

(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2009-504156

(P2009-504156A)

(43) 公表日 平成21年2月5日(2009.2.5)

(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	4 B O 6 5
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	4 C O 8 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-526046 (P2008-526046)	(71) 出願人	593052785
(86) (22) 出願日	平成18年7月26日 (2006.7.26)		ザ スクリップス リサーチ インスティ テュート
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月7日 (2008.4.7)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/029075		037 ラ ジョラ ノース トーリー
(87) 国際公開番号	W02007/019062		パインズ ロード 10550
(87) 国際公開日	平成19年2月15日 (2007.2.15)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/707,839		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成17年8月11日 (2005.8.11)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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】 CNNに対するジンクフィンガー結合ドメイン

(57) 【要約】

式CNNのヌクレオチド配列に結合するジンクフィンガーとヌクレオチドの結合領域を含有するポリペプチドが提供される。又、複数のポリペプチドを含有する組成物、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びにこのようなポリペプチド、組成物及びポリヌクレオチドで遺伝子発現を調節する方法も提供される。本発明は、本明細書に開示した複数又は好ましくは約2～約12個のジンクフィンガーヌクレオチド結合領域を含有するポリペプチド組成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 C N N (式中、N は A、C、G 又は T である) の標的ヌクレオチドに優先的に結合する、5 ~ 10 個のアミノ酸残基のヌクレオチド結合領域を含む、単離精製ジンク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 C A N、C C N、C G N、C T N、C N A、C N C、C N G 又は C 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 C A A、C A C、C A G、C A T、C C A、C C C、C C G、C C T、C G A、C G C、C G G、C G T、C T A、C T C、C T G 又は C T T を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 4】

前記結合領域が、配列番号 1 ~ 28、35 ~ 45、48、54、57 ~ 82、85 ~ 130 及び 134 ~ 157 の何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 ~ 28、35 ~ 45、48、54、57 ~ 82、85 ~ 130 及び 134 ~ 157 の何れかをその中含むポリペプチドと結合について競合する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 6】

前記結合領域が、配列番号 1 ~ 28、35 ~ 45、48、54、57 ~ 82、85 ~ 130 及び 134 ~ 157 の何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 7】

前記結合領域が、配列番号 54、57 ~ 82、85 ~ 130 及び 134 ~ 157 の何れかのアミノ酸配列を有する、請求項 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記結合領域が、配列番号 2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134 及び 153 の何れかのアミノ酸配列を有する、請求項 6 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 9】

前記結合領域が、配列番号 2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81 及び 82 の何れかのアミノ酸配列を有する、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記ヌクレオチド結合領域が 7 個の残基であり、ヘリカル構造を有する、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、

40

(a) 配列番号 2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134 及び 153 の何れかのアミノ酸配列の結合領域；並びに

(b) 配列番号 2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134 及び 153 の何れかのアミノ酸配列と、2 個以下の保存的アミノ酸置換でしか異ならない結合領域であって、解離定数が該置換前のポリペプチドの解離定数の 125% 以下であり、且つ保存的アミノ酸置換が、以下の置換：Ala / Gly 又は Ser ; Arg / Lys ; Asn / Gln 又は His ; Asp / Glu ; Cys / Ser ; Gln / Asn ; Gly / Asp ; Gly / Ala 又は Pro ; His / Asn 又は Gln ; Ile / Leu 又は Val ; Le

50

u / I l e 又は V a l ; L y s / A r g 又は G l n 又は G l u ; M e t / L e u 又は T y r 又は I l e ; P h e / M e t 又は L e u 又は 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 又は P h e ; V a l / I l e 又は L e u の 1 つである、結合領域、

からなる群から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。

【請求項 1 2】

前記ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドが、天然に存在するジンクフィンガータンパク質の誘導体又は変異体である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3】

前記天然に存在するジンクフィンガータンパク質が、S P 1 C、T F I I I A 及び Z i f 2 6 8 からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 に記載のポリペプチドを複数含むポリペプチド組成物であって、該ポリペプチドが互いに作動可能に結合している、ポリペプチド組成物。

【請求項 1 5】

前記ポリペプチドが、5 ~ 1 5 個のアミノ酸残基のフレキシブルペプチドリッカーを介して作動可能に結合する、請求項 1 4 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 1 6】

前記リンカーが配列番号 3 0 及び配列番号 1 3 3 からなる群から選択される配列を有する、請求項 1 5 に記載のポリペプチド組成物。

20

【請求項 1 7】

前記組成物が 2 ~ 1 2 個のポリペプチドを含む、請求項 1 4 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 1 8】

前記組成物が 2 ~ 6 個のポリペプチドを含む、請求項 1 7 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 1 9】

前記ポリペプチド組成物が、天然に存在するジンクフィンガータンパク質の誘導体又は変異体である、請求項 1 5 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 2 0】

前記天然に存在するジンクフィンガータンパク質が、S P 1 C、T F I I I A 及び Z i f 2 6 8 からなる群から選択される、請求項 1 9 に記載のポリペプチド組成物。

30

【請求項 2 1】

ヘリカル構造を有し、式 C N N (式中、N は A、C、G 又は T である) の標的ヌクレオチドに優先的に結合する、単離ヘプタペプチド。

【請求項 2 2】

前記標的ヌクレオチドが、式 C A N、C C N、C G N、C T N、C N A、C N C、C N G 又は C N T を有する、請求項 2 1 に記載の単離ヘプタペプチド。

【請求項 2 3】

前記標的ヌクレオチドが、式 C A A、C A C、C A G、C A T、C C A、C C C、C C G、C C T、C G A、C G C、C G G、C G T、C T A、C T C、C T G 又は C T T を有する、請求項 2 2 に記載の単離ヘプタペプチド。

40

【請求項 2 4】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 1 ~ 2 8、3 5 ~ 4 5、4 8、5 4、5 7 ~ 8 2、8 5 ~ 1 3 0 及び 1 3 4 ~ 1 5 7 の何れかのアミノ酸配列を有する、請求項 2 1 に記載の単離ヘプタペプチド。

【請求項 2 5】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 2、1 4、1 8、6 3、6 6、7 1、7 2、7 3、7 5、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、1 3 4 及び 1 5 3 の何れかのアミノ酸配列を有する、請求項 2 4 に記載の単離ヘプタペプチド。

50

【請求項 26】

前記ヘプタペプチドが、配列番号 2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81 及び 82 の何れかのアミノ酸配列を有する、単離ヘプタペプチド。

【請求項 27】

前記ヘプタペプチドが、

(a) 配列番号 2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134 及び 153 の何れかのアミノ酸配列；並びに

(b) 配列番号 2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134 及び 153 の何れかのアミノ酸配列と、2 個以下の保存的アミノ酸置換でしか異なるアミノ酸配列であって、解離定数が該置換前の該ポリペプチドの解離定数の 125% 以下であり、且つ保存的アミノ酸置換が、以下の置換：即ち、Ala / Gly 又は Ser ; Arg / Lys ; Asn / Gln 又は His ; Asp / Glu ; Cys / Ser ; Gln / Asn ; Gly / Asp ; Gly / Ala 又は Pro ; His / Asn 又は Gln ; Ile / Leu 又は Val ; Leu / Ile 又は Val ; Lys / Arg 又は Gln 又は Glu ; Met / Leu 又は Tyr 又は Ile ; Phe / Met 又は Leu 又は Tyr ; Ser / Thr ; Thr / Ser ; Trp / Tyr ; Tyr / Trp 又は Phe ; Val / Ile 又は Leu の 1 つである、アミノ酸配列

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 21 に記載の単離ヘプタペプチド。

【請求項 28】

1 個以上の転写調節因子と作動可能に結合されている、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 29】

前記転写調節因子が転写のレプレッサーである、請求項 28 に記載のポリペプチド。

【請求項 30】

前記転写調節因子が転写のアクチベーターである、請求項 28 に記載のポリペプチド。

【請求項 31】

1 個以上の転写調節因子と作動可能に結合されている、請求項 14 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 32】

前記転写調節因子が転写のレプレッサーである、請求項 31 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 33】

前記転写調節因子が転写のアクチベーターである、請求項 32 に記載のポリペプチド組成物。

【請求項 34】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする、単離精製ポリヌクレオチド。

【請求項 35】

請求項 14 に記載のポリペプチド組成物をコードする、単離精製ポリヌクレオチド。

【請求項 36】

請求項 21 に記載の単離ヘプタペプチドをコードする、単離精製ポリヌクレオチド。

【請求項 37】

請求項 34 に記載の単離精製ポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 38】

請求項 35 に記載の単離精製ポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 39】

請求項 36 に記載の単離精製ポリヌクレオチドを含むベクター。

10

20

30

40

50

- 【請求項 40】
請求項 37 に記載のベクターで形質転換又は形質導入した宿主細胞。
- 【請求項 41】
真核生物である、請求項 40 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 42】
原核細胞である、請求項 40 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 43】
請求項 38 に記載のベクターで形質転換又は形質導入した宿主細胞。
- 【請求項 44】
真核生物である、請求項 43 に記載の宿主細胞。 10
- 【請求項 45】
原核細胞である、請求項 45 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 46】
請求項 39 に記載のベクターで形質転換又は形質導入した宿主細胞。
- 【請求項 47】
真核生物である、請求項 46 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 48】
原核細胞である、請求項 46 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 49】
請求項 34 に記載のポリヌクレオチドで形質転換又は形質導入した宿主細胞。 20
- 【請求項 50】
真核生物である、請求項 49 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 51】
原核細胞である、請求項 49 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 52】
請求項 35 に記載のポリヌクレオチドで形質転換又は形質導入した宿主細胞。
- 【請求項 53】
真核生物である、請求項 52 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 54】
原核細胞である、請求項 52 に記載の宿主細胞。 30
- 【請求項 55】
請求項 36 に記載のポリヌクレオチドで形質転換又は形質導入した宿主細胞。
- 【請求項 56】
真核生物である、請求項 55 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 57】
原核細胞である、請求項 55 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 58】
(a) 請求項 1 のポリペプチドをコードする単離精製ポリヌクレオチド；及び
(b) (a) の配列と少なくとも 95 % 相同であるが、但し、特異的核酸結合活性を含む請求項 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ことを条件とする、核酸配列 40
からなる群から選択される、単離精製ポリヌクレオチド。
- 【請求項 59】
(a) 請求項 14 に記載のポリペプチド組成物をコードする単離精製ポリヌクレオチド；並びに
(b) (a) の配列と少なくとも 95 % 相同であるが、但し、特異的核酸結合活性を含む請求項 10 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ことを条件とする、核酸配列
からなる群から選択される、単離精製ポリヌクレオチド。
- 【請求項 60】 50

(a) 請求項 21 に記載のヘプタペプチドをコードする単離精製ポリヌクレオチド；並びに

(b) (a) の配列と少なくとも 95% 相同であるが、但し、特異的核酸結合活性を含む請求項 17 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ことを条件とする、核酸配列

からなる群から選択される、単離精製ポリヌクレオチド。

【請求項 61】

配列 5' - (CNN)_n - 3' (式中、n は 2 ~ 12 である) を含有するヌクレオチド配列の発現を調節するプロセスであって、該ヌクレオチド配列を請求項 14 に記載のポリペプチド組成物の有効量に曝露することを含む、プロセス。

10

【請求項 62】

前記配列 5' - (CNN) - 3' が 5' - (CNN)_n - 3' 配列内に位置する、請求項 61 に記載のプロセス。

【請求項 63】

前記配列 5' - (CNN)_n - 3' が前記ヌクレオチド配列の転写領域に位置する、請求項 61 に記載のプロセス。

【請求項 64】

前記配列 5' - (CNN)_n - 3' が前記ヌクレオチド配列のプロモーター領域に位置する、請求項 61 に記載のプロセス。

【請求項 65】

前記配列 5' - (CNN)_n - 3' が発現配列タグ内に位置する、請求項 61 に記載のプロセス。

20

【請求項 66】

前記ポリペプチド組成物が 1 個以上の転写調節因子に作動可能に結合する、請求項 61 に記載のプロセス。

【請求項 67】

前記転写調節因子が転写のレプレッサーである、請求項 66 に記載のプロセス。

【請求項 68】

前記転写調節因子が転写のアクチベーターである、請求項 66 に記載のプロセス。

【請求項 69】

前記ヌクレオチド配列が遺伝子である、請求項 61 に記載のプロセス。

30

【請求項 70】

前記遺伝子が真核細胞遺伝子である、請求項 69 に記載のプロセス。

【請求項 71】

前記遺伝子が原核細胞遺伝子である、請求項 69 に記載のプロセス。

【請求項 72】

前記遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項 69 に記載のプロセス。

【請求項 73】

前記真核細胞遺伝子が哺乳動物遺伝子である、請求項 70 に記載のプロセス。

【請求項 74】

前記哺乳動物遺伝子がヒト遺伝子である、請求項 73 に記載のプロセス。

40

【請求項 75】

前記真核細胞遺伝子が植物遺伝子である、請求項 70 に記載のプロセス。

【請求項 76】

前記原核細胞遺伝子が細菌遺伝子である、請求項 71 に記載のプロセス。

【請求項 77】

(a) 治療有効量の請求項 1 に記載のポリペプチド；及び

(b) 薬学的に許容される担体

を含む、薬学的組成物。

【請求項 78】

50

(a) 治療有効量の請求項 14 に記載のポリペプチド組成物；及び

(b) 薬学的に許容される担体

を含む、薬学的組成物。

【請求項 79】

(a) 治療有効量の請求項 21 に記載のヘプタペプチド；及び

(b) 薬学的に許容される担体

を含む、薬学的組成物。

【請求項 80】

(a) 治療有効量の請求項 34 に記載のポリヌクレオチド；及び

(b) 薬学的に許容される担体

を含む、薬学的組成物。

10

【請求項 81】

(a) 治療有効量の請求項 35 に記載のポリヌクレオチド；及び

(b) 薬学的に許容される担体

を含む、薬学的組成物。

【請求項 82】

(a) 治療有効量の請求項 36 に記載のポリヌクレオチド；及び

(b) 薬学的に許容される担体

を含む、薬学的組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、先の特許出願である、Barbasらによる「Zinc Finger Binding Domains for CNN」という名称の2004年6月18日に出願された、米国特許出願第10/487,268号に関する。米国特許出願第10/487,268号は、2002年8月20日に出願されたPCT出願PCT/US02/26388号の米国国内段階であり、これは次いで、2001年8月20日に出願された米国仮特許出願第60/313,864号および同第60/313,693号から優先権を主張する。これらの開示は、全て、本明細書中に参考として援用される。本願はまた、Barbasらによる「Zinc Finger Binding Domains for CNN」という名称の、2005年8月11日に出願された米国仮特許出願第60/707,839号から優先権を主張する。

30

【0002】

政府の権利

本明細書に報告する試験の幾つかを支援するために使用される基金は、国立衛生研究所(NIH GM 53910)によって提供されたものである。従って、連邦政府は本発明における特定の権利を有する。

【0003】

発明の技術分野

本発明の分野は、標的ヌクレオチドへのジンクフィンガータンパク質の結合である。より具体的には、本発明は、式5'-(CNN)-3'の標的ヌクレオチドに特異的に結合するジンクフィンガーのヘリカルドメイン内のアミノ酸残基配列に関する。

40

【背景技術】

【0004】

人工転写因子の構築は、過去数年の間に多大な注目を集めてきた。遺伝子発現は、調節ドメインに融合する多指のジンク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ファミリーのジンクフィンガードメインは、モジュール構造を有することから、人工転写因子の構築に最も有望であるとされてきた。各ドメインは約30個のアミノ酸からなり、疎水性相互作用及び保存されたCys₂-His₂残基によ

50

る亜鉛イオンのキレート化により安定化したヘリカル構造へと折り畳まれる。現在のところ、このジンクフィンガータンパク質ファミリーの最も特徴の優れたタンパク質は、マウスの転写因子 Zif 268 である (Pavletich, et al., (1991) Science 252 (5007), 809-817; Elrod-Erickson, et al., (1996) Structure 4(10), 1171-1180)。Zif 268/DNA 複合体の分析により、DNA 結合が、主に 1 位、3 位及び 6 位のヘリックスのアミノ酸残基と、3 bp の DNA サブサイトの 3' 末端、中央及び 5' 末端のヌクレオチドとの相互作用によって達成されることが示唆された。1 位、2 位及び 5 位は、DNA のリン酸骨格と直接又は水を介して接触することが明らかにされている。ロイシンは通常 4 位に認められ、ドメインの疎水性コアに詰め込まれる。ヘリックスの 2 位は、その他のヘリックス残基と相互作用する他にも、3 bp サブサイトの外側のヌクレオチドとも接触できることが明らかにされている (Pavletich, et al., (1991) Science 252 (5007), 809-817; Elrod-Erickson, et al., (1996) Structure 4(10), 1171-1180; Isalan, M., et al., (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(11), 5617-5621)。

【0005】

5' - (GNN) - 3' DNA サブサイトのそれぞれを高い特異性と親和性で認識するモジュールジンクフィンガードメインの選択及びその部位特異的変異処理の洗練化が明らかにされてきた (開示内容が参考として本明細書で援用される、米国特許 6,140,081 号)。これらのモジュールドメインが集合して、ヒトゲノム又は他のあらゆるゲノム内で唯一である長さ 18 bp の DNA 配列を認識するジンクフィンガータンパク質を形成することができる。更に、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して遺伝子発現を変化させることができ、核内ホルモン受容体のリガンド結合ドメインに融合してホルモン依存性になることさえできる。あらゆる DNA 配列に結合するジンクフィンガーを主成分とする転写因子を迅速に構築するには、モジュールジンクフィンガードメインの既存のセットを伸長させ、タンパク質を終結させる 3 個のトリプレットを含めた、遺伝コードにおいて意味が割り当てられる 64 個の考え得る DNA トリプレットのの一つ一つを認識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の選択及び/又は合理的なデザインによって達成することができる。ジンクフィンガーと DNA との相互作用に関する構造的なデータが限られているため、亜鉛タンパク質の合理的なデザインには極めて時間がかかる上に、多くの場合不可能であることもある。更に、大部分の天然に存在するジンクフィンガータンパク質は、5' - (GNN) - 3' の DNA 配列を認識するドメインから構成される。5' - (NNN) - 3' の DNA 標的配列に結合する新規のジンクフィンガードメインを同定するために最も有望な手法は、ファージディスプレイを介した選択である。この手法で限定される手順とは、各モジュールで認識されるサブサイト内の 5' アデニン、シトシン又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の選択は、このタンパク質の種々のフィンガーが無作為化された Zif 268 に基づいて行われてきた (非特許文献 1; 非特許文献 2; 非特許文献 3; 非特許文献 4; 非特許文献 5; 非特許文献 6)。5' - (GNN) - 3' の DNA 配列を認識する 1 組の 16 からなるドメインは、Zif 268 の誘導體 (非特許文献 4) である C7 のフィンガー 2 が無作為化されたライブラリーから以前に報告されている (非特許文献 7)。このような戦略においては、フィンガー 3 の Asp² がフィンガー 2 サブサイトで 5' グアニン又はチミンの相補的塩基と接触するため、選択は 5' - (GNN) - 3' 又は 5' - (TNN) - 3' を認識するドメインに限定される (非特許文献 8; 非特許文献 9)。

【0006】

本発明の手法は、科学界を挙げてのジンクフィンガータンパク質の迅速な構築を可能にし、サブサイト間の相互作用による制限に関する懸念が限定された場合にしか起こらない

10

20

30

40

50

、ジンクフィンガードメインのモジュール性に基づくものである。本開示内容は、5' - (CNN) - 3' のDNA配列を特異的に認識するジンクフィンガードメインの選択において新しい戦略を導入するものである。これらのドメインの特異的なDNA結合特性を、16個の5' - (CNN) - 3' のトリプレット全てについてマルチターゲットELISAで評価した。これらのドメインは、一つ一つが延長18bp配列を特異的に認識する種々の数の5' - (CNN) - 3' ドメインを含有する多指のタンパク質に容易に組み入れることができる。更に、これらのドメインは、調節ドメインに融合すると遺伝子発現を特異的に変化させることができる。このような結果は、所定の構成ブロックから多指のタンパク質を構築することの実行可能性を強調するものである。更に、本明細書で特徴付けられるドメインは、人工の転写因子の標的になりうるDNA配列の数を著明に増加させる。

10

【非特許文献1】Choo, et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91(23), 11168-72

【非特許文献2】Rebar, et al., (1994) Science (Washington, D.C., 1883-) 263(5147), 671-3

【非特許文献3】Jamieson, et al., (1994) Biochemistry 33, 5689-5695

【非特許文献4】Wu, et al., (1995) PNAS 92, 344-348

【非特許文献5】Jamieson, et al., (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 12834-12839

20

【非特許文献6】Greisman, et al., (1997) Science 275(5300), 657-661

【非特許文献7】Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758-2763

【非特許文献8】Pavletich, et al., (1991) Science 252(5007), 809-817

【非特許文献9】Elrod-Erickson, et al., (1996) Structure 4(10), 1171-1180

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

30

【0007】

一態様において、本発明は、式CNN(式中、NはA、C、G又はTである)を有する標的ヌクレオチドに優先的に結合する、5~10個のアミノ酸残基からなるヌクレオチド結合領域を含有する、単離精製ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドを提供する。好ましくは、標的ヌクレオチドは、式CAA、CAC、CAG、CAT、CCA、CCC、CCG、CCT、CGA、CGC、CGG、CGT、CTA、CTC、CTG又はCTTを有するのがよい。一実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号1~28、35~45、48、54、57~82、85~130及び134~157の何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を含有する。このようなポリペプチドは、配列番号1~28、35~45、48、54、57~82、85~130及び134~157の何れかと競合して標的ヌクレオチドと結合する。即ち、好ましいポリペプチドは、配列番号1~28、35~45、48、54、57~82、85~130及び134~157の何れかによる結合を、競合によって取って代わる結合領域を含有するのがよい。競合的結合を判定する手段は、当該技術分野で周知である。好ましくは、結合領域は配列番号1~28、35~45、48、54、57~82、85~130及び134~157の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。より好ましくは、結合領域は配列番号54、57~82、85~130及び134~157の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。尚より好ましくは、結合領域は配列番号2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134及び153の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。更に

40

50

より好ましくは、結合領域は配列番号 2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134 及び 153 の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。尚更に好ましくは、結合領域は配列番号 2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81 及び 82 の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。

【0008】

別の態様において、本発明は、本明細書に開示した複数又は好ましくは約 2 ~ 約 12 個のジンクフィンガーヌクレオチド結合領域を含有するポリペプチド組成物を提供する。これらのドメインを、5 ~ 15 個のアミノ酸残基からなるフレキシブルペプチドリンカー等によって作動可能に結合させる。操作的な結合は、好ましくは配列番号 30 に示すようなフレキシブルペプチドリンカーを介して行われるのがよい。このような組成物は、式 5' - (CNN)_n - 3' の配列 (式中、N は A、C、G 又は T であり、n が 2 ~ 12 である) を含有するヌクレオチド配列に結合する。好ましくは、このポリペプチド組成物は、約 2 ~ 約 6 個のジンクフィンガーヌクレオチド結合ドメインを含有し、式 5' - (CNN)_n - 3' の配列 (式中、n は 2 ~ 6 である) を含有するヌクレオチド配列に結合する。結合は解離定数 (K_D) が 1 μM ~ 10 μM の場合に行われる。好ましくは、結合は K_D が 10 μM ~ 1 μM、10 pM ~ 100 nM、100 pM ~ 10 nM である場合に行われるのがよく、より好ましくは K_D が 1 nM ~ 10 nM である場合に行われるのがよい。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド及びポリペプチド組成物は何れも、転写のレプレッサー又は転写のアクチベーター等の 1 つ以上の転写調節因子に作動可能に結合させるのがよい。

【0009】

又別の態様において、本発明は更に、ヘリカル構造を有し、式 CNN (式中、N は A、C、G 又は T である) の標的ヌクレオチドに優先的に結合する単離ヘプタペプチドを提供する。好ましい標的ヌクレオチドは上に記載の通りである。

【0010】

好ましくは、このヘプタペプチドは、配列番号 1 ~ 28、35 ~ 45、48、54、57 ~ 82、85 ~ 130 及び 134 ~ 157 の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。より好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号 54、57 ~ 82、85 ~ 130 及び 134 ~ 157 の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。尚より好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号 2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134 及び 153 の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。更に好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号 2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134 及び 153 の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。尚更に好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号 2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81 及び 82 の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。

【0011】

本発明は更に、本発明のポリペプチド又は組成物をコードするポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドを含有する発現ベクター及びポリヌクレオチド又は発現ベクターと共に形質転換する宿主細胞を提供する。

【0012】

本発明は更に、標的ヌクレオチド配列 5' - (CNN) - 3' を含有するヌクレオチド配列の発現を調節するプロセスを提供する。標的ヌクレオチド配列は、長い 5' - (NNN) - 3' 配列内のどこにでも位置することができる。このプロセスは、ヌクレオチド配列を有効量のジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチド又は本明細書に記載した組成物に曝露する手順を含む。一実施形態においては、あるプロセスで、5' - (CNN)_n - 3' 配列 (式中、n は 2 ~ 12 である) を含有するヌクレオチド配列の発現が調節される。このプロセスは、そのヌクレオチド配列を有効量の本発明の組成物に曝露する手順を含む。配列 5' - (CNN)_n - 3' は、ヌクレオチド配列の転写領域に位置しても、

ヌクレオチド配列の転写プロモーター領域に位置しても、発現配列タグ内に位置してもよい。組成物は好ましくは、転写のレプレッサー又は転写のアクチベーター等の1つ以上の転写調節因子に作動可能に結合させるのがよい。一実施形態において、ヌクレオチド配列は、真核細胞遺伝子、原核細胞遺伝子又はウイルス遺伝子等の遺伝子である。真核細胞遺伝子は、ヒト遺伝子等の哺乳動物遺伝子であっても、植物遺伝子であってもよい。原核細胞遺伝子は細菌遺伝子であってもよい。

【0013】

又別の実施形態において、本発明は、

(1) 上記の本発明に従った治療有効量のポリペプチド、ポリペプチド組成物又は単離ヘプタペプチド；及び

(2) 薬学的に許容される担体、を含む薬学的組成物を提供する。

【0014】

又別の実施形態において、本発明は、

(1) 上記の本発明に従ったポリペプチド、ポリペプチド組成物又は単離ヘプタペプチドをコードする治療有効量のヌクレオチド配列；及び

(2) 薬学的に許容される担体、を含む薬学的組成物を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

発明の詳細な説明

定義

特に記載がない限り、本明細書で使用する技術的及び科学的用語は全て、本発明が属する業界の当業者に共通して理解される同じ意味を有する。

【0016】

本明細書で使用される「核酸」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」という用語又は同様の用語は、一本鎖又は二本鎖であって、コード又は非コード（例えば、アンチセンス）形態を含む、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを指す。この用語は、天然のヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸も包含する。この用語は又、相補的ヌクレオチドのワトソン・クリック結合又はヌクレオチド配列の結合が、ジンクフィンガータンパク質等の特異的に結合するタンパク質で干渉される限り、修飾又は置換塩基が含まれる核酸を包含する。この用語は又、合成骨格を有する核酸様の構造も包含する。本発明が提供するDNA骨格類似体には、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、ホスホラミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、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、モルフォリノカルバメート及びペプチド核酸（PNA）が含まれる；Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, edited by F. Eckstein, IRL Press at Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, Volume 600, Eds. Baserga and Denhardt (NYAS 1992); Milligan (1993) J. Med. Chem. 36: 1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press)を参照されたい。PNAは、N-(2-アミノエチル)グリシン単位等の非イオン性骨格を含む。ホスホロチオエート結合は、例えば米国特許第6,031,092号、第6,001,982号、第5,684,148号に記載されており；又、国際特許第WO 97/03211号、第WO 96/39154号、Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197も参照されたい。本用語で包含される

10

20

30

40

50

他の合成骨格には、メチルホスホネート結合又は代替のメチルホスホネート及びホスホジエステル結合（例えば米国特許第5,962,674号；Strauss-Soukup（1997）Biochemistry 36:8692-8698を参照）及びベンジルホスホネート結合（例えば米国特許第5,532,226号；Samstag（1996）Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156を参照）が含まれる。

【0017】

本明細書で使用される「転写調節ドメイン又は因子」という用語は、遺伝子転写を調節するべく機能する、本明細書で提供される融合ポリペプチドの該当部分を指す。例示的及び好ましい転写レプレッサードメインは、ERD、KRAB、SID、デアセチラーゼ及び誘導体、多量体及び、KRAB-ERD、SID-ERD、(KRAB)₂、(KRAB)₃、KRAB-A、(KRAB-A)₂、(SID)₂、(KRAB-A)-SID及びSID-(KRAB-A)といったその組み合わせである。その他の転写調節ドメインには、参考として本明細書で援用される、Barbasが發明した"Artificial Transcription Factors"という表題のPCT特許出願公開第WO03/104414号に開示されるものがある。本明細書で使用される「ヌクレオチド結合ドメイン又は領域」という用語は、特異的な核酸結合能力を提供する、本明細書によって提供されるポリペプチドの該当部分又は組成物を指す。このヌクレオチド結合領域は、特異的な遺伝子に結合するsubjectポリペプチドを標的にするべく機能する。本明細書で使用される「操作的結合」という用語は、例えばポリペプチドの要素が結合して、それぞれが意図すべく役割を果たすか機能することを意味する。例えば、レプレッサーが結合ドメインに結合して、標的ヌクレオチドにその結合ドメインを介して結合する場合、そのレプレッサーは転写を阻害又は予防するべく働く。要素間の結合は、直接的な場合もあれば、リンカーを介する等、間接的な場合もある。要素は必ずしも隣接していなくてもよい。このため、レプレッサードメインは、当該技術分野で周知のあらゆる結合手段を使用してヌクレオチド結合ドメインに結合させることができる。2つのドメイン間にリンカー部分を含めることが必要になることもある。このようなリンカー部分は一般的に、ドメイン間にスペースを作るアミノ酸残基の短い配列である。リンカーが結合又はレプレッサードメインのあらゆる機能に干渉しない限り、あらゆる配列を使用することができる。例示的なリンカーを以下に挙げる。

【0018】

本明細書で使用される「修飾」という用語は、ジンクフィンガーヌクレオチド結合モチーフが過剰に活性化した場合にそれを含有するプロモーターからの発現を阻害又は抑制すること、又はそうしたプロモーターの活性化が低下した場合にそこからの発現を増加又は促進させることを意味する。

【0019】

本明細書で使用する、本明細書に記載のさまざまなアミノ酸配列から生じるアミノ酸は、周知の3文字又は1文字の略号に従って記載される。種々のDNA断片で生じるヌクレオチドは、当該技術分野で通常使用される標準的な1文字表記によって表記される。

【0020】

ペプチド又はタンパク質において、好適なアミノ酸の保存的置換は、当業者に周知であり、結果として得られる分子の生物学的活性を変化させることなく一般的には行うことができる。当業者は一般的に、ポリペプチド内の重要でない領域における単一アミノ酸置換は、生物学的活性を実質的に変化させないことを認識している（例えば、Watson, et al., Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, Benjamin/Cummings, p. 224を参照）。特に、このような保存的変異体は、その変化がそのタンパク質（その保存的変異体）の構造及び/又は活性、例えば核酸結合活性、抗体活性、酵素活性又は受容体活性等を実質的に変化させないような修飾アミノ酸配列を有する。これらは、保存的に修飾されたアミノ酸配列の変異体を含む。即ち、タンパク質の活性に重要ではない残基の

アミノ酸が置換、追加又は欠失されるか、同様の特性（例えば、酸性、塩基性、陽性帯電又は陰性帯電、極性又は非極性等）を有する残基のアミノ酸が置換されて、それよりも更に重要なアミノ酸の置換が構造及び／又は活性を実質的に変化しないようにする。機能的に同様のアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当該技術分野で周知である。例えば、保存的置換を選択するためのガイドラインの例は（元々の残基の後に置換例を表記）：Ala / Gly又はSer ; Arg / Lys ; Asn / Gln又はHis ; Asp / Glu ; Cys / Ser ; Gln / Asn ; Gly / Asp ; Gly / Ala又はPro ; His / Asn又はGln ; Ile / Leu又はVal ; Leu / Ile又はVal ; Lys / Arg又はGln又はGlu ; Met / Leu又はTyr又はIle ; Phe / Met又はLeu又はTyr ; Ser / Thr ; Thr / Ser ; Trp / Tyr ; Tyr / Trp又はPhe ; Val / Ile又はLeu。代替のガイドラインの例は、以下の6つの群を使用したもので、それぞれが互いに保存的置換であるアミノ酸を含むものである；（1）アラニン（A又はAla）、セリン（S又はSer）、スレオニン（T又はThr）；（2）アスパラギン酸（D又はAsp）、グルタミン酸（E又はGlu）；（3）アスパラギン（N又はAsn）、グルタミン（Q又はGln）；（4）アルギニン（R又はArg）、リジン（K又はLys）；（5）イソロイシン（I又はIle）、ロイシン（L又はLeu）、メチオニン（M又はMet）、バリン（V又はVal）及び（6）フェニルアラニン（F又はPhe）、チロシン（Y又はTyr）、トリプトファン（W又はTrp）；（又、例えば、Creighton（1984）Proteins, W.H. Freeman and Company ; Schulz and Schimer（1979）Principles of Protein Structure, Springer-Verlagを参照）。当業者は、上記の置換のみが考え得る保存的置換ではないことを理解している。例えば、ある目的のために全ての荷電したアミノ酸をそれが陽性であろうと陰性であろうと、互いにとっての保存的置換としてみなすことができる。更に、コードされた配列において単一のアミノ酸又は低率のアミノ酸を変化、添加又は欠失させる個々の置換、欠失又は添加も、送達されるタンパク質の3次元構造及び機能がこのような変異によっても保存される場合は、「保存的に修飾した変異体」とみなすことができる。

【0021】

本明細書で使用される「発現ベクター」という用語は、本明細書に記載の融合タンパク質又は本明細書に示す発現カセットをコードする核酸等の異種DNAの挿入又は組入れにより操作された、当該技術分野で既知のプラスミド、ウイルス、ファージミド又はその他のビヒクルを指す。このような発現ベクターは一般的に、細胞内に挿入された核酸を効率よく転写するためのプロモーター配列を含有する。発現ベクターは一般的に、複製起点、プロモーター並びに形質転換細胞の表現型選択を可能にする特異的な遺伝子が含まれる。

【0022】

本明細書で使用される「宿主細胞」という用語は、ベクターがその中で増殖し、そのDNAが発現することのできる細胞を指す。この用語は又、subject宿主細胞のあらゆる子孫細胞を含む。複製中に変異が起こることもあるため、全ての子孫細胞が親細胞と同一であるとは限らないことは理解されるはずである。このような子孫細胞も、「宿主細胞」という用語が使用される場合には含まれる。外来DNAが宿主の中に持続的に保存されるための安定した転移方法は、当該技術分野で既知である。

【0023】

本明細書で使用される遺伝子治療は、このような治療が求められる疾患又は病態を来した哺乳動物、特にヒトの特定の細胞、標的細胞に異種DNAを導入することを伴う。DNAは、その異種DNAが発現し、それによりコードされた治療的生成物が産生されるように、選択した標的細胞に導入する。或いは、異種DNAは何らかの方法で治療的生成物をコードするDNAの発現を媒介することができるか、治療的生成物の発現を直接的又は間接的に何らかの方法で媒介するペプチドやRNAといった生成物をコードすることができる。遺伝子治療は又、欠損のある遺伝子に取って代わるか、それが導入された哺乳動物又

は細胞が産出する遺伝子生成物を補給する遺伝子生成物をコードする核酸を送達するのに使用されることもある。導入された核酸は、通常は哺乳動物の宿主内では産生されないか、治療有効量が産出されないか、治療上有用な時期に産出されない、増殖因子阻害剤等の治療的化合物又はその受容体等の腫瘍壊死因子又は阻害剤をコードすることができる。治療的生成物をコードする異種DNAは、罹患宿主の細胞に導入する前に修飾して、その生成物又は発現を促進するか、別の方法で変化させることができる。遺伝子治療は又、遺伝子発現の阻害剤又はレプレッサー又はその他の修飾物質の送達を伴う。

【0024】

本明細書で使用される異種DNAとは、それが発現する細胞によって *in vivo* では通常産生されないか、内在性DNAの発現を転写、翻訳又はその他の調節可能な生化学的プロセスに作用することによって変化させる媒介物質を媒介するかコードするRNA及びタンパク質をコードするDNAである。異種DNAは外来DNAと呼ばれることもある。当業者が、それが発現する細胞に対して異種又は外来と認識又はみなすあらゆるDNAを、本明細書では異種DNAに含める。異種DNAの例には、薬物耐性を付与するタンパク質等の追跡マーカータンパク質をコードするDNA、抗がん剤、酵素及びホルモン等の治療上有効な物質をコードするDNA及び抗体等の他の種類のタンパク質をコードするDNAが含まれるが、これらに限定されない。異種DNAによりコードされる抗体は、異種DNAが導入された細胞の表面に分泌されるか発現する。

10

【0025】

このため、本明細書における異種DNA又は外来DNAは、ゲノム内に認められる対のDNA分子と全く同じ方向及び位置に存在しないDNA分子を含む。又、その他の生体又は種由来（即ち、外因性）のDNA分子のことも指す場合がある。

20

【0026】

本明細書で使用される治療上有効な生成物とは、異種核酸、一般的にはDNAがコードする生成物であって、その核酸が宿主に導入された場合に発現する、先天性又は後天性疾患の症状や徴候を改善するか除去するか、疾患を治癒する生成物である。一般的には、所望の遺伝子生成物をコードするDNAは、プラスミドベクター内にクローン化し、リン酸カルシウムによるDNA取り込み（（1981）*Somat. Cell. Mol. Genet.* 7:603-616を参照）又はμインジェクション等の通常の方法で、パッケージング細胞等のプロデューサー細胞に導入する。プロデューサー細胞で増幅した後、異種DNAを含有するベクターを選択した標的細胞に導入する。

30

【0027】

本明細書で使用される発現又は送達ベクターとは、好適な宿主細胞での発現のためその中に外来又は異種DNAが挿入されたあらゆるプラスミド又はウイルスを指す。即ち、DNAでコードされるタンパク質又はポリペプチドは、宿主細胞系で合成される。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）の発現を制御することのできるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。又、逆転写酵素を使用して産生したmRNA由来のcDNA（相補的DNA）のクローニングを可能にするベクターも含まれる。

40

【0028】

本明細書で使用される遺伝子とは、そのヌクレオチド配列がRNA又はポリペプチドをコードする核酸分子を指す。遺伝子は、RNA又はDNAの何れかであってもよい。遺伝子は、コード領域の前後の領域（リーダー領域及びトレーラー領域）並びに個々のコードセグメント（エクソン）間に介在する配列（イントロン）を含む。

【0029】

本明細書で使用される、核酸分子又はポリペプチド又はその他の生体分子に関する「単離された」という用語は、その核酸又はポリペプチドが、そのポリペプチド又は核酸が得られた遺伝環境から分離されていることを意味する。又、その生体分子が天然の状態から変化させられていることを意味する場合もある。例えば、生きている動物に天然のポリヌクレオチド又はポリペプチドは「単離され」ていないが、天然状態の共存物質から分離さ

50

れている同じポリヌクレオチド又はポリペプチドは、本明細書でその用語が使用されている場合は「単離されて」いる。このため、遺伝子組換え宿主細胞内で産生及び／又は含有されるポリペプチド又はポリヌクレオチドは、単離されているとみなされる。又、「単離ポリペプチド」又は「単離ポリヌクレオチド」の意図するところは、遺伝子組換え宿主細胞又は生来の源から、部分的又は実質的に精製されているポリペプチド又はポリヌクレオチドである。例えば、遺伝子組換えによって産生された化合物は、Smith, et al. (1988) Gene 67:3140に記載の一段法により実質的に精製することができる。「単離」及び「精製」という用語は、時に同義に使用される。

【0030】

このため、「単離」という用語は、当該の核酸をコードする遺伝子がすぐ近傍に存在する天然のゲノムの中で、その核酸がそれらの遺伝子のコード配列を有さないことを意味する。単離DNAは、一本鎖又は二本鎖であることができ、ゲノムDNA、cDNA、遺伝子組換えハイブリッドDNA又は合成DNAであることもできる。天然のDNA配列と同一であることもできるが、1個以上のヌクレオチドの欠失、追加又は置換によってこのような配列と異なっていることもできる。

10

【0031】

生物学的細胞又は宿主から作製された調製物を指すのに使用される「単離された」又は「精製された」という用語は、当該DNA又はタンパク質の粗抽出物を含む所定のDNA又はタンパク質を含有するあらゆる細胞抽出物を意味する。例えば、タンパク質の場合、精製された調製物は、個々の技法又は一連の調製法又は生化学的技法に従って得ることができ、所定のDNA又はタンパク質は種々の純度でこれらの調製物中に存在することができる。特にタンパク質の場合、この手順には、例えば硫酸アンモニウム分画法、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離法、等電点分画電気泳動法、クロマトフォーカシング及び電気泳動が含まれるが、これらに限定はされない。

20

【0032】

「実質的に純粋な」又は「単離された」DNA又はタンパク質の調製物は、このようなDNA又はタンパク質が通常天然に関連する天然物質を含まない調製物を意味することは理解されなければならない。「本質的に純粋な」は、所定のDNA又はタンパク質を少なくとも95%含有する「高度に」精製された調製物を意味することを理解されなければならない。

30

【0033】

所定のDNA又はタンパク質を含有する細胞抽出物は、所定のタンパク質を発現しているか、所定のDNAを含有している細胞から入手した均質な調製物又は細胞を含まない調製を意味することを理解されなければならない。「細胞抽出物」という用語は、培地、特に細胞が取り除かれた後の消費された培地を含むことを意図する。

【0034】

本明細書で使用される「修飾」とは、ある機能の抑制、促進又は誘導を指す。例えば、ジンクフィンガー核酸結合ドメイン及びその変異体は、プロモーター内のモチーフに結合することによりプロモーター配列を修飾し、それによってプロモーター細胞ヌクレオチド配列に作動可能に結合する遺伝子の転写を促進するか抑制する。或いは、修飾は、ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドの変異体が構造遺伝子に結合し、DNA依存性RNAポリメラーゼによるその遺伝子の読み取りを遮断し、それによってその遺伝子の転写を阻害する場合には、遺伝子の転写の阻害を含む。構造遺伝子は、通常の細胞遺伝子であっても、例えば腫瘍遺伝子であってもよい。或いは、修飾は転写生成物の翻訳の阻害を含むことができる。

40

【0035】

本明細書で使用される「阻害」という用語は、あるプロモーターに作動可能に結合した構造遺伝子の転写の活性化レベルの抑制を指す。例えば、本明細書に記載の方法においては、遺伝子はジンクフィンガーヌクレオチド結合モチーフを含む。

50

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される「転写調節ドメイン」という用語は、標的細胞内で遺伝子を発現させる領域を指す。本明細書で使用するのに好適な転写調節ドメインには、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したPGK及びアクチンプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。その他の転写調節ドメインも、当該技術分野で既知である。

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用される、ある遺伝子のプロモーター領域は、調節要素又は、5' から構造遺伝子に一般的に又がる要素を含み、複数の調節要素が存在し、介在するヌクレオチド配列によって分離されることができる。遺伝子を活性化させる必要がある場合は、転写因子と呼ばれるタンパク質がその遺伝子のプロモーター領域に結合する。この結合したアセンブリは、ある酵素の第二の遺伝セグメントをDNAからRNAに転写することを可能にすることによって「スイッチオン」に似た状態にする。殆どの場合、結果生じるRNA分子は、特異的なタンパク質を合成するテンプレートの役割を果たすが、場合によってはRNAそれ自体が最終生成物になることもある。プロモーター領域は、通常の細胞プロモーターであることもあれば、例えば、腫瘍プロモーターであることもある。腫瘍プロモーターは一般的にウイルス由来プロモーターである。ジンクフィンガー結合ポリペプチドが標的となるウイルスプロモーターには、レトロウイルスの長末端反復配列 (LTR)、ヒトTリンパ球向性ウイルス (HTLV) 1 及び 2 及びヒト免疫不全ウイルス (HIV) 1 又は 2 由来のプロモーターといったレンチウイルスプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、以前に活性化したプロモーターの不活性化を引き起こす量又は、ジンクフィンガーヌクレオチド結合モチーフを含有するプロモーターの不活性化を引き起こす量又は、構造遺伝子の転写又はRNAの翻訳を遮断する量を含む。ジンクフィンガー由来のヌクレオチド結合ポリペプチドの必要量は、既存のタンパク質/プロモーター複合体における天然に存在するジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質に取って代わるのに必要な量又は、天然に存在するジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質と競合してプロモーターそれ自体と複合体を形成するのに必要な量の何れかである。同様に、構造遺伝子又はRNAを遮断するのに必要な量は、それぞれ、RNAポリメラーゼに結合してそれによる遺伝子の読み取りを遮断する量又は、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実施されるのがよい。機能的にプロモーター又は構造遺伝子を不活性化することによって、転写又は翻訳が抑制される。ジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質モチーフを含有する細胞ヌクレオチド配列に結合又は「接触」するのに有効な量の阻害タンパク質の送達、レトロウイルスベクター又はリボソーム等の本明細書に記載の機序の一つにより、又は当該技術分野で周知のその他の方法により達成することができる。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される「短縮された (truncated)」という用語は、天然に存在するジンクフィンガー結合タンパク質で認められる総数のジンクフィンガーの数が足りないか、非所望の配列が欠失したジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチド誘導体を指す。例えば、9個のジンクフィンガーを天然の状態では含有するジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質TFIIIAは短縮により、1~3個のみのジンクフィンガーを含むポリペプチドとなる。「拡大 (expansion)」という用語は、追加のジンクフィンガーモジュールが追加されたジンクフィンガーポリペプチドを指す。例えば、TFIIIAは3個のジンクフィンガードメインを追加することにより、12フィンガーまで拡大することができる。更に、短縮されたジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドは、1個以上の野生型ポリペプチドのジンクフィンガーモジュールを含み、「ハイブリッド」ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドとなる。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される「突然変異した」という用語は、タンパク質をコードするDNAの無作為又は部位特異的な突然変異を達成する既知の方法の何れかを実施することによって得られた、ジンクフィンガー由来ヌクレオチド結合ポリペプチドを指す。例えば、TFIIIIでは、突然変異を実施して、1個以上のコンセンサス配列の反復において保存されていない残基に取って代わることができる。短縮又は拡大したジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質も、突然変異させることができる。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される、ポリペプチドの「変異体」又は「誘導体」は、ポリペプチド又は遺伝子組換えによって産生されたポリペプチドの突然変異形態であるが、リガンド又は核酸分子に結合する能力や転写を修飾する能力といった所望の活性を依然として有する突然変異体のポリペプチドを指す。

10

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される、ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドの「変異体」又は「誘導体」は、ジンクフィンガータンパク質の突然変異体、又は遺伝子組換えにより産生されたジンクフィンガータンパク質の突然変異体であるポリペプチドを指す。変異体は、例えば、あるタンパク質が第二のタンパク質のジンクフィンガードメインに結合した、ジンクフィンガードメインを含有するハイブリッドであってもよい。ドメインは野生型であっても突然変異体であってもよい。「変異体」又は「誘導体」は、野生型タンパク質の元来のフィンガー数よりも少ないフィンガーを含有する、野生型ジンクフィンガータンパク質の短縮型を含むことができる。誘導体又は変異体をそこから産生することのできるジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドの例には、SP1C、TFIIIIA及びZif268が含まれる。同じ用語は、「変異体」又は「誘導体」の核内ホルモン受容体及び「変異体」又は「誘導体」の転写エフェクタードメインを指すためにも使用される。

20

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される「ジンクフィンガーヌクレオチド結合ターゲット又はモチーフ」は、ジンクフィンガーヌクレオチド結合誘導体ポリペプチドが特異的に結合するヌクレオチドセグメントのあらゆる2次元又は3次元特性を指す。この定義に含まれるのは、一般的には5個以下のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列並びにヘリックスの主溝及び副溝及び面等であるがこれらに限定されないDNA二重らせんの3次元側面である。モチーフは一般的に、ジンクフィンガーポリペプチドが結合することのできる好適な長さのあらゆる配列である。例えば、3フィンガーポリペプチドは、一般的には約9～約14個の塩基対を有するモチーフに結合する。好ましくは、認識配列は少なくとも約16個の塩基対であって、ゲノム内での特異性を確実にするのがよい。このため、あらゆる特異性を有するジンク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。ジンクフィンガー結合モチーフは、先験的にデザインされたか、ジンクフィンガータンパク質が結合するあらゆる配列であってもよい。モチーフは、調節配列、エクソン、イントロン又はあらゆる非コード配列を含め、あらゆるDNA又はRNA配列に認めることができる。

30

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」、「生理学的に許容される」という用語、及びその文法的変異体は、組成物、担体、希釈剤及び試薬を指す場合は、同義に使用され、その材料がその組成物の投与を不可能にする程度までの悪心、眩暈、胃蠕動異常亢進等の望ましくない生理学的作用を生じさせることなく、ヒトに投与することができることを意味する。

40

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、異なる遺伝環境の間を、それが作動可能に結合した別の核酸へ運搬することのできる核酸分子を指す。好ましいベクターは、自己複製ができ、それが作動可能に結合したDNAセグメント中に存在する構造遺伝子生成物を発現することのできるものである。このため、ベクターは、好ましくはレプリコン及び前述の選択可能なマーカーを含有するのがよい。ベクターには発現ベクターが含まれ

50

るが、必ずしもこれに限定されない。

【0046】

DNA断片を含む核酸分子について本明細書で使用される「作動可能に結合した」という用語は、配列又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り、一本鎖又は二本鎖DNAの1本鎖に共有結合して、作動可能に結合した部分が意図した通りに機能することを意味する。本明細書で提供される転写ユニット又はカセットが作動可能に結合するベクターの選択は、当該技術分野で周知の通り、ベクター複製及びタンパク質発現といった所望の機能特性及び形質導入する宿主細胞に直接依存し、これらは遺伝子組換えDNA分子を構築する技術が元来有する制限事項である。

【0047】

本明細書で使用される、治療的組成物の投与は、あらゆる手段によって実行することができ、経口、皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内、注入法、腹腔内投与及び非経口投与を含むが、これらに限定されない。

I. 本発明

本発明は、ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチド、1個以上の前記ポリペプチドを含有する組成物、前記ポリペプチド及び組成物をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、前記ポリヌクレオチド又は発現ベクターが形質導入された細胞及び、ヌクレオチドの構造及び/又は機能を修飾するためのポリペプチド、組成物、ポリヌクレオチド及び発現ベクターの使用を提供する。

II. ポリペプチド

本発明は、単離精製ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドを提供する。ポリペプチドは、5～10個のアミノ酸残基、及び好ましくは約7個のアミノ酸残基からなるヌクレオチド結合領域を含有する。ヌクレオチド結合領域は、式CNN（式中、NはA、C、G又は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CAA、CAC、CAG、CAT、CCA、CCC、CCG、CCT、CGA、CGC、CGG、CGT、CTA、CTC、CTG又はCTTを有する。

【0048】

本発明のポリペプチドは、非天然の変異体である。本明細書で使用される「非天然の」という用語は、例えば以下の1つ以上を意味する：（a）非天然のアミノ酸配列から構成されるポリペプチド；（b）天然のポリペプチドを伴わない非天然の二次構造を有するポリペプチド；（c）ポリペプチドが天然に生じる生体種では通常伴わない1個以上のアミノ酸を含むポリペプチド；（d）ポリペプチドを含む1個以上のアミノ酸の立体異性体を含むポリペプチドで、その立体異性体が天然に発生する状態のポリペプチドを伴わない；（e）天然のアミノ酸の一つ以外の1個以上の化学成分を含むポリペプチド；又は（f）天然のアミノ酸配列の単離部分（短縮された配列）。本発明のポリペプチドは単離された形態で存在し、実質的に汚染物質を含まないように精製される。ポリペプチドは天然資源から単離し精製することができる。或いは、ポリペプチドは、遺伝子工学又は固相ペプチド合成といった当該技術分野で周知の技法を使用して新規に作製することもできる。ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドは、ポリペプチド、即ち、好ましくはジンクフィンガータンパク質の突然変異体、又は遺伝子組換えにより産生されたものであるのがよい。ポリペプチドは、例えば、あるタンパク質が第二のタンパク質のジンクフィンガードメインに結合した、ジンクフィンガードメインを含有するハイブリッドであってもよい。ドメインは野生型であっても突然変異体であってもよい。ポリペプチドは、野生型のジンクフィンガータンパク質の短縮型を含むことができる。ポリペプチドを産生することができるジンクフィンガータンパク質の例には、SP1C、TFIIIA及びZif268、並びにC7（Zif268の誘導体）及び当該技術分野で既知のその他のジンクフィンガータンパク質が含まれる。その他のジンクフィンガータンパク質が誘導されるこれらのジンクフィンガータンパク質は、本明細書において「骨格」と呼ばれる。

【0049】

本発明のジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドは、ポリペプチドのヘリッ

クストメイン内に独自の七量体（7個のアミノ酸残基からなる隣接配列）を包含し、その七量体の配列が標的ヌクレオチドへの結合特異性を決定する。この七量体配列は、ヘリックスドメイン内のどこにでも位置することができるが、残基が従来から当該技術分野で番号付けられているように、七量体が - 1 位から 6 位に位置するのが好ましい。本発明のポリペプチドは、ジンクフィンガータンパク質の一部として機能するために、当該技術分野で既知のあらゆるシート及びフレームワーク配列を含むことができる。多くのジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドが作製され、CNNトリプレットを含有する標的ヌクレオチドに対する結合特異性を試験した。

【0050】

ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチド誘導体は、短縮又は拡大によって野生型のジンクフィンガータンパク質から、又は部位特異的突然変異のプロセス又は手順の組み合わせによって野生型由来ポリペプチドの変異体として、誘導又は産生することができる。更に、短縮されたジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドは、1個以上の野生型ポリペプチドからなるジンクフィンガーモジュールを含み、それによって「ハイブリッド」ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドとなる場合がある。

【0051】

「突然変異した」という用語は、タンパク質をコードするDNAの無作為又は部位特異的な突然変異を達成する既知の方法の何れかを実施することによって得られた、ジンクフィンガー由来のヌクレオチド結合ポリペプチドを指す。例えば、TFIIIAでは、突然変異を実施して、1個以上のコンセンサス配列の反復において保存されていない残基に取

【0052】

一実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号1～28、35～45、48、54、57～82、85～130及び134～157の何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を含有する。どのようにしてこれらの結合特性が決定されるかについての詳細な説明は、本明細書に後述する実施例に認めることができる。このようなポリペプチドは、配列番号1～28、35～45、48、54、57～82、85～130及び134～157の何れかと、標的ヌクレオチドへの結合において競合する。即ち、好ましいポリペプチドは、配列番号1～28、35～45、48、54、57～82、85～130及び134～157の何れかの結合に、競合的に取って代わる結合領域を含有する。競合する結合を決定する手段は、当該技術分野で周知である。好ましくは、結合領域は、配列番号1～28、35～45、48、54、57～82、85～130及び134～157の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。より好ましくは、結合領域は、配列番号54、57～82、85～130及び134～157の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。尚より好ましくは、結合領域は、配列番号2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134及び153の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。更により好ましくは、結合領域は、配列番号2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134及び153の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。尚更により好ましくは、結合領域は、配列番号2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81及び82の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。

【0053】

一般的には、結合領域は7個のアミノ酸残基を有し、ヘリックス構造を有する。

【0054】

10

20

30

40

50

本発明の適用範囲内には、上に開示したポリペプチドと、置換を行う前のポリペプチドに比べて所望のサブサイト又は標的領域への結合親和性が少なくとも80%にもなる、2個以下の保存的アミノ酸置換又は2個以下の保存的アミノ酸置換の点で異なるポリペプチドも含まれる。解離定数の点からは、これは置換を行う前のポリペプチドの解離定数の125%以下に相当する。この文脈において、「保存的アミノ酸置換」という用語は、以下の置換の一つとして定義される：Ala / Gly又はSer ; Arg / Lys ; Asn / Gln又はHis ; Asp / Glu ; Cys / Ser ; Gln / Asn ; Gly / Asp ; Gly / Ala又はPro ; His / Asn又はGln ; Ile / Leu又はVal ; Leu / Ile又はVal ; Lys / Arg又はGln又はGlu ; Met / Leu又はTyr又はIle ; Phe / Met又はLeu又はTyr ; Ser / Thr ; Thr / Ser ; Trp / Tyr ; Tyr / Trp又はPhe ; Val / Ile又はLeu。好ましくは、ポリペプチドは上述のポリペプチドと1個以下の保存的アミノ酸置換の点で異なるのがよい。

【0055】

又、本発明のポリペプチドは、長いポリペプチドに組み込むことができる。この例を幾つか、ポリペプチドを使用して人工転写因子を作製する場合のものとして以下に記載する。一般的に、ポリペプチドは長い融合タンパク質に組み入れられても、その特異的なDNA結合活性は保持する。これらの融合タンパク質は、精製タグ、酵素ドメイン又はその他のドメイン等、当該技術分野で既知の種々の追加のドメインを、ジンクフィンガーとポリペプチドの特異的なDNA結合活性を著明に変化させることなく、含むことができる。一例では、ポリペプチドは、ラクタマーゼ等の分断酵素の2個の半分に組み込んで、細胞内又はin vivoで配列を方向付けることができる。このような分断酵素の2個の半分の結合により、分断酵素のアセンブリが完成する(J. M. Spotts, et al., "Time-Lapse Imaging of a Dynamic Phosphorylation Protein-Protein Interaction in Mammalian Cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:15142-15147 (2002))。別の例では、本発明に基づく複数のジンクフィンガードメインを連結的に結合して、長いDNA配列に対する特異的な結合親和性を有するポリペプチドを形成することができる。これは下に更に記載する。

【0056】

本発明のポリペプチドは、当該技術分野で周知の種々の標準的な技法を使用して作製することができる。本明細書の実施例で後に更に詳細に開示する通り、ジンク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製し、配列特異的なタンパク質を豊富にするのに好条件下で選択した。多くの配列を認識するジンクフィンガードメインは、ファージ選択データ及び構造情報の両方によって導かれる部位特異的な突然変異による洗練化を必要とする。

【0057】

従って、本発明に基づくジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質の誘導体又は変異体であってもよい。天然に存在するジンクフィンガータンパク質は、限定ではないが例えば、SP1C、TFIIIA又はZif268であってもよい。その他の天然に存在するジンクフィンガータンパク質、特にCys₂-His₂に分類されるものは、本発明に基づくジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドを形成するのに使用することができる。この天然に存在するジンクフィンガータンパク質は、本明細書において「骨格」と呼ばれる。天然に存在するジンクフィンガータンパク質を骨格と呼ぶことは、この天然ジンクフィンガータンパク質内での他の残基の突然変異を阻むものではない。これは、結合親和性、結合特異性、タンパク質の安定性を高めるため又は他の理由のために行うことができる。

【0058】

マウスの転写因子Zif268の変異体であるC7に基づくファージディスプレイの選

10

20

30

40

50

択によって単離され、部位特異的突然変異によって精製された、5' - (GNN) - 3' のDNA配列をそれぞれ特異的に認識する16個のジンクフィンガードメインの特徴を以前に報告した(開示内容が参考として本明細書で援用される、Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758-2763; Dreier, et al., (2000) J. Mol. Biol. 303, 489-502; 及び米国特許第6,140,081号)。一般的に、Cys₂-His₂型のジンクフィンガードメインの特異的なDNA認識は、各ヘリックスのアミノ酸残基-1、3及び6を介してなされるが、必ずしも常にこの3つの残基がDNA塩基と接触するわけではない。優性の架橋-サブサイトの相互作用が、認識ヘリックスの2位から認められている。Asp²は、それに続く3bpのサブサイトの5'末端チミン又はグアニンに対するそれぞれ相補的アデニン又はシトシンと直接接触することによって、ジンクフィンガードメインの結合を安定化することが明らかにされている。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きた。更に、アミノ酸と3bpサブサイトの外側のヌクレオチドとその他の相互作用が、結合部位を伸長させることも報告されている(Pavletich, et al., (1991) Science 252(5007), 809-817; Elrod-Erickson, et al., (1996) Structure 4(10), 1171-1180; Isalan, et al., (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(11), 5617-5621)。

