

(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2007-532567  
(P2007-532567A)

(43) 公表日 平成19年11月15日(2007. 11. 15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 57 頁)

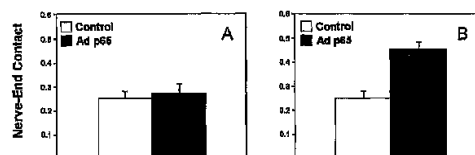
(21) 出願番号	特願2007-507511 (P2007-507511)	(71) 出願人	302043837
(86) (22) 出願日	平成17年4月7日 (2005. 4. 7)		サンガモ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年12月1日 (2006. 12. 1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94804 リッチモンド カナル プールバード 501 ポイント リッチモンド テック センター ザ セカンド スウィート エイ100
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/011838	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02005/099771		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成17年10月27日 (2005.10.27)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/560, 566		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成16年4月8日 (2004. 4. 8)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	60/631, 455		
(32) 優先日	平成16年11月29日 (2004. 11. 29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経障害および神経変性症状を治療するための方法と組成物

(57) 【要約】

血管内皮増殖因子-A (VEGF-A) をコードする遺伝子および神経栄養活性を有する生成物をコードする他の遺伝子の転写を調節する、遺伝子工学的に作成された亜鉛フィンガータンパク質が、本明細書に開示される。また神経障害（糖尿病性神経障害を含む）および他のタイプの神経損傷と神経変性の治療における、これらの遺伝子工学的に作成された亜鉛フィンガータンパク質の使用方法も開示される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象の神経障害又は神経変性症状を治療する方法であって：

ポリペプチドをコードする核酸を対象に導入すること、

を含み、ここで当該ポリペプチドは、以下の：

(i) 血管内皮増殖因子-A (VEGF-A) 遺伝子中の標的部に結合するように遺伝子工学的に作成された亜鉛フィンガー-DNA結合ドメイン；及び

(ii) 転写活性化ドメイン

を含み、

前記核酸が対象の1又は複数の細胞で発現され、それにより前記ポリペプチドが前記標的  
10 部位に結合しVEGF-A遺伝子の転写を活性化する方法。

## 【請求項2】

前記亜鉛フィンガー-DNA結合ドメインが3つの亜鉛フィンガーを含み、当該亜鉛フィンガーの認識領域のアミノ酸配列が以下の：

F1：DRSNLTR (配列番号55)

F2：TSGHLSR (配列番号141)

F3：RSDHLSR (配列番号68)

である請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

前記転写活性化ドメインがp65活性化ドメインである、請求項1に記載の方法。  
20

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

背景

糖尿病性神経障害は、糖尿病が引き起こす神経障害の1つのファミリーである。糖尿病の人は、時間とともに体中の神経が傷害を受けることがある。神経障害は、手、腕、足、脚の麻痺を引き起こし、時に疼痛や脱力感を引き起こす。これらの神経の問題はまた、すべての臓器系（消化管、心臓、および性器を含む）で起き得る。糖尿病の人はいつでも神経の問題が発症する可能性があるが、糖尿病の期間が長いほどそのリスクが大きくなる。

## 【0002】

糖尿病性神経障害の最も一般的なタイプは末梢神経障害（また遠位対称性神経障害とも呼ばれる）であり、これは四肢（例えば、腕、手、脚、足）を冒す。末梢神経障害以外に糖尿病性神経障害は自律神経系内で、近位（大腿、腰、または臀部の疼痛が脚の脱力感に至る）および局所的に発生する。自律神経障害は、消化機能、腸機能、膀胱機能、性的応答、および発汗の変化を引き起こすことがある。これはまた、心臓に作用する神経や血圧を支配する神経に影響を与えることがある。自律性糖尿病性神経障害はまた、低血糖性（血糖が低い）無意識（低血糖の警戒症状を感じなくなる状態）を引き起こすことがある。

## 【0003】

糖尿病患者の半分以上は何らかの神経障害を経験するが、現在は糖尿病症状自体を抑制する以外に神経障害の治療法が存在しない。糖尿病患者は酵素デルタ-6-デサチュラーゼおよび/または酵素デルタ-5-デサチュラーゼの産生に欠陥があるため、必須脂肪酸（EFA）であるリノール酸をガンマ-リノール酸（GLA）に変換できないことが知られている。例えば、Keenら（1993）Diabetes Care. 16(1):8-15を参照されたい。従って糖尿病性神経障害のいくつかの治療法は、患者の栄養摂取を変化させて神経の増殖を促進することに注目してきた。

## 【0004】

神経障害または神経変性（すなわち、ニューロンの死、または傷害されたニューロンが再生することができないこと）から他の多くの疾患が生じる。これらには、例えば筋萎縮性側索硬化症（ALS、ルーゲーリッグ病としても知られている）があり、これは運動ニューロンの変性により生じる。さらに神経組織への外傷（例えば神経破砕や脊髄損傷）によ  
50

り神経障害が生じることがあり、この場合神経再生を刺激する治療法が有効であろう。

【0005】

最近、いくつかのグループが、神経栄養性分子自体の投与が糖尿病性神経障害に特徴的な神経変性の改善を助けることを報告している。例えばSchratzbergerら、J. Clin. Inv. (2001) 107, 1083-1092は、血管内皮増殖因子(VEGF)の遺伝子移動が、ラット実験モデルで軸索の喪失と脱髄を特徴とする糖尿病性神経障害を逆転させることを証明した。またIsnerら(2001) Hum. Gene Ther. 10;12(12):1593-4; Sondellら(2000) European J. Neurosciences 12:4243-4254; Sondel(1999) J. Neurosciences 19(14):5731-5740を参照されたい。さらに重症の四肢虚血のVEGF<sub>165</sub>遺伝子治療のフェーズI/IIの用量増加試験において、糖尿病患者で逸話的神経改善が報告されている。Simovicら、Arch Neurol (2001) 58:761-788。 10

【0006】

しかし神経障害および神経変性症状(糖尿病性またはその他の原因)を治療するための神経増殖に関する神経栄養性タンパク質の発現の調節は、まだ記載されていない。1つ以上の外因性分子を使用して細胞または細胞群の神経増殖を刺激する能力は、すべてのタイプの神経障害や神経変性の治療および/または予防、およびこれらの症状のいくつかに関連する疼痛を緩和するのに有用であろう。

【発明の開示】

【0007】

要約

種々の亜鉛フィンガータンパク質(zeinc finger proteins)(ZFPs)およびかかるタンパク質を利用する方法が、神経障害の治療で使用するために提供されている。これらには、遺伝子工学的に作成した亜鉛フィンガータンパク質、すなわち異なる配列の複数の亜鉛フィンガータンパク質を含むライブラリーからの合理的な設計または選択により得られるあらかじめ決められた核酸標的配列に結合する天然に存在しないタンパク質がある。かかるライブラリーは、ポリペプチドライブラリーまたは、そこから複数のタンパク質を発現することができる異なる配列の複数の亜鉛フィンガーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのライブラリーでもよい。 20

【0008】

ZFPは融合タンパク質の一部として制御ドメイン(または機能性ドメイン)と機能できる形で結合することができる。ZFPとの融合のための活性化ドメインまたは抑制ドメインを選択することにより、遺伝子発現を活性化または抑制するためにかかる融合タンパク質を使用することができる。すなわちZFPに融合した制御ドメインの適切な選択により、遺伝子発現を選択的に調節することができ、従って1つ以上の遺伝子に関連した種々の生理学的プロセスを調節することができる。いくつかの神経障害の場合、例えば神経栄養性産物をコードする遺伝子内の標的配列に結合するZFPに活性化ドメインを結合させて、かかる融合タンパク質(またはかかる融合タンパク質をコードする核酸)を細胞または組織中に導入することにより、標的遺伝子の神経栄養性に関連するいくつかの有利な面を増強することができる。これに対して遺伝子の過剰発現に関連する神経障害については、抑制ドメインに融合したZFPを使用して遺伝子の発現を低下させることができる。 30 40

【0009】

いくつかのZFPを選択することにより、生理学的プロセス(例えば神経増殖および/または機能)を調節できる程度を調整し、治療を調整することができる。これは、本明細書のZFPがある遺伝子中の複数の標的部位(例えば、9、12、15または18塩基対の標的配列)に作用することができ、単一のZFPが複数の遺伝子中に位置する標的部位に結合できるために、可能である。すなわちいくつかの方法において複数のZFPが投与され、これは次に、同じ遺伝子内に位置する異なる標的部位に結合することができる。かかるZFPはある場合には、相乗作用を有する。いくつかの方法では、複数の融合タンパク質は異なる制御ドメインを含む。これに対して本明細書のいくつかのZFPでは、各遺伝子が標的部位を含む(例えば、異なる遺伝子中の配列保存領域内に)ため、単一のZFPにより複数の遺伝子の 50

発現を調節することができる。

【0010】

また本発明において、本明細書に開示のZFPをコードするポリヌクレオチドおよび核酸が提供される。さらに核酸および/またはZFPを含有する医薬組成物も提供される。例えばいくつかの組成物は、制御配列に機能できる形で結合した本明細書に記載のZFPの1つをコードする配列を含む核酸を、薬剤学的に許容される担体または希釈剤とともに含み、ここで制御配列は細胞内での核酸の発現を可能にする。タンパク質ベースの組成物は、本明細書に開示のZFPと薬剤学的に許容される担体または希釈剤とを含む。

【0011】

また、本明細書に開示の組成物を使用して、神経変性を予防するための方法ならびに神経再生を刺激するための方法が、提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

詳細な説明

本明細書に開示された方法の実施ならびに組成物の使用は、特に明記しない場合は、分子生物学、生化学、クロマチン構造と分析、コンピューター化学、細胞培養、組換えDNA、および当該分野の関連分野の通常の方法を使用する。これらの方法は文献に詳細に記載されている。例えば、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989、および第3版、2001; Ausubelら、「分子生物学の現代のプロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、ジョンワイリーアンドサンズ (John Wiley and Sons)、ニューヨーク、1987、および定期的改訂版; シリーズMethods in Enzymology、アカデミックプレス (Academic Press)、サンジエゴ; Wolffe、「クロマチン構造と機能 (Chromatin Structure and Function)」、第3版、アカデミックプレス (Academic Press)、サンジエゴ、1998; Methods in Enzymology、第304巻、「クロマチン (Chromatin)」(P.M. WassarmanとA.P. Wolffe編)、アカデミックプレス (Academic Press)、サンジエゴ、1999; およびMethods in Molecular Biology、第119巻、「クロマチンプロトコール (Chromatin Protocols)」(P.B. Becker編)、ヒューマナプレス (Humana Press)、トトワ (Totowa)、1999を参照されたい。

【0013】

1. 定義

用語「亜鉛フィンガータンパク質」または「ZFP」は、亜鉛により安定化されたDNA結合ドメインを有するタンパク質を意味する。ZFPは少なくとも1つのフィンガー、典型的には2、3、4、5、6、またはそれ以上のフィンガーを有する。各フィンガーは2~4塩基対のDNA、典型的には3~4塩基対のDNAに結合する。ZFPは標的部位または標的セグメントと呼ばれる核酸配列に結合する。各フィンガーは典型的には約30アミノ酸の亜鉛キレート性のDNA結合サブドメインを含む。これらのタンパク質の1つのクラス(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>クラス)を特徴付けるモチーフの例は、-Cys-(X)<sub>2-4</sub>-Cys-(X)<sub>1-2</sub>-His-(X)<sub>3-5</sub>-His(ここでXは任意のアミノ酸である)(配列番号147)である。追加のクラスの亜鉛フィンガータンパク質が知られており、本明細書に開示の方法の実施および組成物の製造と使用で有用である(例えばRhodesら(1993) Scientific American 268:56-65、および米国特許出願第2003/0108880号を参照)。このクラスの単一の亜鉛フィンガーは、単一のベータターンの2つのシステイン残基とともに亜鉛と配位結合した2つの不変ヒスチジン残基を含有するアルファらせんからなる(例えば、BergとShi、Science 271:1081-1085 (1996)を参照)。

【0014】

「標的部位」はZFPにより認識される核酸配列である。単一の標的部位は典型的には、約4~約10塩基対を有する。典型的には2フィンガーのZFPは4~7塩基対標的部位を認識し、3フィンガーのZFPは6~10塩基対の標的部位を認識し、4フィンガーZFPは12~14塩基対の標的配列を認識し、6フィンガーZFPは18~21塩基対の標的配列を認識し、これは2つの

隣接する9~10塩基対の標的部位または3つの隣接する6~7塩基対の標的部位を含む。

【0015】

「標的サブサイト」または「サブサイト」は、交叉鎖相互作用を除いて単一の亜鉛フィンガーにより結合したDNA標的部位の部分である。すなわち交叉鎖相互作用の非存在下では、サブサイトは一般に3ヌクレオチドの長さである。交叉鎖相互作用が起きる場合（すなわち、「D可能サブサイト」、本出願人によるW000/42219を参照）、サブサイトは4ヌクレオチドの長さであり、他の3-または4-ヌクレオチドサブサイトと重複する。

【0016】

「Kd」は、結合分子の解離定数であり、すなわちある測定系（例えば、米国特許第5,789,538号を参照）を使用して測定するようなある条件下（すなわち、「標的」 Kd）でその標的に対する化合物の最大結合の半分（化合物分子の半分が標的に結合している）を与える化合物の濃度である。Kdを測定するのに使用される測定系は、ZFPの実際のKdの最も正確な尺度を与えるように選択すべきである。ZFPの実際のKdの正確な測定値を与える限り、任意のアッセイシステムを使用することができる。ある実施態様においてZFPのKdは、電気泳動度シフトアッセイ（「EMSA」）を使用して測定される。ZFP純度または活性について調整が行われないと、Kd計算値はあるZFPの真のKdの過剰推定値になるかも知れない。好ましくは、遺伝子の転写を調節するのに使用されるZFPのKdは、約100nM未満、さらに好ましくは約75nM未満、さらに好ましくは約50nM未満、最も好ましくは約25nM未満である。

10

【0017】

本開示の目的について「遺伝子」は、遺伝子産物をコードするDNA領域、ならびに遺伝子産物の産生を制御するすべてのDNA領域を、かかる制御配列がコード配列および/または転写配列に隣接するか否かにかかわらず、含む。従って遺伝子は、特に限定されないが、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳制御配列（例えば、リボゾーム結合部位および内部リボゾーム侵入部位）、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界要素、複製起源、マトリックス結合部位、および遺伝子座制御領域を含む。本明細書に開示のZFPおよび方法を使用して糖尿病性神経障害を治療するために種々の遺伝子をターゲティングすることができ、種々の増殖因子、酵素などを含む。例えばVEGFは神経栄養効果をも有することが証明されている。VEGF遺伝子は、米国特許出願第20030021776A1号（参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）で規定され詳細に説明されている。

20

30

【0018】

用語「遺伝子」は、未変性の遺伝子と実質的に同一である核酸を含む。「同一である」または「同一性」という用語は、2つ以上の核酸またはポリペプチドにおいて、例えば視覚的検査のような後述の配列比較アルゴリズムを使用して測定して最大の一致について比較し整理する時、同じであるか、または同じであるヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の特定の割合を有する2つ以上の配列もしくはサブ配列を意味する。

【0019】

2つの核酸またはポリペプチドについて「実質的に同一である」という用語は、例えば視覚的検査のような後述の配列比較アルゴリズムを使用して測定して最大の一致について比較し整理する時、少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、95%以上、またはこれらの中間の整数値のヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の同一性を有する2つ以上の配列もしくはサブ配列を意味する。好ましくは実質的な同一性は、少なくとも約10、好ましくは約20、さらに好ましくは約40~60残基の長さ、またはこれらの中間の整数値、好ましくは60~80残基より長い領域、さらに好ましくは少なくとも約90~100残基の配列の領域にわたって存在し、最も好ましくは配列は、例えばヌクレオチド配列のコード領域のように比較される配列の完全長にわたって実質的に同一である。

40

【0020】

配列比較のために、典型的には1つの配列が、これに対して配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する時、試験配列および参照配列がコンピ

50

ューターに入力され、サブ配列が必要であれば規定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが規定される。次に配列比較アルゴリズムは、規定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列について配列同一性パーセントを計算する。

#### 【0021】

比較のための配列の最適整列は、例えばSmithとWaterman、Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所的相同性アルゴリズムにより、NeedlemanとWunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性整列アルゴリズムにより、PearsonとLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似検索法により、これらのアルゴリズムのコンピューター化実行( Wisconsin 遺伝学ソフトウェアパッケージ (Wisconsin Genetics Software Package)、遺伝学コンピューターグループ (Genetics Computer Group)、575 Science Dr., マジソン、ウィスコンシン州のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)により、または視覚化検査[一般的には、「分子生物学の現代のプロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」(Ausubel, F.M.ら編)、ジョンワイリーアンドサンズインク (John Wiley and Sons Inc.)、ニューヨーク (1987-1999、増刊46号 (1999年4月)のような増刊号を含む)を参照]により行うことができる。配列比較を行うためのこれらの配列の使用は、典型的には各プログラムに特異的なデフォルトパラメータを使用して行われる。

10

#### 【0022】

配列同一性パーセントと配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの他の例は、BLASTプログラムであり、これはAltschul, S.F.ら、J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載されている。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、ナショナルセンター・フォー・バイオテクノロジーインフォメーション (National Center for Biotechnology Information) から公に入手できる。このアルゴリズムは、まずデータベース配列中の同じ長さのワードと整列した時、あるプラス値の閾値スコアTに一致するかまたは満足するクエリー(問い合わせ)配列中の長さWの短いワードを特定することにより、高スコア配列対(HSP)を特定することを含む。これは、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschulら、前述)。これらの初期近隣ワードヒットは、これらを含むより長いHSPを見つける検索を開始するための種となる。次にワードヒットは各配列に沿って両方向に、累積整列スコアが増加するまで延長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列についてパラメータM(一致残基対の報酬スコア; 絶えず $>0$ )およびN(ミスマッチ残基の罰則スコア; 絶えず $<0$ )について計算される。アミノ酸配列については、累積スコアを計算するのにスコアリングマトリックスが使用される。各方向へのワードヒットの延長は、以下の時停止する: 累積整列スコアが最大達成値から量Xだけ低下した時; 1つ以上の負のスコアの残基整列の累積のために、累積スコアがゼロ以下になった時; 各配列の終点に達した時。

20

30

#### 【0023】

配列類似性を決定するためには、BLASTプログラムのデフォルトパラメータが適している。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、デフォルトとしてワード長さ(W)が11、予測値(E)が10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列用にはBLASTPプログラムは、デフォルトとしてワード長さ(W)が3、予測値(E)が10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する。TBLASTNプログラム(ヌクレオチド配列のタンパク質配列を使用する)は、デフォルトとしてワード長さ(W)が3、予測値(E)が10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する。(HenikoffとHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)を参照)。配列同一性パーセントを計算する以外に、BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計解析を行う(例えば、KarlinとAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)を参照)。BLASTアルゴリズムにより与えられる類似性の1つの尺度は、最小合計確率(P(N))であり、これは2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の一致が偶然起きる確率を示す。例えば試験核酸と参照核酸の比較において最小合計確率が約0.1未満、さらには好ましくは約0.01未満、および最も好ましくは約0.001未満である時、核酸は参照配列と類似していると見なされる。

40

#### 【0024】

50

2つの核酸配列が実質的に同一であることの他の指標は、2つの分子が厳密性条件下で互いにハイブリダイズすることである。「実質的にハイブリダイズする」とは、プローブ核酸と標的核酸との相補的ハイブリダイゼーションを意味し、標的ポリヌクレオチド配列の所望の検出を達成するためにハイブリダイゼーション媒体の厳密性を低下させることにより吸収される小さなミスマッチを包含する。「～と特異的にハイブリダイズする」という用語は、ある配列が複雑な混合物（例えば、総細胞）DNAまたはRNA中に存在する時、厳密性条件下での特定のヌクレオチド配列のみとの分子の結合、2本鎖形成、またはハイブリダイズを意味する。

【0025】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることの他の指標は、第1の核酸によりコードされるポリペプチドは、後述のように第2の核酸によりコードされるポリペプチドと免疫学的交差反応することである。

【0026】

特定のポリヌクレオチド配列の「保存的に修飾された変異体」は、同一のもしくは基本的に同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドがアミノ酸配列をコードしない時は基本的に同一の配列を意味する。遺伝コードの縮重のために、多数の機能的に同一の核酸がある特定のポリペプチドをコードする。例えば、コドンCGU、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGはすべて、アミノ酸アルギニンにコードする。すなわちあるコドンによりアルギニンが特定されるすべての位置で、コードされるポリペプチドを改変せずに、記載の対応する任意のコドンに変化させることができる。かかる核酸変異体は「サイレント変異体」であり、これは「保存的に修飾された変異体」の一種である。ポリペプチドをコードする記載のすべてのポリヌクレオチド配列はまた、特に明記しない場合は、すべての可能なサイレント変異体を示す。核酸中の各コドン（AUGを除く、これは通常メチオニンの唯一のコドンである）を標準的方法により修飾して、機能的に同一の分子を得ることができることを当業者は認識するであろう。従ってポリペプチドをコードする核酸の各「サイレント変異体」は、各記載の配列中で潜在的に含まれる。

【0027】

例えば2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、典型的にはポリペプチドは第2のポリペプチドと実質的に同一である。タンパク質について言及する時「保存的置換」は、タンパク質の活性を実質的に変化させないタンパク質のアミノ酸組成の変化を意味する。すなわち特定のアミノ酸配列の「保存的に修飾された変異体」とは、タンパク質活性にとって決定的に重要ではないアミノ酸のアミノ酸置換、または決定的に重要なアミノ酸の置換であっても活性を実質的に変化させないように同様の性質（例えば、酸性、塩基性、正荷電または負荷電、極性または非極性など）を有する他のアミノ酸によるアミノ酸の置換を意味する。機能的に同様のアミノ酸を与える保存的置換表は当該分野で公知である。例えばCreighton (1984) 「タンパク質 (Proteins)」、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W.H. Freeman and Company) を参照されたい。さらにコードされる配列中の単一のアミノ酸もしくは小数のアミノ酸を変異、付加もしくは欠失させる個々の置換、欠失または付加もまた「保存的に修飾された変異体」である。

