

【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18年10月19日(2006.10.19)

【公表番号】特表2006-502748(P2006-502748A)

【公表日】平成18年1月26日(2006.1.26)

【年通号数】公開・登録公報2006-004

【出願番号】特願2005-501601(P2005-501601)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 31/711 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/18 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 7/00

A 6 1 P 7/04

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 31/18

A 6 1 P 37/04

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

C 1 2 N 5/00 B

【手続補正書】

【提出日】平成18年8月31日(2006.8.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項11

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項11】

上記ウィルスベクターは、アデノ関連ウィルス(AAV)ベクターである請求項9のベクター。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項38

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 3 8】

それが必要な個体中の、遺伝子ターゲット配列により一部又は全部で引き起こされた病気の改善、治療及び予防用医薬品の製造に使用される請求項 7 のベクター。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 3 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 3 9】

上記個体はヒトである請求項 3 8 のベクター。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 0】

上記病気は重症複合型免疫不全（S C I D）、鎌状赤血球症、及び血友病の群から選ばれる請求項 3 8 のベクター。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 1】

上記病気は感染症であり、遺伝子ターゲット配列は感染症に対する個体の罹患性に影響する請求項 3 8 のベクター。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 2】

上記感染症は H I V 感染であり、遺伝子ターゲット配列は H I V による細胞侵入に關与する細胞表面蛋白質のための遺伝子の少なくとも一部であり、ターゲット配列を変更して H I V による細胞侵入を阻止する請求項 4 1 のベクター。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 3】

上記細胞は T 細胞又は T 前駆細胞である請求項 4 2 のベクター。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 3】

【図 1 A】図 1 A ~ 1 D は、全て緑色蛍光蛋白質（G F P）遺伝子ターゲットイングシス

テムを示す。図 1 A は、G F P 遺伝子ターゲッティングシステムを示す。人工遺伝子ターゲット (A 6 5 8) は、コード配列の塩基対 3 2 7 での、停止コドン及び I - S c e I エンドヌクレアーゼ (S c e) の認識部位 (5' T A G G G G A T A A C A G G G T A A T 3') を含有する 3 5 塩基対挿入により突然変異された G F P 遺伝子から構成される。G F P 遺伝子は、ハイブリッドサイトメガロウィルスエンハンサー/ニワトリ 3 - アクチンプロモーター (「C M V / C B A」又は「C B A」) により作動される。G F P 遺伝子は、内部のリボソームの侵入部位 (I R E S) がヒト C D 8 遺伝子 (C D 8) の翻訳を可能とする bicistronic 転写の一部である。bicistronic メッセージは、メッセンジャー R N A レベルを増加させるウッドチャック転写後調節要素 (W P R E) を含有した (Z u f f e r e y ら、1999、J V i r o l、73:2886-92)。最後に、上記座は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (N E O) を作動させて抗生物質 G 4 1 8 による選択を可能とするホスホグリセレートキナーゼプロモーター (P G K) を有する遺伝子を含有した。修復基質 R S 2 1 0 0 及び R S 2 7 0 0 も又表現された。それらはコード配列の塩基対 3 7 で短縮された G F P 遺伝子から構成され、従って開始コドン (t r u n c G F P) を有さない。短縮された G F P 遺伝子の次に、A 6 5 8 内のように R S 2 1 0 0 用の I R E S - C D 8 又は R S 2 7 0 0 用の I R E S - C D 8 - W P R E が連続した。2 × 10⁶ 細胞を 10 µg のスーパーコイル A 6 5 8 プラスミド DNA で電気穿孔して、A 6 5 8 遺伝子ターゲットを 293 細胞中に導入した。細胞を 500 µg / ml G 4 1 8 中 2 週間で選択操作を行なった。個体コロニーを採集し、フィコエリトリン結合抗 - C D 8 抗体 (B D B i o s c i e n c e s 社製、S a n J o s e、C A) で染色して高い表面 C D 8 発現を示したものを特定してモノクローンセルラインを作成した (293 細胞、通常 C D 8 を発現しない)。ポリクローンセルラインを「M i l t e n y i 抗 - C D 8 マイクロビーズ」商標及び「M A C S ミニカラム」商標 (M i l t e n y i B i o t e c 社製、A u b u r n、C A) を使用して細胞集団を精製して製造した。293 / A 6 5 8 細胞を S c e 発現プラスミドと共に又はそれ無しの R S 2 1 0 0 で、調節プラスミド (p O N 4 0 5) と共にトランスフェクトしてトランスフェクション効率を決定し、遺伝子ターゲッティングを測定した。S c e 発現の作動のために下記 3 種の異なるプロモーターを使用した: P G K、サイトメガロウィルス (C M V) 及び C B A。細胞を次に 3 日間培養し、G F P ポジティブ細胞の割合を F A C S c a n (B D B i o s c i e n c e s 社製、S a n J o s e、C A) を使用してフロー血球計算法により測定した。遺伝子ターゲッティング確率を、G F P ポジティブ細胞のトランスフェクション効率に対する測定された割合を標準化して決定した。

【図 1 B】遺伝子ターゲッティングの代表的フロー血球計算法プロットを示す。G F P ポジティブ細胞は左のフロープロットに示された領域「R 2」中で定量化された。それは、S c e 発現プラスミド単独でトランスフェクション後の 293 / A 6 5 8 細胞を示す。G F P ポジティブ細胞は存在しなかった。真ん中のプロット「S - G T」は、R S 2 1 0 0 単独でトランスフェクション後の 293 / A 6 5 8 細胞を示す。2 つの G F P ポジティブ細胞が丸くなり自発的遺伝子ターゲッティング減少を示した。右のプロット「D S B - G T」は R S 2 1 0 0 及び C B A - S c e で共トランスフェクション後の 293 / A 6 5 8 細胞を示す。このプロット中、領域 R 2 中に多量の G F P ポジティブ細胞があった。

【図 1 C】293 細胞中の遺伝子ターゲッティング確率を示す。結果はトランスフェクトされた細胞百万当たりの両方の遺伝子ターゲッティング事象の数 (「事象 / 10⁶ 細胞」) ± 1 標準偏差として、及び全体の確率として示される。結果を 4 種の異なる遺伝子ターゲットとして示す。「1 b p 突然変異」ターゲット中、ナンセンス突然変異が機能性 G F P 発現を排除するコード領域の b p 3 2 1 位で G F P 遺伝子中に生成した。「7 b p 挿入」ターゲット用に、7 b p 配列が G F P コード領域の b p 3 2 7 位に挿入された。「3 5 b p 挿入」用遺伝子ターゲットは A 6 5 8 であり、「6 6 b p 挿入」用ターゲットは Q Q R 8 であった (図 3 A に図解する)。「S c e」と表示した列は、S c e が共トランスフェクトされたかされないかを示す。「S c e 誘起した D S B による F o l d 誘発」と表示した行は、S c e の発現により誘起したターゲット A 6 5 8 上の遺伝子ターゲッティング

確率の誘発である。

【図 1 D】遺伝子ターゲッティングの時間的経過を示す。D S B - G T の相対速度は第 3 日に標準化した。

【図 2 A】図 2 A ~ 2 E は、D S B 誘起した遺伝子ターゲッティングの確率を調節する変数因子を示す。実験中、トランスフェクションは 24 ウェルプレート中でリン酸カルシウム技術で行われた。図 2 A ~ 2 D 中、遺伝子ターゲッティングの確率は、200 ng の R S 2 1 0 0 及び 200 ng の P G K - S c e を使用した標準条件に標準化された。トランスフェクトされた構成要素の量を変化させた実験中、合計 DNA 量は p B S K (-) プラスミド (S t r a t g e n e 社製、L a J o l l a、C A) を添加して一定に維持した。

図 2 A は遺伝子ターゲッティング確率に対する基質量を示す。結果は、200 ナノグラム (ng) の R S 2 1 0 0 をトランスフェクトした後に得られた遺伝子ターゲッティングの確率に標準化された。

