

(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2020-527938

(P2020-527938A)

(43) 公表日 令和2年9月17日(2020.9.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z	4 B 0 5 0
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z N A Z	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/90 (2006.01)	C 1 2 N 15/90 1 0 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	4 C 0 8 4
C 1 2 N 9/22 (2006.01)	C 1 2 N 9/22	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-568653 (P2019-568653)
 (86) (22) 出願日 平成30年6月14日 (2018. 6. 14)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年2月5日 (2020. 2. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/065881
 (87) 国際公開番号 W02018/229226
 (87) 国際公開日 平成30年12月20日 (2018. 12. 20)
 (31) 優先権主張番号 17175895.6
 (32) 優先日 平成29年6月14日 (2017. 6. 14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 516355139
 テクニスチェ ユニベルシタト ドレスデン
 ドイツ 01069 ドレスデン ヘルム
 ホルトズストラッセ 10
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 フランク ブチホルツ
 ドイツ 01307 ドレスデン フェト
 スチェルストル. 74 ユニベルシタツ
 クレブスゼントラム ユーシーシー メ
 デイジニスチェ ファクルタト デル ツ
 ドレスデン メデイジニスチェ システ
 ムバイオロジー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デザイナーDNA組換え酵素を利用したゲノムを遺伝的に改変するための方法及び手段

(57) 【要約】

本発明は、特に対象とする配列を欠失させ、又は置換することによるゲノム編集のために、ゲノム中のDNA配列を特異的に改変するための方法及び手段を提供する。本発明の利点は、ゲノム中に天然に出現する2つの同一でない配列を標的部位として使用し、該標的部位に対するDNA組換え酵素を作製することである。本発明は特に、ゲノム中の突然変異を修復し、又は細胞若しくは組織由来の所定の遺伝物質を欠失させ、かつ疾患を治療する医薬に特に有用である。本発明の利点は、宿主DNA修復経路を引き入れることなくDNAの正確な部位指定制の改変を可能とし、それによりランダムな挿入及び欠失（挿入欠失）を誘導することなく機能することである。

【選択図】 図1

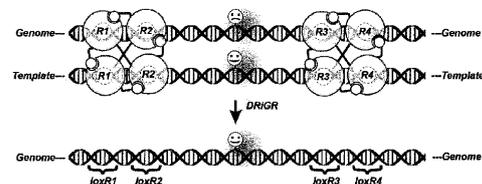


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゲノム中の対象とする配列の部位特異的DNA組換えを誘導することができるDNA組換え酵素の潜在的標的部位となる配列を同定するための方法であって：

i. 該対象とする配列を含む該ゲノム又はその部分を少なくとも5 bp、最大12 bpの長さの潜在的スペーサー配列である2つの配列についてスクリーニングする工程であって、該潜在的スペーサー配列の一方が該対象とする配列の上流にあり、かつ該潜在的スペーサー配列の他方が該対象とする配列の下流にあり、かつ該2つの配列が100 kbの最大距離及び150 bpの最小距離をとる、前記工程；

ii. 各々の潜在的スペーサー配列について、それらの一方の側の隣接するヌクレオチド、好ましくは10~20ヌクレオチドが、潜在的第1の部分部位を形成すること、及び他方の側の隣接するヌクレオチド、好ましくは10~20ヌクレオチド、より好ましくは12~15ヌクレオチドが、潜在的第2の部分部位を形成することを決定することによって該潜在的標的部位を同定する工程であって、ここで両方の潜在的な部分部位及びそれらの間の該スペーサー配列により該潜在的標的部位が形成される、前記工程、を含み、

iii. 工程ii.で同定された該潜在的標的部位をさらにスクリーニングして、宿主ゲノム中の（どこにも）出現せず、そのために配列特異的欠失が保証される潜在的標的配列を選択する、前記方法。

【請求項2】

部位特異的DNA組換えを誘導してゲノム中に天然に出現する2つの標的配列を組換えることにより、該ゲノム中のヌクレオチド配列を改変することができるデザイナーDNA組換え酵素を調製するための方法であって：

a) 改変すべきヌクレオチド配列の上流のヌクレオチド配列を第1の標的部位として、及び該改変すべきヌクレオチド配列の下流のヌクレオチド配列を第2の標的部位として選択する工程であって、ここで、これら標的部位の配列は同一でなく、各々の標的部位が5~12ヌクレオチドのスペーサー配列によって隔てられた各々10~20ヌクレオチドの第1の部分部位及び第2の部分部位を含み、請求項1記載の工程を工程a)の前に、又はその部分として実施する、前記工程；

b) a)において基質として選択した該第1の標的部位及び該第2の標的部位を含むベクターを使用して、DNA組換え酵素の少なくとも1つのライブラリに分子指向性進化法を適用する工程を含み、

a)で選択した該第1の標的部位及び該第2の標的部位に対し活性を有する少なくとも1つの該デザイナーDNA組換え酵素を得るまでこれを行う、前記方法。

【請求項3】

前記DNA組換え酵素が欠失に好適であり、かつ前記（潜在的）スペーサー配列が同一である、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

前記DNA組換え酵素が置換に好適であり、かつ前記（潜在的）スペーサー配列が同一でない、請求項1又は2記載の方法。

【請求項5】

部位特異的DNA組換えを誘導してゲノム中に天然に出現する2つの標的配列を組換えることにより、該ゲノム中のヌクレオチド配列を置換することができるデザイナーDNA組換え酵素を調製するための方法であって：

a) 改変すべきヌクレオチド配列の上流のヌクレオチド配列を第1の標的部位として、及び該改変すべきヌクレオチド配列の下流のヌクレオチド配列を第2の標的部位として選択する工程であって、ここで、これら標的部位の配列は同一でなく、各々の標的部位が5~12ヌクレオチドのスペーサー配列によって隔てられた各々10~20ヌクレオチドの第1の部分部位及び第2の部分部位を含む、前記工程

b) a)において基質として選択した該第1の標的部位及び該第2の標的部位を含むベクターを使用して、DNA組換え酵素の少なくとも1つのライブラリに分子指向性進化法を適用す

10

20

30

40

50

る工程を含み、

ここで工程bは、ベクター及び合成配列間の組換えを選択するために該第1の標的部位及び該第2の標的部位を含む該合成配列の存在下実施され、

a)で選択した該第1の標的部位及び該第2の標的部位に対し活性を有する少なくとも1つの該デザイナーDNA組換え酵素を得るまでこれを行う、前記方法。

【請求項6】

前記改変すべきヌクレオチド配列が突然変異、特に点突然変異、フレームシフト突然変異、欠失、又は挿入を含む配列である、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

工程b)で使用する前記ベクターが前記DNA組換え酵素の少なくとも1つのライブラリをコードし、かつ前記第1及び第2の標的部位の間にあるネガティブ選択マーカ、より好ましくは制限酵素の少なくとも1つの固有の認識部位を含む、発現ベクターである、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項8】

前記合成配列が前記第1及び第2の標的部位の間にあるポジティブ選択マーカを含む、置換に好適なデザイナーDNA組換え酵素を調製するための請求項5～7のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】

工程b)を3つの副工程：

- i) 前記少なくとも1つのライブラリを人工配列なしで進化させる副工程；
- ii) 工程i)の結果として得られる該少なくとも1つのライブラリを、ポジティブ選択マーカを有する人工配列を使用して進化させる副工程；
- iii) 工程ii)の結果として該少なくとも1つのライブラリをポジティブ選択マーカを有さない人工配列を用いて得る副工程、で実施する、置換に好適なデザイナーDNA組換え酵素を調製するための請求項5～8のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項10】

請求項1～9のいずれか1項記載の方法により取得することができる、デザイナーDNA組換え酵素。

【請求項11】

少なくとも2つの異なる単量体を含み、ここで前記酵素が前記ゲノム中に天然に出現する2つの標的配列を組換えることにより宿主生物の該ゲノム中での前記部位特異的DNA組換えを誘導することができ、前記標的部位の配列が同一でなく、好ましくは請求項1～9のいずれか1項記載の方法によって取得することができる、好ましくは請求項10記載のデザイナーDNA組換え酵素。

30

【請求項12】

単量体が配列番号：1 (Rec F9-1) による配列、あるいは配列番号1、又は好ましくは配列番号：28、配列番号：3、若しくは配列番号：5と少なくとも95%の配列同一性、好ましくは98%の配列同一性を有する配列を含み、かつ単量体が配列番号：2 (Rec F9-2) による配列、あるいは配列番号：2、又は好ましくは配列番号：29、配列番号：4、若しくは配列番号：6と少なくとも90%の配列同一性、好ましくは95%の配列同一性、より好ましくは98%の配列同一性を有する配列を含む、請求項10又は11記載のデザイナーDNA組換え酵素。

40

【請求項13】

配列番号：1 (Rec F9-1)、及び/若しくは配列番号：2 (Rec F9-2)、若しくは配列番号：36 (Rec F9-3)、若しくは配列番号：46 (Hex-R-#7)、及び/若しくは配列番号：47 (Hex-L-#7)、若しくは配列番号：48 (Hex-R-#30)、及び/若しくは配列番号：49 (Hex-L-#30) による配列、配列番号：1及び/若しくは2、若しくは配列番号：36、若しくは配列番号：46、及び/若しくは配列番号：47、若しくは配列番号：48、及び/若しくは配列番号：49と、又は好ましくは配列番号：28、29、若しくは3～6から選択される少なくとも1つの配列と、少なくとも90%の配列同一性、好ましくは95%の配列同一性、より好ましくは98%の配列同一性を有する配列を含む、デザイナーDNA組換え酵素。

50

【請求項14】

対象とするヌクレオチド配列を改変するための部位特異的DNA組換えが、第1の標的部位及び第2の標的部位を組換えることによりゲノム中で誘導され、両方の標的部位が該ゲノム中に天然に出現し、かつそれらが前記デザイナー-DNA組換え酵素又は該DNA組換え酵素をコードする核酸若しくはベクターを導入することにより同一とはならず、ここで該標的部位が前記対象とする配列を縁取っており、各々の標的部位が5~12ヌクレオチドのスペーサー配列によって隔てられた10~20ヌクレオチドの第1の部分部位及び第2の部分部位を含む、医薬における使用のための請求項10~13のいずれか1項記載のデザイナー-DNA組換え酵素、請求項9~11のいずれか1項記載のDNA組換え酵素をコードする医薬における使用のための核酸又はベクター。

10

【請求項15】

両方の標的部位が同一のスペーサー配列を含み、組換えにより前記対象とする配列が欠失する、請求項14記載の医薬における使用のためのデザイナー-DNA組換え酵素又は核酸又はベクター。

【請求項16】

両方の標的部位が同一でないスペーサー配列を含み、さらに所望の配列を縁取る両方の標的部位を含む合成ドナー配列を提供し、組換えにより前記対象とする配列が該所望の配列によって置換される、請求項14記載の医薬における使用のためのデザイナー-DNA組換え酵素又は核酸又はベクター。

【請求項17】

請求項10~13のいずれか1項記載のデザイナー-DNA組換え酵素をコードする核酸又はベクター。

20

【請求項18】

配列番号：7 (loxF9a) 及び配列番号：8 (loxF9b)、配列番号：7若しくは8との少なくとも90%の配列同一性を有する配列、又はこれらに逆相補的な核酸配列から選択される核酸。

【請求項19】

請求項17若しくは18記載の核酸若しくはベクターを含む宿主細胞、宿主臓器、若しくは非ヒト宿主生物、及び/又は請求項10~13のいずれか1項記載のデザイナー-DNA組換え酵素。

30

【請求項20】

第1の標的部位及び第2の標的部位を組換えることによりゲノム中の対象とするヌクレオチド配列を改変し、ここで両方の標的部位は該ゲノム中に天然に出現し、かつそれらが請求項10~13のいずれか1項記載のデザイナー-DNA組換え酵素又は請求項10~13のいずれか1項記載のDNA組換え酵素をコードする核酸若しくはベクターを導入することにより同一とはならない、前記部位特異的DNA組換えを誘導する方法。

【請求項21】

そのスペーサー配列が異なる前記第1及び第2の標的部位を選択すること、及び該第1の標的部位及び該第2の標的部位を含む合成配列をさらに提供することにより前記対象とするヌクレオチド配列の置換を誘導し、ここで該第1及び第2の標的部位が所望の配列を縁取っており、又は同一のスペーサー配列を含む該第1及び第2の標的部位を選択することによって該対象とするヌクレオチド配列の欠失を誘導する、請求項20記載の方法。

40

【請求項22】

ゲノム中に天然に出現する2つの標的配列を組み換えることによる、部位特異的DNA組換えにより、該ゲノム中の対象とする配列を置換するためのキットであって：

請求項10~13のいずれか1項記載のデザイナー-DNA組換え酵素又は請求項17若しくは18記載の核酸若しくはベクター；

前記第1の標的部位及び前記第2の標的部位に隣接する前記対象とする配列と置換する、所望の配列を含む合成配列、を含む、前記キット。

【請求項23】

50

2つの認識部位の間の部位特異的DNA組換えを触媒する、請求項10～13のいずれか1項記載のデザイナーDNA組換え酵素の使用。

【請求項24】

前記対象とする配列をロックアウトされ、又は改変された配列を有する細胞又は多細胞生物を作製する、請求項23記載の使用。

【請求項25】

前記標的部位が配列番号：7 (loxF9a) 及び配列番号：8 (loxF9b) と同一であるか、又はこれらに逆相補的である配列から選択される、請求項23記載の使用。

【請求項26】

請求項10～13のいずれか1項記載のデザイナーDNA組換え酵素又は請求項9記載の核酸若しくはベクターを含む、医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ゲノム中のDNA配列を特異的に改変するための方法及び手段を提供する。デザイナーDNA組換え酵素を作製するためのベクター及び方法を提供する。本発明は特に、ゲノム中の突然変異を修復し、又は細胞若しくは組織由来の所定の遺伝物質を欠失させ、かつ疾患を治療する医薬に有用である。さらに、本発明は（例えば、動物モデルを作出するための）生物学研究及び生物医学研究に有用である。

【背景技術】

20

【0002】

ヒト疾患の原因となる多くの遺伝的突然変異が、過去数十年間に特定されている。ゲノム編集の分野における近年のブレークスルーは現在、DNAの損傷を修復し、インビトロ又は生体内で機能不全に陥った細胞を置換し、操作し、又は再生させる革新的なアプローチを確立する真の機会をもたらしている。

【0003】

しかしながら、近年開発されたゲノム編集技術の大部分、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ（例えば、US20150093802 A1）、TALEN（例えば、WO2014134412 A1）、及びCRISPR/Cas9（例えば、US 8,697,359 B1）では、遺伝子修正の第1工程として標的座位に二本鎖DNA切断部が導入される。これらの切断部は続いて細胞の内因性DNA修復機構の1つによって修復され、その結果典型的に標的座位に多数のランダムな挿入及び欠失（挿入欠失（indels））が導入される。しかしながら、理想的には治療的ゲノム編集は、挿入欠失を導入することなく効率的かつ特異的であるべきである。

30

【0004】

DNA組換え酵素、特に部位特異的リコンビナーゼ（SSR）システムは、内因性DNA修復経路を誘発することなく正確にDNAを操作することを可能とし、かつ処理されたDNAのインビボでの切断及び即座の再結合（resealing）の両方を実現する固有の能力を有する。さらに、SSRシステム、例えばCre/loxP（EP 0 2200 009 B1）は、モデル生物における幅広い用途を見出しており、これらが動物において終生発現される場合でさえも、安全となり得ることが実証されている。SSRは4量体としてその標的部位に働きかけ、これらの部位の方向に応じて、組換えは様々な結果をもたらし得る。新規の部位特異的リコンビナーゼを得るために、Creのアミノ酸配列を改変することができることが知られている（Buchholz F 及びStewart AFの文献、2001）。

40

【0005】

当技術分野で公知の他のSSRシステムには、Flp/FRTシステム（WO 1999025841 A1及びUS 6,774,279 B2）、Dre/roxシステム（US 7,422,889 B2及びUS 7,915,037 B2）、VCre/VloxPシステム、及びsCre/SloxPシステム（WO 2010/143606 A1）、並びにVika/vox、Nigri/nlox及びPanto/poxシステム（WO 2014/016248 A1）がある。

【0006】

天然のDNA組換え酵素、特に部位特異的リコンビナーゼ（SSR）システム（例えば、チロ

50

シン型SSR)は、一般的に4つの同一の単量体からなる。一般的に、DNA組換え酵素は、2つの同一かつ対称な、各々多くの場合8ヌクレオチド長の非対称なスペーサーによって隔てられた2つの13ヌクレオチド長の部分部位からなるパリンδροーム標的部位を認識する。標的部位の数及び相対的な方向に応じて、DNA組換え酵素は遺伝的内容の欠失、挿入、逆位、又は置換を引き起こす。

【0007】

治療用ゲノム編集においてDNA組換え酵素を使用するためのボトルネックは、組換えることができる配列の数が制限されることである。

【0008】

WO2008083931A1では、HIVの長鎖末端反復(LTR)配列を認識部位(loxLTR Tre 1.0)として使用したテラーメイドリコンビナーゼ(tailored recombinases)(Tre 1.0)の指向性分子進化によってこの制限にある程度対処している。非対称な標的部位を使用したこのアプローチのさらなる開発は、WO2011147590 A2(Tre 3.0)及びWO2016034553 A1(Tre 3.1及びuTre/Brec1)並びにKarpinski Jらの刊行物、2016(Brec1)に記載されている。しかしながら、全ての事例においてシステムが機能するためには、ゲノム中に34塩基対の長さの厳密な認識部位が(例えば組み込まれたHIプロウイルスのLTR中に)2つなくてはならないため、このアプローチの有用性は制限されていた。

10

【0009】

WO2009007982A1には、DNA組換え酵素の潜在的標的部位としてのHIV-1のLTRに位置する核酸配列が記載されている。

20

【0010】

US2009/0217400 A1には、非対称なloxP-M7標的部位での組換えのための酵素及び方法が記載されている。さらに、Zhang, Cらの文献、(2015)及びUS 20170058297 A1には、非対称なloxP-M7標的部位を認識するために必須な2つのCre突然変異体のヘテロ四量体複合体が記載されている。しかしながら、これらの認識部位はゲノムに人為的に導入しなくてはならない。

【0011】

US 20040003435 A1には、対象とする配列の植物への標的化挿入のための方法であって、野生型FLPリコンビナーゼによってなお認識され得る改変FRT部位である同一でない認識部位に隣接する、又はこれを含む該対象とするヌクレオチド配列を含む導入カセットを導入することを含む、前記方法が記載されている。

30

【0012】

まとめると、最新の公知のリコンビナーゼシステムの適用は、ゲノム中に2つの認識部位を人為的に導入しなくてはならず、又はゲノム中の対象とする配列が34塩基対の長さの2つの同一配列と隣接しなくてはならないという事実によって制限されている。

【0013】

従って、現在利用されている直接的なゲノム編集アプローチは、プログラム可能ヌクレアーゼ、例えばCRISPR/Cas9のようなRNA誘導型ヌクレアーゼ(例えば、US 8,657,359 B1)に依存しているが、これはこれらの酵素の標的部位への特異性が対象とする配列に適応して汎用され得るガイドRNAによって規定されるためである。

40

【発明の概要】

【0014】

しかしながら、これらのヌクレアーゼシステムは細胞の内因性DNA修復機構を必要とするため、典型的に標的座位に多数のランダムな挿入及び欠失(挿入欠失)が誘導される。

【0015】

理想的なゲノム編集又は遺伝子治療では、ゲノムにさらなる改変を加えることなく、欠陥のある遺伝子を正常な遺伝子座で置換し、又は欠陥のある遺伝子をその天然の位置から欠失させる。従って、理想的なゲノム編集は、挿入欠失を導入することなく、効率的かつ特異的であるべきである。

【0016】

50

従って本発明の目的は、ヌクレアーゼゲノム編集アプローチの欠点を克服し、同時に対象とする配列に適応する汎用性を有する、ゲノム中のヌクレオチド配列を改変する方法を提供することである。

【0017】

本発明は、ゲノム中には34塩基対の長さ（DNA組換え酵素の通常の標的部位の長さ）を有する2つの同一な配列がほとんど見出されないという発見に基づく。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、デザイナーDNA組換え酵素の切除組換えを達成するための唯一の制約は、通常8 bp長のスペーサー配列の保存性（例えば、図17を参照されたい）であることを本発明者らが理解したところから始まる。組換えが起こるためにはこの配列が同一でなくてはならないため、組換えることのできる配列については制約が設けられている。しかしながら、様々なゲノムの生物情報工学的解析から、ウイルス、原核生物、及びヒトゲノムを含む真核生物ゲノムにおいて、8 bp長の直列反復配列が、高頻度に出現することが、明らかとなった（例えば、図18、19を参照されたい）。

10

【0019】

この発見に基づき、本発明者らはゲノム中の異なる標的部位を標的化するように進化させたDNA組換え酵素の異なる単量体を組み合わせることにより、細胞修復経路を引き入れることなく、正確なゲノム編集を行うことが可能となることを理解した。従って、指向性進化、合理的設計、又はこれらの組み合わせによって作製されたDNA組換え酵素の単量体の組み合わせを作製して、ゲノム中の実質的に対象とするあらゆる配列を組換えることができる。組換えにより配列が欠失する場合、およそ8塩基対の長さの2つの同一の配列が、ゲノム中のスペーサー配列として必要となる。しかしながら、組換えにより配列が置換される場合、ゲノム中のスペーサー配列は好ましくは同一でなく、この場合、同一のスペーサー配列は人工配列上の対象とする配列と置換される所望の配列（ドナーDNA）を提供する。

20

【0020】

本発明は、異なるDNA組換え酵素の単量体を組み合わせることにより、公知のDNA組換え酵素のそれらが組換えることができる標的部位に関する限界を克服し、ゲノム中に天然に出現する標的配列を認識することができるゲノム編集に有用なデザイナーDNA組換え酵素を提供する。

30

【0021】

本発明の第1の態様において、本発明は、部位特異的DNA組換えを誘導し、ゲノム中に（好ましくは、天然に）出現する2つの同一でない標的配列を組み換えることにより、ゲノム中のヌクレオチド配列を改変することができるデザイナーDNA組換え酵素、及びデザイナーDNA組換え酵素を調製するための方法を提供する。

【0022】

本発明のデザイナーDNA組換え酵素は、ゲノム中に標的部位を人為的に導入することを必要とせず、さらに長鎖末端反復配列（LTR）のような8ヌクレオチド超の長さ（特に、34ヌクレオチドでない）の同一の配列の存在を要求しないという利点を有する。

【0023】

本発明の文脈における同一でない標的配列とは、標的部位が少なくとも2ヌクレオチド異なることをいう。標的部位は、さらに多く、特に少なくとも3ヌクレオチドが異なり得る点で有利である。本発明の実施態様において、標的部位は少なくとも4ヌクレオチド、又は8ヌクレオチドさえも異なる。標的部位の少なくとも20%又はさらにより好ましくは30%のヌクレオチド及び最大70%又はさらに最大90%のヌクレオチドが異なり得るものであり、このことは、標的部位がわずかに10~80%、好ましくは30~90%の配列同一性を有し得ることを意味する点で有利である。各標的部位は、スペーサー配列（好ましくは5~12ヌクレオチド）によって隔てられた第1の部分部位（好ましくは10~20ヌクレオチド）及び第2の部分部位（好ましくは10~20ヌクレオチド）を含む。一方又はさらに両方の標的部位は、非対称であり得る点で有利であり、このことは標的部位の部分部位が互いに逆相補的でない

40

50

いことを意味する。部分部位の少なくとも20%又はさらにより好ましくは30%のヌクレオチド、及び最大70%又はさらに最大90%のヌクレオチドが異なり得る点で有利であり、このことは、全ての部分部位がわずか10~80%、好ましくは30~90%の配列同一性を有し得ることを意味する。一実施態様において、標的部位の相違は部分部位においてのみあり、スペーサー配列は同一であり、対象とする配列の欠失を誘導する。別の実施態様においてまた、2つのスペーサー配列は異なっており、その結果対象とする配列と置換されることとなるドナー配列を縁取るゲノム中に出現する標的部位と同一の2つの配列を含む合成配列を提供することにより、対象とする配列を置換することが可能となる。

