

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5047437号
(P5047437)

(45) 発行日 平成24年10月10日(2012.10.10)

(24) 登録日 平成24年7月27日(2012.7.27)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02

請求項の数 48 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-558729 (P2001-558729)	(73) 特許権者	508241200
(86) (22) 出願日	平成13年2月8日(2001.2.8)		サンガモ バイオサイエンス、 イン コーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2003-522536 (P2003-522536A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 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 テク センタ ー スト エー100
(43) 公表日	平成15年7月29日(2003.7.29)	(74) 代理人	100109726
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/004301		弁理士 園田 吉隆
(87) 国際公開番号	W02001/059450	(74) 代理人	100101199
(87) 国際公開日	平成13年8月16日(2001.8.16)		弁理士 小林 義教
審査請求日	平成14年10月25日(2002.10.25)	(72) 発明者	ケース, キャシー
審査番号	不服2008-21092 (P2008-21092/J1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 944 02, サン マテオ, バーロイレット アベニュー 605
審査請求日	平成20年8月18日(2008.8.18)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/181, 117		
(32) 優先日	平成12年2月8日(2000.2.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 薬物の発見のための細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

内因性分子標的との相互作用について化合物をスクリーニングするための方法であって、

(a) 第1細胞と第2細胞を用意する工程であって、該第1細胞は少なくとも一つの設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードする少なくとも一つのポリヌクレオチドを含むか含まず、該第2細胞は少なくとも一つの設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードする少なくとも一つのポリヌクレオチドを含み、

該第1細胞が設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードする少なくとも一つのポリヌクレオチドを含まない場合は、該第1細胞は該少なくとも一つの設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードする少なくとも一つのポリヌクレオチド以外について該第2細胞と同一であり、

該第1細胞が少なくとも一つの設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードする少なくとも一つのポリヌクレオチドを含む場合は、該第1細胞は該第2細胞に含まれる設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードするポリヌクレオチドとは異なる少なくとも一つの設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードする少なくとも一つのポリヌクレオチドを含み、これらの設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードする少なくとも一つのポリヌクレオチド以外について該第2細胞と同一である、工程；

(b) 該化合物と第1細胞とを接触させる工程；

(c) 該第 1 細胞の性質の第 1 値を決定する工程であって、該性質が、該化合物を接触させている細胞に対して応答性である、工程；

(d) 該化合物と第 2 細胞とを接触させる工程であって、ここで、該第 2 細胞が少なくとも一つの設計された外因性ジンクフィンガータンパク質を含み、該外因性ジンクフィンガータンパク質が機能的ドメインとして転写調節活性を有するポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質ドメインをさらに含み、該少なくとも一つの設計された外因性ジンクフィンガータンパク質が該内因性分子標的の発現を直接的にかまたは間接的に調節する、工程；

(e) 該第 2 細胞における性質の第 2 値を決定する工程であって、ここで、該第 1 値と該第 2 値との間の差が、該化合物と該分子標的との間の相互作用の指標を提供する工程、を包含する、方法。

10

【請求項 2】

前記外因性ジンクフィンガータンパク質が、前記分子標的の発現を直接的に調節する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記機能的ドメインが、活性化ドメインを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記活性化ドメインが、VP16、NF- κ B の p65 サブユニット、VP64 およびリガンド結合甲状腺ホルモンレセプターからなる群より選択される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記機能的ドメインが、抑制ドメインを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抑制ドメインが、KRAB、MBD-2B、v-ErbA、MBD3、非リガンド化 TR、および DNMT ファミリーのメンバーからなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記分子標的が、シグナル伝達経路に関連する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記化合物が、前記分子標的を介するシグナルの伝達を阻害するその能力についてスクリーニングされる、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記第 2 細胞が、内因性分子標的の発現を直接的にかまたは間接的に調節する第 2 の設計された外因性ジンクフィンガータンパク質を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチドが、前記第 2 細胞に安定にトランスフェクトされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ジンクフィンガータンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、誘導性プロモーターに作動可能に連結される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記ジンクフィンガータンパク質の発現が、前記第 2 細胞において誘導される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ジンクフィンガータンパク質の発現が、前記第 1 細胞において誘導されない、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分子標的が、タンパク質である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記分子標的が、細胞表面レセプターである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記性質が、増殖および新生血管形成および選択マーカー発現からなる群より選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

細胞プロセスに対するその効果について化合物をスクリーニングする方法であって、該方法は、以下：

(a) 第 1 ポリヌクレオチドおよび第 2 ポリヌクレオチドを含む細胞を提供する工程であって、該第 1 ポリヌクレオチドが、第 1 転写制御エレメントに作動可能に連結された設計された外因性ジンクフィンガータンパク質をコードする第 1 核酸分子を含み、ここで、該第 1 転写制御エレメントが、該細胞プロセスに関連する内因性分子に対して応答性であり、そして、該第 2 ポリヌクレオチドが、レポーターまたは選択マーカーをコードする第 2 核酸分子を含み、ここで、該レポーターまたは選択マーカーの発現が、該外因性ジンクフィンガータンパク質によって調節される、工程；

(b) 工程 (a) の細胞を該化合物と接触させる工程；および、

(c) 該レポーターまたは選択マーカーの発現レベルをアッセイする工程であって、ここで、該レポーターまたは選択マーカーの発現レベルにおける変化が、該化合物が該細胞プロセスに対する効果を有することを示す、工程、

を包含する、方法。

【請求項 18】

前記細胞プロセスが、シグナル伝達経路を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 1 ポリヌクレオチドが、前記ジンクフィンガータンパク質に作動可能に連結された機能的ドメインとして転写調節活性を有するポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項 17 または請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記機能的ドメインが、抑制ドメインである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記抑制ドメインが、K R A B、M B D - 2 B、v - E r b A、M B D 3、リガンドに結合していない T R、および D N M T ファミリーのメンバーからなる群より選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記レポーターまたは選択マーカーが、直接検出可能なレポーター、酵素レポーター、陽性選択マーカー、陰性選択マーカー、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

前記直接検出可能なレポーターが、蛍光タンパク質である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記直接検出可能なレポーターが、緑色蛍光タンパク質である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記酵素レポーターが、ルシフェラーゼ、 - ガラクトシダーゼ、 - グルクロニダーゼ、 - ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) からなる群より選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

前記陽性選択マーカーが、ネオマイシン耐性、G 4 1 8 耐性、Z e o c i n (登録商標

10

20

30

40

50

) 耐性、およびハイグロマイシン耐性からなる群より選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記陰性選択マーカーが、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (H S V - T K) である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 8】

設計された外因性ジンクフィンガータンパク質 (Z F P) をコードする第 1 のポリヌクレオチドを含む細胞であって、該細胞は、レポーターをコードする第 2 のポリヌクレオチドをさらに含み、ここで、該外因性 Z F P の発現が、細胞プロセスに関連する内因性分子に対して応答性である転写制御エレメントによって調節され；そして、ここで、該レポーターの発現が、該 Z F P によって調節される、細胞。

10

【請求項 2 9】

前記細胞プロセスが、シグナル伝達経路を含む、請求項 2 8 に記載の細胞。

【請求項 3 0】

前記第 1 ポリヌクレオチドが、前記ジンクフィンガータンパク質に作動可能に連結された機能的ドメインとして転写調節活性を有するポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項 2 8 または請求項 2 9 に記載の細胞。

【請求項 3 1】

前記機能的ドメインが、抑制ドメインである、請求項 3 0 に記載の細胞。

20

【請求項 3 2】

前記抑制ドメインが、K R A B、M B D - 2 B、v - E r b A、M B D 3、リガンドに結合していない T R、および D N M T ファミリーのメンバーからなる群より選択される、請求項 3 1 に記載の細胞。

【請求項 3 3】

前記レポーターが、直接検出可能なレポーター、酵素レポーター、陽性選択マーカー、陰性選択マーカー、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 2 8 に記載の細胞。

【請求項 3 4】

前記直接検出可能なレポーターが、蛍光タンパク質である、請求項 3 3 に記載の細胞。

30

【請求項 3 5】

前記直接検出可能なレポーターが、緑色蛍光タンパク質である、請求項 3 4 に記載の細胞。

【請求項 3 6】

前記酵素レポーターが、ルシフェラーゼ、 - ガラクトシダーゼ、 - グルクロニダーゼ、 - ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) からなる群より選択される、請求項 3 3 に記載の細胞。

【請求項 3 7】

前記陽性選択マーカーが、ネオマイシン耐性、G 4 1 8 耐性、Z e o c i n (登録商標) 耐性、およびハイグロマイシン耐性からなる群より選択される、請求項 3 3 に記載の細胞。

40

【請求項 3 8】

前記陰性選択マーカーが、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (H S V - T K) である、請求項 3 3 に記載の細胞。

【請求項 3 9】

分子標的との相互作用について化合物をスクリーニングするためのキットであって、該キットは、(a) 請求項 2 8 に記載の細胞；(b) 補助試薬；および(c) 適切な容器を備える、キット。

【請求項 4 0】

50

前記第2のポリヌクレオチドは、前記レポーターをコードする配列に作動可能に連結する構成性プロモーターを含む、請求項31に記載の細胞。

【請求項41】

前記抑制ドメインが、KRAB、MBD-2D、v-ErbA、MBD3、リガンドに結合していないTR、およびDNMTファミリーのメンバーからなる群より選択される、請求項40に記載の細胞。

【請求項42】

請求項40に記載の細胞であって、ここで、前記レポーターまたは選択マーカが、直接検出可能なレポーター、酵素レポーター、陽性選択マーカ、陰性選択マーカ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、細胞。

10

【請求項43】

前記直接検出可能なレポーターは、蛍光タンパク質である、請求項42に記載の細胞。

【請求項44】

前記直接検出可能なレポーターは、緑蛍光タンパク質である、請求項43に記載の細胞。

【請求項45】

請求項42に記載の細胞であって、ここで、酵素レポーターが、ルシフェラーゼ、
-ガラクトシダーゼ、
-グルクロニダーゼ、
-ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)からなる群より選択される、細胞。

20

【請求項46】

前記陽性選択マーカが、ネオマイシン耐性、G418耐性、Zeocin(登録商標)耐性、およびハイグロマイシン耐性からなる群より選択される、請求項42に記載の細胞。

【請求項47】

前記陰性選択マーカが、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)である、請求項42に記載の細胞。

【請求項48】

分子標的との相互作用について化合物をスクリーニングするためのキットであって、該キットは、(a)請求項40に記載の細胞；(b)補助試薬；(c)指示書および(d)適切な容器を備える、キット。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本開示は、細胞の操作および薬物の発見の分野にある。

【0002】

(背景)

過去何年もの間の製薬会社のリサーチ活動の多くは、既存の薬物の付加的な改良に焦点を当てていた。これらの努力は、反復ラウンドの化合物の改変および生物学的試験を含み、そして類似の標的に指向される利用可能な薬物を大きな割合で得た。

40

【0003】

約12年前、薬学的リサーチ活動の重点が、新規の化学的クラスおよび新規の分子標的の意図的な発見へとシフトし始めた。重点におけるこの変化、およびタイムリーな技術的躍進(例えば、分子生物学、実験の自動化、コンビナトリアルケミストリー)は、高スループットスクリーニング(すなわち、HTS)を誕生させた。この高スループットスクリーニングは、現在、生物薬剤学的産業中に広まっている。

【0004】

高スループットスクリーニングは、以下のいくつかの工程を包含する：特定の生理学的応答を予測するアッセイを開発する工程；何回も再現可能に実施し得るようにこのアッセイを自動化する工程；およびこのアッセイで「ヒット」し得る化学構造(このような構造が

50

意図される生理学的応答を誘発し得ることを示唆する)を同定するために化学ライブラリーからサンプルを順次試験する工程。高スループットスクリーニングによるヒットを種々の二次アッセイにおいて追跡して、人為的な結果(特に、毒性化合物)を排除する。

【0005】

高スループットスクリーニングは、200,000個以上の化合物サンプルを試験する工程を含み得、それ故、ラボロボットの使用を必要とする。このようなアッセイにおいて試験されるサンプルの例は、化合物アーカイブ中に保存された純粋な化合物(例えば、特定の製薬会社は、何十年もの医薬品化学の努力を通して生み出された化学ライブラリーを保有する)、学術源から購入されるサンプル、天然産物の抽出物および高スループットスクリーニングのために意図的に生成されたライブラリー(例えば、コンビナトリアルライブラリー)を含む。

10

【0006】

高スループットスクリーニングにおいて使用されるアッセイは、特定の生物学的性質または生化学的性質を有する化学サンプルの存在を検出することが意図される。これらの性質を選んで、インビボで適用される場合に特定の生物学的応答を惹起する潜在能力を有する化合物を同定する。高スループットスクリーニングは、代表的に、最終的に薬物として使用される因子よりもむしろ薬物候補を同定する。高スループットアッセイにおいていくらかのレベルの所望の生物学的性質を有することが見出された特定の化学的クラスの化合物は、次いで、医薬品化学者による誘導化合物の合成のための基礎となり得る。

【0007】

これらのアッセイは、広範な2つのカテゴリに分類される: 生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイ。生化学的アッセイは、細胞環境の外側の純粋な成分または半純粋な成分を利用する。酵素アッセイおよびレセプター結合アッセイは、生化学的アッセイの代表的な例である。細胞ベースのアッセイは、培養中のインタクトな細胞を利用する。このようなアッセイの例としては、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイおよびカルシウムフラックス(flux)アッセイが挙げられる。

20

【0008】

生化学的アッセイは、通常、実施するのがより容易であり、そして一般的に、従来の細胞ベースのアッセイよりも人為的な結果への傾向がより少ない。生化学的アッセイにおいて「活性」として同定された化合物は、代表的に、所望のメカニズムに従って機能し、このことが、「ヒット」として化合物の状態を確認するために必要とされる追跡実験の回数を減少させる。しかし、生化学的アッセイの主な不利点は、生物学的内容物の欠如である。生化学的スクリーニングによる化合物の「ヒット」は、標的タンパク質に到達しそして作用するために、形質膜または他の構造物を横切る必要がない。結果的に、生化学的アッセイは、細胞ベースのアッセイよりも、動物における化合物の活性の予測性はるかに少ない傾向にある。

30

【0009】

細胞ベースのアッセイは、分子標的の多数の生物学的内容物を保存する。形質膜を通じて通過し得ない化合物または細胞に対して毒性のある化合物は、追跡されない。しかし、この内容物が、アッセイに複雑性を付加する。それ故、従来の細胞ベースのアッセイは、生化学的アッセイよりも、人為的な結果または偽陽性の結果に対するはるかに高い傾向がある。複雑な毒性反応を誘発するかまたはアポトーシスを誘発する化合物は、特に厄介である。従来の細胞ベースの高スループットスクリーニングにあてられる多くの労力は、誤ったヒットまたは望ましくないメカニズムで働くヒットを検出する追跡アッセイに向けられる。

40

【0010】

偽陽性ヒットまたは人為的なヒットが迅速に同定されそして除外され得る場合、生化学的アッセイの容易さおよび有効性が、生物学的内容物を保存しながら、細胞ベースのアッセイにおいてアプローチされ得る。この結果は、生物学的機能の最適なスループットおよび最適な予測性を伴うアッセイである。要するに、新たな医薬品の発見のためのより効率的

50

なプロセスが、実現される。

【0011】

(要約)

1つの局面において、分子標的との相互作用について化合物をスクリーニングするための方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、以下の工程を包含する：(a) この化合物と第1細胞とを接触させる工程；(b) この第1細胞の性質の第1値を決定する工程であって、この性質が、この化合物を接触させている細胞に対して応答性である、工程；(c) この化合物と第2細胞とを接触させる工程であって、ここで、この第2細胞が、この分子標的の発現を直接的にかまたは間接的に調節する外因性ジンクフィンガータンパク質を含む、工程；(d) この第2細胞におけるこの性質の第2値を決定する工程。この第1細胞におけるこの細胞の性質の値とこの第2細胞におけるこの細胞の性質の値との間の差が、この化合物とこの分子標的との間の相互作用の指標を提供する。このジンクフィンガータンパク質は、好ましくは、この分子標的自体の発現を調節するが、いくつかの実施形態において、このジンクフィンガータンパク質は、例えば、次いで、この分子標的を調節および/またはこの分子標的に作用するタンパク質の発現を調節することによって、この分子標的の発現を間接的に調節し得る。それ故、これらのスクリーニング方法を用いて、当業者は、例えば、この分子標的を介するシグナルを伝達するその能力またはこの分子標的を介するシグナルの伝達をブロックするその能力について化合物を試験し得る。

10

【0012】

特定の実施形態において、第1細胞および第2細胞は、第2の細胞が外因性ジンクフィンガータンパク質および/または外因性ジンクフィンガータンパク質コードする配列を含むことを除いて、実質的に同一である。特定の実施形態において、さらに、第1細胞と第2細胞との間に遺伝的差異(および/または表現型差異)が存在し得る。

20

【0013】

本明細書において記載された方法のいずれかにおいて、ジンクフィンガータンパク質は、融合分子(例えば、ジンクフィンガータンパク質と機能的ドメインとの融合体)の成分であり得る。この機能的ドメインは、例えば、抑制ドメイン(例えば、KRAB、MBD-2B、v-ErbA、MBD3、非リガンド化TR、およびDNMTファミリーのメンバー)；活性化ドメイン(例えば、VP16、NF-Bのp65サブユニット、リガンド結合TR、およびVP64)；インシュレーター(insulator)ドメイン；クロマチン再構築タンパク質もしくはクロマチン再構築複合体の成分；ならびに/またはメチル結合ドメインであり得る。本方法に従って、ジンクフィンガータンパク質は、標的の発現を活性化するかまたは阻害するかのいずれかである。ジンクフィンガータンパク質(または融合体)は、発現を活性化し得、例えば、その結果、第2細胞における発現レベルが、第1細胞における発現レベルの125%または175%より大きい。ジンクフィンガータンパク質は、発現を阻害し得、例えば、その結果、第2細胞における発現レベルが、第1細胞における発現レベルの95%、75%、50%、25%、または5%より小さい。

30

【0014】

特定の実施形態において、この分子標的はタンパク質である。しかし、分子標的は、その発現がジンクフィンガータンパク質によって調節され得る任意の分子(例えば、RNA、炭水化物および/または脂質)である。

40

【0015】

本明細書中に記載される任意の方法において、このジンクフィンガータンパク質(または融合タンパク質)は、タンパク質として、またはこのタンパク質もしくは融合分子をコードするポリヌクレオチドとして提供される。従って、この方法によって、このジンクフィンガータンパク質は、第2細胞中で発現されるかまたは第2細胞に付加されるかのいずれかである。このジンクフィンガータンパク質がポリヌクレオチドとして提供される特定の実施形態において、例えば、このジンクフィンガータンパク質をコードする配列に作動可能に連結された誘導性転写制御エレメント(例えば、プロモーター)を使用して、このジ

50

ンクフィンガータンパク質の発現は誘導性であり得る。これらの実施形態において、第1細胞および第2細胞は、両方共ジンクフィンガータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み得るが、しかし発現は2つの一致する細胞のうち1つの細胞においてのみ誘導される。さらに、この第1細胞および/または第2細胞は、1つよりも多い外因性ジンクフィンガータンパク質または融合分子（あるいはこのジンクフィンガータンパク質をコードするポリヌクレオチド）を含み得る。

【0016】

他の局面において、このスクリーニング方法において使用される第1細胞および/または第2細胞はまた、レポーター（例えば、選択可能なマーカー）を含み得る。例えば、特定の実施形態において、ジンクフィンガータンパク質の発現が、公知の分子標的、好ましくは生化学的経路またはシグナル伝達経路のような細胞内プロセスの成分に応答性の転写制御エレメントに作動可能に連結されたこのジンクフィンガータンパク質を、細胞が含む方法が提供される。従って、シグナル伝達経路が活性な条件下で、このジンクフィンガータンパク質は発現される。この細胞はまた、好ましくはレポーター（例えば、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質）、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ラクタマーゼ、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、アルカリホスファターゼ、CATなど）をコードするポリヌクレオチドを含む。レポーター分子のサブセットとしては、選択マーカー（例えば、薬物耐性、チミジンキナーゼなど）が挙げられる。このレポーターまたは選択マーカーは、ジンクフィンガータンパク質（またはジンクフィンガータンパク質を含む融合物）によって調節される転写制御エレメントに作動可能に連結され得る。従って、試験化合物がこの細胞に投与される場合、標的（例えば、シグナル伝達経路の成分）と相互作用してZFPの産生を調節するこの化合物の能力は、産生されるレポーターおよび/または選択マーカーの量に反映される。特定の実施形態において、このジンクフィンガータンパク質（または融合物）は、レポーターおよび/または選択マーカーの発現を抑制する。これらの場合において、この化合物が、シグナル伝達経路を遮断するような方法でこの化合物の標的と相互作用する場合、ZFPによって発現が制御されるレポーターの産生は上昇する。この細胞はまた、1つより多くのレポーター/選択マーカーを含み得る。

【0017】

さらなる実施形態において、分子標的を過剰発現する細胞が提供され、ここでこの過剰発現は、外因性ジンクフィンガータンパク質の作用によって仲介される。同様に、分子標的の発現が不足する細胞（ここでこの発現不足は、外因性ジンクフィンガータンパク質の作用によって仲介される）が提供される。このような細胞を作成および使用する方法が、また提供される。

【0018】

なおさらなる実施形態において、外因性ジンクフィンガータンパク質を含む細胞から単離される1つ以上の細胞成分の使用を包含する方法が提供される。好ましい実施形態において、この細胞成分は、好ましくは、ジンクフィンガータンパク質（またはジンクフィンガータンパク質を含む融合物）の活性によって分子標的（例えば、レセプター）を過剰発現する細胞から単離される細胞膜である。この単離された膜は、例えば結合研究（例えば、放射標識リガンドを使用して）のために使用され得る。

【0019】

別の局面において、本明細書中に記載される任意のジンクフィンガータンパク質を含む細胞が提供される。好ましい実施形態において、分子標的を発現する細胞が提供される。この種類の細胞は、分子標的と相互作用する化合物と接触される細胞に対して応答性であるという特徴を示す。この細胞は、この細胞中のタンパク質、好ましくは分子標的の産生を調節する外因性ジンクフィンガータンパク質を含む。

【0020】

さらに別の局面において、本明細書中に記載される任意の細胞、タンパク質、ポリヌクレオチドなどを含む、目的の化合物をスクリーニングするためのキットが提供される。好ま

10

20

30

40

50

しい実施形態において、このキットはさらに、補助試薬、指示書、および本明細書中に記載されるスクリーニング方法を実行するために設計された他の材料を含む。

【0021】

これらの実施形態および他の実施形態は、本明細書中における開示から、当業者にとって容易に明白である。

【0022】

(詳細な説明)

(概要)

本明細書中に開示される組成物および方法は、特定の分子標的と相互作用する候補化合物の能力について、候補化合物をスクリーニングするための新規のアッセイを含む。このアッセイは、細胞ベースのアッセイおよび生化学的アッセイの両方を含む。さらに、本明細書中に記載されるこのアッセイは、目的の遺伝子の発現を調節し得るジンクフィンガータンパク質を含む細胞を含むか、またはこの細胞から誘導される。

10

【0023】

1つの実施形態において、ジンクフィンガータンパク質またはこれらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、細胞内に導入されて(例えば、安定な形質転換または一過性のトランスフェクションを介して)、目的の分子標的を過剰発現する。ZFP含有細胞におけるこの分子標的に対する候補化合物の効果は、ZFP非含有細胞におけるこの候補化合物の効果と比較され、この標的と相互作用する化合物の能力を決定し得る。従って、このZFPは、分子標的そのものの発現を調節(例えば、活性化)し得る。あるいは、このZFPは、異なる分子の発現を調節し得、これは次いで、分子標的に対して直接的または間接的に作用し得、例えば、このZFPはこの分子標的を調節するシグナル伝達経路において、上流の分子または下流の分子の発現を調節し得る。

20

【0024】

他の実施形態において、ZFPをコードする遺伝子は、誘導性プロモーターの制御下にあり、そして第1細胞および第2細胞の両方は、この誘導性遺伝子を含む。従って、この細胞は、実質的に同一であり、そしてZFPの発現は1つの細胞(試験細胞)中に誘導され得、そして他の細胞(コントロール細胞)には誘導されず、候補化合物の分子標的との相互作用を決定する。この細胞は、安定または一過性に誘導性ZFP構築物でトランスフェクトされ得る。

30

【0025】

別の実施形態において、ジンクフィンガータンパク質は、細胞中に導入され、細胞表面分子または膜結合分子(例えば、レセプター)を過剰発現する。次いで、このレセプターが豊富な膜は単離され、そして生化学的アッセイ(例えば、化合物の結合の測定によって)に使用される。

【0026】

さらに他の実施形態において、化合物は、分子標的(例えば、細胞プロセス(例えば、生化学的経路またはシグナル伝達カスケード)に関する任意の標的)と相互作用するその能力について試験される。例えば、試験化合物が、特定のシグナル伝達カスケードを開始するレセプター発現することが公知である細胞に投与される。さらに、この試験細胞はまた、(1)外因性ジンクフィンガータンパク質および機能的ドメインを含む融合分子をコードするポリヌクレオチド、および(2)レポーター分子(例えば、緑色蛍光タンパク質、または薬物耐性のような選択マーカー)をコードするポリヌクレオチドを含む。この融合分子をコードするこのポリヌクレオチドは、目的の細胞プロセスに応答性の転写制御エレメントに作動可能に連結される。例えば、融合分子をコードするポリヌクレオチドは、発現がシグナル伝達カスケードの結果として調節される遺伝子から誘導される、転写制御配列に作動可能に連結される。この融合分子は、例えば、ジンクフィンガータンパク質および抑制ドメイン(これは、発現される場合、レポーター分子の発現を抑制する)を含み得る。従って、このレセプターおよび関連プロセス(例えば、シグナル伝達カスケード)が機能する場合、この融合分子は発現され、そして次々に、この融合分子はレポーター分子

40

50

の発現の抑制を補助する。候補試験化合物が、シグナル伝達経路の成分と、この経路を遮断するように相互作用する場合、この抑制的な融合分子の発現は、減少または排除され、そしてレポーターのレベルは上昇する。従って、任意の化合物は、レポーターレベルをモニターすることによって、シグナル伝達カスケード干渉するこの化合物の能力についてスクリーニングされ得る。

【0027】

開示される方法の実行は、他に指示がなければ、分子生物学、生化学、遺伝学、計算機化学、細胞培養、組換えDNAおよび当該分野の技術内にある関連の分野における従来の技術を利用する。これらの技術は、文献に十分に説明されている。例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989; Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John WileyおよびSons、New York、1987および定期的な更新; ならびにMETHODS IN ENZYMOLOGYのシリーズ、Academic Press、San Diegoを参照のこと。

【0028】

(定義)

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、交換可能に使用され、そして一本鎖形状もしくは二本鎖形状のいずれかの、デオキシリボヌクレオチドポリマーまたはリボヌクレオチドポリマーをいう。本開示の目的のために、これらの用語はポリマーの長さについての限定として解釈されるべきではない。この用語は、天然のヌクレオチドの公知のアナログ、ならびに塩基、糖、および/またはリン酸部分において改変されたヌクレオチドを包含し得る。一般に、特定のヌクレオチドのアナログは、同じ塩基対特異性を有する; すなわち、Aのアナログは、Tと塩基対を形成する。

【0029】

用語「ポリペプチド」「ペプチド」および「タンパク質」は、交換可能に使用され、アミノ酸残基のポリマーをいう。この用語はまた、1つ以上のアミノ酸が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学的アナログまたは改変された誘導体であるアミノ酸ポリマーにも、適用される。

【0030】

「ジンクフィンガー」は、亜鉛原子の配位によって安定化される構造を有するポリペプチド配列(一般に約30アミノ酸)を含む、配列特異的結合ドメインである。ジンクフィンガーは、DNA、RNA、および/またはアミノ酸配列に結合し得る。DNA結合に関して、単一のジンクフィンガーは、一般に、2~4塩基対、代表的には3または4塩基対を含む標的サブサイトに結合する。ジンクフィンガーの例示的なクラスは、一般構造-Cys-X₂₋₄-Cys-X₁₋₂-His-X₃₋₅-His-(ここでXは、任意のアミノ酸である)を有し; これは亜鉛原子と配意する2つのシステイン残基および2つのヒスチジン残基を含む(いわゆるCCHHまたはC₂H₂ジンクフィンガー)。しかし、さらなるジンクフィンガーの構造(例えば、CCHC、CCCH、CHHC、CHCHおよびCHHH)もまた、開示された方法および組成物において有用である。

【0031】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」は、1つ以上のジンクフィンガーの結合活性を介して配列特異的な様式でDNAと結合する、より大きなタンパク質中の、タンパク質またはセグメントである。用語ジンクフィンガーDNA結合タンパク質は、しばしばジンクフィンガータンパク質またはZFPと省略される。ZFPは、ジンクフィンガーに加えてポリペプチドドメインを含み得る; 例えば、他のDNA結合ドメインおよび/または機能的ドメインである。

【0032】

「設計された」ジンクフィンガータンパク質は、その設計/組成が主に合理的な判断基準から生じる、天然に存在しないタンパク質である。設計のための合理的な判断基準には、

10

20

30

40

50

置換法則の適用、および既存のZFP設計および結合データの情報を保存するデータベースにおける、情報を処理するためのコンピューター化されたアルゴリズムが挙げられる(例えば、共同所有されたPCT WO 00/42219および共同所有された米国特許出願第09/444,241号(1999年11月9日提出)に記載される)。

【0033】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質は、その産生が、ファージディスプレイのような経験的なプロセスから主に生じる、天然に見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第5,789,538号;米国特許第6,007,988号;米国特許第6,013,453号;WO 95/19431;WO 96/06166およびWO 98/54311を参照のこと。

10

【0034】

「最適化された」ジンクフィンガータンパク質は、上記に記載されたように設計または選択され、次いで結合特異性について試験され、そして共同所有された米国特許出願第09/716,637号(2000年11月20日提出、タイトル「Iterative Optimization in the Design of Binding Proteins.」)に記載されるように、このジンクフィンガータンパク質の結合特異性を改善するために配列において変更されたジンクフィンガータンパク質をいう。

【0035】

用語「天然に存在する」は、ヒトによって人工的に産生された物とは別の、天然に見出され得る対象を記載するために使用される。

20

【0036】

核酸またはアミノ酸配列は、互いに機能的な関係に配置された場合、「作動可能に連結される(operably linked)」(または、「作動可能的に連結される(operatively linked)」)。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、このプロモーターもしくはエンハンサーがコード配列の転写を制御するか、または調節に寄与する場合、このコード配列に作動可能に連結される。作動可能に連結されたDNA配列は、代表的に連続し、そして作動可能に連結されたアミノ酸配列は、代表的に連続し、かつ同じリーディングフレーム中にある。しかし、エンハンサーが数kb以上プロモーターから離れ、そしてイントロン配列が可変の長さであり得る場合、一般にこのエンハンサーは機能するので、いくつかのポリヌクレオチドエレメントは作動可能に連結し得るが、連続し得ない。同様に、一次ポリペプチド配列において非連続である特定のアミノ酸配列が、例えばポリペプチド鎖の折り畳みに起因して、それでも作動可能に連結し得る。

30

【0037】

融合ポリペプチドに関して、用語「作動可能的に連結する」は、それぞれの成分が他の成分との連鎖において、この成分がそのように連鎖していないかのように、同じ機能を実行するという事実をいい得る。例えば、ZFP DNA結合ドメインが転写活性化ドメイン(またはそれらの機能的フラグメント)と融合される融合ポリペプチドに関して、このZFP DNA結合ドメインおよびこの転写活性化ドメイン(またはそれらの機能的フラグメント)は、融合ポリペプチドにおいてこのZFP DNA結合ドメイン部分とその標的部位および/またはその結合部位に結合し得、一方、転写活性化ドメイン(またはそれらの機能的フラグメント)が転写を活性化し得る場合に、作動可能的に連結される。

40

【0038】

例えば、ZFPと特異的標的部位との間の「特異的結合」は、少なくとも 1×10^6 Mの結合親和性を意味する。

【0039】

「調節ドメイン」または「機能的ドメイン」は、DNA結合ドメイン(例えば、ZFP)に結合される場合、転写調節活性を有するポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質ドメインをいう。代表的に、調節ドメインは、ZFPに共有結合または非共有結合し(例えば、融合分子を形成するために)、転写調節をもたらす。調節ドメインは、活性化ドメインまたは抑制ドメインであり得る。活性化ドメインには、VP16、VP64、リガン

50

ドに結合された野生型甲状腺ホルモンレセプター (TR) および特定のTR変異体、ならびに核因子 - B の p 6 5 サブユニットが挙げられるが、これらに限定されない。抑制ドメインには、KRAB、MBD2B、結合していない野生型TRおよび特定のTR変異体、ならびに v - ErbA が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる調節ドメインには、例えば転写因子および補助因子 (例えば、MAD、ERD、SID、早期成長応答因子1 (early growth response factor 1)、および核ホルモンレセプター)、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挙げられる。活性化因子および抑制因子には、活性化補助因子および抑制補助因子が挙げられる (例えば、Utleyら、Nature 384: 498~502 (1998) を参照のこと)。あるいは、ZFPは、調節ドメインなしで単独に作用し、転写調節をもたらし得る。

10

【0040】

「融合分子」は、2つ以上のサブユニット分子が結合、好ましくは共有結合した分子である。このサブユニット分子は、同じ化学型の分子であり得るか、または異なる化学型の分子であり得る。第1の型の融合分子の例としては、融合ポリペプチド (例えば、ZFP DNA結合ドメインとメチル結合ドメインとの間の融合) および融合核酸 (例えば、本明細書中に記載される融合ポリペプチドをコードする核酸) が挙げられるがこれらに限定されない。第2の型の融合分子の例としては、三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合、および副溝結合因子 (minor groove binder) と核酸との間の融合が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0041】

「外因性分子」は、細胞中に通常存在しないが、1つ以上の遺伝学的方法、生化学的方法、または他の方法によって細胞中に導入され得る分子である。細胞における通常の存在は、その細胞の特定の発育段階および環境条件に関して決定される。従って、例えば筋肉の胚発達の間でのみ存在する分子は、成体筋肉細胞に関して外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、熱ショックされていない細胞に関して外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全の内因性分子の機能的な異形 (version)、または通常に機能する内因性分子の機能不全な異形を含み得る。

30

【0042】

外因性分子は、とりわけ、コンビナトリアル化学プロセスによって産生されるような小分子、または高分子 (例えば、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、多糖類、上記分子の任意の改変された誘導體、または上記分子の1つ以上を含む任意の複合体) であり得る。核酸は、DNAおよびRNAを含み、一本鎖もしくは二本鎖であり得；直鎖状、分枝状、もしくは環状であり得、そして任意の長さで有り得る。核酸は、二本鎖を形成し得る核酸、ならびに三重鎖形成核酸を含む。例えば、米国特許第5,176,996号および同第5,422,251号を参照のこと。タンパク質には、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチン再構築因子 (chromatin remodeling factor)、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が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0043】

外因性分子は、内因性分子 (例えば、タンパク質または核酸) と同じ型の分子であり得る (すなわち、外因性遺伝子) が、ただし、内因性分子とは異なる配列を有する。例えば、外因性核酸は、細胞中に導入されるプラスミドまたはエピソーム、あるいは通常は細胞中に存在しない染色体を含み得る。外因性分子を細胞中に導入するための方法は、当該分野で公知であり、そして、脂質介在転移 (すなわち、中性脂肪および陽イオン性脂肪を含むリポソーム)、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、微粒ボンバードメント、カルシウムリン酸共沈降、DEAE-デキストラン介在転移およびウイルスベクター介在

50

転移が挙げられるがこれらに限定されない。

【0044】

対照的に、「内因性分子」は、特定の環境条件下で、特定の細胞中に特定の発育段階で通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリアのゲノム、葉緑体のゲノムもしくは他の小器官のゲノム、または天然に存在するエピソームの核酸を含み得る。さらなる内因性分子としては、内因性遺伝子および内因性タンパク質（例えば、転写因子およびクロマチン再構築複合体の成分）が挙げられ得る。

【0045】

本開示の目的についての「遺伝子」とは、遺伝子産物（以下を参照のこと）をコードするDNA領域、ならびに遺伝子産物の産生を調節する全てのDNA領域（そのような調節配列がコード配列および/または転写配列に隣接するかしないに関わらず）を含む。従って、遺伝子は、限定される必要はないが、プロモーター配列、ターミネーター、転写調節配列（例えば、リボゾーム結合部位および内部リボゾーム流入部位、エンハンサー、サイレンサー、絶縁体（insulator）、結合エレメント、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）が挙げられる。遺伝子は、正常または変異のいずれかの内因性細胞遺伝子、あるいは感染性生物（例えば細菌またはウイルスなど）の外因性遺伝子であり得る。

10

【0046】

「内因性細胞遺伝子」は、細胞に対してネイティブな遺伝子をいい、これはその細胞の正常のゲノム内容物（context）および染色体内容物中にあり、そしてこれはこの細胞に対して異種ではない。このような細胞遺伝子には、例えば、動物遺伝子、植物遺伝子、細菌遺伝子、原生動物遺伝子、真菌遺伝子、ミトコンドリア遺伝子および葉緑体遺伝子が挙げられる。

20

【0047】

「ネイティブなクロマチン内容物」とは、天然に存在する、構造的な関係のゲノムDNA（例えば細菌ゲノムDNA、動物ゲノムDNA、真菌ゲノムDNA、植物ゲノムDNA、原生動物ゲノムDNA、ミトコンドリアゲノムDNAおよび葉緑体ゲノムDNA）、およびDNA結合タンパク質（例えば、ヒストン、非ヒストン染色体タンパク質および細菌DNA結合タンパク質II）をいい、これは共に染色体を形成する。内因性細胞遺伝子は、ネイティブなクロマチン内容物中で、転写的に活性化状態または非活性化状態であり得る。

30

【0048】

「遺伝子発現」は、遺伝子中に含まれる情報の、遺伝子産物への変換をいう。遺伝子産物は、遺伝子（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNAまたは任意の他の型のRNA）の直接的な転写産物、またはmRNAの翻訳によって産生されたタンパク質であり得る。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、およびエディティングのようなプロセスによって改変されるRNA、ならびに、例えばメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン結合、ADP-リボシル化、ミリスチル化、およびグリコシル化によって改変されるタンパク質を含む。

【0049】

「遺伝子の活性化」および「遺伝子発現の増大」は、遺伝子産物の産生における増大を生じる任意の方法をいう。遺伝子産物は、RNA（mRNA、tRNA、rRNA、および構造RNAを含むがこれらに限定されない）またはタンパク質のいずれかであり得る。従って、遺伝子の活性化は、遺伝子の転写および/またはmRNAの翻訳を増大するプロセスを含む。転写を増大する遺伝子の活性化プロセスの例は、転写開始複合体の形成を促進するプロセス、転写開始率を増加するプロセス、転写の持続率を増加するプロセス、転写の進化性を増加するプロセス、および転写抑制を取り除くプロセス（例えば、転写抑制物の結合を遮断することによって）が挙げられるがこれらに限定されない。遺伝子の活性化は、例えば、抑制の阻害ならびに、存在するレベル以上の発現の刺激を構成し得る。翻訳を増大する遺伝子の活性化プロセスの例は、翻訳開始を増大するプロセス、翻訳の持続を

40

50

増大するプロセス、および mRNA の安定性を増大するプロセスが挙げられる。一般に、遺伝子の活性化は、遺伝子産物の産生における任意の検出可能な増加、好ましくは遺伝子産物の産生における約 2 倍の増加、より好ましくは約 2 ~ 約 5 倍もしくはその間の任意の整数値、より好ましくは約 5 ~ 約 10 倍の間もしくはその間の任意の整数値、より好ましくは約 10 ~ 約 20 倍の間もしくはその間の任意の整数値、さらにより好ましくは約 20 ~ 約 50 倍の間もしくはその間の任意の整数値、より好ましくは約 50 ~ 約 100 倍の間もしくはその間の任意の整数値、より好ましくは 100 倍以上の増加を含む。

【 0 0 5 0 】

「遺伝子抑制」および「遺伝子発現の阻害」は、遺伝子産物の生産において減少をもたらす任意のプロセスをいう。遺伝子産物は、RNA (mRNA、rRNA、tRNA および構造 RNA を含むが、これらに限定されない) またはタンパク質のいずれかであり得る。従って、遺伝子抑制は、遺伝子の転写および/または mRNA の翻訳を減少させるプロセスを含む。転写を減少させる遺伝子抑制プロセスの例として以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：転写開始複合体の形成を阻害するプロセス、転写開始率を減少させるプロセス、転写延長率を減少させるプロセス、転写のプロセシング率 (*processivity*) を減少させる方法および転写活性を拮抗するプロセス (例えば、転写活性化因子の結合をブロックすることによる)。遺伝子抑制は、例えば、活性化の防止および発現の存在レベルを下まわる発現の阻害からなり得る。翻訳を減少させる遺伝子抑制プロセスの例としては、翻訳開始を減少させる方法、翻訳延長を減少させる方法および mRNA 安定性を減少させる方法が挙げられる。翻訳抑制としては、遺伝子転写の可逆的および不可逆的な不活性化の両方が挙げられる。一般的には、遺伝子抑制は、遺伝子産物の生産における任意の検出可能な減少を含み、好ましくは約 2 倍だけの遺伝子産物の生産における減少、さらに好ましくは約 2 ~ 約 5 倍またはそれらの間の任意の整数値、さらに好ましくは、約 5 ~ 約 10 倍の間またはそれらの間の任意の整数値、さらに好ましくは、約 10 ~ 約 20 倍の間またはそれらの間の任意の整数値、なおさらに好ましくは、約 20 ~ 約 50 倍の間またはそれらの間の任意の整数値、さらに好ましくは、約 50 ~ 約 100 倍の間またはそれらの間の任意の整数値、さらに好ましくは、100 倍以上である。最も好ましくは、遺伝子抑制が、遺伝子発現の完全な阻害をもたらし、それゆえ遺伝子産物が検出されない。

【 0 0 5 1 】

用語「調節する」は、機能の抑制、促進または誘導をいう。例えば、ZFP は、転写制御配列内のモチーフに結合し、それによって転写制御配列に作動可能に連結される遺伝子の転写を促進または抑制することによって、遺伝子発現を調節し得る。さらに、調節は、遺伝子への ZFP 結合の性質による遺伝子の転写阻害、および DNA 依存性 RNA ポリメラーゼが遺伝子を最初から最後まで読むことをブロックしてそれゆえ遺伝子の転写を阻害することを含む。さらに、調節は、転写物の翻訳の阻害を含む。従って、遺伝子発現の「調節」は、遺伝子活性化および遺伝子抑制の両方を含む。

【 0 0 5 2 】

調節は、標的遺伝子の発現により間接的または直接的に影響を受ける任意のパラメーターを決定することによって、アッセイされ得る。このようなパラメーターとしては、例えば以下のものが挙げられる：RNA またはタンパク質のレベルにおける変化；タンパク質活性における変化；産物レベルにおける変化；下流の遺伝子発現における変化；レポーター遺伝子 (例えば、ルシフェラーゼ、CAT、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、GFP (例えば、Mistilli および Spector、(1997) *Nature Biotechnology* 15 : 961 - 964 を参照のこと)、または薬物耐性のような選択マーカー) の転写または活性化における変化；シグナル伝達における変化；リン酸化および脱リン酸化における変化；レセプター - リガンド相互作用における変化；セカンドメッセンジャー (例えば、cGMP、cAMP、IP₃、および Ca²⁺) の濃度における変化；細胞増殖における変化；血管新生における変化；および/または遺伝子発現の任意の機能的効果にお

る変化。測定は、インビトロ、インビボ、および/またはエキソビボでなされ得る。このような機能的効果は、従来の方法（例えば、RNAレベルまたはタンパク質レベルの測定、RNA安定性の測定、および/または下流遺伝子もしくはレポーター遺伝子の発現の同定）によって測定され得る。読み出しは、例えば、以下によりし得る：化学ルミネセンス、蛍光発光、比色定量反応、抗体結合、誘導マーカー、リガンド結合アッセイ；cGMPおよびイノシトール三リン酸（IP₃）のような細胞内セカンドメッセンジャーにおける変化；細胞内カルシウムレベルにおける変化；サイトカイン放出など。

【0053】

ジンクフィンガータンパク質（または融合分子）が細胞内タンパク質の発現を阻害するために使用される場合、細胞内タンパク質の発現レベル、および/またはそれをコードするmRNAは、好ましくは発現しないかまたは調節に影響を及ぼすジンクフィンガータンパク質を含む参照細胞中のものの75%未満。好ましくは、発現レベルは、参照細胞中のものの50%未満；より好ましくは参照細胞中のものの25%未満；最も好ましくは参照細胞中のものの5%未満。ジンクフィンガータンパク質が細胞タンパク質の発現を活性化するために使用される場合、この発現レベルは、ZFPを発現しない参照細胞中のレベルの110%よりも多い。より好ましくは、この発現レベルは参照細胞中のレベルの125%よりも多く；より好ましくは原始細胞（original cell）中のレベルの150%よりも多く；最も好ましくは参照細胞中のレベルの175%よりも多い。

10

【0054】

用語「転写制御エレメント」「転写調節エレメント」「転写制御配列」および「転写調節配列」は、相互交換可能に使用され、転写の調節を媒介するDNA配列をいう。これらのエレメントまたは配列の例として、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：プロモーター、オペレーター、エンハンサー、サイレンサー、スプライスドナー部位およびスプライサクセプター部位、転写終結部位およびポリアデニル化部位。転写制御配列は、調節標的が制御エレメントによって媒介される転写の調節に直接的または間接的に参加する場合、分子標的に応答する。

20

【0055】

「真核生物細胞」は、以下のものを含むが、これらに限定されない：真菌細胞（例えば、酵母）、原生動物細胞、古細菌細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞およびヒト細胞。同様に、「原核生物細胞」は、細菌を含むがこれに限定されない。

30

【0056】

タンパク質、ポリペプチド、または核酸の「機能的フラグメント」は、配列が全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸に同一ではないが、全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸によって示される一つ以上の機能をなお保持するタンパク質、ポリペプチドまたは核酸である。機能的フラグメントは、対応するネイティブ分子と比べてより多くの、より少ないまたは同数の残基を有し得、および/または一つ以上のアミノ酸置換またはヌクレオチド置換を含み得る。核酸の機能を決定するための方法（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力）は、当該分野で周知である。同様に、タンパク質機能を決定するための方法が周知である。例えば、フィルター結合、電気泳動移動度シフト、または免疫沈降アッセイによって、例えば、ポリペプチドのDNA結合機能が決定され得る。Ausubelら（前出）を参照のこと。例えば、同時免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイまたは相補性検定（遺伝子的相補性検定および生化学的相補性検定の両方）によって、タンパク質が別のタンパク質と相互作用する能力は決定され得る。例えば、Fieldsら（1989）Nature 340:245-246；米国特許第5,585,245号およびPCT WO98/44350を参照のこと。

40

【0057】

「標的部位」または「標的配列」は、結合タンパク質（例えば、ZFPのような）によって結合される配列である。標的配列は、ヌクレオチド配列（DNAまたはRNAのいずれか）またはアミノ酸配列であり得る。例として、3-フィンガーZFPに対するDNA標的配列は、一般的に、ZFPと標的配列間の交差鎖相互作用の存在および/または性質に

50

依存して、9または10ヌクレオチド長のいずれかである。

【0058】

「標的サブサイト」または「サブサイト」は、単独のジンクフィンガーによって結合されるDNA標的部位の部分である。従って、交差鎖相互作用の非存在下において、サブサイトは、一般的に、3ヌクレオチド長である。交差鎖相互作用（例えば、共同所有されているPCT WO 00/42219に記載される「D - a b l eサブサイト（D - a b l e s u b s i t e）」）が生じる場合において、サブサイトは4ヌクレオチド長であり、そして別の3または4ヌクレオチドサブサイトと重なり合う。

【0059】

「分子標的」は、候補化合物（例えば、薬物）との相互作用について試験される任意の分子（例えば、細胞内の分子、または細胞膜と結合する分子）をいう。分子標的の非限定の例として、DNA、RNA、およびタンパク質（例えば、レセプター（例えば、細胞表面レセプター、膜結合レセプターまたは核レセプター）、シグナル伝達経路の成分、転写因子またはそれらの機能的フラグメント）が挙げられる。分子標的としてはまた、高分子（例えば、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、多糖類、上記分子の改変された任意の誘導体、または上記分子の1つ以上を含む任意の複合体）を含み得る。化合物が分子標的に直接的または間接的に作用する場合、その化合物はその分子標的と「相互作用」する。その化合物は、その分子標的に直接的に作用し得る。例えば、分子標的がタンパク質である場合、その化合物は、そのタンパク質に結合することによって直接的にそのタンパク質と相互作用し得るか、または転写調節エレメントへの作用を介してそのタンパク質の発現を直接的に調節し得る。同様に、例えば、分子標的に代わりに作用する別の分子をブロックするかまたは刺激することによって、その化合物はまた、間接的に分子標的に作用し得る。例えば、標的が非タンパク質分子であり、そしてその化合物が、非タンパク質分子標的の産生、安定性、活性、維持および/または修飾に関連するタンパク質と相互作用する場合、化合物の分子標的への間接的な作用が起こり得る。

【0060】

用語「有効量」は、所望される結果（例えば、既に活性化されている遺伝子の不活性化または不活性化遺伝子の活性化）をもたらす量、あるいはジンクフィンガーヌクレオチド結合モチーフを含む遺伝子の不活性化をもたらす量、もしくは構造遺伝子の転写またはRNAの翻訳をブロックする量を含む。

【0061】

「 K_d 」は、化合物に関する解離定数（すなわち、所定の条件下（すなわち、[標的] $< K_d$ の場合）での、化合物の標的への最大結合の2分の1（すなわち、標的に結合される化合物分子の2分の1）を示す化合物（例えば、ジンクフィンガータンパク質）の濃度）をいい、所定のアッセイ系（米国特許第5,789,538号）を使用して測定される。この K_d を測定するために使用されるアッセイ系が選択されるべきであり、そのためZFPの実際の K_d の最も厳密な測定が与えられる。ZFPの実際の K_d の厳密な測定が与えられる限り、任意のアッセイ系が使用され得る。1つの実施形態において、ZFPの K_d は、本明細書の実施例1に記載されるような電気泳動移動度シフトアッセイ（「EMSA」）を使用して測定される。ZFPの純度またはZFP活性のための調整がなされない限り、実施例1を使用してなされる K_d の計算は、所定のZFPの実際の K_d よりも小さい見積もりをもたらす。好ましくは、内因性細胞遺伝子の転写を調節するために使用されるZFPの K_d は、約100nM未満であり、さらに好ましくは約75nM未満であり、さらに好ましくは約50nM未満であり、最も好ましくは約25nM未満である。

【0062】

（スクリーニングアッセイ）

好ましい実施形態において、スクリーニングアッセイが、少なくとも1つの外因性ジンクフィンガータンパク質を含む細胞を用いてかまたは少なくとも1つの外因性ジンクフィンガータンパク質を含む細胞由来の物質を用いて実施される。本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイは、候補化合物の高スループットスクリーニングを可能にし、これは

10

20

30

40

50

、疑陽性の発生を減少しながら達成され得る。

【0063】

(A. ジンクフィンガータンパク質)

本明細書中に開示される組成物および方法は、DNA結合タンパク質、特にジンクフィンガータンパク質の使用を含む。例えば、Millerら(1985)EMBO J. 4: 1609-1614; Rhodesら(1993)Scientific American Feb.: 56-65; およびKlug(1999)J. Mol. Biol. 293: 215-218を参照のこと。3つのフィンガーのZif268マウス転写因子が、詳細に十分に研究されている(Pavletich, N. P. & Pabo, C. O. (1991) Science 252: 809-17)。Zif268 ZFPと二本鎖DNAとのX線共結晶構造によって、各フィンガーがDNAと独立して相互作用することが示される(Nolteら(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95: 2938-43; Pavletich, N. P. & Pabo, C. O. (1993) Science 261: 1701-7)。3フィンガーのドメインの機構は、各フィンガーによる3つ連続する塩基対トリプレットの認識を可能にする。各フィンガーは、約30アミノ酸長であり、折り畳みをとる。この2つの鎖は、シートを形成し、DNA結合のための主溝中に認識ヘリックスを位置づける。塩基との特定の接触は、主に認識ヘリックスの直前およびこの認識ヘリックス内の4アミノ酸によって媒介される。従来、これらの認識残基は、ヘリックス内のその位置に基づいて1、2、3、および6と番号付けられる。

10

20

【0064】

ZFP DNA-結合ドメインは、共同所有されるWO 00/42219; WO 00/41566; および米国出願番号09/444, 241(1999年11月19日出願); 同09/535, 088(2000年3月23日出願); ならびに米国特許第5, 789, 538号; 同第6, 007, 408号; 同第6, 013, 453号; 同第6, 140, 081号; 同第および; 同第6, 140, 466; ならびにPCT公開WO 95/19431、同WO 98/54311、同WO 00/23464および、同WO 00/27878に記載されるように設計および/または選択されて、特定の標的部位を認識する。1つの実施形態において、ジンクフィンガーDNA結合ドメインの標的部位は、共同所有されるWO 00/42219に開示される部位選択規則に従って同定される。好ましい実施形態において、ZFPは、共同所有される米国出願番号09/716, 637(2000年11月20日出願)の表題「Iterative Optimization in the Design of Binding Proteins」に記載されるように、設計および最適化される。特定の好ましい実施形態において、DNA結合ドメインの結合特異性は、問題の配列中(例えば、細胞性クロマチン中)の1つ以上の接近可能な領域を指向する。接近可能な領域は、例えば、共同所有される米国特許出願番号60/200, 590(2000年4月28日出願)の表題「Methods for Binding an Exogenous Molecule to Cellular Chromatin」、および米国特許出願番号60/228, 556(2000年8月28日出願)の表題「Databases of Regulatory Sequences; Methods of Making and Using Same」に記載されるように決定される。DNA結合ドメインは、次いで、近接可能な領域内の標的部位に結合するために、設計され、そして/または、選択され、そして/または、最適化される。

30

40

【0065】

2つの代替方法が代表的に使用されて、新規に設計されたDNA結合ペプチドを発現するために必要とされるコード配列を作製する。1つのプロトコルの例は、3フィンガーZFPの構築のためのPCRベースの組み立て手順であり、これは、6つの重複オリゴヌクレオチドを利用する(図1を参照のこと)。3つのオリゴヌクレオチドは、認識ヘリックス間のDNA結合ドメインの一部をコードする「ユニバーサル」配列に対応する。これら

50

のオリゴヌクレオチドは、全てのジンクフィンガー構築物に関して一定なままである。他の3つの「特異的」オリゴヌクレオチドは、認識ヘリックスをコードするように設計される。これらのオリゴヌクレオチドは、主に、認識ヘリックス上の1位、2位、3位、および6位に置換を含み、その結果、各々は、異なるDNA結合ドメインを特定する。

【0066】

PCR合成は、2工程で実行される。最初に、二本鎖DNA鋳型を、低い温度のアニーリング工程を用いた4サイクルのPCR反応において6つのオリゴヌクレオチド(3つはユニバーサル、3つは特異的)を合わせ、これによってオリゴヌクレオチドをアニーリングしてDNA「足場」を形成することによって作製する。この足場の中のギャップは、高い忠実度(high-fidelity)の熱安定ポリメラーゼによって充填され、TaqおよびPfuポリメラーゼの組合せもまた、十分である。構築の第2段階において、ジンクフィンガー鋳型は、増幅産物の両末端に制限部位を組み込むために設計された外部プライマーを用いて増幅され、これがシャトルベクターまたは直接発現ベクターへクローニングされることを容易にする。

【0067】

設計されたDNA結合タンパク質をコードするために配列を組み立てる代替の方法は、所望のジンクフィンガータンパク質の特定の領域をコードする相補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。この特定の適用は、オリゴヌクレオチドが最終連結工程前にリン酸化されることを必要とする。これは通常、アニーリング反応を始める前に実施されるが、リン酸化(例えば、ポリヌクレオチドキナーゼによる)はまた、アニーリング後に生じてもよい。簡単に言うと、タンパク質の定常領域をコードする「ユニバーサル」オリゴヌクレオチドは、相補オリゴヌクレオチドにアニーリングされる。さらに、フィンガー認識ヘリックスをコードする「特異的」オリゴヌクレオチドは、そのそれぞれの相補的オリゴヌクレオチドとアニーリングされる。これらの相補的オリゴは、上記のプロトコールにおいてポリメラーゼによって以前に充填された領域を充填するように設計される。ユニバーサルオリゴ1および特異的オリゴ6(フィンガー3をコードする)に相補的なオリゴヌクレオチドは、操作されて、選択ベクターへのクローニングに使用される認識部位に特異的な突出配列を含む。第2の組み立てプロトコールは、最初のプロトコールと以下の面で異なる:新規に設計されたジンクフィンガータンパク質をコードする「足場」は、完全に合成DNAから構成され、これによってポリメラーゼ充填工程を排除し、さらにベクターにクローニングされるフラグメントは、増幅を必要としない。最後に、配列特異的突出を含むことは、ベクターへの挿入前の制限酵素消化の必要性を排除する。

【0068】

生じるフラグメント(新規に設計されたジンクフィンガータンパク質をコードする)は、発現ベクターに連結される。一般的に利用される発現ベクターとしては、改変pMAL-c2細菌発現ベクター(New England Biolabs、「NEB」、Beverly, MA)または真核生物発現ベクターのpCDNA(Promega, Madison, WI)が挙げられるが、これらに限定されない。従来製の精製方法が使用され得る(Ausubel(前出) Sambrook(前出)を参照のこと)。さらに、任意の適切な宿主(例えば、細菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞など)が、使用され得る。

【0069】

マルトース結合タンパク質に融合されたジンクフィンガータンパク質(MBP-ZFP)の細菌株JM109における発現は、アミロースカラム(NEB)を介した直接的な精製を可能にする。ジンクフィンガーキメラタンパク質の高い発現レベルは、IPTGを用いた誘導によって得ることができる。なぜなら、pMal-c2発現プラスミド中のMBP-ZFP融合物は、IPTG誘導可能なtacプロモーター(NEB)の制御下にあるからである。MBP-ZFP融合プラスミドを含む細菌は、2xYT培地(10μM ZnCl₂、0.02% グルコース、および50μg/ml アンピシリンを含む)に接種され、37で振盪される。中間の指数関数的な増殖期に、IPTGが0.3mMまで添

10

20

30

40

50

加され、そして培養物が振盪される。3時間後、細菌が遠心分離によって回収され、超音波処理によって破壊され、次いで、不溶性物質が、遠心分離によって除去される。MBP-ZFPタンパク質は、アミロース結合樹脂上に捕獲され、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl、5 mM DTTおよび50 μ M ZnCl₂を含む緩衝液で徹底的に洗浄され、次いで、本質的に同じ緩衝液中でマルトースを用いて溶出される(精製は、NEBからの標準的なプロトコールに基づく)。精製タンパク質は、定量され、そして生化学分析のために保存される。

【0070】

精製タンパク質の生化学特性(例えば、 K_d)は、任意の適切なアッセイによって特徴付けられ得る。 K_d は、電気泳動移動度シフトアッセイ(「EMSA」)を介して特徴付けられ得る(Buratoski & Chodos, Current Protocols in Molecular Biology, 12.2.1-12.2.7頁(Ausubel編、1996);米国特許第5,789,538号;PCT WO 00/42219もまた参照のこと)。親和性は、低目に固定された量の標識二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滴定することによって測定される。この標的は、天然の配列中に見出される3 bpが隣接した天然の結合部位配列(9または18 bp)を含む。結合部位および隣接配列の外部にあるのは、定常配列である。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た効率的な標的の標識を可能にする1 bpの5'突出を保有する。このアッセイに関して、標的を、40 nM以下の濃度で添加し(実際の濃度は、最も低いタンパク質希釈よりも少なくとも10分の1に維持される)、そして反応物を、少なくとも45分間平衡させる。さらに反応混合物はまた、10 mM Tris (pH 7.5)、100 mM KCl、1 mM MgCl₂、0.1 mM ZnCl₂、5 mM DTT、10% グリセロール、0.02% BSAも含む(ポリ(dIdC)または(dAdT)(Pharmacia)がまた、10~100 μ g/ μ lで添加され得る)。

【0071】

平衡された反応物は、10% ポリアクリルアミドゲル(これは、Tris/グリシン緩衝液中で45分間、予備泳動された)に充填され、次いで、結合または未結合の標識標的が、150 Vの電気泳動で分離される(あるいは、4%ポリアクリルアミドゲルスタッカーを含む10~20%勾配のTris-HClゲルがまた、使用され得る)。乾燥させたゲルは、オートラジオグラフィーまたはホスホロイメージング(phosphorimaging)によって可視化され、そして見かけの K_d が、最大半減の結合を与えるタンパク質濃度を計算することによって決定される。

【0072】

類似のアッセイがまた、タンパク質調製物における活性な画分を決定することを含み得る。活性な画分は、タンパク質が高い濃度の標的DNAに対して滴定される化学量論的ゲルシフトによって決定される。滴定は、100、50、および25%の標的で実施される(通常、マイクロモルのレベル)。

【0073】

(B. 融合分子)

ジンクフィンガー含有タンパク質の選択および/または設計はまた、遺伝子発現の調節を容易にする融合分子の設計を可能にする。従って、特定の実施形態において、本明細書中に開示される組成物および方法は、ジンクフィンガータンパク質(またはその機能フラグメント)と1つ以上の機能ドメイン(またはその機能フラグメント)との間の融合物、またはこのような融合物をコードするポリヌクレオチドを含む。このような融合分子が細胞に存在する場合、機能ドメインは、ジンクフィンガータンパク質が結合する遺伝子中の配列の近位にもたらされる。次いで、この機能ドメインの転写調節機能は、例えば、遺伝子発現を調節することによって遺伝子上で作用し得る。

【0074】

ジンクフィンガータンパク質は、1つ以上の調節ドメインあるいは2つ以上の調節ドメイ

10

20

30

40

50

ン(この2つ以上のドメインは、同じドメインの2つのコピーであるか、または2つの異なるドメインである)と、共有結合しても非共有結合してもよい。調節ドメインは、例えば、アミノ酸リンカーを介して、融合タンパク質の一部としてジンクフィンガータンパク質に共有結合で連結され得る。ジンクフィンガータンパク質はまた、非共有結合二量体化ドメイン(例えば、ロイシンジッパー、STATタンパク質N末端ドメイン、またはFK506結合タンパク質)を介して調節ドメインと結合され得る(例えば、O'Shea, *Science* 254:539(1991) Barahmand-Pourら, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211:121-128(1996); Klemmら, *Annu. Rev. Immunol.* 16:569-592(1998); Klemmら, *Annu. Rev. Immunol.* 16:569-592(1998); Hoら, *Nature* 382:822-826(1996); および Pomeranzら, *Biochem.* 37:965(1998)を参照のこと)。調節ドメインは、任意の適切な位置(ジンクフィンガータンパク質のC末端またはN末端を含む)でジンクフィンガータンパク質と結合され得る。

【0075】

ジンクフィンガータンパク質に加えるための通常の制御ドメインとしては、以下が挙げられる:例えば、転写因子由来のエフェクタードメイン(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、核ホルモンレセプター、癌遺伝子転写因子(例えば、myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mosおよび/またはerbファミリーメンバーなど); DNA修復酵素ならびにこれらの関連因子および修飾因子; DNA再編成酵素ならびにこれらの関連因子および修飾因子; クロマチン関連タンパク質およびこれらの修飾因子(例えば、キナーゼ、アセチラーゼおよびデアセチラーゼ); 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)ならびにこれらの関連因子および修飾因子。

【0076】

制御ドメインを入手し得る転写因子ポリペプチドは、制御されかつ基礎的な転写に関連する転写因子ポリペプチドを含む。このようなポリペプチドとしては、例えば、転写因子、これらのエフェクタードメイン、コアクチベーター、サイレンサーおよび核ホルモンレセプターが挙げられる。転写に関するタンパク質および核酸エレメントの概説については、例えば、Goodrichら, *Cell* 84:825-30(1996)を参照のこと; 一般に転写因子は、Barnes&Adrock, *Clin. Exp. Allergy* 25 Suppl. 2:46-9(1995)およびRoeder, *Methods Enzymol.* 273:165-71(1996)に概説される。転写因子の専用データベースは公知である(例えば、*Science* 269:630(1995)を参照のこと)。核ホルモンレセプター転写因子は、例えば、Rosenら, *J. Med. Chem.* 38:4855-74(1995)に記載される。転写因子のC/EBPファミリーは、Wedelら, *Immunobiology* 193:171-85(1995)に概説される。核ホルモンレセプターによって転写制御を媒介するコアクチベーターおよびコリプレッサーは、例えば、Meier, *Eur. J. Endocrinol.* 134(2):158-9(1996); Kaiserら, *Trends Biochem. Sci.* 21:342-5(1996); および Utleayら, *Nature* 394:498-502(1998)に概説される。造血の制御に関連する、GATA転写因子は、例えば、Simon, *Nat. Genet.* 11:9-11(1995); Weissら, *Exp. Hematol.* 23:99-107に記載される。TATAボックス結合タンパク質(TBP)およびその関連TAFポリペプチド(これは、TAF30、TAF55、TAF80、TAF110、TAF150およびTAF250を含む)は、Goodrich&Tjian, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:403-9(1994)およびHurley, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:69-75(1996)に記載される。STATファミリーの転写因子は、例えば、Barah

10

20

30

40

50

mand - Pour \bar{a} , Curr. Top. Microbiol. Immunol. 21
1:121-8 (1996)に概説される。疾患に関連する転写因子は、Aso \bar{a} , J.
Clin. Invest. 97:1561-9 (1996)に概説される。

【0077】

ZFPと融合するための例示的な機能的ドメインは、ヒトKOX-1タンパク質由来のK
RAB抑制ドメインである(例えば、Thiesen \bar{a} , New Biologist
2, 363-374 (1990); Margolin \bar{a} , Proc. Natl. Acad.
. Sci. USA 91, 4509-4513 (1994); Pangu \bar{e} , Nucl
. Acids Res. 22:2908-2914 (1994); Witzgall \bar{a} ,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4514-4518 (1994
10)を参照のこと)。別の最適な抑制ドメインは、メチル結合ドメインタンパク質2B(M
BD-2B)である(MBDタンパク質の記述に関してHendrich \bar{a} , (1999)
Mamm Genome 10:906-912も参照のこと)。別の有用な抑制ドメ
インは、v-ErbAタンパク質に関連する抑制ドメインである。例えば、Damm \bar{a} ,
(1989) Nature 339:593-597; Evans (1989) Int.
J. Cancer Suppl. 4:26-28; Pain \bar{a} , (1990) New B
iol. 2:284-294; Sap \bar{a} , (1989) Nature 340:242-
244; Zenke \bar{a} , (1988) Cell 52:107-119; およびZenke
 \bar{e} , (1990) Cell 61:1035-1049を参照のこと。さらなる例示的
な抑制ドメインとしては以下が挙げられるがこれらに限定されない: 非リガンド化(例え
20ば、T3に結合しない)甲状腺ホルモンレセプター(TR)および特定のTR変異体、S
ID、MBD2、MBD3、DNMTファミリーのメンバー(例えば、DNMT1、DN
MT3A、DNMT3B)、Rb、およびMeCP2。例えば、Zhang \bar{a} , (200
0); Ann Rev Physiol 62:439-466; Brid \bar{a} , (199
9) Cell 99:451-454; Tyler \bar{a} , (1999) Cell 99:4
43-446; Knoepfler \bar{a} , (1999) Cell 99:447-450;
およびRobertson \bar{a} , (2000) Nature Genet. 25:338-
342を参照のこと。さらなる例示的な抑制ドメインとしては、ROM2およびAtHD
2Aが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、Chern \bar{a} , (1996) Pla
nt Cell 8:305-321; およびWu \bar{a} , (2000) Plant J. 2
302:19-27を参照のこと。

【0078】

活性化を達成するための適切なドメインとしては以下が挙げられる: HSV VP16活
性化ドメイン(例えば、Hagmenn \bar{a} , J. Virol. 71, 5952-5962
(1997)を参照のこと)、核ホルモンレセプター(例えば、Torchia \bar{a} , Cu
rr. Opin. Cell. Biol. 10:373-383 (1998)を参照のこと)
); リガンド結合TRおよび特定のTR変異体; 核因子 Bのp65サブユニット(Bi
tko&Barik, J. Virol. 72:5610-5618 (1998)ならびに
Doyle&Hunt, Neuroreport 8:2937-2942 (1997)
40); Liu \bar{a} , Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998)、または
VP64のような人工キメラ機能的ドメイン(Seifpal \bar{a} , EMBO J. 11,
4961-4968 (1992))。

【0079】

さらなる例示的な活性化ドメインとしては以下が含まれるがこれらに限定されない: p3
00、CBP、PCAF、SRC1、PvALF、AtHD2A、およびERF-2。例
え、Robyr \bar{a} , (2000) Mol. Endocrinol. 14:329-34
7; Collingwood \bar{a} , (1999) J. Mol. Endocrinol. 23
:255-275; Leo \bar{a} , (2000) Gene 245:1-11; Manteu
ffel-Cymborowska (1999) Acta Biochem. Pol. 4
6:77-89; McKenna \bar{a} , (1999) J. Steroid Biochem
50

. Mol. 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を参照のこと。さらなる例示的な活性化ドメインとしては以下が含まれるがこれらに限定されない: OSGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5, -6, -7, および -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP, ならびに TRAB1。例えば、Ogawaら, (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-Hausseleら, (2000) Plant J. 22:1-8; Gongら, (1999) Plant Mol. Biol. 41:33-44; および Hoboら, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15, 348-15, 353を参照のこと。

【0080】

さらなる機能的ドメインは、例えば、共有に係るWO00/41566に開示される。さらに、インシュレイトドメイン (insulator domain) (融合分子における使用に適切なISWI含有ドメインおよび/またはメチル結合ドメインタンパク質のようなクロマチン再構築タンパク質) は、例えば、共有に係る米国特許出願番号60/236,409号(「Nuclear Reprogramming Using ISWI And Related Chromatin Remodeling ATPases」と題される); 米国特許出願番号60/236,884号(「Modulation Of Gene Expression Using Methyl Binding Domain Polypeptides」と題される); および米国特許出願番号60/253,678号(「Modulation of Gene Expression Using Insulator Binding Proteins」と題される)に記載される。

【0081】

機能的ドメインはまた、核ホルモンレセプター由来であり得る。例えば、甲状腺ホルモンレセプター (TR) は、核ホルモンレセプターサブファミリーのメンバーであり、そして一般的にその標的遺伝子に構成的に結合される。TR結合の効果(すなわち、遺伝子発現の抑制かまたは活性化のいずれか)は、通常、そのリガンド(甲状腺ホルモン(T3))が存在するか、または存在しないかに依存する。T3の非存在下において、レセプターは、一般に、基礎レベルより下のレベルに遺伝子発現を抑制する。非リガンド化レセプターによって補充され、そして抑制的な複合体を構成すると考えられる多数のタンパク質が同定された。このようなタンパク質の例としては、レセプターと直接的に相互作用する、SMRTおよびNCOR、ならびにSMRT/NCORに相互作用する、Sin3が挙げられる。Sin3はまた、多くのヒストンデアセチラーゼ(例えば、HDACの1~8(このうちのいくつかはまた、TRと直接的に相互作用し得る))と相互作用する。DNA結合TRによるヒストンデアセチラーゼの再補充は、抑制を与える能力において主要な役割を担うと考えられるが; HDAC以外の抑制因子が、TRによって補充されることもまた可能である。

【0082】

DNA結合TRへのリガンドの結合は、TRに関連する抑制性複合体の崩壊およびDNA結合、リガンド結合TRへの活性因子の再補充を生じる。このような活性因子としては以下が含まれるがそれらに限定されない: ヒストンアセチルトランスフェラーゼSRC-1、CBP/p300、およびP/CAF。オリゴマーの活性化複合体はまた、リガンド結合TR(例えば、DRIPおよびARC)によって補充され得る。Rachezら, (1999) Nature 398:824-827; および Naarら, (1999) Nature 398:828-832。これらは、リガンド結合への応答において、他の核

10

20

30

40

50

ホルモンレセプターと相互作用すること、そしてクロマチンの鋳型の前後において遺伝子発現の活性化を容易にすることが示されている。核レセプターファミリー（糖質コルチコイドレセプター（GR））の別のメンバーは、リガンド結合に応答してhBRG1/BAFクロマチン再構築複合体を補充する。Fryerら、(1998) Nature 393: 88-91。

【0083】

TRおよび関連する核レセプターは、（規定されていない機能の）アミノ末端領域、中心的なDNA結合ドメインおよびカルボキシ末端リガンド結合ドメイン（LBD）を含むモジュラータンパク質である。LBDは、ホルモンを結合することに加えて、上記される抑制因子と活性因子の両方との相互作用の原因である。LBDが、異種DNA結合ドメイン（Gal4）に融合される場合、Gal4結合部位を含む標的プロモーターの抑制を媒介する。Collingwoodら、(1998) EMBO J. 17: 4760-4770。さらに、転写のT3依存活性化は、Gal4 DNA結合ドメインとTR LBDとの融合を使用して達成され得る。Toneら、(1994) J. Biol. Chem. 269: 31, 157-31, 161。

10

【0084】

TRおよび関連する核レセプターのLBDの構造の知見（突然変異誘発の研究の結果と共に）は、ホルモン濃度に無感覚である抑制活性および活性化活性を有する変異体レセプターを設計するために使用され得る。例えば、生理学的なレベルのT3を結合し得ないTRの単一アミノ酸変異体（例えば、G344E、430M、および276I）は、これらの結合部位にコリプレッサーを補充する。Collingwoodら、(1994) Mol. Endocrinol. 8: 1262-1277; Collingwoodら、(1998) 前出。逆に、ホルモン結合によって誘導される構造変化を模倣するリガンド結合ドメインにおける構造変化を起こす変異は、エストロゲンレセプター（例えば、L536PおよびY541D/E/A）において同定され、そしてレセプターの構造的活性形態を生じる。Engら、(1997) Mol. Cell. Biol. 17: 4644-4653; Whiteら、(1997) EMBO J. 16: 1427-1435。

20

【0085】

従って、例えば、TRまたはGRに由来する変異体核ホルモンレセプターLBDは、細胞内のクロマチンにおける目的の領域に活性化タンパク質複合体または抑制タンパク質複合体を補充するために、ZFP DNA結合ドメインとの融合の成分として使用され得、それによって標的分子の発現を制御する。特定の天然に存在する変異体LBDは、利用可能であり；そして新しい変異体は、当業者に周知の方法によって作製され得る。このような複合体の作用部位は、DNA結合ドメインの特異性によって決定されるが；これらの活性は、LBDに対する変異の性質によって決定され、そしてこれは、リガンド濃度に依存しない。例えば、ホルモンを結合し得ないように変異されたLBDを含む融合は、抑制性の複合体の形成を容易にするが；リガンド結合LBDに似ているようにLBDの構造を変化するLBD変異を含む融合分子は、転写の活性化を容易にする複合体の形成を刺激する。従って、本発明の開示の目的に関して、変異体核ホルモンレセプターLBD（例えば、TR）は、活性化ドメインまたは抑制ドメインとして使用され得る。

30

40

【0086】

さらなる実施形態において、「Targeted Modification of Chromatin Structure」と題される共有に係る米国特許出願に開示されるように、クロマチンの標的再構築は、機能的ドメイン融合分子/DNA結合ドメイン融合分子の結合にアクセス可能である細胞のクロマチンにおいて1つ以上の部位を産生するために使用され得る。

【0087】

キナーゼ、ホスファターゼ、および遺伝子制御に関連するポリペプチドを改変する他のタンパク質はまた、ジンクフィンガータンパク質のための機能的ドメインとして有用である。このような修飾因子は、しばしば、例えば、ホルモンによって媒介される転写を作動す

50

るかまたは停止するかに関連する。転写制御に関連するキナーゼは、Davis, Mol. Reprod. Dev. 42: 459 - 67 (1995), Jacksonら, Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. 28: 279 - 86 (1993), および Boulikas, Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 5: 1 - 77 (1995) に概説され、一方でホスファターゼは、例えば、Schonthal & Semin, Cancer Biol. 6: 239 - 48 (1995) に概説される。核のチロシンキナーゼは、Wang, Trends Biochem. Sci. 19: 373 - 6 (1994) に記載される。

【0088】

有用なドメインはまた、癌遺伝子（例えば、myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mos および / または erb ファミリーメンバー）ならびにこれらに関連する因子および修飾因子の遺伝子産物から入手され得る。癌遺伝子は、例えば、Cooper, Oncogenes, The Jones and Bartlett Series in Biology (第2版, 1995) に記載される。ets 転写因子は、Waslylkら, Eur. J. Biochem. 211: 7 - 18 (1993) および Crepieuxら, Crit. Rev. Oncog. 5: 615 - 38 (1994) に概説される。Myc 癌遺伝子は、例えば、Ryanら, Biochem. J. 314: 713 - 21 (1996) に概説される。jun および fos 転写因子は、例えば、Fos and Jun Families of Transcription Factors (Angel & Herrlich 編, 1994) に記載される。max 癌遺伝子は、Hurlinら, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59: 109 - 16 に概説される。myb 遺伝子ファミリーは、Kanei-Ishiiら, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211: 89 - 98 (1996) に概説される。mos ファミリーは、Yewら, Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 19 - 25 (1993) に概説される。

【0089】

ジンクフィンガータンパク質は、DNA 修復酵素ならびに関連因子および修飾因子から得られる機能的ドメインを含み得る。DNA 修復系は、例えば、Vos, Curr. Opin. Cell Biol. 4: 385 - 95 (1992); Sancar, Ann. Rev. Genet. 29: 69 - 105 (1995); Lehmann, Genet. Eng. 17: 1 - 19 (1995); および Wood, Ann. Rev. Biochem. 65: 135 - 67 (1996) に概説される。DNA 再構築酵素ならびにこれらの関連因子および修飾因子はまた、制御ドメインとして使用され得る（例えば、Gangloffら, Experientia 50: 261 - 9 (1994); Sadowski, FASEB J. 7: 760 - 7 (1993) を参照のこと）。

【0090】

同様に、制御ドメインは、DNA 修飾酵素（例えば、DNA 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）ならびにこれらの関連因子および修飾因子由来であり得る。ヘリカーゼは、Matsonら, Bioessays, 16: 13 - 22 (1994) に概説され、そしてメチルトランスフェラーゼは、Cheng, Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 4 - 10 (1995) に記載される。ヒストンデアセチラーゼ (Wolffe, Science 272: 371 - 2 (1996)) のような、クロマチン関連タンパク質およびこれらの修飾因子（例えば、キナーゼ、アセチラーゼおよびデアセチラーゼ）はまた、選択されたジンクフィンガータンパク質に加えるドメインとして有用である。転写性のリプレッサーとして作用する DNA メチルトランスフェラーゼはまた、制御ドメインであり得る（例えば、Van den Wyngaertら, FEBS Lett. 426: 283 - 289 (1998); Flynnら, J. Mol. Biol. 279: 101 - 116 (1998); Okanoら, Nucleic Acids Res. 26: 2536 -

10

20

30

40

50

2540(1998);およびZardo&Caiafa, J. Biol. Chem. 273:16517-16520(1998)を参照のこと)。FokIのようなエンドヌクレアーゼはまた、遺伝子切断を介して作用する、転写性のリプレッサーとして使用され得る(例えば、WO95/09233;およびPCT/US94/01201を参照のこと)。

【0091】

クロマチンならびにDNA構造、移動および局在ならびにこれらの関連因子および修飾因子を制御する因子;微生物(例えば、原核生物、真核生物およびウイルス)に由来する因子、およびこれらと結合するかまたはこれらを修飾する因子はまた、融合タンパク質を得るために使用され得る。リコンビナーゼおよびインテグラーゼは、機能的ドメインとして使用され得る。ヒストンアセチルトランスフェラーゼはまた、転写性のアクチベーターとして使用され得る(例えば、Jin&Scott, Mol. Cell. Biol. 18:4377-4384(1998);Wolfe, Science 272:371-372(1996);Tauntonら, Science 272:408-411(1996);およびHassigら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:3519-3524(1998)を参照のこと)。ヒストンデアセチラーゼは、転写性のリプレッサーとして使用され得る(例えば、Jin&Scott, Mol. Cell. Biol. 18:4377-4384(1998);Syntichaki&Thireos, J. Biol. Chem. 273:24414-24419(1998);Sakaguchira, Genes Dev. 12:2831-2841(1998);およびMartinezら, J. Biol. Chem. 273:23781-23785(1998)を参照のこと)。

【0092】

ポリペプチドドメイン間(例えば、2つのジンクフィンガータンパク質間またはジンクフィンガータンパク質と機能的ドメインとの間)のリンカードメインは、含まれ得る。このようなリンカーは、典型的にポリペプチド配列である(例えば、約5~200アミノ酸の間のポリgly配列)。好ましいリンカーは、典型的には組換え融合タンパク質の1部分として合成される可撓性のアミノ酸配列である。例えば、リンカーDGGGS(配列番号:28)は、2つのジンクフィンガータンパク質を連結するために使用され得る。2つのジンクフィンガータンパク質を連結する可動性のリンカーはまた、配列TGEKP(配列番号:29)を含むアミノ酸配列であり得る(例えば、Liuら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 5525-5530(1997)を参照のこと)。リンカーLRQKDGERP(配列番号:30)は2つのジンクフィンガータンパク質を連結するために使用され得る。以下のリンカーはまた、2つのジンクフィンガータンパク質を連結するために使用され得る:GGR(配列番号:31)(Pomerantzら, 1995, 前出), (G4S)_n(配列番号:45)(Kimら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 1156-1160(1996);およびGGRGGGS(配列番号:32);LRQRDGERP(配列番号:33);LRQKDGGSERP(配列番号:34);LRQKd(G3S)₂ERP(配列番号:35)。あるいは、可動性のリンカーは、DNA結合部位とペプチドそれ自身の両方をモデル化し得るコンピュータープログラムを使用して(Desjarlais&Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2256-2260(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:11099-11103(1994))またはファージディスプレイ方法によって(例えば、PCT WO99/45132)合理的に設計され得る。

【0093】

化学的リンカーは、合成的にかまたは組換え的に産生されたドメイン配列を結合するために使用され得る。例えば、ポリ(エチレングリコール)リンカーは、Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabamaから入手可能である。いくつかのリンカーは、アミド結合、スルフヒドリル結合またはヘテロ機能的結合

10

20

30

40

50

を有する。制御ドメインとジンクフィンガータンパク質との共有結合に加えて、非共有結合性の方法は、制御ドメインと関連するジンクフィンガータンパク質を有する分子の産生に使用され得る。

【0094】

ZFP融合分子はまた、1つ以上の機能的ドメインに加えて、または代わりに、精製、発現、モニタリングならびに/または細胞の局在および/もしくは細胞下の局在の検出を容易にする1つ以上のドメインを含み得る。例えば、これらとしては、マルトース結合タンパク質(「MBP」)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、ヘキサヒスチジン、c-myc、およびFLAGエピトープのようなポリペプチドが挙げられる。

【0095】

融合分子は、当業者に周知であるクローニングの方法および生化学的な組み合わせによって作製される。特定の実施形態において、融合分子は、ジンクフィンガータンパク質および少なくとも2つの機能的ドメインを含む(例えば、インシュレイトードメインまたはメチル結合タンパク質ドメイン、そして、さらに、転写活性化ドメインまたは転写抑制ドメイン)。融合分子はまた、核局在シグナル(例えば、SV40媒体T抗原由来のような)およびエピトープタグ(例えば、FLAGおよび血球凝着素のような)を必要に応じて含む。融合タンパク質(およびこれらをコードする核酸)は、翻訳性リーディングフレームが、融合の成分間で保存されるように設計される。

【0096】

本明細書中で開示される融合分子は、標的部位に結合し、そして分子標的の発現を媒介するジンクフィンガー結合タンパク質を含む。特定の実施形態において、標的部位は、細胞のクロマチンのアクセス可能な領域に存在する。アクセス可能な領域は、共有に係る米国特許出願番号60/200,590号、米国特許出願番号60/214,674号および米国特許出願番号60/228,556号に記載されるように決定され得る。標的部位が、細胞のクロマチンのアクセス可能な領域に存在しない場合、1つ以上のアクセス可能な領域は、「Targeted Modification of Chromatin Structure」と題される共有に係る米国特許出願に記載されるように決定される。さらなる実施形態において、融合分子のジンクフィンガー成分は、その標的部位が、アクセス可能な領域にあるかどうかに関係なく細胞のクロマチンに結合し得る。例えば、このような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のDNAに結合し得る。「パイオニア」DNA結合ドメインのこの型の例は、特定のストロイドレセプターおよび肝細胞核因子-3(HNF3)において見出される。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。

【0097】

融合化DNA結合ドメインの長所によって特定の配列に標的化された、1つ以上の機能的ドメインを使用する遺伝子制御の方法は、遺伝子発現のモジュレーションを達成し得る。遺伝子発現のモジュレーションは、低下した発現の形態であり得る(例えば、抑制)。この場合において、分子標的の発現が、ZFPによって抑制されている細胞における細胞内の性質の価値は、しばしば、分子標的に指向される抑圧的なZFPを発現しない細胞における性質の価値よりも低い。本明細書中に記載されるように、特定の標的遺伝子の抑制は、ジンクフィンガータンパク質および機能的ドメインを含む融合分子を使用することによって達成され得る。

【0098】

あるいは、分子標的をコードする遺伝子の活性化が、分子標的と化合物との相互作用を試験するために必要である場合、モジュレーションは、増大した遺伝子発現、または活性化の形態であり得る。この機能的ドメイン(例えば、インシュレイトードメイン、活性化ドメインなど)は、標的遺伝子の発現を増大および/または維持することを可能にする。分子標的の発現が、ZFPによって増大される細胞内における細胞内の性質の価値は、しば

10

20

30

40

50

しば、分子標的に指向される活性ZFPを発現しない細胞における細胞内の性質の価値よりも高い。

【0099】

いくつかの細胞は、誘導性プロモーターに操作可能に連結されるジンクフィンガータンパク質をコードする配列を発現するように設計される。種々の誘導性プロモーターは、利用可能であり；誘導性プロモーターの多くは、低分子または他の環境因子（例えば、温度および栄養状態のような）によって制御され得る。誘導性プロモーターとの操作可能な連結は、ZFPの活性化、そしてそれによってZFPによる分子標的の発現のモジュレーションが、適切な低分子を細胞に供給することまたは刺激を誘導することによって制御されることを可能にする。誘導性プロモーターによるZFPの発現の制御は、細胞に対して致死性を生じる持続性の過剰発現または過少発現下を有する分子標的の発現の一過性のモジュレーションを達成するのに有用である。誘導性発現はまた、分子標的のモジュレーションに帰する二次的な効果を軽減する利点がある。例えば、1つの細胞のタンパク質の発現のモジュレーションは、細胞内の多くの他のタンパク質（および他の分子）の相対的な量の変化を直接的にかまたは間接的に生じ得る。アッセイを実施する直前にジンクフィンガータンパク質の発現を誘導することによって、このような二次的な変化は最小化される。従って、制御された分子標的を含む試験細胞とコントロール細胞との間での応答の差異は、標的の制御によって起きる二次的な効果よりも化合物と分子標的との間の相互作用に全面的にかまたは実質的に全面的に帰する。

10

【0100】

(C. 細胞に基づくアッセイ)

1つの局面において、他の従来的な方法に共通した偽陽性の発生率を減少する、細胞に基づく薬物スクリーニングアッセイを行う方法が記載される。偽陽性は、例えば、化合物が、内因性の標的と相互作用しないが、代替のメカニズムによって同一または類似の効果を達成する場合に起こる。

20

【0101】

本方法において、好ましくは、少なくとも1つの分子標的（例えば、タンパク質標的または分子標的の発現を調節するタンパク質）の発現レベルのみが異なる一致した細胞集団でアッセイを行うことによって、偽陽性は、減少または排除される。代表的には、コントロール細胞集団は、特定の細胞型および環境（例えば、培養）条件について正常なレベルで分子標的を発現する。試験細胞集団は、コントロール集団と比較して変化したレベル（より高いか、またはより低いかのいずれか）で、分子標的を発現する。分子標的の変化した発現レベルは、標的分子の発現を調節するように作用するZFP分子またはZFP融合分子によって達成される。標的分子の発現は、例えば、ZFP分子またはZFP融合分子が、分子標的をコードする遺伝子の転写を調節する場合のように、直接的に調節され得る。あるいは、標的分子の発現の間接的な調節は、ZFP分子またはZFP融合分子が、標的分子の合成、安定性または調節に関連する遺伝子の発現を調節する場合に生じる。間接的な調節は、分子標的がタンパク質ではない場合に生じ得るが、タンパク質分子標的の間接的な調節もまた可能である。

30

【0102】

1つの実施形態において、分子標的は、試験細胞で過剰発現される。化合物は、試験細胞集団において、例えば、分子標的との相互作用を測定（定量的にまたは定性的に）する1以上のアッセイを使用して、過剰発現された分子標的と相互作用する能力についてスクリーニングされる。同一の化合物がまた、コントロール集団においてもスクリーニングされ、そして分子標的と相互作用するその能力がまた、試験細胞集団で使用されたアッセイを使用して決定される。化合物が、これらの2つの細胞集団において同様な応答を惹起する場合、その化合物は、分子標的との相互作用を介してその効果を発揮しないようである。逆に、化合物が、これらの2つの細胞集団において異なる応答を惹起する場合、その化合物は、分子標的と相互作用（例えば、直接的にまたは間接的に）するようである。一般的に、分子標的が、試験細胞で過剰発現される場合、応答の程度は、コントロール細胞にお

40

50

いてよりも試験細胞において大きい。従って、標的と相互作用することが予期される化合物が、コントロール細胞よりも試験細胞に対してより大きな効果を発揮する場合、この化合物は、意図された標的を介してその効果を発揮しているようである。しかし、特定の場合において、例えば、分子標的が、応答に関連する細胞成分を抑制する場合、応答の程度は、分子標的を過剰発現している試験細胞においてより小さくあり得る。

【 0 1 0 3 】

特定の実施形態において、試験細胞およびコントロール細胞は、この試験細胞が、コントロール細胞において発現される薬物スクリーニングのための分子標的を発現しないかまたは減少したレベルで発現するという点で異なる。標的と相互作用することが予期される化合物が、コントロール細胞および試験細胞に同様の効果を発揮する場合、この化合物は、意図された分子標的の相互作用を介してその効果を発揮しない。コントロール細胞で発現されるよりも低いレベルで分子標的を発現する試験細胞について、分子標的と相互作用する化合物は、一般的に、コントロール細胞においてよりも試験細胞においてより小さな効果を有する。

10

【 0 1 0 4 】

他の実施形態において、試験細胞およびコントロール細胞は、コントロール細胞が、構造的に分子標的と類似でありかつ分子標的を介する誘導により生じる細胞応答と同様の細胞応答を誘導し得るタンパク質を発現しないかまたは減少したレベルで発現するという点で異なる。標的と相互作用することが予期される化合物が、コントロール細胞および試験細胞に異なる効果を発揮する場合、その化合物は、意図された分子標的の相互作用を介してその効果を発揮しない。

20

【 0 1 0 5 】

試験細胞は、好ましくは、ジンクフィンガータンパク質または本明細書中で記載される融合分子で細胞遺伝子を調節することにより生成される。いくつかの方法において、試験細胞は、内因性分子標的の発現を抑制するように設計された外因性ジンクフィンガータンパク質（または融合分子）を発現するように細胞を操作することによって生成される。代替的な方法において、試験細胞は、内因性分子標的の発現を活性化または増加するように設計された外因性ジンクフィンガータンパク質（または融合分子）を発現するように細胞を操作することによって生成される。生じる試験細胞は、好ましくは、外因性ジンクフィンガー含有タンパク質をコードする外因性核酸（そして、おそらく、環境因子に起因するランダム変異の低い発生率）を除いて、対応するコントロール細胞と実質的に同一である。従って、特定の実施形態において、試験細胞集団およびコントロール細胞集団の表現型は、外因性ジンクフィンガー含有分子による調節（および、このタンパク質の調節に起因する他の二次的変化）に供されるタンパク質のレベルに関してのみ異なる。他の実施形態において、試験細胞およびコントロール細胞は、実質的に同一でなくともよいが、これらの場合において、遺伝的相違（任意の外因性 Z F P コードポリヌクレオチドに加えて）が、代表的に既知である。

30

【 0 1 0 6 】

本願方法において使用されるコントロール細胞および試験細胞は、個々の細胞または細胞集団であり得、後者がより一般的である。細胞型は、細胞株または天然の（例えば、単離された）細胞（例えば、一次細胞）であり得る。細胞株は、例えば、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能であるか、または例えば、Freshneyら、Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (第3版、1994)、およびこの中に列挙された参考文献に記載されるように当該分野で公知の方法によって、生成され得る。類似の細胞は、当該分野で公知の方法によって単離され得る。細胞型の他の非限定的な例として、病理を有するか、または病理に供された細胞（例えば、癌性細胞および形質転換細胞）、病原体で感染させた細胞、幹細胞、完全分化細胞、部分的分化細胞、不死化細胞などが挙げられる。原核生物（例えば、細菌）および真核生物（例えば、酵母、植物、真菌、魚類および哺乳動物細胞（例えば、ネコ、イヌ、マウス、ウシ、ブタお

40

50

よびヒト)の両方の細胞が使用され得、真核細胞が好ましい。哺乳動物(ヒトおよび非ヒト)細胞型が、特に好ましい。古細菌細胞もまた使用され得る。細胞型の選択は、試験される薬物の意図されたレシピエントに一部依存する。例えば、ヒト細胞型は、ヒトでの使用を意図された薬物をスクリーニングするために有利であり、そしてネコ細胞型は、ネコでの使用を意図された薬物をスクリーニングするために有利である。

【0107】

適切な哺乳動物細胞株として、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞、HEP-G2細胞、BaF-3細胞、シュナイダー(Schneider)細胞、COS細胞(SV40 T抗原を発現するサル腎臓細胞)、CV-1細胞、HuTu80細胞、NTERA2細胞、NB4細胞、HL-60細胞およびHeLa細胞、293細胞(例えば、Grahamら(1977)J. Gen. Virol. 36:59を参照のこと)、ならびにSIP2またはNS0のような骨髄腫細胞(例えば、GalfréおよびMilstein(1981)Meth. Enzymol. 73(B):3~46を参照のこと)が挙げられる。他の真核生物細胞として、例えば、昆虫(例えば、sp. frugiperda)、真菌細胞(酵母(例えば、S. cerevisiae、S. pombe、P. pastoris、K. lactis、H. polymorpha)を含む)、および植物細胞(Fleer, R. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:486~496を参照のこと)が挙げられる。細菌細胞型として、E. coli、B. subtilis、およびS. typhimuriumが挙げられる。

10

【0108】

細胞は、ZFPまたは融合分子(またはZFPまたは融合分子をコードするポリヌクレオチド)で一過的にかまたは安定にトランスフェクトまたは形質転換され得る。細胞をトランスフェクトする方法は、当該分野で公知であり、そして例えば、Ausubelら(前出)に記載される。実施例11は、293細胞を、エリスロポエチン(EPO)発現を活性化するZFPをコードする核酸分子で安定にトランスフェクトし得る方法を示す。

20

【0109】

さらに、上記のように、ジンクフィンガータンパク質は、実質的に任意の細胞遺伝子の発現を抑制または活性化するように設計され得る。従って、ZFPおよびZFP融合体は、意図された分子標的に構造的に関連するタンパク質の発現を抑制するか、または細胞に基づくHTSアッセイに適切な細胞を生成するために分子標的を過剰発現するように設計され得る。

30

【0110】

薬物発見のための細胞に基づくアッセイについて、ジンクフィンガー含有細胞を適用する際に、多くの方法を使用し得る。試験細胞集団およびコントロール細胞集団を、例えば、2つの異なる容器に入れ得る。候補化合物の溶液を連続して両容器に添加し得、そして各細胞集団について細胞の特性を定量および/または観察し得る。それぞれの細胞集団についての細胞特性の値の間に有意差(すなわち、実験誤差の範囲外)が存在する場合、この候補化合物をこのアッセイにおける「ヒット」とであると決定する。

【0111】

別の方法は、最初にコントロール細胞集団と候補化合物を接触する工程、および特定の細胞応答を測定する工程を包含する。この応答の値は、アッセイについてのベースライン尺度として役立つ。次いで、試験細胞集団を候補化合物と接触させ、そして同一の細胞応答を測定する。2つの応答について統計学的に異なる値は、この化合物が「ヒット」であること;これが、実質的に分子標的と相互作用することを示す。この方法は、順序が逆であっても行われ得、その場合、最初に試験細胞集団をアッセイする。

40

【0112】

他の方法において、ジンクフィンガータンパク質を使用して、試験細胞における分子標的の発現を増強する。このような試験細胞は、必要に応じて、コントロール細胞(ここで、この標的は、正常なレベルで発現される)か、または他の試験細胞(ここで、この標的は正常以下のレベルで発現される)と組み合わせて使用され得る。あるいは、分子標的の発

50

現、増強されている試験細胞を、コントロール細胞との比較なしで使用し得る。例えば、化合物の存在下および非存在下で、細胞応答を測定する分析を行い得る。

【0113】

いくつかの方法において、試験細胞およびコントロール細胞における細胞応答の分析は、並行して行われる。他の方法において、試験細胞における細胞応答の分析は、ヒストリカル(historical)コントロールと比較される。いくつかの方法において、化合物の存在下での試験細胞またはコントロール細胞のいずれかにおける細胞応答が、化合物の非存在下での同様の細胞応答と比較される。

【0114】

細胞の実質的に任意の成分が、薬物スクリーニングのための分子標的として役立ち得る。代表的には、分子標的はポリペプチドである。目的の分子標的の非限定的な例として、増殖因子レセプター(例えば、FGFR、PDGFR、EGF、NGFR、およびVEGF)が挙げられる。他の標的は、Gタンパク質レセプターであり、K物質レセプター、アンギオテンシンレセプター、およびアドレナリン作用性レセプター、セロトニンレセプター、およびPAFレセプターが挙げられる。例えば、Gilman、Ann. Biochem. 56:625~649(1987)を参照のこと。他の標的として、イオンチャンネル(例えば、カルシウムチャンネル、ナトリウムチャンネル、カリウムチャンネル)、ムスカリン性レセプター、アセチルコリンレセプター、GABAレセプター、グルタミン酸レセプター、およびドーパミンレセプター(Harpoold、5,401,629号、および米国特許第5,436,128号を参照のこと)が挙げられる。他の標的は、接着タンパク質(例えば、インテグリン、セレクチン、および免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバー)である(Springer、Nature 346:425~433(1990); Osborn、Cell 62:3(1990); Hynes、Cell 69:11(1992)を参照のこと)。他の標的は、サイトカイン(例えば、インターロイキンIL-1~IL13)、腫瘍壊死因子 および 、インターフェロン 、 および 、トランスフォーミング増殖因子 (TGF-)、コロニー刺激因子(CSF)および顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)である。Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Agrawalら編)、Blackwell Scientific、Boston、MA 1991を参照のこと。他の標的は、ホルモン、酵素、ならびに細胞内メッセンジャーおよび細胞間メッセンジャー(例えば、アデニルシクラーゼ、グアニルシクラーゼ)、ならびにホスホリパーゼC、核内レセプター(例えば、FXR(ファルネソールXレセプター(Farnesoid X Receptor))、ならびにRZR(レチノイドZレセプター(Retinoid Z Receptor))、PPAR(ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター(Peroxisome Proliferator Activator Receptor))、ならびにオルガネラレセプターである。標的分子は、ヒト、哺乳動物、ウイルス、植物、真菌、または細菌であり得る。他の標的は、抗原(例えば、微生物病原体(ウイルスおよび細菌の両方)由来ならびに腫瘍体由来のタンパク質、糖タンパク質、および炭水化物、)である。なお他の標的が、米国特許第4,366,241号に記載される。標的との相互作用についてスクリーニングされるいくつかの化合物は、ほとんど標的と結合しない。他の化合物は、標的をアゴナイズするかまたはアンタゴナイズする。

【0115】

いくつかの方法において、化合物は、個々にスクリーニングされる。他の方法において、多くの化合物は、並行してスクリーニングされる。マイクロタイタープレートおよびロボット利用は、多くの化合物の並行的なスクリーニングに特に有用である。光学的検出がまた、迅速性および自動化について好ましい。数百、数千または数百万もの化合物が、1週間でスクリーニングされ得る。

【0116】

本発明の方法を使用して、一旦「ヒット」が同定されると、その化合物の誘導体が、作製

10

20

30

40

50

され、その分子標的と相互作用する能力を最大化され得る。誘導体は、従来技術（例えば、自己一致領域（SCF）分析（self-consistent field（SCF）analysis）、立体配置相互作用（CI）分析、および正規モード動力学分析）を使用して作製され得る。これらの技術を実行するためのコンピュータプログラムが、容易に入手可能である。例えば、Reinら、Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions（Alan Liss, New York, 1989）を参照のこと。化合物誘導体を、細胞に基づくアッセイにおけるスクリーニングに供し、分子標的と最良の相互作用プロフィールを示す化合物を選択する。

【0117】

他の実施形態において、細胞が操作され、その結果、レセプター系が、分子標的を介してシグナル伝達に作動可能に関連付けられる。レセプター発現が、転写産物または翻訳産物の形成を検出することによって直接的に検出され得る。例えば、転写産物は、RNA（ノーザン）プロットを使用して検出され得、特定のタンパク質の形成は、特徴的な株を用いるか、またはタンパク質固有の特徴を検出することによって検出され得る。しかし、より代表的には、レセプターの発現は、レセプター活性の結果として形成される産物を検出することによって決定される。

【0118】

従って、細胞に基づくスクリーニングアッセイが実施され得る。ここでは、ZFPが、陰性シグナル（例えば、シグナル伝達カスケードにおける事象の遮断の結果としてのZFP制御抑制からのリポーターまたは選択可能なマーカーの放出）に対する陽性応答（例えば、リポーターおよび/または選択可能なマーカーの活性化）を媒介する。例えば、化合物の既知のシグナル伝達カスケードへの影響について化合物をスクリーニングするために、この化合物は、特定のシグナル伝達カスケードに関連する標的を発現することが既知の細胞に投与される。特定の実施形態において、標的は、細胞表面または膜に結合したレセプターであり、その結果、この化合物は、細胞膜または細胞壁を横切る必要はない。他の実施形態において、この標的は、シグナル伝達カスケードの細胞内成分であり、従って、この化合物はまた、当該分野で公知であり、そして本明細書中で記載された方法を用いて細胞に直接投与され得る。

【0119】

代表的には、これらの陽性応答アッセイにおいて、試験細胞は（1）外因性ジンクフィンガータンパク質および機能的ドメイン（例えば、抑制ドメイン）を含む融合分子をコードするポリヌクレオチドならびに（2）リポーターおよび/または選択可能な分子（例えば、緑色蛍光タンパク質、薬物耐性など）をコードするポリヌクレオチドを含む。融合分子をコードするポリヌクレオチドは、目的のシグナル伝達カスケードに応答性の転写制御エレメントに作動可能に連結される。機能的ドメインが、抑制ドメインである実施形態において、融合分子は、発現される場合に、リポーター分子の発現を抑制するように設計される。従って、シグナル伝達カスケードが機能している場合、融合分子が発現され、次いでこれは、リポーター分子の発現を抑制するのに役立つ。試験化合物が、例えば、融合分子の転写を調節する制御エレメントに直接的または間接的に作用するシグナル伝達経路の成分をブロックすることによって、抑制性融合分子の発現を阻害する場合、リポーター分子発現の抑制が減少し、そして増加したレベルのリポーター発現が観察される。従って、任意の化合物は、リポーターレベルをモニタリングするか、またはZFPによってリポーター（例えば、選択可能マーカー）分子の調節をモニターするための陽性および/または陰性選択を使用することによって、シグナル伝達カスケードを阻害する能力についてスクリーニングされ得る。

【0120】

本明細書中に記載された任意の方法が、任意のリポーターおよび/または選択可能マーカーと共に使用され得る。直接検出され得るリポーターとして、蛍光分子（例えば、GFP（緑色蛍光タンパク質））が挙げられる。蛍光は、市販の種々の蛍光検出システム（例えば

10

20

30

40

50

、蛍光活性化細胞ソーター（FACS）システムを含む）を使用して検出される。他のリポーターは、検出可能な産物の形成を触媒する酵素である。適切な酵素として、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、リパーゼ、ホスファターゼ、糖加水分解酵素、およびエステラーゼが挙げられる。酵素をコードする適切なリポーター遺伝子の例として、例えば、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ；AltonおよびVapnek（1979）Nature 282：864～869）、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼ（例えば、Tohra（1980）Dur. J. Biochem. 182：231～238；およびHallら（1983）J. Mol. Appl. Gen. 2：101）が挙げられる。

10

【0121】

選択可能マーカーはまたサブセットまたはリポーター分子を形成し、そしてまた上記の直接検出可能なリポーターの代わりに、またはそれに加えて使用され得る。陽性選択マーカーは、この遺伝子を保有し、そして発現する細胞のみが特定の条件下で生存および/または増殖するのを可能にする産物をコードするポリヌクレオチドである。例えば、ネオマイシン耐性（Neo^r）遺伝子を発現する細胞は、化合物G418に耐性であるが、Neo^rを発現しない細胞は、G418によって死滅（skilled）させられる。陽性選択マーカーの他の例として、ハイグロマイシン耐性、Zeocin（登録商標）耐性などが挙げられ、これらは、当業者に公知である。陰性選択マーカーは、この遺伝子を保有し、そして発現する細胞のみが、特定の条件下で死滅させられるのを可能にする産物をコードするポリヌクレオチドである。例えば、チミジンキナーゼ（例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、HSV-TK）を発現する細胞は、ガンシクロビルが添加される場合に死滅する。他の陰性選択マーカーが、当業者に公知である。選択マーカーは導入遺伝子である必要はなく、そしてさらにリポーターと選択可能マーカーは、種々の組み合わせで使用され得る。

20

【0122】

（D．生化学的アッセイ）

生化学的薬物スクリーニングアッセイを行う方法もまた本明細書中で記載される。特定のレセプターに影響する薬物を試験するための重要な生化学的アッセイは、目的のレセプターを含む細胞膜の単離および候補化合物の結合についての試験を含む。従って、細胞膜に結合する特定のタンパク質（例えば、レセプター）を過剰発現する細胞は、これらのタンパク質の発現を活性化するジंकフィンガータンパク質を使用して容易に生成され得る。引き続き、目的のタンパク質を過剰発現する細胞の膜は、アッセイ（例えば、結合アッセイ）における使用のために容易に単離され得る。

30

【0123】

（E．化合物および細胞特性）

本明細書中で記載された方法は、広範で多様な化合物のスクリーニングにおいて有用である。例えば、本方法でスクリーニングされる化合物は、ペプチドまたは低分子、ホルモン、増殖因子、およびサイトカインのコンビナトリアルライブラリー由来であり得るか、天然に生じる分子であり得るか、または製薬産業で合成される化合物の既存のレパートリー由来であり得る。コンビナトリアルライブラリーは、ステップバイステップ様式で合成され得る多くの型の化合物について作製され得る。このような化合物として、例えば、ポリペプチド、ターン模倣物、多糖類、核酸、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、複素環式化合物、ベンゾジアゼピン、オリゴマーN置換グリシンおよびオリゴカルバメートが挙げられる。これらの化合物の大きなコンビナトリアルライブラリーは、Affymax、WO95/12608、Affymax、WO93/06121、Columbia University、WO94/08051、Pharmacopeia、WO95/35503、およびScripps、WO95/30642に記載されるコードされた合成ライブラリー（ESL）法によって構築され得る。ペプチドライブラリーもまた、ファージディスプレイ法によって作製され得る。例えば、D

40

50

evlin、WO91/18980を参照のこと。スクリーニングされる化合物はまた、National Cancer Institute's Natural Product Repository、Bethesda, MDから入手し得る。既知の効果を有する既存の化合物または薬物をまたスクリーニングして、副作用および/またはさらなる指標を評価し得る。

【0124】

さらに、種々の細胞および/または生化学的応答（細胞特性とも呼ばれる）が、測定され得、そして本明細書中で記載される方法において比較され得る。いくつかの方法において、細胞特性の値は、細胞増殖、新生血管形成、ホルモン放出、pH変化、細胞内セカンドメッセンジャー（例えば、GMP）の変化、レセプターとの結合などの関数として測定される。

10

【0125】

別の実施形態において、化合物の投与に対する細胞の応答が、細胞特性の値として正常に定量される。値の単位は、特性に依存する。例えば、この単位は、吸光度、光子計数、放射活性粒子計数または光学密度であり得る。

【0126】

（分子の送達）

分子標的が細胞内に存在する場合、分子と相互作用する化合物は、細胞膜を横断しなければならない。細胞と接触する化合物は、多くの手段で細胞膜を通過し得る。化合物が適切なサイズおよび適切な電荷特性を有する場合、化合物は、受動的に膜を横切って輸送され得る。膜通過の他のプロセスとして、能動輸送（例えば、レセプター媒介輸送）、エンドサイトーシスおよびピノサイトーシスが挙げられる。化合物が前述の任意の方法によって効率的に輸送され得ない場合、微量注入、微粒子銃、または他の方法を使用して細胞内部に化合物を送達し得る。あるいは、スクリーニングされる化合物がタンパク質である場合、タンパク質をコードする核酸が細胞内に導入され、そして細胞内で発現され得る。

20

【0127】

同様に、細胞内の調節をもたらす外因性ジンクフィンガータンパク質は、細胞内に導入されなければならない。代表的には、このことは、ZFP分子またはZFPをコードする核酸のいずれかを、細胞内においてジンクフィンガータンパク質の発現をもたらす細胞に導入することによって達成される。核酸は、ウイルスに基づく方法、化学的方法、リポフェクションおよび微量注入を含む従来手段によって導入され得る。導入された核酸は、宿主染色体に組み込まれ得るか、エピソーム形態で存続し得るか、または細胞質中で一過的に存在し得る。同様に、外因性タンパク質は、タンパク質の形態で細胞に導入され得る。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、リポフェクション、微粒子銃、もしくは微量注入によってか、または膜トランスロケーションドメインへの融合を介して導入され得る。

30

【0128】

従って、本明細書中で記載される組成物は、インビトロまたはインビボで標的細胞に提供され得る。さらに、この組成物は、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの組み合わせとして提供され得る。

【0129】

（A. ポリヌクレオチドの送達）

特定の実施形態において、この組成物は、1つ以上のポリヌクレオチドとして提供される。さらに、上記のように、ジンクフィンガータンパク質含有組成物は、ポリペプチドのジンクフィンガーと機能的ドメイン（これは、融合核酸によってコードされる）との間の融合体として設計され得る。融合体および非融合体の両方の場合において、この核酸は、複製および/または発現のための原核生物細胞または真核生物細胞への形質転換のための中間ベクターにクローニングされ得る。核酸の貯蔵もしくは操作またはタンパク質の産生のための中間ベクターは、例えば、原核生物ベクター（例えば、プラスミド）、シャトルベクター、昆虫ベクター、またはウイルスベクターであり得る。ジンクフィンガータンパク質をコードする核酸はまた、細菌細胞、真菌細胞、原生動物細胞、植物細胞、または魚細

40

50

胞または哺乳動物細胞（好ましくは、ヒト細胞）のような動物細胞への投与のための、発現ベクターにクローニングされ得る。

【0130】

クローニングされた核酸の発現を得るために、代表的に、核酸は、転写を指向するプロモーターを含む発現ベクターにサブクローニングされる。適切な細菌および真核生物プロモーターは、当該分野で周知であり、例えば、Sambrookら、前出；Ausubelら、前出；およびKriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990)において記載されている。細菌発現系は、例えば、E. coli、Bacillus種、およびSalmonellaにおいて利用可能である(Palvaら(1983) Gene 22:229-235)。このような発現系のためのキットは、市販されている。哺乳動物細胞、酵母細胞、および昆虫細胞のための真核生物発現系は、当該分野で周知であり、そしてまた、例えば、Invitrogen, Carlsbad, CAおよびClontech, Palo Alto, CAから市販されている。

10

【0131】

選択した核酸の発現を指向するために使用されるプロモーターは、特定の適用に依存する。例えば、強力な構成性プロモーターは、代表的に、発現および精製のために使用される。対照的に、タンパク質が、インビボで使用される場合、構成性または誘導性プロモーターのいずれかが使用され、これは、タンパク質の特定の用途に依存する。さらに、HSV TKまたは同様の活性を有するプロモーターのような弱いプロモーターが使用され得る。代表的に、これらのプロモーターはまた、トランス活性化に応答性であるエレメント（例えば、低酸素応答性エレメント、Gal4応答性エレメント、lacリプレッサー応答性エレメント、ならびにtet調節系およびRU-486系のような低分子制御系）を含み得る（例えば、Gossenら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551；Oliginoら(1998) Gene Ther. 5:491-496；Wangら(1997) Gene Ther. 4:432-441；Neeringら(1996) Blood 88:1147-1155；およびRendahlら(1998) Nat. Biotechnol. 16:757-761を参照のこと）。

20

【0132】

プロモーターに加えて、発現ベクターは、代表的に、宿主細胞（原核生物または真核生物のいずれか）における核酸の発現のために必要なさらなるエレメントを含む転写単位、または発現カセットを含む。従って、代表的な発現カセットは、例えば、核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター、および、例えば、転写産物の効率的なポリアデニル化、転写終結、リボソーム結合、および/または翻訳終結に必要なシグナルを含む。このカセットのさらなるエレメントは、例えば、エンハンサー、および異種のスプライスされるイントロンシグナルを含み得る。

30

【0133】

遺伝情報を細胞に輸送するために使用される特定の発現ベクターは、得られたZFPポリペプチドの意図される用途（例えば、植物、動物、細菌、真菌、原生動物類などにおける発現）に関して選択される。標準的な細菌発現ベクターとしては、pBR322、pBR322ベースのプラスミド、pSKF、pET23Dのようなプラスミド、ならびにGSTおよびlacZのような市販の融合発現系が挙げられる。エピトープタグはまた、組換えタンパク質に付加され、発現のモニタリングならびに細胞および細胞以下の局在化のモニタリングのための、単離の慣例的な方法（例えば、c-mycまたはFLAG）を提供する。

40

【0134】

真核生物ウイルス由来の調節エレメントは、しばしば真核生物発現ベクター（例えば、SV40ベクター、乳頭腫ウイルスベクター、およびエプスタイン-バーウイルス由来のベクター）において使用される。他の例示的な真核生物ベクターとしては、pMSG、pA

50

V009/A+、pMTO10/A+、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、およびSV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腺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、または真核生物細胞における発現に効果的であると示される他のプロモーターの指向下で、タンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターが挙げられる。

【0135】

いくつかの発現系は、チミジンキナーゼ、ハイグロマイシンBホスホ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、安定してトランスフェクトされた細胞株の選択のためのマーカーを有する。昆虫細胞におけるバキュロウイルスベクターのような高収率発現系はまた、ポリヘドリンプロモーターまたは任意の他の強力なバキュロウイルスプロモーターの転写制御下で、本明細書中に記載されるように、ZFPをコードする核酸配列に適している。

10

【0136】

代表的に発現ベクターに含まれるエレメントはまた、E. coli (または、原核生物宿主、E. coli 以外の場合) において機能するレプリコン、組換えプラスミドを保有する細菌の選択を可能にする選択マーカー (例えば、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ベクターの非必須な領域における特殊な制限部位を含む。

【0137】

標準的なトランスフェクション方法を使用して、所望であれば標準的な技術を使用して精製され得る大量のジンクフィンガータンパク質を発現する、細菌細胞株、哺乳動物細胞株、酵母細胞株、昆虫細胞株、または他の細胞株を作製し得る (例えば、Colleyら (1989) J. Biol. Chem. 264: 17619 - 17622; および Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, 第182巻 (Deutscher編) 1990年を参照のこと)。真核生物細胞および原核生物細胞の形質転換は、標準的な技術に従って行なわれる (例えば、Morrisson (1977) J. Bacteriol. 132: 349 - 351; Clark-Curtissら (1983) Methods in Enzymology 101: 347 - 362 (Wuら編) を参照のこと)。

20

30

【0138】

外来のヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するための任意の手順が使用され得る。これらとしては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、脂質媒介性送達 (例えば、リポソーム)、微小注入、微粒子銃、裸のDNAの導入、プラスミドベクター、ウイルスベクター (エピソームおよび組込みの両方) およびクローニングされたゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたは他の外来の遺伝物質を宿主細胞に導入するための周知の他の方法のいずれかの使用が挙げられるが、これらに限定されない (例えば、Sambrookら、前出を参照のこと)。使用される特定の遺伝子操作手順は、選択したタンパク質を発現し得る宿主細胞に少なくとも1つの遺伝子を首尾良く導入し得ることのみが必要である。

40

【0139】

慣習的なウイルスおよび非ウイルスベースの核酸送達方法を使用して、核酸を宿主細胞または標識組織に導入し得る。このような方法を使用して、核酸をインビトロで細胞に投与し得る。さらに、核酸は、インビボまたはエキソビボで投与される。非ウイルス送達系としては、DNAプラスミド、裸の核酸、およびリポソームのような送達ビヒクルと複合体化した核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、細胞への送達後、エピソームまたは組込みゲノムのいずれかを有するDNAおよびRNAウイルスが挙げられる。核酸送達手順の総説としては、例えば、Anderson (1992) Science 256: 808 - 813; Nabelら (1993) Trends Biotechnol

50

. 11:211 - 217; Mitaniら (1993) Trends Biotechnol. 11:162 - 166; Dillon (1993) Trends Biotechnol. 11:167 - 175; Miller (1992) Nature 357:455 - 460; Van Brunt (1988) Biotechnology 6(10):1149 - 1154; Vigne (1995) Restorative Neurology and Neuroscience 8:35 - 36; Kremerら (1995) British Medical Bulletin 51(1):31 - 44; Haddadら、Current Topics in Microbiology and Immunology, DoerflerおよびBohm(編)、1995年;ならびにYuら (1994) Gene Therapy 1:13 - 26を参照のこと。

10

【0140】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、リポフェクション、微小注入、バリスティックス (ballistics)、ピロゾーム、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、裸のDNA、人工ビリオン、および薬剤増強性のDNAの取り込みが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号;同第4,946,787号;および同第4,897,355号に記載されており、そして、リポフェクション試薬が市販されている(例えば、TransfectamTMおよびLipofectinTM)。ポリヌクレオチドの効率的なレセプター認識リポフェクションに適切な陽イオン性および中性脂質としては、Felgner, WO91/17424およびWO91/16024の脂質が挙げられる。核酸は、細胞(インビトロもしくはエキソビボ投与)または標的組織(インビボ投与)に送達され得る。

20

【0141】

脂質：核酸複合体(免疫脂質複合体のような標的化されたリポソームを含む)の調製は、当業者に周知である。例えば、Cryatal (1995) Science 270:404 - 410; Blaeseら (1995) Cancer Gene Ther. 2:291 - 297; Behrら (1994) Bioconjugate Chem. 5:382 - 389; Remyら (1994) Bioconjugate Chem. 5:647 - 654; Gaoら (1995) Gene Therapy 2:710 - 722; Ahmadら (1992) Cancer Res. 52:4817 - 4820;ならびに米国特許第4,186,183号;同第4,217,344号;同第4,235,871号;同第4,261,975号;同第4,485,054号;同第4,501,728号;同第4,774,085号;同第4,837,028号;および同第4,946,787号を参照のこと。

30

【0142】

核酸の送達のためのRNAウイルスまたはDNAウイルスベースの系の使用は、身体中の特定の細胞にウイルスを標的化するため、そしてウイルス荷重(payload)を核に輸送するための高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、直接被験体に投与され得るか(インビトロ)またはそれらを使用して、インビトロもしくはエキソビボで細胞を処置し得る。ZFPの送達のための慣例的なウイルスベースの系としては、レトロウイルス、レンチウイルス、ボックスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、水疱性口内炎ウイルスおよびヘルペスウイルスベクターの系が挙げられる。宿主ゲノムにおける組込みは、特定のウイルスベクター(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移入方法を含む)で可能であり、しばしば、挿入された導入遺伝子の長期発現を生じる。さらに、高い形質転換効率が、多数の異なった細胞型および標的組織において観察される。

40

【0143】

レトロウイルスの向性は、外来のエンベロープタンパク質を取り込むことによって変更され得、潜在的な標的細胞集団の変更および/または増殖を可能にする。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得るレトロウイルスベクターであり、そして、代表的に高いウイルス力価を生成する。従って、レトロウイルス核酸送達系の選択は

50

、標的細胞および/または組織に依存する。レトロウイルスベクターは、6 ~ 10 kbまでの外来配列のパッケージング能力を有し、そして、シス作用性の長い末端配列(LTR)から構成される。最小のシス作用性LTRは、ベクターの複製およびパッケージングに十分であり、次いで、これらを使用して、外因性遺伝子を標的細胞に組み込み、永続的な導入遺伝子発現を提供する。広範に使用されるレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、シミアン免疫不全ウイルス(SiV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびそれらの組み合わせに基づいたベクターが挙げられる(Buchscherら(1992) J. Virol. 66: 2731-2739; Johannら(1992) J. Virol. 66: 1635-1640; Sommerfeltら(1990) Virol. 176: 58-59; Wilsonら(1989) J. Virol. 63: 2374-2378; Millerら(1991) J. Virol. 65: 2220-2224; およびPCT/US94/05700)。pLASNおよびMFG-Sは、臨床試験において使用されるレトロウイルスベクターの例である(Dunbarら(1995) Blood 85: 3048-305; Kohnら(1995) Nature Med. 1: 1017-102; Malechら(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12133-12138)。PA317/pLASNは、遺伝子治療試験において使用された最初の治療ベクターであった(Blaeseら(1995) Science 270: 475-480)。50%以上の形質転換効率が、MFG-Sパッケージ化ベクターについて観察された(Ellemら(1997) Immunol Immunother. 44(1): 10-20; Dranoffら(1997) Hum. Gene Ther. 1: 111-2)。

10

20

【0144】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターをまた使用して、例えば、核酸およびペプチドのインビトロ産生において、そして、インビボおよびエキソビボ適用のために、標的核酸で細胞を形質導入する。例えば、Westら(1987) Virology 160: 38-47; 米国特許第4,797,368号; WO93/24641; Kotin(1994) Hum. Gene Ther. 5: 793-801; およびMuzyczka(1994) J. Clin. Invest. 94: 1351を参照のこと。組換えAAVベクターの構築は、多数の刊行物において記載され、米国特許第5,173,414号; Traatschinら(1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260; Traatschinら(1984) Mol. Cell. Biol. 4: 2072-2081; Hermonatら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6466-6470; およびSamulskiら(1989) J. Virol. 63: 3822-3828が挙げられる。

30

【0145】

欠損性および非病原性パルボウイルス属2型アデノ随伴ウイルス(AAV-2)に基づいた組換えアデノ随伴ウイルスベクターは、有望な核酸送達系である。例示的なAAVベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するAAVの145bpの逆位末端反復を含むプラスミドに由来する。核酸の効率的な移入および形質導入された細胞のゲノムへの組み込み起因する安定した導入遺伝子送達は、このベクター系についての重要な特徴である(Wagnerら(1998) Lancet 351(9117): 1702-3; およびKearnら(1996) Gene Ther. 9: 748-755)。

40

【0146】

一過的な発現が好ましい適用において、アデノウイルスベースの系が有用である。アデノウイルスベースのベクターは、多数の細胞型において非常に高い効率で形質導入し得、そして、感染し得、従って、分裂細胞および非分裂細胞の両方に核酸を送達する。このようなベクターを用いて、高い力価および高い発現レベルが得られた。アデノウイルスベクターは、比較的単純な系で大量に生成され得る。

【0147】

50

複製欠損組換えアデノウイルス (Ad) ベクターは、高い力価で生成され得、そして、それらは、容易に多数の異なる細胞型に感染する。大部分のアデノウイルスベクターは、導入遺伝子が、Ad E1a、E1b、および/またはE3 遺伝子を置換するように操作され；複製欠損ベクターは、トランスで必要なE1 機能を提供するヒト293細胞において増殖する。Adベクターは、インビボで多数の型の組織（肝臓、腎臓および筋肉において見出されるような非分裂の分化した細胞を含む）を形質導入し得る。慣例的なAdベクターは、挿入されたDNAについて大規模な保有能力を有する。臨床試験におけるAdベクターの用途の例としては、筋肉内注射を用いる抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド治療が挙げられる (Stermanら (1998) Hum. Gene Ther. 7: 1083 - 1089)。核酸送達のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる例としては、Roseneckerら (1996) Infection 24: 5 - 10; Stermanら、前出; Welshら (1995) Hum. Gene Ther. 2: 205 - 218; Alvarezら (1997) Hum. Gene Ther. 5: 597 - 613; および Topfら (1998) Gene Ther. 5: 507 - 513 が挙げられる。

10

【0148】

パッケージング細胞を使用して、宿主細胞を感染し得るウイルス粒子を形成する。このような細胞としては、293細胞（これは、アデノウイルスをパッケージ化する）、および2細胞またはPA317細胞（これは、レトロウイルスをパッケージ化する）が挙げられる。核酸送達において使用されるウイルスベクターは、通常、ウイルス粒子に核酸ベクターをパッケージ化する産生細胞株によって、産生される。これらのベクターは、代表的に、パッケージングおよび引き続く宿主細胞への組込みに必要な最小限のウイルス配列、発現されるタンパク質の発現カセットによって置換される他のウイルス配列を含む。ウイルス機能を失うことは、必要な場合、細胞株をパッケージングすることによって、トランスで提供される。例えば、核酸送達において使用されるAAVベクターは、代表的に、AAVゲノム由来のITR配列のみを保有し、これは、パッケージングおよび宿主ゲノムへの組込みに必要である。ウイルスDNAは、細胞株にパッケージ化され、この細胞株は、他のAAV遺伝子（すなわちrepおよびcap）をコードするがITR配列を欠くヘルパープラスミドを含む。この細胞株はまた、ヘルパーとして、アデノウイルスで感染される。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製および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配列の欠如に起因して、有意な量でパッケージ化されない。アデノウイルスの混入は、例えば、アデノウイルスを優先的に不活化する熱処理によって減少され得る。

20

30

【0149】

多数の核酸送達適用において、ベクターは、特定の組織型に対して高度の特異性を有して送達されることが望ましい。ウイルスベクターは、ウイルスの外表面上にウイルスコートタンパク質との融合タンパク質として、リガンドを発現することによって、所定の細胞について特異性を有するように改変され得る。このリガンドは、目的の細胞型に存在することが知られているレセプターに親和性を有するように選択される。例えば、Hanら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9747 - 9751 は、モロニー Maus 白血病ウイルスが、gp70に融合されたヒトヘレグリン (heregulin) を発現するように改変され得、そして、組換えウイルスは、ヒト上皮増殖因子レセプターを発現する特定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およびレセプターを発現する標的細胞の他の組み合わせに広げられ得る。例えば、繊維状ファージは、事実上任意の選択された細胞レセプターについて特異的結合親和性を有する抗体フラグメント（例えば、FabまたはFv）を提示するように操作され得る。上記の説明は、主にウイルスベクターに適用するが、同じ原理が非ウイルスベクターに適用され得る。このようなベクターは、特定の標的細胞による取り込みを助けると考えられている特定の取り込み配列を含むように操作され得る。

40

【0150】

50

ベクターは、以下に記載のように、被験体への投与によって、代表的には、全身投与（例えば、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または頭蓋内注射）または局所適用によって、インビボで送達され得る。あるいは、ベクターは、インビトロまたはエキソビボで細胞（例えば、被験体から外植された細胞（例えば、リンパ球、骨髄吸引液、組織生検））に送達され得る。

【0151】

1つの実施形態において、造血幹細胞は、細胞トランスフェクションおよび核酸送達のためのインビトロ手順において使用される。幹細胞を使用することに対する利点は、それらが、インビトロで他の細胞型に分化し得ることである。GM-CSF、IFN- γ および TNF- α のようなサイトカインを使用する、インビトロでCD34+幹細胞を臨床的に重要な免疫細胞型に分化させるための方法は、公知である（Inabaら（1992）J. Exp. Med. 176:1693-1702）。

10

【0152】

幹細胞は、公知の方法を使用して、形質転換および分化のために単離される。例えば、幹細胞は、不必要な細胞（例えば、CD4+およびCD8+（T細胞）、CD45+（pan B細胞）、GR-1（顆粒球）、ならびにIad（分化した抗原提示細胞））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って、骨髄細胞から単離される（Inabaら、前出、を参照のこと）。

【0153】

（B. ポリペプチドの送達）

20

他の実施形態において、ZFPまたはZFP融合タンパク質は、直接標的細胞に投与される。特定のインビトロ内容物において、標的細胞は、1つ以上のZFPに融合された機能的ドメインを含む1つ以上の融合タンパク質を含む培地中で培養される。

【0154】

ポリペプチド化合物の投与における重要な要因は、ポリペプチドが、細胞の原形質膜または核のような細胞内区画の膜を横断する能力を有することを保証することである。細胞膜は、小さい非イオン性の親油性化合物に対して自由に浸透可能であり、そして、極性化合物、マクロ分子、および治療薬剤または診断薬剤に対して固有に非浸透性である、脂質-タンパク質の2層から構成される。しかし、細胞膜を横切るポリペプチドを転位する能力を有する、タンパク質、脂質および他の化合物が記載される。

30

【0155】

例えば、「膜転位ポリペプチド」は、膜転移キャリアとして作用する能力を有する両親媒性または疎水性のアミノ酸のサブ配列を有する。1つの実施形態において、ホメオドメインタンパク質は、細胞膜を横切って転移する能力を有する。ホメオドメインタンパク質（Antennapedia）の最も短い内部移行可能なペプチドは、タンパク質の第3のヘリックス（アミノ酸43～58位に由来する）であることが見出された（Prochiantz（1996）Curr. Opin. Neurobiol. 6:629-634）。別のサブ配列（シグナルペプチドのh（疎水性）ドメイン）が、同様の細胞膜転移特徴を有することが見出された（Linら（1995）J. Biol. Chem. 270:14255-14258）。

40

【0156】

細胞へのその取り込みを促進するためのジンクフィンガーポリペプチド（またはこれを含む融合体）に連結され得るペプチド配列の例としては、以下を含むがこれらに限定されない：HIVのtat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（1996）Curr. Biol. 6:84）；Antennapediaの長さ60アミノ酸のホメオドメインの第3のヘリックス（Derossiら（1994）J. Biol. Chem. 269:10444）；シグナルペプチドのh領域（例えば、カポジ線維芽細胞増殖因子（K-FGF）h領域（Linら、前出））；およびHSV由来のVP22転移ドメイン（Elliotら（1997）Cell 88:223-233）。強化された細胞性取り込

50

みを提供する他の適切な化学部位はまた、ZFPに共有結合または非共有結合のいずれかで結合され得る。

【0157】

毒素分子はまた、細胞膜を横切ってポリペプチドを輸送する能力を有する。しばしば、このような分子（「バイナリー毒素」と呼ばれる）は、少なくとも2つの部分から構成される：転移または結合ドメインおよび別々の毒素ドメイン。代表的に、転移ドメイン（これは、必要に応じて、ポリペプチドであり得る）は、細胞レセプターに結合し、細胞への毒素の輸送を容易にする。いくつかの細菌毒素（*Clostridium perfringens* 微小毒素、ジフテリア毒素（DT）、*Pseudomonas* 外毒素A（PE）、百日咳毒素（PT）、*Bacillus anthracis* 毒素、および百日咳アデニルシクラーゼ（CYA）を含む）を使用して、内部融合体またはアミノ末端融合体として、細胞細胞質へペプチドを送達する（Aroraら（1993）*J. Biol. Chem.* 268:3334-3341；Perelleら（1993）*Infect. Immun.* 61:5147-5156；Stenmarkら（1991）*J. Cell Biol.* 113:1025-1032；Donnellyら（1993）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3530-3534；Carbonettiら（1995）*Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 95:295；Seboら（1995）*Infect. Immun.* 63:3851-3857；Klimpel（1992）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10277-10281；およびNovakら（1992）*J. Biol. Chem.* 267:17186-17193）。

10

20

【0158】

このようなサブ配列を使用して、細胞膜を横切って、ポリペプチド（本明細書中に記載されるようなポリペプチドを含む）を転移する。これは、例えば、これらの転移配列の1つで、融合ポリペプチドを誘導することによって、または、融合ポリペプチドと転移配列のさらなる融合を形成することによって、達成される。必要に応じて、リンカーを使用して、融合ポリペプチドおよび転移配列に連結し得る。任意の適切なリンカー（例えば、ペプチドリナー）が使用され得る。

【0159】

適切なポリペプチドがまた、リポソームおよび免疫リポソームのようなリポソーム誘導体を介して、動物細胞、好ましくは、哺乳動物細胞に導入され得る。用語「リポソーム」は、水相をカプセル化する、1つ以上の同心性の向きの脂質の2層から構成される小胞をいう。代表的に、この水相は、細胞に送達される分子を含む。

30

【0160】

リポソームは原形質膜と融合し、それにより、分子を細胞質中に放出する。あるいは、リポソームは貪食されるか、または、輸送小胞体中の細胞に取り込まれる。一旦エンドソームまたは食胞中に入ると、リポソームは、分解されるかまたは輸送小胞体の膜と融合し、そしてその含有物を放出する。

【0161】

現在のリポソームを介した薬物送達方法において、リポソームは最終的に透過性になり、そして標的組織または標的細胞でカプセル化された分子を放出する。全身的送達または組織特異的送達にとって、このことは、例えば、リポソームの二重層が、体内の種々の因子の作用を通じて経時的に分解されるような受動的な様式で達成され得る。あるいは、活性な薬物の放出は、リポソームビヒクルにおける透過性の変化を誘導する因子の使用を伴う。リポソーム膜は、リポソーム膜付近の環境が酸性になる場合、不安定になるように構築され得る。例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851（1987）；*Biochemistry* 28:908（1989）を参照のこと。例えば、リポソームが標的細胞によってエンドサイトーシスを受ける場合、これらは不安定になり、そして内容を放出する。この不安定化は、フソジェネシス（fusogenesis）と呼ばれる。ジオレイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）は、多くの

40

50

「フソジェニック」システムの基本である。

【0162】

本明細書中で開示される方法および組成物を用いる使用のために、リポソームは代表的に、本明細書中で開示されるような融合ポリペプチド、脂質構成成分（例えば、中性脂質および/またはカチオン性脂質）を含み、そして必要に応じて、限定の細胞表面レセプターまたはリガンド（例えば、抗原）に結合する抗体のような、レセプター認識分子を含む。例えば、以下の文献に記載されるような、リポソームを調製するための、種々の方法が利用可能である：米国特許第4,186,183号；同第4,217,344号；同第4,235,871号；同第4,261,975号；同第4,485,054号；同第4,501,728号；同第4,774,085号；同第4,837,028号；同第4,235,871号；同第4,261,975号；同第4,485,054号；同第4,501,728号；同第4,774,085号；同第4,837,028号；同第4,946,787号；PCT公開第WO91/17424号；Szokaら(1980)Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467；Deamerら(1976)Biochim. Biophys. Acta 443:629-634；Fralleyら(1979)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3348-3352；Hopeら(1985)Biochim. Biophys. Acta 812:55-65；Mayerら(1986)Biochim. Biophys. Acta 858:161-168；Williamsら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:242-246；Liposomes, Ostro編, 1983, Chapter 1)；Hopeら(1986)Chem. Phys. Lip. 40:89；Gregoriadis, Liposome Technology (1984)およびLasica, Liposomes: from Physics to Applications (1993)。例えば、適切な方法として、超音波破碎、押し出し、高圧/ホモジェナイゼーション、マイクロ流体化、界面活性剤透析、小リポソームベシクルのカルシウム誘導性融合およびエーテル融合方法が挙げられ、これらの全ては当該分野で周知である。

【0163】

特定の実施形態において、特定の細胞型、組織などに特異的な標的化部分を用いてリポソームを標的化することが、望ましくあり得る。種々の標的化部分（例えば、リガンド、レセプター、およびモノクローナル抗体）を用いたリポソームの標的化は、これまでに記載されている。例えば、米国特許第4,957,773号および同第4,603,044号を参照のこと。

【0164】

標的化部分の例として、新生物に関連する抗原（例えば、前立腺癌特異的抗原およびMAGE）に特異的なモノクローナル抗体が挙げられる。腫瘍細胞もまた、癌遺伝子（例えば、rasまたはc-erbB2）の活性化または過剰発現に起因する遺伝子産物を検出することによって標的化され得る。さらに、多くの腫瘍が、胎児組織によって通常は発現される抗原（例えば、フェトプロテイン（AFP）および癌胎児抗原（CEA））を発現する。ウイルス感染細胞は、種々のウイルス抗原（例えば、B型肝炎コア抗原およびB型肝炎表面抗原（HBVc、HBVs）、C型肝炎抗原、エプスタイン-バーウイルス抗原、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）ならびにパピローマウイルス抗原）を用いて標的化され得る。炎症細胞は、炎症部位で発現される表面分子（例えば、インテグリン（例えば、VCAM-1）、セレクチンレセプター（例えば、ELAM-1）など）によって特異的に認識される分子を用いて標的化され得る。

【0165】

リポソームに標的化因子をカップリングさせるための標準的な方法が、用いられる。これらの方法は一般に、リポソーム中への脂質成分（例えば、標的化因子の付着のために活性化され得るホスファチジルエタノールアミン）の組み込みか、または誘導体化された親油性化合物（例えば、脂質誘導体化プレオマイシン）の組み込みを含む。抗体を標的化したリポ

ソームは、例えば、プロテインAを組み込んだリボソームを用いて構築され得る。Renneisenら(1990) J. Biol. Chem. 265:16337-16342 および Leonettiら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2448-2451を参照のこと。

【0166】

(キット)

上記の方法のいずれかを実施するためのキットもまた、提供される。このキットは代表的に、上記の方法において使用するための細胞またはこのような細胞を作製するための構成成分を含む。例えば、いくつかのキットは、1つの細胞集団が、試験細胞内の分子標的(例えば、タンパク質)の発現を調節するために設計されたジンクフィンガータンパク質をコードする外来核酸を用いて形質転換されている点で相違する、試験細胞およびコントロール細胞の対を含む。いくつかのキットは、1つの細胞型、およびこの細胞型から試験細胞を生成することを可能にする他の構成成分を含む。このような構成成分は、ジンクフィンガータンパク質をコードするベクターかまたはジンクフィンガータンパク質自体を含み得る。このキットはまた、必要な容器、細胞の形質転換のための緩衝液、細胞のための培養培地、および/またはアッセイを実施するための緩衝液を含み得る。代表的に、このキットはまた、この細胞が、化合物をスクリーニングするために用いられるべきことを示す標識を含み得る。標識は、備え付けであるか、そうでなければこのキットの他の構成成分を伴う包装用印刷物または広告用印刷物のような、任意の物質を含む。

10

【0167】

(実施例)

以下の実施例は、例示するために提供されるのであって、いかなる手段においても限定することを意図しない。

20

【0168】

(実施例1)

この第1の実施例は、ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)遺伝子のプロモーター内に含まれたDNA配列を認識するよう設計されたZFPの構築を実証する。VEGFは、低酸素症により誘導される内皮細胞特異的マイトジェンであるおよそ46kDaの糖タンパク質である。VEGFは、癌、種々の網膜症、および他の重篤な疾患に関連する、脈管形成に関連するとみなされてきた。選択したDNA標的部位は、この遺伝子の転写開始部位の周囲の領域であった。選択した2つの9塩基対(bp)の部位は、配列

30

【0169】

【化1】

agcGGGGAGGATcGCGGAGGCTtgg

(配列番号1)(ここで、大文字は、実際の9塩基標的をあらわす)中に存在することが見出された。上流の9bp標的を標的化したタンパク質を、VEGF1と命名し、そして下流の9bp標的を標的化したタンパク質をVEGF3aと命名した。VEGFの主要な転写開始部位は、第1の9bp標的の3'末端におけるTであり、上記の配列において下線を引いてある。

40

【0170】

ヒトSP-1転写因子を、設計されたZFPの構築のための前駆体分子として使用した。SP-1は、十分に研究されているマウスZif268に関連する3フィンガーDNA結合ドメインを有する(Christyら、PNAS 85:7857-7861(1988))。このドメインを用いた部位特異的変異誘発実験は、Zif268において作動している提唱された「認識ルール」が、他の標的DNA配列にSP-1を適合するために用いられ得ることを示した(Desjarlais & Berg、PNAS 91:11099-11103(1994))。ジンクフィンガークローンの構築のために用いられ

50

た S P - 1 配列は、 S P - 1 転写因子のアミノ酸 5 3 3 ~ 6 2 4 に対応する。

【 0 1 7 1 】

2 つの設計された Z F P である V E G F 1 および V E G F 3 a の認識ヘリックスにおけるアミノ酸の選択を、表 1 に要約する。

【 0 1 7 2 】

(表 1 : V E G F - 認識 Z F P の認識ヘリックスとして選択されたアミノ酸)

【 0 1 7 3 】

【表 1】

タンパク質	フィンガー-1				フィンガー-2				フィンガー-3			
	-1	2	3	6	-1	2	3	6	-1	2	3	6
VEGF1	T	S	N	R	R	S	N	R	R	D	H	R
VEGF3A	Q	S	D	R	R	S	N	R	R	D	E	R

10

6 つの重複オリゴヌクレオチドを利用する P C R ベースの構築手順を用いて、これらのペプチドを発現させるために、コード配列を構築した。これらのオリゴヌクレオチドは、認識ヘリックス間の D N A 結合ドメインの一部をコードする「ユニバーサル」配列に対応する。これらのオリゴヌクレオチドは、どのジンクフィンガー構築物についても一定のままである。3 つの「特異的な」オリゴヌクレオチドを、認識ヘリックスをコードするように設計した。これらのオリゴヌクレオチドは、異なる D N A 結合ドメインそれぞれに対して特異的になるように、認識ヘリックスにおける 1、2、3 および 6 位での置換を含んだ。哺乳動物細胞および E . c o l i の両方において発現を可能にするよう、コドンのバイアスを選択した。

20

【 0 1 7 4 】

P C R 合成を、2 工程で実施した。第 1 に、二本鎖 D N A テンプレートを、上記の 6 つのオリゴヌクレオチド (ユニバーサルな 3 つ、特異的な 3 つ) を組み合わせること、そして低温 (2 5) のアニーリング工程を含む 4 サイクル P C R 反応を用いることによって作製した。この温度では、この 6 つのオリゴヌクレオチドは、D N A 「骨格」を形成するよう結び付く。骨格中の間隙を T a q ポリメラーゼと P f u ポリメラーゼとの組合せにより満たした。構築の第 2 段階において、ジンクフィンガーのテンプレートを、クローニングのために p U C 1 9 に制限部位を組み込むよう設計された外部プライマーによって、3 0 サイクルにて増幅した。V E G F Z F P に対するクローンの正確さを、D N A 配列決定によって確認した。この 2 つの構築物のそれぞれの D N A 配列を、以下に列挙する。

30

V E G F 1 :

【 0 1 7 5 】

【化 2】

```
GGTACCCATACCTGGCAAGAAGAAGCAGCACATCTGCCACATCCAGGGCTGT
GGTAAAGTTTACGGCACAACCTCAAATCTGCGTCGTCACCTGCGCTGGCACAC
CGGCGAGAGGCCCTTTCATGTGTACCTGGTCCTACTGTGGTAAACGCTTCACCC
GTTTCGTCAAACCTGCAGCGTCACAAGCGTACCCACACCGGTGAGAAGAAATT
TGCTTGCCCGGAGTGTCCGAAGCGCTTCATGCGTAGTGACCACCTGTCCCGTC
ACATCAAGACCCACCAGAATAAGAAGGGTGGATCC (配列番号 2)
```

40

V E G F 1 翻訳物 :

【 0 1 7 6 】

【化 3】

50

VPIPGKKKQHICHIQGGCKVYGTTSNLRRLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFTRS
 SNLQRHKRTHTEGKKFACPECPKRFMRSDHLSRHIKTHQNKKGGS (配列番号3)

VEGF3a:

【0177】

【化4】

GGTACCCATACCTGGCAAGAAGAAGCAGCACATCTGCCACATCCAGGGCTGT
 GGTAAGTTACGGCCAGTCTCCGACCTGCAGCGTCACCTGCGCTGGCACAC
 CGGCGAGAGGCCTTTCATGTGTACCTGGTCCTACTGTGGTAAACGCTTCACCC
 GTTCGTCAAACCTACAGAGGCACAAGCGTACACACACCCGGTGAGAAGAAATT
 TGCTTGCCCGGAGTGTCCGAAGCGCTTCATGCGAAGTGACGAGCTGTACGA
 CATATCAAGACCCACCAGAACAAGAAGGGTGGATCC (配列番号4)

10

VEGF3a 翻訳物:

【0178】

【化5】

VPIPGKKKQHICHIQGGCKVYQGSSDLQRHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFTRS
 SNLQRHKRTHTEGKKFACPECPKRFMRSDHLSRHIKTHQNKKGGS (配列番号5)

20

設計されたZFPがそれらの標的部位に結合する能力を、E. coliから組換えタンパク質を発現および精製し、そして電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)を実施することによって確認した。ZFPの発現を、2つの異なる系において実行した。第1の系において、DNA結合ペプチドを、それらを市販のpET15bベクター(Novagen)に挿入することにより、E. coliにおいて発現させた。このベクターは、組換えタンパク質の発現を駆動するためのT7プロモーター配列を含む。この構築物を、E. coli BL21/DE3(laqI^q)細胞に導入した。この細胞は、IPTG誘導性T7ポリメラーゼを含む。培養物に50 μM ZnCl₂を補充し、600 nmのODが0.5~0.6になるまで37 °Cで培養し、そしてタンパク質産生を、IPTGを用いて2時間誘導した。ZFP発現が、非常に高いレベル(総細胞タンパク質のおよそ30%)で見られた。これらのタンパク質を、「非融合」ZFPと呼ぶ。

30

【0179】

部分的に純粋な非融合ZFPを、以下のように生成した(Desjarlais & Berg, Proteins: Structure, Function and Genetics 12:101-104(1992)から適合させた)。凍結細胞ペレットを、1/50容量の1M NaCl、25mM Tris HCl(pH8.0)、100 μM ZnCl₂、5mM DTTに再懸濁した。このサンプルを、10分間沸騰させ、そして約3,000 × gにて10分間遠心分離した。この時点での上清中のZFPタンパク質は、クマシーブルーを用いてSDSポリアクリルアミドを染色することにより概算すると、50%を超える精製度であり、そして生成物は、11kDaあたりの推定分子量に移動した。

40

【0180】

ZFPを生成する第2の方法は、それらをE. coliマルトース結合タンパク質(MBP)との融合物として発現させることであった。ZFPとのN末端MBP融合物を、pET15bクローンのPCR増幅およびTaqプロモーターの制御下でのベクターpMal

50

- c 2 (New England Biolabs) への挿入によって構築した。この融合物は、組換えタンパク質の容易な精製および検出を可能にする。ジンクフィンガー DNA 結合タンパク質が、E. coli において可溶化形態で高レベルにこのベクターから発現され得ること、および再フォールディングすることなく適切な DNA 標的に効果的に結合し得ることが、これまでに報告されている (Liu ら、PNAS 94 : 5525 - 5530 (1997))。MBP 融合タンパク質の生成は、製造元 (New England Biolabs) によって記載されている通りであった。形質転換体を、グルコースおよびアンピシリンを補充した LB 培地で増殖させ、そして IPTG を用いて 37 °C にて 3 時間誘導した。この細胞を、フレンチプレスによって溶解させ、次いで MBP 部分に特異的に結合する (従って、このタンパク質に対するアフィニティー樹脂として作用する) アガロースベースのアミロース樹脂に曝した。MBP 融合タンパク質を、10 mM マルトースを用いて溶出し、50% を超える精製度の ZFP を遊離させた。いくつかの場合、このタンパク質を、Centricon 30 フィルターユニット (Amicon) を用いてさらに濃縮した。

10

【 0181 】

部分的に精製した非融合 ZFP および MBP 融合 ZFP を、EMSA によって試験し、それらの標的 DNA 配列との結合を評価した。調製物中のタンパク質濃度を、Bradford アッセイ (BioRad) によって測定した。SDS ポリアクリルアミドゲルが、いずれの精製方法によっても 50% を超える均質性を示したので、この算出における ZFP 精製度に対して調整は行わなかった。さらに、この調製物中に有意な量の不活性タンパク質が存在し得た。従って、以下の EMSA によって生じたデータは、タンパク質のそれらの標的に対する真の親和性の過小評価 (すなわち、 K_d の過大評価) を示している。2 つの別々の調製物を、それぞれのタンパク質に対して作製し、ZFP 活性における相違の制御を手助けした。

20

【 0182 】

EMSA 実験のための VEGF DNA 標的部位を、29 bp の二重鎖オリゴヌクレオチド中に 9 bp の結合部位を組み込むことによって作製した。このアッセイにおいて用いられる認識 (「上方」) 鎖の配列およびそれらの相補鎖 (「下方」) の配列を以下に示す：

【 0183 】

【 化 6 】

30

VEGF 部位 1, 上方 : 5'-CATGCATAGCGGGGAGGATCGCCATCGAT
(配列番号 6)

VEGF 部位 1, 下方 : 5'-ATCGATGGCGATCCTCCCCGCTATGCATG
(配列番号 7)

VEGF 部位 3, 上方 : 5'-CATGCATATCGCGGAGGCTTGGCATCGAT
(配列番号 8)

VEGF 部位 3, 下方 : 5'-ATCGATGCCAAGCCTCCGCGATATGCATG
(配列番号 9)

40

VEGF DNA 標的部位は、下線を引かれている。9 bp の結合部位のそれぞれの端の 3 bp もまた、実際の VEGF DNA 配列に由来した。それぞれの標的部位の上方の鎖を、ポリヌクレオチドキナーゼおよび γ -³²P ATP を用いて標識した。上方および下方の鎖を、0.5 μM の各オリゴヌクレオチド、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、および 50 mM NaCl にて、各オリゴヌクレオチドを含む反応においてアニールさせた。この混合物を 95 °C で 5 分間加熱し、そして 60 分間にわたって 37 °C までゆっくり冷却した。二重鎖形成を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動

50

によって確認した。標的調製物中に残存する遊離の標識DNAおよびssDNAは、この結合反応を妨害するようではなかった。

【0184】

標的オリゴヌクレオチドへのZFPの結合を、固定量の二重鎖基質に対してタンパク質を滴定することにより行った。20マイクロリットルの結合反応物は、10フェムトモル(0.5nM)5'32P標識二本鎖標的DNA、35mM Tris HCl (pH7.8)、100mM KCl、1mM MgCl₂、1mM ジチオスレイトール、10%グリセロール、20μg/ml ポリdI-dC(必要に応じて)、200μg/ml ウシ血清アルブミン、および25μM ZnCl₂を含んだ。タンパク質を、200mM NaCl、20mM Tris (pH7.5)、1mM DTT中に作製された連続希釈からの1/5容量として加えた。結合を、室温にて30分間進行させた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動を、プレキャストされた10%または10~20%のTris-HClゲル(BioRad)および0.1mM ZnCl₂を含む標準的なTris-グリシン泳動緩衝液を用いて実行した。

10

【0185】

MBP融合ZFPを用いた代表的なEMSAを実施した。この場合、MBP-VEGF1タンパク質の3倍連続希釈を用いた。シフトされた生成物をホスホールイメジャー(Molecular Dynamics)で定量し、そして相対的なシグナル(プラトー値の%)対nMタンパク質濃度のlog₁₀をプロットした。見かけのK_dを、MBP-VEGF1のその標的部位への最大結合の半値を与えるタンパク質濃度を決定することによって見出した。そしてこの実験においてこれは、およそ2nMであった。

20

【0186】

VEGFタンパク質に対する決定された結合親和性は、以下のように要約され得る。VEGF1は、より強いDNA結合親和性を示した；複数のEMSA分析において、平均の見かけ上のK_dを、VEGF部位1に結合する場合、およそ10nMであると決定した。VEGF3aは、その標的部位に十分結合したが、VEGF1よりも高い見かけ上のK_dを有した；VEGF3aについての平均K_dは、約200nMであった。両方の場合において、このタンパク質のMBP融合バージョンおよび非融合バージョンは、同様の親和性で結合した。またK_dを、野生型Zif268とSP-1 ZFPとのMBP融合物について、これらの条件下で決定した(それぞれ、K_d60nMおよび65nMを生じた)。これらの結果は、およそ2~30nMのZif268について文献において報告された結合定数と同様である(例えば、Jamiesonら、Biochemistry 33:5689-5695(1994)を参照のこと)。従って、合成VEGF ZFPについてのK_dは、これらの天然に存在するDNA結合タンパク質について決定されたK_dと非常に好都合に比較される。

30

【0187】

要約すると、この実施例は、VEGF遺伝子の転写開始付近の特定の標的に関する2つの新規のDNA結合タンパク質の生成を示す。これらのタンパク質は、天然に存在する転写因子のそれらの標的への結合の親和性と同様の親和性で結合する。

40

【0188】

(実施例2)

9bp標的部位を認識するジンクフィンガードメインが、細胞内で発現された場合に必要親和性または特異性を欠く場合、18塩基対の標的部位を認識するために、リンカー配列を用いて別々の3-フィンガードメインを結び付け、6-フィンガードメインを形成することによって、より大きなドメインを構築し得る。このことは、ZFPに融合された機能的ドメイン(例えば、アクチベーターまたはリプレッサー)が、特に少量のZFP融合タンパク質のみが生成されるような条件下で、適切な配列を特異的に標的化することを保証するはずである。VEGFにおける9bp標的部位を、相互に隣接するよう選択し、その結果、ジンクフィンガーが、18bp配列を認識するよう連結し得た。リンカーDGGGSを、1つのヌクレオチドギャップによって分離された2つの9bp部位へのZFPの

50

結合を可能にすることが理由で選択した。V E D F 1 および V E G F 3 a 部位についても同様である (L i u ら、P N A S 5 5 2 5 - 5 5 3 0 (1 9 9 7) もまた参照のこと)。

【 0 1 8 9 】

6 - フィンガー V E G F 3 a / 1 タンパク質をコードする配列を、以下のように生成した。V E G F 3 a を、プライマー S P E 7 (

【 0 1 9 0 】

【 化 7 】

5'-GAGCAGAAATTCGGCAAGAAGAAGCAGCAC

10

(配列番号 1 0)) および S P E a m p 1 2 (

【 0 1 9 1 】

【 化 8 】

5'-GTGGTCTAGACAGCTCGTCACTTCGC

(配列番号 1 1)) を用いて P C R 増幅し、その末端に E c o R I 制限部位および X b a I 制限部位を生成した (制限部位に下線を引く) 。 V E G F 1 をプライマー S P E a m p 1 3 (

20

【 0 1 9 2 】

【 化 9 】

5'-GGAGCCAAGGCTGTGGTAAAGTTTACGG

(配列番号 1 2)) および S P E a m p 1 1 (

【 0 1 9 3 】

【 化 1 0 】

5'-GGAGAAGCTTGGATCCTCATTATCCC

30

(配列番号 1 3)) を用いて P C R 増幅し、その末端に S t y I 制限部位および H i n d I I I 制限部位を生成した (制限部位に下線を引く) 。合成オリゴヌクレオチドを用いて、以下の配列を、X b a I 部位と S t y I 部位との間に連結した (X b a I 部位および S t y I 部位に下線を引く) :

【 0 1 9 4 】

【 化 1 1 】

TCTAGA CAC

ATC AAA ACC CAC CAG AAC AAG AAA GAC GGC GGT GGC AGC GGC AAA

40

AAG AAA CAG CAC ATA TGT CAC ATC CAA GG

(配列番号 1 4)) 。これは、2つの S P - 1 ドメイン間にリンカー配列 D G G G S を導入した。この連結産物をプライマー S P E 7 および S P E a m p 1 1 を用いて再増幅し、そして E c o R I 部位および H i n d I I I 部位を用いて p U C 1 9 中にクローン化した。次いでこの連結 Z F P 配列を、以下のプライマーを用いて増幅し、上述したように、改変された p M A L - c 2 発現ベクター中に、クローニングのための K p n I 部位および B a m H I 部位を導入した :

(1) G B 1 9

【 0 1 9 5 】

50

【化 1 2】

GCCATGCCGGTACCCATACCTGGCAAGAAGAAGCAGCAC

(配列番号 1 5)

(2) G B 1 0

【 0 1 9 6 】

【化 1 3】

CAGATCGGATCCACCCTTCTTATTCTGGTGGGT

10

(配列番号 1 6)。

【 0 1 9 7 】

K p n I から B a m H I までの設計された 6 - フィンガー Z F P V E G F 3 a / 1 のヌクレオチド配列は、以下のようなものである：

【 0 1 9 8 】

【化 1 4】

GGTACCCATACCTGGCAAGAAGAAGCAGCACATCTGCCACATC
 CAGGGCTGTGGTAAAGTTTACGGCCAGTCCTCCGACCTGCAGCGTCACCTGCG
 CTGGCACACCGGCGAGAGGCCCTTTCATGTGTACCTGGTCCTACTGTGGTAAAC
 GCTTCACACGTTTCGTCAAACCTACAGAGGCACAAGCGTACACACACAGGTGA
 GAAGAAATTTGCTTGCCCGGAGTGTCCGAAGCGCTTCATGCGAAGTGACGAG
 CTGTCTAGACACATCAAAACCCACCAGAACAAGAAAGACGGCGGTGGCAGC
 GGCAAAAAGAAACAGCACATATGTCACATCCAAGGCTGTGGTAAAGTTTACG
 GCACAACCTCAAATCTGCGTCGTCACCTGCGCTGGCACACCGGCGAGAGGCC
 TTTTCATGTGTACCTGGTCCTACTGTGGTAAACGCTTCACCCGTTTCGTCAAACCT
 GCAGCGTCACAAGCGTACCCACACCGGTGAGAAGAAATTTGCTTGCCCGGAG
 TGTCCGAAGCGCTTCATGCGTAGTGACCACCTGTCCCGTCACATCAAGACCCA
 CCAGAATAAGAAGGGTGGATCC

20

30

(配列番号 1 7)。

【 0 1 9 9 】

V E G F 3 a / 1 アミノ酸翻訳物は、以下のようなものである (1 文字コードを用いる)
 :

【 0 2 0 0 】

【化 1 5】

VPIPGKKKQHICHIQCGKQVYQSSDLQRHLRWHTGERPFMCTWS
 YCGKRFTRSSNLQRHKRTHTEGKKFACPECPKRFMRSDLSRHKTHQNKKG
 GSGKQKQHICHIQCGKQVYGTSSNLRRHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFTRSS
 LQRHKRTHTEGKKFACPECPKRFMRSDHLSRHKTHQNKKGGS

40

(配列番号 1 8)。

【 0 2 0 1 】

1 8 b p の結合タンパク質 V E G F 3 a / 1 を、M B P 融合物として E . c o l i 中で発現させて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして実施例 1 に記載されるような E M S A 実験において試験した。この標的オリゴヌクレオチドを、記載された

50

ように調製した。そしてこれは以下の相補配列を含んだ：

(1) J V F 9

【 0 2 0 2 】

【 化 1 6 】

AGCGAGCGGGGAGGATCGCGGAGGCTTGGGGCAGCCGGGTAG

(配列番号 1 9)、および

(2) J V F 1 0

【 0 2 0 3 】

【 化 1 7 】

10

CGCTCTACCCGGCTGCCCAAGCCTCCGCGATCCTCCCCGCT

(配列番号 2 0)。

【 0 2 0 4 】

E M S A 研究のために、20 μ l の結合反応物は、10 f m o l (0 . 5 n M) の 5 ' ³ ² P - 標識された二重鎖の標的DNA、35 m M の T r i s - H C l (p H 7 . 8)、1 0 0 m M の K C l、1 m M の M g C l ₂、5 m M のジチオトレイトール、10 % のグルコース、20 μ g / m l のポリd I - d C、200 μ g / m l のウシ血清アルブミン、および25 μ M の Z n C l ₂ を含んだ。タンパク質を、3倍に希釈したシリーズから1 / 5体積として添加した。結合を、室温または37 °Cのいずれかで60分間進行させた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動を、成形済みの10%または10 ~ 20%のT r i s - H C l ゲル (B i o R a d) および標準的T r i s - グリシン泳動用緩衝液を使用して、室温または37 °Cで実行した。この室温アッセイは、約1 . 5 n M の V E G F 3 a / 1 タンパク質についての見かけのK_dを得た。従って、この18 - b p の結合ZFPは、その標的部位に高い親和性で結合した。平行する実験において、V E G F 1 タンパク質を、その標的に対して実施例1に記載されたオリゴヌクレオチドを使用して試験し、約2 . 5 n M の見かけのK_dを得た。結合および電気泳動が37 °Cで実施された場合、18 - b p の標的に対して試験された場合には、その標的に対して試験されたV E G F 1 についての40 n M のK_dと比較して、V E G F 3 a / 1 の見かけのK_dは、約9 n Mであった。これは、結合の親和性における差異が、より高い温度で強調されることを示す。

20

30

【 0 2 0 5 】

見かけのK_dは、そのDNA標的に対するタンパク質の親和性の有用な尺度である。しかし、インビトロまたはインビボのいずれかのDNA結合部位について、その占有率は、DNA結合タンパク質の乖離率 (o f f - r a t e) によって大部分、決定される。このパラメーターを、競合実験によって測定し得る。E M S A のための条件は、上記のとおりである；結合および電気泳動を、37 °Cで実施した。これらのデータは、タンパク質 - D N A 複合体の半減期が、V E G F 1 に関してより、V E G F 3 a / 1 に関して、10倍より長いことを示す。従って、これらのインビボ条件下では、標的部位の占有率は、9 - b p のタンパク質に関してより、18 - b p のタンパク質に関して、より高い。

40

【 0 2 0 6 】

(実施例 3 :)

この実施例は、哺乳動物細胞内でZFPを産生するための発現ベクターの構築、発現ベクターの核への転移、およびZFPによって標的DNAに局在化される機能的ドメインの提供を記載する。採用された機能的ドメインは、K r u p p e l - A s s o c i a t e d B o x (K R A B) 抑制ドメインおよび単純性疱疹ウイルス (H S V - 1) V P 1 6 活性化ドメインである。

50

【0207】

特定のDNA結合タンパク質は、転写リプレッサーとして機能する分離可能なドメインを含む。約20%のZFPは、転写リプレッサーとして機能する約90アミノ酸の非DNA結合ドメインを含む(Thiesen, *The New Biologist* 2:363-374 (1990); Margolinら, *PNAS* 91:4509-4513 (1994); Pengueら, (1994)、上記; Witzgallら, (1994)、上記)。KRABドメインと命名されたこのドメインは、モジュラーであり、そして他のDNA結合タンパク質に連結されて、標的のDNA配列を有する遺伝子の発現をブロックし得る(Margolinら, (1994); Pengueら, (1994); Witzgallら, (1994)、上記)。このKRABドメインは、それ自体では効果を有さない; リプレッサーとして機能するためには、DNA結合ドメインを通じて、DNA配列に連結されることが必要である。このKRABドメインは、転写の開始をブロックすることが示されており、そして転写開始部位から少なくとも3kbまで上流の距離で機能し得る。ヒトKOX-1タンパク質由来のKRABドメイン(Thiesen, *The New Biologist* 2:363-37 (1990))を、本明細書に記載される研究のために使用した。この64アミノ酸のドメインは、ZFPに融合され得、細胞培養物において抑制を与えることが示された(Liuら、上記)。

10

【0208】

HSV-1のVP16タンパク質は、広く研究されており、そしてC末端の78アミノ酸が、DNA結合ドメインと融合した場合、トランス活性化ドメインとして働き得ることが示された(Hagmannら, *J. Virology* 71:5952-5962 (1997))。VP16はまた、離れて、そして方向非依存的な様式で機能することが示された。これらの研究のために、VP16タンパク質配列のアミノ酸413~490を使用した。このドメインをコードするDNAを、以下の配列を有するプライマーを使用して、プラスミドpMSVP16C+119からPCR増幅した:

20

(1) JVF24

【0209】

【化18】

CGCGGATCCGCCCCCGACCGATG

30

(配列番号21); および

(2) JVF25

【0210】

【化19】

CCGCAAGCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGCTGCCCCACCGTACTC
GTCAATCC

40

(配列番号22)

下流のプライマー、JVF25を、下流のFLAGエピトープをコードする配列を含むように設計した。

【0211】

3つの発現ベクターを、これらの研究のために構築した。これらのベクターは、pcDNA3.1(+)(Invitrogen)由来であり、そしてサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの制御下にZFP構築物を配する。このベクターは、それぞれ細菌および哺乳動物細胞培養物での選択のためのアンピシリンマーカールおよびネオマイシンマーカールを有する。適切な転写開始のためのKozak配列(Kozak, *J. Biol. C*

50

hem.266:19867-19870(1991))を、取り込んだ。この産物の核への局在を達成するために、SV40大(Large)T抗原由来の核局在配列(NLS)(Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val、配列番号40)(Kaldersonら、Cell 39:499-509(1984))を付加した。ZFPコード配列のためのこの挿入部位には、機能的ドメイン配列が続く。このベクターの3つの変形型は、その機能的ドメインにおいて異なる；「pcDNA-NKF」は、KRAB抑制ドメイン配列を有し、「pcDNA-NVF」は、VP16活性化ドメインを有し、そして「NF-コントロール」は、機能的ドメインを有さない。以下の機能的ドメインは、ZFPの特異的な検出を可能にするためのFLAGエピトープ配列(Kodak)である。

【0212】

これらのベクターを、以下のように構築した。プラスミドpcDNA-HBは、プラスミドpcDNA3.1(+)(Invitrogen、Carlsbad、CA)を、HindIIIおよびBamHIで切断し、付着末端をクレノウによって埋め、再連結させることによって構築した。このことにより、ポリリンカー中のHindIII、KpnIおよびBamHI部位を除外した。このベクターpcDNA3.1(+)は、Invitrogenのカatalogに記載される。プラスミドpcDNA-NKFを、pcDNA-HBのEcoRI/XhoI部位中にフラグメントを挿入することによって生成した。pcDNA-HBは、以下を含む：1)開始コドンおよびSV40NLS配列を含むKozak配列を含む、全体でDNA配列

【0213】

【化20】

GAATTCGCTAGCGCCACCATGGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGGAATCC
ATGGGGTAC

(配列番号23)

を構成するEcoRI~KpnI断片、ここでEcoRI部位およびKpnI部位を下線で示す；ならびに2)BamHI部位、KOX-1由来のKRAB-Aボックス(上記のThiesen、1990におけるアミノ酸11~53に相当する)、FLAGエピトープ(Kodak/IBIカatalogから)、およびHindIII部位を含む、全体で配列

【0214】

【化21】

GGTACCCGGGGATCCCGGACACTGGTGACCTTCAAGGATGTATTTGTGGACTT
CACCAGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACTGCTCAGCAGATCGTGTACAGA
AATGTGATGCTGGAGAACTATAAGAACCTGGTTTCCTTGGGCAGCGACTACA
AGGACGACGATGACAAGTAAGCTTCTCGAG

(配列番号24)

を構成するKpnIからXhoIの断片、ここでKpnI、BamHIおよびXhoI部位を、下線で示す。

【0215】

VEGF3a/1-KRABエフェクタープラスミドを、KpnIおよびBamHIで切断したpcDNA-NKF中に、ZFP配列を含むKpnI-BamHIカセットを挿入することによって生成した。VEGF1-KRABおよびVEGF3a-KRABエフェクタープラスミドを、同様の方法で構築した(プラスミドpLitmus 28(new England Biolabs))の場合に、ZFP配列を最初にNLS-KRAB-FLAG配列中にクローン化し、そしてBglII-XhoIカセットとしてpcDNA

10

20

30

40

50

3.1 (+)のBamHI - XhoI部位に続いて移動させることを除く)。ここで、このBglII部位を、EcoRI部位の直ぐ上流に設置した(これらのベクターの発現については、実施例4を参照のこと)。

【0216】

実施例5に使用したエフェクタープラスミドを、以下のように構築した。プラスミドpcDNA - NVFを、上記のように、VP16トランス活性化ドメインをPCR増幅し、そしてこの産物をpcDNA - NKFのBamHI / HindIII部位に挿入し、KRAB配列を置換することによって構築した。BamHIからHindIIIのこの挿入フラグメントの配列は：

【0217】

【化22】

GGATCCCCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTCCACTTAGACG
GCGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTTCGATCTGGA
CATGTTGGGGGACGGGATTCCCCGGGGCCGGGATTTACCCCCACGACTCC
GCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGATGTTTAC
CGATGCCCTTGAATTGACGAGTACGGTGGGGGCAGCGACTACAAGGACGCAC
GATGACAAGTAAGCTT

10

20

(配列番号25)

であった。

【0218】

VEGF1 - VP16およびVEGF3a / 1 - VP16ベクターを、KpnIおよびBamHIで切断したpcDNA - NVF中に、ZFP配列を含むKpnI - BamHIカセットを挿入することによって構築した。

【0219】

実施例6に使用したエフェクタープラスミドを、以下のように構築した。プラスミドNF - コントロールを、pcDNA - NKFのEcoRI - XhoI部位中に配列

【0220】

【化23】

GAATTCGCTAGCGCCACCATGGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGGAATCC
ATGGGGTACCCGGGGATGGATCCGGCAGCGACTACAAGGACGACGATGACA
AGTAAGCTTCTCGAG

30

(配列番号26)

を挿入することによって生成し、それによってNLA - FLAGのみでNLS - KRAB - FLAG配列を置換した。

【0221】

VEGF1 - NFおよびVEGF3a / 1 - NFは、ZFP配列を含むKpnI - BamHIカセットを、KpnIおよびBamHIで切断したNF - コントロール中に挿入することによって構築した。CCR5 - KRABを、VEGF - KRABベクターと同じ方法によって構築した(ZFP配列が、VEGF標的に関連しないDNA標的部位に対して特異的であるように設計された点を除く)。

【0222】

最後に、KRAB発現プラスミドおよびVP16発現プラスミドの両方のコントロールの変形型を、構築した。プラスミドNKF - コントロールを、ジンクフィンガータンパク質配列なしのNLS - KRAB - FLAGを発現するように設計した；プラスミドNVF -

40

50

コントロールを、ZFP配列なしのNLS-VP16-FLAGを発現するように設計した。これらのプラスミドは、適切なリーディングフレーム中に下流のドメインを設置するために、pcDNA-NKFおよびpcDNA-NVFをそれぞれ、BamHIで切断し、クレノウで末端を埋め、そして再連結することによって作製した。これらのプラスミドは、細胞培養物研究のための厳密なコントロールとして働く。

【0223】

ZFPを操作したVEGFの哺乳動物細胞の発現および核への局在を、免疫蛍光研究で実証した。293(ヒト胚性腎臓)細胞を、NLS-VEGF1-KRAB-FLAGキメラをコードする発現プラスミドでトランスフェクトした。リポフェクトアミン(Lipofectamine)を、以下に記載のように使用した。24~48時間後、細胞を固定し、そしてFLAGエピトープに対する一次抗体に曝露した。Texas Redで標識した二次抗体を用い、そしてこれらの細胞を、DAPIで対比染色した。Texas Red染色は、DAPI染色と一致して共局在することが観察された。これは、このプラスミドから発現されるZFPが核に局在したことを示す。

10

【0224】

(実施例4:)

この実施例は、細胞内でのZFP抑制タンパク質の活性を測定するための一過性の共トランスフェクションの使用を実証する。このような実験は、VEGF標的部局を有するレポータープラスミドを伴う、ZFP-KRAB発現(「エフェクター」)プラスミドの共トランスフェクションを含む。効力を、空のベクターコントロールと比較した、エフェクター

20

【0225】

このレポータープラスミドシステムは、pGL3ホタルルシフェラーゼベクター(Promega)に基づいた。VEGF標的部局の4つのコピーを、pVFR1-4xを創出するために、プラスミドpGL3-コントロール中の、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を駆動するSV40プロモーターの上流に挿入した。このプラスミドは、SV40エンハンサーを含み、そして多くの細胞型においてホタルルシフェラーゼを高レベルで発現する。挿入を、実施例2に記載された2つの相補的な42-bpのオリゴヌクレオチド、JV9およびJV10の縦列コピーを共に連結させることによって作製した。アダプター配列を連結し、そしてこの組立を、pGL3-コントロールのMluI/BglII部位中に挿入した。これは、これらの部局間の以下の配列の挿入を生じた:

30

【0226】

【化24】

ACGCGTaaagcttGCTAGCGAGCGGGGAGGATCGCGGAGGCTTGGGGCAGCCGGG
TAGAGCGAGCGGGGAGGATCGCGGAGGCTTGGGGCAGCCGGGTAGAGCGAG
CGGGGAGGATCGCGGAGGCTTGGGGCAGCCGGGTAGAGCGAGCGGGGAGGA
TCGCGGAGGCTTGGGGCAGCCGGGTAGAGCGCTCAgaagcttAGATCT

40

(配列番号27)

示された最初の6ヌクレオチドおよび最後の6ヌクレオチドは、MluI部位およびBglII部位であり;小文字はHindIII部位を示す。VEGF1およびVEGF3aの結合部局を、下線で示す。

【0227】

エフェクタープラスミド構築物を、上に記した。VEGF1-KRAB、VEGF3a-KRABおよびVEGF3a/1-KRAB発現ベクターを、CMVプロモーターの制御下にあるSV40核局在配列、VEGF-ZFP、KRAB抑制ドメイン、およびFLAGエピトープマーカ-全ての融合を生成するように設計した。空のpcDNA3.1発現ベクターを、コントロール(pcDNA)として使用した。

50

【0228】

全てのベクターを、QiagenのDNA精製キットを使用して、調製した。約40,000細胞を、24ウェルプレートの各ウェルに撒き、10%のウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(D-MEM)培地中で、5%のCO₂と共に37℃で一晩増殖させた。細胞を、PBSで洗浄し、そして血清なしのD-MEMの200μlを被せた。プラスミドを、リポフェクトアミン(Gibco-BRL)を使用して導入した。各ウェルを、6μlのリポフェクトアミンと25μlのD-MEMで30分間37℃で複合化した約0.3μgのエフェクタープラスミド、0.3μgのレポータープラスミド、および0.01μgのプラスミドpRL-SV40(Promega)で、トランスフェクトした。トランスフェクションを、3連で行った。3時間後、10%の血清を含む1mlの培地を、各ウェルに添加した。細胞を、トランスフェクション後40~48時間で回収した。ルシフェラーゼアッセイを、Dual Luciferase System(Promega)を使用して行った。トランスフェクトされた第三のプラスミド、pRL-SV40は、Renillaルシフェラーゼ遺伝子を有し、そしてトランスフェクション効率についての基準として共トランスフェクトした。

10

【0229】

コントロールレポータープラスミドpGL3-コントロール(pGL3-C)に関して、ZFP-KRAB発現プラスミドの存在または不在は、ルシフェラーゼ発現レベルに影響しない。しかし、pVFR1-4x、VEGF標的部位の4つのコピーを含むレポーターに関しては、VEGF1(9-bp-結合ZFP)またはVEGF3a/1(18-bp-結合ZFP)発現プラスミドの存在が、空のpcDNAベクターコントロールに対して、2~3倍ルシフェラーゼの発現を減少させる。このVEGF3a(9-bp-結合ZFP)発現プラスミドは、ほとんど影響を示さないかまたは影響を示さないようである。これらの実験は明らかに、設計されたZFPが、その標的部位が存在する場合、細胞内で機能して遺伝子の転写を抑制し得ることを実証する。さらに、親和性の特定のレベルが、機能のために必要であるように思われる；すなわち、10nM以下のK_dを有するVEGF1およびVEGF3a/1は機能的であるが、一方200nMのK_dを有するVEGF3aは機能的でない。

20

【0230】

第二のレポータープラスミド、pVFR2-4xを、VEGF標的部位の4つのコピーをHindIIIを使用して取り除き、そしてそれをpGL3-コントロールのHindIII部位中に(順方向に)挿入することによって構築した。これは、SV40プロモーターについての転写の開始部位とルシフェラーゼ遺伝子の翻訳開始コドンとの間の標的部位に位置する。記載されたものに類似の共トランスフェクション実験において、pcDNAコントロールと比較して、ルシフェラーゼシグナルの約3~4倍の抑制が、VEGF1-KRABリプレッサーまたはVEGF3a/1-KRABリプレッサーで観察された。これは、このリプレッサーが、転写の開始の上流または下流のいずれかに結合した場合に、活性であることを示す。

30

【0231】

(実施例5：)

この実施例は、細胞におけるZFP転写活性化因子の活性を測定するための一過性の共トランスフェクション研究の使用を実証する。実験的な設定は、異なったトランスフェクション方法、異なった細胞株、ならびに異なったレポーターおよびエフェクタープラスミドの組を使用した点を除いて、実施例4のものと類似である。

40

【0232】

活性化実験に関して、レポーターは、構築された標識化されたpVFR3-4xであった。このレポーターは、プラスミドpGL3-プロモーター(Promega)のMunII/BglII部位で、上に示した配列と共にVEGF標的の4つのコピーを含む。このベクターは、SV40のエンハンサー配列について欠失されており、従ってより低い基準レベルのホタルルシフェラーゼ発現を有する。pVFR3-4xは、pVFR1-4xのK

50

p n I / N c o I フラグメントを、p G L 3 - プロモーターの K p n I / N c o I 部位中に交換することによって構築した。

【 0 2 3 3 】

このエフェクタープラスミド構築物は、上に記載した。V E G F 1 - V P 1 6、V E G F 3 a - V P 1 6 および V E G F 3 a / 1 - V P 1 6 発現ベクターを、C M V プロモーターの制御下にある S V 4 0 核局在配列、V E G F Z F P、V P 1 6 トランス活性化ドメインおよび F L A G エピトープタグ全ての融合を生成するように設計した。空の p c D N A 3 発現ベクターを、コントロールとして使用した。

【 0 2 3 4 】

全てのベクターを、Q i a g e n の D N A 精製キットを使用して調製した。約 4 0 , 0 0 0 個の細胞を、2 4 ウェルプレートの各ウェルに撒き、そして 1 0 % のウシ胎仔血清を含む D - M E M 培地中で、5 % の C O ₂ と共に 3 7 ° で一晩増殖させた。細胞を、血清なしの D - M E M 培地で洗浄し、血清なしの D - M E M 培地の 2 0 0 μ l を被せた。プラスミドを、製造業者の取扱説明書に従って、リン酸カルシウムトランスフェクションキット (G i b c o - B R L) を使用して導入した。各ウェル中の細胞を、1 . 5 μ g のレポータープラスミド、1 . 5 μ g のエフェクタープラスミド、および 0 . 5 μ g のアクチン / - g a l プラスミドでトランスフェクトした。プラスミドを、1 5 μ l の C a C l ₂ と合わせ、d H ₂ O で 1 0 0 μ l にした。1 0 0 μ l の H E P E S 溶液を、ボルテックスで混合しながら滴下して添加した。この混合物を、室温で 3 0 分間インキュベートした。次いで、リン酸カルシウム処理した D N A の 2 0 0 μ l を、各ウェル中の培地に添加した。トランスフェクションを 3 連で行った。5 時間後、この培地を除去し、1 0 % の血清を含む 1 m l の培地を添加した。細胞を、トランスフェクション後 4 0 ~ 4 8 時間で回収した。ルシフェラーゼアッセイを、D u a l - L i g h t S y s t e m (T r o p i x) を使用して行った。トランスフェクトされた第三のプラスミド、アクチン - g a l は、アクチンプロモーターの制御下にある - ガラクトシダーゼ遺伝子を有し、トランスフェクション効率についての基準として共トランスフェクトした。この - ガラクトシダーゼアッセイをまた、製造業者のプロトコル (T r o p i x) に従って行った。

【 0 2 3 5 】

コントロールレポータープラスミド、p G L 3 - プロモーター (p G L 3 - P) に関して、Z F P - V P 1 6 発現プラスミドの存在または不在は、ルシフェラーゼ発現レベルに有意に影響しない。V E G F 標的部位の 4 つのコピーを含むレポーター、p V F R 3 - 4 x に関しては、V E G F 1 (9 - b p - 結合 Z F P) の存在が、空の p c D N A ベクターコントロールと比較して非常に僅かな活性化を示す。V E G F 3 a / 1 (1 8 - b p - 結合 Z F P) 発現プラスミドは、ルシフェラーゼ発現をまさに実質的に活性化し、p c D N A と比較して約 1 4 倍の増大を示す。これらの実験は明らかに、設計された Z F P が、V P 1 6 の活性化ドメインと融合した場合、その標的部位が存在する場合に、細胞において機能して遺伝子の転写を活性化し得ることを実証する。さらに、これらの結果は明らかに、このアッセイにおいて、1 8 - b p の結合タンパク質、V E G F 3 a / 1 が、9 - b p の結合 V E G F 1 タンパク質よりも、かなりよい活性化因子であることを実証する。これは、親和性の改善または V E G F 3 a / 1 タンパク質の乖離率の減少の結果であり得る。

【 0 2 3 6 】

第四の V E G F レポータープラスミドを、プラスミド p V F R 4 - 4 x を創出するために p V F R 2 - 4 x の K p n I / N c o I フラグメントを p G 3 - プロモーター中にクローニングすることによって構築した。活性化は、V E G F 1 - V P 1 6 および V E G F 3 a / 1 - V P 1 6 融合物を発現するエフェクタープラスミドと組み合わせてこのレポーターを使用した共トランスフェクションにおいて観察された。これは、これらの人工のトランス活性化因子が、転写開始の上流または下流のいずれかに結合した場合、機能的であることを示す。

【 0 2 3 7 】

これらの共トランスフェクションデータは、Z F P がレポーター遺伝子の発現を調節する

10

20

30

40

50

ために使用され得ることを実証する。このような実験は、内因性分子の標的の発現の調節因子としてのさらなる使用のために、ZFPを同定するための有用なツールとして働き得る。

【0238】

(実施例6：)

この実施例は、設計されたZFPが、通常のゲノム状態およびクロマチン状態である内因性の細胞の遺伝子の発現を抑制し得ることを実証する。詳細には、KRAB抑制ドメインに融合したVEGF ZFPを発現するエフェクタープラスミドを、細胞中に導入し、これがVEGF遺伝子をダウンレギュレートすることを示した。

【0239】

真核生物の発現ベクターを、実施例3で上に記したように、VEGF3a/1およびVEGF1 ZFPを、SV40 NLSおよびKRABに融合するように構築した。トランスフェクションを、GIBCO-BRLから市販されるリポソーム調製物のリポフェクトアミンを使用して行った。全てのプラスミドDNAを、Qiagen Midi DNA精製システムを使用して調製した。総体積1600 μ lのOpti-MEM中で、10 μ lのエフェクタープラスミドを、100 μ gのリポフェクトアミン(50 μ l)と混合した。pCMV-galプラスミド(Promega)をまた、トランスフェクション効率についての内部コントロールとして、このDNA混合物中に含んだ。30分間のインキュベーション後に、6.4 mlのDMEMを添加し、そしてこの混合物を 3×10^6 個の293細胞上に重ねた。5時間後、このDNA-リポフェクトアミン混合物を除去し、そして10%のウシ胎仔血清を含む新鮮な培養培地を、これらの細胞上に重ねた。

【0240】

トランスフェクション後18時間で、これらの293細胞を、100 μ MのDFX(デスフェリオキサミン(desferrioxamine))での処理によって誘導し、VEGF遺伝子の迅速かつ持続する転写活性化を生じ、かつまたVEGF mRNAの安定性における段階的な増大を生じた(Ikedaら、J. Biol. Chem. 270:19761-19766(1995))。慣用的な培養条件下で、293細胞は、培養培地中に低レベルのVHGFを分泌する。これらの細胞を、ELISAアッセイによるVEGFレベルの決定のために上清を収集する前に、さらに24時間インキュベートさせた。

【0241】

類似のレベルの抑制が実証された平行する実験において、細胞生存率を、Promega Celltiter 96(登録商標)Aqueous One Solution細胞増殖アッセイ(Promega)を使用してモニターした。18時間のDfx処理後、元の2 mlの培地のうち500 μ lを除去し、上記のようにVEGF発現について分析した。細胞の生存率を評価するために、300 μ lのPromega Celltiter 96(登録商標)Aqueous One Solution Reagentを、残りの1.5 mlに添加した。次いで、これらの細胞を37 $^{\circ}$ Cで約2時間インキュベートした。各ウェルからの100 μ lを、96ウェルプレートに移し、そしてOD 490 nmで、ELISAプレート読み取り機上で読み取った。空のベクターコントロールでトランスフェクトされた細胞と比較して、VEGF3a/1-KRAB構築物を発現する細胞の生存率における有意な減少は存在しなかった。これは、観察されたVEGF抑制が、一般化した細胞死に起因しないことを示す。

【0242】

VEGF発現の40~50倍の減少を、VEGF3a/1-KRAB(18bpの結合VEGF高親和性ZFPをコードする発現するベクター)でトランスフェクトされたDFX処理細胞において示した。細胞をVEGF1-KRAB(9bpの結合VEGF高親和性ZFPをコードする発現するベクター)でトランスフェクトした場合に、発現の2倍の減少を観察した。VEGF発現の有意な減少は、非VEGF ZFP(CCR5-KRAB)またはNKfコントロールでトランスフェクトした細胞において観察されなかった。同様の結果を、3つの独立したトランスフェクション実験において得た。

10

20

30

40

50

【0243】

別途の実験において、以下の結果を得た（データは示さない）。VEGF1-NF（機能的なドメインなしに9bpの結合VEGF1 ZFPを発現する）は、VEGF遺伝子発現するに効果を示さなかった。VEGF発現における有意な減少を、VEGF3a/1-NF（機能的なドメインなしに18bpの結合タンパク質を発現する）で観察した。この結果は、転写の開始部位への結合が、抑制ドメインなしでさえ、転写を妨げることを示唆する。KRABドメインに融合された場合でさえ、VEGF3a ZFPは、発現レベル（プラスミドVEGF3a-KRAB）に影響を及ぼし得ない。しかし、KRABに融合されたVEGF1（VEGF1-KRAB）は、発現における劇的な減少を生じる。KRABに融合されたVEGF3a/1（VEGF3a/1-KRAB）は、全体的にVEGFの発現を妨げる。

10

【0244】

これらのデータは、設計されたZFPが、染色体上のその標的部位へ位置し得、そして結合し得、そして内因性の細胞標的遺伝子発現を防ぎ得ことを示す。特に、結果は、約25nM未満のKdを有するZFP（例えば、VEGF1が約10nMの平均的な見かけのKdを有する）が発現における劇的な減少を提供することを示す。さらに、データは、KRAB機能性ドメインが遺伝子サイレンシングを高めることを示す。この発現におけるリプレッサーの誘導は、VEGFのインデューサー（DFX）が添加される前に起こるため、このデータは、設計されたリプレッサーがすでに休止の遺伝子の活性化を妨げる能力を示す。さらに、これらの結果は、転写開始部位と重なる標的を結合する場合、その標的に対するナノモルの親和性でシックスフィンガー（six-finger）の操作したZFP（VEGF3a/1）がVEGF遺伝子の低酸素性応答を阻害し得ることを示す。

20

【0245】

（実施例7：）

本実施例は、設計したZFPが正常なゲノムおよびクロマチン内容物にある内因性の細胞性遺伝子の発現を活性化し得ることを示す。特に、VP16活性化ドメインに融合されたVEGF ZFPを発現するエフェクタープラスミドを、細胞に導入し、そしてVEGF遺伝子を上方制御することを示した。

【0246】

真核生物発現ベクターを、実施例3に記載されるように、VEGF3a/1およびVEGF1 ZFPをSV40 NLSおよびVP16に融合させて構築した。トランスフェクションをリポフェクトアミン（GIBCO-BRLから市販されるリポソーム調製物）を使用して行った。全てのプラスミドDNAを、Qiagen Midi DNA精製システムを使用して調製した。10μgのエフェクタープラスミド（操作したZFPを含む）を、1600μlのOpti-MEMの総容積中100μgのリポフェクトアミン（50μl）と共に混合した。pCMV-galプラスミド（Promega）をまた、トランスフェクション効率に関する内部コントロールとして、DNA混合物中に含有した。インキュベート30分後、6.4mlのDMEMを添加し、そして混合物を 3×10^6 の293細胞上に積層した。5時間後、DNA-リポフェクトアミン混合物を除去して、そして10%のウシ胎仔血清を含有する新鮮な培養培地を細胞上に積層した。1日後、新鮮な培地を添加して、そして市販されるELISAキット（Rand D Systems）を使用するVEGFレベルの測定のために、上澄みを24時間後に収集した。

30

40

【0247】

スリーフィンガーのVEGF1-特異的ZFP（VEGF1-VP16）について、コントロールプラスミド（NVF-コントロール）および擬トランスフェクトした細胞と比較した場合に、VEGF発現の7~10倍の増加が観察された。同様の結果を、5つの独立した実験において観察している。VEGF1-VP16トランスフェクト細胞におけるVEGF分泌のレベルがDFXで処理されている細胞におけるレベルと等価であるかまたは、それより大きいことを示すことが重要である。VEGF3a/1-VP16の導入は、より緩やかな導入を刺激した。この結果は、実施例6における知見と矛盾しない。この知

50

見において、機能的なドメインなしでの18bpの結合タンパク質の発現は一定の程度まで活性化を妨げた。この結果は、転写の開始部位へのこのタンパク質の密接な結合が活性化を妨げることを示唆した。

【0248】

これらのデータは、設計したZFPが、染色体上の標的部位に位置し得、そしてこの部位に結合し得、転写活性化ドメインを提示し得、そして劇的に内因性遺伝子の発現レベルを高め得ること示す。特に、この結果は、約25nM未満のKdを有するZFP（例えば、VEGF1が約10nMの平均的な見かけのKdを有する）が、発現における劇的な増加を提供することを示す。

【0249】

（実施例8：）

さらに実施例6および7における結果を実体化するため、リボヌクレオチド保護アッセイ（RPA）を実施して、増加したレベルのVEGFタンパク質とVEGF mRNAレベルにおける増加とを相関させ（実施例7）、そして減少したレベルのVEGFタンパク質とVEGF mRNAレベルの減少とを相関させた（実施例6）。

【0250】

RNAを、RNA単離キット（Pharmingen）を使用してトランスフェクトした細胞から単離した。放射標識された複数のテンプレートプローブ（VEGF特異的プローブを含む）を、インビトロの転写によって調製し、そして56で一晩、実験細胞およびコントロールトランスフェクトした細胞由来の5μgの各RNAにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション混合物を、RNaseで処理し、そして保護されたプローブを精製し、そして5%の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、そして放射能をオートラジオグラフィによって評価した。VEGF1-VP16でトランスフェクトした293細胞は、NVF-コントロールでトランスフェクトした細胞と比較した場合、VEGF mRNAのレベルにおける2~4倍の増加を有した（実験の詳細については実施例7を参照のこと）。保護されたプローブのサイズは、RNAの完全性のためのコントロールトランスフェクトして提供したコントロールヒトRNAから生成されるプローブのサイズと同一であった。

【0251】

別途の実験において、VEGF特異的mRNAのレベルをまた、VEGF-KRABエフェクタープラスミドでトランスフェクトされている細胞において定量した（実験の詳細については実施例6を参照のこと）。トランスフェクションの詳細を実施例6に記載する。細胞をVEGF3a/1-KRABエフェクタープラスミドでトランスフェクトした場合、VEGF mRNAのレベルの劇的な減少を観察した。細胞をNKF-コントロールまたは非VEGF特異的ZFP（異なるCCR5標的部位を認識する、CCR5-5-KRABおよびCCR5-3-KRAB）でトランスフェクトした場合、VEGF mRNAにおける有意な減少を観察しなかった。

【0252】

この実験は、VEGF1-VP16キメラ転写因子でのトランスフェクションの際に観察されるVEGFタンパク質の増加は、VEGF mRNAのレベルの増加によって媒介されることを示す。同様に、VEGF3a/1-KRABキメラ転写因子でのトランスフェクションの際に観察されるVEGFタンパク質の減少は、VEGF mRNAのレベルの減少によって媒介されることを示す。

【0253】

（実施例9：VEGF2媒介マイトジェンシグナルのインヒビターの同定）

（工程1：細胞株の産生）

VEGF-R2を過剰発現し、そしてVEGF-R1を発現しないECV304由来細胞株を以下のように産生する。VEGF-R1に対して設計したZFPリプレッサーを上記のように産生した。VEGF-R2を高めるように設計したZFPアクチベーターをまた、上記のように産生した。ECV304細胞を、2つのZFP構築物で同時トランスフェ

10

20

30

40

50

クトする；クローンを薬物選択に続いてFACS分析（R&D Systems, NFVE0）のために選んだ。FACS分析を介してVEGF-R1の欠失および膜表面上でのVEGF-R2の増加を示すクローンを増殖させ、そして細胞株を高スループット（HTP）スクリーニングを実行する。細胞株を、VEGF-R1-/R2++と再命名する。

【0254】

VEGF-R1を本質的に抑制し、そして条件付でVEGF-R2を産生するコントロール細胞株を以下のように産生する。VEGF-R2に対して設計したZFPリプレッサーを、T-Rex（登録商標）（Invitrogen）プラスミドへクローニングする。これおよびVEGF-R1 ZFPリプレッサーを、ECV304細胞中へと同時トランスフェクトする。再度、安定なクローンを選択し、VEGF-R1の欠失およびVEGF-R2の存在についてFACS分析を介して分析する。次いで、細胞をドキシサイクリンで処理し、そして、VEGF-R2の欠失についてFACS分析を介して試験する。VEGF-R1を発現せず、そしてドキシサイクリン処理後にVEGF-R2の欠失を示す細胞株に、HTPスクリーニングを繰り返す。この細胞株を、VEGF-R1-/R2indと再命名する。

10

【0255】

2. VEGF-R1-/R2++を用いて開始し、96ウェルプレートにおいて、1ウェルあたり10,000細胞をプレートする。アッセイの最終容量が100μlであるので、細胞を50μlの培地中にプレートする。

【0256】

3. 化合物ライブラリー由来の試験化合物を、30nMの最終濃度まで（25μl）添加し、そしてプレートを1時間インキュベートする。25μlの培地を1ウェルに対して化合物なしで添加して、+VEGFコントロールとして利用する。別のウェルに対して、1ng/mlの最終濃度まで、TGF（R&D Systems, 100-B-001）（25μl中に0.075ng）を添加して、VEGFインヒビターコントロールとして利用する。

20

【0257】

4. 各ウェルに対して、30ng/mlの最終濃度までVEGF（R&D Systems, 298-vs-005）（25μl中に3ng）を添加する。30分間インキュベートする。

30

【0258】

5. 膜を透過することによって細胞内のリン酸化チロシンについてアッセイする。タンパク質チロシンキナーゼ活性を測定する代替のアッセイもまた、利用可能であり、工程17へ飛ぶ。

【0259】

6. 培地を吸引する。細胞を30分間1%ホルムアルデヒドで固定する。

【0260】

7. PBSで細胞を洗浄する。

【0261】

8. 抗リン酸化チロシン抗体（Pierce, #29926）を5μg/mlの最終濃度になるように添加する。1時間インキュベートする。

40

【0262】

9. 1%BSAおよび0.05%NP-40を含有するPBSで細胞を洗浄する。

【0263】

10. ヤギ抗マウスIgG-HRP結合体（Pierce, #31430）、1:200希釈液を添加する。1時間インキュベートする。

【0264】

11. 上記のように細胞を洗浄する。

【0265】

12. 記載通りにHRP ELISAアッセイ（Pierce, #32052）を実施す

50

る。VEGF - 刺激リン酸チロシン産生を低下させる化合物を同定する。

【0266】

13. 工程2のようにVEGF - R1 - / R2 i n d細胞をプレートすることで2次スクリーニングのための準備をし、同時に複製プレートを調製する。

【0267】

14. 1つのプレートに対して、ドキシサイクリンを1 μ g / mlの最終濃度まで添加する。一晚インキュベートする。

【0268】

15. 両方のプレートに対して、工程3 ~ 11を繰り返す。

【0269】

16. 陽性ヒット (hit) は、ドキシサイクリンで未処理の細胞において減少したVEGF刺激リン酸チロシン産生を示した。理想的な化合物は、ドキシサイクリン処理細胞と同様にふるまい、従ってVEGF - R2誘導経路以外の任意の系では作用しないことを示す。

【0270】

17. 工程5から再開する。培地を吸引する。1%のTriton X - 100を含有する200 μ lのPTK抽出緩衝液 (Promega, V6480) を添加することによって細胞を可溶化し、そして10分間氷上でインキュベートする。

【0271】

18. 任意の残留細胞を分離し、そして数回ピペットで上げ下げすることで、細胞懸濁液を混合する。深いウェルブロックに懸濁液を移し、そして4 で15分間振動させる。

【0272】

19. 懸濁液を4 で100,000 \times gで1時間遠心分離し、そして上澄みを保存する。

【0273】

20. Promega (技術広報TB211) に記載されるようなPTKアッセイプロトコルの工程III. A. 1を続ける。

【0274】

(実施例10: T細胞の活性化を生じないT細胞増殖の刺激因子の同定)
カリウムチャンネルは、Tリンパ球のカルシウムシグナル伝達の調節において重大な役割を果たす。ヒトTリンパ球において発現される2つの際立ったカリウムチャンネルは、Kv1.3 (膜電位の変化に応答して開くチャンネル) およびKCa4 (細胞内のカルシウムレベルにおける上昇によって活性化されるチャンネル) である。Kv1.3が、T細胞増殖の制御においてきわめて重大な役割を果たし、一方KCa4はT細胞活性化において機能することを示している。次いで、T細胞の活性化は、IFN- の放出および免疫応答を導く。この経路に対する注意は、KCa4が公知のミトジェン刺激および抗原性刺激に応答して上方制御されることである、従って、選択的にTリンパ球の増殖を可能にし得るが、T細胞の活性化を生じない化合物を同定することは困難であった。いくつかのKCa4インヒビターは同定されているが、これらのインヒビターは、完全には選択されていない; これらはまた、他のタンパク質 (例えば、T細胞にまた存し得るカルシウム関連活性化Ca²⁺ (CRAC) チャンネル) を阻害し得る。

【0275】

ヒトhKCa4遺伝子のZFPベースのインヒビターを、上記のZFP設計の方法を使用して作製した。その標的配列を、cDNA配列 (Genbank 登録番号AE022797) の塩基対217に位置させる。標的配列は、5' - GGGGAGGGC - 3' (配列番号41) である。認識ヘリックス (-1 ~ +6) のアミノ酸配列 (一文字コード) は以下である: F1 = RSDHLAR (配列番号42)。F2 = RSDNLAR (配列番号43)。F3 = RSDHLSR (配列番号44)。

【0276】

得られる3フィンガーZFP (ZFP3Aと呼ばれる) は、ゲル移動度シフトアッセイに

10

20

30

40

50

よって測定されるように、その標的に対して0.3 nMの解離定数を有する。ZFP3A DNA結合ドメインに対するVP16融合物は、同時トランスフェクトされたレポーター遺伝子を5倍よりも大きく活性化する。

【0277】

hKCa4遺伝子発現のインヒビターに影響するKRAB-ZFP3Aキメラ構築物を、緑蛍光タンパク質(GFP)をコードする発現ベクターと共にヒト赤白血球細胞に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、蛍光顕微鏡を使用して同定した。次いで、トランスフェクトした細胞を、パッチクランプ方法によってhKCa4機能について試験した。イオンチャンネル機能を、勾配伝導度(nS)を決定することによって決定した。トランスフェクトしていないコントロールは、12.5(n=1)の値を有する。空のベクターでトランスフェクトされた細胞は、10.0±2.5(n=4)の値を有する。ZFP3Aでトランスフェクトされた細胞は、1.0±0.1の値を有する。これは、機能のほとんどの総損失を示す。

10

【0278】

ZFP3Aトランスフェクトされた細胞をさらに、Kv1.3発現を活性化するように設計された第2ZFPでトランスフェクトする。アクチベーターをコードする配列を、T-RexTM(Invitrogen)プラスミドにクローニングする。安定なクローンを、FACS分析を使用して選択して、Kv1.3の増加した発現を有するこれらのクローンを同定する。クローンを、ドキシサイクリン(1µg/ml)有りまたは無しで処理した場合、FLIPR(登録商標)I蛍光画像化プレートリーダーシステム(Fluorometric Imaging Plate Reader Systems)(Molecular Dynamics)を使用して、細胞内のカルシウム変動における変化について試験する。ドキシサイクリンの存在下では、細胞内のカルシウム変動において最小の変化があり、一方、ドキシサイクリン未処理細胞は、野生型Jurkatと同様の変動を示す。Kv1.3の増加した発現を有し、そしてドキシサイクリン処理後のKCa4の損失を示す細胞株を、HTPスクリーニングについて繰り返す。これを、Kv1.3⁺/KCa4⁺と再命名する。

20

【0279】

Kv1.3⁺/KCa4⁺細胞を、96ウェルディッシュにおいて10,000細胞/ウェルにて二重でプレートする。ドキシサイクリンを1プレートに1µg/mLの最終濃度まで添加し、そして両方のプレートを一晩インキュベートする。

30

【0280】

化合物ライブラリー由来の試験化合物を、30nMの最終濃度まで添加し、そして両方のプレートを24時間インキュベートする。各プレートについて、コントロールウェルは、10µg/mLのコンカナバリンA(Con A, Amersham Pharmacia)を有して、マイトジェン活性およびT細胞活性化に対する陽性コントロールとなる。第2コントロールウェルは、何も添加されず、バックグランドコントロールとしてなる。

【0281】

収集4時間前、[³H]チミジン(1µCi/ウェル)を各ウェルに添加する。

40

【0282】

プレートを回して、細胞をペレット化する。上清をIFN-ELISA(Amersham Pharmaciaのプロトコールおよび試薬)を使用して収集する。

【0283】

細胞をPBS中に再懸濁して、そしてグラスファイバーフィルター上で収集する。[³H]チミジン組み込みを、シンチレーションカウンターで測定する。

【0284】

マイトジェン性化合物に曝していない細胞は[³H]チミジン摂取およびIFN-分泌についてのベースラインとなる。ConAコントロールは、ドキシサイクリン処理細胞および未処理細胞の両方において増加した[³H]チミジン摂取を示す；さらに、未処置細

50

胞における分泌IFN- γ の増加があるが、ドキシサイクリン処理細胞における増加はない。陽性ヒットは、ドキシサイクリン処理細胞または未処理細胞のいずれかにおいて [3 H]チミジン組み込みの増加を刺激するがIFN- γ 分泌の増加を刺激しない化合物である。

【0285】

(実施例11：ヒトエリスロポエチン(EPO)遺伝子のZFP調節)

この実施例において、ヒトエリスロポエチン(EPO)遺伝子を、発現がZFPによって調節され得る分子標的の例として使用した。従って、誘導性ZFPを含む安定な細胞株を、Zhangら(2000) *J. Biol. Chem.* 275:33850~33860に記載されるように確立した。この細胞株は、VP16活性化ドメインに融合したヒトEPO遺伝子上流の標的部位862ヌクレオチドを結合するように設計したZFP-DNA結合ドメイン(EPOZFP-862)をコードする安定に統合された融合遺伝子を含んでいた。この融合遺伝子の発現は、tet転写制御配列の制御下にあり；従ってドキシサイクリンによって誘導可能であった。

10

【0286】

EPOZFP-862タンパク質に対する標的部位は、GCGGTGGCTC(配列番号36)であった。その認識ヘリックス(-1位と+6位の間)のアミノ酸配列は、F1:QSSDLTR(配列番号:37);F2:RSDALSR(配列番号:38);およびF3:RSDERKR(配列番号:39)であった。EPOZFP-862ジンクフィンガータンパク質をSP-1骨格(この遺伝子をPCRによって組み立てる)に設計し、マルトース結合タンパク質との融合体として精製し、そして上に記載されるように、標的部位に対するその親和性について試験した。

20

【0287】

一過性かつ安定にトランスフェクトしたヒト胚性腎(HEK293)細胞を、Zhangら(2000)(上述)に記載されるように産生した。簡単には、細胞を、10%の胎生子ウシ血清を補充したDulbecco改変イーグル培地中で増殖させた。安定なtet誘導性EPOZFP細胞株を産生するため、

pEPOZFP862 DNA由来のコード領域を、AflIII制限部位およびHindIII制限部位を使用してpcDNA4/TO(Invitrogen)にサブクローニングした。生じたpTO-EPOZFP862構築物を、LipofectAMINE(Life Technologies, Inc.)を使用してT-Rex-293TM(Invitrogen)細胞株にトランスフェクトした。ZeocinTM(Invitrogen)を含む培地における選択の2週間後、安定なクローンを、単離し、そしてZFP発現のドキシサイクリン(Dox)-依存活性化について分析した。

30

【0288】

一過性のトランスフェクションを、LipofectAMINEを使用して実施した。細胞溶解物をトランスフェクションの40時間後に収穫し、そしてルシフェラーゼ活性をデュアルライト(Dual-Light)ルシフェラーゼおよびガラクトシダーゼレポーターアッセイシステム(Tropix)によって測定した。内因性染色体EPO遺伝子活性化をアッセイするために、EPO mRNAのノーザン分析およびTaqman分析を、Zhangら(上記)に詳細に記載されるように実施した。

40

【0289】

図2に示されるように、内因性EPO遺伝子を、EPOZFP862の合成に対応して誘導的に発現した。図2Aは、EPO発現およびtet応答性全長CMVプロモーターの制御下でEPOZFP862遺伝子のコピーを含む安定にトランスフェクトした293細胞に対するDox用量応答曲線を示す。この実験について、順化培地を、Doxの添加(図に示す濃度で)の48時間後に収穫し、そしてEPO ELISAキットによって分析した。図2Bは、示されるDox濃度で処理したEPOZFP862細胞からのタンパク質抽出物の免疫プロットを、抗Flag抗体を使用して示す。抽出物を、導入48時間後の細胞から調製した。図2Cは、EPOZFP862で誘導したEPO mRNAのRNA

50

(ノーザン)プロット分析を示す。EPO mRNAシグナルを、トランスフェクトしていない293細胞およびEPOZFP862cでトランスフェクトした293細胞について(それぞれ、レーン1およびレーン2)、ならびに誘導していないEPOZFP862細胞およびDox誘導したEPOZFP862細胞について(それぞれ、レーン3およびレーン4)示す。EPOプローブ化された膜を、はがし、そしてZFP mRNAならびに負荷コントロールとなるヒトアクチン遺伝子にハイブリダイズするアンチセンスフラグメントを含む³²P標識化リボプローブで再ハイブリダイズさせた。

【0290】

従って、内因性のヒトEPOを、EPO遺伝子に対して標的化されるZFPの一過性の発散、または安定な発現のいずれかに応答して活性化し得る。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、設計されたZFPをコードする核酸分子を構築するプロセスを示す。

【図2A】 図2のパネルA~Cは、テトラサイクリン応答性全長CMVプロモーターの制御下で、ジンクフィンガータンパク質(EPOZFP-862)の合成に対する応答において、安定に形質転換された293細胞中の、内因生EPO遺伝子の誘導性発現を示す。図2Aは、ELISAによって決定された、EPO発現についてのドキシサイクリン(Dox)用量応答性を示す。

【図2B】 図2のパネルA~Cは、テトラサイクリン応答性全長CMVプロモーターの制御下で、ジンクフィンガータンパク質(EPOZFP-862)の合成に対する応答において、安定に形質転換された293細胞中の、内因生EPO遺伝子の誘導性発現を示す。図2Bは、抗FLAG抗体を使用した、示された濃度のドキシサイクリンで処理された細胞におけるEPOZFP-862発現のイムノプロット分析を示す。

20

【図2C】 図2のパネルA~Cは、テトラサイクリン応答性全長CMVプロモーターの制御下で、ジンクフィンガータンパク質(EPOZFP-862)の合成に対する応答において、安定に形質転換された293細胞中の、内因生EPO遺伝子の誘導性発現を示す。図2Cは、EPOZFP-862によって誘導されるEPO mRNAのノーザンプロット分析を示す。レーン1は、トランスフェクトされない細胞を示すコントロールであり;レーン2は、EPOZFP-862で一過性にトランスフェクトした細胞を示し;レーン3およびレーン4は、Doxの非存在(レーン3)および存在(レーン4)において、EPOZFP-862で安定にトランスフェクトした細胞を示す。

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sangamo BioSciences, Inc.
Case, Casey

<120> CELLS FOR DRUG DISCOVERY

<130> 8325-0010.40

<140>

<141>

<160> 45

10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: human VEGF

<400> 1

agcggggagg atcgcggagg cttgg 25

<210> 2

<211> 298

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: human SP-1

<400> 2

ggtaccata cctggcaaga agaagcagca catctgccac atccagggct gtggtaaagt 60
ttacggcaca acctcaaatc tgcgtcgtca cctgcgctgg cacaccggcg agaggccttt 120
catgtgtacc tggteact gtggtaaacg cttcacccgt tcgtcaaac tgcagcgtca 180
caagcgtacc cacaccggtg agaagaaatt tgcttgccg gagtgtccga agcgttcat 240
gcgtagtgcac cacctgtccc gtcacatcaa gaccaccag aataagaagg gtggatcc 298

<210> 3

<211> 99

30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ZFP-VEGF1

<400> 3

Val Pro Ile Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly
1 5 10 15

Cys Gly Lys Val Tyr Gly Thr Thr Ser Asn Leu Arg Arg His Leu Arg
20 25 30

Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly
 35 40 45

Lys Arg Phe Thr Arg Ser Ser Asn Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His
 50 55 60

Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met
 65 70 75 80

Arg Ser Asp His Leu Ser Arg His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys
 85 90 95

Gly Gly Ser

10

<210> 4
 <211> 298
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: ZFP-VEGF3a

<400> 4
 ggtaccata cctggcaaga agaagcagca catctgccac atccagggct gtggtaaagt 60
 ttacggccag tcctccgacc tgcagcgtca cctgcgctgg cacaccggcg agaggccttt 120
 catgtgtacc tggctcctact gtggtaaacg cttcacccgt tcgtcaaacc tacagaggca 180
 caagcgtaca cacaccggcg agaagaaatt tgcttgcccg gagtgtccga agcgcttcat 240
 gcgaagtgc gagctgtcac gacatatcaa gaccaccag aacaagaagg gtggatcc 298

20

<210> 5
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: ZFP-VEGF3a

<400> 5
 Val Pro Ile Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly
 1 5 10 15

Cys Gly Lys Val Tyr Gly Gln Ser Ser Asp Leu Gln Arg His Leu Arg
 20 25 30

Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly
 35 40 45

Lys Arg Phe Thr Arg Ser Ser Asn Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His
 50 55 60

Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met
 65 70 75 80

Arg Ser Asp Glu Leu Ser Arg His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys
 85 90 95

Gly Gly Ser

30

<210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VEGF-1 top

 <400> 6
 catgcatagc ggggaggatc gccatcgat 29

 <210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VEGF-1 bottom

 <400> 7
 atcgatggcg atcctccccg ctatgcatg 29

 <210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VEGF-3 top 20

 <400> 8
 catgcatatc gcggaggctt ggcatcgat 29

 <210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VEGF-3 bottom

 <400> 9
 atcgatgcca agcctccgag atatgcatg 29

 <210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer SPE7

 <400> 10
 gagcagaatt cggcaagaag aagcagcac 29

 <210> 11

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 SPEamp12

<400> 11
 gtggtctaga cagctcgtca cttcgc 26

<210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 SPEamp13

<400> 12
 ggagccaagg ctgtggtaaa gtttacgg 28

<210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 SPEamp11 20

<400> 13
 ggagaagctt ggatcctcat tatccc 26

<210> 14
 <211> 83
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: linker Xba-Sty

<400> 14
 tctagacaca tcaaaaccca ccagaacaag aaagacggcg gtggcagcgg caaaaagaaa 60
 cagcacatat gtcacatcca agg 83 30

<210> 15
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer GB19

<400> 15
 gccatgccgg tacccatacc tggcaagaag aagcagcac 39

<210> 16

<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer GB10

<400> 16
cagatcggat ccacccttct tattctggtg ggt 33

<210> 17
<211> 589
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ZFP-VEGF 3a/1

<400> 17
ggtaccata cctggcaaga agaagcagca catctgccac atccagggct gtggtaaagt 60
ttacggccag tcctccgacc tgcagcgtca cctgcgctgg cacaccggcg agaggccttt 120
catgtgtacc tggctctact gtggtaaacg cttcacacgt tcgtcaaacc tacagaggca 180
caagcgtaca cacacaggtg agaagaaatt tgcttgcccg gagtgtccga agcgccttcat 240
gcgaagtgc gagctgtcta gacacatcaa aaccaccag aacaagaaag acggcgggtgg 300
cagcggcaaa aagaacacgc acatatgtca catccaaggc tgtggtaaag tttacggcac 360
aacctcaaat ctgctgctgc acctgctgctg gcacaccggc gagaggcctt tcatgtgtac 420
ctggtcctac tgtggtaaac gcttcaccog ttcgtcaaac ctgcagcgtc acaagcgtac 480
ccacaccggt gagaagaaat ttgcttgccc ggagtgtccg aagcgttca tgcgtagtga 540
ccacctgtcc cgtcacatca agaccaccca gaataagaag ggtggatcc 589

20

<210> 18
<211> 196
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ZFP-VEGF 3a/1

<400> 18
Val Pro Ile Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly
1 5 10 15
Cys Gly Lys Val Tyr Gly Gln Ser Ser Asp Leu Gln Arg His Leu Arg
20 25 30
Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly
35 40 45
Lys Arg Phe Thr Arg Ser Ser Asn Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His
50 55 60
Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met
65 70 75 80
Arg Ser Asp Glu Leu Ser Arg His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys
85 90 95
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln
100 105 110

30

Gly Cys Gly Lys Val Tyr Gly Thr Thr Ser Asn Leu Arg Arg His Leu
 115 120 125

Arg Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys
 130 135 140

Gly Lys Arg Phe Thr Arg Ser Ser Asn Leu Gln Arg His Lys Arg Thr
 145 150 155 160

His Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe
 165 170 175

Met Arg Ser Asp His Leu Ser Arg His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys
 180 185 190

Lys Gly Gly Ser
 195

10

<210> 19
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer JVF9

<400> 19
 agcgagcggg gaggatcgcg gaggcttggg gcagccgggt ag 42

20

<210> 20
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer JVF10

<400> 20
 cgctctaccc ggctgcccc aacctccgcg atcctccccg ct 42

<210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer JVF24

<400> 21
 cgcggatccg cccccccgac cgatg 25

<210> 22
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer JVF25

<400> 22
 ccgcaagctt acttgtcatt gtcgtccttg tagtcgctgc cccaccgta ctctcaatt 60
 cc 62

<210> 23
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: SV40 NLS

<400> 23
 gaattcgcta gcgccaccat ggcccccaag aagaagagga aggtgggaat ccatggggta 60
 c 61

10

<210> 24
 <211> 187
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: KRAB-FLAG

<400> 24
 ggtaccggg gatcccgac actgggtgacc ttcaaggatg tatttggga cttcaccagg 60
 gaggagtga agctgctgga cactgctcag cagatcgtgt acagaaatgt gatgctggag 120
 aactataaga acctggtttc cttgggcagc gactacaagg acgacgatga caagtaagct 180
 tctcgag 187

20

<210> 25
 <211> 277
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VP16 FLAG

<400> 25
 ggatccgccc ccccgaccga tgtcagcctg ggggacgagc tccacttaga cggcgaggac 60
 gtggcgatgg cgcattgccga cgcgctagac gatttcgac tggacatgtt gggggacggg 120
 gattccccgg ggccgggatt tccccccac gactccgcc cctacggcgc tctggatatg 180
 gccgacttgc agtttgagca gatgtttacc gatgcccttg gaattgacga gtacgggtggg 240
 ggcagcgact acaaggacga cgatgacaag taagctt 277

30

<210> 26
 <211> 118
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: plasmid
 NF-control

<400> 26
 gaattcgcta gcgccaccat ggcccccaag aagaagagga aggtgggaat ccatggggta 60
 cccggggatg gatccggcag cgactacaag gacgacgatg acaagtaagc ttctcgag 118

<210> 27

<211> 204
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: plasmid
pGL3-control

<400> 27
acgcgtaagc ttgctagcga gcggggagga tcgcgaggc ttggggcagc cgggtagagc 60
gagcggggag gatcgcgag gcttggggca gccgggtaga gcgagcgggg aggatcgagg 120
aggccttggg cagccgggta gagcgagcgg ggaggatcgc ggaggcttgg ggcagcgggg 180
tagagcgctc agaagcttag atct 204

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 28
Asp Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 29
Thr Gly Glu Lys Pro
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

30

<400> 30
Leu Arg Gln Lys Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 31
Gly Gly Arg Arg
1

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 32
Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
1 5

10

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 33
Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

20

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 34
Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10

30

<210> 35
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 35
Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10 15

<210> 36
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: target
sequence

<400> 36
gcgggtggctc

10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 37
Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 38
Arg Ser Asp Ala Leu Ser Arg
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 39
Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SV40 large T antigen from nuclear localization sequence

<400> 40

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: target sequence

10

<400> 41

ggggaggggc

9

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: recognition helix

<400> 42

Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1 5

20

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: recognition helix

<400> 43

Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1 5

30

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: recognition helix

<400> 44

Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

40

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: linker

<400> 45

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

【 図 1 】

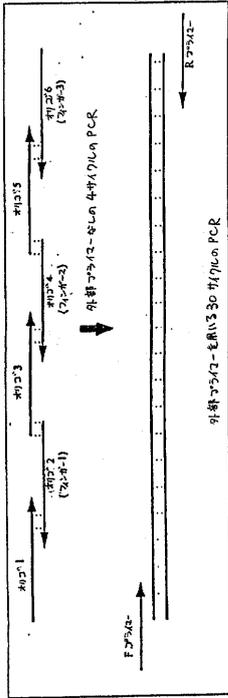


FIG. 1

5' EPOZF-862c 遺伝子 3' 領域を PCR 増幅した

【 図 2 A 】

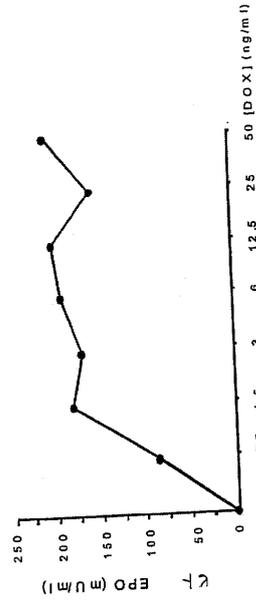


FIG. 2A

【 図 2 B 】



FIG. 2B

【 図 2 C 】

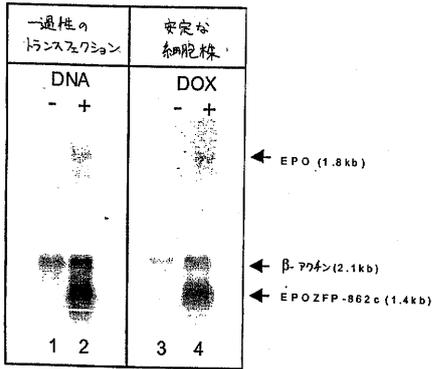


FIG. 2C

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/58 (2006.01)		G 0 1 N 33/58	Z
G 0 1 N 33/68 (2006.01)		G 0 1 N 33/68	

合議体

審判長 郡山 順

審判官 杉江 渉

審判官 秋月 美紀子

- (56)参考文献 国際公開第99/47656(WO,A1)
 国際公開第96/40939(WO,A1)
 特表2003-509078(JP,A)
 特表2002-527097(JP,A)
 特開2001-231583(JP,A)
 BEERLI,RR et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,
 vol.95, pp.14628-14633 (1998)
 KIM,JS et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., vol
 .94, pp.3616-3620 (1997)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

G01N33/00-33/98

BIOSIS

MEDLINE

WPIDS