【図 2 B】遺伝子ターゲッティング確率に対する相同長さを示す。結果はプラスミド R S 2 1 0 0 で得られた確率に標準化された。800 bp の相同性 (R S 8 0 0) を有するプラスミドは R S 2 1 0 0 の I R E S - C D 8 構成要素を失った。2700 bp の相同性 (R S 2 7 0 0) を有するプラスミドは、図 1 A に示される。4200 bp の相同性 (R S 4 2 0 0) を有するプラスミドは、R S 2 1 0 0 の 3' 末端への W P R E 及び P G K - N E O 構成要素の両方の添加を有した。一定量 (200 ng) のそれぞれの修復基質がトランスフェクトされたが、D S B - G T の相対速度がトランスフェクトされたモル量に標準化された。

【図 2 C】遺伝子ターゲッティング確率に対するトランスフェクトされた S c e 発現プラスミドの量を示す。結果は、200 ng の P G K - S c e がトランスフェクトされた時に得られた遺伝子ターゲッティングの確率に標準化された。

【図 2 D】遺伝子ターゲッティング確率に対する修復基質の転写状態を示す。「非転写」とは、R S 2 1 0 0 を使用した D S B - G T の割合である。「転写」とは、R S 2 1 0 0 のセンスストランドが C M V プロモーター (C M V - R S 2 1 0 0) を使用して転写された時の D S B - G T の割合である。割合は R S 2 1 0 0 を使用して得られた遺伝子ターゲッティングの確率に標準化された。

【図 2 E】遺伝子ターゲッティングの最適化を示す。「1」と表示した行は、S c e 及び R S 2 1 0 0 が同一プラスミド上の場合であり「2」と表示した行は、S c e 及び R S 2 1 0 0 が分離されたプラスミド上の場合である。トランスフェクトされた細胞百万当たり 30000 G F P ポジティブ細胞は、遺伝子ターゲッティング確率の 3% に相当する。

【図 3 A】図 3 A ~ 3 D は、キメラヌクレアーゼ誘起された遺伝子ターゲッティングを示す。それぞれの実験中、遺伝子ターゲッティングの確率を適切なヌクレアーゼ及び修復基質 R S 2 7 0 0 で共トランスフェクトして測定した (図 1 A)。図 3 A はキメラヌクレアーゼ及びキメラヌクレアーゼターゲットの概略図を示す。遺伝子ターゲットは、挿入部位を延長する追加的配列が S c e 認識部位 (S c e 部位) の近傍の G F P 遺伝子中に挿入された以外は A 6 5 8 と同じである。Q Q R 8 及び Q Q R 6 中に、Q Q R ジンクフィンガートリプレット (5' G G G G A A G A A 3') 用の結合部位 (Q Q R 部位) の逆方向反復を、6 bp スペース「6」(Q Q R 6) 又は 8 bp スペース「8」(Q Q R 8) のいずれかと共に挿入した。Q Q R Z I F 6 中で、Z i f 2 6 8 トリプレットフィンガー (Z i f 部位) (5' G C G T G G T C G 3') 用の結合部位を、部位間に 6 bp スペース (6) を有する Q Q R 部位に対し逆転配置で挿入した。ポリクロナル 293 セルラインを Q Q R 8、Q Q R 6、及び Q Q R Z I F 6 から図 1 に示されるように作成した。キメラヌクレアーゼを C M V プロモーター C M V により作動した。それぞれは標準開始コドン「A T G」を有しその後ろに核局在化シグナル「N」がアミノ末端に続いた。トリプレットジンクフィンガードメイン、Q Q R ジンクフィンガートリプレット用のいずれかの「Q Q R」(S h i ら、1995、S c i e n c e、268:282-284) 又は、Z i f 2 6 8 トリプレット用の「Z i f」(W o l f e ら、2001、S t r u c t u r e (C a m b)、9:717-23) は核局在化シグナルの次に続いた。次に変数因子アミノ酸

リンカー、18アミノ酸(L18)がCMV-QQR-L18-Fn中に、ゼロアミノ酸(L0)がCMV-QQR-L0-Fn中に、又は3アミノ酸(L3)がCMV-ZIF-L3-Fn中に、FokI制限酵素(「ヌクレアーゼ」又は「Fn」)のエンドヌクレアーゼドメイン前に存在する(Chandrasegaranら、1999、Biochem、380:841-8)。CMV-ZIF-L3-Fnが新規な一方、CMV-QQR-L18-Fn及びCMV-QQR-LO-Fnは、予め特徴づけられた融合蛋白質からのクローンである(Smithら、2000、Nucleic Acids Res、28:3361-9)。

【図3B】キメラヌクレアーゼホモダイマーを使用した遺伝子ターゲッティングを示す。

【図3C】キメラヌクレアーゼヘテロダイマーを使用した遺伝子ターゲッティングを示す。

。

【図3D】キメラヌクレアーゼを使用した遺伝子ターゲッティングの時間的経過を示す。

【図4】鎌状赤血球貧血を引き起こすように突然変異されたコドン(赤)の周囲のヒト-グロブリン遺伝子の配列を示す。2対の可能性のあるキメラヌクレアーゼ(HBGZF1及びHBGZF2; HBGZF3及びHBGZF4)が示される。キメラヌクレアーゼ用の結合部位が、大文字でハイライトされている。

【図5】単一の文字コードを使用して、それぞれトリプレットを認識する、HBGZF1及びジンクフィンガードメインの結合部位を示す。

【図6】HBGZF1の遺伝子ターゲッティング及び、人工ハイブリッドHBGZF1/Zif268結合部位を含有するGFP遺伝子ターゲットの結果を示す。

【図7】HBGZF4用の設計及びターゲット部位を示す。

【図8】HBGZF4の遺伝子ターゲッティング及び人工ハイブリッドHBGZF4/Zif268結合部位を含有するGFP遺伝子ターゲットの結果を示す。

【図9A】ヒト共通 - 鎖の構造及び、Notarangeloら、2002から由来するSCIDへ導く遺伝子中の突然変異の位置を示す。

【図9B】エクソン5の配列並びにキメラヌクレアーゼHCGCZF1及びHCGCZF2用の予定結合部位を示す。

【図10】HCGCZF2の結合部位並びに、Sera及びUranga(2002)からのジンクフィンガーコードに由来するジンクフィンガー1~3用アミノ酸を使用したHCGCZF2の構造を示す。

【図11】HBGZF2の遺伝子ターゲッティング及び人工ハイブリッドHCGCZF2/Zif268結合部位を含有するGFP遺伝子ターゲットの結果を示す。

【図12A】図12はGFPキメラヌクレアーゼによる遺伝子ターゲッティングを示す。12Aは、GFP遺伝子中のターゲット配列の配列、及びGFP遺伝子を切断するように設計されたキメラヌクレアーゼを示す概略図を示す。GFPキメラヌクレアーゼターゲット部位は、丁度5'からI-SceI認識部位(Sce部位)の挿入まで存在する。

【図12B】実施例1に記載された修復基質A767で表示ヌクレアーゼを共トランスフェクションした後の、293細胞中の遺伝子ターゲッティングの確率を示す。

【図13A】図13はCD8キメラヌクレアーゼによる遺伝子ターゲッティングを示す。13Aは、キメラヌクレアーゼ用のヒトCD8 遺伝子中のターゲット配列を示す。

【図13B】293/1104細胞の、CD8ノックアウトプラスミド単独(5%CD8ネガティブ細胞)又は、CD8ノックアウトプラスミド及びCD8キメラヌクレアーゼ(20%CD8ネガティブ)でのトランスフェクト後のフロー血球計算法プロットを示す。CD8発現の測定は、ピューロマイシン抵抗性コロニーの採集後、フィコエリトリン結合抗(anti)-CD8モノクローン性抗体で染色して行った。