

(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2009-520463

(P2009-520463A)

(43) 公表日 平成21年5月28日(2009.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/00 (2006.01)	C O 7 K 14/00 Z T D	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 134 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-542539 (P2008-542539)	(71) 出願人	501244222
(86) (22) 出願日	平成18年11月28日 (2006.11.28)		ザ スクリプス リサーチ インスティテ
(85) 翻訳文提出日	平成20年7月25日 (2008.7.25)		ュート
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/061289		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92
(87) 国際公開番号	W02007/062422		037, ラ ホヤ, ノース トーリー
(87) 国際公開日	平成19年5月31日 (2007.5.31)		パインズ ロード 10550
(31) 優先権主張番号	60/740, 525	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成17年11月28日 (2005.11.28)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T N Nのための亜鉛フィンガー結合ドメイン

(57) 【要約】

式 T N N のヌクレオチド配列に結合する亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合領域が含まれるポリペプチドが提供される。複数のポリペプチド、特異的結合活性を有する単離されたヘプタペプチド、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる組成物、およびそのようなポリペプチド、組成物、およびポリヌクレオチドで遺伝子発現を調節する方法もまた提供される。好ましくは、この標的ヌクレオチドは、式 T A N、T C N、T G N、T T N、T N A、T N C、T N G、または T N T を有する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

5 個から 10 個のアミノ酸残基のヌクレオチド結合領域を含む、単離され、精製された亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドであって、該領域が式 T N N の標的ヌクレオチドに優先的に結合し、N が、A、C、G、または T である、亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチド。

【請求項 2】

前記標的ヌクレオチドが、式 T A N、T C N、T G N、T T N、T N A、T N C、T N G、または T N T を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記標的ヌクレオチドが、式 T A A、T A C、T A G、T A T、T C A、T C C、T C G、T C T、T G A、T G C、T G G、T G T、T T A、T T C、T T G、または T T T を有する、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記結合領域が、配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記結合領域が、配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記結合領域が、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記結合領域が、その中に配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかを含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記結合領域が、その中に配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかを含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記結合領域が、その中に配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかを含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記結合領域が、配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記結合領域が、配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

前記結合領域が、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 11 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

前記ヌクレオチド結合領域が 7 残基であり、 α -ヘリックス構造を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

前記結合領域が、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド：

(a) 配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列の結合領域；および

(b) 2 つ以下の保存的アミノ酸置換によって配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる結合領域であって、ここで、解離定数は、置換が行われる前のポリペプチドの解離定数の 125% を超えず、そして保存的アミノ酸置換は以下の置換

10

20

30

40

50

のうちの1つである：Ala / GlyもしくはSer ; Arg / Lys ; Asn / Gln
 もしくはHis ; Asp / Glu ; Cys / Ser ; Gln / Asn ; Gly / Asp ;
 Gly / AlaもしくはPro ; His / AsnもしくはGln ; Ile / Leuもしくは
 Val ; Leu / IleもしくはVal ; Lys / ArgもしくはGlnもしくはGlu ;
 Met / LeuもしくはTyrもしくはIle ; Phe / MetもしくはLeuもしくは
 Tyr ; Ser / Thr ; Thr / Ser ; Trp / Tyr ; Tyr / Trpもしくは
 Phe ; Val / IleもしくはLeu。

【請求項15】

前記結合領域が、わずかに1つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号1から配列番号
 411のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項14に記載のポリペプチド。

10

【請求項16】

前記結合領域が、2つ以下の保存的アミノ酸置換によって、配列番号1から配列番号46
 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項17】

前記結合領域が、わずかに1つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号1から配列番号
 46のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項16に記載のポリペプチド。

【請求項18】

前記結合領域が、2つ以下の保存的アミノ酸置換によって、配列番号1から配列番号6の
 いずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項19】

前記結合領域が、わずかに1つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号1から配列番号
 6のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項18に記載のポリペプチド。

20

【請求項20】

前記ヌクレオチド結合領域に7アミノ酸の亜鉛フィンガードメインが含まれており、ここ
 で、該ドメインの7個のアミノ酸には-1から6の番号が付けられ、該ドメインは以下か
 らなる群より選択される、請求項1に記載のポリペプチド：

(a)ヌクレオチド配列5'-(TAA)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌ
 クレオチド結合ドメインであって、ここで、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ
 酸残基は、Q、N、およびSからなる群より選択される、ドメイン；

(b)ヌクレオチド配列5'-(TCA)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌ
 クレオチド結合ドメインであって、ここで、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ
 酸残基は、Sである、ドメイン；

30

(c)ヌクレオチド配列5'-(TNG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌ
 クレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであ
 り、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、お
 よびIからなる群より選択される、ドメイン；

(d)ヌクレオチド配列5'-(TNG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌ
 クレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであ
 り、2と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基はDである、ドメイン；

(e)ヌクレオチド配列5'-(TNT)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌ
 クレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであ
 り、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、A
 、およびCからなる群より選択される、ドメイン；

40

(f)ヌクレオチド配列5'-(TNC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌ
 クレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであ
 り、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、Q、N、S、G、H、および
 Dからなる群より選択される、ドメイン；

(g)ヌクレオチド配列5'-(TAN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌ
 クレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであ
 り、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、H、N、G、V、P、I、およ

50

び K からなる群より選択される、ドメイン；

(h)ヌクレオチド配列 5' - (TCN) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、T、D、H、K、R、および N からなる群より選択される、ドメイン；

(i)ヌクレオチド配列 5' - (TCC) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、N、H、S、D、T、Q、および G からなる群より選択される、ドメイン；

(j)ヌクレオチド配列 5' - (TCG) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、T、H、S、D、N、Q、および G からなる群より選択される、ドメイン；

(k)ヌクレオチド配列 5' - (TGN) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は H である、ドメイン；

(l) 5' - (TGG) - 3' および 5' - (TGT) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、S、D、T、N、Q、G、および H からなる群より選択される、ドメイン；

(m)ヌクレオチド配列 5' - (TGC) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、W、T、および H からなる群より選択される、ドメイン；

(n)ヌクレオチド配列 5' - (TGN) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は H である、ドメイン；

(o) 5' - (TTA) - 3' および 5' - (TTG) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、S および A からなる群より選択される、ドメイン；

(p) 5' - (TTC) - 3' および 5' - (TTT) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は H である、ドメイン；

(q)ヌクレオチド配列 5' - (TNA) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、- 1 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は R である、ドメイン；

(r)ヌクレオチド配列 5' - (TNT) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、- 1 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、S、T、および H からなる群より選択される、ドメイン；ならびに、

(s)ヌクレオチド配列 5' - (TNN) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、4 と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、L、V、I、および C からなる群より選択される、ドメイン。

【請求項 21】

ヌクレオチド結合領域が、分子モデリングによって配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかであるヌクレオチド結合領域から導かれ、その結果、水素結合パターンが、配列番号 1 から配列番号 411 の少なくとも 1 つに実質的に類似しているポリペプチドに由来する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 22】

式 ANN、CNN、または GNN の標的ヌクレオチドに優先的に結合する少なくとも 1 つの他の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドに対して動作可能であるように連結

10

20

30

40

50

されている、請求項 1 に記載のポリペプチドであって、式中、N は、A、C、G、または T である、ポリペプチド。

【請求項 23】

1 つ以上の転写調節因子に動作可能であるように連結された、請求項 22 に記載のポリペプチド。

【請求項 24】

請求項 1 に記載の複数のポリペプチドが含まれるポリペプチド組成物であって、該ポリペプチドが互いに動作可能であるように連結されている、ポリペプチド組成物。

【請求項 25】

前記ポリペプチドが、5 から 15 個のアミノ酸残基の可撓性ペプチドリinker によって動作可能であるように連結されている、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

10

【請求項 26】

前記リンカーが、配列番号 412、配列番号 414、配列番号 416、配列番号 417、配列番号 418、配列番号 419、配列番号 420、配列番号 421、および配列番号 422 からなる群より選択される配列を有する、請求項 25 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 27】

前記組成物に 2 個から 18 個のポリペプチドが含まれる、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 28】

前記組成物に 2 個から 12 個のポリペプチドが含まれる、請求項 27 に記載のポリペプチド組成物。

20

【請求項 29】

前記組成物が、式 $5' - (TNN)_n - 3'$ の配列を含むヌクレオチド配列に結合する、請求項 28 に記載のポリペプチド組成物であって、式中、N は、A、C、G、または T であり、n は 2 から 12 である、ポリペプチド組成物。

【請求項 30】

前記組成物に、2 個から 6 個のポリペプチドが含まれる、請求項 28 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 31】

前記組成物が、式 $5' - (TNN)_n - 3'$ の配列を含むヌクレオチド配列に結合する、請求項 30 に記載のポリペプチド組成物であって、式中、N は、A、C、G、または T であり、n は 2 から 6 である、ポリペプチド組成物。

30

【請求項 32】

前記組成物に、さらに、配列 $5' - (ANN) - 3'$ 、 $5' - (CNN) - 3'$ 、または $5' - (GNN) - 3'$ のヌクレオチドサブサイトに結合する結合領域を含む少なくとも 1 つのポリペプチドが含まれる、請求項 27 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 33】

各々のポリペプチドの結合領域に、配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列が含まれる、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

40

【請求項 34】

各々のポリペプチドの結合領域に、配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列が含まれる、請求項 33 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 35】

各々のポリペプチドの結合領域に、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列が含まれる、請求項 34 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 36】

各々のポリペプチドの結合領域が、その中に配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかを

50

含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 37】

各々のポリペプチドの結合領域が、その中に配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかを含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 36 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 38】

各々のポリペプチドの結合領域が、その中に配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかを含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 37 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 39】

各々のポリペプチドの結合領域が、配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

10

【請求項 40】

各々のポリペプチドの結合領域が、配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 39 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 41】

各々のポリペプチドの結合領域が、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 40 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 42】

各々のポリペプチドのヌクレオチド結合領域が 7 残基であり、 α -ヘリックス構造を有する、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 43】

各々のポリペプチドの結合領域が、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物：

20

(a) 配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列の結合領域；および

(b) 2 つ以下の保存的アミノ酸置換によって配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる結合領域であって、ここで、解離定数は、置換が行われる前のポリペプチドの解離定数の 125 % を超えず、そして保存的アミノ酸置換は以下の置換のうちの 1 つである：Ala / Gly もしくは Ser ; Arg / Lys ; Asn / Gln もしくは His ; Asp / Glu ; Cys / Ser ; Gln / Asn ; Gly / Asp ; Gly / Ala もしくは Pro ; His / Asn もしくは Gln ; Ile / Leu もしくは Val ; Leu / Ile もしくは Val ; Lys / Arg もしくは Gln もしくは Glu ; Met / Leu もしくは Tyr もしくは Ile ; Phe / Met もしくは Leu もしくは Tyr ; Ser / Thr ; Thr / Ser ; Trp / Tyr ; Tyr / Trp もしくは Phe ; Val / Ile もしくは Leu 。

30

【請求項 44】

各々のポリペプチドの結合領域が、わずかに 1 つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 43 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 45】

各々のポリペプチドの結合領域が、2 つ以下の保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

40

【請求項 46】

各々のポリペプチドの結合領域が、わずかに 1 つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 45 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 47】

各々のポリペプチドの結合領域が、2 つ以下の保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 48】

50

各々のポリペプチドの結合領域が、わずかに1つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号1から配列番号6のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項47に記載のポリペプチド組成物。

【請求項49】

各々のポリペプチドのヌクレオチド結合領域に7アミノ酸の亜鉛フィンガードメインが含まれており、ここで、該ドメインの7個のアミノ酸には-1から6の番号が付けられ、該ドメインは以下からなる群より選択される、請求項24に記載のポリペプチド組成物：

(a)ヌクレオチド配列5'-(TAA)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、Q、N、およびSからなる群より選択される、ドメイン；

(b)ヌクレオチド配列5'-(TCA)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、Sである、ドメイン；

(c)ヌクレオチド配列5'-(TNG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、およびIからなる群より選択される、ドメイン；

(d)ヌクレオチド配列5'-(TNG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、2と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基はDである、ドメイン；

(e)ヌクレオチド配列5'-(TNT)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、A、およびCからなる群より選択される、ドメイン；

(f)ヌクレオチド配列5'-(TNC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、Q、N、S、G、H、およびDからなる群より選択される、ドメイン；

(g)ヌクレオチド配列5'-(TAN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、H、N、G、V、P、I、およびKからなる群より選択される、ドメイン；

(h)ヌクレオチド配列5'-(TCN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、T、D、H、K、R、およびNからなる群より選択される、ドメイン；

(i)ヌクレオチド配列5'-(TCC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、N、H、S、D、T、Q、およびGからなる群より選択される、ドメイン；

(j)ヌクレオチド配列5'-(TCG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、T、H、S、D、N、Q、およびGからなる群より選択される、ドメイン；

(k)ヌクレオチド配列5'-(TGN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基はHである、ドメイン；

(l)5'-(TGG)-3'および5'-(TGT)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、S、D、T、N、Q、G、およびHからなる群より選択される、ドメイン；

(m)ヌクレオチド配列5'-(TGC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌ

10

20

30

40

50

クレオチド結合ドメインであって、ここで、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、W、T、およびHからなる群より選択される、ドメイン；

(n)ヌクレオチド配列5'-(TGN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基はHである、ドメイン；

(o)5'-(TTA)-3'および5'-(TTG)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、SおよびAからなる群より選択される、ドメイン；

(p)5'-(TTC)-3'および5'-(TTT)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、3と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基はHである、ドメイン；

(q)ヌクレオチド配列5'-(TNA)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基はRである、ドメイン；

(r)ヌクレオチド配列5'-(TNT)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、S、T、およびHからなる群より選択される、ドメイン；ならびに、

(s)ヌクレオチド配列5'-(TNN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、4と番号が付けられる該ドメインのアミノ酸残基は、L、V、I、およびCからなる群より選択される、ドメイン。

【請求項50】

各々のポリペプチドのヌクレオチド結合領域が、分子モデリングによって配列番号1から配列番号411のいずれかであるヌクレオチド結合領域から導かれ、その結果、水素結合パターンが、配列番号1から配列番号411の少なくとも1つに実質的に類似しているポリペプチド組成物に由来する請求項24に記載のポリペプチド組成物。

【請求項51】

前記ポリペプチド組成物に、2つの半分の部分が含まれる二重特異的亜鉛フィンガータンパク質が含まれており、それぞれの半分の部分には6個の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインが含まれる、請求項24に記載のポリペプチド組成物であって、ここで、該半分の部分の少なくとも一方に、5'-(TNN)-3'型の標的ヌクレオチド配列に結合する少なくとも1つのドメインが含まれ、その結果、該二重特異的亜鉛フィンガーの2つの半分の部分は独立して作動することができる、ポリペプチド組成物。

【請求項52】

前記二重特異的亜鉛フィンガータンパク質の前記2つの半分の部分がリンカーによって連結されている、請求項51に記載のポリペプチド組成物。

【請求項53】

前記リンカーが、アミノ酸残基配列TGGGGSGGGGTGEKP(配列番号414)を有する、請求項52に記載のポリペプチド組成物。

【請求項54】

前記ポリペプチド組成物に、さらに、FokIのヌクレアーゼ触媒ドメインが含まれており、その結果、該ポリペプチド組成物は、選択されたゲノム標的での部位特異的切断を指示する、請求項24に記載のポリペプチド組成物。

【請求項55】

式ANN、CNN、またはGNNの標的ヌクレオチドに優先的に結合する少なくとも1つの他の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドに対して動作可能であるように連結されており、式中、Nは、A、C、G、またはTである、請求項24に記載のポリペプチド組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 56】

1つ以上の転写因子に動作可能であるように連結された、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 57】

- ヘリックス構造を有しており、式 TNN の標的ヌクレオチドに優先的に結合する、単離されたヘプタペプチドであって、式中、N は、A、C、G、または T である、ヘプタペプチド。

【請求項 58】

前記標的ヌクレオチドが、式 TAN、TCN、TGN、TTN、TNA、TNC、TNG、または TNT を有する、請求項 57 に記載の単離されたヘプタペプチド。

10

【請求項 59】

前記標的ヌクレオチドが、式 TAA、TAC、TAG、TAT、TCA、TCC、TCG、TCT、TGA、TGC、TGG、TGT、TTA、TTC、TTG、または TTT を有する、請求項 58 に記載の単離されたヘプタペプチド。

【請求項 60】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 57 に記載の単離されたヘプタペプチド。

【請求項 61】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 60 に記載の単離されたヘプタペプチド。

20

【請求項 62】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 61 に記載の単離されたヘプタペプチド。

【請求項 63】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 57 に記載の単離されたヘプタペプチド。

【請求項 64】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 63 に記載の単離されたヘプタペプチド。

【請求項 65】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 64 に記載の単離されたヘプタペプチド。

30

【請求項 66】

前記ヘプタペプチドが、その中に配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかを含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 57 に記載の単離されたヘプタペプチド。

【請求項 67】

前記ヘプタペプチドが、その中に配列番号 1 から配列番号 46 のいずれかを含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 66 に記載の単離されたヘプタペプチド。

【請求項 68】

前記ヘプタペプチドが、その中に配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかを含むポリペプチドとの結合について競合する、請求項 67 に記載の単離されたヘプタペプチド。

40

【請求項 69】

前記ヘプタペプチドが、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 57 に記載の単離されたヘプタペプチド：

(a) 配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列の結合領域；および

(b) 2つ以下の保存的アミノ酸置換によって配列番号 1 から配列番号 411 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる結合領域であって、ここで、解離定数は、置換が行われる前のヘプタペプチドの解離定数の 125% を超えず、そして保存的アミノ酸置換は以下の置換のうちの 1つである：Ala / Gly もしくは Ser；Arg / Lys；Asn / Gln もしくは His；Asp / Glu；Cys / Ser；Gln / Asn；Gly / Asp

50

; Gly / Ala もしくは Pro ; His / Asn もしくは Gln ; Ile / Leu もしくは Val ; Leu / Ile もしくは Val ; Lys / Arg もしくは Gln もしくは Glu ; Met / Leu もしくは Tyr もしくは Ile ; Phe / Met もしくは Leu もしくは Tyr ; Ser / Thr ; Thr / Ser ; Trp / Tyr ; Tyr / Trp もしくは Phe ; Val / Ile もしくは Leu 。

【請求項 7 0】

前記結合領域が、わずかに 1 つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 4 1 1 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 6 9 に記載の単離されたヘptaペプチド。

【請求項 7 1】

前記結合領域が、2 つ以下の保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 6 9 に記載の単離されたヘptaペプチド。

【請求項 7 2】

前記結合領域が、わずかに 1 つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 7 1 に記載の単離されたヘptaペプチド。

【請求項 7 3】

前記結合領域が、2 つ以下の保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 7 1 に記載の単離されたヘptaペプチド。

【請求項 7 4】

前記結合領域が、わずかに 1 つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列とは異なる、請求項 7 3 に記載の単離されたヘptaペプチド。

【請求項 7 5】

前記ヘptaペプチドが以下からなる群より選択される、請求項 5 7 に記載の単離されたヘptaペプチド：

(a)ヌクレオチド配列 5 ' - (T A A) - 3 ' に特異的に結合するヘptaペプチドであって、ここで、- 1 と番号が付けられる該ヘptaペプチドのアミノ酸残基は、Q、N、および S からなる群より選択される、ヘptaペプチド；

(b)ヌクレオチド配列 5 ' - (T C A) - 3 ' に特異的に結合するヘptaペプチドであって、ここで、- 1 と番号が付けられる該ヘptaペプチドのアミノ酸残基は、S である、ヘptaペプチド；

(c)ヌクレオチド配列 5 ' - (T N G) - 3 ' に特異的に結合するヘptaペプチドであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、- 1 と番号が付けられる該ヘptaペプチドのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、および I からなる群より選択される、ヘptaペプチド；

(d)ヌクレオチド配列 5 ' - (T N G) - 3 ' に特異的に結合するヘptaペプチドであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、2 と番号が付けられる該ヘptaペプチドのアミノ酸残基は D である、ヘptaペプチド；

(e)ヌクレオチド配列 5 ' - (T N T) - 3 ' に特異的に結合するヘptaペプチドであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、- 1 と番号が付けられる該ヘptaペプチドのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、A、および C からなる群より選択される、ヘptaペプチド；

(f)ヌクレオチド配列 5 ' - (T N C) - 3 ' に特異的に結合するヘptaペプチドであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、- 1 と番号が付けられる該ヘptaペプチドのアミノ酸残基は、Q、N、S、G、H、および D からなる群より選択される、ヘptaペプチド；

(g)ヌクレオチド配列 5 ' - (T A N) - 3 ' に特異的に結合するヘptaペプチドであって、ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、3 と番号が付けられる該ヘptaペプチドのアミノ酸残基は、H、N、G、V、P、I、および K からなる群より

10

20

30

40

50

選択される、ヘプタペプチド；

(h)ヌクレオチド配列 5' - (TCN) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基は、T、D、H、K、R、およびNからなる群より選択される、ヘプタペプチド；

(i)ヌクレオチド配列 5' - (TCC) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基は、N、H、S、D、T、Q、およびGからなる群より選択される、ヘプタペプチド；

(j)ヌクレオチド配列 5' - (TCG) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基は、T、H、S、D、N、Q、およびGからなる群より選択される、ヘプタペプチド；

(k)ヌクレオチド配列 5' - (TGN) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基はHである、ヘプタペプチド；

(l) 5' - (TGG) - 3' および 5' - (TGT) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基は、S、D、T、N、Q、G、およびHからなる群より選択される、ヘプタペプチド；

(m)ヌクレオチド配列 5' - (TGC) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基は、W、T、およびHからなる群より選択される、ヘプタペプチド；

(n)ヌクレオチド配列 5' - (TGN) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基はHである、ヘプタペプチド；

(o) 5' - (TTA) - 3' および 5' - (TTG) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基は、SおよびAからなる群より選択される、ヘプタペプチド；

(p) 5' - (TTC) - 3' および 5' - (TTT) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、3と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基はHである、ヘプタペプチド；

(q)ヌクレオチド配列 5' - (TNA) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基はRである、ヘプタペプチド；

(r)ヌクレオチド配列 5' - (TNT) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基は、S、T、およびHからなる群より選択される、ヘプタペプチド；ならびに、

(s)ヌクレオチド配列 5' - (TNN) - 3' に特異的に結合するヘプタペプチドであって、ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、4と番号が付けられる該ヘプタペプチドのアミノ酸残基は、L、V、I、およびCからなる群より選択される、ヘプタペプチド。

【請求項76】

ヘプタペプチドの配列が、分子モデリングによって配列番号1から配列番号411のいずれかであるヌクレオチド結合領域から導かれ、その結果、水素結合パターンが、配列番号1から配列番号411の少なくとも1つに実質的に類似している、ヘプタペプチドに由来する請求項57に記載の単離されたヘプタペプチド。

【請求項77】

1つ以上の転写調節因子に動作可能であるように連結された、請求項1に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 78】

前記転写調節因子が転写のリプレッサーである、請求項 77 に記載のポリペプチド。

【請求項 79】

前記転写調節因子が転写の活性化因子である、請求項 77 に記載のポリペプチド。

【請求項 80】

前記転写調節因子が、ヒストンデアセチラーゼ、およびヒストンデアセチラーゼの発現の調節因子からなる群より選択される、請求項 77 に記載のポリペプチド。

【請求項 81】

1 つ以上の転写調節因子に動作可能であるように連結された、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 82】

前記転写調節因子が転写のリプレッサーである、請求項 81 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 83】

前記転写調節因子が転写の活性化因子である、請求項 81 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 84】

前記転写因子が、ヒストンデアセチラーゼ、およびヒストンデアセチラーゼの発現の調節因子からなる群より選択される、請求項 81 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 85】

前記ポリペプチドは、HIV-1 tRNA プライマー結合部位の少なくとも一部に結合する人工的な転写因子である、請求項 77 に記載のポリペプチド。

【請求項 86】

前記人工的な転写因子が、6 個の亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインを有しており、そして式 TNN の標的ヌクレオチドに優先的に結合する 1 つの亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインを有する、請求項 85 に記載のポリペプチドであって、式中、N は、A、C、G、または T である、ポリペプチド。

【請求項 87】

前記人工的な転写因子が、Sp1C 亜鉛フィンガー足場に集合される、請求項 85 に記載のポリペプチド。

【請求項 88】

前記人工的な転写因子に、少なくとも 1 つの KRAB 抑制ドメインが含まれる、請求項 85 に記載のポリペプチド。

【請求項 89】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする、単離され、精製されたポリヌクレオチド。

【請求項 90】

請求項 24 に記載のポリペプチド組成物をコードする、単離され、精製されたポリヌクレオチド。

【請求項 91】

請求項 57 に記載の単離されたヘプタペプチドをコードする、単離され、精製されたポリヌクレオチド。

【請求項 92】

請求項 89 に記載の単離され、精製されたポリヌクレオチドが含まれるベクター。

【請求項 93】

請求項 90 に記載の単離され、精製されたポリヌクレオチドが含まれるベクター。

【請求項 94】

請求項 91 に記載の単離され、精製されたポリヌクレオチドが含まれるベクター。

【請求項 95】

請求項 92 に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 96】

真核生物である、請求項 95 に記載の宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 97】

原核生物である、請求項 95 に記載の宿主細胞。

【請求項 98】

請求項 93 に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 99】

真核生物である、請求項 98 に記載の宿主細胞。

【請求項 100】

原核生物である、請求項 98 に記載の宿主細胞。

【請求項 101】

請求項 94 に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

10

【請求項 102】

真核生物である、請求項 101 に記載の宿主細胞。

【請求項 103】

原核生物である、請求項 101 に記載の宿主細胞。

【請求項 104】

請求項 95 に記載のポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 105】

真核生物である、請求項 104 に記載の宿主細胞。

【請求項 106】

原核生物である、請求項 104 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 107】

請求項 90 に記載のポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 108】

真核生物である、請求項 107 に記載の宿主細胞。

【請求項 109】

原核生物である、請求項 107 に記載の宿主細胞。

【請求項 110】

請求項 91 に記載のポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

30

【請求項 111】

真核生物である、請求項 110 に記載の宿主細胞。

【請求項 112】

原核生物である、請求項 110 に記載の宿主細胞。

【請求項 113】

以下からなる群より選択される、単離され、精製されたポリヌクレオチド：

(a) 請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする、単離され、精製されたポリヌクレオチド；および

(b) 核酸配列が、特異的核酸結合活性を備える請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を有するポリペプチドに翻訳されるとの条件で、(a) の配列と少なくとも 95 % 同一である核酸配列。

40

【請求項 114】

以下からなる群より選択される、単離され、精製されたポリヌクレオチド：

(a) 請求項 24 に記載のポリペプチド組成物をコードする、単離され、精製されたポリヌクレオチド；および

(b) 核酸配列が、特異的核酸結合活性を備える請求項 19 に記載のポリペプチド組成物の活性を有するポリペプチドに翻訳されるとの条件で、(a) の配列と少なくとも 95 % 同一である核酸配列。

【請求項 115】

50

以下からなる群より選択される、単離され、精製されたポリヌクレオチド：

(a) 請求項 57 に記載のヘプタペプチドをコードする、単離され、精製されたポリヌクレオチド；および

(b) 核酸配列が、特異的核酸結合活性を備える請求項 50 に記載のヘプタペプチドの活性を有するポリペプチドに翻訳されるとの条件で、(a) の配列と少なくとも 95 % 同一である核酸配列。

【請求項 116】

配列 5' - (TNN)_n - 3' を含むヌクレオチド配列の発現を調節するプロセスであって、式中、n は 2 から 12 であり、該プロセスは、該ヌクレオチド配列を、請求項 24 に記載のポリペプチド組成物の有効量に曝す工程を含む、プロセス。

10

【請求項 117】

前記配列 5' - (TNN) - 3' が 5' - (TNN)_n - 3' 配列の中に配置されている、請求項 116 に記載のプロセス。

【請求項 118】

前記配列 5' - (TNN)_n - 3' が、前記ヌクレオチド配列の転写される領域の中に配置されている、請求項 116 に記載のプロセス。

【請求項 119】

前記配列 5' - (TNN)_n - 3' が、前記ヌクレオチド配列のプロモーター領域の中に配置されている、請求項 116 に記載のプロセス。

20

【請求項 120】

前記配列 5' - (TNN)_n - 3' が発現される配列タグの中に配置されている、請求項 116 に記載のプロセス。

【請求項 121】

前記ポリペプチド組成物が、1 つ以上の転写調節因子に動作可能であるように連結させられる、請求項 116 に記載のプロセス。

【請求項 122】

前記転写調節因子が転写のリプレッサーである、請求項 121 に記載のプロセス。

【請求項 123】

前記転写調節因子が転写の活性化因子である、請求項 121 に記載のプロセス。

【請求項 124】

前記転写調節因子が、ヒストンデアセチラーゼ、およびヒストンデアセチラーゼの発現の調節因子からなる群より選択される、請求項 121 に記載のプロセス。

30

【請求項 125】

前記ヌクレオチド配列が遺伝子である、請求項 116 に記載のプロセス。

【請求項 126】

前記遺伝子が真核生物の遺伝子である、請求項 125 に記載のプロセス。

【請求項 127】

前記遺伝子が原核生物の遺伝子である、請求項 125 に記載のプロセス。

【請求項 128】

前記遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項 125 に記載のプロセス。

40

【請求項 129】

前記真核生物の遺伝子が哺乳動物の遺伝子である、請求項 126 に記載のプロセス。

【請求項 130】

前記哺乳動物の遺伝子がヒトの遺伝子である、請求項 129 に記載のプロセス。

【請求項 131】

前記真核生物の遺伝子が植物の遺伝子である、請求項 126 に記載のプロセス。

【請求項 132】

前記原核生物の遺伝子が細菌の遺伝子である、請求項 127 に記載のプロセス。

【請求項 133】

HIV-1 ウイルスの複製を阻害する方法であって、HIV-1 ウイルスに感染した個体

50

に対して、十分な量の、tRNAプライマー結合部位に結合することができる請求項85に記載の人工的な転写因子を投与し、その結果、HIV-1の複製が阻害される工程を含む、方法。

【請求項134】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項1に記載のポリペプチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

【請求項135】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項24に記載のポリペプチド組成物の治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

10

【請求項136】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項57に記載のヘプタペプチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

【請求項137】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項85に記載の人工的な転写因子の治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

【請求項138】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項89に記載のポリヌクレオチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

20

【請求項139】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項90に記載のポリヌクレオチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

【請求項140】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項91に記載のポリヌクレオチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

30

【請求項141】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項113に記載のポリヌクレオチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

【請求項142】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項114に記載のポリヌクレオチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

【請求項143】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項115に記載のポリヌクレオチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

40

【請求項144】

以下を含む薬学的組成物：

- (a) 請求項85に記載の人工的な転写因子をコードするポリヌクレオチドの治療有効量；および
- (b) 薬学的に許容される担体。

【請求項145】

HIV-1ウイルスの複製を阻害するための方法であって、HIV-1ウイルスに感染し

50

た個体に対して、十分な量の、請求項 85 に記載の人工的な転写因子をコードするポリヌクレオチドを投与し、その結果、HIV-1 の複製が阻害される工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(相互参照)

この出願は、本明細書中に、その全体が参考として援用される Carlos F. Barbass III および Birgit Dreier により 2005 年 11 月 28 日に
出願された、米国仮特許出願第 60/740,525 号(「TNN のための亜鉛フィンガー結合ドメイン」と題す)に対する優先権を主張する。

10

【0002】

(政府の所有権)

本明細書中に報告される研究の一部を支援するために使用された資金は、国立衛生研究所(National Institutes of Health)(NIH GM 53910)によって提供された。したがって、米国政府は、本発明において一定の権利を有し得る。

【0003】

(発明の分野)

本発明の分野は、標的ヌクレオチドに結合する亜鉛フィンガータンパク質である。さらに具体的には、本発明は、式 5'-(TNN)-3' の標的ヌクレオチドに特異的に結合する亜鉛フィンガーの -ヘリックスドメインの中のアミノ酸残基の配列に関する。

20

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

人工的な転写因子の構築は、ここ数年の間に大きな関心となっている。遺伝子発現は、調節ドメインに融合させられたポリダクチル(polydactyl)亜鉛フィンガータンパク質によって特異的に調節することができる。Cys₂-His₂ファミリーの亜鉛フィンガードメインは、それらのモジュール構造の理由から人工的な転写因子の構築について最も期待されている。個々のドメインはおおよそ 30 アミノ酸から構成されており、そして疎水性相互作用、および保存されている Cys₂-His₂ 残基による亜鉛イオンのキレート化によって安定化させられた -ヘリックス構造へと折り畳まれる。今日までに、亜鉛フィンガータンパク質のこのファミリーの中で最も特性決定されたタンパク質は、マウスの転写因子 Zif268 である(非特許文献 1; 非特許文献 2)。Zif268/DNA 複合体の分析により、DNA の結合が、-1 位、3 位、および 6 位の -ヘリックスのアミノ酸残基の、それぞれ、3 bp の DNA サブサイト(subsite)の 3' 中央、および 5' ヌクレオチドとの相互作用によって大部分が行われることを示唆していた。1 位、2 位、および 5 位は、DNA のリン酸骨格と直接接触する、または水によって媒介されて接触することが示されている。ロイシンは、通常、4 位で見られ、これは、ドメインの疎水性コアの中に包まれる。-ヘリックスの 2 位は、他のヘリックス残基と相互作用することが示されており、加えて、3 bp のサブサイトの外側のヌクレオチドと接触することができる(非特許文献 1; 非特許文献 2; 非特許文献 3)。

30

40

【0005】

5'-(GNN)-3' DNA サブサイトのそれぞれを高い特異性および親和性で認識するモジュールである亜鉛フィンガードメインの選択、ならびに部位特異的突然変異によるそれらの改良が明らかにされている(特許文献 1(その開示は引用により本明細書中に組み入れられる))。これらのモジュールドメインは、ヒトゲノムまたは任意の他のゲノムにおいて特有である、18 bp に広がる DNA 配列を認識する亜鉛フィンガータンパク質へと集合することができる。加えて、これらのタンパク質は転写因子として機能し、調節ドメインに融合させられると遺伝子発現を変化させることができ、さらには、核ホルモン受容体のリガンド結合ドメインへの融合によってホルモン依存性となることができる。

50

任意のDNA配列に結合する亜鉛フィンガーをベースとする転写因子の迅速な構築を可能にするためには、遺伝子コードにおいて意味が割り当てられている64種類の可能なDNAトリプレットのそれぞれを認識するように、モジュールである亜鉛フィンガードメインの既存のセットを伸張させることが重要である。この目的は、ファージディスプレイ選択および/または合理的な設計によって行うことができる。亜鉛フィンガー/DNA相互作用についての構造のデータが限られているという理由から、亜鉛タンパク質の合理的な設計には非常に時間がかかり、多くの場合には不可能であり得る。加えて、ほとんどの自然界に存在している亜鉛フィンガータンパク質は、5'-(GNN)-3'型のDNA配列を認識するドメインから構成されている。5'-(NNN)-3'型のDNA標的配列に結合する新規の亜鉛フィンガードメインを同定するための最も見込みのあるアプローチは、ファージディスプレイによる選択である。このアプローチの律速工程は、それぞれのモジュールによって認識されるサブサイトの中の5'アデニン、シトシン、またはチミンの特定を可能にするライブラリーの構築である。ファージディスプレイ選択はZif268に基づき、ここで、このタンパク質の様々なフィンガーが無作為化された(非特許文献4; 非特許文献5; 非特許文献6; 非特許文献7; 非特許文献8; 非特許文献9)。5'-(GNN)-3'型のDNA配列を認識する16個のドメインのセットは、C7のフィンガー2(Zif268の誘導体(非特許文献7))が無作為化されているライブラリーから、これまでに報告されている(非特許文献10)。このような戦略では、選択は、フィンガー-2サブサイトの中の5'グアニンまたはチミンの相補的な塩基と接触するフィンガー3のA_{sp}²が原因で、5'-(GNN)-3'または5'-(TNN)-3'を認識するドメインに限定される(非特許文献1; 非特許文献2)。

【0006】

上記の戦略による5'-(TNN)-3'型の配列を認識する亜鉛フィンガードメインの選択が可能であるにもかかわらず、実際には、そのような配列はほとんど選択、および同定されていない。したがって、5'-(TNN)-3'型の配列を認識し、その結果、亜鉛フィンガードメインの幅広い「語彙(vocabulary)」を、マルチフィンガー亜鉛フィンガータンパク質の構築に利用できるようにする亜鉛フィンガードメインを発見する必要がある。5'-(TNN)-3'型の配列を認識する亜鉛フィンガードメインの有用性により、はるかに多種多様な核酸配列を認識する他の核酸配列認識機能を有する人工的な転写因子およびタンパク質を調製する能力が導かれる。5'-(TNN)-3'型の配列を特異的に認識する能力は、主要な終結コドンであるTGA、TAG、およびTAAがこの形態であり、そして調節配列が鎖の末端領域に非常に近い位置に頻繁に存在するために特に重要である。加えて、終結コドンは、多くの場合に、自然界に存在しているDNAの中ではタンデムで見られ、これらの領域を標的化させるために望ましい。5'-(TNN)-3'型の配列を認識する亜鉛フィンガードメインが不足すると、これは非常に難しくなる。

【0007】

本発明のアプローチは、科学界による亜鉛フィンガータンパク質の迅速な構築を可能にし、サブサイトを越えた(cross-subsite)相互作用によって強要される限界に関する懸念が限られた数の場合にしか起こらないことが示されている亜鉛フィンガードメインのモジュール方式に基づく。本発明の開示により、5'-(TNN)-3'型のDNA配列を特異的に認識する亜鉛フィンガードメインの選択のための新しい戦略が導入される。これらのドメインの特異的なDNA結合特性は、16種類の5'-(CNN)-3'トリプレット全てに対する多標的ELISA(multi-target ELISA)によって評価された。これらのドメインは、それぞれが18bpに広がる配列を特異的に認識する様々な数の5'-(TNN)-3'ドメインを含むポリダクチルタンパク質の中に容易に取り込ませることができる。さらに、これらのドメインは、調節ドメインに融合させられると、遺伝子発現を特異的に変化させることができる。これらの結果は、予め定義された構成要素(building block)からポリダクチルタンパク質を構築することの実現可能性を強調する。加えて、本明細書中で特性決定されたド

メインは、人工的な転写因子を用いて標的化させることができるDNA配列の数を大幅に増大させる。

【特許文献1】米国特許第6,140,081号明細書

【非特許文献1】Pavletichら、(1991) Science 252(5007), 809-817

【非特許文献2】Elrod-Ericksonら、(1996) Structure 4(10), 1171-1180

【非特許文献3】Isalan, M.ら、(1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(11), 5617-5621

【非特許文献4】Chooら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91(23), 11168-72 10

【非特許文献5】Rebarら、(1994) Science (Washington, D.C., 1883-) 263(5147), 671-3

【非特許文献6】Jamiesonら、(1994) Biochemistry 33, 5689-5695

【非特許文献7】Wuら、(1995) PNAS 92, 344-348

【非特許文献8】Jamiesonら、(1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 12834-12839

【非特許文献9】Greismanら、(1997) Science 275(5300), 657-661 20

【非特許文献10】Segalら、(1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758-2763

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の簡単な要旨)

1つの態様においては、本発明により、5から10アミノ酸残基のヌクレオチド結合領域(この領域は、式TNN(式中、Nは、A、C、G、またはTである)の標的ヌクレオチドに優先的に結合する)を含む、単離されそして精製された亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドが提供される。好ましくは、標的ヌクレオチドは、式TAN、TCN、TGN、TTN、TNA、TNC、TNG、またはTNTを有する。さらに好ましくは、標的ヌクレオチドは、式TAA、TAC、TAG、TAT、TCA、TCC、TCG、TCT、TGA、TGC、TGG、TGT、TTA、TTC、TTG、またはTTTを有する。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチドには、配列番号1から配列番号411のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する結合領域が含まれる。そのようなポリペプチドは、ヌクレオチド標的への結合について、配列番号1から配列番号411のいずれかと競合する。すなわち、好ましいポリペプチドには、競合様式で配列番号1から配列番号411のいずれかの結合に置き換わる結合領域が含まれる。競合結合を決定するための手段は当該分野で周知である。好ましくは、結合領域は、配列番号1から配列番号411のいずれかのアミノ酸配列を有する。さらに好ましくは、結合領域は、配列番号1から配列番号46のいずれかのアミノ酸配列を有する。なおさらに好ましくは、結合領域は配列番号1から配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を有する。あるいは、結合領域は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し得る：(1)配列番号1から配列番号411のいずれか、配列番号1から配列番号46のいずれか、または配列番号1から配列番号6のいずれかのアミノ酸配列の結合領域；および(2)配列番号1から配列番号411のいずれか、配列番号1から配列番号46のいずれか、または配列番号1から配列番号6のいずれかのアミノ酸配列とは、2つ以下の保存的アミノ酸置換によって異なる結合領域であって、ここで、解離定数が置換が行われる前のポリペプチドの解離定数の125%を超えず、保存的アミノ酸置換が以下の置換のうちの1つである、結合領域：Ala/GlyもしくはSer；Arg/Lys；Asn/Glnもしくは 30 40 50

His; Asp/Glu; Cys/Ser; Gln/Asn; Gly/Asp; Gly/AlaもしくはPro; His/AsnもしくはGln; Ile/LeuもしくはVal; Leu/IleもしくはVal; Lys/ArgもしくはGlnもしくはGlu; Met/LeuもしくはTyrもしくはIle; Phe/MetもしくはLeuもしくはTyr; Ser/Thr; Thr/Ser; Trp/Tyr; Tyr/TrpもしくはPhe; Val/IleもしくはLeu。なお別の手段においては、ヌクレオチド結合領域には、7アミノ酸の亜鉛フィンガードメインが含まれる。ここで、このドメインの7個のアミノ酸には-1から6の番号が付けられ、そしてこのドメインは以下からなる群より選択される：(1)ヌクレオチド配列5'-(TAA)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Q、N、およびSからなる群より選択される)；(2)ヌクレオチド配列5'-(TCA)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Sである)；(3)ヌクレオチド配列5'-(TNG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、およびIからなる群より選択される)；(4)ヌクレオチド配列5'-(TNG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、このドメインの2と番号が付けられるアミノ酸残基はDである)；(5)ヌクレオチド配列5'-(TNT)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、A、およびCからなる群より選択される)；(6)ヌクレオチド配列5'-(TNC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Q、N、S、G、H、およびDからなる群より選択される)；(7)ヌクレオチド配列5'-(TAN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、H、N、G、V、P、I、およびKからなる群より選択される)；(8)ヌクレオチド配列5'-(TCN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、T、D、H、K、R、およびNからなる群より選択される)；(9)ヌクレオチド配列5'-(TCC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、N、H、S、D、T、Q、およびGからなる群より選択される)；(10)ヌクレオチド配列5'-(TCG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、T、H、S、D、N、Q、およびGからなる群より選択される)；(11)ヌクレオチド配列5'-(TGN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである)；(12)5'-(TGG)-3'および5'-(TGT)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S、D、T、N、Q、G、およびHからなる群より選択される)；(13)ヌクレオチド配列5'-(TGC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、W、T、およびHからなる群より選択される)；(14)ヌクレオチド配列5'-(TGN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである)；(15)5'-(TTA)-3'および5'-(TTG)-3'からなる群より選択されるヌ

クレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン（ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、SおよびAからなる群より選択される）；（16）5' - (TTC) - 3' および 5' - (TTT) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン（ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである）；（17）ヌクレオチド配列 5' - (TNA) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はRである）；（18）ヌクレオチド配列 5' - (TNT) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S、T、およびHからなる群より選択される）；ならびに、（19）ヌクレオチド配列 5' - (TNN) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、4と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、L、V、I、およびCからなる群より選択される）。

10

20

30

【0009】

別の態様においては、本発明により、複数の、そして好ましくは約2個から約18個の、本明細書中に開示される亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインを含むポリペプチド組成物が提供される。これらのドメインは、通常、動作可能であるように連結され、例えば、5個から15個のアミノ酸残基の可撓性のペプチドリinkerによって連結される。動作可能な連結は、好ましくは、配列番号412に示されるような可撓性のペプチドリinkerによって行われる。そのような組成物は、通常、式 5' - (TNN)_n - 3'（式中、Nは、A、C、G、またはTであり、nは2から12である）の配列を含むヌクレオチド配列に結合する。好ましくは、ポリペプチド組成物には、約2個から約6個の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインが含まれ、これらは、式 5' - (TNN)_n - 3'（式中、nは2から6である）の配列を含むヌクレオチド配列に結合する。結合は、1 μMから10 μMのK_Dで起こる。好ましくは、結合は、10 μMから1 μM、10 pMから100 nM、100 pMから10 nMのK_Dで、さらに好ましくは、1 nMから10 nMのK_Dで起こる。好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドおよびポリペプチド組成物はいずれも、1つ以上の転写調節因子（例えば、転写のリプレッサーまたは転写の活性化因子）に動作可能であるように連結される。

【0010】

なお別の態様においては、本発明によってさらに、 α -ヘリックス構造を有する単離されたヘプタペプチドが提供され、これは、式 TNN（式中、Nは、A、C、G、またはTである）の標的ヌクレオチドに優先的に結合する。好ましい標的ヌクレオチドは上記に記載した通りである。好ましいヘプタペプチドは、上記ポリペプチドの結合領域のヘプタペプチドと同じである。

【0011】

加えて、本発明によってさらに、二重特異的亜鉛フィンガーが提供される。二重特異的亜鉛フィンガーには、2つの半分の部分が含まれ、それぞれの半分の部分には、6個の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインが含まれる。ここで、半分の部分の少なくとも一方に、5' - (TNN) - 3' 型の標的ヌクレオチド配列に結合する少なくとも1つのドメインが含まれ、その結果、二重特異的亜鉛フィンガーの2つの半分の部分は独立して作動することができる。

40

【0012】

加えて、本発明によってさらに、その中に少なくとも1つの5' - (TNN) - 3' 型の標的ヌクレオチド配列が含まれる部位で切断する配列特異的ヌクレアーゼである FokI のヌクレアーゼ触媒ドメインを含む配列特異的ヌクレアーゼが提供される。本発明によってさらに、そのような配列特異的ヌクレアーゼを使用する核酸配列の配列特異的切断のための方法が提供される。

50

【 0 0 1 3 】

本発明によってはさらに、本発明のポリペプチドまたは組成物をコードするポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドを含む発現ベクター、およびポリヌクレオチドまたは発現ベクターで形質転換された宿主細胞が提供される。

【 0 0 1 4 】

本発明によってはさらに、標的ヌクレオチド配列 5' - (T N N) - 3' を含むヌクレオチド配列の発現を調節するプロセスが提供される。標的ヌクレオチド配列は、より長い 5' - (N N N) - 3' 配列の中のどこにでも配置することができる。このプロセスには、亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドまたは本明細書中に示される組成物の有効量に対して、ヌクレオチド配列を曝す工程を含む。1つの実施形態においては、プロセスによって、配列 5' - (T N N)_n - 3' (式中、n は 2 から 12 である) を含むヌクレオチド配列の発現が調節される。このプロセスには、本発明の組成物の有効量に対してヌクレオチド配列を曝す工程を含む。配列 5' - (T N N)_n - 3' は、ヌクレオチド配列の転写される領域の中に配置することも、ヌクレオチド配列のプロモーター領域の中に配置することも、また、発現される配列タグの中に配置することもできる。組成物は、好ましくは、1つ以上の転写調節因子 (例えば、転写のリプレッサーまたは転写の活性化因子) に動作可能であるように連結させられる。1つの実施形態においては、ヌクレオチド配列は、真核生物遺伝子、原核生物遺伝子、またはウイルス遺伝子のような遺伝子である。真核生物遺伝子は、ヒト遺伝子のような哺乳動物遺伝子であっても、また、あるいは、植物の遺伝子であってもよい。原核生物遺伝子は、細菌の遺伝子であり得る。本発明による1つの特異的な方法は、H I V - 1 ウイルスの複製を阻害する方法であり、これには、H I V - 1 ウイルスに感染した個体に対して、十分な量の、t R N A プライマー結合部位に結合することができる本発明の人工的な転写因子を投与し、その結果、H I V - 1 の複製が阻害される工程を含む。あるいは、本発明による別の特異的な方法は、H I V - 1 ウイルスの複製を阻害する方法であり、これには、H I V - 1 ウイルスに感染した個体に対して、十分な量の、本発明の人工的な転写因子をコードするポリヌクレオチドを投与し、その結果、H I V - 1 の複製が阻害される工程を含む。

【 0 0 1 5 】

なお別の実施形態においては、本発明により、以下を含む薬学的組成物が提供される：

(1) ポリペプチド、ポリペプチド組成物 (例えば、人工的な転写因子)、または上記のような本発明の単離されたヘプタペプチドの治療有効量；および

(2) 薬学的に許容される担体。

【 0 0 1 6 】

なお別の実施形態においては、本発明により、以下を含む薬学的組成物が提供される：

(1) ポリペプチド、ポリペプチド組成物 (例えば、人工的な転写因子)、または上記のような本発明の単離されたヘプタペプチドをコードする、ヌクレオチド配列の治療有効量；および

(2) 薬学的に許容される担体。

【 0 0 1 7 】

以下の本発明は、明細書、添付される特許請求の範囲、および添付の図面を参照してさらに理解されるであろう。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 8 】

(発明の詳細な説明)

定義

特に明記されていない限りは、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。

【 0 0 1 9 】

本明細書中で使用される場合は、用語「核酸」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」

、または同様の用語は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを意味し、これには、一本鎖の形態または二本鎖の形態、そしてコード形態または非コード（例えば、「アンチセンス」）形態が含まれる。この用語には、天然のヌクレオチドの公知のアナログを含む核酸が含まれる。この用語にはまた、修飾もしくは置換された塩基が、相補的なヌクレオチドのワトソンクリック結合を妨害せず、また、特異的に結合するタンパク質（例えば、亜鉛フィンガータンパク質）によるヌクレオチド配列の結合も妨害しない限りは、修飾された塩基あるいは置換された塩基を含む核酸も含まれる。この用語にはまた、合成の骨格を有する核酸様構造も含まれる。本発明によって提供されるDNA骨格アナログには、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファミン酸塩、3'-チオアセタール、メチレン（メチルイミノ）、3'-N-カルバメート、カルバミン酸モルホリノ、およびペプチド核酸（PNA）が含まれる。Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, F. Eckstein 編, IRL Press, Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, 第600巻, Baserga and Denhardt 編 (NYAS 1992); Milligan (1993) J. Med. Chem. 36: 1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press) を参照のこと。PNAには、非イオン性骨格（例えば、N-(2-アミノエチル)グリシン単位）が含まれる。ホスホロチオエート結合は、例えば、米国特許第6,031,092号；同第6,001,982号；同第5,684,148号に記載されている。WO97/03211; WO96/39154; Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144: 189-197 もまた参照のこと。この用語に含まれる他の合成の骨格としては、メチルホスホネート結合、またはメチルホスホネートとホスホジエステルの交互の結合（例えば、米国特許第5,962,674号；Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36: 8692-8698 を参照のこと）、およびベンジルホスホネート結合（例えば、米国特許第5,532,226；Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6: 153-156 を参照のこと）が挙げられる。

【0020】

本明細書中で使用される場合は、用語「転写調節ドメインまたは因子」は、遺伝子の転写を調節するように機能する、本明細書中に提供される融合ポリペプチドの一部をいう。例示的であり、そして好ましい転写リプレッサードメインはERD、KRAB、SID、デアセチラーゼ（Deacetylase）、ならびに、それらの誘導体、多量体、およびそれらの組み合わせ（例えば、KRAB-ERD、SID-ERD、(KRAB)₂、(KRAB)₃、KRAB-A、(KRAB-A)₂、(SID)₂、(KRAB-A)-SID、およびSID-(KRAB-A)）である。本明細書中で使用される場合は、用語「ヌクレオチド結合ドメインまたは領域」は、特異的な核酸結合能力を提供する、本明細書中に提供されるポリペプチドまたは組成物の一部を意味する。ヌクレオチド結合領域は、特異的遺伝子に対して目的のポリペプチドを標的化させるように機能する。本明細書中で使用される場合は、用語「動作可能であるように連結される」は、例えば、ポリペプチドの複数のエレメントが、それぞれが意図されるように役割を果たす、または機能するように連結されることを意味する。例えば、リプレッサーは、その結合ドメインを介して標的ヌクレオチドに結合させた場合には、リプレッサーが転写を阻害するまたは妨げるように作用するような様式で、結合ドメインに結合させられる。エレメントの間およびそれらの中での結合は、直接である場合も、または間接的である（例えば、リンカーを介する）場合もある。複数のエレメントは、必ずしも隣接している必要はない。したがって、リプレッサードメインは、当該分野で周知の任意の連結手順を使用してヌクレオチド結合

ドメインに連結させることができる。2つのドメインの間にリンカー部分を含めることが必要である場合がある。そのようなリンカー部分は、通常は、アミノ酸残基の短い配列であり、これによって、それらのドメインの間に間隔がもたらされる。リンカーが結合ドメインまたはリプレッサードメインの機能のいずれをも妨害しない限りは、任意の配列を使用することができる。

【0021】

本明細書中で使用される場合は、用語「調節する」は、それが過剰に活性化される場合には、亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合モチーフを含むプロモーターからの発現の阻害もしくは抑制を想定し、また、それが発現が抑えられる場合には、そのようなプロモーターからの発現の増大もしくは増強を想定する。

10

【0022】

本明細書中で使用される場合は、本明細書中に現れる様々なアミノ酸配列において生じるアミノ酸は、それらの周知の三文字または一文字の省略形にしたがって特定される。様々なDNA断片の中に生じるヌクレオチドは、当該分野で日常的に使用される標準的な一文字の表記で指定される。

【0023】

ペプチドまたはタンパク質においては、アミノ酸の適切な保存的置換は当業者に公知であり、これらは、一般的には、得られる分子の生物学的活性を変化させることなく作成することができる。当業者は、一般的に、ポリペプチドの必須ではない領域の中の1つのアミノ酸の置換によっては生物学的活性が実質的には変化することはないことを認識している（例えば、Watsonら、Molecular Biology of the Gene, 第4版, 1987, Benjamin/Cummings, 224頁を参照のこと）。具体的には、そのような保存的変異体は修飾されたアミノ酸配列を有しており、その結果、変化（単数または複数）は、タンパク質の（保存的変異体の）構造および/または活性（例えば、抗体活性、酵素活性、または受容体活性）を実質的に変化させることはない。これらには、アミノ酸配列の保存的に修飾されたバリエーション、すなわち、タンパク質の活性に重要ではないそれらの残基のアミノ酸置換、付加、もしくは欠失、または、類似する特性（例えば、酸性、塩基性、正電荷を有する、もしくは負電荷を有する、極性もしくは非極性など）を有する残基でのアミノ酸の置換が含まれ、その結果、さらに重要なアミノ酸の置換によっても、構造および/または活性は実質的には変化しない。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換の表は当該分野で周知である。例えば、保存的置換を選択するための1つの例示的な指針としては、以下が挙げられる（もとの残基の後に例示的な置換が続く）：Ala/GlyもしくはSer; Arg/Lys; Asn/GlnもしくはHis; Asp/Glu; Cys/Ser; Gln/Asn; Gly/Asp; Gly/AlaもしくはPro; His/AsnもしくはGln; Ile/LeuもしくはVal; Leu/IleもしくはVal; Lys/ArgもしくはGlnもしくはGlu; Met/LeuもしくはTyrもしくはIle; Phe/MetもしくはLeuもしくはTyr; Ser/Thr; Thr/Ser; Trp/Tyr; Tyr/TrpもしくはPhe; Val/IleもしくはLeu。別の例示的な指針では、以下の6つのグループが使用され、それぞれには、互いに保存的置換であるアミノ酸が含まれる：（1）アラニン（AもしくはAla）、セリン（SもしくはSer）、スレオニン（TもしくはThr）；（2）アスパラギン酸（DもしくはAsp）、グルタミン酸（EもしくはGlu）；（3）アスパラギン（NもしくはAsn）、グルタミン（QもしくはGln）；（4）アルギニン（RもしくはArg）、リジン（KもしくはLys）；（5）イソロイシン（IもしくはIle）、ロイシン（LもしくはLeu）、メチオニン（MもしくはMet）、バリン（VもしくはVal）；および（6）フェニルアラニン（FもしくはPhe）、チロシン（YもしくはTyr）、トリプトファン（WもしくはTrp）；（例えば、Creighton (1984) Proteins, W. H. Freeman and Company; Schulz and Schirmer (1979) Principles of Protein Structure, Springer-Verlag

20

30

40

50

もまた参照のこと)。当業者は、上記で特定された置換が限られた可能な保存的置換ではないことを理解するであろう。例えば、いくつかの目的については、全ての電荷を有するアミノ酸を、それらがポジティブであるかまたはネガティブであるかにはかわらず、互いに保存的置換として見なすことができる場合がある。加えて、コードされる配列の中の1つのアミノ酸またはアミノ酸のうちの少ない割合を変化させる、付加する、または欠失させる個々の置換、欠失、または付加もまた、導かれるタンパク質の三次元構造および機能がそのようなバリエーションによって保存されると考えられる場合には、「保存的に修飾されたバリエーション」と考えることができる。

【0024】

本明細書中で使用される場合は、用語「発現ベクター」は、プラスミド、ウイルス、ファージミド、または異種DNA（例えば、本明細書中の融合タンパク質をコードする核酸または本明細書中に提供される発現カセット）の挿入または取り込みによって操作されている当該分野で公知の他の媒体を意味する。そのような発現ベクターには、通常、細胞の中での挿入された核酸の効率的な転写のためのプロモーター配列が含まれる。発現ベクターには、通常、複製起点、プロモーター、ならびに、形質転換された細胞の表現形による選択を可能にする特異的な遺伝子が含まれる。

10

【0025】

本明細書中で使用される場合には、用語「宿主細胞」は、その中でベクターが増殖することができ、そのDNAが発現させられる細胞をいう。この用語にはまた、目的の宿主細胞の任意の子孫も含まれる。複製の間に起こる変異が存在する可能性があるので、全ての子孫がもとの細胞と同じでない場合があることが理解される。そのような子孫は、用語「宿主細胞」が使用される場合には含まれる。外来DNAが宿主の中で持続的に維持される安定な導入方法は当該分野で公知である。

20

【0026】

本明細書中で使用される場合は、遺伝子治療には、そのような治療が想定される疾患または症状を有する哺乳動物（特に、ヒト）の特定の細胞、標的細胞への異種DNAの導入が含まれる。DNAは、異種DNAが発現させられ、それによってコードされる治療用の産物が生産される様式で、選択された標的細胞に導入される。あるいは、異種DNAは、いくつかの様式で、治療用産物をコードするDNAの発現を媒介することができるか、またはこれは、いくつかの様式において、治療用産物の発現を直接もしくは間接的に媒介するペプチドまたはRNAのような産物をコードする場合もある。遺伝子治療はまた、欠損遺伝子に置き換わる遺伝子産物をコードする核酸、またはそれが導入される哺乳動物または細胞によって生産される遺伝子産物を補うものを送達するために使用される場合もある。導入された核酸は、治療用化合物（例えば、その成長因子阻害剤、または腫瘍壊死因子もしくはその阻害剤（例えば、それについての受容体）をコードする場合がある。これらは、通常は、哺乳動物宿主の中では生産されないか、または治療有効量では、もしくは治療上有効なタイミングでは生産されない。治療用産物をコードする異種DNAは、産物もしくはその発現を高めるかまたは別の方法で変化させるために、罹患した宿主の細胞に導入される前に修飾される場合がある。遺伝子治療にはまた、阻害剤もしくはリプレッサー、または遺伝子発現の他の調節因子の送達が含まれる場合がある。

30

40

【0027】

本明細書中で使用される場合は、異種DNAは、その中でそれが発現させられる細胞によっては通常はインビボでは生産されないRNAおよびタンパク質をコードするDNAであるか、あるいは、転写、翻訳、または他の調節することができる生化学的プロセスに影響を与えることによって内因性DNAの発現を変化させる媒介因子を媒介するかまたはコードするDNAである。異種DNAはまた、外来DNAと呼ばれる場合もある。当業者が、それが発現させられる細胞に対して異種または外来と認識する、またはそのように考える任意のDNAが、本明細書中では異種DNAに含まれる。異種DNAの例としては、追跡することができるマーカータンパク質（例えば、薬剤耐性を付与するタンパク質）をコードするDNA、治療上有効である物質（例えば、抗ガン剤、酵素、およびホルモン）を

50

コードするDNA、ならびに、他のタイプのタンパク質（例えば、抗体）をコードするDNAが挙げられるが、これらに限定されない。異種DNAによってコードされる抗体は、異種DNAが導入されている細胞の表面上に分泌される場合も、また、その表面上で発現される場合もある。

【0028】

したがって、本明細書中の異種DNAまたは外来DNAには、ゲノムの中で見られる対応するDNA分子としての正確な方向および位置では存在していないDNA分子が含まれる。これはまた、別の生物または種に由来する（すなわち、外因性の）DNA分子を意味する場合もある。

【0029】

本明細書中で使用される場合は、治療上有効な産物は、異種核酸、通常はDNAによってコードされる産物である。これは、核酸が宿主細胞に導入されると、遺伝性または後天性の疾患の症状、発現を緩和するかまたは排除するか、あるいは、疾患を治癒させる産物が発現される。通常、所望される遺伝子産物をコードするDNAはプラスミドベクターにクローニングされ、日常的に行われている方法（例えば、リン酸カルシウム媒介性のDNAの取り込み（（1981）Somat. Cell. Mol. Genet. 7: 603-616を参照のこと）、またはマイクロインジェクション）によってプロデューサー細胞（例えば、パッケージング細胞）に導入される。プロデューサー細胞の中での増幅の後、異種DNAを含むベクターが選択された標的細胞に導入される。

【0030】

本明細書中で使用される場合は、発現ベクターまたは送達ベクターは、適切な宿主細胞の中での発現のためにその中に外来または異種DNAを挿入することができる任意のプラスミドまたはウイルスを意味する。すなわち、DNAによってコードされるタンパク質またはポリペプチドは、宿主細胞のシステムにおいて合成される。1つ以上のタンパク質をコードするDNAセグメント（遺伝子）の発現を指示することができるベクターは、本明細書中では「発現ベクター」と呼ばれる。逆転写酵素を使用して生産されたmRNAからのcDNA（相補的DNA）のクローニングを可能にするベクターもまた含まれる。

【0031】

本明細書中で使用される場合は、遺伝子は、そのヌクレオチド配列がRNAまたはポリペプチドをコードする核酸分子を意味する。遺伝子は、RNAまたはDNAのいずれかであり得る。遺伝子には、コード領域に先行する領域とコード領域に続く領域（リーダーおよびトレイラー）、ならびに、個々のコードセグメント（エキソン）の間に介在配列（イントロン）が含まれる場合もある。

【0032】

本明細書中で使用される場合には、核酸分子またはポリペプチドまたは他の生態分子に関する用語「単離された」は、核酸またはポリペプチドが、そのポリペプチドまたは核酸が得られた遺伝的環境から分離されていることを意味する。これはまた、生体分子が天然の状態から変化していることを意味する場合もある。例えば、生存している動物の中には自然に存在しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離されて」いないが、その自然界での状態では一緒に存在している物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書中でこの用語が使用される場合には、「単離されている」。したがって、組み換え体である宿主細胞の中で生産されるおよび/またはその中に含まれるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、単離されていると見なされる。組み換え宿主細胞から、または自然界の供給源から部分的または実質的に精製されているポリペプチドあるいはポリヌクレオチドもまた、「単離されたポリペプチド」または「単離されたポリヌクレオチド」として含まれる。例えば、化合物の組み換えによって生産されたバージョンは、Smithら、（1988）Gene 67: 3140に記載されている1工程の方法によって実質的に精製することができる。用語「単離された」および「精製された」は、同じ意味で使用される場合がある。

【0033】

10

20

30

40

50

したがって、「単離された」によっては、核酸が、自然界に存在しているゲノムにおいては、目的の核酸をコードする遺伝子にすぐ隣接しているそのような遺伝子のコード配列を含まないことが意味される。単離されたDNAは、一本鎖である場合も、また、二本鎖である場合もあり、ゲノムDNAである場合も、cDNAである場合も、組み換え体であるハイブリッドである場合も、また、合成のDNAである場合もある。これは、自然界に存在しているDNA配列と同一である場合も、また、1つ以上のヌクレオチドの欠失、付加、または置換によってそのような配列とは異なる場合もある。

【0034】

「単離された」または「精製された」は、それらの用語が生物学的細胞または宿主から作成された調製物をいうように使用される場合には、目的のDNAまたはタンパク質の粗抽出物を含む、示されたDNAまたはタンパク質を含む任意の細胞抽出物を意味する。例えば、タンパク質の場合には、精製された調製物は、個々の技術、または一連の分配もしくは生化学的技術にしたがって得ることができ、目的のDNAまたはタンパク質は、これらの調製物の中に様々な純度で存在し得る。特にタンパク質については、手順としては、例えば、硫酸アンモニウム分画、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、等電点電気泳動、クロマト分画、および電気泳動を挙げることができるが、これらに限定されない。

10

【0035】

「実質的に純粋」または「単離された」DNAまたはタンパク質の調製は、そのようなDNAまたはタンパク質が自然界において通常は会合している、自然界に存在している材料を含まない調製物を意味すると理解されるべきである。「本質的に純粋」は、目的のDNAまたはタンパク質が少なくとも95%を構成している、「高度に」精製された調製物を意味すると理解されるべきである。

20

【0036】

目的のDNAまたはタンパク質を含む細胞抽出物は、目的のタンパク質を発現するかまたは目的のDNAを含む細胞から得られた、ホモジネート(homogenate)調製物または細胞を含まない調製物を意味すると理解されるべきである。用語「細胞抽出物」は、培養培地、特に、そこから細胞が取り出された使用済みの培養培地を含むように意図される。

【0037】

本明細書中で使用される場合には、「調節する」は、機能の抑制、増強、または誘導を意味する。例えば、亜鉛フィンガー-核酸結合ドメインおよびその変異体は、プロモーターの中のモチーフに結合し、それによってプロモーターである細胞性のヌクレオチド配列に動作可能であるように連結された遺伝子の転写を増大させるかまたは抑制することによって、プロモーター配列を調節することができる。あるいは、調節には、遺伝子の転写の阻害が含まれ得る。ここで、亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチド変異体が構造遺伝子に結合し、DNA依存性RNAポリメラーゼが遺伝子を読み取ることをブロックし、それによって遺伝子の転写を阻害する。構造遺伝子は、例えば、正常な細胞性の遺伝子または腫瘍遺伝子であり得る。あるいは、調節には、転写物の翻訳の阻害が含まれる場合がある。

30

40

【0038】

本明細書中で使用される場合は、用語「阻害」は、プロモーターに動作可能であるように連結された構造遺伝子の転写の活性化のレベルの抑制を意味する。例えば、本明細書中の方法については、遺伝子には亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合モチーフが含まれる。

【0039】

本明細書中で使用される場合は、用語「転写調節領域」は、標的細胞中で遺伝子の発現を駆動する領域を意味する。本明細書中で使用に適している転写調節領域としては、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期エンハンサー/プロモーター、SV40初期エンハンサー/プロモーター、JCポリオーマウイルスプロモーター、アルブミンプロモーター、CMVエンハンサーに結合させられたPGKおよび - アクチンプロモーターが挙

50

げられるが、これらに限定されない。他の転写調節領域もまた当該分野で公知である。

【0040】

本明細書中で使用される場合は、遺伝子のプロモーター領域には、通常は構造遺伝子の5'側に存在している調節エレメント(単数または複数)が含まれ、複数の調節エレメントが、介在するヌクレオチド配列によって間隔を隔てられて存在することができる。遺伝子が活性化させられる場合には、転写因子として知られているタンパク質が遺伝子のプロモーター領域に結合する。この集合は、酵素がDNAからRNAへと第2の遺伝子セグメントを転写することを可能にする「スイッチオン(on switch)」と似ている。ほとんどの場合には、得られるRNA分子は、特異的なタンパク質の合成のための鋳型となる。多くの場合は、RNA自体が最終産物である。プロモーター領域は、正常な細胞性のプロモーター、または例えば、腫瘍プロモーター(onco-promoter)であり得る。腫瘍プロモーターは、一般的には、ウイルスに由来するプロモーターである。亜鉛フィンガーDNA結合ポリペプチドをそれに対して標的化させることができるウイルスプロモーターとしては、レトロウイルス長末端反復(LTR)、およびレンチウイルスプロモーター(例えば、ヒトT細胞リンパ向性ウイルス(HTLV)1および2、ならびに、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)1または2)に由来するプロモーター)が挙げられるが、これらに限定されない。HIV-1 LTRからの転写を抑制するTNN-特異的亜鉛フィンガーDNA結合ドメインを含む亜鉛フィンガー結合ポリペプチドの一例は、以下の実施例12に提供される。

10

【0041】

本明細書中で使用される場合は、用語「有効量」には、すでに活性化されたプロモーターの不活化を生じる量、または亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合モチーフを含むプロモーターの不活化を生じる量、または構造遺伝子の転写もしくはRNAの翻訳をブロックする量が含まれる。必要とされる亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合ポリペプチドの量は、既存のタンパク質/タンパク質複合体の中の天然の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合タンパク質のいずれかを置き換えるために必要な量、または、プロモーター自体と複合体を形成することについて天然の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合タンパク質と競合するために必要な量である。同様に、構造遺伝子またはRNAをブロックするために必要な量は、それぞれ、RNAポリメラーゼに結合して、RNAポリメラーゼの遺伝子からの読み取りをブロックする量、または、翻訳を阻害する量である。好ましくは、この方法は細胞内で行われる。プロモーターまたは構造遺伝子を機能的に不活化させることにより、転写または翻訳が抑制される。亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合タンパク質モチーフを含む細胞性のヌクレオチド配列に結合する、またはそれらに「接触する」ための有効量の阻害性タンパク質の送達は、本明細書中に記載される機構のうちの1つ(例えば、レトロウイルスベクターまたはリポソーム)、あるいは当該分野で周知の他の方法によって行うことができる。

20

30

【0042】

本明細書中で使用される場合は、用語「短縮型」は、天然の亜鉛フィンガー結合タンパク質において見られる亜鉛フィンガーの総数よりも少ない亜鉛フィンガーを含むか、あるいは、所望されない配列が欠失させられている、亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチド誘導体を意味する。例えば、亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合タンパク質TFIIIA(これは、自然界においては、9個の亜鉛フィンガーを含む)の短縮によっては、亜鉛フィンガーを1個から3個しか有していないポリペプチドが生じ得る。用語「拡大」は、さらに亜鉛フィンガーモジュールが付加されている亜鉛フィンガーポリペプチドを意味する。例えば、TFIIIAは、3個の亜鉛フィンガードメインを付加することによって12フィンガーに拡大させることができる。加えて、短縮型の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドには、1つ以上の野生型ポリペプチドに由来する亜鉛フィンガーモジュールが含まれ得、したがって、「ハイブリッド」亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドが生じる。

40

【0043】

50

本明細書中で使用される場合は、用語「突然変異した」は、タンパク質をコードする DNA の無作為の、または部位特異的突然変異誘発を行うための公知の方法のうちのいずれかを行うことによって得られた、亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合ポリペプチドを意味する。例えば、TFIIIA においては、突然変異誘発は、コンセンサス配列の 1 つ以上の繰り返しのうちの保存されていない残基を置き換えるために行うことができる。短縮型または拡大型の亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合タンパク質もまた、突然変異させることができる。

【0044】

本明細書中で使用される場合は、ポリペプチド「変異体」または「誘導体」は、ポリペプチドの突然変異した形態であるポリペプチド、または組み換えによって生産されたが、
10 所望される活性（例えば、リガンドもしくは核酸分子に結合する能力、または転写を調節する能力）をなおも保持しているポリペプチドを意味する。

【0045】

本明細書中で使用される場合は、亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合ポリペプチドの「変異体または「誘導体」は、亜鉛フィンガータンパク質の突然変異した形態であるポリペプチド、または組み換えによって生産されたポリペプチドを意味する。変異体は、例えば、第 2 のタンパク質の亜鉛フィンガードメイン（単数または複数）に連結させられた、1 つのタンパク質に由来する亜鉛フィンガードメイン（単数または複数）を含むハイブリッドであり得る。ドメインは野生型である場合も、また、突然変異している場合もある。「
20 変異体」または「誘導体」には、野生型の亜鉛フィンガータンパク質の短縮型が含まれ得、これには、野生型タンパク質の中のフィンガーのものと数の数よりも少ないフィンガーの数が含まれる。誘導体または変異体をそれから生産することができる亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合ポリペプチドの例としては、TFIIIA および zif268 が含まれる。同様の用語が、「変異体」または「誘導体」核ホルモン受容体、および「変異体」または「誘導体」転写エフェクタードメインを意味するように使用される。

【0046】

本明細書中で使用される場合は、「亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合標的またはモチーフ」は、亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合誘導ポリペプチドがそれに対して特異性を伴って結合するヌクレオチドセグメントの、任意の 2 次元または 3 次元特性を意味する。
30 この定義には、ヌクレオチド配列（一般的には、5 ヌクレオチド未満のもの）、ならびに、DNA 二重ヘリックスの三次元態様（例えば、主溝および副溝とヘリックスの表面であるが、これらに限定されない）が含まれる。モチーフは、通常は、亜鉛フィンガーポリペプチドがそれに結合することができる適切な長さの任意の配列である。例えば、3 フィンガーポリペプチドは、通常は約 9 から約 14 塩基対を有するモチーフに結合する。好ましくは、ゲノムの中での特異性を確実にするためには、認識配列は、少なくとも約 16 塩基対である。したがって、何らかの特異性を有する亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合ポリペプチドが提供される。亜鉛フィンガー結合モチーフは、経験によって設計された任意の配列であっても、また、それに対して亜鉛フィンガータンパク質が結合する任意の配列であってもよい。このモチーフは、任意の DNA または RNA 配列の中で見ることができ、
40 これには、調節配列、エキソン、イントロン、または任意の非コード配列が含まれる。

【0047】

本明細書中で使用される場合は、用語「薬学的に許容される」、「生理学的に寛容である」、およびそれらの文法上のバリエーションは、それらが組成物、担体、希釈剤、および試薬を意味する場合には、ほとんど同じ意味で使用され、それらの材料を、組成物の投与が禁止される程の望ましくない生理学的作用（例えば、吐き気、眩暈、異常亢進など）を生じることなく、ヒトに投与することができることを示す。

【0048】

本明細書中で使用される場合は、用語「ベクター」は、様々な遺伝的環境の間で、それに動作可能であるように連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子をいう。
50 好ましいベクターは、自己複製、およびそれに対して動作可能であるように連結されて

いるDNAセグメントの中に存在している構造遺伝子産物の発現ができるベクターである。したがって、ベクターには、好ましくは、レプリコンと、先に記載された選択マーカーが含まれる。ベクターとしては、発現ベクターが挙げられるが、必ずしもこれに限定はされない。

【0049】

DNA断片を含む核酸分子に関して本明細書中で使用される場合は、表現「動作可能であるように連結された」は、配列またはセグメントが、好ましくは、従来のホスホジエステル結合によって、DNAの1つの鎖（一本鎖の形態であるか二本鎖の形態であるかは問わない）になるように共有結合されており、その結果、動作可能であるように連結された部分が意図されるように機能することを意味する。それに対して本明細書中に提供される転写単位またはカセットが動作可能であるように連結させられるベクターの選択は、当該分野で周知であるように、所望される機能的特性（例えば、ベクターの複製およびタンパク質の発現）、ならびに、形質転換される宿主細胞に直接依存する。これらは、組み換えDNA分子の構築の分野で固有の限定である。

10

【0050】

本明細書中で使用される場合は、治療用組成物の投与は任意の手段によって行うことができ、これには、経口、皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内、注入技術、腹腔内投与、および非経口投与が含まれるが、これらに限定されない。

【0051】

I. 本発明

20

本発明により、亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチド、1つ以上のそのようなポリペプチドを含む組成物、そのようなポリペプチドおよび組成物をコードするポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドを含む発現ベクター、そのようなポリヌクレオチドまたは発現ベクターで形質転換された細胞、ならびに、ヌクレオチド構造および/または機能を調節するためのポリペプチド、組成物、ポリヌクレオチド、および発現ベクターの使用が提供される。

【0052】

II. ポリペプチド

本発明により、単離され、精製された亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドが提供される。ポリペプチドには、5から10個のアミノ酸残基、好ましくは、約7アミノ酸残基のヌクレオチド結合領域が含まれる。通常は、ヌクレオチド結合領域は、「ドメイン」と本明細書中で呼ばれる7アミノ酸の配列であり、これは、その立体構造においては主に α -ヘリックスである。このドメインの構造は、以下にさらに詳細に記載される。しかし、ヌクレオチド結合領域にはそれぞれの側に5個までのアミノ酸を隣接させることができ、用語「ドメイン」には、本明細書中で使用される場合には、これらの追加のアミノ酸が含まれる。ヌクレオチド結合領域は、式TNN（式中、Nは、A、C、G、またはTである）の標的ヌクレオチドに優先的に結合する。好ましくは、標的ヌクレオチドは、式TAN、TCN、TGN、TTN、TNA、TNC、TNG、またはTNTを有する。さらに好ましくは、標的ヌクレオチドは、式TAA、TAC、TAG、TAT、TCA、TCC、TCG、TCT、TGA、TGC、TGG、TGT、TTA、TTC、TTG、またはTTTを有する。

30

40

【0053】

本発明のポリペプチドは自然界には存在しない変異体である。本明細書中で使用される場合は、用語「自然界には存在しない」は、例えば、以下の1つ以上を意味する：（a）自然界には存在しないアミノ酸配列から構成されるポリペプチド；（b）それが自然界において存在している場合にはそのポリペプチドには関係のない、自然界には存在しない二次構造を有するポリペプチド；（c）自然界においてそのポリペプチドが中に存在している生物種とは通常は関係のない1つ以上のアミノ酸を含むポリペプチド；（d）1つ以上のアミノ酸の立体異性体を含むポリペプチドが含まれるポリペプチドであって、立体異性体は、それが自然界において存在している場合にはそのポリペプチドとは無関係で

50

ある；（e）自然界に存在しているアミノ酸以外の1つ以上の化学的部分を含むポリペプチド；または（f）自然界に存在しているアミノ酸配列の単離された部分（例えば、短縮型の配列）。本発明のポリペプチドは、実質的に混入している物質がない、単離された形態および精製された形態で存在する。ポリペプチドは、天然の供給源から単離し、精製することができる。あるいは、ポリペプチドは、当該分野で周知の技術（例えば、遺伝子操作または固相ペプチド合成）を使用して新しく作成することができる。亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドは、好ましくは、亜鉛フィンガータンパク質の突然変異した形態、または組み換えによって生産されたものであるポリペプチドを意味する。ポリペプチドは、例えば、第2のタンパク質の亜鉛フィンガードメイン（単数または複数）に連結させられた1つのタンパク質に由来する亜鉛フィンガードメイン（単数または複数）を含むハイブリッドであり得る。ドメインは、野生型である場合も、また、突然変異している場合もある。ポリペプチドには、野生型の亜鉛フィンガータンパク質の短縮型が含まれ得る。ポリペプチドを生産することができる亜鉛フィンガータンパク質の例としては、SP1C、TFIIIA、およびZif268、ならびに、C7（Zif268の誘導体）、および当該分野で公知の他の亜鉛フィンガータンパク質が挙げられる。他の亜鉛フィンガータンパク質を導くことができるこれらの亜鉛フィンガータンパク質は、本明細書中では「骨格」または「足場」と呼ばれる。

10

【0054】

本発明の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドには、ポリペプチドの - ヘリックスドメインの中に特有のヘプタマー（連続している7アミノ酸残基の配列）が含まれ、このヘプタマー配列が標的ヌクレオチドに対する結合特異性を決定する。ヘプタマー配列は、 - ヘリックスドメインの中のどの場所にも配置することができるが、残基に当該分野での従来の番号付けを行った場合に、ヘプタマーが - 1位から6位までに広がるのが好ましい。本発明のポリペプチドには、亜鉛フィンガータンパク質の一部として機能するように、当該分野で公知の任意の - シート、およびフレームワーク配列を含めることができる。多数の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドを作成し、TNNTripletを含む標的ヌクレオチドに対する結合特異性について試験した。

20

【0055】

亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチド誘導体を、短縮もしくは拡大によって野生型亜鉛フィンガータンパク質から、または部位特異的突然変異のプロセスによって野生型に由来するポリペプチドの変異体として、あるいは、これらの手順の組み合わせによって抽出、あるいは作成することができる。加えて、短縮型の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドには、1つ以上の野生型ポリペプチドに由来する亜鉛フィンガーモジュールが含まれ得、それによって、「ハイブリッド」亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドが生じる。

30

【0056】

用語「突然変異した」は、タンパク質をコードするDNAの無作為の、または部位特異的突然変異誘発を行うための公知の方法のうちのいずれかを行うことによって得られた、亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合ポリペプチドを意味する。例えば、TFIIIAにおいては、突然変異誘発は、コンセンサス配列の1つ以上の繰り返しの中の保存されていない残基を置き換えるために行うことができる。短縮型の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合タンパク質もまた、突然変異させることができる。亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合モチーフを含むヌクレオチド配列の機能を阻害するための、本発明による短縮型、拡大型、および/または突然変異型であり得る公知の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドの例としては、TFIIIAおよびZif268が挙げられる。他の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合タンパク質は当業者に公知である。

40

【0057】

通常、結合領域は7個のアミノ酸残基を有しており、 - ヘリックス構造を有する。

【0058】

加えて、本発明のポリペプチドは、より長いポリペプチドの中に組み込むことができる

50

。これについてのいくつかの例が、ポリペプチドが人工的な転写因子を作成するために使用される場合について、以下に記載される。しかし、一般的には、ポリペプチドはより長い融合タンパク質の中に組み込まれ、それらの特異的DNA結合活性を保持することができる。これらの融合タンパク質には、当該分野で公知の様々なさらなるドメイン（例えば、精製タグ、酵素ドメイン、または他のドメイン）を、亜鉛フィンガーポリペプチドの特異的DNA結合活性を有意に変化させることなく、含めることができる。1つの例においては、ポリペプチドは、細胞内またはインビボで配列に意味を持たせるために、 γ -ラクタマーゼ様の開裂酵素の2つの半分の部分の中に組み込むことができる。その後、そのような開裂酵素の2つの半分の部分の結合によって、開裂酵素の集合が可能となる（J. M. Spottsら、「Time-Lapse Imaging of a Dynamic Phosphorylation Protein-Protein Interaction in Mammalian Cells, " Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:15142-15147 (2002)）。別の例においては、本発明のマルチ亜鉛フィンガードメインはタンデムに連結させることができ、より長いDNA配列に対して特異的な結合親和性を有するポリペプチドを形成させることができる。これは以下にさらに説明する。具体的には、ポリペプチドを、式ANN、CNN、またはGNN（式中、Nは、A、C、G、またはTである）の標的ヌクレオチドに優先的に結合する、少なくとも1つの他の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドに動作可能であるように連結させることができる。あるいは、ポリペプチドは、1つ以上の転写調節因子に動作可能であるように連結させることができる。

10

20

【0059】

本発明のポリペプチドは、当該分野で周知の様々な標準的な技術を使用して作成することができる。実施例において本明細書中以後に詳細に開示されるように、亜鉛フィンガータンパク質のファージディスプレイライブラリーを作成し、配列特異的タンパク質の富化に好ましい条件下で選択した。多数の配列を認識する亜鉛フィンガードメインには、ファージ選択データと構造情報の両方によって導かれる部位特異的突然変異誘発による確認が必要であった。

【0060】

本発明者らは、5'-(GNN)-3'型のDNA配列のそれぞれを特異的に認識する16個の亜鉛フィンガードメインの特性決定を以前に報告した。これらは、マウスの転写因子Zif268の変異体であるC7に基づいてファージディスプレイ選択によって単離され、部位特異的突然変異によって確認された（Segalら、(1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758-2763; Dreierら、(2000) J. Mol. Biol. 303, 489-502; および米国特許第6,140,081号（その開示は引用により本明細書中に組み入れられる））。一般的には、Cys₂-His₂型の亜鉛フィンガードメインの特異的DNA認識は、それぞれのヘリックスの1位、3位、および6位のアミノ酸残基によって媒介されるが、全ての場合において、3つの塩基がすべてDNA塩基と接触しているわけではない。1つの優性なサブサイトを超えた相互作用が、認識ヘリックスの2位から観察されている。Asp²は、続く3bpのサブサイトの、それぞれ、5'-チミンまたはグアニンの、相補的なアデニンまたはシトシンへの直接の接触によって、亜鉛フィンガードメインの結合を安定化させることが示されている。これらの非モジュール相互作用は、標的部位の重複として記載されている。加えて、拡大された結合部位を作成する3bpのサブサイトの外側のヌクレオチドとのアミノ酸の他の相互作用が報告されている（Pavletichら、(1991) Science 252(5007), 809-817; Elrod-Ericksonら、(1996) Structure 4(10), 1171-1180; Isalanら、(1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(11), 5617-5621）。

30

40

【0061】

多数の亜鉛フィンガードメインについての結果から得られた、特定のDNAトリプレッ

50

トに結合する亜鉛フィンガードメインの配列の一般化のいくつかを、以下の表 1 に示す。一般的には、亜鉛フィンガードメインの - 1 位のアミノ酸は、トリプレット部位の 3' ヌクレオチドの特定に主に関与しており、亜鉛フィンガードメインの 3 位のアミノ酸は、トリプレット部位の中央のヌクレオチドの特定に主に関与しており、そして亜鉛フィンガードメインの 6 位のアミノ酸は、トリプレット部位の 5' ヌクレオチドの特定に主に関与している。これらの一般化が、実施例 1 に記載される亜鉛フィンガーに基づくさらなる亜鉛フィンガーの構築のために、以下で使用される。

【 0 0 6 2 】

【表 1】

表 1: 亜鉛フィンガードメインのタンパク質/DNA 相互作用

(D. J. Segal, B. Dreier, R. R. Beerli, C. F. Barbas III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 2758-2763)

トリプレットヌクレオチド中の位置	5'	中央	3'
アデニン	Nd	Asn	Gln
シトシン	Nd	Thr, Asp, Glu	Asp, Glu
グアニン	Arg	His, Lys	Arg
チミン	Nd	Ser, Ala	Thr, Ser

グアニンまたはチミン以外の 5' ヌクレオチドに結合する亜鉛フィンガードメインについての以前に報告されているファージディスプレイライブラリーの選択は、フィンガー 3 認識ヘリックス RSD - E - LKR (配列番号 413) の 2 位のアスパラギン酸からのサブサイトを越えた相互作用が原因で成功していない。人工的な転写因子の構築のために亜鉛フィンガードメインの利用性を拡大するために、5' - (ANN) - 3' 型の DNA 配列を特異的に認識するドメインが選択された (2001 年 2 月 21 日に提出された米国特許出願番号 09/791,106 (その開示は引用により本明細書中に組み入れられる))。他のグループによっては、4 種類の 5' - (ANN) - 3' サブサイト、5' - (AAA) - 3'、5' - (AAG) - 3'、5' - (ACA) - 3'、および 5' - (ATA) - 3' を認識するドメインの特性決定へと導く連続する選択方法が記載されている (Greisman ら、(1997) Science 275 (5300), 657-661; Wolfe ら、(1999) J Mol Biol 285 (5), 1917-1934)。本開示では、標的部位の重複を排除することによる、TNN 部位を認識する亜鉛フィンガードメインを選択するためのアプローチが使用される。

【 0 0 6 3 】

3 フィンガータンパク質 C7, GAT に基づいて、ライブラリーが、これまでに、ファージディスプレイベクター pComb3H の中に構築されている (Barbas ら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7978-7982; Rader ら、(1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8 (4), 503-508)。無作為化には、VNS コドンドーピングストラテジー (V = アデニン、シトシン、またはグアニン、N = アデニン、シトシン、グアニン、またはチミン、S = シトシンまたはグアニン) を使用するフィンガー 2 の - ヘリックスの - 1 位、1 位、2 位、3 位、5 位、および 6 位が含まれていた。これにより、それぞれの無作為化されたアミノ酸位置について 24 の可能性が可能となり、一方では、芳香族アミノ酸 Trp、Phe、および Tyr、さらには終結コドンが、このストラテジーにおいては排除された。Leu は Cys₂ - His₂ 型の亜鉛フィンガードメインの認識ヘリックスの 4 位に優先的に見られるので、この位置は無作為化されなかった。ER2537 細胞 (New Engl

and Biolabs)へのライブラリーの形質転換の後、ライブラリーには 1.5×10^9 のメンバーが含まれていた。これは、必要なライブラリーの大きさを60倍上回っており、全てのアミノ酸の組み合わせを含めるに十分であった。

【0064】

これまでに、5'-(CNN)-3'型の亜鉛フィンガードメイン結合配列に関して、6回の亜鉛フィンガー-ディスプレイファージの選択が、非ピオチニル化競合因子DNAの存在下で、それぞれ、16種類の5'-GAT-CNN-GCG-3'(配列番号369)ピオチニル化ヘアピン標的オリゴヌクレオチドのそれぞれに対する結合について行われた。選択のストリンジェンシーは、ピオチニル化標的オリゴヌクレオチドの量を減少させること、および競合因子オリゴヌクレオチド混合物の量を増加させることによって、毎回高められた。6回目には、標的濃度は、通常、18nMであり、5'-(ANN)-3'、5'-(GNN)-3'、および5'-(TNN)-3'競合因子混合物は、それぞれ、各オリゴヌクレオチドのプールについて5倍過剰であり、特異的5'-(CNN)-3'混合物(標的配列を排除する)は10倍過剰であった。ピオチニル化標的オリゴヌクレオチドに対するファージの結合は、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズへの捕捉によって回収された。クローンは、通常、6回の選択の後で分析された。同様の選択プロセスを、5'-(TNN)-3'型の配列に特異的に結合する亜鉛フィンガードメインの選択に使用することができる。このプロセスは、以下に実施例1で説明する。

【0065】

これらの結果により、当業者が本発明において配列を決定するための多数の指針が提供される。これらの指針のいくつかは、式5'-(TNN)-3'型の配列に特異的に結合する亜鉛フィンガードメインの選択にもまた有用である。これらの指針には、以下が含まれる：(1)サブサイトが5'-TAA-3'である場合には、Gln、Asn、またはSerが-1位であることが好ましい。(2)サブサイトが5'-TCA-3'である場合には、Serが-1位であることが好ましい。(3)標的サブサイトが3'-グアニンを有する場合には、-1位にArg、Asn、Gln、His、Ser、Thr、またはIleを有することが一般的には好ましく、Argが特に好ましい。(4)5'-TNG-3'サブサイトへの結合のためには、2位にAspを有することが一般的には好ましい。(5)サブサイト5'-TNT-3'への結合のためには、Arg、Asn、Gln、His、Ser、Thr、Ala、およびCysが-1位にあることが一般的には好ましい。(6)3'-シトシンを含むサブサイトについては、Gln、Asn、Ser、Gly、His、またはAspが-1位にあることが通常は好ましい。(7)5'-TAN-3'(すなわち、中央のアデニン)の認識については、His、Asn、Gly、Val、Pro、Ile、およびLysが3位にあることが通常は好ましく；Asnが強く好ましい。(8)5'-TCN-3'サブサイト(すなわち、中央のシトシン)を認識するヘリックスの3位には、ThrまたはAspが特に好ましいが、His、Lys、Arg、およびAsnもまた推奨され得る。(9)標的部位5'-TCC-3'については、3位は好ましくはAsnまたはHisである。(10)標的部位5'-TCG-3'については、3位はThrまたはHisのいずれかが好ましい。(11)標的部位5'-TGN-3'については、3位にはHisが好ましい。(12)標的部位5'-TG(G/T)-3'については、3位にはSer、Asp、Thr、Asn、Gln、およびGlyが好ましく；Hisもまた好ましい。(13)標的部位5'-TGC-3'については、3位にはTrpおよびThrが、通常は好ましく；Hisも可能である。(14)一般的には、5'-TGN-3'の中央のグアニンは、3位のHisによって認識され得る。(15)標的部位5'-TTN-3'については、Hisが好ましい5'-TTC-3'および5'-TTT-3'を除き、3位にはSerまたはAlaのいずれかが好ましい。(16)1位、2位および5位は幅広く変化することができる。(17)3'アデニンの認識については、-1位には、通常は、Glnが好ましい。(18)3'グアニンの認識については、-1位には、通常は、Argが好ましい。(19)3'チミンの認識については、-1位には、通常、Ser、Thr、またはHisが好ましい。これらは一部の指針にす

10

20

30

40

50

ぎず、本発明の亜鉛フィンガードメインが組み込まれているタンパク質またはポリペプチドの二次構造または三次構造から、特定のサブサイト、またはそのようなサブサイトの定義された位置の特定のヌクレオチドの認識に好ましい様々なアミノ酸を導くことができる。加えて、複数の亜鉛フィンガー部分を有するタンパク質の中の特定の亜鉛フィンガー部分の立体構造が結合に影響を与え得る。

【0066】

他のアミノ酸残基もまた、変異または置換の目的である。例えば、ロイシンは、多くの場合は7アミノ酸のドメインの4位に存在し、タンパク質の疎水性コアの中に包まれている。したがって、4位のロイシンは、タンパク質の三次元構造または機能を乱すことなく、他の比較的小さい疎水性残基（例えば、バリンおよびイソロイシン）で置き換えることができる。あるいは、4位のロイシンはまた、フェニルアラニンまたはトリプトファンのような他の疎水性残基で置き換えることもできる。

10

【0067】

他のアミノ酸置換が可能である。例えば、トリプレット部位が中央の位置にCを有する場合には、ヘリックスの3位について、His、Lys、Arg、Asn、Asp、およびThrの間で置換を行うことができる。Gがトリプレットの中央の位置にある場合には、Hisがヘリックスの3位について可能であり、その場所の別のアミノ酸に置き換わることができる。トリプレットの最後の2つの塩基がCGまたはCCである場合には、Ser、Asp、Thr、Asn、Gln、およびGlyが3位についての代替であり、その場所の別のアミノ酸に置き換わることができる。トリプレットの最後の2つの塩基がGCである場合には、TrpおよびThrが3位についての代替であり、その場所の別のアミノ酸に置き換わることができる。トリプレットの中央の塩基がTである場合には、ヘリックスの3位についての代替としては、Ser、Alaがあげられ、Hisも可能である。これらのアミノ酸残基は、ヘリックスの3位の別のアミノ酸に置き換わることができる。特に、Leuがその場所に存在する場合には、Cysもまた4位についての代替である。

20

【0068】

以下の表（表2）には、5'塩基がTであると仮定した場合の潜在的に有用なアミノ酸置換の範囲が記載される。

【0069】

【表 2】

表 2

中央の塩基	3' 塩基	亜鉛フィンガー アミノ酸の位置	アミノ酸の代替	
A	A	-1	Q, N, S	10
C	A	-1	S	
N	G	-1	R, N, Q, H, S, T, I	
N	G	2	D	
N	T	-1	R, N, Q, H, S, T, A, C	
N	C	-1	Q, N, S, G, H, D	20
A	N	3	H, <u>N</u> , G, V, P, I, K	
C	N	3	<u>I</u> , <u>D</u> , H, K, R, N	
C	C	3	<u>N</u> , <u>H</u> , S, D, T, Q, G	
C	G	3	<u>I</u> , <u>H</u> , S, D, N, Q, G	
G	N	3	H	
G	G/T	3	S, D, T, N, Q, G, H	
G	C	3	<u>W</u> , <u>I</u> , H	
G	N	3	H	
T	A/G	3	S, A	
T	C/T	3	H	30
N	A	-1	R	
N	T	-1	S, T, H	
N	N	4	<u>L</u> , V, I, C	

表 2 には、特に好ましいアミノ酸が下線で示されている。「N」は、4 種類の可能な自然界に存在しているヌクレオチド (A、C、G、または T) のいずれかである。

【0070】

加えて、実施例 12 には、トリプレット 5' - TCT - 3' に結合するさらなる亜鉛フィンガードメイン RGG - W - LQA (配列番号 46) が提供される。この亜鉛フィンガードメインは、HIV - 1 の高度に保存されているプライマー結合部位を標的化し、5' - AAATCTCTAGCAGTGCG - 3' (配列番号 425) の DNA 配列全体に結合する、人工的な転写因子の 6 フィンガーの DNA 結合配列の中にある (実施例 12、表 13)。

【0071】

したがって、本発明のポリペプチドの中に含まれる好ましい亜鉛フィンガードメイン、および 5' - (TNN) - 3' 型の結合配列としては、以下が挙げられる：

【0072】

10

20

30

40

【化 1】

- | | |
|----------------------|----------------------|
| (1) QAS-N-LIS (配列番号 | 1) (5'-TAA-3' に結合) |
| (2) SRG-N-LKS (配列番号 | 2) (5'-TAC-3' に結合) |
| (3) RLD-N-LQT (配列番号 | 3) (5'-TAG-3' に結合) |
| (4) ARG-N-LRT (配列番号 | 4) (5'-TAT-3' に結合) |
| (5) RKD-A-LRG (配列番号 | 5) (5'-TTG-3' に結合) |
| (6) RED-N-LHT (配列番号 | 6) (5'-TAG-3' に結合) |
| (7) ARG-N-LKS (配列番号 | 7) (5'-TAC-3' に結合) |
| (8) RSD-N-LTT (配列番号 | 8) (5'-TAC-3' に結合) |
| (9) VRG-N-LKS (配列番号 | 9) (5'-TAT-3' に結合) |
| (10) VRG-N-LRT (配列番号 | 10) (5'-TAT-3' に結合) |
| (11) RLR-A-LDR (配列番号 | 11) (5'-TCG-3' に結合) |
| (12) DMG-A-LEA (配列番号 | 12) (5'-TCG-3' に結合) |
| (13) EKD-A-LRG (配列番号 | 13) (5'-TTG-3' に結合) |
| (14) RSD-H-LTT (配列番号 | 14) (5'-TCA-3' に結合) |
| (15) AQQ-L-LMW (配列番号 | 15) (5'-TCA-3' に結合) |
| (16) RSD-E-RKR (配列番号 | 16) (5'-TCC-3' に結合) |
| (17) DYQ-S-LRQ (配列番号 | 17) (5'-TCC-3' に結合) |
| (18) CFS-R-LVR (配列番号 | 18) (5'-TCC-3' に結合) |
| (19) GDG-G-LWE (配列番号 | 19) (5'-TCG-3' に結合) |
| (20) LQR-P-LRG (配列番号 | 20) (5'-TCG-3' に結合) |
| (21) QGL-A-CAA (配列番号 | 21) (5'-TCG-3' に結合) |
| (22) WVG-W-LGS (配列番号 | 22) (5'-TCT-3' に結合) |
| (23) RLR-D-IQF (配列番号 | 23) (5'-TCT-3' に結合) |
| (24) GRS-Q-LSC (配列番号 | 24) (5'-TCT-3' に結合) |

10

20

30

【 0 0 7 3 】

【化 2】

(25) GWQ-R-LLT (配列番号	25) (5'-TGA-3' に結合)
(26) SGR-P-LAS (配列番号	26) (5'-TGA-3' に結合)
(27) APR-L-LGP (配列番号	27) (5'-TGA-3' に結合)
(28) APK-A-LGW (配列番号	28) (5'-TGC-3' に結合)
(29) SVH-E-LQG (配列番号	29) (5'-TGC-3' に結合)
(30) AQA-A-LSW (配列番号	30) (5'-TGC-3' に結合)
(31) GAN-A-LRR (配列番号	31) (5'-TCA-3' に結合)
(32) QSL-L-LGA (配列番号	32) (5'-TCA-3' に結合)
(33) HRG-T-LGG (配列番号	33) (5'-TCA-3' に結合)
(34) QVG-L-LAR (配列番号	34) (5'-TCC-3' に結合)
(35) GAR-G-LRG (配列番号	35) (5'-TCC-3' に結合)
(36) DKH-M-LDT (配列番号	36) (5'-TCC-3' に結合)
(37) DLG-G-LRQ (配列番号	37) (5'-TCC-3' に結合)
(38) QCY-R-LER (配列番号	38) (5'-TCC-3' に結合)
(39) AEA-E-LQR (配列番号	39) (5'-TCT-3' に結合)
(40) QGG-V-LAA (配列番号	40) (5'-TCT-3' に結合)
(41) QGR-C-LVT (配列番号	41) (5'-TGA-3' に結合)
(42) HPE-A-LDN (配列番号	42) (5'-TGA-3' に結合)
(43) GRG-A-LQA (配列番号	43) (5'-TGC-3' に結合)
(44) LAS-R-LQQ (配列番号	44) (5'-TGC-3' に結合)
(45) RED-N-LIS (配列番号	45) (5'-TAG-3' に結合)
(46) RGG-W-LQA (配列番号	46) (5'-TCT-3' に結合)

10

20

30

これらの中では、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、および配列番号 6 が特に好ましい。

【0074】

亜鉛フィンガードメインの以下のアミノ酸配列は、表 1 において上記に示されたアミノ酸の置換についての一般的な適用性の規則によって、配列番号 1 から配列番号 46 のアミノ酸配列から導かれる。これらには、配列番号 359 から配列番号 411 が含まれ、これらは、実施例 12 によって RGG-W-LQA (配列番号 46) から導かれる。したがって、これらの配列は本発明の範囲に含まれ、そしてこれらの配列が組み込まれ、特定のヌクレオチドトリプレット配列に結合するポリペプチドもまた、本発明の範囲に含まれる。これらの配列のそれぞれによって結合されるトリプレットは括弧内である。これらの配列は以下である：

40

【0075】

【化 3】

(47) DAS-N-LIS (配列番号	47) [TAC]
(48) EAS-N-LIS (配列番号	48) [TAC]
(49) RAS-N-LIS (配列番号	49) [TAG]
(50) TAS-N-LIS (配列番号	50) [TAT]
(51) SAS-N-LIS (配列番号	51) [TAT]
(52) QAS-T-LIS (配列番号	52) [TCA]
(53) QAS-D-LIS (配列番号	53) [TCA]
(54) QAS-E-LIS (配列番号	54) [TCA]
(55) QAS-H-LIS (配列番号	55) [TGA]
(56) QAS-K-LIS (配列番号	56) [TGA]
(57) QAS-S-LIS (配列番号	57) [TTA]
(58) QAS-A-LIS (配列番号	58) [TTA]
(59) DAS-T-LIS (配列番号	59) [TCC]
(60) DAS-D-LIS (配列番号	60) [TCC]
(61) DAS-E-LIS (配列番号	61) [TCC]
(62) DAS-H-LIS (配列番号	62) [TGC]
(63) DAS-K-LIS (配列番号	63) [TGC]
(64) DAS-S-LIS (配列番号	64) [TTC]
(65) DAS-A-LIS (配列番号	65) [TTC]
(66) EAS-T-LIS (配列番号	66) [TCC]
(67) EAS-D-LIS (配列番号	67) [TCC]
(68) EAS-E-LIS (配列番号	68) [TCC]
(69) EAS-H-LIS (配列番号	69) [TGC]
(70) EAS-K-LIS (配列番号	70) [TGC]
(71) EAS-S-LIS (配列番号	71) [TTC]
(72) EAS-A-LIS (配列番号	72) [TTC]
(73) RAS-T-LIS (配列番号	73) [TCG]
(74) RAS-D-LIS (配列番号	74) [TCG]

10

20

30

【 0 0 7 6 】

【化 4】

(75) RAS-E-LIS (配列番号	75) [TCG]	
(76) RAS-H-LIS (配列番号	76) [TGG]	
(77) RAS-K-LIS (配列番号	77) [TGG]	
(78) RAS-S-LIS (配列番号	78) [TTG]	
(79) RAS-A-LIS (配列番号	79) [TTG]	
(80) TAS-T-LIS (配列番号	80) [TCT]	
(81) TAS-D-LIS (配列番号	81) [TCT]	10
(82) TAS-E-LIS (配列番号	82) [TCT]	
(83) TAS-H-LIS (配列番号	83) [TGT]	
(84) TAS-K-LIS (配列番号	84) [TGT]	
(85) TAS-S-LIS (配列番号	85) [TTT]	
(86) TAS-A-LIS (配列番号	86) [TTT]	
(87) SAS-T-LIS (配列番号	87) [TCT]	
(88) SAS-D-LIS (配列番号	88) [TCT]	
(89) SAS-E-LIS (配列番号	89) [TCT]	20
(90) SAS-H-LIS (配列番号	90) [TGT]	
(91) SAS-K-LIS (配列番号	91) [TGT]	
(92) SAS-S-LIS (配列番号	92) [TTT]	
(93) SAS-A-LIS (配列番号	93) [TTT]	
(94) QLD-N-LQT (配列番号	94) [TAA]	
(95) DLD-N-LQT (配列番号	95) [TAC]	
(96) ELD-N-LQT (配列番号	96) [TAC]	30
(97) TLD-N-LQT (配列番号	97) [TAT]	
(98) SLD-N-LQT (配列番号	99) [TAT]	
(99) RLD-T-LQT (配列番号	99) [TCG]	
(100) RLD-D-LQT (配列番号	100) [TCG]	
(101) RLD-E-LQT (配列番号	101) [TCG]	
(102) RLD-H-LQT (配列番号	102) [TGG]	
(103) RLD-K-LQT (配列番号	103) [TGG]	
(104) RLD-S-LQT (配列番号	104) [TTG]	40
(105) RLD-A-LQT (配列番号	105) [TTG]	

【 0 0 7 7 】

【化 5】

(106) QLD-T-LQT (配列番号	106) [TCA]
(107) QLD-D-LQT (配列番号	107) [TCA]
(108) QLD-E-LQT (配列番号	108) [TCA]
(109) QLD-H-LQT (配列番号	109) [TGA]
(110) QLD-K-LQT (配列番号	110) [TGA]
(111) QLD-S-LQT (配列番号	111) [TTA]
(112) QLD-A-LQT (配列番号	112) [TTA]
(113) DLD-T-LQT (配列番号	113) [TCC]
(114) DLD-D-LQT (配列番号	114) [TCC]
(115) DLD-E-LQT (配列番号	115) [TCC]
(116) DLD-H-LQT (配列番号	116) [TGC]
(117) DLD-K-LQT (配列番号	117) [TGC]
(118) DLD-S-LQT (配列番号	118) [TTC]
(119) DLD-A-LQT (配列番号	119) [TTC]
(120) ELD-T-LQT (配列番号	120) [TCC]
(121) ELD-D-LQT (配列番号	121) [TCC]
(122) ELD-E-LQT (配列番号	122) [TCC]
(123) ELD-H-LQT (配列番号	123) [TGC]
(124) ELD-K-LQT (配列番号	124) [TGC]
(125) ELD-S-LQT (配列番号	125) [TTC]
(126) ELD-A-LQT (配列番号	126) [TTC]
(127) TLD-T-LQT (配列番号	127) [TCT]
(128) TLD-D-LQT (配列番号	128) [TCT]
(129) TLD-E-LQT (配列番号	129) [TCT]
(130) TLD-H-LQT (配列番号	130) [TGT]
(131) TLD-K-LQT (配列番号	131) [TGT]
(132) TLD-S-LQT (配列番号	132) [TTT]
(133) TLD-A-LQT (配列番号	133) [TTT]
(134) SLD-T-LQT (配列番号	134) [TCT]
(135) SLD-D-LQT (配列番号	135) [TCT]
(136) SLD-E-LQT (配列番号	136) [TCT]

10

20

30

40

【 0 0 7 8 】

【化 6】

(137) SLD-H-LQT (配列番号	137) [TGT]	
(138) SLD-K-LQT (配列番号	138) [TGT]	
(139) SLD-S-LQT (配列番号	139) [TTT]	
(140) SLD-A-LQT (配列番号	140) [TTT]	
(141) ARG-T-LRT (配列番号	141) [TCT]	
(142) ARG-D-LRT (配列番号	142) [TCT]	
(143) ARG-E-LRT (配列番号	143) [TCT]	10
(144) ARG-H-LRT (配列番号	144) [TGT]	
(145) ARG-K-LRT (配列番号	145) [TGT]	
(146) ARG-S-LRT (配列番号	146) [TTT]	
(147) ARG-A-LRT (配列番号	147) [TTT]	
(148) SRG-T-LRT (配列番号	148) [TCC]	
(149) SRG-D-LRT (配列番号	149) [TCC]	
(150) SRG-E-LRT (配列番号	150) [TCC]	20
(151) SRG-H-LRT (配列番号	151) [TGC]	
(152) SRG-K-LRT (配列番号	152) [TGC]	
(153) SRG-S-LRT (配列番号	153) [TTC]	
(154) SRG-A-LRT (配列番号	154) [TTC]	
(155) QKD-A-LRG (配列番号	155) [TTA]	
(156) DKD-A-LRG (配列番号	156) [TTC]	
(157) EKD-A-LRG (配列番号	157) [TTC]	
(158) TKD-A-LRG (配列番号	158) [TTT]	30
(159) SKD-A-LRG (配列番号	159) [TTT]	
(160) RKD-N-LRG (配列番号	160) [TAG]	
(161) RKD-T-LRG (配列番号	161) [TCG]	
(162) RKD-D-LRG (配列番号	162) [TCG]	
(163) RKD-E-LRG (配列番号	163) [TCG]	
(164) RKD-H-LRG (配列番号	164) [TGG]	
(165) RKD-K-LRG (配列番号	165) [TGG]	
(166) RKD-S-LRG (配列番号	166) [TTG]	40
(167) QKD-N-LRG (配列番号	167) [TAA]	

【 0 0 7 9 】

【化 7】

(168) QKD-T-LRG (配列番号	168) [TCA]
(169) QKD-D-LRG (配列番号	169) [TCA]
(170) QKD-E-LRG (配列番号	170) [TCA]
(171) QKD-H-LRG (配列番号	171) [TGA]
(172) QKD-K-LRG (配列番号	172) [TGA]
(173) QKD-S-LRG (配列番号	173) [TTA]
(174) DKD-N-LRG (配列番号	174) [TAC]
(175) DKD-T-LRG (配列番号	175) [TCC]
(176) DKD-D-LRG (配列番号	176) [TCC]
(177) DKD-E-LRG (配列番号	177) [TCC]
(178) DKD-H-LRG (配列番号	178) [TGC]
(179) DKD-K-LRG (配列番号	179) [TGC]
(180) DKD-S-LRG (配列番号	180) [TTC]
(181) EKD-N-LRG (配列番号	181) [TAC]
(182) EKD-T-LRG (配列番号	182) [TCC]
(183) EKD-D-LRG (配列番号	183) [TCC]
(184) EKD-E-LRG (配列番号	184) [TCC]
(185) EKD-H-LRG (配列番号	185) [TGC]
(186) EKD-K-LRG (配列番号	186) [TGC]
(187) EKD-S-LRG (配列番号	187) [TTC]
(188) TKD-N-LRG (配列番号	188) [TAT]
(189) TKD-T-LRG (配列番号	189) [TCT]
(190) TKD-D-LRG (配列番号	190) [TCT]
(191) TKD-E-LRG (配列番号	191) [TCT]
(192) TKD-H-LRG (配列番号	192) [TGT]
(193) TKD-K-LRG (配列番号	193) [TGT]
(194) TKD-S-LRG (配列番号	194) [TTT]
(195) SKD-N-LRG (配列番号	195) [TAT]
(196) SKD-T-LRG (配列番号	196) [TCT]
(197) SKD-D-LRG (配列番号	197) [TCT]
(198) SKD-E-LRG (配列番号	198) [TCT]

10

20

30

40

【 0 0 8 0 】

【化 8】

(199) SKD-H-LRG (配列番号	199) [TGT]
(200) SKD-K-LRG (配列番号	200) [TGT]
(201) SKD-S-LRG (配列番号	201) [TTT]
(202) VRG-T-LRT (配列番号	202) [TCT]
(203) VRG-D-LRT (配列番号	203) [TCT]
(204) VRG-E-LRT (配列番号	204) [TCT]
(205) VRG-H-LRT (配列番号	205) [TGT]
(206) VRG-K-LRT (配列番号	206) [TGT]
(207) VRG-S-LRT (配列番号	207) [TTT]
(208) VRG-T-LRT (配列番号	208) [TTT]
(209) QLR-A-LDR (配列番号	209) [TCA]
(210) DLR-A-LDR (配列番号	210) [TCC]
(211) ELR-A-LDR (配列番号	211) [TCC]
(212) TLR-A-LDR (配列番号	212) [TCT]
(213) SLR-A-LDR (配列番号	213) [TCT]
(214) RSD-N-RKR (配列番号	214) [TAC]
(215) RSD-T-RKR (配列番号	215) [TCC]
(216) RSD-D-RKR (配列番号	216) [TCC]
(217) RSD-H-RKR (配列番号	217) [TGC]
(218) RSD-K-RKR (配列番号	218) [TGC]
(219) RSD-S-RKR (配列番号	219) [TTC]
(220) RSD-A-RKR (配列番号	220) [TTC]
(221) QYQ-S-LRQ (配列番号	221) [TCA]
(222) EYQ-S-LRQ (配列番号	222) [TCC]
(223) RYQ-S-LRQ (配列番号	223) [TCG]
(224) TYQ-S-LRQ (配列番号	224) [TCT]
(225) SYQ-S-LRQ (配列番号	225) [TCT]
(226) RLR-N-IQF (配列番号	226) [TAG]
(227) RLR-T-IQF (配列番号	227) [TCG]
(228) RLR-E-IQF (配列番号	228) [TCG]
(229) RLR-H-IQF (配列番号	229) [TGG]

10

20

30

40

【 0 0 8 1 】

【化 9】

(230) RLR-K-IQF (配列番号	230) [TGG]
(231) RLR-S-IQF (配列番号	231) [TTG]
(232) RLR-A-IQF (配列番号	232) [TTG]
(233) DSL-L-LGA (配列番号	233) [TCC]
(234) ESL-L-LGA (配列番号	234) [TCC]
(235) RSL-L-LGA (配列番号	235) [TCG]
(236) TSL-L-LGA (配列番号	236) [TCT]
(237) SSL-L-LGA (配列番号	237) [TCT]
(238) HRG-N-LGG (配列番号	238) [TAA]
(239) HRG-D-LGG (配列番号	239) [TCA]
(240) HRG-E-LGG (配列番号	240) [TCA]
(241) HRG-H-LGG (配列番号	241) [TGA]
(242) HRG-K-LGG (配列番号	242) [TGA]
(243) HRG-S-LGG (配列番号	243) [TTA]
(244) HRG-A-LGG (配列番号	244) [TTA]
(245) QKH-M-LDT (配列番号	245) [TCA]
(246) EKH-M-LDT (配列番号	246) [TCC]
(247) RKH-M-LDT (配列番号	247) [TCG]
(248) TKH-M-LDT (配列番号	248) [TCT]
(249) SKH-M-LDT (配列番号	249) [TCT]
(250) QLG-G-LRQ (配列番号	249) [TCA]
(251) ELG-G-LRQ (配列番号	251) [TCC]
(252) RLG-G-LRQ (配列番号	252) [TCG]
(253) TLG-G-LRQ (配列番号	253) [TCT]
(254) SLG-G-LRQ (配列番号	254) [TCT]
(255) AEA-N-LQR (配列番号	255) [TAT]
(256) AEA-T-LQR (配列番号	256) [TCT]
(257) AEA-D-LQR (配列番号	257) [TCT]
(258) AEA-H-LQR (配列番号	258) [TGT]
(259) AEA-K-LQR (配列番号	259) [TGT]
(260) AEA-S-LQR (配列番号	260) [TTT]

10

20

30

40

【 0 0 8 2 】

【化 1 0】

(261) AEA-A-LQR (配列番号	261) [TTT]
(262) DGR-C-LVT (配列番号	262) [TGC]
(263) EGR-C-LVT (配列番号	263) [TGC]
(264) RGR-C-LVT (配列番号	264) [TGG]
(265) TGR-C-LVT (配列番号	265) [TGT]
(266) SGR-C-LVT (配列番号	266) [TGT]
(267) QED-N-LHT (配列番号	267) [TAA]
(268) DED-N-LHT (配列番号	268) [TAC]
(269) EED-N-LHT (配列番号	269) [TAT]
(270) SED-N-LHT (配列番号	270) [TAT]
(271) RED-T-LHT (配列番号	271) [TCG]
(272) RED-D-LHT (配列番号	272) [TCG]
(273) RED-E-LHT (配列番号	273) [TCG]
(274) RED-H-LHT (配列番号	274) [TGG]
(275) RED-K-LHT (配列番号	275) [TGG]
(276) RED-S-LHT (配列番号	276) [TTG]
(277) RED-A-LHT (配列番号	277) [TTG]
(278) QED-T-LHT (配列番号	278) [TCA]
(279) QED-D-LHT (配列番号	279) [TCA]
(280) QED-E-LHT (配列番号	280) [TCA]
(281) QED-H-LHT (配列番号	281) [TGA]
(282) QED-K-LHT (配列番号	282) [TGA]
(283) QED-S-LHT (配列番号	283) [TTA]
(284) QED-A-LHT (配列番号	284) [TTA]
(285) DED-T-LHT (配列番号	285) [TCC]
(286) DED-D-LHT (配列番号	286) [TCC]
(287) DED-E-LHT (配列番号	287) [TCC]
(288) DED-H-LHT (配列番号	288) [TGC]
(289) DED-K-LHT (配列番号	289) [TGC]
(290) DED-S-LHT (配列番号	290) [TTC]
(291) DED-A-LHT (配列番号	291) [TTC]

10

20

30

40

【 0 0 8 3】

【化 1 1】

(292) EED-T-LHT (配列番号	292) [TCC]
(293) EED-D-LHT (配列番号	293) [TCC]
(294) EED-E-LHT (配列番号	294) [TCC]
(295) EED-H-LHT (配列番号	295) [TGC]
(296) EED-K-LHT (配列番号	296) [TGC]
(297) EED-S-LHT (配列番号	297) [TTC]
(298) EED-A-LHT (配列番号	298) [TTC]
(299) TED-T-LHT (配列番号	299) [TCT]
(300) TED-D-LHT (配列番号	300) [TCT]
(301) TED-E-LHT (配列番号	301) [TCT]
(302) TED-H-LHT (配列番号	302) [TGT]
(303) TED-K-LHT (配列番号	303) [TGT]
(304) TED-S-LHT (配列番号	304) [TTT]
(305) TED-A-LHT (配列番号	305) [TTT]
(306) SED-T-LHT (配列番号	306) [TCT]
(307) SED-D-LHT (配列番号	307) [TCT]
(308) SED-E-LHT (配列番号	308) [TCT]
(309) SED-H-LHT (配列番号	309) [TGT]
(310) SED-K-LHT (配列番号	310) [TGT]
(311) SED-S-LHT (配列番号	311) [TTT]
(312) SED-A-LHT (配列番号	312) [TTT]
(313) QED-N-LIS (配列番号	313) [TAA]
(314) DED-N-LIS (配列番号	314) [TAC]
(315) EED-N-LIS (配列番号	315) [TAT]
(316) SED-N-LIS (配列番号	316) [TAT]
(317) RED-T-LIS (配列番号	317) [TCG]
(318) RED-D-LIS (配列番号	318) [TCG]
(319) RED-E-LIS (配列番号	319) [TCG]
(320) RED-H-LIS (配列番号	320) [TGG]
(321) RED-K-LIS (配列番号	321) [TGG]
(322) RED-S-LIS (配列番号	322) [TTG]

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

【化 1 2】

(323) RED-A-LIS (配列番号	323) [TTG]	
(324) QED-T-LIS (配列番号	324) [TCA]	
(325) QED-D-LIS (配列番号	325) [TCA]	
(326) QED-E-LIS (配列番号	326) [TCA]	
(327) QED-H-LIS (配列番号	327) [TGA]	
(328) QED-K-LIS (配列番号	328) [TGA]	
(329) QED-S-LIS (配列番号	329) [TTA]	10
(330) QED-A-LIS (配列番号	330) [TTA]	
(331) DED-T-LIS (配列番号	331) [TCC]	
(332) DED-D-LIS (配列番号	332) [TCC]	
(333) DED-E-LIS (配列番号	333) [TCC]	
(334) DED-H-LIS (配列番号	334) [TGC]	
(335) DED-K-LIS (配列番号	335) [TGC]	
(336) DED-S-LIS (配列番号	336) [TTC]	
(337) DED-A-LIS (配列番号	337) [TTC]	20
(338) EED-T-LIS (配列番号	338) [TCC]	
(339) EED-D-LIS (配列番号	339) [TCC]	
(340) EED-E-LIS (配列番号	340) [TCC]	
(341) EED-H-LIS (配列番号	341) [TGC]	
(342) EED-K-LIS (配列番号	342) [TGC]	
(343) EED-S-LIS (配列番号	343) [TTC]	
(344) EED-A-LIS (配列番号	344) [TTC]	30
(345) TED-T-LIS (配列番号	345) [TCT]	
(346) TED-D-LIS (配列番号	346) [TCT]	
(347) TED-E-LIS (配列番号	347) [TCT]	
(348) TED-H-LIS (配列番号	348) [TGT]	
(349) TED-K-LIS (配列番号	349) [TGT]	
(350) TED-S-LIS (配列番号	350) [TTT]	
(351) TED-A-LIS (配列番号	351) [TTT]	
(352) SED-T-LIS (配列番号	352) [TCT]	40
(353) SED-D-LIS (配列番号	353) [TCT]	

【 0 0 8 5】

【化 1 3】

(354) SED-E-LIS (配列番号	354) [TCT]	
(355) SED-H-LIS (配列番号	355) [TGT]	
(356) SED-K-LIS (配列番号	356) [TGT]	
(357) SED-S-LIS (配列番号	357) [TTT]	
(358) SED-A-LIS (配列番号	358) [TTT]	
(359) TGG-W-LQA (配列番号	359) [TCT]	
(360) SGG-W-LQA (配列番号	360) [TCT]	10
(361) DGG-W-LQA (配列番号	361) [TCC]	
(362) EGG-W-LQA (配列番号	362) [TCC]	
(363) QGG-W-LQA (配列番号	363) [TCA]	
(364) RGG-T-LQA (配列番号	364) [TCT]	
(365) RGG-D-LQA (配列番号	365) [TCT]	
(366) RGG-E-LQA (配列番号	366) [TCT]	
(367) RGG-N-LQA (配列番号	367) [TAT]	
(368) RGG-H-LQA (配列番号	368) [TGT]	20
(369) RGG-K-LQA (配列番号	369) [TGT]	
(370) RGG-S-LQA (配列番号	370) [TTT]	
(371) RGG-A-LQA (配列番号	371) [TTT]	
(372) TGG-T-LQA (配列番号	372) [TCT]	
(373) TGG-D-LQA (配列番号	373) [TCT]	
(374) TGG-E-LQA (配列番号	374) [TCT]	
(375) TGG-N-LQA (配列番号	375) [TAT]	
(376) TGG-H-LQA (配列番号	376) [TGT]	30
(377) TGG-K-LQA (配列番号	377) [TGT]	
(378) TGG-S-LQA (配列番号	378) [TTT]	
(379) TGG-A-LQA (配列番号	379) [TTT]	
(380) SGG-T-LQA (配列番号	380) [TCT]	
(381) SGG-D-LQA (配列番号	381) [TCT]	
(382) SGG-E-LQA (配列番号	382) [TCT]	
(383) SGG-N-LQA (配列番号	383) [TAT]	40
(384) SGG-H-LQA (配列番号	384) [TGT]	

【 0 0 8 6 】

【化 1 4】

(385) SGG-K-LQA (配列番号	385) [TGT]
(386) SGG-S-LQA (配列番号	386) [TTT]
(387) SGG-A-LQA (配列番号	387) [TTT]
(388) DGG-T-LQA (配列番号	388) [TCC]
(389) DGG-D-LQA (配列番号	389) [TCC]
(390) DGG-E-LQA (配列番号	390) [TCC]
(391) DGG-N-LQA (配列番号	391) [TAC]
(392) DGG-H-LQA (配列番号	392) [TGC]
(393) DGG-K-LQA (配列番号	393) [TGC]
(394) DGG-S-LQA (配列番号	394) [TTC]
(395) DGG-A-LQA (配列番号	395) [TTC]
(396) EGG-T-LQA (配列番号	396) [TCC]
(397) EGG-D-LQA (配列番号	397) [TCC]
(398) EGG-E-LQA (配列番号	398) [TCC]
(399) EGG-N-LQA (配列番号	399) [TAC]
(400) EGG-H-LQA (配列番号	400) [TGC]
(401) EGG-K-LQA (配列番号	401) [TGC]
(402) EGG-S-LQA (配列番号	402) [TTC]
(403) EGG-A-LQA (配列番号	403) [TTC]
(404) QGG-T-LQA (配列番号	404) [TCA]
(405) QGG-D-LQA (配列番号	405) [TCA]
(406) QGG-E-LQA (配列番号	406) [TCA]
(407) QGG-N-LQA (配列番号	407) [TAA]
(408) QGG-H-LQA (配列番号	408) [TGA]
(409) QGG-K-LQA (配列番号	409) [TGA]
(410) QGG-S-LQA (配列番号	410) [TTA]
(411) QGG-A-LQA (配列番号	411) [TTA]

10

20

30

40

50

1つの実施形態においては、本発明のポリペプチドには、配列番号1から配列番号411のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を含む結合領域が含まれる。これらの結合特性が決定される方法についての詳細な記載は、実施例において本明細書中以後に見ることができる。そのようなポリペプチドは、配列番号1から配列番号411のいずれかと、ヌクレオチド標的に対する結合について競合する。すなわち、好ましいポリペプチドには、競合様式で、配列番号1から配列番号411のいずれかの結合に取って代わる結合領域が含まれる。競合結合を決定するための手段は当該分野で周知である。さらに好ましくは、ポリペプチドには、配列番号1から配列番号46のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を含む結合領域が含まれる。これは、配列番号1から配列番号46のいずれかと、ヌクレオチド標的に対する結合について競合するか、あるいは、競合様式で、配列番号1から配列番号46のいずれかの結合に取って代わる結合領域が含まれる。なおさらに好ましくは、ポリペプチドには、配列番号1から配列番号6のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を含む結合領域が含まれ

る。これは、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかと、ヌクレオチド標的に対する結合について競合するか、あるいは、競合様式で、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかの結合に取って代わる結合領域が含まれる。好ましくは、結合領域は、配列番号 1 から配列番号 4 1 1 のいずれかのアミノ酸配列を有する。さらに好ましくは、結合領域は、配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれかのアミノ酸配列を有する。なおさらに好ましくは、結合領域は、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を有する。

【0087】

上記で開示されたポリペプチドとは異なるポリペプチド（例えば、2 つ以下の保存的アミノ酸置換が配列番号 1 から配列番号 4 1 1 のいずれか、配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれか、もしくは配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかの中に含まれており、置換が行われる前のポリペプチドの少なくとも 80 % 程度の、所望されるサブサイトもしくは標的領域に対する結合親和性を有するポリペプチド）もまた、本発明の範囲に含まれる。解離定数に関しては、これは、置換が行われる前のポリペプチドの解離定数の 125 % を超えない解離定数に等しい。この状況では、用語「保存的アミノ酸置換」は、以下の置換のうちの 1 つと定義される：Ala / Gly もしくは Ser ; Arg / Lys ; Asn / Gln もしくは His ; Asp / Glu ; Cys / Ser ; Gln / Asn ; Gly / Asp ; Gly / Ala もしくは Pro ; His / Asn もしくは Gln ; Ile / Leu もしくは Val ; Leu / Ile もしくは Val ; Lys / Arg もしくは Gln もしくは Glu ; Met / Leu もしくは Tyr もしくは Ile ; Phe / Met もしくは Leu もしくは Tyr ; Ser / Thr ; Thr / Ser ; Trp / Tyr ; Tyr / Trp もしくは Phe ; Val / Ile もしくは Leu。好ましくは、ポリペプチドは、わずか 1 つの保存的アミノ酸置換によって、上記ポリペプチドとは異なる。

【0088】

加えて、亜鉛フィンガーが組み込まれているタンパク質またはポリペプチドは、実施例 11 において以下に詳細に記載されるように、分子的にモデル化することができる。分子のモデル化のための 1 つの適切なコンピュータプログラムは、Insight II である。分子モデリングは、本明細書中に記載される亜鉛フィンガー部分のバリエーションに基づいて他の亜鉛フィンガー部分を作成するために使用することができ、これは本発明の範囲に含まれる。モデル化によって、そのような変異体が、本発明の範囲に含まれる亜鉛フィンガー部分の水素結合パターンと実質的に類似しており、モデル化のための基準として使用される水素結合パターンを有することが確立される場合には、そのような変異体もまた本発明の範囲に含まれる。本明細書中で使用される場合は、水素結合パターンに関する用語「実質的に類似している」は、同じ数の水素結合が存在すること、それぞれの水素結合の結合角が約 10° を超えないで変化すること、そしてそれぞれの水素結合の結合の長さが約 0.2 Å を超えないで変化することを意味する。

【0089】

通常、ポリペプチドと適切な配列の DNA との間での結合は、1 μM から 10 μM までの K_D で生じる。好ましくは、結合は、10 μM から 1 μM、10 pM から 100 nM、100 pM から 10 nM の K_D で、さらに好ましくは、1 nM から 10 nM の K_D で起こる。これらの結合パラメーターもまた、これらのポリペプチドが組み込まれている他のポリペプチド（例えば、本明細書中で以下に記載されるポリペプチド組成物）の結合を特性決定する。

【0090】

したがって、他の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインを、本発明のポリペプチドに含めることができる。これらのドメインの全てに、7 アミノ酸の亜鉛フィンガードメインが含まれており、ここで、このドメインの 7 個のアミノ酸には - 1 から 6 の番号が付けられる。これらのドメインには、以下が含まれる：(1) ヌクレオチド配列 5' - (TAA) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン（ここで、- 1 と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Q、N、および S からなる群より選択される）；(2) ヌクレオチド配列 5' - (TCA) - 3' に特異的に結合する亜鉛フ

ィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Sである)；(3)ヌクレオチド配列5'-(TNG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、およびIからなる群より選択される)；(4)ヌクレオチド配列5'-(TNG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、このドメインの2と番号が付けられるアミノ酸残基はDである)；(5)ヌクレオチド配列5'-(TNT)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、A、およびCからなる群より選択される)；(6)ヌクレオチド配列5'-(TNC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Q、N、S、G、H、およびDからなる群より選択される)；(7)ヌクレオチド配列5'-(TAN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、H、N、G、V、P、I、およびKからなる群より選択される)；(8)ヌクレオチド配列5'-(TCN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、T、D、H、K、R、およびNからなる群より選択される)；(9)ヌクレオチド配列5'-(TCC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、N、H、S、D、T、Q、およびGからなる群より選択される)；(10)ヌクレオチド配列5'-(TCG)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、T、H、S、D、N、Q、およびGからなる群より選択される)；(11)ヌクレオチド配列5'-(TGN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである)；(12)5'-(TGG)-3'および5'-(TGT)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S、D、T、N、Q、G、およびHからなる群より選択される)；(13)ヌクレオチド配列5'-(TGC)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、W、T、およびHからなる群より選択される)；(14)ヌクレオチド配列5'-(TGN)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである)；(15)5'-(TTA)-3'および5'-(TTG)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、SおよびAからなる群より選択される)；(16)5'-(TTC)-3'および5'-(TTT)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである)；(17)ヌクレオチド配列5'-(TNA)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はRである)；(18)ヌクレオチド配列5'-(TNT)-3'に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S、T、およびHからなる群より選択される)；ならびに、(19)ヌクレオチド配列5'-(TNN)-3'に

特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、4と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、L、V、I、およびCからなる群より選択される）。

【0091】

本発明のポリペプチドの中に組み込むことができるなお他の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインは、上記のドメイン、すなわち、配列番号1から配列番号411から、部位特異的突然変異およびスクリーニングによって導くことができる。部位特異的突然変異（site-directed mutagenesis）技術（部位特異的突然変異（site-specific mutagenesis）技術としても知られている）は当該分野で周知であり、本明細書中に詳細に記載される必要はない。そのような技術は、例えば、J. Sambrook & D. W. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"（第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001）, 第2巻, 第13章, pp. 13.1 - 13.56に記載されている。

10

【0092】

III. ポリペプチド組成物

別の態様においては、本発明により、 $5' - (TNN)_n - 3'$ （式中、 n は1より大きい整数である）として定義されるヌクレオチド標的モチーフに特異的に結合するように、動作可能に連結させられた複数の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ドメインが含まれるポリペプチド組成物が提供される。標的モチーフは、任意のより長いヌクレオチド配列（例えば、3個から13個またはそれ以上のTNN、GNN、ANN、またはNNN配列）の中に配置することができる。好ましくは、 n は2から18、より好ましくは2から12、なおさらに好ましくは2から6までの整数である。個々のポリペプチドは、オリゴペプチドリンカーに連結させられることが好ましい。そのようなリンカーは、好ましくは、自然界に存在している亜鉛フィンガータンパク質の中で見られるリンカーに似ている。本発明での使用に好ましいリンカーは、アミノ酸残基配列TGEKP（配列番号412）である。このリンカーの修飾もまた使用することができる。例えば、リンカーの3位のグルタミン酸（E）をアスパラギン酸（D）で置き換えることができる。1位のスレオニン（T）はセリン（S）で置き換えることができる。2位のグリシン（G）はアラニン（A）で置き換えることができる。4位のリジン（K）はアルギニン（R）で置き換えることができる。本発明での使用に好ましい別のリンカーは、アミノ酸残基配列TGGGGSGGGGTGEKP（配列番号414）である。このより長いリンカーは、実質的に独立した様式で動作するより長い複数の亜鉛フィンガー結合ポリペプチドの2つの半分の部分を有することが所望される場合に使用され得る。このより長いリンカーの修飾もまた使用することができる。例えば、4個のグリシン（G）残基のポリグリシンの並びは、それぞれが、より長いまたはより短いものであり得る（すなわち、それぞれ、3個または5個のグリシン残基）。ポリグリシンの並びの間のセリン残基（S）は、スレオニン（T）で置き換えることができる。リンカーTGGGGSGGGGGTGEKP（配列番号414）の一部を含むTGEKP（配列番号412）部分は、TGEKP（配列番号412）リンカーの単独についての上記と同様に修飾することができる。ペプチド（例えば、単鎖抗体ドメイン）を連結させるための他のリンカー（例えば、グリシンまたはセリンの繰り返し）は当該分野で周知であり、本発明の組成物において使用することができる。リンカーの使用は全ての目的について必要ではなく、状況に応じて省略することができる。

20

30

40

【0093】

他のリンカーが当該分野で公知であり、代わりに使用することができる。これらとしては、リンカーLRQKDGGSERP（配列番号416）、LRQKDGERP（配列番号417）、GGRGRGRGRGRQ（配列番号418）、QNKKGSGDGKKKQH I（配列番号419）、TGGERP（配列番号420）、ATGEKP（配列番号421）、およびGGGSGGGGEGP（配列番号422）、ならびに、アミノ酸置換

50

が T G E K P (配列番号 4 1 2) および T G G G S G G G T G E K P (配列番号 4 1 4) について上記に記載されたように行われているそれらのリンカーの誘導体が挙げられる。例えば、これらのリンカーにおいては、Q N K K G S G D G K K K Q H I (配列番号 4 1 9) または G G S G G G E G P (配列番号 4 2 2) の中のジグリシンまたはポリグリシンの並びの間のセリン (S) 残基は、スレオニン (T) で置き換えることができる。G G S G G G E G P (配列番号 4 2 2) においては、9 位のグルタミン酸 (E) はアスパラギン酸 (D) で置き換えることができる。これらのリンカーおよびこれらのリンカーの誘導体を含むポリペプチド組成物は、本発明のポリペプチド組成物に含まれる。

【 0 0 9 4 】

これらのポリペプチド組成物においては、亜鉛フィンガードメインはそれぞれ、配列番号 1 から配列番号 4 1 1 の配列である。通常、亜鉛フィンガードメインはそれぞれ、配列番号 1 から配列番号 4 6 の配列である。好ましくは、亜鉛フィンガードメインはそれぞれ、配列番号 1 から配列番号 6 の配列である。

【 0 0 9 5 】

あるいは、これらのポリペプチド組成物においては、これらの亜鉛フィンガードメインのそれぞれには、配列番号 1 から配列番号 4 1 1 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する結合領域が含まれる。これらの結合領域は、ヌクレオチド標的への結合について、配列番号 1 から配列番号 4 1 1 のいずれかと競合するか、または、競合様式で配列番号 1 から配列番号 4 1 1 のいずれかの結合に置き換わる。あるいは、好ましくは、これらの亜鉛フィンガードメインのそれぞれには、配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する結合領域が含まれる。これらの結合領域は、ヌクレオチド標的への結合について、配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれかと競合するか、または、競合様式で配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれかの結合に置き換わる。さらに好ましくは、これらの亜鉛フィンガードメインのそれぞれには、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する結合領域が含まれる。これらの結合領域は、ヌクレオチド標的への結合について、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかと競合するか、または、競合様式で配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかの結合に置き換わる。

【 0 0 9 6 】

あるいは別に、これらの亜鉛フィンガードメインのそれぞれには、上記に開示された結合領域とは異なる結合領域 (例えば、2 つ以下の保存的アミノ酸置換が配列番号 1 から配列番号 4 1 1 のいずれか、配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれか、もしくは配列番号 1 から配列番号 6 のいずれかの中に含まれており、置換が行われる前の結合領域の少なくとも 8 0 % 程度の、所望されるサブサイトもしくは標的領域に対する結合親和性を有する結合領域) が含まれる。これらのマルチ結合領域ポリペプチドの中の所望されるサブサイトまたは標的領域に対する結合親和性の評価においては、結合親和性は、他の結合領域からの干渉のない条件で決定される。

【 0 0 9 7 】

あるいはなお別に、上記に記載された本発明のポリペプチド組成物においては、亜鉛フィンガードメインのそれぞれは以下のようなドメインである： (1) ヌクレオチド配列 5 ' - (T A A) - 3 ' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン (ここで、- 1 と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Q、N、および S からなる群より選択される) ； (2) ヌクレオチド配列 5 ' - (T C A) - 3 ' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン (ここで、- 1 と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S である) ； (3) ヌクレオチド配列 5 ' - (T N G) - 3 ' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン (ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、- 1 と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、および I からなる群より選択される) ； (4) ヌクレオチド配列 5 ' - (T N G) - 3 ' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン (ここで、N は、A、C、G、または T のいずれかであり、このドメインの 2 と番号が

付けられるアミノ酸残基はDである) ; (5)ヌクレオチド配列 5' - (T N T) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、A、およびCからなる群より選択される) ; (6)ヌクレオチド配列 5' - (T N C) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Q、N、S、G、H、およびDからなる群より選択される) ; (7)ヌクレオチド配列 5' - (T A N) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、H、N、G、V、P、I、およびKからなる群より選択される) ; (8)ヌクレオチド配列 5' - (T C N) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、T、D、H、K、R、およびNからなる群より選択される) ; (9)ヌクレオチド配列 5' - (T C C) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、N、H、S、D、T、Q、およびGからなる群より選択される) ; (10)ヌクレオチド配列 5' - (T C G) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、T、H、S、D、N、Q、およびGからなる群より選択される) ; (11)ヌクレオチド配列 5' - (T G N) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである) ; (12) 5' - (T G G) - 3' および 5' - (T G T) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S、D、T、N、Q、G、およびHからなる群より選択される) ; (13)ヌクレオチド配列 5' - (T G C) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、W、T、およびHからなる群より選択される) ; (14)ヌクレオチド配列 5' - (T G N) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである) ; (15) 5' - (T T A) - 3' および 5' - (T T G) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、SおよびAからなる群より選択される) ; (16) 5' - (T T C) - 3' および 5' - (T T T) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである) ; (17)ヌクレオチド配列 5' - (T N A) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はRである) ; (18)ヌクレオチド配列 5' - (T N T) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、- 1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S、T、およびHからなる群より選択される) ; ならびに、(19)ヌクレオチド配列 5' - (T N N) - 3' に特異的に結合する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメイン(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、4と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、L、V、I、およびCからなる群より選択される)。

【 0 0 9 8 】

あるいはなお他には、上記に記載された亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインのうちの任意のものを、本発明のポリペプチド組成物に含めることができる。

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

50

上記に記載された分子モデリングによって作成された結合領域を含む、これらのポリペプチドの結合領域についての他の代わりとなるものは本発明の範囲に含まれる。

【0100】

あるいはなお別に、ポリペプチド組成物には、2つの半分の部分が含まれる二重特異的亜鉛フィンガータンパク質が含まれ得る。それぞれの半分の部分には、6個の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインが含まれる。ここで、半分の部分の少なくとも一方に、5'-(TNN)-3'型の標的ヌクレオチド配列に結合する少なくとも1つのドメインが含まれ、その結果、二重特異的亜鉛フィンガーの2つの半分の部分は独立して作動することができる。2つの半分の部分は、アミノ酸残基配列TGGGSGGGGTGEKP(配列番号414)のようなリンカーまたは上記に記載された別のリンカーによって連結させることができる。通常、二重特異的亜鉛フィンガータンパク質のこの形態のリンカーには、約12から約18個のアミノ酸残基が含まれる。

【0101】

あるいは別に、ポリペプチド組成物には、配列5'-(TNN)-3'を有するヌクレオチドサブサイトまたは標的領域に特異的に結合する結合領域に加えて、配列5'-(ANN)-3'、5'-(CNN)-3'、または5'-(GNN)-3'を有するヌクレオチドサブサイトまたは標的領域に特異的に結合する結合領域を含む1つ以上のポリペプチドが含まれ得る。配列5'-(ANN)-3'を有するヌクレオチドサブサイトに特異的に結合する結合領域は、例えば、Barbasら、による米国特許出願公開番号2002/0165356(引用により本明細書中に組み入れられる)に開示されている。配列5'-(CNN)-3'を有するヌクレオチドサブサイトに特異的に結合する結合領域は、例えば、Barbasら、による米国特許出願公開番号2004/0224385(引用により本明細書中に組み入れられる)に開示されている。配列5'-(GNN)-3'を有するヌクレオチドサブサイトに特異的に結合する結合領域は、例えば、Barbasの米国特許第6,610,512号およびBarbasの米国特許第6,140,081号(いずれも、引用により本明細書中に組み入れられる)に開示されている。適切な特異性のヌクレオチド配列に結合する他の結合領域は当該分野で公知である。

【0102】

ポリペプチドに、構造5'-(ANN)-3'、5'-(TNN)-3'、または5'-(TNN)-3'のヌクレオチドサブサイトに特異的に結合する結合領域が含まれる場合には、これらは、ポリペプチドが構造5'-(TNN)-3'のヌクレオチドサブサイトに結合する少なくとも1つの結合領域を有する限りにおいて、ポリペプチドの中では任意の順序で存在することができる。例えば、しかし限定ではないが、ポリペプチドには、結合領域(その全てが構造5'-(TNN)-3'のヌクレオチドサブサイトに結合する)のブロックが含まれ得るか、あるいは、構造5'-(ANN)-3'、5'-(CNN)-3'、または5'-(TNN)-3'の結合領域結合ヌクレオチドサブサイトが散りばめられている構造5'-(TNN)-3'の結合領域結合ヌクレオチドサブサイトを有することができる。ポリペプチドには、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、またはそれ以上の結合領域が含まれ得、それぞれは、重ねて、ポリペプチドが構造5'-(TNN)-3'のヌクレオチドサブサイトに結合する少なくとも1つの結合領域を有する限りにおいて、構造5'-(ANN)-3'、5'-(CNN)-3'、5'-(GNN)-3'、または5'-(TNN)-3'のサブサイトに結合する。1つの別の方法においては、ポリペプチドの中の結合領域の全てが、構造5'-(TNN)-3'のヌクレオチドサブサイトに結合する。したがって、本発明には、式ANN、CNN、またはGNN(式中、Nは、A、C、G、またはTである)の標的ヌクレオチドに優先的に結合する少なくとも1つの他の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドに動作可能であるように連結された上記ポリペプチド組成物が含まれる。あるいは、以下に記載されるように、本発明のポリペプチド組成物は、1つ以上の転写因子に動作可能であるように連結させることができる。

10

20

30

40

50

【0103】

本発明のポリペプチド組成物は、1つ以上の機能的なポリペプチドに動作可能であるように連結させることができる。そのような機能的なポリペプチドは、定義された機能を有するタンパク質の完全な配列であってよく、また、定義された機能を有するタンパク質の中に生じる1つのドメインもしくは複数のドメインに由来することもできる。そのような機能的なポリペプチドは当該分野で周知であり、転写調節因子（例えば、リプレッサーまたは活性化ドメイン）または他の機能を有するポリペプチドであり得る。組み込むことができる例示的であり、好ましい機能的なポリペプチドは、ヌクレアーゼ、ラクタマーゼ、インテグラーゼ、メチラーゼ、核局在化ドメイン、および制限酵素（例えば、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ）、ならびに加水分解活性のような酵素活性を有する他のドメインである（例えば、Chandrasegaran and Smith, Biol. Chem., 380: 841-848, 1999を参照のこと）。通常、動作可能な連結は、融合タンパク質を形成させるために亜鉛フィンガードメインを他の機能的なポリペプチド（単数または複数）と結合させて1つのポリペプチドを作成することによって行われる。連結は、上記に記載されたように、直接行うことも、また、1つ以上のリンカーを介して行うこともできる。中でも、本発明のポリペプチド組成物に結合させることができる他のポリペプチドは、例えば、選択されたゲノム標的での部位特異的切断を指示することができる構築物を作成するための、FokIのヌクレアーゼ触媒ドメインである。

10

【0104】

20

例示的なリプレッションドメインポリペプチドは、ERFリプレッサードメイン（ERD）であり（Sgouras, D. N., Athanasiou, M. A., Beal, G. J., Jr., Fisher, R. J., Blair, D. G. & Mavrothalassitis, G. J. (1995) EMBO J. 14, 4781-4793）、これは、ets2リプレッサー因子（ERF）の473位から530位のアミノ酸によって定義される。このドメインは、etsファミリーの転写因子の活性に対するERFのアンタゴニスト効果を媒介する。合成のリプレッサーが、亜鉛フィンガータンパク質のN末端またはC末端に対してこのドメインを融合させることによって構築された。第2のリプレッサータンパク質は、Kruppel-associated box（KRAB）ドメインを使用して調製された（Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W., K.-H., Vissing, H., Thiesen, H.-J. & Rauscher III, F. J. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4509-4513）。このリプレッサードメインは、一般的には、亜鉛フィンガータンパク質のN末端に見られ、おそらくは、距離および方向非依存性の様式（Pengue, G. & Lania, L. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1015-1020）で、RINGフィンガータンパク質KAP-1と相互作用することによってTATA依存性の転写に対してその抑制活性を発揮する（Friedman, J. R., Fredericks, W. J., Jensen, D. E., Speicher, D. W., Huang, X.-P., Neilson, E. G. & Rauscher III, F. J. (1996) Genes & Dev. 10, 2067-2078）。本発明者らは、亜鉛フィンガータンパク質KRX1の1位から97位の間のアミノ酸に見られるKRABドメインを利用した（Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W., K.-H., Vissing, H., Thiesen, H.-J. & Rauscher III, F. J. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4509-4513）。この場合、亜鉛フィンガーポリペプチドを有するN末端融合体が構築された。最後に、抑制についてのヒストン脱アセチル化の有用性を調べるためにMad mSIN3相互作用ドメイン（SID）の1位から36位のアミノ酸が亜鉛フィンガータンパク質のN末端に融合させられた（Ayer, D. E., Laherty, C. D., Lawrence, Q. A., Armstrong, A. P. & Eisenman, R. N. (1996) Mol

30

40

50

. Cell . Biol . 16 , 5772 - 5781) 。この小さいドメインは、転写因子 Mad の N 末端で見られ、これは、mSIN3 との相互作用によってその転写抑制を媒介する役割を担っている。これは次いで、コリプレッサーである N - COR、およびヒストンデアセチラーゼ mRPD1 と相互作用する (Heinzel , T . , Lavinsky , R . M . , Mullen , T . - M . , Soderstrom , M . , Laherty , C . D . , Torchia , J . , Yang , W . - M . , Brard , G . , & Ngo , S . D . (1997) Nature 387 , 43 - 46) 。遺伝子特異的活性化を試験するために、転写活性化因子が、単純ヘルペスウイルス VP16 タンパク質の 413 位から 489 位のアミノ酸に対して亜鉛フィンガーポリペプチドを融合させることによって (Sadowski , I . , Ma , J . , Triezenberg , S . & Ptashne , M . (1988) Nature 335 , 563 - 564) 、または VP64 と呼ばれる VP16 の最小活性化ドメインの人工的な四量体反復に対して亜鉛フィンガーポリペプチドを融合させることによって (Seipel , K . , Georgiev , O . & Schaffler , W . (1992) EMBO J . 11 , 4961 - 4968) 作成された。

10

20

30

40

50

【0105】

上記で示された本発明のポリペプチドは、1つ以上の転写調節因子 (modulating factor) または調節因子 (regulating factor) に動作可能であるように連結させることができる。調節因子 (例えば、転写活性化因子または転写抑制因子 (transcription suppressor) もしくはリプレッサー) は当該分野で周知である。そのような因子に対してポリペプチドを動作可能であるように連結させるための手段もまた当該分野で周知である。例示的であり、好ましいそのような因子、および遺伝子発現を調節するためのそれらの使用は、本明細書中以後で詳細に述べる。

【0106】

遺伝子特異的転写調節因子として亜鉛フィンガータンパク質を使用する概念を試験するために、6フィンガーのタンパク質が多数のエフェクタードメインに融合させられた。転写リプレッサーは、亜鉛フィンガータンパク質に対して3つのヒト由来のリプレッサードメインのいずれかを結合させることによって作成された。第1のリプレッサータンパク質は、ERFリプレッサードメイン (ERD) を使用して調製され (Sgouras , D . N . , Athanasiou , M . A . , Beal , G . J . , Jr . , Fisher , R . J . , Blair , D . G . & Mavrothalassitis , G . J . (1995) EMBO J . 14 , 4781 - 4793) 、これは、ets2リプレッサー因子 (ERF) の 473 位から 530 位のアミノ酸によって定義される。このドメインは、etsファミリーの転写因子の活性に対する ERF のアンタゴニスト効果を媒介する。合成のリプレッサーが、亜鉛フィンガータンパク質の C 末端に対してこのドメインを融合させることによって構築された。第2のリプレッサータンパク質は、Kruppel-associated box (KRAB) ドメインを使用して調製された (Margolin , J . F . , Friedman , J . R . , Meyer , W . , K . - H . , Vissing , H . , Thiesen , H . - J . & Rauscher III , F . J . (1994) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 91 , 4509 - 4513) 。このリプレッサードメインは、一般的には、亜鉛フィンガータンパク質の N 末端に見られ、おそらくは、距離および方向非依存性の様式 (Pengue , G . & Lania , L . (1996) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 93 , 1015 - 1020) で、RINGフィンガータンパク質 KAP-1 と相互作用することによって TATA 依存性の転写に対してその抑制活性を発揮する (Friedman , J . R . , Fredricks , W . J . , Jensen , D . E . , Speicher , D . W . , Huang , X . - P . , Neilson , E . G . & Rauscher III , F . J . (1996) Genes & Dev . 10 , 2067 - 2078) 。本発明者らは、亜鉛フィンガータンパク質 KOX1 の 1 位から 97 位のアミノ酸の間に見られる KRAB ドメ

ンを利用した (Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W., K.-H., Vissing, H., Thiesen, H.-J. & Rauscher III, F. J. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4509 - 4513)。この場合、6フィンガータンパク質を有するN末端融合体が構築された。最後に、抑制についてのヒストン脱アセチル化の有用性を調べるために、Mad-mSIN3相互作用ドメイン (SID) の1位から36位のアミノ酸が亜鉛フィンガータンパク質のN末端に融合させられた (Ayer, D. E., Laherty, C. D., Lawrence, Q. A., Armstrong, A. P. & Eisenman, R. N. (1996) Mol. Cell. Biol. 16, 5772 - 5781)。この小さいドメインは、転写因子MadのN末端で見られ、これは、mSIN3との相互作用によってその転写抑制を媒介する役割を担っている。これは次いで、コリプレッサーであるN-CoR、およびヒストンデアセチラーゼmRPD1と相互作用する (Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T.-M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W.-M., Brard, G., & Ngo, S. D. (1997) Nature 387, 43 - 46)。別の代わりとなるものは、HDAC1のようなヒストンデアセチラーゼとの直接の融合体である。

【0107】

遺伝子特異的活性化を試験するために、転写活性化因子が、単純ヘルペスウイルスVP16タンパク質の413位から489位のアミノ酸に対して亜鉛フィンガーポリペプチドを融合させることによって (Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M. (1988) Nature 335, 563 - 564)、またはVP64と呼ばれるVP16の最小活性化ドメインDALDDFDLDM (配列番号415) の人工的な四量体反復に対して亜鉛フィンガーポリペプチドを融合させることによって (Seipel, K., Georgiev, O. & Schaffner, W. (1992) EMBO J. 11, 4961 - 4968) 作成された。

【0108】

ルシフェラーゼレポーター遺伝子に結合させられたerbB-2プロモーターの断片を含むレポーター構築物が、本発明者らが設計した転写調節因子の特異的活性を試験するために作成された。標的レポータープラスミドには、ATG開始コドンに関して-758位から-1位のヌクレオチドが含まれていた。プロモーター断片は、HeLa細胞の中に一時的にトランスフェクトされた場合には、以前の観察 (Hudson, L. G., Ertl, A. P. & Gill, G. N. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4389 - 4393) と一致して、同様の活性を示した。erbB-2プロモーター活性に対する亜鉛フィンガー-リプレッサードメイン融合体構築物の効果を試験するために、HeLa細胞を、亜鉛フィンガー発現ベクターとルシフェラーゼレポーター構築物で一時的に同時トランスフェクトした。有意な抑制が、それぞれの構築物を用いた場合に観察された。転写の活性化を媒介する遺伝子特異的ポリダクチルタンパク質の有用性を、同じ2つのレポーター構築物を使用して研究した。

【0109】

本明細書中のデータは、新規の9bpおよび18bpのDNA標的部位、さらには他の長さのDNA標的部位に結合することができる亜鉛フィンガータンパク質を、5' - (TNN) - 3' 部位を認識する予め定義されたドメイン、またはさらには、5' - (TNN) - 3'、5' - (TNN) - 3'、または5' - (TNN) - 3' 部位を認識するドメインを使用して迅速に調製することができることを示している。この情報は、それぞれが18bpのDNA配列に結合することができる、1億6600万または1700万個の新規の6フィンガータンパク質の調製に十分である。新規の亜鉛フィンガータンパク質の構築のためのこの迅速な方法には、他の研究者によって提案されている亜鉛フィンガードメインの連続的な作成および選択 (Greisman, H. A. & Pabo, C. O. (1997) Science 275, 657 - 661) を上回る利点があり、5' - (T

10

20

30

40

50

NN) - 3' 部位を標的化するタンパク質の中では回避される、上記で定義されたような標的の重複の問題についての可能性を示唆する構造情報が利用される。複合体、および十分に研究されている *erbB-2* プロモーター、および生存しているヒト細胞を使用した場合には、データは、これらのタンパク質を、適切なエフェクタードメインと共に提供される場合には、発現を誘発または活性化させるために、そして、これらの実験でのバックグラウンドのレベルにまで下げる段階的な抑制レベルを生じさせるために用いることができることを示している。

【0110】

TNN 特異的亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインを含む人工的な転写因子のさらなる例は、実施例 12 に提供される。これらの実施例には、(1) 以下のような 6 個の亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインを含み：F1 RSD - D - LVR (配列番号 453)；F2 RSD - V - LVR (配列番号 452)；F3 QSG - D - LRR (配列番号 451)；F4 QRH - S - TLE (配列番号 450)；F5 RGG - W - LOA (配列番号 46)；および F6 QRA - N - LRA (配列番号 449)、そして DNA 配列 AATCTCTAGCAGTGGCG (配列番号 433) に結合する、PBS1 と命名された、2 つの半分の部分に分けられた人工的な転写因子であって、ここで、RGG - W - LOA (配列番号 46) はトリプレット 5' - TCT - 3' に結合する；(2) 以下のような 6 個の亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインを含み：F1 RSD - D - LVR (配列番号 453)；F2 RSD - V - LVR (配列番号 452)；F3 QSG - D - LRR (配列番号 451)；F4 QRA - N - LRA (配列番号 449)；F5 RSD - H - LTT (配列番号 14)；および F6 RSD - V - LVR (配列番号 452)、そして DNA 配列 GTCTGGAAATCTCTAGCAGTGGCG (配列番号 434) に結合する PBS1a と命名された、ATCTCTA の非結合性の介在配列を有する 2 つの半分の部分に分けられた人工的な転写因子であって、ここで、RSD - H - LTT (配列番号 14) はトリプレット 5' - TGG - 3' に結合する；および (3) 以下のような 6 個の亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインを含み：F1 DPG - N - LVR (配列番号 460)；F2 RSD - H - LTN (配列番号 459)；F3 DSG - N - LRV (配列番号 458)；F4 RND - T - LTE (配列番号 457)；F5 HTG - H - LLE (配列番号 454) I、および F6 RSD - H - LTT (配列番号 14)、そして DNA 配列 TGGCGCCCGAACAAGGGAC (配列番号 436) に結合する PBS3 と命名された、2 つの半分の部分に分けられた人工的な転写因子であって、ここで、RSD - H - LTT (配列番号 14) は (この 6 フィンガーの人工的な転写因子の中の) トリプレット 5' - TGG - 3' に結合する。これらの因子は、実施例 1 において表 13 に示される。これらの因子をベースとする他の人工的な転写因子、および他の TNN 特異的亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインの置換もまた、本発明の範囲に含まれる。例えば、PBS1 においては、以下のような他の TCT 結合亜鉛フィンガー DNA 結合ドメイン：WVG - W - LGS (配列番号 22)、RLR - D - IQF (配列番号 23)、GRS - Q - LSC (配列番号 24)、AEA - E - LQR (配列番号 39)、QGG - V - LAA (配列番号 40)、TAS - T - LIS (配列番号 80)、TAS - D - LIS (配列番号 81)、TAS - E - LIS (配列番号 82)、SAS - T - LIS (配列番号 87)、SAS - D - LIS (配列番号 88)、SAS - E - LIS (配列番号 89)、SLD - T - LQT (配列番号 134)、SLD - D - LQT (配列番号 135)、SLD - E - LQT (配列番号 136)、ARG - T - LRT (配列番号 141)、ARG - D - LRT (配列番号 142)、ARG - E - LRT (配列番号 143)、TKD - T - LRG (配列番号 189) TKD - D - LRG (配列番号 190)、TKD - E - LRG (配列番号 191)、SKD - T - LRG (配列番号 196)、SKD - D - LRG (配列番号 197)、SKD - E - LRG (配列番号 198)、VRG - T - LRT (配列番号 202)、VRG - D - LRT (配列番号 203)、VRG - E - LRT (配列番号 204)、TLR - A - LDR (配列番号 212)、SLR - A - LDR (配列番号 213)、TYQ - S - LRQ (配列番号 224)、SYQ - S - LRQ (配列番号 225)、TS

10

20

30

40

50

L - L - L G A (配列番号 2 3 6)、S S L - L - L G A (配列番号 2 3 7)、T K H - M - L D T (配列番号 2 4 8)、S K H - M - L D T (配列番号 2 4 9)、T L G - G - L R Q (配列番号 2 5 3)、S L G - G - L R Q (配列番号 2 5 4)、A E A - T - L Q R (配列番号 2 5 6)、A E A - D - L Q R (配列番号 2 5 7)、T E D - T - L H T (配列番号 2 9 9)、T E D - D - L H T (配列番号 3 0 0)、T E D - E - L H T (配列番号 3 0 1)、S E D - T - L H T (配列番号 3 0 6)、S E D - D - L H T (配列番号 3 0 7)、S E D - E - L H T (配列番号 3 0 8)、T E D - T - L I S (配列番号 3 4 5)、T E D - D - L I S (配列番号 3 4 6)、T E D - E - L I S (配列番号 3 4 7)、S E D - T - L I S (配列番号 3 5 2)、S E D - D - L I S (配列番号 3 5 3)、S E D - E - L I S (配列番号 3 5 4)、T G G - W - L Q A (配列番号 3 5 9)、S G G - W - L Q A (配列番号 3 6 0)、R G G - T - L Q A (配列番号 3 6 4)、R G G - D - L Q A (配列番号 3 6 5)、R G G - E - L Q A (配列番号 3 6 6)、T G G - T - L Q A (配列番号 3 7 2)、T G G - D - L Q A (配列番号 3 7 3)、T G G - E - L Q A (配列番号 3 7 4)、S G G - T - L Q A (配列番号 3 8 0)、S G G - D - L Q A (配列番号 3 8 1)、S G G - E - L Q A (配列番号 3 8 2)、および表 2 のような、その配列が上記に記載された規則に従うこれらの亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインの修飾で、R G G - W - L O A (配列番号 4 6) を置換することができる。P B S 1 a および P B S 3 においては、他の T G G 結合亜鉛フィンガー DNA 結合ドメイン (例えば、R A S - H - L I S (配列番号 7 6)、R A S - K - L I S (配列番号 7 7)、R L D - H - L Q T (配列番号 1 0 2)、R L D - K - L Q T (配列番号 1 0 3)、R K D - H - L R G (配列番号 1 6 4)、R K D - K - L R G (配列番号 1 6 5)、R L R - H - I Q F (配列番号 2 2 9)、R L R - K - I Q F (配列番号 2 3 0)、R G R - C - L V T (配列番号 2 6 4)、R E D - H - L H T (配列番号 2 7 4)、R E D - K - L H T (配列番号 2 7 5)、R E D - H - L I S (配列番号 3 2 0)、および R E D - K - L I S (配列番号 3 2 1))、ならびに、表 2 のような、その配列が上記の規則に従うこれらの亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインの修飾で、R S D - H - L T T (配列番号 1 4) を置換することができる。加えて、これらの亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインの結合の特異性は、より長いポリペプチド、または融合タンパク質 (例えば、人工的な転写因子) への組み込みによって変化させることができる。例えば、亜鉛フィンガー DNA 結合領域メイン R S D - H - L T T (配列番号 1 4) は、P B S 1 a および P B S 3 の中の T G G に結合する。しかし、これは、T C A および T C T に対して親和性を有する (表 9)。したがって、これらの亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインの結合の特異性は、好ましくは、人工的な転写因子全体、または、マルチフィンガー部分を形成させるように動作可能であるように連結させられる亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインの少なくともセット全体の状況において決定される。通常、本発明の人工的な転写因子は、H I V - 1 t R N A プライマー結合部位の少なくとも一部に結合する。通常、人工的な転写因子は 6 個の亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインを有しており、式 T N N (式中、N は、A、C、G、または T である) の標的ヌクレオチドに優先的に結合する少なくとも 1 つの亜鉛フィンガー DNA 結合ドメインを有する。通常、人工的な転写因子は、S p 1 C 亜鉛フィンガー足場に集合される。通常、人工的な転写因子には、少なくとも 1 つの K R A B 抑制ドメインが含まれる。しかし、人工的な転写因子には、他の抑制ドメインまたは活性化ドメインを含めることができる。

【0111】

I V . 単離されたヘプタペプチド

本発明の別の態様は、 α - ヘリックス構造を有する単離されたヘプタペプチドであり、これは、式 T N N (式中、N は、A、C、G、または T である) の標的ヌクレオチドに優先的に結合する。好ましい標的ヌクレオチドは上記に記載した通りである。ヘプタペプチドは、配列番号 1 から配列番号 4 1 1 であり得る。

【0112】

好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号 1 から配列番号 4 6 のいずれかのアミノ酸配列を有する。さらに好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号 1 から配列番号 6 のいずれ

かのアミノ酸配列を有する。

【0113】

別の方法においては、本発明のヘプタペプチドは、配列番号1から配列番号411のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する。そのようなヘプタペプチドは、配列番号1から配列番号411のいずれかと、ヌクレオチド標的に対する結合について競合する。すなわち、好ましいヘプタペプチドは、競合様式で、配列番号1から配列番号411のいずれかの結合に取って代わる。さらに好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号1から配列番号46のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する。これは、配列番号1から配列番号46のいずれかと、ヌクレオチド標的に対する結合について競合するか、あるいは、競合様式で、配列番号1から配列番号46のいずれかの結合に取って代わる。なおさらに好ましくは、ヘプタペプチドには、配列番号1から配列番号6のいずれかと同じヌクレオチド結合特性を有するアミノ酸配列を有する。これは、配列番号1から配列番号6のいずれかと、ヌクレオチド標的に対する結合について競合するか、あるいは、競合様式で、配列番号1から配列番号6のいずれかの結合に取って代わる結合領域が含まれる。

10

【0114】

なお別の代わりの方法においては、ヘプタペプチドは、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する：

(1) 配列番号1から配列番号411のいずれかのアミノ酸配列；および

(2) 2つ以下の保存的アミノ酸置換によって配列番号1から配列番号411のいずれかのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列であって、ここで、解離定数は、置換が行われる前のポリペプチドの解離定数の125%を超えず、保存的アミノ酸置換は以下の置換のうちの1つである：Ala / GlyもしくはSer；Arg / Lys；Asn / GlnもしくはHis；Asp / Glu；Cys / Ser；Gln / Asn；Gly / Asp；Gly / AlaもしくはPro；His / AsnもしくはGln；Ile / LeuもしくはVal；Leu / IleもしくはVal；Lys / ArgもしくはGlnもしくはGlu；Met / LeuもしくはTyrもしくはIle；Phe / MetもしくはLeuもしくはTyr；Ser / Thr；Thr / Ser；Trp / Tyr；Tyr / TrpもしくはPhe；Val / IleもしくはLeu。

20

【0115】

この別の方法では、好ましくは、ヘプタペプチドは、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する：

(1) 配列番号1から配列番号46のいずれかのアミノ酸配列；および

(2) 2つ以下の保存的アミノ酸置換によって配列番号1から配列番号46のいずれかのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列であって、ここで、解離定数は、置換が行われる前のポリペプチドの解離定数の125%を超えず、保存的アミノ酸置換は以下の置換のうちの1つである：Ala / GlyもしくはSer；Arg / Lys；Asn / GlnもしくはHis；Asp / Glu；Cys / Ser；Gln / Asn；Gly / Asp；Gly / AlaもしくはPro；His / AsnもしくはGln；Ile / LeuもしくはVal；Leu / IleもしくはVal；Lys / ArgもしくはGlnもしくはGlu；Met / LeuもしくはTyrもしくはIle；Phe / MetもしくはLeuもしくはTyr；Ser / Thr；Thr / Ser；Trp / Tyr；Tyr / TrpもしくはPhe；Val / IleもしくはLeu。

30

40

【0116】

さらに好ましくは、この別の方法においては、ヘプタペプチドは、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する：

(1) 配列番号1から配列番号6のいずれかのアミノ酸配列；および

(2) 2つ以下の保存的アミノ酸置換によって配列番号1から配列番号6のいずれかのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列であって、ここで、解離定数は、置換が行われる前のポリペプチドの解離定数の125%を超えず、保存的アミノ酸置換は以下の置換のうち

50

の1つである：Ala / GlyもしくはSer ; Arg / Lys ; Asn / GlnもしくはHis ; Asp / Glu ; Cys / Ser ; Gln / Asn ; Gly / Asp ; Gly / AlaもしくはPro ; His / AsnもしくはGln ; Ile / LeuもしくはVal ; Leu / IleもしくはVal ; Lys / ArgもしくはGlnもしくはGlu ; Met / LeuもしくはTyrもしくはIle ; Phe / MetもしくはLeuもしくはTyr ; Ser / Thr ; Thr / Ser ; Trp / Tyr ; Tyr / TrpもしくはPhe ; Val / IleもしくはLeu。

【0117】

これらの別の方法においては、好ましくは、ヘプタペプチドは、わずかに1つの保存的アミノ酸置換によって、配列番号1から配列番号411、配列番号1から配列番号46、または配列番号1から配列番号6のアミノ酸配列とは異なる。

10

【0118】

なお別の代わりとなる方法においては、ヘプタペプチドは、以下のうちの1つである（ここで、ヘプタペプチドの残基には、上記に記載されたように-1から6の番号が付けられる）：（1）ヌクレオチド配列5' - (TAA) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Q、N、およびSからなる群より選択される）；（2）ヌクレオチド配列5' - (TCA) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Sである）；（3）ヌクレオチド配列5' - (TNG) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、およびIからなる群より選択される）；（4）ヌクレオチド配列5' - (TNG) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、このドメインの2と番号が付けられるアミノ酸残基はDである）；（5）ヌクレオチド配列5' - (TNT) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、R、N、Q、H、S、T、A、およびCからなる群より選択される）；（6）ヌクレオチド配列5' - (TNC) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、Q、N、S、G、H、およびDからなる群より選択される）；（7）ヌクレオチド配列5' - (TAN) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、H、N、G、V、P、I、およびKからなる群より選択される）；（8）ヌクレオチド配列5' - (TCN) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、T、D、H、K、R、およびNからなる群より選択される）；（9）ヌクレオチド配列5' - (TCC) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、N、H、S、D、T、Q、およびGからなる群より選択される）；（10）ヌクレオチド配列5' - (TCG) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、T、H、S、D、N、Q、およびGからなる群より選択される）；（11）ヌクレオチド配列5' - (TGN) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである）；（12）5' - (TGG) - 3' および5' - (TGT) - 3' からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S、D、T、N、Q、G、およびHからなる群より選択される）；（13）ヌクレオチド配列5' - (TGC) - 3' に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド（ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、W、T、およびHからなる群より選択される）

20

30

40

50

；(14)ヌクレオチド配列5'-(TGN)-3'に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである)；(15)5'-(TTA)-3'および5'-(TTG)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、SおよびAからなる群より選択される)；(16)5'-(TTC)-3'および5'-(TTT)-3'からなる群より選択されるヌクレオチド配列に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド(ここで、3と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はHである)；(17)ヌクレオチド配列5'-(TNA)-3'に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基はRである)；(18)ヌクレオチド配列5'-(TNT)-3'に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、-1と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、S、T、およびHからなる群より選択される)；ならびに、(19)ヌクレオチド配列5'-(TNN)-3'に特異的に結合する単離されたヘプタペプチド(ここで、Nは、A、C、G、またはTのいずれかであり、4と番号が付けられるこのドメインのアミノ酸残基は、L、V、I、およびCからなる群より選択される)。

10

【0119】

V. ポリヌクレオチド、発現ベクター、および形質転換された細胞

本発明には、亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ペプチドまたはポリペプチド(上記に記載されたポリペプチド、ポリペプチド組成物、および単離されたヘプタペプチドを含む)をコードするヌクレオチド配列が含まれる。本発明の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチド(天然のもの、短縮型、および伸張型のポリペプチドを含む)をコードするDNA配列は、いくつかの方法によって得ることができる。例えば、DNAは、当該分野で周知であるハイブリダイゼーション手順を使用して単離することができる。これらには、以下が含まれるが、それらに限定されない：(1)共有されているヌクレオチド配列を検出するための、ゲノムまたはcDNAライブラリーに対するプローブのハイブリダイゼーション；(2)共有されている構造上の特徴を検出するための発現ライブラリーの抗体スクリーニング；および(3)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による合成。本発明のRNA配列は当該分野で公知の方法によって得ることができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら、編、1989を参照のこと)。

20

30

【0120】

本発明の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドをコードする特異的DNA配列の開発は、以下によって得ることができる：(1)ゲノムDNAからの二本鎖のDNA配列の単離；(2)目的のポリペプチドについての不可欠なコドンを提供するためのDNA配列の化学的製造；および(3)真核生物ドナー細胞から単離されたmRNAの逆転写による二本鎖DNA配列のインビトロでの合成。後者の場合には、mRNAの二本鎖のDNA補体が最終的に形成され、これは一般的には、cDNAと呼ばれる。組み換え手順において使用される特異的DNA配列を開発するためのこれらの3つの方法のうち、ゲノムDNAの単離は極めてまれである。これは、哺乳動物のポリペプチドの微生物による発現を得ることが所望される場合には、イントロンの存在が原因で、特にその通りである。亜鉛フィンガーに由来するDNA結合ポリペプチドを得るためには、所望されるポリペプチド産物のアミノ酸残基の配列全体がわかっている場合には、DNA配列の合成が、頻繁に選択される方法である。所望されるポリペプチドのアミノ酸残基の配列全体がわかっていない場合には、DNA配列の直接の合成は不可能であり、選択される方法は、cDNA配列の形成である。中でも、目的のcDNA配列を単離するための標準的な手順は、高レベルの遺伝子発現を有するドナー細胞の中に豊富に存在しているmRNAの逆転写によって導かれる、プラスミドに保有されているcDNAライブラリーの形成である。ポリメラーゼ連鎖反応技術と組み合わせて使用される場合には、さらに珍しい発現産物をクローニング

40

50

することができる。ポリペプチドのアミノ酸配列の有意な部分がわかっている場合には、標的 cDNA の中に存在すると推定される配列を複製する標識された一本鎖または二本鎖の DNA もしくは RNA プローブ配列の生産が、DNA/DNA ハイブリダイゼーション手順において使用され得る。これは、一本鎖の形態へと変性させられた、クローニングされた cDNA のコピーに対して行われる (Jayら、Nucleic Acid Research 11:2325, 1983)。

【0121】

本発明の範囲に含まれるヌクレオチド配列に関しては、記載されるような本発明の実施形態であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は全て、本発明の範囲に含まれるヌクレオチド配列の中に含まれる。これにはさらに、上記で定義されたように、保存的アミノ酸置換が組み込まれている本発明のポリペプチドをコードする全てのヌクレオチド配列が含まれる。これにはさらに、融合タンパク質を含む、亜鉛フィンガードメインが組み込まれているより大きなタンパク質、および亜鉛フィンガードメインに動作可能であるように連結させられた転写調節因子が組み込まれているタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれる。

10

【0122】

本発明の核酸配列にはさらに、上記の配列と少なくとも 95% 同一である核酸配列が、そのような核酸配列が塩基の置換が行われる前の配列の活性 (ヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の任意の活性、および核酸レベルで発現されるヌクレオチド配列の任意の活性が含まれる) を保持しているという条件で含まれ、例えば、転写に影響を与えるタンパク質についての結合部位である。好ましくは、核酸配列は、少なくとも 97.5% 同一である。さらに好ましくは、これらは少なくとも 99% 同一である。これらの目的から、「同一」は、Needleman-Wunsch アルゴリズム (S. B. Needleman & C. D. Wunsch, "A General Method Applicable to the Search for Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins," J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)) にしたがって定義される。

20

【0123】

本発明に含まれるヌクレオチド配列はまた、当該分野で周知であるように、ベクター (発現ベクターが含まれるが、これに限定されない) の中に組み込むことができ、適切な宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換するために使用することができる。本発明に含まれるヌクレオチド配列が組み込まれているベクターもまた本発明の範囲に含まれる。ベクターで、または、本発明のポリヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列で形質転換あるいはトランスフェクトされた宿主細胞もまた、本発明の範囲に含まれる。宿主細胞は、原核生物であっても、また、真核生物であってもよい。真核生物である場合には、宿主細胞は哺乳動物細胞であっても、昆虫細胞であっても、また、酵母細胞であってもよい。原核生物である場合には、宿主細胞は、通常は細菌細胞である。

30

【0124】

組み換え DNA での宿主細胞の形質転換は、当業者に周知の従来技術によって行うことができる。宿主が原核生物 (例えば、Escherichia coli) である場合には、DNA を取り込むことができるコンピテント細胞を、指数増殖期の後に回収された細胞から調製することができる。続いて、当該分野で周知の手順によって CaCl₂ 法によって処理することができる。あるいは、MgCl₂ または RbCl を使用することもできる。形質転換はまた、宿主細胞のプロトプラストを形成させた後に、またはエレクトロポレーションによって行うこともできる。

40

【0125】

宿主が真核生物である場合には、リン酸カルシウム共沈のような DNA のトランスフェクションの方法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リボソームの中に含まれるプラスミドの挿入のような従来 of 機械的手順、あるいはウイルスベクターを使

50

用することができる。

【0126】

様々な宿主発現ベクターシステムを、亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合コード配列を発現させるために利用することができる。これには、以下のような微生物が含まれるが、これらに限定されない：亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合ポリペプチドコード配列を含む組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌；亜鉛フィンガーヌクレオチド結合コード配列を含む組み換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母；組み換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染させられたか、または、亜鉛フィンガーに由来するDNA結合コード配列を含む組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞システム；亜鉛フィンガー・ヌクレオチド結合コード配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させられた昆虫細胞システム；あるいは、亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合コード配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス）に感染させられた動物細胞システム、または、安定な発現のために操作された形質転換された動物細胞システム。グリコシル化が重要であり得るような場合には、翻訳による修飾および翻訳後修飾を提供する発現システム（例えば、哺乳動物、昆虫、酵母、または植物発現システム）が使用され得る。

10

20

【0127】

利用される宿主/ベクターシステムに応じて、任意の多数の適切な転写および翻訳エレメント（構成的プロモーターおよび誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどが含まれる）が、発現ベクターの中で使用され得る（例えば、Bitterら、Methods in Enzymology, 153: 516-544, 1987を参照のこと）。例えば、細菌システムのクローニングの場合には、誘導性プロモーター（例えば、バクテリオファージのpL、pLac、ptrp、ptac（ptrp-lacハイブリッドプロモーター）など）が使用され得る。哺乳動物細胞システムのクローニングの場合には、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、レトロウイルス長末端反復；アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）が使用され得る。組み換えDNAまたは合成技術によって得られるプロモーターもまた、挿入された亜鉛フィンガー・ヌクレオチド結合ポリペプチドをコードする配列の転写を提供するために使用され得る。

30

40

【0128】

細菌システムにおいては、多数の発現ベクターを、発現させられた亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合ポリペプチドについて意図される用途に応じて、有利であるように選択することができる。例えば、大量に生産される場合には、容易に精製することができる融合タンパク質産物の高レベルの発現を指示するベクターが所望され得る。タンパク質の回収を補助する切断部位が含まれるように操作されているものが好ましい。そのようなベクターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Escherichia coli発現ベクターpUR278（Rutherfordら、EMBO J., 2: 1791, 1983）（ここで、亜鉛フィンガーヌクレオチド結合タンパク質コード配列を、lacZコード領域とインフレームとなるようにベクターの中に連結することができ、その結果、ハイブリッド亜鉛フィンガー-lacZタンパク質が生産される）；pINベクター（Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109, 1985；Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509, 1989）など。

【0129】

酵母においては、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターが含まれる多数のベクターを使用することができる。概要については、Current Protocols

50

in Molecular Biology, 第2巻, 1988, Ausubelら編、Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 第13章; Grantら、1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Wu & Grossman編, 31987, Acad. Press, N.Y., 第153巻, pp. 516 - 544; Glover, 1986, DNA Cloning, 第II巻, IRL Press, Wash., D.C., 第3章; および Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Berger & Kimmel編, Acad. Press, N.Y., 第152巻, pp. 673 - 684; ならびに、The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, 1982, Strathernら編, Cold Spring Harbor Press, 第I巻およびII巻を参照のこと。構成的な酵母プロモーター(例えば、ADHまたはLEU2)、あるいは誘導性プロモーター(例えば、GAL)を使用することができる(Cloning in Yeast, 第3章, R. Rothstein In: DNA Cloning 第11巻, A Practical Approach, DM Glover編, 1986, IRL Press, Wash., D.C.)。あるいは、酵母の染色体の中への外来DNA配列の組み込みを促進するベクターが使用され得る。

10

20

30

40

50

【0130】

植物発現ベクターが使用される場合には、亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドをコードする配列の発現は、多数のプロモーターのうちのいずれかによって駆動させることができる。例えば、ウイルスプロモーター(例えば、CaMVの35S RNAおよび19S RNAプロモーター(Brissonら、Nature, 310: 511 - 514, 1984))、またはTMVの外殻タンパク質プロモーター(Takamatsuら、EMBO J., 6: 307 - 311, 1987)を使用することができる。あるいは、RUBISCOの小さいサブユニット(Coruzziら、EMBO J. 3: 1671 - 1680, 1984; Broglieら、Science 224: 838 - 843, 1984); または熱ショックプロモーター(例えば、ダイズhsp17.5 - Eもしくはhsp17.3 - B(Gurleyら、Mol. Cell. Biol., 6: 559 - 565, 1986)のような植物プロモーター使用することができる。これらの構築物は、Tiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接のDNA形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを使用して植物細胞に導入することができる。そのような技術の概要については、例えば、Weissbach & Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, 第VII章, pp. 421 - 463, 1988; および Grierson & Corey, Plant Molecular Biology, 第2版, Blackie, London, 第7 - 9章, 1988を参照のこと。

【0131】

本発明のタンパク質を発現させるために使用することができる別の発現システムは昆虫システムである。1つのそのようなシステムにおいては、Autographa californica核多角体病ウイルス(ACNPV)が、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。このウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞の中で増殖する。亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドをコードする配列は、ウイルスの必須ではない領域(Spodoptera frugiperda、例えば、ポリヘドリン遺伝子の中)にクローニングすることができ、ACNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置くことができる。亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドをコードする配列の挿入がうまくできていれば、ポリヘドリン遺伝子の不活化が生じ、非閉塞組み換えウイルス(すなわち、ポリヘドリン遺伝子に

よってコードされるタンパク質様の外殻を含まないウイルス)が生産される。これらの組み換えウイルスは、その後、挿入された遺伝子がその中で発現させられる細胞を感染させるために使用される(例えば、Smithら、J. Biol. 46:584, 1983; Smith, 米国特許第4,215,051号を参照のこと)。

【0132】

真核生物システム(および好ましくは、哺乳動物発現システム)により、発現させられた哺乳動物タンパク質の適切な翻訳後修飾を行うことが可能である。したがって、真核生物細胞(例えば、一次転写物の適切なプロセッシング、グリコシル化、リン酸化、および遺伝子産物の有利な分泌のための細胞性の機構を有する哺乳動物細胞)が、亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合ポリペプチドの発現のための好ましい宿主細胞である。そのような宿主細胞株としては、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、およびWI38を挙げることができるが、これらに限定されない。

10

【0133】

発現を指示する組み換えウイルスまたはウイルスエレメントを利用する哺乳動物細胞システムを操作することができる。例えば、アデノウイルス発現ベクターが使用される場合には、亜鉛フィンガーに由来するポリペプチドのコード配列を、アデノウイルスの転写/翻訳制御複合体(例えば、後期プロモーターおよび三成分リーダー配列)に連結させることができる。このキメラ遺伝子は、その後、インビトロまたはインビボでの組み換えによってアデノウイルスのゲノムの中に挿入することができる。ウイルスゲノムの必須ではない領域(例えば、E1またはE3領域)への挿入によっては、生存可能であり、感染させられた宿主の中で亜鉛フィンガーポリペプチドを発現することができる組み換えウイルスが得られる(例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659, 1984を参照のこと)。あるいは、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーターを使用することができる(例えば、Mackettら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7415-7419, 1982; Mackettら、J. Virol. 49:857-864, 1984; Panicaliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:4927-4931, 1982を参照のこと)。染色体外エレメントとして複製する能力を有するウシバビロームウイルスをベースとするベクターが、具体的な目的である(Sarverら、Mol. Cell. Biol. 1:486, 1981)。このDNAのマウス細胞への侵入の直後に、プラスミドは、細胞1個あたり約100から200コピーに複製する。挿入されたcDNAの転写には、宿主の染色体へのプラスミドの組み込みは必要なく、それによって高レベルの発現が生じる。これらのベクターは、プラスミドの中に選択マーカー(例えば、neo遺伝子)を含めることによって安定な発現のために使用することができる。あるいは、レトロウイルスのゲノムは、宿主細胞の中に亜鉛フィンガーヌクレオチド結合タンパク質遺伝子を導入し、その中でその発現を指示することができるベクターとしての使用のために修飾することができる(Cone & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349-6353, 1984)。高レベルの発現はまた、誘導性プロモーター(メタロチオネインIIAプロモーターおよび熱ショックプロモーターが含まれるが、これらに限定されない)を使用して行うこともできる。

20

30

40

【0134】

長期間にわたる多量の組み換えタンパク質の生産のためには、安定な発現が好ましい。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターが使用されるよりもむしろ、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)によって制御されるcDNA、および選択マーカーで形質転換することができる。組み換えプラスミドの中の選択マーカーによっては、選択に対する耐性が付与され、細胞がそれらの染色体へプラスミドを安定に組み込むことを可能にし、その後クローニングすることができ、細胞株の中で増殖させることができる遺伝子座を形成させるために増殖させることができる。例えば、外来DNAの導入後に、操作された細胞を富化培地の中で1~2日間増殖させることができ、これらはその後、選択培地に移

50

される。多数の選択システムを使用することができ、これには、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら、Cell 11: 223, 1977)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026, 1962)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら、Cell, 22: 817, 1980) 遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。これらは、それぞれ、*tk⁻*、*hgprt⁻*、または *aprt⁻* 細胞の中で使用することができる。また、代謝物質に対する耐性を付与する遺伝子を選択のための基準として使用することができる。例えば、*dhfr* についての遺伝子 (これは、メトトレキセートに対する耐性を付与する) (Wiglerら、Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567, 1980; O'Hareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527, 1981); *gpt* (これは、ミコフェノール酸に対する耐性を付与する) (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072, 1981); *neo* (これは、アミノグリコシド G418 に対する耐性を付与する) (Colbierre-Garapinら、J. Mol. Biol., 150: 1, 1981); および *hygro* (これは、ハイグロマイシンに対する耐性を付与する) (Santerreら、Gene, 30: 147, 1984))。最近、さらに別の選択可能な遺伝子、すなわち、*trpB* (これは、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にする); *hisD* (これは、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする) (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 804, 1988); および ODC (オルニチンデカルボキシラーゼ) (これは、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤である 2 - (ジフルオロメチル) - DL - オルニチン (DFMO) に対する耐性を付与する) (McConlogue L., In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory 編, 1987) が記載された。

【0135】

本発明によって提供される微生物によって発現されたタンパク質、またはそれらの断片の単離および精製は、従来の手段によって行うことができ、これには、分取クロマトグラフィーおよび免疫学的分離 (モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体が含まれる) が含まれる。本発明で提供される抗体は、本発明の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合タンパク質と免疫反応性である。原則として様々なエピトープ特異性を有するプールされたモノクローナル抗体から構成される抗体、ならびに異なるモノクローナル抗体調製物が提供される。モノクローナル抗体は、当該分野で周知の方法によって、タンパク質の断片を含む抗原から作成される (Kohlerら、Nature, 256: 495, 1975; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, 1989)。

【0136】

VI. 薬学的組成物

別の態様においては、本発明により、以下が含まれる薬学的組成物が提供される：

- (1) 上記に記載された本発明のポリペプチド、ポリペプチド組成物、または単離されたヘptaペプチドの治療有効量；および
- (2) 薬学的に許容される担体。

【0137】

あるいは、本発明によってまた、以下が提供される。

【0138】

- (1) 上記に記載された本発明のポリペプチド、ポリペプチド組成物、または単離されたヘptaペプチドをコードするヌクレオチド配列の治療有効量；および
- (2) 薬学的に許容される担体。

【0139】

その中に有効成分が溶解させられているかまたは分散させられている薬学的組成物の調製物は、当該分野で十分に理解されている。通常、そのような組成物は、液体溶液または懸濁液、水性または非水性としてのいずれかで、滅菌の注射可能なものとして調製される。しかし、使用前に液体の中の溶液または懸濁液とするために適している固体の形態もまた調製することができる。調製物はまた、乳化させることもできる。有効成分は、薬学的に許容され、有効成分と適合性である賦形剤と共に、そして本明細書中に記載される治療方法での使用に適した量で混合することができる。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせである。加えて、所望される場合には、組成物には、有効成分の有効性を高める少量の補助物質（例えば、湿潤剤、または乳化剤、さらにはpH緩衝化剤など）を含めることができる。薬学の分野で一般的であるなお他の成分（例えば、キレート化剤、保存剤、抗微生物薬、抗酸化剤、着色剤、香味剤など）を、組成物の特性、および組成物の意図される投与経路に応じて使用することができる。

10

20

30

【0140】

本発明の薬学的組成物には、その中に成分の薬学的に許容される塩を含めることができる。薬学的に許容される塩としては、無機酸（例えば、塩酸、またはリン酸）を用いて形成させられたか、あるいは有機酸（例えば、酢酸、酒石酸、マンデル酸など）を用いて形成させられた酸付加塩（ポリペプチドの遊離のアミノ基を用いて形成されたもの）が挙げられる。遊離のカルボキシル基を用いて形成させられた塩もまた、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄）および有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど）から誘導することができる。生理学的に許容される担体は当該分野で周知である。液体担体の例は、有効成分と水以外にはいずれの物質も含まれていないか、または生理学的pH値のリン酸ナトリウムのような緩衝液、生理食塩水、もしくはそれらの両方（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水）が含まれる滅菌の水溶液である。なおさらに、水性担体には、1つ以上の緩衝塩、さらには、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムのような塩、デキストロース、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、および他の溶質を含めることができる。液体組成物にはまた、水に加えて、そして水を除く液体相も含めることができる。そのようなさらなる液体相の例は、グリセリン、植物油（例えば、菜種油）、有機エステル（例えば、オレイン酸エチル、および水-油エマルジョン）である。

【0141】

具体的には、本発明の薬学的組成物には以下を含めることができる：（1）HIV-1 tRNAプライマー結合部位、または人工的な転写因子をコードするポリヌクレオチドの少なくとも一部に結合する、そのような人工的な転写因子の治療有効量；および（2）薬学的に許容される担体。

【0142】

VII. 使用

1つの実施形態においては、本発明の方法には、TNN標的配列を含むヌクレオチド配列の発現を調節する（阻害するか、または抑制する）ためのプロセスが含まれる。この方法には、ヌクレオチドを、モチーフに結合する本発明の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドの有効量と接触させる工程を含む。ヌクレオチド配列がプロモーターである場合には、この方法には、亜鉛フィンガー-DNA結合モチーフを含むプロモーターの転写によるトランス活性化を阻害することが含まれる。用語「阻害する」は、プロモーターに動作可能であるように連結させられた構造遺伝子（例えば、亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合モチーフが含まれる）の転写の活性化のレベルの抑制を意味する。加えて、亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドは、構造遺伝子内、またはRNA配列内の標的に結合することができる。

40

【0143】

用語「有効量」には、すでに活性化されているプロモーターの脱活性化を生じる量、ま

50

たは標的ヌクレオチドを含むプロモーターの不活化を生じる量、または構造遺伝子の転写もしくはRNAの翻訳をブロックする量が含まれる。必要とされる亜鉛フィンガーに由来するヌクレオチド結合ポリペプチドの量は、既存のタンパク質/プロモーター複合体の中の天然の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合タンパク質のいずれかに置き換わるために必要な量、または、プロモーター自体との複合体を形成するために天然の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合タンパク質と競合するために必要な量である。同意に、構造遺伝子またはRNAをブロックするために必要な量は、それぞれ、RNAポリメラーゼに結合して、RNAポリメラーゼが遺伝子を通じて読み取ることをブロックする量、または翻訳を阻害する量である。好ましくは、この方法は細胞内で行われる。プロモーターまたは構造遺伝子を機能的に不活化させることによって、転写または翻訳が抑制される。標的配列を含む細胞性のヌクレオチド配列に結合するまたはそれと「接触する」ための有効量の阻害性タンパク質の送達は、本明細書中に記載される機構のうちの1つによって（例えば、レトロウイルスベクターまたはリポソームによって）、あるいは当該分野で周知の他の方法によって行うことができる。用語「調節する」は、機能の抑制、増強、または誘導を意味する。例えば、本発明の亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドは、プロモーターの中の標的配列に結合することによってプロモーター配列を調節することができ、それによって、プロモーターヌクレオチド配列に動作可能であるように連結された遺伝子の転写が増強または抑制される。あるいは、調節には、遺伝子の転写の阻害が含まれる場合がある。この場合、亜鉛フィンガー-ヌクレオチド結合ポリペプチドは構造遺伝子に結合し、DNA依存性RNAポリメラーゼが遺伝子を通じて読み取ることをブロックし、それによって遺伝子の転写が阻害される。構造遺伝子は、正常な細胞性の遺伝子である場合も、または、例えば、腫瘍遺伝子である場合もある。あるいは、調節には、転写物の翻訳の阻害が含まれる場合がある。

10

20

30

40

50

【0144】

遺伝子のプロモーター領域には、通常は構造遺伝子の5'に存在する調節エレメントが含まれる。複数の調節エレメントを、介在するヌクレオチド配列によって間隔を空けて存在させることができる。遺伝子が活性化させられる場合には、転写因子として知られているタンパク質が遺伝子のプロモーター領域に結合させられる。この集合は、酵素がDNAからRNAへと第2の遺伝子セグメントを転写することを可能にする「スイッチオン（on switch）」と似ている。ほとんどの場合には、得られるRNA分子は、特異的なタンパク質の合成のための鋳型となる。多くの場合は、RNA自体が最終産物である。

【0145】

プロモーター領域は、正常な細胞性のプロモーター、または例えば、腫瘍プロモーターであり得る。腫瘍プロモーターは、一般的には、ウイルスに由来するプロモーターである。例えば、レトロウイルスの長末端反復（LTR）が、本発明の亜鉛フィンガーポリペプチド変異体に対してそれを標的化させることができるプロモーター領域である。レンチウイルスのグループのメンバー（これには、ヒトT細胞リンパ向性ウイルス（HTLV）1および2、ならびに、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）1または2）のような病原体が含まれる）に由来するプロモーターが、本発明の亜鉛フィンガー結合ポリペプチドによる転写調節の標的とすることができるウイルスプロモーター領域の例である。

【0146】

標的TNNヌクレオチド配列は、遺伝子の転写される領域の中、または発現させられる配列タグの中に配置することができる。上記のように、標的TNN配列はまた、遺伝子の転写終結部位に隣接して配置することもできる。標的配列を含む遺伝子は、植物遺伝子、動物遺伝子、またはウイルス遺伝子であり得る。遺伝子は、真核生物遺伝子であっても、また、原核生物遺伝子（例えば、細菌遺伝子）であってもよい。動物遺伝子は、哺乳動物遺伝子（ヒト遺伝子を含む）であり得る。好ましい実施形態においては、ヌクレオチドの発現を調節する方法は、標的ヌクレオチド配列を含む細胞を、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは組成物で形質転換することによって行われる。好ましくは、コードポリヌクレオチドは、標的細胞の中での使用に適している発現ベクターの中に

含まれる。適切な発現ベクターは当該分野で周知である。

【0147】

TNN標的は、他の標的トリプレット配列との任意の組み合わせで存在し得る。すなわち、特定のTNN標的は、伸張させられたTNN配列（例えば、 $[TNN]_{2-12}$ ）の一部として、あるいは $(GNN)_{1-12}$ 、 $(ANN)_{1-12}$ 、 $(CNN)_{1-12}$ 、または $(NNN)_{1-12}$ のような任意の他の伸張型の配列の一部として存在し得る。

【0148】

具体的には、本発明には、HIV-1ウイルスの複製を阻害する方法も含まれる。この方法には、HIV-1ウイルスに感染した個体に対して、上記に記載されたような、tRNAプライマー結合部位に結合することができ、その結果、HIV-1の複製が阻害される、十分な量の本発明の人工的な転写因子を投与する工程を含む。本明細書中で使用される場合は、用語「阻害される」には、HIV-1の複製の完全な阻害またはブロックは必要ではなく、少なくとも1つの臨床的に有用な結果が得られる程度のHIV-1の複製の何らかの程度の阻害が含まれる。用語「臨床的に有用な結果」には、循環しているCD4陽性Tリンパ球の数の増加、ウイルス負荷の減少、日和見感染に対する抵抗力の増大、ならびに、活動力および満足感の増大が含まれるが、これらに限定されない。同様に、本発明にはまた、HIV-1ウイルスの複製を阻害するための方法も含まれる。これには、HIV-1ウイルスに感染した個体に対して、HIV-1の複製が阻害される程度の十分な量の本発明の人工的な転写因子をコードするポリヌクレオチドを投与する工程を含む、

10

20

【0149】

以下の実施例では本発明の好ましい実施形態が説明されるが、これらは決して、明細書および特許請求の範囲の限定ではない。

【実施例】

【0150】

（実施例1）

5'-(TNN)-3' DNA配列に対して特有の結合特異性を有する亜鉛フィンガードメインの選択および特性決定

序論

Cys₂-His₂亜鉛フィンガータンパク質は、真核生物の転写因子の中で見られる最も一般的なDNA結合モチーフの1つである。これらの亜鉛フィンガーは、2つの鎖と亜鉛の連結によって安定化させられた1つの両親媒性ヘリックスを含む小型のドメインである。ヘリックスの表面上のアミノ酸は、DNAの主溝の中の塩基と接触する。亜鉛フィンガータンパク質には、通常、DNAに沿ってタンデムに接触する複数のフィンガーが含まれる。DNA認識の態様は、原則として、認識ヘリックスに由来するアミノ酸とDNA塩基との間での1対1相互作用である。1つのフィンガーは、通常、3塩基対(bp)を認識する。これらのフィンガーは独立したモジュールとして機能するので、様々なトリプレット特異性を有するフィンガーを、より長いDNA配列の特異的認識を得るために組み合わせることができる。亜鉛フィンガードメインのこの単純なモジュール構造と、認識することができるDNA配列の幅広い多様性によって、これらは、新しいDNA結合タンパク質の設計のための魅力的なフレームワークとなる。

30

40

【0151】

DNA配列に対する予め決定された特異性を有するタンパク質を迅速に調製する能力により、広範囲の技術が可能となり得る。これは、例えば、遺伝子の発現を指示するために、または遺伝子およびゲノムを物理的に修飾するために使用することができる。遺伝子の調節のための普遍的なシステムを開発するために、多くの努力が、ポリダクチル亜鉛フィンガータンパク質をベースとする人工的な転写因子の開発に注がれている(Blancafort, P., Segal, D. J., and Barbas, C. F., 第3版(2004) Mol Pharmacol 66(6), 1361-1371; Beerli, R. R., and Barbas, C. F., 第3版(2002) Nat Biote

50

chnol 20(2), 135-141; Jantz, D., and Berg, J. M. (2004) Chem Rev. 104(2), 789-799)。そのようなシステムは、生物学およびバイオテクノロジーに相当の影響を与える可能性があり、そして、指示された遺伝子調節に基づいて疾患の処置のための新しいアプローチを付与できる可能性がある。遺伝子発現を、18塩基対(bp)の標的部に結合するポリダクチル亜鉛フィンガータンパク質をベースとする人工的な転写因子を使用して特異的に変化させることができることは、現在示されている(Blancafort, P., Segal, D. J., and Barbas, C. F., 第3版(2004) Mol Pharmacol 66(6), 1361-1371; Beerli, R. R., and Barbas, C. F., 第3版(2002) Nat Biotechnol 20(2), 135-141)。9bp程度の小さな部位の標的化もまた、クロマチン閉塞(chromatin occlusion)の助けを借りて、おそらくはある程度の調節特異性を提供することができる(Zhang, L., Spratt, S. K., Liu, Q., Johnstone, B., Qi, H., Raschke, E. E., Jamieson, A. C., Rebar, E. J., Wolffe, A. P., and Case, C. C. (2000) J Biol Chem 275(43), 33850-33860; Liu, P. Q., Rebar, E. J., Zhang, L., Liu, Q., Jamieson, A. C., Liang, Y., Qi, H., Li, P. X., Chen, B., Mendel, M. C., Zhong, X., Lee, Y. L., Eisenberg, S. P., Spratt, S. K., Case, C. C., and Wolffe, A. P. (2001) J Biol Chem 276(14), 11323-11334; Blancafort, P., Magnenat, L., and Barbas, C. F., 第3版(2003) Nat Biotechnol 21(3), 269-274)。転写調節に加えて、新規の亜鉛フィンガーDNA結合特異性は、ForkIヌクレアーゼドメインとのそれらの融合による相同組み換えを指示することにおいて多大な期待が示されている(Urnov, F. D., M. J., Lee, Y. L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D., Holmes, M. C. (2005) Nature 435(7042), 646-651; Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K., and Carroll, D. (2003) Science 300(5620), 764)。

【0152】

Cys₂-His₂型の亜鉛フィンガードメインは特有であり、それらのモジュールの性質の理由から、伸張型のDNA配列の認識について有望なタンパク質のクラスである。それぞれのドメインは、疎水性相互作用と、保存されているCys₂-His₂残基による亜鉛イオンのキレート化によって安定化させられた構造に折り畳まれたおよそ30個のアミノ酸から構成されている(Miller, J., McLachlan, A. D., and Klug, A. (1985) EMBO J. 4(6), 1609-1614; Lee, M. S., Gippert, G. P., Soman, K. V., Case, D. A., and Wright, P. E. (1989) Science (Washington, D. C., 1883-) 245(4918), 635-637)。今日までに、鉛フィンガータンパク質のこのファミリーの中で最も特性決定されているタンパク質は、マウスの転写因子Zif268である。Zif268の3個の亜鉛フィンガードメインのそれぞれは、DNA二重ヘリックスの主溝への認識ヘリックスの挿入によって、3bpのサブサイトに結合する(Pavletich, N. P., and Pabo, C. O. (1991) Science (Washington, D. C., 1883-) 252(5007), 809-817; Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekludova, L., and Pabo, C. O. (1996) Structure 4, 1171-1180)。DNA結合タンパク質の迅速な構築を容易にするため、およびタンパク質-DNA相互作用を研究するために、5'-GNN-3'およ

び 5' - ANN - 3' ファミリーの DNA 配列に結合する複数のドメインが、これまでに作成されている (Segal, D. J., Dreier, B., Beerli, R. R., and Barbas, C. F., 第 3 版. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96 (6), 2758 - 2763; Dreier, B., Segal, D. J., and Barbas, C. F., 第 3 版. (2000) J Mol Biol 303 (4), 489 - 502; Dreier, B., Beerli, R. R., Segal, D. J., Flippin, J. D., and Barbas, C. F., 第 3 版. (2001) J Biol Chem 276 (31), 29466 - 29478)。これらのドメインが、9 bp から 18 bp の標的部を特異的に認識するポリダクチル亜鉛フィンガータンパク質に集合することができるモジュール認識単位として機能することが明らかにされている。重要なのは、18 bp の部位が、ヒトまたは任意の他のゲノムの中で唯一であり得るに十分な長さであることであり、そして、そのようなタンパク質の転写特異性が、アレイ分析を使用してトランスジェニック植物およびヒト細胞の中で明らかにされている (Guan, X., Stege, J., Kim, M., Dahmani, Z., Fan, N., Heifetz, P., Barbas, C. F., 第 3 版, and Briggs, S. P. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99 (20), 13296 - 13301; Tan, S., Guschin, D., Davalos, A., Lee, Y. L., Snowden, A. W., Jouvenot, Y., Zhang, H. S., Howes, K., McNamara, A. R., Lai, A., Ullman, C., Reynolds, L., Moore, M., Isalan, M., Berg, L. P., Campos, B., Qi, H., Spratt, S. K., Case, C. C., Pabo, C. O., Campisi, J., and Gregory, P. D. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. US A. 100 (21), 11997 - 12002)。構成的な調節に加えて、核ホルモン受容体に由来するリガンド結合ドメインと特異的な結合ドメインとの融合によって、このクラスの転写因子を用いた誘導性の遺伝子調節が提供される (Beerli, R. R., Schopfer, U., Dreier, B., and Barbas, C. F., 第 3 版. (2000) J Biol Chem 275 (42), 32617 - 32627)。DNA の標的化において最終的な自由度を提供するためには、それぞれ可能な 3 bp のサブサイトを標的化するために必要である 64 種類の DNA 結合ドメインを特定することが重要である。

【0153】

亜鉛フィンガー / DNA 相互作用についての構造データが限られているので (Pavletich, N. P., and Pabo, C. O. (1993) Science (Washington, D. C., 1883 -) 261 (5129), 1701 - 1707; Kim, C. A., and Berg, J. M. (1996) Nature Structural Biology 3, 940 - 945; Fairall, L., Schwabe, J. W. R., Chapman, L., Finch, J. T., and Rhodes, D. (1993) Nature (London) 366 (6454), 483 - 487; Houbaviy, H. B., Usheva, A., Shenk, T., and Burley, S. K. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (24), 13577 - 13582; Wuttke, D. S., Foster, M. P., Case, D. A., Gottesfeld, J. M., and Wright, P. E. (1997) J. Mol. Biol. 273 (1), 183 - 206; Nolte, R. T., Conlin, R. M., Harrison, S. C., and Brown, R. S. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (6), 2938 - 2943)、新規の配列に対して高度な特異性で結合する亜鉛タンパク質の新たな設計はわずかしが成功していない (Havranek JJ, D. C., Baker D. (2004) J Mol Biol. 344 (1), 59 - 70)。Cys₂ - His₂ ファミリーの亜鉛フィンガードメインの相互作用の形式に関する結晶

学的データおよび突然変異実験によって、本発明者らは、多くのDNAサブサイトを認識するドメインの選択のためのファージディスプレイライブラリーの構築へと導かれた(Dreier, B., Beerli, R. R., Segal, D. J., Flippin, J. D., and Barbas, C. F., 第3版.(2001) J Biol Chem 276(31), 29466-29478)。Zif268/DNA複合体の分析は、DNA結合が、-1位、3位、および6位のヘリックスのアミノ酸残基の、それぞれ、3bpのDNAサブサイトの3'中央、および5'ヌクレオチドとの相互作用によって大部分が行われることを示唆していた(Pavletich, N. P., and Pabo, C. O. (1991) Science (Washington, D. C., 1883-) 252(5007), 809-817; Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekludova, L., and Pabo, C. O. (1996) Structure 4, 1171-1180)。-ヘリックスの1位、2位、および5位は、DNAのリン酸骨格と直接接触、または水によって媒介されて接触し、タンパク質の最終的な特異性についての重要な要因である。ロイシンは、通常、4位で見られ、ドメインの疎水性コアの中に包まれる。-ヘリックスの2位は、他のヘリックス残基と相互作用し、加えて、3bpのサブサイトの外側のヌクレオチドと接触することができ、それにより標的部位の重複を生じる(Segal, D. J., Dreier, B., Beerli, R. R., and Barbas, C. F., 第3版.(1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758-2763; Dreier, B., Beerli, R. R., Segal, D. J., Flippin, J. D., and Barbas, C. F., 第3版.(2001) J Biol Chem 276(31), 29466-29478; Wolfe SA, G. H., Ramm EI, Pabo CO. (1999) J Mol Biol. 285(5), 1917-1934; Isalan, M., Choo, Y., and Klug, A. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94(11), 5617-5621; Pabo C. O., Nekludova, L., (2000) J Mol Biol. 301(3), 597-624)。

【0154】

最も研究されている、新しい特異性を有するタンパク質を組み立てるための足場は、マウスの転写因子Zif268であり、これは、ヒトの転写因子Sp1と構造的に関連がある。

【0155】

図1には、マウスの転写因子Zif268の亜鉛フィンガー-DNA複合体を示す。

【0156】

両方のタンパク質の構造およびDNA結合特異性は十分に研究されている(Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekludova, L., and Pabo, C. O. (1996) Structure 4, 1171-1180; Narayan, V. A, Kriwacki, R. W., and Caradonna, J. P. (1997), J. Biol. Chem. 272, 7801-7809)。図2は、DNAの特異的な塩基と転写因子の3つのフィンガーの特異的なアミノ酸との間での相互作用に関する、転写因子Zif268のタンパク質-DNA相互作用を示す。-1位、3位、および-6位は、通常、それぞれ、塩基のトリプレットの3'中央、および5'ヌクレオチドと接触することが観察されている。-2位、1位、および5位は、多くの場合には、リン酸骨格との直接の接触、または水によって媒介される接触に関係している。4位は、通常、ロイシン残基であり、ドメインの疎水性コアの中に包まれている。2位は、他のヘリックス残基、および/またはヘリックス構造に応じた塩基と相互作用することが示されている。Zif268-DNA複合体においては、フィンガー2の2位、およびフィンガー3の2位のアスパラギン酸は、それぞれ、相補的DNA鎖上のシトシンまたはアデニンと接触する。これは、「標的部位の重複」と呼ばれる。他の亜鉛フィンガー結合タンパク質からは際立って、Zif268およびSp1は、ドメイン間での共同する結合活性

をわずかししか示さず、これにより、これらは亜鉛フィンガーの構造 - 活性の関係の研究、および新規の亜鉛フィンガードメインの設計のための魅力的なフレームワークとなっている。

【0157】

しかし、認識の構造的な詳細は、定義することはなおも困難である。DNAに特異的に結合するための、詳細に特性決定されている亜鉛フィンガードメインの選択は、これまでのところ、5' - (GNN) - 3' 標的ファミリーに集中している。この研究による詳細なアミノ酸 - 塩基相互作用についてのいくつかの情報を表1に提供する。

【0158】

成功した選択のほとんどにはこの形態の部位が含まれる。残りの48種類のトリプレットの大部分については、所望される特異性を有する数個のフィンガーしか報告されていない。これが、5' - (GNN) - 3' 標的、またはこれまでに試験されたまさに限られた標的部位に対する結合について亜鉛フィンガーの固有の優先をどの程度示すかは、未だにわかっていない。2位から隣接しているトリプレット上の隣の塩基対に対する「鎖を超えた」相互作用が、結合の特異性に影響を与え得るという事実にしたがって、亜鉛フィンガーが3個の塩基対に結合する原則として独立したモジュールであるという単純なモデルを、隣接しているフィンガーの間での相乗効果を考慮するモデルに改善した。マルチフィンガータンパク質の構築は、ドメイン間の共働の理由だけではなく、リンカー領域および亜鉛フィンガータンパク質構造の - 鎖の影響も考慮しなければならないとの理由から、依然として困難である。この実施例に報告する研究の目的は、5' - (TNN) - 3' DNA配列に特異的に結合する亜鉛フィンガードメインを選択することである。今日までには、 - ヘリックスの6位のアミノ酸による5' - ヌクレオチドの認識は、5' - グアニンのアルギニンまたはリジンとの相互作用を除き、理解されていない(表1)。

【0159】

結果

ドメインの数を増やすために、既存のファージディスプレイライブラリーを選択に使用した。このライブラリーは、これらの3フィンガータンパク質のフィンガー - 3ヘリックスの2位のアスパラギン酸が、フィンガー2標的部位での5' - グアニンまたはチミンの認識を可能にするとの理由から、5' - (GNN) - 3' に結合する亜鉛フィンガードメインについて以前に作成されたドメインであり、そして5' - (TNN) - 3' 標的部位に特異的に結合するドメインの選択に十分に適しているはずである(図2)。ファージディスプレイライブラリーの構築は、Zif268の変異体であるC7タンパク質をベースとした。2つのサブライブラリーを、ファージディスプレイベクターpComb3Hの中で構築した。NNKライブラリーには、終結コドンを除く全てのアミノ酸の組み合わせを可能にするコドンドーピングストラテジーを使用して、 - 1位、1位、2位、3位、5位、および6位でのフィンガー2の - ヘリックスのアミノ酸残基の無作為化を含め、それにより32種類のコドンの可能性を作成した。VNSライブラリーは、芳香族アミノ酸Tyr、Phe、およびTrp、さらには終結コドンを除く、 - 2位、 - 1位、1位、2位、3位、5位、および6位の無作為化によって構築し、これによってそれぞれのコドンについて24種類の可能性を残した。ライブラリーは、それぞれが5' - GCGNNNGCG - 3' (配列番号423)型の配列を認識することができる、それぞれ、4.4 × 10⁹ および3.5 × 10⁹ 個のメンバーから構成されていた。これらのサブライブラリーを増幅させ、そして選択手順のために混合した。6回のパンニングの中で、競合因子DNAの濃度を増大させ、選択圧を増大させるために、標的濃度を低下させた(表3、8、11)。最後の回のパンニングの後、それぞれの5' - (TNN) - 3' 標的部位について選択した4つのシングルクロンのDNA配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。最初のセットのパンニング(それぞれのセットは、同時に実験した6種類のDNA標的から構成される)から、5' - (TAA) - 3'、5' - (TAC) - 3'、5' - (TAG) - 3'、5' - (TAT) - 3'、および5' - (TTG) - 3' DNA標的部位に選択的に結合したコンセンサス配列を見出した。コンセンサスではない配列は、5' - (TCG

) - 3' に結合するように選択したクローンについて見られた。

【0160】

一般的には、それぞれのセットは、アミノ酸レベルでの良好な保存を示していた。5' - (TAA) - 3' に選択的に結合するドメインの場合には、分析した4つのクローンは全て、フィンガー2のヘリックス領域(-1位から6位)の中に同じアミノ酸配列を有していた。5' - (TAC) - 3' DNA 標的に結合するように選択したクローンは、1位、2位、3位、4位、5位、および6位については保存を示したが、-1位はAlaまたはSerと特定した。対照的に、5' - (GNN) - 3' - 特異的ドメインによる3' - シトシンの認識は、アミノ酸AspまたはGluによって媒介される(表1)。5' - (TAG) - 3' 配列に結合するように選択したクローンは、1位、2位、3位、54位、および6位に保存を示した。1位はLeuまたはSerであり得、そして5位はGlnまたはThrであり得る。いずれの位置も、DNA塩基との相互作用には直接は関係していなかったが、多くの場合には、リン酸骨格に対して水によって媒介されて接触していた(図2)。5' - (TAT) - 3' に結合するドメインは、1位、2位、3位、4位、5位、および6位で保存されており、一方、-1位は、AlaまたはValであることが明らかになった。5' - (GNN) - 3' サブサイトに結合するドメインについては、3' - チミンの認識は、1位のThrまたはSerによって行われていた。さらに、この実施例にいたる研究において単離された5' - (TAN) - 3' サブサイトに結合するクローンは全て、-ヘリックスの3位に保存を示し、これは中央のアデニンの認識がAsn³によって媒介されることを示している。この知見は、5' - (GNN) - 3' についての研究による結果(表1)と一致している。加えて、5' - (TTG) - 3' に結合するように選択したドメインは、1位、2位、3位、4位、5位、および6位では保存されており、一方、-1位はArgまたはGluであり得る。Arg⁻¹はまた、5' - (GNG) - 3' 標的部位に結合するドメインの全てについて以前に特性決定された3' - グアニンの認識についても強く選択された(表1)。興味深いことに、5' - (TNN) - 3' に特異的に結合するように実施例1にいたる研究において選択されたドメインは、-ヘリックスの6位において保存を示し、これは通常、3塩基対のサブサイトの中の5'ヌクレオチドの認識を媒介する。アミノ酸Thr、Ser、およびGlyは6位で同定された。Thr⁶はまた、Zif268のフィンガー-2ドメインにも存在していた(図2)が、その位置によるタンパク質/DNA複合体の構造の研究においては接触は観察されなかった。驚くべきことに、ファージディスプレイ選択によっては、5' - チミンの優先的な認識を示す数個の特異的なアミノ酸残基が生じた(図3)。

【0161】

新しく選択されたフィンガー-2ドメインを含む3フィンガータンパク質についてのコード領域を発現ベクターpMalにクローニングし、そしてXL-1ブルーに形質転換した。IPTGでの誘導後、タンパク質抽出物を調製した。これらのタンパク質の、16種類の可能性のある5' - (TNN) - 3' フィンガー-2サブサイトの全てに対する結合特異性を、マルチ標的ELISAによって実験した(図3)。全てのタンパク質が、それらの標的DNAサブサイトに対して高度な結合特異性を示した(図3)。5' - (TAC) - 3' に特異的に結合するように選択したクローンは、3' - ヌクレオチドの認識に関与しているフィンガー2の-1位(SerまたはAla)だけが異なっていた。研究したクローンはいずれも、5' - (TAA) - 3' および5' - (TAT) - 3' DNA 標的とわずかな交差反応性を示した。5' - (TAG) - 3' DNA 標的について選択したクローンは、フィンガー2の1位(LeuまたはSer)および5位(GlnまたはThr)が異なっていた。いずれの残基も、通常は、DNA塩基との接触には関与していないので、これらのヘリックスが異なるDNA結合の優先性を示したことは驚くべきことであった。クローンTAG-3d-2は、中央のヌクレオチドの区別なく、5' - (TNG) - 3' 標的部位に結合する。クローンTAG-3c-2は、標的に対して高い特異的結合を示した。5' - (TAT) - 3' に結合するように選択したクローンはいずれも、-1位(AlaまたはVal)、5位(ArgまたはLys)、および6位(ThrまたはSe

r)においてフィンガー2のアミノ酸配列が異なっていた。これらが、全ての場合において高度に保存的であるアミノ酸置換であり、そしていずれのクローンも、これらの位置で類似するアミノ酸側鎖についての選択を示すことに留意されたい(疎水性については-1位、塩基性については5位、そして極性の電荷を有していない残基については6位)。興味深いことに、いずれのクローンも、それらの標的部位に対する結合を優先するが、OD₄₀₅値によって概算される親和性は比較的強く、そして-1位がValである場合(クローン4d-2)には、3'-ヌクレオチドの認識にはほとんど区別がない。5'-(T T G)-3' DNA 標的に結合させるために選択したクローンは、5'-(T A G)-3'に対してはわずかな交差反応性を示し、5'-(T G G)-3'に対しては、より少ない交差反応性を示した。同様の効果が、5'-(G N G)-3'結合タンパク質の選択についても観察された。2回目のパンニングのセットには、DNA 標的5'-(T C A)-3'、5'-(T C C)-3'、5'-(T C T)-3'、5'-(T G A)-3'、5'-(T G C)-3'、および5'-(T C G)-3'を含めた。なぜなら、フィンガー2の-ヘリックスについてのコンセンサス配列が、1回目のパンニング手順の後には、これらの標的については見られなかったからである。6回の選択の後に、それぞれのプールに由来する4個のシングルクローンを、DNA 配列決定、および-ヘリックスの中のアミノ酸残基の予想によって分析した。いずれのセットも、それらの選択したフィンガー-2ドメインのコンセンサス配列を示さなかった。驚くべきことに、ポジティブ対照である5'-(T G A)-3'の選択についてもなお、コンセンサス配列は見られなかった。このDNA サブサイトに結合するドメインは以前の研究において特性決定されており、これは、さらに特異的なクローンを単離する試みのために本明細書中で使用した。2回目のパンニングのセットからいずれのドメインも単離できなかった1つの理由としては、選択した比較的高い選択圧であった可能性がある(表8)。したがって、低い競合因子の濃度を用いて、これらの標的についてのパンニング手順を繰り返した。非常に穏やかな選択圧を用いても、それらの標的DNA に特異的に結合するドメインは単離されず、また、アミノ酸のレベルでの保存は全く示されなかった(表10~12)。

【0162】

まとめ

この実施例で報告した研究は、5'-(T N N)-3' DNA 標的に対して結合特異性を有する新しい亜鉛フィンガードメインの選択を目的とした。

【0163】

D7タンパク質に基づいて構築されたファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより、5個の新しいフィンガー-2ドメインが、5'-(T A A)-3'、5'-(T A C)-3'、5'-(T A G)-3'、5'-(T A T)-3'、および5'-(T T G)-3' DNA 標的部位に選択的に結合することを見出した。新しく選択したドメインのアミノ酸配列は、以前に報告された亜鉛フィンガードメインのアミノ酸配列と、特に、-1位のGlnによる3'-アデニン、3位のAspによる中央のアデニン、および-1位のArgによる3'-グアニンの認識について、強い相同性が明らかである(表1)。この相同性は、5'-(T N N)-3'の形態の亜鉛フィンガードメイン結合配列については知られていなかった。さらに、新しいフィンガー-2ドメインの分析により、5'-チミンを有するヘリックス領域の中の6位の可能性のある相互作用パターンについてのさらなる知見が導かれた。これらの結果に基づくと、5'-チミンの認識は、おそらく、Ser、Thr、またはGlyによって行われる。

【0164】

実験

1. ライブラリーの増幅

選択は、C7タンパク質(Zif268の誘導体)のフィンガー2の6個のアミノ酸が無作為化されたファージディスプレイライブラリーに基づいた。このライブラリーを、PCRによって無作為化したDNA断片をファージディスプレイベクターpComb3Hの中にクローニングし、そしてEscherichia coliに形質転換することによ

って作成した。ライブラリーには、 10^9 のメンバーが含まれていた。

【0165】

ファージライブラリーを、 OD_{600} が約1.0のE. coli (ER2537)の10 mlの培養物(SB培地)を10 μ lのファージライブラリーに感染させることによって増幅させた。50 μ g/mlのカルベニシリンを含む10 mlのSBを、37 で1時間の震盪後に添加した。2 mlのヘルパーファージ(VCSM13; 約 10^{13} cfu/ml)をさらに1時間の後に添加し、そして、培養物を、50 μ g/mlのカルベニシリンと90 μ MのZnCl₂を含む200 mlの新しいSB培地に移した。37 で2時間の震盪の後、カナマイシンを70 μ g/mlとなるように添加した。培養物を37 で一晩インキュベートした。翌朝、ファージをPEG/NaCl調製によって調製し、プールし、そして1つのセットあたり6種類の異なるDNA標的に対するパンニングに使用した。漸増量の競合因子DNAを用いた標的結合ファージの選択を6回行った(表4、8、11)。

10

【0166】

2. 選択手順

ファージの調製のために、一晩培養物を5,000 rpmで20分間、Beckman J2-HS遠心分離機の中のJLA-10.5ローターの中で、遠心分離した。培養上清からファージを、4%のPEG 8000、および0.5 MのNaClを用いて、氷上で30分間沈殿させた。混合物を9,000 rpmでさらに30分間遠心分離した。上清を廃棄し、そしてファージペレットを風乾(10~20分間)させた。ファージペレットを、5 mMの新鮮なDTTを含む1%のBSA/亜鉛緩衝液A(10 mMのTris、pH 7.5; 90 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、90 μ MのZnCl₂)の中に再度懸濁させ、0.2 μ MのCA-膜/CF-プレフィルターシリンジフィルター(CA-membrane/CF-prefilter syringe filter)を通して滅菌濾過した。これらの「投入(input)」ファージの力価を、段階希釈、および $OD_{600} = 1.0$ のER2537の接種によって決定した。ファージ調製物は、10 μ lの2%NaN₃を加えた後、4 で保存した。

20

【0167】

100 μ lのこれらのファージ調製物を、標的オリゴヌクレオチドに対する結合反応に使用した。結合反応は、500 μ lの容量の、5 mMの新鮮なDTT、非特異的競合因子としての切断したニシンの精子DNA、および様々な濃度の競合因子オリゴヌクレオチドを含む亜鉛緩衝液A中の1%のBlottoの中で行った(表4、8、11)。Blotto、5 mMの新鮮なDTT、切断したニシンの精子DNA、競合因子オリゴヌクレオチドを含む亜鉛緩衝液A、およびファージ調製物を一緒に混合し、そして4 で1時間(または室温で30分間)、一定速度で穏やかに混合しながらインキュベートした。その後、標的オリゴヌクレオチドを加え、4 で一晩(または室温で3時間)、インキュベーションを続けた。50 μ lのストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズ(Dynal)を、500 μ lの、亜鉛緩衝液A中の1%のBSAで2回洗浄し、その後、500 μ lの、亜鉛緩衝液A中の5%のBlottoで、一定速度で穏やかに混合しながら4 また一晩(または室温で3時間)ブロックした。

30

40

【0168】

ブロック溶液を廃棄し、全量の結合反応混合物で置き換えた。ビオチニル化された標的オリゴヌクレオチドのストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズへの結合を、一定速度で穏やかに混合しながら、4 で1時間行った。ビーズを、5 mMの新鮮なDTTを含む亜鉛緩衝液A中の2%のTweenで、穏やかに混合しながら10回洗浄した。最後の洗浄工程には、亜鉛緩衝液A(5 mMのDTT)を使用して界面活性剤を除去した。DNAが結合したファージを、25 μ lの、亜鉛緩衝液A中の10 mg/mlトリプシンを添加して、室温で30分間、磁気ビーズから溶出させた。タンパク質分解を、75 μ lのSB培地の添加によって停止させた。

【0169】

50

100 μ l の溶出混合物を使用して、 $OD_{600} = 1.0$ の SB 中の、5 ml の E R 2 537 E. coli 細胞を感染させた。37 で30分のインキュベーションの後、50 μ g/ml のカルベニシリンを含む5 ml の SB を添加した。この工程では、10 μ l の反応混合物を取り出し、そして「出力 (output)」ファージの数を決定するために、100 μ l の SB 培地と混合した (表3、7、および10)。細胞を、50 μ g/ml のカルベニシリンを含む LB プレート上に段階希釈でプレートした。30分後、1 ml のヘルパーファージを添加し、全混合物を、50 μ g/ml のカルベニシリンと90 μ M の $ZnCl_2$ を含む、100 ml の新鮮な、予め温めておいた SB 培地を含む遠心分離管に移した。1.5時間後、カナマイシンを70 μ g/ml になるように添加した。培養物を37で一晩インキュベートした。

10

【0170】

DNA の単離

最後の回のパンニングの後、細菌ペレットを、10 ml の P1 緩衝液 (QIAprep Spin Miniprep Kit 250, QIAGEN Inc.) に再度懸濁させた。500 μ l のこの懸濁液を、このキットを使用して DNA を調製するために使用した。残りの容量は20 で保存した。1.5 μ g の単離した DNA を、200 ng の Omp seq GTG プライマーと混合し、そして配列を分析した。

【0171】

ELISA アッセイのための pMal - 融合タンパク質の細菌抽出物

選択した亜鉛フィンガータンパク質を、発現のために pMal ベクター (New England Biolabs) にクローニングした。構築物を、エレクトロポレーションにより E. coli XL1-Blue 株に導入し、50 μ g/ml のカルベニシリンを含む LB プレート上に画線した。それぞれの変異体の4個のシングルコロニーを、50 μ g/ml のカルベニシリンと1%のグルコースを含む3 ml の SB 培地に植菌した。培養物を37で一晩増殖させた。1.2 ml の培養物を、50 μ g/ml のカルベニシリン、0.2%のグルコース、90 μ g/ml の $ZnCl_2$ を含む20 ml の新鮮な SB 培地に移し、37でさらに2時間増殖させた。IPTG を、0.3 mM の最終濃度になるように添加した。インキュベーションを2時間続けた。培養物を、Beckman GPR 遠心分離機の中で3500 rpm で、4 で5分間、遠心分離した。細菌ペレットを、5 mM の新鮮な DTT を含む1.2 ml の亜鉛緩衝液 A の中に再度懸濁させた。タンパク質抽出物を、凍結/解凍手順によって、ドライアイス/エタノールと温水を使用して単離した。この手順を6回繰り返した。試料を4 で5分間、Eppendorf 遠心分離機の中で遠心分離した。上清を清潔な1.5 ml の遠心分離管に移し、そして ELISA アッセイに使用した。

20

30

【0172】

ELISA アッセイ

PBS 中の0.2 μ g/25 μ l の濃度のストレプトアビジンを、96 ウェル ELISA プレート (Costar 3690, high binding, Corning, Inc.) の個々のウェルに添加し、その後、37 で1時間 (または4で一晩) インキュベートした。プレートを、水で2回洗浄し、その後、PBS 中の0.025 μ g/25 μ g のビオチニル化されたオリゴヌクレオチド、または BSA 対照については PBS だけを添加し、そして37 で1時間インキュベートした。プレートを水で2回洗浄した。ブロック反応については、それぞれのウェルを (濾過した) PBS 中の3%の BSA で満たし、そして37 で1時間インキュベートした。BSA を除去し、25 μ l の細菌抽出物またはファージ懸濁液をウェルに添加した。37 で1時間のインキュベーションの後、プレートを水で10回洗浄した。- MBP 抗体をウェルに添加し、続いて、- m - alk Phos 抗体 (pMal - 融合タンパク質について; PBS 中に1:1000に希釈した)、または西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させられた - M13 mAb (Pharmacia) (ファージ懸濁液について; PBS 中に1:5000に希釈した) をそれぞれのウェルに添加し、37 で1時間インキュベートした。プレートを水で10回洗浄

40

50

した。 - m - a l k P h o s A b については $25 \mu\text{l}$ のアルカリホスファターゼ基質溶液 (S i g m a) を、また、 (- M 1 3 m A b については) $25 \mu\text{l}$ の A B T S 基質を、それぞれのウェルに添加した。インキュベーションを室温で行った。それぞれのウェルの OD_{405} を、通常は、20分および60分の時点で決定した。

【 0 1 7 3 】

【 表 3 】

表3: 5' - T N N - 3' C 7 . L i b S e t 1 のパンニングチャート

投入ファージ		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
VNS NNK	1.2xE10 1.3xE10						
1-TAA			2.0xE11	5.2xE12	2.7xE12	2.1xE12	2.3xE12
2-TAC			4.8xE11	4.0xE12	2.4xE12	1.2xE12	3.9xE12
3-TAG			5.1xE11	1.0xE13	1.7xE12	1.4xE12	5.1xE11
4-TAT			1.7xE11	3.6xE12	2.4xE12	1.2xE12	6.9xE12
5-TCG			3.4xE11	4.2xE12	2.8xE12	7.8xE11	1.0xE12
6-TTG			4.0xE11	6.8xE12	3.2xE12	1.0xE12	3.6xE11
出力ファージ							
1-TAA		1.1xE6	6.5xE5	3.4xE5	8.6xE6	4.5xE7	1.5xE8
2-TAC		1.2xE6	8.5xE5	5.3xE5	5.0xE5	7.9XE5	2.9xE7
3-TAG		1.7xE6	1.1xE6	6.7xE6	1.2xE8	8.5xE7	2.3xE8
4-TAT		1.1xE6	9.0xE5	4.2xE5	5.2xE5	3.4xE6	1.1xE8
5-TCG		4.6xE5	1.3xE6	4.6xE5	2.5xE5	1.2xE5	4.5xe5
6-TTG		1.3xE6	8.7xE5	3.5xE5	1.8xE6	1.9xE7	1.3xE8

10

20

【 0 1 7 4 】

【表 4】

表 4: (C7-TNN) Set 1 のパンニングのための競合因子／標的濃度

	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
標的	0.4 μ g	0.4 μ g	0.4 μ g	0.4 μ g	0.2 μ g	0.2 μ g
ニシンの精子 DNA	20 μ g	20 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g
XNN競合因子						
ANN CNN GNN TNN 特異的競合因子		0.128 μ g 0.128 μ g 0.064 μ g / 1:50	0.256 μ g 0.256 μ g 0.128 μ g / 1:25	0.256 μ g 0.256 μ g 0.128 μ g / 1:25	0.256 μ g 0.256 μ g 0.128 μ g / 1:12.5	1.024 μ g 1.024 μ g 0.512 μ g / 1:0.3125
TNN (一標的)	/	0.32 μ g 1:20	0.64 μ g 3-TAG 0.32 μ g 1:10	1.28 μ g 1:5	1.28 μ g 3-TAG 0.256 μ g 1:2.5	1.6 μ g 3-TAG 5.18 μ g 1:1.25
GGG (WT) TAG競合因子	0.64 μ g /	1.28 μ g /	2.56 μ g /	2.56 μ g 0.01 μ g in 1,2,4	2.56 μ g 0.01 μ g in 1,2,4	2.56 μ g 0.01 μ g in 1 0.05 μ g in 2,4

10

20

【 0 1 7 5 】

30

【表 5】

表 5: pCombの6回目のTNN set 1のパニング

配列 #	クローン #	アミノ酸配列
bk007 bk008 bk009 bk010	TAA-1a TAA-1b TAA-1c TAA-1d	QASNLIS QASNLIS QASNLIS QASNLIS
bk011 bk012 bk013 bk014	TAC-2a TAC-2b TAC-2c TAC-2d	ARGNLKS SRGNLKS SRGNLKS ARGNLKS
bk015 bk016 bk017 bk018	TAC-3a TAC-3b TAC-3c TAC-3d	RLDNLQT RLDNLQT RLDNLQT RSDNLTT
bk019 bk020 bk021 bk022	TAT-4a TAT-4b TAT-4c TAT-4d	ARGNLRT ARGNLRT ARGNLRT VRGNLRT
bk023 bk024 bk025 bk026	TCG-5a TCG-5b TCG-5c TCG-5d	RLRALDR 不明 不明 DMGALEA
bk027 bk028 bk029 bk030	TTG-6a TTG-6b TTG-6c TTG-6d	RKDALRG RKDALRG EKDALRG RKDALRG

10

20

30

【 0 1 7 6 】

【表 6】

表 6: pMAL-サブクローン

配列 #	クローン #	アミノ酸配列
bk031	TAA-1a-2	不明
bk042	TAC-2c-2	SRGNLKS
bk045	TAC-2d-2	ARGNLKS
bk033	TAG-3c-2	RLDNLQT
bk034	TAG-3d-2	RSDNLTT
bk035	TAT-4d-2	VRGNLKS
bk036	TTG-6c-2	RKDALRG
bk037	TTG-6d-2	RKDALRG
bk038	TAA-1a-2	QASNLIS
bk039	TAC-2d-7	RSDNLTT
bk040	TAT-4c-8	ARGNLRT

10

20

【0177】

【表 7】

表 7: 5'-TNN-3' C7. Lib Set 2 のバンニングチャート

投入ファージ		1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	5 回目	6 回目
VNS NNK	E10 E10						
1- TCA			1.0xE12	1.4xE12	1.0xE12	1.3xE12	2.3xE12
2- TCC			1.9xE12	3.5xE12	7.5xE11	1.7xE12	3.9xE12
3- TCG			2.6xE12	1.9xE12	1.0xE12	1.0xE12	5.1xE11
4- TCT			6.3xE12	4.3xE11	1.0xE12	1.3xE12	6.9xE13
5- TGA			1.9xE12	1.2xE13	6.1xE11	1.9xE12	1.0xE12
6- TGC			7.2xE12	4.3xE12	1.1xE12	2.5xE12	3.6xE11
出力ファージ							
1- TCA		1.5xE6	1.4xE6	2.8xE6	-	8.4xE5	1.5xE8
2- TCC		9.5xE5	1.3xE6	3.9xE6	7.6xE5	1.6xE6	2.9xE7
3- TCG		3.3xE6	1.2xE6	1.5xE6	1.2xE6	4.3xE5	2.3xE8
4- TCT		1.7xE6	6.6xE5	3.1xE6	1.4xE6	6.4xE5	1.1xE8
5- TGA		7.9xE5	2.3xE6	8.7xE5	1.5xE6	1.2xE6	4.5xE5
6- TGC		5.6xE5	9.3xE5	2.6xE6	1.2xE6	5.7xE5	1.3xE8

30

40

【0178】

【表 8】

表 8: (C7-TNN) Set 2 のパンニングのための競合因子／標的濃度

	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
標的 ニシンの精子 DNA	0.4 µg 20 µg	0.4 µg 20 µg	0.4 µg 10 µg	0.4 µg 10 µg	0.2 µg 10 µg	0.2 µg 10 µg
XNN 競合因子						
ANN	0.128 µg	0.256 µg	0.521 µg	2.520 µg	5.120 µg	5.120 µg
CNN	0.128 µg	0.256 µg	0.521 µg	2.520 µg	5.120 µg	5.120 µg
GNN	0.064 µg	0.128 µg	0.256 µg	0.521 µg	2.560 µg	2.560 µg
TNN	/	/	/	/	/	/
	1:50	1:25	1:12.5	1:6.25	1:3.125	1:1.56
特異的競合 因子						
But TCG	0.16 µg	→	→	→	→	→
TNN (一標的)	/	0.32 µg	1.28 µg	2.52 µg	10.04 µg	10.04 µg
		1:20	1:5	1:1.25	1:0.315	1:0.156
GGG (WT)	0.64 µg	1.28 µg	2.56 µg	2.56 µg	2.56 µg	2.56 µg
追加の競合 因子						
TAG 3	0.01 µg	0.05 µg	0.1 µg	0.4 µg	0.8 µg	1 µg
TGG 3		0.01 µg	0.02 µg	0.1 µg	0.2 µg	0.5 µg
TCA 3			0.02 µg	0.05 µg	0.2 µg	0.5 µg
TCC 3			0.02 µg	0.05 µg	0.2 µg	0.5 µg
TCG 1						0.5 µg
TCT 2			0.02 µg			0.5 µg
TGA						

10

20

30

【 0 1 7 9 】

【表 9】

表9: pCombの6回目のTNN set 2のパニング

配列 #	クローン #	アミノ酸配列
bk054 bk055 bk056 bk057	TCA-1a TCA-1b TCA-1c TCA-1d	RSDHLTT RSDHLTT 不明 AQQLMW
bk058 bk059 bk060 bk061	TCC-2a TCC-2b TCC-2c TCC-2d	不明 RSDERKR DYQSLRQ CFSRLVR
bk062 bk063 bk064 bk065	TCG-3a TCG-3b TCG-3c TCG-3d	GDGGLWE 不明 LQRPLRG QGLACAA
bk066 bk067 bk068 bk069	TCT-4a TCT-4b TCT-4c TCT-4d	フィンガー2および3がない WVGWLGS RLRDIQF GRSQLSC
bk070 bk071 bk072 bk073	TGA-5a TGA-5b TGA-5c TGA-5d	GWQRLLT SGRPLAS 不明 APRLLGP
bk074 bk075 bk076 bk077	TGC-6a TGC-6b TGC-6c TGC-6d	不明 APKALGW SVHELQG AQAALSW

10

20

30

【 0 1 8 0 】

【表 10】

表10: 5' -TNN-3' C7. Lib Set 2のパニングチャート/2回目

投入ファージ		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
VNS NNK	E10 E10						
1- TCA			1.5xE12	1.3xE12	2.5xE12	3.8xE12	1.4xE12
2- TCC			1.6xE12	1.8xE12	1.7xE11	1.2xE12	1.6xE12
3- TCG			7.1xE11	9.8xE11	1.8xE12	1.3xE12	2.0xE12
4- TCT			9.4xE11	1.2xE12	1.9xE12	1.8xE12	1.6xE13
5- TGA			1.5xE12	1.2xE12	1.5xE12	8.4xE11	1.7xE12
6- TGC			9.4xE12	7.6xE11	1.5xE12	6.8xE11	1.2xE12
出力ファージ							
1- TCA		4.2xE6	3.6xE6	5.9xE5	1.1xE6	2.7xE6	1.5xE6
2- TCC		1.4xE6	5.4xE6	5.2xE5	8.3xE5	2.5xE6	1.1xE6
3- TCG		2.1xE6	5.5xE6	1.1xE6	3.7xE5	2.2xE6	6.6xE6
4- TCT		7.6xE5	5.1xE6	8.8xE5	2.2xE6	1.2xE6	1.5xE6
5- TGA		1.1xE6	2.5xE6	4.7xE5	7.6xE5	1.5xE6	1.1xE6
6- TGC		1.2xE6	1.4xE6	5.4xE5	7.4xE5	1.3xE6	1.4xE6

10

【0181】

20

【表 1 1】

表 1 1: (C7-TNN) Set 2 のパンニングのための競合因子／標的濃度／2回目

	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
標的	0.4 μ g	0.4 μ g	0.4 μ g	0.2 μ g	0.2 μ g	0.2 μ g
ニシンの精子 DNA	20 μ g	20 μ g	20 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g
XNN競合 因子						
ANN	0.128 μ g	0.256 μ g	0.521 μ g	0.521 μ g	1.240 μ g	2.480 μ g
CNN	0.128 μ g	0.256 μ g	0.521 μ g	0.521 μ g	1.240 μ g	2.480 μ g
GNN	0.064 μ g	0.128 μ g	0.256 μ g	0.256 μ g	0.512 μ g	1.240 μ g
TNN	/	/	/	/	/	/
	1:50	1:25	1:12.5	1:6.25	1:3.125	1:1.56
特異的競合 因子						
but TCG	0.16 μ g	→	→	→	→	→
TNN (一標的)	/	0.32 μ g 1:20	0.64 μ g 1:10	0.64 μ g 1:5	1.92 μ g 1:1	9.6 μ g 1:0.2
GGG (WT)	0.64 μ g	1.28 μ g	2.56 μ g	2.56 μ g	2.56 μ g	2.56 μ g
追加の競合 因子						
TTA						0.02 μ g
TTC						0.02 μ g
TAG 3				0.01 μ g	0.1 μ g	0.04 μ g
TTG 3				0.01 μ g	0.1 μ g	0.04 μ g
TTT 1						0.02 μ g
TAC 2						0.02 μ g

【 0 1 8 2 】

【表 12】

表 12 : pComb の 6 回目の TNN set 2 のパンニング / 2 回目

配列 #	クローン #	アミノ酸配列
bk078 bk079 bk080 bk081	TCA-1a TCA-1b TCA-1c TCA-1d	GANALRR QSLLLGA RSDHLTT HRGTLGG
bk082 bk083 bk084 bk085	TCC-2a TCC-2b TCC-2c TCC-2d	QVGLLAR GARGLRG DKHMLDT DLGGLRQ
bk086 bk087 bk088 bk089	TCG-3a TCG-3b TCG-3c TCG-3d	QCYRLER QCYRLER QCYRLER QCYRLER
bk090 bk091 bk092 bk093	TCT-4a TCT-4b TCT-4c TCT-4d	AEAELOQ RSDHLTT QGGVLAA RSDERKR
bk094 bk095 bk096 bk097	TGA-5a TGA-5b TGA-5c TGA-5d	不明 RSDHLTT QCRCLVT HPEALDN
bk098 bk099 bk100 bk101	TGC-6a TGC-6b TGC-6c TGC-6d	フィンガー 2 がない GRGALQA RSDHLTT LASRLQQ

10

20

30

分析した多数の垂鉛フィンガーについてのマルチ標的特異性アッセイの結果を図 3 に示す。これらは、以下である：(a) QAS-N-LIS (TAA-1a-2) (配列番号 1 ; 5' - (TAA) - 3' に結合する；(b) SRG-N-LKS (TAC-2c-2) (配列番号 2 ; 5' - (TAC) - 3' に結合する；(c) ARG-N-LKS (TAC-2d-2) (配列番号 7 ; 5' - (TAC) - 3' に結合する；(d) RLD-N-LQT (TAG-3c-2) (配列番号 3 ; 5' - (TAG) - 3' に結合する；(e) RSD-N-LTT (TAG-3d-2) (配列番号 8 ; 5' - (TAG) - 3' に結合する；(f) ARG-N-LRT (TAT-4c-8) (配列番号 4 ; 5' - (TAT) - 3' に結合する)；(g) VRG-N-KLS (TAT-4d-2) (配列番号 9 ; 5' - (TAT) - 3' に結合する)；および (h) RKD-A-LRG (TTG-6c-2) (配列番号 5 ; 5' - (TTG) - 3' に結合する)。

40

【0183】

図 4 は、作成された様々なフィンガーに対するマルチ標的特異性の結果についての第 2 のセットを示す：(a) RLD-N-LQT (配列番号 3 ; 5' - (TAG) - 3' に結合する；(b) ARG-N-LRT (配列番号 4 ; 5' - (TAT) - 3' に結合する；(c) SRG-N-LKS (配列番号 2 ; 5' - (TAT) - 3' に結合する；(d) QAS-N-LIS (配列番号 1 ; 5' - (TAA) - 3' に結合する；(e) RED-N-LHT (配列番号 6 ; 5' - (TAG) - 3' に結合する；および (f) ARG-N-LKS (配列番号 7 ; 5' - (TAT) - 3' に結合する)。

50

【0184】

(実施例2)

リンカー領域が変化している新しい無作為化された亜鉛フィンガーライブラリーの設計
序論

隣接している亜鉛フィンガーを繋ぐリンカー領域は、DNA部位に沿った複数のフィン
ガーの間隔の制御を助ける重要な構造エレメントである。最も一般的なリンカーの配置は
、1つのフィンガーの最後のヒスチジンと、次のフィンガーの最初の保存されている芳香
族アミノ酸との間に5個の残基を有する。亜鉛フィンガーのリンカーのほぼ半分は、コン
センサス配列 T G E K P (配列番号 4 1 2) に適合する T r a n s c r i p t i o n F
a c t o r D a t a b a s e の中に見られる。リンカー残基のそれぞれの構造上の役割
は、すでに研究されている(図4)。隣接するフィンガーの結合は、前のフィンガーのヘ
リックスの9位の側鎖と、続くフィンガーの骨格カルボニルまたは-2位の側鎖との間で
の接触によってさらに安定化させられる。この接触は、T G E K P (配列番号 4 1 2) リ
ンカーと関係している可能性がある。複数の亜鉛フィンガーの間でこれが起こる場合には
いつでも、前のフィンガーの2つのヒスチジンの間に、ほぼ必ず3個の残基が存在し、こ
れらのタンパク質の80%においては、9位に塩基性アミノ酸(アルギニンまたはリジン
)が存在する。この位置にアルギニンがある場合には、これは、-2位の骨格カルボニル
とフィンガー内接触を形成する。いくつかの構造においては、このアルギニンの立体構造
が、リンカーに由来するグルタミン酸との相互作用によって安定化させられることが明ら
かになっている。

10

20

【0185】

突然変異実験では、リンカー配列が高親和性のDNA結合に重要であることが明らかに
されている。いくつかの点変異によっては、DNA結合親和性の10倍~100倍の低下
が生じ、これは、インビボでは機能の欠失を引き起こし得る。NMR実験は、T G E K P
(配列番号 4 1 2) リンカーは遊離のタンパク質においては可撓性であるが、DNAに結
合するとより固くなることを示している。

【0186】

C y s₂ - H i s₂ 亜鉛フィンガータンパク質は、多くの場合には、高い親和性および
特異性で、それらの標的部位に結合する。いくつかのグループは、T G E K P (配列番号
4 1 2) に連結されたフィンガーの数が1個から2個から3個へと増加するに伴い、付随
してDNA結合親和性が増大することに注目している。3個のフィンガーを含むタンパク
質(例えば、Z i f 2 6 8 および S P 1)は、それらの好ましい配列に、通常は 10^{-8}
Mから 10^{-11} Mの間の解離定数で結合する。予想外に、T G E K P (配列番号 4 1 2)
) リンカーを使用したさらなるフィンガーの結合によっては、DNAに対する結合親和性
のさらなる増大はわずかしが得られなかった。それについての理由は完全には明らかでは
なく、この作用の根拠を理解するためにはさらなる実験が必要である。マルチフィンガー
タンパク質の中に4個以上のフィンガーが存在することによって生じる構造上、およびエ
ネルギー的な問題は、DNAに結合すると亜鉛フィンガーによって引き起こされる、DN
A分子の湾曲によって起こる可能性がある。T G E K P (配列番号 4 1 2) リンカーによ
って繋がれた亜鉛フィンガーは、DNAに結合すると、DNAのヘリックスピッチに完全
には合っていないヘリックス配置をとり、その結果、さらにフィンガーが結合されると、
さらなる立体障害が蓄積する。したがって、立体障害のネガティブエネルギーの影響によ
り、立体障害が存在しない場合の結合親和性よりも結合親和性は弱まる。スーパーコイル
レベルでの実験は、亜鉛フィンガーの結合が、1つのフィンガーについておよそ18°、
DNAを解くことを示している。得られる複合体においては、DNAは、1つのターンお
よび大きくなった主溝あたり、約11塩基対の変異体B型立体構造をとる。

30

40

【0187】

それらのDNA標的に対して特異的に、そして高い親和性で結合するポリダクチル亜鉛
フィンガータンパク質を作成するためには、これまでは2つのアプローチしか存在してい
なかった。そのうちの1つは、より長い可撓性リンカーを、共有により配置されている基

50

準に沿って連結されたフィンガーの2つのセットの間に挿入することである。より長い可撓性のリンカーによって繋がれたZif268およびNREに由来する2つの3フィンガータンパク質からなる6フィンガーの構築物は、フェムトモルの解離定数を示した。別の可能性は、基準に沿った亜鉛フィンガーのセットに対する二量化ドメインの結合である。二量化ドメインによっては、より大きな複合体への亜鉛フィンガーの集合が誘導され、それにより、より長いアミノ酸DNA標的部位の認識が誘導される。このアプローチは、二量体の安定性に影響を与えることができるので、完全なモジュールである。これは、例えば、オンオフ状態のチューニングを可能にする。

【0188】

設計概念

さらに別のフィンガーを結合させるために全て基準に沿ったリンカーが使用されるポリダクチル亜鉛フィンガータンパク質についての設計戦略は、DNA結合親和性の比較的控えめな増大を生じた。構造的および生化学的分析は、亜鉛フィンガーペプチドに結合されると、DNAは多くの場合にはわずかに解かれることを示している。モデル化の実験は、基準に沿ったリンカーが、好ましい結合（例えば、理想的なB-DNAへのZif268の結合）を可能にするには短すぎることを示していた。この理由は、亜鉛フィンガーのヘリックスの周期性が、B-DNAのヘリックスの周期性とほとんどあっておらず、そして、解かれた鎖は、さらなるフィンガーが使用される場合にはより深刻な問題となることである。結合はエネルギー的には比較的好ましくなくなってしまうので、これは結合親和性を低下させる作用を有する。

【0189】

ファージディスプレイを使用するポリダクチル亜鉛フィンガータンパク質のDNA結合親和性に対するリンカー領域の構造の影響を実験することを決定した。したがって、2つの異なるポリダクチル亜鉛フィンガータンパク質B3C2およびVegf5'16を選択した。いずれも、約1nmのDNA結合親和性を有する6フィンガータンパク質である。

【0190】

それぞれのペプチドについて2つの異なる種類のライブラリーを構築した。第1のライブラリーは、あまり拘束されておらず、そしてDNAに固く結合することができる、アミノ酸配列が変化している変異体を選択するための基準に沿ったリンカーTGKPK（配列番号412）の5つの位置を無作為化した。より長い、さらに可撓性のリンカーもまた求めた。ライブラリーの第2のセットは、基順に沿ったリンカーTGKPK（配列番号412）の中のTおよびGを維持し、3位、4位、および5位を無作為化し、そして3個のさらに別のアミノ酸を付加した（図6）。4フィンガーのタンパク質（フィンガー2～5を含む）を、ライブラリーの構築を容易にするために、6フィンガーのタンパク質から構築した。これらの4フィンガーのタンパク質を、無作為化したライブラリーを構築するためのPCRの鋳型とした。

【0191】

（実施例3）

ゲル移動度のシフトの分析

（期待される実施例）

ゲルシフト分析を、原則として記載されている通りに、精製したタンパク質を用いて行う（Protein Fusion and Purification System, New England Biolabs）。一般的には、融合タンパク質を、ZBA/5mMのDTTをカラム緩衝液として使用したことを除き、Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs) を使用して、>90%の均質性となるまで精製する。タンパク質の純度および濃度を、BSA標準物に対する比較によって、クマシーブルー（Coomassie blue）で染色した15%のSDS-PAGEゲルから決定する。標的オリゴヌクレオチドを、それらの5'または3'末端で³²Pで標識し、そしてゲル精製する。タンパク質の11種類の3倍段階希釈物を、20μlの結合反応物（1×結合緩衝液（Bi

10

20

30

40

50

nding Buffer) / 10% のグリセロール / 約 1 pM の標的オリゴヌクレオチド) の中で室温で 3 時間インキュベートし、その後、0.5 × TBE 緩衝液中の 5% のポリアクリルアミドゲル上で再度分離させる。乾燥させたゲルの定量を、ホスホリメジャー (PhosphorImager) と ImageQuant ソフトウェア (Molecular Dynamics) を使用して行い、そして K_D を Scatchard 分析によって決定する。

【0192】

(実施例 4)

一般的方法

(期待される実施例)

トランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ

HeLa 細胞を、40 ~ 60% の細胞集密度で使用する。細胞を、160 ng のレポータープラスミド (pGL3 - プロモーター構築物) と 40 ng のエフェクタープラスミド (pCDNA3 中の亜鉛フィンガー - エフェクタードメイン融合体) で、24 ウェルプレートの中でトランスフェクトする。細胞抽出物をトランスフェクションの 48 時間後に調製し、MicroLumat LB96P 照度計 (EG & Berthold, Gaithersburg, Md.) の中でルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega) を用いて測定する。

【0193】

レトロウイルス遺伝子標的化とフローサイトメトリー分析

これらのアッセイは、記載されている通りに行う (Beerliら、(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(4), 1495 - 1500; Beerliら、(2000) J. Biol. Chem. 275(42), 32617 - 32627]。一次抗体として、ErbB - 1 特異的 mAb EGFR (Santa Cruz)、ErbB - 2 特異的 mAb FSP77 (Nancy E. Hynes から譲り受けた; Harwerthら、1992)、および ErbB - 3 特異的 mAb SGP1 (Oncogene Research Products) を使用する。蛍光標識されたロバ F(ab')₂ 抗マウス IgG を二次抗体として使用する (Jackson Immuno-Research)。

【0194】

(実施例 5)

亜鉛フィンガー - エフェクタードメイン融合タンパク質の構築

(期待される実施例)

亜鉛フィンガー - エフェクタードメイン融合タンパク質の構築のために、ets リプレッサー因子 (ERF) リプレッサードメイン (ERD) の 473 位から 530 位のアミノ酸 (Sgouras, D. N., Athanasiou, M. A., Beal, G. J., Jr., Fisher, R. J., Blair, D. G. & Mavrothalassitis, G. J. (1995) EMBO J. 14, 4781 - 4793)、KRX1 の KRAB ドメインの 1 位から 97 位のアミノ酸 (Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W., K.-H., Vissing, H., Thiesen, H.-J. & Rauscher III, F. J. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4509 - 4513)、または Mad m SIN3 相互作用ドメイン (SID) の 1 位から 36 位のアミノ酸 (Ayer, D. E., Laherty, C. D., Lawrence, Q. A., Armstrong, A. P. & Eisenman, R. N. (1996) Mol. Cell. Biol. 16, 5772 - 5781) をコードする DNA を、Taq DNA ポリメラーゼを使用して重複しているオリゴヌクレオチドから集合させる。VP16 転写活性化ドメインの 413 位から 489 位のアミノ酸のコード領域 (Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M. (1988) Nature 335, 563 - 564) を、pCDNA3 / C₇ - C₇ - VP16 (10) から PCR 増幅させる。

10

20

30

40

50

VP64 DNA (437位から447位のアミノ酸を含む、VP16の最小活性化ドメインの四量体反復をコードする) (Seipel, K., Georgiev, O. & Schaffner, W. (1992) EMBO J. 11, 4961-4968) を、相補的なオリゴヌクレオチドの2つの対から作成する。得られる断片を、標準的なクローニング手順によって亜鉛フィンガーコード領域に融合させ、その結果、それぞれの得られる構築物に、内部SV40核局在化シグナル、さらには、C末端HAデカペプチドタグを含める。融合構築物を真核生物発現ベクターpcDNA3 (Invitrogen) にクローニングする。

【0195】

(実施例6)

ルシフェラーゼレポータープラスミドの構築

(期待される実施例)

ATG開始コドンに関して-758位から-1位のヌクレオチドを含むerbB-2プロモーター断片を、TaqExpand DNAポリメラーゼミックス (Boehringer Mannheim) を用いてヒトの骨髄のゲノムDNAからPCR増幅させ、pGL3basic (Promega) に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流にクローニングする。-1571位から-24位のヌクレオチドを含むヒトerbB-2プロモーター断片を、pSVOALD5' / erbB-2 (N-N) (Hudson, L. G., Ertl, A. P. & Gill, G. N. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4389-4393) から、Hind3消化によって切り出し、そしてpGL3basicの中に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流にサブクローニングする。

【0196】

(実施例7)

ルシフェラーゼアッセイ

(期待される実施例)

全てのトランスフェクションには、HeLa細胞を40~60%の細胞集密度で使用する。通常、細胞を、400ngのレポータープラスミド (pGL3-プロモーター構築物、またはネガティブ対照としてのpGL3basic)、50ngのエフェクタープラスミド (pcDNA3の中の亜鉛フィンガー構築物、またはネガティブ対照としての空のpcDNA3)、および200ngの内部標準プラスミド (phrAct-bGal) で、6ウェル皿のウェルの中で、リポフェクタミン試薬 (Gibco BRL) を使用してトランスフェクトする。細胞抽出物をトランスフェクションのおよそ48時間後に調製する。ルシフェラーゼ活性はルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega) を用いて、Gal活性はGalacto-Light (Tropix) を用いて、MicroLumat LB 96P照度計 (EG&G Berthold) の中で測定する。ルシフェラーゼ活性は、Gal活性に対して校正する。

【0197】

(実施例8)

HeLa細胞の中でのerbB-2遺伝子の調節

(期待される実施例)

erbB-2遺伝子を、課された調節のために標的化する。天然のerbB-2遺伝子を調節するために、合成のリプレッサータンパク質および転写活性化因子タンパク質を利用する (R. R. Beerli, D. J. Segal, B. Dreier, C. F. Barbas, III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 14628 (1998))。このDNA結合タンパク質は、6個の予め定義された、モジュールである亜鉛フィンガードメインから構築される (D. J. Segal, B. Dreier, R. R. Beerli, C. F. Barbas, III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2758 (1999))。リプレッサータンパク質には、Kox-1 KRA Bドメインが含まれており (J. F. Margolinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4509 (1994))、一方、トランス活性

10

20

30

40

50

化因子VP64には、単純ヘルペスウイルスタンパク質VP16に由来する最小活性化ドメインの四量体反復が含まれる(K. Seipel, O. Georgiev, W. Schaffner, EMBO J. 11, 4961 (1992))。

【0198】

ヒト子宮頸ガン細胞株HeLaの誘導体である、HeLa/tet-offを(M. Gossen and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547 (1992))利用する。HeLa細胞は上皮起源であるので、これらはErbB-2を発現し、そしてerbB-2遺伝子の標的化の研究に十分に適している。HeLa/tet-off細胞は、テトラサイクリンによって制御されるトランス活性化因子を生産し、それによって、増殖培地からのテトラサイクリン、またはその誘導体であるドキシサイクリン(Dox)の除去により、テトラサイクリン応答エレメント(TRE)の制御下で目的の遺伝子を誘導することができる。このシステムは、化学的な制御下で転写因子を置くために使用する。したがって、リプレッサープラスミドと活性化因子プラスミドを構築し、そしてBamHIおよびClaI制限部位を使用してpRevTRE(Clontech)に、そしてにBamHIおよびNotI制限部位を使用してPMX-IRES-GFP(X. Liura, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 10669 (1997))サブクローニングする。PCR増幅の忠実度を配列決定によって確認し、HeLa/tet-off細胞にトランスフェクトし、そして20個の安定なクローンをそれぞれ単離し、Dox依存性の標的遺伝子の調節について分析する。構築物を、HeLa/tet-off細胞株(M. Gossen and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547 (1992))にLipofectamine Plus試薬(Gibco BRL)を使用してトランスフェクトする。ハイグロマイシンを含む培地の中での2週間の選択後、2mg/mlのDoxの存在下で、安定なクローンを単離し、Dox依存性のErbB-2の発現の調節について分析する。ウェスタンブロット、免疫沈降、ノーザンブロット、およびフローサイトメトリー分析を、原則として記載されている通りに行う(D. Graus-Porta, R. R. Beerli, N. E. Hynes, Mol. Cell. Biol. 15, 1182 (1995))。erbB-2プロモーター活性の読み出しとしてErbB-2タンパク質レベルを最初にウェスタンブロッティングによって分析する。これらのクローンの有意な画分は、4日間、Doxを除去すると、ErbB-2の発現の調節(すなわち、リプレッサークローンの中のErbB-2のダウンレギュレーションおよび活性化因子クローンのアップレギュレーション)を示す。ErbB-2タンパク質レベルは、それらの特異的なmRNAレベルの変化に関係しており、このことは、ErbB-2発現の調節が転写の抑制または活性化の結果であることを示している。

【0199】

(実施例9)

E2S-KRAB、E2S-VP64、E3F-KRAB、およびE3F-VP64タンパク質をコードする領域のレトロウイルスベクターpM-IRES-GFPへの導入

(期待される実施例)

E2S-KRAB、E2S-VP64、E3F-KRAB、およびE3F-VP64タンパク質をいくつかの細胞株の中で発現させるために、それらのコード領域を、レトロウイルスベクターpMX-IRES-GFPに導入する。

【0200】

これらの構築物の配列を、ErbB-2またはErbB-3プロモーターの特異的領域に結合するように選択する。コード領域を、pcDNA3をベースとする発現プラスミドからPCR増幅させ(R. R. Beerli, D. J. Segal, B. Dreier, C. F. Barbabas, III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 14628 (1998))、BamHIおよびClaI制限部位を使用してpRevTRE(Clontech)に、そしてBamHIおよびNotI制限部位を使用してpMX-IRES-GFP(X. Liura, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

、94、10669(1997))にサブクローニングする。PCR増幅の忠実度を配列決定によって確認する。このベクターは、亜鉛フィンガータンパク質の翻訳のための1つの2シストロン性のメッセージと、内部リボソーム侵入部位(IRES)からは緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する。いずれのコード領域も同じmRNAを共有しているので、それらの発現は互いに物理的に関連しており、GFPの発現は亜鉛フィンガーの発現の指標である。これらのプラスミドから調製したウイルスを、その後、ヒトのガン細胞株A431を感染させるために使用する。

【0201】

(実施例10)

ErbbB-2およびErbbB-3遺伝子の発現の調節

10

(期待される実施例)

実施例9によるプラスミドを、両親媒性パッケージング細胞株Phoenix Amp h oに、Lipofectamine Plus(Gibco BRL)を使用して一時的にトランスフェクトし、2日後に、培養上清を、8mg/mlのポリブレンの存在下での標的細胞の感染のために使用する。感染の3日後、細胞を分析のために回収する。感染の3日後に、ErbbB-2およびErbbB-3の発現をフローサイトメトリーによって測定する。結果は、E2S-KRABとE2S-VP64組成物が、それぞれ、ErbbB-2遺伝子の発現を阻害し、そして増強することを示すと予想される。データは、E3F-KRABとE3F-VP64組成物が、それぞれ、ErbbB-2遺伝子の発現を阻害し、そして増強することを示すと予想される。

20

【0202】

ヒトerbbB-2およびerbbB-3遺伝子を、亜鉛フィンガーをベースとする転写のスイッチの開発のためのモデル標的として選択した。ErbbB受容体ファミリーのメンバーは、ヒトの悪性腫瘍の発生において重要な役割を担っている。具体的には、erbbB-2は、多数の部位(乳房、卵巣、肺、胃、および唾液腺を含む)に生じているヒトの腺ガンの高い割合において、遺伝子増幅および/または転写の脱制御の結果として過剰発現される(Hynes, N. E. & Stem, D. F. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1198, 165-184)。ErbbB-2の発現の増大は、その内因性のチロシンキナーゼの構成的活性化を導き、そして、培養された細胞の形質転換を引き起こすことが示されている。多数の臨床試験では、ErbbB-2の発現レベルが増大している腫瘍を有する患者は、予後が不良であることが示されている(Hynes, N. E. & Stern, D. F. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1198, 165-184)。ヒトのガンにおける関与に加えて、erbbB-2は、哺乳動物の成体においても、そして胚発生の間にも重要な生物学的役割を担っている(Hynes, N. E. & Stem, D. F. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1198, 165-184, Altiook, N., Bessereau, J. - L. & Changeux, J. - P. (1995) EMBO J. 14, 4258-4266, Lee, K. - F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. - C. & Hauser, C. (1995) Nature 378, 394-398)。

30

40

【0203】

したがって、erbbB-2プロモーターは、人工的な転写調節因子の開発についての興味深いテストケースを呈する。このプロモーターは詳細に特性決定されており、そして比較的複雑であることが示されており、これには、TATA依存性およびTATA非依存性転写開始部位の両方が含まれる(Ishii, S., Imamoto, F., Yamashita, Y., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4374-4378)。初期の研究では、ポリダクチルタンパク質が、転写を特異的に活性化または抑制する転写調節因子として作用できることが示されているが、これらのタンパク質は、タンパク質結合部位の6個のタンデムな反復に対して、人工的なプロモーターの上流に結合させられた(Liu, Q

50

., Segal, D. J., Ghiara, J. B. & Barbas, C. F. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 5525 - 5530)。さらに、この研究では、結合特異性が修飾されていないポリダクチルタンパク質が利用された。本明細書中では、本発明者らは、天然の erbB - 2 および erbB - 3 プロモーターの中の1つの部位に結合する、予め定義されたビルディングブロックから集合させられたポリダクチルタンパク質の効力を試験する。

【0204】

所望されるDNA結合特異性を有するポリダクチルタンパク質を作成するために、現在の研究は、予め定義された亜鉛フィンガードメインの集合に集中しており、これは、Greisman and Pabo (Greisman, H. A. & Pabo, C. O. (1997) Science 275, 657 - 661) によって提案された連続的な選択戦略とは対照的である。このような戦略には、個々の必要なタンパク質について6個の亜鉛フィンガーライブラリーの連続的な作成および選択が必要であり、そのためにこの実験アプローチを、ほとんどの研究室は利用できず、誰にとっても極めて時間のかかることとなっている。さらに、この戦略において別の配列への結合に対して特異的なネガティブ選択を適用することは難しいので、最近報告されたように、比較的非特異性であるタンパク質が生じる可能性がある。(Kim, J. - S. & Pabo, C. O. (1997) J. Biol. Chem. 272, 29795 - 29800)。

【0205】

18bpのDNA配列を認識する3フィンガーのタンパク質を作成するための2つの異なる戦略の一般的な有用性を研究する。個々の戦略は、亜鉛フィンガードメインのモジュールの性質に基づき、5' - (NNN) - 3' のトリプレットを認識する亜鉛フィンガードメインのファミリーを利用する。erbB - 2 または erbB - 3 標的部位の半分の部位を認識する3個の6フィンガータンパク質を、PCR集合戦略を使用して、予め定義されたフィンガー2 (F2) ドメイン変異体を一緒に融合させることによって、第1の戦略において作成する。

【0206】

その標的に対する個々のタンパク質の親和性を、電気泳動の移動度のシフトアッセイによって決定する。これらの実験は、亜鉛フィンガーペプチドが、Zif268 および他の天然の転写因子に匹敵する親和性を有することを示すと予想される。

【0207】

DNA標的部位に対する個々のタンパク質の親和性を、ゲルシフト分析によって決定する。

【0208】

(実施例11)

コンピューターによるモデル化

(期待される実施例)

コンピューターモデルを、Insight II (Molecular Simulations, Inc.) を使用して作成する。モデルは、Zif268 - DNA の共晶構造の座標に基づく (PDB accession 1AAY)。構造は最小化されたエネルギー状態ではなく、相互作用の可能性を示唆するために示されるにすぎない。水素結合は、重原子の間の距離が3 (±0.3) である場合がふさわしいと考えられ、そして重原子と水素によって形成される角度は120 以上である。

【0209】

(実施例12)

TNN配列に特異的に結合し、HIV - 1 の高度に保存されているプライマー結合部位を標的化する亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインが組み込まれている人工的な転写因子の構築

AIDSは、最近数十年間で世界的流行病となったウイルスによる免疫系の疾患である。この疾患に関係しているウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) はCD4T細胞

10

20

30

40

50

胞に感染し、そして感染した細胞の潜伏しているプールを確立する。AIDSについての現在の治療には、強力な抗レトロウイルス療法 (highly active anti retroviral therapy (HAART)) と呼ばれる多剤混合物 (multidrug cocktail) の使用が含まれる。HAARTは、この疾患の強力な治療法であることが証明されているが、このアプローチには有意な欠点があり、これには、毒性、多数の副作用、そして、さらに重要なものとしては、混合物の効果を逃してしまうウイルスの変異が含まれる (21)。さらに、HAARTの直後に、最初はウイルス負荷が減少するにもかかわらず、潜伏している感染した細胞のレザーバーは依然として患者の血液中に留まり、そしてウイルスは薬物の使用中止後に迅速に再活性化される (48)。したがって、新しい方法が、変異により治療を回避するHIVの能力を防ぐために、また、潜伏している感染した細胞が患者のウイルス力価を再び満たすことを防ぐためにも、開発される必要がある。HIV-1は高い変異率を有するが、ウイルスゲノムの中の特定の配列は、ウイルスの適切な複製のために保存されていなければならない、そして新しい治療方法の開発のためのこれらの配列の標的化が多くの研究者の目的である。

10

20

30

40

50

【0210】

ウイルスの生活環は、ウイルスおよび宿主因子の両方が必要である多数の工程から構成されている。これらの工程のうちのいずれか1つが遮られると、ウイルスの生産を阻害するための実行可能な手段が提供されるであろう。HIV-1の生活環の1つの特に十分に研究されている工程は、組み込まれたウイルスゲノムからのRNAの転写である。HIV-1の5'長末端反復 (LTR) には、多数の宿主転写因子 (Sp1、Nf-B、およびLef-1が含まれる) の結合部位が含まれる (43)。これらの因子の結合は、RNAポリメラーゼIIによる転写の開始を媒介し、発生の転写物上のトランス活性化応答エレメントに対するHIV-1 Tatタンパク質の結合は、宿主タンパク質のポジティブ転写伸張因子bの動員により伸張を刺激する (37)。多数のストラテジーが、標的HIV-1転写物を標的化するために使用されており、これには、リボザイム (19、59)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (2)、およびさらに最近では、RNA干渉 (RNAi) (8、25、26) が含まれる。これらのアプローチの1つの欠点は、これらが標的mRNAに対して設計されることであり、したがって、標的の複数のコピーが不活化されなければならない。高度に発現したmRNAは、ほとんどのウイルス転写物がそうであるように、完全に抑制することは難しい。したがって、より効果的なストラテジーは、DNAレベルで転写を標的化することであり、なぜなら、1つのDNAプロウイルスだけに、ウイルスの生産を阻害するために結合されればよいからである。

【0211】

C₂H₂ 亜鉛フィンガー (ZF) モチーフは、後生動物において最も遍在するDNA結合モチーフである。1つの亜鉛フィンガーは、亜鉛イオンによって配位されて折り畳まれた1つの から構成されている。 -ヘリックスの中の残基は、3個のヌクレオチドと特異的に接触する。以前の研究によって、64種類のメンバーのトリプレットのアルファベットのうち、5'-(G/A/C)NN-3'サブセットを認識するドメインの特定に至っている (16、17、49)。加えて、5'-TNN-3'ファミリーの配列を認識する多くのドメインを本出願において開示した。亜鉛フィンガーモチーフのモジュール性により、ゲノム中の特有の部位に結合する可能性があるポリヌクレオチド転写因子の構築が可能である。転写活性化因子 (例えば、V16トランス活性化ドメイン (47)) またはリプレッサー (例えば、Kruppel 会合ボックス (Kruppel-associated box (KRAB)) ドメイン (38)) を加えることにより、目的の遺伝子の強力なアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションが可能である (3-5、34)。このような人工的な転写因子は、多くの様々な動物細胞および植物細胞の中で多数の内因性の遺伝子を調節することが示されている (3、22、23、28、53、61)。

【0212】

本発明者らは、以前に、HIV-1の5'LTRを調節するために人工的な亜鉛フィンガー転写因子を使用した (50)。HIV-1と指定した試験したタンパク質のうちの1

つは、一時的なトランスフェクション後にH I V - 1の転写を効率よく阻害し、そして転写因子を安定に発現する細胞株および末梢血単核細胞 (P B M C) の中でのウイルスの複製を阻害する。H L T R 3は、2つのS p 1結合部位が重複しているH I V - 1 L T Rの中の1つの部位に結合する。他の研究によってもまた、Z F転写因子でこの領域が標的化された (3 0、4 5)。この配列は、Bクレードの中では十分に保存されているが、この領域は、いくつかの他のクレードの中では有意な配列のバリエーションを示す (2 7)。したがって、本発明者らは、全てのクレードの間で十分に保存されているL T Rの中の配列を標的化することを考えた。t R N Aプライマー結合部位 (P B S) は、H I V - 1ゲノムの中の最も高度に保存されている部位である。ヒトt R N A^{Lys}₃はP B Sに結合し、そして逆転写のためのプライマーとして使用されている (3 6、3 9)。P B Sは、複数のクレードの間で完全に保存されており (1 4)、そしてP B Sへの変異は、ウイルスの生産および感染性にネガティブな影響を与える (4 2、4 6)。P B Sに隣接している配列もまた高度に保存されている。さらに、P B Sは、D N a s e Iおよびマイクロコッカスヌクレアーゼ消化に接近しやすい、ヌクレオソームが含まれていない配列の中の、L T Rの3'末端に存在している (5 4)。したがって、この部位に対して標的化せられたZ Fタンパク質は、結合し、転写を調節するはずである。

【 0 2 1 3 】

この研究では、いくつかのZ Fタンパク質を、H I V - 1 P B Sの中の配列と隣接配列に結合するように設計し、K R A B抑制ドメインに融合させた。これらの転写因子を、レポーターアッセイにおいてはL T Rの転写を抑制するそれらの能力について、そしてP B M Cの感染後のウイルスの生産を阻害するそれらの能力について試験した。最後に、エスケープアッセイ (e s c a p e a s s a y) を、Z Fに対する長期間の暴露によって、リプレッサーの有効性を低下させ得るウイルスの変異が誘導されるかどうかを決定するために行った。本発明者らの結果は、H I V - 1 P B Sを標的化する転写リプレッサーが、H I V - 1疾患の新しい治療薬である可能性があることを示唆している。

【 0 2 1 4 】

材料および方法

カスタムD N A結合タンパク質の構築

6個の亜鉛フィンガードメインを含むD N A結合タンパク質を、S p 1 C亜鉛フィンガー足場上に、以前に記載されている方法およびドメインを使用して集合させた (4、1 6、1 8、4 9)。簡単に説明すると、重複しているP C Rプライマーを、特有の3 b pの部位に結合することが予め決定されている亜鉛フィンガードメインをコードするように設計した。3フィンガータンパク質を、オーバーラップP C Rによって集合させ、その後、A g e I / X m a I連結によって6フィンガータンパク質へと集合させた。最近、本発明者らは、亜鉛フィンガータンパク質を自動的に設計することができる、Z i n c F i n g e r T o o l sと呼ばれるウェブをベースとするプログラムを発表した (<http://www.scripps.edu/mbTharbas/zfdesignJzfdesignhome.php>)。インビトロでの特性決定のために、構築物を原核生物発現ベクターp M A L - c 2 (N e w E n g l a n d B i o l a b s) にクローニングした。マルトース結合タンパク質との融合体を発現させ、タンパク質の融合および精製 (P r o t e i n F u s i o n a n d P u r i f i c a t i o n) システム (N e w E n g l a n d B i o l a b s) を用いて精製した。電気泳動の移動度のシフトアッセイは、以前に記載した通りに行った (4、4 9)。

【 0 2 1 5 】

エフェクタープラスミドおよびレポータープラスミド

6フィンガータンパク質であるP B S 1、P B S 1 a、P B S 2、およびP B S 3を、上記に記載した通りに、K R A B抑制ドメインを含むp c D N Aをベースとするエフェクタープラスミドにクローニングした (4)。4個の6フィンガータンパク質もまた、p M X K R A B - H L T R 3およびp S I N - K R A B - H L T R 3 (5 0) をS f 1で消化し、その後、p M a l - c 2ベクターに由来するS f 1で消化した4個の6フィンガー

タンパク質のそれぞれを、pMXレトロウイルスベクターおよびpSINレンチウイルスベクターと連結させることによって、pMXレトロウイルスベクターおよびpSINレンチウイルスベクターにクローニングした。HIV-1 LTRレポーターであるLTR658-lucを、正方向プライマー5'-GATACGACAGCTAGCTGGAAAGGGCTAATTCACTCCC-3' (配列番号426)と逆方向プライマー5'-AACGTCTGGCTCGAGTTCAAGGTCCTTGTTCGGGCGCCACTGCTAGAGATTTTCC-3' (配列番号427)を使用して、プラスミドpIIIEenv3-1 (National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program [NARRRP]) (52)からPCRによってHIV LTRを増幅させることにより構築した。PCR産物をNheIとXhoIで消化し、そして予めNheIとXhoIで消化しておいたpGL3対照ベクター (Promega) に連結させた。シミアンウイルス40 (SV40) プロモーターによって駆動されるpGL3プロモーターベクター (Promega) をネガティブ対照として使用した。細胞培養物および一時的なトランスフェクションアッセイ。HeLa細胞 (アメリカンタイプカルチャーコレクション)、TZM-bl細胞 (NARRRP) (15、44、60)、およびGag-Pol 293細胞 (Clontech) を、10%のウシ胎児血清と1%のペニシリン-ストレプトマイシン-抗真菌薬 (Gibco) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco)) の中で、37℃、そして5%CO₂で維持した。一時的なトランスフェクションアッセイのために、およそ5×10⁴個の細胞を24ウェルプレートに、40から60%の細胞集密度で播種した。HeLa細胞を、10ngのレポータープラスミド、75ngのTat発現プラスミドpSV2tat72 (NARRRP) (20)、100ngのエフェクタープラスミド、および100ngのCMV-lacZプラスミドで、リポフェクタミントランスフェクション試薬 (Invitrogen) を使用してトランスフェクトした。TZM-bl細胞は、レポータープラスミドを使用しなかったことを除き同様にトランスフェクトし、50ngのタケ (Renilla) ルシフェラーゼプラスミドpRL-CMV (Promega) を、CMV-lacZの代わりにトランスフェクトした。細胞抽出物をトランスフェクションの約48時間後に調製した。ルシフェラーゼ活性と3-ガラクトシダーゼ活性を、それぞれ、PromegaとTropixによるアッセイ試薬キットを使用して、MicroLumat LB96P照度計 (EG&G Berthold, Gaithersburg, MD) において測定した。ルシフェラーゼ活性は、HeLa細胞の中の3-ガラクトシダーゼ活性と、TZM-bl細胞中のタケルシフェラーゼ活性に対して校正した。ZFタンパク質の発現、および一時的にトランスフェクトされたプラスミドをベースとするHIVの発現の障害の決定は、以前に記載した通りに行った (50)。

【0216】

ZFタンパク質のレトロウイルスによる送達とクロマチン免疫沈降 (ChIP)

KRAB-PBSタンパク質のTZM-bl細胞の中へのレトロウイルス形質導入を、モロニーマウス白血病ウイルスをベースとするpMXベクターを使用して、原則として以前に記載した通りに行った (35)。形質導入効率を、亜鉛フィンガー発現カセットの中の内部リボソーム侵入部位から発現された緑色蛍光タンパク質のフローサイトメトリー分析によってモニターした (データは示さない)。およそ10⁷個の感染細胞を1%のホルムアルデヒドで架橋し、クロマチンを以前に記載した通りに調製した (7)。クロマチンを1μgのRNAポリメラーゼII抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、10μlのZF抗体 (35)、または抗体を用いることなく免疫沈降させた。免疫沈降したクロマチンを十分に洗浄し、DNAを以前に記載した通りに精製した。免疫沈降したDNA、ならびに、抗体を含まない試料から採取した投入DNAの全量の20%の1:100希釈物を、HIV-1 LTRプライマー5'-CCGCTGGGGACTTTCCAGGGA-3' (配列番号428)と5'-CACTGCTAGAGATTTTCCACACTG-3' (配列番号429)を使用して、30から35サイクルのPC

Rによって増幅させた。

【0217】

tRNA発現のノーザンブロット分析。

【0218】

HeLa細胞を、10cmの皿の上に 2×10^6 細胞の密度でプレートし、細胞を、示したKRAB-ZFを発現する4 μ gのプラスミド、またはネガティブ対照としての空のプラスミドでトランスフェクトした。48時間後、全RNAをTRIzol試薬(Invitrogen)を使用して単離した。全部で60 μ gのRNAを15%のTris-ホウ酸-EDTA-尿素ポリアクリルアミドゲル上で分離させ、XCell II Blot Module(Invitrogen)を用いてGeneScreen Plusメンブレン(Perkin-Elmer)に、製造業者の説明書にしたがって移動させた。メンブレンのプレハイブリダイゼーションを、5mlのRapid-hyb緩衝液(Amersham Biosciences)の中で、42℃で15分間行った。その後、メンブレンを 10^6 から 10^7 cpmの 32 Pで末端標識したtRNAプローブと、42℃で1から2時間ハイブリダイズさせた。プロットを、0.1%のSDS-0.1xSSC(15mMのNaClと1.5mMのクエン酸ナトリウム)中で、42℃で15mmで2回洗浄し、その後、蛍光スクリーン上で24から48時間感光させた。これをMolecular Dynamicsホスホリメジャーで現像した。tRNA^{Lys}3プローブの配列は5'-CGCCCGAACAAGGGAC-3'(配列番号430)であり、tRNA^{Pro}プローブは5'-TGCCGAAACCCGGGA-3'(配列番号431)である。

10

20

【0219】

レンチウイルスの生産と送達、およびPMBCのHIV-1感染

レンチウイルスの生産、滴定、PMBCへの形質導入、そしてその後のHIV-1でのチャレンジを、以前に記載した通りに(50)、自己不活化レンチウイルスベクターシステムを用いて行った。PBS亜鉛フィンガーに対して耐性であるHIV-1クローンのインビトロでの選択を、Keulenら(29)によって記載された通りに行った。簡単に説明すると、選択は、野生型NL4-3(0.02の感染多重度[MOI])でのSupT1細胞の感染によって開始した。37℃で1時間の後、培養物を分け、細胞に1または10のMOIで個々の亜鉛フィンガーリプレッサーを形質導入した。形質導入しなかった細胞のアッセイを、阻害性の亜鉛フィンガーが存在しない条件下でのウイルスの複製および細胞増殖のレベルを決定するために使用した。細胞に、5日目に2回目の形質導入を行った。5日目の2回目の形質導入の後、培養物の半分を、Keulenら(29)によって記載されている通りに(29)、限界希釈による96ウェルプレートの中での滴定に使用した。1週間後、個々のウェルからの試料を、細胞増殖とウイルスの複製を最適化させるために24ウェルプレートに移した。細胞を含まない上清と細胞を、大きなシンチウムが観察された時点で個々のウェルから回収した。細胞の遺伝子型分析を、PBS領域に重複するプライマーを用いて行った。PCR産物をTAクローニングベクター(pGEM-Teasy; Promega)にクローニングし、個々のクローンを配列決定した。2から3週間の培養後、亜鉛フィンガーを発現しない細胞の中でのウイルスの複製との比較によって、20個のウェルをポジティブと考えた。ポジティブではないウェルは、10のMOIで形質導入した細胞の滴定後に得られた。野生型ウイルスは、1のMOIで形質導入したいくつかのウェルの中で複製することができた。したがって、インビトロで選択したウイルスを、1のMOIでSIN-PBSBを先に形質導入した新しいSupT1細胞上で継代させた。10個の試料が1のMOIで最適に複製することができた。これらの10個のウイルスの配列分析により、PBS部位の中のGからAへの変異の存在が明らかになった。

30

40

【0220】

結果

プライマー結合部位亜鉛フィンガータンパク質の設計、発現、および分析

50

H I V - 1 P B S に結合するように 4 種類の亜鉛フィンガータンパク質を構築した (図 7 ; 表 1 3) 。 図 7 は、H I V - 1 L T R 上の P B S 亜鉛フィンガータンパク質の結合部位を示している図である。示した配列は、H X B 2 参照株に由来する。タンパク質のうちの 3 種類は、P B S のすぐ上流、または P B S の中の 1 8 ヌクレオチドの配列に結合するように設計した。タンパク質のうちの 1 つである P B S 1 a は、7 b p 離れた、2 つの隣接していない 9 b p の部位に結合するように設計した。これは、長いリンカー (G G G S G G G G E K P) (配列番号 4 2 2) によって間隔を空けられた 2 つの 3 フィンガードメインから構成されている。H I V - 1 の転写を調節するそれらの能力の最初の評価として、P B S に対する Z F のそれぞれの結合定数を決定した。タンパク質を発現させ、マルチ標的酵素結合免疫吸着アッセイと電気泳動の移動度のシフトアッセイ (E M S A S) において、P B S 配列を含むオリゴヌクレオチドヘアピンに結合する能力について試験した。それらの標的に対するタンパク質 P B S 1、P B S 1 a、P B S 2、および P B S 3 の平衡解離定数 (K_D) 値は、E M S A によって決定すると、それぞれ、0 . 7 9、1 . 2 5、2 . 4、および 0 . 9 3 n M であった (図 8 A) 。 図 8 は、P B S 亜鉛フィンガー結合定数と、一時トランスフェクションアッセイにおける H I V - 1 L T R の阻害を示す。 (A) P B S 亜鉛フィンガーのゲルシフト。P B S 配列を含む ³²P で標識した D N A ヘアピンオリゴヌクレオチドを、タンパク質の量を減少させながらインキュベートした。遊離の D N A と結合した D N A の密度を I m a g e Q u a n t s o f t w a r e を使用して定量し、そしてそれぞれのタンパク質について K_D を計算した。 (B) K R A B 抑制ドメインに融合させた P B S タンパク質の抑制と比較した一時レポーターアッセイ。左のグラフは、H I V - 1 L T R によって駆動されるルシフェラーゼレポーターと T a t タンパク質を発現するプラスミドでの K R A B - 亜鉛フィンガータンパク質のトランスフェクションによる結果を示す。右のグラフは、S V 4 0 プロモーターによって駆動されるルシフェラーゼレポーターでの K R A B - 亜鉛フィンガータンパク質の対照のトランスフェクションを示す。 (C) P B S 亜鉛フィンガータンパク質のタンパク質発現レベル。細胞を、パネル (B) と同様に亜鉛フィンガータンパク質で一時的にトランスフェクションし、細胞抽出物を調製した。タンパク質をドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離させ、ポリニフッ化ビニリデンメンブレンに移動させた。プロットを、亜鉛フィンガータンパク質上の H A タグを認識する抗体、または - アクチン抗体でプローブした。相対的なタンパク質の発現を、個々の試料中の - アクチンの発現に対して亜鉛フィンガーの発現を校正することによって計算した。

【 0 2 2 1 】

【 表 1 3 】

表 1 3

H I V - 1 L T R を調節するためにアセンブリされた Z F 配列

sE

ZF	ZF link						予想される標的部位 ^c	
	F6	F5	F4	F3	F2	F1	半分の部位 1 - 半分の部位 2	
PBS1 ^a	QAGNLRA	RGGLQA	QHSSTAE	QSGHLPR	RSFVWE	RSDELVR	5'-AAA TGT GGA-GCA GTG GCG-3'	
PBS1a ^b	PSLVNVR	RSDELVR	QAGNLRA	QSGHLPR	RSFVWE	RSDELVR	5'-GTS TGG AAA ATGATA GAA GAG GCG-3'	
PBS2	QAGNLRA	RSFVVR	RSDELVR	HSGLLEK	QSGNLVR	RSGLATE	3'-GCA GTG GCG-CCC GAA CAG-3'	
PBS3	RSGLAT	HSGLLE	RSDELVR	DSGLLV	RSDELVR	RSFVWE	3'-TGS CGT CCS-ATG AAG GAC-3'	

^a Z F ヘリックスは、DNA 標的配列に対して逆平衡の方向 (F 1 - N H 2 に対して C O O H - F 6) で配置されている。それぞれの DNA 認識配列の - 1 位から + 6 位のアミノ酸位置を示す。ウェブをベースとするソフトウェアを、亜鉛フィンガータンパク質の自動設計に利用することができる (<http://www.scripps.edu/mb/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php>) 。

^b P B S 1 a は長い可換性リンカー (G l y 3 S e r G l y 4) によって間隔を空けられた 2 つの 3 フィンガー Z F から構成される。F 3 から F 1 は第 2 の半分の部位 G C A G T G G C G に結合し、F 6 から F 4 は第 1 の半分の部位 G T G T G G A A A に結合する。介在する非結合 DNA 配列は小文字で示した。

^c 予想される標的 DNA 配列を、5' から 3' の方向で示す。

Z F ヘリックスについての配列番号は、F 1 から F 6 である：それぞれ、P B S 1 につ

いては：配列番号 4 5 3、4 5 2、4 5 1、4 5 0、4 6、および 4 4 9；P B S 1 a については：配列番号 4 5 3、4 5 2、4 5 1、4 4 9、1 4、および 4 5 2；P B S 2 については：配列番号 4 5 6、4 5 5、4 5 4、4 5 3、4 5 2、および 4 5 1；そして P B S 3 については：配列番号 4 6 0、4 5 9、4 5 8、4 5 7、4 5 4、および 1 4。標的部位についての配列番号は：P B S 1、P B S 1 a、P B S 2、および P B S 3 について、それぞれ、配列番号 4 3 3、4 3 4、4 3 5、および 4 3 6 である。

【0222】

転写の抑制を可能にするために、Z F タンパク質を K R A B ドメインに融合させた。その後、タンパク質を H I V - 1 L T R によって駆動されるルシフェラーゼレポーター L T R 6 5 8 - l u c、および T a t タンパク質を発現する構築物とともに H e L a 細胞の中で発現させた。ネガティブ対照として、H I V - 1 L T R には結合しないが、その標的配列を含むレポーターを調節することにおいて機能する 6 フィンガータンパク質 K R A B - A a r t もまた試験した。K R A B - P B S 1、K R A B - P B S 1 a、および K R A B - P B S 2 は、それぞれ、20 倍、9.5 倍、および 2.8 倍のレポーターの発現を抑制した。有意な抑制は、K R A B - P B S 3 については観察されなかった。予想した通り、K R A B - A a r t は、レポーターを抑制することはなかった。加えて、抑制ドメインが付加されて発現された P B S 亜鉛フィンガーはいずれも、S V 40 プロモーターによって駆動されるルシフェラーゼレポーターの発現を変化させることはなかった（図 8 B）。最後に、これらの観察がタンパク質の発現の差が原因ではないことを確認するために、ウェスタンブロット分析を行った。K R A B - P B S 2 および K R A B - P B S 3 は、K R A B - P B S 1 および K R A B - P B S 1 a よりも約 2 倍高いレベルで発現されていた（図 8 C）。

【0223】

P B S Z F によるクロマチンの中での H I V - 1 L T R 発現の抑制

一時的なトランスフェクションにおいては、レポータープラスミドは染色体遺伝子と同じ様式でクロマチンの中にはパッケージされておらず、結果、一時アッセイで見られた調節は、ゲノム標的を用いた場合には観察されないであろう。これは、哺乳動物のゲノムに組み込まれたレポーターを抑制する、P B S に結合する Z F タンパク質の能力を試験するためのより関連するアッセイである。したがって、P B S Z F および T a t の一時的なトランスフェクションを、レンチウイルスをベースとするルシフェラーゼレポーターと 3 - ガラクトシダーゼレポーターのコピーが組み込まれている H e L a 誘導体である T Z M - b 1 細胞株の中で繰り返した（図 9 A、上部）。図 9 は、染色体に組み込まれた H I V - 1 L T R レポーター上の P B S 亜鉛フィンガータンパク質の抑制とインビボでの結合を示す。（A）K R A B - P B S 亜鉛フィンガータンパク質と T A t を、ルシフェラーゼおよび l a c Z 遺伝子の発現を駆動する H I V 構築物が染色体に組み込まれている H e L a 細胞株である T Z M - b 1 細胞株の中で一時的に発現させた。（B）亜鉛フィンガータンパク質に結合した H I V - 1 L T R のクロマチン免疫沈降。亜鉛フィンガータンパク質を T Z M - b 1 細胞株の中でのレトロウイルス形質導入によって発現させた。細胞を、ホルムアルデヒドで架橋し、核抽出物を調製した。抽出物を R N A ポリメラーゼ I I （p o l I I）または S p 1 コンセンサス亜鉛フィンガー（S p 1 C）を認識する抗体とともにインキュベートし、S t a p h A 細胞と共に沈殿させた。免疫沈降した D N A を精製し、L T R に特異的なプライマーを使用して、H I V - 1 L T R の存在について P C R によって分析した。（C）t R N A ^{L y s}₃ のノーザンブロット。H e L a 細胞を、示した K R A B - Z F タンパク質でトランスフェクトし、全 R N A を抽出した。R N A を変性ポリアクリルアミドゲルによって分離させ、膜に移動させた。これを、t R N A ^{L y s}₃ および t R N A ^{P h e} について放射性標識オリゴヌクレオチドでプローブした。それぞれのレーンの下の数字は、t R N A ^{P h e} に対して校正した後の、t R N A ^{L y s}₃ の相対的な発現を示す。H I V - 1 L T R の抑制を、K R A B - P B S 1、K R A B - P B S 1 a、および K R A B - P B S 2 の存在下で観察したが、K R A B - P B S 3 および K R A B - A a r t は、レポーターを一時的にトランスフェクトした場合に観察されたよう

に、抑制は示さなかった（図 9 A）。Z F は一時アッセイにおいて観察されたレベルと同様のレベルで、染色体に組み込まれたレポーターを抑制した。ルシフェラーゼレポーターは、K R A B - P B S 1 によつては 7 倍、K R A B - P B S 1 a によつては 15 倍、そして K R A B - P B S 2 によつては 20 倍抑制された。同様のレベルの抑制は、3 - ガラクトシダーゼレポーターについても観察された。

【 0 2 2 4 】

P B S Z F が H I V - L T R に結合したことを確認するために、C h I P アッセイを、T Z M - b 1 細胞を用いて行った。P B S Z F を、レトロウイルス感染によつて T Z M - b 1 細胞の中で発現させた。細胞をホルムアルデヒドで架橋し、クロマチンを超音波処理し、そして核から単離した。D N A に結合した Z F を、亜鉛フィンガー骨格を認識する抗体を用いて免疫沈降させ、免疫沈降した D N A を、H I V - 1 L T R に特異的なプライマーを使用して P C R によつて分析した。クロマチンを、ポジティブ対照としての R N A ポリメラーゼ I I 抗体で免疫沈降させた。レポーターアッセイと一致して、本発明者らは、K R A B - P B S 1、K R A B - P B S 1 a、および K R A B - P B S 2 は H I V - 1 L T R に結合し、一方、K R A B - P B S 3 はインビボでは L T R に結合しなかったことを発見した（図 9 B）。プライマー結合部位が t R N A ^{Lys}₃ に相補的であるので、K R A B - P B S 3 が t R N A ^{Lys}₃ 遺伝子に、そして H I V L T R に結合でき、t R N A の発現を抑制できることが可能である。なぜなら、K R A B ドメインは R N A ポリメラーゼ I I I の転写に影響を与えることが示されているからである（41、51）。この可能性を試験するために、ノーザンブロットを、K R A B - P B S 2、K R A B - P B S 3、または K R A B - A a r t の存在下での t R N A ^{Lys}₃ のレベルを測定するために行った。t R N A ^{Ph} の較正を行った後、本発明者は、いずれの Z F によつても t R N A ^{Lys}₃ レベルに対しては有意な影響がないことを明らかにした（図 9 C）。

【 0 2 2 5 】

P B S Z F による H I V - 1 ウイルスの生産の阻害

感染の条件下で H I V - 1 ウイルスの生産を阻害する P B S Z F の能力の事前の試験として、K R A B - P B S 発現プラスミドをそれぞれ、H I V - 1 株 N L 4 - 3 ゲノムをコードするプラスミドと共に同時トランスフェクトした。48 時間後、ウイルス生産の有意な阻害が、K R A B - P B S 1 を発現する細胞（75%）および K R A B - P B S 2 を発現する細胞（約 90%）において見られたが、K R A B - P B S 1 a と K R A B - P B S 3 は、ウイルスの生産を < 50% しか阻害しなかった（図 10）。図 10 は P B S 亜鉛フィンガータンパク質のウイルス生産の一時的な阻害を示しているグラフである。示した K R A B - P B S 亜鉛フィンガーを発現するプラスミドと、H I V - 1 の N L 4 - 3 株のゲノムを、293T 細胞に同時トランスフェクトした。ウイルスの生産を p 2 4 E L I S A によつてモニターした。

【 0 2 2 6 】

本発明者らは、次に、転写因子が、より生理学的な設定においてもウイルスの生産を阻害できるかどうかを研究した。したがって、本発明者らは、H I V - 1 に感染させた初代 T 細胞の中でのウイルスの複製に対する P B S Z F の効果を分析した。P B M C に、K R A B - P B S 転写因子を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。Z F の C 末端ヘマグルチニン（H A）タグを認識する抗体を使用してフローサイトメトリー分析を行って、形質導入の効率を決定した：P B M C によつて発現された Z F のおよそ 20 から 30%（図 11 A）。図 11 は、初代細胞の中での P B S 亜鉛フィンガーによる H I V ウイルスの生産の阻害を示す。（A）P B M C の中での亜鉛フィンガーの発現のフローサイトメトリー分析。P B M C に、K R A B - P B S 亜鉛フィンガータンパク質を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。細胞を固定し、Z F の C 末端 H A タグを認識する抗体で染色し、そして亜鉛フィンガーの発現についてフローサイトメトリーによつて分析した。右側のパネルは、C D 4 および H A 抗体について染色した K R A B - P B S 2 を形質導入した細胞のフローサイトメトリー分析を示す。（B）P B M C に、示した K R A B - P B S レンチウイルスベクターを形質導入し、その後、0.1 の M O I で、H I V - 1 株

N L 4 - 3 による感染でチャレンジした。p 2 4 レベルを、感染の 3 日、7 日、1 2 日、および 1 8 日後にモニターした。本発明者らはフローサイトメトリー分析を行った。ここで、K R A B - P B S 2 を形質導入した細胞を、H A 抗体に加えて C D 4 抗体でも染色した。これは、形質導入した細胞のおよそ 3 分の 2 が C D 4 を発現しており、したがって、H I V - 1 許容細胞であることを示していた (図 1 1 A)。これらの結果は、末梢血単核細胞の形質導入における本発明者らの以前の結果と一致していた (5 0)。形質導入した細胞を H I V - 1 でチャレンジし、ウイルスの生産を p 2 4 の定量によってモニターした。4 種類の P B S に結合する転写因子のうち、K R A B - P B S 2 だけが、ウイルスの生産を阻害することができた。K R A B - P B S 2 を形質導入した細胞においては、形質導入しなかった細胞についてのウイルスの生産と比較して、ウイルスの生産の > 9 0 % の減少が観察された (図 1 1 B)。ウイルスの生産の減少が、K R A B - P B S 2 の過剰発現が原因で生じる細胞傷害性の理由にはよらないことを確認するために、細胞の生存性を、H I V - 1 感染後の様々な時点で測定した。全ての試料が、測定した全ての時点で同様の生存性を有することが明らかになった (図 1 2)。図 1 2 は、亜鉛フィンガー (Z F) タンパク質での P B M C の形質導入によっては細胞の生存性には影響がないことを示しているグラフである。示した Z F 転写因子を形質導入した P B M C、または形質導入しなかった細胞を、H I V - 1 でチャレンジした。示した時点で、細胞の生存性を W S T - 1 アッセイによって決定した。

【 0 2 2 7 】

本発明者らは、これまでに、K R A B - H L T R 3 (H I V - 1 L T R の中の S p 1 部位に結合するように設計されたタンパク質) がウイルスの複製を効率よく阻害することを見出した。H L T R 3 Z F タンパク質を、H I V - 1 の B サブタイプ (米国および欧州で優勢なウイルス株であり、ほとんどの研究において使用されているウイルスである) の L T R に結合するように設計した。しかし、L T R のこの領域の配列は、サブタイプの間で変化した。多数のサブタイプについての H L T R - 3 結合部位の D e B a a r ら、(1 4) による配列の試験は、H L T R - 3 結合配列の中に数個の相違が存在することを示しており、これは、K R A B - H L T R 3 がこれらのウイルスの複製を阻害できるであろうことを示唆している (図 1 3 A)。図 1 3 は、F - サブタイプの L T R に対する K R A B - H L T 1 の有効性の低下を示しているグラフである。(A) 様々な H I V - 1 M グループサブタイプの中の H L T R 3 と P B S 2 Z F 結合部位の配列比較。点線は配列同一性を示し、点は欠失を示す。(B) K R A B - H L T R 3 (左) または K R A B - P B S 2 (右) のいずれかを形質導入した P B M C を、野生型または F サブタイプの L T R のいずれかを含む B サブタイプのウイルスでチャレンジした。ウイルスの複製を p 2 4 の生産を測定することによってモニターした。しかし、F サブタイプの H L T R 3 配列は B サブタイプとは大きく異なり、B サブタイプの H L T R 3 標的配列とは、1 8 個のうちの 9 個のヌクレオチドが異なっていた。対照的に、K R A B - P B S 2 の標的部位の配列は、分析した複数のサブタイプについて同じであった。K R A B - H L T R 3 の、F サブタイプ L T R を調節する能力を試験するために、F サブタイプウイルスの U 3 配列で置き換えた L T R の U 3 領域を有する B サブタイプのウイルスを使用した。P B M C に K R A I 3 - H L T R 3 を形質導入し、その後、キメラウイルスでチャレンジした。予想した通り、F サブタイプ L T R ウイルスの生産を阻害する K R A B - H L T R 3 の能力は、野生型ウイルスと比較すると大幅に低下した (図 1 3 B)。予想した通り、K R A B - P B S 2 はキメラウイルスと B サブタイプウイルスの複製を同じ程度阻害した。なぜなら、試験したウイルスにはいずれにも、B サブタイプに由来する P B S が含まれるからである。しかし、K R A B - P B S 2 結合部位の配列は、F サブタイプと B サブタイプにおいては同じであり、その結果 K R A B - P B S 2 が F サブタイプウイルスを阻害することができると予想した。したがって、抗 H I V - 1 治療薬としての K R A B - H L T R 3 の使用の可能性には限界があるが、K R A B - P B S 2 は、任意の公知の H I V - 1 株を処置するために使用できる可能性がある。

【 0 2 2 8 】

A I D S 治療の主要な問題点は、迅速に変異してしまうH I V の能力であり、治療薬に対する耐性が生じることである。本発明者らは、転写因子についての標的部₁₀位としてプライマー結合部位を選択した。なぜなら、これは、公知の全てのH I V - 1 サブタイプにおいて保存されており、このことは、この配列がウイルスの複製について不変であることを示唆している。実際、多くの研究により、P B S への変異によってウイルスの生産速度の低下が生じることが示されている。P B S に結合するように本発明者らが設計した4種類のZ F 転写因子のうち、K R A B - P B S 2 は、ウイルスの転写と複製を最も効率よく抑制した。本発明者らは、K R A B - P B S 2 に対するH I V - 1 の暴露の繰り返しによ₂₀って、ウイルスが調節を回避できるような変異を生じ得るかどうかを決定したいと考えた。K R A B - P B S 2 を形質導入したP B M C をH I V - 1 のN L 4 - 3 株に感染させ、生産されたウイルスを回収し、これを使用してK R A B - P B S 2 が形質導入されたP B M C の新しい集団を感染させた。数回の感染後、得られたウイルスをクローニングし、20個のクローンのプライマー結合部位領域を配列決定した。20個のクローンのうち、わずかに2個にしか野生型P B S 配列は含まれていなかった。残りの18個はP B S の中に1個または2個の変異を有する3種類の配列から構成されていた(図14A)。図14は亜鉛フィンガーの抑制に₃₀応答するプライマー結合部位の変異を示す。(A) P B M C にK R A B - P B S 2 を形質導入し、H I V - 1 に感染させた。ウイルスを上清から回収し、形質導入した細胞の新しい集団を再度感染させるために使用した。数回の後、出力ウイルスをクローニングし、20個のクローンに由来するプライマー結合部位領域を配列決定した。変異の部位は下線で示す。(B) K R A B - P B S を形質導入したP B M C の、野生型およびM u t - 3 H I V による感染。(C) 野生型およびM u t - 3 ヘアピンオリゴヌクレオチドを用いたP B S 2 のゲルシフト。M u t - 3 と指定した、配列決定したクローンの半分において生じた変異を有するウイルスクローンをウイルスにパッケージし、P B S Z F が形質導入されているP B M C を感染させるために使用して、このウイルスが設計した転写因子による調節に対して耐性であるかどうかを決定した。野生型ウイルスを用いた場合と同様に、K R A B - P B S 1、K R A B - P B S 1 a、およびK R A B - P B S 3 は、M u t - 3 ウイルスの複製に対しては効果がなかった。K R A B - P B S 2 はM u t - 3 ウイルスの複製を抑制することができたが、野生型ウイルスの抑制よりもはるかに効率が悪かった(図14B)。加えて、変異したウイルスは、野生型H I V - 1 よりもはるかに低いウイルスレベルを生じた。これらの結果は、P B S に対する変異によって、その標的配列に対するK R A B - P B S 2 の親和性が低下することを示唆している。これを試験するために、E M S A を行って、P B S 2 Z F がM u t - 3 配列に結合できるかどうかを決定した。本発明者らは、P B S 2 Z F が、この相互作用の結合定数が計算できないほどに弱く、この配列に結合したことを明らかにした(図14C)。したがって、P B S 領域は、Z F による調節を回避するような変異に対して寛容であり得るが、ウイルスの生産効率が犠牲になることが明らかである。

【0229】

考察

P B S 配列は、特定した全てのH I V - 1 サブタイプにおいて同じであり、H I V - 1 の全ての天然の株が、逆転写の開始のためにt R N A ^{Lys}₃を使用する(31)。変異の効果を試験する研究により、P B S の配列の変化によりウイルスの複製の減少が生じることが明らかにされている(42、46)。これらの重要な特徴により、保存されているこの領域の性質を利用する治療が期待される。この実験では、本発明者らは、高度に保存されているプライマー結合部位への結合を通じてH I V - 1 の転写を調節する人工的な亜鉛フィンガー転写因子を設計し、発現させ、そして特性決定した。本発明者らが試験した4種類のZ F 転写因子のうち、わずかに1つだけ(K R A B - P B S 2)がR E V - i ウイルスの生産を阻害することができた。不思議なことに、2つの他のタンパク質(K R A B - P B S 1 およびK R A B - P B S 1 a)はC h I P アッセイによって明らか₄₀なようにP B S 配列に結合し、一時的なレポーターアッセイにおいてH I V - 1 L T R を阻害し

10

20

30

40

50

たが、これらは、P B M Cの中でのウイルスの生産は阻害しなかった。これについての可能性のある説明は、一時的なレポーターと安定なレポーターのいずれを用いたアッセイにおいても、K R A B - P B S 2は、他の2つのタンパク質よりもわずかに良好なリプレッサーであったことである。したがって、ウイルスの複製の効果的な阻害に必要な転写抑制についてはいくつかの閾値がある可能性があり、試験したZ Fのうち、K R A B - P B S 2だけがこのレベルに達したのであろう。

【0230】

K R A B - P B S 3は、本発明者らのアッセイのいずれにおいても、H I V - 1 L T Rを調節することができず、ゲルシフトアッセイにおいて試験した他のZ FについてのK_D値に匹敵する二本鎖のDNA結合部位についてのK_D値を有するにもかかわらず、C h I Pアッセイによって示される、核の中のL T Rに結合することができなかった。1つの可能性は、K R A B - P B S 3が、H I V - 1 P B Sと同じ配列が含まれるt R N A^{Lys}₃遺伝子に結合することである。核の中にt R N A遺伝子の複数のコピーが存在しているので、K R A B - P B S 3の結合についてH I Vゲノムの1つの組み込まれたコピーを完全に打ち負かすと考えることができる。しかし、レポーターの一時的なトランスフェクションにおいては、H I V L T Rの何千ものコピーが核の中に存在しており、K R A B - P B S 3はL T Rからの転写を抑制することがなおもできなかった(図8)。また、t R N A^{Lys}₃遺伝子に対するK R A B - P B S 3の直接の結合は試験しなかったが、t R N A^{Lys}₃が抑制されていないことがノーザンブロットから見られた(図9)。したがって、細胞環境では、L T Rは、K R A B - P B S 3に結合できない立体構造を有する可能性がある。この表現形は、H I V - 1 L T Rに結合するように設計した他のZ F転写因子について観察された。Reynoldsら、およびKimら(30, 45)による研究では、L T RのSp-1結合部位に対して標的化された複数のポリダクチル転写因子が構築された。いずれの研究においても、タンパク質の大部分は、レポーターアッセイによって試験した場合には調節されていないことを示した。これらの知見は、設計した転写因子の有効性を決定するためには複数のアッセイを使用する必要があることを明らかにしている。願わくば、さらなるZ F転写因子が構築され、試験されると、標的部位の選択のためのパラメーターがより明確になるであろう。最近発売されたウェブをベースとするソフトウェアによって、現在は、人工的な垂鉛フィンガー転写因子の自動的な設計が可能である(<http://www.scripps.edu/mb/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php>)。

【0231】

K R A B - P B S 2に対するH I V - 1の長期にわたる暴露によって、リプレッサーの有効性が低下してしまうようなP B Sの中での変異が誘導されるかどうかを決定するために、本発明者らは、K R A B - P B S 2を形質導入した細胞を使用してウイルスを複数回継代することにより、ウイルスの変異を回避するために選択した。本発明者らは、得られたウイルスにはP B Sの中に変異が含まれており、そしてK R A B - P B S 2による調節に対してより耐性であることを実際に見出した。しかし、このウイルスはまた、野生型と比較して遅い複製速度論も有していた。本発明者らが試験したウイルス変異体は、P B Sの6番目と7番目のヌクレオチドにC CからG Aへの変異を有していた(図14A)。P B Sの変異分析は、H I V - 1 P B Sの最初の6個のヌクレオチドが、マイナス鎖の合成の開始に必要であり、一方、最後の5個のヌクレオチドは、プラス鎖の合成の間の効率のよい鋳型の移動に重要であることを示唆している(9, 46, 57)。1位から6位のヌクレオチドの中のt R N A^{Lys}₃に相補的であり、P B Sの下流の5ヌクレオチドの挿入に沿った7位から18位のヌクレオチドの中のt R N A^{Ph}に相補的なP B Sを用いた、複製可能なウイルスを使用した、その後の研究では、それらの複製能力に対する最初の6ヌクレオチドのそれぞれの中に点変異を有するウイルスを試験した。6番目のヌクレオチドに変異を有する2つのウイルスのうち、CからAへの変異を有する変異体は感染性ではなかった。CからUへの変異を有する変異体は感染性であったが、ウイルスの出現は野生型と比較すると遅れた(56)。本明細書中の本発明者らの観察と一致して、P B

Sの6番目のヌクレオチドでのいくつかの変異は、6番目のヌクレオチドで本発明者らが観察したCからGへの変異がそうであったように、寛容化される。

【0232】

変異したウイルスが生存可能であるようであるという事実は、ウイルスが、逆転写に備えて別のtRNAを使用できることを示唆している。しかし、データベースの検索では、この新しいPBSの配列と適合するtRNAは見出せなかった。したがって、tRNA^{Lys}₃がプライマーであること、これらの変異は逆転写の間に生じ、そしてこれらは修復される代わりにKRAB-PBS2による調節を回避するための圧力によって連続して選択される可能性がある。PBSの変異についてのほとんどの研究においては、選択圧を用いることなく培養された変異したPBSを有するウイルスは、通常、野生型PBS配列へと戻った(11、33、58)。しかし、HIVが様々なtRNAを使用できるように設計した変異によって安定なクローンが生じた実例がある。具体的には、tRNA^{Lys}₁、₂、tRNA^{His}、およびtRNA^{Met}を使用することができるウイルスが単離されている(112、40、55)。重要なことは、これらの単離物がHTV-1の研究室での操作によって得られたことであり、これらの変異体が自然界に存在し得ることを示唆している証拠はない。天然のプライマーのパリエーションだけがtRNA^{Lys}₅のめったに起こらない使用に関係しており、これによって、HTV-サル免疫不全ウイルス単離物の約5%において1ヌクレオチド多形が生じる(12、13)。これらの結果は、AIDSの治療薬としてKRAB-PBS2を使用するための最良の戦略が、任意のウイルスが戻るように変異することを可能にし、その後、KRAB-PBS2での処置を再び始めることができる間隔で、処置が中断されることを示唆している。「休止」期間の間に、別の治療法が使用される場合があり、これには、HTV-1LTRの中の他の部位(例えば、KRAB-HLTR3)を標的化するZFタンパク質が含まれるが、これに限定はされない。しかし、本発明者らが単離した変異体ウイルスが、実際に、KRAB-PBS2が存在しない条件下で野生型PBS配列に戻るかどうかを決定するためにさらなる研究を行う必要がある。

10

20

【0233】

RNAiは、多数の疾患についての可能性のある処置として最近、浮上してきた。具体的には、いくつかの研究が、HIV-1を標的化する低分子干渉RNA(sRNA)分子を用いて行われており、ウイルス遺伝子の発現の強力なダウンレギュレーションが示されている(8、25、26)。残念なことに、長期にわたる研究では、sRNAに対する長時間の暴露によって、調節を回避することができるウイルスの変異が生じることが示されている(6、10)。最近、1つの研究により、PBSを標的化するsRNAがHIV-1感染を阻害できることが示された(24)。PBSの中に変異がないことが、sRNAに対する暴露の14日後までに見られたが、本発明者らの研究は、HIVがPBS領域を変異させてRNAiによる標的化を回避できることを示唆している。これは、sRNA戦略の使用における有意な欠点であり得る。なぜなら、1つの点変異が、HIVがsRNAによる調節を回避するためには十分であり得ることが示されているからである(6)。しかし、PBS配列が戻ることを可能にするための上記に示唆されたこの戦略は、RNA干渉を含む任意の治療にも適用することができる。実際、HIV-1の処置におけるRNA干渉と転写因子の両方の使用は、強力な治療用混合物であることを証明することができた。なぜなら、これらは2つの異なるレベルで作用するからである。このアプローチは、vegfa遺伝子の調節においてすでに明らかにされており、ここで、人工的な転写因子とsRNAの使用が、別々よりも一緒の場合により大きな抑制を有することが示されている(32)。

30

40

【0234】

結論として、この実験の結果により、抗HIV治療に使用される可能性がある転写因子として、KRAB-PBS2を同定した。KRAB-HLTR3と同様に、KRAB-PBS2は、長期間にわたり初代リンパ球の中でのウイルスの生産を阻害することができ、これには明らかな毒性は伴わない。有意であるのは、KRAB-PBS2が、KRAB-

50

H L T R 3 の調節を回避するウイルスの複製を阻害できることである。H I V - 1 の全ての公知のサブタイプにおいて高度に保存されている配列である K R A B - P B S 2 標的と同様に、これは、世界中のあらゆる地域で治療薬として使用される可能性がある。H I V - 1 に対する低分子アプローチによって確立されているように、遺伝子をベースとするアプローチにはまた、H I V - 1 の回避を制限するためのエフェクターの混合物を組み入れることもできる。

【 0 2 3 5 】

(引用文献)

以下の参考文献は、実施例 1 2 においてそれらの番号の参照により本明細書中に引用される。これらの番号の参照が実施例 1 2 にだけ適用されることに留意されたい。

10

【 0 2 3 6 】

【 化 1 5 】

1. Abbink, T. E., N. Beerens, and B. Berkhout. 2004. Forced selection of a human immunodeficiency virus type 1 variant that uses a non-self tRNA primer for reverse transcription: involvement of viral RNA sequences and the reverse transcriptase enzyme. *J. Virol.* 78:10706-10714.

2. Barnor, J. S., N. Miyano-Kurosaki, K. Yamaguchi, A. Sakamoto, K. Ishikawa, Y. Inagaki, N. Yamamoto, M. Osei-Kwasi, B. Ofori-Adjei, and H. Takaku. 2004. Intracellular expression of antisense RNA transcripts complementary to the human immunodeficiency virus type-1 vif gene inhibits viral replication in infected T-lymphoblastoid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:544-550.

20

3. Beerli, R. R., B. Dreier, and C. F. Barbas III. 2000. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1495-1500.

4. Beerli, R. R., D. J. Segal, B. Dreier, and C. F. Barbas III. 1998. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14628-14633.

30

5. Blancafort, P., D. J. Segal, and C. F. Barbas III. 2004. Designing transcription factor architectures for drug discovery. *Mol. Pharmacol.* 66:1361-1371.

【 0 2 3 7 】

【化 1 6】

6. Boden, D., O. Pusch, F. Lee, L. Tucker, and B. Ramratnam. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J. Virol.* 77:11531-11535.

7. Boyd, K. E., J. Wells, J. Gutman, S. M. Bartley, and P. J. Farnham. 1998. c-Myc target gene specificity is determined by a post-DNA binding mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13887-13892.

8. Coburn, G. A., and B. R. Cullen. 2002. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J. Virol.* 76:9225-9231. 10

9. Das, A. T., and B. Berkhout. 1995. Efficient extension of a misaligned tRNA-primer during replication of the HIV-1 retrovirus. *Nucleic Acids Res.* 23: 1319-1326.

10. Das, A. T., T. R. Brummelkamp, E. M. Westerhout, M. Vink, M. Madiredjo, R. Bernards, and B. Berkhout. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.* 78:2601-2605.

11. Das, A. T., B. Kiaver, and B. Berkhout. 1995. Reduced replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants that use reverse transcription primers other than the natural tRNA. *J. Virol.* 69:3090-3097. 20

12. Das, A. T., B. Kiaver, and B. Berkhout. 1997. Sequence variation of the human immunodeficiency virus primer-binding site suggests the use of an alternative tRNA(Lys) molecule in reverse transcription. *J. Gen. Virol.* 78: 837-840.

13. Das, A. T., M. Vink, and B. Berkhout. 2005. Alternative tRNA priming of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription explains sequence variation in the primer-binding site that has been attributed to APOBEC3G activity. *J. Virol.* 79:3179-3181. 30

14. Be Baar, M. P., A. De Ronde, B. Berkhout, M. Cornelissen, K. H. Van Der Horn, A. M. Van Der Schoot, F. De Wolf, V. V. Lukashov, and J. Goudsmit. 2000. Subtype-specific sequence variation of the HIV type 1 long terminal repeat and primer-binding site. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 16:499-504.

15. Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, X. Wu, W. A. O'Brien, L. Ratner, J. C. Kappes, G. M. Shaw, and E. Hunter. 2000. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J. Virol.* 74:8358- 8367. 40

【 0 2 3 8】

【化 1 7】

16. Dreier, B., R. R. Beerli, D. J. Segal, J. D. Flippin, and C. F. Barbas III. 2001. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J. Biol. Chem.* 276:29466-29478.

17. Dreier, B., R. P. Fuller, D. J. Segal, C. V. Lund, P. Blancafort, A. Huber, B. Koksche, and C. F. Barbas III. 2005. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-CNN-3' family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J. Biol. Chem.* 280:35588-35597.

10

18. Dreier, B., D. J. Segal, and C. F. Barbas III. 2000. Insights into the molecular recognition of the 5'-GNN-3' family of DNA sequences by zinc finger domains. *J. Mol. Biol.* 303:489-502.

19. Feng, Y., M. Leavitt, R. Tritz, E. Duarte, D. Kang, M. Mamounas, P. Gilles, F. Wong-Staal, S. Kennedy, J. Merson, M. Yu, and J. R. Barber. 2000. Inhibition of CCR5-dependent HIV-1 infection by hairpin ribozyme gene therapy against CC-chemokine receptor 5. *Virology* 276:271-278.

20

20. Frankel, A. D., and C. O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193.

21. Gea-Banacloche, J. C., and H. Clifford Lane. 1999. Immune reconstitution in HIV infection. *AIDS* 13:525-538.

22. Graslund, T., X. Li, L. Magnenat, M. Popkov, and C. F. Barbas III. 2005. Exploring strategies for the design of artificial transcription factors: targeting sites proximal to known regulatory regions for the induction of gamma-globin expression and the treatment of sickle cell disease. *J. Biol. Chem.* 280:3707-3714.

30

23. Guan, X., J. Stege, M. Kim, Z. Dahmani, N. Fan, P. Heifetz, C. F. Barbas III, and S. P. Briggs. 2002. Heritable endogenous gene regulation in plants with designed polydactyl zinc finger transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13296-13301.

24. Han, W., M. Wind-Rotolo, R. L. Kirkman, and C. D. Morrow. 2004. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by siRNA targeted to the highly conserved primer binding site. *Virology* 330:221-232.

25. Hu, W. V., C. P. Myers, J. M. Kilzer, S. L. Pfaff, and F. D. Bushman. 2002. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr. Biol.* 12: 1301-1311.

40

【 0 2 3 9】

【化 1 8】

26. Jacque, J. M., K. Triques, and M. Stevenson. 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418:435-438.
27. Jeeninga, R. E., M. Hoogenkamp, M. Armand-Ugon, M. de Baar, K. Verhoef, and B. Berkhout. 2000. Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J. Virol.* 74:3740-3751.
28. Jouvenot, Y., V. Ginja, L. Zhang, P. Q. Liu, M. Oshimura, A. P. Feinberg, A. P. Wolffe, R. Ohlsson, and P. D. Gregory. 2003. Targeted regulation of imprinted genes by synthetic zinc-finger transcription factors. *Gene Ther.* 10:513-522. 10
29. Keulen, W., N. K. Back, A. van Wijk, C. A. Boucher, and B. Berkhout. 1997. Initial appearance of the 184Ile variant in lamivudine-treated patients is caused by the mutational bias of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Virol.* 71:3346-3350.
30. Kim, Y. S., J. M. Kim, D. L. Jung, J. E. Kang, S. Lee, J. S. Kim, W. Seol, H. C. Shin, H. S. Kwon, C. Van Lint, N. Hernandez, and M. W. Hur. 2005. Artificial zinc finger fusions targeting Sp1-binding sites and the trans-activator-responsive element potently repress transcription and replication of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 280:21545-21552. 20
31. Kleiman, L. 2002. tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB Life* 53:107-114.
32. Kwon, H. S., H. C. Shin, and J. S. Kim. 2005. Suppression of vascular endothelial growth factor expression at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Nucleic Acids Res.* 33:e74. 30
33. Li, X., J. Mak, E. J. Arts, Z. Gu, L. Kleiman, M. A. Wainberg, and M. A. Pamiak. 1994. Effects of alterations of primer-binding site sequences on human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* 68:6198-6206.
34. Liu, Q., B. J. Segal, J. B. Ghiara, and C. F. Barbas III. 1997. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5525-5530.
35. Magnenat, L., P. Blancafort, and C. F. Barbas III. 2004. In vivo selection of combinatorial libraries and designed affinity maturation of polydactyl zinc finger 40

【 0 2 4 0 】

【化 1 9】

transcription factors for ICAM-1 provides new insights into gene regulation. *J. Mol. Biol.* 341:635-649.

36. Mak, J., and L. Kleiman. 1997. Primer tRNAs for reverse transcription. *J. Virol.* 71:8087-8095.

37. Marcello, A., M. Lusic, G. Pegoraro, V. Pellegrini, F. Beltram, and M. Giacca. 2004. Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene* 326:1-11.

38. Margolin, J. F., J. R. Friedman, W. K. Meyer, H. Vissing, H. J. Thiesen, and F. J. Rauscher III. 1994. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4509-4513.

39. Marquet, IL, C. Isel, C. Ehresmann, and B. Ehresmann. 1995. tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie* 77:113-124.

40. Moore-Rigdon, K. L., B. R. Kosloff, R. L. Kirkman, and C. B. Morrow. 2005. Preferences for the selection of unique tRNA primers revealed from analysis of HIV-1 replication in peripheral blood mononuclear cells. *Retrovirology* 2:21.

41. Moosmann, P., O. Georgiev, H. J. Thiesen, M. Hagmann, and W. Schaffner. 1997. Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor. *Biol. Chem.* 378:669-677.

42. Nagashunmugam, T., A. Velpandi, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, V. S. Kalyanaraman, and A. Srinivasan. 1992. Mutation in the primer binding site of the type 1 human immunodeficiency virus genome affects virus production and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4114-4118.

43. Pereira, L. A., K. Bentley, A. Peeters, M. J. Churchill, and N. J. Deacon. 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res.* 28:663-668.

44. Platt, E. J., K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro, and D. Kabat. 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:2855-2864.

45. Reynolds, L., C. Uliman, M. Moore, M. Isalan, M. J. West, P. Clapham, A. Mug, and Y. Choo. 2003. Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of

【 0 2 4 1 】

10

20

30

40

【化 2 0】

HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1615-1620.

46. Rhim, H., J. Park, and C. D. Morrow. 1991. Deletions in the tRNA^{Lys} primer-binding site of human immunodeficiency virus type 1 identify essential regions for reverse transcription. *J. Virol.* 65:4555-4564.

47. Sadowski, I., J. Ma, S. Triezenberg, and M. Ptashne. 1988. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335:563-564. 10

48. Schragar, L. K., and M. P. D'Souza. 1998. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *JAMA* 280:67-71.

49. Segal, D. J., B. Dreier, R. R. Beerli, and C. F. Barbas III. 1999. Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2758-2763. 20

50. Segal, D. J., J. Goncalves, S. Eberhardy, C. H. Swan, B. F. Torbett, X. Li, and C. F. Barbas III. 2004. Attenuation of HIV-1 replication in primary human cells with a designed zinc finger transcription factor. *J. Biol. Chem.* 279: 14509-14519.

51. Senatore, B., A. Cafieri, L. Di Marino, M. Rosati, P. P. Di Nocera, and G. Grimaldi. 1999. A variety of RNA polymerases II and III-dependent promoter classes is repressed by factors containing the Kruppel-associated/ finger preceding box of zinc finger proteins. *Gene* 234:381-394.

52. Sodroski, J., W. C. Goh, C. Rosen, K. Campbell, and W. A. Haseltine. 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322:470-474. 30

53. Stege, J. T., X. Guan, T. Ho, R. N. Beachy, and C. F. Barbas III. 2002. Controlling gene expression in plants using synthetic zinc finger transcription factors. *Plant J.* 32:1077-1086.

54. Verdin, E., P. Paras, Jr., and C. Van Lint. 1993. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J.* 12:3249-3259. 40

【 0 2 4 2】

【化 2 1】

55. Wakefield, J. K., S. M. Karig, and C. D. Morrow. 1996. Construction of a type 1 human immunodeficiency virus that maintains a primer binding site complementary to tRNA^{His}. *J. Virol.* 70:966-975.

56. Wakefield, J. K., and C. D. Morrow. 1996. Mutations within the primer binding site of the human immunodeficiency virus type 1 define sequence requirements essential for reverse transcription. *Virology* 220:290-298.

57. Wakefield, J. K., H. Rhim, and C. D. Morrow. 1994. Minimal sequence requirements of a functional human immunodeficiency virus type 1 primer binding site. *J. Virol.* 68:1605-1614.

10

58. Wakefield, J. K., A. G. Wolf, and C. D. Morrow. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 can use different tRNAs as primers for reverse transcription but selectively maintains a primer binding site complementary to tRNA^{Lys}₃. *J. Virol.*

69:6021-6029.

20

59. Waninger, S., K. Kuhen, X. Hu, J. E. Chatterton, F. Wong-Staal, and H. Tang. 2004. Identification of cellular cofactors for human immunodeficiency virus replication via a ribozyme-based genomics approach. *J. Virol.* 78:12829- 12837.

60. Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw, and J. C. Kappes. 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1896—1905.

61. Zhang, L., S. K. Spratt, Q. Liu, B. Johnstone, H. Qi, E. E. Raschke, A. C. Jamieson, E. J. Rebar, A. P. Wolfe, and C. C. Case. 2000. Synthetic zinc finger transcription factor action at an endogenous chromosomal site. Activation of the human erythropoietin gene. *J. Biol. Chem.* 275:33850—33860.

30

【 0 2 4 3 】

【表 1 4 - 1】

表 1 4

引用したタンパク質配列と核酸配列のまとめヘプタペプチド亜鉛フィンガー部分

<u>ヘプタペプチド</u>	<u>配列番号</u>	
QAS-N-LIS	1	
SRG-N-LKS	2	
RLD-N-LQT	3	
ARG-N-LRT	4	
RKD-A-LRG	5	
RED-N-LHT	6	
ARG-N-LKS	7	
RSD-N-LTT	8	
VRG-N-LKS	9	
VRG-N-LRT	10	
RLR-A-LDR	11	10
DMG-A-LEA	12	
EKD-A-LRG	13	
RSD-H-LTT	14	
AQQ-L-LMW	15	
RSD-E-RKR	16	
DYQ-S-LRQ	17	
CFS-R-LVR	18	
GDG-G-LWE	19	
LQR-P-LRG	20	
QGL-A-CAA	21	
WVG-W-LGS	22	
RLR-D-IQF	23	20
GRS-Q-LSC	24	
GWQ-R-LLT	25	
SGR-P-LAS	26	
APR-L-LGP	27	
APK-A-LGW	28	
SVH-E-LQG	29	
AQA-A-LSW	30	
GAN-A-LRR	31	
QSL-L-LGA	32	
HRG-T-LGG	33	
QVG-L-LAR	34	
GAR-G-LRG	35	30

【 0 2 4 4 】

【表 1 4 - 2】

DKH-M-LDT	36	
DLG-G-LRQ	37	
QCY-R-LER	38	
AEA-E-LQR	39	
QGG-V-LAA	40	
QGR-C-LVT	41	
HPE-A-LDN	42	
GRG-A-LQA	43	
LAS-R-LQQ	44	
RED-N-LIS	45	10
RGG-W-LOA	46	
DAS-N-LIS	47	
EAS-N-LIS	48	
RAS-N-LIS	49	
TAS-N-LIS	50	
SAS-N-LIS	51	
QAS-T-LIS	52	
QAS-D-LIS	53	
QAS-E-LIS	54	
QAS-H-LIS	55	
QAS-K-LIS	56	20
QAS-S-LIS	57	
QAS-A-LIS	58	
DAS-T-LIS	59	
DAS-D-LIS	60	
DAS-E-LIS	61	
DAS-H-LIS	62	
DAS-K-LIS	63	
DAS-S-LIS	64	
DAS-A-LIS	65	
EAS-T-LIS	66	
EAS-D-LIS	67	
EAS-E-LIS	68	30
EAS-H-LIS	69	
EAS-K-LIS	70	
EAS-S-LIS	71	
EAS-A-LIS	72	
RAS-T-LIS	73	
RAS-D-LIS	74	
RAS-E-LIS	75	
RAS-H-LIS	76	
RAS-K-LIS	77	
RAS-S-LIS	78	
RAS-A-LIS	79	
TAS-T-LIS	80	40
TAS-D-LIS	81	

【 0 2 4 5 】

【表 1 4 - 3】

TAS-E-LIS	82	
TAS-H-LIS	83	
TAS-K-LIS	84	
TAS-S-LIS	85	
TAS-A-LIS	86	
SAS-T-LIS	87	
SAS-D-LIS	88	
SAS-E-LIS	89	
SAS-H-LIS	90	
SAS-K-LIS	91	10
SAS-S-LIS	92	
SAS-A-LIS	93	
QLD-N-LQT	94	
DLD-N-LQT	95	
ELD-N-LQT	96	
TLD-N-LQT	97	
SLD-N-LQT	98	
RLD-T-LQT	99	
RLD-D-LQT	100	
RLD-E-LQT	101	
RLD-H-LQT	102	
RLD-K-LQT	103	20
RLD-S-LQT	104	
RLD-A-LQT	105	
QLD-T-LQT	106	
QLD-D-LQT	107	
QLD-E-LQT	108	
QLD-H-LQT	109	
QLD-K-LQT	110	
QLD-S-LQT	111	
QLD-A-LQT	112	
DLD-T-LQT	113	
DLD-D-LQT	114	30
DLD-E-LQT	115	
DLD-H-LQT	116	
DLD-K-LQT	117	
DLD-S-LQT	118	
DLD-A-LQT	119	
ELD-T-LQT	120	
ELD-D-LQT	121	
ELD-E-LQT	122	
ELD-H-LQT	123	
ELD-K-LQT	124	
ELD-S-LQT	125	
ELD-A-LQT	126	40
TLD-T-LQT	127	

【 0 2 4 6 】

【表 1 4 - 4】

TLD-D-LQT	128	
TLD-E-LQT	129	
TLD-H-LQT	130	
TLD-K-LQT	131	
TLD-S-LQT	132	
TLD-A-LQT	133	
SLD-T-LQT	134	
SLD-D-LQT	135	
SLD-E-LQT	136	
SLD-H-LQT	137	10
SLD-K-LQT	138	
SLD-S-LQT	139	
SLD-A-LQT	140	
ARG-T-LRT	141	
ARG-D-LRT	142	
ARG-E-LRT	143	
ARG-H-LRT	144	
ARG-K-LRT	145	
ARG-S-LRT	146	
ARG-A-LRT	147	
SRG-T-LRT	148	
SRG-D-LRT	149	20
SRG-E-LRT	150	
SRG-H-LRT	151	
SRG-K-LRT	152	
SRG-S-LRT	153	
SRG-A-LRT	154	
QKD-A-LRG	155	
DKD-A-LRG	156	
EKD-A-LRG	157	
TKD-A-LRG	158	
SKD-A-LRG	159	
RKD-N-LRG	160	30
RKD-T-LRG	161	
RKD-D-LRG	162	
RKD-E-LRG	163	
RKD-H-LRG	164	
RKD-K-LRG	165	
RKD-S-LRG	166	
QKD-N-LRG	167	
QKD-T-LRG	168	
QKD-D-LRG	169	
QKD-E-LRG	170	
QKD-H-LRG	171	
QKD-K-LRG	172	40
QKD-S-LRG	173	

【 0 2 4 7 】

【表 1 4 - 5】

DKD-N-LRG	174	
DKD-T-LRG	175	
DKD-D-LRG	176	
DKD-E-LRG	177	
DKD-H-LRG	178	
DKD-K-LRG	179	
DKD-S-LRG	180	
EKD-N-LRG	181	
EKD-T-LRG	182	
EKD-D-LRG	183	10
EKD-E-LRG	184	
EKD-H-LRG	185	
EKD-K-LRG	186	
EKD-S-LRG	187	
TKD-N-LRG	188	
TKD-T-LRG	189	
TKD-D-LRG	190	
TKD-E-LRG	191	
TKD-H-LRG	192	
TKD-K-LRG	193	
TKD-S-LRG	194	20
SKD-N-LRG	195	
SKD-T-LRG	196	
SKD-D-LRG	197	
SKD-E-LRG	198	
SKD-H-LRG	199	
SKD-K-LRG	200	
SKD-S-LRG	201	
VRG-T-LRT	202	
VRG-D-LRT	203	
VRG-E-LRT	204	
VRG-H-LRT	205	
VRG-K-LRT	206	30
VRG-S-LRT	207	
VRG-T-LRT	208	
QLR-A-LDR	209	
DLR-A-LDR	210	
ELR-A-LDR	211	
TLR-A-LDR	212	
SLR-A-LDR	213	
RSD-N-RKR	214	
RSD-T-RKR	215	
RSD-D-RKR	216	
RSD-H-RKR	217	40
RSD-K-RKR	218	
RSD-S-RKR	219	

【 0 2 4 8 】

【表 1 4 - 6】

RSD-A-RKR	220	
QYQ-S-LRQ	221	
EYQ-S-LRQ	222	
RYQ-S-LRQ	223	
TYQ-S-LRQ	224	
SYQ-S-LRQ	225	
RLR-N-IQF	226	
RLR-T-IQF	227	
RLR-E-IQF	228	
RLR-H-IQF	229	10
RLR-K-IQF	230	
RLR-S-IQF	231	
RLR-A-IQF	232	
DSL-L-LGA	233	
ESL-L-LGA	234	
RSL-L-LGA	235	
TSL-L-LGA	236	
SSL-L-LGA	237	
HRG-N-LGG	238	
HRG-D-LGG	239	
HRG-E-LGG	240	
HRG-H-LGG	241	20
HRG-K-LGG	242	
HRG-S-LGG	243	
HRG-A-LGG	244	
QKH-M-LDT	245	
EKH-M-LDT	246	
RKH-M-LDT	247	
TKH-M-LDT	248	
SKH-M-LDT	249	
QLG-G-LRQ	250	
ELG-G-LRQ	251	
RLG-G-LRQ	252	30
TLG-G-LRQ	253	
SLG-G-LRQ	254	
AEA-N-LQR	255	
AEA-T-LQR	256	
AEA-D-LQR	257	
AEA-H-LQR	258	
AEA-K-LQR	259	
AEA-S-LQR	260	
AEA-A-LQR	261	
DGR-C-LVT	262	
EGR-C-LVT	263	
RGR-C-LVT	264	40
TGR-C-LVT	265	

【 0 2 4 9 】

【表 1 4 - 7】

SGR-C-LVT	266	
QED-N-LHT	267	
DED-N-LHT	268	
EED-N-LHT	269	
SED-N-LHT	270	
RED-T-LHT	271	
RED-D-LHT	272	
RED-E-LHT	273	
RED-H-LHT	274	
RED-K-LHT	275	10
RED-S-LHT	276	
RED-A-LHT	277	
QED-T-LHT	278	
QED-D-LHT	279	
QED-E-LHT	280	
QED-H-LHT	281	
QED-K-LHT	282	
QED-S-LHT	283	
QED-A-LHT	284	
DED-T-LHT	285	
DED-D-LHT	286	20
DED-E-LHT	287	
DED-H-LHT	288	
DED-K-LHT	289	
DED-S-LHT	290	
DED-A-LHT	291	
EED-T-LHT	292	
EED-D-LHT	293	
EED-E-LHT	294	
EED-H-LHT	295	
EED-K-LHT	296	
EED-S-LHT	297	
EED-A-LHT	298	30
TED-T-LHT	299	
TED-D-LHT	300	
TED-E-LHT	301	
TED-H-LHT	302	
TED-K-LHT	303	
TED-S-LHT	304	
TED-A-LHT	305	
SED-T-LHT	306	
SED-D-LHT	307	
SED-E-LHT	308	
SED-H-LHT	309	40
SED-K-LHT	310	
SED-S-LHT	311	

【 0 2 5 0 】

【表 1 4 - 8】

SED-A-LHT	312	
QED-N-LIS	313	
DED-N-LIS	314	
EED-N-LIS	315	
SED-N-LIS	316	
RED-T-LIS	317	
RED-D-LIS	318	
RED-E-LIS	319	
RED-H-LIS	320	
RED-K-LIS	321	10
RED-S-LIS	322	
RED-A-LIS	323	
QED-T-LIS	324	
QED-D-LIS	325	
QED-E-LIS	326	
QED-H-LIS	327	
QED-K-LIS	328	
QED-S-LIS	329	
QED-A-LIS	330	
DED-T-LIS	331	
DED-D-LIS	332	20
DED-E-LIS	333	
DED-H-LIS	334	
DED-K-LIS	335	
DED-S-LIS	336	
DED-A-LIS	337	
EED-T-LIS	338	
EED-D-LIS	339	
EED-E-LIS	340	
EED-H-LIS	341	
EED-K-LIS	342	
EED-S-LIS	343	
EED-A-LIS	344	30
TED-T-LIS	345	
TED-D-LIS	346	
TED-E-LIS	347	
TED-H-LIS	348	
TED-K-LIS	349	
TED-S-LIS	350	
TED-A-LIS	351	
SED-T-LIS	352	
SED-D-LIS	353	
SED-E-LIS	354	
SED-H-LIS	355	40
SED-K-LIS	356	
SED-S-LIS	357	

【 0 2 5 1 】

【表 1 4 - 9】

SED-A-LIS	358	
TGG-W-LQA	359	
SGG-W-LQA	360	
DGG-W-LQA	361	
EGG-W-LQA	362	
QGG-W-LQA	363	
RGG-T-LQA	364	
RGG-D-LQA	365	
RGG-E-LQA	366	
RGG-N-LQA	367	10
RGG-H-LQA	368	
RGG-K-LQA	369	
RGG-S-LQA	370	
RGG-A-LQA	371	
TGG-T-LQA	372	
TGG-D-LQA	373	
TGG-E-LQA	374	
TGG-N-LQA	375	
TGG-H-LQA	376	
TGG-K-LQA	377	
TGG-S-LQA	378	
TGG-A-LQA	379	20
SGG-T-LQA	380	
SGG-D-LQA	381	
SGG-E-LQA	382	
SGG-N-LQA	383	
SGG-H-LQA	384	
SGG-K-LQA	385	
SGG-S-LQA	386	
SGG-A-LQA	387	
DGG-T-LQA	388	
DGG-D-LQA	389	
DGG-E-LQA	390	30
DGG-N-LQA	391	
DGG-H-LQA	392	
DGG-K-LQA	393	
DGG-S-LQA	394	
DGG-A-LQA	395	
EGG-T-LQA	396	
EGG-D-LQA	397	
EGG-E-LQA	398	
EGG-N-LQA	399	
EGG-H-LQA	400	
EGG-K-LQA	401	
EGG-S-LQA	402	40
EGG-A-LQA	403	

【 0 2 5 2 】

【表 1 4 - 1 0】

QGG-T-LQA	404
QGG-D-LQA	405
QGG-E-LQA	406
QGG-N-LQA	407
QGG-H-LQA	408
QGG-K-LQA	409
QGG-S-LQA	410
QGG-A-LQA	411

他のタンパク質配列

10

TGEKP (リンカー)	412
RSD-E-LKR (亜鉛フィンガードメイン)	413
TGGGGSGGGGTGEKP (リンカー)	414
DALDDFDLDM (活性化ドメイン)	415
LRQKDGGGSERP (リンカー)	416
LRQKDGERP (リンカー)	417
GGRGRGRGRQ (リンカー)	418
QNKKGSGDGKKQHI (リンカー)	419
TGGERP (リンカー)	420
ATGEKP (リンカー)	421
GGGSGGGGEGP (リンカー)	422
QRA-N-LRA	449
QRH-S-LTE	450
QSG-D-LRR	451
RSD-V-LVR	452
RSD-D-LVR	453
HTG-H-LLE	454
QSS-N-LVR	455
RAD-N-LTE	456
RND-T-LTE	457
DSG-N-LRV	458
RSD-H-LTN	459
DPG-N-LVR	460

20

30

ヌクレオチド配列

GCGNNNGCG	423
GATCNNGCG	424
AAATCTCTAGCAGTGGCG	425
GATACGACAGCTAGCTGGAAGGGCTAATTCCTCCC	426
AACGTCTGGCTCGAGTTCAGGTCCCTGTTCTGGGCGCCACTGCTAG-	427
AGATTTTCC	427
CCGCTGGGGACTTTCCAGGGA	428

40

【 0 2 5 3 】

【表 1 4 - 1 1】

CACTGCTAGAGATTTTCCACACTG	429
CGCCCGAACAGGGAC	430
TGCCGAAACCCGGGA	431
ACTGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGAC	432
AAATCTCTAGCAGTGGCG	433
GTCTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCG	434
GCAGTGGCGCCCGAACAG	435
TGGCGCCCGAACAGGGAC	436
GGAGGCGTGGCCTGGGCG	437
GGAGGTGTGGTTTGGGCG	438
GGAGGCGTGACCTGGGCG	439
GGAGGCGTGACCTGGGCG	440
GGAGGTGTGGCCGGGGCG	441
AGGGCGGTCCAGAGGGCG	442
GGAGGGTGGCCTGGGCG	443
GCAGTGGCGCCCGAACAG	444
CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAAA-	445
GCGAA	446
CAGTGTGGAAAATCTCTAGCACTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAAA-	447
GCGAA	448
CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGGACGAACAGGGACCTGAAA-	
GCGAA	

10

20

本発明の利点

本発明により、核酸配列（特に、DNA配列）についての多用途の結合タンパク質が提供される。これらの結合タンパク質は、転写調節因子と結合することができ、したがって、特異的な様式での特定の遺伝子のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションに利用することができる。したがって、これらの結合タンパク質は、ガン、自己免疫疾患、代謝性疾患、発育障害、および遺伝子発現の不調が関係している他の疾患または症状の処置のための遺伝子治療またはタンパク質治療に使用することができる。

30

【0254】

本発明によるポリペプチド、ポリペプチド組成物、単離されたヘプタペプチド、薬学的組成物、および方法は、遺伝子発現の制御または調節によって処置することができる疾患および症状（HIV-1感染を含む）を処置することができる医薬品の調製についての産業上の適用性を有する。

【0255】

値の範囲に関して、本発明には、文中に明記されていない限りは、範囲の上限および下限の間に存在しているそれぞれの値から、下限値の少なくとも10分の1までが含まれる。さらに、本発明には、記載した範囲から具体的に排除されていない限りは、任意の他の記載した間に存在している値と範囲が含まれ、これには、範囲の上限と下限のいずれかまたは両方が含まれる。

40

【0256】

他に明記されていない限りは、本明細書中で使用される全ての技術的および科学的用語の意味は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されている意味である。当業者にはまた、本明細書中に記載されている方法と材料に類似するかまたは同等である任意の方法と材料もまた、本発明を実施または試験するために使用できることは明らかである。

【0257】

本明細書中で議論した刊行物および特許は、本出願の出願日前のそれらの開示だけが提供される。本明細書中では、本発明が以前の発明からそのような刊行物を予見することの

50

了解とは解釈されない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の公開日とは異なる場合があり、個別に確認することが必要であり得る。

【0258】

引用した全ての刊行物は、それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられ、これには、全ての公開された特許、特許出願、学術文献、さらには、そのような公開されている文献の中に引用されている刊行物が含まれる。しかし、引用により本明細書中に組み入れられる任意の刊行物が今後公開される情報について言及する範囲に関して、出願人は、本出願の提出日以後に公開された全てのそのような情報は先行技術としては認めない。

【0259】

本明細書中、および添付の特許請求の範囲において使用される場合は、単数形には複数形が含まれる。例えば、用語「a」、「an」、および「the」には、文中に明記されていない限りは、複数についての言及も含まれる。加えて、一連のエレメントの前の用語「少なくとも」は、一連のエレメントのそれぞれについて言及されると理解される。本明細書中に実例を伴って記載された本発明は、本明細書中には特に開示されていない任意のエレメント（単数または複数）、限定（単数または複数）が存在しない条件下で安定に行うことができる。したがって、例えば、用語「含む（comprising）」、「含む（including）」、「含まれる（containing）」などは、拡大して読まれるべきであり、限定されるべきではない。加えて、本明細書中で使用される用語および表現は、記述的な用語として使用され、限定ではなく、またそのような用語および表現の使用によって、将来示され、記載されるあらゆる等価物またはその一部を除く意図はなく、そして、請求される本発明の範囲内において様々な改良が可能であると理解される。したがって、本発明は好ましい実施形態および任意の特徴によって具体的に開示されているが、本明細書中に開示されている本発明の改良および変更は当業者が行うことができること、そして、そのような改良および変更が本明細書中に開示される本発明の範囲内に含まれると考えられることが理解されるべきである。本発明は、本明細書中で広く、一般的に記載されている。一般的な開示の範囲に含まれるより狭い種、および亜族のグループのそれぞれもまた、これらの発明の一部を形成する。これには、条件付きでの個々の発明の一般的な記載、または属から任意の目的の物を除くネガティブな限定が、排除される物質が具体的にその中に残っているかどうかにはかわからず、含まれる。加えて、本発明の特徴または態様がMarkushのグループで記載されている場合には、当業者は、それによってMarkushグループの任意の個々のメンバーまたは複数のメンバーのサブグループに関しても記載されていることを認識するであろう。上記記載が説明を意図するものであって、限定を意図しないこともまた理解される。上記の説明を参照すれば、当業者にとって多くの実施形態は明らかであろう。したがって、本発明の範囲は、上記記載を参照して決定されるべきではなく、代わりに、特許請求の範囲に与えられる等価物の全範囲とともに、添付の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。当業者は、日常的に行われる実験だけを使用して、記載された本発明の多くの特異的な実施形態の等価物を理解、または確認できるであろう。そのような等価物のことは、以下の特許請求の範囲に含まれると意図される。

【図面の簡単な説明】

【0260】

【図1】図1は、マウスの転写因子Zif268の垂鉛フィンガー-DNA複合体のモデルである。

【図2】図2は、DNAの特異的な塩基と転写因子の3つのフィンガーの特異的なアミノ酸との間での相互作用に関する、転写因子Zif268のタンパク質-DNA相互作用を示している図である。

【図3】図3は、実施例1のプロセスによって作成された垂鉛フィンガーの数についての多標的特異性アッセイの結果を示しているグラフの第1のシリーズである：（（a）QAS-N-LIS（TAA-1a-2）（配列番号1；5'-（TAA）-3'に結合する；（b）SRG-N-LKS（TAC-2c-2）（配列番号2；5'-（TAC）-3

10

20

30

40

50

’に結合する；(c) ARG - N - LKS (TAC - 2 d - 2) (配列番号7；5’ - (TAC) - 3’に結合する；(d) RLD - N - LQT (TAG - 3 c - 2) (配列番号3；5’ - (TAG) - 3’に結合する；(e) RSD - N - LTT (TAG - 3 d - 2) (配列番号8；5’ - (TAG) - 3’に結合する；(f) ARG - N - LRT (TAT - 4 c - 8) (配列番号4；5’ - (TAT) - 3’に結合する)；(g) VRG - N - KLS (TAT - 4 d - 2) (配列番号9；5’ - (TAT) - 3’に結合する)；および(h) RKD - A - LRG (TTG - 6 c - 2) (配列番号5；5’ - (TTG) - 3’に結合する)。

【図4】図4は、分析したさらに別の多数の亜鉛フィンガーについての多標的特異性アッセイの結果を示しているグラフの第2のシリーズである：((a) RLD - N - LQT (配列番号3；5’ - (TAG) - 3’に結合する；(b) ARG - N - LRT (配列番号4；5’ - (TAT) - 3’に結合する；(c) SRG - N - LKS (配列番号2；5’ - (TAT) - 3’に結合する；(d) QAS - N - LIS (配列番号1；5’ - (TAA) - 3’に結合する；(e) RED - N - LHT (配列番号6；5’ - (TAG) - 3’に結合する；および(f) ARG - N - LKS (配列番号7；5’ - (TAT) - 3’に結合する)。

10

【図5】図5は、亜鉛フィンガータンパク質 Zif 268 のリンカー領域の構造と機能を示している図である。

【図6】図6は、改良されたリンカーの構築のための設計概念を示している図である(実施例2)。

20

【図7】図7は、HIV - 1 LTR 上の PBS 亜鉛フィンガータンパク質の結合部位を示している図である。示した配列は、HXB 2 参照株に由来する(実施例12)。

【図8】図8は、一時トランスフェクション(transient transfection)アッセイにおける PBS 亜鉛フィンガー結合定数と HIV - 1 LTR の阻害を示す。(A) PBS 亜鉛フィンガーのゲルシフト。PBS 配列を含む³²P 標識 DNA ヘアピンオリゴヌクレオチドを、タンパク質の量を減少させながらインキュベートした。遊離の DNA と結合した DNA の密度を、Image Quant ソフトウェアを使用して定量し、それぞれのタンパク質について K_D を計算した。(B) KRA B 抑制ドメインに融合させられた PBS タンパク質の抑制を比較する一時的なレポーターアッセイ。左側のグラフは、HIV - 1 LTR によって駆動されるルシフェラーゼレポーターと、Tat タンパク質を発現するプラスミドでの KRA B - 亜鉛フィンガータンパク質のトランスフェクションによる結果を示す。右側のグラフは、SV 40 プロモーターによって駆動されるルシフェラーゼレポーターでの KRA B - 亜鉛フィンガータンパク質の対照のトランスフェクションを示す。(C) PBS 亜鉛フィンガータンパク質のタンパク質発現レベル。細胞を、パネル(B)と同様に亜鉛フィンガータンパク質で一時的にトランスフェクトし、細胞抽出物を調製した。タンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離させ、ポリビニリデンジフルオライド膜に移動させた。プロットを、亜鉛フィンガータンパク質上の HA タグを認識する抗体または - アクチン抗体でプローブした。相対的なタンパク質の発現を、亜鉛フィンガーの発現をそれぞれの試料中の - アクチンの発現に対して校正することによって計算した。

30

40

【図9】図9は、染色体に組み込まれた HIV - 1 LTR レポーター上の PBS 亜鉛フィンガータンパク質の抑制、およびインビボでの結合を示す。(A) KRA B - PBS 亜鉛フィンガータンパク質および Tat を、TZM - b1 細胞株(ルシフェラーゼおよび lacZ 遺伝子の発現を駆動する染色体に組み込まれた HIV 構築物が含まれる HeLa 細胞株)の中で一時的に発現させた。(B) 亜鉛フィンガータンパク質に結合させた HIV - 1 LTR のクロマチン免疫沈降。亜鉛フィンガータンパク質を、TZM - b1 細胞の中でのレトロウイルス形質導入によって発現させた。細胞をホルムアルデヒドで架橋させ、核抽出物を調製した。抽出物を、RNA ポリメラーゼ II (pol II) または Sp1 コンセンサス亜鉛フィンガー(Sp1C)を認識する抗体とともにインキュベートし、Staph A 細胞で沈降させた。免疫沈降させた DNA を精製し、LTR に特異的なプ

50

ライマーを使用してH I V - 1 L T Rの存在についてP C Rによって分析した。(C) t R N A ^{L y s}₃のノーザンブロット。H e L a細胞を示したK R A B - Z Fタンパク質でトランスフェクトし、全R N Aを抽出した。R N Aを変性ポリアクリルアミドゲルによって分離させ、膜に移動させた。これを、t R N A ^{L y s}₃およびt R N A ^{P h e}について放射性標識オリゴヌクレオチドでプローブした。それぞれのレーンの下の数字は、t R N A ^{P h e}に対して校正した後の、t R N A ^{L y s}₃の相対的な発現を示す。

【図10】図10は、P B S 亜鉛フィンガータンパク質のウイルス生産の一時的な阻害を示しているグラフである。示したK R A B - P B S 亜鉛フィンガーを発現するプラスミド、およびH I V - 1のN L 4 - 3株のゲノムを、293T細胞の中に同時トランスフェクトした。ウイルスの生産を、p 24 E L I S Aによってモニターした。

【図11】図11は、初代細胞の中でのP B S 亜鉛フィンガーによるH I Vウイルスの生産の阻害を示す。(A) P B M Cの中での亜鉛フィンガーの発現のフローサイトメトリー分析。P B M Cに、K R A B - P B S 亜鉛フィンガータンパク質を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。細胞を固定し、Z FのC末端H Aタグを認識する抗体で染色し、そして亜鉛フィンガーの発現についてフローサイトメトリーによって分析した。右側のパネルは、C D 4およびH A抗体について染色したK R A B - P B S 2を形質導入した細胞のフローサイトメトリー分析を示している。(B) 示したK R A B - P B S レンチウイルスベクターをP B M Cに形質導入し、その後、0、1のM O IでのH I V - 1株N L 4 - 3による感染でチャレンジした。p 24レベルを、感染の3日後、7日後、12日後、および18日後にモニターした。

【図12】図12は、亜鉛フィンガー(Z F)タンパク質でのP B M Cの形質導入は細胞の生存性に影響を与えなかったことを示しているグラフである。示したZ F転写因子を形質導入したP B M C、または形質導入しなかった細胞をH I V - 1でチャレンジした。示した時点で、細胞の生存性をW S T - 1アッセイによって決定した。

【図13】図13は、FサブタイプL T Rに対するK R A B - H L T 1の有効性の低下を示しているグラフである。(A) 様々なH I V - 1 Mグループのサブタイプの中のH L T R 3およびP B S 2 Z F結合部位の配列比較。点線は配列同一性を示し、点は欠失を示す。(B) K R A B - H L T R 3(左)またはK R A B - P B S 2(右)のいずれかを形質導入したP B M Cを、野生型またはFサブタイプL T Rのいずれかを含みBサブタイプウイルスでチャレンジした。ウイルスの複製を、p 24の生産を測定することによってモニターした。

【図14】図14は、亜鉛フィンガーの抑制に反応するプライマー結合部位の変異を示す。(A) P B M CにK R A B - P B S 2を形質導入し、H I V - 1に感染させた。ウイルスを上清から回収し、これを使用して形質導入した細胞の新しい集団を再度感染させた。数回の後、生じたウイルスをクローニングし、20個のクローンからプライマー結合部位領域を配列決定した。変異の部位を下線で示した。(B) 野生型およびM u t - 3 H I VによるK R A B - P B Sを形質導入したP B M Cの感染。(C) 野生型およびM u t - 3ヘアピンオリゴヌクレオチドを用いたP B S 2のゲルシフト。

10

20

30

【 図 1 】

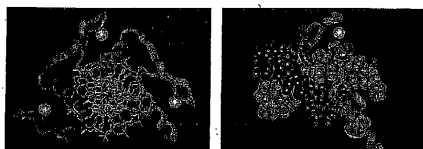


FIG. 1

【图 2】

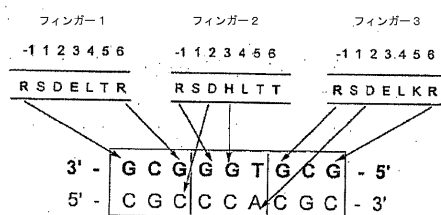


FIG. 2

【 図 4 】

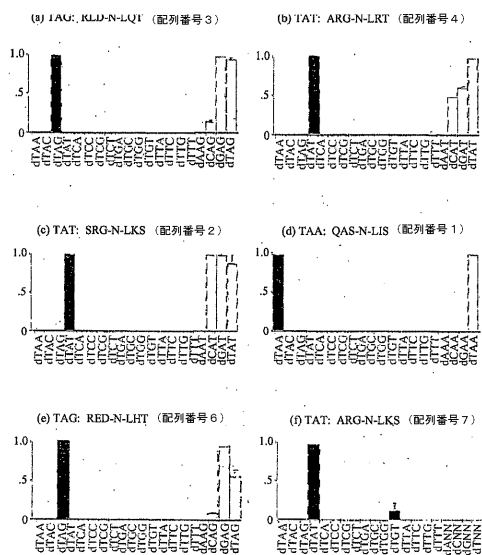


FIG. 4

【 図 5 】

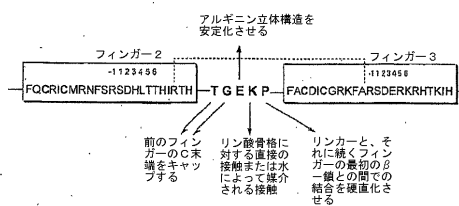


FIG. 5

【 図 6 】

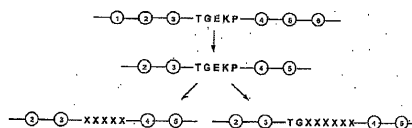


FIG. 6

【图 8】

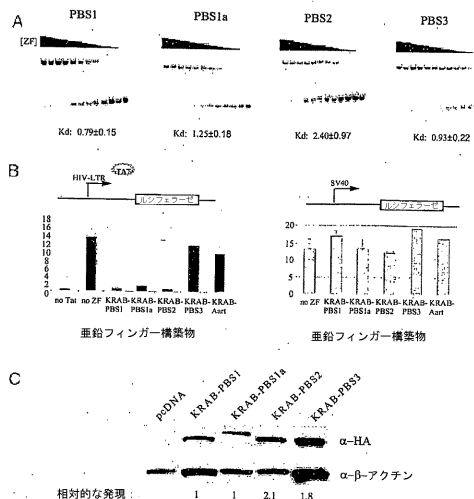


FIG. 8

【 図 1 0 】

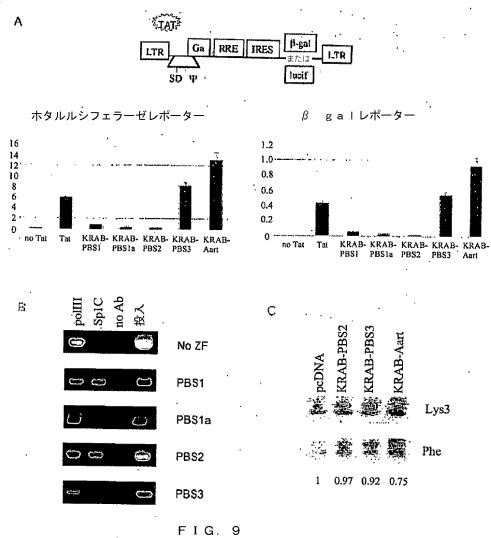
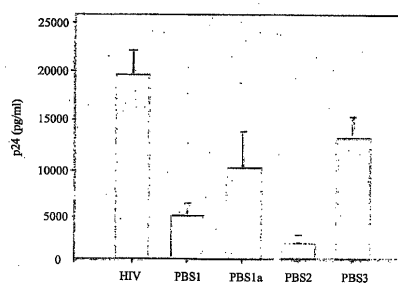
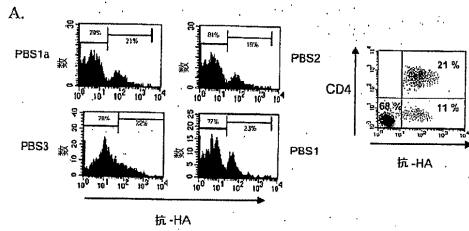


FIG. 10



【図 1 1】



B.

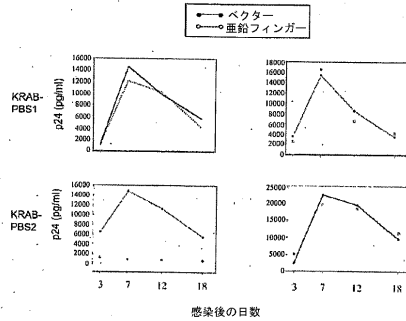


FIG. 11

【図 1 2】

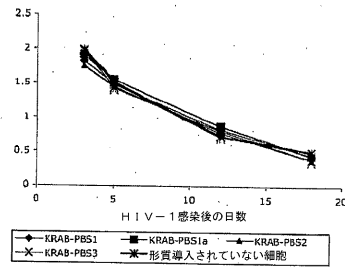


FIG. 12

【図 1 3】

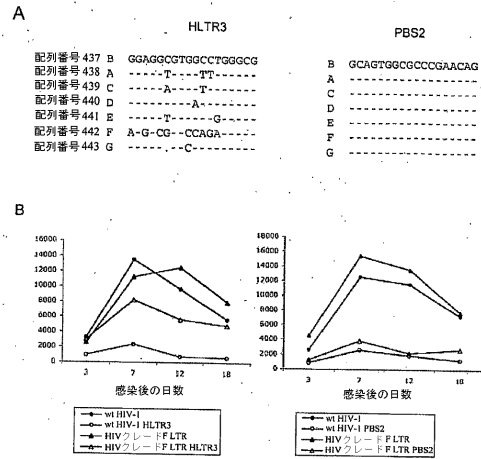


FIG. 13

【図 1 4】

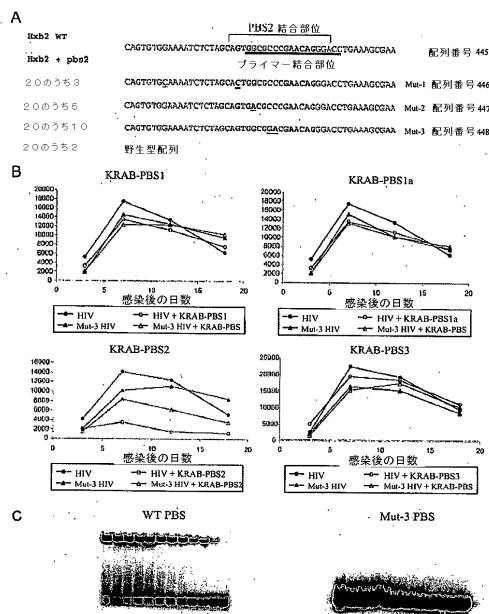


FIG. 14

【配列表】

2009520463000001.app

【国際調査報告】

PCT/US2006/061289

60800610013



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/61289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07K 14/00(2006.01) USPC: 530/350 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.: 530/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) none												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 03/066828 A2 (BARBAS et al.) 14 August 2003 (14.08.2003), entire document.</td> <td>1-88</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 03/066828 A2 (BARBAS et al.) 14 August 2003 (14.08.2003), entire document.	1-88				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	WO 03/066828 A2 (BARBAS et al.) 14 August 2003 (14.08.2003), entire document.	1-88										
<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: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family											
"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 20 June 2008 (20.06.2008)		Date of mailing of the international search report 05 AUG 2008										
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. (571) 273-3201		Authorized officer Karen Cochrane Carlson, Ph.D. Telephone No. 571-272-0700 31.10.2008										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

PCT/US2006/061289

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/61289

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1-411, claim(s) 1-88, drawn to polypeptides having nucleotide binding regions SEQ ID NO: 1-411, respectively.

Group 412 - 822, claim(s) 89-115, drawn to polynucleotides encoding polypeptides having nucleotide binding regions SEQ ID NO: 1-411, respectively.

Group 823-1233, claim(s) 116-132, drawn to a method for regulating expression via polypeptide having nucleotide binding regions SEQ ID NO: 1-411, respectively.

Group 1234-1644, claim(s) 133-137, drawn to a method for inhibiting HIV-1 replication in vivo via polypeptide having nucleotide binding regions SEQ ID NO: 1-411, respectively.

Group 1645-2055, claim(s) 138-145, drawn to a method for inhibiting HIV-1 replication via gene therapy.

The inventions listed as Groups 1-2055 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The independent claims read on thousands of peptide sequences that are not related in structure. These linking claims lack novelty because Barbas et al. (WO 03/066828) teach a polypeptide comprising instant SEQ ID NO: 1 as Barbas SEQ ID NO: 52, and this SEQ ID NO: 52 binds to TNN (page 33).

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 5/00 A
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K 7/06
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18

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

(72)発明者 バーバス, カルロス エフ. ザ サード
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92075, ソラナ ビーチ, グラナドス アベニュー
624

(72)発明者 ドライア, パーギット
スイス国 ツェーハー - 8106 レーゲンスドルフ, ルーヴィゼンシュトラッセ 15

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA05 CA07 DA06 EA03 FA10 GA14 GA19 GA25
GA27 HA01 HA20
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AA91Y AB01 BA02 BA03 BA16
BA25 CA24 CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA08 BA17 BA23 MA52 MA55 MA56
MA66 NA14 ZC551 ZC552
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZC55
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 EA61 EA65 FA74