

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-514144

(P2011-514144A)

(43) 公表日 平成23年5月6日 (2011.5.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	2 B 0 3 0
<b>C 1 2 N 9/22 (2006.01)</b>	C 1 2 N 9/22 Z N A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 B 0 5 0
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-544817 (P2010-544817)  
 (86) (22) 出願日 平成21年2月2日 (2009.2.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年9月7日 (2010.9.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2009/000439  
 (87) 国際公開番号 W02009/095793  
 (87) 国際公開日 平成21年8月6日 (2009.8.6)  
 (31) 優先権主張番号 PCT/IB2008/001331  
 (32) 優先日 平成20年1月31日 (2008.1.31)  
 (33) 優先権主張国 国際事務局 (IB)

(71) 出願人 508245231  
 セレクトィス  
 C E L L E C T I S  
 フランス、エフー93235 ロマンヴィ  
 ル セデックス、アヴェニュー ガストン  
 ルセル、102  
 102 avenue Gaston R  
 ousssel, F-93235 Roma  
 inville Cedex, Franc  
 e  
 (74) 代理人 100065248  
 弁理士 野河 信太郎  
 (74) 代理人 100145229  
 弁理士 秋山 雅則

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新しい I-CreI 由来単鎖メガヌクレアーゼ及びその使用

## (57) 【要約】

2つのドメインを含み、それぞれのドメインが、第1ヘリックスの始点からC末端ループの終点まで少なくとも広がる親のI-CreI単量体の部分を含み、該2つのドメインが、それぞれの親のホモ二量体I-CreIメガヌクレアーゼ標的配列の一方の異なる半分を含むキメラDNA標的に結合して切断できるI-CreI二量体に前記2つのドメインが折り畳まれることを可能にするペプチドリンカーにより連結されている、新しいI-CreI由来単鎖メガヌクレアーゼ。該I-CreI由来単鎖メガヌクレアーゼの、遺伝子工学、ゲノム療法及び抗ウイルス療法のための使用。

【選択図】 図1

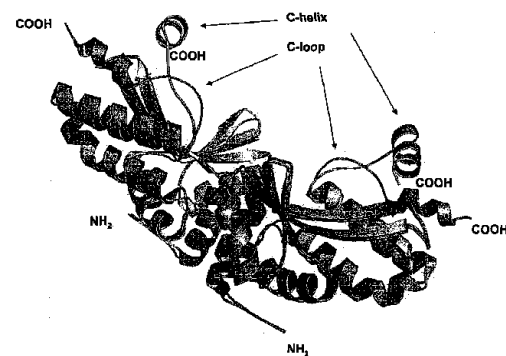


FIGURE 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ペプチドリinkerにより連結された2つのドメインを含み：

(a) 親のI-CreI単量体に由来するそれぞれのドメインが、I-CreIの第1アルファヘリックスの始点( $\alpha_1$ )からC末端ループの終点まで少なくとも広がりかつ  $\alpha_1$   $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\alpha_2$   $\alpha_3$   $\alpha_4$   $\alpha_3$  コアドメインと、 $\alpha_4$ 及び $\alpha_5$ ヘリックスと、I-CreIのC末端ループとを連続的に含む前記親のI-CreI単量体の部分を含み、

(b) それぞれの親のホモ二量体I-CreIメガヌクレアーゼ標的配列の一方の異なる半分を含むキメラDNA標的と結合しそれを切断できるI-CreI二量体として前記2つのドメインが折り畳まれることを可能にするペプチドリinkerにより、前記2つのドメインが連結されて

いる、  
単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 2】

N末端ドメインがI-CreIの1位又は6位から始まり、C末端ドメインがI-CreIの2位又は6位から始まる請求項1に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 3】

N末端及び/又はC末端ドメインが、I-CreIの145位にて終結する請求項1又は2に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 4】

N末端及び/又はC末端ドメインが、少なくともI-CreIのアルファ6ヘリックスをさらに含む請求項1又は2に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 5】

N末端及び/又はC末端ドメインが、I-CreIの152位、156位、160位又は163位で終結する請求項4に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 6】

リンカーが、15～35アミノ酸の配列からなる請求項1～5のいずれか1項に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 7】

リンカーが、配列番号2～12及び14～19の配列からなる群より選択される請求項6に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 8】

両方のドメインが、I-CreIの26位～40位及び/又は44位～77位にて異なる変異を含み、単鎖I-CreIメガヌクレアーゼが非パリンδροームDNA配列を切断でき、前記DNA配列の少なくとも+3位～+5位、+8位～+10位、-10位～-8位及び-5位～-3位のヌクレオチドが、興味対象の遺伝子からのDNA標的の+3位～+5位、+8位～+10位、-10位～-8位及び-5位～-3位のヌクレオチドに相当する、請求項1～7のいずれか1項に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 9】

少なくとも一方のドメインが、I-CreI部位の±1～2、6～7及び/又は11～12位のヌクレオチドに対する単鎖I-CreIメガヌクレアーゼの特異性を改変する変異を、I-CreIの137位～143位を含む請求項1～8のいずれか1項に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 10】

変異が、A、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S、T、Y、C、V、L及びWからなる群より選択されるアミノ酸での元のアミノ酸の置き換えである請求項8又は9に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 11】

2つのドメインからの機能的ホモ二量体の形成を損なう変異を含む請求項1～10のいずれか1項に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

## 【請求項 12】

それぞれのドメインが、それぞれ第1及び第2のドメインについて、K7E又はK7DとE8K

10

20

30

40

50

又はE8R ; F54G又はF54AとL97F又はL97W ; K96D又はK96EとE61R又はE61K ; R51D又はR51EとD137R又はD137Kからなる群より選択される少なくとも1つの変異を含む請求項11に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

【請求項13】

一方のドメインが、7位及び96位のリジン残基の、酸性アミノ酸による置換を含み、他方のドメインが、8位及び61位のグルタミン酸残基の塩基性アミノ酸による置換を含む請求項12に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

【請求項14】

一方のドメインが、G19S変異を含む請求項1～10のいずれか1項に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

10

【請求項15】

他方のドメイン又は両方のドメインが、請求項11～13のいずれか1項で規定される機能的ホモ二量体の形成を損なう少なくとも1つの変異を含む請求項14に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

【請求項16】

配列番号95又は97の配列を含む請求項1～15のいずれか1項に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ。

【請求項17】

請求項1～16のいずれか1項に記載の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドフラグメント。

20

【請求項18】

2つのドメインをコードするヌクレオチド配列同士が、80%未満の核酸配列同一性を有する請求項17に記載のポリヌクレオチドフラグメント。

【請求項19】

2つのドメインをコードする配列が、それぞれ配列番号22及び配列番号24の配列に由来する請求項18に記載のポリヌクレオチドフラグメント。

【請求項20】

単鎖I-CreIメガヌクレアーゼの生成を可能にする調節配列に機能可能に連結された請求項17～19のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドフラグメントを含む発現ベクター。

30

【請求項21】

単鎖I-CreIメガヌクレアーゼのゲノムDNA標的を取り囲む領域と同一性を有する配列を含むターゲティングDNA構築物を含む請求項20に記載のベクター。

【請求項22】

ターゲティングDNA構築物が、a)前記ゲノムDNA標的を取り囲む領域と同一性を有する配列と、b) a)の配列と接する、導入される配列とを含む請求項21に記載のベクター。

【請求項23】

請求項17～19のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドフラグメント又は請求項20～22のいずれか1項に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項24】

請求項17～19のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドフラグメントを含む非ヒトトランスジェニック動物。

40

【請求項25】

請求項17～19のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドフラグメントを含むトランスジェニック植物。

【請求項26】

請求項1～16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ、請求項16～18のいずれか1項に記載の1つのポリヌクレオチドフラグメント、又は請求項20～22のいずれか1項に記載の1つのベクターを含む医薬組成物。

【請求項27】

興味対象のゲノム部位と同一性を有する配列で挟まれた前記ゲノム部位を修復する配列

50

を含むターゲティングDNA構築物をさらに含む請求項26に記載の組成物。

【請求項 28】

請求項1～16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ、請求項17～19のいずれか1項に記載の1つのポリヌクレオチドフラグメント、請求項20～22のいずれか1項に記載の1つのベクター、請求項23に記載の1つの宿主細胞、請求項25に記載の1つのトランスジェニック植物、請求項24に記載の1つの非ヒトトランスジェニック哺乳動物の、非治療目的での、分子生物学、インビボ又はインビトロでの遺伝子工学、及びインビボ又はインビトロでのゲノム工学のための使用。

【請求項 29】

請求項1～16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ、請求項17～19のいずれか1項に記載の1つのポリヌクレオチドフラグメント、請求項20～22のいずれか1項に記載の1つのベクターの、必要とする個体における遺伝病を予防、改善又は治療するための医薬品の製造のための使用。

【請求項 30】

単鎖I-CreIメガヌクレアーゼが、配列番号95又は配列番号97の配列を含み、前記遺伝病が、ヒトRAG1遺伝子における変異に関連するSCID症候群である請求項29に記載の使用。

【請求項 31】

請求項1～16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ、請求項17～19のいずれか1項に記載の1つのポリヌクレオチドフラグメント、請求項20～22のいずれか1項に記載の1つのベクターの、必要とする個体においてDNA媒介物を示す感染性因子により引き起こされる疾患を予防、改善又は治療するための医薬品の製造のための使用。

【請求項 32】

請求項1～16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ、請求項17～19のいずれか1項に記載の1つのポリヌクレオチドフラグメント、請求項20～22のいずれか1項に記載の1つのベクターの、生物由来製品又は生物学的使用若しくは物体の消毒を意図する製品において、インビトロにおいて、DNA媒介物を示す感染性因子の増殖を阻害するか、不活性化するか若しくは欠失させるための使用。

【請求項 33】

前記感染性因子がウイルスである請求項31又は32に記載の使用。

【請求項 34】

前記メガヌクレアーゼ、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、トランスジェニック植物又は非ヒトトランスジェニック哺乳動物が、請求項21、22及び27のいずれか1項で規定されるターゲティングDNA構築物とともにある請求項28～33のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 35】

請求項1～16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ、請求項17～19のいずれか1項に記載の1つのポリヌクレオチドフラグメント、請求項20～22のいずれか1項に記載の1つのベクターの、他のメガヌクレアーゼを工学的に作製するための足場としての使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新しいI-CreI由来単鎖メガヌクレアーゼ、該新しいI-CreI由来単鎖メガヌクレアーゼをコードするベクター、該ベクターで改変された細胞、動物又は植物、並びに該I-CreI由来単鎖メガヌクレアーゼ及び派生生成物の、遺伝子工学、ゲノム療法及び抗ウイルス療法のための使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ある所定の遺伝子座を工学的に操作する(engineer)ストラテジーのうちで、メガヌクレアーゼのようなレアカットDNAエンドヌクレアーゼの使用が、DNA二本鎖破断(DSB)の作製

10

20

30

40

50

による相同遺伝子ターゲティングを増大させるための強力なツールとして出現している。メガヌクレアーゼは、大きい(>12 bp)配列を認識し、よって、全体的なゲノム完全性に影響することなくそれらの同種の部位を切断できる。天然メガヌクレアーゼであるホーミングエンドヌクレアーゼは、可動性のイントロン又はインティンによりコードされるタンパク質のいくつかの大きいファミリーを構成する。それらの標的配列は、イントロン又はインティンを欠く相同対立遺伝子中で通常見出され、切断は、DSB誘導相同組換えの機構により破断された配列内への可動性要素の移動を開始する。I-SceIは、哺乳動物細胞中のゲノム標的にて1000倍を超えて相同組換えを刺激するために用いられた最初のホーミングエンドヌクレアーゼであった(Choulikaら, Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 1968~1973; Cohen-Tannoudjiら, Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 1444~1448; Donohoら, Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 4070~4078; Alwinら, Mol. Ther., 2005, 12, 610~617; Porteus, M. H., Mol. Ther., 2006, 13, 438~446; Rouetら, Mol. Cell. Biol., 1994, 14, 8096~8106)。最近、I-SceIは、マウス肝臓中でインビボにて標的にされた組換えを刺激するためにも用いられ、組換えは、肝細胞の1%までで観察できた(Goubleら, J. Gene Med., 2006, 8, 616~22)。

10

20

30

40

50

#### 【0003】

しかし、このような方法論の固有の制限は、天然切断部位を興味対象の遺伝子座に予め導入することが必要であることである。この制限を回避するために、仕立てられた切断特異性を有するエンドヌクレアーゼを作製するための著しい努力が過去数年にわたってなされている。このようなタンパク質は、本来の染色体配列を切断するために用いることができ、広範囲の使用においてゲノム工学のための新しい展望を開く。例えば、メガヌクレアーゼは、単遺伝子性遺伝病につながる突然変異の修正を誘導し、現在の遺伝子療法アプローチにおいて用いられる無作為に挿入されたトランスジーンによる危険性を回避できるだろう(Hacein-Bey-Abinaら, Science, 2003, 302, 415~419)。

#### 【0004】

クラスIIS制限エンドヌクレアーゼであるFokIの触媒ドメインとのジンクフィンガータンパク質(ZFP)の融合体を用いて、機能的配列特異的エンドヌクレアーゼが作製された(Smithら, Nucleic Acids Res., 1999, 27, 674~681; Bibikovaら, Mol. Cell. Biol., 2001, 21, 289~297; Bibikovaら, Genetics, 2002, 161, 1169~1175; Bibikovaら, Science, 2003, 300, 764; Porteus, M.H.及びD. Baltimore, Science, 2003, 300, 763~; Alwinら, Mol. Ther., 2005, 12, 610~617; Urnovら, Nature, 2005, 435, 646~651; Porteus, M.H., Mol. Ther., 2006, 13, 438~446)。このようなヌクレアーゼは、最近、リンパ球系統からのヒト細胞においてILR2G遺伝子を工学的に改変するために用いることができた(Urnovら, Nature, 2005, 435, 646~651)。

Cys2-His2型のジンクフィンガータンパク質の結合特異性は、おそらくこれらが単純(フィンガーあたり実質的に4残基により駆動される特異性)でモジュール性の(modular)システムを示すことを理由として、操作するのが容易である(Paboら, Annu. Rev. Biochem., 2001, 70, 313~340; Jamiesonら, Nat. Rev. Drug Discov., 2003, 2, 361~368)。Pabo (Rebar, E.J.及びC.O. Pabo, Science, 1994, 263, 671~673; Kim, J.S.及びC.O. Pabo, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1998, 95, 2812~2817)、Klug (Choo, Y.及びA. Klug, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 11163~11167; Isalan M.及びA. Klug, Nat. Biotechnol., 2001, 19, 656~660)並びにBarbas (Choo, Y.及びA. Klug, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 11163~11167; Isalan M.及びA. Klug, Nat. Biotechnol., 2001, 19, 656~660)の実験室からの研究は、ほとんどのG/ANNG/ANNG/ANN配列に結合できる新規な人工ZFPの大きいレパートリーをもたらした。

#### 【0005】

にもかかわらず、ZFPは、特に、治療用途のような非常に高レベルの特異性を必要とする用途について制限があるだろう。融合体でのFokIヌクレアーゼ活性は二量体として作用するが、最近、2つの単量体の1つのみがDNAに結合するか、又は2つの単量体が2つの離れたDNA配列に結合したときに、これがDNAを切断できることが示された(Cattoら, Nucl

eic Acids Res., 2006, 34, 1711~1720)。よって、特異性は、哺乳動物細胞(Porteus, M. H.及びD. Baltimore, Science, 2003, 300, 763)及びショウジョウバエ(Drosophila) (Bibikovaら, Genetics, 2002, 161, 1169~1175; Bibikovaら, Science, 2003, 300, 764~)における毒性により示されるように、非常に退化している。

#### 【0006】

それらの例外的な特異性に鑑みて、ホーミングエンドヌクレアーゼは、仕立てられたエンドヌクレアーゼを工学的に操作するために理想的な足場であり得る。いくつかの研究が、最も広範なホーミングエンドヌクレアーゼである(Chevalier, B. S.及びStoddard B. L., Nucleic Acids Res. 2001; 29:3757~74)LAGLIDAGタンパク質からのDNA結合ドメインを工学的に操作できることを示している。LAGLIDAGとは、このファミリーを通して実際に保存されている唯一の配列のことであり、タンパク質中で1コピー、より頻繁には2コピーが見出される(Lucasら, Nucleic Acids Res., 2001, 29:960~969)。単一モチーフを有するタンパク質、例えばI-CreI (タンパク質データベースアクセス番号1G9Y)及びI-MsoIは、ホモ二量体を形成し、パリンδροーム又は偽パリンδροームのDNA配列を切断するが、より大きい二重モチーフタンパク質、例えばI-SceI及びI-DmIは単量体であり、非パリンδροーム標的を切断する。いくつかの異なるLAGLIDAGタンパク質が結晶化されており、これらは、1次配列レベルでの類似性がないこととは対照的に、非常に著しいコア構造の保存を示す(Juricaら, Mol. Cell., 1998; 2:469~476; Chevalierら, Nat. Struct. Biol. 2001; 8:312~316; Chevalierら, J. Mol. Biol., 2003, 329:253~69, Moureら, J. Mol. Biol., 2003, 334:685~695; Moureら, J. Mol. Biol., 2003, 334, 685~695; Moureら, Nat. Struct. Biol., 2002, 9:764~770; Ichianagiら, J. Mol. Biol., 2000, 300:889~901; Duanら, Cell, 1997, 89:555~564; Bolducら, Genes Dev., 2003, 17:2875~2888; Silvaら, J. Mol. Biol., 1999, 286:1123~1136)。このコア構造において、2つの単量体又は二重LAGLIDAGタンパク質中の2つのドメインが寄与する2つの特徴的な折り畳みが、2回回転対称により互いに面している。DNA結合は、逆平行シートに折り畳まれ、DNAヘリックス主溝上のサドルを形成する、それぞれのドメインからの4つの鎖に依存する。触媒コアは中央にあり、両方の対称単量体/ドメインが寄与する。このコア構造に加えて、その他のドメインを見出すことができる。例えば、インティンであるPI-SceIは、タンパク質スプライシングドメインと、さらなるDNA結合ドメインとを有する(Moureら, Nat. Struct. Biol., 2002, 9:764~70, Grindlら, Nucleic Acids Res. 1998, 26:1857~1862)。それぞれのI-CreI単量体は、3つのヘリックス(アルファ4( $\alpha_4$ )、アルファ5( $\alpha_5$ )及びアルファ6( $\alpha_6$ ))でできたC末端サブドメインと、 $\alpha_5$ 及び $\alpha_6$ ヘリックスの間のループ(C末端ループ; 図1)を含み、これは部位認識、DNA結合及び切断にとって必須である(Prietoら, Nucleic Acids Res., 2007, 35, 3267~3271)。

#### 【0007】

PI-SceI (Gimbleら, J. Mol. Biol., 2003, 334:993~1008)、I-CreI (Seligmanら, Nucleic Acids Res. 2002, 30:3870~3879; Sussmanら, J. Mol. Biol., 2004, 342:31~41; 国際PCT出願WO 2006/097784、WO 2006/097853、WO 2007/060495及びWO 2007/049156; Arnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458; Rosenら, Nucleic Acids Res., 2006, 34, 4791~4800; Smithら, Nucleic Acids Res., 2006, 34, e149)、I-SceI (Doyonら, J Am Chem Soc., 2006, 128:2477~2484)並びにI-MsoI (Ashworthら, Nature, 2006, 441:656~659)を含むいくつかのLAGLIDAGタンパク質は、合理的又は半合理的突然変異誘導及びスクリーニングにより改変して、新しい結合又は切断特異性を獲得できた。

#### 【0008】

別の戦略は、I-CreIとI-DmIとの間のドメイン交換による新しいメガヌクレアーゼの創出であり、これは2つの半分の親の標的配列(two half parent target sequences)に対応するハイブリッド配列を切断するメガヌクレアーゼの作製を導いた(Epinatら, Nucleic Acids Res., 2003, 31:2952~2962; Chevalierら, Mol. Cell. 2002, 10:895~905; 国際PCT出願WO 03/078619及びWO 2004/031346)。

10

20

30

40

50

最近、ハイスループットスクリーニング法により補助された半合理的設計により、I-Crelからの数千の新規タンパク質を導くことが可能になった(Smithら, Nucleic Acids Res. 2006, 34, e149; Arnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355:443~458; 国際PCT出願WO 2006/097784、WO 2006/097853、WO 2007/060495及びWO 2007/049156)。このようなアプローチにおいて、タンパク質残基の制限された組を、タンパク質/DNA共結晶構造の分析の後に選択して、無作為化する。ハイスループットスクリーニング(HTS)技術と組み合わせて、この方法は、数百の特異性が改変されたホーミングエンドヌクレアーゼ誘導体の同定を迅速にもたすことができる。

#### 【0009】

さらに、変異体のコンビナトリアル組み立てを可能にするのに十分に独立したDNA結合サブドメインが同定された(Smithら, Nucleic Acids Res. 2006, 34, e149; 国際PCT出願WO 2007/049095及びWO 2007/057781)。これらの発見は、選択された標的を切断する工学的I-Crel誘導体の第2世代の生成を可能にした。このコンビナトリアルストラテジーは、ヒトRAG1及びXPC遺伝子内にある天然DNA標的配列を切断するメガヌクレアーゼの作製により記載された(Smithら, Nucleic Acids Res., 2006, 34, e149; Arnouldら, J. Mol. Biol., 2007, 371:49~65; 国際PCT出願WO 2007/093836、WO 2007/093918及びWO 2008/010093)。

#### 【0010】

ヒトRAG1又はXPC遺伝子からの天然DNA標的を切断する工学的メガヌクレアーゼはヘテロ二量体であり、これは2つの別々に工学的に操作された単量体を含み、それぞれが標的の一方の半分に結合する。ヘテロ二量体形成は、同じ細胞内での2つの単量体の同時発現により得られる(Smithら, Nucleic Acids Res., 2006, 34, e149)。2つの単量体のこのような同時発現は、3つの分子種の形成をもたらす：興味対象の標的を切断するヘテロ二量体、及び副産物とみなし得る2つのホモ二量体(Arnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458; 国際PCT出願WO 2006/097854及びWO 2007/057781; Smithら, Nucleic Acids Res., 2006, 34, e149)。しかし、別個のホモ二量体は、高レベルの毒性の原因になり得る場合がある(Bibikovaら, Genetics, 2002, 161, 1169~1175; Beumerら, Genetics, 2006, 172, 2391~2403)。よって、I-Crelのような単一LAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼの広範な使用のためにまだ残されている制限因子は、タンパク質がホモ二量体であるということである。この問題を克服し得る2つの可能性がある：機能的ホモ二量体形成の抑制をもたらす二量体形成界面の再設計による偏性(obligatory)ヘテロ二量体の作製、又は別個の折り畳みの分子内相互作用が分子間相互作用よりも好ましくなるようにするための、タンパク質結合若しくはリンカーを用いる単鎖分子中での2つの単量体の融合。この最後のストラテジーは、1つのコード配列のみへの方向付けの点でさらなる利点を有するか、又はタンパク質を核内へ導入しなければならないだろう。よって、2つの異なるベクター又はバイシストロニックなベクターの使用を緩和するだろう。少なくとも理論上では、単鎖分子は、リンカーが長く柔軟性である場合は特に、別個の分子からの折り畳み同士の相互作用を必ずしも緩和しないが、同じ分子からの折り畳み間の相互作用に少なくとも好ましいはずであることに注目されたい。

さらに、単鎖分子の作製及び二量体形成界面の再設計は、排他的なストラテジーではなく、併せて用い得る。

#### 【0011】

I-Crelの単鎖バージョン(scl-Crel)の作製は、すでに試されている(Epinatら, Nucleic Acids Res., 2003, 3, 2952~2962, 国際PCT出願WO 03/078619)。この最初のバージョンにおいて、単鎖メガヌクレアーゼのN末端ドメイン(I-Crelアミノ酸配列の1~93位)は、I-Crel単量体の折り畳み(コアドメイン)のみから本質的になるが、C末端(I-Crelアミノ酸配列の8~163位)は、ほぼ完全なI-Crel単量体であった。リンカー(MLER IRLFNMR; 配列番号1)は、I-Dmolの2つのドメインを連結するループに由来した。

#### 【0012】

最初のscl-Crelは機能的メガヌクレアーゼであったが、これはI-Crelよりも安定性が低

10

20

30

40

50

く、これはおそらくその天然の対応物と比較して最適折り畳みがより低いことによるのである。最初のscl-CreIの設計は、二重LAGLIDADGエンドヌクレアーゼの構造に適合し、よって、I-CreIのものとは、N末端ドメインがC末端ドメインよりも短く、いくつかの二重LAGLIDADGエンドヌクレアーゼのC末端ドメイン中に存在し得る3つのヘリックスで形成されるC末端サブドメインを欠く点で異なる。

最初の単量体から3つのC末端ヘリックスを除くことは、最初のscl-CreIの折り畳み、安定性、よって切断活性に影響するだろう。なぜなら、最近の研究は、I-CreIのC末端サブドメインの、タンパク質DNA結合特性及びDNA標的切断活性における重要な役割を示しているからである(Prietoら, Nucleic Acids Res., 2007, ), 35, 3267~3271)。

【0013】

10

しかし、3つのC末端ヘリックスは、LAGLIDADGモチーフを含むN末端ヘリックスからは遠く離れたI-CreIの二量体構造の反対側で終結する(図1)。一方のドメインのC末端残基と他方のドメインのN末端残基とを連結する柔軟性リンカーの長さ(融合体の端から端まで)は、かなりのものであろう。また、このようなリンカーを工学的に操作することは、タンパク質表面の大部分を横切る必要があるので、困難であろう。よって、適切なパッキングが得られるかは確実でない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

今回、本発明者は、I-CreIホモ二量体メガヌクレアーゼに由来する単鎖分子を設計する新しい様式を示す。この戦略は、コア ( 1 1 2 2 3 4 3 ) 折り畳み及び2つの連結されたI-CreIユニットのC末端部分を保存する。

20

この設計は、オフサイト切断及び毒性を大きく低減する一方、効力を増進する。この単鎖分子の構造及び安定性は、ヘテロ二量体変異型のものと非常によく似ており、この分子は溶液中で単量体であるようである。さらに、得られるタンパク質は、生細胞中のヒト細胞における内因性遺伝子座(SCID遺伝子)にて非常に効率的な相同遺伝子ターゲティング(パーセントレベルで)を惹起する一方、可能性のある遺伝毒性に対してより効率的に保護する。全ての点において、この単鎖分子は、特異性の点で最高の基準であると考えられる単量体ホーミングエンドヌクレアーゼであるI-SceIと同様に良好に挙動する。これらの特性により、この新世代のメガヌクレアーゼは、ゲノム手術戦略について利用可能な最良の分子はさみの中に含まれることとなり、これらの特性は、単遺伝子疾患、例えば重症複合免疫不全(SCID)についての遺伝子修正療法を促進しながら、以前の遺伝子療法アプローチの有害な影響を避ける可能性を有する。

30

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の主題は、ペプチドリinkerにより連結された2つのドメイン(N末端及びC末端)を含む単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ(scl-CreI)であって：

