

(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2005-514957

(P2005-514957A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
A61K 35/76
A61K 38/00
A61K 48/00
A61P 9/00

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 35/76
A 61 K 48/00
A 61 P 9/00
A 61 P 25/30

Z N A A
A 61 K 48/00
A 61 P 9/00
A 61 P 25/30

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 4
4 B 06 5
4 C 08 4
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-562314 (P2003-562314)	(71) 出願人	501016559 シンジェンタ・パティシペーションズ・ア クチエンゲゼルシャフト Syngenta Participat ions AG スイス国, 4058 バーゼル, シュバル ツバルトアレー 215
(86) (22) 出願日	平成15年1月17日 (2003.1.17)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月14日 (2004.9.14)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/001529	(74) 代理人	100116311 弁理士 元山 忠行
(87) 國際公開番号	W02003/062447	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 慎史
(87) 國際公開日	平成15年7月31日 (2003.7.31)		
(31) 優先権主張番号	60/350,163		
(32) 優先日	平成14年1月18日 (2002.1.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/351,315		
(32) 優先日	平成14年1月23日 (2002.1.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】遺伝子発現を調節するための核膜および核ラミナ結合キメラ

(57) 【要約】

本発明は、核膜および/または核ラミナ結合ドメインおよびDNA結合ドメインを含む、核酸標的特異的キメラタンパク質に関する。これらのタンパク質を、これらのタンパク質をコードする核酸と同様に、選択された遺伝子の発現を抑制もしくはダウンレギュレートする方法において使用することができる。該DNA結合ドメインは、好ましくは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質(ZFPs)もしくは人工のジンクフィンガータンパク質(AZPs)に由来するものである。遺伝子調節のための分子スイッチシステムも提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的遺伝子と関連したヌクレオチド配列を特異的に結合することのできる、1つもしくはそれ以上の第1ドメイン、および核周辺部と会合することのできる、1つもしくはそれ以上の第2ドメインを含む核酸標的特異的キメラタンパク質であって、少なくとも1つの前記第1ドメインが、少なくとも1つの前記第2ドメインに対して異種であるキメラタンパク質。

【請求項 2】

前記の1つもしくはそれ以上の第1ドメインが、ジンクフィンガータンパク質 (ZFP) 10) 、人工的なジンクフィンガータンパク質 (AZP) 、ロイシンジッパートンパク質、ヘリックス-ターン-ヘリックスタンパク質、ヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質、ホメオボックスドメインタンパク質、前記のタンパク質のいずれかのDNA結合部分、またはそれらのいずれかの組み合わせを含む、請求項1のキメラタンパク質。

【請求項 3】

前記AZPが、少なくとも1つのジンクフィンガーを含むものであって、該フィンガーは、さらなるフィンガーが存在する場合には、独立して、0ないし10個のアミノ酸残基でもってそれらに共有結合し、ジンクフィンガーの-ヘリックスの-1、2、3および6位のアミノ酸が、以下のもの：

-1位において、アミノ酸は、アルギニン、グルタミン、スレオニン、メチオニンもしくはグルタミン酸であり；

2位において、アミノ酸は、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸；

3位において、アミノ酸は、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸；および

6位において、アミノ酸は、アルギニン、グルタミン、スレオニン、チロシン、ロイシンもしくはグルタミン酸である；

より選択されるものである、請求項2のキメラタンパク質。

【請求項 4】

前記AZPが、少なくとも1つのジンクフィンガーを含むものであって、それぞれのジンクフィンガーは、独立して、式：-X₃-Cys-X₂-₄-Cys-X₅-Z⁻¹-X-Z²-Z³-X₂-Z⁶-His-X₃-₅-His-X₄-

[式中：

Xは、独立して、あらゆるアミノ酸であり、X_nは、ポリペプチド鎖におけるXの存在数を示し；

Z⁻¹は、アルギニン、グルタミン、スレオニン、メチオニンもしくはグルタミン酸であり；

Z²は、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸であり；

Z³は、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸であり；および

Z⁶は、アルギニン、グルタミン、スレオニン、チロシン、ロイシンもしくはグルタミン酸である]

によって示されるものであり、該フィンガーは、さらなるフィンガーが存在する場合には、独立して、0ないし10個のアミノ酸残基でもってそれらに共有結合したものである、請求項2もしくは3のキメラタンパク質。

【請求項 5】

Z⁻¹が、アルギニン、グルタミン、スレオニンもしくはグルタミン酸であり；

Z²が、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸であり；

Z³が、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸であり；および

Z⁶が、アルギニン、グルタミン、スレオニンもしくはグルタミン酸である、

請求項4のキメラタンパク質。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

前記ジンクフィンガーの少なくとも1つのX位が、Zif268ジンクフィンガー、Sp1フィンガーもしくはSp1Cフィンガーに由来する対応アミノ酸を含む、請求項4または5のキメラタンパク質。

【請求項7】

前記の1つもしくはそれ以上の第1ドメインが、少なくとも3つのジンクフィンガーを含むものであって、それぞれのジンクフィンガーが、式：-Pro-Tyr-Lys-Cys-Pro-Glu-Cys-Gly-Lys-Ser-Phe-Ser-Z¹-Ser-Z²-Z³-Leu-Gln-Z⁶-His-Gln-Arg-Thr-His-Thr-Gly-Glu-Lys-

によって示されるものであって、前記フィンガーは互いに直接結合しているものであって、ここに、 10

Z¹が、アルギニン、グルタミン、スレオニン、メチオニンもしくはグルタミン酸であり；

Z²が、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸であり；

Z³が、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸であり；および

Z⁶が、アルギニン、グルタミン、スレオニン、チロシン、ロイシンもしくはグルタミン酸である、

請求項1のキメラタンパク質。

【請求項8】

Z¹が、アルギニン、グルタミン、スレオニン、もしくはグルタミン酸であり； 20

Z²が、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸であり；

Z³が、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸であり；および

Z⁶が、アルギニン、グルタミン、スレオニンもしくはグルタミン酸である、

請求項7のキメラタンパク質。

【請求項9】

前記AZPが、3から15個のジンクフィンガーを含み、そのいずれか1つもしくはそれ以上が前記式によって示されるものである、請求項3～8のいずれか1項のキメラタンパク質。

【請求項10】

前記AZPが、7、8もしくは9個のジンクフィンガーを含むものである、請求項9のキメラタンパク質。 30

【請求項11】

前記AZPが、6個のジンクフィンガーを含むものである、請求項10のキメラタンパク質。

【請求項12】

前記の1つもしくはそれ以上の第2ドメインが、直接的または間接的に、核膜、核ラミナ、ヘテロクロマチンもしくはそれらいずれかの組み合わせと会合する、または結合する、前記請求項のいずれか1項のキメラタンパク質。

【請求項13】

前記第2ドメインの1つがGCLタンパク質もしくはGCLタンパク質の結合部分である、請求項12のキメラタンパク質。 40

【請求項14】

前記の1つもしくはそれ以上の第2ドメインが、核膜結合タンパク質、核ラミナ結合タンパク質、ヘテロクロマチン結合タンパク質、前記タンパク質のいずれかと会合もしくは結合することのできるタンパク質、前記タンパク質のいずれかの結合部分、あるいはそれらのいずれかの組み合わせを含む、請求項12のキメラタンパク質。

【請求項15】

前記核ラミナ結合タンパク質、もしくは前記核ラミナ結合タンパク質の結合部分が、ラミンもしくはラミナ結合タンパク質である、請求項14のキメラタンパク質。

【請求項16】

前記ヘテロクロマチン結合タンパク質、もしくは前記ヘテロクロマチン結合タンパク質の結合部分が、H P 1 およびポリコーム群タンパク質 (polycomb-group protein) からなる群より選択されるものである、請求項 1 4 のキメラタンパク質。

【請求項 17】

1 から 6 個の第 1 ドメイン、および 1 から 6 の第 2 ドメインを含む、前記請求項のいずれか 1 項のキメラタンパク質。

【請求項 18】

さらに、核局在シグナルを含む、前記請求項のいずれか 1 項のキメラタンパク質。

【請求項 19】

さらに、細胞取り込みシグナルを含む、前記請求項のいずれか 1 項のキメラタンパク質 10。

【請求項 20】

さらに、核局在シグナルを含む、請求項 19 のキメラタンパク質。

【請求項 21】

治療上有効量の前記請求項のいずれか 1 項のキメラタンパク質を、医薬上許容される担体との混合物中に含む、医薬組成物。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項のキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項 23】

請求項 22 の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 24】

請求項 23 の発現ベクターを含むホスト細胞。

【請求項 25】

キメラタンパク質を調製する方法であって、

(a) 前記キメラタンパク質を発現する条件下で、請求項 24 のホスト細胞を一定時間培養すること；および

(b) 前記キメラタンパク質を回収することを含む方法。

【請求項 26】

前記ベクターが、調節のための標的遺伝子を含む細胞へのトランスフェクトに適合した真核細胞発現ベクターである、請求項 23 の発現ベクター。

【請求項 27】

治療上有効量の請求項 22 、 23 もしくは 26 のいずれか 1 項の核酸または発現ベクターを、医薬上許容される担体との混合物中に含む、医薬組成物。

【請求項 28】

標的核酸をキメラタンパク質と結合させる方法であって、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列を含む標的核酸を、請求項 1 ~ 20 のいずれかのキメラタンパク質と、前記タンパク質が前記核酸に結合するのに十分な量および時間にて、接触させることを含む方法。

【請求項 29】

標的遺伝子の発現を抑制もしくはダウンレギュレートする方法であって、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列を含む標的核酸を、請求項 1 ~ 20 のいずれかのキメラタンパク質と、前記キメラタンパク質が前記標的遺伝子の発現を抑制もしくはダウンレギュレートするのに十分な量および時間にて、接触させることを含む方法。

【請求項 30】

前記キメラタンパク質が、タンパク質として、または前記タンパク質をコードする核酸として、細胞もしくは生物に導入される、請求項 28 もしくは 29 の方法。

【請求項 31】

キメラタンパク質が、さらに、核局在シグナルを含むものである、請求項 28 ~ 30 の 50

いずれか 1 項の方法。

【請求項 3 2】

キメラタンパク質が、さらに、細胞取り込みシグナルを含むものである、請求項 2 8 ~ 3 1 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 3 3】

前記標的遺伝子が、哺乳類遺伝子、昆虫遺伝子もしくは酵母遺伝子をコードするものである、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 3 4】

前記標的遺伝子が、哺乳類に由来するものであって、サイトカイン、インターロイキン、癌遺伝子、血管形成因子、抗血管形成因子、薬物耐性遺伝子、成長因子または腫瘍サブレッサーをコードするものである、請求項 3 3 の方法。

【請求項 3 5】

前記標的遺伝子が、ウイルス遺伝子をコードするものである、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 3 6】

前記ウイルス遺伝子が、DNA ウイルスに由来するものである、請求項 3 5 の方法。

【請求項 3 7】

標的遺伝子が、植物遺伝子をコードするものである、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 3 8】

前記植物遺伝子が、ジャガイモ、トマト、トウモロコシ、コメもしくは穀物用植物に由来するものである、請求項 3 7 の方法。

【請求項 3 9】

前記標的遺伝子が、商業用動物に由来するものである、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 4 0】

(a) 標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列に特異的に結合することのできる第 1 ドメイン、および 2 倍のリガンドの第 1 の結合部分に特異的に結合することのできる第 2 ドメインを含む、第 1 の融合タンパク質であって、前記リガンドが、細胞によって取り込まれることのできるものであって、前記第 1 ドメインが、前記第 2 ドメインに対して異種である第 1 の融合タンパク質；ならびに

(b) 核周辺部と会合することのできる第 1 ドメイン、および前記の 2 倍のリガンドの第 2 の結合部分に特異的に結合することのできる第 2 ドメインを含む、第 2 の融合タンパク質；

を含む分子スイッチシステム。

【請求項 4 1】

それぞれの融合タンパク質の前記第 2 ドメインが、2 倍のリガンドのそれぞれの結合部分に対する特異性を有する抗体の 1 本鎖可変領域 (scFv) である、請求項 4 0 の分子スイッチシステム。

【請求項 4 2】

(a) 標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列に特異的に結合することができる第 1 ドメイン、および結合相手に特異的に結合することができる第 2 ドメインを含み、前記第 1 ドメインが前記第 2 ドメインに対して異種である、第 1 の融合タンパク質、ならびに

(b) 核周辺部と会合することができる第 1 ドメイン、および前記前記第 1 の融合タンパク質の第 2 ドメインの結合相手を含む第 2 ドメインを含み、前記第 1 ドメインが前記第 2 ドメインに対して異種である、第 2 の融合タンパク質

を含む分子スイッチシステム。

【請求項 4 3】

第 1 の融合タンパク質の前記第 2 ドメインが、S - タンパク質であって、前記第 2 の融合タンパク質の第 2 ドメインが、S - タグであるか、あるいはその逆である、請求項 4 2

10

20

30

40

50

の分子スイッチシステム。

【請求項 4 4】

前記第1の融合タンパク質の第1ドメインが、ジンクフィンガータンパク質 (ZFP) 、人工的なジンクフィンガータンパク質 (AZP) 、ロイシンジッパートンパク質、ヘリックス-ターン-ヘリックスタンパク質、ヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質、ホメオボックスドメインタンパク質、前記タンパク質のいずれかのDNA結合部分、またはそれらのいずれかの組み合わせを含むものである、請求項40～43のいずれか1項の分子スイッチシステム。

【請求項 4 5】

前記AZPが、少なくとも1つのジンクフィンガーを含むものであって、それぞれのジンクフィンガーは、独立して、式：-X₃-Cys-X₂-₄-Cys-X₅-Z⁻¹-X-Z²-Z³-X₂-Z⁶-His-X₃-₅-His-X₄-

[式中：

Xは、独立して、あらゆるアミノ酸であり、X_nは、ポリペプチド鎖におけるXの存在数を示し；

Z⁻¹は、アルギニン、グルタミン、スレオニン、メチオニンもしくはグルタミン酸であり；

Z²は、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸であり；

Z³は、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸であり；および

Z⁶は、アルギニン、グルタミン、スレオニン、チロシン、ロイシンもしくはグルタミン酸である]

によって示されるものであり、該フィンガーは、さらなるフィンガーが存在する場合には、独立して、0ないし10個のアミノ酸残基でもってそれらに共有結合したものである、請求項44の分子スイッチシステム。

【請求項 4 6】

Z⁻¹が、アルギニン、グルタミン、スレオニンもしくはグルタミン酸であり；

Z²が、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸であり；

Z³が、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸であり；および

Z⁶が、アルギニン、グルタミン、スレオニンもしくはグルタミン酸である、

請求項45の分子スイッチシステム。

30

【請求項 4 7】

前記ジンクフィンガーの少なくとも1つのX位が、Zif268ジンクフィンガー、Sp1フィンガーもしくはSp1Cフィンガーに由来する対応アミノ酸を含む、請求項45または46の分子スイッチシステム。

【請求項 4 8】

前記の第1の融合タンパク質の第1ドメインが、少なくとも3つのジンクフィンガーを含むものであって、

それぞれのジンクフィンガーが、式：

-Pro-Tyr-Lys-Cys-Pro-Glu-Cys-Gly-Lys-Ser-Phe-Ser-Z⁻¹-Ser-Z²-Z³-Leu-Gln-Z⁶-His-Gln-Arg-Thr-His-Thr-Gly-Glu-Lys-

によって示されるものであって、前記フィンガーは互いに直接結合しているものであって、ここに、

Z⁻¹が、アルギニン、グルタミン、スレオニン、メチオニンもしくはグルタミン酸であり；

Z²が、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸であり；

Z³が、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸であり；および

Z⁶が、アルギニン、グルタミン、スレオニン、チロシン、ロイシンもしくはグルタミン酸である、

請求項40～43のいずれか1項の分子スイッチシステム。

50

【請求項 4 9】

Z¹ が、アルギニン、グルタミン、スレオニン、もしくはグルタミン酸であり；
 Z² が、セリン、アスパラギン、スレオニンもしくはアスパラギン酸であり；
 Z³ が、ヒスチジン、アスパラギン、セリンもしくはアスパラギン酸であり；および
 Z⁶ が、アルギニン、グルタミン、スレオニンもしくはグルタミン酸である、

請求項 4 8 の分子スイッチシステム。

【請求項 5 0】

前記 A Z P が、3 から 15 個のジンクフィンガーを含み、そのいずれか 1 つもしくはそれ以上が前記式によって示されるものである、請求項 4 4 ~ 4 9 のいずれか 1 項の分子スイッチシステム。 10

【請求項 5 1】

前記 A Z P または前記第 1 ドメインが、6、7、8 もしくは 9 個のジンクフィンガーを含む、請求項 5 0 の分子スイッチシステム。

【請求項 5 2】

前記第 2 の融合タンパク質の第 1 ドメインが、核膜、核ラミナ、ヘテロクロマチン、もしくはそれらのいずれかの組み合わせと、直接もしくは間接的に、会合または結合するものである、請求項 4 0 ~ 5 1 のいずれか 1 項の分子スイッチシステム。 20

【請求項 5 3】

前記第 2 の融合タンパク質の前記第 1 ドメインが、GCL タンパク質もしくは GCL タンパク質の結合部分である、請求項 5 2 の分子スイッチシステム。 20

【請求項 5 4】

前記第 2 の融合タンパク質の前記第 1 ドメインが、核膜結合タンパク質、核ラミナ結合タンパク質、ヘテロクロマチン結合タンパク質、前記タンパク質のいずれかと会合もしくは結合することのできるタンパク質、前記タンパク質のいずれかの結合部分、あるいはそれらのいずれかの組み合わせを含む、請求項 5 2 の分子スイッチシステム。 30

【請求項 5 5】

前記核ラミナ結合タンパク質、もしくは前記核ラミナ結合タンパク質の結合部分が、ラミンもしくはラミナ結合タンパク質である、請求項 5 4 の分子スイッチシステム。

【請求項 5 6】

前記ヘテロクロマチン結合タンパク質、もしくは前記ヘテロクロマチン結合タンパク質の結合部分が、HP 1 およびポリコーム群タンパク質からなる群より選択されるものである、請求項 5 4 の分子スイッチシステム。 30

【請求項 5 7】

治療上有効量の請求項 4 0 ~ 5 6 のいずれか 1 項のキメラタンパク質を、医薬上許容される担体との混合物中に含む、医薬組成物。

【請求項 5 8】

請求項 4 0 ~ 5 6 のいずれか 1 項の分子スイッチシステムの第 1 もしくは第 2 の融合タンパク質、またはその両方をコードする核酸。

【請求項 5 9】

前記第 1 および第 2 の融合タンパク質が、協調して調節されるものである、請求項 5 8 の核酸。 40

【請求項 6 0】

前記第 1 および第 2 の融合タンパク質が、独立して調節されるものである、請求項 5 8 の核酸。

【請求項 6 1】

請求項 5 8 の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 6 2】

請求項 6 1 の発現ベクターを含むホスト細胞。

【請求項 6 3】

1 つもしくはそれ以上の融合タンパク質を調製する方法であって、

(a) 前記の1つもしくはそれ以上の融合タンパク質を発現する条件下で、請求項62のホスト細胞を一定時間培養すること；および

(b) 前記の1つもしくはそれ以上の融合タンパク質を回収することを含む方法。

【請求項64】

前記ベクターが、調節のための標的遺伝子を含む細胞へのトランスフェクションに適合した真核生物発現ベクターである、請求項61の発現ベクター。

【請求項65】

治療上有効量の請求項64の発現ベクターを、医薬上許容される担体との混合物中に含む、医薬組成物。

【請求項66】

(a) 標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列を有する標的ヌクレオチド配列を含む細胞もしくは生物を、請求項40、41または44～56のいずれか1項の分子スイッチシステムと接触させること、ついで、

(b) 前記融合タンパク質間の複合体の形成を可能にする時期または位置において、前記細胞または生物を、前記分子スイッチシステムの2価のリガンドと接触させ、そのことにより、前記標的遺伝子の発現を抑制すること

を含む、時間的もしくは空間的な様式で、標的遺伝子の発現を抑制する方法。

【請求項67】

(a) 標的遺伝子と関連したヌクレオチド配列を有する標的ヌクレオチド配列を含む細胞もしくは生物を、請求項42～56のいずれか1項の分子スイッチシステムと接触させること、ついで、

(b) 第1および第2の融合タンパク質の会合を分裂させる時期または位置において、前記細胞または生物をリガンドと接触させ、そのことにより、前記標的遺伝子の発現を抑制解除すること

を含む、時間的もしくは空間的な様式で、標的遺伝子の発現を活性化する方法。

【請求項68】

前記分子スイッチシステムの融合タンパク質が、タンパク質として、1つもしくはそれ以上の前記タンパク質をコードする1つもしくはそれ以上の核酸として、またはそれらの組み合わせとして、細胞もしくは生物へ導入されるものである、請求項66もしくは67の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、核膜および/または核ラミナ結合ドメインおよびDNA結合ドメインを含む、核酸標的特異的キメラタンパク質に関する。これらのタンパク質と、タンパク質をコードする核酸も同様に、遺伝子発現を調節するための方法において使用することができ、特に、選択された標的遺伝子の発現を抑制もしくはダウンレギュレートするために有用である。該DNA結合ドメインは、好ましくは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質(ZFPs)もしくは人工的なジンクフィンガータンパク質(AZPs)由来のものである。本発明は、遺伝子抑制および抑制解除のための、分子スイッチシステムにも関する。

【0002】

発明の背景

遺伝子の転写抑制は、機構の多様性によって達成されることがある。標準的な例は、lacリプレッサーであり、lacオペロン上の標的配列に結合すると、RNAポリメラーゼの結合およびそれによる転写開始を妨げるものである。真核生物において、遺伝子抑制を制御するさらなる機構が存在する。例えば、構成的なヘテロクロマチン中の遺伝子は、転写的にサイレントである。ヘテロクロマチンは、無作為に配置されているのではなく、核の周辺部と関連しているようであり[Cohen et al. (2001) Trends Biochem. Sci. 26, 361-366]。

. 26:41-47]、遺伝子をヘテロクロマチンの近く、または核周辺部に持っていくことは、少なくとも部分的に、遺伝子抑制において役割を果たしていることを示唆している。

【0003】

真核生物において、転写リプレッサーも、核周辺部で見いだされている。いくつかの場合において、かかるタンパク質は、核周辺部に局在するときのみ、リプレッサーとしての活性があるようである。高等真核生物（後生動物および上記）の核周辺部は、内および外膜のある核膜（NE）ならびに核ラミナから構成される。核ラミナは、内側の核膜の直下にあり、ラミンと呼ばれる中間径フィラメント、およびラミナ結合タンパク質（LAPs）より構成される。あるLAPsは、内側の核膜の膜タンパク質である。様々な種の核ラミナの組成についての議論は、Cohen et al.において行われている。

10

【0004】

Oct-1は、加齢関連コラゲナーゼ遺伝子のリプレッサーである。Oct-1の核周辺部からの解離がコラゲナーゼ遺伝子の発現を誘導することを、実験的証拠は示す[Imai et al. (1997) Mol. Biol. Cell 8: 2404-2419]。さらに、網膜芽細胞腫タンパク質（RB）活性型が、転写因子E2Fに結合すると、複合体は *in vivo* において核周辺部にラミンA/Cと共存して、転写を抑制する[Mancini et al. (1999) Dev. Biol. 215: 288-297]。マウスジャームセルレス（germ-cell-less）タンパク質（GCL）は、同様に遺伝子抑制に関与し[Nili et al. (2001) J. Cell. Sci. 114: 3297-3307]、核ラミナにおいてLAP23に結合することが報告されている（Cohen et al.）。

20

【0005】

転写因子および他のDNA結合タンパク質は、遺伝子発現を調節するために配列特異的な方法で標的に結合し、それによって標的遺伝子の発現を促進もしくは抑制する。遺伝子発現の調節は、時間的（例えば、発生もしくは細胞周期の異なる時期に）および/または空間的に（例えば、異なる組織において）達成されうる。いくつかの例では、特定の時期または特定の細胞の種類において、望ましくない遺伝子の発現を止めることができ望ましいだろう。例えば、発癌に関連し、活性化される遺伝子は、抑制の標的となつてもよい。ヘテロクロマチンおよび核周辺部に局在する遺伝子が、サイレンスにされることが知られているため、遺伝子を核周辺部に結合させる配列特異的な方法によって、その標的遺伝子の発現をサイレンスにするあるいはダウンレギュレート（抑制）する方法への道が提供されるだろう。あるいは、遺伝子を抑制状態から解放する（すなわち、それらの遺伝子を抑制解除もしくは活性化する）方法も、価値があるだろう。

30

【0006】

しかし、既知の転写因子には、限られた有用性しかないかかるタンパク質は、本来の標的配列に関連した遺伝子の制御、または密接に関連した標的配列の限られたセットには有用である。この欠点を克服するための1つの方法は、大きく複雑なゲノム中の、特に、単一の標的配列への配列特異性があらかじめ決定された、DNA結合タンパク質を設計し、構築することである。かかる操作に従うことが示されたタンパク質の1つの特定のクラスが、ジンクフィンガータンパク質（ZFPs）である。

【0007】

ZFPは、ZFP中のそれぞれのジンクフィンガーのヘリックスにおける特定のアミノ酸と、標的配列との相互作用によって、DNAを認識し、結合する、周知のDNA結合タンパク質である。ZFPは、典型的には、3から9個、時にはそれ以上のジンクフィンガーを含み、ZFPの多くのクラスが存在する；レビューのために、例えば、Laity et al. (2001) Curr. Opin. Struct. Biol. 11: 39-46を参照。ZFPのCys₂His₂クラスは、広く研究されており、特に、あらかじめ決定されたDNA標的配列に結合する、人工的なジンクフィンガータンパク質（AZPs）の設計を許容する普遍的な認識コードの開発において、有用であることが証明されている。例えば、Wolfe et al. (2000) Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29: 183-212; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10: 411-416; Segal et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2758-2763; Kim et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2812-2817; および2001年

40

50

7月23日、タカシセラに付与された、「ジンクフィンガードメイン認識コードおよびそれらの使用 (Zinc Finger Domain Recognition Code and Uses Thereof)」という名称の米国特許出願第09/911,261号を参照にする。

【0008】

A Z P の入手可能性によって、既知の調節配列だけでなく、あらゆるユニークな配列に結合する、標的遺伝子を調節できるタンパク質の設計が可能となった。これらの A Z P (もしくは他の D N A 結合タンパク質) が、1つもしくはそれ以上の、核周辺部に結合できるタンパク質ドメインと結合する場合、標的遺伝子と関連したヌクレオチド配列を結合するために使用できるキメラタンパク質が生成し、その標的遺伝子を、サイレンシングもしくはダウンレギュレーションのために、核周辺部に局在させる。これらのキメラタンパク質のドメインが、分子スイッチシステムに再構成される場合、遺伝子発現の活性化もしくは抑制のいずれかのための、システムを提供することが可能である。

【0009】

発明の概要

本発明は、標的遺伝子に関連するヌクレオチド配列に特異的に結合できる1つもしくはそれ以上の第1ドメインを有し、核周辺部に会合もしくは結合することのできる、1つもしくはそれ以上の第2ドメインを有する、核酸標的特異的なキメラタンパク質に関する。これらのタンパク質は、遺伝子発現調節において有用である。多数の第1および第2ドメインが、好ましくは、1から5のさらなるドメインも、本発明のキメラタンパク質中に存在しうる。好ましい第1ドメインは、A Z P であり、好ましい第2ドメインは、G C L タンパク質である。ある具体例において、キメラタンパク質は、細胞の取り込みおよび/または核への輸送を容易にするために、さらなるドメインを含むことができる。

【0010】

本発明の他の態様は、本発明のキメラタンパク質をコードする、単離された核酸、それらの核酸を含む発現ベクター、および該発現ベクターで（あらゆる方法によって）形質転換されたホスト細胞を提供する。かかるホスト細胞を、例えば、キメラタンパク質を発現する条件下で、ホスト細胞を一定時間培養して、次いで、キメラタンパク質を回収することにより、キメラタンパク質を調製する方法において、使用することができる。さらに、該ホスト細胞を、発現ベクターのソースとして使用して、細胞もしくは生物への遺伝子移入法によって、キメラタンパク質を送達することができる。さらに、本発明は、これらのキメラタンパク質、核酸および発現ベクターの医薬組成物を提供する。

【0011】

本発明のさらなる態様は、標的核酸（標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列を有する）を本発明のキメラタンパク質と、タンパク質が標的核酸に結合するのに十分な量および時間にて、接触させることによって、標的核酸を本発明のキメラタンパク質と結合させる方法に関する。好ましい具体例において、該キメラタンパク質は、in vivo 結合のために、核酸を介して、細胞へ導入される。あるいは、該方法は、in vitro 結合アッセイに使用することのできるキメラタンパク質を提供する。

【0012】

本発明のさらなる態様は、標的遺伝子に関連した、もしくは十分近いヌクレオチド配列を含む核酸を、本発明のキメラタンパク質と、適切な対照に比べて標的遺伝子の発現レベルが減少するのに十分な量および時間にて接触させることを含む、標的遺伝子の発現を抑制もしくはダウンレギュレートするための方法を提供する。ある態様において、該キメラタンパク質は、タンパク質、もしくは該タンパク質をコードする核酸として、細胞もしくは生物に導入される。

【0013】

企図される標的核酸の結合方法、もしくは企図される遺伝子発現の抑制方法において、標的遺伝子は、植物遺伝子、哺乳類遺伝子、昆虫遺伝子、酵母遺伝子もしくは D N A ウィルスのごときウィルス由来のものをコードするか、あるいは、標的となったヌクレオチド配列部位は、それらに由来するか、それらを制御する。標的遺伝子が哺乳類に由来する場

10

20

30

40

50

合、それは、サイトカイン、インターロイキン、癌遺伝子、抗血管新生因子、薬物耐性遺伝子および／または、選択された遺伝子を核周辺部の近くにもっていくことによって、サイレンスする、あるいはダウンレギュレートすることのできる、あらゆる他の所望の標的をコードする、または制御する。目的の植物遺伝子は、トマト、トウモロコシ、コメおよび穀物用植物の遺伝子を含むが、それらに限定されない。さらに、共通の核酸標的配列を共有する多数の標的遺伝子は、調和して、もしくは同時に制御することができる。

【0014】

本発明のさらなる態様は、遺伝子抑制に有用な、分子スイッチシステムに関する。これらのシステムは、(a) 標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列に特異的に結合することができる第1ドメイン、および2価のリガンドの第1結合部分に特異的に結合することができる第2ドメインを含む第1の融合タンパク質であって、ここに該リガンドが細胞によって取り込まれうるものであり、かつ第1ドメインおよび第2ドメインが、それぞれ異種であり；(b) 核周辺部に結合できる第1ドメイン、および2価のリガンドの第2の結合部位に特異的に結合することができる第2ドメインを含む第2の融合タンパク質を含む。第1の融合タンパク質の第1ドメインは、本発明のキメラタンパク質の第1ドメインと同じものであり；第2の融合タンパク質の第1ドメインは、本発明のキメラタンパク質の第2ドメインと同じものである。2つの融合タンパク質の第2ドメインは、それぞれの2価のリガンドの結合部分に対する特異性のある、抗体の1本鎖可変領域(scfv)であってもよい。

【0015】

本発明の他の態様は本発明の遺伝子抑制のための、融合タンパク質をコードする単離された核酸、それらの核酸を含む発現ベクター、および該発現ベクターで(あらゆる方法によって)形質転換されたホスト細胞を提供する。かかるホスト細胞を、融合タンパク質を発現する条件下で、ホスト細胞を一定時間培養して、次いで、融合タンパク質を回収することにより、融合タンパク質を調製する方法において、使用することができる。さらに、該ホスト細胞を、発現ベクターのソースとして使用して、細胞もしくは生物への遺伝子移入法によって、融合タンパク質を送達することができる。さらに、本発明は、これらの融合タンパク質の医薬組成物、分子スイッチシステム、核酸および発現ベクターを提供する。

【0016】

遺伝子抑制に有用な分子スイッチは、(a) これらの分子スイッチシステムと、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列を有する標的核酸を含む細胞もしくは生物を接触させること；および(b) 融合タンパク質間で複合体形成を可能にし、そのことによって、標的遺伝子を核周辺部に局在させることにより、前記標的遺伝子の発現を抑制することができる時間もしくは場所にて、分子スイッチシステムの2価のリガンドと、細胞もしくは生物を接触させることによって、標的遺伝子の発現を、時間的もしくは空間的に抑制する方法において使用されることができる。この分子スイッチシステムの融合タンパク質は、タンパク質として、1つもしくはそれ以上の該タンパク質をコードする1つもしくはそれ以上の核酸として、またはそれらの組み合わせとして、細胞もしくは生物へ導入されることができる。

【0017】

本発明のさらにもう一つの態様は、遺伝子抑制解除、すなわち、抑制された遺伝子の活性化に有用な分子スイッチシステムに関する。これらのシステムは、(a) 標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列に特異的に結合することのできる第1ドメイン、および結合相手に特異的に結合することができる第2ドメインを含む第1の融合タンパク質であって、ここに第1ドメインおよび第2ドメインが、それぞれ異種であり；(b) 核周辺部に結合できる第1ドメイン、および前記第1の融合タンパク質の第2ドメインの結合相手を含む第2ドメインを含み、前記第1ドメインが、前記第2ドメインについて異種である第2の融合タンパク質を含む。第1の融合タンパク質の第1ドメインは、本発明のキメラタンパク質の第1ドメインと同じものであり；第2の融合タンパク質の第1ドメインは、本発明

10

20

30

40

50

のキメラタンパク質の第2ドメインと同じものである。第1の融合タンパク質の第2ドメインは、S-タンパク質(S-protein)であってもよく、前記第2の融合タンパク質の第2ドメインは、S-タグ(S-tag)であってもよく、または逆であってもよい。

【0018】

本発明の他の態様は、本発明の遺伝子抑制解除のための、これらの融合タンパク質をコードする単離された核酸、それらの核酸を含む発現ベクター、および該発現ベクターで(あらゆる方法によって)形質転換されたホスト細胞を提供する。かかるホスト細胞を、融合タンパク質を発現する条件下で、ホスト細胞をしばらく培養して、次いで、融合タンパク質を回収することにより、融合タンパク質を調製する方法において、使用することができる。さらに、該ホスト細胞を、発現ベクターの原料として使用して、細胞もしくは生物への遺伝子移入法によって、融合タンパク質を送達することができる。さらに、本発明は、これらの融合タンパク質の医薬組成物、分子スイッチシステム、核酸および発現ベクターを提供する。

【0019】

遺伝子抑制解除に有用な分子スイッチは、(a)これらの分子スイッチシステムと、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列を有する標的核酸を含む細胞もしくは生物を接触させること；および(b)第1および第2の融合タンパク質の複合体を分裂させ、そのことによって、前記標的遺伝子の発現を抑制解除する時間もしくは場所にて、分子スイッチシステムのリガンドと、細胞もしくは生物を接触させることによって、時間的もしくは空間的に、標的遺伝子の発現を変化させる方法において使用されることができる。この分子スイッチシステムの融合タンパク質は、タンパク質として、1つもしくはそれ以上の該タンパク質をコードする1つもしくはそれ以上の核酸として、またはそれらの組み合わせとして、細胞もしくは生物へ導入されることができる。

【0020】

発明の詳細な説明

A. 本発明のキメラタンパク質

本発明は、標的遺伝子を核周辺部に導き、その結果、その遺伝子の発現をサイレンスもしくはダウンレギュレートすることによって、遺伝子の発現を抑制するための、標的特異的なキメラタンパク質に関する。該キメラタンパク質は、少なくとも2つの異種ドメイン：標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列を特異的に結合させることのできる第1ドメイン、および核膜、核ラミナ、ヘテロクロマチン、もしくはそれら3つのいずれかの組み合せにおいて、もしくはその中で、タンパク質に結合するもしくはタンパク質と会合することによって、核周辺部と会合することができる第2のドメインを含む。本発明のキメラタンパク質は、遺伝子発現の調節、特に、選択された遺伝子の発現の抑制もしくはダウンレギュレートにおいて、有用である。例えば、癌、細胞の増殖および再生、血管形成(腫瘍のような、望ましくない血管形成が起こる場合)に、あるいは特定の発生もしくは成長段階の植物において関与する遺伝子をダウンレギュレートもしくは停止することが、望ましいであろう。同様に、本発明のキメラタンパク質を、ウイルス遺伝子をダウンレギュレートもしくは停止するために使用することができる。

【0021】

本明細書中で使用される、「核周辺部」という語は、核膜および核ラミナを含む。核周辺部の近くにある遺伝子とは、物理的に核周辺部に隣接しており、本発明に従えば、タンパク質と(共有結合的もしくは非共有結合的な)会合体を形成することによって配置され、核膜、核ラミナまたは核膜もしくは核ラミナと会合したヘテロクロマチンと結合するかそれらの1部分を形成するものである。本発明の目的のために、核周辺部に関連した遺伝子の物理的位置を決定する必要はないが、むしろ、正常な発現レベル、もしくは発現の対照レベルに対する遺伝子発現の減少を測定および使用して、遺伝子が核周辺部にあるかまたはその近くにあるかを評価することができる。

【0022】

本明細書中で使用される、「キメラタンパク質」もしくは「キメラタンパク質(複数形)

10

20

30

40

50

」という語は、本発明のタンパク質が、天然に存在しないタンパク質であることを示すために使用される。本発明のタンパク質は、核酸結合ドメインおよび核周辺部と会合できるドメインであって、異なるソースに由来する、すなわち、2つのドメインがそれぞれ異種であるものを組み合わせた人工的な構築物である。多数のドメインが存在する場合、1つの核酸結合ドメインが、核周辺部と会合できるドメインと異なるソースに由来すれば十分である。異種ドメインのソースは、いずれの組み合わせも天然のタンパク質を生じるものでなく、独立して、異なる種、生物の異なる株、単一の生物の異なるタンパク質、もしくは所望の活性を有するように設計された人工的なタンパク質に由来してもよい。

【0023】

該キメラタンパク質の核酸結合ドメインは、標的遺伝子と関連したヌクレオチド配列に特異的に結合する。そのドメインの同一性および特徴は、キメラタンパク質によって結合されることが望ましいヌクレオチド配列によって決定される。本明細書中で使用される、「特異的に結合する」とは、例えば、温度、イオン強度、溶媒の極性等のごとき特定の条件のセットの下での、他のヌクレオチド配列への結合または会合よりも検出可能でより大きな程度（例えば、少なくともバックグラウンドの1.5倍）での、DNA結合部分もしくはタンパク質（例えば、タンパク質全体として、ドメインとして、もしくは本発明のキメラタンパク質に存在するものとして）の特定のヌクレオチド配列との結合または会合を意味し、それに対する言及を包含し、かつ、他のヌクレオチド配列の実質的排除を意味し、それに対する言及を包含する。当業者によく知られた、ゲルシフトアッセイは、結合が特定のヌクレオチド配列に特異的であるかを評価および証明するために、有用な1つの方法である。

【0024】

標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列の性質および位置を制御することが可能である。本明細書中で使用される、「標的ポリヌクレオチド」「標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列」もしくは「標的にされたヌクレオチド配列」または他の類似用語は、2本鎖ポリヌクレオチド、好ましくはDNAの部分であって、キメラタンパク質のDNA結合ドメインが結合するものをいう。標的ヌクレオチド配列は、その標的遺伝子の発現を抑制するのに適した場所を提供する、あらゆる場所、調節される標的遺伝子の近くもしくはその内部であってもよい。例えば、標的ヌクレオチド配列は、コード領域内、それらのすぐ上流もしくは下流であってもよく、あるいは、選択されたヌクレオチド配列が依然として遺伝子を核周辺部に十分近いところに持ってくる結果、当該遺伝子の発現をその正常または他の制御されたレベルよりも低下させる場合には、標的ヌクレオチド配列は幾分離れたところ（例えば、数百ヌクレオチド）にあってもよい。標的ヌクレオチド配列は、標的遺伝子の既知の転写制御エレメントの全部もしくは一部であってもよい。

【0025】

標的ヌクレオチド配列の長さは、6-10ヌクレオチドから、約50、60、70もしくはそれ以上のヌクレオチドにわたってもよい。適當なヌクレオチド配列の長さの例は、約8から約30、約10から約25、および約10から約20ヌクレオチドである。約16ヌクレオチドの長さは、ヒトのゲノムにおいて、単一の標的部位を提供するのに十分である。DNA結合ドメインの特異性および親和性、標的となる生物および配列の性質は、全て、標的ヌクレオチド配列の適切な長さを決定する際の要素となりうる。当業者なら、かかる考察に基づいて、標的ヌクレオチド配列の長さおよび同一性を、容易に決定できる。

【0026】

キメラタンパク質の核酸結合ドメインは、既知もしくは人工的なDNA結合タンパク質またはDNA結合活性を有するそれらの断片であってもよい。DNA結合タンパク質の例は、ジンクフィンガータンパク質（ZFPs）、人工的なジンクフィンガータンパク質（AZPs）、転写因子のDNA結合部分、核ホルモン受容体、のごときホメオボックスドメインタンパク質、ラムダリプレッサー、tetリプレッサー、Gal4、TATA結合タンパク質のごときヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフタンパク質、mycおよびm

10

20

30

40

50

y o D のごときヘリックス - ターン - ヘリックスモチーフタンパク質、f o s およびj u n のごときロイシンジッパー型タンパク質、ならびにm e t 、a r c およびm n t リプレッサーのごとき - シートモチーフタンパク質、またはそれらのタンパク質のいずれかのD N A 結合部分を含むが、それらに限定されない。かかるタンパク質および部分は、当業者に知られている。

【 0 0 2 7 】

本発明の核酸結合ドメインに好ましいD N A 結合タンパク質は、Z F P およびA Z P である。Z F P には多くのクラスがあり、C y s₂ H i s₂ クラス（例えば、S p I C およびZ i f 2 6 8 ）、C y s₆ （例えば、G a l 4 D N A 結合タンパク質）ならびにC y s₄ （例えば、エストロジエンホルモン受容体）を含むがそれらに限定されない；所望のヌクレオチド配列特異性を有するこれらのタンパク質のいずれかを使用することができる。
10

【 0 0 2 8 】

「ジンクフィンガータンパク質」「ジンクフィンガーポリペプチド」「Z F P 】「人工的なジンクフィンガータンパク質」もしくは「A Z P 」は、亜鉛によって安定化されるD N A 結合ドメインを有するポリペプチドを意味する。典型的に、「フィンガー」として示され、個々のD N A 結合ドメインは、Z F P もしくはペプチドが、少なくとも1つのフィンガー、典型的には2つのフィンガー、より好ましくは3つのフィンガー、またはさらに好ましくは4つもしくは5つのフィンガー、6つもしくはそれ以上のフィンガーを有する。それぞれのフィンガーは、D N A の3もしくは4塩基対を結合する。C y s₂ H i s₂ クラスのZ F P およびA Z P において、それぞれのフィンガーは、典型的に、約30アミノ酸の、亜鉛を配位した、D N A 結合部分ドメインである。C y s₂ H i s₂ クラスの代表的な配列モチーフは、-Cys-(X)₂₋₄-Cys-(X)₁₋₂-His-(X)₃₋₅-Hisであり、ここに、Xはいずれのアミノ酸でもよい（配列番号1）。2つの不变のヒスチジン残基および2つの不变のシステイン残基は、亜鉛イオンを結合する[例えば、Berg et al. (1996) Science 271: 1081-1085を参照]。
20

【 0 0 2 9 】

本発明の1つの具体例において、該キメラタンパク質は、少なくとも1つのジンクフィンガーを含むAZPである第1ドメインを有し、それぞれのフィンガーは式-X₃-Cys-X₂₋₄-Cys-X₅-Z⁻¹-X-Z²-Z³-X₂-Z⁶-His-X₃₋₅-His-X₄-（配列番号2）であり、ここに、複数のフィンガーが存在する場合には、独立して、それらは0ないし10個のアミノ酸残基でもって互いに共有結合し、Xはいずれかのアミノ酸を表し、X n はポリペプチド鎖中に存在するXの数を表し、Z⁻¹、Z²、Z³ およびZ⁶ は、表1および2に示される（そしてさらに後で説明される）認識コードによって決定される。
30

【 0 0 3 0 】

Xによって示されるアミノ酸は、ジンクフィンガーの骨格を形成し、既知のジンクフィンガー骨格、一致した骨格、これらの骨格のいずれかの配列を変化させることによって得られる骨格、またはあらゆる人工的な骨格であってもよい。好ましい既知の骨格は、それぞれのXの同一性を決定するために使用される。ある具体例において、Xを決定するための骨格は、Sp1、Sp1CもしくはZif268である。好ましい具体例において、骨格は、配列が-Pro-Tyr-Lys-Cys-Pro-Glu-Cys-Gly-Lys-Ser-Phe-Ser-Z⁻¹-Ser-Z²-Z³-Leu-Gln-Z⁶-His-Gln-Arg-Thr-His-Thr-Gly-Glu-Lys-（配列番号3）である、Sp1C ドメイン2（すなわち、S p 1 C の中指）配列を有する。かかるA Z P は、2 0 0 1 年 7 月 2 3 日、セラタカシ出願の米国特許出願第09/911,261号により詳細に記載されている。
40

【 0 0 3 1 】

本発明のA Z P は、3、4、5、6、7、8もしくは9個のフィンガーを有するZ F P と同様に、3から40個のジンクフィンガー、3から15個のフィンガー、3から12個のフィンガー、3から9個のフィンガー、もしくは3から6個のフィンガーを含むことができる。

【 0 0 3 2 】

上記の式において、 Z^{-1} 、 Z^2 、 Z^3 および Z^6 として設計される該ジンクフィンガーの 4 つの核酸接触残基は、DNA 結合の特異性および親和性の決定に主に関与する。これらの 4 つのアミノ酸残基は、塩基接触アミノ酸として示されてもよい。これら 4 つの残基は、第 1 のコンセンサスヒスチジンおよびコンセンサスシステインに対して同じ位置にある。第 1 の残基は、第 1 の一致したヒスチジンの N 末端側に 7 残基、第 2 のシステインの C 末端側に 6 残基のところである。第 1 の残基は、「-1 ポジション」としても示され、ジンクフィンガー中の - ヘリックスの N 末端にすぐ隣接した残基を示すことから、そのように言われている（よってポジション 1 は、- ヘリックスの第 1 の N 末端残基である）。他の 3 つのアミノ酸は、- ヘリックスのポジション 2、3 および 6 にあり、それぞれ「2 ポジション」「3 ポジション」および「6 ポジション」として示される。これら 4 つのポジションは、 Z^{-1} 、 Z^2 、 Z^3 および Z^6 として、互換的に本明細書中で示される。

10

20

30

40

50

【0033】

認識コードの表は、所定のヌクレオチド配列について、 Z^{-1} 、 Z^2 、 Z^3 および Z^6 の同一性を決定する方法を提供する。認識コード表（ヌクレオチド配列のそれぞれ 4 塩基対について）において、塩基は常に 5' から 3' の順に提供される。しかし、第 4 の塩基は、常に、標的配列において提供される第 4 の塩基の相補である。例えば、標的配列が、ATCC と書かれているならば、標的配列のセンス鎖が 5'-ATCC-3' であって、アンチセンス鎖が 3'-TAGG-5' であることを意味する。従って、センス鎖の配列 ATCC が、以下の表 1 のアミノ酸に翻訳された場合、第 1 塩基の A は、ポジション 6 にグルタミンがあることを意味し、第 2 塩基の T は、ポジション 3 にセリンがあることを意味し、第 3 塩基の C は、ポジション -1 にグルタミン酸があることを意味する。しかし、C として書かれた第 4 塩基については、表中にある C の相補鎖、すなわち G が、ポジション 2 のアミノ酸の同定に使用される。この場合、ポジション 2 のアミノ酸はセリンである。

【0034】

表 1 および 2 は、本発明において有効である、AZP のための、好ましい、選択的な認識コード表を、それぞれ一覧形式にて提供する：

【表 1】

	第 1 塩基	第 2 塩基	第 3 塩基	第 4 塩基
G	Arg	His	Arg	Ser
A	Gln	Asn	Gln	Asn
T	Thr, Tyr, Leu	Ser	Thr, Met	Thr
C	Glu	Asp	Glu	Asp
	ポジション 6	ポジション 3	ポジション -1	ポジション 2

【表 2】

	第 1 塩基	第 2 塩基	第 3 塩基	第 4 塩基
G	Arg, Lys	His, Lys	Arg, Lys	Ser, Arg
A	Gln, Asn	Asn, Gln	Gln, Asn	Asn, Gln
T	Thr, Tyr, Leu, Ile, Met	Ser, Ala, Val, Thr	Thr, Met, Leu, Ile	Thr, Val, Ala
C	Glu, Asp	Asp, Glu	Glu, Asp	Asp, Glu
	ポジション 6	ポジション 3	ポジション -1	ポジション 2

表 2 において、それぞれのマスに示されたアミノ酸の順は、左から右方向に、その場所において、より好ましい - あまり好ましくないアミノ酸を示している。

【0035】

これらの認識コード表は、以下のように記載されていてもよい。A Z P のための好ましい認識コード表（表 1 に相当する）は、各 4 塩基標的配列のためのものであり、5' から 3' の順になっている：

- (i) 第 1 塩基が G ならば、Z⁶ はアルギニンであり、
第 1 塩基が A ならば、Z⁶ はグルタミンであり、
第 1 塩基が T ならば、Z⁶ はスレオニン、チロシンもしくはロイシンであり、
第 1 塩基が C ならば、Z⁶ はグルタミン酸であり
- (ii) 第 2 塩基が G ならば、Z³ はヒスチジンであり、
第 2 塩基が A ならば、Z³ はアスパラギンであり、
第 2 塩基が T ならば、Z³ はセリンであり、
第 2 塩基が C ならば、Z³ はアスパラギン酸であり
- (iii) 第 3 塩基が G ならば、Z⁻¹ はアルギニンであり、
第 3 塩基が A ならば、Z⁻¹ はグルタミンであり、
第 3 塩基が T ならば、Z⁻¹ はスレオニンもしくはメチオニンであり、
第 3 塩基が C ならば、Z⁻¹ はグルタミン酸であり
- (iv) 第 4 塩基の相補塩基が G ならば、Z² はセリンであり、
第 4 塩基の相補塩基が A ならば、Z² はアスパラギンであり、
第 4 塩基の相補塩基が T ならば、Z² はスレオニンであり、および
第 4 塩基の相補塩基が C ならば、Z² はアスパラギン酸である。

上記の認識コード（すなわち、表 1 の認識コード）の好ましい具体例において、第 1 塩基が T ならば、Z⁶ はスレオニンであり；第 3 塩基が T ならば、Z⁻¹ はスレオニンである（表 1）。 20

【0036】

別の認識コード表（表 2 に相当する）も、次のものとして存在しうる：

- (i) 第 1 塩基が G ならば、Z⁶ はアルギニンもしくはリジンであり、
第 1 塩基が A ならば、Z⁶ はグルタミンもしくはアスパラギンであり、
第 1 塩基が T ならば、Z⁶ はスレオニン、チロシン、ロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであり、
第 1 塩基が C ならば、Z⁶ はグルタミン酸もしくはアスパラギン酸であり
- (ii) 第 2 塩基が G ならば、Z³ はヒスチジンもしくはリジンであり、
第 2 塩基が A ならば、Z³ はアスパラギンもしくはグルタミンであり、
第 2 塩基が T ならば、Z³ はセリン、アラニン、バリンもしくはスレオニンであり、
第 2 塩基が C ならば、Z³ はアスパラギン酸もしくはグルタミン酸であり
- (iii) 第 3 塩基が G ならば、Z⁻¹ はアルギニンもしくはリジンであり、
第 3 塩基が A ならば、Z⁻¹ はグルタミンもしくはアスパラギンであり、
第 3 塩基が T ならば、Z⁻¹ はスレオニン、メチオニン、ロイシンもしくイソロイシンはであり、
第 3 塩基が C ならば、Z⁻¹ はグルタミン酸もしくはアスパラギン酸であり
- (iv) 第 4 塩基の相補塩基が G ならば、Z² はセリンもしくはアルギニンであり、
第 4 塩基の相補塩基が A ならば、Z² はアスパラギンもしくはグルタミンであり、
第 4 塩基の相補塩基が T ならば、Z² はスレオニン、バリンもしくはアラニンであり、
第 4 塩基の相補塩基が C ならば、Z² はアスパラギン酸もしくはグルタミン酸である。

【0037】

認識コード表を使用して、所定のヌクレオチド配列についての A Z P を設計し、同定するために、N が標的中の部分的に重複した 4 塩基対のセグメントの数である、3 N + 1 塩

10

20

30

40

50

基対のヌクレオチド配列は、N-1のセグメントまでの、それぞれのセグメントの第4の塩基がすぐ次のセグメントの第1塩基である、部分的に重複した4塩基対のセグメントに分けられる。ジンクフィンガーにおけるZ⁻¹、Z²、Z³およびZ⁶それぞれの同一性は、該認識コード表に従って決定される。

【0038】

本発明に従って設計されたジンクフィンガーは、もう一方と直接共有結合的に結合するか、1-10個のアミノ酸のリンカーによって分けられているかのいずれかである。該リンカーアミノ酸は、可動性もしくはある程度の構造的な強直性を与えることができる。リンカーの選択は、所望のZFPの、同種のヌクレオチド配列への親和性によって決定されるが、必ずしもそうではない。同種の標的配列へのAZPの結合親和性を向上させるための、様々なリンカー配列を試験し最適化することは、当該技術の範囲内である。例えば、6フィンガーZFPのための1つの有用な組み合わせは、アミノ酸リンカーなしで結合した始めの3つのジンクフィンガー、第3および第4フィンガー間の可動的なアミノ酸リンカー、ならびにアミノ酸リンカーなしで結合した後ろ3つのフィンガーを有するものである。この組み合わせは、他の3つのフィンガー群の結合に対する立体障害を最小化させつつ、それぞれ3つのフィンガー群が、独立してその標的配列を結合できるようにすると思われる。

【0039】

1つの具体例において、GGGGS、GGGSおよびGGS（これらの配列は、AZPにおける付加的な1-10のアミノ酸の一部となりうる；それぞれ配列番号4、配列番号4の残基2-5および配列番号4の残基3-5）を含むが、それらに限定されない可動性リンカーを用いて、他のマルチフィンガーAZPに結合したマルチフィンガーAZPを使用して、より長いゲノム配列が標的とされる。

【0040】

さらに、本発明のキメラタンパク質の核酸結合ドメインは、単一のドメインもしくは複数のドメインのいずれかを用いて、非隣接ヌクレオチド配列に結合するように設計されてもよい。例えば、6フィンガーのAZPによって結合したヌクレオチド配列は、10塩基対の配列（3つのフィンガーによって認識される）であって、介在塩基（他の3つのフィンガーによって認識されない）を有するものであってもよい。介在塩基の数は多様であり、適切に設計されたアミノ酸リンカーで、AZPの2つの3フィンガー部分の間の介在距離を補正することができる。標的結合部位において介在する核酸塩基の範囲は、5~100塩基できることができる、好ましくは10~20もしくはそれ以下の塩基、より好ましくは10もしくはそれ以下であり、さらにより好ましくは6もしくはそれ以下の塩基であろう。もちろん、リンカーは、連結されたAZPの部分間の読み替りを維持する。

【0041】

ファージディスプレイ、ランダム変異導入法、コンビナトリアルライブラリー、コンピュータ/合理的設計、アフィニティーセレクション、PCR、cDNAもしくはゲノムライブラリーからのクローニング、合成的構築およびその類似法によって、ZFPおよびAZPをコードする核酸を設計し、構築する方法は既知である（例えば、米国特許第5,786,538号；Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 344-348 (1995); Jamieson et al., Biochemistry 33: 5689- 5695 (1994); Rebar & Pabo, Science 263: 671-673 (1994); Choo & Klug, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11168-11172 (1994); Desjarlais et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7345-5349 (1992); Desjarlais et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2256-2260 (1993); Desjarlais et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11099-11103; Pomerantz et al., Science 267: 93-96 (1995); Pomerantz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9752-9756 (1995); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5525- 5530 (1997); Griesman & Berg, Science 275: 657-661 (1997)；2001年7月23日、タカシセラに付与された米国特許出願第09/911,261号（Sera出願）参照）。例えば、Sera出願には、AZPのコンビナトリアルライブラリーを得るために適応されうる、モジュラー式のAZP製造方法が記載されている。これらのAZPを、

標的遺伝子に、もしくはその近くに結合するAZPを同定するための、スクリーニング/セレクションアッセイにおいて使用することができる。かかるAZPがわかれれば、それらは本発明のキメラタンパク質の第1ドメインとして働くことができる。同様に、in vitroもしくはin vivoの手順にかかわらず、スクリーニングもしくはセレクションの手順によって得られる、あらゆるAZP(もしくはZFP)を、AZP(もしくはZFP)が、本発明によって意図された方法にて、標的遺伝子と特異的に結合もしくは会合するようにする、第1ドメインとして使用することができる。

【0042】

本発明によると、本発明のキメラタンパク質は、多数の第1核酸結合ドメインを有することができる。かかるそれぞれのドメインは、選択されたヌクレオチド配列に特異的に結合する。かかる配列は、互いに近くても、キメラタンパク質が核周辺部に局在して、会合した標的遺伝子(gene or genes)の発現を抑制することを妨げない距離で位置していてもよい。第1ドメインが存在する場合、ヌクレオチド配列は、該ヌクレオチド配列および核周辺部の両方と、キメラタンパク質の結合体もしくは会合体が遺伝子発現を抑制する、意図された標的遺伝子に関連したあらゆる位置に存在することができる。さらなる第1ドメインを、転写抑制を促進するために、本発明のキメラタンパク質に加えることができる。該キメラタンパク質は、1つから6つの第1ドメイン、1つから3つの第1ドメイン、または1つの第1ドメインを有する。

【0043】

他の転写リプレッサーの例は、ヒトKOX-1タンパク質由来のKRAB抑制ドメインを含むがそれらに限定されない(Thiesen et al., New Biologist 2: 363-374 (1990); Margolin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 4509-4513 (1994); Pengue et al., Nucl. Acids Res. 22: 2908-2914 (1994); Witzgall et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 4514-4518 (1994))。KRABのコリプレッサーであるKAP-1を、KRABと共に使用することができる(Friedman et al., Genes Dev. 10:2067-2078 (1996))。KAP-1もまた、単独で使用することができる。転写リプレッサーとして働く他の転写因子および転写因子ドメインは、MAD(例えば、Sommer et al., J. Biol. Chem. 273:6632-6642 (1998); Gupta et al., Oncogene 16:1149-1159 (1998); Queva et al., Oncogene 16:967-977 (1998); Larsson et al., Oncogene 7:737-748 (1997); Laherty et al., Cell 89:349-356 (1997); and Cultraro et al., Mol. Cell. Biol. 17:2353-2359 (1997)参照); FKHR(横紋筋肉腫遺伝子におけるフォークヘッド(forkhead in rhabdomyoma gene); Ginsberg et al., Cancer Res. 15:3542-3546 (1998); Epstein et al., Mol. Cell. Biol. 18:4118-4130 (1998)); EGR-1(初期成長応答遺伝子産物-1(early growth response gene product-1); Yan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:8298-8303 (1998); and Liu et al., Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998)); ets2リプレッサー因子リプレッサードメイン(ERD; Sgouras et al., EMBO J. 14:4781-4793 ((1995))); およびMAD smSIN3相互作用ドメイン(SID; Ayer et al., Mol. Cell. Biol. 16:5772-5781 (1996))を含む。

【0044】

本発明のキメラタンパク質の第2ドメインは、核周辺部と会合することができる。この会合は、直接もしくは間接でもよく、典型的には、第2ドメインおよび1つもしくはそれ以上の核膜、核ラミナ、ヘテロクロマチンまたはそれらいずれかの組み合わせのタンパク質成分間の、タンパク質-タンパク質相互作用によってもたらされる。例えば、第2ドメインは、(1)核ラミナの成分であるタンパク質、または(2)核ラミナの成分であるタンパク質と会合したタンパク質と会合もしくは結合することができる。よって、第2ドメインは、核膜結合タンパク質、核ラミナ結合タンパク質(あるいは、ラミナ会合ポリペプチドとして知られたもの)、ヘテロクロマチン結合タンパク質、これらいずれかの結合部分、前記のいずれかと会合もしくは結合できるタンパク質、またはそれらのいずれかの組み合わせを含むことができる。

【0045】

10

20

30

40

50

核膜および核ラミナ結合タンパク質（もしくはそれらの適切な結合部分）は、それぞれ、核の構造成分に直接的または間接的に結合することによって、核膜（特に核膜の内膜）または核ラミナと相互作用することが知られているか、あるいはそのように操作される。いくつかの場合、キメラタンパク質の第2ドメインは、核膜の内膜および核ラミナの両方と相互作用してもよい。好ましい核膜および/または核ラミナ結合タンパク質（またはそれらの結合部分）は、ラミン（例えば、ラミンA、BおよびC）およびLAP2のごときラミナ結合タンパク質、LAP2相互作用領域（138-524アミノ酸）を含むが、それらに限定されない[Nili et al., 2001]。第2ドメインに好ましい他のタンパク質は、524アミノ酸のマウスGCLタンパク質[Leatherman et al. (2000) Mech. Dev. 92: 145-153]、またははドロソフィラ(Drosophila)もしくは他のあらゆる哺乳類種に由来するような、他のあらゆるGCLタンパク質を含む。GCLタンパク質は、ラミナ会合タンパク質（LAP）を介して、核ラミナに間接的に結合するようである。第2ドメインに有用な他のタンパク質（もしくはそれらの結合部分）は、Rb、Oct-aおよびインスリンアクチベーターIPF/PDX1（低グルコース時に核膜に局在する）の過剰リン酸化型を含む。全ての第2ドメインについて、標的遺伝子と同種由来のドメインを選択することは有用であるかもしれない。ヘテロクロマチン結合タンパク質（もしくは結合活性を有するそれらの部分）も、本発明のキメラタンパク質における第2ドメインとして使用することができる。有用なヘテロクロマチン結合タンパク質は、HP1およびポリコーム(polycomb)群タンパク質を含むが、それらに限定されない。).

10

20

【0046】

本発明のもう1つの態様において、核コンパートメントへのタンパク質の輸送を補助するために、核局在性ポリペプチドを、本発明のキメラタンパク質に結合させることができる。核局在性ポリペプチドは、細胞質にあるタンパク質の核への輸送を容易にする。核局在性ポリペプチドを、単独で、もしくは他のドメインと連結して使用することができる。核局在性ポリペプチドの1つの例は、配列Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val（配列番号9）を有する、SV40ラージT抗原由来のポリペプチドである。

【0047】

さらに、該キメラタンパク質は、細胞へのタンパク質の輸送を補助するために、単独、もしくは核局在性ポリペプチドと連結するかのいずれかで、細胞取り込みシグナルを有することができる。かかる細胞取り込みシグナルは、ヒト免疫不全ウイルスTatタンパク質の47~57残基である、最小Tatタンパク質伝達ドメイン：YGRKKRRQRRR（配列番号5）；アンテナペディア（pAntp）ホメオドメインの43~58残基：Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys（配列番号10）（Derossi et al., (1994) J. Biol. Chem. 269: 10444-10450）；単純ヘルペスウイルス（HSV）VP22タンパク質の267~300残基：Asp-Ala-Ala-Thr-Ala-Thr-Arg-Gly-Arg-Ser-Ala-Ala-Ser-Arg-Pro-Thr-Glu-Arg-Pro-Arg-Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Arg-Pro-Arg-Arg-Pro-Val-Glu（配列番号11）（Elliott et al. (1997) Cell 88: 223-233）；Tyr-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala（配列番号12）（Ho et al. (2001) Cancer Res. 61: 474-477）、Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg（配列番号13）、R9として知られているもの（Jin et al. (2001) Free Rad. Biol. Med. 31: 1509-1519）、および全てのD-アルギニン型のR9（Winder et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 13003-13008）のごとき報告された細胞取り込みシグナル活性を有する様々な塩基性ペプチド；ならびに、血液脳関門を超えて物質を運ぶことのできるW000/32236のポリペプチド、W000/32237に記載の癌細胞へ抗ガン剤を運ぶことのできるポリペプチド、W002/02595の抗生ポリペプチドの両親媒性ペプチド部分、W002/053583に記載の細胞内もしくは細胞核へ負電荷の物質を輸送する両親媒性ポリペプチド、ならびに、W002/067994の鎮痛性分子のペプチドベクター部分を含むTemsamaniのグループによって記載されたポリペプチドを含むがそれらに限定されない。Temsamaniによって記載されたポリペプチドは、D-ペネトラチン（D-penetratin）（rqikiwfqnrrmkwkk；全てのアミノ酸がD型である）（配列番

30

40

50

号14)、pAntpおよびそれらの活性型変種、SynB1 (RGGRRLSYSRRRFSTSTGR) (配列番号15)、L-SynB3 (RRLSYSRRRF) (配列番号16)、およびD-SynB3 (rrlsysrrrf; 全てのアミノ酸がD型である) (配列番号17)を含むが、それらに限定されない。

【0048】

精製、発現の測定、細胞および細胞内局在の測定を容易にするために、本発明のキメラタンパク質は、マルトース結合タンパク質(「MBP」)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、ヘキサヒスチジン、c-my c、およびFLAGエピトープAsp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys(配列番号18)のごときタンパク質もしくはタンパク質部分との融合タンパク質として発現させることができる。 10

【0049】

本発明のキメラタンパク質は、あらゆる多くの当業者に広く知られた方法を用いて、合成的もしくは組み換え的のいずれか、好ましくは組み換え的に、調製されることができる。タンパク質が組み換え的に、例えば、キメラタンパク質をコードするDNAを介して調製される場合、コドン使用頻度を、タンパク質を発現する生物における高い発現のために最適化することができる。かかる生物は、細菌、真菌、酵母、動物、昆虫および植物を含む。より詳細には、該生物は、ヒト、マウス、イー・コリ(E. coli)、穀物用植物、コメ、トマトおよびトウモロコシを含むが、それらに限定されない。核酸を用いて本発明のキメラタンパク質を送達する場合、コドン使用頻度を、核酸構築物を受け取る真核生物向けに最適化することができる。 20

【0050】

当業者に知られた適当なタンパク質の精製方法のいずれも、本発明のキメラタンパク質を精製するために使用できる[例えば、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ded., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York 参照)。さらに、あらゆる適当なホスト、例えば、細菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、植物細胞およびそれらの類似物を、タンパク質の発現のために使用できる。 30

【0051】

本発明のキメラタンパク質およびそれをコードする核酸を、酵母、動物、植物を含むあらゆる真核生物において、(特定のヌクレオチド配列との会合によって決定される)標的遺伝子の発現を抑制する、ダウンレギュレートするもしくは減少させるために使用される。標的遺伝子は、発現の抑制が望まれるあらゆる真核生物遺伝子をコードすることができる。例えば、標的遺伝子は、サイトカイン、インターロイキン、癌遺伝子、血管形成因子、抗血管形成因子、薬物耐性遺伝子、成長因子および/または腫瘍サプレッサーをコードすることができる。標的遺伝子は、ウイルス遺伝子、特にDNAウイルス遺伝子由来のものでもよい。標的遺伝子は、植物遺伝子をコードするものでもよい。好ましい植物遺伝子源は、トマト、トウモロコシ、コメおよび穀物植物である。 30

【0052】

標的遺伝子は、myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bc1、myb、mosファミリーのメンバーまたはそれらの関連因子および修飾因子を含むが、それらに限定されない癌遺伝子であることができる。癌遺伝子は、例えば、Cooper, *Oncogenes*, 2nded., The Jones and Bartlett Series in Biology, Boston, MA, Jones and Bartlett Publishers, 1995に記載されている。ets転写因子は、Waslylk et al., Eur. J. Biochem. 211: 7-18 (1993)に概説されている。Myc癌遺伝子は、例えば、Ryan et al., Biochem. J. 314: 713-21 (1996)に概説されている。FosおよびJunファミリーは、例えば、*The Fos and Jun Families of Transcription Factors*, Angel & Herrlich, eds. (1994)に記載されている。max癌遺伝子は、Hurlin et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59: 109-16に概説されている。myb遺伝子ファミリーは、Kanei-Ishii et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211: 89-98 (1996)に概説されている。mosファミリーは、Yew et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 19-25 (1993)に概説されている。 40 50

【 0 0 5 3 】

本発明のキメラタンパク質を、疾患関連遺伝子の発現を阻害するために使用することができる。1つの例において、疾患関連遺伝子は、B C R - A B L 融合癌遺伝子もしくはr a s 癌遺伝子のごとき癌遺伝子であり、D N A 結合ドメインを、D N A 配列GCAGAAGCC (配列番号6)に結合するように設計して、核周辺部にターゲティングすること、および転写過程に必要な配列に結合することにより発現を阻害することのいずれもによって、B C R - A B L 融合癌遺伝子の発現を阻害することができる。疾患に関連する転写因子は、As o et al., J Clin. Invest. 97: 1561-9 (1996)に概説されている。

【 0 0 5 4 】

B. 使用方法

10

本発明のもう1つの態様は、遺伝子を核周辺部に局在させることによる、標的遺伝子の発現の抑制もしくはダウンレギュレートの方法に関する。この方法は、標的遺伝子と会合した、もしくは標的遺伝子の十分近くにあるヌクレオチド配列を含む標的核酸を、本発明のキメラタンパク質と接触させることを伴う。該核酸は、細胞もしくは生物に存在することができ、好ましくはゲノムD N Aである。しかしながら、核酸は、核に存在する染色体外のD N Aであってもよい。該ヌクレオチド配列および標的遺伝子は、前に記載されている。ヌクレオチド配列および標的遺伝子の近さは、本発明のキメラタンパク質にさらされた後の、測定可能な標的遺伝子の抑制もしくはダウンレギュレーションに十分なものである。

【 0 0 5 5 】

20

本発明に従って、該キメラタンパク質を、タンパク質として、もしくはそのタンパク質をコードする核酸として、細胞に導入することもできる。タンパク質が使用される場合、該キメラタンパク質は、細胞によるタンパク質の取り込みとその核への輸送を容易にするために、細胞取り込みシグナルおよび/または核局在シグナルを有していてもよい。標的遺伝子の発現を抑制もしくはダウンレギュレートするのに必要なキメラタンパク質の量は、当業者によって容易に決定されることができる。R N AもしくはD N Aのごとき核酸を使用する場合、裸のプラスミドもしくは他のD N Aとして、リポソーム中に処方されたもの、およびウイルスベクター (R N AウイルスおよびD N Aウイルス) 中、D N AもしくはR N Aを用いたPowderject (商標) のごとき注入装置を介して、あるいは他の好都合な手段によるものを含む、様々な形式のいずれかにて送達されることができる。さらに、標的遺伝子の発現を抑制もしくはダウンレギュレートするのに必要な核酸の量は、標的細胞もしくは生物、送達処方および形式に基づいて、当業者によって容易に決定されることが可能、核酸はD N AもしくはR N Aのいずれかである。好ましくはD N Aを使用する。

30

【 0 0 5 6 】

40

本発明によると、該キメラタンパク質は、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列において、標的核酸に結合する。結合が生じたか否か、および標的遺伝子の抑制もしくは目的のタンパク質が生成する効率を決定するアッセイは、知られている。要するに、1つの具体例において、- グルクロニダーゼ (G U S) 、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) 、- ガラクトシダーゼ (- g a l) もしくはG F Pを、プロモーターを制御する標的遺伝子と作動可能に結合させ、形質転換ベクターに連結し、動物もしくは植物細胞へ形質転換する。キメラタンパク質の導入後 (タンパク質として、もしくは翻訳して該タンパク質を生じる核酸として、いずれでも) 、レポーター遺伝子のレベルを、適切な対照に対して、評価することができる。もう1つの選択肢として、ノザンプロットもしくは他の方法によってR N Aのレベルを測定することができる。この後者の方は、レポーター構築物が実用的でない場合に有効である。

【 0 0 5 7 】

50

本発明は、組織特異的もしくはそうでなくとも、誘導可能もしくはそうでなくともよい、および動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、あるいは培養細胞もしくは完全な植物体いずれかの植物細胞において生じる遺伝子調節を意図している。有用な抑制レベルは、通常どの程度緊密に調節されているのか、調節変化の影響、および他の類似の因子によって変化し

うる。望ましくは、遺伝子発現における変化は、少なくとも 1.5 倍ないし 2 倍；約 3 倍ないし 5 倍、約 8 ないし、10 ないし 15 倍；もしくはそれ以上、例えば、20 ないし、25 ないし 30 倍；およびさらに 40、50、75 もしくは 100 倍、またはそれ以上に変わる。遺伝子発現における変化の程度は、系ごとに異なる。

【0058】

使用される「生物」とは、酵母、動物、鳥類、昆虫、植物もしくはその類似物を含むあらゆる真核生物のことである。動物は、哺乳類（ヒト、靈長類等）、商業もしくは農業動物（魚、ニワトリ、乳牛、畜牛、ブタ、ヤギ、七面鳥等）、実験動物（マウス、ラット、ウサギ等）およびペット（イヌ、ネコ、インコおよび他のペットとなる鳥、魚等）を含むがそれらに限定されない。本明細書で企図されるように、特定の動物は、複数の動物群のメンバーであってもよい。10

【0059】

本発明のキメラタンパク質（もしくはそれらのタンパク質をコードする核酸）を、例えば、様々な植物の種類および植物組織、好ましくは形質転換技術に敏感な高等植物綱、特に単子葉および双子葉植物に対して、遺伝子発現を抑制、ダウンレギュレートまたは減少させるために、使用することができる。

【0060】

「植物」とは、あらゆる植物、もしくは、種子、懸濁培養、胚、成長点領域、カルス組織、葉、根、シート、配偶体、胞子体、花粉、および小胞子、あらゆる発生段階の植物の部分およびそれらの子孫をいう。切断物、および細胞もしくは組織培養も同様に含まれる。本発明と関連して使用される、「植物組織」という語は、植物細胞、植物器官（例えば、葉、茎、根、成長点）、植物種子、プロトプラスト、カルス、細胞培養、あるいは構造的および／または機能的単位にまとまつた植物細胞の群のいずれかを含むがそれらに限定されない。20

【0061】

特に好ましくは、ソルガム・ビコロ (*Sorghum bicolor*) およびジー・メイズ (*Zea mays*) を含むイネ科の種のごとき単子葉植物である。本発明の単離された核酸およびタンパク質は、以下の属：キュキュルビタ (*Cucurbita*)、ローサ (*Rosa*)、ヴィティス (*Vitis*)、ジュグランス (*Juglans*)、フラガリア (*Fragaria*)、ロータス (*Lotus*)、メディカゴ (*Medicago*)、オノブリチス (*Onobrychis*)、トリフォリウム (*Trifolium*)、トリゴネラ (*Trigonella*)、ヴィグナ (*Vigna*)、シトルス (*Citrus*)、リナム (*Linum*)、ジェラニウム (*Geranium*)、マニホット (*Manihot*)、ダウカス (*Daucus*)、アラビドブシス (*Arabidopsis*)、ブラシカ (*Brassica*)、ラファナス (*Raphanus*)、シナピス (*Sinapis*)、アトパ (*Atropa*)、カブシカム (*Capsicum*)、ダチュラ (*Datura*)、ヒオシアムス (*Hyoscyamus*)、リコペルシコン (*Lycopersicon*)、ニコチアナ (*Nicotiana*)、ソラナム (*Solanum*)、ペチュニア (*Petunia*)、ジギタリス (*Digitalis*)、マジョラナ (*Majorana*)、シアホリウム (*Ciahorium*)、ヘリアンタス (*Helianthus*)、ラクツカ (*Lactuca*)、ブロムス (*Bromus*)、アスパラガス (*Asparagus*)、アンチリヒナム (*Antirrhinum*)、ヘテロカリス (*Heterocallis*)、ネメシス (*Nemesis*)、ペラルゴニウム (*Pelargonium*)、パニウム (*Panicum*)、ペニセタム (*Pennisetum*)、ラナンキュラス (*Ranunculus*)、セネシオ (*Senecio*)、サルピゴロシス (*Salpiglossis*)、ククミス (*Cucumis*)、ブロワーリア (*Browaalia*)、グリシン (*Glycine*)、ピサム (*Pisum*)、ファセオラス (*Phaseolus*)、ロリウム (*Lolium*)、オリザ (*Oryza*)、アベナ (*Avena*)、ホルデウム (*Hordeum*)、セカル (*Secale*)、およびトリチカム (*Triticum*) の種においても使用することができる。30

【0062】

好ましい植物および植物組織は、トウモロコシ (*Zea mays*)、キャノーラ (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.)、アルファルファ (*Medicago sativa*)、コメ (*Oryza sativa*)、ライ麦 (*Secale cereale*)、ソルガム (*Sorghumbicolor*, *Sorghum vulgare*)、ヒマワリ (*Helianthus annuus*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、ダイズ (*Glycine max*)、40

10

20

30

40

50

タバコ (*Nicotiana tabacum*)、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、ピーナッツ (*Arachis hypogaea*)、ワタ (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*)、サツマイモ (*Ipomoea batatas*)、キヤッサバ (*Manihot esculenta*)、コーヒー (*Coffea spp.*)、ココナツ (*Cocos nucifera*)、パイナップル (*Ananas comosus*)、citrus trees (*Citrus spp.*)、ココア (*Theobroma cacao*)、チャ (*Camellia sinensis*)、バナナ (*Musa spp.*)、アボカド (*Persea americana*)、イチジク (*Ficus carica*)、グアバ (*Psidium guajava*)、マンゴー (*Mangifera indica*)、オリーブ (*Olea europaea*)、パパイヤ (*Carica papaya*)、カシュー (*Anacardium occidentale*)、マカダミア (*Macadamia integrifolia*)、アーモンド (*Prunus amygdalus*)、テンサイ (*Beta vulgaris*)、サトウキビ (*Saccharum spp.*)、ウキクサ (*Lemna spp.*)、エンバク、オオムギ、野菜、観賞植物および針葉樹に由来するものを含む。
10

【0063】

好みしい野菜は、トマト (*Lycopersicon esculentum*)、レタス (例えば、*Lactuca sativa*)、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*)、ライマメ (*Phaseolus limensis*)、エンドウ (*Lathyrus spp.*)、さらに、キュウリ (*C. sativus*)、カンタロープ (*C. cantalupensis*)、およびマスクメロン (*C. megalone*) のごとき (*Cucumis*) 属のメンバーを含む。

【0064】

好みしい観賞植物は、アザレア (*Rhododendron spp.*)、アジサイ (*Macrophyllea hydrangea*)、ハイビスカス (*Hibiscus rosa-sinensis*)、バラ (*Rosa spp.*)、チューリップ (*Tulipa spp.*)、スイセン (*Narcissus spp.*)、ペチュニア (*Petunia hybrida*)、カーネーション (*Dianthus caryophyllus*)、ポインセチア (*Euphorbia pulcherrima*) およびキクを含む。
20

【0065】

本発明を実施する際に使用してもよい針葉樹は、例えば、テーダマツ (*Pinus taeda*)、スラッシュマツ (*Pinus elliotii*)、ポンデローサマツ (*Pinus ponderosa*)、ロッジポールマツ (*Pinus contorta*)、およびモントレーマツ (*Pinus radiata*) のごときマツ；ベイマツ (*Pseudotsuga menziesii*)；アメリカツガ (*Tsuga canadensis*)；ベイトウヒ (*Picea glauca*)；セコイア (*Sequoia sempervirens*)；ヨーロッパモミ (*Abies amabilis*) およびバルサムモミ (*Abies balsamea*) のごときモミ；ならびにベイスギ (*Thuja plicata*) およびアラスカヒノキ (*Chamaecyparis nootkatensis*) のごときシーダーを含む。
30

【0066】

最も好みしくは、本発明の植物および植物組織は、農作物 (例えば、トウモロコシ、アルファルファ、ヒマワリ、キャノーラ、ダイズ、ワタ、ピーナッツ、ソルガム、コムギ、タバコ等) であり、さらにより好みしくはトウモロコシおよびダイズであり、さらにいっそう好みしくはトウモロコシである。

【0067】

本明細書中で使用される、「遺伝子組み換え植物」もしくは「遺伝的に改変された植物」は、ゲノム中に異種のポリヌクレオチド (すなわち、受け手の生物以外のソースに由来するポリヌクレオチド) を含む植物との関連を含む。通常、および好みしくは、異種のポリヌクレオチドは、ゲノム中に安定して組み込まれるため、ポリヌクレオチドは以後の世代に受け継がれる。異種のポリヌクレオチドは、単独もしくは組み換え発現カセットの一部としてゲノム中に組み込まれてもよい。本明細書中の、「遺伝子組み換えの」という語は、最初に変化した組み換え体だけでなく、最初の遺伝子組み換え体から優性交配もしくは無性繁殖によって生じたものも含む、遺伝子型が異種の核酸の存在によって変化した、あらゆる細胞、細胞株、カルス、組織、植物の部分もしくは植物体に対して使用される。本明細書中で使用される「遺伝子組み換えの」という語は、従来の植物育種法、または他家受精 (crossfertilization)、非組み換え型ウイルスの感染、非組み換え型細菌の形質転換、非組み換え型遺伝子転移、もしくは自然発生的な変異のごとき自然発生の事象による、ゲノムの変化 (染色体もしくは染色対外の) を含むしない。
40

【0068】

C. 発現系

本発明は、本発明のキメラタンパク質をコードする核酸を含む組み換え発現カセットも提供する。本発明の所望のポリペプチドをコードする核酸配列を使用して、所望のホスト細胞へ導入できる組み換え発現カセットを構築することができる。組み換え発現カセットは、典型的に、目的のホスト細胞、例えば、形質転換植物の組織において、ポリヌクレオチドの転写を誘導するであろう、翻訳開始調節配列に作動可能に連結した、本発明のポリヌクレオチドを含むであろう。発現ベクターは、哺乳類発現ベクター、昆虫発現ベクター、酵母発現ベクターもしくは植物発現ベクターであってもよい。タンパク質が、タンパク質の調製および生成のために発現される場合（タンパク質を次に使う場合、例えば、本発明の方法において）、発現ベクターは、細菌発現ベクターであってもよい。発現ベクターは当業者によく知られており、所望の目的により容易に選択することができる。

10

【0069】

転写因子は、真核生物中で活性のあるプロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルもしくはポリAトラクト（poly A tract）を含む転写終結シグナル、核原形質性輸送を容易にするエレメント等を含むが、それらに限定されない。適当な転写終結エレメントは、SV40転写終結領域もしくはそれらに由来するターミネーターを含む。

20

【0070】

本発明において、あらゆる哺乳類、酵母、細菌、昆虫、ウイルス、他の真核発現ベクター、もしくは発現カセットを使用することができ、例えば、Invitrogen Corporation (San Diego, Calif.)より販売される、pCEP4もしくはpRc/RSV、Stratagene (La Jolla, Calif.)より販売される、pXT1、pSG5、pPbacもしくはpMbac、ClonTech (Palo Alto, Calif.)より販売される、pPURもしくはpMAM、ならびにPromega Corporation (Madison, Wis.)より販売されるpSV-galのごとき多くの商業的に入手可能なベクターもしくはカセットのいずれか、あるいは、de novoまたは公にもしくは商業的に入手可能な真核発現系の改変のいずれかから合成されたものより選択することができる。

20

【0071】

発現カセット内の個々のエレメントは、複数のソースに由来してもよく、活性部位における特異性を与えるため、もしくは受け手側の細胞でのカセットの寿命を延ばすために選択されてもよい。かかる発現カセットの操作を、あらゆる通常の分子生物学の手法によって行うことができる。

30

【0072】

植物の発現ベクターは、(1) 5'および3'調節配列の転写制御下でクローニングされた植物遺伝子、ならびに(2)優性選抜可能なマーカーを含んでいてもよい。かかる発現ベクターは、必要であれば、プロモーター調節領域（例えば、誘導可能もしくは構成的な、環境的もしくは発生的に調節される、または細胞もしくは組織特異的/選択的発現をさせるもの）、転写開始部位、リボソーム結合部位、RNAプロセシングシグナル、転写終結部位、および/またはポリアデニル化シグナルも含んでよい。

【0073】

高等植物において、遺伝子の発現に有用な典型的なベクターは、当業者によく知られており、Rogers et al., Meth. in Enzymol., 153: 253-277 (1987)に記載の、アグロバクテリウム・チュメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) の腫瘍誘導 (Ti) プラスミド由来のベクターを含む。これらのベクターは、形質転換時に、ベクターDNAの一部をホスト植物のゲノム中に組み込むことから、植物組み込みベクターである。本明細書中で有用なエー・チュメファシエンス (A. tumefaciens) ベクターの例は、Schardl et al., Gene, 61: 1-11 (1987) およびBerger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86: 8402-8406 (1989) の、pKYLX6およびpKYLX7である。もう1つの有用なベクターは、プラスミドpBI101.2である。

40

【0074】

細胞形質転換技術および遺伝子送達方法（例えば、遺伝子を送達して *in vivo* で使用するための方法）は、当業者によく知られている。本発明のキメラタンパク質をコ

50

ドする核酸を、細胞に、もしくは *in vivo* で被験者の細胞に、それぞれ送達するために、かかるあらゆる技術を使用することができる。

【0075】

本明細書中で使用される「発現力セット」という語は、適切なホスト細胞において、特定のヌクレオチド配列を発現させることのできる DNA 配列であって、終止シグナルに作動可能に連結した目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結したプロモーターを含むものを意味する。それは、典型的に、ヌクレオチド配列の適切な翻訳に必要な配列も含む。コード領域は、通常、目的のタンパク質をコードするが、目的の機能的な RNA、例えば、アンチセンス RNA もしくは非翻訳 RNA を、センスもしくはアンチセンス方向にコードしていてもよい。目的ヌクレオチド配列を含む発現力セットは、少なくともその 1 つの構成成分が、少なくとも 1 つの他の構成成分に対して異種であるような、キメラであってもよい。該発現力セットは、天然に存在するものであるが異種発現に有効な組み換え型となつたものでもよい。しかし、典型的に、発現力セットは、ホストに対して異種である。すなわち、発現力セットの特定の DNA 配列は、ホスト中に本来的に存在しないものであり、形質転換によって、ホスト細胞もしくはホスト細胞の祖先へ導入されなければならぬ。発現力セット中のヌクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター、もしくはホスト細胞がいくつかの特定の外部刺激にさらされた場合のみ転写を開始させる、誘導性プロモーターの制御下にあってもよい。植物のごとき、多細胞生物の場合、プロモーターは、特定の組織もしくは器官もしくは発生段階に特異的であってもよい。

10

20

【0076】

動物細胞において、遺伝子の発現を駆動するのに有効であることがよく知られている様々なプロモーターは、例えば、ウイルスに由来する SV40、ごく初期の CMV および、RSV プロモーターもしくは真核生物由来の - カゼイン、ウテログロブリン、- アクチンもしくはチロシナーゼプロモーターである。特定のプロモーターは、時期もしくは組織特異的な発現を得ることが目的でない限り、本発明に重要ではない。例えば、所望の組織もしくは選択された細胞型においてのみ活性のあるプロモーターを選択することができる。組織特異的プロモーターの例は、乳腺組織に特異的な S1 - および - カゼインプロモーター (Platenburget al., Trans. Res., 3: 99-108 (1994); and Maga et al., Trans. Res., 3: 36-42 (1994))；肝臓、腎臓、脂肪、空腸および乳腺組織にて活性のある、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼプロモーター (McGrane et al., J. Reprod. Fert., 41:17 23 (1990))；肺および脾臓にて活性があるが、精巣、脳、心臓、肝臓もしくは腎臓において活性のないチロシナーゼプロモーター (Vile et al., Canc. Res., 54:6228 6234 (1994))；扁平上皮の分化しているケラチノサイトにおいてのみ活性のあるインボルクリンプロモーター (Carroll et al., J. Cell Sci., 103:925 930 (1992))；ならびに肺および子宮内膜において活性のあるウテログロブリンプロモーター (Helftenbein et al., Annal. N.Y. Acad. Sci., 622:69 79 (1991)) を含むがそれらに限定されない。

30

40

【0077】

あるいは、細胞特異的エンハンサー配列を、発現を制御するために使用することができる。例えば、ヒト向神経性パポバウイルス JCV エンハンサーは、グリア細胞のみにおいて、ウイルスの転写を調節する (Remenick et al., J. Virol., 65:5641 5646 (1991))。組織特異的な発現を制御するさらにもう 1 つの方法は、どの細胞系譜でプロモーターが活性であるかを特定するために、ホルモン応答性エレメント (HRE) を使用することであり、例えば、MMTV プロモーターは、プロゲステロン受容体のごときホルモン受容体の、活性化前の HRE の上流への結合を必要とする (Beato, FASEB J., 5:2044 2051 (1991); and Truss et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 41:241 248 (1992))。

【0078】

植物プロモーター断片を、再生された植物の全ての組織において、本発明のポリヌクレオチドを発現させるために使用することができる。かかるプロモーターは、本明細書中で、「構成的な」プロモーターと呼ばれており、ほとんどの環境状態および発生もしくは細胞分化状態の下で活性がある。構成的なプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス

50

(C a M V) 3 5 S 転写開始領域、アグロバクテリウム・チュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) に由来する P - もしくは 2' - プロモーター、ユビキチン I プロモーター、S m a s プロモーター、シナミルアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター(米国特許第5,683,439号)、N o s プロモーター、p E m u プロモーター、ルビスコプロモーター、G R P 1 - 8 プロモーター、および他の当業者に知られた様々な植物遺伝子に由来する転写開始領域を含む。

【0079】

あるいは、植物プロモーターは、特定の組織における本発明のポリヌクレオチドの発現を指令することができるものであるか、さもなくば、より正確な環境的もしくは発生的制御下にあるものであってもよい。かかるプロモーターは、本明細書中で、「誘導性の」プロモーターと呼ばれる。誘導性プロモーターによって転写に影響を及ぼす環境の状態は、病原体の攻撃、嫌気条件、もしくは光の存在を含む。誘導性プロモーターの例は、低酸素もしくは低温ストレスによって誘導可能な A d h I プロモーター、熱ストレスによって誘導可能な H S P 7 0 プロモーター、および光によって誘導可能な P P D K プロモーターを含む。発生の制御下のプロモーターの例は、葉、根、果実、種子もしくは花のごとき、ある組織のみで、または選択的に、転写を開始させるプロモーターを含む。典型的なプロモーターは、薬特異的プロモーター 5 1 2 6 (米国特許第5,689,049号および第5,689,051号) である。プロモーターの作用は、ゲノムにおけるその位置によって異なるかもしれない。よって、誘導性プロモーターは、ある位置では、完全もしくは部分的に構成的になるかもしれない。

【0080】

異種および非異種(すなわち、内在性)プロモーターのいずれもを、本発明の核酸の発現を導くために使用することができる。これらのプロモーターを、例えば、所望の組織における本発明のタンパク質の濃度および/または組成を、減少させる、増加させる、または変化させるために、アンチセンスの核酸の発現を駆動するための組み換え体発現力セットにも使用することができる。よって、いくつかの具体例において、核酸構築物は、ジー・メイズ (*Zea mays*) のごとき植物細胞において、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結した機能的なプロモーターを含むだろう。これらの具体例において有用なプロモーターは、本発明のポリペプチドの発現を駆動する、内在性プロモーターを含む。

【0081】

いくつかの具体例において、プロモーターもしくはエンハンサー要素として働く単離された核酸は、非異種型のポリペプチドの適切な部位(通常は上流)において、その発現のアップまたはダウンレギュレートするために導入される。例えば、内在性プロモーターを、in vivoで、変異、欠失、および/または置換によって変えることができる(米国特許第5,565,350号; PCT/US93/03868)、あるいは、遺伝子の発現を制御するために、単離されたプロモーターを、本発明の遺伝子からの適切な方向および距離にて、植物細胞へ導入することができる。植物細胞中の本発明のポリペプチドの全濃度を変えるおよび/または組成を変えるために、遺伝子発現を、植物の成長に適した条件下で、変化させることができる。

【0082】

本発明において、特に、キメラタンパク質の発現を制御するために、様々なプロモーターが有効であるとされ、その選択は、部分的に、所望のタンパク質発現レベル、所望の組織特異的、時期特異的、もしくは環境の合図特異的な制御が植物細胞にあるならば、それらに依存するだろう。構成的および組織特異的プロモーターは、特に重要である。かかる構成的プロモーターは、例えば、R s y n 7 のコアプロモーター、コア C a M V 3 5 S プロモーター(Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812)、コメアクチン(McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); ユビキチン(Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 and Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689)、p E M U (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588)、M A S (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730)ならびに、例えば、米国特許第5,608,149号; 第5,608,1

10

20

30

40

50

44号；第5,604,121号；第5,569,597号；第5,466,785号；第5,399,680号；第5,268,463号；および第5,608,142号に記載の構成的プロモーターを含む。

【0083】

組織特異的プロモーターを、特定の植物組織内の増大した発現を標的にするために使用することができる。組織特異的プロモーターは、Yamamoto et al. (1997) *PlantJ.* 12 (2) 255-265、Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38 (7): 792-803、Hansen et al. (1997) *Mol. Gen Genet.* 254 (3): 337)、Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6 (2): 157-168、Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112 (3): 1331、Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112 (2): 525-535、Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112 (2): 513-524、Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35 (5): 773-778、Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181-196、Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23 (6): 1129-1138、Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* 90 (20): 9586-9590およびGuevara-Garcia et al. (1993) *PlantJ.* 4 (3): 495-505に記載のものを含む。かかるプロモーターを、弱い発現のために、必要であれば、変えることができる。

【0084】

葉特異的プロモーターは、当業者に知られており、例えば、Yamamoto et al. (1997) *PlantJ.* 12 (2): 255-265, Kwon et al. (1994) *Plant Physiol.* 105: 357-67, Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35 (5): 773-778, Gotor et al. (1993) *Plant J.* 3: 509-18, Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23 (6): 1129-1138, and Matsuoka et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (20): 9586-9590に記載のものを含む

【0085】

構成的もしくは誘導性および非組織特異的もしくは組織特異的なもののあらゆる組み合せを、本発明のキメラタンパク質の発現を制御するために使用してもよい。所望の制御は、適当なプロモーターを用いて、時間的、発生的もしくは環境的に制御されてもよい。環境的に制御されたプロモーターは、病原体、病原性の毒物、もしくは他の外部の化合物（例えば、意図的に用いられた小分子誘導物質）の攻撃に応答するものである。時間的もしくは発生的なプロモーターの1例は、果実の成熟依存的なプロモーターである。特に好みいものは、誘導性PR1プロモーター、トウモロコシユビキチンプロモーター、およびORSである。

【0086】

例えば、組織の種類、細胞の種類、発生の段階、および/または環境の状態に関して、特定の発現様式を有するプロモーターを同定する方法は、当業者によく知られている。例えば、The Maize Handbook, Chapters 114-115, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994); Corn and Corn Improvement, Pedition, Chapter 6, Sprague and Dudley, Eds., American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin (1988)参照。

【0087】

植物の形質転換のプロトコールは、ヌクレオチド配列を植物に導入するためのプロトコールと同様に、形質転換の標的となる植物もしくは植物細胞の種類、すなわち、単子葉もしくは双子葉によって異なっていてもよい。植物細胞にヌクレオチド配列を導入した後、植物のゲノムに挿入する適当な方法は、マイクロインジェクション (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4: 320-334)、エレクトロポーレーション (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606)、アグロバクテリウムを介した形質転換 (Townsend et al., 米国特許第5,563,055号)、直接遺伝子転移 (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722)、弾道粒子の高速化（例えば、Sanford et al., 米国特許第4,945,050号；Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment, " in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); and McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6: 923-926参照）を含む。Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 50

. 22: 421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (タマネギ); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87: 671- 674 (ダイズ); McCabe et al. (1988) *BioTechnology* 6: 923-926 (ダイズ); Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol. 27P*: 175-182 (ダイズ); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (ダイズ); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736- 740 (rice); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (トウモロコシ); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (トウモロコシ); Tomes, 米国特許第5,240,855号; Busing et al., 米国特許第5,322,783号および第5,324,646号; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment, " in Plant Cell Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin) (トウモロコシ); Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (トウモロコシ); Frommet al. (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (トウモロコシ); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; Bowen et al., 米国特許第5,736,369 (穀物); Bytebieret al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (ユリ科); De Wet et al. (1985) in The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (pollen); Kaepler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415- 418 and Kaepler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560- 566 (ウィスカ-を介した形質転換); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (エレクトロポーレーション); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250-255 and Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75: 407-413 (コメ); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (アグロバクテリウム・チュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) を介したトウモロコシ)も参照とし、それらの全ては参考により本明細書に組み込まれる。

【0088】

改変された植物を、従来の方法によって植物体に生育させてもよい。例えば、McCormick et al. (1986) *Plant Cell. Reports*: 81-84参照。次いで、これらの植物は、生育し、同じ形質転換株もしくは異なる株のいずれかと受粉し、同定された所望の表現型的な特性を有するハイブリッドを生じてもよい。2つもしくはそれ以上の世代を生育させて、目的の表現型的な特性が安定して保持され、継承されるようにしてもよく、この時、収穫された種子は、所望の表現型的もしくは他の特性を確保する。

【0089】

D. 遺伝子抑制のために分子スイッチシステム

本発明のもう1つの態様は、遺伝子発現を制御するための分子スイッチシステム、特に、本発明のキメラタンパク質中のドメインを用いた、遺伝子発現を抑制もしくはダウンレギュレートするための分子スイッチシステムに関する。かかるシステム（「化学スイッチ」とも呼ばれる）は、遺伝子発現が調節されているもしくは制御されている、時期もしくは場所を操作するための、さらなる道具を提供する。簡単に、分子スイッチシステムは、1つが核酸結合ドメインを有するものであり、もう1つが核周辺部結合ドメインを有するものである2つの融合タンパク質を、細胞もしくは生物へ導入する。これらの2つの融合タンパク質は、それぞれ、1つもしくはそれ以上の2価のリガンドに特異的に結合する第2のドメインを有する。2つの融合タンパク質を有する細胞もしくは生物へ、2価のリガンドが導入されると、該リガンドは、その3つのものの間の複合体の形成を誘発するスイッチとして働く。その後、この複合体は、一度形成されると、標的遺伝子を核周辺部と会合させて、遺伝子発現を抑制もしくはダウンレギュレートできることから、本発明のキメラタンパク質と同様の機能をする。

【0090】

一例は、部分AおよびBを有する2価の化学リガンド、AZPおよび部分Aに特異的な抗体（もしくはかかる抗体の活性断片）をコードする第1の融合タンパク質、ならびに核周辺部と会合できるドメインおよび部分Bに特異的な抗体（もしくはかかる抗体の活性断片）をコードする第2の融合タンパク質によって形成された複合体である。2つの融合タ

ンパク質を、同じ細胞において、別々に、もしくは協調して発現させることができる。互いに結合した部分 A と部分 B を含む 2 値の化学物質を細胞または生物に添加すると、部分 A または部分 B のいずれかに対する各融合タンパク質のアフィニティーにより複合体の形成がもたらされる。

【 0 0 9 1 】

従って、本発明のこの態様の第 1 の融合タンパク質は、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列に特異的に結合しうる第 1 のドメイン、および 2 値のリガンドの第 1 の結合部分に特異的に結合しうる第 2 のドメインを含み、前記リガンドが細胞によって取り込まれるものであり、前記第 1 および第 2 のドメインは互いに異種のものである。融合タンパク質の第 1 ドメインは、本発明のキメラタンパク質の第 1 ドメインと同じものである。例えば、第 1 の融合タンパク質の第 1 ドメインは、ZFP、AZP、ロイシンジッパートンパク質、ヘリックス - ターン - ヘリックスタンパク質、ヘリックス - ループ - ヘリックスタンパク質、ホメオボックスタンパク質、それらのタンパク質のいずれかの DNA 結合部分、またはそれらのいずれかの組み合わせであってもよい。

【 0 0 9 2 】

同様に、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列、および標的遺伝子は、本発明のキメラタンパク質について記載されたものと同じである。

【 0 0 9 3 】

本発明のこの態様の第 2 の融合タンパク質は、核周辺部と会合することのできる第 1 ドメイン、および 2 値のリガンドの第 2 の結合部分に特異的に結合することのできる第 2 ドメインを含み、前記第 1 ドメインは、前記第 2 ドメインに対して異種のものである。これらの融合タンパク質の第 1 ドメインは、本発明のキメラタンパク質の第 2 ドメインと同じものである。よって、前記第 2 の融合タンパク質の第 1 ドメインは、核周辺部、核ラミナ、ヘテロクロマチン、もしくはそれらのいずれかの組み合わせと結合するもので、好ましくは核膜結合タンパク質、核ラミナ結合タンパク質、ヘテロクロマチン結合タンパク質、それらのタンパク質のいずれかの結合部分、もしくはそれらのいずれかの組み合わせである。

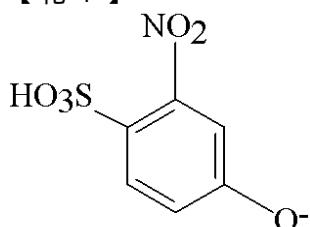
【 0 0 9 4 】

この分子スイッチシステムの第 1 および第 2 融合タンパク質の第 2 ドメインは、それぞれ、2 値のリガンドの 1 つの結合部分に特異的に結合することができる。第 1 の融合タンパク質は、2 値のリガンドの結合部分の 1 つ（例えば、部分 A ）に結合し、第 2 の融合タンパク質は、2 値のリガンドの他の結合部分（例えば、部分 B ）に結合する。1 つの具体例において、それぞれの融合タンパク質の第 2 ドメインは、2 値のリガンドのそれぞれの結合部分に対する特異性を有する抗体の一本鎖可変領域（scFV）であってもよい。

【 0 0 9 5 】

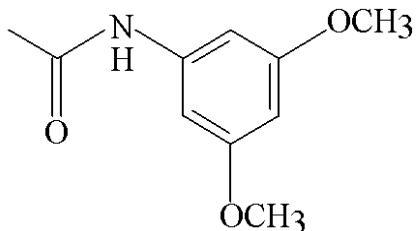
部分 A および B については、多くの候補が存在する。基準は、該部分が、十分に抗原性があり、当該部分に特異的な抗体の選抜ができること、および 2 つの部分が互いに結合して、細胞内に入って作用して、複合体の形成を媒介しうる化合物を形成することである。1 つの具体例において、部分 A は、例えば、以下に示す構造：

【 化 1 】



を有していてもよく、部分 B は、例えば、以下に示す構造：

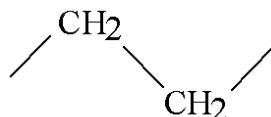
【化2】



を有していてもよく、部分AおよびBは、あらゆる適當な長さの、例えば、以下に示すユニット：

10

【化3】



を有するリンカーによって連結されていてもよい。

【0096】

細胞へ入ることがでて、かつ抗体を産生させることのできる部分を有するあらゆる化合物が、本発明の2価のリガンドの態様に適當である。本発明のこの具体例は、2価のリガンド存在下にて複合体を形成させることによって、核周辺部への標的遺伝子ドメインの配列特異的局在を許容する。2価のリガンドの不在の場合、三次構造は形成されない。

20

【0097】

好みの具体例において、2つの連結した化合物を含む2価の化学物質である、化学スイッチが使用される。これらの化合物は、短いリンカー、例えば、 CH_2CH_2 によって連結された、抗体を産生させることのできるあらゆる化合物であってもよい。1つの好みの具体例において、一本鎖抗体（例えば、一本鎖 F_v （ s c F_v ））は、2価の化学物質の1部分に結合して、それを核酸結合ドメインに連結する。2価の化学物質の他の部分は、核周辺部と会合もしくは結合することのできるタンパク質のドメインを認識して結合する、第2の一本鎖抗体、例えば、一本鎖 F_v （ s c F_v ）に結合する。

30

【0098】

もう1つの具体例において、2つの融合タンパク質の第2ドメインは、変異型S-タグおよびS-タンパク質（以下に記載）であって、小さな分子もしくは化学物質の存在下でのみ、それぞれと結合できるものであってもよい。従って、この小分子は、2価のリガンドとして働き、2つの融合タンパク質を、核周辺部に局在する単一の複合体にして、遺伝子抑制もしくはダウンレギュレーションを引き起す。

【0099】

この分子スイッチシステムを、時間的もしくは空間的な様式で、標的遺伝子の抑制を調節するための方法において使用することができる。特に、該方法は、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列を有する標的核酸を含む細胞または生物を、本発明の分子スイッチシステム（本セクションにおいて記載されている）と接触させること、次いで、融合タンパク質との複合体の形成を可能にする時期または位置において、細胞または生物を適當な2価のリガンドと接触させ、そのことにより、核周辺部へのその局在によって標的遺伝子の発現を抑制またはダウンレギュートすることを包含する。キメラタンパク質と同様に、分子スイッチシステムの融合タンパク質は、タンパク質として、1つもしくはそれ以上のタンパク質をコードする1つもしくはそれ以上の核酸として、もしくはそれらの組み合わせとして、細胞または生物に導入されてもよい。1つの核酸が融合タンパク質の送達のために使用される場合、それぞれのタンパク質の発現は、協調してもしくは独立して制御されることができる。同様に、該方法は、本発明のキメラタンパク質を使用する方法について企図されたものと同じ標的遺伝子に有効である。

40

【0100】

50

キメラタンパク質について前に説明したように、該融合タンパク質を、発現、単離および生成させることができる。同様に、キメラタンパク質について前に説明したように、それらを細胞または生物へ導入することができる。

【0101】

E. 遺伝子抑制解除のための分子スイッチシステム

分子スイッチシステムは、標的遺伝子の抑制解除のための、すなわち、現在抑制されている標的遺伝子の発現を活性化するための、制御された調節を許容する、もう1つの形式にて提供されることができる。本発明のこの態様において、「スイッチ」は、2つの融合タンパク質の相互作用をなくす（セクションDにあるように、相互作用を促進するよりもむしろ）ために使用される。さらに、これらのシステム（「化学スイッチ」とも呼ばれる）は、遺伝子発現が調節もしくは制御される時期または場所を操作するための、もう1つの道具を提供する。簡単には、該分子スイッチシステムは、一方が核酸結合ドメインを有するものであり、他方が核周辺部結合ドメインを有するものである、2つの融合タンパク質を、細胞または生物へ導入する。これらの2つの融合タンパク質は、それぞれ、互いに特異的に結合する第2ドメイン、例えば、互いの結合パートナーである第2ドメインを有する。このシステムにおいて、融合タンパク質の導入によって、核周辺部に局在して、会合した標的遺伝子の発現を抑制もしくはダウンレギュレートする複合体が形成される。化学スイッチが、所望の時期の細胞もしくは生物に（もしくは特定の細胞の種類に）導入されると、複合体を分裂させ、抑制状態を解く働きをする、すなわち、該化学スイッチの存在が、標的遺伝子の抑制解除を引き起こす。

10

20

30

40

50

【0102】

従って、本発明のこの態様の第1の融合タンパク質は、標的遺伝子と関連したヌクレオチド配列を特異的に結合することのできる第1ドメイン、および2価のリガンドの第二の結合部分に特異的に結合することのできる第2ドメインを含み、前記第1ドメインは前記第2ドメインに対して異種である。これらの融合タンパク質は、セクションDに記載されたものとは異なる。

【0103】

融合タンパク質の第1ドメインは、本発明のキメラタンパク質の第1ドメインと同じものである。例えば、第1の融合タンパク質の第1ドメインは、ZFP、AZP、ロイシンジッパータンパク質、ヘリックス-ターン-ヘリックスタンパク質、ヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質、ホメオボックスタンパク質、それらのタンパク質のいずれかのDNA結合部分、またはそれらのいずれかの組み合わせであってもよい。同様に、標的遺伝子に関連したヌクレオチド配列、および標的遺伝子は、本発明のキメラタンパク質について記載されたものと同じものである。

30

【0104】

本発明のこの態様の第2の融合タンパク質は、核周辺部と会合することのできる第1ドメイン、および前記第1の融合タンパク質の第2ドメインの結合パートナーを含む第2ドメインを含み、前記第1ドメインは前記第2ドメインに対して異種である。これらの第2の融合タンパク質の第1ドメインは、本発明のキメラタンパク質の第2ドメインと同じものである。よって、前記第2の融合タンパク質の第1ドメインは、核周辺部、核ラミナ、ヘテロクロマチン、もしくはそれらのいずれかの組み合わせと結合するもので、好ましくは、核膜結合タンパク質、核ラミナ結合タンパク質、ヘテロクロマチン結合タンパク質、それらのタンパク質のいずれかの結合部分、もしくはそれらのいずれかの組み合わせである。

【0105】

この分子スイッチシステムの第1および第2の融合タンパク質の第2ドメインは、それぞれ、互いに特異的に結合することができる。第2ドメインの一例は、S-タグ/S-タンパク質系[Kim et al. (1993) *Protein Sci.* 3: 348-356]によって示される。S-タグは、短いペプチド（15アミノ酸）であり、S-タンパク質は小さなタンパク質（104アミノ酸）であり、2つの融合タンパク質のいずれかの第2ドメインとして、互換的に使

用されることがある。S-タグとS-タンパク質複合体の親和性は、高い($K_d = 1 \text{ nM}$)。その場合、化学スイッチもしくはリガンドは、S-タグおよびS-タンパク質間の相互作用をなくすことのできる分子である。例えば、遊離もしくは抱合化されたS-タグタンパク質は、化学スイッチとして働くかもしれない。

【0106】

この分子スイッチシステムを、時間的もしくは空間的な様式で、標的遺伝子の抑制を調節するための方法において使用することができる。特に、該方法は、本発明の分子スイッチシステム(本セクションにおいて記載されている)と、標的遺伝子と関連したヌクレオチド配列を有する標的核酸を含む細胞または生物を接触させること、ついで、第1および第2の融合タンパク質の会合を分裂させる時期もしくは位置において、細胞または生物をリガンドと接触させ、そのことにより、標的遺伝子の発現の抑制を解除することを包含する。キメラタンパク質と同様に、分子スイッチシステムの融合タンパク質は、タンパク質として、1つもしくはそれ以上のタンパク質をコードする1つもしくはそれ以上の核酸として、もしくはそれらの組み合わせとして、細胞または生物に導入されてもよい。1つの核酸が融合タンパク質の送達のために使用される場合、それぞれのタンパク質の発現は、協調してもしくは独立して制御されることができる。同様に、該方法は、本発明のキメラタンパク質を使用する方法について企図されたものと同じ標的遺伝子に有効である。