【0028】

タンパク質、ポリペプチドまたは核酸の「機能性断片」または「機能性同等物」は、その配列が完全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一ではないが、完全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同じ機能を保持するタンパク質、ポリペプチドまたは核酸である。機能性断片は対応する未変性の分子より多いか、少ないか、または同じ数の残基を有することができるか、および/または1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチド置換を含有する。核酸の機能（例えば、コード機能、他の核酸にハイブリダイズする能力、制御分子に結合）を測定するための方法は、当該分野で公知である。同様にタンパク質の機能を測定する方法は公知である。例えばポリペプチドのDNA結合機能は、例えばフィルター結合、電気泳動移動度シフト、または免疫沈降測定法により測定することができる。Ausubel (前述) を参照されたい。他のタンパク質と相互作用するタンパク質の能力は、例え

10

20

30

40

50

ば同時免疫沈降、2ハイブリッドアッセイまたは相補的結合（遺伝的および生化学的）により測定することができる。例えばFieldsら（1989）Nature 340:245-246；米国特許第5,585,245号、およびPCT W098/44350号を参照されたい。

**【0029】**

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」は同義で使用され、1本鎖または2本鎖型のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを意味する。本発明の目的においてこれらの用語は、ポリマーの長さを限定するものではない。これらの用語は、天然のヌクレオチドの公知の類似体、ならびに塩基、糖および/またはリン酸塩成分が修飾されたヌクレオチドを包含する。一般に特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対合特異性を有する；すなわちAの類似体はTと塩基対合する。すなわちポリヌクレオチド配列という用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は中央処理装置を有するコンピューター中のデータベースに入力することができ、機能的ゲノミクスや相同性検索のようなバイオインフォマティクス（生物情報学）で使用することができる。この用語はさらに、公知のヌクレオチド類似体または修飾骨格残基もしくは結合を含有する核酸を包含し、これらは合成の、天然に存在する、および天然に存在しないものであり、これらは参照核酸と同様の結合性を有し、これらは参照ヌクレオチドと同様の方法で代謝される。かかる類似体の例には、特に限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホラミダイト、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-0-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド-核酸（PNA）がある。本発明においてヌクレオチド配列は通常5'~3'方向で表示される。

10

20

**【0030】**

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。「細胞クロマチン」は、核酸（主にDNA）およびタンパク質（ヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含む）を含む。真核細胞クロマチンの大部分はヌクレオソームの形で存在し、ここでヌクレオソームコアは、各ヒストンH2A、H2B、H3およびH4の2つずつを含む8量体に結合した約150塩基対のDNAを含む；そして（生物に依存した異なる長さの）リンカーDNAはヌクレオソームコアの間で伸張する。ヒストンH1の分子は一般に、リンカーDNAに結合している。本開示の目的において用語「クロマチン」は、すべてのタイプの細胞核タンパク質（原核生物および真核生物）を包含することを意味する。細胞クロマチンは、染色体性およびエピソーム性クロマチンの両方を含む。

30

**【0031】**

「染色体」は、細胞のゲノムのすべてまたは一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムはしばしば、その核型が特徴であり、これは細胞のゲノムを含むすべての染色体の集合である。細胞のゲノムは1つ以上の染色体を含むことができる。

**【0032】**

「エピソーム」は、複製性核酸、核タンパク質複合体、または細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む他の構造体である。エピソームの例は、プラスミドおよびいくつかのウイルスゲノムを含む。

**【0033】**

「外因性分子」は、通常は細胞中に存在しないが、1つ以上の遺伝的、生化学的または他の方法により細胞中に導入することができる分子である。細胞中の通常の存在は、細胞の特定の発生段階および環境条件について決定される。すなわち、例えば筋肉の胚発生中にのみ存在する分子は、成体の筋肉細胞にとって外因性分子である。外因性分子は、例えば機能不全の外因性分子の機能性分子、または通常は機能性外因性分子の機能不全分子を含むことができる。

40

**【0034】**

外因性分子は特に、コンビナトリアル化学プロセスにより生成されるような小分子、またはタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上記分子の任意の修飾誘導体、または上記分子の1つ以上を含む任意の複合体のような巨大分子でもよい。核酸にはDNAやRNAを含み、1本鎖または2本鎖でもよく；線状、分岐または環状

50



でもよく；任意の長さでよい。核酸は、2本鎖を形成することができるもの、ならびに3本鎖形成核酸を含む。例えば米国特許第5,176,996号および5,422,251号を参照されたい。タンパク質は、特に限定されないが、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、およびヘリカーゼを含む。

【0035】

外因性分子は内因性分子と同じタイプの分子でもよく、内因性分子とは異なる配列を有するなら、例えばタンパク質または核酸（すなわち外因性遺伝子）でもよい。細胞への外因性分子の導入方法は当業者に公知であり、特に限定されないが、脂質介在トランスファー（すなわち、リポソーム、中性および陽イオン性脂質を含む）、電気穿孔法、直接注入、細胞融合、粒子衝撃、リン酸カルシウム共沈法、DEAEデキストラン介在トランスファー、およびウイルスベクター介在トランスファーがある。

10

【0036】

「内因性分子」は、特定の環境条件下で特定の発生段階の特定の細胞中に通常存在する分子である。

【0037】

「内因性遺伝子」は、通常ゲノムおよびクロマチン中に存在する遺伝子である。内因性遺伝子は、例えば染色体、エピソーム、細菌ゲノム、またはウイルスゲノム中に存在してもよい。

20

【0038】

用語「転写開始部位に隣接する」は、転写開始部位の上流または下流の約50塩基以内にある標的部位を意味する。転写開始部位の「上流」は、転写開始部位の5'方向へ約50塩基以上の標的部位（すなわち、遺伝子の非転写領域）を意味する。転写開始部位の「下流」は、転写開始部位の3'方向へ約50塩基以上の標的部位を意味する。

【0039】

「融合分子」は、2つ以上のサブユニット分子が結合、典型的には共有結合している分子である。サブユニット分子は同じ化学的タイプの分子であるか、または異なる化学的タイプの分子でもよい。第1のタイプの融合分子の例には、特に限定されないが、融合ポリペプチド（例えば、ZFP DNA結合ドメインと転写活性化ドメインとの融合体）および融合核酸（例えば、上記融合ポリペプチドをコードする核酸）がある。第2のタイプの融合分子の例には、特に限定されないが、3本鎖形成核酸とポリペプチドとの融合体、および小さくほみ結合体（minor groove binder）と核酸との融合体がある。

30

【0040】

「遺伝子発現」は、遺伝子中に含有される情報の遺伝子産物への変換を意味する。遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA、または他の任意のタイプのRNA）でも、mRNAの翻訳により産生されるタンパク質でもよい。遺伝子産物はまた、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集のような方法により修飾されたRNA、および例えばメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP-リボシル化、ミリスチル化、およびグリコシル化により修飾されたタンパク質も含む。

40

【0041】

「遺伝子活性化」は、遺伝子産物の産生を増加させる任意の方法を意味する。遺伝子産物は、RNA（特に限定されないが、mRNA、rRNA、tRNA、および構造RNAを含む）またはタンパク質でもよい。従って遺伝子活性化は、遺伝子の転写および/またはmRNAの翻訳を上昇させる方法を含む。転写を上昇させる遺伝子活性化法の例には、特に限定されないが、転写開始複合体の形成を促進するもの、転写開始速度を上昇させるもの、転写伸張速度を上昇させるもの、転写のプロセシビティ（processivity）を上昇させるもの、および転写抑制を緩和（例えば、転写リプレッサーの結合を阻止することにより）するものがある。

【0042】

50

遺伝子活性化は、例えば抑制の阻害、ならびに既存レベルより上への発現の刺激を含む。翻訳を上昇させる遺伝子活性化法の例には、翻訳開始を上昇させるもの、翻訳伸張を上昇させるもの、およびmRNA安定性を上昇させるものがある。一般に遺伝子活性化は、遺伝子産物の産生の検出可能な上昇を含み、ある場合には遺伝子産物の産生の約2倍の、別の場合には遺伝子産物の産生の約2倍～約5倍のまたはこの間の整数倍の、さらに別の場合には遺伝子産物の産生の約5倍～約10倍のまたはこの間の整数倍の、さらに別の場合には遺伝子産物の産生の約10倍～約20倍のまたはこの間の整数倍の、時に遺伝子産物の産生の約20倍～約50倍のまたはこの間の整数倍の、別の場合には遺伝子産物の産生の約50倍～約100倍のまたはこの間の整数倍の、および別の場合に約100倍以上の上昇を含む。

**【0043】**

「遺伝子抑制」および「遺伝子発現の阻害」は、遺伝子産物の産生の低下を引き起こす任意の方法を意味する。遺伝子産物はRNA（特に限定されないが、mRNA、rRNA、tRNA、および構造RNAを含む）またはタンパク質でもよい。従って遺伝子抑制は、遺伝子の転写および/またはmRNAの翻訳を低下させる方法を含む。転写を低下させる遺伝子抑制法の例には、特に限定されないが、転写開始複合体の形成を阻害するもの、転写開始速度を低下させるもの、転写伸張速度を低下させるもの、転写のプロセシビティ（processivity）を低下させるもの、および転写活性化に拮抗（例えば、転写アクチベーターの結合を阻止することにより）するものがある。遺伝子抑制は、例えば活性化の阻害、ならびに既存レベルより下への発現の刺激を含む。翻訳を低下させる遺伝子抑制法の例には、翻訳開始を低下させるもの、翻訳伸張を低下させるもの、およびmRNA安定性を低下させるものがある。

**【0044】**

転写抑制は、遺伝子転写の可逆的および不可逆的不活性化を含む。一般に遺伝子抑制は、遺伝子産物の産生の検出可能な低下を含み、ある場合には遺伝子産物の産生の約2倍の低下、別の場合には遺伝子産物の産生の約2倍～約5倍のまたはこの間の整数倍の、さらに別の場合には遺伝子産物の産生の約5倍～約10倍、またはこの間の整数倍の、さらに別の場合には遺伝子産物の産生の約10倍～約20倍のまたはこの間の整数倍の、時に遺伝子産物の産生の約20倍～約50倍のまたはこの間の整数倍の、別の場合には遺伝子産物の産生の約50倍～約100倍のまたはこの間の整数倍の、および別の場合に約100倍以上の低下を含む。さらに別の例において遺伝子抑制は、遺伝子産物が検出できなくなるような遺伝子発現の完全な阻害を引き起こす。

**【0045】**

「調節」は、活性または方法のレベルまたは強度の変化を意味する。変化は上昇でも低下でもよい。例えば遺伝子発現の調節は、遺伝子活性化と遺伝子抑制の両方を含む。調節は、標的遺伝子の発現により間接または直接に影響を受ける任意のパラメータを決定して測定することができる。かかるパラメータには、例えばRNAもしくはタンパク質レベルの変化、タンパク質活性の変化、生成物レベルの変化、下流の遺伝子発現の変化、抑制遺伝子転写の変化（ルシフェラーゼ、CAT、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質（例えば、MistiliとSpector、Nature Biotechnology 15:961-964 (1997)参照）の変化；シグナル伝達、リン酸化、および脱リン酸化、受容体-リガンド相互作用、第2メッセンジャー濃度（例えば、cGMP、cAMP、IP3、およびCa<sup>2+</sup>）、細胞増殖、および血管形成の変化がある。これらの測定法は、インビトロでも、インビボでも、エクスピボでもよい。かかる機能的作用は、当業者に公知の任意の方法、例えば、RNAもしくはタンパク質レベルの測定、RNA安定性の測定、例えば化学発光、蛍光、比色反応、抗体結合、誘導性マーカー、リガンド結合アッセイによる、下流もしくはレポーター遺伝子発現の同定；cGMPやイノシトール3リン酸（IP3）のような細胞内第2メッセンジャーの変化；細胞内カルシウムレベルの変化；サイトカイン放出、などにより測定することができる。

**【0046】**

「制御ドメイン」または「機能性ドメイン」は、DNA結合ドメインにつながれた時転写調節活性を有するタンパク質もしくはタンパク質ドメイン（すなわちZFP）を意味する。典型的には制御ドメインは、ZFPに共有結合または非共有結合（例えば、融合分子を形成

10

20

30

40

50

するために)して転写調節を示す。制御ドメインは、活性化ドメインまたは抑制ドメインでもよい。活性化ドメインには、特に限定されないが、核因子カッパ - BのVP16、VP64、およびp65サブユニットがある。抑制ドメインには、特に限定されないが、K0X、KRAB MBD 2Bおよび -ErbAがある。追加の制御ドメインには、例えば転写因子および補助因子(例えば、MAD、ERD、SID、早期増殖応答因子1、および核ホルモン受容体)、エンドヌクレアーゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなどがある。アクチベーターとリプレッサーは、同時アクチベーターと度リプレッサーとを含む(例えば、Utleyら、Nature 394:498-502 (1998)を参照)。あるいはZFPは単独で、制御ドメインとともに作用して、転写調節を行う。

10

**【0047】**

用語「機能できる形で結合した(operably linked)」または「機能できる形で結合した(operatively linked)」は2つ以上の成分(例えば配列要素)の隣接について使用され、ここで両方の成分は、正常に機能し、成分の少なくとも1つが他の成分の少なくとも1つに及ぼす機能を仲介することができる可能性を可能にするように整列される。例えば転写制御配列(例えばプロモーター)が、1つ以上の転写制御因子の有無に反応してコード配列の転写レベルを調節するなら、転写制御配列はコード配列に機能できる形で結合している。機能できる形で結合した転写制御配列は、一般にコード配列とシスで結合しているが、直接接している必要は無い。例えばエンハンサーは連続してはいないが、コード配列に機能できる形で結合した転写制御配列を構成することができる。

20

**【0048】**

融合ポリペプチドについて用語「機能できる形で結合した(operably linked)」または「機能できる形で結合した(operatively linked)」は、それぞれ成分が結合していない場合に機能するように、各成分が他の成分に結合して同じ機能を果たす事実を意味する。例えばZFP DNA結合ドメインが転写活性化ドメイン(またはその機能性断片)に融合している融合ポリペプチドについて、融合ポリペプチド中でZFP DNA結合ドメイン部分が標的部位および/またはその結合部位に結合することができ、転写活性化ドメイン(またはその機能性断片)が転写を活性化できるなら、ZFP DNA結合ドメインと転写活性化ドメイン(またはその機能性断片)は機能できる形で結合している。

30

**【0049】**

用語「組換え」は細胞について使用される時、細胞が外因性核酸を複製するか、または外因性核酸にコードされたペプチドもしくはタンパク質を発現することを示す。組換え細胞は、未変性(非組換え)型の細胞内では見つからない遺伝子を含有することができる。組換え細胞はまた、未変性型の細胞中で見つかる遺伝子も含有することができる。遺伝子は人工的手段により修飾され細胞に再導入される。この用語はまた、細胞から核酸を除去することなく修飾されている細胞に対して内因性である核酸を含有する細胞を包含し、かかる修飾体は、遺伝子置換、部位特異的突然変異、および関連技術により得られるものを含む。

**【0050】**

「組換え発現カセット」、「発現カセット」または「発現構築体」は、組換え法でまたは合成法で作成された核酸構築体であり、制御因子と適合性のある宿主中で制御因子に機能できる形で結合した構造遺伝子の発現を行うことができる制御因子を有する核酸構築体である。発現カセットは少なくとも1つのプロモーター、および場合により、転写停止配列を含む。典型的には組換え発現カセットは、転写される少なくとも1つの核酸(例えば、所望のポリペプチドをコードする核酸)とプロモーターとを含む。発現を行うのに必要なまたは有用な追加の因子もまた、本明細書に記載のように使用することができる。例えば発現カセットはまた、宿主細胞から発現されるタンパク質の分泌を指令するシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含むことができる。転写停止配列、エンハンサー、および遺伝子発現に影響を与える他の核酸配列もまた、発現カセット中に含まれる。

40

**【0051】**

50

「プロモーター」は、転写を指令する核酸制御配列のアレイとして定義される。本明細書においてプロモーターは典型的には、転写の開始部位の近くで必要な核酸配列、例えばRNAポリメラーゼII型プロモーター、TATA要素、CCAATボックス、SP-1部位などを含む。本明細書においてプロモーターはまた、転写の開始部位から数千塩基対離れて位置することができる遠隔エンハンサーまたはリプレッサー因子を場合により含む。プロモーターはしばしば、ポリペプチドのようなDNA結合成分、例えば核受容体、Gal4、lacリプレッサーなどによるトランス活性化に応答性の成分を有する。

【0052】

「構成性」プロモーターは、ほとんどの環境および発生条件下で活性のあるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、ある環境および発生条件下で活性のあるプロモーターである。

10

【0053】

「弱いプロモーター」は、EisenbergとMcKnight、Mol. Cell. Biol. 5:1940-1947 (1985)に記載のように、野生型単純ヘルペスウイルス(「HSV」)チミジンキナーゼ(「tk」)プロモーターまたは突然変異HSV tkプロモーターとほぼ同じ活性を有するプロモーターを意味する。

【0054】

「発現ベクター」は、宿主細胞中で特定の核酸の転写と、場合により宿主細胞中の発現ベクターの組み込みもしくは複製を可能にする一連の特定の核酸要素を有する、組換え法または合成法で作成した核酸構築体である。発現ベクターは、プラスミド、ウイルス、またはウイルスもしくは非ウイルス起源の核酸断片の一部でもよい。典型的には発現ベクターは「発現カセット」を含み、これはプロモーターに機能できる形で結合した転写される核酸を含む。発現ベクターという用語はまた、プロモーターに機能できる形で結合したネーキッド(naked)DNAを包含する。

20

【0055】

「宿主細胞」とは、いずれかがZFPまたはZFP融合タンパク質を場合によりコードする発現ベクターもしくは核酸を含有する。宿主細胞は典型的には、発現ベクターの複製または発現を支持する。宿主細胞は、原核細胞、例えば大腸菌(E. coli)、または真核細胞、例えば酵母、真菌、原生動物、高等植物、昆虫、または両生類細胞、または哺乳動物細胞、例えばCHO、HeLa、293、COS-1など、例えば培養細胞(インビトロ)、外植片および初

30

【0056】

用語「天然に存在する」とは対象物に適用される時、対象物は自然界に存在するものであって、ヒトが人工的に産生したものではないことを意味する。

【0057】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は本明細書において同義に使用されてアミノ酸残基のポリマーを意味する。これらの用語は、1又は複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の類似体もしくは模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは、例えば炭水化物残基の付加により修飾して糖タンパク質を生成することができる。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、糖タンパク質ならびに非糖タンパク質を含む。本明細書においてポリペプチド配列は、従来法のN末端からC末端への配向で表示される。

40

【0058】

「サブ配列」または「セグメント」は核酸またはポリペプチドについて使用される時、ヌクレオチドまたはアミノ酸(例えばポリペプチド)のより長い配列の一部を含むヌクレオチドまたはアミノ酸の配列を意味する。

【0059】

「神経障害」は、ニューロンおよび/またはグリア細胞の死滅、または神経傷害後にニューロンが再生できないことを特徴とする臨床症状を意味する。「糖尿病性神経障害」は

50

広義には、糖尿病が引き起こす進行性神経傷害を意味する。神経障害は、末梢血神経障害、自律神経障害、および局所的神経障害を含む。

【0060】

用語「治療する」および「治療」は本明細書において、症状の重症度および/または頻度の低下、症状および/または原因の除去、症状および/または原因の発生の予防、および傷害の改善もしくは修復を意味する。

【0061】

医薬組成物の「有効」量（または「治療的有效」量）とは、所望の効果を与えるのに十分な薬物の非毒性量を意味する。この用語は、対象を治療するのに十分な量を意味する。すなわち治療量という用語は、疾患または他の好ましくない症状の進行を予防、阻止、遅延、または逆転させることにより、疾患状態または症状を修復するのに十分な量を意味する。予防的有効量という用語は、まだ疾患の無い対象に投与される量を意味し、従って疾患の発症を予防、阻止または遅延させるのに有効な量を意味する。

【0062】

## 11. 概要

神経障害および神経変性症状を治療するための種々の方法が、本明細書において提供される。特に本明細書に記載の方法は、その生成物が種々の神経障害または神経変性症状（例えば、糖尿病性神経障害、ALS）に關与する遺伝子の調節を含む。かかる遺伝子には、特に限定されないが、神経増殖因子、例えば血管内皮増殖因子（VEGF）、神経増殖因子（NGF）、インスリン様増殖因子2（IGF-2）などをコードする遺伝子、ならびに代謝に關与する他の遺伝子、例えばガンマリノール酸（GLA）を産生するために脂肪酸代謝に關与する生成物をコードする遺伝子、および酵素デルタ-6-デサチュラーゼおよびデルタ-5-デサチュラーゼをコードする遺伝子がある。

【0063】

ある例においてかかる方法は、生物中の細胞または細胞集団に、上記遺伝子（例えばVEGF、IGF-2）の1又は複数の特異的配列に結合する1又は複数の亜鉛フィンガータンパク質（ZFP）を接触させることを含む。ある方法において、1つのZFPが投与され、異なる遺伝子（例えば、VEGF-A、VEGF-B、およびVEGF-C中の標的部位、またはVEGF-AとIGF-2中の標的部位）の標的部位に結合することができる。他の方法は、特定の遺伝子内の複数の標的部位に結合する複数の異なるZFPを投与することを含む。あるいは細胞または細胞集団は、ZFPをコードする1又は複数のポリヌクレオチドと接触することができ、こうしてポリヌクレオチドは1又は複数の細胞に入り、コードされたZFPが発現され、タンパク質がその標的配列に結合して、こうして標的配列が位置する遺伝子の発現が調節される。

【0064】

すなわち、神経障害症状に關与する1又は複数の遺伝子（例えばVEGF、IGF-2）において特定の核酸セグメント（標的部位または標的配列）を特異的に認識し結合し、遺伝子の発現を調節し、こうして神経障害を治療するように遺伝子工学的に作成された種々の亜鉛フィンガータンパク質（および/またはかかる亜鉛フィンガータンパク質をコードする核酸）もまた本明細書において提供される。神経障害の治療は、神経変性の予防と神経再生の刺激の両方を含む。