【0024】

好ましい実施態様において、本発明のデザイナー-DNA組換え酵素は、1つ若しくは2つ、又は最大4つの単量体を含む。一実施態様において、デザイナー-DNA組換え酵素は、4つの異なる単量体を含み、各単量体は、異なる部分部位を認識する：しかしながらまた、デザイナー-DNA組換え酵素は2つ又は3つの異なる単量体を含み、ここで1つ又は2つの単量体が非対称な標的部位を認識することができる。デザイナー-DNA組換え酵素は、4つの同一の単量体を含み、ここでデザイナー-DNA組換え酵素は、2つの異なる非対称な標的部位を認識することさえできる。本発明の異なる単量体とは、単量体が少なくとも2%、特に少なくとも4%、好ましくは少なくとも8%のアミノ酸残基異なることを意味する。最大10%、又は最大30%さえものアミノ酸残基が異なり得る点で有利であり、このことは、単量体がわずか70~98%、好ましくは90~96%、又は最大92%の配列同一性を有し得ることを意味する。

【0025】

従って、本発明のDNA組換え酵素は、2つ又は最大4つの異なる単量体を含むホモ四量体又はヘテロ四量体である。

【0026】

ヘテロ四量体の好ましい実施態様において、単量体-単量体界面は、異なる単量体のみが四量体を形成し得る方法で遺伝子改変する（例えば、Zhangらの刊行物、2015及びUS 20170058297 A1に記載されている）。この改変により、1つの単量体のみを含む四量体を除く必須のヘテロ四量体が形成される。

【0027】

対象とする配列は、改変すべきヌクレオチド配列である。これは、突然変異を含む配列であることが好ましい。本発明における突然変異という用語には、あらゆる種類の遺伝的又は染色体異常、特に点突然変異、フレームシフト突然変異、転座、重複、欠失、又は挿入を含む。

【0028】

あるいは、活性は疾患を引き起こし、又は遺伝子活性の阻害は症状を低下させることが公知であるところ、対象とする配列は、不活性化させたい配列、特に病原体（細菌、ウイルスのような微生物、又は寄生虫）の配列、又は癌遺伝子若しくは別の遺伝子である。一例はPCSK9（プロタンパク質変換酵素サブチリシン/ケキシン9型）をコードする遺伝子であり、これを阻害するとコレステロールレベル及び低密度リポタンパク質粒子（LDL）の血中濃度を低下させることが知られている。

【0029】

対象とする配列が挿入、重複、又は不活性化させたい配列（例えば、ウイルス配列）である場合、本発明のDNA組換え酵素によって誘導される組換えにより、好ましくは挿入された配列又は不活性化させたい配列が欠失する。この欠失 さらにデザイナー-DNA組換え酵素により誘導された遺伝子欠失（DRiGD）とも呼ぶ は、2つの標的部位中の2つの同一のスペーサー配列によって達成される（例示的实施例について、図2も参照されたい）。

【0030】

あるいは、本発明のDNA組換え酵素によって誘導される組換えにより、対象とする配列は所望の配列により置換される。この置換 さらにデザイナー-DNA組換え酵素により誘導された遺伝子置換（DRiGR）とも呼ぶ は、第1の標的部位及び第2の標的部位を含む合成ドナー配列を提供することによって達成され、ここで第1及び第2の標的部位は、所望の配

10

20

30

40

50

列を縁取っている。対象とする配列を所望の配列で置換することにより、原理的に、点突然変異、ナンセンス突然変異、フレームシフト突然変異、重複、並びに欠失及び挿入さえもを含むあらゆる突然変異を治療することが可能である（例示的实施例について、図1も参照されたい）。

【0031】

本発明のDNA組換え酵素は、内因性DNA修復経路を誘発することなく正確にゲノム編集することを可能とし、かつ処理されたDNAのインピボでの切断及び即座の再結合の両方を実現する固有の能力を有する点で有利である。

【0032】

DNA組換え酵素という用語は、部位特異的DNA組換え事象を誘導することができる全ての酵素、好ましくはリコンビナーゼ又はインテグラーゼ、特にトポイソメラーゼ様反応を実行する酵素、例えば、セリン若しくはチロシンリコンビナーゼファミリーから選択される。一実施態様において、その標的配列が工程a)で使用され、かつ工程(b)において分子指向性進化法が適用された公知のDNA組換え酵素をCre、Dre、Cre、VCre、sCre、FLP、Tre（Tre 1.0~Tre 3.1及びBrec1を含む）、Vika、Nigri、及びPantoから選択される。

10

【0033】

「デザイナー」DNA組換え酵素という用語は、本発明により所与の標的部位に対するDNA組換え酵素が作製され、かつそのDNA組換え酵素が天然には出現しないという事実を指す。

【0034】

一態様において、本発明は、ゲノム中の対象とする配列の、部位特異的DNA組換えを誘導することができるDNA組換え酵素に対する、潜在的標的部位である配列を同定するための方法であって：

20

i. 潜在的スペーサー配列である2つの配列についての対象とする配列を含む、ゲノム又はその部分をスクリーニングする工程（これらの潜在的スペーサー配列は、少なくとも5 bp、好ましくは少なくとも7 bp、より好ましくは8 bp、及び好ましくは最大12、より好ましくは最大10 bpの長さである。潜在的スペーサー配列の一方は対象とする配列の上流にあり、潜在的スペーサー配列の他方は、対象とする配列の下流にある。2つの配列は好ましくは100 kb、より好ましくは10 kb、及びさらにより好ましくは2 kbの最大距離、及び好ましくは150 bpの最小距離をとる。）

30

ii. 潜在的標的部位を同定（規定）する工程（（工程i.で得られた）潜在的スペーサー配列並びにそれを縁取る配列は、潜在的標的配列を形成する。（工程i.で得られた）各潜在的スペーサー配列について、その一方の側の隣接ヌクレオチド、好ましくは10~20ヌクレオチド、より好ましくは12~15ヌクレオチド、最も好ましくは13ヌクレオチドは潜在的第1の部分部位を形成し、かつその他方の側の隣接ヌクレオチド、好ましくは10~20ヌクレオチド、より好ましくは12~15ヌクレオチドは潜在的第2の部分部位を形成する。従って、両方の潜在的部分部位及びそれらの間のスペーサー配列は、潜在的標的部位を形成する。）を含み、

iii. 工程ii.で同定された潜在的標的部位を好ましくはさらにスクリーニングして、宿主ゲノム中の（どこにも）出現せず、そのために配列特異的組換え、特に欠失が保証される潜在的標的配列を選択する、前記方法に関する。

40

【0035】

この方法は、ゲノム中の対象とする配列の欠失を誘導するDNA組換え酵素（DRiGD）の潜在的標的部位となる配列を同定するためのスクリーニングに特に好適である。この場合、工程i.で潜在的スペーサー配列となる2つの同一の配列についてゲノムをスクリーニングする。この方法はまた、図18における例によって例示される。

【0036】

一実施態様において、欠失させるべき対象とする配列は、宿主のゲノム中の配列、例えば癌遺伝子又は不活性化させたい別の遺伝子である。従って、工程i.でスクリーニングするゲノムは、宿主自体のゲノム（又は対象とする配列を含むその部分）、例えばヒトゲノ

50

ム又はヒト染色体の部分である。この場合、工程iii.において、好ましくは宿主のゲノム中のどこにも出現しない（従って、対象とする配列の周囲にのみ出現する）潜在的標的配列をスクリーニングして、配列特異的欠失を保証する。

【0037】

別の実施態様において、欠失させるべき対象とする配列は、病原体、例えばウイルスのゲノム中の配列である。ここで、工程i.を病原体のゲノムに対して実施し、工程iii.をその病原体が感染する宿主のゲノムに対して実施する。この場合、工程iii.において、好ましくは宿主のゲノム中に出現しない（従って、病原体のゲノム中にのみ出現する）潜在的標的配列をスクリーニングして、配列特異的欠失を保証する。

【0038】

さらに好ましい工程iv.において、標的配列は、各々DNA組換え酵素の既知の標的部位の部分部位との相同性を有する部分部位を含む、工程ii.はiii.で得られた潜在的標的配列のリストから選択する。相同性とは、一定数のヌクレオチド位置に同一の塩基を有することを意味する。好ましくは、各部分部位はDNA組換え酵素の既知の標的部位の部分部位と少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%同一なヌクレオチド位置を有する。さらに、部分部位は好ましくは、相互間に相同性を有する。好ましくは、各部分部位は、同じ標的部位の他の部分部位及び/又は他の標的部位の部分部位と少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%同一なヌクレオチド位置を有する。標的部分部位間の相同性が高いと、両方の部分部位に対する活性を有する単量体を作製することができ、従って組換えに要する単量体の数を低下させる見込みが増加する。

【0039】

配列特異的な欠失を保証する工程iii.の選択は、工程iv.の前に実施しても、後に実施してもよい。

【0040】

好ましくは工程i.の間又はその前に、不活性化すべき対象の配列（好ましくは、遺伝子又はエキソン）のゲノム中の座標を決定する。探索範囲とする対象とする配列及び縁取る配列に及ぶ150 bp~10 kbの断片を作成する。他の遺伝子と重複する断片は除く。他の全ての断片について、潜在的に同一なスペーサー配列 従って少なくとも1回繰り返されているスペーサー配列を同定する。

【0041】

一実施態様において、対象とする配列（例えば不活性化させるべき遺伝子のエキソン）又は少なくとも対象とする配列（例えばエキソン）との重複配列を縁取るスペーサー配列は、工程ii.の前に選択する。あるいは、対象とする配列（例えば不活性化させるべき遺伝子のエキソン）又は少なくとも対象とする配列（例えばエキソン）との重複配列を縁取る潜在的標的部位は、工程ii.に記載の通り同定し、続いて標的部位の対を選択する。

【0042】

別の実施態様において、この方法は、ゲノム中の対象とする配列の置換を誘導するDNA組換え酵素（DRiGR）の潜在的標的部位となる配列を同定するために使用する。この場合、工程i.で潜在的スペーサー配列となり、かつ同一でない2つの配列についてゲノムをスクリーニングする。この場合、潜在的スペーサー配列は、少なくとも30%~100%、好ましくは少なくとも50%のヌクレオチドだけ異なる。従ってこの場合、潜在的スペーサー配列は好ましくは0%~50%、又は少なくとも70%未満の配列同一性を有する。

【0043】

さらに好ましい実施態様において、ゲノム中の対象とする配列の置換を誘導するDNA組換え酵素（DRiGR）の潜在的標的部位となる配列を：

i. 潜在的標的部位である2つの配列についての対象とする配列を含む、ゲノム又はその部分をスクリーニングすること（これらの潜在的標的部位は、少なくとも5 bp、好ましくは少なくとも7 bp、より好ましくは8 bp、及び好ましくは最大12、より好ましくは最大10 bpの長さであるスペーサー配列によって隔てられた各々10~20ヌクレオチド、より好

10

20

30

40

50

ましくは12~15ヌクレオチドを有する第1の部分部位及び第2の部分部位を含む。潜在的標的部位の一方は対象とする配列の上流にあり、潜在的標的部位の他方は、対象とする配列の下流にある。2つの配列は好ましくは100 kb、より好ましくは10 kb、及びさらにより好ましくは2 kbの最大距離、及び好ましくは150 bpの最小距離をとる。置換を可能にするため、スパーサー配列は同一とならないように選択する。スパーサー配列は、少なくとも30%~100%、好ましくは50%のヌクレオチドだけ異なる。従って、スパーサー配列は好ましくは0%~50%、又は少なくとも70%未満の配列同一性を有する。)を含み、

ii. 工程i. で同定された潜在的標的部位を好ましくはさらにスクリーニングして、宿主ゲノム中の(どこにも)出現せず、そのために(ドナー配列を用いて、以下参照)配列特異的置換が保証される潜在的標的配列を選択する、前記方法によって同定する。

10

【0044】

さらに好ましい工程iii.において、標的配列は、各々DNA組換え酵素の既知の標的部位の部分部位との相同性を有する部分部位を含む、工程i.はii.で得られた潜在的標的配列のリストから選択する。相同性とは、一定数のヌクレオチド位置に同一の塩基を有することを意味する。好ましくは、各部分部位はDNA組換え酵素の既知の標的部位の部分部位と少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%同一なヌクレオチド位置を有する。

【0045】

配列特異的な置換を保証する工程ii.の選択は、工程iii.の前に実施しても、後に実施してもよい。

20

【0046】

好ましくは工程i.の間又はその前に、置換すべき対象とする配列(好ましくは、遺伝子又はエキソン)のゲノム中の座標を決定する。探索範囲とする対象とする配列及び縁取る配列に及ぶ150 bp~10 kbの断片を作成する。他の遺伝子と重複する断片は除く。他の全ての断片について、潜在的標的部位を同定する。

【0047】

一実施態様において、対象とする配列(例えば置換すべき遺伝子のエキソン)又は少なくとも対象とする配列(例えばエキソン)との重複配列を縁取るスパーサー配列を、選択する。

【0048】

ゲノム中に天然に出現する2つの標的配列を組換えることにより、部位特異的DNA組換えを誘導して、ヌクレオチド配列を改変することが可能な本発明のデザイナーDNA組換え酵素を調製するための方法(デザイナーリコンビナーゼ誘導遺伝子置換又は欠失)は:

30

a) 改変すべきヌクレオチド配列(対象とする部位)の上流のヌクレオチド配列を第1の標的部位として、改変すべきヌクレオチド配列の下流の(好ましくは30~40塩基対の長さである)ヌクレオチド配列を第2の標的部位として選択する工程(ここで、標的部位の配列は、同一ではない。同一ではない(not identical)又は同一ではない(non-identical)標的配列という用語は、上記の通り定義する。標的部位の一方又は両方は非対称であり、対称な部位はゲノム中にほとんど見つからない点で有利である。各々の標的部位はスパーサー配列(先に定義した通り、好ましくは5~12ヌクレオチド)によって隔てられた第1の部分部位及び第2の部分部位(先に定義した通り、好ましくは10~20ヌクレオチド)を含む。好ましくは、標的配列は各々DNA組換え酵素の既知の標的部位の部分部位との相同性を有する部分部位を含むように選択する。相同性とは、一定数のヌクレオチド位置に同一の塩基を有することを意味する。好ましくは、各部分部位はDNA組換え酵素の既知の標的部位の部分部位と少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%同一なヌクレオチド位置を有する。さらに、先に説明した通り、部分部位は好ましくは、相互間に相同性を有する。好ましくは、各部分部位は、同じ標的部位の他の部分部位及び/又は他の標的部位の部分部位と少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%同一なヌクレオチド位置を有する。)

40

b) a)で基質として選択した第1の標的部位及び第2の標的部位を含む核酸を使用してDNA

50

組換え酵素の少なくとも1つのライブラリ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくは最大4つのライブラリに対して、分子指向性進化法を適用する工程、を含み、
(分子指向性進化法又は分子指向性進化法及び合理的設計の組合わせにより) a1)で選択した該第1の標的部位及び該第2の標的部位に対し活性を有する少なくとも1つのデザイナー-DNA組換え酵素を得るまでこれを行う。

【0049】

デザイナー-DNA組換え酵素は、任意の標的配列の対を標的化するように選択し、その結果これらの標的部位に隣接したあらゆる対象とする配列を選択することができる。標的配列は、宿主(例えば、細胞又は生物)ゲノム中又はウイルスのような病原体のゲノム中に天然に出現する配列とする。本発明の状況における「ゲノム中に天然に出現する配列」とは、標的配列が人為的に導入されたものでないこと、及び同一でない両方の配列が同じゲノム中にネイティブに(天然に)出現することを意味する。

10

【0050】

ゲノムは、生物又は病原体の全ての遺伝物質と定義する。ゲノムは、一般的にDNA(又はRNAウイルスではRNA)からなる。ゲノムは、遺伝子(コード領域又はエキソン)、(イントロン及び調節配列のような)非コードDNA、並びにミトコンドリア及びクロロプラストの遺伝物質を含む。

【0051】

好ましい標的配列は、宿主細胞又は宿主生物の標的ゲノム中に固有の配列を含む。一部の生物は複数の染色体コピーを有し、この状況において「固有の」とは、その配列が染色体1セット当たり1回きり出現することをいう。

20

【0052】

本発明者らは、予想外にもあるDNA組換え酵素を使用して、全ての部分部位が相互間で13個の位置のうち、7~9個だけ異なる場合に、2つの異なる標的部位を組み換えることができることを見出した(実施例F9-3を参照されたい。この例では、loxF9a及びloxF9bの両方を組換えることができる)。

【0053】

一般的に、全ての部分部位は、相互間で7つ以下の位置、好ましくは5つ以下の位置、より好ましくは4つ以下の位置で異なる。1つのDNA組換え酵素のライブラリを使用して、両方の標的部位を、特にDRiGR反応で組換えることができる酵素を進化させることができる(図15及び16、並びに実施例についての63ページの表を参照されたい)。

30

【0054】

別の場合、部分部位は対比較における最大7つ、好ましくは5つ、より好ましくは4つのミスマッチの相違を示し、従って、両方の標的部位は部分部位間で最大7つ、好ましくは5つ、より好ましくは4つのミスマッチを示す。この場合、DNA組換え酵素の2つのライブラリを使用して、両方の標的部位を組換えることができるように酵素を進化させる。

【0055】

さらなる場合、一方の標的部位のみが最大7つ、好ましくは5つ、より好ましくは4つのミスマッチを有する1対の部分部位を示し、従って、他方の標的部位は7つ超、好ましくは5つ、より好ましくは4つのミスマッチだけ異なり、また、他方の標的部位の部分部位は、相互に比較して7つ超、好ましくは5つ、より好ましくは4つのミスマッチを示す。この場合、DNA組換え酵素の3つ又は4つのライブラリを使用して、両方の標的部位を組換えることができるように酵素を進化させる。

40

【0056】

工程b)で使用するDNA組換え酵素のライブラリ(複数可)を進化させて、DNA組換え酵素の1つの単量体を得、又は共進化させて標的部位の対と一緒に働きかけるDNA組換え酵素の少なくとも2つの単量体を得る。工程b)において使用するDNA組換え酵素の2以上のライブラリの場合、それらは好ましくは作用上、好ましくは1つの発現ベクターで結び付けられている。DNA組換え酵素の2以上のライブラリを使用する場合、ライブラリは好ましくは同じ調節エレメント、好ましくは同じプロモーターの制御下で発現させる。

50

【0057】

好ましくは、DNA組換え酵素の1又は2~4つのライブラリを、共進化させるために工程b)で使用する。特に好ましい実施態様において、DNA組換え酵素の2~4つのライブラリを、工程b)で使用する。

【0058】

2以上のライブラリを使用する場合、使用するDNA組換え酵素の異なるライブラリは、標的部特異性の観点で異なっている。

【0059】

DNA組換え酵素の2つのライブラリを使用する場合、各ライブラリ中のDNA組換え酵素は異なる非対称の標的部 2つの異なる部分部位から構成される標的部を認識する点で有利である。

10

【0060】

DNA組換え酵素の4つのライブラリを使用する場合、各ライブラリ中のDNA組換え酵素は好ましくは各々異なる非対称の標的部位の部分部位を認識する。従って、それらはヘテロ四量体として共発現された場合にのみ、標的部を組換える。

【0061】

好ましい実施態様において、工程b)における共進化を、DNA組換え酵素のライブラリ又は少なくとも2つの異なるDNA組換え酵素のライブラリ、及び第1及び第2の標的部を含むものをコードする発現ベクターを使用して実施する。特に、好ましい実施態様において、発現ベクターはDNA組換え酵素の2つ又は4つのライブラリをコードする。

20

【0062】

ベクターの好ましい実施態様において、ネガティブ選択マーカは、第1及び第2の標的部位の間にある。従って、第1及び第2の標的部位は、好ましくはネガティブ選択マーカを縁取る。従って、組換えが起こる場合、ネガティブ選択マーカを有する配列が切断され、ネガティブ選択は行われない。しかしながら、組換えが起こらない場合、ネガティブ選択マーカは機能する。

【0063】

好ましい実施態様において、ネガティブ選択マーカは制限酵素の認識部位である。好ましくは固有の認識部位とはベクター中に1回だけ出現する制限酵素の認識部位を意味する。制限酵素とインキュベートすることにより、組換えを受けていない発現ベクターは線状化する。線状化された発現ベクターは、例えば(図4~7に例示されている)非線状化プラスミドのみを増幅するPCR用のプライマーペアを選択し、かつ/又は線状化DNAをエキソヌクレアーゼで消化することによりネガティブ選択する。

30

【0064】

好ましい実施態様において、ネガティブ選択は、2以上の制限酵素認識部位を含み、好ましくは2又は3つの(最大5つさえもの)同じ制限酵素認識部位を、特に2~3つの(又は最大5つさえもの)異なる制限酵素認識部位を含む。

【0065】

これにより、組換えを受けていない発現ベクターの線状化の効率が著しく増強される。置換をもたらす酵素の選択をさらに増強するため、好ましくはエキソヌクレアーゼを加えて線状化DNAを消化する。

40

【0066】

第1の標的部位及び第2の標的部位を含む基質核酸(好ましくは縁取るネガティブ選択マーカ)を、好ましくはDNA組換え酵素のライブラリ又はDNA組換え酵素の少なくとも2つの異なるライブラリをコードするDNAと同じベクターに配置する(図4及び7に例示する)。

【0067】

一実施態様においてまた、方法は先に規定した発現ベクターを細胞に導入すること及びDNA組換え酵素を発現させることを含む。あるいは、無細胞発現システムを使用する。

【0068】

50

本発明のDNA組換え酵素により欠失をもたらしたい場合(DRiGD)、好ましくはさらなるDNA基質又はベクターは1つの組換え反応に使用しない。組換えに成功すると、ネガティブ選択マーカークが切り出され、プラスミドを好ましくはPCRによって増幅させる(図6及び7に例示する pDuoSLiDE-DRiGD、pQuSLiDE-DRiGD)。本事例において先に記載の通り、第1及び第2の標的配列は、同一のスペーサー配列を含む(図2も参照されたい)。

【0069】

先に記載のDNA組換え酵素の潜在的標的部位である配列を同定する方法を、好ましくは欠失又は置換のためのデザイナーDNA組換え酵素を調製するための方法の工程a)において、標的部位を選択するとき又は前に、実施する。

【0070】

本発明のDNA組換え酵素により置換をもたらしたい場合(DRiGR)、基質に加え、第1の標的部位及び第2の標的部位を含む合成配列を使用する。本事例において先に記載の通り、第1及び第2の標的配列は、欠失が起こることを避けるため、異なるスペーサー配列を含む。結果として、(ライブラリをコードするベクターにある)基質上の同一の標的配列及び合成配列を組換えることにより、組換えが置換に対して変化する。ここで、ネガティブ選択マーカークを合成配列で組換えることにより置換する。

【0071】

好ましい実施態様において、合成配列は複製欠損プラスミドである(例えば、図4及び5も参照されたい)。しかしながら、代替の実施態様において、線状DNA鎖を使用する。別の好ましい実施態様において、合成配列は高コピー数プラスミド上にある(例えば図14を参照されたい)。

【0072】

置換をもたらすDNA組換え酵素をさらに選択するため、合成配列は、好ましくは第1及び第2の標的の間ポジティブ選択マーカークを含む。組換えが起こる場合、ポジティブ選択マーカークを有する配列を発現ベクターに挿入し、かつポジティブ選択マーカークを有する発現ベクターをポジティブ選択することができる。一実施態様において、ポジティブ選択マーカークは抗生物質耐性遺伝子である。従って、ベクターの細胞への導入後、ポジティブ選択マーカークを有するベクターを含む細胞を、容易に選択することができる。

【0073】

(DRiGRについての)一実施態様において、ベクターは第1及び第2の標的部位の間ネガティブ選択マーカークを有し、合成配列は第1及び第2の標的部位の間ポジティブ選択マーカークをさらに含む。

【0074】

他のネガティブ及びポジティブ選択マーカークは、当業者に公知である。さらに適用可能なネガティブ選択マーカークには、URA3(5-フルオロオロト酸を毒性化合物である5-フルオロウラシルに変換する)又はウイルスチミジンキナーゼ(宿主をガンシクロビル選択に感受性にする)のような毒素をコードする遺伝子又はプロドラッグを毒性薬物に変換する遺伝子をコードする酵素をコードする遺伝子がある。更に適用可能なポジティブ選択マーカークは、栄養要求性を補充することができる酵素をコードする遺伝子である。