(a) 親のI-CreI単量体に由来するそれぞれのドメインが、I-CreIの第1アルファヘリックスの始点( 1 )からC末端ループの終点まで少なくとも広がりかつ 1 1 2 2 3 4 3 コアドメインと、 4 及び 5 ヘリックスと、I-CreIのC末端ループとを連続的に含む前記親のI-CreI単量体の部分を含み、

40

(b) それぞれの親のホモ二量体I-CreIメガヌクレアーゼ標的配列の一方の異なる半分(one different half)を含むキメラDNA標的と結合しそれを切断できるI-CreI二量体として前記2つのドメインが折り畳まれることを可能にするペプチドリinkerにより、前記2つのドメインが連結されているメガヌクレアーゼである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【発明を実施するための形態】

【0017】

50



## 定義

- ポリペプチド配列中のアミノ酸残基は、本明細書において、1文字コードに従って表し、例えばQはGln又はグルタミン残基を意味し、RはArg又はアルギニン残基を意味し、DはAsp又はアスパラギン酸残基を意味する。
- ヌクレオチドは、次のように表す：1文字コードは、ヌクレオシドの塩基を表すために用いる：aはアデニンであり、tはチミンであり、cはシトシンであり、gはグアニンである。縮重ヌクレオチドについて、rはg又はa (プリンヌクレオチド)を表し、kはg又はtを表し、sはg又はcを表し、wはa又はtを表し、mはa又はcを表し、yはt又はc (ピリミジンヌクレオチド)を表し、dはg、a又はtを表し、vはg、a又はcを表し、bはg、t又はcを表し、hはa、t又はcを表し、nはg、a、t又はcを表す。

10

## 【0018】

- 「メガヌクレアーゼ」により、12~45 bpの2本鎖DNA標的配列を有するエンドヌクレアーゼを意図する。該メガヌクレアーゼは、各ドメインが単量体上にある二量体酵素、又は単一ポリペプチド上に2つのドメインを含む単量体酵素のいずれかである。該メガヌクレアーゼは、LAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼ、例えばI-CreIに由来し得る。
- 「メガヌクレアーゼドメイン」又は「ドメイン」により、メガヌクレアーゼのDNA標的の一方の半分と相互作用し、かつDNA標的の他方の半分と相互作用する同じメガヌクレアーゼの他方のドメインと会合して、該DNA標的を切断できる機能的メガヌクレアーゼを形成できる領域を意図する。
- 「単鎖メガヌクレアーゼ」により、ペプチドスペーサーで連結された2つのLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼドメインを含むメガヌクレアーゼを意図する。単鎖メガヌクレアーゼは、2つの親のメガヌクレアーゼ標的配列の一方の異なる半分を含むキメラDNA標的配列を切断できる。単鎖メガヌクレアーゼは、単鎖誘導体、単鎖メガヌクレアーゼ、単鎖メガヌクレアーゼ誘導体又はキメラメガヌクレアーゼとも命名される。

20

## 【0019】

- 「コアドメイン」により、約100アミノ酸残基の配列に相当する、LAGLIDADGファミリーのホーミングエンドヌクレアーゼの特徴的な<sub>1 1 2 2 3 4 3</sub>折り畳みである「LAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼコアドメイン」を意図する。該コアドメインは、DNA標的の一方の半分と相互作用する逆平行ベータシートに折り畳まれた4つのベータ鎖(<sub>1 2 3 4</sub>)を含む。このコアドメインは、DNA標的の他方の半分と相互作用する別のLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼコアドメインと会合して、該DNA標的を切断できる機能エンドヌクレアーゼを形成できる。例えば、二量体ホーミングエンドヌクレアーゼI-CreI (163アミノ酸)の場合、コアドメインは、I-CreIの残基6~94を含む。
- 「ベータヘアピン」により、ループ又はターンにより連結されたLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼコアドメインの逆平行ベータシートの2つの連続するベータ鎖(<sub>1 2</sub>又は<sub>3 4</sub>)を意図する。

30

## 【0020】

- 「サブドメイン」により、ホーミングエンドヌクレアーゼDNA標的ハーフサイトの別個の部分と相互作用するLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼコアドメインの領域を意図する。
- 「メガヌクレアーゼ変異型」又は「変異型」により、野生型メガヌクレアーゼ(天然のメガヌクレアーゼ)のアミノ酸配列における少なくとも1つの残基の、別のアミノ酸での置き換えにより得られるメガヌクレアーゼを意図する。
- 「機能的変異型」により、DNA標的配列、好ましくは、親のメガヌクレアーゼにより切断されない新しい標的を切断できる変異型を意図する。例えば、このような変異型は、DNA標的配列に接触するか、又は直接若しくは間接的に該DNA標的と相互作用する位置にてアミノ酸変動を有する。

40

## 【0021】

- 「新規な特異性を有するメガヌクレアーゼ変異型」により、親のメガヌクレアーゼのものとは異なる切断標的パターンを有する変異型を意図する。等価であり同等に用いられる

50

用語「新規な特異性」「改変された特異性」「新規な切断特異性」「新規な基質特異性」は、DNA標的配列のヌクレオチドに対する変異形の特異性をいう。

- 「I-CreI」により、配列表内の配列番号20の配列に相当する野生型I-CreI（タンパク質データバンクアクセス番号1g9y）を意図する。

- 「親のI-CreI単量体」又は「I-CreI単量体」は、全長野生型I-CreIアミノ酸配列である配列番号20(163アミノ酸)又は配列番号20中にアミノ酸置換を含むその機能的変異形を意図する。I-CreIは二量体として機能し、これは2つのI-CreI単量体から形成される。

#### 【0022】

- 「I-CreIの第1アルファヘリックスの始点からC末端ループの終点まで少なくとも広がりがつ<sub>1</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>2</sub><sub>3</sub><sub>4</sub><sub>3</sub>コアドメインと、<sub>4</sub>及び<sub>5</sub>ヘリックスと、C末端ループとを連続的に含む前記親のI-CreI単量体の部分」により、I-CreIの少なくとも8～143位に相当するアミノ酸配列を意図する。

- 「I-CreI部位」により、I-CreIにより切断される22～24 bpの2本鎖DNA配列を意図する。I-CreI部位は、野生型(天然)非パリンドロームI-CreIホーミング部位と、C1221ともよばれる配列5'-c<sub>-11</sub>a<sub>-10</sub>a<sub>-9</sub>a<sub>-8</sub>a<sub>-7</sub>c<sub>-6</sub>g<sub>-5</sub>t<sub>-4</sub>c<sub>-3</sub>g<sub>-2</sub>t<sub>-1</sub>a<sub>+1</sub>c<sub>+2</sub>g<sub>+3</sub>a<sub>+4</sub>c<sub>+5</sub>g<sub>+6</sub>t<sub>+7</sub>t<sub>+8</sub>t<sub>+9</sub>t<sub>+10</sub>g<sub>+11</sub>（配列番号21；図3）のような派生パリンドローム配列を含む。

- 「DNA標的」、「DNA標的配列」、「標的配列」、「標的部位」、「標的」、「部位」、「興味対象の部位」、「認識部位」、「認識配列」、「ホーミング認識部位」、「ホーミング部位」、「切断部位」により、I-CreIのようなLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼ、又は変異型、又はI-CreIに由来する単鎖キメラメガヌクレアーゼにより認識されかつ切断される20～24 bpの2本鎖パリンドローム、部分的パリンドローム(偽パリンドローム)又は非パリンドロームのポリヌクレオチド配列を意図する。これらの用語は、そこでメガヌクレアーゼにより2本鎖破断(切断)が誘導される特定のDNAの場所、好ましくはゲノムの場所のことをいう。DNA標的は、C1221について上で示したように、2本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖の5'から3'の配列により定義される。DNA標的の切断は、センス鎖及びアンチセンス鎖のそれぞれについて、+2位及び-2位のヌクレオチドで生じる。そうでないと記載しない限り、I-CreIメガヌクレアーゼ変異型又は単鎖誘導体によるDNA標的の切断が生じる位置は、DNA標的のセンス鎖上の切断部位に相当する。

#### 【0023】

- 「DNA標的ハーフサイト」、「ハーフ切断部位」又は「ハーフサイト」により、それぞれのLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼコアドメインが結合するDNA標的の部分を意図する。

- 「キメラDNA標的」又は「ハイブリッドDNA標的」により、2つの親のメガヌクレアーゼ標的配列の異なる半分の融合を意図する。さらに、該標的の少なくとも一方の半分は、少なくとも2つの別々のサブドメインが結合するヌクレオチドの組み合わせ(組み合わせたDNA標的)を含み得る。

#### 【0024】

- 「それぞれの親のホモ二量体I-CreIメガヌクレアーゼ標的配列の一方の異なる半分を含むキメラDNA標的」により、一方の親の単量体の2つの同一単量体で作られるホモ二量体メガヌクレアーゼにより切断されるパリンドローム標的配列の左部分と、他方の親の単量体の2つの同一単量体で作られるホモ二量体メガヌクレアーゼにより切断されるパリンドローム標的配列の右部分とを含む標的配列を意図する。

- 「ベクター」により、連結された別の核酸を輸送できる核酸分子を意図する。

- 「相同な」により、配列同士の間で相同組換えを導くのに十分な別の配列との同一性を有する、より具体的には少なくとも95%の同一性、好ましくは97%の同一性、より好ましくは99%を有する配列を意図する。

#### 【0025】

- 「同一性」は、2つの核酸分子又はポリペプチド間の配列同一性をいう。同一性は、比較の目的のために整列させ得るそれぞれの配列中の位置の比較により決定できる。比較される配列中の位置が同じ塩基により占められる場合、その分子同士は、その位置に

10

20

30

40

50

において同一である。核酸又はアミノ酸配列間の類似性又は同一性の程度は、核酸配列により共有される位置での同一又は一致するヌクレオチドの数の関数である。種々のアラインメントアルゴリズム及び/又はプログラムを用いて、2つの配列間の同一性を計算することができ、GCG配列解析パッケージ(University of Wisconsin, Madison, Wis.)の一部として利用可能であり、例えばデフォルト設定で用い得るFASTA又はBLASTを含む。

【0026】

「個体」は、哺乳動物、及びその他の脊椎動物(例えば鳥類、魚類及び爬虫類)を含む。用語「哺乳動物」及び「哺乳類」は、本明細書で用いる場合、その子に授乳し、生存する子を出産する(真獣類(eutharian)又は胎盤哺乳類(placental mammals))又は産卵する(後獣類(metatharian)又は無胎盤哺乳類(nonplacental mammals))単孔類、有袋類及び有胎盤類(placental)を含むいずれの脊椎動物のことをいう。哺乳動物の種の例は、ヒト、及びその他の霊長類(例えばサル、チンパンジー)、げっ歯類(例えばラット、マウス、モルモット)、並びにその他、例えばウシ、ブタ及びウマを含む。

10

【0027】

「変異」により、ポリヌクレオチド(cDNA、遺伝子)又はポリペプチド配列内の1つ又は複数のヌクレオチド/アミノ酸の置換、欠失、挿入を意図する。上記の変異は、遺伝子のコード配列又はその調節配列に影響し得る。これは、ゲノム配列の構造又はコードされるmRNAの構造/安定性にも影響し得る。

「部位特異的突然変異」により、ランダム突然変異とは反対の、ヌクレオチド配列中の特定のヌクレオチド/コドンの変異を意図する。

20

【0028】

本発明による単鎖I-CreIメガヌクレアーゼは、scI-CreIメガヌクレアーゼ又はsc-I-CreIとも命名される。

本発明によると、リンカーの配列は、sc-I-CreIの2つのドメインがI-CreI二量体として折り畳まれ、それぞれの親のホモ二量体I-CreIメガヌクレアーゼ標的配列の一方の異なる半分を含むキメラDNA標的と結合しそれを切断することが可能になるように選択される。

【0029】

I-CreI二量体形成は、Prietoら, Nucleic Acids Research, 2007, 35, 3267~3271に以前に記載されたような、分析遠心分離により行われる沈降平衡実験のような公知のアッセイによりアッセイできる。

30

DNA結合は、例えば、Prietoら, Nucleic Acids Research, 2007, 35, 3267~3271に以前に記載されたような、電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)のような公知のアッセイによりアッセイできる。

【0030】

本発明による単鎖メガヌクレアーゼの切断活性は、国際PCT出願WO 2004/067736; Epinatら, Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952~2962; Chamesら, Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178; Arnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458; Arnouldら, J. Mol. Biol., Epub 10 May 2007に記載されるもののような、任意の公知のインビトロ又はインビボ切断アッセイにより測定できる。

40

例えば、本発明の単鎖メガヌクレアーゼの切断活性は、直列反復組換えアッセイ(direct repeat recombination assay)により、酵母又は哺乳動物細胞内で、レポーターベクターを用いて、対応するヘテロ二量体メガヌクレアーゼ又は同一の親のI-CreI単量体に由来する別の単鎖メガヌクレアーゼのものとの比較により測定できる。レポーターベクターは、酵母又は哺乳動物発現ベクター中にクローニングされた介在配列内に、レポーター遺伝子の2つの切り詰められた非機能的コピー(直列反復)と、(非パリンδροームの)ゲノムDNA標的配列とを含む。ゲノムDNA標的配列は、それぞれの(パリンδροーム又は偽パリンδροーム)の親のホモ二量体I-CreIメガヌクレアーゼ標的配列の一方の異なる半分を含む。メガヌクレアーゼの発現は、ゲノムキメラDNA標的配列の切断をもたらす。この切断は、直列反復同士の相同組換えを誘導し、機能的レポーター遺伝子(例えばLacZ)をもたらす、

50

その発現を、適切なアッセイによりモニターできる。さらに、単鎖メガヌクレアーゼの、そのゲノムDNA標的に対する活性は、同じゲノム遺伝子座にて、哺乳動物細胞における染色体アッセイ(Arnouldら, J. Mol. Biol., Epub 10 May 2007)を用いて、I-Crelの、I-Crel部位に対する活性と比較できる。さらに、単鎖メガヌクレアーゼによる切断の特異性は、親のI-Crelホモ二量体メガヌクレアーゼにより切断される2つのパリンδροーム配列のものと、キメラDNA標的配列の切断を比較することによりアッセイできる。

#### 【0031】

sc-I-Crelの2つのドメインのN末端配列は、I-Crelの1位、2位、3位、4位、5位、6位又は8位から始まり得る。好ましい実施形態において、N末端ドメインはI-Crelの1位又は6位から始まり、C末端ドメインはI-Crelの2位又は6位から始まる。

10

2つのドメインのC末端配列は、C末端ループの直後、例えばI-Crelの143位又は145位で終結する。或いは、ドメインのC末端配列は、少なくともアルファ6ヘリックス(I-Crelの145~150位)と、結局はさらなるC末端残基とをさらに含む。この場合、ドメインのC末端配列は、I-Crelの150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位又は163位で終結し得る。好ましくは、152位~160位である。例えば152位、156位、160位又は163位である。好ましい実施形態において、N末端ドメインは、I-Crelの163位で終結する。より好ましくは両方のドメインがI-Crelの163位で終結する。

#### 【0032】

sc-I-Crelメガヌクレアーゼの別の好ましい実施形態において、リンカーは、10~100の連続するアミノ酸、好ましくは15~50アミノ酸、より好ましくは20~35アミノ酸、さらにより好ましくは25~35アミノ酸の直鎖状配列を含むか又はそれからなる。リンカーの配列は、アルファヘリックス(SOPMA: Self-Optimized Prediction Method with Alignmentによる予測; Geourjon及びDeleage, 1995)又はII型ポリプロリンヘリックスのいずれかのヘリックスを形成するように予測される。このようなポリプロリンヘリックスの例は、配列番号15又は16に示される(表I)。より好ましくは、リンカーはアルファヘリックスを含む。リンカーは、有利には、配列番号2~19を含むか又はそれらからなる配列からなる群より選択される。好ましくは、これは、配列番号2~12及び14~19の配列からなる群より選択される。より好ましくは、リンカーは、配列2、4~8、11、16、18及び19からなる群より選択される。さらにより好ましくは、リンカーは配列番号2の配列からなる。

20

30

#### 【0033】

本発明による単鎖I-Crelメガヌクレアーゼは、野生型I-Crel単量体又はその機能的変異型に由来し得る。さらに、親の単量体のNH<sub>2</sub>末端及び/又はCOOH末端に挿入される1つ又は複数の残基。さらなるコドンを経親の単量体の5'又は3'の終点に付加して、種々のベクターへのクローニングのために用いられる制限部位を導入できる。該配列の例は配列番号23であり、これは、1番目のメチオニン残基の後に挿入されたアラニン(A)残基と、C末端プロリン残基の後に挿入されたアラニン及びアスパラギン酸(AD)残基とを有する。これらの配列により、種々のベクターへのクローニングのために用いられるNcoI (ccatgg)及びEagI (cggccg)制限部位を含むDNAコード配列が可能になる。例えば、タグ(エピトープ又はポリヒスチジン配列)をN末端ドメインのNH<sub>2</sub>末端及び/又はC末端ドメインのCOOH末端に導入することもできる。上記のタグは、sc-I-Crelメガヌクレアーゼの検出及び/又は精製のために有用である。

40

好ましくは、sc-I-Crelメガヌクレアーゼは、ヘテロ二量体I-Crel変異型、より好ましくは以前に記載されたような新規な切断特異性を有する変異型(Arnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458; Smithら, Nucleic Acids Res., 2006, 34, e149; Arnouldら, J. Mol. Biol., Epub 10 May 2007; 国際PCT出願WO 2006/097784、WO 2006/097853、WO 2007/049095、WO 2007/057781、WO 2007/060495、WO 2007/049156、WO 2007/093836及びWO 2007/093918)の単量体に由来する。

#### 【0034】

よって、単鎖I-Crelメガヌクレアーゼのドメインは、DNA標的配列と接触するか、又はD

50

NA主鎖若しくはヌクレオチド塩基と直接若しくは水素結合を介して相互作用するI-CreIアミノ酸残基の位置にて変異を含み得る。これらの残基は当該技術において公知である(Juricaら, Molecular Cell., 1998, 2, 469~476; Chevalierら, J. Mol. Biol., 2003, 329, 253~269)。好ましくは、上記の変異は、メガヌクレアーゼの切断特異性を改変し、興味対象の遺伝子からのDNA標的を切断できる新規な特異性を有するメガヌクレアーゼをもたらす。より好ましくは、上記の変異は、以前に記載されたような(国際PCT出願WO 2006/097784、WO 2006/097853、WO 2007/060495、WO 2007/049156、WO 2007/049095及びWO 2007/057781; Arnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458; Smithら, Nucleic Acids Res., 2006)、DNA標的の $\pm 8 \sim 10$ 位のヌクレオチドに対する特異性を変更する、I-CreIアミノ酸配列の26~40位にあるものに相当する第1機能的サブドメイン中の1つ又は複数のアミノ酸の置換、及び/又はDNA標的の $\pm 3 \sim 5$ 位のヌクレオチドに対する特異性を変更する、I-CreIアミノ酸配列の44~77位にあるものに相当する第2機能的サブドメイン中の置換である。置換は、有利には、I-CreIアミノ酸配列の26位、28位、30位、32位、33位、38位及び/又は40位、44位、68位、70位、75位及び/又は77位に相当する。 $n_{+4}$ がtであるか又は $n_{+4}$ がaであるDNA標的を切断するために、上記のI-CreIドメインは、有利には、44位にグルタミン(Q)を有する。 $n_{+4}$ がaであるか又は $n_{+4}$ がtであるDNA標的を切断するために、上記のドメインは44位にアラニン(A)又はアスパラギンを有し、 $n_{+9}$ がgであるか又は $n_{+9}$ がcであるDNA標的を切断するために、上記のドメインは、有利には、38位にアルギニン(R)又はリジン(K)を有する。

10

20

#### 【0035】

上記のscl-CreIメガヌクレアーゼの別の好ましい実施形態によると、少なくとも一方のドメインは、I-CreIの26~40位及び/又は44~77位にて変異を有し、該scl-CreIメガヌクレアーゼは、非パリンドロームDNA配列を切断でき、該DNA配列の+3~+5位、+8~+10位、-10~-8位及び-5~-3位のヌクレオチドは、興味対象の遺伝子からのDNA標的の+3~+5位、+8~+10位、-10~-8位及び-5~-3位のヌクレオチドに相当する。好ましくは、scl-CreIメガヌクレアーゼの両方のドメインが、26~40位及び/又は44~77位にて変異されている。より好ましくは、両方のドメインが、I-CreIの26~40位及び44~77位にて異なる変異を有する。

#### 【0036】

上記のscl-CreIメガヌクレアーゼの別の好ましい実施形態において、少なくとも一方のドメインは、DNA標的配列と相互作用するI-CreIのその他のアミノ酸残基の位置にて1つ又は複数の変異を含む。特に、リン酸主鎖と接触する位置にて、例えば最後のC末端ループ(137~143位; Prietoら, Nucleic Acids Res., 2007, 35, 3262~3271)中にさらなる置換を導入できる。好ましくは、上記の残基は、該DNA切断部位の結合及び切断に關与する。より好ましくは、上記の残基は、I-CreIの138位、139位、142位又は143位である。2つの残基を1つのドメインにおいて変異させ得るが、但し、それぞれの変異が、138位と139位との残基の対、及び142位と143位との残基の対から選択される異なる残基の対にあることを条件とする。導入される変異は、最終C末端ループの上記のアミノ酸と、I-CreI部位のリン酸主鎖との相互作用を改変する。好ましくは、138位又は139位の残基が、DNA切断部位のリン酸主鎖との水素結合の形成を回避するように疎水性アミノ酸で置換される。例えば、138位の残基がアラニンにより置換されるか、又は139位の残基がメチオニンにより置換される。142位又は143位の残基を、有利には、小さいアミノ酸、例えばグリシンにより置換して、これらのアミノ酸残基の側鎖のサイズを低減させる。より好ましくは、最終C末端ループ中の上記の置換は、I-CreI部位の $\pm 1 \sim 2$ 位、 $\pm 6 \sim 7$ 位及び/又は $\pm 11 \sim 12$ 位のヌクレオチドに対するscl-CreIメガヌクレアーゼの特異性を改変する。

30

40

#### 【0037】

上記のscl-CreIメガヌクレアーゼの別の好ましい実施形態において、少なくとも一方のドメインは、興味対象の遺伝子からのDNA標的配列に対するscl-CreIメガヌクレアーゼの切断活性及び/又は特異性を含む、結合及び/又は切断の特性を改善する1つ又は複数のさらなる置換を含む。変異されるさらなる残基は、I-CreI配列全体上にあり得る。

50

上記のsc-I-CreIメガヌクレアーゼのより好ましい実施形態によると、上記のさらなる変異は、sc-I-CreIメガヌクレアーゼのドメインからの機能的ホモ二量体の形成を損なう。

#### 【0038】

それぞれの親の単量体は、それぞれ同じ親の単量体の残基Z'及びZと相互作用して(相互作用する残基ZZ'の2対)2つのホモ二量体と1つのヘテロ二量体を形成する、二量体形成界面の少なくとも2つの残基Z及びZ'を有する。本発明によると、二量体形成界面の相互作用残基の2対のうち的一方が交換されて、2つの残基Z又はZ'を有する第1ドメインと、2つの残基Z'又はZを有する第2ドメインとをそれぞれ得る。その結果、2つの残基Z又は2つの残基Z'をそれぞれ有する第1及び第2ドメインは、親の対応物よりもホモ二量体を形成しにくくなる(sc-I-CreIドメイン間相互作用)が、sc-I-CreIの2つのドメインの界面に相互作用残基ZZ'の2対が存在することが、ヘテロ二量体の形成を好ましいものにする(sc-I-CreIドメイン内相互作用)。

10

#### 【0039】

よって、sc-I-CreIメガヌクレアーゼのドメインは、有利には、第1(N末端又はC末端ドメイン)及び第2ドメイン(C末端ドメイン又はN末端ドメイン)についてそれぞれ、以下の変異の対の少なくとも1つを有する：

- a) 8位のグルタミン酸の塩基性アミノ酸、好ましくはアルギニンでの置換(第1ドメイン)、及び7位のリジンの酸性アミノ酸、好ましくはグルタミン酸での置換(第2ドメイン)；第1ドメインは、7位及び96位のリジン残基の少なくとも1つのアルギニンによる置換をさらに含み得る、
- b) 61位のグルタミン酸の塩基性アミノ酸、好ましくはアルギニンでの置換(第1ドメイン)、及び96位のリジンの酸性アミノ酸、好ましくはグルタミン酸での置換(第2ドメイン)；第1ドメインは、7位及び96位のリジン残基の少なくとも1つのアルギニンによる置換をさらに含み得る、
- c) 97位のロイシンの芳香族アミノ酸、好ましくはフェニルアラニンでの置換(第1ドメイン)、及び54位のフェニルアラニンの小さいアミノ酸、好ましくはグリシンでの置換(第2ドメイン)；第1ドメインは、54位のフェニルアラニンのトリプトファンによる置換をさらに含むことができ、第2ドメインは、58位のロイシン又は57位のリジンのメチオニンによる置換をさらに含み得る、
- d) 137位のアスパラギン酸の塩基性アミノ酸、好ましくはアルギニンでの置換(第1ドメイン)、及び51位のアルギニンの酸性アミノ酸、好ましくはグルタミン酸での置換(第2ドメイン)。

20

30

#### 【0040】

例えば、第1ドメインは変異D137Rを、第2ドメインは変異R51Dを有し得る。

或いは、sc-I-CreIメガヌクレアーゼは、上記のa)、b)、c)又はd)で定義される変異の少なくとも2対を含む。変異の対のうち1つは、有利にはc)又はd)で定義されるとおりである。好ましくは、一方のドメインは、7位及び96位のリジン残基の酸性アミノ酸(D又はE)による置換を含み、他方のドメインは、8位及び61位のグルタミン酸残基の塩基性アミノ酸(K又はR)による置換を含む。より好ましくは、sc-I-CreIメガヌクレアーゼは、上記のa)、b)及びc)で定義される変異の3対を含む。sc-I-CreIメガヌクレアーゼは、有利には、(i) E8R、E8K又はE8H、E61R、E61K又はE61H及びL97F、L97W又はL97Y；(ii) K7R、E8R、E61R、K96R及びL97F、或いは(iii) K7R、E8R、F54W、E61R、K96R及びL97Fから選択される変異を少なくとも有する第1ドメイン(A)と、(iv) K7E又はK7D、F54G又はF54A及びK96D又はK96E；(v) K7E、F54G、L58M及びK96E、或いは(vi) K7E、F54G、K57M及びK96Eの変異を少なくとも有する第2ドメイン(B)とからなる。

40

#### 【0041】

sc-I-CreIメガヌクレアーゼのドメインからの機能的ホモ二量体の形成を損なう変異の別の例は、G19S変異である。G19S変異は、有利には、sc-I-CreIメガヌクレアーゼの2つのドメインの一方に導入されることにより、切断活性が増進され、切断特異性が増進され

50

た単鎖メガヌクレアーゼが得られる。さらに、切断特異性をさらに増進させるために、他方のドメイン又は両方のドメインが、機能的ホモ二量体の形成を損なうか、又はヘテロ二量体sc-I-CreIメガヌクレアーゼの形成に好ましい上記で定義されるような別個の変異を有し得る。例えば、それぞれ、一方の単量体がG19S変異とK7E及びK96E又はE8K及びE61R変異とを含み、他方の単量体がE8K及びE61R又はK7E及びK96E変異を含む。