【0059】

グアニン又はチミン以外の5'末端のヌクレオチドに結合するジンクフィンガードメインの、以前に報告された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26)の2位のアスパラギン酸塩からの架橋-サブサイト相互作用のため奏功しなかった。人工転写因子の構築のため、ジンクフィンガードメインの利用可能性を広げるために、5' - (ANN) - 3' 型のDNA配列を特異的に認識するドメインを選択した(開示内容が参考として本明細書で援用される、2001年2月出願の米国特許出願第09/791,106)。その他の研究チームは、4つの5' - (ANN) - 3' サブサイト、即ち5' - (AAA) - 3'、5' - (AAG) - 3'、5' - (ACA) - 3' 及び5' - (ATA) - 3' を認識するドメインの特徴付けが行える連続選択法を記載している(Greisman, et al., (1997) Science 275(5300), 657-661; Wolfe, et al., (1999) J Mol Biol 285(5), 1917-1934)。本開示内容は、標的部位の重複を除去することによってCNN部位を認識するジンクフィンガードメインを選択するための手法を使用する。第一に、サブサイト5' - (GCG) - 3' に結合するC7(RSD-E-RKR)(配列番号27)のフィンガー3を、2位にアスパラギン酸塩を含有しないドメインと交換した(図1)。以前にトリプレット5' - (GAT) - 3' に高い特異性で結合する位置にあるフィンガー2を特徴とするヘリックスTSN-LVR(配列番号28)は、良好な候補であるように思われた。C7のフィンガー1及び2及び5' - (GAT) - 3' 認識ヘリックスをフィンガー3の位置に含有するこの3フィンガータンパク質(C7.GAT;図1A下)の、異なるフィンガー2サブサイトを有する標的に対するDNA結合特異性を、マルチターゲットELISAで分析し、元々のC7タンパク質(C7.GCG;図1B)と比較した。何れのタンパク質も5' - (TGG) - 3' サブサイトに結合した(C7.GCGは、以前に報告されているフィンガー3のAsp²によってチミン又はグアニンの5'規格のため、5' - (GGG) - 3' にも結合することに留意されたい)。フィンガー2サブサイトの5'ヌクレオチドの認識を、16個全ての5' - (XNN) - 3' 標的部位(Xはアデニン、グアニン、シトシン又はチミンを表す)の混合物を使用して評価した。事実、元々のC7.GCGタンパク質が、フィンガー2の5位におけるグアニン又はチミンを特定したのに対し、C7.GATは塩基を特定せず、5'チミンに対して相補的なアデニンへの架橋-サブサイト相互作用が消失していることを示した。同様の作用は、Asp²が部位特異的

突然変異によってAla2に取って代わられたZif268の変異体でも報告されている (Isalan, et al., (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(11), 5617-5621; Dreier, et al., (2000) J. Mol. Biol. 303, 489-502)。ゲル運動性シフト分析によって測定したC7・GATの親和性は、C7・GCGの0.5 nMに比べて、約400 nMと比較的低いことが明らかになり (Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758-2763)、それは部分的にはフィンガー3のAsp²が欠けているためと考えられる。

【0060】

3フィンガータンパク質C7・GATに基づき、ファージディスプレイベクターpComb3Hでライブラリーを構築した (Barbas, et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7978-7982; Rader, et al., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8(4), 503-508)。無作為化には、VNSコドンドープング戦略 (V = アデニン、シトシン又はグアニン、N = アデニン、シトシン、グアニン又はチミン、S = シトシン又はグアニン) を使用して、フィンガー2のヘリックスの-1位、1位、2位、3位、5位及び6位を含めた。これにより、各無作為化したアミノ酸の位置に24つの可能性が生じたが、芳香族のアミノ酸、Trp、Phe及びTyr並びに終止コдонはこの戦略から除外した。Leuは主に、Cys₂-His₂のジンクフィンガードメインの認識ヘリックスの4位に認められるため、この部分は無作為化しなかった。ライブラリーをER2537細胞 (New England Biolabs) に形質導入した後、ライブラリーは1.5 × 10⁹のメンバーを含有した。これは必要なライブラリーサイズを60倍ほど超えており、全てのアミノ酸の組み合わせを含有するのに十分であった。

【0061】

ジンクフィンガーディスプレイファージを6回選択し、非ビオチン化競合DNAの存在下で、それぞれ16個の5'-GAT-CNN-GCG-3' (配列番号29) ビオチン化ヘアピン標的オリゴヌクレオチドと結合させた。選択の厳密性は回を重ねるごとに、ビオチン化標的オリゴヌクレオチドの量が減少し、競合オリゴヌクレオチド混合物の量が増加することから、高まった。6回目において、標的の濃度は通常は18 nMであり、5'-(ANN)-3'、5'-(GNN)-3'及び5'-(TNN)-3'競合混合物は、各オリゴヌクレオチドプールでそれぞれ5倍過剰となり、特異的5'-(CNN)-3'混合物 (標的配列を除外) は10倍過剰となった。ビオチン化標的オリゴヌクレオチドに結合したファージを、ストレプトアビジンでコーティングした磁性ビーズへの捕捉により回収した。クローンは通常、6回の選択が終了した後に解析した。

【0062】

これらの結果は、本発明における配列を決定するための多くの指針を当業者に提供するものである。これらの指針とは以下のものである。(1) 5'ヌクレオチドがアデニンである場合、Glnは-1位にあるのが好ましい。(2) サブサイトが5'-CAA-3'である場合、Gln、Asn又はSerは-1位にあるのが好ましい。(3) サブサイトが5'-CCA-3'である場合、Serは-1位にあるのが好ましい。(4) 標的サブサイトが3'グアニンを有する場合、Arg、Asn、Gln、His、Ser、Thr又はIleは-1位にあるのが一般的に好ましく、Argについては特に好ましい。(5) 5'-CNG-3'サブサイトに結合させるには、Aspが2位にあるのが一般的に好ましい。(6) サブサイト5'-CNT-3'に結合させるには、Arg、Asn、Gln、His、Ser、Thr、Ala及びCysは-1位にあるのが一般的に好ましい。(7) 3'シトシンを含有するサブサイトの場合、Gln、Asn、Ser、Gly、His又はAspは一般的には-1位にあるのが好ましい。(8) 5'-CAN-3'を認識させるには、His、Asn、Gly、Val、Pro、Ile及びLysは一般的に

3 位にあるのが好ましく、A s n については極めて好ましい。(9) 5' - G C N - 3' サブサイトを認識するヘリックスの 3 位には T h r 又は A s p が特に好ましいが、H i s、L y s、A r g 及び A s n も適応させることができる。(10) 標的部位 5' - C C C - 3' の場合、3 位は好ましくは A s n 又は H i s であるのがよい。(11) 標的部位 5' - C C G - 3' の場合、3 位は好ましくは T h r 又は H i s の何れかであるのがよい。(12) 標的部位 5' - G G N - 3' の場合、H i s は 3 位にあるのがよい。(13) 標的部位 5' - C G (G / T) - 3' の場合、S e r、A s p、T h r、A s n、G l n 及び G l y は 3 位にあるのが好ましい。H i s も可能である。(14) 標的部位 5' - C G C - 3' の場合、T r p 及び T h r は一般的には 3 位にあるのが好ましい。H i s も可能である。(15) 一般的に、5' - C G N - 3' の中央のグアニンは、H i s によって認識されることができる。(16) 標的部位 5' - C T N - 3' の場合、3 位は好ましくは S e r 又は A l a の何れかであるが、H i s が好ましい 5' - C T C - 3' 及び 5' - C T T - 3' については例外である。(17) 6 位には、G l u、A s p、A s n、I l e、A l a、S e r 又は V a l が好ましい。G l u が特に好ましい。隣接するアミノ酸がこの相互作用に影響を与えることがある。(18) 1 位、2 位及び 5 位は幅広く異なることができる。(19) 3' アデニンを認識するには、G l n は一般的には - 1 位にあるのが好ましい。(20) 3' グアニンを認識するには、A r g は一般的には - 1 位にあるのが好ましい。(21) 3' チミンを認識するには、S e r、T h r 又は H i s は一般的には - 1 位にあるのが好ましい。(22) 5' シトシンを認識するには、4 位、5 位及び 6 位のモチーフ L e u - T h r - G l u が一般的には好ましい。これらは単なる指針であり、本発明に基づくジンクフィンガー部分を組み込んだタンパク質又はポリペプチドの二次又は三次構造は、特定のサブサイト、又はこのようなサブサイトの所定の位置における特定のヌクレオチドを認識するのに種々のアミノ酸が好ましくなる可能性がある。更に、複数のジンクフィンガー部分を有するタンパク質内での、特殊なジンクフィンガー部分の配座は、結合を妨げることがある。

【 0 0 6 3 】

更に、ジンクフィンガーを組み込んだタンパク質又はポリペプチドは、詳細を実施例 13 に記載の通りに、分子レベルでモデル化することができる。分子モデリングに好適なコンピュータプログラムの一つは、I n s i g h t I I である。分子モデリングを使用して、本明細書に記載され、本発明の適用範囲内のジンクフィンガー部分の変異に基づいた他のジンクフィンガー部分を産生することができる。このような変異が、本発明の適用範囲内のジンクフィンガー部分のそれと実質的に類似し、モデリングの基礎として使用した、水素結合パターンを有するようなモデリングが確立されれば、その変異も本発明の適用範囲内に含まれる。本明細書で使用される、水素結合パターンに関する「実質的に類似する」という用語は、同じ数の水素結合が存在し、各水素結合の結合角度が約 10 度以下しか異ならず、各水素結合の結合長が約 0.2 オングストローム以下しか異ならないことを意味する。

【 0 0 6 4 】

I I I . ポリペプチド組成物

別の態様において、本発明は、上述のように作動可能に結合されて、5' - (C N N)_n - 3' (式中、n は 1 を超える整数である) として示されるヌクレオチド標的モチーフに特異的に結合する、本発明に基づく複数のジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドを含むポリペプチド組成物を提供する。この標的モチーフはあらゆる長さのヌクレオチド配列内 (例えば、3 ~ 13 個以上の T N N、G N N、A N N 又は N N N 配列) に位置することができる。好ましくは、n は 2 ~ 約 12 の整数であり、より好ましくは 2 ~ 6 の整数である。個々のポリペプチドは、好ましくはオリゴペプチドリンカーと結合する。このようなリンカーは好ましくは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質に認められるリンカーと類似するのがよい。本発明で使用するのに好ましいリンカーは、アミノ酸残基配列 T G E K P (配列番号 30) である。本発明で使用するのに好ましい別のリンカーには、アミノ酸残基配列 T G G G S G G G T G E K P (配列番号 133) がある。よ

り長い複数のジンクフィンガー結合ポリペプチドの2個の半分を実質的に独立した方法で操作したい場合は、より長いリンカーを使用することができる。グリシン又はセリン反復配列等の他のリンカーは、ペプチド（例えば、一本鎖抗体領域）に結合させるものとして当該技術分野で周知であり、本発明の組成物に使用することができる。更に別のリンカーが当該技術分野で既知であり、参考として本明細書で援用される、S. Alwin, et al., "Custom Zinc-Finger Nucleases for Use in Human Cells," Mol. Ther. 12:610-617 (2005)に記載されるような、AAAAリンカー（配列番号158）等を使用することができる。リンカーの使用は全ての目的において必要とされるわけではなく、任意には省くこともできる。本発明に基づくポリペプチド組成物の、その特異的核酸配列に対する好ましい結合は、 K_D が $10\mu\text{M} \sim 1\mu\text{M}$ 、 $10\text{pM} \sim 100\text{nM}$ 、 $100\text{pM} \sim 10\text{nM}$ 、及びより好ましくは $1\text{nM} \sim 10\text{nM}$ で起こるのがよい。

10

【0065】

本発明に基づくポリペプチド組成物は、天然したジンクフィンガータンパク質の誘導体又は変異体であってもよい。天然したジンクフィンガータンパク質は、上述のようなSP1C、TFIIIA又はZif268であることができるが、これらに限定はされない。使用される天然に存在するジンクフィンガータンパク質は、本明細書では上述の通り「骨格」と呼ばれる。

【0066】

本発明のポリペプチド又はポリペプチド組成物は、1個以上の機能ポリペプチドに作動可能に結合させることができる。このような機能ポリペプチドは、所定の機能を有するタンパク質の競合配列であることができるか、所定の機能を有するタンパク質内で発生する単一又は複数のドメインから派生することができる。このような機能ポリペプチドは、当該技術分野で周知であり、レプレッサー又は活性化ドメイン又は他の機能を有するペプチド等の転写調節因子であってもよい。このような機能ポリペプチドの例及び好ましい形は、ヌクレアーゼ、メチラーゼ、核局在ドメイン及びエンド-又はエクソヌクレアーゼ等の制限酵素である（例えば、Chandrasegaran and Smith, Biol. Chem., 380:841-848, 1999を参照）。

20

【0067】

抑制ドメインポリペプチドの一例は、ets2抑制因子（ERF）のアミノ酸473～530によって規定されるERFレプレッサードメイン（ERD）である（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の拮抗作用を媒介する。合成レプレッサーは、このドメインをジンクフィンガータンパク質のN-又はC-末端に融合させることによって構築される。第二の抑制タンパク質は、Kruppel結合ボックス（KRAB）ドメインを使用して調製される（Margolin, J.F., Friedman, J.R., Meyer, W., K.-H., Vissing, H., Thiesen, H.-J. & Rauscher II, F.J. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4509-4513）。このレプレッサードメインはジンクフィンガータンパク質のN末端に通常は認められ、おそらくは、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（Friedman, J.R., Frederick, W.J., Jensen, D.E., Speicher, D.W., Huang, X.-P., Neilson, E.G. & Rauscher II, F.J. (1996) Genes & Dev. 10, 2067-2078）、距離及び方向に非依存的な方法で、TATA-依存性転写に対する抑制活性を発揮する（Pengue, G. & Lania, L. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1015-1020）。本発明者等

30

40

50

はジンクフィンガータンパク質 K O X 1 のアミノ酸 1 ~ 9 7 の間に認められる K R A B ドメインを使用した (M a r g o l i n , J . F . , F r i e d m a n , J . R . , M e y e r , W . , K . - H . , V i s s i n g , H . , T h i e s e n , H . - J . & R a u s c h e r I I I , F . J . (1 9 9 4) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 1 , 4 5 0 9 - 4 5 1 3) 。この場合、N 末端融合のジンクフィンガーポリペプチドが構築される。最後に、ヒストン脱アセチル化が抑制に果たす有用性を確認するため、M a d m S I N 3 相互作用ドメイン (S I D) のアミノ酸 1 ~ 3 6 を、ジンクフィンガータンパク質の N 末端に融合する (A y e r , D . E . , L a h e r t y , C . D . , L a w r e n c e , Q . A . , A r m s t r o n g , A . P . & E i s e n m a n , R . N . (1 9 9 6) M o l . C e l l . B i o l . 1 6 , 5 7 7 2 - 5 7 8 1) 。この小さなドメインは転写因子 M a d の N 末端に認められ、m S I N 3 と相互作用することによってその転写抑制を媒介する役割を担っており、m S I N 3 は、今度コレプレッサー N - C O R 及びヒストン脱アセチル化酵素 m R P D 1 と相互作用する (H e i n z e l , T . , L a v i n s k y , R . M . , M u l l e n , T . - M . , S o d e r s t r o m , M . , L a h e r t y , C . D . , T o r c h i a , J . , Y a n g , W . - M . , B r a r d , G . , & N g o , S . D . (1 9 9 7) N a t u r e 3 8 7 , 4 3 - 4 6) 。遺伝子特異的活性化を確認するため、ジンクフィンガーポリペプチドを単純ヘルペスウイルス V P 1 6 タンパク質のアミノ酸 4 1 3 ~ 4 8 9 (S a d o w s k i , I . , M a , J . , T r i e z e n b e r g , S . & P t a s h n e , M . (1 9 8 8) N a t u r e 3 3 5 , 5 6 3 - 5 6 4) 又は V P 1 6 の最小活性化ドメインの人工四量体反復である V P 6 4 (S e i p e l , K . , G e o r g i e v , O . & S c h a f f n e r , W . (1 9 9 2) E M B O J . 1 1 , 4 9 6 1 - 4 9 6 8) に融合させることにより、転写アクチベーターを産生する。

【 0 0 6 8 】

上述のような本発明のポリペプチド組成物は、1 個以上の転写修飾又は調節因子に作動可能に結合させることができる。転写アクチベーター又は転写サプレッサー又はレプレッサーといった修飾因子は、当該技術分野で周知である。ポリペプチドをこのような因子に作動可能に結合させる方法も、当該技術分野で周知である。遺伝子発現を修飾するためのこのような因子の例及び好ましい例及びその使用については、本明細書で後に詳述する。

【 0 0 6 9 】

遺伝子特異的転写調節因子としてジンクフィンガータンパク質を使用するという考え方を検証するため、6 フィンガータンパク質を多くのエフェクタードメインに融合させる。3 個のヒト由来レプレッサードメインの何れかをジンクフィンガータンパク質に結合させることによって、転写レプレッサーを産生する。最初のレプレッサータンパク質は、e t s 2 抑制因子 (E R F) のアミノ酸 4 7 3 ~ 5 3 0 によって規定される E R F レプレッサードメイン (E R D) (S g o u r a s , D . N . , A t h a n a s i o u , M . A . , B e a l , G . J . , J r . , F i s h e r , R . J . , B l a i r , D . G . & M a v r o t h a l a s s i t i s , G . J . (1 9 9 5) E M B O J . 1 4 , 4 7 8 1 - 4 7 9 3) を使用して調製される。このドメインは、e t s ファミリーの転写因子の活性に対する E R F の拮抗作用を媒介する。合成レプレッサーは、このドメインをジンクフィンガータンパク質の C - 末端に融合させることによって構築される。第二の抑制タンパク質は、K r u p p e l 結合ボックス (K R A B) ドメインを使用して調製される (M a r g o l i n , J . F . , F r i e d m a n , J . R . , M e y e r , W . , K . - H . , V i s s i n g , H . , T h i e s e n , H . - J . & R a u s c h e r I I I , F . J . (1 9 9 4) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 1 , 4 5 0 9 - 4 5 1 3) 。このレプレッサードメインはジンクフィンガータンパク質の N 末端に通常は認められ、おそらくは、R I N G フィンガータンパク質 K A P - 1 と相互作用することによって (F r

iedman, 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)、距離及び方向に非依存的な方法で、TATA - 依存性転写に対する抑制活性を発揮する (Pengue, G. & Lania, L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1015 - 1020)。本発明者等はジンクフィンガータンパク質K O X 1のアミノ酸1 ~ 97の間に認められるKRABドメインを使用した (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によるN - 末端融合が構築される。最後に、ヒストン脱アセチル化が抑制に果たす有用性を確認するため、Mad mSIN3相互作用ドメイン (SID) のアミノ酸1 ~ 36を、ジンクフィンガータンパク質のN末端に融合する (Ayer, D. E., Laherty, C. D., Lawrence, Q. A., Armstrong, A. P. & Eisenman, R. N. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 5772 - 5781)。この小さなドメインは転写因子MadのN末端に認められ、mSIN3と相互作用することによってその転写抑制を媒介する役割を担っており、mSIN3は、今度コレプレッサーN - COR及びヒストン脱アセチル化酵素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)。人工転写因子を産生するためにエフェクタードメインに融合させる6フィンガーのジンクフィンガータンパク質のこの他の例は、参考として本明細書で援用される、P. Blancafort, et al., "Genetic Reprogramming of Tumor Cells by Zinc Finger Transcription Factors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11716 - 11721 (2005)に記載されており、薬物耐性、細胞骨格リモデリング、基質依存性細胞移動及びin vitroにおける腫瘍細胞浸潤を誘導することのできるVP64アクチベータードメインを含有する6ジンクフィンガー人工転写因子の選択及び特徴も記載されている。又、合成6及び12フィンガー合成ジンクフィンガータンパク質からなる合成転写因子は、類表皮扁平上皮癌細胞系のErbB2及びErbB3受容体のレベルを変化させることが明らかになった (参考として本明細書で援用される、C. V. Lund, et al., "Zinc Finger Transcription Factors Designed for Bispecific Coregulation of ErbB2 and ErbB3 Receptors: Insight into ErbB Receptor Biology", *Mol. Cell. Biol.* 25: 9082 - 9091 (2005))。

【0070】

遺伝子特異的活性化を確認するため、ジンクフィンガータンパク質を単純ヘルペスウイルスVP16タンパク質のアミノ酸413 ~ 489 (Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M. (1988) *Nature* 335, 563 - 564)又はVP16の最小活性化ドメインの人工四量体反復、DALDDFDLDM (配列番号36)であるVP64 (Seipel, K., Georgiev, O. & Schaffner, W. (1992) *EMBO J.* 11, 4961 - 4968)に融合させることにより、転写アクチベーターを産生する。

【0071】

本発明者等の設計した転写調節因子の特異的活性を確認するため、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に結合させた *erbB-2* プロモーターの断片を含有するレポーター構築物を産生する。標的レポータープラスミドは、ATG開始コドンに関するヌクレオチド-758~-1を含有する。プロモーター断片は、HeLa細胞に一過性に形質導入させた場合に同様の活性を示し、過去の知見と合致することが明らかになった(Hudson, L.G., Ertl, A.P. & Gill, G.N. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4389-4393)。ジンクフィンガーとレプレッサードメインの融合構築物が、*erbB-2* プロモーターの活性に与える作用を確認するため、HeLa細胞に一過性にジンクフィンガー発現ベクター及びルシフェラーゼレポーター構築物を同時に形質導入する。各構築物で著明な抑制が認められる。転写の活性化を媒介させる場合の遺伝子特異的な多指の(polydactyl)タンパク質の有用性を、同じ2個のレポーター構築物を使用して試験する。

10

20

30

40

50

【0072】

本明細書のデータは、新規の9-及び18-bpのDNA標的部に結合することのできるジンクフィンガータンパク質が、5'-(CNN)-3'部位を認識する予め規定したドメインを使用することによって迅速に調製できることを示している。この情報は、DNA配列の18bpにそれぞれ結合することのできる166又は1700万個の新規の6フィンガータンパク質を調製するのに十分なものである。この新規のジンクフィンガータンパク質を構築する迅速な方法論は、その他の研究者らが提案したジンクフィンガードメインの連続的産生及び選択(Greisman, H.A. & Pabo, C.O. (1997) Science 275, 657-661)よりも有益であり、上述のような標的の重複の問題が5'-(CNN)-3'部位を標的とするタンパク質内で回避されうること示唆する構造的情報を利用する。複雑且つよく研究された*erbB-2* プロモーター及び生存ヒト細胞を使用して、このデータはこれらのタンパク質が、適切なエフェクタードメインと共に提供された場合、発現を惹起又は活性化し、これらの実験の背景レベルまでの段階的なレベルの抑制を実現するのに使用することができることを明らかにしている。

【0073】

上述のような本発明に基づくポリペプチド組成物は、酵素活性等の他の活性を有する融合タンパク質分子に組み込むこともできる。融合タンパク質分子に組み込むことのできる酵素活性の中には、インテグラーゼがある。一例は、参考として本明細書で援用される、W. Tan, et al., "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Incorporated with Fusion Proteins Consisting of Integrase and the Designed Polydactyl Zinc Finger Protein E2C Can Bias Integration of Viral DNA into a Predetermined Chromosomal Region in Human Cells", J. Virol. 80: 1939-1948 (2006)に記載されている。同様に、本発明に基づく融合タンパク質は、ヒト細胞を含めた哺乳類細胞における相同遺伝子組換えを刺激する標的DNA二重鎖切断を触媒するヌクレアーゼの産生を記載した、参考として本明細書で援用される、S. Alwin, et al., "Custom Zinc-Finger Nucleases for Use in Human Cells", Mol. Ther. 12: 610-617 (2005)に記載のような、ヌクレアーゼ活性を含むこともできる。これらの融合タンパク質はFokI触媒ドメインをその中に組み込む。このような融合タンパク質は、矯正した細胞をex vivoで増殖させた後に患者に再導入するといった、ヒト幹細胞の遺伝子修復に使用することができる。

【0074】

更に、本発明に基づくポリペプチド又はポリペプチド組成物のジンクフィンガーヌクレオチド結合活性特性の他に、2つ以上の活性を有するドメインをその中に含む融合タンバ

ク質をはじめとして、その他の融合タンパク質も可能である。このような融合タンパク質も本発明の適用範囲内に含まれる。

【0075】

IV. 単離ヘプタペプチド

本発明の別の態様は、ヘリックス構造を有し、式CNN（式中、NはA、C、G又はTである）の標的ヌクレオチドに優先的に結合する単離ヘプタペプチドである。好ましい標的ヌクレオチドは、上述の通りである。

【0076】

好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号1～28、35～45、48、54、57～82、85～130及び134～157の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。より好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号54、57～82、85～130及び134～157の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。尚より好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134及び153の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。更により好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134及び153の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。尚更により好ましくは、ヘプタペプチドは、配列番号2、14、18、63、66、71、72、73、75、77、78、79、80、81及び82の何れかのアミノ酸配列を有するのがよい。

【0077】

或いは、ヘプタペプチドは、

(a) 配列番号2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134及び153の何れかのアミノ酸配列；並びに

(b) 配列番号2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134及び153の何れかのアミノ酸配列と、2個以下の保存的アミノ酸置換でしか異ならないアミノ酸配列であって、解離定数が置換前のポリペプチドのその125%以下であり、且つ保存的アミノ酸置換が、以下の置換：即ち、Ala/Gly又はSer；Arg/Lys；Asn/Gln又はHis；Asp/Glu；Cys/Ser；Gln/Asn；Gly/Asp；Gly/Ala又はPro；His/Asn又はGln；Ile/Leu又はVal；Leu/Ile又はVal；Lys/Arg又はGln又はGlu；Met/Leu又はTyr又はIle；Phe/Met又はLeu又はTyr；Ser/Thr；Thr/Ser；Trp/Tyr；Tyr/Trp又はPhe；Val/Ile又はLeuの1つである、アミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。好ましくは、このアミノ酸配列は、配列番号2、14、18、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、75、77、78、79、80、81、82、134及び153の何れかのアミノ酸配列と、1個以下の保存的アミノ酸置換でしか異ならないのがよい。

【0078】

V. ポリヌクレオチド、発現ベクター及び形質導入細胞

本発明は、ポリペプチド、ポリペプチド組成物及び上述のような単離ヘプタペプチドを含めた、ジンク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ヌクレオチド配列を含む。天然、短縮及び拡大ポリペプチドを含む、本発明のジンク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DNA配列は、幾つかの方法で得ることができる。例えば、DNAは、当該技術分野で周知の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、(1)共有のヌクレオチド配列を検出するためのプローブとゲノム、又はcDNAライブラリーとのハイブリダイゼーション；(2)共有の構造特性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及び(3)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による合成が含まれるが、これらに限定されない。本発明のRNA配列は、当

10

20

30

40

50

該技術分野で既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, et al., Eds., 1989を参照）。

【0079】

本発明のジंक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なDNA配列を開発するには、(1)ゲノムDNAからの二重鎖DNA配列の単離；(2)当該ポリペプチドに必要なコドンを提供するためのDNA配列の化学的製造及び(3)真核ドナー細胞から単離したmRNAの逆転写による二重鎖DNA配列のin vitroでの合成を行う。(3)の場合、mRNAの二重鎖DNA補体が最終的には形成され、これを一般的にはcDNAと呼ぶ。遺伝子組換えの手順に使用する特異的DNA配列を作製するためのこれら3つの方法の内、ゲノムDNAの単離は最もまれである。哺乳動物ポリペプチドの細菌を使用した発現が望まれる場合は特に、イントロンの存在のために行われることは稀である。ジंकフィンガー由来のDNA結合ポリペプチドを得るには、所望のポリペプチド生成物のアミノ酸残基の全配列が既知である場合は、DNA配列の合成が第一選択の方法となることが多い。所望のポリペプチドのアミノ酸残基の全配列が未知である場合、DNA配列の直接的な合成は不可能であり、第一選択の方法はcDNA配列の形成となる。当該cDNA配列を単離するための標準的手順には、高レベルの遺伝子発現が認められるドナー細胞に豊富に含まれるmRNAの逆転写に由来するプラスミド保有cDNAライブラリーの形成がある。ポリメラーゼ連鎖反応技術と共に使用した場合、極めて少量の発現生成物であってもクローン化することができる。ポリペプチドのアミノ酸配列の大部分が既知である場合は、一本鎖に変性したcDNAのクローン複製を対象に実施されるDNA/DNAハイブリダイゼーション手順において、標的cDNAに存在することが推定される配列を複製する、標識された一本鎖又は二本鎖DNA又はRNAプローブ配列の産生を行うことができる(Jay, et al., Nucleic Acid Research 11: 2325, 1983)。

【0080】

本発明の適用範囲内に含まれるヌクレオチド配列に関しては、記載された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、本発明の適用範囲内のヌクレオチド配列に含まれる。これは更に、上述のような保存的アミノ酸置換が組み込まれた本発明に基づくポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を全て含む。これは更に、融合タンパク質をはじめとして、ジंकフィンガードメインを組み込んだより大きなタンパク質及び、ジंकフィンガードメインに作動可能に結合した転写修飾因子を組み込んだタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。これらの目的のため、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))に従って、「同一性」を定義する。

【0081】

本発明に包含されるヌクレオチド配列は、当該技術分野で周知の通り、発現ベクターを含むがこれに限定されないベクターに組み込まれることができ、好適な宿主細胞に感染又は形質導入するのに使用することができる。この本発明に包含されるヌクレオチド配列を組み込んだベクターも、本発明の適用範囲内に含まれる。ベクター又は本発明のポリヌクレオチド又はヌクレオチド配列で形質導入又は感染させた宿主細胞も、本発明の適用範囲内に含まれる。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞であることができ、真核細胞であれば、宿主細胞は哺乳動物細胞、昆虫細胞又は酵母細胞であってもよい。原核細胞であれば、宿主細胞は一般的には細菌細胞である。

【0082】

遺伝子組換えDNAの宿主細胞への形質導入は、当業者に周知の従来の技法によって実施することができる。宿主が大腸菌等の原核細胞である場合、DNA取り込みが可能な競

10

20

30

40

50

合細胞は、当該技術分野で周知の手順によって、指数増殖期の後に回収し、その後 $CaCl_2$ 法で処理することによって調製することができる。或いは、 $MgCl_2$ 又は $RbCl$ を使用することもできる。形質導入は、宿主細胞のプロトプラストを形成した後、又はエレクトロポレーションによって実施することもできる。