【0075】

分子進化の一工程は、好ましくは少なくとも1つの選択工程及び少なくとも1つの突然変異誘発工程を含む。選択した分子を選択工程の間で「進化」させるため、選択した候補を好ましくは突然変異誘発し、その結果突然変異を配列に導入して次のラウンドの選択で試験する。突然変異誘発の好適な方法は当業者には公知であり、特に誤りを起こしやすいPCR、化学的突然変異誘発、特異的突然変異宿主種の使用、再帰的アンサンブル突然変異誘発、コンビナトリアルカセット突然変異誘発、及びDNAシャッフル、並びにこれらの方法の組合わせを含む。

【0076】

1以上、好ましくは5~50、好ましくは8~30サイクルの共進化を好ましくは実施し、標的部位に対する活性を有するDNA組換え酵素が進化するまでこれを行う。

10

20

30

40

50

【0077】

本発明のいくつかの実施態様において、共進化工程b)をDNA組換え酵素の既存のライブラリに直接実施することができる。

【0078】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、工程b)で使用するDNA組換え酵素の2つのライブラリを取得するための、以下のさらなる工程を含む。ここで、工程a)は、さらに工程a1)と呼ぶ。

a2) DNA組換え酵素の既知の標的部位の部分部位となる4つの配列を同定する工程(ここで、第1の配列は(a1)に従って選択する)第1の標的部位の第1の部分部位と相同であり、第2の配列は(a1)に従って選択する)第1の標的部位の第2の部分部位と相同であり、第3の配列は(a1)に従って選択する)第2の標的部位の第1の部分部位と相同であり、第4の配列は(a1)に従って選択する)第2の標的部位の第2の部分部位と相同である)。

10

【0079】

選択する工程a1)及び同定する工程a2)は、好ましくは一工程a)で、例えばSeLOXアルゴリズムのようなコンピュータプログラム((Surendranath, V. らの文献(2010))によって同時に実施する。好ましくは対象とする部位の上流及び下流の配列をDNA組換え酵素の既知の標的部位と比較する。各部分部位がDNA組換え酵素の既知の標的部位の部分部位との一定の相同性を有する標的配列は、a1)に記載の通り選択する。この方法において同定する公知の標的部位の部分部位は、a2)で言及する部位である。相同性の度合いは好ましくはa1)で言及した通りである。

20

【0080】

(工程a3):)

この工程において、工程a2)で同定する部分部位及び工程a1)で選択する標的部位の間の混合物である、中間標的部位を好ましくは作製する。

【0081】

a1)で選択する標的部位とは異なる(a2)で定義した)第1~第4の配列中のヌクレオチドを決定し、かつ標的部位の対応する部分部位に出現するヌクレオチドが異なる1以上、好ましくは最大3つのヌクレオチドを置換することにより、好ましくは中間標的部位を作製する。

30

【0082】

各中間標的部位上のDNA組換え酵素の分離した分子指向性進化についての一実施態様において、中間標的部位は対称であり、従ってこれらは同一又は逆相補的部分部位を含む。この実施態様において、好ましくは4つの中間標的部位のセットを作製する 標的部位の各部分部位について1つの中間標的部位をa1)で選択する。

【0083】

DNA組換え酵素の共進化についての別の実施態様において、好ましくは2つの非対称中間標的部位のセットを作製する。第1の中間第1標的部位は、(工程a1)で選択する)第1の標的部位の第1の部分部位中に出現するヌクレオチドによってヌクレオチドが置換される(a2)で規定する)第1の配列に対応する1つの配列、及び(a1)で選択する)第1の標的部位の第2の部分部位中に出現するヌクレオチドによってヌクレオチドが置換される(a2)で規定する)第2の配列に対応する配列を含む。第2の中間標的部位は、(工程a1)で選択する)第2の標的部位の第1の部分部位中に出現するヌクレオチドによってヌクレオチドが置換される(a2)で規定する)第3の配列に対応する配列、及び(工程a1)で選択する)第2の標的部位の第2の部分部位中に出現するヌクレオチドによってヌクレオチドが置換される(a2)で規定する)第4の配列に対応する配列を含む。

40

【0084】

(工程a4):)

工程a2)で規定する配列を認識するDNA組換え酵素に対し、第1の中間標的部位及び/又は第2の中間標的部位を含む核酸を基質として使用して、分子指向性進化法を適用する。

50

【0085】

一実施態様において、核酸は第1の中間標的部位及び第2の中間標的の両方を含み、DNA組換え酵素の直接的進化を両方の中間標的部位に対し実施する（直接的共進化）。共進化は好ましくは工程b)について先に記載の通りに実施する。

【0086】

好ましい実施態様において、分子指向性進化法の第1ラウンドを各中間標的部位についてDNA組換え酵素の分離分子指向性進化法（separated molecular directed evolution）（分離進化法）として実施する（例えば、図8を参照されたい）。さらなる実施態様において、これらに続き、1以上の共進化工程を行う。

【0087】

分子指向性進化法の工程は、好ましくは中間標的部位に対する組換えのポジティブ選択を行うこと、及び/又は他の標的部位に対する組換えに対しネガティブ選択を行うことを含む。

【0088】

選択した分子を選択工程の間で「進化」させるため、選択した候補を好ましくは突然変異誘発し、その結果突然変異を配列に導入して次のラウンドの選択で試験する。突然変異誘発の好適な方法は当業者には公知であり、特に誤りを起こしやすいPCR、化学的突然変異誘発、特異的突然変異宿主種の使用、再帰的アンサンプル突然変異誘発、コンビナトリアルカセット突然変異誘発、及びDNAシャッフル、並びにこれらの方法の組合わせを含む。

【0089】

1以上、好ましくは8~40、好ましくは15サイクルの分子指向性進化法を好ましくは実施し、中間標的部位に対する活性を有するDNA組換え酵素が進化するまでこれを行う。

【0090】

利用する分子指向性進化法は、好ましくは基質に関連したタンパク質の進化、特にWO 2002044409 A2に記載された通りである。しかしながら、他の指向性進化戦略、例えば継続的進化（WO2012088381 A2）も適用することができる。

【0091】

続いて好ましくは中間標的部位のさらなるセットを配列を（a1）で選んだ）標的部位の部分部位にさらに適応させることにより、標的部位の対応する部分部位に出現するヌクレオチドの分だけ異なる、好ましくは1以上の、最大3ヌクレオチドを置換することにより作製する。

【0092】

分子指向性進化法の下位工程である中間標的部位のシャッフル及びそのさらなるセットの作製は、好ましくは中間標的部位が（a1）で選択した）標的部位の部分部位からの部分部位当たり1~3、好ましくは1又は2ヌクレオチドのみの分だけ差がつくまで実施する。

【0093】

置換を誘導するDNA組換え酵素（DRiGR）を取得するために好ましい一実施態様において、工程b)を分子進化法の3つの下位工程において実施する。

【0094】

第1の工程において、ライブラリ（複数可）を人工配列を用いずに（従って、ドナーベクターを用いずに）先にDRiGDについて記載した通りに進化させ、標的部位に対する少なくともいくつかの活性を示すリコンビナーゼ、従って少なくとも切除活性を示すDNA組換え酵素を選択する。この第1工程を好ましくは、最初に中間標的部位の第1のセット、及び続いて任意に中間標的部位の第2のセット、及び最後に最終標的部位に対して先に記載の通り実施する。

【0095】

第2の工程において、工程i)の結果として得られるDNA組換え酵素のライブラリ（複数可）を、抗生物質耐性遺伝子のようなポジティブ選択マーカーを有する人工配列を使用して進化させる。人工配列は、好ましくは複製欠損ドナーベクターである。従って、宿主細胞

10

20

30

40

50

において活性を有する複製起点を有さないプラスミド又は線状配列を使用する（図9に例示されている）。第2の工程は好ましくは最終標的的部位に対して実施する。第2の工程において、（純粋な切除よりも複雑な反応である）DRiGRによって配列を置換することができるDNA組換え酵素を選択する。好ましくは5～20サイクル、より好ましくは8～15サイクルの基質連関分子進化法を実施し、最終標的的部位に対する活性を有する酵素を得るまでこれを行う。複製欠損ドナーベクターの抗生物質選択マーカーと組み合わせた使用により、第1の標的的部位に対する第1の組換え反応（統合）を第2の標的的部位に対する第2の組換え反応（切除）から分離することが可能となり、これはDRiGR反応の成功に必要である。

【0096】

第3の工程において、分子進化法をポジティブ選択マーカーを含まない人工配列を用いた、工程ii)の結果として得られるDNA組換え酵素のライブラリ（複数可）により実施する。人工配列は、好ましくは使用した宿主細胞において活性を有する機能的複製起点を担持するドナーベクターである（図14に例示されている）。第3の工程は好ましくは最終標的的部位に対して実施する。好ましくは5～20サイクル、より好ましくは8～15サイクルの基質連関分子進化法を実施し、最終標的的部位に対する活性を有する酵素を得るまでこれを行う。この第3の工程において、標的的部位1及び標的的部位2に対する同等の組換え速度論を有し、ポジティブ選択マーカーを必要としない、高い置換活性を示すDNA組換え酵素を選択する。これは、ポジティブ選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）の存在が不利な選択肢となる多くの使用（特に、医学的使用、又は改変配列を有する多細胞生物を作製する場合も）に関して重要な点である。

【0097】

この3工程の方法は、特に標的的部位間に同酵素又は特に2～3つ（又は最大5つさえも）の異なる制限酵素の1つ又はいくつかの認識部位を含むベクターと組合わせた場合、置換を誘導する酵素（DRiGR）を選択するのに非常に効率的であることが示されている。

【0098】

一般に、この明細書の全体を通して、「ベクター」という用語は、それが連結されている核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターには、これらに限定はされないが、一本鎖、二本鎖、又は部分的に二本鎖の核酸分子；1以上の自由末端を含み、自由末端を有さない（例えば、環状）の核酸分子；DNA、RNA、又はこれら両方を含む核酸分子；及び当技術分野で公知の他の様々なポリヌクレオチドがある。ベクターの1種に「プラスミド」がある。これは例えば標準的分子クローニング技術により追加のDNAセグメントをその内部に挿入することができる環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターにウイルスベクターがある。これは、ベクター中にウイルス由来DNA又はRNA配列が存在し、パッケージングしてウイルスとなるものである（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス AAV）。また、ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためにウイルスが担持するポリヌクレオチドを含む。あるベクターはそれらが導入された宿主細胞中で自律複製することができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム型の哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム型哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入に際して宿主細胞のゲノムに統合され、それにより宿主ゲノムとともに複製される。

【0099】

さらに、あるベクターは、それらが作用可能に連結された遺伝子の発現を導くことができる。そのようなベクターを、本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。組換えDNA技術において有用となる一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態をとることが多い。

【0100】

発現ベクターは好ましくはプラスミド、ウイルス、又は人工染色体である。

【0101】

本発明のもう1つの目的は、ベクター又は方法において使用するベクターである。

【0102】

10

20

30

40

50

好ましい発現ベクターは：

- i) 各々DNA組換え酵素の（異なる）ライブラリをコードする1、2、3、又は4つの遺伝子（ここで、ライブラリをコードする遺伝子は、同じプロモーターの制御下にある）
- ii) 好ましくは発現ベクター中にたった1回だけ出現する制限酵素の認識部位（固有の認識部位）である、ネガティブ選択マーカーを縁取る第1の標的部位及び第2の標的部位を含む基質核酸、を含む。

【0103】

対象とする部位の欠失を誘導するDNA組換え酵素（DRiGD）を選択するためには、さらなる基質DNAは必要とされない。発現ベクターの第1の中間標的部位及び第2の中間標的部位の間での組換えが、単独で引き起こされるためである。

10

【0104】

所望の配列により、対象とする部位の置換を誘導するDNA組換え酵素（DRiGR）を選択するために、第1の中間標的部位及び/又は第2の中間標的部位を含む、好ましくは合成核酸（好ましくは複製欠損プラスミド）を追加の（ドナー）ベクターとして使用する。好ましくは、ポジティブ選択マーカーは、第1及び第2の中間標的部位の間にある。従って、第1及び第2の中間標的部位は、好ましくは抗生物質耐性遺伝子のようなポジティブ選択マーカーを縁取る。

【0105】

DNA組換え酵素を調製するための本発明の方法であって：

- c) ライブラリから工程b)において得られた少なくとも1つのDNA組換え酵素の核酸を単離する工程；及び好ましくは
- d) 工程c)で得られた核酸を好適な送達ベクターにクローニングする工程、をさらに含む得る。

20

【0106】

また、本発明は本発明の方法によって得られるデザイナーDNA組換え酵素を含む。

【0107】

提示された発明により、本発明者らは柔軟で欠点のない遺伝子情報の改変を可能にする組換えベースのゲノム編集の解決策を提供する。この方法を用いると、特にヒト疾患を引き起こす遺伝的突然変異を置換し、又は所定の遺伝物質を細胞から抹消するDNA組換え酵素を作製することが可能になる。従って、本発明のDNA組換え酵素を使用して、ヌクレオチド配列を改変し、特に突然変異を修復し、又はゲノム由来配列若しくはウイルスによって導入された配列を抹消する。本発明により修復することができる突然変異は、特に点突然変異、フレームシフト突然変異、欠失、及び挿入を含む。

30

【0108】

DNA組換え酵素は宿主細胞のゲノム、宿主臓器、又は宿主生物、又はウイルスのような病原体のゲノムさえも含む、ゲノム中に天然に出現する標的配列を使用することができる点で有利である。本発明の利点は、宿主DNA修復経路を引き入れることなくDNAの正確な部位指定的改変を可能とし、それによりランダムな挿入及び欠失（挿入欠失）を誘導することなく機能することである。

【0109】

従ってまた、本発明は同一でない天然に出現する標的部位に対して部位特異的組換えを誘導することによって、ゲノムを改変する方法を含む。方法は、タンパク質自体を送達するか、又はそれをコードするヌクレオチド配列を導入し、mRNA又はDNAの鋳型からこれを発現させることにより、宿主中に本発明のDNA組換え酵素を送達することを含む。

40

【0110】

先に定義した「天然に出現する」とは、標的部位が人為的に導入されず 同じゲノム中にネイティブに存在することを意味する。

【0111】

好適な宿主細胞は、特に造血幹細胞、神経幹細胞、脂肪組織由来幹細胞、胎児性幹細胞、臍帯幹細胞、誘導性複能性幹細胞、及び胚性幹細胞のような幹細胞を含む真核生物細胞

50

である。ヒト胚性幹の場合、好ましくは胚を破壊したものに由来しない細胞が存在する。さらに、宿主細胞でのヒト生殖細胞系列及びヒト配偶子の改変は、好ましくは除外される。

【0112】

本発明のDNA組換え酵素の送達に好適な宿主臓器は、骨髄、皮膚、筋肉、肝臓、肺、リンパ節、及び脾臓を含む体内の任意の細胞を含む。

【0113】

本発明の方法により、インビトロ（生きた生物の体外）又はインビボで実施することができる。インビトロには、単離した細胞及び/又は臓器の操作を含む。

【0114】

一態様において、本発明は先に記載の通り、ゲノム中で対象とする配列を置換、又は欠失させる方法を提供する。

【0115】

一態様において本発明は、対象とする配列（例えば、遺伝子又はエキソン）をロックアウトし、又は改変配列（例えば、導入遺伝子）を有する細胞又は（好ましくは非ヒト）多細胞生物を作製するための、本発明のDNA組換え酵素の（好ましくは、非治療的）使用に関する。

【0116】

この方法において、本発明のDNA組換え酵素又は本発明の酵素をコードする遺伝子（単量体1つ当たり1つの遺伝子）を送達方法により細胞又は生物に導入する。

【0117】

本発明のデザイナーDNA組換え酵素は、ゲノム中の対象とする配列を縁取る2つの同一でない標的部位での部位特異的組換えを誘導する。

【0118】

対象とする配列（例えば、挿入配列又はウイルス配列）を欠失させるための部位特異的組換え（DRiGD）を誘導することによって、ゲノムを改変するためには、追加のDNA又はRNAを要さない。

【0119】

対象とする配列（例えば、点突然変異）を置換するための部位特異的組換え（DRiGR）を誘導することによって、ゲノムを改変するためには、本発明のDNA組換え酵素に加え、所望の配列（ドナーDNA）を含む合成配列を宿主にさらに導入する。合成配列は、対象とする配列と置換する所望の配列（ドナーDNA）を含み、ここで所望の配列は本発明のDNA組換え酵素によって認識される第1の標的部位及び第2の標的部位に隣接する。

【0120】

別の態様において、本発明は生化学シグナル伝達経路関連遺伝子及びポリヌクレオチドから選択される突然変異した、若しくは改変された疾患関連遺伝子若しくはポリヌクレオチド、又は突然変異した、若しくは改変された配列を含む真核生物細胞モデルを作製する方法を提供する。これらの遺伝子及びポリヌクレオチドの例は、以下の表A~Cに列記する。

【0121】

本発明のもう1つの適用は、特に突然変異を導入し、又は好ましくはヒト疾患に対応する特定の突然変異を有し、かつ/若しくはヒト化配列を有するヌクレオチド配列を導入し若しくは置換することによって、ゲノム中の対象とする配列を特異的に改変すること、例えば真核生物細胞モデル又は動物モデルを作製することである。この方法を用いると、ランダムな挿入及び欠失（挿入欠失）又は他の望まない遺伝物質の制御の効かない改変を誘導することなく動物モデルを目的としてこれを作製することが可能となる点で有利である。いくつかの実施態様において、導入された突然変異は疾患を有し、又は発症するリスクの増加と関連付けられる。

【0122】

好ましい実施態様において、本発明の方法を使用して、生物医学研究に有用な動物モデ

10

20

30

40

50

ル、例えばヒト疾患のモデルを作製する。本発明を動物において実施する場合、好ましくは動物の非治療的使用のために実施する。

【0123】

好適な宿主生物には、無脊椎動物及び脊椎動物、特にウシ科 (Bovidae)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、メダカ、ゼブラフィッシュ、ハツカネズミ (*Mus musculus*)、ドブネズミ (*ratus norvegicus*)、又はこれらの生物の胚がある。

【0124】

しかしながら、植物及び真菌並びにそれらの細胞も、宿主として使用することができる。

10

【0125】

いくつかの実施態様において、本明細書に記載の1以上のベクターを使用して、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を生産する。いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は、哺乳動物、例えばマウス、ラット、又はウサギである。ある実施態様において、生物又は対象は、植物である。ある実施態様において、生物又は対象又は植物は、藻類である。トランスジェニック植物及び動物を生産するための方法は当技術分野で公知であり、一般的に細胞トランスフェクションの方法を用いて開始する。トランスジェニック植物、特に穀物及び藻類と同様に、トランスジェニック動物も提供する。トランスジェニック動物又は植物は、疾患モデルの提供以外の適用において有用となり得る。これらは、例えば野生型に通常見られるよりも高いタンパク質の発現、糖類、栄養分、又はビタミンのレベルを通じた食物又は食餌の生産を含み得る。この観点では、トランスジェニック植物、特に豆類及びジャガイモ、並びに動物、特に家畜などの哺乳動物 (ウシ、ヒツジ、ヤギ、及びブタ) に加え、家禽及び食用昆虫が好ましい。

20

【0126】

DNA組換え酵素の宿主への導入及び発現のために、送達ベクターを使用することができ、あるいは他の送達方法、例えばDNA、mRNA、又はリボソーム若しくはナノ粒子中に封入されたタンパク質 (例えば、Wang Mらの文献、(2016)) に記載されている)、又はエクスピボでのエレクトロポレーション、又は細胞圧搾物も適用可能である。

【0127】

使用する送達方法は、対象とする配列を改変したい宿主、宿主細胞、又は宿主中の標的組織に応じて決まる。

30

【0128】

また、使用する送達ベクターの選択は、対象とする配列を改変したい宿主、宿主細胞、又は宿主中の標的組織に応じて決まる。好適な送達ベクターは当業者に公知であり、プラスミド、人工染色体、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、スプマウイルスベクター、及びアデノウイルスベクターに加え、シャトルベクターを保有するアグロバクテリウムがある。また、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルス、並びにこれらのベクターの型 (特に、アデノ随伴ウイルスベクター) を含む送達ベクターを選択して、特定の種類の細胞又は組織に標的化することができる点で有利である。

【0129】

送達ベクターは、好ましくは調節エレメントを含む。「調節エレメント」という用語は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位 (IRES)、及び他の発現制御エレメント (例えば、転写終結シグナル、例えばポリアデニル化シグナル及びポリU配列) を含むことを意図する。いくつかの実施態様において、調節エレメントは細胞、細菌、ウイルス、又はハイブリッドプロモーターであり、ここで該プロモーターは好ましくは構成的又は誘導性プロモーターである。また、プロモーターは好ましくは宿主、宿主細胞、又は宿主中の標的組織に応じて選択する。また、好適なプロモーターは当業者に公知である。好ましい構成的プロモーターは、サイトメガロウイルス、ラウス肉腫ウイルス、マウス白血病ウイルス関連レトロウイルス、ホスホグリセロキナーゼ遺伝子、マウス脾臓フォーカス形成ウイルス、又はヒト伸長因子1 のプロモーターから選択する。

40

50

【0130】

また、対象とする配列の置換 (DRiGR) のために、送達ベクターは好ましくは本発明のデザイナー-DNA組換え酵素によって認識される2つの同一でない標的部位を含むドナー配列を含み、ここで標的部位は対象とする配列と置換する所望の配列 (ドナー-DNA) を縁取り、ここで所望の配列は第1の標的部位及び第2の標的部位に隣接する。

【0131】

あるいは、ドナー配列は分離した核酸分子又はベクター (例えば、複製欠損プラスミド) 上に提供する。

【0132】

また、本発明は本発明のデザイナー-DNA組換え酵素をコードする核酸又はベクターを含む。好ましい施態様において、本発明のデザイナー-DNA組換え酵素の単量体をコードする核酸は、1つの核酸分子又は1つのベクターである。好ましくはデザイナー-DNA組換え酵素の単量体は、1つのプロモーター又は他の調節エレメントの制御下で発現させる。

【0133】

また、本発明は：

1. 本発明のデザイナー-DNA組換え酵素をコードする先に記載の発現ベクター又は送達ベクター (ここで、本発明のデザイナー-DNA組換え酵素は、ゲノム中で対象とする配列を縁取る2つの同一でない標的部位で、部位特異的組換えを誘導する)
2. 対象とする配列と置換する所望の配列 (ドナー-DNA) を縁取る同じ2つの同一でない標的部位を含むドナー配列である、ヌクレオチド配列 (ここで、所望の配列は第1の標的部位及び第2の標的部位に隣接する)、及びDNA組換え酵素の発現、を有する細胞に形質導入するための方法を含む。

【0134】

ドナー配列は発現ベクター若しくは送達ベクターに配置することができ、又は分離した核酸、好ましくは複製欠損プラスミドとして提供する。好ましくはドナー配列を細胞当たり複数のコピーで提供し、標的配列の置換率を増加させる (図3も参照されたい)。

【0135】

さらなる態様において、本発明は：

- i) 本発明のデザイナー-DNA組換え酵素、又は本発明のデザイナー-DNA組換え酵素をコードする核酸若しくはベクター (ここで、本発明のデザイナー-DNA組換え酵素は、ゲノム中で対象とする配列を縁取る2つの同一でない標的部位で、部位特異的組換えを誘導する)
- ii) 対象とする配列と置換する所望の配列 (ドナー-DNA) を縁取る同じ2つの同一でない標的部位を含むドナー配列である、ヌクレオチド配列 (ここで、所望の配列は第1の標的部位及び第2の標的部位に隣接する)、を含むセット又はキットに関する。好ましくはドナー配列を細胞当たり複数のコピーで提供し、標的配列の置換率を増加させる (図3も参照されたい)。

【0136】

ここでも、ドナー配列は (本発明のデザイナー-DNA組換え酵素をコードする) 同じベクターに配置され、又は分離した核酸、好ましくは複製欠損プラスミドとして提供する。

【0137】

一般的に、本発明の置換 (DRiGR) については、ドナー配列上の所望の配列は、好ましくは対象とする配列に対応する配列であるが、ここで突然変異は野生型配列 (遺伝子若しくはエキソンのようなその部分) 又はその機能的パリアント (例えば、サイレント突然変異若しくは活性を増加させる突然変異) によって置換される。

【0138】

本発明のさらに重要な部分は、本発明のDNA組換え酵素、本発明の核酸若しくはベクター、又は本発明のセット/キットの医学的応用性である。

【0139】

医学的応用性について、対象とする配列は、疾患を治療するように改変され、又は少なくとも症状を軽減し、若しくは寿命を延長させる「疾患関連」遺伝子又はポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドである。