#### 【0042】

上記のsc-I-CreIメガヌクレアーゼの別の好ましい実施形態において、上記の変異は、元のアミノ酸の、A、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S、T、Y、C、V、L及びWからなる群より選択されるアミノ酸での置き換えである。

#### 【0043】

本発明の主題は、配列番号95又は97の配列を含むsc-I-CreIメガヌクレアーゼでもある。これらのsc-I-CreIメガヌクレアーゼは、ヒトRAG1遺伝子に存在するRAG1標的(RAG1.10；配列番号41及び図16)を切断する。このsc-I-CreIメガヌクレアーゼは、SCID症候群に関連するRAG1変異を修正するため、又はRAG1遺伝子座にてゲノムを工学的に操作するために用いることができる。RAG1.10はコード配列の上流にあるので(図16)、これらのsc-I-CreIメガヌクレアーゼは、国際PCT出願WO 2008/010093に記載されるように、RAG1遺伝子中の任意の変異を、エキソンノックインにより修復するために用いることができる。

#### 【0044】

本発明の主題は、上記で規定される単鎖メガヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドフラグメントでもある。上記のポリヌクレオチドの好ましい実施形態によると、上記の単鎖メガヌクレアーゼの2つのI-CreIドメインをコードする核酸配列同士は、80%未満の核酸配列同一性、好ましくは70%未満の核酸配列同一性を有する。このことにより、2つの配列間の組換えの危険性が低減され、その結果、ポリヌクレオチド構築物及び得られるベクターの遺伝子的安定性が増加する。このことは、I-CreI配列をコドン使用及び遺伝子コード縮重を用いて書き換えることにより得ることができる。例えば、ドメインの一方が野生型I-CreIコード配列(配列番号22)に由来し、他方のドメインがI-CreIコード配列の書き換えられたバージョン(配列番号24)に由来する。さらに、単鎖メガヌクレアーゼをコードするcDNAのコドンは、該タンパク質の、所望の発現系における発現に好ましいように選択される。

#### 【0045】

本発明の主題は、本発明による単鎖メガヌクレアーゼの発現のための組換えベクターでもある。組換えベクターは、上記で定義される、単鎖メガヌクレアーゼをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドフラグメントを含む。

本発明において用い得るベクターは、限定されないが、ウイルスベクター、プラスミド、RNAベクター、或いは染色体、非染色体、半合成又は合成の核酸からなり得る直鎖状若しくは環状のDNA又はRNA分子を含む。好ましいベクターは、自律複製できるもの(エピソードベクター)及び/又は連結された核酸の発現を可能にするもの(発現ベクター)である。多数の適切なベクターが当業者に知られ、商業的に入手可能である。

#### 【0046】

ウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス(例えばアデノ随伴ウイルス)、コロナウイルス、マイナス鎖RNAウイルス、例えばオルトミクソウイルス(例えばインフルエンザウイルス)、ラブドウイルス(例えば狂犬病及び水疱性口内炎ウイルス)、パラミクソウイルス(例えば麻疹及びセンダイ)、プラス鎖RNAウイルス、例えばピコルナウイルス及びアルファウイルス、並びにアデノウイルス、ヘルペスウイルス(例えば単純ヘルペスウイルス1及び2型、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス)及びポックスウイルス(例えばワクシニア、鶏痘及びカナリア痘)を含む二本鎖DNAウイルスを含む。その他のウイルスは、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス及び肝炎ウイルスを含む。レトロウイルスの例は、トリ白血病肉腫、哺乳類C型、B型ウイルス、D型ウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプマウイルスを含む(Coffin, J. M., Retroviridae: The

10

20

30

40

50

viruses and their replication, In Fundamental Virology, 第3版, B. N. Fieldsら編, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)。

好ましいベクターは、レンチウイルスベクター、特に自己不活化レンチウイルスベクター (self inactivating lentiviral vectors) を含む。

#### 【0047】

ベクターは、選択マーカー、例えば真核細胞培養についてネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、グルタミンシンセターゼ及びヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ；エス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) について TRP1、URA3 及び LEU2；大腸菌 (*E. coli*) においてテトラサイクリン、リファンピシン又はアンピシリン耐性を含み得る。

#### 【0048】

好ましくは、上記のベクターは、本発明の単鎖メガヌクレアーゼをコードする配列が、適切な転写及び翻訳制御要素の制御下に位置して、該メガヌクレアーゼの生成又は合成を許容する発現ベクターである。よって、上記のポリヌクレオチドは、発現カセットに含まれる。より具体的には、該ベクターは、複製始点、該コードポリヌクレオチドに機能可能に連結されたプロモーター、リボソーム結合部位、RNAスプライシング部位 (ゲノムDNAを用いる場合)、ポリアデニル化部位、及び転写終結部位を含む。これは、エンハンサーも含み得る。プロモーターの選択は、ポリペプチドが発現される細胞に依存する。適切なプロモーターは、組織特異的及び/又は誘導性プロモーターを含む。誘導性プロモーターの例は、重金属のレベルの増加により誘導される真核メタロチオネインプロモーター、イソプロピル-β-D-チオガラクト-ピラノシド (IPTG) に応答して誘導される原核 lacZ プロモーター、及び温度の増加により誘導される真核熱ショックプロモーターである。組織特異的プロモーターの例は、骨格筋クレアチンキナーゼ、前立腺特異的抗原 (PSA)、α-アンチトリプシンプロテアーゼ、ヒトサーファクタント (SP) タンパク質 A 及び B、α-カゼイン及び酸性ホエータンパク質遺伝子である。

上記のベクターの別の有利な実施形態によると、これは、上記で定義されるゲノムDNA切断部位を取り囲む領域と相同性を有する配列を含むターゲティング構築物を含む。

#### 【0049】

或いは、単鎖メガヌクレアーゼをコードするベクターと、ターゲティング構築物を含むベクターとは、異なるベクターである。

より好ましくは、上記のターゲティングDNA構築物は：

- a) 上記で定義されるゲノムDNA切断部位を取り囲む領域と相同性を有する配列と、
- b) a) に記載の配列で挟まれた、導入される配列とを含む。

好ましくは、少なくとも 50 bp、好ましくは 100 bp を超える、より好ましくは 200 bp を超える相同配列が用いられる。よって、ターゲティングDNA構築物は、好ましくは 200 pb ~ 6000 pb、より好ましくは 1000 pb ~ 2000 pb である。実際に、共有されるDNA相同性は、破断の部位の上流及び下流に接する領域に位置し、導入されるDNA配列は、2つの腕の間に位置するべきである。導入される配列は、好ましくは、ゲノム療法のために、興味対象の遺伝子の変異を修復する配列である (遺伝子修正又は機能的遺伝子の回復)。或いは、これは、特定の配列を改変するため、興味対象の遺伝子を減弱若しくは活性化するため、興味対象の遺伝子若しくはその一部分を不活性化又は削除するため、興味対象の部位に変異を導入するため、或いは外因性遺伝子又はその一部分を導入するために用いられる配列を含む、ある特定の様式で染色体DNAを変更させるために用いられる任意のその他の配列であり得る。このような染色体DNAの変更は、ゲノム工学 (動物モデル/ヒト組換え株化細胞) のために用いられる。

#### 【0050】

本発明は、上記で定義されるポリヌクレオチド又はベクター、好ましくは発現ベクター



で改変された原核又は真核宿主細胞にも関する。

本発明は、細胞の全て又は一部分が上記で定義されるポリヌクレオチド又はベクターで改変されたことを特徴とする非ヒトトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物にも関する。

本明細書で用いる場合、細胞とは、原核細胞、例えば細菌細胞、又は真核細胞、例えば動物、植物若しくは酵母細胞のことである。

#### 【0051】

本発明の主題は、さらに、メガヌクレアーゼ、好ましくは発現ベクターに含まれるポリヌクレオチド、上記で定義される細胞、トランスジェニック植物、非ヒトトランスジェニック哺乳動物の、非治療目的での分子生物学、インビボ若しくはインビトロの遺伝子工学、及びインビボ若しくはインビトロのゲノム工学のための使用である。

10

分子生物学は、限定されないが、DNA制限及びDNAマッピングを含む。非治療目的の遺伝子工学及びゲノム工学は、例えば、(i) タンパク質生産のための細胞パッケージング系統における特定の遺伝子座の遺伝子ターゲティング、(ii) 株の改良及び代謝工学のための農作物の特定の遺伝子座の遺伝子ターゲティング、(iii) 遺伝子改変された農作物におけるマーカーの除去のための標的された組換え、(iv) (例えば抗生物質生産のために) 遺伝子改変された微生物株におけるマーカーの除去のための標的された組換えを含む。

#### 【0052】

上記の使用の有利な実施形態によると、これは、DNA標的配列を含む興味対象の部位において2本鎖破断を誘導することにより、DNA組換え事象、DNA欠失又は細胞死を誘導するためである。

20

本発明によると、上記の2本鎖破断は、特定の配列を修復するため、特定の配列を改変するため、変異された遺伝子の代わりに機能的遺伝子を回復させるため、興味対象の内因性遺伝子を減弱若しくは活性化させるため、興味対象部位に変異を導入するため、外因性遺伝子若しくはその一部分を導入するため、内因性遺伝子若しくはその一部分を不活性化又は検出するため、染色体腕を転座させるため、又はDNAを修復されないままにして分解させるためである。

#### 【0053】

本発明の主題は、上記で定義されるDNA標的を含むベクター上に位置する興味対象の部位中で、該ベクターを上記で定義されるメガヌクレアーゼと接触させることにより2本鎖核酸を破断させ、そのことにより、該メガヌクレアーゼの切断部位を取り囲む配列と相同性を示す別のベクターとの相同組換えを誘導するステップを含むことを特徴とする遺伝子工学の方法でもある。

30

#### 【0054】

本発明の主題は、1) 上記で定義されるメガヌクレアーゼの少なくとも1つのDNA標的を含むゲノム遺伝子座の2本鎖を、該標的を該メガヌクレアーゼと接触させることにより破断させるステップと、2) 該破断したゲノム遺伝子座を、標的にされた遺伝子座との相同性を有する配列で挟まれた、該遺伝子座に導入される配列を含むターゲティングDNA構築物との相同組換えに適する条件下に維持するステップとを含むことを特徴とするゲノム工学の方法でもある。

40

#### 【0055】

本発明の主題は、1) 上記で定義されるメガヌクレアーゼの少なくとも1つのDNA標的を含むゲノム遺伝子座の2本鎖を、該切断部位を該メガヌクレアーゼと接触させることにより破断させるステップと、2) 該破断したゲノム遺伝子座を、切断部位を取り囲む領域との相同性を有する染色体DNAとの相同組換えに適する条件下に維持するステップとを含むことを特徴とするゲノム工学の方法でもある。

#### 【0056】

本発明の主題は、上記で定義される少なくとも1つのメガヌクレアーゼ、1つ又は2つの派生ポリヌクレオチド、好ましくは発現ベクターに含まれるものの、必要とする個体における遺伝病を予防、改善又は治療するための、該個体に任意の手段により投与される医

50

薬品の製造のための使用でもある。

【0057】

本発明の主題は、必要とする個体に、上記で定義されるメガヌクレアーゼを少なくとも含む組成物を、任意の手段により投与するステップを含む、該個体における遺伝病を予防、改善又は治療するための方法でもある。

この場合、上記で定義されるメガヌクレアーゼの使用は、(a) 個体の体組織に、該メガヌクレアーゼの少なくとも1つの認識及び切断部位を含む遺伝子の興味対象部位にて2本鎖切断を誘導するステップと、(b) 個体にターゲティングDNAを導入するステップとを少なくとも含み、該ターゲティングDNAは、(1) 切断部位を取り囲む領域と相同性を有するDNAと、(2) ターゲティングDNAと染色体DNAとの間の組換えの際に興味対象部位を修復するDNAとを含む。ターゲティングDNAは、個体に、興味対象部位にターゲティングDNAを導入するのに適する条件下で導入される。

【0058】

本発明によると、上記の2本鎖切断は、該メガヌクレアーゼを個体に投与することにより全体として(in toto)、又は個体から回収して、改変の後に個体に戻す体細胞に該メガヌクレアーゼを導入することによりエキスピボで誘導される。

上記の使用の好ましい実施形態において、上記のメガヌクレアーゼは、上記で定義されるような、該メガヌクレアーゼのゲノムDNA切断部位を取り囲む遺伝子の領域と相同性を有する配列で挟まれた、遺伝子中の変異を修復する配列を含むターゲティングDNA構築物と組み合わせる。変異を修復する配列は、正しい配列を有する遺伝子のフラグメント又はエキソンノックイン構築物のいずれかである。

【0059】

遺伝子を修正するために、遺伝子の切断は、変異の近傍、好ましくは変異から500 bp以内で生じる。ターゲティング構築物は、切断を修復するためのゲノムDNA切断部位に接する相同配列の少なくとも200 bpを有する遺伝子フラグメント(最小修復マトリクス)を含み、変異を修復するための遺伝子の正しい配列を含む。その結果、遺伝子修正のためのターゲティング構築物は、最小修復マトリクスを含むか又はそれからなり、これは、好ましくは200 pb~6000 pb、より好ましくは1000 pb~2000 pbである。

【0060】

機能的遺伝子を回復させるために、遺伝子の切断は、変異の上流で生じる。好ましくは、上記の変異は、遺伝子の配列内で最初のわかっている変異であり、そのことにより、遺伝子の全ての下流の変異が、同時に修正できる。ターゲティング構築物は、(cDNAとして)インフレームで融合され、3'における転写を停止するためのポリアデニル化部位を含む、ゲノムDNA切断部位の下流のエキソンを含む。導入される配列(エキソンノックイン構築物)は、切断部位を取り囲むイントロン又はエキソンの配列で挟まれており、そのことにより、工学的な遺伝子(エキソンノックイン遺伝子)を、機能的タンパク質をコードできるmRNAに転写することが可能になる。例えば、エキソンノックイン構築物は、上流及び下流の配列で挟まれる。

【0061】

本発明の主題は、上記で定義される少なくとも1つのメガヌクレアーゼ、1つのポリヌクレオチド、好ましくは発現ベクターに含まれるものの、必要とする個体において、DNA媒介物(intermediate)を示す感染性因子により引き起こされる疾患を予防、改善又は治療するための、任意の手段により個体に投与される医薬品の製造のための使用でもある。

【0062】

本発明の主題は、必要とする個体に、上記で定義される組成物を、任意の手段により投与するステップを少なくとも含む、該個体における、DNA媒介物を示す感染性因子により引き起こされる疾患を予防、改善又は治療する方法でもある。

【0063】

本発明の主題は、上記で定義される少なくとも1つのメガヌクレアーゼ、1つのポリヌクレオチド、好ましくは発現ベクターに含まれるものの、生物由来製品又は生物学的使用

若しくは物体の消毒を意図する製品において、インビトロにおいて、DNA媒介物を示す感染性因子の増殖を阻害するか、不活性化するか若しくは欠失させるための使用でもある。

【0064】

本発明の主題は、生物由来製品、生物学的使用を意図する製品又は物体を、上記で定義される組成物と、感染性因子の増殖の阻害、不活性化又は欠失に十分な時間接触させるステップを少なくとも含む、DNA媒介物を示す感染性因子から、製品又は物質を除染する方法でもある。

具体的な実施形態において、上記の感染性因子は、ウイルスである。例えば、該ウイルスは、アデノウイルス(Ad11、Ad21)、ヘルペスウイルス(HSV、VZV、EBV、CMV、ヘルペスウイルス6、7又は8)、ヘパドナウイルス(HBV)、パポバウイルス(HPV)、ボックスウイルス又はレトロウイルス(HTLV、HIV)である。

10

【0065】

本発明の主題は、上記で定義される少なくとも1つのメガヌクレアーゼ、1つのポリヌクレオチド、好ましくは発現ベクターに含まれるものを含むことを特徴とする組成物でもある。

上記の組成物の好ましい実施形態において、これは、上記で定義される標的された遺伝子座と相同性を有する配列に挟まれた興味対象部位を修復する配列を含むターゲティングDNA構築物を含む。好ましくは、該ターゲティングDNA構築物は、組換えベクターに含まれているか、又は本発明で定義されるメガヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターに含まれるかのいずれかである。

20

【0066】

本発明の主題は、メガヌクレアーゼ又は該メガヌクレアーゼをコードする1つの発現ベクターと、上記で定義されるターゲティング構築物を含むベクターとを少なくとも含む、遺伝病の予防又は治療における同時、別々又は逐次的な使用のための組み合わせ製剤としての製品でもある。

治療の目的のために、メガヌクレアーゼと、医薬的に許容される賦形剤とは、治療有効量で投与される。このような組み合わせは、投与される量が、生理的に効果をもたらす場合に「治療有効量」で投与されるという。ある因子は、その存在が、受容者の生理機能における検出可能な変化をもたらす場合に、生理的に効果をもたらす。この関係において、ある因子は、その存在が、標的にされた疾患の1つ又は複数の症状の重篤さの減少と、損傷又は異常のゲノム修正をもたらす場合に、生理的に効果をもたらす。

30

【0067】

本発明による使用のある実施形態において、メガヌクレアーゼは、実質的に非免疫原性であり、すなわち、有害な免疫学的応答をほとんど又は全く生じない。この種の有害な免疫学的反応を緩和又は排除する種々の方法を、本発明に従って用いることができる。好ましい実施形態において、メガヌクレアーゼは、N-ホルミルメチオニンを実質的に有さない。望まない免疫学的反応を回避する別の方法は、メガヌクレアーゼを、ポリエチレングリコール(「PEG」)又はポリプロピレングリコール(「PPG」)(好ましくは、500~20,000ダルトンの平均分子量(MW)のもの)とコンジュゲートさせることである。例えばDavisら(US 4,179,337)により記載されるPEG又はPPGとのコンジュゲート形成は、抗ウイルス活性を有する、非免疫原性で、生理活性で、水溶性のエンドヌクレアーゼコンジュゲートを提供できる。ポリエチレン-ポリプロピレングリコールコポリマーを用いる同様の方法は、Safferら(US 5,006,333)に記載されている。

40

【0068】

メガヌクレアーゼは、ポリペプチド、又は該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド構築物/ベクターとして用い得る。これは、細胞に、インビトロ、エキスピボ又はインピボで、具体的な種類の細胞に適する当該技術において公知の任意の簡便な手段により、単独で、又は少なくとも適切なビヒクル若しくは担体、及び/又はターゲティングDNAとともに、導入される。細胞内に一旦入ると、メガヌクレアーゼと、存在するならばターゲティングDNA及び/又はメガヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターは、細胞質か

50

ら、核の作用部位へと、細胞により移入されるか又は輸送される。

【0069】

メガヌクレアーゼ(ポリペプチド)は、リボソーム、ポリエチレンジイミン(PEI)及び/又は膜輸送ペプチド(membrane translocating peptides) (Bonetta, The Scientist, 2002, 16, 38; Fordら, Gene Ther., 2001, 8, 1~4; Wadia及びDowdy, Curr. Opin. Biotechnol., 2002, 13, 52~56)と会合しているのが有利であり得る。後者の場合、メガヌクレアーゼの配列は、膜輸送ペプチドの配列と融合される(融合タンパク質)。

ターゲティングDNA及び/又はメガヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターは、細胞に、種々の方法により導入できる(例えば、注入、直接摂取、発射衝撃、リボソーム、エレクトロポレーション)。メガヌクレアーゼは、発現ベクターを用いて、細胞内で安定的又は一過的に発現させ得る。真核細胞における発現の方法は、当該技術において公知である(Current Protocols in Human Genetics: 12章「Vectors For Gene Therapy」及び13章「Delivery Systems for Gene Therapy」を参照)。所望により、組換えタンパク質中に、核局在化シグナルを組み込んで、核内でそれが発現されることを確実にすることが好ましい。

10

【0070】

本発明の主題は、上記で定義される少なくとも1つのメガヌクレアーゼの、他のメガヌクレアーゼを作製するための足場としての使用でもある。例えば、さらなる回の突然変異誘導及び選択/スクリーニングを、新規なホーミングエンドヌクレアーゼを作製する目的で、単鎖メガヌクレアーゼに対して行うことができる。

20

【0071】

本発明によるメガヌクレアーゼの使用、及び該メガヌクレアーゼを用いる方法は、上記で定義される、上記のメガヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、ベクター、細胞、トランスジェニック植物又は非ヒトトランスジェニック哺乳動物の使用も含む。

本発明の使用及び方法の別の有利な実施形態によると、上記のメガヌクレアーゼ、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、トランスジェニック植物又は非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、上記のターゲティングDNA構築物と関連する。好ましくは、メガヌクレアーゼをコードする該ベクターは、上記で定義されるターゲティングDNA構築物を含む。

【0072】

新規な切断特異性を有するI-CreI変異型を作製する方法は、以前に記載されている(Epinatら, Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952~2962; Chamesら, Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178, 及びArnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458; Smithら, Nucleic Acids Res., 2006, 34, e149; Arnouldら, J. Mol. Biol., Epub 10 May 2007; 国際PCT出願WO 2004/067736、WO 2006/097784、WO 2006/097853、WO 2007/049095、WO 2007/057781、WO 2007/060495、WO 2007/049156、WO 2007/093836、WO 2007/093918、WO2008/010009、WO2008/010093、WO2008/059317、WO2008/059382、WO2008/093152、WO2008/093249、WO2008/02198、WO2008/02199、WO2008/02274、WO2008/149176、WO2008/152523、WO2008/152524及びWO2009/001159)。本発明の単鎖メガヌクレアーゼは、公知の組換えDNA及び遺伝子工学技術により、I-CreI又はその機能的変異型から導くことができる。例えば、N末端ドメインコード配列の3'終点又はC末端ドメインコード配列の5'終点のいずれかとインフレーションでのリンカーコード配列を含む配列を、DNA鋳型から、特異的プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応により増幅する。PCRフラグメントを、次いで、適切な制限部位を用いることにより他方のドメインをコードする配列を含むベクターにクローニングする。本発明で規定される単鎖メガヌクレアーゼは、上記で規定されるポリペプチドを発現させることにより生成される。好ましくは、ポリペプチドは、1つの発現ベクターで改変された宿主細胞又はトランスジェニック動物/植物において、該ポリペプチドの発現に適切な条件下で発現され、単鎖メガヌクレアーゼ誘導体を、宿主細胞培養又はトランスジェニック動物/植物から回収する。

30

40

【0073】

本発明の実行は、そうでないと記載しない限り、当該技術の範囲内である細胞生物学、

50

細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA及び免疫学の通常の技術を用いる。このような技術は、文献に十分に説明されている。例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA) ; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版(Sambrook ら, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) ; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編, 1984) ; Mullisら、米国特許第4,683,195号 ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries及びS. J. Higgins編 1984) ; Transcription And Translation (B. D. Hames及びS. J. Higgins編 1984) ; Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986) ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson及びM. Simon編, Academic Press, Inc., New York)のシリーズ、特に154巻及び155巻(Wuら編)及び185巻「Gene Expression Technology」(D. Goeddel編) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller及びM. P. Calos編, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer及びWalker編, Academic Press, London, 1987) ; Handbook Of Experimental Immunology, I ~ IV巻(D. M. Weir及びC. C. Blackwell編, 1986) ; 並びにManipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照されたい。

10

#### 【 0 0 7 4 】

上記の特徴に加えて、本発明は、本発明の単鎖I-CreIメガヌクレアーゼ及び本発明によるその使用を説明する実施例並びに添付の図面に言及する以下の記載から明らかになるその他の特徴も含む。添付の図面において；

20

- 図 1 は、I-CreIのC リボン図である。

- 図 2 は、ヒトXPC遺伝子(GenBankアクセッション番号NC\_000003)の模式図である。XPCエキソンを箱で囲む。XPC4.1 (又はC1：配列番号26)配列(20438位)は、エキソン 9 内にある。

- 図 3 は、I-CreI又はいくつかのその派生変異型(それぞれ配列番号21、27~29、26、30及び31)により切断される22 bp DNA標的を表す。C1221はI-CreI標的である。10GAG\_P、10GTA\_P及び5TCT\_Pはパリンδροーム標的であり、C1221とは箱で囲んだモチーフが異なる。C1はXPC標的である。C3及びC4はパリンδροーム標的であり、それぞれC1の左及び右の部分から導かれる。図に示すように、10GAG\_P、10GTA\_P及び5TCT\_Pからの箱で囲んだモチーフは、C1標的で見出される。

30

#### 【 0 0 7 5 】

- 図 4 は、ヘテロ二量体コンビナトリアル変異体によるC1標的の切断を示す。この図は、C1標的を用いる、C3及びC4カッターの組み合わせの2次スクリーニングを示す。H33変異体は、7つのC3カッターのうちであり、X2は8つのC4カッターのうちであり、X2/H33ヘテロ二量体によるC1標的の切断は、黒い丸で囲む。

- 図 5 は、pCLS0542メガヌクレアーゼ発現ベクターマップを表す。pCLS0542は、LEU2栄養要求性遺伝子をマーカーとして有し、メガヌクレアーゼの発現を駆動する誘導性Gal10プロモーターを有する2ミクロンベースの複製可能ベクターである。

40

- 図 6 は、哺乳動物細胞におけるメガヌクレアーゼの発現のためのプラスミドであるpCLS1088のマップを表す。

- 図 7 は、pCLS1058レポーターベクターマップを表す。レポーターベクターは、プラストサイジン及びアンピシリン耐性遺伝子をマーカーとして有する。LacZタンデム反復は、800 bpの相同性を共有し、1.3 kbのDNAで分けられている。これらは、EF1-アルファプロモーター及びターミネーター配列で囲まれている。標的部位を、Gatewayプロトコル(INVITROGEN)を用いてクローニングして、CmR及びccdB遺伝子を選択された標的部位で置き換える。

#### 【 0 0 7 6 】

- 図 8 は、18個の単鎖構築物の、3つのXPC標的であるC1、C3及びC4に対する酵母スクリ

50

ーニングを示す。それぞれの単鎖分子は、表 I に記載するその番号により参照する。それぞれの 4 ドット酵母クラスタについて、2 つの左のドットは実験の結果であり、2 つの右のドットは実験の質及び有効性を評価するための種々の内部対照である。

- 図 9 は、C1、C3 及び C4 XPC 標的の、2 つの X2-L1-H33 及び X2-RM2-H33 単鎖構築物による、CHO 細胞での染色体外アッセイにおける切断を示す。バックグラウンドは、空の発現ベクターでの細胞の形質移入に相当する。S1234 I-SceI 標的の、I-SceI による同じ実験における切断を、陽性対照として示す。

- 図 10 は、C1、C3 及び C4 XPC 標的の、X2/H33 ヘテロ二量体並びに 2 つの X2-L1-H33<sub>G19S</sub> 及び X2-RM2-H33<sub>G19S</sub> 単鎖構築物による、CHO 細胞での染色体外アッセイにおける切断を示す。バックグラウンドは、空の発現ベクターでの細胞の形質移入に相当する。S1234 I-SceI 標的の、I-SceI による同じ実験における切断を、陽性対照として示す。