【0107】

該融合タンパク質も、キメラタンパク質について前に記載されたように、発現、単離および生成することができる。同様に、それらを、キメラタンパク質について前に記載されたように、細胞または生物へ導入することができる。

【0108】

F. 医薬製剤

キメラタンパク質、分子スイッチシステム(セクションDもしくはEにおいて提供される)、様々な(セクションDもしくはEの)融合タンパク質、または本発明の他のタンパク質もしくはシステムのいずれかをコードする核酸の治療製剤は、所望の純度を有するそれらの実体を、任意の生理学的に許容される担体、賦形剤もしくは安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))と混合することによって、凍結乾燥された製剤もしくは水性溶液の形にて、貯蔵のために調製される。許容される担体、賦形剤もしくは安定剤は、使用される用量または濃度にて、レシピエントに対して無毒であり、リン酸、クエン酸もしくは他の有機酸のごときバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存料(例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンズアルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンのごときアルキルパラベン；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール)；低分子量(約10残基以下)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくはイムノグロブリンのごときタンパク質；ポリビニルピロリドンのごとき親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンのごときアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む炭水化物；EDTAのごときキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールのごとき糖；ナトリウムのごとき塩形成対イオン(salt-forming counter-ions)；金属複合体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；および/またはTWEEN(商標)、PLURONICS(商標)もしくはポリエチレングリコール(PEG)のごとき非イオン性界面活性剤を包含しうる。

【0109】

本明細書中の製剤は、治療される特定の徵候に必要な、1つより多くの化合物、好ましくは、互いに悪影響を与えない、相補的な活性を有するものも含んでもよい。かかる分子は、適当には、企図された目的を達成するために効果的な量の組み合わせにて存在する。

【0110】

活性のある成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、または、界面重合、例

えば、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン・マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル、それぞれによって、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)またはマクロエマルジョンにて、調製されたマイクロカプセル中に閉じこめてよい。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0111】

in vivo投与に使用される製剤は、滅菌される。これは、滅菌フィルターを通したる過によって容易に達成されるが、活性成分の活性が消失もしくは変化しないのであれば、他の滅菌方法を使用することができる。

10

【0112】

徐放性製剤が、調製されてもよい。徐放性製剤の適当な例は、マトリクスが成形物の形であるポリペプチド変種を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含む。徐放性製剤の例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、もしくは、ポリ(ビニルアルコール))、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸とL-グルタミン酸エチルの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸リュープロリドからなる注射可能なマイクロスフェア)のごとき分解性乳酸-グリコール酸共重合体、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸共重合体のごとき重合体は、100日間以上分子を放出することができるが、あるヒドロゲルは、短い時間タンパク質を放出する。合理的な戦略を、必要な機構に依存した安定化について考案することができる。例えば、集合機構が、チオール-ジスルフィドの互換を介した、分子内のS-S結合であることが発見されるならば、安定化は、メルカプト残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分量の制御、適当な添加物の使用、および特定のポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されるかもしれない。

20

【0113】

当業者であれば、あらゆる医薬組成物中に含まれる、キメラタンパク質、分子スイッチシステム(セクションDもしくはEに記載)、様々な融合タンパク質(セクションDもしくはEの)または本発明のそれらのタンパク質もしくはシステムのいずれかをコードする核酸の量、ならびに企図された使用のための適正投与量を、容易に決定することができる。

30

【0114】

この出願の中で、様々な出版物、特許および特許出願が参照されている。これらの出版物、特許および特許出願の教示および開示は、参照により、全体として、本出願に組み込まれる。

30

【0115】

本明細書に開示された発明の本質における変化が行われうることが当業者によって理解され、期待されるが、かかる修正、変化および置換は、本発明の範囲内に含まれるとされる。

40

【実施例】

【0116】

実施例1

ヒトVEGF-Aの抑制

ヒト血管内皮細胞増殖因子A(VEGF-A)遺伝子の発現をダウントレギュレートするために、524アミノ酸のマウスGCLタンパク質[Leatherman et al.(2000)]を含むキメラタンパク質(CP1-vegf)、および配列5'-GTG TGG GTG AGT GAG TGT G-3'(配列番号7)を標的としたAZPをコードする組み換え構築物を調製する。もう1つのキメラタンパク質(CP2-vegf)をコードする第2の構築物を、同じマウスGCLタンパク質および配列5'-GGG GCT GGG GGC GGT GTC T-3'(配列番号8)を標的としたAZPを用いて調製する。標的ヌクレオチド配列は、ヒトVEGF-A遺伝子のプロモーター

50

配列に由来する [Tischer et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:11947-11954]。AZPは、6つのジンクフィンガーを有し、それぞれがフレームワーク配列-Pro-Tyr-Lys-Cys-Pro-Glu-Cys-Gly-Lys-Ser-Phe-Ser-Z⁻¹-Ser-Z²-Z³-Leu-Gln-Z⁶-His-Gln-Arg-Thr-His-Thr-Gly-Glu-Lys-（配列番号3）を伴っている；それぞれのフレームワークは、アミノ酸残基の付加なく、次に結合している。CP1-vegfおよびCP2-vegfへのDNA結合特異性を決定する残基（Z⁻¹、Z²、Z³およびZ⁶）の同定を表3に示す。

【0117】

抑制活性を試験するために、キメラタンパク質構築物を、組織球性リンパ腫細胞株U-937へ、ヒトVEGF-Aネイティブプロモーター調節下のルシフェラーゼ遺伝子レポーターを含むルシフェラーゼ遺伝子レポータープラスミドと共に、同時トランスフェクト（co-transfect）する。このルシフェラーゼ遺伝子レポータープラスミドは、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に、VEGF-A遺伝子の-2279から+1041までのヌクレオチドを含む [Liu et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:11323-11334]。正の対照については、U-937細胞を、ルシフェラーゼ遺伝子レポータープラスミド単独でトランスフェクトするか、またはルシフェラーゼ遺伝子レポータープラスミド、ならびにGCLおよび関連しない標的配列のためのAZP（もしくは他のDNA結合ドメイン）のキメラタンパク質構築物（タンパク質として、もしくは核酸として）で同時トランスフェクトする。対照のレベルに比べてルシフェラーゼ活性が減少することは、CP1-vegfおよびCP2-vegfがVEGF-Aプロモーター活性をダウンレギュレートすることを示す。

【0118】

あるいは、CP1-vegfもしくはCP2-vegfタンパク質で細胞を処理することによって、または、CP1-vegfもしくはCP2-vegfタンパク質をコードする核酸でU-937細胞をトランスフェクトして、ノーザンプロット技術により内在性VEGF-A mRNAのレベルを測定することによって、抑制活性を測定することができる。

【0119】

【表3】

タンパク質	ドメイン／標的 ヌクレオチド	Z ⁻¹	Z ²	Z ³	Z ⁶
CP1-vegf	1 GTGT	Arg	Asn	Ser	Arg
	2 TGGG	Arg	Asp	His	Thr
	3 GTGA	Arg	Thr	Ser	Arg
	4 AGTG	Thr	Asp	His	Gln
	5 GAGT	Arg	Asn	Asn	Arg
	6 TGTG	Thr	Asp	His	Thr
CP2-vegf	1 GGGG	Arg	Asp	His	Arg
	2 GCTG	Thr	Asp	Asp	Arg
	3 GGGG	Arg	Asp	His	Arg
	4 GGCG	Glu	Asp	His	Arg
	5 GGTG	Thr	Asp	His	Arg
	6 GTCT	Glu	Asn	Ser	Arg

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1】図1は、1つもしくはそれ以上の標的遺伝子を核周辺部の近傍に導くための、本発明のキメラタンパク質を用いた、単量体および重合体の遺伝子抑制を図示する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sera, Takashi

5 <120> Nuclear-Envelope and Nuclear-Lamina Binding Chimeras for
Modulating Gene Expression

<130> 109845-163

10 10 <160> 18

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

15 <211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Zinc finger domain 20

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (2)..(5)

<223> Amino acids 2-5 are Xaa wherein Xaa = any amino acid, and up to
two amino acids can be missing.

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(18)

<223> Xaa can be any amino acid 30

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(24)

<223> Amino acids 20-24 are Xaa wherein Xaa = any amino acid, and up to
two amino acids can be missing.

40 <400> 1

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15 40

Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
20 25
5

<210> 2
<211> 32
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence

<220> 10
<223> Zinc finger domain

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(3)
<223> Xaa can be any amino acid

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(8)
20 <223> Amino acids 5-8 are Xaa wherein Xaa = any amino acid, and up to
two amino acids can be missing

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(14)
30 <223> Xaa can be any amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
30 <223> Amino acid 15 is Z(-1) wherein Z(-1) = Arg, Lys, Gln, Asn, Thr,
Met, Leu, Ile, Glu or Asp.

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
40 <222> (16)..(16)
<223> Xaa can be any amino acid

<220>

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Amino acid 17 is Z2 wherein Z2 = Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val,
      Ala, Asp or Glu.

5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Amino acid 18 is Z3 wherein Z3 = His, Lys, Asn, Gln, Ser, Ala,
10      Val, Thr, Asp or Glu..          10

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
15 <223> Amino acid 18 is Z3 wherein Z3 = His, Lys, Asn, Gln, Ser, Ala,
      Val, Thr, Asp or Glu.

<220>
<221> MISC_FEATURE
20 <222> (19)..(20)
<223> Xaa can be any amino acid          20

<220>
<221> MISC_FEATURE
25 <222> (21)..(21)
<223> Amino acid 21 is Z6 wherein Z6 = Arg, Lys, Gln, Asn, Thr, Tyr,
      Leu, Ile, Met, Glu or Asp.

<220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(27)
<223> Amino acids 5-8 are Xaa wherein Xaa = any amino acid, and up to
      two amino acids can be missing          30

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(32)
<223> Xaa can be any amino acid

40 <400> 2

```

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

5

<210> 3
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Zinc finger domain

10

15

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Amino acid 13 is Z(-1) wherein Z(-1) = Arg, Lys, Gln, Asn, Thr,
Met, Leu, Ile, Glu or Asp.

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> Amino acid 15 is Z2 wherein Z2 = Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val,
25 Ala, Asp or Glu.

20

30

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Amino acid 16 is Z3 wherein Z3 = His, Lys, Asn, Gln, Ser, Ala,
Val, Thr, Asp or Glu.

30

35

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Amino acid 19 is Z6 wherein Z6 = Arg, Lys, Gln, Asn, Thr, Tyr,
Leu, Ile, Met, Glu or Asp.

40

<400> 3
Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10 15

Leu Gln Xaa His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys
20 25

5 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
10 <220> 10
<223> peptide

<400> 4
15 Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

20 <210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus 20

25 <220>
<221> misc_feature
<223> HIV Tat protein domain

<400> 5
30 .
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10 30

35 <210> 6
<211> 9
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus
40
<220>
<221> misc_feature
<223> DNA binding domain 40

```

<400> 6
gcagaagcc
9

5
<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
10
<220>
<223> DNA target sequence
15
<400> 7
gtgtgggtga gtgagtgtg
19

20
<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20
<220>
<223> DNA target sequence
25
<400> 8
ggggctgggg gcgggtgtct
19

30
<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Simian virus 40
30
35
<220>
<221> misc_feature
<223> Peptide from SV40 large T antigen
40
<400> 9
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5
40

```

5 <210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Peptide, residues 43-58 of the Antennapeida homeodomain protein
<400> 10 10

15 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

20 <210> 11
<211> 34
<212> PRT
<213> Herpes Simplex Virus

25 <220>
<221> misc_feature
<223> Residues 267-300 of the HSV VP22 protein
<400> 11 20

30 Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
1 5 10 15

35 Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
20 25 30 35 30

40 Val Glu

40 <210> 12
<211> 11
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Basic peptide with cellular uptake signal activity

5

<400> 12

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1

5

10

10

10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

15

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Basic peptide with cellular uptake signal activity, "R9"

20

<400> 13

20

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

25

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> D-penetratin peptide

30

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> All amino acids are in the D-form.

40

<400> 14

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

10

15

40

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> All amino acids are in the D-form.

5

<400> 17

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe
1 5 10

10

10

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flag Epitope Peptide

20 <400> 18

20

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

25

【図1】

抑制のための新しいストラテジー

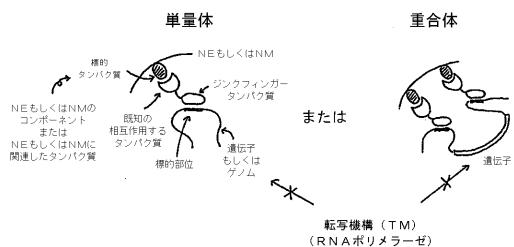
～ ジングフィンガータンパク質を介した
核骨格への標的遺伝子の固定例えば：核マトリクス（NM）へ
および／または
核膜（NE）へ

FIGURE 1

【手続補正書】

【提出日】平成16年11月16日 (2004.11.16)

【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】変更

【補正の内容】

【配列表】

2005514957000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/01529									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 31/70, 38/02; C07K 19/00; C12N 1/00, 5/02, 5/10, 15/62, 15/63; C12P 21/02 US CL : 435/69.1, 243, 320.1, 325, 375, 419; 514/12, 44; 530/350; 536/23.4 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) U.S. : 435/69.1, 243, 320.1, 325, 375, 419; 514/12, 44; 530/350; 536/23.4											
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) Please See Continuation Sheet											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">US 5,652,340 A (KOHWI-SHIGEMATSU ET AL.) 29 July 1997, (29.07.1997), see entire document.</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">1-5, 7, 8, 21, 40-49</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">US 6,153,729 A (STEIN ET AL.) 28 November 2000 (28.11.2000), see entire document.</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">1-5, 7, 8, 21, 40-49</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	US 5,652,340 A (KOHWI-SHIGEMATSU ET AL.) 29 July 1997, (29.07.1997), see entire document.	1-5, 7, 8, 21, 40-49	A	US 6,153,729 A (STEIN ET AL.) 28 November 2000 (28.11.2000), see entire document.	1-5, 7, 8, 21, 40-49
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
A	US 5,652,340 A (KOHWI-SHIGEMATSU ET AL.) 29 July 1997, (29.07.1997), see entire document.	1-5, 7, 8, 21, 40-49									
A	US 6,153,729 A (STEIN ET AL.) 28 November 2000 (28.11.2000), see entire document.	1-5, 7, 8, 21, 40-49									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 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											
Date of the actual completion of the international search 14 June 2004 (14.06.2004)		Date of mailing of the international search report 10 AUG 2004									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 872-9306		Authorized officer Terry A. McKelvey <i>T. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600									

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/01529

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

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

2. Claim 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. Claim Nos.: 6, 9-20, 22-39, and 50-68 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/01529

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

EAST (USPAT, PGPUB, EPO, JPO, Derwent databases), Dialog OneSearch (biotech databases)
search terms: nuclear, lamina, periphery, binding, domain?, envelope, matrix, chimer?, hybrid, fusion, fused, heterologous, transcription factor?

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/30	A 6 1 P 31/20	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 14/00	
C 0 7 K 14/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	

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

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 世良 貴史

京都府京都市西京区大原野東境谷町 1 - 1 - 6 - 9 0 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA21 BA80 CA02 CA07 DA03 GA11 HA17
 4B064 AG02 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA93X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DB52
 DC50 NA14 ZA36 ZB26 ZB33 ZC39
 4C087 AA01 BC83 CA12 NA14 ZA36 ZB26 ZB33 ZC39
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 EA20 EA50 FA74