【0140】

一態様において、本発明はインビトロ方法に関する。この方法において、本発明は先に記載の単離された細胞又は臓器に適用する。

【0141】

別の態様において、本発明は、対象、好ましくはヒト又は動物の治療方法であって、本発明のDNA組換え酵素、本発明のデザイナーDNA組換え酵素をコードする核酸若しくはベクター、又は本発明のセットを適用する工程を含む、前記方法に関する。

【0142】

送達方法及びベクターは、好ましくは先に記載の通り選択する。

10

【0143】

一実施態様において、治療すべき対象は、対象を疾患に罹患させるヌクレオチド配列（対象とする配列）、特に遺伝子産物の機能の低下又は機能の喪失を引き起こす突然変異、例えば血友病を引き起こす第IX因子遺伝子中の突然変異を保有する。本発明のDNA組換え酵素、それをコードする核酸又はベクター、及び遺伝子の野生型又は他の機能的バリエーションである所望の配列を担持するドナー配列（又はエキソンのようなその部分）の送達により、遺伝子の突然変異した部分を所望の（機能的）配列によって置換する。部位特異的組換えを可能にするために、ドナー配列中の所望の配列をDNA組換え酵素の標的部位によって隣接させる。

【0144】

20

別の実施態様において、治療すべき対象は、疾患を引き起こすヌクレオチド配列（対象とする配列）を保有し、阻害によりその症状が低減する。ここで、対象とする配列は、本発明の方法を適用し、本発明のDNA組換え酵素、それをコードする核酸、又はベクターを送達することにより、欠失する。ここで、対象とする配列は、特に病原体（細菌、ウイルス、又は寄生虫のような微生物）又は癌遺伝子又は別の遺伝子の配列であり、ここでその活性は疾患を引き起こし、又は（例えばPCSK9をコードする遺伝子のような）その遺伝子活性の阻害は、症状を低減させることが知られている。

【0145】

さらに本発明は本発明のDNA組換え酵素、本発明のデザイナーDNA組換え酵素をコードする核酸若しくはベクター、又は本発明のセット並びに好適な担体を含む医薬組成物を含む。

30

【0146】

本発明によるDNA組換え酵素によって標的化される対象とする配列は、真核生物細胞にとって内因の又は外因の任意のポリヌクレオチドとすることができる。例えば、対象とする配列は、核、又は真核生物細胞のミトコンドリア、又は宿主細胞のゲノムに統合されたか否かによらず、ウイルスの内にあるポリヌクレオチドとすることができる。対象とする配列は、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列又は非コード配列（例えば、イントロン又は調節ポリヌクレオチド）とすることができる。

【0147】

本発明のDNA組換え酵素によって標的化される対象とする配列は、多数の疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチド並びに生化学シグナル伝達経路関連遺伝子及びポリヌクレオチドを含み得る。

40

【0148】

「疾患関連」遺伝子又はポリヌクレオチドとは、疾患に罹患した組織由来の細胞において非疾患対照の組織又は細胞と比較して、転写産物又は翻訳産物を異常なレベルで、又は異常な形態で生産する任意の遺伝子又はポリヌクレオチドを指す。疾患関連遺伝子は、異常に高レベルで発現する遺伝子であり得る；疾患関連遺伝子は、異常に低レベルの発現状態になる遺伝子であり得る。ここで、発現の変化は疾患の発生及び/又は進行と関連する。また、疾患関連遺伝子は、突然変異（複数可）又は疾患の病因となる遺伝子（複数可）に直接寄与し、又はこれと連鎖不平衡にある遺伝的変動を有する遺伝子を指す。転写産物

50

又は翻訳産物は、公知であっても公知でなくてもよく、そのレベルは正常であっても異常であってもよい。疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチドの例は、McKusick-Nathans遺伝医学研究所 (Institute of Genetic Medicine)、Johns Hopkins大学 (Baltimore, Md.) 及び国立生物技術情報センター (National Center for Biotechnology Information)、国立医学図書館 (National Library of Medicine) (Bethesda, Md.) から入手可能であり、これらはワールドワイドウェブで利用可能である。

【0149】

本発明のDNA組換え酵素によって標的化される対象とする配列は、多数の疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチド並びに生化学シグナル伝達経路関連遺伝子及びその内容の全体が参照により本明細書に組み込まれている米国特許US8697359 B1に列記されているポリヌクレオチドを含み得る。

10

【0150】

疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチドの例は、表A及びBに列記されている。疾患の具体的な情報は、McKusick-Nathans遺伝医学研究所、Johns Hopkins大学 (Baltimore, Md.) 及び国立生物技術情報センター、国立医学図書館 (Bethesda, Md.) から入手可能であり、これらはワールドワイドウェブで利用可能である。生化学シグナル伝達経路関連遺伝子及びポリヌクレオチドの例は、表Cに列記されている。

【0151】

これらの遺伝子の突然変異及び経路は、機能に影響を及ぼす異常なタンパク質又は異常な量のタンパク質の生産をもたらし得る。遺伝子のさらなる例において、疾患及びタンパク質は、米国仮出願からの参照により本明細書に組み込まれている。そのような遺伝子、タンパク質、及び経路は、本発明のDNA組換え酵素の標的となる対象とする配列とし得る。

20

【0152】

【表 1】

表 A	
疾患/障害	遺伝子
腫瘍	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR α ; PPAR γ ; WT1 (ウィルムス腫瘍); FGF 受容体ファミリーメンバー (5つのメンバー: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (網膜芽細胞腫); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (アンドロゲン受容体); TSG101; IGF; IGF 受容体; Igf1 (4つのバリエーション); Igf2 (3つのバリエーション); Igf 1 受容体; Igf 2 受容体; Bax; Bcl2; カスパーゼファミリー (9つのメンバー: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
加齢黄斑変性症	Aber; Ccl2; Cc2; cp (セルロプラスミン); Timp3; カテプシン D; Vldlr; Ccr2
統合失調症	ニューレグリン1 (Nrg1); Erb4 (ニューレグリン受容体); コンプレキシン1 (Cplx1); Tph1 トリプトファンヒドロキシラーゼ; Tph2 トリプトファンヒドロキシラーゼ 2; ニューレキシン1; GSK3; GSK3a; GSK3b
障害	5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
トリプレット リピート病	HTT (ハンチントンDx); SBMA/SMAX1/AR (ケネディDx); FXN/X25 (フリートラ イヒ運動失調症); ATX3 (マチャドジョセフ Dx); ATXN1 及び ATXN2 (脊髄小脳 失調症); DMPK (筋緊張性ジストロフィー); アトロフィン-1 及び Atn 1 (DRPLA Dx); CBP (Creb-BP-全不安定性); VLDLR (アルツハイマー); Atn7; Atn10
脆弱X症候群	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
セクレーターゼ 関連障害	APH-1 (α 及び β); プレセニリン (Psen1); ニカストリン (Ncstn); PEN-2
その他のプリオン 関連障害	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2, Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
薬物中毒	Prkce (アルコール); Drd2; Drd4; ABAT (アルコール); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (アルコール)
自閉症	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; ニューレキシン1; 脆弱 X (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
アルツハイマー病	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM; クラスチリン; PS1; SORL1; CR1; Vld1r; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, アクアポリン 1); Uchl1; Uchl3; APP
炎症	1L-10; IL-1 (1L-1a; IL-1b); 1L-13; IL-17 (IL-17a, CTLA8); IL-17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3er1; ptpn22; TNFa; IBD についての NOD2/CARD15; IL-6; 1L-12 (1L- 12a; 1L-12b); CTLA4; Cx3cl1
パーキンソン病	x-シヌクレイン; DJ-1; LRRK2; パーキン; PINK1

【 0 1 5 3 】

【表 2】

表 B		
疾患/障害	遺伝子	
細胞の調節不全 及び腫瘍性 疾患及び 障害	B細胞非ホジキンリンパ腫(BCL7A, BCL7); 白血病 (TAL1 TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, OX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, AF10, ARH-GEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, NF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR,CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN).	10
炎症性及び 免疫関連 疾患及び 障害	AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1); 自己免疫性リンパ増殖症候群 (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A); 複合型免疫不全症, (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228), HIV感受性または感染症 (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCKR5 (CCR5)); 免疫不全症 (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI); 炎症 (IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8)), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f, IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, OD2/CARD15 for IBD, IL-6, IL-12 (IL-12a, IL-12b), CTLA4, Cx3cl1); 重度の複合型免疫不全症 (SCIDs) (JAK3, JAKL, DCL-RE1C, ARTEMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4).	20
代謝、肝臓、 腎、及びタンパク質 疾患及び 障害	アミロイド神経障害 (TTR, PALB); アミロイドーシス (APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB); 肝硬変 (KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988); 嚢胞性線維症 (CFTR, ABCC7, CF, MRP7); グリコーゲン貯蔵疾患 (SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM); 肝腺腫, 142330 (TCF1, HNF1A, MODY3), 肝不全、早期発症型 及び 神経障害 (SCOD1, SCO1), 肝リパーゼ不全症 (LIPC), 肝芽腫、癌及び癌 (CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5; 髄質性嚢胞性腎疾患 (UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2); フェニルケトン尿症 (PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS); 多嚢胞性腎及び肝疾患 (FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS,	30

	PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63).	
筋/骨格疾患及び障害	ベッカー型筋ジストロフィー (DMD, BMD, MYF6), デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD, BMD); エメリ・ドレフェス型筋ジストロフィー (LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A); 顔面肩甲上腕筋ジストロフィー (FSHMD1A, FSHD1A); 筋ジストロフィー (FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPN1, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1); 大理石骨病 (LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1); 筋萎縮症 (VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1).	10
神経性及び神経疾患及び障害	ALS (SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF (VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c)); アルツハイマー病 (APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLA2, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3); 自閉症 (Mecp2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, ニューレキシン1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2); 脆弱X症候群 (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); ハンチントン病及びハンチントン病様障害 (HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); パーキンソン病 (NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDJ, DBH, NDUFV2); レット症候群 (MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-シヌクレイン, DJ-1); 統合失調症 (ニューレグリン1 (Nrg1), Erb4 (ニューレグリンの受容体), コンプレキシン1 (Cplx1), Tph1トリプトファンヒドロキシラーゼ, Tph2, トリプトファンヒドロキシラーゼ2, ニューレキシン1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT (Slc6a4), COMT, DRD (Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBP1, Dao (Dao1)); セクレターゼ関連障害 (APH-1 (α 及び β), プレセニリン (Psen1), ニカストリン, (Ncstn), PEN-2, Nos1, Parp1, Nat1, Nat2); トリプレットリピート病 (HTT (ハンチントン Dx), SBMA/SMAX1/AR (ケネディDx), FXN/X25 (フリートライヒ運動失調症), ATX3 (マチャドジョセフ Dx), ATXN1 及び ATXN2 (脊髄小脳失調症), DMPK (筋緊張性ジストロフィー), アトロフィン-1 及び Atn1 (DRPLA Dx), CBP (Creb-BP - 全不安定性), VLDLR (アルツハイマー), Atn7, Atn10).	20 30
眼疾患及び障害	加齢黄斑変性症 (Aber, Ccl2, Cc2, cp (セルロプラスミン), Timp3, カテプシン D, Vldlr, Ccr2); 白内障 (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8,	40

	CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); 角膜薄濁及びジストロフィー (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 先天性扁平角膜 (KERA, CNA2); 緑内障 (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); レーバー先天黒内障 (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 黄斑ジストロフィー (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2).	10
てんかん-ミオクローヌスラフォラ型、254780	EPM2A, MELF, EPM2, NHLRC1, EPM2A, EPM2B	
デュシェンヌ型筋ジストロフィー、310200	DMD, BMD	
AIDS, 遅進行性/急速進行性	KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1	
AIDS, 急速進行性 609423	IFNG	
AIDS, 抵抗性	CXCL12, SDF1	20
α 1-アンチトリプシン不全症	SERPINA1 [セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (α -1アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー 1]; SERPINA2 [セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (α -1アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー 2]; SERPINA3 [セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (α -1アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー 3]; SERPINA5 [セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (α -1アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー 5]; SERPINA6 [セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (α -1アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー 6]; SERPINA7 [セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (α -1アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー 7];” 及び “SERPLNA6 (セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (α -1アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー 6)	30

【 0 1 5 4 】

【表 3】

表 C		
細胞機能	遺伝子	
PI3K/AKT シグナル伝達	PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2; PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2; ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7; YWHAZ; ILK; TP53; RAF1.; IKBKG; RELB; DYRK1A; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1.; MAP2K1; NFKB1; PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2; TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; HSP90AA1; RPS6KB1	10
ERK/MAPK シグナル伝達	PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1; PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN; EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ; PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1; PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK	20
糖質コルチコイド受容体 シグナル伝達	RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1; MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I; PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2; MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13; RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1; PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1; STAT1; IL6; HSP90AA1	30
軸索誘導 シグナル伝達	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12; IGF1; RAC1; RAP1A; EIF4E; PRKCZ; NRP1; NTRK2; ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKC1;PTK2; CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11; PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1; GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B; AKT3; PRKCA	40
エフリン受容体 シグナル伝達	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; GRK6; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2; DOK1; CDK8; CREB1;	

	PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14; CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4; AKT3; SGK	
アクチン細胞骨格 シグナル伝達	ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6; ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8; F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; VAV3; SGK	10
ハンチントン病 シグナル伝達	PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1.; PRKCZ; HDAC4; TGM2; MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SP1; CAPN2; PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKC1; HSPA5; REST; GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1; GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2; HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A; HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1; PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX; ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3	20
アポトーシスシグナル伝達	PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1; BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB; CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2; CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2; BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK; CASP3; BIRC3; PARP1	30
B細胞受容体 シグナル伝達	RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1; MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9; EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN; GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1	40
白血球血管外遊走 シグナル伝達	ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA; RAC1; RAP1A; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11; MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB; MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK; MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2; CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK; CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9	

インテグリンシグナル伝達	ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAP1A; TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2; CAPN2; P1K3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2; CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3	
急性期反応 シグナル伝達	IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1; TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN; AKT3; IL1R1; IL6	10
PTEN シグナル伝達	ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11; MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA; CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1; MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR; RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1; NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2; GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1	20
p53 シグナル伝達	PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A; BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1; PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9; CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A; HIPK2; AKT1; RIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1; SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN; SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3	
アリアル炭化水素 受容体 シグナル伝達	HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1; SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1; MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1; SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF; CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1; CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1; HSP90AA1	30
生体異物代謝 シグナル伝達	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD; GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1; CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1; NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1; HSP90AA1	40
SAPK/JNKシグナル伝達	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1; GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN;	

	TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; SGK	
PPAr/RXR シグナル伝達	PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN; RXRA; MAPK1; SMAD3;GNAS; IKBKB; NCOR2; ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8; IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A; NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1; ADIPOQ	10
NF-KB シグナル伝達	IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2; KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF; INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10; GSK3B; AKT3;TNFAIP3; IL1R1	10
ニューレグリンシグナル伝達 Wnt & β カテニン シグナル伝達	ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1; MAPK1; TPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI; CDKN1B; STAT5B; PRKD1; MAPK3; ITGA1; KRAS; PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2; ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3; EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL; AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1 CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO; AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A; WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK; LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1; PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFBR1; CCND1; GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; SOX2	20
インスリン受容体 シグナル伝達	PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCZ; MAPK1; TSC1; PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1; SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; RPS6KB1	30
IL-6 シグナル伝達	HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3; MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6	40
肝胆汁うっ滞	PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA; RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8; CHUK; NR1H2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6	40
IGF-1 シグナル伝達	IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2; PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A; YWHAZ;	

	PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3; FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1	
NRF2 媒介型 酸化 ストレス反応	PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1; NQO1; PIK3CA; PRKC1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1; GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1	
肝線維症/肝 星状細胞活性化	EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF; SMAD3; EGFR; FAS; CSF1;NFKB2; BCL2; MYH9; IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8; PDGFRA; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; VEGFA; BAX; IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9	10
PPAR シグナル伝達	EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB; NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14;STAT5B; MAPK3; NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2; PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA; MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1	20
Fc Epsilon RI シグナル伝達	PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD; MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3; VAV3; PRKCA	20
Gタンパク質共役型 受容体シグナル伝達	PRKCE; RAP1A; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; GNAQ;NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3; PRKCA	30
イノシトールリン酸 代謝	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8;PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK	30
PDGF シグナル伝達	EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB;PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2	
VEGF シグナル伝達	ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA	40
ナチュラルキラー細胞 シグナル伝達	PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3;	

	VAV3; PRKCA	
細胞周期 : G1/S チェックポイント調節	HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC; ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RB1; HDAC11; HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; GSK3B; RBL1; HDAC6	
T細胞受容体 シグナル伝達	RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS; NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10; JUN; VAV3	10
デス受容体シグナル伝達	CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8; DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB; CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3; BIRC3	
FGF シグナル伝達	RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4; AKT3; PRKCA; HGF	
GM-CSF シグナル伝達	LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3; ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3; STAT1	20
筋萎縮性側索 硬化症シグナル伝達	BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2; PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1; PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1; APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3	
JAK/Stat シグナル伝達	PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3; STAT1	30
ニコチン酸及び ニコチンアミド 代謝	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2; MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK	
ケモカインシグナル伝達	CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ; CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13; RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1; MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA	
IL-2 シグナル伝達	ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2; JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3	40
シナプス長期 抑制	PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; PRKC1; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKID1; MAPK3; KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA	
エストロゲン受容体 シグナル伝達	TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1; HDAC3; PPARGC1A;	

	RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; MAP2K2; NCOA2;MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2	
タンパク質ユビキチン化 経路	TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3	
IL-10 シグナル伝達	TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; JUN; IL1R1; IL6	10
VDR/RXR 活性化	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; NCOR2; SP1; PRKC1; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA	
TGF- β シグナル伝達	EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5	
Toll様受容体 シグナル伝達	IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK; NFKB1; TLR2; JUN	20
p38 MAPKシグナル伝達	HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS; CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFBR1; MYC; ATF4; IL1R1; SRF; STAT1	
ニューロトロフィン/TRK シグナル伝達	NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; CDC42; JUN; ATF4	
FXR/RXR 活性化	INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; APOB; MAPK10; PPARG; MTPP; MAPK9; PPARGC1A; TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1	30
シナプス長期 増強	PRKCE; RAP1A; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1; PRKC1; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; ATF4; PRKCA	
カルシウムシグナル伝達	RAP1A; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1; CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11; HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4; HDAC6	
EGF シグナル伝達	ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1	40
心血管系における 低酸素シグナル伝達	EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE21; CREB1; ARNT; HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM; VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1	
LPS/IL-1によって仲介される RXR機能の阻害	IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1, MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1	
LXR/RXR 活性化	FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA; NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1; SREBF1; IL1R1;	

	CCL2; IL6; MMP9	
アミロイドプロセッシング	PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2; CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1; PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP	
IL-4 シグナル伝達	AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1; PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; FRAP1; AKT3; RPS6KB1	
細胞周期 : G2/M DNA	EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1;	
損傷チェックポイント調節	BTRC; CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A	10
一酸化窒素シグナル伝達 (心疾患系)	KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; CAV1; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1; VEGFA; AKT3; HSP90AA1	
プリン代謝	NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4; PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C; NT5E; POLD1; NME1	
cAMP 仲介型シグナル伝達	RAP1A; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3; SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4	
ミトコンドリア	SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9;	
機能不全	CASP9; PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3	20
Notchシグナル伝達	HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2; PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4	
小胞体 ストレス経路	HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4; EIF2AK3; CASP3	
ピリミジン代謝	NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B; NT5E; POLD1; NME1	
パーキンソンシグナル伝達	UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7; PARK2; CASP3	
心臓 & β アドレナリンシグナル伝達	GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C	30
解糖/糖新生	HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1	
インターフェロンシグナル伝達	IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3	
Sonic Hedgehogシグナル伝達	ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B	
グリセロリン脂質代謝	PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2	
リン脂質 分解	PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2	40
トリプトファン代謝	SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1	
リシン分解	SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C	
ヌクレオチド除去 修復経路	ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1	
でんぷん及びスクロース 代謝	UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1	

アミノ糖代謝	NQO1; HK2; GCK; HK1	
アラキドン酸代謝	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1	
サーカディアンリズム代謝	CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1	
凝血系	BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3	
ドーパミン受容体シグナル伝達	PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C	
グルタチオン代謝	IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1	10
グリセロ脂質代謝	ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2	
リノレン酸代謝	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1	
メチオニン代謝	DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3A	
ピルビン酸代謝	GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA	
アルギニン及びプロリン代謝	ALDH1A1; NOS3; NOS2A	
エイコサノイドシグナル伝達	PRDX6; GRN; YWHAZ	
フルクトース及びマンノース代謝	HK2; GCK; HK1	
ガラクトース代謝	HK2; GCK; HK1	20
スチルベン、クマリン、及びリグニン生合成	PRDX6; PRDX1; TYR	
抗原提示経路	CALR; B2M	
ステロイドの生合成	NQO1; DHCR7	
ブタン酸代謝	ALDH1A1; NLGN1	
クエン酸回路	IDH2; IDH1	
脂肪酸代謝	ALDH1A1; CYP1B1	
グリセロリン脂質代謝	PRDX6; CHKA	30
ヒスチジン代謝	PRMT5; ALDH1A1	
イノシトール代謝	ERO1L; APEX1	
チトクロームp450による生体異物の代謝	GSTP1; CYP1B1	
メタン代謝	PRDX6; PRDX1	
フェニルアラニン代謝	PRDX6; PRDX1	
プロパン酸代謝	ALDH1A1; LDHA	
セレンアミノ酸代謝	PRMT5; AHCY	
スフィンゴ脂質代謝	SPHK1; SPHK2	40
アミノリン酸代謝	PRMT5	
アンドロゲン及びエストロゲン代謝	PRMT5	
アスコルビン酸及びアルダル酸代謝	ALDH1A1	
胆汁酸生合成	ALDH1A1	

システイン代謝	LDHA	
脂肪酸生合成	FASN	
グルタミン酸受容体 シグナル伝達	GNB2L1	
NRF2-媒介性 酸化ストレス反応	PRDX1	
ペントースリン酸 経路	GPI	
ペントース及びグルクロン酸 相互転換	UCHL1	10
レチノール代謝	ALDH1A1	
リポフラビン代謝	TYR	
チロシン代謝	PRMT5, TYR	
ユビキノン生合成	PRMT5	
バリン、ロイシン、及び イソロイシン分解	ALDH1A1	
グリシン、セリン、及び スレオニン代謝	CHKA	
リシン分解	ALDH1A1	20
疼痛/味、 疼痛	TRPM5; TRPA1, TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2; Trpa1; Pomc; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca; Prkacb; Prkar1a; Prkar2a	
ミトコンドリア機能 発達 神経学	AIF; CytC; SMAC (Diablo); Aifm-1; Aifm-2, BMP-4; Chordin (Chrd); Noggin (Nog); WNT, (Wnt2; Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b; Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16); β -カテニン; Dkk-1; Frizzled 関連タンパク質 ; Otx-2; Gbx2; FGF-8; リーリン; Dab1; unc-86 (Pou4f1又はBrn3a); Numb; Reln	30

【 0 1 5 5 】

また、本発明の実施態様は、遺伝子をノックアウトすること、遺伝子を増幅すること、及び点突然変異、フレームシフト突然変異、欠失、又は挿入を含む特定の突然変異を修復することに関する方法及び組成物に関する。

【 0 1 5 6 】

本発明のさらに別の態様において、本発明を使用して、いくつかの遺伝的突然変異から生じる視覚上の欠陥を修正することができる。

【 0 1 5 7 】

本発明のいくつかのさらなる態様は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) のウェブサイト上で遺伝的疾患のトピック小区分においてさらに記載されている多種多様な遺伝的疾患に関連する欠陥を修正することに関する (ウェブサイトは health.nih.gov/topic/GeneticDisorders にある)。遺伝的脳疾患には、これらに限定はされないが、副腎白質ジストロフィー、脳梁の無形成、アイカルディ症候群、アルパーズ病、アルツハイマー病、パーズ症候群、バッテン病、CADASIL、小脳変性症、ファブリー病、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハンチントン病及び他のトリプレットリピート病 (Triplet Repeat Disorders)、リー症候群、レッシュ・ナイハン症候群、メンケス病、ミトコンドリア筋症、及びNINDS脳梁欠損症を含み得る。これらの疾患は、国立衛生研究所のウェブサイト上で遺伝的脳障害の小区分においてさらに記載されている。