【 0 0 7 7 】

- 図 11 は、3 つの XPC 単鎖分子である X2-L1-H33、SCX1 及び SCX2 の、3 つの XPC 標的 (C1、C3 及び C4) に対する酵母スクリーニングを示す。SCX1 は X2(K7E)-L1-H33(E8K,G19S) 分子であり、SCX2 は X2(E8K)-L1-H33(K7E,G19S) 分子のことである。それぞれの 4 ドット酵母クラスタについて、2 つの左のドットは実験の結果であり、2 つの右のドットは実験の質及び有効性を評価するための種々の内部対照である。

- 図 12 は、チャニーズハムスター (*Cricetulus griseus*) のヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) mRNA (GenBank アクセッション番号 J00060.1) の模式図である。ORF を灰色の箱で示す。HprCH3 標的の部位は、その配列 (配列番号 34) 及び位置で示す。

- 図 13 は、I-CreI 又はいくつかのその派生変異型 (それぞれ配列番号 21、27 及び 32 ~ 36) により切断される 22 bp DNA 標的を表す。C1221 は I-CreI 標的である。10GAG\_P、10CAT\_P 及び 5CTT\_P はパリンδροーム標的であり、C1221 とは箱で囲んだモチーフが異なる。HprCH3 は HPRT 標的であり、HprCH3.3 及び HprCH3.4 はパリンδροーム標的であり、それぞれ HprCH3 の左及び右の部分から導かれる。図に示すように、10GAG\_P、10CAT\_P 及び 5CTT\_P は、HprCH3 標的で見出される。

【 0 0 7 8 】

- 図 14 は、MA17 及び H33 ホモ二量体、HPRT ヘテロ二量体、並びに 3 つの HPRT 単鎖分子の、3 つの HPRT 標的である HprCH3、HprCH3.3 及び HprCH3.4 に対する酵母スクリーニングを示す。H は、MA17/H33 ヘテロ二量体である。これは MA17 と H33 の同時発現により得られるので、酵母内には実際には 3 つの分子種：2 つの MA17 及び H33 ホモ二量体と、MA17/H33 ヘテロ二量体が存在する。ホモ二量体形成は、HprCH3.3 及び HprCH3.4 標的の切断を説明する。SC1 ~ SC3 は、それぞれ MA17-L1-H33、MA17-L1-H33<sub>G19S</sub> 及び MA17-RM2-H33 である。それぞれの 4 ドット酵母クラスタについて、2 つの左のドットは実験の結果であり、2 つの右のドットは実験の質及び有効性を評価するための種々の内部対照である。

- 図 15 は、HprCH3、HprCH3.3 及び HprCH3.4 HPRT 標的の、MA17/H33 ヘテロ二量体及び 4 つの HPRT 単鎖構築物 (MA17-L1-H33、MA17-L1-H33<sub>G19S</sub>、MA17-RM2-H33 及び MA17-RM2-H33<sub>G19S</sub>) による、CHO 細胞での染色体外アッセイにおける切断を示す。バックグラウンドは、空の発現ベクターでの細胞の形質移入に相当する。S1234 I-SceI 標的の、I-SceI による同じ実験における切断を、陽性対照として示す。

【 0 0 7 9 】

- 図 16 は、ヒト RAG1 遺伝子 (GenBank アクセッション番号 NC\_000011) の模式図である。エキソン配列を箱で囲み、エキソン-イントロン結合部を示す。ORF は灰色の箱で示す。RAG1.10 配列を、その配列 (配列番号 41) 及び位置で示す。

- 図 17 は、I-CreI 又はいくつかのその派生変異型 (それぞれ配列番号 21 及び 37 ~ 43) により切断される 22 bp DNA 標的を表す。C1221 は I-CreI 標的である。10GTT\_P、5CAG\_P、10TGG\_P 及び 5GAG\_P はパリンδροーム標的であり、C1221 とは箱で囲んだモチーフが異なる。RAG1.10 は RAG1 標的であり、RAG1.10.2 及び RAG1.10.3 はパリンδροーム標的であり、それぞれ RAG1.10 の左及び右の部分から導かれる。図に示すように、10GTT\_P、5CAG\_P、10TGG\_P 及び 5

10

20

30

40

50

GAG\_Pからの箱で囲んだモチーフは、RAG1.10標的で見出される。

- 図18は、4つのRAG1単鎖分子の、3つのRAG1標的であるRAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3に対する酵母スクリーニングを示す。SC1～SC4は、それぞれM2-L1-M3、M2<sub>G19S</sub>-L1-H33、M2-RM2-H33及びM2<sub>G19S</sub>-RM2-M3を表す。M2及びM3 I-CreI 変異体並びにM2/M3 ヘテロ二量体の、3つのRAG1標的に対する活性も示す。それぞれの4ドット酵母クラスタについて、2つの左のドットは実験の結果であり、2つの右のドットは実験の質及び有効性を評価するための種々の内部対照である。

#### 【0080】

- 図19は、2つの単鎖分子SC1及びSC2の、3つのRAG1.10標的に対する酵母スクリーニングを示す。SC1はM3-RM2-M2分子であり、SC2はM3(K7E K96E)-RM2-M2(E8K E61R)分子のことである。それぞれの4ドット酵母クラスタについて、2つの左のドットは実験の結果であり、2つの右のドットは実験の質及び有効性を評価するための種々の内部対照である。

- 図20は、6つのRAG1単鎖分子の、3つのRAG1標的であるRAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3に対する酵母スクリーニングを示す。M2/M3ヘテロ二量体の、3つのRAG1標的に対する活性も示す。それぞれの4ドット酵母クラスタについて、2つの左のドットは実験の結果であり、2つの右のドットは実験の質及び有効性を評価するための種々の内部対照である。

- 図21は、RAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3標的の、4つの単鎖構築物による、CHO細胞での染色体外アッセイにおける切断を示す。バックグラウンドは、空の発現ベクターでの細胞の形質移入に相当する。結果は、同じ3つの標的に対するM2/M3ヘテロ二量体の活性のパーセンテージで表す。

#### 【0081】

- 図22は：A. CHO細胞における染色体アッセイの原理、B. M2/M3ヘテロ二量体、並びに2つの単鎖分子M3-RM2-M2<sub>G19S</sub>及びM3<sup>-</sup>-RM2-M2<sup>+</sup><sub>G19S</sub>の遺伝子修正活性を示す。LacZ陽性細胞の頻度を、形質移入された発現プラスミドの量の関数で表す。

- 図23は、5つの単鎖分子の、3つのRAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3標的に対する活性を示す。それぞれの酵母クラスタにおいて、2つの左のドットは単鎖分子であり、2つの右のドットは実験内部対照である。

- 図24は、内因性RAG1遺伝子座にて用いた遺伝子ターゲティングストラテジーの図である。RAG1標的配列(RAG1.10：配列番号41)は、Rag1タンパク質をコードするエキソン2のすぐ上流にある。エキソン2を箱で囲み、オープンリーディングフレームを白で示す。メガヌクレアーゼによる天然RAG1遺伝子の切断により、相同組換えのための基質が生成し、これは相同腕で挟まれた1.7 kbの外因性DNAを含む修復マトリクスを修復マトリクスとして用い得る。

#### 【0082】

- 図25は、pCLS1969ベクターマップを表す。

- 図26は、遺伝子ターゲティング事象のPCR分析を示す。RAG1遺伝子座について野生型のクローンと、ドナー修復プラスミドのランダム挿入を有するクローンは、PCR増幅をもたらさない。RAG1遺伝子座にて遺伝子ターゲティング事象を有するクローンは、2588bpのPCR生成物をもたらす。

- 図27は、細胞クローンのサザンプロット分析を示す。ゲノムDNA調製物をHindIIIで消化し、サザンプロットングを、右の相同腕の外側にあるRAG1遺伝子のフラグメントを用いて行った。遺伝子座地図は、野生型遺伝子座(5.3 kb)及び標的遺伝子座(3.4 kb)の制限パターンを示す。プローブは、塗りつぶした黒い箱で示す。単一形質移入細胞に由来する5つのクローン(1～5)試料を、非形質移入細胞(293)からのDNAとともに分析する。3つの試料において、対立遺伝子の1つが標的にされている。H、HindIII部位。

#### 【0083】

- 図28は、ヘテロ二量体及び単鎖分子の生物物理学的分析を示す。A；単鎖メガヌクレアーゼ及び対応するヘテロ二量体タンパク質の円偏光2色性スペクトル。B；全てのヘテロ二量体及び単鎖変異型の熱変性。C；分配計数(KAV)対分析用Superdex- 200 10-300GL

10

20

30

40

50

カラムについての4つのタンパク質標準物質(塗りつぶしていない丸)の分子質量の対数の検量グラフ。単鎖メガヌクレアーゼの値は、塗りつぶした丸で示す(測定されたMW = 34 kDa、理論的MW = 41 kDa)

- 図29は、毒性研究を示す。A. 用量応答研究。CHO株化細胞に、種々のメガヌクレアーゼについての種々の量の発現ベクター及び固定された量の修復プラスミドを形質移入した。

M2 / M3 ヘテロ二量体 ; M2<sub>G19S</sub> / M3ヘテロ二量体 ; M2<sup>+</sup> / M3<sup>-</sup>ヘテロ二量体 ; x M2<sup>+</sup><sub>G19S</sub> / M3<sup>-</sup> ; \* M3-RM2-M2<sub>G19S</sub> ; M2<sup>+</sup><sub>G19S</sub>-RM2-M3<sup>-</sup> ; I-SceI。B. 細胞生存アッセイによりモニターされる工学的メガヌクレアーゼの毒性。種々の量のメガヌクレアーゼ発現ベクターと一定量のGFPをコードするプラスミドとを用いて、CHO-K1細胞を同時形質移入した。細胞の生存を、材料及び方法に記載するように、形質移入の6日後にGFPを発現する細胞のパーセンテージとして表す。完全に不活性なM2<sub>G19S</sub>/M3<sub>G19S</sub>ヘテロ二量体を、非毒性の対照として示す( )。C. DNA損傷も、DNA二本鎖破断でのH2AX増殖巣(foci)の形成により視覚化した。メガヌクレアーゼの活性用量の10倍で処置した細胞の代表的な画像。

10

#### 【実施例】

#### 【0084】

実施例1：ヒトXPC遺伝子を切断する単鎖I-CreI由来メガヌクレアーゼの作製。

色素性乾皮症(XP)は、紫外線(UV)への曝露に対する過敏症と皮膚癌を発生する高い素因とを特徴とする、希な常染色体劣性遺伝疾患である。色素性乾皮症に關与するヒトXPC遺伝子を、可能性のある標的配列についてスキャンした。C1と呼ばれる可能性のある22bpのDNA標的(cgagatgtcacacagaggtacg; 配列番号26)は、XPCの9番目のエキソンの終点に存在した(図2)。C1標的を切断できるI-CreI由来変異体を工学的に操作することは、以前に記載されている(Arnouldら, J. Mol. Biol., Epub 10 May 2007; 国際PCT出願WO 2007/093836及びWO 2007/093918)。簡単に、C1配列をC3及びC4と呼ばれる2つのパリンδροーム半分標的に分けた(図3)。C3標的は±6位での単一の違い以外は10GAG\_P標的と同一であるので、10GAG\_P標的を切断できるI-CreI由来変異体をC3標的に対してスクリーニングした。I-CreI野生型配列と比較して単一の変異Y33H(33位のチロシンのヒスチジン残基による置換)を有する変異体H33を、強いC3カッターとして単離した。C4標的は、10GTA\_P及び5TCT\_P標的の組み合わせである。以前に記載されるようにして(Smithら, Nucleic Acids Research, 2006, 34, e149; 国際PCT出願WO 2007/049095及びWO 2007/057781)、10GTA\_Pを切断できるI-CreI変異体と、5TCT\_P標的を切断できるI-CreI変異体とを組み合わせ、C4 DNA標的に対してスクリーニングした。X2と呼ばれるI-CreI変異体を、強いC4カッターとして単離した。X2変異体は、I-CreI野生型配列と比較して以下の変異を有する：Y33H、Q38A、S40Q、Q44K、R68Q、R70S及びD75N。最後のステップは、以前に記載されたような(国際PCT出願WO 2006/097854及びArnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458)、H33及びX2 I-CreI変異体の酵母同時発現からなり、これによりXPC C1 DNA標的の強い切断がもたらされた(図4)。

20

30

#### 【0085】

2つの変異体の同時発現により得られるX2/H33 XPCヘテロ二量体は、C1標的を切断するが、2つのホモ二量体の存在により、C3及びC4標的も切断する。これらの副作用を回避するために、2つのI-CreI由来変異体X2及びH33で構成される単鎖分子を設計するための新しい様式を考案した。この目的のために、全長X2 N末端変異体を単鎖設計に維持し、X2-L-H33(ここで、Lはタンパク質リンカーである)の型のいくつかの構築物を工学的に作製した。この命名において、X2はN末端変異体、H33はC末端変異体である。別の重要な問題は、単鎖分子内の2つの変異体の配列同一性であった。実際に、2つのI-CreI変異体X2及びH33は、ほぼ同じ核酸配列を有し、このことは、2つのほぼ同一の配列間での組換え事象の危険性を有する、このような構築物の安定性の問題を提起する。この可能性を回避するか少なくとも低減するために、I-CreI CLSと呼ばれる別のI-CreIバージョンを用いて、H33変異体をコードした。I-CreI CLSの核酸配列(配列番号24)は、コドン使用及び遺伝子コード縮重を用いてI-CreI野生型配列(I-CreI wt; 配列番号22)から書き換えた。この

40

50



ことは、I-CreI CLSが73%の核酸配列同一性をI-CreI wtと共有し、I-CreI活性を変更しない3つの単一アミノ酸変異(T42A、E110W及びQ111R)を有することを意味する。次いで、Y33HをI-CreI CLSバージョンに導入した(配列番号25)。H33 CLS変異体の活性をC3標的に対して確認し、I-CreI wtバージョンにおけるH33変異体についてと同様に強いことが示された。

#### 【0086】

H33 CLS変異体を用いて、X2-L-H33型(ここで、Lは18個のバージョンのそれぞれで異なるリンカーである)の18個の単鎖バージョンを構築した。G19S変異も、C末端H33変異体中に、2つの単鎖分子について導入した。C1 XPC標的並びにその2つの誘導体であるC3及びC4に対するこれらの異なる単鎖構築物の活性を、次いで、酵母、及びそれらのいくつかについて染色体外アッセイを用いてCHO細胞においてモニターした。

#### 【0087】

##### 1) 材料及び方法

##### a) I-CreI CLSバージョンへのY33H変異の導入

2つのオーバーラップPCR反応を、2組のプライマーを用いて行った：第1フラグメントについてGal10F (5'-gcaacttttagtgctgacacatacagg-3'; 配列番号44)及びH33Rev60 (5'-ctgggtgtttgaacttgtgagattgatttgggtt-3'; 配列番号45)、第2フラグメントについてH33For60 (5'-aaaccaaatacaatctcacaagttcaaaccacag-3'; 配列番号46)及びGal10R (5'-acaaccttgattggagacttgacc-3'; 配列番号47)。およそ25 ngのそれぞれのPCRフラグメントと、NcoI及びEagIでの消化により直鎖状にした75 ngのベクターDNA pCLS0542 (図5)とを用いて酵母サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) FYC2-6A株(MAT<sup>-</sup>, trp1<sup>-</sup>63, leu2<sup>-</sup>1, his3<sup>-</sup>200)を、高効率LiAc形質転換プロトコル(Gietz, R. D.及びWoods R. A., *Methods Enzymol.*, 2002, 350, 87~96)を用いて形質転換した。Y33H変異を含むインタクトなコード配列を、酵母にてインビボ相同組換えにより作製する。

#### 【0088】

##### b) 変異体の配列決定

変異体発現プラスミドを回収するために、酵母DNAを標準的なプロトコルを用いて抽出し、大腸菌を形質転換するために用いた。変異ORFの配列決定を、次いで、プラスミドに対してMILLEGEN SAにより行った。

#### 【0089】

##### c) 18個のXPC単鎖分子のクローニング

18回の独立したPCR反応を、I-CreI CLSバージョンのH33変異体に対して行った。それぞれのPCR反応は、同じリバースプライマーCreCterR60 (5'-tagacgagctcctaaggagaggacttttcttctcag-3'; 配列番号48)及び特異的フォワードプライマーを用いる。用いた18個のフォワードプライマーは、以下のとおりである：

- L1EagI: 5'-tatcgccgggtggcggaggatctggcggcgggtggatccgggtggaggctccggaggagggtggctctaacaagaggttcctgctgtatcttgcctgga-3' (配列番号49)
- YPP: 5'-tatcgccgggtaaatcttccgattccaagggtattgatctgactaatgttactctgcctgatacccctacttattccaaagctgcctctgatgctattcctccagctaacaagaggttcctgctgtatcttgcctggattt-3' (配列番号50)
- AOL: 5'-tatcgccgggtctggagtatcaggctccttactcttcccctccaggctcctccttgttgcctccgggttcctctggctcctctgctggttgttctaacaagaggttcctgctgtatcttgcctggattt-3' (配列番号51)
- CXT: 5'-tatcgccgggtctgtcctatcattattctaattgggtggctcccctacttctgatggctccagctctgggtggcatttctgatgggtggcgtactaacaagaggttcctgctgtatcttgcctggattt-3' (配列番号52),
- BQY: 5'-tatcgccgggtgattcctctgtttctaattccgagcacattgctcctctgtctctgccttcctctcctccatctgttgggttctaacaagaggttcctgctgtatcttgcctggattt-3' (配列番号53)
- VSG: 5'-tatcgccgggtgcttctcagggttgtaaacctctggcctctgcctgagctgcttactgaggattcttataatactgataacaagaggttcctgctgtatcttgcctggattt-3' (配列番号54)
- BYM: 5'-tatcgccgggtaatcctattcctgggtctggatgagctgggtgttggcaactctgatgctgccgctcctggcactaacaagaggttcctgctgtatcttgcctggattt-3' (配列番号55)

- MCJ: 5'-tatcgccgggtgctcctactgagtgttctccttccgctctgacccagcctccatccgcttctgggtccctgaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号56)

- GSmid: 5'-tatcgccgggtggaggcggttctggaggcggtggctctggaggcggttccggtggaggcggtatctggaggcggttctaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号57)

- GSshort: 5'-tatcgccgggtggaggcggttctggaggcggtggctctggaggcggttccaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号58)

- GSxshort: 5'-tatcgccgggtggaggcggttctggaggcggtggctctaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号59)

- PPR: 5'-tatcgccgggtcagggttacttctgctgcccgtcctgctactgttccatctggtaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号60)

- SBA1: 5'-tatcgccgggtggatctcctctgaagccttctgccccaaagattcctatagggtggctccaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号61)

- SBA2: 5'-tatcgccgggtggatctcctctgaagccttctgccccaaagattcctatagggtggctccccactgaaaccttccgcacctaaaaatcccaattgggtggctctaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号62)

- LP1: 5'-tatcgccgggtggatctcctctgtctaaaccaattccaggcggttccaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号63)

- LP2: 5'-tatcgccgggtggatctcctctgtctaaaccaattccaggcggttccccactgtcaaagccaatccctggcggttctaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号64)

- RM1: 5'-tatcgccgggtggatctgataagtataatcaggctctgtctgagcgctcgcgccctacgttgtcgccaataacctggtttccggtggaggcggttccaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号65)

- RM2: 5'-tatcgccgggtggatctgataagtataatcaggctctgtctaaatacaaccaagcactgtccaagtacaatcaggccctgtctggaggcggttccaacaaagagttcctgctgtatcttgctggattt-3' (配列番号66)。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

全てのPCRフラグメントを精製し、EagI及びSacIにより消化し、それぞれのPCRフラグメントを、これもまたEagI及びSacIで消化したX2変異体についての酵母発現ベクターにライゲーションした。クローンの配列決定の後に、酵母発現ベクター中の全ての単鎖分子を得た。

【 0 0 9 1 】

d) 2つの単鎖分子のC末端H33変異体X2-L1-H33及びX2-RM2-H33へのG19S変異の導入

2回のオーバーラップPCR反応を、2組のプライマーを用いて行った：第1フラグメントについてGal10F (5'-gcaactttagtgctgacacatacagg-3'；配列番号44)及びG19SRev (5'-gcaatgatggagccatcagaatccacaaatccagc-3'；配列番号67)、第2フラグメントについてG19SFor60 (5'-gctggatttgtggattctgatggctccatcattgc-3'；配列番号68)及びGal10R (5'-acaaccttgattggagacttgacc-3'；配列番号47)。およそ25 ngのそれぞれのPCRフラグメントと、NcoI及びEagIでの消化により直鎖状にした75 ngのベクターDNA (pCLS0542；図5)とを用いて酵母サッカロミセス・セレビスIEFYC2-6A株(MAT<sup>-</sup>, trp1<sup>-</sup> 63, leu2<sup>-</sup> 1, his3<sup>-</sup> 200)を、高効率LiAc形質転換プロトコル(Gietz, R. D.及びWoods R. A., Methods Enzymol., 2002, 350, 87~96)を用いて形質転換した。G19S変異を含むインタクトなコード配列を、酵母にてインピボ相同組換えにより作製する。

【 0 0 9 2 】

e) XPC X2-L1-H33単鎖分子へのK7E、E8K及びG19S変異の導入

まず、G19S変異をX2-L1-H33分子に導入した。2回のオーバーラップPCR反応を、pCLS0542酵母発現ベクターにクローニングした単鎖分子に対して行った。第1のPCR反応は、プライマー：Gal10F (5'-gcaactttagtgctgacacatacagg-3'；配列番号44)及びG19SRev60 (5'-gcaatgatggagccatcagaatccacaaatccagc-3'；配列番号67)を用い、第2のPCR反応は、プライマー-G19SFor60 (5'-gctggatttgtggattctgatggctccatcattgc-3'；配列番号68)及びGal10R (5'-acaaccttgattggagacttgacc-3'；配列番号47)を用いる。およそ25 ngのそれぞれのPCRフラグメントと、NcoI及びEagIでの消化により直鎖状にした75 ngのベクターDNA (pCLS0542；図5)とを用いて酵母サッカロミセス・セレビスIEFYC2-6A株(MAT<sup>-</sup>, trp1<sup>-</sup> 63, le

u2 1, his3 200)を、高効率LiAc形質転換プロトコル(Gietz, R. D.及びWoods R. A., Methods Enzymol., 2002, 350, 87~96)を用いて形質転換した。G19S変異を含むインタクトなコード配列を、酵母にてインビボ相同組換えにより作製した。

#### 【0093】

第2ステップにおいて、K7E及びE8K変異を、X2-L2-H33(G19S)分子中に、3回のオーバーラップ変異を行うことにより導入した。SCX1分子について、3回のPCR反応はそれぞれ以下のとおりである3組のプライマーを用いる：Gal10FとK7ERev (5'-gtacagcaggaactcttcgttatatttggatttgg-3')、K7EFor (5'-aataccaaataacgaagagttcctgctgtacc-3'; 配列番号69)とE8KRevSC (5'-aagatacagcaggaacttttggtagagccacc-3'; 配列番号70)、E8KForSc (5'-ggtggctctaacaaaaagttcctgctgtatctt-3'; 配列番号71)とGal10R。SCX2分子について、3回のPCR反応はそれぞれ以下のとおりである3組のプライマーを用いる：Gal10FとE8KRev (5'-caggtacagcaggaacttttggtagatttgg-3'; 配列番号72)、E8KFor (5'-accaaataacaaaaagttcctgctgtacctgg-3'; 配列番号73)とK7ERevSC (5'-aagatacagcaggaactcttcgttagagccacc-3'; 配列番号74)、K7EForSc (5'-ggtggctctaacgaagagttcctgctgtatctt-3'; 配列番号75)とGal10R。両方の構築物について、およそ25 ngのそれぞれのPCRフラグメントと、NcoI及びEagIでの消化により直鎖状にした75 ngのベクターDNA (pCLS0542; 図5)とを用いて酵母サッカロミセス・セレビスIEFYC2-6A株(MAT<sup>+</sup>, trp1<sup>-</sup>63, leu2<sup>-</sup>1, his3<sup>-</sup>200)を、高効率LiAc形質転換プロトコル(Gietz R D及びWoods R A Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods Enzymol. 2002; 350:87-96)を用いて形質転換した。SCX1又はSCX2構築物についてのインタクトなコード配列を、酵母にてインビボ相同組換えにより作製した。

#### 【0094】

f) メガヌクレアーゼ発現クローンの交配及び酵母でのスクリーニング

スクリーニングは、以前に記載されたようにして行った(国際PCT出願WO 2004/067736; Epinatら, Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952~2962; Chamesら, Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178及びArnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458)。交配は、コロニーグリッター(QpixII, Genetix)を用いて行った。変異体を、YPDプレートに覆うナイロンフィルタ上に、低格子密度(grid density) (約4スポット/cm<sup>2</sup>)を用いてグリッドした。2回目のグリッド手順を同じフィルタ上に行って、それぞれの標的について異なるレポーターを有する酵母株からなる第2層をスポットした。メンブレンを固形寒天YPDリッチ培地上に置き、30℃にて一晩インキュベートして交配を可能にした。次に、フィルタを、ロイシン及びトリプトファンを欠き、ガラクトース(2%)を炭素源として有する合成培地上に移し、37℃にて5日間インキュベートして、発現及び標的ベクターを有する二倍体を選択した。5日後にフィルタを、0.5Mリン酸ナトリウムバッファー、pH 7.0中の0.02% X-Gal、0.1% SDS、6%ジメチルホルムアミド(DMF)、7 mM β-メルカプトエタノール、1%アガロースを含む固形アガロース培地上に置き、37℃にてインキュベートして、β-ガラクトシダーゼ活性をモニターした。結果をスキャンにより分析し、定量を、適切なソフトウェアを用いて行った。

#### 【0095】

g) 哺乳動物発現ベクターへのXPC単鎖構築物のクローニング

それぞれの変異体ORFを、PCRによりプライマーCCM2For (5'-aagcagagctctctggctaactagagaacccactgcttactggcttatcgaccatggccaataacaaagagttcc-3'; 配列番号76)及びCCMRev60 (5'-ctgctctagactaaggagaggacttttcttctcag-3'; 配列番号77)を用いて増幅した。PCRフラグメントを、制限酵素SacI及びXbaIにより消化し、次いで、これもまたSacI及びXbaIにより消化したベクターpCLS1088 (図6)にライゲーションした。得られたクローンを、配列決定により確認した(MILLEGEN)。

#### 【0096】

h) CHO細胞での染色体外アッセイのためのベクターへのC1、C3及びC4標的のクローニング  
興味対象の標的を、次のようにしてクローニングした。ゲートウェイクローニング配列と接する標的配列に相当するオリゴヌクレオチドを、PROLIGOに注文した。1本鎖オリゴ

ヌクレオチドのPCR増幅により作製した2本鎖標的DNAを、Gatewayプロトコル(INVITROGEN)を用いてCHOレポーターベクター(pCLS1058、図7)にクローニングした。