【0065】

ある実施態様においてZFPは、制御ドメインに結合されてキメラ転写因子を作成して、標的遺伝子の転写を活性化または抑制する。

【0066】

あるZFPでは遺伝子の発現を増強することができ、いくつかの他のZFPでは発現を抑制することができる。一般にZFPが結合する標的部位は、結合により標的遺伝子（例えばVEGF）の発現の活性化または抑制が起きる部位である。標的部位は転写開始部位（ヌクレオチド+1として定義される）に隣接、その上流、および/または下流でもよい。上記したように、本ZFPの一部は単一の遺伝子の発現を調節する。他のZFPは複数の遺伝子の発現を調節する。すなわち使用される特定のZFPに依存して、1又は複数の遺伝子が発現されるレベル

10

20

30

40

50

を調整することができる。さらに、明確な標的部を有する複数のZFPまたはZFP融合分子は、単一の遺伝子を制御するのに使用できる。

#### 【0067】

標的部に結合し選択された遺伝子の発現に影響を与えるZFPの能力のために、本明細書のZFPは、神経変性の予防と神経再生の刺激の両方により、広範囲の神経障害を治療するのに使用できる。ある応用ではZFPは、いくつかの遺伝子の発現を活性化して、インビトロおよびインビボの両方で細胞集団の有効な神経増殖を開始させるのに使用することができる。かかる活性化は、例えば神経組織の形成の促進、従って神経障害の治療に使用することができる。

#### 【0068】

他の方法では、神経障害で過剰発現されているか、またはその発現が神経障害を引き起こす病態に寄与する遺伝子の抑制を含む。例えば糖尿病では、過剰のグルコースがアルドース還元酵素（AR）によりソルビトールに変換される。細胞はソルビトールに対して不透過性であり、従って糖尿病ではソルビトールは細胞内に蓄積する傾向がある。従ってAR発現の抑制は、ソルビトールの蓄積が引き起こすいくつかの糖尿病症状の重症度を低下させることが期待される。従ってAR遺伝子の標的部に結合するように遺伝子工学的に作成され、また転写抑制ドメインも含むZFPは、治療に使用することができる。

#### 【0069】

### III. 遺伝子発現を制御するための亜鉛フィンガータンパク質

#### A. 概論

本明細書に開示される亜鉛フィンガータンパク質（ZFP）は、配列特異的にDNAに結合することができるタンパク質である。上記したようにこれらのZFPは、多くの神経障害症状を治療するのに使用できる。これらのタンパク質の1つのクラス（C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>クラス）を特徴付けるモチーフの例は、-Cys-(X)<sub>2-4</sub>-Cys-(X)<sub>1,2</sub>-His-(X)<sub>3-5</sub>-His（ここでXは任意のアミノ酸である）（配列番号1）である。いくつかの構造研究により、亜鉛フィンガードメインは、2つの不変ヒスチジン残基を含有するアルファらせんと、2つの不変システイン残基と含有するベータターンとを含有し、ここで2つの不変ヒスチジン残基と2つの不変システイン残基とは亜鉛イオンを介して配位結合していることが証明された。しかし本明細書のZFPはこの特定のクラスに限定されない。追加のクラスの亜鉛フィンガータンパク質が知られており、本明細書に開示の方法の実施および組成物で使用することもできる（例えばRhodesら（1993）Scientific American 268:56-65、および米国特許出願第2003/0108880号を参照）。あるZFPでは、単一の亜鉛フィンガードメインは約30アミノ酸の長さである。亜鉛フィンガードメインはDNA認識のみではなく、RNA結合とタンパク質-タンパク質結合にも関与する。

#### 【0070】

Zif268のX線結晶構造（マウス転写因子からの3フィンガードメイン）は、同種のDNA配列と複合体を形成していることを解決し、各フィンガーが周期的回転により次のフィンガーに重なることができることを証明している。この構造は、各フィンガーが各認識らせん上で1、2、3および6位で側鎖で3塩基対間隔でDNAと独立に相互作用して、各DNAトリプレットサブサイトのヌクレオチドと接触していることを示唆している。Zif268のアミノ末端は、最大の接触をするDNA鎖の3'末端に位置する。いくつかの亜鉛フィンガーは、標的セグメントの第4の塩基に結合することができる。亜鉛フィンガータンパク質が最も接触する鎖を標的鎖とすると、いくつかの亜鉛フィンガータンパク質は標的鎖中の3つの塩基トリプレットと非標的鎖上の第4の塩基とに結合する。第4の塩基は、3つの塩基サブサイトのすぐ3'にある塩基と相補的である。

#### 【0071】

#### B. ZFP例

神経障害症状に関与する遺伝子の配列中の標的部に結合するように遺伝子工学的に作成されたZFPが本明細書に開示される。ZFPの遺伝子工学的作成は、例えば合理的設計またはランダム化ライブラリーからの経験的選択により行うことができる。例えば、本出願人

10

20

30

40

50

の米国特許第6,453,242号および6,534,261号を参照されたい。神経障害に關与する生成物をコードする遺伝子の非限定例には、VEGF、IGF-2のような神経栄養性増殖因子ならびに酵素（例えば、GLA合成に關与する酵素）がある。すなわちZFPは、ZFPが目的の遺伝子中の標的部に結合するなら、異なるアミノ酸組成の種々の異なる成分フィンガーを含む。

#### 【0072】

標的部は、転写開始部位（ヌクレオチド+1として定義される）の上流または下流に位置することができる。いくつかの標的部は9ヌクレオチドを含み、いくつかは12ヌクレオチドを含み、他の部は18ヌクレオチドを含む。これらの標的部の1つの特徴は、標的部へのZFPの結合、またはZFPと1つ以上の制御ドメインとを含む融合タンパク質の結合が、1つ以上の遺伝子の発現レベルに影響を与えることである。本明細書のZFPにより制御することができるVEGF遺伝子の例には、特に限定されないが、VEGF-A（アイソフォームVEGF-A121、VEGF-A145、165、VEGF-A189、およびVEGF-A206を含む）、VEGF-B（アイソフォームVEGF-B167およびVEGF-B186を含む）、VEGF C、VEGF D、ウイルスVEGF様タンパク質（ウイルスVEGF-E）および哺乳動物VEGF-E、VEGF-H、VEGF-R、VEGF-X、VEGF-138およびP1GF（PIGF-1とPIGF-2を含む）がある。また米国特許出願第20030021776A1号を参照されたい。

10

#### 【0073】

標的部は転写開始部に隣接するか、または転写開始部のかなり上流または下流に位置してもよい。いくつかの標的部は単一の遺伝子内に位置し、その結果標的へのZFPの結合は単一の遺伝子の発現に影響を与える。他の標的部は複数の遺伝子内に位置し、その結果、単一のZFPの結合は複数の遺伝子の発現を調節することができる。さらに別の例において、それぞれが同じ遺伝子または異なる遺伝子中の標的を認識する複数のZFPを使用することができる。

20

#### 【0074】

これらの標的部に結合するZFPは、典型的には少なくとも1つの亜鉛フィンガーを含むが、複数の亜鉛フィンガー（例えば、2、3、4、5、6またはそれ以上のフィンガー）を含むことができる。通常ZFPは少なくとも3つのフィンガーを含む。いくつかのZFPは4または6つのフィンガーを含む。これらのフィンガーを含むZFPは、典型的には9または10個のヌクレオチドを含む標的部を認識する；4つのフィンガーを含むZFPは、典型的には12～14個のヌクレオチドを含む標的部を認識する；6つのフィンガーを有するZFPは、18～21個のヌクレオチドを含む標的部を認識することができる。ZFPはまた、1つ以上の制御ドメインを含む融合タンパク質でもよく、このドメインは転写活性化ドメインまたは転写抑制ドメインでもよい。

30

#### 【0075】

従って、ZFPの具体例は表1と2に開示される。標的部について検査されたVEGF配列には、VEGF-A（ジーンバンク（GenBank）受け入れ番号AF095785参照）、VEGF-B（ジーンバンク（GenBank）受け入れ番号U80601、-0.4kb～+0.32kb参照）、VEGF-C（ジーンバンク（GenBank）受け入れ番号AF020393参照）、およびVEGF-D（HSU69750とHYS12864参照）、ならびにP1GFの配列（ジーンバンク（GenBank）受け入れ番号AC015837参照）、およびウイルスVEGF-E遺伝子（ジーンバンク（GenBank）受け入れ番号AF106020とMeyer, M.ら, (1999) EMBO J. 18:363-74；ジーンバンク（GenBank）受け入れ番号S67520とLyttle, D.J.ら, (1994) J. Virol. 68:84-92；およびジーンバンク（GenBank）受け入れ番号AF091434参照）の配列がある。すなわち例えば、標的部について検査されたVEGF-A遺伝子のヌクレオチド配列は、転写開始部の2.3kb上流から転写開始部の1.1kb下流まで伸張していた。

40

#### 【0076】

ある実施態様において糖尿病性神経障害および他の神経障害症状（例えば、神経傷害、脊髄損傷）は、VEGF遺伝子中の標的部に結合する1つ以上のZFPを使用して治療される。種々のVEGF遺伝子中の表1と2に開示されるZFPの例の標的部の位置は、表3に要約される。この表の第1列は、ZFPの内部参照名であり、表1と2の列1と同じ名前に対応する。種々

50

のVEGF遺伝子配列中の標的部位の5'末端の位置は、残りの列に列記される。表3中の負の数は転写開始部位（ヌクレオチド+1として定義される）の上流のヌクレオチドの数を示し、正の数は転写開始部位の下流のヌクレオチドの数を示す。

【0077】

すなわち本明細書のように、本明細書のいくつかのZFPを使用して単一の遺伝子の活性を調節することにより糖尿病性神経障害を治療することができ、他のZFPを使用して複数の遺伝子の発現を制御することができる。本明細書に記載の種々のZFPおよびこれらの組合せをうまく選択することにより、どの遺伝子が調節されるか、従ってどの神経障害が治療されるかを調整することができる。

【0078】



【表 1】

表 1 ヒト VEGF 標的化 ZEP の標的的部位及び認識領域配列

ZEP 名	標的	配列番号	F 1	配列番号	F 2	配列番号	F 3	配列番号	K <sub>a</sub> (nM)
BVO 13A	ATGGACGGG	1	RSDHLAR	30	DRSNLTR	59	RSDALTQ	88	<.02
EPI0A	KGGGCTGG	2	RSDHLTT	31	DRSHLAR	60	RSDHLSK	89	0.35
GATA8Z2678	GAGKCKGYG	3	RLDLRR	32	DRDHLTR	61	RSDNLAR	90	1.8
HBV 3	GGGGAGGW	4	QTGHLRR	33	QSGHLQR	62	RSDHLNR	91	30
HP38 4A	GGDTGGGG	5	RSDHLAR	34	RSDHLTT	63	QRHLAR	92	0.75
HUM 17A	ARGGGGAG	6	RSDNLAR	35	RSDHLNR	64	RSDNLTTQ	93	<.02
HUM 19A	TGGGCAGAC	7	DRSNLTR	36	QSGDLTR	65	RSDHLTT	94	0.02
MTS 5A	TGGGGTGG	8	RSDHLTT	37	RSDHLTR	66	RSDHLTT	95	0.07
MX1E	ATGGACGGG	9	RSDHLAR	38	DRSNLTR	67	RSDALSA	96	3.4
PDF 5A	GYAGGGCC	10	DRSSLTR	39	RSDHLNR	68	QSGSLTR	97	.23
RAT 24A	GDGGAAGHC	11	ERGTLAR	40	QSGNLAR	69	RSDALAR	98	<.02
SAN 16A	AKGGAAGG	12	RSDHLAR	41	QSGNLAR	70	RSDALRQ	99	1.03
USX 3A	GCCGGGAG	13	RSDNLTR	42	RSDHLTR	71	DRSDLTR	100	0.06
VEGF 1	GGGAGGVK	14	TTSNLR	43	RSSNLQR	72	RSDHLNR	101	2.83
VEGF 1*	GGGAGGVK	15	TTSNLR	44	RSSNLQR	73	RSDHLNR	102	3
VEGF 1A	GGGAGGVK	16	TTSNLR	45	RSDNLQR	74	RSDHLNR	103	0.2
VEGF 1B	GGGAGGAT	17	QSSNLAR	46	RSDNLQR	75	RSDHLNR	104	2
VEGF 1C	GGGAGGAT	18	TTSNLAR	47	RSDNLQR	76	RSDHLNR	105	1
VEGF 1D	GGGAGGAT	19	QSSNLRR	48	RSDNLQR	77	RSDHLNR	106	2
VG 10A	GAWGGGGC	20	DSGHLTR	49	RSDHLTR	78	QSGNLTR	107	ND
VG 1B	ATGGGGTG	21	RSDALTR	50	RSDHLTR	79	RSDALTQ	108	ND
VG 4A	GGGGCTGG	22	RSDHLTT	51	DRSHLAR	80	RSDHLNR	109	ND
VG 8A	GDGTGGGN	23	QSHLAR	52	RSDHLTT	81	RSDALAR	110	.35
VOP 28A-2	GGGGCGCT	24	QSDLR	53	DRSHLAR	82	RSDHLNR	111	<.02
VOP 30A-4	GTGGGGC	25	DRSHLTR	54	RSDHLTR	83	QSDLTR	112	<.02
VOP 32A-6	GGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	MSHLNR	84	RSDHLNR	113	<.02
VOP 32B-7	GGGGTGAC	27	DRSNLTR	56	TSGHLNR	85	RSDHLNR	114	<.02
VOP 35A-10	GCTGGAGCA	28	QSGSLTR	57	QSGHLQR	86	QSDLTR	115	<.02

10

20

30

40

【表 2】

ZEN-7A 1	GGGGHGCT	29	QSSDLRR	58	QSSHLAR	87	RSDHLSR	116	.63
VOP 29A-3	GAGCCTGG	138	RSDHLTT	51	QSSDLTR	112	RSDNLTR	42	<.02
VOP 32-C	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGHLTR	139	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-D	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGHLTR	140	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-E	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGHLTR	141	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-F	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGHLAR	142	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-G	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGHLRR	143	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-H	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TAGHLVR	144	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-I	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TTGHLVR	145	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-J	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TKDHLVR	146	RSDHLSR	68	ND

10

20

30

40

【表 3】

表 2 ヒト VEGF 標的化 ZEP の標的的部位及び認識領域配列

ZFP 名	標的	配列番号	F 1	配列番号	F 2	配列番号	F 3	配列番号	F 4	配列番号	F 5	配列番号	F 6	配列番号
EVO 10A- 9A	GTCGAGGGGGTCGGGGCT	117	QSSDLRR	120	RSDHLTR	123	DRSALAR	126	RSDHLAR	129	RSDNLAR	132	RSDALTR	135
EVO 12A- 11B	GGAGAGGGGGCYGCAGTG	118	RSDALTR	121	QSGDLTR	124	ERGDLTR	127	RSDHLAR	130	RSDNLAR	133	QSGHLQR	136
EVO 14B- 13A	ATGGACGGGtGAGGYGGY	119	RSDELTR	122	RSDELTR	125	RSDNLAR	128	RSDHLAR	131	DRSNLTR	134	RSDALTO	137

10

20

30

40

【 0 0 8 0 】

## 【表 4】

表 3 VEGF配列中の標的部位の位置

ZFP 名	VEGF A	VEGF B	VEGF C	VEGF D	VEGF E (PLDGF)	ウイルス VEGF
BVO 13A	+851					
EP10A	-1083 +534	-31	-252			
GATB2Z7678	-485	-170			+183	
HBV 3	+779		-245			
HP38 4A	-2248 -1413 -1055 -633	-119	+479 +510	+805	-29 +210	
HUM 17A	-1002 +472				-33	
HUM 19A	-1016					
MTS 5A	-2251				+213	
MX1E	+851					
PDF 5A	+590				-748	
RAT 24A	+711					
SAN 16A	-1954					
USX 3A	+554 +928		-230			
VEGF 1	-8				-454 -348 -36	
VEGF 1*3	-8				-454 -348 -36	
VEGF 1A	-8				-454 -348 -36	
VEGF 1B	-8					
VEGF 1C	-8					
VEGF 1D	-8					
VG 10A	-1412 -354	-774				
VG 1B	-2252	-943				
VG 4A	-1083	-31	-252			
VG 8A	-2248 -633 -475 -391	-119 -784	+479 +510	+313 +805	-903 -29 -22 +179 +210	+575
VOP 28A-2	-573		+61			
VOP 30A-4	+42 +530		-481			
VOP 32A-6	+434					
VOP 32B-7	+434					
VOP 35A-10	+892					
ZEN-7A 1	-1273 -573	-945	+61		-675	
BVO 10A-9A	+621					
BVO 12A-11B	+806					
BVO 14B-13A	+851					
VOP 29A-3	+5					

10

20

30

40

【表 5】

VOP 32C	+434					
VOP 32D	+434					
VOP 32E	+434					
VOP 32F	+434					
VOP 32G	+434					
VOP 32H	+434					
VOP 32I	+434					
VOP 32J	+434					

10

## 【0081】

## IV. ZFPの性状解析

亜鉛フィンガータンパク質は亜鉛フィンガー成分から形成される。例えば亜鉛フィンガータンパク質は、1~37個のフィンガー、一般的には2、3、4、5または6つのフィンガーを有する。亜鉛フィンガータンパク質は、標的遺伝子内の比較的小さいサブ配列である標的部位（特に標的セグメントと呼ぶ）を認識しこれに結合する。亜鉛フィンガータンパク質の各成分フィンガーは、標的部位内のサブサイトに結合することができる。サブサイトは、すべて同じ鎖（時に標的鎖と呼ぶ）上の3つの連続塩基のトリプレットを含む。サブサイトは、標的鎖上の3つの連続塩基のすぐ3'にある塩基の相補体である反対の鎖上の第4の塩基を含んでも含まなくてもよい。多くの亜鉛フィンガータンパク質では亜鉛フィンガーは、同じ亜鉛フィンガータンパク質中の他のフィンガーとは実質的に独立にトリプレットサブサイトに結合する。従って、複数のフィンガーを含有する亜鉛フィンガータンパク質の結合特異性は、通常その成分フィンガーの特異性のほぼ集合である。例えば亜鉛フィンガータンパク質が、トリプレットXXX、YYY、およびZZZに個々に結合する第1、第2、および第3のフィンガーから形成されるなら、亜鉛フィンガータンパク質の結合特異性は3'XXXYYYZZZ5'である。

20

## 【0082】

N末端からC末端への亜鉛フィンガータンパク質中のフィンガーの相対的順序は、標的中の3'から5'方向のトリプレットの相対的順序を決定する。例えば亜鉛フィンガータンパク質が、N末端からC末端にそれぞれトリプレット5'GAC3'、5'GTA3'、および5'GGC3'に個々に結合する第1、第2、および第3のフィンガーを含むなら、亜鉛フィンガータンパク質は標的セグメント3'CAGATGCGG5'（配列番号148）に結合する。亜鉛フィンガータンパク質が、例えば別の順序で第1、第2、および第3のフィンガーを含むなら、亜鉛フィンガータンパク質は異なるトリプレットの順序を含む標的セグメント、この例では3'ATGCAGCGG5'（配列番号149）に結合する。BergとShi, Science 271, 1081-1086 (1996)を参照されたい。その成分フィンガーの集合体としての亜鉛フィンガータンパク質の結合性の評価は、ある場合には同じタンパク質中の複数のフィンガー結合の状況依存性相互作用により影響を受ける。

30

40

## 【0083】

2つ以上の亜鉛フィンガータンパク質を連結して、成分亜鉛フィンガータンパク質の特異性の集合体である標的特異性を有することができる（例えば、KimとPabo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2812-2817 (1998)参照）。例えばXXX、YYY、およびZZZにそれぞれ結合する第1、第2、および第3の成分フィンガーを有する第1の亜鉛フィンガータンパク質は、結合特異性AAA、BBB、およびCCCを有する第1、第2、および第3の成分フィンガーを有する第2の亜鉛フィンガータンパク質に結合することができる。従って第1と第2のタンパク質の結合特異性は3'XXXYYYZZZ\_AAABBBCCC5'である（ここで下線は、短い介在領域（典型的には任意のタイプの0~5塩基）を示す）。この場合標的部位は、介在セグメントにより分離された2つの標的セグメントを含むと見なされる。

50

## 【0084】

結合は以下のペプチドリンカーの任意のものを使用して行うことができる：

TGEKP：（配列番号150）（Liuら、1997、前述）； $(G_4S)_n$ （配列番号151）（Kimら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1156-1160 (1996)）；GGRRGGGS；（配列番号152）LRQRDGERP；（配列番号153）LKQKDGGSERP；（配列番号154）LRQKD $(G_3S)_2$ ERP（配列番号155）。

## 【0085】

あるいは、DNA結合部位とペプチド自体をモデル化することができるコンピュータプログラムを使用して、またはファージ表示法により、柔軟なリンカーを合理的に設計することができる。さらなる変更態様では、2つの亜鉛フィンガータンパク質のヘテロダイマー形成を促進するドメインを用いて2つの亜鉛フィンガータンパク質を融合して、非共有結合を行うことができる。例えば1つの亜鉛フィンガータンパク質をfosと融合し、他の亜鉛フィンガータンパク質をjunに融合することができる（Barbasら、W095/119431号参照）。

10

## 【0086】

2つ以上の亜鉛フィンガータンパク質の結合は、哺乳動物ゲノム内でユニークな結合特異性を付与するために有効である。典型的な哺乳動物二倍体ゲノムは $3 \times 10^9$  bpからなる。4つのヌクレオチドA、C、GおよびTがランダムに分布していると仮定すると、ある9bpの配列は約23,000倍存在する。すなわち絶対特異性を有する9bpの標的を認識するZFPは、ゲノム内の約23,000部位に結合する可能性を有する。18bpの配列は、その複雑さが哺乳動物ゲノムの複雑さの10倍であるランダムDNA配列中に約1回存在する。

20

## 【0087】

亜鉛フィンガータンパク質の成分フィンガーは典型的には約30アミノ酸を含有し、ある実施態様において以下のモチーフ(N-C)を有する：

Cys-(X)<sub>2-4</sub>-Cys-X.X.X.X.X.X.X.X.X.X.X.X.-His-(X)<sub>3-5</sub>-His（配列番号156）