【 0 1 5 8 】

いくつかの実施態様において、状態は新生物であり得る。状態が新生物であるいくつか

10

20

30

40

50

の実施態様において、標的とすべき遺伝子は、表Aに列記された遺伝子のいずれかである（この場合、PTENなどである）。いくつかの実施態様において、状態は加齢性黄斑変性であり得る。いくつかの実施態様において、状態は統合失調症であり得る。いくつかの実施態様において、状態はトリプレットリピート病（Trinucleotide Repeat Disorder）であり得る。いくつかの実施態様において、状態は脆弱X染色体症候群であり得る。いくつかの実施態様において、状態はセクレターゼ関連障害であり得る。いくつかの実施態様において、状態はプリオン関連障害であり得る。いくつかの実施態様において、状態はALSであり得る。いくつかの実施態様において、状態は薬物中毒であり得る。いくつかの実施態様において、状態は自閉症であり得る。いくつかの実施態様において、状態はアルツハイマー病であり得る。いくつかの実施態様において、状態は炎症であり得る。いくつかの実施態様において、状態はパーキンソン病であり得る。

10

【0159】

パーキンソン病と関連するタンパク質の例には、これらに限定はされないが、 α -シヌクレイン、DJ-1、LRRK2、PINK1、パーキン、UCHL1、シンフィリン-1、及びNURR1がある。

【0160】

中毒関連タンパク質の例には、例えばABATがあり得る。

【0161】

炎症関連タンパク質の例には、例えばCcr2遺伝子によってコードされる単球走化性タンパク質-1（MCP1）、Ccr5遺伝子によってコードされるC-Cケモカイン受容体5型（CCR5）、Fcgr2b遺伝子によってコードされるIgG受容体IIb（FCGR2b、別名CD32）、Fcer1gによってコードされるFc ϵ R1g（FCER1g）タンパク質があり得る。

20

【0162】

心血管疾患関連タンパク質の例には、例えばIL1B（インターロイキン1、 β ）、XDH（キサンチンデヒドロゲナーゼ）、TP53（腫瘍タンパク質p53）、PTGIS（プロスタグランジン12（プロスタサイクリン）シターゼ）、MB（ミオグロビン）、IL4（インターロイキン4）、ANGPT1（アンジオタンパク質1）、ABCG8（ATP-結合カセット、サブファミリーG（WHITE）、メンバー8）、又はCTSK（カテプシンK）があり得る。

【0163】

アルツハイマー病関連タンパク質の例には、例えばVLDLR遺伝子によってコードされる超低密度リポタンパク質受容体タンパク質（VLDLR）、UBA1遺伝子によってコードされるユビキチン様修飾因子活性化酵素1（UBA1）、又はUBA3遺伝子によってコードされるNEDD8-活性化酵素E1触媒サブユニットタンパク質（UBE1C）があり得る。

30

【0164】

自閉症スペクトラム障害に関連するタンパク質の例には、例えばBZRAP1遺伝子によってコードされるベンゾジアゼピン受容体（末梢）関連タンパク質（BZRAP1）、AFF2遺伝子によってコードされるAF4/FMR2ファミリーメンバー2タンパク質（AFF2）（別名MFR2）、FXR1遺伝子によってコードされる脆弱X精神遅滞常染色体性ホモログ1タンパク質（FXR1）、又はFXR2遺伝子によってコードされる脆弱X精神遅滞常染色体性ホモログ2タンパク質（FXR2）があり得る。

40

【0165】

黄斑変性症に関連するタンパク質の例には、例えばABCR遺伝子によってコードされるATP結合カセット、サブファミリーA（ABC1）メンバー4タンパク質（ABCA4）、APOE遺伝子によってコードされるアポリポタンパク質Eタンパク質（APOE）、又はCCL2遺伝子によってコードされるケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド2タンパク質（CCL2）があり得る。

【0166】

統合失調症に関連するタンパク質の例には、NRG1、ErbB4、CPLX1、TPH1、TPH2、NRXN1、GSK3A、BDNF、DISC1、GSK3B、及びこれらの組み合わせがあり得る。

【0167】

腫瘍抑制に関与するタンパク質の例には、例えばATM（毛細血管拡張性運動失調症変異

50

型)、ATR(毛細血管拡張性運動失調症及びRad3関連)、EGFR(上皮増殖因子受容体)、ERBB2(v-erb-b2赤芽球性白血病ウイルス性癌遺伝子ホモログ2)、ERBB3(v-erb-b2赤芽球性白血病ウイルス性癌遺伝子ホモログ3)、ERBB4(v-erb-b2赤芽球性白血病ウイルス性癌遺伝子ホモログ4)、Notch1、Notch2、Notch 3、又はNotch4があり得る。

【0168】

セクレターゼ障害に関連するタンパク質の例には、例えばPSENEN(プレセニリンエンハンサー2ホモログ(線虫(C. elegans))、CTSB(カテプシンB)、PSEN1(プレセニリン1)、APP(アミロイド(A4)前駆体タンパク質)、APH1B(前咽頭欠陥1ホモログB(線虫))、PSEN2(プレセニリン2(アルツハイマー病4))、又はBACE1(部位APP-切断酵素1)があり得る。

10

【0169】

筋萎縮性側索硬化症に関連するタンパク質の例には、SOD1(スーパーオキシドジスムターゼ1)、ALS2(筋萎縮性側索硬化症2)、FUS(肉腫内融合)、TARDBP(TAR DNA結合タンパク質)、VAGFA(血管内皮増殖因子A)、VAGFB(血管内皮増殖因子B)、及びVAGFC(血管内皮増殖因子C)、並びにこれらの任意の組合わせがあり得る。

【0170】

プリオン疾患に関連するタンパク質の例には、SOD1(スーパーオキシドジスムターゼ1)、ALS2(筋萎縮性側索硬化症2)、FUS(肉腫内融合)、TARDBP(TAR DNA結合タンパク質)、VAGFA(血管内皮増殖因子A)、VAGFB(血管内皮増殖因子B)、及びVAGFC(血管内皮増殖因子C)、並びにこれらの任意の組合わせがあり得る。

20

【0171】

プリオン障害における神経変性状態に関するタンパク質の例には、例えばA2M(2-マクログロブリン)、AATF(アポトーシス拮抗転写調節因子)、ACPP(酸性ホスファターゼ前立腺型)、ACTA2(アクチン2大静脈平滑筋型)、ADAM22(ADAMメタロペプチダーゼドメイン)、ADORA3(アデノシンA3受容体)、又はADRA1D(1Dアドレナリン受容体に対する1Dアドレナリン作動性受容体)があり得る。

【0172】

免疫欠損症に関連するタンパク質の例には、例えばA2M[2-マクログロブリン]; AANAT[アリアルアルキルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ]; ABCA1[ATP-結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー1]; ABCA2[ATP-結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー2]; 又はABCA3[ATP-結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー3]があり得る。

30

【0173】

トリプレットリピート病に関連するタンパク質の例には、例えばAR(アンドロゲン受容体)、FMR1(脆弱X精神遅滞1)、HTT(ハンチンチン)、又はDMPK(筋強直性ジストロフィータンパク質キナーゼ)、FXN(フラタキシン)、ATXN2(アタキシン2)がある。

【0174】

神経伝達障害に関連するタンパク質の例には、例えばSST(ソマトスタチン)、NOS1(一酸化窒素シンターゼ1(神経型))、ADRA2A(アドレナリン作動性2A受容体)、ADRA2C(アドレナリン作動性2C受容体)、TACR1(タキキニン受容体1)、又はHTR2c(5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)受容体2C)がある。

40

【0175】

神経発達関連配列の例には、例えばA2BP1[アタキシン2-結合タンパク質1]、AADAT[アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ]、AANAT[アリアルアルキルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ]、ABAT[4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼ]、ABCA1[ATP-結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー1]、又はABCA13[ATP-結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー13]がある。

【0176】

本発明により治療可能な好ましい状態のさらなる例は：アイカルディ・グティエール症候群；アレキサンダー病；アラン・ハーンドン・ダドリー症候群；POLG-関連障害；Alpha

50

-マンノシドーシス (II型及びIII型); アルストレーム症候群; アンジェルマン症候群; 毛細血管拡張性運動失調症; 神経セロイドリポフスチン症; -サラセミア; 両側視神経萎縮症及び (小児性) 神経萎縮症1型; 網膜芽細胞腫 (両側); カナバン病; 脳・眼・顔・骨格症候群1 [COFS1]; 脳髄黄色腫症; コルネリア・デ・ランゲ症候群; MAPT-関連障害; 遺伝性プリオン疾患; ドラーベ症候群; 早期発症家族型アルツハイマー病; フリートライヒ運動失調症 [FRDA]; フリンズ症候群; フコシドーシス; 福山型先天性筋ジストロフィー; ガラクトシアリドーシス; ゴーシェ病; 器質性酸血症; 血球貪食性リンパ組織球症; ハッチンソン-ギルフォード早老症候群; ムコリピドーシスII; 小児性遊離シアル酸貯蔵病; PLA2G6-関連神経変性症; イェルベル・ランゲニールセン症候群; 接合部型表皮水疱症; ハンチントン病; クラッペ病 (小児性); ミトコンドリアDNA-関連リー症候群及びNARP; レッシュ・ナイハン症候群; LIS 1 -関連脳回欠損; ロウ症候群; メーブルシロップ尿症; MECP2重複症候群; ATP7A-関連銅輸送障害; LAMA2-関連筋ジストロフィー; アリールスルファターゼA欠損症; ムコ多糖症I型、II型、又はIII型; ペルオキシソーム形成異常症、ツェルウェーガー症候群スペクトラム; 脳内鉄蓄積障害を伴う神経変性症; 酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症; ニーマン・ピック病C型; グリシン脳症; ARX-関連障害; 尿素サイクル異常症; COL1A1/2-関連骨形成不全症; ミトコンドリアDNA欠失症候群; PLP1-関連障害; ペリー症候群; フェラン-マクダーミド症候群; 糖原病II型 (ポンペ病) (小児性); MAPT-関連障害; MECP2-関連障害; 根性点状軟骨異形成症1型; ロバート症候群; サンドホフ病; シンドラー病1型; アデノシンデアミナーゼ欠損症; スミス・レムリ・オピッツ症候群; 脊髄性筋萎縮症、小児発症型脊髄小脳失調症; ヘキソサミニダーゼA欠損症; タナトフォリック骨異形成症1型; コラーゲンVI型-関連障害; アッシャー症候群I型; 先天性筋ジストロフィー; ウォルフ・ヒルショルン症候群; リソソーム酸リパーゼ欠損症; 及び色素性乾皮症から選択され得る。

10

20

【0177】

本システムを使用して、対象とする任意のポリヌクレオチド配列を標的化することができることが、想定されることは明らかとなる。本システムを用いて有益に治療され得る状態又は疾患のいくつかの例は、先に列記してある。これらの状態と現在関連づけられる遺伝子の例も、そこに提供する。しかしながら、例示された遺伝子は、網羅するものではない。

30

【0178】

(例F-9:)

DRiGRについての好ましい実施態様において、本発明のデザイナーDNA組換え酵素は、血友病Bの原因となるF9遺伝子のエキソン8中の突然変異を置換する。エキソン8は重度の形態の血友病Bにおいて高頻度に突然変異しており、この集団中に出現する突然変異は公知である (www.factorix.org)。

【0179】

一実施態様において、F9デザイナーDNA組換え酵素は、2つの異なる単量体: 配列番号: 1の配列 (Rec F9-1) 又は配列番号1と少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは95%の配列同一性を有する配列を有する単量体、及び配列番号: 2の配列 (Rec F9-2)、又は配列番号: 2と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは95%若しくは98%さえもの配列同一性を有する配列を有する単量体を含むヘテロ四量体である。

40

【0180】

また、本発明の目的は、配列番号: 1 (Rec F9-1) 若しくは配列番号: 2 (Rec F9-2) の配列、又は配列番号: 1若しくは2と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは95%若しくは98%さえもの配列同一性を有する配列を含む、デザイナーDNA組換え酵素である。

【0181】

配列番号: 1 (Rec F9-1)

【化1】

MSNLQTLHQN LSALLVXAXS DXARKNLMDX FRDRQAFSEH TWXVLLSVCR SWAAWCKLNX	60
RKWFPAEXXD VRDYLLHLQA XGLXVNTIXQ HLXQLNMLHR RSGLEPRPGDS NAVSLVMRRI	120
RKENVDAGER VKQALAFERX DFDQVRSLME NSDRQCQDIRN LAFLGXAYNT LLRISEXARI	180
RXXDIXRTDG GRMLIHIGRT KTLVXSAGVE KALSLRVTRL VXRWXS SVSGV ADDPNNXLXC	240
RVRRNGVAXP SATSQLSTXX LQGXFAAAHR LIYGARDXSG QRYXTWSGHS ARVGAARDMA	300
RAGVSIAEIM QAGGWTTXES VMNYIRNLDS ETGAMVRLLE DXD	343

【0182】

10

配列番号：1 (Rec F9-1) の配列を有する単量体において、好ましくは以下の位置に以下のアミノ酸残基を有する：

X17は、任意のアミノ酸であり、好ましくはD又はGである。

X19は、任意のアミノ酸であり、好ましくはT又はAである。

X22は、任意のアミノ酸であり、好ましくはG又はEである。

X30は、小さな非極性アミノ酸であり、好ましくはV、L、I、A、又はG、より好ましくはV又はAから選択される。

X43は、正に荷電したアミノ酸であり、好ましくはK又はRである。

X60は、任意のアミノ酸であり、好ましくはN又はDである。

X68は、任意のアミノ酸であり、好ましくはP又はSである。

20

X69は正又は負に荷電したアミノ酸であり、好ましくはD、E、K、またはR、より好ましくはE又はKから選択される

X81は極性アミノ酸であり、好ましくはS、T、C、K、又はR、より好ましくはC又はRから選択される。

X84は任意のアミノ酸であり、好ましくはA又はTである。

X89は任意のアミノ酸であり、好ましくはL又はQである。

X93は小さなアミノ酸であり、好ましくはC、S、及びA、より好ましくはC又はAから選択される。

X140は任意のアミノ酸であり、好ましくはI又はTである。

X166は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、又はV、より好ましくはI又はVから選択される。

30

X177は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、又はV、より好ましくはI又はVから選択される。

X182は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、又はV、より好ましくはI又はVから選択される。

X183は正に荷電したアミノ酸であり、好ましくはK又はRである。

X186は極性アミノ酸であり、好ましくはS又はTである。

X206は任意のアミノ酸であり、好ましくはA又はTである。

X222は、任意のアミノ酸であり、好ましくはV又はEである。

X225は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、又はV、より好ましくはI又はVから選択される。

40

X237は極性アミノ酸であり、好ましくはS、T、C、又はY、より好ましくはY又はCから選択される。

X239は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、V、又はF、より好ましくはF又はIから選択される。

X249は小さな非極性アミノ酸であり、好ましくはV、L、I、A、又はG、より好ましくはV又はAから選択される。

X259は任意のアミノ酸であり、好ましくはF又はPである。

X260は、任意のアミノ酸であり、好ましくはT又はAである。

X264は任意のアミノ酸であり、好ましくはA又はDである。

50

X278は任意のアミノ酸であり、好ましくはL又はQである。

X284は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、又はV、より好ましくはI又はVから選択される。

X318は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、又はV、より好ましくはI又はLから選択される。

X342は任意のアミノ酸であり、好ましくはG又はDである。

【 0 1 8 3 】

大文字は、IUPAC命名法の1文字コードを表す。配列番号：1の好ましい配列は、配列番号：28、配列番号：3、及び配列番号：5の配列、及び配列番号：28、配列番号：3、又は配列番号：5と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは95%又は98%さえもの配列同一性を有する配列から選択される。

10

【 0 1 8 4 】

配列番号：2 (Rec F9-2)

【 化 2 】

MSXLXTLXQN LSAXLXDXXX XEARKNLMDV XRDRQAFSXH TWRVLLSVCR SWAAWCELNN	60
RKWFPAEPED VRDYLLHLQX RGLXVNTIQQ HLXQLNXLHR RSGGLPRPGDS NAVSLVMRRI	120
RKENXDAGER VXQALAFERT DFDQVRSLME NSDRQCQDIRN LAFLGVAYNT LLRISEIARI	180
RXXDIXRTDG GRMLXHIGRT KTLVXSAGVE KALSLXVTKL VERWISVSGV ADDPNNYLFC	240
RVRRNGVAXP SAXSQLSTXX LQGXFAXAHR LIXGAXDXSG QRYLTWSGHS ARVGAARDMA	300
RAGVSXAEIM QAGGWTTVES VMNYXRNLDS ETGAMVRLLE DGD	343

20

【 0 1 8 5 】

配列番号：2 (Rec F9-2) の配列を有する単量体において、好ましくは以下の位置に以下のアミノ酸残基を有する：

X3は任意のアミノ酸であり、好ましくはK又はNである。

X5は任意のアミノ酸であり、好ましくはP又はQである。

X8は任意のアミノ酸であり、好ましくはH又はTである。

X14は、非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、又はV、より好ましくはI又はLから選択される。

30

X16は、小さな非極性アミノ酸であり、好ましくはV、L、I、A、又はG、より好ましくはV又はAから選択される。

X18は小さなアミノ酸であり、好ましくはA又はGである。

X19は、任意のアミノ酸であり、好ましくはT又はAである。

X20は極性アミノ酸であり、好ましくはS、T、N、又はQ、より好ましくはS又はNから選択される。

X21は任意のアミノ酸であり、好ましくはD又はGである。

X31は、非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、V、及びF、より好ましくはL又はFから選択される。

X39は正又は負に荷電したアミノ酸であり、好ましくはD、E、K、又はR、より好ましくはK又はEから選択される

40

X80は、任意のアミノ酸であり、好ましくはT又はAである。

X84は、任意のアミノ酸であり、好ましくはT又はAである。

X93は、任意のアミノ酸であり、好ましくはC又はAである。

X97は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、V、及びM、より好ましくはL又はMから選択される。

X125は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、及びV、より好ましくはI又はVから選択される。

X132は正に荷電したアミノ酸であり、好ましくはK又はRである。

X182は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、及びV、より好ましくはI又はVから選

50

択される。

X183は正に荷電したアミノ酸であり、好ましくはK又はRである。

X186は極性アミノ酸であり、好ましくはT又はSである。

X195は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、及びV、より好ましくはI又はVから選択される。

X206は任意のアミノ酸であり、好ましくはA又はTである。

X216は、任意のアミノ酸であり、好ましくはG又はRである。

X249は、小さな非極性アミノ酸であり、好ましくはV、L、I、A、又はG、より好ましくはV又はAから選択される。

X253は任意のアミノ酸であり、好ましくはI又はTである。

X259は、任意のアミノ酸であり、好ましくはP又はSである。

X260は任意のアミノ酸であり、好ましくはA又はTである。

X264は、非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、及びV、より好ましくはV又はI（又はL）から選択される。

X266は小さなアミノ酸であり、好ましくはA又はGである。

X273は芳香族又はヘテロ芳香族アミノ酸であり、好ましくはH又はYである。

X276は任意のアミノ酸であり、好ましくはK又はQである。

X278は任意のアミノ酸であり、好ましくはA又はDである。

X306は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、及びV、より好ましくはL又はIから選択される。

X325は非極性アミノ酸であり、好ましくはI、L、及びV、より好ましくはL又はIから選択される。

【0186】

ここでも、大文字は、IUPAC命名法の1文字コードを表す。

【0187】

配列番号：2の好ましい配列は、配列番号：29、配列番号：4、及び配列番号：6の配列、及び配列番号：29、配列番号：4、又は配列番号：6と少なくとも85%の配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは95%又は98%さえもの配列同一性を有する配列から選択される。

【0188】

本発明のF9デザイナーDNA組換え酵素を形成する単量体の好ましい対は、配列番号：28及び29及び特に配列番号3及び4並びに配列番号：5及び6のアミノ酸配列を有する。

【0189】

別の実施態様において、F9デザイナーDNA組換え酵素は、配列番号：36の配列（Rec F9-3）又は配列番号：36と少なくとも90%の配列同一性、好ましくは95%、より好ましくは98%の配列同一性を有する配列を含む。この場合において、F9デザイナーDNA組換え酵素は好ましくはホモ四量体である。

【0190】

本発明のF9デザイナーDNA組換え酵素は、本明細書に記載の本発明の方法を使用して取得され、配列番号：7及び配列番号：8の非対称なloxF9-A及びloxF9-A標的部位を認識する：

【表4】

名称	配列	配列番号
loxF9a	<u>CTCATTACATTTA</u> ACCAAAAT <u>TATCACAATATAA</u>	7
loxF9b	<u>CCATCTTTTGTTA</u> GATTTGAA <u>TATATACATTCTA</u>	8

【0191】

これらの配列はヒトゲノム中に存在し、F9遺伝子のエキソン8に隣接する。本発明は、配列番号：7（loxF9a）及び配列番号：8（loxF9b）から選択される核酸、又は配列番号：

10

20

30

40

50

7若しくは配列番号：8との少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列、又はこれらの配列の1つと逆相補的な核酸配列、及びこれらのDNA組換え酵素、好ましくは本発明のF9デザイナー-DNA組換え酵素の標的部としての使用を含む。一実施態様において、本発明のこれらの核酸は、30~40ヌクレオチド、好ましくは32~36、より好ましくは34ヌクレオチドの長さである。

【0192】

また、本発明は本発明のF9デザイナー-DNA組換え酵素をコードする核酸及びベクターを含む。

【0193】

また、本発明は：

1. 本発明のF9デザイナー-DNA組換え酵素をコードする核酸を含む送達ベクター、
2. F9遺伝子のエキソン8又はその機能的突然変異体をコードする配列を縁取るloxP9a及びLoxP9b部位を含むドナー配列、並びにDNA組換え酵素の発現を用いて細胞に形質導入するための方法を含む。

【0194】

ドナー配列は発現ベクター若しくは送達ベクターに配置することができ、又は分離した核酸、好ましくは複製欠損プラスミドとして提供する。好ましくはドナー配列を細胞当たり複数のコピーで提供し、標的配列の置換率を増加させる（図3及び図11に例示されたものも参照されたい）。

【0195】

本発明は、細胞中に：

本発明によるF9デザイナー-DNA組換え酵素又はそれをコードし、かつ発現する核酸又はベクター、

loxP9a及びloxP9b標的部に隣接したF9遺伝子のエキソン8又はその機能的突然変異体をコードする配列を含むドナー配列

を導入することにより、F9遺伝子の（非機能的又は機能不全）突然変異体エキソン8を置換する（ここで、F9デザイナー-DNA組換え酵素は、部位特異的組換えでドナー配列により突然変異体エキソン8を含む配列を置換する）ための方法をさらに含む。

【0196】

また、本発明は：

本発明によるF9デザイナー-DNA組換え酵素又はそれをコードする核酸又はベクター、

loxP9a及びloxP9b標的部に隣接したF9遺伝子のエキソン8又はその機能的突然変異体をコードする配列を含むドナー配列を含むキットを含む。

【0197】

好ましい実施態様において、欠陥のあるF9エキソン8配列を、過活動Padua突然変異（R338L）（PMID：23197580）を担持するドナー配列によって置換する。

【0198】

先に言及した方法及びキットについての特定の好ましいドナー配列は、配列番号：26（野生型エキソン8）及び配列番号：27（Padua突然変異を有するエキソン8）から選択される。

【0199】

ドナー配列は、F9デザイナー-DNA組換え酵素をコードするベクターに配置することができ（例として、図11を参照されたい）、又は分離した核酸、好ましくは複製欠損プラスミドとして提供する。

【0200】

好ましくは、ドナー配列は、先に言及した方法及びキットにおいて、標的配列の置換率を増加させるために（例えばAAVベクターにより）細胞当たり複数のコピーで提供する（例えば、図11も参照されたい）。

【0201】

10

20

30

40

50

(例Hex：)

DRiGDについての好ましい実施態様において、本発明のデザイナーDNA組換え酵素は、ヒト第7染色体上の配列を欠失させる。このデザイナーDNA組換え酵素はさらに、HexデザイナーDNA組換え酵素と呼ばれ、配列番号：40及び配列番号：41の非対称なHex1及びHex2標的部位を認識する：

【表5】

名称	配列	配列番号
Hex1	TACACAGTGTATATTGATTTTTATCAAATGCCTT	40
Hex2	TACACAATGTATATTGATTTTTATCAAATGCCTT	41

10

【0202】

一実施態様において、デザイナーDNA組換え酵素は、2つの異なる単量体：配列番号：46の配列（Hex-R-#7）又は配列番号46と少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは95%の配列同一性を有する配列を有する単量体、及び配列番号：47の配列（Hex-L-#7）、又は配列番号：47と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは95%若しくは98%さえもの配列同一性を有する配列を有する単量体を含むヘテロ四量体である。

【0203】

別の実施態様において、デザイナーDNA組換え酵素は、2つの異なる単量体：配列番号：48の配列（Hex-R-#30）又は配列番号48と少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは95%の配列同一性を有する配列を有する単量体、及び配列番号：49の配列（Hex-L-#30）、又は配列番号：49と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは95%若しくは98%さえもの配列同一性を有する配列を有する単量体を含むヘテロ四量体である。

20

【0204】

また、本発明は本発明のHexデザイナーDNA組換え酵素をコードする核酸及びベクターを含む。

【0205】

さらなる態様において、本発明は、医療における使用のための、特に先に言及した疾患関連遺伝子若しくはポリヌクレオチド又は先に言及した生化学シグナル伝達経路関連遺伝子及びポリヌクレオチドの1つと関連する疾患又は状態の治療のための、本発明のDNA組換え酵素、本発明の核酸若しくはベクター、または本発明のセット/キットを含む。

30

【0206】

同様の態様において、本発明は、本発明のDNA組換え酵素、本発明の核酸若しくはベクターを含む先に言及した疾患関連遺伝子若しくはポリヌクレオチド又は先に言及した生化学シグナル伝達経路関連遺伝子及びポリヌクレオチドの1つと関連する疾患又は状態の治療のための医薬の調製、あるいは本発明のセット/キット、あるいは本発明の方法の使用を含む。

【0207】

本開示において、特に特許請求の範囲及び/又は段落において、「含む」、「含んでいた」、及び「含んでいる」などの用語は、米国特許法におけるこの用語に起源をおく意味を有し得ることに留意されたい；例えば、これらの用語は「含む」、「含んでいた」、及び「含んでいる」などを意味し得る；並びに「本質的に～からなっている」及び「本質的に～からなる」などの用語は、米国特許法におけるこれらの用語に帰着される意味を有する。例えば、これらの用語は明記されていない要素を許容するが、発明の基礎的又は新規の特徴に影響を及ぼす先行技術において見いだされる要素を除外する。これらの及びほかの実施態様を開示する、又はこれらは、以下の詳細な説明から明らかとなり、かつそれに包含される。

40

【0208】

50

さらに、本発明に記載される実施態様は、相互に結合することができる。

【図面の簡単な説明】

【0209】

本発明は、以下の図面及び非限定的な実施例によって例示する：

【図1】本発明の好ましいDNA組換え酵素によって誘導される遺伝子置換（DRiGR）の一般的スキームを示す。DNA組換え酵素の異なる単量体R1~4及びそれらのそれぞれのDNA結合配列loxR1~loxR4（標的部位の部分部位）を示す。ゲノム中の対象とする部位（しかめっ面）を所望の配列（笑顔）により置換する。

【図2】デザイナーDNA組換え酵素によって誘導される遺伝子欠失（DRiGD）の一般的スキームを示す。ここでも、DNA組換え酵素の異なる単量体R1~4のそれらのそれぞれのDNA結合配列loxR1~loxR4での結合を、上のスキームに示す。ここで、標的部位は各々同一の8bpのスペーサーを有する。ここではゲノム中の対象とする部位（しかめっ面）を切りとばす。

【図3】ドナーベクターがゲノムDNAに対して過剰にある場合、DNA組換え酵素によって誘導される遺伝子置換は、ドナーベクターDNAによるゲノムDNAの置換に向けて駆動されることを図解する。好ましくは、ドナーベクター、例えばAAVベクターは標的細胞の核内に複数のコピーで存在し、細胞の突然変異を効率的に修復する。

【図4】DNA組換え酵素の2つのライブラリを有するソースベクターから開始して、ゲノム中に存在する2つの異なる標的部位（白い三角形はlox1、黒い三角形はlox2）を共同して組換えるように機能する1対のDNA組換え酵素の単量体を生み出す新規指向性進化戦略（Duo-SLiDE DRiGR）を適用することにより、DRiGRのためのDNA組換え酵素を取得する一般的方法を実証する。このシステムにおける単一のリコンビナーゼの発現も、実現性がある（図15を参照されたい）。R1、R2、及びR3は、3つの異なる制限酵素又はそれぞれの制限部位を表す。P1及びP2は、2つの異なるPCRプライマー又はそれぞれのプライマー結合部位を表す。DNA組換え酵素のこれらの単量体を同様に2つの標的部位を担持するDNA鋳型（ここでは、pDonorプラスミド）と共に発現させると、両方の標的部位の組換えによりDNA断片が交換される。DNA断片の挿入によりpDuoSLiDEベクター由来の制限部位が除去されるため、置換を促進させた効果的なリコンビナーゼは制限酵素によるDNAの消化後にPCRによって増幅することができる。このシステムをランダム突然変異誘発と組み合わせて周期的に繰り返すこと及びDNAシャッフルにより、反応を促進する最も効率の高いリコンビナーゼが明らかとなる。宿主中で不活性なpDonor上の複製起点（R6K-ori）を使用することにより、一方の標的部位（例えば、lox1）を通じた統合及び他方の標的部位（例えば、lox2）を通じた切除のプロセスを分離することができる。さらに、統合されたベクターは、カナマイシン含有プレート上での抗生物質による選択により同定することができる。

【図5】2つの異なる標的部位を共同して組換えるように機能する2対のDNA組換え酵素の単量体を生み出す新規指向性進化戦略（QuSLiDE DRiGR）を適用することにより、DRiGRのためのDNA組換え酵素を取得する同様の方法を実証する。ここで、各単量体は、DNA組換え酵素の4つのライブラリを有するソースベクターから開始して、ゲノム中に存在する1つの標的部位の1つの部分部位（白い三角形はlox1、黒い三角形はlox2）に導かれる（R1、R2、及びR3並びにP1及びP2は、図4におけるものと同じ意味である）。ドナーベクター上のDNAが野生型対立遺伝子を含み、かつゲノムが疾患を引き起こす突然変異を含む場合、遺伝子の欠陥は細胞中で修復される（図1を参照されたい）。

【図6】新規指向性進化戦略（Duo-SLiDE DRiGD）を適用することにより、DNA組換え酵素の2つのライブラリを有するソースベクターから開始して、ゲノム中に存在する2つの異なる標的部位（白い三角形はlox1、黒い三角形はlox2）を共同して組換えるように機能する1対のDNA組換え酵素の単量体を生み出すことにより、DRiGDのためのDNA組換え酵素を取得する一般的方法を実証する（R1、R2、及びR3並びにP1及びP2は、図4におけるものと同じ意味である）。DNA組換え酵素のこれらの単量体を発現させると、pDuoSLiDEベクターの2つのコピーの間での組換えによりpDuoSLiDEベクター由来の制限部位が除去される。欠失を促進する効果的なリコンビナーゼは制限酵素によるDNAの消化後にPCRによって増幅する

10

20

30

40

50

ことができる。このシステムをランダム突然変異誘発と組み合わせて周期的に繰り返すこと及びDNAシャッフルにより、反応を促進する最も効率の高いリコンビナーゼが明らかとなる。

【図7】2つの異なる標的部位を共同して組換えるように機能する2対のDNA組換え酵素の単量体を生み出す新規指向性進化戦略 (QuSLiDE DRiGD) を適用することにより、DRiGDのためのDNA組換え酵素を取得する同様の方法を実証する。ここで、各単量体は、DNA組換え酵素の4つのライブラリを有するソースベクターから開始して、ゲノム中に存在する1つの標的部位の1つの部分部位 (白い三角形はlox1、黒い三角形はlox2) に導かれる (R1、R2、及びR3並びにP1及びP2は、図4におけるものと同じ意味である)。この単量体のセットにより、ゲノム中の対象とする部位を欠失させることが可能となる (図2を参照されたい)。

10

【図8】基質と関連するタンパク質の進化 (SLiPE) により一方の標的部位に作用するテイラーメドリコンビナーゼを取得するための、最新の公知の方法を示す (Buchholz F及びStewart AFの文献、2001)。ここで、ベクターは1つのライブラリ及び2つの同一の標的部位を含むのみである (破線柄の三角形)。

【図9】Duo-SLiDE DRiGRによるF9遺伝子のエキソン8中の突然変異を置換するための、本発明の適用を示す。図9Aは、F9遺伝子のエキソン8及び隣接する配列の図式提示を示す。2つの選択された標的配列 (loxF9a 配列番号: 3及びloxF9b 配列番号: 4) を三角形で示し (黒及び白)、かつヌクレオチド配列及び染色体位置を示す。図9Bは、2つのリコンビナーゼ単量体F9-1 (配列番号: 1、3、5、及び28) 及びF9-2 (配列番号: 2、4、6、及び29) を取得するための方法並びに置換反応を図解する。組換え反応が予測した通り起こったことの確認は、DNA配列決定法によって確認した。図9Cは、NdeI及びSacIによる消化の後、pDuoF9 (ソース) (レーン1) 及びpDuoF9 (産物) (レーン2) の制限パターンを実証するアガロースゲルを示す。M = 分子マーカー。

20

【図10】DNA組換え酵素のライブラリを所与の標的部位に適応させる例示的な進化プロセスを示す。ここでは、loxF9a及びloxF9b標的部位に適用した。ここで、loxF9a部位 (F9A) 上の活性を有するDNA組換え酵素を2つの対称な中間部位AL及びARを設計し、20又は17サイクルのSLiPEを実施することにより取得した (図8を参照されたい)。得られたDNA組換え酵素のライブラリを組み合わせ、かつシャッフルした後、非対称なloxF9a部位 (F9A) で108サイクルのSLiPEを実施した。示された世代サイクルのアガロースゲルを示す。2つの三角形を伴う線は、組換えられていないバンドを示し、1つの三角形を伴う線は、組換えられたバンドのサイズを示す。ゲル写真の下の灰色の三角形は増殖培地に追加したL-アラビノースの量の低下を示す。loxF9b部位 (F9B) 上の活性を有するDNA組換え酵素を取得するために、2つの対称な中間部位BLS及びBRSの第1のセットを設計し、9サイクルのSLiPEを実施した (図8を参照されたい)。DNA組換え酵素のライブラリをシャッフルした後、対称な中間部位BL (30サイクル) 及びBR (22サイクル) の第2のセットに対し再度SLiPEを実施した。最後に、得られたDNA組換え酵素のライブラリを組み合わせ、かつシャッフルした後、非対称なloxF9b部位 (F9B) で17サイクルのSLiPEを実施した。最後に、loxF9a部位およびloxF9b部位で取得したDNA組換え酵素の2つのライブラリをpDuoF9 (ソース) にクローニングした (図9を参照されたい) (示さない)。

30

40

【図11】治療的設定におけるF9デザイナーDNA組換え酵素の使用を図解し、F9-1及びF9-2の両方のコード配列をF9遺伝子のエキソン8の野生型又はPadua突然変異 (R338L) に隣接するloxF9a及びloxF9bを含むドナー配列とともに送達ベクター (例えば、アデノ随伴ウイルスベクター) へクローニングする。そのようなベクターの複数コピーでの標的細胞への送達は、ゲノム中の不活性化突然変異を置換する。

【図12】第1染色体上でのヒトPCSK9遺伝子の8 bp反復配列のスクリーニング結果を示す。PCSK9遺伝子のエキソンを太線の長方形で示す。8 bp反復配列は少なくとも150 bpかつ2 kb以下隔てられ、スクリーニングにより得たゲノム中の他のどこにも出現しない34 bpの長さの潜在的標的部位 (垂直線によって示す) に存在する。潜在的標的部位の間の対象とする配列を、水平線で示す。

50

【図13】ヒトパピローマウイルス16 (HPV16) のゲノムの少なくとも150 bpかつ2 kb以下隔てられ、スクリーニングにより得たヒトゲノム中に出現しない34 bpの潜在的標的部位に存在する8 bp反復配列についての同様のスクリーニング結果を示す。ウイルスタンパク質をコードする配列は、矢印を伴う太線の長方形で示す(記号より大きい)。

【図14】ゲノム中に存在する2つの異なる標的部位(白い三角形はlox1、黒い三角形はlox2)を組換えるDNA組換え酵素のライブラリを生み出す新規指向性進化戦略(SLiDE DRiGR 2.0)を適用することにより、実施例3工程3において使用するDRiGRのためのDNA組換え酵素を取得するための、異なる一般的方法を実証する。R1、R2、R3、R4、及びR5は、5つの異なる制限酵素又はそれぞれの制限部位を表す。P3及びP4は、2つの異なるPCRプライマー又はそれぞれのプライマー結合部位を表す。DNA組換え酵素のこのライブラリを同様に2つの標的部位を担持するDNA鋳型(ここでは、pDonor-ex8プラスミド)の存在下で発現させると、両方の標的部位の組換えによりDNA断片が交換される。DNA断片の挿入によりpF9ベクター由来の制限部位が除去されるため、置換を促進させた効果的なりコンビナーゼは制限酵素R1~3及びRecBCDによるDNAの消化後にPCRによって増幅することができる。このシステムをランダム突然変異誘発と組み合わせて周期的に繰り返すこと及びDNAシャッフルにより、DRiGR反応を促進する最も効率の高いリコンビナーゼが明らかとなる。

【図15】実施例3工程3において使用する新規指向性進化戦略(SLiDE DRiGR)の工程を強調する。副工程1において、pF9(ソース)及びpDonorで細菌を形質転換する。リコンビナーゼの発現が誘導された場合にのみ、抗生物質に耐性を有するコロニーの増殖を観察することができる。副工程2において、得られたコロニーのプラスミドDNAを制限酵素R1~3を使用して消化する。これにより、DRiGRを受けることに成功したコロニーが富化され、pF9の純粋な調製物(産物)を得る。プラスミド調製物の純度をpDuoF9(産物)の固有の制限パターンを示す酵素XhoI及びXmaIを使用して制限消化することにより実証する。さらに、DNA配列決定法により、pF9(産物)の正確な配列が明らかとなる。

【図16】DNA組換え酵素の1又は2つのライブラリを有するソースベクターから開始して、ゲノム中に存在する2つの異なる標的部位(白い三角形はlox1、黒い三角形はlox2)を共同して組換えるように機能する1つ又は1対のDNA組換え酵素の単量体を生み出す新規指向性進化戦略(Duo-SLiDE DRiGR 2.0)を適用することにより、DRiGRのためのDNA組換え酵素を取得する異なる一般的方法を実証する。R1、R2、R3、R4、及びR5は、5つの異なる制限酵素又はそれぞれの制限部位を表す。P3及びP4は、2つの異なるPCRプライマー又はそれぞれのプライマー結合部位を表す。これらのDNA組換え酵素の単量体を同様に2つの標的部位を担持するDNA鋳型(ここでは、高コピー数プラスミドpDonor-ex8)と共に発現させると、両方の標的部位の組換えによりDNA断片が交換される。DNA断片の挿入によりpDuoSLiDEベクター由来の制限部位が除去されるため、置換を促進させた効果的なりコンビナーゼは制限酵素によるDNAの消化後にPCRによって増幅することができる。重要なことに、抗生物質選択マーカをこのアッセイでは使用しない。このシステムをランダム突然変異誘発と組み合わせて周期的に繰り返すこと及びDNAシャッフルにより、反応を促進する最も効率の高いリコンビナーゼが明らかとなる。

【図17】(最新の)Cre、実施例3の工程1の後に得たりコンビナーゼ(R#1)、実施例の工程2の後に得たりコンビナーゼ(3R#7-B5)、及び実施例3の工程3の後に得たりコンビナーゼ(F9-3)間のアラインメントを示す。アラインメントは、進化の後期段階の間にどのようなさらなる突然変異が生じたかを示している。

【図18】本発明のDRiGD方法及び工程により例示される本発明の方法の一般的スキームを示す。

【図19】DRiGD方法によって例示され、ヒトゲノムに適用される本発明の方法のより詳細なスキームを示す。

【図20】DRiGD方法によって例示され、ヒトゲノムに適用される本発明の方法のより詳細なスキームを示す。

【図21】実施例5でさらに説明するヒト第7染色体上の標的部位に適用される本発明のDRiGD方法を例示する。A. 標的部位を示す: Hex1及びHex2は切除に使用する標的部位であり

10

20

30

40

50

HexL、HexR、HexR1、及びHexR2は、中間標的部位である。B. Hex1及びHex2標的部位の特異的リコンビナーゼの進化を示す。C. 得られた2つのクローン（クローン#7及びクローン#30）の組換え効率を示す。

【図22】実施例5で得たリコンビナーゼを使用したプラスミド基質からの配列の正確な切除を示す。

【実施例】

【0210】

（実施例1：）

DRiGDの有用性を実証するために、本発明者らは少なくとも150 bpにより隔てられたすべての8 bp反復配列についてヒトゲノムをスクリーニングした：ゲノムから最大2 kbを欠失させるための範囲内の潜在的標的部位は、ヒトゲノム中のほかのどこにも出現しない8 bpの反復配列の左13 bp及び右13 bpの配列を示す。図12はヒトPCSK9遺伝子中のDNA組換え酵素の309個全ての考え得る標的部位の結果を示す。図13はヒトパピローマウイルス（HPV 16）中のDNA組換え酵素の176個全ての考え得る標的部位の結果を示す。

10

【0211】

（実施例2：）

DRiGR発明の実現可能性を実証するために、本発明者らは共に適用した場合にヒト第IX因子（F9）遺伝子のエキソン8を置換することができるリコンビナーゼを作製した。このエキソンは血友病Bに罹患する患者において高い頻度で突然変異を有する。本発明者らの結果は、適切なドナーベクター及び共同して機能する2つのリコンビナーゼの発現を提供して、このエキソンを異なる配列に効率的に置換することができることを実証する（図6、図9、及び図11）。

20

【0212】

別途明示されない限り、WO 2008/083931 A1、WO 2011/147590 A1、WO2016034553 A1、並びにBuchholz F及びStewart AFの刊行物、2001に記載された材料及び方法を使用する。

【0213】

標的配列（loxF9a 配列番号：7及びloxF9b 配列番号：8）を事前に同定したDNA組換え酵素の標的部位（LoxP、LoxH、LoxM7、LoxM5、loxLTR、LoxBTR）の部分部位を有するヒトゲノム中の配列を比較することにより選択した：

【表6】

30

名称	配列	配列番号
loxF9a	<u>CTCATTACATTTA</u> ACCAAAAT <u>TATCACAATATAA</u>	7
loxF9b	<u>CCATCTTTTGTTA</u> GATTTGAA <u>TATATACATTCTA</u>	8
loxP	<u>ATAACTTCGTATA</u> ATGTATGC <u>TATACGAAGTTAT</u>	9
loxH	<u>ATATATACGTATA</u> TAGACATA <u>TATACGTATATAT</u>	10
loxM7	<u>ATAACTCTATATA</u> ATGTATGC <u>TATATAGAGTTAT</u>	11
LoxM5	<u>ATAACTTCGTGCA</u> ATGTATGC <u>TGCACGAAGTTAT</u>	12
loxLTR	<u>ACAACATCCTATT</u> ACACCCTA <u>TATGCCAACATGG</u>	13
loxBTR	<u>AACCCACTGCTTA</u> AGCCTCAA <u>TAAAGCTTGCCTT</u>	14

40

表中標的部位中の第1（左）及び第2（右）の部分部位に下線を引いた。

【0214】

第1の工程において、2つのリコンビナーゼライブラリを先に記載のSLiDEアプローチを使用して個別に進化させた（Buchholz及びStewartの文献、2001並びにWO 2002044409 A2 図8を参照されたい）。手短かに説明すると、各ライブラリを中間標的部位（AL、AR、BLS、BLRS、BL、BR）の組換えに向けて進化させ、最終的に2つの標的部位、loxF9a又はloxF9bの1つの組換えに到達させた。新たな突然変異を誤りを起こしやすいPCR及びDNAシャッフ

50

ルにより導入し、かつ選択圧をリコンビナーゼの発現レベルを介してさらに調節した。活性を有するリコンビナーゼをそれぞれの標的部位を組換えてベクターに由来する標的部位と隣接した配列を欠失させるそれらの能力によって選択した（図8を参照されたい）。

【0215】

以下の中間配列を使用する：

【表7】

名称	配列	配列番号
loxF9-AL	<u>CTCATTACATTTA</u> ACCAAAAT <u>TAAATGTAATGAG</u>	15
loxF9-AR	<u>TTATATTGTGATA</u> ACCAAAAT <u>TATCACAATATAA</u>	16
loxF9-BLS	<u>CCAACTTTTGATA</u> GATTTGAA <u>TATCAAAAGTTGG</u>	17
loxF9-BRS	<u>TAGACTTTATATA</u> GATTTGAA <u>TATATAAAGTCTA</u>	18
loxF9-BL	<u>CCATCTTTTGTTA</u> GATTTGAA <u>TAACAAAAGATGG</u>	19
loxF9-BR	<u>TAGAATGTATATA</u> GATTTGAA <u>TATATACATTCTA</u>	20

10

【0216】

これら2つのライブラリに由来するリコンビナーゼのコード配列を続いてベクターバックボーンpDuoF9（ソース）（配列番号：21、図9を参照されたい）にクローニングした。このベクター中2つのリコンビナーゼライブラリを、両酵素の転写を一体に結び付けるオペロン様構造をとる共通の誘導性プロモーターから発現させる。このライブラリのサイズは、100,000クローンを超えた。

20

【0217】

DRiGRを実施するために、50 μ lのエレクトロコンピテントな大腸菌（E.coli）XL1-Blue細胞を1 ng pDuoF9（ソース）ライブラリで形質転換して、15 μ g/mlクロラムフェニコールを含む200 ml LB中一晩増殖させた。翌日、1 mlの一晩培養物を使用して新鮮な培地100 mlに接種し、2時間増殖させた。続いて培養物を2 \times 50 mlに分割し、L-アラビノースを添加して最終濃度を50 μ g/mlとし、培養物のうちの1つでリコンビナーゼの発現を誘導した。細胞を2.5時間インキュベートした後、氷上に置き、先に記載の通りにエレクトロポレーションのために調製した（Sambrook及びRussellの文献、2001）。エレクトロコンピテントセルを200 μ lの水に再懸濁させ、50 μ lの細胞懸濁物をすぐに0.4 ng pDonorの1700 Vでの形質転換に使用した。続いて細菌をSOC培地中2時間回復させ、その後全懸濁物を15 μ g/mlカナマイシンを含むLB寒天プレートに播いた。

30

【0218】

誘導していない細胞を播いた場合、コロニーは寒天プレート上で一晩かけても増殖せず、これによりリコンビナーゼの発現がpDonorベクター（配列番号：22）の統合に必要であることが立証された。誘導した試料からの全ての増殖するコロニーをプールし、15 μ g/mlカナマイシン及び50 μ g/ml L-アラビノースを含む220 ml LB培地中で培養し、第2の対の標的部位を通じて可能な組換えをさせた。

40

【0219】

翌日、プラスミドDNAを培養物から単離した。DRiGRを受けることに成功したクローンを富化させるために、DNAを任意の非pDuoF9（産物）を切断する酵素で消化しネガティブ選択再度形質転換した。この目的で、500 ngのプラスミド調製物を1 μ lのNdeI、AvrII、及びPspXIの各々で消化した。37 $^{\circ}$ Cでの3時間のインキュベーションの後、DNAを沈殿させ、50 μ l水に再度懸濁させた。このうち1 μ lを、50 μ lのエレクトロコンピテントな大腸菌XL1-Blue細胞の形質転換のために使用した。形質転換細胞を15 μ g/mlカナマイシンを含む220 ml LB中で増殖させた。ポジティブ選択。

【0220】

翌日、プラスミドDNAを培養物から単離した。リコンビナーゼライブラリをプライマーP1及びP2（配列番号：23及び24）を用いたPCRによって増幅させ、PCR産物をカラム上で精

50

製し、制限酵素SacI及びSbfIを用いる消化に付した。単離したリコンビナーゼライブラリを次にpDuoF9(ソース)に再度ライゲーションさせ、さらなるサイクルのDRiGRを開始した。3ラウンドのDuo-SLiDE DRiGR (Fig. 10を参照されたい)を実施して、標的部位loxF9a及びloxF9bでのDRiGR効率的に実施することができるリコンビナーゼを富化させた。