【0097】

i) CHO細胞における染色体外アッセイ

CHO細胞を、Polyfect形質移入試薬を供給業者(QIAGEN)のプロトコルに従って用いて形質移入した。形質移入の72時間後に、培養培地を回収し、150  $\mu$ lの溶解/明示(revelation)バッファーを -ガラクトシダーゼ液体アッセイのために加えた(1リットルのバッファーは、以下のものを含んでいた: 100 mlの溶解バッファー(Tris-HCl 10 mM pH7.5、NaCl 150 mM、Triton X100 0.1%、BSA 0.1 mg/ml、プロテアーゼ阻害剤)、10 mlのMg 100  $\times$  バッファー(MgCl<sub>2</sub> 100 mM、 -メルカプトエタノール35%)、110 ml ONPG 8 mg/ml及び780 mlのリン酸ナトリウム0.1M pH7.5)。37  $^{\circ}$ Cでのインキュベーションの後に、ODを420 nmにて測定した。プロセス全体を、自動化Velocity11 BioCelプラットフォームで行った。

【0098】

2) 結果

a) 3つのXPC標的に対する18個のXPC単鎖メガヌクレアーゼの切断活性

表Iは、異なる単鎖分子の構築のために用いた異なるリンカーを示す。それぞれの単鎖分子について、リンカーはN末端X2変異体の最後の残基(P163)の後で始まり、リンカーの後でN末端H33変異体が残基N6にて始まる。

【0099】

【表1】

表 I: リンカー

番号	リンカー名	サイズ (aa)	配列番号	1次配列
1	L1	22	3	-AA(GGGGS) <sub>4</sub> -
2	YPP	35	4	-AAGKSSDSKIGIDLTNVTLPDPTYSKAASDAIPPA-
3	AOL	31	5	-AAGLEYPQAPYSSPPGPPCCSGSSGSSAGCS-
4	CXT	30	6	-AAGLSYHYNSNGGSPTSDGPALGGISDGGAT-
5	BQY	27	7	-AAGDSSSVNSEHIALPLSLPSSPPSVGS-
6	VSG	25	8	-AAGASQGCKPLALPELLTEDSYNTD-
7	BYM	24	9	-AAGNPIPLDELGVGNSDAAAPGT-
8	MCJ	23	10	-AAGAPTECSPSALTQPPSASGSL-
9	GSmid	27	11	-AA(GGGGS) <sub>5</sub> -
10	Gsshort	17	12	-AA(GGGGS) <sub>3</sub> -
11	GSxshort	12	13	-AA(GGGGS) <sub>2</sub> -
12	PPR	17	14	-AAGQVTSAGPATVPSG-
13	SBA1	19	15	-AAGGSPLKPSAPKIPIGGS-
14	SBA2	33	16	-AAGGSPLKPSAPKIPIGGSPLKPSAPKIPIGGS-
15	LP1	15	17	-AAGGSPLSKPIPGGS-
16	LP2	25	18	-AAGGSPLSKPIPGGSPLSKPIPGGS-
17	RM1	31	19	-AAGGSDKYNQALSERRAYVVANNLVSGGGGS-
18	RM2	32	2	-AAGGSDKYNQALSKYNQALSKYNQALSGGGGS-

【0100】

18個のXPC単鎖分子の切断活性を、3つのXPC標的C1、C3及びC4に対して、以前に記載された酵母スクリーニングアッセイ(国際PCT出願WO 2004/067736; Epinatら, Nucleic Acid Res., 2003, 31, 2952~2962; Chamesら, Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178及びArnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458)を用いてモニターした。図8に示すように、全ての単鎖構築物はC1標的を切断し、C3標的も強く切断するが、C4標的に対する活性も検出可能である。2つの単鎖分子X2-L1-H33及びX2-RM2-H33を、哺乳動物発現ベクター

にクローニングして、3つのXPC標的に対するそれらの活性を、CHO細胞において染色体外アッセイを用いて確認した(図9)。このアッセイにより、酵母切断プロファイルを確認した(図9)。さらに、X2-RM2-H33は、CHO細胞において、X2-L1-H33よりもC1標的に対してより活性である。C4切断は、CHO細胞においてかろうじて検出可能である。C3の切断はX2を用いて観察されず、同様に、H33はC4を切断しない(データ示さず)。よって、単鎖分子を用いてのC3標的の強い切断は、2つの別個の分子からのH33ユニットの二量体形成界面間の相互作用に起因する分子間種の形成をリンカーが消失させないことを示唆する。偽H33ホモ二量体の形成が、次いで、C3切断の原因であろう。

【0101】

b) XPC単鎖メガヌクレアーゼの切断の特異性に対するG19S変異単独の影響

10

この仮説を試験するために、G19S変異を、2つの単鎖分子のH33 C末端変異体に導入した。G19S変異(pdb 1G9Y番号付けに従う、I-CreIからの残基19の変異)は、機能的ホモ二量体の形成を消失させる一方で、G19S単量体を示すヘテロ二量体の活性を増進させることが以前に示されている(国際PCT出願WO 2008/010093)。得られた2つの単鎖分子(X2-L1-H33<sub>G19S</sub>及びX2-RM2-H33<sub>G19S</sub>)の、3つのXPC標的に対するプロファイルを用いて、CHO細胞における染色体外アッセイを用いて決定した。図10は、G19S変異がC1標的に対する活性を増加させるだけでなく、C3標的に対する活性も大きく低減させることを示す。3つのXPC標的に対するX2/H33ヘテロ二量体のプロファイル切断も、比較のために図10に示す。

【0102】

これらの結果により、2つのH33ユニットの相互作用に起因する分子間種の形成の仮説が確認される。同様に、2つのX2ユニット間の相互作用は、C4標的の弱い切断をおそらく説明する(図8及び9)。よって、X2単量体とH33単量体との間のリンカーの導入は分子内相互作用に好ましいかもしれないが(例えばC4の切断の低減をもたらす)、これは分子間相互作用を消失させない。

20

にもかかわらず、工学的なXPC単鎖分子X2-RM2-H33<sub>G19S</sub>は、C1 XPC標的を、X2/H33ヘテロ二量体よりも強く切断し、2つのパリンドロームC3及びC4標的に対する切断活性が、同じヘテロ二量体よりも大きく低減されている。単鎖分子X2-RM2-H33<sub>G19S</sub>は、X2/H33ヘテロ二量体よりもかなりよい特異性を示し、DNA二本鎖破断により誘導される相同組換えの分野の最高の基準であるI-SceIのものに匹敵する活性レベルを有する。

【0103】

30

c) G19S変異と、機能的ホモ二量体の形成を損なう別の変異との組み合わせの、XPC単鎖メガヌクレアーゼの切断の特異性に対する影響

図11は、3つの単鎖分子X2-L1-H33、SCX1及びSCX2の、3つのXPC標的に対する酵母スクリーニングアッセイにおける活性を示す。元の単鎖分子は、C1及びC3標的に対して強い切断活性を有するが、K7E/E8K及びG19S変異を導入してSCX1及びSCX2分子を作製することにより、C1標的に対する切断活性の増加と、C3標的に対する切断活性の完全な消失とが促進される。よって、変異K7E/E8K及びG19Sは、単鎖分子にうまく導入されて、興味対象のDNA標的に対するその切断活性に影響することなく、その特異性を改善できる。

【0104】

実施例2：チャイニーズハムスターHPRT遺伝子を切断する単鎖I-CreI由来メガヌクレアーゼの作製

40

チャイニーズハムスターからのヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)遺伝子を、可能性のある標的部位についてスキャンした。HprCH3と呼ばれる22bpの配列(cgagatgtcatgaaagagatgg: 配列番号34)を、遺伝子ORFにおいて同定した(図12)。2つの派生パリンドローム標的HprCH3.3及びHprCH3.4は、HprCH3標的から導かれた(図13)。HprCH3.3標的は、実施例1に記載されたC3標的と同一であるので、H33 I-CreI変異体は、HprCH3.3 (C3)を強く切断できる。HprCH3.4標的は、10CAT\_P標的と5CTT\_P標的との組み合わせである。10CAT\_P標的を切断できるI-CreI変異体を、Smithら、Nucleic Acids Research, 2006, 34, e149; 国際PCT出願WO 2007/049156及びWO 2007/060495に以前に記載されたようにして得て、5CTT\_P標的を切断できるI-CreI変異体を、Arnouldら、J Mol.

50

Biol., 2006; 355, 443 ~ 458; 国際PCT出願WO 2006/097784及びWO 2006/097853に以前に記載されたようにして得た。変異体は、Smithら, Nucleic Acids Research, 2006, 34, e149; 国際PCT出願WO 2007/049095及びWO 2007/057781に以前に記載されたようにして組み合わせ、HprCH3.4 DNA標的に対してスクリーニングした。MA17と呼ばれるI-CreI変異体が、HprCH3.4カッターとして単離された。しかし、これは、弛緩された特異性のために、HprCH3.3標的も切断することが見出された(図14を参照)。MA17変異体は、I-CreI野生型配列と比較して、以下の変異を有する：S32T、Y33H、Q44R、R68Y、R70S、S72T、D75N及びI77N。最後のステップは、以前に記載されたような(国際PCT出願WO 2006/097854及びArnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443 ~ 458)、H33及びMA17 I-CreI変異体の酵母同時発現からなり、これにより、HprCH3 DNA標的が切断された。

10

#### 【0105】

2つのHPRT単鎖構築物は、実施例1と同じスキームに従って工学的に操作された。2つのL1及びRM2リンカー(実施例1の表Iを参照)を用いて、MA17-L1-H33及びMA17-RM2-H33単鎖分子の生成がもたらされた。第2ステップにおいて、G19S変異をC末端H33変異体に導入して、2つの他の単鎖メガヌクレアーゼであるMA17-L1-H33<sub>G19S</sub>及びMA17-RM2-H33<sub>G19S</sub>を得た。これらの異なる構築物の活性を、次いで、酵母及びCHO細胞において、HprCH3標的及びその2つの誘導体であるHprCH3.3及びHprCH3.4標的に対してモニターした。

#### 【0106】

##### 1) 材料及び方法

実施例1を参照されたい。

20

#### 【0107】

##### 2) 結果

3つのHPRT標的HprCH3、HprCH3.3及びHprCH3.4に対する3つの単鎖分子(MA17-L1-H33、MA17-L1-H33<sub>G19S</sub>及びMA17-RM2-H33)の活性を、以前に記載された酵母アッセイを用いてモニターした(国際PCT出願WO 2004/067736; Epinatら, Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952 ~ 2962; Chamesら, Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178及びArnouldら, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443 ~ 458)。図14に示すように、MA17-L1-H33はHprCH3標的を切断せず、これはその他の2つの単鎖分子により切断される。よって、RM2リンカーは、実施例1ですでに観察されたように、我々が単鎖構築物を工学的に操作した様式によりよく順応したようである。これらの結果により、G19S変異の存在がヘテロ二量体活性を増進させることも確認される。全ての3つの単鎖分子は、HprCH3.3(実施例1からのC3標的と同一)を非常に強く切断するが、MA17/H33ヘテロ二量体とは対照的に、HprCH3.4を切断しない。この場合、HprCH3.3(C3)の切断は、分子間種の形成を原因として、必須ではない。MA17及びH33変異体がともにHprCH3.3標的をホモ二量体として切断するので、MA17/H33ヘテロ二量体又はMA17-RM2-H33単鎖単量体は、原則的に、HprCH3.3を切断できた。この仮説は、MA17-L1-H33<sub>G19S</sub>及びMA17-RM2-H33<sub>G19S</sub>によるHprCH3.3の堅固な切断により確認される。次いで、4つの単鎖分子(MA17-L1-H33、MA17-L1-H33<sub>G19S</sub>、MA17-RM2-H33及びMA17-RM2-H33<sub>G19S</sub>)を、3つのHPRT標的の切断について用いる、CHO細胞において試験された哺乳動物発現ベクターにクローニングした(図15)。MA17-RM2-H33<sub>G19S</sub>単鎖分子は、強い活性を示した。ここでもまた、HprCH3.3(C3)の強い切断が観察されたが、HprCH3.4の切断は低い又はなかった。

30

40

#### 【0108】

実施例3：ヒトRAG1遺伝子を切断する単鎖I-CreI由来メガヌクレアーゼの作製

RAG1は、免疫グロブリン及びTリンパ球受容体(TCR)の成熟における必須ステップであるV(D)J組換えプロセスに関与する遺伝子である。RAG1遺伝子における変異は、リンパ球Bにおける機能的欠陥と常に関連するリンパ球T成熟における欠陥をもたらし、これは、重症複合免疫不全(SCID)を導く。ヒトRAG1のイントロンと第2エキソンとの間の結合部にあるRAG1.10と呼ばれる22 bpのDNA配列(配列番号41; 図16)が、我々のメガヌクレアーゼによる可能性のある切断可能配列として同定されている(Smithら, Nucleic Acids Research, 2006, 34, e149 国際PCT出願WO 2008/010093)。RAG1.10配列から、2つのパリンδρο

50

ー△RAG1.10.2及びRAG1.10.3配列を導いた(図17)。RAG1.10.2標的は、10GTT\_P及び5CAG\_P標的の組み合わせであり、RAG1.10.3標的は、10TGG\_P及び5GAG\_P標的の組み合わせである。RAG1.10.2及びRAG1.10.3標的の両方についての強いカッターが、一方で10GTT\_P及び5CAG\_P標的、他方で10TGG\_P及び5GAG\_P標的を切断できるI-CreI変異体を、Smithら、Nucleic Acids Research, 2006, 34, e149; 国際PCT出願WO 2007/049095、WO 2007/057781、WO 2007/049156、WO 2007/060495、WO 2006/097784及びWO 2006/097853; Arnouldら、J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458に以前に記載されたようにして組み合わせることにより得られた。以前に記載されたようなカッターの同時発現(国際PCT出願WO 2006/097854及びArnouldら、J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458)は、次いで、RAG1.10標的の強い切断を導く。M2/M3 RAG1.10ヘテロ二量体は、酵母において最も強く切断する(国際PCT出願WO 2008/010093)。M2はRAG1.10.2カッターであり、I-CreI野生型配列と比較して以下の変異を有する：N30R、Y33N、Q44A、R68Y、R70S及びI77R。M3はRAG1.10.3カッターであり、I-CreI野生型配列と比較して以下の変異を有する：K28N、Y33S、Q38R、S40R、Q44Y、R70S、D75Q及びI77V。

10

20

30

40

50

#### 【0109】

実施例1及び2と同じ実験スキームに従って、3つの単鎖構築物を、2つのリンカーL1及びRM2(実施例1の表Iを参照)を用いて工学的に操作し、3つの単鎖分子：M2-L1-M3、M2-RM2-M3及びM3-RM2-M2を生成した。第2ステップにおいて、G19S変異を、M2-L1-M3及びM2-RM2-M3単鎖分子からのN末端M2変異体に導入して、2つのさらなる構築物を得た。さらに、変異K7E、K96EをM3-RM2-M2のM3変異体に、E8K、E61RをM3-RM2-M2のM2変異体に導入して、単鎖分子：M3(K7E K96E)-RM2-M2(E8K E61R)を創出したが、これをさらにSC\_OHと称する。6つの単鎖構築物を、次いで、酵母においてRAG1.10標的並びにその2つのRAG1.10.2及びRAG1.10.3誘導体の切断について試験した。

#### 【0110】

##### 1) 材料及び方法

元に戻したI-CreI CLSの変異(T42A、E110W及びQ111R)以外については実施例1を参照されたい。

#### 【0111】

##### SC\_OH単鎖分子のクローニング

PCR反応を、pCLS0542酵母発現ベクターにクローニングされた、K7E及びK96E変異を有するM2変異体に対して行った。PCR反応は、リバースプライマーCreCterSacI (5'-tagacgagctcctacggggaggatttcttcttctcgct-3'; 配列番号78)とフォワードプライマーRM2 (5'-tatcgccggtggatctgataagttataatcaggctctgtctaaatacaaccaagcactgtccaagtacaatcaggccctgtctgtgtggaggcggttccaacaaagagttcctgtctgtatcttctgtggattt-3'; 配列番号66)とを用いる。

PCRフラグメントを精製し、EagI及びSacIにより消化し、これもまたEagI及びSacIで消化された変異E8K及びE61Rを有するM3変異体のための酵母発現ベクターにライゲーションした。クローンの配列決定の後に、SC\_OH単鎖分子を得た。

#### 【0112】

##### 2) 結果

4つのRAG1単鎖分子(M2-L1-M3、M2<sub>G19S</sub>-L1-M3、M2-RM2-M3及びM2<sub>G19S</sub>-RM2-M3)の活性を、3つのRAG1標的RAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3(図18)に対して、以前に記載された酵母アッセイ(国際PCT出願WO 2004/067736; Epinatら、Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952~2962; Chamesら、Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178及びArnouldら、J. Mol. Biol., 2006, 355, 443~458)を用いてモニターした。実施例1及び2で観察されたように、RM2リンカーは、単鎖構築物が工学的に操作された様式によりよく順応されたようである。RAG1.10標的の切断は、M2-RM2-M3分子を用いて観察されたが、M2-L1-M3では観察されなかった。さらに、M2-RM2-M3は、RAG1.10.2も切断することが見出された。M3はRAG1.10.2(図18)を切断しないので、これらの結果は、分子間相互作用が、パリンδροームRAG1.10.2標的の切断を担うホモ二量体又は偽ホモ二量体の種を形成するであろう2つのM2ユニット同士の接触をまだもたらし得ることを示唆する。

## 【 0 1 1 3 】

M2変異体へのG19S変異の導入は、両方の分子の活性を改善した。なぜなら、M2<sub>G19S</sub>-L1-M3がRAG1.10標的を切断し、M2<sub>G19S</sub>-RM2-M3がM2-L1-M3よりも活性であるからである。さらに、機能的ホモ二量体の形成を損なうと以前に示されたG19S変異が(本願の実施例1及び国際PCT出願WO 2008/010093を参照)、RAG1.10.2切断を消失させる。この結果は、別個のM2-RM2-M3単鎖分子からのM2ユニット同士の相互作用が、まだ可能であるという仮説と一貫している。しかし、M3とは対照的に、M2-RM2-M3分子はRAG1.10.3を切断しないので、単鎖構造は、ある程度は分子内相互作用に好ましいであろう。結論として、M2<sub>G19S</sub>-RM2-M3 RAG1単鎖分子は、RAG1.10標的を、M2/M3ヘテロ二量体を用いて観察されたものに匹敵して酵母において飽和レベルで切断し、2つの派生パリンドローム標的RAG1.10.2及びRAG1.10.3のいずれの切断も示さない。

## 【 0 1 1 4 】

図19に示す、2つの単鎖分子M3-RM2-M2及びSC\_OHの、3つのRAG1.10標的に対する酵母スクリーニングは、K7E/E8K及びE61R/K96Eの導入が、RAG1.10.2標的に対するホモ二量体活性を、RAG1.10標的についての単鎖分子切断活性を低減させることなく消失させ得ることを示す。よって、これらの変異を単鎖分子に導入して、興味対象のDNA標的に対するその活性に影響することなく、その特異性を改善することが可能である。

## 【 0 1 1 5 】

実施例4：単鎖分子を構成する2つの変異体について異なる位置と、G19S変異の異なる配置を有するRAG1単鎖分子の作製

それぞれの変異体とG19S変異との配置が単鎖分子活性に与える影響を評価するために、6つの構築物(M2-RM2-M3、M2<sub>G19S</sub>-RM2-M3、M2-RM2-M3<sub>G19S</sub>、M3-RM2-M2、M3<sub>G19S</sub>-RM2-M2、M3-RM2-M2<sub>G19S</sub>)を、3つのRAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3標的に対する活性について、我々の酵母スクリーニングアッセイを用いて試験した。

## 【 0 1 1 6 】

## 1) 材料及び方法

実施例1を参照されたい。

## 【 0 1 1 7 】

## 2) 結果

図20に示すように、全ての6つの単鎖分子(M2-RM2-M3、M2<sub>G19S</sub>-RM2-M3、M2-RM2-M3<sub>G19S</sub>、M3-RM2-M2、M3<sub>G19S</sub>-RM2-M2、M3-RM2-M2<sub>G19S</sub>)は、RAG1.10標的に対して高度に活性であり、活性は同じ標的に対する元のM2/M3ヘテロ二量体と同等である。単鎖中の単量体M2又はM3の相対的な位置(N末端又はC末端)は、分子の全体的な活性に影響しない。例えば、M2-RM2-M3タンパク質は、M3-RM2-M2分子と同じ切断パターンを示し、RAG1.10及びRAG1.10.2標的を同じ強度で切断するが、RAG1.10.3標的(RR標的)を切断しない。

いくつかの構築物について、RAG1.10.2パリンドローム標的が切断可能であり、このことは、分子間相互作用が生じることができ、活性なヌクレアーゼを創出できることを示唆する。しかし、この残存活性は、G19S変異の導入により消失する。図20における分子2及び3(M2<sub>G19S</sub>-RM2-M3及びM2-RM2-M3<sub>G19S</sub>)の活性プロファイルの比較は、G19S変異の配置がRAG1.10標的に対する活性に影響しないが、この活性を担う変異体(ここでは変異体M2)がG19S変異を有する場合に、残存ホモ二量体活性が消失することを示す。

## 【 0 1 1 8 】

実施例5：CHO細胞における染色体外アッセイにより示される、単鎖分子におけるG19S変異の重要性

RAG1.10切断活性の点で、上記の6つの単鎖分子、及び実施例3に示したSC\_OH単鎖分子は、酵母スクリーニングアッセイにおいて同等であるようである。しかし、これらは全て飽和レベルにてこの標的を切断する。よって、G19S変異を有するか又は有さない2つの単鎖分子の、3つの標的RAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3標的に対する活性を、CHO細胞において、実施例1に記載した染色体外SSAアッセイを用いて評価した。このアッセイのために選択した4つの単鎖分子は、M3-RM2-M2、M3-RM2-M2<sub>G19S</sub>、M3<sup>-</sup>-RM2-M2<sup>+</sup>及びM3<sup>-</sup>-RM2-M



$M3^{-}$ 、 $M2^{+}$ 及び $M3^{-}$ - $M2^{+}$   $G_{19S}$ であった。 $M3^{-}$ は、K7E及びK96E変異を有するM3変異体のことであり、 $M2^{+}$ は、E8K及びE61R変異を有するM2変異体を表す。

【0119】

#### 1) 材料及び方法

$M3^{-}$ - $M2^{+}$ 及び $M3^{-}$ - $M2^{+}$   $G_{19S}$ 分子の、哺乳動物発現ベクターへのクローニング

方法論は、実施例1に記載したものと全く同じであるが、CCM2Forプライマーを、CCM2ForE8Kプライマー(5'-AAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGACCATGGCCAA TACCAAAATATAACAAAAAGTTCC-3': 配列番号93)に置き換えた。

【0120】

#### 2) 結果

図21は、4つの単鎖分子 $M3^{-}$ - $M2$ 、 $M3^{-}$ - $M2$   $G_{19S}$ 、 $M3^{-}$ - $M2^{+}$ 及び $M3^{-}$ - $M2^{+}$   $G_{19S}$ についての、3つのRAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3に対するCHO細胞における染色体外SSA活性を示す。3つの標的に対する活性を、同じ3つの標的に対する元のM2/M3ヘテロ二量体の活性のパーセンテージとして表す。4つの単鎖タンパク質は、バックグラウンドレベルと同等のホモ二量体活性を有する(RAG1.10.2及びRAG1.10.3標的に対して)。図21も、 $G_{19S}$ 変異が単鎖分子活性に必須であることを示す。なぜなら、 $G_{19S}$ 変異を有する2つの単鎖タンパク質だけが、M2/M3ヘテロ二量体活性と同等又はそれより大きいRAG1.10標的切断活性を示すからである。

【0121】

実施例6: RAG1単鎖分子は、CHO-K1細胞において高レベルの遺伝子ターゲティングを誘導する。

2つの単鎖分子 $M3^{-}$ - $M2$   $G_{19S}$  (配列番号94のヌクレオチド配列によりコードされる配列番号95)及び $M3^{-}$ - $M2^{+}$   $G_{19S}$  (配列番号96のヌクレオチド配列によりコードされる配列番号97)の切断活性をさらに評価するために、CHO細胞における染色体レポーター系を用いた(図22)。この系において、CMVプロモーターにより駆動される単コピーLacZ遺伝子にはRAG1.10配列が介在し、よって非機能的である。株化細胞へのRAG1単鎖メガヌクレアーゼをコードするプラスミド及びLacZ修復プラスミドの形質移入により、相同組換えによる機能的LacZ遺伝子の回復が可能になる。二本鎖破断が相同組換えを誘導できることは以前に示されている。よって、LacZ遺伝子が修復される頻度は、ゲノムRAG1.10標的部位の切断効率の指標である。

【0122】

#### 1) 材料及び方法

CHO-K1細胞での染色体アッセイ

レポーター系を有するCHO-K1株化細胞を、10 cmのウェルあたり $2 \times 10^5$ 細胞の密度で、完全培地(2 mM L-グルタミン、ペニシリン(100 UI/ml)、ストレプトマイシン(100 µg/ml)、アンホテリシンB(フォンギゾン)(0.25 µg/ml)(INVITROGEN-LIFE SCIENCE)及び10% FBS (SIGMA-ALDRICH CHIMIE)を補ったKaighnの改変F-12培地(F12-K))中に播種した。次の日に、細胞にPolyfect形質移入試薬(QIAGEN)を用いて形質移入した。簡単に、2 µgのlacZ修復マトリクスベクターを、種々の量のメガヌクレアーゼ発現ベクターとともに同時形質移入した。37 °Cにて72時間のインキュベーションの後に、細胞を0.5%グルタルアルデヒド中で4 °Cにて10分間固定し、0.02% NP40を含む100 mMリン酸バッファーで2回洗浄し、以下の染色バッファーで染色した(10 mMリン酸バッファー、1 mM  $MgCl_2$ 、33 mMヘキサシアノ鉄(III)酸K、33 mMヘキサシアノ鉄(II)酸K、0.1% (v/v) X-Gal)。37 °Cにて一晩のインキュベーションの後に、プレートを光学顕微鏡下で観察して、LacZ陽性細胞クローンの数を計数した。LacZ修復の頻度を、形質移入細胞の数( $5 \times 10^5$ )で除し、形質移入効率で補正したLacZ<sup>+</sup>増殖巣の数として表す。

【0123】

#### 2) 結果

図22は、2つの単鎖分子 $M3^{-}$ - $M2$   $G_{19S}$ 及び $M3^{-}$ - $M2^{+}$   $G_{19S}$ が、CHO細胞において高レベルの遺伝子ターゲティングを誘導できることを示す。これらは、遺伝子修正頻度を、元

のM2/M3ヘテロ二量体と比較して3.5倍の係数で増加させさえる。

【 0 1 2 4 】

実施例 7 : 両方のサブユニットについて異なる N 末端及び C 末端終点を有する RAG1 単鎖分子の作製

M2-RM2-M3 RAG1 単鎖分子を用いて、両方のサブユニットについて異なる N 末端及び C 末端終点を有する新しい単鎖構築物を工学的に操作した。これらの新しい構築物は、2 つの I-CreI 由来変異体を連結するリンカーの最良の可能な位置を正確に指摘することを可能にした。I-CreI の N 末端は、6 残基ループと、その後の残基 K7 で開始する LAGLIDADG -ヘリックスとからなる。I-CreI 構造(PDBコード 1G9Y)において、最後の 10 個の C 末端残基は、おそらく混乱しているために、見ることができない。この構造において、C 末端は残基 D153 で終結し、ヘリックス 6 が残基 145 ~ 150 を覆う。よって、M2 又は M3 変異体の N 末端が残基 M1、N2 又は N6 で始まり、C 末端が異なる位置、それぞれ S145、L152、S156 及び K160 で終結するいくつかの単鎖構築物を作製した。これらの異なる RAG1 単鎖構築物の活性を、以前に記載された酵母スクリーニングアッセイを用いてモニターした(実施例 1 を参照)。

【 0 1 2 5 】

1) 材料及び方法

a) 酵母発現ベクターへの M2 変異体の切り詰めバージョンのクローニング

RAG1 M2-RM2-M3 単鎖のクローニングは、まず、酵母発現ベクター(pCLS0542)にクローニングされた M2 変異体を得ることを必要とする(実施例 3 の材料及び方法を参照)。M2 変異体の切り詰めバージョンをクローニングするために、いくつかの PCR 反応を、異なるプライマー対を用いて行った: CreNter6 / CreCter、CreNter / CreCter160、CreNter / CreCter156、CreNter / CreCter152、CreNter / CreCter145。異なるプライマーの配列は、以下の表 II に列挙する。異なる PCR フラグメントを、次いで、制限酵素 NcoI 及び EagI で消化し、これもまた NcoI 及び EagI で消化された pCLS0542 ベクターにライゲーションした。次いで、クローンを配列決定した。M2 変異体の切り詰めバージョンはそれぞれ: M2 (6-163)、M2 (1-160)、M2 (1-156)、M2 (1-152) 及び M2 (1-145) (番号は M2 変異体コード配列に含まれる I-CreI 残基を示す)である。

【 0 1 2 6 】

b) 両方のサブユニットについて異なる終点を有する RAG1 単鎖分子のクローニング

異なる PCR 反応を、I-CreI CLS バージョンの M3 変異体に対して行った。それぞれの PCR 反応は、1 つのフォワードプライマーと、1 つのリバースプライマーとを用いる。2 つの可能なフォワードプライマー(RM2 及び RM2N2)と、5 つの可能なリバースプライマー(CreCterR60、Cre160R60、Cre156R60、Cre152R60 及び Cre145R60)とがある。フォワードプライマーは、残基 N6 又は N2 で開始する M3 コード配列を得ることを可能にし、リバースプライマーは、それぞれ残基 P163、K160、S156、L152 及び S145 で終結する M3 コード配列を得ることを可能にする。異なる PCR フラグメントを精製し、EagI 及び SacI により消化し、それぞれの PCR フラグメントを、これもまた EagI 及び SacI で消化した上記の M2 変異体の 1 つについての酵母発現ベクターにライゲーションした。クローンを配列決定した後に、酵母発現ベクター中の全ての可能な単鎖分子を得た。

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

【表 2】

表 II: プライマー配列

プライマー名	配列 (配列番号 79~92)
CreNter	5'- acagggccatggccaataacaaataacaaag -3'
CreNter6	5'- acagggccatggccaacaaagagttcctgctgtacctg-3'
CreCter	5'- gattgacggccgcccggggaggatttcttctt-3'
CreCter160	5'- gattgacggccgcttcttcttctcgtcaggctgtc -3'
CreCter156	5'- gattgacggccgctcaggctgtccaggacagcacg -3'
CreCter152	5'- gattgacggccgagacagcacgaacggttcaga -3'
CreCter145	5'- gattgacggccgcagaagtgttttacgcgtcttaga -3'
RM2	5'- tatcgccgggtggatctgataagtataatcaggctctgtctaaatacaaccaagcactgtccaa gtacaatcaggccctgtctggtggaggcgggtccaacaaagagttcctgctgtatctgtctggattt -3'
RM2N2	5'- tatcgccgggtggatctgataagtataatcaggctctgtctaaatacaaccaagcactgtccaagtaca atcaggccctgtctggtggaggcgggtccaacaccaagtacaacaaagagttcctgctgtat -3'
CreCterR60	5'- tagacgagctcctaaggagaggacttttcttctcag -3'
Cre160R60	5'- tagacgagctcctacttttcttctcagagaggtcatc -3'
Cre156R60	5'- tagacgagctcctaagagaggtcatccagaactgcct -3'
Cre152R60	5'- tagacgagctcctacagaactgcctcacagctcaga -3'
Cre145R60	5'- tagacgagctcctaagaggtgttttctggtcttggga -3'

10

20

## 【0128】

## 2) 結果

RAG1 M2-RM2-M3単鎖分子から始まって、N末端M2変異体がそのC末端にて切り詰められた4つの新しい単鎖分子を構築した。これらのタンパク質は、SCtr1、SCtr2、SCtr3及びSCtr4と呼ばれ、M2変異体配列がそれぞれ残基145、152、156及び160で終結する単鎖分子に相当する。これらの4つの分子、及び元のM2-RM2-M3単鎖を、3つのRAG1.10、RAG1.10.2及びRAG1.10.3標的に対する切断について、我々の酵母スクリーニングアッセイを用いて試験した。図23は、SCtr1が3つの標的に対して不活性であり、3つのその他の切り詰め

30

## 【0129】

## 実施例 8：ヒト細胞での内因性Rag1遺伝子座での遺伝子ターゲティング

工学的単鎖Rag1メガヌクレアーゼの切断活性をさらに検証するために、内因性ヒトRAG1遺伝子座にて相同組換えを刺激するそれらの能力について評価した(図24)。細胞に、2つの単鎖分子M3-RM2-M2<sub>G19S</sub>(配列番号95)及びM3<sup>-</sup>-RM2-M2<sup>+</sup><sub>G19S</sub>(配列番号97)のうちの1つについての哺乳動物発現プラスミドと、ヒトRAG1遺伝子座に相同な2 kb及び1.2 kbの長さの2つの配列で挟まれた1.7 kbの外因性DNA配列を含むドナー修復プラスミドpCLS1969 (図25)とを形質移入した。メガヌクレアーゼによる天然RAG1遺伝子の切断は、相同組換えをののための基質を生じ、これが、相同腕で挟まれた1.7 kbの外因性DNAを含むドナー修復プラスミドを修復マトリクスとして用い得る。よって、RAG1遺伝子座にて標的にされた組み込みが生じる頻度は、ゲノムRAG1.10標的部位の切断効率を示す。

40

## 【0130】

## 1) 材料及び方法

## a) メガヌクレアーゼ発現プラスミド

この実施例で用いたRag1メガヌクレアーゼは、哺乳動物発現ベクターpCLS1088 (図6)にクローニングされたM3-RM2-M2<sub>G19S</sub>(配列番号95)及びM3<sup>-</sup>-RM2-M2<sup>+</sup><sub>G19S</sub>(配列番号97)である。

50

## 【 0 1 3 1 】

## b) ドナー修復プラスミド

遺伝子ターゲティング実験のためのドナープラスミドは、RAG1遺伝子座のPCRにより作製された2075 bpのフラグメント(第11染色体上の36549341位～36551416位、NC\_000011.8)を左の相同腕として、かつRAG1遺伝子座の1174 bpフラグメント(第11染色体上の36551436位～36552610位、NC\_000011.8)を右の相同腕として含む。SV40プロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子及びIRES配列を含む外因性1.8 kb DNAフラグメントを、2つの相同腕の間に、RAG1遺伝子座のPCR増幅中に導入されたEcoRI及びBamHI部位を用いて挿入した。得られたプラスミドはpCLS1969 (図25)である。

## 【 0 1 3 2 】

## c) Rag1遺伝子ターゲティング実験

ヒト胚性腎臓293H細胞(Invitrogen)を、10 cmディッシュあたり  $1 \times 10^6$  細胞の密度で、完全培地(2 mM L-グルタミン、ペニシリン(100 UI/ml)、ストレプトマイシン(100  $\mu$ g/ml)、アンホテリシン B (フオンギゾン) (0.25  $\mu$ g/ml) (Invitrogen-Life Science) 及び10% FBSを補ったDMEM)中に播種した。次の日に、細胞にLipofectamine 2000形質移入試薬(Invitrogen)を供給業者のプロトコルに従って用いて形質移入した。簡単に、2  $\mu$ gのドナープラスミドを、3  $\mu$ gの単鎖メガヌクレアーゼ発現ベクターとともに同時形質移入した。37℃にて72時間のインキュベーションの後に、細胞をトリプシン処理し、96ウェルプレート中のウェルあたり10細胞又は10 cmプレートあたり200細胞にて完全培地中に播種した。個別のクローンをその後、10cmプレートからClonePixロボット(Genetix)を用いて採取した。ゲノムDNA抽出を、ZR-96ゲノムDNAキット(Zymo research)を供給業者のプロトコルに従って用いて行った。

## 【 0 1 3 3 】

## d) 遺伝子ターゲティング事象のPCR分析

遺伝子ターゲティングの頻度を、PCRにより、ゲノムDNAに対して、2588bpの遺伝子ターゲティング特異的PCR生成物(図26)をもたらすプライマーF2-neo:5'-AGGATCTCCTGTCTCATCTCAC-3' (配列番号98)及びRagEx2-R12:5'-CTTTCACAGTCCTGTACATCTTGT-3' (配列番号99)を用いて決定した。F2プライマーは、ネオマイシンコード配列中にあるフォワードプライマーである。R12プライマーは、ドナー修復プラスミドの右の相同腕の外側のヒトRAG1遺伝子内にあるリバースプライマーである。

## 【 0 1 3 4 】

## e) サザンブロット分析

サザンブロット分析は、HindIIIで消化したゲノムDNAを用いて行い、ドナー修復プラスミドの右の相同腕の3'である830 bp RAG1特異的プローブとハイブリッド形成させた。

## 【 0 1 3 5 】

## 2) 結果

ヒト胚性腎臓293H細胞に、2つのベクター: 2つの単鎖Rag1メガヌクレアーゼのうちの1つを発現するプラスミドとドナー修復プラスミドpCLS1969 (図25)とを同時形質移入した。自発的組換えについての対照として、293H細胞に、ドナー修復プラスミドのみを形質移入した。次いで、細胞を96ウェルマイクロプレートのウェルあたり10細胞にて播種するか、又は10 cmディッシュに播種し、個別のクローンを、その後、採取した。これらの細胞に由来するゲノムDNAを、遺伝子ターゲティングについてPCRにより、材料及び方法に記載されたようにして分析した。結果を表IIIに示す。メガヌクレアーゼの非存在下(修復プラスミドのみ)では、10細胞のプールで分析した2,560個の細胞、又は調べた94個の個別のクローンのうちで、PCR陽性シグナルは検出されなかった。対照的に、M3-RM2-M2<sub>G19S</sub>メガヌクレアーゼの存在下では、10細胞のプールで分析した2,560個の細胞のうち11個の陽性が検出され、このことは、0.4%の組換え頻度を示す。調べた94個の個別のクローンのうち、陽性はなかった。M3<sup>-</sup>-RM2-M2<sup>+</sup><sub>G19S</sub>の存在下では、34個の陽性クローン(1.4%)が、分析した2560個の細胞(10のプールにおいて)のうちで検出され、分析した94個の個別のクローンのうち、4個が陽性であった(4.3%)。これらの4個の個別のクローンのサザンブロット

分析により、3つが、Rag1遺伝子座での遺伝子ターゲティング事象と矛盾しないことが示される(図27)。これらの結果は、2つの単鎖分子M3-RM2-M2<sub>G19S</sub>及びM3<sup>-</sup>-RM2-M2<sup>+</sup><sub>G19S</sub>が、内因性Rag1遺伝子座にて高レベルの遺伝子ターゲティングを誘導できることを示す。

【0136】

【表3】

**表 III: ヒト 293H 細胞における Rag1 遺伝子座での遺伝子ターゲティング事象の頻度**

メガヌクレアーゼ	ウェルあたりの細胞	PCR+ 事象	遺伝子ターゲティング頻度
M3-RM2-M2 <sub>G19S</sub>	10	11/2510	0.4 %
M3-RM2-M2 <sub>G19S</sub>	1	0/94	NA
M3 <sup>-</sup> -RM2-M2 <sup>+</sup> <sub>G19S</sub>	10	34/2430	1.4 %
M3 <sup>-</sup> -RM2-M2 <sup>+</sup> <sub>G19S</sub>	1	4/94	4.3 %
なし	10	0/2560	NA
なし	1	0/94	NA

NA: 当てはまらず

【0137】

実施例 9 : I-CreI 由来単鎖メガヌクレアーゼは安定である

1) 材料及び方法

a) タンパク質の発現及び精製

ヘテロ二量体I-CreI誘導体を同時発現させるために、それぞれの単量体ORFを、6 × His タグ又はStrepタグをC末端に有するCDFDuet-1ベクター (NOVAGEN) にクローニングし、二重タグ付加されたヘテロ二量体の精製を、以前に記載されたようにして行った(P. Redondoら, Nature, 2008, 456, 107 ~ 1)。C末端にHis<sub>6</sub>タグを有する単鎖M3-RM2-M2<sub>G19S</sub>タンパク質配列(実施例4)を、pET24d(+)ベクターにクローニングし、カナマイシン及びクロラムフェニコールを加えたLB中で成長した大腸菌Rosetta(DE3)pLysS細胞 (NOVAGEN) で発現させた。IPTGを用いて37 °Cにて5時間、又は20 °Cにて15時間の誘導により高発現レベルが得られたが、50 mMリン酸ナトリウムpH 8.0、300 mM NaCl、5%グリセロール及びプロテアーゼ阻害剤(Complete EDTA-フリータブレット、ROCHE)を含有する溶解バッファー中での超音波破碎及び20,000 gにて1時間の超遠心分離の後に、タンパク質は、抗His抗体を用いるウェスタンブロットにより検出されるように、不溶性画分中에서도見出された。よって、タンパク質を、まず、8 M尿素を加えた溶解バッファー中で可溶化することによる変性条件下で精製した。超遠心分離(40,000 gにて2時間)による清澄化の後に、試料を、同じバッファーで平衡化したQ-Sepharose XL樹脂(GE Healthcare)が充填されたカラムにアプライした。この精製ステップは、全ての核酸(カラム内に保持される)を、タンパク質から分離し、その後の精製ステップの性能を改善した。タンパク質は、8 M尿素を加えた溶解バッファーで平衡化した、Co<sup>2+</sup>を載せたHiTrap Chelating HP 5 mlカラム(GE Healthcare)によるフロースルーから回収される。試料を載せ、カラムを洗浄した後に、タンパク質は、0.5Mイミダゾールを加えた同じバッファーを用いて溶出される。タンパク質に富む画分(SDS-PAGEにより決定)を回収し、20 mMリン酸ナトリウムpH 6.0、300 mM NaCl中へ4 °Cにて20倍希釈(1滴ずつ)することにより(0.13 mg/mlの最終タンパク質濃度)リフォールディングした。リフォールディングされたタンパク質を、同じバッファーで平衡化した5 ml HiTrapヘパリンカラムに載せ、1 M NaClへの勾配を用いて溶出した。純粋タンパク質を含む画分をプールし、1.4 mg/ml (35.6 nM、280 nmでの吸光度により決定)まで濃縮し

、直ちに用いたか、又は液体窒素中で急速凍結させて-80℃にて貯蔵した。

#### 【0138】

##### b) タンパク質の生化学的及び生物物理学的特徴決定

円偏光2色性(CD)測定は、Jasco J-810分光偏光計にて、0.2 cm経路長の石英キュベット及びリン酸生理食塩水中の10-4 μMタンパク質溶液を用いて行った。平衡アンフォールディングを、1℃/分の割合で増加する温度により誘導した(プログラム設定可能なPeltier熱電器を用いて)。分析ゲルろ過クロマトグラフィーを、室温にて、AKTA FPLCシステム(GE)で、Superdex 200 10/300GLカラムを20 mMリン酸ナトリウムバッファーpH 6.0、1 M NaCl中で用いて行った。0.3 mg/mlの濃度の100 μLのSC-v3v2G19S構築物の試料を注入し、流速0.2 ml/分で溶出した。カラムをブルーデキストラン(排除体積)及び17~670 kDaの分子量マーカー(BioRad)を用いて校正した。

#### 【0139】

##### 2) 結果

タンパク質は、精製ポリペプチド鎖において最初のメチオニンが存在しないことを示す質量分析により、それであることを確認した。精製タンパク質は、野生型と類似の構造に折り畳まれていることが、円偏光2色性及びNMRにより見出され、溶液中で二量体であることが分析超遠心分離及びゲルろ過により見出された。単鎖分子の構造及び安定性は、ヘテロ二量体変異型のものと非常によく似ており、この分子は溶液中で単量体であるようである(図28)。

#### 【0140】

実施例10：I-Crel由来単鎖メガヌクレアーゼは毒性でない

##### 1) 材料及び方法

##### a) 細胞生存アッセイ

CHO-K1株化細胞を、10cmディッシュあたり $2 \times 10^5$ 細胞の密度にて播種した。次の日に、種々の量のメガヌクレアーゼ発現ベクターと、一定量のGFPをコードするプラスミドとを、CHO-K1細胞に、10 cmプレート中で同時形質移入した。GFP発現を、形質移入後第1日及び第6日に、フローサイトメトリー(Guava EasyCyte, Guava technologies)によりモニターした。第1日に測定した形質移入効率により補正した細胞生存を、[(第6日にGFPを発現するメガヌクレアーゼ形質移入細胞)/(第1日にGFPを発現するメガヌクレアーゼ形質移入細胞)]/[[(第6日にGFPを発現する対照形質移入細胞)/(第1日にGFPを発現する対照形質移入細胞)]の比として計算した。

#### 【0141】

##### b) H2AX免疫細胞化学

H2AX免疫細胞化学のために、CHO-K1細胞に、Polyfect試薬(Qiagen)により、HAタグ付加メガヌクレアーゼをコードする種々の量のプラスミドと、4 μgまでを満たすための空のベクターとを含有する4 μgのDNA混合物を形質移入した。形質移入の48時間後に、2%パラホルムアルデヒドを30分間用いて細胞を固定し、0.5% TritonをRTにて5分用いて透過にした。洗浄の後に、細胞を、10%正常ヤギ血清(NGS)及び3% BSAを含有するPBS/triton 0.3%バッファーと1時間インキュベートして、非特異的染色をブロックした。次いで、細胞を、RTにて1時間、3% BSA及び10% NGS含有PBS/triton 0.3%で希釈した抗H2AX (Upstate: 1/10000)及び抗HA (Santa Cruz:1/100)抗体とインキュベートし、その後、PBS/triton 0.3%、3% BSA及び10% NGSで希釈した2次抗体Alexa Fluor 488ヤギ抗マウス(Invitrogen-Molecular probes: 1/1000)及びAlexa Fluor 546ヤギ抗ウサギと1時間インキュベートした。1 μg/mlの4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI; Sigma)とインキュベートした後に、カバーガラスを載せ、H2AX増殖巣を、形質移入された(HA陽性)細胞中で蛍光顕微鏡により視覚化した。

#### 【0142】

##### 2) 結果

毒性は、特に治療用途でのDSB誘導組換え技術についての大きな問題であり、このために活性/毒性比が主な関心事である。RAG1メガヌクレアーゼ(実施例4及び5)の毒性を、

10

20

30

40

50

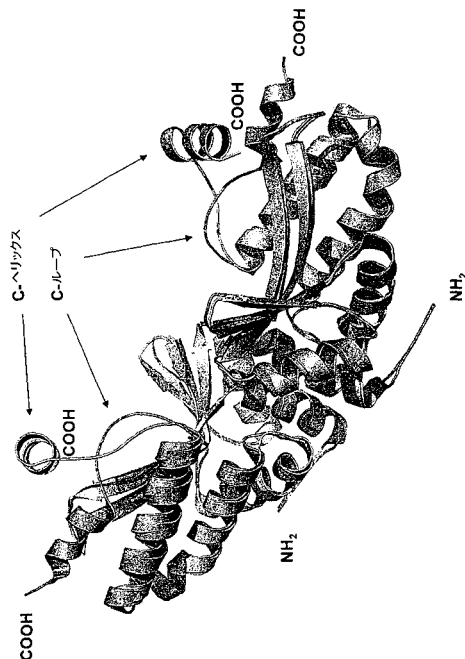
以前に記載されたようにして(M.L. Maederら, Mol. Cell., 2003, 31, 2952~)、細胞生存アッセイにおいて評価した。活性用量応答アッセイのために用いたCHO-K1細胞を用いる使用についてこのアッセイを適合させることにより、効率と毒性とのつながりを調べた。活性用量(メガヌクレアーゼがそれらの最大レベルの活性を示す用量、図29A)にて、用いたメガヌクレアーゼにかかわらず毒性がかるうじて検出された(図29B)。しかし、M2/M3ヘテロ二量体は、高い用量では著しい毒性を示し、これは、偏性ヘテロ二量体設計により部分的に緩和された。単鎖設計は、最良のバージョンがI-SceIを用いて得られるパターンを再現したので、改善も示した。配列特異的エンドヌクレアーゼの毒性は、通常、オフサイト切断に帰するものであり、これは、変異、欠失、転位、及びその他の全体的なゲノム変更をもたらし得る(M.H. Porteus, D. Carroll, Nat. Biotechnol., 2005, 23, 967~)。オフサイト切断は、リン酸化H2AXヒストン(γ-H2AX)増殖巣の形成をモニターすることにより評価した。γ-H2AX増殖巣形成は、DNA 2本鎖破断(DSB)に対する細胞の最初の応答の1つであり、生細胞におけるDSBのモニターの簡便な手段を提供する(E.P. Rogakouら, J. Biol. Chem., 1998, 273, 5858)。CHO-K1細胞に、2つの用量のメガヌクレアーゼ発現ベクター(活性用量及び10倍過剰)を形質移入した。M2(G19S)/M3(G19S)ヘテロ二量体を非毒性についての対照として用いた。なぜなら、この分子は、アッセイにおいて完全に不活性であったからである。活性用量において、用いたメガヌクレアーゼ変異型にかかわらず、バックグランドを超えるシグナルは観察されず、これは発表された結果と矛盾しなかった(P. Redondoら, Nature, 2008, 456, 107~)。以前のデータに従って、M2(G19S)/M3ヘテロ二量体は、活性用量の10倍で用いたときに、図29Cに示すように、著しいレベルの増殖

10

20

巣の形成を誘導したが、偏性ヘテロ二量体又は単鎖設計のいずれかを用いることにより、オフサイト切断が最小化された。つまり、単鎖分子M3-RM2-M2<sup>+</sup><sub>G19S</sub>を用いて得られたシグナルは、I-SceIメガヌクレアーゼを用いて得られたものとよく似ていた。

【図1】



【図23】

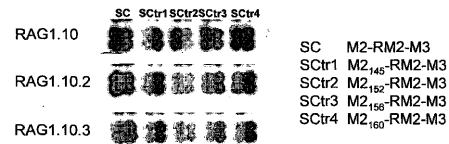
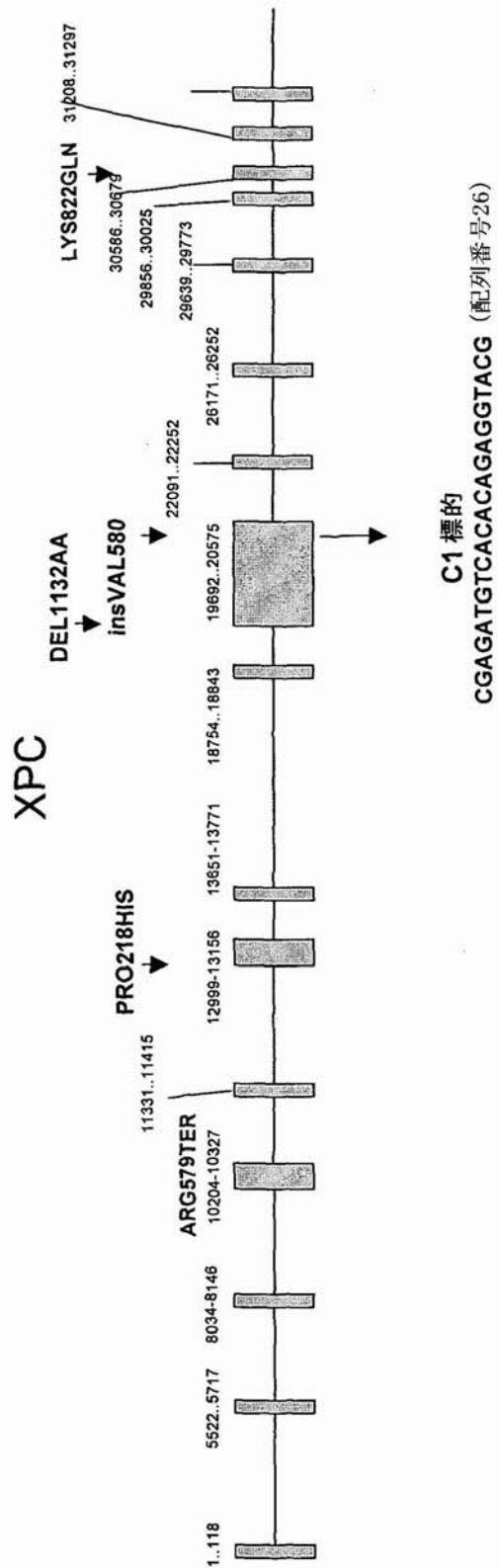