【0083】

宿主が真核細胞である場合、リン酸カルシウム共沈法或いは、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リボソームに包埋したプラスミドの挿入又はウイルスベクター等の従来の機械的手順等の DNA トランスフェクション法を使用することができる。

【0084】

ジンクフィンガー由来のヌクレオチド結合コード配列を発現させるため、種々の宿主 - 発現ベクター系を使用することができる。これらには、ジンクフィンガー由来ヌクレオチド結合ポリペプチドコード配列を含有する遺伝子組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA 又はコスミド DNA 発現ベクターを導入した細菌等の微生物；ジンクフィンガーヌクレオチド結合コード配列を含有する遺伝子組換え酵母発現ベクターを導入した酵母；ジンクフィンガー由来 DNA 結合コード配列を含有する遺伝子組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 ）に感染させるか、当該配列を含有する遺伝子組換えプラスミド発現ベクター（例えば、 Ti プラスミド）を導入した植物細胞系；ジンクフィンガーヌクレオチド結合コード配列を含有する遺伝子組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；又はジンクフィンガー由来ヌクレオチド結合コード配列を含有する遺伝子組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）に感染させた動物細胞系又は安定した発現を行わせるべく工学的処理を行った形質導入した動物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。糖化が重要になるこのような場合においては、哺乳動物、昆虫、酵母又は植物発現系等の、翻訳修飾及び翻訳後修飾に備えた発現系を使用することができる。

【0085】

使用する宿主 / ベクター系によって、構成及び誘導プロモーター、転写エンハンサー要素、転写ターミネーター等を含めた多くの好適な転写及び翻訳要素の何れかを、発現ベクター内で使用することができる（例えば、Bitter, et al., Methods in Enzymology, 153: 516-544, 1987を参照）。例えば、細菌系におけるクローニングの場合、バクテリオファージの pL 、 p_{lac} 、 p_{trp} 、 p_{tac} ($p_{trp-lac}$ ハイブリッドプロモーター) 等の誘導プロモーターを使用することができる。哺乳動物細胞系におけるクローニングの場合は、哺乳動物のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例えば、レトロウイルス末端反復配列；アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター）を使用することができる。遺伝子組換え DNA 又は合成法によって産生したプロモーターも、挿入されたジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドコード配列の転写のために使用することができる。

【0086】

細菌系では、発現させるジンクフィンガー由来ヌクレオチド結合ポリペプチドの使用意図に応じて、多くの発現ベクターを有益に選択することができる。例えば、大量に産生する必要がある場合、容易に精製できる高レベルの融合タンパク質生成物の発現を誘導するベクターが望ましい場合がある。当該タンパク質を回収する助けとなる切断部位を含有するべく工学的に処理されたベクターが好ましい。このようなベクターには、ジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質コード配列が $lacZ$ コード領域を有するフレーム内でベクターに結合するために、ジンクフィンガーと $lacZ$ のハイブリッドタンパク質が産生される大腸菌発現ベクター $pUR278$ (Ruther, et al., EMBO J., 2: 1791, 1983)； pIN ベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109, 1985；Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 2

10

20

30

40

50

64:5503-5509, 1989)等が含まれるが、これらに限定はされない。

【0087】

酵母では、構成又は誘導プロモーターを含有する多くのベクターを使用することができる。レビューについては、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel, et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13; Grant, et al., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3; 及びBitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684; 及びThe Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, 1982, Eds. Strathern, et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and IIを参照されたい。ADH又はLEU2等の構成酵母プロモーター又はGAL等の誘導プロモーターを使用することができる (Cloning in Yeast, Ch. 3, R. Rothstein In: DNA Cloning Vol. 11, A Practical Approach, Ed. DM Glover, 1986, IRL Press, Wash., D.C.)。或いは、外来DNA配列の酵母の染色体への組み込みを促進するベクターを使用することができる。

【0088】

植物発現ベクターを使用する場合、ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドコード配列の発現は、多くのプロモーターの何れかによってなされる。例えば、CaMVの35S RNA及び19S RNAプロモーター等のウイルスプロモーター (Brisson, et al., Nature, 310:511-514, 1984) 又はTMVに対するコートタンパク質プロモーター (Takamatsu, et al., EMBO J., 6:307-311, 1987)を使用することができる。或いは、RUBISCOの小さなサブユニット等の植物プロモーター (Coruzzi, et al., EMBO J. 3:1671-1680, 1984; Broglie, et al., Science 224:838-843, 1984) 又はダイズhsp17.5-E又はhsp17.3-B等の熱ショックプロモーター (Gurley, et al., Mol. Cell. Biol., 6:559-565, 1986)を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、直接的DNA形質導入、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等を使用して植物細胞に導入することができる。このような技法のレビューについては、例えば、Weissbach & Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VII, pp. 421-463, 1988及びGrierson & Corey, Plant Molecular Biology, 2d ed., Blackie, London, Ch. 7-9, 1988を参照されたい。

【0089】

本発明のタンパク質を発現させるのに使用することのできる又別の発現系は、昆虫系である。このような系の一つとして、Autographa californica核多角体病ウイルス (AcNPV) をベクターとして使用して、外来遺伝子を発現させること

ができる。このウイルスは *Spodoptera frugiperda* 細胞において増殖する。ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドコード配列を、当該ウイルスの非主要領域（例えば、*Spodoptera frugiperda* にポリヘドリン遺伝子を）にクローン化し、*AcNPV* プロモーター（例えばポリヘドリンプロモーター）の制御下におくことができる。ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドコード配列の挿入に成功すれば、ポリヘドリン遺伝子を不活化し、非包埋の遺伝子組換えウイルス（即ち、ポリヘドリン遺伝子によってコードされるタンパク質からなる外殻を持たないウイルス）を産生することができる。次に、これらの遺伝子組換えウイルスを使用して、挿入した遺伝子を発現させる細胞に感染させる（例えば、Smith, et al., J. Biol. 46:584, 1983; Smith, 米国特許第4,215,051号を参照）。

10

【0090】

真核細胞系、及び好ましくは哺乳動物発現系は、発現させた哺乳動物のタンパク質を適切に翻訳後修飾させることを可能にする。このため、一次転写生成物の適切な処理、糖化、リン化及び有益には遺伝子生成物の分泌等を行う細胞内機械を有する哺乳動物細胞等の真核細胞は、ジンクフィンガー由来ヌクレオチド結合ポリペプチドを発現させるのに好ましい宿主細胞である。このような宿主細胞系は、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、-293及びWI38を含むが、これらに限定されない。

【0091】

発現を制御するのに遺伝子組換えウイルス又はウイルス要素を使用する哺乳動物細胞系は、工学的に処理することができる。例えば、アデノウイルス発現ベクターを使用する場合、ジンクフィンガー由来ポリペプチドのコード配列を、例えば後期プロモーター及び三単位（tripartite）リーダー配列等のアデノウイルス転写／翻訳制御複合体に結合させることができる。次にこのキメラ遺伝子を、*in vitro* 又は *in vivo* の遺伝子組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非主要領域（例えば、領域E1又はE3）への挿入により、感染宿主の中で生存が可能で、ジンクフィンガーポリペプチドを発現することのできる遺伝子組換えウイルスを得ることができる（例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659, 1984を参照）。或いは、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーターを使用することもできる（例えば、Mackett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7415-7419, 1982; Mackett, et al., J. Virol. 49:857-864, 1984; Panicali, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:4927-4931, 1982を参照）。特に注目されるのは、染色体外要素として複製する能力を有するウシパピローウイルスに基づくベクターである（Sarver, et al., Mol. Cell. Biol. 1:486, 1981）。このDNAをマウス細胞に導入してまもなく、プラスミドは細胞当たり約100~200のコピーを複製する。挿入されたcDNAが転写されるのに、プラスミドが宿主の染色体に組み込まれる必要がなく、そのため高レベルでの発現が得られる。これらのベクターを使用して、プラスミドにneo遺伝子等の選択可能なマーカーを含めることによって、安定した発現を得ることができる。或いは、レトロウイルスゲノムを、ジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質遺伝子を宿主細胞へ導入しその発現を制御することのできるベクターとして使用するために修飾することができる（Cone & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349-6353, 1984）。メタロチオネインIIAプロモーター及び熱ショックプロモーターを含むがこれらに限定されない誘導プロモーターを使用することによっても、高レベルの発現が可能になる。

20

30

40

【0092】

長期にわたる高レベルでの遺伝子組換えタンパク質の産生には、安定した発現が望まれる。複製の元となるウイルスを含有する発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞に、適

50

切な発現制御要素（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等）で制御される cDNA 及び選択マーカーを導入することができる。遺伝子組換えプラスミド内の選択マーカーはその選択肢に耐性を付与し、細胞がその染色体にプラスミドを安定的に組み込み、細胞巢を形成してそれがクローン化され細胞系にまで増殖することを可能にする。例えば、外来 DNA の導入後に、工学的処理を行った細胞は、栄養豊富な培地で 1～2 日間増殖させ、その後選択的培地に切り替えることができる。多くの選択系を使用することができ、それには、それぞれ tk^{sup}、hgp^{rt}、sup⁺ 又は apr⁺、sup⁺ 細胞で使用するのことができる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (Wigler, et al., 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遺伝子 (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026, 1962) 及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (Lowy, et al., Cell, 22: 817, 1980) が含まれるが、これらに限定はされない。又、抗代謝物耐性付与遺伝子を選択の基礎として使用することもできる。例えば、メトトレキセートに対する耐性を付与する dhfr 遺伝子 (Wigler, et al., Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567, 1980; O'Hare, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527, 1981)、ミコフェノール酸に対する耐性を付与する gpt 遺伝子 (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072, 1981)、アミノグリコシド G418 に対する耐性を付与する neo 遺伝子 (Colberre-Garapin, et al., J. Mol. Biol., 150: 1, 1981) 及びハイグロマイシンに対する耐性を付与する hyg^{ro} 遺伝子 (Santerre, et al., Gene, 30: 147, 1984) 等である。近年、この他の選択遺伝子も報告されている。細胞に対してトリプトファンの代わりにインドールを使用することを可能にさせる trp^B 遺伝子、細胞に対してヒスチジンの代わりにヒスチノールを使用することを可能にさせる his^D 遺伝子 (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 804, 1988) 及びオルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、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 ODC (オルニチンデカルボキシラーゼ) 遺伝子 (McConlogue L., In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed., 1987) 等である。

【0093】

本発明が提供する細菌を介して発現させたタンパク質又はその断片の単離及び精製は、分取クロマトグラフィー及びモノクローナル又はポリクローナル抗体に関わる免疫学的分離を含めた従来の方法によって実施することができる。本発明で提供される抗体は、本発明のジंकフィンガーヌクレオチド結合タンパク質に対して免疫反応性を有する。種々のエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体のプールから主になる抗体並びに独特の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、当該技術分野で周知の方法により、タンパク質の断片を含有する抗原から作製される (Kohler, et al., Nature, 256: 495, 1975; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al., ed., 1989)。

【0094】

VI. 薬学的組成物

別の態様において、本発明は、(1) 上述の本発明に基づく治療有効量のポリペプチド、ポリペプチド組成物又は単離ヘptaペプチド；及び(2) 薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。或いは、本発明は、(1) 上述の本発明に基づくポリペプチ

ド、ポリペプチド組成物又は単離ヘプタペプチドをコードする治療有効量のヌクレオチド配列；及び（２）薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。

【００９５】

本明細書で使用される、治療量のヌクレオチド配列を含む本発明に基づく薬理学的組成物の説明において、ヌクレオチド配列は更に上述のようなベクターに組み込むこともできる。

【００９６】

その中に溶解又は分散させた活性成分を含有する薬理学的組成物の調製方法は業界で理解されている。一般的に、このような組成物は、水性又は非水性の液体溶液又は懸濁液の何れかの滅菌注射剤として調製されるが、溶液又は懸濁液に好適な固体であって使用前に液体にするものとしても調整することができる。調製物は乳化させることもできる。活性成分は、薬学的に許容され、活性成分に適合する賦形剤と、本明細書に記載の治療方法で使用するのに好適な量だけ混合することができる。好適な調剤は、例えば、水、生食水、ブドウ糖、グリセロール、エタノール等及びその組み合わせである。更に、必要に応じて、組成物は、湿潤剤又は乳化剤並びにｐＨ緩衝剤等活性成分の有効性を高める副次的物質を少量含有することができる。キレート化剤、保存剤、抗菌剤、抗酸化剤、着色剤、矯味剤等の、製薬業界で慣習とされている更に他の成分も、組成物の特徴及び組成物の予定投与経路に応じて使用することができる。

【００９７】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される構成要素の塩を含むことができる。薬学的に許容される塩には、例えば塩酸又はリン酸等の無機酸又は、酢酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸と形成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基と形成）が含まれる。遊離カルボキシル基と形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は水酸化第二鉄等の無機塩基及び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、プロカイン等の有機塩基に由来することができる。生理学的に許容される担体は、当該技術分野で周知である。液体担体の例は、活性成分及び水の他に物質を全く含有しない滅菌水溶液又はリン酸緩衝生食水等の生理学的ｐＨ値でリン酸ナトリウム等の緩衝剤、生理学的生食水又はその両方を含有する滅菌水溶液である。更に、水性担体は、１つ以上の緩衝塩並びに塩化ナトリウム及びカリウム等の塩、ブドウ糖、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール及び他の溶質を含有することができる。液体組成物は、水と共に及び水を除外して、液相を含有することができる。このような追加の液相の例は、グリセリン、綿実油等の植物油、オレイン酸エチル等の有機エステル及び水-油エマルジョンである。

【００９８】

V I . 使用

一実施形態において、本発明の方法は、ＣＮＮ標的配列を含有するヌクレオチド配列の発現を修飾する（阻害する又は抑制する）プロセスを含む。この方法は、当該ヌクレオチドを、当該モチーフに結合した本発明の有効量のジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドに接触させる手順を含む。ヌクレオチド配列がプロモーターである場合、この方法はジンクフィンガーＤＮＡ結合モチーフを含有するプロモーターの転写活性化の阻害を含む。「阻害」という用語は、例えばジンクフィンガーヌクレオチド結合モチーフを含有する等、プロモーターと作動可能に結合させた構造遺伝子の転写の活性化レベルの抑制を指す。更に、ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドは、構造遺伝子又はＲＮＡ配列内の標的に結合することができる。

【００９９】

「有効量」という用語は、既に活性化されたプロモーターを不活化させる量又は標的ヌクレオチドを含有するプロモーターを不活化させる量又は構造遺伝子の転写又はＲＮＡの翻訳を遮断する量を含む。必要とされるジンクフィンガー由来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内の天然に存在するジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質に取って代わるのに必要な量又は、プロモーターそれ自体

と複合体を形成するのに天然に存在するジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質と競合するのに必要な量である。同様に、構造遺伝子又はRNAを遮断するのに必要な量は、それぞれ、RNAポリメラーゼに結合して遺伝子の読み取りを遮断する量、又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実施されるのがよい。プロモーター又は構造遺伝子を機能的に不活化することにより、転写又は翻訳は抑制される。標的配列を含有する細胞内ヌクレオチド配列と結合するか「接触する」阻害タンパク質の有効量の送達は、レトロウイルスベクター又はリボソーム等本明細書に記載した機序の一つ、又は当該技術分野で周知のその他の方法によって達成することができる。「修飾」という用語は、ある機能の抑制、促進又は誘導を指す。例えば、本発明のジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドは、プロモーター内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修飾し、それによってプロモーターヌクレオチド配列に作動可能に結合した遺伝子の転写を促進又は抑制することができる。或いは、修飾は、ジンクフィンガーヌクレオチド結合ポリペプチドが構造遺伝子に結合し、DNA依存性RNAポリメラーゼによる遺伝子の読み取りを遮断して、その遺伝子の転写を阻害する場合、遺伝子の転写の阻害を含む。構造遺伝子は通常の細胞遺伝子又は例えば腫瘍遺伝子であってもよい。或いは、修飾は、転写生成物の翻訳の阻害を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0100】

遺伝子のプロモーター領域は一般的に、5'から構造遺伝子の間に存在する調節要素を含む。或いは、複数の調節要素が、仲介するヌクレオチド配列によって隔てられて存在することができる。遺伝子を活性化させる必要がある場合、転写因子と呼ばれるタンパク質がその遺伝子のプロモーター領域に結合する。このアセンブリは、ある酵素の第二の遺伝セグメントをDNAからRNAに転写することを可能にすることによって「スイッチオン」に似た状態にする。殆どの場合、結果生じるRNA分子は、特異的なタンパク質を合成するためのテンプレートとして働くが、場合によってはRNAそれ自体が最終生成物になることもある。

【0101】

プロモーター領域は、通常の細胞のプロモーター又は例えば腫瘍プロモーターであってもよい。腫瘍プロモーターは一般的にウイルス由来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配列(LTR)は、本発明のジンクフィンガー結合ポリペプチド変異体の標的となるプロモーター領域である。このようなヒトT細胞リンパ球向性ウイルス(HTLV)1及び2又はヒト免疫不全ウイルス(HIV)1又は2等の病原体を含むレンチウイルス群のメンバー由来のプロモーターは、本発明のジンクフィンガー結合ポリペプチドにより転写修飾の標的となるウイルスプロモーター領域の例である。

【0102】

標的CNNヌクレオチド配列は、遺伝子の転写領域又は発現配列タグ内に位置させることができる。標的配列を含有する遺伝子は、植物遺伝子、動物遺伝子又はウイルス遺伝子であってもよい。遺伝子は、真核細胞遺伝子又は細菌遺伝子等の原核細胞遺伝子であってもよい。動物遺伝子は、ヒト遺伝子を含めた哺乳動物遺伝子であってもよい。好ましい実施形態において、ヌクレオチド発現を修飾する方法は、標的ヌクレオチド配列を含有する細胞に本発明のポリペプチド又は組成物をコードするポリヌクレオチドを導入することによって達成される。好ましくは、このコードを行うポリヌクレオチドは、標的細胞で使用するのに好適な発現ベクター内に含有されるのがよい。好適な発現ベクターは、当該技術分野で周知である。

【0103】

CNN標的は、その他の標的トリプレット配列とのあらゆる組み合わせで存在することができる。即ち、特殊なCNN標的は、伸長CNN配列($[CNN]_{2-12}$)の一部として、又は(GNN)₁₋₁₂、(ANN)₁₋₁₂、(TNN)₁₋₁₂又は(NNN)₁₋₁₂等のあらゆる他の伸長配列の一部として存在することができる。

【0104】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を説明するもので、本明細書及び特許請求

の範囲を如何なる方法でも制限するものではない。これらの実施例、特に実施例 13 については、参考として本明細書で援用される、B. Dreier, et al., "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 (2005) に詳述されている。

【実施例】

【0105】

10

実施例 1

ジンクフィンガーライブラリーの構築及びファージディスプレイを介した選択

ジンクフィンガーライブラリーの構築を前述の C7 タンパク質に基づき行った ([Wu, et al., 1995) PNAS 92, 344 - 348]; 図 1A 上)。フィンガー 3 をコードするプライマー (5' - GAGGAAGTTTGCCACCAAGTGGCAACCTG GTGAGGCATACCAAAATC - 3') (配列番号 31) 及び pMal 特異的プライマー (5' - GTAAACGACGGCCAG TGCCAGGC - 3') (配列番号 32) を使用した重複 PCR 法を介して、5' - (GCG) - 3' サブサイトを認識するフィンガー 3 を、5' - (GAT) - 3' サブサイト [Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758 - 2763] に結合するドメインで置換した。ジンクフィンガーライブラリーの重複伸長 PCR による無作為化を、主に記載の通りに行った [Wu, et al., (1995) PNAS 92, 344 - 348; Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758 - 2763]。ライブラリーをファージミドベクター pComb3H に連結した [Rader, et al., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8(4), 503 - 508]。文献に記載の通り、ファージの増殖及び沈殿を実施した [Barbas, et al., (1991) Methods: Companion Methods Enzymol. 2(2), 119 - 124; Barbas, et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7978 - 7982; Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(6), 2758 - 2763]。500 μ L の亜鉛緩衝液 A (ZBA: 10mM Tris, pH 7.5 / 90mM KCl / 1mM MgCl₂ / 90mM ZnCl₂) / 0.2% BSA / 5mM DTT / 1% Blotto (Biorad) / 二本鎖の剪断処理したニシン精子 DNA 20mg を含有する 100 μ L の沈殿ファージ (10¹³ コロニー形成単位) 中で結合反応を実施した。ファージを非ビオチン化競合オリゴヌクレオチドに 4 にて 1 時間結合させた後に、ビオチン化した標的オリゴヌクレオチドを添加した。結合を 4 にて一晩持続した。50 μ L のストレプトアビジンでコーティングした磁性ビーズ (Dynal; ZBA 中の 5% Blotto で遮断) で 1 時間培養した後、ビーズを 500 μ L の ZBA / 2% Tween 20 / 5mM DTT で 10 回、Tween を含有しない緩衝液で 1 回洗浄した。TBS (Tris 緩衝食水) 中の 25 μ L のトリプシン (10 μ g / μ L) 中で室温にて 30 分間培養することによって、結合ファージを溶出した。ヘアピン競合オリゴヌクレオチドは、NNN がフィンガー 2 サブサイトオリゴヌクレオチドを、N'N'N' がその相補的塩基を示す、配列 5' - GGC CGCN'N'N' ATCGAGTTTCTCGATNN NGCGGCC - 3' (配列番号 33) (標的オリゴヌクレオチドはビオチン化した) を有した。通常、標的オリゴヌクレオチドは、最初の 3 回の選択で 72 nM を添加し、6 回目で 36 nM に、最終回では 18 nM にして添加した。競合として、5' - (TGG) - 3' フィンガー 2 サブサイトオリゴヌクレオチドを使用して、親クローンと競合させた。15 個の標的部位を除くフ

20

30

40

50

ィンガー 2 5' - (CNN) - 3' サブサイトの等モル混合物及び 5' - (ANN) - 3'、5' - (GNN) - 3' 及び 5' - (TNN) - 3' 型の各フィンガー 2 サブサイトの競合混合物を、それぞれ選択の回を重ねるごとに量を増やして添加した。通常、特異的 5' - (CNN) - 3' 競合混合物は、初回には添加しなかった。

【0106】

実施例 2

マルチターゲット特異性検定及びゲル運動性シフト分析

ジンクフィンガーコード配列を、pComb3H から修飾細菌発現ベクター pMal-c2 (New England Biolabs) にサブクローニングした。XL1-Blue (Stratagene) に形質転換した後、ジンクフィンガー-マルトース-結合タンパク質 (MBP) 融合体を、1mM のイソプロピル-D-チオガラクトシド (IPTG) を添加した後に発現させた。これらの細菌培養物の凍結/融解抽出物を、1:2 で希釈して、ストレプトアビジンでコーティングした 96 ウェルプレート (Pierce) に注入し、16 個の 5' - (GAT CNN GCG) - 3' (配列番号 34) 標的部位のそれぞれに対する DNA 結合特異性を試験した。主に記載の通りに、ELISA (酵素免疫検定法) を実施した [Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96 (6), 2758-2763; Dreier, et al., (2000) J. Mol. Biol. 303, 489-502]。マウス抗 MBP (マルトース結合タンパク質) 抗体 (Sigma, 1:1000) と培養した後、アルカリホスファターゼに結合させたヤギ抗マウス抗体 (Sigma, 1:1000) を添加した。検出の後にアルカリホスファターゼ基質 (Sigma) を添加し、OD₄₀₅ を SOFTMAX 2.35 (Molecular Devices) で測定した。

【0107】

ゲルシフト分析を、主に記載の通りに、精製タンパク質 (Protein Fusion and Purification System, New England Biolabs) で実施した。

【0108】

実施例 3

フィンガー 2 の部位特異的突然変異

文献に記載の通り、PCR によってフィンガー 2 突然変異体を構築した [Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96 (6), 2758-2763; Dreier, et al., (2000) J. Mol. Biol. 303, 489-502]。PCR テンプレートとして、5' - TGG - 3' フィンガー 2 及び 5' - GAT - 3' フィンガー 3 を含有するライブラリークローンを使用した。突然変異したフィンガー 2 及び 5' - GAT - 3' フィンガー 3 を含有する PCR 生成物を、C7 のフィンガー 1 を有するフレーム内の NsiI 及び SpeI 制限部位を介して、修飾 pMal-c2 ベクター (New England Biolabs) にサブクローニングした。3 フィンガータンパク質を、記載のような SP1C フレームワークを使用して、フィンガー 2 縫取り法により構築した [Beerli, et al., (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 (25), 14628-14633]。この作業で産生されたタンパク質は、5' - GNN - 3' DNA 配列を認識するヘリックス [Segal, et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96 (6), 2758-2763] 並びに本明細書に記載の 5' - ANN - 3' 及び 5' - TAG - 3' ヘリックスを含有した。6 フィンガータンパク質を、適合可能な XmaI 及び BsrFI 制限部位を介して組み立てた。DNA 結合特性の分析を、IPTG 誘導凍結/融解細菌抽出物から実施した。

【0109】

実施例 4

一般的方法

形質導入及びルシフェラーゼ検定

HeLa細胞を集密度40～60%で使用した。24ウェルプレートで、細胞に160 ngのレポータープラスミド(pGL3-プロモーター構築物)及び40 ngのエフェクタープラスミド(pCDNA3中のジンクフィンガー-エフェクタードメイン融合体)を形質導入した。形質導入から48時間後に細胞抽出物を調製し、MicroLumat LB96P照度計(EG & Berthold, Gaithersburg, Md.)を使用して、ルシフェラーゼ検定試薬(Promega)で測定した。

【0110】

レトロウイルスによる遺伝子ターゲティング及びフローサイトメトリー分析

これらの検定を文献に記載の通りに実施した[Beerli, et al., (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(4), 1495-1500; Beerli, et al., (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から寄贈; Harwerth, et al., 1992)及びErbB-3-特異的mAb SGP1(Oncogene Research Products)を使用した。二次抗体としては、蛍光標識したロバF(ab')₂抗マウスIgGを使用した(Jackson Immuno-Research)。

10

20

【0111】

実施例5

ELISA検定のためのpMal融合タンパク質の細菌抽出物

選択したジンクフィンガータンパク質を、発現させるため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って大腸菌株XL1-Blueに導入し、50 µg/mLのカルベネシリンを含有するLBプレート上に画線塗抹した。各突然変異体の4つの単独コロニーを、50 µg/mLのカルベネシリン及び1%グルコースを含有するSB培地3 mL中に接種した。培養物を37℃にて一晚増殖させた。培養物1.2 mLを、50 µg/mLのカルベネシリン、0.2%グルコース、90 µg/mLのZnCl₂を含有する新鮮SB培地20 mLに形質転換させ、37℃にて更に2時間増殖させた。IPTGを終濃度0.3 mMまで添加した。培養を2時間続けた。Beckman GPR遠心分離器を使用して、培養物を4℃にて5分間、3500 rpmで遠心分離した。細菌のペレットを、5 mMの新鮮DTTを含有するZinc Buffer A 1.2 mL内で再懸濁した。タンパク質抽出物を、ドライアイス/エタノール及び温水を使用して、凍結/融解手順により単離した。この手順を6回繰り返した。Eppendorf遠心分離器を使用して、試料を4℃にて5分間遠心分離した。上澄液を清潔な1.5 mL入り遠心分離チューブに移し、ELISA検定に使用した。

30

【0112】

ELISA検定: C7. GATのフィンガー2変異体を、マルトース-結合タンパク質(MBP)との融合体として細菌発現ベクターにサブクローニングし、タンパク質を1 mMのIPTGによる誘導により発現させた(タンパク質(p)には選択されたフィンガー2サブサイトの名前を付けた)。タンパク質は、5'- (GAT CNN GCG) - 3' (配列番号34)の16個のフィンガー2サブサイトのそれぞれに対して酵素免疫測定(ELISA)を行い、そのDNA結合特異性を試験した。

40

【0113】

又、5'-ヌクレオチドの認識を、ジンクフィンガータンパク質を特異的標的オリゴヌクレオチド及び、中央のトリプレットの5'-ヌクレオチドのみが異なる3個のサブサイトに曝露することによって分析した。例えば、pCAAは、5'-AAA-3'、5'-CAA-3'、5'-GAA-3'及び5'-TAA-3'サブサイトについて」試験を

50

行った。試験を受けた3フィンガータンパク質の多くは、選択されたフィンガー2サブサイトに対して著明なDNA結合特異性を示した(表1)。

【0114】

【表1-1】

表 1

標的	ジンクフィンガー 七量体			
CAA	配列番号	1	QRHNLTE	10
	配列番号	2	QSGNLTE	
CAC	配列番号	3	NLQHLGE	
CAG	配列番号	4	RADNLTE	
	配列番号	5	RADNLAI	
	配列番号	14	RSDHLTE	20
	配列番号	16	RSDHLTD	
CAT	配列番号	8	RNDTLTE	
	配列番号	1	QRHNLTE	
	配列番号	6	NTTHLEH	
	配列番号	24	TKQTLTE	
	配列番号	3	NLQHLGE	30

【0115】

【表 1 - 2】

- 続き				
標的	ジンクフィンガー 七量体			
CCA	配列番号	6	NTTHLEH	
	配列番号	25	QSGDLTE	
CCC	配列番号	7	SKKHLAE	
CCG	配列番号	8	RNDTLTE	
	配列番号	9	RNDTLQA	10
CCT	配列番号	6	NTTHLEH	
CGA	配列番号	10	QSGHLTE	
	配列番号	11	QLAHLKE	
	配列番号	12	QRAHLTE	
	配列番号	17	RSDHLTN	
CGC	配列番号	13	HTGHLLE	
CGG	配列番号	14	RSDHLTE	
	配列番号	15	RSDKLTE	20
	配列番号	16	RSDHLTD	
	配列番号	17	RSDHLTN	
	配列番号	8	RNDTLTE	
CGT	配列番号	18	SRRTCRA	
	配列番号	19	QLRHLRE	
	配列番号	7	SKKHLAE	
CTA	配列番号	20	QRHSLTE	
CTC	配列番号	21	QLAHLKR	30
	配列番号	22	NLQHLGE	
CTG	配列番号	23	RNDALTE	
	配列番号	5	RADNLAI	
	配列番号	8	RNDTLTE	
	配列番号	14	RSDHLTE	
	配列番号	9	RNDTLQA	
CTT	配列番号	6	NTTHLEH	

実施例 6

40

ゲル運動性シフト分析

転写調節因子に結合したジンクフィンガーポリペプチドを、ZBA / 5 mM DTT をカラム緩衝液として使用することを除いては、タンパク質融合及び精製系 (New England Biolabs) を使用して、90 % 未満の均質性まで精製する。タンパク質の純度及び濃度を、クマシーブルー染色 15 % SDS - PAGE ゲルをもとに、BSA 標準品との比較によって測定する。標的オリゴヌクレオチドをその 5' 又は 3' 末端において [³²P] 及び精製ゲルで標識する。11 個のタンパク質の 3 倍連続希釈物を、20 µL の結合反応物 (1 × 結合緩衝液 / 10 % グリセロール / >> 1 pM 標的オリゴヌクレオチド) 中で、室温にて 3 時間培養し、0.5 × TBE 緩衝液中の 5 % ポリアクリルアミドゲル上で溶解する。乾燥ゲルの定量化を Phosphor imager 及び Image

50

Quantソフトウェア(Molecular Dynamics)を使用して実施し、 K_D をScatchard解析により測定した。

【0116】

実施例 7

ジンクフィンガー - エフェクタードメイン融合タンパク質の構築

ジンクフィンガー - エフェクタードメイン融合タンパク質を構築するため、etsレプレッサー因子(ERF)レプレッサードメイン(ERD)のアミノ酸473~530(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)、KOX1のKRABドメインのアミノ酸1~97(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)又はMad mSIN3相互作用ドメイン(SID)のアミノ酸1~36(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を重複するオリゴヌクレオチドからTaq DNAポリメラーゼを使用して組み立てる。VP16転写活性化ドメインのアミノ酸413~489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増幅した。VP16の最小活性化ドメインの四量体反復をコードし、アミノ酸437~447を含むVP64 DNA(Seipel, K., Georgiev, O. & Schaffner, W. (1992) EMBO J. 11, 4961-4968)を、相補的オリゴヌクレオチドの二対から産生する。結果得られた断片を標準的なクローニング手順によりジンクフィンガーコード領域に融合し、結果得られた各構築物が内部SV40核局在化シグナル並びにC末端HAデカペプチドタグを含有するようにした。融合構築物を真核細胞発現ベクターpcDNA3(Invitrogen)にクローニングする。

【0117】

実施例 8

ルシフェラーゼレポータープラスミドの構築

ATG開始コドンに対するヌクレオチド-758~-1を含むerbB-2プロモーター断片を、Taq Expand DNAポリメラーゼミックス(Boehringer Mannheim)を使用して、ヒト骨髄ゲノムDNAからPCR増幅し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の upstream に位置するpGL3basic(Promega)にクローニングする。ヌクレオチド-1571~-24を包含するヒトerbB-2プロモーター断片を、Hind3による消化により、pSV0ALD5'/erbB-2(N-N)(Hudson, L.G., Ertl, A.P. & Gill, G.N. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4389-4393)から切断し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の upstream に位置するpGL3basicにサブクローニングする。

【0118】

実施例 9

ルシフェラーゼの検定

全ての形質導入に、HeLa細胞を集密度40~60%で使用する。一般的には、細胞に400ngのレポータープラスミド(pGL3-プロモーター構築物又は陰性対照としてpGL3basic)、50ngのエフェクタープラスミド(pcDNA3内のジンク

フィンガー構築物又は陰性対照として空の p c D N A 3) 及び 2 0 0 n g の内部標準プラスミド (p h r A c t - b G a l) を、リポフェクタミン試薬 (G i b c o B R L) を使用して、6 ウェルディッシュのウェルで導入する。形質導入から約 4 8 時間後に細胞抽出物を調製する。M i c r o L u m a t L B 9 6 P 照度計 (E G & G B e r t h o l d) を使用して、ルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼ検定試薬 (P r o m e g a) で、G a l 活性を G a l a c t o - L i g h t (T r o p i x) で測定する。ルシフェラーゼ活性を G a l 活性で正規化する。

【0119】

実施例 10

HeLa 細胞内の e r b B - 2 遺伝子の調節

10

e r b B - 2 遺伝子を調節の標的とする。天然の e r b B - 2 遺伝子を調節するには、合成レプレッサータンパク質及びトランス活性化因子タンパク質を使用する (R . R . B e e r l i , D . J . S e g a l , B . D r e i e r , C . F . B a r b a s , I I I , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 5 , 1 4 6 2 8 (1 9 9 8)) を使用する。この DNA 結合タンパク質を、6 個の予め規定したモジュールジंकフィンガードメインから構築する (D . J . S e g a l , B . D r e i e r , R . R . B e e r l i , C . F . B a r b a s , I I I , I I I , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 5 , 2 7 5 8 (1 9 9 9)) 。レプレッサータンパク質が K o x - 1 K R A B ドメインを含有するのに対し (J . F . M a r g o l i n , e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 1 , 4 5 0 9 (1 9 9 4)) 、トランス活性化因子 V P 6 4 は単純ヘルペスウイルスタンパク質 V P 1 6 に由来する最小活性化ドメインの四量体反復を含有する (K . S e i p e l , O . G e o r g i e v , W . S c h a f f n e r , E M B O J . 1 1 , 4 9 6 1 (1 9 9 2)) 。

20

【0120】

ヒト子宮頸癌細胞系 He L a である He L a / t e t - o f f の誘導体を使用する (M . G o s s e n a n d H . B u j a r d , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 , 5 5 4 7 (1 9 9 2)) 。He L a 細胞は上皮細胞由来であるため、E r b B - 2 を発現し、e r b B - 2 遺伝子ターゲティングの試験によく適合する。He L a / t e t - o f f 細胞はテトラサイクリン制御性トランス活性化因子を産生し、増殖培地からテトラサイクリン又はその誘導体のドキシサイクリン (D o x) を除外することにより、所定の遺伝子をテトラサイクリン応答因子 (T R E) の制御下に誘導することができる。本発明者等はこの系を使用して、転写因子を化学的制御下におく。こうして、レプレッサー又はアクチベータープラスミドを構築し、B a m H I 及び C l a I 制限部位を使用して p R e v T R E (C l o n t e c h) に、B a m H I 及び N o t I 制限部位を使用して P M X - I R E S - G F P [X . L i u , e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 4 , 1 0 6 6 9 (1 9 9 7)] にサブクローニングする。P C R 増幅の忠実性を配列決定により確認し、He L a / t e t - o f f 細胞に形質導入し、2 0 個の安定したクローンをそれぞれ単離して、D o x 依存性標的遺伝子の調節について解析する。L i p o f e c t a m i n e P l u s 試薬 (G i b c o B R L) を使用して、構築物を He L a / t e t - o f f 細胞系に形質導入する (M . G o s s e n a n d H . B u j a r d , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 , 5 5 4 7 (1 9 9 2)) 。2 m g / m L の D o x の存在下で、ハイグロマイシン含有培地で 2 週間選択した後、安定したクローンを単離し、E r b B - 2 発現の D o x 依存性調節について解析する。主に文献に記載の通り、ウェスタンブロット、免疫沈澱、ノーザンブロット及びフローサイトメトリー解析を実施する [D . G r a u s - P o r t a , R . R . B e e r l i , N . E . H y n e s , M o l . C e l l . B i o l . 1 5 , 1 1 8 2 (1 9 9 5)] 。e r b B - 2 プロモーター活性の読み出しとして、E r b B - 2 タンパク質のレベルを最初にウェスタンブロッティングで解析する。これらのクローンの著明な分画が、D o x

30

40

50

の4日間の除去によるErbB-2発現量の調節、即ち、レプレッサーのクローンにおけるErbB-2のダウンレギュレーション及びアクチベーターのクローンにおけるアップレギュレーションを示すはずである。ErbB-2タンパク質のレベルは、その特異的mRNAのレベルの変化に相関し、ErbB-2の発現の調節が転写の抑制又は活性化の結果であることを示している。

【0121】

実施例11

E2S-KRAB、E2S-VP64、E3F-KRAB及びE3F-VP64タンパク質のコード領域のレトロウイルスベクターpM-IRES-GFPへの導入

幾つかの細胞系でE2S-KRAB、E2S-VP64、E3F-KRAB及びE3F-VP64タンパク質(下の表2を参照)を発現させるため、そのコード領域をレトロウイルスベクターpMX-IRES-GFPに導入した。

【0122】

これらの構築物の配列を選択して、ErbB-2又はErbB-3プロモーターの特異的領域に結合させた(表2を参照)。コード領域をpcDNA3に基づく発現プラスミドからPCR増幅し(R. R. Beerli, D. J. Segal, B. Dreier, C. F. Barbas, III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14628 (1998))、BamHI及びClaI制限部位を使用してpRevTRE(Clontech)に、BamHI及びNotI制限部位を使用してpMX-IRES-GFP[X. Liu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10669 (1997)]にサブクローニングした。PCR増幅の忠実性を配列決定により確認した。このベクターはジンクフィンガータンパク質を翻訳するための単一の2シストロン性(bicistronic)メッセージを発現し、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。両方のコード領域が同じmRNAを共有しているため、その発現は互いに物理的に関連しあい、GFPの発現はジンクフィンガーの発現の指標となる。その後、これらのプラスミドから調製したウイルスを使用して、ヒト癌細胞系A431に感染させた。

これらの構築物の配列を選択して、ErbB-2又はErbB-3プロモーターの特異的領域に結合させた(表2を参照)。コード領域をpcDNA3に基づく発現プラスミドからPCR増幅し(R. R. Beerli, D. J. Segal, B. Dreier, C. F. Barbas, III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14628 (1998))、BamHI及びClaI制限部位を使用してpRevTRE(Clontech)に、BamHI及びNotI制限部位を使用してpMX-IRES-GFP[X. Liu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10669 (1997)]にサブクローニングした。PCR増幅の忠実性を配列決定により確認した。このベクターはジンクフィンガータンパク質を翻訳するための単一の2シストロン性(bicistronic)メッセージを発現し、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。両方のコード領域が同じmRNAを共有しているため、その発現は互いに物理的に関連しあい、GFPの発現はジンクフィンガーの発現の指標となる。その後、これらのプラスミドから調製したウイルスを使用して、ヒト癌細胞系A431に感染させた。

これらの構築物の配列を選択して、ErbB-2又はErbB-3プロモーターの特異的領域に結合させた(表2を参照)。コード領域をpcDNA3に基づく発現プラスミドからPCR増幅し(R. R. Beerli, D. J. Segal, B. Dreier, C. F. Barbas, III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14628 (1998))、BamHI及びClaI制限部位を使用してpRevTRE(Clontech)に、BamHI及びNotI制限部位を使用してpMX-IRES-GFP[X. Liu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10669 (1997)]にサブクローニングした。PCR増幅の忠実性を配列決定により確認した。このベクターはジンクフィンガータンパク質を翻訳するための単一の2シストロン性(bicistronic)メッセージを発現し、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。両方のコード領域が同じmRNAを共有しているため、その発現は互いに物理的に関連しあい、GFPの発現はジンクフィンガーの発現の指標となる。その後、これらのプラスミドから調製したウイルスを使用して、ヒト癌細胞系A431に感染させた。

【0123】

【表2】

表 2

DNA 標的 <u>e2t</u> 5'→3'	CAA	CGA	AGT	CTG	GGA	GTC
ジンクフィンガー配列 E2T	QRNLTTE	QLAHLKE	HRITLTN	RNDALTE	QRAHLER	DPGALVR
配列番号 :	1	11	35	23	36	37
DNA 標的 <u>e2s</u> 5'→3'	CGG	GGG	GCT	CCC	CTG	GTT
ジンクフィンガー配列 E2S	RSDHLTE	RSDKLVR	TSGELVR	SKKRLAE	RNDALTE	TSGSLVR
配列番号 :	14	38	39	7	23	39
DNA 標的 <u>e3f</u> 5'→3'	AGG	GGC	CCC	CGG	GCC	GGA
ジンクフィンガー配列 E3F	RSDHLTN	DPGULVR	SKKHLAE	RSDHLTE	DCRDLAR	QRAHLER
配列番号 :	40	41	7	14	42	36

実施例12

ErbB-2及びErbB-3遺伝子発現の調節

Lipofectamine Plus(Gibco BRL)を使用して、両指向性(amphotropic)パッケージング細胞系であるPhoenix Amphoに

実施例 11 のプラスミドを一過的に形質導入し、2 日後に、培養物上澄液を使用して、8 mg / mL のポリブレンの存在下で標的細胞への感染を行った。感染から 3 日後、細胞を回収して解析した。感染から 3 日後、E r b B - 2 及び E r b B - 3 の発現をフローサイトメトリーで測定した。結果は、E 2 S - K R A B 及び E 2 S - V P 6 4 組成物が E r b B - 2 遺伝子発現をそれぞれ抑制及び促進させたことを示した。データは又、E 3 F - K R A B 及び E 3 F - V P 6 4 組成物が、E r B - 2 遺伝子発現をそれぞれ抑制及び促進させたことも示している。

【0124】

ジンクフィンガーに基づく転写スイッチの開発のため、標的モデルとしてヒト e r b B - 2 及び e r b B - 3 遺伝子を選択した。E r b B 受容体ファミリーのメンバーは、ヒト悪性腫瘍の発現に重要な役割を果たす。特に、乳房、卵巣、肺、胃及び唾液腺を含めた多くの部位に生じるヒト腺癌の高レベルにおいて、遺伝子の増幅及び / 又は転写の脱調節 (d e r e g u l a t i o n) の結果として e r b B - 2 が過剰発現する (H y n e s , N . E . & S t e m , D . F . (1 9 9 4) B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1 1 9 8 , 1 6 5 - 1 8 4) 。 E r b B - 2 の発現の亢進は、その内在性チロシンキナーゼの構成的な活性化につながり、培養細胞の形質転換を引き起こすことが明らかにされている。多くの臨床試験により、E r b B - 2 発現レベルが上昇した腫瘍患者の予後が不良であることが明らかにされている (H y n e s , N . E . & S t e m , D . F . (1 9 9 4) B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1 1 9 8 , 1 6 5 - 1 8 4) 。 ヒト癌への関与に加えて、e r b B - 2 は哺乳動物の成熟期及び胚発生時期の両方において重要な生物学的役割を果たす (H y n e s , N . E . & S t e m , D . F . (1 9 9 4) B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1 1 9 8 , 1 6 5 - 1 8 4 , A l t i o k , N . , B e s s e r e a u , J . - L . & C h a n g e u x , J . - P . (1 9 9 5) E M B O J . 1 4 , 4 2 5 8 - 4 2 6 6 , L e e , K . - F . , S i m o n , H . , C h e n , H . , B a t e s , B . , H u n g , M . - C . & H a u s e r , C . (1 9 9 5) N a t u r e 3 7 8 , 3 9 4 - 3 9 8) 。

【0125】

このため、e r b B - 2 プロモーターは、人工転写調節因子の開発には興味深い試験例となる。このプロモーターは詳細まで特徴が明らかになっており、T A T A 依存性及び T A T A 非依存性転写開始部位の両方を含有するという比較的複雑なものであることが明らかにされている (I s h i i , S . , I m a m o t o , F . , Y a m a n a s h i , Y . , T o y o s h i m a , K . & Y a m a m o t o , T . (1 9 8 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 4 , 4 3 7 4 - 4 3 7 8) 。 初期の試験では多指タンパク質は転写を特異的に活性化又は抑制する転写調節因子として働くことを示したが、これらのタンパク質は人工プロモーターの上流でタンパク質結合部位の 6 連結反復に結合した (L i u , Q . , S e g a l , D . J . , G h i a r a , J . B . & B a r b a s , C . F . (1 9 9 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 4 , 5 5 2 5 - 5 5 3 0) 。 更に、この試験は、その結合特異性が修飾されていない多指タンパク質を使用していた。本明細書で本発明者等は、予め規定された構成ブロックから組み立てた多指タンパク質が天然の e r b B - 2 及び e r b B - 3 プロモーターの単一の部位に結合する場合の有効性を試験した。

【0126】

所望の DNA 結合特異性を有する多指タンパク質を産生するため、本試験は G r e i s m a n と P a b o (G r e i s m a n , H . A . & P a b o , C . O . (1 9 9 7) S c i e n c e 2 7 5 , 6 5 7 - 6 6 1) が提唱した連続的選択法とは異なり、予め規定したジンクフィンガードメインのアセンブリに焦点を当てた。何故なら、そうした選択法では、必要とされる各タンパク質に対して 6 個のジンクフィンガーライブラリーを連続的に産生し選択する必要が生じ、この実験法が殆どの研究室にとって手の届か

ないものになり、皆にとって極めて時間のかかるものになるからである。更に、この方法では、代替となる結合配列に対して特異的な陰性選択を適用するのは困難であるため、最近報告された通りに結果として得られるタンパク質が比較的非特異的なものになると考えられる (Kim, J. - S. & Pabo, C. O. (1997) J. Biol. Chem. 272, 29795 - 29800)。

【0127】

18bpのDNA配列を認識する3フィンガータンパク質を産生するために2種類の方法の一般的有用性を検討した。各方法はジンクフィンガードメインのモジュール的性質に基づくものであり、5' - (NNN) - 3' のトリプレットを認識するジンクフィンガードメインのファミリーを利用するものである。第一の方法では、erbB - 2又はerbB - 3標的部位のhalf-siteを認識する3個の6フィンガータンパク質を、PCRアセンブリ方法を使用して、予め規定されたフィンガー2 (F2) ドメイン変異体を共に融合させることによって産生した。

10

【0128】

その標的に対する各タンパク質の親和性を、電気泳動運動性シフト検定により測定した。これらの試験により、ジンクフィンガーペプチドがZif268及びその他の天然の転写因子と同等の親和性を有することが明らかになった。

【0129】

DNA標的部位に対する各タンパク質の親和性をゲルシフト解析により測定する。

20

【0130】

実施例13

更なるジンクフィンガードメイン特異的結合(CNN)配列の開発

DNA配列に予め規定された特異性を有するタンパク質を迅速に調製することができれば、多岐にわたるテクノロジーが可能になり、例えば遺伝子の発現を制御したり、遺伝子及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。普遍的な遺伝子調節系を開発するために、多指のジンクフィンガータンパク質に基づく人工転写因子の開発に多大な努力が払われてきた[1~3]。このような系は生物学及び生物工学に多大な影響を与えることが考えられ、制御された遺伝子調節に基づく疾患の処置のため新しい手法を提供する。現在、遺伝子発現は、18塩基対(bp)の標的部位に結合する多指のジンクフィンガータンパク質に基づく人工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が明らかにされている[1、2]。9bpといった小さな部位のターゲティングによっても、おそらくクロマチン凝集(chromatin occlusion)を介して、調節の特異性がある程度までは提供される[4~6]。転写調節に加え、新規のジンクフィンガーDNA結合の特異性は、Fork Iヌクレアーゼドメインと融合させることにより相同遺伝子組換えを制御するのに極めて有望である[7、8]。

30

【0131】

Cys₂-His₂のジンクフィンガードメインは独特であり、そのモジュール的性質のため、伸長DNA配列を認識する有望なタンパク質である。各ドメインは構造へと折り畳まれた約30個のアミノ酸からなり、この構造は疎水性相互作用及び保存されたCys₂-His₂残基による亜鉛イオンのキレート化により安定化される[9、10]。現在まで、ジンクフィンガータンパク質ファミリーの中で最も特徴が明らかにされているタンパク質は、マウス転写因子Zif268である。Zif268の3個のジンクフィンガードメインはそれぞれ、認識ヘリックスのDNA2重ヘリックスの主溝への挿入により、3bpのサブサイトに結合する[11、12]。DNA結合タンパク質の迅速な構築を容易化し、タンパク質とDNAの相互作用を研究するため、本発明者等は以前にDNA配列の5' - GNN - 3' 及び5' - ANN - 3' ファミリーに結合するドメインを作製していた[13~15]。本発明者等は、これらのドメインが、9~18bpの標的部位を特異的に認識する多指のジンクフィンガータンパク質を組み立てることのできるモジュール認識単位として機能することを明らかにした。特に、18bp部位はヒト又は他のあらゆるゲノムにおいて独自であることができるのに十分なだけ長く、このようなタンバ

40

50

ク質の転写特異性は形質転換植物及びヒト細胞においてアレイ解析を使用することで明らかにされてきた [1 6、1 7]。構成的調節に加えて、核内ホルモン受容体のリガンド結合ドメインの特異的結合ドメインとの融合は、この種の転写因子による遺伝子調節の誘導を可能にする [1 8]。DNA ターゲティングにおいて究極的な自由を提供するには、考え得る 3 b p サブサイトをターゲティングするのに必要な 6 4 個の DNA 結合ドメインを同定することが重要である。

【 0 1 3 2 】

ジンクフィンガー / DNA 相互作用に関する構造的データが限られているため [1 9 ~ 2 4]、高度の特異性で新規の配列と結合する亜鉛タンパク質の新規の設計はある程度までしか成功していない [2 5]。特に、本明細書に報告する試験では、天然に存在するジンクフィンガードメインと 5' - CNN - 3' サブサイトとの相互作用に関する構造的情報は全く得られていない。DNA 認識ヘリックスを、全長タンパク質を条件として DNA サブサイト 5' - CAA - 3' に結合する配列 QST - N - LKS (配列番号 5 4) (配列はタンパク質のヘリックスの N 末端近位の最初の残基 (- 1) から開始する) を含有する YY 1 のフィンガー 4 は、5' シトシンと直接相互作用せず、この部位に特異的に結合しない [2 2]。Cys₂ - His₂ ファミリーのジンクフィンガードメインの作用様式に関する結晶学的データ及び突然変異試験により、多くの DNA サブサイトを認識するドメインを選択するためのファージディスプレイライブラリーの構築に関する指針が得られた [1 5]。Zif 2 6 8 / DNA 複合体の解析により、DNA 結合が主に、ヘリックスの - 1 位、3 位及び 6 位のアミノ酸残基と、DNA サブサイトの 3 b p のそれぞれ 3'、中央及び 5' のヌクレオチドと相互作用して達成されることが示唆されている [1 1、1 2]。ヘリックスの 1 位、2 位及び 5 位は DNA のリン酸骨格と直接又は水を介して接触し、タンパク質の究極の特異性に重要な寄与因子である。ロイシンは通常 4 位に認められ、ドメインの疎水性コアに詰め込まれる。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他、3 b p 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、標的部位の重複を起こす [1 3、1 5、2 6 ~ 2 8]。

【 0 1 3 3 】

Zif 2 6 8 に基づくファージディスプレイライブラリーは、5' - GNN - 3' モチーフに結合するドメインの選択に好適であった。幾つかのジンクフィンガードメインが伸長認識接触部と相互作用してしまう標的部位の重複の問題のため、5' - ANN - 3' の選択はファージディスプレイライブラリーの洗練を必要とした。これは、Asp をヘリックスの 2 位に有する Zif 2 6 8 のフィンガー 3 が、ドメイン間認識を媒介する残基を持たないドメインに置換されることによって達成された。本発明者等はこのライブラリーから、5' - ANN - 3' サブサイトのドメインを選択し、更に部位特異的突然変異を介して新規のドメインの洗練又は設計に取り組んだ [1 5]。その他の研究チームは、DNA 結合特異性が変化したジンクフィンガードメインの開発に、異なる選択方法を適用した [1 - 3]。

【 0 1 3 4 】

ここでは、予め規定されたドメインの既存のセットを 5' - CNN - 3' 標的配列に特異的なドメインへと伸長させるための、ジンクフィンガードメインのモジュラー性に基づく選択法について報告する。ファージディスプレイライブラリーから、5' - CNN - 3' 標的部位を特異的に認識する 8 個のジンクフィンガードメインを選択した。部位特異的突然変異により、4 個のドメインの DNA 結合特異性を改善した。6 個の 5' - CNN - 3' 標的部位の場合は、特異的ドメインを d 新規の設計で産生した。結果得られたタンパク質の DNA 結合特異性を解析した。更に、これらのドメインが、1 8 b p 標的部位への DNA 結合特異性を有する人工転写因子を構築するモジュールとして使用することができることを示す。VP 6 4 活性化ドメイン又は KRA B 抑制ドメインに融合されると、ヒト ERBB - 2 遺伝子の 5' UTR を標的とする 6 フィンガータンパク質 E 2 S は、その内在遺伝子の発現を変化させることができる。同様に、gg 1 - VP 6 4 と呼ばれる転写アクチベーターを構築し、ヒト - グロブリンの内在性発現を調節することを示した。本明

細書に報告する結果は、5' - CNN - 3' サブサイトのジンクフィンガー / DNA による認識に関する新しい知見を提供し、設計された転写因子及びヌクレアーゼで標的とすることのできる DNA 配列の種類を格段に増加させるものである。

【0135】

材料及び方法

ジンクフィンガーライブラリーの構築及びファージディスプレイを介する選択

ジンクフィンガーライブラリーの構築は、前述の C7 タンパク質に基づいた [29]。5' - GCG - 3' サブサイトを認識するフィンガー3を、前述の通り、フィンガー3 (5' - GAGGAAGTTTGCACCAAGTGGCAACCTGGTGAAGGCATACCAAAATC - 3') (配列番号31) をコードするプライマー及び pMal 特異的プライマー (5' - GTAAAACGACGGCCAGTGGCCAAAGC - 3') (配列番号32) を使用して、重複 PCR 法を介して、5' - GAT - 3' サブサイト (13) に結合することが知られているドメインで置換した [15]。PCR 重複伸長によるジンクフィンガーライブラリーの無作為化は主に文献に記載の通りに実施した [13、29]。ライブラリーはファージミドベクター pComb3H に結合させた [30]。前述の通り、ファージを増殖して沈殿させた [13、31、32]。容量 500 µL の亜鉛緩衝液 A (ZBA: 10 mM Tris、pH 7.5 / 90 mM KCl / 1 mM MgCl₂ / 90 mM ZnCl₂) / 0.2% BSA / 5 mM DTT / 1% Biotto (Biorad) / 二本鎖の剪断処理したニシン精子 DNA 20 mg を含有する 100 µL の沈殿ファージ (10¹³ コロニー形成単位) 中で結合反応を実施した。ファージを非ビオチン化競合オリゴヌクレオチドに 4 にて 1 時間結合させた後に、ビオチン化した標的オリゴヌクレオチドを添加した。結合を 4 にて 3 時間又は一晩持続した。50 µL のストレプトアビジンでコーティングした磁性ビーズ (Dynal; ZBA 中の 5% Biotto で遮断) で 1 時間培養した後、ビーズを 500 µL の ZBA / 2% Tween 20 / 5 mM DTT で 10 回、Tween を含有しない緩衝液で 1 回洗浄した。TBS (50 mM Tris、150 mM NaCl、pH 7.5) 中の 25 µL のトリプシン (10 µg / µL) 中で室温にて 30 分間培養することによって、結合ファージを溶出した。

【0136】

標的及び競合オリゴヌクレオチドをヘアピンを形成するように設計して、NNN がフィンガー2サブサイトを、N'N'N' がその相補的塩基を示す、配列 5' - GGCCGCN'N'N'ATCGAGTTTCTCGATNNNGCGGCC - 3' (配列番号33) (標的オリゴヌクレオチドは 5' 末端でビオチン化した) を有するようにした。通常、標的オリゴヌクレオチドは、最初の 3 回の選択で 72 nM を添加し、5 回目で 36 nM に、6 回目では 18 nM にして添加した。選択の第 1 回における野生型の競合ヘアピンは、濃度 108 nM で、NNN において 5' - TGG - 3' と同じ配列を有し、回を重ねるごとに増加して 6 回目では最大 460 nM とした。続く選択においては、15 個の標的配列を除くフィンガー2 5' - CNN - 3' サブサイトの等モル混合物を増量し、標的よりも 5 モル多いように第 1 回に添加した。5' - ANN - 3'、5' - GNN - 3' 及び 5' - TNN - 3' の各フィンガー2サブサイトの混合物を、標的よりも 1.25 モル多いように第 1 回で添加し、実験に応じて標的配列よりも 10 倍又は場合によっては 40 倍多くなるように増量した。更に、5' - CGA - 3'、5' - CAG - 3'、5' - CGG - 3' 及び / 又は 5' - CTG - 3' (これらが標的部位ではない場合) の NNN との競合物を濃度 180 nM まで含めて、特定の標的部位の特異的認識のために選択を強化した。

【0137】

マルチターゲット特異性 ELISA

ジンクフィンガーをコードする配列を、pComb3H [30、31] から修飾細菌発現ベクター pMal-c2 (New England Biolabs) にサブクロニングした。XL1-Blue (Stratagene) に形質転換した後、ジンクフィ

ンガー - マルトース - 結合タンパク質 (MBP) 融合体を、1 mM のイソプロピル -
D - チオガラクトシド (IPTG) を添加した後に発現させた。これらの細菌培養物又は
精製タンパク質の凍結 / 融解抽出物を、1 : 2 で希釈して、ストレプトアビジンでコーテ
ィングした 96 ウェルプレート (Pierce) に注入し、上述のヘアピンオリゴヌクレ
オチドを使用して、16 個の 5' - GAT CNN GCG - 3' (配列番号 29) 標的
部位のそれぞれに対する DNA 結合特異性を試験した。主に記載の通りに、ELISA (酵
素免疫検定法) を実施した [13, 14]。マウス抗 MBP (マルトース結合タンパク
質) 抗体 (Sigma、1 : 1000) と培養した後、アルカリホスファターゼに結合さ
せたヤギ抗マウス抗体 (Sigma、1 : 1000) を添加した。アルカリホスファター
ゼ基質 (Sigma) を添加し、405 nm における光学密度 (OD₄₀₅) を SOFT
MAX 2.35 (Molecular Devices) で測定した。

10

【0138】

ゲル運動性シフト及び DNase I フットプリント解析

pE2S のコード配列を修飾 pMAL - c2 (New England Biolabs) 細菌発現ベクターにサブクローニングし、大腸菌株 XL - 1 Blue (Strat
agene) に形質転換した。タンパク質を、Protein Fusion and
Purification System (New England Biolabs) で、カラム緩衝液として Zinc Buffer A / 5 mM DTT を使用して精製
した。タンパク質の純度を、クマシーブルー染色 4 ~ 12 % Novex ゲルで評価した。
ウシ血清アルブミン (BSA) 標準品を使用して、Bradford 検定により濃度を測
定した。精製タンパク質を使用して、DNase I フットプリント及びゲル運動性シフ
ト検定を実施し、DNA 結合部位及び親和性を決定した。

20

【0139】

DNase / フットプリントのため、ヒト ERBB - 2 プロモーターの DNA 断片を、
5' - ³²P 標識 E2SF (5' - GGC TGC TTG AGG AAG TAT
AAG AAT GAA GTT GTG AAG C - 3') (配列番号 55) 及び、
pGL3 に挿入したゲノム断片由来の pGLP2 (5' - CTT TAT GTT TT
T GGC GTC TTC CA - 3') (配列番号 56) (Invitrogen)
プライマーを使用して、PCR で産生した [33]。この DNA 断片は 267 bp を含有
し、ERBB - 2 プロモーターの領域 - 209 ~ +3 を含んでいた。反応緩衝液の内容は
、10 mM Tris - HCl、10 mM KCl、10 mM MgCl₂、5 mM CaCl₂、10 μM ZnCl₂、pH 7.0 であった。結合反応物は、15 kcpm の
³²P 末端標識 ERBB - 2 プロモーター断片及び 5 mM DTT を含有し、タンパク質
の濃度は 0.1 ~ 100 nM であった。反応物を 4 にて 12 ~ 18 時間培養した。DN
A の分解を、既述の通り、DNase I (Roche Diagnostics) を使
用して実施した [34]。試料を 6 % アクリルアミド / 8 M 尿素ゲル上で分離し、Pho
sphoImager プレートで曝露し、PhosphorImager SI (Mol
ecular Dynamics) で記録した。ImageQuant (Molecu
lar Dynamics) 及び KaleidaGraph ソフトウェア (Synerg
y [米国ペンシルバニア州レディング]) を使用して解析を行い、K_d 値を得た。

30

40

【0140】

ゲル運動性シフト解析を、主に記載の通り精製タンパク質を使用して実施した [13]

。

【0141】

フィンガー 2 の部位特異的突然変異

既述の通り、PCR によってフィンガー 2 突然変異体を構築した [13, 14]。PC
R テンプレートとして、5' - TGG - 3' フィンガー 2 及び 5' - GAT - 3' フィン
ガー 3 を含有するライブラリークローンを使用した。突然変異したフィンガー 2 及び 5'
- GAT - 3' フィンガー 3 を含有する PCR 生成物を、C7 のフィンガー 1 を有するフ
レーム内の Nsi I 及び Spe I 制限部位を介して、修飾 pMal - c2 ベクター (

50

New England Biolabs) にサブクローニングした。

【0142】

多指ジンクフィンガータンパク質の構築

3フィンガータンパク質を、記載のようなSP1Cフレームワークを使用して、フィンガー2縫取り法により構築した[33]。6フィンガータンパク質を、適合可能なXmaI及びBsrFI制限部位を介して組み立てた。DNA結合特性の分析を、IPTG誘導凍結/融解細菌抽出物から実施した。これらのタンパク質の遺伝子発現の調節能力を分析するため、文献に記載の通り[33, 35]、活性化ドメインVP64(単純ヘルペスウイルスのVP16最小活性化ドメインの4量体反復)又はKox-1の抑制ドメインKRABに融合させ、レトロウイルスpMX-IRESGFPベクター[35, 36]

10

【0143】

レトロウイルス遺伝子ターゲティング及びフローサイトメトリー解析

これらの検定を主に既述の通りに実施した[35]。遺伝子組換えレトロウイルスを産生するため、 3.5×10^6 293GagPol細胞に、Lipofectamine PLUS試薬(Invitrogen)を使用して、調節ドメインに融合したジンクフィンガータンパク質のそれぞれをコードするpMX-IRESGFP及びpMDG-VSVプラスミド1.25µgを同時に形質導入した。形質導入から2日後にウイルス上澄液を回収し、これを使用して 1×10^5 A431細胞を感染させた。感染から2日後、A431細胞をERBB2特異的抗体(5µg/mL)で染色し、フローサイトメトリーで解析した。一次抗体として、ERBB2-特異的mAb FSP77(Nancy E. Hynesから寄贈; [37])を使用した。二次抗体としては、フィコエリトリンで標識したロバF(ab')₂抗マウスIgGを使用した(Jackson Immuno-Research)。

20

【0144】

コンピュータモデリング

Insight II(Molecular Simulations, Inc.)を使用してコンピュータモデルを産生した。モデルは、Zif268-DNAの共結晶構造の配位に基づいた(PDB委託1AAY)。構造のエネルギー最小化は行わず、可能な相互作用を示唆するためのみに示す。重原子間の距離が3(±0.3)オングストロームであり、重原子と水素によって形成される角度が120°を超える場合には、水素結合が適切とみなした。

30

【0145】

結果

ライブラリーの構築及び選択

以前に本発明者等は、ファージディスプレイの選択による単離及びそれぞれ特異的に5'-GNN-3'型DNA配列を認識する16個のジンクフィンガードメインの同定を報告した。選択に使用したライブラリーは、マウス転写因子Zif268の高親和性変異体であるC7に基づくものであった[29]。Zif268のフィンガー1は、アミノ酸配列RSD-E-LTR(配列番号15)(-1位~6位)を有し、C7は配列KSA-D-LKR(配列番号44)を有する。何れのタンパク質も、フィンガー2は配列RSD-H-LTT(配列番号45)(-1位~6位)を有し、フィンガー3は配列RAD-E-RKR(-1位~6位)(配列番号57)を有する。何れのタンパク質も、DNA標的部位5'-GCG-TGG-GCG-3'(配列番号46)に結合する。この5'-A/CNN-3'サブサイトに結合するこのライブラリーからジンクフィンガードメインを選択する試みは、認識ヘリックスの2位のAspが、続く3bpサブサイトの反対側の鎖にあるアデニン又はシトシンの何れかと優勢なサブサイト間相互作用を起こすため、成功をみなかった[11, 12]。このドメイン間の接触は、標的部位重複と呼ばれてきた[13, 26~28]。

40

50

【 0 1 4 6 】

5' - CNN - 3' サブサイトと結合するジンクフィンガードメインを選択するため、既述の通り [1 5]、フィンガー交換 (finger-swapping) によりファージディスプレイライブラリーを構築した。サブサイト 5' - GCG - 3' に特異性を有する C7 (RSD - E - RKR、- 1 位 ~ 6 位) (配列番号 27) のフィンガー 3 を、5' - GAT - 3' サブサイトと結合することが以前に特徴付けられているドメイン [1 3] と交換して、3 フィンガータンパク質 C7 . GAT を産生した。この認識ヘリックス (TSG - N - LVR) (配列番号 58) は 2 位に Asp を有さないため、5' - ANN - 3' 又は 5' - CNN - 3' DNA サブサイトと結合するジンクフィンガードメインを選択することができた。本発明者等は以前に、2 個の標的部位、5' - ACG - 3' 及び 5' - ACT - 3' の認識には芳香族アミノ酸残基が必要であることを主張していたため、追加のファージディスプレイライブラリーを NNK コドンドーピング法を使用して構築した (N = アデニン、シトシン、グアニン又はチミン; K = グアニン又はチミン)。このライブラリーは芳香族アミノ酸残基を含んでいたが、終止コドンを含んでいなかった。無作為化にはフィンガー 2 のヘリックスの - 1 位、1 位、2 位、3 位、5 位及び 6 位を含めて、各アミノ酸の配位に 32 通りの可能性を提供した。ライブラリーには 2.4×10^9 のメンバーが含まれ、殆ど全てのアミノ酸の組み合わせが保証された。

10

【 0 1 4 7 】

所望の 9 個の bp 結合部位を含有するビオチン化したヘアピンオリゴヌクレオチドを使用して、ジンクフィンガーディスプレイファージの選択を実施した。通常、非ビオチン化競合 DNA の存在下で、16 個の 5' - GAT - CNN - GCG - 3' (配列番号 29) 標的オリゴヌクレオチドのそれぞれでパンニングを 6 回実施した。回を重ねるごとにビオチン化標的オリゴヌクレオチドを減量し、競合オリゴヌクレオチド混合物を増量することにより、選択の厳密性を高めた。6 回目で標的濃度は一般的に 18 nM であった。5' - ANN - 3'、5' - GNN - 3' 及び 5' - TNN - 3' フィンガー 2 サブサイトの競合混合物は、各オリゴヌクレオチドプールの 5 倍超とし、特異的 5' - CNN - 3' 混合物 (標的配列を除く) は標的の 10 倍超で存在するようにした。幾つかの特異的競合物を、標的部位に応じて 20 倍量まで添加した。競合の 5' - TGG - 3' を使用して、野生型タンパク質の選択を抑制した。競合の 5' - CAG - 3'、5' - CGG - 3' 及び 5' - CGA - 3' を添加して、全ての 5' - CNN - 3' 標的部位に非特異的に結合するタンパク質の選択を抑制した (下記参照)。ビオチン化標的オリゴヌクレオチドに結合するファージを、ストレプトアビジンでコーティングした磁性ビーズによる捕捉により回収した。

20

30

【 0 1 4 8 】

第 6 回の選択の後、又は修飾大腸菌発現ベクター pMal - c2 へのサブクローニングの後、クローンを直接配列した。選択したフィンガー 2 ヘリックスのアミノ酸配列を、配列解析によって決定した (図 2)。図 2 では、通常は各標的部位に対して幾つかのクローンを第 6 回のパンニングの後に配列した。各クローンのアミノ酸配列を決定した。フィンガー 2 サブサイトを左側に示し、認識ヘリックス内の配位を各セットの上に示す。DNA と直接接触すると思われるアミノ酸を太字で示す。囲み線で示した配列は、最上の親和性及び特異性を有して結合するクローンである。これらの 3 フィンガータンパク質の DNA 結合特異性を図 2 の上の図に示す。決定された各ヘリックスの右側の番号は、特定の配列の発現数である。* 印は、修飾 pMal - c2 発現ベクターへのサブクローニングの後に同定されたクローンを示す。# 印は NNK ライブラリーから選択されたクローンを示す。タンパク質は一般的に Zif 268 骨格の中でクローン化して解析した。幾つかのタンパク質は SP1 の添加が示す通り、Sp - 1 骨格の中でクローン化した。16 個の 5' - CNN - 3' 標的部位の内の 8 個に妥当な親和性及び特異性で結合するタンパク質を選択した (図 2 及び 3)。C7 . GAT NNK ライブラリーを使用したパンニング又は特異的競合物の添加により、その他の 7 個のサブサイトのジンクフィンガーを選択する試みは成功しなかった。

40

50

【 0 1 4 9 】

5' - CNN - 3' 標的部位のファージディスプレイから選択したフィンガー 2 のヘリカル認識ドメインを含むアミノ酸を図 2 に示す。良好な特異性を有するアミノ酸配列を図 2 の枠内に示す。選択したヘリックスの 50 % 超が His を 3 位に有した。標的部位 5' - CNA - 3' 及び 5' - CNG - 3' のために選択したヘリックスは、一般的に - 1 位に良好に保存されており、これらの配位のアミノ酸残基で以前に認められている知見と合致した [13 ~ 15]。3' ヌクレオチドがアデニンである場合 (5' - CGA - 3' 及び 5' - CTA - 3')、- 1 位は Gln であった。5' - CAA - 3' では、Gln、Asn 又は Ser は好ましくは - 1 位にあるのがよいが、5' - CAA - 3' では Ser が選択された。- 1 位にある Ser の 3' アデニンとの相互作用は、以前に 5' - ACA - 3' (SPA - D - LTN) (配列番号 59) に結合するドメインで認められていた [15]。3' グアニンを含有するフィンガー 2 標的部位に対するバンニングでは、- 1 位の Arg が強度に選択されたが、Asn、Gln、His、Ser、Thr 及び Ile も認められた。5' - CNG - 3' サブサイトに結合するドメインは、2 位に Asp を有することが多かった。Asp はおそらく、フィンガー 1 の 5' グアニンと対をなすシトシン塩基に接触することにより、3 フィンガータンパク質の相互作用を安定化させるものと思われる。標的部位 5' - CNT - 3' では、Arg、Asn、Gln、His、Ser、Thr、Ala 及び Cys が認識ヘリックスの - 1 位に認められた。3' シトシンを含有するフィンガー 2 サブサイトでは、Gln、Asn、Ser、Gly、His 又は Asp が - 1 位に選択された。

10

20

【 0 1 5 0 】

5' - CAN - 3' の認識では、His、Asn、Gly、Val、Pro、Ile 及び Lys が認識ヘリックスの 3 位に選択された。以前に、5' - GCN - 3' を認識したヘリックスの 3 位に Thr 又は Asp が認められている [13、15]。ここでは、His、Lys、Arg、Asn 並びに Asp 及び Thr を選択した。標的部位 5' - CCC - 3' では、3 位は Asn 又は His であった。5' - CCG - 3' では、3 位は Thr 又は His の何れかであった (図 2)。5' - GGN - 3' では、His が 3 位に強度に選択され、以前に認められた所見と合致した [13 ~ 15]。標的部位 5' - CGG - 3' 及び 5' - CGT - 3' では、3 位に Ser、Asp、Thr、Asn、Gln 及び Gly が選択された。5' - CGC - 3' では、場合によって Trp 及び Thr が選択された。5' - CTN - 3' に結合するヘリックスでは、3 位は Ser 又は Ala の何れかであった。例外は His が選択された 5' - CTC - 3' 及び 5' - CTT - 3' であった。認識ヘリックスの 1 位、2 位及び 5 位は変動可能であった。これらの残基は通常 DNA と接触する直接塩基に関与しないため、これは驚くべきことではない [11、12]。4 位は無作為化しなかったが、天然の突然変異により、5' - CGT - 3' に結合する 4 位において Leu から Cys への変化を有するヘリックスが産生された (図 2)。この種の天然の突然変異は、5' - ATC - 3' 及び 5' - GCC - 3' 標的部位に結合するタンパク質の選択において稀に認められた [13、15]。

30

【 0 1 5 1 】

Cys₂ - His₂ ジンクフィンガードメインによる 5' シトシンの認識に関しては殆ど知られていない。5' グアニンの認識については詳細に特徴付けられており、ヘリックスの 6 位の Arg 又は Lys の何れかによって達成される [12、13、19 ~ 24]。部位特異的突然変異の選択も、認識が 6 位のアミノ酸によって達成されることを示唆した。例えば、5' アデニンの認識では、アミノ酸は Asn、Ala、Val、Asp、Arg 又は Glu であることができる [15]。これから類推するに、5' シトシンの認識は認識ヘリックスの 6 位におけるアミノ酸残基によって達成されることが考えられる。5' - CNN - 3' フィンガー 2 サブサイトに結合するドメインのファージディスプレイの選択の結果、6 位の Glu、Asn、Ile、Asp、Ala、Ser 及び Val が選択された。驚くべきことに、配列したタンパク質の 65 % (127 中 82) において、6 位に Glu が存在した (図 2)。

40

50

【 0 1 5 2 】

5' - CNN - 3' 標的部位を認識する選択ドメインのDNA結合特異性

ファージディスプレイにより選択されるジンクフィンガードメインのDNA結合特異性を評価するため、16部位全ての5' - GAT - CNN - GCG - 3' (配列番号29) に対してマルチターゲット特異性ELISAを使用してそれぞれを試験した(図3、黒色のバー)。更に、5' - ANN - 3'、5' - CNN - 3'、5' - GNN - 3' 及び5' - TNN - 3' 標的部位のそれぞれに対する16個のオリゴヌクレオチドの等モル混合物への結合を評価することにより、5' 特異性を解析した(図3、白色のバー)。図3の、各グラフの上に示すのは、認識されたオリゴヌクレオチド配列(pNNN)及び分析した3フィンガータンパク質のフィンガー2ドメイン(ヘリックス開始部に対する-1~6位)のアミノ酸配列である。黒色のバーは、種々のフィンガー2サブサイト: 5' - CAA - 3'、5' - CAC - 3'、5' - CAG - 3'、5' - CAT - 3'、5' - CCA - 3'、5' - CCC - 3'、5' - CCG - 3'、5' - CCT - 3'、5' - CGA - 3'、5' - CGC - 3'、5' - CGG - 3'、5' - CGT - 3'、5' - CTA - 3'、5' - CTC - 3'、5' - CTG - 3' と標的オリゴヌクレオチドへの結合を示す。白色のバーは、5' 認識を評価するためのサブサイト5' - ANN - 3'、5' - CNN - 3'、5' - GNN - 3' 及び5' - TNN - 3' のそれぞれの16個のオリゴヌクレオチドの混合物への結合を示す。各バーの高さは、各標的へのタンパク質の相対的親和性を示すもので、2回の独立した実験結果を平均し、黒色又は白色のバーでの最強シグナルに補正したものである。エラーバーはこの平均値からの偏差を示す。上図: パンニングで得られた図1の枠内のヘリックス配列に対応して解析したタンパク質。下図: 解析したタンパク質は部位特異的突然変異から派生したものであった(pm)。一般的に、タンパク質はZif268骨格の中でクローン化して解析した。幾つかのタンパク質はSP1の添加が示す通り、Sp-1骨格の中でクローン化した。パンニングから派生したクローンの結果を図3の上の図に示す。一般的に、選択されたヘリックスは、認識ヘリックスの6位がGluである場合は、5' シトシンに対する著明なDNA結合特異性を示した。唯一の例外は、5' アデニンとオリゴヌクレオチドの結合がより強度であった標的部位5' - CGG - 3' (タンパク質配列RSD - H - L T E) (配列番号14)であった(図3g)。6位にIle (RAD - H - L A I: 図3a) (配列番号60) 又はAsp (RSD - H - L T D) (配列番号61; 図示なし) を有するクローンを、それぞれ優先的に5' グアニンに結合する5' - CAG - 3' 及び5' - CCG - 3' への結合のために選択した。これらのヘリックスの2個は6位にAlaを有した。5' - CCG - 3' への結合のために選択された配列RND - T - L Q A (配列番号62) を有するジンクフィンガーは、5' グアニンに優先的に結合したが(図3d)、5' - CGT - 3' への結合のために選択された配列SRR - T - C R A (配列番号18) を有するタンパク質は高度の特異性で5' シトシンに結合した(図3h)。以前に、6位のAlaは、5' アデニンの認識を媒介することが明らかにされている[15]。これらの結果は、トリプレットの5' ヌクレオチドの認識が、ヘリックスの6位にあるアミノ酸残基にのみ依存するのではなく、おそらくは配位による相互作用を介して、隣接するアミノ酸にも依存することを示すものと考えられる。

【 0 1 5 3 】

中央のアデニン(5' - C A N - 3') の認識は、ヘリックスが3位にA s nを含む場合に、RAD - N - L A I (配列番号5) による5' - CAG - 3' の結合として認められ(図3a)、以前の報告結果と合致した[13~15]。中央のシトシン(5' - C C N - 3') は、ヘリックスの3位がH i sである場合に、S K K - H - L A E (配列番号63) の場合として特異的に認識された(図3b)。A s nも極めて特異的に中央のシトシンを認識した(S V R - N - L R E) (配列番号64) (図3c)。これも以前の知見と合致したのは、3位にT h rがある場合の、RND - T - L Q A (配列番号65) による5' - CCG - 3' の認識(図3d)であった[13~15]。中央のグアニン、5' - C G N - 3' は、以前に報告された通り、3位のH i sによって認識された[13~1

5]。HTG - H - LLE (配列番号 66) (図 3 f) が 5' - CGC - 3' に対する優れた DNA 結合特異性を示したのに対し、5' - CGN - 3' を認識する他のタンパク質 (QLA - H - LKE (配列番号 11) (図 3 e)、RSD - H - LTE (配列番号 67) (図 3 g) 及び QLR - H - LRE (配列番号 68) (図 3 i)) は他の部位との若干の交差反応性を示した。QLA - H - LKE (配列番号 11) (図 3 e) が親和性及び特異性の低いクローンの代表である。ヘリックス SRR - T - CRA (配列番号 69) (図 2 h) は、3 位に Thr があるにもかかわらず、5' - CGT - 3' の中央のグアニンに特異的に結合した。中央のチミンは、3 位に Ser 又は Ala の何れかを有するヘリックス QRH - S - LTE (配列番号 70) (図 3 j) 及び RND - A - LTE (配列番号 71) (図 3 k) によって特異的に認識され、過去の知見と合致した [13 ~ 15]。

10

【 0 1 5 4 】

- 1 位に Gln を有するヘリックス (QLA - H - LKE (配列番号 11) (図 3 e) ; QRH - S - LTE (配列番号 70) (図 3 j)) では、過去に報告されている通り [13 ~ 15]、3' アデニンの認識が認められた。3' シトシンの認識においては、- 1 位に Ser 及び His が認められた (HTG - H - LLE (配列番号 66) (図 2 f) ; SKK - H - LAE (配列番号 63) (図 3 b) ; 及び SVR - N - LRE (配列番号 64) (図 3 c))。3' グアニンの認識は、- 1 位の Arg によってなされた (図 3 a、3 d、3 g 及び 3 k) 。このデータは過去の報告と合致する [13 ~ 15]。3' チミンの認識は、- 1 位の Ser、Thr 又は His によって媒介されることが報告されている [13 ~ 15]。本試験では、3' チミンを認識するヘリックスは、- 1 位に Ser (SRR - T - CRA (配列番号 69) (図 3 h)) 又は Gln (QLR - H - LRE (配列番号 68) (図 2 i)) を有した。

20

【 0 1 5 5 】

要約すれば、ファージディスプレイの選択により、8 個の 5' - CNN - 3' 標的部位 : 5' - CAG - 3'、5' - CCC - 3'、5' - CCG - 3'、5' - CGC - 3'、5' - CGG - 3'、5' - CGT - 3'、5' - CTA - 3' 及び 5' - CTG - 3' のドメインが得られた。その他の標的部位においては、パンニングの結果妥当な特異性を有するドメインが得られなかった。5' - CAG - 3' (図 2 a) 及び 5' - CCG - 3' (図 2 d) では、5' シトシンの結合における特異性を改善する必要があった。5' - CGA - 3' に結合するヘリックス (図 2 e) は、殆ど特異性を示さず、部位特異的突然変異による改良を必要とした。5' - CNG - 3' 型の DNA 配列に結合するドメインの場合は、中央のヌクレオチドに対する特異性が不足していることが通常であった。この現象は、5' - GNG - 3' 及び 5' - ANG - 3' 型の DNA 配列に結合するドメインについても、以前に報告されているものでもあった [13 ~ 15]。

30

【 0 1 5 6 】

部位特異的突然変異及び新規の設計による、5' - CNN - 3' 配列ファミリーに結合するドメインの特異性の改良

ファージディスプレイの選択では、5' - CAA - 3'、5' - CAC - 3'、5' - CAT - 3'、5' - CCA - 3'、5' - CCT - 3'、5' - CGA - 3'、5' - CTC - 3' 又は 5' - CTT - 3' に特異的に結合するジンクフィンガードメインが産生されなかった。場合によっては選択されたヘリックスがそのコグネート標的部位に結合したが、その他の部位との若干の交差反応性が認められた (例えば 5' - CAG - 3'、図 3 a ; 5' - CCG - 3'、図 3 d ; 5' - CGA - 3'、図 3 e ; 5' - CGG - 3'、図 3 g) 。部位特異的突然変異を使用して、DNA 結合特異性を改良した。結果を図 3 の下の図に示す。ヘリックスの 4 位、5 位及び 6 位の DNA 結合モチーフ Leu - Thr - Glu が、5' シトシンの認識を媒介するためのパンニング中に選択された多くの配列で認められた。5' - CAG - 3' (RAD - N - LAI (配列番号 60) (図 3 a)) を認識するために選択されたヘリックスを、このコンセンサス配列 (RAD - N - LTE) (配列番号 72) に変更した。DNA 結合特異性は 5' シトシンだけでなく中央のアデニンについても格段に改良された (図 3 n) 。Leu - Thr - Glu モチーフの

40

50

使用は、5' - C C G - 3' への結合も改良した (R N D - T - L Q A (配列番号 6 2) (図 3 d) を R N D - T - L T E (配列番号 7 3) (図 3 q) と比較した場合)。標的部位 5' - C G G - 3' で 5' シトシンの認識を改良するために、3 位の H i s を L y s で置換した (R S D - K - L T E (配列番号 7 4) (図 3 t) に対する R S D - H - L T E (配列番号 1 4) (図 3 g))。これは 5' シトシンの認識を改良しなかったが、中央のグアニンの排他的認識をもたらした。5' - C G A - 3' の認識のために選択されたアミノ酸配列を、S e g a l , e t a l . , 1 9 9 9 の配列 (Q S G - D - L R R) (配列番号 7 6) に基づき、Q L A - H - L K E (配列番号 1 1) (図 3 e) から Q S G - H - L T E (配列番号 7 5) へと変更した。これにより、DNA 結合特異性及び親和性が改良されたが、正味の特異性はその他殆どのドメインに比べて低いままであった (図 3 s)。

10

【 0 1 5 7 】

5' - C A A - 3' を認識するドメインの産生にも、理論設計を適用した。フィンガー 2 ヘリックス Q S G - N - L T E (配列番号 2) (5' - G C A - 3' を認識するジンクフィンガー Q S G - D - L R R (配列番号 7 6) から派生) [1 3] は、その標的部位に良好な特異性で結合した (図 3 l)。ヘリックス S K K - A - L T E (配列番号 7 7) は、その標的部位 5' - C A C - 3' に、優れた 5' シトシン認識で優先的に結合したが (図 3 m)、中央の塩基の特異性は低かった。5' - C A T - 3' の認識のため、5' - G A T - 3' (T S G - N - L V R) (配列番号 2 8) を認識するヘリックスに基づいて、ヘリックス T S G - N - L T E (配列番号 7 8) を産生した [1 3]。マルチターゲット E L I S A により、このヘリックスがその標的 V に優れた 5' シトシン認識で、優先的に結合することが明らかになった (図 3 o)。Q R H - S - L T E (図 3 j) (配列番号 7 0) の 5' - C T A - 3' ヘリックスを Q N S - T - L T E (配列番号 7 9) (図 3 u) に変更することにより、その他の標的に対する非特異的な結合が抑制された。5' - C C C - 3' を除き (図 2 b)、ピリミジンヌクレオチドのみを含有する部位を標的とする特異的ヘリックスは、ファージディスプレイから産生されなかった。ヘリックス T S H - S - L T E (配列番号 8 0) は、サブサイト 5' - C T C - 3' に結合すべく設計されたが、驚くべきことに優れた 5' シトシン認識で 5' - C C A - 3' に優先的に結合した (図 3 p)。その後このデータは、5' - C C T - 3' を極めて特異的に認識するドメイン、T K N - S - L T E (配列番号 8 1) (図 3 r) 及び 5' - C T T - 3' に対する T T G - A - L T E (配列番号 8 2) (図 3 v) を設計することを可能にした。サブサイト 5' - C T C - 3' の場合は、複数のヘリックスを試験した後も、特異的に結合するものは全く同定できなかった。

20

30

【 0 1 5 8 】

5' - C N N - 3' ドメインを含有する多指ジンクフィンガータンパク質の産生

本発明者等は以前に、外在及び内在遺伝子が、5' - (G N N) 6 - 3' DNA 配列を特異的に認識するジンクフィンガードメインを含む 6 フィンガータンパク質によって調節することができることを明らかにしている [3 3、3 5、3 6]。更に、本発明者等は、5' - G N N - 3'、5' - A N N - 3' 及び 5' - T N N - 3' を認識する種々の数のドメインを含む 5 フィンガータンパク質が、内在遺伝子を調節することができることを明らかにした [1 5]。DNA 配列の 5' - C N N - 3' ファミリーを認識する本明細書に記載のドメインが、人工転写因子の構築に好適であるかどうかを確認するため、6 フィンガータンパク質 p E 2 S を構築した。本発明者等は以前に、E R B B - 2 遺伝子の 5' U T R を標的とする 6 フィンガータンパク質 E 2 C 及び E 2 X による特異的な遺伝子調節を報告しているため [1 5、3 5]、モデル系としてはヒト E R B B - 2 遺伝子を選択した。6 フィンガー p E 2 S は、5' U T R 内の - 1 3 7 ~ - 1 5 4 位の標的部位 5' - C G G - G G G - G C T - C C C - C T G - G T T - 3' (配列番号 8 3) に結合すべく設計された [3 8]。この標的部位は、過去に同定された 3 個の 5' - G N N - 3' 領域 [1 3] の認識部位及び、本明細書に記載の 3 個の 5' - C N N - 3' 領域 (下線で示す) を含有した。

40

50

【 0 1 5 9 】

迅速PCR重複伸長法及びSp1Cフレームワークを使用して、2個の3フィンガーコード領域を産生した[33]。次に、これらの3フィンガータンパク質を融合して6フィンガータンパク質を作製し、それを細菌発現ベクターpMal-c2にクローニングした。この6フィンガータンパク質を大腸菌内にMPB融合タンパク質として発現させ、精製した。精製pE2Sの親和性を、電気泳動運動性シフトアッセイ(EMSA)を使用して測定し、3.25nMにおける解離定数を決定した。pE2S結合部位を含有するERBB-2プロモーターの267bp断片内での6フィンガータンパク質E2SのそのDNA標的部位に対する結合特異性の特徴を、DNase Iフットプリント法を使用して測定した(図4)。E2Sタンパク質を100nM~0.1nMの範囲で滴定し、解離定数を
10
得た。図4では、6フィンガータンパク質pE2SをSP1Cフレームワークを使用して構築した。細菌内での発現及び精製の後、pE2Sを、ERBB-2プロモーターの-209~+3領域を含有する267bpの放射線標識したDNA断片と共に培養した。DNase Iによる分解の後、試料を6%アクリルアミド/8M尿素ゲル上で分離した。対照：分解していないDNA断片；G+Aラダー：267bp DNA断片の配列ラダー；DNase I：E2Sタンパク質を有さない標識断片の分解；レーン4~13は、100nM、50nM、20nM、10nM、5nM、2nM、1nM、0.5nM、0.2nM及び0.1nMのE2Sタンパク質を含有。E2S結合部位の位置を示す。3個の独立した実験結果を平均するとK_d値は14±4nMとなり、EMSAで求められた親和性
20
データと合致した。pE2SのDNA結合は、正確に18bpの標的部位5'-CGG-GGG-GCT-CCC-CTG-GTT-3'(配列番号83)で認められた。この結果は、ここで特徴付けた5'-CNN-3'ドメインが、6フィンガータンパク質の枠内においても極めて特異的な結合も促進することを示すものである。

【 0 1 6 0 】

6フィンガータンパク質pE2Sの内在ErbbB-2遺伝子の発現を変化させる能力を確認するため、そのコード領域をレトロウイルスベクターpMX-IREsにサブクローニングし、VP64活性化ドメイン又はKox-1のKRABレプレッサドメインの何れかと融合させた[33、39]。ヒト癌細胞系A431を遺伝子組換えレトロウイルスに感染させた。感染から2日後、細胞をERBB2特異的抗体を使用してフローサイトメトリーで解析した(図5)。図5で、A431細胞に、活性化ドメインVP64に融合させ
30
たpE2S又は抑制ドメインKRABに融合させたpE2Sの何れかからなる転写因子をコードするレトロウイルスを形質導入した。3日後、フィコエリトリンで標識した二次抗体と組み合わせたErbbB2-特異的mAb FSP77で無傷の細胞を染色し、フローサイトメトリーで解析した。細線、二次抗体単独で染色；点線、mock導入細胞の特異的染色；実線、転写因子E2S-VP64(A)又はE2S-KRAB(B)を発現させるための導入を行った細胞の特異的染色。VP64活性化ドメインに融合したpE2Sでは内在ERBB-2遺伝子の強度のアップレギュレーションが認められ(図5A)、KRAB抑制ドメインに融合したpE2Sを発現させた場合はダウンレギュレーションが認められた(図5B)。pE2Sの結果は、本明細書に記載の5'-CNN-3'ドメイン
40
が、設計した転写調節因子を構築するモジュール構成ブロックとして働くことができることを明確に示している。

【 0 1 6 1 】

同様に、本発明者等は最近、解離定数0.7nMで配列5'-GTC AAG GCA AAG CTG GCC-3'(配列番号84)に結合する -グロブリンを標的とするタンパク質gg1の構築を報告した[40]。このタンパク質はDNase Iフットプリント法及びクロマチン免疫沈殿法により、標的とする配列にin vitro及びin vivoで結合することが明らかにされており、このタンパク質に基づく転写因子は内在遺伝子の強力な調節因子であった。これらの2例は、ここで選択されたドメインが、本発明者等が報告してきた種々の他のドメインと容易に結合することを示している。

【 0 1 6 2 】

10

20

30

40

50

考察

Cys₂-His₂のジンクフィンガードメインは、内在遺伝子を標的により調節する用途の広いツールであることが明らかになっており、より近年では、相同遺伝子組換えを介する遺伝子修復を容易にするヌクレアーゼ標的ドメインとして知られている。ジンクフィンガーによる3bpのDNA配列の認識は、ヘリックスの-1位、3位及び6位のアミノ酸残基と、3'、中央及び5'ヌクレオチドとのそれぞれの相互作用により主に達成されるが、ヘリックス内の他の部位におけるアミノ酸は微細な特異性の要素を提供する鍵を握っている。ヘリックスの2位は他のヘリックス残基と相互作用し、更に3bp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[11、12、41]。この標的部位の重複は、転写因子を作製するモジュール法の限界であるが、認識ヘリックスの2位がAspである場合、この影響はドメイン間の相互作用に対してのみに制限されると考えられる[41、42]。

10

【0163】

本試験で本発明者等は、3フィンガータンパク質C7・GATに基づくファージディスプレイライブラリーからの選択による、5'-CNN-3'サブサイトに結合するジンクフィンガードメインの産生並びに、理論設計による洗練化及び/又は作製を説明する。このC7・GATライブラリーは、2位にAspを含有しないフィンガー3で構築して、5'アデニン又は5'シトシンを含有するフィンガー2サブサイトを認識するジンクフィンガードメインの選択を可能にした。このライブラリーからの5'-CNN-3'型DNA配列に結合するドメインのファージディスプレイの選択は、5'-ANN-3'ドメインの選択ほど成功しなかった[15]。5'ピリミジン(シトシン又はチミン)を含有する標的部位の選択は、ピリミジンが認識ヘリックスの側鎖に到達しにくく、水素結合の機会をそれほど提供しないことから、より困難であると考えられる。

20

【0164】

16個の考え得る5'-CNN-3'標的部位の内の8個を特異的に認識するジンクフィンガードメインを、ファージディスプレイから選択した(図2)。これらは、標的部位5'-CCC-3'、5'-CGC-3'、5'-CGT-3'、5'-CTA-3'、及び5'-CTG-3'(図3b、f、h、j及びk)との優れたDNA結合特異性を有する5個のドメイン及び、5'-CAG-3'、5'-CCG-3'及び5'-CGG-3'(図3a、d及びg)と良好な特異性で結合する3個のドメインを含んでいた。標的部位5'-CAG-3'、5'-CCG-3'、5'-CGA-3'及び5'-CTA-3'に対するDNA結合特異性は、ファージディスプレイで得られたアミノ酸配列に理論設計を適用することによって改良された(図3n、q、s及びu)。標的部位5'-CAA-3'、5'-CAC-3'、5'-CAT-3'、5'-CCA-3'、5'-CCT-3'及び5'-CTT-3'の場合は、妥当から優れたDNA結合特異性を有するジンクフィンガードメインが、新規の設計により得られた(図3l、m、o、p、r及びv)。広範な解析を行ったが、特異性をもって5'-CTC-3'を認識するジンクフィンガードメインを同定することはできなかった。最も適当なジンクフィンガードメイン及びその認識部位を表3に要約する。

30

【0165】

40

【表 3】

表 3

標的部位 5' → 3'	フィンガー2ヘリックス	供給源	図への参照
CAA	QSG-N-LTE (配列番号 2) M	3l	
CAC	SKK-A-LTE (配列番号 77) M	3m	
CAG	RAD-N-LTE (配列番号 72) M	3n	
CAT	TSG-N-LTE (配列番号 78) M	3o	
CCA	TSH-S-LTE (配列番号 80) M	3p	
CCC	SKK-H-LAE (配列番号 63) P	3b	
CCG	RND-T-LTE (配列番号 73) M	3q	
CCT	TKN-S-LTE (配列番号 81) M	3r	
CGA	QSG-H-LTE (配列番号 75) M	3i	
CGC	HTG-H-LLE (配列番号 66) P	3f	
CGG	RSD-H-LTE (配列番号 14) P	3g	
CGT	SRR-T-CRA (配列番号 18) P	3h	
CTA	QNS-T-LTE (配列番号 79) M	3u	
CTC	なし		
CTG	RND-A-LTE (配列番号 71) P	3k	
CTT	TTG-A-LTE (配列番号 82) M	3v	

10

20

本発明者等の選択の中には非特異的なジンクフィンガーも認められた。多くの標的部位 5' - CAA - 3'、5' - CAC - 3'、5' - CAT - 3'、5' - CCA - 3'、5' - CCT - 3'、5' - CTC - 3' 及び 5' - CTT - 3' に対する選択の中で同じ3個のヘリックスQRH - H - LVE (配列番号85)、SPG - H - LIE (配列番号86) 及びSCS - H - LAE (配列番号87) が得られた (図2)。これらのヘリックスにおいては、特異的な標的部位が全く同定されなかった。この3個のヘリックスは、親和性は高いが特異性は低い状態でDNAと結合すると考えられる。

30

【0166】

一般的に、ジンクフィンガードメインによる5' - CNN - 3' サブサイトの中央及び3' のヌクレオチドの認識に関しては、過去の知見と合致した [13 - 15]。中央のアデニン (5' - CAN - 3') は、主に3位のAsnによって認識されるが、例外は5' - CAC - 3' (SKK - A - LTE (配列番号77) (図3m)) であった。中央のグアニンは3位のHisによって認識されるが、例外は5' - CGT - 3' (SRR - T - CRA (配列番号18) (図3h)) であり、中央のチミンは3位のSer又はAlaの何れかによって認識された。興味深いことに、中央のシトシンの認識は、過去に報告されたように3位のThr、Asp又はGluによつては達成されず、Ser又はHisによつて達成された (例外は5' - CCG - 3'、RND - T - LTE (配列番号73) (図3q))。標的の3'ヌクレオチドの認識は、-1位のアミノ酸によって媒介された：3' アデニンはGlnによつて (例外は5' - CCA - 3'、TSH - S - LTE (配列番号80) (図3p))、3' グアニンはArgによつて、及び3' チミンはThr又はSerによつて認識された。3' シトシンを認識するドメインでは、-1位に稀なアミノ酸残基、例えばAsn、Ser、Thr及びHisが認められた。以前には、Asp及びGluのみが3' シトシンの特異的な認識を媒介するとされていた [13 ~ 15]。

40

【0167】

選択されたジンクフィンガードメインの多くが、認識ヘリックスの6位にGluを有していた (図2)。このGluが5' シトシンの認識を媒介すると仮定したいところであるが、選択されたヘリックスのDNA結合特異性の解析により、シトシンの認識はより複雑で、ヘリックスの他の配位に依存することが明らかとなった。6位にGluを有する8

50

個のドメインにおいては5'シトシンの優れた識別力が認められたが(図3b、c、e、f、h、i、j及びk)、RSD-H-LTE(配列番号14)(図3g)は例外であった。5位及び6位で最も多く選択されたモチーフは、TEであった。このモチーフをジンクフィンガードメインの理論設計に使用した場合、そのドメインは5'シトシンの優れた識別力を示したが(図3l-v)、例外はQSG-N-LTE(配列番号2)及びRSD-K-LTE(配列番号74)(図3s、t)であった。

【0168】

分子モデリングを実施して、ジンクフィンガー認識ヘリックスにおける変化がどのようにして観察されたDNA結合特異性を生じさせるのかについての知見を深めた。主要な興味は、6位のGluがどのようにして5'シトシンの認識を媒介するのかであった。5'-CGG-3'(図3g)を認識したヘリックスRSD-H-LTE(配列番号14)を、その特徴が明らかにされているZif268タンパク質RSD-H-LTT(配列番号45)(図6A)のフィンガー2の配列の相似性を利用して、モデル化した(図6B)。そのオペレーターDNAに結合したZif268の構造[11]は、本試験に関連した幾つかのアミノ酸と塩基との相互作用を明らかにした。Zif268構造におけるフィンガー2サブサイトは5'-TGG-3'である。3'グアニンの認識は、-1位のArgからの2個の水素結合によって達成された。Arg側鎖は、2位のAspへの2個のつかい効果を有する(buttredding)水素結合によって、構造的に束縛された。中央グアニンの認識は、3位のHisからの1個の水素結合によって達成された。このHisは5'チミンに連結し、この相互作用がHisの構造的フレキシビリティを制限し、それによって中央グアニンに対する特異性が高まるものと考えられた。6位のThrは5'チミンと水素結合をなさなかった。5'チミンへの特異性は、3位のHisとチミンとの連結による相互作用及び反対側の鎖のアデニンと隣接するフィンガー3認識ヘリックスの2位のAspとの水素結合によって達成された(図6Aには示さず)。この標的部位の重複については上で考察した。図6では、選択された酸素(赤色)、窒素(青色)及びリン(紫色)原子を明晰性のためカラーで示す。緑色の点線は、示唆される水素結合を示す。各ヘリックスの配列、DNAサブサイト及び考え得る相互作用を各モデルの下に要約する。緑色の線は水素結合を示す。矢印は水素受容体を示す。A、Zif268のフィンガー2; B、pCGG(図3g); C、pmCAG(図3n)。

【0169】

フィンガー2ヘリックスRSD-H-LTE(配列番号14)が、Zif268フィンガー2ヘリックスRSD-H-LTT(配列番号45)が5'-TGG-3'に結合するのとはほぼ同じ方法で5'-CGG-3'に結合すると予測するのは、先験的には妥当であると考えられる。Zif268の配位上で適切なアミノ酸及び塩基を置換することにより、図6Bに示すRSD-H-LTE(配列番号14)のモデルが得られた。このモデルは、5'シトシンのN4の水素結合距離(3 ± 0.5)内の6位でGluの酸素を有し、この塩基へのGluの特異性についての妥当な説明を提供する。但し、マルチターゲットELISAデータは、RSD-H-LTE(配列番号14)が実際には5'シトシンよりも5'アデニンに優先的に結合することを示した(図3g)。RSD-H-LTE(配列番号14)による5'シトシンへの特異性の低さの理由として考えられるのは、Zif268のフィンガー2で認められるHis-5'チミンの相互作用に類似した、3位のHisと5'シトシンとの連結による相互作用である。このような相互作用により、5'シトシンは6位のGluと水素結合しにくいように位置付けられると思われる。ファージ選択データも、Hisと5'シトシンとの間に相互作用が存在する可能性を支持している(図2)。Hisは、5'-CGN-3'を標的とする選択されたジンクフィンガードメインの56%において3位に現れ、これは中央グアニンの認識におけるその確立された役割によるものと考えられた。但し、Hisは、5'-CNA-3'(5'-CTA-3'を除く)、5'-CNC-3'及び5'-CNT-3'に結合するドメインの大半を含めた、全体例の51%(82配列中42配列)にも現れた(図2)。このため、標的部位における5'シトシンの存在は、3位の残基としてのHisの選択を偏らせてきた可能性があ

る。認識ヘリックスの他の配位も、5'ヌクレオチドへの特異性に影響を与えている可能性がある。QSG-H-LTE（配列番号75）は低い5'特異性を示したが（図3s）、SKK-H-LAE（配列番号63）及びHTG-H-LLE（配列番号66）は何れも5'シトシンに強い特異性を示した（図3b及び3f）。残念なことに、このようなヘリックスに基づくモデルは何れも、関連配列の構造データが十分ではないため、極めて推測的なものととどまる。

【0170】

検討すべき第二の興味深い事例は、5'-CAG-3'を認識するRAD-N-LTE（配列番号72）である（図6C）。このヘリックスとRSD-H-LTE（配列番号14）との主要な差は、3位のAsnである。このヘリックスは5'シトシンに対する優れた特異性を示す（図3n）。5'特異性の根拠を調べるため、適切なアミノ酸及び塩基を、Zif268のフィンガー2の構造の配位に置換した。これらの単純な置換により、3位AsnのO及びNは、アデニンのN6及びN7を遥かに超える水素結合距離（4.5）を持つに至った。しかし、過去の構造データ並びにこのドメインの中央アデニンに対する優れた特異性は、水素結合が存在しなくてはならないことを示唆している。原則として、これはアデニンの再配置又はAspをDNAに近付ける認識ヘリックスの回転によって達成される。何れの構造的変化も、5'-AAG-3'に結合するタンパク質Tramtrak、RKD-N-MTA（配列番号88）のフィンガー2の構造において認められる[21]。この構造的変化は又、6位のGlnを5'シトシンに近付け、観察された5'シトシンへの優れた特異性を生じさせる相互作用を容易にしている可能性がある。但し、Tramtrakタンパク質のフィンガー2の6位のAlaが標的の5'塩基と接触することはなく、Tramtrakヘリックスの配位上でのモデル化RAD-N-LTE（配列番号72）は更なる知見を殆ど提供するものではなかったことには留意する必要がある（データなし）。

【0171】

既存の構造データが不足していることから、本試験で説明したジンクフィンガーヘリックスの多くによる5'シトシンの特異性は、コンピュータモデリングによって容易に解釈することはできない。5'アデニン、チミン又はシトシンの認識が合理的に解釈できる構造においては、特異性は標的部位の重複の結果生じるものであった[11, 42]。本試験では全てのタンパク質に共通のフィンガー3が存在していたが、5'シトシン認識は変化しやすいことから、本発明者等は本試験で使用したフィンガー3ヘリックスから標的部位重複による相互作用が生じることはないとする。DNA塩基の配置に關与するパラメータ及びヘリックスのDNAに対する連結方向を理解するには、より多くの構造試験が必要であることは明らかである。

【0172】

本明細書に記載のジンクフィンガードメインの5'-CNN-3'標的部位に対する特異性を生じさせる分子的相互作用をより詳しく理解するには至っていないものの、人工転写因子におけるその利用を示してきた。本発明者等は、ERBB-2遺伝子の5'UTR内の18bp配列5'-CGG-GGG-GCT-CCC-CTG-GTT-3'（配列番号83）を標的とする、3個の5'-CNN-3'認識ヘリックスを含有する6フィンガータンパク質pE2Sを構築した。DNase Iフットプリント解析結果が示す通り、この18bp認識部位へのpE2Sの結合は特異的であった（図4）。更に、本発明者等は、pE2Sが、活性化領域VP64又は抑制領域KRABに融合すると、内在ERBB-2遺伝子をそれぞれアップ及びダウンレギュレートすることができることを明らかにした（図5）。また最近、本発明者等は、鎌状赤血球貧血を処置することを目的とした戦略における、グロブリン遺伝子をアップレギュレートするべく設計された転写因子を報告した[40]。この報告では、5'-CTG-3'ドメインが5'-ANN-3'及び5'-GNN-3'と共に組み込まれた配列5'-GTC AAG GCA AGG CTG GCC-3'（配列番号84）に結合すべく、転写因子gg1を設計した。この転写因子は又、in vitro及びin vivoで高い親和性及び特異性でその標的

部位に結合し、内在遺伝子を調節することが明らかになった。

【 0 1 7 3 】

要約すれば、本明細書に記載の 5' - C N N - 3' DNA サブサイトを認識するジンクフィンガードメインは、人工転写因子を迅速に構築するのに好適である。これらの 15 個の 5' - C N N - 3' ジンクフィンガードメインが、本発明者等が過去に開発した 16 個の 5' - G N N - 3'、14 個の 5' - A N N - 3' 及び 2 個の 5' - T N N - 3' ドメインを増大させ、5' - [(G / A / C) N N]₆ - 3' に結合する 100 億を超えるタンパク質の迅速な構築を共に可能にする。この種の部位は、ランダム配列において約 6 ヌクレオチドに 1 回の頻度で出現する。このため、本明細書に開示する予め規定したドメインは、人工転写因子及びヌクレアーゼによって迅速に標的されることのできる DNA 配列の数を著明に増加させる。

10

【 0 1 7 4 】

実施例 13 の参考文献

便宜上、実施例 13 の参考文献を示し、番号順に列挙する。これらの参考文献は、参考として本明細書で援用される。

参考文献

【 0 1 7 5 】

【 数 1 】

1. Blancafort, P., Segal, D. J., and Barbas, C. F., 3rd. (2004) *Mol Pharmacol* 66(6), 1361-1371
2. Beerli, R. R., and Barbas, C. F., 3rd. (2002) *Nat Biotechnol* 20(2), 135-141
3. Jantz, D., and Berg, J. M. (2004) *Chem Rev.* 104(2), 789-799
4. 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
5. 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
6. Blancafort, P., Magnenat, L., and Barbas, C. F., 3rd. (2003) *Nat Biotechnol* 21(3), 269-274
7. Urmov FD, M. J., Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. (2005) *Nature* 435(7042), 646-651
8. Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K., and Carroll, D. (2003) *Science* 300(5620), 764
9. Miller, J., McLachlan, A. D., and Klug, A. (1985) *EMBO J.* 4(6), 1609-1614
10. 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
11. Pavletich, N. P., and Pabo, C. O. (1991) *Science (Washington, D. C., 1883-)* 252(5007), 809-817
12. Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekudova, L., and Pabo, C. O. (1996) *Structure* 4, 1171-1180
13. Segal, D. J., Dreier, B., Beerli, R. R., and Barbas, C. F., 3rd. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6), 2758-2763
14. Dreier, B., Segal, D. J., and Barbas, C. F., 3rd. (2000) *J Mol Biol* 303(4), 489-502

10

20

30

40

【 0 1 7 6 】

【 数 2 】

15. Dreier, B., Beerli, R. R., Segal, D. J., Flippin, J. D., and Barbas, C. F., 3rd. (2001) *J Biol Chem* 276(31), 29466-29478
16. Guan, X., Stege, J., Kim, M., Dahmani, Z., Fan, N., Helfetz, P., Barbas, C. F., 3rd, and Briggs, S. P. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20), 13296-13301
17. 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., U S A.* 100(21), 11997-12002 10
18. Beerli, R. R., Schopfer, U., Dreier, B., and Barbas, C. F., 3rd. (2000) *J Biol Chem* 275(42), 32617-32627
19. Pavletich, N. P., and Pabo, C. O. (1993) *Science (Washington, D. C., 1883-)* 261(5129), 1701-1707
20. Kim, C. A., and Berg, J. M. (1996) *Nature Structural Biology* 3, 940-945 20
21. Fairall, L., Schwabe, J. W. R., Chapman, L., Finch, J. T., and Rhodes, D. (1993) *Nature (London)* 366(6454), 483-487
22. Houbaviy, H. B., Usheva, A., Shenk, T., and Burley, S. K. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(24), 13577-13582
23. Wuttke, D. S., Foster, M. P., Case, D. A., Gottesfeld, J. M., and Wright, P. E. (1997) *J. Mol. Biol.* 273(1), 183-206
24. 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 30
25. Havranek JJ, D. C., Baker D. (2004) *J Mol Biol.* 344(1), 59-70
26. Wolfe SA, G. H., Ramm EI, Pabo CO. (1999) *J Mol Biol.* 285(5), 1917-1934.
27. Isalan, M., Choo, Y., and Klug, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(11), 5617-5621
28. Pabo C.O., Nekludova, L.. (2000) *J Mol Biol.* 301(3), 597-624
29. Wu, H., Yang, W.-P., and Barbas, C. F., III. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(2), 344-348 40
30. Rader, C., and Barbas, C. F., III. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8(4), 503-508

【数 3】

31. Barbas, C. F., III, Kang, A. S., Lerner, R. A., and Benkovic, S. J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(18), 7978-7982
32. Barbas, C. F., III, and Lerner, R. A. (1991) *Methods (San Diego)* 2(2), 119-124
33. Beerli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B., and Barbas, C. F., 3rd. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25), 14628-14633
34. Trauger, J.W., Dervan, P.B. (2001) *Methods Enzymol.* 340, 450-466 10
35. Beerli, R. R., Dreier, B., and Barbas, C. F., 3rd. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4), 1495-1500
36. Liu, Q., Segal, D. J., Ghiara, J. B., and Barbas, C. F., III. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(11), 5525-5530
37. Harwerth IM, W. W., Marte BM, Hynes NE. (1992) *J Biol Chem.* 267(21), 15160-15167
38. Hudson, L. G., Ertl, A. P., and Gill, G. N. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(8), 4389-4393 20
39. Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W. K.-H., Vissing, H., Thiesen, H.-J., and Rauscher, F. J., III. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(10), 4509-4513
40. Graslund, T., Li, X., Magnenat, L., Popkov, M., and Barbas, C. F., 3rd. (2005) *J Biol Chem* 280(5), 3707-3714
41. Segal, D. J., Beerli, R. R., Blancafort, P., Dreier, B., Effertz, K., Huber, A., Koksche, B., Lund, C. V., Magnenat, L., Valente, D., and Barbas, C. F., 3rd. (2003) *Biochemistry* 42(7), 2137-2148 30
42. Wolfe SA, N. L., Pabo CO. (2000) *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29, 183-212.

実施例 1 4

更なるジンクフィンガーの構築

種々の骨格を使用して、実施例 1 3 の通り、更なるジンクフィンガーを構築した。

【0 1 7 8】

1. T S G - N - L T E (配列番号 7 8)

T S G - N - L T E (配列番号 7 8) を使用したジンクフィンガーを Z i f 2 6 8 骨格で構築した。その結合能を、実施例 1 3 の通り、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは C A T 及び C T T に結合し、親和性は C A T の方が高かった。 40

【0 1 7 9】

又、T S G - N - L T E (配列番号 7 8) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは C A T と結合した。

【0 1 8 0】

2. T K N - S - L T E (配列番号 8 1)

T K N - S - L T E (配列番号 8 1) を使用した別のジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジ 50

ンクフィンガーはCCTと結合した。

【0181】

3. QNS-T-LTE (配列番号79)

QNS-T-LTE (配列番号79)を使用したジンクフィンガーをZif268骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは高い特異性でCTAに結合した。

【0182】

4. NLQ-H-LGE (配列番号3)

NLQ-H-LGE (配列番号3)を使用したジンクフィンガーをZif268骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAC及びCATと結合し、若干の交差反応性が認められた。

10

【0183】

5. QSG-N-LTE (配列番号2)

QSG-N-LTE (配列番号2)を使用したジンクフィンガーをZif268骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAC及びCATと結合し、若干の交差反応性が認められた。

【0184】

6. QRH-N-LTE (配列番号1)

QRH-N-LTE (配列番号1)を使用したジンクフィンガーをZif268骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは可能なCNNトリプレットの14個と結合したが、CTG及びCTTには殆ど結合しなかった。

20

【0185】

7. RND-T-LTE (配列番号8)

RND-T-LTE (配列番号8)を使用したジンクフィンガーをZif268骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAG、CCG、CGG及びCTGと結合した。

【0186】

8. RND-T-LQA (配列番号62)

RND-T-LQA (配列番号62)を使用したジンクフィンガーをZif268骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーはCCGと高い特異性で結合した。

30

【0187】

9. QLA-H-LKE (配列番号11)

QLA-H-LKE (配列番号11)を使用したジンクフィンガーをZif268骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAT及びCGAと結合したが、CTTを除く他のトリプレットの大半と交叉反応を起こした。

【0188】

10. QSG-H-LTE (配列番号10)

QSG-H-LTE (配列番号10)を使用したジンクフィンガーをZif268骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAG及びCGAと結合したが、その他のトリプレットの大半と交叉反応を起こした。

40

【0189】

QSG-H-LTE (配列番号10)を使用した別のジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーはCGTを除くトリプレットの大半と結合した。

【0190】

11. RAD-N-LTE (配列番号4)

50

R A D - N - L T E (配列番号 4) を使用したジンクフィンガーを Z i f 2 6 8 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは高い特異性で C A G と結合した。

【 0 1 9 1 】

R A D - N - L T E (配列番号 4) を使用した別のジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは C A G、C G G 及び C G G と結合した。

【 0 1 9 2 】

1 2 . T S H - S - T L E (配列番号 8 0)

T S H - S - T L E (配列番号 8 0) を使用したジンクフィンガーを Z i f 2 6 8 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは C T A と結合したが、若干の交差反応性が認められた。

10

【 0 1 9 3 】

T S H - S - T L E (配列番号 8 0) を使用した別のジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは極めて高い特異性で C C A と結合した。

【 0 1 9 4 】

1 3 . N L Q - N - L G E (配列番号 1 3 4)

N L Q - N - L G E (配列番号 1 3 4) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは極めて高い特異性で C C T と結合した。

20

【 0 1 9 5 】

1 4 . Q S G - H - C R A (配列番号 1 3 5)

Q S G - H - C R A (配列番号 1 3 5) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは極めて高い交差反応性と共に C G A と結合した。即ち、5'ヌクレオチドの認識は不良であった。

【 0 1 9 6 】

1 5 . R S D - K - C R A (配列番号 1 3 6)

R S D - K - C R A (配列番号 1 3 6) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは C G G と結合した。即ち、5'ヌクレオチドの認識は不良であった。

30

【 0 1 9 7 】

1 6 . H K N - A - C R A (配列番号 1 3 7)

H K N - A - C R A (配列番号 1 3 7) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは 16 個のトリプレット全てと結合した。

【 0 1 9 8 】

1 7 . T S G - A - L T E (配列番号 1 3 8)

T S G - A - L T E (配列番号 1 3 8) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による部分的に精製した融解生成物 (1 : 8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは C T T と結合したが、若干の交差反応性が認められた。

40

【 0 1 9 9 】

1 8 . T S G - T - L T E (配列番号 1 3 9)

T S G - T - L T E (配列番号 1 3 9) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による部分的に精製した融解生成物 (1 : 8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは C A C、C T C 及び C T T と結合した。

【 0 2 0 0 】

1 9 . T T G - A - L T E (配列番号 8 2)

50

TTG - A - LTE (配列番号 82) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CTT と結合したが、若干の交差反応性が認められた。

【0201】

20. TTG - G - LTE (配列番号 140)

TTG - G - LTE (配列番号 140) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CAC、CTC 及び CTT を除くトリプレットの大半と結合した。

10

【0202】

21. DCR - T - LAE (配列番号 141)

DCR - T - LAE (配列番号 141) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CTT と結合した。

【0203】

22. DCR - A - LTE (配列番号 142)

DCR - A - LTE (配列番号 142) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CAC、CTC 及び CTT を除くトリプレットの大半と結合した。

20

【0204】

23. DCR - T - LTE (配列番号 143)

DCR - T - LTE (配列番号 143) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CAC、CTC 及び CTT を除くトリプレットの大半と結合した。

【0205】

24. SCR - T - LAE (配列番号 144)

SCR - T - LAE (配列番号 144) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CAC、CTC 及び CTT を除くトリプレットの大半と結合した。

30

【0206】

25. SCR - A - LTE (配列番号 145)

SCR - A - LTE (配列番号 145) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CAC、CTC 及び CTT を除くトリプレットの大半と結合した。但し、CCT 及び CGC に対しては若干の特異性が認められた。

40

【0207】

26. SCR - T - LTE (配列番号 146)

SCR - T - LTE (配列番号 146) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CCT と結合したが、若干の交差反応性が認められた。

【0208】

27. DKK - A - LAE (配列番号 147)

DKK - A - LAE (配列番号 147) を使用したジンクフィンガーを SP1C 骨格で構築した。その結合能を、ELISA による部分的に精製した融解生成物 (1:8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは CAC、CTC 及び CTT を除くトリプレット

50

の大半と結合した。

【0209】

28. DKK - T - LAE (配列番号148)

DKK - T - LAE (配列番号148)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる部分的に精製した融解生成物(1:8)を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAC、CTC及びCTTを除くトリプレットの大半と結合した。

【0210】

29. DKK - A - LTE (配列番号149)

DKK - A - LTE (配列番号149)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる部分的に精製した融解生成物(1:8)を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAC、CTC及びCTTを除くトリプレットの大半と結合した。

10

【0211】

30. DKK - T - LTE (配列番号150)

DKK - T - LTE (配列番号150)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる部分的に精製した融解生成物(1:8)を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAC及びCCCと結合したが、若干の交差反応性が認められた。

【0212】

31. SKK - A - LAE (配列番号151)

SKK - A - LAE (配列番号151)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる部分的に精製した融解生成物(1:8)を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAC、CTC及びCTTを除くトリプレットの大半と結合した。

20

【0213】

32. SKK - T - LAE (配列番号152)

SKK - T - LAE (配列番号152)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる部分的に精製した融解生成物(1:8)を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAC、CTC及びCTTを除くトリプレットの大半と結合した。

30

【0214】

33. SKK - A - LTE (配列番号77)

SKK - A - LTE (配列番号77)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる部分的に精製した融解生成物(1:8)を使用して解析した。このジンクフィンガーはCACと結合した。

【0215】

34. SKK - T - LTE (配列番号153)

SKK - T - LTE (配列番号153)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる部分的に精製した融解生成物(1:8)を使用して解析した。このジンクフィンガーはCACと結合した。

40

【0216】

35. HTG - A - LLE (配列番号154)

HTG - A - LLE (配列番号154)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で構築した。その結合能を、ELISAによる部分的に精製した融解生成物(1:8)を使用して解析した。このジンクフィンガーはCAC、CTC及びCTTを除くトリプレットの大半と結合した。

【0217】

36. HTG - N - LLE (配列番号155)

HTG - N - LLE (配列番号155)を使用したジンクフィンガーをSP1C骨格で

50

構築した。その結合能を、E L I S A による部分的に精製した融解生成物 (1 : 8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは C A C、C T C 及び C T T を除くトリプレットの大半と結合した。

【 0 2 1 8 】

3 7 . S K K - H - L A E (配列番号 7)

S K K - H - L A E (配列番号 7) を使用したジンクフィンガーを Z i f 2 6 8 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による粗融解生成物を使用して解析した。このジンクフィンガーは C C C と結合した。

【 0 2 1 9 】

3 8 . D P G - N - L V R (配列番号 1 5 6)

D P G - N - L V R (配列番号 1 5 6) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による部分的に精製した融解生成物 (1 : 8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは G A C と結合した。

【 0 2 2 0 】

3 9 . D S G - N - L V R (配列番号 1 5 7)

D S G - N - L V R (配列番号 1 5 7) を使用したジンクフィンガーを S P 1 C 骨格で構築した。その結合能を、E L I S A による部分的に精製した融解生成物 (1 : 8) を使用して解析した。このジンクフィンガーは C A C 及び C A T と結合した。当初は A A C に対する特異性を有するとされていた。

【 0 2 2 1 】

10

20

【表 4】

表 4

言及したタンパク質及び核酸配列の要約ヘプタペプチドジンクフィンガー部分

<u>ヘプタペプチド</u>	<u>配列番号</u>	
QRH-N-LTE	1	10
QSG-N-LTE	2	
NLQ-H-LGE	3	
RAD-N-LTE	4	
RAD-N-LAI	5	
NTT-H-LEH	6	
SKK-H-LAE	7	
RND-T-LTE	8	
RND-T-LNA	9	
QSG-H-LTE	10	
QLA-H-LKE	11	20
QRA-H-LTE	12	
HTG-H-LLE	13	
RSD-H-LTE	14	
RSD-K-LTE	15	
RSD-H-LTE	16	
RSD-H-LTN	17	
SRR-T-CRA	18	
QLR-H-LRE	19	
QRH-S-LTE	20	
QLA-H-LKE	21	30
NLQ-H-LGE	22	
RND-A-LTE	23	
TKN-T-LTE	24	
QSG-D-LTE	25	
RSD-E-LKR	26	
RSD-E-RKR	27	
TSG-N-LVR	28	
HRT-T-LTN	35	
QRA-H-LER	36	40
DPG-A-LVR	37	
RSD-K-LVR	38	
TSG-E-LVR	39	
RSD-H-LTN	40	
DPG-H-LVR	41	
DCR-D-LAR	42	
KSA-D-LKR	44	
RSD-H-LTT	45	
TSG-S-LVR	48	
QST-N-LKS	54	

RAD-E-RKR	57	
TSG-N-LVR	58	
SPA-D-LTN	59	
RAD-H-LAI	60	
RSD-H-LTD	61	
RND-T-LQA	62	
SKK-H-LAE	63	
SVR-N-LRE	64	
RND-T-LQA	65	
HTG-H-LLE	66	
RSD-H-LTE	67	
QLR-H-LRE	68	10
SRR-T-CRA	69	
QRH-S-LTE	70	
RND-A-LTE	71	
RAD-N-LTE	72	
RND-T-LTE	73	
RSD-K-LTE	74	
QSG-H-LTE	75	
QSG-D-LRR	76	
SKK-A-LTE	77	
TSG-N-LTE	78	
QNS-T-LTE	79	
TSH-S-LTE	80	20
TKN-S-LTE	81	
TTG-A-LTE	82	
QRH-H-LVE	85	
SPG-H-LIE	86	
SCS-H-LAE	87	
RKD-N-MTA	88	
QLG-H-LIQ	89	
NTK-Q-LRN	90	
NTT-H-LEH	91	
SCG-H-LTE	92	
THR-D-LRQ	93	
QRH-S-LTE	94	30
NCN-H-LAE	95	
GPG-G-LIR	96	
SPG-H-LVE	97	
GLK-W-LVV	98	
DLR-W-LVV	99	
NCF-H-LTE	100	
NVR-T-LDT	101	
RLN-N-LLV	102	
DRK-V-LAT	103	
HVI-D-LDH	104	
NTT-H-LEH	105	
NVN-P-LPP	106	40
NHT-R-LAS	107	
IPA-D-LKQ	108	

RRR-G-WRK	109	
ETR-T-LTA	110	
HII-D-LDH	111	
TRK-E-LRS	112	
NHG-H-LTE	113	
GRL-I-LLG	114	
AMG-H-LVE	115	
QWH-H-LTD	116	
SCV-H-LAE	117	
TCG-H-LVE	118	
SCY-K-LRE	119	
SCG-G-LTA	120	10
QCG-H-LVA	121	
GCS-K-LRE	122	
SCG-H-LQE	123	
CCA-H-LSE	124	
DHQ-D-LTI	125	
DLR-S-CRS	126	
QRR-H-LLS	127	
LRR-Q-LAH	128	
RMR-N-LQK	129	
NLQ-H-LGE	130	
NLQ-N-LGE	134	
QSG-H-CRA	135	20
RSD-K-CRA	136	
HKN-A-CRA	137	
TSG-A-LTE	138	
TSG-T-LTE	139	
TTG-G-LTE	140	
DCR-T-LAE	141	
DCR-A-LTE	142	
DCR-T-LTE	143	
SCR-T-LAE	144	
SCR-A-LTE	145	
SCR-T-LTE	146	
DKK-A-LAE	147	30
DKK-T-LAE	148	
DKK-A-LTE	149	
DKK-T-LTE	150	
SKK-A-LAE	151	
SKK-T-LAE	152	
SKK-T-LTE	153	
HTG-A-LLE	154	
HTG-N-LLE	155	
DPG-N-LVR	156	
DSG-N-LVR	157	

他のタンパク質配列

TGEKP (リンカー)	30
DALDDFDLML (合成ペプチド)	43
TGGGGSGGGGTGEKP (リンカー)	133
AAARA (リンカー)	158

ヌクレオチド配列

GATCNGCG ¹	29
GAGGAAGTTT GCCACCAGTG GCAACCTGGT GAGGCATACC	
AAAATC	31
GTAAAACGAC GGCCAGTGCC AAGC	32
GGCCGCNNNA TCGAGTTTTC TCGANNNGC	
GGCC ²	33
GATCNGCG ¹	34
GCGTGGGCG	46
GATTGGGCG	47
CNNCNCNNC NNCNNCNCN NCNNCNCNN	
CNNCNC ³	49
CNNCNCNNC NNCNNCNC ⁴	50
GNNGNNGNNG NNGNNGNNGN NGNNGNNGNN	
GNNGNN ⁵	51
ANNANNANNA NNANNANNAN NANNANNANN	
ANNANN ⁶	52
TNNTNNTNNT NNTNNTNNTN NTNNTNNTNN	
TNNTNN ⁷	53
GGCTGCTTGA GGAAGTATAA AATGAAGTTG	
GAAG	55
CTTTATGTTT TTGGCGTCTT CCA	56
CGGGGGGCTC CCCTGGTT	83
GTCAAGGCAA GGCTGGCC	84
AACCAGGGGAGCCCCCG	131
TTGGTCCCCTCGGGGGGC	132

10

20

核酸配列のフットプリント

30

¹ N は A、C、G 又は T の何れかである。

² 塩基 26 ~ 28 に相補的な塩基 7 ~ 9 ; 塩基 26 ~ 28 は A、C、G 又は T の何れかである。

³ CNNヌクレオチドモチーフ (式中、N は A、C、G 又は T である) の 2 ~ 12 回の反復を包含する。

⁴ GNNヌクレオチドモチーフ (式中、N は A、C、G 又は T である) の 2 ~ 6 回の反復を包含する。

⁵ ANNヌクレオチドモチーフ (式中、N は A、C、G 又は T である) の 2 ~ 12 回の反復を包含する。

⁶ TNNヌクレオチドモチーフ (式中、N は A、C、G 又は T である) の 2 ~ 12 回の反復を包含する。

40

⁷ TNNヌクレオチドモチーフ (式中、N は A、C、G 又は T である) の 2 ~ 12 回の反復を包含する。

【0222】

発明の利点

本発明は、核酸配列、特に DNA 配列に対して多岐にたって結合するタンパク質を提供する。これらの結合タンパク質は転写修飾因子と結合させることができ、そのため特定の遺伝子の特異的な方法でアップレギュレート又はダウンレギュレートさせるのに使用することができる。このため、これらの結合タンパク質は、癌、自己免疫疾患、代謝性疾患、発達障害及び遺伝子発現の調節異常に起因する他の疾患又は病態を処置する遺伝子療法又

50

はタンパク質療法に使用することができる。

【0223】

核酸配列への結合タンパク質、その結合タンパク質をコードする核酸配列、その核酸配列を組み込んだベクター及びそのベクターで形質転換又は形質導入した宿主細胞は、転写の調節異常又は異常な転写パターンが存在を特徴とする疾患又は病態を処置する医薬品の調製のための産業的適用可能性を有する。これらの結合タンパク質、核酸配列、ベクター及び宿主細胞は又、更なるジンクフィンガータンパク質を開発及び単離するためのタンパク質、核酸及び核酸配列の細胞をスクリーニングするための産業的適用可能性を有する。

【0224】

値の範囲に関しては、特に明確な記載がない限り、本発明はその範囲の上限及び下限の間の下限の10分の1単位までの全ての介在値を包含する。更に、本発明は、指定した範囲から特に除外されない限り、その範囲の上限及び下限の何れか又は両方を含むあらゆる他の指定した介在値及び範囲を包含する。

【0225】

特に記載のない限り、本明細書で使用した全ての技術的及び化学的用語の意味は、本発明が帰属する業界の当業者によって広く理解されているものとする。当業者は又、本明細書に記載のそれと類似又は等価のあらゆる方法及び材料が本発明を实践又は試験するのに使用することができることを理解する必要がある。

【0226】

本明細書で考察した刊行物及び特許は、本出願の出願日以前の開示内容のためにのみ提供される。本発明が先行特許のためにこのような刊行物に先立つ権利が与えられないことに対する許可として解釈されるものは本明細書には何一つない。更に、記載の出版日は実際の出版日と異なることがあり、それらは独自に確認する必要がある。

【0227】

引用した刊行物は全て、公開された全ての特許、特許出願、参照文献、並びにこれらの出版文書で援用される刊行物を含め、全体が参考として本明細書で援用される。但し、参考として本明細書で援用された何らかの刊行物で、公開する情報について言及する限り、本出願者等は、本出願の出願日後に公開された何れの当該情報も従来技術であることを認めない。

【0228】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される単数形は、複数形を包含する。例えば、「a」、「an」及び「the」という冠詞は、特に明確な記載がない限り、複数の指示物を包含する。更に、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、その一連の要素全てを指すものとして理解されなければならない。本明細書で例示的に記載された本発明は、本明細書に特に開示されていない何れかの要素、限度がなくても好適に実施することができる。このため、例えば、「含む」「含めた」「含有する」等の用語は、広範に制限なく解釈されるものとする。更に、本明細書で使用する用語及び表現は、制限のためではなく例示のために使用されており、このような用語及び表現を使用するのに、今後示され記載されるあらゆる等価物又はそのあらゆる部分を除外する意図は全くなく、種々の改変は権利請求する本発明の適用範囲内で可能であることが認識される。このため、本発明は望ましい実施例及び至適な特性により特異的に開示されているが、本明細書に開示する本発明の改変及び変更は当業者によって行われることができ、このような改変及び変更は本明細書に開示の本発明の適用範囲内に含まれるとみなされることが理解されるべきである。本発明を本明細書で広汎且つ包括的に説明してきた。その包括的開示内容の適用範囲内に含まれるより狭義の種類及び垂属的集合も、これらの発明の一部を形成する。削除された内容が特異的に本明細書にとどまるかどうかに関係なく、あらゆる内容をこの属から除去するという条件又は否定的限定付きで、これは各発明の包括的説明を含む。更に、発明の特性又は側面をマルクーシュ構造の用語で説明する場合、当業者は本発明もそれによりあらゆる個々のメンバー又はマルクーシュ構造のメンバーの亜群に関して記載されることを認識する必要がある。又、上記の説明は例示を目的とするものであって制限を目

10

20

30

40

50

的とするものでないことを理解する必要がある。上の記載をレビューする当業者にとっては多くの実施形態が明らかであるはずである。従って、本発明の適用範囲は上の記載を参照して決定されるのではなく、添付の特許請求の範囲、並びにこのような特許請求の範囲に権利が付与される等価物の全範囲によって決定されるべきである。当業者は、通常の実験のみを使用して、記載された本発明の特異的な実施形態との多くの等価物を認識することができ、確認することができるはずである。このような等価物も以下の特許請求の範囲によって網羅される。

【図面の簡単な説明】

【0229】

本発明は、明細書、添付の特許請求の範囲及び添付の図面を参照することによってより詳しく理解されるであろう。

【図1-1】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す：(1)5'-(CAA)-3'；(2)5'-(CAC)-3'；(3)5'-(CAG)-3'；(4)5'-(CAT)-3'；(5)5'-(CCA)-3'；(6)5'-(CCC)-3'；(7)5'-(CCG)-3'；(8)5'-(CCT)-3'；(9)5'-(CGA)-3'；(10)5'-(CGC)-3'；(11)5'-(CGG)-3'；(12)5'-(CGT)-3'；(13)5'-(CTA)-3'；(14)5'-(CTC)-3'；(15)5'-(CTG)-3'；(16)5'-(CTT)-3'。

【図1-2】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-3】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-4】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-5】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-6】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-7】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-8】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-9】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-10】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図1-11】図1は、1A及び1Bの2つの図で、ジंकフィンガーファージディスプレイライブラリー(A)及びC7タンパク質のマルチターゲット特異的ELISA(B)の構築を図式的に示す。

【図 1 - 1 2】図 1 は、1 A 及び 1 B の 2 つの図で、ジンクフィンガーファージディスプレイライブラリー (A) 及び C 7 タンパク質のマルチターゲット特異的 E L I S A (B) の構築を図式的に示す。

【図 1 - 1 3】図 1 は、1 A 及び 1 B の 2 つの図で、ジンクフィンガーファージディスプレイライブラリー (A) 及び C 7 タンパク質のマルチターゲット特異的 E L I S A (B) の構築を図式的に示す。

【図 1 - 1 4】図 1 は、1 A 及び 1 B の 2 つの図で、ジンクフィンガーファージディスプレイライブラリー (A) 及び C 7 タンパク質のマルチターゲット特異的 E L I S A (B) の構築を図式的に示す。

【図 1 - 1 5】図 1 は、1 A 及び 1 B の 2 つの図で、ジンクフィンガーファージディスプレイライブラリー (A) 及び C 7 タンパク質のマルチターゲット特異的 E L I S A (B) の構築を図式的に示す。

【図 1 - 1 6】図 1 は、1 A 及び 1 B の 2 つの図で、ジンクフィンガーファージディスプレイライブラリー (A) 及び C 7 タンパク質のマルチターゲット特異的 E L I S A (B) の構築を図式的に示す。

【図 1 - 1 7】図 1 は、1 A 及び 1 B の 2 つの図で、ジンクフィンガーファージディスプレイライブラリー (A) 及び C 7 タンパク質のマルチターゲット特異的 E L I S A (B) の構築を図式的に示す。

【図 2】図 2 は、選択クローンからのフィンガー 2 認識ヘリックスのアミノ酸配列を示す。

【図 3】図 3 は、選択されたドメイン及び下記の部位特異的変異から派生したドメインの DNA 結合特性を確認するためのマルチターゲット特異性検定を示すグラフである：(a) R A D - N - L A I (配列番号 5)；(b) S K K - H - L A E (配列番号 6 3)；(c) S V R - N - L R E (配列番号 6 4)；(d) R N D - T - L Q A (配列番号 6 2)；(e) Q L A - H - L K E (配列番号 1 1)；(f) H T G - H - L L E (配列番号 6 6)；(g) R S D - H - L T E (配列番号 1 4)；(h) S R R - T - C R A (配列番号 1 8)；(i) Q L R - H - L R E (配列番号 6 8)；(j) Q R H - S - L T E (配列番号 7 0)；(k) R N D - A - L T E (配列番号 7 1)；(l) Q S G - N - L T E (配列番号 2)；(m) S K K - A - L T E (配列番号 7 7)；(n) R A D - N - L T E (配列番号 7 2)；(o) T S G - N - L T E (配列番号 7 8)；(p) T S H - S - L T E (配列番号 8 0)；(q) R N D - T - L T E (配列番号 7 3)；(r) T K N - S - L T E (配列番号 8 1)；(s) Q S G - H - L T E (配列番号 7 5)；(t) R S D - K - L T E (配列番号 7 4)；(u) Q N S - T - L T E (配列番号 7 9)；(v) T T G - A - L T E (配列番号 8 2)。

【図 4】図 4 は、5' - C N N - 3' DNA 配列を認識するドメインを含有する 6 フィンガータンパク質 p E 2 S の D N a s e I の足跡を示す放射能写真である。

【図 5】図 5 は、内在性遺伝子の発現を調節する本発明に基づく人工転写因子の作用を試験するための、レトロウイルスを使用した遺伝子ターゲティングの結果を示すフローサイトメトリーで得られた一連のグラフである：細線は二次抗体単独での染色を、点線は m o c k 導入細胞の特異的な染色を、実線は転写因子 E 2 S - V P 6 4 (A) 又は E 2 S - K R A B (B) を発現する形質導入細胞の特異的な染色を示す。

【図 6】図 6 は、5' - シトシンの認識を示唆するフィンガー 2 ドメインのコンピュータモデルを示すグラフである。選択された酸素 (赤)、窒素 (青) 及びリン (紫) 原子をわかりやすく着色して示す。緑色の点線は、示唆される水素結合を示す。各ヘリックスの配列、DNA サブサイト及び考え得る相互作用を各モデルの下に要約する。緑色の線は、水素結合を示す。矢印は、水素受容体を示す。A : Z i f 2 6 8 のフィンガー 2 ; B : p C G G (図 3 g) ; C : p m C A G (図 3 n)。

10

20

30

40

【図 1 A】

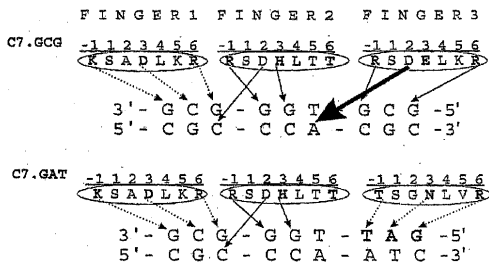
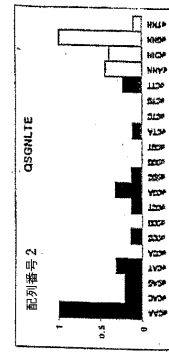


FIG. 1A

【図 1 - 2】



(1) CAA

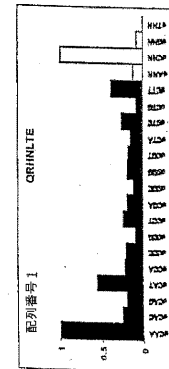


FIG. 1B

【図 1 - 3】

(2) CAC

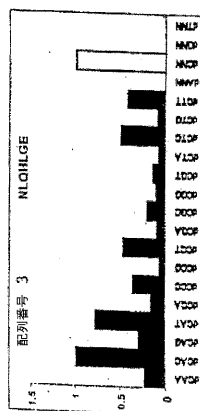


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 4】

(3) CAG

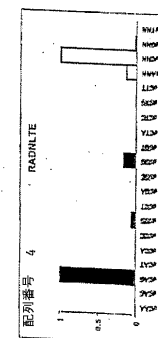
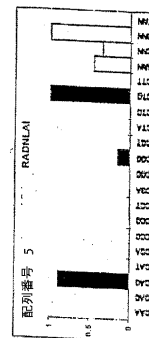


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 5】

(4) CAT

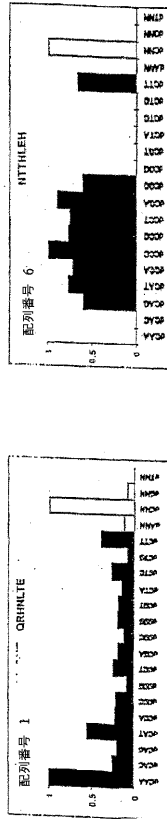


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 6】

(5) CCA

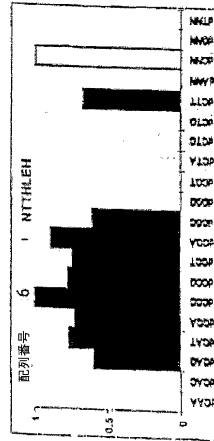


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 7】

(6) CCC

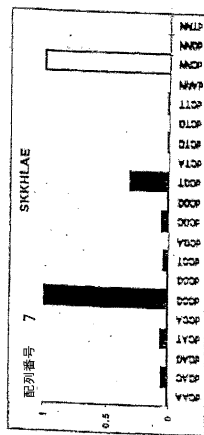


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 8】

(7) CCG

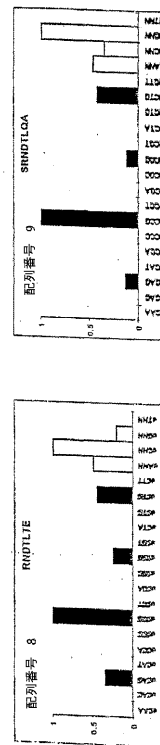


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 13】

(12) CGT

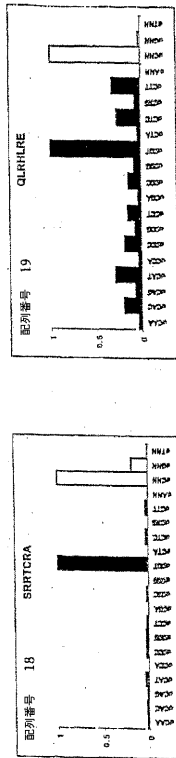


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 14】

(13) CTA

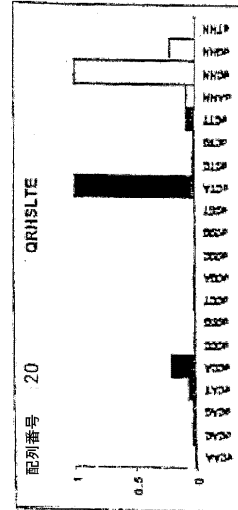


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 15】

(14) CTC

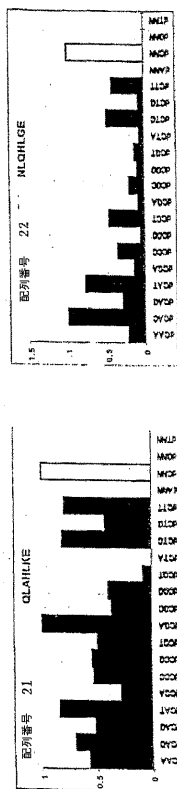


FIG. 1B, 続き

【図 1 - 16】

(15) CTG

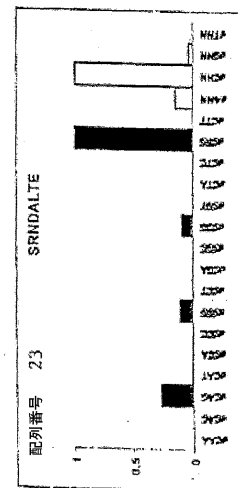


FIG. 1B, 続き

【 図 1 - 1 7 】

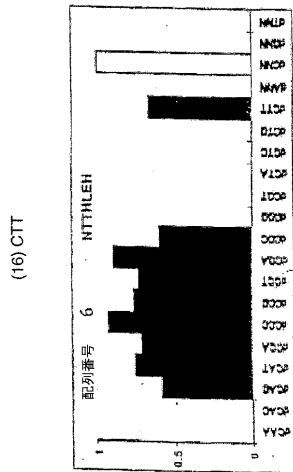
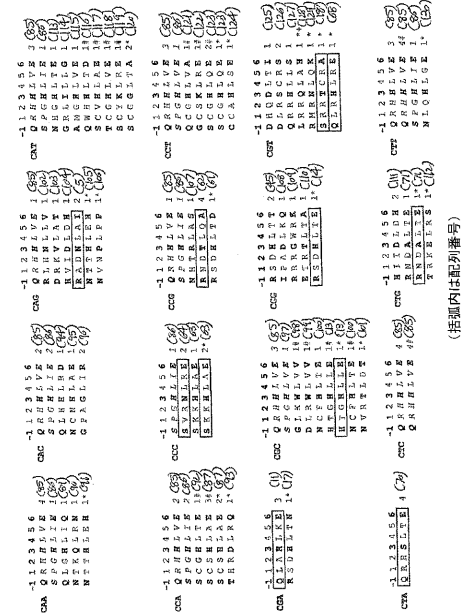


FIG. 1B, 続き

【 図 2 】



【 図 3 】

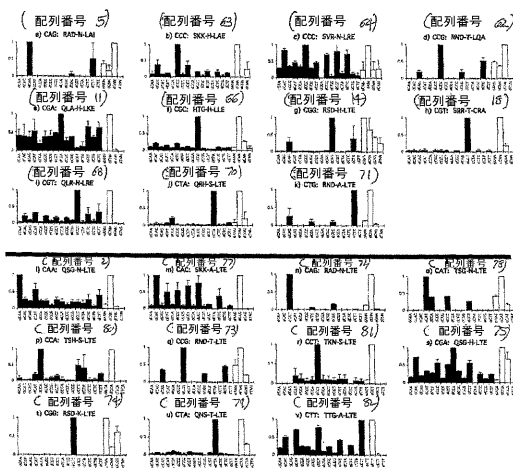
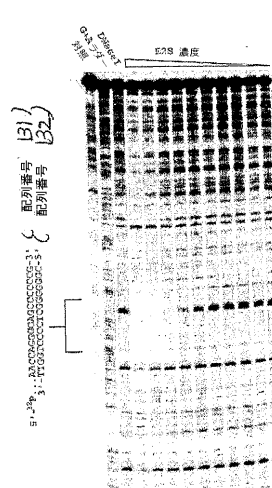


FIG. 3

【 図 4 】



【図 5】

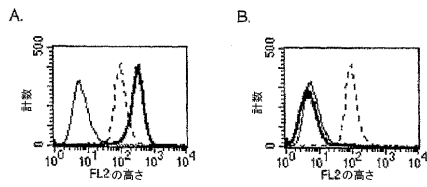


FIG. 5

【図 6】

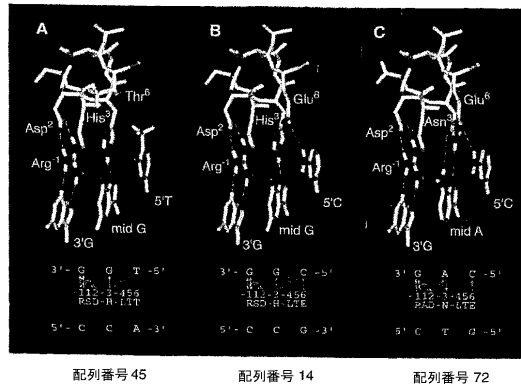


FIG. 6

【配列表】

2009504156000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/29075
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07K 14/00(2006.01) C07H 21/00(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		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/016496 (BARBAS et al.) 27 February 2003 (12.02.2003).	1, 3, 4, 6, 10, 12, 13, 21, 23, 24, and 28-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 August 2007 (06.08.2007)		Date of mailing of the international search report 13 SEP 2007
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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/29075

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 3, 4, 6, 10, 12, 13, 21, 23, 24, and 28-30 as drawn to SEQ ID NO: 1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/29075

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.

Groups 1-134, claim(s) 1-4, 6-33, drawn to polypeptide comprising SEQ ID NO: 1-28, 35-45, 48, 54, 57-82, 85-130, 134-157, respectively.

Groups 135-268, claim(s) 1, 5, drawn to antagonist of to polypeptide comprising SEQ ID NO: 1-28, 35-45, 48, 54, 57-82, 85-130, 134-157, respectively.

Groups 269-402, claim(s) 34-60, drawn to polynucleotide encoding to polypeptide comprising SEQ ID NO: 1-28, 35-45, 48, 54, 57-82, 85-130, 134-157, respectively.

Groups 403-536, claim(s) 61-76, drawn to process of regulating gene expression via to polypeptide comprising SEQ ID NO: 1-28, 35-45, 48, 54, 57-82, 85-130, 134-157, respectively.

Groups 537-670, claim(s) 77-79, drawn to pharmaceutical compositions/intended use of method of treatment, to polypeptide comprising SEQ ID NO: 1-28, 35-45, 48, 54, 57-82, 85-130, 134-157, respectively.

Group 671- 804, claim(s) 80-82, drawn to pharmaceutical compositions/intended use of gene therapy, to polynucleotides encoding polypeptide comprising SEQ ID NO: 1-28, 35-45, 48, 54, 57-82, 85-130, 134-157, respectively.

The inventions listed as Groups 1-804 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 polypeptides do not share a special technical feature because their sequences are different. For example, in the Table 1 at page 47, SEQ ID NO: 1 is QRHNLTE and NO: 2 is QSGNLTE, and both bind to target CAA; while SEQ ID NO: 3 is NLQHLGE and binds CAC. Thus, the polypeptides do not share a special technical feature and lack unity of invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US06/29075

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	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
			A 6 1 P 43/00 1 0 5

(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, 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, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, 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 9 2 0 7 5 , ソラナ ビーチ , パシフィック サーフ ド
ライブ 7 5 5

(72)発明者 ドライア , ビルギット
スイス国 ツェーハー - 8 1 0 6 レゲンスドルフ イクスイクス , ローヴィーゼンシュトラ
セ 1 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA80 CA02 CA07 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04
FA01 GA11 HA03
4B065 AA01X AA57X AA57Y AA87X AA87Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
CA60
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA17 CA18 CA53 CA56 DC50
NA14 ZB212
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA14 BA41 CA15 CA40 EA20 EA60
FA74 GA21