【0221】

使用したプライマー：

【表8】

名称	配列	配列番号
P1	CTCTACTGTTTCTCCATAC	23
P2	AGGGAATAAGGGCGACA	24

10

【0222】

プラスミドpDuoF9(産物)の配列を、配列番号：25に与える。

【0223】

この方法により、以下の対のリコンビナーゼ単量体の配列を得た：

Rec F9-1：配列番号：3及びRec F9-2a：配列番号：4

Rec F9-1b：配列番号：5及びRec F9-2b：配列番号：6

【0224】

(実施例3)

20

(工程1：)

第1の工程において、2つのリコンビナーゼライブラリを先に記載のSLiDEアプローチを使用して個別に進化させた(Buchholz及びStewartの文献、2001並びにWO 2002044409 A2 図8を参照されたい)。手短かに説明すると、実施例2に記載の各ライブラリを中間標的部位(loxF9-AL、AR、BLS、BLRS、BL、BR 実施例2を参照されたい)の組換えに向けて進化させ、最終的に2つの標的部位、loxF9a又はloxF9bの1つの組換えに到達させた。新たな突然変異を誤りを起こしやすいPCR及びDNAシャッフルにより導入し、かつ選択圧をリコンビナーゼの発現レベルを介してさらに調節した。活性を有するリコンビナーゼをそれぞれの標的部位を組換えてベクターに由来する標的部位と隣接した配列を欠失させるそれらの能力によって選択した(図8を参照されたい)。

30

【0225】

(工程2：)

第2の工程において、単一のリコンビナーゼライブラリを進化させ、複製欠損pDonorを用いた選択スキームに従いDRiGRを実施した(図9を参照されたい)。これには、ベクターバックボーンpF9(ソース)(=pDuoF9、配列番号：21)中の工程1で作製したライブラリに由来するリコンビナーゼコード配列のクローニングを伴う。このベクター中1~4つのリコンビナーゼライブラリを、両酵素の転写を一体に結び付けるオペロン様構造をとる共通の誘導性プロモーターから発現させることができる。このライブラリのサイズは、100,000クローンを超える。

【0226】

40

DRiGRを実施するために、50 µlのエレクトロコンピtentな大腸菌XL1-Blue細胞を1 ng pDuoF9(ソース)ライブラリで形質転換して、15 µg/mlクロラムフェニコールを含む200 ml LB培地中一晚増殖させた。翌日、1 mlの一晚培養物を使用して新鮮な培地100 mlに接種し、2時間増殖させた。続いて培養物を2×50 mlに分割し、L-アラビノースを添加して最終濃度を1~200 µg/mlとし、培養物のうちの1つでリコンビナーゼの発現を誘導した。細胞を2.5時間インキュベートした後、氷上に置き、先に記載の通りにエレクトロポレーションのために調製した(Sambrook及びRussellの文献、2001)。エレクトロコンピtentセルを200 µlの水に再懸濁させ、200 µlの細胞懸濁物をすぐに80 ng pDonorの1700 Vでの形質転換に使用した。続いて細菌をSOC培地中2時間回復させ、その後全懸濁物を使用して、15 µg/mlクロラムフェニコール、5 µg/mlカナマイシン、及び1~200 µg/ml L

50

-アラビノースを含む200 ml LB培地に接種した。ライブラリサイズを評価するために、少量の懸濁物を一部寒天プレート上に播いた。

【0227】

翌日、誘導していない細胞を播いた場合、コロニーは寒天プレート上で増殖しないことが確認され、これによりリコンビナーゼの発現がpDonorベクター（配列番号：22）の統合に必要であることが立証された。プラスミドDNAは、液体培養物から単離した。DRiGRを受けることに成功したクローンを富化させるために、DNAを任意の非pDuoF9（産物）を切断する酵素で消化し、ネガティブ選択、再度形質転換した。この目的で、500 ngのプラスミド調製物を1 μ lのNdeI、AvrII、PspXI、及びFspIの各々で消化した。37 $^{\circ}$ Cでの3時間のインキュベーションの後、DNAを膜フィルター上でのマイクロダイアリシスによってクリーンアップした。この消化物のうち3 μ lを、50 μ lのエレクトロコンピテントな大腸菌XL1-Blue細胞の形質転換のために使用した。形質転換細胞を15 μ g/mlクロラムフェニコール及び15 μ g/mlカナマイシンを含む100 ml LB中で増殖させた。ポジティブ選択。

10

【0228】

翌日、プラスミドDNAを培養物から単離し、500 ngのDNAを各々1 μ lのNdeI及びAvrIIで消化した。リコンビナーゼライブラリをプライマーP1#及びP2#（配列番号：30及び31）を用いた誤りを起こしやすいPCRによって増幅させ、PCR産物をカラム上で精製し、制限酵素SacI及びSbfIを用いる消化に付した。単離したリコンビナーゼライブラリを次にpDuoF9（ソース）に再度ライゲーションさせ、さらなるサイクルのDRiGRを開始した。3及び8サイクルの後、DNAシャッフルを先に記載の通り実施した（Buchholz及びStewartの文献、2001）。11ラウンドのDuo-SLiDE DRiGRを実施して、標的部位loxF9a及びloxF9bでのDRiGRを効率的に実施することができるリコンビナーゼを富化させた。

20

【0229】

（工程3：）

第3の工程において、単一のリコンビナーゼライブラリを進化させ、高コピー数プラスミドpDonor-ex8を用い（図14、配列番号：37を参照されたい）、抗生物質による選択及びドナーベクターの統合を分割から分離することなく、異なる選択スキームに従って（図14を参照されたい）、DRiGR 2.0を実施した。これには、ベクターバックボーンpF9（ソース）（= pDuoF9（ソース）配列番号：21）中の工程2で作製したライブラリに由来するリコンビナーゼコード配列のクローニングを伴う。続いて、ライブラリを既にpDonor-ex8を有するエレクトロコンピテント大腸菌XL1-Blue細胞へと形質転換した。形質転換細胞を15 μ g/mlクロラムフェニコール、15 μ g/mlカナマイシン、及び1~200 μ g/ml L-アラビノースを含む100 ml LB培地中で増殖させた。このライブラリのサイズは、100,000クローンを超えた。

30

【0230】

翌日、プラスミドDNAを培養物から単離し、1000 ngのDNAを各々1 μ lのNdeI、AvrII、PspXI（制限酵素R1、R2、及びR3 図14及び15を参照されたい）、及びエキソヌクラーゼRecBCDで消化した。リコンビナーゼライブラリをプライマーP3及びP4（配列番号：32及び33）を用いた誤りを起こしやすいPCRによって増幅させ、PCR産物をカラム上で精製し、制限酵素SacI及びSbfIを用いる消化に付した。続いて、単離したリコンビナーゼライブラリをpF9（ソース）に再度ライゲーションし、pDonor-ex8を有するエレクトロコンピテント大腸菌XL1-Blue細胞に形質転換した。形質転換細胞を15 μ g/mlクロラムフェニコール、5 μ g/mlカナマイシン、及び1~200 μ g/ml L-アラビノースを含む100 ml LB培地中で増殖させた。このようにして、次のサイクルを開始した。3サイクルごとに、DNAシャッフルを先に記載の通り実施した（Buchholz及びStewartの文献、2001）。11ラウンドのSLiDE DRiGR（Fig. 14を参照されたい）を実施して、抗生物質による選択をせず、かつドナーベクターの統合を分割から分離することなく、標的部位loxF9a及びLoxF9bでのDRiGRを効率的に実施することができるリコンビナーゼを富化させた。

40

【0231】

使用したプライマー：

50

【表 9】

名称	配列	配列番号
P1#	CGGCGTCACACTTTGCTATG	30
P2#	CCCTTAAACGCCTGGTGCTA	31
P3	AAGATTAGCGGATCCTACCT	32
P4	GTGATTAGTTAGTGAGAGGC	33

10

【0232】

この方法により、以下のリコンビナーゼ単量体の配列を得た：

工程1の後、R#1（配列番号：34）：工程2の後、R#7-B5（配列番号：35）、及び最終工程3の後、Rec F9-3（配列番号：36）。

【0233】

工程1、2、及び3の後に得たリコンビナーゼのリコンビナーゼ効率（DRGR効率）を以下の表において比較する：

【表 10】

工程	選択スキーム	得られたリコンビナーゼの例	配列番号	DRIGR効率
1	SLIDE (図8を参照されたい)	R#1	34	0,5 %
2	Duo-SLIDE DRIGR (図9を参照されたい)	R#7-B5:	35	12,3 %
3	SLIDE-DIGR 2.0(図14を参照されたい)	F9-3	36	90 %

20

30

【0234】

(実施例4)

治療的設定におけるF9リコンビナーゼを利用するために、F9-1及びF9-2の両方のコード配列をF9遺伝子のエキソン8の野生型又はPadua突然変異（R338L）に隣接するloxP9a及びloxP9aを含むドナー配列とともに送達ベクター（例えば、アデノ随伴ウイルスベクター）へクローニングする。そのようなベクターの複数コピーでの標的細胞への送達は、ゲノム中の不活性化突然変異を置換する（図11を参照されたい）。

【0235】

(実施例5)

DRiGDの有用性を実証するため、ヒトゲノムの第7染色体上の特異的DNA配列を切除するためのリコンビナーゼを進化させた。

【0236】

第1に、2つの異なるリコンビナーゼライブラリを記載された基質関連指向性進化のプロトコル（Buchholz及びStewartの文献、2001及びWO 2002044409 A2 図8を参照されたい）を使用して進化させた。ライブラリを、最終標的部位Hex1及びHex2の左右の部分部位（HexL又はHexR）に対して進化させた（図21Aを参照されたい）。HexRについてリコンビナーゼライブラリを進化させるため、2つの中間標的部位（HexR1及びHexR2）を使用した（図21Bを参照されたい）。進化のプロセスの全体を通じて、新たな突然変異を誤りを起こしやすいPCR（プライマーP1#及びP2#を使用する）及びDNAシャッフルにより導入し、かつ選択

40

50

圧をリコンビナーゼの発現レベルを介してさらに調節した。活性を有するリコンビナーゼをそれぞれの標的部位を組換えてベクターに由来する標的部位と隣接した配列を欠失させるそれらの能力によって選択した（図8 標準的SLiPE及び図21Bを参照されたい）。

【0237】

次に、最終標的部位Hex1及びHex2を組換えるために、両方のライブラリ（HexR及びHexLについて得る）を組合せた。従って、ライブラリ（ライブラリサイズは100,000リコンビナーゼよりも大きい）を同じ発現プラスミドにクローニングし、両酵素の転写を一体に結び付けるオペロン様構造をとる共通の誘導性プロモーターから発現させた（図6のpDUO-SLiDE DRiGDを参照されたい）。続いて、両方のライブラリを担持するプラスミドをXL-1 blue大腸菌細胞に形質転換した。1 ml SOC培地中1時間細胞を回復させた後、10 µlを15 µg/mlクロラムフェニコールを含むLB寒天プレートに播いた。翌日、32クローンを選択し、25 µg/mlクロラムフェニコールを含む500 µl LB中で8時間培養した。次に、250 µl前培養物を25 µg/mlクロラムフェニコールを含む2×5 ml LBに接種するために使用した。5 ml培養物のうちの1つにおいて、リコンビナーゼ二量体の発現を誘導するために、10 µg/ml L-アラビノースを加えた。翌日、プラスミドDNAを単離し、SacI (R2) 及びSbfI (R3) により消化して、誘導試料及び非誘導試料中の組換え効率を評価した。

10

【0238】

この方法により、高い効率で切除反応を実施することができる2つのリコンビナーゼの二量体（クローン#7及びクローン#30）を取得した。正確な切除は、組換えpDUO-SLiDE DRiGDを配列決定することによって確認された（図22を参照されたい）。

20

【0239】

標的部位及び中間標的部位及び使用したプライマーを以下の表に列記する：

【表11】

Hex 標的部位		配列番号
Hex1	TACACAGTGTATATTGATTTTTATCAAATGCCTT	40
Hex2	TACACAATGTATATTGATTTTTATCAAATGCCTT	41
HexL	TACACAGTGTATATTGATTTTTATAACATTGTGTA	42
HexR	AAGGCATTTGATATTGATTTTTATCAAATGCCTT	43
HexR1	AAGACATTTTATATTGATTTTTATAAAATGTCTT	44
HexR2	AACGCATTGGATATTGATTTTTATCCAATGCGTT	45
P1#	CGGCGTCACACTTTGCTATG	30
P2#	AAGGGAATAAGGGCGACACG	31

30

【0240】

この方法により、以下の対のリコンビナーゼ単量体の配列を得た：

Hex-R-#7：配列番号：46及びHex-L-#7：配列番号：47

Hex-R-#30：配列番号：48及びHex-L-#30：配列番号：49

40

【0241】

引用非特許文献

【化 3】

Buchholz, F., & Stewart, A. F. (2001). Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution. *Nature Biotechnology*, 19(11), 1047–1052.

Karpinski J, Hauber I, Chemnitz J, et al. (2016). Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. *Nat Biotechnol* 34(4):401-9.

10

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (3rd edition).

Surendranath, V. et al. (2010). SeLOX—a locus of recombination site search tool for the detection and directed evolution of site-specific recombination systems. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38(W293-W298)

20

Wang M et al. (2016). Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. *PNAS* 113:2868-2873.

Zhang, C et al. (2015) Redesign of the monomer–monomer interface of Cre recombinase yields an obligate heterotetrameric complex. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43 (18): 9076-9085.

【 図 1 】

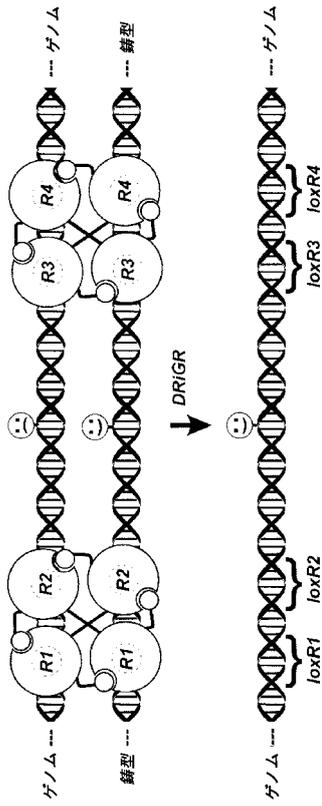


図 1

【 図 2 】

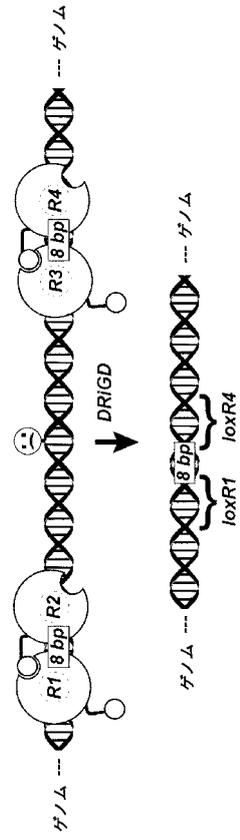


図 2

【 図 3 】

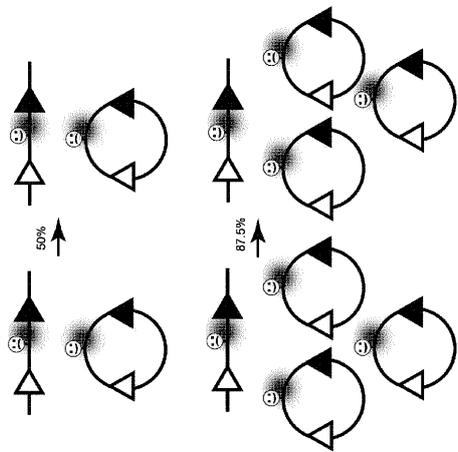


Fig. 3

【 図 4 】

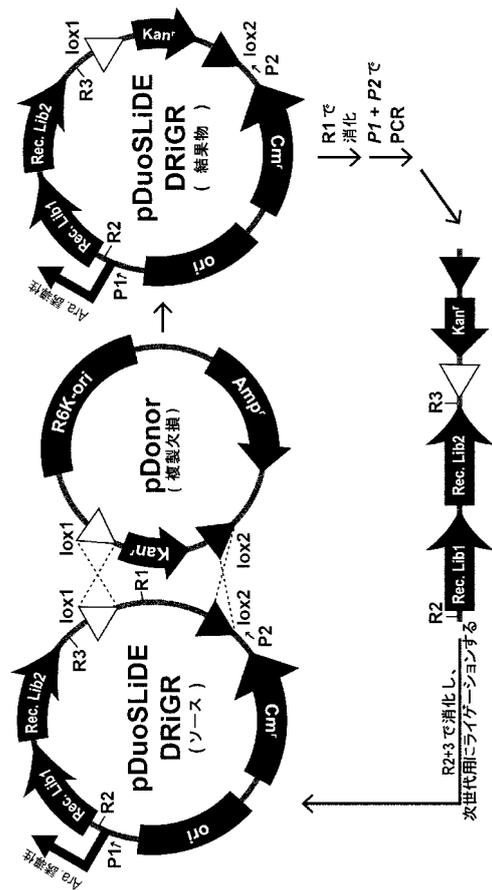
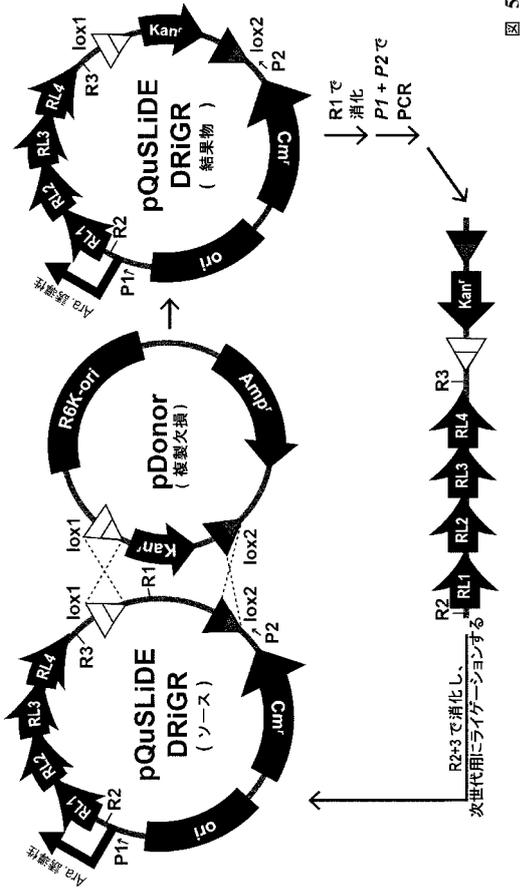
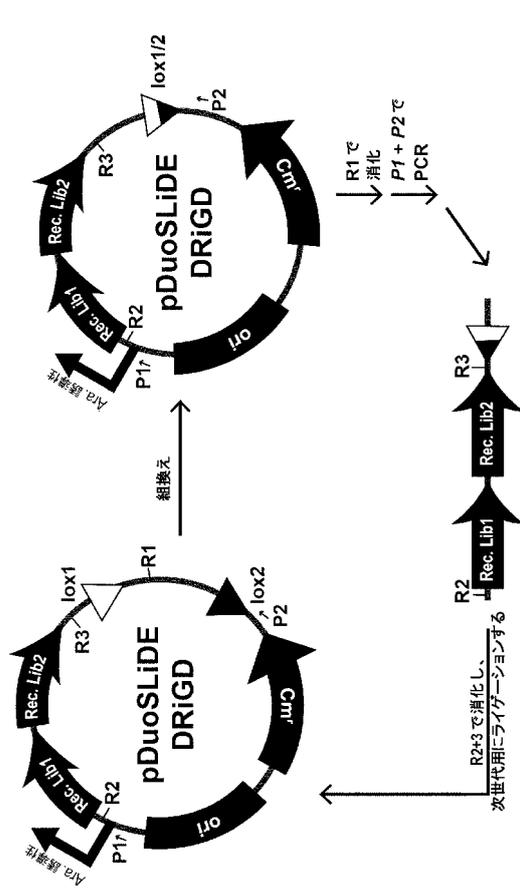


図 4

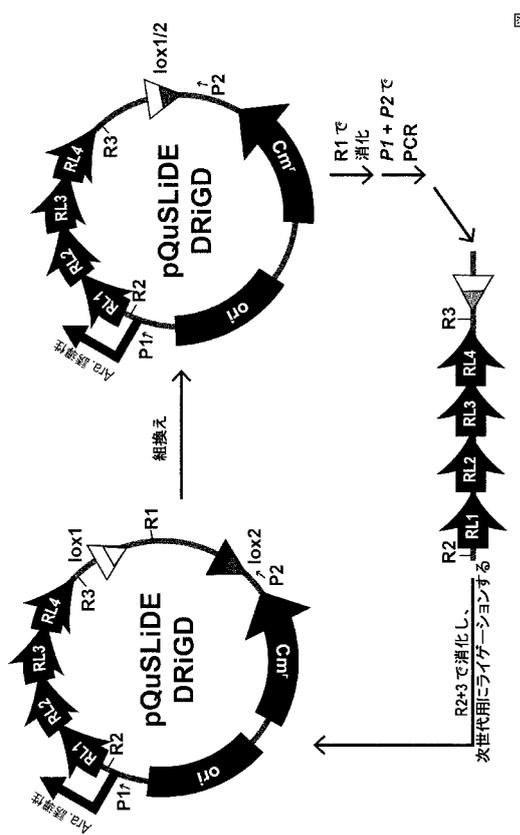
【 図 5 】



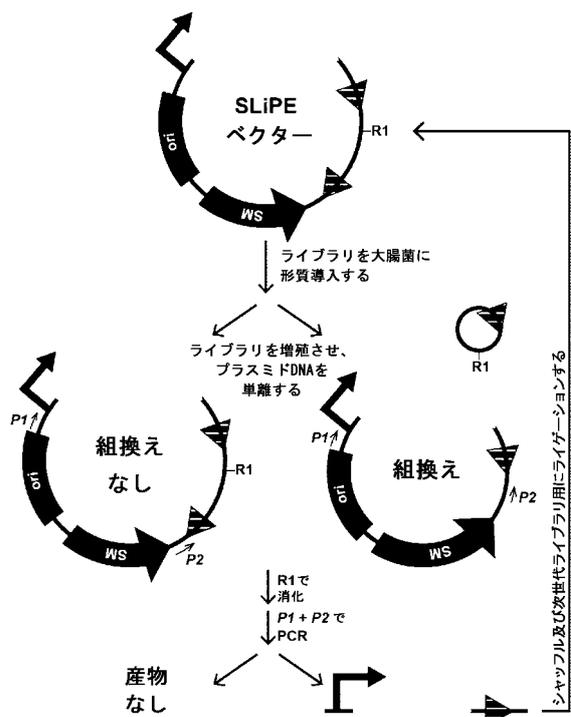
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

