

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 19 年 11 月 22 日 (2007.11.22)

【公表番号】特表 2003-512827 (P2003-512827A)

【公表日】平成 15 年 4 月 8 日 (2003.4.8)

【出願番号】特願 2001-533840 (P2001-533840)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 14/72 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 1 1 1

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 14/72

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 5/00 A

A 6 1 K 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 10 月 2 日 (2007.10.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】細胞内受容体由来のリガンド結合ドメインと実施可能に連結したヌクレオチド結合ドメインを含む融合タンパク質であって、

該ヌクレオチド結合ドメインが、少なくとも約 3 ヌクレオチドの隣接するヌクレオチド配列と特異的に相互作用する多趾動物亜鉛フィンガーペプチドまたはそのモジュラー部分であり；かつ

該融合タンパク質が、リガンドで活性化される転写レギュレーターである、

融合タンパク質。

【請求項 2】 実施可能に連結した転写制御ドメインをさらに含む、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 3】 該細胞内受容体が核ホルモン受容体である、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 4】 核ホルモン受容体由来の該リガンド結合ドメインが、自然のホルモン受容体と比較してそのリガンド選択性が変化するように改変された、請求項 3 の融合タンパク質。

【請求項 5】 該改変されたリガンド結合ドメインが、内在性のリガンドによって実質的に活性化されない、請求項 4 の融合タンパク質。

【請求項 6】 亜鉛フィンガーペプチドが、式 $(GNN)_n$ 、ただし G はグアニジン、N は任意のヌクレオチド、そして n は 1 ないし 6 の整数である、のヌクレオチド配列に結合する、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 7】 n が 3 ないし 6 である、請求項 6 の融合タンパク質。

【請求項 8】 ヌクレオチド配列と特異的に相互作用し、そして該ヌクレオチド配列を含む外因性または内在性の遺伝子に該融合タンパク質を標的化させる、C₂H₂ 亜鉛フィンガーペプチドまたはその変異体由来のモジュラーユニットを、該亜鉛フィンガーペプチドが含む、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 9】 該亜鉛フィンガーペプチドが、標的核酸分子に特異的に結合する少なくとも 1 つの亜鉛フィンガーまたはその変異体を含む、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 10】 少なくとも 3 つの亜鉛フィンガーまたはその変異体を含む、請求項 9 の融合タンパク質。

【請求項 11】 該細胞内受容体が、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド - 受容体、グルココルチコイド - 受容体、ミネラルコルチコイド受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、レチノイン酸受容体、レチノイド X 受容体、ビタミン D 受容体、C/EBP - β 受容体、エクジソン受容体、Nurr - 1 受容体およびオーファン受容体からなる群から選択される核ホルモン受容体である、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 12】 該細胞内受容体がステロイド受容体である、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 13】 該ホルモン受容体が、プロゲステロン受容体変異体またはエストロゲン受容体変異体であって、受容体変異体が、その自然のリガンドと異なる内在性および外因性のリガンドへの選択性と感受性を有するリガンド結合ドメインを含む、請求項 4 の融合タンパク質。

【請求項 14】 該転写制御ドメインが転写活性化ドメインを含む、請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 15】 該転写制御ドメインが、VP16、VP64、TA2、STAT - 6、p65 ならびにそれらの転写活性化活性を有する誘導体類、多量体および組合せからなる群から選択される、請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 16】 該転写制御ドメインが、核ホルモン受容体転写活性化ドメインまたはその転写活性化活性を有する変異体を含む、請求項 14 の融合タンパク質。

【請求項 17】 該転写制御ドメインが、ステロイドホルモン受容体転写活性化ドメインまたはその変異体を含む、請求項 14 の融合タンパク質。

【請求項 18】 該転写制御ドメインが、ウイルスの転写活性化ドメインまたはその転写活性化活性を有する変異体を含む、請求項 14 の融合タンパク質。

【請求項 19】 該転写制御ドメインが、VP16 の転写活性化ドメインまたはその変異体を含む、請求項 18 の融合タンパク質。

【請求項 20】 該転写制御ドメインが転写抑制ドメインを含む、請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 21】 該転写制御ドメインが、ERD、KRAB、SID、デアセチラー

ぜ、ならびにそれらの誘導体類、多量体および組合せ、例えば K R A B - E R D、S I D - E R D、(K R A B)₂、(K R A B)₃、K R A B - A、(K R A B - A)₂、(S I D)₂、(K R A B - A) - S I D および S I D - (K R A B - A)、からなる群から選択される、請求項 20 の融合タンパク質。

【請求項 22】 配列番号 1 ないし配列番号 18 のいずれかに示すヌクレオチド配列にコードされる、請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 23】 請求項 1 の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項 24】 請求項 2 の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項 25】 該融合タンパク質が、配列番号 1 ないし配列番号 18 のいずれかに示すヌクレオチド配列にコードされる、請求項 23 の核酸分子。

【請求項 26】 請求項 1 の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 27】 請求項 2 の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 28】 請求項 26 の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 29】 請求項 27 の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 30】 真核生物細胞である、請求項 28 の細胞。

【請求項 31】 真核生物細胞である、請求項 29 の細胞。

【請求項 32】 ウイルスベクターである、請求項 26 のベクター。

【請求項 33】 ウイルスベクターである、請求項 27 のベクター。

【請求項 34】 該ウイルスベクターが D N A ウイルスまたはレトロウイルスに由来する、請求項 32 のベクター。

【請求項 35】 アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 34 のベクター。

【請求項 36】 ウイルスベクターである、請求項 33 のベクター。

【請求項 37】 該ウイルスベクターが D N A ウイルスまたはレトロウイルスに由来する、請求項 36 のベクター。

【請求項 38】 アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 37 のベクター。

【請求項 39】 請求項 1 の融合タンパク質または該融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子；および

該融合タンパク質の核酸結合ドメインに認識される少なくとも 1 つの応答エレメントを含む、制御可能な発現カセットを含む組合せ。

【請求項 40】 該カセットが治療的産物をコードする遺伝子を含む、請求項 39 の組合せ。

【請求項 41】 医薬的に許容し得る賦形剤の中に、該融合タンパク質または該融合タンパク質をコードする核酸分子および制御可能な発現カセットを含有する単一の組成物を形成する、請求項 39 の組合せ。

【請求項 42】 該融合タンパク質または該融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、および制御可能な発現カセットが別個の組成物の中にある、請求項 39 の組合せ。

【請求項 43】 有効量の請求項 1 の融合タンパク質または該融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子；および

医薬的に許容し得る賦形剤を含む、遺伝子発現を制御するための組成物。

【請求項 4 4】 単回投与用に製剤された、請求項 4 3 の組成物。

【請求項 4 5】 有効量の請求項 2 の融合タンパク質；および
医薬的に許容し得る賦形剤
を含む、遺伝子発現を制御するための組成物。

【請求項 4 6】 該制御可能な発現カセットが 3 個ないし 6 つの応答エレメントを含む、請求項 3 9 の組合せ。

【請求項 4 7】 請求項 1 の融合タンパク質または該融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を細胞に導入すること；および

該融合タンパク質中の結合ドメインと相互作用するリガンドに細胞を接触させ、該融合タンパク質が標的核酸分子と相互作用して、コードされる遺伝子の転写を該融合タンパク質によって活性化または抑制すること
を含む、細胞内で遺伝子発現を制御する方法。

【請求項 4 8】 該リガンド結合ドメインが非天然リガンドと相互作用するように改変された、請求項 4 7 の方法。

【請求項 4 9】 該標的核酸分子が、細胞にとって内在性である、請求項 4 7 の方法。

【請求項 5 0】 該標的核酸分子が、発現カセットの部分として細胞に導入される、請求項 4 7 の方法。

【請求項 5 1】 該発現カセットおよび融合タンパク質または該融合タンパク質をコードする核酸が、同時に導入される、請求項 4 7 の方法。

【請求項 5 2】 該発現カセットおよび融合タンパク質または該融合タンパク質をコードする核酸が、逐次的に導入される、請求項 4 7 の方法。

【請求項 5 3】 該融合タンパク質または該融合タンパク質をコードする核酸分子が細胞に導入された後に、リガンドが細胞に送達される、請求項 4 7 の方法。

【請求項 5 4】 該融合タンパク質をコードする該核酸分子が、ベクターを構成する、請求項 4 7 の方法。

【請求項 5 5】 該ベクターがウイルスベクターである、請求項 5 4 の方法。

【請求項 5 6】 該細胞が哺乳動物内にある、請求項 4 7 の方法。

【請求項 5 7】 該発現カセットがベクターに含有される、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 8】 該ベクターがウイルスベクターである、請求項 5 7 の方法。

【請求項 5 9】 該細胞が哺乳動物内にある、請求項 5 0 の方法。

【請求項 6 0】 核ホルモン受容体由来の該リガンド結合ドメインが、自然のホルモン受容体と比較してそのリガンド選択性が変化するように改変されたものである、請求項 4 7 の方法。

【請求項 6 1】 該改変されたリガンド結合ドメインが、内在性のリガンドによって実質的に活性化されない、請求項 6 0 の方法。

【請求項 6 2】 亜鉛フィンガーペプチドが、式 $(GNN)_n$ 、ただし G はグアニジン、N は任意のヌクレオチド、そして n は 1 ないし 6 の整数である、のヌクレオチド配列に結合する、請求項 4 7 の方法。

【請求項 6 3】 n が 3 ないし 6 である、請求項 6 2 の方法。

【請求項 6 4】 ヌクレオチド配列と特異的に相互作用し、そして該ヌクレオチド配列を含む外因性または内在性の遺伝子に該融合タンパク質を標的化させる、C₂H₂ 亜鉛フィンガーペプチドまたはその変異体由来のモジュラーユニットを、該亜鉛フィンガーペプチドを含む、請求項 4 7 の方法。

【請求項 6 5】 該亜鉛フィンガーペプチドが、標的核酸分子に特異的に結合する少なくとも 1 つの亜鉛フィンガーまたはその変異体を含む、請求項 4 7 の方法。

【請求項 6 6】 少なくとも 3 つの亜鉛フィンガーまたはその変異体を含む、請求項 6 5 の方法。

【請求項 6 7】 該細胞内受容体が、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド - 受容体、グルココルチコイド - 受容体、ミネラルコルチコイド

受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、レチノイン酸受容体、レチノイド X 受容体、ビタミン D 受容体、C O U P - T F 受容体、エクジソン受容体、N u r r - I 受容体およびオーファン受容体からなる群から選択される核ホルモン受容体である、請求項 47 の方法。

【請求項 68】 該細胞内受容体がステロイド受容体である、請求項 47 の方法。

【請求項 69】 該多趾動物亜鉛フィンガーペプチドまたはそのモジュラー部分が、少なくとも約 3ヌクレオチドないし約 18ヌクレオチドの隣接するヌクレオチド配列と特異的に相互作用する、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 70】 請求項 1 の融合タンパク質または該融合タンパク質をコードする核酸分子を含む、非ウイルスの送達システム。

【請求項 71】 発現カセットを含む核酸分子をさらに含み、該発現カセットは、該融合タンパク質の核酸結合ドメインが相互作用するヌクレオチド配列を含有するものである、請求項 70 の非ウイルスの送達システム。

【請求項 72】 該非ウイルスの送達システムが、DNA - リガンド複合体、アデノウイルス - リガンド - DNA 複合体、DNA の直接注入、CaPO₄ 沈殿、遺伝子銃技術、エレクトロポレーション、リポソーム法およびリポフェクションからなる群から選択される、請求項 70 の非ウイルスの送達システム。

【請求項 73】 該亜鉛フィンガーペプチドが、標的核酸分子と約 1.0 ナノモルより小さい解離定数で特異的に結合する少なくとも 1 つの亜鉛フィンガーまたはその変異体を含む、請求項 9 の融合タンパク質。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

発明の背景

細胞内受容体は、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモンおよびビタミン A および D を含むさまざまなホルモンおよびエフェクター分子の核への作用を介在する関連タンパク質のスーパーファミリーである。細胞内受容体の本ファミリーのメンバーは、基本型のリガンド活性化転写因子である。これらの受容体は、2 つの基本的な機能のドメイン：約 66 アミノ酸を含む DNA 結合ドメイン (D B D) および約 300 アミノ酸を有する受容体の C 末端側の半分に位置するリガンド結合ドメイン (L B D) を含む。受容体は、熱ショックタンパク質のような不活性化因子と関連しているため、ホルモン (リガンド) の不存在下では不活性である。リガンドが結合すると、受容体は不活性複合体から解離してダイマー化し、このことによりそれらは DNA と結合できるようになり、転写を調節できる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

リガンド結合ドメイン (L B D)

L B D は細胞内受容体、特にステロイドホルモン受容体由来のものである。L B D の由来となる受容体は、グルココルチコイド受容体、ミネラルコルチコイド受容体、甲状腺ホルモン受容体、レチノイン酸受容体、レチノイド X 受容体、ビタミン D 受容体、C O U P - T F 受容体、エクジソン受容体、N u r r - I 受容体、オーファン受容体およびその変異体を含むが、これらに限定されない。これらの種類の受容体は、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド - 受容体、グルココルチコイド - 受容体、アンドロゲン受容体および甲状腺ホルモン受容体を含むが、これらに限定されない。L

B D は、好ましくは、内在性のリガンドと比較して外因性のリガンド、例えば薬物と優先的に結合するようにリガンド選択性を改変するように修飾される。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

核酸結合ドメイン(D B D)は、少なくとも1、好ましくは少なくとも2亜鉛フィンガー核酸結合ポリペプチドのモジュラーユニットを含み、各モジュラーユニットは3塩基のヌクレオチド配列を特異的に認識する。得られるD B Dは、3～約18ヌクレオチドの隣接するヌクレオチド配列に結合する。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

組成物、組合せおよびキット

融合タンパク質または融合タンパク質をコードするベクターを含む組成物も提供される。融合タンパク質または該タンパク質をコードしている核酸および融合タンパク質による活性化のために選択された制御領域を有する標的遺伝子をコードする核酸の組合せも提供される。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

既に述べたように、標的制御領域および目的の遺伝子は、細胞中に内在的に存在し得、または目的の遺伝子をコードしている発現カセットの一部として別々に投与され得る。別々に投与される場合、それは遺伝子および融合タンパク質のヌクレオチド結合ドメインにより認識される遺伝子に関する少なくとも1つの応答エレメントを含む制御可能な発現カセットの一部として投与される。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

ここで使用されるように、“宿主細胞”は、ベクターを増加させ、そしてそのDNAを発現させることのできる細胞である。対象の宿主細胞の後代も含む。すべての後代が親細胞と同一であるとはいえず、なぜなら、複製中に発生する突然変異があり得るからである。用語“宿主細胞”が使用されるとき、そのような後代が含まれる。安定的導入の方法であって、ここで、外因性DNAが宿主に継続的に維持される方法は、当業界で既知である。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0110

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0110】

ここで使用されるように、リガンドは、受容体のリガンド結合ドメインと相互作用し、その活性を調節する任意の化合物を意味する；リガンドは典型的に受容体を活性化する。リガンドは、結合なく受容体を活性化する化合物も含むことができる。天然のリガンドは、その受容体と通常は相互作用する化合物である。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0119

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0119】

ここで、融合タンパク質は、標的遺伝子に結合するように選択された、細胞内受容体から1以上の亜鉛フィンガードメインへ、LBDドメインを実施可能なように連結することにより作成する。転写調節ドメインはまた、実施可能なように連結し得る。これは、当業者に既知の任意の方法により行われる。一般的に融合タンパク質は、融合タンパク質をコードする核酸を発現することにより産生される。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0135

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0135】

亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ポリペプチド変異体は既知モチーフから構成され得る。当該変異体は、DNA、RNAまたはその両方のような細胞性ヌクレオチド配列に結合および特異的に結合し、細胞性ヌクレオチド配列の機能を調節する、少なくとも2つおよび好ましくは少なくとも約4つの亜鉛フィンガーマジュールを含む。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0169

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0169】

第二のリプレッサータンパク質は、Krueppel-associated box(KRAB)ドメインを用い産生された(Margolin et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4509-4513)。このリプレッサードメインは、亜鉛フィンガータンパク質のN末端で通常発見され、RINGフィンガータンパク質KAP-1(Friedman et al. (1996) Genes & Dev. 10: 2067-2078)との相互作用により、距離および方向独立性方法(Pengue et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1015-1020)でTATA依存転写の抑制活性があると推定される。亜鉛フィンガータンパク質KOX1のアミノ酸1から97の間に見られるKRABドメイン(Margolin et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4509-4513)を用いた。この場合、6フィンガータンパク質とのN末端融合が構成された。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0207

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0207】

4. 医薬組成物および組合せ

医薬的に許容される担体において、治療的に有効量の融合タンパク質または融合タンパ

ク質をコードする核酸分子が含まれる医薬組成物もまた提供される。別の亜鉛フィンガーヌクレオチド結合ドメインを有する 1 以上の融合タンパク質を含む医薬組成物を意図する。発現カセットを含む医薬組成物および当該リガンドを含む組成物もまた提供する。多数の組成物を含む組合せもまた提供する。