## 【0088】

1つのペーパターン中の2つの不変ヒスチジン残基と2つの不変システイン残基は、亜鉛原子を介して配位結合している（BergとShi、Science 271:1081-1085 (1996)を参照）。上記モチーフは、結合特異性を付与する亜鉛フィンガーの領域（「認識領域」）について、当該分野で標準的な番号付け法を示す。第1の不変His残基の左（N末端側）のアミノ酸は番号+6を割り当てられ、さらに左の他のアミノ酸には続いて減少する数が割り当てられる。アルファラセンは残基1で始まり、第2の不変ヒスチジンの後の残基まで伸張する。従って全ラセンは、11~13残基の可変長さである。

30

## 【0089】

## V. ZFPの設計

本明細書のZFPは、1つ以上の糖尿病性神経障害を引き起こす遺伝子中の選択された標的部位を認識するように遺伝子工学的に作成される（例えば1つ以上のVEGF遺伝子）。

## 【0090】

ZFPの設計または選択プロセスは、典型的にはフレームワーク残基源として天然のZFPを開始する。設計または選択プロセスは、所望の結合特異性を付与するように非保存位置（すなわち-1~+6位）を規定するのに有用である。1つの適当なZFPは、マウス転写因子Zif268のDNA結合ドメインである。このタンパク質のDNA結合ドメインはアミノ酸配列：

40

YACPVESCRRFRSDELTRHIRIHTGQKP(F1)（配列番号157）

FQCRICMRNFRSDHLTTHTHTGQKP(F2)（配列番号158）

FACDICGRKFARSDERKRHTKIHLRQK(F3)（配列番号159）

を有し、標的5'GCG TGG GCG3'（配列番号160）に結合する。

## 【0091】

フレームワーク残基の供給源としての別の適当な天然のZFPはSp-1である。亜鉛フィンガータンパク質の作成に使用されるSp-1配列は、Sp-1転写因子中のアミノ酸531~624に対応する。この配列は94アミノ酸の長さである。Sp1およびSp-1の別の型（Sp-1コンセンサス配列と呼ぶ）の配列については、例えば米国特許出願第20030021776号を参照されたい

50

。

## 【0092】

Sp-1は標的部位5'GGG GCG GGG3' (配列番号161) に結合する。

## 【0093】

いくつかのアルファフェトプロテインの合理的な設計を補助するいくつかの置換規則がある。例えば本出願人の米国特許第6,453,242号と6,534,261号および米国特許出願第2003/0068675号；ならびに米国特許第5,789,538号；6,007,408号；6,013,453号；6,140,081号；および6,140,466号；およびPCT公報W095/19431号、W098/53057号；W098/53058号、W098/53059号；W098/53060号；W098/54311号、W000/23464号およびW000/27878号に記載のように、ZFP DNA結合ドメインは特定の標的部位を認識するように設計および/または選択することができる。ある実施態様において亜鉛フィンガーDNA結合ドメインの標的部位は、本出願人の米国特許第6,453,242号に開示された部位選択規則に従って同定される。ある実施態様においてZFPは、本出願人のW002/077227号に記載のように選択することができる。またW096/06166号；DesjarlaisとBerg、PNAS 90, 2256-2260 (1993)；ChooとKlug、PNAS 91, 11163-11167 (1994)；DesjarlaisとBerg、PNAS 89, 7345-7349 (1992)；およびJamiesonら、Biochemistry 33:5689-5695 (1994)を参照されたい。

10

## 【0094】

これらの規則の多くは、遍在性転写因子Sp-1 (DesjarlaisとBerg、1992；1993) の3フィンガードメインの部位特異的突然変異誘発により支持される。これらの規則の1つは、DNAトリプレット中の5'Gは、認識させんの6位のアルギニンを取り込んだ亜鉛フィンガーにより結合することができるというものである。別の置換規則は、サブサイトの中央のGは、亜鉛フィンガーの3位にヒスチジン残基を含むことにより認識することができるというものである。

20

## 【0095】

さらなる置換規則は、トリプレットの中央のAを認識するようにアスパラギンを導入することができる、トリプレットの中央のCを認識するようにアスパラギン酸、グルタミン酸、セリンまたはスレオニンを導入することができる、そしてトリプレットの中央のTを認識するようにアラニンのような小さい側鎖を有するアミノ酸を導入することができるというものである。さらなる置換規則は、トリプレットサブサイトの3'塩基は認識させんの1位に以下のアミノ酸を導入することにより認識することができるというものである：Gを認識するためにアルギニン、Aを認識するためにグルタミン、Cを認識しないグルタミン酸 (またはアスパラギン酸)、およびTを認識するためにスレオニン。これらの置換規則は亜鉛フィンガータンパク質を設計するのに有用であるが、これらはすべての可能な標的部位を考慮してはいない。さらにこの規則の基礎となっている仮定、すなわち亜鉛フィンガー中の特定のアミノ酸はサブサイト中の特定の塩基への結合をつかさどるという過程は近似的なものである。フィンガー中の近傍のアミノ酸間の状況依存性相互作用または単一塩基への複数のアミノ酸の結合もしくはその逆は、既存の置換規則により予測される結合特異性の変化を引き起こす。従ってある実施態様においてあらかじめ決められた特異性のZFP DNA結合ドメインは、本出願人のW002/077227号および/または米国特許出願第2003/0068675号に記載された方法に従って得られる。

30

40

## 【0096】

ZFPをコードする核酸を設計し構築するのに当該分野で公知の任意の適当な方法 (例えば、ファージ表示、ランダム突然変異誘発、コンビナトリアルライブラリー、コンピューター/合理的設計、親和性選択、PCR、cDNAもしくはゲノムライブラリーからのクローニング、合成的構築など) を使用することができる。(例えば、米国特許第5,786,538号；Wuら、PNAS 92:344-348 (1995)；Jamiesonら、Biochemistry 33:5689-5695 (1994)；RebarとPabo、Science 263:671-673 (1994)；ChooとKlug、PNAS 91:11163-11167 (1994)；ChooとKlug、PNAS 91:11168-11172 (1994)；DesjarlaisとBerg、PNAS 90:2256-2260 (1993)；DesjarlaisとBerg、PNAS 89:7345-7349 (1992)；Pomerantzら、Science 267:93-96 (1995)；Pomerantzら、PNAS 92:9752-9756 (1995)；およびLiuら、PNAS 94:5525-5530 (1997)

50

; GriesmanとPabo、Science 275:657-661 (1997); DesjarlaisとBerg、PNAS 91:11-99-11103 (1994)を参照)。

【0097】

ある好適な実施態様においてDNA結合ドメイン(例えばZFP DNA結合ドメイン)の結合特異性は、(例えば細胞クロマチン中の)問題の配列中のアクセス可能な領域を同定することにより決定することができる。アクセス可能な領域は本出願人のW001/83732号に記載のように測定することができる。また米国特許出願第20030021776A1号を参照されたい。次に本明細書に記載のように、アクセス可能な領域内の標的部位に結合するDNA結合ドメインが設計および/または選択される。

【0098】

VI. 亜鉛フィンガータンパク質の例と同等物

例えば神経変性症状と神経障害の治療に有用な転写の制御のための組成物と方法が本明細書で開示される。これらには、遺伝子工学的に作成された亜鉛フィンガータンパク質と機能性ドメイン(例えば転写活性化ドメイン)とを含む融合タンパク質がある。適当な機能性ドメインは当該分野で公知であり、特に限定されないが、例えばVP16、VP64およびp65のような転写活性化ドメインがある。さらに1つ以上の同じかまたは異なる機能性ドメイン(例えば転写活性化ドメイン)が、ある融合タンパク質中に存在してもよい。転写活性化ドメインと抑制ドメインの例の開示については、本出願人の米国特許出願第2002/0160940号(参照することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

【0099】

ある実施態様において、VEGF-A遺伝子中に存在する標的配列GGGGGTGAC(配列番号26)に結合する亜鉛フィンガータンパク質が遺伝子工学的に作成される。3フィンガー亜鉛フィンガータンパク質の例(VOP32E)はこうして遺伝子工学的に作成されている。VOP32Eの3つの亜鉛フィンガーの認識領域は以下のアミノ酸配列を有する:

F1: DRSNLTR(配列番号55)

F2: TSGHLR(配列番号141)

F3: RSDHLR(配列番号68)

【0100】

これらのアミノ酸配列は、亜鉛フィンガーのらせん部分の開始部位の-1~+6に対応し、これらの残基の1つ以上が核酸結合の配列特異性に参加するため「認識領域」と記載される。従って異なるポリペプチド骨格配列中に同じ3つの認識領域を含むタンパク質は同じDNA結合特異性を有するため、VOP32Eタンパク質と同等であると見なされる。

【0101】

すなわちある実施態様において、3つの認識領域(配列番号55、141および68)を任意の亜鉛フィンガー骨格に置くことができ(例えば米国特許第6,453,242号と6,534,261号を参照)、得られたタンパク質を使用して、例えば神経再生を促進するためにVEGF転写を制御することができる。従って以下の配列を含む遺伝子工学的に作成した亜鉛フィンガータンパク質を開示された方法で使用することができる:

C-X<sub>2-4</sub>-C-X<sub>5</sub>-D-R-S-N-L-T-R-H-X<sub>3-5</sub>-H-X<sub>7</sub>-C-X<sub>2-4</sub>-C-X<sub>5</sub>-T-S-G-H-L-S-R-H-X<sub>3-5</sub>-H-X<sub>7</sub>-C-X<sub>2-4</sub>-C-X<sub>5</sub>-R-S-D-H-L-S-R-H-X<sub>3-5</sub>-H(配列番号162)。

【0102】

認識領域内で、残基-1、+3および+6は主にタンパク質-ヌクレオチド接触に関与する。従って追加の同等物の非限定例には3つの亜鉛フィンガーを含むタンパク質があり、ここで第1のフィンガーは-1にD残基、+3にN残基、そして+6にR残基を有する(DXXNXXR、配列番号163);第2のフィンガーは-1にT残基、+3にH残基、そして+6にR残基を有する(TXXHXXR、配列番号164);第3のフィンガーは-1にR残基、+3にH残基、そして+6にR残基を有する(RXXHXXR、配列番号165)。すなわち、例えば配列番号166を含むタンパク質は、開示された方法での使用において同等物であると見なされる。

【0103】

C-X<sub>2-4</sub>-C-X<sub>5</sub>-D-X-X-N-X-X-R-H-X<sub>3-5</sub>-H-X<sub>7</sub>-C-X<sub>2-4</sub>-C-X<sub>5</sub>-T-X-X-H-X-X-R-H-X<sub>3-5</sub>-H-X<sub>7</sub>-C-

10

20

30

40

50



X<sub>2-4</sub>-C-X<sub>5</sub>-R-X-X-H-X-X-R-H-X<sub>3-5</sub>-H (配列番号166)。

【0104】

追加の同等物は、標的セグメントGGGGGTGAC (配列番号26) を含む配列に結合する任意のZFPを含む。

【0105】

亜鉛フィンガーの認識領域の-1、+3および+6接触残基のアミノ酸と標的部位中のヌクレオチドの対応が記載されている。例えば米国特許第6,007,988号；6,013,453号；6,746,838号、および6,866,997号；ならびにPCT公報W096/06166号；W098/53058号；W098/53059号およびW098/53060号を参照されたい。従って同等物と見なされるのはまた、第1のフィンガーが-1にDまたはH；+3にN、そして+6にR、K、SまたはTを有する（およびSまたはTが隣接C末端亜鉛フィンガーの+2位にDを含有するなら）；第2のフィンガーは-1にH、T、NまたはQ、+3にH、そして+6にR、K、SまたはTを有する（およびSまたはTが隣接C末端亜鉛フィンガーの+2位にDを含有するなら）；第3のフィンガーは-1にR、+3にH、そして+6にR、K、SまたはTを有する（およびSまたはTが隣接C末端亜鉛フィンガーの+2位にDを含有するなら）3フィンガー-亜鉛フィンガータンパク質である。

10

【0106】

VII. 亜鉛フィンガータンパク質の産生

A. 合成とクローニング

ZFPポリペプチドとこれをコードする核酸は、組換え遺伝学の分野で日常的な方法を使用して作成することができる。一般的方法を記載する基礎的教科書には、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」(第2版、1989)；Kriegler、「遺伝子移動と発現：実験室マニュアル (Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual)」(1990)；および「分子生物学の現代のプロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」(アウスベル (Ausubel) ら編、1994)がある。さらに約100塩基未満の核酸は、種々の販売業者、例えばThe Midland Certified Reagent Company (mrcr@oligos.com)、The Great American Gene Company (http://www.genco.com)、ExpressGen Inc. (www.expressgen.com)、Operon Technologies Inc. (Alameda, Calif.) から注文作成することができる。同様にペプチドは、種々の販売業者、例えばPeptidoGenic (pkim@ccnet.com)、HTI Bio-products, inc. (http://www.htibio.com)、BMA Biomedicals Ltd (U.K.)、Bio.Synthesis, Inc. から注文作成することができる。

20

30

【0107】

オリゴヌクレオチドは、BeaucageとCaruthers、Tetrahedron Letts. 22:1859-1862 (1981)により最初に記載された固相ホスホラミダイトリエステル法に従って、Van Devanterら、Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984)に記載のように自動合成機を使用して化学合成することができる。オリゴヌクレオチドの精製は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または反応生成物HPLCにより行われる。クローン化された遺伝子と合成オリゴヌクレオチドの配列は、クローニング後に、例えばWallaceら、Gene 16:21-26 (1981)の2本鎖鑄型を配列決定するための鎖停止法を使用して証明することができる。

【0108】

新に設計されたDNA結合ペプチドを発現するための必要なコード配列を作成するのに、典型的には2つの方法のいずれかが使用できる。1つは、6つの重複オリゴヌクレオチドを利用するPCRベースのアセンブリー法である。3つのオリゴヌクレオチドは、認識らせん間のDNA結合ドメインの一部をコードする「普遍的」配列に対応する。これらのオリゴヌクレオチドは典型的には、すべての亜鉛フィンガー構築体について一定である。認識らせんをコードするように他の3つの「特異的」オリゴヌクレオチドが設計される。これらのオリゴヌクレオチドは、認識らせん上の-1、2、3および+6位に置換を含有し、これらを異なるDNA結合ドメインのそれぞれに対して特異的にしている。

40

【0109】

PCR合成は2工程で行われる。まず、低温アニーリング工程を有する4サイクルPCR反応で

50

6つのオリゴヌクレオチド（3つは普遍的、3つは特異的）を組合せて2本鎖DNA鋳型を作成し、こうしてオリゴヌクレオチドをアニーリングしてDNA「足場（scaffold）」を作成する。足場中のすき間は、高忠実度熱安定性ポリメラーゼ（TaqとPfuポリメラーゼの組合せでもよい）により充填される。作成の第2相において、亜鉛フィンガー鋳型は、シャトルベクター中にクローニングするためのいずれかの末端に、または発現ベクター中に直接、制限部位を取り込むために設計される外部プライマーにより増幅される。

#### 【0110】

新に設計されたDNA結合タンパク質をクローニングするための代替法は、所望のZFPの特異的領域をコードする相補的オリゴヌクレオチドをアニーリングすることに依存する。この具体的な応用は、最終的連結工程の前にオリゴヌクレオチドをリン酸化することを必要とする。これは通常、アニーリング反応を設定する前に行われる。簡単に説明すると、タンパク質の定常領域をコードする「普遍的」オリゴヌクレオチド（上記のオリゴ1、2および3）をその相補的オリゴヌクレオチドを用いてアニーリングする。さらにフィンガー認識らせんをコードする「特異的」オリゴヌクレオチドが、そのそれぞれの相補的オリゴヌクレオチドを用いてアニーリングされる。これらの相補的オリゴは、上記プロトコール中でポリメラーゼによりすでに充填された領域を充填するのに設計される。以下の工程の選択されたベクター中にクローニングするのに使用される認識部位に特異的なオーバーハング配列を残すように、オリゴ1と6に相補的なオリゴヌクレオチドが遺伝子工学的に作成される。

10

#### 【0111】

第2のアセンブリープロトコールは以下の面で第1のプロトコールとは異なる：新に設計されたZFPをコードする「足場」は完全に合成DNAからなり、こうしてポリメラーゼ充填工程を排除し、さらにベクター中にクローン化される断片は増幅する必要がない。最後に配列特異的オーバーハングを残す設計は、挿入する断片の制限酵素消化物の必要性を排除する。あるいは、標準的な部位特異的突然変異誘発法を使用して、ZFP認識らせんに対する変化を作成することができる。

20

#### 【0112】

両方のアセンブリー法は、新に設計されたZFPをコードする生じる断片をベクターに連結することを必要とする。最後にZFPをコードする配列は発現ベクター中にクローン化される。一般的に使用される発現ベクターには、特に限定されないが、修飾pMAL-c2細菌発現ベクター（ニューイングランドバイオラボズ（New England Biolabs）、ビバリー（Beverly）、マサチューセッツ州）または真核生物発現ベクターpcDNA（プロメガ（Promega）、マジソン、ウィスコンシン州）がある。最終的構築体は配列解析により証明される。

30

#### 【0113】

当業者に公知の任意の適当なタンパク質精製法を使用して、ZFPを精製することができる（前述のAusubel、前述のSambrookを参照）。さらに発現のために任意の適当な宿主を使用することができる（例えば、細菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞など）。

#### 【0114】

マルトース結合タンパク質に融合した亜鉛フィンガータンパク質（MBP-ZFP）の細菌JM109株での発現は、アミロースカラムによる直接的な精製を可能にする（ニューイングランドバイオラボズ（New England Biolabs）、ビバリー（Beverly）、マサチューセッツ州）。pMal-c2発現プラスミド中のMBP-ZFP融合体はtacプロモーター（ニューイングランドバイオラボズ（New England Biolabs）、ビバリー（Beverly）、マサチューセッツ州）の制御下にあるため、IPTGを用いて誘導することにより、高発現レベルの亜鉛フィンガーキメラタンパク質が得られる。MBP-ZFP融合プラスミドを含有する細菌は、 $10\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ 、0.02% グルコース、プラス $50\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含有する $2\times\text{YT}$ 培地中に接種され、37で振盪される。指数増殖中期にIPTGを $0.3\text{mM}$ になるように加え、培養物を振盪させる。3時間後、遠心分離して細菌を採取し、超音波処理または圧力セル中を通過させるか、リゾチームの使用により破碎して、遠心分離により不溶性物質を除去する。MBP-ZFPタンパク質はアミロース結合樹脂上に捕捉され、 $20\text{mM}$  トリス塩酸（ $\text{pH}7.5$ ）、 $200\text{mM}$   $\text{NaCl}$ 、 $5\text{mM}$  DTT、

40

50

および50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>を含有する緩衝液を用いて充分洗浄され、次に基本的に同じ緩衝液中のマルトースを用いて溶出される（精製はニューイングランドバイオラボズ（New England Biolabs）の標準的プロトコールに基づく）。精製されたタンパク質は定量され、生化学的分析のために保存される。

#### 【0115】

精製したタンパク質の解離定数（例えばKd）は典型的には、電気泳動度シフトアッセイ（「EMSA」）を使用して測定される（BuratowskiとChodosh、「分子生物学の現代のプロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）：中、12.2.1～12.2.7頁（Ausubelら、1996））。親和性は、一定量の標識2本鎖オリゴヌクレオチド標的に対して精製タンパク質を力価測定することにより測定される。標的は典型的には、天然配列中に存在する3bpと追加の定常フランキング配列によりフラックされた天然の結合部位配列を含む。天然の結合部位は典型的には、3フィンガータンパク質について9bpで、6フィンガーZFPについては2×9bp+介在塩基である。アニーリングされたオリゴヌクレオチド標的は、T4ファージポリヌクレオチドキナーゼを用いる標的の効率的標識を可能にする1塩基5'オーバーハングを有する。アッセイについて標的は1nM以下の濃度（実際の濃度は予測される解離定数より少なくとも10倍低く維持される）で加えられ、精製ZFPは種々の濃度で加えられる、反応物は少なくとも45分間平衡化される。さらに反応混合物はまた、10mM トリス（pH7.5）、100mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM ZnCl<sub>2</sub>、5mM DTT、10%グリセロール、0.02% BSAを含有する。

10

#### 【0116】

平衡化した反応物を、あらかじめトリス/グリシン緩衝液で45分間流した10%ポリアクリルアミドゲルにのせ、次に結合および非結合標識標的を150Vで電気泳動により分離する。あるいは4%ポリアクリルアミドスタッキングゲルを含有する10～20%の勾配トリス塩酸ゲルを使用することができる。乾燥したゲルをオートラジオグラフィー、またはホスホルイメージング（phosphorimaging）により視覚化し、半最大結合を与えるタンパク質濃度を計算して見かけのKdを測定する。

20

#### 【0117】

アッセイはまた、タンパク質調製物中の活性画分の測定を含んでよい。活性画分は化学量論ゲルソフトにより測定され、ここでタンパク質は高濃度の標的DNAに対して力価測定される。力価測定は標的の100、50、および25%で行われる（通常マイクロモルレベル）。

30

#### 【0118】

##### B. ファージ表示

ファージ表示法は、所望の標的特異性を有する亜鉛フィンガータンパク質を生成するためのほぼ経験的な手段を提供する（例えば、Rebar、US5,789,538号；Chooら、W096/06166号；Barbasら、W095/19431号、および98/543111号；Jamiesonら、前述を参照）。この方法は、合理的設計と組合せて、またはその代替法として使用することができる。この方法は、突然変異誘発した亜鉛フィンガータンパク質の多様なライブラリーを作成し、次に親和性選択法を使用して所望のDNA結合性を有するタンパク質を単離することを含む。この方法を使用するために、実験者は典型的には以下のように進める。まず亜鉛フィンガータンパク質の遺伝子を突然変異誘発して、結合特異性および/または親和性に重要な領域中に多様性を導入する。典型的な応用ではこれは、-1、+2、+3および+6位、時に+1、+5、+8および+10の付属位置の単一のフィンガーのランダム化により行われる。次に突然変異誘発した遺伝子を、線状ファージの遺伝子III（これはコートタンパク質pIIIをコードする）との融合体としてファージまたはファジミドベクター中にクローン化する。亜鉛フィンガー遺伝子が、成熟しプロセスされたタンパク質中でpIIIとのアミノ末端融合体として発現されるように、膜排出シグナルペプチドをコードする遺伝子IIIのセグメントとpIIIの残りの間に亜鉛フィンガー遺伝子を挿入する。

40

#### 【0119】

ファジミドベクターを使用する時、突然変異誘発されたフィンガー遺伝子はまた、少な

50

くともファージ粒子へのpIIIのアセンブリーに必要なC末端領域をコードする遺伝子IIIの末端切断型と融合してもよい。生じるベクターライブラリーは大腸菌 (*E. coli*) 中に形質転換され、これを使用して、コーティングタンパク質pIIIとの融合体としてその表面上に変種亜鉛フィンガータンパク質を発現する線状ファージを産生させる。ファジミドベクターを使用する場合は、この工程はヘルパーファージとの重複感染が必要である。次にファージライブラリーは標的DNA部位とインキュベートされ、親和性選択法を使用して、バルクファージから高親和性で標的に結合するファージを単離する。典型的にはDNA標的は固体支持体上に固定化され、これは次に、最も堅い結合ファージ以外のすべてを除去するのに十分な条件下で洗浄する。洗浄後、支持体上に残ったファージを、亜鉛フィンガー-DNA結合を破壊する条件下で溶出して回収する。回収されたファージを使用して新鮮な大腸菌 (*E. coli*) を感染させ、次にこれを増幅し、ファージ粒子の新しいバッチを産生するのに使用する。次に選択と増幅を必要な回数だけ繰り返して、強結合物についてファージプールを濃縮して、配列決定および/またはスクリーニング法を使用してこれらを同定する。この方法はpIII融合体について例示されるが、類似の原理を使用してZFP変種をpVII融合体としてスクリーニングすることができる。

10

#### 【0120】

ある実施態様において特定の亜鉛フィンガータンパク質により結合される配列は、タンパク質とランダム化2本鎖オリゴヌクレオチド配列との結合反応 (例えばKd測定の条件下、前述) を行うことにより測定される。結合反応は電気泳動度シフトアッセイ (「EMSA」) を使用して分析され、ここでタンパク質-DNA複合体はゲル中で遅延泳動を受け、非結合核酸から分離することができる。フィンガーに結合したオリゴヌクレオチドはゲルから精製され、例えばポリメラーゼ連鎖反応により増幅される。次に選択されたオリゴヌクレオチド配列を用いて、選択 (すなわち、結合反応とEMSA分析) が必要な回数繰り返される。こうして特定のアミノ酸配列を有する亜鉛フィンガータンパク質の結合特異性が決定される。

20

#### 【0121】

### C. 制御ドメイン

亜鉛フィンガータンパク質はしばしば、融合タンパク質として外因性ドメイン (またはその機能性断片) とともに発現される。ZFPへの付加のための共通ドメインには、例えば転写因子ドメイン (アクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー)、サイレンサー、癌遺伝子 (例えば、*myc*、*jun*、*fos*、*myb*、*max*、*mad*、*rel*、*ets*、*bcl*、*myb*、*mos*ファミリーメンバーなど); DNA修復酵素およびその結合因子と修飾物; DNA再整列酵素とその結合因子と修飾物; クロマチン結合タンパク質とその修飾物 (例えば、キナーゼ、アセチラーゼデアセチラーゼ); およびDNA修飾酵素 (例えば、メチルトランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ) およびその結合因子と修飾物がある。標的遺伝子の発現を抑制するためにZFPが使用される時、ZFPと融合するための好適なドメインはヒトK0X-1タンパク質のKRAB抑制ドメインである (Thiesenら、*New Biologist* 2, 363-374 (1990); Margolinら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4509-4513 (1994); Pengueら、*Nucl. Acids Res.* 22:2908-2914 (1994); Witzgallら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4514-4518 (1994)。活性化を行うための好適なドメインは、HSV VP16活性化ドメイン (例えば、Hagmannら、*J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)を参照) 核ホルモン受容体 (例えば、Torchiaら、*Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383 (1998)を参照); 核因子カッパBのp53サブユニット (BitkoとBarik、*J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) およびDoyleとHunt、*Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); Leuら、*Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998)を参照)、または人工的キメラ機能性ドメイン、例えばVP64 (Seifpalら、*EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992)を参照) がある。

30

40

#### 【0122】

糖尿病性神経障害に関連する遺伝子 (例えばVEGF) 中の新規配列とアクセス可能領域 (例えばDNaseI超高感度部位) の同定は、糖尿病性神経障害の治療のための融合分子の設計

50

を可能にする。すなわちある実施態様において本明細書に開示の組成物と方法は、VEGF遺伝子の1つ以上の制御領域を特異的に標的とするDNA結合ドメインと、機能性（例えば抑制または活性化）ドメインとの融合体（またはかかる融合体をコードするポリヌクレオチド）を含む。こうして抑制または活性化ドメインは、DNA結合ドメインにより結合された遺伝子中の配列との近傍にもってこられる。次に機能性ドメインの転写制御機能は、選択された制御配列に作用することができる。例えば米国特許出願第2002-0064802号を参照されたい。

**【0123】**

さらなる実施態様において、本出願人のW001/83793号に開示されたクロマチンの標的化レモデリングを使用して、DNA結合分子の結合にアクセス可能な細胞クロマチン中に1つ以上の部位を作成することができる。

10

**【0124】**

融合分子は、当業者に公知のクローニングおよび生化学的結合法により構築される。融合分子は、DNA結合ドメインと機能性ドメイン（例えば、転写活性化または抑制ドメイン）とを含む。融合分子はまた、核局在化シグナル（例えば、SV40培地T抗原からのもの）およびエピトプタグ（例えば、FLAGおよび血球凝集素）を随時含む。融合タンパク質（およびこれをコードする核酸）は、融合の成分間で翻訳読みとり枠が保存されるように設計される。

**【0125】**

一方では機能性ドメイン（またはその機能性断片）のポリペプチド成分と、他方で非タンパク質DNA結合ドメイン（例えば、抗生物質、インターカレーター、小さくぼみ結合体、核酸）との融合体は、当業者に公知の生化学的結合法により構築される。例えば、ピアスケミカル社（Pierce Chemical Company）（ロックフォード（Rockford）、イリノイ州）カタログを参照されたい。小さくぼみ結合体とポリペプチドとの融合体を作成するための方法と組成物が記載されている。Mappら（2000）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935。

20

**【0126】**

ある実施態様において、亜鉛フィンガータンパク質が結合する標的部位は細胞クロマチンのアクセス可能領域に存在する。アクセス可能領域は、例えば本出願人の国際公報W001/83732号に記載のように測定することができる。標的部位が細胞クロマチンのアクセス可能領域に存在しない場合は、1つ以上のアクセス可能領域を本出願人のW001/83793号に記載のように作成することができる。別の実施態様において融合分子のDNA結合ドメインは、その標的がアクセス可能領域であるか否かにかかわらず、細胞クロマチンに結合することができる。例えばかかるDNA結合ドメインは、リンカーDNAおよび/またはヌクレオソームDNAに結合することができる。このタイプの「パイオニア」DNA結合ドメインの例は、いくつかのステロイド受容体および肝細胞核因子3（HNF3）中に存在する。Cordingleyら（1987）Cell 48:261-270；Pinaら（1990）Cell 60:719-731；およびCirilloら（1998）EMBO J. 17:244-254。

30

**【0127】**

かかる応用において融合分子は典型的には、当業者に公知の薬剤学的に許容される担体を用いて調製される。例えばレミントンの薬剤科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、第17版、1985；および本出願人のW000/42219号を参照されたい。

40

**【0128】**

いったん融合分子がDNA結合ドメインを介して標的セグメントに結合すると、融合分子の機能性成分/ドメインは、遺伝子の転写に影響を与えることができる種々の異なる成分から選択することができる。従って機能性成分は、特に限定されないが、種々の転写因子ドメイン、例えばアクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー、およびサイレンサー、を含むことができる。

**【0129】**

遺伝子の発現を抑制するのに使用される例えばZFPのようなDNA結合ドメインと含有する

50

ための機能性ドメインの例は、KOX-1タンパク質からのKOX抑制ドメインおよびKRAB抑制ドメインである（例えば、Thiesenら、*New Biologist* 2, 363-374 (1990); Margolinら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4509-4513 (1994); Pengueら、*Nucl. Acids Res.* 22:2908-2914 (1994); Witzgallら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4514-4518 (1994)。他の適当な抑制ドメインは、メチル結合ドメインタンパク質2B (MBD-2B) である（またMBDタンパク質の説明についてはHendrichら (1999) *Mamm Genome* 10:906-912を参照）。他の有用な抑制ドメインはv-ErbAタンパク質に結合したものである。例えば、Dammら (1989) *Nature* 339:593-597; Evans (1989) *Int. J. Cancer Suppl.* 4:26-28; Painら (1990) *New Biol.* 2:284-294; Sapら (1989) *Nature* 340:242-244; Zenkeら (1988) *Cell* 52:107-119; およびZenkeら (1990) *Cell* 61:1035-1049を参照されたい。

10

## 【0130】

活性化を行うための好適なドメインは、HSV VP16活性化ドメイン（例えば、Hagmannら、*J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)）核ホルモン受容体（例えば、Torchiaら、*Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383 (1998)）；核因子カッパBのp65サブユニット（BitkoとBarik、*J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) およびDoyleとHunt、*Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)）；Leuら、*Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998)）、または人工的キメラ機能性ドメイン、例えばVP64（Seifpalら、*EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992)を参照）がある。活性化ドメインのさらなる例には、特に限定されないが、VP16、VP64、p300、CBP、PCAF、SRC1 PVALF、AtHD2AおよびERF-2がある、例えばRobyrら (2000) *Mol. Endocrinol.* 14:329-347; Collingwoodら (1999) *J. Mol. Endocrinol.* 23:255-275; Leoら (2000) *Gene* 245:1-11; Manteuffel-Cymborowski (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89; McKennaら (1999) *J. Steroid Biochem. Mo. Biol.* 69:3-12; Malikら (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283; およびLemonら (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504を参照されたい。活性化ドメインのさらなる例には、特に限定されないが、Osgai、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、-6、-7および-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP、およびTRAB1がある。例えばOgawara (2000) *Gene* 245:21-29; Okanamiら (1996) *Genes Cells* 1:87-99; Goffら (1991) *Genes Dev.* 5:298-309; Choら (1999) *Plant Mol. Biol.* 40:419-429; Ulmasonら (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849; Sprenger-Hausseisら (2000) *Plant J.* 22:1-8; Gongら (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44; およびHobora (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15, 348-353を参照されたい。

20

30

## 【0131】

抑制ドメインのさらなる例には、特に限定されないが、KRAB、KOX、SID、MBD2、MBD3、DNMTファミリーのメンバー（例えば、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B）、RbおよびMeCP2がある。例えばBirdら (1999) *Cell* 99:451-454; Tylerら (1999) *Cell* 99:443-446; Knoepflerら (1999) *Cell* 99:447-450; およびRobertsonら (2000) *Nature Genet.* 25:338-342を参照されたい。抑制ドメインのさらなる例には、特に限定されないが、ROM2とAtHD2Aがある。例えばChemら (1996) *Plant Cell* 8:305-321; およびWuら (2000) *Plant J.* 22:19-27を参照されたい。

## 【0132】

機能性ドメインのさらなる例には、例えば本出願人の米国特許第6,534,261号、および米国特許出願第2002/0160940がある。

40

## 【0133】

## D. 発現ベクター

選択されたZFPをコードする核酸は典型的には、複製および/または発現のため（例えばKdの測定のため）に、原核細胞または真核細胞への形質転換のための中間ベクターにクローン化される。中間ベクターは典型的には、ZFPをコードする核酸の保存もしくは操作のための、またはタンパク質の産生のための、原核生物ベクター、例えばプラスミドもしくはシャトルベクター、または昆虫ベクターである。ZFPをコードする核酸もまた、典型的には植物細胞、動物細胞（好ましくは哺乳動物細胞またはヒト細胞）、真菌細胞、細菌細胞、または原生動物細胞への投与のために、発現ベクター中にクローン化される。

50

## 【0134】

クローン化遺伝子または核酸の発現を得るために、ZFPは典型的には、転写を指令するプロモーターを含有する発現ベクター中にサブクローン化される。適当な細菌および真核生物プロモーターは当該分野で公知であり、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」(第2版、1989)；Kriegler、「遺伝子移動と発現：実験室マニュアル (Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual)」(1990)；および「分子生物学の現代のプロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」(Ausubelら編、1994)に記載されている。ZFPを発現するための細菌発現系が利用でき、例えば大腸菌 (*E. coli*)、パチルス (*Bacillus*) 種、およびサルモネラ (*Salmonella*) がある (Palvaら、Gene 22:229-235 (1983))。かかる発現系のためのキットが市販されている。哺乳動物細胞、酵母、および昆虫細胞のための真核生物発現系は当該分野で公知であり、これらも市販されている。

10

## 【0135】

ZFP核酸の発現を指令するために使用されるプロモーターは、具体的な応用に依存する。例えばZFPの発現と精製のために典型的には強い構成性プロモーターが使用される。これに対してZFPが遺伝子制御のためにインピボで投与される時は、ZFPの具体的な用途に依存して構成性または誘導性プロモーターが使用される。さらにZFPの投与のための好適なプロモーターは、弱いプロモーター、例えばHSV TKまたは同様の活性を有するプロモーターでもよい。このプロモーターはまた典型的には、トランス活性化に応答性の要素、例えば、低酸素症応答要素、Gal4応答要素、lacリプレッサー応答要素、および小分子制御系 (例えばtat-制御系) およびRU-486系がある (例えば、GossenとBujard、PNAS 89:5547 (1992)；Oliginoら Gene Ther. 5:491-496 (1998)；Wangら、Gene Ther. 4:432-441 (1997)；Neeringら、Blood 88:1147-1155 (1996)；およびRendahlら、Nat. Biotechnol. 16:757-761 (1998)を参照)。

20

## 【0136】

プロモーター以外に、発現ベクターは典型的には、宿主細胞 (原核生物または真核生物) 中で核酸の発現に必要なすべての追加の要素を含有する転写ユニットまたは発現カセットを含有する。すなわち典型的な発現カセットは、例えばZFPをコードする核酸配列に機能できる形で結合したプロモーター、および転写体の効率的ポリアダニル化、転写停止、リボゾーム結合部位、または翻訳停止に必要なシグナルを含有する。カセットの追加の要素は、例えばエンハンサー、および外因性のスプライスされたイントロン性シグナルを含有してもよい。

30

## 【0137】

遺伝子情報を細胞に輸送するのに使用される具体的な発現ベクターは、ZFPの使用目的に関して選択される。標準的な細菌発現ベクターには、pBR322ベースのプラスミド、pSKF、pET23Dなどのプラスミド、および市販の融合発現系 (例えばGSTとlacZ) がある。好適な融合タンパク質はマルトース結合タンパク質「MBP」である。かかる融合タンパク質はZFPの精製に使用される。エピトープタグもまた組換えタンパク質に付加して、発現を追跡するための、および細胞およびサブ細胞局在化を追跡するための、便利な単離法を提供することができる (例えばc-mycまたはFLAG)。

40

## 【0138】

真核生物ウイルスからの制御要素を含有する発現ベクターは、しばしば真核生物発現ベクター (SV40ベクター、パピローマウイルスベクター、およびエプスタインバーウイルス由来のベクター) で使用される。他の真核生物ベクターの例には、pMSG、pAV009/A+、pMT010/A+、pMAMneo-5、パキキュロウイルス pDSVE、およびSV40早期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核細胞中での発現に有効であることが証明された他のプロモーターの指令下でタンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターである。

## 【0139】

50

いくつかの発現系は、チミジンキナーゼ、ヒグロマイシンBホストトランスフェラーゼ、およびジヒドロ葉酸レダクターゼのような安定にトランスフェクトされる細胞株の選択のためのマーカーを有する。例えばポリヘドリンプロモーターまたは他の強いバキュロウイルスプロモーターまたは他の強いバキュロウイルスプロモーターの指令で、ZFPをコードする配列を用いて昆虫細胞中でバキュロウイルスベクターを使用するような高収率発現系もまた適している。

#### 【0140】

発現ベクター中に典型的に含まれる要素はまた、大腸菌 (*E. coli*) 中で機能するレプリコン、組換えプラスミドを有する細菌の選択を可能にする抗生物質耐性をコードする遺伝子、および組換え配列の挿入を可能にするプラスミドの非必須領域中のユニークな制限部位がある。

#### 【0141】

標準的トランスフェクション法を使用して、多量のタンパク質を発現する細菌、哺乳動物、酵母または昆虫細胞株が産生され、これらは次に標準的方法を使用して精製される (例えば、Colleyら、*J. Biol. Chem.* 264:17619-17622 (1989); タンパク質精製のガイド (Guide to Protein Purification)、*Methods in Enzymology* 中、第182巻 (Deutscher編、1990)を参照)。真核細胞および原核細胞の形質転換は標準的方法に従って行われる (例えば、Morrison、*J. Bact.* 132:349-351 (1977); Clark-CurtissとCurtiss、*Methods in Enzymology* 101:347-362 (Wuら編、1983)を参照)。

#### 【0142】

宿主細胞に外来ヌクレオチド配列を導入するための任意の公知の方法が使用される。これらは、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、電気穿孔法、リポソーム、微量注入法、ネーキッドDNA、プラスミドベクター、ウイルスベクター (エピソーム性および組み込み性)、および宿主細胞中にクローン化ゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたは他の外来遺伝子物質を導入するための他の公知の方法がある (例えば、Sambrookら、前述を参照)。使用される具体的な遺伝子操作法は、選択されたタンパク質を発現することができる宿主細胞中に少なくとも1つの遺伝子をうまく導入できることのみが必要である。

#### 【0143】

### VIII. 測定法

ZFPが前記の方法に従っていったん設計し調製されると、設計されたZFPの活性の最初の評価が行われる。次に、目的の遺伝子の発現を調節する能力を示すZFPタンパク質を、ZFPが設計された具体的な応用に依存して、より具体的な活性についてさらに測定することができる。すなわち例えば、本明細書のZFPはまず、VEGF発現を調節する能力について測定することができる。次に、糖尿病性神経障害を治療するために標的遺伝子の発現を調節するZFPの能力のより特異的な測定が行われる。これらのより特異的な測定法の説明は、セクションIXで後述される。

#### 【0144】

特定のZFPの活性は、種々のインビトロおよびインビボ測定法を使用して、例えばタンパク質またはmRNAレベル、生成物レベル、酵素活性、腫瘍増殖; レポーター遺伝子の転写活性化もしくは抑制; 2次メッセンジャーレベル (例えば、cGMP、cAMP、IP3、DAG、Ca<sup>2+</sup>) ; サイトカインとホルモン産生レベル; および血管新生を、例えばイムノアッセイ (例えば、抗体を用いるELISAと免疫組織化学測定法)、ハイブリダイゼーション測定法 (例えば、RNase保護、RNAプロット (「ノーザン」)、インサイチューハイブリダイゼーション、オリゴヌクレオチドアレイ試験)、比色測定法、増幅測定法、酵素活性測定法、腫瘍増殖測定法、表現型測定法などを使用して測定することにより、評価することができる。

#### 【0145】

ZFPは典型的には、最初は例えば293細胞、CHO細胞、VERO細胞、BHK細胞、ヒーラ細胞、COS細胞などの培養細胞を使用してインビトロの活性について試験される。好ましくはヒト細胞が使用される。ZFPはしばしば、まずレポーター遺伝子を用いる一過性発現系を使

10

20

30

40

50



用して試験され、次に標的内在性遺伝子が細胞中および動物でインビボおよびエクスピボの両方で試験される。ZFPは細胞中で組換え発現され、動物に移植された細胞中に組換え発現され、またはトランスジェニック動物中で組換え発現され、ならびに後述の送達ビヒクルを使用して動物もしくは細胞にタンパク質として投与することができる。細胞は固定化されるか、溶液中か、動物に注入されるか、またはトランスジェニックもしくは非トランスジェニック動物中に天然に存在してもよい。

**【0146】**

遺伝子発現の調節は、本明細書に記載のインビトロまたはインビボ測定法の1つを使用して試験される。試料または測定法はZFPを用いて試験され、未処理対照試料と比較して調節の程度を調べる。上記したように、内在性遺伝子発現の制御について、ZFPは典型的には200nMまたはそれ以下、さらに好ましくは100nMまたはそれ以下、さらに好ましくは50nM、最も好ましくは25nMまたはそれ以下のKdを有する。

10

**【0147】**

ZFPの作用は、上記パラメータのいずれかを調べることにより測定することができる。任意の適当な遺伝子発現、表現型、または生理学的な変化を使用して、ZFPの影響を評価することができる。昆虫細胞または動物を使用して機能的結果を測定する時、神経栄養性、公知のおよび解析されていない遺伝子マーカーに対する転写的変化（例えば、ノーザンブロットまたはオリゴヌクレオチドアレイ試験）、細胞代謝の変化（例えば細胞増殖またはpH変化）、および細胞内2次メッセンジャー（例えばcAMPまたはcGMP）の変化のような種々の作用を測定することもできる。

20

**【0148】**

内在性遺伝子発現のZFP制御の好適な測定法は、インビトロで行うことができる。1つの好適なインビトロアッセイフォーマットでは、培養細胞中の内在性遺伝子発現のZFP制御は、ELISA測定法を使用してタンパク質産生を調べることにより測定される。試験試料が、ZFPコード配列が欠如したベクターまたは別の遺伝子を標的とする無関係のZFPをコードするベクターで処理した対照細胞と比較される。

**【0149】**

別の実施態様において内在性遺伝子発現のZFP制御は、標的遺伝子mRNA発現のレベルを測定することによりインビトロで測定される。遺伝子発現のレベルは、増幅（例えば、PCR、LCR）またはハイブリダイゼーション測定法（例えばノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットおよびRNase保護）を使用して測定される。定量的RT-PCR法（いわゆるTaqMan測定法）の使用は、転写体のレベルを定量するのに使用することができる。タンパク質またはmRNAのレベルは、直接または間接に標識された検出物質、例えば本明細書に記載の蛍光もしくは放射能標識核酸、放射能標識もしくは酵素標識抗体などを使用して検出される。かかる方法はまた、Gelfandの米国特許第5,210,015号、Livakらの米国特許第5,538,848号、Haalandの米国特許第5,863,736号、ならびにHeid, C.A.ら、Genomic Research, 6:986-994 (1996); Gibson, U.E.M.ら、Genomic Research, 6:995-1001 (1996); Holland, P.M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280 (1991); およびLivak, K.J.ら、PCR Methods and Applications 357-362 (1995)（これらはそれぞれ参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

30

40

**【0150】**

あるいは、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、CAT、または-galのようなレポーター遺伝子に機能できる形で結合した選択された標的遺伝子（例えばVEGF）からの遺伝子プロモーターを使用して、レポーター遺伝子系を作成することができる。レポーター構築体は典型的には培養細胞中に同時トランスフェクトされる。選択されたZFPを用いて処理した後、レポーター遺伝子の転写、翻訳、または活性の量を当業者に公知の標準的方法に従って測定する。

**【0151】**

内在性遺伝子発現のZFP制御に有用な好適なアッセイフォーマットの別の例は、インビボで行われる。このアッセイは、神経機能に關与する遺伝子を調べるのに特に有用である

50

。このアッセイでは選択されたZFPが、糖尿病性神経障害を示す動物に投与（例えば筋肉内注射）される。適当な時間（好ましくは4～8時間）後、運動および感覚神経伝導速度が、同様に糖尿病である対照動物と比較される。対照と糖尿病との間で有意差を示す（スチューデントt検定を使用）神経速度は、ZFPに影響を受けると言われている。あるいは神経組織の増殖を染色するのに使用される神経細胞特異抗体を使用してイムノアッセイを使用することができる。

【0152】

#### IX. 医薬組成物

本明細書のZFPおよびより典型的にはこれらをコードする核酸は、薬剤学的に許容される担体を用いて医薬組成物として場合により調製される。

【0153】

#### A. 核酸ベースの組成物

通常ウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子移動法を使用して、哺乳動物細胞または標的組織中に本ZFPをコードする核酸を導入することができる。かかる方法は、インビトロで細胞にZFPをコードする核酸を投与するために使用することができる。ある例ではZFPをコードする核酸は、インビボまたはエクスピボ遺伝子治療用途に投与される。非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、ネーキッド（naked）核酸、および送達ビヒクル（ポロキサマーまたはリポソーム）と複合体形成した核酸を含む。ウイルスベクター送達系には、DNAおよびRNAウイルスがあり、これらは細胞への送達後にエピソーム性もしくは組み込みゲノムを有する。遺伝子治療法の総説については、Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); NabelとFelgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); MitaniとCaskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TEITECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); KremerとPerricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddadら、*Current Topics in Microbiology and Immunology* 中、DoerflerとBohm（編）(1995); およびYuら、*Gene Therapy* 1:13-26 (1994)を参照されたい。

【0154】

ZFPをコードする核酸の非ウイルスデリバリー法には、リポフェクション、電気穿孔法、微量注入法、バイオリスティクス、ピロソーム（virosomes）、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸結合体、ネーキッドDNA、人工的ビリオン、およびDNAの薬剤増強摂取がある。リポフェクションは例えば米国特許第5,049,386号、4,946,787号、および4,897,355号に記載され、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、トランスフェクタム（Transfectam）（登録商標）、およびリポフェクチン（Lipofectin）（登録商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適した陽イオン性および中性脂質には、Felgner, W091/17424号、W091/16024号のものを含む。デリバリーは細胞（エクスピボ投与）または標的組織（インビボ投与）に行われる。

【0155】

免疫脂質複合体のような標的化リポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は当業者に公知である（例えば、Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaeseら、*Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behrら、*Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remyら、*Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gaoら、*Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmadら、*Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992); 米国特許第4,816,183号、4,217,344号、4,235,871号、4,261,975号、4,485,054号、4,501,728号、4,774,085号、4,837,028号、および4,946,787号を参照）。

【0156】

遺伝子工学的に作成したZFPをコードする核酸の送達のためのRNAまたはDNAベースのシステムの使用は、体内の特異的細胞にウイルスを標的化し、ウイルス負荷量を核に運ぶための高度に進んだプロセスを利用する。

【0157】

10

20

30

40

50

ウイルスベクターは直接患者投与される（インビボ）か、またはインビトロで細胞を処理するのに使用して、修飾された細胞を患者に投与する（エクスピボ）ことができる。ZFPのデリバリーのための通常のウイルスベースのシステムは、遺伝子輸送のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルスベクターを含む。ウイルスベクターは、標的細胞や組織に遺伝子を輸送するための現在最も効率的で多用性のある方法である。レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルス遺伝子輸送法を用いて宿主ゲノムへの組み込みが可能であり、挿入されたトランス遺伝子がしばしば長期発現される。さらに多くの異なるタイプの細胞や標的組織で、高効率の形質導入が観察されている。

**【0158】**

レトロウイルスの親和性は、外来エンベロープタンパク質を取り込んで、標的細胞の可能な標的集団を拡張することができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入または感染して典型的には高いウイルス力価を生み出すことができるレトロウイルスベクターである。従ってレトロウイルス遺伝子輸送系の選択は標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、パッケージング能が最大6~10kbの外来配列であるシス作用性の長い末端反復配列（long terminal repeats）からなる。最小のシス作用性LTRがウイルスの複製とパッケージングに充分であり、次にこれを使用して、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで永久的なトランス遺伝子発現を与える。広く使用されているレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス（MuLV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、サル免疫不全症ウイルス（SIV）、ヒト免疫不全症ウイルス（HIV）、およびこれらの組合せに基づくものがある（例えば、Buchscherら、*J. Virol.* 66:2731-2739 (1992)；Johannら、*J. Virol.* 66:1635-1640 (1992)；Sommerfeltら、*Virology* 176:58-59 (1990)；Wilsonら、*J. Virol.* 63:2374-2378 (1989)；Millerら、*J. Virol.* 65:2220-2224 (1991)；PCT/US94/05700号を参照）。

**【0159】**

ZFPの一過性発現が好適な応用では、典型的にはアデノウイルスベースの系が使用される。アデノウイルスベースのベクターは、多くのタイプの細胞で高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。かかるベクターでは、高力価と高レベルの発現が得られている。このベクターは、比較的単純な系で大量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス（「AAV」）ベクターもまた、例えば核酸とペプチドのインビトロ産生で、およ

**【0160】**

びインビボとエクスピボの遺伝子治療法で、細胞に標的核酸を形質導入するのに使用される（例えば、Westら、*Virology* 160:38-47 (1987)；米国特許第4,797,368号；W093/24641号；Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994)；Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994)を参照）。組換えAAVベクターの構築は多くの文献に記載されており、例えば米国特許第5,173,414号；Tratschinら、*Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985)；Tratschinら、*Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984)；HermonatとMuzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984)；およびSamulskiら、*J. Virol.* 63:03822-3828 (1989)がある。

**【0161】**

特に、少なくとも6つのウイルスベクター法が現在臨床治験の遺伝子輸送に利用でき、レトロウイルスベクターが最も頻繁に使用されている系である。これらのウイルスベクターのすべては、ヘルパー細胞株に挿入された遺伝子による欠陥ウイルスの補完を含むアプローチを利用して、形質導入体を作成する。

**【0162】**

pLASNとMFG-Sは、臨床治験で使用されているレトロウイルスベクターの例である（Dunbarら、*Blood* 85:3048-305 (1995)；Kohnら、*Nat. Med.* 1:1017-102 (1995)；Malechら、*PNAS* 94:2212133-12138 (1997)）。PA317/pLASNは遺伝子治療治験で使用された最初の治療用ベクターである（Blaeseら、*Science* 270:475-480 (1995)）。MFG-Sパッケージベクターについて50%またはそれ以上の形質導入効率が観察されている（Ellemら、*Immunol Immunother.* 44(1):10-20 (1997)；Dranoffら、*Hum. Gene Ther.* 1:111-2 (1997)）。

10

20

30

40

50

組換えアデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) は、欠陥および非病原性パルボウイルスアデノ随伴2型ウイルスに基づく別の遺伝子デリバリー系である。すべてのベクターは、トランス遺伝子発現カセットにフラックする AAV 145bp の逆方向末端反復配列のみを保持するプラスミドから得られる。形質導入された細胞のゲノムへの組み込みによる効率的な遺伝子輸送と安定なトランス遺伝子送達は、このベクター系の主要な特徴である (Wagnerら、Lancet 351:9117 1702-3 (1998)、Kearnsら、Gene Ther. 9:748-55 (1996))。

#### 【0163】

複製欠損組換えアデノウイルスベクター (Ad) は高力価で産生され、多くの異なるタイプの細胞に容易に感染するために、主に結腸癌遺伝子治療に使用される。ほとんどのアデノウイルスベクターは、トランス遺伝子が Ad E1a、E1b、および E3 遺伝子を置換するように遺伝子工学的に作成される。次に複製欠損ベクターは、欠失した遺伝子機能をトランスで供給する 293細胞中で増殖される。Adベクターは、多種類の組織 (肝臓、腎臓、および筋肉系組織にあるような非分裂性分化細胞を含む) をインピボで形質導入することができる。通常の Adベクターは、大きな運搬能力を有する。臨床試験での Adベクターの使用例は、筋肉内注射による抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド療法である (Stermanら、Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998))。遺伝子治療のためのアデノウイルスベクターのさらなる使用例は、Roseneckerら、Infection 24:15-10 (1996); Stermanら、Hum. Gene Ther. 9:71083-1089 (1998); Welshら、Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995); Alvarezら、Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997); Topfetterら、Gene Ther. 5:507-513 (1998); Stermanら、Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)がある。

10

20

#### 【0164】

パッケージング細胞は、宿主細胞に感染できるウイルス粒子を形成するのに使用される。かかる細胞には、アデノウイルスをパッケージする 293細胞、およびレトロウイルスをパッケージするプサイ2細胞または PA317細胞がある。遺伝子治療で使用されるウイルスベクターは、通常核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージするプロデューサー細胞株により作成される。ベクターは典型的には、パッケージングと以後の宿主への組み込みに必要な最小のウイルス配列と、タンパク質を発現するための発現カセットにより置換される他のウイルス配列を含有する。欠失しているウイルス機能は、パッケージング細胞株によりトランスで供給される。例えば遺伝子治療で使用される AAVベクターは典型的には、宿主ゲノムへのパッケージングと組み込みに必要な AAVゲノムからの ITR配列のみを有する。ウイルス DNA は細胞株でパッケージされ、これは他の AAV 遺伝子 (すなわち rep および cap) をコードするが ITR配列が欠如したヘルパープラスミドを含有する。この細胞株はまた、ヘルパーとしてのアデノウイルスで感染される。ヘルパーウイルスは AAVベクターの複製とヘルパープラスミドからの AAV 遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列が欠如しているため多量にはパッケージされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば AAV よりアデノウイルスがより感受性である熱処理により低下させることができる。

30

#### 【0165】

上記したように、当該分野で公知の種々のウイルスデリバリー媒体を使用して、核酸 (例えば亜鉛フィンガータンパク質をコードする核酸) を細胞に導入することができる。デリバリー媒体の選択は多くの要因 (特に限定されないが、送達される核酸と所望の標的細胞のサイズを含む) に依存する。

40

#### 【0166】

ある実施態様においてアデノウイルスはデリバリー媒体として使用される。アデノウイルスビヒクルの例には、アデノウイルス 2、5、12 および 35 型がある。例えば造血幹細胞へのトランス遺伝子の導入に有用な媒体 (例えば CD34<sup>+</sup>細胞) は、アデノウイルス 35 型を含む。さらなるアデノウイルス媒体にはいわゆる「空の (gutless)」アデノウイルスがある。例えば Kochanekら、(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5, 731-736 を参照されたい。

#### 【0167】

アデノ随伴ウイルスビヒクルには、AAV 血清型 1、2、5、6、7、8 および 9; ならびにキメ

50

ラAAV血清型、例えばAAV 2/1とAAV 2/5がある。1本鎖および2本鎖AAVベクターの両方とも使用できる。

【0168】

レンチウイルスデリバリー媒体は、例えば米国特許第6,312,682号と6,669,936号、および米国特許出願第2002/0173030号に記載されており、トランス遺伝子を免疫細胞（例えばT細胞）に導入するのに使用することができる。レンチウイルスはそのRNAゲノムのDNAコピーを宿主細胞のゲノム内に組み込みことができる。例えばOryら(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11382-11388; Miyoshiら(1998) *J. Virol.* 72:8150-8157; Dullら(1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zufferyら(1998) *J. Virol.* 72:9873-9880; Follenziら(2000) *Nature Genetics* 25:217-222 およびDelenda(2004) *J. Gene Medicine* 6:S125-S138を参照されたい。あるレンチウイルス媒体では、その組み込み機能が無能力にされており非組み込みレンチウイルス媒体を生成する。例えばPoonら(2003) *J. Virol.* 77:3962-3972、およびVargasら(2004) *Human Gene Therapy* 15:361-372を参照されたい。造血幹細胞の形質導入のための組み込みおよび非組み込みレンチウイルスベクターの両方の使用が、Haasら(2000) *Mol. Therapy* 2:71-80により記載されている。組み込みレンチウイルスベクターによるCD4<sup>+</sup> T細胞の形質導入がHumeauら(2004) *Mol. Therapy* 9:902-913により記載されている。

【0169】

ニューロンや神経節で長期発現が可能な単純ヘルペスウイルス媒体が記載されている。例えばKriskyら(1998) *Gene Therapy* 5(11):1517-1530; Kriskyら(1998) *Gene Therapy* 5(12):1593-1603; Burtonら(2001) *Stem Cells* 19:358-377; Lilleyら(2001) *J. Virology* 75(9):4343-4356を参照されたい。

【0170】

神経組織へのデリバリーのために、特に単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターが適している。例えばCoffinら(1996)「*神経系の遺伝子操作(Genetic Manipulation of the Nervous System)*」(DS Latchman編)中、99-114頁; アカデミックプレス(Academic Press)、ロンドン; Finkら(1996) *Ann. Rev. Neurosci.* 19:265-287を参照されたい。特に、複製欠陥HSVベクターが記載されている。例えば米国特許第5,849,571号; 5,849,572号; 6,248,320号; 6,261,552号; 6,344,445号; 6,613,892号; 6,719,982号; および6,821,753号を参照されたい。また米国特許出願第2002/0192802号; 2003/0040500号; 2003/0082142号; 2003/0091537号; 2003/0113348号; 2003/0219409号; および2004/0063094号も参照されたい。またKriskyら(1998) *Gene Therapy* 5:1517-1530; Palmerら(2000) *J. Virol.* 74:5604-5618; Lilleyら(2001) *J. Virol.* 75(9):4343-4356; Burtonら(2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:424-428; およびGoinsら(2002) *Methods Mol. Med.* 69:481-507も参照されたい。

【0171】

造血幹細胞のレトロウイルス形質導入の効率を改良するための方法が、米国特許第5,928,638号に開示されている。

【0172】

レトロウイルスおよびレンチウイルスデリバリー媒体の親和性は、偽型判定法(pseudo typing)により改変することができ、こうして特定のタイプの細胞への核酸のウイルスデリバリーが可能になる。例えば米国特許第5,817,491号を参照されたい。

【0173】

多くの遺伝子治療応用では、特定のタイプの組織に対して高度の特異性を有する遺伝子治療ベクターをデリバリーすることが好ましい。ウイルスベクターは典型的には、ウイルス外表面にウイルスコートタンパク質を有する融合タンパク質としてリガンドを発現することにより、ある特定のタイプの細胞に対する特異性を有するように修飾される。リガンドは、目的のタイプの細胞上に存在することが公知の受容体に対する親和性を有するように選択される。例えばHanら、PNAS 92:9747-9751(1995)は、モロニーマウス白血病ウイルスがgp70に融合したヒトヘレグリン(heregulin)を発現するように修飾することがで

き、組換えウイルスがヒト表皮増殖因子受容体を発現するいくつかのヒト乳癌細胞に感染することを報告した。この原理は、リガンド融合タンパク質を発現するウイルスと受容体が発現する標的細胞の他の対に延長することができる。例えば実質的に任意の選択された細胞受容体に対する特異的結合親和性を有する抗体断片（例えばFAbまたはFv）を示すように、線状ファージを遺伝子工学的に作成することができる。上記説明は主にウイルスベクターに適用されるが、同じ原理が非ウイルスベクターに応用できる。かかるベクターは、特異的標的細胞による取り込みを促進すると考えられる特異的取り込み配列を含有するように遺伝子工学的に作成することができる。

【0174】

遺伝子治療ベクターは、典型的には後述のように全身性投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内注入）により、または局所的塗布により、個々の患者に投与してインビボでデリバリーされる。あるいはベクターは細胞、例えば個々の患者から移植した細胞（例えば、リンパ球、骨髄吸引液、組織生検試料）、または普遍的ドナー造血幹細胞にエクスピボで送達され、次に通常ベクターを取り込んだ細胞の選択後、細胞は患者に再移植される。

10

【0175】

診断、研究、または遺伝子治療のためのエクスピボ細胞トランスフェクション（例えば、宿主生物へのトランスフェクトした細胞の再注入）は、当業者に公知である。ある例では細胞は対象生物から単離され、ZFP核酸（遺伝子またはcDNA）でトランスフェクトされ、そして対象生物（例えば患者）に再注入される。エクスピボトランスフェクションに適した種々のタイプの細胞は当業者に公知である（例えば、Freshneyら、「動物細胞の培養、基礎的技術のマニュアル（Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique）」（第3版）、および患者から如何に細胞を単離し培養するかについてそこに引用された文献、を参照）。

20

【0176】

ある実施態様において幹細胞は、細胞トランスフェクションと遺伝子治療のためのエクスピボ法で使用される。幹細胞を使用する利点は、これらはインビトロで他のタイプの細胞に分化させることができ、または哺乳動物（例えば細胞のドナー）中に導入されてそこで骨髄に移植することができることである。GM-CSF、IFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ のようなサイトカインを使用して臨床的に重要なタイプの免疫細胞にCD34+細胞をインビトロで分化させる方法は公知である（Inabaら、J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)参照）。

30

【0177】

幹細胞は公知の方法を使用して形質導入と分化のために単離される。例えば幹細胞は、例えばCD4+とCD8+（T細胞）、CD45+（パンB細胞）、GR-1（顆粒球）、およびIad（分化した抗原提示細胞）のような好ましくない細胞に結合する抗体を用いて骨髄細胞をパニングすることにより、骨髄細胞から単離される（Inabaら、J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)参照）。

【0178】

治療用ZFP核酸を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、リボソームなど）はまた、インビボで細胞の形質導入のために生物に直接投与することができる。あるいはネーキッドDNAを投与することができる。投与は、血液または組織細胞との最終的接触に分子を導入するために通常使用される任意の経路による。かかる核酸を投与する適切な方法は利用でき、当業者に公知であり、特定の組成物を投与するのに2つ以上の経路が使用できるが、特定の経路がしばしば他の経路より直接的でありより有効な反応を与えることがある。

40

【0179】

薬剤学的に許容される担体は、一部は投与される具体的な組成物により、ならびに組成物を投与するために使用される具体的な方法により決定される。従って後述のように広範囲の適当な医薬組成物調製物がある（例えば、レミントンの薬剤科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、第17版、1989を参照）。

50

## 【0180】

## B. タンパク質組成物

ポリペプチド化合物（例えば本ZFP）の投与において重要な要因は、ポリペプチドが細胞の原形質膜を横断するか、または核のような細胞内コンパートメントの膜を横断する能力を有することである。細胞膜は、脂質 - タンパク質二重層からなり、これは小さい非イオン性親油性化合物は自由に透過でき、極性化合物、巨大分子、および治療薬または診断薬は本質的に非透過性である。しかしタンパク質や他の化合物（例えばリポソーム）が記載されており、これらは、細胞膜を介してZFPのようなポリペプチドを移動させる能力を有する。

## 【0181】

例えば「膜移動ポリペプチド」は、膜移動担体として作用する能力を有する両親媒性または疎水性アミノ酸サブ配列を有する。ある実施態様においてホメオドメインタンパク質は細胞膜を横断して移動する能力を有する。ホメオドメインタンパク質の最も短いインターナリゼーション可能なペプチドであるアンテナペディア（Antennapedia）が、アミノ酸43～58位からタンパク質の第3らせんであることが発見された（例えば、Prochiantz, *Current Opinion in Neurobiology* 6:629-634 (1996)を参照）。別のサブ配列であるシグナルペプチドのh（疎水性）ドメインが、同様の細胞膜移動特性を有することが発見された（例えば、Linら、*J. Biol. Chem.* 270:14255-14258 (1995)を参照）。

## 【0182】

細胞へのZFPの取り込みを促進するためのZFPに連結できるペプチド配列の例には、特に限定されないが以下がある：HIVのタンパク質の11アミノ酸ペプチド；p16タンパク質のアミノ酸84～103に対応する20残基ペプチド配列（Fahraeusら、*Current Biology* 6:84 (1996)）；アンテナペディア（Antennapedia）の60アミノ酸長さのホメオドメインの第3らせん（Derossiら、*J. Biol. Chem.* 269:10444 (1994)を参照）；カポジ繊維芽細胞増殖因子（K-FGF）h領域のようなシグナルペプチドのh領域（Linら、前述）；またはHSVからのVP22移動ドメイン（ElliotとO'Hare、*Cell* 88:223-233 (1997)を参照）。増強された細胞取り込みを与える他の適当な化学成分もまた、ZFPに化学的に連結してもよい。膜移動ドメイン（すなわち、インターナリゼーションドメイン）はまた、ランダム化ペプチド配列のライブラリーから選択することもできる。例えば、Yehら（2003）*Molecular Therapy* 7(5): S461、抄録# 1191を参照されたい。