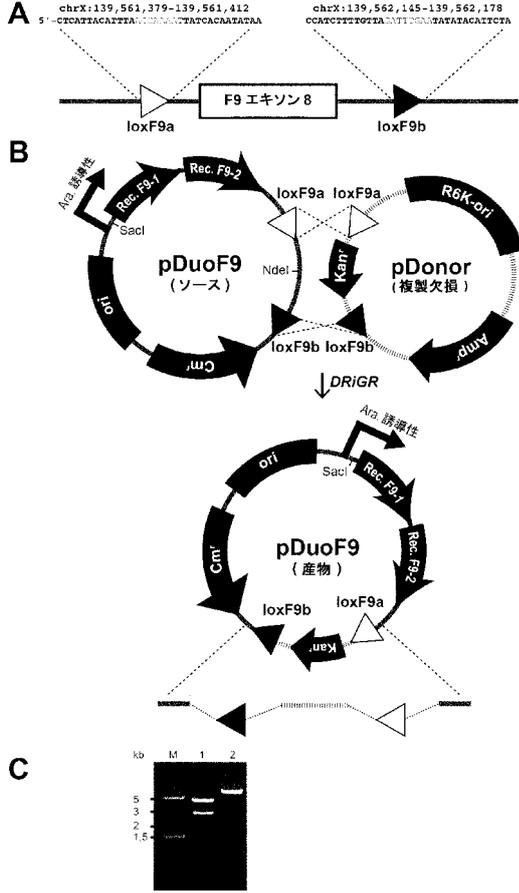


図 9

【 図 1 1 】

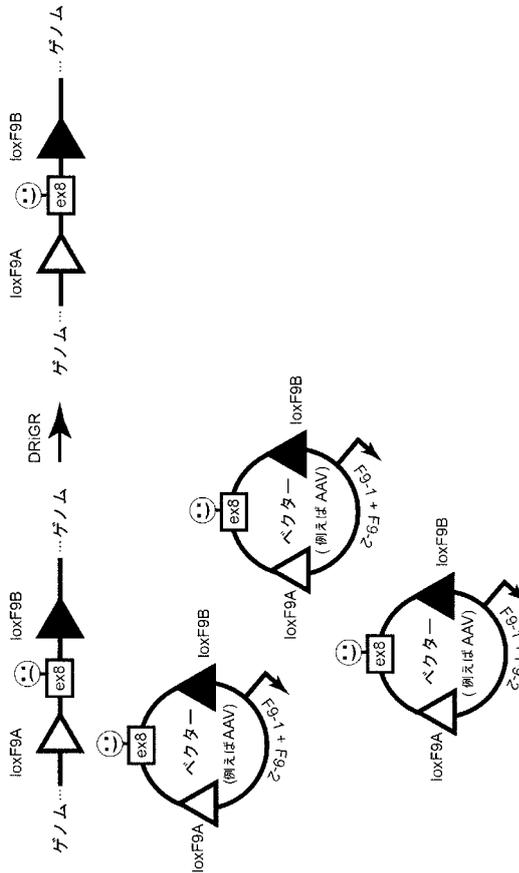


図 11

【 図 1 0 】

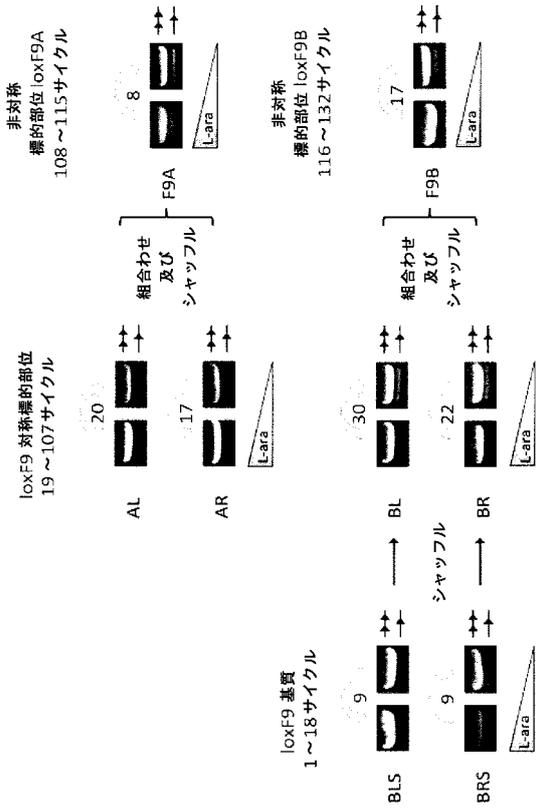


図 10

【 図 1 2 】

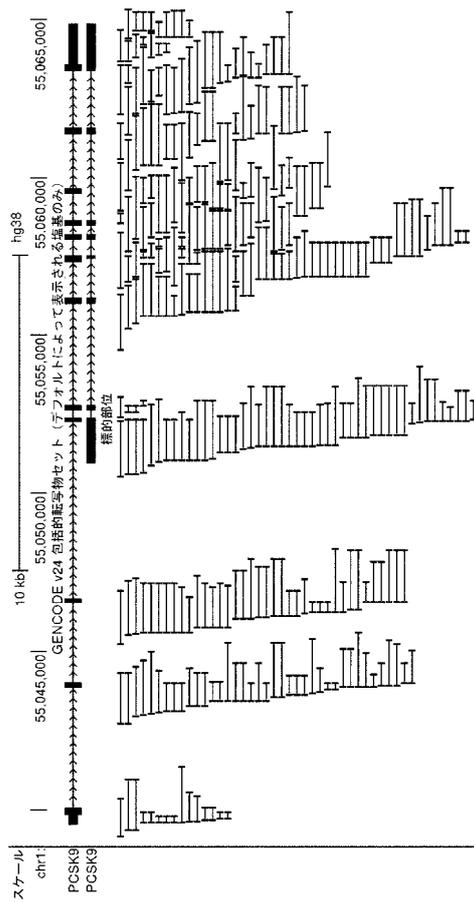


図 12

【 図 13 】

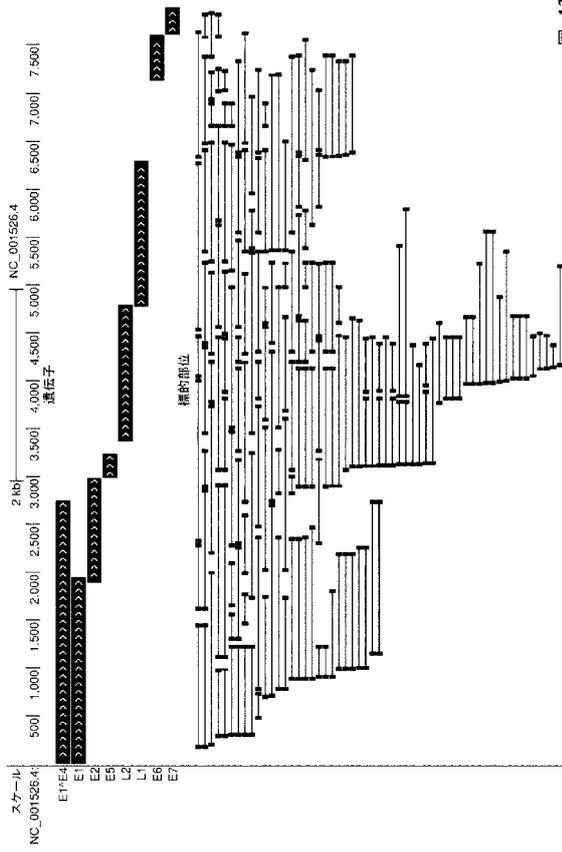


図 13

【 図 15 】

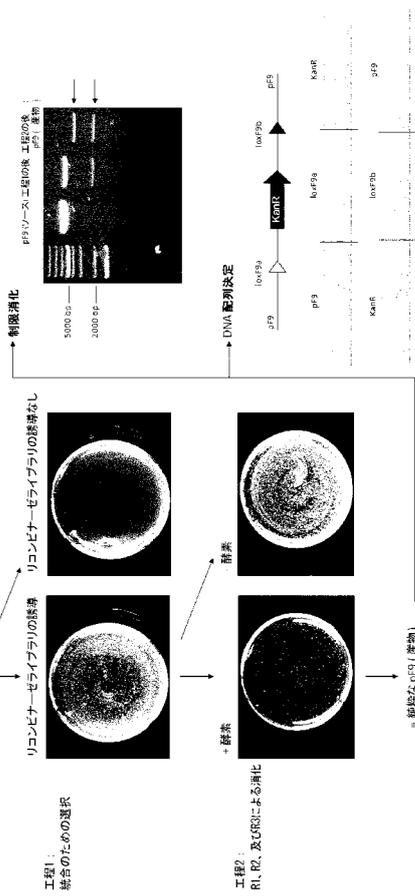


図 15

【 図 14 】

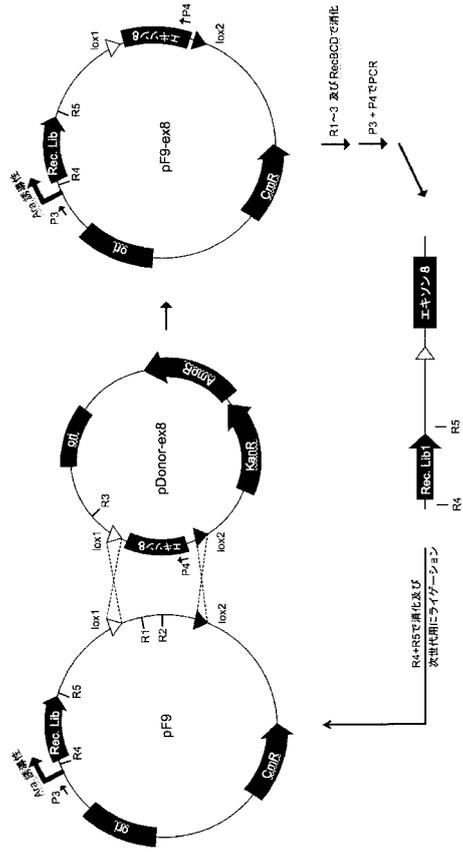


図 14

【 図 16 】

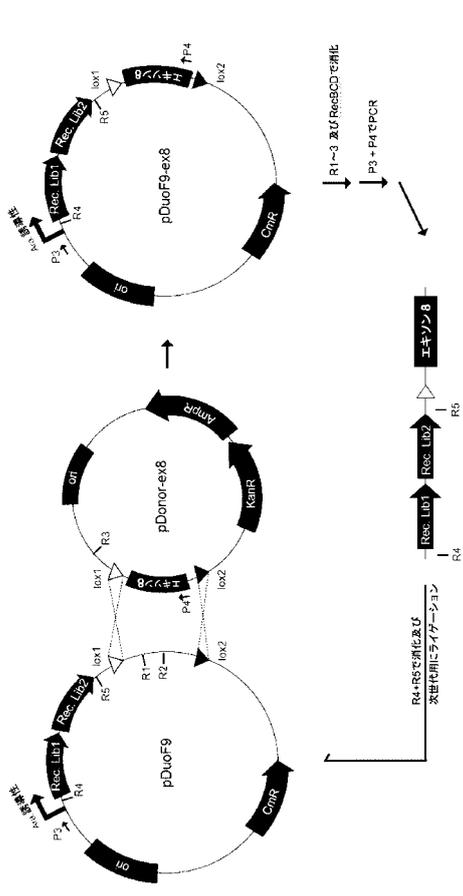


図 16

【 図 17 】

リコンビナーゼ	配列	配列番号
Cce	MSNLLTVHONLPAFLPVYDTSVTSDEVRKLVLMDFRQAFSEHTWMLLSVCRSWAACKLNN 60	39
R#1	MSKQVHONLPAFLPVYDTSVTSDEVRKLVLMDFRQAFSEHTWMLLSVCRSWAACKLNN 60	34
R#7-B5	MSKQVHONLPAFLPVYDTSVTSDEVRKLVLMDFRQAFSEHTWMLLSVCRSWAACKLNN 60	35
F#9-3	MSKQVHONLPAFLPVYDTSVTSDEVRKLVLMDFRQAFSEHTWMLLSVCRSWAACKLNN 60	36
Cce	RKWFPAEDVDYDYLILHQRGHLVNIQOHLQDLMLARRSGLEFRSDSNVAVSMVKRI 120	39
R#1	RKWFPAEDVDYDYLILHQRGHLVNIQOHLQDLMLARRSGLEFRSDSNVAVSMVKRI 120	34
R#7-B5	RKWFPAEDVDYDYLILHQRGHLVNIQOHLQDLMLARRSGLEFRSDSNVAVSMVKRI 120	35
F#9-3	RKWFPAEDVDYDYLILHQRGHLVNIQOHLQDLMLARRSGLEFRSDSNVAVSMVKRI 120	36
Cce	RKENVDAERAKALAFERDQVSLMENSRCODIRNLAFIQLGIAYNTLLRIAEIARI 180	39
R#1	RKENVDAERAKALAFERDQVSLMENSRCODIRNLAFIQLGIAYNTLLRIAEIARI 180	34
R#7-B5	RKENVDAERAKALAFERDQVSLMENSRCODIRNLAFIQLGIAYNTLLRIAEIARI 180	35
F#9-3	RKENVDAERAKALAFERDQVSLMENSRCODIRNLAFIQLGIAYNTLLRIAEIARI 180	36
Cce	RVKDISRDGGRMLHIGRTKLVISAGVEKALSLGVTKLVERWISVGVADDPNNVLF 240	39
R#1	RVKDISRDGGRMLHIGRTKLVISAGVEKALSLGVTKLVERWISVGVADDPNNVLF 240	34
R#7-B5	RVKDISRDGGRMLHIGRTKLVISAGVEKALSLGVTKLVERWISVGVADDPNNVLF 240	35
F#9-3	RVKDISRDGGRMLHIGRTKLVISAGVEKALSLGVTKLVERWISVGVADDPNNVLF 240	36
Cce	RVRKNGVAAPSOLSTALGIFPAETHRIIGAKDSDSGORVYLVNHSRARGAARDMA 300	39
R#1	RVRKNGVAAPSOLSTALGIFPAETHRIIGAKDSDSGORVYLVNHSRARGAARDMA 300	34
R#7-B5	RVRKNGVAAPSOLSTALGIFPAETHRIIGAKDSDSGORVYLVNHSRARGAARDMA 300	35
F#9-3	RVRKNGVAAPSOLSTALGIFPAETHRIIGAKDSDSGORVYLVNHSRARGAARDMA 300	36
Cce	RAGVSTPEIIMAGGWTWVIVIRNDDSETGANVRLLEDGD 343	39
R#1	RAGVSTPEIIMAGGWTWVIVIRNDDSETGANVRLLEDGD 343	34
R#7-B5	RAGVSTPEIIMAGGWTWVIVIRNDDSETGANVRLLEDGD 343	35
F#9-3	RAGVSTPEIIMAGGWTWVIVIRNDDSETGANVRLLEDGD 343	36

図 17

【 図 18 】

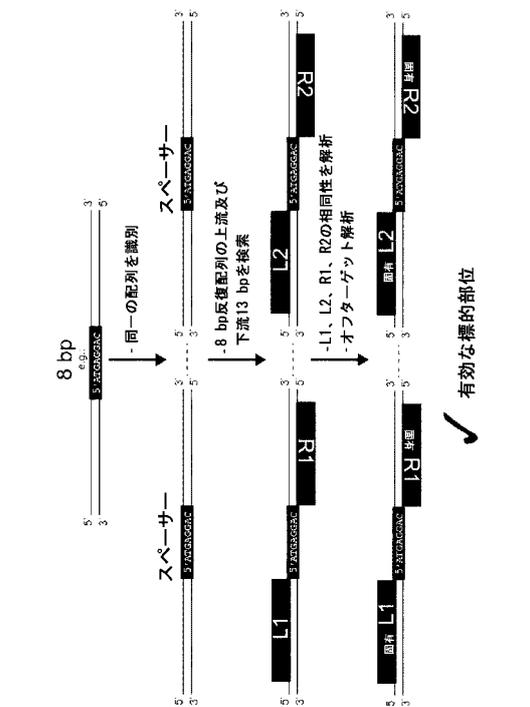


図 18

【 図 19 】

例：ヒトタンパク質コード遺伝子のノックアウトのための標的的部位

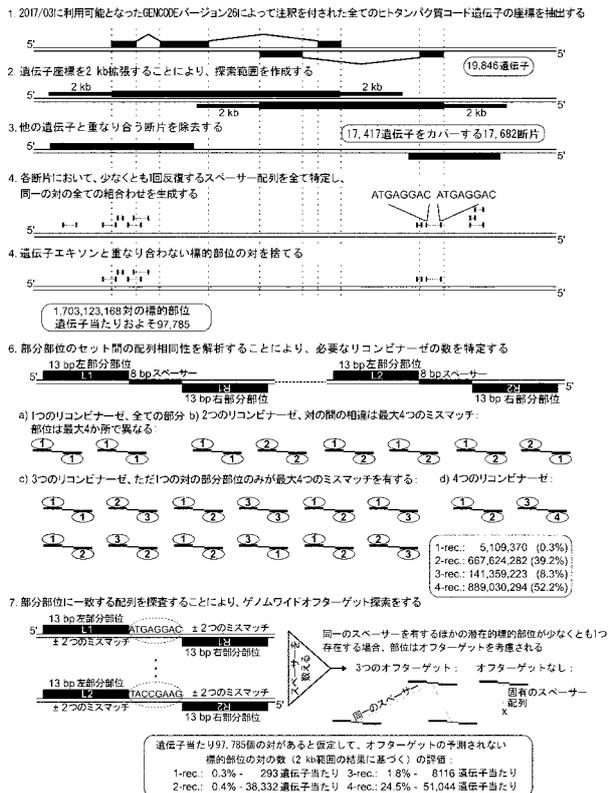


図 19

【 図 20 】

例：全てのヒト染色体に及ぶ2 kbのインターバル

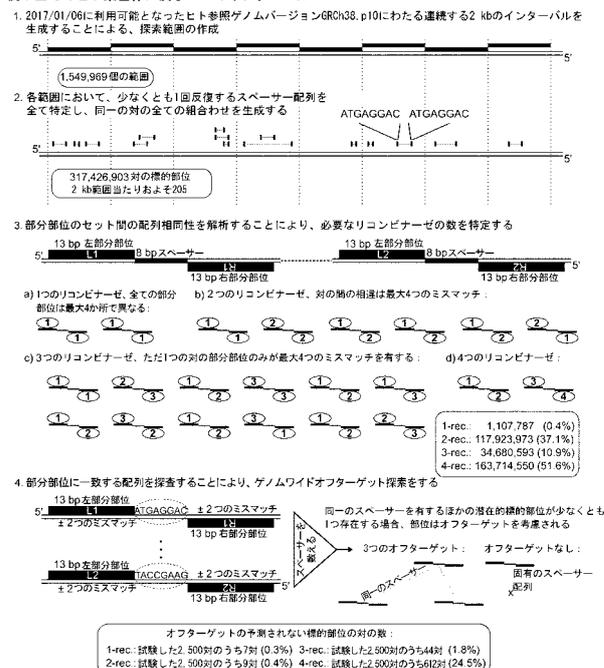
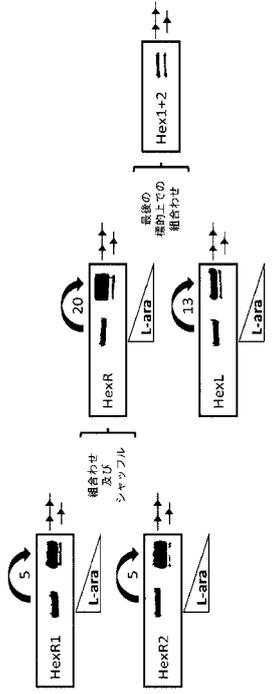
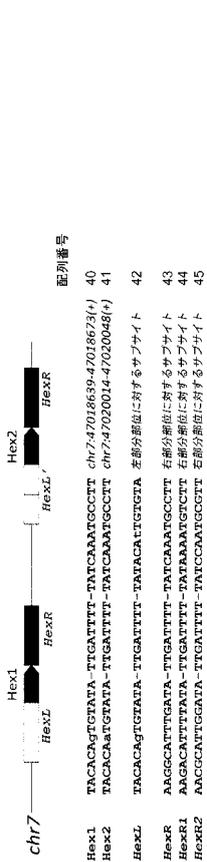


図 20

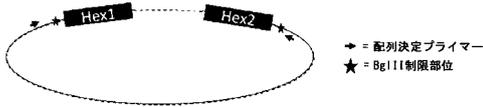
【 図 2 1 A - B 】

【 図 2 1 C 】

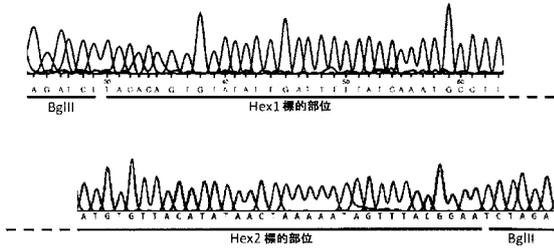


【 図 2 2 】

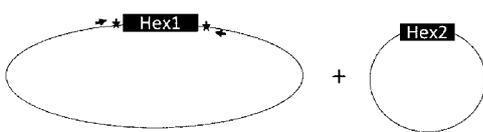
プラスミド基質の模式図



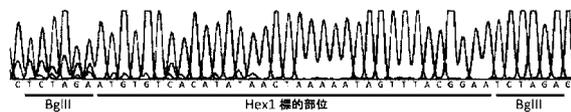
プラスミド上の標的部位の配列決定結果



組換え後のプラスミド基質の模式図



組換えプラスミド基質の配列決定結果



【配列表】

2020527938000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和2年7月6日(2020.7.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2020527938000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/065881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N9/00	C12N9/22
		C12N15/10
		C12N15/90
		C12N9/12
ADD.		
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 practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. BOLUSANI ET AL: "Evolution of variants of yeast site-specific recombinase Flp that utilize native genomic sequences as recombination target sites", NUCLEIC ACID RESEARCH, vol. 34, no. 18, 20 September 2006 (2006-09-20), pages 5259-5269, XP055319140, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkl548 the whole document	1-9, 16, 18, 25
X	US 2017/058297 A1 (HAVRANEK JAMES J [US] ET AL) 2 March 2017 (2017-03-02)	10, 11, 16, 18, 20-22, 25, 26
Y	paragraphs [0070], [0096], [0097]; claims 1-20; figures 1, 3, 4	1-9
	----- -/--	
<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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 July 2018		06/08/2018
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 Seroz, Thierry

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/065881

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/147590 A2 (PETTE HEINRICH INST [DE]; MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]; HAUBER JOACHIM) 1 December 2011 (2011-12-01) claims 1-17; figure 5; sequence 36	12-14, 17,19
Y	-----	1-9
X	KARPINSKI JANET ET AL: "Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity(incl Online Methods)", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 34, no. 4, April 2016 (2016-04), pages 401-409+4pp, XP002783093, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1093/nar/gk1548	15,16, 18,23-25
Y	the whole document	1-9
Y	-----	1
Y	SURENDRANATH VINEETH ET AL: "SeLOX--a locus of recombination site search tool for the detection and directed evolution of site-specific recombination systems.", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 38, no. Web Server Issue, July 2010 (2010-07), pages W293-W298, XP002773601, ISSN: 1362-4962, DOI: 10.1093/nar/gkq523	1
A	the whole document	1-26
A	KARPINSKI JANET ET AL: "Designer-Rekombinasen für präzisesGenome Editing", BIOSPEKTRUM, vol. 23, no. 2, 29 March 2017 (2017-03-29) , pages 151-154, XP036199778, SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, DE ISSN: 0947-0867, DOI: 10.1007/S12268-017-0780-X [retrieved on 2017-03-29]	1-26
A	the whole document	1-26
A	KONIECZKA J H ET AL: "Recombination of Hybrid Target Sites by Binary Combinations of Flp Variants: Mutations that Foster Interprotomer Collaboration and Enlarge Substrate Tolerance", JOURNAL OF MOLECULAR BIO, vol. 339, no. 2, 28 May 2004 (2004-05-28), pages 365-378, XP004506523, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2004.03.060	1-26
	the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2018/065881**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2018/ 065881

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/065881

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2017058297	A1	02-03-2017	NONE

WO 2011147590	A2	01-12-2011	AU 2011257555 A1 06-12-2012
			CA 2801913 A1 01-12-2011
			CN 103154256 A 12-06-2013
			CN 106065405 A 02-11-2016
			EP 2576798 A2 10-04-2013
			ES 2577929 T3 19-07-2016
			HK 1179302 A1 14-07-2017
			RU 2012157303 A 10-07-2014
			SG 186695 A1 28-02-2013
			US 2013164271 A1 27-06-2013
			US 2015104433 A1 16-04-2015
			US 2017130212 A1 11-05-2017
			WO 2011147590 A2 01-12-2011
			ZA 201208908 B 30-04-2014

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K	38/43	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	

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

(72) 発明者 マーティン シュナイダー
 ドイツ 0 1 3 0 7 ドレスデン フェトスチエルストル . 7 4 ユニベルシタツ クレブスゼ
 ントラム ユーシーシー メディジニスチェ ファクタルト デル ツ ドレスデン メディジニ
 スチェ システムバイオロジー

(72) 発明者 フェリックス ランシング
 ドイツ 0 1 3 0 7 ドレスデン フェトスチエルストル . 7 4 ユニベルシタツ クレブスゼ
 ントラム ユーシーシー メディジニスチェ ファクタルト デル ツ ドレスデン メディジニ
 スチェ システムバイオロジー

F ターム(参考) 4B050 CC03 LL01
 4B063 QA08 QQ08 QQ13 QR14 QR62 QS38 QX02
 4B065 AA90X AB01 BA02 CA44
 4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 AA13 CA01 CA53 DC01 NA14 ZC191
 ZC192
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZC19
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZC19