

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年8月26日(2010.8.26)

【公表番号】特表2009-542228(P2009-542228A)

【公表日】平成21年12月3日(2009.12.3)

【年通号数】公開・登録公報2009-048

【出願番号】特願2009-518632(P2009-518632)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 0 7 K	7/06	(2006.01)
C 0 7 K	7/08	(2006.01)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
A 0 1 K	67/027	(2006.01)
A 0 1 H	5/00	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	7/06	(2006.01)
A 6 1 P	3/06	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 P	21/04	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2006.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	7/06	
C 0 7 K	7/08	
C 1 2 N	9/16	A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 Q	1/02	
A 0 1 K	67/027	
A 0 1 H	5/00	A
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	21/04	

A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 31/7088

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月5日(2010.7.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインに作動可能に連結されたセリンリコンビナーゼを含むキメラリコンビナーゼタンパク質であって、前記キメラリコンビナーゼタンパク質は、前記ジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインにより特異的に結合されるDNA部位で部位特異的組換えを触媒し、前記セリンリコンビナーゼは、前記キメラタンパク質の構成において組換えを触媒するように選択され、または改良され、改良されたリコンビナーゼが自然に発生するものではない、キメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項2】

前記セリンリコンビナーゼが、

(a) Tn3 (EcoTn3としても公知) ならびに

(b) (a)のセリンリコンビナーゼの変異タンパク質

である、請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項3】

前記ジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインが、

ヘキサヌクレオチドと結合する2指向性のジンクフィンガー結合ドメイン、9塩基対に結合する3指向性のジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメイン、12塩基対に結合する4指向性のジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメイン、15塩基対に結合する5指向性のジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメイン、18塩基対に結合する6指向性のジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインからなる群より選択される、請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項4】

前記キメラリコンビナーゼタンパク質が、

Tn3_{GAGGAG} であり、かつ、6塩基対配列GAGGAG (配列番号1)と選好的に結合する2指向性のジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインとリンカーによって融合したTn3由来のドメインを有する；および

Tn3Ch15_G であり、かつ、Tn3に由来する変異セリンリコンビナーゼを有するからなる群より選択される、請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項5】

Tn3セリンリコンビナーゼ触媒ドメイン中のG70S、D102Y、またはE124Q；または、Tn3セリンリコンビナーゼ触媒ドメイン中のI12V、D13G、K65R、M73V、I80M、V108A、K53E、またはK151Mの変異のうち1つまたは複数の変異が、前記セリンリコンビナーゼに導入される、請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項6】

前記ジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインが、前記9塩基対配列GGAGGGTG (配列番号3)と結合する、または、前記9塩基対配列GCA GTGGCG (配列番号4)と結合する、請求項4に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項7】

前記ジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインに、配列番号5～配列番号74から成

る群から選択される配列 A N N 、配列番号 4 4 ~ 配列番号 5 3 から成る群から選択される前記配列 A N N 、配列番号 7 5 ~ 配列番号 1 3 1 から成る群から選択される配列 A G C 、配列番号 7 5 ~ 配列番号 8 4 から成る群から選択される前記配列 A G C 、配列番号 1 3 2 ~ 配列番号 1 5 6 から成る群から選択される配列 C N N 、配列番号 1 5 7 ~ 配列番号 2 6 6 から成る群から選択される前記配列 G N N 、配列番号 1 5 7 ~ 配列番号 1 7 2 から成る群から選択される前記配列 G N N 、配列番号 2 6 7 ~ 配列番号 6 2 3 および配列番号 6 5 3 ~ 配列番号 7 0 5 から成る群から選択される配列 T N N 、配列番号 2 6 7 ~ 配列番号 3 1 1 から成る群から選択される前記配列 T N N からなる群から選択されるトリヌクレオチドに結合している少なくとも1つの配列を含む、請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項8】

前記ジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインが、トリプレット結合ドメイン間に位置する少なくとも1つのオリゴペプチドリンカーを含む、請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項9】

前記オリゴペプチドリンカーが、T G E K P (配列番号 6 2 4) 、 T G G G G S G G G G T G E K P (配列番号 6 2 5) 、 L R Q K D G G G S E R P (配列番号 6 2 6) 、 L R Q K D G E R P (配列番号 6 2 7) 、 G G R G R G R G R Q (配列番号 6 2 8) 、 Q N K K G G S G D G K K K Q H I (配列番号 6 2 9) 、 T G G E R P (配列番号 6 3 0) 、 A T G E K P (配列番号 6 3 1) 、および G G G S G G G G E G P (配列番号 7 0 6) からなる群から選択される、請求項8に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項10】

1から5の保存的アミノ酸置換による請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質に由来するキメラリコンビナーゼタンパク質であって、前記保存的アミノ酸置換が各々、A l a / G l y または S e r ; A r g / L y s ; A s n / G l n または H i s ; A s p / G l u ; C y s / S e r ; G l n / A s n ; G l y / A s p ; G l y / A l a または P r o ; H i s / A s n または G l n ; I l e / L e u または V a l ; L e u / I l e または V a l ; L y s / A r g または G l n または G l u ; M e t / L e u または T y r または I l e ; P h e / M e t または L e u または T y r ; S e r / T h r ; T h r / S e r ; T r p / T y r ; T y r / T r p または P h e ; V a l / I l e または L e u から選択され、前記保存的アミノ酸置換に由来する前記キメラリコンビナーゼタンパク質は、前記未変異のキメラリコンビナーゼと同じ組換えに対するD N A配列特異性を有し、その基質に対する結合親和性が、前記未変異のキメラリコンビナーゼの基質に対する結合親和性の約80%以上であり、そのV_{m a x}が、前記未変異のキメラリコンビナーゼのV_{m a x}の約80%以上である、キメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項11】

前記キメラリコンビナーゼタンパク質が、少なくとも1つの追加のドメインをさらに含む、請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項12】

前記追加のドメインが、精製タグ、酵素ドメイン、リガンド結合ドメイン、細胞透過性ドメイン、及び蛍光または生物発光を介して検出できる光の生成を触媒する酵素ドメインである、請求項11に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質。

【請求項13】

請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質をコードする、単離された核酸配列。

【請求項14】

(a) (i) 前記キメラリコンビナーゼタンパク質が前記ジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインにより特異的に結合されているD N A部位で部位特異的組換えを触媒するように、ジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインに作動可能に連結されたセリンリコンビナーゼ、および

(i i) キメラリコンビナーゼ T n 3 G A G G A G 、
から成る群から選択されるキメラリコンビナーゼタンパク質をコードする、単離された核酸配列と、

(b) (a) の配列と少なくとも 95 % 同一である、単離および精製された核酸配列であって、前記核酸配列が前記配列の活性を塩基の置換が行われるまで保持しており、かつ、前記核酸配列により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前記核酸配列の任意の活性を含む核酸配列と

から成る群から選択される、単離された核酸配列。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 に記載の DNA 配列を含むベクター。

【請求項 16】

発現ベクターである、請求項 15 に記載のベクター。

【請求項 17】

請求項 13 もしくは 14 に記載の核酸配列、または請求項 15 もしくは 16 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 18】

前記宿主細胞が真核細胞である、請求項 17 に記載の宿主細胞。

【請求項 19】

(a) 少なくとも 1 種類の請求項 1 に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質に結合している、少なくとも 2 つの部位をその中に有する DNA 配列を提供する工程であって、前記部位がスペーサーによって分離されている、工程と、

(b) 前記 DNA と前記キメラリコンビナーゼとを、少なくとも一つのキメラリコンビナーゼが部位特異的組換えを触媒する条件下で接触させる工程であって、前記 DNA 配列の両方の鎖が前記キメラリコンビナーゼと特異的に結合する二つの部位の間で切断され、部位特異的組換えが起こる、工程と
を含む、部位特異的組換えを行う方法。

【請求項 20】

部位特異的組換え事象が、反転、組込み、または分離である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

(a) 第 1 の配列および第 2 の配列からなる 2 つの DNA 配列を提供する工程であって、前記第 1 の配列および前記第 2 の配列の各々が少なくとも 1 種類の請求項 1 に記載のキメラリコンビナーゼに結合する部位をその中に有する工程と、

(b) 前記第 1 の配列および第 2 の配列と、少なくとも一つの前記キメラリコンビナーゼとを、前記キメラリコンビナーゼが部位特異的組換えを触媒する条件において接触させる工程であって、第 1 の配列および第 2 の配列の両方の鎖が切断され、第 1 の配列および第 2 の配列が関与する部位特異的組換えが行われる工程と
を含む、部位特異的組換え事象を行う方法。

【請求項 22】

前記第 1 の配列および前記第 2 の配列を伴って行われる組換え事象が、一部の DNA が失われるかまたは付加され、かつ、産物の部位が少なくとも 1 種類のキメラリコンビナーゼとの反応に適合する基質ではない、非保存的組換え事象であるか、または適合する組換え部位の 1 つの対または両方の対のいずれかが、一方向性の組換えに適しているカセット交換である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

(a) 第 1 の配列および第 2 の配列からなる 2 つの DNA 配列を提供する工程であって、前記第 1 の配列および前記第 2 の配列の一方が、少なくとも 1 種類の請求項 1 に記載のキメラリコンビナーゼに結合している部位をその中に有し、かつ、前記第 1 の配列および前記第 2 の配列のもう一方が、少なくとも 1 種類の天然に存在するセリンリコンビナーゼに結合する部位をその中に有する工程と、

(b) 前記第1の配列および前記第2の配列と前記少なくとも一つのキメラリコンビナーゼおよび前記天然に存在するセリンリコンビナーゼとを、前記キメラリコンビナーゼおよび前記天然に存在するセリンリコンビナーゼが部位特異的組換えを触媒する条件下で接触させる工程であって、前記第1の配列と前記第2の配列の両方の鎖が切断され、前記第1の配列および前記第2の配列が関与する部位特異的組換え事象がおこる、工程とを含む、部位特異的組換え事象を行う方法。

【請求項24】

(a) 組換えのための2つの部位をその中に有するDNA配列を提供する工程であって、各部位が、

(i) キメラリコンビナーゼ半部位の最適な結合部位と比較して、実質的に低い親和性で前記少なくとも1種類のキメラリコンビナーゼと結合している、少なくとも1種類の請求項1に記載のキメラリコンビナーゼのための変異結合部位と、

(ii) 最適に結合している少なくとも1種類のキメラリコンビナーゼ半部位のための結合部位とを含み、これらの部位が、少なくとも1種類の請求項1に記載のキメラリコンビナーゼと特異的に結合し、これらの部位がスペーサーによって分離されている、工程と

(b) 前記DNA配列と少なくとも1種類のキメラリコンビナーゼとを前記少なくとも1種類のキメラリコンビナーゼが部位特異的組換えを触媒する条件下で反応させる工程であって、前記DNA配列の両方の鎖が前記キメラリコンビナーゼと特異的に結合する二つの部位の間で切断されることにより部位特異的組換えが行われ、部位特異的組換え事象が組み込みであり、組み込みの結果が安定するようにキメラリコンビナーゼ半部位のための変異結合部位のホモ二量体が組換えに対して非機能的に形成される、工程とを含む、DNA分子において安定な組込みを行う方法。

【請求項25】

(a) 少なくとも1種類の請求項1に記載の第1のキメラリコンビナーゼと反応性である、組換えのための第1の部位をその中に有する第1のDNA配列を提供する工程と、

(b) 少なくとも1種類の請求項1に記載の第2のキメラリコンビナーゼと反応性である、組換えのための第2の部位をその中に有する第2のDNA配列を、前記第1の部位と前記第2の部位が機能的に直交するよう提供する工程と、

(c) 前記第1のDNA配列を前記少なくとも1種類の第1のキメラリコンビナーゼと反応させ、前記第2のDNA配列を前記少なくとも1種類の第2のキメラリコンビナーゼと反応させて組換えをもたらす工程とを含む、DNA分子において組換えを行う方法。

【請求項26】

カセット交換を実行するために、前記組換えのための第1の部位かまたは前記組換えのための第2の部位のいずれかでの組込みに続いて、組込みに用いられていない前記第1および前記第2の部位の一方で切除が行われる、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

組換えの結果が反転、または分離となる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

(a) 2つのプラスミド、

(i) 第1の触媒ドメインおよび第1のジンクフィンガードメインを含む、請求項1に記載の第1のキメラリコンビナーゼを発現し、かつ第1の抗生物質抵抗性遺伝子を発現する第1のプラスミドと、

(ii) 第2の触媒ドメインおよび第2のジンクフィンガードメインを含む、請求項1に記載の第2のキメラリコンビナーゼを発現し、かつ第2の抗生物質抵抗性遺伝子を発現する、第2のプラスミドであって、前記第1の触媒ドメインと前記第2の触媒ドメインが異なり、前記第1のジンクフィンガードメインと前記第2のジンクフィンガードメインが異なり、かつ、前記第1および前記第2の抗生物質抵抗性遺伝子が2つの異なる抗生物質に対する抵抗性を付与する第2のプラスミドと

を生成する工程と、

(b) 第1の遺伝子のコード領域および第2の遺伝子のコード領域を、2つのキメラリコンビナーゼによるプラスミド内切除を防ぐように、請求項1に記載の第1のキメラリコンビナーゼおよび請求項1に記載の第2のキメラリコンビナーゼの1つと各々が結合している非反復ホモ二量体部位で隣接することにより2つのカセットを構築する工程と、

(c) 各プラスミドに1つのカセットを挿入して、カセットをその中に含む2つのプラスミドを生成する工程と、

(d) 細菌宿主に、カセットを含む前記第1のプラスミドおよびカセットを含む前記第2のプラスミドを、組換えが起こるように同時導入する工程とを含む、カセット交換を促進する方法。

【請求項29】

(a) 2つのプラスミド、

(i) 第1の触媒ドメインおよび第1のジンクフィンガードメインを含み、請求項1に記載の第1のキメラリコンビナーゼを発現し、かつ第1の抗生物質抵抗性遺伝子を発現する第1のプラスミドであって、前記第1のキメラリコンビナーゼは変異または選択されて第1の遺伝子の内在性隣接配列と結合する、第1のプラスミドと、

(ii) 第2の触媒ドメインおよび第2のジンクフィンガードメインを含み、請求項1に記載の第2のキメラリコンビナーゼを発現し、かつ第2の抗生物質抵抗性遺伝子を発現している第2のプラスミドであって、前記第2のキメラリコンビナーゼは変異または選択されて第2の遺伝子の内在性隣接配列と結合し、前記第1の触媒ドメインと前記第2の触媒ドメインが異なり、かつ前記第1のジンクフィンガードメインと前記第2のジンクフィンガードメインが異なるように、かつ、前記第1および前記第2の抗生物質抵抗性遺伝子が2つの異なる抗生物質に対する抵抗性を付与する第2のプラスミドとを生成する工程と、

(b) 第1のカセットが第1の内在性隣接領域に隣接される第1の遺伝子を含み、第2のカセットが第2の内在性隣接領域に隣接される第2の遺伝子を含む2つのカセットを、2つのキメラリコンビナーゼによるプラスミド内切除を防ぐように、請求項1に記載の第1のキメラリコンビナーゼおよび請求項1に記載の第2のキメラリコンビナーゼの1つと各々が結合している非反復ホモ二量体部位をその中に含む前記2つの内在性隣接領域の各々により構築する工程と、

(c) 各プラスミドに1つのカセットを挿入して、カセットをその中に含む2つのプラスミドを生成する工程と、

(d) 細菌宿主に、カセットを含む前記第1のプラスミドおよびカセットを含む前記第2のプラスミドを、組換えが起こるように同時導入する工程とを含む、カセット交換を促進する方法。

【請求項30】

前記組換えが、プラスミド内カセット交換、染色体遺伝子とプラスミドの間、導入DNAと染色体遺伝子の間、またはカセット交換により促進される切除である、請求項28または29に記載の方法。

【請求項31】

(a) ゲノム中に有害遺伝子を有する個体に、請求項1に記載の部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸をその中に含む組成物を投与する工程であって、前記部位特異的リコンビナーゼは、発現されると、前記有害遺伝子をゲノムから特異的に取り除く、工程と、

(b) 発現される前記部位特異的リコンビナーゼに前記有害遺伝子をゲノムから特異的に取り除かせる工程と、

を含む、有害遺伝子が組換え切除により取り除かれる遺伝子治療のための方法において用いるための、請求項1に記載の部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸。

【請求項32】

(a) 治療有効量の請求項1に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質、または治療有

効量の請求項 1 に記載のキメラリコンビナーゼタンパク質をコードする核酸配列と、
(b) 医薬品として許容される担体と
を含む医薬組成物。

【請求項 33】

前記核酸配列が遺伝子治療のための送達系に組み込まれている、請求項 119 に記載の
医薬組成物。