## 【0183】

毒素分子もまた、細胞膜を横断してポリペプチドを輸送する能力を有する。かかる分子はしばしば少なくとも2つの部分からなる（「2成分毒性」と呼ぶ）；輸送または結合ドメインもしくはポリペプチドおよび別の毒素ドメインもしくはポリペプチドである。典型的には輸送ドメインもしくはポリペプチドは細胞受容体に結合し、次に毒素は細胞中に輸送される。内部またはアミノ末端融合体として細胞サイトゾルにペプチドをデリバリーする試みにおいて、いくつかの細菌毒素（ウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）イオタ毒素、ジフテリア毒素（DT）、シュードモナス（*Pseudomonas*）外毒素A（PE）、百日咳（*pertussis*）毒素（PT）、炭疽菌（*Bacillus anthracis*）毒素、および百日咳アデニル酸シクラーゼ（CYA））が使用されている（Aroraら、*J. Biol. Chem.*, 268:3334-3341 (1993)；Perelleら、*Infect. Immun.*, 61:5147-5156 (1993)；Stemmarkら、*J. Cell. Biol.* 113:1025-1032 (1991)；Donnellyら、*PNAS* 90:3530-3534 (1993)；Carbonettiら、*Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 95:295 (1995)；Seboら、*Infect. Immun.* 63:3851-3857 (1995)；Klimpelら、*PNAS U.S.A.* 89:10277-10281 (1992)；およびNovakら、*J. Biol. Chem.* 267:17186-17193 (1992)）。

## 【0184】

かかるサブ配列は、細胞膜を横切ってZFPを輸送するのに使用することができる。ZFPはかかる配列と融合または誘導体化することが便利である。典型的には移動配列は融合タンパク質の一部として提供される。場合によりリンカーを使用して、ZFPと移動配列とを連結することができる。任意の適当なリンカー（例えばペプチドリリンカー）を使用すること

10

20

30

40

50

ができる。

【0185】

ZFPはまた、リポソームおよびリポソーム誘導体（例えば免疫リポソーム）を介して動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞に導入することができる。用語「リポソーム」は、1つ以上の同心円状に並んだ脂質二重層からなる小胞を意味し、これは水相を封入する。水相は典型的には、細胞に送達される化合物（すなわちZFP）を含有する。リポソームは原形質膜と融合し、こうして薬物をサイトゾルに放出する。あるいはリポソームは、輸送小胞中で細胞により貪食されるかまたは摂取される。エンドソームまたはファゴソーム中にあると、リポソームは分解されるか、または輸送小胞の膜と融合してその内容物を放出する。

10

【0186】

リポソームを介する薬剤デリバリーの現在の方法において、リポソームは最終的に透過性になり、標的組織または細胞で封入された化合物（この場合、ZFP）を放出する。全身性または組織特異的送達のために、これは例えばリポソーム二重層が体内の種々の物質の作用を介して経時的に分解する受動的方法で行われる。あるいは活性薬物放出は、リポソーム小胞中の浸透性の変化を誘導する物質を使用することを含む。リポソーム膜はリポソーム膜の近くの環境が酸性になる時、不安定化されるように構築される（例えば、PNAS 84:7851 (1987); Biochemistry 28:908 (1989)を参照）。リポソームが標的細胞によりエンドサイトーシスを受けると、これらは不安定化され、その内容物を放出する。この不安定化はフソゲネシス（fusogenesis）と呼ばれる。ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）は、多くの「フソゲニック（fusogenic）」系の基礎である。

20

【0187】

かかるリポソームは典型的にはZFPと脂質成分（例えば、天然のおよび/または陽イオン性脂質）を含み、所定の細胞表面受容体またはリガンド（例えば抗原）に結合する抗体のような受容体認識分子を随時含む。リポソームを調製するための種々の方法が、例えばSzokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980)、米国特許第4,186,183号、4,217,344号、4,235,871号、4,261,975号、4,485,054号、4,501,728号、4,774,085号、4,837,028号、4,235,871号、4,261,975号、4,485,054号、4,501,728号、4,774,085号、4,837,028号、4,946,787号、PCT公報第W091/17424号、DeamerとBangham, Biochim. Biophys. Acta 443:629-634 (1976); Fraleyら、PNAS 76:3348-3352 (1979); Hopeら、Biochim. Biophys. Acta 812:55-65 (1985); Mayerら、Biochim. Biophys. Acta 858:161-168 (1986); Williamsら、PNAS 85:242-246 (1988); 「リポソーム（Liposomes）」（Ostro編、1983、第1章）; Hopeら、Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986); Gregoriadis, Liposome Technology (1984)およびLasic, Liposomes: Physics to Applicationsから（1993）に記載されている。適当な方法には、例えば超音波処理、押出し、高圧/ホモジナイゼーション、マイクロ流動化、界面活性剤透析、小リポソーム小胞のカルシウム誘導性融合、およびエーテル融合法（これらのすべては当該分野で公知である）がある。

30

【0188】

ある例ではリポソームは、特定のタイプの細胞、組織などに特異的な標的化成分を使用して標的化される。種々の標的化成分（例えば、リガンド、受容体、およびモノクローナル抗体）を使用するリポソームの標的化は、既に記載されている（例えば米国特許第4,957,773号と4,603,044号を参照）。

40

【0189】

リポソームに標的化物質を結合するための標準的方法を使用することができる。これらの方法は一般に、リポソームへの脂質成分（例えばホスファチジルエタノールアミン、これは標的化物質の結合のために活性化することができる、または誘導体化親油性化合物、例えば脂質誘導体化プレオマイシン）への取り込みを含む。抗体標的化リポソームは、例えばプロテインAを取り込むリポソームを使用して構築することができる（Renneisenら、J. Biol. Chem., 265:16337-16342 (1990)、およびLeonettiら、PNAS 87:2448-2451 (1990)を参照）。

50



## 【0190】

## C. 投与量

ZFPの治療的応用のために患者に投与される用量は、経時的に患者に有効な治療応答を与えるのに十分なものである。用量は使用される特定のZFPの効力とKd、標的細胞の核容量、ならびに患者の状態、治療される患者の体重または表面積により決定される。用量の大きさはまた、特定の患者への特定の化合物またはペクターの投与に伴う有害な副作用の存在、性質、および程度により決定されるであろう。

## 【0191】

糖尿病性神経障害の治療または予防で投与されるZFPの有効量の決定において、医師は、ZFPまたはZFPをコードする核酸の循環血漿レベル、ZFP毒性の可能性、疾患の進行、抗ZFP抗体の産生を評価する。投与は単回投与または分割投与により行われる。 10

## 【0192】

## D. 組成物と投与方法

## 1. 総論

ZFPおよびZFPをコードする核酸は、遺伝子発現の調節のために、および治療または予防応用のために患者に直接投与することができる。一般におよび本明細書の考察において、動物または患者にZFPを導入するという用語は、ZFPもしくはZFP融合タンパク質がおよび/またはZFP融合タンパク質のZFPをコードする核酸が、動物中で発現できる形で導入されることを意味する。例えば以下のセクションで詳細に説明されるように、ZFPおよび/または核酸は1又は複数の神経障害の治療に使用することができる。 20

## 【0193】

治療的有効量の投与は、治療すべき組織に最終的に接触できるようにZFPを導入するために通常使用される任意の経路による。ZFPまたはZFPをコードする核酸は、任意の適当な方法で、好ましくは薬剤学的に許容される担体（例えばポロキサマーおよび/または緩衝剤）とともに投与される。かかる調節物質を投与するための適当な投与法は利用可能でかつ当業者に公知であり、特定の組成物を投与するのに2つ以上の経路が使用できるが、ある特定の経路が他の経路より即時的でより有効な反応を与えることがしばしばある。

## 【0194】

薬剤学的に許容される担体は、一部は投与される特定の組成物により、ならびに組成物を投与するのに使用される特定の方法により決定される。従って医薬組成物の種々の適当な調製物がある。例えばレミントンの薬剤科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、第17版（1985）を参照されたい。 30

## 【0195】

吸入法で投与するためにZFPを単独または他の適当な成分とともに、エアロゾル剤にすることができる（すなわち、これらは「噴霧」することができる）。エアロゾル剤は、加圧された許容される噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など）中に入れられる。

## 【0196】

非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮内、および皮下経路）に適した製剤は、水性および非水性の等張無菌注射溶液（これは抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および調製物を目的の患者の血液と等張にする溶質を含むことができる）、および水性および非水性の無菌懸濁液（これは、懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含むことができる）を含む。開示された方法の実施において組成物は、例えば静脈内注入、経口、局所的、腹腔内、膀胱内またはくも膜下投与することができる。化合物の調製物は、単位用量または多回用量の密封容器（例えば、アンプルおよびバイアル）で提供することができる。注射溶液および懸濁液は、既に記載した種類の無菌粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。 40

## 【0197】

## 2. デリバリーの選択肢の例

糖尿病および他のタイプの神経障害を治療するための本発明の医薬組成物のデリバリー 50

のために、種々のデリバリーの選択肢が利用できる。具体的な適応症に依存して、組成物は対象の特定の部位または組織に標的化される。例えばある方法では組成物は、糖尿病性神経障害を治療するために四肢に注射することにより送達される。これに対して他の治療法では、特定の部位への送達を目的とすることなく、一般的に組成物を投与する。

#### 【0198】

薬剤のデリバリーを特定の部位に局在化するのに、多くのアプローチを使用することができる。これらの方法のいくつかは、体の内腔または組織へのデリバリーを含む（例えば、米国特許第5,941,868号；6,067,988号；6,050,986号；および5,997,509号；ならびにPCT公報W000/25850号；W000/04928号；99/59666号；および99/38559号を参照）。デリバリーはまた、筋肉内もしくは心筋内注射もしくは投与により行われる。かかるアプローチの例には、米国特許第6,086,582号；6,045,565号；6,056,969号；および5,997,525号；およびPCT公報W000/16848号；W000/18462号；W000/24452号；W099/49773号；およびW099/49926号に記載のものがある。局所的デリバリーのための他の選択肢には、心膜内注射（例えば、米国特許第5,931,810号；5,968,010号；および5,972,013号を参照）および脈管周囲デリバリーがある。種々の経心筋的血管再生（TMR）チャンネル送達アプローチも同様に使用できる。これらの方法の多くはレーザーを使用して血管再生を行う。かかるアプローチの考察は、例えば米国特許第5,925,012号；5,976,164号；5,993,443号；および5,999,678号に記載されている。他の選択肢には、例えば冠状動脈注入のための動脈内および/または冠状動脈内デリバリー（例えば、W099/29251号を参照）および血管内投与（例えば、米国特許第6,001,350号；6,066,123号；および6,048,332号；およびPCT公報W099/31982号；W099/33500号；およびW000/15285号を参照）がある。

10

20

#### 【0199】

神経障害を治療するための組成物のデリバリーのための追加の選択肢には、静脈内または皮下投与、心筋チャンパーアクセス（例えば米国特許第5,924,424号を参照）および組織工学（米国特許第5,5944,754号）を使用する全身性投与がある。

#### 【0200】

当業者に公知の他のデリバリー方法には、米国特許第5,698,531号；5,893,839号；5,797,870号；5,693,622号；5,674,722号；5,328,470号；および5,707,969号に開示された方法がある。

#### 【0201】

### X. 応用

#### A. 総論

VEGF遺伝子（および他の遺伝子）中の標的部に結合するZFPおよびこれらをコードする核酸は、広範囲の神経障害および神経変性症状を治療するのに使用することができる。かかる方法は一般的に、細胞または細胞集団内の核酸の標的部に、標的部を認識しこれに結合するように遺伝子工学的に作成されたZFPを接触させることを含む。方法はインビトロで細胞培養で行われるかまたはインビボで行うことができる。いくつかの方法は、1つ以上のVEGF遺伝子を活性化することにより神経障害が治療されるように行われる。

#### 【0202】

#### B. 治療的応用

例えば本明細書に記載の医薬組成物中で本明細書のZFPおよびこれらをコードする核酸は、神経障害および/または神経変性を改善または排除するのに関与する遺伝子の発現を調節（例えば活性化または抑制）するために使用することができる。例えばVEGF遺伝子は活性化して、生じるVEGFタンパク質が神経栄養因子として作用して、細胞培養（すなわちインビトロ応用）およびインビボの両方で、神経機能および/または神経増殖を促進し、および/または神経変性を予防することができる。

30

40

#### 【0203】

従って種々のタイプの神経障害（糖尿病性神経障害を含む）および神経変性症状を治療するためのいくつかの方法は、対象へのZFPの導入を含む。活性化ドメインを有するZFPの、その発現が神経障害を改善する遺伝子への結合は、神経障害を治療するのに使用するこ

50

とができる。いくつかの方法は、VEGF遺伝子中の標的部位に結合する本明細書に記載のよ  
うなZFPの使用を含む。ZFPに融合した活性化ドメインは、1つ以上のVEGF遺伝子の発現を  
活性化する。

#### 【0204】

神経障害（例えば神経機能）に関する神経栄養性を評価するための種々の測定法が知ら  
れている。例えば内皮細胞増殖アッセイがFerraraとHenzel（1989）Nature 380:439-443  
；Gospodarowiczら、（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7311-7315；およびClaffey  
ら（1995）Biochim. Biophys. Acta 1246:1-9により考察されている。ZFPおよび/または  
核酸が神経栄養性を促進する能力は、例えばLeungら（1989）Science 246:1306-1309によ  
り考察されているようにヒヨコ漿尿膜で評価することができる。他の選択肢は、Rastinej  
adら（1989）Cell 56:345-355により考察されているように、ラット角膜を用いるアッセ  
イを実施することである。他の測定法は米国特許第5,840,693号に開示されている。神経  
再生のための測定法は、ラットの反回神経の挫傷後の神経終板の評価を含む。Rubinら（2  
001）Laryngoscope 111:2041-2045；Rubinら（2003）Laryngoscope 113:985-989。さらに  
組織切片の顕微鏡観察を使用して、神経症状を評価することができる。神経血液流もまた  
、例えばSchratzberger（2001）J. Clin. Invest. 107(9):1083-92に記載のように、レー  
ザードブライメージングまたは局所投与した蛍光レクチン類似体の直接検出により測定  
してもよい。さらに運動および感覚神経伝導速度を、Schratzberger（前述）に記載のよ  
うに測定することができる。これらの各方法およびその結果はまた、他の系に拡張するこ  
とができる。

10

20

#### 【0205】

本明細書の組成物はまた、種々の治療的応用で遺伝子の発現を抑制するのに使用するこ  
ともできる。例えばその生成物が正常な状況下で神経増殖を制限するように作用する遺伝  
子を抑制して、種々の神経障害症状（例えば糖尿病性神経障害）における神経増殖を刺激  
することができる。

#### 【0206】

以下の例は、開示した方法と組成物の特定の面のみを詳述するものであって、決して本  
発明を限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0207】

#### 実施例1：設計された亜鉛フィンガータンパク質を用いる末梢血神経障害の治療

VEGF遺伝子内の標的部位を認識しVEGFの発現を活性化するように設計した亜鉛フィンガ  
ータンパク質の治療的可能性を、糖尿病性神経障害の実証された実験モデルであるストレ  
プトゾトシン処理ラットで評価した。このモデルでは、ストレプトゾトシンの単回腹腔内  
注射により一晩絶食後にラットで糖尿病が誘導される。ストレプトゾトシン（STZ）処理  
は、膵臓細胞の部分的破壊を引き起こし、1週間以内に糖尿病が誘導される。このモデ  
ルでは重症の末梢神経障害が発生し、運動および感覚神経伝導速度の顕著な低下が特徴と  
なる。

30

#### 【0208】

VEGF-Aの標的部位を認識する3フィンガーの亜鉛フィンガータンパク質を前述のように  
設計した。設計したZFP（VOP32Eと命名する）は標的部位GGGGGTGACに結合し、各フィンガ  
ーの認識らせん中に以下のアミノ酸配列を含む：DRSNLTR（フィンガー1またはF1）；TSGH  
LSR（フィンガー2またはF2）；およびRSDHLR（フィンガー3またはF3）。また表1を参照  
されたい。p65転写活性化ドメインをVOP32E ZFPに融合させた。

40

#### 【0209】

ストレプトゾトシンの単回腹腔内注射により一晩絶食後に雄ウィスターラットで糖尿病  
を誘導した。年齢と体重の一致した未処理ラットを対照として使用した。ストレプトゾ  
トシン処理の1週間後に血清グルコースレベルを測定し、糖尿病であることが確認されたSTZ  
-処理動物を3つの治療群（n=12）にランダム化した。

#### 【0210】

50

糖尿病誘導の30日後に治療を開始した。VOP32E-p65をコードするプラスミドを125 $\mu$ gまたは500 $\mu$ gの用量で右脚の腓腹筋とヒラメ筋群中に3回注射の単回投与で与えた。空のベクタープラスミドVAX-1による同様の注射を対照とした。VOP32EとpVAX-1プラスミドを1%ポロキサマー407、150mM NaCl、2mM トリス (pH8.0) で調製した。

## 【0211】

反対側の脚を注射していない対照とした。基本的にSchratzbergerら(前述)に記載のように、遺伝子デリバリーの4週間後に治療した脚および未治療の反対側の脚で神経伝導速度(MNCVとSNCV)を測定した。結果を表4に示す：

## 【0212】

## 【表6】

10

群	処理	用量( $\mu$ g)	最終体重(g)	坐骨神経 MNCV (m/s)	坐骨神経 SNCV (m/s)
対照-非糖尿病	なし	0	507.7 $\pm$ 33.6	57.1 <sup>A</sup> $\pm$ 5.5	59.3 <sup>A</sup> $\pm$ 9.93
糖尿病	pVAX-1	500	351.0 $\pm$ 45.1	48.5 <sup>B</sup> $\pm$ 5.9	50.3 <sup>B</sup> $\pm$ 9.33
糖尿病	SGMO-001	125	351.5 $\pm$ 15.23	47.2 <sup>C</sup> $\pm$ 10.2	59.4 <sup>C</sup> $\pm$ 8.77
糖尿病	SGMO-001	500	340.8 $\pm$ 15.23	48.3 <sup>D</sup> $\pm$ 9.4	47.2 <sup>D</sup> $\pm$ 7.5
統計的有意性					p<0.0039 (C vs. B)

20

30

## 【0213】

SNCVとMNCV測定後に動物を屠殺し、注射した筋肉を解剖し、RNA単離のために回収した。次にRNA調製物をリアルタイムPCRにより32Ep65トランス遺伝子発現について分析した。

## 【0214】

糖尿病ラットの骨格筋へのVOP32Eのデリバリーにより、運動伝導速度に影響を与えることなく感覚神経の伝導速度が上昇した(図1)。低用量VOP32E(125 $\mu$ g)治療群のSNCV改善は、pVAX-1(空ベクター)処理動物と比較して統計的に有意であった(p<0.005)。低用量治療群中のSNCVは、遺伝子移動の4週間以内に正常なレベルまで回復した(表1、図1)。低用量群では注射していない反対側脚と比較するとSNCVの改善傾向が観察された(p=0.054)。他の研究者らは、MNCVに対する作用無しでSNCVが改善することを報告した(Sayers, NMら、Diabetes (2003) 52, 2372-2380)。

40

## 【0215】

すなわち遺伝子工学的に作成したZFP VOP32Eは、糖尿病性神経障害の動物モデルで感覚神経伝導速度を有意に改善することができる。

## 【0216】

## 実施例2：用量応答

前記の末梢糖尿病性神経障害のモデルでVOP32Eの用量応答を評価するために、3つの追加のVOP32E治療群をこの試験に加え、125 $\mu$ g(実施例1)の有効用量より4倍低い用量と2倍高い用量を投与した。上記したように糖尿病を誘導した。年齢と体重の一致したラット

50

を対照として使用した。1週間後に血清グルコースレベルを測定し、糖尿病であった動物を3つの治療群 (n=12) にランダム化した。

【0217】

糖尿病誘導の27日後に治療を開始した。動物にVOP32Eを31.25、62.5、125または250 µgの用量で左の腓腹筋に与えた。反対側の脚を非注射対照とした。VOP32EまたはpVAX-1プラスミドDMAを5% ポロキサマー-188、150mM NaCl、2mM トリス (pH8.0) で調製した。遺伝子デリバリーの4週間後にSNCVとMNCVを測定した。神経伝導速度 (MNCVとSNCV) の測定は上記したように行った。RNAを処理し、上記したようにトランス遺伝子発現について分析した。

【0218】

この試験でMNCVとSNCV値は、3つの高用量のVOP32E-p65プラスミドについて明白な効力を示した。

【0219】

実施例3：調整培地

VEGF遺伝子を標的としたZFPアクチベーターを使用してVEGF発現を活性化したヒトHEK293細胞を、調整培地源として使用した。かかる調整培地は、2つのヒト (SK-N-MCとSHEP-1) およびラット (ND8) 神経芽腫細胞株の血清依存性をレスキューすることができた。

【0220】

実施例4：VEGF標的化亜鉛フィンガータンパク質転写因子をコードするアデノウイルスベクターの構築

本例は、核局在化シグナル (NLS)、VEGF標的化VOP32E亜鉛フィンガーDNA結合ドメイン (表1)、p65転写活性化ドメイン、およびFlagエピトープタグを含有する融合タンパク質をコードする配列を含有する、組換えアデノウイルスベクターAd-VOP32Ep65Flagの構築を記載する。

【0221】

当該融合タンパク質をコードする配列は、例えば本出願人の米国特許第6,453,242号と6,534,261号に記載のように組み立て、pcDNA3ベクター (インビトロゲン (Invitrogen)、カールスバード (Carlsbad)、カリフォルニア州) のEcoRI部位とXhoI部位間にクローン化した。得られたプラスミドをXhoIで消化し、次にdNTPsの存在下でDNAポリメラーゼIクレノウ断片を用いて処理してXhoI末端を平滑末端に変換した。次にこのDNAをAflIII (NLSをコードする配列の上流の挿入体中に存在する部位) で消化し、2つの断片の小さい方をキアゲン (Qiagen) ゲル抽出キット (キアゲン (Qiagen)、バレンシア (Valencia)、カリフォルニア州) を使用して精製した。

【0222】

pcDNA4/T0プラスミド (インビトロゲン (Invitrogen)、カールスバード (Carlsbad)、カリフォルニア州) をMluIとAflIIIとで消化し、2つの断片の小さい方をキアゲン (Qiagen) ゲル抽出キット (キアゲン (Qiagen)、バレンシア (Valencia)、カリフォルニア州) を使用して精製して、ヒトサイトメガロウイルス前初期プロモーター/エンハンサー (CMV) と2つのテトラサイクリンオペレーター配列 (TetO2) とを含有するDNA断片を得た。

【0223】

このプラスミドpShuttle (クロンテック (Clontech)、パロアルト (Palo Alto)、カリフォルニア州) をXbaIで消化し、次にdNTPsの存在下でDNAポリメラーゼIクレノウ断片を用いて処理してXhoI末端を平滑末端に変換した。次にこのDNA断片をMluIで消化して、2つの断片の大きい方をキアゲン (Qiagen) ゲル抽出キット (キアゲン (Qiagen)、バレンシア (Valencia)、カリフォルニア州) を使用して精製した。

【0224】

テトラサイクリン誘導性CMVプロモーター/エンハンサーを含有するMluI/AflIII断片、融合タンパク質をコードするAflIII/XhoI断片、およびpShuttle (ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルとカナマイシン耐性マーカーとを含有する) のXbaI/MluI断片を使用して、3者連結を行い、テトラサイクリン誘導性CMVプロモーター/エンハンサーとウシ成長

10

20

30

40

50

ホルモンポリアデニル化シグナルの転写制御下で融合タンパク質をコードする転写単位を含有するpShuttleベクター骨格を有するプラスミドを作成した。

【0225】

得られたpShuttleベースのプラスミドをI-CeuIとPI-SceIとで消化した。消化混合物をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出し、0.3M NaOAc/エタノールで沈殿させた。沈殿したDNAをTE緩衝液に再懸濁し、I-CeuIとPI-SceIとで2重消化したpAdeno-Xベクター（クロンテック（Clontech）、パロアルト（Palo Alto）、カリフォルニア州）に連結した。pAdeno-XのI-CeuI部位とPI-SceI部位に挿入された、融合タンパク質をコードするI-CeuI/PI-SceI断片を含有するクローンを選択した。

【0226】

T-REX（登録商標）-293細胞（インビトロゲン（Invitrogen））にトランスフェクション後、組換えアデノウイルスベクターをウイルス粒子にパッケージし、3回の連続凍結-融解サイクルで溶解しておいたトランスフェクトしたT-REX（登録商標）-293細胞からアデノウイルスを採取した。組換えアデノウイルスをさらにT-REX（登録商標）-293細胞中で増幅し、2ラウンドの塩化セシウム勾配遠心分離により精製した。精製した組換えアデノウイルス（AdVOP32Ep65）を10mM トリス（pH8.0）、2mM MgCl<sub>2</sub>、4% ショ糖を3回交換して透析し、分注して-80 で保存した。アデノウイルス粒子数を、260nmの吸光度で定量し、感染力価をアデノ-X ラピッドタイターキット（Adeno-X Rapid Titer Kit）（クロンテック（Clontech）、パロアルト（Palo Alto）、カリフォルニア州）を使用して測定した。

【0227】

実施例5：神経挫傷後のVEGF標的化ZFP転写アクチベーターにより仲介される神経再生

VOP32E転写アクチベーターが神経再生を増強する能力を、ラットの挫傷反回性咽頭神経モデル系で試験した。Rubinら（2003）Laryngoscope 113:985-989。空のアデノウイルスベクター（すなわち挿入トランス遺伝子が欠如したベクター）を挫傷反回性咽頭神経（RLN）に投与しても、有意な追加のニューロン傷害は起きないことはすでに知られていた。Rubinら（2003）、前述。

【0228】

この実験のために、ラットをランダムに2群に割り当てた。第I群では、RLNを挫傷させ、神経に空アデノウイルスベクターを注入した（対照、n=10）。第II群では、神経を挫傷させ、AdVOP32Ep65を注入した（n=10）。喉頭筋中の神経-終板接触の数を計測して、再生を測定した。3日目に各群から5匹のラットを屠殺し、各群の残りの5匹のラットを7日目に屠殺した。アセチルコリン組織化学分析のために咽頭の凍結切片を処理し（運動終板を同定するため）、次に神経繊維免疫ペルオキシダーゼにより処理した（神経繊維を同定するため）。神経-終板接触パーセント（神経再生の確立された指標）を測定し、公表されたプロトコルに従って3日目（C）と7日目（D）に群間を比較した。Rubinら（2003）Laryngoscope 111:2041-2045；Rubinら（2003）、前述。

【0229】

これらの分析結果は、RLNの挫傷の3日後に、対照とAdp65注入動物との間で神経-終板接触パーセントの有意な上昇は無かった。しかし7日目までに、空ベクターを注入された動物と比較してAdp65を注入した動物では、神経-終板接触の大きな上昇があった。組織学的試験は、ニューロンへのVEGFの遺伝子送達が異常な血管形成を引き起こさないという従来の報告（Rubinら、前述）を確認した。これらの結果は、傷害された神経組織へのVEGF標的化ZFP転写アクチベーターをコードするアデノウイルスベクターのデリバリーが神経再生を刺激することを示す。

【0230】

実施例6：VEGF標的化亜鉛フィンガータンパク質をコードするAAVデリバリー媒体（AAV-VOP32Ep65Flag）の構築と産生

組換えAAVベクターであるpAAV-VOP32Ep65Flagを以下のように作成した：1) プラスミドpcDNA3-VOP32Ep65FlagをPmeIとXhoIで消化した。核局在化シグナル（NLS）、VOP32E亜鉛フィンガーDNA結合ドメイン、p65転写活性化ドメイン、およびflagエピトープタグを含有

10

20

30

40

50

する断片を、キアゲン (Qiagen) ゲル抽出キットを使用して精製した。2) プラスミド pAAV-MCS (ストラタジーン (Stratagene)) を HincII と XhoI で消化した。消化物からの大きい方の断片をキアゲン (Qiagen) ゲル抽出キットを使用して精製した。3) 1) と 2) からの断片を連結して、プラスミド pAAV-VOP32Ep65Flag を作成した。

【0231】

pAAV-VOP32Ep65Flag、pAAV-RC (ストラタジーン (Stratagene)) および pHelper (ストラタジーン (Stratagene)) を、リン酸カルシウムにより HEK293 細胞 (ATCC) 中に同時トランスフェクトし、2回の連続的凍結 - 融解サイクルで溶解したトランスフェクト HEK293 細胞から組換え AAV を採取した。組換え AAV をヘパリン - アガロース懸濁液 (シグマ (Sigma)) を使用して精製し、アミコンウルトラ -15 (Amicon Ultra-15) およびウルトラ -4 遠心分離フィルター (ミリポア (Millipore)) を使用して濃縮した。精製し濃縮した組換え AAV を 10mM トリス (pH7.5) - 115mM NaCl - 1mM MgCl<sub>2</sub> を 3回交換して透析し、分注して -80 で保存した。AAV ベクターゲノム力価を、タクマン (Taqman) により測定した。

10

【0232】

実施例 7: VEGF 標的化亜鉛フィンガータンパク質をコードするプラスミド DNA の筋肉内注射による糖尿病性神経障害の治療

調製物

pV-32Ep65 は、N 末端から C 末端の順序で核局在化シグナル、VEGF 遺伝子に標的化した VOP32E 亜鉛フィンガー結合ドメイン、および p65 転写活性化ドメインとを含有する融合タンパク質をコードするプラスミドである (図 4)。

20

【0233】

これは、筋肉内投与のために無菌の注射溶液として 3ml のバイアル中に調製される (表 5)。この調製物は、pV-32Ep65 プラスミド DNA (2mg/ml)、ポロキサマー 88 (5%w/v)、NaCl (150mM)、2mM トリス塩酸 (pH8.0)、および注射用無菌水からなる。

【0234】

【表 7】

表 5. 注射調製物の量的組成

成分	単位調製物 (mg/mL)
pV-32Ep65 (プラスミド DNA)	2 mg
塩化ナトリウム、USP (150mM NaCl)	8.76mg
P188, NF (5% w/v)	50mg
トロメタミン、pH8.0, USP (2mM Tris-HCl)	0.242mg
注射用滅菌水、USP	1.0mLにする

30

【0235】

最終薬剤製品を、外観、プラスミド本体と濃度、ポロキサマー本体と濃度、水分含量、pH、伝導度、エンドトキシン、無菌性について試験する。正常の食塩水 (0.9% NaCl) は 3ml のバイアルで提供してプラセボとする。調製物を -20 で保存する。使用直前に、バイアルを室温で 10 分間平衡化する。いったん融解すると、バイアルは後日再使用することはない。

40

【0236】

投与

投与は両方の下肢に行い、末端から初めて近くに移動する。ブラインド形式で、片脚に pV-32Ep65 を投与し、他方の脚にプラセボを投与する。用量は以下の通りである: コホート 1: 1mg、コホート 2: 5mg、コホート 3: 15mg、コホート 4: 30mg、コホート 5: 60mg。薬剤を 3ml のバイアルで提供し、0.5、1、または 1.5ml 容量でそれぞれ足、ふくらはぎ、および

50

び大腿に注射する。足には1回のみ注射し、足背の短趾伸筋に注射する。1mlの注射を下肢の腓腹、腓骨、脛骨神経の標的神経部位の近くの筋肉に、最大10回行う。残りの注射は大腿へ1.5ml分量で行う（大腿前部と後部に最大用量60mgで最大13回注射）。

【0237】

#### 注射法

筋肉中の注射部位は、0.5ml用量の調製物を1～3回、筋肉繊維の縦軸（すなわち、大腿動脈に平行）に沿って中心（針を完全に挿入した点）まで針を挿入し、針を引きながら1/2インチ間隔で0.5ml用量ずつ入れる。針は足の方に向け、足の部分を除いて、皮膚の表面に対して30°の角度で挿入する。足では、針はつま先に向けて少し角度を付ける。

【0238】

#### 注射針と各注射部位の容量

3ccのシリンジに付いた針（25ゲージ）を以下のように使用する：足には1インチ針、ふくらはぎには1.5インチ針、大腿には3インチ針。注射部位は後述する。皮膚の潰瘍形成部位への注射を避けるように注意しなければならない。

【0239】

#### 各用量レベルの注射部位の説明

各脚について、コホート1の対象には0.5ml（1.0mgのプラスミド）またはプラセボを1回IM注射する。針はつま先に向け、注射は足背の短趾伸筋（浅腓骨神経）に注射する。

【0240】

各脚について、コホート2の対象には全部で3回のIM注射またはプラセボ注射をする。上記したように0.5ml（1mgのプラスミド）の注射を1回脚に行う。さらに1ml（1回の注射当たり2.0mgのプラスミド）の注射を2回下肢に行う。1つの注射は、ふくらはぎの下の内側（ヒラメ筋の内側、足根管の近くの長指屈筋〔脛骨神経〕）で、他の1つはアキレス腱の近傍の外側の腓腹筋（腓腹神経）に行う。

【0241】

各脚について、コホート3の対象には全部で8回のIM注射をする。コホート1に記載したように0.5ml（1.0mgの各プラスミドまたはプラセボ）の注射を1回足に行う。さらに1ml（2.0mgの各プラスミドまたはプラセボ）のIM注射を7回下肢に行う。1つの注射は長指屈筋〔脛骨神経〕の近くに行い、第2の注射はコホート2に記載したようにアキレス腱の近傍の外側の腓腹筋（腓腹神経）に行う。1mlの注射を腓側頭部（腓骨神経）の近くの外側の腓腹筋に1回行い、他の1mlの注射を脚の膝窩（脛骨神経）のすぐ下のヒラメ筋に1回行い、さらに1回の1mlの注射をアキレス腱の約5cmの近傍の腓腹筋の内側の部分に行う。さらに1mlのIM注射を前脛骨筋の中心部分に行う。

【0242】

各脚について、コホート4の対象には全部で14回のプラスミドまたはプラセボのIM注射を行う。コホート3に記載したように足および脚の下方に注射をする。さらに3回の1mlのIM注射を脚の下方に行い；1回の追加の1mlのIM注射を前脛骨筋の上部に、2回の追加の1mlのIM注射を腓腹筋の中央に行う（このうち最初の1回は、コホート3について記載したアキレス腱のすぐ上の腓腹筋の中央の5cm上に、第2のIM注射はさらに5cm上に行う）。大腿に1.5mlのIM注射（3mgの各プラスミドまたはプラセボ）を3回行う。これらのうち最初は、大腿内側の最も遠い部分の内側広筋に投与する。これらのうち第2回の注射は、大腿の外側の最も遠い部分の外側広筋に投与する。これらのうち第3回の注射は、大腿直筋の腱のすぐ近くの大腿四頭筋中に行う。

【0243】

各脚について、コホート5の対象には全部で24回のプラスミドまたはプラセボのIM注射を行う。コホート4に記載したように注射は、足、脚の下方、および下位大腿に行う。さらに10回の1.5mlのIM注射（3.0mgの各プラスミドまたはプラセボ）を5回の2環状注射で大腿に行う。各環状の注射は、互いに約5cmの平面上に行う。最も下の環は、コホート4に記載の大腿四頭筋注射の約5cm上に入れる。各環内の注射は約5cm離す。

【0244】

10

20

30

40

50



臨床的評価

対象は以下の方法を使用して糖尿病末梢神経障害の程度について評価される。

【0245】

NSS

NSSはDNの症状に関する17の別々の項目を含む。8項目は筋肉衰弱に注目し、5項目は感覚障害に、4項目は自律系症状に注目する。各項目は二進法スケール(0=無し、1=有り)でスコア化され、最大スコアは17である。

【0246】

NIS-LL

NIS-LLは、下肢の筋肉の強度、感覚の種類、および深部腱反射のスコアを付ける。両足が評価される。筋肉強度は0~4のスケールで評価される。感覚の種類と反射は、0~2のスケールでスコア化される。最大64のスコアが可能である。

【0247】

TNS

TNSは、DNの症状、兆候、振動のQST、および神経伝導属性を評価する。10個の方法が評価され、それぞれは0~4のスケールで評価される。最大40のスコアが可能である。

【0248】

神経伝導試験

すべての対象について両側の腓骨神経、腓腹神経、および脛骨神経の標準的NCSが行われる。

【0249】

定量的感覚試験(QST)

VPTの測定を含むQSTは、CASE IV装置(ダブリューアールメディカルエレクトロニクス(WR Medical Electronics)、スティルウォーター(Stillwater)、ミネソタ州)を使用して両足の親指で測定される。

【0250】

皮膚生検

皮膚生検は0日目と180日目に、そとくるぶしの近傍10cmの両側の足の下方に行い、表皮内神経繊維の密度を測定する。

【0251】

本明細書に記載の実施例と実施態様は例示のためのものであって、その種々の修飾または変更が、本出願の精神と範囲および添付の請求の範囲内で当業者には可能であろう。本明細書で引用されたすべての刊行物、特許、および特許出願は、各刊行物、特許、および特許出願が具体的かつ個別に参照のために取り込まれるのと同程度に、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0252】

【図1】図1は、アデノウイルスベクターの略図を示す。

【図2】図2は、テトラサイクリン誘導性のCMVプロモーターとウシ成長ホルモンポリアダニル化シグナルの転写制御下で、NLS-VOP32E-p65-Flag融合タンパク質をコードするアデノウイルスベクターの略図を示す。詳細については実施例4を参照されたい。

【図3】図3(AとB)は、反回神経を破壊し、次にAdVOP32Ep65(黒い棒)または対照アデノウイルスベクター(白い棒)で治療したラットの喉頭筋の低温切片中の、運動終板と神経繊維の組織学的同定により測定した神経終板接触パーセントを示す。測定は処理後3日目(A)と7日目(B)に行った。

【図4】図4は、VEGF 活性化亜鉛フィンガー融合タンパク質をコードするプラスミドpV-32Ep65の略図である。略語は以下の通りである:pUC:ベクター骨格;カナマイシンR:カナマイシン耐性遺伝子;CMV早期p/e:ヒトサイトメガロウイルス早期プロモーター/エンハンサー配列;T7:バクテリオファージT7プロモーター;NLS:核局在化シグナル;32E:VOP32E亜鉛フィンガー結合ドメイン(表1);p65act.ドメイン:p65からの転写活性化ド

10

20

30

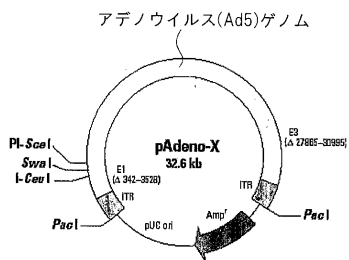
40

50

メイン ; BGHポリA : ウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化シグナル。制限酵素EcoRI、KpnI、BamHIおよびXhoIの認識部位も示される。

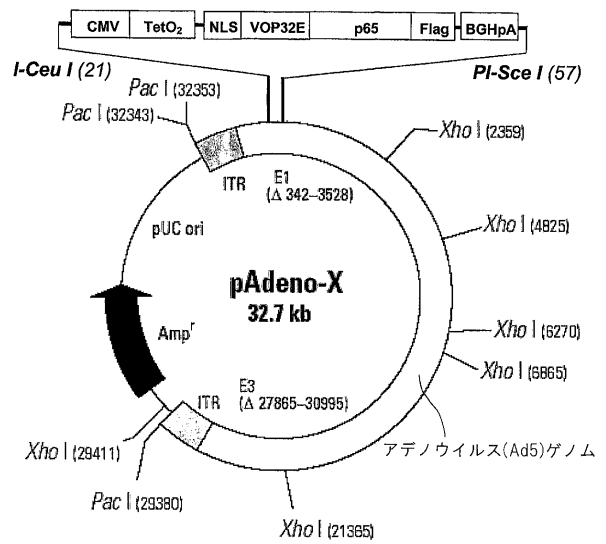
【 図 1 】

FIGURE 1



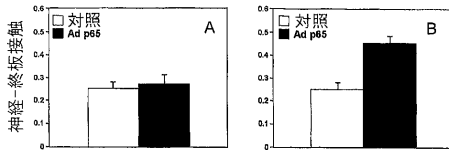
【 図 2 】

FIGURE 2



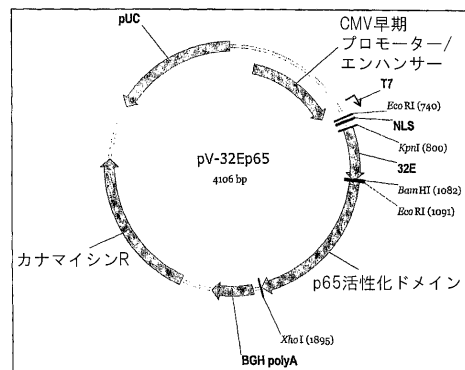
【 図 3 】

FIGURE 3



【 図 4 】

FIGURE 4



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成19年2月7日 (2007.2.7)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

対象の神経障害又は神経変性症状を治療するための医薬組成物であって：

ポリペプチドをコードする核酸を含み、ここで当該ポリペプチドは、以下の：

- (i) 血管内皮増殖因子-A (VEGF-A) 遺伝子中の標的部に結合するように遺伝子学的に作成された亜鉛フィンガー-DNA結合ドメイン；及び
- (ii) 転写活性化ドメイン

を含み、

前記核酸が対象の1又は複数の細胞で発現され、それにより前記ポリペプチドが前記標的部位に結合しVEGF-A遺伝子の転写を活性化する、上記医薬組成物。

【 請求項 2 】

前記亜鉛フィンガー-DNA結合ドメインが3つの亜鉛フィンガーを含み、当該亜鉛フィンガーの認識領域のアミノ酸配列が以下の：

F1：DRSNLTR (配列番号55)

F2：TSGHLSR (配列番号141)

F3：RSDHLSR (配列番号68)

である請求項1に記載の組成物。

【 請求項 3 】

前記転写活性化ドメインがp65活性化ドメインである、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

対象の神経障害又は神経変性症状を治療するためのポリペプチドであって、以下の：

(i) 血管内皮増殖因子-A (VEGF-A) 遺伝子中の標的部位に結合するように遺伝子工学的に作成された亜鉛フィンガー-DNA結合ドメイン；及び

(ii) 転写活性化ドメイン

を含む、前記ポリペプチド。

【請求項5】

前記亜鉛フィンガー-DNA結合ドメインが3つの亜鉛フィンガーを含み、当該亜鉛フィンガーの認識領域のアミノ酸配列が以下の：

F1：DRSNLTR（配列番号55）

F2：TSGHLSR（配列番号141）

F3：RSDHLSR（配列番号68）

である請求項4に記載のポリペプチド。

【請求項6】

前記転写活性化ドメインがp65活性化ドメインである、請求項4又は5に記載のポリペプチド。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US2005/011838
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/044404 A1 (REBAR EDWARD ET AL) 6 March 2003 (2003-03-06) the whole document	1-3
Y	LIU P-Q ET AL: "REGULATION OF AN ENDOGENOUS LOCUS USING A PANEL OF DESIGNED ZINC FINGER PROTEINS TARGETED TO ACCESSIBLE CHROMATIN REGIONS ACTIVATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 276, no. 14, 6 April 2001 (2001-04-06), pages 11323-11334, XP000999288 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-3
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 October 2005		24/10/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hillenbrand, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2005/011838

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002/160940 A1 (CASE CASEY C ET AL) 31 October 2002 (2002-10-31) paragraph '0261!; figure 16; examples 1-3,5,7	1-3
P,X	WO 2004/053130 A (TOOLGEN INC 'KR!; KIM JIN-SOO 'KR!; SHIN HYUN-CHUL 'KR!; KWON HEUNG-SU) 24 June 2004 (2004-06-24) page 9, lines 13-16; claims 6,9	1,3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2005/011838

**Box 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:  
Although claims 1-3 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2005/011838

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003044404	A1	06-03-2003	NONE
US 2002160940	A1	31-10-2002	AU 745844 B2 11-04-2002 AU 2847000 A 01-08-2000 CA 2323086 A1 20-07-2000 EP 1061805 A1 27-12-2000 GB 2348424 A 04-10-2000 JP 2002534104 T 15-10-2002 JP 2001231583 A 28-08-2001 WO 0041566 A1 20-07-2000 US 6534261 B1 18-03-2003 US 6607882 B1 19-08-2003 US 6824978 B1 30-11-2004 US 2003087817 A1 08-05-2003
WO 2004053130	A	24-06-2004	AU 2003302752 A1 30-06-2004 CA 2508631 A1 24-06-2004 EP 1570058 A1 07-09-2005



## フロントページの続き

(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, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100141807

弁理士 川幡 兼介

(72)発明者 マーティン, ジェイ. タイラー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 3 9, フレモント, リースリング コート 3 4 9

Fターム(参考) 4C084 AA13 NA14 ZA012 ZC352

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZC35