KKR_I479T	1.16	0.09	0.07	0.39	0.03	9.63
KKR_Q481E	1.16	0.04	0.04	0.02	0.06	29.98
KKR_N527D	0.94	0.26	0.19	0.43	0.26	3.36
KKR_Q531R	0.96	0.26	0.49	0.63	0.29	2.74
KKR_R416D	0.95	0.03	0.01	0.00	0.10	31.22
KKR_R416E	1.14	0.11	0.01	0.04	0.54	8.17
KKR_R416N	1.15	0.52	0.06	0.17	1.28	2.24
KKR_R416S	0.96	0.38	0.08	0.16	0.45	2.92
KKR_K525A	0.91	0.05	0.01	0.04	0.07	18.02
KKR_K525E	0.82	0.02	0.00	0.01	0.04	47.89
KKR_K525G	0.89	0.13	0.03	0.06	0.16	7.72
KKR_K525S	1.05	0.15	0.04	0.04	0.19	8.11
KKR_Q481A	1.01	0.02	0.01	0.01	0.05	46.85
KKR_Q481C	1.06	0.27	0.03	0.01	0.15	5.36
KKR_Q481D	1.23	0.41	0.03	0.04	0.28	4.04

【０２５８】

【表３７】

KKR_Q481S	0.93	0.03	0.00	0.00	0.04	37.57
gfp	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	ND
gfp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	ND

【０２５９】

【表３８】

表１１Ｃ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	63.63	15.40	3.50	3.29	3.11	2.52
親	63.10	18.77	3.50	3.63	3.01	2.18
親	60.00	11.17	2.50	2.92	2.79	3.10
親	56.67	13.75	2.05	2.62	2.28	2.74
半分量	43.53	6.13	0.58	0.98	0.58	5.26
半分量	45.07	6.62	0.81	0.77	0.67	5.08
半分量	36.53	3.47	0.31	0.48	0.30	8.01
半分量	34.68	3.72	0.28	0.68	0.43	6.80
ELD_KKR_S418A	56.41	3.20	0.67	0.90	0.57	10.56
ELD_KKR_S418C	24.43	0.74	0.21	0.35	0.28	15.51
ELD_KKR_S418D	48.70	0.08	0.03	0.05	0.12	172.57
ELD_KKR_S418E	58.18	0.04	0.01	0.02	0.05	470.11
ELD_KKR_S418F	5.17	0.18	0.06	0.09	0.13	11.37
ELD_KKR_S418G	26.97	9.45	2.45	1.64	1.93	1.74
ELD_KKR_S418H	40.18	3.40	0.55	0.75	0.76	7.36
ELD_KKR_S418I	5.96	0.02	0.02	0.02	0.10	37.01
ELD_KKR_S418K	34.84	3.16	1.33	1.29	0.92	5.20
ELD_KKR_S418L	1.79	0.03	0.01	0.01	0.14	9.91
ELD_KKR_S418M	8.86	0.09	0.05	0.06	0.10	30.11
ELD_KKR_S418N	44.66	8.43	0.90	1.34	0.95	3.84
ELD_KKR_S418P	91.49	35.58	9.89	6.21	8.86	1.51
ELD_KKR_S418Q	39.47	0.85	0.10	0.31	0.25	26.33
ELD_KKR_S418R	29.54	5.45	3.22	1.52	2.05	2.41
ELD_KKR_S418T	34.61	0.24	0.07	0.14	0.09	64.01
ELD_KKR_S418V	18.75	0.03	0.03	0.05	0.11	87.69
ELD_KKR_S418W	6.01	0.12	0.10	0.08	0.13	13.82
ELD_KKR_S418Y	7.26	0.33	0.09	0.06	0.12	12.07
ELD_KKR_R422A	3.43	0.03	0.01	0.05	0.15	14.34
ELD_KKR_R422C	13.04	0.09	0.07	0.03	0.11	43.05
ELD_KKR_R422D	21.98	0.02	0.02	0.01	0.08	166.09
ELD_KKR_R422E	25.12	0.03	0.00	0.03	0.14	124.28
ELD_KKR_R422F	20.43	0.69	0.03	0.30	0.16	17.27
ELD_KKR_R422G	19.82	0.05	0.02	0.03	0.12	89.17
ELD_KKR_R422H	58.50	0.65	0.08	0.39	0.23	43.21
ELD_KKR_R422I	16.94	0.22	0.05	0.14	0.15	30.61
ELD_KKR_R422K	78.47	23.05	2.17	3.34	3.98	2.41
ELD_KKR_R422L	37.68	0.71	0.17	0.28	0.23	27.22
ELD_KKR_R422M	20.81	0.21	0.05	0.20	0.18	32.91
ELD_KKR_R422N	23.17	0.04	0.03	0.06	0.11	93.57
ELD_KKR_R422P	3.63	0.03	0.02	0.01	0.09	23.37

【０２６０】

【表３９】

ELD_KKR_R422Q	43.13	0.53	0.10	0.23	0.14	43.28
ELD_KKR_R422S	32.72	0.15	0.04	0.20	0.20	54.65
ELD_KKR_R422T	37.16	0.29	0.04	0.09	0.17	62.72
ELD_KKR_R422V	23.36	0.18	0.02	0.06	0.14	57.49
ELD_KKR_R422W	13.07	0.32	0.03	0.10	0.10	23.58
ELD_KKR_R422Y	37.28	1.31	0.08	0.46	0.31	17.28
ELD_KKR_S418D	44.22	0.09	0.03	0.01	0.07	219.68
ELD_KKR_N476D	4.51	0.03	0.01	0.02	0.07	36.91
ELD_KKR_I479T	41.46	0.03	0.02	0.01	0.09	278.85
ELD_KKR_Q481E	66.40	0.03	0.04	0.01	0.08	413.30
ELD_KKR_N527D	32.76	0.15	0.05	0.11	0.11	78.86
ELD_KKR_Q531R	56.63	0.60	0.02	0.24	0.12	57.58
ELD_KKR_R416D	67.30	0.06	0.03	0.06	0.09	283.84
ELD_KKR_R416E	90.77	0.45	0.06	0.13	0.14	116.83
ELD_KKR_R416N	88.98	0.73	0.14	0.31	0.19	65.36
ELD_KKR_R416S	62.78	1.06	0.11	0.45	0.17	35.01
ELD_KKR_K525A	66.59	0.04	0.02	0.03	0.13	296.70
ELD_KKR_K525E	18.58	0.04	0.02	0.01	0.09	122.53
ELD_KKR_K525G	49.73	0.12	0.01	0.07	0.08	178.32
ELD_KKR_K525S	74.03	0.09	0.03	0.05	0.11	258.39
ELD_KKR_Q481A	92.58	0.03	0.04	0.00	0.09	570.76
ELD_KKR_Q481C	72.98	0.06	0.04	0.03	0.12	298.84
ELD_KKR_Q481D	91.87	0.43	0.02	0.04	0.22	128.41
ELD_KKR_Q481S	58.67	0.03	0.02	0.01	0.08	422.94
gfp	0.01	0.02	0.00	0.02	0.09	NA
gfp	0.01	0.01	0.01	0.00	0.12	NA

親	1.05	1.04	1.21	1.06	1.11	0.96
親	1.04	1.27	1.21	1.17	1.08	0.83
親	0.99	0.76	0.87	0.94	1.00	1.18
親	0.93	0.93	0.71	0.84	0.81	1.04
半分量	0.72	0.42	0.20	0.32	0.21	2.00
半分量	0.74	0.45	0.28	0.25	0.24	1.93
半分量	0.60	0.23	0.11	0.16	0.11	3.04
半分量	0.57	0.25	0.10	0.22	0.15	2.58
ELD_KKR_S418A	0.93	0.22	0.23	0.29	0.21	4.01
ELD_KKR_S418C	0.40	0.05	0.07	0.11	0.10	5.89
ELD_KKR_S418D	0.80	0.01	0.01	0.01	0.04	65.54
ELD_KKR_S418E	0.96	0.00	0.00	0.01	0.02	178.54
ELD_KKR_S418F	0.08	0.01	0.02	0.03	0.05	4.32
ELD_KKR_S418G	0.44	0.64	0.85	0.53	0.69	0.66
ELD_KKR_S418H	0.66	0.23	0.19	0.24	0.27	2.79
ELD_KKR_S418I	0.10	0.00	0.01	0.01	0.04	14.06
ELD_KKR_S418K	0.57	0.21	0.46	0.41	0.33	1.97

【０２６１】

【表４０】

ELD_KKR_S418L	0.03	0.00	0.00	0.00	0.05	3.77
ELD_KKR_S418M	0.15	0.01	0.02	0.02	0.03	11.43
ELD_KKR_S418N	0.73	0.57	0.31	0.43	0.34	1.46
ELD_KKR_S418P	1.50	2.41	3.42	1.99	3.17	0.57
ELD_KKR_S418Q	0.65	0.06	0.03	0.10	0.09	10.00
ELD_KKR_S418R	0.49	0.37	1.12	0.49	0.73	0.92
ELD_KKR_S418T	0.57	0.02	0.02	0.05	0.03	24.31
ELD_KKR_S418V	0.31	0.00	0.01	0.02	0.04	33.30
ELD_KKR_S418W	0.10	0.01	0.03	0.03	0.05	5.25
ELD_KKR_S418Y	0.12	0.02	0.03	0.02	0.04	4.58
ELD_KKR_R422A	0.06	0.00	0.00	0.02	0.05	5.45
ELD_KKR_R422C	0.21	0.01	0.03	0.01	0.04	16.35
ELD_KKR_R422D	0.36	0.00	0.01	0.00	0.03	63.08
ELD_KKR_R422E	0.41	0.00	0.00	0.01	0.05	47.20
ELD_KKR_R422F	0.34	0.05	0.01	0.10	0.06	6.56
ELD_KKR_R422G	0.33	0.00	0.01	0.01	0.04	33.87
ELD_KKR_R422H	0.96	0.04	0.03	0.13	0.08	16.41
ELD_KKR_R422I	0.28	0.02	0.02	0.04	0.05	11.63
ELD_KKR_R422K	1.29	1.56	0.75	1.07	1.42	0.92
ELD_KKR_R422L	0.62	0.05	0.06	0.09	0.08	10.34
ELD_KKR_R422M	0.34	0.01	0.02	0.06	0.06	12.50
ELD_KKR_R422N	0.38	0.00	0.01	0.02	0.04	35.54
ELD_KKR_R422P	0.06	0.00	0.01	0.00	0.03	8.87
ELD_KKR_R422Q	0.71	0.04	0.03	0.07	0.05	16.44
ELD_KKR_R422S	0.54	0.01	0.02	0.06	0.07	20.75
ELD_KKR_R422T	0.61	0.02	0.01	0.03	0.06	23.82
ELD_KKR_R422V	0.38	0.01	0.01	0.02	0.05	21.83
ELD_KKR_R422W	0.21	0.02	0.01	0.03	0.04	8.95
ELD_KKR_R422Y	0.61	0.09	0.03	0.15	0.11	6.56
ELD_KKR_S418D	0.73	0.01	0.01	0.00	0.03	83.43
ELD_KKR_N476D	0.07	0.00	0.00	0.01	0.02	14.02
ELD_KKR_I479T	0.68	0.00	0.01	0.00	0.03	105.90
ELD_KKR_Q481E	1.09	0.00	0.01	0.00	0.03	156.97
ELD_KKR_N527D	0.54	0.01	0.02	0.04	0.04	29.95
ELD_KKR_Q531R	0.93	0.04	0.01	0.08	0.04	21.87
ELD_KKR_R416D	1.11	0.00	0.01	0.02	0.03	107.80
ELD_KKR_R416E	1.49	0.03	0.02	0.04	0.05	44.37
ELD_KKR_R416N	1.46	0.05	0.05	0.10	0.07	24.82
ELD_KKR_R416S	1.03	0.07	0.04	0.14	0.06	13.30
ELD_KKR_K525A	1.09	0.00	0.01	0.01	0.05	112.68
ELD_KKR_K525E	0.31	0.00	0.01	0.00	0.03	46.53
ELD_KKR_K525G	0.82	0.01	0.00	0.02	0.03	67.72
ELD_KKR_K525S	1.22	0.01	0.01	0.02	0.04	98.13
ELD_KKR_Q481A	1.52	0.00	0.02	0.00	0.03	216.77
ELD_KKR_Q481C	1.20	0.00	0.01	0.01	0.04	113.49

【０２６２】

【表４１】

ELD_KKR_Q481D	1.51	0.03	0.01	0.01	0.08	48.77
ELD_KKR_Q481S	0.96	0.00	0.01	0.00	0.03	160.62
gfp	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	ND
gfp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	ND

【０２６３】

表１２Ａ～１２Ｃは、２つの異なる実験、オンターゲット（ＡＡＶＳ１）及び３つのオフターゲット（ＯＴ１、ＯＴ２、ＯＴ３）からの切断結果、ならびに示された変異体のオンターゲットのオフターゲットに対する比を示す。

【０２６４】

【表４２】

表１２Ａ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09
半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
ELD_K448A	59.76	7.05	0.93	2.04	1.40	5.23
ELD_K448C	63.80	9.43	3.22	2.51	2.11	3.69
ELD_K448D	3.14	0.04	0.05	0.05	0.07	15.10
ELD_K448E	75.48	19.58	6.59	3.86	2.19	2.34
ELD_K448F	5.08	0.06	0.20	0.09	0.05	12.65
ELD_K448G	42.70	2.67	0.33	1.26	0.68	8.65
ELD_K448H	6.19	0.19	0.27	0.15	0.09	8.89
ELD_K448I	3.65	0.07	0.10	0.13	0.08	9.54
ELD_K448L	5.82	0.13	0.15	0.24	0.11	9.22
ELD_K448M	69.53	9.69	5.97	3.41	1.87	3.32
ELD_K448N	14.00	0.77	0.44	0.78	0.43	5.79
ELD_K448P	0.10	0.02	0.03	0.03	0.03	0.95
ELD_K448Q	76.82	16.60	4.64	3.11	3.12	2.80
ELD_K448R	73.43	9.83	2.60	3.52	1.87	4.12
ELD_K448S	45.95	6.15	1.53	1.88	1.16	4.29
ELD_K448T	34.16	3.41	2.85	1.96	0.82	3.78
ELD_K448V	13.46	1.47	0.58	0.70	0.53	4.09
ELD_K448W	0.93	0.02	0.04	0.05	0.05	5.74
ELD_K448Y	7.36	0.21	0.52	0.28	0.15	6.37
ELD_I479A	41.45	0.03	0.04	0.04	0.06	248.65
ELD_I479C	32.55	0.02	0.09	0.05	0.10	124.76
ELD_I479D	0.98	0.03	0.01	0.02	0.06	7.69
ELD_I479E	1.46	0.02	0.03	0.05	0.03	11.56
ELD_I479F	22.48	0.02	0.04	0.03	0.11	112.11
ELD_I479G	11.09	0.02	0.04	0.01	0.04	88.84
ELD_I479H	18.97	0.04	0.03	0.02	0.05	142.61
ELD_I479K	0.44	0.02	0.01	0.04	0.07	3.22
ELD_I479L	39.31	0.29	0.13	0.22	0.96	24.66
ELD_I479M	41.44	1.30	0.41	0.41	0.61	15.17
ELD_I479N	20.15	0.03	0.01	0.03	0.06	168.10
ELD_I479P	3.79	0.03	0.01	0.04	0.04	32.04
ELD_I479Q	64.22	0.03	0.05	0.03	0.10	294.99
ELD_I479R	3.21	0.03	0.01	0.03	0.10	18.05

【０２６５】

【表４３】

ELD_I479S	36.20	0.02	0.03	0.06	0.09	184.80
ELD_I479T	45.91	0.05	0.07	0.04	0.09	185.53
ELD_I479V	49.92	0.20	0.24	0.11	0.11	75.50
ELD_I479W	3.90	0.00	0.04	0.04	0.04	31.51
ELD_I479Y	23.34	0.02	0.04	0.04	0.03	178.07
ELD_S418D	43.61	0.12	0.14	0.17	0.10	82.58
ELD_N476D	60.68	0.03	0.05	0.05	0.04	342.95
ELD_I479T	41.58	0.05	0.08	0.04	0.07	175.66
ELD_Q481E	54.21	0.05	0.08	0.15	0.07	159.57
ELD_N527D	35.49	0.36	0.11	0.32	0.07	41.19
ELD_Q531R	45.27	0.51	0.11	0.23	0.17	44.55
ELD_R416N	59.39	0.33	0.56	0.42	0.11	41.97
ELD_R416D	30.56	0.12	0.21	0.04	0.03	76.33
ELD_R416E	51.84	0.18	0.74	0.30	0.12	38.76
ELD_R416S	38.94	0.40	0.39	0.46	0.13	28.23
ELD_K525A	45.40	0.11	0.21	0.12	0.11	81.02
ELD_K525E	33.51	0.02	0.01	0.09	0.06	196.02
ELD_K525G	33.61	0.07	0.09	0.09	0.10	95.62
ELD_K525S	50.08	0.23	0.18	0.11	0.11	80.29
ELD_Q481A	46.06	0.02	0.06	0.09	0.04	227.61
ELD_Q481D	73.79	0.48	0.11	0.53	0.20	56.16
ELD_Q481C	47.38	0.06	0.10	0.23	0.17	86.03
ELD_Q481S	36.39	0.01	0.03	0.06	0.02	304.40
ELD_S418E	50.36	0.07	0.09	0.07	0.08	162.21
ELD_R422H	38.80	0.66	0.38	0.58	0.12	22.30
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

親対	1.07	1.35	1.23	1.18	1.25	0.80
親対	0.92	0.73	0.75	0.88	0.69	1.19
親対	1.05	1.13	1.14	1.15	1.22	0.89
親対	0.95	0.80	0.88	0.79	0.85	1.12
半分量	0.67	0.37	0.26	0.22	0.31	1.99
半分量	0.68	ND	0.23	0.30	0.30	ND
半分量	0.57	0.22	0.17	0.16	0.17	2.80
半分量	0.57	0.24	0.28	0.25	0.17	2.31
ELD_K448A	1.38	1.44	0.78	1.71	1.38	0.97
ELD_K448C	1.47	1.92	2.71	2.11	2.08	0.68
ELD_K448D	0.07	0.01	0.04	0.04	0.07	2.79
ELD_K448E	1.74	3.99	5.54	3.24	2.16	0.43
ELD_K448F	0.12	0.01	0.17	0.07	0.05	2.33
ELD_K448G	0.98	0.54	0.28	1.06	0.67	1.60
ELD_K448H	0.14	0.04	0.22	0.13	0.09	1.64
ELD_K448I	0.08	0.01	0.08	0.11	0.08	1.76

【０２６６】

【表４４】

ELD_K448L	0.13	0.03	0.13	0.20	0.10	1.70
ELD_K448M	1.60	1.97	5.02	2.86	1.84	0.61
ELD_K448N	0.32	0.16	0.37	0.65	0.42	1.07
ELD_K448P	0.00	0.00	0.02	0.03	0.03	0.17
ELD_K448Q	1.77	3.38	3.90	2.61	3.07	0.52
ELD_K448R	1.69	2.00	2.19	2.96	1.84	0.76
ELD_K448S	1.06	1.25	1.29	1.58	1.14	0.79
ELD_K448T	0.79	0.69	2.40	1.64	0.80	0.70
ELD_K448V	0.31	0.30	0.49	0.59	0.53	0.76
ELD_K448W	0.02	0.01	0.04	0.04	0.05	1.06
ELD_K448Y	0.17	0.04	0.44	0.24	0.14	1.18
ELD_I479A	0.96	0.01	0.03	0.03	0.06	45.88
ELD_I479C	0.75	0.00	0.07	0.04	0.10	23.02
ELD_I479D	0.02	0.01	0.01	0.02	0.06	1.42
ELD_I479E	0.03	0.00	0.02	0.04	0.03	2.13
ELD_I479F	0.52	0.00	0.03	0.03	0.11	20.69
ELD_I479G	0.26	0.01	0.04	0.01	0.04	16.39
ELD_I479H	0.44	0.01	0.02	0.02	0.05	26.31
ELD_I479K	0.01	0.00	0.01	0.03	0.07	0.59
ELD_I479L	0.91	0.06	0.11	0.18	0.94	4.55
ELD_I479M	0.96	0.26	0.35	0.34	0.60	2.80
ELD_I479N	0.46	0.01	0.01	0.02	0.06	31.02
ELD_I479P	0.09	0.01	0.01	0.03	0.04	5.91
ELD_I479Q	1.48	0.01	0.04	0.03	0.10	54.43
ELD_I479R	0.07	0.01	0.01	0.03	0.10	3.33
ELD_I479S	0.83	0.00	0.03	0.05	0.09	34.10
ELD_I479T	1.06	0.01	0.06	0.03	0.09	34.23
ELD_I479V	1.15	0.04	0.20	0.09	0.10	13.93
ELD_I479W	0.09	0.00	0.04	0.03	0.04	5.81
ELD_I479Y	0.54	0.00	0.03	0.04	0.03	32.86
ELD_S418D	1.01	0.02	0.12	0.15	0.10	15.24
ELD_N476D	1.40	0.01	0.04	0.05	0.04	63.28
ELD_I479T	0.96	0.01	0.07	0.03	0.07	32.41
ELD_Q481E	1.25	0.01	0.07	0.12	0.06	29.44
ELD_N527D	0.82	0.07	0.09	0.27	0.07	7.60
ELD_Q531R	1.04	0.10	0.09	0.19	0.17	8.22
ELD_R416N	1.37	0.07	0.47	0.35	0.11	7.74
ELD_R416D	0.70	0.03	0.18	0.03	0.03	14.08
ELD_R416E	1.20	0.04	0.62	0.25	0.12	7.15
ELD_R416S	0.90	0.08	0.33	0.38	0.13	5.21
ELD_K525A	1.05	0.02	0.18	0.10	0.11	14.95
ELD_K525E	0.77	0.00	0.01	0.07	0.06	36.17
ELD_K525G	0.77	0.01	0.08	0.08	0.10	17.64
ELD_K525S	1.15	0.05	0.15	0.09	0.11	14.81
ELD_Q481A	1.06	0.00	0.05	0.07	0.04	42.00

【０２６７】

【表４５】

ELD_Q481D	1.70	0.10	0.09	0.44	0.19	10.36
ELD_Q481C	1.09	0.01	0.08	0.19	0.16	15.87
ELD_Q481S	0.84	0.00	0.02	0.05	0.02	56.17
ELD_S418E	1.16	0.02	0.08	0.06	0.08	29.93
ELD_R422H	0.89	0.13	0.32	0.49	0.12	4.11
GFP	0.00	0.00	0.05	0.02	0.05	ND
GFP	0.00	0.00	0.04	0.05	0.03	ND

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09
半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
ELD_K448A	59.76	7.05	0.93	2.04	1.40	5.23
ELD_K448C	63.80	9.43	3.22	2.51	2.11	3.69
ELD_K448D	3.14	0.04	0.05	0.05	0.07	15.10
ELD_K448E	75.48	19.58	6.59	3.86	2.19	2.34
ELD_K448F	5.08	0.06	0.20	0.09	0.05	12.65
ELD_K448G	42.70	2.67	0.33	1.26	0.68	8.65
ELD_K448H	6.19	0.19	0.27	0.15	0.09	8.89
ELD_K448I	3.65	0.07	0.10	0.13	0.08	9.54
ELD_K448L	5.82	0.13	0.15	0.24	0.11	9.22
ELD_K448M	69.53	9.69	5.97	3.41	1.87	3.32
ELD_K448N	14.00	0.77	0.44	0.78	0.43	5.79
ELD_K448P	0.10	0.02	0.03	0.03	0.03	0.95
ELD_K448Q	76.82	16.60	4.64	3.11	3.12	2.80
ELD_K448R	73.43	9.83	2.60	3.52	1.87	4.12
ELD_K448S	45.95	6.15	1.53	1.88	1.16	4.29
ELD_K448T	34.16	3.41	2.85	1.96	0.82	3.78
ELD_K448V	13.46	1.47	0.58	0.70	0.53	4.09
ELD_K448W	0.93	0.02	0.04	0.05	0.05	5.74
ELD_K448Y	7.36	0.21	0.52	0.28	0.15	6.37
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09

【０２６８】

【表４６】

半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
ELD_I479A	41.45	0.03	0.04	0.04	0.06	248.65
ELD_I479C	32.55	0.02	0.09	0.05	0.10	124.76
ELD_I479D	0.98	0.03	0.01	0.02	0.06	7.69
ELD_I479E	1.46	0.02	0.03	0.05	0.03	11.56
ELD_I479F	22.48	0.02	0.04	0.03	0.11	112.11
ELD_I479G	11.09	0.02	0.04	0.01	0.04	88.84
ELD_I479H	18.97	0.04	0.03	0.02	0.05	142.61
ELD_I479K	0.44	0.02	0.01	0.04	0.07	3.22
ELD_I479L	39.31	0.29	0.13	0.22	0.96	24.66
ELD_I479M	41.44	1.30	0.41	0.41	0.61	15.17
ELD_I479N	20.15	0.03	0.01	0.03	0.06	168.10
ELD_I479P	3.79	0.03	0.01	0.04	0.04	32.04
ELD_I479Q	64.22	0.03	0.05	0.03	0.10	294.99
ELD_I479R	3.21	0.03	0.01	0.03	0.10	18.05
ELD_I479S	36.20	0.02	0.03	0.06	0.09	184.80
ELD_I479T	45.91	0.05	0.07	0.04	0.09	185.53
ELD_I479V	49.92	0.20	0.24	0.11	0.11	75.50
ELD_I479W	3.90	0.00	0.04	0.04	0.04	31.51
ELD_I479Y	23.34	0.02	0.04	0.04	0.03	178.07
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

【０２６９】

【表４７】

表１２Ｂ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09
半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
KKR_K448A	58.79	4.46	0.58	1.06	0.89	8.42
KKR_K448C	57.00	7.57	1.34	1.41	2.28	4.52
KKR_K448D	2.66	0.04	0.04	0.04	0.02	18.94
KKR_K448E	64.43	6.96	0.21	0.73	1.86	6.60
KKR_K448F	5.15	0.07	0.05	0.02	0.13	18.91
KKR_K448G	13.56	0.05	0.05	0.03	0.06	74.17
KKR_K448H	7.39	0.09	0.02	0.07	0.17	21.44
KKR_K448I	4.04	0.16	0.05	0.06	0.08	11.63
KKR_K448L	5.85	0.08	0.08	0.04	0.08	21.19
KKR_K448M	62.00	6.17	0.51	0.84	2.83	5.99
KKR_K448N	15.19	0.75	0.21	0.20	0.22	10.96
KKR_K448P	0.04	0.02	0.03	0.03	0.04	0.31
KKR_K448Q	65.53	7.52	1.10	1.28	3.51	4.89
KKR_K448R	58.33	7.45	0.71	1.00	1.49	5.48
KKR_K448S	46.58	4.04	0.75	0.90	0.87	7.10
KKR_K448T	34.43	3.18	0.43	0.41	1.45	6.28
KKR_K448V	14.04	1.09	0.31	0.36	0.35	6.68
KKR_K448W	0.64	0.03	0.05	0.06	0.04	3.70
KKR_K448Y	8.97	0.11	0.18	0.09	0.10	18.95
KKR_I479A	39.97	0.06	0.05	0.10	0.07	144.06
KKR_I479C	41.45	0.51	0.17	0.27	0.05	41.20
KKR_I479D	6.45	0.01	0.03	0.04	0.04	54.74
KKR_I479E	13.23	0.02	0.04	0.02	0.07	83.65
KKR_I479F	25.15	0.08	0.11	0.12	0.02	76.19
KKR_I479G	18.48	0.03	0.04	0.02	0.11	95.39
KKR_I479H	19.66	0.04	0.03	0.04	0.07	113.04
KKR_I479K	0.78	0.01	0.04	0.01	0.06	6.35
KKR_I479L	40.10	1.91	2.96	0.90	0.20	6.71
KKR_I479M	43.43	2.12	1.33	1.35	0.19	8.68
KKR_I479N	25.03	0.04	0.05	0.11	0.08	91.41
KKR_I479P	1.28	0.03	0.04	0.06	0.07	6.30
KKR_I479Q	59.57	1.32	0.54	0.77	0.05	22.11
KKR_I479R	3.17	0.03	0.04	0.01	0.04	26.74

【０２７０】

【表４８】

KKR_I479S	35.64	0.05	0.06	0.06	0.03	167.22
KKR_I479T	48.64	0.44	0.06	0.50	0.08	45.12
KKR_I479V	49.23	0.48	0.18	0.32	0.25	40.12
KKR_I479W	6.86	0.02	0.01	0.06	0.05	46.92
KKR_I479Y	21.50	0.04	0.04	0.04	0.05	120.50
KKR_S418D	47.81	0.26	0.07	0.10	0.10	90.39
KKR_N476D	19.63	0.06	0.03	0.04	0.04	119.60
KKR_I479T	46.95	0.30	0.11	0.28	0.06	62.71
KKR_Q481E	47.06	0.16	0.09	0.05	0.07	127.97
KKR_N527D	39.17	0.85	0.20	0.40	0.37	21.48
KKR_Q531R	36.99	1.08	0.30	0.63	0.28	16.15
KKR_R416N	54.55	0.92	0.05	0.18	0.49	33.30
KKR_R416D	36.70	0.11	0.03	0.04	0.14	120.60
KKR_R416E	51.32	0.35	0.03	0.06	0.33	66.66
KKR_R416S	39.97	1.41	0.18	0.22	0.62	16.48
KKR_K525A	39.26	0.46	0.05	0.07	0.18	50.61
KKR_K525E	32.52	0.07	0.01	0.11	0.07	128.95
KKR_K525G	34.47	0.43	0.10	0.08	0.24	40.02
KKR_K525S	40.86	0.39	0.02	0.12	0.19	56.36
KKR_Q481A	46.97	0.04	0.02	0.08	0.02	294.46
KKR_Q481D	55.80	1.06	0.05	0.05	0.17	42.03
KKR_Q481C	39.74	0.81	0.08	0.05	0.04	40.79
KKR_Q481S	36.46	0.12	0.05	0.07	0.05	128.50
KKR_S418E	50.83	0.20	0.06	0.06	0.05	137.52
KKR_R422H	40.44	0.77	0.10	0.15	0.40	28.46
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

親対	1.07	1.35	1.23	1.18	1.25	0.80
親対	0.92	0.73	0.75	0.88	0.69	1.19
親対	1.05	1.13	1.14	1.15	1.22	0.89
親対	0.95	0.80	0.88	0.79	0.85	1.12
半分量	0.67	0.37	0.26	0.22	0.31	1.99
半分量	0.68	ND	0.23	0.30	0.30	ND
半分量	0.57	0.22	0.17	0.16	0.17	2.80
半分量	0.57	0.24	0.28	0.25	0.17	2.31
KKR_K448A	1.36	0.91	0.49	0.89	0.87	1.55
KKR_K448C	1.31	1.54	1.13	1.18	2.25	0.83
KKR_K448D	0.06	0.01	0.04	0.03	0.02	3.50
KKR_K448E	1.49	1.42	0.18	0.61	1.84	1.22
KKR_K448F	0.12	0.01	0.04	0.02	0.13	3.49
KKR_K448G	0.31	0.01	0.04	0.02	0.06	13.69
KKR_K448H	0.17	0.02	0.02	0.06	0.16	3.96
KKR_K448I	0.09	0.03	0.04	0.05	0.08	2.15

【０２７１】

【表４９】

KKR_K448L	0.13	0.02	0.07	0.04	0.08	3.91
KKR_K448M	1.43	1.26	0.43	0.71	2.79	1.10
KKR_K448N	0.35	0.15	0.18	0.17	0.22	2.02
KKR_K448P	0.00	0.00	0.03	0.02	0.04	0.06
KKR_K448Q	1.51	1.53	0.93	1.07	3.45	0.90
KKR_K448R	1.34	1.52	0.60	0.84	1.47	1.01
KKR_K448S	1.07	0.82	0.63	0.75	0.86	1.31
KKR_K448T	0.79	0.65	0.36	0.35	1.43	1.16
KKR_K448V	0.32	0.22	0.26	0.30	0.34	1.23
KKR_K448W	0.01	0.01	0.04	0.05	0.04	0.68
KKR_K448Y	0.21	0.02	0.15	0.07	0.10	3.50
KKR_I479A	0.92	0.01	0.04	0.08	0.07	26.58
KKR_I479C	0.96	0.10	0.14	0.23	0.05	7.60
KKR_I479D	0.15	0.00	0.02	0.04	0.04	10.10
KKR_I479E	0.31	0.00	0.03	0.02	0.07	15.44
KKR_I479F	0.58	0.02	0.09	0.10	0.02	14.06
KKR_I479G	0.43	0.01	0.03	0.02	0.11	17.60
KKR_I479H	0.45	0.01	0.03	0.03	0.07	20.86
KKR_I479K	0.02	0.00	0.03	0.01	0.06	1.17
KKR_I479L	0.92	0.39	2.49	0.76	0.20	1.24
KKR_I479M	1.00	0.43	1.12	1.13	0.19	1.60
KKR_I479N	0.58	0.01	0.04	0.09	0.08	16.87
KKR_I479P	0.03	0.01	0.03	0.05	0.07	1.16
KKR_I479Q	1.37	0.27	0.45	0.65	0.05	4.08
KKR_I479R	0.07	0.01	0.03	0.01	0.04	4.93
KKR_I479S	0.82	0.01	0.05	0.05	0.03	30.85
KKR_I479T	1.12	0.09	0.05	0.42	0.08	8.33
KKR_I479V	1.14	0.10	0.15	0.27	0.24	7.40
KKR_I479W	0.16	0.00	0.01	0.05	0.05	8.66
KKR_I479Y	0.50	0.01	0.03	0.04	0.05	22.23
KKR_S418D	1.10	0.05	0.06	0.09	0.10	16.68
KKR_N476D	0.45	0.01	0.02	0.03	0.04	22.07
KKR_I479T	1.08	0.06	0.09	0.24	0.06	11.57
KKR_Q481E	1.08	0.03	0.07	0.04	0.07	23.61
KKR_N527D	0.90	0.17	0.17	0.33	0.37	3.96
KKR_Q531R	0.85	0.22	0.25	0.53	0.28	2.98
KKR_R416N	1.26	0.19	0.04	0.15	0.48	6.14
KKR_R416D	0.85	0.02	0.02	0.03	0.13	22.25
KKR_R416E	1.18	0.07	0.02	0.05	0.32	12.30
KKR_R416S	0.92	0.29	0.15	0.18	0.61	3.04
KKR_K525A	0.91	0.09	0.05	0.06	0.18	9.34
KKR_K525E	0.75	0.01	0.01	0.09	0.07	23.79
KKR_K525G	0.79	0.09	0.09	0.07	0.24	7.38
KKR_K525S	0.94	0.08	0.02	0.10	0.19	10.40
KKR_Q481A	1.08	0.01	0.02	0.06	0.02	54.33

【０２７２】

【表５０】

KKR_Q481D	1.29	0.22	0.04	0.04	0.17	7.75
KKR_Q481C	0.92	0.16	0.07	0.04	0.04	7.53
KKR_Q481S	0.84	0.02	0.04	0.06	0.05	23.71
KKR_S418E	1.17	0.04	0.05	0.05	0.05	25.37
KKR_R422H	0.93	0.16	0.08	0.13	0.39	5.25
GFP	0.00	0.00	0.05	0.02	0.05	ND
GFP	0.00	0.00	0.04	0.05	0.03	ND

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09
半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
KKR_K448A	58.79	4.46	0.58	1.06	0.89	8.42
KKR_K448C	57.00	7.57	1.34	1.41	2.28	4.52
KKR_K448D	2.66	0.04	0.04	0.04	0.02	18.94
KKR_K448E	64.43	6.96	0.21	0.73	1.86	6.60
KKR_K448F	5.15	0.07	0.05	0.02	0.13	18.91
KKR_K448G	13.56	0.05	0.05	0.03	0.06	74.17
KKR_K448H	7.39	0.09	0.02	0.07	0.17	21.44
KKR_K448I	4.04	0.16	0.05	0.06	0.08	11.63
KKR_K448L	5.85	0.08	0.08	0.04	0.08	21.19
KKR_K448M	62.00	6.17	0.51	0.84	2.83	5.99
KKR_K448N	15.19	0.75	0.21	0.20	0.22	10.96
KKR_K448P	0.04	0.02	0.03	0.03	0.04	0.31
KKR_K448Q	65.53	7.52	1.10	1.28	3.51	4.89
KKR_K448R	58.33	7.45	0.71	1.00	1.49	5.48
KKR_K448S	46.58	4.04	0.75	0.90	0.87	7.10
KKR_K448T	34.43	3.18	0.43	0.41	1.45	6.28
KKR_K448V	14.04	1.09	0.31	0.36	0.35	6.68
KKR_K448W	0.64	0.03	0.05	0.06	0.04	3.70
KKR_K448Y	8.97	0.11	0.18	0.09	0.10	18.95
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09

【０２７３】

【表５１】

半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
KKR_I479A	39.97	0.06	0.05	0.10	0.07	144.06
KKR_I479C	41.45	0.51	0.17	0.27	0.05	41.20
KKR_I479D	6.45	0.01	0.03	0.04	0.04	54.74
KKR_I479E	13.23	0.02	0.04	0.02	0.07	83.65
KKR_I479F	25.15	0.08	0.11	0.12	0.02	76.19
KKR_I479G	18.48	0.03	0.04	0.02	0.11	95.39
KKR_I479H	19.66	0.04	0.03	0.04	0.07	113.04
KKR_I479K	0.78	0.01	0.04	0.01	0.06	6.35
KKR_I479L	40.10	1.91	2.96	0.90	0.20	6.71
KKR_I479M	43.43	2.12	1.33	1.35	0.19	8.68
KKR_I479N	25.03	0.04	0.05	0.11	0.08	91.41
KKR_I479P	1.28	0.03	0.04	0.06	0.07	6.30
KKR_I479Q	59.57	1.32	0.54	0.77	0.05	22.11
KKR_I479R	3.17	0.03	0.04	0.01	0.04	26.74
KKR_I479S	35.64	0.05	0.06	0.06	0.03	167.22
KKR_I479T	48.64	0.44	0.06	0.50	0.08	45.12
KKR_I479V	49.23	0.48	0.18	0.32	0.25	40.12
KKR_I479W	6.86	0.02	0.01	0.06	0.05	46.92
KKR_I479Y	21.50	0.04	0.04	0.04	0.05	120.50
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

【０２７４】

【表５２】

表１２Ｃ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09
半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
ELD_KKR_K448A	61.79	1.69	0.26	0.70	0.46	19.89
ELD_KKR_K448C	64.98	6.21	1.34	1.40	1.79	6.05
ELD_KKR_K448D	0.08	0.03	0.02	0.01	0.04	0.86
ELD_KKR_K448E	84.95	18.50	0.87	1.02	2.25	3.75
ELD_KKR_K448F	0.72	0.02	0.02	0.05	0.04	5.26
ELD_KKR_K448G	8.15	0.03	0.05	0.06	0.09	36.59
ELD_KKR_K448H	1.10	0.02	0.02	0.04	0.08	7.22
ELD_KKR_K448I	0.19	0.02	0.01	0.04	0.03	1.94
ELD_KKR_K448L	0.59	0.03	0.05	0.02	0.05	4.00
ELD_KKR_K448M	81.10	9.18	1.14	1.81	2.50	5.55
ELD_KKR_K448N	4.51	0.16	0.19	0.10	0.11	8.02
ELD_KKR_K448P	0.04	0.03	0.03	0.04	0.08	0.24
ELD_KKR_K448Q	90.81	20.83	4.03	3.99	8.91	2.41
ELD_KKR_K448R	82.04	6.56	0.76	1.63	0.95	8.29
ELD_KKR_K448S	40.23	2.31	0.42	0.67	0.41	10.57
ELD_KKR_K448T	19.29	1.14	0.43	0.37	0.37	8.40
ELD_KKR_K448V	3.93	0.34	0.15	0.28	0.19	4.07
ELD_KKR_K448W	0.04	0.04	0.04	0.02	0.10	0.20
ELD_KKR_K448Y	1.79	0.01	0.13	0.02	0.08	7.54
ELD_KKR_I479A	0.79	0.01	0.02	0.03	0.06	7.35
ELD_KKR_I479C	14.11	0.06	0.04	0.03	0.07	70.49
ELD_KKR_I479D	0.01	0.04	0.04	0.01	0.03	0.07
ELD_KKR_I479E	0.04	0.02	0.04	0.06	0.04	0.23
ELD_KKR_I479F	5.13	0.03	0.01	0.03	0.03	50.10
ELD_KKR_I479G	0.08	0.03	0.03	0.03	0.05	0.58
ELD_KKR_I479H	0.09	0.02	0.04	0.04	0.04	0.66
ELD_KKR_I479K	0.04	0.03	0.04	0.01	0.03	0.37
ELD_KKR_I479L	27.72	0.05	0.17	0.12	0.08	66.94
ELD_KKR-I479M	34.75	0.22	0.22	0.10	0.10	53.87
ELD_KKR_I479N	0.12	0.02	0.06	0.04	0.03	0.83
ELD_KKR_I479P	0.04	0.03	0.02	0.04	0.04	0.33
ELD_KKR_I479Q	53.80	0.03	0.04	0.07	0.04	303.42
ELD_KKR_I479R	0.05	0.02	0.07	0.06	0.01	0.27

【０２７５】

【表５３】

ELD_KKR_I479S	0.46	0.01	0.05	0.03	0.06	3.16
ELD_KKR_I479T	28.74	0.03	0.04	0.03	0.09	154.73
ELD_KKR_I479V	36.57	0.05	0.04	0.06	0.05	184.04
ELD_KKR_I479W	0.04	0.04	0.01	0.03	0.04	0.28
ELD_KKR_I479Y	1.00	0.01	0.04	0.04	0.03	8.20
ELD_KKR_S418D	22.59	0.02	0.05	0.04	0.08	115.05
ELD_KKR_N476D	2.29	0.03	0.03	0.04	0.08	12.55
ELD_KKR_I479T	20.33	0.03	0.03	0.06	0.06	116.86
ELD_KKR_Q481E	43.53	0.01	0.03	0.04	0.11	234.62
ELD_KKR_N527D	15.86	0.03	0.03	0.06	0.02	112.24
ELD_KKR_Q531R	31.62	0.17	0.06	0.13	0.04	80.56
ELD_KKR_R416N	70.71	0.06	0.06	0.07	0.12	227.36
ELD_KKR_R416D	32.67	0.03	0.02	0.01	0.04	349.76
ELD_KKR_R416E	66.68	0.13	0.06	0.10	0.05	198.02
ELD_KKR_R416S	36.47	0.20	0.05	0.13	0.08	79.49
ELD_KKR_K525A	36.88	0.02	0.05	0.02	0.04	292.90
ELD_KKR_K525E	8.26	0.01	0.01	0.02	0.08	74.88
ELD_KKR_K525G	24.82	0.02	0.03	0.07	0.05	142.86
ELD_KKR_K525S	46.15	0.04	0.02	0.12	0.07	184.82
ELD_KKR_Q481A	82.60	0.04	0.02	0.04	0.04	559.53
ELD_KKR_Q481D	89.32	0.19	0.03	0.04	0.06	279.60
ELD_KKR_Q481C	50.98	0.06	0.01	0.02	0.04	410.14
ELD_KKR_Q481S	36.72	0.02	0.04	0.06	0.05	214.56
ELD_KKR_S418E	38.52	0.04	0.02	0.05	0.02	303.63
ELD_KKR_R422H	37.96	0.14	0.09	0.11	0.08	93.14
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

親対	1.07	1.35	1.23	1.18	1.25	0.80
親対	0.92	0.73	0.75	0.88	0.69	1.19
親対	1.05	1.13	1.14	1.15	1.22	0.89
親対	0.95	0.80	0.88	0.79	0.85	1.12
半分量	0.67	0.37	0.26	0.22	0.31	1.99
半分量	0.68	ND	0.23	0.30	0.30	ND
半分量	0.57	0.22	0.17	0.16	0.17	2.80
半分量	0.57	0.24	0.28	0.25	0.17	2.31
ELD_KKR_K448A	1.42	0.34	0.22	0.59	0.45	3.67
ELD_KKR_K448C	1.50	1.26	1.12	1.18	1.76	1.12
ELD_KKR_K448D	0.00	0.01	0.02	0.01	0.03	0.16
ELD_KKR_K448E	1.96	3.77	0.73	0.86	2.21	0.69
ELD_KKR_K448F	0.02	0.00	0.02	0.04	0.04	0.97
ELD_KKR_K448G	0.19	0.01	0.04	0.05	0.09	6.75
ELD_KKR_K448H	0.03	0.00	0.01	0.03	0.07	1.33
ELD_KKR_K448I	0.00	0.00	0.01	0.03	0.03	0.36

【０２７６】

【表５４】

ELD_KKR_K448L	0.01	0.01	0.05	0.01	0.05	0.74
ELD_KKR_K448M	1.87	1.87	0.95	1.52	2.46	1.02
ELD_KKR_K448N	0.10	0.03	0.16	0.08	0.11	1.48
ELD_KKR_K448P	0.00	0.01	0.03	0.03	0.08	0.04
ELD_KKR_K448Q	2.09	4.24	3.39	3.35	8.77	0.44
ELD_KKR_K448R	1.89	1.34	0.64	1.37	0.93	1.53
ELD_KKR_K448S	0.93	0.47	0.35	0.57	0.40	1.95
ELD_KKR_K448T	0.44	0.23	0.36	0.31	0.36	1.55
ELD_KKR_K448V	0.09	0.07	0.13	0.24	0.19	0.75
ELD_KKR_K448W	0.00	0.01	0.03	0.02	0.10	0.04
ELD_KKR_K448Y	0.04	0.00	0.11	0.02	0.08	1.39
ELD_KKR_I479A	0.02	0.00	0.02	0.02	0.06	1.36
ELD_KKR_I479C	0.33	0.01	0.03	0.03	0.07	13.01
ELD_KKR_I479D	0.00	0.01	0.03	0.01	0.03	0.01
ELD_KKR_I479E	0.00	0.01	0.03	0.05	0.04	0.04
ELD_KKR_I479F	0.12	0.01	0.01	0.03	0.03	9.24
ELD_KKR_I479G	0.00	0.01	0.03	0.02	0.04	0.11
ELD_KKR_I479H	0.00	0.00	0.04	0.04	0.04	0.12
ELD_KKR_I479K	0.00	0.01	0.03	0.01	0.03	0.07
ELD_KKR_I479L	0.64	0.01	0.14	0.10	0.08	12.35
ELD_KKR-I479M	0.80	0.05	0.19	0.08	0.10	9.94
ELD_KKR_I479N	0.00	0.00	0.05	0.03	0.03	0.15
ELD_KKR_I479P	0.00	0.01	0.02	0.04	0.03	0.06
ELD_KKR_I479Q	1.24	0.01	0.03	0.06	0.04	55.98
ELD_KKR_I479R	0.00	0.00	0.06	0.05	0.01	0.05
ELD_KKR_I479S	0.01	0.00	0.05	0.02	0.05	0.58
ELD_KKR_I479T	0.66	0.01	0.03	0.02	0.09	28.55
ELD_KKR_I479V	0.84	0.01	0.04	0.05	0.05	33.96
ELD_KKR_I479W	0.00	0.01	0.01	0.02	0.04	0.05
ELD_KKR_I479Y	0.02	0.00	0.03	0.04	0.03	1.51
ELD_KKR_S418D	0.52	0.00	0.04	0.03	0.08	21.23
ELD_KKR_N476D	0.05	0.01	0.03	0.03	0.08	2.32
ELD_KKR_I479T	0.47	0.01	0.02	0.05	0.05	21.56
ELD_KKR_Q481E	1.00	0.00	0.02	0.04	0.11	43.29
ELD_KKR_N527D	0.37	0.01	0.03	0.05	0.02	20.71
ELD_KKR_Q531R	0.73	0.03	0.05	0.11	0.04	14.86
ELD_KKR_R416N	1.63	0.01	0.05	0.06	0.11	41.95
ELD_KKR_R416D	0.75	0.01	0.02	0.01	0.04	64.54
ELD_KKR_R416E	1.54	0.03	0.05	0.08	0.05	36.54
ELD_KKR_R416S	0.84	0.04	0.04	0.11	0.08	14.67
ELD_KKR_K525A	0.85	0.00	0.04	0.01	0.04	54.04
ELD_KKR_K525E	0.19	0.00	0.01	0.01	0.07	13.82
ELD_KKR_K525G	0.57	0.00	0.03	0.06	0.05	26.36
ELD_KKR_K525S	1.06	0.01	0.02	0.10	0.07	34.10
ELD_KKR_Q481A	1.90	0.01	0.02	0.03	0.04	103.24

【０２７７】

【表５５】

ELD_KKR_Q481D	2.06	0.04	0.03	0.04	0.05	51.59
ELD_KKR_Q481C	1.18	0.01	0.01	0.02	0.04	75.68
ELD_KKR_Q481S	0.85	0.00	0.04	0.05	0.05	39.59
ELD_KKR_S418E	0.89	0.01	0.02	0.04	0.02	56.02
ELD_KKR_R422H	0.88	0.03	0.07	0.09	0.08	17.19
GFP	0.00	0.00	0.05	0.02	0.05	ND
GFP	0.00	0.00	0.04	0.05	0.03	ND

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09
半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
ELD_KKR_K448A	61.79	1.69	0.26	0.70	0.46	19.89
ELD_KKR_K448C	64.98	6.21	1.34	1.40	1.79	6.05
ELD_KKR_K448D	0.08	0.03	0.02	0.01	0.04	0.86
ELD_KKR_K448E	84.95	18.50	0.87	1.02	2.25	3.75
ELD_KKR_K448F	0.72	0.02	0.02	0.05	0.04	5.26
ELD_KKR_K448G	8.15	0.03	0.05	0.06	0.09	36.59
ELD_KKR_K448H	1.10	0.02	0.02	0.04	0.08	7.22
ELD_KKR_K448I	0.19	0.02	0.01	0.04	0.03	1.94
ELD_KKR_K448L	0.59	0.03	0.05	0.02	0.05	4.00
ELD_KKR_K448M	81.10	9.18	1.14	1.81	2.50	5.55
ELD_KKR_K448N	4.51	0.16	0.19	0.10	0.11	8.02
ELD_KKR_K448P	0.04	0.03	0.03	0.04	0.08	0.24
ELD_KKR_K448Q	90.81	20.83	4.03	3.99	8.91	2.41
ELD_KKR_K448R	82.04	6.56	0.76	1.63	0.95	8.29
ELD_KKR_K448S	40.23	2.31	0.42	0.67	0.41	10.57
ELD_KKR_K448T	19.29	1.14	0.43	0.37	0.37	8.40
ELD_KKR_K448V	3.93	0.34	0.15	0.28	0.19	4.07
ELD_KKR_K448W	0.04	0.04	0.04	0.02	0.10	0.20
ELD_KKR_K448Y	1.79	0.01	0.13	0.02	0.08	7.54
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親対	46.50	6.60	1.46	1.41	1.26	4.33
親対	40.06	3.57	0.90	1.05	0.70	6.44
親対	45.74	5.54	1.36	1.37	1.24	4.81
親対	41.20	3.92	1.04	0.94	0.86	6.09

【０２７８】

【表５６】

半分量	29.20	1.82	0.31	0.26	0.31	10.78
半分量	29.32	ND	0.27	0.36	0.31	ND
半分量	24.58	1.06	0.20	0.19	0.17	15.16
半分量	24.63	1.16	0.34	0.30	0.17	12.53
ELD_KKR_I479A	0.79	0.01	0.02	0.03	0.06	7.35
ELD_KKR_I479C	14.11	0.06	0.04	0.03	0.07	70.49
ELD_KKR_I479D	0.01	0.04	0.04	0.01	0.03	0.07
ELD_KKR_I479E	0.04	0.02	0.04	0.06	0.04	0.23
ELD_KKR_I479F	5.13	0.03	0.01	0.03	0.03	50.10
ELD_KKR_I479G	0.08	0.03	0.03	0.03	0.05	0.58
ELD_KKR_I479H	0.09	0.02	0.04	0.04	0.04	0.66
ELD_KKR_I479K	0.04	0.03	0.04	0.01	0.03	0.37
ELD_KKR_I479L	27.72	0.05	0.17	0.12	0.08	66.94
ELD_KKR-I479M	34.75	0.22	0.22	0.10	0.10	53.87
ELD_KKR_I479N	0.12	0.02	0.06	0.04	0.03	0.83
ELD_KKR_I479P	0.04	0.03	0.02	0.04	0.04	0.33
ELD_KKR_I479Q	53.80	0.03	0.04	0.07	0.04	303.42
ELD_KKR_I479R	0.05	0.02	0.07	0.06	0.01	0.27
ELD_KKR_I479S	0.46	0.01	0.05	0.03	0.06	3.16
ELD_KKR_I479T	28.74	0.03	0.04	0.03	0.09	154.73
ELD_KKR_I479V	36.57	0.05	0.04	0.06	0.05	184.04
ELD_KKR_I479W	0.04	0.04	0.01	0.03	0.04	0.28
ELD_KKR_I479Y	1.00	0.01	0.04	0.04	0.03	8.20
GFP	0.03	0.02	0.06	0.02	0.05	NA
GFP	0.04	0.01	0.04	0.06	0.03	NA

【０２７９】

表１３Ａ～１３Ｃは、示された変異（ＥＬＤ、ＫＫＲ、ＥＬＤ／ＫＫＲ、及び示されたさらなる変異）を有するＡＡＶＳ１標的化ＺＦＮを使用するオンターゲット及びオフターゲット切断事象を示す。

【０２８０】

【表５７】

表１３Ａ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	47.96	4.32	2.12	1.05	0.84	5.76
親	46.45	4.34	1.84	1.11	1.06	5.57
親	45.83	3.15	1.28	0.77	0.92	7.49
親	47.63	4.30	1.67	0.99	1.03	5.97
半分量	30.79	1.21	0.38	0.19	0.18	15.72
半分量	31.59	1.19	0.23	0.28	0.18	16.78
半分量	29.49	0.76	0.35	0.21	0.16	19.93
半分量	28.04	0.85	0.31	0.20	0.17	18.41
ELD_N527A	20.52	0.76	0.34	0.42	0.28	11.37
ELD_N527C	16.30	0.80	0.25	0.25	0.17	11.05
ELD_N527D	45.05	0.42	0.11	0.21	0.12	53.34
ELD_N527E	18.93	0.06	0.08	0.13	0.09	52.04
ELD_N527F	5.32	0.21	0.16	0.15	0.02	9.79
ELD_N527G	25.25	1.22	0.92	0.60	0.71	7.32
ELD_N527H	20.69	1.65	1.10	0.55	0.13	6.05
ELD_N527I	1.58	0.04	0.02	0.07	0.01	11.16
ELD_N527K	14.65	1.31	0.66	0.49	0.11	5.70
ELD_N527L	3.37	0.22	0.12	0.09	0.06	6.90
ELD_N527M	6.61	0.44	0.18	0.23	0.08	7.06
ELD_N527P	34.71	2.50	0.97	0.72	0.63	7.20
ELD_N527Q	25.72	2.62	1.76	1.13	0.99	3.96
ELD_N527R	17.38	1.70	1.07	0.37	0.28	5.08
ELD_N527S	22.51	0.93	0.67	0.37	0.32	9.83
ELD_N527T	25.14	0.25	0.14	0.12	0.04	45.36
ELD_N527V	4.22	0.14	0.09	0.10	0.05	10.88
ELD_N527W	3.33	0.17	0.05	0.11	0.04	9.07
ELD_N527Y	5.34	0.22	0.18	0.12	0.06	9.29
ELD_Q481A	56.06	0.06	0.10	0.14	0.05	160.54
ELD_Q481C	61.83	0.05	0.28	0.35	0.22	69.22
ELD_Q481D	78.20	0.54	0.21	0.87	0.29	40.90
ELD_Q481E	61.09	0.03	0.05	0.12	0.04	248.97
ELD_Q481F	0.50	0.02	0.05	0.02	0.05	3.54
ELD_Q481G	33.52	0.43	0.32	0.74	0.24	19.41
ELD_Q481H	71.31	7.24	5.48	1.76	0.15	4.87
ELD_Q481I	0.95	0.04	0.04	0.07	0.02	5.29
ELD_Q481K	19.90	0.05	0.06	0.05	0.04	102.54
ELD_Q481L	1.22	0.03	0.05	0.04	0.03	7.88
ELD_Q481M	5.62	0.02	0.05	0.04	0.04	35.82
ELD_Q481N	36.71	1.29	0.50	0.65	0.22	13.81
ELD_Q481P	1.99	0.02	0.01	0.07	0.04	14.21
ELD_Q481R	5.62	0.04	0.02	0.04	0.01	45.70

【０２８１】

【表５８】

ELD_Q481S	50.84	0.05	0.07	0.14	0.04	171.76
ELD_Q481T	36.86	0.05	0.07	0.11	0.01	150.05
ELD_Q481V	1.45	0.03	0.06	0.06	0.02	8.28
ELD_Q481W	0.24	0.03	0.02	0.04	0.03	1.95
ELD_Q481Y	1.75	0.04	0.04	0.05	0.02	11.96
ELD_S418D	49.76	0.13	0.14	0.15	0.07	100.32
ELD_N476D	63.24	0.10	0.03	0.09	0.06	222.11
ELD_I479T	49.59	0.05	0.20	0.03	0.09	134.46
ELD_Q481E	65.37	0.07	0.12	0.13	0.07	168.40
ELD_N527D	42.99	0.45	0.15	0.31	0.06	44.51
ELD_Q531R	53.22	0.73	0.21	0.23	0.16	40.16
ELD_R416D	40.79	0.07	0.39	0.05	0.05	73.16
ELD_R416E	57.69	0.13	1.39	0.09	0.11	33.54
ELD_R416N	62.32	0.32	1.90	0.45	0.13	22.24
ELD_R416S	47.72	0.37	1.19	0.82	0.19	18.57
ELD_K525A	55.65	0.07	0.23	0.10	0.15	101.13
ELD_K525E	49.34	0.05	0.08	0.09	0.08	164.69
ELD_K525G	47.83	0.12	0.25	0.06	0.12	86.58
ELD_K525S	60.06	0.28	0.37	0.16	0.16	62.41
GFP	0.01	0.02	0.03	0.02	0.05	NA
GFP	0.01	0.03	0.02	0.05	0.06	NA
親	1.02	1.07	1.23	1.08	0.87	0.93
親	0.99	1.08	1.06	1.13	1.10	0.90
親	0.98	0.78	0.74	0.79	0.96	1.21
親	1.01	1.07	0.97	1.01	1.07	0.96
半分量	0.66	0.30	0.22	0.19	0.19	2.54
半分量	0.67	0.30	0.13	0.29	0.19	2.71
半分量	0.63	0.19	0.20	0.21	0.17	3.22
半分量	0.60	0.21	0.18	0.20	0.17	2.97
ELD_N527A	0.44	0.19	0.20	0.43	0.29	1.84
ELD_N527C	0.35	0.20	0.15	0.25	0.18	1.78
ELD_N527D	0.96	0.10	0.06	0.21	0.12	8.61
ELD_N527E	0.40	0.02	0.05	0.13	0.09	8.40
ELD_N527F	0.11	0.05	0.09	0.15	0.02	1.58
ELD_N527G	0.54	0.30	0.54	0.61	0.74	1.18
ELD_N527H	0.44	0.41	0.63	0.56	0.13	0.98
ELD_N527I	0.03	0.01	0.01	0.07	0.01	1.80
ELD_N527K	0.31	0.32	0.38	0.50	0.11	0.92
ELD_N527L	0.07	0.05	0.07	0.09	0.06	1.11
ELD_N527M	0.14	0.11	0.11	0.24	0.08	1.14
ELD_N527P	0.74	0.62	0.56	0.73	0.66	1.16
ELD_N527Q	0.55	0.65	1.02	1.15	1.03	0.64
ELD_N527R	0.37	0.42	0.62	0.38	0.29	0.82

【０２８２】

【表５９】

ELD_N527S	0.48	0.23	0.39	0.38	0.34	1.59
ELD_N527T	0.54	0.06	0.08	0.12	0.04	7.32
ELD_N527V	0.09	0.03	0.05	0.11	0.06	1.76
ELD_N527W	0.07	0.04	0.03	0.11	0.04	1.46
ELD_N527Y	0.11	0.05	0.11	0.12	0.06	1.50
ELD_Q481A	1.19	0.01	0.06	0.14	0.05	25.92
ELD_Q481C	1.32	0.01	0.16	0.36	0.23	11.17
ELD_Q481D	1.67	0.13	0.12	0.89	0.31	6.60
ELD_Q481E	1.30	0.01	0.03	0.12	0.05	40.19
ELD_Q481F	0.01	0.00	0.03	0.02	0.05	0.57
ELD_Q481G	0.71	0.11	0.19	0.75	0.25	3.13
ELD_Q481H	1.52	1.80	3.18	1.80	0.16	0.79
ELD_Q481I	0.02	0.01	0.02	0.07	0.02	0.85
ELD_Q481K	0.42	0.01	0.04	0.05	0.04	16.55
ELD_Q481L	0.03	0.01	0.03	0.04	0.03	1.27
ELD_Q481M	0.12	0.00	0.03	0.04	0.04	5.78
ELD_Q481N	0.78	0.32	0.29	0.66	0.23	2.23
ELD_Q481P	0.04	0.00	0.01	0.07	0.04	2.29
ELD_Q481R	0.12	0.01	0.01	0.04	0.01	7.38
ELD_Q481S	1.08	0.01	0.04	0.14	0.04	27.73
ELD_Q481T	0.78	0.01	0.04	0.11	0.01	24.22
ELD_Q481V	0.03	0.01	0.03	0.06	0.02	1.34
ELD_Q481W	0.01	0.01	0.01	0.04	0.03	0.32
ELD_Q481Y	0.04	0.01	0.02	0.05	0.02	1.93
ELD_S418D	1.06	0.03	0.08	0.16	0.08	16.19
ELD_N476D	1.35	0.03	0.02	0.10	0.06	35.85
ELD_I479T	1.06	0.01	0.11	0.03	0.09	21.71
ELD_Q481E	1.39	0.02	0.07	0.13	0.07	27.18
ELD_N527D	0.92	0.11	0.09	0.32	0.06	7.18
ELD_Q531R	1.13	0.18	0.12	0.24	0.16	6.48
ELD_R416D	0.87	0.02	0.23	0.05	0.06	11.81
ELD_R416E	1.23	0.03	0.80	0.10	0.12	5.41
ELD_R416N	1.33	0.08	1.10	0.46	0.14	3.59
ELD_R416S	1.02	0.09	0.69	0.84	0.20	3.00
ELD_K525A	1.18	0.02	0.13	0.11	0.15	16.33
ELD_K525E	1.05	0.01	0.05	0.09	0.09	26.58
ELD_K525G	1.02	0.03	0.14	0.06	0.13	13.98
ELD_K525S	1.28	0.07	0.21	0.17	0.16	10.07
GFP	0.00	0.01	0.02	0.02	0.06	ND
GFP	0.00	0.01	0.01	0.05	0.06	ND

【０２８３】

【表６０】

表１３Ｂ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	47.96	4.32	2.12	1.05	0.84	5.76
親	46.45	4.34	1.84	1.11	1.06	5.57
親	45.83	3.15	1.28	0.77	0.92	7.49
親	47.63	4.30	1.67	0.99	1.03	5.97
半分量	30.79	1.21	0.38	0.19	0.18	15.72
半分量	31.59	1.19	0.23	0.28	0.18	16.78
半分量	29.49	0.76	0.35	0.21	0.16	19.93
半分量	28.04	0.85	0.31	0.20	0.17	18.41
KKR_N527A	18.75	0.77	0.48	0.29	0.43	9.48
KKR_N527C	9.00	0.30	0.39	0.17	0.21	8.43
KKR_N527D	46.36	0.77	0.48	0.61	0.21	22.42
KKR_N527E	24.41	0.65	0.66	0.25	0.26	13.36
KKR_N527F	3.53	0.14	0.21	0.06	0.06	7.42
KKR_N527G	26.10	1.25	0.46	0.54	0.45	9.69
KKR_N527H	16.67	0.89	0.99	0.40	0.31	6.42
KKR_N527I	0.98	0.03	0.07	0.03	0.02	6.78
KKR_N527K	18.96	0.77	0.77	0.40	0.34	8.32
KKR_N527L	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_N527M	5.67	0.22	0.43	0.20	0.18	5.48
KKR_N527P	15.11	0.10	0.10	0.13	0.05	39.87
KKR_N527Q	17.36	1.69	1.19	0.40	0.34	4.79
KKR_N527R	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_N527S	20.83	0.84	0.44	0.49	0.31	10.04
KKR_N527T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_N527V	1.40	0.04	0.05	0.07	0.02	7.59
KKR_N527W	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_N527Y	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_Q481A	48.27	0.15	0.05	0.03	0.09	150.70
KKR_Q481C	53.52	1.44	0.15	0.04	0.28	27.84
KKR_Q481D	60.01	1.15	0.07	0.10	0.30	37.18
KKR_Q481E	56.82	0.18	0.04	0.03	0.08	167.29
KKR_Q481F	0.88	0.05	0.04	0.04	0.05	5.12
KKR_Q481G	23.60	2.40	0.55	0.25	0.31	6.72
KKR_Q481H	55.88	2.69	0.15	0.51	2.74	9.18
KKR_Q481I	2.97	0.03	0.05	0.04	0.02	21.98
KKR_Q481K	2.17	0.03	0.03	0.02	0.06	16.91
KKR_Q481L	6.95	0.03	0.01	0.03	0.03	66.91
KKR_Q481M	21.59	0.06	0.04	0.06	0.03	116.95
KKR_Q481N	38.65	0.50	0.09	0.12	0.22	41.46
KKR_Q481P	4.78	0.03	0.07	0.02	0.03	31.55
KKR_Q481R	7.85	0.05	0.04	0.05	0.02	47.90

【０２８４】

【表６１】

KKR_Q481S	47.95	0.29	0.07	0.03	0.11	93.90
KKR_Q481T	35.61	0.06	0.06	0.04	0.05	170.00
KKR_Q481V	2.27	0.02	0.03	0.07	0.03	15.14
KKR_Q481W	0.11	0.03	0.02	0.04	0.01	1.10
KKR_Q481Y	12.71	0.22	0.03	0.09	0.11	28.31
KKR_S418D	49.74	0.26	0.10	0.08	0.13	89.43
KKR_N476D	27.43	0.03	0.02	0.07	0.03	166.00
KKR_I479T	51.62	0.29	0.13	0.25	0.12	65.91
KKR_Q481E	52.15	0.07	0.09	0.08	0.09	158.02
KKR_N527D	46.85	1.06	0.60	0.70	0.85	14.62
KKR_Q531R	43.62	0.65	0.79	0.41	0.27	20.59
KKR_R416D	47.19	0.14	0.03	0.11	0.20	97.96
KKR_R416E	56.98	0.55	0.04	0.04	0.78	40.63
KKR_R416N	60.68	1.19	0.18	0.28	1.20	21.34
KKR_R416S	44.42	1.37	0.21	0.18	0.51	19.53
KKR_K525A	49.24	0.19	0.03	0.07	0.14	112.49
KKR_K525E	42.36	0.06	0.06	0.06	0.07	163.51
KKR_K525G	44.05	0.47	0.09	0.07	0.27	48.61
KKR_K525S	50.87	0.44	0.08	0.16	0.29	52.53
GFP	0.01	0.02	0.03	0.02	0.05	NA
GFP	0.01	0.03	0.02	0.05	0.06	NA

親	1.02	1.07	1.23	1.08	0.87	0.93
親	0.99	1.08	1.06	1.13	1.10	0.90
親	0.98	0.78	0.74	0.79	0.96	1.21
親	1.01	1.07	0.97	1.01	1.07	0.96
半分量	0.66	0.30	0.22	0.19	0.19	2.54
半分量	0.67	0.30	0.13	0.29	0.19	2.71
半分量	0.63	0.19	0.20	0.21	0.17	3.22
半分量	0.60	0.21	0.18	0.20	0.17	2.97
KKR_N527A	0.40	0.19	0.28	0.30	0.45	1.53
KKR_N527C	0.19	0.07	0.23	0.17	0.21	1.36
KKR_N527D	0.99	0.19	0.28	0.62	0.22	3.62
KKR_N527E	0.52	0.16	0.38	0.26	0.27	2.16
KKR_N527F	0.08	0.04	0.12	0.06	0.07	1.20
KKR_N527G	0.56	0.31	0.27	0.55	0.47	1.56
KKR_N527H	0.35	0.22	0.58	0.40	0.33	1.04
KKR_N527I	0.02	0.01	0.04	0.03	0.02	1.09
KKR_N527K	0.40	0.19	0.45	0.41	0.36	1.34
KKR_N527L	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_N527M	0.12	0.06	0.25	0.20	0.19	0.88
KKR_N527P	0.32	0.03	0.06	0.13	0.05	6.44
KKR_N527Q	0.37	0.42	0.69	0.41	0.36	0.77
KKR_N527R	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_N527S	0.44	0.21	0.25	0.50	0.32	1.62

【０２８５】

【表６２】

KKR_N527T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_N527V	0.03	0.01	0.03	0.07	0.02	1.23
KKR_N527W	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_N527Y	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_Q481A	1.03	0.04	0.03	0.03	0.09	24.33
KKR_Q481C	1.14	0.36	0.09	0.04	0.30	4.49
KKR_Q481D	1.28	0.29	0.04	0.10	0.31	6.00
KKR_Q481E	1.21	0.05	0.02	0.03	0.08	27.00
KKR_Q481F	0.02	0.01	0.02	0.04	0.05	0.83
KKR_Q481G	0.50	0.60	0.32	0.26	0.33	1.08
KKR_Q481H	1.19	0.67	0.09	0.52	2.85	1.48
KKR_Q481I	0.06	0.01	0.03	0.04	0.02	3.55
KKR_Q481K	0.05	0.01	0.02	0.02	0.06	2.73
KKR_Q481L	0.15	0.01	0.01	0.03	0.03	10.80
KKR_Q481M	0.46	0.01	0.02	0.06	0.03	18.88
KKR_Q481N	0.82	0.12	0.05	0.12	0.23	6.69
KKR_Q481P	0.10	0.01	0.04	0.02	0.03	5.09
KKR_Q481R	0.17	0.01	0.02	0.05	0.03	7.73
KKR_Q481S	1.02	0.07	0.04	0.03	0.11	15.16
KKR_Q481T	0.76	0.01	0.04	0.04	0.05	27.44
KKR_Q481V	0.05	0.01	0.02	0.07	0.03	2.44
KKR_Q481W	0.00	0.01	0.01	0.04	0.01	0.18
KKR_Q481Y	0.27	0.05	0.02	0.09	0.11	4.57
KKR_S418D	1.06	0.06	0.06	0.08	0.13	14.44
KKR_N476D	0.58	0.01	0.01	0.08	0.04	26.80
KKR_I479T	1.10	0.07	0.08	0.25	0.12	10.64
KKR_Q481E	1.11	0.02	0.05	0.08	0.09	25.51
KKR_N527D	1.00	0.26	0.35	0.71	0.88	2.36
KKR_Q531R	0.93	0.16	0.46	0.42	0.28	3.32
KKR_R416D	1.00	0.03	0.02	0.11	0.21	15.81
KKR_R416E	1.21	0.14	0.02	0.04	0.81	6.56
KKR_R416N	1.29	0.29	0.10	0.28	1.25	3.44
KKR_R416S	0.95	0.34	0.12	0.19	0.53	3.15
KKR_K525A	1.05	0.05	0.02	0.07	0.15	18.16
KKR_K525E	0.90	0.02	0.03	0.06	0.08	26.39
KKR_K525G	0.94	0.12	0.05	0.08	0.28	7.85
KKR_K525S	1.08	0.11	0.05	0.16	0.30	8.48
GFP	0.00	0.01	0.02	0.02	0.06	ND
GFP	0.00	0.01	0.01	0.05	0.06	ND

【０２８６】

【表６３】

表１３Ｃ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	47.96	4.32	2.12	1.05	0.84	5.76
親	46.45	4.34	1.84	1.11	1.06	5.57
親	45.83	3.15	1.28	0.77	0.92	7.49
親	47.63	4.30	1.67	0.99	1.03	5.97
半分量	30.79	1.21	0.38	0.19	0.18	15.72
半分量	31.59	1.19	0.23	0.28	0.18	16.78
半分量	29.49	0.76	0.35	0.21	0.16	19.93
半分量	28.04	0.85	0.31	0.20	0.17	18.41
ELD_KKR_N527A	8.62	0.25	0.14	0.13	0.17	12.54
ELD_KKR_N527C	3.27	0.10	0.08	0.04	0.09	10.70
ELD_KKR_N527D	34.90	0.05	0.04	0.07	0.07	155.15
ELD_KKR_N527E	4.64	0.03	0.03	0.05	0.06	26.18
ELD_KKR_N527F	0.68	0.03	0.07	0.05	0.04	3.54
ELD_KKR_N527G	12.78	0.30	0.08	0.40	0.34	11.37
ELD_KKR_N527H	7.94	0.58	0.68	0.31	0.22	4.44
ELD_KKR_N527I	0.02	0.03	0.03	0.01	0.06	0.13
ELD_KKR_N527K	6.75	0.36	0.29	0.29	0.12	6.35
ELD_KKR_N527L	3.18	0.13	0.10	0.15	0.06	7.23
ELD_KKR_N527M	1.31	0.07	0.14	0.09	0.09	3.29
ELD_KKR_N527P	10.03	0.04	0.04	0.06	0.06	48.92
ELD_KKR_N527Q	9.15	0.90	0.82	0.33	0.20	4.07
ELD_KKR_N527R	16.97	1.78	1.21	0.54	0.35	4.37
ELD_KKR_N527S	9.71	0.12	0.14	0.15	0.16	16.85
ELD_KKR_N527T	26.89	0.14	0.08	0.16	0.11	55.91
ELD_KKR_N527V	1.39	0.30	0.03	0.09	0.10	2.67
ELD_KKR_N527W	1.86	0.06	0.05	0.05	0.07	8.21
ELD_KKR_N527Y	2.63	0.09	0.10	0.09	0.09	7.19
ELD_KKR_Q481A	86.30	0.02	0.04	0.04	0.09	462.88
ELD_KKR_Q481C	66.07	0.05	0.03	0.05	0.09	300.25
ELD_KKR_Q481D	90.46	0.12	0.05	0.10	0.16	214.39
ELD_KKR_Q481E	57.02	0.04	0.03	0.04	0.05	343.26
ELD_KKR_Q481F	0.02	0.04	0.02	0.08	0.05	0.09
ELD_KKR_Q481G	18.06	0.34	0.13	0.18	0.12	23.46
ELD_KKR_Q481H	84.29	22.17	0.65	4.71	1.07	2.95
ELD_KKR_Q481I	0.05	0.03	0.01	0.02	0.06	0.47
ELD_KKR_Q481K	3.36	0.03	0.05	0.02	0.10	17.13
ELD_KKR_Q481L	0.12	0.03	0.01	0.03	0.06	0.96
ELD_KKR_Q481M	1.92	0.03	0.03	0.09	0.08	8.29
ELD_KKR_Q481N	29.35	0.20	0.05	0.13	0.09	62.01
ELD_KKR_Q481P	0.45	0.03	0.03	0.08	0.10	1.82
ELD_KKR_Q481R	3.75	0.03	0.04	0.03	0.03	28.89

【０２８７】

【表６４】

ELD_KKR_Q481S	54.96	0.02	0.04	0.07	0.05	308.59
ELD_KKR_Q481T	33.31	0.02	0.02	0.00	0.07	290.95
ELD_KKR_Q481V	0.11	0.03	0.01	0.03	0.09	0.67
ELD_KKR_Q481W	0.01	0.02	0.04	0.04	0.07	0.06
ELD_KKR_Q481Y	0.40	0.03	0.01	0.02	0.05	3.52
ELD_KKR_S418D	40.13	0.03	0.03	0.03	0.06	278.01
ELD_KKR_N476D	5.72	0.03	0.04	0.02	0.02	53.02
ELD_KKR_I479T	45.10	0.04	0.04	0.06	0.07	214.05
ELD_KKR_Q481E	68.22	0.02	0.04	0.09	0.07	308.56
ELD_KKR_N527D	29.60	0.05	0.04	0.14	0.08	98.76
ELD_KKR_Q531R	46.16	0.20	0.10	0.09	0.09	95.03
ELD_KKR_R416D	54.14	0.03	0.01	0.04	0.10	298.38
ELD_KKR_R416E	79.47	0.13	0.16	0.12	0.09	157.31
ELD_KKR_R416N	80.25	0.32	0.23	0.43	0.26	64.21
ELD_KKR_R416S	51.99	0.25	0.16	0.20	0.12	72.26
ELD_KKR_K525A	56.83	0.03	0.01	0.04	0.03	508.42
ELD_KKR_K525E	19.36	0.03	0.02	0.05	0.07	114.28
ELD_KKR_K525G	46.19	0.03	0.04	0.09	0.08	186.72
ELD_KKR_K525S	68.60	0.03	0.07	0.05	0.08	301.52
GFP	0.01	0.02	0.03	0.02	0.05	NA
GFP	0.01	0.03	0.02	0.05	0.06	NA
親	1.02	1.07	1.23	1.08	0.87	0.93
親	0.99	1.08	1.06	1.13	1.10	0.90
親	0.98	0.78	0.74	0.79	0.96	1.21
親	1.01	1.07	0.97	1.01	1.07	0.96
半分量	0.66	0.30	0.22	0.19	0.19	2.54
半分量	0.67	0.30	0.13	0.29	0.19	2.71
半分量	0.63	0.19	0.20	0.21	0.17	3.22
半分量	0.60	0.21	0.18	0.20	0.17	2.97
ELD_KKR_N527A	0.18	0.06	0.08	0.14	0.17	2.02
ELD_KKR_N527C	0.07	0.02	0.04	0.04	0.10	1.73
ELD_KKR_N527D	0.74	0.01	0.02	0.07	0.07	25.05
ELD_KKR_N527E	0.10	0.01	0.02	0.05	0.06	4.23
ELD_KKR_N527F	0.01	0.01	0.04	0.05	0.04	0.57
ELD_KKR_N527G	0.27	0.08	0.05	0.40	0.35	1.84
ELD_KKR_N527H	0.17	0.14	0.40	0.31	0.23	0.72
ELD_KKR_N527I	0.00	0.01	0.02	0.01	0.07	0.02
ELD_KKR_N527K	0.14	0.09	0.17	0.29	0.13	1.03
ELD_KKR_N527L	0.07	0.03	0.06	0.15	0.06	1.17
ELD_KKR_N527M	0.03	0.02	0.08	0.10	0.10	0.53
ELD_KKR_N527P	0.21	0.01	0.03	0.07	0.06	7.90
ELD_KKR_N527Q	0.19	0.22	0.48	0.34	0.21	0.66
ELD_KKR_N527R	0.36	0.44	0.70	0.55	0.36	0.71

【０２８８】

【表６５】

ELD_KKR_N527S	0.21	0.03	0.08	0.15	0.17	2.72
ELD_KKR_N527T	0.57	0.03	0.04	0.17	0.11	9.02
ELD_KKR_N527V	0.03	0.07	0.02	0.09	0.10	0.43
ELD_KKR_N527W	0.04	0.02	0.03	0.05	0.07	1.33
ELD_KKR_N527Y	0.06	0.02	0.06	0.09	0.10	1.16
ELD_KKR_Q481A	1.84	0.00	0.02	0.04	0.09	74.72
ELD_KKR_Q481C	1.41	0.01	0.02	0.05	0.10	48.47
ELD_KKR_Q481D	1.93	0.03	0.03	0.10	0.16	34.61
ELD_KKR_Q481E	1.21	0.01	0.02	0.04	0.05	55.41
ELD_KKR_Q481F	0.00	0.01	0.01	0.08	0.05	0.01
ELD_KKR_Q481G	0.38	0.08	0.07	0.18	0.13	3.79
ELD_KKR_Q481H	1.79	5.51	0.38	4.81	1.12	0.48
ELD_KKR_Q481I	0.00	0.01	0.00	0.02	0.06	0.08
ELD_KKR_Q481K	0.07	0.01	0.03	0.02	0.10	2.77
ELD_KKR_Q481L	0.00	0.01	0.01	0.03	0.06	0.16
ELD_KKR_Q481M	0.04	0.01	0.02	0.09	0.09	1.34
ELD_KKR_Q481N	0.62	0.05	0.03	0.13	0.09	10.01
ELD_KKR_Q481P	0.01	0.01	0.02	0.08	0.11	0.29
ELD_KKR_Q481R	0.08	0.01	0.02	0.03	0.03	4.66
ELD_KKR_Q481S	1.17	0.00	0.02	0.07	0.05	49.81
ELD_KKR_Q481T	0.71	0.01	0.01	0.00	0.07	46.97
ELD_KKR_Q481V	0.00	0.01	0.01	0.03	0.09	0.11
ELD_KKR_Q481W	0.00	0.00	0.02	0.04	0.08	0.01
ELD_KKR_Q481Y	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.57
ELD_KKR_S418D	0.85	0.01	0.02	0.03	0.06	44.88
ELD_KKR_N476D	0.12	0.01	0.02	0.02	0.02	8.56
ELD_KKR_I479T	0.96	0.01	0.02	0.06	0.07	34.55
ELD_KKR_Q481E	1.45	0.00	0.02	0.09	0.08	49.81
ELD_KKR_N527D	0.63	0.01	0.02	0.14	0.08	15.94
ELD_KKR_Q531R	0.98	0.05	0.06	0.09	0.09	15.34
ELD_KKR_R416D	1.15	0.01	0.01	0.04	0.10	48.17
ELD_KKR_R416E	1.69	0.03	0.09	0.12	0.09	25.39
ELD_KKR_R416N	1.71	0.08	0.13	0.44	0.28	10.37
ELD_KKR_R416S	1.11	0.06	0.09	0.20	0.12	11.66
ELD_KKR_K525A	1.21	0.01	0.01	0.04	0.03	82.07
ELD_KKR_K525E	0.41	0.01	0.01	0.05	0.08	18.45
ELD_KKR_K525G	0.98	0.01	0.03	0.09	0.08	30.14
ELD_KKR_K525S	1.46	0.01	0.04	0.05	0.08	48.67
GFP	0.00	0.01	0.02	0.02	0.06	ND
GFP	0.00	0.01	0.01	0.05	0.06	ND

【０２８９】
表１４Ａ～１４Ｃは、示された変異体による結果を示す。
【０２９０】

【表６６】

表１４Ａ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	42.55	7.68	3.88	2.05	2.94	2.57
親	41.57	6.44	3.50	1.64	2.72	2.91
親	41.51	6.14	2.93	1.36	2.25	3.27
親	38.53	6.24	3.14	1.32	2.35	2.95
半分量	32.45	2.46	1.00	0.46	0.63	7.14
半分量	31.98	2.41	1.02	0.53	0.51	7.16
半分量	27.34	1.29	0.45	0.19	0.34	12.05
半分量	30.04	2.06	0.91	0.36	0.61	7.63
ELD_N476A	43.61	3.28	1.86	1.50	1.15	5.60
ELD_N476C	46.78	3.74	1.92	1.35	0.97	5.86
ELD_N476D	67.25	0.20	0.09	0.18	0.16	106.44
ELD_N476E	65.43	0.07	0.06	0.08	0.07	228.99
ELD_N476F	18.10	1.22	1.12	0.77	0.39	5.16
ELD_N476G	62.70	3.13	0.60	0.56	0.41	13.33
ELD_N476H	41.57	4.94	3.07	1.81	2.48	3.38
ELD_N476I	30.48	0.21	0.55	0.29	0.25	23.42
ELD_N476K	32.00	3.78	1.00	1.62	0.46	4.67
ELD_N476L	12.47	0.13	0.15	0.14	0.10	23.76
ELD_N476M	27.91	2.27	1.14	0.73	0.81	5.64
ELD_N476P	40.20	6.83	3.21	1.40	2.79	2.82
ELD_N476Q	38.61	2.08	0.77	0.80	0.51	9.28
ELD_N476R	40.17	6.10	4.87	2.55	1.41	2.69
ELD_N476S	54.42	9.71	4.38	2.67	2.74	2.79
ELD_N476T	53.11	5.19	2.35	1.77	1.75	4.80
ELD_N476V	34.78	0.49	0.53	0.36	0.22	21.82
ELD_N476W	14.91	0.49	1.13	0.39	0.22	6.66
ELD_N476Y	26.63	2.53	1.63	0.73	1.41	4.24
ELD_Q531A	25.87	1.96	0.48	0.37	0.70	7.39
ELD_Q531C	12.57	0.16	0.11	0.21	0.09	21.86
ELD_Q531D	4.48	0.05	0.01	0.03	0.05	30.17
ELD_Q531E	29.54	0.06	0.02	0.06	0.05	150.94
ELD_Q531F	4.09	0.02	0.02	0.04	0.09	23.42
ELD_Q531G	7.39	0.56	0.20	0.27	0.45	5.00
ELD_Q531H	47.18	10.36	3.04	2.12	6.48	2.14
ELD_Q531I	25.66	0.05	0.02	0.04	0.06	141.34
ELD_Q531K	42.12	7.43	4.18	1.80	6.55	2.11
ELD_Q531L	12.77	0.03	0.04	0.05	0.04	76.78
ELD_Q531M	30.65	0.35	0.40	0.31	0.19	24.46
ELD_Q531N	12.98	0.69	0.24	0.28	0.46	7.78
ELD_Q531P	5.30	0.05	0.03	0.08	0.05	26.25
ELD_Q531R	48.64	1.11	0.43	0.26	0.46	21.54

【０２９１】

【表６７】

ELD_Q531S	14.86	0.39	0.17	0.20	0.33	13.64
ELD_Q531T	37.95	0.40	0.37	0.30	0.33	27.16
ELD_Q531V	33.24	0.11	0.12	0.12	0.02	87.92
ELD_Q531W	2.82	0.05	0.02	0.05	0.11	12.47
ELD_Q531Y	18.15	0.04	0.02	0.04	0.03	133.53
ELD_S418D	42.20	0.10	0.24	0.31	0.14	53.28
ELD_N476D	57.06	0.07	0.09	0.09	0.06	184.93
ELD_I479T	42.10	0.04	0.15	0.02	0.09	137.07
ELD_Q481E	52.80	0.04	0.04	0.19	0.09	145.99
ELD_N527D	35.32	0.60	0.18	0.24	0.08	32.04
ELD_Q531R	43.15	0.74	0.25	0.20	0.29	29.03
ELD_R416N	58.18	0.48	2.31	0.46	0.14	17.21
ELD_R416D	36.27	0.11	0.59	0.08	0.04	44.30
ELD_R416E	55.41	0.17	2.40	0.23	0.09	19.15
ELD_R416S	39.03	0.37	1.26	0.47	0.27	16.49
ELD_K525A	46.87	0.27	0.24	0.17	0.06	63.48
ELD_K525E	40.21	0.05	0.05	0.10	0.04	167.71
ELD_K525G	35.64	0.21	0.15	0.08	0.06	70.09
ELD_K525S	49.97	0.23	0.28	0.31	0.20	48.28
ELD_Q481A	55.82	0.04	0.05	0.16	0.05	191.70
ELD_Q481D	71.61	0.83	0.13	1.15	0.38	28.73
ELD_Q481C	50.24	0.17	0.16	0.23	0.20	66.34
ELD_Q481S	40.58	0.09	0.08	0.07	0.10	118.21
ELD_S418E	53.03	0.09	0.15	0.06	0.16	113.62
ELD_R422H	36.38	0.77	1.01	0.48	0.22	14.68
ELD_I479Q	58.23	0.03	0.03	0.05	0.06	337.38
GFP	0.09	0.03	0.01	ND	0.04	NA
GFP	0.08	0.02	0.03	0.01	0.02	NA

【０２９２】

【表６８】

表１４Ｂ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	42.55	7.68	3.88	2.05	2.94	2.57
親	41.57	6.44	3.50	1.64	2.72	2.91
親	41.51	6.14	2.93	1.36	2.25	3.27
親	38.53	6.24	3.14	1.32	2.35	2.95
半分量	32.45	2.46	1.00	0.46	0.63	7.14
半分量	31.98	2.41	1.02	0.53	0.51	7.16
半分量	27.34	1.29	0.45	0.19	0.34	12.05
半分量	30.04	2.06	0.91	0.36	0.61	7.63
KKR_N476A	41.76	3.81	1.60	1.20	1.97	4.87
KKR_N476C	44.42	3.25	1.35	0.98	1.44	6.32
KKR_N476D	31.25	0.10	0.16	0.06	0.04	88.08
KKR_N476E	37.65	0.07	0.04	0.04	0.03	220.42
KKR_N476F	15.09	1.21	0.60	0.29	0.38	6.09
KKR_N476G	45.33	2.34	0.59	1.16	0.85	9.19
KKR_N476H	41.14	7.08	2.71	1.20	2.06	3.15
KKR_N476I	33.90	0.59	0.30	0.16	0.30	25.33
KKR_N476K	41.23	2.04	0.87	1.11	0.88	8.40
KKR_N476L	11.80	0.23	0.13	0.09	0.12	20.83
KKR_N476M	30.41	2.34	0.79	0.75	0.77	6.53
KKR_N476P	33.04	3.11	1.21	1.38	2.72	3.92
KKR_N476Q	38.61	1.03	0.42	0.50	0.58	15.21
KKR_N476R	44.34	6.29	3.71	1.38	3.07	3.07
KKR_N476S	49.87	9.00	3.00	2.07	4.76	2.65
KKR_N476T	48.39	4.98	2.03	1.55	2.71	4.29
KKR_N476V	39.89	0.55	0.23	0.22	0.46	27.20
KKR_N476W	13.62	1.05	1.64	0.36	0.38	3.97
KKR_N476Y	26.14	2.86	1.46	1.06	0.50	4.45
KKR_Q531A	33.77	3.29	2.47	0.89	0.94	4.45
KKR_Q531C	13.20	0.33	0.21	0.28	0.12	14.06
KKR_Q531D	6.11	0.05	0.02	0.04	0.08	31.32
KKR_Q531E	18.16	0.32	0.30	0.57	0.13	13.71
KKR_Q531F	4.27	0.04	0.04	0.04	0.06	24.16
KKR_Q531G	7.06	0.63	1.39	0.35	0.25	2.70
KKR_Q531H	38.76	6.91	1.57	0.91	2.35	3.30
KKR_Q531I	32.37	0.15	0.03	0.08	0.07	97.56
KKR_Q531K	38.59	9.56	6.05	1.62	1.05	2.11
KKR_Q531L	30.94	0.06	0.02	0.05	0.04	181.72
KKR_Q531M	39.71	1.07	0.57	0.46	0.37	16.08
KKR_Q531N	33.22	5.31	1.85	0.84	1.27	3.59
KKR_Q531P	3.89	0.08	0.09	0.06	0.05	13.73
KKR_Q531R	41.38	1.89	1.96	1.07	0.70	7.37

【０２９３】

【表６９】

KKR_Q531S	20.10	1.59	0.79	0.52	0.35	6.18
KKR_Q531T	38.72	2.20	0.31	0.37	0.43	11.69
KKR_Q531V	33.72	0.81	0.05	0.07	0.18	30.51
KKR_Q531W	3.69	0.13	0.06	0.05	0.06	12.37
KKR_Q531Y	6.03	0.23	0.06	0.08	0.06	14.16
KKR_S418D	45.54	0.37	0.11	0.11	0.22	56.33
KKR_N476D	25.28	0.07	0.05	0.04	0.06	118.80
KKR_I479T	45.08	0.54	0.17	0.34	0.05	41.10
KKR_Q481E	46.92	0.28	0.03	0.06	0.10	97.21
KKR_N527D	34.74	1.03	0.51	0.56	0.40	13.88
KKR_Q531R	37.42	1.37	1.65	0.72	0.50	8.84
KKR_R416N	52.89	2.05	0.08	0.16	1.09	15.63
KKR_R416D	45.13	0.28	0.04	0.07	0.20	75.06
KKR_R416E	51.18	0.51	0.03	0.08	0.78	36.52
KKR_R416S	42.07	2.94	0.35	0.20	0.98	9.42
KKR_K525A	43.73	0.59	0.08	0.09	0.16	47.64
KKR_K525E	40.94	0.11	0.03	0.03	0.10	150.39
KKR_K525G	37.87	0.70	0.06	0.11	0.29	32.75
KKR_K525S	40.53	0.64	0.07	0.05	0.26	40.01
KKR_Q481A	48.58	0.07	0.03	0.04	0.08	212.03
KKR_Q481D	51.77	2.24	0.04	0.09	0.40	18.71
KKR_Q481C	40.58	1.50	0.10	0.07	0.31	20.44
KKR_Q481S	41.92	0.40	0.04	0.08	0.07	71.54
KKR_S418E	51.17	0.19	0.06	0.07	0.07	129.17
KKR_R422H	41.25	1.53	0.24	0.29	0.75	14.62
KKR_I479Q	47.54	1.66	0.95	0.53	0.09	14.68
GFP	0.09	0.03	0.01	ND	0.04	NA
GFP	0.08	0.02	0.03	0.01	0.02	NA

【０２９４】

【表７０】

表１４Ｃ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	42.55	7.68	3.88	2.05	2.94	2.57
親	41.57	6.44	3.50	1.64	2.72	2.91
親	41.51	6.14	2.93	1.36	2.25	3.27
親	38.53	6.24	3.14	1.32	2.35	2.95
半分量	32.45	2.46	1.00	0.46	0.63	7.14
半分量	31.98	2.41	1.02	0.53	0.51	7.16
半分量	27.34	1.29	0.45	0.19	0.34	12.05
半分量	30.04	2.06	0.91	0.36	0.61	7.63
ELD_KKR_N476A	38.74	0.88	0.22	0.75	0.33	17.82
ELD_KKR_N476C	46.45	0.54	0.56	0.43	0.24	26.33
ELD_KKR_N476D	8.21	0.02	0.02	0.04	0.07	56.96
ELD_KKR_N476E	1.99	0.04	0.01	0.03	0.05	15.67
ELD_KKR_N476F	6.61	0.21	0.16	0.05	0.11	12.56
ELD_KKR_N476G	58.20	0.10	0.07	0.08	0.07	185.26
ELD_KKR_N476H	36.62	2.95	1.48	1.06	1.09	5.57
ELD_KKR_N476I	13.54	0.03	0.03	0.02	0.02	141.62
ELD_KKR_N476K	25.76	0.31	0.10	0.60	0.10	23.29
ELD_kkR_N476L	1.67	0.04	0.01	0.06	0.04	11.86
ELD_kkR_N476M	16.01	0.29	0.12	0.17	0.12	23.13
ELD_KKR_N476P	28.84	1.82	0.61	0.74	1.21	6.59
ELD_KKR_N476Q	29.68	0.06	0.06	0.09	0.12	90.88
ELD_KKR_N476R	36.35	3.33	3.04	1.67	0.76	4.13
ELD_KKR_N476S	55.29	8.64	2.32	2.13	3.28	3.38
ELD_KKR_N476T	55.05	1.63	0.98	0.97	1.04	11.91
ELD_KKR_N476V	24.38	0.06	0.05	0.06	0.07	101.77
ELD_KKR_N476W	4.04	0.09	0.00	0.08	0.03	19.35
ELD_KKR_N476Y	13.95	0.80	0.30	0.38	0.17	8.47
ELD_KKR_Q531A	17.74	0.53	0.20	0.18	0.22	15.68
ELD_KKR_Q531C	3.11	0.03	0.02	0.02	0.08	20.54
ELD_KKR_Q531D	0.05	0.02	0.01	0.02	0.03	0.62
ELD_KKR_Q531E	5.44	0.04	0.03	0.03	0.04	38.30
ELD_KKR_Q531F	0.19	0.03	0.00	0.04	0.05	1.77
ELD_KKR_Q531G	1.37	0.16	0.11	0.06	0.07	3.36
ELD_KKR_Q531H	42.66	7.88	1.12	1.19	3.73	3.07
ELD_KKR_Q531I	2.61	0.03	0.01	0.04	0.05	20.98
ELD_KKR_Q531K	38.46	8.02	5.20	1.54	2.03	2.29
ELD_KKR_Q531L	0.34	0.03	0.01	0.03	0.09	2.13
ELD_KKR_Q531M	17.43	0.04	0.04	0.01	0.08	100.86
ELD_KKR_Q531N	6.41	0.40	0.22	0.08	0.09	8.17
ELD_KKR_Q531P	0.15	0.03	0.02	0.03	0.04	1.18
ELD_KKR_Q531R	43.88	0.46	0.15	0.18	0.10	48.73

【０２９５】

【表７１】

ELD_KKR_Q531S	6.70	0.07	0.06	0.10	0.06	22.49
ELD_KKR_Q531T	29.41	0.06	0.03	0.07	0.05	144.03
ELD_KKR_Q531V	19.78	0.05	0.01	0.01	0.09	125.77
ELD_KKR_Q531W	0.19	0.05	0.02	0.02	0.06	1.27
ELD_KKR_Q531Y	1.50	0.06	0.02	0.02	0.06	9.52
ELD_KKR_S418D	31.26	0.05	0.02	0.04	0.03	226.26
ELD_KKR_N476D	4.18	0.03	0.01	0.02	0.03	44.63
ELD_KKR_I479T	27.06	0.05	0.03	0.06	0.05	139.49
ELD_KKR_Q481E	43.46	0.04	0.02	0.04	0.03	324.28
ELD_KKR_N527D	21.32	0.03	0.02	0.08	0.02	142.33
ELD_KKR_Q531R	35.54	0.16	0.07	0.08	0.06	94.23
ELD_KKR_R416N	68.24	0.22	0.11	0.16	0.14	106.90
ELD_KKR_R416D	38.22	0.05	0.04	0.03	0.03	259.98
ELD_KKR_R416E	69.86	0.05	0.09	0.08	0.12	207.67
ELD_KKR_R416S	37.02	0.33	0.11	0.12	0.11	54.52
ELD_KKR_K525A	44.65	0.04	0.02	0.02	0.10	262.08
ELD_KKR_K525E	15.13	0.02	0.03	0.03	0.05	108.50
ELD_KKR_K525G	31.56	0.04	0.03	0.02	0.07	199.27
ELD_KKR_K525S	46.57	0.02	0.02	0.04	0.04	405.87
ELD_KKR_Q481A	80.87	0.04	0.00	0.06	0.04	567.11
ELD_KKR_Q481D	85.06	0.25	0.03	0.10	0.14	162.56
ELD_KKR_Q481C	50.45	0.02	0.04	0.06	0.03	333.81
ELD_KKR_Q481S	39.61	0.04	0.00	0.03	0.05	342.28
ELD_KKR_S418E	46.25	0.04	0.03	0.01	0.09	273.38
ELD_KKR_R422H	37.06	0.27	0.06	0.07	0.12	72.00
ELD_KKR_I479Q	55.27	0.04	0.00	0.04	0.08	343.98
GFP	0.09	0.03	0.01	ND	0.04	NA
GFP	0.08	0.02	0.03	0.01	0.02	NA

【０２９６】
表１５Ａ～１５Ｃは、示された変異体を用いた２連実験の結果を示す。
【０２９７】

【表７２】

表１５Ａ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	66.27	11.83	3.46	4.41	2.67	2.96
親	66.73	11.97	3.83	4.11	3.12	2.90
親	62.81	10.97	3.22	3.14	2.45	3.18
半分量	48.04	3.58	0.80	0.88	0.39	8.51
半分量	43.89	3.26	0.75	0.78	0.66	8.05
半分量	45.19	2.87	0.64	0.97	ND	10.07
ELD_T419D	78.79	11.23	3.69	4.89	3.59	3.37
ELD_Q420E	32.41	3.86	1.44	1.99	1.16	3.84
ELD_Q420R	29.10	2.19	1.14	1.88	0.59	5.01
ELD_E425D	0.23	0.04	0.04	0.03	0.02	1.85
ELD_S446A	73.08	21.06	7.32	5.85	3.84	1.92
ELD_S446D	75.31	0.66	0.39	0.23	0.05	56.91
ELD_S446R	72.76	2.75	8.84	5.34	0.22	4.24
ELD_S446T	33.26	2.23	1.63	1.07	0.36	6.29
ELD_R447A	19.26	0.20	0.12	0.18	0.06	34.22
ELD_R447E	9.96	0.06	0.03	0.02	0.03	69.17
ELD_R447Q	21.02	0.38	0.51	0.37	0.06	15.96
ELD_A470D	0.06	0.09	0.01	0.04	0.03	0.34
ELD_A470G	14.66	0.21	0.14	0.42	0.06	17.59
ELD_Y471E	0.34	0.02	0.01	0.03	0.03	3.65
ELD_Y471F	47.88	0.10	0.17	0.45	0.03	63.86
ELD_S472A	74.79	14.00	7.01	6.05	3.59	2.44
ELD_S472D	71.65	0.26	1.22	0.62	0.12	32.28
ELD_S472G	51.69	5.45	4.09	3.94	1.83	3.38
ELD_Y475E	0.15	0.05	0.03	0.03	0.04	1.04
ELD_Y475F	39.94	7.76	1.80	2.48	2.23	2.80
ELD_P478D	86.44	0.39	0.02	0.12	0.13	133.89
ELD_G480A	83.61	23.32	6.80	6.63	12.01	1.71
ELD_G480D	86.31	2.13	0.10	1.26	1.48	17.34
ELD_G480K	83.45	21.94	6.63	4.99	14.57	1.73
ELD_G480N	72.90	20.19	1.90	5.23	4.81	2.27
ELD_G480R	70.85	21.55	6.56	3.58	10.49	1.68
ELD_N492D	0.67	0.06	0.03	0.04	0.06	3.66
ELD_Q493E	15.78	2.79	1.01	1.47	0.97	2.53
ELD_N500D	2.15	0.06	0.04	0.02	0.02	15.13
ELD_N502D	6.77	0.87	0.19	0.63	0.27	3.46
ELD_S521A	78.63	13.46	4.39	6.26	3.30	2.87
ELD_S521D	0.52	0.12	0.03	0.03	0.05	2.34
ELD_H523E	82.23	4.72	6.32	4.82	1.28	4.80
ELD_H523K	69.86	9.95	3.49	4.30	1.94	3.55
ELD_H523S	80.18	17.34	8.96	6.98	4.84	2.10

【０２９８】

【表７３】

ELD_H523V	41.49	3.56	2.12	2.32	1.08	4.58
ELD_H523Y	71.52	24.22	6.87	4.50	7.88	1.65
ELD_G526D	9.28	0.05	0.05	0.09	0.04	40.47
ELD_G526N	10.88	0.20	0.08	0.22	0.09	18.55
ELD_G526S	10.79	0.22	0.11	0.30	0.17	13.35
ELD_A530D	57.08	5.87	1.80	2.75	1.01	4.99
ELD_Q531E	48.43	0.08	0.07	0.03	0.06	207.58
ELD_N536D	4.93	0.39	0.07	0.22	0.13	6.10
ELD_N540D	17.44	2.97	1.59	1.72	1.17	2.34
ELD_N542D	82.04	26.01	8.78	6.82	5.77	1.73
ELD_N573D	36.59	6.49	2.30	2.30	1.81	2.84
ELD_N574D	7.62	0.98	0.23	0.53	0.33	3.66
ELD_N578D	23.28	2.69	1.33	1.78	0.96	3.45
ELD_S418E	77.93	0.13	0.16	0.20	0.11	130.43
ELD_S418D	69.74	0.48	0.17	0.63	0.22	46.38
ELD_N476D	74.70	0.01	0.04	0.07	0.09	352.05
ELD_I479T	60.80	0.12	0.12	0.01	0.06	201.14
ELD_Q481E	71.27	0.04	0.10	0.15	0.07	202.50
ELD_N527D	50.11	0.59	0.17	0.34	0.06	42.99
ELD_Q531R	63.19	0.91	0.14	0.28	0.20	41.47
ELD_Q481A	75.33	0.05	0.11	0.08	0.06	254.98
ELD_R416E	76.92	0.28	4.23	0.57	0.10	14.86
ELD_K525A	72.24	0.41	0.42	0.56	0.19	45.87
ELD_K525S	73.75	0.91	0.64	0.69	0.29	29.11
ELD_I479Q	77.13	0.06	0.04	0.05	0.06	373.93
GFP	0.09	0.04	0.04	0.02	0.05	NA
GFP	0.01	0.03	0.02	0.01	0.03	NA

【０２９９】

【表７４】

表１５Ｂ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	66.27	11.83	3.46	4.41	2.67	2.96
親	66.73	11.97	3.83	4.11	3.12	2.90
親	62.81	10.97	3.22	3.14	2.45	3.18
半分量	48.04	3.58	0.80	0.88	0.39	8.51
半分量	43.89	3.26	0.75	0.78	0.66	8.05
半分量	45.19	2.87	0.64	0.97	ND	10.07
KKR_T419D	75.79	14.88	7.12	6.14	4.34	2.33
KKR_Q420E	37.28	4.82	1.99	2.17	1.48	3.56
KKR_Q420R	27.41	4.09	1.16	1.21	1.28	3.54
KKR_E425D	0.23	0.04	0.04	0.04	0.02	1.59
KKR_S446A	69.60	17.74	5.75	5.60	9.07	1.82
KKR_S446D	71.48	0.11	0.03	0.04	0.05	311.16
KKR_S446R	69.10	3.80	0.35	0.33	2.39	10.05
KKR_S446T	68.15	6.99	3.88	2.40	4.04	3.94
KKR_R447A	32.43	0.01	0.02	0.03	0.06	249.14
KKR_R447E	10.88	0.03	0.01	0.03	0.03	112.41
KKR_R447Q	41.86	0.02	0.02	0.02	0.09	269.85
KKR_A470D	2.09	0.06	0.01	0.04	0.05	12.73
KKR_A470G	14.81	0.43	0.11	0.24	0.22	14.80
KKR_Y471E	0.29	0.01	0.00	0.01	0.01	10.77
KKR_Y471F	59.99	1.03	0.08	0.09	0.44	36.50
KKR_S472A	72.04	18.47	4.06	4.86	5.36	2.20
KKR_S472D	73.49	0.51	0.08	0.09	0.59	57.76
KKR_S472G	58.36	9.39	2.26	2.74	3.37	3.29
KKR_Y475E	0.08	0.01	0.02	0.02	0.01	1.43
KKR_Y475F	40.95	7.01	4.44	3.44	1.91	2.44
KKR_P478D	68.06	0.22	0.18	0.13	0.11	107.13
KKR_G480A	74.73	11.68	13.46	6.92	4.14	2.06
KKR_G480D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_G480K	74.95	14.58	4.77	5.59	9.04	2.21
KKR_G480N	72.63	13.59	11.47	6.96	1.87	2.14
KKR_G480R	72.60	13.28	9.20	5.33	6.12	2.14
KKR_N492D	0.49	0.03	0.01	0.03	0.04	4.61
KKR_Q493E	19.03	2.00	1.24	1.14	0.85	3.64
KKR_N500D	2.44	0.02	0.01	0.03	0.03	25.48
KKR_N502D	10.57	0.43	0.18	0.51	0.24	7.77
KKR_S521A	73.75	14.27	4.57	4.50	3.63	2.73
KKR_S521D	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.14
KKR_H523E	77.04	12.72	1.14	1.86	4.57	3.80
KKR_H523K	68.39	9.40	2.92	3.75	2.51	3.68
KKR_H523S	73.90	18.71	3.05	5.29	6.00	2.24

【０３００】

【表７５】

KKR_H523V	51.85	7.60	2.23	2.16	2.33	3.62
KKR_H523Y	65.36	9.66	7.27	5.25	3.16	2.58
KKR_G526D	9.91	0.10	0.03	0.11	0.05	34.03
KKR_G526N	9.13	0.48	0.08	0.20	0.36	8.18
KKR_G526S	9.33	0.23	0.04	0.26	0.12	14.26
KKR_A530D	67.48	13.32	5.25	6.01	4.12	2.35
KKR_Q531E	26.70	0.49	0.20	1.08	0.05	14.69
KKR_N536D	4.55	0.26	0.11	0.25	0.05	6.80
KKR_N540D	38.98	4.18	1.89	2.31	1.31	4.03
KKR_N542D	70.17	15.67	5.58	4.86	4.57	2.29
KKR_N573D	43.19	7.22	2.96	2.81	1.90	2.90
KKR_N574D	9.05	1.05	0.58	0.55	0.45	3.43
KKR_N578D	8.46	0.81	0.27	0.47	0.28	4.63
KKR_S418E	69.91	0.22	0.06	0.08	0.04	176.22
KKR_S418D	63.18	0.73	0.12	0.08	0.23	54.44
KKR_N476D	31.97	0.09	0.07	0.09	0.11	89.68
KKR_I479T	67.39	0.56	0.11	0.96	0.08	39.39
KKR_Q481E	67.03	0.16	0.03	0.04	0.08	213.25
KKR_N527D	49.72	1.12	0.19	0.75	ND	24.10
KKR_Q531R	53.34	1.41	0.71	1.19	0.38	14.45
KKR_Q481A	66.84	0.14	0.04	0.05	0.08	217.35
KKR_R416E	74.69	1.79	0.06	0.11	2.17	18.11
KKR_K525A	65.23	0.90	0.07	0.13	0.37	44.44
KKR_K525S	67.51	2.22	0.20	0.15	0.64	20.95
KKR_I479Q	73.07	1.99	1.11	1.34	0.11	16.06
GFP	0.09	0.04	0.04	0.02	0.05	NA
GFP	0.01	0.03	0.02	0.01	0.03	NA

【０３０１】

【表７６】

表１５Ｃ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	66.27	11.83	3.46	4.41	2.67	2.96
親	66.73	11.97	3.83	4.11	3.12	2.90
親	62.81	10.97	3.22	3.14	2.45	3.18
半分量	48.04	3.58	0.80	0.88	0.39	8.51
半分量	43.89	3.26	0.75	0.78	0.66	8.05
半分量	45.19	2.87	0.64	0.97	ND	10.07
ELD_KKR_T419D	85.90	11.12	5.15	6.07	4.42	3.21
ELD_KKR_Q420E	13.44	0.53	0.29	0.56	0.27	8.13
ELD_KKR_Q420R	11.95	0.85	0.21	0.41	0.22	7.07
ELD_KKR_E425D	0.08	0.02	0.02	0.04	0.06	0.57
ELD_KKR_S446A	74.69	23.06	7.98	6.61	8.35	1.62
ELD_KKR_S446D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ELD_KKR_S446R	65.40	3.05	1.55	1.67	0.40	9.79
ELD_KKR_S446T	60.85	2.91	6.14	1.43	1.80	4.96
ELD_KKR_R447A	3.05	0.01	0.01	0.02	0.01	54.51
ELD_KKR_R447E	0.11	0.01	0.01	0.03	0.04	1.15
ELD_KKR_R447Q	5.65	0.02	0.00	0.02	0.03	80.80
ELD_KKR_A470D	0.06	0.03	0.02	0.02	0.04	0.49
ELD_KKR_A470G	3.42	0.05	0.03	0.03	0.02	26.36
ELD_KKR_Y471E	0.08	0.00	0.01	0.01	0.02	2.19
ELD_KKR_Y471F	40.26	0.02	0.00	0.04	0.02	476.01
ELD_KKR_S472A	80.75	19.68	5.51	6.09	4.95	2.23
ELD_KKR_S472D	75.69	0.11	0.02	0.06	0.09	275.20
ELD_KKR_S472G	42.97	3.47	1.96	2.50	1.45	4.58
ELD_KKR_Y475E	0.04	0.00	0.01	0.02	0.04	0.59
ELD_KKR_Y475F	22.50	3.79	1.65	1.86	1.18	2.66
ELD_KKR_P478D	59.04	0.05	0.01	0.01	0.04	550.41
ELD_KKR_G480A	87.20	17.66	13.65	7.82	9.44	1.80
ELD_KKR_G480D	91.15	0.06	0.06	0.05	0.08	349.99
ELD_KKR_G480K	88.46	5.67	0.26	1.23	11.32	4.79
ELD_KKR_G480N	71.97	16.43	3.72	6.72	2.05	2.49
ELD_KKR_G480R	38.18	9.36	6.54	1.15	6.83	1.60
ELD_KKR_N492D	0.03	0.02	0.01	0.01	0.04	0.41
ELD_KKR_Q493E	5.52	0.58	0.23	0.37	0.23	3.92
ELD_KKR_N500D	0.07	0.02	0.03	0.03	0.04	0.58
ELD_KKR_N502D	1.10	0.07	0.04	0.10	0.04	4.30
ELD_KKR_S521A	81.32	12.31	3.39	6.02	2.84	3.31
ELD_KKR_S521D	ND	0.06	0.01	0.03	0.03	ND
ELD_KKR_H523E	83.69	3.33	1.05	1.37	1.10	12.21
ELD_KKR_H523K	71.56	5.67	1.65	3.19	1.01	6.21

【０３０２】

【表７７】

ELD_KKR_H523S	86.20	23.40	6.54	7.59	7.24	1.93
ELD_KKR_H523V	32.38	2.32	1.17	1.35	0.48	6.09
ELD_KKR_H523Y	68.44	20.77	8.90	4.64	6.21	1.69
ELD_KKR_G526D	0.45	0.05	0.01	0.05	0.02	3.23
ELD_KKR_G526N	1.43	0.02	0.03	0.03	0.01	14.61
ELD_KKR_G526S	1.56	0.05	0.02	0.05	0.03	10.66
ELD_KKR_A530D	57.66	4.57	1.75	4.02	1.33	4.94

【０３０３】

【表７８】

ELD_K448S	42.71	4.50	1.29	1.49	1.45	0.55	9.29	4.60
ELD_K469S	0.10	0.28	0.25	0.14	0.42	0.13	1.21	0.08
ELD_R487S	0.19	0.23	0.23	0.12	0.41	0.18	1.17	0.16
ELD_R495S	1.37	0.21	0.21	0.12	0.58	0.18	1.30	1.06
ELD_K497S	22.50	2.89	0.65	0.95	0.81	0.47	5.77	3.90
ELD_K506S	20.06	2.87	0.88	0.77	1.15	0.41	6.07	3.30
ELD_K516S	2.67	0.30	0.25	0.31	0.53	0.18	1.56	1.71
ELD_K525S	53.18	0.42	0.31	0.26	0.42	0.26	1.67	31.81
ELD_K529S	16.10	1.48	0.53	0.51	0.69	0.42	3.64	4.43
ELD_R534S	12.81	0.28	0.26	0.30	0.43	0.17	1.44	8.91
ELD_K559S	17.55	2.05	0.54	0.65	0.73	0.44	4.42	3.97
ELD_R569S	51.39	8.56	2.26	2.03	2.08	0.99	15.92	3.23
ELD_R570S	15.32	2.10	0.68	0.59	0.86	0.35	4.57	3.35
ELD_K571S	17.23	2.78	0.98	0.82	1.20	0.50	6.28	2.74
KKR_K387S	53.39	8.19	1.69	1.36	2.75	1.07	15.05	3.55
KKR_K393S	8.26	0.43	0.30	0.35	0.60	0.31	2.00	4.14
KKR_K394S	9.13	0.60	0.50	0.44	0.60	0.28	2.42	3.77
KKR_R398S	17.87	1.43	0.53	0.59	0.64	0.28	3.47	5.16
KKR_K400S	15.10	1.69	0.42	0.64	0.69	0.44	3.88	3.89
KKR_K402S	15.77	1.46	0.70	0.74	0.89	0.41	4.20	3.75
KKR_R416S	52.03	2.77	0.33	0.52	1.32	0.51	5.45	9.56
KKR_R422S	45.06	0.86	0.33	0.32	0.93	0.51	2.95	15.28
KKR_K427S	8.58	0.68	0.42	0.44	0.51	0.29	2.33	3.68
KKR_K434S	29.41	3.49	1.17	1.29	1.23	0.57	7.75	3.79
KKR_R439S	27.32	3.05	0.86	0.82	1.04	0.51	6.27	4.35
KKR_K441S	11.00	0.90	0.48	0.28	0.50	0.27	2.43	4.53
KKR_R447S	24.50	0.15	0.20	0.19	0.35	0.23	1.11	22.06
KKR_K448S	45.19	3.53	0.77	0.80	1.24	0.79	7.13	6.34
KKR_K469S	0.15	0.18	0.24	0.17	0.46	0.26	1.30	0.11
KKR_R487S	0.16	0.24	0.18	0.13	0.37	0.10	1.02	0.15
KKR_R495S	1.78	0.21	0.14	0.16	0.46	0.21	1.19	1.50
KKR_K497S	31.87	4.05	1.24	1.26	1.35	0.83	8.72	3.65
KKR_K506S	30.39	4.27	1.44	1.15	1.39	0.72	8.97	3.39
KKR_K516S	5.60	0.62	0.39	0.42	0.57	0.24	2.25	2.49
KKR_K525S	51.12	1.18	0.37	0.18	0.70	0.21	2.64	19.36
KKR_K529S	17.49	1.78	0.49	0.73	0.77	0.42	4.19	4.18
KKR_R534S	18.27	1.29	0.81	0.66	0.77	0.33	3.85	4.74
KKR_K559S	23.28	2.32	0.71	0.62	0.81	0.46	4.92	4.73
KKR_R569S	5.40	0.20	0.35	0.31	0.44	0.21	1.51	3.57
KKR_R570S	23.22	3.52	1.13	0.90	1.07	0.75	7.36	3.15
KKR_K571S	8.62	1.03	0.53	0.52	0.61	0.34	3.04	2.83
EGFP	0.12	0.16	0.23	0.14	0.40	0.15	0.21	0.57

【０３０４】

【表７９】

表１６Ｂ

試料	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	合計	比
親	47.56	9.72	2.63	2.84	2.46	17.65	2.70
親	49.08	11.10	3.09	3.71	3.06	20.97	2.34
ELD_I414L	37.57	4.36	2.12	2.24	1.18	9.91	3.79
ELD_N417D	67.23	17.94	5.20	5.03	3.71	31.89	2.11
ELD_N417S	29.91	7.81	1.11	1.56	2.17	12.65	2.37
ELD_S418D	46.39	0.29	0.14	0.34	0.16	0.93	49.69
ELD_S418G	32.76	11.10	0.81	1.11	4.23	17.25	1.90
ELD_S418P	67.64	19.29	11.36	5.53	3.85	40.03	1.69
ELD_T419K	54.75	12.34	3.49	3.64	2.83	22.29	2.46
ELD_T419S	56.92	11.83	3.66	3.51	2.26	21.27	2.68
ELD_T419Y	39.15	6.93	1.83	2.27	1.74	12.76	3.07
ELD_Q420A	37.22	9.61	1.07	1.81	2.61	15.10	2.46
ELD_D421N	39.03	13.33	1.77	2.41	5.30	22.80	1.71
ELD_D421S	50.44	16.11	1.73	2.46	6.35	26.65	1.89
ELD_I423D	14.05	1.84	0.39	0.75	0.57	3.55	3.96
ELD_I423L	57.80	15.54	2.48	3.29	3.51	24.82	2.33
ELD_L424F	67.38	20.09	10.08	6.00	4.01	40.18	1.68
ELD_E425Q	8.67	0.07	0.10	0.05	0.07	0.29	30.34
ELD_M426I	61.70	16.65	2.74	4.59	3.84	27.82	2.22
ELD_K441E	32.05	9.23	2.59	2.29	2.31	16.41	1.95
ELD_K441D	5.87	0.94	0.35	0.38	0.24	1.91	3.06
ELD_K441L	13.37	2.77	0.74	0.80	0.95	5.26	2.54
ELD_H442R	18.30	0.45	0.63	0.47	0.14	1.70	10.79
ELD_G445E	2.63	0.15	0.21	0.20	0.06	0.62	4.21
ELD_S446G	35.42	3.07	1.52	1.75	1.09	7.42	4.77
ELD_T468N	0.19	0.06	0.05	0.14	0.07	0.31	0.59
ELD_S472K	44.07	2.77	1.36	1.45	0.54	6.13	7.19
ELD_G473D	29.64	6.26	1.15	1.52	2.12	11.04	2.68
ELD_G473K	25.08	5.70	0.92	1.42	0.70	8.74	2.87
ELD_N476S	55.45	10.94	2.55	3.65	2.18	19.31	2.87
ELD_N476D	59.33	0.13	0.06	0.17	0.10	0.46	128.70
ELD_P478S	63.62	14.02	0.62	2.98	4.36	21.98	2.89
ELD_I479T	41.42	0.09	0.15	0.06	0.11	0.42	99.43
ELD_G480S	61.29	14.12	2.99	4.03	6.03	27.17	2.26
ELD_Q481H	67.73	14.54	6.96	4.37	0.32	26.19	2.59
ELD_Q481E	53.31	0.11	0.11	0.21	0.05	0.48	110.94
ELD_Q481N	35.13	3.37	0.59	1.56	0.35	5.88	5.97
ELD_E484Q	37.48	11.64	1.93	1.39	4.08	19.04	1.97
ELD_P501S	20.02	4.32	1.60	1.47	1.17	8.56	2.34
ELD_G522S	60.02	12.86	2.23	3.29	3.27	21.65	2.77

【０３０５】

【表８０】

ELD_H523F	42.63	14.68	2.12	2.27	4.62	23.68	1.80
ELD_N527D	41.63	1.13	0.22	0.68	0.11	2.13	19.59
ELD_N527G	23.28	2.93	0.84	1.27	1.50	6.55	3.56
ELD_N527K	13.62	2.56	0.78	0.89	0.23	4.46	3.06
ELD_Y528F	52.40	12.72	3.52	3.03	2.79	22.05	2.38
ELD_K529E	22.98	2.77	0.58	1.51	0.54	5.40	4.25
ELD_A530E	41.94	3.37	0.57	1.18	0.85	5.97	7.03
ELD_A530K	46.55	6.55	1.31	1.71	1.50	11.07	4.21
ELD_Q531N	16.28	1.30	0.26	0.53	0.37	2.46	6.62
ELD_Q531R	50.98	1.64	0.30	0.48	0.39	2.81	18.14
KKR_I414L	51.17	9.11	1.42	2.80	2.95	16.28	3.14
KKR_N417D	73.10	16.32	2.74	3.50	5.59	28.14	2.60
KKR_N417S	33.80	4.26	2.65	2.30	1.26	10.47	3.23
KKR_S418D	58.61	0.57	0.20	0.15	0.16	1.08	54.37
KKR_S418G	41.59	4.18	5.48	2.79	1.37	13.82	3.01
KKR_S418P	74.02	17.76	3.16	3.61	8.51	33.05	2.24
KKR_T419K	63.65	16.14	3.82	4.06	4.22	28.25	2.25
KKR_T419S	66.12	13.56	2.63	3.54	3.41	23.14	2.86
KKR_T419Y	42.35	4.81	1.45	1.68	1.20	9.14	4.63
KKR_Q420A	44.62	4.92	2.87	2.81	1.17	11.78	3.79
KKR_D421N	39.41	8.14	6.27	2.59	1.84	18.84	2.09
KKR_D421S	51.41	10.28	7.67	3.19	2.50	23.64	2.17
KKR_I423D	29.67	2.84	0.93	1.08	0.66	5.50	5.39
KKR_I423L	66.91	13.71	4.37	4.47	3.16	25.72	2.60
KKR_L424F	73.65	23.87	5.78	6.31	12.31	48.26	1.53
KKR_E425Q	33.35	0.09	0.05	0.08	0.08	0.30	109.99
KKR_M426I	63.92	9.92	2.71	3.45	2.36	18.44	3.47
KKR_K441E	45.72	8.60	5.21	3.29	2.64	19.74	2.32
KKR_K441D	10.66	0.80	0.84	0.58	0.40	2.63	4.05
KKR_K441L	23.57	2.99	1.55	1.40	0.91	6.84	3.44
KKR_H442R	32.85	2.18	0.14	0.51	0.62	3.45	9.51
KKR_G445E	5.57	0.31	0.16	0.25	0.24	0.96	5.80
KKR_S446G	48.86	4.31	1.13	1.13	1.59	8.16	5.99
KKR_T468N	0.94	0.06	0.02	0.05	0.07	0.20	4.79
KKR_S472K	54.49	6.10	0.99	1.93	1.66	10.68	5.10
KKR_G473D	41.00	7.64	3.40	2.26	1.52	14.83	2.76
KKR_G473K	32.02	2.67	2.10	2.03	1.01	7.80	4.11
KKR_N476S	59.29	8.93	1.51	2.82	2.96	16.22	3.66
KKR_N476D	28.98	0.12	0.04	0.08	0.05	0.30	97.89
KKR_P478S	64.26	5.11	1.52	2.45	1.40	10.49	6.13
KKR_I479T	59.75	0.55	0.22	0.87	0.10	1.73	34.49
KKR_G480S	65.65	10.79	4.90	3.14	2.04	20.87	3.15
KKR_Q481H	69.52	6.10	0.12	1.41	6.52	14.16	4.91
KKR_Q481E	65.72	0.28	0.07	0.06	0.11	0.52	125.97

【０３０６】

【表８１】

KKR_Q481N	35.21	2.64	0.10	0.83	1.15	4.72	7.46
KKR_E484Q	51.22	10.35	8.22	2.39	2.70	23.66	2.17
KKR_P501S	30.29	3.83	0.79	1.57	1.02	7.21	4.20
KKR_G522S	63.97	12.37	3.37	3.47	2.21	21.42	2.99
KKR_H523F	53.03	9.32	5.28	3.38	2.74	20.72	2.56
KKR_N527D	52.34	1.75	0.56	1.24	0.59	4.13	12.66
KKR_N527G	28.13	2.49	0.55	1.59	0.78	5.41	5.20
KKR_N527K	20.69	1.81	0.72	1.02	0.63	4.19	4.94
KKR_Y528F	57.87	8.88	2.17	2.83	2.86	16.73	3.46
KKR_K529E	30.72	3.64	1.05	1.62	1.22	7.53	4.08
KKR_A530E	58.94	9.65	3.18	4.82	2.87	20.52	2.87
KKR_A530K	60.15	3.86	1.26	1.87	0.86	7.84	7.67
KKR_Q531N	17.46	2.00	1.25	1.49	0.46	5.20	3.36
KKR_Q531R	56.70	1.99	1.28	2.44	0.62	6.33	8.96

【０３０７】

表１７Ａ～１７Ｃは、例示的な二重変異体を含む、示された例示的な変異体を用いた結果を示す。

【０３０８】

【表８２】

表１７Ａ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	29.64	3.29	1.51	0.82	0.98	4.49
親	30.09	3.79	1.91	0.97	1.09	3.88
親	29.29	3.92	1.53	0.73	0.75	4.23
半分量	20.23	1.53	0.49	0.24	0.27	7.96
半分量	19.34	1.28	0.41	0.21	0.19	9.25
半分量	21.01	1.37	0.32	0.16	0.34	9.62
ELD_R416E_S418E	20.74	0.03	0.09	0.04	0.06	94.13
ELD_R416E_N476D	40.36	0.06	0.04	0.03	0.07	213.54
ELD_R416E_I479T	21.55	0.06	0.25	0.01	0.03	61.74
ELD_R416E_Q481A	2.83	0.05	0.02	0.01	0.06	19.59
ELD_R416E_Q481E	41.39	0.07	0.03	0.04	0.04	225.41
ELD_R416E_K525S	34.38	0.03	0.07	0.03	0.08	166.24
ELD_S418E_N476D	31.37	0.04	0.03	0.01	0.06	221.16
ELD_S418E_I479T	11.14	0.08	0.02	0.03	0.04	62.37
ELD_S418E_Q481A	3.20	0.03	0.02	0.03	0.11	16.08
ELD_S418E_Q481E	38.73	0.01	0.03	0.01	0.05	400.31
ELD_S418E_K525S	24.79	0.07	0.02	0.01	0.06	160.35
ELD_N476D_I479T	20.03	0.02	0.04	0.01	0.03	180.94
ELD_N476D_Q481A	12.76	0.03	0.04	0.02	0.05	88.57
ELD_N476D_Q481E	50.65	0.07	0.03	0.03	0.08	242.53
ELD_N476D_K525S	42.41	0.05	0.04	0.01	0.06	270.45
ELD_I479T_Q481A	8.92	0.07	0.02	0.01	0.02	72.43
ELD_I479T_Q481E	35.78	0.05	0.06	0.01	0.06	196.60
ELD_I479T_K525S	25.90	0.06	0.04	0.02	0.07	139.72
ELD_R416S_K525S	32.61	0.06	0.07	0.05	0.07	127.78
ELD_R422S_K525S	26.37	0.10	0.05	0.01	0.08	108.57
ELD_K448S_K525S	38.31	0.32	0.31	0.29	0.16	35.35
ELD_Q481A_K525S	15.18	0.09	0.05	0.01	0.07	67.80
ELD_Q481E_K525S	48.15	0.06	0.07	0.01	0.04	274.23
ELD_K525S_Q531R	46.91	0.07	0.06	0.06	0.10	168.33
ELD_R416D_K448A	33.83	0.09	0.41	0.07	0.05	54.89
ELD_R416D_I479Q	4.00	0.11	0.01	0.01	0.03	24.24
ELD_R416D_Q481A	0.98	0.07	0.02	0.04	0.03	6.23
ELD_R416D_K525A	5.58	0.07	0.07	0.02	0.04	26.88
ELD_R416E_R422H	36.93	0.10	0.41	0.10	0.04	56.30
ELD_R416E_K448A	46.84	0.24	1.54	0.27	0.08	22.04
ELD_R416E_I479Q	16.28	0.05	0.01	0.02	0.05	129.05
ELD_R416E_K525A	25.31	0.04	0.04	0.02	0.05	171.87
ELD_R416E_N527D	29.19	0.06	0.15	0.03	0.05	103.79
ELD_S418E_K448A	45.64	0.11	0.08	0.05	0.13	125.00

【０３０９】

【表８３】

ELD_S418E_I479Q	11.10	0.05	0.03	0.03	0.07	60.83
ELD_S418E_K525A	18.22	0.05	0.03	0.00	0.06	132.51
ELD_R422H_I479Q	31.90	0.04	0.03	0.02	0.04	232.64
ELD_R422H_Q481A	15.51	0.07	0.07	0.01	0.04	84.46
ELD_R422H_K525A	31.01	0.07	0.05	0.03	0.05	152.49
ELD_K448A_I479Q	51.54	0.04	0.01	0.06	0.01	421.61
ELD_K448A_Q481A	35.37	0.08	0.01	0.06	0.05	173.76
ELD_K448A_K525A	43.95	0.17	0.15	0.22	0.13	65.65
ELD_K448A_N527D	32.41	0.58	0.13	0.21	0.08	32.34
ELD_I479Q_Q481A	4.15	0.04	0.02	0.01	0.08	28.92
ELD_I479Q_K525A	27.87	0.05	0.02	0.00	0.05	252.87
ELD_Q481A_K525A	8.65	0.04	0.03	0.01	0.05	65.76
ELD_Q481A_N527D	15.47	0.07	0.06	0.01	0.07	72.82
ELD_K525A_N527D	23.46	0.07	0.04	0.02	0.07	116.95
ELD_S446D	40.19	0.53	0.44	0.11	0.10	34.11
ELD_G480D	54.97	1.33	0.11	0.38	0.69	21.84
ELD_S418D	32.88	0.10	0.18	0.12	0.16	58.14
ELD_N476D	44.56	0.10	0.05	0.07	0.10	137.79
ELD_I479T	30.54	0.13	0.16	0.02	0.04	88.36
ELD_Q481E	40.57	0.06	0.05	0.15	0.04	139.98
ELD_N527D	26.68	0.41	0.13	0.14	0.07	35.71
ELD_Q531R	32.95	0.63	0.17	0.12	0.19	29.60
ELD_I479Q	50.31	0.06	0.03	0.01	0.05	313.15
ELD_R416E	46.99	0.37	2.36	0.24	0.17	15.03
ELD_K525A	41.41	0.31	0.38	0.14	0.13	42.92
ELD_K525S	39.15	0.18	0.42	0.15	0.12	44.95
ELD_Q481A	41.21	0.05	0.13	0.04	0.09	133.38
GFP	0.04	0.05	0.04	0.00	0.08	NA
GFP	0.05	0.06	0.02	0.02	0.05	NA
GFP	0.02	0.05	0.03	0.01	0.05	NA

【０３１０】

【表８４】

表１７Ｂ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	29.64	3.29	1.51	0.82	0.98	4.49
親	30.09	3.79	1.91	0.97	1.09	3.88
親	29.29	3.92	1.53	0.73	0.75	4.23
半分量	20.23	1.53	0.49	0.24	0.27	7.96
半分量	19.34	1.28	0.41	0.21	0.19	9.25
半分量	21.01	1.37	0.32	0.16	0.34	9.62
KKR_R416E_S418E	20.09	0.02	0.01	0.02	0.08	151.13
KKR_R416E_N476D	20.88	0.03	0.02	0.02	0.10	121.14
KKR_R416E_I479T	42.32	0.11	0.03	0.03	0.03	220.35
KKR_R416E_Q481A	0.05	0.08	0.03	0.03	0.05	0.28
KKR_R416E_Q481E	31.75	0.08	0.02	0.01	0.10	163.74
KKR_R416E_K525S	30.56	0.08	0.03	0.04	0.06	146.79
KKR_S418E_N476D	2.68	0.06	0.03	0.02	0.07	15.27
KKR_S418E_I479T	35.49	0.04	0.02	0.02	0.08	234.26
KKR_S418E_Q481A	1.55	0.08	0.01	0.02	0.05	9.60
KKR_S418E_Q481E	17.90	0.05	0.04	0.01	0.04	135.16
KKR_S418E_K525S	10.28	0.08	0.02	0.03	0.05	55.61
KKR_N476D_I479T	5.09	0.05	0.02	0.01	0.10	26.81
KKR_N476D_Q481A	4.44	0.08	0.05	0.01	0.06	22.35
KKR_N476D_Q481E	3.08	0.09	0.04	0.02	0.03	17.28
KKR_N476D_K525S	8.06	0.02	0.02	0.00	0.11	52.10
KKR_I479T_Q481A	25.89	0.05	0.01	0.01	0.05	204.61
KKR_I479T_Q481E	35.07	0.05	0.00	0.02	0.08	218.88
KKR_I479T_K525S	37.19	0.09	0.08	0.02	0.06	151.36
KKR_R416S_K525S	30.89	0.12	0.02	0.04	0.07	125.26
KKR_R422S_K525S	28.13	0.07	0.04	0.01	0.06	160.39
KKR_K448S_K525S	30.31	0.42	0.04	0.04	0.08	52.74
KKR_Q481A_K525S	4.99	0.03	0.02	0.04	0.04	36.01
KKR_Q481E_K525S	24.26	0.03	0.01	0.01	0.12	142.63
KKR_K525S_Q531R	31.33	0.20	0.05	0.01	0.12	83.63
KKR_R416D_K448A	34.82	0.06	0.07	0.05	0.04	160.49
KKR_R416D_I479Q	37.53	0.07	0.01	0.01	0.07	229.85
KKR_R416D_Q481A	1.51	0.05	0.01	0.03	0.05	10.67
KKR_R416D_K525A	8.83	0.09	0.02	0.01	0.11	40.27
KKR_R416E_R422H	39.63	0.19	0.02	0.03	0.08	122.95
KKR_R416E_K448A	43.43	0.13	0.05	0.04	0.19	106.38
KKR_R416E_I479Q	40.55	0.12	0.04	0.07	0.05	140.11
KKR_R416E_K525A	23.98	0.04	0.05	0.03	0.09	112.67
KKR_R416E_N527D	40.12	0.10	0.01	0.04	0.13	141.70
KKR_S418E_K448A	36.67	0.10	0.08	0.02	0.03	158.02

【０３１１】

【表８５】

KKR_S418E_I479Q	36.46	0.07	0.09	0.03	0.02	173.06
KKR_S418E_K525A	6.28	0.08	0.01	0.04	0.04	36.37
KKR_R422H_I479Q	35.05	0.29	0.14	0.06	0.03	66.28
KKR_R422H_Q481A	12.81	0.06	0.03	0.01	0.10	64.84
KKR_R422H_K525A	31.03	0.11	0.04	0.05	0.05	126.26
KKR_K448A_I479Q	35.23	0.17	0.19	0.05	0.06	74.29
KKR_K448A_Q481A	19.81	0.11	0.01	0.03	0.03	116.04
KKR_K448A_K525A	36.25	0.08	0.04	0.01	0.07	183.47
KKR_K448A_N527D	29.74	0.30	0.12	0.01	0.10	55.29
KKR_I479Q_Q481A	31.65	0.09	0.07	0.01	0.06	128.89
KKR_I479Q_K525A	37.06	0.06	0.02	0.03	0.08	196.46
KKR_Q481A_K525A	3.09	0.06	0.01	0.03	0.05	21.23
KKR_Q481A_N527D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_K525A_N527D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KKR_S446D	38.46	0.08	0.03	0.03	0.08	175.19
KKR_G480D	40.11	0.60	0.98	0.14	0.14	21.66
KKR_S418D	35.59	0.35	0.13	0.06	0.08	56.27
KKR_N476D	20.04	0.12	0.05	0.05	0.04	78.85
KKR_I479T	36.62	0.40	0.09	0.24	0.07	45.83
KKR_Q481E	37.26	0.15	0.03	0.01	0.08	137.34
KKR_N527D	29.30	0.98	0.37	0.24	0.30	15.48
KKR_Q531R	27.77	0.61	0.69	0.38	0.19	14.82
KKR_I479Q	40.88	1.28	0.74	0.35	0.09	16.60
KKR_R416E	41.76	0.49	0.06	0.05	0.55	35.99
KKR_K525A	33.81	0.46	0.04	0.07	0.19	44.54
KKR_K525S	35.00	1.05	0.15	0.14	0.24	22.10
KKR_Q481A	36.52	0.12	0.09	0.01	0.10	113.98
GFP	0.04	0.05	0.04	0.00	0.08	NA
GFP	0.05	0.06	0.02	0.02	0.05	NA
GFP	0.02	0.05	0.03	0.01	0.05	NA

【０３１２】

【表８６】

表１７Ｃ

	AAVS1	OT1	OT2	OT3	OT4	比
親	29.64	3.29	1.51	0.82	0.98	4.49
親	30.09	3.79	1.91	0.97	1.09	3.88
親	29.29	3.92	1.53	0.73	0.75	4.23
半分量	20.23	1.53	0.49	0.24	0.27	7.96
半分量	19.34	1.28	0.41	0.21	0.19	9.25
半分量	21.01	1.37	0.32	0.16	0.34	9.62
ELD_KKR_R416E_S418E	1.12	0.06	0.01	0.04	0.08	5.75
ELD_KKR_R416E_N476D	0.08	0.02	0.01	0.02	0.05	0.90
ELD_KKR_R416E_I479T	9.58	0.01	0.01	0.01	0.07	93.64
ELD_KKR_R416E_Q481A	0.04	0.03	0.03	0.02	0.06	0.34
ELD_KKR_R416E_Q481E	15.79	0.01	0.01	0.02	0.07	146.87
ELD_KKR_R416E_K525S	18.64	0.07	0.03	0.01	0.06	110.61
ELD_KKR_S418E_N476D	0.03	0.05	0.03	0.01	0.06	0.19
ELD_KKR_S418E_I479T	0.07	0.06	0.05	0.02	0.05	0.39
ELD_KKR_S418E_Q481A	0.06	0.06	0.02	0.01	0.07	0.39
ELD_KKR_S418E_Q481E	0.25	0.06	0.02	0.01	0.06	1.60
ELD_KKR_S418E_K525S	0.04	0.07	0.01	0.01	0.06	0.28
ELD_KKR_N476D_I479T	0.01	0.08	0.03	0.01	0.07	0.06
ELD_KKR_N476D_Q481A	0.04	0.02	0.01	0.02	0.02	0.60
ELD_KKR_N476D_Q481E	0.04	0.07	0.04	0.01	0.05	0.22
ELD_KKR_N476D_K525S	0.03	0.05	0.05	0.00	0.04	0.19
ELD_KKR_I479T_Q481A	1.92	0.02	0.03	0.01	0.07	14.25
ELD_KKR_I479T_Q481E	1.71	0.06	0.04	0.02	0.04	11.29
ELD_KKR_I479T_K525S	0.87	0.03	0.02	0.02	0.07	6.00
ELD_KKR_R416S_K525S	16.65	0.08	0.02	0.04	0.08	77.13
ELD_KKR_R422S_K525S	8.09	0.10	0.02	0.01	0.07	39.66
ELD_KKR_K448S_K525S	34.04	0.06	0.03	0.02	0.06	203.03
ELD_KKR_Q481A_K525S	2.27	0.05	0.04	0.01	0.08	12.73
ELD_KKR_Q481E_K525S	1.58	0.04	0.04	0.02	0.05	10.24
ELD_KKR_K525S_Q531R	31.89	0.06	0.02	0.02	0.05	213.09
ELD_KKR_R416D_K448A	34.69	0.02	0.05	0.04	0.09	171.10
ELD_KKR_R416D_I479Q	0.64	0.09	0.04	0.01	0.08	2.97
ELD_KKR_R416D_Q481A	0.72	0.07	0.03	0.00	0.09	3.74
ELD_KKR_R416D_K525A	0.44	0.03	0.01	0.03	0.03	4.38
ELD_KKR_R416E_R422H	51.26	0.06	0.04	0.04	0.08	241.20
ELD_KKR_R416E_K448A	65.65	0.04	0.05	0.03	0.11	296.99
ELD_KKR_R416E_I479Q	9.45	0.03	0.01	0.03	0.06	69.73
ELD_KKR_R416E_K525A	8.87	0.06	0.02	0.03	0.07	50.16
ELD_KKR_R416E_N527D	8.77	0.06	0.02	0.00	0.05	65.60
ELD_KKR_S418E_K448A	12.39	0.07	0.01	0.02	0.02	105.55

【０３１３】

【表８７】

ELD_KKR_S418E_I479Q	0.17	0.08	0.04	0.06	0.07	0.68
ELD_KKR_S418E_K525A	0.07	0.05	0.02	0.00	0.04	0.57
ELD_KKR_R422H_I479Q	6.81	0.04	0.01	0.01	0.10	39.89
ELD_KKR_R422H_Q481A	17.21	0.05	0.04	0.04	0.05	97.54
ELD_KKR_R422H_K525A	9.57	0.02	0.04	0.04	0.04	68.82
ELD_KKR_K448A_I479Q	33.17	0.06	0.01	0.01	0.07	209.50
ELD_KKR_K448A_Q481A	52.80	0.05	0.03	0.02	0.05	351.52
ELD_KKR_K448A_K525A	31.94	0.06	0.03	0.02	0.08	164.22
ELD_KKR_K448A_N527D	12.12	0.08	0.03	0.01	0.04	70.27
ELD_KKR_I479Q_Q481A	1.71	0.01	0.00	0.06	0.10	10.33
ELD_KKR_I479Q_K525A	1.27	0.09	0.05	0.02	0.06	5.70
ELD_KKR_Q481A_K525A	0.52	0.01	0.02	0.01	0.05	5.01
ELD_KKR_Q481A_N527D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ELD_KKR_K525A_N527D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ELD_KKR_S446D	15.36	0.04	0.02	0.04	0.08	83.81
ELD_KKR_G480D	64.90	0.09	0.02	0.06	0.15	200.43
ELD_KKR_S418D	26.63	0.05	0.03	0.00	0.08	167.71
ELD_KKR_N476D	4.22	0.02	0.05	0.02	0.03	36.30
ELD_KKR_I479T	26.01	0.05	0.05	0.04	0.03	153.83
ELD_KKR_Q481E	38.76	0.08	0.02	0.05	0.03	221.20
ELD_KKR_N527D	21.40	0.10	0.03	0.03	0.07	92.64
ELD_KKR_Q531R	30.69	0.17	0.05	0.10	0.03	89.70
ELD_KKR_I479Q	52.76	0.03	0.03	0.02	0.07	350.46
ELD_KKR_R416E	61.25	0.16	0.10	0.09	0.10	138.11
ELD_KKR_K525A	38.71	0.15	0.01	0.03	0.07	152.55
ELD_KKR_K525S	42.82	0.02	0.03	0.02	0.07	299.99
ELD_KKR_Q481A	70.60	0.07	0.02	0.04	0.06	383.30
GFP	0.04	0.05	0.04	0.00	0.08	NA
GFP	0.05	0.06	0.02	0.02	0.05	NA
GFP	0.02	0.05	0.03	0.01	0.05	NA

【０３１４】

表１８Ａ～１８Ｃは、示された切断ドメイン変異体を用いた結果を示す。

【０３１５】

【表８８】

表１８Ａ

	AAVS1	OT1	比
親	60.28	12.69	4.75
親	57.85	9.71	5.96
親	54.74	9.42	5.81
半分量	51.05	5.51	9.26
半分量	42.72	3.69	11.58
半分量	50.26	7.75	6.49
ELD_G480A	71.44	10.67	6.70
ELD_G480C	62.08	8.04	7.72
ELD_G480D	64.70	0.79	82.32
ELD_G480E	76.47	0.57	134.21
ELD_G480F	40.12	1.20	33.37
ELD_G480H	ND	15.72	ND
ELD_G480I	41.29	4.05	10.19
ELD_G480K	68.06	14.64	4.65
ELD_G480L	41.04	2.35	17.49
ELD_G480M	39.95	3.93	10.16
ELD_G480N	57.82	11.58	4.99
ELD_G480P	45.73	1.29	35.32
ELD_G480Q	25.33	0.30	85.73
ELD_G480R	56.94	13.22	4.31
ELD_G480S	68.85	11.40	6.04
ELD_G480T	68.02	14.68	4.63
ELD_G480V	43.43	2.22	19.53
ELD_G480W	64.39	0.83	77.94
ELD_G480Y	45.27	2.45	18.51
ELD_R416E	66.43	0.40	164.15
ELD_I479Q	70.95	0.21	345.03
ELD_G480D	72.46	0.65	110.75
ELD_Q481A	58.01	0.34	173.11
ELD_K525A	66.31	0.60	111.25
ELD_R416E_R422H	48.29	0.07	679.24
ELD_R416E_K448A	70.50	0.50	142.30
ELD_K448A_I479Q	68.99	0.11	637.89
ELD_K448A_Q481A	41.36	0.12	333.89
ELD_K448A_K525A	70.69	0.24	300.02
GFP	0.11	0.03	ND
GFP	0.20	0.00	ND

【０３１６】

【表８９】

表１８Ｂ

	AAVS1	OTI	比
親	60.28	12.69	4.75
親	57.85	9.71	5.96
親	54.74	9.42	5.81
半分量	51.05	5.51	9.26
半分量	42.72	3.69	11.58
半分量	50.26	7.75	6.49
KKR_G480A	65.59	6.54	10.03
KKR_G480C	56.27	5.14	10.94
KKR_G480D	56.11	1.00	56.19
KKR_G480E	56.49	0.73	77.63
KKR_G480F	34.91	0.78	44.55
KKR_G480H	60.07	8.52	7.05
KKR_G480I	38.68	1.60	24.22
KKR_G480K	65.79	11.26	5.84
KKR_G480L	41.92	1.13	36.98
KKR_G480M	55.69	5.66	9.84
KKR_G480N	61.56	9.62	6.40
KKR_G480P	54.84	1.32	41.45
KKR_G480Q	62.68	7.05	8.89
KKR_G480R	60.84	10.34	5.88
KKR_G480S	66.61	12.23	5.45
KKR_G480T	71.73	14.73	4.87
KKR_G480V	41.05	1.63	25.24
KKR_G480W	57.21	0.56	102.21
KKR_G480Y	46.86	3.28	14.27
KKR_R416E	70.79	1.45	48.82
KKR_I479Q	65.46	2.18	29.99
KKR_G480D	56.96	1.09	52.26
KKR_Q481A	62.91	0.17	366.11
KKR_K525A	66.35	1.35	49.21
KKR_R416E_R422H	69.06	0.08	847.00
KKR_R416E_K448A	ND	0.25	ND
KKR_K448A_I479Q	64.17	0.37	175.75
KKR_K448A_Q481A	35.73	0.17	214.80
KKR_K448A_K525A	64.77	0.34	192.29
GFP	0.11	0.03	ND
GFP	0.20	0.00	ND

【０３１７】

【表９０】

表１８Ｃ

	AAVS1	OT1	比
親	60.28	12.69	4.75
親	57.85	9.71	5.96
親	54.74	9.42	5.81
半分量	51.05	5.51	9.26
半分量	42.72	3.69	11.58
半分量	50.26	7.75	6.49
ELD_KKR_G480A	83.25	15.29	5.44
ELD_KKR_G480C	62.30	6.18	10.09
ELD_KKR_G480D	68.39	0.17	400.26
ELD_KKR_G480E	64.32	0.16	390.88
ELD_KKR_G480F	50.56	2.10	24.03
ELD_KKR_G480H	70.45	19.84	3.55
ELD_KKR_G480I	30.54	1.41	21.66
ELD_KKR_G480K	75.70	4.49	16.88
ELD_KKR_G480L	29.27	0.35	83.87
ELD_KKR_G480M	38.29	2.25	17.05
ELD_KKR_G480N	62.58	10.50	5.96
ELD_KKR_G480P	46.49	0.10	446.75
ELD_KKR_G480Q	21.45	0.45	48.14
ELD_KKR_G480R	34.10	4.91	6.94
ELD_KKR_G480S	70.28	15.69	4.48
ELD_KKR_G480T	74.83	16.53	4.53
ELD_KKR_G480V	30.55	0.92	33.16
ELD_KKR_G480W	40.77	0.11	378.20
ELD_KKR_G480Y	38.97	1.69	23.09
ELD_KKR_R416E	75.31	0.36	207.10
ELD_KKR_I479Q	63.75	0.08	804.35
ELD_KKR_G480D	77.51	0.13	612.83
ELD_KKR_Q481A	86.20	0.12	731.56
ELD_KKR_K525A	56.37	0.06	969.83
ELD_KKR_R416E_R422H	58.35	0.06	996.94
ELD_KKR_R416E_K448A	84.57	0.07	1241.44
ELD_KKR_K448A_I479Q	43.78	0.03	1296.88
ELD_KKR_K448A_Q481A	63.32	0.08	816.13
ELD_KKR_K448A_K525A	48.43	0.13	384.71
GFP	0.11	0.03	ND
GFP	0.20	0.00	ND

【０３１８】

図１５及び１６もまた、示された変異体を用いた選択された結果のまとめを示す。

【０３１９】

これらの結果は、本明細書に記載の変異体による高度に特異的な切断を示す。

【０３２０】

本明細書に言及される全ての特許、特許出願及び刊行物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

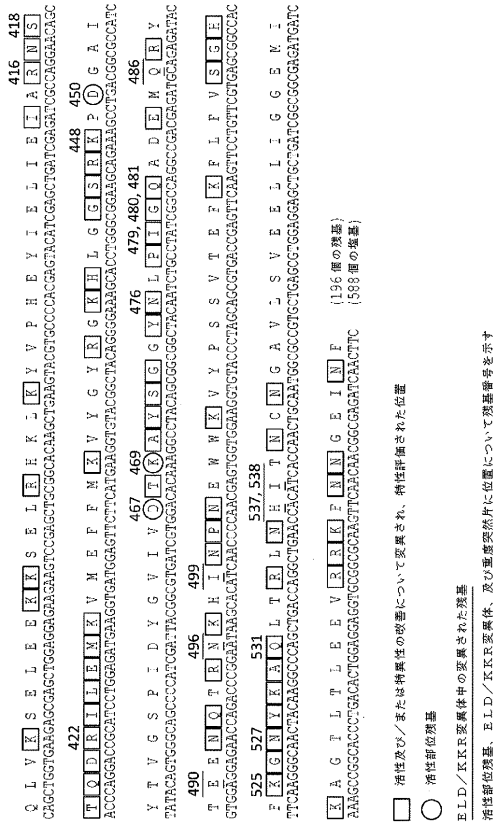
【０３２１】

明確に理解できるように図示及び例として本開示を多少詳細に提供したが、本開示の趣

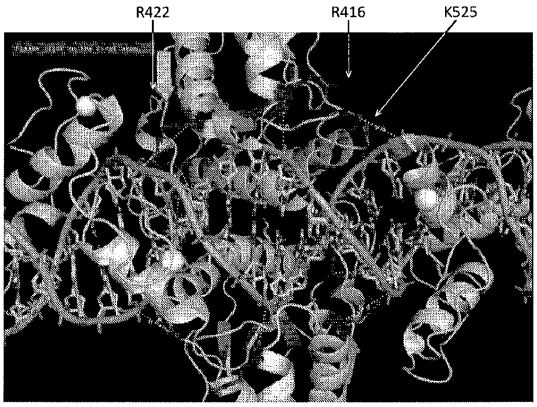
旨または範囲から逸脱することなく、様々な変更及び修正を実施することができることは、当業者には明らかであろう。したがって、前述の説明及び例を限定的であると見なされるべきではない。

【図面】

【図１】

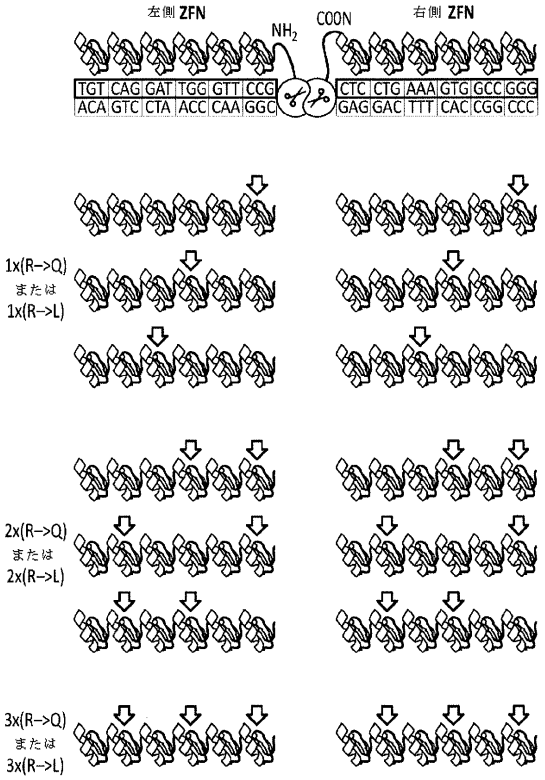


【図２Ａ】



【図２Ｂ】

【図２Ｃ】



【図３】

ZFN1	ZFN2	PRJIYLFN	NIFMAEVG	PEVYOHIU
51857 ELD	51949 KKR	80.59	9.04	0.65
51857 ELD	51949 KKR_R416S	80.63	0.75	0.08
51857 ELD	51949 KKR_R422S	53.31	0.36	0.02
51857 ELD	51949 KKR_R447S	11.60	0.05	0.03
51857 ELD	51949 KKR_K448S	80.95	1.63	0.67
51857 ELD	51949 KKR_K525S	73.55	0.34	0.03
51857 ELD_R416S	51949 KKR	49.29	1.38	0.09
51857 ELD_R422S	51949 KKR	55.46	1.15	0.22
51857 ELD_R447S	51949 KKR	0.09	0.07	0.05
51857 ELD_K448S	51949 KKR	78.35	9.00	0.51
51857 ELD_K525S	51949 KKR	22.39	0.37	0.11
51857 ELD_R416S	51949 KKR_R416S	48.70	0.26	0.05
51857 ELD_R422S	51949 KKR_R422S	19.78	0.14	0.04
51857 ELD_R447S	51949 KKR_R447S	0.47	0.11	0.06
51857 ELD_K448S	51949 KKR_K448S	69.45	2.59	0.34
51857 ELD_K526S	51949 KKR_K525S	6.53	0.07	0.05

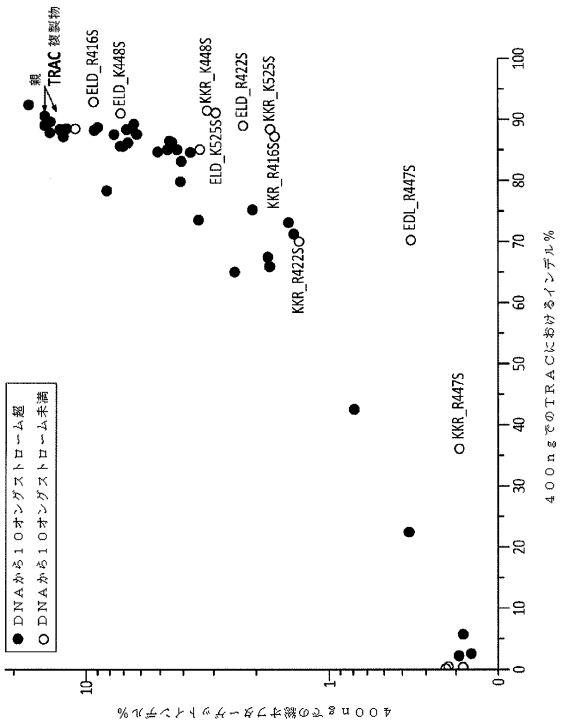
A

ZFN1	ZFN2	PRJIYLFN	NIFMAEVG	PEVYOHIU
51857_KKR	51949_ELD	88.28	9.26	0.87
51857_KKR	51949_ELD_R416S	81.35	1.68	0.38
51857_KKR	51949_ELD_R422S	67.78	0.12	0.12
51857_KKR	51949_ELD_K447S	70.79	0.09	0.08
51857_KKR	51949_ELD_K448S	83.02	1.00	0.33
51857_KKR	51949_ELD_K525S	76.60	0.06	0.09
51857_KKR_R416S	51949_ELD	59.43	0.76	0.12
51857_KKR_R422S	51949_ELD	71.64	3.27	0.26
51857_KKR_K447S	51949_ELD	25.01	0.07	0.06
51857_KKR_K448S	51949_ELD	83.71	15.88	0.34
51857_KKR_K525S	51949_ELD	33.14	0.21	0.11
51857_KKR_R416S	51949_ELD_R416S	68.35	0.04	0.11
51857_KKR_R422S	51949_ELD_R422S	26.25	0.07	0.11
51857_KKR_K447S	51949_ELD_K447S	1.42	0.06	0.11
51857_KKR_K448S	51949_ELD_K448S	84.31	3.06	0.71
51857_KKR_K525S	51949_ELD_K525S	6.99	0.06	0.09

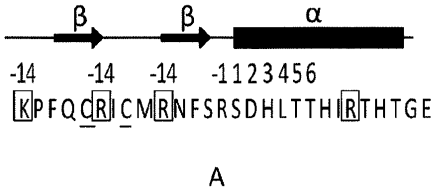
B

各ＺＦＮは、２μＧのｍＲＮＡで送達された

【図４】

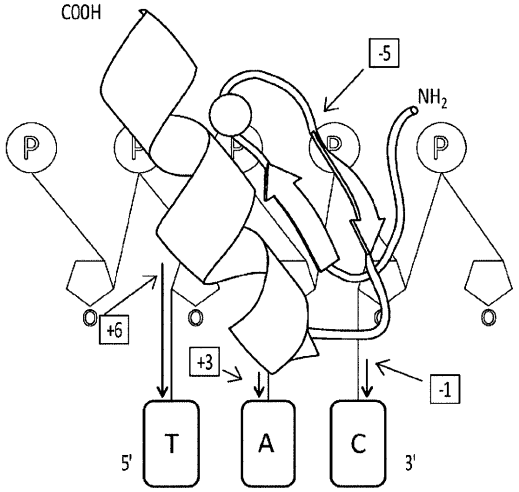


【図５Ａ】



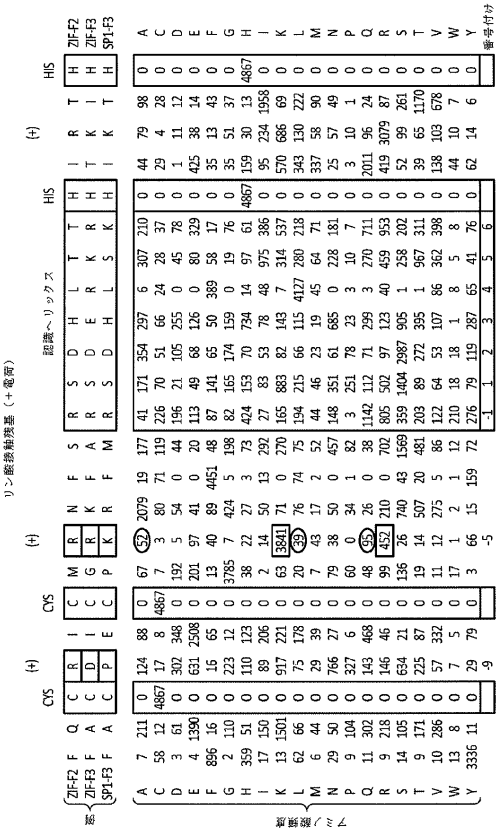
A

【図５Ｂ】

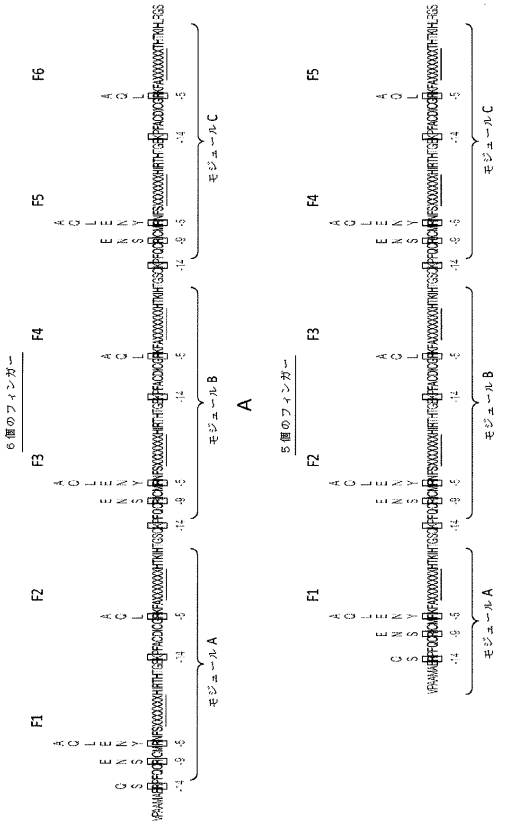


B

【図６】

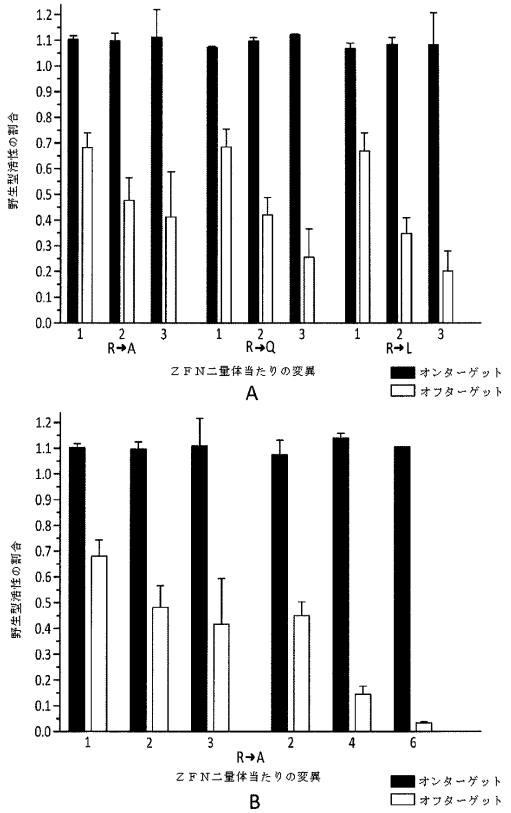


【図７】

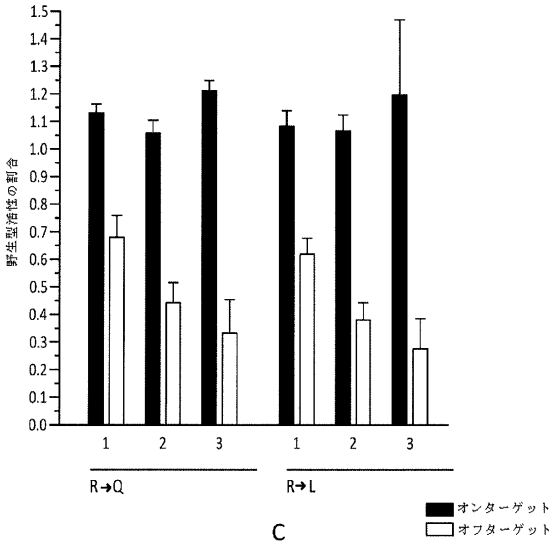


A B

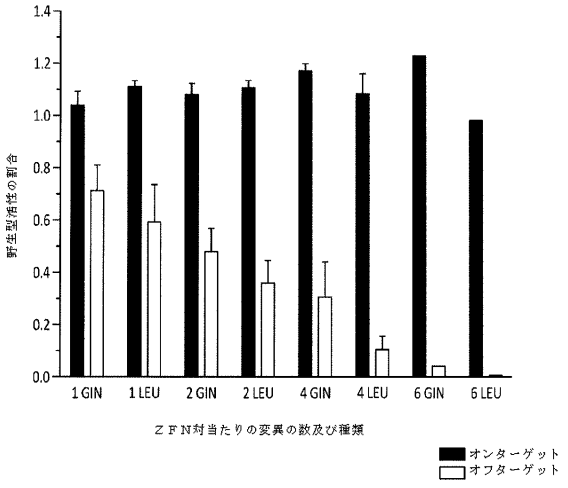
【図８－１】



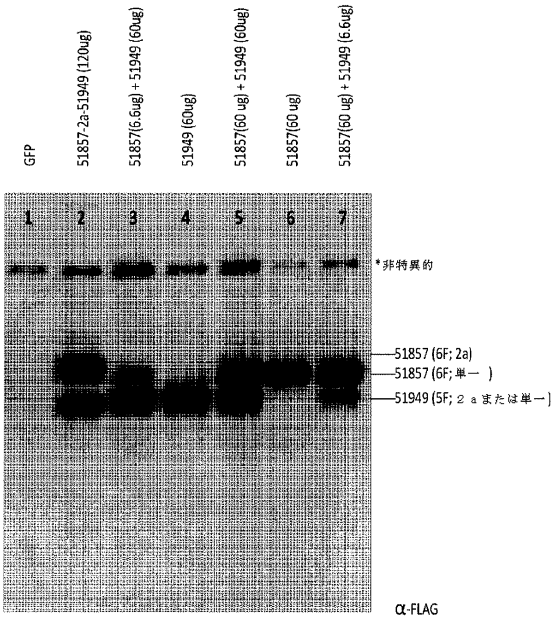
【図８－２】



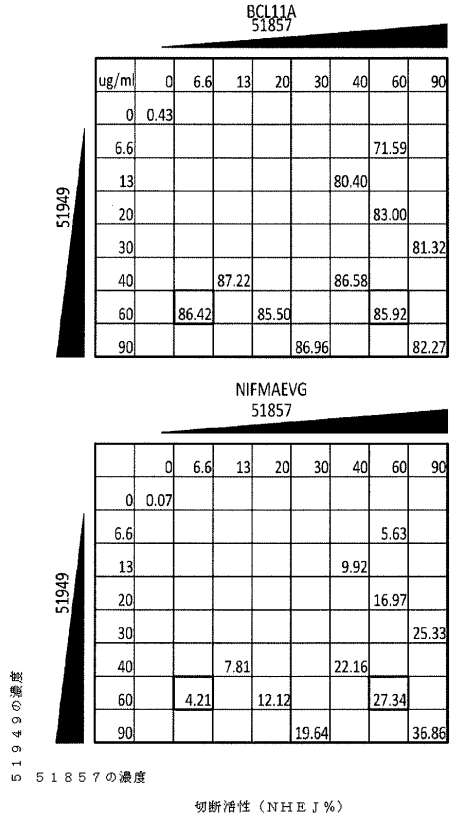
【図９】



【図１０】



【図１１】



【図１２】

名称	配列番号		51857/51949 2a ZFN	51857/51949 2a 対照	51857/51949 R416S ZFN	51857/51949 R416S 対照	比
PRJIYLFN	13	PRJIYLFN	53.24	0.17	61.54	0.22	0.87
NIFMAEVG	14	NIFMAEVG	18.20	0.06	0.58	0.04	31.21
GJZEIYTO	15	GJZEIYTO	1.87	0.06	0.15	0.07	12.76
PEVYOHIU	20	PEVYOHIU	1.43	0.07	0.10	0.10	14.68
QYYPVRQWMN	51	QYYPVRQWMN	1.18	0.10	0.09	0.08	12.51
ZJCRPAXW	23	ZJCRPAXW	0.93	0.06	0.20	0.05	4.53
RFGIYSHZ	16	RFGIYSHZ	0.90	0.10	0.03	0.13	27.39
XCVJFHOB	18	XCVJFHOB	0.83	0.08	0.13	0.08	6.58
ZMIYSTJN	19	ZMIYSTJN	0.81	0.05	0.11	0.04	7.27
WOEIMTLA	36	WOEIMTLA	0.65	0.09	0.07	0.09	8.88
QRMXFJNY	21	QRMXFJNY	0.60	0.08	0.08	0.09	7.76
EMQNZDWX	25	EMQNZDWX	0.59	0.32	0.13	0.27	4.54
DYNFTSUP	46	DYNFTSUP	0.57	0.03	0.06	0.05	9.41
IRSUAEVF	40	IRSUAEVF	0.55	0.11	0.10	0.11	5.24
RFTBCWPJ	17	RFTBCWPJ	0.52	0.07	0.09	0.09	6.02
TXHULGPN	45	TXHULGPN	0.47	0.08	0.08	0.06	5.96
ZTIFQRKB	48	ZTIFQRKB	0.46	0.11	0.11	0.10	4.02
XFDECBQY	47	XFDECBQY	0.37	0.09	0.08	0.08	4.86
WBEAFQRU	43	WBEAFQRU	0.28	0.07	0.04	0.08	6.39
EKYJXRAHKV	52	EKYJXRAHKV	0.24	0.09	0.04	0.06	5.52
TBUYJIVX	37	TBUYJIVX	0.19	0.07	0.04	0.10	5.12
SIJYTMVG	31	SIJYTMVG	0.19	0.11	0.07	0.12	2.77
AKRHSGPT	39	AKRHSGPT	0.15	0.07	0.03	0.06	4.90
RSYQNPLG	30	RSYQNPLG	0.14	0.27	0.14	0.25	0.99
HBXGRVYT	27	HBXGRVYT	0.12	0.06	0.05	0.07	2.60
ATWDXHSC	41	ATWDXHSC	0.11	0.05	0.08	0.05	1.48
ZLRCYHDF	28	ZLRCYHDF	0.11	0.08	0.04	0.13	3.01
RXDOKCGI	44	RXDOKCGI	0.11	0.05	0.04	0.07	2.46
OTHMRBJL	29	OTHMRBJL	0.10	0.05	0.04	0.05	2.48
QDMBZRWI	42	QDMBZRWI	0.09	0.07	0.03	0.08	3.47
RDEWOSIT	33	RDEWOSIT	0.09	0.06	0.03	0.06	3.15
BCGJKHUV	32	BCGJKHUV	0.09	0.08	0.06	0.08	1.37
LXAFJWRI	24	LXAFJWRI	0.09	0.07	0.10	0.09	0.89
YPLXMQCB	34	YPLXMQCB	0.09	0.06	0.06	0.03	1.44
ZFUQTLMTFC	49	ZFUQTLMTFC	0.07	0.03	0.03	0.04	2.45
QBFUYVGW	22	QBFUYVGW	0.07	0.10	0.04	0.11	1.80
LPRCNGHU	38	LPRCNGHU	0.06	0.08	0.03	0.06	1.99
YJRBCUNZ	26	YJRBCUNZ	0.05	0.05	0.04	0.06	1.38
TPHSLVEM	35	TPHSLVEM	0.05	0.04	0.02	0.03	2.69
ZCNLWTPH	50	ZCNLWTPH	0.04	0.08	0.03	0.07	1.31
ADWZQXZI	53	ADWZQXZI	0.02	0.04	ND	ND	ND

51857/51949 2a: 120 μg mRNA
51857/51949 R416S: 60 μg 51949-R416S, 6.6 μg 51857

【図１３】

親ＺＦＮ対 (SBS51857/SBS51949)

遺伝子座 染色体	遺伝子座 塩基	捕捉事象番号	インデル%、ＣＤ３４細胞 右側ZFNのμg 60	6.6 60
2	60495268	2616	82.23	82.16
8	119856442	2202	11.74	1.26
4	7829724	214	0.41	NS
12	132241502	207	ND	ND
2	62164812	179	2.17	0.31
1	54506812	162	0.83	0.19
2	23702832	133	0.97	0.08
10	132654830	124	1.04	0.25
14	67422056	116	0.86	0.06
17	29624230	101	0.48	0.05
10	69571178	72	1.54	0.31
13	75549350	72	0.72	0.13
16	15141542	69	NS	NS
16	67184174	69	ND	ND
16	2122340	68	NS	NS
14	73740924	66	0.18	NS
X	134914730	66	0.39	0.06
6	53805554	65	4.04	0.49
1	29182166	59	0.20	NS
20	37707466	53	0.62	0.07
10	101133378	50	1.12	0.07
12	124995298	49	0.08	NS
7	131503656	46	0.13	NS
8	29495582	44	0.05	0.04
21	33308802	41	0.19	NS
8	94988046	40	0.25	NS
19	45406684	39	ND	ND
標準なインデル系有するオフターゲット遺伝子座：			21	13
総オフターゲットインデル%：			28.0%	3.4%

親ＺＦＮ対 (SBS51857/SBS65721)

遺伝子座 染色体	遺伝子座 塩基	捕捉事象番号	インデル%、ＣＤ３４細胞 右側ZFNのμg 60	20 60
2	60495270	7372	82.87	80.21
8	119856444	157	0.06	NS
16	67184174	71	ND	ND
2	23702834	65	0.04	NS
17	29624236	60	NS	0.03
10	69789196	38	NS	NS
2	60494824	36	NS	NS
X	66004392	34	0.08	NS
10	132654830	33	0.07	NS
8	29495582	33	NS	NS
4	7829724	29	NS	0.05
21	36901820	27	NS	NS
21	46423666	20	ND	ND
16	88559110	19	NS	NS
19	51327618	19	NS	NS
6	169090708	18	NS	NS
1	134914730	17	NS	NS
5	54506812	17	NS	NS
9	91430050	17	NS	NS
1	612400	17	ND	ND
1	612500	17	ND	ND
1	107771554	16	NS	NS
11	70518296	15	NS	NS
20	49636010	15	NS	NS
8	94988046	15	NS	NS
1	26938300	15	NS	NS
8	66165666	15	NS	NS
			4	2
			0.26%	0.08%

【図１４】

染色体	塩基番号	組み込み体数	インデル% ZFN	インデル% 対照	P値(<0.05の場合)
17	721818	5	0.04	0.04	NS
2	112583538	5	0.03	0.07	NS
2	169268666	5	ND1	ND1	NS
8	26449836	5	ND1	ND1	
8	29495584	5	0.03	0.12	
11	10961236	5	0.04	0.04	NS
16	46386624	5	0.22	0.24	NS
16	88559110	5	0.08	0.05	NS
2	164741410	5	0.03	0.01	NS
5	176402584	5	0.08	0.06	NS
5	95714316	5	0.03	0.03	NS
6	84224380	5	0.0	0.13	NS
7	106878380	5	0.03	0.06	NS
9	37906562	5	0.19	0.18	NS
1	211655464	4	0.02	0.07	NS
13	75549352	4	0.04	0.05	NS
14	49586826	4	0.02	0.06	NS
16	46399565	4	0.09	0.08	NS
1	154649476	4	0.1	0.09	NS
10	21001996	4	0.08	0.18	
13	79775980	4	ND1	ND1	
15	82322852	4	0.0	0.05	NS
15	82327918	4	0.02	0.28	NS
15	85267112	4	0.09	0.12	NS
15	85267176	4	0.05	0.03	NS
16	34586904	4	ND2	ND2	
17	21016474	4	0.03	0.04	NS
19	14243018	4	ND1	ND1	
2	173593302	4	0.04	0.1	NS

ND2：データなし－バックグラウンドが高かった（１％超）か、または総リード数が不十分であった（１０００未満のリード数）

染色体	塩基番号	組み込み体数	インデル% ZFN	インデル% 対照	P値(<0.05の場合)
2	60495266	1893	79.54	0.11	<0.00001
8	119856640	85	0.15	0.1	NS
3	184689238	33	0.07	0.07	NS
10	132654832	16	0.07	0.06	NS
11	108224088	13	0.03	0.02	NS
16	67184174	12	ND1	ND1	
1	223123858	12	0.02	0.05	NS
2	23702834	12	0.07	0.05	NS
1	29182168	10	ND1	ND1	
20	48636010	9	0.04	0.05	NS
1	204975770	9	0.02	0.05	NS
2	62164816	9	0.0	0.04	NS
1	116494398	9	0.06	0.01	NS
16	34590356	9	ND1	ND1	
8	94988044	8	0.11	0.03	NS
1	21635648	7	0.06	0.02	NS
19	51327822	7	ND1	ND1	
4	7829724	7	0.04	0.06	NS
X	66004390	7	0.12	0.04	NS
10	91591624	7	0.07	0.02	NS
16	15220090	7	0.13	0.11	NS
6	28540486	7	0.02	0.05	NS
9	98755464	7	0.06	0.05	NS
14	73740924	6	ND1	ND1	
10	69789200	6	0.0	0.02	NS
16	18131716	6	ND1	ND1	
18	45431502	6	0.05	0.06	NS
4	59602300	6	0.24	0.21	NS
18	2920000	6	0.07	0.02	NS
2	96873180	5	0.09	0.06	NS

NS：P値>0.05 | ND1：データなし－遺伝子座が増幅しなかったか、または配列しなかった

【図１５】

	総量			半分量		
オン	29.64	30.09	29.29	20.23	19.34	21.01
比	4.49	3.88	4.23	7.96	9.25	9.62

親

A

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
オン	46.99	ND	44.56	30.54	41.21	40.57	39.15
比	15.03	ND	137.79	88.36	133.38	139.98	44.95

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
オン	41.76	ND	20.04	36.62	36.52	37.26	35.00
比	35.99	ND	78.85	45.83	113.98	137.34	22.10

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
オン	61.25	ND	4.22	26.01	70.60	38.76	42.82
比	138.11	ND	36.30	153.83	383.30	221.20	299.99

単一変異体

B

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
R416E	NA	20.74	40.36	21.55	2.83	41.39	34.38
S418E	20.74	NA	31.37	11.14	3.20	38.73	24.79
N476D	40.36	31.37	NA	20.03	12.76	50.65	42.41
I479T	21.55	11.14	20.03	NA	8.92	35.78	25.90
Q481A	2.83	3.20	12.76	8.92	NA	ND	15.18
Q481E	41.39	38.73	50.65	35.78	ND	NA	48.15
K525S	34.38	24.79	42.41	25.90	15.18	48.15	NA

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
R416E	NA	20.09	20.88	42.32	0.05	31.75	30.56
S418E	20.09	NA	2.68	35.49	1.55	17.90	10.28
N476D	20.88	2.68	NA	5.09	4.44	3.08	8.06
I479T	42.32	35.49	5.09	NA	25.89	35.07	37.19
Q481A	0.05	1.55	4.44	25.89	NA	ND	4.99
Q481E	31.75	17.90	3.08	35.07	ND	NA	24.26
K525S	30.56	10.28	8.06	37.19	4.99	24.26	NA

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
R416E	NA	1.12	0.08	9.58	0.04	15.79	18.64
S418E	1.12	NA	0.03	0.07	0.06	0.25	0.04
N476D	0.08	0.03	NA	0.01	0.04	0.04	0.03
I479T	9.58	0.07	0.01	NA	1.92	1.71	0.87
Q481A	0.04	0.06	0.04	1.92	NA	ND	2.27
Q481E	15.79	0.25	0.04	1.71	ND	NA	1.58
K525S	18.64	0.04	0.03	0.87	2.27	1.58	NA

二重変異体グリッドのオンターゲット

C

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
R416E	NA	94.13	213.54	61.74	19.59	225.41	166.24
S418E	94.13	NA	221.16	62.37	16.08	400.31	160.35
N476D	213.54	221.16	NA	180.94	88.57	242.53	270.45
I479T	61.74	62.37	180.94	NA	72.43	196.60	139.72
Q481A	19.59	16.08	88.57	72.43	NA	ND	67.80
Q481E	225.41	400.31	242.53	196.60	ND	NA	274.23
K525S	166.24	160.35	270.45	139.72	67.80	274.23	NA

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
R416E	NA	151.13	121.14	220.35	0.28	163.74	146.79
S418E	151.13	NA	15.27	234.26	9.60	135.16	55.61
N476D	121.14	15.27	NA	26.81	22.35	17.28	52.10
I479T	220.35	234.26	26.81	NA	204.61	218.88	151.36
Q481A	0.28	9.60	22.35	204.61	NA	ND	36.01
Q481E	163.74	135.16	17.28	218.88	ND	NA	142.63
K525S	146.79	55.61	52.10	151.36	36.01	142.63	NA

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S
R416E	NA	5.75	0.90	9.64	0.34	146.87	110.61
S418E	5.75	NA	0.19	0.39	0.39	1.60	0.28
N476D	0.90	0.19	NA	0.06	0.60	0.22	0.19
I479T	9.64	0.39	0.06	NA	14.25	11.29	6.00
Q481A	0.34	0.39	0.60	14.25	NA	ND	12.73
Q481E	146.87	1.60	0.22	11.29	ND	NA	10.24
K525S	110.61	0.28	0.19	6.00	12.73	10.24	NA

二重変異体グリッドのオン－オフ比

D

【図１６Ａ】

ELD

R416D	K448A	R422H	I479Q	K525A	N527D
ND	46.84	36.93	16.28	25.31	29.19
ND	45.64	ND	11.10	18.22	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.98	35.37	15.51	4.15	8.65	15.47
ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
NA	33.83	ND	4.00	5.58	ND
33.83	NA	ND	51.54	43.95	32.41
ND	ND	NA	31.90	31.01	ND
4.00	51.54	31.90	NA	27.87	ND
5.58	43.95	31.01	27.87	NA	23.46
ND	32.41	ND	ND	23.46	NA

R416D	K448A	R422H	I479Q	K525A	N527D
ND	22.04	56.30	129.05	171.87	103.79
ND	125.00	ND	60.83	132.51	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
6.23	173.76	84.46	28.92	65.76	72.82
ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
NA	54.89	ND	24.24	26.88	ND
54.89	NA	ND	421.61	65.65	32.34
ND	ND	NA	232.64	152.49	ND
24.24	421.61	232.64	NA	252.87	ND
26.88	65.65	152.49	252.87	NA	116.95
ND	32.34	ND	ND	116.95	NA

KKR

R416D	K448A	R422H	I479Q	K525A	N527D
ND	46.84	36.93	16.28	25.31	29.19
ND	45.64	ND	11.10	18.22	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.98	35.37	15.51	4.15	8.65	15.47
ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
NA	33.83	ND	4.00	5.58	ND
33.83	NA	ND	51.54	43.95	32.41
ND	ND	NA	31.90	31.01	ND
4.00	51.54	31.90	NA	27.87	ND
5.58	43.95	31.01	27.87	NA	23.46
ND	32.41	ND	ND	23.46	NA

R416D	K448A	R422H	I479Q	K525A	N527D
ND	22.04	56.30	129.05	171.87	103.79
ND	125.00	ND	60.83	132.51	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
6.23	173.76	84.46	28.92	65.76	72.82
ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND	ND	ND	ND	ND	ND
NA	54.89	ND	24.24	26.88	ND
54.89	NA	ND	421.61	65.65	32.41
ND	ND	NA	232.64	152.49	ND
24.24	421.61	232.64	NA	252.87	ND
26.88	65.65	152.49	252.87	NA	116.95
ND	32.34	ND	ND	116.95	NA

【図１６Ｂ】

	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S	R416D	K448A	R422H	I479Q	K525A	N527D
R416E	NA	20.99	20.88	42.32	0.05	31.75	30.56	ND	43.43	39.63	40.55	23.98	49.12
S418E	20.09	NA	2.58	35.49	1.55	17.90	10.28	ND	36.67	ND	36.46	6.28	ND
N476D	20.88	2.58	NA	5.09	4.44	3.08	8.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
I479T	42.32	35.49	5.09	NA	25.89	35.07	37.19	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Q481A	0.05	1.55	4.44	25.89	NA	ND	4.99	1.51	19.81	12.81	31.65	3.09	ND
Q481E	31.75	17.90	3.08	35.07	ND	NA	24.26	ND	ND	ND	ND	ND	ND
K525S	30.56	10.28	8.06	37.19	4.99	24.26	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R416D	ND	ND	ND	ND	1.51	ND	ND	NA	34.82	ND	37.53	8.83	ND
K448A	43.43	36.67	ND	ND	19.81	ND	ND	34.82	NA	ND	35.23	36.25	29.74
R422H	39.63	ND	ND	ND	12.81	ND	ND	ND	ND	NA	35.05	31.09	ND
I479Q	40.55	36.46	ND	ND	31.65	ND	ND	37.53	35.23	35.05	NA	37.05	ND
K525A	23.98	6.28	ND	ND	3.09	ND	ND	8.83	36.25	31.03	37.06	NA	ND
N527D	40.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29.74	ND	ND	ND	ND	NA

オンターゲット

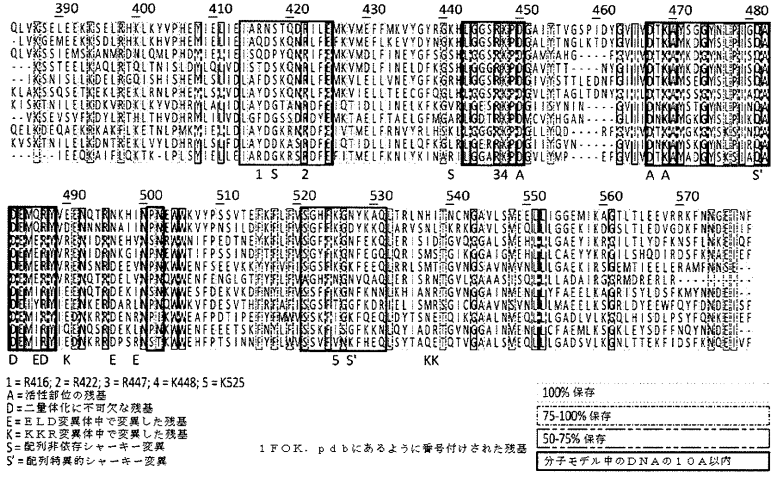
	R416E	S418E	N476D	I479T	Q481A	Q481E	K525S	R416D	K448A	R422H	I479Q	K525A	N527D
R416E	NA	151.13	121.14	220.35	0.28	163.74	146.79	ND	106.38	122.95	140.11	112.67	141.70
S418E	151.13	NA	15.27	234.26	9.60	135.16	55.61	ND	158.02	ND	173.06	36.37	ND
N476D	121.14	15.27	NA	26.81	22.35	17.28	52.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
I479T	220.35	234.26	26.81	NA	204.61	218.88	151.36	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Q481A	0.28	9.60	22.35	204.61	NA	ND	36.01	10.67	116.64	54.84	128.89	21.25	ND
Q481E	163.74	135.16	17.28	218.88	ND	NA	142.63	ND	ND	ND	ND	ND	ND
K525S	146.79	55.61	52.10	151.36	36.01	142.63	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R416D	ND	ND	ND	ND	10.67	ND	ND	NA	160.49	ND	229.85	40.27	ND
K448A	106.38	158.02	ND	ND	116.64	ND	ND	160.49	NA	ND	74.29	183.47	55.29
R422H	122.95	ND	ND	ND	54.84	ND	ND	ND	ND	NA	66.28	126.26	ND
I479Q	140.11	173.06	ND	ND	128.89	ND	ND	229.85	74.29	66.28	NA	196.46	ND
K525A	112.67	36.37	ND	ND	21.23	ND	ND	40.27	183.47	126.25	196.46	NA	ND
N527D	141.70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	55.29	ND	ND	ND	NA

オン－オフ比

【図１７】

相同体と整列したＦＯＫＬ切断ドメイン

ＦＯＫＬ切断ドメインは、一番上の行にあり（配列番号１）、次いで１０個の鎖も関連する配列が上から下に順番に並べられている（配列番号５８～６７）

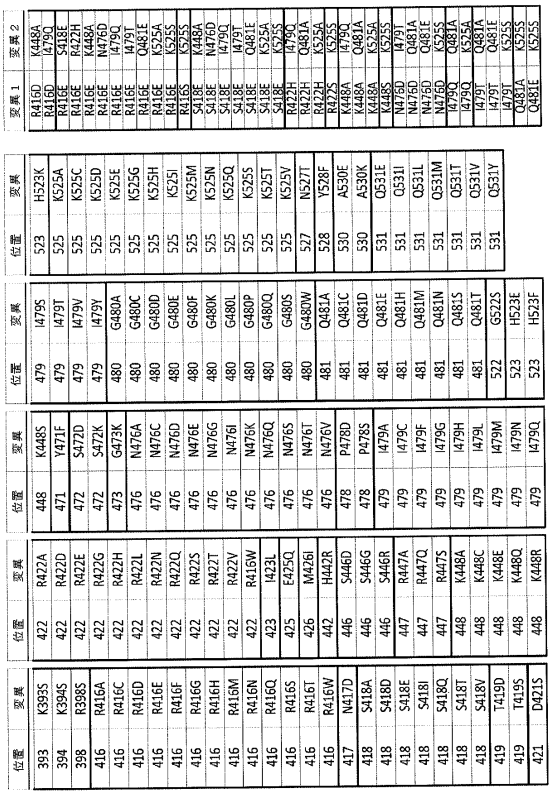


1 = R416; 2 = R422; 3 = R447; 4 = K448; 5 = K525
A＝酸性部位の残基
D＝二量体化に不可欠な残基
E＝ＥＬＤ変異体中で変異した残基
K＝ＫＫＲ変異体中で変異した残基
S＝配列非依存シャーキー変異
S'＝配列特異的シャーキー変異

１ＦＯＫ．ｐｄｂにあるように番号付けされた残基

100%保存
75-100%保存
50-75%保存
分子モデル中のＤＮＡの１０Ａ以内

【図１８】



変異 1	変異 2
R416D	K448A
R416D	I479Q
R416E	S418E
R416E	R422H
R416E	K448A
R416E	N476D
R416E	I479Q
R416E	I479T
R416E	Q481E
R416E	K525A
R416E	K525S
R416S	K525S
S418E	K448A
S418E	N476D
S418E	I479Q
S418E	I479T
S418E	Q481E
S418E	K525A
S418E	K525S
R422H	I479Q
R422H	Q481A
R422H	K525A
R422S	K525S
K448A	I479Q
K448A	Q481A
K448A	K525A
K448S	K525S
N476D	I479T
N476D	Q481A
N476D	Q481E
N476D	K525S
I479Q	Q481A
I479Q	K525A
I479T	Q481A
I479T	Q481E
I479T	K525S
Q481A	K525S
Q481E	K525S

位置	変異
393	K393S
394	K394S
398	R398S
416	R416A
416	R416C
416	R416D
416	R416E
416	R416F
416	R416G
416	R416H
416	R416M
416	R416N
416	R416Q
416	R416S
416	R416T
416	R416W
417	N417D
418	S418A
418	S418D
418	S418E
418	S418I
418	S418Q
418	S418T
418	S418V
419	T419D
419	T419S
421	D421S
422	R422A
422	R422D
422	R422E
422	R422G
422	R422H
422	R422L
422	R422N
422	R422Q
422	R422S
422	R422T
422	R422V
422	R416W
423	I423L
425	E425Q
426	N426I
442	H442R
446	S446D
446	S446G
446	S446R
447	R447A
447	R447Q
447	R447S
448	K448A
448	K448C
448	K448E
448	K448Q
448	K448R
448	K448S
471	Y471F
472	S472D
472	S472K
473	G473K
476	N476A
476	N476C
476	N476D
476	N476E
476	N476G
476	N476I
476	N476K
476	N476Q
476	N476S
476	N476T
476	N476V
478	P478D
478	P478S
479	I479A
479	I479C
479	I479F
479	I479G
479	I479H
479	I479L
479	I479M
479	I479N
479	I479Q
479	I479S
479	I479T
479	I479V
479	I479Y
480	G480A
480	G480C
480	G480D
480	G480E
480	G480F
480	G480K
480	G480L
480	G480P
480	G480Q
480	G480S
480	G480W
481	Q481A
481	Q481C
481	Q481D
481	Q481E
481	Q481H
481	Q481M
481	Q481N
481	Q481S
481	Q481T
522	G522S
523	H523E
523	H523F
523	H523K
525	K525A
525	K525C
525	K525D
525	K525E
525	K525G
525	K525H
525	K525I
525	K525M
525	K525N
525	K525Q
525	K525S
525	K525T
525	K525V
527	N527T
528	Y528F
530	A530E
530	A530K
531	Q531E
531	Q531I
531	Q531L
531	Q531M
531	Q531T
531	Q531V
531	Q531Y

【配列表】

0007272948000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

FI
C12N 15/09 100
C12N 15/55
C07K 19/00

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
ポレイテッド

(72)発明者 エドワード・ジェイ・レバー
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４８０４．リッチモンド．スイート・エー１００．カナル・ブールバード５０１．サンガモ・セラピューティクス，インコーポレイテッド

審査官 松原 寛子
(56)参考文献 国際公開第２０１１／０９７０３６（WO，Ａ１）
ＪＢＣ，1994年，Vol.269, p.12298-12303
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／５５
Ｃ１２Ｎ ９／１６
Ｃ１２Ｎ １／１５
Ｃ１２Ｎ １／１９
Ｃ１２Ｎ １／２１
Ｃ１２Ｎ ５／１０
Ｃ１２Ｎ １５／０９
Ｃ０７Ｋ １９／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