FIGURE 23

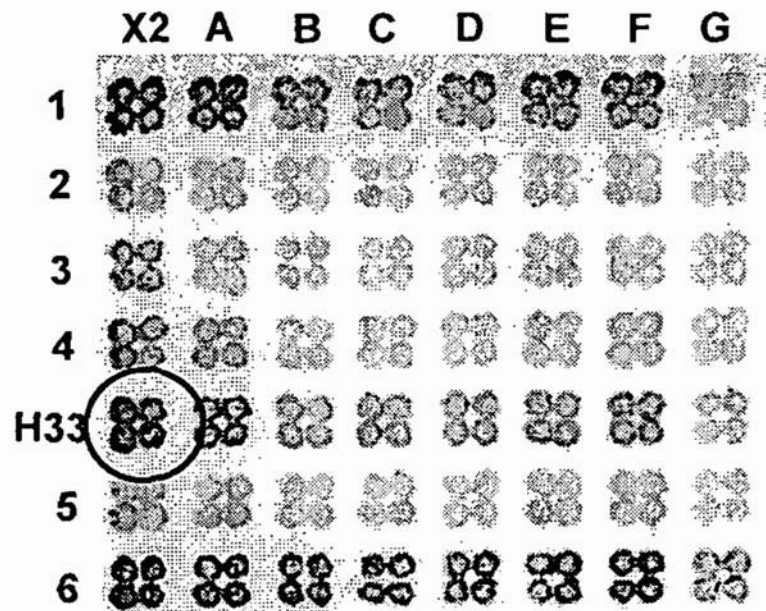
【 図 2 】



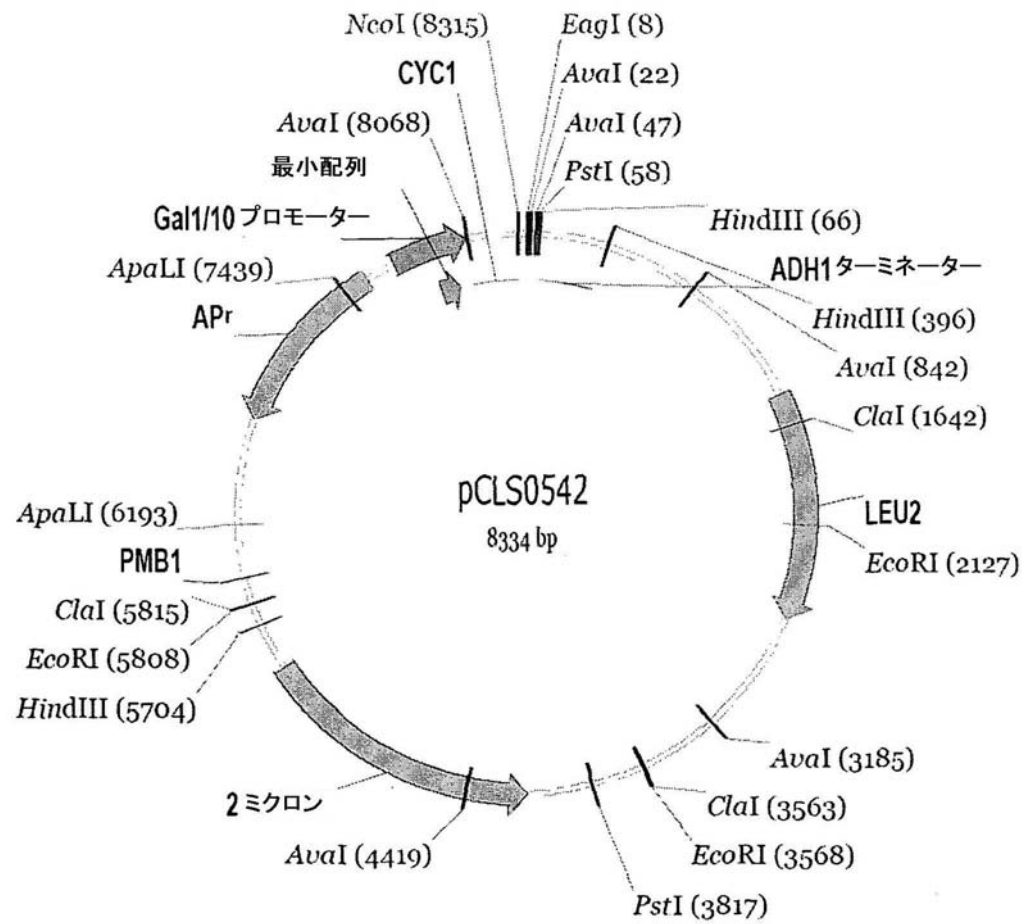


		-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
<b>C1221</b>	(配列番号21)	<b>CAAAACGTCGTACGACGTTTGTG</b>																							
<b>10GAG_P</b>	(配列番号27)	<b>CGAGACGTCGTACGACGTCCTCG</b>																							
<b>10GTA_P</b>	(配列番号28)	<b>CGTAACGTCGTACGACGTTTACG</b>																							
<b>5TCT_P</b>	(配列番号29)	<b>CAAAACTCTGTACAGAGTTTGTG</b>																							
<b>C1</b>	(配列番号26)	<b>CGAGATGTCACACAGAGGTACG</b>																							
<b>C3</b>	(配列番号30)	<b>CGAGATGTCGTACGACATCTCG</b>																							
<b>C4</b>	(配列番号31)	<b>CGTACCTCTGTACAGAGGTACG</b>																							

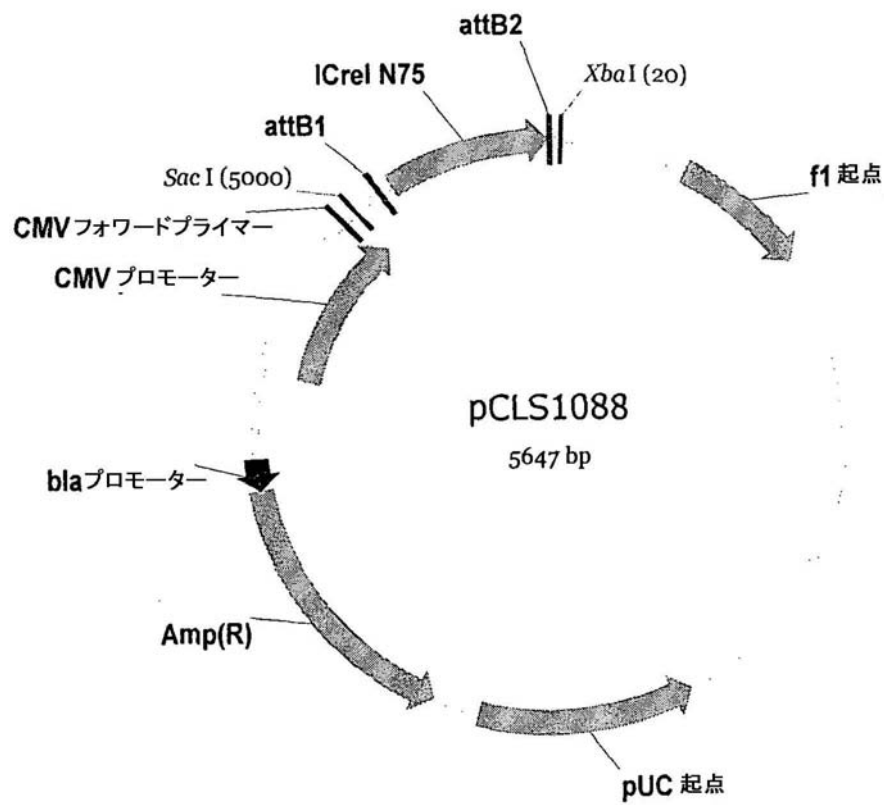
## C4 カッター



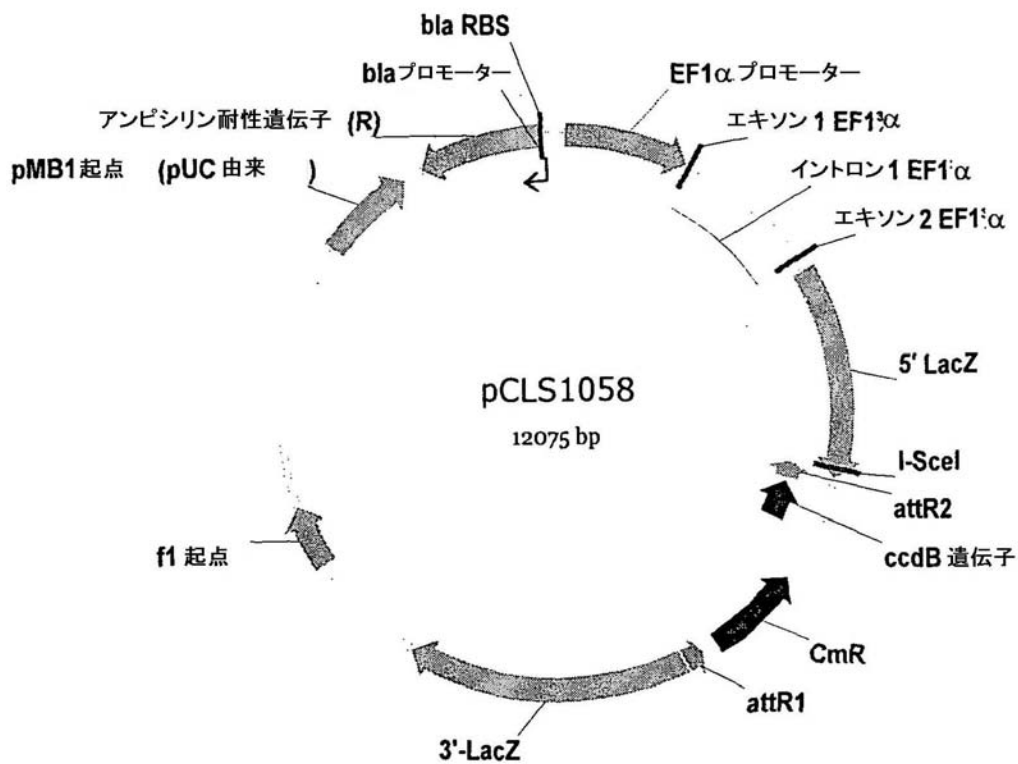
【 図 5 】



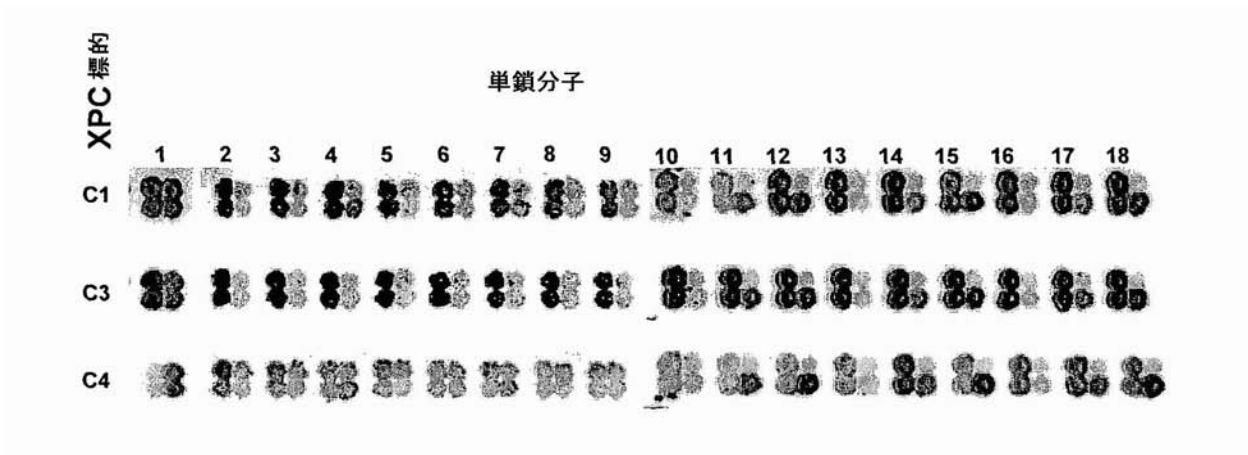
【 図 6 】



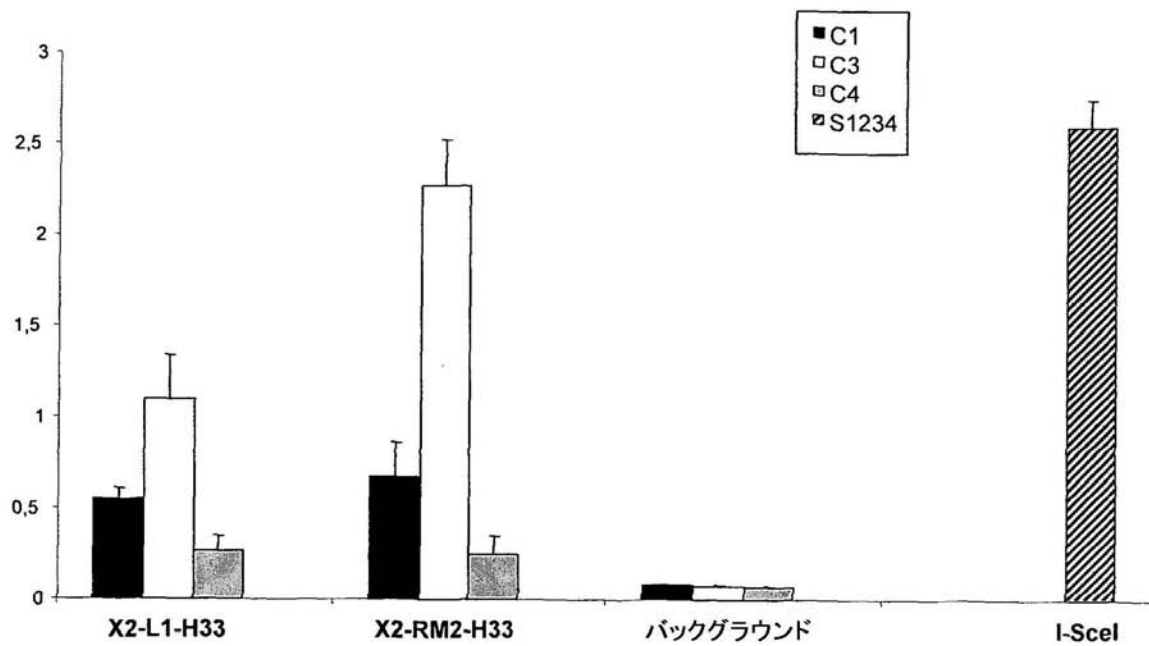
【 図 7 】



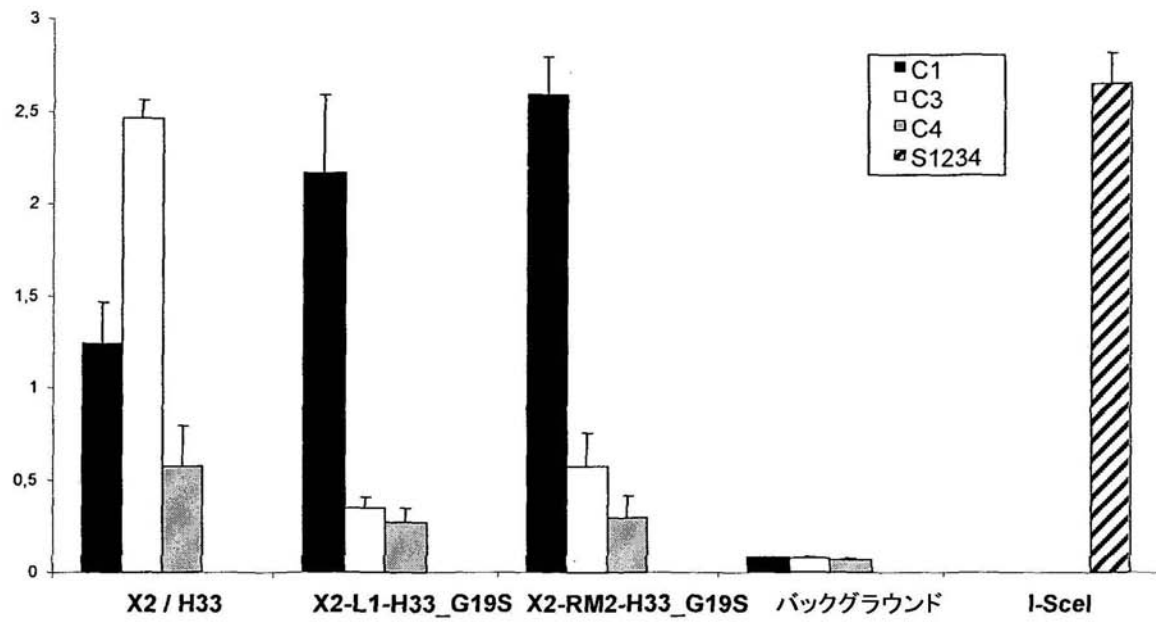
【 図 8 】



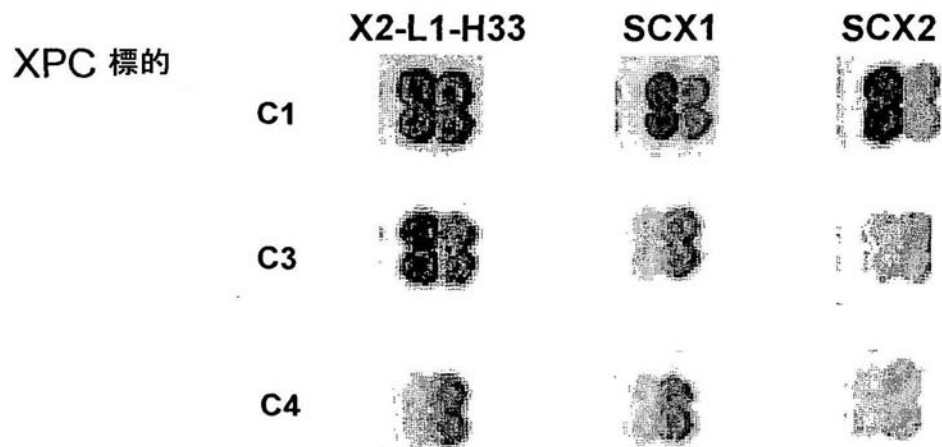
【 図 9 】



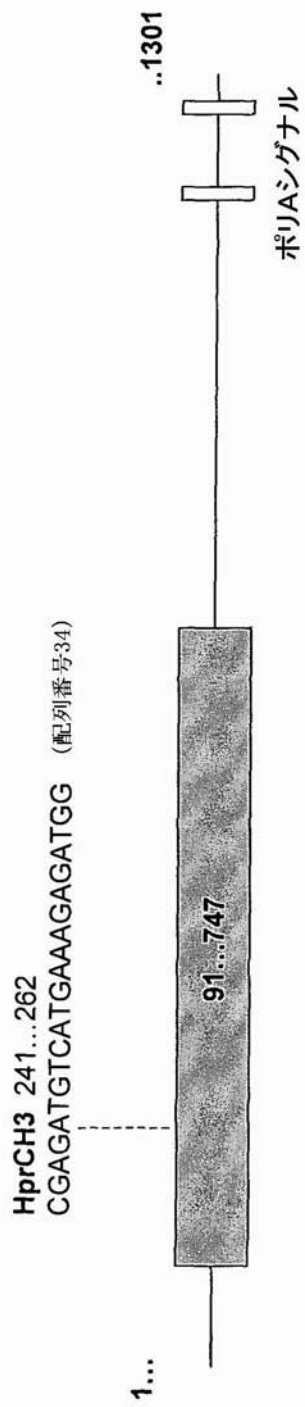
【図 10】



【図 11】



【図 12】



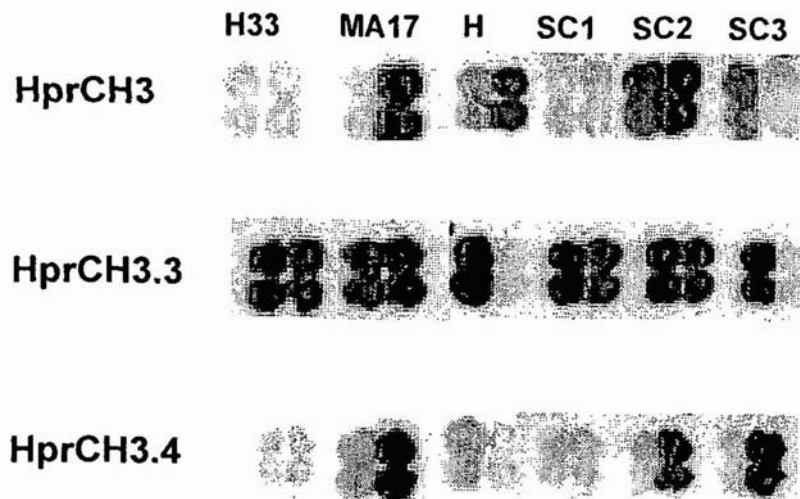
【図 1 3】

		-11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
C1221	(配列番号21)	CAAAACGTCGTACGACGTTTGT
10GAG_P	(配列番号27)	CGAGACGTCGTACGACGTCTCG
10CAT_P	(配列番号32)	CCATACGTCGTACGACGTATGG
5CTT_P	(配列番号33)	CAAAACCTTGTACAAGGTTTGT
HprCH3	(配列番号34)	CGAGATGTCATGAAGAGATGG
HprCH3.3	(配列番号35)	CGAGATGTCGTACGACATCTCG
HprCH3.4	(配列番号36)	CCATCTCTTGTACAAGAGATGG

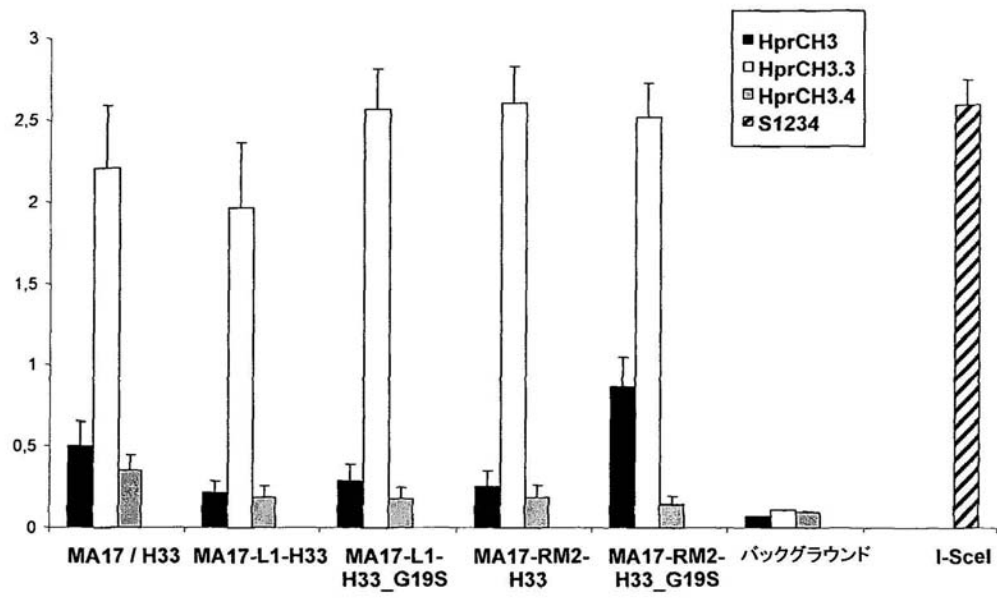
【図 1 4】

### HPRT ヘテロ二量体及び 単鎖分子

HPRT 標的

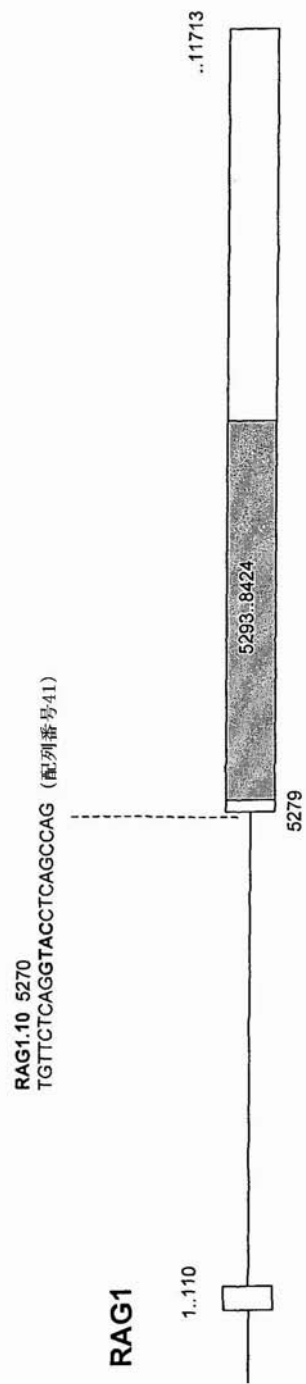


【 図 1 5 】





【図 16】



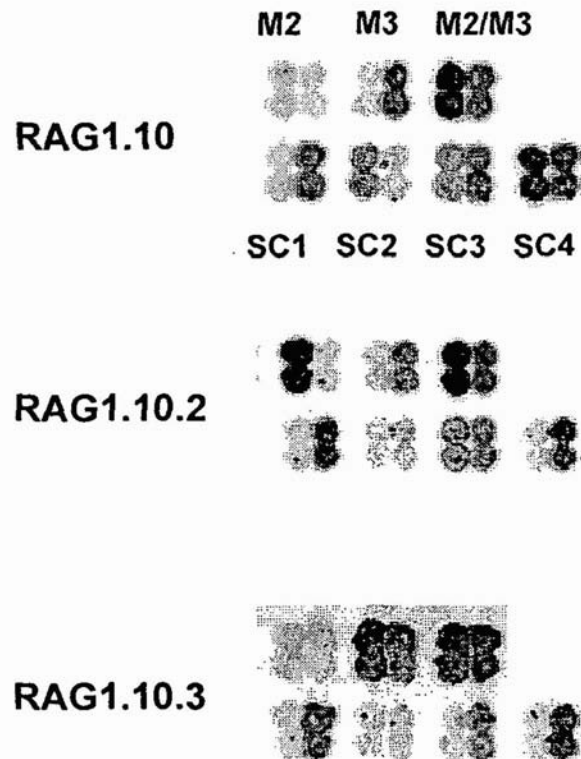
【図 17】

**C1221**  
 (配列番号21)  
**10GTT\_P**  
 (配列番号37)  
**5CAG\_P**  
 (配列番号38)  
**10TGG\_P**  
 (配列番号39)  
**5GAG\_P**  
 (配列番号40)  
**RAG1.10**  
 (配列番号41)  
**RAG1.10.2**  
 (配列番号42)  
**RAG1.10.3**  
 (配列番号43)

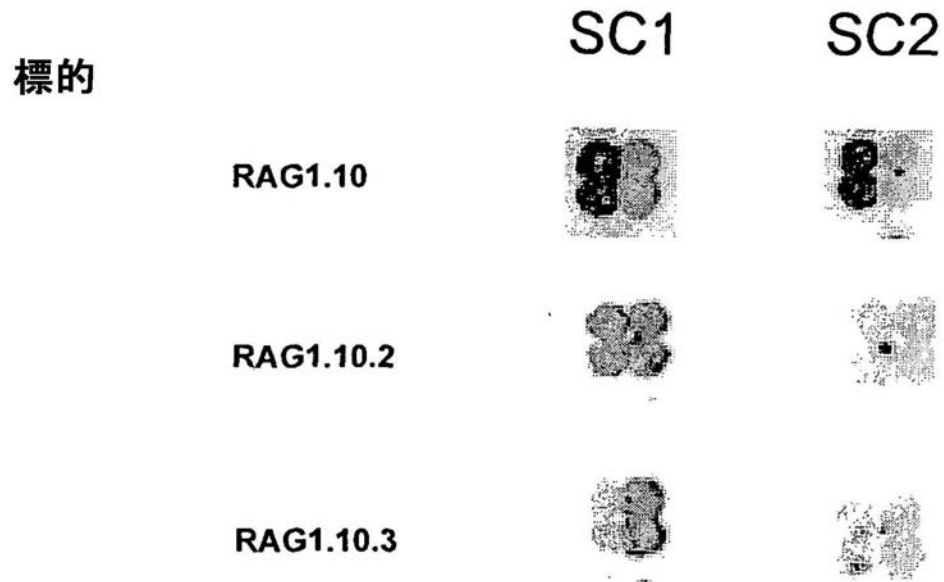
-11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11  
**CAAAACGTCGTACGACGTTTGTG**  
**CGTTACGTCGTACGACGTAACG**  
**CAAAACAGGTACCTGGTTTGTG**  
**CTGGACGTCGTACGACGTCCAG**  
**CAAAACGAGGTACCTCGTTTGTG**  
**TGTTCTCAGGTACCTCAGCCAG**  
**TGTTCTCAGGTACCTGAGAACA**  
**CTGGCTGAGGTACCTCAGCCAG**

【図 18】

RAG1 標的



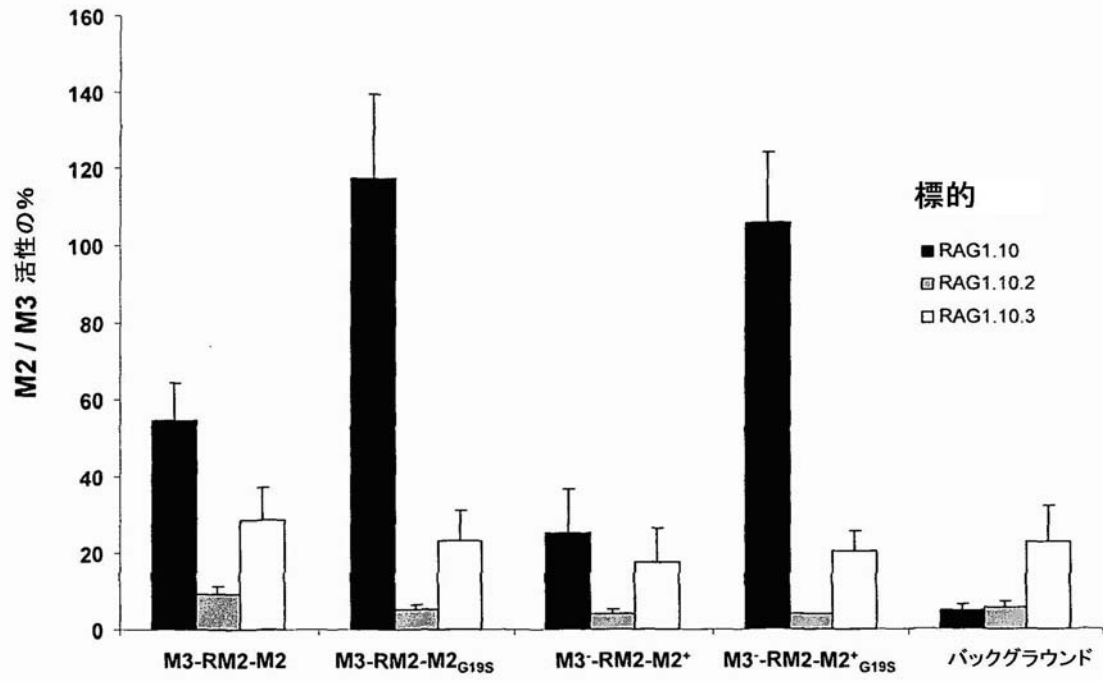
【図 19】



【図 20】

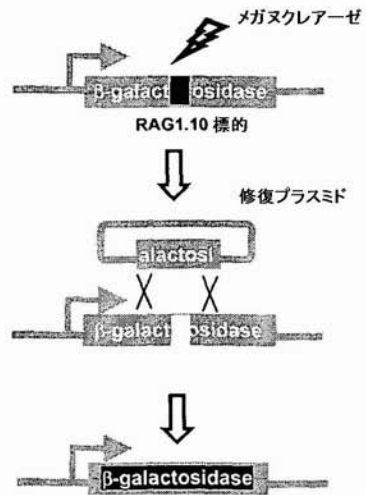


【図 2 1】

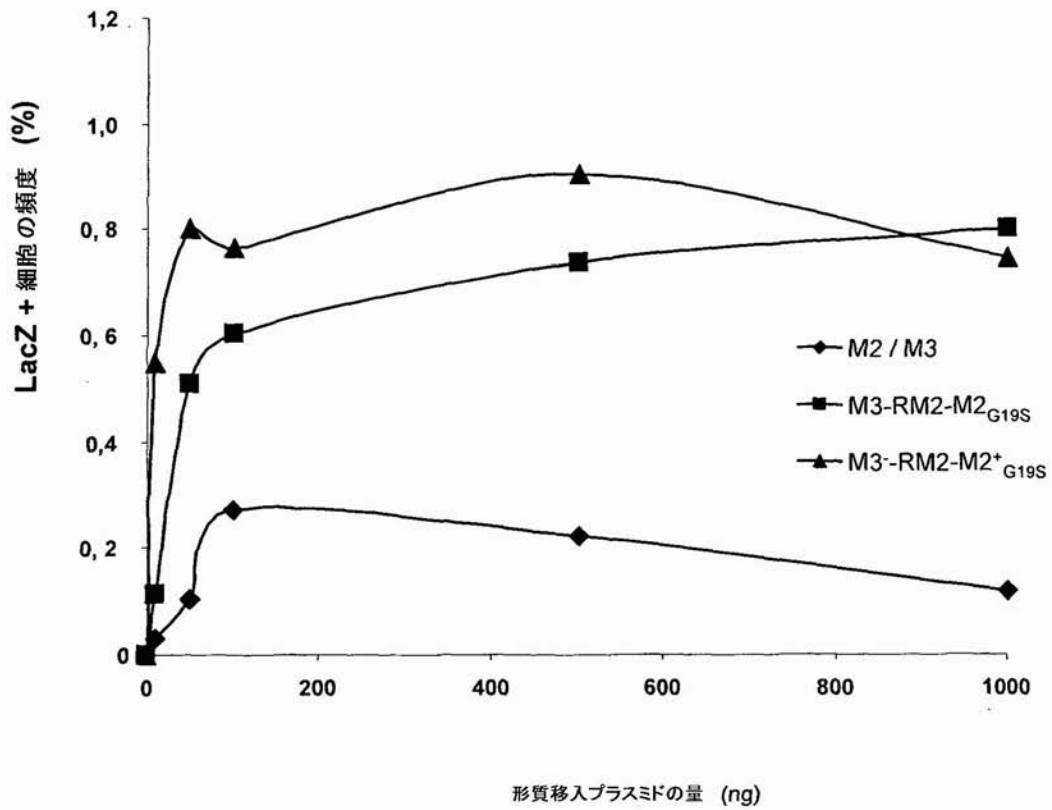


【図 2 2】

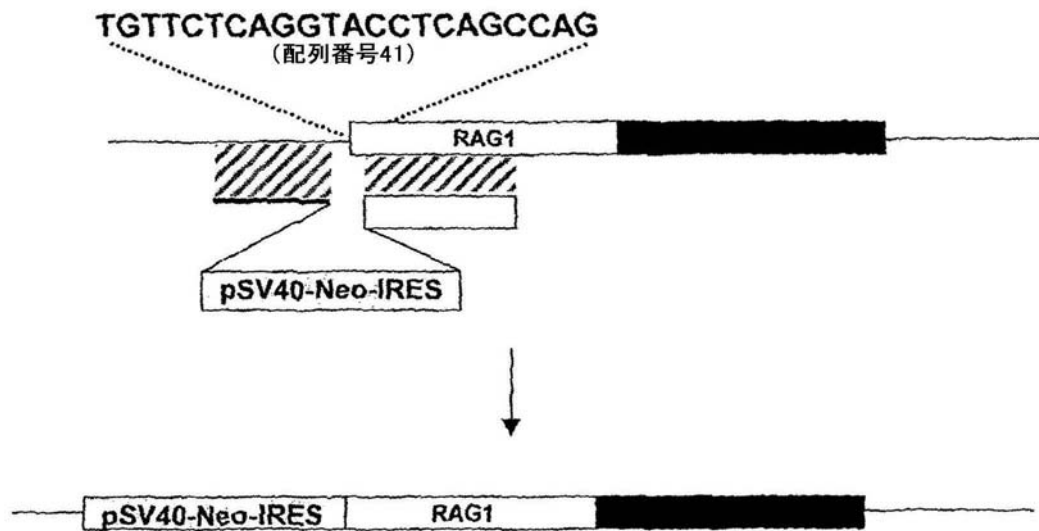
A



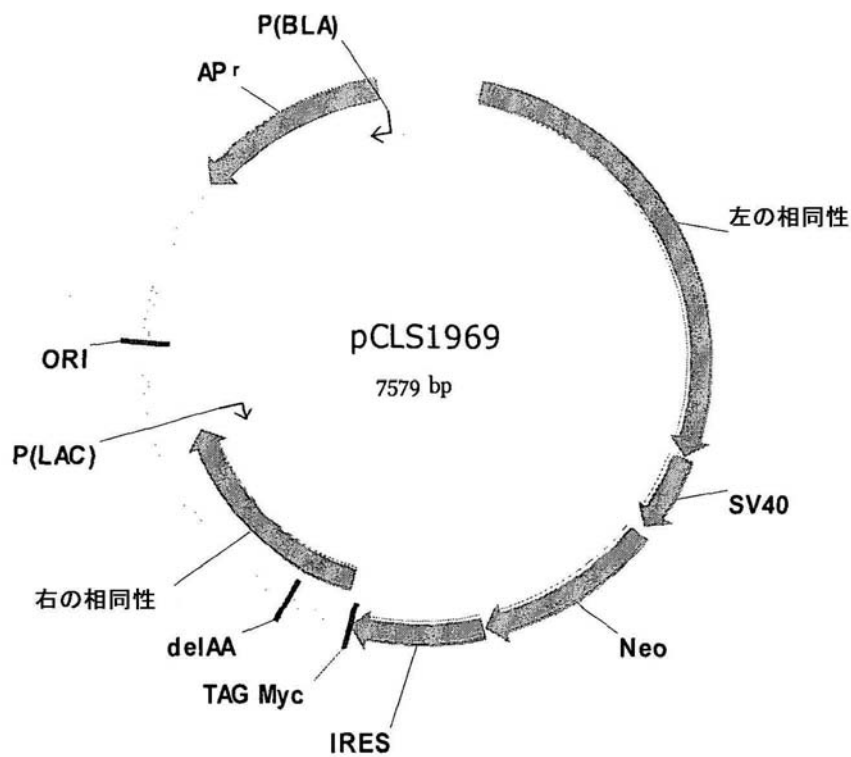
B



【図 2 4】

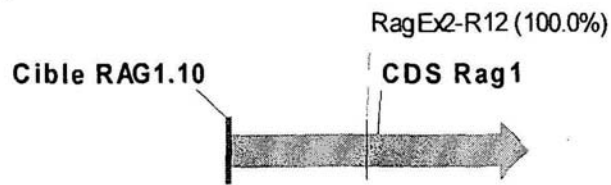


【図 2 5】

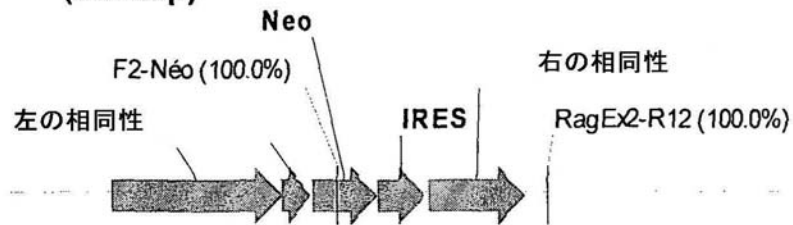


【 図 2 6 】

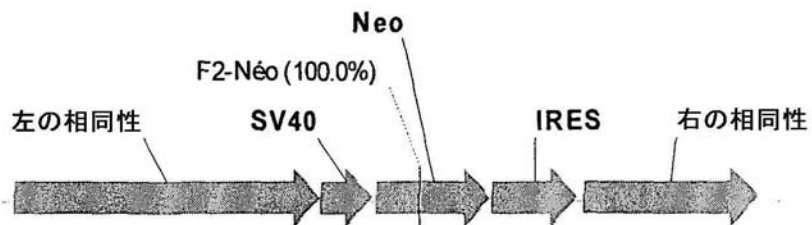
野生型 **Rag1** 遺伝子座  
PCR 陰性



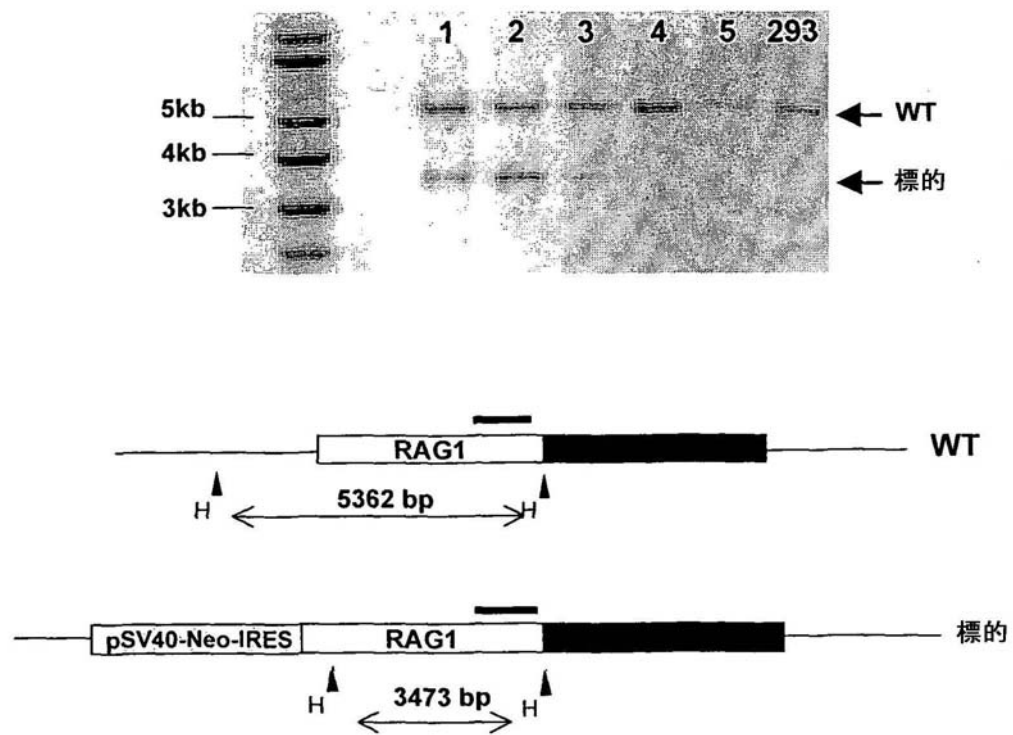
標的 **Rag1** 遺伝子座  
PCR 増幅 (2588bp)



修復プラスミドのランダム挿入  
PCR 陰性

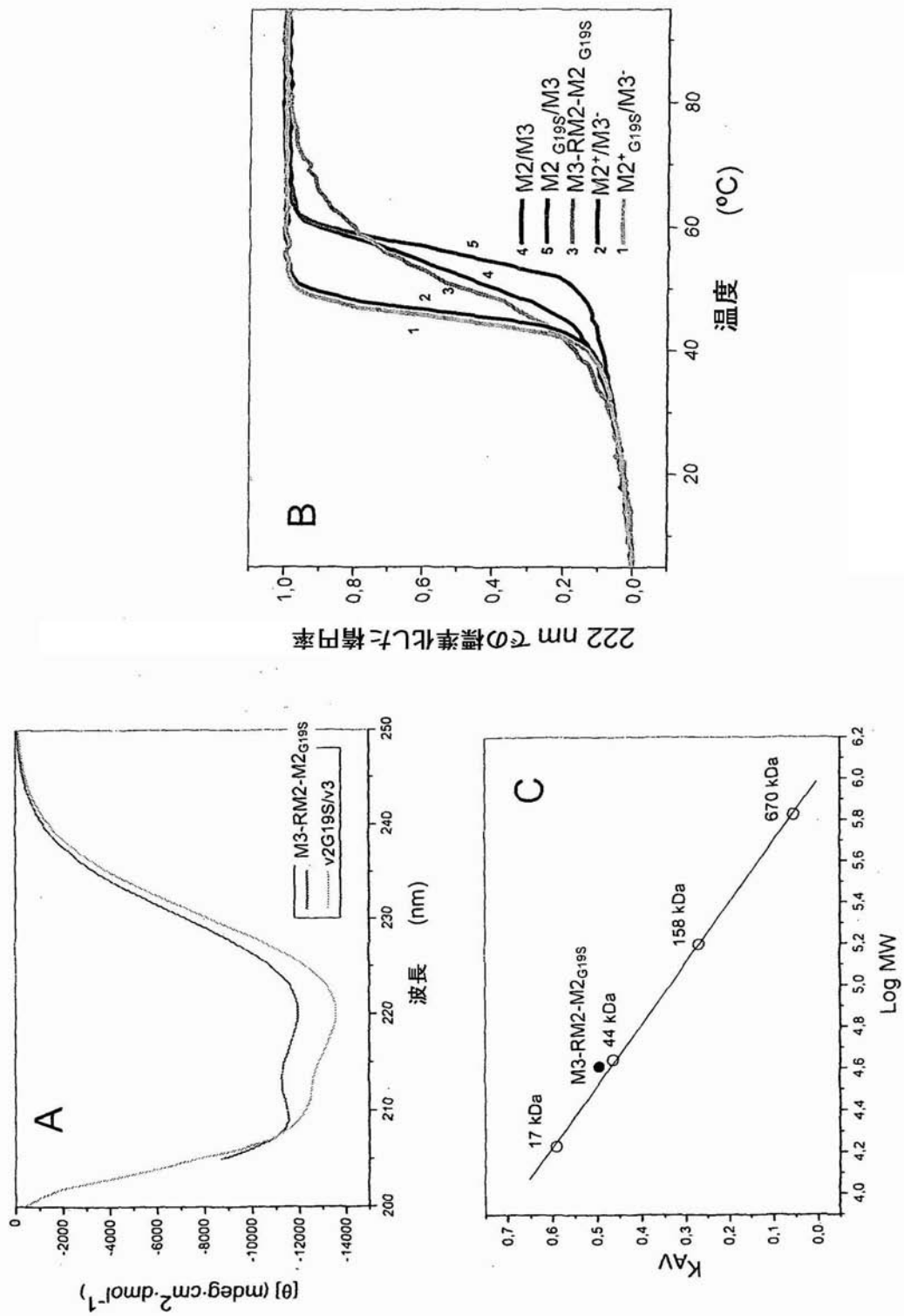


【 図 2 7 】

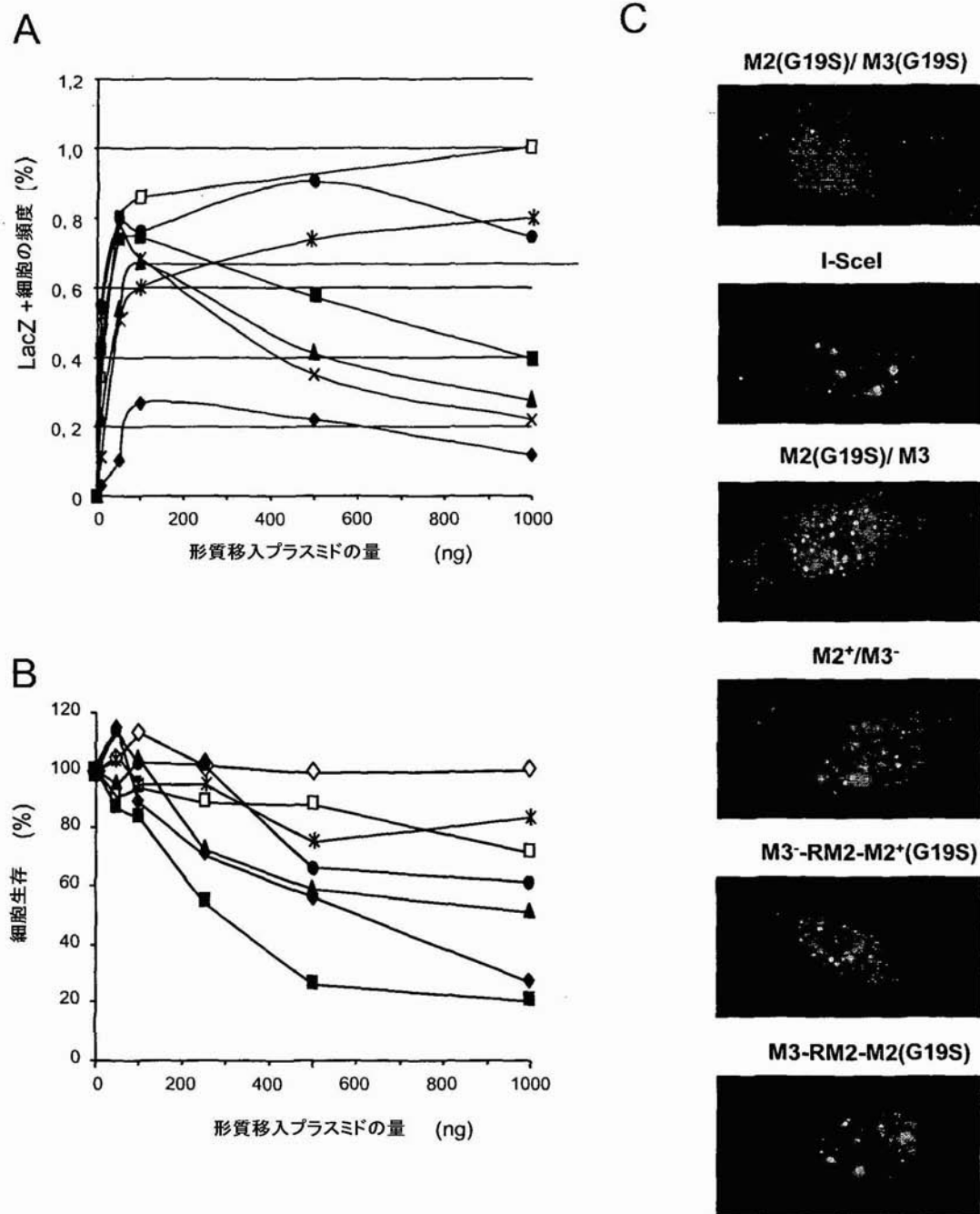




【図 28】



【図 29】



【配列表】

2011514144000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2009/000439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/22		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/078619 A (CELLECTIS [FR]; ARNOULD SYLVAIN [FR]; CHAMES PATRICK [FR]; CHOULIKA AN) 25 September 2003 (2003-09-25) cited in the application	1, 17, 20, 23, 28
Y	the whole document	1-35
Y	EPINAT JEAN-CHARLES ET AL: "A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 31, no. 11, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 2952-2962, XP002248751 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document	1-35
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  10 June 2009		Date of mailing of the international search report  22/06/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Valcárcel, Rafael

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2009/000439

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PRIETO JESUS ET AL: "The C-terminal loop of the homing endonuclease I-CreI is essential for site recognition, DNA binding and cleavage" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 35, no. 10, May 2007 (2007-05), pages 3262-3271, XP009108728 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document	1-35
Y	SILVA ET AL: "From Monomeric to Homodimeric Endonucleases and Back: Engineering Novel Specificity of LAGLIDADG Enzymes" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 361, no. 4, 25 August 2006 (2006-08-25), pages 744-754, XP005593236 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-35
Y	ARNOULD ET AL: "Engineered I-CreI Derivatives Cleaving Sequences from the Human XPC Gene can Induce Highly Efficient Gene Correction in Mammalian Cells" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 371, no. 1, 9 July 2007 (2007-07-09), pages 49-65, XP022145891 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1-35
X	WO 2006/097853 A (CELLECTIS [FR]; DUCHATEAU PHILIPPE [FR]; PAQUES FREDERIC [FR]) 21 September 2006 (2006-09-21)	1, 17, 20, 23
Y	the whole document	1-35
Y	SMITH JULIANNE ET AL: "A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 34, no. 22, 27 November 2006 (2006-11-27), pages e149-1, XP002457876 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document	1-35
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2009/000439

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEVALIER B S ET AL: "Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 10, no. 4, 20 October 2002 (2002-10-20), pages 895-905, XP002248750 ISSN: 1097-2765 cited in the application the whole document	1-35
X	WO 2007/049095 A (CELLECTIS [FR]; PAQUES FREDERIC [FR]) 3 May 2007 (2007-05-03)	1,17,20, 23
Y	the whole document	1-35
X	WO 2007/093918 A (CELLECTIS [FR]; ARNOULD SYLVAIN [FR]; PEREZ-MICHAUT CHRISTOPHE [FR]; S) 23 August 2007 (2007-08-23)	1,17,20, 23
Y	cited in the application the whole document	1-35
X	WO 2006/097784 A (CELLECTIS [FR]; PAQUES FREDERIC [FR]) 21 September 2006 (2006-09-21)	1,17,20, 23
Y	the whole document	1-35
Y	WO 2007/093836 A (CELLECTIS [FR]; PEREZ-MICHAUT CHRISTOPHE [FR]) 23 August 2007 (2007-08-23)	1-35
	cited in the application the whole document	
P,X	WO 2008/093249 A (CELLECTIS [FR]; FAJARDO SANCHEZ EMMANUEL [ES]; GRIZOT SYLVESTRE [FR];) 7 August 2008 (2008-08-07)	1,17,20, 23
	the whole document	
Y	WO 02/099105 A (CELLECTIS [FR]; CHOULIKA ANDRE [FR]; PERRIN ARNAUD [FR]; EPINAT JEAN C) 12 December 2002 (2002-12-12)	19
	the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/000439

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03078619	A	25-09-2003	AT 372379 T AU 2003215869 A1 CA 2479153 A1 DE 60316124 T2 DK 1485475 T3 EP 1485475 A1 ES 2292994 T3 JP 2005520519 T	15-09-2007 29-09-2003 25-09-2003 05-06-2008 21-01-2008 15-12-2004 16-03-2008 14-07-2005
WO 2006097853	A	21-09-2006	AU 2006224248 A1 CA 2600033 A1 EP 1863909 A1 WO 2006097854 A1 JP 2008535484 T	21-09-2006 21-09-2006 12-12-2007 21-09-2006 04-09-2008
WO 2007049095	A	03-05-2007	AU 2006314220 A1 CA 2625774 A1 CN 101310015 A EP 1979478 A2 WO 2007057781 A2 JP 2009513130 T	24-05-2007 24-05-2007 19-11-2008 15-10-2008 24-05-2007 02-04-2009
WO 2007093918	A	23-08-2007	AU 2007216264 A1 CA 2639149 A1 CN 101384712 A EP 1989299 A2 WO 2007093836 A1	23-08-2007 23-08-2007 11-03-2009 12-11-2008 23-08-2007
WO 2006097784	A	21-09-2006	CN 101198694 A	11-06-2008
WO 2007093836	A	23-08-2007	AU 2007216264 A1 CA 2639149 A1 CN 101384712 A EP 1989299 A2 WO 2007093918 A2	23-08-2007 23-08-2007 11-03-2009 12-11-2008 23-08-2007
WO 2008093249	A	07-08-2008	WO 2008093152 A1	07-08-2008
WO 02099105	A	12-12-2002	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード ( 参考 )		
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/00</b>	<b>1 0 1</b>	<b>4 C 0 8 7</b>		
<b>A 0 1 K</b>	<b>67/027</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 0 1 K</b>	<b>67/027</b>				
<b>A 0 1 H</b>	<b>5/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 0 1 H</b>	<b>5/00</b>	<b>A</b>			
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>37/02</b>				
<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>				
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/46</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>37/54</b>				
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>31/00</b>				
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/12</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>31/12</b>				
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/76</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>35/76</b>				

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100159385

弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407

弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(72)発明者 グリゾ, シルヴェストル

フランス、エフ - 9 2 2 5 0 ラ ガレン コロンベ、リュ ド ライグレ 3 5

F ターム(参考) 2B030 AB04 CA14

4B024 AA01 BA11 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11 HA08

4B050 CC03 CC05 DD07 EE10 LL01

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA02 BA16 CA31 CA44

4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA18 BA19 BA23 BA35 DC02 NA14

ZB331

4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZB33